

泌乳による着床遅延が乳飲みマウスの生時体重 および成長に及ぼす影響について

辻井 弘忠・吉田 元一

信州大学農学部 家畜育種・繁殖学研究室

緒 論

マウスおよびラットにおいて、後分娩発情時の交配により、泌乳と妊娠が同時進行すると、着床遅延が起こることが知られている^{1,2)}。しかし、吸引刺激すなわち乳飲みマウスが2匹以下の場合は、泌乳による着床遅延は誘起されず、3匹以上になると着床遅延が誘起され³⁾、また、乳飲みマウスの数に比例して、つまり吸乳刺激の強さに関連して着床期間が長くなる¹⁾、など知られている。この着床遅延期間中、胚盤胞は、発生分化⁴⁾ならびに代謝が正常妊娠時の胚盤胞と比べ非常に低く^{5,6)}、休眠状態となっている。着床遅延の原因としては、吸乳刺激による下垂体からのプロラクチン放出が1日2回ピークをもつ周期的分泌パターンを示し、プロジェステロンの分泌を促進するために、プロジェステロンとエストロジェンの比率が適当でないためと考えられている¹⁾。また吸乳刺激が弱まると、着床遅延は終了して、着床が誘起される¹⁾。

マウスおよびラットは、一般に交配してから、4～6日目の夜までには着床をする。この着床を人為的に遅延させる方法として、妊娠初期に、卵巣の除去を行なうか、また、卵巣除去後、プロジェステロンを投与すると、着床遅延が誘起され、数週間続く。さらに、エストロジェンを投与すると着床遅延が終了して、着床が誘起される⁷⁾。

人為的に作出された着床遅延ラットから生まれた胎児は、正常妊娠のものよりも重いといわれ、これら実験的に作出された着床遅延ラットの胎児等の重量増加は、遅延に費やされた時間ではなく、ホルモン処理によるホルモン環境によるものである⁸⁾と報告されているが、マウスおよびラットにおいて、泌乳による着床遅延から生れた子の生時体重ならびにその後の成長に関する報告はない。

そこで、本実験は、泌乳による着床遅延を誘起させたマウスにおける、乳飲みマウスの生時体重から離乳時体重までを測定し、着床遅延が子マウスの成長に及ぼす影響について比較検討を行った。

材料及び方法

当研究室で系統維持しているICR系処女マウス、6週齢、(体重22～25g)を用いた。

飼育条件は、室温 $20\pm 3^{\circ}\text{C}$ 、午前6時点燈12LD、エサは市販のマウス固形飼料(クレア K.K. CE-2)を使用し、エサおよび水は自由摂取とした。

1983年4月30日受付

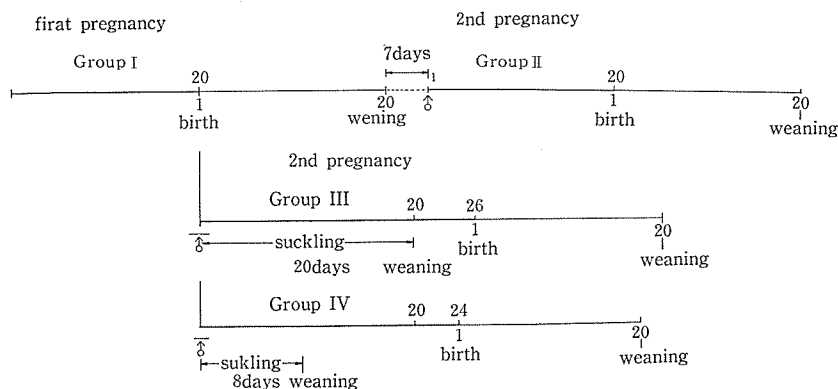


Fig. 1. Experimental Schedule.

実験群は、4群で、実験スケジュールを図1に示した。

I群：正常妊娠1産目

II群：正常妊娠2産目で、1産目の乳飲みマウスが離乳してから、1週間以内に2回目の交配を行った。2産目における子の成長について調べた。

III群：20日同時泌乳したもので、後分娩発情時に交配を行ない、1産目の乳飲みマウスは、20日間授乳し泌乳と妊娠を同時進行させ、2産目の子の成長について調べた。

IV群：8日同時泌乳したもので、III群と同様に後分娩発情時に交配を行ない、1産目の乳飲みマウスを8日目で強制的除去し、2産目の子の成長について調べた。

交配は発情前期を示した雌マウスを交配可能な雄と一晚同居させ、翌朝、膣栓の存在するものを調べ、その日を妊娠第1日目とした。分娩のチェックは、分娩予定日の朝夕2度調べ、分娩日を記録した。分娩時に、産子数、生時体重、雌雄数を調べた後、乳飲みマウスを雌3雄3の計6匹になるように無作為に取り出し調整した。以後、離乳までの20日間、毎日正午に子マウスの各個体の体重を測定した。後分娩発情時の交配は、分娩予定日の1日前から分娩2日後までの間、交配可能な雄と同居させ、交配を確認後、雄を除いて、母マウスと乳飲みマウスのみにした。交配から次の分娩日までを妊娠期間として算出した。巢材は、木材チップを使い、分娩日2～3日前に1度取り換え、以後離乳日までは、そのままとした。

なお、II群の着床遅延時の胚は、どのような状態で子宮中に存在しているか、また、いつ頃着床するかを調べてみた。同時泌乳中、妊娠7～10日目のマウス、各3例づつを、P.M. 2:00に、ポンタミン・スカイ・ブルーを静脈注射して、着床の有無を調べた。反応がなかったものは、右の子宮を生理食塩水で灌流して個数を数えた。左は、ブアンで固定し、パラフィンで包埋し、ミクロトームで7 μ の連続切片を作り、ヘマトキシリン、エオシンで染色後、検鏡し、子宮内の胚ならびに子宮上皮内膜を観察した。

統計処理は、t検定で行ない、危険率5%を有意水準とした。

結 果

I 群およびII群の平均妊娠期間は、いずれも20日間、III群が26.2日間、IV群が24.1日間であった(表1)。IIIおよびIV群は、IおよびII群と比較して、妊娠期間が有意に長く、着床遅延を起こしたことが明らかであった。後分娩発情時における交配は、III群およびIV群において、分娩時の昼には膣栓がなく、夕方に膣栓を見つけて交配を確認した。後分娩発情の交配率は、20/30で、66.7%であった。

Table 1. Reproductive performances of the dams. (Mean±S.E)

Group	I	II	III	IV
Number delivered	30	10	10	10
Gestation period (days)	20.0	20.0	26.2*	24.1*
Litter size	12.3± 1.7	12.6± 2.5	13.9± 4.7	14.7± 3.0
Birth weight (g)	1.58±0.13	1.56±0.17	1.83±0.29*	1.75±0.07*

* $P<0.05$ by student t test when comparison were made Group I or II.

I～IV群における産子数は、平均12.3匹から14.7匹までで、統計的に有意差はみられなかった。体重について本実験では、子を6匹に調整後の体重をもって示した。I群の生時体重の平均値は、I群が1.58g、II群は1.56gで、着床遅延誘起したIIIおよびIV群の1産目を比較しても統計的な有意差はみられなかった。一方、着床遅延を起こした群の生時体重は、III群で1.83g、IV群で1.75gで、I群およびII群と比べて有意に重かった。また、妊娠期間と生時体重の関係をみると、相関係数 $r=0.84$ で、統計的に有意、つまり妊娠期間が長くなると生時体重が多くなる傾向がみられた。生時の性比において、I～IV群とも有意差がみられなかった。

1腹の産子数と生時体重の関係について、IからIV群の全部をあわせた場合の産子数と生時体重との相関係数は、 $r=-0.636$ で統計的に有意であった。つまり、産子数が大きくなると生時体重が小さくなる傾向がみられた。

各群の子の成長を知るために、5, 10, 15, 20日齢における各群の各子の体重から、各生時体重を引いた値を比較し、結果を表2に示した。増体重の大きい順はIII, IV, I, II群の順で着床遅延をしたものの増体重が大きかった。すなわち、着床遅延を起こしたIII群の増体重の平均は5日目:2.3g, 10日目:6.1g, 15日目:8.8g, 20日目:11.8gと正常妊娠のI群およびII群の増体重の平均より重く両者の各増体重の間において統計的に有意な差があり、着床遅延の子の体重の増加が大きかった。また、着床遅延のIII群とIV群を比較すると、IV群の増体重の平均は、5日目:1.8g, 10日目:5.1g, 15日目:7.5g, 20日目:9.6gと、両者の各日齢の増体重において有意差があり、III群の増体重が大きかった。その他、I群とII群の増体重およびI群とIII群の増体重の間には有意差がみられなかった。

I～IV群の成長曲線を図2に示した。各群とも同じような成長曲線を描き、生まれて17日

Table 2. Growth record of the offsprings. (Mean \pm S.E.)

Group	I	II	III	IV
1 st day (birth)	1.6 \pm 0.13	1.6 \pm 0.17	1.8 \pm 0.29*	1.8 \pm 0.07*
5 th day	3.3 \pm 0.30 (1.7 \pm 0.19) ^{a*}	3.3 \pm 0.59 (1.7 \pm 0.57)	4.4 \pm 0.35* (2.3 \pm 0.17)*	3.5 \pm 0.28 (1.8 \pm 0.31)
10 th day	6.5 \pm 0.51 (4.9 \pm 0.42)	6.2 \pm 0.66 (4.6 \pm 0.77)	7.9 \pm 0.25* (6.1 \pm 0.29)*	6.9 \pm 0.38 (5.1 \pm 0.38)
15 th day	9.0 \pm 0.48 (7.5 \pm 0.33)	8.80 \pm 1.04 (7.24 \pm 0.33)	10.7 \pm 0.50* (8.8 \pm 0.74)*	9.3 \pm 0.11 (7.5 \pm 0.26)
20 th day (weaning)	10.6 \pm 0.69 (9.1 \pm 0.56)*	10.41 \pm 1.44 (8.85 \pm 1.48)	13.6 \pm 0.66* (11.8 \pm 0.77)*	11.3 \pm 0.58 (9.6 \pm 0.61)

^a The parentheses showed average body weight gains (mean body weight minus birth weight).

* $P < 0.05$ by student t test when comparison were made between Group I or II.

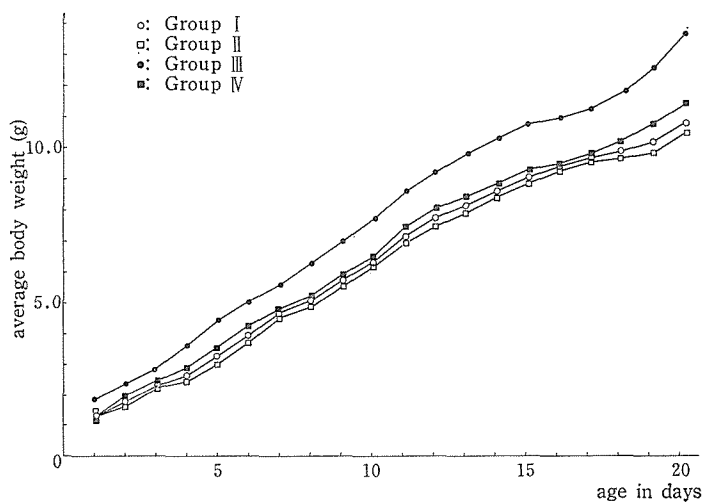


Fig.2. Growth curve of the progeny in suckling mice.
normal pregnancy (open circle) and delayed implantation (solid circle).

Table 3. Time of implantation during delayed implantation in suckling mice.

	Pregnancy period (days)			
	7	8	9	10
No. of mice	3	3	3	3
Pontamine sky blue reaction	—	—	—	+
No. of recovery of blastocysts/animal	10	8	6	0
No. of implantation	0	0	0	12

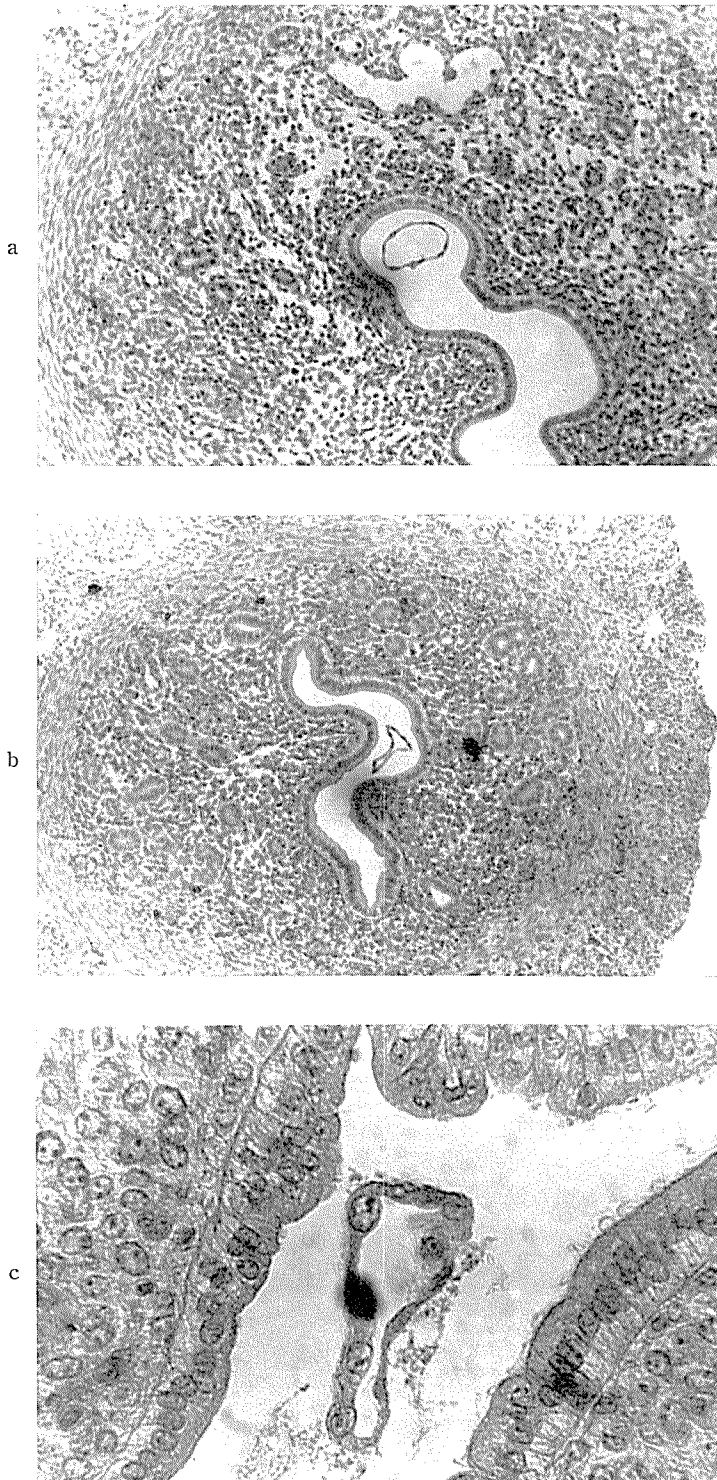


Fig. 3. Consecutive cross-sections of a blastocyst in utero obtained from delayed implantation in suckling mice.

- a. 7 days p.c.
- b. 9 days p.c.
- c. 10 days p.c. Trophoblastic invasion of the uterine epithelium and decidualization have already begun. $\times 200$.

目から体重増加が著しかった。

Ⅲ群の着床遅延誘起マウスにおいて、着床遅延した胚盤胞がいつ着床するかについて検討し、表3に示した。その結果、着床部位の目安となるポンタミン・スカイ・ブルー反応において、妊娠7、8、9日目の子宮には反応はみられず、また、子宮を灌流したところ着床遅延を起こした胚盤胞が、それぞれ10個、8個、6個採卵出来た。妊娠10日目の子宮にポンタミン・スカイ・ブルー反応が見られ、子宮に着床部位数が左右子宮角に計12個存在した。また、妊娠7～9日の子宮の組織切片を観察した。

7、8日目の胚は、完全に子宮上皮から遊離し、透明帯は見られなかった。胚の形態は、内細胞塊が大きくなり、栄養膜細胞も肥大していた。また、子宮腔も小さくなり、子宮上皮が厚さを増し、脱落膜細胞形成が起っているのが観察された(図3—a)。

9日目の胚は、7、8日目とそれほど形態的に著しい変化がないが、脱落膜細胞がよく発達していた。また、子宮腔がやや小さくなっていることが観察された(図3—b)。

10日目の胚の一部は、子宮上皮の一部と接着を開始しており、胚の一部で合体しているのが観察された。子宮上皮の厚さが増し、脱落膜も子宮のまわりに密着しているのが観察された(図3—c)。

考 察

妊娠期間について、正常妊娠のⅠ、Ⅱ群の平均が20日間であった。一方、20日間泌乳して着床遅延を誘起したⅢ群は26.2日間、8日間泌乳して着床遅延を誘起したⅣ群は24.1日間であった。Ⅲ群とⅣ群は、Ⅰ群とⅡ群に比較して、有意に妊娠期間が長く、着床遅延が誘起された。着床遅延した期間は、正常妊娠期間からの差からみると、Ⅲ群が6.2日間、Ⅳ群が4.2日間であった。Ⅲ群において、乳飲みマウス6匹における着床遅延時中の着床時期をポンタミン・スカイ・ブルー反応で見た結果、着床が6日間遅れていることと一致した。

Zeilmaker⁹⁾は、10匹の乳飲みマウスを泌乳の3日の13時まで付けて哺乳させても着床遅延は起きないが、泌乳の4日の10時以降まで哺乳させたり、8日まで哺乳させると1日だけ着床が遅延することを報告している。また Maneckjee ら¹⁰⁾は、ラットで8匹哺乳を泌乳の4日の10時まで行ない、乳飲みラットを2匹に減らすと正常に着床するが、逆に2匹の乳飲みラットに泌乳4日の10時から8匹の乳飲みラットにすると着床遅延が起こる。しかし、後分娩発情で交配してから5、6日目に8匹哺乳させても着床遅延は誘起されないことを明らかにしている。これらのことからマウスおよびラットにおける泌乳中の着床遅延は、少なくとも3匹以上による最低5日間の吸乳刺激を継続しないと起こらないとされている。本実験において、乳飲みマウス6匹を8日間のみ泌乳させたⅣ群でも、着床遅延が誘起され、また、20日間泌乳させたⅢ群において6.4日間着床が遅延した。Daniel¹¹⁾、Kirkham ら¹²⁾は、泌乳による着床遅延は3日もしくはそれ以上と報告している。また、Bindon¹³⁾は、3～9日と報告している。本実験の結果は Bindon の成績に近い値を示した。

後分娩発情における交配は、マウス・ラットでは、分娩終了後2～4時間内に排卵に必要なホルモンの放出が始まり、分娩後18～38時間内に発情する¹⁴⁾と言われている。本実験の交配は、分娩日の昼と夕方、腔栓の確認によったが、交配率は20/30匹で66.7%であった。こ

の交配率については、25から100%までの報告例^{2,3)}があるが、70%弱が最も高い交配率と言われており、本実験の結果は、比較的高い交配率と考えられた。

産子数について、Ⅰ～Ⅳ群の各群についても、平均12.3～14.7匹で、統計的な有意差がみられなかった。しかし、着床遅延を起こしたⅢ群とⅣ群は、産子数の幅が、7～23匹と大きかった。泌乳による着床遅延における産子数について、Bloch²⁾は、NMRI系マウスで1～18匹平均7.75匹、B系で5～18匹平均12匹であったと報告しており、本実験のⅢおよびⅣ群の産子数の方がやや多かった。また、Shapiraら¹⁵⁾は、制限給与の強さによって、着床遅延の長さおよび産子数に違いを生じると報告している。本実験は、泌乳マウスを6匹に制限したこと、また、餌、水が自由摂取であった為、栄養的なストレスはなかったものと考えした。

生時体重について、着床遅延を起こしたⅢ群とⅣ群の平均体重は、正常妊娠のⅠ群およびⅡ群よりも大きかった。このことは、Hooverman⁸⁾のラットの人為的な着床遅延、すなわち妊娠初期に卵巣除去後プロジェステロンを投与して着床遅延を誘起し、その後エストロゲン投与によって着床を起こさせて得た胎児および胎盤重量は、正常妊娠の胎児および胎盤重量より重いと報告していることと同じ結果を得た。Hooverman⁸⁾は、着床遅延中に受けたホルモン特にプロジェステロンに起因していると考えしている。

Noyesら¹⁶⁾は、生時体重を左右する要因として、①精子および卵子の遺伝的支配、②遺伝的に支配されている母親の環境、③母親の栄養および健康、④妊娠期間の長さ、⑤同腹数、⑥胎児の性、⑦子宮内の胎児の位置、⑧同腹の胎児同志の競争などをあげている。本実験の着床遅延による生時体重の増加の要因として考えられるのは、④妊娠期間の長さ、⑤同腹数が強い影響力を有しているものと考えられる。

一般的に、一腹あたりの着床数が少ないと胎児重量が大きい¹⁷⁾と言われている。着床遅延時の産子数についてLoisら¹⁸⁾の報告を例にすると、正常妊娠ラットの着床数9.3～11.4平均10.3に比べ、人為的な着床遅延時の着床数は5.1～9.2平均7.3と、人為的な着床遅延時の着床数は、正常妊娠より少ない傾向にある。このことから、人為的な着床遅延時の胎児重量ならびに胎盤重量の増加は、単に胎児数の減少による可能性も考えられる。本実験による泌乳による着床遅延における産子数は、正常妊娠のものと変らなかったことから、産子数の減少によって生時体重が増加したのではなく着床遅延によって生じたものと考えされた。

着床遅延中の卵子は、正常の着床前の卵子に比べて代謝は低く^{5,6)}、卵分割ならびに卵子の大きさなどには著しい変化はなく⁴⁾、いわゆる冬眠状態であるといわれている。この間の着床遅延中のマウスの卵子の細胞数は、着床前の正常胚盤胞で64、着床遅延の妊娠8日目で60、妊娠10日目で88と、徐々であるが、卵子の細胞数の増加¹⁹⁾、すなわち正常着床卵よりも過熟がなされている。これは、着床遅延中に受けたホルモン、特にプロジェステロンに起因している。

Alloiteau and Acker²⁰⁾は、正常妊娠ラットに妊娠13から20日まで、日量4mgのプロジェステロン投与したところ、胎児ならびに胎盤重量に影響を与えなかったが、日量40mgにしてやると、それらの重量が減少したことを報告している。また、Bartholomeuszら²¹⁾も、同様に妊娠の各時期にプロジェステロンを投与しても生時体重に影響がないことを報告している。

Noyess ら¹⁶⁾は、ラット卵子の移植において、偽妊娠4日目の子宮に、妊娠4日目の卵子と妊娠5日目の卵子の移植を行ったところ、5日目の卵子の方が胎児重量が大きかったことを報告している。このことから、着床前の卵子が内因性ホルモンのプロジェステロンの影響によって、正常妊娠の場合より多く着床前に卵子の細胞分裂をきたした影響、すなわち卵子の過熟が、生時体重の差ならびにその後の成長に影響を及ぼしたものと考えられた。

また、生時体重と脳重量とは、正の相関があること、また、生時体重ならびに脳重量の重い程、初期行動の発達が良い²²⁾という報告がある。本実験で得られた、着床遅延マウスの生時体重の増加と、その後の知能の発達の関係について、今後検討する必要があると思われる。

摘 要

I C R系処女マウスを用いて、泌乳により着床遅延を誘起させて、6匹(♀:♂=3:3)の乳飲みマウスの生時体重から、離乳時までの体重を測定し、その間の成長を調べた。

I 群: 正常妊娠の1産目

II 群: 正常妊娠の2産目

III 群: 20日間泌乳させて着床遅延を誘起させたもの

IV 群: 8日間泌乳させて着床遅延を誘起させたもの

妊娠期間は、I 群およびII 群が20日間、III 群が26.2日間、IV 群が24.1日間であり、III およびIV 群において、着床遅延が誘起された。なおIII 群における着床遅延期間はポンタミンスカイブルー反応ならびに組織観察から約6日間であった。

また、着床遅延によって妊娠期間が長くなると、生時体重が有意に大きくなった。さらにその後の成長において、生時体重は離乳時体重まで大きく影響を及ぼすことが判明した。

引 用 文 献

- 1) Mantalenakis, S. J. and M. M. Ketchel, J. Reprod. Fert., 12: 391-394. 1966.
- 2) Bloch, S., J. Reprod. Fert., 26: 279-280. 1971.
- 3) Bloch, S., Bull. Schweiz. Akad. Med. Wiss., 4: 309. 1948.
- 4) Tsujii, H., Y. Murakami and M. Yoshida, J. Fac. Agr. Shinshu Univ., 18: 133-144. 1981.
- 5) Tsujii, H., S. Sugawara and S. Takeuchi, Jap. J. Zootech. Sci., 43: 91-96. 1972.
- 6) Weitlauf, H. M., J. Reprod. Fert., 39: 213-224. 1974.
- 7) Mayer, G., Delayed Implantation p.213 Enders, A.C. ed., Chicago University Press., 1963.
- 8) Hooverman, L. L., R. Meyer and R.C. Wolf, Endocrinology, 86: 131-138. 1970.
- 9) Zeilmaker, G. H., Acta Endocrinology, 46: 483-492. 1964.
- 10) Maneckjee, R. and N. R. Mondgal, J. Reprod. Fert., 43: 33-40. 1975.
- 11) Daniel, J. F., J. Exp. Zool., 33: 942. 1910.
- 12) Kirkham, W. B., Anat. Record., 11: 31. 1916.

- 13) Bindon, B. M., J. Endocr., 44 : 357-362. 1969.
- 14) Bingel, A. S. and N. B. Schwartz, J. Reprod. Fert., 19 : 231-237. 1969.
- 15) Shapira, N., J. Kali, S. Amir and H. Schindler, J. Reprod. Fert., 36 : 295-300. 1974.
- 16) Noyes, R. W., L. L. Doyle and D. L. Bentley, J. Reprod. Fert., 2 : 238-245. 1961.
- 17) Perry, J. S. and J. G. Rowell, J. Reprod. Fert., 19 : 527-534. 1969.
- 18) Lois, L. D., Roland, K. M., and C. W. Richard, Endocrinology., 86 : 131-138. 1970.
- 19) Sherman M. I. and P. W. Barlow, J. Reprod. Fert., 29 : 123-126. 1972.
- 20) Alloiteau, J. J. and G. Acker, C. R. Hebd, Seances Acad. Sci., 254 : 3901-3903. 1962.
- 21) Bartholomeusz, R. K. and N. W. Bruce, Biol. Reprod., 15 : 84-89. 1976.
- 22) Castellano, C. and A. Oliverio, Brain Res., 101 : 317-325. 1976.

Effects of the Physiological Delayed Implantation on the Birth Weight and the Growth in Mice.

By Hirotada TSUJII and Motokazu YOSHIDA

Laboratory of Animal Breeding and Reproduction,
Fac. Agric., Shinshu Univ.

Summary

This experiment were designed to determine if the greater birth weight and growth could be obtained by the delayed implantation in the suckling mice.

Mice used were ICR mature virgin females at 6 weeks old. They were maintained on our laboratory, fed and water *ad libitum*, and kept in an environment maintained at $20\pm 1^{\circ}\text{C}$ with 12 hr. of artificial light daily. Mouse mated at the post-partum estrus, each of them nursing 6 young, were allocated to two groups, 20 days p.c. (Group III) and 8 days p.c. (Group IV) in the term of the suckling period. The lengths of gestation in delayed implantation groups were longer than that in normal groups. The birth weights were 1.83 and 1.56g in delayed mice and normal mice, and the weaning weight were 13.6 and 10.4g in delayed mice and normal mice. These results showed the birth weight and the growth in delayed implantation groups were greater than those in normal implantation groups.