

氏名 (本 (国) 籍)	Mohammad Ibrahim QASIMI (アフガニスタン・イスラム共和国)
主指導教員氏名	東京農工大学 教授 渡 辺 元
学位の種類	博士 (獣医学)
学位記番号	獣医博甲第490号
学位授与年月日	平成29年9月22日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科及び専攻	連合獣医学研究科 獣医学専攻
研究指導を受けた大学	東京農工大学
学位論文題目	Studies on the Relationship between Nutrition and Reproduction in the Japanese Quail (ウズラにおける栄養と生殖の関係に関する研究)
審査委員	主査 東京農工大学 教授 渋谷 淳 副査 帯広畜産大学 教授 佐々木 基 樹 副査 岩手大学 教授 高橋 透 副査 東京農工大学 教授 渡 辺 元 副査 岐阜大学 教授 阿 閉 泰 郎

#### 学位論文の内容の要旨

ファイトステロール(PS)は植物由来の食品添加物で、コレステロール低下作用を有するものとして広く使われている。PSの摂取によって、総コレステロールと低密度リポタンパク質(LDL)コレステロールの値を低下させる。本研究では、PSが副腎機能や生殖機能、内分泌機能に与える新たな影響について雌雄のウズラを用いて、成長期と成熟後に解析した。

成長期の雌雄のウズラで副腎機能と生殖内分泌機能に与えるPSの影響を解析した。慢性的及び急性に嚔嚢内あるいは皮下にPS投与(8, 80, 800 mg/kg BW)を行なった。慢性実験では、7日齢から50日齢まで1日1回、嚔嚢内に投与した。44日齢以降、半数にはACTH(1IU/100g BW)を毎日筋肉内投与し、投与開始後2日と6日に頸静脈より採血した。急性実験では、慢性実験と同様の用量のPSを皮下に投与し、3, 6, 24時間後に採血した。両実験の結果から、いずれの容量のPS投与によってもACTH投与後のコルチコステロンレベル(C)がPSの溶媒とした中鎖トリグリセリド(MCT)投与群及び対照群より増加した。しかしながら、テストステロン(T)濃度と性腺重量は雌雄ともにMCT投与群及び対照群に比較して減少した。さらに、プロジェステロンレベル(P)も800 mg/kg BW慢性投与群で減少した。しかしながら、LH濃度はPS投与によって雌雄ともに有意な変化が認められなかった。結論として、PSの影響が副腎と精巣で異なる理由は、副腎ではステロイド生成において性腺とは異なるリポプロテイン・コレステロールを使うことによるのではないかと考えられた。さらに、PSは局所的に作用してTの生成、あるいは性腺

の成熟を遅らせるかもしれないと考えられた。

成熟後の雄ウズラで、PSの性腺機能に対する直接作用と性行動に対する影響を検討した。精巣間質細胞を培養し、PSを0.875あるいは87.5 µg/ml作用させた。また、雄ウズラに80あるいは800 mg/kwのPSを15日齢から100日齢まで毎日嚙嚙内に投与した。性成熟後5分間の性行動テスト(ワルチング、乗駕、交尾)に用いた。精液採取と受精率検査も行った。雄と同日齢の雌を交配試験に用いた。結果は高用量のPS投与により有意に性行動が減少することを示した。さらにTレベルが高用量のPS投与により有意に減少し、ライディッチ細胞の数が減少した。しかしながら黄体形成ホルモン(LH)レベル、精液性状には有意な変化が見られなかった。17β-HSD遺伝子発現が減少していた。これらの結果から、高用量のPS投与でT産生が減少し、性行動が減少した。その原因としては、ライディッチ細胞の分裂、コレステロールの取り込み、17β-HSD遺伝子発現が雄ウズラの精巣で減少したためと考えられた。

PS投与が視床下部・下垂体・性腺軸に影響している可能性について検討した。雄ウズラにPSを投与し、100日齢においてニワトリ性腺刺激ホルモン放出ホルモン(cGnRH-1)10µgを投与した。cGnRH-1投与前と投与30分後に採血した。cGnRH-1投与によりLHとT濃度が増加した。GnRHと性腺刺激ホルモン放出抑制ホルモンGnIHの遺伝子発現が脳及び精巣で変化した。cGnRH-1投与は脳と精巣でのGnRH遺伝子発現に有意な変化を生じなかった。対照的にGnIH遺伝子発現はcGnRH-1非投与群で有意に高かった。さらに、精巣でも高レベルであった。これらの結果は、高用量のPS投与によりコルチコステロン(C)レベルや性腺での局所作用のみならず、性腺刺激ホルモン遺伝子発現にも影響していることを示唆していた。PS投与が脳及び精巣でGnIH遺伝子発現を促進し、GnRH分泌を減少させ生殖機能を低下させたと考えられた。

ウズラ卵殻中のステロイドを解析して、胎子発育に伴う母親と胎子のステロイド産生について検討した。放卵直後、孵卵15日目と孵化後の卵殻を採取した。内容物を除去後、卵殻を100℃で24時間乾燥し、粉砕した。卵殻粉末に80%メタノールを加え、30分間攪拌して抽出した。孵卵15日と孵化後の卵では性腺と羽毛により性を確認した。その結果、卵殻中のTが放卵直後に高く、孵卵による胎子発生の経過とともに減少した。Tレベルに雌雄差は無かった。対照的に、E2は孵卵15日には雌で雄より有意に高く、孵化後ではわずかな差であった。Cレベルは孵化時に雄で雌より有意に高かった。これらの結果は卵殻がステロイドホルモンを含むこと、胎子の発育とともにその量が増加することを示唆した。

本研究の結論として、高用量のPS投与が雌雄のウズラともに繁殖機能と性的活動に影響することを示唆した。また、雌においては卵黄へのホルモンやコレステロールなどの生物活性物質の蓄積に影響する可能性を示唆した。これらの卵成分の変化が子孫の生存や発育にも影響する可能性が考えられた。

## 審査結果の要旨

本研究では、ファイトステロール(PS)が副腎機能や生殖機能、内分泌機能に与える新たな影響について雌雄のウズラを用いて、成長期と成熟後に解析した。

成長期の雌雄のウズラで副腎機能と生殖内分泌機能に与える PS の影響を解析した。慢性的及び急性に嚔嚢内あるいは皮下に PS 投与 (8, 80, 800 mg/kg BW) を行なった。その結果, PS の影響が副腎と精巣で異なり, 副腎ではステロイド生成において性腺とは異なるリポタンパク質・コレステロールを使う可能性を示唆した。さらに PS は局所的に作用してテストステロン(T)の生成, あるいは性腺の成熟を遅らせる可能性を示した。

成熟後の雄ウズラで, PS の性腺機能に対する直接作用と性行動に対する影響を検討した。性腺機能に対する直接作用は精巣間質細胞を培養し検討した。雄ウズラに 80 あるいは 800 mg/kg の PS を 15 日齢から 100 日齢まで毎日嚔嚢内に投与し, 5 分間の性行動テスト(ワルチング, 乗駕, 交尾)に用いた。精液採取と受精率検査も行った。その結果, 高用量の PS 投与で T 産生が減少し, 性行動が減少した。その原因としては, ライディッシュ細胞の分裂, コレステロールの取り込み, 17 $\beta$ -HSD 遺伝子発現が, 雄ウズラの精巣で減少したためと考えた。

PS 投与が視床下部・下垂体・性腺軸に影響している可能性について検討した。性腺刺激ホルモン放出ホルモン(GnRH)と性腺刺激ホルモン放出抑制ホルモン(GnIH)の遺伝子発現が脳及び精巣で変化した。高用量の PS 投与により性腺刺激ホルモン遺伝子発現にも影響していることを示唆した。PS 投与が脳及び精巣で GnIH 遺伝子発現を促進し, GnRH 分泌を減少させ生殖機能を低下させたと考えた。

ウズラ卵殻中のステロイドを解析して, 胎児発育に伴う母親と胎児のステロイド産生について検討した。卵殻がステロイドホルモンを含むこと, 胎児の発生とともにその量が変化することを示唆した。

上記のように申請者は, 高用量の PS 投与が雌雄のウズラともに繁殖機能と性的活動に影響することを示唆した。また, 雌においては卵黄へのホルモンやコレステロールなどの生物活性物質の蓄積に影響する可能性を示唆した。これらの卵成分の変化が子孫の生存や発育にも影響する可能性を示唆し, 非常に意義があるものと認める。

以上について, 審査委員全員一致で本論文が岐阜大学大学院連合獣医学研究科の学位論文として充分価値があると認めた。

#### 基礎となる学術論文

- 1) 題 目 : The effects of phytosterols on the sexual behavior and reproductive function in the Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*)  
著 者 名 : Mohammad, I. Q., Nagaoka, K. and Watanabe, G.  
学術雑誌名 : Poultry Science  
巻・号・頁・発行年 : in press