博士（栄養学） 学位論文

論文題目

生活リズム攪乱モデル実験系における成長期雄ラットの

生殖器官発達抑制に対する各種栄養素の影響

The Effects of Nutrients to Improve the Depression of Gonadal Development in Growing Male Rats with Disturbed Daily Rhythm

２００３年

指導教員　　久保　勝知　教授

氏　名　　花井　美保

HANAI, Miho

女子栄養大学

Summary

The Effects of Nutrients to Improve the Depression of Gonadal Development in Growing Male Rats with Disturbed Daily Rhythm

Almost all organisms, including humans, possess a circadian rhythm with an approximately 24-hour cycle. This endogenous rhythm is entrained by exogenous rhythmic factors, such as the light/dark (LD) cycle and other cycles of the organism's environment, resulting in the 24-hour biological rhythm referred to as diurnal rhythm. In plants and animals, the primary factor in the entrainment of the cycles is the LD cycle. In humans, however, the primary factor is the cycle of social activity, with the cycles of eating and sleeping as subordinate factors. The diurnal rhythm in humans appears to be remarkably disarranged as a consequence of the globalization of social activities and diversification of both life styles and work schedules, especially in the use of work shifts for round-the-clock operation and the international time lag. Such irregularities in the daily rhythm should adversely affect the bio-regulatory mechanisms, resulting in an abnormal diurnal rhythm that can impede biological activities structurally and functionally. Furthermore, the process by which such disorders are induced is, in theory, dependent upon the nutritional conditions of individuals. However, the basic nutritional data necessary for maintaining or promoting the health with disturbed daily rhythm has accumulated less thoroughly.

It has been observed that rats kept under constant darkness developed disturbances in their feeding and motor-activity rhythms. It has also been reported that rats kept under constant darkness developed disturbances not only in the rhythms of hormone secretions and enzyme activities, but also in considerable physiological functions, particularly a remarkable depression of gonadal development. Additionally, it has been mentioned that a low-protein diet accelerated the depression of male gonadal development in the rats. Based on these facts, in the present study, growing male rats kept under

constant darkness were used as a model of animals with disturbed daily rhythm. The effects of various nutrients on male gonadal development, which is highly sensitive to constant darkness and dietary nutrients, were examined.

Fischer strain 3-week-old rats were preliminarily maintained for one week on the standard purified diet given ad libitum, then divided into experimental groups and fed ad libitum the experimental diets while being kept in constant darkness for four weeks. The control groups were kept under a 12-h L, 12-h D cycle. In order to manifest the effects of the nutrients in detail, the experimental protocol was based on either the table of orthogonal array (a type of investigation design that is superior for factorial analysis and factor interaction analysis) or on three-way classification. The diets were based on the AIN-76 or the AIN-93G purified diet, and the amounts of various nutrients were changed.

The nutrient factors studied were as follows.

1) Protein, methionine supplement, vitamin mixture, mineral mixture, total lipids
2) Various minerals (calcium, phosphorus, magnesium, sodium, zinc)
3) Essential amino acids (methionine, cysteine, tryptophan, valine, arginine, histidin, leucine, isoleucine, lysine, phenylalanine, threonine)
4) Various vitamins {vitamins (V.) A, D, E, K, B_1, B_2, B_6, B_{12}; niacin, choline, biotin, pantothenic acid, folic acid}

After 4 weeks, the rats were decapitated, and the weight of the reproductive organs and the serum testosterone concentration were measured. In addition, serum luteinizing hormone (LH), follicle-stimulating hormone (FSH), dehydrotestosterone (DHT) and some intermediate hormones in testosterone biosynthesis were measured. The effects of each nutrient were statistically analyzed using software developed by the Japan Technology Training Institute Co., Ltd., JUSE-QCAS/V6.0.

The depression of male gonadal development under the disturbed daily rhythm was partly improved by supplementation with excess doses of methionine (Met) and cysteine (Cys), V.E or pantothenic acid (PaA). The nutrients that showed a more desirable effect when taken in normal quantities were valine (Val), threonine (Thr), isoleucine (Ile), calcium (Ca), magnesium (Mg), and sodium (Na). In addition, one nutrient, tryptophan (Trp), showed benefits when taken at below-normal levels. The nutrients that depressed male gonadal development when given at above-normal levels were Val, V.A, V.D, $V.B_1$, and $V.B_6$. The intake of above-normal levels of amino acids, vitamins and minerals was found to be unfavorable. In the rats kept under constant darkness, the effects of Cys, Mg, and Na on testis development were different from the effects on the serum concentration of testosterone. In contrast, the nutrients that had the same influences on testis and serum testosterone were Met, Ile, Trp, and Ca.

In addition, in rats kept under constant darkness and fed a low-protein diet, the depression of male gonadal development appeared to depend on a low serum testosterone concentration, because these conditions had no effect on the production of DHT or on serum concentrations of LH and FSH. The low serum testosterone concentration was reflected in the inhibition of the conversion pathway from progesterone to androstenedione, suggesting a reduction in the activity of enzyme 17α-hydroxylase and/or 17,20-lyase, which participate in testosterone biosynthesis.

The present study well documented that the disruption in the daily rhythms varied with the nutrient metabolisms, an organism's response to a quantitative change in each nutrient, and the requirements for nutrients. In addition, hormone biosynthesis was affected by the disruption of the daily rhythm. Finally, it may be conjectured that nutrients can mitigate or exacerbate the influence of the disruption of daily rhythm, and that suitable quantities of certain nutrients can maintain or promote the health of people who experience disturbed daily rhythms.

目　次

頁

第１章　緒　言　1

第２章　生活リズム攪乱モデル実験系における成長期雄ラットの
生殖器官発達抑制に対する飼料中各種栄養素の影響　7

１．研究方法　7

1）実験動物　8

2）飼育環境　8

3）飼料組成　9

(1) 実験 1：飼料中タンパク質量、メチオニン添加、ビタミン
混合量、ミネラル混合量および総脂質量の影響　10

(2) 実験 2：飼料中各種ミネラル量の影響　10

(3) 実験 3：飼料中各種アミノ酸量の影響　11

(4) 実験 4：飼料中各種ビタミン量の影響　12

4）採取臓器および分析項目　14

5）統計処理　14

２．研究結果　15

1）実験別結果　15

(1) 実験 1：飼料中タンパク質量、メチオニン添加、ビタミン
混合量、ミネラル混合量および総脂質量の影響　17

(2) 実験 2：飼料中各種ミネラル量の影響　23

(3) 実験 3：飼料中各種アミノ酸量の影響　27

(4) 実験 4：飼料中各種ビタミン量の影響　38

2）実験結果総括 49
(1) 体重を最大または最小にする組み合わせ 49
(2) 精巣重量を最大または最小にする組み合わせ 52
(3) 血清テストステロン濃度を最大または最小にする組み合わせ 54
３．考察 57
1）飼料中タンパク質量、メチオニン添加、ビタミン混合量、
ミネラル混合量および総脂質量の影響 57
2）飼料中各種ミネラル量の影響 66
3）飼料中各種アミノ酸量の影響 69
4）飼料中各種ビタミン量の影響 79
5）まとめ 85
表 **Table 1 ～ Table 88** 88

第３章 生活リズム攪乱モデル実験系における成長期雄ラットの
下垂体ゴナドトロピン、テストステロンおよびその前駆体
ステロイドの血清濃度におよぼす飼料タンパク質量の影響 138
１．研究方法 138
1）実験動物および飼育環境 138
2）飼料組成 139
(1) 実験 1：血清テストステロン、デヒドロテストステロン、
LH および FSH 濃度および精子成熟度への影響 139
(2) 実験 2：血清テストステロンおよびテストステロン合成
系にある前駆体ステロイド量への影響 139
3）分析方法 139
4）統計処理 140

２．研究結果 141
1）実験 1：血清テストステロン、デヒドロテストステロン、
LH および FSH 濃度および精子成熟度への影響 141
2）実験 2：血清テストステロンおよびテストステロン合成
系にある前駆体ステロイド量への影響 143
３．考察 145
図表 **Table 1 ～ Table 6 , Photo.1 ～ Photo.8 , Figure 1** 150

第４章 要 約 156

謝 辞 162

文 献 163

Abbreviation

実験群　：N 群 ・・・ 正常明暗飼育群

D 群 ・・・ 連続暗黒飼育群

ミネラル：Ca ・・・ Calcium (カルシウム)

P ・・・ Phosphorus (リン)

Mg ・・・ Magnesium (マグネシウム)

Na ・・・ Sodium (ナトリウム)

Zn ・・・ Zinc (亜鉛)

アミノ酸：Met ・・・ Methionine (メチオニン)

Cys ・・・ Cysteine (システイン)

Trp ・・・ Tryptophan (トリプトファン)

Val ・・・ Valine (バリン)

Arg ・・・ Arginine (アルギニン)

His ・・・ Histidine (ヒスチジン)

Leu ・・・ Leucine (ロイシン)

Ile ・・・ Isoleucine (イソロイシン)

Lys ・・・ Lysine (リジン)

Phe ・・・ Phenylalanine (フェニルアラニン)

Thr ・・・ Threonine (スレオニン)

Met+Cys ・・・メチオニンとシステインの混合物

ビタミン：V.A ・・・ Vitamin A (ビタミン A)

V.D ・・・ Vitamin D (ビタミン D)

V.E ・・・ Vitamin E (ビタミン E)

V.K ・・・ Vitamin K (ビタミン K)

$V.B_1$ ・・・ Vitamin B_1 (ビタミン B_1)

$V.B_2$ ・・・ Vitamin B_2 (ビタミン B_2)

$V.B_6$ ・・・ Vitamin B_6 (ビタミン B_6)

$V.B_{12}$ ・・・ Vitamin B_{12} (ビタミン B_{12})

NA ・・・ Nicotinc acid (ニコチン酸)

Cho. ・・・ Choline (コリン)

Bio. ・・・ Biotin (ビオチン)

PaA ・・・ Pantothenic acid (パントテン酸)

FA ・・・ Folic acid (葉酸)

ホルモン：LH ・・・ Luteinizing hormone (黄体化ホルモン)

FSH ・・・ Follicle-stimulating hormone (卵胞刺激ホルモン)

DHT ・・・ Dehydrotestosterone (デヒドロテストステロン)

1章　緒　言

人を始めほとんどすべての生物は、約 24 時間を周期とする内因性のサーカディアンリズム(概日リズム)をもっている。近年、このサーカディアンリズムの発振装置である生物時計に関する研究が急速に進んでいる。リズムを発振させている時計遺伝子もいくつか発見され、遺伝子レベルにおけるリズム発振に対する機構が明らかになりつつある[1~4]。我々の生活は、24 時間を周期とした中で営われているため、体内に存在する生物時計が発振するサーカデイアンリズムとはわずかなずれが生じる。このずれの調整に当たっているのが、光(明暗周期)や生活環境のような外因性因子(同調因子)である。すなわち、内因性のサーカディアンリズムが外因性の因子に同調することにより、24 時間周期の生体リズム(「日内リズム」)が形成されるのである。外因性因子の一つである光(明暗周期)は最も強力な同調因子であるが[5~7]、人の場合、光だけでなく自らが選択する食事時間、活動時間、睡眠時間などのような生活時間も強力な同調因子となっている。体温のリズム、ホルモンや消化酵素の分泌には日内リズムがみられるが、これらは食事時間や睡眠時間の影響を強く受けている[8]。石井、嶋津ら[9]は、ラットの肝臓グリコーゲン代謝に関与する酵素の日内リズムは食事時間の影響を大きく受け、食事時間を12時間位相転移させるとその酵素活性日内リズムも12時間シフトすると述べている。斉藤ら[10]は、小腸微絨毛に局在する二糖類消化酵素の活性は制限給餌により明暗周期とは断絶したリズムを示し、日内リズムの形成に食事時間が重要な役割を果たしていると述べている。すなわち、一定の時間に食事をし、一定の時間に睡眠をとるというような規則的な生活が内因性リズムであるサーカディアンリズムを調節し、日内リズムを形成しているのである。

規則的な生活が日内リズムを形成し、生体機能を維持しているのだが、近年、労働形態・生活活動の多様化に伴って 24 時間周期の規則的な生活を送らない人々が増加している。交替制勤務従事者などはその代表的な例である。交替制勤務とは、2 組み以上に分けられた労働者が、1 日のなかの異なった時間帯を一定の日数、一定の順序で勤務する方式である。24 時間の隔日制勤務、12 時間の昼夜 2 交替制勤務、8 時間の日勤、夕勤、夜勤の 3 交替制勤務に大別される。このような勤務に従事している人々は、24 時間の規則的な生活を送ることは困難である。平成 11 年度の調査によると、所定内深夜労働(所定労働時間が午後 10 時から午前 5 時を含んでいる場合、その深夜にかかる労働)を実施している企業は 25.2%におよんでいる [11]。また、生活活動の多様化により深夜まで活動している人々も多く、午前 1 時の国民(10 歳以上）の就寝率は 90.9%、午前 2 時では 94.9%であったと報告されている [12]。阿部ら [13]は、交替制勤務従事者は食事時間が不規則であり欠食も多いこと、栄養素摂取に過不足があることを報告している。また、平成 13 年に行われた労働環境調査によると、深夜業務に従事する労働者において、深夜業務につく前と比較して体調の変化があった労働者の割合は 36.1%であり、深夜業務に従事している期間が長いほど、体調の変化があったとする割合が高かったと報告されている [14]。

不規則な生活は成人だけでなく成長期にある小学生、中学生においても認められる。例えば、小学生、中学生の午前 1 時の就寝率はそれぞれ 98.3%、93.3%であり、遅くまで起きている子供も少なくない [12]。また、小学生の生活時間調査においても、不規則な生活を送っている子供が増加している [15]。この背景には周囲の大人たちの生活スタイルの多様化の影響があると考えられる。不規則な生活は生体が完全に出来上がってい

ない成長期の子供たちに対し、成人以上に何らかの影響を与えるのではないかと考えられる。しかし、成長期すなわち思春期前の不規則な生活が生体に与える影響に関する調査や研究はなされていない。不規則な生活によって生活リズムが攪乱している人々は、生体調節機構に何らかの悪影響を受けている可能性が考えられ、食事時間の不規則、栄養素摂取の過不足がこれらの影響を増幅あるいは軽減している可能性がある。現代の食生活は精製加工素材、精製加工食品に大きく依存しており、ビタミン、ミネラルなどの栄養素が摂取しにくい状況にある。その一方で、市場には種々の栄養補助食品が多数出回っている。生活リズムが攪乱された人々は、健康保持・疾病予防の目的でこれらの食品を摂取することが多く、ビタミン、ミネラルを始め各種栄養素が過不足になりやすい食環境に暴露されていると考えられる。しかし、生活リズム攪乱下にある人々の健康保持・疾病予防ために、「どのような食生活を送るべきか」、すなわち、「どのような栄養素をどれだけの量、どのような組み合わせで摂取すべきであるか」を提言するために必要な栄養学的基礎データはほとんど見当たらない。

日内リズムに対する研究は遺伝子レベル、細胞レベルで活発でありメカニズム解明が進んでいるが、実験条件に対する栄養因子の考慮、実験結果に対する栄養因子の解析など、栄養要因に対する考慮がなされていないのが現状である。それゆえ、日内リズム研究分野において栄養因子の研究を系統的に実施し、生体における日内リズムと栄養素の事実関係を明らかにすることは、今後の日内リズム研究を進めていく上での基礎データの蓄積の面から重要であると考えられる。これまでになされている日内リズムに対する栄養学的取り扱いは、消化酵素が日内リズムを示すことに関する研究[10]、そして消化酵素やホルモン分泌にみられる日内

リズムが強制給餌によりシフトすることに関する研究[9)10)]であり、栄養因子に関する研究とは性質が異なるものである。

一方、生体リズムに関与する情報物質として注目されている松果体メラトニンは、光刺激により分泌が抑制されている。それゆえ、ラットでもヒトでも、暗期に高まり明期に低下するという分泌日内リズムが形成されている[16)17)]。ヒトの場合、メラトニン分泌が睡眠時に高まることを基礎に、臨床医学の分野でも時差ボケ[18)]や睡眠障害[19)]の治療にメラトニンの経口投与がなされている。しかし、メラトニンと栄養との関係に関する研究は少ない。江指ら[20)]は、9%Casein 食、27%Casein 食で飼育したラットにおいてメラトニン生合成の律速酵素である N-アセチルトランスフェレースの活性を調べている。その結果、9%Casein 食群は 27%Casein 食群に比較して明らかに午前 1 時(暗期)、午前 9 時(明期)の N-アセチルトランスフェレース活性が低下すると報告している。メラトニンの生合成にも飼料タンパク質量が関与していることを示したが、その後栄養学的な研究は進んでいない。

以上のことから、進化系統は若干離れているが、雑食性であり環境適応能が高いラットをモデル動物として用い栄養学的基礎データを得ることを目的に本研究を推進した。ラットも人と同様にサーカディアンリズムを刻む体内時計を保持している。しかし、体内時計を調節する外因性の因子が、人の場合は光だけでなく生活時間も重要な同調因子となっている一方で、ラットの場合、光が体内時計を調節する最も強力な同調因子となっている。ラットを光情報のない連続暗黒下で飼育する(連続暗黒飼育ラット)と、摂食リズムや活動リズムに変化が起こり、それに対応してホルモンや酵素の分泌も変化する。例えば、血中コルチコステロン分泌リズムの乱れ[21)]、血中ノルアドレナリン分泌リズムの消失[22)]が報

告されている。ラットの場合、光という体内時計に対する同調因子が取り除かれた環境下では、摂食リズムや活動リズムの変化をもたらし、人における生活リズムの乱れと同様な状態に置かれるのではないかと考えられる。

坂井は、連続暗黒飼育飼育ラットでは下垂体前葉重量の低下および生殖器官の発達抑制が起こることを報告している[23)24)]。また、江指らは、連続暗黒下で成長期(4 週齢)雄ラットをタンパク質量の異なる飼料で 4 週間飼育した結果、低タンパク質食(9%カゼイン食)群は、標準タンパク質食(18%カゼイン食)群および高タンパク質食(27%カゼイン食)群に比較し、生殖器官の発達抑制が顕著にみられたことを報告している[20)25)]。この場合、正常明暗飼育ラットでは、生殖器官に対する飼料タンパク質量の大きな影響が認められないことから、連続暗黒飼育ラットでは、栄養素の代謝調節機構、感受性、必要量などが変化していると考えられている。また、明期の時間を２時間とし点灯時刻を攪乱させた環境下でラットを飼育した場合も、連続暗黒飼育と同様、生殖器官の発達抑制が起こることが確認されている(未発表)。これらの事実は連続暗黒飼育ラットでは生活リズムが攪乱され生体リズム障害が起こること、そして、連続暗黒飼育が生活リズム攪乱モデル実験系として成立することを示している。しかし、連続暗黒飼育による生殖器官への影響は成熟ラットでは顕著に現れないことも報告されている[26)]。そこで、生活リズム攪乱モデル実験系として連続暗黒飼育を取り入れ、成長期にある４週齢雄ラットを実験動物として用いた。

本研究においては、まずはじめに、生殖器官発達におよぼす飼料中各種栄養素の影響に関して系統的に実験し、栄養学的基礎データの蓄積を試みた。また、系統的に実験を進めるため、飼料組成は米国栄養学会の

標準精製飼料である AIN-76[27]または AIN-93G[28]の飼料組成を基準とした。そして、飼料中の各種栄養素の影響および栄養素間の交互作用を検討するため、すべての実験は多くの因子について効率よく検討できる直交表[29]、または三元配置法を用いる実験計画法に基づき実施することとした。この研究に関する方法ならびにその成果は第２章に記述した。

雄性生殖器官発達は血中テストステロン濃度に依存すると同時に、副生殖器官である前立腺の発達に対するテストステロンの作用は、その還元代謝物であるデヒドロテストステロン(DHT)に変換されて発現する。また、テストステロン産生は黄体化ホルモン(LH)に支配され、精巣における精子形成には卵胞刺激ホルモン(FSH)が関与している。そこで、生殖器官発達抑制とそれに対する栄養素の影響の機序を明らかにする目的で、血清テストステロン、DHT、LH、FSH、およびテストステロン合成系にある前駆体ステロイドの定量実験を行うと共に、生殖器官発達の指標として精巣の病理組織学的解析および精子成熟度も評価した。この研究に関する方法ならびにその成果は第3章に記述した。

第２章　生活リズム攪乱モデル実験系における成長期雄ラットの生殖器官発達抑制に対する飼料中各種栄養素の影響

１．研究方法

本研究では生殖器官発達抑制に対する飼料中各種栄養の影響を系統的に検討した。実施した実験は以下の様である。

実験１：飼料中タンパク質量、メチオニン添加、ビタミン混合量、ミネラル混合量および総脂質量の影響

実験２：飼料中各種ミネラル量の影響

実験３：飼料中各種アミノ酸量の影響

実験 3-1 含硫アミノ酸、トリプトファン、イソロイシン、アルギニンおよびスレオニンの影響

実験 3-2 システイン、アルギニン、トリプトファン、スレオニンおよびバリンの影響

実験 3-3 AIN-76、AIN-93G 精製飼料の影響および 11 種の必須アミノ酸の影響

実験 3-4 含硫アミノ酸、トリプトファンおよびバリンの影響

実験４：飼料中各種ビタミン量の影響

実験 4-1 タンパク質量とビタミン混合量の影響

実験 4-2 水溶性ビタミン量と脂溶性ビタミン量の影響

実験 4-3 各種脂溶性ビタミン量の影響

実験 4-4 各種水溶性ビタミン量の影響

生殖器官発達に及ぼす各種栄養素の影響を詳細に検討するため、これらの実験は、直交表 [29]および三元配置法を用いる実験計画法により実施

した。直交表は同時に多くの因子とそれらの交互作用の検討が効率的に検討できるという利点がある。それゆえ、本研究のように多くの栄養素を対象とする研究には適した手法である。上記に示したように、初めに実験1として、飼料中のタンパク質、ビタミン、ミネラルおよび脂質の量(標準量と低量)の影響を検討し、その後、栄養素毎に飼料中濃度の影響を検討した。すなわち、実験2では各種ミネラル、実験3では各種アミノ酸、実験4では各種ビタミンについて検討した。検討する栄養素とその添加量は、その都度、実験1およびすでに得られている実験結果をもとに決めた。

詳細は本章3）の飼料組成の項に記した。

本動物実験は、国立健康・栄養研究所動物実験委員会の承認の下、実験動物の飼養および保管等に関する基準」(昭和55年3月総理府告示6号)に準じ実施した。

1）実験動物

実験動物としてFischer344系、離乳直後の3週齢雄ラットを日本チャールスリバー社(株)より購入し、米国栄養学会が提案した栄養研究のための標準精製飼料 AIN-76[27]または AIN-93G[28]にて1週間予備飼育した。その後、各群の平均体重が等しくなるよう群分けし、本実験に使用した。1群の匹数は実験により6匹または3匹とした。

2）飼育環境

ラットは6連の個飼いステンレス網製の飼育ケージにて、室温 23±1℃、湿度 55±5％の動物室で飼育した。

飼育条件は光のない連続暗黒とし、対照群には一日 12 時間、作業台

上 300 ルックスの白色蛍光灯を点灯した(明期：7 時-19 時、暗期：19 時-7 時)。摂食量測定、給水および体重測定は、2 日に一度、午前中(9:00 ～ 12:00、45 ～ 51 時間置き)に行った。ただし、週に一度のみ 21 ～ 27 時間後に作業を行った。連続暗黒飼育群に対する給餌、給水および体重測定は、光同調による生体リズムの位相変異を引き起こさない写真用暗室ランプを一回に約 2 時間点灯して実施した。

これらの作業を毎日(24 時間置き)行わなかった理由は齋藤らが示した「予知反応によるリズム形成」の研究結果に基づいている [30 ~ 32]。24 時間周期の外因性因子は、その因子がなくなってもしばらくの期間は予知反応によるリズムが形成されるが、24 時間でない周期の外因性因子(36 時間周期 [30]、20 時間または 28 時間周期 [31])では、その因子がなくなると予知反応によるリズム形成がなされにくいという報告である。そのため本実験では飼育作業を 45 ～ 51 時間置き、または 21 ～ 27 時間置きに行い、飼育作業がラットにとって日内リズム形成のための同調因子とならないようにした。

飼育期間は 4 週間、飼料、飲料水(蒸留水)は自由摂取とした。ただし、実験 3-4 のみ飼育期間を 5 週間とした。

3） 飼料組成

飼料組成は、検討する栄養因子の数および栄養因子間の交互作用または明暗飼育環境と栄養因子との交互作用をどのように検討するかにより最も適した直交表 [29]または三元配置法を使用して設計した。本研究では直交表として $L_8(2^7)$型、$L_{16}(2^{15})$型、$L_{32}(2^{31})$型、$L_9(3^4)$型を使用した [33]。

以下に実験毎に検討した栄養因子とその添加レベルに基づいた飼料組成を述べる。

(1) 実験１：飼料中タンパク質量、メチオニン添加、ビタミン混合量、ミネラル混合量および総脂質量の影響

実験１で検討した飼料中の栄養因子はタンパク質(Pro.)、メチオニン(Met)、ビタミン混合(Vit.)、ミネラル混合(Min.)および脂質(Oil)の5種類である。そのため、$L_8(2^7)$型直交表(Table1)を用い 8 種類の実験食を設計した。検討した栄養因子および飼料への添加水準を Table2 に、飼料組成を Table3 に示した。

Table2 に示したように、$L_8(2^7)$型直交表(Table1)の1列に Pro.、2列に Met、4列に Vit.、5列に Min.、6列に Oil を割り付けた。飼料への各種栄養素の添加量は AIN-76 飼料組成[27]に準じ、標準量の 1/3 から 1/2(水準1)の低量、または標準量(水準 2)とした(Table2)。ただし、メチオニンについては無添加(水準 1)または、標準量添加(水準 2)とした。3 列は Pro.と Met の交互作用を観察する列とし、7 列は誤差列とした。

Pro.はミルクカゼイン(オリエンタル酵母(株)製)、Met は L-メチオニン(和光純薬工業(株)製)、Oil は大豆油(局方大豆油)、ビタミン混合およびミネラル混合は AIN-76 組成(オリエンタル酵母(株)製)を使用した。繊維、コーンスターチ(いずれもオリエンタル酵母(株)製)、重酒石酸コリン(和光純薬工業(株)製)の飼料中添加量は AIN-76 組成に準じ、スクロースにより飼料全体量が 100 となるよう調製した。

(2) 実験２：飼料中各種ミネラル量の影響

実験２では飼料中各種ミネラル量の影響を検討した。検討したミネラルはカルシウム(Ca)、リン(P)、マグネシウム(Mg)、ナトリウム(Na)および亜鉛(Zn)の５種類である。また、明暗飼育条件と各ミネラルの交互作用を検討するため、明暗飼育条件も一つの因子として加えた。それゆえ、

$L_{16}(2^{15})$型直交表(Table4)を用いて実験計画および飼料組成を設計した。検討した因子とその水準および飼料組成を Table5、Table6 に示した。

飼料への各ミネラルの添加量は AIN-76 飼料組成の 1/3.5 量(水準 1)または、標準量(水準2)とした。ミネラル添加の方法は、あらかじめ、Ca、P、Mg、Na、Zn およびカリウム(K)が AIN-76 組成の 1/3.5 量、その他のミネラルが AIN-76 組成と同量であるミネラル混合を調整しておき、これをすべての飼料に 3.5%添加後、各飼料のミネラル組成に基づき不足するミネラルを標準量となるよう添加した。使用した各種ミネラル塩は、基本的に AIN-76 ミネラル混合に用いられている塩を使用した。しかし、カルシウム塩、カリウム塩に関しては他の形態の塩($CaCO_3$、KH_2PO_4)も使用した(Table6)。また、飼料中ミネラル量の影響を発現させやすくするため、糖質源はすべてスクロースとし、その他の栄養成分は AIN-76 飼料組成に準じた。

(3) 実験３：飼料中各種アミノ酸量の影響

実験３では飼料中の各種必須アミノ酸の量の影響を検討した。11 種類の必須アミノ酸の影響を米国栄養学会の飼料組成、AIN-76 組成および AIN-93G 組成、それぞれについて観察した。実験は４回実施し、それぞれを実験 3-1、3-2、3-3、3-4 とした。

実験 3-1 で検討した因子は含硫アミノ酸(メチオニン＋システイン)(Met+Cys)、トリプトファン(Trp)、イソロイシン(Ile)、アルギニン(Arg)およびスレオニン(Thr)の 5 種類、実験 3-2 では Cys、Arg、Trp、Thr およびバリン(Val)の 5 種類の影響を検討した。明暗飼育条件も一つの因子として加え、$L_{16}(2^{15})$型直交表を用いて実験計画および飼料組成を設計した。検討した因子とその水準および飼料組成を Table7 と Table8(実験

3-1)、Table9 と Table10(実験 3-2)に示した。

実験 3-3 で検討した因子は 11 種類のアミノ酸{Met、Cys、Arg、Trp、Thr、フェニルアラニン(Phe)、Ile、Val、ロイシン(Leu)、ヒスチジン(His)、リジン(Lys)}、明暗飼育条件および基本となる飼料の種類(AIN-76 組成または AIN-93G 組成)の合計 13 因子であるため、32 群間の相互比較が可能な $L_{32}(2^{31})$型直交表を用いて実験計画および飼料組成を設計した。検討した因子とその水準および飼料組成を Table11、Table12 に示した。

実験 3-1 から実験 3-3 までは飼料中のカゼインレベルを 9%とし、飼料中の各種アミノ酸を飼料中に 10%の全卵タンパク質を添加した場合のアミノ酸量と同量になるよう添加した。アミノ酸添加の有無により無添加(水準 1)または添加(水準 2)とした。その他の成分は AIN-76 または AIN-93G 飼料組成に準じた。

実験 3-4 で検討したアミノ酸は実験 3-1、3-2 および 3-3 で大きな影響の認められた含硫アミノ酸(Met+Cys)、Trp および Val である。飼料組成は $L_9(3^4)$型直交表(Table13)を用いて設計した。検討した因子とその水準および飼料組成を Table14、Table15 に示した。飼料中のカゼインレベルは 9%とし、これらのアミノ酸を飼料中に 10%または 20%の全卵タンパク質を添加した場合のアミノ酸量と同量になるよう添加した。アミノ酸無添加のものを低量(水準１)、アミノ酸添加量が 10%全卵タンパク質レベルのものを標準量(水準２)、20%全卵タンパク質レベルのものを高量(水準 3)とした(Table14)。その他の成分は AIN-93G 飼料組成に準じた。

本実験で用いた各種アミノ酸は味の素(株)製のものを使用した。

(4) 実験４：飼料中各種ビタミン量の影響

実験４では飼料中の各種ビタミン量の影響を検討した。実験は４回実

施し、それぞれを実験 4-1、4-2、4-3、4-4 とした。

実験 4-1 ではタンパク質とビタミン混合の量的関係の影響、実験 4-2 では水溶性ビタミンと脂溶性ビタミンの量的関係の影響、実験 4-3 では飼料中各種脂溶性ビタミン量の影響、そして実験 4-4 では飼料中各種水溶性ビタミン量の影響に関して検討した。

実験 4-1 は明暗飼育条件、飼料中タンパク質量、ビタミン混合量を因子とする三元配置分散分析法により実施した。Table16、Table17 に示したように、飼料中タンパク質量は 9%カゼイン(低量、水準 1)と、20%カゼイン(標準量、水準 2)とした。ビタミン量は低量(AIN-93G 組成の 1/3.3 量、水準 1)、標準量(水準 2)および高量(AIN-93G 組成の 3 倍量、水準 3)の 3 水準とした。

実験 4-2 は明暗飼育条件、飼料中水溶性ビタミン量と脂溶性ビタミン量を因子とする三元配置法により実施した。Table18、Table19 に示したように、飼料中水溶性および脂溶性ビタミン量は低量(AIN-93G 組成の 1/3.3 量、水準 1)、標準量(水準 2)および高量(AIN-93G 組成の 3 倍量、水準 3)の 3 水準とした。飼料中のタンパク質量は 9%カゼイン(低タンパク質食)とし、他の成分は AIN-93G 組成に準じた。

実験 4-3 は明暗飼育条件、飼料中のビタミン A(V.A)量、ビタミン D(V.D)量、ビタミン E(V.E)量およびビタミン K(V.K)量を因子とし、$L_{16}(2^{15})$型直交表を用いて実験計画および飼料組成を設計した。Table20、Table21 に示したように、飼料中各種脂溶性ビタミン量は標準量(水準 1)および高量(AIN-93G 組成の 3 倍量、水準 2)とした。飼料中のタンパク質量は 9%カゼイン(低タンパク質食)とし、他の成分は AIN-93G 組成に準じた。

実験 4-4 では飼料中の水溶性ビタミン量の影響に関して検討した。飼

料中の水溶性ビタミンは9種類あるため2回に分けて実験を行うこととした。初めに、コリン(Cho.)、ニコチン酸(NA)、パントテン酸(PaA)、ビタミン B_6(V.B_6)、ビタミン B_1(V.B_1)、ビタミン B_2(V.B_2)および葉酸(FA)の7種の水溶性ビタミンについて実験し(実験 4-4(1))、その後、ビオチン(Bio.)とビタミン B_{12}(V.B_{12})について実験した(実験 4-4(2))。実験 4-4(1)は、$L_{16}(2^{15})$型直交表、実験 4-4(2)は、三元配置法による実験計画法にて実施した。検討した因子とその水準および飼料組成を Table22、Tbale23(実験 4-4(1))、Table24、Table25(実験 4-4(2))に示した。Table22 ～ Table25 に示したように、飼料中各種水溶性ビタミンの添加量は標準量(水準1)および高量(AIN-93G 組成の6倍量、水準2)とし、実験 4-2 の飼料組成より水溶性ビタミンの添加量を増加させた群を設けた。飼料中のタンパク質量は 9%カゼイン(低タンパク質食)とし、他の成分は AIN-93G 組成に準じた。

4) 採取臓器および分析項目

4 週間飼育後(実験 3-4 のみ 5 週間)に断頭屠殺して血液を採取し、内生殖器官(精巣、精巣上体、精嚢および前立腺)の摘出を行った。生殖器官は重量を測定し、血液は遠心分離(3,000rpm、15 分間、4 ℃)して血清を得た。得られた血清は分析時まで-20 ℃で保存し、テストステロン濃度を Radioimmunoassay Kit(シーアイエスダイアグノステック(株)製)を用いて測定した。

5) 統計処理

実験計画法によって設計された飼料組成がラットに与える影響の解析は、そのために開発されたコンピュター用ソフトウエア、JUSE －

QCAS/V6.0（株式会社日本科学技術研修所）の解析方法に従い実施した。すなわち、生殖器官重量および血清テストステロン濃度に対する各種因子の影響およびその交互作用について分散分析を行った。分散分析後、有意(有意水準 5%以下)に影響の認められた因子を組み合わせ、組み合わせ毎の生殖器官重量および血清テストステロン濃度の推定値を算出した。それゆえ、結果に示した数値は推定値である。

実験1における正常明暗飼育群(N群)と連続暗黒飼育群(D群)の2群間の比較は Student's *t*-検定により行った。また、実験 4-1 の飼料中のタンパク質量とビタミン混合の量的関係に関する実験結果の解析は分散分析後、Fischer の多重比較検定により行った。

体重および飼料摂取量に関しても同様に解析を行った。飼料摂取量は飼育期間中の総摂取量の値を使用した。

2．研究結果

1）実験別結果

以下、実験毎に研究結果を示した。成長期における生殖器官の機能は生殖器官の重量と比例する[34]。それゆえ、本研究では生殖器官の重量は体重 100g あたりの重量でなく、絶対量を用いて評価することとした。体重と飼料摂取量に関しても個別栄養素摂取量の影響がみられたため、各実験毎にデータを示した。

飼料効率(体重増加量/飼料摂取量)についてもすべての実験で検討した。その結果、飼料効率は明暗飼育条件の影響や飼料中各種栄養素の影響を受け、さらに週齢によっても異なるという結果を得た。グロスな栄養素の影響に関する実験1の飼料効率は、N群の0.280±0.049(平均±SD)に対し、D群では0.238±0.049と有意に低値を示した($p<0.01$)。またN群

では、飼料効率に個別栄養素の影響は認められなかったが、D群では飼料中タンパク質の影響が認められ、標準タンパク質食は低タンパク質食より飼料効率の推定値は高値を示した。しかし、この値は実測値ではなく、しかも直交表による検索では個別栄養素の単一の影響を抽出することはできない。そこで、以下すべての実験系で、個別栄養素の飼料効率を定量的に議論することは不可能であり、これには別途検討が必要である。一方、この飼料効率に対する影響は週齢によって異なっていた。すなわち、5週齢(飼育１週目)ではタンパク質の影響は認められなかったが、6週齢(飼育２週目)以降よりタンパク質の影響が認められ、その影響は8週齢(飼育4週目)が最も強かった。

成長期ラットを用いて栄養実験を行う場合、体重増加、飼料摂取量と共に飼料効率も重要な検討項目である。本実験の評価対象は生殖器官発達であるため、生殖器官重量に対して体重の面から栄養素の影響を論ずる必要性、そして体重増加に対する飼料摂取量の影響を論ずることも必要である。生殖器官重量に対する個別の栄養効率の影響も重要である。しかし、生殖器官重量と飼料効率の相関を調べた結果、強い相関が認められなかった(自由度ϕ=46、相関係数γ=0.2443)。また、本実験の目的は、生殖器官発達に対する摂取飼料中の個別栄養素の影響を明らかにすることであるため、飼料効率に対しても、飼料中に含まれるの個別栄養素の影響を抜き出して検討する必要がある。しかし、本実験手法では、総飼料摂取量から個別飼料栄養素の摂取量を抜き出し、個別栄養素に対する効率を求めることは困難である。それゆえ、本論文では体重と飼料摂取量に対しては各実験毎にデータを記すが、飼料効率のデータは示さないこととした。

(1) 実験１：飼料中タンパク質量、メチオニン添加、ビタミン混合量、ミネラル混合量および総脂質量の影響

① 生殖器官重量、血清テストステロン濃度、体重および総飼料摂取量に及ぼす飼料中栄養素量の影響

Table26 に生殖器官重量、血清テストステロン濃度および体重に対する各種栄養素の分散分析結果、および D 群と N 群間の *t*-検定結果を示した。

分散分析の結果、D 群、N 群、それぞれ生殖器官に及ぼす栄養素の影響の表れ方は異なり、D 群は N 群に比較し影響の認められた栄養因子が多かった。精巣重量(g)に関しては、D群ではすべての栄養因子の影響が認められたが、N 群では Pro.と Pro.＊ Met の交互作用の影響のみであった。D 群では特に Min.の影響が多く認められた。しかし、体重と総飼料摂取量に関してはD群より N 群において、多くの栄養因子の影響が認められた。

D 群の精巣、精巣上体、精嚢、前立腺重量および血清テストステロン濃度はN群に比較して明らかに低値を示した($p<0.01$)。しかし、総飼料摂取量は N 群より D 群において高値を示した。一方、体重に明暗飼育条件の影響は認められなかった。

② 体重および総飼料摂取量に及ぼす飼料中栄養素量の影響

Table27、Table28 に体重、総飼料摂取量に有意な影響を与えた栄養素の種類およびその水準の組み合わせによる体重推定値、総飼料摂取量推定値を示した。

D群において体重に影響を与えた栄養素は Pro.、Met であり、Pro.＊ Met の交互作用(Table26、Table27)がみられた。体重は「標準 Pro.・Met 無添

加の時最大(145.5g)、「低 Pro.・Met 無添加」の時最小(118.5g)であった(Table27)。Pro.＊ Met の交互作用は飼料への Met 添加効果が飼料中の Pro.量により異なることを示した。すなわち、低 Pro.飼料では Met 添加により体重が増加した(21.6g 増加、Table27 より)が、標準 Pro.飼料では Met 添加により低下した(2.2g 低下、Table27 より)。Table27 より、A (Pro.)の水準が 1 である時、B(Met)の水準が 1 から 2 に変わる、すなわち AB が 11 から 12 に変わると、体重は 21.6g 増加(AB:11;118.5g → AB:12;140.1g)するが、A(Pro.)の水準が 2 であるとき、B(Met)の水準が 1 から 2 に変わる、すなわち AB が 21 から 22 に変わると、体重は 2.2g 低下する(AB:21;145.5g → AB:22;143.3g)ことが読みとれる。

一方、N群では、体重に影響を与えた栄養素は Pro.、Met および Min.であり、Pro.＊ Met の交互作用がみられた(Table26、Table27)。体重は「標準 Pro.・Met 添加・標準 Min.飼料」の時最大(162.7g)、「低 Pro.・Met 無添加・低 Min.飼料」の時最小(105.7g)であった(Table27)。Pro.＊ Met の交互作用は、飼料への Met 添加効果が飼料中の Pro.量により異なることを示した。すなわち低 Pro.飼料では Met 添加により体重は顕著に増加した(32.4g 増加、Table27 より)が、標準 Pro.飼料時では Met 添加によりわずかに増加した(6.5g 増加、Table27 より)。Table27 より、A (Pro.)の水準が 1 である時、B(Met)の水準が 1 から 2 に変わる、すなわち AB が 11 から 12 に変わると、体重は 32.4g 増加(例えば ABD:111;105.7g → ABD:121;138.1g)するが、A(Pro.)の水準が 2 であるとき、B(Met)の水準が 1 から 2 に変わる、すなわち AB が 21 から 22 に変わると、体重は 6.5g 増加する(例えば ABD:211:140.8g → ABD:221:147.3g)ことが読みとれる。この交互作用の影響は D 群とは異なっていた。

以下に記述した交互作用も同様の方法で算出したものである。

一方、総飼料摂取量に影響を与えた栄養素はD群ではPro.のみであり(Table26、Table28)、「低 Pro.飼料」の時最大(383.3g)、「標準 Pro.飼料」の時最小(342.9g)であった(Table28)。N群では、総飼料摂取量に影響を与えた栄養素は、Pro.、Met、Vit.、Min.およびOilのすべてであり、Pro.＊Metの交互作用も認められた(Table26、Table28)。総飼料摂取量は「低Pro.・Met添加・低Vit・標準Min.・低Oil」の時最大(372.0g)、「低Pro・Met無添加・標準Vit・低Min.・標準Oil」の時最小(299.0g)であった(Table28)。Pro.＊Metの交互作用は飼料へのMet添加効果が飼料中のPro.量により異なることを示した。すなわち低Pro.飼料ではMet添加により総飼料摂取量は増加した(30.9g増加、Table28より)が、標準Pro.飼料時ではMet添加によるその増加量が少なかった(5.8g増加、Table28より)。

体重と総飼料摂取量に対する栄養素の影響は異なっており、D群では体重にPro.およびMetの影響が認められたが、総飼料摂取量にはProの影響のみであった。N群では、体重に影響の認められた栄養素はPro.、Metおよび Min.であったが、総飼料摂取量には、Pro.、Met、Vit.、Min.およびOilすべての影響が認められた。

③ 精巣重量に及ぼす飼料中栄養素量の影響

Table29に精巣重量に有意な影響を与えた栄養素の種類およびその水準の組み合わせによる精巣重量推定値を示した。

D群において精巣重量に影響を与えた栄養素は、Pro.、Met、Vit.、Min.およびOilの全てであり、Pro.＊ Metの交互作用(Table26、Table29)がみられた。精巣重量は「標準Pro.・Met添加・低Vit.・低Min.・標準Oil飼料」の時最大(1.594g)、「低Pro.・Met添加・標準Vit.・標準Min・低Oil飼料」の時最小(0.731g)であった(Table29)。Pro.＊ Metの交互作用は飼

料への Met 添加効果が飼料中の Pro.量により異なることを示した。すなわち、低 Pro.飼料では Met 添加により精巣重量が低下した(0.059g 低下、Table29 より)が、標準 Pro.飼料では Met 添加により増加した(0.159g 増加、Table29 より)。

一方、N群では、精巣重量に影響を与えた栄養素は Pro.と Met のみであり、Pro.＊ Met の交互作用がみられた(Table26、Table29)。精巣重量は「標準 Pro.・Met 無添加飼料」の時最大(1.859g)、「低 Pro.・Met 無添加飼料」の時最小(1.432g)であった(Table29)。Pro.＊ Met の交互作用は、飼料への Met 添加効果が飼料中の Pro.量により異なることを示した。すなわち低 Pro.飼料では Met 添加により精巣重量は増加した(0.356g 増加、Table29 より)が、標準 Pro.飼料時では Met 添加により低下した(0.039g 低下、Table29 より)。この交互作用の影響は D 群とは異なっていた。

精巣重量と体重に対する栄養素の影響は異なっており、D 群では精巣重量に Pro.、Met、Vit.、Min.および Oil すべての影響が認められたが、体重には Pro.と Met の影響のみであり、Pro ＊ Met の交互作用の表れ方も異なっていた。N 群でも、精巣重量に影響の認められた栄養素は Pro.と Met のみであったが、体重には Pro.と Met の他、Min.の影響も認められた。また、Pro.＊ Met の交互作用の表れ方も異なっていた。

④ 精巣上体重量に及ぼす飼料中栄養素量の影響

Table30 に精巣上体重量に有意な影響を与えた栄養素とその水準の組み合わせによる精巣上体重量推定値を示した。

D 群において精巣上体重量に影響を与えた栄養素は精巣と同様、Pro.、Met、Vit.、Min.および Oil の全てであり、Pro.＊ Met の交互作用がみられた(Table26、Table30)。精巣上体重量は「標準 Pro.・Met 添加・低 Vit.・

低 Min.・標準 Oil 飼料」の時最大(0.187g)、「低 Pro.・Met 添加・標準 Vit.・標準 Min.・低 Oil 飼料」の時最小(0.085g)であった(Table30)。Pro.＊ Met の交互作用は、飼料への Met 添加効果が飼料中の Pro.量により異なることを示した。すなわち、低 Pro.飼料では Met 添加により精巣上体重量が低下した(0.007g 低下、Table30 より)が、標準 Pro.飼料では Met 添加により増加した(0.019g 増加、Table30 より)。

一方、N群では、精巣上体重量に影響を与えた栄養素は Pro.、Met、Vit. および Oil であり、Pro.＊ Met の交互作用がみられた(Table26、Table30)。精巣上体重量は「標準 Pro.・Met 無添加・低 Vit.・標準 Oil 飼料」の時最大(0.250g)、「低 Pro.・Met 無添加・標準 Vit.・低 Oil 飼料」の時最小(0.149g)であった。Pro.＊ Met の交互作用は、飼料への Met 添加効果が飼料中の Pro.量により異なることを示した。すなわち、低 Pro.飼料では Met 添加により精巣上体重量が増加した(0.062g 増加、Table30 より) が、標準 Pro.飼料では、Met 添加により低下した(0.027g 低下、Table30 より)。

精巣上体重量と精巣重量に対する影響が同様であった栄養素は、D 群ではすべての栄養素であったが、N 群では Pro.と Met であった。N 群では精巣重量に Vit.と Oil の影響が認められなかったが、精巣上体重量には Vit.と Oil の影響が認められた。

⑤ 精嚢重量に及ぼす飼料中栄養素量の影響

Table31 に精嚢重量に有意な影響を与えた栄養素とその水準の組み合わせによる精嚢重量推定値を示した。

D 群において、精嚢重量に影響を与えた栄養素は Pro.、Met.、Vit.および Min.であり、Pro.＊ Met の交互作用はみられなかった(Table26、Table31)。精嚢重量は「標準 Pro.・Met 添加・低 Vit.・低 Min.飼料」の時

最大（56.9mg）、「低 Pro.・Met 無添加・標準 Vit.・標準 Min.飼料」の時最小（19.6mg）であった。一方、N 群においては検討した栄養素の影響はみられなかった（Table31）。

精嚢重量と精巣重量に対する影響が同様であった栄養素は、D 群では Vit.と Min.のみであり、Pro.と Met の交互作用の表れ方は精巣と精嚢では異なっていた。また、D 群の精巣重量に Oil の影響が認められたが、精嚢重量には認められなかった。一方、N 群では精巣重量に Pro.と Met の影響が認められたが、精嚢重量には認められなかった。

⑥ 前立腺重量に及ぼす飼料中栄養素量の影響

Table32 に前立腺重量に影響を与えた栄養素とその水準の組み合わせによる前立腺重量推定値を示す。

D 群において、前立腺重量に影響を与えた栄養素は Min.のみであり、前立腺重量は「低 Min.飼料」の時最大（32.7mg）、「標準 Min.飼料」の時最小（20.6mg）であった（Table32）。

N群において、影響のみられた栄養素は Pro.および Met であり、Pro.＊ Met の交互作用がみられた（Table26、Table32）。前立腺重量は「標準 Pro.・Met 添加飼料」の時最大（66.5mg）、「低 Pro.・Met 無添加飼料」の時最小（35.4mg）であった（Table32）。Pro.＊ Met の交互作用は、飼料への Met 添加効果が飼料中の Pro.量により異なることを示した。すなわち、低 Pro.飼料では Met 添加により前立腺重量は増加した（29.9mg 増加、Table32 より）が、標準 Pro.飼料では Met 添加によりわずかに増加したのみであった（3.9mg 増加、Table32 より）。

なお、D 群の前立腺重量の最大値は N 群の最小値より低値であった。

前立腺重量と精巣重量に対する影響が同様であった栄養素は、D 群で

は Min.のみであった。D 群の精巣重量には Pro.、Met、Vit および Oil の影響が認められたが、前立腺重量にはこれらの栄養素の影響は認められなかった。一方、N 群では Pro.＊ Met の交互作用の表れ方が精巣と前立腺で異なっていた。

⑦ 血清テストステロン濃度に及ぼす飼料中栄養素量の影響

Table33 に血清テストステロン濃度に影響を与えた栄養素とその水準の組み合わせによる血清テストステロン濃度推定値を示した。

D 群においてのみ、Pro.と Min.の影響がみられ、血清テストステロン濃度は「標準 Pro.量・低 Min.量飼料」の時最大(1.298ng/ml)、「低 Pro.量・標準 Min.量飼料」の時最小(0.422ng/ml)であった(Table33)。

血清テストステロン濃度と精巣重量に対する影響が同様であった栄養素は、D 群では Pro.と Min.であった。また、D 群の精巣重量には Met、Vit.、Oil および Pro.＊ Met の交互作用の影響が認められたが、血清テストステロン濃度にはこれらの影響が認められなかった。N 群では、精巣重量に Pro.と Met の影響が認められたが、血清テストステロン濃度には認められなかった。

(2) 実験２：飼料中各種ミネラル量の影響

① 生殖器官重量、血清テストステロン濃度、体重および総飼料摂取量に及ぼす飼料中各種ミネラルの影響

Table34 に精巣・精巣上体重量、血清テストステロン濃度、体重および総飼料摂取量に対する明暗飼育条件および各種ミネラル因子の分散分析結果を示した。

明暗飼育条件、Mg および Na の影響が精巣重量、精巣上体重量、体

重および総飼料摂取量に対して認められた。明暗飼育条件＊ Ca の交互作用は精巣・精巣上体重量、血清テストステロン濃度、体重および総飼料摂取量に対し認められた。また、精巣・精巣上体重量、血清テストステロン濃度には Mg ＊ Na の交互作用も認められた。

②体重および総飼料摂取量に及ぼす飼料中各種ミネラル量の影響

Table35、Table36 に体重、総飼料摂取量に有意な影響を与えた因子の種類およびその水準の組み合わせによる体重推定値、総飼料摂取量推定値を示した。

体重に影響を与えた因子は明暗飼育条件、Ca、P、Mg および Na であり、明暗飼育条件＊ Ca の交互作用が認められた(Table34、Table35)。体重は「正常明暗飼育、低 Ca・低 P・標準 Mg・標準 Na 飼料」の時最大(183.3g)、「連続暗黒飼育、低 Ca・標準 P・低 Mg・低 Na 飼料」の時最小(134.0g)であった。D 群における体重の最大は「標準 Ca・低 P・標準 Mg・標準 Na 飼料」の時(160.8g)であった(Table35)。また、明暗飼育条件＊ Ca の交互作用は飼料 Ca 量の影響が明暗飼育条件によって異なることを示した。すなわち、N 群では飼料中の Ca 量が低量から標準量になると体重は低下した(8.5g 低下、Table35 より)が、D 群では Ca 量が低量から標準量になると体重は増加した(5.7g 増加、Table35 より)。

一方、総飼料摂取量に影響を与えた因子は明暗飼育条件、Ca、P、Mg および Na であり、明暗飼育条件＊ Ca の交互作用が認められた(Table34、Table36)。総飼料摂取量は「正常明暗飼育、低 Ca・低 P・標準 Mg・標準 Na 飼料」の時最大(350.7g)、「連続暗黒飼育、低 Ca・標準 P・低 Mg・低 Na 飼料」の時最小(281.4g)であった。D 群における総飼料摂取量の最大は「標準 Ca・低 P・標準 Mg・標準 Na 飼料」の時(335.4g)であった

(Table36)。また、明暗飼育条件＊ Ca の交互作用は飼料 Ca 量の影響が明暗飼育条件によって異なることを示した。すなわち、N 群では飼料中の Ca 量が低量から標準量になると総飼料摂取量は低下した(5.4g 低下、Table36 より)が、D 群では Ca 量が低量から標準量になると総飼料摂取量は増加した(17.3g 増加、Table36 より)。

体重と総飼料摂取量に対する各種ミネラルの影響は同様であった。

③ 精巣・精巣上体重量に及ぼす飼料中各種ミネラル量の影響

Table37、Table38 に精巣、精巣上体重量に有意な影響を与えた因子の種類およびその水準の組み合わせによる精巣重量、精巣上体重量推定値を示した。

精巣重量に影響を与えた因子は明暗飼育条件、Ca、Mg および Na であり、明暗飼育条件＊ Ca および Mg ＊ Na の交互作用が認められた(Table34、Table37)。

精巣重量は「正常明暗飼育、低 Ca・標準 Mg・標準 Na 飼料」の時最大(1.990g)、「連続暗黒飼育、低 Ca・標準 Mg・低 Na 飼料」の時最小(0.747g)であった。D 群における精巣重量の最大は「標準 Ca・標準 Mg・標準 Na 飼料」の時(1.245g)であった(Table37)。

また、明暗飼育条件＊ Ca の交互作用は飼料中 Ca 量の影響が明暗飼育条件によって異なることを示した。すなわち、N 群では飼料中の Ca 量が低量から標準量になると精巣重量は低下した(0.177g 低下、Table37 より)が、D 群では Ca 量が低量から標準量になると精巣重量は増加した(0.209g 増加、Table37 より)。また、Mg ＊ Na の交互作用は飼料中 Na の影響が飼料中の Mg 量により異なることを示した。すなわち、飼料中の Mg 量が低量時には飼料 Na 量が低量から標準量になると精巣重量はわ

ずかに増加したのみであった(0.071g 増加、Table37 より)が、飼料中の Mg 量が標準量時には飼料 Na 量が低量から標準量になると明らかに増加した(0.289g 増加、Table37 より)。

精巣上体重量に対する各種ミネラルの影響は精巣重量と同様の結果であった(Table38)。

精巣および精巣上体重量と体重に対する各種ミネラルの影響は、Ca と明暗飼育条件＊ Ca の交互作用は同様であったが、Mg と Na に関しては異なっていた。精巣および精巣上体重量に Mg ＊ Na の交互作用が認められたが、体重には認められなかった。また、P の影響は体重にのみ認められ、精巣や精巣上体重量には認められなかった。

④ 血清テストステロン濃度に及ぼす飼料中各種ミネラル量の影響

Table39 に血清テストステロン濃度に有意な影響を与えた因子とその水準の組み合わせによる血清テストステロン濃度推定値を示した。

血清テストステロン濃度に影響を与えた因子も、精巣、精巣上体と同様、明暗飼育条件、Ca、Mg および Na であり、明暗飼育条件＊ Ca および Mg ＊ Na の交互作用が認められた(Table34、Table39)。血清テストステロン濃度は「正常明暗飼育、低 Ca・標準 Mg・低 Na 飼料」の時最大(2.408ng/ml)、「連続暗黒飼育、低 Ca・低 Mg・低 Na 飼料」の時最小(0.162ng/ml)となった。D 群における血清テストステロン濃度の最大値は「標準 Ca・標準 Mg・低 Na 飼料」の時(1.993ng/ml)であった(Table39)。

明暗飼育条件＊ Ca の交互作用は、飼料 Ca 量の影響が明暗飼育条件により異なることを示した。すなわち、精巣および精巣上体重量と同様、N 群では飼料中の Ca 量が低量から標準量になるとテストステロン濃度は低下した(0.758ng/ml 低下、Table39 より)が、D 群では増加した(0.681ng/ml

増加、Table39 より)。一方、Mg ＊ Na の交互作用は、精巣および精巣上体とは異なった結果であった。すなわち、飼料中の Mg 量が低量時では、飼料 Na 量が低量から標準量になると血清テストステロン濃度は増加した(0.957ng/ml 増加、Table39 より)が、飼料中の Mg 量が標準量時には、飼料 Na 量が低量から標準量になると血清テストステロン濃度は低下した(0.961ng/ml 低下、Table39 より)。

血清テストステロン濃度と精巣重量に対する各種ミネラルの影響は、Ca に関しては同様であったが、Mg ＊ Na の交互作用の表れ方に関しては、精巣重量と血清テストステロン濃度では異なっていた。

(3) 実験３：飼料中各種アミノ酸量の影響

① 生殖器官重量、血清テストステロン濃度、体重および総飼料摂取量に及ぼす飼料中各種アミノ酸の影響

Table40 ～ Table42 に実験 3-1 ～実験 3-3 の精巣、精巣上体、精嚢、前立腺重量、血清テストステロン濃度、体重および総飼料摂取量に対する明暗飼育条件および各種アミノ酸因子の分散分析結果を示した。いずれの実験においても明暗飼育条件の影響が最も多く認められ、また、飼料に添加した Met、Cys、Trp、Thr、Val などの単独の影響および明暗飼育条件との交互作用が認められた。

Table43 に実験 3-4 の正常明暗飼育群、連続暗黒飼育群毎の分散分析結果を示した。N 群、D 群、それぞれ生殖器官発達に及ぼすアミノ酸の影響の表れ方が異なり、D 群は N 群に比較し影響の認められたアミノ酸が多かった。一方、血清テストステロン濃度にアミノ酸の影響は認められなかった。体重および総飼料摂取量に関しては Met+Cys の影響のみ認められた。

②体重および総飼料摂取量に及ぼす飼料中各種アミノ酸量の影響

Table44 ～ Table46(実験 3-1 ～実験 3-3)に体重、Table48 ～ Table50(実験 3-1 ～実験 3-3)に総飼料摂取量に有意な影響を与えた因子の種類およびその組み合わせによる体重推定値および総飼料摂取量推定値を示した。

体重に影響の認められた因子は、実験 3-1 では明暗飼育条件、Met+Cys および Thr(Table44)であり、実験 3-2 では明暗飼育条件、Cys、Trp および Thr(Table45)であった。また、明暗飼育条件＊ Met+Cys(Table40、Table44)および明暗飼育条件＊ Cys(Table41、Table45)の交互作用が認められた。実験 3-3 では、体重に影響の認められた因子は明暗飼育条件、Met、Cys、Thr および Leu(Table46)であり、Met ＊ Cys の交互作用が認められた(Table42、Table46)。

体重は「正常明暗飼育、Met+Cys 添加・Thr 添加飼料」の時最大(161.3g)(Table44、実験 3-1)、または「正常明暗飼育、Cys 添加・Trp 無添加・Thr 添加飼料」の時最大(163.3g)(Table45、実験 3-２)となった。実験 3-3 での体重の最大は「正常明暗飼育、Met 添加・Cys 無添加・Thr 添加・Leu 無添加飼料」の時(155.7g)(Table46)であった。

反対に、体重の最小は「連続暗黒飼育、Met+Cys 無添加・Thr 無添加飼料」の時(109.3g)(Table44、実験 3-1)、または「正常明暗飼育、Cys 無添加・Trp 添加・Thr 無添加飼料」の時(109.1g)(Table45、実験 3-２)であった。実験 3-3 での体重の最小は「連続暗黒飼育、Met 無添加・Cys 無添加・Thr 無添加・Leu 添加飼料」の時(100.0g)(Table46)であった。

D 群において、体重の最大は「Met+Cys 添加・Thr 添加飼料」(151.4g)(Table44、実験 3-1)、または「Cys 添加・Trp 無添加・Thr 添加飼料」(1.035g)(Table45、実験 3-２)、あるいは「Met 添加・Cys 添加・Thr 添加・Leu 無添加飼料」(144.7g)(Table46、実験 3-3)の時であった。

実験 3-1 でみられた明暗飼育条件＊ Met+Cys の交互作用は、Met+Cys の影響がN群とD群で異なることを示した。すなわち、N群ではMet+Cys 添加により体重が増加した(45.8g 増加、Table44 より)が、D 群では Met+Cys 添加によるその増加量が N 群より少なかった(36.4g 増加、Table44 より)。また、実験 3-2 でみられた明暗飼育条件＊ Cys の交互作用は、N群ではCys添加により体重が大きく増加した(43.4g増加、Table45 より)が、D 群では Cys 添加によるその増加量が N 群より少なかった(30.9 増加、Table45 より)ことより示された。実験 3-3 ではアミノ酸の交互作用も認められ、Met ＊ Cysの交互作用は、Metが無添加の時にはCys 添加により体重が大きく増加する(35.2g 増加、Table46 より)が、Met を添加している時にはその増加が少ない(3.8g 増加、Table46 より)ことより示された。

一方、総飼料摂取量に影響の認められた因子は、実験 3-1 では明暗飼育条件、Met+Cys および Trp(Table48)であり、実験 3-2 では、明暗飼育条件、Cys、Trp(Table49)であった。また、明暗飼育条件＊ Met+Cys、Met+Cys ＊ Trp(Table40、Table48)、明暗飼育条件＊ Cys、明暗飼育条件＊ Trp (Table41、Table49)の交互作用が認められた。実験 3-3 では、総飼料摂取量に影響の認められた因子は明暗飼育条件、Met、Cys、および Leu (Table50)であり、明暗飼育条件＊ Leu および Met ＊ Cys の交互作用が認められた(Table42、Table50)。

総飼料摂取量は「正常明暗飼育、Met+Cys 添加・Trp 無添加飼料」の時最大(352.7g)(Table48、実験 3-1)、または「正常明暗飼育、Cys 添加・Trp 無添加飼料」の時最大(388.9g)(Table49、実験 3-２)となった。実験 3-3 での総飼料摂取量の最大は「正常明暗飼育、Met 添加・Cys 無添加・Leu 無添加飼料」の時(339.6g)(Table50)であった。

反対に、総飼料摂取量の最小は「正常明暗飼育、Met+Cys 無添加・Trp 無添加飼料」の時(292.8g)(Table48、実験 3-1)、または「正常明暗飼育、Cys 無添加・Trp 添加飼料」の時(325.5g)(Table49、実験 3-２)であった。実験 3-3 での総飼料摂取量の最小は「連続暗黒飼育、Met 無添加・Cys 無添加・Leu 無添加飼料」の時(280.7g)(Table50)であった。

D 群において、総飼料摂取量の最大は「Met+Cys 添加・Trp 添加飼料」(336g)(Table48、実験 3-1)、または「Cys 添加・Trp 添加飼料」(354.9g)(Table49、実験 3-２)、あるいは「Met 添加・Cys 無添加・Leu 添加飼料」(317.4g)(Table50、実験 3-3)の時であった。

実験 3-1 でみられた明暗飼育条件＊ Met+Cys の交互作用は Met+Cys の影響が N 群と D 群で異なることを示した。すなわち、N 群では Met+Cys 添加により総飼料摂取量が増加した(59.9g 増加、Table48 より)が、D 群では Met+Cys 添加によるその増加量が N 群より少なかった(30.7g 増加、Table48 より)。また、Met+Cys と Trp の交互作用は、Met+Cys が無添加の時には Trp 添加により総飼料摂取量が増加する(7.5g 増加、Table48 より)が、Met を添加している時には低下する(6.1g 低下、Table48 より)ことより示された。実験 3-2 でみられた明暗飼育条件＊ Cys の交互作用は、N 群では Cys 添加により総飼料摂取量が増加した(52.2g 増加、Table49 より)が、D 群では Cys 添加によるその増加量が N 群より少なかった(16.8g 増加、Table49 より)ことより示された。明暗飼育条件＊ Trp の交互作用は、N 群では Trp 添加により総飼料摂取量が低下する(11.2g 低下、Table49 より)が、D 群では増加する(1.8g 増加、Table49 より)ことより示された。実験 3-3 でみられた明暗飼育条件＊ Leu の交互作用は、N 群では Leu 添加により総飼料摂取量が低下する(2.7g 低下、Table50 より)が、D 群では Leu 添加により増加する(9.2g 増加、Table50 より)ことより示された。Met と

Cys の交互作用は、Met が無添加の時には Cys 添加により総飼料摂取量が増加する(19.9g 増加、Table50 より)が、Met を添加している時には低下する(9.9g 低下、Table50 より)ことより示された。

Table47 に実験 3-4 において体重に有意な影響を与えたアミノ酸の種類およびその水準の組み合わせによる体重推定値を示した。D 群、N 群共に、Met+Cys の影響のみが認められ「標準 Met+Cys 飼料」の時最大(D 群 159.9g、N 群 178.8g)、「低 Met+Cys 飼料」の時最小(D 群 123.7g、N 群 129.6g)(Table47)であった。一方、実験 3-4 において総飼料摂取量に有意な影響を与えたアミノ酸は、Table51 に示したように N 群においてのみ Met+Cys の影響が認められ、「標準 Met+Cys 飼料」の時最大(440.6g)、「低 Met+Cys 飼料」の時最小(373.2g)であった。D 群では検討したアミノ酸の影響は認められなかった。

体重と総飼料摂取量に対する各種アミノ酸の影響は、Met+Cys、Cys および Leu、明暗飼育条件＊ Met+Cys、明暗飼育条件＊ Cys の交互作用に関しては同様であった。しかし、Met ＊ Cys の交互作用の影響は体重と総飼料摂取量では異なっていた。Thr の影響は体重のみ、明暗飼育条件＊ Trp、明暗飼育条件＊ Leu の交互作用は総飼料摂取量にのみ認められた。実験 3-4 における Met ＊ Cys の体重と総飼料摂取量に対する影響は、N 群では同様であったが、D 群では体重にのみ認められた。

③ 精巣重量に及ぼす飼料中各種アミノ酸量の影響

Table52 ～ Table54(実験 3-1 ～実験 3-3)に精巣重量に有意な影響を与えた因子の種類およびその組み合わせによる精巣重量推定値を示した。

精巣重量に影響の認められた因子は、実験 3-1 では明暗飼育条件と Met+Cys(Table52)であり、実験 3-2 では明暗飼育条件、Cys、Trp および Thr

(Table53)であった。また、明暗飼育条件＊ Met+Cys(Table40、Table52)および明暗飼育条件＊ Cys(Table41、Table53)の交互作用が認められた。実験 3-3 では、精巣重量に影響の認められた因子は明暗飼育条件、AIN 飼料組成、Met、Cys、Ile および Val(Table54)であり、明暗飼育条件＊ AIN 飼料組成、明暗飼育条件＊ Val、Met ＊ Cys の交互作用が認められた(Table42、Table54)。

精巣重量は「正常明暗飼育、Met+Cys 添加飼料」の時最大(2.018g)(Table52、実験 3-1)、または「正常明暗飼育、Cys 添加・Trp 無添加・Thr 添加飼料」の時最大(1.936g)(Table53、実験 3-２)となった。実験 3-3 での精巣重量の最大は「正常明暗飼育、AIN-76 組成・Met 添加・Cys 無添加・Ile 添加・Val 無添加飼料」の時(1.776g)(Table54)であった。反対に、精巣重量の最小は「連続暗黒飼育、Met+Cys 無添加飼料」の時(0.884g)(Table52、実験 3-1)、または「連続暗黒飼育、Cys 無添加・Trp 添加・Thr 無添加飼料」の時(0.638g)(Table53、実験 3-２)であった。実験 3-3 での精巣重量の最小は「連続暗黒飼育、AIN-76 組成・Met 無添加・Cys 無添加・Ile 無添加・Val 無添加飼料」の時(0.375g)(Table54)であった。

D 群において、精巣重量の最大は「Met+Cys 添加飼料」(1.409g)(Table52、実験 3-1)、または「Cys 添加・Trp 無添加・Thr 添加飼料」(1.035g)(Table53、実験 3-２)、あるいは「AIN-93G 飼料、Met 添加・Cys 無添加・Ile 添加・Val 添加飼料」(1.179g)(Table54、実験 3-3)の時であった。

実験 3-1 でみられた明暗飼育条件＊ Met+Cys の交互作用は、N 群では Met+Cys 添加により精巣重量が増加する(0.296g 増加、Table52 より)のに対し、D 群では Met+Cys 添加によりその重量増加が N 群より大きい(0.525g 増加、Table52 より)ことより示された。また、実験 3-２でみられた明暗飼育条件＊ Cys の交互作用は、N 群では Cys 添加により精巣重量

が増加する(0.438g 増加、Table53 より)のに対し、D 群では Cys 添加によるその重量増加が N 群より少ない(0.113g 増加、Table53 より)ことから示された。実験 3-3 における明暗飼育条件＊ AIN 組成の交互作用は、N 群では AIN-76 組成が AIN-93G 組成に変わると精巣重量が低下する(0.060g 低下、Table54 より)のに対し、D 群では精巣重量が増加する(0.248g 増加、Table54 より)ことより示された。明暗飼育条件＊ Val の交互作用は、N 群では Val 添加により精巣重量が低下する(0.143g 低下、Table54 より)が、D 群では Val 添加により精巣重量が増加する(0.058g 増加、Table54 より)ことより示された。また、アミノ酸の交互作用として Met ＊ Cys の交互作用がみられたが、これは Met が無添加の時には Cys 添加により精巣重量が増加する(0.324g 増加、Table54 より)が、Met を添加している時には、Cys 添加により低下する(0.027g 低下、Table54 より)ことより示された。

Table55 に実験 3-4 において精巣重量に有意な影響を与えたアミノ酸の種類およびその水準の組み合わせによる精巣重量推定値を示した。

D 群においては検討したアミノ酸すべての影響が認められ、精巣重量は「高 Met+Cys・低 Trp・標準 Val 飼料」の時最大(2.138g)、「低 Met+Cys・標準 Trp・高 Val 飼料」の時最小(1.407g)(Table55)であった。N 群では検討したアミノ酸の影響は認められなかった。

精巣重量と体重に対する各種アミノ酸の影響は Cys および Thr、明暗飼育条件＊ Cys の交互作用に関しては同様であった。しかし、明暗飼育条件＊ Met+Cys、Met ＊ Cys の交互作用は精巣重量と体重では異なっていた。精巣重量のみに影響が認められたアミノ酸は Ile、Val であり、明暗飼育条件＊ Val、明暗飼育条件＊ AIN 組成の交互作用も精巣重量にのみ認められた。一方、体重にのみ影響が認められたアミノ酸は Leu であ

った。Trp の影響は実験 3-2 では精巣重量、体重と同様の結果であったが、実験 3-4 では精巣重量にのみに認められ体重には認められなかった。

④ 精巣上体重量に及ぼす飼料中各種アミノ酸量の影響

Table56 ～ Table58(実験 3-1 ～実験 3-3)に精巣上体重量に有意な影響を与えた因子の種類およびその組み合わせによる精巣上体重量推定値を示した。

精巣上体重量に影響の認められた因子は、実験 3-1 では明暗飼育条件、Met+Cys および Ile(Table56)であり、実験 3-2 では明暗飼育条件、Cys、Trp および Thr(Table57)であった。また、明暗飼育条件＊ Ile(Table40、Table56)および明暗飼育条件＊ Cys(Table41、Table57)の交互作用が認められた。実験 3-3 では、精巣上体重量に影響の認められた因子は明暗飼育条件、AIN 飼料組成、Met および Cys(Table58)であり、明暗飼育条件＊ AIN 飼料組成、明暗飼育条件＊ Met、明暗飼育条件＊ Cys および Met＊ Cys の交互作用も認められた(Table42、Table58)。

精巣上体重量は「正常明暗飼育、Met+Cys 添加・Ile 添加飼料」の時最大(0.278g)(Table56、実験 3-1)、または「正常明暗飼育、Cys 添加・Trp 無添加・Thr 添加飼料」の時最大(0.243g)(Table57、実験 3-2)となった。実験 3-3 での精巣上体重量の最大は「正常明暗飼育、AIN-76 組成・Met 添加・Cys 無添加飼料」の時(0.210g)(Table58)であった。反対に、精巣上体重量の最小は「連続暗黒飼育、Met+Cys 無添加・Ile 添加飼料」の時(0.084g)(Table56、実験 3-1)、または「連続暗黒飼育、Cys 無添加・Trp 添加・Thr 無添加飼料」の時(0.062g)(Table57、実験 3-2)であった。実験 3-3 での精巣重量の最小は「連続暗黒飼育、AIN-76 組成・Met 無添加・Cys 無添加飼料」の時(0.034g)(Table58)であった。

D 群においての精巣上体重量の最大は「Met+Cys 添加・Ile 無添加飼料」(0.167g)(Table56、実験 3-1)、「Cys 添加・Trp 無添加・Thr 添加飼料」(0.120g)(Table57、実験 3-2)または「AIN-93G 組成・Met 無添加・Cys 添加飼料」(0.104g)(Table58、実験 3-3)の時であった。

実験 3-1 でみられた明暗飼育条件＊ Ile の交互作用は、N 群では Ile 添加により精巣上体重量が増加する(0.016g 増加、Table56 より)のに対し、D 群では Ile 添加により低下する(0.019g 低下、Table56 より)ことより示された。実験 3-2 でみられた明暗飼育条件＊ Cys の交互作用は、N 群では Cys 添加により精巣上体重量が増加する(0.074g 増加、Table57 より)が、D 群では Cys 添加によるその重量増加が N 群より少ない(0.020g 増加、Table57 より)ことより示された。実験 3-3 における明暗飼育条件＊ AIN 組成の交互作用は、N 群では AIN-76 組成が AIN-93G 組成に変わると精巣上体重量が低下する(0.019g 低下、Table58 より)のに対し、D 群では反対に増加する(0.022g 増加、Table58 より)ことより示された。明暗飼育条件＊ Met の交互作用は、N 群では Met 添加により精巣上体重量が増加する(0.071g 増加、Table58 より)が、D 群では Met 添加によるその増加量が少ない(0.022g 増加、Table58 より)ことより示された。明暗飼育条件＊ Cys の交互作用は、N 群では Cys 添加により精巣上体重量が増加する(0.013g 増加、Table58 より)が、D 群では Cys 添加によるその増加量が大きい(0.048g 増加、Table58 より)ことより示された。しかし、この結果は実験 3-2 の結果と異なっていた。また、アミノ酸の交互作用として Met ＊ Cys の交互作用がみられたが、これは Met が無添加の時には Cys 添加により精巣上体重量が増加する(0.013g 増加、Table58 より)が、Met を添加している時には Cys 添加により低下する(0.031 低下、Table58 より)ことより示された。

Table59 に実験 3-4 において精巣上体重量に有意な影響を与えたアミノ酸の種類およびその水準の組み合わせによる精巣上体重量推定値を示した。D 群において影響の認められたアミノ酸は Val であり、精巣上体重量は「標準 Val 飼料」の時最大(0.238g)、「高 Val 飼料」の時最小(0.159g)であった。N 群では検討したアミノ酸の影響は認められなかった(Table59)。

精巣上体重量と精巣重量に対する影響が同様であったアミノ酸は Met+Cys、Trp、Thr および Val であり、AIN 飼料組成の影響も同様であった。一方、Met と Cys の個別の影響および Ile の影響は精巣上体重量と精巣重量で異なっていた。

⑤ 血清テストステロン濃度に及ぼす飼料中各種アミノ酸量の影響

Table60 ～ Table62(実験 3-1 ～実験 3-3)に血清テストステロン濃度に有意な影響を与えた因子の種類およびその組み合わせによる血清テストステロン濃度推定値を示した。

血清テストステロン濃度に影響が認められた因子は、実験 3-1 では明暗飼育条件、Met+Cys、Trp、Ile および Arg(Table60)であり、実験 3-2 では明暗飼育条件のみ(Table61)であった。また、実験 3-1 においては明暗飼育条件＊ Met+Cys、明暗飼育条件＊ Ile、明暗飼育条件＊ Arg および Met+Cys ＊ Trp(Table40、Table60)の交互作用も認められた。実験 3-3 では、血清テストステロン濃度に影響の認められた因子は明暗飼育条件、AIN 飼料組成、Met、Cys、Arg および Lys であり、AIN 飼料組成＊ Cys の交互作用が認められた(Table42、Table62)。

血清テストステロン濃度は「正常明暗飼育、Met+Cys 無添加・Trp 添加・Ile 添加・Arg 添加飼料」の時最大(7.762ng/ml)(Table60、実験 3-1)、

または「正常明暗飼育」の時最大(0.724ng/ml)(Table61、実験 3-２)であった。実験 3-3 での推定値の最大は「正常明暗飼育、AIN-93G 組成・Met 添加・Cys 添加・Arg 無添加・Lys 添加飼料」の時(4.030ng/ml) g)(Table62)であった。反対に、血清テストステロン濃度の最小は「連続暗黒飼育、Met+Cys 無添加・Trp 無添加・Ile 無添加・Arg 添加飼料」の時(0.001ng/mlg)(Table60、実験 3-１)、または「連続暗黒飼育」の時(0.284ng/ml)(Table61、実験 3-2)であった。実験 3-3 での血清テストステロン濃度の最小は「連続暗黒飼育、AIN-93G 組成・Met 無添加・Cys 無添加・Arg 添加・Lys 無添加飼料」の時(0.001ng/ml)(Table62)であった。

D 群における血清テストステロン濃度の最大は「Met+Cys 添加・Trp 無添加・Ile 添加・Arg 無添加飼料」(1.287ng/ml)(Table60、実験 3-1)、または「AIN-93G 組成・Met 添加・Cys 添加・Arg 無添加・Lys 添加飼料」(2.582ng/ml)(Table62、実験 3-3)の時であった。

実験 3-1 でみられた明暗飼育条件＊ Met+Cys の交互作用は、N 群では Met+Cys 添加により血清テストステロン濃度が低下する(2.738ng/ml 低下、Table60 より)のに対し、D 群では Met+Cys 添加により増加する(0.932ng/ml 増加、Table60 より)ことより示された。明暗飼育条件＊ Ile の交互作用は、N 群では Ile 添加により血清テストステロン濃度が増加する(1.767ng/ml 増加、Table60 より)のに対し、D 群では Ile 添加によるその増加量が N 群より少ない(0.174ng/ml 増加、Table60 より)ことより示された。明暗飼育条件＊ Arg の交互作用は、N 群では Arg 添加により血清テストステロン濃度が増加する(1.731ng/ml 増加、Table60 より)が、D 群では Arg 添加をしてもほとんど変化しない(Table60 より)ことより示された。さらに、アミノ酸の交互作用として Met+Cys ＊ Trp の交互作用がみられたが、これは Met+Cys が無添加の時には Trp 添加により血清テスト

ステロン濃度が増加する(1.058ng/ml 増加、Table60 より)が、Met+Cys を添加している時には Trp 添加により低下する(0.467ng/ml 低下、Table60 より)ことより示された。また、実験 3-3 においてみられた AIN 飼料組成＊ Cys の交互作用は、AIN-76 飼料組成の時には Cys 添加により血清テストステロン濃度は増加する(0.504ng/ml 増加、Table62 より)が、AIN-93G 飼料組成の時には Cys 添加によるその増加量が大きい(1.164ng/ml 増加、Table62)ことより示された。

実験 3-4 では、N 群、D 群共に血清テストステロン濃度に検討したアミノ酸の影響は認められなかった。

血清テストステロン濃度と精巣重量に対する影響が同様であったアミノ酸は Met および Ile であり、Met+Cys、Cys、Trp、Val および AIN 飼料組成の影響は、精巣重量と血清テストステロン濃度では異なっていた。

(4) 実験 4 ：飼料中各種ビタミン量の影響

① 生殖器官重量、血清テストステロン濃度、体重および総飼料摂取量に及ぼす飼料中タンパク質量とビタミン量の影響および各種ビタミン量の影響

Table63 に実験 4-1 の生殖器官重量、血清テストステロン濃度、体重および総飼料摂取量に対する明暗飼育条件、飼料タンパク質量およびビタミン量の分散分析結果を示した。明暗飼育条件、飼料タンパク質およびビタミンの因子が単独あるいは因子間の交互作用をもって、生殖器官重量、血清テストステロン濃度、体重および総飼料摂取量に影響を与えた。明暗飼育条件および飼料タンパク質量の影響と飼料タンパク質量とビタミン量の交互作用が、多くの項目に対し認められた。

Table64 ～ Table67 に実験 4-2、4-3、4-4(1)、4-4(2)の生殖器官重量、血清

テストステロン濃度、体重および総飼料摂取量に対する明暗飼育条件および各種ビタミン因子の分散分析結果を示した、明暗飼育条件の影響は精巣、精巣上体、精嚢および前立腺、全ての生殖器官の発達、体重および総飼料摂取量に認められた。

Table64(実験 4-2)に示したように、明暗飼育条件、水溶性ビタミン量、脂溶性ビタミン量の交互作用も各種生殖器官において認められた。しかし、血清テストステロン濃度には、明暗飼育条件、水溶性ビタミン量および脂溶性ビタミン量の影響は認められなかった。体重には明暗飼育条件の影響のみ、総飼料摂取量には明暗飼育条件と水溶性ビタミンの影響が認められた。

Table65(実験 4-3)に示したように、各種脂溶性ビタミンに関しては精巣、精巣上体に対し V.E の単独の影響、明暗飼育条件＊ V.A、明暗飼育条件＊ V.E および V.A ＊ V.D の交互作用がみられた。体重には明暗飼育条件および V.E の影響、総飼料摂取量には明暗飼育条件の影響のみ認められた。

Table66(実験 4-4(1))、Table67(実験 4-4(2))に示したように、各種水溶性ビタミンに関しては生殖器官に対し Cho.、NA、PaA、$V.B_6$、FA の単独の影響がみられた。また、明暗飼育条件と Cho.、PaA、$V.B_6$、$V.B_1$、$V.B_2$ および $V.B_{12}$ の交互作用も認められた。体重には、明暗飼育条件、Cho.、NA、PaA、$V.B_6$、$V.B_2$、FA の単独の影響および明暗飼育条件＊ Cho.、明暗飼育条件＊ NA、明暗飼育条件＊ PaA、明暗飼育条件＊ $V.B_6$ および明暗飼育条件＊ $V.B_2$ の交互作用が認められた。総飼料摂取量には、明暗飼育条件、Cho.および明暗飼育条件＊ Bio.の交互作用が認められた。

② 体重および総飼料摂取量に対する飼料中タンパク質量とビタミン量の影響および各種ビタミン量の影響

Table68(実験 4-1)に示したように、ビタミン量が標準量または高量の時、D群はN群に比較して明らかに体重は低値を示した。D群では標準タンパク質飼料(20%Casein)および低タンパク質飼料(9%Casein食)共に、体重にビタミン量の影響は認められなかった。総飼料摂取量に関してはD群の低タンパク質飼料群においてビタミン量の影響が認められ、高ビタミン飼料群は低ビタミン飼料群より摂食量が低下した。

Table69 ～ Table73(実験 4-2、4-3、4-4(1)、4-4(2))に体重、Table74 ～ Table77に総飼料摂取量に有意な影響を与えた因子を組み合わせ算出した体重推定値および総飼料摂取量推定値を示した。

Table69(実験 4-2)に示したように、水溶性ビタミン量、脂溶性ビタミン量に関する実験では、体重に影響を与えた因子は明暗飼育条件のみであり「正常明暗飼育」の時最大(151.7g)、「連続暗黒飼育」の時最小(136.7g)であった。水溶性ビタミン量、脂溶性ビタミン量の影響は認められなかった。一方、総飼料摂取量に影響を与えた因子は明暗飼育条件と水溶性ビタミン量であり「正常明暗飼育、低水溶性ビタミン飼料」の時最大(320.0g)、「連続暗黒飼育、高水溶性ビタミン飼料」の時最小(279.6g)であった(Table74)。

しかし、Table70(実験 4-3)に示したように、各種脂溶性ビタミンに関する実験では、体重に影響を与えた因子は明暗飼育条件とV.Eであり、体重は「正常明暗飼育、高V.E飼料」の時最大(163.8g)、「連続暗黒飼育、標準V.E飼料」の時最小(148.2g)であった。D群における体重の最大も「高V.E飼料」の時(151.4g)であった。一方、総飼料摂取量には明暗飼育条件のみの影響であり「正常明暗飼育」の時最大(340.6g)、「連続暗黒飼育」

の時最小(315.6g)となり、各種脂溶性ビタミンの影響は認められなかった(Table75)。

Table71、Table72(実験 4-4(1))、Table73(実験 4-4(2))に示したように、各種水溶性ビタミンに関する実験では、体重に影響を与えた因子は明暗飼育条件、Cho.、NA、PaA、$V.B_6$、$V.B_2$、$V.B_1$、FA の影響および明暗飼育条件＊ Cho.、明暗飼育条件＊ NA、明暗飼育条件＊ PaA、明暗飼育条件＊ $V.B_6$ および明暗飼育条件＊ $V.B_2$ の交互作用が認められた(Table66、Table71、Table72、実験 4-4(1))。Bio.および $V.B_{12}$ の影響は認められなかった(Table67、Table73)。実験 4-4(1)の体重の推定値を二つの Table(Table71、Table72)に示したのは影響の認められた因子の数が多く、一度に推定値を算出できなかったためである。Table71 は単独の影響のみであった因子、Table72 は交互作用の認められた因子を組み合わせて算出した推定値である。

実験 4-4(1)における体重は、「標準 $V.B_1$、高 FA 飼料」の時(147.2g、Table71)および「正常明暗飼育、標準 Cho.・標準 NA・高 PaA・高 $V.B_6$・標準 $V.B_2$ 飼料」の時(163.7g、Table72)最大であり、「高 $V.B_1$・標準 FA 飼料」の時(142.4g、Table71)および「連続暗黒飼育、高 Cho.・標準 NA・標準 PaA・高 $V.B_6$・高 $V.B_2$ 飼料」の時(129.4g、Table72)最小であった。また、実験 4-4(2)では「正常明暗飼育」の時(153.6g)最大、「連続暗黒飼育」の時(135.3g)最小であった(Table73)。D 群における体重の最大は「標準 $V.B_1$・高 FA 飼料」の時(147.2g、Table71)および「標準 Cho.・高 NA・高 PaA・標準 $V.B_6$・標準 $V.B_2$」の時(145.2g、Table72)であった。

明暗飼育条件＊ Cho.の交互作用は、Cho.の影響が N 群と D 群で異なることを示した。すなわち、N 群では Cho.が標準量から高量になると体重が低下した(10.3g 低下、Table72 より)が、D 群ではその低下量が N 群

より少なかった(6.1 増加、Table72 より)。明暗飼育条件＊ NA の交互作用は、N 群では NA が標準量から高量になると体重が低下した(4.2g 低下、Table72 より)が、D 群では増加した(0.6g 増加、Table72 より)ことより示された。明暗飼育条件＊ PaA の交互作用は、N 群では PaA が標準量から高量になると体重が増加した(0.6g 増加、Table72 より)が、D 群ではその増加量が N 群より大きかった(5.1g 増加、Table72 より)ことより示された。明暗飼育条件＊ $V.B_6$ の交互作用は、N 群では $V.B_6$ が標準量から高量になると体重が増加した(1.3g 増加、Table72 より)が、D 群では低下した(2.5g 低下、Table72 より)ことより示された。明暗飼育条件＊ $V.B_2$ の交互作用は、N 群では $V.B_2$ が標準量から高量になると体重が低下した(6.7g 低下、Table72 より)が、D 群ではその低下量が N 群より少なかった(1.5g 低下、Table72 より)ことより示された。

各種水溶性ビタミンの総飼料摂取量に対する影響は Table76(実験 4-4(1))、Table77(実験 4-4(2))に示したように、Cho.(Table76)と Bio.(Table77)においてのみ認められた。明暗飼育条件の影響も同時に認められ、明暗飼育条件＊ Bio.の交互作用が認められた(Table67、Table77)。総飼料摂取量は「正常明暗飼育、標準 Cho.飼料」の時(331.8g、Table76)、または「明暗飼育条件、高 Bio.飼料」の時(338.1g、Table77)の時最大となった。一方「連続暗黒飼育、高 Cho.」の時(286.7g、Table76)、または「連続暗黒飼育、高 Bio.飼料」の時(294.8g、Table77)最小となった。明暗飼育条件＊ Bio.の交互作用は、N 群では、Bio.が標準量から高量になると総飼料摂取量が増加する(17.1g 増加、Table77 より)が、D 群では低下する(9.1g、Table77 より)ことより示された。

体重と総飼料摂取量に対する影響が同様であったビタミンは認められなかった。体重には明暗飼育条件と各種水溶性ビタミンの交互作用が多

く認められたが、総飼料摂取量に対して明暗飼育条件との交互作用が認められた水溶性ビタミンはBio.のみであった。

③ 精巣、精巣上体、精嚢および前立腺重量に及ぼす飼料中タンパク質量およびビタミン量の影響

Table78(実験 4-1)に示したように、D 群では N 群に比較し低タンパク質飼料により生殖器官重量が低値を示した。また、その程度はビタミン量の影響を受け、ビタミン量が低量から高量になるにしたがい生殖器官重量は低値を示した。すなわち、「連続暗黒飼育、低タンパク質・高ビタミン飼料」は精巣、精巣上体、精嚢、前立腺いずれの重量増加も抑制した。連続暗黒飼育・高ビタミン飼料であっても標準タンパク質量の場合、生殖器官の重量増加抑制は認められなかった。一方、N 群の場合には、低タンパク質飼料で飼料中ビタミン量が高量であっても生殖器官の重量増加抑制はほとんど認められなかった。

精巣重量と体重に関する飼料中タンパク質量およびビタミン量の影響は、D 群では低タンパク質飼料で睾丸重量はビタミン量に依存し低値を示したが、体重には影響が認められなかった。

④ 精巣重量に及ぼす飼料中各種ビタミンの影響

Table79 ～ Table82(実験 4-2、4-3、4-4(1)、4-4(2))に精巣重量に有意な影響を与えた因子を組み合わせ算出した精巣重量推定値を示した。

Table79(実験 4-2)に示したように精巣重量に影響を与えた因子は明暗飼育条件、水溶性ビタミン量、脂溶性ビタミン量であり、これら３つの因子の交互作用も認められた(Table64、Table79)。精巣重量は「正常明暗飼育、標準水溶性ビタミン・標準脂溶性ビタミン飼料」の時最大(2.310g)

であった。また、「連続暗黒飼育、標準水溶性ビタミン・標準脂溶性ビタミン飼料」の時最小(0.827g)であった(Table79)。D 群における精巣重量の最大は「高水溶性ビタミン・低脂溶性ビタミン飼料」の時(1.683g)であった(Table79)。

Table80(実験 4-3)に示したように、各種脂溶性ビタミンに関する実験では、精巣重量に影響を与えた因子は明暗飼育条件、V.A、V.D および V.E であり、明暗飼育条件＊ V.E および V.A ＊ V.D の交互作用も認められた(Table65、Table80)。精巣重量は「正常明暗飼育、標準 V.A・標準 V.D・高 V.E 飼料」の時最大(2.213g)、「連続暗黒飼育、標準 V.A・高 V.D・標準 V.E 飼料」の時最小(1.370g)であった（Table80)。D 群における精巣重量の最大は「標準 V.A・標準 V.D・高 V.E 飼料」の時(1.868g)であった(Table80)。明暗飼育条件＊ V.E の交互作用は、V.E の影響が N 群と D 群で異なることを示した。すなわち、N 群では V.E が標準量から高量になるとわずかに精巣重量が増加した(0.045g 増加、Table80 より)が、D 群では精巣重量増加が著しかった(0.335g 増加、Table80 より)。また、V.A ＊ V.D の交互作用は、標準 V.A 飼料では V.D が標準量から高量になると精巣重量が低下した(0.163g 低下、Table80 より)が、高 V.A 量飼料では増加した(0.029g 増加、Table80 より)ことより示された。

Table81(実験 4-4(1))、Table82(実験 4-4(2))に示したように、各種水溶性ビタミンに関する実験では、精巣重量に影響を与えた因子は明暗飼育条件、PaA、$V.B_6$、$V.B_1$ であり、また、明暗飼育条件＊ PaA、明暗飼育条件＊ $V.B_6$ および明暗飼育条件＊ $V.B_1$ の交互作用が認められ(Table66、Table81)、Bio.、$V.B_{12}$ の影響は認められなかった(Table67、Table82)。

精巣重量は「正常明暗飼育、標準 PaA・高 $V.B_6$・高 $V.B_1$ 飼料」の時最大(2.200g)、「連続暗黒飼育、標準 PaA・高 $V.B_6$・高 $V.B_1$ 飼料」の時最小

(0.907g)であった(Table81、実験 4-4(1))。また、実験 4-4(2)では「正常明暗飼育」の時最大(1.903g)、「連続暗黒飼育」の時最小(0.948g)であった(Table82)。D 群における精巣重量の最大は「高 PaA・標準 $V.B_6$・標準 $V.B_1$ 飼料」の時(1.547g)であった(Table81、実験 4-4(1))。

明暗飼育条件＊ PaA の交互作用は、PaA の影響が N 群と D 群で異なることを示した。すなわち、N 群では PaA が標準量から高量になると精巣重量が低下した(0.053g 低下、Table81 より)が、D 群では増加した(0.232g 増加、Table81 より)。また、明暗飼育条件＊ $V.B_6$ の交互作用は、N 群では $V.B_6$ が標準量から高量になると精巣重量が増加した(0.023g 増加、Table81 より)が、D 群では低下した(0.213g 低下、Table81 より)ことより示された。明暗飼育条件＊ $V.B_1$ の交互作用は、N 群では $V.B_1$ が標準量から高量になると精巣重量が増加した(0.078g 増加、Table81 より)が、D 群では低下した(0.194g 低下、Table81 より)ことより示された。

精巣重量と体重に対する影響が同様であったビタミンは認められず、明暗飼育条件＊ PaA の交互作用は精巣重量、体重共に認められたがその作用の表れ方は異なっていた。明暗飼育条件＊ V.E、明暗飼育条件＊ V.B6 および明暗飼育条件＊ $V.B_1$ の交互作用は精巣重量のみ、明暗飼育条件＊ Cho.、明暗飼育条件＊ NA、明暗飼育条件＊ $V.B_6$ および明暗飼育条件＊ $V.B_2$ の交互作用は体重にのみ認められた。また、体重には FA の影響も認められたが、精巣重量に FA の影響は認められなかった。

⑤ 精巣上体重量に及ぼす飼料中各種ビタミン量の影響

Table83 ～ Table86(実験 4-2、4-3、4-4(1)、4-4(2))に精巣上体重量に有意な影響を与えた因子を組み合わせ算出した精巣上体重量推定値を示した。

Table83(実験 4-2)に示したように精巣上体重量に影響を与えた因子は、明暗飼育条件と脂溶性ビタミン量であり、これらの交互作用も認められた(Table64、Table83)。精巣上体重量は「正常明暗飼育、高脂溶性ビタミン量飼料」の時最大(0.233g)、「連続暗黒飼育、高脂溶性ビタミン量飼料」の時最小(0.093g)であった。D 群における精巣上体重量の最大は「低脂溶性ビタミン量飼料」の時(0.138g)であった(Table83)。

Table84(実験 4-3)に示したように、精巣上体重量に影響を与えた各種脂溶性ビタミン因子は、精巣重量と同様、明暗飼育条件、V.A、V.D および V.E であり、明暗飼育条件＊ V.E および V.A ＊ V.D の交互作用も認められた(Table65、Table84)。精巣上体重量は「正常明暗飼育、標準 V.A・標準 V.D・標準 V.E 量飼料」の時最大(0.268g)、「連続暗黒飼育、標準 V.A・高 V.D・標準 V.E 量飼料」の時最小(0.118g)であった。D 群における精巣上体重量の最大は「標準 V.A・標準 V.D・高 V.E 飼料」の時(0.218g)に示された(Table84)。

明暗飼育条件＊ V.E の交互作用は、V.E の影響が N 群と D 群で異なることを示した。すなわち、N 群では V.E 量が標準量から高量になると精巣上体重量が低下した(0.011g 低下、Table84 より)が、D 群では増加した(0.066g 増加、Table84 より)。また、V.A ＊ V.D の交互作用に関しては精巣と同様の影響であった。すなわち、標準 V.A 飼料では V.D が標準量から高量になると精巣上体重量が低下した(0.033g 低下、Table84 より)が、高 V.A 量飼料では増加した(0.009g 増加、Table84 より)。

Table85(実験 4-4(1))、Table86(実験 4-4(2))に示したように各種水溶性ビタミンに関する実験では、精巣上体重量に影響を与えた因子は明暗飼育条件、PaA、$V.B_1$ であり、また、明暗飼育条件＊ PaA および明暗飼育条件＊ $V.B_1$ の交互作用が認められ(Table66、Table85)、Bio.、$V.B_{12}$ の影響は

認められなかった(Table67、Table86)。精巣上体重量は「正常明暗飼育、標準 PaA・高 $V.B_1$ 飼料」の時最大(0.282g)、「連続暗黒飼育、標準 PaA・高 $V.B_1$ 飼料」の時最小(0.106g)(Table85、実験 4-4(1))、また「正常明暗飼育」の時最大(0.237g)、「連続暗黒飼育」の時最小(0.106g)(Table86、実験 4-4(2))となった。D 群における精巣上体重量の最大は「高 PaA・標準 $V.B_1$ 飼料」の時(0.155g)であった(Table85、実験 4-4(1))。

精巣上体重量に対する明暗飼育条件＊ PaA および明暗飼育条件＊ $V.B_1$ の交互作用は、精巣と同様の結果であった。すなわち、明暗飼育条件＊ PaA の交互作用に関しては、N 群では PaA が標準量から高量になると精巣上体重量が低下した(0.023g 低下、Table85 より)が、D 群では増加した(0.029g 増加、Table85 より)。また、明暗飼育条件＊ $V.B_1$ の交互作用に関しては、N 群では $V.B_1$ が標準量から高量になると精巣上体重量が増加した(0.019g 増加、Table85 より)が、D 群では低下した(0.020g 低下、Table85 より)。

精巣上体重量と精巣重量に対する影響が同様であったビタミンは V.A、V.D、PaA、$V.B_1$ であり、明暗飼育条件＊ V.E の交互作用の表れ方は精巣と精巣上体では異なっていた。また、$V.B_6$ の影響は精巣重量に対してのみ認められた。

⑥ 血清テストステロン濃度に対する飼料中タンパク質量とビタミン量の影響および各種ビタミン量の影響

Table63、Table78(実験 4-1)に示したように、実験 4-1 では、血清テストステロン濃度に明暗飼育条件および飼料タンパク質量の影響がみられた。また、D 群は N 群に比較し血清テストステロン濃度は低値を示し、低タンパク質量飼料でも血清テストステロン濃度が低値を示した

(Table78)。

しかし、水溶性ビタミンと脂溶性ビタミンに関する実験(実験 4-2)では、血清テストステロン濃度に対する水溶性ビタミン量と脂溶性ビタミン量の影響は認められなかった(Table64)。また、各種脂溶性ビタミンに関する実験(実験 4-3)においても、ビタミン A、D、E および K の血清テストステロン濃度に及ぼす影響は認められず、明暗飼育条件のみが血清テストステロン濃度に影響を示し(Table65、Table87)、「正常明暗飼育」の時最大(1.603ng/ml)、「連続暗黒飼育」の時最小(0.943ng/ml)となった(Table87)。

各種水溶性ビタミンに関する実験(実験 4-4(1)、実験 4-4(2))では、血清テストステロン濃度に影響を与えた因子は明暗飼育条件、Bio.および $V.B_{12}$ であり、明暗飼育条件＊ Bio.＊ $V.B_{12}$ の交互作用が認められた(Table67、Table88)。血清テストステロン濃度は「正常明暗飼育、標準 Bio.・高 $V.B_{12}$ 飼料」の時最大(1.729ng/ml)、「連続暗黒飼育、高 Bio.・高 $V.B_{12}$ 飼料」の時最小(0.361ng/ml)であった(Table88、実験 4-4(2))。D 群における血清テストステロン濃度の最大は「標準 Bio.・標準 $V.B_{12}$ 飼料」の時(0.844ng/ml)であった。

血清テストステロン濃度と精巣重量に対する影響が同様であったビタミンは認められなかった。V.A、V.D、V.E、PaA、$V.B_1$ および $V.B_6$ の影響は精巣重量に対してのみで認められ、Bio.および $V.B_{12}$ の影響は血清テストステロン濃度に対してのみ認められた。

２）実験結果総括

以下に、実験１～４において体重、精巣重量および血清テストステロン濃度の推定値を最大または最小にした飼料中各種栄養素量の組み合わせを記した。

(1)体重を最大または最小にする組み合わせ

① 実験１：タンパク質、メチオニン、ビタミン、ミネラル、脂質

体重を最大にする組み合わせ

D 群「標準 Pro.・Met 添加」

N 群「標準 Pro.・Met 添加・標準 Min.」

体重を最小にする組み合わせ

D 群「低 Pro.・Met 無添加」

N 群「低 Pro.・Met 無添加・低 Min.」

② 実験２：各種ミネラル

体重を最大にする組み合わせ

D 群「標準 Ca・低 P・標準 Mg・標準 Na」

N 群「低 Ca・低 P・標準 Mg・標準 Na」

体重を最小にする組み合わせ

D 群「低 Ca・標準 P・低 Mg・低 Na」

N 群「標準 Ca・標準 P・低 Mg・低 Na」

③ 実験３：各種アミノ酸

体重を最大にする組み合わせ

（それぞれの実験における組み合わせ）

D 群「Met+Cys 添加・Thr 添加」

「Cys 添加・Trp 無添加・Thr 添加」

「AIN-93G 組成・Met 添加・Cys 添加・Thr 添加・Leu 無添加」

「標準 Met+Cys 添加」

N 群「Met+Cys 添加・Thr 添加」

「Cys 添加・Trp 無添加・Thr 添加」

「AIN-93G 組成・Met 添加・Cys 添加・Thr 添加・Leu 無添加」

「標準 Met+Cys 添加」

体重を最小にする組み合わせ

（それぞれの実験における組み合わせ）

D 群「Met+Cys 無添加・Thr 無添加」

「Cys 無添加・Trp 添加・Thr 無添加」

「AIN-76 組成・Met 無添加・Cys 無添加・Thr 無添加・
Leu 添加」

「Met+Cys 無添加」

N 群「Met+Cys 無添加・Thr 無添加」

「Cys 無添加・Trp 添加・Thr 無添加」

「AIN-76 組成・Met 無添加・Cys 無添加・Thr 無添加・
Leu 添加」

「Met+Cys 無添加」

④ 実験４：各種ビタミン

体重を最大にする組み合わせ

（それぞれの実験における組み合わせ）

D 群「高 V.E」

「標準 $V.B_1$・標準 $V.B_2$・標準 $V.B_6$・標準 Cho.・高 NA・高 PaA ・高 FA」

N 群「高 V.E」

「標準 $V.B_1$・標準 $V.B_2$・高 $V.B_6$・標準 Cho.・標準 NA・高 PaA・高 FA 」

体重を最小にする組み合わせ

（それぞれの実験における組み合わせ）

D 群「標準 V.E」

「高 $V.B_1$・高 $V.B_2$・高 $V.B_6$・高 Cho.・標準 NA・標準 PaA・標準 FA」

N 群「標準 V.E」

「高 $V.B_1$・高 $V.B_2$・標準 $V.B_6$・高 Cho.・高 NA・標準 PaA・・標準 FA」

(2) 精巣重量を最大または最小にする組み合わせ

① 実験１：タンパク質、メチオニン、ビタミン、ミネラル、脂質

精巣重量を最大にする組み合わせ

D 群「標準 Pro.・Met 添加・低 Vit.・低 Min.・標準 Oil」

N 群「標準 Pro.・Met 無添加」

精巣重量を最小にする組み合わせ

D 群「低 Pro.・Met 添加・標準 Vit.・標準 Min.・低 Oil」

N 群「低 Pro.・Met 無添加」

② 実験２：各種ミネラル

精巣重量を最大にする組み合わせ

D 群「標準 Ca・標準 Mg・標準 Na」

N 群「低 Ca・標準 Mg・標準 Na」

精巣重量を最小にする組み合わせ

D 群「低 Ca・標準 Mg・低 Na」

N 群「標準 Ca・標準 Mg・低 Na」

③ 実験３：各種アミノ酸

精巣重量を最大にする組み合わせ

（それぞれの実験における組み合わせ）

D 群「Met+Cys 添加」

「Cys 添加・Trp 無添加・Thr 添加」

「AIN-93G 組成・Met 添加・Cys 無添加・Ile 添加・Val 添加」

「高 Met+Cys 添加・Trp 無添加・標準 Val 添加」

N 群「Met+Cys 添加」

「Cys 添加・Trp 無添加・Thr 添加」

「AIN-76 組成・Met 添加・Cys 無添加・Ile 添加・Val 無添加」

精巣重量を最小にする組み合わせ

（それぞれの実験における組み合わせ）

D群「Met+Cys無添加」

「Cys無添加・Trp添加・Thr無添加」

「AIN-76組成・Met無添加・Cys無添加・Ile無添加・Val無添加」

「Met+Cys無添加・標準Trp添加・高Val添加」

N群「Met+Cys無添加」

「Cys無添加・Trp添加・Thr無添加」

「AIN-93G組成・Met無添加・Cys無添加・Ile無添加・Val添加」

④ **実験４：各種ビタミン**

精巣重量を最大にする組み合わせ

（それぞれの実験における組み合わせ）

D群「高水溶性ビタミン・低脂溶性ビタミン」

「標準V.A・標準V.D・高V.E」

「標準$V.B_1$・標準$V.B_6$・高PaA」

N群「標準水溶性ビタミン・標準脂溶性ビタミン」

「標準V.A・標準V.D・高V.E」

「高$V.B_1$・高$V.B_6$・標準PaA」

精巣重量を最小にする組み合わせ

（それぞれの実験における組み合わせ）

D群「低タンパク質・高ビタミン」

「標準水溶性ビタミン・標準脂溶性ビタミン」

「標準 V.A・高 V.D・標準 V.E」

「高 $V.B_1$・高 $V.B_6$・標準 PaA」

N群「低水溶性ビタミン・標準脂溶性ビタミン」

「標準 V.A・高 V.D・標準 V.E」

「標準 $V.B_1$・標準 $V.B_6$・高 PaA」

(3) 血清テストステロン濃度を最大または最小にする組み合わせ

① 実験１：タンパク質、メチオニン、ビタミン、ミネラル、脂質

血清テストステロン濃度を最大にする組み合わせ

D群「標準 Pro.・低 Min.」

N群に対しては影響が認められなかった。

血清テストステロン濃度を最小にする組み合わせ

D群「低 Pro.・標準 Min.」

N群に対しては影響が認められなかった。

② 実験２：各種ミネラル

血清テストステロン濃度を最大にする組み合わせ

D群「標準 Ca・標準 Mg・低 Na」

N群「低 Ca・標準 Mg・低 Na」

血清テストステロン濃度を最小にする組み合わせ

D群「低 Ca・低 Mg・低 Na」

N群「標準 Ca・低 Mg・低 Na」

③ 実験３：各種アミノ酸

血清テストステロン濃度を最大にする組み合わせ

（それぞれの実験における組み合わせ）

D 群「Met+Cys 添加・Trp 無添加・Ile 添加・Arg 無添加」

「AIN-93G 組成・Met 添加・Cys 添加・Arg 無添加・Lys 添加」

N 群「Met+Cys 無添加・Trp 添加・Ile 添加・Arg 添加」

「AIN-93G 組成・Met 添加・Cys 添加・Arg 無添加・Lys 添加」

血清テストステロン濃度を最小にする組み合わせ

（それぞれの実験における組み合わせ）

D 群「Met+Cys 無添加・Trp 無添加・Ile 無添加・Arg 添加」

「AIN-93G 組成・Met 無添加・Cys 無添加・Arg 添加・

Lys 無添加」

N 群「Met+Cys 添加・Trp 添加・Ile 無添加・Arg 無添加」

「AIN-93G 組成・Met 無添加・Cys 無添加・Arg 添加・

Lys 無添加」

④ 実験４：各種ビタミン

血清テストステロン濃度を最大にする組み合わせ

（それぞれの実験における組み合わせ）

D 群「標準 Bio.・標準 $V.B_{12}$」

N 群「標準タンパク質・低ビタミン」

「標準 Bio.・高 $V.B_{12}$」

血清テストステロン濃度を最小にする組み合わせ

（それぞれの実験における組み合わせ）

D 群「高 Bio.・標準 $V.B_{12}$」

N 群「低タンパク質・低ビタミン」

「標準 Bio.・高 $V.B_{12}$」

３．考察

生活リズム攪乱モデル実験として、ラットを連続暗黒飼育すると、生殖器官の発達が抑制されることはすでに報告されている[20),23 ~ 25)]。また、生殖器官の発達は飼料栄養素の影響を受けることも古くから明らかとなっている[35)]。しかし、この両者を伴わせた研究、すなわち、生活リズム攪乱時における生殖器官発達に対する飼料栄養素の影響に関する研究はこれまで報告されていない。本研究では、連続暗黒飼育ラットの成長期における生殖器官の発達に対する個別栄養素量の影響を実験計画法により栄養素毎に検討を進めた。

１）飼料中タンパク質量、メチオニン添加、ビタミン混合量、ミネラル混合量および総脂質量の影響

本研究ではまず、グロスな栄養成分について検討するため、タンパク質、メチオニン、ビタミン混合、ミネラル混合および脂質量の飼料中への添加量を標準量または低量(メチオニンに関しては無添加)として実験した。実験 1 の結果の項で述べたように、D 群では N 群に比較し、検討したすべての栄養素の影響が生殖器官重量に対して認められた。また、血清テストステロン濃度に対しても D 群でタンパク質およびメチオニンの影響が認められた。

本実験で設定した低量という添加量は欠乏量ではなく不足量であり、4 週間の飼育期間では生体に対して顕著な欠乏症状が現れないことを予備実験において確認した量である。それゆえ、連続暗黒飼育という特殊な環境にある生体では摂取栄養素に対する需要量が高まると考えられた。

また、D 群と N 群では体重と総飼料摂取量に対する飼料中の各種栄養素の影響が異なっていた。N 群では総飼料摂取量に対してタンパク質

量、メチオニン添加、ビタミン混合量、ミネラル混合量および総脂質量の影響、D 群ではタンパク質量の影響が認められた。正常明暗飼育した場合、例えば低ビタミン、低脂質飼料の総摂取量は増加したが、これは各栄養素を必要量摂取するというラットの栄養適応能力としての選択摂取能の現れである[36]。しかし、D 群では総摂取量に対する飼料中ビタミンや脂質の影響は認められなかった。このことは連続暗黒飼育によって生体リズムが乱れ、ラットの選択摂取能力が発動しなかった可能性、すなわち、選択摂取調節メカニズム(視床下部・大脳辺縁系) は成長期にリズム調節機構と連動して成熟するとされているが[37]、本実験では生体リズムの乱れによってこの選択摂取調節メカニズムが成熟しなかった可能性が考えられる。あるいは、連続暗黒飼育では成長過程で生体の栄養需要量が変化した可能性が考えられるが明らかでない。選択摂取能力に関する詳細な検討には別途の研究方法による系統的解析の必要があると考えられる。

本論文の実験結果はすべて自由摂取条件下で飼育したもので pair-feeding 法を行っていない。それゆえ、体重や生殖器官重量の変化には飼料摂取量の変化を伴う効果もあるが、それも個別栄養素の特異的な影響であり、本実験ではそれを分けて解析することが困難である。また、飼育第 4 週目の N 群での一日あたりの飼料摂取量は 9%Casein 食群で 13.6 ± 1.4g(平均± SD)、20%Casein 食群で 13.4 ± 0.9g であった($p<0.03$ で有意差あり)。20%Casein 食群に相当するタンパク質量を 9%Casein 食群が摂取するにはその比率から計算して約 29g の飼料摂取が必要であるが、体重約 130g のラットにとっては摂取不可能な量である。飼料中タンパク質が低量(9%Casein)である場合、飼料摂取量は増加するが、タンパク質摂取量は標準タンパク質飼料(20%Casein 食)で摂取される量に達

していない。これは選択摂取能力が未発達であるか、あるいは成長期における胃の受け入れ容量が少ないことによるか、二つの可能性が考えられる。以上のタンパク質にみられた現象は他の栄養素についても認められた。各種栄養素量が標準量である飼料と標準量の 1/2 から 1/3 量である飼料を給与する場合、この栄養素量の差はラットの選択摂取能力では補いきれない量であり、生殖器官発達の変化は総摂取量の影響より個別栄養素摂取不足による影響の方が強いと考えられる。したがって、生殖器官重量や血清テストステロン濃度に関して総飼料摂取量の変化も含めて考察を進めていく。

結果の項に示したように、実験 1 の飼料効率には明暗飼育条件、飼料タンパク質量の影響と共に週齢の影響も認められた。D 群は N 群に比較し、有意に飼料効率が低下したが、週齢(飼育期間の長さ)によっても飼料効率に対する飼料中タンパク質の影響が異なるという結果であった。一方、体重には明暗飼育条件の影響は認められず、飼料摂取量は N 群より D 群が高値を示した。それゆえ、飼料効率に関しては体重増加、飼料摂取量のみでなく、摂食リズムと体重増加の相互関係に対する検討も含め、今後さらに別途な研究方法を用い評価する必要がある。

(1) 飼料中タンパク質量とメチオニン量について

生殖器官発達抑制は低タンパク質給与により引き起こされ、連続暗黒飼育環境下ではその発達抑制が顕著になると江指らは報告している[20)25)]。また、連続暗黒飼育ラットにおける精巣重量の低下は精巣中の特定の成分の過不足によって起こるのでなく、組織全体の細胞分裂そのものの低下、すなわち、発達の遅れであると述べている[20)]。本実験において、飼料中のタンパク質量の影響は D 群の精巣、精巣上体、精嚢重量および

血清テストステロン濃度、N 群の精巣、精巣上体、精嚢および前立腺重量に認められ、いずれも、低タンパク質食(9%カゼインレベル)によりそれらの発達は抑制された。さらに、D 群においてその抑制程度が大きく、これまでの結果を支持した。

本実験ではタンパク質とメチオニンの精巣、精巣上体に対する影響が明暗飼育条件の違いにより異なるという結果を得た。AIN-76 飼料組成ではタンパク質給源としてミルクカゼインが用いられており、ミルクカゼインのアミノ酸組成のうち最も含有量の少ないメチオニンが、ラットの成長促進のために 0.3%添加されている[27]。本実験でも、正常明暗飼育ラットの体重は飼料中カゼイン含量に関係なく 0.3%のメチオニン添加により明らかに増加した。総飼料摂取量もメチオニン添加により増加したため、この体重増加は飼料摂取量増加に伴うものであったと考えられる。一方、精巣、精巣上体重量に関してはメチオニン添加により必ずしも増加しなかった。すなわち、N 群では 9%カゼイン食に 0.3%のメチオニンを添加すると 9%カゼイン食より精巣、精巣上体重量は増加したが、20%カゼイン食に 0.3%のメチオニンを添加すると、20%カゼイン食より精巣、精巣上体重量は低下したのである。

連続暗黒飼育ラットの体重に対するメチオニン添加効果は N 群とは異なり、9%カゼイン食に 0.3%のメチオニンを添加した時のみ増加し、20%カゼイン食に 0.3%のメチオニンを添加した時は反対に低下した。総飼料摂取量にメチオニンの影響は認められなかったことから、この体重増加に飼料摂取量は関与していないと考えられる。一方、精巣、精巣上体重量に対しては 9%カゼイン食に 0.3%のメチオニンを添加すると 9%カゼイン食より精巣、精巣上体重量は低下し、20%カゼイン食にメチオニンを添加すると 20%カゼイン食より精巣、精巣上体重量は増加した。

すなわち、D 群の精巣、精巣上体に対するカゼインレベルとメチオニンの交互作用は、体重に対する効果とは逆の結果、そして N 群の精巣、精巣上体重量に対する効果とも逆の結果を示したのである。

これらの結果は、AIN-76 飼料のタンパク質、アミノ酸組成が正常明暗飼育したラットの成長のためには適しているが、生殖器官発達のためには必ずしも最適でないことを示している。また、明暗飼育条件の違いにより、体重や生殖器官重量に対するタンパク質とメチオニンの交互作用の影響が異なったという実験結果から、連続暗黒飼育によりメチオニン代謝に何らかの変化が起こったと考えられる。それが消化吸収の段階であるのか、あるいは吸収されたアミノ酸の代謝の段階であるのか、本実験では明らかにすることはできないが、D 群と N 群では生殖器官アミノ酸プールのアミノ酸組成が変化している可能性があり、生殖器官発達に必要とされる摂取飼料中のアミノ酸バランスが異なると考えられる。それゆえ、連続暗黒飼育という生活リズム攪乱下にある場合における飼料中の最適なアミノ酸組成に関して検討する必要があると考え、各種アミノ酸に関する実験を実施した。これに関する考察は 3)飼料中各種アミノ酸量の影響の項に後述する。

一方、生殖器官の発達に主要な働きを示すテストステロンの血清レベルは、D 群のみ、飼料タンパク質量およびミネラル量の影響が示され、メチオニンの影響は示されなかった。これに関する考察は本項(4)に後述する。

(2) 飼料中ビタミン量について

飼料中ビタミン量は N 群の総飼料摂取量に影響を与え、低ビタミン飼料により飼料摂取量は増加したが、体重に対しては影響を与えなかっ

た。また、D 群においては総飼料摂取量、体重共にビタミンの影響は認められなかった。しかし、N 群、D 群共に飼料中ビタミンは生殖器官に影響を与え、その影響は明暗飼育条件の違いにより異なるという結果であった。すなわち、D 群では、多くの生殖器官(精巣、精巣上体および精嚢)にビタミンの影響が認められたが、N 群でビタミンの影響が認められたのは精巣上体のみであった。そして、これらの生殖器官に対するビタミンの影響は、標準ビタミン量飼料群は低ビタミン量飼料群よりその発達が抑制されるということであった。AIN-76 飼料組成のビタミン量は生殖器官発達のためには過剰であることを本実験結果は示しており、D 群ではその影響が強くなることが明らかとなった。これらの結果は連続暗黒飼育により摂取したビタミンの代謝、またはビタミンが関与する代謝機構が変化したことを示していると考えられる。どのような変化によって生殖器官発達に関与しているかは本実験からは不明であるが、血清テストステロン濃度量には影響を与える結果ではなかったため、テストスロン生合成とは関与しない機序で生殖器官発達を抑制していると考えられる。

また、本実験で用いた AIN-76 飼料組成のビタミンミックスには 12 種類のビタミンが含まれており、これらのすべてのビタミンが過剰となっているとは限らないと考えられる。それゆえ、これらの内どのビタミンが過剰となっているのか、あるいは、各種ビタミンの交互作用が働いているのか明らかにするため、各種ビタミンに関する実験を実施した。それに関する考察は 4)飼料中各種ビタミン量の影響の項に後述する。

(3) 飼料中ミネラル量について

飼料中ミネラル量は連続暗黒飼育ラットの体重に対しては影響を与え

なかったが、正常明暗飼育ラットに対しては影響を与え、標準量である時体重は高値を示した。総飼料摂取量に関しては、N 群のみにミネラルの影響が認められ、標準ミネラル量のとき飼料摂取量は増加し、体重増加に寄与したと考えられる。一方、生殖器官に対しては D 群、N 群共にミネラルの影響が認められた。しかし、その影響は明暗飼育条件の違いにより異なっていた。すなわち、D 群ではすべての生殖器官(精巣、精巣上体、精嚢および前立腺)と血清テストステロン濃度にミネラル量の影響が認められ、いずれも標準量である時に低値を示したが、N 群ではミネラルの影響は体重 100g あたりの精巣および精巣上体重量においてのみ認められ、ミネラル量が標準量であるとき低値を示した。ミネラルもビタミンと同様、AIN-76 飼料組成のミネラル含有量は体重増加のためには問題ないが、生殖器官発達のためには過剰であると考えられる。また、連続暗黒飼育により飼料中ミネラル量の影響が強く示されたことは、連続暗黒飼育によってミネラル代謝あるいはその生体利用性に変化が起こっていることを示していると考えらる。しかし、その変化の実態およびメカニズムに関して考察することは本実験からは困難である。

また、ミネラル混合に含まれるミネラルのうちどのミネラルが関与しているか明らかにするため、各種ミネラルに関しても検討した。これに関する考察は 3)飼料中各種ミネラル量の影響の項に後述する。

(4) 飼料中総脂質量について

飼料中の脂質量が少ない時、N 群では総飼料摂取量が増加したが、体重には影響を与えなかった。また、D 群では体重、総飼料摂取量に飼料中脂質量の影響は認められなかった。しかし、N 群、D 群共に生殖器官に対して脂質量の影響が認められたことより、この飼料中脂質量の影響

は、生殖器官固有のものであると考えられる。D 群では精巣および精巣上体、N 群では精巣において脂質量の影響が認められ、ビタミンやミネラルとは異なり脂質量が低量時においてこれらの発達が抑制された。脂質に関しては、AIN-76 組成に基づいた 5%添加量が有効であった。しかし、脂質に関しても D 群に多くの影響が認められたことから、連続暗黒飼育による脂質代謝の変化が起こっていると考えられる。

テストステロンはコレステロールの代謝産物であるため、飼料中脂質との関連が考えられる。しかし、本実験では飼料中脂質量は血清テストステロンに影響を与えていなかったので、テストステロンの代謝経路以外のところで影響を与えていると考えられる。

飼料中総脂質量に関しては AIN-76 組成標準量が最も有効であったため、個別脂質に関する検討を進めなかった。しかし、摂取脂肪酸の精巣発達に対する影響が報告され [38]、テストステロン生合成能に対する影響に関する報告もすでになされ [39]、リノール酸添加食はα-リノレン酸添加食よりラットの精巣発達を促すこと、イコサペンタエン酸の多い魚油はα-リノレン酸の多い亜麻仁油に比較してテストステロンの生合成能が高まると報告されている。それゆえ、飼料中脂肪酸組成についても今後、同一実験系を用いて検討する必要がある。

(5) 生殖器官重量と血清テストステロン濃度との関連について

血清テストステロン濃度に関与した栄養素は、D 群ではタンパク質とミネラルであり、タンパク質が標準量、ミネラルが低量の時、血清テストステロン濃度は最大となり、これは生殖器官重量に対する結果と一致していた。また、メチオニン、ビタミンおよび脂質は生殖器官重量に影響を与えたが、血清テストステロン濃度には影響を与えなかった。

雄性生殖器官の発達はアンドロジェンであるテストステロンに依存している。そして、テストステロンは標的細胞のアンドロジェン受容体と結合、または標的細胞で還元されデヒドロテストステロン(DHT)となりアンドロジェン受容体と結合することによりその機能を発現させる。さらに、その機能発現はアンドロジェン受容体の量および受容体との結合能、テストステロンおよびDHT-受容体複合体のDNAとの結合能、さらには遺伝子転写活性能の影響を受ける[40]。それゆえ、血清テストステロン濃度と生殖器官発達に対する影響が同一であることは、テストステロンの生殖器官標的細胞における機能発現が阻害されていないことを示していると考えられる。このことから、タンパク質とミネラルは、生殖器官におけるテストステロンの機能発現を阻害していないこと、テストステロン生合成を介して生殖器官発達に関与していると考えられる。そして、他の栄養素、すなわち、メチオニン、ビタミンおよび脂質はテストステロン濃度に影響を与えなかったことより、テストステロン生合成とは関与しない機序で生殖器官発達を促進または抑制していると推察される。

D群ではN群に比較し明らかに血清テストステロン濃度が低いこと、そして、N群では血清テストステロン濃度に栄養素の影響がみられなかったという事実は、連続暗黒飼育により、テストステロン生合成の変化とテストステロン生合成に関わる栄養素、あるいはその代謝などが変化したことを示している。

また、生殖器官のうち精巣と精巣上体では影響の認められた栄養素は同一であったが、精嚢や前立腺では異なったことから、各生殖器官の発達段階において必要とされる栄養素の種類とその量が異なることが推察される。また、精巣や精巣上体発達に影響を与えた栄養素の種類が精嚢

や前立腺より多いことから、精巣や精巣上体は飼料栄養素の影響を受けやすいことも推察される。

2）飼料中各種ミネラル量の影響

生殖器官発達に対する飼料中各種ミネラル量の影響に関する実験では、飼料中ミネラルのうち Ca、P、Mg、Na および Zn 量に関し検討した。実験 1 の結果よりミネラル含量が標準量の 1/3.5 という低量の時、標準量に比較し生殖器官の発達が優れていたため、どのミネラルが関与しているかを明らかにするために行ったものである。

Leathem はその総説 [35]のなかで、生殖器官に影響を与えるミネラルとして Ca、P、Zn、マンガン、モリブテンおよびヨウ素をあげている。本実験で検討した 5 種のミネラルの内、Ca、Mg および Na 量が生殖器官発達に影響を与え、P および Zn 量の影響は認められなかった。すなわち、P および Zn は飼料中の量が標準量であっても、標準量の 1/3.5 量であっても生殖器官の発達程度は変わらないということであった。

(1) 飼料中カルシウム量について

飼料中 Ca 量と生殖器官重量との関係は明暗飼育条件の違いにより異なっていた。N 群では Ca 量が低量であるとき、精巣、精巣上体重量が高値を示したが、D 群では Ca 量が標準量であるとき、精巣、精巣上体が高値を示したのである。この結果は体重に対する Ca の結果と同様であったことより、飼料中 Ca の生殖器官発達に対する影響は体重増加に付随するものであると考えられる。さらに体重に対する Ca の影響は、飼料摂取量にも同様に認められたことより、この体重増加は飼料摂取量の増加に伴うものであると考えられる。また、実験 1 では、D 群の飼料

中ミネラル量が低量であるとき、精巣、精巣上体重量が高値を示したが、本実験結果からCaは関与していないと考えられる。

小腸におけるCa吸収には日内リズムがあり、明暗条件や摂食時間に影響を受けていることが報告されている[41)42)]。また、我々はすでに、DとN群では、Ca吸収に対する他の摂取ミネラルの影響が異なること[43)44)]を発表しており、さらにD群のCa吸収量・保留量はN群より低値を示すという結果を得ている(未発表)。それゆえ、N群の精巣、精巣上体重量が飼料中Ca量が低量であるとき高値を示すのに対し、D群ではCa量が標準量であるとき高値を示すのは、D群でのCa吸収量が低下し、適正量が吸収された可能性が考えられる。一方、D群の低Ca食群の精巣および精巣上体重量が低値を示したのは、Ca吸収量の低下によりCa不足に陥ったためであると推察される。

血清テストステロン濃度に関しても精巣、精巣上体重量と同様の結果であり、これに関する考察は本項(4)に後述する。

(2) 飼料中マグネシウム量とナトリウム量について

明暗飼育条件の違いに関係なく、精巣、精巣上体重量はMgとNaが標準量であるとき高値を示し、Mgが標準量、Naが低量であるとき低値を示した。すなわち、生殖器官の発達に対する飼料中MgとNaの交互作用が認められたのである。体重にはMgとNaの交互作用が認められなかったことから、これは生殖器官発達に対する固有の結果であると考えられる。Mgは生体の様々な反応の補酵素として働いていることは周知である[45)]が、これまで生殖器官に対するMgとNaの影響に関する報告はなされていない。したがって、今後さらに検討していく必要がある。

また、血清テストステロン濃度におよぼす飼料中MgとNaの交互作

用の影響は精巣、精巣上体重量とは異なっていた。これに関する考察は本項の(4)で後述する。

(3) 飼料中亜鉛量について

生殖器官と Zn の関係についてはすでに多くの報告[46)47)]があり、Zn 欠乏により生殖器官重量の低下、精子形成の異常などが起こるとされている。しかし、本実験では精巣、精巣上体重量に飼料中 Zn 量の影響は認められなかった。本実験の飼料中 Zn 量は標準量(実測値;36 ～ 40ppm)と低量(標準量の 1/3.5 量、実測値;15 ～ 16ppm)であるが、これまでの報告[46)47)]は、飼料中 Zn の量を 0.7ppm[46)]や 1.2ppm[47)]としたときの結果である。それゆえ、本実験に比べ著しく Zn 量が少ないため、Zn 欠乏の影響がみられたのではないかと考えられる。

(4) 生殖器官重量と血清テストステロン濃度との関連について

実験 1 の結果では、D 群のみ、低ミネラル飼料の時血清テストステロン濃度が高値を示した。本実験において検討した 5 種のミネラルの内、血清テストステロン濃度に影響を与えたミネラルは Ca、Mg、Na であり、N 群では低 Ca・標準 Mg・低 Na 飼料の時、D 群では標準 Ca・標準 Mg・低 Na 飼料の時高値を示した。飼料中 P 量および Zn 量は関与していなかった。これらの結果より、飼料中 Na 量が、実験 1 で得られた低ミネラル飼料の時、血清テストステロン濃度が高値を示したという結果に関与していることが示唆される。

また、精巣、精巣上体重量に対する明暗飼育条件と Ca の交互作用の影響は、血清テストステロンに対しても同様に認められた。すなわち、N 群では低 Ca 食により血清テストステロン濃度および精巣、精巣上体重

量が増加し、D 群では標準 Ca 食により血清テストステロン濃度および精巣、精巣上体重量が増加したのである。血清テストステロン濃度と精巣、精巣上体重量に対する Ca の影響が一致しているということは、精巣、精巣上体におけるテストステロンの作用発現機構が阻害されていないことを示していると考えられる。すなわち、精巣や精巣上体におけるアンドロジェン受容体数や受容体との結合能、アンドロジェン－受容体複合体と DNA との結合能さらには遺伝子発現などを Ca が阻害していないことを示していると考えられる。また、D 群では、低 Ca 食によりテストステロンの生合成が抑制されたことも生殖器官発達の阻害の原因の一つであると考えられが、そのメカニズムに関し推察することは困難である。

飼料 Mg と Na の交互作用の影響は、精巣、精巣上体重量と血清テストステロン濃度では異なっていた。特に顕著であった違いは標準 Mg 飼料の時の飼料中 Na の影響であり、精巣、精巣上体重量は、標準 Mg 飼料時に Na 量が低量から標準量になると増加したのに対し、血清テストステロン濃度は反対に低下したことである。このことより、飼料中の Mg と Na が精巣、精巣上体の発達に関与する機序とテストステロン生合成に関与する機序が異なるという可能性、および飼料中 Mg と Na の比率がテストステロンの精巣、精巣上体における機能発現に何らかの影響を与えている可能性も示唆される。

3）飼料中各種アミノ酸量の影響

実験 1 において、D 群の生殖器官は飼料中のタンパク質量の影響を最も強く受け、20%カゼイン食は 9%カゼイン食に比較して精巣、精巣上体重量は明らかに高値を示した。また、Met の添加効果もタンパク質量

により異なると同時に、明暗飼育条件によっても異なることが明らかとなった。それゆえ、D 群と N 群では、生殖器官発達に必要とされる飼料中のアミノ酸バランスが異なることが推察された。そこで、低タンパク質食に 11 種類の必須アミノ酸を添加し、各種アミノ酸の添加効果を検討したのである。飼料組成の項に記したように、アミノ酸の添加量は良質タンパク質である全卵のアミノ酸組成を用い、ラットの成長に対し必要充分量である 10%全卵タンパク質飼料のアミノ酸量と同様となるよう設定した。

Leathem はその総説[35]のなかで、精巣の発達は飼料タンパク質の量だけでなくタンパク質の質も重要であると述べている。そして、20%カゼイン食に比較し、20%の小麦グルテン食、20%のピーナツ粉食は精巣の発達を阻害すること[48]、Arg、Lys および Trp 欠乏食は精子形成に影響を与えるが、Leu、Met および Val は影響を与えないとの報告[49]、一方では、Mey 欠乏食[50]、Val 欠乏食[51]は精子形成に悪影響を与えるとの報告もあるとされ、一貫した結果とはなっていない。しかし、これらの研究は 40 年近く前になされたものである。近年、個々のアミノ酸代謝に関する研究は大いに進んでおり、小腸刷子縁膜や側底膜における輸送システムなど、細胞レベルでの詳細なメカニズムが明らかとなっている[52)53)]。その一方で、個体レベルでの飼料中アミノ酸に関する系統的な栄養学実験はなされていない。したがって、本実験では現代の栄養学実験のレベルにおいて、生殖器官発達に対する各種必須アミノ酸の影響に関し検討を進めた。また、米国栄養学会でだされている飼料組成が AIN-76 組成から AIN-93G 組成に変更されたため、AIN 飼料組成の違いによる影響に関しても検討した。

本実験で検討したアミノ酸はすべて L 型アミノ酸であるが、D 型アミ

ノ酸に関する研究も急速に進んでおり、哺乳動物の組織においてアスパラギン酸・セリン・アラニン・プロリンの D 型異性体が検出されている[54]。D-セリンは大脳や視床下部に多く存在すること、ラットに L-セリンを腹腔内投与すると脳内 D-セリン濃度が高まることから、D-セリンは哺乳類組織中で生合成されることが明らかにされている[55]。また、D-アスパラギン酸は松果体のメラトニン生合成を阻害するという報告もなされており、生体リズムとの関与が考えられている[56]。メラトニンは生殖器官発達を抑制することも報告もされている[57]ことから、D-アスパラギン酸と生殖器官との関わりも考えられるが、それに対する実証はいまだなされていない。本実験で用いた L 型アミノ酸が生体内でどれだけ D 型に変換されるかは全く明らかでないため、D 型を介しての影響をこの論文で論ずることはできない。また、L 型と D 型アミノ酸の働きも同一であるとは考えられないため、D 型アミノ酸に関する研究は全く別途に行う必要がある。

本実験において、精巣および精巣上体重量に影響の認められたアミノ酸は Met、Cys、Trp、Thr、Ile および Val の 6 種であり、これらのうち発達を促進したアミノ酸は Met、Cys、Thr、Ile および Val、発達を抑制したアミノ酸は Trp のみであった。また、影響の認められなかったアミノ酸は Arg、Phe、Leu、His および Lys の 5 種であった。一方、体重に影響の認められたアミノ酸は Met、Cys、Trp、Thr および Leu の 5 種であり、これらのうち体重増加を促進したアミノ酸は Met、Cys および Thr、抑制したアミノ酸は Trp および Leu であった。総飼料摂取量に影響を与えたアミノ酸は Met、Cys、Trp および Leu であった。また、血清テストステロン濃度に影響の認められたアミノ酸は Met、Cys、Trp、Ile、Arg および Lys の 6 種、影響の認められなかったアミノ酸は Thr、Phe、Val、Leu

およびHisの5種であった。

また、AIN-飼料組成の影響は体重、精巣重量および血清テストステロン濃度に対して認められた。

(1) 精巣、精巣上体の発達にプラスの添加効果が認められたアミノ酸について

① メチオニンとシステインについて

D群、N群共に、含硫アミノ酸であるMetとCysを標準量添加することにより、精巣、精巣上体重量は増加した。また、D群では、その添加量を標準量の倍量、すなわち20%全卵タンパク質食レベルに増加させても精巣重量を増加させた(実験 3-4)。一方、体重に対するMetとCysの添加効果は精巣とは異なり、両飼育群共に標準量を添加した時最も体重増加量が大きく、標準量の倍量添加すると体重増加量は低下した。また、N群では体重増加に対するMetとCysの影響は総飼料摂取量と同様であったことから、この体重増加は飼料摂取に付随したものであると考えられる。しかし、D群では飼料摂取にMetとCysの影響が認められなかったことより(実験 3-4)、Metと Cysの体重増加に対する効果は飼料摂取とは関与していないと考えられる。これらのことは、連続暗黒飼育によって含硫アミノ酸の代謝が変化し、体重増加に対する含硫アミノ酸の効果が異なったこと、そして、精巣発達に必要とされる含硫アミノ酸の量がN群より増加したことを示していると考えられる。また、精巣に対するMetとCysの個別の添加効果はMetの方がCysより高いことが実験結果(実験 3-1、3-2、3-3)より推察できる。Metを必要量摂取している場合、Cysをさらに摂取することは精巣発達の面においては好ましくないと考えられる。この結果は実験3-4で得られたMetとCysの添加量が20%

全卵タンパク質食レベルの時、10%全卵タンパク質食レベルより精巣重量が増加したという結果と矛盾しているともみられる。しかし、これは実験 3-4 では Met と Cys の量的比率を検討していないためであり、Met の添加量を 20%全卵タンパク質食レベル、Cys の添加量をそれより少なくした場合、Met と Cys の添加量が共に 20%全卵タンパク質食レベルの時より精巣重量がさらに増加する可能性も考えられる。

一方、精巣上体に対しては、Met と Cys の個別の添加効果は明暗飼育条件の違いにより異なり、N 群では Met の効果の方が高かったが、D 群では Met と Cys の効果に大きな違いはみられなかった。精巣と精巣上体において、含硫アミノ酸である Met と Cys の個別の添加効果が異なり、さらに、明暗飼育条件の違いの影響も受けるという結果は、精巣と精巣上体発達に必要とされる Met と Cys の量および比率が異なること、および連続暗黒飼育により Met 代謝および Cys 代謝が変化したことを示していると考えられる。

② スレオニンとイソロイシンについて

Thr および Ile に関しても標準量添加により D 群、N 群共に精巣重量は増加し、精巣発達に対するこれらのアミノ酸の必要性が認められた。Thr の体重に対する影響は精巣重量と同様であったため、精巣発達に対する Thr の効果は体重増加に付随していると考えられる。しかし、飼料摂取量に Thr の影響は認められなかったことより、体重増加や精巣発達に認められた Thr の効果は飼料摂取とは関与していないと考えられる。一方、Ile の影響は体重や飼料摂取量に対しては認められなかったため、精巣発達に対する Ile の効果は、精巣固有のものであると考えられる。

③ バリンについて

Val に関しては、D 群は標準量添加により精巣重量は増加したが、N 群では反対に無添加時に増加し、明暗飼育条件の違いによる影響が認められた。このことから Val 代謝は連続暗黒飼育により変化することが明らかとなった。さらに、Val 添加量を標準量の２倍量、すなわち 20%全卵タンパク質食レベルにした時は、D 群では無添加時より精巣重量は低下し、過剰の悪影響が認められた。D 群では Val の精巣発達のための適当量は標準量であること、少なくても多くても好ましくないことが示された。また、体重や飼料摂取量に Val の影響は認められなかったことから、精巣発達に対する Val の影響は精巣固有のものであると考えられる。

これらのアミノ酸と血清テストステロンに関する考察は本項(4)に後述する。

(2) 精巣、精巣上体の発達にマイナスの添加効果が認められたアミノ酸、トリプトファンについて

D 群、N 群共に、Trp の標準量添加により精巣および精巣上体重量は低下した。また、D 群では Trp の添加量を標準量の倍量にした時も精巣重量は標準量時とほとんど変わらなかった(実験 3-4)。すなわち、D 群の精巣は Trp が無添加の時、最も発達抑制が軽減された。体重に対する Trp の影響も両飼育群共に標準量添加により低値を示し、精巣、精巣上体と同様の結果であった。しかし、Trp を標準量の倍量添加した時には、両飼育群共に体重への影響は認められなかった。さらに飼料摂取量に対する Trp の影響は N 群では標準量添加により低下し、体重と同様の結果であったが、D 群では標準量添加により飼料摂取量は増加し、体重とは異なる結果であった(実験 3-2)。それゆえ、D 群の体重増加に対する Trp

の影響は飼料摂取量とは関与していないことが考えられる。以上のことより生殖器官発達に対する Trp の影響は、N 群では体重増加、飼料摂取量に付随したものであるが、D 群では生殖器官固有のものであると考えられる。Trp は神経伝達物質であるセロトニンの原料であり、セロトニンは松果体メラトニンの前駆体である。メラトニンは光に対する感受性が高く、生体リズムと密接な関係があることはすでに明らかとなっている[16)17)58)]。また、メラトニン投与により生殖器官の発達障害、機能障害が起こることも報告されている[57)]。ラットにおける *in vivo.*[59)]、 *in vitro.*[60)] の研究においてもメラトニンがテストステロン分泌を抑制することが明らかとなっている。本実験において、摂取した Trp がセロトニンからメラトニンにどの程度代謝されたかは明らかではない。しかし、Trp 添加により精巣および精巣上体重量が低下したという結果は、Trp のメラトニンへの代謝と関与しているのではないかと考えられる。

血清テストステロン濃度に対する Trp の影響に関する考察は本項(4)に後述する。

(3) 生殖器官発達に及ぼす AIN 飼料組成の影響について

1993 年に米国栄養学会より研究用齧歯類の実験飼料 AIN-93G(成長、妊娠、泌乳期用)組成が発表され、これまで使用してきた AIN-76 組成から AIN-93G 組成への移行が推奨された。AIN-76 組成は腎臓の石灰化を引き起こすなど、いくつかの問題点があった。そこで AIN-76 組成を見直し、AIN-93G 組成では糖質源のシュクロースからスターチへの変更、リン含有量の減少、脂質量の増加、含硫アミノ酸のメチオニンからシスチンへの変更、ビタミンミックスの組成変更、ミネラルミックスへの超微量ミネラルの添加などがなされた[28)]。AIN-93G 組成は、ラットおよび

マウスの成長、腎臓の石灰化および骨形成の面においては問題ないと評価されている[61]が、生殖器官への影響に関する評価はなされていない。本実験において AIN-76 組成と AIN-93G 組成の生殖器官発達に対する影響に関して検討した結果、N 群では AIN-76 組成、D 群では AIN-93G 組成の時、精巣および精巣上体重量が高値を示し、明暗飼育条件の違いにより影響が異なるという結果を得た。体重や総飼料摂取量に AIN 飼料組成の影響が認められないことより、これらの結果は生殖器官固有のものであると考えられる。生殖器官に対する AIN 飼料組成の影響が AIN-76 組成と AIN-93G 組成の違いのうち、どれに関与しているかは明らかではない。糖質源の違い、脂質量の違い、含硫アミノ酸の種類の違い、または P 量の違いであるのか、ミネラルミックスに含まれる超微量元素に関与しているのかなど考えられ得る因子が多いため、結論を出すことは本実験からは不可能である。ただし、実験 2 の結果より、飼料中 P 量は関与していない可能性が考えられる。また、N 群においては Cys より Met の方が生殖器官発達に効果があったこと、そして AIN-76 で用いられている含硫アミノ酸も Met であることより、含硫アミノ酸の種類が関与している可能性が推察できる。しかし、D 群においては Met と Cys の生殖器官発達に対する効果は Met の方が高い、あるいは同様であったため、この推察は成り立たない。

一方、血清テストステロン濃度の面からみると、N 群、D 群共に AIN-93G 組成の方が高値を示した。これに関する考察は本項(5)に後述する。

(4) 生殖器官重量と血清テストステロン濃度の関連について

標準量添加することにより血清テストステロン濃度を高めたアミノ酸

は、D 群では Met、Cys、Ile、Lys、N 群では Trp、Ile、Lys であった。一方、標準量添加により血清テストステロン濃度を低めたアミノ酸は、D 群では Trp、Arg であったが、N 群ではそのようなアミノ酸はみられなかった。実験により結果が一致しなかったアミノ酸は N 群においてみられ、Met、Cys、Arg であった。この Met、Cys は、実験 3-1 では標準量添加により血清テストステロン濃度は増加したが、実験 3-3 では標準量添加により減少した。一方、Arg は、実験 3-1 では標準量添加により血清テストステロン濃度は増加したが、実験 3-3 では標準量添加により減少した。この原因は不明である。実験飼料の材料でロットの違いや保存状態の影響を最も受けやすいのは、ビタミンミックスや大豆油であると考えられるが、現時点で明らかにすることは困難である。

D 群において、精巣重量と血清テストステロン濃度に及ぼす影響が同様であったアミノ酸は Met、Ile、Trp であった。それゆえ、D 群では、これら 3 種のアミノ酸は精巣におけるテストステロンの機能発現を阻害していないこと、そして、テストステロンの生合成を介して精巣の発達に関与していることが推察された。

また、D 群において、精巣重量と血清テストステロン濃度に及ぼす影響が異なっていたアミノ酸は Cys であった。実験 3-3 では、Cys を標準量添加すると血清テストステロン濃度は増加したが、精巣重量の抑制は軽減しなかった。それゆえ、Cys は精巣におけるテストステロンの機能発現を抑制している可能性が推察される。

D 群において、血清テストステロン濃度には影響を与えず、精巣重量にのみ影響を与えたアミノ酸は Val、Thr であったことから、これら 2 種のアミノ酸はテストステロン生合成とは関与しない機序で精巣発達を促進、または抑制していることが推察される。

明暗飼育条件により血清テストステロン濃度に及ぼす影響が異なるアミノ酸(Met、Cys、Ile、Arg)があったこと、さらに、精巣重量と血清テストステロン濃度に及ぼす影響が同様であるアミノ酸、同様でないアミノ酸の種類も明暗飼育条件により異なっていた。これらの結果は、連続暗黒飼育ではテストステロン生合成を正常に維持するために必要なアミノ酸バランスがN群とは異なること、また、精巣におけるテストステロンの機能発現に関与するアミノ酸を変化させることを示していると考えられる。

(5)血清テストステロン濃度に及ぼすAIN飼料組成の影響について

D群、N群共に、血清テストステロン濃度はAIN-93G組成であるとき最大値を示した。D群の精巣重量もAIN-93G組成で最大値となったことより、AIN-93G組成の場合には、D群の精巣発達にテストステロンが効果的に働いていることが考えられる。すなわち、AIN-93G組成は精巣におけるテストステロンの機能発現を妨げないということが示唆される。一方、N群では、精巣重量はAIN-93G組成では最大値を示さないことから、正常明暗飼育の場合、精巣におけるテストステロンの機能発現をAIN-93G組成が妨げている可能性が示唆される。精巣におけるテストステロンの機能発現にも明暗飼育条件の影響とAIN飼料組成の影響が交互作用をもって関与していることが考えられる。AIN-76組成とAIN-93G組成の違いのうち、どの栄養素がこれらの結果に関与しているかは明らかでないが、実験1において飼料中の総脂質量は血清テストステロン濃度に影響を与えていなかったこと、実験2において飼料中P量は精巣重量や血清テストステロン濃度に影響を与えていなかったことから、これらの結果に総脂質とPは関与していないことが推察できる。

4）飼料中各種ビタミン量の影響

実験 1 において飼料中ビタミン混合量が低量の時、生殖器官重量は高値を示し、その影響は D 群で顕著であった。それゆえ、どのビタミンが連続暗黒飼育ラットの生殖器官発達に関与しているかを明らかにするため各種ビタミンに関して検討した。

Leathem はその総説 [35]の中で、生殖器官に影響を与えるビタミンとして、V.A、V.E、$V.B_1$、$V.B_2$、$V.B_6$、PaA および Bio.をあげ、これらの欠乏により、精子形成の異常、生殖器官の萎縮が起こると述べている。また、V.D 欠乏における精巣機能の低下に関する報告もすでになされている[62)63)]。

飼料中タンパク質量とビタミン混合の添加量の相互関係に関して検討した結果、D 群ではビタミン混合の添加量の影響は飼料中のタンパク質量に大きく依存し、低タンパク質食にビタミン混合を標準量の 3 倍量添加すると生殖器官重量の低下が起こり、ビタミンの過剰障害が認められた。しかし、体重にはビタミンの影響が認められなかったことより、これは生殖器官固有の影響であると考えられる。また、N 群の生殖器官に対してはビタミンの過剰障害がみられなかったことから、連続暗黒飼育という飼育条件がタンパク質代謝、ビタミン代謝に変化を及ぼしている可能性が本実験でも示唆された。そこで、9%カゼイン食である低タンパク質食の時にビタミン添加量の影響が顕著であったことより、9%カゼイン食に水溶性ビタミンと脂溶性ビタミンを添加する実験を行い、生殖器官に対する影響を検討したのである。

水溶性ビタミンと脂溶性ビタミンの生殖器官に対する影響は明暗飼育条件の違いにより異なったが、本実験においても体重に対する影響が認められなかったことより、水溶性ビタミンと脂溶性ビタミンの影響も生

殖器官固有のものであることが示された。D 群では水溶性ビタミンの添加量が標準の 3 倍量、脂溶性ビタミンの添加量が標準量の 1/3.3 量の時、精巣発達が促進された。N 群では水溶性ビタミン、脂溶性ビタミン共に標準量の時、精巣発達が促進されたことより、水溶性ビタミンと脂溶性ビタミン共に連続暗黒飼育により代謝が変化すると考えられた。それゆえ、水溶性ビタミンおよび脂溶性ビタミン、それぞれ個々のビタミンの影響に関し、さらに検討を進めた。個々のビタミン添加量は標準量と標準量の 3 倍量(各種脂溶性ビタミンの場合)、または標準量の 6 倍量(各種水溶性ビタミンの場合)とし、各種ビタミンの影響を検討した。

その結果、精巣、精巣上体重量に影響を与えたビタミンは V.A、V.D、V.E、$V.B_1$、$V.B_6$ および PaA の 6 種であり、影響の認められなかったビタミンは V.K、$V.B_2$、$V.B_{12}$、Cho.、NA、FA および Bio.であった。一方、血清テストステロンに影響を与えたビタミンは $V.B_{12}$ と Bio の 2 種であり、精巣、精巣上体に影響を与えたビタミンとは一致しなかった。また、体重に対しても個々のビタミンの影響が多く認められ、V.E、$V.B_1$、$V.B_2$、$V.B_6$、Cho.、FA、NA および PaA がラットの体重増加に関与していた。これらのビタミンのうち精巣重量にも関与していたビタミンは、V.E、$V.B_1$、$V.B_6$ および PaA であり、体重増加にのみ関与していたビタミンは、$V.B_2$、Cho.、NA および FA であった。また、総飼料摂取量に影響の認められたビタミンは、Cho.と Bio.であった。

(1) 標準量より多く添加した時、精巣、精巣上体の発達にプラスの効果が認められたビタミンについて

① ビタミン E について

D 群において V.E を標準量の 3 倍量添加することにより精巣、精巣上

体重量は高値を示し、その効果はN群よりも大きかった。V.Eの効果は飼料摂取量には認められなかったが、体重に対しては認められ、V.Eが高量であるとき体重も高値も示した。しかし、体重に対する効果に明暗飼育条件の影響は認められなかった。それゆえ、連続暗黒飼育することにより生殖器官発達に対するV.Eの必要量が高まる可能性が考えられる。

本実験飼料は飼料中タンパク質レベルが9%カゼインという低タンパク質食である。低タンパク質食は精巣のV.E含量を低下させるとの報告がある[64]。それゆえ、標準量のV.E添加では、精巣発達のためのV.E必要量を満たさなかった可能性も考えられる。

また、V.Eの添加効果が連続暗黒飼育群で大きかったという結果をV.Eの生理作用である抗酸化機能の面から推察すると以下の様になる。連続暗黒飼育という飼育条件、すなわち生体にとっては一種のストレスであるが、これが生体における過酸化反応を促進する。そして、精巣においても精巣組織の生体膜脂質の過酸化が起こりやすくなり、生体膜の安定性を維持するための抗酸化物質として、V.Eの必要量が高まるのかもしれない。しかし、これはあくまでも推測の域をでないため、今後の研究を進める上での着眼点としたい。

② パントテン酸について

D群においてPaA含量が標準量の6倍量である時、精巣、精巣上体重量は高値を示した。一方、N群では、PaAの添加量が標準量である時、精巣、精巣上体重量は高値を示し、6倍量添加の時は反対に低値を示すという結果を得た。PaAの影響は飼料摂取量には認められなかったが、体重に対しては認められ、体重増加に対するその影響はD群、N群共

に、PaA の添加量が 6 倍量であるとき高値を示した。しかし、その体重増加の程度は D 群の方が、N 群より強く認められた。それゆえ、D 群の生殖器官発達に対する PaA の効果は、ラットの体重増加に付随しているとも考えられる。しかし、PaA の影響が明暗飼育条件により異なったという事実は、連続暗黒飼育により PaA の代謝が変化し、体重増加および生殖器官発達のための必要量が増加したことを示していると推察される。

PaA はアセチル化する酵素の補酵素(CoA)の構成成分として代謝の重要な位置を占めている[65]。PaA の生理作用はほとんど CoA の作用と考えられ、脂質代謝、糖代謝、アミノ酸代謝に関与している。これまでの実験(実験 1 および実験 3)結果より、D 群ではアミノ酸代謝が変化していることが推察されたことから、それに伴い PaA の代謝も変化した可能性もある。

(2)標準量より多く添加した時、 精巣、精巣上体の発達にマイナスの効果が認められたビタミンについて

① ビタミン A とビタミン D について

D 群では、V.A と V.D が標準量の 3 倍量でなく、標準量添加された時、精巣重量は高値を示した。さらに V.A と V.D の交互作用も認められ、V.A が標準量である時、V.D を標準量の 3 倍量添加すると、精巣重量が低下したことから、この 2 つの脂溶性ビタミンの飼料中の量的比率が精巣発達に関わっていることが明らかとなった。体重や飼料摂取量に対しては V.A と V.D の影響は認められなかったことから、この影響は生殖器官固有のものであると考えられる。V.A 欠乏食[66]、または V.D 欠乏食[62)63)]がラットの生殖機能障害を起こすことが明らかとなっているが、この 2 つ

のビタミンの交互作用に関する報告はなされていない。それゆえ、今後検討していく必要があると考えられる。

② ビタミン B_6 とビタミン B_1 について

D 群では、$V.B_6$ と $V.B_1$ が標準の 6 倍量でなく、標準量添加された時、精巣重量は高値を示した。すなわち、飼料中への 6 倍量添加は精巣発達に対して過剰であった。しかし、N 群では両ビタミンとも 6 倍量添加時の方が、標準量添加時より精巣重量は高値を示し、D 群の結果とは逆の結果であった。また、飼料摂取量に $V.B_6$ と $V.B_1$ の影響は認められなかったが、体重に対しては影響が認められた。すなわち、体重に対する $V.B_6$ と $V.B_1$ の効果は $V.B_6$ に関しては精巣と同様の効果であったが、$V.B_1$ に関しては異なり、両飼育群とも 6 倍量添加により体重は低値を示した。それゆえ、$V.B_6$ の精巣に対する効果は体重増加に付随している可能性、そして $V.B_1$ の精巣に対する効果は、N 群では生殖器官固有のもの、D 群では体重増加に付随している可能性が考えられる。しかし、明暗飼育条件により $V.B_6$ や $V.B_1$ の精巣に対する効果が異なったという事実は、連続暗黒飼育により $V.B_6$、$V.B_1$ の代謝が変化し、ラットの生殖器官発達に対する必要量が変化したことを示していると考えられる。

$V.B_6$ の生理作用はアミノ基転移酵素や、各種脱炭酸酵素の補酵素としての働きであり、アミノ酸代謝、糖代謝と深く関与している[67]。そして、その必要量は摂取タンパク質量に依存するといわれている[68)69)]。D 群と N 群で、$V.B_6$ の影響が異なったということは、連続暗黒飼育によるアミノ酸代謝の変化と関与していることが考えられるが、本実験より詳細を明らかにすることは不可能である。

$V.B_6$ のもう一つの生理作用として、ホルモン作用の制御があり、ステ

ロイドホルモンで誘導される遺伝子発現を抑制するとされている[67]。ラットに $V.B_6$ を過剰投与すると、精巣の病理組織学的異常が引き起こされるとの報告がなされている[70]。後者では、この異常が $V.B_6$ のステロイドホルモン作用の抑制作用により発現したかどうかに関しては明らかにされていない。本実験において、D 群のみ $V.B_6$ の 6 倍量添加により精巣重量が低下したという事実は、$V.B_6$ のステロイドホルモンで誘導される遺伝子発現を抑制する作用が、連続暗黒飼育という飼育条件により高まった可能性も考えられる。しかし、これに関しても、本実験から明らかにすることは不可能である。

$V.B_1$ の生理作用として数種類の糖代謝酵素の補酵素としての働きや、分枝鎖アミノ酸代謝酵素の補酵素としての働きがあげられる[71]。実験 3 で得られた各種アミノ酸に関する実験結果では、分枝鎖アミノ酸である Val の精巣発達のために必要とされる量は明暗飼育条件により異なり、D 群は N 群より必要量が多かった。一方、本実験では、D 群の精巣発達に必要な $V.B_1$ の量は N 群より少なかった。連続暗黒飼育により分枝鎖アミノ酸の代謝と $V.B_1$ の生理作用が変化した可能性があるが、実験 3 と実験 4 は異なる実験における結果であるため、代謝の面から両者を結びつけて考えることには無理があるかもしれない。しかし、一つの問題提議として Val と $V.B_1$ 代謝の変化に関する研究を行う必要性があると考えられる。

(3) 生殖器官重量と血清テストステロン濃度の関連について

血清テストステロン濃度に影響を与えたビタミンは Bio.と $V.B_{12}$ であり、精巣重量に影響を与えたビタミン(V.A、V.D、V.E、PaA、$V.B_6$、$V.B_1$)とは一致しなかった。

D 群では飼料中 Bio.と $V.B_{12}$ の添加量が標準量の時、標準量の 6 倍量添加の時より血清テストステロン濃度は高値を示した。一方、N 育群では飼料中 Bio.が標準量、$V.B_{12}$ が標準の 6 倍量の時高値を示し、Bio.と $V.B_{12}$ の血清テストステロン濃度に対する影響は明暗飼育条件により異なっていた。$V.B_{12}$ は生殖機能の維持にとって不可欠であるとされており、ホルモンを介する影響より精子形成に関与するセルトリ細胞に直接働いているとされているが、詳細は明らかとなっていない[72]。本実験では、$V.B_{12}$ は血清テストステロン濃度に影響を与え、さらに、明暗飼育条件によりその影響が変化したことから、$V.B_{12}$ の代謝に関しても今後さらに研究をする必要があると考えられる。

また、血清テストステロン濃度に影響を与えず精巣、精巣上体の発達に影響を与えたビタミン、すなわち V.A、V.D、V.E、PaA、$V.B_6$、$V.B_1$ は、テストステロンの生合成とは関与しない機序で精巣、精巣上体の発達を促進または抑制していることが推察される。

5）まとめ

本研究では、飼料中タンパク質、ミネラル、ビタミンおよび総脂質量の影響に関する実験をはじめとし、最終的に 11 種のアミノ酸、5 種のミネラル、13 種のビタミンについて飼料中への添加量を変化させ、連続暗黒飼育ラットの生殖器官発達に及ぼす影響を検討した。その結果、ラットを連続暗黒飼育し生活リズムを攪乱させることにより、摂取したアミノ酸、ミネラルおよびビタミンの代謝が変化し、それに伴い生殖器官発達のために必要とされる量が変化することが明らかとなった。

D 群において生殖器官の発達に関与した栄養素は、アミノ酸では Met、Cys、Trp、Thr、Ile および Val の 6 種、ミネラルでは Ca、Mg および Na

の3種、ビタミンではV.A、V.D、ビタミンE、$V.B_1$、$V.B_6$およびPaAの6種であった。これらのうち、低量でなく標準量摂取すべきであったものはVal、Thr、Ile、Ca、MgおよびNaであり、標準量よりさらに多く摂取すべきであったものはMetとCys、V.EおよびPaAであった。反対に、標準量より低量の方が好ましかったもの、または、標準量より多く添加することにより精巣発達にとって過剰の影響がみられた栄養素はVal、Trp、V.A、V.D、$V.B_1$および$V.B_6$であった。

生殖器官発達に対し、連続暗黒飼育することにより正常明暗飼育とは異なる効果を示した栄養素はMet、Cys、Val、Ca、V.E、PaA、$V.B_1$および$V.B_6$であった。それゆえ、これらの栄養素の代謝や生体利用性が連続暗黒飼育により変化し、生殖器官発達のための必要量が変化したことが示唆される。

また、D群において精巣の発達とテストステロン濃度が一致していなかった栄養素はCys、MgおよびNaであったことより、これらの栄養素は精巣におけるテストステロンの機能発現を抑制している可能性が考えられる。一方、D群において精巣の発達とテストステロン濃度が一致していた栄養素はMet、Ile、TrpおよびCaであったことより、これらの栄養素の精巣発達に対する影響はテストステロン生合成の機序に関与していること、また、これらの栄養素は精巣におけるテストステロンの機能発現を抑制していないことが考えられる。

本研究より、生活リズム攪乱モデル実験系としてラットを連続暗黒飼育することにより、摂取した各種栄養素の代謝が変化し、その結果として生殖器官に様々な影響を及ぼした。各種栄養素の影響は上述した通りであり、生活リズムが乱れているような特殊環境にある場合、生殖器官発達のために標準量より多く摂取すべきであった栄養素はMet+Cys、V.E

および PaA であることが明らかとなった。一方で、標準量より少なく摂取すべき、または標準量以上摂取すべきでなかった栄養素は Val、Trp、V.A、V.D、$V.B_1$ および $V.B_6$ であった。それゆえ、生活リズムが乱れているような特殊環境にある場合、生体が要求する栄養素の量およびそれらの比率が変化することが明らかとなった。

Table 1 $L_8(2^7)$ Type Orthogonal Array (**Ex.1**)

Row No.	1	2	3	4	5	6	7
1	1	1	1	1	1	1	1
2	1	1	1	2	2	2	2
3	1	2	2	1	1	2	2
4	1	2	2	2	2	1	1
5	2	1	2	1	2	1	2
6	2	1	2	2	1	2	1
7	2	2	1	1	2	2	1
8	2	2	1	2	1	1	2

Table 2
Estimated Factors and It's level on $L_8(2^7)$ Type Orthogonal array (**Ex.1**)

Factor	Row	Level 1 *	Level 2**
A: Protein (Casein)	1	9	20 (%)
B: L-Methionine	2	0	0.3
C: Vitamin Mixture	4	0.3	1
D: Mineral Mixture	5	1	3.5
E: Soybean Oil	6	1.5	5

*; 1: Low level (1/3-1/2 level of AIN-76)
**; 2: Normal level (AIN-76)

Table 3 Composition of the Diets (**Ex.1**)
g/100gDiet

Ingredient \ Diet No.	1	2	3	4	5	6	7	8
Milk Casein	9	9	9	9	20	20	20	20
L-Methionine	0	0	0.3	0.3	0	0	0.3	0.3
Soy Bean Oil	1.5	5	5	1.5	1.5	5	5	1.5
Vitamin Mixture 1)	0.3	1	0.3	1	0.3	1	0.3	1
Mineral Mixture 1)	1	3.5	1	3.5	3.5	1	3.5	1
α-Corn Starch	15	15	15	15	15	15	15	15
Fiber	5	5	5	5	5	5	5	5
Choline bitartrate	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
Sucrose	68.0	61.3	64.2	64.5	54.5	52.8	50.7	56.0

1) :AIN-76™

Table 4 $L_{16}(2^{15})$ Type Orthogonal Array **(Ex.2)**

Row / No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
2	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2
3	1	1	1	2	2	2	2	1	1	1	1	2	2	2	2
4	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	1	1	1	1
5	1	2	2	1	1	2	2	1	1	2	2	1	1	2	2
6	1	2	2	1	1	2	2	2	2	1	1	2	2	1	1
7	1	2	2	2	2	1	1	1	1	2	2	2	2	1	1
8	1	2	2	2	2	1	1	2	2	1	1	1	1	2	2
9	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
10	2	1	2	1	2	1	2	2	1	2	1	2	1	2	1
11	2	1	2	2	1	2	1	1	2	1	2	2	1	2	1
12	2	1	2	2	1	2	1	2	1	2	1	1	2	1	2
13	2	2	1	1	2	2	1	1	2	2	1	1	2	2	1
14	2	2	1	1	2	2	1	2	1	1	2	2	1	1	2
15	2	2	1	2	1	1	2	1	2	2	1	2	1	1	2
16	2	2	1	2	1	1	2	2	1	1	2	1	2	2	1

Table 5 **(Ex.2)**
Estimated Factors and It's level on $L_{16}(2^{15})$ Type Orthogonal array

Factor	Row	Level 1	Level 2
A: Lighting condition	9	Normal lighting	Constant darkness
B: Calcium	2	Low (1/3.5)	Normal
C: Posphorus	4	Low (1/3.5)	Normal
D: Magnesium	10	Low (1/3.5)	Normal
E: Sodium	12	Low (1/3.5)	Normal
F: Zinc	8	Low (1/3.5)	Normal

Table6 Composition of the Diets **(Ex.2)**

g/100gDiet

Ingredients		Diet No. 1	2	3	4	5	6	7	8
Milk Casein		20	20	20	20	20	20	20	20
L-Methionine		0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
Soy Bean Oil		5	5	5	5	5	5	5	5
Vitamin Mixture 1)		1	1	1	1	1	1	1	1
Mineral Mixture 2)		3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5
Cellose Fiber		5	5	5	5	5	5	5	5
Choline Bitartrate		0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
Sucrose		62.9	63.1	64.1	64.4	63.4	63.3	63.7	63.5
$CaHPO_4$		1.25	1.25	0	0	0	0	0	0
NaCl		0.19	0	0.19	0	0	0.19	0	0.19
$K_3C_6H_5O_7 \cdot H_2O$		0.55	0.55	0.55	0.55	0.55	0.55	0	0
K_2SO_4		0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0	0
MgO		0.06	0	0.06	0	0.06	0	0.06	0
$CaCO_3$		0	0	0	0	0.93	0.93	0	0
KH_2PO_4		0	0	0	0	0	0	1.26	1.26
ZnO		0.004	0	0	0.004	0.004	0	0	0.004
Analayzed	Ca	492.6	501.6	142.4	144.0	512.2	495.6	144.6	145.6
(mg/ 100gDiet)	P	484.9	497.8	237.5	239.7	233.9	227.9	484.1	493.6
	Mg	46.0	13.8	46.5	13.7	43.2	12.6	44.9	14.1
	Na 3)	102.0	29.1	102.0	29.1	29.1	102.0	29.1	102.0
	Zn	4.01	1.60	1.54	3.57	3.92	1.57	1.53	3.90

1): AIN-76™ [7] Vitamin Mixture.
2): Calcium, Phosphorus, Magnesium, Sodium, Zinc and Potassium contents are 1/3.5 of AIN-76™ Mineral Mixture.
3): Caluculated Value

Table 7 **(Ex.3-1)**

Estimated Factors and It's level on $L_{16}(2^{15})$ Type Orthogonal array

Factor	Row	Level 1	Level 2
A: Lighting condition	1	Normal lighting	Constant darkness
B: L-Methionine+Cysteine	2	Not Added	Added*
C: Tryptophan	4		
D: Isoleucine	8		
E: Arginine	10		
F: Threonine	12		

*: 10% egg protein level

Table 8 Composition of the Diets **(Ex.3-1)**

g/100gDiet

Diet No. / Ingredient	1	2	3	4	5	6	7	8
Methionine+Cysteine	0	0	0	0	0.498	0.498	0.498	0.498
Tryptophan	0	0	0.043	0.043	0	0	0.043	0.043
Isoleucine	0	0.117	0	0.117	0	0.117	0	0.117
Arginine	0	0.491	0	0.491	0.491	0	0.491	0
Threonine	0	0.198	0.108	0	0	0.108	0.108	0
Milk Casein	9	9	9	9	9	9	9	9
α-Corn Starch	15	15	15	15	15	15	15	15
Soy Bean Oil	5	5	5	5	5	5	5	5
Vitamin Mixture 1)	1	1	1	1	1	1	1	1
Mineral Mixture 1)	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5
Fiber	5	5	5	5	5	5	5	5
Choline bitartrate	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
Sucrose	61.3	60.49	61.15	60.65	60.31	60.58	60.16	60.64

1): AIN-76™

Table 9 **(Ex.3-2)**

Estimated Factors and It's level on $L_{16}(2^{15})$ Type Orthogonal array

Factor	Row	Level 1	Level 2
A: Lighting condition	1	Normal lighting	Constant darkness
B: Cystein	2	Not added	Added*
C: Arginine	4		
D: Tryptophan	8		
E: Thereonine	10		
F: Valine	12		

*: 10% egg protein level

Table 10 Composition of the Diets **(Ex.3-2)**

g/100gDiet

Diet No. / Ingredient	1	2	3	4	5	6	7	8
Cysteine HCl	0	0	0	0	0.361	0.361	0.361	0.361
Arginine	0	0	0.491	0.491	0	0	0.491	0.491
Tryptophan	0	0.043	0	0.043	0	0.043	0	0.043
Theronine	0	0.108	0	0.108	0.108	0	0.108	0
Valine	0	0.142	0.142	0	0	0.142	0.142	0
Milk Casein	9	9	9	9	9	9	9	9
α-Corn Starch	15	15	15	15	15	15	15	15
Soy Bean Oil	5	5	5	5	5	5	5	5
Vitamin Mixture 1)	1	1	1	1	1	1	1	1
Mineral Mixture 1)	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5
Fiber	5	5	5	5	5	5	5	5
Choline bitartrate	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
Sucrose	61.30	61.00	60.65	60.65	60.85	60.75	60.20	60.40

1) :AIN-76™

Table 11 **(Ex.3-3)**

Estimated Factors and It's level on $L_{32}(2^{31})$ Type Orthogonal array

Factor	Row	Level 1	Level 2
A: Lighting condition	1	Normal lighting	Constant darkness
B: AIN	2	AIN-76	AIN-93G
C: Methionine	4	Not added	Added*
D: Cysteine HCl	8		
E: Arginine HCl	14		
F: Tryptophan	16		
G: Threonine	18		
H: Phenylalanine	20		
I: Isoleucine	22		
J: Valine	24		
K: Leucine	26		
L: Histidine HCl	28		
M: Lysine HCl	30		

*: 10% egg protein level

Table12 Composition of the Diets **(Ex.3-3)**

g ／ 100gDiet

Diet No. Ingredient	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
Methionine	0	0	0	0	0.137	0.137	0.137	0.137	0	0	0	0	0.137	0.137	0.137	0.137
Cysteine HCl	0	0	0.361	0.361	0	0	0.361	0.361	0	0	0.361	0.361	0	0	0.361	0.361
Arginine HCl	0	0	0.491	0.491	0.491	0.491	0	0	0.491	0.491	0	0	0	0	0.491	0.491
Tryptophan	0	0.043	0	0.043	0	0.043	0	0.043	0	0.043	0	0.043	0	0.043	0	0.043
Threonine	0	0.108	0	0.108	0	0.108	0	0.108	0.108	0	0.108	0	0.108	0	0.108	0
Phenylalanine	0	0.121	0	0.121	0.121	0	0.121	0	0	0.121	0	0.121	0.121	0	0.121	0
Isoleucine	0	0.117	0	0.117	0.117	0	0.117	0	0.117	0	0.117	0	0	0.117	0	0.117
Valine	0	0.142	0.142	0	0	0.142	0.142	0	0	0.142	0.142	0	0	0.142	0.142	0
Leucine	0	0.113	0.113	0	0	0.113	0.113	0	0.113	0	0	0.113	0.113	0	0	0.113
Histidine HCl	0	0.038	0.038	0	0.038	0	0	0.038	0	0.038	0.038	0	0.038	0	0	0.038
Lysine HCl	0	0.089	0.089	0	0.089	0	0	0.089	0.089	0	0	0.089	0	0.089	0.089	0
Milk Casein	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9
α-Corn Starch	15	15	15	15	15	15	15	15	53	53	53	53	53	53	53	53
Sucrose	61.3	60.5	60.1	60.1	60.3	60.3	60.3	60.5	20.4	20.5	20.5	20.6	20.8	20.8	19.9	20.0
Fiber	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Soy Bean Oil	5	5	5	5	5	5	5	5	7	7	7	7	7	7	7	7
AIN-76™Vitamin Mixture	1	1	1	1	1	1	1	1	–	–	–	–	–	–	–	–
AIN-93 Vitamin Mixture	–	–	–	–	–	–	–	–	1	1	1	1	1	1	1	1
AIN-76™Mineral Mixture	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	–	–	–	–	–	–	–	–
AIN-93G Mineral Mixture	–	–	–	–	–	–	–	–	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5
Choline bitartrate	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
Tert-butylhydoquinone	–	–	–	–	–	–	–	–	0.0014	0.0014	0.0014	0.0014	0.0014	0.0014	0.0014	0.0014

Table 13 $L_9(3^4)$ Type Orthgonal Array (**Ex.3**)

No. \ Row	1	2	3	4
1	1	1	1	1
2	1	2	2	2
3	1	3	3	3
4	2	1	2	3
5	2	2	3	1
6	2	3	1	2
7	3	1	3	2
8	3	2	1	3
9	3	3	2	1

Table 14 **(Ex.3-4)**

Estimated Factors and It's level on $L_9(3^4)$ Type Orthogonal array

Factor	Row	Level 1	Level 2	Level 3
A: L-Methionine+Cysteine	1	Low*	Normal**	High***
B: Tryptophan	2	Low	Normal	High
C: Valine	4	Low	Normal	High

* Low; not added
Normal; dded up to 10% egg protein level
High; added up to 20% egg protein level

Table 15 Composition of the Diets **(Ex.3-4)**

g/100gDiet

Ingredient \ Diet No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9
L-Methionine	0	0	0	0.137	0.137	0.137	0.526	0.526	0.526
Cystein	0	0	0	0.326	0.326	0.326	0.693	0.693	0.693
Tryptophan	0	0.043	0.230	0	0.043	0.230	0	0.043	0.230
Valine	0	0.142	0.905	0.905	0	0.142	0.142	0.905	0
Milk Casein	9	9	9	9	9	9	9	9	9
α-Corn Starch	64.2	64.1	63.1	62.9	63.7	63.4	62.9	62.1	62.8
Sucrose	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Fiber	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Soy Bean Oil	7	7	7	7	7	7	7	7	7
AIN-93 Vitamin mixture	1	1	1	1	1	1	1	1	1
AIN-93G Mineral mixture	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5
Chorine bitartrate	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
Tert-butylhydroquinone	0.0014	0.0014	0.0014	0.0014	0.0014	0.0014	0.0014	0.0014	0.0014

Table 16 Estimated factors and it's level on three-way classification **(Ex.4-1)**

Factor	Level 1	Level 2	Level 3
A: Lighting condition	Normal lighting	Constant darkness	-
B: Protein (Casein)	Low*	Normal*	-
C: Vitamin mixture	Low**	Normal**	High**

*; Casein level, low: 9% casein, Normal: 20% casein
**; Vitamin mixture level, Low: 0.3% (x1/3.3), Normal: 1%, High: 3% (x3)

Table 17 Composition of the diets **(Ex.4-1)**
(g/100gdiet)

Diet No. / Ingredients	1	2	3	4	5	6
Milk casein 1)	9	9	9	20	20	20
L-Cystine	0.135	0.135	0.135	0.3	0.3	0.3
α-Corn starch	64.99	64.11	61.61	53.82	52.95	50.45
Sucrose	10	10	10	10	10	10
Fiber	5	5	5	5	5	5
Soybean oil	7	7	7	7	7	7
Vitamin mix.2)	0.3	1.0	3.0	0.3	1.0	3.0
Choline bitartrate	0.075	0.25	0.75	0.075	0.25	0.75
Mineral mix.3)	-	-	-	3.5	3.5	3.5
Mineral mix.4)	3.5	3.5	3.5	-	-	-
tert-butylhydroquinone	0.0014	0.0014	0.0014	0.0014	0.0014	0.0014

1) :Vitamin free milk casein
2) :AIN-93 vitamin mixture
3) :AIN-93G mineral mixture
4) :AIN-93G mineral mixture containing 67.2g/kg of phosphorus

Table 18 Estimated factors and it's level on three-way classification **(Ex.4-2)**

Factor	Level 1	Level 2	Level 3
A: Lighting condition	Normal lighting	Constant darkness	-
B: Water-solube vitamin	Low*	Normal*	High*
C: Fat-soluble vitamin	Low	Normal	High

*; Vitamin level, Low: 0.3%(x1/3.3), Normal: 1%, High: 3%(x3)

Table 19 Composition of the diets **(Ex.4-2)**
(g/100g diet)

Ingredients \ Diet No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Milk casein 1)	9	9	9	9	9	9	9	9	9
L-Cystine	0.135	0.135	0.135	0.135	0.135	0.135	0.135	0.135	0.135
α-Corn starch	64.69	63.99	61.99	63.81	63.11	61.11	61.31	60.61	58.61
Sucrose	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Fiber	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Soybean oil	6.888	6.625	5.875	6.888	6.625	5.875	6.888	6.625	5.875
Mineral mix.2)	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5
tert-butylhydroquinone	0.0014	0.0014	0.0014	0.0014	0.0014	0.0014	0.0014	0.0014	0.0014
Water-solble Vitamin mix.3)	0.3	0.3	0.3	1.0	1.0	1.0	3.0	3.0	3.0
Choline bitartrate	0.075	0.075	0.075	0.25	0.25	0.25	0.75	0.75	0.75
Fat-solble Vitamin mix.4)	0.3	1.0	3.0	0.3	1.0	3.0	0.3	1.0	3.0
Vitamin K 5)	0.1125	0.3750	1.125	0.1125	0.375	1.125	0.1125	0.375	1.125

1):Vitamin free milk casein
2):AIN-93G mineral mixture containing 67.2g/kg of phosphorus
3):AIN-93 water-soluble vitamin mixture
4):AIN-93 fat-soluble vitamin mixture (Vitamin A, D and E)
5):solubled phylloquinone in soybean oil(0.2mg/g soybean oil)

Table 20 Estimated Factors and It's level on $L_{16}(2^{15})$ Type Orthogonal array **(Ex.4-3)**

Factor	Row	Level 1	Level 2
A: Lighting condition	1	Normal lighting	Constant darkness
B: Vitamin A	2	Normal*	High*
C: Vitamin D	4	Normal	High
D: Vitamin E	8	Normal	High
E: Vitamin K	14	Normal	High

*; Vitamin level; Normal or High(x3)

Table 21 Composition of the Diets **(Ex.4-3)**

g/100gDiet

Ingredients \ Diet groups	1	2	3	4	5	6	7	8
Milk casein 1)	9	9	9	9	9	9	9	9
L-Cystine	0.135	0.135	0.135	0.135	0.135	0.135	0.135	0.135
α-Corn starch	63.16	62.56	62.66	62.06	62.36	61.76	61.86	61.26
Sucrose	10	10	10	10	10	10	10	10
Fiber	5	5	5	5	5	5	5	5
Soybean oil	6.625	5.875	5.875	6.625	5.875	6.625	6.625	5.875
Mineral mix. 2)	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5
tert-butylhydroquinone	0.0014	0.0014	0.0014	0.0014	0.0014	0.0014	0.0014	0.0014
Water-soluble vitamin mix.3)	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Choline bitartrate	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
Vitamin A 4)	0.4	0.4	0.4	0.4	1.2	1.2	1.2	1.2
Vitamin D 5)	0.25	0.25	0.75	0.75	0.25	0.25	0.75	0.75
Vitamin E 6)	0.30	0.90	0.30	0.90	0.30	0.90	0.30	0.90
Vitamin K 7)	0.375	1.125	1.125	0.375	1.125	0.375	0.375	1.125

1):Vitamin free milk casein
2):AIN-93G mineral mixture
3):AIN-93 water-solble vitamin mixture
4):Retinyl palmitate, 1,000IU/g
5):Colecalciferol, 400,000IU/g
6):DL-α-tocopherol acetate, 25IU/g
7):solubled phylloquinone in soybean oil(0.2mg/g soybean oil)

Table 22
Estimated Factors and It's level on $L_{16}(2^{15})$ Type Orthogonal array (**Ex.4-4 (1)**)

Factor	Row	Level 1	Level 2
A: Lighting condition	1	Normal lighting	Constant darkness
B: Choline bitartrate	2	Normal*	High*
C: Nicotic Acid	4	Normal	High
D: Ca pantothenate	6	Normal	High
E: Pyridoxine	8	Normal	High
F: Thiamin	10	Normal	High
G: Riboflavin	12	Normal	High
H: Folic acid	14	Normal	High

*Vitamin level; Normal or High (x6)

Table 23 Composition of the Diets Based on $L_{16}(2^{15})$ Type Orthogonal array **(Ex.4-4(1))**
(g/100gdiet)

Diet groups / Ingredients	1	2	3	4	5	6	7	8
Milk Casein 1)	9	9	9	9	9	9	9	9
α-Corn starch	64.14	63.09	62.80	62.54	61.69	61.44	62.14	62.29
Sucrose	10	10	10	10	10	10	10	10
Soy Bean Oil	7	7	7	7	7	7	7	7
Fiber	5	5	5	5	5	5	5	5
Mineral Mix. 2)	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5
L-Cystin	0.135	0.135	0.135	0.135	0.135	0.135	0.135	0.135
tert-butylhydroquinone	0.0014	0.0014	0.0014	0.0014	0.0014	0.0014	0.0014	0.0014
F.S.Vitamin Mix. 3)	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
D-Biotin 4)	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02
V.B12 5)	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
Choline bitartrate	0.25	0.25	0.25	0.25	1.25	1.25	1.25	1.25
Nicotic Acid 5)	0.03	0.03	0.18	0.18	0.03	0.03	0.18	0.18
Ca pantothenate 6)	0.16	0.16	0.96	0.96	0.96	0.96	0.16	0.16
Pyridoxine 6)	0.07	0.42	0.07	0.42	0.07	0.42	0.07	0.42
Thiamin 6)	0.06	0.36	0.06	0.36	0.36	0.06	0.36	0.06
Riboflavin 6)	0.06	0.36	0.36	0.06	0.06	0.36	0.36	0.06
Folic acid 6)	0.02	0.12	0.12	0.02	0.12	0.02	0.02	0.12

1):Vitamin free milk casein
2):AIN-93G mineral mixture(modified phosphorus content)
3):AIN-93G fat-soluble vitamin mixture (Vitamin A, D, E and K)
4):diluted with sucrose to 1000 times
5):diluted with sucrose to 10 times
6):diluted with sucrose to 100 times

Table 24 Estimated factors and it's level on three-way classification (**Ex.4-4 (2)**)

Factor	Level 1	Level 2
A: Lighting condition	Normal lighting	Constant darkness
B: D-Biotin	Normal*	High*
C: Vitamin B12	Normal	High

*Vitamin level; Normal or High (x6)

Table 25 Composition of the diets **(Ex.4-4 (2))**
(g/100g Diet)

Diet groups / Ingredients	1	2	3	4
Milk casein 1)	9	9	9	9
α-Corn starch	63. 77	63. 77	63. 77	63. 77
Sucrose	10	10	10	10
Soybean oil	7	7	7	7
Fiber	5	5	5	5
Mineral mix. 2)	3. 5	3. 5	3. 5	3. 5
L-Cystine	0. 135	0. 135	0. 135	0. 135
tert-Butylhydroquinone	0. 0014	0. 0014	0. 0014	0. 0014
Fat-solble Vitamin mix. 3)	0. 3	0. 3	0. 3	0. 3
Water-solble Vitamin mix. 4)	1	1	1	1
Choline bitartrate	0. 25	0. 25	0. 25	0. 25
D-Biotin	0. 02	0. 02	0. 12	0. 12
Vitamin B12	0. 025	0. 15	0. 025	0. 15

1) :Vitamin free milk casein
2) :AIN-93G mineral mixture
3) :AIN-93 fat-soluble vitamin mixture (Vitamin A, D, E and K)
4) :AIN-93 water-soluble vitamin mixture omitted biotin and vitamin B12.

Table 26 Effects of dietary nutrient content on reproductive organ weight, serum testosterone level, body weight and total food intake.
Result of anlysis of variance **(Ex.1)**

	Protein (A)		Methio-nine (B)		(A) x (B)		Vitamin Mix. (C)		Mineral Mix. (D)		Oil (E)		Analyzed Value		t-test
	N [1]	D [2]	N	D	N	D	N	D	N	D	N	D	N	D	N vs D
Testes (g)	* [3]	**		**	*	**		**		**		**	1.725 ± 0.324 [4]	1.138 ± 0.47	**
(g/100gBW)									**				1.299 ± 0.191	0.823 ± 0.31	**
Epididymides (g)	**	**	*		**	*	**	*		*	*	*	0.208 ± 0.056	0.133 ± 0.06	**
(g/100gBW)			*		*		*		*				0.148 ± 0.032	0.096 ± 0.04	**
SeminalVesicles (mg)		*		*				*		*			84.8 ± 35.6	38.3 ± 24.3	**
(mg/100gBW)	*	**		*	*	**				**			58.8 ± 21.0	27.3 ± 16.1	**
Prostate (mg)	*		**		*					**			57.4 ± 20.7	26.6 ± 13.9	**
(mg/100gBW)										**			40.2 ± 11.7	19.4 ± 9.6	**
Testosterone (ng/ml)		**								*			1.372 ± 0.566	0.860 ± 0.712	**
Body Weight (g)	*	*	*		*	*			*				140.7 ± 20.0	136.9 ± 14.4	
Total Food Intake (g)	*	*	*		*		*		*		*		332.0 ± 25.8	363.5 ± 37.1	**

1) N; Normal lighting
2) D; Constnat darkness
3) *; $P<0.05$, ** ; $P<0.01$
4) Mean ± SD

Table 27 **(Ex.1)**

The estimated value of combinational effect of nutrients on body weight

Normal lighting		Constant darkness	
Factor level ABD*	Estimated value (g)	Factor level AB	Estimated value (g)
111**	**105.7** min.	**11**	**118.5** min.
112	121.1	12	140.1
121	138.1	**21**	**145.5** max.
122	153.5	22	143.3
211	140.8		
212	156.2		
221	147.3		
222	**162.7** max.		

A:Protein, B:Methionine, D:Mineral

**: 1; Low level or Not added, 2; Normal level

min. ; minimum value, max. ; maximum value

Table 28 **(Ex.1)**

The estimated value of combinational effect of nutrients on total food intake

Normal Lighting				Constant darkness	
Factor level ABCDE*	Estimated value (g)	Factor level ABCDE*	Estimated value (g)	Factor level A	Estimated value(g)
11111**	314.2	21111	319.7	**1**	**383.3** max.
11112	307.6	21112	313.1	**2**	**342.9** min.
11121	341.1	21121	346.6		
11122	334.5	21122	339.9		
11211	305.6	21211	311.1		
11212	**299.0** min.	21212	304.5		
11221	332.5	21221	337.9		
11222	325.8	21222	331.3		
12111	345.1	22111	325.5		
12112	338.5	22112	318.9		
12121	**372.0** max.	22121	352.4		
12122	365.4	22122	345.8		
12211	336.5	22211	316.9		
12212	330.0	22212	310.3		
12221	363.4	22221	343.8		
12222	356.7	22222	337.2		

*: A; Protein, B; Methionine, C; Vitamin, D; Mineral, E; Oil

**: 1; Low level or Not added, 2; Normal level

min. ; minimum value, max. ; maximum value

Table 29 **(Ex.1)**

The estimated value of combinational effect of nutrients on testes weight

Normal Lighting		Constant darkness			
Factor level AB*	Estimated value (g)	Factor level ABCDE*	Estimated value(g)	Factor level ABCDE	Estimated value(g)
11**	**1.432** min.	11111**	1.105	21111	1.356
12	1.788	11112	1.184	21112	1.435
21	**1.859** max.	11121	0.950	21121	1.201
22	1.820	11122	1.030	21122	1.281
		11211	0.945	21211	1.196
		11212	1.025	21212	1.276
		11221	0.791	21221	1.042
		11222	0.870	21222	1.121
		12111	1.046	22111	1.515
		12112	1.125	**22112**	**1.594** max.
		12121	0.891	22121	1.360
		12122	0.970	22122	1.439
		12211	0.886	22211	1.355
		12212	0.965	22212	1.434
		12221	**0.731** min.	22221	1.201
		12222	0.811	22222	1.280

*: A; Protein, B; Methionine, C; Vitamin, D; Mineral, E; Oil
**: 1; Low level or Not added, 2; Normal level
min. ; minimum value, max. ; maximum value

Table 30 **(Ex.1)**

The estimated value of combinational effect of nutrients on epididymides weight

Normal lighting		Constant darkness			
Factor level ABCE*	Estimated value (g)	Factor level ABCDE	Estimated value (g)	Factor level ABCDE	Estimated value (g)
1111**	0.170	11111	0.120	21111	0.162
1112	0.174	11112	0.126	21112	0.169
1121	**0.149** min.	11121	0.109	21121	0.151
1122	0.153	11122	0.116	21122	0.158
1211	0.232	11211	0.103	21211	0.145
1212	0.236	11212	0.109	21212	0.151
1221	0.212	11221	0.092	21221	0.134
1222	0.216	11222	0.099	21222	0.141
2111	0.246	12111	0.113	22111	0.181
2112	**0.250** max.	12112	0.119	**22112**	**0.187** max.
2121	0.225	12121	0.102	22121	0.170
2122	0.229	12122	0.109	22122	0.177
2111	0.219	12211	0.096	22211	0.164
2112	0.223	12212	0.102	22212	0.170
2121	0.199	**12221**	**0.085** min.	22221	0.153
2122	0.203	12222	0.092	22222	0.160

*: A; Protein, B; Methionine, C; Vitamin, D; Mineral, E;Oil
**: 1; Low level or Not added, 2; Normal level
min. ; minimum value, max. ; maximum value

Table 31 **(Ex.1)**

The estimated value of combinational effect of nutrients on seminal vesicles weight

Normal lighting	Constant darkness			
	Factor level ABCD*	Estimated value (mg)	Factor level ABCD	Estimated value (mg)
The effects of nutrient factors were not observed. ($p<0.05$)	1111**	34.0	2111	51.1
	1112	24.6	2112	41.7
	1121	29.1	2121	46.2
	1122	**19.6** min.	2122	36.7
	1211	39.8	**2211**	**56.9** max.
	1212	30.4	2212	47.5
	1221	34.9	2221	52.0
	1222	25.4	2222	42.5

*: A; Protein, B; Methionine, C; Vitamin, D; Mineral
**: 1; Low level or Not added, 2; Normal level
min. ; minimum value, max. ; maximum value

Table 32 **(Ex.1)**

The estimated value of combinational effect of nutrients on prostate weight

Normal lighting		Constant darkness	
Factor level AB*	Estimated value (mg)	Factor level D	Estimated value (mg)
11**	**35.4** min.	**1**	**32.7** max.
12	**65.3** max.	**2**	**20.6** min.
21	62.6		
22	66.5		

*: A; Protein, B; Methionine, D; Mineral
**: 1; Low level or Not added, 2; Normal level
min. ; minimum value, max. ; maximum value

Table 33 **(Ex.1)**

The estimated value of combinational effect of nutrients on serum testosterone

Normal lighting	Constant darkness		
	Factor level AD*	Estimated value (ng/ml)	
The effects of nutrient factors were not observed ($p<0.05$)	11**	0.721	
	12	**0.422**	min.
	21	**1.298**	max.
	22	0.998	

*: A; Protein, D; Mineral
**: 1; Low level, 2; Normal level
min. ; minimum value, max. ; maximum value

Table 34 Effects of minerals on reproductive organ weight, serum testosterone level, body weight and total food intake. **(Ex.2)**

Results of analysis of variance

	Lighting [1] Condition (A)	Ca (B)	P (C)	Mg (D)	Na (E)	Zn (F)	A x B	A x C	A x D	A x E	A x F	D x E
Testes (g)	＊＊ [2]				＊＊		＊＊					＊
(g/100gBW)	＊＊						＊					
Epididymides (g)	＊＊			＊	＊＊		＊＊					＊＊
(g/100gBW)	＊＊				＊		＊＊					＊
Testosterone (ng/ml)							＊					＊＊
Body Weight (g)	＊＊		＊	＊	＊＊		＊＊					
Total Food Intake (g)	＊＊		＊＊	＊	＊＊		＊＊					

1): Lighting Condition; Normal lighting or Constant darkness

2): ＊; $P<0.05$, ＊＊ ; $P<0.01$

Table 35 **(Ex.2)**

The estimated value of combinational effect of minerals on body weight

Factor level ABCDE*	Estimated value (g)	Factor level ABCDE	Estimated value (g)
11111**	168.1	21111	139.9
11112	178.2	21112	150.0
11121	173.3	21121	145.1
11122	**183.3** max.	21122	155.1
11211	162.3	**21211**	**134.0** min.
11212	172.3	21212	144.1
11221	167.4	21221	139.2
11222	177.5	21222	149.2
12111	159.6	22111	145.6
12112	169.6	22112	155.7
12121	164.7	22121	150.8
12122	174.8	22122	160.8
12211	153.7	22211	139.8
12212	163.7	22212	149.8
12221	158.9	22221	144.9
12222	168.9	22222	155.0

*: A; Lighting condition, B; Ca, C; P, D; Mg, E; Na
**: 1; Normal lighting or Low level, 2; Constant darkness or Normal level
max.; maximum value, min.; minimum value

Table 36 **(Ex.2)**

The estimated value of combinational effect of minerals on total food intake

Factor level ABCDE*	Estimated value (g)	Factor level ABCDE	Estimated value (g)
11111**	325.3	21111	292.8
11112	341.9	21112	309.3
11121	334.1	21121	301.6
11122	**350.7** max.	21122	318.1
11211	313.9	**21211**	**281.4** min.
11212	330.5	21212	297.9
11221	322.8	21221	290.2
11222	339.3	21222	306.7
12111	319.9	22111	310.1
12112	336.5	22112	326.6
12121	328.8	22121	318.9
12122	345.3	22122	335.4
12211	308.6	22211	298.7
12212	325.1	22212	315.2
12221	317.4	22221	307.5
12222	333.9	22222	324.0

*: A; Lighting condition, B; Ca, C; P, D; Mg, E; Na
**: 1; Normal lighting or Low level, 2; Constant darkness or Normal level
max.; maximum value, min.; minimum value

Table 37 **(Ex.2)**

The estimated value of combinational effect of minerals on testes weight

Factor level ABDE*	Estimated value (g)	Factor level ABDE	Estimated value (g)
1111**	1.735	2111	0.781
1112	1.806	2112	0.852
1121	1.701	**2121**	**0.747** min.
1122	**1.990** max.	2122	1.035
1211	1.558	2211	0.990
1212	1.630	2212	1.061
1221	1.525	2221	0.956
1222	1.813	2222	1.245

*: A; Lighting condition, B; Ca, D; Mg, E; Na

**: 1; Normal lighting or Low level, 2; Constant darkness or Normal level

max.; maximum value, min.; minimum value

Table 38 **(Ex.2)**

The estimated value of combinational effect of minerals on epididymides weight

Factor level ABDE*	Estimated value (g)	Factor level ABDE	Estimated value (g)
1111**	0.194	2111	0.076
1112	0.203	2112	0.085
1121	0.191	**2121**	**0.073** min.
1122	**0.231** max.	2122	0.113
1211	0.169	2211	0.101
1212	0.178	2212	0.110
1221	0.166	2221	0.098
1222	0.206	2222	0.138

*: A; Lighting condition, B; Ca, D; Mg, E; Na

**: 1; Normal lighting or Low level, 2; Constant darkness or Normal level

max.; maximum value, min.; minimum value

Table 39 **(Ex.2)**

The estimated value of combinational effect of minerals on serum testosterone

Factor level ABDE*	Estimated value (ng/ml)	Factor level ABDE	Estimated value (ng/ml)
1111**	1.258	**2111**	**0.162** min.
1112	2.215	2112	1.120
1121	**2.408** max.	2121	1.313
1122	1.447	2122	0.352
1211	0.500	2211	0.843
1212	1.457	2212	1.800
1221	1.650	2221	1.993
1222	0.690	2222	1.033

*: A; Lighting condition, B; Ca, D; Mg, E; Na

**: 1; Normal lighting or Low level, 2; Constant darkness or Normal level

max.; maximum value, min.; minimum value

Table 40 Effects of essential amiono acids on reproductive organ weight, serum testosterone level, body weight and total food intake

Result of analysis of variance **(Ex.3-1)**

	Lighting [1] Condition (A)	Met+Cys (B)	Trp (C)	Ile (D)	Arg (E)	Thr (F)	A x B	A x C	A x D	A x E	A x F	B x C
Testes (g)	＊＊ [2]	＊＊					＊					
(g/100gBW)	＊＊		＊＊				＊＊					＊
Epididymides (g)	＊＊	＊＊							＊			
(g/100gBW)	＊＊		＊				＊＊		＊			
SeminalVesicles (mg)	＊＊	＊＊				＊	＊					
(mg/100gBW)	＊＊	＊＊										
Prostate (mg)	＊＊	＊＊				＊＊	＊			＊	＊＊	
(mg/100gBW)	＊＊	＊＊	＊			＊				＊	＊＊	
Testosterone (ng/ml)	＊＊	＊＊		＊＊	＊		＊＊		＊	＊＊		＊
Body Weight (g)	＊	＊＊				＊	＊					
Total Food Intake (g)		＊＊					＊＊					＊

1) Lighting Condition, Normal lighting or Constant darkness

2) ＊; $P<0.05$, ＊＊ ; $P<0.01$

Table 41 Effects of essential amiono acids on reproductive organ weight, serum testosterone level, body weight and total food intake.

Result of analysis of variance **(Ex.3-2)**

	Lighting[1] Condition (A)	Cys (B)	Arg (C)	Trp (D)	Thr (E)	Val (F)	A x B	A x C	A x D	A x E	A x F	B x C
Testes (g)	** [2]	**		**	*		**					
(g/100gBW)	**	*		*				*			*	
Epididymides (g)	**	**		**	*		**					
(g/100gBW)	**			*								
SeminalVesicles (mg)	**	**		**	**		**	*	*			
(mg/100gBW)	**	**		**	*		**		*			
Prostate (mg)	**	**		*			**					
(mg/100gBW)	**	**		*			**	*				
Testosterone (ng/ml)	**											
Body Weight (g)	*	**		**	**		**					
Total Food Intake (g)	**	**		*			**		*			

1) Lighting Condition, Normal lighting or Constant darkness

2) *; $P<0.05$, ** ; $P<0.01$

Table 42 *Effects of essential amiono acids on reproductive organ weight, serum testosterone level, body weight and total food intake*
Result of analysis of variance (Ex.3-3)

	Lighting[1] condition (A)	AIN (B)	Met (C)	Cys (D)	Arg (E)	Trp (F)	Thr (G)	Phe (H)	Ile (I)	Val (J)	Leu (K)	His (L)	Lys (M)
Testes (g)	＊＊[2]	＊	＊＊	＊＊					＊				
(g/100gBW)	＊＊	＊＊	＊＊		＊＊	＊		＊＊	＊＊				
Epididymides (mg)	＊＊		＊＊										
(mg/100gBW)	＊＊		＊＊					＊					
Seminal Vesicles (mg)	＊＊		＊＊										
(mg/100gBW)	＊＊		＊										
Prostate (mg)	＊＊		＊＊	＊＊			＊						
(mg/100gBW)	＊＊		＊	＊	＊		＊					＊	
Testosterone (ng/ml)	＊＊	＊	＊＊	＊＊	＊								＊
Body Weight (g)	＊＊		＊＊	＊＊			＊＊				＊		
Total Food Intake (g)	＊＊		＊＊										

	A x B	A x C	A x D	A x F	A x G	A x H	A x I	A x J	A x K	A x L	A x M	B x C	B x D	C x D
Testes (g)	＊＊							＊						＊＊
(g/100gBW)	＊＊		＊＊	＊				＊＊		＊			＊＊	
Epididymides (g)	＊＊	＊	＊											＊＊
(g/100gBW)	＊＊		＊＊							＊			＊	
SeminalVesicles (mg)		＊												＊＊
(mg/100gBW)														＊
Prostate (mg)														＊＊
(mg/100gBW)	＊		＊											＊
Testosterone (ng/ml)													＊＊	
Body Weight (g)														＊＊
Total Food Intake (g)									＊					＊＊

1) Lighting Condition, Normal lighting or Constant darkness
2) ＊ ; $P<0.05$, ＊＊ ; $P<0.01$

Table 43 Effects of amino acids on reproductive organ weight, serum testosterone level, body weight and total food intake.
Result of analysis of variance **(Ex.3-4)**

	Normal Lighting			Constant Darkness		
	Met+Cys (A)	Trp (B)	Val (C)	Met+Cys (A)	Trp (B)	Val (C)
Testes (g)				＊＊	＊＊	＊＊
(g/100gBW)	＊ [1)]					
Epididymides (g)						＊
(g/100gBW)					＊	＊
Seminal Vesicles (mg)						
(mg/100gBW)						
Prostate (mg)	＊＊			＊		
(mg/100gBW)				＊	＊	＊
Testosterone (mg/ml)						
Body Weight (g)	＊＊			＊＊		
Total Food Intake (g)	＊＊					

1) ＊; $P<0.05$, ＊＊ ; $P<0.01$

Table 44 The estimted value of combinational effect of essential amino acids on body weight **(Ex.3-1)**

Factor level ABF*	Estimated value (g)	Factor level ABF	Estimated value (g)
111**	109.7	**211**	**109.3** min.
112	115.5	212	115.0
121	155.5	221	145.7
122	**161.3** max.	222	151.4

*: A; Lighting condition, B; Met+Cys, F; Thr
**: 1; Normal lightng or Not added,
2; Constant darkness or Added
max. ; maximum value, min. ; minimum value

Table 45 The estimted value of combinational effect of essential amino acids on body weight **(Ex.3-2)**

Factor level ABDE*	Estimated value (g)	Factor level ABDE	Estimated value (g)
1111**	114.4	2111	117.0
1112	119.9	2112	122.5
1121	**109.1** min.	2121	111.7
1122	114.6	2122	117.2
1211	157.8	2211	147.9
1212	**163.3** max.	2212	153.4
1221	152.5	2221	142.6
1222	158.0	2222	148.1

*: A; Lighting condition, B; Cys, D; Trp, E; Thr
**: 1; Normal lightng or Not added,
2; Constant darkness or Added
max. ; maximum value, min. ; minimum value

Table 46 The estimted value of combinational effect of essential amino acids on body weight **(Ex.3-3)**

Factor level ACDGK*	Estimated value (g)	Factor level ACDGK	Estimated value (g)
11111**	114.4	21111	103.4
11112	111.0	**21112**	**100.0** min.
11121	120.0	21121	108.6
11122	116.1	21122	105.1
11211	149.6	21211	138.6
11212	146.2	21212	135.2
11221	154.8	21221	143.8
11222	151.3	21222	140.3
12111	146.8	22111	135.8
12112	143.4	22112	132.4
12121	152.0	22121	141.0
12122	148.5	22122	137.5
12211	150.6	22211	139.6
12212	147.1	22212	136.1
12221	**155.7** max.	22221	144.7
12222	152.3	22222	141.3

*: A; Lighting condition, C; Met, D; Cys, G; Thr, K; Leu
**: 1; Normal lightng or Not added,
2; Constant darkness or Added
max. ; maximum value, min. ; minimum value

Table 47 The estimated value of combinational effect of essential amino acids on body weight **(Ex.3-4)**

Normal lighting		Constant Darkness	
Factor level A*	Estimated value (g)	Factor level A	Estimated value (g)
1**	**129.6** min.	**1**	**123.7** min.
2	**178.8** max.	**2**	**159.9** max.
3	170.8	3	151.0

*: A; Met + Cys.
**: 1; Low level, 2; Normal level, 3; High level
max. ; maximum value, min. ; minimum value

Table 48 The estimted value of combinational effect of essential amino acids on total food intake (**Ex.3-1**)

Factor level ABC*	Estimated value (mg)	Factor level ABC	Estimated value (mg)
111**	**292.8** min.	211	312.2
112	300.3	212	319.7
121	**352.7** max.	221	342.9
122	346.6	222	336.8

*: A; Lighting condition, B; Met+Cys, C; Trp
**: 1; Normal lightng or Not added,
2; Constant darkness or Added
max. ; maximum value, min. ; minimum value

Table 49 The estimted value of combinational effect of essential amino acids on total food intake (**Ex.3-2**)

Factor level ABD*	Estimated value (g)	Factor level ABD	Estimated value (g)
111**	336.7	211	336.9
112	**325.5** min.	212	337.8
121	**388.9** max.	221	353.7
122	377.7	222	354.9

*: A; Lighting condition, B; Cys, D; Trp
**: 1; Normal lightng or Not added,
2; Constant darkness or Added
max.; maximum value, **min.**; minimum value

Table 50 The estimted value of combinational effect of essential amino acids on total food intake (**Ex.3-3**)

Factor level ACDK*	Estimated value (g)	Factor level ACDK	Estimated value (g)
1111**	312.1	**2111**	**280.7** min.
1112	309.4	2112	289.9
1121	332.0	2121	300.6
1122	329.3	2122	309.8
1211	**339.6** max.	2211	308.2
1212	337.0	2212	317.4
1221	329.7	2221	298.3
1222	327.1	2222	307.5

*: A; Lighting condition, C; Met, D; Cys, K; Leu
**: 1; Normal lightng or Not added,
2; Constant darkness or Added
max. ; maximum value, min. ; minimum value

Table 51 The estimated value of combinational effect of essential amino acids on total food intake **(Ex.3-4)**

Normal lighting		Constant Darkness
Factor level A*	Estimated value (g)	The effects of amino acids were not observed.
1**	**373.2** min.	
2	**440.6** max.	
3	414.8	

*: A; Met + Cys.
**: 1; Low level, 2; Normal level, 3; High level
max.; maximum value, min. ; minimum value

Table 52 The estimated value of combinational effect of essential amino acids on testes weight **(Ex.3-1)**

Factor level AB*	Estimated value (g)
11**	1.722
12	**2.018** max.
21	**0.884** min.
22	1.409

*: A; Lighting condition, B; Met+Cys
**: 1; Normal lighting or Not added,
2; Constant darkness or Added
max. ; maximum value, min. ; minimum value

Table 53 The estimated value of combinational effect of essential amino acids on testes weight **(Ex.3-2)**

Factor level ABDE*	Estimated value (g)	Factor level ABDE	Estimated value (g)
1111**	1.385	2111	0.789
1112	1.499	2112	0.903
1121	1.234	**2121**	**0.638** min.
1122	1.347	2122	0.751
1211	1.823	2211	0.922
1212	**1.936** max.	2212	1.035
1221	1.671	2221	0.771
1222	1.785	2222	0.884

*: A; Lighting condition, B; Cys, D;Trp, E; Thr
**: 1; Normal lighting or Not added, 2; Constant darkness or Added
max. ; maximum value, min. ; minimum value

Table 54 The estimated value of combinational effect of essential amino acids on testes weight **(Ex.3-3)**

Factor level ABCDIJ*	Estimated value (g)	Factor level ABCDIJ	Estimated value (g)	Factor level ABCDIJ	Estimated value (g)	Factor level ABCDIJ	Estimated value (g)
111111**	1.277	121111	1.217	**211111**	**0.375** min.	221111	0.623
111112	1.134	121112	1.073	211112	0.433	221112	0.680
111121	1.372	121121	1.311	211121	0.470	221121	0.717
111122	1.228	121122	1.168	211122	0.527	221122	0.775
111211	1.601	121211	1.540	211211	0.698	221211	0.946
111212	1.457	121212	1.396	211212	0.756	221212	1.004
111221	1.695	121221	1.635	211221	0.793	221221	1.041
111222	1.552	121222	1.491	211222	0.851	221222	1.098
112111	1.681	122111	1.620	212111	0.778	222111	1.026
112112	1.537	122112	1.476	212112	0.836	222112	1.084
112121	**1.776** max.	122121	1.715	212121	0.873	222121	1.121
112122	1.632	122122	1.571	212122	0.931	222122	1.179
112211	1.654	122211	1.593	212211	0.752	222211	0.999
112212	1.510	122212	1.450	212212	0.809	222212	1.057
112221	1.749	122221	1.688	212221	0.846	222221	1.094
112222	1.605	122222	1.544	212222	0.904	222222	1.152

*: A; Lightinc condition, B; AIN, C; Met, D; Cys, I; Ile, J; Val
**: 1; Normal lightng or AIN-76 or Not added, 2; Constant darkness or AIN-93G or Added
max. ; maximum value, min. ; minimum value

Table 55 The estimated value of combinational effect of essential amino acids on testes weight **(Ex.3-4)**

Normal Lighting	Constant Darkness					
	Factor level ABC*	Estimated value(g)	Factor level ABC	Estimated value (g)	Factor level ABC	Estimated value (g)
The effects of amino acids were not observed.	111**	1.778	211	1.975	311	2.017
	112	1.899	212	2.097	**312**	**2.138** max.
	113	1.609	213	1.807	313	1.848
	121	1.575	221	1.773	321	1.814
	122	1.696	222	1.894	322	1.936
	123	**1.407** min.	223	1.604	323	1.646
	131	1.602	231	1.800	331	1.842
	132	1.723	232	1.921	332	1.963
	133	1.434	233	1.632	333	1.673

*: A; Met+Cys, B; Trp, C; Val
**: 1; Low level, 2; Normal level, 3; High level
max. ; maximum value, min. ; minimum value

Table 56 The estimated value of combinational effect of essential amino acids on epididymides weight (**Ex.3-1**)

Factor level ABD*	Estimated value (g)
111**	0.196
112	0.212
121	0.263
122	**0.278** max.
211	0.103
212	**0.084** min.
221	0.167
222	0.151

*: A; Lighting condition, B; Met+Cys, D; Ile
**: 1; Normal lighting or Not added,
2; Constant darkness or Added
max. ; maximum value, min. ; minimum value

Table 57 The estimated value of combinational effect of essential amino acids on epididymides weight (**Ex.3-2**)

Factor level ABDE*	Estimated value (g)	Factor level ABDE	Estimated value (g)
1111**	0.153	2111	0.083
1112	0.169	2112	0.099
1121	0.133	**2121**	**0.062** min.
1122	0.149	2122	0.078
1211	0.227	2211	0.103
1212	**0.243** max.	2212	0.120
1221	0.207	2221	0.083
1222	0.223	2222	0.099

*: A; Lighting condition, B; Cys, D; Trp, E;Thr
**: 1; Normal lighting or Not added, 2; Constant darkness or Added
max. ; maximum value, min. ; minimum value

Table 58 The estimted value of combinational effect of essential amino acids on epididymides weight **(Ex.3-3)**

Factor level ABCD*	Estimated value (mg)	Factor level ABCD	Estimated value (mg)
1111**	0.139	**2111**	**0.034** min.
1112	0.152	2112	0.082
1121	**0.210** max.	2121	0.075
1122	0.179	2122	0.078
1211	0.120	2211	0.056
1212	0.134	2212	0.104
1221	0.182	2221	0.097
1222	0.161	2222	0.100

*: A; Lighting condition, B; AIN, C; Met, D; Cys
**: 1; Normal lightng or AIN-76 or Not added,
2; Constant darkness or AIN-93G or Added
max. ; maximum value, min. ; minimum value

Table 59 The estimated value of combinational effect of essential amino acids on epididymides weight **(Ex.3-4)**

Normal lighting	Constant Darkness	
The effects of nutrition factors were not observed.	Factor level C*	Estimated value (mg)
	1**	0.222
	2	**0.238** max.
	3	**0.159** min.

*: C; Val
**: 1; Low level, 2; Normal level, 3; High level
max. ; maximum value, min. ; minimum value

Table 60 The estimted value of combinational effect of essential amino acids on serum testosterone **(Ex.3-1)**

Factor level ABCDE*	Estimated value (ng/ml)		Factor level ABCDE*	Estimated value (ng/ml)	
11111**	3.206		21111	0.001	
11112	4.937		**21112**	**0.001**	min.
11121	4.973		21121	0.175	
11122	6.703		21122	0.001	
11211	4.264		21211	0.880	
11212	5.994		21212	0.630	
11221	6.031		21221	1.233	
11222	**7.762**	max.	21222	0.984	
12111	0.468		22111	0.933	
12112	2.198		22112	0.684	
12121	2.235		22121	1.287	
12122	3.965		22122	1.037	
12211	0.001		22211	0.467	
12212	1.731		22212	0.217	
12221	1.768		22221	0.820	
12222	3.499		22222	0.571	

*: A; Lighting condition, B; Met+Cys, C; Trp, D; Ile, E; Arg
**: 1; Normal lighting or Not added, 2; Constant darkness or Added
max. ; maximum value, min. ; minimum value

Table 61 The estimated value of combinational effect of essential amino acids on serum testosterone **(Ex.3-2)**

Factor level A*	Estimated value (ng/ml)	
1**	**0.724**	max.
2	**0.284**	min.

*: A; Lighting condition
**: 1; Normal lighting , 2; Constant darkness
max. ; maximum value, min. ; minimum value

Table 62 The estimated value of combinational effect of essential amino acids on serum testosterone **(Ex.3-3)**

Factor level ABCDEM*	Estimated value (ng/ml)	Factor level ABCDEM	Estimated value (ng/ml)	Factor level ABCDEM	Estimated value (ng/ml)	Factor level ABCDEM	Estimated value (ng/ml)
111111**	1.415	121111	1.332	211111	0.001	221111	0.001
111112	1.832	121112	1.749	211112	0.384	221112	0.301
111121	1.041	121121	0.957	211121	0.001	**221121**	**0.001** min.
111122	1.458	121122	1.375	211122	0.010	221122	0.001
111211	1.919	121211	2.975	211211	0.471	221211	1.527
111212	2.337	121212	3.392	211212	0.889	221212	1.944
111221	1.545	121221	2.601	211221	0.097	221221	1.152
111222	1.962	121222	3.018	211222	0.514	221222	1.570
112111	2.053	122111	1.969	212111	0.605	222111	0.521
112112	2.470	122112	2.387	212112	1.022	222112	0.939
112121	1.678	122121	1.595	212121	0.230	222121	0.147
112122	2.096	122122	2.012	212122	0.648	222122	0.564
112211	2.557	122211	3.613	212211	1.109	222211	2.164
112212	2.974	**122212**	**4.030** max.	212212	1.526	222212	2.582
112221	2.183	122221	3.238	212221	0.735	222221	1.790
112222	2.600	122222	3.656	212222	1.152	222222	2.207

*: A; Lighting condition, B; AIN, C; Met, D; Cys, E; Arg, M; Lys
**: 1; Normal lightng or AIN-76 or Not added, 2; Constant darkness or AIN-93G or Added
max. ; maximum value, min. ; minimum value

Table 63 Effects of protein and vitamin on reproductive organ weight, serum testosterone level, body weight and total food intake

Result of analysis of variance (Three-Way ANOVA) **(Ex.4-1)**

Factors	Lighting[1] condition (A)	Protein (B)	Vitamin (C)	A x B	A x C	B x C	AxBxC
Testes (g)	＊＊ [2]	＊＊				＊	
(g/100gBW)		＊	＊			＊	
Epididymides (g)	＊＊	＊＊				＊	
(g/100gBW)	＊	＊				＊	
SeminalVesicles (mg)	＊＊	＊＊				＊	
(mg/100gBW)	＊＊					＊	
Prostate (mg)	＊＊	＊＊				＊＊	
(mg/100gBW)	＊＊				＊	＊＊	
Testosterone (ng/ml)	＊	＊＊					
Body Weight (g)	＊＊	＊＊					
Total Food Intake (g)	＊＊	＊＊		＊		＊＊	

1) Lighting Condition, Normal lighting or Constant darkness

2) ＊; $P<0.05$, ＊＊; $P<0.01$

Table 64 Effects of water- and fat-soluble vitamins on reproductive organ weight, serum testosterone level, body weight and total food intake
Result of analysis of variance (Three-Way ANOVA) **(Ex.4-2)**

	Lighting[1] condition (A)	WSV [2] (B)	FSV [3] (C)	A x B	A x C	B x C	A x B x C
Testes (g)	＊＊ [4]						＊
(g/100gBW)	＊＊						＊
Epididymides (g)	＊＊				＊		
(g/100gBW)	＊＊				＊		＊
SeminalVesicles (mg)	＊＊						
(mg/100gBW)	＊＊						
Prostate (mg)	＊＊			＊＊		＊	＊＊
(mg/100gBW)	＊＊	＊		＊＊		＊	＊＊
Testosterone (ng/ml)							
Body Weight (g)	＊＊						
Total Food Intake (g)	＊＊	＊					

1) Lighting condition, Normal lighting or Constant darkness
2) Water soluble vitamin
3) Fat soluble vitamin
4) ＊; $P<0.05$, ＊＊; $P<0.01$

Table 65 Effects of fat-soluble vitamins on reproductive organ weight, serum testosterone level body weight and total food intake
Result of anlysis of variance **(Ex.4-3)**

	Lighting[1] condition (A)	V.A (B)	V.D (C)	V.E (D)	V.K (E)	A x B	A xC	A x D	B x C	B x D	C x D
Testes (g)	＊＊ [2]			＊＊				＊＊	＊		
(g/100gBW)	＊＊			＊＊		＊		＊＊	＊		
Epididymides (g)	＊＊			＊＊				＊＊	＊		
(g/100gBW)	＊＊			＊＊		＊		＊＊	＊		
Seminal Vesicles (mg)	＊＊										
(mg/100gBW)	＊＊										
Prostate (mg)	＊＊										
(mg/100gBW)	＊＊										
Testosterone (ng/ml)	＊＊										
Body Weight (g)	＊＊			＊＊							
Total Food Intake (g)	＊＊										

1) Lighting Condition, Normal lighting or Constant darkness
2) ＊; $P<0.05$, ＊＊ ; $P<0.01$

Table 66 Effects of water-soluble vitamins on reproductive organ weight, serum testosterone level, body weight and total food intake
Result of analysis of variance **(Ex.4-4(1))**

	Lighting[1] condition (A)	Cho[2] (B)	NA[3] (C)	PaA[4] (D)	B_6[5] (E)	B_1[6] (F)	B_2[7] (G)	FA[8] (H)	A x B	A x C	A x D	A x E	A x F	A x G	A x H
Testes (g)	** [9]										*	*	*		
(g/100gBW)	**								*		*	*	*		
Epididymides (g)	**										*		*		
(g/100gBW)	**	*			*						*		*		
Seminal Vesicles (mg)	**							*			*				
(mg/100gBW)	**							*			*				
Prostate (mg)	**	*	*	*							*			*	
(mg/100gBW)	**	*	*	*	*				*		*	*		*	
Testosterone (ng/ml)															
Body Weight (g)	**	**	**	**	*	*	**	**	**	**	**	**		**	
Total Food Intake (g)	*	*													

1) Lighting Condition L; Normal lighting, D; Constant darkness
2) Choline, 3) Nicotic acid, 4) Panthotenic acid, 5) Vitamin B_6, 6) Vitamin B_1, 7) Vitamin B_2, 8) Folic acid
9) *; $P<0.05$, **; $P<0.01$

Table 67 Effects of water- and fat-soluble vitamins on reproductive organ weight, serum testosterone level, body weight and total food intake

Result of analysis of variance (Three-Way ANOVA) **(Ex.4-4(2))**

Factors	Lighting[1] condition (A)	Bio.[2] (B)	B_{12}[3] (C)	A x B	A x C	B x C	A x B x C
Testes (g)	＊＊[4]						
(g/100gBW)	＊＊				＊		
Epididymides (g)	＊＊						
(g/100gBW)	＊＊						
SeminalVesicles (mg)	＊＊						
(mg/100gBW)	＊＊						
Prostate (mg)	＊＊						
(mg/100gBW)	＊＊						
Testosterone (ng/ml)	＊＊						＊
Body Weight (g)	＊＊						
Total Food Intake (g)	＊＊			＊			

1) Lighting Condition L; Normal lighting, D; Constant darkness

2) D-Biotin

3) Vitamin B_{12}

4) ＊; $P<0.05$, ＊＊; $P<0.01$

Table 68 Results of dietary protein and vitamin levels on body weight and total food intake **(Ex.4-1)**

	Protein levels	Vitamin levels	Body Weight (g)	Total Food Intake (g)
Normal lighting	20%Casein	Low[1]	170.9± 7.2 *kl*[4]	296.7±11.2 e*g*
		Normal[2]	178.4± 8.9 Af*k*	306.7±13.5 f
		High[3]	180.3± 7.1 Bg*l*	322.2±21.0 A*g*
	9%Casein	Low	154.6± 7.2 C	338.4±16.5 Be
		Normal	156.9± 9.7 Df	333.5±23.1 Cf
		High	152.6± 7.3 Eg	323.0±12.5 D
Constant darkness	20%Casein	Low	162.0± 8.3 h	301.1±18.3
		Normal	162.0±11.1 Ai	299.4±13.2
		High	163.5±12.4 Bj	299.9±15.5 A
	9%Casein	Low	143.3± 4.5 Ch	319.0± 8.8 B*h*
		Normal	143.3± 9.5 Di	306.7±18.2 C
		High	138.1± 9.8 Ej	292.0±18.4 D*h*

1): Low level (x1/3.3), 2): Normal level, 3): High level (x3)
4): Having the same superscript letters within a column means significantly different to at least 95% probability.

Table 69 The population mean of combinational effect of water- and fat- soluble vitamins on body weight **(Ex.4-2)**

Factor level A*	Estimated value (g)
1**	**151.7** max.
2	**136.7** min.

*: A; Lighting condition
**: 1; Normal lighting, 2; Constant darkness
max.; maximum value, min.; minimum value

Table 70 The estimated value of combinational effect of fat-soluble vitamins on body weight **(Ex.4-3)**

Factor level AD*	Estimated value (g)
11**	160.6
12	**163.8** max.
21	**148.2** min.
22	151.4

*: A; Lighting condition, D; V.E
**: 1; Normal lighting or Normal level,
2; Constant darkness or High level (x3)
max.; maximum value, min.; minimum value

Table 71 The estimated value of combinational effect of water-soluble vitamins on body weight-1 **(Ex.4-4(1))**

Factor level FH*	Estimated value (g)
11**	143.7
12	**147.2** max.
21	**142.4** min.
22	145.9

*: F; V.B_1, H; FA
**: 1; Normal level, 2; High level(x6)
max.; maximum value, min.; minimum value

Table 72 The estimated value of combinational effect of water-soluble vitamins on body weight-2 **(Ex.4-4(1))**

Factor level ABCDEG*	Estimated value (g)	Factor level ABCDEG	Estimated value (g)	Factor level ABCDEG	Estimated value (g)	Factor level ABCDEG	Estimated value (g)
111111**	161.8	121111	151.5	211111	139.5	221111	133.4
111112	155.1	121112	144.9	211112	138.0	221112	131.9
111121	163.1	121121	152.8	211121	137.0	221121	131.0
111122	156.4	121122	146.2	211122	135.5	**221122**	**129.4** min.
111211	162.4	121211	152.2	211211	144.6	221211	138.6
111212	155.8	121212	145.6	211212	143.1	221212	137.0
111221	**163.7** max.	121221	153.5	211221	142.1	221221	136.1
111222	157.1	121222	146.9	211222	140.6	221222	134.5
112111	157.6	122111	147.4	212111	140.1	222111	134.1
112112	151.0	122112	140.8	212112	138.6	222112	132.5
112121	158.9	122121	148.7	212121	137.7	222121	131.6
112122	152.3	122122	142.1	212122	136.1	222122	130.0
112211	158.3	122211	148.1	212211	145.2	222211	139.2
112212	151.7	122212	141.4	212212	143.7	222212	137.6
112221	159.6	122221	149.4	212221	142.7	222221	136.7

*: A; Lighting condition, B; Cho. C; NA, D; PaA, E; V.B_6, G; V.B_2
**: 1; Normal lighting or Normal level,
2; Constant darkness or High level(x6)
max.; maximum value, min.; minimum value

Table 73 The population mean of combinational effect of water-soluble vitamins on body weight (**Ex.4-4(2)**)

Factor level A*	Estimated value (g)
1**	**153.6** max.
2	**135.3** min.

*: A;Lighting condition
**: 1; Normal lighting , 2; Constant darkness
max. ; maximum value, min. ; minimum value

Table 74 The population mean of combinational effect of water- and fat- soluble vitamins on total food intake (**Ex.4-2**)

Factor level AB*	Estimated value (g)	Factor level AB*	Estimated value (g)
11**	**320.0** max.	21	297.4
12	315.5	22	292.9
13	302.2	**23**	**279.6** min.

*: A; Lighting condition B; Water-soluble vitamins
**: 1; Normal lighting, 2; Constant darkness
max. ; maximum value, min. ; minimum value

Table 75 The estimated value of combinational effect of fat-soluble vitamins on total food intake (**Ex.4-3**)

Factor level A*	Estimated value (g)
1**	**340.6** max.
2	**315.6** min.

*: A; Lighting condition,
**: 1; Normal lighting
2; Constant darkness
max.; maximum value, min. ; minimum value

Table 76 The estimated value of combinational effect of water-soluble vitamins on total food intake **(Ex.4-4(1))**

Factor level AB*	Estimated value (g)
11**	**331.8** max.
12	313.2
21	305.1
22	**286.7** min.

*: A; Lighting condition, B; Cho.
**: 1; Normal lighting or Normal level
2; Constant darkness or High level (x6)
max. ; maximum value, min. ; minimum value

Table 77 The population mean of combinational effect of water-soluble vitamins on total food intake **(Ex.4-4(2))**

Factor level AB*	Estimated value (g)
11**	321.0
12	**338.1** max.
21	303.9
22	**294.8** min.

*: A;Lighting condition, B; Bio.
**: 1; Normal lighting or Normal level
2; Constant darkness or High level (x6)
max. ; maximum value, min. ; minimum value

Table 78 Results of dietary protein and vitamin levels on reproductive organ weight and serum testosterone concentration **(Ex.4-1)**

	Pro.	Vit.	Testes Wt (g)	Testes Wt (g/100gBW)	Epididymides Wt (mg)	Epididymides Wt (mg/100gBW)	SeminalVesicle Wt (mg)	SeminalVesicle Wt (mg/100gBW)	Prostate Wt (mg)	Prostate Wt (mg/100gBW)	Testosterone (ng/ml)
N [1]	20 [3]	L [5]	2.11±0.30	1.23±0.14	217±49*d*	127±25	100±30A*i*	58±16	88±17A*j*	51±8J*f*	2.700±1.984a*b*
		N [6]	2.32±0.12	1.30±0.03	265±53	148±26	129±20B	72±8 A	92±16B*k*	51±7*g*	2.051±0.708
		H [7]	2.30±0.20c [8]	1.27±0.07	283±55b*d*	156±27b	130±23Cg*i*	72±11B	111±15Cg*jk*	62±7A*fg*	1.567±1.179*b*
	9 [4]	L	2.00±0.24	1.29±0.13	221±57	142±34	107±23D	69±14C	88± 9D	57±6B	1.127±1.116a
		N	2.04±0.26A	1.30±0.11	221±55	140±28	119±28E	75±14D	92±12E	59±5C	1.590±1.010
		H	1.82±0.18Bc	1.19±0.08A	184±28Ab	120±14Ab	95±21Fg	62±12E	89±13Fg	58±7D	1.189±1.142
D [2]	20	L	2.03±0.36	1.25±0.20	233±71	143±41	69±30A	42±19	63±8A	39±4Je	1.625±0.169
		N	2.09±0.40d	1.29±0.26	203±74	124±39	67±34B	41±18A	72±17Bh	44±8	1.557±0.451
		H	2.08±0.43e	1.27±0.20b	226±79c	137±42c	75±35Ch	45±20Bf	71±18Ci	43±9A	1.543±0.561
	9	L	1.81±0.28*f*	1.27±0.19c	192±42*e*	134±29*d*	63±21D	44±14C	69±10D*l*	49±7Be*hi*	0.857±0.742a
		N	1.70±0.18Ad*g*	1.19±0.09*d*	163±30	113±18	42±10E	29±6 D*g*	55±5 Eh	38±3C*h*	0.860±0.486
		H	1.27±0.31Be*fg*	0.91±0.17Ab*cd*	119±27Ac*e*	85±15Ac*d*	34±15Fh	24±9 Ef*g*	51±8 Fi*l*	37±4D*i*	0.885±0.201

(Mean ± SD)

1):Normal Lighting 2):Constant Darkness
3):20%Casein Diet 4):9%Casein Diet
5):Low vitamin level 6):Normal vitamin level 7):High vitamin level
8):Having the same superscript letters within a column means significantly different to at least 95% probability.

Table 79 The population mean of combinational effect of water- and fat- soluble vitamins on testes weight **(Ex.4-2)**

Factor level ABC*	Estimated value (g)	Factor level ABC	Estimated value (g)
111**	2.046	211	1.064
112	1.631	212	1.426
113	2.044	213	0.953
121	1.849	221	1.283
122	**2.310** max.	**222**	**0.827** min.
123	2.015	223	1.125
131	1.661	231	1.683
132	1.952	232	1.385
133	1.789	233	1.046

*: A; Lighting cndiion, B; Water-soluble vitamin, C; Fat-soluble vitamin
**: 1; Normal lighting or Low level (x1/3.3),
2; Constant darkness or Normal level,
3; High level (x3)
max. ; maximum value, min. ; minimum value

Table 80 The estimated value of combinational effect of fat-soluble vitamins on testes weight **(Ex.4-3)**

Factor level ABCD*	Estimated value (g)	Factor level ABCD	Estimated value (g)
1111**	2.168	2111	1.533
1112	**2.213** max.	2112	1.868
1121	2.005	**2121**	**1.370** min.
1122	2.050	2122	1.705
1211	2.029	2211	1.394
1212	2.074	2212	1.729
1221	2.058	2221	1.423
1222	2.103	2222	1.758

*: A; Lighting condition, B; V.A, C; V.D, D; V.E
**: 1; Normal lighting or Normal level,
2; Constant darkness or High level (x3)
max. ; maximum value, min. ; minimum value

Table 81 The estimated value of combinational effect of water-soluble vitamins on testes weight **(Ex.4-4(1))**

Factor level ADEF*	Estimated value (g)	Factor level ADEF	Estimated value (g)
1111**	2.099	2111	1.315
1112	2.177	2112	1.121
1121	2.122	2121	1.102
1122	**2.200** max.	**2122**	**0.907** min.
1211	2.046	2211	1.547
1212	2.123	2212	1.353
1221	2.069	2221	1.334
1222	2.146	2222	1.140

*: A; Lighting condition, D; Panthotenic acid, E; V.B_6, F; V.B_1
**: 1; Normal lighting or Normal level,
2; Constant darkness or High level (x6)
max. ; maximum value, min. ; minimum value

Table 82 The population mean of combinational effect of water-soluble vitamins on testes weight **(Ex.4-4(2))**

Factor level A*	Estimated value (g)
1**	**1.903** max.
2	**0.948** min.

*: A;Lighting condition
**: 1; Normal lighting or Normal level,
2; Constant darkness or High level (x6)
max. ; maximum value, min. ; minimum value

Table 83 The population mean of combinational effect of water- and fat- soluble vitamins on epididymides weight **(Ex.4-2)**

Factor level AC*	Estimated value (mg)	Factor level AC	Estimated value (mg)
11**	0.204	21	0.138
12	0.216	22	0.122
13	**0.233** max.	**23**	**0.093** min.

*: A; Lighting condition, C; Fat-soluble vitamin
**: 1; Normal lighting or Low level (x1/3.3),
2; Constant darkness or Normal level,
3; High level (x3)
max. ; maximum value, min. ; minimum value

Table 84 The estimated value of combinational effect of fat-soluble vitamins on epididymides weight **(Ex.4-3)**

Factor level ABCD*	Estimated value (g)	Factor level ABCD	Estimated value (g)
1111**	**0.268** max.	2111	0.152
1112	0.257	2112	0.218
1121	0.235	**2121**	**0.118** min.
1122	0.224	2122	0.185
1211	0.246	2211	0.130
1212	0.235	2212	0.196
1221	0.255	2221	0.138
1222	0.244	2222	0.205

*: A; lighting condition, B; V.A, C; V.D, D; V.E
**: 1; Normal lighting or Normal level,
2; Constant darkness or High level (x3)
max.; maximum value, min.; minimum value

Table 85 The estimated value of combinational effect of water-soluble vitamins on epididymides weight **(Ex.4-4 (1))**

Factor level ADF*	Estimated value (mg)	Factor level ADF	Estimated value (mg)
111**	0.263	211	0.126
112	**0.282** max.	**212**	**0.106** min.
121	0.240	221	0.155
122	0.259	222	0.135

*: A; Lighting condition, D; PaA, F; $V.B_1$
**: 1; Normal lighting or Normal level,
2; Constant darkness or High level (x6)
max.; maximum value, min.; minimum value

Table 86 The population mean of combinational effect of water-soluble vitamins on epididymides weight **(Ex.4-4 (2))**

Factor level A*	Estimated value (g)
1**	**0.237** max.
2	**0.106** min.

*: A;Lighting condition
**: 1; Normal lighting , 2; Constant darkness
max.; maximum value, min.; minimum value

Table 87 The estimated value of combinational effect of fat-soluble vitamins on serum testosterone (**Ex.4-3**)

Factor level A*	Estimated value (ng/ml)
1**	**1.603** max.
2	**0.943** min.

*: A; Lighting condition
**: 1; Normal lighting, 2; Constant darkness
max. ; maximum value, min. ; minimum value

Table 88 The population mean of combinational effect of water-soluble vitamins on serum testosterone (**Ex.4-4(2)**)

Factor level ABC*	Estimated value (ng/ml)	Factor level ABC	Estimated value (ng/ml)
111**	1.305	211	0.844
112	**1.729** max.	212	0.510
121	1.580	**221**	**0.361** min.
122	1.246	222	0.785

*: A; Lighting condition, B; D-Biotin, C; Vitamin B_{12}
**: 1; Normal lighting or Normal level,
2; Constant darkness or High level (x6)
max. ; maximum value, min. ; minimum value

第３章　生活リズム攪乱モデル実験系における成長期雄ラットの下垂体ゴナドトロピン、テストステロンおよびその前駆体ステロイドの血清濃度におよぼす飼料タンパク質量の影響

１．研究方法

本研究では、生活リズム攪乱モデル実験系である連続暗黒飼育成長期雄ラットの血清テストステロン、デヒドロテストステロン(DHT)、黄体化ホルモン(LH)および卵胞刺激ホルモン(FSH)濃度と生殖器官発達に対する飼料タンパク質量の影響を検討した。生殖器官発達の指標として精巣の病理組織学的解析、および精子成熟度の判定を行った。また、連続暗黒飼育による血清テストステロン濃度の低下がテストステロン合成系のどの段階によるものであるかを明らかにするため、テストステロン合成系にある前駆ステロイド血清濃度についても検討した。実験は以下に示すように二度に分けて実施した。

実験 1：血清テストステロン、デヒドロテストステロン、LH および FSH 濃度および精子成熟度への影響

実験 2：血清テストステロンおよびテストステロン合成系にある前駆体ステロイド量への影響

飼料タンパク質の影響に関しても検討するため、飼料組成は標準タンパク質と低タンパク質、または、低タンパク質と低タンパク質にメチオニンを添加する飼料を設けた。詳細は飼料組成の項に記す。

１）実験動物および飼育環境

第２章１．(1)および(2)の項と同様とし、1 週間の予備飼育期間には

AIN-93G 飼料を給与した。予備飼育終了後、各群の平均体重が等しくなるよう1群6匹の4群に群分けし、4週間飼育した。

2）飼料組成

(1) 実験 1：血清テストステロン、デヒドロテストステロン、LH および FSH 濃度および精子成熟度への影響

実験 1 の飼料組成を Table1 に示した。飼料は 9%カゼインレベルの低タンパク質食(9%Casein 食と表記)とメチオニン添加食(+Met 食と表記)の 2 種とした。メチオニンは 9%Casein 食に 0.3%添加した。他の組成は AIN-93G 飼料に準じた。

(2) 実験 2：血清テストステロンおよびテストステロン合成系にある前駆体ステロイド量への影響

実験 2 の飼料組成を Table2 に示した。本実験の飼料組成は、江指らが初期に実施した連続暗黒飼育実験[20)25)]において、顕著な生殖器官発達抑制が認められた時と同様のものを使用した。すなわち、飼料は 9%カゼインレベルの低タンパク質食(9%Casein 食と表記)と 18%カゼインレベルの標準タンパク質食(18%Casein 食と表記)の 2 種とし、ミネラル混合はハーパー塩(オリエンタル酵母(株)製)、ビタミン混合はパンビタン(武田製薬 (株)製)を用いた。

3）分析方法

4 週間飼育後、断頭屠殺して血液を採取すると共に、内生殖器官(精巣、精巣上体、精嚢および前立腺)を摘出し、その重量を測定した。採取した血液は直ちに遠心分離(3,000rpm、15 分間、4 ℃)して血清を得、

分析時まで-20℃で保存した。

実験 1 では血清中のテストステロン、DHT、LH および FSH 濃度の測定、精巣の病理組織学的解析、精子成熟度の測定を行った。

実験 2 では血清中のテストステロン、アンドロステンジオン、プロゲステロン、LH および FSH 濃度の測定を行った。

(1) 血清ホルモンの測定

血清中のテストステロン、DHT、LH および FSH 濃度は Radioimmunoassay Kit を用い測定した。テストステロン測定キットはシーアイエスダイアグノステック(株)製、DHT 測定キットは Diagnostic Systems Laboratories(株)製、LH および FSH 測定キットは Amersham Life Science(株)製を使用した。アンドロステンジオンおよびプロゲステロンは Neogen(株)製の Enzyme immunoassay Kit を使用した。

(2) 精巣の病理組織学的解析および精子成熟度の判定

生殖器官は重量を測定し、精巣はブアン固定した。ブアン固定後、中央部の横断面からパラフィン切片を作成して H&E 染色および PAS 染色を施した。作成した精巣の組織標本を光学顕微鏡で観察し、病理組織学的解析および精子の成熟度を 14 ステージ、19 ステップに分けて判定した[73]。

4) 統計処理

結果の解析は明暗飼育条件および飼料の種類を因子とし、分散分析後、Fischer の多重比較検定を行った。有意水準 5%で検定した。

２．研究結果

１）実験 1：血清テストステロン、デヒドロテストステロン、LH および FSH 濃度および精子成熟度への影響

(1) 体重および生殖器官重量

Table3 に体重および生殖器官重量を示した。

体重は 9%Casein 食群が+Met 食群に比較し明らかに低値を示したが、明暗飼育条件による差は認められなかった。精巣重量(g)は 9%Casein 食のみ明暗飼育条件による差が認められ、連続暗黒飼育(D 群)は正常明暗飼育(N 群)に比較し明らかに低値を示した。また、D 群では 9%Casein 食群は、+Met 食群に比較し明らかに低値を示したが、N 群では 9%Casein 食群と+Met 食群間に有意差は認められなかった。

精巣上体重量(g)も、精巣重量と同様の結果であった。精嚢重量(mg)は 9%Casein 食群および+Met 食群共に明暗飼育条件による差が認められ、飼料による差は認められなかった。前立腺重量(mg)は 9%Casein 食群および+Met 食群共に明暗飼育条件による差が認められた。また、D 群のみ、9%Casein 食群が+Met 食群に比較し明らかに低値を示した。

(2) 血清ホルモン濃度

Table4 に血清中のテストステロン、DHT、LH および FSH 濃度を示した。血清テストステロンおよび DHT 濃度は 9%Casein 食群のみ明暗飼育条件の差が認められ、D 群は N 群に比較し明らかに低値を示した。また、D 群では 9%Casein 食群は+Met 食群に比較し明らかに低値を示したが、N 群では 9%Casein 食群と+Met 食群間に有意差は認められなかった。これは精巣重量、精巣上体重量と同様の結果であった。

血清 LH、FSH 濃度はテストステロン、DHT 濃度とは異なり、9%Casein

食群、+Met 食群共に明暗飼育条件の影響は認められなかった。また、D 群、N 群共に、9%Casein 食群と+Met 食群間に有意差は認められなかった。

(3) 精巣の病理組織学的解析および精子成熟度

Photo.1 ～ 8 に精巣の組織像、Fig.1 に精巣の精子成熟度を示した。

D 群では 9%Casein 食群の 6 例中 1 例のみ正常な精子形成がみられた。6 例中 3 例の精巣の精子細胞は step9(stage Ⅸ)以降で少なく、step15(stage Ⅰ)以降では認められなかった。残り 1 例の精巣の精子細胞は step15(stage Ⅰ)以降で少なく、step18(stage Ⅵ)以降では認められなかった(Photo.5、Photo.6)。一方、+Met 食群では 6 例中 4 例において正常な精子形成が認められた。1 例の精巣の精子細胞は step15(stage Ⅰ)以降で少なく、残り 1 例では step18(stage Ⅵ)以降で少なかった(Photo.7、Photo.8)(Fig.1)。9%Casein 食、+Met 食いずれも精巣の精粗細胞、精母細胞、セルトリ細胞(Sertori 細胞)およびライディヒ細胞(Leydig 細胞)に形態上の変化はみられなかった。

D 群の+Met 食群は 9%Casein 食群に比較し明らかに精子成熟度が高まっていた。また、精子成熟段階は精巣重量とほぼ一致していた。

N 群では 9%Casein 食群の 6 例中 5 例で正常な精子形成が認められ、残り 1 例のみ、精巣の精子細胞は step18(stage Ⅵ)以降で少なかった(Photo.1、Photo.2)。一方、+Met 食群では 6 例中 4 例において正常な精子形成が認められ、1 例の精巣では精子細胞は step15(stage Ⅰ)以降で少なく、step18(stage Ⅵ)以降では認められなかった。その他の 1 例では精子細胞は step18(Ⅵ)以降で少なかった(Photo.3、Photo.4)(Fig.1)。9%Casein 食群、+Met 食群いずれの精巣も精粗細胞、精母細胞、Sertori 細胞および

Leydig 細胞に形態上の変化はみられなかった。

2）実験２：血清テストステロンおよびテストステロン合成 系にある前駆体ステロイド量への影響

(1) 終体重および生殖器官重量

Table5 に終体重および生殖器官重量を示した。

体重は 9%Casein 食群、18%Casein 食群共に明暗飼育条件の影響が認められ、D 群は N 群に比較し明らかに低値を示した。また、D 群、N 群共に、9%Casein 食群は 18%Casein 食群に比較し明らかに低値を示した。精巣重量(g)も体重と同様の結果であった。体重 100g あたりの精巣重量では明暗飼育条件の影響のみが認められ、飼料の影響は認められなかった。

精巣上体重量(g)は 9%Casein 食群、18%Casein 食群共に明暗飼育条件の影響が認められ、D 群は N 群に比較し明らかに低値を示した。また、N 群においてのみ 9%Casein 食群が 18%Casein 食群に比較し明らかに低値を示した。精嚢重量(mg)は 18%Casein 食群のみ明暗飼育条件による差が認められ、D 群は N 群に比較し明らかに低値を示した。D 群、N 群共に 9%Casein 食群が 18%Casein 食群に比較し明らかに低値を示した。前立腺重量(mg)は 9%Casein 食群、18%Casein 食群共に明暗飼育条件の影響が認められ、D 群は N 群に比較し明らかに低値を示した。また、D 群、N 群共に、9%Casein 群食は 18%Casein 食群に比較し明らかに低値を示した。

(2) 血清ホルモン濃度

Table6 に血清中のテストステロン、アンドロステンジオン、プロゲステロン、LH および FSH 濃度を示した。

血清テストステロン濃度は 9%Casein 食群のみ明暗飼育条件の差が認

められ、D 群は N 群に比較し明らかに低値を示した。また、D 群では、9%Casein 食群は 18%Casein 食群に比較し明らかに低値を示したが、N 群では、9%Casein 食群と 18%Casein.食群間に有意差は認められなかった。

テストステロンの前駆体であるアンドロステンジオンの血清濃度は、18%Casein 食群のみ明暗飼育条件の差が認められた。また、D 群では、9%Casein 食群は 18%Casein 食群に比較し明らかに低値を示したが、N 群では 9%Casein 食群と 18%Casein.食群間に有意差は認められず、テストステロンと同様の結果であった。

一方、アンドロステンジオンの前駆体に位置するプロゲステロンの血清濃度には、9%Casein 食群、18%Casein 食群共に明暗飼育条件の影響は認められなかった。また、D 群、N 群共に 9%Casein 食群と 18%Casein 食群間に有意差は認められず、テストステロン、アンドロステジオンとは異なる結果であった。

血清 LH および FSH 濃度は 9%Casein 食群、18%Casein 食群共に明暗飼育条件の影響は認められなかった。また、D 群、N 群共に 9%Casein 食群と 18%Casein 食群間に有意差は認められなかった。

３．考察

実験１において、D 群では Met の添加効果が生殖器官重量に対して認められ、第２章で記述した結果を支持した。すなわち、D 群に Met 添加食を給与することにより、その精巣および精巣上体重量は N 群と差が認められないまでに増加した。一方、D 群の精嚢および前立腺重量は Met 添加食給与により 9%Casein 食群より高値を示したものの、正常明暗飼育・Met 添加食群までには増加しなかった。このことは、精嚢および前立腺は連続暗黒飼育による発達抑制が顕著であり、摂取栄養素による改善を受けにくいことを示していると考えられる。また、精嚢および前立腺の発達に必要なテストステロン量は精巣の４倍量であるという報告[74]もあることから、連続暗黒飼育・Met 添加食群のテストステロン分泌量が精巣発達のためには十分量であったが、精嚢、前立腺発達には不十分であった可能性も考えられる。あるいは、連続暗黒飼育・Met 添加食群の精嚢および前立腺におけるテストステロンの機能発現が阻害されている可能性も考えられる。

一方、実験２において、D 群の 18%Casein 食群は 9%Casein 食群に比較して生殖器官重量は高値を示したが、N 群の 18%Casein 食群および 9%Casein 食群のレベルにそれらの重量は到達しなかった。この実験で用いた飼料組成は、江指らが初期の実験で用いていた飼料組成[20)25)]であり AIN-飼料組成とは大きく異なっている。AIN-飼料組成に比較して含まれているビタミンやミネラルの種類が少なく、含有量も少ないものが多い。例えば、本論文第２章において、D 群では精巣発達のために V.E 必要量が増加したことを報告している。しかし、本実験２で用いた飼料の V.E 含有量は AIN-93G 飼料の 1/250 量となっている。また、PaA に関しても同様である。それゆえ、D 群に 18%Casein 食を給与しても、N 群の 9%Casein

食群より生殖器官の発達が悪かったと考えられる。また、この結果は第２章で記述した結果を支持しているとも言える。

周知のようにテストステロンと LH および FSH(GnRH)は密接な関係があり、下垂体前葉から分泌される LH は精巣 Leydig 細胞に作用して、コレステロールからプログネロンの律速段階を制御している。そして、LH 分泌はテストステロンの負フィードバック機構によって制御されている。一方、FSH は精巣の Sertori 細胞の機能を促し、テストステロンと共に精子形成機能を維持している[40)75)]。さらに FSH の機能は Leydig 細胞の LH 受容体数を増加させることも報告されている[76)77)]。また、GnH の分泌は視床下部の GnRH により支配されている。そして、視床下部の視交叉上核(SCN)にはサーカディアンリズムを調整する時計遺伝子が存在し、目から入る光情報は直接、視神経繊維から SCN に入力され、時計遺伝子に影響を与えていることなどが知られている[78 ~ 80)]。

本研究では、血清 LH および FSH 濃度に飼料の影響および明暗飼育条件の影響は認められなかった(実験 1、実験 2)。Herbert の研究[81)]では、低タンパク質食(8%タンパク質)給与により、ラットの血清テストステロン、LH および FSH 濃度はコントロール食(27%タンパク食)に比較し低下すると報告されている。本研究では、9%Casein 食群と Met 添加食群(実験 1)、または 9%Casein 食群と 18%Casein 食群(実験 2)を比較した場合、LH および FSH 濃度の差は認められず、既存の報告とは異なる結果であった。これは、本研究で用いたラットが比較的小型な Fischer 系であるのに対し、Herbert が用いたラットは SD 系で体重増加が急激であること、それに加え飼料タンパク質のレベルを 8%と 27%にして比較したためではないかと考えられる。

また、連続暗黒飼育・ 9%Casein 食群の血清テストステロン濃度が低値

を示すにも関わらず、LH および FSH 濃度は他の群と差が認められなかったという事実は、テストステロンと GnRH 間にある負フィードバック効果が抑制されている可能性が考えられる。テストステロンの負フィードバックに対する感受性は明暗飼育条件の影響を受けないという報告[82]があるが、本実験の場合、連続暗黒飼育かつ低タンパク質食給与という２つの条件が同時に存在したために、フィードバック感受性が低下したのではないかと推察される。

テストステロンの還元型である DHT は標的細胞内における作用型アンドロゲンといわれ、アンドロゲン活性はテストステロンの２倍とされている。そして DHT の存在により標的器官におけるテストステロン作用も強まるとされている[40]。連続暗黒飼育・ 9%Casein 食群の生殖器官の発達抑制は、テストステロン濃度の低下のみならず、テストステロンから DHT への変換率が変化している可能性も考えられた。それゆえ血清 DHT の測定を行ったが、血清 DHT 濃度は、血清テストステロン濃度と同様、連続暗黒飼育・ 9%Casein 食群で低値を示し、その値の低下程度もテストステロン濃度の低下程度と同程度であった。このことより、標的器官におけるテストステロンから DHT への変換は阻害されていないと考えられる。

精巣の組織学的解析結果から、連続暗黒飼育・ 9%Casein 食群では明らかに精子成熟度に遅れが認められたが、連続暗黒飼育・ Met 添加食群では N 群のものと同程度までに精子成熟度は進んでいた。また、精子成熟度の程度と精巣重量は同様の傾向が認められ、精子成熟度が遅れているものは精巣重量も低値であり、精子成熟度が進んでいるものは精巣重量も高値を示した。このことは、本実験のように成長期にあるラットの精巣発達の評価を精巣の絶対重量で行うことが可能であることを示して

いる。

また、連続暗黒飼育・9%Casein 食群は精子成熟度に大きな遅れはあるものの、精祖細胞、精母細胞、Leydig 細胞および Sertori 細胞に形態学的な異常が認められないことが明らかとなった。すなわち、連続暗黒・9%Casein 食群の精巣では精巣の内部組織に異常はなく、精子成熟度の遅れとなる精巣の細胞分裂そのものが低下していることが示された。このことは江指の報告[20]を支持するものであった。

これらのことから、テストステロン生合成の低下が連続暗黒飼育・9%Casein 食群に顕著に認められる精巣の発達抑制の大きな要因の一つであることが示された。それゆえ、実験 2 において、テストステロン生合成の前駆段階にあるホルモンを測定したところ、プロゲステロンからアンドロステンジオンへの変換が阻害されていることが明らかとなった。この変換に関与している酵素は、17 α-ヒドロキシラーゼと 17,20-リアーゼである。したがって、連続暗黒飼育下において 9%Casein 食のような低タンパク質食を給与することにより、これらの酵素活性が低下するためにテストステロンの生合成が低下したのではないかと推察された。テストステロン生合成に関与する酵素に悪影響を与える物質に関しては、すでにいくつかの報告[83 ~ 85]がなされている。例えば、内分泌攪乱物質(環境ホルモン)とされている PCB の一種、A1248 は 3 β-ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼ(HSD)、17 α-ヒドロキシラーゼ、17,20-リアーゼおよび 17 β-HSD の活性を低下させテストステロンの合成を阻害するとの報告[83]、合成ステロイドの R1881 は 3 β-HSD、17 α-ヒドロキシラーゼ、17,20-リアーゼの活性は低下させるが、17 β-HSD には影響を与えないとの報告[84]などである。また、Orr ら[86]は、ラットに 3 時間の拘束ストレスを与えると血漿テストステロン濃度が低下するが、これ

には 17,20-リアーゼ活性の低下が関与しているのではないかと推察している。本研究においても 17 α-ヒドロキシラーゼおよび 17,20-リアーゼ(CYP17)活性の低下が推察されることから、これらは連続暗黒飼育および低タンパク質食給与に対しても感受性が高い酵素であると考えられる。この酵素は NADPH を補酵素とする電子伝達系を介して酸素を取り込みプロゲステロンからアンドロステンジオン生合成を行っている。NADPH からの電子伝達にはフラビン酵素の一つである NADPH-シトクロム P450-レダクターゼの共存が必要とされている [87]。それゆえ、プロゲステロンからアンドロステンジオンの変換には、NADPH の構成成分であるナイアシン、NADPH-シトクロム P450-レダクターゼの構成成分であるリボフラビン、そしてシトクロム P450 依存の電子伝達に関わる鉄も栄養素として必要である。飼料中の鉄に関しては本研究では検討しておらず、第２章の研究結果では血清テストステロン濃度に飼料中ナイアシンやリボフラビンの影響は認められなかった。連続暗黒飼育・低タンパク質食給与により、CYP17 の活性が低下しているか否かに関しては本研究結果では明らかにすることはできないが、今後この酵素活性に関与する電子伝達系に対する栄養学的な視点からの研究が必要である。

本研究により、連続暗黒飼育という生活リズム攪乱および 9%Casein 食による生殖器官の発達抑制はテストステロンの生合成の低下に依ること、そしてその低下はプロゲステロンからアンドロステンジオンへの変換阻害に依ることが示された。それゆえ、この変換に関与する酵素 17 α-ヒドロキシラーゼおよび 17,20-リアーゼ活性が低下していることが推察される。また、テストステロンから DHT への変換、および下垂体ホルモンである LH、FSH には影響を与えないことが明らかになった。

Table 1 Composition of diets **(Ex.1)**

(g/100gDiet)

	9%Casein	+Met.
Methionine	–	0.3
Casein	9	9
α-Corn Starch	64.2	63.9
Sucrose	10	10
Soybean oil	7	7
Fiber	5	5
Mineral Mixture1)	3.5	3.5
Vitamin Mixture2)	1	1
Choline bitartrate	0.25	0.25
Tert-butylhydroquinone	0.0014	0.0014

1) AIN-93G mineral mixture
2) AIN-93 vitamin mixture

Table 2 Composition of diets **(Ex.2)**

(g/100gDiet)

	9%casein	18%Casein
Casein	9	18
α-Corn Starch	81	72
Soybean oil	5	5
Mineral Mixture1)	4	4
Vitamin Mixture2)	1	1

1) Hapar mineral mixture
2) Panvitan : Choline·HCl: Dextrin=20:10:70

Table 3 Body weight and sex organ weight **(Ex.1)**

	Normal Lighting		Constant Darkness	
	9%Casein	+Met.	9%Casein	+ Met.
	118.3±4.7a	154.2±11.0a	118.1±6.8b	147.5±5.1b
Body Weight (g)	1.81±0.24a	1.89±0.31	0.94±0.42ab	1.65±0.39b
Testes (g)	1.53±0.22ab	1.22±0.13b	0.80±0.38ac	1.11±0.23c
(g/100gBW)	0.218±0.063a	0.215±0.059	0.093±0.042ab	0.175±0.056b
Epididymides (g)	0.185±0.058a	0.138±0.029	0.079±0.038a	0.117±0.034
(g/100gBW)	85.7±30.2a	133.4±69.1b	20.5±5.7a	58.4±29.7b
Seminal Vesicles (mg)	72.9±27.4a	84.8±39.0b	17.3±4.7a	39.1±19.0b
(mg/100gBW)	85.8±16.8a	96.7±30.4b	41.3±9.0ac	72.5±15.1bc
Prostate (mg)	72.6±14.4a	62.0±15.6	35.0±7.3a	48.9±8.9
(mg/100gBW)				

*Having the same letters within each horizontal row means significantly different to at least 95% probability.
*Each value is the Mean ± SD

Table 4
Serum testosterone, dihydrotestosterone, leuteinizing hormone and follice stimulating hormone concentration **(Ex.1)**

	Normal Lighting		Constant Darkness	
	9%Casein	+ Met.	9%Casein	+ Met.
Testosterone (ng/ml)	2.437±0.646a	2.018±0.887	0.487±0.400ab	1.820±1.294b
DHT (pg/ml)	96.7±44.4a	114.1±33.2	25.5±6.6ab	82.5±40.8b
LH (ng/ml)	1.840±0.239	1.698±0.297	2.108±0.569	2.047±0.474
FSH (ng/ml)	7.007±0.779	7.749±1.591	7.240±0.861	8.090±1.404

*Having the same letters within each horizontal row means significantly different to at least 95% probability.
*Each value is the Mean ± SD

Table 5 Body weight and sex organ weight **(Ex.2)**

	Normal Lighting		Constant Darkness	
	9%Casein	18%Casein	9%Casein	18%Casein
Body Weight (g)	119.2±7.4ac	156.4±6.4bc	109.2±7.6ad	135.8±7.9bd
Testes (g)	1.66±0.23ac	2.12±0.11bc	0.84±0.36ad	1.19±0.29bd
(g/100gBW)	1.39±0.18a	1.36±0.07b	0.77±0.33a	0.87±0.17b
Epididymides (g)	0.163±0.027ac	0.228±0.030ab	0.081±0.033c	0.117±0.025b
(g/100gBW)	0.136±0.020a	0.146±0.018b	0.074±0.031a	0.085±0.014b
Seminal Vesicles (mg)	56.5±24.3a	135.5±50.1ab	19.7±7.6c	27.4±7.8bc
(mg/100gBW)	47.3±20.3ac	86.6±32.3bc	18.0±7.3a	20.0±4.8b
Prostate (mg)	56.3±11.2ac	99.2±16.4bc	28.7±7.8ad	51.2±14.4bd
(mg/100gBW)	47.0±7.1ac	63.2±8.9bc	26.2±7.0ad	37.4±8.9bd

*Having the same letters within each horizontal row means significantly different to at least 95% probability.
*Each value is the Mean ± SD

Table 6 Serum sex hormone and pituitary hormone **(Ex.2)**

	Normal Lighting		Constant Darkness	
	9%Casein	18%Casein	9%Casein	18%Casein
Testosterone (ng/ml)	1.001±0.792a	0.933±0.119	0.171±0.232ab	1.077±0.766b
Androstenedione (ng/ml)	1.222±0.515	1.133±0.264b	0.673±0.354a	2.055±1.362ab
Progesterone (ng/ml)	0.834±0.263	0.967±0.198	1.053±0.594	1.712±1.339
LH (ng/ml)	1.712±0.169	2.037±0.563	1.943±0.531	1.811±0.227
FSH (ng/ml)	7.062±2.379	5.692±1.868	6.357±2.025	7.344±0.445

*Having the same letters within each horizontal row means significantly different to at least 95% probability.
*Each value is the Mean ± SD

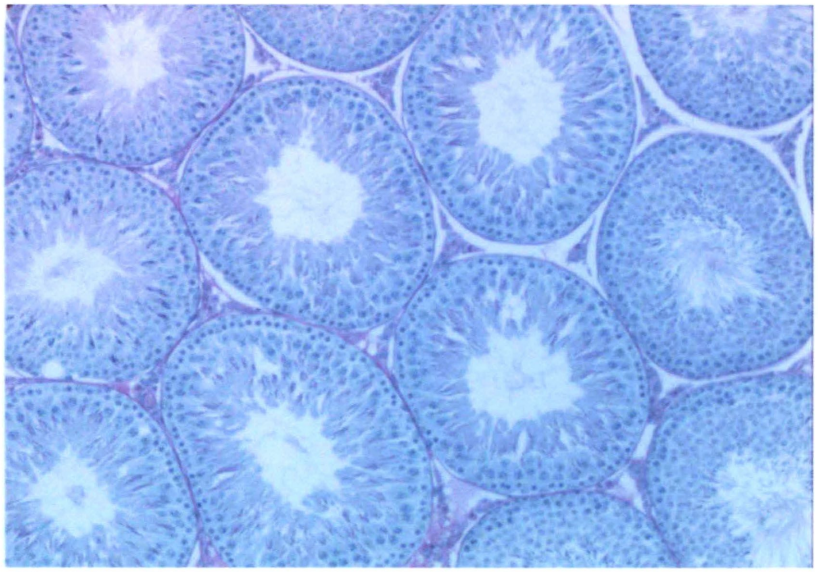

Photo.1 Seminiferous tubules of 8-week old rat (x125)
(Normal lighting, 9%Casein)

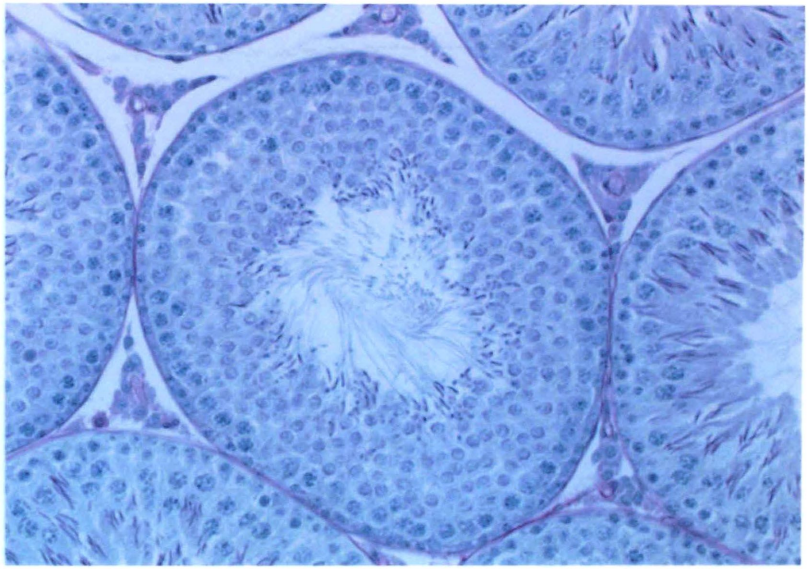

Photo.2 Seminiferous tubules of 8-week old rat (x250)
(Normal lighting, 9%Casein)

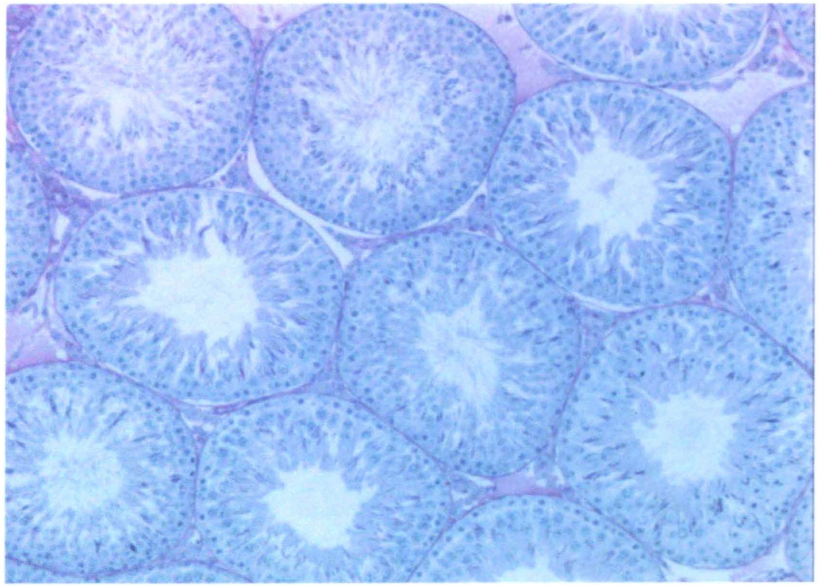

Photo.3 Seminiferous tubules of 8-week old rat (x125)
(Normal lighting, +Met)

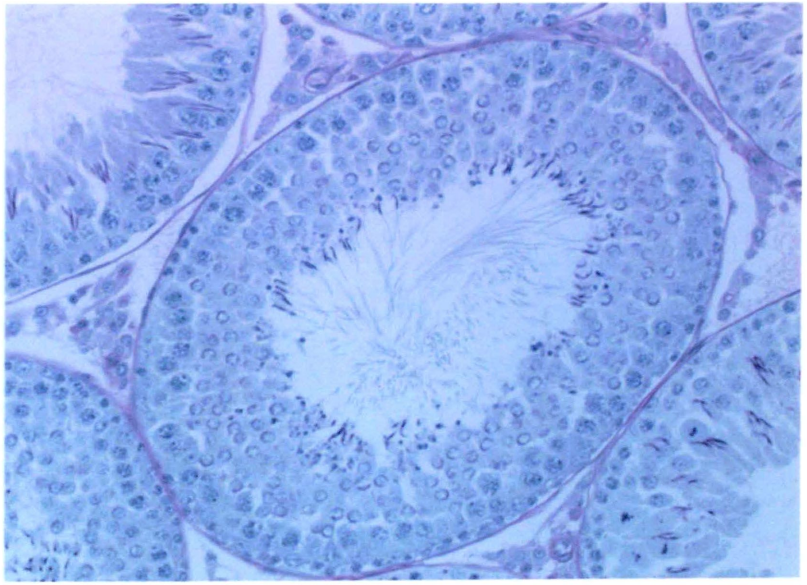

Photo.4 Seminiferous tubules of 8-week old rat (x250)
(Normal lighting, +Met)

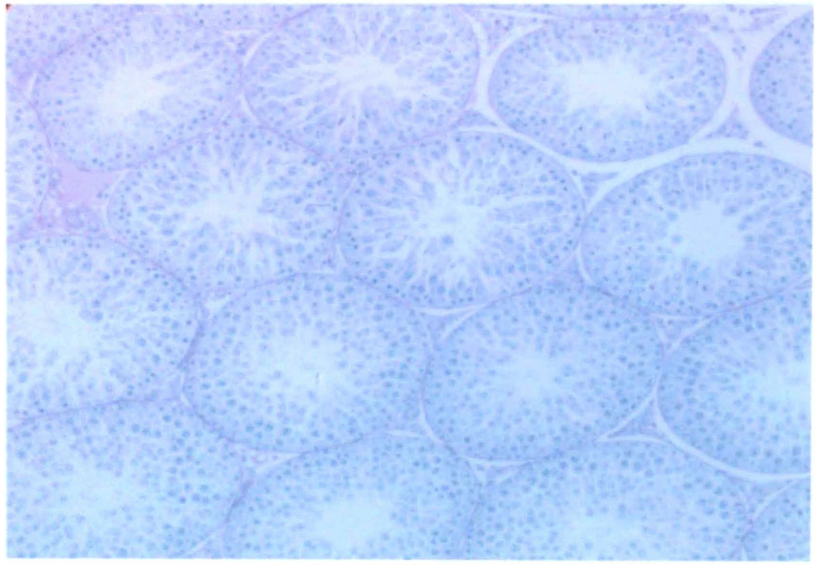

Photo.5 Seminiferous tubules of 8-week old rat (x125)
(Constant darkness, 9%Casein)

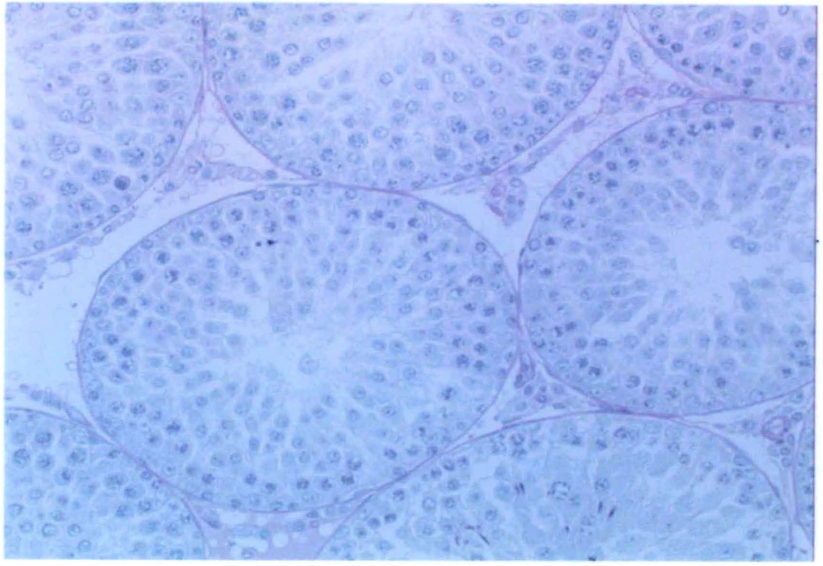

Photo.6 Seminiferous tubules of 8-week old rat (x250)
(Constant darkness, 9%Casein)

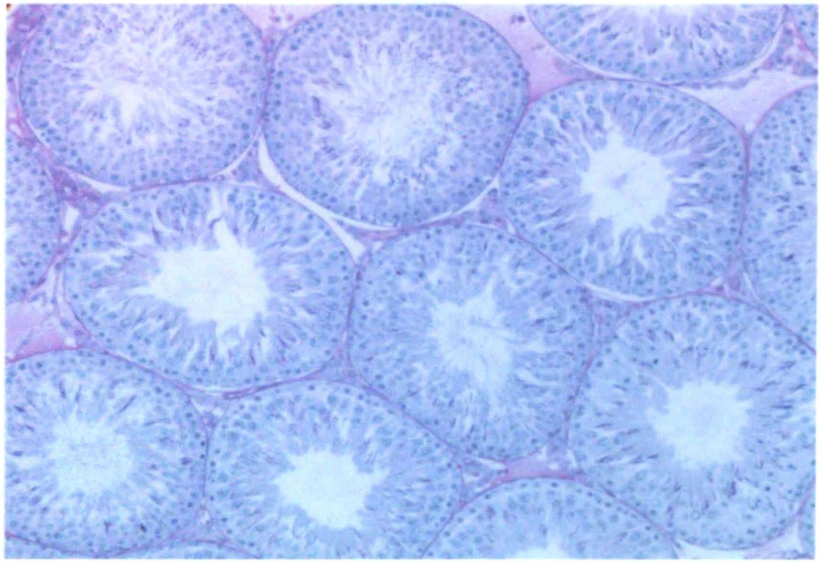

Photo.7 Seminiferous tubules of 8-week old rat (x125)
(Constant darkness, +Met)

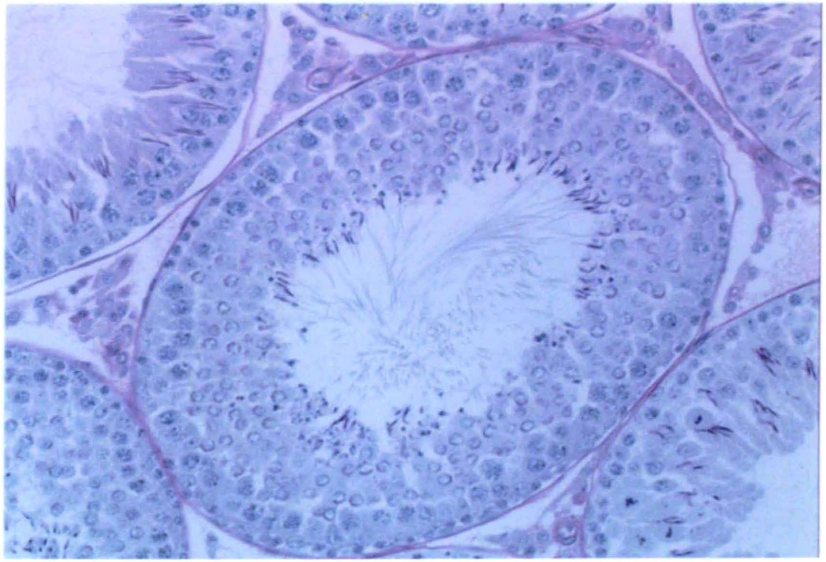

Photo.8 Seminiferous tubules of 8-week old rat (x250)
(Constant darkness, +Met)

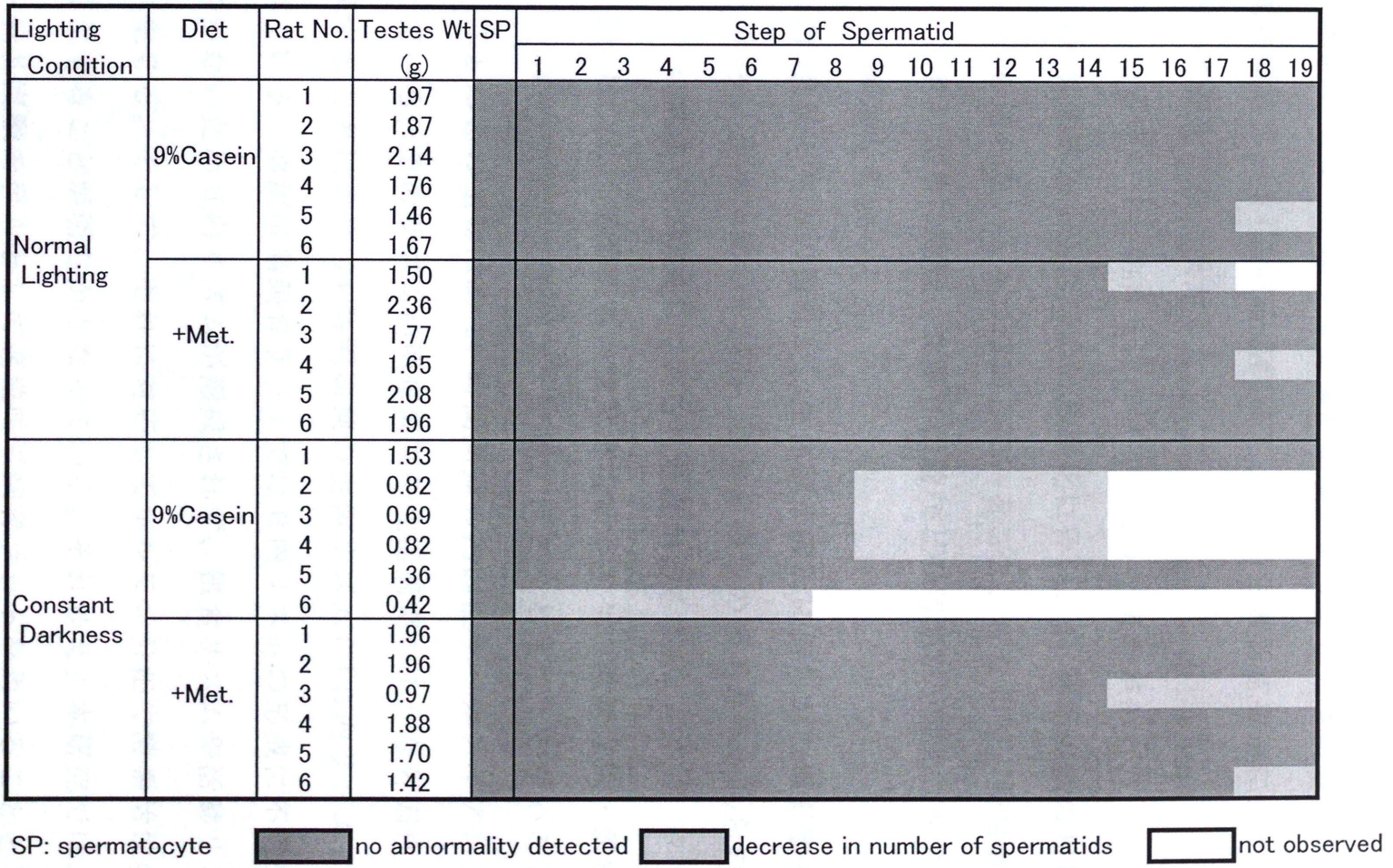

Figure 1 Step of spermatid of testis

第4章　　要　約

本研究では、生活リズム攪乱実験モデルとして連続暗黒下で飼育した成長期雄ラット(連続暗黒飼育ラット)の生殖器官発達に対する飼料栄養素の影響を詳細に検討した。

この研究の社会的背景には以下のような実態がある。

1) 労働形態・生活活動の多様化に伴い、24 時間周期の規則的な生活を送らない人々が増加していること、すなわち、交替制勤務従事者のように睡眠、食事、活動などの時間が一定していない人々が増加していること。
2) 生活リズムの攪乱が、生体調節機能に何らかの悪影響を与えており、食事時間の不規則、栄養素摂取の過不足がこれらの影響を増幅あるいは軽減している可能性があること。
3) しかし、生活リズム攪乱下にある人々の健康保持・疾病予防のための栄養学的基礎データは、ほとんど見当たらないことである。

ほとんどの生物は約 24 時間周期の内因性サーカデイアンリズムを持っている。そのリズムが明暗周期や生活周期のような外因性リズムに同調することにより 24 時間周期の生体リズム(「日内リズム」)が形成されている。連続暗黒飼育ラットでは日内リズムの形成に不可欠な同調因子がないため日内リズムが形成されず、摂食リズムや活動リズムに乱れが生じる。そして、それに対応してホルモン分泌や酵素活性のリズムも変化することが明らかとなっている。それゆえ、本研究では、生活リズム攪乱実験モデルとして連続暗黒飼育ラットを用いることとした。連続暗黒飼育ラットでは下垂体前葉重量の低下や生殖器官の発達抑制などがみられ、さらに、その発達が低タンパク質食給与によって増強すること

も報告されている

本研究では、以上の結果を踏まえ、リズム攪乱による影響が明らかな生殖器官を研究対象として、個別栄養素摂取量の変化の影響を追求することとした。すなわち、栄養素摂取量の調整によって、生殖器官発達障害を軽減する可能性を明らかにするための栄養学的基礎データの蓄積を試みた。さらに、連続暗黒飼育雄ラットの各種血清ホルモンに対する低タンパク質食の影響を検討した。

実験動物として Fischer344 系の 4 週齢雄ラットを用い、4 週間(一部の実験は 5 週間)連続暗黒下で飼育した。そして、各種飼料栄養素が生殖器官発達に及ぼす影響を直交表または三元配置法を用いる実験計画法に基づいて検討した。

検討した栄養因子は以下の通りである。

1) タンパク質量、メチオニン添加、ビタミン混合量、ミネラル混合量、総脂質量
2) 各種ミネラル量(カルシウム、リン、マグネシウム、ナトリウム、亜鉛)
3) 各種アミノ酸量(メチオニン、システイン、トリプトファン、バリン、アルギニン、ヒスチジン、ロイシン、イソロイシン、リジン、フェニルアラニン、スレオニン)
4) 各種ビタミン量(ビタミン A、ビタミン D、ビタミン E、ビタミン K、ビタミン B_1、ビタミン B_2、ビタミン B_6、ビタミン B_{12}、ナイアシン、コリン、ビオチン、パントテン酸、葉酸)

飼育期間終了後、断頭屠殺し、内生殖器官重量、血清テストステロン濃度を測定した。また、黄体化ホルモン(LH)、卵胞刺激ホルモン(FSH)

およびテストステロンの還元型であるデヒドロテストステロン(DHT)濃度、そして、テストステロン生合成中間段階にある前駆体ステロイドに関しても定量した。飼料中の栄養素の影響は、(株)日本科学技術研修所のソフトウエアー、JUSE-QCAS/V6.0により解析した。

各種栄養素が連続暗黒飼育ラットの生殖器官発達に及ぼす影響に関し、本研究で明らかにされたことは以下の通りである。

1) 連続暗黒飼育ラットの生殖器官発達に関与する栄養素は正常明暗飼育群とは異なること、また摂取栄養素に対する感受性も高まることが明らかとなった。

2) 連続暗黒飼育ラットの生殖器官発達のために特に有効であった栄養素はメチオニン(Met)とシステイン(Cys)、ビタミン E(V.E)およびパントテン酸(PaA)であり、これらの栄養素を標準量より多く摂取すると睾丸発達が促進された。

3) 連続暗黒飼育ラットにおいて標準量より低量摂取が生殖器官発達のために有効であった栄養素はトリプトファン(Trp)であった。

4) 反対に、連続暗黒飼育ラットにおいて低量より標準量摂取が生殖器官発達のために有効であった栄養素はバリン(Val)、スレオニン(Thr)、イソロイシン(Ile)、カルシウム(Ca)、マグネシウム(Mg)、ナトリウム(Na)であった。

5) 連続暗黒飼育ラットにおいて標準量より多く摂取することにより生殖器官発達抑制を促進させた栄養素は、Val、ビタミン A(V.A)、ビタミン D(V.D)、ビタミン B_1($V.B_1$)およびビタミン B_6($V.B_6$)であり、低タンパク質食の時これらの栄養素を標準量の2倍量から6倍量摂取すると、精巣の発達抑制が促進された。

6) 連続暗黒飼育群(D 群)と正常明暗飼育群(N 群)において生殖器官発

達に対する影響が異なった栄養素は Met と Cys、Val、Ca、V.E、PaA、$V.B_1$ および $V.B_6$ であった。これらのうち、D 群において N 群より摂取量を多くした時、生殖器官の発達抑制を軽減させた栄養素は Met と Cys、Val、Ca、V.E および PaA であった。一方、N 群より摂取量を少なくした時、生殖器官の発達抑制を軽減させた栄養素は $V.B_1$ および $V.B_6$ であった。それゆえ、連続暗黒飼育によりこれら栄養素の代謝回転が変化し、生殖器官発達のための必要量が変化する可能性が示唆される。

7) D 群において精巣発達とテストステロン濃度に対する影響が異なっていた栄養素は Cys、Mg および Na であった。Cys の影響は Cys が無添加の時、精巣重量は増加するが、テストステロン濃度は反対に低下するというものであった。Mg と Na の影響は標準 Mg 飼料の時、Na が低量から標準量になると精巣重量は増加するが、テストステロン濃度は標準 Mg 飼料の時、Na が低量から標準量になると低下するというものであった。それゆえ、Cys、Mg および Na は精巣におけるテストステロンの機能発現を抑制している可能性が考えられる。

8) D 群において精巣発達とテストステロン濃度に与える影響が一致していた栄養素は Met、Ile、Trp および Ca であった。Met、Ile および Ca はいずれも低量より標準量の時、精巣発達および血清テストステロン濃度共に高まった。一方、Trp は標準量添加より無添加の時、精巣発達および血清テストステロン濃度共に高まった。それゆえ、Met、Ile、Trp および Ca の精巣発達に対する影響はテストステロン生合成と関わっていること、また、これらの栄養素は精巣におけるテストステロンの機能発現を抑制していないことが考えられた。

9) AIN 飼料組成の精巣発達に対する影響は明暗飼育条件により異なっていた。D 群の精巣重量は AIN-93G 飼料組成の時、正常明暗飼育群の精巣重量は AIN-76 飼料組成の時増加した。一方、血清テストステロン濃度に関しては、D 群、N 群共に AIN-93G 飼料組成の時にその濃度が高まった。

10) 精巣発達に対し栄養素間の交互作用が認められた組み合わせは、Met ＊ Cys、Mg ＊ Na および V.A ＊ V.D であった。Met ＊ Cys の交互作用は、Met が無添加の時には Cys 添加により精巣重量が顕著に増加するが、Met を添加している時にはその増加量が極めて少ないという効果であった。また、Mg ＊ Na の交互作用は、Mg が低量時には Na が低量から標準量になると精巣重量はわずかに増加するのみであるが、Mg が標準量時には顕著に増加するという効果であった。V.A ＊ V.D の交互作用は、V.A が標準量時には V.D が標準量から高量になると精巣重量が低下するが、V.A が高量時にはわずかに増加するという効果であった。

11) 連続暗黒飼育･9%Casein 食群における生殖器官の発達抑制はテストステロンの生合成の低下に依っており、LH、FSH 濃度、DHT 生成に影響は認められなかった。

12) 連続暗黒飼育・9%Casein 食群にみられた血清テストステロン濃度の低下は、テストステロン生合成の中間段階にあるプロゲステロンからアンドロステンジオンへの変換が阻害がされているためであることが明らかとなった。それゆえ、連続暗黒飼育・9%Casein 食群では、テストステロン生合成に関与する酵素のうち 17 α-ヒドロキシラーゼ、または 17,20-リアーゼ活性が低下している可能性が示唆される。

以上の結果は臓器レベルにおける現象論の枠を出ておらず、そのメカ

ニズムについては明らかにされていない。しかし、生活リズム攪乱実験モデルである連続暗黒飼育は、各種摂取栄養素の代謝回転、摂取栄養素量に対する器官の感受性、さらには、それらの必要量を変化させることが示された。そして、ホルモンの生合成過程に特異的な影響をおよぼすことが明らかとなった。本研究で得られた栄養学的基礎データは摂取栄養素により生活リズム攪乱における影響がコントロールできること、すなわち、適切な栄養素摂取により生活リズム攪乱が引き起こす悪影響を制御・軽減できることを示している。これは栄養学的立場から生活リズム攪乱下にある人々の健康の維持・増進に寄与できる可能性を潜めている。

謝 辞

本研究はすべて、国立健康・栄養研究所(現、独立行政法人　国立健康・栄養研究所)において 10 年以上にわたり実施させていただいたものです。これらの研究をまとめるにあたりご指導いただきました女子栄養大学教授久保勝知博士、聖徳大学教授菅原龍幸博士に心より御礼を申し上げます。

そして、本研究に関し、終始にわたり多大なるご指導を賜った聖徳大学教授(前国立健康・栄養研究所応用食品部長)江指隆年博士に心より感謝の意を表します。

また、ご協力いただきました国立健康・栄養研究所の職員の皆様、研修生の皆様に感謝申し上げます。

文 献

1) King DP, Zhao Y, Sangoram AM, Wilsbacher LD, Tanaka M, Antoch MP, Steeves TD, Vitaterna MH, Kornhauser JM, Lowrey PL, Turek FW, Takahashi JS. 1997. Positional cloning of the mouse circadian clock gene. *Cell* **89**:641-53.

2) Kume K, Zylka MJ, Sriram S, Shearman LP, Weaver DR, Jin X, Maywood ES, Hastings MH, Reppert SM, 1999. mCRY1 and mCRY2 are essential components of the negative limb of the circadian clock feedback loop. *Cell* **98**:193-205.

3) van der Horst GT, Muijtjens M, Kobayashi K, Takano R, Kanno S, Takao M, de Wit J, Eker AP, van Leenen D, Buijs R, Bootsma D, Hoeijmakers JH, Yasui A. 1999. Mammalian Cry1 and Cry2 are essential for maintenance of circadian rhythms. *Nature* **398**:627-30.

4) Steeves TD, King DP, Zhao Y, Sangoram AM, Du F, Bowcock AM, Moore RY, Takahashi JS. 1999. Molecular cloning and characterization of the human CLOCK gene: expression in the suprachiasmatic nuclei. *Genomics* **57**:189-200.

5) Honma K, Honma S, 1988. Circadian rhythm: its appearance and disappearance in association with a bright light pulse. *Experientia* **44**:981-983.

6) Minors DS, Waterhouse JM, Wirz-Justice A. 1991. A human phase-response curve to light. *Neurosci Lett* **133**:36-40.

7) Daan S, Albrecht U, van der Horst GT, Illnerova H, Roenneberg T, Wehr TA, Schwartz WJ. 2001. Assembling a clock for all seasons: are there M and E oscillators in the genes? *J Biol Rhythms* **16**:106-116.

8) 嶋津孝. 1999. 生物時計と生体リズム:脳の中の視床下部. 成人病との関連をさぐる. p66-77. ブレーン出版. 東京.

9) Ishikawa K, Shimazu T. 1976. Daily rhythm of glycogen synthetase and phoshorylase activities in rat liver: influence of food and light. *Life sci* **19**:1873-1878.

10) Saito M, Murakami E, Nishida T, Fujisawa Y, Suda M. 1975. Circadian rhythms in digestive enzymes in the small intestine of rats. I .Patterns of the rhythms in various regions of the small intestine. *J Biochem (Tokyo)* **78**:475-480.

11)厚生労働省大臣官房統計情報部. 2000. 平成 11 年度賃金労働時間制度等総合調査結果.厚生労働省.

12)NHK 放送文化研究所. 2001. データブック全国国民生活時間調査. 日本放送出版協会.東京.

13)阿部芳子, 江指隆年.1985. 我が国における交替勤務者の食生活.*臨床栄養* **66**:757-764.

14)厚生労働省大臣官房統計情報部.2002. 平成 13 年労働環境調査の概況. 厚生労働省.

15)家庭栄養研究会プロジェクトチーム. 1999. 子どもの生活リズムと食生活研究報告第五次調査.家庭栄養研究会.東京.

16) Ozaki Y, Lynch HJ, Wurtman RJ. 1976. Melatonin in rat pineal, plasma, and urine: 24-hour rhythmicity and effect of chlorpromaize. *Endocrinology* **98**:1418-1424.

17) Lynch HJ, Wurtman RJ, Moskowitz MA, Archer MC, Ho MH. 1975. Daily rhythm in human urinary melatonin. *Science***187**:169-171.

18) Petrie K, Conaglen JV, Thompson L, Chamberlain K. 1989. Effect of melatonin on jet lag after long haul flights. *BMJ* **298**:705-707.

19) Zhdanova IV, Wurtman RJ, Lynch HJ, Ives JR, Dollins AB, Morabito c, Matheson JK, Schomer DL. 1995. Sleep-inducing effects of low doses of melatonin ingested in the evening. *Clin Pharmacol Ther* **57**:552-558.

20) 江指隆年.1994. 光線不足と栄養-雄性器への影響を中心に-.*栄養学雑誌* **52**:211-226.

21) 高橋康郎.1991. 哺乳類:内分泌学的機構.時間生物学ハンドブック (千葉喜彦, 高橋清久編) p112-129.朝倉書店.東京.

22) Depres-Brummer P, Bourin P, Pages N, Metzger G, Levi F. 1997. Persisitent T lymphocyte rhythms despite suppressed circadian clock outputs in rats. *Am J Physiol* **273**:R1891-R1899.

23) 坂井友吉.1963. 暗黒環境飼育ネズミの下垂体、精巣および松果体. *J Physiol Soc Japan* **25**:140-145.

24) 坂井友吉.1963. 暗黒環境飼育ネズミの生殖器官.*J Physiol Soc Japan* **25**:133-139.

25) 江指隆年, 横田フミ, 速見泱.1972. 雄シロネズミの生殖器発育におよぼす光線の影響.栄養と食糧 **25**:227.

26) Esashi T, Suzue R, Leathem JH. 1982. Influence of dietary protein depletion and repletion on sex organ weight of male rats in relation to age. *J Nutr Sci Vitaminol* **28**:163-172.

27) American Institute of Nutrition. 1977. Report of the American Institute of Nutrition ad hoc committe on stndards for nutritional studies. *J Nutr* **107**:1340-1348.

28) Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC. 1993. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: Final report of the American institute of nutrition ad hoc writing committe on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr* **123**:1939-1951

29) 田口玄一.1998. 第 3 版実験計画法 上. p107-159.丸善.東京.

30) Saito M, Kato H, Suda M. 1980. Circadian rhythm of intestinal disaccharidases of rats fed with adiurnal periodicity. *Am J Physiol* **238**:G97-101.

31) 齋藤昌之, 加藤秀夫. 1982. 摂食予知行動と代謝リズム. *蛋白質核酸酵素* **27**:134-142.

32) 齋藤昌之. 1984. 摂食予知行動に連動した内分泌・代謝の日内リズム. 生体リズムの発現機構体内時計の医療への応用(川上正澄, 高坂睦年編) p96-106. 理工学社. 東京.

33) 田口玄一, 小西省三.1987. 直交表による実験のわりつけ方.p2-10. 日科技連出版社.東京.

34) Dhar JD, Setty BS. 1990. Changes in testis, epididymis and other accessory organs of male rats treated with anandron during sexual maturation. *Endocr Res* **16**:231-239.

35) Leathem JH 1970. Nutrition. In: The Testis 3 (Johnson AD, Gomes WR, Vandemark NL, eds), p169-205. Academic Press, New Tork.

36) Hartsook EW, Nee JC. 1976. Effects in the rat of environmental temperature, diet dilution and treadmill running on voluntary food intake, body composition and endocrine organ mass: a multiple regression analysis. *J Nutr* **106**:1314-1325.

37) 久保勝知.1984. 摂食行動概日リズム調節の中枢機序:生体リズムの発現機構-体内時計の医療への応用-.川上正澄,高坂睦年編) p68-95.理工学社.東京.

38) Leat WM, Northrop CA, Harrison FA, Cox RW. 1983. Effect of dietary linoleic and linolenic acids on testicular development in the rat. *Q J Exp Physiol* **68**:221-231.

39) Sebokova E, Garg M, Wierzbicki A, Wierzbicki A, Thomson ABR, Clandinin MT. 1990. Alteration of lipid composition of rat testicular plasma membrans by dietary (n-3) fatty acids changes the responsiveness of leydig cell and testosterone synthesis, *J Nutr* **120**:610-618.

40) 佐久間康夫.2000. 生殖線:生殖系の発達と機能:医科生理学展望原著 19 版(星猛, 岡田恭伸, 河原克雅, 管野富夫, 熊田衛, 黒澤美枝子, 佐久間康夫, 佐藤俊英,鈴木裕一,多久和陽,中村嘉男,福田康一郎訳) p442-453. 丸善.東京.

41) Wrobel J, Nagel G. 1972. Diurnal rhythm of active calcium transport in rat intestine. *Experimenta* **35**:1581-1582.

42) Shinoda H, Stern PH. 1992. Diurnal rhythms in Ca transfer into bone, Ca release from bone, and bone resorbing activity in serum of rats. *Am J Physiol* **262**:R235-240.

43) 花井美保, 江指隆年.1999. 雄ラットのカルシウム、リン、マグネシウムおよび亜鉛出納に及ぼす飼料中各種ミネラル含量の影響および交互作用-$L_8(2^7)$型直交表を用いた検討-. *日本栄養・食糧学会誌* **52**:193-199.

44) 花井美保, 江指隆年.2000. 生活リズム攪乱モデル実験系における雄ラットのカルシウム出納に及ぼす飼料中各種ミネラル含量の影響および交互作用-$L_8(2^7)$型直交表を用いた検討-. *日本栄養・食糧学会誌* **53**:139-148.

45) Fleet JC, Cashman KD.2001. Magnesium: Present Kowledge in Nutrition Eighth Edition (Bowman BA, Russell RM eds.) p292-301. ILSI Press. Washington.

46) McClain CJ, Gavaler JS, Van Thiel DH, 1984. Hypogonadism in the zinc-deficient rat: Localization of the functional abnormalities. *J Lab Clin Med* **104**:1007-1015.

47) Merker HJ, Gunther T. 1997. Testis damage induced by zinc deficiency in rats. *J Trace Elem Med Biol* **11**:19-22.

48) Wolf RC, Leathem JH. 1955. Hormonal and nutritional influences on the biochemical composition of rat testis. *Endocrinology* **57**:286.

49) Shettles LB. 1960. The relation of dietary deficiencies to male fertility. *Fertility Sterility* **11**:88.

50) Pomeranze J, Piliero SJ, Medeci PT, Plachta A. 1959. Deficiency diets in young growing rats. *Proc Soc Exptl Biol Med* **100**:207-209.

51) Scott EB. 1964. Histopathology of amino acid deficiencies. Ⅶ.Valine. *Exptl Mol Pathol* **3**:610.

52) 南久則.2002. タンパク質の消化・吸収:消化・吸収-基礎と臨床-(武藤泰敏編) p296-324. 第一出版. 東京.

53) Young VR. 2001. Protein and Amino Acids: Present Kowledge in Nutrition Eighth Edition (Bowman BA, Russell RM eds.) p43-58. ILSI Press. Washington.

54) 長田洋子.2000. 自然界に存在する D-アミノ酸. *生化学*.**72**:173-180.

55) Hashimoto A. 2002. Effect of the intracerebroventricular and systemic administaration of L-serine on the concentrations of D- and L-serine in several brain areas and periphery of rat. *Brain Res* **955**:214-220.

56) Ishio S, Yamada H, Hayashi M, Yatsushiro S, Noumi T, Yamaguchi A, Moriyama Y. 1998. D-aspartate modulates melatonin synthesis in rat pinealocytes. *Neursci Lett* **249**:143-146.

57) Lang U, Aubert ML, Conne BS, Bradtke JC, Sizonenko PC. 1983. Influence of exogenous melatonin on melatonin secretion and the neuroendocrine reproductive axis of intact male rats during sexual maturation. *Endocrinology* **112**:1578-1584.

58) 山崎潤，樋口輝彦.1990.メラトニンリズムはうつ病とどう関係するか. 臨床時間生物学(高橋三郎、高橋清久、本間研一編) p165-67. 朝倉書店. 東京.

59) Kus I, Akpolat N, Ozen OA, Songur A, Kavakli A, Sarsilmaz M. 2002. Effects of melatonin on leydig cells in pinealectomized rat: an immunohistochemical study. *Acta Histochem* **104**:93-97.

60) Valenti S, Giusti M. 2002. Melatonin participates in the control of testosterone secretion from rat testis: an overview of our experience. *Ann N Y Acad sci* **966**:284-289.

61) Reeves PG, Rossow KL, Lindlauf J. 1993. Development and testing of the AIN-93 purified for rodents: Results on growth, Kidney calcification and bone mineralization in rats and mice. *J Nutr* **123**:1923-1931

62) Sood S, Reghunandanan R, Reghunandanan V, Marya RK, Singh PI. 1995. Effect of vitamin D repletion on testicular function in vitamin D-dedicient rats. *Ann Nutr Metab* **39**:95-98.

63) Sood S, Marya RK, Reghunandanan R, Singh GP, Jaswal TS, Gopinathan K.1992. Effect of vitamin D deficiency on testicular function in the rat. *Ann Nutr Metab* **36**:203-208.

64) Hung CJ, Shaw HM. 1994. Tissue vitamin E status is compromised by dietary protein insufficiency in young growing rats. *J Nutr* **124**: 571-579.

65) 木村修一.1997. パントテン酸.ビタミンの事典(ビタミン学会編) p255-282. 朝倉書店. 東京.

66) Huang HF, Marshall GR. 1983. Failure of spermatid release under various vitaminA states - an indication of delayed spermiation. *Biol Reprod* **28**:1163-1172.

67) 左右田健次, 八木年晴. 1997. ビタミン B_6 :ビタミンの事典(ビタミン学会編) p201-227. 朝倉書店. 東京.

68) 健康・栄養情報研究会編.1999. 日本人の栄養所要量 食事摂取基準. p101. 第一出版. 東京.

69) Okada M, Shibuya M, Akazawa T, Muya H, Murakami Y. 1998. Dietry protein as a factor affecting vitamin B6 requirement. *J Nutr Sci Vitaminol* **44**:37-45.

70) Kaido M, Mori K, Ide Y, Inoue N, Koide O. 1991. Testicular damage by high dose of vitamin B6 (pyridoxine) in rats: a light and electron microscopical study. *Exp Mol Pathol* **55**:63-82.

71) 糸川嘉則.1997. ビタミン B_1.ビタミンの事典(ビタミン学会編) p150-167. 朝倉書店. 東京.

72) 前川昭男.1997. ビタミン B_{12} の生理作用.ビタミンの事典(ビタミン学会編) p346-349.朝倉書店.東京.

73) Steinberger E, Steinberger A. 1972. Testis basic and clinical aspects. Reproductive Biology (Balin H, Glasser S. eds.) p149. Excerpta Medica. Amsterdam.

74) Simpson ME, Evans HM. 1946.Comparison of the spermatogenic and androgenic properties of testosterone propionate with those of pituitary ICSH in hypophysectomized 40-day-old male rats. *Endocrinol* **39**:281-285.

75) Griffin JE, Wilson JD.1998. Disorders of the testes and the male reproductive tract: Wiliams Textbook of Endocrinology 9th edition (Wilson JD, Foster DW, Kronenberg HM, Larsen PR. eds) p819-917. W.B.Saunders Co. Philadelphia.

76) Odell WD, Swerdloff RS, Jacobs HS, Hescox MA. 1973. FSH induction of sensitivity to LH: one cause of sexual maturation in the male rat. *Endocrinology* **92**:160-165.

77) Ketelslegers JM, Hetzel WD, Sherins RJ, Catt KJ. 1978. Developmental changes in testicular gonadotropin receptors: plasma gonadotropins and plasma testosterone in the rat. *Endocrinology* **103**:212-222.

78) Stephan FK, Zucker I. 1972. Circadian rhythms in drinking behavior and locomotor activity of rats are eliminated by hypothamic lesions. *Proc Natl Acad USA* **69**:1583-1586.

79) Moore RY, Eichler VB. 1972. Loss of a circadian adrenal corticosterone rhythm following suprachiasmatic lesions in the rat. *Brain Res* **42**:201-206.

80) 守屋孝洋, 柴田重信. 2001. 視交叉上核における時計リセッティングのシグナル伝達.*細胞工学* **20**:828-836.

81) Herbert DC. 1980.Growth patterns hormonal profile of male rats with protein-calorie malnutrition. *Anat Rec* **197**:339-354.

82) Porkka-Heiskanen T, Laakso ML, Stenberg D.1992. The effect of testosterone on serum gonadotropins of castrated rats kept under different lighting conditions. *Biol Reprod* **46**:1127-1129.

83) Andric SA, Kostic TS, Stojilkovic SS, Kovacevic RZ. 2000. Inhibition of rat testicular androgenesis by a polychlorinated biphenyl mixture aroclor 1248. *Biol Reprod* **62**:1882-1888.

84) Fanjul LF, Estevez F, Deniz A, Marrero I, Benitez L, Quintana J, Gonzales J, Centol I, Ruize de Galarreta CM. 1989. R1881 regulation of steroidogensis in cultured testicular cells. *Biochem Int* **19**:301-312.

85) Bruynseels J, De Coster R, Van Rooy P, Wouters W, Coene MC, Snoeck E, Raeymaekers A, Freyne E, Sanz G, Vanden Bussche G. 1990. R75251, a new inhibitor of steroid biosynthesis. *Prostate* **16**:345-357.

86) Orr TE, Mann DR. 1990. Effects of restraint stress on plasma LH and testosterone concentration, Leydig cell LH/hCG receptors, and in vitro testicular steroidogenesis in adult rats. *Horm Behav* **24**:324-41.

87) Michal G ed.1999. Biochemical pathways: An atlas of biochemistry and molecular biology. p91-93. Spektrum Akademischer Verlag. Heidelberg.