

《研究ノート》

産卵鶏血漿中 8-ヒドロキシデオキシグアノシン (8-OHdG) の季節変動

董 偉杰・青柳陽介

茨城大学農学部, 茨城県阿見町 300-0393

産卵鶏の血漿中 8-ヒドロキシデオキシグアノシン (8-OHdG) 濃度の季節変動 (2005 年 12 月～2006 年 12 月) について調査した。産卵鶏の血漿中 8-OHdG 濃度は, 5 月および 9 月で最も低値であった。夏季および冬季で, 8-OHdG 濃度の有意な上昇がみられた。夏季の血漿中 8-OHdG 濃度と鶏舎内最高温度との間には有意な正の相関関係が, また, 冬季の血漿中 8-OHdG 濃度と鶏舎内最低温度との間には有意な負の相関関係が観察された。卵重は, 2006 年 1 月より 2007 年 1 月まではほぼ一定の値であったが, 8 月および 9 月で最も高い値が得られた 1 月より有意に減少した。また, 7, 8 月および 9 月でのみ, 軟卵が確認された。産卵率に関しては, 測定を開始した 2006 年 1 月から 7 月までは高い値で推移したが, その後, 日齢の進行に伴い, 暫時減少し, 12 月には 62.4% まで減少した。

本研究の結果より, 低温および高温環境下で, 産卵鶏が受ける酸化ストレスが増加する可能性が示唆された。

キーワード: 産卵鶏, 8-ヒドロキシデオキシグアノシン (8-OHdG), 卵重, 産卵率

緒 言

動物体内に生じる酸化ストレスが, 動物に悪影響を及ぼすことが広く知られている (Ames *et al.*, 1993; Bongarzone *et al.*, 1995)。酸化ストレスは種々の要因により誘導されるが (Halliwell, 1998; Newcomb and Loeb, 1998), 環境温度もその要因の一つである。寒冷曝露により, ラット肝臓のミトコンドリアから放出される過酸化水素により, 肝臓に酸化ストレスが生じることが報告されている (Venditti *et al.*, 2007)。また, 高温環境下でニワトリヒナの血中および肝臓中の過酸化脂質量が増加することより, 高温曝露によりニワトリヒナ体内に酸化ストレスが生じ, それが夏季におけるニワトリの生産性低下の一因となることが示唆されている (青柳ら, 1997; Mujahid *et al.*, 2007)。本研究は, 産卵鶏が受ける酸化ストレスの季節変動について調査することを目的とした。

これまでに, チオバルビツール酸反応物 (TBARS, Yagi, 1976), タンパク質カルボニルの定量 (Stadtman and Oliver, 1991) など, 酸化ストレスの評価のため, 種々の方法が提唱されている。それらには, 酸化ストレスに対する特異性が低いこと, 試薬が高価であること, 熟練した実験・操作技術が必要であることなどの短所がある。そこで, 信頼性が高く, 操作が簡易な方法の開発が望まれていた。近年 8-ヒドロキシデオキシグアノシン (8-OHdG) が酸化ストレスマーカーとして注目されている。8-OHdG は, 遺伝子 DNA 中のグアノシン塩基が活性酸素の作用により酸化的損傷を受けることで生成される物質である (Loft *et*

*al.*, 1993; 葛西, 2001)。遺伝子 DNA が修復される過程で 8-OHdG は細胞外に排出され, さらに血液を経て尿中に排泄される (Suzuki *et al.*, 2003; Chiou *et al.*, 2003; Wu *et al.*, 2004)。また 8-OHdG は比較的安定な物質で, 生体内で代謝や分解されことなく尿中に速やかに排泄され, 生体損傷を鋭敏に反映するため, ヒトの尿中 8-OHdG が酸化ストレスマーカーとして実用化されており, 臨床検査で利用されている (Maki *et al.*, 2007)。本研究でも, 産卵鶏の酸化ストレスのマーカーとして血中 8-OHdG を用いた。

材料と方法

用いた実験動物すべての取り扱い, 茨城大学動物実験指針 (茨城大学実験動物委員会) に従った。単冠白色レグホーン種雌初生ヒナ (霞ヶ浦孵卵場, 土浦市) をヒーター付きケージ内で予備飼育した。飼料は市販の幼雛用飼料を用い, 水とともに自由摂取させた。23 日齢時にヒナを実験鶏舎に移し, 産卵が確認できるまでケージ内で 2 羽ずつ飼育した。産卵が確認された時点で, 6 羽を選抜し, ケージ内で単飼した。実験鶏舎は, 南向きの風通しのよい開放鶏舎であり, ネット, 粘着式のネズミ捕りおよび殺鼠剤の使用により, 野鳥および野鼠との接触を防いでおり, 茨城県保健所からも問題無しと判断された。なお, 鶏舎内の照明と温度は特別なコントロールは行っておらず, 毎日の鶏舎内の最高および最低気温を記録した。飼料は産卵鶏の各ステージに適合した市販飼料を用い, 飼料と水は自由摂取とした。

実用産卵鶏の群産卵率は 210 日齢前後でピークに達するとされている (松島ら, 1982)。また, 卵重に関しては 330 日齢前後で成熟卵重に達するとされている (松島ら, 1982)。そこで, 本研究では, 産卵率および卵重の測定開始を 300 日齢程度に設定し, その 1 ヶ月前である 2005 年 12 月 (247 日齢) より 2006 年 12 月 (622 日齢) まで, 毎月 1 回翼下静脈より, 約 200  $\mu$ l の血液をヘパリン

2007 年 10 月 1 日受付, 2007 年 12 月 4 日受理

連絡先: 青柳陽介

〒300-0393 茨城県阿見町中央 3-21-1

Tel/Fax: 029-888-8579

E-mail: arambo@jcom.home.ne.jp

処理したシリンジを用いて採取した。採血時刻は午後2時とした。また、2005年12月～2006年9月まで、採血はすべて産卵後であった。直ちに血漿を分離し、分析まで $-80^{\circ}\text{C}$ で保存した。約1年間の採血期間中の飼育条件は前述の通りである。また、2006年1月より2007年の1月までの産卵率を記録し、同期間中、全ての卵重を測定した。飼料摂取量に関しては、使用した給餌器の形状のため、こぼれが多く、正確に測定することができなかった。

血漿中8-OHdG濃度は、モノクローナル抗体を用いたELLISAキット（日本老化制御研究所，袋井市）で測定した。凍結保存血漿サンプルを解凍後 $0.1\mu\text{m}$ のフィルター（Ultrafree-MC, Millipore Corporation）を用いてタンパク質を除去し、8-OHdG濃度の測定に供した。血漿サンプルは可能な限り密閉保存したが、実験初期の血漿サンプルと後期のサンプルでは、保存期間にかなりの差があるため水分含量が変化する可能性が考えられた。そこで、タンパク質濃度測定キット（DC protein assay, Bio-Rad Laboratories）を用いて血漿中のタンパク質濃度を同時に測定し、8-OHdG濃度を補正した。

統計解析には、統計解析パッケージSAS（SAS Institute）のGLMおよびCORRプロシジャを用い、平均値の比較はダンカン法（Duncan, 1966）に依った。

### 結果および考察

図1に実験鶏舎内の月平均最高および最低温度を示す。実験鶏舎内の月平均温度は $-1.3\sim 30.2^{\circ}\text{C}$ の範囲であった。

図2に2005年12月より2006年12月までの毎月の産卵鶏の血漿中8-OHdG濃度を示した。産卵鶏の血漿中8-OHdG濃度は、5月および9月で最も低値であった。測定期間中の産卵鶏の血漿中8-OHdG濃度と鶏舎内最高および最低温度の間には何ら有意な相関関係が得られなかった。しかし、図2から5月および9月を境に、夏季および冬季で産卵鶏の血漿中8-OHdG濃度が上昇するというパターンであった。

8-OHdGはDNAのグアニン塩基が酸化ストレスにより8位の炭素に水酸基が付加し、その後代謝され、ヌクレオシドとして血液を經由して、尿中に排泄される物質である（Inoue *et al.*, 1993; Loft *et al.*, 1993）。現在、酸化ストレスマーカーとして、ヒトの尿中8-OHdG濃度が臨床検査に応用されている。本研究では、産卵鶏の血中8-OHdGを酸化ストレスマーカーとし、その季節変動について調査した。その結果（図2）、採血を開始した2005年12月より2006年1月と有意に上昇し、3月まではほぼ同等の値であった。4月には1年間で最も高い値であった1月の値よりも有意に減少した。5月にはさらに減少したが、6月より気温の上昇に伴い、血中8-OHdG濃度も上昇を始め、7月の値は5月のそれに比し、有意に高い値となった。その後再び減少し、2006年9月の値は、約1年の測定期間中最も低値であった。以後、上昇傾向に転じ、採血最終月の2006年12月の値は2005年12月の値とほぼ同程度であった。産卵鶏の至適温度は $13\sim 24^{\circ}\text{C}$ だとされている（松島ら, 1982）。2006年5月および9月の実験鶏舎内の月平均最高温度は $21.9^{\circ}\text{C}$ と $26.2^{\circ}\text{C}$ であり、月平均最低温度はそれぞれ $13.8^{\circ}\text{C}$ 、 $19.4^{\circ}\text{C}$ であった。また、産卵鶏の酸化ストレスマーカーが最も低値であったことから、2006年5月から2006年9月までの

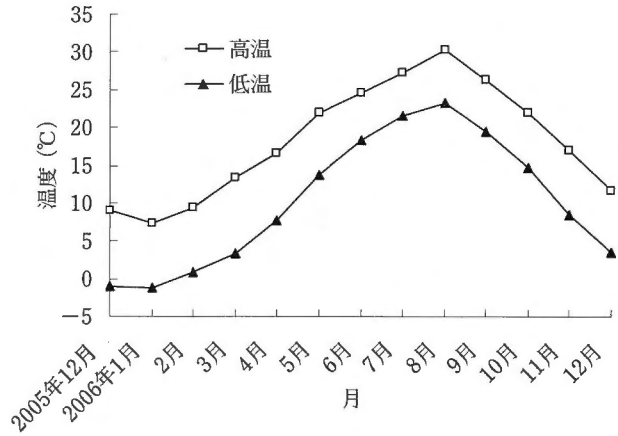


図1. 鶏舎内の最高最低温度

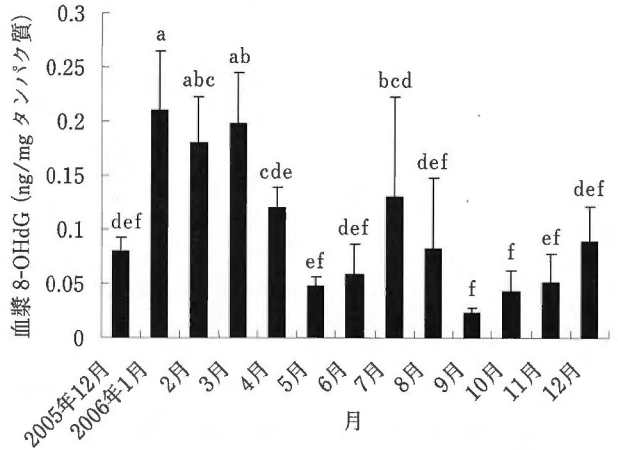


図2. 産卵鶏の血漿中8-OHdG濃度の季節変動  
縦線は標準誤差の大きさを表す (n=6).  
異符号間に有意差あり (P<0.05).

鶏舎内平均最高温度と産卵鶏血中8-OHdG濃度との相関を調べた。その結果、 $r=0.44115$ 、 $P<0.05$ という有意な正の相関関係が得られた。また、2005年12月～2006年5月および2006年9月～2006年12月の鶏舎内平均最低温度と産卵鶏血中8-OHdG濃度の相関を調べた結果、 $r=-0.59051$ 、 $P<0.01$ という有意な負の相関関係が得られた。低温（Venditti *et al.*, 2007）および高温環境（Flanagan *et al.*, 1998; Hall *et al.*, 1994）が体内での活性酸素の発生を増加させ、その結果、ラット体内での酸化ストレスの増加を促すことが報告されている。

以上より、産卵鶏においても、高温および低温環境下で体内に生じる酸化ストレスが増加する可能性が示唆された。しかし、高温よりも低温環境の方が、より大きく影響することに関しては予想外であった。

さらに日照時間と産卵鶏血中8-OHdG濃度の関係についても解析したが、何ら有意な相関関係は観察されなかった。

本研究では、産卵鶏の日齢と血中8-OHdGとの間には何ら有意な相関関係はみられなかった。しかし、本研究に用いた産卵鶏は、

4月孵化の鶏のみである。今後、孵化月の異なる産卵鶏を用い、同様の実験を行うことで、環境温度と産卵鶏が受ける酸化ストレスとの関係について、より詳細に考察できるものと考えられた。また、前述のとおり、2005年12月～2006年9月まではすべて産卵後の個体であったが、それ以降、採血終了までは、産卵前の個体も含まれる。産卵前後での血中8-OHdG濃度の比較も必要であると考えられるが、今後の課題であると考えられた。

図3に卵重の季節変動について示した。卵重は2006年1月から2007年1月まではほぼ一定の値であったが、8月および9月で最も高い値が得られた2006年1月より有意に減少した。また、7、8および9月でのみ、軟卵が確認された。しかし、本研究では、使用羽数が少ないため、さらなる検討が必要と思われた。

高温環境下で産卵鶏の卵重が減少することが報告されている(Marsden *et al.*, 1987)。本実験でも卵重に関しては、2006年の8月で卵重の測定を開始した2006年1月の値に比して有意に減少した。2006年9月の値は他のどの区よりも有意に低値であった。その後、10月より増加を始め、11月には2006年1月の値と同程度まで回復した。また、2006年7、8、9月で合計7個の軟卵が観察された。高温環境下で軟卵および破卵の発生率が上昇することがよく知られている(Pardue and Thaxton, 1986)。前述の通り、夏季において血中8-OHdG濃度即ち酸化ストレスが高温期で上昇することが判明したが(図2)、本実験で得られた夏季における卵重の減少と血中8-OHdG濃度の夏季における上昇との間には約1ヶ月の時間差が生じた。この原因に関しては不明であり、今後の検討課題であると考えられた。

図4に産卵率の季節変動を示す。本研究では257日齢時(2005年12月)より一ヶ月毎の産卵率を測定した。2006年1月より7月までは高い産卵率が得られたが、その後僅かずつ下降し、11月には81.7%、12月には62.4%まで減少した。採血は2006年12月に終了したが、その後1ヶ月間は産卵率と卵重は測定を続けた。その結果、2007年1月の産卵率は僅かではあるが、2006年12月の値よりも回復した。これには日齢以外の要因が考えられた。本実験の産卵鶏の飼育条件では、鶏舎内温度は年間 $-4.1^{\circ}\text{C}$ ～ $35.2^{\circ}\text{C}$ であった。また、照明および温度コントロールは行っていない。従って、1ヶ月の平均日照時間等の要因も考えられたが、茨城県の2006年12月の平均日照時間は9時間44分であり、2007年1月のそれは9時間59分と大差が無かった。従って、前述の8-OHdG濃度の低温環境による増加、即ち酸化ストレスの増加もその一因として考えられた。

筆頭著者の出身地は、中華人民共和国、内モンゴル自治区、通遼市である。この地は、北緯 $43^{\circ}$ 、東経 $120^{\circ}$ に位置し、内陸部のために、寒暖の差が激しく、夏季では $30\sim 35^{\circ}\text{C}$ 、冬季には $-20^{\circ}\text{C}$ 程度となる。近年、中華人民共和国でも養鶏産業が盛んであるが、日本に比較すると鶏肉・鶏卵は高価である。近代的な養鶏施設も増加しているが、都市部近郊以外では、まだ日本でいうところの、庭先養鶏的な形態も多く存在する。しかし、一般消費者が、購入する鶏卵および鶏肉は、内モンゴル自治区の場合、規模が数千から数万羽程度の養鶏場で生産される。これら養鶏場の鶏舎は、ある程度の温度調節は行っているが、近代的な養鶏施設ほどは充実していない。内モンゴル自治区より提供された資料(未発表)によ

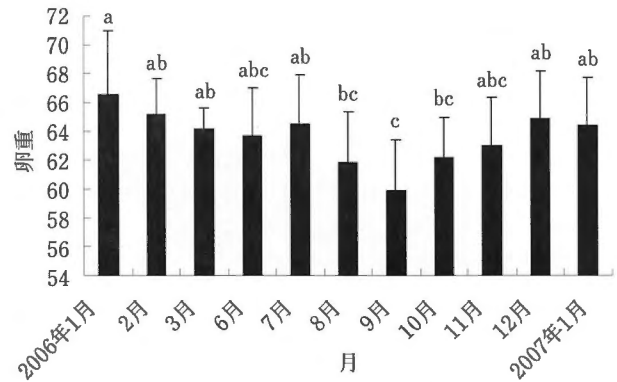


図3. 産卵鶏の卵重の季節変動  
縦線は標準誤差の大きさを表す (n=6).  
異符号間に有意差あり (P<0.05).

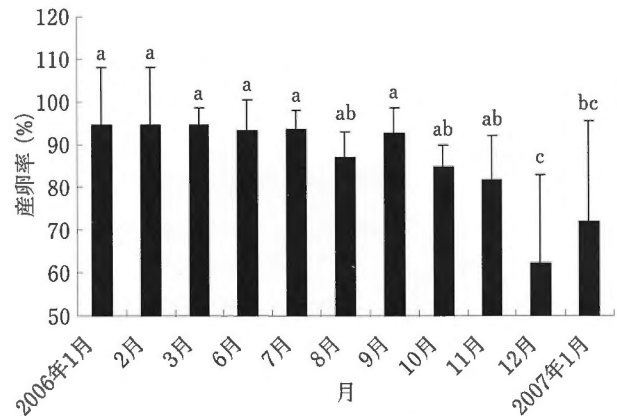


図4. 産卵鶏の産卵率の季節変動  
縦線は標準誤差の大きさを表す (n=6).  
異符号間に有意差あり (P<0.05).

ると、内モンゴル自治区の養鶏場の年間鶏舎内温度は $0\sim 35^{\circ}\text{C}$ の幅を持つ。これは、本研究で使用した実験鶏舎内の年間気温変動とほぼ同等である。

本研究では、産卵鶏の飼育環境温度のみを内モンゴル地区内で使用されている鶏舎内温度に模しており、湿度等の他の環境条件は異なる可能性が十分に考えられたが、少なくとも、環境温度が産卵鶏血中8-OHdG濃度に影響を及ぼすことが判明した。筆頭著者は、帰国後、本研究と同様な実験を内モンゴル自治区と共同で行うことになっており、本研究で考慮しなかった諸条件と産卵鶏が受ける酸化ストレスとの関係についてより詳細に調査することが可能であると考えられた。その際、8-OHdG法は少量の血液の採取で測定可能であり、酸化ストレスマーカーとして有効であると考えられた。上海に近く、杭州市を擁する浙江省の大規模養鶏業者(A公司)では、鶏舎の温度を年間 $18\sim 25^{\circ}\text{C}$ にコントロールし、生産性が内モンゴル自治区に比較して高い。内モンゴル自治区でも、これに習い、飼育環境(鶏舎)の改善等により、鶏卵をより効率的に生産できることが可能であると考えられた。さらに

本研究で明らかとなった低温および高温環境によって産卵鶏が受ける酸化ストレスを緩和することにより、動物福祉の面でも寄与できる可能性が考えられた。

### 引用文献

- Ames BN, Shigenaga MK and Hagen TN. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proceedings of National Academy of Science USA*, 90 : 7915-7922. 1993.
- 青柳陽介・大西 崇・伊東 忍・中谷哲郎. 暑熱ストレス及びL-アスコルビン酸-2-リン酸マグネシウムがニワトリヒナの血漿と肝臓のチオバルビツール酸反応物及び肝臓のタンパク質カルボニル濃度に及ぼす影響. *日本家禽学会誌*, 34 : 63-66. 1997.
- Bongarzone ER, Pasquini JM and Soto EF. Oxidative damage to proteins and lipids of CNS myelin produced by in vitro generated reactive oxygen species. *Journal of Neuroscience Research*, 41 : 213-221. 1995.
- Chiou CC, Chang PY, Chan EC, Wu JL Tsao KC and Wu JT. Urinary 8-hydroxydeoxyguanosine and its analogs as DNA marker of oxidative stress : development of an ELISA and measurement in both bladder and prostate cancer. *Clinica Chimica Acta*, 334 : 87-94. 2003.
- Duncan DB. Multiple range and multiple F test. *Biometrics*, 11 : 344-358. 1966.
- Flanagan SW, Moseley PL and Buettner GR. Increased flux of free radicals in cells subjected to hyperthermia : detection by electron paramagnetic resonance spin trapping. *FEBS Letters*, 431 : 285-286. 1998.
- Halliwell B. Free radical reactions in human disease. in : *Environmental stressors in Health and Disease* (J.Fuchs and L. Packer eds.), pp. 1-16. Marcel Dekker. New York. 1998.
- Hall DM, Buettner GR, Matthes RD and Gisolfi CV. Hyperthermia stimulates nitric oxide formation : electron paramagnetic resonance detection of NO-heme in blood. *Journal of Applied Physiology*, 77 : 548-53. 1994.
- Inoue T, Mu Z, Sumikawa K, Adachi K and Okochi T. Effect of physical exercise on the content of 8-hydroxyguanosine in nuclear DNA prepared from human lymphocytes. *Japanese Journal of Cancer Research*, 84 : 720-725. 1993.
- 葛西 広. 酸化ストレスのマーカー 8-OHdG の測定. *Foods & Food Ingredients Journal Of Japan*, 194 : 10-16. 2001.
- Loft S, Fischer-Nielsen A, Jeding IB, Vistisen K and Poulsen HE. 8-Hydroxydeoxyguanosine as a urinary biomarker of oxidative DNA damage. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 40 : 391-404. 1993.
- Maki A, Kono H, Gupta M, Asakawa M, Suzuki T, Matsuda M, Fujii H and Rusyn I. Predictive power of biomarkers of oxidative stress and inflammation in patients with hepatitis C virus-associated hepatocellular carcinoma. *Annals Surgical Oncology*, 14 : 1182-1190. 2007.
- Marsden A, Morris TR and Cromarty AS. Effects of constant environmental temperatures on the performance of laying pullets. *British Poultry Science*, 28 : 361-380. 1987.
- 松島正洋・宮園幸男・海老沢昭二. 採卵鶏の管理. 新編養鶏ハンドブック (田先威和夫・山田行雄・森田琢磨・田中克英編). 第一版. 479-537 頁. 養賢堂. 東京. 1982.
- Mujahid A, Akiba Y and Toyomizu M. Acute heat stress induces oxidative stress and decreases adaptation in young white leghorn cockerels by downregulation of avian uncoupling protein. *Poultry Science*, 86 : 364-371. 2007.
- Newcomb TG and Loeb LA. Oxidative DNA damage and mutagenesis. in : *DNA damage and repair* (Nickloff JA and Hoekstra MF eds.), 1 : 65-84. Humana press. Totowa. 1998.
- Pardue SL and Thaxton JP. Ascorbic acid in Poultry : A review, *World's Poultry Science*, 42 : 107-123. 1986.
- Stadtman ER and Oliver CN. Metal-catalyzed oxidation of proteins. *The Journal of Biological Chemistry*, 266 : 2005-2008. 1991.
- Suzuki K, Ito Y, Ochiai J, Aoki K, Wakai K, Tamakoshi A, Ando M, Watanabe Y, Ozasa K, Seki N, Nishino Y, Kondo T, Ohno Y, Tamakoshi A, Mori M, Motohashi Y, Tsuji I, Nakamura Y, Iso H, Mikami H, Hashimoto S, Inaba Y, Hoshiyama Y, Suzuki H, Shimizu H, Toyoshima H, Tokudome S, Ito Y, Kikuchi S, Koizumi A, Kawamura T, Watanabe Y, Miki T, Date C, Sakata K, Nose T, Hayakawa N, Yoshimura T, Fukuda K, Okamoto N, Shio H, Ohno Y, Kitagawa T, Kuroki T and Tajima K. The relationship between smoking habits and serum levels of 8-OHdG, oxidized LDL antibodies, Mn-SOD and carotenoids in rural Japanese residents. *Journal of Epidemiology*, 13 : 29-37. 2003.
- Venditti P, Bari A, Di Stefano L and Di Meo S. Vitamin E attenuates cold-induced rat liver oxidative damage reducing H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mitochondrial release. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39 : 1731-42. 2007.
- Wu LL, Chiou CC, Chang PY and Wu JT. Urinary 8-OHdG : a marker of oxidative stress to DNA and a risk factor for cancer, atherosclerosis and diabetes. *Clinica Chimica Acta*, 339 : 1-9. 2004.
- Yagi K. A simple fluorometric assay for lipoperoxide in blood plasma. *Biochemical Medicine*, 15 : 212-216. 1976.

## The Seasonal Changes in the Plasma 8-Hydroxy-2-Deoxyguanosine (8-OHdG) Concentrations in Laying Hens

Weijie Dong and Yosuke Aoyagi

Laboratory of Animal Nutrition, college of Agriculture Ibaraki University, Ami-machi, Ibaraki-ken 300-0393

In the present study, plasma 8-hydroxy-2-deoxyguanosine (8-OHdG) concentrations were measured for 1 year (December 2005–2006) in laying hens, in order to evaluate any possible seasonal changes in oxidative stress in these hens. The lowest values of the plasma 8-OHdG concentrations in the laying hens were observed in May and September. While a significant increase was observed in summer and winter. In summer, a significant positive correlation was observed between the plasma 8-OHdG concentrations and high temperatures, while in winter, a significant inverse correlation was observed between the plasma 8-OHdG concentrations and low temperatures. Egg weights were measured from January 2006–2007. these values were significantly lower in August and September than in January. Moreover, soft eggs were observed only in July, August and September. Egg production was measured from January 2006–2007. High values were obtained until July. Thereafter, egg production gradually decreased, and the mean value in December was 62.4%.

Based on the results presented, it was suggested that low or high ambient temperature causes oxidative stress in laying hens.

*(Japanese Journal of Poultry Science, 45 : J16–J20, 2008)*

**Key words** : laying hens, 8-hydroxy-2-deoxyguanosine (8-OHdG), egg weight, egg productions