

原著論文

アルギニンの給与が 黒毛和種牛の血中遊離アミノ酸濃度および免疫機能に及ぼす影響

松田敬一¹⁾ 前田洋佑²⁾ 岡田 徹³⁾ 大塚浩通⁴⁾

- 1) 宮城県農業共済組合 家畜診療研修所
〒 981-3602 宮城県黒川郡大衡村大衡字平林 39-4
- 2) 北里大学 獣医学部
〒 034-8628 青森県十和田市東二十三番町 35-1
- 3) あすかアニマルヘルス株式会社
〒 163-0541 東京都新宿区西新宿一丁目 26 番 2 号
- 4) 酪農学園大学 獣医学群
〒 069-8501 北海道江別市文京台緑町 582 番地

連絡担当者：松田敬一

〒 981-3602 宮城県黒川郡大衡村大衡字平林 39-4

Tel : 022-345-2239 Fax : 022-345-0891

E-mail : matsuda@nosaimiyagi.or.jp

【要 約】

アルギニンは、様々な生理作用を表すアミノ酸であり、ヒトにおいて免疫賦活作用があると報告されている。しかし、牛におけるアルギニンの生理作用はあまり明らかにされていない。今回我々は、アルギニンを牛に給与し血中遊離アミノ酸濃度および免疫細胞数に及ぼす影響を調査した。調査には、10ヶ月齢の黒毛和種肥育牛 36頭（去勢 18頭、雌 18頭）を用いた。試験開始より3ヶ月間、L-アルギニンを20%含有したアルギニン配合飼料（50g/頭/日）を給与した18頭を給与群、非給与の18頭を対照群とした。アルギニン給与前（10ヶ月齢）、給与後（13ヶ月齢）、および給与終了3ヵ月後（16ヶ月齢）に採血を行い、血中遊離アミノ酸濃度および末梢血単核球表面抗原の解析を行った。血中遊離アミノ酸濃度は、アルギニンが2群間で有意な交互作用が認められ、単純主効果検定の結果、給与群の13ヶ月齢が給与群の10、16ヶ月齢および対照群の10、13、16ヶ月齢に比べ有意に高い値を示した。他のアミノ酸では群間に有意な差は認められなかった。末梢血単核球表面抗原陽性細胞数は、CD3陽性 CD45R 陽性細胞数は給与群が対照群に比べ有意に高い値で推移した。他の細胞では群間に有意な差は認められなかった。また、疾病発生率は給与群（5.56%）が対照群（44.44%）に比べ有意に低かった。これらの結果から、アルギニンの給与によって、血中遊離アルギニン濃度が増加するとともに、疾病発生率が改善され、免疫細胞数もそれと同時に変動したと考えられ、アルギニンは免疫機能を改善させることによって疾病発生を防除する可能性がある。

キーワード：アミノ酸、アルギニン、免疫機能、黒毛和種牛

受付：2015年1月9日

受理：2015年6月18日

緒論

アミノ酸は、動物においてタンパク質の構成成分となる重要な栄養素であり、生体内で合成することが出来ない必須アミノ酸と、合成することが出来る非必須アミノ酸とに分類される[17]。アミノ酸は、様々な生理作用を有しており、免疫機能に作用するアミノ酸としては、グルタミン [26, 27]、オルニチン [11, 12]、分岐鎖アミノ酸 (BCAA) [2] およびアルギニンなどが報告されている。

アルギニン (Arg) はアミノ酸の一つであり、ヒトを含む多くの哺乳動物において準必須アミノ酸 (条件付必須アミノ酸) として考えられており、成長期などの生体の状態によっては摂取することが望ましいアミノ酸である[23]。また、体内で一酸化窒素 (NO) の合成基質となる [4] など様々な生理作用を示すアミノ酸である。ヒトにおいて、血管拡張作用 [10]、成長ホルモン分泌促進作用 [3]、オルニチン回路の活性化 [19]、および免疫賦活作用 [5] などが報告されている。しかし、牛における Arg の生理作用はあまり明らかにされておらず、特に免疫機能に及ぼす影響についての報告はほとんど見られない。そこで、我々は Arg の給与が牛の免疫機能に及ぼす影響を調査することを目的として、黒毛和種牛に Arg 配合した混合飼料を給与し血中遊離アミノ酸濃度および免疫細胞数の推移、疾病発生率を調査した。

材料と方法

調査対象牛および群分け：管内6黒毛和種肥育農家に飼養されていた臨床的に健康な10ヶ月齢の黒毛和種肥育牛36頭(去勢18頭、雌18頭)を用いた。試験協力農家は同一肉牛部会に加盟しており、基本となる肥育飼養管理方法は同一であった。給与飼料は、粗飼料にはチモシー乾草および県内で収集された稲ワラ、濃厚飼料には大豆粕および同一の配合飼料(現物中%：DM 88%、TDN 70%、CP 11.5%、NDF 21.0%)を用いた。給与量および飼料養分含量は、10ヶ月齢ではチモシー乾草3kg、稲ワラ2kg、および配合飼料2kg(乾物中%：TDN 59.8%、CP 9.2%、NDF 55.3%)、13ヶ月齢では、チモシー乾草1kg、稲ワラ2kg、大豆粕

0.5kg、および配合飼料4kg(乾物中%：TDN 67.4%、CP 13.1%、NDF 41.1%)、16ヶ月齢では、稲ワラ2kg、大豆粕0.5kg、および配合飼料7kg(乾物中%：TDN 72.2%、CP 13.5%、NDF 32.9%)と牛の成長に合わせて濃厚飼料を増給した。

通常の飼料に加え試験開始から3か月間、L-Argを20%含有したArg配合飼料(アルファット、あすかアニマルヘルス株式会社、東京)を1日50g給与した18頭(去勢9頭、雌9頭)を給与群、および通常の飼料のみを給与した18頭(去勢9頭、雌9頭)を対照群に群分けした。各肥育農場に、給与群および対照群の両群を配置した。各農場における調査対象牛の群分けおよび性別は以下の通りである。A農場、給与群：雌2頭、対照群：雌2頭。B農場、給与群：去勢3頭、対照群：去勢3頭。C農場、給与群：去勢2頭および雌2頭、対照群：去勢2頭および雌2頭。D農場、給与群：雌2頭、対照群：雌2頭。E農場、給与群：雌3頭、対照群：雌3頭。F農場、給与群：去勢4頭、対照群：去勢4頭。

調査方法：Arg配合飼料給与前(10ヶ月齢)、給与3ヶ月間終了時(13ヶ月齢)、および給与終了3ヶ月後(16ヶ月齢)に体側および採血を行った。体側は、電気抵抗線式はかり(SC-4L、田中衡機工業所、新潟)を用いて体重、牛体測定器(NFK64、富士平工業株式会社、東京)を用いて体高、および和牛体重推定尺(NFK71、富士平工業株式会社)を用いて胸囲の測定を行った。採血は、頸静脈より血清分離用凝固促進剤入真空採血管(ベノジェクトII VP-AS109K、テルモ株式会社、東京)およびEDTA-2Na加真空採血管(ベノジェクトII VP-DK052K、テルモ株式会社)を用いて実施した。採血後1時間以内に遠心分離を行い、血清分離用凝固促進剤入真空採血管から血清を得た。得られた血清は、血液生化学検査および血中遊離アミノ酸濃度の測定に供した。また、EDTA-2Na添加真空採血管で採取した血液は、白血球数(WBC)の測定および末梢血単核球表面抗原の解析に供した。加えて、調査期間中の疾病発生数(腸炎および呼吸器感染症)を調査し、各群において疾病発生率(疾病発生数/調査対象牛数×100)を算出した。

血液生化学検査：血液生化学検査として血清ビタミンA濃度(VA)、血清ビタミンE濃度(VE)、血清アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ活性値(AST)、血清 γ -グルタミルトランスペプチターゼ活性値(GGT)、血清尿素窒素濃度(BUN)、血清アルブミン濃度(Alb)、血清総コレステロール濃度(T.cho)、および血清総タンパク質濃度(TP)を測定した。VAおよびVEの測定は、高速液体クロマトグラフィー法を用いて測定した。AST、GGT、BUN、およびT.Choは酵素法を用いて測定した。Albはブロムクレゾールグリーン法を用いて測定した。TPはBiuret法を用いて測定した。

血中遊離アミノ酸濃度の測定：血中遊離アミノ酸濃度の測定には、全自動アミノ酸分析機(JLC-500/V、日本電子株式会社)を用いて、イオン交換クロマトグラフィ法によりアミノ酸の分離および測定を行った。測定項目は、必須アミノ酸(EAA)としてメチオニン(Met)、リジン(Lys)、スレオニン(Thr)、ヒスチジン(His)、トリプトファン(Trp)、フェニルアラニン(Phe)、バリン(Val)、イソロイシン(Ile)およびロイシン(Leu)を、非必須アミノ酸(NEAA)としてグリシン(Gly)、アラニン(Ala)、アスパラギン(Asn)、アスパラギン酸(Asp)、グルタミン(Gln)、グルタミン酸(Glu)、セリン(Ser)、Arg、プロリン(Pro)およびチロシン(Tyr)とした。

末梢血単核球表面抗原の解析：WBCの測定は、自動血球計算装置(PC607、ERMA社、Germany)を用いて行った。末梢血単核球表面抗原の解析は間接蛍光抗体法を用い、報告されている方法に準じてフローサイトメーター(FACScan、Becton Dickinson、U.S.A.)で測定および解析した[24]。使用した一次抗体は、抗ウシCD3抗体(MMIA、VMRD、U.S.A.:成熟総T細胞)、抗ウシCD4抗体(CACT183B、VMRD:ヘルパーT細胞)、抗ウシCD8抗体(9ACT80C、VMRD:キラーT細胞)、抗ヒトCD14抗体(MY-4、ベックマンコールター(株)、東京:単球)、抗ウシCD45R抗体(GC6A、VMRD:B細胞、ナイーブT細胞)、抗ウシCD335抗体(MCA2365、AbDserotec、UK:ナチュラルキラー(NK)細胞)、抗ウシWC1-N1抗体(B7A1、VMRD: $\gamma\delta$ T細胞)、

および抗ウシMHC class-II抗体(TH14B、VMRD:単球、B細胞)である。算定はこれまでの報告を参考に[14]、FACScan解析により得られたサイトグラム中の単核球および顆粒球の割合、単核球中の各抗原の陽性割合および白血球数から下記の計算式を用いて各細胞の実数値を算出した。細胞数(個/ $\mu\ell$) = 単核球中の対象細胞陽性率 \times WBC \times [単核球割合 / (単核球割合 + 顆粒球割合)]

統計方法：統計解析にはSPSS 13.0(エス・ピー・エス・エス株式会社、東京)を用いた。得られた結果は平均値 \pm 標準偏差で示した。各検査項目における農場間、性別間、および群間の比較には、反復測定二元配置分散分析を用い、群間効果を求め危険率5%未満となった項目を有意差ありとした。また、要因間において交互作用が認められた項目についてはBonferroniの方法による単純主効果検定を用いて各要因における主効果の検出を行い、危険率5%未満となった要因を有意差ありとした。疾病発生率の比較は、Fisherの直接確立計算法を実施し、危険率5%未満を有意差ありとした。

結 果

体側結果：農場間および群間の比較では各項目で有意な差は認められなかった(表1)。性別間の比較では、体重、体高、および胸囲は、去勢が雌に比べて有意に高い値で推移した。

血液生化学検査：農場間、性別間および群間の比較において、すべての検査項目で有意な差は認められなかった(表1)。

血中遊離アミノ酸濃度：農場間および性別間の比較では、すべての検査項目で有意な差は認められなかった。群間の比較では、Argは2群間で有意な交互作用が認められ、単純主効果検定の結果、給与群の13ヶ月齢($1179.0 \pm 266.6 \text{ nmol/m}\ell$)が給与群の10($243.7 \pm 46.6 \text{ nmol/m}\ell$)、16ヶ月齢($464.5 \pm 506.9 \text{ nmol/m}\ell$)および対照群の10($383.9 \pm 432.0 \text{ nmol/m}\ell$)、13($597.5 \pm 468.5 \text{ nmol/m}\ell$)、16ヶ月齢($588.3 \pm 540.9 \text{ nmol/m}\ell$)に比べ有意に高い値を示した。他のアミノ酸では群間に有意な差は認められなかった(表2)。

末梢血単核球細胞構成：農場間および性別間の比較では、すべての検査項目で有意な差は認

表1. 各群における体側および血液生化学検査結果の推移

		10ヶ月齢(給与前)	13ヶ月齢(給与後)	16ヶ月齢(給与終了3ヶ月後)
体重 (kg)	給与群	291.3 ± 37.4	347.6 ± 42.8	455.7 ± 62.4
	対照群	296.0 ± 34.7	373.1 ± 49.5	445.2 ± 60.1
体高 (cm)	給与群	115.6 ± 3.5	120.3 ± 4.5	125.7 ± 5.1
	対照群	116.1 ± 5.3	121.4 ± 6.0	126.9 ± 7.6
胸囲 (cm)	給与群	153.0 ± 6.7	171.6 ± 6.3	186.0 ± 9.7
	対照群	152.2 ± 5.1	169.0 ± 6.0	183.4 ± 6.6
血清ビタミンA濃度(VA) (IU/dL)	給与群	78.1 ± 28.4	101.6 ± 37.3	96.1 ± 26.5
	対照群	93.8 ± 32.8	123.4 ± 42.4	103.1 ± 50.0
血清ビタミンE濃度(VE) (IU/dL)	給与群	206.5 ± 100.3	349.7 ± 116.5	482.8 ± 31.8
	対照群	242.2 ± 115.7	375.0 ± 103.3	488.2 ± 52.5
血清アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ活性値(AST) (IU/L)	給与群	70.4 ± 28.1	73.9 ± 16.4	84.4 ± 17.5
	対照群	78.5 ± 33.5	87.8 ± 42.8	85.9 ± 19.0
血清γ-グルタミルトランスペプチダーゼ活性値(GGT) (IU/L)	給与群	26.1 ± 2.4	27.1 ± 5.8	29.8 ± 4.5
	対照群	25.5 ± 3.4	28.5 ± 10.4	29.5 ± 5.6
血清尿素窒素濃度(BUN) (mg/dL)	給与群	8.5 ± 3.4	16.4 ± 4.5	16.0 ± 3.5
	対照群	9.9 ± 3.2	16.9 ± 5.4	15.4 ± 3.0
血清アルブミン濃度(Alb) (mg/dL)	給与群	3.67 ± 0.10	3.68 ± 0.19	3.53 ± 0.15
	対照群	3.67 ± 0.17	3.59 ± 0.15	3.51 ± 0.19
血清総コレステロール濃度(T.cho) (mg/dL)	給与群	98.5 ± 18.1	119.4 ± 35.5	158.6 ± 33.6
	対照群	100.0 ± 24.2	116.6 ± 22.9	152.7 ± 20.1
血清総タンパク質濃度(TP) (mg/dL)	給与群	6.58 ± 0.22	6.53 ± 0.44	6.53 ± 0.25
	対照群	6.47 ± 0.34	6.59 ± 0.41	6.68 ± 0.35

mean ± SD

められなかった。群間の比較では、CD3 陽性 CD45R 陽性細胞数は給与群 (10ヶ月齢: 481.4 ± 328.2 個 / μ l、13ヶ月齢: 791.4 ± 355.5 個 / μ l、16ヶ月齢: 789.6 ± 215.9 個 / μ l) が対照群 (10ヶ月齢: 462.4 ± 259.4 個 / μ l、13ヶ月齢: 591.4 ± 212.1 個 / μ l、16ヶ月齢: 647.6 ± 272.5 個 / μ l) に比べ有意に高い値で推移した。WBC および他の細胞では群間に有意な差は認められなかった (表3)。

疾病発生率: 各群の疾病発生数は、給与群 (腸炎1頭、呼吸器感染症0頭) および対照群 (腸炎3頭、呼吸器感染症5頭) であった。疾病発生率は、給与群 5.56% および対照群 44.44% であり給与群が対照群に比べ有意に低かった。

考 察

本試験の結果より、体重、体高、胸囲、および血液生化学検査の全ての項目で、群間に有意な差は認められなかったことから、Arg 配合飼料の給与は、本試験で用いた期間および量では牛の発育や健康状態に大きな影響を及ぼさないと考えられた。血中遊離アミノ酸濃度では、Arg 配合飼料を3ヶ月間継続給与した直後の13ヶ月齢で、Arg が給与前の10ヶ月齢に比べ有意

に増加し、給与終了3ヶ月後の16ヶ月齢では投与前の濃度と差の無い濃度まで低下したことから、Arg 配合飼料に含有されている L- Arg は牛に吸収され血中濃度を増加させることが確認された。また、Arg 以外のアミノ酸には有意な変化が認められなかったことから、Arg 配合飼料の給与は他のアミノ酸濃度に影響を及ぼさないことが示唆された。Arg は、タンパク質の合成促進や筋肉増強 [9]、若い動物の成長 [21, 22] に関与している。山崎らは、黒毛和種牛は14ヶ月齢を中心に発育すると報告しており [25]、本試験期間は牛において増体率の高い時期であるため Arg の消費量が多いと考えられる。しかし、給与群の13ヶ月齢における血中遊離 Arg 濃度が対照群に比べ有意に高い値を示したことから、Arg 配合飼料は本試験で給与した量で消費量の多い時期においても血中濃度を増加させることが示唆された。しかし、反芻動物が Arg を摂取した時の消化および吸収に関する報告は無く、その機序は明らかになっていない。そのため、今後詳細に検討する必要がある。

末梢血単核球表面抗原陽性細胞数は、ナイーブ成熟総 T 細胞を示す CD3 陽性 CD45R 陽性

表 2. 各群における血中遊離アミノ酸濃度の推移

		10ヶ月齢(給与前)	13ヶ月齢(給与後)	16ヶ月齢(給与終了3ヶ月後)
必須アミノ酸 (EAA)	メチオニン (Met)	給与群 30.9 ± 6.2 対照群 30.2 ± 4.9	40.8 ± 8.4 38.4 ± 10.1	52.5 ± 22.4 55.4 ± 25.8
	リジン (Lys)	給与群 158.0 ± 32.9 対照群 158.3 ± 28.8	190.6 ± 52.1 188.4 ± 46.4	249.6 ± 100.2 275.1 ± 137.4
	スレオニン (Thr)	給与群 81.6 ± 18.9 対照群 86.3 ± 15.0	98.2 ± 24.1 97.6 ± 32.6	128.9 ± 56.8 133.9 ± 60.8
	ヒスチジン (His)	給与群 79.6 ± 18.5 対照群 79.5 ± 16.4	108.0 ± 25.0 106.1 ± 25.0	151.1 ± 72.2 152.4 ± 82.8
	トリプトファン (Trp)	給与群 49.8 ± 11.2 対照群 50.3 ± 10.1	74.6 ± 16.4 73.6 ± 20.1	126.0 ± 66.9 127.2 ± 66.3
	フェニルアラニン (Phe)	給与群 82.8 ± 16.6 対照群 88.7 ± 17.1	88.9 ± 20.6 89.8 ± 18.0	124.1 ± 44.2 140.2 ± 63.4
	バリン (Val)	給与群 334.7 ± 70.1 対照群 358.7 ± 80.1	428.8 ± 102.9 429.6 ± 97.4	584.8 ± 191.6 664.1 ± 298.7
	イソロイシン (Ile)	給与群 142.1 ± 28.2 対照群 137.2 ± 28.2	177.2 ± 41.0 178.6 ± 45.1	229.2 ± 79.8 259.4 ± 122.4
	ロイシン (Leu)	給与群 201.1 ± 44.5 対照群 210.1 ± 43.1	230.6 ± 58.2 229.5 ± 65.2	322.9 ± 111.2 374.1 ± 184.4
	非必須アミノ酸 (NEAA)	グリシン (Gly)	給与群 392.5 ± 73.6 対照群 419.7 ± 84.9	456.6 ± 116.9 457.4 ± 88.6
アラニン (Ala)		給与群 376.3 ± 63.6 対照群 354.4 ± 58.4	354.7 ± 83.4 349.6 ± 74.5	487.8 ± 174.0 526.3 ± 254.5
アスパラギン (Asn)		給与群 38.2 ± 7.4 対照群 39.9 ± 5.3	51.6 ± 15.5 53.9 ± 16.6	55.1 ± 38.6 55.7 ± 30.5
アスパラギン酸 (Asp)		給与群 18.3 ± 5.4 対照群 16.5 ± 5.3	20.4 ± 6.2 18.4 ± 5.2	19.0 ± 9.0 19.8 ± 11.7
グルタミン (Gln)		給与群 267.4 ± 80.7 対照群 277.6 ± 39.8	417.4 ± 81.2 428.4 ± 99.6	468.5 ± 194.1 489.6 ± 227.7
グルタミン酸 (Glu)		給与群 195.0 ± 81.1 対照群 168.6 ± 40.9	150.9 ± 30.5 145.6 ± 29.0	190.0 ± 97.1 194.6 ± 133.3
セリン (Ser)		給与群 111.8 ± 18.3 対照群 119.7 ± 23.9	142.9 ± 38.9 144.7 ± 38.5	199.7 ± 68.8 202.1 ± 97.1
アルギニン (Arg) ※※		給与群 243.7 ± 46.6 A 対照群 383.9 ± 432.0 A	1179.0 ± 266.6 B 597.5 ± 468.5 A	464.5 ± 506.9 A 588.3 ± 540.9 A
プロリン (Pro)		給与群 109.2 ± 18.8 対照群 108.5 ± 15.4	128.7 ± 27.3 121.4 ± 27.4	171.9 ± 71.1 189.3 ± 84.9
チロシン (Tyr)		給与群 59.4 ± 13.8 対照群 60.0 ± 13.3	93.6 ± 22.8 92.7 ± 21.9	125.5 ± 49.9 133.8 ± 57.9

mean ± SD

群間の交互作用 ※※ : p<0.01 (単純主効果検定 異符号間に有意差有り p<0.01)

表3. 各群における白血球数および末梢血単核球数の推移

		10ヶ月齢(給与前)	13ヶ月齢(給与後)	16ヶ月齢(給与終了3ヶ月後)
白血球数(WBC) (個×10 ² /μℓ)	給与群	103.7 ± 24.5	102.2 ± 28.2	100.2 ± 18.9
	対照群	94.6 ± 25.2	114.4 ± 26.4	110.3 ± 20.8
CD3陽性CD45R陽性細胞 ※ (個/μℓ)	給与群	481.4 ± 328.2	791.4 ± 355.5	789.6 ± 215.9
	対照群	462.4 ± 259.4	591.4 ± 212.1	647.6 ± 272.5
CD3陽性CD45R陰性細胞 (個/μℓ)	給与群	1396.0 ± 659.1	1435.6 ± 731.1	1540.5 ± 466.4
	対照群	1284.3 ± 595.6	1299.6 ± 678.1	1596.8 ± 858.2
CD4陽性CD8陰性細胞 (個/μℓ)	給与群	576.5 ± 422.4	708.5 ± 308.8	711.2 ± 250.3
	対照群	466.7 ± 345.8	551.2 ± 179.0	649.9 ± 372.3
CD4陰性CD8陽性細胞 (個/μℓ)	給与群	386.4 ± 212.9	495.5 ± 211.5	667.5 ± 172.0
	対照群	315.4 ± 138.6	419.2 ± 153.7	565.9 ± 247.1
CD335陽性WC1-N1陰性細胞 (個/μℓ)	給与群	82.8 ± 64.1	118.7 ± 105.7	309.8 ± 98.1
	対照群	78.9 ± 89.8	212.9 ± 115.6	299.2 ± 149.0
CD335陰性WC1-N1陽性細胞 (個/μℓ)	給与群	838.9 ± 386.1	783.8 ± 505.2	671.3 ± 280.8
	対照群	744.2 ± 365.3	688.4 ± 330.5	699.9 ± 365.9
MHCclass II 陽性CD14陰性細胞 (個/μℓ)	給与群	1195.3 ± 952.3	1562.5 ± 859.8	1477.0 ± 1260.5
	対照群	1016.7 ± 849.8	1397.6 ± 454.9	1441.6 ± 634.3
MHCclass II 陰性CD14陽性細胞 (個/μℓ)	給与群	574.8 ± 317.6	564.8 ± 249.1	604.0 ± 209.4
	対照群	527.2 ± 473.4	645.7 ± 242.3	594.4 ± 255.6

mean±SD
群間の有意差 ※ : p<0.05

細胞数が、給与群は対照群に比べて有意に高い値で推移した。ナイーブ T 細胞は、胸腺から移出して未だ抗原刺激を受けていない細胞であり、若齢でのナイーブ T 細胞の量は、胸腺からの移出量に依存している [15]。マウスやニワトリでは Arg の給与により胸腺重量が増加すると報告されている [13, 20]。これは、Arg がタンパク質の主要な構成要素であること、および Arg には、グルカゴン、インシュリン、および成長ホルモン (GH) を含む脳下垂体および腺臓のホルモン分泌を刺激する分泌促進作用があり、この作用により生産されたホルモンがタンパク質の合成を増大させて、胸腺等のリンパ器官を大きくさせるものと考えられている [13]。また、Arg はヒトにおいて T 細胞の幼弱化反応を促進させる [1]、マウスの T 細胞の増殖を亢進させる [20] 等の T 細胞を活性化させる報告がある。これは、Arg の給与により、T 細胞の増殖を促進するインターロイキン-2 (IL-2) の産生量が増加するとともに、T 細胞の IL-2 レセプターの数が増えることが一因と考えられている [20]。また、Arg を欠乏させると、T 細胞の膜表面のレセプター数が著しく減少するとの報告もあり [18]、Arg は T 細胞レセプターの発現に影響するものと考え

られる。加えて、Arg は動物の体内で NO の合成基質であること [4]、および in vitro の試験系において、Arg が欠乏した培養条件化では T 細胞の幼弱化反応が低下するが、NO の原料となるニトロプルシドを添加すると、幼弱化反応が回復することから、Arg は NO の産生を介して T 細胞の活性化に関与すると考えられている [8]。これらのことから、本試験で認められたナイーブ型成熟総 T 細胞数の増加は、血中遊離 Arg 濃度の増加による GH などのホルモン分泌量増加に伴う間接的な作用とともに、T 細胞のレセプター数を増加させる、および NO の産生を介して T 細胞を活性化させるなどの T 細胞を直接的に活性化することにより生じたものと推察される。また、ナイーブ T 細胞は、抗原やサイトカイン刺激により様々な機能を持った免疫細胞に分化していくため [6, 7, 16]、ナイーブ T 細胞数の増加は牛の免疫機能を増強させる可能性があり、これが本試験で得られた給与群の疾病発生率の有意な低値に繋がったものと考えられる。これらのことから、Arg の給与によって、血中遊離 Arg 濃度が増加するとともに、疾病発生数が改善され、免疫細胞数もそれと同時に変動したと考えられる。よって、Arg は免疫機能を改善させることに

より疾病発生を防除する可能性がある。今後は本研究結果の作用機序を明らかにするために、牛への Arg 給与が NO 産生や IL-2 レセプター発現などの免疫機能に与える影響について検証する必要がある。

引用文献

1. Barbul A, Sisto DA, Wasserkrug HL, Efron G. 1981. Arginine stimulates lymphocyte immune response in healthy human beings. *Surgery*. 90:244-251
2. Bassit RA, Sawada LA, Bacurau RF, Navarro F, Martins E Jr, Santos RV, Caperuto EC, Rogeri P, Costa Rosa LF. 2002. Branched-chain amino acid supplementation and the immune response of long-distance athletes. *Nutrition*. 18:376-379
3. Besset A, Bonardet A, Rondouin G, Descomps B, Passouant P. 1982. Increase in sleep related GH and Prl secretion after chronic arginine aspartate administration in man. *Acta Endocrinol*. 99:18-23
4. Böger RH, Tsikas D, Bode-Böger SM, Phivthong-Ngam L, Schwedhelm E, Frölich JC. 2004. Hypercholesterolemia impairs basal nitric oxide synthase turnover rate: a study investigating the conversion of L-[guanidino-(15)N(2)]-arginine to (15) N-labeled nitrate by gas chromatography-mass spectrometry. *Nitric Oxide*. 11: 1-8
5. Brittenden J, Park KG, Heys SD, Ross C, Ashby J, Ah-See Ak, Eremin O. 1994. L-arginine stimulates host defenses in patients with breast cancer. *Surgery*. 115:205-212
6. Cho JH, Kim HO, Kim KS, Yang DH, Surh CD, Sprent J. 2013. Unique features of naive CD8+ T cell activation by IL-2. *J Immunol*. 191:5559-5573
7. Corthay A. 2006. A three-cell model for activation of naïve T helper cells. *Scand J Immunol*. 64:93-96
8. Efron DT, Kirk SJ, Regan MC, Wasserkrug HL, Barbul A. 1991. Nitric oxide generation from L-arginine is required for optimal human peripheral blood lymphocyte DNA synthesis. *Surgery*. 110:327-334
9. Elam RP, Hardin DH, Sutton RA, Hagen L. 1989. Effects of arginine and ornithine on strength, lean body mass and urinary hydroxyproline in adult males. *J Sports Med Phys Fitness*. 29:52-56
10. Hambrecht R, Hilbrich L, Erbs S, Gielen S, Fiehn E, Schoene N, Schuler G. 2000. Correction of endothelial dysfunction in chronic heart failure: additional effects of exercise training and oral L-arginine supplementation. *J Am Coll Cardiol*. 35:706-713
11. Kawai Y, Nakagawa Y, Matuyama T, Akagawa K, Itagawa K, Fukase K, Kusumoto S, Nishijima M, Yano I. 1999. A typical bacterial ornithine-containing lipid Nalpha-(D)-[3-(hexadecanoyloxy)hexadecanoyl]-ornithine is a strong stimulant for macrophages and a useful adjuvant. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 23:67-73
12. Kawai Y, Takasuka N, Inoue K, Akagawa K, Nishijima M. 2000. Ornithine-containing lipids stimulate CD14-dependent TNF-alpha production from murine macrophage-like J774.1 and RAW 264.7 cells. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 28:197-203
13. Kwak H, Austic RE, Dietert RR. 1999. Influence of dietary arginine concentration on lymphoid organ growth in chickens. *Poult Sci*. 78:1536-1541
14. Mori A, Kenyon PR, Mori N, Yamamoto I, Tanaka Y, Suzuki N, Tazaki H, Ozawa T, Hayashi T, Hickson RE, Morris ST, Blair H, Arai T. 2008. Changes in metabolite, energy metabolism related enzyme activities and peripheral blood mononuclear cell (PBMC) populations in beef heifers with two differing liveweight change profiles in New Zealand. *32:159-166*
15. Murray JM, Kaufmann GR, Hodgkin PD, Lewin SR, Kelleher AD, Davenport MP, Zaunders JJ. 2003. Naive T cells are maintained by thymic output in early ages but by proliferation without phenotypic change after age twenty. *Immunol Cell Biol*. 81:487-495
16. Nakamura T, Kamogawa Y, Bottomly K, Flavell RA. 1997. Polarization of IL-4- and IFN-gamma-producing CD4+ T cells following activation of naive CD4+ T cells. *J Immunol*. 158:1085-1094
17. 小田裕昭. 2007. 必須アミノ酸・非必須アミノ酸その二つを分けるもの. *日本栄養・食糧学会誌* 60:137-149
18. Petar J, Popovic HJ, Zeh III, Juan B Ochoa. 2007. Arginine and Immunity. *J Nutr*. 137:1681-1686
19. Reeds PJ, Burrin DG, Stoll B, Jahoor F. 2000.

- Intestinal glutamate metabolism. *J Nutr.* 130:978-982
20. Reynolds JV, Daly JM, Shou J, Sigal R, Ziegler MM, Naji A. 1990. Immunologic effects of arginine supplementation in tumor-bearing and non-tumor-bearing hosts. *Ann Surg.* 211:202-210
 21. Scibior D, Czeczot H. 2004. Arginine-metabolism and functions in the human organism. *Postepy Hig Med Dosw(Online).* 58:321-332
 22. Wu G, Bazer FW, Davis TA, Kim SW, Li P, Marc Rhoads J, Carey Satterfield M, Smith SB, Spencer TE, Yin Y. 2009. Arginine metabolism and nutrition in growth, health and disease. *Amino Acids.* 37:153-168
 23. Wu G, Morris SMJr. 2003. Arginine metabolism in mammals.in *Metabolic and therapeutic aspects of amin acids in clinical nutrition 2nd Edition*, 153-167, CRC Press LLC, USA
 24. Wyatt, C. R., Madruga, C., Cluff, C., Parish, S., Hamilton, M. J., Goff, W., Davis, W. C. 1994. Differential distribution of gamma delta T-cell receptor lymphocyte subpopulations in blood and spleen of young and adult cattle. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 40:187-199
 25. 山崎敏雄, 小沢忍, 塩谷康生, 加藤国雄, 福原利一, 西野武蔵, 土屋平四郎. 1972. 若齢去勢牛の肥育過程における体構成の発達に関する研究(第4報). *中国農業試験場報告* 19:39-60
 26. Yoshida S, Matsui M, Shirouzu Y, Fujita H, Yamana H, Shirouzu K. 1998. Effects of glutamine supplements and radiochemotherapy on systemic immune and gut barrier function in patients with advanced esophageal cancer. *227:485-91*
 27. Ziegler TR, Bye RL, Persinger RL, Young LS, Antin JH, Wilmore DW. 1998. Effects of glutamine supplementation on circulating lymphocytes after bone marrow transplantation: a pilot study. *Am J Med Sci.* 315:4-10

The effects of feeding Japanese black cattle with arginine on their levels of free amino acids in blood and immune function

Keiichi Matsuda¹⁾, Yousuke Maeda²⁾, Toru Okada³⁾, Hiromichi Ohtsuka⁴⁾

- 1) Miyagi Prefecture Agricultural Mutual Aid Associations Livestock Medicine Training Center
39-4 Hirabayashi, Oohira, Kurokawagun, Miyagi, 981-3602, Japan
- 2) School of Veterinary Medicine, Kitasato University
35-1 Higashi23, Twada, Aomori, 034-8628, Japan
- 3) ASKA Animal Health Co., Ltd.
1-26-2 Nishishinjuku, Shinjuku-ku, Tokyo, 163-0541, Japan
- 4) School of Veterinary Medicine, Rakuno Gakuen University
582, Bunkyo-dai-Midorimachi, Ebetsu, Hokkaido, 069-8501, Japan

[Abstract]

Arginine, an amino acid with various physiological effects, is reported to have an immunostimulating effect in humans. However, its physiological effects in cattle have been less clarified. Thus, we have studied the effects of feeding cattle with arginine on their levels of free amino acids in blood and immune cell counts. For this study, 36 fattened Japanese black cattle 10 months of age were used. They were divided into two groups: 18 cattle fed with arginine-mixed feed containing L-arginine by 20% (50 grams per animal per day) for 3 months from the start of the study (fed group) and 18 cattle without such feeding (control group). Blood samples were collected before and after the feeding as well as 3 months after completion of the feeding, and analyzed for the free amino acid concentration in blood and peripheral-blood mononuclear cell surface antigens. As for the free amino acid level in blood, a significant interaction between the two groups was observed for arginine, with cattle 13 months of age in the fed group showing significantly higher values than cattle 10 and 16 months of age in the fed group and 10, 13 and 16 months of age in the control group in a test for simple main effects. As for the number of surface antigen-positive peripheral-blood mononuclear cells, the fed group consistently showed significantly greater values than the control group in the number of CD3+CD45R+ cells. A fed group had a low disease occurrence rate significantly compared with the control group. The arginine fed a cattle with makes the arginine concentration of the blood increased. The head count infected with a disease decreased and increased in the number of immune cell at the same time. There is a possibility that disease occurrence is dewormed by arginine's making them improve the immune function.

Key words: amino acid, arginine, immune function, Japanese black cattle