

産卵鶏の加齢変化に対する杜仲葉の長期投与の影響

塩谷 正勝^{a)} 佐藤 常男^{b)} 白井 弥^{b)} 平 敬宏^{c)} 高橋 周七^{*d)}^{a)}日本大学農獣医学部畜産学科飼養学研究室, ^{b)}日本大学農獣医学部獣医学科病理学研究室^{c)}日本大学理工学部薬学科生化学教室, ^{d)}日本大学薬学部生物薬学科生化学教室

Effect of long Tochu dosage to aging change on Laying hens

Masakatsu SHIOYA^{a)} Tsuneo SATO^{b)} Wataru SHIRAI^{b)} Takahiro TAIRA^{c)} and Shushichi TAKAHASHI^{*d)}^{a)}Department of Animal Nutrition, College of Agriculture & Veterinary Medicine, Nihon University^{b)}Department of Veterinary Pathology, College of Agriculture & Veterinary Medicine, Nihon University^{c)}Department of Pharmacy, College of Science and Technology, Nihon University^{d)}Department of Biochemistry, College of Pharmacy, Nihon University

(Received December 11, 1989. Accepted April 12, 1990.)

Abstract

We mixed dry Tochu leaves (Tochu : *Eucommia ulmoides* OLIVER, Eucommiaceae) at the rate of 5% with the feed, and continuously fed the feed to white Laying hens, 398 days old, for 23 weeks. The average oviposition rate of the group given Tochu leaves (hereinafter called group A) for 20 weeks from the 3rd week to the 23rd week was 77%, while another group not given Tochu leaves (hereinafter called group B) was marked at 50%. The average feed conversion rate of group A from the 5th week to the 23rd week was 2.3, and group B was 3.6. After finishing the experiments, the protein contents and RNA contents in the liver and muscle of group A's Laying hens were significantly higher than group B. The tissues of group A were also healthier than those of group B. By the results of a series of experiments of dosing Tochu as mentioned above, the effect against the change by aging was proved.

Key words *Eucommia ulmoides*, hens, aging, rate of egg production, feed conversion, protein, RNA.

Abbreviations STS, Schnidt Thahauser Schneider ; RNA, ribonucleic acid.

緒 言

杜仲 (*Eucommia ulmoides* OLIVER, トチュウ科) の樹皮は中国では古くより薬物の古書「神農本草経」に保健・強壯薬としての薬効が記載されている。^{1, 3)} 最近、難波らにより、杜仲葉をラットに投与した報告の中で、^{4, 6)} 副腎と精巣の重量の増加と肝細胞の巨大化阻止⁶⁾ などの抗老化の作用が報告されている。

産卵鶏は産卵の最盛期が過ぎ、加齢とともに、餌の摂取量に相当する産卵量を維持できなくなり、飼料要求率は上昇し、⁷⁾ 産卵率は下降する。^{8, 10)}

今回、我々は産卵の最盛期を過ぎた雌鶏 (398日齢, 白色レグホーン) に杜仲葉を23週間の長期にわ

たり投与して、飼料要求率と産卵率の推移を連続的に観察した。実験終了後に雌鶏の組織学的並びに生化学的な影響を観察することにより、杜仲葉成分の雌鶏に対する抗加齢変化作用を確認した。

材料と方法

(1) 杜仲葉および投与方法：中国湖北省産の杜仲 [*Eucommia ulmoides* OLIVER の葉 (樹齢20~25年の樹木より7~8月頃採集した葉)] を使用した。採集後、天日乾燥した乾燥葉を粉末として、40~50℃で恒量としたものを試料として用いた。

試料の雌鶏への投与方法は、試料5%と飼料95%の割合で混合したものを餌として経口的に29週間に

*〒274 千葉県船橋市習志野台7-7-1
Narashinodai 7-7-1, Funabashi 274, Japan

わたる長期間投与を行った。

(2) 使用動物：シェーバー種の雌鶏（孵化後398日齢，産卵率60%，平均体重1685g）を温度 $20 \pm 1^\circ\text{C}$ ，湿度 $40 \pm 5\%$ ，12時間明/12時間暗に調整されたサイクルの飼育室のケージ（ $23 \times 41 \times 40\text{ cm}$ ）内で，市販の成鶏用配合飼料（CP:17%以上，ME 2850 kcal/kg，山一飼料株式会社）と水を自由に摂取させて飼育した。実験動物の羽数は杜仲葉投与群（以後グループAと呼ぶ）と非投与群（以後グループBと呼ぶ）でそれぞれ7羽を用いた。

(3) 産卵率⁹⁾と飼料要求率⁷⁾の測定：産卵記録は毎日個体別に記録し，卵重は各区ごとに毎日秤量して，1週間分を加算して，週の総産卵量とした。飼料は自由摂取させ，1週間ごとに秤り，給与総量から残飼を差し引いたものを飼料摂取量とした。

産卵率は1週間にあたり，毎日1個の卵を産んだ場合を100%，全く産卵しなかったものを0%とする計算方法をとった。

1週間の飼料要求率は $\frac{\text{総飼料摂取量}}{\text{総産卵重量}}$ とした。

(4) 実験動物の解剖：実験開始後23週目に雌鶏の頸部動脈を切断し，放血殺した。引続き組織標本作製のため肺，心臓，肝臓，脾臓，脾臓，腺胃，十二指腸，骨髄，および大腿二頭筋を摘出し，10%中性緩衝ホルマリン液にて固定した。また，成分分析用として肝臓と大腿二頭筋の一部を摘出し，速やかに氷冷の後，周囲の結合組織を取り除いて液体窒素にて瞬間凍結した。

(5) 肝臓と筋肉からのタンパク質と核酸の抽出：STS法（Schmidt Thanhauser-Schneider法）¹¹⁾に従って試料1gに氷冷蒸留水20mlを加え，細切後homogenizeして試料液とした。試料液の1mlを用いて，冷酸可溶画分，脂質画分を分離後，沈澱を蒸留水1.3mlで懸濁させ，これに10% TCA 1.3mlを加え混和し 90°C の水浴中で15分間加熱した。冷却後，上澄を総核酸画分，沈澱を総タンパク画分とした。

(6) 肝臓および筋肉からの総タンパク質¹²⁾とRNA¹³⁾の測定：前述の肝臓および筋肉からのそれぞれの抽出画分の一定量を用いて，タンパク質はLowry法，RNAはOrcynol法で測定した。

(7) 組織標本の作製と観察：10%中性緩衝ホルマリンで固定した材料を常法に従いパラフィン包埋とし，薄切，染色（ヘマトキシリン・エオジン染色，マツソントリクローム染色）し，光顕的に観察を行った。また，肝臓の脂肪化の観察のために凍結切片を作製し，ズダンIII染色を行った。

結 果

1. 産卵率および飼料要求率に対する影響

雌鶏の平均産卵率は試験開始時，グループAは $63 \pm 8.64\%$ ，グループBは $67 \pm 14.73\%$ を示し，1週～2週までは，グループAとグループBはほぼ同じ値を示した。3週目になるとグループAは $86 \pm 11.67\%$ に上昇したが，グループBの方は $67 \pm 18.89\%$ にとどまった。

4週より23週までの21週間の両者の産卵率はグループAでは $76.6 \pm 7.31\%$ ，グループBでは $49.2 \pm 5.07\%$ を示した。グループAの方がグループBに比較して1%水準で有意差をもって高い値を示した。

雌鶏の飼料要求率（Fig. 1）は試験開始時，グループAは 3.07 ± 0.36 ，グループBは 2.88 ± 0.47 を示し，1週から3週間における平均は，グループAは 2.88 ± 0.86 で，グループBは 2.61 ± 0.14 を示し，ほとんど両者の差はなかった。しかし，4週より23週までの20週の平均値はグループAは 2.29 ± 0.27 ，グループBは 3.63 ± 0.64 を示し，グループAはグループBに比較して約1.0も低い飼料要求率（ $p < 0.01$ ）を示した。

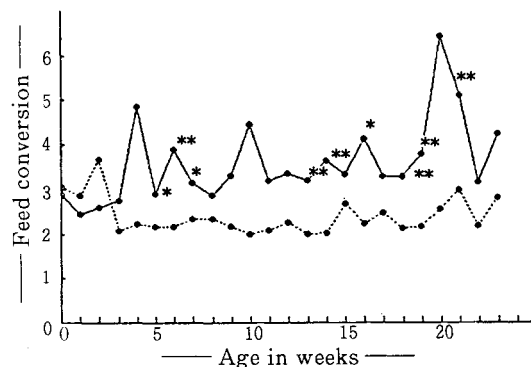


Fig. 1 Average feed conversion of Laying hens in each week.

●—●, Group A (Tochu dosage, n=7).
●---●, Group B (Tochu non dosage, n=7).

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

2. 組織学的所見

グループAとグループBにおける肺，心臓，肝臓，脾臓，脾臓，腺胃，十二指腸，骨髄の組織学的所見を総括的に記載する。

肺：うっ血がほぼ全例に見られた。その程度はグ

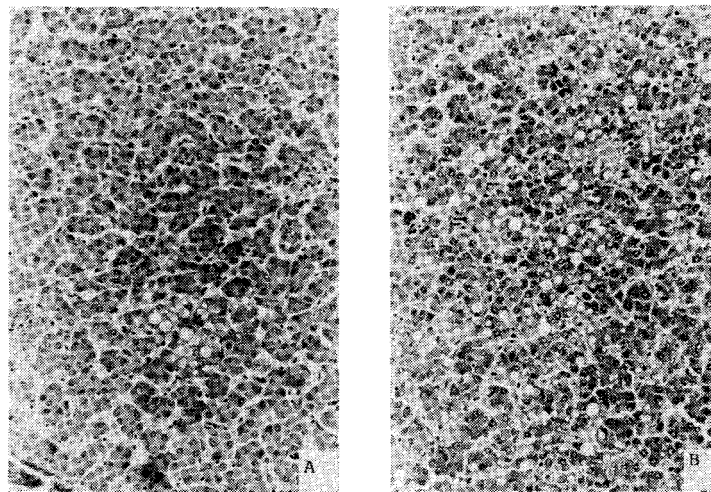


Fig. 2 Fatty metamorphosis (discrete vacuoles) in hepatocytes on Laying hens.
A) The hens of group A (Tochu dosage) showed slight changes. B) The hens of group B (Tochu non dosage) showed mild changes. HE stain, $\times 240$.

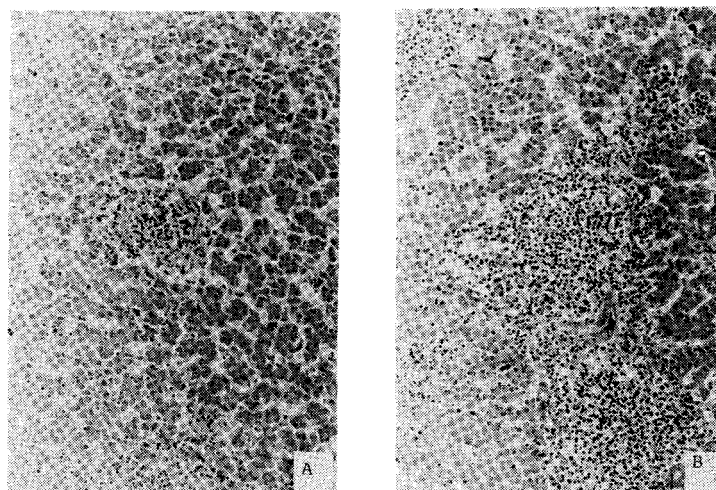


Fig. 3 Cellular infiltration of the Glisson's sheath in liver on Laying hens.
A) The hens of group A (Tochu dosage) showed mild changes. B) The hens of group B (Tochu non dosage) showed marked changes. HE stain, $\times 198$.

グループBでは中等度のものが多く (3/5例), 軽度が2/5例と少なかった。グループAでは中等度が1/7例で, 軽度のものが6/7例と多かった。気管支粘膜上皮の粘液分泌の亢進はグループBの3/5例 (60%) に対してグループAは3/7例 (43%) と少

なかった。

心臓: うっ血, 心筋線維の離開, 細胞浸潤および心弁膜の浮腫性膨化などが両群にみられたが, グループAではグループBに比較してこれらの変化が認められない例が多かった。

肝臓：うっ血，類洞の拡張，細胞浸潤などは両群に見られたが，差は認められなかった。しかし，肝細胞の空胞化（脂肪化）はグループBが部分的なものも含め4/5例（80％）に認められたのに対し，グループAでは4/7例（57％）と少なかった。

腺胃：主な変化は粘膜上皮の剥離，脱落粘液分泌の亢進などであったが，これらの変化がグループBに比べてグループAでは軽度なものが多かった。固有層の細胞浸潤もグループBに中等度以上の例がやや多かった。

脾臓：細胞浸潤がグループBに3/4例（75％）みられたのに対し，グループAでは1/7例（14％）と少なかった。

十二指腸：粘膜上皮の剥離，脱落がほぼ全例に認められたが，グループBに中～高度のものが多く，グループAでは軽度な例が多かった。

脾臓，骨髓には特に変化が認められなかった。

3. 肝臓と筋肉のタンパク質とRNA量

実験開始後23週目のグループAの大腿二頭筋の1g当りの総タンパク量と総RNA量はグループBに比較して，それぞれ23.12％，21.87％高い値を示した。またグループAの肝臓1g当りの総タンパク量と総RNA量はグループBに比較して，それぞれ26.88％，29.20％と高い値を示した（Table I）。

Table I Comparison of quantity of protein and RNA on Laying hens of Group A and Group B.
mg/tissue (g)

Sample	Total protein		Total RNA	
	muscle	liver	muscle	liver
Group A	215.00 ±20.01*	271.00 ±28.15*	71.53 ±6.35*	81.90 ±7.65*
Group B	165.30 ±10.31	198.15 ±19.80	55.89 ±5.00	65.00 ±5.92

* $p < 0.05$. Group A, Tochu dosage; Group B, Tochu non dosage.

考 察

1. 産卵率と飼料要求率

産卵率と飼料要求率を雌の加齢変化の指標に用いたことにより長期にわたり連続的に雌鶏の加齢変化度を測定することができた。鶏に杜仲葉を5％の割合で飼料に混入して投与開始後3週間でグループAの産卵率がグループBより有意差をもって高くなったことは，杜仲葉が雌鶏に対し，遅効性ではあるが

確実に生理的な機能を上昇させたことが確認された。カシ，シイ，サクラ等の木酢液を主成分とする製剤¹⁶⁾を用いた場合の平均産卵率の上昇度は我々の杜仲葉を用いた場合とほぼ同じ値を示した。なお，クロレラ¹⁷⁾，あなあおさ及びあさくさのり¹⁸⁾等を用いた場合には産卵率の上昇を示していない。

飼料要求率についても，産卵率の場合と同様に，4週間目より変化を示し，その値は約3から2に低下した。この理由は生体内の生化学的な代謝効率が良くなったため飼料を卵へ変換する効率が上昇したことを示唆している。

一般に雌鶏が若く体力が充実している時の産卵率⁹⁾は80～90％を示しているが，加齢とともに60～50～40％と下降の一途をたどる。これとは逆に飼料要求率⁷⁾は加齢とともに上昇する傾向がある。

この実験の結果から杜仲葉により雌鶏の生殖と生理機能が活性化されたことが推測された。

なお，杜仲葉の雌鶏に対する効果が用量（濃度）依存性であるかを確認するため，飼料に杜仲葉を各々0％，1.5％，5％，10％の割合に混合して，これを雌鶏に投与して，3週間後の産卵率の上昇の割合を検討した。その結果，杜仲葉0％の場合の産卵率は 63 ± 8.6 ，1.5％の場合は 75 ± 9.12 ，5％の場合は 86 ± 11.67 であった。更に杜仲葉10％の場合は飼料の摂取が明らかに低下したために，産卵率の低下が予測されるので，この実験を停止した。

以上のように杜仲葉の投与量を高めることにより5.0％までは産卵率が上昇を示した。したがって杜仲葉の雌鶏に対する効果は用量依存性であると考ええる。

2. 組織学的所見

うっ血性の所見は，一般的に軽度な変化としてよく観察される。本研究においても肺，心臓および肝臓で認められた。そのうち肝臓ではグループAとグループBの間では差は認められなかったが，肺と心臓では明らかにグループBよりもグループAの方が肺において軽度であり，心臓におけるうっ血所見は認められない例が多かった。また，心弁膜の浮腫性膨化などもグループBよりグループAの方が軽度か，あるいは認められなかった。このことは循環器系に対して杜仲葉の作用があったものと考えられる。

腺胃および十二指腸の粘膜上皮は常時，生理的な再生を行っているので，その剥離，脱落は普通であるが，グループAはグループBにおけるよりも軽度であったことは粘膜上皮の長持ちを意味するもので，粘膜上皮の生理的な若返りと考えられる。ま

た、気管支および腺胃の粘液分泌についても同様で、グループBよりグループAの方が軽度であった。

肝臓の脂肪化についてみるとグループBは80%に、グループAは57%に認められた。これは肝細胞の脂肪の代謝系に対しても杜仲葉が生理的活性を高めたものと考えられる。鶏の臓器における細胞浸潤は、日常、普通に間質組織内によく認められる所見であるが、認められないものもあり、原因の不明なことが多い。本研究においても心臓、肝臓、腺胃および脾臓などに細胞浸潤が認められたが、いずれもグループAはグループBに比較してその発生が抑えられていた。

以上の他、脾臓、骨髄ではグループAとグループBの間に形態的差は認められなかった。これは脾臓と骨髄では生理的範囲内の機能的変化を光顕で確認することは困難であるためと考えられる。しかし、前記の組織所見およびその他の成績から杜仲葉が全身性に生理的機能を良好にしているものと推察される。したがって、この点について更に検索、検討をする必要があると考える。

3. 筋肉と肝臓のタンパクとRNA量

老化が進行しつつある生体では、組織のタンパクとRNA量が低下する。その結果、組織の衰退が進むとされている。^{14,15)}しかし、我々の実験では、杜仲葉を投与したグループAではグループBに比較して、肝臓と筋肉のタンパクとRNA量が多く、組織の老化速度が抑制され充実した生理機能が保たれていることを示唆している。

結 論

今回の実験では加齢変化が進行しつつある雌鶏に長期間にわたり杜仲葉を与えたことにより、若い時の産卵率と飼料要求率に戻ったことは加齢変化を防ぎ、生体の機能を回復させることができたものと考ええる。また、組織学的所見と生化学的な所見からも、杜仲葉を投与したグループAに属する雌鶏の方が杜仲葉を投与しなかったグループBの雌鶏に比較して、良好であったことは杜仲葉の長期間の投与にもかかわらず、雌鶏の生体にとって副作用のないことを示しており、杜仲葉が抗加齢変化作用を示したことが確認された。

謝 辞

種々の御指導、御助言を賜った、富山医科薬科大

学の難波恒雄教授に深謝致します。又、本研究に際し、杜仲葉の提供を受けた大海バイオエンジニアリング(株)の枝芳春氏及び本実験にあたり、全面的に協力いただいた日本大学農獣医学部畜産学科家畜飼養学第1教室昭和63年度研究生、石川美奈子君、ならびに同大学理工学部薬学科生化学教室昭和63年度研究生、菊池好晃君、市原順子君に深謝いたします。

文 献

- 1) 江蘇新医学院：“中藥大辞典”，上海人民出版社，上海，pp. 1031-1033, 1977.
- 2) 李 時珍：“本草綱目（第3冊）”，人民衛生出版社，北京，pp. 1986-1987, 1987.
- 3) 難波恒雄：“原色和漢薬図鑑（下）”，大阪，pp. 144-146, 1980.
- 4) 難波恒雄，服部征雄，葉 加南，馬 永華，野村靖幸，金子周司，北村佳久，小泉 保，片山和憲，盧 輝：杜仲葉の研究(I)水抽出画分の一般薬理作用，和漢医薬学会誌 3, 89-97, 1986.
- 5) 馬 永華，葉 加南，服部征雄，金子周司，野村靖幸，倉茂洋一，若木邦彦，難波恒雄：杜仲葉の研究（IV）センナ長期投与による虚弱ラットへの杜仲葉水エキスの影響について，和漢医薬学会誌 4, 180-191, 1987.
- 6) 馬 永華，葉 加南，服部征雄，金子周司，野村靖幸，若木邦彦，倉茂洋一，難波恒雄：杜仲葉の研究（II）杜仲葉水エキス長期投与によるラットへの影響について，和漢医薬学会誌 4, 26-34, 1987.
- 7) 望月完二：第10章 鶏種別管理マニュアルゴトウ成鶏管理のポイント，“成鶏全書”，鶏の研究社，東京，p.146, 1983.
- 8) 宮園幸男：採卵鶏の管理，産卵最盛期とそれ以後の管理，“養鶏ハンドブック”，養賢堂，東京，pp. 500-501, 1982.
- 9) 倉田新一郎，友 安夫，大角 彰，井上哲夫：鶏に対する食酢の利用価値 第1報，大阪府立家禽試験所研究報告 No. 5, 11-23, 1972.
- 10) 柏本 忍：採卵鶏の飼養技術体系とその更新時期，畜産の研究 養賢堂 Vol. 35, 492-498, 4, 1981.
- 11) Schneider, W.C. : Phosphorus compounds in animal tissues. III. Comparison of methods for the estimation of nucleic acids. *J. Biol. Chem.* 164, 747-751, 1946.
- 12) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J. Lewis, Farr, A. and Randall, J. : Protein measurement with Folin Phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275, 1951.
- 13) Ceriotti, G. : Determination of nucleic acids in animal tissue. *J. Biol. Chem.* 214, 59-70, 1955.
- 14) Ashford A.J. and Pan, V.M. : Effect of diabetes on the rates of synthesis and degradation of ribosomes in rat muscle and liver in vivo. *J. Biol. Chem.* 261(9), 4059-4065, 1986.
- 15) Richardson, A. and Cheung, H.T. : The relationship between age-related changes in gene expression, protein turnover, and the responsiveness of an organism to stimuli. *Life Sci.* 30 (7), 605-613, 1982.

- 16) 坂井田節, 塩谷栗夫, 田中稔治: 木酢液を主成分とする製剤が鶏の産卵成績および卵質におよぼす影響. 日本家禽学会誌 **24**, 44-48, 1987.
- 17) 奥村純市, 田先威和夫: II. クロレラの給与が鶏の産卵におよぼす影響. 日本家禽学会誌 **10**, 238-241, 1973.
- 18) 松川誠夫: 採卵鶏に対する緑藻植物あなおおさ・あさくさのり給与試験. “畜産の研究,” 養賢堂, Vol. **36**, 781-782, 6, 1982.