

## ヌードマウスの繁殖能力の再検討

川崎医科大学 動物飼育センター

北 徳, 山下 貢 司

川崎医療短期大学 微生物学教室

仲 田 包 著

(昭和54年2月24日 受付)

Reexamination on Reproductive Performance in the  
Congenitally Athymic "Nude" Mice

Megumu Kita, Koshi Yamashita

Laboratory Animal Center, Kawasaki Medical School

Kaneaki Nakata

Department of Microbiology, Kawasaki Paramedical College

(Accepted on Feb. 24, 1979)

**Nude mouse** の繁殖能力について再検討する目的で, **nude mouse** (BALB/c-*nu/nu*, SPF) と **normal mouse** (BALB/c-*nu/+*, SPF) について交尾率, 妊娠率などを比較検討した.

*nu/nu* ♀ と *nu/nu* ♂ を交配した場合, 67.4% の *nu/nu* ♀ が交尾し, その 37.9% で妊娠が成立した. *nu/nu* ♂ との交配で妊娠しなかった *nu/nu* ♀ に *nu/+* ♂ を交配した場合, 83.7% の *nu/nu* ♀ で交尾が確認され, その 62.5% が妊娠した. *nu/nu* ♀ に交配したと同じ *nu/nu* ♂ を *nu/+* ♀ に交配した場合, 86.6% の *nu/+* ♀ が交尾し, その 51.2% が妊娠した. *nu/nu* ♀ との交配で妊娠しなかった *nu/+* ♀ に, *nu/nu* ♀ に交配したと同じ *nu/+* ♂ を交配した場合, すべての *nu/+* ♀ が交尾し, その 96.0% が妊娠した.

これらのことから, **nude mouse** の, 雌では受胎能力が, 雄では交尾, 授精能力が **normal mouse** に比較して劣っていることが明らかである.

Reproductive performance of nude mice (BALB/c-*nu/nu*, SPF) was reexamined comparing with it of normal mice (BALB/c-*nu/+*, SPF).

When *nu/nu* females were mated with *nu/nu* males, the copulation was detected in 67.4% of *nu/nu* females within 3-wks-cohabitation, 37.9% in which females conceived. Besides, if *nu/nu* females that could not conceive within 3-wks-cohabitation with *nu/nu* males were mated with *nu/+* males, the copulation was detected in 83.7% of the above non-copulated *nu/nu* females, 62.5% in which females conceived. On the other hand, 86.6% of females copulated

within 3-wks-cohabitation when nu/+ females were mated with nu/nu males, and 51.2% of copulated nu/+ females conceived. Then, nu/+ females that were infertile within 3-wks-cohabitation with nu/nu males copulated without exception, as they were mated with nu/+ males, and 90.6% of them conceived.

These findings suggested that the reproductive performances of nu/nu females and males are considerably inferior to those of nu/+ females and males.

## はじめに

Nude mouse (nu/nu) は、その発見以来、多くの研究分野において注目を集め、いくつかの分野では、重要な研究手段あるいは研究目標となっている。発見当初には、nude mouse の飼育繁殖は非常に困難であるとされていたが、Pantelouris<sup>1)</sup> によって nude mouse が遺伝的に無胸腺であり、おおむね完全な B-cell 動物であることが確認されると同時に、実験動物としての有用性が改めて認識され、その繁殖法の開発に多くの努力がなされるようになった。その結果、通常環境においても、幼若時に免疫学的処置を加えれば長期の飼育と繁殖が可能であること<sup>2,3)</sup>、そして、SPF 状態で飼育するならば、免疫学的処置を加えなくとも繁殖が可能であり、かなりの長期間にわたって生存し得ることが明らかとなった<sup>4,5,6,7)</sup>。Nude mouse は、SPF 環境であれば、容易に妊娠、分娩させ得ることより、それまでに報告されていた nude mouse の内分泌器管にみられる機能不全<sup>8)</sup> は、微生物感染による wasting の一つの現われであることも証明されるに至った<sup>7)</sup>。しかしながら、近年 Nagasawa and Yanai<sup>9)</sup> は、nude mouse は normal mouse に比較して乳腺の発育が著しく劣っており、mammothrophin に対する乳腺の反応性も低いと報告している。また、SPF 状態であっても、卵巣を始めとするいくつかの内分泌器管に、組織学的には機能低下が認められるとする報告<sup>14)</sup> もあり、nude mouse の雌は、SPF 状態であれば正常に妊娠、分娩し得ると結論するには、なお十分に検討する必要があると思われる。

本報告は、nude mouse の繁殖能力について再検討する目的で nude mouse (nu/nu) と

normal mouse (nu/+) の交尾率、妊娠率などを比較検討したものである。

## 材料と方法

実験に用いた nude mouse は、1976年に武田薬品光工場(山口)より分与を受けた BALB/c-nu/nu (BC-8, SPF) で、以後、川崎医科大学動物飼育センターにおいて系統維持を行なっているものである。Nude mouse は、電気集じん器を設置した室温 20~27°C の飼育室において、東京大学医科学研究所の鈴木ら<sup>10)</sup> の方法に習い、アイソキャップ付テフロンケージ (Lab. Products, USA) に収容し、クリンラック (岡崎産業・東京) 中で飼育した。日長条件は、人工照明により14時間明、10時間暗に調節した。飼料は、滅菌用固型飼料 (オリエンタル酵母・東京) を用い、飼料は 121°C 30分、水は 121°C 45分 加圧滅菌した後常時給与した。また、飼育資材、作業衣などはすべて加圧滅菌、あるいは、エチレンオキサイドガス滅菌したものをを用いた。実験には、90~150日令の nude mouse (nu/nu), normal mouse (nu/+) を供試した。これらの雌雄の交配実験の方法は Fig. 1 に図示し、以下に説明する遺伝子型の組み合わせによって交配した。

〔実験 I〕 nu/nu ♀ と nu/nu ♂ を、♀3:♂1 の比率で3週間同居させ、毎朝膣垢と膣栓によって交尾の有無を判定した。3週間の同居の後に、nu/nu ♂ のみを分離した。次に、nu/nu ♂ との同居によって妊娠しなかった nu/nu ♀ は、その妊娠能力を検査する目的で、♂分離の1週間後に再び nu/+ ♂ と同居させ、同じく3週間にわたって膣垢と膣栓の検査を実施した。

〔実験 II〕 実験 I では、nu/nu ♀ の妊娠能

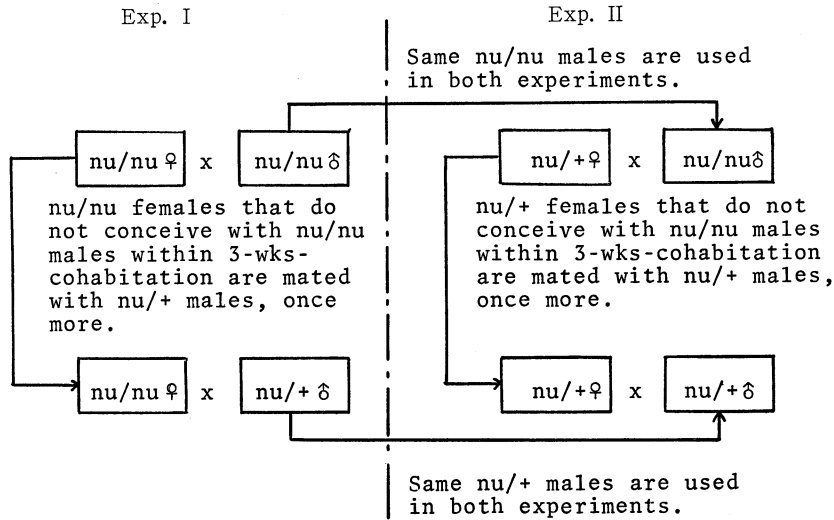


Fig. 1. Experimental design

Exp. I: Fertility of nu/nu females that are infertile during 3-wks-cohabitation with nu/nu males are tested by nu/+ males.

Exp. II: Fertility of nu/+ females that are infertile during 3-wks-cohabitation with nu/nu males are tested by nu/+ males.

From the results obtained in this experimental design, fertility of nu/nu females and males are examined comparing with those of nu/+ females and males.

力の検討を行ったが、実験IIでは、逆に nu/nu ♂ の交尾、授精能力について同様に検討した。すなわち、実験Iで用いた nu/nu ♂ の交尾、授精能力を検査する目的で、nu/nu ♂ を nu/+ ♀ に、♀3:♂1の比率で同居させ、3週間にわたって交尾の有無を検査した。そして、nu/nu ♂ との同居中に妊娠しなかった nu/+ ♀ の妊娠能力を、nu/+ ♂ によって再検査した。

上の交配組合わせのそれぞれについて、次の項目について比較検討を加えた。

**交尾率:** 交配した♀に対する交尾の認められた頭数の割合 (交尾頭数/交配頭数. ×100%) によって表わす交尾率Iと、交配したすべての♀が♂との同居中に示した発情の総回数に対する交尾回数の割合 (総交尾回数/総発情回数. ×100%) によって表わす交尾率IIを求めた。なお、交尾の確認は、膣栓と膣垢中の精子によって行い、発情は、膣垢像によって判定した。

**妊娠率:** 交尾頭数に対する妊娠頭数の割合 (妊娠頭数/交尾頭数. ×100%) によって表わす

妊娠率Iと、総交尾回数に対する妊娠成立回数の割合 (妊娠成立回数/総交尾回数. ×100%) によって表わす妊娠率IIを求めた。

**分娩率:** 分娩率は、妊娠の成立した♀のうち分娩の見られた♀の割合として示した。また、分娩した♀のうち、分娩異常によって分娩時に死亡した♀の割合を分娩時死亡率とした。

これらの数値の交配組合わせ間に見られる差について、統計的有意性を x<sup>2</sup>-test によって検討した。

### 結 果

得られた結果を **Table 1, 2** および **3** に示す。

**[実験I]** nu/nu ♀ に nu/nu ♂ を交配し、それによって妊娠しなかった nu/nu ♀ に、さらに nu/+ ♂ を交配する交配実験によって次の結果を得た。

nu/nu ♀ に nu/nu ♂ を交配した場合、3週間の同居中に 67.4% (交尾率I) の nude ♀ が交尾したが、交尾率IIは、37.8%と低い値であった。3週間の間に交尾した nu/nu ♀ のう

**Table 1.** Copulation and Conception Rates in Exp. I and Exp. II

Genotype of ♀♀ Geno- type of ♂♂	Exp. I				Exp. II			
	nu/nu				nu/+			
	Copulation Rate*		Conception Rate**		Copulation Rate		Conception Rate	
	I	II	I	II	I	II	I	II
nu/nu	67.4 (29/43)	37.8 (49/129)	37.9 (11/29)	22.4 (11/49)	86.6 (39/45)	43.0 (65/151)	51.2 (20/39)	30.7 (20/65)
nu/+	83.7 (27/32)	44.1 (34/77)	62.5 (20/32)	58.8 (20/34)	100 (25/25)	91.4 (32/35)	96.0 (24/25)	75.0 (24/32)

$$\begin{aligned}
 \text{*Copulation rate:} & \begin{cases} \text{I} = \frac{\text{Number of copulated female}}{\text{Number of female used}} \times 100 \% \\ \text{II} = \frac{\text{Total number of copulation}}{\text{Total number of estrus}} \times 100 \% \end{cases} \\
 \text{**Conception rate:} & \begin{cases} \text{I} = \frac{\text{Number of female conceived}}{\text{Number of copulated female}} \times 100 \% \\ \text{II} = \frac{\text{Total number of conception}}{\text{Total number of copulation}} \times 100 \% \end{cases}
 \end{aligned}$$

**Table 2.** Rate of parturition and maternal death rate at parturition in Exp. I and Exp. II

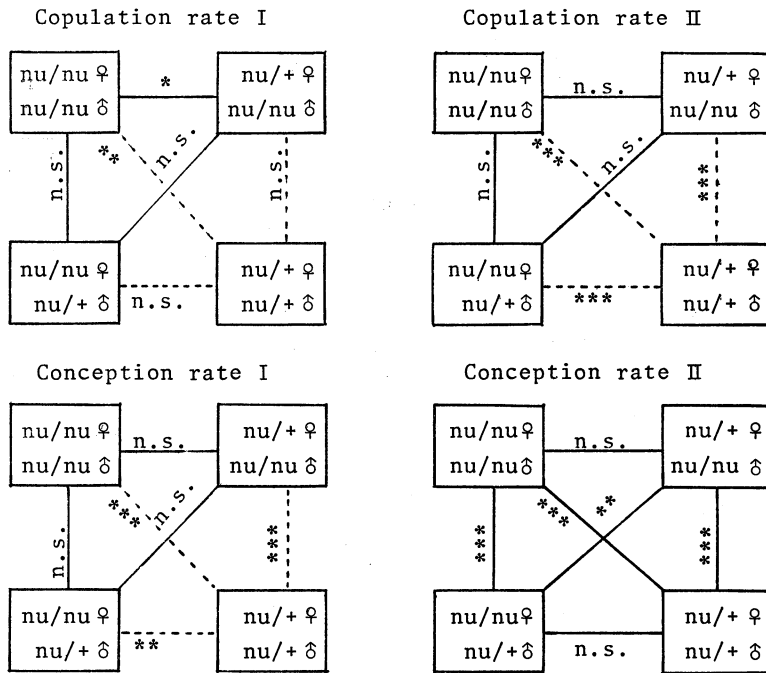
Genotype of ♀♀ Geno- type of ♂♂	Exp. I		Exp. II	
	nu/nu		nu/+	
	Rate of parturition %	Maternal death rate %	Rate of parturition %	Maternal death rate %
nu/nu	90.9 (10/11)	20.0 (2/10)	100 (20/20)	0 (0/20)
nu/+	100 (20/20)	10.0 (2/20)	100 (24/24)	0 (0/24)

ち、37.9% (妊娠率 I) が妊娠したが、総交尾回数に対する妊娠率 II は、非常に低く、22.4% であった。次に、nu/nu♂ との交配によって妊娠しなかった32頭の nu/nu♀ を nu/+♂ と交配したところ、3週間の同居中に83.7% (交尾率 I) が交尾した。そして交尾率 II も44.1% と nu/nu♂ との交配によって得られた成績よりも高くなったが、いずれの場合にも、交尾♂ の遺伝子型の違いによる差は、統計的に有意でなかった。また、この場合の妊娠率 I は62.5%、妊娠率 II は58.8% であり、nu/nu♂ と交配した場合のほぼ2倍の値となった。ここで妊娠率 I にみられた差は、統計的には有意で

はなかったが、妊娠率 II にみられた差は有意性を示唆した。nu/nu♂ との交配で妊娠した nu/nu♀ は、11頭のうち10頭 (90.9%) が分娩し、残り1頭は、妊娠16日目に早産した。また、nu/+♂ との交配によって妊娠した nu/nu♀ は全例が分娩した。しかし、いずれの場合にも分娩時に母マウスの死亡が観察され、分娩時母死亡率は、それぞれ20.0%と10.0%であった。

〔実験 II〕 nu/+♀ に nu/nu♂ を交配し、それによって妊娠しなかった nu/+♀ にさらに nu/+♂ を交配する交配実験によって、次の結果を得た。

**Table 3.** Summary of the results of Chi-Square test for 2x2 contingency tables



\*\*\*:  $p < 0.001$ , \*\*:  $0.001 < p < 0.01$ , \*:  $0.01 < p < 0.05$ , n.s.:  $0.05 < p$ . Yates' correction for continuity was applied to the tables indicated by dotted lines.

nu/+ ♀ に nu/nu ♂ を交配した場合、3週間の同居中に 86.6% (交尾率 I) の♀が交尾し、交尾率 II は 43.0% であった。nu/nu ♂ との同居中に交尾した 39頭の nu/+ ♀ のうち 20頭 (妊娠率 I: 51.2%) が妊娠し妊娠率 II は 30.7% であった。次に、nu/nu ♂ との交配によって妊娠しなかった nu/+ ♀ を nu/+ ♂ と交配したところ、全例において交尾が確認され、交尾率 II も 91.4% と高い結果であった。この場合の妊娠率 I は 96.0% と極めて高く、妊娠率 II も 75.0% と、nu/nu ♂ との交配によって得られた成績よりもはるかに高い値であった。これら交配♂の遺伝子型間にみられた差は、交尾率 I を除いていずれの場合にも統計的に有意性を示していた。nu/nu ♂、および、nu/+ ♂ との交配によって妊娠した nu/+ ♀ は、すべて正常に分娩し、nu/nu ♀ に見られたような分娩時死亡は観察されなかった。

**[実験 I と実験 II の比較]**

nu/nu ♂ を nu/nu ♀ に交配した場合、交尾率 I は 67.4%、交尾率 II は 37.8% であるのに対して、同じ nu/nu ♂ を nu/+ ♀ に交配した時の交尾率 I は 86.6%、交尾率 II は 43.0% であり、交尾率 I、II とともに、nu/nu ♂ に交配する♀の遺伝子型がヘテロ (nu/+) である場合が常に高い値であった。ただし、統計的には交尾率 I にみられた差のみが有意性を示した。さらに、nu/nu ♀ に nu/nu ♂ を交配した場合の妊娠率 I は、37.9%、妊娠率 II は 22.4% であったのに

対して、nu/+ ♀ に nu/nu ♂ を交配した場合は、それぞれ 51.2%、30.7% であった。♀が nu/+ である場合の値が少しずつ高い値であったが、♀の遺伝子型の違いによる差は統計的に有意でなかった。また、実験 I、II を通じて、13.3% の nu/nu ♂ で交尾がみられなかった。一方、nu/+ ♂ を nu/nu ♀ に交配した場合、交尾率 I は 83.7%、交尾率 II は 44.1% であるのに対して、同じ nu/+ ♂ を nu/+ ♀ に交配した場合、交尾率 I は 100.0%、交尾率 II は 91.4% と極めて高い値が得られた。♀がヘテロ (nu/+) の場合の値が有意に高い結果であった。さらに、nu/nu ♀ に nu/+ ♂ を交配した場合の妊娠率は、妊娠率 I が 62.5%、II が 58.8% であったのに対して、nu/+ ♀ に nu/+ ♂ を交配した場合、それぞれ 96.0%、75.0% であった。♀の遺伝子型の違いによる差は、妊娠率 I の場合有意であった。なお、nu/+ ♂ では、

nu/nu♂ との交配によって妊娠しなかった♀に交配したにもかかわらず、実験 I, II を通じて交尾のみられない個体は認められなかった。

## 考 按

Nude mouse (nu/nu) は、先天的に無胸腺 (athymic) である為に、感染症にかかり易く、通常環境においては多くが短命であり、しかも、繁殖は極めて困難である。発見当初は、単に飼育の困難な無毛症遺伝子と考えられていたにすぎないが、1968年に Pantelouris<sup>1)</sup> によって先天的に無胸腺であることが発見されて以来、免疫学分野では重視され、飼育繁殖の困難さにもかかわらず世界中に急速に広がり、特に細胞免疫に関しては長足の展開を示すに至った。Nude mouse の実験使用の高度需要性から、通常環境における繁殖法について種々の検討が積み重ねられ、抗生物質などの薬物投与はほとんど効果を示さないが、幼若時に、normal mouse の胸腺細胞、あるいは脾臓細胞を移植することにより、長期飼育と繁殖が可能になることが明らかにされた<sup>3)</sup>。しかし、このことは実験の目的によっては全く無意味になり満足すべき需要性を欠いている。そして、nude mouse を SPF 環境において飼育するならば、通常環境において現われる wasting も出現せず、長期飼育と繁殖が可能であることが明らかにされ、nude mouse の大量生産が初めて可能になった<sup>5,6,7,10,11)</sup>。さらに一方では、SPF 環境で飼育された nude mouse の内分泌機能についても研究され、nude mouse と normal mouse の間に内分泌機能の差は認められず、nude mouse の内分泌機能に異常があるとするそれまでの報告は誤りであることも結論されつつある<sup>7,12,13)</sup>。現在、nude mouse は、SPF 環境で飼育するならば normal mouse とまったく同じに繁殖が可能であると結論されているが、依然として nude mouse を母とした場合に乳仔の離乳率が極めて低い事実がある。この原因についてはまだ明らかでなく、これまでの報告にも十分な検討は加えられていない現状の

ようである。

**Table 1** に示すように、nu/nu♂ と nu/nu ♀ を交配して得られた結果は、交尾率、妊娠率ともに、nu/nu♂ と nu/+ ♀ を交配した場合よりもやや低い値となった。この場合、両者間に有意差は認められないが、nu/+♂ を nu/nu ♀、および nu/+ ♀ に交配した結果は、妊娠率 II を除いた交尾率 I, II、および妊娠率 I において nu/+ ♀ の値が有意に高くなっている。また、妊娠率 II に示されるように♂が nu/nu である場合、交配する♀が nu/nu であると nu/+ であるにもかかわらず不妊交尾の頻度が高い。これらの結果から、nu/nu♂ は、交配する♀が nu/nu, nu/+ のいずれであっても交尾、授精能力が nu/+♂ よりも劣っていることが推察される。また、nu/nu ♀ と nu/nu♂ の交配では、交尾率、妊娠率ともに非常に低く、交尾した nu/nu ♀ のうちわずかに 37.9% が妊娠したにすぎない。しかし、ここで不妊であった nu/nu ♀ にさらに nu/+♂ を交配することによって 83.7% の nu/nu ♀ が交尾し、その 62.5% が妊娠した。このことは、nu/nu ♀ は交配する♂が nu/nu, nu/+ のいずれであっても、交尾をとまなわない発情が多いけれども、交配する♂の交尾、授精能力が高ければある程度まで妊娠可能であることを示している。しかし、nu/nu ♀ と nu/+♂ の交配によって得られた成績は、nu/+ 同志の交配によって得られた成績よりも極めて低いことから、nu/nu ♀ の繁殖能力が nu/+ ♀ に比してかなり低いことが示されると思われる。さらに、nu/+ ♀ に nu/nu♂ を交配した場合も、交尾率、妊娠率ともに低い値にとどまっている。この場合、交尾した♀のうち約半数が不妊に終わったが、不妊であった nu/+ ♀ にさらに nu/+♂ を交配することによって、すべての♀が交尾し、その大部分 (96.0%) で妊娠が成立している成績から考えると、nu/nu♂ は、♀の繁殖能力が正常であっても、多くの場合、♀を受胎させ得ないほどに交尾、授精能力が低いとみなされる。

以上のように、我々の得た結果は、明らかに nu/nu の繁殖能力が ♂ ♀ ともに低いことを示している。ただ、今回は、飼育管理には細心の注意を払ったけれども、微生物検査までは実施できず、真の無病 (SPF) 状態であったか否かの疑問が残っている。飼育管理上、本実験に使用した nude mouse は、比較的頻度の高い脱肛<sup>3)</sup> による衰弱の為に淘汰した例と、実験終了後、腫瘍継代に使用した個体を除いた全例 (16例) が 1.5年\* 以上生存したことから、nude mouse に重大な影響をおよぼすような病原微生物汚染は起っていないと推定される。しかし、nude mouse は、先天的に無胸腺であるために、微生物環境による影響を受けるが、我々の結果から、微生物環境が良好であっても、繁殖能力に低下を来たしていることは否定できない。Nagasawa and Yanai<sup>9)</sup> の報告、および SPF nude mouse に卵巣を始めとするいくつかの内分泌器官の組織学的な機能低下を認めたとする Ruitenbergh and Berkvens<sup>14)</sup> の報告からも、SPF 状態であるならば、nude mouse

の繁殖機能にまったく異常が無いと結論するのは、早計にすぎると考えられる。したがって、nude mouse の繁殖機能については、今後、germfree,あるいは, gnotobiotic nude mouse を用い、さらには、胸腺機能の reconstitute された nude mouse などを用いて、綿密な実験により再検討される必要がある。

\* 本実験に用いた nude mouse colony は、飼育室の完全な barrier system 化改造の為に、1978年5月をもって中断した。Colony 閉鎖の時まで生存した16例の nude mouse は、すべて外見上異常は認められず、wasting は見られなかった。なお、飼育室改造後、1978年10月より SPF nude mouse の維持繁殖を再開し現在に至っている。

#### (謝 辞)

終りに臨み、SPF nude mouse を恵与頂いた武田薬品光工場松山繁夫細菌部長にお礼申し上げる。本研究の機会を与えられ、始終ご鞭撻頂いた当大学中央研究所柴田進部長、および有益な討論を頂いた解剖学教室顔政坤助手に深謝する。

#### 文 献

- 1) Pantelouris, E. M.: Absence of thymus in a mouse mutant. *Nature*, 217: 370—371, 1968.
- 2) 児島昭徳, 田中幸子, 西塚泰章: 先天的無胸腺 “Nude” マウスの妊娠能力について. *実験動物*, 23: 196, 1974.
- 3) 児島昭徳: Conventional “Nude” マウスの飼い方, 殖やし方. *免疫実験操作法*, 1974 増補版, 日本免疫学会編, p. 803—806, 1974.
- 4) Rygaard, J. and Friss, C. W.: The husbandry of mice with congenital absence of the thymus (nude mouse). *Z. Versuchstierk.*, 16: 1—10, 1974.
- 5) Poily, S. M., Ovejera, A. A., Otis, A. P. and Reeder, C. R.: Reproductive behavior of athymic nude (nu/nu-BALB/c/A/ BOM Cr) mice in a variety of environments. In *Proceeding of the first international workshop on nude mice*. ed. by Rygaard, M. and Povlsen, C. O., Gustav Fisher Verlag, Stuttgart, 1974, p. 190—202.
- 6) Holmes, M. C. and Mason, S.: Production of germ-free inbred nude mice. *Ibid.*, 1974, p. 183—188.
- 7) Ohsawa, N., Matsuzaki, F., Tamaoki, N. and Nomura, T.: Endocrine function of the nude mouse. *Ibid.*, 1974, p. 221—226.
- 8) Pierpaoli, W. and Shorkin, E.: Alterations of adrenal cortex and thyroid in mice with congenital absence of the thymus. *Nature (New Biology)*, 238: 282—285, 1972.
- 9) Nagasawa, H. and Yanai, R.: Mammary growth and function and pituitary prolactin secretion in female nude mice. *Acta Endocr.*, 86: 794—802, 1977.
- 10) 鈴木 潔, 須藤カツ子, 小林理造: スードマウスの繁殖・生産ならびに胃癌の異種移植と継代胃癌に対

する制癌剤の影響. 医学のあゆみ, 96 : 288—295, 1976.

- 11) Festing, M. F. W. and King, D.: Large scale production of nude mice. In Proceeding of the first international workshop on nude mice. ed. by Rygaard, J. and Povlsen, C. O., Gustav Fisher Verlag, Stuttgart, 1974, p. 203—208.
- 12) 大沢仲昭：先天性胸腺欠損マウス (nude mouse). 代謝, 11 : 763—772, 1974.
- 13) 山本 慧：ヌードマウスの内分泌機能. 実験動物, 26 : 83—84, 1977.
- 14) Ruitenbergh, E. J. and Berkvens, J. M.: A morphological study of the endocrine system in congenitally athymic (nude) mice. In Proceedings of the second international workshop on nude mice. ed. by Nomura, T. et al., Univ. Tokyo Press, Tokyo, 1977, p. 147—153.