

氏名 (本 (国) 籍)	Shaoxia PU (中華人民共和国)		
主指導教員氏名	東京農工大学 教授 渡 辺 元		
学位の種類	博士 (獣医学)		
学位記番号	獣医博甲第521号		
学位授与年月日	平成31年3月13日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
研究科及び専攻	連合獣医学研究科 獣医学専攻		
研究指導を受けた大学	東京農工大学		
学位論文題目	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)		
審査委員	主査	東京農工大学 准教授	佐々木 一 昭
	副査	帯広畜産大学 准教授	室 井 喜 景
	副査	岩 手 大 学 教 授	高 橋 透
	副査	東京農工大学 教 授	渡 辺 元
	副査	岐 阜 大 学 准教授	椎 名 貴 彦

#### 学位論文の内容の要旨

夏季の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。本研究では、暑熱による卵胞発育抑制のメカニズムを内分泌学的、および栄養学的に解析した。

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、抗炎症及び抗酸化生物活性物質を含み、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、雌雄の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 SCE 投与の効果解析した。

第2章では、成熟雌ウズラを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、産卵率も有意に減少した。暑熱処理群では卵巣重量及び卵管重量が有意に減少した。また、黄色卵胞の数と卵巣重量も減少した。一方、血液中コルチコステロン濃度は暑熱処理によって有意に増加し、卵黄中コルチコステロン濃度も黄色卵胞 (F1, F2, F3) で有意に増加した。ステロイド合成酵素の一つである  $17\beta$ -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。以上の結果は、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。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たことが示された。さらに、小腸と肝臓を組織学的に解析した結果、十二指腸、空腸、回腸の絨毛の高さが減少す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有意に変化した。以上の結果から、暑熱処理が小腸、肝臓の障害を起こした結果として、脂質代謝に影響を受けたと考えられた。

第4章では、20日間の暑熱処理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結果、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、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。血中コルチコステロン濃度、エストラジオール-17 $\beta$ 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 $\beta$ 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- $\kappa$ B の遺伝子発現は減少していた。以上の結果から、暑熱処理が肝臓を傷害し、脂質代謝に影響を受け、apoptosis と炎症が生じたと判断された。血液中エストラジオール-17 $\beta$ 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、雌雄ウズラを用いて解析した。餌料に SCE を添加した結果、雌では暑熱処理による卵重量の減少をわずかに緩和した。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 $\beta$ 濃度が減少した。一方、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 の遺伝子発現も暑熱処理によって増加した。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。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、交尾行動が減少した。精巣のステロイド合成酵素 P450c17, 17 $\beta$  HSD, P450scc, 3 $\beta$  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 $\beta$ -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 $\beta$  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 $\beta$  HSD の発現を抑制して、精巣機能を抑制すると考えられた。

暑熱ストレスによって家禽の繁殖障害が起きるメカニズムについて、ウズラをモデルとして暑熱による影響を内分泌学的に解析した結果、卵黄へのコルチコステロンの蓄積が増加すること、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、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こと、副腎と性腺でステロイド生成酵素の発現調節に SCE が異なる作用を示すことが明らかとなった。

## 審査結果の要旨

本研究では、暑熱ストレスによって家禽の繁殖障害が起きるメカニズムについて、ウズラをモデルとして用い、暑熱による卵胞発育抑制を内分泌学的に解析した。

まず、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ものの、暑熱処理群では卵巣重量及び卵管重量が軽量であり、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、卵黄中濃度が黄色卵胞(F1, F2, F3)で有意に増加した。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することが判明した。

次に、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、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。以上の結果は、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可能性を示した。

さらに長い期間、20日間、の影響について、成熟した雌ウズラを用い、生殖機能への影響を解析した。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、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。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。血液中エストラジオール-17 $\beta$ 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と考えられた。

暑熱処理に対するサトウキビエキス (SCE) の効果を、雌ウズラを用いて検討した。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。しかしながら SCE 摂取の暑熱処理に対する効果は限定的であった。

雄ウズラを用いて SCE 摂取の効果を検討するため、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、交尾行動、血中テストステロン濃度が減少した。SCE は直接精巣の間質細胞に作用し、3 $\beta$  HSD の発現を抑制して精巣機能を抑制すると考えられた。

上記のように申請者は、暑熱ストレスによって家禽の繁殖障害が起きるメカニズムについて、ウズラをモデルとして暑熱による卵胞発育抑制を内分泌学的に解析し、卵黄へのコルチコステロンの蓄積が増加すること、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、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ことを示唆し、非常に意義があるものと認める。

以上について、審査委員全員一致で本論文が岐阜大学大学院連合獣医学研究科の学位論文として充分価値があると認めた。

### 基礎となる学術論文

- 1) 題 目 : Heat challenge influences serum metabolites concentrations and liver lipid metabolism in Japanese quail (*Coturnix japonica*)

著者名 : PU, S., Usuda, K., Nagaoka, K. and Watanabe, G.  
学術雑誌名 : The Journal of Veterinary Medical Science  
卷・号・頁・発行年 : In Press

既発表学術論文

- 1) 題 目 : *Tert*-butylhydroquinone attenuates scrotal heat-induced damage by regulating Nrf2-antioxidant system in the mouse testis  
著者名 : Yansen, L., Yun, C., Fei, W., Shaoxia, P., Yonghui, Z. and ChunMei, L.  
学術雑誌名 : General and Comparative Endocrinology  
卷・号・頁・発行年 : 37(2):121-126, 2014
- 2) 題 目 : Supplemental dietary phytosterin protects against 4-nitrophenol-induced oxidative stress and apoptosis in rat testes  
著者名 : Yonghui, Z., Meiyan, S., Xiaoli, R., Shaoxia, P., Yansen, L. and ChunMei, L.  
学術雑誌名 : Toxicology Reports  
卷・号・頁・発行年 : 2(2015):664-676, 2015
- 3) 題 目 : Expression of nerve growth factor (NGF) and its receptors TrkA and p75 in the reproductive organs of laying hens  
著者名 : Shaoxia, P., Changwei, Q., Zhi, L., Yansen, L. and Chunmei, L.  
学術雑誌名 : Brazilian Journal of Poultry Science  
卷・号・頁・発行年 : 18(1):187-192, 2016