

学位論文要約

氏名 Shaoxia PU
題目 The Influence of High Temperature on Reproduction and Effect of Sugar Cane Extract in the Japanese Quail
(ニホンウズラの繁殖に対する暑熱の影響とサトウキビエキスの効果)

夏季の高温は家禽産業において主要な減産要因である。暑熱ストレスによって産卵数のみならず、卵巣重量や卵胞重量も減少する。暑熱ストレスによって繁殖障害が起きることがよく知られているが、そのメカニズムについては不明な部分が多い。過去の報告の多くは、摂食量の減少することによって生じる視床下部や下垂体を介した卵巣卵胞発育の抑制が原因であることを示唆している。暑熱による卵胞発育抑制のメカニズムが分かれば、暑熱による繁殖抑制の解決策を策定する基礎データを提供できると期待される。

サトウキビエキス (SCE) は、サトウキビの絞り汁からブドウ糖、果糖、ショ糖を分離した残り、脱臭、抗炎症、抗酸化、様々な生物活性を含み、すでに動物の飼料添加物として使われている。本研究では、成熟ウズラを用いて、ホルモン濃度、性腺のステロイド合成に対する暑熱の影響について解析した。さらに、雌雄のウズラで SCE の飼料添加物としての可能性について評価した。

第2章では、成熟雌ウズラに10日間連続して高温に暴露し、卵の質に関する影響を解析した。その結果、暑熱処理群では卵重量が日毎に徐々に減少し、最後の2日間では有意に減少を示した。産卵率は全群において有意差が認められなかった。しかしながら、暑熱処理最終日には有意に減少した。卵重量の減少は、卵黄と卵白の減少のせいかもしれない。その原因を解析するため解剖した結果、暑熱処理群では卵巣重量及び卵管重量が軽量であった。また、黄色卵胞の数と卵巣重量が減少した。血液中コルチコステロン濃度が、暑熱処理によって有意に増加したが、すぐに正常値に復した。卵黄中濃度は黄色卵胞 (F1, F2, F3) で有意に増加した。さらに、ステロイド合成酵素の一つである 17β -HSD 遺伝子の卵巣での発現には変化が見られなかったが、副腎では有意に増加した。我々の結果は、暑熱処理により副腎においてステロイド合成酵素の遺伝子発現が増加し、その結果卵黄へのコルチコステロンの蓄積が増加したことを示唆した。

第3章では、暑熱処理影響のメカニズムを明らかにするために、血清中代謝物含有量を解析した。血清中に165の代謝物が検出され、その内の7つについて対照群と暑熱処理群の間で有意な差が認められた。Web上の解析ソフト MetaboAnalyst によって解析したところ、暑熱処理が、butanoate, propanoate, および pyrimidine の代謝、ケトン体の合成と分解、cyanoamino acid の代謝に影響を与えていることが示された。さらに、小腸と肝臓を組織学的に解析した結果、暑熱処理が十二指腸、空腸、回腸の絨毛の高さを減少させることを明らかにした。肝臓の中性脂肪、コレステロール含量が増加したが、血液中コレステロールレベルは低下した。肝臓における脂質代謝に関連した遺伝子の発現量が暑熱処理によって有意に変化した。暑熱処理が小腸、肝臓の障害を起こした結果、脂質代謝に影響を与えたことを示唆した。暑熱下で肝臓を保護することにより、夏季の高温に対抗できる一つの可能性を示した。

第4章では、10日間の暑熱処理の代わりに、さらに長い期間、20日間、の影響について解析した。成熟した雌ウズラを用い、生殖機能への影響を解析した。血清中の代謝物につ

いても第3章同様に解析した。暑熱処理によって、卵巣、卵管重量ともに有意に減少し、黄色卵胞数、重量共に減少した。その結果、卵重量が減少した。受精率には変化がなかったが、暑熱処理群で、初生雛の体重が有意に減少した。興味深いことに、血中コルチコステロン濃度、エストラジオール-17 β 濃度がどちらも増加した。卵黄中のコルチコステロン濃度、エストラジオール-17 β 濃度ともに同様の傾向を示した。卵巣ステロイド合成酵素 P450scc、エストロジェンレセプター(ER)の遺伝子発現が上昇した。しかしながら、FSH のレセプターの遺伝子発現は減少した。代謝解析の結果、血清中に 165 の代謝物が検出され、8 つの代謝物に有意な差が認められた。MetaboAnalyst での分析結果、propanoate 代謝、beta-alanine 代謝、aspartate と histidine 代謝にも影響することが明らかとなった。肝臓の組織解析の結果は暑熱処理が肝臓の脂質代謝異常を起こすことを示した。中性脂肪、コレステロールが肝臓で増加し、AGPAT5 mRNA が増加していた。さらに、肝臓でアポトーシスに関連した caspase3 の遺伝子発現と、サイトカインの IL-6 と TLR4 の遺伝子発現が増加していた。NF- κ B の遺伝子発現は減少していた。暑熱処理が肝臓を傷害し、脂質代謝が影響を受け、apoptosis と炎症が生じた。血液中エストラジオール-17 β の肝臓での代謝も傷害され、卵巣の機能不全、黄色卵胞の減少、重量減少、卵重量、初生雛体重の減少などを引き起こした。暑熱下で肝臓を保護することが、夏の高温の影響を軽減することに繋がると考えられた。

第5章では、暑熱処理に対する SCE の効果を、雌ウズラを用いて検討した。使用した SCE には、31.61%が窒素を含まない物質、16.9%がタンパク質、10.1%が糖類、4.8%がポリフェノールである。試料に添加した結果、暑熱処理による卵重量の減少をわずかに緩和した。暑熱処理により、卵巣、卵管重量が6例中2例で減少した。その血中コルチコステロンとエストラジオール 17 β 濃度が減少した。卵巣でのステロイド合成酵素 P450scc の遺伝子発現が暑熱処理後に増加した。0.02%の SCE 飼料添加は卵生産を増加したが、P450scc の遺伝子発現は暑熱処理によってやはり増加した。今回使用した濃度の SCE 摂取の暑熱処理に対する効果は限定的で、さらなる検討が必要であると考えられた。

雄ウズラを用いて SCE 摂取の効果を検討した。過去の実験では SCE 摂取により雄ウズラの精巣重量が減少し、クロアカ腺の面積も減少した。そのメカニズム検討する目的で、SCE 投与が雄ウズラの性行動と精巣機能に与える作用を検討した結果、血中テストステロン濃度が減少した。精巣のステロイド合成酵素 P450c17、17 β HSD、P450scc、3 β HSD の遺伝子発現を解析した結果、いずれも減少した。蛍光免疫組織化学染色とウエスタンブロッティング法で精巣の 3 β -HSD を解析した結果、SCE 投与でいずれも減少していた。精巣の間質細胞を培養し、SCE をヒツジ LH とともに培養液に添加した結果、テストステロン分泌、3 β HSD の遺伝子発現ともに、減少した。SCE は直接精巣の間質細胞に作用し、3 β HSD の発現を抑制して、精巣機能を抑制すると考えられた。

学 位 論 文 要 約

氏 名 Shaoxia PU
題 目 The Influence of High Temperature on Reproduction and Effect of Sugar Cane Extract in the Japanese Quail
(ニホンウズラの繁殖に対する暑熱の影響とサトウキビエキスの効果)

High temperature in summer is one of the major factors restrict poultry industry. Heat stress can reduce egg laying number, decrease ovarian weight and hierarchical follicles number. Although reproductive failure associated with heat stress is a well-known phenomenon, its mechanism involved in this failure is not clear. Pervious researches found the decreased feed intake, and its effects at the level of the hypothalamus and pituitary may contribute to suppression of ovarian follicular development. Understanding the mechanism about high temperature suppression on follicular development can provide basal knowledge for proposing solutions to reproductive failure by heat.

Sugar Cane Extract (SCE) is the residue after removing glucose, fructose and sucrose from sugar cane juice, which has been proved wide range of biological effects, including deodorization, anti-inflammation and anti-oxidative, and already used in animal feed. In this study, adult Japanese quails (*Coturnix japonica*) were used to study the temperature influence in hormone levels, and gonadal steroidogenesis. SCE was used as feed additive in quails (male and female) to evaluate the feasibility of SCE as a feed additive resource.

In Chapter 2, adult female quails were exposed to consecutive 10 days high temperature for uncovering how high temperature affected egg qualities. And found egg weight slightly decreased day by day in heat-challenged group, the last two days of experimental period, egg weight showed significantly decreased in heat group. The laying rate showed no difference in whole experimental period, but significantly decrease at the last day of heat treatment showed. The decreased egg weight may due to decrease of yolk and albumin. For investigating causes, we anatomized maternal quails and found that ovaries and oviducts were lighter in the experimental quails, and the hierarchical follicles number and ovarian weight decreased. Although serum corticosterone significantly increased after heat challenge, and soon recovered to normal level, the yolk corticosterone in the hierarchical follicle (F1, F2, F3) significantly increased. Furthermore, steroidogenic enzymes gene *17 β -HSD* did not change in the ovary but significantly increased in adrenals. Our finding indicates that heat challenge increased steroidogenic enzymes gene expression in the adrenal gland, and alter corticosterone deposition in the yolk, which suggests heat challenge affects maternal ovary by targeting adrenal function.

In Chapter 3, to further investigate the mechanism for the influence, metabolite content in the serum of heat challenged quails were examined using metabolomic analysis. Which identified 165 metabolites in the serum, and significant differences

were observed in the serum for 7 metabolites between two groups. An analysis by MetaboAnalyst, a web-based metabolome data tool, indicate that high temperature affected butanoate metabolism, propanoate metabolism, pyrimidine metabolism, synthesis and degradation of ketone bodies, cyanoamino acid metabolism. Furthermore, small intestines and liver were stained with hematoxylin–eosin (HE). Results indicate heat challenge decrease villus height in duodenum, jejunum, and ileum. Triglyceride and cholesterol level in liver increased, however cholesterol level decreased in serum. Genes related to lipid metabolic significantly changed in the liver after heat challenge. Which suggests high temperature cause intestine and liver damage, thus lipid metabolic was affected. Protect liver under high temperature can be one solution for coping with high temperatures in summer.

In Chapter 4, instead of 10 days heat treatment, an extend experimental period was conducted (20 days). Adult female quails were introduced into this investigation for evaluating reproductive affect. Serum metabolite contents analysis was performed same as Chapter 3. Quail ovary and oviduct weight significantly decreased after heat challenge, the hierarchical follicles number and weight decreased as well. Consequently, egg weight decreased. Although fertilization rate showed no difference, chicks birth weight significantly decreased in heat group. Interestingly both corticosterone and 17 β -estradiol in the serum significantly increased after heat challenge. Yolk corticosterone and 17 β -estradiol concentration content changed in the same tendency. Ovary steroidogenic enzymes gene *P450scc* and *estrogen receptor (ER)* expression level increased, however, *FSH receptor (FSHR)* decreased in heat-challenged quails. The metabolomic analysis identified 165 metabolites in the serum, and significant differences were observed in the serum for 8 metabolites between two groups. An analysis by MetaboAnalyst, a web-based metabolome data tool, indicate that high temperature affected propanoate metabolism; beta-alanine metabolism, aspartate metabolism and histidine metabolism. Liver was stained with hematoxylin–eosin (HE). Results indicate heat challenge induced abnormal lipid metabolism. Triglyceride and cholesterol level in liver increased. *AGPAT5* mRNA expression increased in heat group. Furthermore, liver apoptosis gene *caspase3* and immunocytokines gene *IL-6* and *TLR4* increased in heat group, *NF- κ B* gene expression decreased in heat group. High temperature cause liver damage, thus lipid metabolic was affected, apoptosis and inflammation occurred. Serum 17 β -estradiol had abnormal metabolism in liver, which cause ovary dysfunction, hierarchical follicles number and weight decreased, egg weight and chicks birth weight decreased. Protect liver under high temperature can be one solution for coping with high temperatures in summer.

In Chapter 5, effect of SCE on heat challenged female quail was investigated. SCE, which used in present study, contains 31.61% nitrogen free extract, 16.9% protein, 10.1% saccharides and 4.8% polyphenol. Results indicated that heat-challenge decrease egg weight, SCE feed additive can slightly rescue the decrease. Heat challenged quails have possibility to showed ovary and oviduct degradation (2/6) and those quails have decreased corticosterone and 17 β -Estradiol. Steroidogenic enzyme gene expressions were detected in ovary, *P450scc* increased after the heat challenge. Results indicated that 0.02%SCE feed additive could increase egg production. *P450scc*

was susceptible to high temperature. However, according to our results, the function of SCE on relieve the effects of high temperature is not obvious in present condition. More researches were needed to support it.

Consider about the different genders, male quails were used for clarifying the function of SCE. Our previous studies found SCE feed decrease male quail testis weight and cloaca gland size, however the mechanism underlying this phenomenon is still unknown. Here we show the effects of SCE on sexual behavior and gonad function in male quails with testosterone concentration in serum decreased. Steroidogenic enzymes *P450c17*, *17 β HSD*, *P450scc* and *3 β HSD* expression in the testis decreased. Immunofluorescence staining and western blotting results showed decreased 3 β -HSD in the testis of SCE groups. Later, testicular interstitial cells were isolated and cultured with SCE and oLH; testosterone secretion as well as *3 β HSD* gene expression was suppressed by SCE. We propose a model in which SCE influences male quail gonadal function by suppressing the expression of *3 β -HSD* in testicular interstitial cells.