

マウスの発情促進効果におよぼす 包皮腺の影響について

辻 井 弘 忠

信州大学農学部 家畜育種・繁殖学研究室

緒 論

マウスのフェロモンは、数多く存在する。そのマウスのフェロモンを、リリーサ・フェロモンとプライマ・フェロモンとに分けると、前者のリリーサ・フェロモンは、雄の包皮腺分泌が、他の雄の攻撃行動を促進することや、雌を誘引することなど¹⁾が知られている。後者のプライマ・フェロモンは、雄からのフェロンが雌に及ぼすもの：Whitten 効果（発情促進効果）²⁾、Vandenbergh 効果（性成熟促進効果）³⁾、Bruce 効果（妊娠阻止効果）⁴⁾、排卵誘起効果（Zarrow）⁵⁾、雌の同性に及ぼすもの：Lee-Boot 効果（発情抑制効果）⁶⁾などが知られている。これらのフェロモンは雄の尿中の蛋白質から成り、雄からのフェロモンが、雌マウスの内分泌系に影響を及ぼし特異な生理現象を起こすものである⁸⁾。この雄のフェロモンはアンドロジェンに依存する物質^{7,8)}で、各々の効果を及ぼすフェロモンは同一物質であるが、受容体の雌の状態、つまり幼若マウスには性成熟効果、成熟マウスには発情および排卵に効果を生じるというように反応性が異なるであろうと示唆されている⁸⁾が、そのフェロモン物質の完全抽出、単離、構造決定はなされず、まだ同一物質であるかは不明である。また雄由来のフェロモンの分泌器官として、包皮腺、腎臓、肝臓が示唆されている⁸⁾。特に包皮腺の介在については、COLBY & VANDENBERGH⁹⁾が、Vandenbergh 効果で、HOPPE¹⁰⁾およびMARCHLEWSKA¹¹⁾が Bruce 効果で、BRONSON & WHITTEN⁷⁾およびMCKINNEY¹²⁾が、Whitten 効果でそれぞれ否定している。しかし、CHIPMAN & ALBRECHT¹³⁾は、包皮腺分泌液が正常な雄の尿と同等の Whitten 効果をもち、包皮腺除去雄の尿は、正常な雄の尿または包皮腺分泌液と比べて Whitten 効果が減少したことを報告している。これらのことから、Whitten 効果をもたらすフェロモンが、包皮腺を介在しているかどうか再検討する必要がある。

そこで本実験は、Whitten 効果に及ぼす雄のフェロモンが包皮腺に由来するかどうか、また Whitten 効果において雄との交配の経験の有無による効果の違いがあるかどうかを未經産と経産を用いて調べ、さらに、暴露実験に供した動物の包皮腺、陰核腺ならびに腎臓のアンドロジェン投与による組織学的変化について観察を行なった。

材料および方法

当研究室で育成繁殖している I C R 系成熟マウス (7 週齢) を使用した。飼育条件は、温度 $20 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 、照明は 12 L. D (6 時点燈)、餌は市販の固形飼料 (日本クレア K. K. C A-2) を用い、餌・水は自由摂取、ケージの床敷として木材チップを使用した。実験に供試するまでは、分娩時 1 腹 6 匹に調節し、20 日齢で離乳、その後雌雄に分けて 1 ケージ当り 5 ~ 7 匹で飼育した。

(1) 尿暴露

以下に示す 6 群で行なった。

1. 無暴露
2. 正常雄：繁殖能力を有する雄
3. 去勢雄：繁殖能力を有する雄の精巣を除去
4. 包皮腺除去雄：繁殖能力を有する雄の包皮腺を除去
5. 卵巣除去+アンドロジェン投与雌：卵巣除去後テストステロン $195 \mu\text{g}/0.1\text{ml}^{(14,15)}$ を暴露の開始 3 前日より 11 日間連続投与
6. 陰核腺, 卵巣除去+アンドロジェン投与雌：陰核腺, 卵巣除去後, 5 群と同様テストステロン投与

なお、摘出手術を行なった動物は、暴露終了後に剖検を行ない、手術が完全かどうかの確認を行なった。

被暴露動物は、未経産マウス 300 匹を使用し、6 群に組分けした。実験に供したケージは $17 \times 30 \times 10\text{cm}$ のアルミ製で、この被暴露ケージの上に暴露動物を単飼した $10 \times 16 \times 10\text{cm}$ のステンレス製金網ケージを重ねて暴露を行なった。暴露は前暴露 8 日間 (無暴露)、暴露 8 日間の計 16 日間で、連日午前 11 時 ~ 12 時の一定時間に膣垢を採取し検鏡して発情の有無を判定した。

(2) 包皮腺分泌物による影響

暴露物質は、以下に示す 3 種で

1. 包皮腺分泌液：暴露直前に、繁殖能力を有する雄 1 個体分の包皮腺をホモゲナイズしたもの 1.0ml を用い、未経産と経産で違いを比較した。
2. 雄尿：暴露直前、繁殖能力を有する雄 5 匹以上からの膀胱上部を圧迫し強制排泄した尿 0.2ml と生理食塩水 0.8ml 。
3. 生理食塩水 1.0ml

暴露方法は、それぞれの暴露物質を濾紙 ($9 \times 9\text{cm}$) に吸着させ、それを金網で覆い、被暴露動物は未経産 90 匹経産 30 匹を使用し、各群に分け (10 匹/ケージ) の各ケージ内に取付けた。暴露物質は、8 日間の暴露期間中毎日交換し、一定の時間に膣垢を採取し観察を行なった。

(3) 暴露動物の組織学的観察

1)で使用した正常雄、去勢雄、正常雌および卵巣除去+アンドロゲン投与雌の4群で、包皮腺、陰核腺および腎臓を摘出し、分泌液を含んだ状態でトーションバランスで秤量した。組織標本は1群8個体で行ない、ブアン固定後、パラフィン包埋し、厚さ8 μ mの切片としてヘマトキシリン・エオシン染色を行なった。

包皮腺、陰核腺の組織学的観察は、腺房細胞および導管の発達、退行を中心に行ない、腎臓については、糸球体包上皮の立方細胞化の割合、尿細管上皮細胞の変化等を中心に行なった。なお、糸球体包上皮の立方細胞化の割合は、切片当り腎小体を無作為に約50数え（立方上皮細胞を有する腎小体/観察した全腎小体） $\times 100$ （%）として表示した。また糸球体包を立方上皮細胞が、約30%以上覆っている腎小体を、立方上皮細胞を有する腎小体とした。

統計学的処理は、 χ^2 検定ならびにt検定を用い、危険率5%を有意水準とした。

結 果

(1) 尿暴露

暴露前8日間の発情出現率を図1に示した。無発情が全体の37.6%、1回発情が現われたのが50.4%、2回発情が現われたのが12%であった。これを1ケージ4匹以内で飼育した場合の8日間の発情出現割合と比較すると有意に無発情が多く、2回発情した雌は有意に少なかった。このことから8日間の群飼(10匹/ケージ)によって、発情の抑制つまり Lee-Boot 効果が引き起こされた。

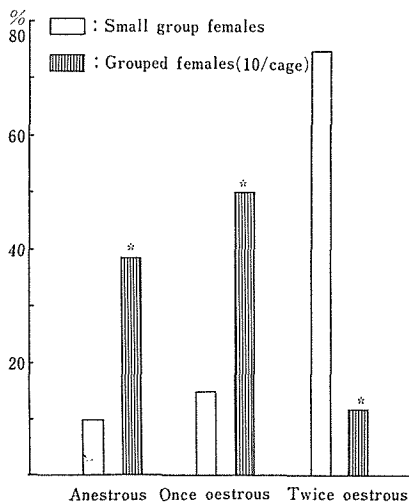


Fig. 1. The percentage of female mice in oestrous for 8 days.

(*P<0.05)

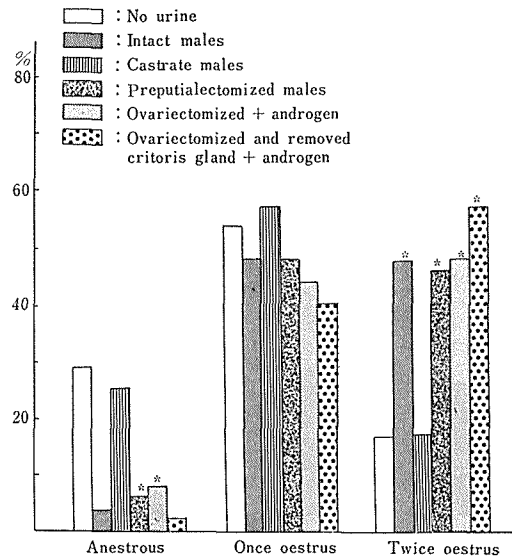


Fig. 2. Frequency of oestrous following oestrous accelerating pheromone of mice.

(*P<0.05)

各暴露8日間の発情出現率を図2に示した。2. 正常雄, 4. 包皮腺除去雄, 5. 卵巣除去+アンドロジェン投与雌の暴露期間中の発情出現割合を1. 無暴露と比較すると, これらの各暴露とも無発情の雌が有意に少なく, 2回発情した雌は有意に多かった。3. 去勢雄の発情出現割合は, 1. 無暴露の発情割合と統計的な有意差を認めなかった。また3. 去勢雄を除く各暴露群の発情出現割合には, 統計的な有意差を認めなかった。

これらのことから, 発情促進効果は, 包皮腺または雄性化した陰核腺の有無に関係なく, アンドロジェンの存在に関係することが明らかとなった。

(2) 包皮腺分泌物による影響

各暴露物質が, 被暴露動物の発情出現に及ぼす影響を図3に示した。発情出現割合を無発情, 1回のみ発情および2回発情の個体数に分けて表示した。2. 雄尿の被暴露動物の発情出現割合は, 1. 包皮腺分泌液 (未経産), 3. 生理食塩水と比較して, 無発情に関しては差がなかったが, 2回発情に関しては有意に多かった。一方, 1. 包皮腺分泌液 (未経産, 経産), 3. 生理食塩水の暴露期間中の発情出現割合には, 統計的な有意差が認められなかった。また, 1. 包皮腺分泌液暴露において, 未経産と経産の違いによる反応の違いは認められなかった。

これらのことから, 包皮腺分泌液には発情促進効果はなく, 雌の交尾経験の有無にも関係ないことが明らかになった。

(3) 暴露動物の組織学的観察

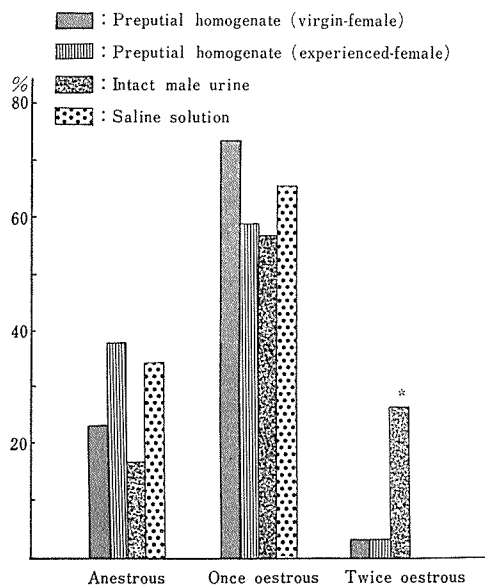


Fig. 3. Frequency of oestrous in mice of exposure to preputial homogenate, intact male urine and saline solution. (* $P < 0.05$)

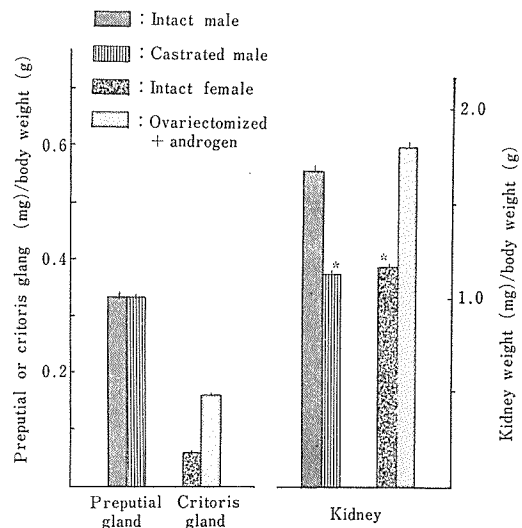


Fig. 4. Weights in preputial or critoritis gland and kidney. ($M \pm S.E.$, * $P < 0.05$)

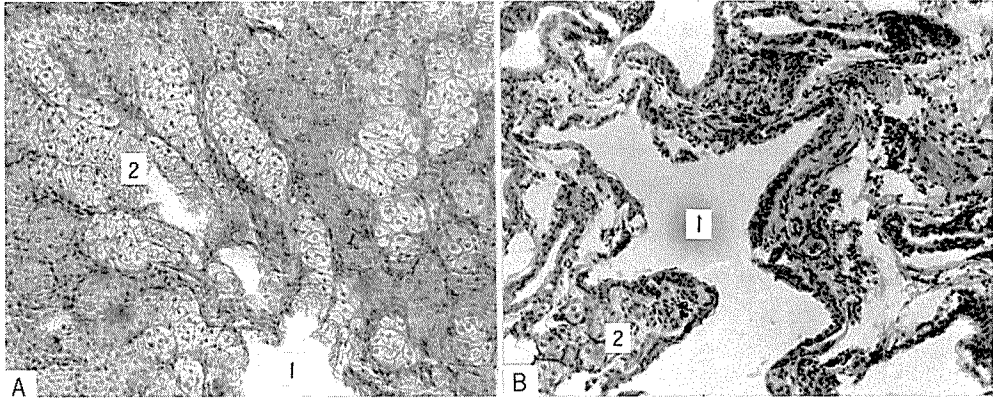


Fig. 5. Histology of preputial gland, (A) intact male and (B) castrated male. 1. duct, 2. glandular acinus. $\times 100$.

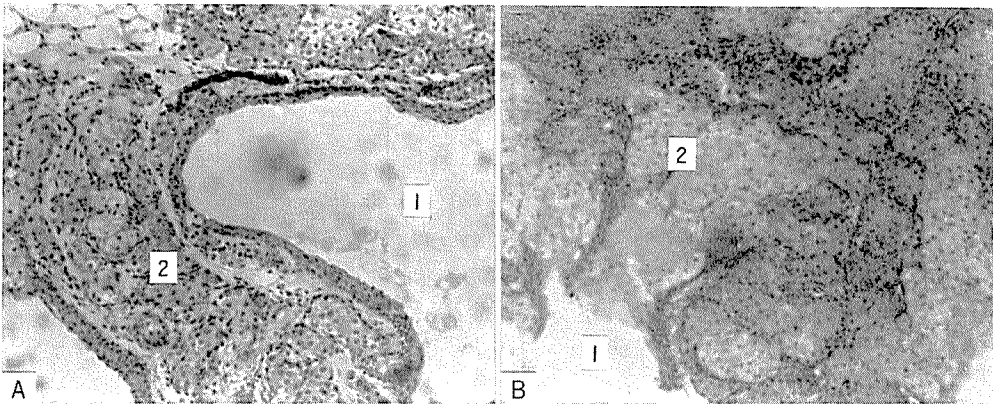


Fig. 6. Histology of critoris gland, (A) intact female and (B) ovariectomized and removed critoris gland + androgen. 1. duct, 2. glandular acinus. $\times 100$.

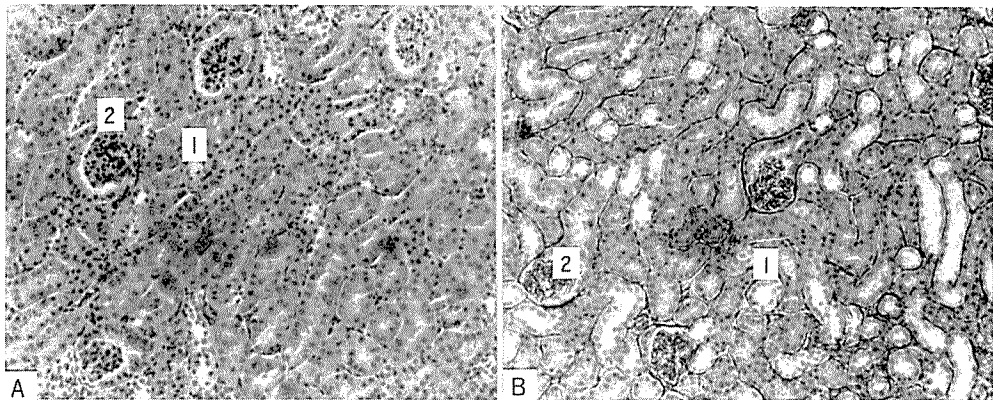


Fig. 7. Histology of kidney, (A) intact male and (B) castrate male. 1. tubular, 2. corpuscula renis. $\times 100$.

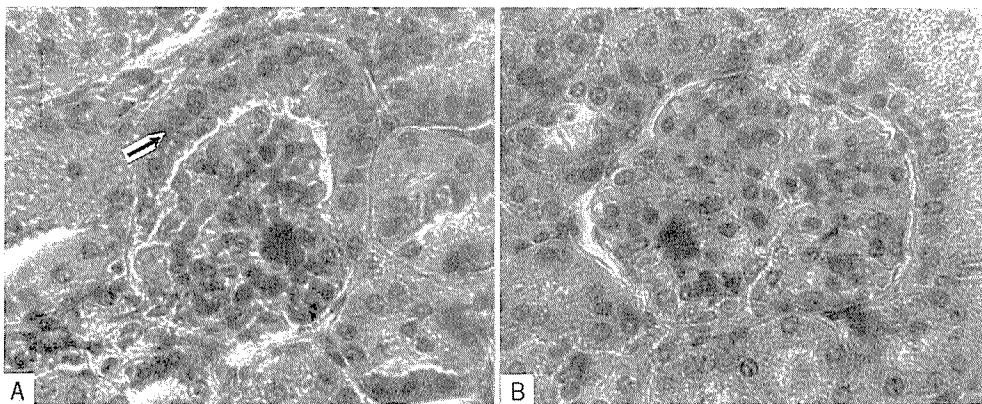


Fig. 8. Histology of epithelium cells of Bowman's capsule, (A) intact male with cuboidal epithelium and (B) intact female with squamous epithelium. $\times 400$.

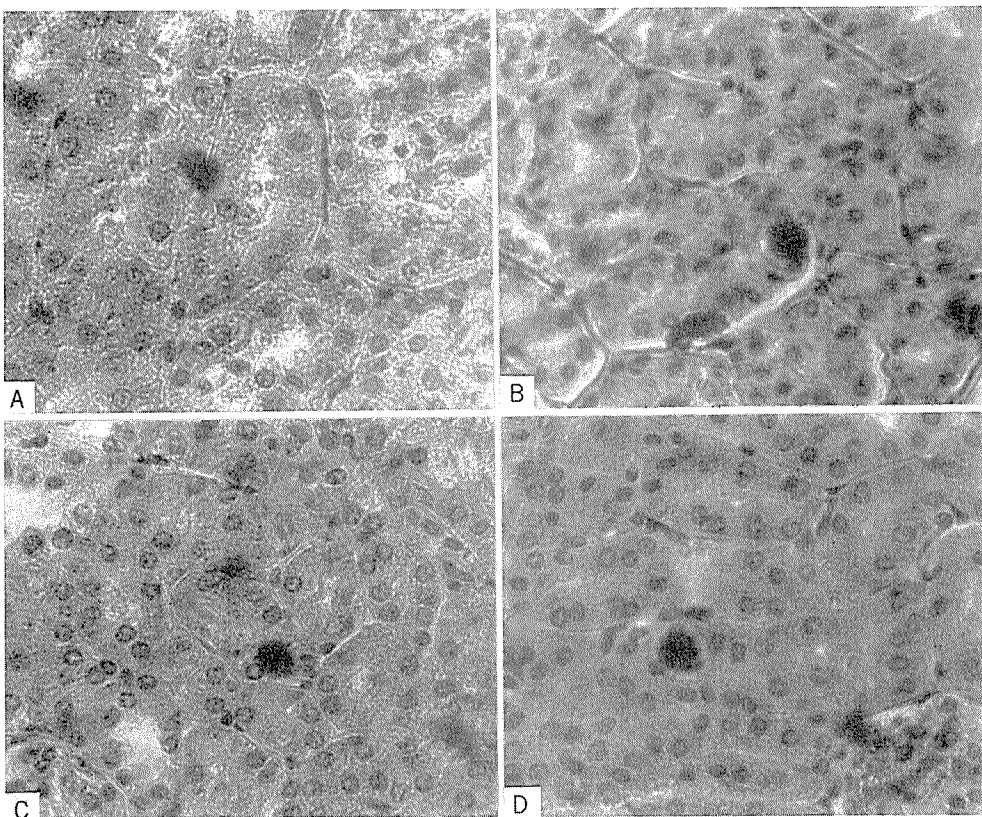


Fig. 9. Comparison of density of nucleus in renal tubule cells, (A) intact male (B) castrated male, (C) intact female (D) ovariectomized + androgen. A, D $<$ B. C. $\times 400$.

包皮腺、陰核腺および腎臓の平均重量と比体重値を図4に示した。1. 正常雄の包皮腺は、142.9mg, 2. 去勢雄は129.1mgとやや軽かったが、比体重値は双方共0.33%で、統計的な有意差はなかった。4. 卵巣除去+アンドロジェン投与雌の陰核腺の平均重量は63.3mg, 比体重値は0.16%で、3. 正常雌の陰核腺23.4mg比体重値0.06%と、4. 卵巣除去+アンドロジェン投与雌の陰核腺が有意に大きかった。

正常雄の腎臓の平均重量は725.3mg, 比体重値は1.68%と、去勢雄の腎臓438.4mg, 1.11%より有意に大きかった。また卵巣除去+アンドロジェン投与雌の平均重量は684.3mg, 比体重値は1.80%と、正常雌の449.2mg, 1.17%より有意に大きかった。1. 正常雄と4. 卵巣除去+アンドロジェン投与雌の腎臓の比体重値の間には、統計的な有意差はなかった。

これらのことから、包皮腺より腎臓の方がよりアンドロジェン依存であることがあきらかとなった。

組織学的所見では、正常雄および去勢雄の包皮腺において、両者とも個体差がかなり認められたが、正常雄ではおびただしい数の腺房が存在し、導管側に接した腺房は円形細胞の集塊を作りさらに導管に向かって肥大し、核は変形、消失して剝離していた。この分泌型の腺房は基底側でエオシン好性の腺房と結合していた(図5-A)。一方、去勢雄では顕著な腺房の発達はみられず、導管が著しく拡張し上皮組織、結合組織ともに細胞が萎縮し、核の変形もみられ、腺房細胞が存在しない個体(図5-B)や、導管の被覆として重層上皮が存在し、腺体の結合組織内にエオシン好性の腺房が点在する個体も存在した。正常雌と卵巣除去+アンドロジェン投与雌において、両群とも個体差は少なかった。正常雌の陰核腺の導管は、卵巣除去+アンドロジェン投与雌よりも、その占る割合が高くその被覆として重層上皮の発達がみられた。正常雌の腺房は、エオシン好性のものが結合組織内に散在し、分泌型の腺房もみられた(図6-A)。卵巣除去+アンドロジェン投与雌の陰核腺は、正常雄の包皮腺と同様の構造が認められた(図6-B)。

Table 1. Renal corpuscles with cuboidal cell capsules in mice.

Treatment	No. of animals	No. of examined renal corpuscles	No. of renal corpuscles with cuboidal cell capsules	%
Intact males	8	1270	936	73.7*
Castrated males	8	1313	582	44.3*
Intact females	8	1248	133	10.7
Ovariectomized + androgen	8	1126	181	16.1

(*P<0.05)

腎臓の組織学的所見で、糸球体包上皮の立方細胞化の割合は表1に示した。正常雄73.7%、去勢雄44.3%と、去勢によって有意に減じた(図7)。また正常雌の割合は10.7%と、性差においても有意差がみられた。正常雄および卵巣除去+アンドロジェン投与雌は、去勢雄および正常雌と比較して、腎皮質の細胞核の密度が低く、近位尿管上皮が発達しているのが観察された(図8A~D)。

考 察

実験1において、正常雄および卵巢除去+アンドロジェン投与雌に発情促進効果(Whitten効果)がみられた。一方、去勢雄には発情促進効果がみられなかった。このことは、BRONSONら¹⁴⁾多くの研究者¹²⁾が、発情促進効果をもつフェロモンはアンドロジェン依存性の物質であると報告していることと一致した。

卵巢除去+アンドロジェン投与雌が、正常雄と同等の発情促進効果を有したことは、卵巢除去+アンドロジェン投与雌の陰核腺が、正常雌の陰核腺よりも重量が増し、また包皮腺と類似した構造を示したことから、陰核腺の雄性化によるものと考えられた。しかし、包皮腺除去雄ならびに陰核腺および卵巢除去+アンドロジェン雌が、正常雄と同様に発情促進効果を示した。このことから、包皮腺には発情促進効果を有さないことが判った。さらに包皮腺の介在について、包皮腺分泌液の発情促進効果を調べた結果、包皮腺分泌液は生理食塩水と同程度であった。

以上のことから発情促進効果には、包皮腺ならびに包皮腺分泌液が介在しないことが判明した。この結果は、BRONSON & WHITTEN¹⁴⁾ および MCKINNEY¹²⁾ の報告と一致した。包皮腺に発情促進効果を有すると報告したCHIPMAN & ALBRECHTの報告は¹³⁾方法、結果について再検討する必要があると思われる。

また、Bruce効果において、雌マウスが交尾雄のにおいを識別し記憶するために起るのではないかと考えられている¹⁶⁾。もし仮に包皮腺分泌液が効果を発揮するには、このようなニオイの学習が、Whitten効果にも関与し、発情促進の効果に違いが生じる可能性も考えられる。本実験において、未経産と経産による包皮腺分泌液の発情促進効果を調べた結果両者とも包皮腺分泌液による効果の違いはなかった。これらのことから包皮腺は、性誘引機能等¹⁾を有するだけで、プライマ・フェロモンは有さないと思われた。

包皮腺の形態において、大きさ、重量、腺房の数等に顕著な個体差がみられた。この個体差は、包皮腺がアンドロジェン依存器官である¹³⁾ことから、雄のアンドロジェンの分泌量の差に因り、さらに攻撃行動ならびに雌を誘引するニオイの差あるいは個体識別に働いているものと考えられた。

腎臓の重量において、正常雄の方が正常雌より有意に重く、卵巢除去+アンドロジェン投与雌は正常雌より重かった。アンドロジェンによって腎重量が増加した。これらのことはDICKIE¹⁷⁾およびKOCHAKIAN¹⁸⁾の結果と一致した。またアンドロジェン投与によってマウス腎臓内の酵素が数種増える^{19,20)}という報告もある。従って、フェロモンの分泌器官が腎臓である可能性は高いと考えられる。

腎臓の糸球体包上皮の立方細胞化には、アンドロジェンによって影響する^{10,21)}ことが示唆されている。HOPPE¹⁰⁾は、この糸球体包上皮の立方細胞化がフェロモン分泌に関係することを示唆している。しかし、本実験において、卵巢除去+アンドロジェン投与雌の方が去勢雄よりも顕著に高いフェロモン効果を示したにもかかわらず、組織学的検索において、糸球体包上皮の立方細胞化の割合は、卵巢除去+アンドロジェン投与雌が去勢雄よりも、著しく低い値であった。このことから糸球体包上皮の立方細胞化は、フェロモン分泌に関係しない

と推察した。

また組織の観察から、腎臓のアンドロジェンの影響は、糸球体包上皮よりも、近位尿細管において顕著にみられた。つまり、正常雄および卵巢除去+アンドロジェン投与雌は共通して、去勢雄および正常雌よりも、近位尿細管上皮細胞が肥大していた。このことは、アンドロジェンにより、近位尿細管上皮細胞に、何らかの機能的変化をもたらしたと考えられる。近位尿細管の一般的な機能は、物質の再吸収および分泌である。しかし、尿細管での蛋白質の合成や代謝が示唆されており²²⁾、発情促進効果をもつフェロモンが、尿中のペプチド蛋白であることを考えあわせると、腎の近位尿細管の上皮細胞がフェロモンの生産部位と推察された。

これらのことは、Bruce 効果および Vandenberg 効果のフェロモン起因が腎臓であると^{10,23)}言われていることと、本実験の推察と一致した。このことから、プライマ・フェロモンは腎臓で生産される共通のペプチド蛋白によって引き起されるものであると思われた。

今後さらにフェロモンの起源について検討する必要があると思われる。

摘 要

マウスフェロモンの発情促進効果 (Whitten 効果) に包皮腺が介在するかどうかについて検索を行なった。

群飼 (10匹/ケージ) を行ない発情抑制した雌に、正常雄、去勢雄、包皮腺除去雄等の尿を暴露したところ、包皮腺除去雄尿にも正常雄と同等の発情促進効果がみられた。また雄の尿、包皮腺をホモゲナイズしたもの、生理食塩水を濾紙に吸着させ、発情抑制した雌に暴露したところ包皮腺ホモゲナイズしたものは、生理食塩水と同じ程度の発情促進効果しかなかった。これらのことから包皮腺には発情促進効果を有さないことが判明した。

また包皮腺および腎臓の重量ならびに組織学的検索から、包皮腺よりも腎臓の方がアンドロジェンの影響を受けていることから、腎臓がフェロモンの生産部位であると推察した。

引 用 文 献

- 1) BRONSON, F. H and D. CAROOM, J. *Rerod. Fert.*, 25 : 279-282. 1971.
- 2) WHITTEN, W. K, J. *Endocrinol*, 13 : 399-404. 1956.
- 3) VANDENBERGH, J. G., *Endocrinology*, 81 : 345-349. 1967.
- 4) BRUCE, H. M. *Nature*, 184 : 105. 1959.
- 5) ZARROW, M. X., S. A. ESTES, V. H. DENENBERG, J. H. CLARK, J. *Reprod. Fert.* 23 : 357-360. 1970.
- 6) LEE, S., VAN DER., and L.M. BOOT, *Acta Physiological et Pharmacologica Neerlandica*, 5 : 213-215. 1956.
- 7) BRUCE, H. M., J. *Reprod. Fert.* 2 : 138-142. 1965.
- 8) 木村武二, 環境と内分泌, 東京大学出版会. 251-264. 1974.
- 9) COLBY, D. R., and J. G. VANDENBERGH, *Biol. Reprod.* 11 : 268-279. 1974.
- 10) HOPPE, P. C., J. *Reprod. Fert.*, 45 : 109-115. 1975.

- 11) MARCHLEWSKA, K. A., Biol. Reprod. 17 : 729-732. 1977.
- 12) MCKINNEY, T. D., J. Mammal., 53 : 391-393. 1972.
- 13) CHIPMAN, R. K., and E. D. ALBRECHT., J. Reprod. Fert., 38 : 91-96. 1974.
- 14) BRONSON, F. H., and W. K. WHITTEN, J. Repod. Fert., 15, 131-134. 1968.
- 15) BARTKE, A., J. Endocrinol. 60 : 145-148. 1974.
- 16) 古館専一, 中野健司, 実験動物, 30 : 1-5. 1981.
- 17) DICKIE, M. M., Cited by P. C. HOPPE. J. Reprod. Fert. 45 : 109-115. 1975.
- 18) KOCHAKIAN, C. D., Am. J. Physiol. 142, 315-325. 1944.
- 19) SHAW, C. R. and A. L. KOEN, Science, 140 : 70-71. 1963.
- 20) DOFUKU, R., TETTENBORN, V. and S. OHNO. Nature., 232 : 5-7. 1971.
- 21) 浜田佑二, 実験動物, 28 : 485-490. 1979.
- 22) 遠藤 仁, 酒井文徳, 代謝, 8 : 516-523. 1971.
- 23) VANDENBERGH, J. G., J. S. FINLAYSON, W. J. DOBROGOSZ, S. S. DILLS, and T. A. KOST, Biol. Reprod. 15 : 260-265. 1976.

Influence of the Male Preputial Gland to the Acceleration of Oestrus in the Laboratory Mouse.

By Hirotada TSUJII

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

Summary

Grooping of female laboratory mice in the absence of males induce to suppression of oestrus cycle (Whitten effect). Prolonged diestrus in grouped females may be overcome and oestrus synchronized by the presence of males, a phenomenon linked to pheromonal properties of male odor. CHIPMAN and ALBRECHT reported that the oestrous-accelerating pheromone is closely related to and/or augmented by the preputial gland secretion. However, MCKINNEY reported that odor from male preputial did not accelerate or induce oestrus in grouped females. The present study was conducted to examine further the effects of grouping on oestrus in mice exposed continuously to the stimulus of preputial gland odors. The present study was initiated with two objectives : (1) to obtain an efficient of the urinary pheromone, and (2) to determine if the pheromone is present in preputial gland.

Mice used were ICR mature virgin females. 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 12hr. of artificial light daily.

In Exp. 1, 7 weeks-old females were grouped ten per cage, the dimensions of which were $17 \times 30 \times 10\text{cm}$, for 8 days to cause inhibition of oestrus (Fig. 1). The exposure animals were 6 groups : (1) no urine, (2) intact male, (3) castrate male (4) removed preputial gland male, (5) ovariectomized female + testosterone $195\mu\text{g}/0.1\text{ml}/\text{day}$, (6) ovariectomized, removed critoris gland female + testosterone which was housed individually in $10 \times 16 \times 10\text{cm}$ cages. The exposure animals were placed on the subject female cages. Frequency of oestrous following exposure with a male or female is shown in Fig. 2, in which (2), (4), (5) and (6) groups differed significantly ($P < 0.05$) from (1) and (3) groups. These results were suggested that male preputial gland did not accelerate oestrus in grouped female.

In Exp. 2, the exposure odour were 3 groups : (1) preputial homogenate (2) intact male urine (3) saline solution. Frequency of oestrous following exposure with these odour is shown in Fig. 3. The observed frequency of oestrus in (2) intact male urine differed significantly ($P < 0.05$) from preputial homogenate and saline solution. Topical application of preputial gland homogenate failed to promote oestrous among grouped

females. Kidneys of males are heavier than those of females and kidney weight is increased by androgen treatment (Fig. 4). In histological observation, the preputial glands are androgen-dependency (Fig. 5 and 6). Furthermore, Bowman's capsules with cuboidal epithelium were found in 74% and 44% in the kidney of adult intact male and castrated male, respectively (Fig. 8 and 9). We suggest that the kidney is involved in pheromone synthesis under the influence of androgens.