

暑熱ストレス依存的な生殖障害に対する
明日葉の改善作用

2019 年 1 月
國府大智

暑熱ストレス依存的な生殖障害に対する

明日葉の改善作用

筑波大学大学院

生命環境科学研究科

国際地縁技術開発科学専攻

博士（農学）学位論文

國府大智

目次

<u>摘要</u>	1
-----------	---

<u>略語</u>	4
-----------	---

第1章 緒言

第1節 不妊の現状と対策	5
--------------	---

第2節 本研究の仮説と目的	9
---------------	---

第2章 研究課題－1

暑熱ストレス依存的な造精機能低下に対する明日葉の保護作用

第1節 研究背景	12
----------	----

第2節 研究目的	13
----------	----

第3節 実験手技	14
----------	----

第4節 研究結果	21
----------	----

第5節 考察	25
--------	----

第6節 図及び表	34
----------	----

第3章 研究課題－2

暑熱ストレス依存的な成熟精子の機能低下に対する明日葉の保護作用

第1節 研究背景	51
----------	----

第2節 研究目的	52
----------	----

第3節 実験手技	53
----------	----

第4節 研究結果	60
----------	----

第5節 考察	64
--------	----

第6節 図及び表	69
----------	----

第4章 研究課題－3

暑熱ストレス依存的な卵巣機能低下に対する明日葉の保護作用

第1節 研究背景	82
第2節 研究目的	84
第3節 実験手技	85
第4節 研究結果	93
第5節 考察	97
第6節 図及び表	102

第5章 総合討論

第1節 明日葉の生殖機能保護効果で推定される作用機序	117
第2節 研究の限界と今後の展望	123
第3節 食の健康機能性と生殖障害改善作用	127

<u>結論</u>	129
-----------	-----

<u>引用文献</u>	130
-------------	-----

<u>謝辞</u>	146
-----------	-----

摘要

生殖障害はヒトや家畜で深刻な問題である。ヒトの生殖障害は肥満、喫煙、精神的ストレス等により引き起こされる。生殖障害の1つである不妊は、配偶子の機能低下が原因である。我が国の不妊夫婦の割合は年々増加しており、現在は5から6組に1組の夫婦が該当する。このヒト不妊の増加は、少子化を加速させることが懸念されている。また家畜では、夏季の高温・高湿度環境が受胎率の低下を引き起こす。家畜の不妊は食肉や鶏卵の安定供給に深刻な影響を与えることが懸念されている。現在のヒトや家畜の不妊対策として、生殖補助医療が施されている。しかし、質の悪い精子や卵子が体外受精の成功率を低下させること、不妊夫婦や畜産農家への経済的負担が増加することから、生殖補助医療に代わる新たな不妊対策が求められている。

ストレス依存的な生殖障害の原因は生殖器官内での酸化ストレスレベルの増加が一因と考えられている。そこで本研究では、不妊の改善に酸化ストレス依存的な損傷に対する生殖器官の保護が重要であると考えた。酸化ストレスの抑制には抗酸化作用が深く関わる。この作用を有するポリフェノールの摂取は酸化ストレスの抑制を介して肥満や動脈硬化を改善することが知られている。そこで本研究は、ポリフェノールを含んだ食成分の摂取は生殖障害の改善に有効であると考え、「明日葉」に着目した。日本原産の植物である明日葉は、生活習慣病の予防・改善及び酸化ストレスの軽減作用などの健康機能性を有することが知られている。また、明日葉の新新種「源生林あしたば」は塩害地域や寒冷地域などで生育できるため、全国レベルでの大量栽培による家畜への飼料供給を可能とする。そこで本研究は、ストレス依存的な生殖障害に対する明日葉の効果を実証すると共にその作用機序を明らかにすることを目的とした。体内で酸化ストレスに変換される暑熱負荷をラットあるいはマウスに与え、酸化ストレス依存的な雌雄の生殖障害を体現し、明日葉の改善効果を検討した。

雄マウスへの暑熱処理は、造精機能及び成熟精子機能の低下を示した。造精機能の実験

では暑熱処理が精母細胞への損傷を介して、精子濃度や精子の運動機能、産仔数をそれぞれ低下させた。また成熟精子の実験では、暑熱処理が成熟精子の運動能力及び胚発生機能を低下させた。これらの精巣機能の低下に対して、明日葉は顕著な改善効果を示した。さらに、マウスだけでなく夏季のブタの精巣機能低下を改善した。これらのことから、明日葉は暑熱ストレス依存的な造精機能及び成熟精子機能の低下を改善することが明らかとなった。

雌ラット及びマウスへの暑熱処理は、排卵機能と卵子機能の低下を示した。排卵機能の実験では、暑熱処理が排卵卵子数を低下させた。また卵子機能の実験では、暑熱負荷が胚盤胞期への発生と産仔数を低下させた。これらの卵巣及び卵子機能の低下に対して、明日葉は有意な改善効果を示した。さらに明日葉は、夏季のブタの受胎率低下を改善した。これらのことから、明日葉は暑熱ストレス依存的な排卵機能及び卵子機能の低下を改善することが明らかとなった。

本研究では、暑熱ストレス依存的な精巣及び卵巣機能の低下に、直接的な熱ストレスと間接的な酸化ストレスの2つの作用機序が関わることに着目し、これらに対する抑制作用が明日葉の改善効果をもたらすと仮定した。熱ストレス抵抗性では、タンパクの変性を改善するヒートショックプロテイン（HSP）に着目した。本研究の結果では、明日葉は精巣及び卵巣内のHSPの遺伝子発現量を増加させることや、暑熱ストレス依存的に低下した精巣特異的なHSPの遺伝子発現の低下を改善することが明らかとなった。また酸化ストレス抵抗性では、活性酸素種を分解する抗酸化酵素に着目した。その結果、明日葉は精巣及び卵巣内の抗酸化酵素の遺伝子発現量を増加させ、卵巣内の暑熱ストレス依存的な過酸化脂質量の増加を抑制した。これらのことから、明日葉は各生殖器官内に抗酸化酵素を介した酸化ストレス抵抗性とHSPの発現制御を介した熱ストレス抵抗性を付与し、暑熱ストレス依存的な生殖障害を改善したと考えられる。

本研究は、食機能成分が有する不妊の改善効果を分子メカニズムに着目して明らかにし

た初めての論文である。これらの研究成果は、明日葉がヒトの不妊症及び家畜の夏季不妊の予防に有効であることを示している。

略語

ACP	Ashitaba chalcone powder
XA	Xanthoangelol
4HD	4-hydroxyderricin
TBARS	Thiobarbituric acid reactive substance
HE	Hematoxinilin eosin
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
MgCl	Magnesium chloride
NaCl	Sodium chloride
KCl	Potassium chloride
EtOH	Ethanol
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
TBE	Tris borate-EDTA
PCR	Polymerase chain reaction,
GSS	Gluthathione synthase
GPx	Glutathione peroxidase
SOD	Superoxide dismutase
HO-1	Heme oxygenase-1
HSF	Heat shock factor
HSP	Heat shcok protein
HSPA	Heat shock protein 70
NRF2	Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2
RT	Room temperture
HTF	Human tubul fluid
VSL	Straight-line velocity
VCL	Curvilinear velocity
VAP	Average path velocity
ALH	Amplitude of lateral head displacement
PBS	Phosphate buffered salts
H ₂ O ₂	Hydrogen peroxidase
PMSG	Pregnant mare serum gonadotropin
hCG	Human chorionic gonadotropin
F-12 HAM	Ham's F12 nutrient mixture
ATP	Adenosine triphosphate
NAC	N-acetylcysteine

第 1 章 序論

第 1 節 不妊の現状と対策

第 1 項 ヒトの不妊

不妊とは、「妊娠を望む健康な男女が避妊をしないで性交をしているにもかかわらず、一定期間妊娠しないこと」を指す。現在、日本国内では 5.5 組に 1 組の夫婦が不妊であり、夫婦間の問題の上位に位置する。少子化が進む日本では解決すべき問題の 1 つである。不妊の原因は男女半々に由来すると言われているが、歴史的に男性不妊症の概念は比較的に新しく、かつては根拠もないままに女性側に責任を押し付けることが多々あった。近年では研究と認知が進み、罹患率も上昇傾向にあるなど、不妊症が女性だけの問題ではないことが認識されつつある。世界保健機構も、不妊の原因の約 50% は男性に由来することを明らかにしている。したがって、ヒト不妊の改善には男女両方に着眼する必要がある。

男性の不妊症状として、精子数の減少や精子運動能の低下などの造精機能障害、勃起障害などの性機能障害が知られている。近年の疫学的研究により、1938 年から 1991 年の約 50 年間で精子濃度は 113×10^6 sperm/ml から 66×10^6 sperm/ml へと約 40% 低下していることが示されている^[1]。また、フランスやポーランドの研究では、近年の男性の精子濃度減少と奇形精子の増加が報告されている^[2,3]。これらの精子異常は妊娠率の低下をもたらすことが考えられ、人類の存続にとって深刻な問題である。男性不妊の原因として、喫煙や肥満に伴う体内の酸化ストレスレベルの上昇や、精索静脈瘤に伴う活性酸素種の増加と精巣内温度の上昇の関与が報告されている^[4-8]。これらの報告では、男性不妊は体内で増加した活性酸素種及び熱ストレスが精巣内の生殖細胞に損傷を与えることによりもたらされることが考えられている。

女性の不妊症状として、排卵機能及び卵子発生能の低下、子宮の機能障害、生理不順などの性機能障害が知られている。日本産婦人科学会は、32 歳以上の女性の卵子発生率が著しく低下することを報告している。現代の日本では、女性の社会進出に伴う初婚年齢の上昇が報告されており、2016 年では 29.4 歳となっている。そのため、今後の日本社会では、晩婚化に伴う卵子の質の低下が少子化を加速させると懸念されている^[9]。これら女性不妊の原因として、加齢や肥満に伴う酸化ストレスレベルの上昇が卵巣機能障害を引き起こすことが報告されている^[10-12]。

これら男女のヒト不妊への対策として、ステップアップ療法が用いられている。この療法は、不妊治療患者の度合いに合わせてホルモン治療、人工授精、体外受精、顕微授精と段階的に治療を変える方法である。ステップアップ療法が不妊対策に有効であり、その例として高度生殖補助医療の 1 つである体外受精により国内の 2016 年出生児の 5.5% (54410 人) が誕生したと報告されている。しかし、不妊治療の幾つかの問題点として、女性への肉体的負担、精神的負担、夫婦への金銭的負担が指摘されている^[11]。さらに体外受精では、奇形精子の多い男性の精子や 32 歳以上の女性の卵子を使用した場合、受精率の急激な低下を招くことが知られている^[9,14]。したがって、ステップアップ療法とは別に、精子や卵子の質を向上させる根本的な解決策が不妊改善に必要である。

第 2 項 家畜の不妊

夏季の高温・高湿度環境は家畜個体の体温上昇を招き、家畜の受胎率を低下させる^[15]。これは夏季不妊と呼ばれており、畜産業では、食肉や鶏卵の安定供給の面で大きな問題である。夏季の受胎率は冬の受胎率と比較し、20-30%程度とも言われ、夏季の暑熱ストレスによるダメージが秋季の繁殖にまで残り、大きな影響をもたらしている。近年の地球温暖化や異常気象などの気候変動の問題と相まって、今後ますますこの夏季不妊は深刻化することが予想される。各種家畜に関する研究は、夏季不妊が雌雄両方に起因することを明らかにし

ている。雄では精子数の減少，交尾欲の減退，精子運動能の低下が報告されている^[16,17]。雌では出産率の低下，流産率の増加，胚の発生率の低下，排卵卵子の質の低下，無発情の増加が報告されている^[18-20]。これらの生殖機能障害は，視床下部や脳下垂体が制御する性ホルモンの異常により引き起こされると考えられてきた。しかし，近年の研究により，酸化ストレスは家畜の夏季不妊に関与することが明らかにされた^[21]。

これら雌雄家畜の夏季不妊への対策として，畜舎温度の空調制御，スプリンクラーや扇風機の設置，地下豚舎の設立などが施されている^[22]。しかし，各設備投資は畜産農家への大きな負担であり，日本の畜産業の衰退を招きかねない。また，高度技術を利用した不妊対策として，人工授精や体外受精により生じた受精卵の移植が行われている^[23]。しかし，技術面及び設備面の課題が多く，すべての畜産農家で行うことは難しいと考えられる。したがって，暑熱ストレスから精子や卵子の機能を保護することが夏季不妊の改善に重要であり，畜舎環境の改善などの従来法とは異なるアプローチを必要としている。

第3項 本論文における不妊研究への着眼点

ヒトや家畜の生殖機能は視床下部や脳下垂体から分泌されるホルモンによって制御されているため，ホルモンバランス異常がヒトや家畜の不妊の原因であると考えられてきた。しかし近年の研究により，様々な不妊症に共通して酸化ストレスが深く関与していることが明らかになりつつある^[5,12]。酸化ストレスとは，酸化反応により引き起こされる生体にとって有害な作用であり，活性酸素種と抗酸化作用のバランスにより制御されている。抗酸化酵素などの体内の消去機能では除去しきれなくなった過剰な活性酸素種が，強力な酸化作用により遺伝子および蛋白質を変性させ，細胞および器官の機能を低下させる。各生殖器官での酸化ストレスの増加は，造精機能や排卵機能などの生殖機能の低下をもたらす。

そこで本研究では、酸化ストレス依存的な不妊モデル動物を作成する必要がある。夏季環境飼育下のウシとブタは、精液及び体内の酸化ストレスレベルが上昇することが先行研究で報告されている^[21,24,25]。また、未成熟雌ラットへの暑熱ストレス負荷が肝臓内の酸化ストレスレベルを増加させることが示されている^[26]。そこで本研究は、生殖器官内で酸化ストレスを誘導できる暑熱ストレス負荷実験を用いて、各種研究を進めた。

第2節 本研究の仮説と目的

第1項 本研究の仮説

本研究は暑熱ストレス依存的な生殖障害に対する有効な対策として、“植物の生理機能成分”の摂取に着眼した。近年では生活習慣病の深刻化に伴い、生活習慣の中心となる食生活の重要性が見直されている。特に、食由来成分であるポリフェノール類を用いた疾病予防の研究が盛んに行われている。赤ワイン成分であるレスベラトロールの摂取は高血圧、心肥大、肥満の抑制に有効であることが示されている^[27-29]。また、オリーブ成分であるヒドロキシチロソール及びローズマリー成分であるカルノシン酸の摂取が、生活習慣病に対する予防効果をもつことが知られている^[30,31]。これらの研究は、生活習慣病に伴う酸化ストレスの増加を抑制することが各疾病の改善作用に関与すると論じている。本研究で着眼した暑熱ストレス依存的な生殖障害では、体内で増加した酸化ストレスが機能障害をもたらすと述べている^[21]。また家畜の夏季不妊対策として、抗酸化作用をもつビタミン E やビタミン C の投与が知られており、ニワトリの卵の重量低下や死亡率を改善することが示されている^[32]。したがって、本研究は「食機能成分の投与による体内の酸化ストレスの軽減が暑熱ストレス依存的な生殖障害改善に有効である」という仮説を提唱した。先行研究は、抗酸化作用を有するオリーブ成分のオレウロペインの投与が暑熱ストレス依存的な排卵障害及び造精機能障害を改善することを明らかにしている^[33-35]。これらのことから、機能性を有する天然化合物の摂取は、暑熱ストレス依存的な生殖障害を改善すると期待される。

第2項 研究で着眼した明日葉について

本研究は抗酸化機能を有する「明日葉」に着眼した。明日葉は日本原産のセリ科の大形多年草で、八丈島を中心とし、房総半島、三浦半島、伊豆諸島などの太平洋岸に自生している。また新品種である源生林あしたばは越冬性や耐塩性を有するため、土地を選ばず大量栽培可能である。そのため、野菜としてだけでなく国産の飼料としての利用が期待できる。古く

から食用や民間薬として使用されている明日葉は、胃痛や皮膚アレルギーに対する改善作用をもつことが伝承的に知られている^[36]。明日葉の機能性成分にはカルコンが知られており、中でもキサントアンゲロール (Xanthoangelol: XA) および4-ヒドロキシデリシン (4-hydroxyderricin: 4-HD) は明日葉特有の成分である。これらのカルコンは根、茎、葉の順で豊富に含まれている。本論文では明日葉の茎を切って滲みでる黄色液を粉末化した明日葉カルコンパウダー (ACP) を研究で用いており、上記のカルコン類を含んだ粉末である。

明日葉に関する先行研究では、明日葉が血圧降下作用^[37]、利尿作用^[38]、抗がん作用^[39]などの機能性を有することを明らかにしている。また、明日葉特有のカルコン化合物である XA および 4-HD は、抗がん作用^[39,40]、高血糖抑制作用^[41]、血管弛緩作用^[42,43]、脂質代謝調節作用^[44]、胃酸分泌抑制作用^[45]、抗菌作用^[46]、メラニン形成抑制作用^[47]、抗うつ抑制効果^[48]、抗炎症作用^[49]を示す。カルコン類である XA 及び 4-HD は、経口投与により血中を介して、肝臓、腎臓、脾臓、筋肉、精巣上体脂肪組織で検出される^[50]。当研究室の先行研究は、明日葉粉末の投与が暑熱ストレス依存的な雌の排卵障害や雄の精子濃度の低下を改善することを示している^[51-54]。しかし、雌雄への生殖機能に対する明日葉の保護作用は、未解明な点が多い。

先行研究で、明日葉は酸化ストレスを軽減する抗酸化酵素を各種細胞で発現誘導できることが報告されている^[36, 43]。本研究では暑熱ストレス依存的な不妊の改善に、酸化ストレスの除去が重要であると考えている。したがって、明日葉は精巣及び卵巣内で抗酸化酵素の発現誘導を介した酸化ストレス軽減作用が考えられる。また暑熱ストレスは、直接的または酸化ストレスの増加を介して間接的に、蛋白質の変性による生殖機能障害が考えられる。分子シャペロンであるヒートショックプロテイン (HSP) は蛋白質の変性を改善することが知られている。食機能成分が HSP の発現誘導を介して生殖機能を保護することを示した先行研究は未だない。明日葉の機能成分であるカルコン類は HSP の発現を誘導することが知られていることから、HSP を介した生殖機能保護作用が期待される。これらのことから、

暑熱ストレス依存的な生殖機能障害に対する明日葉の効果をより詳細に解明するために、抗酸化酵素と HSP に着目した研究が必要である。

第 3 項 本研究の目的

前述のように、生殖障害の悪化は、少子化や食肉供給量の減少を加速させると懸念されている。しかし、生殖障害の改善に関する研究は少ない。これらの背景を踏まえ、本研究は「生殖障害に対する明日葉の改善効果を検討すること」を目的とした。生殖障害改善に酸化ストレスの軽減が重要であると仮定し、生殖器官で活性酸素種を増加させる暑熱ストレスの実験系を用いて、明日葉の生殖障害改善作用を評価した。マウスやラットを用いて、暑熱ストレス依存的な雄の造精機能障害と成熟精子機能障害、雌の排卵障害と胚発生障害に対する明日葉の改善効果及びその作用機序を検討した。また、夏季におけるブタの繁殖率の低下に着目し、大型動物に対する明日葉の生殖機能保護作用を検討した。

第2章 研究課題-1

暑熱ストレス依存的な造精機能低下に対する明日葉の改善作用

第1節 研究背景

第1章で述べた通り、ヒトや家畜では暑熱ストレス依存的に造精機能が低下する。男性不妊に関する先行研究は、暑熱ストレス負荷が精子濃度や妊娠率の低下などの男性不妊を引き起こすことを明らかにしている^[16,17,55-58]。現在の不妊対策として、体外受精や顕微授精などの高度生殖補助医療を施しているが、これらの技術の向上に成果が伴っていない。そのため、男性及び雄家畜の保有する精子の機能改善及び向上が求められている。

本論文における造精機能は精子形成を指す。精子形成は、精原細胞の有糸分裂に始まり、精母細胞の減数分裂を経て、精子細胞から精子に形態変化する過程である。精子形成は精巣内の精細管で生じている。男性生殖器官である精巣は卵円型をした一対の器官で、陰嚢内に納められて下垂し、腹腔とは精索で結ばれている。精細管は直径100-400 μm の管であり、精巣内部で迂曲した状態で詰め込まれている。精子形成は精細管の周辺から管腔に向かって始まり、最終的に精子に形態変化する。形態変化した精子は精巣輸出管から精巣上体内腔へ放出され、射精の機会を待つ。また、生殖細胞とは別に2種の細胞が精巣に含まれている。生殖細胞への成長因子などの供給を行うセルトリ細胞が精細管内に、精子形成に重要なアンドロゲンを分泌するライディッヒ細胞は精細管と精細管の隙間に存在する。

暑熱ストレス依存的な造精機能低下に関する先行研究により、造精機能障害の作用機序が明らかになりつつある。マウスを用いた先行研究では、減数分裂を生じている精母細胞はストレスに対して脆弱であること、精母細胞の消失は造精機能障害を引き起こすことを明らかにしている^[59-60]。一方で、暑熱ストレス依存的な造精機能低下に対する改善効果を検

討した研究は少ない。本論文では、生殖障害に対して食機能成分の投与が有効であるとの仮説を提唱した。先行研究は、明日葉粉末の投与やオリーブ成分であるオレウロペインの投与が暑熱ストレス依存的な精子濃度の低下を改善することを示している^[35,54]。しかし、各成分による改善効果の作用機序や、保護された精子の質は評価されていない。

したがって、先行研究^[35,54]と同様に、本章では性成熟した雄マウスへの短期的な暑熱ストレス負荷実験系を用いて、暑熱ストレス依存的な造精機能に対する明日葉の改善効果を検討した。明日葉の保護効果の作用機序は、造精機能の維持に重要な役割を担う抗酸化酵素及びヒートショックプロテインに着眼し、明日葉の造精機能保護作用と関連するか否かを検討した。また、造精機能障害に対する明日葉の保護効果がマウス特有のものでないことを確認するため、ブタを用いて同様な実験を行った。

第2節 研究目的

「暑熱ストレス依存的な造精機能低下に対する明日葉の改善作用を検討すること」を研究目的とした。本章ではストレスに脆弱な精母細胞に焦点をあて、研究を行った。

第3節 実験手技

第1項 材料

I. 動物

動物実験で用いた ICR マウスは、日本チャールズリバーから購入後に、自家繁殖させた個体を用いた。明日葉の葉粉末は、(株)食機能探査研究所より提供を受けた。マウス用飼料に用いた MF 粉末は、日本チャールズリバーより購入した。梅山豚の精液希釈に用いたマルベリーⅢは、富士農場サービスより購入した。

II. 投与化合物

各種実験に使用した明日葉粉末である明日葉カルコンパウダー (ACP) は、(株)日本生物科学研究所から購入した。キサントアングロール (XA) は、筑波大学生命環境系・河村芳恵研究員より提供を受けた。粉末給餌器用カバーは、オリエンタル酵母より購入した。麻酔に使用したペントバルビタールナトリウムは、共立製薬より購入した。

III. 各種アッセイキット

DNA 抽出に用いた Isogenome 及び RNA 抽出に使用した Isogen II は、ニッポンジーン (#311-07361) から購入した。アガロースゲル染色液である Gelred (TM) nucleic acid gel stain は、ナカライテスク (#41003) より購入した。過酸化脂質量を測定した TBARS Assay Kit は、Cayman Chemical (#10009055) より購入した。タンパク定量に使用した BCA TM Protein assay kit は、Thermo Fisher (A53225) より購入した。逆転写反応に利用した ReverTra Ace qPCR kit は、東洋紡 (#FSQ-201) から購入した。PCR 反応に利用した KAPA SYBR Fast Kit は、Kapa Biosystems (#KK4602) より購入した。

第2項 動物実験

I. マウス

a. 飼育条件

本研究は 8 週齢の雄 ICR マウスを使用し，コントロール群と化合物投与群に分けた．化合物投与群では，11.5 mg/kg 体重又は 57.5 mg/kg 体重で明日葉粉末を，1.5 mg/kg 体重でキサントアンゲロールを粉末飼料中に混合し，粉末給餌器を用いて投与した．各群マウスは室温 23-25°C，光周期 12L：12D（午前 7 時に点灯）で飼育した．

b. 暑熱処理

本研究はストレス負荷に暑熱処理を採用し，マウスは室温処理群と暑熱処理群に分けた．室温処理群のマウスは化合物非投与群（コントロール群）とし，暑熱処理群は化合物投与群と非投与群（暑熱コントロール群）に分けた．各群のマウスに麻酔薬のペントバルビタールナトリウムを 40-50 mg/kg 体重で腹腔投与した．室温処理群のマウスは麻酔後，室温で静置した．暑熱処理群のマウスは，麻酔後に身体下半分を 41 若しくは 42°Cのお湯に 15-20 分間暴露した．実験のモデル図を Fig. 1 に示す．

c. 精巣組織切片の作製

暑熱暴露から 48 時間後にマウスを頸椎脱臼死させ，精巣を摘出した．ブアン固定液を用いて，4°Cで 4 時間固定した．80%エタノールで洗浄保管後，筑波大学医学医療系組織標本作製室に依頼し，パラフィン包埋後に HE 染色した切片を作製した．

d. 精巣組織切片の評価

精巣組織切片を倒立顕微鏡下で計測及び撮影を行った．精細管を通常精細管と異常精細管に分け，1 個体あたり 100 管以上の精細管を計測した．異常精細管は，多核巨細胞が存在する管，精母及び精子細胞が脱落した管の 2 種類を定義した（Fig. 2）．精巣内の異常精細

管の占める割合を算出した。

e. 精子の運動機能評価

造精機能を評価するため、暑熱処理から 28 日後に精子を解析した。解剖時に精巣上体尾部を摘出し、精子培養バッファー【2.2 mM HEPES (pH 7.4), 1.2 mM MgCl_2 , 100 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 4.8 mM lactic acid Ca, 5.5 mM d-Glucose, 20 mM sodium bicarbonate and 88 mM pyruvic acid】に静置した。18G の針で精巣上体尾部の 1 ヶ所に切りこみを入れ、貯蓄された成熟精子を掻き出した。37°C で 15 分間培養後、500 rpm で 1 分間遠心洗浄し、上清の精子液を回収した。精子は精子解析システム(ディテクト, Tokyo, Japan) を用いて下記のパラメータを評価した。精子濃度 (Sperm concentration), 精子運動率 (Sperm motility), 運動精子濃度 (Motile sperm concentration), 直線速度 (Straight-line velocity), 曲線速度 (Curvilinear velocity), 平均速度 (Average path velocity), 頭部振幅 (Amplitude of lateral head displacement)

f. 交配試験

暑熱処理から 25 日後に、雄マウスと性成熟した ICR 雌マウスを 1 対 1 で交配させた。交配期間は 5 日間とし、終了時に雄マウスを除去した。交配終了時から約 15 日後に、雌マウスの出産を毎朝 10 時に確認した。出産した個体の産仔数及び産仔重量を計測した。ここで本データに示す生存産仔重量は、生存した産仔の重量のみを計測した数値とした。

II. 梅山豚

a. 飼育条件

塚原牧場株式会社で飼育している、2016 年 7 月から 8 月の間に 1-2 歳の雄梅山豚を 4 頭用いて実験を行った。4 頭の梅山豚は、対照群と明日葉投与群に 2 頭ずつ分けた。明日葉投

与群では、明日葉の茎葉乾燥粉末を 200 mg/kg 体重で 40 日間投与した。明日葉の投与前と投与後に精液を回収した。本実験は精液貯蓄による影響を除くため、精液回収の 7 日前に 1 度射精させた。回収した精液は、マルベリーⅢを用いて 2 倍希釈した。

b. 精子の運動機能評価

射出精液を液化させるため、常温で 1 時間静置した。液化した精液を 37°C で 15 分間培養後、精子解析システム（SMAS：Sperm motility analysis system）を用いて精子を解析し、本節第 2 項 I -e の項目を測定した。

第 3 項 DNA 断片化の検出

I. 精巣組織からの DNA 調製

-80°C で保存したマウスの精巣を氷上で融解後、精巣 1 個あたり Isogenome 2 ml を加え、テフロンホモジナイザーを用いてホモジナイズした。遠心分離後（16200 g, 10 min, RT），上清を回収し、エタノール（99.5%）を加えた。転倒混和で溶液を均一にし、室温で 3 分間静置した。析出した DNA を回収し、Isogenome と 100% EtOH を添加した。転倒混和後に遠心し（1000 g, 2 min, RT），上清を除去後に沈殿を得た。75%EtOH を加え転倒混和し、再び遠心後（1000 g, 2 min, RT），上清を除去した。450 μ l Tris-EDTA（pH 8.0）で沈殿を溶解し、イソプロパノール及び 3M 酢酸 Na でイソプロパノール沈殿を 1 晩行った。その後、遠心（16200 g, 10 min, 4°C）で上清を除去し、70% EtOH による遠心洗浄（1000 g, 2 min, RT）をした。上清除去後に Tris-EDTA（pH 8.0）を加え、完全に溶解することで DNA 溶液を得た。

II. アガロースゲル電気泳動

DNA 溶液量は ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop Technology, DE, USA)を用いて、

純度及び濃度を測定した. 2 μ g 相当の DNA を Orange G と混合調製した後, 2 % アガロース [2 g agarose, 100 ml TBE buffer (89 mM Tris, 89 mM Boric acid, 2 mM EDTA-2Na)] に供し, 50 V で電気泳動した. 電気泳動後にゲルを Gelred (TM) nucleic acid gel stain で染色し, Printgraph (ATTO, Tokyo, Japan)で DNA の検出を行った.

第4項 酸化ストレスレベルの検出

I. 精巣組織からのタンパク質調製

マウスから摘出した精巣は-80°Cで保存した. 氷上で融解後に RIPA buffer [50 mM Tris-HCl (pH 7.6), 10% Glycerol, 1% Triton-X100, 0.2 mM PMSF, 150 mM NaF, 1 mM EDTA, 1 mM Na_3VO_4 , 3 μ g/ml antipain, 10 μ g/ml leupeptin, 10 μ g/ml aprotinin]を精巣 1 個あたり 0.8 ml 加えホモジェナイズし, 遠心 (4200 rpm, 4°C) 後に上清を得た. 更に同条件で遠心し, タンパク溶液を得た.

II. 過酸化脂質量の測定

過酸化脂質で精巣の酸化ストレスレベルを評価した. TBARS assay kit 付属のプロトコールに従い, 得られたタンパク質の過酸化脂質量を測定した. また, タンパク溶液中の濃度を BCA TM Protein assay kit で測定し, 精巣 1 mg あたりの過酸化脂質量を算出した. 各吸光度の測定は, Ultra mark (Bio-rad, CA, USA)で行った.

第5項 精巣内因子の解析

I. 精巣組織からの RNA 精製

マウスから摘出した精巣は-80°Cで保存した. 氷上で融解後に Isogen II を精巣 1 個あたり 800 μ l 加え, ホモジナイズした. 精巣溶液を遠心 (12000 rpm, 15 min, 4°C) し, 上清を回収した. 10 分間静置後, 遠心 (12000 rpm, 15 min, 4°C) を行い, 上清を回収した. 上清と同量

のイソプロパノールを加えて混合した後, 10 分間静置し, 遠心後 (12000 rpm, 10 min, 4°C) に沈殿を得た. 70% Ethanol/DEPC water を加えて, 遠心洗浄 (7500 rpm, 5 min, 4°C) し, 完全に除去した. DEPC water を用いて完全に溶解後, RNA 溶液を得た.

II. cDNA の作製

ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop Technology, DE, USA)で RNA 純度を測定した. RNA 1 µg 相当を 65°Cで 5 分間の熱変性させ, 変性 RNA 溶液を ReverTra Ace qPCR kit 付属のプロトコールに従って, 逆転写反応を行った. 作成した cDNA 溶液は Tris-EDTA で 16 ng/µl へ調製した.

III. Real-time PCR

KAPA SYBR Fast qPCR kit を反応液とし, cDNA 溶液と各種特異的なプライマーと共に 7300 real-time PCR system (Thermo Fisher Scientific, Tokyo, Japan) に供し, mRNA の発現量を測定した. PCR の条件は 50°Cで 2 分間, 95°Cで 15 秒間反応後, 95°C, 15sec と 60-65°C, 30-60 sec の 2 工程を 40 サイクル繰り返した. 内部標準は 18S rRNA を使用した. 尚, 本論文で使用したプライマーを Table 1 に示す.

第 6 項 統計処理

実験結果は, 平均値±SE (Standard error) で示した. 2 群間のデータは T 検定を用いて有意差検定を行った. また, 3 群間以上のデータは Holm 検定, Dunnett 検定, Steel 検定を用いて有意差検定を行った. 使用した検定手法は各図及び表の説明に明記している. $P < 0.05$ のときに有意な差がある, $P < 0.1$ のときに傾向があると判断した.

Table 1 本研究の Real-time PCR で使用したプライマー

本研究で使用したプライマーの遺伝子配列を示している。

遺伝子の名前		5'→3'
<i>Catalase</i>	R	TGAAATTCTTGACCGCTTTC
	F	GAACGAGGAGGAGAGGAAAC
<i>Gss</i>	R	GTGAATGGGGCATACGTCA
	F	CAAAGCAGGCCATAGACAGG
<i>Gpx1</i>	R	CATTGCGACACACTGGAGAC
	F	CACAACGGTGCGGGACTA
<i>Sod1</i>	R	AAAATGAGGTCCTGCACTGG
	F	ACCATCCACTTCGAGCAGAA
<i>Sod2</i>	R	AGCCTCCAGCAACTCTCCTT
	F	GCACATTAACGCGCAGATCA
<i>Ho-1</i>	R	CCTTCAAGGCCTCAGACAAA
	F	GAGCCTGAATCGAGCAGAAC
<i>Hsf1</i>	R	AGGGCTCGCCTCCAGTACCC
	F	GCCTCCCCAGGCAGGAGCATA
<i>Hsf2</i>	R	GCACTACTTTTCGGAAGCCA
	F	CATCACCTGGAGTCAGAATGGA
<i>Hspa1a</i>	R	AGCCACAGTGCAATACACAA
	F	TGGCCTTGAGGACTGTCATT
<i>Hspa1l</i>	R	TCCCGTCCATTAAAGTAGTCCTG
	F	ACACGTCCATCACTAGAGCAC
<i>Hspa2</i>	R	TGAGACGCTCGGTGTCAGT
	F	GCGTGGGGGTATTCCAACAT
<i>Hsp40</i>	R	CACCGAAGAACTCAGCAAACA
	F	TTCGACCGCTATGGAGAGGAA
<i>18s</i>	R	CCATCCAATCGGTAGTAGCG
	F	GTAACCCGTTGAACCCCAT

R; reverse primer, F; forward primer

第4節 実験結果

第1項 暑熱ストレス依存的な造精機能低下に対する明日葉の保護効果

I. 精細管の損傷に対する保護効果

精巣の断面図を Fig. 2 と Fig. 3 に示す。Figure 2 では、暑熱処理が精細管内の生殖細胞に与えた影響を示している。室温処理のマウス精巣では、精細管内に生殖細胞が密に存在していた。暑熱処理のマウス精巣では、多くの精細管内に多核巨細胞の出現や生殖細胞の脱落が認められた。本研究は、暑熱処理マウスで多く出現したこれらの精細管を異常精細管と定義した。明日葉粉末投与が暑熱ストレス依存的な精細管の損傷に与える影響を Fig. 3 に示す。暑熱暴露したマウスでは室温処理のマウスと比較し、異常な精細管の割合が有意に増加した。しかし、明日葉粉末の投与は異常精細管の増加を有意に抑制した。

II. DNA 断片化の出現に対する保護効果

精細管での多核巨細胞の出現した精巣では、生殖細胞のアポトーシスが生じる^[60]。アポトーシスの指標である DNA 断片化を低分子 DNA で確認した。精巣内 DNA の写真を Fig. 4 に示す。室温処理群のマウス精巣では、100-500 bp である低 bp の DNA が検出されなかったが、暑熱処理群のマウス精巣では低 bp DNA の増加すなわちアポトーシスが確認された。しかし、明日葉粉末を投与したマウス精巣では、低 bp DNA が検出されなかった。

III. 暑熱負荷 28 日後の精子機能低下に対する保護効果

生殖細胞の中でもパキテン期精母細胞はストレスに弱い^[59]。マウスを用いた先行研究では、暑熱負荷 28 日後の精巣上体尾部中の成熟精子がパキテン期精母細胞の影響を反映することを明らかにしている^[59,61,62]。そこで、明日葉粉末の投与がパキテン期精母細胞への保護作用を有するかを検討するため、暑熱処理 28 日後の精子を評価した。結果を Table 2 に示す。マウスへの暑熱負荷は、精子濃度、精子運動率、運動精子濃度、頭部振幅を有意に低下

させた。また、暑熱ストレス負荷は精子の各種速度を低下させなかったが、各種速度における 25 $\mu\text{m/s}$ 以上の精子の割合は低下した。これらの精子パラメータの低下に対して、明日葉は有意な改善効果を示した。

IV. 産仔数の低下に対する効果

母親 1 匹あたりの産仔数の結果を Table 3 に示す。産仔数および生存産仔数では暑熱ストレス依存的な低下が認められ、1.7 匹以上の低下を示した。また、母親 1 匹から生まれてくる産仔重量や生存産仔重量は約 4 g 低下していた。明日葉粉末を投与したマウスでは、暑熱ストレス負荷の未投与マウスと比較して、母親 1 匹あたりの産仔数で 1.1 匹、生存産仔数で 1.8 匹、産仔重量で 2.1 g、生存産仔重量で 3.3 g の改善作用を示した。

第 2 項 暑熱負荷による精巣内酸化ストレスレベルの上昇に対する保護効果

I. 暑熱負荷が精巣内酸化ストレスレベルに与える影響

精巣への暑熱負荷は精巣内の活性酸素種の増加を介して、造精機能を低下させる^[63]。本実験における暑熱負荷と酸化ストレスの関連を調べるため、酸化ストレスの指標である精巣内の過酸化脂質量を測定した (Fig. 5)。精巣内の過酸化脂質量は、暑熱ストレス負荷により有意に増加した。

II. 精巣内の抗酸化酵素の発現に与える影響

酸化ストレスの低減は明日葉粉末の投与による造精機能保護作用に関与すると仮定し、酸化ストレスの低減に重要な抗酸化酵素に着眼した。精巣内抗酸化酵素の mRNA 発現量を測定した結果を Fig. 6 に示す。明日葉粉末を投与したマウス精巣では未投与マウスの精巣と比較し、還元型グルタチオン合成酵素 (GSS) とヘムオキシゲナーゼ 1 (HO-1) の発現が有意に増加した。

III. 暑熱負荷が抗酸化酵素の発現に与える影響

明日葉の精巣保護作用に酸化ストレスの低減が関与すると仮定し、暑熱ストレス負荷後に精巣内抗酸化酵素の発現を検討した。暑熱処理 1 時間後に精巣内抗酸化酵素の mRNA 発現量を測定した (Fig. 7)。暑熱処理は GSS の発現量を増加させなかったが、HO-1 の発現量を有意に増加させた。明日葉粉末の投与は暑熱処理の未投与マウス精巣と比較して、GSS 及び HO-1 の発現量を有意に増加させた。

第 3 項 暑熱負荷によるヒートショックプロテインの発現低下に対する明日葉の保護効果

I. 精巣内のヒートショックプロテイン発現レベルに与える影響

明日葉の精巣保護効果に熱ストレスの軽減が関与すると仮定し、熱ストレス抵抗性に重要なヒートショックプロテイン (HSP)、HSP の制御を担うヒートショックファクター (HSF) に着眼した。精巣内 HSP 及び HSF の mRNA 発現量を測定した結果を Fig. 8 に示す。明日葉粉末の投与は、HSP70 である HSPA1A, HSPA1L, HSP70 の活性補助を行う HSP40 の mRNA 発現量を有意に増加させた。一方で、HSPA2 の mRNA 発現量に増加は認められなかった。HSF では、明日葉粉末の投与は HSF1 mRNA を有意に増加させたが、HSF2 の mRNA 発現に影響を与えなかった。

II. 暑熱負荷によるヒートショックプロテインの発現変化に対する明日葉の効果

明日葉の精巣保護効果に熱ストレス抵抗性が関与すると仮定し、熱ストレスの低減に重要な HSP に着眼した。暑熱処理 3 時間後に精巣内 HSP の mRNA 発現量を測定した結果を Fig. 9 【A】に示す。暑熱処理は HSPA1A の mRNA 発現量を有意に増加させた。明日葉粉末の投与は、暑熱ストレス依存的な HSPA1A の増加に対して変化を与えなかった。次に、暑熱処理 6 時間後に、精巣内 HSP の mRNA 発現を測定した結果を Fig. 9 【B】に示す。暑熱暴露は HSPA1L, HSPA2, HSP40 の mRNA 発現量を有意に減少させた。明日葉粉末の投与

は HSP40 の発現量低下に改善効果を与えなかったが、暑熱ストレス依存的な HSPA1L と HSPA2 の発現量低下を有意に改善した。

HSP の制御を担う HSF にも着眼した。暑熱処理 1 時間後に精巣内 HSF の mRNA 発現量を測定した結果を Fig. 10 に示す。暑熱処理は HSF2 の mRNA 発現のみを有意に低下させた。一方で、明日葉粉末の投与は暑熱処理の未投与マウスと比較し、HSF 1 及び HSF 2 の mRNA 発現量を有意に増加させた。

第 4 項 暑熱ストレス依存的なストレス依存的な造精機能低下に対するキサントアンゲロールの保護効果

I. 生殖細胞の脱落に対するキサントアンゲロールの保護効果

明日葉粉末の造精機能保護作用の機能成分を明らかにするために、本研究は機能性成分のキサントアンゲロール (XA) に着眼した。XA の投与が、暑熱ストレス依存的な精細管損傷に与える影響を Fig. 11 に示す。暑熱処理はマウス精巣内の異常精細管の割合を有意に増加させた。XA の投与は、暑熱ストレス依存的な異常精細管の増加を有意に抑制した。

II. 精巣内の抗酸化酵素発現レベルに与える影響

XA の精巣保護作用は、明日葉粉末と同様の作用機序を示すと仮定した。XA の投与が精巣内の抗酸化酵素に与える影響を検討した。精巣内抗酸化酵素の mRNA 発現量の測定結果を Fig. 12 に示す。XA の投与はマウス精巣内の HO-1 の発現量に変化を与えなかったが、GSS の発現量を有意に増加させた。

III. 精巣内のヒートショックプロテイン発現レベルに与える影響

暑熱ストレス依存的な造精機能低下に対する XA の保護効果に熱ストレスの低減が関与していると仮定した。本研究は熱ストレスの低減に重要な役割を担う HSP に着眼した。精

巢内 HSP mRNA 発現の測定結果を Fig. 13 に示す. XA を投与したマウス精巢では, HSP70 及び HSP40 の HSPA1A の発現量を増加させたが, HSPA1L 及び HSPA2 の発現量を増加させなかった.

第 5 項 梅山豚の夏季不妊に対する明日葉投与の効果

明日葉粉末の精巣保護機能を大型動物で調べるため, 夏季に梅山豚を用いて検討した. 対照群の射出精子を投与前と投与後で比較すると, 運動精子濃度及び頭部振幅が顕著に減少した. しかし, 明日葉投与群の射出精子では, 投与前後における運動精子濃度及び頭部振幅の減少を改善した.

第4節 考察

明日葉は暑熱ストレス依存的な造精機能低下に対して保護作用を有すると期待されるため、性成熟雄マウスを用いて、各種実験を行った。その結果、明日葉粉末 57.5 mg/kg 体重の投与が暑熱ストレス依存的な造精機能障害を改善することや、精巣内因子を増加させることが明らかとなった。

第1項 暑熱ストレス依存的な造精機能低下に対する明日葉の保護効果について

マウスへの暑熱ストレス負荷は、精細管内の空洞化と多核巨細胞の出現、精巣内 DNA の断片化を誘導した (Fig. 2-4)。暑熱ストレス依存的な造精機能低下の研究報告では、生殖細胞由来の多核巨細胞の形成が関与すること^[60]、多核巨細胞が観察される個体の精巣では生殖細胞のアポトーシスが生じていること^[59, 64]を示している。本章の結果は、先行研究の報告と一致する。したがって、本研究の暑熱ストレス依存的な造精機能障害の要因は、生殖細胞のアポトーシスが考えられる。また明日葉の投与は、精細管損傷及び精巣内 DNA 断片化の出現を抑制した (Fig. 3-4)。したがって、明日葉の効果は暑熱ストレス依存的な生殖細胞のアポトーシスに対する保護作用が関与することが考えられる。

明日葉の生殖細胞保護作用を詳細に検討するため、本研究はパキテン期精母細胞に焦点をあてた。パキテン期精母細胞は第2減数分裂期の生殖細胞であり、数ある生殖細胞の中で最もストレスを受けやすい^[59]。また、マウスのパキテン期精母細胞の評価は、暑熱ストレス負荷 28 日後の精巣上体尾部中精子に反映される^[61, 62]。本研究では、暑熱負荷 28 日後の精子濃度が有意に減少したが、明日葉粉末の投与が暑熱ストレス依存的な精子濃度の低下を有意に改善した (Table 2)。したがって本研究により、明日葉はパキテン期精母細胞を保護し、暑熱ストレス依存的な造精機能低下を改善することが明らかとなった。この結果は当研究室の先行研究と一致するが^[54]、明日葉粉末が精巣内の生殖細胞のアポトーシスを抑制することは、本研究により初めて明らかとなった。

本研究は暑熱ストレス依存的な造精機能低下に対する明日葉の保護作用を示したが、作られた精子の質も重要である。熱ストレス負荷で損傷を受けた精母細胞の分化は、DNA の損傷を受けた精子に変化し、精子運動機能や受精した胚の発生が低下する^[61,65,66]。本研究では、暑熱処理が精子運動率や頭部振幅、交配後の産仔数を減少させた。しかし、明日葉粉末の投与はこれらの低下を改善した (Table 2-3)。したがって、明日葉粉末の投与は精母細胞の DNA を保護し、暑熱ストレス依存的な精子機能低下を改善することが示唆された。これらのことから、明日葉は精母細胞の保護を介して、質の高い精子濃度を維持することが示唆された。

第 2 項 明日葉の造精機能保護効果と抗酸化酵素の関与

暑熱ストレス依存的な精母細胞への損傷では複数の作用機序が知られている。本研究は間接的な作用機序として酸化ストレス、直接的な作用機序として熱ストレスに着眼した。

この項は、酸化ストレスについて考察する。精巣への暑熱ストレス負荷は、精巣内の酸化ストレスレベルを上昇させ、造精機能障害を引き起こす^[63,67]。本研究では、暑熱処理がマウス精巣内の過酸化脂質量を増加させた (Fig. 5)。したがって本研究では、暑熱ストレスが精巣内で酸化ストレスに変換され、造精機能障害を誘導したと考えられる。

ビタミン E やビタミン C などの抗酸化剤の投与は、家畜の暑熱ストレス依存的な造精機能障害を改善することが知られている^[32]。しかし、明日葉粉末と機能成分であるカルコン類では DPPH ラジカル還元作用が認められていない。したがって、本研究ではスカベンジング作用の考察は控える。そこで、酸化ストレスの軽減を担う抗酸化酵素に着眼した。抗酸化作用に着目した先行研究は、亜鉛やテトラブチルキノンの投与が精巣内での抗酸化酵素の増加を通して酸化ストレス抵抗性を付与し、暑熱ストレス依存的な造精機能障害から保護すると述べている^[68,69]。さらに、暑熱ストレス依存的に精巣内の抗酸化酵素の発現増加が認められること^[67]、抗酸化酵素のノックアウトマウスでは造精機能が低下する^[70-71] ことも

知られている。これらの知見から、造精機能の維持に抗酸化酵素が必要不可欠であると考えられる。先行研究で、明日葉カルコンの投与は血管内皮細胞^[43]内の抗酸化酵素の増加を促進することが報告されている。したがって、本研究は明日葉粉末の投与が抗酸化酵素を介した造精機能保護作用を有すると仮説を立てた。明日葉粉末の投与は、精巣内の抗酸化酵素の GSS と HO-1 の mRNA 発現量を増加させ、暑熱ストレス負荷後においても高い発現レベルを示した (Fig. 6-7)。GSS の先行研究は、マウスへの暑熱ストレス負荷が精巣内の還元型グルタチオン量を低下させ、精巣内の酸化ストレスの上昇をもたらすことを明らかにしている^[67]。本研究では、明日葉の投与が還元型グルタチオン合成酵素である GSS の発現量を暑熱ストレス負荷前に精巣内で増加させた。したがって、明日葉は還元型グルタチオンの増加を通して精巣内の酸化ストレスレベルの上昇を防ぎ、精巣内の生殖細胞を保護したと推測される。HO-1 の先行研究は、暑熱ストレス依存的に発現が増加すること^[73,74]、転写因子の Nrf2 のノックアウトマウスは造精機能が低下することを報告している^[71]。本研究では、暑熱処理が HO-1 の mRNA 発現量を増加させた (Fig. 9)。これは、生体防御機構による発現誘導と考えられる。しかし、同条件の暑熱ストレス負荷は 28 日後の精子濃度を減少させたため、造精機能保護にこの HO-1 発現上昇作用では不足であると考えられる。明日葉粉末の投与は、暑熱処理未投与マウスより HO-1 の発現量をより強く増加させた。したがって、明日葉の造精機能保護効果に HO-1 の発現増加が寄与したことが考えられる。これらのことから、暑熱ストレス依存的な造精機能障害に対する明日葉の保護効果に、精巣内の抗酸化酵素の発現増加に伴う酸化ストレス抵抗性付与が関与することが考えられる。

第 3 項 明日葉の造精機能保護効果とヒートショックプロテインの関与

暑熱ストレス依存的な精母細胞への損傷に対する明日葉の保護効果の熱ストレス依存的な作用機序に着眼した。熱ストレスへの対抗因子として、ヒートショックプロテイン (HSP) が知られている。分子シャペロンである HSP はタンパクの機能保護や膜貫通等の補助とし

て働く。明日葉の機能成分であるカルコン類は、肺がん細胞における HSP70 及び HSF1 の mRNA 発現誘導作用が知られている^[75]。そこで、本研究は多種類ある HSP の中でも、タンパク保護機能を有する HSP70s、HSP70 のシャペロン機能を補助する HSP40、これらの因子を転写制御する HSF1、HSF2 に着眼した。

I. HSPA1A

本研究では、明日葉の投与が精巣内の HSPA1A の mRNA 発現量を増加させた (Fig. 8)。HSPA1A は各器官に存在し、各種ストレスから生じるタンパクの構造変化に対して保護作用を示している^[76]。HSPA1A に関する先行研究は、芍薬の投与による胃の HSPA1A のタンパク発現増加が塩酸による細胞障害からの保護することを明らかにしている^[77]。また、芍薬の添加はヒト子宮頸がん細胞内の HSPA1A の発現増加を介して、熱ストレス依存的な細胞死を改善したとの報告がある^[78]。これらのことから、明日葉粉末の投与は、暑熱処理前に HSPA1A の発現増加を促し、暑熱ストレス依存的な精巣内生殖細胞死を抑制したと推測される。

暑熱処理は精巣内 HSPA1A の mRNA 発現量を顕著に増加させ、明日葉粉末の投与による影響を受けなかった (Fig. 9 【B】)。HSP に関する先行研究は、マウスへの暑熱ストレス負荷が生体防御のために精巣内の HSPA1A を増加させることを報告している^[79,80]。明日葉は HO-1 と同様に、暑熱ストレス負荷後に HSPA1A の mRNA 発現をさらに増加させると期待したが、暑熱ストレス負荷による発現増加が大きいため、本研究では確認できなかったと考えられる。これらのことから、明日葉の造精機能保護効果は HSPA1A の発現増加を介した熱ストレス抵抗性の付与が関与することが考えられる。

II. HSPA1L and HSPA2

本実験では、明日葉粉末の投与が HSPA1L mRNA 発現を増加させたが、HSPA2 mRNA に影響を与えなかった (Fig. 8)。HSPA1L 及び HSPA2 は精巣組織に特異的に存在し、

HSPA1A と同様のタンパク保護機能を有している^[82]。また、HSPA1L と HSPA2 は生殖細胞の精母細胞及び精子細胞に多く発現している^[83]。したがって明日葉の投与は、暑熱ストレス負荷前に HSPA1L の発現増加を促し、精巣内生殖細胞に熱ストレス抵抗性を付与したと推測される。

暑熱処理は HSPA1L 及び HSPA2 mRNA を有意に減少させた (Fig. 9 【B】)。精巣特異的な HSP の先行研究は、暑熱負荷が精巣内の HSPA1L 及び HSPA2 の発現を減少させると述べている^[82]。また、HSPA1L 及び HSPA2 をノックアウトしたマウスでは、造精機能が著しく低下する^[83,84]。これらのことから、本研究の暑熱処理は精巣特異的な HSP70s の低下を介して造精機能を低下させたと考えられる。一方で、明日葉粉末の投与は、暑熱ストレス依存的な精巣特異的 HSP70s の低下を有意に改善した (Fig. 9 【B】)。したがって、明日葉の投与は、暑熱ストレス依存的な精巣特異的 HSP70s の発現低下を抑制することで、精母細胞を保護したと考えられる。これらのことから、暑熱ストレス依存的な造精機能低下に対する明日葉の保護効果は、精巣特異的な HSP70s の発現の増加と暑熱ストレス依存的なそれら発現低下の抑制を介して精母細胞を保護したことが関与すると推測される。

III. HSP40

HSP40 は各器官にユビキタスに存在し、ATP 依存的に HSP70 のタンパク保護作用の活性補助に寄与する。先行研究の HSP40 をノックアウトしたマウスでは、HSP70 によるタンパク保護機能が働かず、造精機能が低下する^[85]。そのため、HSP40 は造精機能の維持に重要と言える。本研究では、明日葉粉末の投与が HSP40 mRNA の発現量を増加させた (Fig. 8)。明日葉粉末の投与は HSPA1A 及び HSPA1L の mRNA 発現量を増加させたことから、HSP40 の発現増加が暑熱処理前に HSP70 依存的な熱ストレス抵抗性を高めたと推測される。

暑熱処理は HSP40 mRNA 発現量を有意に減少させたが、明日葉の投与は改善作用を示さなかった (Fig. 9 【B】)。しかし、明日葉粉末を投与した精巣では造精機能が保護されてい

ることから、本実験の HSP40 の発現低下は改善作用に大きく影響しないと考えられる。精巣特異的な HSP70 の発現は維持されたことから、熱ストレス抵抗性は HSP70 に依存すると推測される。これらのことから、明日葉粉末の投与は HSP40 の発現を増加させ、HSP70 の活性補助を介して精母細胞を暑熱ストレスから保護したと考えられる。

IV. HSF1 and HSF2

各 HSP は HSF の転写制御を受けている。HSP に関する先行研究は、HSF 1 が HSPA1A, HSP40, HSPA1L の発現を制御すること、HSF2 が HSPA1A, HSPA1L, HSPA2, HSP40 の発現を制御することを述べている^[79]。本研究では、明日葉の投与は HSF1 mRNA の発現を増加させ、HSF2 mRNA の発現量に変化を与えなかった (Fig. 8)。また、明日葉粉末の投与は HSPA2 以外の HSP 発現量を増加させた (Fig. 8)、したがって、明日葉の各 HSP の発現増加作用は、HSF1 依存적であると示唆された。

暑熱処理は HSF2 の mRNA 発現量を有意に減少した (Fig. 9 【B】)。HSF2 は HSF1 と共に HSPA1L と HSPA2 の発現を制御する。そのため、暑熱ストレス依存的な HSF2 mRNA の発現量の低下が、HSPA1L と HSPA2 の発現量の減少に影響したと推測される。一方で、明日葉粉末の投与は、暑熱ストレス依存的な HSF 2 と精巣特異的 HSP70 の発現低下を改善した (Fig. 9 【B】)。したがって、明日葉は暑熱ストレス依存的な HSF2 の発現量の低下を改善し、精巣特異的な HSP70 の発現量を維持したと考えられる。これらのことから、HSF を介した HSP の発現制御が暑熱ストレス依存的な造精機能障害に対する明日葉粉末の保護効果に寄与することが示唆された。

第 4 項 明日葉の造精機能保護を担う機能性化合物について

暑熱ストレス依存的な造精機能低下に対する明日葉の保護効果が示されたため、機能性成分の探査を行った。明日葉の機能性成分であるカルコン類のキサントアンゲロール (XA) は、各組織に蓄積される^[45]。そのため、XA は精巣組織に蓄積し、明日葉と同様の保護機能

を示すことが考えられる。当研究室の先行研究は、XA の投与が抗酸化酵素の発現増加を介して、暑熱ストレスに対して卵巣機能の保護作用を示すこと^[51,52]、血管内皮細胞の抗酸化酵素の発現を増加させること^[43]を報告している。本研究では、XA の投与が暑熱ストレス依存的な精細管の空洞化を抑制すること、精巣内の抗酸化酵素の発現を促進することを示している (Fig. 11-12)。したがって、精巣器官で明日葉粉末と同様の作用を示していることから、暑熱ストレス依存的な造精機能障害に対する XA の効果は、抗酸化酵素を介して精巣内の生殖細胞を保護することが推測される。さらに、カルコン類は HSP の発現を促進することが知られている^[75]。本研究でも、明日葉粉末と同様に、XA の投与が精巣内 HSP の発現を増加させた (Fig. 13)。したがって、暑熱ストレス依存的な造精機能障害に対する XA の保護効果は、HSP の発現増加を介した熱ストレス抵抗性の付与が関与すると考えられる。

しかし、XA を投与したマウス精巣内の抗酸化酵素や HSP の mRNA 発現量の増加は、明日葉粉末を投与したマウス精巣の発現量と比較して不十分であった。明日葉粉末は 4-ヒドロキシデリシンやクマリン類など様々な生理活性を有する機能性化合物を含んでいる。今後はこれらの化合物を用いて、検討する必要がある。これらのことから、XA は暑熱ストレス依存的な造精機能障害に対する明日葉の保護効果の一部を担うことが示唆された。

第 5 項 明日葉の夏季不妊に対する造精機能保護効果について

本研究はマウス実験で、暑熱ストレス依存的な造精機能低下を明日葉が改善する作用を明らかにした。実用化を視野に入れ、梅山豚による評価を行った。その結果、明日葉の投与が夏季環境による暑熱ストレス依存的な精子運動能力の低下を抑制した (Fig. 15)。この結果より、暑熱ストレス依存的な造精機能障害に対する明日葉の保護効果はマウスに限った作用ではないと考えられる。また、明日葉の投与は造精機能だけでなく頭部振幅の低下も抑制した。したがって明日葉の投与は、分化した精子の質への保護作用も有すると考えられる。暑熱ストレス依存的な生殖障害の改善では、増加した体内の酸化ストレスレベルを低下さ

せることが重要である [32, 68, 69]. 本研究は, マウス精巣への酸化ストレス抵抗性の付与が暑熱ストレス依存的な生殖障害に対する明日葉の改善効果に重要であると考えている. したがって, 明日葉の夏季不妊改善効果は, 暑熱ストレス依存的な酸化ストレスの増加に対する抑制作用が関与したと推測される. さらに, 明日葉粉末の投与は, HSP を介したマウス精巣内への熱ストレス抵抗性の付与を示しているため, 梅山豚でも同様の付与作用が考えられる.

第 6 項 本章の結論

本章の実験で, 明日葉粉末の投与が暑熱ストレス依存的な造精機能低下を改善した. その改善効果は, 精母細胞の保護効果が関与することを明らかにした. さらに, 明日葉粉末の投与は精巣内の抗酸化酵素及び HSP の発現を有意に亢進させることが明らかとなった. また, 明日葉の保護機能とキサントアンゲロールの保護機能は類似していた.

以上の研究結果から, 明日葉は精巣内に酸化ストレス抵抗性及び熱ストレス抵抗性を付与し, 暑熱ストレスから精母細胞を保護することで, 暑熱ストレス依存的な造精機能障害に対する保護作用を示すことが明らかになった. また, 明日葉の精巣保護機能では, カルコン類が重要な役割を果たしていると考えられる. さらに, 明日葉の投与はブタの夏季不妊に対して有効であることが示されたことから, 今後はヒトへの応用を視野に入れた研究も進めるべきである.

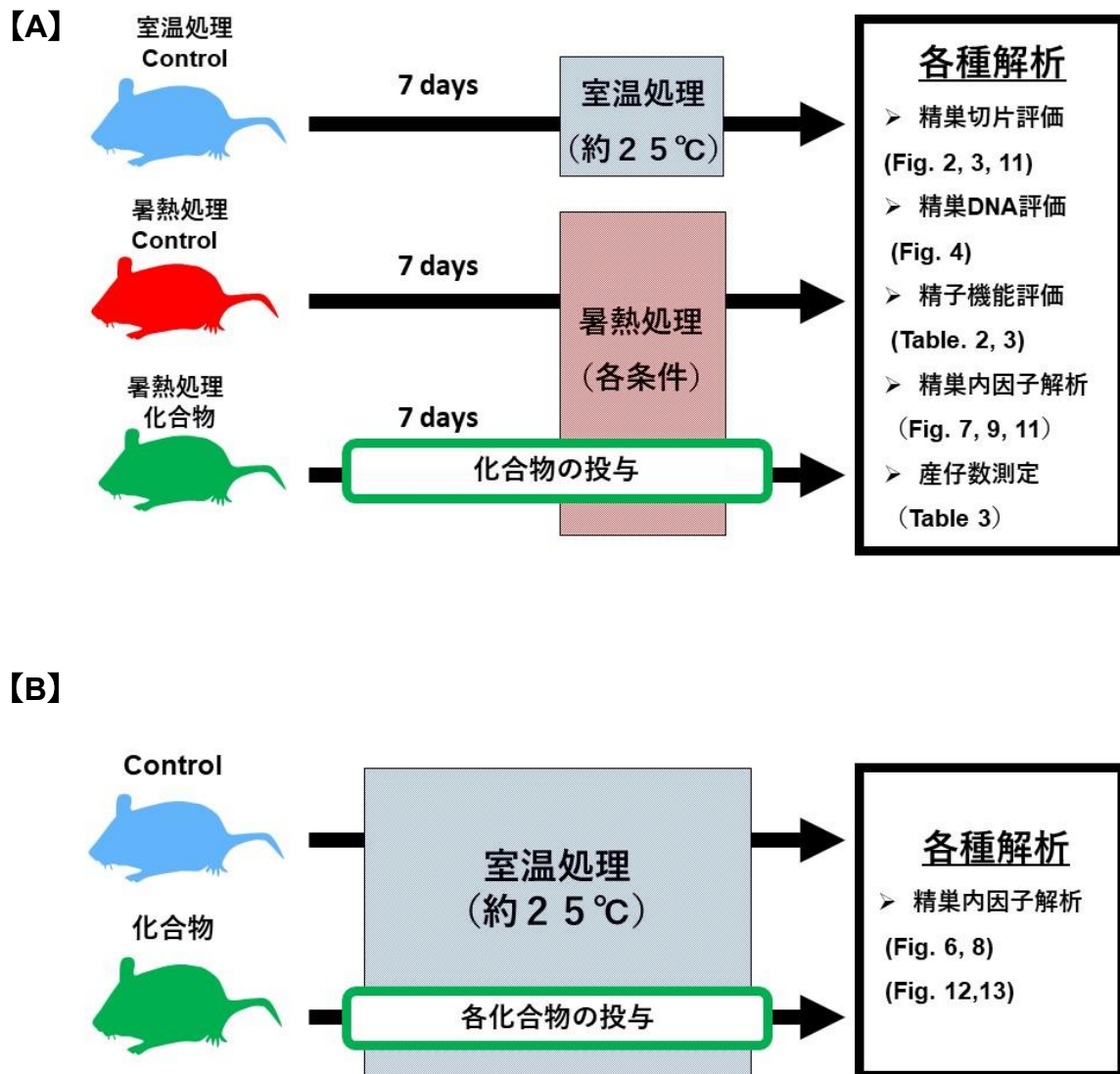


Fig. 1 実験系 【造精機能保護効果の評価】

条件 【A】

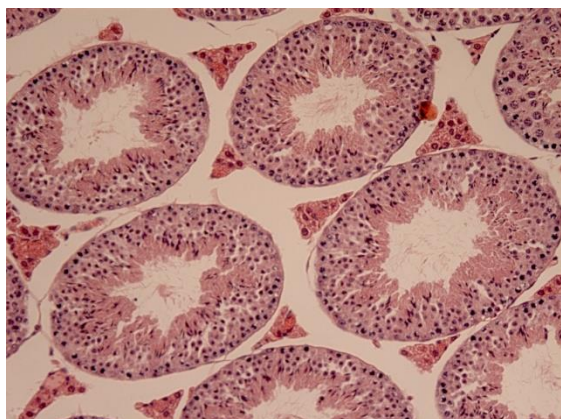
性成熟した雄の ICR マウスを室温処理群と暑熱処理群に分け、2 種の Control（未投与）群と化合物群で飼育した。各種化合物投与 7 日後に暑熱ストレスを負荷し、成熟精子や精巣を回収後に各種解析を行った。化合物の投与量及び暑熱処理の条件は各 Figure の説明で明記している。

条件 【B】

性成熟した雄の ICR マウスをコントロール群と化合物群に分け、室温で飼育した。各種化合物の投与 7 日後に精巣を摘出し、各種解析を行った。

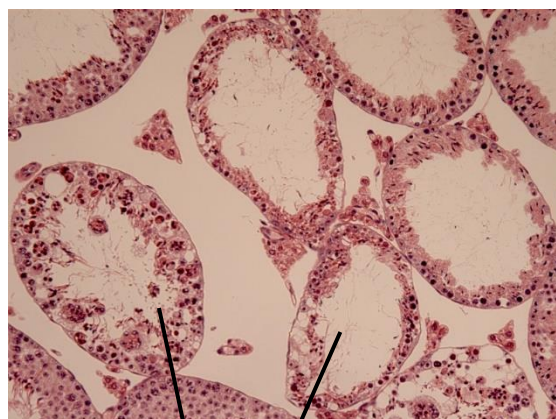
室温処理

Control



暑熱処理

Control



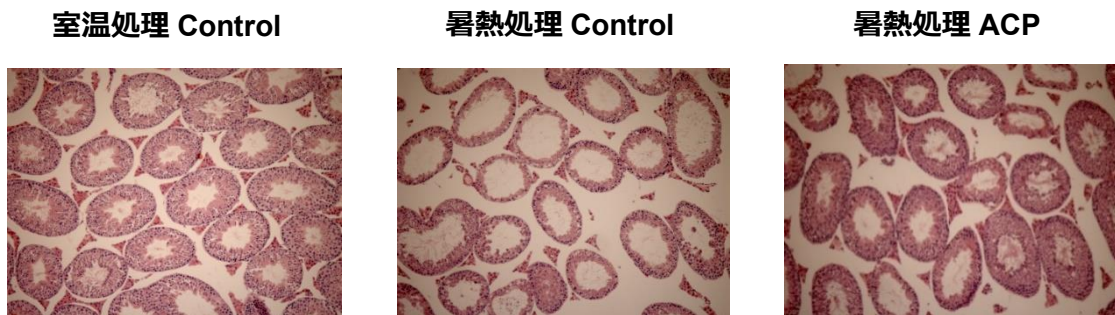
異常精細管

Fig. 2 暑熱ストレス処理が精細管内生殖細胞に与える影響

ICR マウスを室温処理群と暑熱処理群に分けた。暑熱処理（42°C, 20 分）から 48 時間後に精巣を摘出し、ブアン固定した。パラフィン包埋後、HE 染色法で染色後、精巣断面を撮影した。

異常精細管は、精母細胞及び精子細胞の脱落した精細管および多角巨細胞が観察される精細管を指す。

(A)



(B)

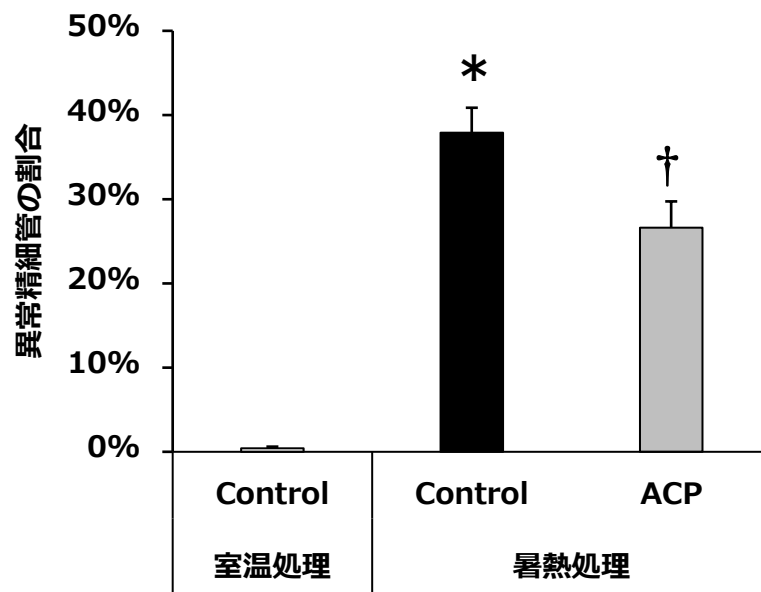


Fig. 3 暑熱ストレス依存的な精細管の損傷に対する明日葉粉末の保護効果

【A】 Figure. 1 の条件【A】で実験を行い、57.5 mg/kg 体重/day で明日葉粉末（ACP）を化合物群に投与した。暑熱処理（42℃, 20 分）から 48 時間後に精巣を摘出し、ブアン固定した。パラフィン包埋後、HE 染色法で染色し、精巣断面を撮影した。精母細胞及び精子細胞の脱落や多角巨細胞が観察される精細管を異常精細管と定義した。

【B】 各群の異常精細管の割合を計測した。グラフは平均値±SE (n=6)を示している。統計処理は Holm-test で行った。

*P<0.05 vs. 室温処理-Control, †P<0.05 vs. 暑熱処理-Control

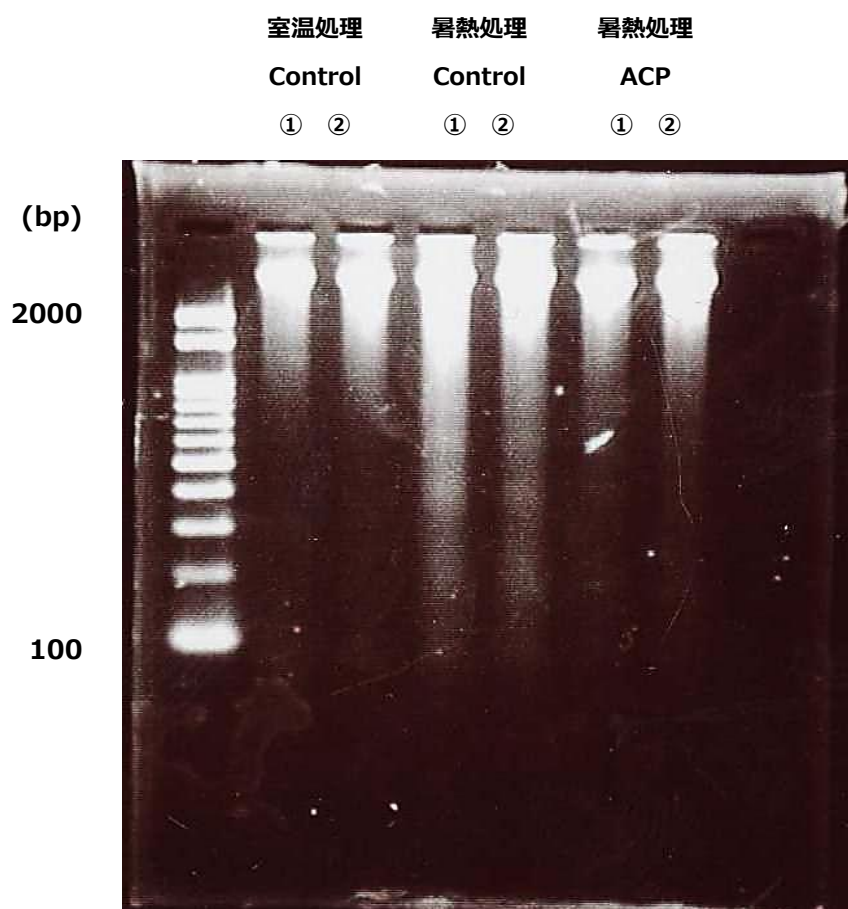


Fig. 4 暑熱ストレス依存的な精細の低 bpDNA の増加に対する明日葉の効果

Figure. 1 の条件【A】で実験を行った．57.5 mg/kg 体重/day の明日葉粉末（ACP）を化合物群に投与した．暑熱処理（42°C, 20 分）から 48 時間後に精巣を摘出し，DNA を抽出した．各群の DNA サンプルをアガロースゲル電気泳動法で分離した．分離したゲルを核酸染色液で染色後，可視光ゲル撮影システムで撮影した．

Table 2 暑熱ストレス依存的な造精機能の低下に対する明日葉の効果

Figure. 1 の条件【A】で実験を行い, 57.5 mg/kg 体重/day の明日葉粉末 (ACP) を化合物群に投与した. 暑熱処理 (41°C, 15 分) から 28 日後に精巣上体尾部から精子を取り出し, 精子解析システムで各群の精子を測定した.

各表値は平均値±SE (n=6 or 9)を示している. 統計処理は Holm-test 又は Dunnett-test で行った.

*P < 0.1, †P < 0.05 vs. 室温処理-Control; ‡P < 0.1, §P < 0.05 vs. 暑熱処理-Control.

	室温処理	暑熱処理	
	Control	Control	ACP
精子濃度 (million/ml)	13.7 ± 1.1	8.2 ± 1.4 [†]	15.2 ± 1.6 [§]
精子運動率 (%)	71.1 ± 0.9	54.1 ± 6.5 [†]	72.1 ± 2.5 [§]
運動精子濃度 (million/ml)	9.8 ± 0.9	5.0 ± 1.3 [†]	11.0 ± 1.3 [§]
直線速度 (μm/s)	55.7 ± 2.9	40.4 ± 7.2	61.0 ± 3.1 [§]
曲線速度 (μm/s)	198.6 ± 8.3	154.2 ± 18.9 [*]	209.4 ± 8.4 [§]
平均速度 (μm/s)	81.8 ± 3.6	62.1 ± 9.1	89.7 ± 3.3 [§]
頭部振幅 (μm)	4.4 ± 0.2	3.4 ± 0.4 [*]	4.6 ± 0.2 [§]
25 μm/s 以上の直線速度をもつ精子の割合 (%)	41.7 ± 2.5	26.7 ± 7.3 [*]	48.3 ± 3.3 [‡]
25 μm/s 以上の曲線速度をもつ精子の割合 (%)	66.7 ± 1.5	45.0 ± 8.2 [*]	69.0 ± 2.6 [§]
25 μm/s 以上の平均速度をもつ精子の割合 (%)	50.3 ± 2.4	33.8 ± 7.6 [†]	56.5 ± 3.2 [§]

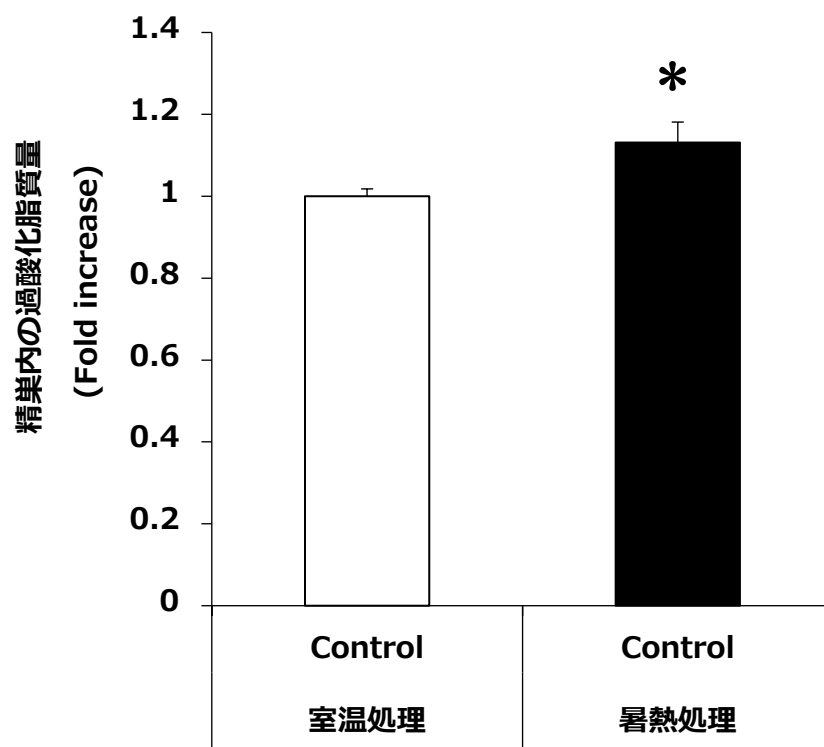


Fig. 5 暑熱ストレス負荷が精巣内酸化ストレスレベルに与える影響

ICR マウスを室温処理群と暑熱処理群に分けた。暑熱処理（42°C, 20 分）から 30 分後に精巣を摘出した。組織用 RIPA バッファーでホモジナイズしてタンパク質を調整後, TBARS 法で過酸化脂質量を測定した。

グラフは平均値±SE (n=6)を示している。統計処理は Student t-test で行った。

*P<0.05 vs. 室温処理-Control

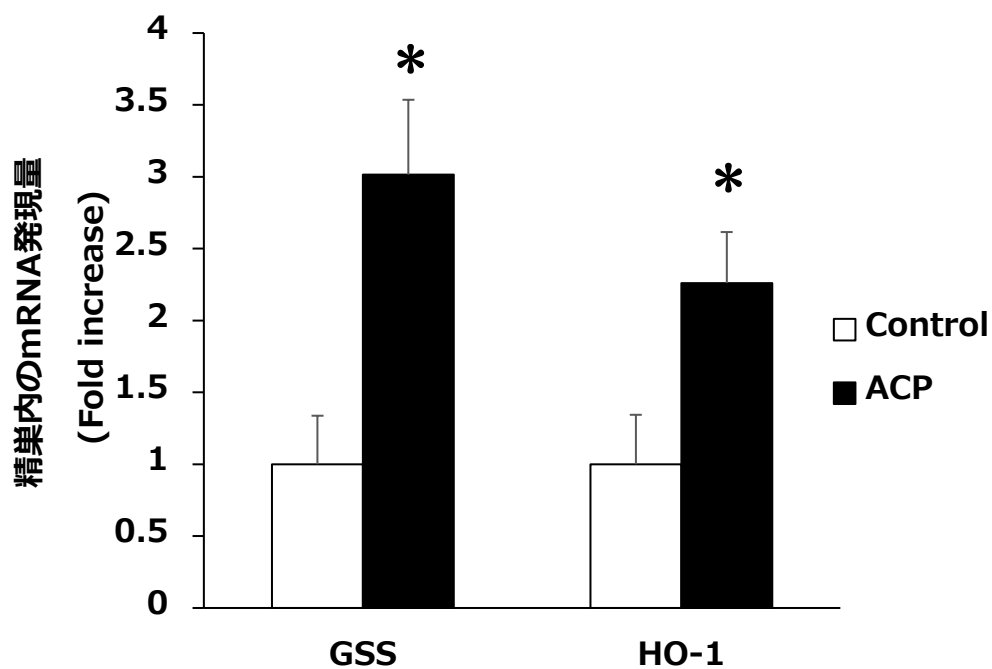


Fig. 6 明日葉が精巣内抗酸化酵素の発現に与える影響

Fig. 1 の条件【B】で実験を行い、57.5 mg/kg 体重/day の明日葉粉末（ACP）を化合物群に投与した。解剖時に精巣を摘出後、各サンプルの RNA を調製した。各 mRNA 量の発現評価は Real-Time PCR 法を用いた。

グラフは平均値±SE (n=6)を示している。統計処理は Student t-test で行った。

*P<0.05 vs. Control

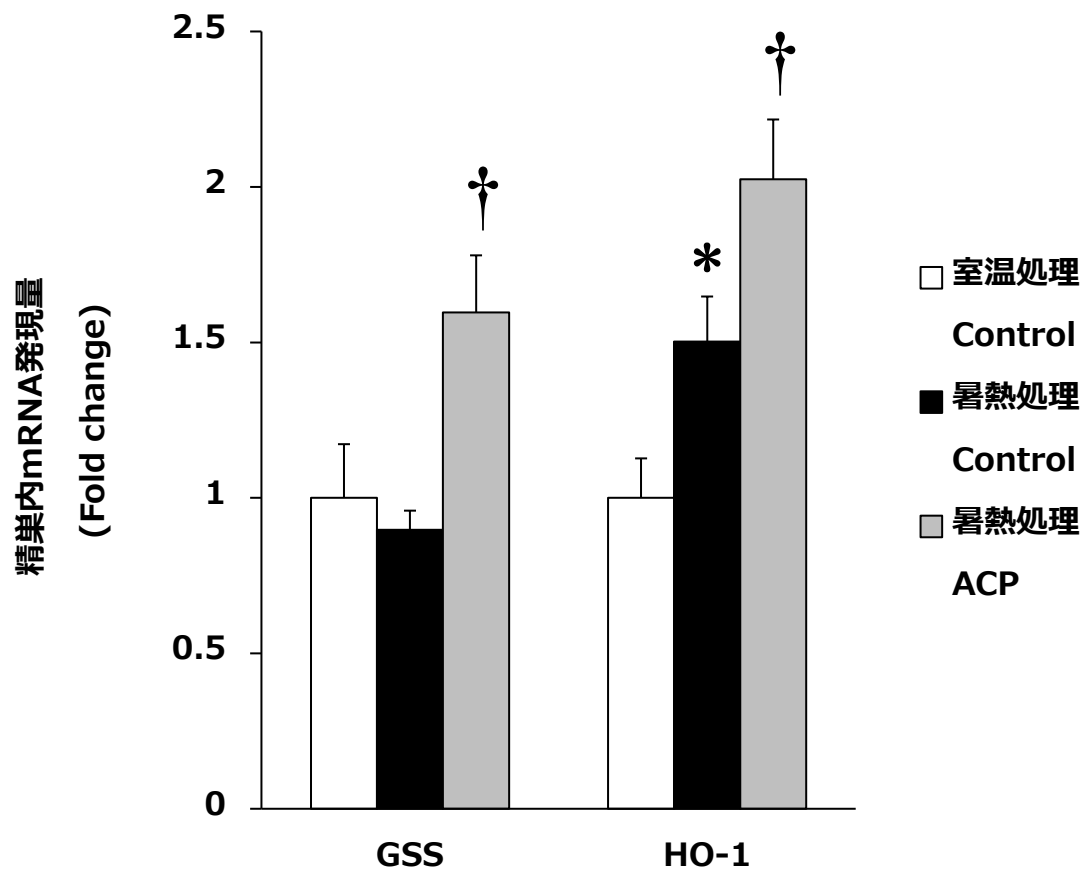


Fig. 7 暑熱ストレス依存的な精巣内の抗酸化酵素の発現に対する明日葉の効果

Fig. 1 の条件【B】で実験を行い、57.5 mg/kg 体重/day の明日葉粉末（ACP）を化合物群に投与した。暑熱処理（41℃, 15 分）から 1 時間後に精巣を摘出し、各サンプルの RNA を調製した。各 mRNA 量の発現評価は Real-Time PCR 法を用いた。

グラフは平均値±SE (n=6)を示している。統計処理は Holm-test 又は Dunnett-test で行った。

*P<0.05 vs. 室温処理-Control, †P<0.05 vs. 暑熱処理-Control

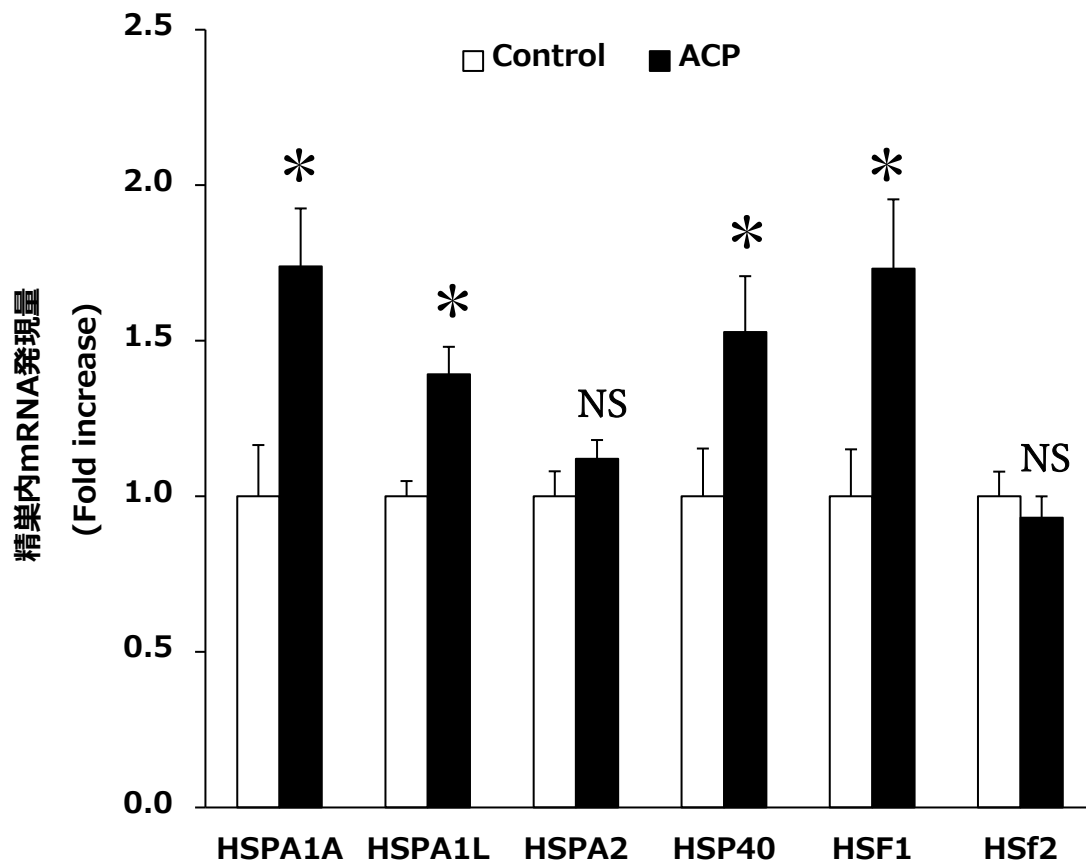


Fig. 8 明日葉が精巣内 Heat Shock Protein と Heat Shock Factor に与える影響

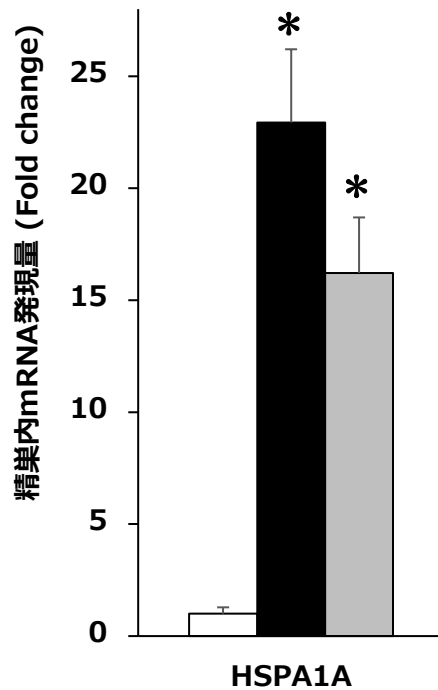
Fig. 1 の条件【A】で実験を行い、57.5 mg/kg 体重/day の明日葉粉末（ACP）を化合物群に投与した。解剖時に精巣を摘出後、各サンプルの RNA を調製した。各 mRNA 量の発現評価は Real-Time PCR 法を用いた。

グラフは平均値±SE (n=6)を示している。統計処理は Student t-test で行った。

*P<0.05 vs. Control

【A】

□ 室温処理 Control
■ 暑熱処理 Control
■ 暑熱処理 ACP



【B】

□ 室温処理 Control ■ 暑熱処理 Control ■ 暑熱処理 ACP

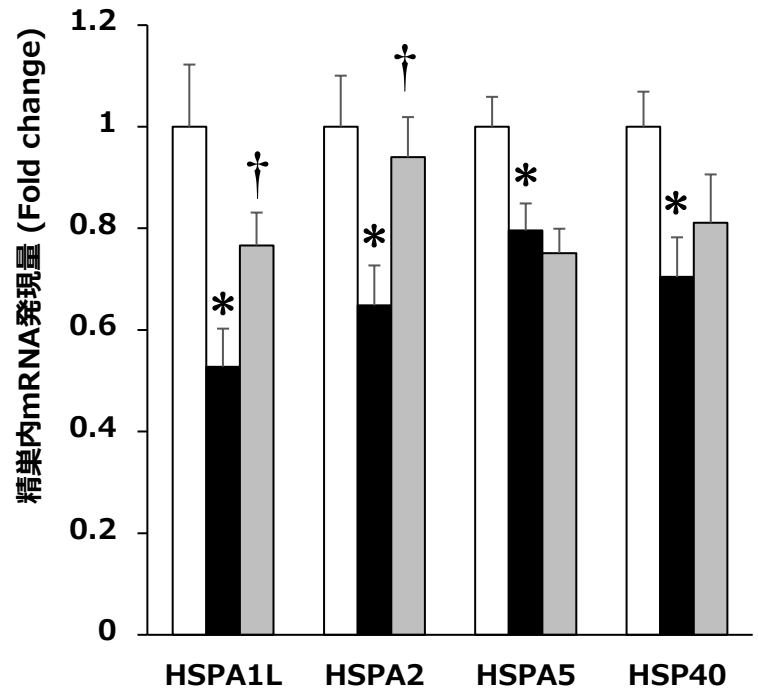


Fig. 9 暑熱ストレス依存的な精巣内 Heat Shock Protein の発現変化に対する

明日葉の効果

Fig. 1 の条件【A】で実験を行い、57.5 mg/kg 体重/day の明日葉粉末（ACP）を化合物群に投与した。暑熱処理（41°C, 15 分）から【A】3 時間後、【B】6 時間後に精巣を摘出し、各サンプルの RNA を調製した。各 mRNA 量の発現評価は Real-Time PCR 法を用いた。

グラフは平均値±SE（【A】n=6【B】n=5-6）を示している。統計処理は Holm-test 又は Dunnett-test で行った。

*P<0.05 vs. 室温処理-Control, †P<0.05 vs. 暑熱処理-Control

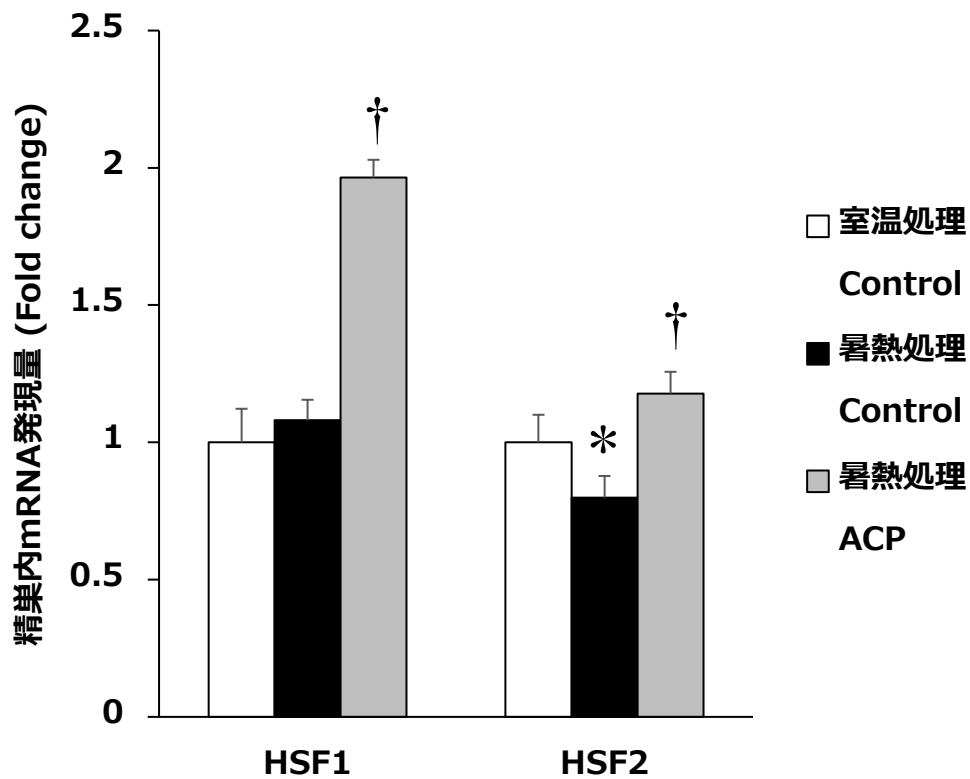


Fig. 10 暑熱ストレス依存的な精巣内 Heat Shock Factor の発現変化に対する

明日葉の効果

Fig. 1 の条件【A】で実験を行い、57.5 mg/kg 体重/day の明日葉粉末（ACP）をサンプル投与群に投与した。暑熱処理（41°C, 15 分）から 1 時間後に精巣を摘出し、各サンプルの RNA を調製した。各 mRNA 量の発現評価は Real-Time PCR 法を用いた。

グラフは平均値±SE (n=6)を示している。統計処理は Holm-test で行った。

*P<0.05 vs. 室温処理-Control, †P<0.05 vs. 暑熱処理-Control

Table 3 暑熱ストレス依存的な産仔数の低下に対する明日葉の効果

Fig. 1 の条件【A】で実験を行った．明日葉粉末を 57.5 mg/kg 体重/day で化合物群に投与した．暑熱処理（41℃, 20 分）から 25 日後に雌マウスと 5 日間交配させた．交配後に雌マウスを個別飼育し，約 20 日後に生まれた子供を測定した．

各表値は平均値（n=6）を示している．

母親 1 匹あたり	室温処理	暑熱処理	
	Control	Control	ACP
産仔数（匹）	11.71	10.00	11.13
産仔重量（g）	21.70	17.89	20.04
生存産仔数（匹）	11.71	9.00	10.88
生存産仔重量（g）	21.70	16.20	19.56

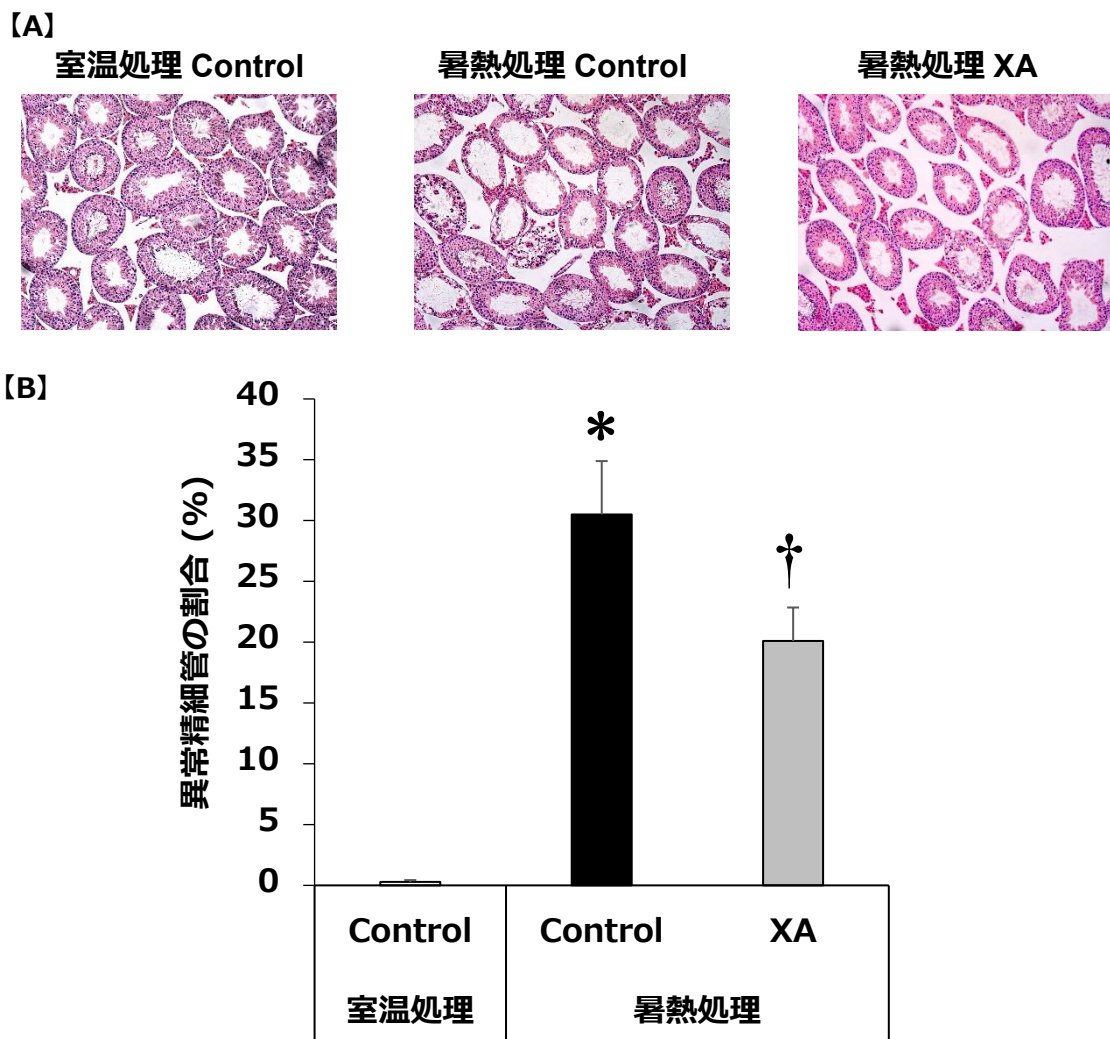


Fig. 11 暑熱ストレス依存的な精細管の損傷に対する XA の効果

【A】 Fig. 1 の条件 【A】 で実験を行い、キサントアンゲロール (XA) を 3.0 mg/kg 体重/day で化合物群に投与した。暑熱処理 (42°C, 20 分) から 48 時間後に精巣を摘出し、ブアン液で固定した。パラフィン包埋後、HE 染色法で染色し、精巣断面を撮影した。精母細胞及び精子細胞の脱落や多角化巨細胞が観察される精細管を異常精細管と定義した。

【B】 各群の異常精細管の割合を計測した。グラフは平均値±SE (n= 5-7)を示している。統計処理は Dunnett-test で行った。

*P<0.05 vs. 室温処理-Control, †P<0.05 vs. 暑熱処理-Control

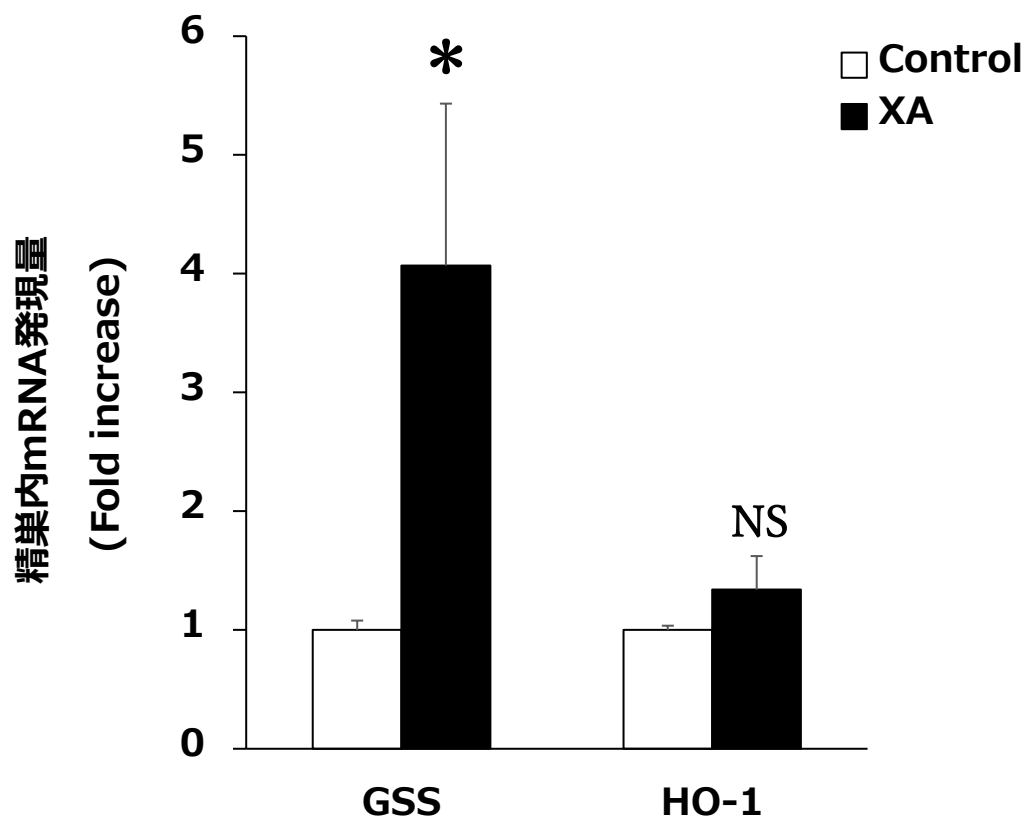


Fig. 12 XA が精巣内の抗酸化酵素の発現に与える影響

Fig. 1 の条件【A】で実験を行い、キサントアンゲロール（XA）を 3 mg/kg 体重/day で化合物群に投与した。解剖時に精巣を摘出後、各サンプルの RNA を調製した。各 mRNA 量の発現評価は Real-Time PCR 法を用いた。

グラフは平均値± SE (n=5)を示している。統計処理は Wilcoxon signed-rank test 又は Student t-test で行った。*P<0.05 vs. Control

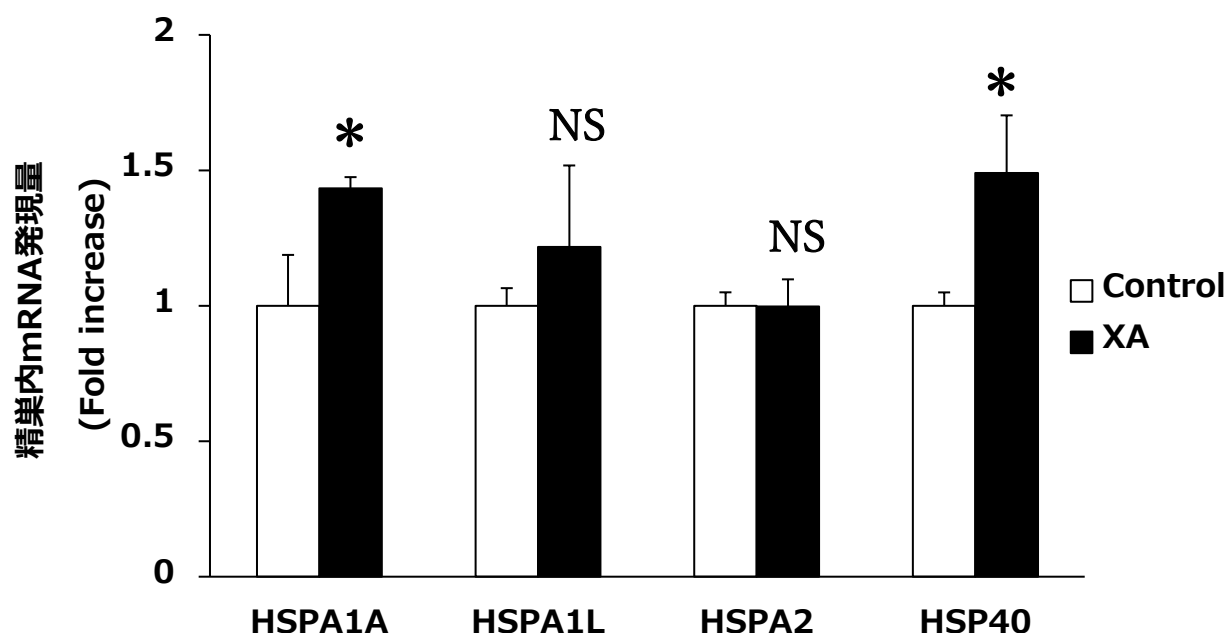


Fig. 13 XA が精巣内の Heat Shock Protein の発現に与える影響

Fig. 1 の条件【A】で実験を行い、キサントアンゲロール（XA）を 3 mg/kg 体重/day で化合物群に投与した。解剖時に精巣を摘出後、各サンプルの RNA を調製した。各 mRNA 量の発現評価は Real-Time PCR 法を用いた。

グラフは平均値± SE (n=5)を示している。統計処理は Wilcoxon signed-rank test 又は Student t-test で行った。

*P<0.1 vs. Control

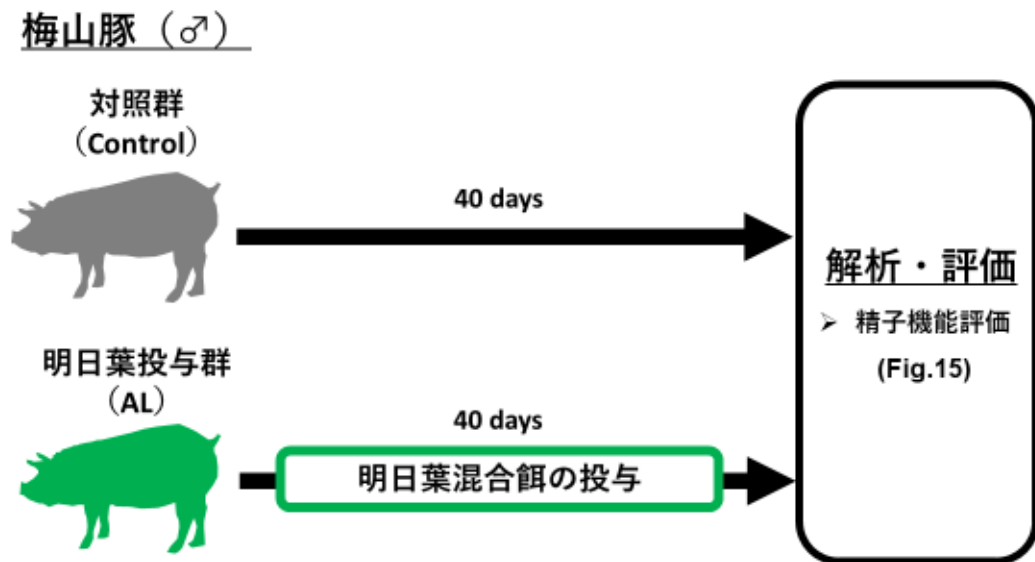


Fig. 14 実験系 【梅山豚の夏季不妊に対する改善評価】

1 - 2 歳の雄の梅山豚を対照群 (Control) と明日葉投与群 (AL) に分け, 夏季に飼育した. 明日葉投与群では通常のエサに明日葉の茎葉粉末を 200 mg/kg 体重/day で混合し, 40 日間投与した. 投与前と投与後に射出精子を回収し, 精子解析システムで精子機能の評価を行った.

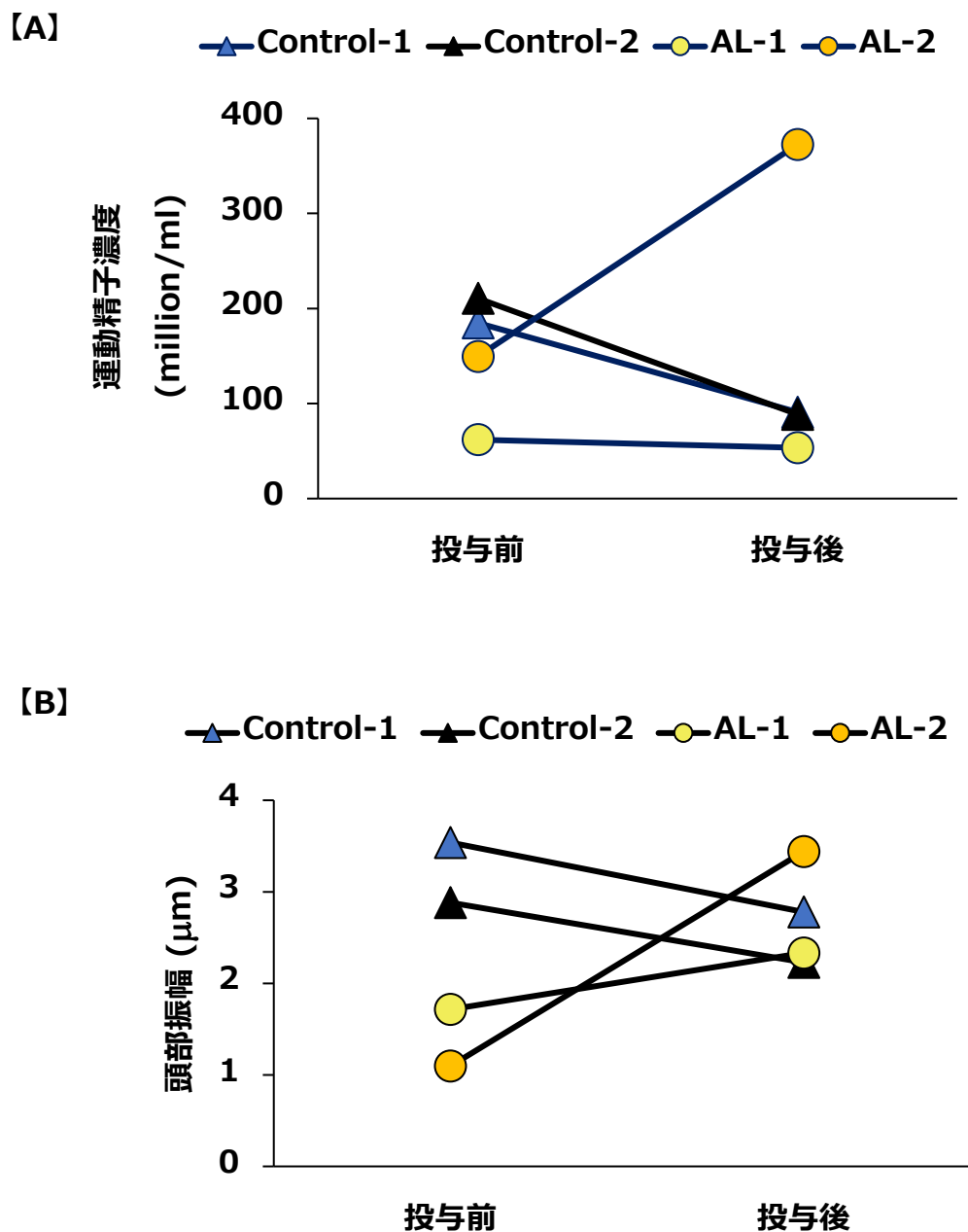


Fig. 15 梅山豚の夏季不妊に対する明日葉の効果

Fig.14 の条件を用いて、200 mg/kg 体重/day のあしたば葉粉末（AL）を投与した。投与開始時と投与終了後に射出精子を回収し、精子解析システムで各群の精子を測定した。

グラフは平均値 (n=2, 2)を示している。【A】運動精子濃度【B】頭部振幅

第3章 研究課題－2

暑熱ストレス依存的な成熟精子の機能低下に対する明日葉の改善作用

第1節 研究背景

ヒトや家畜では、母体への暑熱ストレス暴露が精子に損傷を与え、精子運動機能や受精した受精卵の機能低下を引き起こす^[6, 88]。

本論文の成熟精子は、精巣上体内で成熟が進行し、運動性を獲得した精子を指す。精巣内で形態変化を終えた精子は、射精に向けて精子成熟を行うため、精巣輸出管を通り精巣上体に運ばれる。精巣上体に運ばれた精子は、精巣上体の頭部、体部、尾部へと迂曲した管内を移送される。体部から尾部の移送期間中に、精巣上体の分泌液による成熟変化が進行し、射出精子と同等の運動能や受精能を有する成熟精子が完成する。各機能を獲得した成熟精子は精巣上体尾部に貯留され、射精の機会を待つ。精巣上体内で頭部から尾部まで移送される期間はヒトでは約10－15日間、マウスでは約7日間である。

ストレス依存的な成熟精子機能低下の研究のモデル実験系として、暑熱ストレス依存的な精子機能低下の系がよく用いられる。マウスの先行研究は、暑熱ストレス負荷が精子のDNA損傷、妊娠率の低下、受精卵の発生機能の低下をもたらすことを報告している^[89]。一方で、暑熱ストレス依存的な成熟精子機能低下に対する改善効果を示した研究は少ない。現在の不妊対策は体外受精や顕微授精などの高度生殖補助医療が施されているが、過度な配偶子の質の低下はこれらの技術の成功率を低下させると言われている^[14]。そのため、保有する射精精子の機能改善及び向上が男性不妊改善に重要である。本論文は、食機能成分が精子機能障害の改善に有効であると仮説を立てた。当研究室の先行研究は、オリーブ成分のオレウロペインが暑熱ストレス依存的な造精機能低下だけでなく、成熟精子機能低下

を改善することを明らかにしている^[35]。本論文では第2章で、明日葉粉末の投与が暑熱ストレス依存的な造精機能に対して保護作用を示すことを明らかにしている。そのため、明日葉粉末の投与は、成熟精子に対する保護作用が期待できる。したがって、性成熟した雄マウスへの短期的な暑熱ストレス負荷実験系を用いて、明日葉粉末の投与が暑熱ストレス依存的な成熟精子機能障害に対する保護効果に関して検討した。特に、明日葉粉末の投与により保護された精子の各種運動機能、受精卵への影響、作用機序に着目した。

第2節 研究目的

「暑熱ストレス依存的な成熟精子機能低下に対する明日葉の保護効果を検討すること」を研究目的とした。本章では精巣上体尾部に貯蓄されている成熟精子に焦点をあて、研究を行った。

第3節 実験手技

第1項 材料

I. 動物

動物実験で用いた ICR マウスは、日本チャールズリバーから購入後に自家繁殖させた個体を用いた。マウス用飼料の MF 粉末は、日本チャールズリバーより購入した。

II. 投与化合物

各種実験に使用した明日葉粉末は、明日葉カルコンパウダー (ACP) を (株) 日本生物科学研究所から購入した。キサントアンゲロール (XA) は、筑波大学生命環境系・河村芳恵研究員より提供を受けた。カルコン量 0.07% の明日葉の葉粉末は、(株) 食機能探査研究所より提供を受けた。粉末給餌器用カバーは、オリエンタル酵母より購入した。麻酔に使用したペントバルビタールナトリウムは、共立製薬より購入した。

III. 各種アッセイキット

過酸化脂質量を測定した TBARS Assay Kit は Cayman Chemical (#A53255) より購入した。タンパク定量に使用した BCA TM protein assay kit は Thermo Fisher (#FSQ-201) より購入した。

第2項 マウス実験

I. 飼育条件

雄の 8 週齢の ICR マウスは、コントロール群と化合物投与群に分けた。化合物投与群は、57.5 mg/kg 体重で明日葉粉末を、3.0 mg/kg 体重でキサントアンゲロールを、650 mg/kg 体重で明日葉の葉粉末を粉末飼料に混ぜ、粉末給餌器で投与した。各群マウスは室温 23-25°C、光周期 12L : 12D (午前 7 時に点灯) で飼育した。

II. 暑熱処理

本研究はストレス負荷に暑熱処理を採用し、マウスは室温処理群と暑熱処理群に分けた。室温処理群の ICR マウスは化合物非投与（コントロール群）とし、暑熱処理群は化合物投与群と非投与群（暑熱コントロール群）に分けた。各群のマウスに麻酔薬 ペントバルビタールナトリウムを 40-50 mg/kg 体重で腹腔投与した。室温処理群のマウスは麻酔後、室温で静置した。暑熱処理群のマウスは麻酔後、身体の下半分を 42°Cのお湯に 20 分間暴露した (Fig.16)。

III. 精子の運動機能評価

成熟精子を評価するため、暑熱処理から 24 時間後に精子を解析した。解剖時に精巣上体尾部を摘出し、精子培養バッファー (2.2 mM HEPES, 1.2 mM MgCl₂, 100 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 4.8 mM lactic acid Ca, 5.5 mM d-Glucose, 20 mM sodium bicarbonate and 88 mM pyruvic acid) に入れ静置した。18G の針で精巣上体尾部の 1 ヶ所に切りこみを入れ、貯蓄された成熟精子を掻き出した。37°Cで 15 分間培養後、500 rpm で 1 分間遠心洗浄し、上清の精子液を回収した。精子は SMAS で下記のパラメータを評価した。精子濃度 (Sperm concentration), 精子運動率 (Sperm motility), 運動精子濃度 (Motile sperm concentration), 直線速度 (Straight-line velocity), 曲線速度 (Curvilinear velocity), 平均速度 (Average path velocity), 頭部振幅 (Amplitude of lateral head displacement), Progressive sperm (直線速度 50 mm/s 以上かつ直線率 75%以上の精子)

第3項 体外受精

I. 過排卵処理

過排卵処理を行うため、性成熟した雌 ICR マウスに 5 IU 妊馬血清性腺刺激ホルモン

(PMSG) を腹腔投与した。投与から 48 時間後に 5 IU のヒト絨毛性ゴナドトロピン (hCG) を腹腔投与し、過排卵を誘発させた。投与から 15 時間後に雌 ICR マウスの卵管膨大部を摘出し、3 mg/ml BSA の HTF medium (Irvine scientific, CA, USA) に入れて静置した。18G の針で卵管膨大部に 1 ヶ所切りこみを入れ、貯蓄された排卵卵子を掻き出した。

II. 媒精

卵子を採取する 1 時間前に、受精能獲得のために精子の前培養を行った。解剖時に精巣上体尾部を摘出し、3 mg/ml BSA を含んだ HTF medium (Irvine scientific, CA, USA) の中で静置した。18G の針で精巣上体尾部の 1 ヶ所に切りこみを入れ、貯蓄された成熟精子を掻き出した。37°C, 5 %CO₂ 条件下で 30 分間培養後、SMAS で精子濃度を確認した。

III. 受精

1 時間媒精した精子を 2.0×10^5 sperm/ml の濃度で採卵した卵子の HTF medium に添加した。37°C, 5 %CO₂ の条件下で 5 時間培養した。尚、本実験では雄と雌を 1 対 1 の組合せにし、実験を行った。

IV. 発生

培養した受精卵を mHTF medium (3 mg/ml BSA, 1 mM glutamine, 0.1 mM EDTA) に移した。37°C, 5% CO₂ 条件下で 48 時間培養後、再び新鮮な mHTF medium に移し、同条件下で更に 48 時間培養した。胚の観察は、受精卵培養から 24 時間後に 2 細胞, 48 時間後に 4 細胞, 96 時間後に胚盤胞をそれぞれ顕微鏡下で測定した。

第 4 項 マウス精子実験

I. 暑熱ストレス負荷試験

実験前に 3 mg/ml BSA を含んだ HTF medium (Irvine scientific, CA, USA) を用意した. 解剖時に精巣上体尾部を摘出し, HTF medium に静置した. 18G の針で精巣上体尾部の 1 ヶ所に切りこみを入れ, 貯蓄された成熟精子を掻き出した. 37°C で 15 分間培養後, 33°C もしくは 42°C で 20 分間培養した. 500 rpm で 1 分間遠心洗浄し, 上清の精子液を回収した. 精子は SMAS を用いて下記のパラメータを評価した. 精子運動率 (Sperm motility), 直線速度 (Straight-line velocity), 曲線速度 (Curvilinear velocity), 平均速度 (Average path velocity), 頭部振幅 (Amplitude of lateral head displacement)

II. 酸化ストレス負荷試験

実験前に 3 mg/ml BSA を含んだ HTF medium (Irvine scientific, CA, USA) を用意し, PBS (-) 又は H_2O_2 150 μM を添加した. 解剖時に精巣上体尾部を摘出し, 2 種の HTF medium に静置した. 18G の針で精巣上体尾部の 1 ヶ所に切りこみを入れ, 貯蓄された成熟精子を掻き出した. 37°C で 30 分間培養後, 500 rpm で 1 分間遠心洗浄し, 上清の精子液を回収した. 精子は SMAS を用いて下記のパラメータを評価した. 精子運動率 (Sperm motility), 直線速度 (Straight-line velocity), 曲線速度 (Curvilinear velocity), 平均速度 (Average path velocity), 頭部振幅 (Amplitude of lateral head displacement)

第 5 項 抗酸化酵素の活性測定

I. 精巣上体組織からのタンパク調製

マウスから摘出した精巣上体は貯蓄された精子を除去後, -80°C で保存した. 氷上で融解後に RIPA Buffer [5 mM EDTA, 0.01% digitonin, 0.25% sodium cholate/PBS (-)] を精巣上体 2 個当たり 0.6 ml 加えホモジナイズし, 遠心 (13200 rpm, 10 min, 4°C) 後に上清を得た. 更に同条件で遠心し, タンパク溶液を得た.

II. 成熟精子からのタンパク調製

マウスから摘出した精巣上体尾部から成熟精子を取り出し、37°C環境下で培養した。遠心洗浄（500 rpm, 1 min, RT）、上清を回収し、再び遠心（9000 rpm, 3min, 4°C）した。沈殿の精子塊は-80°Cで保存した。氷上で融解後に IP Buffer [5 mM EDTA, 0.01% digitonin, 0.25% sodium cholate/ PBS (-), 10% glycerol, 1% Triton-X100, 0.2 mM PMSF, 3 µg/ml antipain, 10 µg/ml leupeptin, 10 µg/ml aprotinin]を1個体当たり 0.2 ml 加えホモジナイズし、遠心（15000 rpm, 20 min, 4°C）後に上清を回収し、タンパク溶液を得た。

III. GP x 活性測定

Tris-EDTA (pH 8.0)と DDW の混合物を実験前に用意した。測定時に 0.1 M GSH, 10 U/ml glutathione reductase, 2 mM NADPH を加え、37°Cで2分間インキュベートした。その後、各サンプル溶液と 7 mM t-BuOOH を加え、340 nm で吸光度を測定した。測定は 37°Cで300秒間とし、経時的な変化を記録した。酵素活性値は各サンプルの吸光度の変化をタンパク濃度で割った値とした。

IV. Catalase 活性測定

Tris-EDTA (pH 8.0)と 10 mM H₂O₂/50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0)の混合物を実験前に用意した。37°Cで2分間インキュベート、各サンプル溶液を加え、240 nm で吸光度を測定した。測定は 37°Cで 300 秒間とし、経時的な変化を記録した。酵素活性値は各サンプルの吸光度の変化をタンパク濃度で割った値とした。

第6項 酸化ストレスレベルの検出

I. 精巣上体組織からのタンパク質調製

マウスから摘出した精巣上体は貯蓄された精子を除去後、-80°Cで保存した。氷上で融解

後に RIPA Buffer [50 mM Tris-HCl (pH 7.6), 10% Glycerol, 1% Triton-X100, 0.2 mM PMSF, 150 mM NaF, 1 mM EDTA, 1 mM Na₃VO₄, 3 µg/ml antipain, 10 µg/ml leupeptin, 10 µg/ml aprotinin] を精巣上体 2 個当たり 0.4 ml 加えホモジナイズし、遠心 (4200 rpm, 4°C) 後に上清を得た。更に同条件で遠心し、タンパク溶液を得た。

II. 成熟精子からタンパク質調製

マウスから摘出した精巣上体尾部から成熟精子を取り出し、37°C環境下で培養した。遠心洗浄 (500 rpm, 1 min, RT), 上清を回収し、再び遠心 (9000 rpm, 3min, RT) した。沈殿の精子塊は-80°Cで保存した。氷上で融解後に RIPA Buffer [50 mM Tris-HCl (pH 7.6), 10% Glycerol, 1% Triton-X100, 0.2 mM PMSF, 150 mM NaF, 1 mM EDTA, 1 mM Na₃VO₄, 1 mg/ml sodium dodecyl sulfate, 3 µg/ml Antipain, 10 µg/ml Leupeptin, 10 µg/ml Aprotinin] を 1 個体当たり 0.2 ml 加えホモジェナイズし、遠心 (13200 rpm, 20 min, 4°C) 後に上清を得た。更に同条件で遠心し、タンパク溶液を得た。

III. 過酸化脂質量の測定

過酸化脂質で各組織の酸化ストレスレベルを評価した。得られたタンパク溶液を TBARS assay kit 付属のプロトコールに従い、過酸化脂質量の測定を行った。また、タンパク溶液中の濃度を BCA TM protein assay kit で測定し、精子 1 mg あたりの過酸化脂質量を算出した。各吸光値の測定は Ultra mark (Baio-rad, CA, USA)で行った。

第 7 項 統計処理

実験結果は、平均値±SE (Standard Error) で示した。2 群間のデータは T 検定を用いて有意差検定を行った。また、3 群間以上のデータは Holm 検定, Dunnett 検定, Steel 検定を用いて有意差検定を行った。使用した検定手法は各図および表の説明に明記している。

$P < 0.05$ のときに有意な差がある， $P < 0.1$ のときに傾向があると判断した．

第4節 結果

第1項 熱ストレス依存的な成熟精子機能低下に対する明日葉投与の効果

I. 暑熱ストレス依存的な精子運動機能低下に対する明日葉の保護効果

成熟精子は精巣上体尾部中に貯蓄されるため、マウスへの暑熱負荷は24時間後の成熟精子に影響を与える^[62,63]。そこで、明日葉粉末の暑熱ストレス依存的な成熟精子機能障害に対する効果を検討するために、暑熱処理24時間後の精子を評価した。結果をTable 4に示す。室温処理のマウス精子と比較し、暑熱処理のマウス精子では、精子濃度、精子運動率、運動精子濃度、各種速度、頭部振幅が有意に低下した。これらの低下に対して、明日葉粉末の投与は、精子運動率、各種速度、頭部振幅を有意に改善した。一方で、明日葉粉末の投与は精子濃度及び運動精子濃度の低下を改善しなかった。

II. 胚発生機能低下に与える影響

暑熱ストレスを受けた成熟精子は、受精した胚の発生率を低下させる^[89]。暑熱ストレス依存的な精子の胚発生能力低下に対する明日葉粉末の改善効果を検討した。結果をFig. 17に示す。暑熱処理は2細胞及び4細胞への分化に変化を示さなかったが、胚盤胞への発生率を有意に低下させた。これに対して、明日葉粉末の投与は暑熱ストレス依存的な胚盤胞発生率の低下を有意に改善した。

III. 直接的な熱負荷による精子運動機能低下に対する改善効果

熱ストレスを受けた成熟精子は、運動機能の低下することが報告されている^[89]。明日葉粉末の投与がマウスの精子に熱ストレス抵抗性を付与するか検討した。その結果をFig. 23に示す。明日葉粉末の非投与マウスの精子では、42°Cの高温培養が精子運動率や平均速度に変化を与えなかったが、直線速度、曲線速度、頭部振幅が有意に低下した。一方で、明日葉粉末を投与したマウスの精子は、42°Cの高温培養に伴う精子運動能力低下を示さなかった。

第2項 暑熱負荷による酸化ストレスの増加に対する明日葉投与の効果

I. 暑熱負荷が精巣上体及び精子の酸化ストレスレベルに与える影響

過酸化水素処理した成熟精子では運動能力が低下することが報告されている^[90,91]. 第2章で, 暑熱処理はマウス精巣内の酸化ストレスレベルを上昇させたため, 精巣上体でも同様の作用が考えられる. マウスへの暑熱負荷が精巣上体内の過酸化脂質量に与える影響を Fig. 18 に示す. 室温処理のマウス精巣上体と比較し, 暑熱処理のマウス精巣上体では過酸化脂質が有意に増加した.

熱ストレスが精子内の酸化ストレスレベルに与える影響を検討するため, Fig. 22 と同条件で, マウス精子の過酸化脂質量を測定した. 結果を Fig. 24 に示す. 33°C培養の精子と 42°C培養の精子では, 精子内の過酸化脂質量に変化が認められなかった.

II. 精巣上体内の抗酸化酵素の発現レベルに与える影響

第2章で, 暑熱処理はマウス精巣内の酸化ストレスレベルを上昇させたため, 精巣上体でも同様の作用が考えられる. 暑熱ストレス依存的な成熟精子機能障害に対する明日葉粉末の保護作用に, 酸化ストレスの低減が考えられる. そこで, 酸化ストレスの低減に重要な抗酸化酵素に着眼した. 精巣上体内の抗酸化酵素活性の結果を Fig. 19 に示す. 明日葉粉末の投与はマウス精巣上体内のグルタチオンペルオキシダーゼ(GPx)の活性を増加させたが, カタラーゼ (Catalase) に変化を与えなかった.

III. 精子内の抗酸化酵素の発現制御に与える影響

酸化ストレスの低減が明日葉粉末の成熟精子への保護作用に関与すると仮定し, 精子内の抗酸化酵素に着眼した. 成熟精子内の抗酸化酵素活性を測定した結果を Fig. 20 に示す. 明日葉粉末の投与はマウス成熟精子内 Catalase, GPx, グルタチオン還元酵素 (GR) の活性に変化を与えなかった.

IV. 暑熱ストレス負荷による精子内酸化ストレスレベルへの影響

暑熱処理が成熟精子の酸化ストレスレベルに与える影響を検討した。結果を Fig. 21 に示す。暑熱ストレス負荷から 2, 6, 12, 24 時間後のマウス成熟精子では、過酸化脂質量に変化を示さなかった。

V. 直接的な酸化ストレス負荷による運動機能低下に与える影響

過酸化水素 (H_2O_2) を含む培地での精子培養は、成熟精子の運動能を低下させる^[90,91]。精巢上体尾部から摘出した成熟精子を過酸化水素入りの培地で培養した結果を Fig. 25 で示す。 H_2O_2 添加培地での培養は、対照群の Control マウス精子の直線速度、曲線速度、頭部振幅を有意に低下させた。明日葉粉末を投与したマウスも同様に、 H_2O_2 添加培地での培養が精子の運動率、各種速度、頭部振幅を有意に低下させた。

第3項 キサントアングロールが熱ストレス依存的な成熟精子機能低下に与える影響

暑熱ストレス依存的な成熟精子の機能低下に対して明日葉の投与が改善効果を示した。そこで、明日葉の機能成分を明らかにするために、暑熱ストレス依存的な成熟精子の機能低下に対するキサントアングロール (XA) の保護効果を検討した。暑熱処理 24 時間後の精子を評価した結果は Fig. 26 に示している。本実験では、妊娠率と正の相関を示す Progressive sperm を評価した^[93,94]。Progressive Sperm は、 $50 \mu\text{m/s}$ 以上の直線速度かつ 75% 以上直線率を有する精子と定義されている。暑熱処理は Progressive Sperm の濃度を有意に減少させたが、XA の投与はこの低下を有意に改善した。

第4項 明日葉の葉粉末が熱ストレス依存的な成熟精子機能低下に与える影響

本研究は、明日葉粉末による成熟精子への改善作用を示した。しかし、カルコンを高濃度で濃縮した明日葉粉末では、実社会への活用膨大なコストが予測される。そこで、明日葉

の可食部である“葉”が，暑熱ストレス依存的な成熟精子機能障害に改善作用を示すか検討した（Fig. 27）．室温処理のマウスと比較し，暑熱処理のマウスでは Progressive Sperm の割合が有意に低下した．一方で，明日葉の葉粉末の投与は，この低下を有意に改善した．

第5節 考察

明日葉粉末の投与は暑熱ストレス依存的な成熟精子機能低下に対して保護作用を示すと仮定し、性成熟雄マウスを用いて、各種実験を行った。その結果、明日葉粉末を 57.5 mg/kg 体重で投与することにより、成熟精子の運動機能や胚発生機能への保護作用が確認された。

第1項 本研究における暑熱ストレス負荷が成熟精子に与える影響

マウスへの暑熱ストレス負荷は、24 時間後に精子の運動能低下及び受精した胚の発生機能を低下させた (Table 4, Fig. 17)。本論文では第2章で、暑熱ストレス依存的な造精機能の低下が熱ストレスと酸化ストレスにより生じると考えている。そこで、本章では、暑熱ストレス依存的な成熟精子機能障害は同様の作用機序で生じると仮説を立て、研究をすすめた。

I. 直接的な熱ストレスが精子に与える影響

培養細胞への温度変化に関する先行研究は、高温での培養はマクロファージ細胞の DNA の断片化やミトコンドリアの機能低下を引き起こすことを報告している^[92]。また成熟精子の高温培養は、精子ミトコンドリアの膜電位の減少による運動機能の低下を引き起こす^[93]。本研究では、暑熱ストレス負荷が、24 時間後の成熟精子の運動能力と胚発生機能を低下させた (Table 4, Fig. 17)。したがって本研究では、暑熱ストレス依存的な精子機能障害は直接的な熱ストレスが誘導したことが考えられる。また、培養温度の上昇は、精子の運動機能を低下させた (Fig. 23)。精子の先行研究は、精子運動機能の低下はミトコンドリアの機能低下と関連し^[94,95]、胚発生機能低下は精子の DNA の断片化と関連すると述べている^[96,97]。これらのことから、DNA とミトコンドリアの損傷が本研究での暑熱ストレス依存的な精子機能障害に関与することが推測される。

II. 熱ストレス負荷により生じた酸化ストレスが精子に与える影響

本研究では、マウスへの暑熱処理後が精巣上体内の酸化ストレスレベルを上昇させた (Fig. 18)。先行研究は、過酸化水素存在下で培養が精子の DNA の損傷や運動機能の低下を誘導することを示している^[90,91]。したがって、酸化ストレスが本実験条件の暑熱ストレス依存的な成熟機能精子障害に関与すると考えられる。

暑熱ストレス負荷が成熟精子の酸化ストレスレベルに影響を与えるか検討したが、成熟精子の過酸化脂質量は増加しなかった (Fig. 21)。また、直接的な熱ストレスは、精子内の酸化ストレスレベルを増加させなかった (Fig. 24)。これらの結果から、暑熱ストレス負荷による精巣上体内の酸化ストレスレベルの上昇は、精巣上体組織及び精巣上体内腔液で生じると考えられる。したがって、暑熱ストレスの負荷は、精子を取り囲む環境内の酸化ストレスレベルの上昇を通して成熟精子の機能障害を引き起こすと仮定した。本研究では先行研究^[90,91]と同様に、過酸化水素依存的に精子の機能が低下した (Fig. 25)。つまり、成熟精子は培養環境の影響を多く受けることが考えられる。これらのことから、暑熱ストレス負荷は精巣上体尾部内の酸化ストレスレベルの上昇をもたらし、成熟精子の機能低下を引き起こしたと考えられる。

また、暑熱ストレス依存的に精巣上体内の酸化ストレスレベルが上昇することから、活性酸素種の増加が関与していることが考えられる。活性酸素種は細胞の機能低下及びアポトーシスを誘導する^[70]。精巣上体は精子成熟に必要なタンパクを分泌する組織であり^[98-100]、精巣上体の機能低下は精子の運動能を低下させることが知られている^[101]。したがって、暑熱処理が精巣上体内の活性酸素種の増加を介して、精巣上体組織の機能低下をもたらし、成熟精子の運動機能を低下させたと考えられる。

第2項 暑熱ストレス依存的な成熟精子機能障害に対する明日葉の保護作用

明日葉粉末の投与は暑熱ストレス依存的な成熟精子機能障害を改善した (Table 4, Fig. 17)。本章の考察第1項より、2つの作用機序を考察する。成熟精子はタンパク転写及び翻

訳機能を持たないため、精巣上体からのタンパク付加に着眼した。マウス精子は精巣で造られた後、精巣上体管に放出される。放出された精子は精巣上体の頭部から尾部を7日間かけて通り、運動機能や受精機能を獲得する^[104]。この期間に、成熟精子は様々な修飾を受ける^[100-101]。

I. 熱ストレス耐性の付与

明日葉粉末を投与したマウスの精子は、熱ストレス依存的な機能低下を示さなかった (Fig. 23)。この結果から、明日葉は成熟精子に熱ストレス抵抗性を付与したことが考えられる。第2章の暑熱ストレス依存的な造精機能障害に対する明日葉の効果では、熱ストレス抵抗性としてヒートショックプロテイン (HSP) が保護メカニズムに関与することを明らかにした。明日葉の成熟精子保護効果も同様の作用機序が考えられるため、HSP に着眼して考察する。精子成熟過程では、精巣上体からの HSP70 の付加作用が知られている^[98]。HSP に関する先行研究は、HSP70 を発現増加した細胞は高温度の培養から細胞死を抑制することを明らかにしている^[80]。したがって、明日葉粉末は精子と精巣上体に HSP を介した作用機序が推測される。精子に着目すると、明日葉が、精巣上体での成熟過程に HSP70 の分泌を促進させ、成熟精子に熱耐性を付与したと考えられる。精巣上体に着眼すると、明日葉が、精巣上体細胞の HSP 発現増加を介して、精巣上体細胞の働きである成熟機能の維持に寄与したと考えられる。

II. 酸化ストレス抵抗性の付与

明日葉粉末の投与はマウス精子の抗酸化酵素活性に変化を与えず、過酸化水素依存的な機能低下も改善しなかった (Fig. 20, 25)。したがって、明日葉が精子に酸化ストレス抵抗性を付与したとは考え難い。先行研究は、抗酸化剤との共培養が酸化ストレス依存的な精子機能低下を改善することを報告している^[103]。そこで、明日葉粉末の投与が精巣上体内の暑熱ストレス依存的な酸化ストレスレベルの上昇を軽減すると仮定した。精巣上体の抗酸化酵素活性を検討した結果、明日葉粉末の投与が GP x の活性を増加させた (Fig. 19)。したが

って、明日葉は精巣上体細胞内の抗酸化酵素活性の増加を介して、精巣上体内の酸化ストレスを軽減し、成熟精子を保護したと考えられる。また、精巣上体細胞自身の保護を介した成熟機能の維持が、明日葉の成熟精子機能保護作用に寄与したとも考えられる。

第3項 明日葉の成熟精子機能保護を担う機能性化合物について

明日葉粉末の投与が暑熱ストレス依存的な成熟精子への保護作用を示したため、機能性成分の探査を行った。カルコンに関する先行研究は、明日葉の機能性成分であるカルコン類のキサントアンゲロール (XA) は各組織に蓄積されることを明らかにしている^[50]。したがって、XA は精巣上体で保護機能を示すと推測される。XA の投与は、暑熱ストレス依存的な Progressive sperm 濃度低下を改善した (Fig. 26)。受胎率と正の相関を示す Progressive Sperm^[104,105]の改善を示したことから、XA は精子の胚発生能力の改善効果が期待できる。本研究の第2章では、明日葉の造精機能保護効果の一部を XA が担うことを示唆した。したがって、成熟精子及び精巣上体も同様に、暑熱ストレス依存的な成熟精子機能低下に対する明日葉の保護作用は XA が一部を担うと推測される。今後、XA の保護作用をより明確にするため、精子の高温培養や体外受精で評価する必要がある。これらのことから、暑熱ストレス依存的な成熟精子機能障害に対する明日葉の保護効果の一部は、XA に依存すると考えられる。

第6節 本章の結論

本章の実験で、明日葉が暑熱ストレス依存的な成熟精子機能低下を改善することを明らかにした。明日葉粉末の投与は精巣上体尾部中の成熟精子に熱耐性を付与し、精巣上体内の抗酸化酵素活性を増加させた。また、明日葉粉末と XA の成熟精子に対する保護作用は類似していた。

以上の研究成果から、明日葉は精子を取り囲む環境の維持と精子に熱ストレス抵抗性を

付与することで、暑熱ストレス依存的な成熟精子機能低下に対する改善作用を示すことが明らかになった。また、キサントアンゲロールが明日葉粉末の成熟精子保護機能の有効成分であると考えられる。

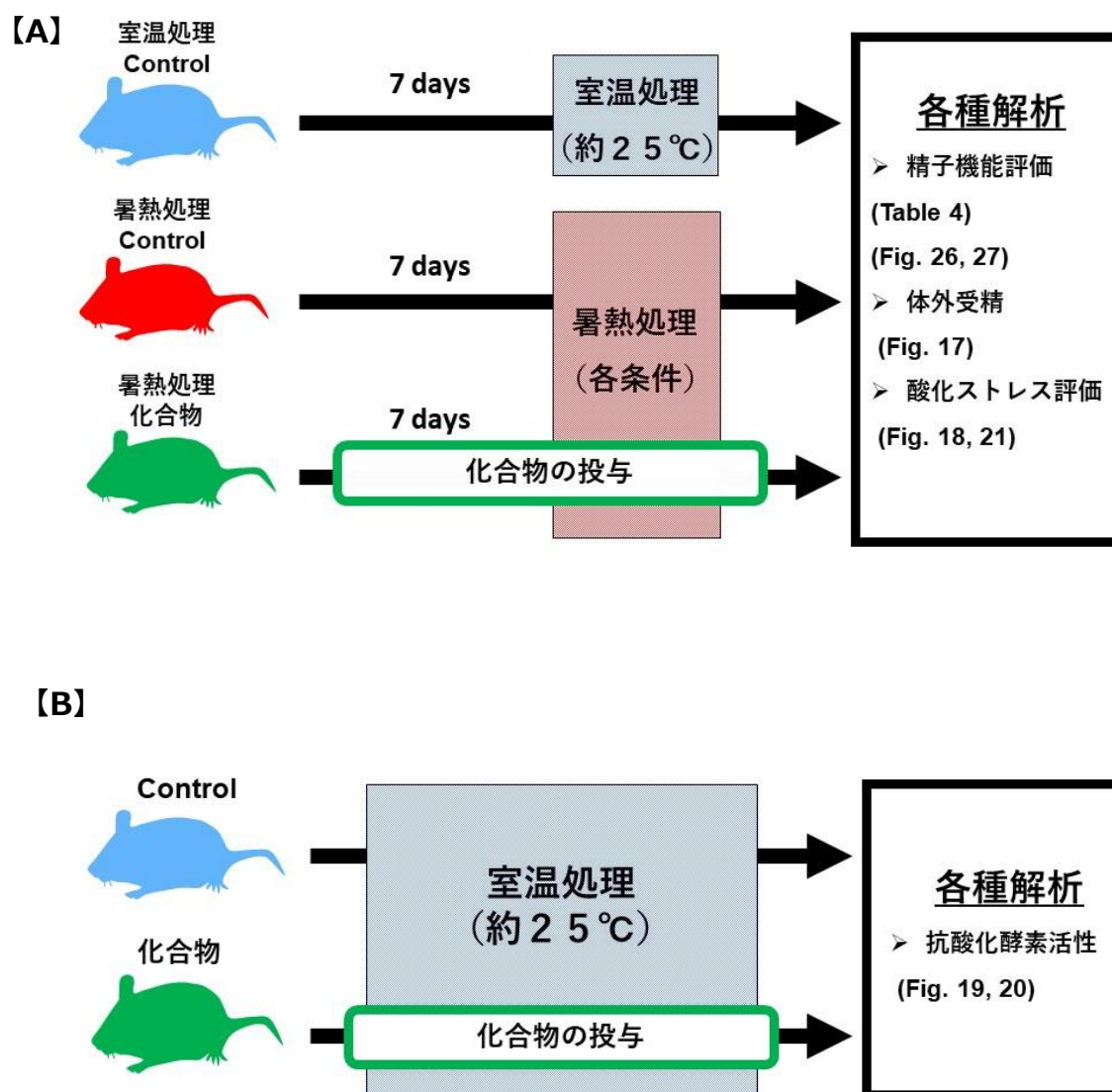


Fig. 16 実験系 【成熟精子保護の評価】

条件【A】

性成熟した雄の ICR マウスを室温処理群と暑熱処理群に分け、2 種の Control（化合物未投与）群と化合物群で飼育した。各種化合物の投与 7 日後に暑熱ストレスを負荷し、成熟精子や精巣上体を回収後に各種解析を行った。化合物の投与量及び暑熱処理の条件は各 Figure のキャプションで明記してある。

条件【B】

性成熟した雄の ICR マウスを Control（化合物未投与）群と化合物群に分け、室温で飼育した。各種サンプル投与 7 日後に精巣上体及び成熟精子を摘出し、各種解析を行った。

Table 4 暑熱ストレス依存的な成熟精子機能の低下に対する明日葉の効果

Fig. 16 の条件【A】で実験を行い, 57.5 mg/kg 体重/day の明日葉粉末 (ACP) を化合物群に投与した. 暑熱処理 (42°C, 20 分) から 24 時間後に精巣上体尾部から精子を取り出し, 精子解析システムで各群の精子を測定した.

各表値は平均値±SE (n=7-8)を示している. 統計処理は Holm-test 又は Dunnett-test で行った.

*P<0.05 vs. 室温処理-Control, †P<0.1 vs. 暑熱処理-Control,

‡P<0.05 vs. 暑熱処理-Control

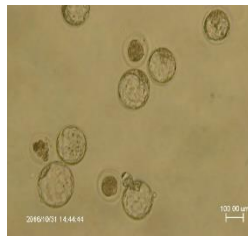
	室温処理	暑熱処理	
	Control	Control	ACP
精子濃度 (million/ml)	12.3 ± 1.9	4.8 ± 1.0 [*]	7.8 ± 1.0 [†]
精子運動率 (%)	70.8 ± 3.4	51.9 ± 4.2 [*]	65.3 ± 3.6 [‡]
運動精子濃度 (million/ml)	9.0 ± 1.7	2.8 ± 0.8 [*]	5.2 ± 0.9 [†]
直線速度 (μm/s)	60.7 ± 4.1	40.6 ± 4.3 [*]	61.4 ± 5.9 [‡]
曲線速度 (μm/s)	215.3 ± 9.5	157.2 ± 15.1 [*]	203.8 ± 14.3 [‡]
平均速度 (μm/s)	88.4 ± 5.1	62.6 ± 5.7 [*]	90.2 ± 7.9 [‡]
頭部振幅 (μm)	4.5 ± 0.3	3.4 ± 0.3 [*]	4.0 ± 0.2 [†]

【A】

室温処理 Control

暑熱処理 Control

暑熱処理 ACP



【B】

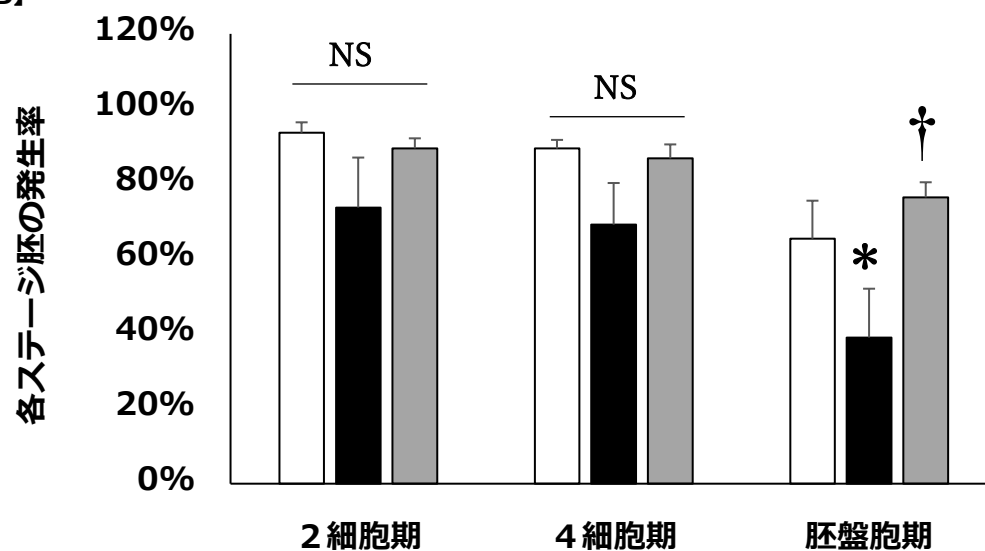


Fig. 17 暑熱ストレス依存的な精子の胚発生機能低下に対する明日葉の効果

Fig. 16 の条件【A】で実験を行い, 57.5 mg/kg 体重/day の明日葉粉末 (ACP) を化合物群に投与した. 暑熱処理 (42°C, 20 分) から 24 時間後に精巢上体尾部から精子を取り出し, 雌 ICR マウスの排卵卵子を用いて体外受精を行った. 受精卵培養から 24 時間後に 2 細胞期, 48 時間後に 4 細胞期, 96 時間後に胚盤胞期の割合を測定した.

【A】受精卵培養 96 時間後の各群の胚写真

【B】グラフは平均値±SE (n=5-6) を示している. 統計処理は Holm-test 又は Dunnett-test で行った.

*P<0.05 vs. 室温処理-Control, †P<0.05 vs. 暑熱処理-Control

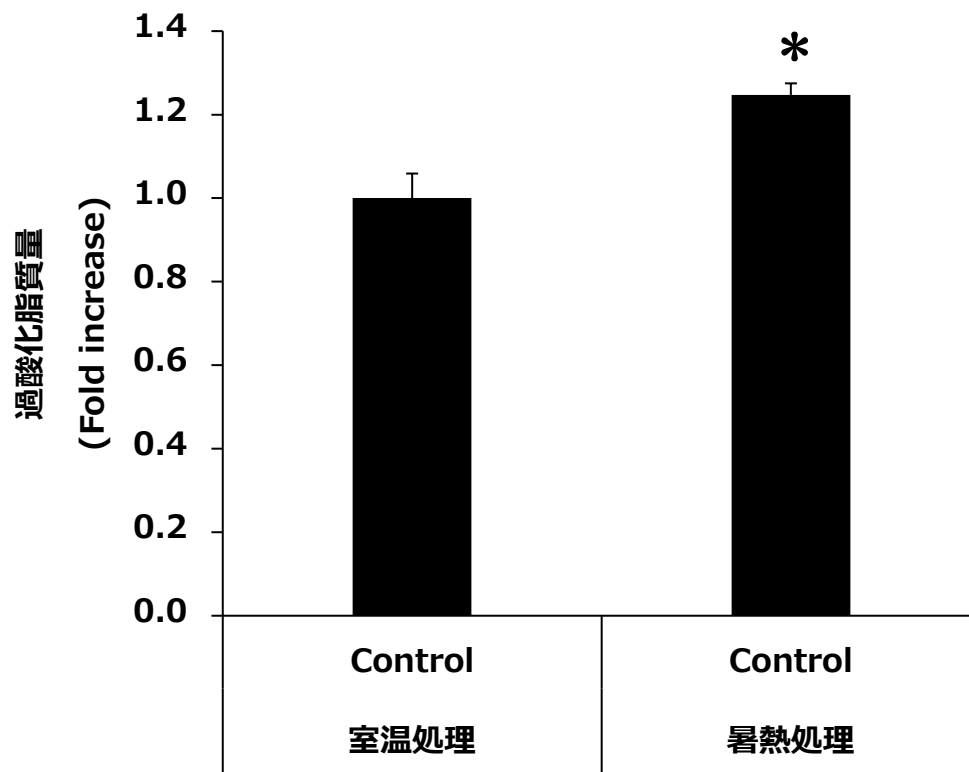


Fig. 18 暑熱ストレス負荷が精巣上体内の酸化ストレスレベルに与える影響

ICR マウスを室温処理群と暑熱処理群に分けた。暑熱処理 (42°C, 20 分) から 2 時間後に精巣上体を摘出し、成熟精子を除去した。組織用 RIPA バッファーでホモジナイズしてタンパク質を調整後、TBARS 法で過酸化脂質量を測定した。

グラフは平均値±SE (n=5-6)を示している。統計処理は Student t-test で行った。

*P<0.05 vs. Control

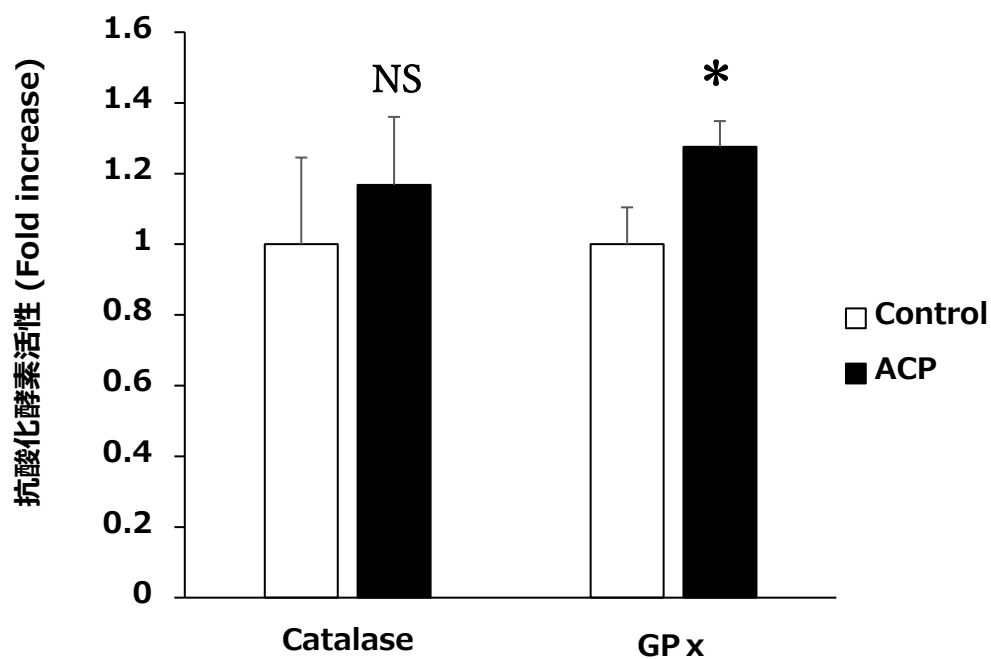


Fig. 19 明日葉が精巣上体内の抗酸化酵素の活性に与える影響

Fig. 16 の条件【A】で実験を行い、57.5 mg/kg 体重/day の明日葉粉末（ACP）を化合物群に投与した。解剖時に精巣上体を摘出後、成熟精子を除去した。各サンプルを組織用 RIPA バッファーでホモジナイズし、タンパク質を調整後、各抗酸化酵素の活性を評価した。

各表値は平均値±SE (n=6)を示している。統計処理は Student t-test で行った。

*P<0.1 vs. Control

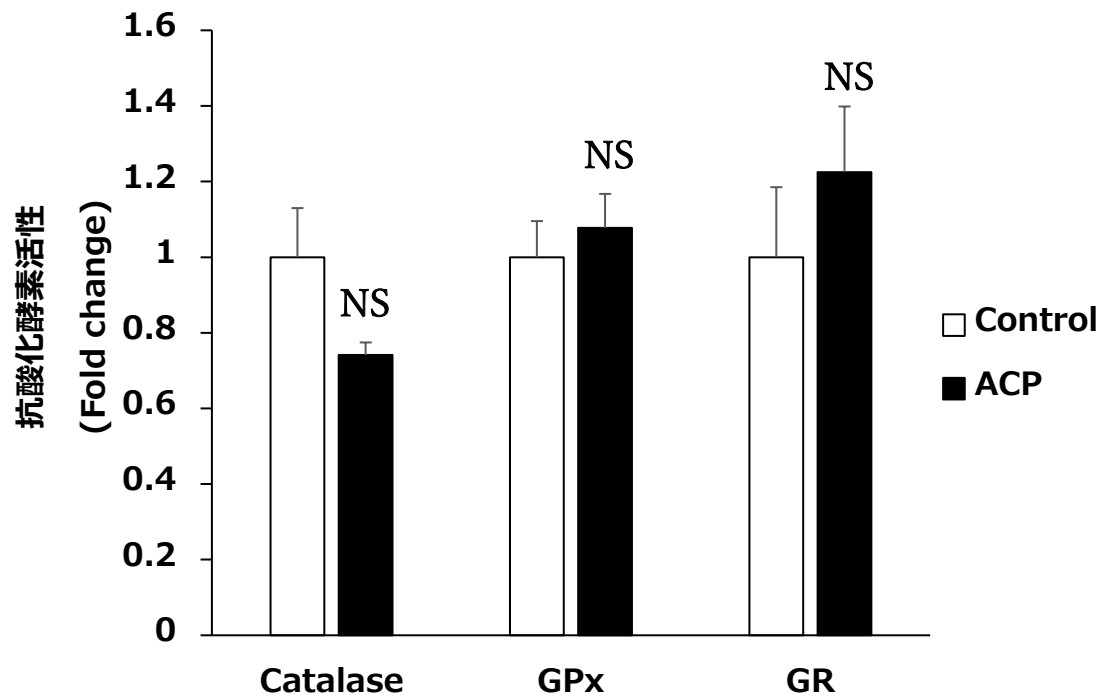


Fig. 20 明日葉が成熟精子の抗酸化酵素活性に与える影響

Fig. 16 の条件【B】で実験を行い、57.5 mg/kg 体重/day の明日葉粉末（ACP）を化合物群に投与した。解剖時に精巣上体尾部から成熟精子を回収した。各サンプルを RIPA バッファーでホモジナイズし、タンパク質を調製後、各抗酸化酵素の活性を評価した。

各表値は平均値±SE (n=6)を示している。統計処理は Student t-test で行った。

*P<0.05 vs. Control

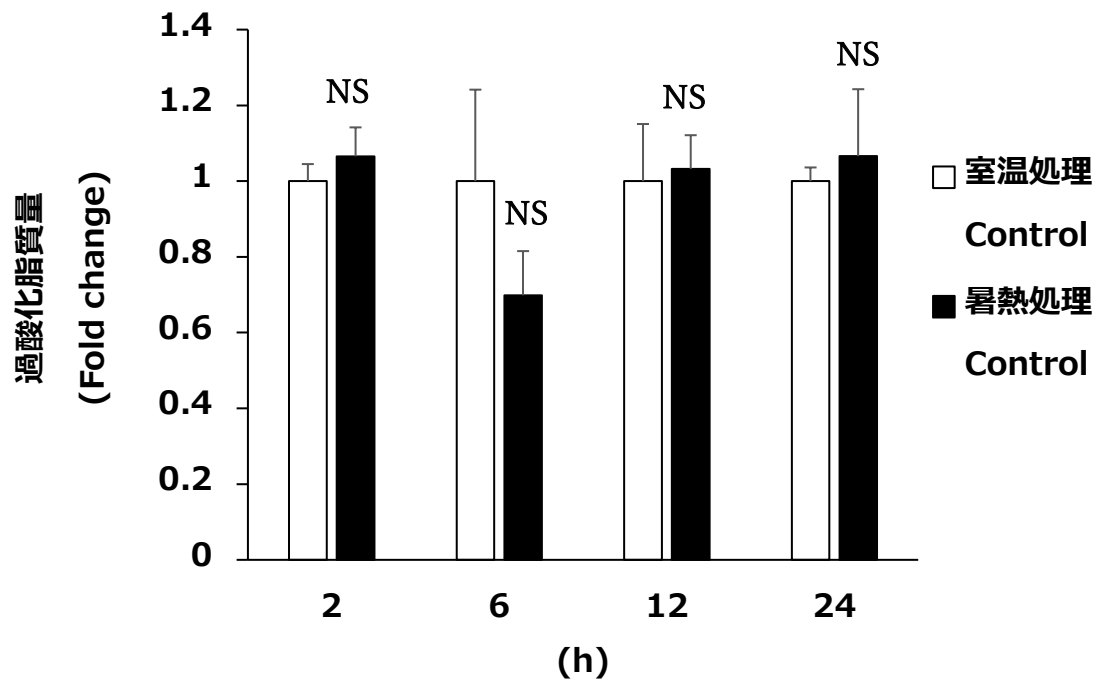


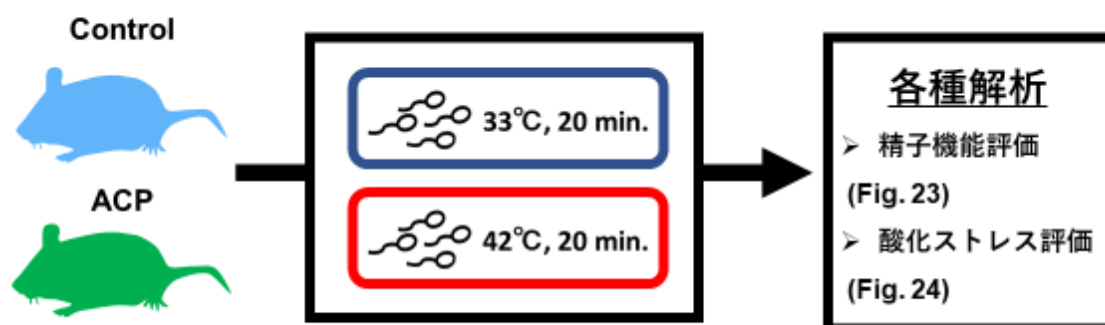
Fig. 21 暑熱ストレス負荷が成熟精子内の酸化ストレスレベルに与える影響

ICR マウスを室温処理群と暑熱処理群に分けた。暑熱処理 (42°C, 20 分) から各時間後に解剖し、精巣上体尾部から成熟精子を回収した。RIPA バッファーでホモジナイズし、タンパク質を調整後、TBARS 法で過酸化脂質量を測定した。

グラフは平均値 ± SE (2 h n=4; 6 h n=4; 12h n=3; 24h n=3)を示している。統計処理は Student t-test で行った。

*P<0.05 vs. Control

【A】



【B】

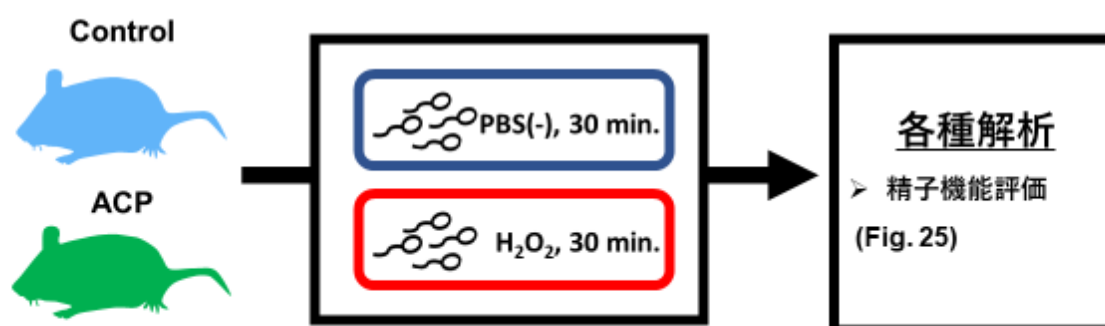


Fig. 22 実験系 【In Vitro での成熟精子保護の評価】

条件【A】

性成熟した雄の ICR マウスを Control 群（化合物未投与群）と ACP 群（明日葉粉末投与群）に分けて飼育した。明日葉粉末投与量は 57.5 mg/kg 体重/day で投与した。投与 7 日目に成熟精子を回収し、33°C 若しくは 42°C の環境で 20 分間の培養を行い、各種解析で評価した。

条件【B】

性成熟した雄の ICR マウスを Control 群（化合物未投与群）と ACP 群（明日葉粉末投与）に分けて飼育した。明日葉粉末投与量は 57.5 mg/kg 体重/day で投与した。投与 7 日目に成熟精子を回収し、PBS（-）もしくは H₂O₂（150 μM）を添加した培地で 60 分間の培養を行い、各種解析で評価した。

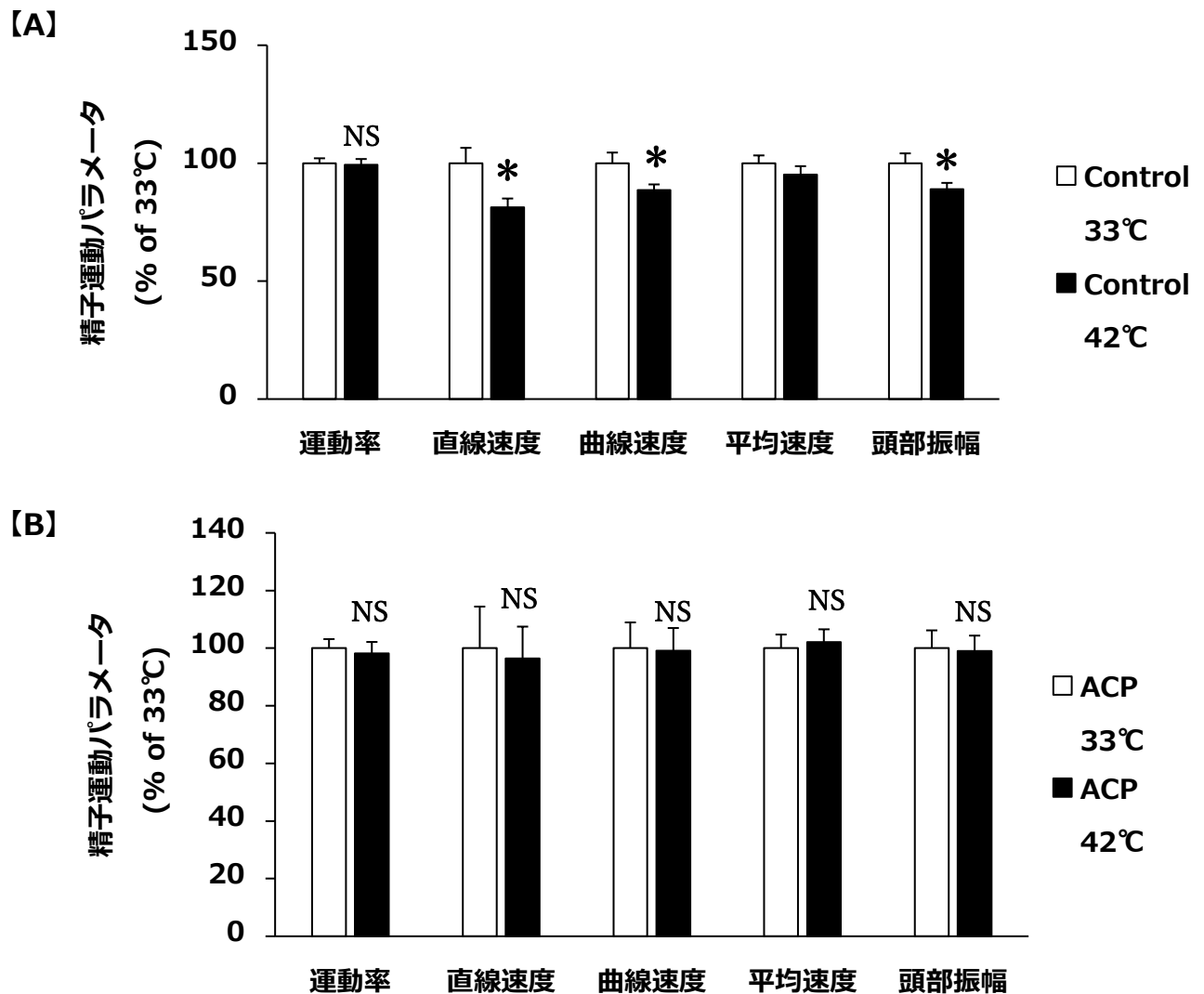


Fig. 23 暑熱ストレス依存的な成熟精子の機能低下に対する明日葉の効果

Fig. 22 の条件【A】で実験を行い、57.5 mg/kg 体重/day の明日葉粉末（ACP）を明日葉粉末投与群に投与した。精子培養から 1 時間後に精子解析システムで評価した。

グラフは 33°C で培養した精子との相対値 \pm SE (n=6) を、パラメータ毎に示している。統計処理は Student t-test で行った。

【A】 MF 粉末を投与した Control 群のマウス精子データ

【B】 明日葉粉末を投与した ACP 群のマウス精子データ

* $P < 0.05$ vs. 33°C-Control

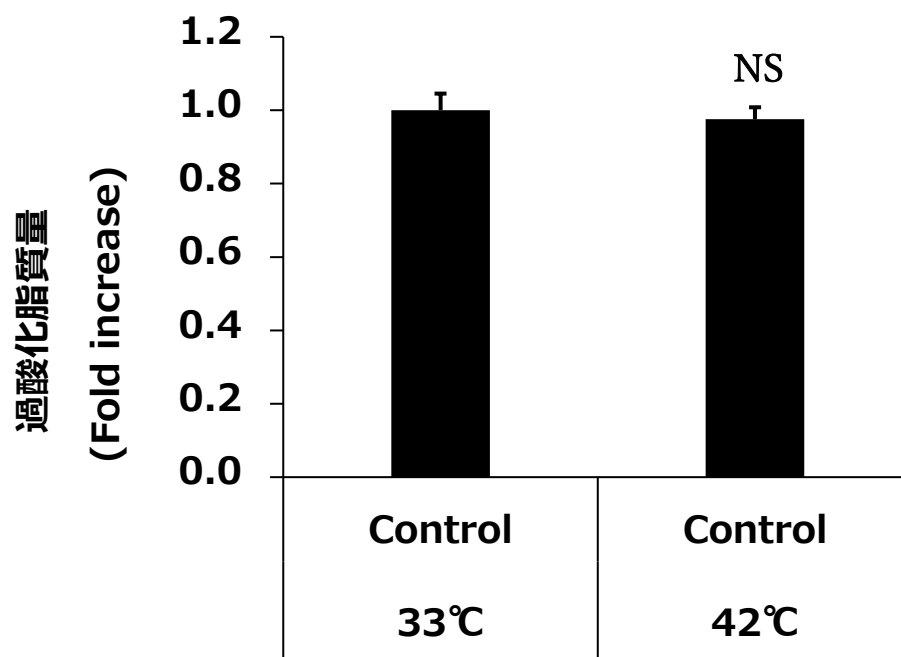


Fig. 24 暑熱ストレス負荷が成熟精子内の酸化ストレスレベルに与える影響

Fig. 22 の条件【A】で実験を行った。精子培養 1 時間後に成熟精子を回収した。RIPA バッファーでホモジナイズし、タンパク質を調整後、TBARS 法で過酸化脂質量を測定した。グラフは平均値 ± SE (n=3)を示している。統計処理は Student t-test で行った。

*P<0.05 vs. 33°C-Control

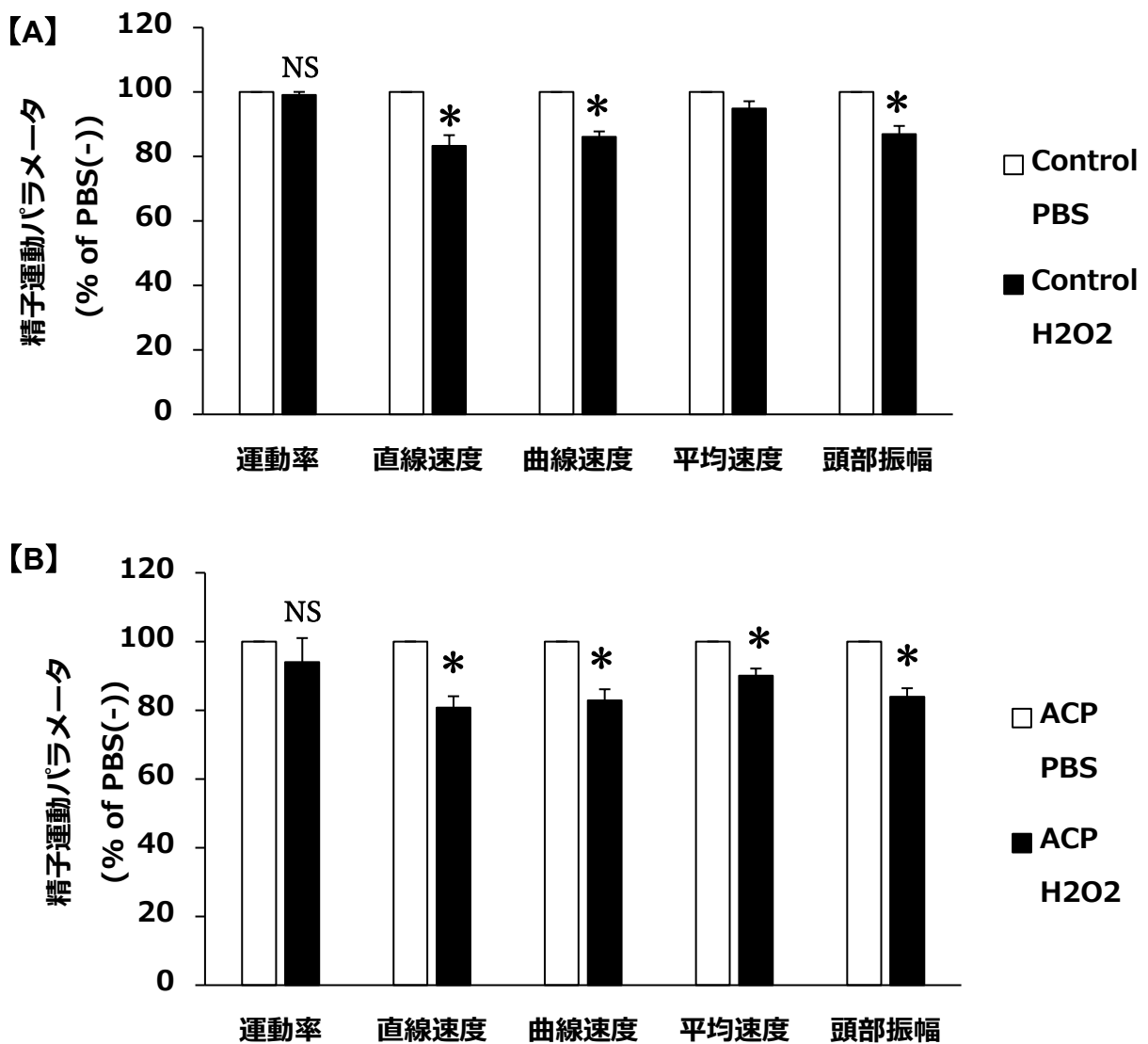


Fig. 25 酸化ストレス依存的な成熟精子の機能低下に対する明日葉の効果

Fig. 22 の条件【B】で実験を行い、57.5 mg/kg 体重/day の明日葉粉末（ACP）をサンプル投与群に投与した。精子培養から 30 分後に精子解析システムで評価した。

グラフは PBS 添加培地で培養した精子との相対値 \pm SE (n=4)を、パラメータ毎に示している。統計処理は Student t-test で行った。

*P<0.05 vs. 33°C-PBS

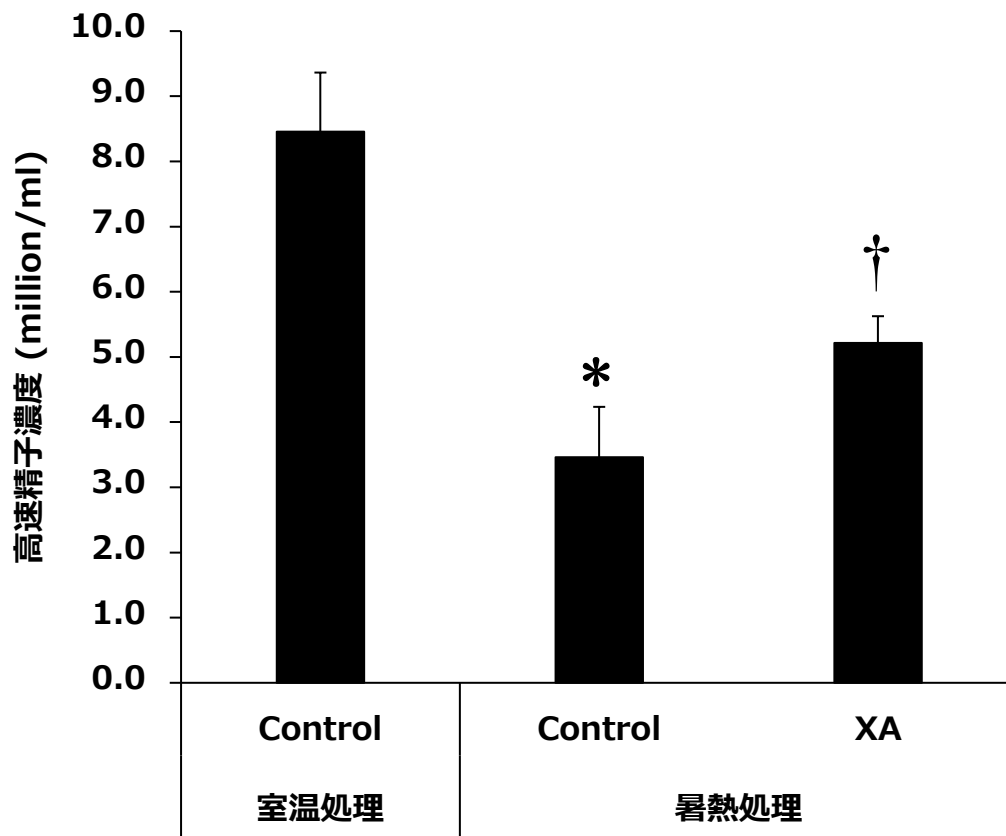


Fig. 26 暑熱ストレス依存的な成熟精子の機能低下に対する XA の効果

Fig.16 の条件【A】で実験を行い、キサントアンゲロール (XA) を 1.5 mg/kg 体重/day を化合物群に投与した。暑熱処理 (42°C, 20 分) から 24 時間後に精巣上体尾部から精子を取り出し、プログレッシブ精子 (直線速度 $\geq 50 \mu\text{m/s}$ かつ直線性 $\geq 75\%$) を精子解析システムで測定した。

各表値は平均値 \pm SE (n=6-7)を示している。統計処理は Steel-test で行った。

*P<0.05 vs. 室温処理-Control, †P<0.05 vs. 暑熱処理-Control

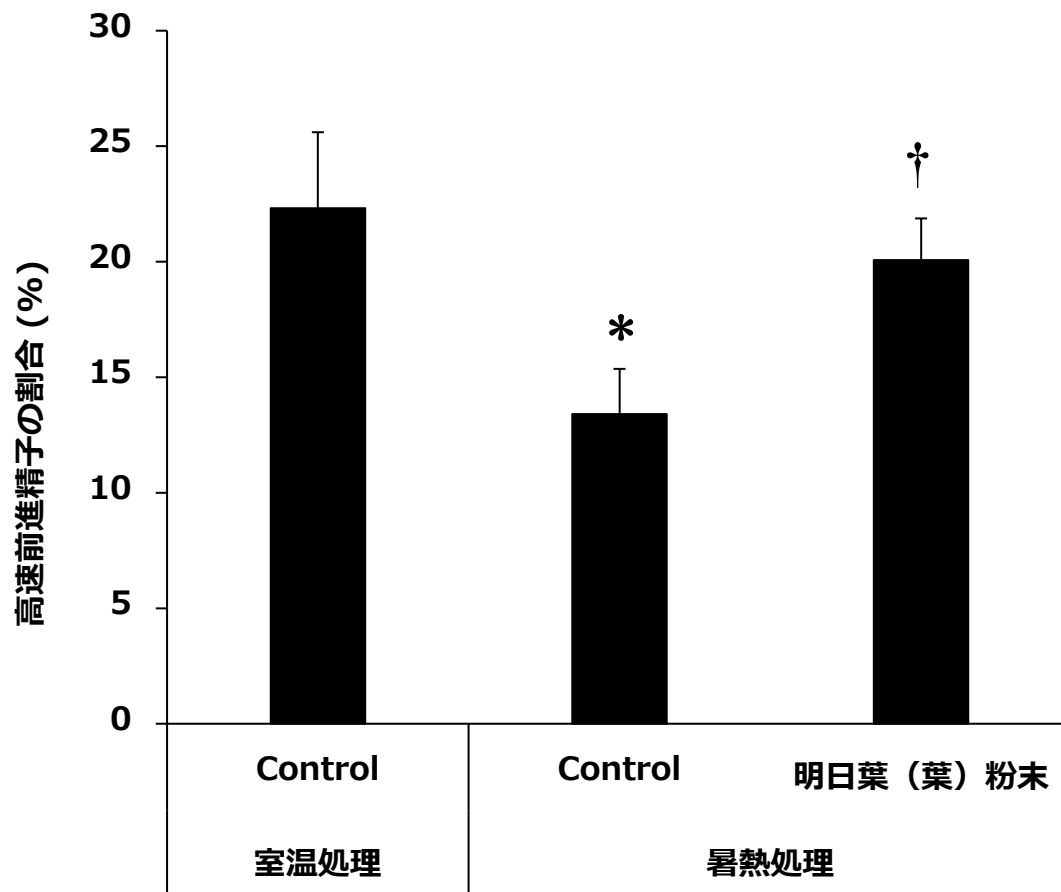


Fig. 27 暑熱ストレス依存的な成熟精子の機能低下に対する明日葉 (葉) の効果

Fig.16 の条件【A】で実験を行い、明日葉粉末 (カルコン量 0.07%) 640 mg/kg 体重/day を化合物群に投与した。暑熱処理 (42°C, 20 分) から 24 時間後に精巣上体尾部から精子を取り出し、プログレッシブ精子 (直線速度 $\geq 50 \mu\text{m/s}$ かつ直線性 $\geq 75\%$) を精子解析システムで測定した。

各表値は平均値 \pm SE (n=7-8) を示している。統計処理は Holm-test で行った。

* $P < 0.05$ vs. 室温処理-Control, † $P < 0.05$ vs. 暑熱処理-Control

第4章 研究課題-3

暑熱ストレス依存的な卵巣機能低下に対する明日葉の改善効果

第1節 研究背景

老化や肥満、暑熱ストレスがストレス依存的にヒトや家畜の卵巣機能を低下させ、産仔数の低下、排卵数の減少、胚の発生率の低下を引き起こす^[11,12]。現在の不妊対策として、高度生殖補助医療が施されている。しかし、卵子の質の低下は成功率を減少させることが報告されており^[9]、新たな不妊対策として保有する卵の質の向上が求められている。

本論文の排卵機能は、排卵卵子が卵管膨大部に放出させるまでの過程を指す。ヒト卵巣では新生児期に数十万から数百万存在する卵胞のうち、排卵に到るのは数百個であり、残りの卵胞は未成熟なまま閉鎖するか、あるいは発育を始めても排卵に至らずに閉鎖する。卵胞は原子卵胞から一次卵胞、前胞状卵胞を経て、胞状卵胞になり、さらに排卵前卵胞へと発育し、排卵に至る。卵胞は、卵母細胞とそれを囲む顆粒層細胞と莢膜細胞から構成されている。前胞状卵胞への発育課程は、性周期に関係なく継続的に起きているが、どの卵胞が排卵前卵胞に発育するかを選択機構は明らかになっていない。胞状卵胞では顆粒層細胞の活発な増殖と機能分化が見られ、閉鎖卵胞ではその莢膜細胞の離脱やアポトーシスといった現象が観察される。したがって、卵胞の発育若しくは閉鎖の運命決定は、顆粒層細胞の生存が鍵を握っていると考えられる。また、視床下部による性腺刺激ホルモンの制御異常は排卵機能の低下に関与することが指摘されている。しかし、先行研究は暑熱ストレス依存的な排卵障害について、顆粒層細胞の性腺刺激ホルモン感受性の低下を原因とすることを明らかにしている^[106,107]。そのため本研究は、排卵機能の研究は顆粒層細胞のみに着眼した。

本論文の胚発生とは、受精卵から胚盤胞までの初期発生のことを指し、精子と卵子の受

精により生じた胚である受精卵が子宮に着床する以前の発生過程のことである。精子は交尾により子宮頸管に射出され、子宮卵管接合部から卵管に入り、卵管峡部へ移動する。この移動の間に精子は受精能獲得を行い、卵管峡部で受精の機会を待つ。雌で排卵が生じると、精子では超活性化運動を生じて、卵管膨大部へ移動する。一方で卵子は排卵によって卵丘細胞層に囲まれた状態で卵巣から卵管膨大部に移動し、滞留している精子と合流する。この卵管膨大部で、先体反応等を介した精子の卵子への侵入を経て前核が形成され、受精完了となる。受精卵である初期胚は卵割を繰り返し生じ、前核形成の約 24 時間後に 2 細胞、約 48 時間に 4 細胞、約 96 時間後では胚盤胞へと発生を続ける。卵管膨大部で生じた初期胚は、卵割による発生を進めながら卵管を通り子宮付近へ移動する。胚盤胞までには子宮に移動し、さらに発生した孵化胚盤胞が子宮に着床する。近年の技術革新により、初期発生を体外で生じさせる、体外受精の技術が確立されており、マウスを用いた基礎研究だけでなく、ヒトや家畜への不妊治療として活用されている。

ストレス依存的な卵巣機能低下の研究では、胚発生機能及び排卵機能障害の作用機序に関する解明が進められている。一方で、ストレス依存的な卵巣機能低下に対する改善作用を検討した研究は少ない。本論文では、卵巣機能の改善に食機能成分の投与が有効ではないかと仮説を立てている。我々の研究室では、オリーブ成分やカテキン類の投与が暑熱ストレス依存的な卵巣機能の低下を改善することを報告している^[26,33,34]。また、明日葉ジュースおよびその機能性成分であるカルコン類の投与は、暑熱ストレス依存的な排卵機能障害に対し、顆粒層細胞の保護を介して改善する^[51-53]。しかし、明日葉及びカルコン類の投与がストレス依存的な排卵卵子の発生能低下に与える影響は未解明である。したがって、先行研究と同様の暑熱ストレス負荷実験系を用いて、明日葉が排卵卵子に与える影響を検討する必要がある。また、暑熱ストレス依存的な卵巣機能に対する保護効果の作用機序に卵巣内酸化ストレスの軽減が関与することが知られている^[51-53]。しかし、暑熱ストレス依存的な卵巣内の酸化ストレスレベルの上昇を、明日葉が抑制する報告は未だない。

第2節 研究目的

「暑熱ストレス依存的な卵巣機能低下に対する明日葉の保護作用を検討すること」を研究目的とした。本章では排卵機能と卵子発生機能に焦点をあて、研究を行った。

第3節 実験手技

第1項 材料

I. 動物

動物実験で用いた ICR マウスは、日本チャールズリバーから購入後に、自家繁殖させた個体を用いた。ウィスター雌ラットは、日本チャールズリバーから購入した。マウス用飼料の MF 粉末及びラット用飼料の MF 固形飼料は、日本チャールズリバーより購入した。明日葉の茎葉粉末は、(株)食機能探査研究所より提供を受けた。

II. 投与化合物

各種実験に使用した明日葉粉末は、明日葉カルコンパウダー (ACP) を (株)日本生物科学研究所から購入した。キサントアンゲロール (XA) および4-ヒドロキシデリシン (4-HD) は、筑波大学生命環境系・河村芳恵研究員より提供を受けた。粉末給餌器用カバーはオリエンタル酵母より購入した。

III. 各種アッセイキット

ATP 測定に使用した Cell Titer-Glo[®] Luminescent Cell Viability Assay は、Promega より購入した。RNA 抽出に使用した Isogen II は、ニッポンジーンから購入した。過酸化脂質量を測定した TBARS Assay Kit は、Cayman Chemical より購入した。タンパク定量に使用した BCA TM Protein assay kit は、Thermo Fisher より購入した。逆転写反応に利用した ReverTra Ace qPCR kit は東洋紡から購入した。PCR 反応に利用した KAPA SYBR Fast Kit は Kapa Biosystems より購入した。

第2項 動物実験

I. ラット

a. 飼育条件

雌の 21 日齢の Wister ラットは、コントロール群と化合物投与群に分けた。化合物投与群では、57.5 mg/kg 体重の濃度で明日葉粉末、若しくは 3 mg/kg 体重でキサントアンゲロールおよび 4-ヒドロキシデリシンをコーンオイルに混ぜて、ゾンデ針を用いて投与した。各群ラットは光周期 12L：12D（午前 7 時に点灯）で飼育した。

b. 暑熱処理

暑熱処理群は 35°C、室温処理群は 25°C で飼育した。暑熱暴露期間は 96 時間とし、暑熱開始は 17:00 とした。化合物の投与は 7 時間前の 10:00 で、化合物は毎日同時刻にゾンデ針を用いて投与した。過排卵処理は暑熱処理終了 48 時間前から開始した。

c. 排卵卵子数の測定

過排卵処理を行うため、雌 Wister ラットに 20 IU 妊馬血清性腺刺激ホルモン（PMSG）を皮下注射した。投与から 48 時間後に 20 IU のヒト絨毛性ゴナドトロピン（hCG）を皮下注射し、過排卵を誘発させた。hCG 投与から 16 時間後に Wister ラットの卵管膨大部を摘出した。実体顕微鏡の下、18G の針で卵管膨大部の 1 ヶ所に切りこみを入れ、貯蓄された排卵卵子を 0.3 mg/ml ヒアルロニターゼ溶液中に掻き出した。卵丘細胞を除去後、排卵卵子数を計測した。

II. マウス

a. 飼育条件

8 週齢の雌 ICR マウスは、コントロール群と化合物投与群に分けた。化合物投与群は、11.5 mg/kg 体重又は 57.5 mg/kg 体重の明日葉粉末、もしくは 1.5 mg/kg 体重でキサントアンゲロールを粉末飼料中に混ぜ、粉末給餌器用カバーを用いて投与した。各群マウスは室温 23-

25°C, 光周期 12L : 12D (午前 7 時に点灯) の環境下で飼育した.

b. 暑熱処理

暑熱処理群は 35°C で飼育し, 室温処理群は通常飼育を続けた. 飼育期間は 144 若しくは 192 時間とし, 暑熱開始は 17 : 00 とした. 化合物の投与は 24 時間前に開始し, 自由摂取で投与した. 過排卵処理を行う場合は暑熱処理終了 48 時間前から開始した.

c. 交配試験

暑熱処理後に, 性成熟した ICR 雄マウスと 1 対 1 で交配させた. 交配期間は 5 日間とし, 終了時に雄マウスを除去した. 交配終了時から約 15 日後に雌マウスの出産を毎朝 10 時に確認し, 確認できた個体から産仔の数, 生存と重量を計測した. 生存産仔重量とは生存した産仔の重量のみを計測した数値である.

III. 梅山豚

a. 飼育条件

塚原牧場株式会社で飼育されており, 性成熟した雌の梅山豚を 22 頭用いた. 10 頭の対照群と 12 頭の明日葉投与群に分けた. 明日葉の茎葉乾燥粉末を 40 g/day で明日葉投与群に 25 日間投与した. 投与期間の詳細は Fig. 40 に示す. 発情の 10 日前から明日葉を投与し, 発情期間に人工授精を行った. 授精期間は 5 日間とし, 妊娠兆候がある個体ものから個別に飼育し, 明日葉を合計 25 日間投与した.

b. 受胎率の評価

投与を終えた個体は, 出産時まで通常飼料を用いて飼育した. 受胎率は出産した頭数を試験頭数で割った値である.

第3項 体外受精

I. 過排卵処理

過排卵処理を行うため、雌 ICR マウスに 5 IU 妊馬血清性腺刺激ホルモン (PMSG) を腹腔投与した。投与から 48 時間後に 5 IU のヒト絨毛性ゴナドトロピン (hCG) を腹腔投与し、過排卵を誘発させた。投与から 15 時間後に雌 ICR マウスの卵管膨大部を摘出し、3 mg/ml BSA の HTF medium (Irvine scientific, CA, USA) に静置した。18G の針で卵管膨大部に 1 ヶ所の切りこみを入れ、貯蓄された排卵卵子を掻き出した。

II. 媒精

卵子を採取する 1 時間前に、精子の前培養を介して受精能を獲得させた。解剖時に精巢上体尾部を摘出し、3 mg/ml BSA を含んだ HTF medium (Irvine scientific, CA, USA) 中に静置した。18G の針で精巢上体尾部の 1 か所に切りこみを入れ、貯蓄された成熟精子を掻き出した。37°C, 5 %CO₂ 条件下で 30 分間培養後、SMAS を用いて精子濃度を確認した。本実験では精子運動率 80%以上のマウス精子を使用した。

III. 受精

1 時間媒性した精子を 2.0×10^5 sperm/ml の濃度に調整し、採卵した卵子の HTF medium に添加した。37°C, 5 %CO₂ の条件下で 5 時間培養した。尚、本実験では 2 個体の雄マウス精子を混合し、複数の雌マウスに使用した。

IV. 発生

培養した受精卵を mHTF medium (3 mg/ml BSA, 1 mM glutamine, 0.1 mM EDTA) に移した。37°C, 5% CO₂ 条件下で 48 時間培養後、再び新鮮な mHTF medium に移し、同条件下で更に 48 時間培養した。受精卵培養から 24 時間後に 2 細胞, 48 時間後に 4 細胞, 96 時間後

に胚盤胞の割合をそれぞれ顕微鏡下で測定し、発生率の評価を行った。

第4項 酸化ストレスレベルの検出

I. 卵巣組織からのタンパク質調製

マウスから摘出した精巣は、 -80°C で保存した。氷上で融解後に RIPA Buffer [50 mM Tris-HCl (pH 7.6), 10% glycerol, 1% triton-X100, 0.2 mM PMSF, 150 mM NaF, 1 mM EDTA, 1 mM Na_3VO_4 , 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ antipain, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ leupeptin, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ aprotinin] を卵巣 1 個あたり 0.4 ml 加えホモジェナイズし、遠心 (4200 rpm, 4°C) 後に上清を得た。更に同条件で遠心し、タンパク溶液を得た。

II. 過酸化脂質量の測定

過酸化脂質で精巣の酸化ストレスレベルを評価した。得られたタンパク溶液を TBARS assay kit 付属のプロトコールに従い、過酸化脂質量の測定を行った。また、タンパク溶液中の濃度を BCA TM Protein assay kit で測定し、卵巣 1 mg あたりの過酸化脂質量を算出した。各吸光値の測定は Ultra mark (Bio-rad, CA, USA)を用いて行った。

第5項 卵巣内因子の解析

I. 卵巣組織からの RNA 調製

マウスから摘出した精巣は、 -80°C で保存した。氷上で融解後に Isogen II を精巣 1 個あたり 800 μl を加えホモジェナイズした。精巣溶液を遠心し (12000 rpm, 15min, 4°C)、上清を回収した。10 分間静置後、遠心 (12000 rpm, 15 min, 4°C) を行い、上清を回収した。上清と同量の Isopropanol を加え混合した後、10 分間静置し、遠心後 (12000 rpm, 10min, 4°C) に沈殿を得た。70% Ethanol/DEPC water を加えて、遠心洗浄 (7500 rpm, 5min, 4°C) し、完全に除去した。Tris-EDTA を加えて、完全に溶解した。

II. cDNA の作製

ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop Technology, DE, USA) で RNA 精度を測定した。RNA 1 μ g 相当を 65°C で 5 分間の熱変性をさせた後, ReverTra Ace qPCR kit 付属のプロトコールに従って, 逆転写反応を行った。作成した cDNA 溶液は, Tris-EDTA で 16 ng/ μ l で調製した。

III. Real-time PCR

KAPA SYBR Fast qPCR kit を反応液とし, cDNA 溶液と各種特異的な Primer と共に 7300 real-time PCR system (Kapa Biosystems, CA, USA) に供し, mRNA の発現量を測定した。PCR の条件は 50°C で 2 分間, 95°C で 15 秒間反応後, 95°C, 15sec と 60-65°C, 30-60 sec の 2 工程を 40 サイクル繰り返した。内部標準は 18S rRNA を使用した。尚, プライマーは Table 1 に示してある。

第 6 項 ATP 量の評価

I. 排卵卵子の ATP 量測定

過排卵処理を行うため, 雌 ICR マウスに 5 IU 妊馬血清性腺刺激ホルモン (PMSG) を腹腔投与した。投与から 48 時間後に 5 IU のヒト絨毛性ゴナドトロピン (hCG) を腹腔投与し, 過排卵を誘発させた。投与から 15 時間後に雌 ICR マウスの卵管膨大部を摘出し, 18G の針で卵管膨大部の 1 ヶ所に切りこみを入れ, 貯蓄された排卵卵子を mHTF medium (3 mg/ml BSA, 0.3 mM hyaluronidase) に掻き出した。15 分間培養後に, 3 mg/ml BSA 入りの HTF medium に移動させた。その後, Cell Titer-Glo® Luminescent Cell Viability Assay 付属のプロトコールに従い, 472 nm の発光値を測定した。胚当たりの ATP 量は記録した発光値を本実験に用いた卵子の数で割った値とした。

II. 2細胞期の ATP 量測定

体外受精の胚培養36時間後の2細胞期胚を実験に供した。培養培地から3 mg/ml BSA 入りの HTF medium に移動させた。その後, Cell Titer-Glo® Luminescent Cell Viability Assay 付属のプロトコールに従い, 472 nm の発光値を測定した。胚当たりの ATP 量は測定した発光値を本実験に用いた2細胞期胚の数で割った値である。

第7項 顆粒層細胞の生存率評価

I. 顆粒層細胞の調製

と畜場（土浦食肉協同組合）より、健常卵胞を保持している卵巣を選別し、周辺組織を除去した。0.2% cetyl trimethyl ammonium bromide で卵巣を一度洗浄した後、PBS-PVA（0.1% polyvinyl alcohol を含むリン酸緩衝生理食塩水）を用いて組織内に残っている血液の洗い出しを2回行い、氷上の同液中に浸した。その後、卵巣組織よりハサミで健常卵胞を切り出し、ピンセットとハサミを用い顕微鏡下で卵胞の外側の結合組織を除去後、10% FBS medium（dulbecco's modified eagle's medium / nutrient mixture F-12 Ham 培地, 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, 2 mM glucose）中に浸し、氷上に置いた。PBS-PVA 液中で卵胞を破り、シート状の顆粒層細胞を10%血清入り培地中に集めた。遠心（2500 rpm, 5 min）で上清を除去後、タッピングでペレットをほぐした。1.2 mg/ml collagenase を含む10% FBS medium を添加し、37°Cで20分間反応させた。PBS（-）を加え、遠心分離（2500 rpm, 5min）して上清を除去した、タッピングでペレットをほぐし、PBS（-）で洗いこみながら新しい遠沈管に移し、遠心分離（3000 rpm, 5min）して上清を除去した。10% FBS medium で細胞を懸濁し、Countess™ II FL Automated Cell Counter（Life Technologies Japan, Tokyo, Japan）で細胞数を計測後、 1.34×10^6 cells/well で播種した。5% CO₂, 37°Cの条件下で培養を開始し、24時間後に PBS（-）で2回洗浄を行い、死細胞を除いた後に新しい培地に交換して実験に供した。

II. 化合物処理

明日葉根のメタノール抽出液(終濃度 1000 倍希釈)を添加した. 24 時間後に再び PBS (-) で 2 回洗浄し, 死細胞や化合物を取り除き, 5%血清入り培地 (dulbecco's modified eagle's medium / nutrient mixture F-12 Ham 培地, 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, 2 mM Glucose) に交換した後, 過酸化水素を添加した.

III. 細胞生存率の評価

過酸化水素添加の 18 時間後に播種した細胞を Trypsin-EDTA で剥がし, trypan blue 染色液と混合 Countess™ II FL Automated Cell Counter (Life Technologies Japan, Tokyo, Japan) を用いて細胞の生存率を測定した.

第 8 項 統計処理

実験結果は, 平均値±SE (Standard Error) で示した. 2 群間のデータは T 検定で有意差検定を行った. また, 3 群間以上のデータは Holm 検定, Dunnett 検定, Steel 検定で有意差検定を行った. 使用した検定手法は各図および表のキャプションに明記している. $P < 0.05$ のときに有意に差がある, $P < 0.1$ のときに傾向があると判断した.

第4節 実験結果

第1項 暑熱ストレス依存的な卵巢機能低下に対する明日葉の保護効果

I. 排卵卵子数の減少に対する効果

未成熟雌ラットへの暑熱負荷は直腸温度の増加と排卵卵子数の減少を引き起こす^[107]。そこで、同実験系における直腸温度と排卵卵子数の相関関係を Fig. 29 に示す。この結果より、直腸温度と排卵卵子数の関係は、有意な負の相関関係であることが明らかになった。

明日葉粉末の投与が暑熱ストレス依存的な排卵卵子数の減少に与える影響を Fig. 30 に示す。室温処理のラットと比較し、暑熱処理のラットでは排卵卵子の数が有意に低下した。明日葉粉末の投与は、暑熱ストレス依存的な排卵卵子数の減少を有意に改善した。また、暑熱処理はラット直腸温度を有意に上昇させたが、明日葉粉末の投与は抑制しなかった。

II. 卵子発生機能の低下に対する効果

夏季環境下の雌ブタの卵子は胚の発生機能が低下すると報告されている^[20]。暑熱処理がマウスの排卵卵子由来の受精卵の発生能力に与える影響を Fig. 31 に示す。室温処理したマウス卵子と比較して、暑熱処理したマウス卵子では 4 細胞期および胚盤胞期の発生率低下が認められた。一方で、明日葉粉末を投与したマウス卵子は、暑熱処理した未投与マウスと比較して、4 細胞期および胚盤胞期への発生率の改善を示した。

III. 産仔数の低下に対する効果

夏季環境下で交配した雌ブタは、受胎率が低下する^[15]。暑熱処理がマウス産仔数に与える影響を Table 5 に示している。母親 1 匹あたりの産仔数では、マウスの暑熱処理が 3 匹以上の減少をもたらした。また、母親 1 匹あたりの産仔重量も低下した。しかし、明日葉粉末の投与は、暑熱処理した未投与マウスと比較して、母親 1 匹あたりの産仔数で 1.8 匹、生存産仔数で約 3.3 匹、産仔重量で約 2.6 g、生存産仔重量で約 5.7 g の改善効果を示した。

第2項 暑熱負荷による酸化ストレスの増加に対する明日葉の効果

I. 卵巣内酸化ストレスレベルの増加に対する効果

暑熱ストレス依存的な卵巣機能障害では、体内の酸化ストレスレベルの上昇が関与する^[21,26]。そこで、暑熱処理に伴う卵巣内の酸化ストレスレベルの上昇を調べるため、卵巣内の過酸化脂質量を測定した結果を Fig. 32 に示す。室温処理のマウス卵巣と比較し、暑熱処理のマウス卵巣では過酸化脂質の有意な増加が示された。一方で明日葉粉末投与のマウス卵巣では、暑熱負荷した未投与のマウス卵巣と比較して過酸化脂質量を有意に低下させた。

II. 卵巣内の抗酸化酵素発現レベルに与える影響

明日葉粉末の投与は、暑熱負荷に伴う卵巣内酸化ストレスレベルの上昇を抑制した。そこで、明日葉の卵巣保護作用に抗酸化酵素が関与すると仮定した。卵巣内抗酸化酵素のmRNA発現量を測定した結果を Fig. 33 に示す。明日葉粉末の投与は、卵巣内の還元型グルタチオン合成酵素（GSS）、スーパーオキシドジスムターゼ1および2（SOD1, SOD2）の発現を増加させた。一方で、明日葉粉末の投与はグルタチオンパーオキシダーゼ（GPx）、カタラーゼ（Catalase）、ヘムオキシゲナーゼ1（HO-1）の発現に影響を与えなかった。

III. 酸化ストレス依存的な顆粒層細胞の細胞死に与える影響

明日葉粉末の投与は暑熱ストレス依存的な排卵数低下を改善した。そこで、排卵機能に重要な卵胞顆粒層細胞に着眼した。卵胞顆粒層細胞のアポトーシスは排卵機能を持たない閉鎖卵胞の出現に関与する^[106]。また、過酸化水素の添加はブタ顆粒層細胞のアポトーシスを誘導する^[108]。ブタ顆粒層細胞の実験結果を Fig. 35 に示す。過酸化水素の処理は細胞生存率を有意に低下させたが、明日葉の抽出液を24時間前処理することで有意に改善された。

第3項 卵巣内のヒートショックプロテイン発現レベルに明日葉が与える効果

第2章と第3章では、マウスへの暑熱処理は、熱ストレス依存的に生殖障害をもたらすと考えている。本章でも同様に、熱ストレスの低減が明日葉の卵巣保護作用に関与すると仮定し、ヒートショックプロテイン（HSP）に着眼した。卵巣内 HSP の mRNA 発現量を測定した結果を Fig. 34 に示す。明日葉粉末の投与は、HSP70 の HSPA1A の mRNA 発現量に変化を与えなかったが、HSP70 の HSPA2 および HSP40 の mRNA 発現量を有意に増加させた。

第4項 暑熱ストレス依存的な胚の ATP 量低下に対する明日葉が与える効果

I. 胚の ATP 量低下に与える影響

明日葉粉末の投与は、暑熱ストレス依存的な胚発生機能低下を改善した（Fig. 31）。初期胚の発生の低下は、胚のミトコンドリア機能の低下に関与する。そこで、マウスへの暑熱処理が初期胚の ATP 量に与える影響を Fig. 37 に示す。本研究は、実験手技上の問題から、2細胞期胚の ATP 量を比較した。暑熱処理は2細胞期胚の ATP 量を有意に減少させた。また、明日葉粉末の投与は暑熱ストレス依存的な2細胞期胚の ATP 量の低下に対して、改善効果を示さなかった。

II. 排卵卵子の ATP 量に与える影響

暑熱ストレス依存的な胚発生率の低下に対し、明日葉粉末の投与は改善効果を示した。ATP 量は胚発生に必要であるため、明日葉粉末の投与が排卵卵子内の ATP 量を増加させると仮定した。排卵卵子の ATP 量を測定した結果を Fig. 36 に示す。明日葉粉末の投与はマウス排卵卵子の ATP 量に変化を示さなかった。

第5項 カルコン類がストレス依存的な排卵機能低下に与える影響

I. 排卵卵子数の減少に与える影響

先行研究データの統計処理を著者が行った^[52,53]。明日葉粉末の投与は、暑熱ストレス依存

的な卵巣機能障害に対する改善作用を示したため、機能性成分のカルコン類に着眼した。カルコン類の投与が暑熱ストレス依存的な排卵卵子数の減少に与える影響を Fig. 38 に示している。室温処理のラットと比較し、暑熱処理のラットでは排卵卵子の数が有意に低下した。カルコン類であるキサントアンゲロールおよび4-ヒドロキシデリシンの投与は、この低下を有意に改善した。

II. 卵子発生機能の低下に与える影響

明日葉粉末の投与は、暑熱ストレス依存的な卵子発生機能の低下に対する改善作用を示したため、機能性成分のカルコン類に着眼した。暑熱ストレス依存的な受精卵の発生能力低下に対するカルコン類の効果を Fig. 39 で示す。暑熱処理は4細胞期胚および胚盤胞期胚の発生率を有意に低下させた。キサントアンゲロールおよび4-ヒドロキシデリシンの投与は、暑熱ストレス依存的な4細胞期および胚盤胞期への発生率の低下を改善した。

第6項 明日葉の投与が梅山豚の夏季不妊に与える影響

家畜の受胎率は夏季に低下する^[15]。暑熱ストレス依存的な卵巣保護機能低下に対する明日葉の改善作用を大型動物で調べるため、夏季の梅山豚を用いて検討した。対照群では30%の受胎率を示したが、明日葉投与群の受胎率は50%を示した。

第5節 考察

暑熱ストレス依存的な卵巣機能低下に対して明日葉粉末の投与が保護効果を示すと仮定し、雌マウスおよびラットを用いて、各種実験を行った。その結果、明日葉粉末は、暑熱ストレス依存的な排卵機能や胚発生機能の低下に対する改善作用が確認された。

第1項 明日葉の排卵機能保護作用について

本研究では、明日葉粉末の投与が暑熱ストレス依存的な排卵卵子数の低下を改善した (Fig. 30)。当研究室の先行研究は、明日葉ジュースの投与が同様の改善効果を示すことを報告している^[51]。これらのことより、暑熱ストレス依存的な排卵機能障害に対する明日葉の保護作用をより明確にしたと主張できる。ラットや家畜の暑熱ストレス依存的な排卵障害では、活性酸素種の増加を介した体内の酸化ストレスレベルの上昇が原因であることが知られている^[21,26]。また、卵巣特異的な酸化ストレスレベルの上昇は、排卵障害を引き起こす^[109,110]。本研究の実験系では、暑熱処理がマウス卵巣内の酸化ストレスレベルを有意に上昇させた (Fig. 32)。したがって、本研究での暑熱ストレス依存的な排卵機能障害は酸化ストレスを介すると考えられる。先行研究は排卵機能の改善について、抗酸化剤の N-acetyl-L-Cysteine (NAC) が有効であることを明らかにしている^[111-113]。つまり、酸化ストレス軽減が排卵機能改善に重要であると考えられる。本研究では、明日葉粉末の投与が暑熱ストレス依存的な卵巣内の酸化ストレスレベルの上昇を抑制した (Fig. 32)。したがって、卵巣内の酸化ストレス軽減が明日葉の排卵機能の保護作用に関与することが考えられる。

排卵機能障害は、卵胞内の顆粒層細胞のアポトーシスが健常卵胞を閉鎖卵胞に変化させることで生じる。本研究では、暑熱ストレス依存的に卵巣内の酸化ストレスが上昇したことから、顆粒層細胞を用いて、酸化ストレスに対する明日葉の保護効果を検討した。過酸化水素の添加は顆粒層細胞の生存率を低下させたが、明日葉抽出物の添加はこの低下を改善した (Fig. 35)。当研究室の先行研究は、暑熱ストレス依存的な排卵障害を改善するヒドロ

キシチロソールは、顆粒層細胞を H_2O_2 から保護することを報告している^[33,34]。また、明日葉ジュースが抗酸化酵素を介して、 H_2O_2 から顆粒層細胞を保護することを示している^[51]。これらのことより、本研究での明日葉の排卵機能保護効果は、酸化ストレスに対する顆粒層細胞への保護効果が関与することが示唆された。

また熱ストレスに関する先行研究は、高温での培養が細胞のアポトーシスを誘導すること、熱ストレスを受けた細胞は HSP70 の発現を増加することを述べている^[80]。また、ブタ顆粒層細胞への熱ストレス負荷は、HSP70 である HSPA2 の発現を増加させる^[120]。明日葉粉末の投与は、卵巢内の HSPA2 と HSP70 の補助機能をもつ HSP40 の発現を増加させた (Fig. 34)。これらのことより、精巣 (第 2 章) と同様に、明日葉が顆粒層細胞を含む卵巢内に HSP の発現増加を介して熱ストレス抵抗性を付与し、排卵機能の維持に寄与したと考えられる。今後は、明日葉抽出物の添加が顆粒層細胞の HSP 発現に与える影響を検討する必要がある。

第 2 項 明日葉の卵子発生機能保護作用について

本研究では、マウスへの暑熱処理が排卵卵子の発生機能を低下させた (Fig. 31)。体内の酸化ストレスレベルの増加は胚発生機能の低下をもたらす^[15]。本研究では、暑熱処理が卵巢内の酸化ストレスレベルを有意に上昇させた (Fig. 32)。先行研究は過酸化水素存在下で培養した卵子について、胚発生の機能低下を引き起こすことを示しているが、抗酸化作用を有するケルセチン、メラトニン、フィコシアニンの共培養はこの低下を改善することを報告している^[115-117]。つまり、卵子を取り囲む環境の酸化ストレスの軽減が、胚の機能向上に重要である。本研究では、暑熱ストレス依存的な胚の発生率低下を改善した明日葉粉末は、同条件における卵巢内の酸化ストレスレベルの上昇を抑制した (Fig. 32)。したがって、明日葉は暑熱ストレス依存的な卵巢の酸化ストレスレベル上昇の抑制を介して発生機能を改善したことが示唆された。また、胚盤胞への高い到達率は、着床と出産の成功率を高めること

が知られており^[117]、明日葉粉末の投与は出産率や着床率に良い効果を与えることが期待できる。

酸化ストレスに伴う卵子の発生機能障害は、複数の作用機序でもたらされる。特に、胚発生のエネルギー源である ATP は重要である。胚発生に関する先行研究は、ミトコンドリアの機能低下が胚発生を低下させると述べている^[115]。本研究は、暑熱ストレスが胚の発生率と 2 細胞期胚の ATP 量を低下させることを明らかにした (Fig. 37)。胚発生機能への改善作用を有する明日葉粉末の投与は、この胚の ATP 量の低下を改善せず、マウス排卵卵子の ATP 量を増加させなかった (Fig. 37, 38)。したがって、明日葉の卵子発生機能改善効果では、ATP とは別の要因が考えられる。各種先行研究は、酸化ストレスに伴う胚発生障害に DNA の損傷やオートファジーの過剰促進が関与することを明らかにしている^[115, 116]。今後、明日葉がこれらの要因に与える影響を検討しなければならない。

また、熱ストレス依存的に初期胚の発生機能は低下し、熱ストレスを受けた胚は HSP70 の発現を増加する^[119]。これは自己防衛のために HSP70 を増加させたことが考えられ、HSP70 が初期胚の発生に重要であることを裏付けている。明日葉粉末の投与は、卵巣内の HSPA2 と HSP40 の発現を増加させた (Fig. 34)。したがって、明日葉粉末の投与は保有する卵子に HSP を介した熱ストレス抵抗性を付与し、発生機能を維持したことが推測される。今後は、明日葉が排卵卵子や受精した胚の HSP に与える効果を検討する必要がある。

第 3 項 卵巣内抗酸化酵素に明日葉が与える効果

本研究は、酸化ストレスが排卵機能と胚発生機能を低下させると考えている。明日葉は暑熱ストレス依存的な卵巣内の酸化ストレスレベルの上昇を抑制した (Fig. 32)。つまり、明日葉の酸化ストレス軽減作用は卵巣機能の維持に重要であると推測される。酸化ストレスの軽減作用は、化合物のスキャベンジング作用と抗酸化酵素による作用が知られている。しかし、明日葉の機能性成分であるカルコン類は DPPH ラジカルスキャベンジング作用を示さな

い.そこで本研究は抗酸化酵素のみに着眼した.明日葉粉末の投与は,卵巣内の GSS, SOD1, SOD2 の mRNA 発現を増加した (Fig. 33). 卵巣の抗酸化酵素に関する先行研究は,卵巣の機能は GSS および SOD1 の増加に伴い向上することを報告している^[120]. また,メトキシクロル濃度依存的な卵巣内の還元型グルタチオンと SOD の濃度低下が,卵巣の酸化ストレスレベルの上昇に関与することも報告されている^[113]. したがって,明日葉粉末の投与は,卵巣機能維持に重要な GSS と SOD の発現増加を介して,卵巣内に酸化ストレス抵抗性を付与したと考えられる.これらのことから,明日葉粉末は抗酸化酵素による酸化ストレスレベルの抑制を介して,酸化ストレス依存的な卵巣機能障害を改善したと考えられる.

第4項 明日葉の卵巣機能保護作用を担う機能性化合物について

暑熱ストレス依存的な卵巣機能低下に対して,明日葉が保護効果を示したため,機能性成分の探査を行った.キサントアンゲロール (XA) および 4-ヒドロキシデリシン (4-HD) は,暑熱ストレス依存的な排卵機能と卵子発生機能の低下を改善した (Fig. 38). この改善効果は明日葉粉末の結果 (Fig. 31) と同等である.当研究室の先行研究は, XA および 4-HD が抗酸化酵素を介して排卵機能を保護することを示している^[51-53]. したがって,本研究でのカルコン類の胚発生に対する保護作用は,明日葉粉末と同様の抗酸化酵素を介した卵巣内の酸化ストレスレベルの軽減作用に関与すると考えられる. また,カルコン類は摂取後に各器官で蓄積されることを明らかにされており^[50]. 卵巣内でも蓄積されたカルコン類が機能する可能性がある.これらのことから,暑熱ストレス依存的な卵巣機能異常に対する明日葉の保護効果は,カルコン類である XA および 4-HD が関与すると考えられる.

第5項 明日葉の投与による産仔数及び夏季不妊への影響について

明日葉粉末の投与は,マウスへの暑熱処理に伴う産仔数の低下を改善した (Table 5). 産仔数に関する先行研究は,喫煙による卵巣内の酸化ストレスレベルの増加が,産仔数の減少

に關与することを明らかにしている^[122]。本研究は、明日葉の投与が暑熱ストレス依存的な卵巣内の酸化ストレスレベルの上昇を抑制することを示している (Fig. 35)。したがって、暑熱ストレス依存的な産仔数低下に対する明日葉の改善作用は、酸化ストレス上昇の抑制を介したことが考えられ、同条件の実験系で評価した明日葉の胚発生機能の改善作用が反映されたと推測される。

明日葉の投与は夏季による受胎率の低下を改善した (Table 6)。この結果より、明日葉の卵巣機能保護作用はマウス特有ではないと考えられる。夏季不妊の改善を報告した研究では、ニワトリへの抗酸化剤の投与が暑熱ストレス依存的に増加した酸化ストレスレベルの低下を介して卵の重量を改善することを示している^[32]。本研究のマウス実験では、明日葉粉末の投与が抗酸化酵素を介して、卵巣内に酸化ストレス抵抗性を付与し、暑熱ストレス依存的な卵巣機能障害を改善したと考えている。したがって、明日葉の梅山豚における夏季不妊改善効果は、酸化ストレスの抑制を介した効果であると推測される。

第6項 本章のまとめ

本章で、明日葉粉末の投与は暑熱ストレス依存的な卵巣機能低下に対する改善作用を示した。さらに、明日葉粉末の投与は卵巣内の抗酸化酵素および HSP の発現を増加させた。また、明日葉粉末とカルコン類は卵巣保護機能の類似を示した。

以上の研究成果から、明日葉は卵巣内での熱および酸化ストレス抵抗性の付与を介して、暑熱ストレス依存的な卵巣機能に対する保護作用を示すことが明らかになった。また、カルコン類が明日葉の卵巣保護機能に重要な役割を果たしていると考えられる。

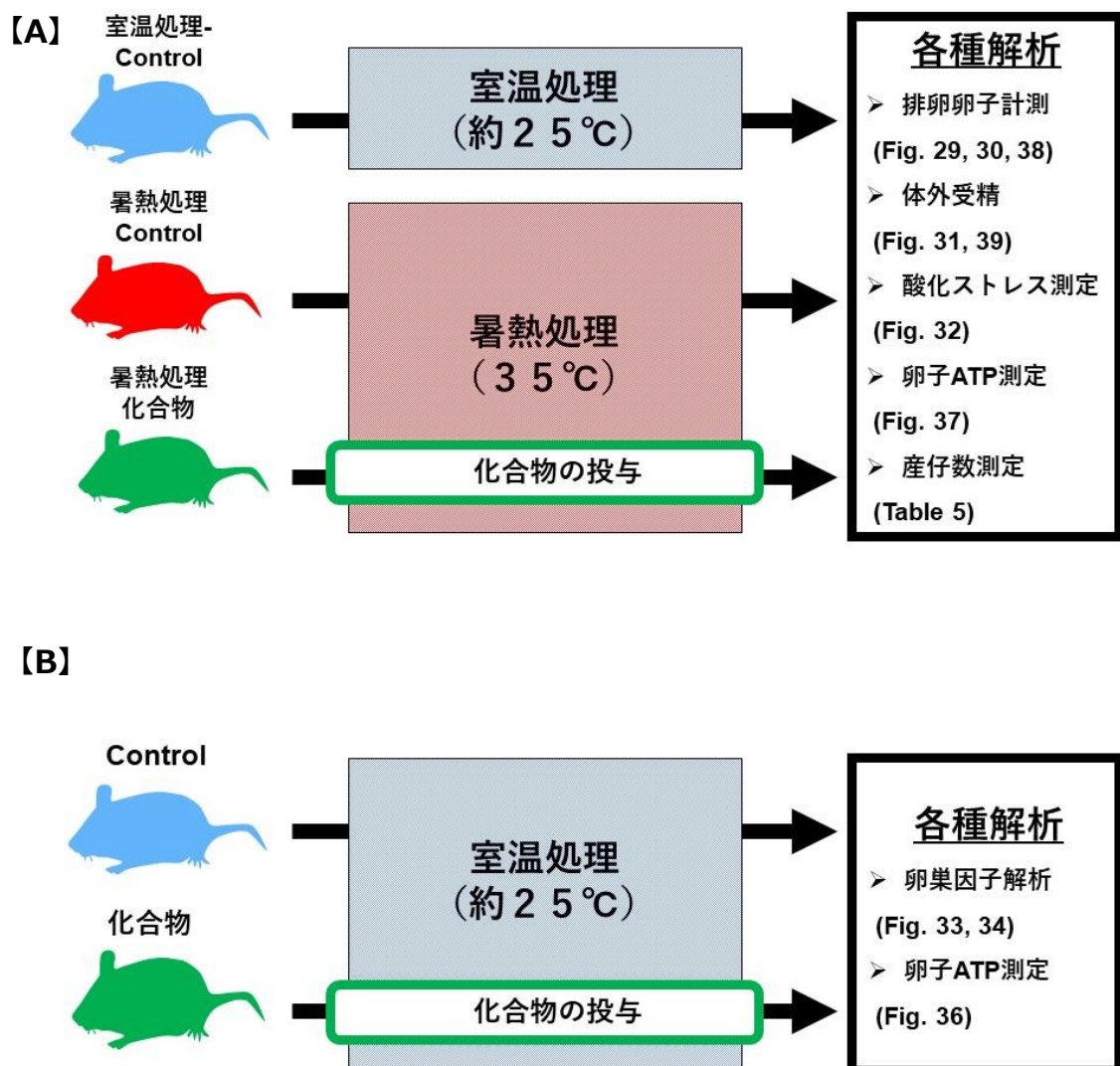


Fig. 28 実験系 【卵巣機能の評価】

条件【A】

性成熟した雌の ICR マウスおよび Wister ラットを室温処理群と暑熱処理群に分け、2 種の Control（化合物未投与）群と化合物群で飼育した。排卵の実験系では Wister ラット、その他の実験系では ICR マウスを用いた。卵子を用いた実験では、暑熱ストレス負荷中に過排卵処理を施し、排卵卵子を回収して実験に供した。化合物の投与量および暑熱処理の条件は各 Figure の説明で明記してある。

条件【B】

性成熟した雌の ICR マウスを Control（化合物未投与）群と化合物群に分け、室温で飼育した。各種サンプル投与 7 日後に卵巣および卵子を摘出し、各種解析を行った。

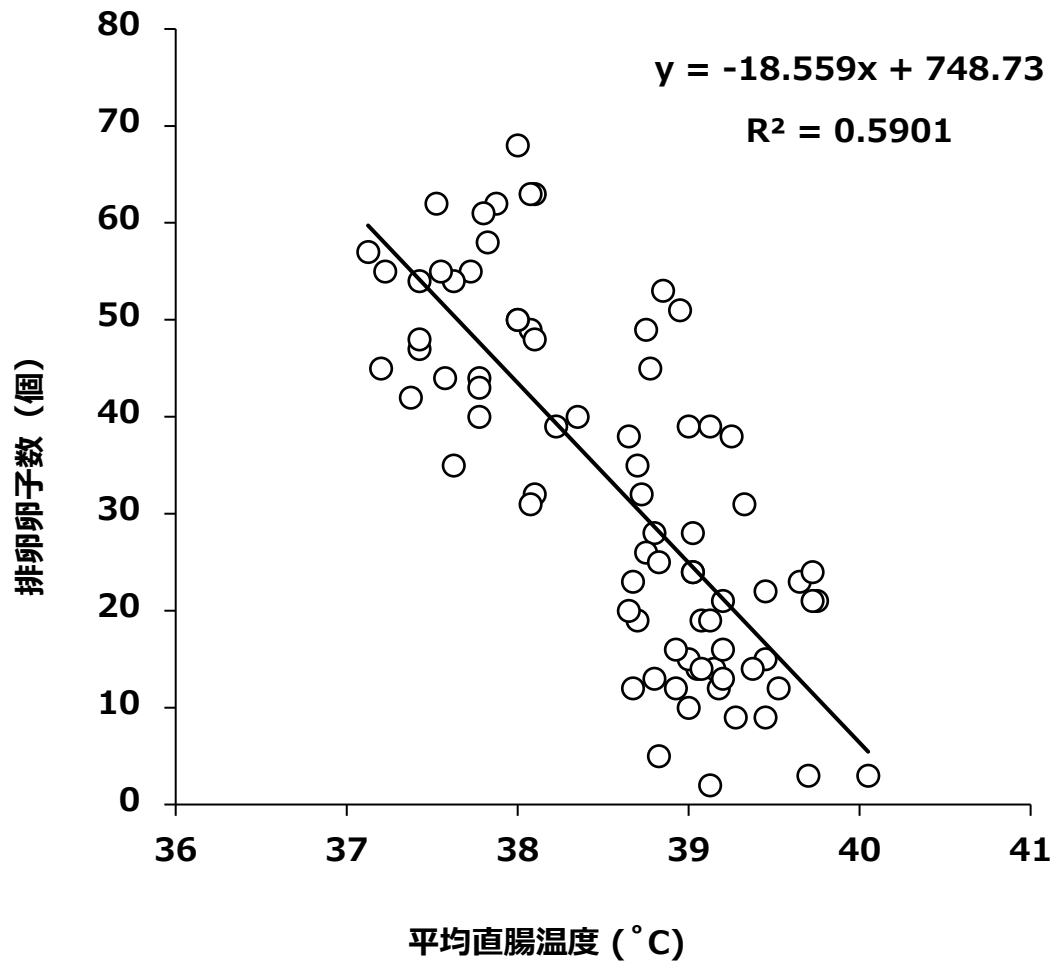


Fig. 29 暑熱負荷ラットにおける排卵卵子数と直腸温度の相関関係

Wister ラットを室温処理群と暑熱処理群に分けた。暑熱処理（35°C, 96 時間）を行い，過排卵処理で卵子を回収し，計測した。また，暑熱処理期間内に 1 日 1 回，計 4 回の直腸温度の測定を行った。

グラフは排卵卵子数と直腸温度の平均値の有意な相関関係を示している（n=77）。

統計手法は Pearson product-moment correlation coefficient を用いた。

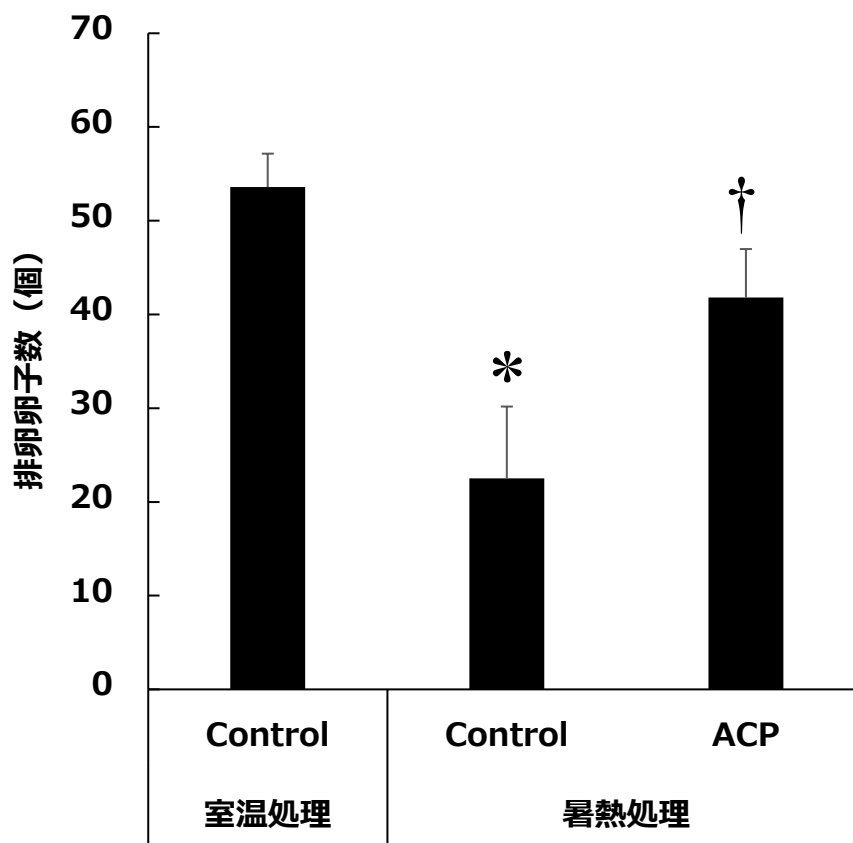


Fig. 30 暑熱ストレス依存的な排卵卵子数の低下に対する明日葉の効果

Fig. 28 の条件【A】で実験を行い，57.5 mg/kg 体重/day の明日葉粉末（ACP）を化合物群に投与した．暑熱処理（35°C, 96 時間）を行い，過排卵処理で排卵卵子を回収後に計測した．グラフは平均値±SE (n=5-6)を示している．統計処理は Dunnett-test で行った．

*P<0.05 vs. 室温処理-Control, †P<0.05 vs. 暑熱処理-Control

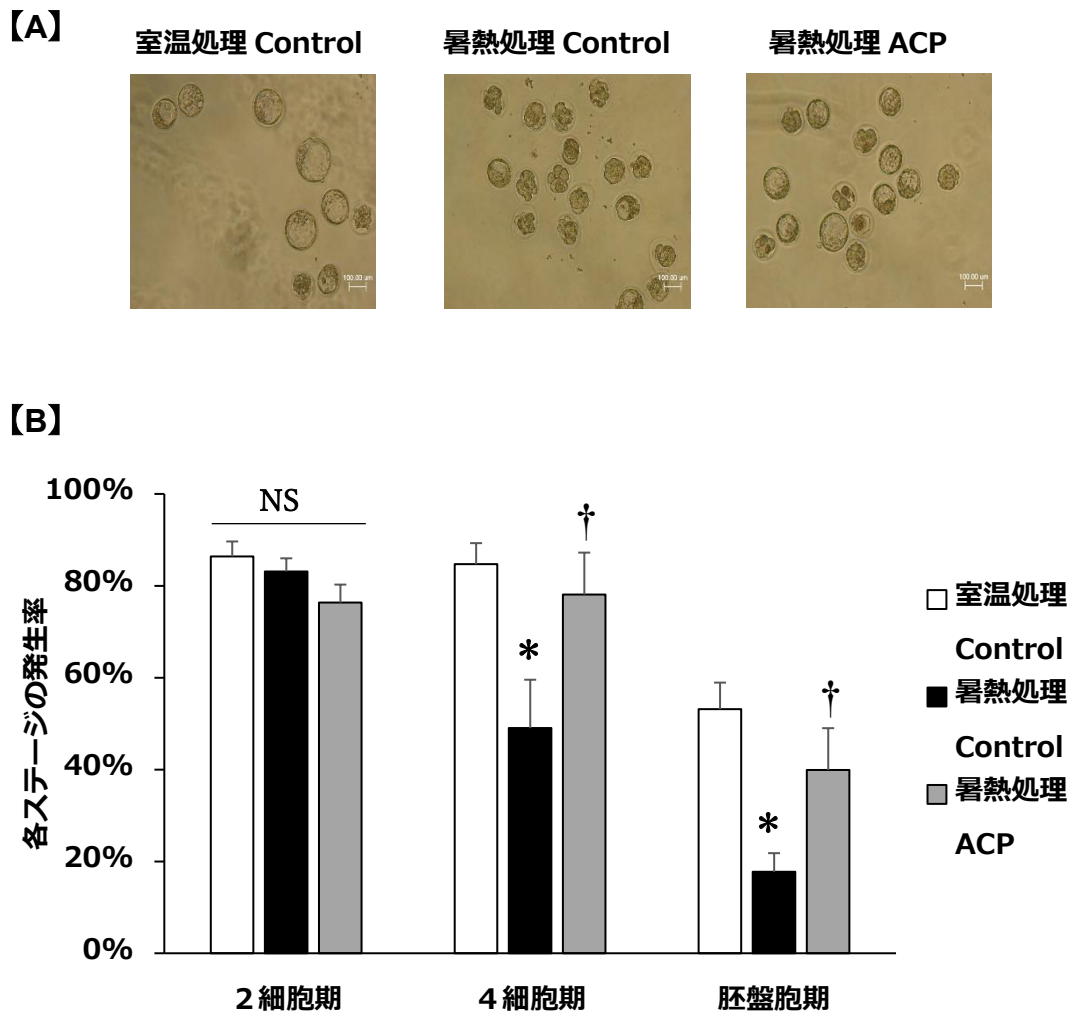


Fig. 31 暑熱ストレス依存的な卵子発生機能の低下に対する明日葉の効果

Fig. 28 の条件 【A】 で実験を行い, 57.5 mg/kg 体重/day の明日葉粉末 (ACP) を化合物群に投与した. 暑熱処理 (35°C, 192 時間) を行い, 過排卵処理で排卵卵子を回収した. 回収した卵子を雄 ICR マウスの精子とともに体外受精に供した. 受精卵培養から 24 時間後に 2 細胞期, 48 時間後に 4 細胞期, 96 時間後に胚盤胞期の割合を測定した.

【A】 受精卵培養 96 時間後の各群の胚写真

【B】 グラフは平均値 \pm SE (n=4-6)を示している. 統計処理は Dunnett-test で行った.

*P<0.05 vs. 室温処理-Control, †P<0.05 vs. 暑熱処理-Control

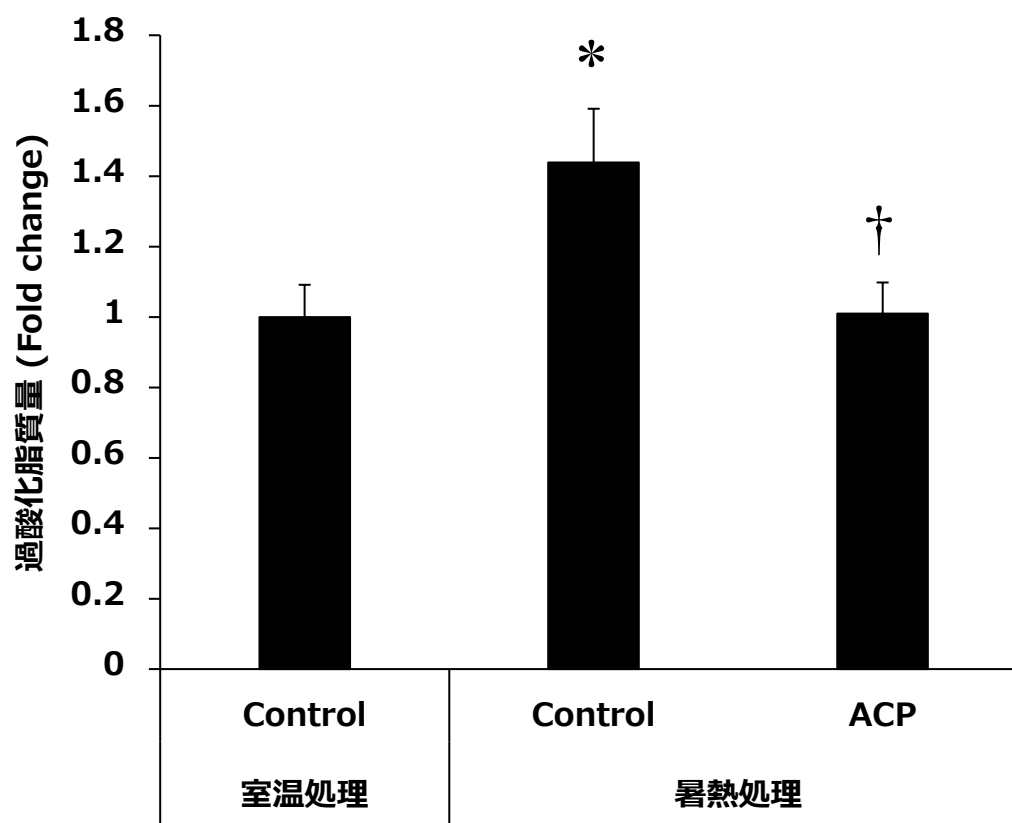


Fig. 32 暑熱ストレス依存的な卵巣内酸化ストレス増加に対する明日葉の効果

Fig. 28 の条件【A】で実験を行い，57.5 mg/kg 体重/day の明日葉粉末（ACP）を化合物群に投与した．暑熱処理（35°C, 144 時間）後に解剖し，卵巣を回収した．組織用 RIPA バッファーでホモジナイズしてタンパク質を調整後，TBARS 法で過酸化脂質量を測定した．グラフは平均値±SE (n=6-8)を示している．統計処理は Dunnett-test で行った．

*P<0.05 vs. 室温処理-Control, †P<0.05 vs. 暑熱処理-Control

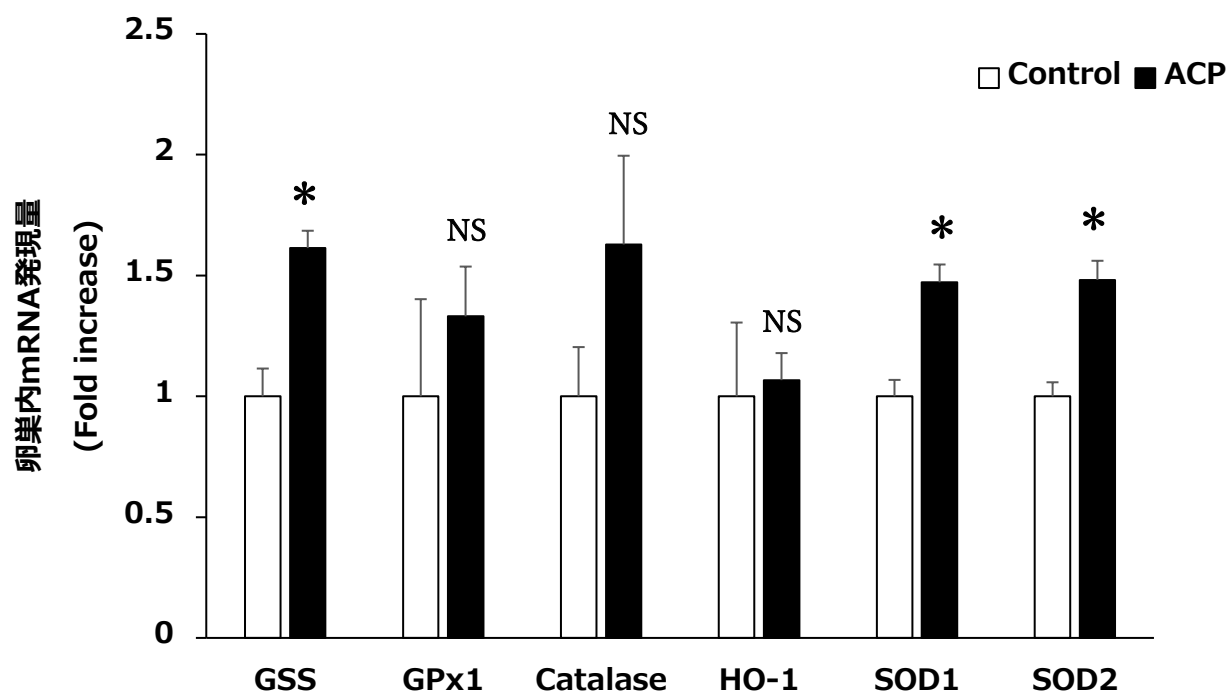


Fig. 33 明日葉が卵巣内の抗酸化酵素の発現に与える影響

Fig. 28 の条件【B】で実験を行い、11.5 mg/kg 体重/day の明日葉粉末（ACP）を化合物群に投与した。解剖時に卵巣を摘出後、各サンプルの RNA を調製した。各 mRNA 量の発現評価は Real-Time PCR 法を用いた。

グラフは平均値±SE (n=6)を示している。統計処理は Student t-test で行った。

*P<0.05 vs. Control

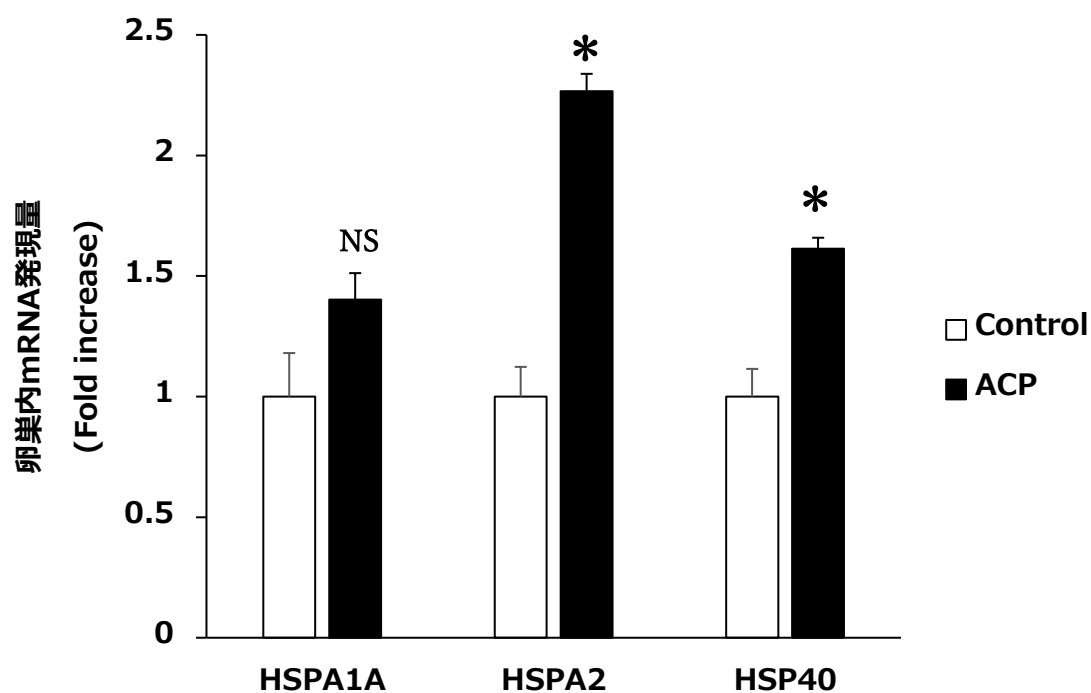


Fig. 34 明日葉が卵巣内の Heat Shock Protein の発現に与える影響

Fig. 28 の条件【B】で実験を行い、11.5 mg/kg 体重/day の明日葉粉末（ACP）を化合物群に投与した。解剖時に卵巣を摘出後、各サンプルの RNA を調製した。mRNA 量の発現評価は Real-Time PCR 法を用いた。

グラフは平均値±SE (n=6, 6)を示している。統計処理は Student t-test で行った。

*P<0.05 vs. Control

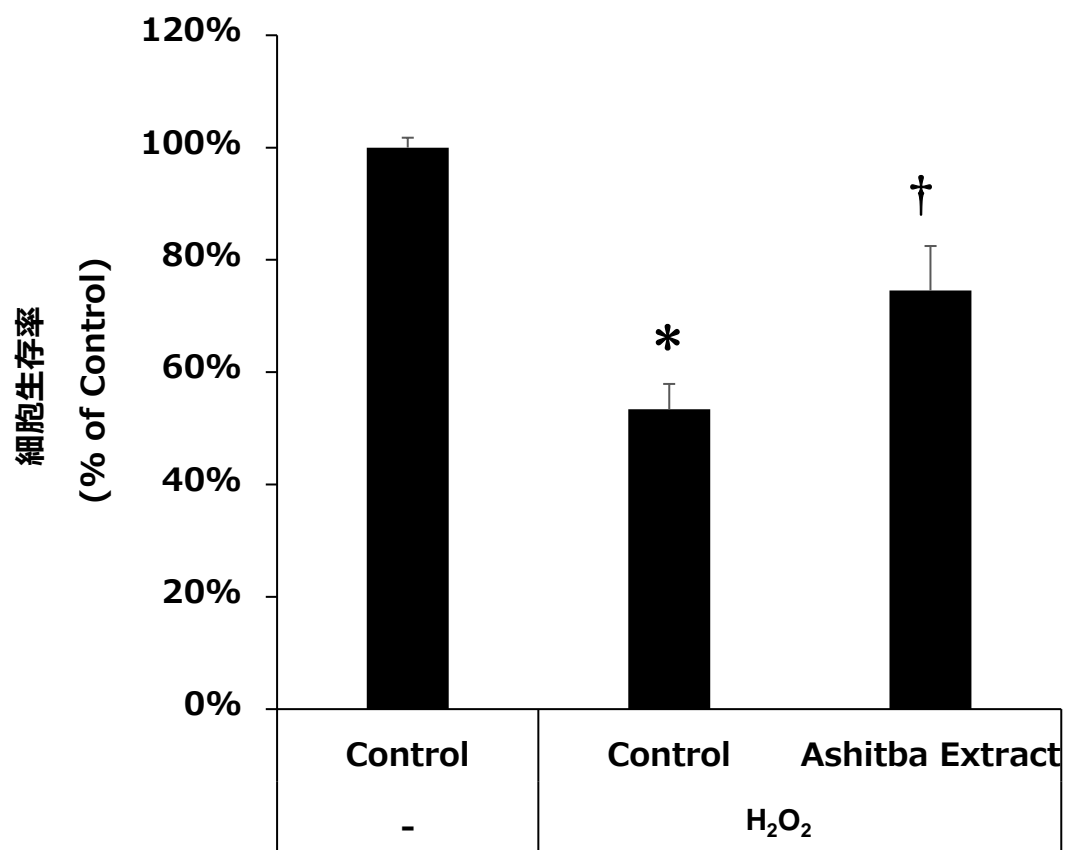


Fig. 35 酸化ストレス依存的な顆粒層細胞の細胞死に対する明日葉の効果

調製した顆粒層細胞を 10%血清存在下で 24 時間培養し、5 %血清培地に交換した。明日葉抽出液を終濃度 1000 倍希釈で添加し、24 時間培養した。その後、抽出液を取り除き過酸化水素 (300 μ M) を添加した。18 時間後に細胞生存率を計測した。

グラフは平均値 \pm SE (n=3)を示している。統計処理は Holm-test で行った。

*P<0.05 vs. Control without H₂O₂, †P<0.05 vs. Control with H₂O₂

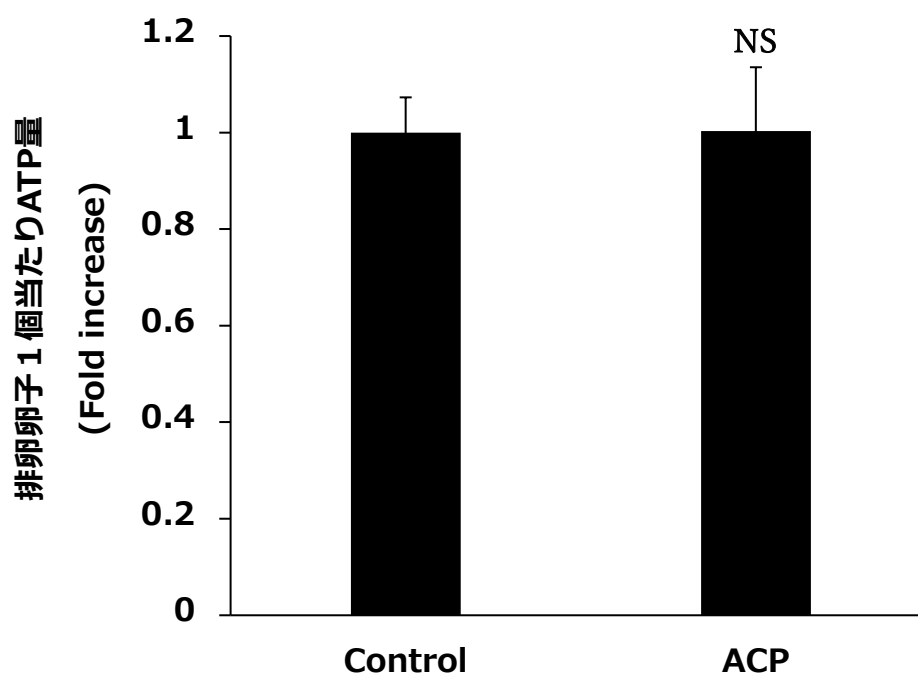


Fig. 36 明日葉粉末の投与が排卵卵子内の ATP 量に与える影響

Fig. 28 の条件【B】で実験を行い、57.5 mg/kg 体重/day の明日葉粉末（ACP）を化合物群に投与した。解剖 2 日前から過排卵処理を施し、解剖時に排卵卵子を回収した。20 個以上の卵子を用いて、胚一個あたりの ATP 量を測定した。

グラフは平均値±SE (n=6)を示している。統計処理 Student t-test で行った。

*P<0.05 vs. Control

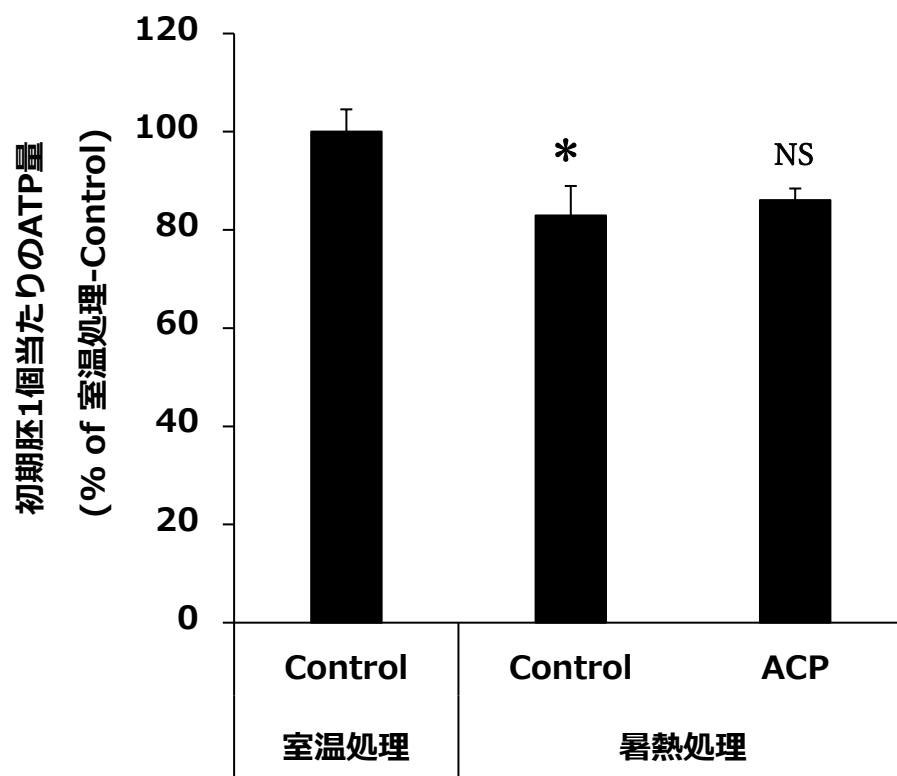


Fig. 37 暑熱ストレス依存的な受精卵内の ATP 量低下に対する明日葉の効果

Fig. 28 の条件【A】で実験を行い、57.5 mg/kg 体重/day の明日葉粉末 ACP を化合物群に投与した。暑熱処理（35°C, 192 時間）を行い、過排卵処理で排卵卵子を回収した。回収した卵子を雄 ICR マウスの精子とともに体外受精に供した。受精卵培養から 36 時間後に 2 細胞期を回収した。20 個以上の受精卵を用いて、一個あたりの ATP 量を測定した。

グラフは平均値 ± SE (n=5)を示している。統計処理は Dunnett-test で行った。

*P<0.05 vs. RT-Control, †P<0.05 vs. HEAT-Control

Table 5 暑熱ストレス依存的な産仔数低下に対する明日葉の効果

Fig. 28 の条件【A】で実験を行い、57.5 mg/kg 体重/day の明日葉粉末（ACP）を化合物群に投与した。暑熱処理（35°C, 192 時間）を行い、雄 ICR マウスと 5 日間交配させた。交配後に雄マウスを個別飼育し、約 20 日後に生まれた子供を測定した。

受胎率は交配した母親で出産した母親の割合を示している（n=5-6）。それ以外の表値は出産した母親 1 匹あたりの数値を平均値（n=4-5）を示している。

母親 1 匹あたり	室温処理	暑熱処理	
	Control	Control	ACP
受胎率	83%	80%	83%
産仔数 (匹)	12.60	9.25	11.00
産仔重量 (g)	20.82	17.88	20.52
生存産仔数 (匹)	12.00	7.75	11.00
生存産仔重量 (g)	19.82	14.83	20.52

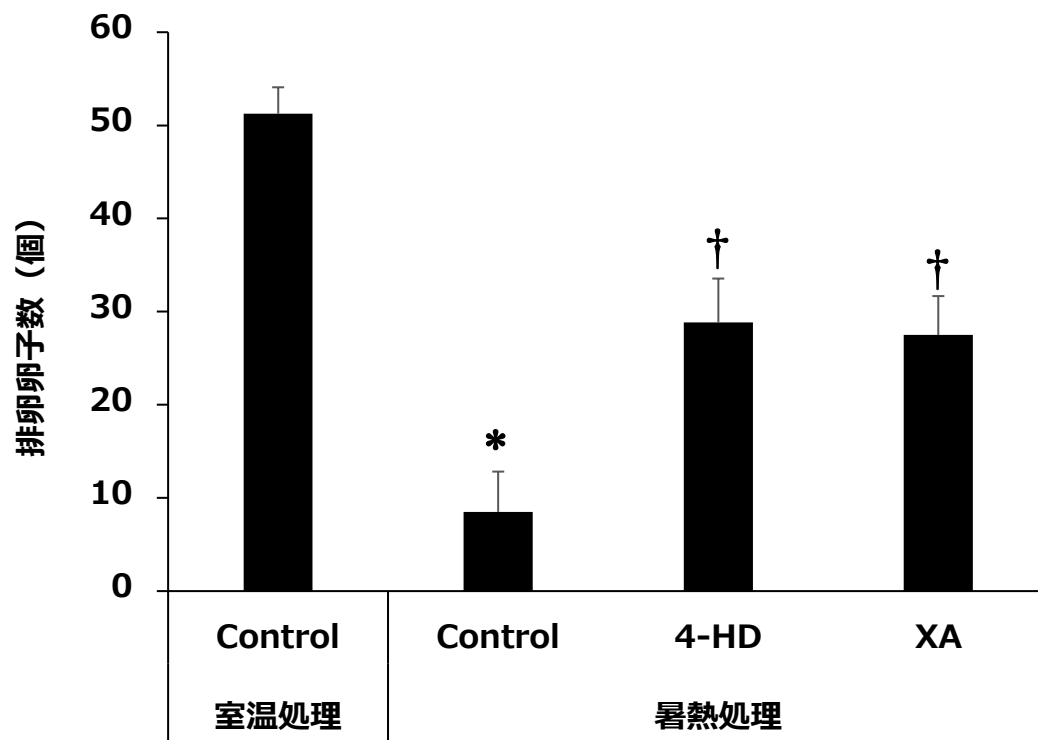


Fig. 38 暑熱ストレス依存的な排卵卵子数の低下に対するカルコン類の効果

Fig. 28 の条件【A】で実験を行い、キサントアンゲロール (XA) 及び4-ヒドロキシデリシン (4-HD) を 3 mg/kg 体重/day を化合物群に投与した。暑熱処理 (35°C, 96 時間) を行い、過排卵処理で排卵卵子を回収後に計測した。グラフは平均値± SE (n=4-6)を示している。統計処理は Holm-test で行った。

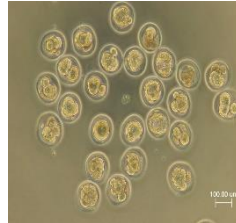
*P<0.05 vs. 室温処理-Control, †P<0.05 vs. 暑熱処理-Control

【A】

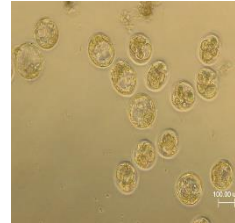
室温処理 Control



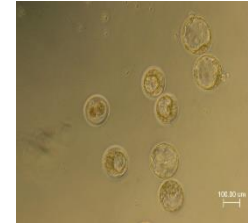
暑熱処理 Control



暑熱処理 XA



暑熱処理 4HD



【B】

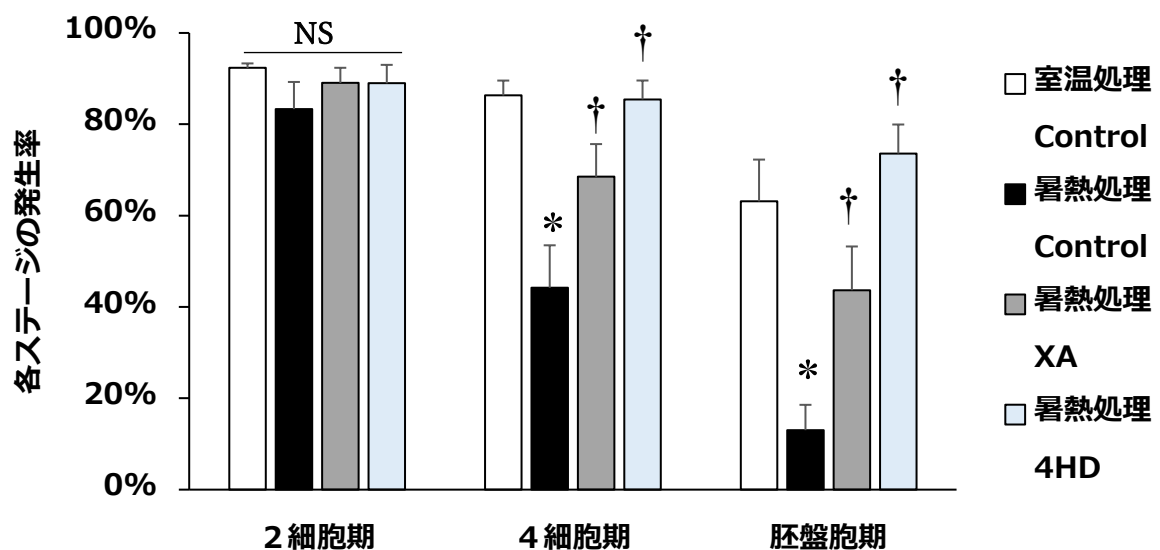


Fig. 39 暑熱ストレス依存的な卵子発生機能の低下に対するカルコン類の効果

Fig. 28 の条件【A】で実験を行い、キサントアンゲロール (XA) 及び4-ヒドロキシデリシン (4-HD) を 3 mg/kg 体重/day を化合物投与群に投与した. 暑熱処理 (35°C, 192 時間) を行い, 過排卵処理で排卵卵子を回収した. 回収した卵子を雄 ICR マウスの精子とともに体外受精に供した. 受精卵培養から 24 時間後に 2 細胞期, 48 時間後に 4 細胞期, 96 時間後に胚盤胞期の割合を測定した.

【A】受精卵培養 96 時間後の各群の胚写真

【B】グラフは平均値±SE (n=6-9)を示している. 統計処理は Holm-test で行った.

*P<0.05 vs. 室温処理-Control, †P<0.05 vs. 暑熱処理-Control

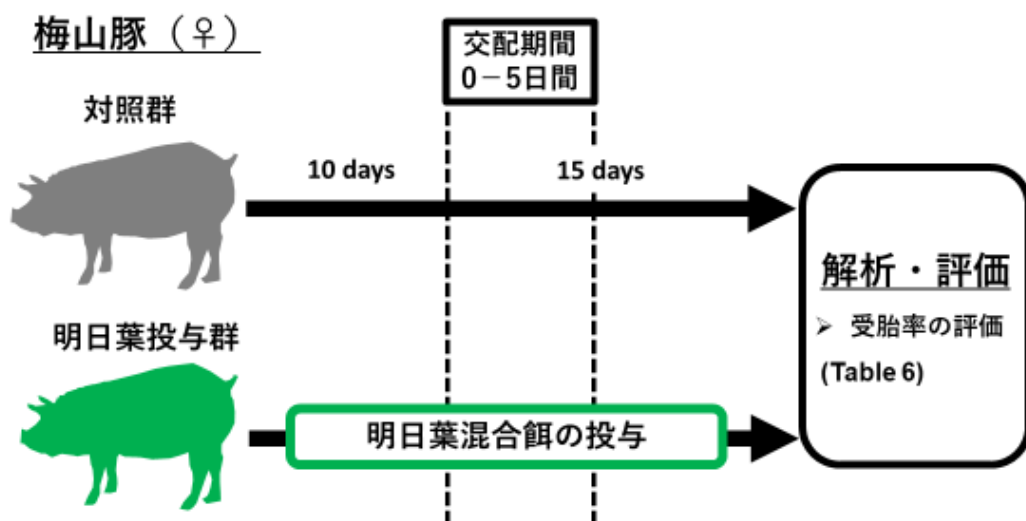


Fig. 40 実験系 【雌梅山豚の夏季不妊改善評価】

雌の梅山豚を対象群と明日葉投与群に分け、夏季に飼育した。明日葉投与群では通常のエサに加え、明日葉の茎葉粉末を 40 g/day で 25 日間投与した。投与 10 日後からデュロック種の雄豚の精子で人工授精をした。明日葉投与終了後も飼育を続け、出産で受胎率を評価した。

	n 数	受胎率
対照群	N=10	30%
明日葉投与群	N=12	50%

Table 6 梅山豚の夏季不妊に対する明日葉の効果

Fig. 40 の条件で，40 g/day の明日葉の葉粉末を投与した．人工授精にて妊娠させ，受胎率を評価した．

受胎率は出産数あたりの交配数で算出した．

第5章 総合討論

I. 明日葉の生殖機能保護効果で推測される作用機序

A) 明日葉の造精機能保護作用

第2章では、暑熱ストレス依存的な造精機能の低下に対し、明日葉粉末の投与が改善効果を示した。本研究の暑熱ストレス依存的な造精機能障害では、酸化ストレスと熱ストレス依存的な生殖細胞への損傷が関与すると考えられる。したがって、明日葉の保護効果では2通りの作用機序が考えられる (Fig. 41)。

第1に、明日葉粉末の投与が精巣内に酸化ストレス抵抗性を付与すると考えられる。先行研究は、抗酸化剤の投与が暑熱ストレス依存的な造精機能の低下を改善すること^[65]を示している。また、抗酸化酵素が発現増加した精巣では、暑熱ストレス依存的な造精機能低下を抑制する^[68-69]。したがって、精巣内への酸化ストレス抵抗性の付与は、暑熱ストレス依存的な造精機能障害の改善に深く関与すると考えられる。本研究で、造精機能の保護作用を示した明日葉粉末の投与が、精巣内の抗酸化酵素を増加させることを明らかにした。したがって、暑熱ストレス依存的な造精機能障害に対する明日葉の保護作用は、抗酸化酵素の発現を介して、精巣内の酸化ストレスレベルの上昇を抑制すると考えられる。

第2に、明日葉粉末の投与は精巣内に熱ストレス抵抗性を付与すると考えられる。先行研究は、HSP の発現が熱ストレス依存的な細胞死を改善することを報告している^[80]。つまり、細胞への HSP を介した熱ストレス抵抗性の付与は、暑熱ストレス依存的な細胞死に対して有効である。本研究は、明日葉の投与が HSP の発現量を増加させること、暑熱ストレス依存的な HSP の発現低下を抑制することを示した。したがって、暑熱ストレス依存的な造精機能障害に対する明日葉の保護作用は、精巣内に熱ストレス抵抗性を付与し、熱による生殖細胞への物理的な損傷を防ぐことが考えられる。

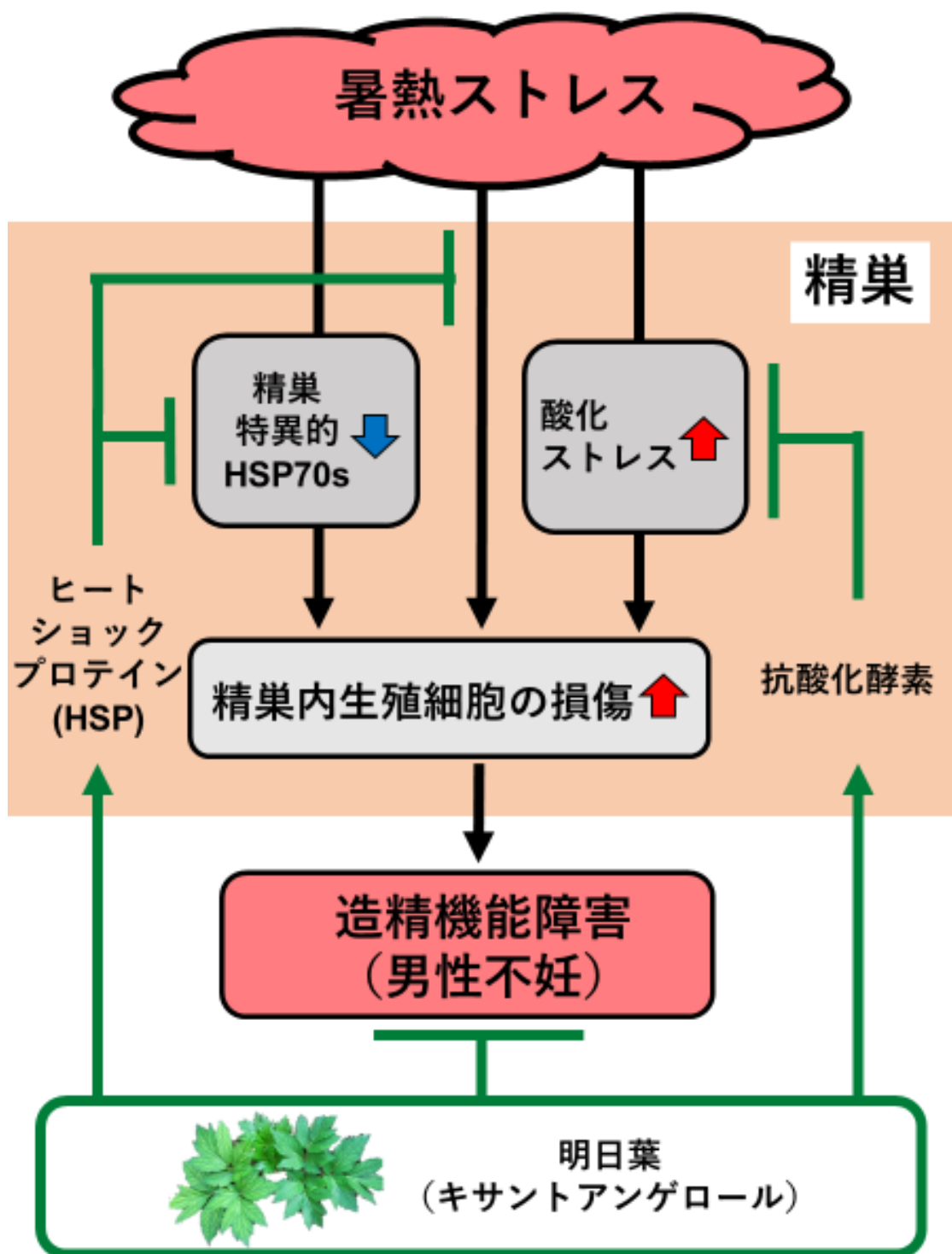


Fig. 41 明日葉の造精機能保護作用にて予想される作用機序モデル

B) 明日葉の成熟精子機能保護作用

第 3 章では、暑熱ストレス依存的な成熟精子機能の低下に対し、明日葉粉末の投与が改善作用を示した。本研究は、暑熱ストレス負荷が精巣上体と成熟精子の機能低下を介して成熟精子の機能障害をもたらすことを明らかにした。そのため、明日葉の保護効果の作用機序は 2 つ考えられる (Fig. 42)。

第 1 に、明日葉の精子保護効果は精子を取り囲む環境を改善したことが考えられる。本研究は、暑熱ストレス依存的な精巣上体内の酸化ストレスを確認した。先行研究は、抗酸化剤との共培養が、活性酸素種を含む培地で培養した精子の運動機能や精子の質の低下を報告している^[91-92, 105]。本研究では、明日葉粉末の投与が、精巣上体内の抗酸化酵素活性を増加させた。したがって、明日葉粉末の投与は、抗酸化酵素の発現増加を介して暑熱ストレス依存的な精巣上体内酸化ストレスレベルの上昇を抑制し、精子の周辺環境を維持したと考えられる。また、別の先行研究は、細胞への直接的な熱ストレスの負荷が細胞機能を低下させること^[80]、精巣上体の機能障害が精子の機能を低下することを示している^[101]。明日葉粉末の投与は、精子の機能低下を熱ストレスから保護したことから、精巣上体に熱耐性を付与した可能性がある。これらのことから、明日葉粉末の投与が精巣上体に酸化ストレス抵抗性と熱ストレス抵抗性の付与を介して、暑熱処理から成熟精子を保護したと考えられる。

第 2 に、明日葉は成熟精子に熱ストレス抵抗性を付与したことが考えられる。先行研究は、熱ストレスの負荷が成熟精子の運動機能を低下させること^[90]、熱ストレス抵抗に必要な HSP は精巣上体通過中に精子へ付加されること^[92-93]、HSP が増加した細胞は熱ストレスによる機能低下を抑制すること^[80]を明らかにしている。本研究では、明日葉粉末を投与したマウス精子は熱ストレス依存的な運動機能の低下を受けなかった。したがって、明日葉粉末の投与は、精巣上体内の精子成熟期間で精子に HSP を介した熱ストレス抵抗性を付与し、成熟精子を熱から保護したと考えられる。

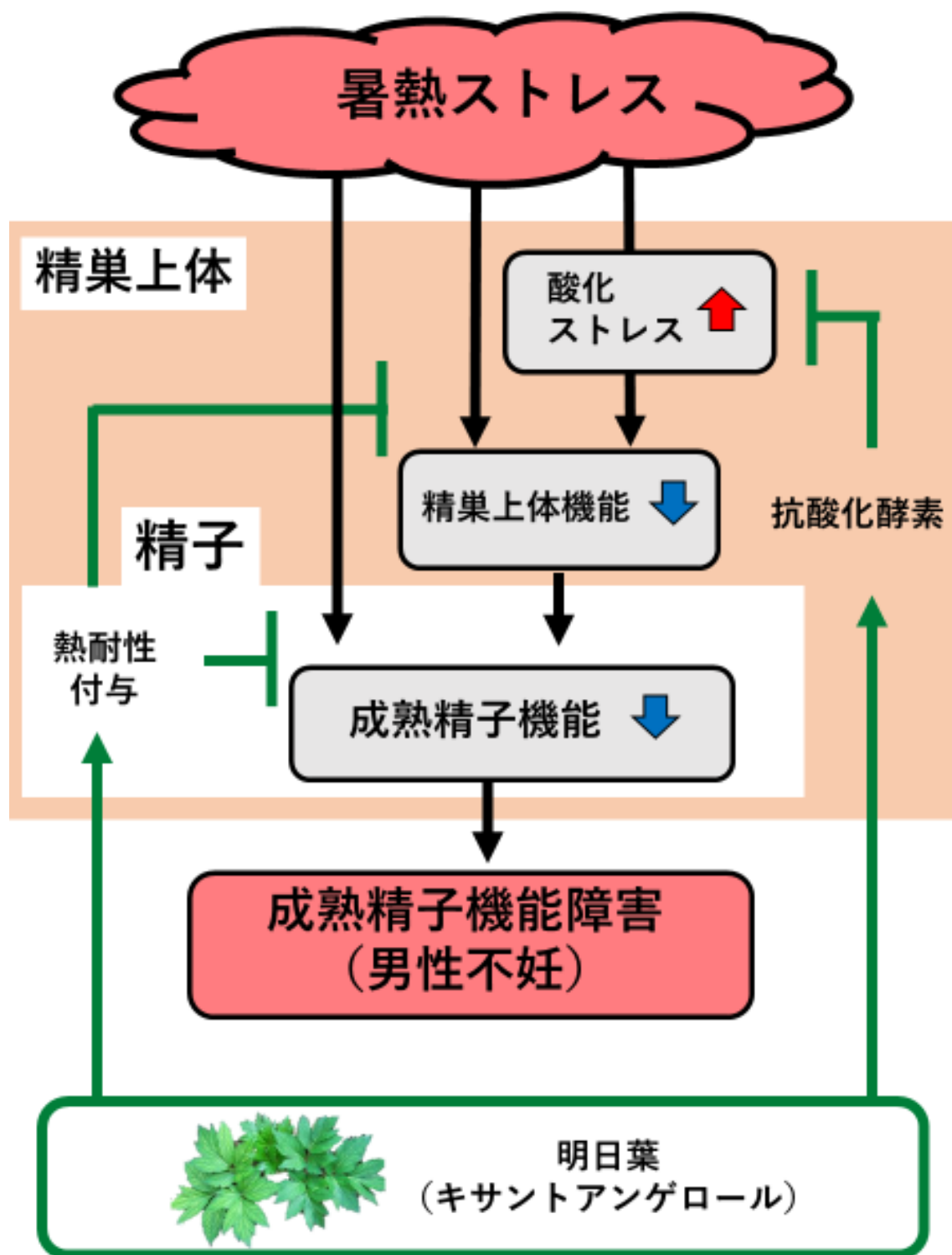


Fig. 42 明日葉の成熟精子機能保護作用にて予想される作用機序

C) 明日葉の卵巣機能保護作用

第4章では、暑熱ストレス依存的な卵巣機能の低下に対し、明日葉粉末の投与が改善作用を示した。本研究は、暑熱処理が酸化ストレスと熱ストレスを介して卵巣機能障害をもたらすと考えている。したがって、明日葉の保護作用は2つの作用機序への関与が考えられる (Fig. 43)。

第1に、明日葉の卵巣保護効果は卵巣内への酸化ストレス抵抗性の付与を介すると考えられる。先行研究は、抗酸化作用を有するNACやメラトニン等の投与が酸化ストレスの軽減を介して、暑熱ストレス依存的な卵巣障害や胚発生機能障害を改善している^[109, 111-113, 116]。つまり、卵巣内に酸化ストレス抵抗性を付与することが暑熱ストレス依存的な卵巣機能障害の改善に重要である。本研究では、卵巣機能を改善する明日葉粉末の投与が、卵巣内の抗酸化酵素の発現を増加させ、暑熱ストレス依存的な卵巣内酸化ストレスレベルの上昇を抑制した。したがって、明日葉粉末の投与は、抗酸化酵素を介して卵巣内に酸化ストレス抵抗性を付与し、暑熱ストレス依存的な卵巣機能障害を改善したと考えられる。

第2に、明日葉の投与が、卵巣内に熱ストレス抵抗性を付与したと考えられる。熱ストレス負荷を行った先行研究は、ラット顆粒層細胞の死に伴う排卵卵子数の低下^[107]、胚の発生率の低下^[20]を報告している。また、熱ストレス抵抗に必要なHSPは顆粒層細胞及び卵子内に存在すること^[120]、HSPの増加した細胞は、熱ストレスによる機能低下を抑制する^[80]ことが示されている。本研究では、卵巣機能の改善作用を有する明日葉粉末の投与はマウス卵巣のHSP発現量を増加させた。したがって、明日葉粉末の投与は、卵巣及び保有する卵子内に熱ストレス抵抗性を付与し、各卵巣機能を熱ストレスから保護したと考えられる。

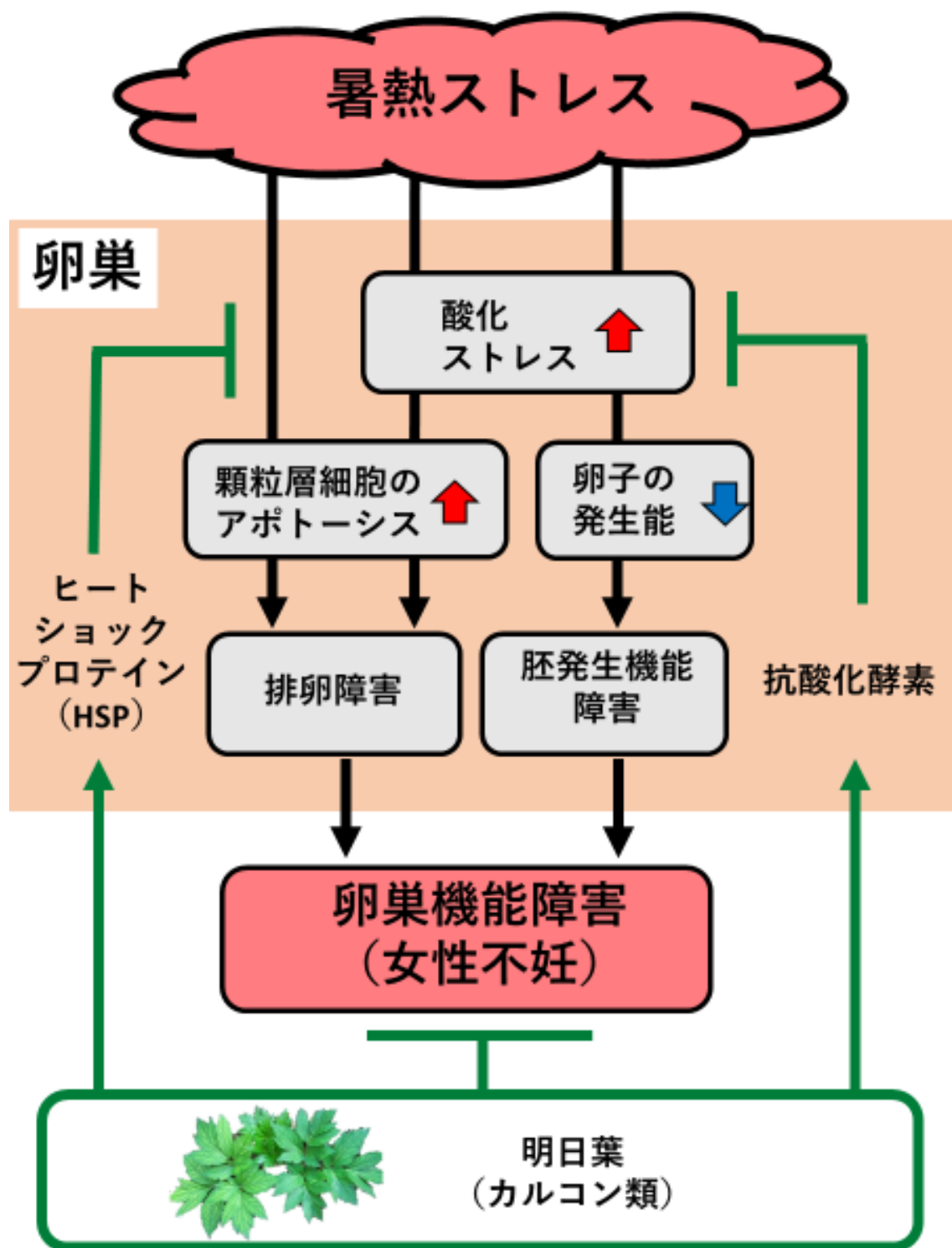


Fig. 43 明日葉の卵巢機能保護作用にて予想される作用機序

II. 研究限界と今後の課題

A) 明日葉の造精機能保護作用

本研究は、暑熱ストレス依存的な造精機能障害に対する明日葉の保護作用を検討するため、酸化ストレスに着眼した。第2章で、暑熱ストレス依存的な精巣内の酸化ストレス増加を示したが、明日葉粉末の投与による酸化ストレスレベルの上昇抑制作用の検証は行えていない。本研究は、明日葉粉末の投与がマウス精巣内の抗酸化酵素の発現を増加させることを示している。したがって、明日葉粉末の投与が、暑熱ストレス依存的な酸化ストレスレベルの上昇を抑制すると推測される。今後、過酸化脂質を指標に検討する必要がある。

また本研究は、明日葉粉末の投与が精巣内の抗酸化酵素や HSP を増加させた。特に、HSPA2 や HSPA1L は精母細胞だけでなく、精子細胞や精原細胞に存在する^[83]。したがって、本研究での各 HSP の発現増加が、パキテン期精母細胞のみに生じると正確に明示できていない。今後、免疫染色法を用いて各細胞のマーカーと各因子の二重染色観察等を用いて、明らかにする必要がある。

B) 明日葉の成熟精子保護機能

本研究は、暑熱ストレス依存的な成熟精子の機能低下に対する明日葉の保護作用を検討するために、酸化ストレスに着眼した。第3章では、暑熱ストレス依存的な精巣上体内の酸化ストレス増加を示したが、明日葉粉末の投与による暑熱ストレス依存的な酸化ストレスレベルの上昇に対する抑制作用は示せていない。本研究で明日葉粉末の投与は、精巣上体内の抗酸化酵素活性を増加させた。したがって、明日葉粉末の投与が、精巣上体内での暑熱ストレス依存的な酸化ストレスレベルの上昇を抑制すると推測される。今後、過酸化脂質を指標として測定する必要がある。

また本研究は、明日葉の投与が精子に熱ストレス抵抗性を付与することを明らかにした。しかし、その作用機序は未解明である。先行研究は、成熟精子が精巣上体内で HSP の付加

作用を受けること^[98], HSP が増加した細胞は熱由来の機能低下を受けないこと^[80]を報告している。したがって, 成熟精子のタンパク評価を用いて HSP の精子への付加を検討する必要がある。また, 精巣上体における HSP の変化も同様に検討すべきである。

本研究は, 暑熱ストレス依存的な成熟精子への作用として精子濃度の低下を示した (Table 4)。明日葉粉末の投与が改善作用を示さなかったため, 第 3 章の考察では触れなかったが, ここで見解を述べる。暑熱ストレス依存的な成熟精子の濃度低下は, 造精機能低下に伴い生じると考えられている。しかし, 本研究は暑熱ストレス負荷 24 時間後に測定しており, 造精機能との関連は皆無と考えられる, 成熟精子に関する先行研究は, 精巣上体での成熟精子の減少にファゴサイトーシスが関与すると述べている^[123]。本研究では暑熱ストレス負荷が異常精子を増加させたことで, ファゴサイトーシスの活性化が生じたと考えている。今後, 更なる研究を進め, 明らかにする必要がある。

C) 明日葉の卵巣機能保護作用

本研究は, 明日葉粉末の投与が暑熱ストレス依存的な排卵卵子の胚発生機能低下を改善することを示した。その改善作用を検討するため受精卵の ATP 量に着眼したが, 明日葉粉末投与による ATP 量の改善作用は認められなかった。酸化ストレス依存的な胚の発生率の低下は ATP 依存的ではなく, 過剰なオートファジーや DNA 断片化も関与することが知られている^[109]。本研究での, 明日葉粉末の投与は, 卵巣内の酸化ストレス抑制を介して胚発生機能の保護作用を示した。したがって, 今後, 明日葉が酸化ストレス依存的な初期胚の DNA 断片化や過剰なオートファジーに与える影響を検討する必要がある。

本研究は明日葉粉末の投与が卵巣内の抗酸化酵素や HSP の発現を増加させると示した。しかし, この増加は卵巣全体で測定した結果であり, 顆粒層細胞や卵子に影響を及ぼしていることを明確に示せていない。今後, 免疫染色法を用いて各細胞のマーカーと各因子の二重染色観察を行い, 明らかにする必要がある。

D) 明日葉の機能成分の探索

我が国の機能性食品では、機能性成分の明示が必要である。本研究は明日葉の生殖機能改善効果を明らかにした。その機能性成分は、男性不妊ではキサントアンゲロール、女性不妊ではキサントアンゲロール及び4-ヒドロキシデリシンであることを示した。明日葉の機能成分はこれらのカルコン類以外に、クマリン等が知られている^[36]。本研究の第2章の考察より、キサントアンゲロールのみが明日葉の生殖機能保護作用を担うとは考え難い。したがって、複数の機能性化合物が同時に機能し、複数の分子機序を動かして役割を担うと考えられる。今後、これらの化合物を用いて生殖機能保護作用を検討し、機能性食品としての明日葉の価値を高める必要がある。

E) 他の生殖機能障害への影響

本研究は男性不妊の中でも、造精機能と成熟精子の機能に着眼した。これらに加え、男性不妊では勃起不全などの射精障害がある。勃起不全とは、陰茎内血管の一酸化窒素の産生低下をもたらすことが知られている。射精は精子の採取に重要な役割を持つため、不妊に関する研究の重要な課題であるが、射精障害に対する明日葉の改善作用は明らかにしていない。しかし明日葉の先行研究が、血管内皮細胞の一酸化窒素産生機能を増加させることを報告している^[43]。したがって、明日葉は勃起不全の改善も期待できる。今後、実験系の作成とともに検討する必要がある。

本研究は女性不妊の中でも、排卵機能と排卵卵子の発生機能に着眼した。これらに加え、女性不妊では性周期の遅延が知られている。当研究室の先行研究が、明日葉粉末の投与は暑熱ストレス依存的な性周期の遅延を改善することを示している。しかし、改善に関する作用機序は未解明な点が多い。今後、研究に邁進し、明らかにする必要がある。

F) 性ホルモンへの影響

本論文では、生殖障害に対する明日葉の改善作用を検討するために、精巣と卵巣の生殖細胞と顆粒層細胞に着眼した。生殖障害の研究は、視床下部と性ホルモンへの影響に着眼したものが多く見受けられる。夏季の家畜飼育では、雌家畜での性腺刺激ホルモン放出ホルモン及び黄体ホルモン内分泌低下が論じられている^[18]。雄マウスを用いた研究では、暑熱ストレス負荷が精巣内テストステロン濃度を減少させることを明らかにしている^[59]。これらの報告は、内分泌機能の低下が生殖器官の機能を低下させることを述べている。しかし、本研究は明日葉の投与が暑熱ストレス依存的な生殖細胞の機能低下を改善すること雌雄ともに明らかにしたことから、明日葉を投与したマウスでは暑熱ストレス依存的なホルモン異常は生じていないと推測される。本研究は、血中や各生殖器官でのホルモン濃度の検証は行っていないため、今後は各器官の性ホルモン濃度を測定する必要がある^[106]。

G) ヒトへの応用

本研究は、げっ歯類及び梅山豚を用いて明日葉粉末の投与が暑熱ストレス依存的な生殖障害を改善することを示した。しかし、本研究はヒトへの改善作用を検討できなかった。ヒト不妊の原因では体内の酸化ストレスの増加が考えられており、増加した活性酸素種が生殖機能不全を引き起こすことを報告している^[5,12]。本研究で、各生殖器官の酸化ストレスの軽減作用が明日葉の生殖機能改善効果に重要であると考えている。したがって、明日葉はヒト不妊を改善できると期待される。今後、ヒト臨床試験で不妊に悩む人々に対する明日葉の投与を行い、男女の生殖障害改善作用を検討する必要がある。

III. 食機能成分と生殖機能改善作用

本研究は、明日葉の投与が暑熱ストレス依存的な生殖障害に対する効果を検討した。その結果、明日葉は雌雄の生殖障害を改善する可能性を見出した。そこで、本研究を通して見出された2点の疑問について述べる。

[1] 他の生殖障害に与える明日葉投与の影響

本論文では、暑熱ストレス依存的な精巣機能障害や卵巣機能障害に対する明日葉の保護作用を検討し、明日葉粉末が暑熱ストレス依存的な生殖障害を改善することを明らかにした。しかし、生殖障害は暑熱ストレスのみに由来せず、加齢、肥満、喫煙や精神的なストレス等を原因とすることが報告されている^[5,12]。各種先行研究は、様々な生殖障害に対する食機能成分の改善効果を示している。赤ワイン成分であるレスベラトロールの投与は、ダイオキシン及び甲状腺異常に伴う精子機能障害を改善する^[124,125]。白茶の投与は肥満に伴う精巣機能障害を改善すると示している^[126]。抗酸化作用が知られているスルフォラファンの投与は、糖尿病由来の造精機能障害を改善すると報告されている^[127]。コエンザイム Q10 の投与は、男性不妊患者の精子機能を改善することを明らかにしている^[128,129]。これらの食機能成分は、各種ストレスによる生殖器官の酸化ストレスレベル上昇を抑制することにより、生殖機能障害を改善している。本研究は、明日葉粉末の投与が精巣、精巣上体、卵巣に酸化ストレス抵抗性を付与すると考えている。これらのことから、明日葉は、各種ストレスから生じるヒトの生殖機能障害の改善に有効であることが期待できる。

本研究は、梅山豚を用いて明日葉の夏季不妊改善作用を示した。家畜の夏季不妊はブタだけではなく、ウシやニワトリなど様々な家畜で生じている。これらの夏季不妊は体内での酸化ストレスレベルの増加が原因であり、現在の家畜への夏季不妊対策に抗酸化剤であるビタミンの投与が行われている。これは体内及び生殖器官内の酸化ストレスを軽減することを目的としている。本研究は、明日葉が生殖器官内に抗酸化作用を付与することを示してい

る。したがって、様々な家畜の夏季不妊対策に有効であると考えられる。

これらのことから、明日葉は、酸化ストレスに起因する生殖障害の改善に幅広く有効であると考えられる。

[2] 明日葉の生殖機能障害への応用性

本研究により、暑熱ストレス依存的な生殖障害に対する明日葉の改善作用が示唆された。そこで、実社会への応用性を追求した。本研究で用いた明日葉粉末は、茎からカルコン類を抽出した後に粉末化しているため、カルコン類を高濃度で含んだ粉末である。実社会への応用は、コスト面から考えて現実的ではない。ヒトでは明日葉の葉を可食部とするが、家畜では葉と茎を可食部とする。そこで低濃度カルコン量を含む明日葉の葉粉末（カルコン量 0.07%）を用いて成熟精子への保護作用を検討した（Fig. 27）。650 mg/kg 体重の投与は、暑熱ストレス依存的な Progressive Sperm の割合低下を改善した（Fig. 27）。これは 50 kg のヒトが 32 g の明日葉を食べる計算となり、明日葉一束の約 6 分の 1 量に相当する。また家畜では、600 kg の牛がエサを 30 kg 食べると仮定すると、エサに対して 0.13% 混合すればよい計算となる。したがって、本論文における明日葉の研究成果は応用へ現実性を帯びた研究であるといえる。また、今回改善した Progressive Sperm は受胎率と正の相関を示すため、受精後の胚発生にも良い効果が期待できる。さらに、造精機能や卵巣機能でも、高カルコン濃度の明日葉粉末と同様の保護効果が期待できる。

したがって、明日葉は、ヒトや家畜の不妊改善に有効であり、不妊対策の新たなアプローチといえる。また、明日葉は保有する精子や卵子の機能をストレスから保護することから、従来の不妊対策であるステップアップ法と組み合わせることで、不妊対策の向上に大きく貢献できると確信している。

結論

本研究は、暑熱ストレス依存的な造精機能、成熟精子の機能、排卵機能および受精卵の機能低下に対して、明日葉の摂取が改善効果を示すことを明らかにした。この成果は、不妊改善の新たなアプローチとして、明日葉の摂取が有効であることを示している。したがって、明日葉は我が国が抱える少子化問題の解決や家畜の食肉安定供給への貢献に寄与することが期待できる。

引用文献

- [1] E. Carlsen, A. Giwercman, N. Keiding, N. E. Skakkebaek, Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years, *BMJ*. 305 (1992) 609-13.
- [2] L. Bablok, W. Dziadeck, I. Szymusik, S. Wolczynski, R. Kurzawa, L. Pawelczyk, P. Jedrzejczak, W. Hanke, P. Kaminski, M. Wielgos, Patterns of infertility in Poland – multicenter study, *Neuroendocrinology Letters*. 32 (2011) 101-106
- [3] M. Rolland, J.L. Moal, V. Wagner, D. Royere, J.D. Mouzon, Decline in semen concentration and morphology in a sample of 26609 men close to general population between 1989 and 2005 in France, *Human Reproduction*. 28 (2013) 462-470.
- [4] S. Cabler, A. Agarwal, M. Flint, S.S. Du Plessis, Obesity: modern man’s fertility nemesis, *Asian Journal Andrology*. 12 (2018) 480-489
- [5] A. Agarwal, G. Virk, C. Ong, S.S. du Plessis, Effect of oxidative stress on male reproduction, *The World Journal of Mens Health*. 32 (2014) 1-17
- [6] K. Shiraishi, H. Takihara, H. Matsuyama, Elevated scrotal temperature, but not varicocele grade, reflects testicular oxidative stress-mediated apoptosis, *World Journal of Urology*. 28 (2010) 359-364
- [7] K. Tremellen, Oxidative stress and male infertility – a clinic perspective, *Human Reproductive Update*. 14 (2008) 243-258
- [8] C.L. Cho, S.C. Esteves, A. Agarwal, Novel insights into the pathophysiology of varicocele and its association with reactive oxygen species and sperm DNA fragmentation, *Asian Journal of Andrology*. 18 (2016) 186-193
- [9] 河合 蘭, 卵子老化の真実, 文春新書, 2013
- [10] G.F.Homan, M. Davies, R. Norman, The impact of lifestyle factors in reproductive performance in the general population and those undergoing infertility treatment: a review, *Human*

Reproduction Update. 13 (2017) 209-223.

- [11] O. Wasiu Eniola, A. Adebayo Adetola, B. Taiwo Abayomi, A review of female infertility; important etiological factors and management, *Journal of Microbiology and Biotechnonology research*. 2 (2012) 379-385
- [12] A. Agarwal, A. Aponte-Mellado, B. J. Premkumar, A. Shaman, S. Gupta, The effect of oxidative stress on female reproduction: a review, *Reproductive Biology and Endocrinology*. 10 (2012) 1-31
- [13] J. Holka-Pokorska, M. Jaremia, A. Wichniak, Clinical determinants of mental disorders occurring during the infertility treatment, *Psychiatria Polska*. 49 (2015) 965-982
- [14] K. Tremellen, D. Wilkinson, J. Savulescu, Should obese women's access to assisted fertility treatment be limited? A scientific and ethical analysis, *Australian and New Zealand Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 57 (2017) 569-574
- [15] T. Murase, N. Imaeda, H. Yamada, K. Miyazawa, Seasonal changes in semen characteristic, composition of seminal plasma and frequency of acrosome reaction induced by calcium and calcium ionophore A23187 in large white boars, *Journal of Reproduction and Development*. 53 (2007) 853-865
- [16] A. Habu, A. Ogasa, Field survey on the occurrence of reproductive disorders in boars. *Journal of the Japan Veterinary Medical Association*. 46 (1993) 376-381
- [17] E. Malama, Y. Zeron, F. Janett, M. Siuda, Z. Roth, H. Bollwein, Use of computer-assisted sperm analysis and flow cytometry to detect seasonal variations of bovine semen quality, *Theriogenology*. 87 (2017) 79-90
- [18] F. De Rensis, F. Lopez-Catius, I. Garcia-Isperto, G. Morini, R.J. Scaramuzzi, Causes of declining fertility in dairy cows during the warm season, *Theriogenology*. 91 (2017) 145-153
- [19] A. Bolarin, M. Hernandez, J. M. Vazquez, H. Rodriguez-Martinez, E. A. Martinez, J. Roca.

- Use of frozen-thawed semen aggravates the summer-autumn infertility of artificially inseminated weaned sows in the Mediterranean region, *Journal of Animal Science*. 87 (2009) 3967-3975
- [20] M.Bertoldo, P.K.Holyoake, G.Evans, C.G.Grupen, Oocytes developmental competence is reduced in sows during the seasonal infertility period, *Reproduction, Fertility and Development*. 22 (2010) 1222-1229
- [21] I. Belhadj Slimen, T. Najar, A. Ghram, M. Adbrabba, Heat stress effects on livestock: molecular, cellular and metabolic aspects, a review, *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*. 100 (2015) 401-412.
- [22] 桑原 康, 雄豚の繁殖障害-現場における症例とその対策-, *JASV 会報* 6 (2007) 12-17
- [23] M. Sakatani, Effects of summer heat stress on domestic animals, *Japanese Journal of large Animal Clinics*. 5 (2015) 238-246
- [24] M. Nichi, P. E. J. Bols, R.M. Züge, V. H. Barnabe, I. G. F. Goovaerts, R. C. Barnabe, C. N. M. Cortaba, Season variation in semen quality in Bos indicus and Bos taurus Bulls raised under tropical condition, *Theriogenology*. 66 (2006) 822-828
- [25] KJ. Kim, KY. Yoon, HD. Hong, BY. Lee, *Scisandra chinensis* prevents hepatic lipid peroxidation and oxidative stress in rats subjected to heat environmental stress, *Phytotherapy Research*. 26 (2012) 1674-1680.
- [26] 西田 綾子, 暑熱ストレス依存的な排卵数減少に対する茶カテキンの保護作用, 筑波大学大学院 生命環境科学研究科 生物資源科学専攻 修士号論文, 2008, 1-41
- [27] K. Ohara, K. Kusano, S. Kitao, T. Yanai, R. Takata, O. Kanauchi, ϵ -viniferin, a-resveratrol dimer, prevents diet-induced obesity in mice, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 468 (2015) 877-882
- [28] L. Rivera, R. Morón, A. Zarzuelo, M. Galisteo, Long-term resveratrol administration reduces

- metabolic disturbance and lowers blood pressure in obese Zucker rats. *Biochemical Pharmacology*. 77 (2009) 1053-1063.
- [29] SJ. Thandapilly, P. Wojciechowski, J. Behbahani, XL. Louis, L. Yu, D. Juric, MA. Kopilas, HD. Anderson, T. Netticadan, Resveratrol prevents the development of pathological cardiac hypertrophy and contractile dysfunction in the SHR without lowering blood pressure. *American Journal of Hypertension*. 23 (2010) 192-196.
- [30] M. González-Santiago, E. Martín-Bautisa, JJ. Carrero, J. Fonollá, L. Baró, MV. Bartolomé, P. Gil-Loyzaga, E. López-Huertas, One-month administration of hydroxytyrosol, a phenolic antioxidant present in olive oil, to hyperlipemic rabbits improves blood lipid profile, antioxidant status and reduces atherosclerosis development, *Atherosclerosis*. 188 (2006) 35-42
- [31] T. Wang, Y. Takikawa, T. Satoh, Y. Yoshioka, K. Kosaka, Y. Tatemichi, K. Suzuki. Carnosic acid prevents obesity and hepatic steatosis in ob/ob mice. *Hepatology Research*. 41 (2011) 87-92
- [32] M. Ciftci, O. N. Ertas, T. Guler. Effects of vitamin E and vitamin C dietary supplementation on egg production and egg quality of laying hens exposed to a chronic heat stress, *Revue de Medecine Veterinaire*. 156 (2005) 107-111
- [33] 若林 由季, オリーブ葉化合物による夏季不妊の改善効果とそのメカニズム, 筑波大学大学院 生命環境科学研究科 生物資源科学専攻 修士号論文, 2009, 1-39
- [34] 北崎 志帆, 卵巣におけるオリーブ葉成分の機能解析, 筑波大学大学院 生命環境科学研究科 生物資源科学専攻 修士号論文, 2010, 1-42
- [35] 石崎 華, 暑熱ストレス依存的な雄の生殖機能障害に対するオリーブ成分の保護効果, 筑波大学大学院 生命環境科学研究科 生物資源科学専攻 修士号論文, 2018, 1-36
- [36] 馬場きみ江, 源生林あしたば, チクマ出版社, 2001
- [37] T. Akihisa, H. Tokuda, M. Ukiya, M. Iizuka, S. Schneider, K. Ogasawara, T. Mukainaka, K.

- Iwatsuki, T. Suzuki, H. Nishino, Chalcones, coumarins, and flavanones from *Angelica keiskei* and their chemopreventive effects. *Cancer Letters*. 201 (2003) 133-137
- [38] T. Enoki, H. Ohnogi, K. Nagamine, Y. Kudo, K. Sugiyama, M. Tanabe, E. Kobayashi, H. Sagawa, I. Kato, Antidiabetic activities of chalcones isolated from a Japanese Herb, *Angelica keiskei*. *Journal of Agricultural Food Chemistry*. 55 (2007) 6013-6017
- [39] Y. Kimura, New anticancer agents: in vitro and in vivo evaluation of the antitumor and antimetastatic actions of various compounds isolated from medicinal plants, *In Vivo*. 19 (2005) 37-60.
- [40] Y. Kimura, M. Taniguchi, K. Baba, Antitumor and antimetastatic activities of 4-hydroxyderricin isolated from *Angelica keiskei* Roots. *Planta Media*. 70 (2004) 211-219.
- [41] K. Kawabata, K. Sawada, K. Ikeda, I. Fukuda, K. Kawasaki, N. Yamamoto, H. Ashida, Prenylated chalcones 4-hydroxyderricin and xanthoangelol stimulate glucose uptake in skeletal muscle cells by inducing GLUT4 translocation, *Molecular. Nutrition and Food Research*. 55 (2011) 467-475.
- [42] M. Matsuura, Y. Kimura, K. Nakata, K. Baba, H. Okuda, Artery relaxation by chalcones isolated from the roots of *Angelica keiskei*. *Planta Media*. 67 (2001) 230-235
- [43] T. Hisatome, Y. Wachi, Y. Yamamoto, A. Ebihara, A. Ishiyama, H. Miyazaki. Promotion of endothelial wound healing by the chalcones 4-hydroxyderricin and xanthoangelol, and the molecular mechanism of this effect, *Journal of Development in Sustainable Agriculture*. 12 (2017) 25-33
- [44] H. Ogawa, M. Ohno, K. Baba, Hypotensive and lipid regulatory actions of 4-hydroxyderricin, a chalcone from *Angelica keiskei*, in stroke-prone spontaneously hypertensive rats, *Clinical and Experimental Pharmacology and Physioplogy*. 32 (2005) 19-23
- [45] S. Murakami, H. Kijima, Y. Isobe, M. Muramatsu, H. Aihara, S. Otomo, K. Baba, M. Kozawa,

- Inhibition of gastric H⁺, K(+) -ATPase by chalcone derivatives, xanthoangelol and 4-hydroxyderricin, from *Angelica keiskei* Koidzumi, *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 42 (1990) 723-726
- [46] Y. Inamori, K. Baba, H. Tsujibo, M. Taniguchi, K. Nakata, M. Kozawa, Antibacterial activity of two chalcones, xanthoangelol and 4-hydroxyderricin, isolated from the root of *Angelica keiskei* KOIDZUMI, *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 39 (1991) 1604-1609
- [47] ET. Arung, S. Furuta, K. Sugamoto, K. Shimizu, H. Ishikawa, Y. Matsushita, R. Kondo, The inhibitory effects of representative chalcones contained in *Angelica keiskei* on melanin biosynthesis in B16 melanoma cells, *Natural Product Communications*. 7 (2012) 1007-1010
- [48] JH. Kin, YK. Son, GH Kim, KH Hwang, Xanthoangelol and 4-hydroxyderricin are the major active principles of the inhibitory activities against monoamine oxidases on *Angelica keiskei* K, *Biomolecules and Therapeutics*. 21 (2013) 234-240
- [49] Y. Li, T. Goto, R. Ikutani, S. Lin, N. Takahashi, H. Takahashi, HF. Jheng, R. Yu, M. Taniguchi, K. Baba, S. Murakami, T. Kawada, Xanthoangelol and 4-Hydroxyderricin suppress obesity-induced inflammatory responses, *Obesity Biology and Integrated Physiology*. 24 (2016) 2351-2360
- [50] T. Nakamura, T. Tokushima, K. Kawabata, N. Yamamoto, M. Miyamoto, H. Ashida, Absorption and metabolism of 4-hydroxyderricin and xanthoangelol after oral administration of *Angelica keiskei* (Ashitaba) extract in mice, *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 521 (2012) 71-76
- [51] 大竹 佳江, 卵巣におけるアシタバ成分の機能解析, 筑波大学大学院 生命環境科学研究科 生物資源科学専攻 修士号論文, 2012, 1-50
- [52] 新井 至, 卵巣におけるアシタバ葉成分キサントアンゲロールの機能解析, 筑波大学大学院 生命環境科学研究科 生物資源科学専攻 修士号論文, 2013, 1-36

- [53] 澤田 結衣, 源生林あしたば成分の暑熱ストレスに対する卵巣保護効果とそのメカニズム, 筑波大学大学院 生命環境科学研究科 生物資源科学専攻 修士号論文, 2014, 1-48
- [54] 阿部 友紀子, 暑熱ストレス依存的な精巣障害に対する源生林あしたば成分の保護効果, 筑波大学大学院 生命環境科学研究科 生物資源科学専攻 修士号論文, 2015, 1-42
- [55] V. Trudeau, L. M. Sanford, Effect of season and social environment on testis size and semen quality of the adult landrace boar, *Journal of Animal Science*. 63 (1986) 1211-1219
- [56] A.W. Zorgmittoi, J.M. Macled, Studies in temperature, human semen quality, and varicocele, *Fertility and Sterility*. 24 (1973) 854-863
- [57] N.H. I Hjollund, L. Storgaard, E. Ernst, J.P. Bonde, J. Olsen, Impact of diurnal scrotal temperature on semen quality, *Reproductive Toxicology*. 16 (2002) 215-221
- [58] M. Rao, W. Xia, J. Yang, L.X. Hu, S.F. Hu, H. Lei, Y. Q. Wu, C.H. Zhu, Transient scrotal hyperthermia affects human sperm DNA integrity, sperm apoptosis, and sperm protein expression. *Andrology*. 4 (2016) 1054-1063
- [59] Y.H. Lue, A. P. S. Hikim, R. S. Swerdloff, P. im, K. S. Taing, T. Bui, A. Leung, C. Wang, Single exposure to heat induces stage-specific germ cell apoptosis in rats: role of intratesticular testosterone on stage specificity, *Endocrinology*. 140 (1999) 1709-1717
- [60] L. Luo, Y. Li, Y. Yang, Y. He, Y. Wang, Z. Xu, Y. Zhang, Multinucleated cells are involved in normal development and apoptosis in mouse testis, *Molecular Medicine Reports*. 8 (2013) 865-870
- [61] M. Perez-Crespo, B. Pintado, A. Gutierrez-adan, Scrotal heat stress effects on sperm viability, sperm DNA integrity, and the offspring sex ratio in mice, *Molecular Reproduction and Development*. 75 (2008) 40-47
- [62] S. Banks, S.A. King, D.S. Irvine, P.T.K. Saunders. Impact of mild scrotal heat stress on DNA

- integrity in murine spermatozoa, *Reproduction*. 129 (2005) 505-514
- [63] C. Paul, S. Teng, P.T.K. Saunders, A single, mild, transient scrotal heat stress causes hypoxia and oxidative stress in mouse testis, which induces germ cell death, *Biology of Reproduction*. 80 (2009) 913-919
- [64] Y. Yin, K.L. Hawkins, W.C. Dewolf, A. Morgentaler, Heat stress causes testicular germ cell apoptosis in adult mice, *Journal of Andrology*. 18 (1997) 159-165
- [65] P. Jannes, C. Spiessens, I. Van der Auwera, T.D. Hooghe, G. Verhoeven, D. Vanderschueren, Male subfertility induced by acute scrotal heating affects embryo quality in normal female mice, *Human Reproduction*. 13 (1998) 372-375
- [66] K. M. Cammack, H. Mesa, W. R. Lamberson, Genetic variation in fertility of heat-stressed male mice, *Theriogenology*. 66 (2006) 2195-2201
- [67] Y. Li, Y. Cao, F. Wang, C.M. Li, Scrotal heat induced the Nrf2-driven antioxidant response during oxidative stress and apoptosis in the mouse testis, *Acta Histochemica*. 116 (2014) 883-890
- [68] Y. Li, Y. Cao, F. Wang, Y. Zhang, C. Li, Tert-butylhydroquinone attenuated scrotal heat-induced damage by regulating Nrf2-antioxidant system in the mouse testis, *General and Comparative Endocrinology*. 208 (2014) 12-20
- [69] Y. Cao, Y.S. Li, Z.J. Li, F. Wang, C.M. Li, Dietary zinc may attenuate heat-induced testicular oxidative stress in mice via up-regulation of Cu-Zn SOD, *Genetics and Molecular Research*. 14 (2015) 16616-16626
- [70] M. Garratt, R. Bathgate, S. P. Graff, R. C. Brooks, Copper-zinc superoxide dismutase deficiency impairs sperm motility and in vivo fertility, *Reproduction*. 146 (2013) 297-304
- [71] B. N. Nakamura, G. Lawson, J. Y. Chan, J. Banuelos, M.M. Cortes, Y.D. Hoang, L. Ortiz, B. A. Rau, U. Luderer, Knockout of the transcription factor NRF2 disrupts spermatogenesis in an age-dependent manner, *Free Radical Biology and Medicine*. 49 (2010) 1368-1379

- [72] S. Halder, M. Sarkar, S. Dey, S. K. Bhunia, A. R. Koley, B. Girl., Protective effects of red grape (*Vitis vinifera*) juice through restoration of antioxidant defense, endocrine swing and Hsf1, Hsp72 levels in heat stress induced testicular dysregulation of Wister rat, *Journal of Thermal Biology*. 71 (2018) 32-40
- [73] L. Li, Z. Y. Han, C. M. Li, X. Q. Jiang, G. L. Wang, Upregulation of heat shock protein 32 in Sertoli cells alleviates the impairments caused by heat shock-induced apoptosis in mouse testis, *Cell Stress and Chaperones*. 18 (2013) 333-351
- [74] L. Li, C. M. Li, J. Wu, S. Huang, G. L. Wang, Heat shock protein 32/heme oxygenase-1 protects mouse Sertoli cells from hyperthermia-induced apoptosis by CO activation of sGC signaling pathways, *Cell Biology International*. 38 (2014) 64-71
- [75] Y.S. Kil, S.K. Choi, Y.S. Lee, M. Jafari, E.K. Seo, chalcones from *Angelika keiskei*: Evaluation of their heat shock protein inducing activities, *Journal of Natural Products*. 78 (2015) 2481-2487
- [76] 塩田 正之, 田中 昌子, HSP70 ファミリーの新たな機能, *Folia Pharmacologica Japonica*. 143 (2014) 310-312
- [77] M. Asai, D. Kawashima, K. Ohtsuka, Prevention and amelioration of gastric mucosal injury by molecular chaperones. *生物機能開発研究所紀要*. 7 (2007) 109-117
- [78] D. Yan, K. Sato, Y. Ohmi, N. Fujie, K. Ohtsuka. Paeoniflorin, a novel heat shock protein-inducing compound, *Cell Stress & Chaperones*. 9 (2004) 378-389
- [79] N. D. Trinklein, W. C. Chen, R. E. Kingston, R. M. Myers, Transcriptional regulation and binding of heat shock factor 1 and heat shock factor 2 to 32 human heat shock genes during thermal stress and differentiation, *Cell Stress and Chaperone*. 9 (2004) 21-28
- [80] B. Kim, K. Park, K. Rhee, Heat stress response of male germ cells, *Cellular and Molecular Life Sciences*. 70 (2013) 2623-2636

- [81] Z.L. Ji, Y.G. Duan, L.S. Mou, J.P. Allam, G. Hhaidl, Z.M. Cai, Association of heat shock proteins, heat shock factors and male infertility, *Asian Pacific Journal of Reproduction*. 1 (2012) 76-84
- [82] W. Widlak, N. Vydra, E. Malusecka, V. Dudaladava, B. Winiarski, D. Scieglinska, P. Widlak, Heat shock transcription factor 1 down-regulates spermatocyte-specific 70 kDa heat shock protein expression prior to the induction of apoptosis in mouse testis, *Genes to Cells*. 12 (2007) 487-499
- [83] D.J. Dix, J.W. Allen, B.W. Collins, C. Mori, N. Nakamura, P. Poorman-Allen, E.H. Goulding, E.M. Eddy. Targeted gene disruption of Hsp70-2 results in failed meiosis, germ cell apoptosis, and male infertility, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 93 (1996) 3264-3268
- [84] W. Edelmann, P.E. Cohen, B. Kneitz, N. Winand, M. Lia, J. Heyer, R. Kolodner, J.W. Polland, R. Kucherlapati, Mammalian Muts homologue 5 is required for chromosome pairing in meiosis, *Nature Genetics*. 21 (1999) 123-127
- [85] K. Terada, K. Yomogida, T. Imai, H. Kiyonari, N. Takeda, T. kadomatsu, M. Yano, S. Aizawa, M. Mori, A type I DnaJ homolog, DjA1, regulates androgen receptor signaling and spermatogenesis, *The EMBO Journal*. 24 (2005) 611-622
- [86] J.Z. Wu, C.C. Cheng, L. L. Shen, Z. K. Wang, S.B. Wu, W.L. Li, S.H. Chen, R.P. Zhou, P.H. Qiu, Synthetic chalcones with potent antioxidant ability on H₂O₂-induced apoptosis in PC12 cells, *International Journal Molecular Sciences*. 15 (2014) 18525-18539
- [87] T.O. Ajiboye, M.T. Yakubu, A.T. Oladiji. Electrophilic and reactive oxygen species detoxification potentials of chalcone dimers is mediated by redox transcription factor Nrf-2, *Journal Biochemical Molecular Toxicology*. 28 (2014) 11-22
- [88] N. Argov-Argaman, K. Mahgrefthe, Y. Zeron, Z. Roth, Season-induced variation in lipid composition is associated with semen quality in Holstein bulls, *Reproduction*. 145 (2013) 479-

- [89] C. Paul, A.A. Murray, N. Spears, P.T.K. Saunders, A single, mild, transient scrotal heat stress causes DNA damage, subfertility and impairs formation of blastocysts in mice, *Reproduction*. 136 (2008) 73-84
- [90] P. Villani, P. Eleuteri, M. G. Grollino, M. Rescia, P. Altavista, M. Spano, F. Pacchierotti, E. Cordelli, Sperm DNA fragmentation induced by DNase I and hydrogen peroxide: an *in vitro* comparative study among different mammalian species, *Reproduction*. 140 (2010) 445-452
- [91] S. S. du Plessis, D. A. Mcallister, A. Luu, J. Savia, A. Agarwal, F. Lampiao, Effects of H₂O₂ exposure on human sperm motility parameters, reactive oxygen species levels and nitric oxide levels, *Andrologia*. 42 (2010) 206-210
- [92] Q. L. Zhao, Y. Fujiwara, T. Kondo, Mechanism of cell death induction by nitroxide and hyperthermia, *Free Radical Biology and Medicine*. 40 (2006) 1131-1143
- [93] Y. Gong, H. Guo, Z. Zhang, H. Zhou, R. Zhao, B. He, Heat stress reduces sperm motility via activation of glycogen synthase kinase-3 α and inhibition of mitochondrial protein import, *Frontiers in Pathology*. 8 (2017) 718
- [94] H. Guo, Y. Gong, B. He, R. Zhao, Relationship between mitochondrial DNA content, mitochondrial activity, and boar sperm motility, *Theriogenology*. 87 (2017) 276-283
- [95] F. Odet, S. Gabel, R. E. London, E. Goldberg, E. M. Eddy, Glycolysis and mitochondrial respiration in mouse LDHC-Null sperm, *Biology of Reproduction*. 88 (2013) 1-7
- [96] H. Katayose, T. Takayama, R. Suganuma, S. Hayashi, K. Yanagida, A. Sato, Relationship between assessment of sperm nuclear qualities and embryo development *in Vitro*, *Journal of Mammalian Ova Research*. 24 (2007) 153-160
- [97] M. K. Samplaski, A. Dimitromanolakis, K. C. Lo, E. D. Grober, B. Mullen, A. Garbens, K. A. Jarvi, The relationship between sperm viability and DNA fragmentation rates, *Reproduction*

- Biology and Endocrinology*. 13 (2015) 42
- [98] G. A. Cornwall, New insights into epididymal biology and function, *Human Reproduction Update*, 15 (2009) 213-227
- [99] J. L. Dacheux, F. Dacheux, New insights into epididymal function in relation to sperm maturation, *Reproduction*. 147 (2014) R27-R42
- [100] M. J. Freitas, S. Vijayaraghaven, M. Fardilha, Signaling mechanisms in mammalian sperm motility, *Biology of Reproduction*, 96 (2017) 2-12
- [101] T. R. Dias, M. G. Alves, L. Rato, S. Casal, B. M. Silva, P. F. Oliveira, White tea intake prevents prediabetes-induced metabolic dysfunction in testis and epididymis preserving sperm quality, *Journal of Nutritional Biochemistry*, 37 (2016) 83-93
- [102] G. A. Cornwall, J. T. Vreeburg, M. K. Holland, M. C. Orgebin-Crist, Interaction of labeled epididymal secretory proteins with spermatozoa after injection of ^{35}S -Melatonin in the mouse, *Biology of Reproduction*, 43 (1990) 121-129
- [103] V. Barbato, R. Talevi, S. Braun, A. Merallo, S. Sudhakaran, S. Longobardi, R. Gualtieri, Supplementation of sperm media with zinc, D-aspartate and co-enzyme Q10 protects bull sperm against exogenous oxidative stress and improves their ability to support embryo development, *Zygote*, 25 (2017) 168-175
- [104] Y. Sakamoto, S. Miho, Association between sperm motility analyzed by sperm quality analyzer-V (SQA-V) and pregnancy rate of artificial insemination with husband's sperm, *現代産婦人科*, 59 (2010) 251-257
- [105] H. L. W. J. Broekhuijsen, E. Sostarie, H. Feistima, B. M. Gadella, Application of computer-assisted semen analysis to explain variations in pig fertility, *American Society of Animal Science*. 90 (2012) 779-789
- [106] T. Shimizu, I. Ohshima, M. Ozawa, S. Takahashi, A. Tajima, M. Shiota, H. Miyazaki, Y.

- Kanai, Heat stress diminishes gonadotropin receptor expression and enhances susceptibility to apoptosis of rat granulosa cells, *Reproduction*, 129 (2005) 463-472
- [107] T. Shimizu, I. Ohshima, Y. Kanai, Effects of heat stress on follicular development in PMSG-treated immature rats, *Animal Science Journal*, 71 (2007) 32-37
- [108] M. Shiota, N. Sugai, M. Tammura, R. Ymaguchi, N. Fukushima, T. Miyano, H. Miyazaki. Correlation of mitogen-activated protein kinase activities with cell survival and apoptosis in porcine granulosa cells, *Zoological Science*. 20 (2013) 193-201.
- [109] M. Shen, F. Lin, J. Zhang, Y. Tang, W. K. Chen, H. Liu, Involvement of the Up-regulated FoxO1 expression in follicular granulosa cell apoptosis induced by oxidative stress, *The Journal of Biological Chemistry*, 287 (2012) 25727-25740
- [110] J. Q. Zhang, M. Shen, C. C. Zhu, F. X. Yu, Z. Q. Liu, N. Ally, S. C. Sun, K. Li, H. L. Liu, 3-Nitropropionic acid induces ovarian oxidative stress and impairs follicle in mouse, *PLOS ONE*. 9 (2014) e86589
- [111] M. Harada, K. Kishimoto, R. Hagiwara, Y. Nagashima, K. Kurisu, Y. Kawaguchi, Infertility observed in female rats treated with N-acetyl-L-cysteine: Histopathological examination of ovarian follicles and recovery of fertility, *Congenital Anomalies*. 43 (2003) 168-176
- [112] W. Gao, J. X. Liang, C. Ma, J. Y. Dong, Q. Yan, The protective effect of N-acetylcysteine on ionizing radiation induced ovarian failure and loss of ovarian reserve in female mouse, *Biomed Research International*. (2017) 4176170
- [113] J. K. Bhardwaj, P. Saraf, N-Acetyl cysteine-mediated effective attenuation of methoxychlor-induced granulosa cell apoptosis by counteracting reactive oxygen species generation in caprine ovary. *Environmental Toxicology*. 32 (2015) 156-166
- [114] Y. Aizawa, M. segino, A. Sato, M. Okamoto, M. Murase, H. Sakakibara, M. Ishikawa, H. Yoshida, F. Hirahara, Evaluation of embryo quality for blastocyst transfer with the graduated

- embryo score (GES), *Journal of Mammalian Ova Research*. 28 (2011) 83-88
- [115] S. Yu, H. Long, Q. F. Zhang, Z. G. Yan, H. X. Liang, W. R. Chai, Z. Yan, Y. P. Kuang, C. Qi, Protective effect of quercetin on the development of preimplantation mouse embryo against hydrogen peroxide-induced oxidative injury, *PLOS ONE*, e89520
- [116] Y. J. Niu, W. Zhou, J. Guo, Z. W. Nie, K. T. Shin, N. H. Kim, W. F. Lv, X. S. Cui, C-Phycocyanin protects against mitochondrial dysfunction and oxidative stress in parthenogenetic porcine embryos, *Scientific Reports*. 7 (2017) 16992
- [117] H. Tamura, A. Takasaki, I. Miwa, K. Taniguchi, R. Maekawa, H. Asada, T. Taketani, A. Matsuoka, Y. Yamagata, K. Shimamura, H. Morioka, H. Ishikawa, R. J. Reiter, N. Sugino, Oxidative stress impairs oocyte quality and melatonin protects oocytes from free radical damage and improves fertilization rate, *Journal of Pineal Research*, 44 (2008) 280-287
- [118] P. Thuwanut, N. Arya, P. Comizzoli, K. Chatdarong, Effect of extracellular adenosine 5'-triphosphate on cryopreserved epididymal cat sperm intracellular ATP concentration, sperm quality, and in vitro fertilizing ability, *Theriogenology*. 84 (2015) 702-709
- [119] M. Sakatani, K. Yamanaka, A. Z. Balboula, N. Takenouchi, M. Takahashi, Heat stress during in vitro fertilization decreases fertilization success by disrupting anti-polyspermy systems of the oocytes, *Molecular Reproduction and Development*. 82 (2015) 36-47
- [120] A. V. Sirotkin, M. Bauer, Heat shock proteins in porcine ovary: synthase, accumulation and regulation by stress and hormones, *Cell Stress and Chaperones*. 16 (2011) 379-387
- [121] J. Wang, X. Qian, Q. Gao, C. Lv, J. Xu, H. Jin, H. Zhu, Quercetin increases the antioxidant capacity of the ovary in menopausal rats and in ovarian granulosa cell culture in vitro, *Journal of Ovarian Research*. 11 (2018) 51
- [122] A. P. Sobinoff, E. L. Beckett, A. G. Jarnicki, J. M. Sutherland, A. McCluskey, P. M. Hansbro, E. A. McLaughlin, Scrambled and fried: cigarette smoke exposure causes antral follicle

- destruction and oocyte dysfunction through oxidative stress, *Toxicology and Applied Pharmacology*, 271 (2013) 156-167
- [123] T. B. Smith, V. Cortez-Retamozo, L. S. Grigoryeva, E. Hill, M. J. Pittet, N. Da Silva, Mononuclear phagocytes rapidly clear apoptotic epithelial cells in the proximal epididymis, *Andrology*, 2 (2014) 755-762
- [124] G. M. Ourique, I. A. Finamor, E. M. H. Saccol, A. P. K. Riffel, T. S. Pes, K. Gutierrez, P. B. D. Goncalves, B. Baldisserotto, M. A. Pavanato, Resveratrol improves sperm motility, prevents lipid peroxidation and enhances antioxidant defences in the testis of hyperthyroid rats, *Reproductive Toxicology*, 37 (2013) 31-39
- [125] A. Revel, H. Raanani, E. Younglai, J. Xu, R. Han, J. F. Savouret, R. F. Casper, Resveratrol, a natural aryl hydrocarbon receptor antagonist, protects sperm from DNA damage and apoptosis caused by benzo (a)pyrene, *Reproductive Toxicology*. 15 (2001) 479-486
- [126] P. F. Oliveira, G. D. Tomas, T. R. Dias, A. D. Martins, L. Rato, M. G. Alves, B. M. Silva, White tea consumption restores sperm quality in prediabetic rats preventing testicular oxidative damage, *Reproductive Bio Medicine Online*. 31 (2015) 544-556
- [127] Y. Wang, Z. Zhang, W. Guo, W. Sun, X. Miao, H. Wu, X. Cong, K. A. Wintergerst, X. Kong, L. Cai, Sulforaphane reduction of testicular apoptotic cell death in diabetic mice is associated with the upregulation with Nrf2 expression and function, *American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism*. 307 (2014) E14-E23
- [128] Y. Kobori, S. Ota, R. Sato, H. Yagi, S. Soh, G. Arai, H. Okada, Antioxidant cosupplementation therapy with vitamin C, vitamin E, and coenzyme Q10 in patients with oligoasthenozoospermia, *Archivio Italiano di Urologia e Andrologia*. 86 (2014) 1
- [129] M. R. Safarinejad, S. Safarinejad, N. Shafiei, Effects of the reduced form of coenzyme Q₁₀ (Ubiquinol) on semen parameters in men with idiopathic infertility: a double-blind, placebo

controlled, randomized study, *The Journal of Urology*, 188 (2012) 526-531

謝辞

本研究を終えるにあたり，過分のご指導ならびご援助を賜りました，

筑波大学生命環境系 宮崎均 教授

に厚く御礼申し上げます。

また，ご多忙の中，審査を引き受けて頂いた

田島淳史 教授，北村豊 教授，吉田滋樹 准教授

に貴重なご指導とご助言を賜りましたこと，心より感謝いたします。

ご多忙の中，夏季不妊の研究にご協力いただいた

株式会社塚原牧場 塚原昇 代表取締役，社員の皆様

に梅山豚のサンプルを提供して頂いたこと，深く御礼申し上げます，

ともに研究活動を行い，ご助言及び議論して頂きました

岡田千枝子 事務員，飯塚真由美 事務員，河村芳恵 研究員，Zouda Zrelli 博士，

洪銘蔚，伍哲緯，新井至，山本雄理，

石山あやね，海老原葵，澤田結衣，

池谷翼，阿部友紀子，高橋美妃，最勝寺秀吉

川上熙世，羽田野真代，久留塚丸，周怡君，

長真由子，鈴木志織，鈴木望美，渡邊千賀子，

石崎華，椎名智弘，安井貴之，吉田一期，

須藤華織，張暢，白川泰平，秋田真里，大葉棕介，吉原瑞樹，尚瑞，李珍珍

遠藤朱莉，川添大，柴野果歩，中原優一

に心から厚く御礼申し上げます。

最後に，研究生生活を支え，温かく励ましてくれた家族，友人に心から感謝いたします。