

孵卵中におけるエストロジェンの投与が ニホンウズラ雄の性行動に及ぼす影響

桑山 岳人*

(平成 14 年 5 月 31 日受付/平成 14 年 9 月 25 日受理)

要約: 本実験では、ニホンウズラ (バンダ羽装) の種卵を用い、エストラジオールベンゾネイト (EB) を孵卵 4 日目に投与した。投与量は、0.0125 mg, 0.025 mg, 0.05 mg, 0.1 mg の 4 区とし、対照区はゴマ油投与のものを用いた。行動の観察は、10 週齢において実施し、ADKINS (1975) の方法に従った。観察終了後、体重及び精巣重量を測定した。その結果、育成率は EB 投与量の増加に伴い低下した。性行動に関しては従来の報告と異なり、投与濃度の如何にかかわらず EB 投与区ではまったく性行動が発現しなかった。また、EB 投与区ではクロアカ腺の萎縮が見られ、精巣は左側が肥大、右側が萎縮するという傾向が認められた。以上のことより、ニホンウズラ (バンダ羽装) に対する孵卵中の EB 投与は、低濃度においても孵化後の性行動のみならず、育成率及び精巣の発達に大きな影響を及ぼすことが明らかになった。

キーワード: ニホンウズラ, エストラジオールベンゾネイト, 性行動

緒 言

雄ウズラは孵化後約 6 週間で性成熟に達すると、特有の鳴声 (male mate calling), 気取り歩き (strutting), 後ろから雌の首筋を掴む (head grabbing), 背中に乗る (mounting), 総排泄口を接触させる (cloacal contact movement) などの行動を示す。これら一連の性行動は、性成熟に達し発達した精巣より分泌されるテストステロンによって発現する。しかし去勢手術を施した雄ウズラに、雌の卵巣から分泌されるエストラジオールを注射した場合でも性行動は発現する^{1,2)}。テストステロンは複雑な経路を経てコレステロールより合成されるが、動物種によりその合成経路は異なっている。合成されたテストステロンは標的細胞まで血液によって運搬され、アロマトラーゼという酵素によってエストラジオールに芳香化される。従って実際にはエストラジオールによって一連の性行動が発現するのである³⁾。

鳥類の本来の性は哺乳類とは逆の雄型であり、性分化において雌性ホルモンであるエストラジオールによってその支配を受けている。WILSON と GLICK⁴⁾ は、鶏において孵卵中の種々な時期にテストステロンプロピオネイト (TP) あるいはエストラジオールベンゾネイト (EB) を投与し、雄鶏の行動について観察した。その結果、孵卵開始 12 日目以前の TP あるいは EB 投与は交尾行動を減少させるのに効果があると報告している。また、榊田と小柳⁵⁾ も同様な結果を報告している。また、ADKINS も⁶⁾ ウズラを用いて同様な実験を行い、交尾、頭掴み、鳴く等の性行動が減少し、クロアカ腺の発達も抑制されたと報告している。さらに、

Ro と KONDO は⁷⁾ 孵卵初期にいろいろな濃度の EB を投与し、それらの雄ウズラと無処理の雌ウズラとの交配実験においてある一定以上の EB を投与した雄ウズラには繁殖能力がないと報告している。これらの報告は鳥類において、孵卵中の特定の時期にさらされる性ホルモンにより後の性行動に影響が出ること示している。しかし、ウズラにおける報告は、ADKINS の実験⁶⁾ 以外、見当たらない。そこで本実験では、孵卵中のニホンウズラの種卵に EB を投与し、孵化後性成熟に達した雄ウズラの性行動に及ぼす EB 投与の影響について検討した。

材料および方法

供試卵: 本学家畜繁殖学研究室で自家繁殖を実施しているニホンウズラ (バンダ羽装) を母鶏として用いた。母鶏は孵化後 6 週齢より雌雄各一羽ずつペアリングを実施し、14L:10D の照明条件下で飼育した。種卵は、毎日集卵し、室温で貯卵し、産卵後 1 週間以内に実験に供した。なお、実験には 9g~11g の卵を用いた。

EB の調整: 必要量の EB を定量して試験管に取り。エタノールを加え攪拌しながら EB を完全に溶解させた。その後、薬局方ゴマ油を 0.1 mg/0.05 ml 薬局方ゴマ油になるように加え、50°C の温湯中で攪拌しながらエタノールを蒸発させた。その後、それをもとに EB 濃度をそれぞれ 0.0125 mg, 0.025 mg, 0.05 mg, 0.1 mg/0.05 ml 薬局方ゴマ油になるように調製した。調製後の EB は、実験まで室温 (22°C) で保存した。

孵卵及び孵卵中の EB の投与: 供試卵は、温度 37.8°C、湿度 70±10% の孵卵器に入卵した。孵卵開始 4 日目に透過

* 東京農業大学農学部畜産学科

光検卵を実施し、受精卵を以下に示す対照区と4つの実験区に分けてた。

対照区：ゴマ油投与区

実験区：EB 0.0125 mg 投与区、EB 0.025 mg 投与区、EB 0.05 mg 投与区、EB 0.1 mg 投与区

EBあるいはゴマ油の投与は孵卵開始4日目に実施した。投与にあたり卵殻は70%アルコールで消毒し、23Gの注射針を用いて卵殻鈍端部に小孔を開け、23Gの針を装着したツベルクリン注射筒を用いて卵白内に約5mm程挿入して注入した。その後、小孔をパラフィンで塞ぎ、孵卵を継続した。

飼育方法：孵化した雛は孵化後24時間以内に体重を測定し、37℃の育雛器へ移動した。育雛器内の温度は常法に従って徐々に下げ、餌と水は自由摂取となるよう留意した。5週齢に達したウズラは単飼ケージに収容した。なお、育雛器内は常明条件下、単飼ケージは温度22±2℃、14L：10D照明条件下に置いた。

行動の観察方法：行動の観察は、ADKINS⁶⁾に従って10週齢において実施した。すなわち50cm×50cm×50cmのケージを静かな室内に置き、その中に、まず性成熟に達した(産卵開始をその指標とする)交尾経験のある雌ウズラをいれた。そこに各実験区の雄ウズラを5分間入れて、以下の行動の回数を記録した。

- 1) 鳴声の回数
- 2) 気取り歩きの回数
- 3) 頭を掴む回数：多くの場合これは乗駕に先立って行われるので、乗駕の伴わない回数のみを記録した。

4) 乗駕の回数：多くの場合これは総排泄口接触行動に先立って行われるので、総排泄口接触行動の伴わない回数のみを記録した。

5) 総排泄口接触行動の回数

これらの行動の観察は全て午前9時から12時の間に実施し、各羽1日1回、4日間にわたって観察した。観察終了後に体重、クロアカ腺の大きさ(縦×横、mm²)を計測し、その後放血屠殺して精巢を摘出し、重量を測定した。摘出した精巢は、常法によってパラフィン切片を作製した後、ヘマトキシリン・エオジン染色を実施し観察した。

6) 統計学的検定法

孵化率及び育成率に関してはカイ二乗検定法により有意差を検定した。精巢重量に関しては、対照区及び各EB投与区間においてはDUNCANのNEW MULTIPLE RANGE TESTにより有意差を検定した。

結 果

孵化率について(図1)

対照区とEB投与区間においては、2検未通過率(孵卵開始15日目に発生を中止していた率)、死籠り率、孵化率に顕著な差は認められなかった。

育成率(5週齢まで生存した割合)について(図2)

対照区において育成率は91%と非常に高い直を示し、異常率(脚の奇形及び脚開きの雛の発現割合)は9%、死亡率は0%を示した。

各EB投与区では、EB投与濃度の増加と共に育成率が減少する傾向が見られた。また、異常率、死亡率に関して

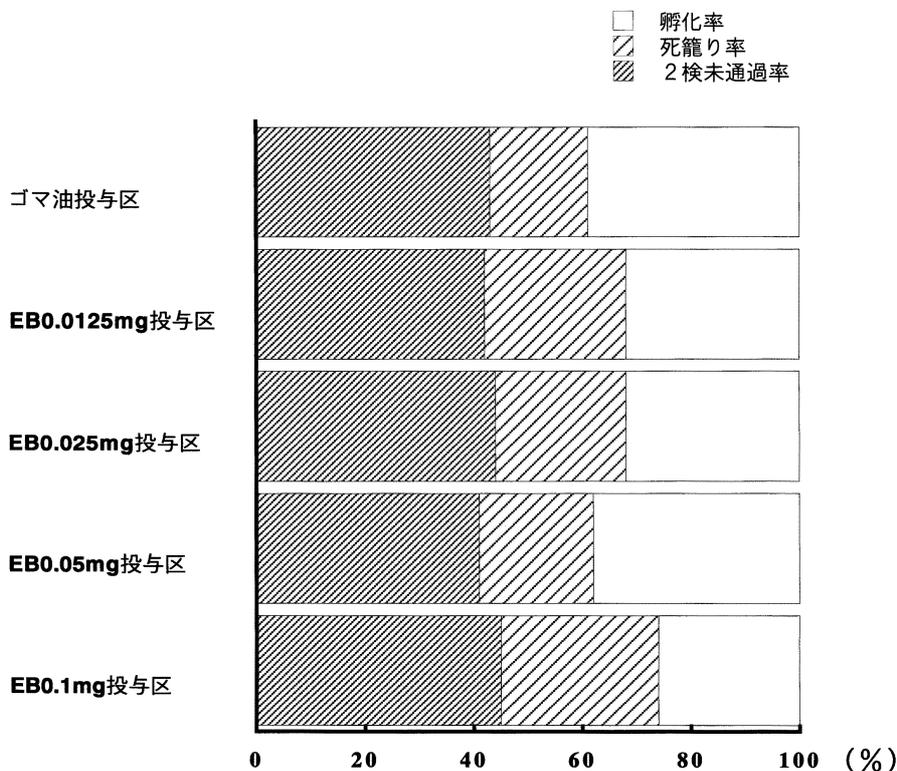


図1 EB投与が雄ニホンウズラの孵化率に及ぼす影響

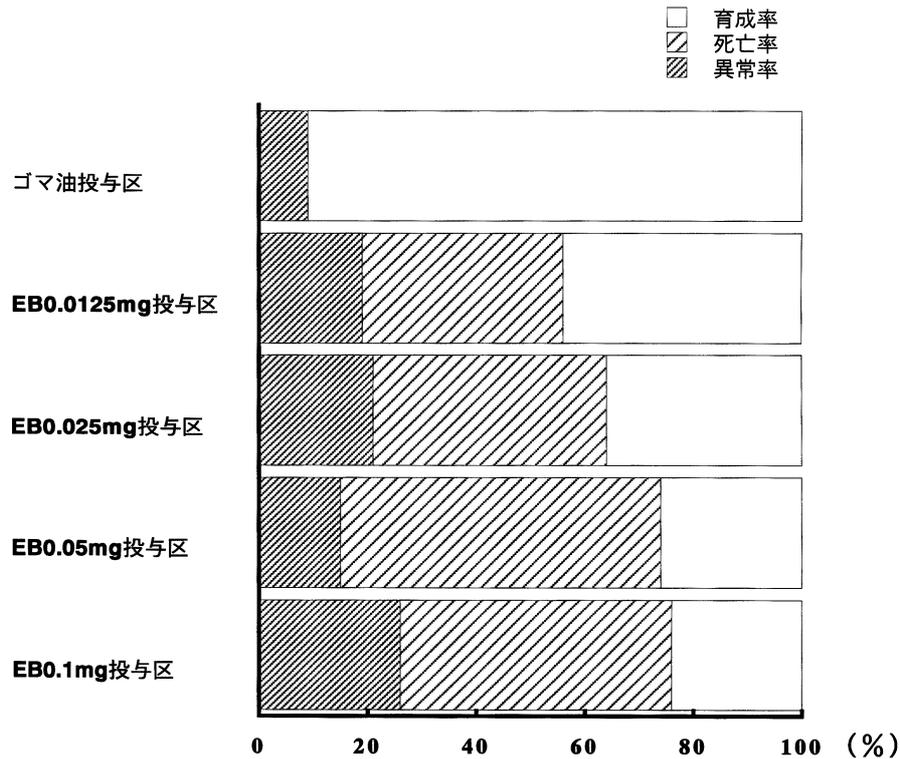


図 2 EB 投与が雄ニホンウズラの育成率 (5 週齢時) に及ぼす影響

表 1 EB 投与が雄ニホンウズラの性行動に及ぼす影響

実験区	個体数	交尾行動	気取り歩き	鳴声 (発現羽数)
ゴマ油投与区	10	9	9	3
EB0.025mg投与区	4	0	0	0
EB0.05mg投与区	5	0	0	0
EB0.1mg投与区	4	0	0	0

*行動の観察は10週齢時に実施した

表 2 EB 投与が雄ニホンウズラ体重, 精巣重量及びクロアカ腺の大きさに及ぼす影響

実験区	個体数	体重 (g)	左側精巣重量 (g)	右側精巣重量 (g)	クロアカ腺 (縦×横, mm ²)
ゴマ油投与区	10	103.3 ± 1.8	1.56 ± 0.01 a	1.16 ± 0.08	171.0 ± 5.2 c
EB0.025mg投与区	4	104.9 ± 0.7	2.24 ± 0.14 ab	0.97 ± 0.20	95.6 ± 7.6 b
EB0.05mg投与区	5	107.4 ± 1.1	3.39 ± 0.51 c	0.89 ± 0.21	83.4 ± 5.2 b
EB0.1mg投与区	4	103 ± 2.9	2.51 ± 0.45 b	0.93 ± 0.29	63.3 ± 1.7 a

各値は平均値±標準誤差 (10週齢時)

異符号間にはDuncanのNew Multiple-range Testにより 1%水準で有意差が認められる

も EB 0.05 mg 投与区を除いては, EB 投与濃度の増加と共に増加する傾向が見られた。EB 0.05 mg 投与区, 他の EB 投与区に比べて僅かに異常率の値が 15% と低く, 死亡率が 59% と高い値を示したが, EB 投与区間には有意差は認められなかった。

性行動について (表 1)

10 週齢において交尾行動 (総排泄口接触行動) が発現し

たのは, 対照区が 9 個体 (9/10) であった。気取り歩きが発現したのは, 対照区が 9 個体 (9/10) であった。鳴声が発現した個体は, 対照区が 3 個体 (3/10) であった。EB 投与区では, 交尾行動, 気取り歩き及び鳴声のいずれも発現しなかった。

体重について (表 2)

体重は, 全ての区において 105 g 前後であり, 顕著な差

は認められなかった。

精巣について (表 2)

左側精巣重量に関しては、EB 投与区では全ての区が対照区と比較して重い値を示した。一方、右側精巣重量は、対照区と比較してEB 投与区についてはやや軽い傾向を示したが、統計学的には有意差は認められなかった。しかし、EB 投与区の精巣は、その重量だけでなく大きさにおいても左側が肥大し、右側が萎縮している傾向が認められた。更に、組織標本作製したところ、EB 投与区においては、精細管内が疎となっていた。

クロアカ腺の大きさ (表 2)

クロアカ腺の大きさは、対照区に比べ対照区 EB 投与区においては投与濃度が増すにつれて小さくなる傾向を示した。また、EB 投与区はクロアカ腺の萎縮のみならず、総排泄口の奇形も認められた。

考 察

対照区とEB 投与区では2 検未通過率、死糞率および孵化率に顕著な差は、認められなかった。従って、今回用いた EB の投与濃度は発生途中から孵化間での間は少なくとも形態的には影響を及ぼさないものと考えられる。

本実験では、異常率は脚の奇形及び脚開きの難の発現割合であるが、これらの異常の認められた難は餌と水の摂取をうまく行うことが出来ず、育雛開始後間もなく全て死亡してしまうので、異常個体は全て孵化時に淘汰した。そして、孵化時は形態的には正常であったが5 週齢までに死亡した雛の割合である死亡率とは区別した。従って、他の報告と比較する場合あえて、生存率で比較することとした。本実験における育成率は、Ro と Kondo⁷⁾ 及び Adkins⁶⁾ の報告より 10~20% 低い、これは彼らの報告ではニホンウズラの野生型羽装を用いたのに対して本実験ではニホンウズラの野生型羽装より突然変異で出現し固定されたニホンウズラのパンダ羽装を用いたことによる違いと考えられた。育成率において対照区とEB 投与区とでは対照区の方が極めて育成率が高いことからEB の投与は育成率に悪影響を及ぼすものと考えられた。また、その影響は投与濃度に比例していた。

Ro と Kondo⁷⁾ は、孵卵中にEB 投与を行った雄ウズラと無処理の雌ウズラとの交配実験において、EB 0.1 mg 投与区では受精卵は得られなかったが、EB 0.01 mg 及び 0.02 mg 投与区では少数の受精卵が得られたと報告している。このことは少なくとも低濃度のEB 投与区では交尾行動が発現したことを意味している。また、クロアカ腺の萎縮もEB 投与濃度の増加とともに顕著になったと報告している。

Adkins⁶⁾ は、EB 0.05 mg を投与したニホンウズラの野生型羽装において数例ではあるが交尾行動、気取り歩き、鳴声を観察したとしている。本実験では、投与濃度の如何にかかわらず性行動は全く発現しなかった。EB 0.025 mg という低濃度投与区においても性行動が全く発現しなかったのは、ニホンウズラのパンダ羽装がニホンウズラの野生型羽装よりも、EB に対する感受性が高いものと考えられ

た。性行動の発現には、性成熟後において血中のアンドロジェン濃度が一定レベル以上あることが必要である。今回の実験では血中のアンドロジェン濃度は測定していないがアンドロジェンの標的器官であるクロアカ腺の発達がEB 投与区では阻害されていたことから精巣からのアンドロジェンの分泌がEB の投与により抑制されたものと考えられた。

また性行動の発現には血中におけるホルモンのみならず、中枢神経機構の性ホルモンに対する感受性、あるいは中枢神経機構そのものが正常に作用する必要がある。梶田と小柳は³⁾、雄鶏において孵卵中のEB 投与により孵化後の性行動は減少したものの、精巣重量及びアンドロジェンの標的器官である鶏冠の面積から推定して、アンドロジェンは正常に分泌しており、性行動の減少は中枢神経機構の発達がエストロジェンの作用によって阻害された可能性を挙げている。鳥類においては雄が中性 (neutral sex) であり、孵卵中の特定の時期に多量のエストロジェンにさらされることによって雌への性分化が起こる。Ro と Kondo⁸⁾ は孵卵中のウズラにEB を投与することにより、左右の雄性生殖腺が萎縮して雌性化することを報告している。また、その生殖腺の雌性化に最も効果的な時期は孵卵4 日目であるとしている⁹⁾。すなわち、この時期がウズラにおける生殖腺の性分化の時期であると考えられる。この体組織の雌への性分化により、雌においては卵巣の先熟現象がおこり^{10,11)}、エストロジェンが多量に分泌される、この分泌されたエストロジェンが脳に作用し、脳において雌の方向への性分化が起こるのである。ゆえに、本実験における孵卵4 日目のEB 投与は、雄性生殖腺を雌性化するだけでなく、脳の性分化をも雌の方向へ導き、孵卵後の雄における性行動の減少につながったものと考えられる。

本実験では、左側精巣の肥大、右側精巣の萎縮が見られ、EB 投与は性成熟過程に大きく影響しているものと考えられた。また、組織標本においては精細管内が非常に疎となっていたためテストステロンは分泌されたものの、その量は対照区に比べて少なくテストステロンの分泌不良によりクロアカ腺の発達も僅かになったものと考えられた。

引用文献

- 1) SILVER, R., O'CONNEL, M. and SAAD, R., 1979. Endocrine control of sexual behavior. Ed. By C. BEYER, Raven Press, New York, 223.
- 2) 和田 勝, 1980. 鳥類の生殖行動とホルモン, 代謝, 17 (臨時増刊), 159-165.
- 3) 石居 進, 1981. ホルモンの生物学 (2), 遺伝, 35, 75-79.
- 4) WILSON, J.A. and GLICK, B., 1970. Ontogeny of mating behavior in the chicken. *Amer. J. Physiol.*, 218, 951-955.
- 5) 梶田信也・小柳 深, 1990. 孵卵中にエストロジェンを投与した種卵から孵化した雄鶏の性行動. 日畜会報, 61, 661-662.
- 6) ADKINS, E.K., 1975. Hormonal basis of sexual differentiation in the Japanese quail. *J. Comp. Physiol. Psychol.*, 89, 61-67.
- 7) Ro, S.C. and KONDO, K., 1979. The effect of prenatal treatment of exogenous estrogen on the postnatal development of the sexual organs and reproductive ability.

- ty on the male Japanese quail. *Jap. J. Zootech. Sci.*, **50**, 821-831.
- 8) RO, S.C. and KONDO, K., 1977. Inhibitory effect of exogenous estrogen in the testicular size of the embryo in Japanese quail. *Jap. J. Zootech. Sci.*, **48**, 13-21.
- 9) RO, S.C. and KONDO, K., 1977. Female like gonadal patterns of the male embryo of Japanese quail with a high dose of exogenous estrogen to early stage of incubation. *Jap. J. Zootech. Sci.*, **48**, 325-330.
- 10) TANABE, Y., 1982. Ontogenic aspect of steroidogenesis by gonads and adrenals of duck and its role on sex differentiation. *J. Yamashina Inst. Ornith.*, **14**, 151-156.
- 11) TANABE, Y., YANO, T. and NAKAMURA, T., 1983. Steroid hormone synthesis and secretion by testes, ovary, and adrenals of embryonic and postembryonic ducks. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **49**, 144-153.

Effect of Exogenous Estrogen during Incubation on Sexual Behavior in Male Japanese Quail

By

Takehito KUWAYAMA*

(Received May 31, 2002/Accepted September 25, 2002)

Summary : On the 4th day of incubation, Japanese quail (panda) eggs were injected with either estradiol benzonate (EB) or sesame oil. The amount of EB injected was 0.0125 mg, 0.025 mg, 0.05 mg, or 0.1 mg in 0.05 ml sesame oil. Observations of the behavior were carried out at 10 weeks of age, following the method of ADKINS (1975). After the observation was finished, body weight and testes weight were measured. In spite of previous reports that the birds treated with less than 0.05 mg of EB still showed a little masculine behavior, such behavior was not observed in any of the birds treated with EB in this experiment. Male birds treated with EB showed a poorer cloacal gland, hypertrophy of left testes, and atrophy of right testes. In the histological examination, the inside of the seminiferous tubule of EB-treated groups were rough in structure. The results of this experiment showed that the injection of EB during incubation influenced greatly not only masculine behavior, but also the viability and development of gonads of male Japanese quail (panda).

Key Words : Japanese quail, estradiol benzonate (EB), sexual behavior

* Department of Zootechnical Science, Faculty of Agriculture, Tokyo University of Agriculture