

ビタミン栄養と卵子の質に関する研究

Studies on relationship between
vitamin nutrition and oocyte quality

辻 愛

2016

Ai Tsuji

目次

1. 序論	- 3 -
2. 実験方法	- 9 -
3. 結果	- 26 -
4. 考察	- 40 -
5. まとめ	- 46 -
6. 引用文献	- 47 -
7. 発表論文	- 52 -
8. 謝辞	- 53 -

略語

- ACMS (α -amino- β -carboxymuconate- ϵ -semialdehyde) :
 α -アミノ- β -カルボキシムコネート- ϵ -セミアルデヒド
- ACMSD (amino carboxymuconate semialdehyde decarboxylase) :
アミノカルボキシムコネートセミアルデヒド脱炭酸酵素
- AMS (α -aminomuconate- ϵ -semialdehyde) : α -アミノムコネート- ϵ -セミアルデヒド
- AnA (anthranilic acid) : アンスラニル酸
- CG (chorionic gonadotropin) : 胎盤性性腺刺激ホルモン
- DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) : 4',6-ジアミジノ-2-フェニルインドール
- FSH (follicle stimulating hormone) : 卵胞刺激ホルモン
- GV (germinal vehicle) : 卵核胞
- GVBD (germinal vehicle brake down) : 卵核胞崩壊
- 3-HIA (3-hydroxyisovaleric acid) : 3-ヒドロキシイソ吉草酸
- 3-HK (3-hydroxykynurenine) : 3-ヒドロキシキヌレニン
- 3-HA (3-hydroxyanthranilic acid) : 3-ヒドロキシアンスラニル酸
- HPLC (high-performance liquid chromatography) : 高速液体クロマトグラフィー
- KA (kynurenine acid) : キヌレン酸
- Kynu (kynureninase) : キヌレニナーゼ
- LH (luteinizing hormone) : 黄体形成ホルモン
- 3-HADO (3-hydroxyanthranilate 3,4-dioxygenase) :
3-ヒドロキシアンスラニル酸オキシゲナーゼ
- MI (meiosis I) : 減数分裂第一分裂
- MII (meiosis II) : 減数分裂第二分裂
- Nam (nicotinamide) : ニコチンアミド
- MNA (N^1 -methylnicotinamide) : N^1 -メチルニコチンアミド
- NMN (nicotinamide mononucleotide) : ニコチンアミドモノヌクレオチド
- 2-NPH (2-nitrophenylhydrazide) 2-ニトロフェニルヒドラジン
- PDH (pyruvate dehydrogenase) : ピルビン酸デヒドロゲナーゼ
- PMSG (pregnant mare serum gonadotropin) : 妊馬血清ゴナドトロピン
- PGC (primordial germ cell) : 始原生殖細胞
- 2-Py (N^1 -methyl-2-pyridone-5-carboxamide) : N^1 -メチル-2-ピリドン-5-カルボキシアミド
- 4-Py (N^1 -methyl-4-pyridone-3-carboxamide) : N^1 -メチル-4-ピリドン-3-カルボキシアミド
- QA (quiniolinic acid) : キノリン酸
- TDO (tryptophan 2,3-dioxygenase) : トリプトファン 2,3-オキシゲナーゼ
- Trp (L-tryptophan) : L-トリプトファン
- WSC (1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide) :
1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド
- XA (xanthurenic acid) : キサンツレン酸

1. 序論

1-1. 日本の妊婦の現状と課題

女性の社会進出が進むにつれ、晩婚化が進み、それに伴って高齢出産率が増加した。世界保健機構（WHO）は高齢出産を「35歳以上の初産，2人目以降であれば40歳以上の出産」と定義している。WHOの定義に基づいた場合，厚生労働省の人口動態調査から日本の高齢出産率は5.93%（2004年）から13.1%（2014年）となり，10年間で約2倍に増加した。高齢出産率は今後も増加することが予想される。

高齢出産にはリスクが伴う。流産率¹⁾，染色体異常児²⁾は母体の加齢とともに増加する。25歳母親の流産の危険寄与率を1とした場合，35～39歳で1.30倍，40～44歳で2.63倍，45歳以上にいたっては8.80倍であったという報告がある¹⁾。また染色体異常症であるダウン症候群の発症率が，25歳母親では約1/1400，35歳では1/350，40歳では1/70という報告²⁾があり，加齢によってその確率は高くなる³⁾。これら的高齢出産によるリスクの増加と卵子（卵母細胞）には密接な関係がある。

1-2. 卵母細胞の発生

卵母細胞のはじまりは，胎児期の初期にまでさかのぼる。卵母細胞は原始生殖細胞（PGC）から分化する。原始生殖細胞は原始外胚葉（エピブラスト）に由来する。その過程をマウスの受精卵を例に説明した。

受精卵からエピブラストができる過程を図1-1に示した。受精卵は受精20時間後には2細胞となり，ついで4細胞，8細胞，桑実胚を経て，受精から4日後に透明帯を脱ぎ捨て胚盤胞となる。この胚盤胞は栄養外胚葉，原始内胚葉，エピブラストに分化する。エピブラストは多分化能組織で卵母細胞や精子などの生殖細胞以外に小腸，肺，皮膚，神経系などにも分化する。

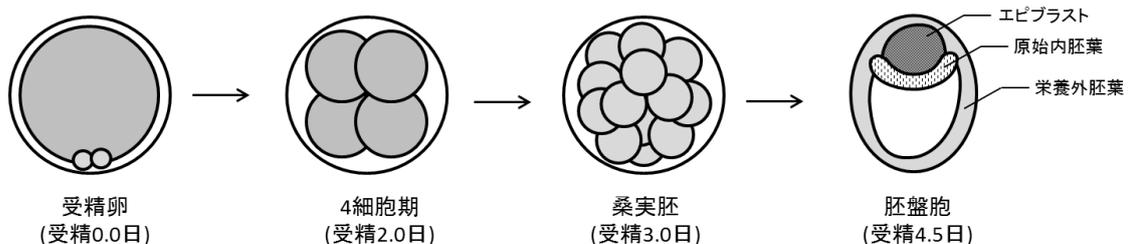


図 1-1. マウス受精卵の発生の様子

受精卵の大きい灰色の円は受精卵。小さい2つの円は極体を示している。その周りの白い部分は透明帯を表している。

PGCは受精7.0日目のエピブラストに認められる。マウスでは受精13日頃にはPGCは25000個までに増殖する。受精18.5日頃に一部の始原生殖細胞の減数分裂第一分裂が始まり，これを卵母細胞と呼ぶ。この分裂は減数分裂第一分裂前期で停止する。この時，卵母細胞は半数体の4倍量のDNAを持つ。減数分裂第一分裂前期で停止を維持したまま胎児は出生され，仔が性成熟するまで，停止状態を維持している。この時の卵母細胞を顕微鏡で観察すると，卵母細胞の中に球体の物体が確認できる。これは卵核胞（GV（ジーブイ）：germinal vesicle）と呼ばれ

る核の状態、この時期を卵核胞期（GV期）と呼ぶ。GV期は受精能力を持たない未成熟卵子である。PGCは胎児期にのみ増殖するため、生後に新たに卵母細胞ができることはない。出生後は卵巣の卵母細胞数は減少の一途をたどる⁴⁾。

1-3. 排卵と卵成熟

排卵にいたるには卵胞の成長が必要である。卵胞成熟から排卵までの過程を図1-2に示した。仔が性成熟すると、脳下垂体前葉から卵胞刺激ホルモン（FSH）は原始卵胞（卵母細胞とその周りの顆粒細胞の複合体）を成長させ、胞状卵胞を経て排卵直前のグラーフ卵胞にまで成長する。卵胞から分泌されるエストロゲンに反応して黄体形成ホルモン（LH）が脳下垂体前葉から大量に分泌され、一過的に血中LH濃度が上昇する。これをLHサージという。LHサージを受けて卵母細胞の減数分裂が再開され、減数分裂の途中でグラーフ卵胞から排卵される。排卵される卵母細胞はヒトでは1個、マウスでは20個前後である。

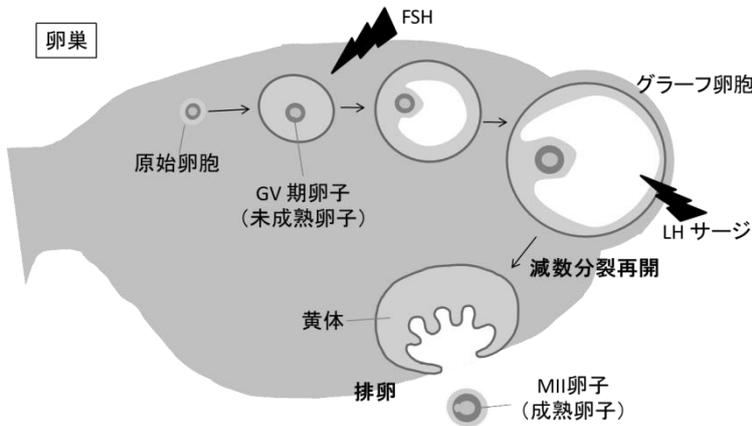


図 1-2. 卵胞の成長と排卵

原始卵胞は FSH 刺激によってグラーフ卵胞へと成長する。卵胞が成長する間、卵母細胞はGV期を維持している。LHの血中濃度上昇により減数分裂が再開され、排卵される。

「卵成熟」とは卵母細胞が減数分裂第一分裂の再開から減数分裂第二分裂中期までの過程を指す（図1-3）。LHサージによって減数分裂が再開するとGV期卵子からGVが消失する現象が起きる。これを卵核胞崩壊（GVBD）という。GVBDを起こした卵母細胞は染色体凝集や紡錘体形成が起き、次いで一次卵母細胞と第一極体に分裂する（図1-3、右から2番目）。続いて減数分裂第二分裂に入り、中期で減数分裂は再び停止し、受精能を獲得した成熟卵子となる。GV期から第一減数分裂期間をmeiosis I (MI (エムワン)) 期といい、第二減数分裂期間をmeiosis II (MII (エムツー)) 期という。MII卵子に精子が入ることで受精は成立する。受精の刺激により減数分裂は再び開始し、第二極体は排出され、減数分裂が完了する。

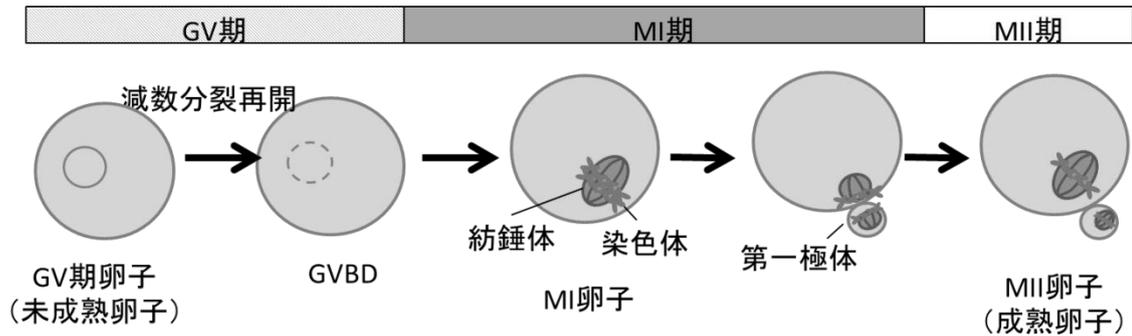


図 1-3. GV 期卵子から MII 卵子への成熟過程

GV 期の卵子は LH サージにより減数分裂を再開し，減数分裂第一分裂が終了した卵子を MI 卵子と呼び，減数分裂第二分裂中期の卵子を MII 卵子と呼ぶ。

1-4. 卵母細胞の代謝

卵母細胞内の代謝は体細胞とは異なる。卵母細胞は解糖系を持たないため，グルコースを利用できない。代わりにピルビン酸をエネルギー源として利用する⁵⁾。卵母細胞の周囲には卵丘細胞が存在する。卵母細胞はグルコースを取り込み，解糖系からピルビン酸を産生する。ピルビン酸は卵母細胞と卵丘細胞をつなぐギャップジャンクションを介して卵母細胞へ輸送される。卵母細胞へ輸送されたピルビン酸はアセチル CoA に代謝され，TCA 回路へ流入した後，電子伝達系により ATP が産生される。卵丘細胞では産生されるアセチル CoA は，主にコレステロール合成に利用される。このコレステロールはホルモン合成に利用される^{6,7)}。ATP 産生には活性酸素がつきものである。卵母細胞中の活性酸素の除去にはペントースリン酸回路から産生された NADPH+H⁺を還元剤として用いているが，この NADPH+H⁺も卵丘細胞からギャップジャンクションを介して卵母細胞へと輸送される^{8,9)}。卵母細胞がこれほどまでにグルコースをその細胞内へ取り込まない明確な理由は明らかではないが，高濃度のグルコース培地で GV 期卵子を培養すると卵成熟が阻害される¹⁰⁾。

1-5. 卵子の老化とは

流産，染色体異常および不妊症の原因に「卵子（卵母細胞）の老化」がある。「卵子（卵母細胞）の老化」は日本特有の表現で，正式に定義されていない。本学位では「卵子（卵母細胞）の老化」とは「卵母細胞の質の低下によって胚の発生が正常に行われず，妊娠（着床）に至らないもしくは妊娠しても流産する，または染色体異常児が産まれる確率が増加した状態」と定義した。卵母細胞の質とは，卵母細胞が正常に成熟する能力や正常に胚発生を遂行する能力を指す。卵母細胞の質の低下は卵母細胞の減数分裂時に紡錘体形成異常や染色体不整列といった現象として現れる。これらの異常は染色体不分離を引き起こす。染色体不分離はトリソミーやモノソミーを生み出す。これが胚の発生停止や流産，染色体異常児の原因である。染色体不分離は加齢に伴って増加することがヒト¹¹⁾，マウス¹²⁾，ブタ¹³⁾など幅広い生物で確認されている。加齢による染色体不分離の原因には，紡錘体形成異常や染色体不整列はミトコンドリアの ATP 産生量の低下⁶⁾，染色体と紡錘体を接合する役割をもつコヒーシナンパク質量の低下⁷⁾などが原因に挙げられている。一度低下した質を回復することは非常に難しい。質が低下した

卵母細胞の質を回復する有効な手立ては、ミトコンドリア移植があるがヒトへの実用化には時間がかかると予想される。また、新たな卵母細胞は生後に産生されることはないため、質の良い卵母細胞が産まれることはないことも、質の改善を難しくしている。そのため、卵母細胞の質を低下せないことが重要となる。そのためには卵母細胞の質を低下させる因子を明らかに、それらを回避しなくてはならない。その因子は加齢と肥満であると考えられてきた。しかし近年、一部の栄養素もその因子となることが示唆され¹⁴⁻¹⁶、栄養素と卵母細胞の質との関係が注目されつつある。

1-6. これまでの研究と最新の知見と課題

卵母細胞に関する研究は、1990年代まで、マウスやウシ、ヒツジなどの卵母細胞や胚を多様な組成の培地で培養する *in vitro* 的手法で研究が行われていた^{5,17}。それにより卵母細胞や胚の代謝の特性や減数分裂のメカニズムが解明されてきた。2000年代に入ると、卵母細胞の質の低下と栄養素に関する *in vivo* 研究が報告され始めた。例えば、マウスへの高脂肪食投与は卵母細胞と卵丘細胞のミトコンドリアを破壊し、その結果、紡錘体異常卵子や染色体不整列卵子が2~3倍に増加したことが報告された¹⁴。亜鉛欠乏食をマウスに投与すると、卵胞は成長するが排卵されづらくなること、MII 卵子が減少したこと、さらに、成熟した卵母細胞の多くが紡錘体形成異常であったことが報告された¹⁵。

卵母細胞の質の低下に対してポジティブな報告もある。Selesniemi ら¹⁶は、マウスを40%カロリー制限させることで、加齢による減数分裂異常の増加を抑制できたことを報告した。また、Liu ら¹⁸は30 mg/L レスベラトロール水を6ヶ月間投与したマウスは、投与していない同週齢のマウスよりも正常卵子数が20%ほど多かったことを報告している。これらの報告は栄養素によって卵母細胞の質の低下を抑制することが可能であることを示唆している。栄養素によって卵母細胞の質の低下を抑制または改善することができれば、これは大きな利益となる。しかし、まだ多くの栄養素について検討はされていない。特に有機微量栄養素であるビタミンや必須アミノ酸については *in vivo* 条件で検討された報告はない。In vitro においては、一部のアミノ酸に胚発生促進効果があることが分かり¹⁹注目されているが、ビタミンについては研究が遅れている。

卵母細胞は減数分裂第一分裂前期で停止するが、冬眠状態にあるのではない。この間GV期卵子は減数分裂や卵割に必要なアミノ酸、脂質を蓄えて大きくなる。いわば、卵成熟および発生の準備期間である。当然、卵母細胞内の代謝にビタミンは関与すると予想されるが、その影響の程は分かっていない。多量栄養素に比べれば微量栄養素の必要量は微々たるものであるが、補酵素や遺伝子発現調節因子として幅広く代謝に関与している。微量栄養素の栄養不良が身体に与える影響力は多量栄養素と変わらない^{20,21}。アミノ酸についても脂質や糖に比べて報告は少ない²²。アミノ酸の中でも特に卵母細胞中濃度が低いアミノ酸については精度の高い研究が困難であるため、ほとんど報告がないアミノ酸も存在する²³。卵母細胞の質に栄養素がどのようにどの程度関係しているのかが明らかになれば、将来、栄養学的手法によって卵母細胞の質を維持、さらに改善も夢ではない。

1-7. 本研究の目的

低下した卵母細胞の質を改善することは非常に困難であるため、質を低下させないことが鍵となる。そのためには卵母細胞の質を低下させる因子を回避する必要がある。卵母細胞の質を低下させる因子に栄養素があることは先に述べた。しかし、卵母細胞の質との関係が明らかである栄養素は、エネルギー、脂質、亜鉛があるのみで、他の栄養素については *in vivo* で検討した報告はないため、上記以外にどの栄養素のどのような栄養状態が卵母細胞の質を低下させるかは不明である。

本学位申請研究では回避すべき栄養状態として、4 つの栄養素の栄養状態（L-トリプトファン過剰、葉酸欠乏、ビタミン B₁ 欠乏、ビオチン欠乏）について着目をした。その詳細な理由は下記に示した。代謝学的観点や過去にある報告、実験的手技から卵母細胞の質に関与する可能性がある栄養素をピックアップした。それら 4 つの栄養素の栄養状態と卵母細胞の質の関係を明らかにすることを本研究の目的とした。

必須アミノ酸の L-トリプトファン (Trp) はセロトニンやメラトニンなどの生理活性物質の前駆体でもある。安眠効果²⁴⁾や精神ケアを効能にサプリメントとして販売されている。そのため習慣的長期にわたって Trp を摂取する可能性がある。大量の Trp 摂取はラットにおいて炎症を誘発させた^{25,26)}という報告がある。炎症時に分泌されるサイトカインの TNF- α などを細胞へ暴露させると、細胞内の活性酸素が増加することが報告されている²⁷⁾。卵母細胞への活性酸素の暴露は紡錘体形成異常を引き起こす²⁸⁾。以上のことから Trp 大量摂取は卵母細胞の質の低下させる因子となる可能性が考えられた。

葉酸は核酸塩基の生合成やメチル基供給源としての役割を持つ。妊娠初期の葉酸欠乏は胎児奇形発症リスクを増加させる²⁹⁾ことから、生殖とかわりの深い栄養素として知られている。染色体異常の 1 つであるダウン症候群は第 21 番染色体トリソミーである。第 21 番染色体のメチル化の異常がその染色体の不分離の原因と考えられている³⁰⁾。葉酸代謝と葉酸輸送体には遺伝子多型が存在し、その型によってそれぞれの活性の強さや輸送能力が異なる³¹⁾。葉酸代謝関連遺伝子の多型とダウン症候群の発症率に関係有りとする疫学研究結果³²⁾もあるが、関係が認められないという結果³³⁾も報告されており、結論には至っていない。また葉酸欠乏状態では血中ホモシステイン濃度が上昇する³²⁾。被体外受精女性の卵胞液中ホモシステイン濃度と卵胞の直径（卵胞の成長の指標）に逆相関が認められた³⁴⁾という報告がある。以上のことから葉酸欠乏状態は卵母細胞の質の低下を促進させる可能性が考えられた。

卵母細胞内でピルビン酸はピルビン酸デヒドロゲナーゼ (PDH) 複合体によってアセチル CoA へと代謝される。PDH 複合体を構成する PDH の活性はビタミン B₁ 補酵素型チアミンニリン酸 (TDP) 濃度に依存し^{35,36)}、PDH 活性の低下はビタミン B₁ 欠乏食投与によって起きる³⁷⁾。PDH を欠損させた卵母細胞は未成熟卵子や紡錘体形成異常卵子の割合が多いこと³⁸⁾が報告されていることから、正常な卵成熟に PDH は重要である。そこで、ビタミン B₁ 低栄養状態は卵母細胞の内の PDH 活性を低下させ、卵母細胞の質の低下を引き起こす可能性が考えられた。

ビオチンは 4 つのカルボキシラーゼの補酵素として働くほか、ヒストンのビオチニル化による遺伝子発現調節³⁹⁾を行う。妊娠期間中のビオチン欠乏食投与は胎児の口蓋裂奇形を引き起こす^{40,41)}ことが知られている。雌性マウスをビオチン欠乏状態にすると、原始卵胞、グラーフ

卵胞，黄体数が減少した⁴²⁾ことが報告されている．卵胞の成長は卵母細胞の成熟と関連が強いことから，卵胞成長阻害だけでなく卵母細胞の質への影響も懸念される．

以上の理由から，Trp，葉酸，ビタミンB₁，ビオチンの各栄養状態に注目をした．Trpでは，GV期からMII期へ卵成熟する期間から受精，妊娠期間を通してTrp栄養状態が卵母細胞の質におよぼす影響を調べた．葉酸，ビタミンB₁，ビオチンはGV期からMII期へ卵成熟する期間の各栄養素の栄養状態が卵母細胞の質におよぼす影響を調べた．

2. 実験方法

2-1. 飼料組成と凍結乾燥による固形化

飼料に用いた原料の購入先はビタミン欠ミルクカゼイン, α -コーンスターチ, デキストリン, セルロース, ミネラル混合 (AIN-93-G-MX)⁴³⁾, ビタミン混合 (AIN-93-VX)⁴³⁾はオリエンタル酵母工業 (株) から購入した. 乾燥卵白たんぱく質はクレア (株) から購入し, コーン油は味の素 (株) から購入した. 酒石酸コリン, L-メチオニン, L-トリプトファン, 葉酸, チアミン塩酸塩, D-ビオチンは和光純薬工業 (株) からそれぞれ購入した. スクシニルサリファチアゾールは MP Biomedicals (株) より購入した.

飼料組成は各実験方法に記載した. コーン油以外の飼料を混ぜあわせ, ストレーナーで3回ふるいにかけて混合した. 次にコーン油を入れて再びストレーナーで3回ふるいにかけて混合した. ビタミン混合葉酸欠およびビタミン混合ビオチン欠は市販されていない. オリエンタル酵母工業 (株) より販売されているビタミン混合 (AIN-93-VX) の組成をもとに, ビタミン混合葉酸欠およびビタミン混合ビオチン欠を作製した. ビタミン混合 100 g 当たりニコチン酸 0.30 g (特級, 142-01232), (+) -パントテン酸カルシウム 0.160 g (特級, 039-14162), ピリドキシン塩酸塩 0.070 g (特級, 163-05402), チアミン塩酸塩 0.060 g (特級, 201-00852), リボフラビン 0.060 g (一級, 188-00172), 葉酸 (プテロイルグルタミン酸) 0.020 g (特級, 060-01802), (\pm) - α -トコフェロール (98%) 0.750 g (一級, 207-01792), ビタミン A アセテート (500000 U/g) 0.050 g (103257), コレカルシフェロール (400000 U/g) 0.0250 g (特級, 224-00361), ビタミン K₁ (フィロキノン) 0.0075 g (221-00371), シアノコバラミン (95%) 0.00025 g (特級, 224-00344), D-ビオチン 0.0020 g を混合し, ショ糖を 100 g になるように加えた. ビタミン A アセテートは MP Biomedicals (株) から購入した. それ以外の試薬は和光純薬工業 (株) から購入した.

粉末の飼料は固形にしてから, マウスに与えた. 飼料 500 g を蒸留水で捏ねて平たく伸ばし, 1.5 cm 角に裁断した. これをバランスディッシュに入れ, -80°C で一晩放置し凍結させた. 凍った状態の飼料を凍結乾燥機 (EYELA 東京理化工業 (株), FD-1 型) に入れ, 捏ねる時に加えた水分を約 2 日かけて昇華させた. 加えた水が完全に昇華したことを重量から確認した. 固形状にした飼料は -20°C で保管し, 次の日に与える飼料の分はデシケーターで保管した.

2-2. 実験動物と飼料組成

雌性 ICR マウスをチャールズリバー (株) から購入した. マウスは自由摂取, 自由飲水させた. 室温 $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 湿度 $60 \pm 10\%$ 環境下で飼育し, 明暗サイクルは 12 時間 (明期: 6 時 00 分 ~ 18 時 00 分) とした. 採尿のためのマウスは代謝ケージで飼育し, それ以外のマウスはプラスチックケージで 5~6 匹ずつ飼育を行った. 水は水道水を与えた. 飼料摂取量は毎日測定し, 体重は毎日または 1 回/2 日の頻度で測定した. 飼育は午前 9 時から 10 時の間に行った.

2-3. Trp 実験

20%カゼイン食を対照食とし Trp を 2%または 5%添加した飼料 (2% Trp 食, 5% Trp 食) を 6 週齢雌性 ICR マウスに与えた (表 1-1). 各飼料を 10 日以上与えた段階で 16 時に雌性マウスの膣の外観から発情しているマウスを選別し, 雄性 ICR マウスのケージに入れ, 1 晩放置した.

翌日の朝に雌の膣栓の有無を確認し、膣栓のある雌性マウスを妊娠マウスとした。妊娠後も同じ飼料を与えた。膣栓が確認された日の朝を妊娠 0.5 日とした。卵母細胞の質の低下の評価に流産率を用いた。異常な卵母細胞が排卵されない機構や異常減数分裂を修復する機構が働いて正常な仔が産まれる可能性を考慮し、流産率を指標とした。

表 1-1. 対照食と L-トリプトファン添加食の飼料組成

	対照食 (g/kg)	2% Trp 食 (g/kg)	5% Trp 食 (g/kg)
ビタミン欠ミルクカゼイン	200	200	200
α -コーンスターチ	469	456	436
シヨ糖	234	227	217
L-メチオニン	2	2	2
コーン油	50	50	50
ミネラル混合 (AIN-93-G-MX)	35	35	35
ビタミン混合 (AIN-93-VX)	10	10	10
Trp	0	20	50

また妊娠 12.5 日目の妊娠マウスの肝臓と全血を採取し、遊離型 Trp を HPLC で測定した。試験食投与から 63 日目に各群の非妊娠マウスの肝臓を取り出し、肝臓中の Trp 異化代謝に関与する酵素 Trp オキシゲナーゼ (TDO), キヌレニンアミノトランスフェラーゼ (KATase), キヌレニナーゼ (Kynu), 3-ヒドロキシアンスラニル酸オキシゲナーゼ (3-HADO), アミノカルボキシムコンネートセミアルデヒド脱炭素酵素 (ACMSD) の活性を測定した。

試験食投与から 15 日目の 24 時間尿を集めた。尿中の Trp, キヌレニン (KA), アンスラニルサン (AnA), 3-ヒドロキシキヌレニン (3-HK), キサンツレン酸 (XA), 3-ヒドロキシアンスラニル酸 (3-HA), キノリン酸 (QA) を HPLC で測定した。Trp 異化代謝経路と酵素の関係を図 2-1 に示した。

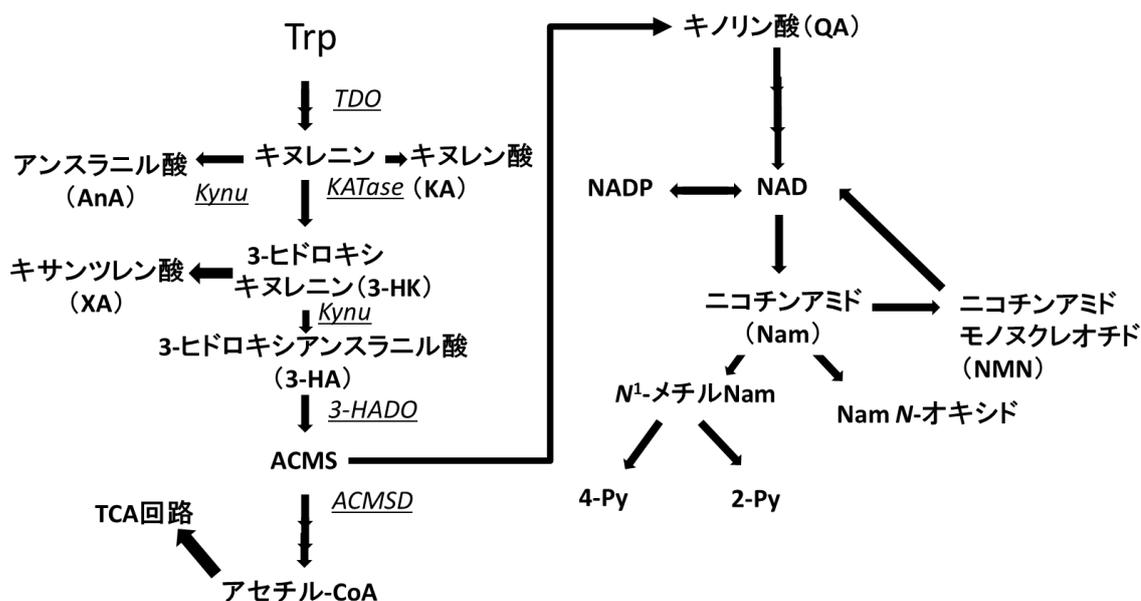


図 2-1. Trp 異化代謝経路と Trp-Nam 転換経路

ACMS : α -アミノ- β -カルボキシムコネート- ε -セミアルデヒド, NMN : ニコチンアミドモノヌクレオチド, TDO : Trp オキシゲナーゼ, Kynu : キヌレニナーゼ, KATase : キヌレニンアミノトランスフェラーゼ, 3-HADO : 3-ヒドロキシアンスラニル酸オキシゲナーゼ, ACMSD : アミノカルボキシムコネートセミアルデヒド脱炭素酵素. 反応に関わる O_2 , H_2O , ATP やアミノ酸などの物質は見やすさを考慮して省略した.

2-4. 葉酸実験

2-4-1. 実験動物と飼育方法

実験動物には 59 匹の 3 週齢雌性 ICR マウスを用いた. そのうちの 30 匹をプラスチックケージで飼育し, 残りの 29 匹を代謝ケージで飼育した. 尿や糞からの葉酸供給の妨害を目的に, プラスチックケージの底から約 2cm の高さに金網を張った. 金網の下には床敷きを敷いた. 毎朝, 金網と床敷きは新しいものに交換した. さらに空中からの葉酸の飛散を考慮し, プラスチックケージを別の透明の箱に入れた. 代謝ケージは 1 匹ずつケージに入れ飼育した. 飼料摂取量を毎日測定し, 2 日目と 1 週間にごとに 24 時間尿を採取した. 体重はケージに関係なく 2 日に 1 度測定した. 飼育開始時を 0 日として 35 日あるいは 58 日まで飼育した.

2-4-2. 飼料組成

マウスは糞食する習性を持つ. 腸内細菌は葉酸を合成するため, 葉酸欠乏状態にするために糞食による葉酸摂取を妨害する必要がある. そこで腸内細菌による葉酸供給を抑制するために抗生物質 (スクシニルサルファチアゾール) を飼料に 1% 加えた (表 1-2). ①抗生物質を添加しない Gold standard 群 (GS 群) と②抗生物質と葉酸を添加した飼料を与えた対照群 (対照群), ③抗生物質を添加するが葉酸を添加しない飼料を与えた葉酸欠乏食群に分けた.

表 1-2. Gold standard 食と対照食および葉酸欠乏食の飼料組成

	Gold standard 食 (g/kg)	対照食 (g/kg)	葉酸欠乏食 (g/kg)
ビタミン欠ミルクカゼイン	200	200	200
α -コーンスターチ	374.5	367.9	367.9
ショ糖	187	183.6	183.7
L-メチオニン	2	2	2
コーン油	80	80	80
デキストリン	50	50	50
セルロース	50	50	50
酒石酸コリン	2.5	2.5	2.5
ミネラル混合 (AIN-93-G-MX)	42	42	42
ビタミン混合 葉酸欠	12	12	12
葉酸 ¹	0.0024	0.0024	-
スクシニルサルファチアゾール ²	-	10	10

¹葉酸はプテロイルグルタミン酸を用いた. ²腸内細菌からの葉酸供給を抑制するために抗生物質を用いた (MP Biomedicals (株)より購入)

2-4-3. 肝臓, 子宮, 卵巣と MII 卵子採取方法

35 日と 58 日に屠殺した. 35 日に屠殺するマウスは, 32 日に GS 群, 対照群, 葉酸欠乏食群からランダムに選択した. プラスチックケージで飼育したマウスから各群 5 匹選び, 代謝ケ-

ジで飼育したマウスから 4~5 匹選び、合計は各群 9~10 匹選択した。プラスチックケージで飼育したマウスは体内葉酸栄養状態を評価するために屠殺した。プラスチックケージで飼育した各群のマウスを断頭し血液を得た。血液は EDTA・2K 入り採血管チューブに入れた。プラスチックケージで飼育した各群のマウスから肝臓、子宮、卵巣を摘出し、重量を測定後に葉酸測定のための処理を行った。その詳細は別に記述した。

代謝ケージで飼育したマウスは卵母細胞の質の解析に用いた。流産率を卵母細胞の質の低下の指標とする点は、生体の排卵機構や修復機構を考慮した、より実際に近い結果が得られるという利点がある。しかし、卵母細胞の質だけを評価することは難しい。そこで、卵母細胞の質の評価方法を変更し、人工的に MII 卵子を排卵させ、紡錘体像と染色体像から異常卵子出現率を求めた。MII 卵子を得るために事前に過排卵処理したマウスを 35 日または 58 日に頸椎脱臼し、卵管から卵塊を取り出した。そののち卵母細胞を蛍光免疫染色し、異常卵子出現率を算出した。過排卵処理および MII 卵子採取方法、蛍光免疫染色、正常卵子と異常卵子の区別については別に記述した。

2-5. ビタミン B₁ 実験

2-5-1. 実験動物、飼育方法および飼料組成

56 匹の 5 週齢の雌性 ICR マウスを購入した。20 匹をプラスチックケージで飼育し、残りの 36 匹を代謝ケージで飼育した。プラスチックケージには 5 匹ずつ入れて飼育し、葉酸欠乏食実験と同様に底には金網と床敷きを敷いた。また、透明の箱で覆った。毎朝、金網と床敷きは交換した。代謝ケージには 1 匹ずつ個別で飼育した。毎朝、代謝ケージで飼育したマウスの飼料摂取量を測定した。体重は毎朝、ケージの種類に関係なく測定した。飼料は 20%カゼイン食を対照食とビタミン B₁ を含まないビタミン B₁ 欠乏食の 2 種類を用意した。なお、対照食にはチアミン塩酸塩を 72 mg/kg 飼料含む。馴化期間には対照食を与え、1 週間後に体重が均等になるように 2 群に分けた。プラスチックケージの 10 匹と代謝ケージの 20 匹にはビタミン B₁ 欠乏食（テスト群）を与え、残りのプラスチックケージ 10 匹と代謝ケージ 16 匹には 20%カゼイン食（対照群）を与えた（表 1-3）。

表 1-3. ビタミン B₁ 欠乏食と対照食の飼料組成

	対照食 (g/kg)	ビタミン B ₁ 欠乏食 (g/kg)
ビタミン欠ミルクカゼイン	200	200
α-コーンスターチ	376	376
ショ糖	188	188
L-メチオニン	2.0	2.0
コーン油	80	80
デキストリン	50	50
セルロース	50	50
ミネラル混合 (AIN-93-G-MX)	42	42
ビタミン混合 (AIN-93)	12	-
ビタミン混合 ビタミン B ₁ 欠 (AIN-93)	-	12

試験食へ切り替時に、代謝ケージはすべて新しいものに交換し、馴化期間にケージに付着したビタミン B₁ を摂取しないようにした。飼育開始時を 0 日として 13 日、20 日、42 日あるいは 62 日まで飼育した。

2-5-2. ビタミン B₁ 欠乏食投与実験

ビタミン B₁ 欠乏は急激な体重減少が現れるため、ビタミン B₁ 欠乏実験では 2 つのポイントに分けて卵母細胞の質への影響を調べた。体重推移を図 2-2 示した。ビタミン B₁ 欠乏食を与えてから体重減少が起きていない段階を「穏やかなビタミン B₁ 欠乏」として試験食投与 13 日目に屠殺した。この時各群のプラスチックケージから 5 匹、代謝ケージからは 6~7 匹をランダムに選んだ。

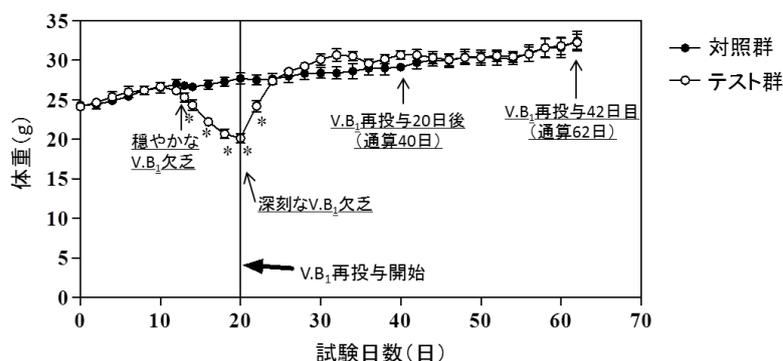


図 2-2. ビタミン B₁ 欠乏食実験における屠殺時期と体重の関係

体重減少が起きていない時を「穏やかなビタミン B₁ 欠乏」とした (13 日)。体重減少が起きている時を「深刻なビタミン B₁ 欠乏」とした (20 日)。20 日目からテスト群にはビタミン B₁ 再投与のために対照食を投与した。ビタミン B₁ 再投与から 20 日後と 42 日後に屠殺した。値は平均値±標準偏差。n = 5~11。Student *t*-test, * *p* < 0.05, 対照群 vs. テスト群。

プラスチックケージで飼育したマウスは体内ビタミン B₁ 栄養状態と血漿中エストロジオールを調べた。プラスチックケージで飼育したマウスの肝臓、子宮、卵巣を取り出し重量測定後、臓器中ビタミン B₁ 量 (遊離チアミンとチアミンニリン酸の含量) を測定するための処理を行った。血液からは血漿を採取してエストロジオールを測定した。詳細は別に記述した。代謝ケージで飼育したマウスは卵母細胞の質への影響を調べるために、あらかじめ過排卵処理を行い、頸椎脱臼により屠殺した。卵管から卵塊を取り出し、蛍光免疫染色し異常卵出現率を調べた。次に体重減少を起こしている状態を「深刻なビタミン B₁ 欠乏」として 20 日に屠殺した。各群の代謝ケージから 5 匹ずつランダムに選択し、穏やかなビタミン B₁ 欠乏実験同様に異常卵子出現率を求めた。

2-5-3. ビタミン B₁ 再投与実験

欠乏実験の残りのテスト群には 20 日の朝から試験終了までテスト群には対照食を与えた。ネガティブコントロールとしてビタミン B₁ 欠乏食投与群を用意したかったが、テスト群のマウスが非常に弱っていたので、これ以上の欠乏食を投与しても死亡するだけと判断し断念した。対照群には引き続き対照食を試験終了まで与えた。ビタミン B₁ 再投与から 20 日後 (通算 40 日) タイシャケージで飼育したテスト群のみランダムに選択し、異常卵子出現率を求めた。残

りのプラスチックケージ5匹/群と代謝ケージ4~5匹/群は再投与から42日後（通算62日）において屠殺した。プラスチックケージで飼育したマウスは体内ビタミン B₁ 栄養状態と血漿中エストラジオールを調べた。プラスチックケージで飼育したマウスの肝臓、子宮、卵巣を取り出し重量測定後、臓器中ビタミン B₁ 量（遊離チアミンとチアミン二リン酸の含量）を測定するための処理を行った。代謝ケージで飼育したマウスは卵母細胞の質への影響を調べるために、異常卵出現率を調べた。

2-5-4. 発情サイクル

毎朝9時に膣スメアを採取し、発情サイクルを測定した。詳細な方法は2-16に示した。1回の発情サイクルの日数が4~5日であれば正常とし、6日以上であれば異常とした。

2-6. ビオチン実験

2-6-1. 実験動物、飼育方法および飼料

51匹の3週齢の雌性ICRマウスを用いた。そのうちの20匹はプラスチックケージで飼育し、残りの31匹を代謝ケージで飼育した。直ちにビオチン欠乏食群と対照群に分けた。ビオチン欠乏食群はプラスチックケージ15匹と代謝ケージ15匹の合計30匹、対照群はプラスチックケージ10匹と代謝ケージ11匹の合計21匹に分けた。ビオチン欠乏食群にはビオチン欠乏食として30%卵白たんぱく食を投与し、対照食にはビオチン欠乏食にビオチンを添加した飼料を与えた（表1-4）。プラスチックケージには5匹ずつ入れた。また、葉酸欠乏実験と同様にプラスチックケージの底に金網と床敷きを敷いた。毎朝、金網と床敷きは新しいものに交換した。さらにプラスチックケージを別の透明の箱に入れた。代謝ケージには1匹ずつマウスを飼育した。飼料摂取量を毎日測定した。体重はケージに関係なく2日に1度測定した。飼育開始時を0日として22日あるいは42日まで飼育した。

表 1-4. ビオチン欠乏食と対照食の飼料組成

	対照食 (g/kg)	ビオチン欠乏食 (g/kg)
乾燥卵白たんぱく質 ¹	300	300
α-コーンスターチ	309.3	309.3
ショ糖	154.2	154.2
コーン油	80	80
デキストリン	50	50
セルロース	50	50
酒石酸コリン	2.5	2.5
ミネラル混合 (AIN-93-G-MX)	42	42
ビタミン混合 ビオチン欠	12	12
ビオチン	0.004	-

¹卵白たんぱく中のアビジンはビオチンとの親和性が高く、アビジン-ビオチン複合体は腸内吸収されない。ビオチン欠乏状態にするために用いた。

2-6-2. ビオチン欠乏食投与実験

22日に各群からプラスチックケージで飼育したマウスを5匹、代謝ケージで飼育したマウスを5匹選んだ。プラスチックケージで飼育したマウスはビオチン栄養状態を把握するために用

いた。プラスチックケージで飼育したマウスは断頭によって屠殺した。血液、肝臓、子宮および卵巣を採取した。各臓器はビオチンを測定するための処理を行った。血液は血漿中エストラジオールを測定するために採取した。詳細は別に記述した。代謝ケージで飼育したマウス5匹をあらかじめ過排卵処理し、卵管から卵塊を採取してMII卵子を得た。MII卵子を蛍光免疫染色し、異常卵子出現を求めた。

2-6-3. ビオチン再投与実験

ビオチン欠乏実験の残りのビオチン欠乏食群からプラスチックケージから5匹、代謝ケージから5匹を選び、回復群とした。回復群には対照食を投与した。回復群に選ばれなかったビオチン欠乏食群のマウスは引き続きビオチン欠乏食群としてビオチン欠乏食を投与した。対照群には対照食を引き続き投与した。回復実験を始めてから20日後（通算42日）に屠殺した。プラスチックケージで飼育したマウスは断頭し、血液、肝臓、子宮および卵巣を採取した。各臓器はビオチンを測定するための処理を行った。血液から血漿を採取し、エストラジオールを測定した。詳細は別に記述した。代謝ケージで飼育したマウス5匹をあらかじめ過排卵処理し、卵管から卵塊を採取してMII卵子を得た。MII卵子を蛍光免疫染色し、異常卵子出現を求めた。

2-6-4. 発情サイクル

毎朝9時に膣スメアを採取し、発情サイクルを測定した。方法の詳細は2-16に示した。1回の発情サイクルの日数が4~5日であれば正常とし、6日以上であれば異常とした。

2-7. 過排卵（葉酸実験、ビタミンB₁実験、ビオチン実験）

過排卵から蛍光免疫染色までの手順を図2-3に示した。過排卵には2種類のホルモンを用いた。1つは妊馬血清ゴナドトロピン(PMSG, アスカ製薬(株))と胎盤性性腺刺激ホルモン(CG: アスカ製薬(株))である。ホルモンは生理食塩水(大塚製薬(株))に25 IU/mLとなるように溶解した。27G注射針(0.40×25 mm, テルモ(株))で卵胞成長作用を持つPMSGを5 IU/匹で19時に腹腔投与した。PMSGを投与してから46~48時間後に排卵を促すためにCGを5 IU/匹で腹腔投与した。5 cmシャーレに90 µL FHM 培地ドロップ(Merck Millipore)×7個を置き、ミネラルオイルを9 mL 静かに入れた。CGを投与してから15時間後にマウスを頸椎脱臼させた。直ちに開腹し、卵管を切り出して、先ほどのFHM 培地内でピンセットを使って卵管を裂き、卵塊(卵母細胞と卵丘細胞の複合体)を取り出した。別のドロップに卵塊を移しヒアルロニダーゼ3.75 mg/mL生理食塩水を10 µL加え、室温で5分放置した。顕微鏡下で卵丘細胞から卵母細胞が離脱したのを確認し、先端を細く加工したパスツールで卵母細胞を別のドロップに移した。さらにこれを2回行い、卵母細胞だけを取り出した。次に、透明帯を剥がすために、5%プロテアーゼ/PBSを15 µL加え、室温で5分放置した。顕微鏡下で卵母細胞から透明帯が剥がれたことを確認した後、別のドロップに卵母細胞を移した。これをさらに2回繰り返した。

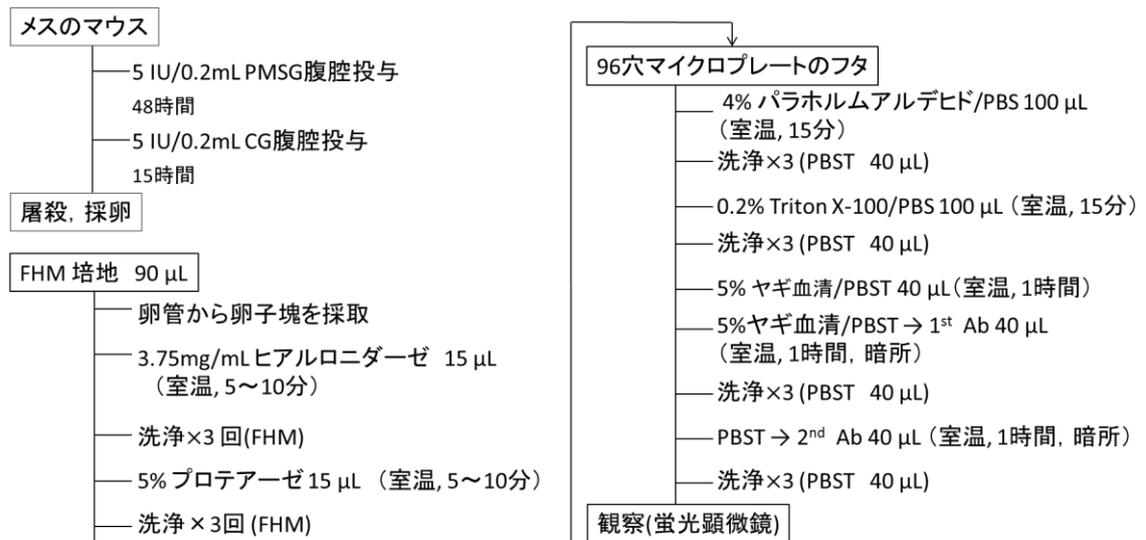


図2-3. 過排卵から蛍光免疫染色までの手順

2-8. 蛍光免疫染色

顕微鏡下でマイクロプレートのフタに4%パラホルムアルデヒド/PBSを100 μL置き、透明帯を除去した卵母細胞をFHM培地ドロップから4%パラホルムアルデヒド/PBSに移し、室温で15分間浸して固定した。固定操作を含めこれ以降の作業では、室温で静置する場合は試薬の蒸発を防ぐために、水で浸したキムタオルを敷いたプラスチックの容器にマイクロプレートのフタを入れた。40 μLのPBST (0.05% tween20/PBS) に卵母細胞を3回移し洗浄した。100 μLの0.2% Triton X-100/PBSに卵母細胞を20分間室温で浸した後、40 μLのPBSTで3回洗浄した。次に5%ヤギ血清/PBSTに室温で1時間ブロッキングした後、5%ヤギ血清/PBSTを吸い取り、4000倍希釈マウス抗α-チューブリン抗体/5%ヤギ血清/PBSTを40 μLに置き換え、暗所かつ室温で1時間浸して1次抗体処理を行った。1次抗体にはマウス抗α-チューブリン抗体 (Cell Signaling Technology (株)) を用いた。40 μLのPBSTで3回洗浄した。PBSTを吸い取って除去し、40 μLの500倍希釈ヤギ由来抗マウスIgG抗体/DAPI/5%ヤギ血清/PBSTに置き換えて、暗所、室温で1時間浸し、2次抗体処理を行った。40 μLのPBSTで3回洗浄した。免疫染色済みの卵母細胞をスライドガラスにのせ、ガラスカバーで封入し、ガラスカバーの淵をマニキュアのトップコートでコーティングした。共焦点顕微鏡 (FV10i, オリンパス (株)) で各卵母細胞の紡錘体像と染色体像を収集した。

各画像を画像処理ソフト Paint.NET で処理した。紡錘体像および染色体像から異常卵子と正常卵子を区別した。正常卵子は紡錘体の両サイドが1点で収束し、かつ全ての染色体が同一平面上に整列している卵母細胞とした (図 2-4A)。異常卵子は、紡錘体が中心体から離れている (図 2-4B)、またはかつ染色体が同一平から離れている (図 2-4C) 卵母細胞とした。また、MII 期卵子でない卵子、つまり GV 期 (図 2-4D) や MI 期の卵子も異常卵子とした。異常卵子出現率は異常卵子数/観察された卵母細胞数で求めた。

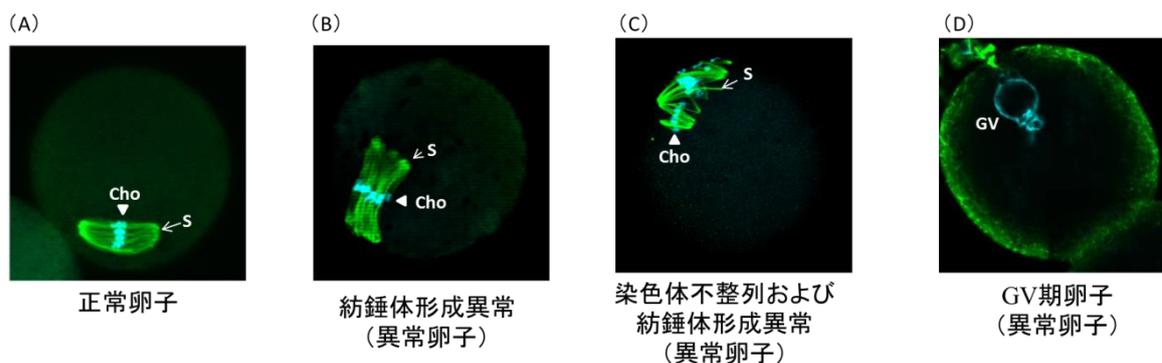


図 2-4. 正常卵子と異常卵子の例

蛍光免疫染色により紡錘体の α -チューブリンと DAPI で染色体を染め、共焦点顕微鏡で観察した。まだ (A) の紡錘体が両側で 1 点に収束し、かつ染色体が同一平面上に並んでいる (B) (C) の紡錘体は両側 1 点に収束せず解けている。(C) は染色体が同一平面上に整列していない。(D) 青いリングは卵核胞 (GV) と呼ばれ、GV 期の特徴である。過排卵により MII 期になるはずが、GV 期のまま減数分裂が停止しているので、これも異常卵子とみなした。紡錘体を“←S”，染色体を“▽Cho”，卵核胞を“GV”で図中に示した。

2-9. 採尿方法

マウス用代謝ケージに入れたマウスの 24 時間尿を採取した。まず、午前 9 時に 1.0 mol/L HCl (和光純薬工業，特級，080-01066) を 1 mL 入れたガラス瓶を代謝ケージにセットし、次の日の午前 9 時に尿を採取した。この際、代謝ケージに付着した尿を 0.1 mol/L HCl で洗い流し、10 mL に定容した。これをプラスチックチューブ (nerbe plus 社，02-212-0000) に入れ、使用するまで -20°C で保存した。

2-10. 血漿および血球の採取方法

断頭により、血液を採取した。採取した血液は EDTA-2K 入り採血試験管 (テルモ (株)) に入れ、遠心分離機にかけた ($1700\times g$ ，室温，30 分)。上清を採取した。分析まで -80°C で保存した。血漿はエストラジオール測定に用いた。

血漿を採取した残りに 0.9% 生理食塩水 1 mL を静かに注ぎ入れ、静かに転倒混和を 3 回行い、遠心分離機にかけた ($1700\times g$ ，室温，5 分)。上層の生理食塩水を吸い取って捨て、下層の血球を吸い取って -80°C で保存した。血球は葉酸測定に用いた。

2-11. 肝臓および全血中 Trp 測定方法

肝臓約 0.7 g に対して 10 倍量の冷水を加えて、テフロンホモジナイザーで均一化した。ホモジネート 500 μL に対して 10% TCA を 500 μL 加えた。5 分間攪拌した。その後 5 分放置し、遠心分離機 (8000 rpm， 4°C ，3 分) かけて得た上清を 0.45 μm フィルターでろ過し、それを 20 μL インジェクションした。全血 20 μL に 5% TCA を 500 μL 加えて、5 分間攪拌した。5 分放置し、遠心分離機 ($13000\times g$ ， 4°C ，3 分) かけて得た上清を 0.45 μm フィルターでろ過し、それを 20 μL インジェクションした。

移動相に 3 mg/L EDTA-2Na および 1g/L ヘプタンスルホン酸 Na 入り 20 mmol/L KH_2PO_4 (リン酸にて pH 3.7 に調製) /アセトニトリル (93 : 7, v/v) を用いた。(株) ケムコプラスの Chemcosorb5-ODS-H (4.6 mm ϕ \times 150 mm)，カラム温度 40°C で分離した。流速は 1.5 mL/分と

した。SHISEIDO NANOSPACE SI-2 ((株) 資生堂) で印過電圧 900 mV の条件下で分析した。

2-12. Trp および Trp 代謝産物測定方法

Trp および Trp 代謝産物は HPLC にて測定した。

2-12-1. Trp, KA, AnA, XA, 3-HA および QA

HCl 処理尿を遠心分離機 (13000×g, 4°C, 10 分) にかけて、上清を 0.45 μm フィルターでろ過した検体をインジェクションした。QA においては、NaOH で中和した後、遠心分離およびろ過を行った。各物質の測定条件を表 1-5 に示した。蛍光法の場合、検出器は Shimadzu RF-10AXL Fluorescence Detector ((株) 島津製作所) を使用した。UV 法の場合、HITACHI UV Detector L-2400 ((株) 日立ハイテクサイエンス) を用いた。電気化学検出法の場合、SHISEIDO NANOSPACE SI-2 ((株) 資生堂) を用いた。

表 1-5. 尿中 Trp, KA, AnA, XA, 3-HA および QA の測定条件

項目		測定条件
尿中 Trp	移動相	3 mg/L EDTA-2Na および 1 g/L ヘプタンスルホン酸 Na 入り 20 mmol/L KH ₂ PO ₄ (リン酸にて pH 3.7 に調製) / アセトニトリル (93 : 7, v/v), 1.0 mL/分
	カラム	Chemcosorb5-ODS-H (4.6 mmφ×150 mm) 40°C
	検出方法	蛍光法 (励起波長 280 nm, 蛍光波長 340 nm) Trp 標準 0.01 mg/mL 0.6 mol/L PCA (ε _{280 nm} = 5220) (和光純薬工業, 特級, 202-03383)
KA	移動相	0.01 mol/L 酢酸-酢酸 Na 緩衝液 (pH 4.5) / アセトニトリル (1000 : 52.6, v/v), 1.0 mL/分 ポストカラム移動相, 1 mol/L 酢酸亜鉛, 1.0 mL/分
	カラム	TOSOH TSK-GEL ODS-80Ts (4.6 mmφ×250 mm, (株) 島津製作所) 40°C
	検出方法	蛍光法 (励起波長 344 nm, 蛍光波長 398 nm) KA 標準 50 μg/mL 0.6 mol/L PCA (ε _{243 nm} = 42500)
AnA	移動相	50 mmol/L KH ₂ PO ₄ (リン酸にて pH 3.0 に調製) / アセトニトリル (65 : 35, v/v), 1.0 mL/分
	カラム	TOSOH TSK-GEL ODS-80Ts (4.6 mmφ×250 mm) 40°C
	検出方法	蛍光法 (励起波長 340 nm, 蛍光波長 410 nm) AnA 標準 20 μg/mL メタノール (ε _{333 nm} = 3990) (和光純薬工業, 特級, 012-04282)
XA	移動相	3 mg/L EDTA-2Na 入り 50 mmol/L KH ₂ PO ₄ (リン酸にて pH 3.0 に調製) / アセトニトリル (10 : 1, v/v), 1.0 mL/分
	カラム	STR ODS II (4.6 mmφ×250 mm, (株) 島津ジーエルシー) 40°C
	検出方法	UV 法 (340 nm) XA 標準 0.1 mg/mL 移動相 (ε _{340 nm} = 8648) (和光純薬工業, 246-00323)

表 1-5 の続き

	項目	測定条件
3-HA	移動相 カラム 検出方法	XA に同じ XA に同じ 電気化学検出法 (+500 mV) 3-HA 標準 0.02 mg/mL メタノール ($\epsilon_{340 \text{ nm}} = 3860$) (東京化成工業 (株), A0316)
QA	移動相 カラム 検出方法	40 mL/L 過酸化水素および 30 $\mu\text{L/L}$ 15%TMA 入り 50 mmol/L KH_2PO_4 (0.2 mol/L クエン酸にて pH 3.8 に調製), 0.6 mL/分 Unisil QC18 (4.6 \times 250 mm) 40 $^\circ\text{C}$ 蛍光法 (励起波長 326 nm, 蛍光波長 380 nm) QA 標準 20 $\mu\text{g/mL}$ ($\epsilon_{275 \text{ nm}} = 4040$) (東京化成工業 (株), P550)

2-12-2. 尿中 3-HK 測定方法

HCl 処理尿 300 μL に対して 5% NaHCO_3 を 100 μL , 0.5% *p*-トルエンスルホン酸クロリド/アセトン 400 μL を加え、室温で 10 分間放置した。これを遠心分離機 (13000 \times g, 4 $^\circ\text{C}$, 10 分) にかけて得た上清を 0.45 μm フィルターでろ過し、HPLC に 40 μL インジェクションした。移動相には 1 mmol/L KH_2PO_4 (リン酸で pH 4.5 に調製) /アセトニトリル (600 : 400, v/v) を用いて、TOSOH TSK-GEL ODS-80Ts (4.6 mm ϕ \times 250 mm), カラム温度 40 $^\circ\text{C}$, 流速 1.0 mL/分で分離した。これを励起波長 375 nm, 蛍光波長 455 nm で測定した。標準品 3-HK 濃度は $\epsilon_{269 \text{ nm}} = 7140$ から算出した。

2-13. Trp 異化代謝酵素活性の測定方法

対照食, 2% Trp 食, 5% Trp 食を投与してから 63 日後に妊娠していないマウスの肝臓を摘出し, Trp 異化代謝に関連する 5 つの酵素の活性を測定した。肝臓 1 g に対して 5 倍量の 50 mmol/L KH_2PO_4 - K_2HPO_4 緩衝液 (pH 7.0) を加えてテフロンホモゲナイザーで均一化した。これをエンザイムソースとした。反応組成の詳細は表 1-6 に記載した。

2-13-1. TDO 活性

TDO は Trp を L-ホルミルキヌレンインへと代謝する。Trp 異化代謝の初発酵素である。反応組成表に基づいて各物質を混和した後, 37 $^\circ\text{C}$ の恒温槽で 1 時間インキュベートした。70%過塩素酸を 60 μL ずつ加え反応を停止させた。10 分間, 室温で放置してから遠心分離器 (13000 \times g, 4 $^\circ\text{C}$, 3 分) にかけて。上清を新しいマイクロチューブに入れた。残った沈殿物に 0.6 mol/L 過塩素酸を 500 μL 加えて, 沈殿物をつぶした。これを振とう機に 5 分かけ, 遠心分離器 (13000 \times g, 4 $^\circ\text{C}$, 3 分) にかけて。この上清を先ほど採取した上清に合わせ混和した。これを 0.45 μm フィルターにかけて, HPLC 法にてキヌレニン を測定した。TOSOH TSK-GEL ODS-80Ts (4.6 mm ϕ \times 250 mm), カラム温度 40 $^\circ\text{C}$ で分離し, 360 nm での吸光度を測定した。移動相には 1g/L 1-ヘプタンスルホン酸 Na 入りの 20 mmol/L KH_2PO_4 (pH 3.7) /アセトニトリル (1000 : 75.3 (v/v)) を用いた。キヌレニンの標準品は東京化成工業 (株) から購入し, $\epsilon_{360 \text{ nm}} = 4500$ から導出した。

2-13-2. KATase 活性

KATase は L-キヌレニンをキヌレン酸へと代謝する。反応組成表に基づいて各物質を混和し

た後、37°C の恒温槽で 5 分ブレインキュベートした。1 mmol/L L-キヌレニン を 100 μ L 加え攪拌後 37°C の恒温槽で 1 時間インキュベートした。70%過塩素酸を 70 μ L ずつ加え反応を停止させた。5 分間、室温で放置してから遠心分離器 (13000 \times g, 4°C, 10 分) にかけて。上清を新しいマイクロチューブに入れた。残った沈殿物に 0.6 mol/L 過塩素酸を 500 μ L 加えて、沈殿物をつぶした。これを振とう機に 5 分かけ、遠心分離器 (13000 \times g, 4°C, 5 分) にかけて。この上清を先ほど採取した上清に合わせ混和した。これを 0.45 μ m フィルターにかけて、HPLC 法にて KA を測定した。KA 測定法の詳細は尿と同条件で行った。

表 1-6. Trp 異化代謝関連酵素の活性測定のための反応組成表

酵素名	反応組成
TDO 活性 [EC. 1. 13. 11. 11]	0.5 mol/L KH ₂ PO ₄ -K ₂ HPO ₄ 緩衝液 (pH 7.0) 120 μ L 50 mmol/L Trp 70 μ L エンザイムソース 60 μ L 超純水 740 μ L
KATase 活性 [EC. 2. 6. 1. 7]	0.1 mol/L HEPS (6 mol/L NaOH で pH 7.5 に調製) 100 μ L 0.94 mmol/L リン酸ピリドキサールー水和物 100 μ L 30 mmol/L 2-オキソグルタル酸 100 μ L エンザイムソース 50 μ L 超純水 50 μ L
Kynu 活性 [EC. 3. 7. 1. 3]	0.5 mol/L Tris-HCl (pH 8.0) 200 μ L 50 mmol/L L-キヌレニン 10 μ L エンザイムソース 20 μ L 超純水 590 μ L
3-HADO [EC. 1. 13. 11. 6]	3.3 mmol/L 3-HA 50 μ L 0.2 mol/L Tri-酢酸緩衝液 (1 mol/L の酢酸で pH 8.0 に調製) 500 μ L エンザイムソース (上清) 10 μ L 超純水 500 μ L
ACMSDase [EC. 4. 1. 1. 45]	1.65 mmol/L 3-HA 10 μ L 0.2 mol/L Tris-酢酸緩衝液 (1 mol/L の酢酸で pH 8.0 に調製) 500 μ L エンザイムソース 100 μ L 超純水 850 μ L

2-13-3. Kynu 活性

Kynu は Trp 代謝において 2 つ物質の生成に関与している。1 つは L-キヌレニンから AnA, もう 1 つは 3-HK から 3-HA を合成する反応である。反応組成表に基づいて各物質を混和した後、37°C の恒温槽で 30 分インキュベートした。10%トリクロロ酢酸を 500 μ L ずつ加え反応を停止させた。3 分間振とうさせた後、遠心分離器 (13000 \times g, 4°C, 3 分) にかけて。上清を新しいマイクロチューブに入れた。残った沈殿物に 10%トリクロロ酢酸を 500 μ L 加えて、沈殿物をつぶした。これを振とう機に 5 分かけ、遠心分離器 (13000 \times g, 4°C, 3 分) にかけて。この上清を先ほど採取した上清に合わせ混和した。これを 0.45 μ m フィルターにかけて、HPLC 法にて AnA を測定した。AnA 測定法の詳細は尿と同様の条件で行った。

2-13-4. 3-HADO 活性

3-HADO は 3-HA を ACMS へと代謝する酵素である。エンザイムソースは遠心分離器にかけその上清を反応に用いた。エンザイムソース以外の反応液を石英セルに入れ、エンザイムソース 10 μ L を加えて反応させた。ACMS の最高吸収波長である 360 nm で測定した。増加吸光度から 3-HADO 活性を算出した。

2-13-5. ACMSDase 活性

ACMSDase は ACMS を AMS へと代謝する酵素である。反応組成表に基づいてエンザイムソース以外を石英セルにいれ、3-HAO 源を 40 μ L 加えた。3-HAO 源にはラット肝臓アセトンパウダー 1 g に 0.01 mol/L Tris-酢酸緩衝液 (1 mol/L の酢酸で pH8.0 に調製) を 10 mL 加え 30 分間攪拌した後、遠心分離器 (15000 rpm, 4°C, 10 分) にかけて得た上清を用いた。吸光度上昇が緩やかになった時点で、エンザイムソースを 100 μ L 加えた。この時 ACMS の最高吸収波長である 360 nm で測定した。ACMS の分子吸光係数 $\epsilon_{360 \text{ nm}}=45000$ と吸光度の変化から ACMSDase 活性を算出した。

2-14. ビタミン測定方法

2-14-1. 葉酸

葉酸は *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 由来の *Lactobacillus rhamnosus* ATCC27773 (クロラムフェニコール耐性) を用いた。一般乳酸菌用培地 (日水製薬 (株), 05801) に保存していた菌を一般乳酸菌用斜面培地に白金耳で塗布し、37°C で 24 時間インキュベートした。斜面培地に生えた菌を別の一般乳酸菌用斜面培地に塗布し、37°C で 24 時間インキュベートした。ここで生えた菌を 1.0 mg/mL クロラムフェニコール (和光純薬工業, 生化学用, 034-10572) 150 μ L を添加した一般乳酸菌用液体培地 5 mL 入れ、37°C で 24 時間インキュベートして生えた菌を測定に用いた。これを遠心分離機 (3000 rpm, 室温, 10 分) にかけて、上清を捨てた。滅菌済みの 0.9% NaCl 溶液を 5 mL 加えて攪拌し、再び遠心分離機にかけた (菌浄)。これを 3 回繰り返した。得られた菌懸濁液 50 μ L を新しい 0.9% NaCl 溶液 5 mL に加え、接種用菌とした。

葉酸 (和光純薬工業, 特級, 060-01802) 0.005 g を秤量し、そこに 0.1 mol/L NaOH を 0.5 mL 加え溶解させた後、50 mmol/L $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-K}_2\text{HPO}_4$ 緩衝液 (pH 7.4) で 0.2 mg/mL 葉酸標準液を作製した。これを適度に 50 mmol/L $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-K}_2\text{HPO}_4$ 緩衝液 (pH 7.4) で希釈し OD 282=27600 より濃度求めた。葉酸濃度 1 ng/mL となるように超純水で希釈した。

葉酸定量用培地 (Difco 社, 282210) 100 mL 対して、アスコルビン酸 (和光薬品工業 (株), 特級, 014-04801) 0.05 g を添加し、オートクレーブで滅菌 (121°C, 5 分) した後、1.0 mg/mL クロラムフェニコールを 3 mL 添加した。定量用試験管 (IWAKI, 12×75 mm, 9831-1207) にクロラムフェニコール入り葉酸定量用培地 1 mL, 滅菌済みのアスコルビン酸を 0.5% 含む 50 mmol/L $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-NaOH}$ (和光純薬工業, 特級, 169-04245, 198-13765) 緩衝液 (pH 6.1) を 200 mL, サンプル溶液または葉酸標準溶液を入れ、最終 2 mL になるように超純水を加えた。検量線は葉酸濃度 0~0.35 ng/mL の間で作成した。ここに接種用菌 50 μ L を加えた。定量用培地, 緩衝液, サンプルまたは葉酸標準溶液をいれた定量用試験管にアルミキャップをし、37°C 孵卵機に 24 時間インキュベートした。インキュベート後、分光光度計にて 660 nm で濁度を測定した。

A) 尿

原尿と 1 mol/L アスコルビン酸を 9:1 の割合で混和した尿を遠心分離 (13000×g, 4°C, 5 分) した上清を測定に用いた。

B) 肝臓, 子宮, 卵巣

Lactobacillus rhamnosus ATCC27773 (クロラムフェニコール耐性) はポリグルタミン酸型の葉酸は利用できないため, ポリグルタミン酸型をモノグルタミン酸型に変えるため, コンジュガーゼ処理を行った。透析のために 1.89 g/50 mL の NaOH 溶液で pH 6.1 に調整した 0.1 mol/L KH_2PO_4 緩衝液 (KH_2PO_4 -NaOH 緩衝液) を作製した。コンジュガーゼは Wistar 系雄性ラット (日本クレア (株)) の血清 10 mL を透析用セルロースチューブ ((株) 日本メディカルサイエンス, ヴィスキングチューブ 15.9 mm) に入れて, 2-メルカプトエタノール (和光純薬工業, 一級, 135-07522) を 0.1% 含む 50 mmol/L KH_2PO_4 -NaOH 緩衝液 (pH 6.1) 800 mL に浸し, 4°C で 3 時間の透析を行った。緩衝液は 1 時間ごとに交換した。透析が完了した血清をコンジュガーゼとして用いた。

臓器約 0.3 g の 10 倍量のアスコルビン酸を 0.5% 含む 50 mmol/L KH_2PO_4 -NaOH 緩衝液 (pH 6.1) を加え, ホモジ化した。肝臓, 卵巣はテフロンホモジナイザーで均一化し, 子宮はハサミで裁断した後, 同様に均一化しホモジネートを得た。ホモジネート 1000 μL を沸騰水浴中に 10 分間置いた。これを氷で冷却し, 0.25% プロテアーゼ溶液 (科研製薬 (株), プロナーゼ[®]MS) を 500 μL 加え, 37°C の恒温槽に 24 時間インキュベートした。これを沸騰水浴中に 10 分間置いた。これを氷で冷却し, 遠心分離 (13000×g, 4°C, 10 分) にかけて上清 1 mL を取った。上清 1 mL に対してラット血清由来コンジュガーゼを 50 μL と 0.0625 g/mL L-システイン塩酸塩 (和光純薬工業, 特級, 033-05272) を 20 μL 加え, 37°C 恒温槽で 5 時間インキュベートした。これを沸騰水浴中に 10 分間置いた。これを氷で冷却し, 遠心分離機 (13000×g, 4°C, 10 分) にかけて, この上清を葉酸の測定に用いた。

C) 血球

血球 100 μL に 0.5% となるようにアスコルビン酸を添加した 0.1 mmol/L KH_2PO_4 -NaOH 緩衝液 (pH 6.1) を 900 μL を加え, 超音波破碎した。沸騰水浴中に 10 分間置き, 氷冷した。ここに 0.25% プロテアーゼ溶液を 500 μL 加え, 37°C の恒温槽に 24 時間インキュベートした。これを沸騰水浴中に 10 分間置き, 氷冷した。ラット血清由来コンジュガーゼを 50 μL に 0.0625 g/mL L-システインを 20 μL 加え, 37°C の恒温槽で 5 時間インキュベートした。これを沸騰水浴中に 10 分間置き, 氷冷した。遠心分離機にかけ (13000×g, 4°C, 10 分) 上清を得た。分析まで -20°C で保存した。

2-14-2. ビタミン B₁

ビタミン B₁ は尿中にはチアミン, 臓器中ではチアミン二リン酸 (TDP, Sigma-Aldrich (株), C8754-5G) を主として存在する。臓器中チアミンは TDP の約 1/10 存在している。本研究では, 尿中はチアミンのみ, 臓器では TDP とチアミンの含量をビタミン B₁ 量とした。チアミン塩酸塩 (和光純薬工業, 特級, 201-00852) を 0.05 mmol/L となるように 0.1 mol/L HCl で溶解した。この吸光度を測定し OD_{246 nm} = 14,200 より正確な濃度を求めた。0.5 nmol/L チアミン標準液として用いた。

A) 尿

HCl 処理尿を遠心分離機 (10000 rpm, 4°C, 3 分) にかけて、その上清 250 µL に 1% ブロムシアン (和光純薬工業 (株), 037-08592) を 50 µL, 次いで 5% NaOH を 50 µL 加え、10 分以上、室温で静置した。中和のために 1.5 mmol/L HCl を 20 µL, 超純水を 400 µL 入れた。この溶液を遠心分離機 (13000×g, 4°C, 3 分) にかけて、0.45 µm フィルターでろ過したものを高速液体クロマトグラフィー (HPLC) に 10 µL インジェクションした。移動相には 3% アセトニトリル/0.05 mol/L KH₂PO₄ - K₂HPO₄ 緩衝液 (pH 7.0) を用い、流速は 1.0 mL/分とした。固定相には TOSHO ODS-100S (φ4.6×250 mm), ガードカラムに TOSHO ODS-100S (φ4.6×15 mm) を用いた。励起波長 365 nm で蛍光波長 480 nm を測定した⁴⁴⁾。ポンプは HITACHI L-2130 Pump, オートインジェクターは SHIMADZU SIL-20AC, 検出器は SHIMADZU RF-10AXL, カラムオーブンは HITACHI L-5020, データプロセッサは SHIMADZU C-R8A を用いた。

B) 肝臓, 子宮, 卵巣

臓器約 0.5 g の 10 倍量の 0.5% トリクロロ酢酸 (和光純薬工業, 特級, 204-02405) を加えて氷水中にてテフロンホモジナイザーで均一化した。得られたホモジネートを遠心分離機 (13000×g, 4°C, 10 分) にかけて。得られた上清 200 µL に 1% ブロムシアンを 40 µL, 5% NaOH を 80 µL 加え混和し、10 分以上、室温で静置した。1.5 mmol/L HCl 溶液を 80 µL 加えて中和し、超純水を 100 µL 加え、遠心分離機 (13000×g, 4°C, 10 分) にかけて上清を得た。この上清を 0.45 µm フィルターでろ過したものを HPLC に 50 µL インジェクションした。臓器中チアミン測定条件は尿中チアミンと同じ条件で行った。チアミンに比べ、TDP の溶出時間が短いため、臓器中 TDP 測定はアセトニトリル (和光純薬工業, HPLC 用, 015-08633) を加えていない 0.05 mol/L KH₂PO₄-K₂HPO₄ 緩衝液 (pH 7.0) を移動相に用いた以外は、尿中チアミンと同じ条件で行った。

2-14-3. ビオチン

Lactobacillus plantarum ATCC8014 を用いたマイクロバイオアッセイ法で測定した。標準には D-ビオチン (和光純薬工業, 一級, 027-08714) を用いた。ビオチン濃度 0.02 pmol/mL から 0.2 pmol/mL の範囲の検量線を引き出した。一般乳酸菌用培地に保存していた菌を一般乳酸菌用斜面培地に白金耳で塗布し、37°C で 24 時間インキュベートした。斜面培地に生えた菌を別の一般乳酸菌用斜面培地に塗布し、37°C で 24 時間インキュベートした。ここで生えた菌を一般乳酸菌用液体培地 5 mL 入れ、37°C で 24 時間インキュベートして生えた菌を測定に用いた。これを遠心分離機 (1700×g, 室温, 10 分) にかけて、上清を捨てた。滅菌済みの 0.9% NaCl 溶液を 5 mL 加えて攪拌し、再び遠心分離機にかけて (菌洗浄)。これを 3 回繰り返した。得られた菌懸濁液 50 µL を新しい 0.9% NaCl 溶液 5 mL に加え、接種用菌とした。

ビオチン (和光純薬工業, 特級, 027-18714) を 1.00 mg/mL 50% エタノール溶液となるように作成した。これを超純水で 1.0 ng/mL に調整した。定量用試験管にビオチン定量用培地 (日水製薬 (株), 05818) を 1 mL, 0.5 mol/L KH₂PO₄ - K₂HPO₄ 緩衝液 (pH 7.0) 200 µL, サンプルまたはビオチン標準溶液を入れ、最終 2 mL になるように超純水を加えた。検量線は 0~0.4 pmol 間で作成した。アルミキャップをした後、オートクレーブ (121°C, 5 分) で滅菌した。冷却後、ガスバーナーの火のもと接種用菌を 50 µL 加えて攪拌し、37°C の孵卵機で 19.5~20.5 時間インキュベートした。インキュベート後、分光光度計にて 660 nm で濁度を測定した。

A) 尿

HCl 処理尿を遠心分離 (10000 rpm, 4°C, 5 分) した上清を測定に用いた。

B) 肝臓, 血球, 子宮, 卵巣

臓器約 0.05g を 10 倍量の 2.25 mol/L 硫酸でホモジ化した。ホモジネートをオートクレーブした (121°C, 1 時間)。これを氷冷し, 遠心分離機 (13000×g, 4°C, 10 分) にかけて上清を得た。分析するまで上清は-20°C で保存した。

2-15. 3-ヒドロキシイソ吉草酸

また, ビオチンを補酵素とするメチルクトロノイル CoA カルボキシラーゼ (MCC) はロイシンの異化代謝産物の β-メチルクトロノイル CoA から 3-メチルグルタコニル CoA を合成する。ビオチン不足により MCC 活性が低下すると, β-メチルクトロノイル CoA が代謝されず, その前駆体のイソ吉草酸 CoA→イソ吉草酸→3-ヒドロキシイソ吉草酸 (3-HIA) となる。ビオチン欠乏時は 3-HIA の尿中排泄量が増加する⁴⁵⁾。3-HIA は体内の代謝レベルでのビオチン不足状態を評価する生体指標として用いられる⁴⁵⁾。3-HIA のカルボキシル基に 2-ニトロフェニルヒドラジド (2-NPH) のアミノ基を脱水反応させることで, ヒドロキシカルボン酸誘導体化させる方法で測定した (図 2-5)⁴⁶⁾。

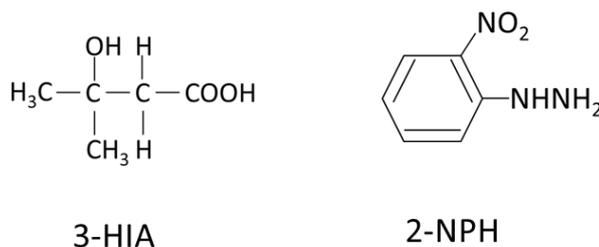


図 2-5. 3-HIA と 2-NPH

3-ヒドロキシイソ吉草酸 (3-HIA) と 2-ニトロフェニルヒドラジド (2-NPH)

3-HIA (H0701), 2-NPH・HCl (N0231) は東京化成工業 (株) から購入し, 1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド・HCl (WSC・HCl, 346-03632) は (株) 同人化学研究所から購入した。ねじ口試験管 ((株) マルエム, 10 mm×16.5 mm, 内径 10.0 mm) に HCl 処理尿を 50μL, 20 mmol/L 2-NPH・HCl を 100 μL, 250 mmol/L WSC・HCl を 100 μL 入れてフタをし, 60°C の恒温水槽で 20 分間インキュベートした。15% KOH/20% メタノールを 100 μL 加え, 再び 60°C の恒温水槽で 15 分間インキュベートした。室温にまで冷却後, それに 0.033 mmol/L KH₂PO₄ - K₂HPO₄ 緩衝液を (pH 6.4) を 1.8 mL と 0.5 mL HCl を pH 5~7 になるように加えた。ジエチルエーテル (和光純薬工業 (株), 特級) を 2.5 mL 加え混和し, 遠心分離 (2800 ×g, 5 分) したのち, ジエチル層を新しいねじ口試験管にいれた。抽出操作をもう一度繰り返した。集めたジエチルエーテルに超純水を 3 mL 加えて混和し, 遠心分離 (2800 ×g, 5 分) したのち, ジエチル層を広口試験管 ((株) マルエム, 10 mm×35.0 mm, 内径 20.3 mm) に入れ, ドラフト内で 40°C の恒温槽で 60 分加温し, 乾固させた。乾固させた広口試験管にメタノールを 1 mL 加えて, 乾固物を溶解させた。これを 0.45 μm フィルターにかけ, 10 μL を HPLC にインジェクションした。移動相にはアセトニトリル:メタノール:超純水を 300:160:540 の割

合で混和し、0.01 mol/L HCl で pH 4.5 に調製したものをカラムオーブン 40°C、流速 1.0 mL/分で流した。固定相には YMC (株) の YMC-Pack FA (6 mmφ×250 mm) を用いて、400 nm の吸光度を測定した。検出器には HITACHI UV Detector L-2400 ((株) 日立ハイテクサイエンス) を用いた。

2-16. 発情サイクル

マウスの発情は通常 4~5 日に 1 回の頻度で起こる。発情前期、発情、発情後期、発情停止期の 4 つ分類される。膣細胞は各発情期によって特徴的に変化するため、発情サイクルを測定するアイテムとして用いられる。膣スミアは毎朝 9 時に採取した。滅菌超純水を 25~50 µL とり、膣にゆっくり流し入れ、ピペッティングすることで、膣細胞を採取した。得られた膣細胞をスライドグラスに滴下し、室温で自然乾燥させた。これを染色した。染色にはギムザ染色液 (ギムザ染色原液: 超純水, 5:150 (v/v)) を用いた。ギムザ染色液にスライドグラスを 10 分間浸し、水道水で軽くすすいだ。これを室温で自然乾燥させたのち、封入剤で封入した。倒立顕微鏡で細胞の観察を行った。丸い有核細胞が観察された時を発情前期、角質化し角ばった細胞が観察された時を発情期、白血球が主に観察された時を発情後期、有核細胞、角質化細胞、白血球すべてが観察された時を発情停止期とした。発情サイクルが 4~5 日の場合は正常とし、6 日以上の場合を異常とした。

2-17. 血漿中エストラジオール

血漿中エストラジオール濃度はビタミン B₁ 欠乏食実験とビオチン欠乏食実験で測定した。両実験とも競合 ELISA 法を利用したキットを用いた。エストロゲンにはエストロン、エストラジオール、エストリオールが存在し、その存在比率および活性が高いエストラジオール濃度を測定した。ビタミン B₁ 欠乏食実験では穏やかなビタミン B₁ 欠乏時とビタミン B₁ 再投与から 42 日後に屠殺したマウスの血漿中エストラジオールを測定し、ビオチン欠乏食実験では、ビオチン欠乏食 22 日目と 42 日目に屠殺を行ったマウスの血漿中エストラジオールを測定した。ビタミン B₁ 欠乏食実験では Arbor Assays 有限責任会社のキット (KB30-H1, 測定波長 450 nm) で、ビオチン欠乏食実験では Cayman chemical 社のキット (582251, 測定波長 405 nm) を用いた。測定はマイクロプレートリーダー Labsystems multiskan ascent plate reader (大日本製薬(株)) で行い、ロジステック回帰モデルより血漿中エストラジオール濃度を導出した。

3. 結果

3-1. Trp 栄養状態と卵母細胞の質の関係

3-1-1. Trp 大量摂取が体重と飼料摂取量におよぼす影響

各群の体重を表 2-1 に示した。5% Trp 食を与えた幼若ラットでは、成長遅延が観察されている⁴⁷⁾。各試験食を与えてから 30 日目の体重を非妊娠時として比較した。3 群間に差は認められなかった。妊娠 0.5 日の体重においても 3 群間に差は認められなかった。妊娠 12.5 日には対照群に比べて 5% Trp 群の体重が約 4 g 少なかった。妊娠 12.5 日の 2% Trp 群と対照群の体重に差は認められなかった。この時 3 群間の飼料摂取に差は認められず、非妊娠時の Trp 摂取量は対照群で 0.3 g/kg 体重/日、2% Trp 群で 1.7 g/kg 体重/日で、5% Trp 群は 5.4 g/kg 体重/日であった。

表 2-1. 体重と妊娠総数、流産数および流産率

	対照群	2%Trp 群	5%Trp 群
Trp 摂取量 (g/kg 体重/日)	0.3	1.7	5.4
体重			
非妊娠 ¹ (g)	27.9 ± 0.7	33.2 ± 2.6	28.2 ± 1.0
妊娠 0.5 日目 ² (g)	28.5 ± 0.6	27.9 ± 1.1	28.8 ± 0.6
妊娠 12.5 日目 ² (g)	39.2 ± 0.9 ^a	37.6 ± 1.2 ^{ab}	35.3 ± 0.7 ^b
妊娠			
妊娠した数(匹)	13	9	16
流産した数(匹)	0	0	5

¹試験食投与開始から 30 日目の体重。²膣栓が確認された日と朝を妊娠 0.5 日した。値はすべて平均 ± 標準偏差。n = 10~20/群。体重の項目のみ One-way ANOVA の Tukey 検定を行った。p < 0.05 : 異なるアルファベット間で有意差あり。

3-1-2. Trp 大量摂取が流産率におよぼす影響

妊娠した各群のマウス数と流産したマウス数を表 2-1 に示した。そこから求めた流産率を図 3-1 に示した。対照群、2% Trp 群の流産が 0% に対し 5% Trp 群の 31.3% が流産した。妊娠マウスの体重増加は妊娠 12.5 日以降の急激な体重増加がみられるが、流産した全てのマウスは体重に変化はなかった。このことから流産は妊娠 12.5 日以前に起こったと考えられる。

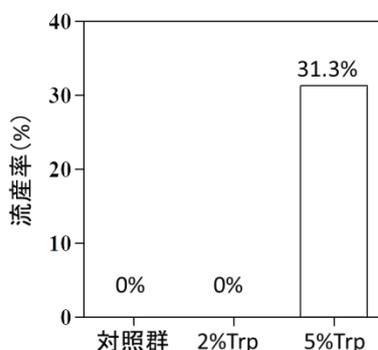


図 3-1. 流産率

表 3-1 より流産数を妊娠数で除して 100 をかけて流産率として示した。

3-1-3. Trp 大量摂取が Trp とその異化代謝産物の尿中排泄量におよぼす影響

各試験食を投与してから 15 日目の Trp およびその代謝産物と Trp 摂取量の関係を図 3-2 に示した。Trp と AnA 尿中排泄量は Trp 摂取量依存的に増加した (図 3-2A, C)。KA, XA, 3-HA および QA は 1.7 g/kg 体重/日で飽和状態に達し, 1.7 g/kg 体重/日と 5.4 g/kg 体重/日の間では差は認められなかった (図 3-2B, E~G)。3-HK は他の代謝産物と異なり, 1.7 g/kg 体重/日までには横ばいであるが, 5.4 g/kg 体重/日では急激にその排泄量は増加した (図 3-2D)。

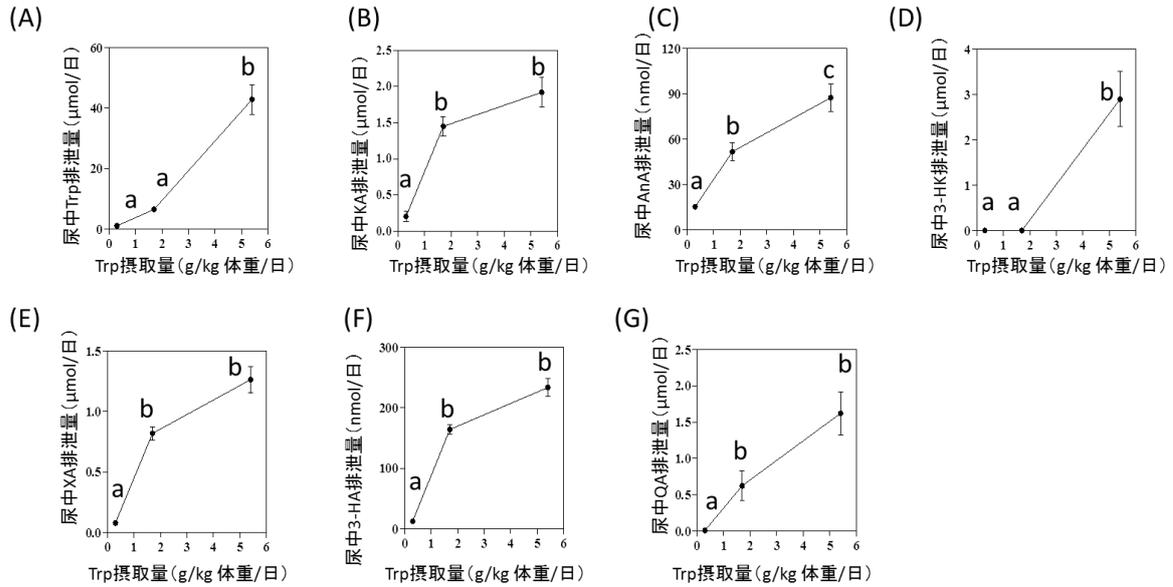


図 3-2. Trp 添加食を与えてから 15 日目の 24 時間尿中 Trp とその代謝産物の尿中排泄量。

Trp 摂取量は非妊娠時に対照群が摂取した Trp は 0.3 g/kg 体重/日と 2% Trp 群が摂取した 1.7 g/kg 体重/日, および 5% Trp 群の摂取した 5.4 g/kg 体重/日を摂取した時の Trp とその代謝産物尿中排泄量を示した。(A) Trp, (B) KA, (C) AnA, (D) 3-HK, (E) XA, (F) 3-HA, (G) QA. $n = 10, 11$. One-way ANOVA の Tukey 検定, $p < 0.05$: 異なるアルファベット間で有意差あり。

3-1-4. Trp 大量摂取が肝臓と血液の Trp 濃度におよぼす影響

非妊娠時および妊娠 12.5 日の肝臓と全血中の遊離 Trp 濃度を図 3-3 に示した。非妊娠時の肝臓 Trp 濃度は Trp を 5.4 g/kg 体重/日 (5% Trp 群) 摂取しても, Trp 濃度を維持していた (図 3-3A)。

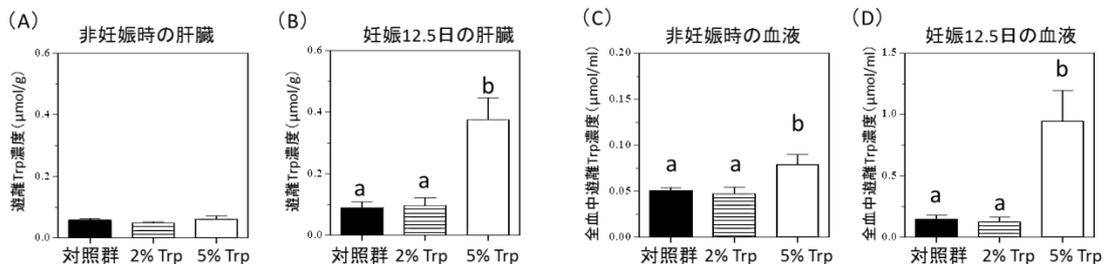


図 3-3. 非妊娠および妊娠時の肝臓と全血中遊離 Trp 濃度

A, B: 肝臓中遊離 Trp 濃度. C, D: 全血中遊離 Trp 濃度. A と C: 非妊娠マウス, B と D: 妊娠 12.5 日の妊娠マウス. $n = 5 \sim 7$. One-way ANOVA の Tukey 検定, $p < 0.05$: 異なるアルファベット間で有意差あり。

血中遊離 Trp 濃度は非妊娠時に比べて妊娠時の方が高値となることが知られている⁴⁸⁾。妊娠時は非妊娠時に比べて、対照群の肝臓の遊離 Trp 濃度は約 2 倍に増加していたが、5% Trp 群は非妊娠時の約 6 倍に増加した (図 3-3B)。全血中遊離 Trp は非妊娠時でも 5% Trp 群の方が対照群より 1.5 倍高い値であり、血中に Trp が蓄積した (図 3-3C)。妊娠 12.5 日の対照群、2% Trp 群の全血中 Trp 濃度は、非妊娠時に比べて約 3 倍高かった。5% Trp 群では約 13 倍高かった (図 3-3D)。過剰な Trp 摂取によって血中の遊離 Trp 濃度が増加すること、さらに妊娠生理状態下では通常でも Trp 濃度が上昇するが、過剰な Trp 摂取によってそれがより顕著になることが明らかになった。

3-1-5. Trp 大量摂取が肝臓 Trp 異化代謝関連酵素の活性におよぼす影響

Trp 添加食を 63 日間投与した非妊娠マウスの Trp 代謝関連酵素の活性を図 3-4 に示した。TDO 活性、ACMSDase 活性は Trp 摂取量依存的に増加した (図 3-4A, E)。KATase 活性と Kynu 活性は対照群に比べ 5% Trp 群で約 2 割低下した (図 3-4B, C)。3-HADO 活性は Trp 摂取量の影響を受けなかった (図 3-4D)。

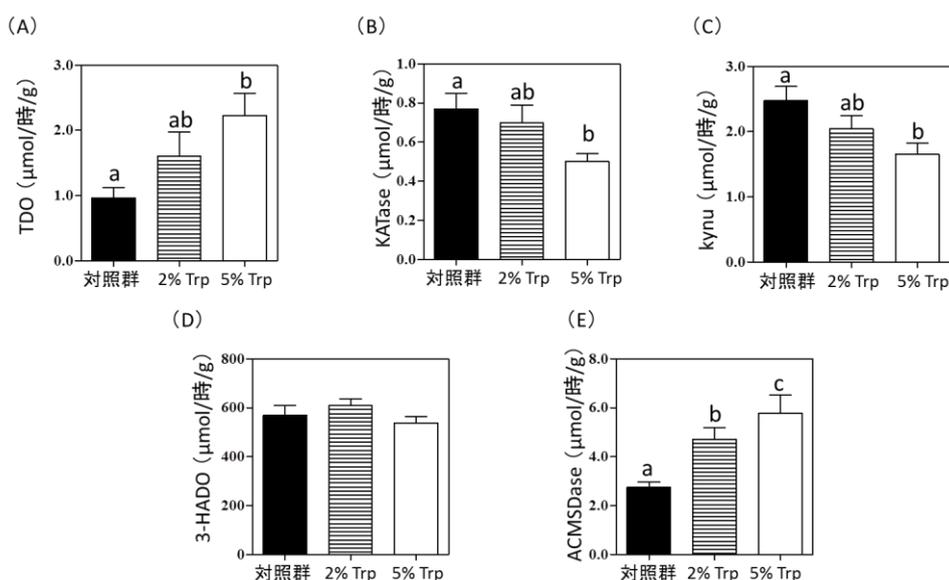


図 3-4. 非妊娠時の肝臓中 Trp 代謝関連酵素活性

Trp 添加食投与から 63 日目に屠殺した非妊娠マウスの肝臓中の Trp 代謝関連酵素活性を測定した。(A) TDO 活性, (B) KATase 活性, (C) kynureninase 活性, (D) 3-HADO 活性, (E) ACMSDase 活性. $n = 3 \sim 6$. One-way ANOVA の Tukey 検定, $p < 0.05$: 異なるアルファベット間で有意差あり。

3-2. 葉酸栄養状態と卵母細胞の質の関係

3-2-1. 35 日間の葉酸欠乏食摂取が体重と飼料摂取量におよぼす影響

各試験食を 35 日間与えた時の GS 群, 対照群および葉酸欠乏食群の間に差は認められなかった。35 日目の朝の体重においても 3 群間に差は認められず、肝臓, 子宮, 卵巣の重量と体重当たりの各臓器重量にも差は認められなかった (表 2-2)。33 日から 35 日までの飼料摂取量の平均においても, GS 群, 対照群, 葉酸欠乏食群の間に差は認められなかった。また, GS 群と対照群の体重, 飼料摂取量, 各種臓器重量に差は認められず, 抗生物質の影響はなかった (表 2-2)。

3-2-2. 35 日間の葉酸欠乏食摂取が体内葉酸栄養におよぼす影響

尿中葉酸排泄量および臓器中葉酸濃度を表 2-2 に示した。尿中葉酸排泄量は葉酸欠乏食投与 2 日目にして葉酸欠乏食群の方が対照群より顕著に低く対照群の 0.6% の葉酸排泄量であった。また、GS 群の葉酸尿中排泄量に比べて対照群の方が有意に低く、抗生物質による影響が見られた ($p < 0.05$)。過排卵による影響を考慮し、PMSG 腹腔投与の日の前日にあたる 32 日目の 24 時間尿を採取した。葉酸欠乏食群の尿中葉酸排泄量は対照群より有意に低かった。32 日の尿中葉酸排泄量では、GS 群と対照群の間に差は認められなかった。血球、肝臓、子宮中葉酸濃度は対照群より葉酸欠乏食群の方が有意に低く、対照群の約 1/3 にまで低下していた。しかし、卵巣中葉酸濃度は対照群と葉酸欠乏食群間に差は認められなかった (図 3-5A)。

表 2-2. 葉酸欠乏食を 35 日間摂取した時の体重、飼料摂取量および臓器中葉酸濃度

	GS 群	対照群	葉酸欠乏食群
体重と飼料摂取量			
試験開始日の体重 (g)	14.0 ± 0.6	13.1 ± 0.9	13.6 ± 0.4
35 日目の体重 (g)	28.5 ± 1.1	27.8 ± 0.9	27.8 ± 0.7
飼料摂取量 (g/日) ¹	4.4 ± 0.1	4.4 ± 0.2	4.0 ± 0.2
臓器重量			
肝臓 (g)	1.22 ± 0.1	1.29 ± 0.1	1.31 ± 0.0
(g/kg 体重)	43.5 ± 1.4	46.3 ± 1.6	46.5 ± 1.7
子宮 (g)	0.139 ± 0.024	0.135 ± 0.019	0.084 ± 0.016
(g/kg 体重)	3.15 ± 0.80	4.80 ± 0.65	5.03 ± 0.99
卵巣 (g)	0.0132 ± 0.0017	0.0161 ± 0.0016	0.0136 ± 0.0005
(g/kg 体重)	0.467 ± 0.044	0.574 ± 0.050	0.498 ± 0.028
葉酸			
血球 (nmol/mL)	1.10 ± 0.06	1.04 ± 0.10	0.21 ± 0.0 ^{***}
肝臓 (nmol/g)	33.0 ± 2.3	27.0 ± 1.0	9.0 ± 0.8 ^{***}
子宮 (pmol/g)	137 ± 5	136 ± 5	36 ± 5 ^{***}
2 日の尿中排泄量 (nmol/日)	5.69 ± 1.25	3.24 ± 0.72	0.020 ± 0.013 ^{***}
32 日の尿中排泄量 (nmol/日)	6.37 ± 1.41	3.71 ± 3.04	0.021 ± 0.022 [*]

値はすべて平均±標準偏差。GS 群, Gold standard 群。体重, n = 9, 10 体重以外 n = 4, 5。¹最終 3 日間の平均 (33~35 日)。Student *t* 検定, 対照群 vs 葉酸欠乏食群。* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ 。

3-2-3. 35 日間の葉酸欠乏食摂取が卵母細胞の質におよぼす影響

35 日目の卵母細胞の質を紡錘体形成異常および染色体形成異常, 未成熟卵子数から求めた (図 3-5B)。異常卵子は GS 群, 対照群, 葉酸欠乏食群でそれぞれ 8.3%, 6.9%, 7.3% であった。そのうち未成熟卵子は GS 群, 対照群, 葉酸欠乏食群でそれぞれ 5.6%, 6.9%, 2.4% であった。異常卵子率は対照群と葉酸欠乏食群で差は認められず, 卵母細胞の質は低下していなかった。また GS 群と対照群の比較でも差は認められず, 抗生物質による卵母細胞の質は低下しなかった。

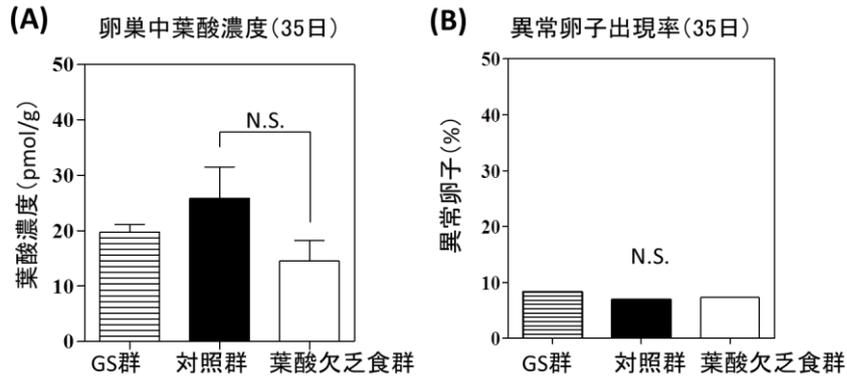


図 3-5. 葉酸欠乏食を 35 日間投与した時の卵巣中葉酸濃度と異常卵子出現率

(A) 卵巣中葉酸濃度 (GS 群と葉酸欠乏食群 ; n = 4, 対照群 ; n = 5). Student *t* 検定, 対照群 vs 葉酸欠乏食群. (B) 異常卵子出現率 (GS 群, n = 36 ; 対照群, n = 29 ; 葉酸欠乏食群, n = 41). Chi-square 解析. N.S : 有意差なし. GS 群 : Gold standard 群.

3-2-4. 58 日間の葉酸欠乏食摂取が体重と飼料摂取量におよぼす影響

35 日間では葉酸欠乏食群の卵巣葉酸濃度は影響を受けず, 卵母細胞を葉酸欠乏に暴露できなかった可能性が高い. そこで, 飼育期間をさらに 22 日間延長した. 58 日間の葉酸欠乏食投与後の体重および飼料摂取量, 各臓器重量において対照群と葉酸欠乏食群に差は認められなかった (表 2-3). また, GS 群と対照群の比較から抗生物質による影響もみられなかった.

表 2-3. 葉酸欠乏食を 58 日間摂取した時の体重, 飼料摂取量および臓器中葉酸濃度

	GS 群	対照群	葉酸欠乏食群
体重と飼料摂取量			
試験開始日の体重 (g)	13.0 ± 0.4	12.9 ± 0.5	13.1 ± 0.5
58 日目の体重 (g)	29.7 ± 1.6	29.4 ± 0.8	28.2 ± 1.4
飼料摂取量 (g/日) ¹	3.9 ± 0.3	3.9 ± 0.1	3.8 ± 0.3
臓器重量			
肝臓 (g)	1.32 ± 0.06	1.21 ± 0.08	1.21 ± 0.16
(g/kg 体重)	40.4 ± 0.7	38.7 ± 1.7	43.8 ± 2.1
子宮 (g)	0.139 ± 0.03	0.130 ± 0.026	0.095 ± 0.019
(g/kg 体重)	4.92 ± 0.80	4.26 ± 0.92	3.49 ± 0.65
卵巣 (g)	0.0255 ± 0.0021	0.0210 ± 0.0052	0.0226 ± 0.0022
(g/kg 体重)	0.790 ± 0.078	0.685 ± 0.178	0.823 ± 0.022
葉酸			
血球 (nmol/mL)	1.4 ± 0.1	1.4 ± 0.1	0.1 ± 0.0 ^{***}
肝臓 (nmol/g)	18.6 ± 3.6	24.9 ± 1.0	5.6 ± 1.7 ^{***}
子宮 (pmol/g)	144 ± 0	137 ± 6	40 ± 4 ^{***}
2 日目の尿中排泄量 (nmol/日)	3.42 ± 2.70	3.43 ± 0.62	0.022 ± 0.022 ^{***}
55 日の尿中排泄量 (nmol/日)	5.80 ± 1.03	4.77 ± 2.06	0.028 ± 0.025 ^{***}

値はすべて平均±標準偏差. GS 群, Gold standard 群. (体重, n = 10, 体重以外 n = 5). ¹最終 3 日間の平均 (56~58 日). Student *t* 検定, 対照群 vs 葉酸欠乏食群. ^{***} *p* < 0.001.

3-2-5. 58 日間の葉酸欠乏食摂取が体内葉酸栄養におよぼす影響

尿中葉酸排泄量および臓器中葉酸濃度を表 2-3 に示した。葉酸欠乏食群の血球，肝臓，子宮の葉酸濃度は対照群に比べて顕著に低く，肝臓，子宮の葉酸濃度は対照群の 1/3 程度であった。血球に至っては対照群と葉酸欠乏食群の間に 14 倍の差が存在した。35 日の葉酸欠乏食群と 58 日の葉酸欠乏食群の各臓器葉酸濃度を比較したが，有意な差は認められなかった。

卵巣中葉酸濃度は対照群より葉酸欠乏食群の方が有意に低い値を示し，卵巣中においても低葉酸栄養状態であることを確認した（図 3-6A）。

3-2-6. 58 日間の葉酸欠乏食摂取が卵母細胞の質におよぼす影響

異常卵出現率は GS 群，対照群，葉酸欠乏食群でそれぞれ 12.2%，14.6%，20.0% であった（図 3-6B）。そのうち未成熟卵子は GS 群，対照群，葉酸欠乏食群でそれぞれ 2.9%，0%，5.7% であった。低葉酸栄養状態の影響は認められなかった。また GS 群と対照群の比較でも有意な差は認められず，抗生物質による影響は認められなかった。

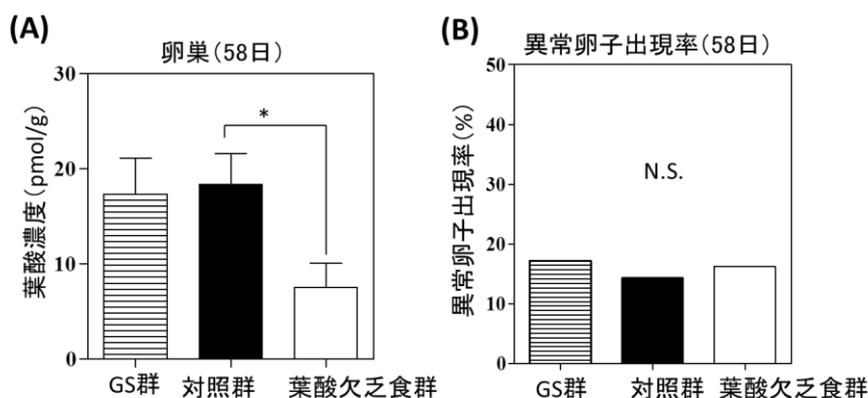


図 3-6. 葉酸欠乏食を 58 日間投与した時の異常卵子出現率

(A) 卵巣中葉酸濃度. (n = 5). Student *t* 検定, 対照群 vs 葉酸欠乏食群, * $p < 0.05$. (B) 異常卵子出現率 (GS 群, n = 29; 対照群, n = 70; 葉酸欠乏食群, n = 43). Chi-square 解析. N.S.: 有意差なし. GS 群: Gold standard 群.

3-3. ビタミン B₁ 栄養状態と卵母細胞の質の関係

3-3-1. ビタミン B₁ 欠乏食摂取が飼料摂取量におよぼす影響

ビタミン B₁ 欠乏症状の 1 つに飼料摂取量の減少が見られる^{20,21}). ビタミン B₁ 欠乏時およびビタミン B₁ 再投与時の飼料摂取量を図 3-7 に示した。本研究でも，ビタミン B₁ 欠乏食投与から 11 日目からテスト群の飼料摂取量が有意に低下した。テスト群の飼料摂取量は 14 日まで激減し，14 日からビタミン B₁ 再投与までのテスト群の飼料摂取量は対照群の半量を維持した。

ビタミン B₁ 再投与により急激に飼料摂取量が増加し，数日間は対照群より 1.4~1.6 倍量の飼料を摂取した。テスト群の飼料摂取量はビタミン B₁ 再投与から 5 日目に減少し，5 日以降からは対照群と差は認められなかった。

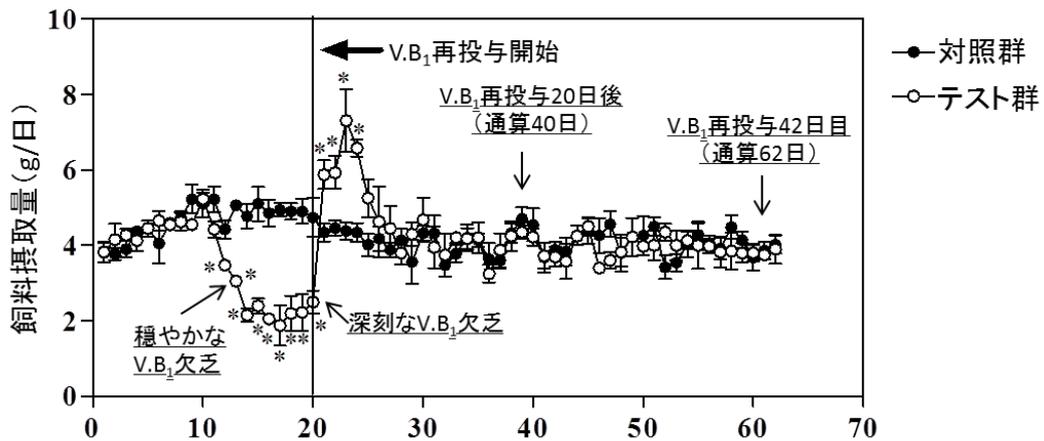


図 3-7. 飼料摂取量

ビタミン B₁ 欠乏症状である体重減少が認められない期間を「穏やかなビタミン B₁ 欠乏」、体重減少が認められた期間を「深刻なビタミン B₁ 欠乏」として矢印で示した。20 日目でテスト群の飼料をビタミン B₁ 欠乏食から対照食に変更した。ビタミン B₁ 再投与から 20 日後（通算 40 日目）と 42 日後（通算 62 日目）を矢印で示した。値は平均値±標準偏差。n = 5~11。Student *t*-test, **p* < 0.05, 対照群 vs. テスト群。

3-3-2. ビタミン B₁ 欠乏食投与が臓器中ビタミン B₁ 濃度におよぼす影響

穏やかなビタミン B₁ 欠乏時の肝臓、子宮、卵巣の各重量は対照群とテスト群間に差は認められなかった（表 2-4）。深刻なビタミン B₁ 欠乏時のテスト群の肝重量は対照群の約半分であったが、体重 1kg 当たりの肝重量では差は認められなかった（表 2-4）。

表 2-4. ビタミン B₁ 欠乏食摂取時の臓器重量、臓器中ビタミン B₁ 濃度および尿中ビタミン B₁ 排泄量

	ビタミン B ₁ 欠乏食投与 13 日目 (穏やかなビタミン B ₁ 欠乏状態)		ビタミン B ₁ 欠乏食投与 21 日目 (深刻なビタミン B ₁ 欠乏状態)	
	対照群	テスト群	対照群	テスト群
臓器重量				
肝臓 (g)	1.27 ± 0.6	26.2 ± 0.7	1.28 ± 0.05	0.68 ± 0.03***
(g/kg 体重)	45.5 ± 1.4	44.1 ± 1.0	46.0 ± 1.1	37.7 ± 0.7
子宮 (g)	0.119 ± 0.029	0.144 ± 0.034	-	-
(g/kg 体重)	4.18 ± 0.92	5.20 ± 1.03	-	-
卵巣 (g)	0.0208 ± 0.0011	0.0218 ± 0.0009	-	-
(g/kg 体重)	0.743 ± 0.039	0.813 ± 0.027	-	-
ビタミン B₁				
肝臓 (nmol/g)	22.8 ± 1.1	2.0 ± 0.2***	38.0 ± 2.5	0.9 ± 0.2***
子宮 (nmol/g)	4.82 ± 1.09	0.39 ± 0.12**	-	-
卵巣 (pmol/g)	676 ± 91	206 ± 123*	-	-
尿中排泄量 (nmol/日) ¹	51.6 ± 7.6	1.39 ± 0.24***	32.6 ± 3.6	1.31 ± 0.09***

値は平均値±標準偏差。尿中排泄量；n = 4~7, 肝臓；n = 4~12, 子宮, 卵巣, 血漿；n = 5。Student *t* 検定, 各ビタミン B₁ 欠乏時の対照群とテスト群で比較を行った。**p* < 0.05, ***p* < 0.01, ****p* < 0.001。PMSG 投与が尿中チアミン排泄量に影響を与えることを避けるために、腹腔投与前日の 24 時間尿を採取した。臓器中ビタミン B₁ はチアミンと TDP の含量。尿中ビタミン B₁ はチアミンのみ。

穏やかなビタミン B₁ と深刻なビタミン B₁ 欠乏時の肝臓、子宮および卵巣中ビタミン B₁ 濃度を表 2-4 に示した。穏やかなビタミン B₁ 欠乏時のビタミン B₁ 欠乏食群の肝臓、子宮中ビタミン B₁ 量は対照群の約 8% であり、子宮は対照群の約 30% と低値であった。深刻なビタミン B₁ 欠乏時の肝臓中ビタミン B₁ 濃度は対照群の 2.4% にまで低下していた。軽度および深刻なビタミン B₁ 欠乏時の尿中ビタミン B₁ 排泄量においても、対照群よりテスト群の方が顕著に低かった (表 2-4)。

3-3-3. ビタミン B₁ 欠乏食摂取が排卵数および血漿エストラジオール濃度におよぼす影響

軽度および深刻なビタミン B₁ 欠乏時の排卵数を表 2-5 に示した。軽度および深刻なビタミン B₁ 欠乏時の排卵数は両群間に差は認められなかった。穏やかなビタミン B₁ 欠乏時の血漿中エストラジオール濃度は対照群とテスト群の間に差は認められなかった。

表 2-5. ビタミン B₁ 欠乏時の排卵数と血漿中エストラジオール濃度

	ビタミン B ₁ 欠乏食投与 13 日目 (穏やかなビタミン B ₁ 欠乏)		ビタミン B ₁ 欠乏食投与 21 日目 (深刻なビタミン B ₁ 欠乏)	
	対照群	テスト群	対照群	テスト群
排卵数 (個/匹)	27 ± 7	34 ± 7	18 ± 4	33 ± 8
血漿エストラジオール (ng/mL)	36.4 ± 2.2	41.9 ± 5.6	-	-

値は平均値±標準偏差。排卵数：n = 4~7。血漿エストラジオール：n = 5。Student *t* 検定, 対照群 vs. テスト群。各ビタミン B₁ 欠乏時の対照群とテスト群で比較を行った。

3-3-4. ビタミン B₁ 欠乏食摂取が卵母細胞の質におよぼす影響

穏やかなビタミン B₁ 欠乏状態での異常卵子出現率は対照群とビタミン B₁ 欠乏群の間に差異は認められなかった (図 3-8, 17.1% vs 14.6%)。深刻なビタミン B₁ 欠乏状態では、テスト群の異常卵出現率は対照群の 3.2 倍に増加した (図 3-8, 13.8% vs 43.5%)。序論で述べた PDH 欠損卵子のように未成熟卵子が多く見られた (図 3-8, 0% vs 12.2%)。以上のことからビタミン B₁ 欠乏食投与期間によって卵母細胞の質へおよぼす影響は異なることが明らかとなった。

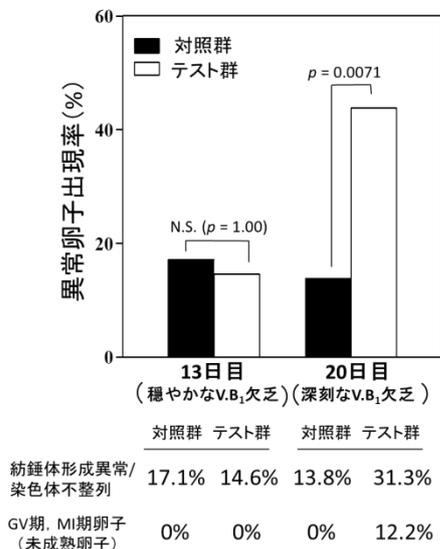


図 3-8. ビタミン B₁ 欠乏時の異常卵子出現率

グラフの下の数値は、紡錘体形成異常および染色体形成異常の割合と GV 期と MI 期卵子の割合をそれぞれ示した。卵母細胞数；n = 29~48。Chi-square 解析。p 値は図中に示した。N.S., 有意差なし。

3-3-5. ビタミン B₁再投与が臓器中ビタミン B₁濃度におよぼす影響

ビタミン B₁再投与から 20 日目と 42 日目の臓器重量を表 2-6 に示した。再投与 20 日目のテスト群の肝重量と 42 日目の対照群の間に差は認められず、再投与 20 日目の地点で肝重量は回復していた。再投与 42 日目のテスト群の肝臓、子宮、卵巣の各重量においても対照群と差は認められなかった。再投与 20 日目のテスト群の肝臓中ビタミン B₁濃度および尿中ビタミン B₁排泄量は再投与 42 日目の対照群と比較しても差は認められず、ビタミン B₁栄養状態は回復していた(表 2-6)。再投与 42 日目の肝臓、子宮および卵巣中のビタミン B₁濃度および尿中ビタミン B₁排泄量においても対照群とテスト群の間に差は認められず、卵巣のビタミン B₁栄養状態も回復していた(表 2-6)。

表 2-6. ビタミン B₁再投与後の排卵数と肝臓、子宮および卵巣中ビタミン B₁と尿中チアミン排泄量

	ビタミン B ₁ 欠乏食投与 20 日間 →ビタミン B ₁ 再投与 20 日目 (通算 40 日目)	ビタミン B ₁ 欠乏食投与 20 日間 →ビタミン B ₁ 再投与 42 日目 (通算 62 日目)	
	テスト群	対照群	テスト群
臓器重量			
肝臓 (g)	1.54 ± 0.09	1.39 ± 0.07	1.48 ± 0.06
(g/kg 体重)	50.0 ± 2.2	42.8 ± 1.2	46.0 ± 1.7
子宮 (g)	-	0.131 ± 0.034	0.141 ± 0.030
(g/kg 体重)	-	3.80 ± 0.94	4.41 ± 1.00
卵巣 (g)	-	0.0280 ± 0.0022	0.0287 ± 0.0021
(g/kg 体重)	-	0.826 ± 0.063	0.886 ± 0.068
ビタミン B₁			
肝臓 (nmol/g)	35.8 ± 4.8	34.0 ± 3.3	33.1 ± 3.2
子宮 (nmol/g)	-	3.65 ± 0.67	3.01 ± 0.58
卵巣 (pmol/g)	-	225 ± 59	102 ± 12
尿中排泄量 (nmol/日) ¹	38.0 ± 4.0	44.0 ± 4.9	40.0 ± 14.9

値は平均値±標準偏差。尿中排泄量；n = 4~7, 肝臓；n = 4~12, 子宮, 卵巣；n = 5。Student's *t* 検定, ビタミン B₁ 再投与 40 日目のテスト群または 62 日目のテスト群 vs 対照群。**p* < 0.05, ***p* < 0.01, ****p* < 0.001。PMSG 投与が尿中チアミン排泄量に影響を与えることを避けるために、腹腔投与前日の 24 時間尿を採取した。臓器中のビタミン B₁ はチアミンと TDP の合量。尿中ビタミン B₁ はチアミンのみ。

3-3-6. ビタミン B₁再投与時が排卵数および血漿エストロジオール濃度におよぼす影響

ビタミン B₁再投与 40 日目のテスト群の排卵数と再投与 42 日目の対照群の排卵数を比較しても差は認められなかった(表 2-7)。また、再投与 42 日目の対照群とテスト群の排卵数を比べたが、差は認められなかった(表 2-7)。血漿中エストロジオールにおいても、対照群とテスト群の間に差は認められなかった(表 2-7)。

3-3-7. ビタミン B₁再投与が卵母細胞の質におよぼす影響

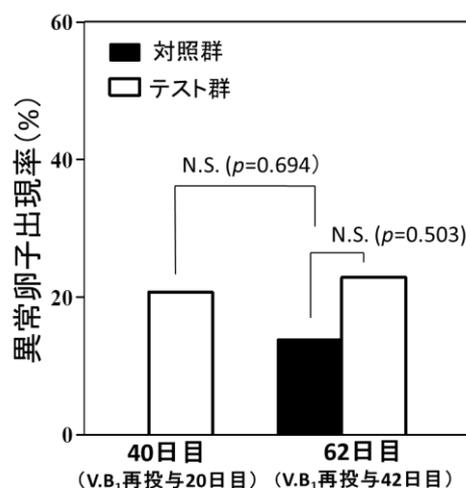
テスト群の異常卵子出現率はビタミン B₁再投与から 20 日目に 20.7%となり、42 日目に 22.9%までに低下した(図 3-9)。対照群と比較しても有意な差は認められなかった。また、未成熟卵子の割合も対照群と比べて差は認められなかった。深刻なビタミン B₁欠乏時のテスト群の異

常卵子出現率とビタミン B₁ 再投与から 20 日, 42 日目のテスト群の異常卵子出現率を比較したところ, それぞれ $p=0.0706$, $p=0.0503$ であった. 検定上の有意な差は認められなかったが $p=0.05$ に非常に近いことから, 卵母細胞の質の低下は回復したと考えられる.

表 2-7. ビタミン B₁ 再投与時の排卵数と血漿中エストラジオール濃度

	ビタミン B ₁ 欠乏食投与 20 日間 → ビタミン B ₁ 再投与 20 日目 (通算 40 日目)	ビタミン B ₁ 欠乏食投与 20 日間 → ビタミン B ₁ 再投与 42 日目 (通算 62 日目)	
	テスト群	対照群	テスト群
排卵数 (個/匹)	34 ± 5	17 ± 5	30 ± 7
血漿エストラジオール (ng/mL)	-	42.3 ± 2.8	40.1 ± 3.9

値は平均値±標準偏差. 排卵数, ; n = 4~7. 血漿エストラジオール : n = 5. Student's *t* 検定, ビタミン B₁ 再投与 40 日目のテスト群または 62 日目のテスト群 vs 対照群.



	テスト群	対照群	テスト群
紡錘体形成異常/ 染色体不整列	16.4%	8.6%	17.2%
GV期, MI期卵子 (未成熟卵子)	4.3%	5.3%	5.7%

図 3-9. ビタミン B₁ 再投与時の異常卵子出現率

グラフの下の数値は, 紡錘体形成異常および染色体形成異常の割合と GV 期と MI 期卵子の割合をそれぞれ示した. 卵母細胞数 ; n = 29~48 / 群. Chi-square 解析. *p* 値は図中に示した. N.S., 有意差なし.

3-4. ビオチン栄養状態と卵母細胞の質の関係

3-4-1. ビオチン欠乏食摂取が体重と飼料摂取量におよぼす影響

ビオチン欠乏食を 22 日間投与した時の体重と飼料摂取量を表 2-8 に示した. 体重および飼料摂取量は, 対照群とビオチン欠乏食群の間に差は認められなかった.

3-4-2. ビオチン欠乏食摂取が臓器中ビオチン濃度におよぼす影響

臓器重量および臓器中ビオチン濃度を表 2-8 に示した. 肝臓, 子宮および卵巣重量は 22 日間のビオチン欠乏食投与の影響は受けなかった. ビオチン欠乏食群の体重 1 kg 当たりの肝臓重

量は対照群に比べて重かった。肝臓、子宮および卵巣中のビオチン濃度は対照群に比べてビオチン欠乏食群の方が顕著に低くかった。また、ビオチン欠乏食群の尿中排泄量はほぼゼロに近かった。

3-4-3. ビオチン欠乏食摂取が尿中 3-HIA 排泄量におよぼす影響

対照群では尿中 3-HIA 排泄量は検出限界を下回った。ビオチン欠乏食群の尿中 3-HIA 排泄量は対照群に比べて高く、代謝レベルでビオチン不足状態であった。ビオチンの欠乏症状である脱毛症が観察された個体はいなかった。

表 2-8. 22 日間のビオチン欠乏食投与が体重、飼料摂取量および臓器中ビオチン濃度におよぼす影響

	対照群	ビオチン欠乏食群
体重推移と飼料摂取量		
試験開始日の体重 (g)	12.0 ± 0.3	12.5 ± 0.4
22 日目の体重 (g)	29.2 ± 0.7	27.4 ± 0.7
飼料摂取量 (g/日 ¹)	4.5 ± 0.2	4.5 ± 0.3
臓器重量		
肝臓 (g)	1.50 ± 0.06	1.69 ± 0.10
(g/kg 体重)	53.5 ± 1.3	63.0 ± 1.0 ^{***}
子宮 (g)	0.104 ± 0.024	0.087 ± 0.014
(g/kg 体重)	3.66 ± 0.72	3.27 ± 0.53
卵巣 (g)	0.0179 ± 0.0009	0.0157 ± 0.0009
(g/kg 体重)	0.641 ± 0.024	0.594 ± 0.050
ビオチン		
肝臓 (nmol/g)	4.04 ± 0.16	0.84 ± 0.04 ^{***}
子宮 (pmol/g)	154 ± 11	23.9 ± 6.4 ^{***}
卵巣 (pmol/g)	779 ± 93	138 ± 16 ^{***}
尿中排泄量 (nmol/日)	14.6 ± 0.9	0.0743 ± 0.0105 ^{***}
3-HIA		
尿中排泄量 (μmol/日)	N.D.	7.81 ± 1.16

値は平均値±標準偏差。n = 5, ただし体重は n = 10。¹ 試験食投与 19 日目から 21 日目までの飼料摂取量を示した。Student's *t* 検定, 対照群 vs. ビオチン欠乏食群。 ** *p* < 0.01, *** *p* < 0.001. N.D., 検出限界以下。

3-4-4. ビオチン欠乏食摂取が排卵数および血漿エストラジオール濃度におよぼす影響

ビオチン欠乏食を 22 日間投与した時の排卵数と血漿エストラジオール濃度を表 2-9 に示した。排卵数および血漿エストラジオール濃度への影響は認められなかった。

表 2-9. 22 日間のビオチン欠乏食摂取が排卵数および血漿エストラジオール濃度におよぼす影響

	対照群	ビオチン欠乏食群
排卵数 (個/匹)	20 ± 4	25 ± 2
血漿エストラジオール (pg/mL)	12.5 ± 2.6	12.8 ± 1.8

値は平均値±標準偏差。n = 5. Student's *t* 検定, 対照群 vs. ビオチン欠乏食群。

3-4-5. ビオチン欠乏食摂取が卵母細胞の質におよぼす影響

ビオチン欠乏食を 22 日間投与した時の異常卵子出現率を図 3-10 に示した。異常卵子出現率は対照群、ビオチン欠乏食群でそれぞれ 16.2%, 39.5%であった。対照群に比べてビオチン欠乏食群の方が 2.4 倍高く、卵母細胞の質は低下していた。GV 期および MI 期卵子は対照群、ビオチン欠乏食群ともに存在しなかった。

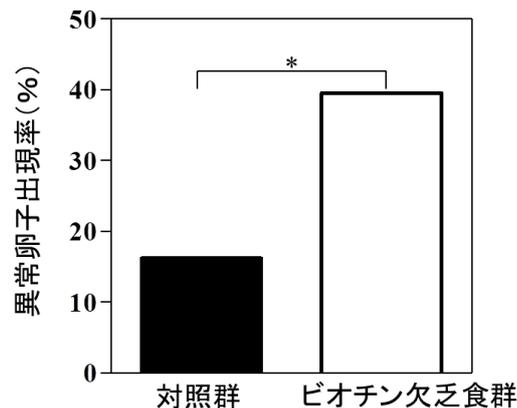


図 3-10. 22 日間のビオチン欠乏食投与時の異常卵出現率

異常卵子（紡錘体形成異常，染色体不整列，GV および MI 期卵子）の割合を示した。Chi-square 解析を行った。* $p < 0.05$. $n = 36, 38$.

3-4-6. ビオチン再投与が体重と飼料摂取量におよぼす影響

ビオチン再投与開始から 20 日後の体重と飼料摂取量を表 2-10 に示した。対照群と回復群の体重に有意な差は認められず、ビオチン欠乏食群は対照群と回復群より体重が軽かった。また、ビオチン再投与時からの体重増加量はビオチン欠乏食群で他の 2 群より低く、欠乏食投与 35 日目から体重は減少した。ビオチン欠乏食群の飼料摂取量は対照群と回復群より少なく、対照群と回復群の間異に差は認められなかった。

3-4-7. ビオチン再投与が臓器中ビオチン濃度におよぼす影響

臓器重量と各臓器のビオチン濃度を表 2-10 に示した。肝臓重量は 3 群に差は認められなかった。体重 1kg 当たりの肝臓重量は対照群に比べて回復群、ビオチン欠乏食群の方が約 1.1 倍重かった。子宮重量は対照群と回復群に比べてビオチン欠乏食群の方が低く、約半分の重さであった。体重 1kg 当たりの子宮重量は対照群に比べてビオチン欠乏食群の方が低く、回復群は対照群とビオチン欠乏食群の間であった。回復群の肝臓、子宮卵巣中ビオチン濃度は対照群と同等レベルにまで回復していた。ビオチン欠乏群は対照群、回復群に比べて顕著に低かった。尿中ビオチン排泄量もビオチン欠乏食群が最も低く、回復群は対照群と同等レベルであった。

3-4-8. ビオチン再投与が尿中 3-HIA 排泄量におよぼす影響

尿中 3-HIA 排泄量を表 2-10 に示した。回復群の尿中 3-HIA は検出限界を下回った。ビオチン欠乏食群の尿中 3-HIA 排泄量はビオチン欠乏食を 22 日間与えた時よりも増加しており、体内の代謝が乱れていた。また、ビオチン欠乏食投与から 23 日目から脱毛症状がビオチン欠乏食群で観られ、42 日目にはビオチン欠乏食群すべてのマウスに脱毛症状が見られた。一方、

回復群でも同様に 23 日目から脱毛症状が現れたが、ビオチン再投与によって完治した。

表 2-10. 20 日間のビオチン再投与が体重，飼料摂取量，臓器重量および体内ビオチン栄養状態におよぼす影響

	対照群 (対照食を 42 日間与えた)	回復群 (22 日間ビオチン 欠乏食→ 20 日間回復食)	ビオチン欠乏食群 (ビオチン欠乏食を 42 日間与えた)
体重および飼料摂取量			
22 日目の体重 ¹ (g)	28.3 ± 0.7	26.7 ± 0.5	27.3 ± 0.5
42 日目の体重 ² (g)	32.4 ± 0.9 ^a	31.8 ± 0.9 ^a	27.2 ± 0.7 ^b
体重増加量 (g/20 days ³)	4.0 ± 0.5 ^a	5.1 ± 0.5 ^a	-0.2 ± 0.9 ^b
飼料摂取量 (g/日 ⁴)	4.9 ± 0.4 ^a	5.2 ± 0.1 ^a	3.6 ± 0.1 ^b
臓器重量			
肝臓 (g)	1.52 ± 0.05	1.71 ± 0.12	1.51 ± 0.08
(g/kg 体重)	47.3 ± 1.6 ^b	54.1 ± 2.0 ^a	55.9 ± 1.2 ^a
子宮 (g)	0.145 ± 0.019 ^a	0.118 ± 0.010 ^a	0.061 ± 0.014 ^b
(g/kg 体重)	4.50 ± 0.50 ^a	3.80 ± 0.39 ^{ab}	2.20 ± 0.43 ^b
卵巣 (g)	0.0167 ± 0.0026	0.0133 ± 0.0023	0.0112 ± 0.0010
(g/kg 体重)	0.521 ± 0.074	0.416 ± 0.061	0.416 ± 0.037
ビオチン			
肝臓 (nmol/g)	4.11 ± 0.24 ^a	4.39 ± 0.12 ^a	0.84 ± 0.06 ^b
子宮 (pmol/g)	171 ± 17 ^a	195 ± 17 ^a	13.7 ± 1.5 ^b
卵巣 (pmol/g)	1302 ± 162 ^a	1165 ± 31 ^a	117 ± 35 ^b
尿中排泄量 (nmol/day)	9.77 ± 0.78 ^a	11.6 ± 2.3 ^a	0.0370 ± 0.0053 ^b
3-HIA			
尿中排泄量 (μmol/day)	0.75 ± 0.75 ^b	N.D. ^b	24.7 ± 2.5 ^a

値は平均値±標準偏差. n = 5 (22 日目と最終日の体重のみ n = 10). ¹回復食投与 1 日目の体重. ²回復食投与 20 日目の体重. ³ビオチン再投与開始日 (22 日目) から試験終了日 (42 日目) までの体重増加量を示した. ⁴40 日から 42 日までの 3 日間の飼料摂取量の平均を示した. N.D., 検出限界以下. One-way ANOVA の Tukey 検定, $p < 0.05$. ^{a,b}異なるアルファベット間で有意差あり.

3-4-9. ビオチン再投与が排卵数，血漿エストラジオール濃度および発情サイクルにおよぼす影響

20 日間のビオチン再投与時の排卵数，血漿エストラジオール濃度，発情サイクル日数を表 2-11 に示した. 排卵数および血漿エストラジオール濃度は 3 群間に差は認められなかった. ビオチン欠乏食群の発情サイクルは正常サイクル日数である 5 日を超え，発情サイクルの遅延が見られた. 回復群の発情サイクル日数は対照群とビオチン欠乏食群の間で，回復傾向にあった.

表 2-11. 20 日間のビオチン再投与が排卵数，血漿エストラジオール濃度，発情サイクルにおよぼす影響

	対照群 (対照食を 42 日間与えた)	回復群 (22 日間ビオチン 欠乏食→ 20 日間回復食)	ビオチン欠乏食群 (ビオチン欠乏食を 42 日間与えた)
排卵数 (個/匹)	40 ± 9	27 ± 3	27 ± 3
血漿エストラジオール (pg/mL)	9.1 ± 2.1	6.4 ± 1.6	13.0 ± 2.5
発情サイクル (日/サイクル)	4.7 ± 0.2 ^b	6.1 ± 1.0 ^{ab}	8.0 ± 0.7 ^a

値は平均値±標準偏差. n = 5, 6. One-way ANOVA の Tukey 検定, $p < 0.05$. ^{a,b}異なるアルファベット間で有意差あり.

3-4-10. ビオチン再投与が卵母細胞の質におよぼす影響

ビオチン再投与時の異常卵子出現率を図 3-11 に示した. 回復群の異常卵子出現率は 48.1% であり, 対照群の 18.1% に比べて有意に高かった. ビオチン欠乏食群の異常卵出現率は 58.5% であった. 回復群とビオチン欠乏食群に差は認められなかった. 観察された卵母細胞に未成熟卵子は確認されなかった.

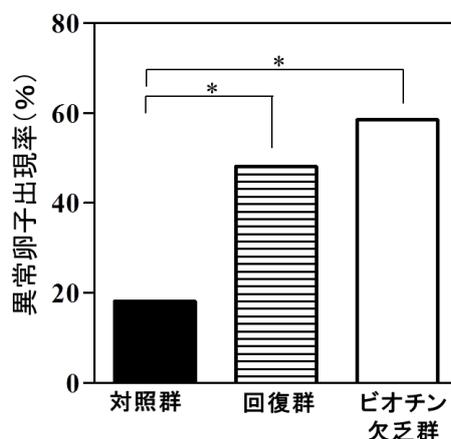


図 3-11. ビオチン栄養状態回復時の異常卵子出現率

ビオチン欠乏食を 21 日間投与した後, ビオチンを 20 日間再投与した時の異常卵子の割合 (紡錘体形成異常, 染色体不整列, GV および MI 期卵子) を示した. Chi-square 解析, $*p < 0.05$. n = 41 ~ 52.

4. 考察

本学位請求研究では、卵母細胞の質にとって回避すべき栄養状態は何か、という観点から 4 つの栄養素の栄養状態と卵母細胞の質の関係を明らかにすることを目的に行った。5.4 g/kg 体重/日の Trp 摂取は流産を誘発させること、葉酸低栄養状態は卵母細胞の減数分裂に影響を与えないこと、ビタミン B₁ およびビオチンの低栄養状態は異常卵子出現率を増加させることを明らかにした。ビタミンと生殖に関する報告は数多存在するが、そのほとんどが受精後に試験食を与えたものだった⁴⁹⁾。また報告はあるが、血中性ホルモン濃度や卵巣の組織像から卵胞の成長を観察することとどまり^{50,51)}、ビタミンやアミノ酸において卵母細胞そのものを観察した研究はなかった。卵母細胞を扱うには生殖や畜産分野の専門技術や特殊機器が必要である。本研究はこれらの専門技術と栄養学の統合により可能となった。本研究はビタミンと卵母細胞の質に関することを世界で初めて示唆した研究である。まずは、各栄養素と卵母細胞の質の関係についての考察を記述し、その後総合的な考察を記述した。

4-1. Trp 過剰栄養状態と卵母細胞の質

紡錘体形成異常卵子や染色体不整列卵子は染色体不分離を招き、流産や染色体異常児発症のリスクを高める。1 回の排卵のために卵巣中の 120 個の卵母細胞が減数分裂を開始するが、排卵される成熟卵子は 1 個である。所有卵母細胞数に比べて排卵される卵母細胞数はわずかである。排卵卵子の選択のメカニズムは不明である。おそらく質の良い卵母細胞の厳選という意義があると考えられている。つまり、卵巣は異常卵子を排卵しない機構を持っている可能性がある。ホルモンによる過排卵では通常より効率良く卵母細胞を得る反面、非生理的である。また、軽度の紡錘体形成異常や染色体形成異常であれば正常に胎児は成長する可能性もある。そのような生体の修正機能を考慮するために流産率を卵母細胞の質の指標として用いた。その結果、Trp においては 1.7 g/kg 体重/日の Trp 摂取では Trp 恒常性が維持できるが、5.4 g/kg 体重/日 Trp 摂取では体内の Trp 恒常性が維持しないこと、そして流産を誘発させることが明らかになった。流産は母体-胎児間の免疫寛容の崩壊、胎盤機能不全など、卵母細胞の質の劣化の要因でも起きる。Meier らは妊娠中期からの Trp 添加食摂取でも流産が起きることを報告した⁵²⁾。また Castro らは通常の培地の 2.5 倍から 5 倍の Trp (0.125 mmol/L) を胚培養培地に添加した場合、添加していない時よりもマウス胚の発生が促進されたが、発生停止胚も多かったことを報告した⁵³⁾。血中の栄養素濃度と卵胞液中の栄養素濃度には正の相関が認められる。妊娠によって 5% Trp 群の血中は約 0.9 mmol/L であったことから、胚が高 Trp 環境に暴露された可能性が考えられる。よって流産率を卵母細胞の質の指標とするには交絡因子の影響が強いため、Trp 栄養状態が卵母細胞の質そのものを低下させたかは判断できなかった。

Trp 過剰と妊娠に関する報告はあるが体内 Trp を測定しておらず、体内で Trp は蓄積しているのか、Trp の蓄積と流産には関係があるのかなど生体側の情報が欠如していた。本研究によって体内 Trp 蓄積が流産と関係が示唆された。5% Trp 群の肝臓中 Trp 異化代謝関連酵素の活性を図 4-1 にまとめた。余剰な Trp は肝臓で異化代謝される。Trp 摂取量依存的に肝臓中 TDO 活性と ACMSD 活性の増加が見られたことから、余剰な Trp を除去するために代謝応答が起きていた。しかし、Trp 代謝能力以上の Trp 摂取の結果、全血中 Trp 濃度の上昇が起きたと考えら

れる.興味深いことに尿中 Trp とその代謝産物の中で3-HK 尿中排泄量のみ5%Trp 群で急増し, その排泄量は対照群の170倍であった. Trp 異化代謝酵素はその代謝産物によってフィードバックを受ける. 3-HK はキヌレニンモノオキシゲナーゼ (KMO) によってキヌレニンから合成される.3-HK は Kynu により 3-HA へと代謝される. Kynu は 3-HA によって強い阻害を受ける. 5%Trp 群では Trp 異化代謝量の増加に伴い, 3-HA 濃度が上昇しキヌレニナーゼ活性を阻害したと考えられる. そのためキヌレニナーゼの基質である 3-HK が異化代謝されず, 急激に尿中排泄量が増加したと考えられる. キヌレニナーゼ活性抑制が Trp 異化代謝能力を低下させ, Trp 恒常性の崩壊につながったのかもしれない.

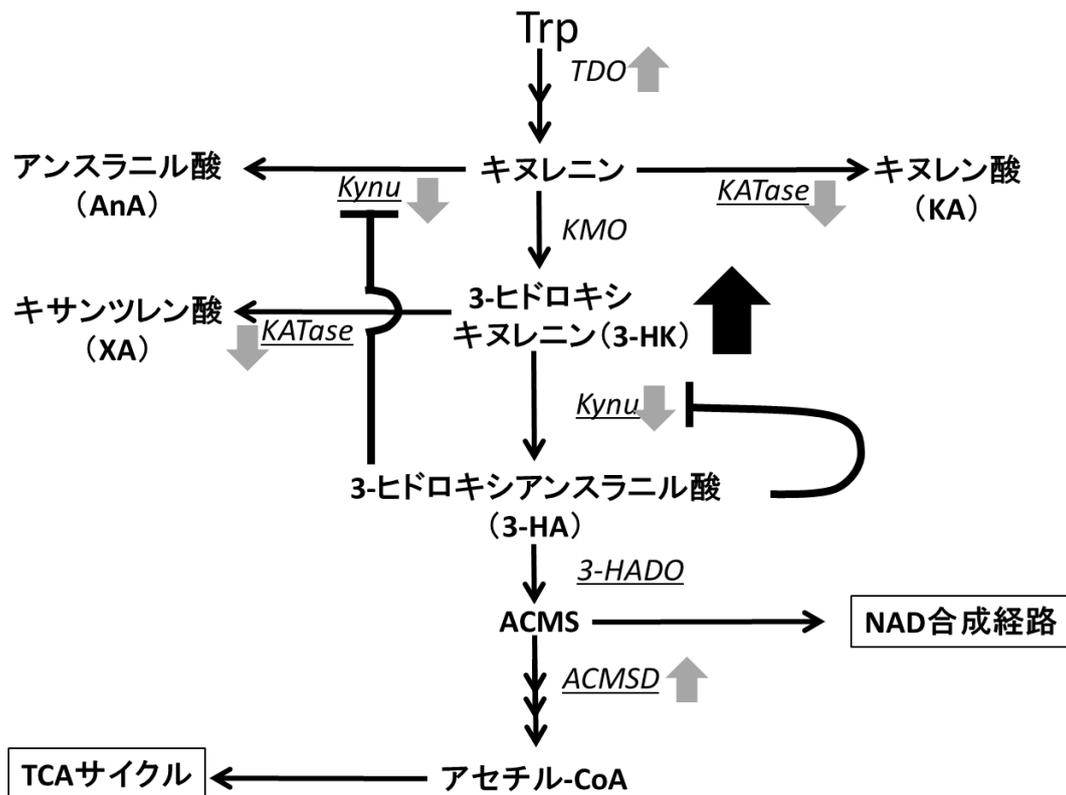


図 4-1. 5%Trp 群の Trp 異化代謝

5%Trp 群の尿中 3-HK 排泄量の急激な増加は, 3-HA による Kynu 活性阻害によるものと考えられる. 灰色の矢印は酵素活性の増減を示している. TDO : Trp オキシゲナーゼ, Kynu : キヌレニナーゼ, KATase : キヌレニンアミノトランスフェラーゼ, 3-HADO : 3-ヒドロキシアンスラニル酸オキシゲナーゼ, ACMSD : アミノカルボキシムコンネートセミアルデヒド脱炭素酵素.

4-2. 葉酸低栄養状態と卵母細胞の質

葉酸代謝能力とダウン症候群児発症リスクの関係について疫学調査を中心とに世界中で研究されている⁵⁴⁻⁵⁶. 特に, 5-, 10-メチレンテトラヒドロ葉酸を 5-メチルテトラヒドロ葉酸へと代謝するメチレンテトラヒドロ葉酸レダクターゼは 677C>T の多型を持つ. 変異体のホモ接合の人はその活性が低く, 酵素が不安定という特徴を持つ⁵⁷. 本研究で得た結果は, 葉酸とダウン症候群の関係を否定するものであった. 末梢への葉酸取り込みは主に還元型葉酸キャリアー

(RFC)が行っている。RFCは腎臓や胸腺での遺伝子発現が強く、肝臓での遺伝子発現は弱い⁵⁸⁾。また、葉酸受容体の発現量は子宮より卵巣に多く発現している⁵⁹⁾。本研究で卵巣の葉酸濃度が子宮より低下しづらい現象が見られたことと、卵管の輸送体発現量の多さが関与しているのかもしれない。今回、葉酸低栄養状態は卵母細胞の減数分裂に影響をおよぼさなかった。卵巣、卵管にとって葉酸が重要であるために、生体はそのような工夫をして葉酸欠乏状況下でも卵巣と卵管の葉酸栄養状態を維持できるように工夫しているのかもしれない。もしそうであれば、本研究の結果は葉酸栄養の重要性を示唆する結果ともとらえることができる。

ホモシステインの蓄積は活性酸素の増加を招くことから卵母細胞の質との関係が研究されている^{34,60)}。不妊治療中の女性の卵胞中ホモシステイン濃度と卵胞の成長に負の相関が認められたことを Boxmeer らは報告している³⁴⁾。Ocal らは不妊治療中の女性の内、妊娠した女性と妊娠しなかった女性の卵胞中ホモシステイン濃度には2倍の差が認められたが、胚の質とホモシステイン濃度の関係は認められなかったと報告している⁶⁰⁾。葉酸欠乏による高ホモシステイン血症モデル動物の作製においても4週間の葉酸欠乏食投与で、血漿中ホモシステイン濃度の上昇が観察されている³³⁾。本研究では最長58日間の葉酸欠乏食を投与していることから、葉酸欠乏症状が現れるには十分な期間を置いている。これらの報告と本研究結果を合わせて考えると、ホモシステインは受精後の胎児の発育や妊娠の維持に対しては悪影響を及ぼす可能性はあるが、卵母細胞の質そのものには影響しないと考えられる。

4-3. ビタミン B₁ 低栄養状態と卵母細胞の質

穏やかなビタミン B₁ 欠乏時の卵巣中のビタミン B₁ 量は PDH の TDP に対する Km 値 0.2 nmol/L⁶¹⁾を下回っていたことから、卵巣中の PDH 活性は低下していたと考えられる。しかし予想に反し、異常卵子出現率は増加しなかった。GV 期から GVBD への移行にはピルビン酸酸化は必須ではないという報告がある¹⁰⁾。また、卵母細胞中には脂肪が蓄えられている⁶²⁾。穏やかなビタミン B₁ 欠乏時にはピルビン酸が代謝できなくとも脂肪がエネルギー源の代替をした可能性がある。一方、深刻なビタミン B₁ 欠乏時には異常卵出現率は2倍以上に増加した。深刻なビタミン B₁ 欠乏時には脂肪や非脂肪組織重量の減少が起きる⁶³⁾。脂肪や一部のアミノ酸はアセチル-CoA になることから、PDH を介さなくても TCA 回路に流入でき、エネルギー産生に利用される。そしてついに欠乏食投与 21 日目には、脂肪が枯渇したと考えられる。体脂肪率と排卵の関係は強い。それは体脂肪率がある一定ラインを下回るとエストロジオールなどのホルモン分泌量が減少するためである^{64,65)}。深刻なビタミン B₁ 欠乏時には発情サイクルが停止したのもそのためと考えられる。GV 期から GVBD への移行には脂肪酸酸化が必要である¹⁰⁾。深刻なビタミン B₁ 欠乏時に GV 期卵子増加した背景には、卵母細胞中に蓄えられていた脂肪が枯渇し、脂肪酸酸化できなかったことを示しているのではないだろうか。長期の絶食状態のマウスを過排卵させた場合も同様に GV 期卵子の割合が増加する⁶⁶⁾。おそらく卵母細胞内の脂肪を使い果たしたため、ホルモン投与の刺激によって排卵はするものの卵成熟が不完全なまま排卵されたと考えられる。

深刻なビタミン B₁ 欠乏時でそして、ビタミン B₁ の再投与は食欲を回復させ、卵母細胞内のエネルギー源や脂肪が確保できたことで、ビタミン B₁ 再投与から 20 日後の卵成熟は完遂でき

たとえられる。発情サイクルの再開はこの考えを支持している。

以上のことから、体内のビタミン B₁ そのものが卵母細胞の質を低下させるのではなく、ビタミン B₁ 欠乏によるエネルギー欠乏が卵母細胞の質を低下させることが示唆された。序論の「これまでの研究と最新の知見と課題」には40%カロリー制限は卵母細胞の質の低下を抑制する¹⁶⁾と記述し、一見矛盾しているように感じられる。しかし、カロリー制限では7ヵ月のカロリー制限期間ののち、通常の飼料を1ヵ月間自由摂食させてから過排卵させているため、エネルギー栄養状態の点で大きく異なるためと考えられる。

4-4. ビオチン低栄養状態と卵母細胞の質

妊娠期間中のビオチン欠乏は奇形児や低体重児の原因となる^{40,41)}ことは知られている。本研究は非妊娠時のビオチン低栄養は卵母細胞の質を低下させることを初めて明らかにした。ビオチンは4つのカルボキシラーゼの補酵素として、糖新生や脂肪酸合成、分岐鎖アミノ酸代謝に関与している。カルボキシラーゼ活性はビオチン依存的である。ビオチン欠乏食投与19日の尿中3-HIA排泄量からビオチン欠乏食群マウスの体内カルボキシラーゼ活性が示唆された。回復群の3-HIA尿中排泄量はほぼ0であり、体内カルボキシラーゼ活性は回復したと考えられるが、卵母細胞の質の劣化は回復しなかった。このことから、ビオチン低栄養状態による卵母細胞の質の低下は、カルボキシラーゼ活性低下によるものではないと考えた。

補酵素以外のビオチンの生体内機能にはビオチニル化がある。ヒストンH4のリジン残基のビオチニル化は、DNA修復や異質染色体の構築、遺伝子の安定性に関与している^{67,68)}。ヒストンのビオチニル化はビオチン濃度に依存する⁶⁹⁾ことから、ヒストンのビオチニル化は卵母細胞の質の低下に関与しているかもしれない。興味深いことに、ビオチンはミトコンドリアの電子伝達系のタンパク質発現に関与していること示唆されている。ビオチン欠乏状態にしたヒト肺繊維芽細胞は細胞中の4種のCOXの内、COX IIとCOX IVのタンパク質発現が減少した^{70,71)}。さらにヘム合成量が約1/2に減少、細胞への鉄の取り込みも約1/2に減少した⁷⁰⁾。COX IIはコハク酸からの電子をユビキノンに受け渡す。COX IVはCOX I, COX II, COX IIIを介して伝達された電子をO₂へ移動させ、O₂を還元してH₂Oを生成する。In vitroでシトクロムc酸化阻害剤を添加したヒト肺繊維芽細胞のCOX IIとCOX IVタンパク質発現量が低下し、一酸化窒素合成酵素(NOS)活性が増加した⁷⁰⁾という報告がある。In vivoでもこのようなことが起きるか、またビオチン再投与してもCOX IIとCOX IVタンパク質発現量やミトコンドリア機能の低下は回復するのかなどは分かっていない。H₂O₂を加えた培地でGV期卵子を培養し、酸化ストレス環境に暴露させるとミトコンドリア膜電位が低下し、卵子細胞質中のATP量が減少、MII期の紡錘体が異様に短い卵子が増加した²⁸⁾。本研究でビオチン不足による卵母細胞の質の低下には、ミトコンドリアが関与しているかもしれない。ビオチンが減数分裂においてどのように関与しているのかについてはさらなる検討が必要である。

4-5. 卵母細胞の質の低下の可逆性の違い

20日間のビタミンB₁再投与によって卵母細胞の質の低下は回復したが、同じく20日間ビオチンを再投与しても卵母細胞の質の低下は回復しなかった。この違いは、各栄養素の不足や欠

乏が与えるダメージが卵母細胞の成熟のどの段階に作用しているかの違いにあると考えられる (図 14-2). 未成熟卵子にはダメージを与えないが, 減数分裂過程が障害されて異常卵子出現率が増加した場合, 未成熟卵子は傷ついていないので, 減数分裂に障害を与えていた要因 (各栄養素の不足や欠乏) が消えれば, また正常な減数分裂を行うことができるのである (図 4-2A)

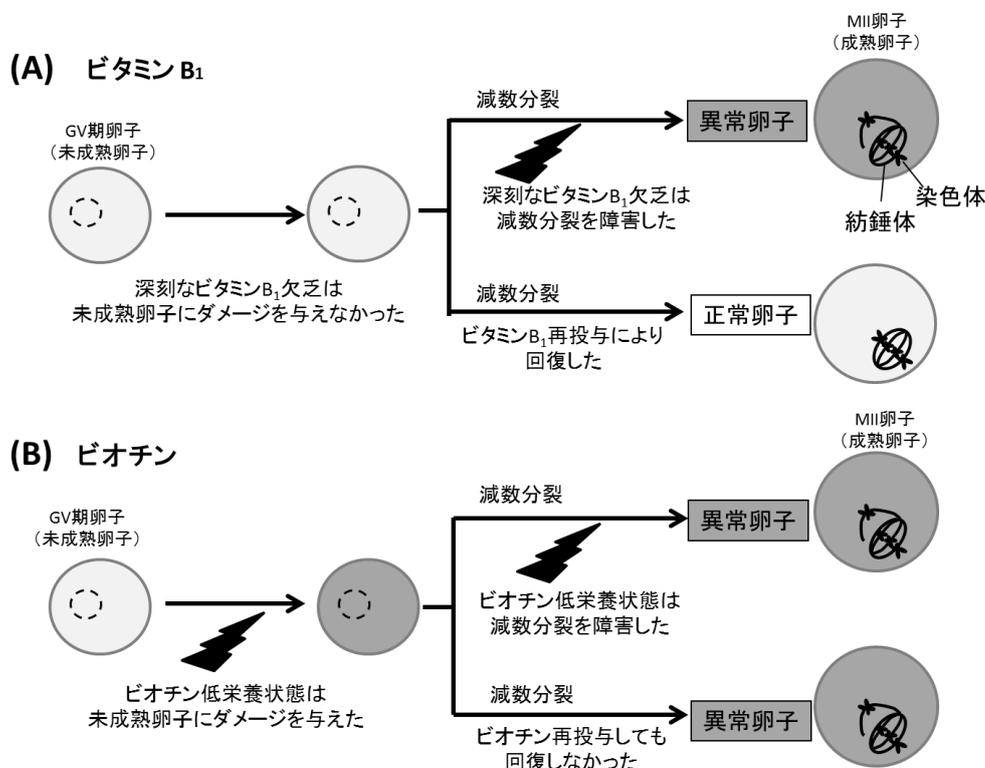


図 4-2. 栄養不良のダメージを受ける対象が卵成熟前後の違いによる卵母細胞の運命の違い
 本学位研究によって栄養素によって卵母細胞に与えるダメージの対象が異なることが明らかになった。ビタミン B₁ の場合 (A), 未成熟卵子 (GV 期) 卵子にダメージを与えないが, 減数分裂に障害が出ることにより異常卵子出現率が増加した。この場合, 未成熟卵子は正常なので, ビタミン B₁ 栄養状態の回復により卵母細胞の質の低下は回復した。ビオチンの場合 (B), 未成熟卵子と減数分裂に障害を与えたため, ビオチン栄養状態が回復しても卵母細胞の質の低下は改善しなかった。

一方, 卵母細胞は GV 期卵子 (未成熟卵子) として卵巣にストックされている。未成熟卵子がダメージを受けた場合, そのダメージが消えた (各栄養素の栄養状態が回復した) としても, 傷ついた卵母細胞は正常な減数分裂を行えず, 異常卵子となる (図 4-2B)。つまりビオチンは減数分裂だけでなく未成熟卵子にも何らかのダメージを与えたと考えられる。このことはビオチンに未成熟卵子の質を保持する働きがあることが初めて示唆された。

今回の様な回復実験を行った例はない。過去に報告のある栄養素で回復実験がなされれば, 卵母細胞の質の低下の予防策で重点的にアセスメントしたほうが良いポイントが絞れるだろう。栄養素ごとに卵母細胞への影響が異なることが示され, 栄養素ごとに卵母細胞の質の低下との関係を検討する必要性が示唆された。

4.6. 卵母細胞の質の低下と生体指標

尿には余剰分が排泄されるため, 尿中排泄量を測定することで体内飽和状態であることを示

す。そのため尿中排泄量はその性格上、不足の程度までは反映しない。不足の程度とは、①尿排泄量はゼロだが、体内（血中や肝臓など）の栄養素濃度は維持できている、②体内の栄養素濃度が減少し始めたが、組織の貯蔵分が減少しただけで、代謝への影響はない、③代謝に混乱をきたすほど体内の栄養素濃度が減少した、の3つに分けることができる。過剰の場合であっても、尿中排泄量は代謝変動が起きていることを推察する重要なアイテムであるが、その蓄積の程度までを知ることはできない。そこで、代謝レベルの情報を示す機能性生体指標が有効となる。

Trp 過剰摂取においては、3-HK 尿中排泄量はヒトの Trp 過剰摂取の指標となる⁷²⁾ことが示唆されている。5%Trp 群でのみ 3-HK 尿中排泄量の増加が認められたことから、Trp 過剰摂取による流産を回避するための指標としても利用できる可能性が示唆された。ビタミン B₁ 欠乏症状として飼料摂取量や体重減少がある。ビタミン B₁ では体重推移が卵母細胞の質の低下に対する機能性生体指標となることが示唆された。ビオチン欠乏では脱毛症や体重減少が起きる。ビオチン欠乏食 22 日目の時点で、これらの体重減少は観察されなかった。しかし、3-HIA 尿中排泄量は増加していたことから、3-HIA はビオチン栄養状態の機能性生体指標だけでなくビオチン低栄養状態による卵母細胞の質の低下においても指標となることが示唆された。

栄養素の過剰および欠乏には必ず潜在的な部分が存在する。卵母細胞の質の低下を回避するためにも、精度の高い生体指標の開発が必要とされる。

5. まとめ

本学位請研究では、4つの栄養素（Trp, 葉酸, ビタミン B₁, ビオチン）と卵母細胞の質との関係を明らかにすることを目的に行った。その結果、①流産を誘発させる1日のTrp摂取量は5.4 g/kg体重であること、②葉酸低栄養状態は卵母細胞の減数分裂に影響しないこと、③ビタミン B₁ 欠乏は卵母細胞の質を低下させるが、その再投与によって回復すること、④ビオチン低栄養状態は卵母細胞の質を低下させ、ビオチン栄養状態の回復によって低下した卵母細胞の質は回復しないことを明らかにした。以上のことから、栄養素によって卵母細胞へ与える影響が異なることから、それぞれの栄養素について卵母細胞の質への影響を検討する必要性が示唆された。

6. 引用文献

- [1] Slama R, Bouyer J, Windham G, Fenster L, Werwatz A, Swan SH. Influence of paternal age on the risk of spontaneous abortion. *Am J Epidemiol*. 2005; 161:816-23.
- [2] Huether CA, Ivanovich J, Goodwin BS, Krivchenia EL, Hertzberg VS, Edmonds LD, May DS, Priest JH. Maternal age specific risk rate estimates for Down syndrome among live births in whites and other races from Ohio and metropolitan Atlanta, 1970-1989. *J Med Genet*. 1998; 35:482-90.
- [3] Morris JK, Mutton DE, Alberman E. Revised estimates of the maternal age specific live birth prevalence of Down's syndrome. *J Med Screen*. 2002; 9:2-6.
- [4] Markström E, Svensson ECh, Shao R, Svanberg B, Billig H. Survival factors regulating ovarian apoptosis dependence on follicle differentiation. *Reproduction*. 2002; 123:23-30.
- [5] Biggers JD, Whittingham DG, Donahue RP. The pattern of energy metabolism in the mouse oöcyte and zygote. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. 1967; 58:560-567.
- [6] Yamashita Y, Nishibori M, Terada T, Isobe N, Shimada M. Gonadotropin-induced delta14-reductase and delta7-reductase gene expression in cumulus cells during meiotic resumption of porcine oocytes. *Endocrinology*. 2005; 146:186-94.
- [7] Su YQ, Sugiura K, Wigglesworth K, O'Brien MJ, Affourtit JP, Pangas SA, Matzuk MM, Eppig JJ. Oocyte regulation of metabolic cooperativity between mouse cumulus cells and oocytes: BMP15 and GDF9 control cholesterol biosynthesis in cumulus cells. *Development*. 2008; 135:111-21.
- [8] Downs SM, Utecht AM. Metabolism of radiolabeled glucose by mouse oocytes and oocyte-cumulus cell complexes. *Biol Reprod*. 1999; 60:1446-52.
- [9] Sutton ML, Gilchrist RB, Thompson JG. Effects of in-vivo and in-vitro environments on the metabolism of the cumulus-oocyte complex and its influence on oocyte developmental capacity. *Hum Reprod Update*. 2003; 9:35-48.
- [10] Downs SM, Houghton FD, Humpherson PG, Leese HJ. Substrate utilization and maturation of cumulus cell-enclosed mouse oocytes: evidence that pyruvate oxidation does not mediate meiotic induction. *J Reprod Fertil*. 1997; 110:1-10.
- [11] Patel J, Tan SL, Hartshorne GM, McAinsh AD. Unique geometry of sister kinetochores in human oocytes during meiosis I may explain maternal age-associated increases in chromosomal abnormalities. *Biol Open*. 2015. pii: bio.016394.
- [12] Pan H, Ma P, Zhu W, Schultz RM. Age-associated increase in aneuploidy and changes in gene expression in mouse eggs. *Dev Biol*. 2008; 316:397-407.
- [13] Hornak M, Jeseta M, Musilova P, Pavlok A, Kubelka M, Motlik J, Rubes J, Anger M. Frequency of aneuploidy related to age in porcine oocytes. *PLoS One*. 2011; 6:e18892.
- [14] Luzzo KM, Wang Q, Purcell SH, Chi M, Jimenez PT, Grindler N, Schedl T, Moley KH. High fat diet induced developmental defects in the mouse: oocyte meiotic aneuploidy and fetal growth retardation/brain defects. *PLoS One*. 2012; 7:e49217.
- [15] Tian X, Diaz FJ. Zinc depletion causes multiple defects in ovarian function during the periovulatory period in mice. *Endocrinology*. 2012; 153:873-86.

- [16] Selesniemi K, Lee HJ, Muhlhauser A, Tilly JL. Prevention of maternal aging-associated oocyte aneuploidy and meiotic spindle defects in mice by dietary and genetic strategies. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011; 108:12319-24.
- [17] Valsangkar D, Downs SM. A requirement for fatty acid oxidation in the hormone-induced meiotic maturation of mouse oocytes. *Biol Reprod*. 2013; 89:43.
- [18] Liu M, Yin Y, Ye X, Zeng M, Zhao Q, Keefe DL, Liu L. Resveratrol protects against age-associated infertility in mice. *Hum Reprod*. 2013; 28:707-17.
- [19] Rezk Y, Huff C, Rizk B. Effect of glutamine on preimplantation mouse embryo development in vitro. *Am J Obstet Gynecol*. 2004; 190:1450-4.
- [20] Shibata K, Shimizu A, Fukuwatari T. Vitamin B₁ Deficiency Does not Affect the Liver Concentrations of the Other Seven Kinds of B-Group Vitamins in Rats. *Nutr Metab Insights*. 2013 ;6:1-10.
- [21] Shibata K, Kobayashi R, Fukuwatari T. Vitamin B₁ deficiency inhibits the increased conversion of tryptophan to nicotinamide in severe food-restricted rats. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2015 ;79:103-8.
- [22] Gu L, Liu H, Gu X, Boots C, Moley KH, Wang Q. Metabolic control of oocyte development: linking maternal nutrition and reproductive outcomes. *Cell Mol Life Sci*. 2015; 72:251-71
- [23] Van Winkle LJ, Dickinson HR. Differences in amino acid content of preimplantation mouse embryos that develop in vitro versus in vivo: in vitro effects of five amino acids that are abundant in oviductal secretions. *Biol Reprod*. 1995; 52:96-104.
- [24] Cardinali DP. Melatonin. A mammalian pineal hormone. *Endocr. Rev*. 1981;2:327-46.
- [25] Gross B, Ronen N, Honigman S, Livne E. Tryptophan toxicity--time and dose response in rats. *Adv Exp Med Biol*. 1999;467:507-16.
- [26] Ronen N, Gross B, Ben-Shachar D, Livne E. The effects of induced kynurenine pathway on immunocytochemical changes in rat tissues following excessive L-tryptophan consumption. *Adv Exp Med Biol*. 1996;398:177-82.
- [27] Ma Y, Ge A, Zhu W, Liu YN, Ji NF, Zha WJ, Zhang JX, Zeng XN, Huang M. Morin Attenuates Ovalbumin-Induced Airway Inflammation by Modulating Oxidative Stress-Responsive MAPK Signaling. *Oxid Med Cell Longev*. 2016; 2016:5843672.
- [28] Zhang X, Wu XQ, Lu S, Guo YL, Ma X. Deficit of mitochondria-derived ATP during oxidative stress impairs mouse MII oocyte spindles. *Cell Res*. 2006; 16:841-50.
- [29] Burgoon JM, Selhub J, Nadeau M, Sadler TW. Investigation of the effects of folate deficiency on embryonic development through the establishment of a folate deficient mouse model. *Teratology*. 2002; 65:219-27.
- [30] Oliver TR, Middlebrooks CD, Tinker SW, Allen EG, Bean LJ, Begum F, Feingold E, Chowdhury R, Cheung V, Sherman SL. An examination of the relationship between hotspots and recombination associated with chromosome 21 nondisjunction. *PLoS One*. 2014; 9:e99560.

- [31] Martínez-Frías ML. The biochemical structure and function of methylenetetrahydrofolate reductase provide the rationale to interpret the epidemiological results on the risk for infants with Down syndrome. *Am J Med Genet A*. 2008; 146A:1477-82.
- [32] Hobbs CA, Sherman SL, Yi P, Hopkins SE, Torfs CP, Hine RJ, Pogribna M, Rozen R, James SJ. Polymorphisms in genes involved in folate metabolism as maternal risk factors for Down syndrome. *Am J Hum Genet*. 2000; 67:623-30.
- [33] Teng YW, Cerdena I, Zeisel SH. Homocysteinemia in mice with genetic betaine homocysteine S-methyltransferase deficiency is independent of dietary folate intake. *J Nutr*. 2012; 142:1964-7.
- [34] Boxmeer JC, Steegers-Theunissen RP, Lindemans J, Wildhagen MF, Martini E, Steegers EA, Macklon NS Homocysteine metabolism in the pre-ovulatory follicle during ovarian stimulation. *Hum Reprod*. 2008; 23:2570-6.
- [35] Strumiło S. Short-term regulation of the mammalian pyruvate dehydrogenase complex. *Acta Biochim Pol*. 2005;52:759-64.
- [36] Czerniecki J, Czygier M. Cooperation of divalent ions and thiamin diphosphate in regulation of the function of pig heart pyruvate dehydrogenase complex. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*. 2001; 47:385-6.
- [37] Chen L, Shu Y, Liang X, Chen EC, Yee SW, Zur AA, Li S, Xu L, Keshari KR, Lin MJ, Chien HC, Zhang Y, Morrissey KM, Liu J, Ostrem J, Younger NS, Kurhanewicz J, Shokat KM, Ashrafi K, Giacomini KM. OCT1 is a high-capacity thiamine transporter that regulates hepatic steatosis and is a target of metformin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014; 111:9983-8.
- [38] Johnson MT, Freeman EA, Gardner DK, Hunt PA. Oxidative metabolism of pyruvate is required for meiotic maturation of murine oocytes in vivo. *Biol. Reprod*. 2007; 77:2-8.
- [39] Smith EM, Hoi JT, Eissenberg JC, Shoemaker JD, Neckameyer WS, Ilvarsonn AM, Harshman LG, Schlegel VL, Zemleni J. Feeding *Drosophila* a biotin-deficient diet for multiple generations increases stress resistance and lifespan and alters gene expression and histone biotinylation patterns. *J Nutr*. 2007; 137:2006-12.
- [40] Watanabe T. Teratogenic effects of biotin deficiency in mice. *J Nutr*. 1983; 113:574-81.
- [41] Watanabe T, Endo A. Species and strain differences in teratogenic effects of biotin deficiency in rodents. *J Nutr*. 1989; 119:255-61.
- [42] Báez-Saldaña A, Camacho-Arroyo I, Espinosa-Aguirre JJ, Neri-Gómez T, Rojas-Ochoa A, Guerra-Araiza C, Larrieta E, Vital P, Díaz G, Chavira R, Fernandez-Mejia C. Biotin deficiency and biotin excess: effects on the female reproductive system. *Steroids*. 2009; 74:863-9.
- [43] Reeves, R. G.: Components of the AIN-93 diets as improvements in the AIN-76A diet. *J. Nutr*. 1998; 127, 838S-841S
- [44] Iwata H, Matsuda T, Tonomura H. Improved high-performance liquid chromatographic determination of thiamine and its phosphate esters in animal tissues. *J. Chromatogr*. 1988; 26:317-23.

- [45] Mock DM, Mock NI. Lymphocyte propionyl-CoA carboxylase is an early and sensitive indicator of biotin deficiency in rats, but urinary excretion of 3-hydroxypropionic acid is not. *J Nutr.* 2002; 132:1945-50.
- [46] Watanabe T, Oguchi K, Ebara S, Fukui T. Measurement of 3-hydroxyisovaleric acid in urine of biotin-deficient infants and mice by HPLC. *J Nutr.* 2005; 135:615-8.
- [47] Okuno A, Fukuwatari T, Shibata K. Urinary excretory ratio of anthranilic acid/kynurenic acid as an index of the tolerable amount of tryptophan. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2008; 72:1667-72.
- [48] Badawy AA. Tryptophan metabolism, disposition and utilization in pregnancy. *Biosci Rep.* 2015; 35.
- [49] Matsueda S, Niiyama Y. The effects of excess amino acids on maintenance of pregnancy and fetal growth in rats. *J Nutr Sci Vitaminol.* 1982;28:557-73.
- [50] Liu G, Shi F, Blas-Machado U, Duong Q, Davis VL, Foster WG, Hughes CL. Ovarian effects of a high lactose diet in the female rat. *Reprod Nutr Dev.* 2005; 45:185-92.
- [51] Liu G, Shi F, Blas-Machado U, Yu R, Davis VL, Foster WG, Magoffin DA, Hughes CL. Dietary galactose inhibits GDF-9 mediated follicular development in the rat ovary. *Reprod Toxicol.* 2006; 21:26-33.
- [52] Meier AH, Wilson JM. Tryptophan feeding adversely influences pregnancy. *Life Sci.* 1983;11:1193-6.
- [53] Castro W, Bueno Sánchez JC, Piedrahita-Ochoa C, Cadavid J AP. Modulation of murine blastocyst hatching in vitro by glutamine and tryptophan. *Braz J Med Biol Res.* 2011; 44:748-53.
- [54] Locke AE, Dooley KJ, Tinker SW, Cheong SY, Feingold E, Allen EG, Freeman SB, Torfs CP, Cua CL, Epstein MP, Wu MC, Lin X, Capone G, Sherman SL, Bean LJ. Variation in folate pathway genes contributes to risk of congenital heart defects among individuals with Down syndrome. *Genet Epidemiol.* 2010; 34:613-23.
- [55] Coppedè F, Grossi E, Migheli F, Migliore L. Polymorphisms in folate-metabolizing genes, chromosome damage, and risk of Down syndrome in Italian women: identification of key factors using artificial neural networks. *BMC Med Genomics.* 2010; 3:42.
- [56] Coppedè F. The genetics of folate metabolism and maternal risk of birth of a child with Down syndrome and associated congenital heart defects. *Front Genet.* 2015; 6:223.
- [57] Goyette P, Frosst P, Rosenblatt DS, Rozen R. Seven novel mutations in the methylenetetrahydrofolate reductase gene and genotype/phenotype correlations in severe methylenetetrahydrofolate reductase deficiency. *Am J Hum Genet.* 1995; 56:1052-9
- [58] Hinken M, Halwachs S, Kneuer C, Honscha W. Subcellular localization and distribution of the reduced folate carrier in normal rat tissues. *Eur J Histochem.* 2011; 55:e3.
- [59] Wu M, Gunning W, Ratnam M. Expression of folate receptor type alpha in relation to cell type, malignancy, and differentiation in ovary, uterus, and cervix. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1999; 8:775-82.

- [60] Ocal P, Ersoylu B, Cepni I, Guralp O, Atakul N, Irez T, Idil M. The association between homocysteine in the follicular fluid with embryo quality and pregnancy rate in assisted reproductive techniques. *J Assist Reprod Genet.* 2012; 29:299-304.
- [61] Czerniecki J, Czygier M. Cooperation of divalent ions and thiamin diphosphate in regulation of the function of pig heart pyruvate dehydrogenase complex. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo).* 2001; 47:385-6.
- [62] Atamna H, Newberry J, Erlitzki R, Schultz CS, Ames BN. Biotin deficiency inhibits heme synthesis and impairs mitochondria in human lung fibroblasts. *J Nutr.* 2007; 137:25-30.
- [63] Liu M, Alimov AP, Wang H, Frank JA, Katz W, Xu M, Ke ZJ, Luo J. Thiamine deficiency induces anorexia by inhibiting hypothalamic AMPK. *Neuroscience.* 2014; 267:102–13.
- [64] Warren MP, Perlroth NE. The effects of intense exercise on the female reproductive system. *J Endocrinol.* 2001; 170:3-11.
- [65] Ziolkiewicz A, Ellison PT, Lipson SF, Thune I, Jasienska G. Body fat, energy balance and estradiol levels: a study based on hormonal profiles from complete menstrual cycles. *Hum Reprod.* 2008; 23:2555-63.
- [66] Yang X, Dunning KR, Wu LL, Hickey TE, Norman RJ, Russell DL, Liang X, Robker RL. Identification of perilipin-2 as a lipid droplet protein regulated in oocytes during maturation. *Reprod Fertil Dev.* 2010; 22:1262-71.
- [67] Kothapalli N, Sarath G, Zempleni J. Biotinylation of K12 in histone H4 decreases in response to DNA double-strand breaks in human JAr choriocarcinoma cells. *J Nutr.* 2005; 135:2337-42.
- [68] Camporeale G, Oommen AM, Griffin JB, Sarath G, Zempleni J. K12-biotinylated histone H4 marks heterochromatin in human lymphoblastoma cells. *J Nutr Biochem.* 2007; 18:760-8.
- [69] Zempleni J, Gralla M, Camporeale G, Hassan YI. Sodium-dependent multivitamin transporter gene is regulated at the chromatin level by histone biotinylation in human Jurkat lymphoblastoma cells. *J Nutr.* 2009; 139:163-6.
- [70] Atamna H, Liu J, Ames BN. Heme deficiency selectively interrupts assembly of mitochondrial complex IV in human fibroblasts: relevance to aging. *J Biol Chem.* 2001; 276:48410-6.
- [71] Atamna H, Newberry J, Erlitzki R, Schultz CS, Ames BN. Biotin deficiency inhibits heme synthesis and impairs mitochondria in human lung fibroblasts. *J Nutr.* 2007; 137:25-30.
- [72] Hiratsuka C, Fukuwatari T, Sano M, Saito K, Sasaki S, Shibata K. Supplementing healthy women with up to 5.0 g/d of L-tryptophan has no adverse effects. *J Nutr.* 2013; 143:859-66.

7. 発表論文

Tsuji A, Nakata C, Sano M, Fukuwatari T, Shibata K.

L-Tryptophan metabolism in pregnant mice fed a high L-tryptophan diet and the effect on maternal, placental, and fetal growth. *Int J Tryptophan Res.* 2013; 6:21-33.

Tsuji A, Nakamura T, Shibata K.

Biotin-deficient diet induces chromosome misalignment and spindle defects in mouse oocytes. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2015; 79:292-9.

Tsuji A, Nakamura T, Shibata K.

Effects of mild and severe vitamin B₁ deficiencies on the meiotic maturation of mice oocytes
Biosci Biotechnol Biochem. 審査中

8. 謝辞

本研究は滋賀県立大学大学院人間文化科学研究科生活文化化学専攻健康栄養部門で行われたものである。本研究を進めるにあたり、指導教授の柴田克己先生の丁寧かつ熱心なご指導をうけ賜りました。学部の間を含めたこの6年間は長いようで短く、大変充実した時間でした。ここでの体験は私の人生の中でもひととき強く輝くことでしょう。心より感謝いたします。長浜バイオ大学バイオサイエンス学科の中村肇伸先生には一から卵子の実験技術の指導や機器の提供などいつも親切に丁寧にご指導していただきました。中村先生がおられなければこの研究は遂行できなかったでしょう。とても素晴らしい先生に巡り合えたことを心より感謝いたします。研究を進める上でいつも的確なご助言をしていただいた福渡努先生に感謝の意を表します。マウスの飼育や解剖など実験技術をご指導いただいた佐野光枝先生に感謝の意を表します。この研究をともにした中田千文さん、寺井俊二さん、野口里奈さんに心から感謝いたします。最後に、いつも研究で夜遅くに帰宅しても晩御飯をつくって待ってくれた家族に心から感謝の気持ちと御礼を申し上げたく、謝辞にかえさせていただきます。