

飼育下におけるハタネズミ 2 系統のオスの性成熟について Male sexual maturation of two *Microtus* species under laboratory conditions

松本 息吹、竹下 溪竜、目加田和之
Ibuki Matsumoto, Keiryu Takeshita, Kazuyuki Mekada

岡山理科大学 理学部 動物学科
Department of Zoology, Faculty of Science, Okayama University of Science

Summary

It is important to know the optimal timing of mating to produce laboratory animals efficiently and to ensure the preservation laboratory strains. To clarify the characteristics of the male sexual maturity of two laboratory *Microtus* strains, namely the “Mar” and “MrosA” strains, which are derived from *M. arvalis* and *M. levis*, respectively, the testes and epididymes from 4-, 6-, 8- and 10 week-old males were weighed and compared. Although the tissue weights increased gradually with age in the Mar strain, in the MrosA strain, the weight of the testis increased markedly from 4 to weeks of age and that of the epididymis increased from 6 to 8 weeks of age. In addition, the spermatozoa concentrations in the cauda epididymis at 6, 8, and 10 weeks of age in were measured in each strain. The sperm concentration increased in the Mar strain at 8 weeks versus 6 weeks in the MrosA strain. From these results, it is clear that there are differences in the patterns of the increases in testis and epididymis weight and sperm concentration between the two strains. It was suggested that males of the MrosA strain attain sexual maturity earlier than those of the Mar strain.

はじめに

ハタネズミ属 (*Microtus*) は 60 種以上の種からなる大きな分類群であり、哺乳類の中でも爆発的に種分化を遂げたグループの一つである (Corbet 1978; Musser and Carleton 1993)。ハタネズミは草食性の小型哺乳類であり、種によって異なった染色体動態や社会構造を示すことから (Borodin et al. 2012; Modi 1987; Wolff 1985 など)、大型家畜のモデル動物として、また、細胞遺伝学的研究や社会的行動解析などに有用であり、これまでに、いくつかのハタネズミ種が実験動物化されてきた (後藤 1979; Mallory and Dieterich 1985; Widayati et al. 2003 など)。

飼育動物の最良な交配のタイミングを知ることが、効率的な動物の生産や、その動物の系統の確実な保存に重要である。ハタネズミに関しては、メスにおいて生殖能力の獲得が早いことが示され、早熟型であると考えられている (Boyce and Boyce 1988; Tkadlec and Zejda 1995)。一方、ハタネズミのオスの性成熟についての情報は乏しく、一部の種ないし系統に限られている (Miska et al. 2014)。そこで、本研究では、ハタネズミのオスの性成熟の特徴を明らかにすることを目的として、ハタネズミ属 2 種 [ロシアハタネズミ (*M. levis*) およびユーラシアハタネズミ (*M. arvalis*)] を由来とする実験動物系統の精巣および精巣上体の重量を測定するとともに、オスの性成熟の指標となる精子パラメーター (精液性状形質) の一つである

精巣上体尾部における精子濃度を測定し、週齢間での比較を行った。

材料および方法 動物

対象動物は、岡山理科大学理学部動物学科で系統維持されているロシアハタネズミ (*M. levis*) とユーラシアハタネズミ (*M. arvalis*) を由来とする系統 (それぞれ MrosA および Mar 系統) とした。飼育環境の条件は、室温 $21 \pm 1^\circ\text{C}$ 、明暗周期 14L10D とし、餌はマウス・ラット用固形飼料 (MR ラボブリーダー、日本農産工業) と草食動物用固形飼料 (ZF、オリエンタル酵母工業株式会社) と市販の牧草 (ペットショップより購入) を併用し、自由摂取させた。水は水道水を自由摂取とした。本研究の全ての動物実験は、岡山理科大学の動物実験管理委員会によって承認され (承認番号 実 2016-05 および 実 2017-06)、かつ実験動物の飼養及び保管並びに苦痛に関する基準 (平成 25 年環境省告示 8 第 4 号) およびその他の動物実験などに関する法令などの規定を踏まえ策定された学内取扱規定などに準じて行った。

組織重量の測定

各系統 4、6、8 および 10 週齢の個体を対象とした。動物を安楽死処置した後、体重を測定し、精巣と精巣上体を摘出し、それらの湿重量を測定した。

精子濃度の測定

各系統 6、8 および 10 週齢の個体を対象とし

た。動物から摘出した精巣上部から尾部のみを切り出し、精子が露出するように組織に切れ込みを入れ、あらかじめミネラルオイルで覆い37°C、5%CO₂ インキュベーター内で平滑化させておいた M2 培養液 (SIGMA) の入ったシャーレに直ちに導入し、約 30 分間の前培養を行った。その後、精子懸濁液を適量取り出し、3%生理的食塩水で任意の希釈倍率になるよう希釈した。希釈したものを改良ノイバウエル血球計算板 (ミナトメディカル株式会社) へ導入し、1 mm×1 mm 区画に存在する精子の数を計数した。計数する精子は、精子頭部が区画内に位置するものとし、精子頭部や尾部が欠落しているものは計数対象外とした。計数した精子の総数から、精巣上部尾部中の精液 1 μL 中に含まれる精子の数 (精子濃度: 個/μL) を計算した [精子の総数 (個) × 計算室の深さ (0.1 mm) × 希釈倍率]。精子が観察できなかった場合は、精子濃度の値を 0 として扱った。

得られた値はエクセル表計算ソフト (マイクロソフト社) および統計ソフト EZR (Easy R) (Kanda 2013) を用いて統計処理 (Kruskal-Wallis 検定) を行った。

結果

Mar 系統 (ユーラシアハタネズミ由来) および MrosA 系統 (ロシアハタネズミ由来) の 4 週齢、6 週齢、8 週齢および 10 週齢の個体の体重および精巣、精巣上部の組織重量ならびに精巣上部尾部における精子濃度の平均値と標準偏差の値を Table 1 に示した。

Table 1. Body weight, testis and epididymis weights, and spermatozoa concentration (mean ± S.D. with sample size in brackets) of the Mar and MrosA laboratory *Microtus* strains.

	Strain	Age			
		4 week-old	6 week-old	8 week-old	10 week-old
Body weight (g)	Mar	10.4 ± 0.2 [3]	17.9 ± 2.5 [11]	25.7 ± 4.9 [13]	31.7 ± 6.6 [13]
	MrosA	20.8 ± 1.2 [6]	27.7 ± 2.4 [11]	31.3 ± 4.9 [12]	35.7 ± 4.1 [14]
Testis (mg)	Mar	12.8 ± 4.6 [3]	77.5 ± 50.5 [11]	186.6 ± 59.0 [13]	276.1 ± 49.1 [13]
	MrosA	87.6 ± 19.8 [6]	248.1 ± 24.0 [11]	303.4 ± 50.2 [12]	314.1 ± 51.6 [14]
Epididymis (mg)	Mar	1.8 ± 0.7 [3]	13.0 ± 5.2 [11]	27.5 ± 7.9 [13]	50.6 ± 9.2 [13]
	MrosA	22.9 ± 2.2 [6]	28.9 ± 7.5 [11]	51.1 ± 11.2 [12]	59.1 ± 10.3 [14]
Spermatozoa conc. (x 10 ⁶ /μL)	Mar		0.01 ± 0.03 [5]	2.5 ± 2.7 [6]	13.1 ± 4.8 [6]
	MrosA		0.83 ± 0.90 [5]	5.3 ± 2.1 [5]	14.1 ± 5.3 [7]

精巣の重量においては、Mar 系統の 4 週齢から 10 週齢にかけて週齢間で有意差 (4-6 week-old: $P < 0.05$, 6-8 week-old: $P < 0.01$, 8-10 week-old: $P < 0.01$) が認められ、重量が次第に増加していく傾向であった (Fig. 1)。一方、MrosA 系統では、4 週齢から 6 週齢にかけて急な増加 ($P < 0.01$) がみられ、それ以降は 6 週

齢と 10 週齢の間に有意差 ($P < 0.05$) が認められるものの、その増加は緩やかであった (Fig. 1)。精巣上部の重量においては、Mar 系統では、精巣の重量と同様の増加パターンであったが、MrosA 系統では、6 週齢から 8 週齢を境に重量の有意な増加 ($P < 0.01$) がみられた (Fig. 2)。

精巣上部尾部の精子濃度においては、Mar 系統の 6 週齢と 8 週齢の間で精子濃度に有意差は認められず、10 週齢と他の週齢との間に有意差 ($P < 0.01$) が認められた (Fig. 3)。一方、MrosA 系統では、6 週齢から 10 週齢にかけて週齢間で有意差 ($P < 0.05$) が認められ、精子濃度が次第に高くなっていく傾向であった (Fig. 3)。

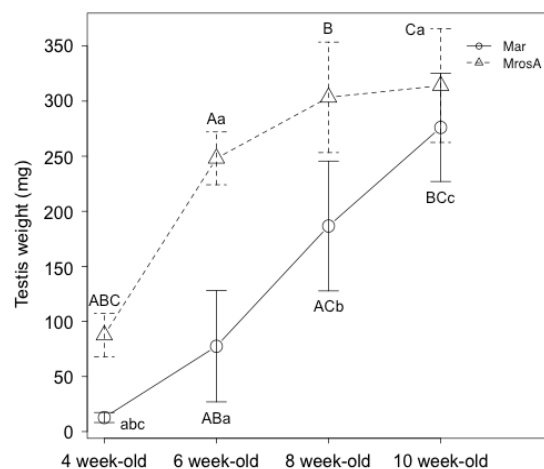


Fig. 1. Testis weights (mean ± S.D.) at 4-, 6-, 8-, and 10 week-old males in the Mar and MrosA laboratory *Microtus* strains. Means marked by the same letters differ significantly by $P < 0.05$ (upper case) or $P < 0.01$ (lower case).

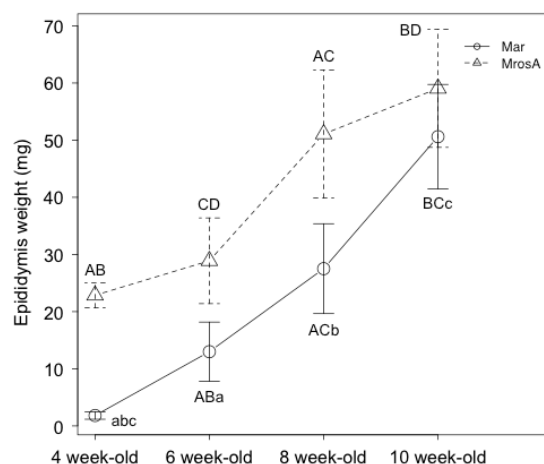


Fig. 2. Epididymis weights (mean ± S.D.) at 4-, 6-, 8-, and 10 week-old males in the Mar and MrosA laboratory *Microtus* strains. Means marked by the same letters differ significantly by $P < 0.05$ (upper case) or $P < 0.01$ (lower case).

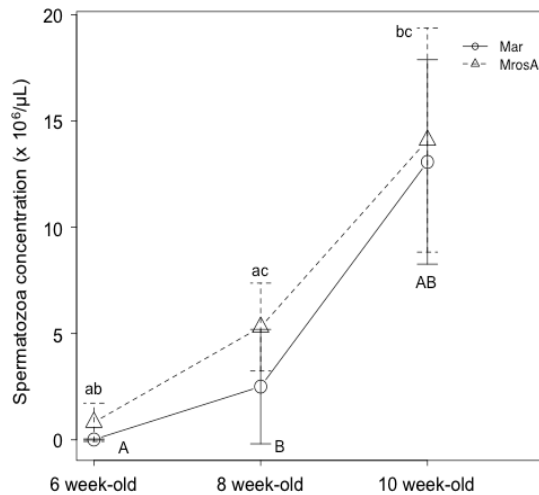


Fig. 3. Spermatozoa concentration (mean \pm S.D.) at 6-, 8-, and 10 week-old males in the Mar and MrosA laboratory *Microtus* strains. Means marked by the same letters differ significantly by $P < 0.05$ (upper case) or $P < 0.01$ (lower case).

考察

今回の解析により、Mar 系統（ユーラシアハタネズミ由来）および MrosA 系統（ロシアハタネズミ由来）の成長に伴う精巣、精巣上体および精子濃度の増加パターンに違いがあることが明らかとなった。Mar 系統の精巣および精巣上体の重量は、週齢の経過とともに、次第に増加する傾向であった。しかし、MrosA 系統では、精巣の重量が4週齢から6週齢にかけて、精巣上体の重量が6週齢から8週齢にかけて、大きく増加する傾向があり、組織重量からみれば MrosA 系統の方が精巣および精巣上体の発達開始の時期が早いと推測された。これは精巣上体尾部の精子濃度の上昇パターンの結果を支持するものであり、Mros 系統では6週齢以降での精子濃度の上昇が認められたが、Mar 系統では、精子濃度の上昇は8週齢以降であった。つまり、MrosA 系統の方が精子形成の開始が早く、Mar 系統よりも MrosA 系統の方が早熟型であると考えられた。Mros 系統はハタネズミ系統の中でも繁殖成績（産仔数および連産性）が良いことが知られている（Widayati et al. 2003）。これらの繁殖特性に早熟性が付加されれば、より扱い易い有用なハタネズミの実験動物として認知されるであろう。一方、飼育下ユーラシアハタネズミ (*M. arvalis*) を用いた先行研究 (Miska et al. 2014) によると、ユーラシアハタネズミの高品質な精液性状が得られる時期は8週齢から10週齢であるとされており、精子濃度の上昇が8週齢以降であった Mar 系統（ユーラシアハタネズミ由来）も

同様である可能性があった。今後は、更に他の精子パラメーター（精液性状形質）である精子の生存率や運動性、奇形率などを調査することで、より正確で詳細な Mar 系統と MrosA 系統のオスの性成熟の特徴が明らかになるものと期待される。

参考文献

- Borodin, P.M., Basheva, E.A., Torgasheva, A.A., Dashkevich, O.A., Golenishchev, F.N., Kartavtseva, I.V., Mekada, K., Dumont B.L. (2012). Multiple independent evolutionary losses of XY pairing at meiosis in the grey voles. *Chromosome Res*, 20, 259-268.
- Boyce, C.C., Boyce, J.L. (1988). Population biology of *Microtus arvalis*. I. Lifetime reproductive success of solitary and grouped breeding females. *J Anim Ecol*, 57: 711-722.
- Corbet, G.B. (1978). The mammals of the Palaearctic region: a taxonomic review. British Museum (Natural History) Publication, London.
- Kanda, Y. (2013). Investigation of the freely available easy-to-use software 'EZR' for medical statistics. *Bone Marrow Transplant*, 48: 452-458.
- Mallory, F.F., Dieterich, R.A. (1985). Laboratory management and pathology. pp. 647-384. In: *Biology of new world Microtus*. Special publication No. 8. (Tamarin, R.H. Ed.), The American Society of Mammalogist, Lawrence.
- 後藤信夫. (1979). ハタネズミ. pp. 283-289. 実験動物の飼育管理と手技 (今道友則 監修) (高橋和明, 信永利馬 編), ソフトサイエンス社, 東京.
- Miska, A., Kruczek, M., Kapusta, J., (2014). Sexual maturation in common vole (*Microtus arvalis*) males raised under laboratory conditions. *Folia Biol (Praha)*, 62: 135-142.
- Modi, W.S. (1987). Phylogenetic Analyses of chromosomal banding patterns among the Nearctic Arvicolidae (Mammalia: Rodentia). *Syst Biol*, 36: 109-136.
- Musser, G.G., Carleton, D.M. (1993). Superfamily Muroidea. pp. 894-1531. In: *Mammal species of the world: A taxonomic and geographic reference*. 3rd ed. Vol. 2. (Wilson, D.E., Reeder, D.M. Eds.), The Johns Hopkins University Press, Baltimore.
- Tkadlec, E., Zejda, J. (1995). Precocious breeding in female common vole and its relevance to rodent fluctuation. *Oikos*, 73: 231-236.
- Widayati, D.T., Mekada, K., Oda, S., Zholnerovskaya, E., Zakiyan, S.M., Fukuta, K. (2003). Reproductive features of the Russian vole in laboratory breeding. *Exp Anim*, 52: 329-334.
- Wolff, J.O. (1985). Behavior. pp. 340-372. In: *Biology of new world Microtus*. Special

publication No. 8. (Tamarin, R.H. Ed.), The American Society of Mammalogist, Lawrence.