

雌ヒツジの性周期に伴う雄ヒツジの性行動に関する研究

筑波大学大学院

生命環境科学研究科

生命産業科学専攻

博士（生物科学）学位論文

小 田 切 敬 子

目次

第1章 研究の背景

| | | |
|--------------------------------|-------|---|
| 1. ヒツジの起源と家畜化の経緯 | ----- | 1 |
| 2. 産業におけるヒツジの有用性と日本における飼養頭数の遷移 | ----- | 1 |
| 3. ヒツジの繁殖技術と問題点 | ----- | 3 |
| 4. 本研究の目的 | ----- | 4 |
| 5. 図 | ----- | 7 |

第2章 雄ヒツジの性行動の分類と解析

| | | |
|--------------------|-------|----|
| 1. 目的 | ----- | 11 |
| 2. 方法 | ----- | 12 |
| (1) 動物 | | |
| (2) 実験手順 | | |
| (3) 行動の分類と連鎖解析 | | |
| 3. 結果 | | |
| (1) マウンティングシリーズの検出 | ----- | 13 |
| (2) 連鎖解析 | ----- | 14 |
| ① 動作の推移数 | ----- | 14 |
| ② 11種類の連鎖推移の頻度 | ----- | 14 |
| ③ 性行動に見られた一連の動作推移数 | ----- | 14 |
| 4. 考察 | ----- | 15 |
| 5. 小括 | ----- | 18 |
| 6. 表 | ----- | 19 |
| 7. 図 | ----- | 22 |

第3章 プロジェステロン(P)測定用キットによる雌ヒツジの性周期判定

| | | |
|-----------------------|-------|----|
| 1. 目的 | ----- | 34 |
| 2. 方法 | ----- | 35 |
| (1) 供試ヒツジ | ----- | 35 |
| (2) 血中プロジェステロン濃度の定量測定 | ----- | 35 |
| ① 血清分離と保存 | ----- | 35 |
| ② 測定方法 | ----- | 35 |
| ③ 測定値の信頼性 | ----- | 36 |
| (3) 血中P濃度の定性測定 | ----- | 37 |
| ①測定方法 | ----- | 37 |
| ②定性判定 | ----- | 37 |
| (4) 統計解析 | ----- | 37 |

| | |
|---|---------|
| 3. 結果 | -----37 |
| (1) 標準曲線の作成と測定値の信頼性の検討 | -----37 |
| (2) 血中プロジェステロン濃度の定量測定 | -----38 |
| (3) 血中プロジェステロン濃度の定性測定と定量測定の比較 | -----38 |
| 4. 考察 | -----39 |
| 5. 小括 | -----40 |
| 6. 表 | -----42 |
| 7. 図 | -----43 |
| | |
| 第4章 雌ヒツジの性周期に伴う血中プロジェステロン濃度の変動と雄ヒツジの乗駕および 匂い嗅ぎ行動 | -----49 |
| 1. 目的 | -----49 |
| 2. 方法 | -----50 |
| (1) 動物と実験手順 | -----50 |
| (2) 血中プロジェステロン濃度の測定 | -----51 |
| (3) 行動の記録と解析 | -----51 |
| 3. 結果 | -----51 |
| (1) 血中プロジェステロン濃度と乗駕行動との関係 | -----51 |
| (2) 乗駕行動と匂い嗅ぎ行動との関係 | -----52 |
| (3) 乗駕および匂い嗅ぎ行動の持続時間 | -----53 |
| 4. 考察 | -----53 |
| 5. 小括 | -----55 |
| 6. 図 | -----57 |
| | |
| 第5章 性周期に伴う雌の排尿と雄の匂い嗅ぎ行動との関係 | -----61 |
| 1. 目的 | -----61 |
| 2. 方法 | -----61 |
| (1) 動物および飼育方法 | -----61 |
| (2) 行動の記録と解析 | -----62 |
| 3. 結果 | -----63 |
| 4. 考察 | -----64 |
| 5. 小括 | -----66 |
| 6. 図 | -----67 |
| | |
| 第6章 性周期に伴う雌ヒツジの尿に対する雄のフレーメン反応試験 | -----76 |
| 1. 目的 | -----76 |
| 2. 方法 | -----76 |
| (1) 尿の採取 | -----76 |
| ①動物および飼育方法 | -----76 |

| | |
|--------------------|---------|
| ②採尿方法 | -----77 |
| (2) 尿に対する反応試験 | -----77 |
| ①動物および飼育方法 | -----77 |
| ②反応試験とフレイメン判定 | -----77 |
| 3. 結果 | -----78 |
| 4. 考察 | -----79 |
| 5. 小括 | -----82 |
| 6. 表 | -----83 |
| 7. 図 | -----86 |
| | |
| 第7章 総括 | -----88 |
| 1. 総合考察 | -----90 |
| 2. 今後の展望 | -----92 |
| 3. 図 | -----93 |
| | |
| 謝辞 | -----95 |
| 本研究に関する学会発表および研究論文 | -----96 |
| 引用文献 | -----98 |

第1章

背景

1. ヒツジの起源と家畜化の経緯

ヒツジは家畜の中で、最も古くから野生動物から家畜化された動物で、文明の発祥とともにヒトと共同生活を営んできたと言われている。その起源は今から 8000 年以上前の西・中央アジアとされており、野生のヒツジは亜種を加えると 40 種以上いると言われている。おもなものは、中央アジア高原に生息するアルガリ (*Ovis ammon*)、ヨーロッパ南部地方に生息し、今なお地中海のサルジニア島、コルシカ島の山岳地帯に棲むムフロン(*Ovis musimon*)、トルキスタン地方からイラン、アフガニスタン、インド、パキスタンなど広汎に生息する草原羊のウリアル(*Ovis vignei*)、アラスカからメキシコの山岳にかけて生息するビッグホーン(*Ovis canadensis*)の 4 タイプに分けられる。そのうち家畜羊に関与しているのはウリアル、ムフロンおよびアルガリ (図 1) で、現在の家畜羊はウリアルを祖先とするものが最も多いといわれている。ビッグホーンはこれまで一度も家畜化されたことがないと言われている野生羊である。野生羊の生息している地方は緯度が 30~45 度で、標高は 6,000m にも及ぶ山岳地帯と高原である。そのような場所は年間の季節の変化が激しく、春から夏にかけては野草が多いが、秋には減少して冬にはほとんどなく、飼料条件の厳しいところである。このような環境のもとにおいて効果的に適応してきたのが家畜羊である (関澤 1988)。

現在では世界に約 11 億頭、3000 品種のヒツジが飼育されていると言われ、地域の土着羊とそれらの交雑によって、その品種の数は増えたと考えられている (福井 2004)。

2. 産業におけるヒツジの有用性と日本における飼育頭数の変遷

綿羊は多様性を持つ代表的な家畜である。分布は高山地帯から海岸、砂漠の乾燥地帯

から緑豊かな草原、赤道直下の暑熱地帯から寒さの厳しいアイスランドまでと広いことからわかるように、環境に適応する高い能力を持っている。利用する草種も幅広く、コケから木の枝まで、また穀類、根菜、枝葉、灌木、海草まで採食するため、飼料の利用性が高く、そのためヒトの家畜として管理し易い動物である。ヒツジが野生で生き残るために獲得した特性は人間生活にとって有用であったと考えられる。用途は多様で、羊毛、皮、肉、乳、毛脂、骨、血液あるいは観光用に利用される。羊毛はセーター、帽子、手袋などの紡ぎに使われ、皮はコート、カバン、靴などに加工される。肉質は良く、特に子ヒツジの肉はイギリスの王室料理やフランス料理界では最高の食材とされており、美味しさは世界が認めている。また高タンパクである上にビタミン・鉄分が豊富であり、その上、低カロリーであるためヘルシー志向に適しており、近年の需要は増えている。

外貌のかわいらしさからは観光用として、河川敷や果樹園、夏のスキー場などでは草刈り用としてヒツジを放牧することも有用である。さらにヒツジの堆肥は糞尿中の窒素含有量が他の家畜よりも高く、水分含量が低いため発酵が早く、肥料効果が高いことから畑作や果樹へも利用できる。

このように有用な家畜でありながら、日本における現在のヒツジの飼養頭数は非常に少なく、国策として羊毛生産が奨励された昭和 30 年代に 95 万頭にまで達したものの減少を続け、現在では 1 万頭前後で変動している状況である（図 2）。わが国の牛の飼養頭数が約 400 万頭、豚が約 900 万頭であるのに対して、ヒツジは比較にならないほど少ない頭数である。ヒツジの飼養頭数が増加しない理由として、昭和 20 年の敗戦後、質の高い羊毛が輸入され、国産品が値下がりしたこと、またこの頃にテトロンなどの化学繊維製品が出回り、国産羊毛は撤退せざるを得なくなったことが原因のひとつである。そのため、羊毛種から肉用綿羊の飼育に転換し、頭数は減少したと考えられる。さらに 1984 年に北海道十勝地方でヒツジ伝達性海綿状脳症であるスクレイピーの発症がはじめて確認された。これはカナダから導入されたサフォーク種がスクレイピーの感染因子である

異常プリオンを保有していたためと考えられている。

スクレイピーの発生が与えた影響は大きく、1933年には3万頭にまで回復した全国の飼養頭数は、ヒツジ飼育者の激減により再び減少に転じた。さらにヒツジスクレイピーが原因で起こると考えられている牛海綿状脳症が、2001年に千葉県、北海道、2004年には神奈川県、熊本県のウシで確認されたことなどが現在においてもヒツジの生産頭数を増加させない要因となっている。

しかしながら農家1戸あたりの頭数はピーク時の昭和30年には1.5頭であったのに対して平成20年度現在のデータでは1戸あたり17.4頭であり(図3)、必ずしも緬羊業が終息に向かっているわけではないことを示唆している。

3. ヒツジの繁殖技術と問題点

ヒツジは季節繁殖性の動物で、日本のように四季のある国では日照時間が短くなる秋から冬にかけて繁殖可能となる。このため、ヒツジは短日性動物と言われる。雄ヒツジは明瞭な繁殖季節をもたないが、季節によっては精巣重量・性欲・精液性状などに変化が見られ、繁殖季節以外での交配による受胎率は一般に低い。一方、雌の繁殖季節は9月以降に始まり、妊娠しなければ10回前後の発情を繰り返し、2月頃には終了する(戸苅ら1989)。非繁殖季節から繁殖季節への移行期である7～8月には、卵巣が徐々に活性化し、数個の卵胞も見られる。この時期に2～3ヶ月以上隔離していた雄ヒツジを雌ヒツジ群に導入すると2～4日後に排卵する。このことを“雄の効果”と呼ぶ(Cushwa et al. 1992, Gelez & Fabre-Nys 2006)。

交配法には自然交配と人工授精があるが、わが国では自然交配が一般的である。自然交配法では、交配された雌ヒツジおよび交配月日が確認できないため、分娩予定日が不明になり、分娩管理が困難となる。それゆえ、交配月日の確認を補うためにマーキングハーネスとクレヨンで種雄ヒツジに装着する方法が昔から現在においても実施されてい

る (Kennaway et al. 1984, Stoops et al. 2006)。群れのどの雌が発情しているのかどうかを確認するためには、マーキングハーネスとクレヨンを付けた試情雄 (図 4) を雌ヒツジ群に入れて発情発見をさせる。試情雄は、通常、①精管切除法、②精巣上体尾部切除法、③陰茎包皮手術法、などによる外科手術を施すことが多い。

このように試情雄を使って群れの雌の発情を確認するのだが、発情発見の実施は朝夕 1 回ずつ、毎日 2 回行うのが普通である。発情開始時間をより正確に知ることにより人工授精の適期も、より正確に知ることができるため、6～8 時間ごとに観察を行う必要がある。これは屋外飼育の場合には労力を要するため、容易な方法ではない。

人工授精は優秀な種雄ヒツジの精液を、より多数の雌ヒツジに交配できることから、育種改良を促進するだけでなく、季節外繁殖と併用することでさらに生産効率を高めることが可能となる。それゆえ多くの利点を有しており、古くから研究が行われてきた。しかしながら人工授精には設備や人件費がかかること、試情雄ヒツジの作成の必要性があること、発情発見および受胎率の低さ、あるいは技術者不足などの理由で現在においても普及していない。また、ヒツジの人工授精は世界的にも未だ確立されておらず、特に使用する精液の種類 (新鮮原精液、希釈性液、凍結精液) における比較研究 (Hiwasa et al. 2009) や人工授精の適期 (Beilby et al. 2009) についても研究途上の段階である。いずれにしても人工授精による高い受胎率の達成においては、発情発見と受精適期の確認が重要である。

4. 本研究の目的

前述したように、ヒツジは家畜として有用性が高いため需要は多い。しかしながら改良や増産は順調に進んでいないため、我が国においては供給ができない現状にある。この主な原因は、良好な種畜の選抜や更新がなされていないこと、あるいは雌の受胎率や産子率に代表される繁殖能力が低いためである。この現状を改善するためには、人工授精技術や

周年繁殖技術を確立して実用化することが重要である。このことは、以前から福井ら (1994) によって提唱されてきたが、雌ヒツジの発情誘起 (Candappa 2009, Matsuoka et al. 2006) や雄ヒツジの凍結精液に関する技術 (Fukui et al. 2007, Fukui et al. 2008) は、今だに研究途上にある。また、これらの技術の試行は必ずしも受胎率の向上には繋がっておらず、ホルモン投与などの人的な操作よりも種雄ヒツジの生殖状態の個体差や受精適期、あるいは牧場内での雌ヒツジの飼養管理、各個体の健康状態などが重要であるとも考えられる。

我が国は人口の数倍のヒツジを飼育しているオーストラリアやニュージーランドとは異なり、小規模でのヒツジの飼養管理が行われているため、日本の風土にあったヒツジの繁殖技術の開発を検討することは重要であろう。小規模ゆえに可能である個体管理を重要視した繁殖体系においては、受胎率に影響を与える個々の行動管理も可能である。それゆえ、もし比較的簡便な行動観察から雌の発情周期や雄の生殖状態を予想できるのなら、受精適期を簡単に判断でき、人工授精技術への応用に貢献できると考えられる。

一般に発情した哺乳動物の雌は、外部生殖器や性行動に顕著な変化を示す。たとえば、ニホンザルでは性皮の発色や腫脹が顕著であったり、雄への積極的な接近が観察されている (大島 1982)。一方、ウシ、ブタおよびヤギでは外陰部の腫脹、充血、また活動性の昂進や発声の増加あるいは他からの雌から発情雌への乗駕が観察されている (Craig 1981)。またネコでは発声が頻発し、背部を圧迫するとロードーシスを起こすことが知られている (Craig 1981)。

しかし、雌ヒツジは他の家畜と比べて外部生殖器や行動に顕著な変化を示さないため、外見上雌ヒツジの発情を確認することは難しい (正木 1992)。一方、雄ヒツジは明瞭な繁殖季節性を示さないと言われているが、繁殖期に雄ヒツジは雌に対して性行動を示し、発情中の雌を群れの中から選択する。従って、雄ヒツジの雌に対する性行動を把握することは、雌ヒツジの発情を的確に判定して、性周期をも予測する最良な方法であろう。正木

(1992) は、性行動は狭義には完了行動およびそれらに繋がる性的欲求行動をさすが、広義には狭義の性行動を全般的に刺激する行動的变化も含まれると述べている。この定義に従って、過去の報告から雄ヒツジの性行動を分類すると、前肢でかくまたはナジング、こする、押す、フレーメン、鼻つけ、乗駕が挙げられる (Banks 1964, Gordon et al. 1969, Hafez 1975, Houpt & Wolski 1982)。しかし、これらの行動が一連の性行動の中でどのように連鎖するのかは明確にされていない。

多くの性行動の研究は、性ホルモン投与など的人為的処理によって雌ヒツジの発情を誘発させ、その雌に対する雄の行動について観察するという手法を用いてきた (Lindsay & Robinson 1961, Lindsay & Fletcher 1972)。他方、自然発情の雌ヒツジに対する雄ヒツジの性行動を詳細に分類し、性周期に伴うそれらの変動を持続的に記録、解析するといった基礎的な研究はほとんどなされてこなかった。

そこで本研究では、迅速かつ簡便に行える行動観察を応用して雌ヒツジの性周期を明確にし、性周期にともなって雄ヒツジがどのような性行動を発現しているのか、また雄はどのようにして雌の性周期を判断し、雌との生殖行動へ移行しているのかどうかを明らかにすることを目的として一連の研究を行った。

第2章

雄ヒツジの性行動の分類と解析

1. 目的

動物の行動は一つの動作が単発的に起こるのではなく、一連の流れの中でいくつかの動作が連鎖することによって形成される。ゆえにこれらの一連の行動を最小の単位動作に分割してそれらの連鎖を明確にすることは、行動を定量化して統計学的手法を用いて解析することになる (Odagiri et al. 1999, Jensen 1983, Fabre-Nys & Venier 1987)。また一連の動作パターンを客観的に評価したり、個々の動作の機能を知る上でも有効である。特に性行動の研究においては、雄は発情期の雌獲得のために繰り返して性的アプローチを行うため、これらを単位動作に分類して動作パターンを調べることは、発情期の動物たちの行動を予測して繁殖率を高めることに有効であると考えられる (Odagiri et al. 1995a)。

ヒツジの性行動に関する研究は、1960年代から1970年代に精力的に行われてきた (Radford et al. 1960, Beamer 1969, Clegg 1969, Gordon 1969, Bryant 1973, Hafez 1975)。しかし、その当時の技術では性行動を長時間持続的にビデオテープレコーダーなどに記録することは困難であり、多くは直接観察法による行動を記述する方法によって研究がなされてきた。

その中で Banks (1964)は、先駆的研究として16 mm映写機によって映像を記録し、再生後に行動を解析する手法をとった。そして雄ヒツジの性行動として雌ヒツジの外陰部と尿に対する鼻つけ、尿に対するフレーメン、および前肢上げについてイラストでその連鎖を示した。しかし、それは短時間の性行動の記録であり、一性周期記録のような長期間にわたる性行動の解析ではなく、また頻度や持続時間を計るといった数量的な行動の解析や統計学的解析はなされなかった。

交尾やそれに係わる行動については、Hafez & Scott (1962)、Gordon et al. (1969)、Hafez (1975)、Haupt & Wolski (1982)などによって報告されているが、それらはいずれも Banks

(1964)の論文を引用したものであった。このように、ヒツジの性行動に関する解析は不十分であり、一連の性行動を構成する各行動要素の機能は未だに明確にされていない。

そこで、本研究では雌雄ヒツジを発情開始前からペアリングさせ、発情終了までのすべての行動をタイムラプスビデオシステムを用いて持続的に長時間記録した(図5)。そして、まず観察された性行動を分類した。さらに発現する各々の動作数を調べて繁殖期における雄ヒツジの雌に対する動作の推移を数量化して統計学的解析を行った。

2. 方法

(1) 動物

コリデール系の交雑種、雄2頭(A, B)、雌4頭(A-1, A-2, B-1, B-2)を用いた。雌は経産であり、雄は交配経験があった。雄の年齢は3歳(A)と5歳(B)、雌はA-1が3歳、A-2が4歳、B-1が2歳およびB-2が5歳であった。体重は雄A70 kg、B90 kgで、雌はA-1が40 kg、A-2が34 kg、B-1が36kgおよびB-2が45kgであった。

(2) 実験手順

雄Aに対して雌A-1、A-2、雄Bに対して雌B-1、B-2の組み合わせでペアリングを行い、4ペアについて屋外実験場(約28 m²)で調査した(図5)。調査は1992年7月12日から15日(ペアNo.1: AとA-1)、9月6日から12日(No.2: BとB-2)に行った。ペアリング開始からの全ての行動をタイムラプスビデオシステム(Videorecorder: HITACHI, CAMERA: SONY)によって持続的に記録(3フレーム/1秒)した。テープ交換は、毎日午前9時に行った。夜間撮影のために照明を実験場に設置した。照明用蛍光灯(60W)は60ルクスを基準に自動点灯、あるいは消灯するようにセットした。餌は朝夕2回、NRC飼養標準(吉本 1991)に準拠して与えた。水および固形塩は常置した。

(3) 行動の分類と連鎖の解析

Robertson(1977)の定義に従って、発情期を雌が雄を許容する期間とした。また、雄が雌に追従または接近し、乗駕にいたるまでの一連の行動をマウンティングシリーズ (MS) と定義した (Enomoto 1974, Odagiri et al. 1995)。さらに Hafez (1975)、Banks (1964)あるいは小田切・松沢 (1993) の分類に準拠して、MS における一連の単位動作を、①顎乗せ (Chin resting: CR)、②フレーメン (Flehmen: Fl)、③追従または接近 (Following or Approaching: F/A)、④乗駕 (Mounting: Mo)、⑤鼻つけ(Nosing: No)、⑥ナジング(Nudging: Nu)、⑦押す(Pushing: Pu)、⑧前駆のひねり(Twisting: Tw)とした(表 1, 図 6-1~6-8)。

行動の解析は VTR スロー再生によって行い、秒単位で単位動作を記録する連続記録法 (Odagiri et al. 1995a)を用いて、全ての MS を解析した。さらにそれら全てを先行と後続の 2 単位の動作を 1 組にして分割し、先行動作と後続動作から成る推移行列を構成した (Martin & Bateson 1986)。推移行列において、例えば鼻つけから鼻つけへの推移といったような同一動作が連続する推移は含めなかった。 χ^2 検定による cell-by-cell テスト (Fagen & Mankovich 1980, 粕谷・藤田 1984) は、推移が偶然起こったと仮定された期待値より統計学的に有意に多いかどうかを検定するために実施された。MS の解析はあらかじめトレーニングされた 2 人の観察者によって行われた。トレーニングは 30 フレーム/1 秒で録画されたビデオテープを使い、8 単位動作における観察者間一致度が 80%以上になるまで行われた。

3. 結果

(1) マウンティングシリーズ (MS) の検出

4 ペアにおいて発現した MS は合計 774 であった(表 2)。ペア No.1,3,4 における MS の平均発現頻度は 125 回 (113~147 回) であった。ペア No.2 における MS の発現頻度は、他のペアの約 3 倍に達した。

MS を構成する平均単位動作数は乗駕を含めて 4.9~6.0 であり、4 ペア間において有意差が認められた ($P<0.05$)。そこで、さらにペア間で検定 (t 検定) を行った結果、No.1

と 3 では No.2 と 4 よりも単位動作数は有意に少なかった ($P<0.05$)。しかし、No.1 と 3 および No.2 と 4 との間には単位動作数について有意差は認められなかった。

(2) 連鎖の解析

① 動作の推移数

4 ペアにおいて検出された連鎖推移の数は全部で 3369 推移であった。表 3 に推移行列を示し、最上段には実際に観察された連鎖推移の数を示した。F/A→Tw (399)、Tw→Nu (361) がもっとも頻度高く発現し、この 2 種類で全体の 10%以上を占めた。次に多く発現した推移は、Tw→Mo (242)、F/A →No (236)、Nu→Tw(211)であった。100 推移以上を数えた組み合わせは、Nu→Mo (194)、No→Tw (187)、No→Nu (143)、F/A→Nu (137)、Tw →No (122) であった。これらの 10 推移の合計は 2232 推移であり、全体の 66%を占めた。発現推移数が 100 以上 (3%以上) であるこれら 10 種類の実測値をもとに作成した行動の流れ図を図 7 に示した。推移検定の結果、観察値が期待値よりも有意に高くなった推移は 11 種類であった (表 3)。連鎖推移における先行動作の内訳は F/A、CR、Tw、Nu であり、それぞれ F/A から CR、No、Nu、Pu、Tw へ ($P<0.001$)、CR から Mo、Nu、Pu へ ($P<0.05$)、Tw から Nu ($P<0.01$)と Mo ($P<0.05$)へ、および Nu から CR へ ($P<0.01$) の推移であった。

② 11 種類の連鎖推移の頻度

統計学的に有意に推移した 11 種類の連鎖(表 3)の頻度を図 8 に表し、どの後続動作が統計学的に有意に発現するか χ^2 検定を行った。F/A に後続する Tw は No、Nu、CR、Pu のどの動作よりも有意に高い頻度($P<0.001$)で観察された。F/A に後続する No、Nu、CR、Pu の発現回数はそれぞれの間で有意差 ($P<0.01$) が認められた。Nu は Mo よりも有意 ($P<0.001$)に高く Tw に後続した。また、Nu と Mo は Pu より有意 ($P<0.001$)に高く CR に後続した。

③ 行動に見られた一連の動作推移数

上記推移行列の結果と連鎖推移の頻度解析をもとにして流れ図を示した (図 9)。その結果、この流れ図から統計学的に有意に推移し、乗駕に至る 7 パターンの MS が検出された。それらは、①F/A-Tw-Mo, ②F/A-Tw-Nu-CR-Mo, ③F/A-Tw-Nu-CR-Nu-CR-Mo, ④F/A-Nu-CR-Mo, ⑤F/A-Nu-CR-Nu-CR-Mo, ⑥F/A-CR-Nu-CR-Mo, ⑦F/A-CR-Mo であった。これら⑦パターンのうち⑥パターンの MS において、F/A から Nu あるいは CR を介して Mo に至った。Pu は F/A あるいは CR に続いて優位に推移したが、Mo には直接推移しなかった。No は F/A に続いて発現したが、その後特定の行動には有意に推移しなかった。また Fl は、行動連鎖において有意に推移しなかった。

4. 考察

ペア No.2(B×B-1)において MS の発現回数は他のどのペアよりも多く、また雄が A であるペア No.3(A×A-2)は No.1(A×A-1)より、雄が B であるペア No.2(B×B-1)は、No.4(B×B-2)より MS を構成する平均動作数は有意に多かった (表 2)。ペア No.2(B×B-1)において MS が最も多く発現した理由は 2 種類考えられた。それらは、①雌 B-1 は 2 歳の未経産羊であるため雄 B の乗駕をうまく受け入れられず、雄 B が乗駕をするたびに前進して不動の姿勢を保てなかった。それゆえ雄 B は乗駕が成功するまで、その試みを繰り返した。②雄 A より体が大きく性的経験が多い雄 B が、より性的魅力が高い雌 B-1 に執着した、といったことが考えられた。例えば雌 B-1 が他の雌よりもエストロジェン (E) 濃度が高い上に分泌持続時間が長く、排卵数が多いといったような内分泌的条件により、雄をより惹きつけたとも考えられる。

雌の内分泌の動態には、品種間差があることは知られている (Cahill et al. 1981, Simetzis et al. 2006, Ben Said et al. 2007)。それゆえ、今後は発情中の雌の性的魅力について (Tilblook & Lindsay 1987)、あるいは雄を惹きつける雌の条件となりえる年齢や品種の違いを考慮した性行動の研究も検討される必要があるかもしれない。

本研究において理論的に有意に高い頻度($P<0.05$)で発現すると考えられた 11 推移のうち 5 種類(F/A-Tw, Tw-Nu, Nu-CR, CR-Nu, CR-Mo)は実測値においても頻度が高かった(図 8)。また、MS を構成する単位動作数の平均は乗駕を含めて 5~6 (表 2) 動作であったことを考慮すると、7 パターンの MS のうち F/A-Tw-Nu-CR-Mo が最も起こり易い推移と考えられた。また、Nu と CR は相互に有意に推移するという解析結果から、それらは密接な相互関係を持っていると考えられた。Nu と CR は前肢あるいは顎によって雌ヒツジの尻部に接触する動作である。これらの 2 種類の動作は、雌ヒツジに接触することが目的であり、そのことによって雌ヒツジに誘いかけをしているのかもしれない。また、雄は雌ヒツジの発情の度合いを知るために、接触に対する反応を確かめている可能性も考えられる。

我々ヒトが、行動観察の手法を用いて雌ヒツジの発情判定をする場合には、①雌が雄の乗駕の試みから逃げない、②雌が雄を探す、といった行動を判断基準にしている (Bland & Jubilan 1987, Blissitt et al. 1990a,b)。その判断基準に照らし合わせて雄ヒツジの行動を推察すると、雄の Nu と CR は雌の性的受容度を確かめる行動として発現していると考えられた。

F1 は匂い嗅ぎに関わる行動であり、雌の尿か外陰部の No による嗅覚刺激によって雄に性的な行動を発現させるという意味では広義 (間接的) の性行動と考えられる。本研究における統計学的な連鎖解析においては、F1 はどの行動にも推移しないで単独で発現した。また実測値の MS においては F1 は 2 回しか発現せず、この結果からでは F1 が雄の性行動の 1 種とはいえない。しかしながら、実際には F1 は対象物の匂いを嗅いだ後に発現する行動であって、単独にこの行動が起こるわけではない。それゆえ、本研究における連鎖解析の結果だけでは F1 の持つ機能について言及するのは難しかった。

雄ヒツジやヤギの F1 は鋤鼻器官によるフェロモン検出に関係しており、雄が雌の尿や外陰部の匂いを探査することによって引き起こされると言われている (Estes 1972, Ladewing et al. 1980, Melese-d'Hospital & Hart 1985)。また雄ヒツジの F1 は発情期あるいは非発情期の雌のどちらの尿に対しても起こるが、雌の性周期において発現回数に変

動することから、F1の機能は雌の生殖に係わる生理状態を識別しているという報告がある(Bland & Jubian 1987)。

行動観察の手法を用いたヒツジの性行動の研究においては、O'Brien (1982)はどのような行動連鎖の中でF1が発現して乗駕に至るのかを報告した。これは2年間に渡る野生化ヤギを観察したもので、雄ヤギが雌の尿に対してF1を発現した場合、75%は雌への行動を停止させたが、残りの25%は求愛行動へ推移したと報告された。このことから雄ヤギは求愛行動を開始するか、雌への相互行動を停止するかをF1によって決定していると結論している。

この結果は、本研究においてF1がその後のどの行動にも有意に推移せず、行動を終結させた結果と一致した。一方、残り25%の行動が求愛行動へと推移した結果は、本研究とは一致しなかった。また本研究では、MSの中で発現するF1についてのみ解析しており、この時の雌は発情中であることが絶対条件で、性周期のさまざまな生殖ステージにおける観察結果ではなかった。そのためF1の発現回数は少なく、結果として統計学的な有意差は検出されなかった。つまり、このことは雄のNo→F1の連鎖行動が雌の発情期には発現しないことが示唆されている。

Bland & Jubilan (1987)は、性周期における9頭の雌の性行動と雄のF1との関係について調べており、尿および外陰部に対するF1は、発情前日(-1日)にピークを示し、発情期(0日)には最低頻度になったと報告した。この結果は、本研究においてF1の発現回数がMSにおいてほとんど発現しなかったことと一致した。

性行動は狭義には求愛、交尾、挿入、射精という完了行動およびそれらに直接つながる性的欲求行動であり、広義には狭義の性行動を全般に刺激する行動的变化をも含めると正木(1992)は定義した。その定義に従えば、追従から連鎖的に乗駕に至る一連の行動は、狭義(直接的)の意味での性行動であり、その一連の性行動から時間的に外れて起こると予想されるF1とNoは嗅覚刺激により行動を変化させる広義(間接的)の意味での性行動と考えられるであろう。それゆえ、嗅覚的探查行動と考えられるNoとF1の性行動として

の機能について考えるためには、雌の発情期にのみに着目するのではなく、性周期に伴う Fl と No の発現パターンを把握することが重要であると考えられた。

5. 小括

発情期ペアリングした時の雄ヒツジの性行動について調査した。雄が雌に追従または接近し、乗駕にいたるまでの一連の性行動（マウンティングシリーズ）について解析を行った。その結果、マウンティングシリーズ（MS）において観察された行動要素は、追従または接近（Following or approaching）、顎乗せ（Chinresting）、押（Pushing）、前駆のひねり（Twisting）、ナジング（Nudging）、鼻つけ（Nosing）、フレーメン（Flehmen）、乗駕（Mounting）の 8 種類であった。さらにこれらについて行動連鎖の解析を行ったところ、MS は追従または接近、ナジング、顎乗せ、前駆のひねり、乗駕の 5 種類の動作から統計学的に有意に高い推移を示す流れ図を構成した。また匂い嗅ぎ行動であるフレーメンと鼻つけは乗駕への直接的な連鎖には至らなかったが、これらの行動の機能について考察するためには雌の性周期に伴う雄のフレーメンと鼻つけ行動の発現回数の変動を調べることが重要であると考えられた。

第3章

プロゲステロン測定用キットによる雌ヒツジの性周期測定

1. 目的

プロゲステロンは主に黄体から分泌されるステロイドホルモンであり、血中プロゲステロン濃度の動態は黄体機能を的確に把握するための有力な指標となる (Walton et al. 1977, 田中ら 1988)。雌ヒツジの性周期は 16~17 日 (Pant et al. 1977, Robertson 1977) であり、前の周期において受精、着床および妊娠が成立しなかった場合、プロゲステロンの低下とともに卵胞が発育し、さらにエストロジェンが増加して発情が起こる。ヒツジの場合、エストロジェンの血中濃度が高い値を示している期間は 8~10 時間 (Pant et al. 1977) であり、その後 LH サージ (約 6 時間) が起こり、続いて排卵が起こって黄体期 (プロゲステロン増加期; 約 1 週間) へと移行する。黄体期は発情期に比べて長いこと、あるいはプロゲステロン濃度の変動はエストロジェンより緩やかであることからプロゲステロン濃度を測定すれば比較的容易に性周期のステージを知ることができる (Pant et al. 1977, Cahill et al. 1979, Walton et al. 1977)。

近年、性ステロイドホルモンの高感度測定が迅速かつ簡便に行え、再現性と信頼性が高い方法として、酵素免疫法 (EIA; Enzyme immunoassay) が開発されてきた (Johanson et al. 1985, 平子 1989, 中尾 1989)。すでにウシ (Van De Wiel et al. 1982, Singhanjan 1982, Arnstadt & Cleere 1981, 田中ら 1988)、ウマ (Borst et al. 1986)、ブタ (Moriyoshi et al. 1996, Moriyoshi et al. 1997) においては早期妊娠診断や発情鑑定のためにプロゲステロン濃度を測定する際、EIA 法を用いることが報告されている。しかし、ヒツジにおけるプロゲステロン濃度測定のための EIA 法の応用については報告されていない。そのため、実際に利用する際にはその信頼性を確かめる必要がある。

そこで、市販のウシ血中プロゲステロン測定用 EIA キット (平子ら 1987, 竹内ら 1987) および牛乳用 EIA キットを使用して、雌ヒツジの血中プロゲステロン濃度の定量

および定性測定を行い、本測定キットの利用により雌ヒツジの血中プロジェステロン濃度の変動を捉えることができるかどうかを検討した(小田切ら 1994)。

2. 方法

(1) 供試ヒツジ

性成熟したコリデール系雑種雌 9 頭を使用した。9 頭のうち 1 頭は未経産羊 (No.1)、残り 8 頭 (No.2~No.9) は経産羊であった。体重は 27 kg~70 kg、年齢は 2.2 歳~6.8 歳であった。これらのヒツジは一隅にシェルターが設置してある茨城大学農学部応用動物行動学所有の屋外パドック (16~32 m²) において飼育された。実験期間は 1993 年 7 月から 12 月までであった。餌は NRC 飼養標準 (吉本 1991) に準拠して 1 日 2 回与えられ、水および固形塩を常置した。

(2) 血中プロジェステロン濃度の定量的測定

① 血清分離と保存

採血は雌雄を同居した初日を 0 日とし、隔日あるいは連日 (1 頭につき 9~13 回) で午前中に行った。血液は雌ヒツジの頸静脈から 5.0ml を採取した。血液は凝血後すみやかに 2800 rpm 18 分間 4°C で遠心し、血清を分離した。血清は定量的測定をするまで -80°C で凍結保存した。

② 測定方法

プロジェステロン濃度は血液用 EIA キット (オブチェック血液用 EIA キット ; Cambridge Life Science Co. LTD.) を用いて測定した。測定操作は 96 穴マイクロタイタープレートのウェル内に抗プロジェステロン抗体を固相化し、これに対して血液中のプロジェステロンと酵素標識プロジェステロンとを競合して結合させる第一抗体固相法による EIA 法であった。以下に測定原理および方法を述べる。

マイクロタイタープレートのウェル内に抗プロジェステロン抗体が固相化しており、検体または標準プロジェステロンをそれぞれのウェル内に加える ($10 \mu\text{l}$) と、ウェル内のプロジェステロンが抗プロジェステロン抗体と結合する。さらに酵素標識プロジェステロン (アルカリフォスファターゼ標識、 $200 \mu\text{l}$) を加え、結合していない抗プロジェステロン抗体と標識プロジェステロン抗体とを結合させた。これを 30 分間室温に放置し、その後、未結合のプロジェステロンを蒸留水で洗浄し、基質 $200 \mu\text{l}$ (パラニトロフェニルリン酸、ジェタノールアミン、塩化マグネシウム、室温 30 分放置) を加えて酵素標識プロジェステロンを反応させて発色させた。それに試薬 $100 \mu\text{l}$ (オルトリン酸一水素二カリウム、エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム) をそれぞれのウェルに加えて反応を停止させた。発色の度合いは吸光度を測定することにより定量した。吸光度の測定にはマイクロプレート用分光光度計 (MTP-22 コロナ電気株式会社、 405 nm) を用いた(図 10)。

③ 測定値の信頼性

キット供えつけの標準プロジェステロン (10 ng/ml) を 2 倍段階希釈法でリン酸緩衝液 (PBS) を用いて 8 段階($1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128, 1/256$) に希釈して検量線を求めた。4 濃度 ($1/1, 1/2, 1/4, 1/8$) を用いて標準直線式を求め、検体のプロジェステロン濃度を求めた。

測定値の再現性を確かめるために、2 濃度 (中濃度、低濃度) について 6 回反復測定し、血中プロジェステロン濃度の測定内変動を調べた。また、2 濃度 (中濃度、高濃度) について測定間変動を調べた。標準プロジェステロンの測定値の信頼性を確かめるために、血清サンプルを 2 段階希釈法で PBS を用いて 8 段階希釈し、2 回反復測定した。そして標準プロジェステロンと血清との間の平行性を調べた。添加回収試験には、低プロジェステロン濃度の雌ヒツジ血清 (0.44 ng/ml) を用いた。プロジェステロン (東京化成工業社製 P478) をエタノールで融解 (1 mg/1ml) し、これを蒸留水で 100 倍希釈した。さらにリン酸緩衝液で希釈して既知の量のプロジェステロン ($0.25 \text{ ng}/\mu\text{l}, 0.2 \text{ ng}/\mu\text{l}$) を $50 \mu\text{l}$ の

血清に加えて 2 種類の濃度 (5.0 ng/ml, 9.5 ng/ml) に調整した。

(3) 血中 P 濃度の定性測定

① 測定方法

血中 P の定性測定には牛乳用 EIA キット (オブチェックカウサイド・W ; ケンブリッジライフサイエンス社) を使用した。測定原理は血液用 EIA キットと同様である。測定操作の概略を図 11 に示した。本法では、標準および血液は付属のスポイド、また酵素標識 P 液、気質液は試薬瓶からの滴下で行い、未結合の酵素標識の分離を流水中で行った。また、測定に要する時間は約 1 時間であった。

② 定性判定

定量測定する際に分注した血清をもちいて定性測定した。P 濃度の判定は肉眼により 2 人で行った。呈色の度合いで + (P 濃度 > 5 ng/ml)、± (1~5 ng/ml) および - (< 1 ng/ml) の 3 段階に評価した。その際、標準液による呈色と同程度の発色 (青) を呈したものを ± とし、それよりも濃い色 (濃青色) を -、薄い色 (淡青色~無色) を + とした。

(4) 統計解析

信頼性の推定とそれらの 95% 信頼限界を、Bliss (1952) の方法によって計算した。直線性と平行性の検定は、佐久間 (1964) の方法によった。定性測定値と定量測定値との相関を Kendall の順位相関によって検定した。

3. 結果

(1) 標準曲線の作成と測定値の信頼性の検討

標準プロジェステロンの希釈に伴う吸光度の変動を図 12 に示した。標準曲線は、1.25 ~ 10 ng/ml の範囲で直線性を示した。また、2 種類 (10.3 ng/ml, 12.1 ng/ml) の血清サ

ンプルについては2~8倍希釈の範囲で直線性を示した。またこれらの直線は、標準曲線の間平行性(10.3 ng/ml vs 標準 : $F(1, 6)=5.03$, $P>0.05$, 12.1 ng/ml vs 標準 : $F(1, 6)=5.03$, $P>0.05$) が認められた。

行った。雌ヒツジの血清(プロジェステロン濃度 : 0.44 ng/ml) に2濃度のプロジェステロンを添加して、計算上の期待値を9.5 ng/ml および 5.0 ng/ml とした。それぞれのサンプルについてプロジェステロン濃度を測定した結果、9.4 ng/ml および 5.7 ng/ml で、回収率はそれぞれ 99% および 113% であった。2濃度について行った血中プロジェステロン濃度の測定内変動係数は、中濃度検体(2.96 ng/ml) では4.7%、低濃度検体数(0.73 ng/ml) では16.4% であった。また、測定間変動係数は中濃度検体(2.46 ng/ml) では4.4%、高濃度検体(8.99 ng/ml) では20.3% であった。

(2) 血中プロジェステロン濃度の定量測定

9頭の雌ヒツジにおける、プロジェステロン濃度の定量測定結果を図13に示した。性周期におけるプロジェステロン濃度の1サイクルの動態を最も良く捉えられた個体はNo.3とNo.5であり、濃度は8日間以上かけてゆっくり上昇した。黄体期におけるプロジェステロン濃度のピークは4.3~10.0 ng (Mean \pm SE, 8.2 ± 0.6) で1~3日間続いた。その後、濃度の上昇に比べて比較的早く(2~5日間 : 2.8 ± 1.2 日) 濃度は下降した。そして低値0.69~0.9 ng/ml (Mean \pm SE, 0.71 ± 0.02) は2~5 (2.9 ± 0.8) 日間続いた。経産羊(高値 : 8.3 ng/ml, 低値 : 0.8 ng/ml) と未経産羊の間にはプロジェステロン濃度に差はみとめられなかった。

(3) 血中プロジェステロン濃度の定性測定と定量測定の比較

最も典型的な性周期を示した3頭の雌ヒツジについての定性および定量測定の結果を図14に示した。定性測定により、性周期における血中P濃度のおおよそその変化が読み取れた。結果は、定量測定によるものと概ね一致した。同様の成績は、今回調査した残りの6頭に

についても得られた。また、7月4日から11月9日にかけて定性測定を行った総検体数58（表4）のうち、－判定は7、±は13、＋判定は38検体あった。これらについて、定量測定値との相関関係について調べた結果を図15に示した。－判定におけるP濃度は 0.13 ± 0.01 （平均値±標準誤差；ng/ml）、±判定は 1.93 ± 1.53 、＋判定は 6.23 ± 2.50 であり、P濃度と定性測定との間に有意な相関関係が認められた（ $\tau=0.585$, $P<0.01$ ）。

4. 考察

エストロゲンとプロジェステロンはともに卵巣から分泌される主要なステロイドホルモンである。それゆえ、雌ヒツジの発情を内分泌学的に判断するにはエストロゲンとプロジェステロン濃度の変動を測定することが重要である。しかしながら、発情期においてエストロゲン濃度が上昇している期間は比較的短期間（Pant et al. 1997）であり、また濃度の変動も激しいため、エストロゲンの変動を捉えるには頻回の測定が必要である。その測定には血液を利用することが有効であるが、そのためには雌ヒツジの頸静脈から頻回の採血をすることが必要となる。このことは雌ヒツジに大きな負担をかけるため、近年の苦痛の軽減を重要視する動物福祉の理念からも推奨される方法ではないと考えられた。

一方、ヒツジの黄体期は約2週間であり、その変動も比較的緩やかであるため、エストロゲンよりも長い間隔でプロジェステロン濃度を測定することにより、その動態を比較的容易に把握することができる（竹内ら 1987、l'Anson & Legan 1988）。そのため本研究では、上記の理由から血中エストロゲン濃度の測定はせず、プロジェステロン濃度のみを測定することにした。またその際、血液中プロジェステロンの高感度測定が迅速かつ簡便に使えるプロジェステロン濃度測定用EIAキットを使用した。本測定キットは固相法によるEIA（enzyme immuno-assay）法を採用している。EIA法は標識物質として酵素を利用し、酵素反応による増幅作用と検出感度の高い基質を利用することにより、標識物質として放射性ヨウ素を利用するRIA法よりも高い測定感度が期待できる。また本測定キットは、ウシおよびウマの血液用キットとして開発されたものであったが、本実験におい

て標準プロジェステロンおよび血清サンプルについての検量線の作成、添加回収試験、測定内変動および測定間変動で良好な結果が得られた。また、ウシにおけるプロジェステロン濃度を EIA 法と RIA 法の両方で測定でき、両者間の濃度は高い相関を示すことは知られている (Chang & Estergreen 1983, l'Anson & Legan 1988)。ヒツジのプロジェステロン濃度を RIA 法で測定した報告では高値は 3~6 ng/ml であった (Pant et al. 1977, Quirke, J.F. 1979)。これらの値は、高値においては本章における結果より若干低い傾向が見られたが、低値あるいは性周期における動態においては類似していた。従って、本キットによりヒツジの血中プロジェステロン濃度は正確に判定され、信頼性および再現性の高い結果が得られたと判断された。

また図 13 のとおり、9 頭の雌ヒツジの血中プロジェステロン濃度において、高値と低値とを明確に区別できた。低値には個体差は見られず、どの個体においても 1 ng/ml 以下であった。一方、高値は 9 頭中 1 頭のみ 4.3 ng/ml と比較的低い値であったが、他は 6.7~10 ng/ml 以上であり、ばらつきは小さいと考えられた。これより、濃度の高低差から発情期と非発情期を区別でき、さらにそれらの経時的変動より性周期の時期をおよそ把握できると考えられた。

また定性判定については、定量による判定との間に有意な相関が認められたことから、+を呈していた時期を雌ヒツジの黄体期の極期、+から±あるいは-に転じた時期を発情期の開始、そして再び-から±あるいは+に回帰した時期を、黄体期の開始と判断できるであろう。

以上より、本 P 定性測定および P 濃度測定用キットは、牛用として開発されたものの、雌ヒツジの血中 P 濃度を正確に測定し、性周期の判定用として応用できると考えられた。

5. 小括

市販のウシ用血中プロジェステロン濃度測定用および牛乳用 EIA キットにより、雌ヒツジの血中プロジェステロン濃度の変動と性周期を捉えることができるかどうかを検討した。

その結果、標準プロジェステロン及び血清サンプルについての検量線の作成、添加回収試験、測定内変動および測定間変動で良好な結果が得られた。従って、本キットによりヒツジの血中プロジェステロン濃度は正確に測定され、信頼性および再現性の高い結果が得られたと判断された。また、9頭の雌ヒツジの血中プロジェステロン濃度の測定をした結果、性周期の把握が可能であり、さらに定性判定との間に有意な相関が認められた。よって、本ウシ用キットはヒツジ血中P濃度の測定および性周期判定用として応用できると考えられた。

第4章

雌ヒツジの性周期に伴う血中プロジェステロン濃度の変動と

雄ヒツジの乗駕および匂い嗅ぎ行動

1. 目的

性行動の発現は、直接あるいは間接的に内分泌支配を受けている。また、性行動は雄と雌の出会いに始まり、雄による乗駕、雌による許容、そして雄と雌の交尾で完了する。マウス、ラットにおいては、性ステロイドホルモンであるエストロジェンとプロジェステロンの他に LRF（黄体ホルモン放出因子）が雌の雄許容（ロードシス）を促進させるのに重要な役割を果たしていると言われている（Moss & McCann 1973, Pfaff 1977）。また、雄ウシの交尾行動は雌ウシの LH サージと密接に関係する（Umezu et al. 1981）ことが報告されている。さらに、卵巣を摘出した雌ヒツジにおいて、エストラジオール 17β とプロジェステロンの投与量あるいは注入開始時間を変える実験によって、性行動の発現におけるこれらのホルモンの役割を調べた報告がある（Fabre-Nys & Martin 1991）。この報告ではプロジェステロン濃度が減少する時期がエストロジェン濃度の増加と雌による交尾許容の時期を決定したと述べられており、プロジェステロン濃度の減少後、24–30 時間後に雌は雄を受け入れたと書かれている。しかしながら、ホルモン処理を施さない雌ヒツジの性行動の経時的変化についての詳細な報告はみあたらない。

第1章で述べたように、雄ヒツジの一連の性行動には追従または接近、顎乗せ、押す、前駆のひねり、ナジング、鼻つけ、フレーメンおよび乗駕の8種類の動作が観察された。このうちフレーメンは、観察された全部で3369推移のうち、わずかに2回認められただけであった。他方、鼻つけはこのうち535回認められたが、両者ともマウンティングシリーズにおいて統計学的に有意な乗駕へとは推移しなかった（Odagiri et al. 1995a）。マウンティングシリーズに含まれる6種類の動作が雌の発情期に対応する雄の性行動特有の動作であるのに対して、前述の2行動は非発情期に発現する一般的な嗅覚的探查行動である

のなら、これらは雌の性的状態を日常的にモニターし、最終的に雌との交尾に導くための刺激として作用するのではないかと考えられた。従って、これらの行動は雌の性周期に伴って発現回数が大きく変動しないで、常に一定の割合で発現することが予想される。そこで本研究では、まず雌ヒツジの性周期のステージを明確にするために、血中プロゲステロン濃度を測定した(Odagiri & Marumo 1996)。そしてその変動と雄の乗駕行動の発現回数との関係を調べ、さらにフレーメンおよび鼻つけの発現回数との関係について考察した(Odagiri et al. 1996)。

2. 方法

(1) 動物と実験手順

雑種ヒツジ(コリデール系)雌9頭 雄3頭を使用した。雌9頭(A-1,2,3, B-1,2,3, C-1,2,3)のうち8頭(A-1,3, B-1,2,3, C-1,2,3)は分娩経験があった。雄は3頭(A,B,C)とも交尾経験を持っていた。体重は、雌27~70 kg、雄56~70 kgで、年齢は雌2.2~6.8才、雄2.3~6.3才であった。

実験は、一隅にシェルターが設置してある2ヶ所の屋外パドック(18および32 m²)で行った。実験に先立ち雌ヒツジの性周期を把握するため、血中プロゲステロン濃度の定性測定を行った。黄体期初期と判断された雌ヒツジを屋外パドックで雌ヒツジと同居させた。そして同居中の性周期の判定を行うために、連日あるいは隔日に採血した。黄体期が回帰したのを確認してから1ペアの同居をを終了した。ペアリングは9組 雄:A,B,C, 雌:A-1,2,3, B-1,2,3, C-1,2,3)について行い、その期間中の行動はすべてタイムラプスビデオレコーダーで記録された。飼料はNRC飼養標準に準拠し、1日2回給餌し、水と固形塩を常置した。夜間照明(40w)は、行動がモニターできる最低の明るさとした。そして、パドック内の明るさが60ルクス以上あるいはそれ以下になれば自動的に消灯あるいは60ルクス以上あるいはそれ以下になれば自動的に消灯あるいは点灯するようにセットした。

(2) 血中プロジェステロン濃度の測定

9頭の雌ヒツジの採血を連日あるいは隔日の午前8時半に行った。採血量は1回あたり5mlとし、頸静脈から採取した。血液は、凝固後すみやかに2800 rpm 18分間遠心して血清を分離し、定量測定を行うまで -80°C に凍結保存した。測定間誤差を少なくするために、9頭のペアリングが終了した後に定量測定をまとめて行った。測定操作は第2章と同様で、血中Pの定性測定には牛乳用EIAキット（オブチェックカウサイド・W；ケンブリッジライフサイエンス社）（図10）を、また定量測定には血液用EIAキット（オブチェック血液用EIAキット；Cambridge Life Science Co.LTD.）を用いた（図11）。

(3) 行動の記録と解析

ペアリング開始と同時にタイムラプスビデオシステムで行動の記録を開始した。ビデオ撮影は、ペアリング期間中継続して行った。行動は起こるたびにすべてを記録する連続記録法（小田切・松沢 1993、Martin & Bateson 1986）によって記録・解析し、それらのデータから雄ヒツジの乗駕と匂い嗅ぎ行動を抽出した。乗駕が初めて発現した日を0日とし、 -7 日から $+6$ 日までの乗駕および匂い嗅ぎ行動の出現頻度と持続時間について記録した。出現頻度は午前と午後のそれぞれ12時間ずつ集計した。匂い嗅ぎ行動であるフレーメンと鼻つけについては、尿あるいは外陰部のどちらに対して行われたかを記録した。

3. 結果

(1) 血中プロジェステロン濃度と乗駕行動との関係

雌ヒツジ9頭の血中プロジェステロン濃度と、12時間あたりの乗駕行動との関係について、ペアリングしたそれぞれの雄についてまとめた（図16-a,b,c）。

図16-a,b,cから判るように、雌の血中プロジェステロン濃度の減少に伴って雄の乗駕の回数は急激に増加し、3頭すべてにおいて0日の午後から1日の午前にかけてピークを示

した。乗駕は0日および1日で、全乗駕数（1404回）の86%（雄A:77%, 雌B:95%, 雄C:100%）を占めた。また、どの雄においても乗駕が完全に消失した後にプロゲステロン濃度は上昇した。

（2）乗駕行動と匂い嗅ぎ行動との関係

雄A,B,Cのいずれも鼻つけの発現回数は尿に対してより外陰部に対して有意（ $p<0.05$ ）に多く発現し、その割合は雄A86%、B85%、C77%であった。外陰部に対する鼻つけの回数ほどの雄においても0日から上昇し、0日の午後から1日の午前にピークを示した。また、0日および1日で総鼻つけ発現回数（1495回）の53%（雄A:68%, B:45%, C:50%）を占めた。また、どの雄においても乗駕のピークと鼻つけのピークはほぼ一致しており、乗駕と外陰部に対する鼻つけ動作の発現パターンは類似していた。

他方、尿に対する鼻つけは、全観察期間中、低頻度で認められた（図16, a-2, b-2, c-2）。また頻度は陰部に対するそれよりも少なく、全観察期間を通して数回程度で発情期に集中する傾向は認められなかった。

フレーメンは、どの雄においても外陰部に対してより尿に対して有意（ $p<0.005$ ）に多く発現した（雄A:96%, B:18%）。尿に対するフレーメンは全観察期間中発現した。雄AおよびBは-1日から上昇して0日にピークを示した。そして、-1日および0日で総フレーメン発現回数643回のうち15%（雄A:11%, B:18%）を占めた。また、雄AとBにおける尿に対するフレーメンのピークは、外陰部に対する鼻つけに先行して発現した。フレーメンの回数は雄C（総発現回数106回中-1日および0日で7%）においては、雄A,Bのような外陰部に対する鼻つけに先行して発現するという特徴的な変動パターンを示さなかった（図16, a-3, b-3, c-3）。外陰部に対するフレーメンは、雄Bで-1日～+3日に低頻度でみられた他は、雄A, B, Cでは全期間を通じてほとんど観察されなかった。

なお、雌9頭のうち7頭（雌A-1, 2, B-1, 2, C-1, 2, 3）は、この時の交配で受胎し、出産（妊娠期間149-152日）した。

(3) 乗駕および匂い嗅ぎ行動の持続時間

フレーメン、鼻つけおよび乗駕の持続時間はそれぞれ 10.5 ± 0.3 秒（平均値±標準誤差）、 1.9 ± 0.1 秒および 1.9 ± 0.2 秒であった（図 17）。これらの持続時間は、いずれも性周期における経時的変化において統計学的に有意な変動を示さなかった。

4. 考察

第 1 章で述べたように、雄ヒツジのマウンティングシリーズには 6 種類の単位動作の連鎖が観察される (Odagiri et al. 1995a)。この中の乗駕は雌が雄を許容する動作であり、行動上の雌の発情を表す最も有効な指標であると考えられている (Robertson 1977)。Glencross et al.(1981)は 24 頭の雌ウシに対する 30 頭の雌ウシの性行動について 1 日 30 分間の観察をしたところ、雌ウシのプロジェステロン濃度が低値の時に乗駕が多く発現したと報告した。しかしながら、雄の乗駕が発現したのは必ずしもプロジェステロン濃度が低値の時のみではなかったと述べている。サルの研究において、Enomoto et al.(1979)は、雌のプロジェステロン濃度が低値を示している間、雄の射精回数が増加したと報告した。しかし、これらの研究はいずれも個体の追跡、あるいは長期間での同一個体群の行動観察を実施したものではなかった。

本研究では、個体別に雌の性周期に伴う雄の乗駕および匂い嗅ぎ行動の経時的変動を正確に捉えるために、個体追跡法による長時間連続の行動記録法を採用した。その結果、血中プロジェステロン濃度が急激に下降すると乗駕が発現し、プロジェステロン濃度が低値を示している間においてのみ雄は雌に乗駕することがわかった。また、再びプロジェステロン濃度が上昇すると乗駕が消失し、両者の密接な関係が経時的に明確に捉えられた。

さらに本研究では、第 2 章で述べたように、直接、乗駕に推移しない匂い嗅ぎ行動が、性行動としての特性をもつのか、あるいは探索行動のうちの嗅覚行動（嗅覚的探査行動）として発現しているのかを知るために、鼻つけとフレーメンの 2 種類の動作について観察

した。

その結果、鼻つけの対象がほとんど外陰部である（77～86%）のに対し、フレイメンはほとんど尿に対して発現する（84～96%）ことが明らかになった。このことにより、鼻つけは外陰部の匂い、フレイメンは尿の匂いを嗅ぐ、というそれぞれに特徴的な役割を持っていることが示唆された。またこれらの行動は乗駕の発現回数の増加と関連して増加する傾向を示すことから、雌の発情との関係が示唆され、その意味で性行動と特定されると考えられた。

尿に対するフレイメンについては、雄 C において他の雄のように-1、0 日において顕著なピークは見られなかった。これは、雌 C-1, -3 に対しては 0 日にピークが見られたもののその頻度が 5～7 回と低かったこと、また C-2 に対しては性周期を通して大きな変動が見られなかった（0～4 回）ためと考えられた。また、雄 C は他の雄よりフレイメンを頻発しない個体であることが関与しているとも考えられた。

Ladewig et al.(1980)は、雄ヤギに雌の尿を呈示すると、発情期のものより非発情のものに対してより頻回にフレイメンを発現し、さらに平均持続時間は長かったと報告した。そして、これは発情初期の個体と発情していない個体を識別しているためであろうと論じた。またウシにおける Haupt et al. (1989) の研究では、前述のヤギの結果とは異なり、非発情中より発情中の雌の尿の匂いに対してフレイメンの発現回数が増加したと報告されている。また、発情中と非発情中の雌ウシに対する雄ウシのフレイメン反応の回数には差は認められなかったという報告 (Geary et al. 1991) もあり、結果は一致していない。これらは、それぞれの研究において発情開始日が明確にされていないこと、発情から何日目のデータを用いたかを明記されていないこと、あるいはフレイメンの種間差による機能の違いも考えられ、それゆえに適切な比較ができないと考えられた。

本研究では、尿へのフレイメンは雄 2 例 (A, B) において乗駕開始の前日から増加した。そして、乗駕発現開始のピークを境にフレイメンの回数は減少した。しかし、雄 1 例 (C) においてはそのような傾向が認められなかった。雄のフレイメンは雌の尿に対して主に行

われる動作であった結果から考慮すると、その発現回数は単純に雌の排尿回数に左右されていることも考えられる。そのため、雌の排尿回数と雄のフレーメン回数との関係を調べる必要がある。

また、雌の性周期において雄の鼻つけはフレーメンより遅れて発現する傾向が見られ、また乗駕とほぼ同様の変動パターンを示した。このことより乗駕と外陰部に対する鼻つけの密接な関係が示唆された。しかし、マウンティングシリーズ (MS) においては鼻つけから乗駕に推移する統計学的な有意性は見られず、鼻つけは乗駕に至る直接的な要因にならないことを第 2 章で述べた。つまり、外陰部に対する鼻つけは雌の発情に伴う雄の性行動の一つであるが、最終行動である交尾には MS として直接には連鎖しない探索行動であると考えられた。なぜなら、実際にフレーメンが発現するためには鼻つけによる匂い嗅ぎは必須であり、時間的隔たりの後に MS へと至るからである (Odagiri et al. 1995a)。

また、フレーメンと鼻つけの持続時間は性周期を通して顕著な変動を示さなかった。つまり、鼻つけとフレーメンはそれぞれ約 2 秒あるいは 11 秒続く動作であるとみなされ、持続時間の長短は発情の度合いを示すものではないと考えられた。Bland & Jubilan(1987)もフレーメンの持続時間は性周期において変動しなかったと報告しており、本研究の結果と一致した。さらに、乗駕の持続時間も性周期において変動せず、フレーメン、鼻つけと同様に、持続時間は性周期のステージを把握する指標にはならないことがわかった。

5. 小括

雌ヒツジの性周期に伴う血中プロジェステロン濃度の変動と雄ヒツジの乗駕および匂い嗅ぎ行動の関係について調べた。同居中の雌雄の行動を長期間持続的に録画し、雄ヒツジの乗駕、鼻つけおよびフレーメンについて解析した。その結果、雌ヒツジの血中プロジェステロン濃度が低値を示している間のみ雄ヒツジによる乗駕の発現が認められた。雄ヒツジの鼻つけおよびフレーメンは、雌ヒツジの全性周期を通して見られたが、その頻度は発

情期と考えられる乗駕の発現期間に集中して高かった。鼻つけは雌ヒツジの外陰部を対象に発現し、乗駕と同様の変動パターンを示した。

他方、フレイメンは主に尿を対象に発現し、乗駕よりも先に発現ピークを示した後に減少する傾向が見られた。また乗駕、鼻つけおよびフレイメン行動の持続時間は発現回数と異なり、性周期に伴って変動せず、性周期を捉える指標とはならないと考えられた。

本研究で行われた個体を長期にわたって追跡する方法により、雌ヒツジの血中プロジェステロン濃度が低値を示している間のみ雄ヒツジが乗駕するという関係を経時的に捉えることができた。また、鼻つけとフレイメンの性周期に伴う変動パターンが異なることから、これらの2種類の匂い嗅ぎ行動はそれぞれ異なる機能をもつことが示唆された。

第5章

性周期に伴う雌の排尿行動と雄の匂い嗅ぎ行動との関係

1. 目的

発情した雌の膻分泌物や尿には、雄を性的に刺激し、雌の方へと誘引する性的誘引物質が含まれていることはよく知られている (O'Connell et al. 1978, Singer et al. 1976, Goodwin et al. 1979)。つまり、その性的誘引物質は雄の嗅覚を刺激して発情を誘発すると考えられる。第4章で述べたように、雄ヒツジの匂い嗅ぎ行動はフレーメンと鼻つけの2種類に分類され、これらはそれぞれ尿と外陰部に対して行われた。尿と外陰部に対する鼻つけは乗駕に同調して発現しており、雌の発情に伴う雄の典型的な性行動の一つであるが、最終的な交尾行動には連鎖しない探査行動であると考えられた。これは、第2章での連鎖解析で示された乗駕に連鎖してMSを直接的に完結させる行動である、という結果を支持した。

他方、尿に対するフレーメンは外陰部に対する鼻つけに先行して発現した。そして、これは発情雌の尿に対して特異的に発現するのではなく、どのような雌の尿に対しても発現する嗅覚的探査行動であることが示唆された。従って、雄のフレーメンの発現は雌の性周期に伴って変動しているのではなく、単に雌の排尿回数に左右されている可能性が示唆された。そこで本章では性周期に伴う雌の排尿行動と、それに対する雄のフレーメン行動および乗駕行動の関係について第4章よりさらに詳しく、1時間単位での経時的変動について調べ、フレーメン行動の機能について考察した。また同様に、外陰部に対する鼻つけ行動についても調べ、前章の結果の再現性を確かめた。

2. 方法

(1) 動物および飼育方法

交尾経験のあるコリデール系雑種雄2頭(年齢:7歳、2.6歳、体重:90kg、56kg)と、

出産経験のある雌 6 頭 (No.1~No.5、年齢 2.8~3.5 歳、体重 27~42 kg) を用いた。飼育は一隅にシェルターが設置してある屋外パドック (4×8 m) にて行った (図 18)。餌は NRC 飼養標準に準拠して生草、ヘイキューブおよび濃厚飼料を 1 日 2 回与え、水および固形塩は自由摂取できるようにした。夜間照明 (40W) は 60 ルクスを基準に自動点灯および消灯するように蛍光灯を設置した。

(1) 行動の記録と解析

雌雄をペアリングさせ、6 組についての行動を観察した。期間はそれぞれ、1995 年 8 月 20 日~9 月 1 日 (雄 A と雌 No.1)、9 月 3 日~9 月 17 日 (雄 B と雌 No.2)、9 月 25 日~10 月 10 日 (雄 A と雌 No.3)、10 月 17 日~11 月 3 日 (雄 B と雌 No.4)、11 月 4 日~11 月 16 日 (雄 B と雌 No.5)、11 月 17 日~12 月 7 日 (雄 A と雌 No.6) に行った。ペアリング開始と同時にタイムラプスビデオシステムで行動の記録を開始し、ペアリング期間中の全ての映像を記録した。行動解析は連続記録法 (小田切・松沢 1993) によって行い、雌の排尿、雄の乗駕および尿に対するフレーメンと外陰部に対する鼻つけについて記録した (Odagiri et al. 1995a, b)。排尿行動は雌が腰を低く下げて排尿する姿勢で、前肢は曲げず後肢は開脚して少し折り曲げた状態で 1 秒以上静止した行動と定義した (図 19)。

乗駕が初めて発現した日を 0 日とし、-8 日から+5 日まで、上記の 4 行動について解析した。-8 日から+5 日までの行動の回数を個体ごとに 1 時間ずつ集計した。また、このデータを乗駕発現日を基準にして乗駕発現前 (-8 日~-1 日)、乗駕発現前日 (-1 日)、乗駕発現期 (0 日~2 日および 3 日)、乗駕終了後 (2 および 3 日~5 日) の 4 ステージに分類した。そして、各々のステージで発現する雌の排尿行動、外陰部に対する雄の鼻つけ、および尿に対する雄のフレーメン行動の 1 日あたりの平均発現回数を 6 組 (雄 A : 雌 1 および : 雌 3、雄 B : 雌 2、: 雌 4、: 雌 5、: 雌 6) について調べ、各ステージ間での有意差を調べた (Mann-whitney の U 検定)。

3. 結果

性周期に伴う雌ヒツジの排尿行動と雄ヒツジの乗駕行動、尿に対するフレイメン行動および外陰部に対する鼻つけの経時的変化について示した（図 20-1~6）。乗駕の初回発現時刻および最終発現時刻と、その間の継続時間は雄 A 雌 1 ペアでは 0 日の 5 時から 2 日の 3 時までの 45 時間（図 20-1）、雄 A 雌 2 ペアでは 0 日の 23 時から 2 日の 6 時までの 31 時間（図 20-2）、雄 A 雌 3 ペアでは 0 日の 18 時から 1 日の 17 時までの 23 時間（図 20-3）、雄 A 雌 4 ペアでは 0 日の 23 時から 1 日の 6 時までの 31 時間（図 20-4）、雄 A 雌 5 ペアでは 0 日の 6 時から 1 日の 8 時までの 28 時間（図 20-5）、雄 A 雌 6 ペアでは 0 日の 17 時から 1 日の 16 時までの 23 時間（図 20-6）であった。これら 6 ペアで発現した平均乗駕継続時間は 30 ± 3 時間であった。

性周期に伴う排尿行動は雌 4 のように -6 日 ~ -5 日に一時排尿行動が増加する個体があったものの（図 20-4）、全体として乗駕発現する 12~24 時間前から頻発し始め、乗駕発現期に最も頻発する傾向が見られた。また排尿に対するフレイメンも排尿行動と同様のパターンで発現する傾向が見られ、乗駕発現する 12~24 時間前から増加し始め、乗駕発現期に最も頻発する傾向が見られた。しかしながら雌 4 に対するフレイメンは他の雌と異なり、性周期を通して低頻度（1~3 回）で発現したが、排尿と同調して -6 日 ~ -5 日、-4 日、-2 日および -1 日 ~ 0 日において増加する傾向が見られた（図 20-4）。

他方、外陰部に対する鼻つけは乗駕が発現している間に頻発する傾向が見られたが、乗駕の発現パターンとは一致しなかった。

また、乗駕発現前（-8 日 ~ -1 日：以後、発現前と記す）、発現前日（-1 日：以後、前日と記す）、発現期、乗駕終了後（終了日 ~ 4 日：以後、終了後と記す）の 4 ステージにおける雌の排尿行動、雌の尿に対するフレイメンおよび外陰部に対する鼻つけ行動の 1 日平均発現回数を調べた（図 21）。その結果、排尿行動は発現前 13.7 ± 1.2 回、前日 23.0 ± 4.5 回、発現期 26.9 ± 4.1 回、終了後 7.8 ± 1.1 回であり、乗駕発現期は発現前（ $p < 0.05$ ）および終了後（ $p < 0.05$ ）のどちらよりも有意に高く、また終了後はどのステージよりも有意

に低い頻度 ($p<0.05$) で排尿行動が発現した (図 21)。

雌の尿に対する雄のフレーメンは、平均 1 日あたり発現前 5.7 ± 0.8 回、前日 9.8 ± 2.4 回、発現期 14.5 ± 2.5 回、終了後 3.9 ± 1.6 回が発現し、発現期は発現前($p<0.05$)および終了後($p<0.05$)より有意に頻発した。また雌の外陰部に対する鼻つけは、平均 1 日あたり発現前 15.4 ± 2.7 回、前日 28.7 ± 7.0 回、発現期 63.1 ± 15.5 回、終了後 9.7 ± 4.6 回発現し、発現期は発現前 ($p<0.05$) および終了後($p<0.05$)より有意に頻発した (図 21)。

4. 考察

本章においては、個体の行動を持続的に追跡する連続記録法を用い、6 頭の雌のそれぞれの性周期における 4 種類の行動を記録して 1 時間ごとに集計した。その結果、雄の乗駕継続時間は平均 30 時間であり、これはそのまま雌の発情継続時間に相当すると考えられた。一般的に雌ヒツジの発情継続時間は 12~48 時間 (Craig 1981, Laing 1970) といわれており、本研究結果と一致した。従って、本実験に用いたヒツジは正常な発情を示したと考えられた。

本研究において、雌は概ね発情前日から頻尿になり始め、乗駕が発現している間は頻尿が続く傾向が見られた。雌 4 のように個体によっては発情期以外にも頻尿傾向 (図 20-4) を示す雌もいるが、1 時間単位での雌の排尿行動パターンによって発情を約 1 日前から予測できることが示唆された。しかしながら、Bland & Jubilan (1987)は性周期において雌ヒツジの排尿回数は発情初日に最も少なくなると述べている。また、Stevens et al. (1982)は、非発情期の雌ヒツジは発情中の雌ヒツジより頻回に排尿すると報告しており、これは非発情期の尿を調べれば雌の発情期がわかることを雄に伝えている、と述べている。これらの研究は本章の結果とは異なるものであった。本研究と彼らの研究は、観察期間が約 2 週間であること、観察頭数は 6 および 10 頭である点については類似していた。しかしながら観察方法が異なり、本研究では連続記録法を用いての長時間の観察であるのに対して、彼らの研究方法は観察時間が 20 分と短かった。行動に個体差や日内変動がない場合は、短

時間の行動観察は解析時間と労力を削減できる点で有効であると考えられた。しかしながら、行動に個体差や日内変動がある場合やそれらについて考慮がなされていない場合は、本研究のように連続記録法を使って個体ごとに長時間の記録をとることが重要であるため、本研究では精度の高い研究結果が得られたと考えられた。

さらに性周期を初回乗駕が発現した日を基準にして、乗駕発現前（以後、発現前）、乗駕前日（前日）、乗駕発現期（発現期）、乗駕発現終了後（終了後）の4ステージに分けて、1日平均の排尿回数をステージ間で比較した結果、前日と発現期との間に有意差は認められないものの、終了後から発現期に近づくにつれて排尿回数は増加し、発現期にピークを示すことがわかった。つまり排尿行動は発情が開始する前から徐々に増加し、発情期とともにピークを迎え、その後減少することが経時的変化ではなく、各々のステージ間での統計学的有意差からも示された（図 21）。

すでに第3章で述べたように、雄のフレーメンは雌の外陰部と尿に対して発現するが、フレーメンの多くは尿に対して発現する。従って、雌に対する雄のフレーメン行動は雌の排尿回数に左右されることが予想された。実際に経時的変化において、フレーメンは雌の排尿パターンに同調して発現する傾向を見せた（図 20-1~6）。また、全期間を4期に分けたときの排尿行動に対するフレーメン行動の発現割合は、42%~54%（発現前：42%、前日：43%、発現期：54%、終了後：50%）で、ステージ間にはいずれも統計学的な差は認められなかったことから、フレーメンは排尿行動と類似した発現パターンを示すことがわかった。つまり発情期以外で排尿回数が増加した時でも、フレーメンの発現回数は同様に増加傾向が見られることから、フレーメンは必ずしも雌の発情期に特有の行動ではないと考えられた。

他方、外陰部に対する鼻つけは、乗駕行動発現期に頻発する傾向が見られ（図 21）、本研究において鼻つけと乗駕は密接に関係しているという前章における結果を再現した。

これらのことから、尿に対するフレーメンは性周期のどの時期でも発現し、排尿と類似した発現パターンを示すことから、雄のフレーメンの発現回数は、単に雌の排尿回数に左

右されており、発情雌の尿に対して特異的には起こらないと考えられた。それゆえフレイメン行動は、匂いを嗅ぐことによって雌の状態を探る、嗅覚探査行動である可能性が示唆された。一方、鼻つけは行動連鎖として直接乗駕にはつながらないものの、性周期中の時間的経過に伴って乗駕へと続くことを示唆しており、それゆえ鼻つけは間接的な性的探査行動の1種であると考えられた。

5. 小括

性周期に伴う雌ヒツジの排尿回数と、雄ヒツジの尿に対するフレイメン行動、外陰部に対する鼻つけ行動および乗駕行動との関係について調べた。乗駕行動が発現した初日を0日とし、-9日から+5日までの雌雄の行動を全て録画して解析した。その結果、雌ヒツジの排尿回数は乗駕が発現する約1日前から増加し、乗駕発現期間中にピークを示した。尿に対するフレイメンは性周期におけるどの時期でも発現したが、性周期において排尿と類似した発現パターンを示した。また、排尿は乗駕発現期は前期および後期よりも統計学的に有意に頻発 ($p<0.05$) し、フレイメンも同様の結果となった。それゆえ、雄のフレイメン行動は発情雌の尿に対して特異的に起こるのではなく、あらゆる性周期ステージの状態である雌の尿に対して発現する嗅覚探査行動であると考えられた。

他方、鼻つけも性周期におけるどの時期においても発現したが、排尿の発現パターンとは異なり、乗駕発現期に前日の約2倍、前期の約3倍の割合で発現した。そして、乗駕発現前および終了後よりも統計学的に有意に頻発 ($p<0.05$) することがわかった。それゆえ、鼻つけは雌の発情に伴う雄の典型的な性的行動という意味で性的探査行動であるという前章の考えを支持した。

第6章

性周期に伴う雌ヒツジの尿に対する雄のフレーメン反応試験

1. 目的

第5章において、雌の排尿行動は雄の乗駕の発現前日、つまり雌の発情開始前日から頻繁に発現することがわかった。そして、雌の尿に対する雄のフレーメンは排尿行動のパターンに同調して発現するため、排尿が頻回になる発情期はもちろんのこと、非発情期に排尿回数が増加したときにも同調して発現回数が増加する傾向が見られた。このことから前章において、雄のフレーメン行動は発情雌の尿に対して特異的に起こるのではなく、どのような雌の尿に対しても発現する嗅覚的探査行動であることが示唆された。従って、雄のフレーメンの発現は雌の性周期に伴って変動しているのではなく、単に雌の排尿回数に左右されている可能性が示唆された。そこで本章では性周期に伴う雌の尿を雌の不在下に飼育されている雄の鼻口に実験的に噴霧し、フレーメン反応の発現の有無について調べることが目的として研究を行った。また、その結果から雄のフレーメン行動の機能についても考察した(小田切 1996)。

2. 方法

(1) 尿の採取

①動物および飼育方法

出産経験のある雌6頭 (No.1~No.6, 年齢 2.8~3.5 歳, 体重 27~42 kg) を用いた。雌の性周期判定には血中プロジェステロン濃度による定性測定 (小田切ら 1994) から雌の黄体期を確認してから実験を開始した。実験開始後の性周期判定は血中プロジェステロン濃度による定性判定と試情雄 (コリデール系雑種 (5 歳, 90 kg) による乗駕確認との両方を用いた。初回乗駕発現日を 0 日 (発情開始日) とし、乗駕発現終了 (発情終了) 後、黄体期が回帰するのを確認して 1 個体の実験を終了した。採尿のための雌と試情雄の飼育

は、一隅にシェルターが設置してある屋外パドック（4×8 m）にて行い、餌はNRC飼養標準に準拠して生草、ヘイキューブおよび濃厚飼料を1日2回与え、水および固形塩は自由摂取できるようにした。夜間照明（40 W）は60ルクスを基準に自動点灯するように蛍光灯を設置した。

②採尿方法

上述した6頭の雌の尿を採取した。毎日午前6時に雌の外陰部の下方に脱脂綿を詰めた写真ネガフィルム用のプラスチックケースを装着し、7時にそれを回収した（図22）。尿を含んだ脱脂綿を20 ml ディスポーザル注射筒にいれ、押し出して尿を採集した。尿中に異物が混入している場合には、2,800 rpm 5分間、4℃で遠心し尿と異物を分離した。

（2）尿に対する反応試験

①動物および飼育方法

雑種雄ヒツジ（コリデール系、1～7才）9頭（交配経験有り6頭、未経験3頭）を使用した。これらの雄ヒツジは、前述の屋外パドックで飼育している雌から視覚的情報を遮断された実験場[ビニールハウス、5（縦）×15（横）×3.5（高さ）m、色：緑]で飼育された（図23）。夜間は120W照明を点灯させた。NRC飼養標準に準拠して1日2回給餌した。水および固形塩は常置した。

②反応試験とフレーメン判定

前述の方法で採集された雌の尿（10～25 cc）を反応試験に用いた。これらを毎日午前7時半に6～9頭の雄の鼻孔に2～3回小型噴霧器（2～3 cc）を使って噴霧した。そして、噴霧直後にフレーメンが起こったかどうかを記録した。フレーメン反応の判定は3段階とし、起こらなかった場合は－、起こったが唇が少し開いた程度では±、唇が鼻先に接触する程度に上向きになった場合を＋とした（図24）。

3. 結果

性周期に伴う 5 頭の雌の尿噴霧に対する、雄のフレーメン反応の発現回数を示した (表 5)。試情雄の初回乗駕の発現日を発情開始日とみなし、性周期を乗駕発現前 (以降は発情前と記す; -9~-2 日)、発現前日 (発情前日; -1 日)、乗駕発現期 (発情期; 0 日~2 日)、乗駕発現終了後 (発情終了後; 3 日~8 日) の 4 ステージに区分した。これらの 4 ステージについて、それぞれ 281 回、36 回、104 回、115 回 (合計 536 回) の反応試験を行った。その結果、発情前の尿に対してフレーメンが発現しなかった (-) のは 170 回 (60.5%)、フレーメン反応が僅か (±) であったのは 12 回 (4.3%)、明瞭なフレーメン (+) が発現したのは 99 回 (35.2%) であった。発情前日の尿に対する (-) 反応は 19 回 (52.8%)、(±) は 4 回 (11.1%)、(+) は 13 回 (36.1%) であった。発情期に (-) 反応が発現したのは 61 回 (58.7%)、(±) 反応が発現したのは 8 回 (7.7%)、(+) 反応が発現したのは 35 回 (33.7%) であった。また発情終了後に (-) 反応が発現したのは 62 回 (53.9%)、(±) 反応が発現したのは 4 回 (3.5%)、(+) 反応が発現したのは 49 回 (42.6%) であった。これらについて χ^2 検定を行った結果、発情前、発情前日、発情期および発情終了後のどのステージ間においてもフレーメンの -、±、+ の発現割合に有意差は認められなかった。

次に上記の 9 頭の雄に実施したフレーメン反応の結果を成獣 (3~7 才、3 頭; 交配経験)、亜成獣 (2 才、3 頭; 交配経験あり)、若齢獣 (1 才、3 頭; 交配経験なし) に分け、各ステージによってフレーメン判定に差があるかどうか集計しなおした (表 6)。その結果、成獣の (-)、(±)、(+) 反応はそれぞれ 63.1%、2.5%、34.4%、亜成獣の (-)、(±)、(+) 反応はそれぞれ 56.1%、5.1%、38.8%、若齢獣の (-)、(±)、(+) 反応は、それぞれ 49.6%、11.5%、38.8% であった。これらについて χ^2 検定した結果、成熟度とフレーメン反応の間には関連性が認められ、成獣と亜成獣の個体は若齢獣よりもフレーメン反応が有意に多く起こった (χ^2 検定、 $P < 0.01$)。

4. 考察

第5章では雌の排尿回数は発情前日から増加し始め、発情期にピークを示すことがわかった。また、それに同調して雄のフレーメンも発情期に多く発現するが、非発情期の雌の排尿回数が増加したときにもフレーメンは増加した。このことは、雄のフレーメンは雌の発情期に特異的に増加するのではなく、単に雌の排尿回数に左右されているにすぎないことを示唆した。本章ではこのことを明確にするために、尿の噴霧実験をおこなった。その結果、雄のフレーメン反応は発情前、発情前日、発情期および発情終了後の各々の性周期ステージに関係なく、－反応は約58%、±反応は約5%、＋反応は約37%と一定の割合で起こることが分かった。フレーメンが起こったか否かだけを考慮すると、±は反応が微弱であるだけで、実際にはフレーメンは発現したと判断できるため、雄は性周期のステージに関係なく、常時、尿の匂いを嗅いだ回数の40～47%に対してフレーメンを発現していると考えられた。

Blissit et al (1990ab) は、雄ヒツジは雌の発情尿と非発情尿を匂いで区別できることをオペラント条件付けによる手法で明らかにした。その実験では雄は発情期と非発情期の尿のにおいを区別するためにはフレーメンを行わないことが示されており、発情期と非発情期の区別にフレーメンが必ずしも必要ではないことが示唆された。

上記の事柄と本研究結果の両方からも、尿に対するフレーメンによってたとえ性フェロモンを探索していたとしても、フレーメンは雌の発情期に典型的に発現する行動ではなく、常時一定の割合で尿の匂いを嗅いで性周期をモニターする意味を持つ嗅覚的な探索行動であると考えられた。

また、雄のフレーメン反応と年齢との間には関連性が認められ、年齢が低くなるほどフレーメンの発現割合は高くなる傾向が見られた。そして若齢個体は成獣および亜成獣の個体よりも有意に高くフレーメン反応(+および±)を発現することが確認された($p<0.01$)。若齢個体における3段階のフレーメン反応の発現割合を比較すると、－反応49.6%に対し

て+および±反応は 50.3%と、尿噴霧に対してほぼ同等の割合でフレーメンを発現したことがわかる。つまり若齢個体においては尿の噴霧に対する匂い嗅ぎの約半分においてフレーメン反応が発現したことになる。一方、成獣および亜成獣の個体における+および±反応は 37~44%であるのに対して、若齢獣の+および±反応が約 50%でありこれらの間の発現割合には有意差が認められた (χ^2 検定、 $p<0.01$)。これは若い雄よりも成熟度の高い雄の方が頻度高くフレーメンを示すという Reinhardt (1983) の研究とは逆の結果であった。

もしフレーメン反応が雌の発情臭において特異的に発現するのなら、発情を感知するその機能を考慮した場合、性成熟に至っていない若齢個体がフレーメンを発現する利点はない。しかしながら、幼い頃に学習した匂いの記憶が後の匂いの識別能力に影響し、性成熟後の繁殖活動を有利にさせるのならば、たとえ若齢であっても個体の月齢に関係なくフレーメンが発現することは予想できる。実際に、1 週令未満のヒツジがフレーメン行動を示すことが Donchin et al. (1983) によって報告されており、フレーメンは発情臭を認識するためだけの反応行動とは考え難い。また、若齢個体より性成熟した個体の方が雌の発情を容易に認識できるであろうことは推察され、それゆえ成熟度が高い個体ほどフレーメンによって雌の尿をモニターする割合が低いと考えられた。

性周期のすべてのステージにおいてフレーメンを一定の割合で発現している、という尿の反応テストによる結果と、未成熟の若齢個体においてフレーメン反応が多かったという 2 つの結果は、フレーメンによって性フェロモンを感知して発情を認識している、ということを実証していない。しかしながら、ヤギの実験的観察において、フレーメン行動は匂い物質の鋤鼻器内への取り込みを助長することが知られている (Melese-d'Hospital et al. 1985)。また口腔に入った液体がフレーメンを行うことによって切歯管を通過して鋤鼻器の前部に流れ込むことが報告されており、雄ヤギはフレーメンによって口腔内に取り込まれた尿や膺分泌物に含まれる不揮発性の性フェロモンを探查していると考えられている (Ladewig & Hart 1980)。

フレーメンは尿に対して多く発現し、鼻付け行動は外陰部に対して多く発現することを第4章で示し、また、第5章ではフレーメンは乗駕行動が発現する12時間から24時間前から発現し、その後、鼻付け行動は乗駕行動と同期して発現することを示した。これらの結果から推察すると、雄はフレーメンによって雌の尿から獲得した情報をもとに性周期を認識し、その後、鼻付けによって外陰部から得られる膣分泌物の情報をもとに乗駕行動を発現していると予想される。このことは、2種類の匂い嗅ぎ行動がそれぞれ機能を分担していることを示唆していると同時に、それぞれが尿と膣分泌物という異なる媒体から性フェロモンを受けとっている可能性も考えられる。

哺乳類には匂いに係わる2種類の神経系がある (Keverne 1978b, Meredith et al. 1983, 椋・瀬戸 1991)。ひとつは嗅覚系 (または主嗅覚系) であり、嗅覚器から脳の主嗅球をへて梨状葉、扁桃体など大脳辺縁系に広く投射し、最終的にその情報は脳皮質に到達する (Meredith et al. 1983)。もう一つは、鋤鼻系 (または副嗅覚系) である。鋤鼻器内のフェロモン受容細胞である鋤鼻細胞から、副嗅球を経て、扁桃体の内側部に至り、最後は視床下部に到達する神経路である (Meredith et al. 1983)。嗅覚系は一般の匂い物質を受容し、餌を探したり外敵からの逃避などに関わる、個体の生命維持に重要な系である。一方、鋤鼻系はフェロモンを受容し、生殖行動や母性行動に関わる重要な役割を果たし、これらはそれぞれお互いに機能を分担していることが知られている (Keverne 1983)。マウスの研究において、匂いの識別能は鋤鼻器あるいは鋤鼻系を破壊しても主嗅覚系が無傷であれば阻害されないことは知られている (Lloyd-Thomas & Kevern 1982)。また Blissitt et al. (1990a) は雄ヒツジのメスの発情尿と非発情尿の区別には鋤鼻器は必要ではなく、これらの区別は主嗅覚系で行われることを実験によって示した。このことは、雄は発情尿と非発情尿を単に尿の匂いの違いで判断している可能性が考えられ、必ずしもフェロモン物質によって違いを判断しているわけではないとも言える。

いずれにしても、性フェロモンが存在しているのは尿中なのか膣分泌物中なのか、あるいは両方なのか。また、そのフェロモンを、雄はフレーメン→鋤鼻器→副嗅球→大脳によ

る鋤鼻系と、鼻付け→嗅上皮→主嗅球→大脳による（主）嗅覚系の両方から受容し、両方の情報から受けた刺激によって乗駕行動を発現しているのか。といった詳細については、雄の脳内伝達物質の経時的変化をリアルタイムでモニターするような神経行動学的研究手法や、神経細胞を培養するような系を用いた研究が今後は必要であると考えられる。またそれと同時に、雌ヒツジの性フェロモン分子の単離・同定といった発展的な研究がヒツジの人工受精や周年繁殖の技術を大きく進歩させるであろう。

5. 小括

雌ヒツジから隔離された雄に、採取した雌の尿を人為的に噴霧した時のフレーメン反応の発現割合について調べた。その結果、どの性周期ステージにおける雌の尿に対してもフレーメン反応の発現割合には差は認められず、性周期を通してほぼ一定の割合（40～47%）で発現した。また、雌の尿を雄の鼻腔に噴霧した時の雄のフレーメン反応は、雄の年齢と関連性があることが認められ、幼獣の方が成獣よりも有意に多く発現することがわかった（ $P<0.01$ ）。幼獣は約 50%の割合でフレーメン反応を示した。

これらの結果から、フレーメンは雌の発情尿に特異的に発現する性成熟した雄に特有な性的探査行動ではなく、雌の排尿回数に対して一定の割合で発現する嗅覚的探査行動であることが示唆された。

第7章

総括

1. 総合考察

ヒツジは有用性の高い動物として人間生活と深く係わってきたため、繁殖に関する研究は、古くから多くの研究者によってなされてきた。とりわけ、繁殖における行動学的アプローチ、つまり繁殖生理の見地から性行動研究は重要であると考えられる。ヒツジの交尾行動に関する研究は、Beamer et al.(1969), Clegg et al.(1969), Hafez & Scott(1962), Hafez(1975)あるいは、Hulet et al.(1962a, b, c)によって精力的に行われた。また、Banks(1964)は雄ヒツジの雌への性行動の連鎖を詳細にイラストで示した。しかしながら、上記の研究はいずれも短時間での行動観察についての報告であった。また単に交尾行動の頻度や持続時間についての報告であったり行動を記述したものであり、性行動を定量化したものでなかった。

Odagiri et al(1995)は、実験期間中のヒツジの行動をすべてビデオテープレコーダーで記録し、行動解析によって性行動を8種類の単位動作に分類した。そして、性行動の連鎖を客観的に評価するために統計学的手法を用いた。その結果、雄ヒツジは雌に対して、追従または接近、から乗駕に至るまでの一連の性行動（マウンティングシリーズ：MS）を示すことを報告した（第2章）。

上記で分類した性行動と考えられる8種類の単位動作のうち、フレーメンと鼻つけはともに匂い嗅ぎ行動と考えられる。鼻つけは追従または接近の後に連鎖して発現するものの、その後の動作から乗駕には至らなかった。またフレーメンはどの単位動作にも有意に推移せず、独立的に発現した。これらの知見から、匂い嗅ぎ行動であるフレーメンおよび鼻つけはMSを構成する他の6種類の動作とは別の機能をもつ性行動であることが示唆された（図25c）。

性ステロイドホルモンのうちエストロジェン（E）とプロジェステロン（P）は雌性動物

の性周期に深く関与しており、雄性動物の性行動は雌のホルモン動態に大きく影響される。性行動と E 濃度あるいは P 濃度との関係については、ウシ (Glencross et al. 1981, Hurnik et al. 1975, Arney et al. 1994)、サル (Enomoto et al. 1979, Eaton & Resko 1974)、ヒョウ (Schmidt et al. 1988) についての報告がある。ヒツジについては、Fabre-Nys & Martin (1991) が P 濃度の低下と雌の性的許容は密接な関係があることを卵巣を削除した後にエストロジェンを投与した雌ヒツジを用いて示した。しかしながら、人為的な処理を施していない雌ヒツジの P 濃度と雄ヒツジの性行動の関係についての報告はみあたらない。また、雌雄のヒツジの行動を長期間持続的に記録し、それらを連続記録法によって解析したという報告はない。

本研究では、雌ヒツジの性周期に伴う雄ヒツジのフレーメン、鼻つけおよび乗駕の変動と、血中 P 濃度との関係について検索した。その結果、①性周期における経時的变化において、乗駕が発現している間は P 濃度は低値を示した。②鼻つけは対象がほとんど外陰部であるのに対し、フレーメンはほとんど尿に対して発現した。③鼻つけは乗駕と同様の変動パターンを示したが、フレーメンは乗駕が発現する前から頻回に発現し始め、発情初日に最も多く発現するといった知見が得られた (図 25a, b)。

さらに、性周期に伴う雌ヒツジの排尿行動と雌の尿に対する雄のフレーメンとの関係について第 5 章において検討した結果、①排尿行動は初回乗駕発現時刻の 12~24 時間前から頻回に発現し始め、乗駕が発現している間に頻発する傾向が見られた。②フレーメンは排尿行動の発現と密接な関係が見られ、排尿回数に同期してフレーメン回数が増加する傾向が見られた。また、フレーメンは雌の発情前、前日、発情期、発情終了後の 4 ステージの尿に対して 34~43% の一定の割合で発現することがわかった。つまりフレーメンは雌の発情に伴う典型的な性行動ではなく、排尿行動の発現回数に対して一定の割合で発現する行動であり、発情ステージには関係なく発現する嗅覚的探査行動であることが示唆された。つまり、雄のフレーメンの発現は雌の性周期に伴って変動しているのではなく、単に雌の排尿回数に左右されている可能性が考えられた。そこで次に性周期に伴う雌の尿を、雌の

不在下に飼育されている雄に実験的に噴霧し、フレーメン反応の有無について調べた。その結果、どの性周期ステージにおける雌の尿に対してもフレーメンの発現割合には差は認められず、性周期を通してほぼ一定の割合（34～39%）で発現した。また、雌の尿に対するフレーメン反応と雄の年齢との間においては、若齢であるほどフレーメンの発現割合が高くなる傾向が見られた。幼い時期には成熟した個体と異なり、フレーメンによって雌の性周期をモニターする必要はない。しかしながらその後、成熟したときに雌の発情と非発情尿を区別するために、多くの尿やさまざまな匂いを嗅いで雄は学習しておく必要があることが、若齢個体においてフレーメンの発現割合が高くなる一要因となったのかもしれない。また、離乳していない個体によるフレーメンは親由来のフェロモンを感知して親の認識を明確にすることが必要であるため、成獣よりは頻度高く匂いをかいでフレーメンによって匂い物質を検出する必要があると考えられた。

以上から、雌ヒツジは雄とのコミュニケーションの媒体として尿を利用し、尿からの匂い情報を常に一定の頻度で雄に伝達していると考えられた。つまりフレーメンは雌ヒツジの性周期に直接依存しているのではなく、雌ヒツジの排尿回数に依存しているため、見かけ上、性周期に伴って頻度に変動していると考えられた。このことは、雄ヒツジが発情と非発情の雌の尿の識別をする際に、必ずしもフレーメン行動を行わないという *Blissit et al.(1990a)*の報告を裏付けた。このようにして、雌は排尿行動によって自らの繁殖に係わる生理状態を積極的に雄に伝えていると考えられた。一方、雄は雌の尿からのメッセージをフレーメンによって定期的にモニターすることによって性周期を確認し、さらに鼻つけ行動によって雌の発情を再確認しているのではないだろうか。つまり、2種類の匂い嗅ぎ行動によって得られた受精適期の情報は、雄によって総合的に判断され、乗駕行動を引き起こす重要な鍵を担っていると考えられた。

哺乳類の嗅覚系には2つの主要な情報処理系が存在する(図 26)。一方が嗅覚系であり、もう一方は鋤鼻系である (*Keverne 1978b*)。嗅覚系では鼻腔粘膜の嗅上皮で匂いが受容され、鋤鼻系では鋤鼻器の上皮で匂いが受容される (椛、瀬戸 1991)。ヒツジにおいては、

これらに関与している行動が鼻つけとフレーメンの2種類の匂い嗅ぎ行動であると考えられた。

フレーメン行動によって得られた匂いは、鋤鼻器を介して情報処理されることが知られている (Melese-d'Hospital et al. 1985, Bland & Jubilan 1987)。一方、鼻つけによって得られた一般的な匂いは鋤鼻系ではなく嗅覚系によって処理されると予想される。

フェロモンは主に鋤鼻系で認識される。鋤鼻器の鋤鼻神経によって認識されたフェロモン情報は副嗅球、扁桃体を経て最終的に視床下部に到達すると考えられており (Shipley et al. 2004)、鋤鼻系と嗅覚系とは独立した神経回路を構成している。しかしながら最近の研究においてフェロモンは、嗅覚系と鋤鼻系の両方で認識されることがわかってきた。ハムスターの鋤鼻神経切断実験 (Powers & Winans 1975) などによる多くの研究によってフェロモンは鋤鼻器で認識されるという概念は、すでに広く受け入れられている。また、近年の電気生理学的研究からは、揮発性および不揮発性のフェロモンが鋤鼻神経を興奮させることが確かめられている。一方、雌豚に不動化を起こすフェロモン (アンドロステノン; 5- α -androst-16-en-3-one) (Dories et al. 1997)は嗅上皮で認識されていること、またマウスのフェロモン(methylthio-methanethiol)が主嗅球の特定の糸球体を活性化することがわかってきた (Lin et al. 2005)

これらのことから、鋤鼻系と主嗅覚系の2つの嗅覚系路によってフェロモンは認識されていることが、すこしづつ明らかになってきている。以上の研究結果を考慮すると、本研究で示されたフレーメンと鼻つけの2種類の雄のにおい嗅ぎ行動は、いずれもフェロモンを受容している可能性が考えられるが、フレーメンは性周期をモニタリングするために乗駕行動に先んじて発現しており、その際にフェロモンを認識していると考えられる。その後、鼻つけ行動によって、フェロモンは再度、嗅上皮のフェロモン受容体によって受容されてさらに大脳辺縁系に伝達され、最終的には受精適期を判断していることが推測される。その情報が、乗駕行動を起こす引き金となっているのではないだろうか。雄の2種類のにおい嗅ぎ行動はそれぞれ、認識、受容、行動発現といった経路で、それぞれ機能を分担し

ているのかもしれない。

2. 今後の展望

本研究から、ヒツジの行動から受精適期を予測するための基礎的知見は得られた。今後はこの結果を応用して、人工授精技術への利用によって産業に還元できるようにすることが重要課題である。例えば、雌ヒツジの排尿回数を簡便にカウントできるような小型の計測機器の開発やその実用化、またその機器からの情報を経時的に捉えることができる簡便なシステムが開発できれば、雌の受精適期を常時把握できるような個体管理が可能となるであろう。またこの機器からの情報を計算させて自動的に雌の受精適期を予想し、飼育者の携帯メールやパソコンに事前に予知情報が入るようなシステムができれば、省力管理に大きく貢献できると考えられる。このような情報の提供は、ヒツジの人工授精による受胎率向上の一助となり、舎飼いのみならず放牧飼育管理においても繁殖効率をあげて生産性を高めることになるであろう。また、家畜羊のみならず近縁種の繁殖にも応用可能であり、野生展示動物などを対象とする動物産業にも貢献できるであろう。

さらに本研究から得られた知見を発展させて、雌の尿中あるいは膺分泌物内のホルモンやフェロモン様物質、あるいは尿のにおい物質の動態と雄の脳内伝達物質との関係を捉えたり、雌の性的魅力や雄との相性など、嗅覚・行動・脳との関係に関する研究に取り組むことにより、ヒツジは有用な繁殖モデル動物としての重要な役割を果たす可能性が考えられた。また、今後はフェロモン分子の探索や同定のために、鋤鼻神経や嗅上皮組織、あるいは細胞培養による研究に取り組むために、神経・生理化学的領域にまで視野を広げ、異分野の研究者との共同研究に取り組むことができれば、今だに未解明な点が多い嗅覚系に関する研究は加速すると考えられ、その意義は大きい。

謝辞

本研究は、多くの方々の援助を受けて行われたものです。

筑波大学大学院生命環境科学研究科王碧昭教授には、早期修了プログラムにおける博士論文の受け入れに始まり、申請、本論文をまとめるまでにあたって、終始丁寧にご指導賜りましたことを心から感謝いたします。

また快く副査を引き受けてくださり、有益な助言と同時にご指導賜りました、生命環境科学研究科・杉浦則夫教授、繁森英幸教授、中島敏明准教授に心から感謝いたします。さらに、研究全般についてご指導を賜った東京大学農学生命科学研究科・吉川泰弘教授（旧：国立予防衛生研究所筑波医学実験用霊長類センター、センター長）、ホルモン測定のご指導ならびに有益な助言を賜った、独立行政法人医薬基盤研究所、霊長類医科学研究センター（旧国立予防衛生研究所、筑波医学実験用霊長類センター）吉田高志主任研究員ならびに山海直主任研究員に感謝いたします。また研究の場の提供していただいた茨城大学生物生産学部・松沢安夫教授、ホルモン測定キットを提供していただいた旧デンカ製薬(株)（現：川崎三鷹製薬(株)）、実験器材などを提供していただいたと同時に、ご助言を賜った茨城大学生物生産学部・足立吉敷教授に深謝いたします。さらに本研究においてともに実験、観察に取り組んだ元茨城大学・佐野（旧姓 丸茂）契子さんに感謝いたします。

本研究に関する学会発表および研究論文

本研究に関する学会発表

1. 小田切敬子, 吉川泰弘, 松沢安夫. 発情期ペアリングによる羊の性行動および休息行動の同調性. 日本家畜管理研究会. 1993年3月.
2. 小田切敬子, 丸茂契子, 松沢安夫, 山海直, 吉田高志. 性周期に伴う羊の性行動と血中性ステロイドホルモン濃度との関係. 第88回. 日本畜産学会. 1994年3月.
3. 小田切敬子, 丸茂契子, 吉田高志, 山海直, 松沢安夫. ペアリングした羊の性周期に伴う雄羊のにおい嗅ぎ行動. 日本家畜管理研究会. 1994年3月.
4. 小田切敬子. 雄羊の性行動の解析. 第13回. 日本動物行動学会. 1994年11月.
5. Odagiri, K., Marumo, H., Matsuzawa, Y. & Yoshikawa, Y., Changes in serum progesterone concentrations in ewes and mounting and sniffing behaviour in rams during oestrus cycle. 14th. International Ethological Conference. 1995年7月.
6. 小田切敬子, 性周期に伴う雌羊の排尿行動とそれに対する雄羊の匂い嗅ぎ行動. 第91回日本畜産学会. 1996年3月.

本研究に関する論文

1. 小田切敬子, 丸茂契子, 松沢安夫, 山海直, 吉田高志. プロジェステロン定性測定用キットによる雌羊の性周期判定, 日本緬羊研究会誌, 31, 1-4, 1994.
2. 小田切敬子. 性周期に伴う雌ヒツジの排尿行動とそれに対する雄ヒツジの匂い嗅ぎ行

動, 日本緬羊研究会誌, 32, 49- 53, 1996.

3 . Odagiri, K., Matsuzawa, M. & Yoshikawa, Y., Analysis of sexual behavior in rams. *Exp. Anim.*, 44, 187-192, 1995.

4 . Odagiri, K. & Marumo, H., Oestrus diagnosis in ewes by using a plasma/serum progesterone enzyme immunoassay(EIA) kit. *Anim. Sci. Technol.* 67, 713-718, 1996.

5 . Odagiri, K., Marumo, H. Matsuzawa, Y. & Yoshikawa, Y., Changes in serum progesterone concentrations in ewes and mounting and sniffing behaviour in rams during oestrus cycle. 14, *J. Ethol.* 14, 133-137, 1996.

引用文献

1. Arney, D.R., Kitwood, S.E. & Phillips, C.J.C., The increase in activity during oestrus in dairy cows. *Appl. Anim. Behav. Sci.*, 40, 211-218, 1994.
2. Arnstadt, K.I. & Cleere, W.F., Enzyme-immunoassay for determination of progesterone in milk from cows. *J.Reprod. Ferti.*,62, 173-180, 1981.
3. Banks, E. M., Some aspects of sexual behavior in domestic sheep, *Ovis aries*. *Behaviour.*, 223, 249-279, 1964.
4. Beamer, W., Bermant, G & Clegg, M. T., Copulatory behaviour of the ram, *Ovis Aries*. II: Factors affecting copulatory station., *Anim. Behav.*, 17, 706-711, 1969.
5. Beilby, K.H., Grupen, C.G., Thomson, P.C., Maxwell, W.M. & Evans, G., The effect of insemination time and sperm dose on pregnancy rate using sex-sorted ram sperm. *Theriogenology*, 1, 829-835, 71, 2009.
6. Ben Said, S., Lomet, D., Chesneau, D., Lardic, L., Canepa, S.,Guillaume, D., Briant, C., Fabre-Nys, C. & Caraty, A., Differential estradiolbnrequirement for the induction of estrus behavior and the luteinizing hormone durge in two breeds of sheep. *Biol. Reprod.*, 76,673-680, 2007.
7. Bland, K.P. & Jubian, B.M., Correlation of flehmen by male sheep with female behaviour and oestrus. *Anim. Behav.*, 35,735-738, 1987.
8. Bliss,C.I., *The statistics of bioassay*. 2nd ed. Academic Press, New York and London. pp.482, 1952.
9. Blissitt, M. J., Bland, K. P. & Cottrell, D.F., Discrimination between the odours of fresh oestrus and non-oestrus ewe urine be rams. *Applied.Anim. Behav. Sci.*, 25, 51-59. 1990a.

10. Blissitt, M. J., Bland, K. P. & Cottrell, D.F., Olfactory and vomeronasal chemoception and the discrimination of oestrus and non-oestrus ewe urine odours by the ram. *Applied. Anim. Behav. Sci.*, 27,325-335, 1990b.
11. Borst, G.H., Berghuis, G.A. & Counotte, G.H., Determination progesterone levels in the milk of mares: a useful aid in the diagnosis of early pregnancy. *Tijdschr Diergeneeskd.*, 15, 739-740, 1986.
12. Bryant, M. J. & Tomkins, T., Sexual behaviour of sheep. *Vet. Rec.* 93, 253, 1973.
13. Candappa, I.B., Bainbridge, H.C., Price, N.T., Hourigan, K.R. & Bartlewski, P.M., A preliminary study on the suitability of Cervidil to induce cervical dialation for artificial insemination in ewes. *Res Vet Sci.* 87, 204-206, 2009.
14. Cahill, L. P., Saumande, J., Ravault, J.P., Blanc, M., Thimonier, J., Mariana, J.C. & Mauleon, P., Hormonal and follicular relationships in ewes of high and low ovulation rates. *J. Reprod. Fertil.* 62, 141-150. 1981.
15. Clegg, N. T., Beamer, W. & Bermant, W., Copulatory behaviour of the ram, OVIS ARIES. : Effects of pre- and postpubertal castration and androgen replacement therapy. *Anim. Behav.* 17, 712-717, 1969.
16. Craig, J. V., *Domestic Animal Behaviour* pp326, Prentice-Hall. Nw Jersey. 1981
17. Cushwa, W. T., Bradford, G. E. , Stabenfeldt, G. H. , Berger Y. M. & Dally M. R., Ram influence on ovarian and sexual activity in anestrus ewes: effects of isolation of ewes from rams before joining and date of ram introduction. *J Anim Sci*, 70:1195-1200, 1992.
18. Donchin, G.W., De Vane, G.W. & Canton, D., Metkephamid-induced flehman in lambs. *Physiol. Behav.*, 33, 335-337, 1984.
19. Dorries, K.M., Adkins-Regan, E. & Halpern, B.P. Sensitivity and behavioral responses to the pheromone androstenone are not mediated by the vomeronasal

- organ in domestic pigs. *Brain Behav. Evol.* 49, 53-62, 1997.
20. Eaton, G. G. & Resko, J. A., Ovarian hormones and sexual behavior in *Macaca nemestrina*. *J. Comp. Psychol.* 86, 919-925, 1974.
21. Enomoto, T., The sexual behavior of Japanese monkeys. *Journal of Human Evolution* 3, 351-372, 1974.
22. Enomoto, T., Seki, K. & Haruki, Y., On the correlation between sexual behavior and ovarian hormone level during the menstrual cycle in captive Japanese monkey. *Primates* 20, 563-570, 1979.
23. Estes, R. D., The role of vomeronasal organ in mammalian reproduction. *Mammalia*, 36, 315-341, 1972.
24. Fabre-Nys, C. & Martin, G. B., Role of progesterone and oestradiol in determining the temporal sequence and quantitative expression of sexual receptivity and preovulatory LH surge in the ewe. *J. Endocrinol.*, 130, 367-379, 1991.
25. Fabre-Nys, C. & Venier, G., Development and use of a method for quantifying female sexual behaviour in ewes. 17, 289-304, 1987.
26. Fagen, R. & Mankovich, N.J., Two-act transitioned contingency tables, and the significant cells problem. *Anim. Behav.*, 28, 1017-1023, 1980.
27. Fukui, Y., Kohno, H., Togari, T. & Hiwasa, M., Fertility of ewes inseminated intrauterinally with frozen semen using extender containing bovine serum albumin. *J. Reprod. Dev.* 53, 959-962, 2007.
28. Fukui, Y., Kohno, H., Togari, T., Hiwasa, M. & Okabe, K., Fertility after artificial insemination using a soybean-based semen extender in sheep. *J. Reprod. Dev.* 54, 286-289, 2008.
29. 福井豊, 増田萬孝, 宮本明夫, 浅見淳之. めん羊産業における周年繁殖の確立・実用化とその経済効果 1、シープジャパン, 12, 1994.

30. 福井豊. 凍結精液による定時人工授精、シーブジャパン、2, 1992
31. Geary, T.W. & Reeves, J. J., Relative importance of vision and olfaction for estrus by bulls. *J. Anim. Sci.* 70, 2726-2731, 1992
32. Gelez, H & Fabre-Nys, C., Role of the olfactory systems and importance of learning in the ewes' response to rams or their odors. *Reprod. Nutr. Dev.* 46, 401-415, 2006
33. Glencross, R.G., Esslemont, R.J., Breant, M.J. & Pope, G.S., Relationships between the incidence of pre-ovulatory behaviour and the concentrations of oestradiol-17 β and progesterone in bovine plasma. *Appl. Anim. Ethol.* 7, 141-148, 1981.
34. Gordon, B., Clegg, M. T. & Beamer, W., Copulatory behaviour of the ram, *OVIS ARIES*. 1: A normative study. *Anim. Behav.* 17, 700-705, 1969.
35. Goodwin, M., Gooding, K.M. & Regnier, F., Sex pheromone in the dog. *Science*, 203, 559-561, 1979.
36. Hafez, E. S.E. & Scott, J., The behaviour of sheep and goats. The behaviour of domestic animals. pp.297-333. Baillier, Tindall, London. 1962.
37. Hafez, E.S.E., Behaviour of domestic animals (3rd ed.). pp.256-265, Baillier Tindall, London. 1975.
38. Harnik, J.F., King, G. J. & Robertson, H. A., Estrous and related behaviour in postpartum Holstein cows. 1975 *Appl. Anim. Ethol.* 2, 55-68, 1975.
39. Houpt, K. A., Rivera, W. & Glickstein, L., The flehmen response of bull and cows. *Theriogenology* 32, 343-349, 1989.
40. Houpt, K. A. & Wolski, T. R., Domestic Animal Behaviour for Veterinarians and Animal Science. Pp 115-122. Iowa State University Press. 1982.
41. Hulet, C., Ercanbrack, S., Price, D., Blackwell, R. & Wilson, L. Mating behavior of the ram in the one-sire pen. *J. Anim. Sci.* 21.857-864, 1962a.
42. Hulet, C., Ercanbrack, S., Blackwell, R. Price, D. & Wilson, L., Mating behavior of

- the ram in the multi-sire pen. *J. Anim. Sci.* 21, 865-869, 1962b.
43. Hulet, C., Blackwell, R., Ercanbrack, S., Price, D. & Wilson, L., Mating behavior of the ewe. *J. Anim. Sci.* 21, 870-874, 1962c.
44. 平子 誠. Progesteronee 測定用市販キットの特性について, *家畜繁殖誌*, 35, 52-55. 1989.
45. 平子 誠. 仮屋堯由, 百目鬼郁男, マイクロプレートを用いた酵素免疫測定法キットによる牛血漿中プロゲステロンの直接測定. *家畜繁殖誌*, 33, 134-139, 1987.
46. Hiwasa, M., Kohno, H., Togari, T., Okabe, K. & Fukui, Y., Fertility after different artificial insemination methods using a synthetic semen extender in sheep. *J. Reprod. Dev.* 55, 50-54, 2009.
47. l'Anson, h. & Legan S. J., Changes in LH pulse frequency and serum progesterone concentrations during the transition to breeding season in ewes. *J. Reprod. Fert.*, 82, 341-351, 1988.
48. Jensen, P., An analysis of agonistic interaction patterns in group-housed dry sows-Aggression regulation through an "avoidance order" *Appl. Anim. Behav.*, 9, 47-61, 1983.
49. Johanson, A., A., Stanley, C. J. & Self, C.H., A fast highly sensitive colorimetric enzymeimmunoassay system demonstrating benefits of enzyme amplification in clinical chemistry. *Lin. Chim. Acta.*, 148, 119-124, 1985.
50. 粕谷英一, 藤田和幸. *動物行動学のための統計学*, 東海大学出版会, pp48-73, 1984.
51. 椋秀人, 瀬戸勝男. 匂いの記憶と生殖内分泌, *日本生理学雑誌*, 53, 151-168, 1991.
52. Kennaway, D.J., Dunstan, E.A., Gilmore, T.A. & Seamark, R.F., Effect of pinealectomy, oestradiol and melatonin on plasma prolactin and LH secretion in ovariectomized sheep. *J. Endocrinology*, 102, 199-207, 1984.
53. Keverne, E. B., Olfactory cues in mammalian sexual behaviour. In *Biological*

- Determinants of Sexual Behaviour(ed. Hutchinson, J.). John Willey. Chichester. pp723-763, 1978a.
54. Keverne, E. B., Olfaction and taste-dual systems for sensory processing. *Trends Neurosci.* 1, 32-34, 1978b.
 55. Keverne, E. B., Pheromonal influences on the endocrine regulation of reproduction. *Trends Neurosci.* 6, 381-384, 1983.
 56. Ladewig, J. E., Price, E.O. & Hart, B.L., Flehmen and vomeronasal organ function in male goats. *Physiol. Behav.* 24, 1067-1071, 1980.
 57. Ladewig, J. E. & Hart, B.L., Flehmen and vomeronasal organ function in male goats. *Physiol. Behav.* 24, 1067-1071, 1980.
 58. Lin, D.Y., Zhang, S.Z., Block, E. & Katz, L.C. Encoding social signals in the mouse main olfactory bulb. *Nature.* 434. 470-477.2005.
 59. Lindsay, D.R. & Robinson, T.J., Oestrus-inducing activity of testosterone in the ewe. *Nature.* 192, 761-762, 1961.
 60. Lindsay, D.R. & Fretcher, I.C., Ram-seeking activity associated with oestrous behaviour in ewes. *Anim. Behav.* 20, 452-456, 1972.
 61. Lloyd-Thomas, A. & Kevern, E.B., Role of the brain and accessory olfactory system in the block to pregnancy in mice. *Neuroscience*, 7, 907-913. 1982.
 62. Martin, P. & Bateson, P., *Measuring behavior an introductory guide.* Cambridge university Press. 1986.
 63. Melese-d' Hospital, P. Y. & Hart, B.L., Vomeronasal organ cannulation male goats: evidence for transport of fluid from oral cavity to vomeronasal organ during flhmen. *Physiol. Behav.* 35, 941-944, 1985.
 64. Meredith, M., Sensory physiology of pheromone communication. In:Vandenbergh, J.G. *Pheromes and reproduction in Mammals*, 199-252, Academic Press, New York.

1983.

65. Moriyoshi, M., Tanaka, M., Nakao, T. & Kawata, K., Early pregnancy diagnosis in the sow by saliva progesterone measurement using a bovine milk progesterone qualitative test EIA kit. *J. Vet. Med. Sci.* 58, 737-741, 1996.
66. Moriyoshi, M., Nozaki, K., Ohtaki, T., Nakao, T. & Kawata, K., Measurement of gestagen concentration in feces using a bovine milk progesterone quantitative test EIA kit and its application to early pregnancy diagnosis in the sow. *J. Vet. Med. Sci.* 59, 695-701, 1997.
67. 正木淳二 編, 哺乳動物の生殖行動 川島書店, pp31-85, 1992.
68. Moss, R.H & McCann, S.M. Induction of mating behavior in rats by luteinizing hormone-releasing factor. *Science. N.Y.*, 171-179. 1973.
69. 中尾敏彦. 性ステロイドの EIA の開発と臨床応用的検討. *家畜繁殖誌*, 35, 30-37, 1989.
70. O'Brien, P.H., Flehmen: Its occurrence and possible function in feral goats. *Anim. Behav.*, 30, 1015-1019, 1982.
71. O'connl, R. J., Singer, A. G., Macrides, F., Pfaffmann, C. & Agosta, C., Responses of the male golden hamster to mixtures of odorants identified from vaginal discharge. *Behav. Biol.* 24, 244-255, 1978.
72. 小田切敬子. 雄ヒツジの性行動の分類と解析, *日本緬羊研究会誌*, 32, 49- 53, 1995.
73. 小田切敬子, 松沢安夫. 子ヒツジの遊び行動における瞬間サンプリング法の適用の検討. *動物心理学研究*, 43, 9-16, 1993.
74. 小田切敬子, 丸茂契子, 松沢安夫, 山海直, 吉田高志. プロジェステロン定性測定用キットによる雌羊の性周期判定, *日本緬羊研究会誌*, 31, 1-4, 1994.
75. Odagiri, K., M. Hamano & Yoshikawa, Y., Egg-eating behaviour in laboratory Squirrel monkeys (*Saimiri sciureus*), *J. Vet. Med. Sci.*, 61, 595-601, 1999.

76. Odagiri, K., M. Matsuzawa & Yoshikawa, Y., Analysis of sexual behavior in rams. *Exp. Anim.*, 44, 187-192, 1995.
77. Odagiri, K. & Marumo, H., Oestrus diagnosis in ewes by using a plasma/serum progesterone enzyme immunoassay(EIA) kit. *Anim. Sci. Techno.* 67, 713-718, 1996.
78. Odagiri, K., Marumo, H. & Matsuzawa, Y., Changes in serum progesterone concentrations in ewes and mounting and sniffing behaviour in rams during oestrus cycle. *J. Ethol.* 14, 133-137, 1996.
79. 大島清 (大西英繭・日高敏隆編) 現代の生物学 3 性行動のメカニズム 7, ニホンザルの性行動の周期性, p101-124. 1982.
80. Pant, H., Hopkinson, C. R. N. & Fitzpatrick, R. J., Concentration of oestradiol, progesterone, luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone in the jugular venous plasma of ewes during the oestrus cycle. *J. Endocr.*, 73, 247-255. 1977.
81. Pfaff, D.W., Luteinizing hormone-releasing factor potentiates lordosis behavior in hypophsectomized ovariectomized female rats. *Science.* 182, 1148-1149, 1973.
82. Powers, M. & Winans, S.S. Vomeronasal organ: critical role in mediating sexual behavior of the male hamster. *Science.* 187. 961-963. 1975.
83. Quirk, J.F., Hanrahan, J. P. & Gosling, J.P., Plasma progesterone levels throughout the oestrous cycle and release of LH at oestrus in sheep with different ovulation rates. *J. Reprod. Fertil.* 55, 37-44, 1979.
84. Radford, H. M., Watson, R. H. & Wood, G. F., A crayon and associated harness for the detection of mating under field conditions. *Aus. Vet. J.*, 36, 57-66, 1960.
85. Rainhardt, V., Flehmen, mounting and copulation among member of a semi-wild cattle herd. *J. Ethol.* 31, 641-650, 1983.
86. Reynolds, J. & Kevern, E. B., The accessory olfactory system and its role in the pheromonally mediated suppression of oestrus in grouped mice. *J. Reprod. Fert.* 57,

- 31-35, 1979.
87. Robertson, H. A., *Reproduction in domestic Animals*. (Cole, H. H. and P.T. Cupps eds.). 479-787. Academic Press. New York. 1977.
88. 佐久間昭. 生物検定法, pp.173-190. 東京大学出版会, 東京, 1964
89. 関澤乙吉. 第3節めん羊の特性, “新しいめん羊飼育法”, pp59-61, 社団法人日本緬羊協会, 1887.
90. Schmidt, A. M., D.L. Hess, M. J. Schmidt, R. C. Smith & Lewis, C. R., Serum concentrations of oestradiol and progesterone, and sexual behaviour during the normal oestrus cycle in the leopard (*Pantera pardus*). *J. Reprod. Fert.* 82, 43-49, 1988.
91. Shipley, M.T., Ennis, M. & Puche, A.C. *In The rat nervous system*. Academic Press, Amsterdam, pp923-964, 2004
92. Stevens, K., Perry, G.O. & Long, S., Effect of ewe urine and vaginal secretions on rams investigative behavior. *J. Chem. Ecol.* 8, 23-29, 1982.
93. Stoops, M.A., Liu, I.K., Shideler, S.E., Lasley, B.L., Fayrer-Hosken, R.A., Benirschke, K., Murata, K., van Leeuwen, E.M. & Anderson, G.B., Effect of porcine zonae pellucidae immunisation on ovarian follicular development and endocrine function in domestic ewes (*Ovis aries*). *Reprod Fertil Dev.* 18, 667-676, 2006.
94. 竹内公志, 中尾敏彦, 森好政晴, 河田啓一郎. 牛乳中 progesterone 測定用キット (Ovucheck EIA kit)の臨床応用. *日獣会誌*, 40, 95-99, 1987.
95. 田中樹竹, 中尾敏彦, 河原隆人, 森好政晴, 河田啓一郎. 牛血漿中 progesterone 測定用 EIA キット(Ovucheck)の実用性についての検討. *日獣会誌*, 41: 83-87, 1988.
96. 戸苅哲朗, 出岡謙太郎, 寒河江洋一郎. 当歳雌羊の繁殖性に関する調査. *日緬羊研究会誌*, 26, 11-14, 1989.
97. Tilbrook, A.J. & Lindsay, D. R., Differences in the sexual “attractiveness” of oestrous

- ewes to rams *Appl. Anim. Behav. Sci.*, 17, 129-138, 1987.
98. Umezu, M., J. Masaki, H. Sasada & Ohta, M., Mating behaviour of a bull and its relationship with serum LH levels in a group oestrus cows. *J. Reprod. Fert.* 63, 467-470, 1981.
99. Van De Wiel, D.F.M., Kamonpatana, M., Ngramsurijaroy, C.H. Koops, W. and Singhanjan, S., Enzymeimmunoassay of milk-progesterone: its application to oestrus confirmation and early pregnancy diagnosis in cattle. *Vet. Q.*,:4:72-78.1982.
100. Walton, J.S., McNeilly, J.R., McNeilly, A.S. & Cunningham, F.J., Changes in concentrations of follicle-stimulating hormone, luteinizing hormone, prolactin and progesterone in the plasma pof ewes during the transition from anoestrus to breeding activity. *J.Endocrinol.*, 75, 127-136, 1977.
101. 吉本 正 監修 (出岡謙太郎訳) NRC 飼養標準めん羊 第 6 次改訂版, 日本緬羊研究会. 1991.