

令和元年6月16日現在

機関番号：11201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07982

研究課題名(和文) 機能性アミノ酸アルギニンの静脈投与がウシの受胎性に及ぼす影響

研究課題名(英文) Effect of intravenous administration of functional amino acid arginine on the fertility of cattle

研究代表者

平田 統一 (HIRATA, Toh-ichi)

岩手大学・農学部・助教

研究者番号：20241490

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：牛の定時人工授精プロトコルの卵胞成熟期にアルギニン5あるいは60g静脈投与することは受胎率を改善させる。このアルギニンの作用は、1)タンパク質同化の促進や血中アンモニアの解毒促進、血流量増加などを介して母体の妊孕性を改善すること、および2)卵胞や卵子成熟に直接影響することを介して発揮される可能性がある。アルギニン投与による牛の受胎率改善は、安価で、消費者に許容される安全な新しい繁殖技術となり得る。

研究成果の学術的意義や社会的意義

良質なタンパク質食品等を通じ国民の健康増進に資する畜産業において、食する以上に子畜を生産することは革新的技術である。しかし、近年わが国における牛の人工授精の受胎率は低下傾向にある。アルギニンは機能性アミノ酸であり、その活用はホルモン剤等の多様と比較して消費者から問題視されることは少ない。アルギニンを活用することで受胎率が向上するという本研究成果は、低コストで安全な新しい牛の繁殖技術開発に繋がる。

研究成果の概要(英文)：Intravenous administration of 5 or 60 g of arginine during follicular maturation of the bovine timed insemination protocol improves conception rates. The action of arginine improves maternal fertility through 1) promoting protein assimilation, promoting blood ammonia detoxification, increasing blood flow, etc., and 2) directly affecting follicle and oocyte maturation. It may be exerted that the improvement of conception rates in cattle by arginine administration could be an inexpensive, consumer-acceptable and safe new animal breeding technology.

研究分野：家畜繁殖学

キーワード：アルギニン 雌牛 繁殖 アルギニン 定時授精

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

### 1. 研究開始当初の背景

我が国の畜産業において、黒毛和種牛の繁殖経営では、一般に1年1産を達成することが経済的に有利であるとされ、その実現のためには分娩後60日以内に初回発情が回帰し、80日以内に受胎させる必要がある。しかし、黒毛和種牛の分娩間隔は20年間ほぼ改善がみられず、平成24年の肉用牛における分娩間隔は13.3ヶ月であり、受胎率はむしろ悪化した。

### 2. 研究の目的

牛の受胎率を改善する手法として、機能的アミノ酸の1種であるアルギニン（Arg）を活用することが考えられる。Argは単にタンパク質の構成成分になるのみならず、生理活性物質としての機能を有している。例えば、Argは一酸化窒素の前駆体であり、一酸化窒素は血管を拡張し、血流を増やすことから、勃起不全などの性機能障害、狭心症や心筋梗塞の治療に使用されている。また、Argは成長ホルモンの分泌促進を通じて、タンパク質の合成促進、筋肉増強効果を有すること、免疫賦活作用、インスリン分泌促進、アンモニア除去、肝機能改善などの効果を有することが報告されている。繁殖分野では、ブタの妊娠中にArgを経口投与すると、生存産子数が増加すること、ヒトでは子宮内膜を厚くし受胎率を改善することが知られている。そこで、Arg投与が牛の定時授精後の受胎率を改善し得るか検討した。

### 3. 研究の方法

- (1) 黒毛和種雌牛34頭を用い、定時授精プロトコールの卵胞成熟期にArg製剤5gまたは60gを頸静脈内単回投与し、受胎率を検証すると共に卵巣動態や血中プロゲステロン濃度を測定した。
- (2) 黒毛和種雌牛42頭を用い、簡易化した定時授精プロトコールの卵胞成熟期にArg製剤5gを頸静脈内単回投与し、受胎率を検証した。
- (3) 黒毛和種未経産牛6頭を用い、Arg5gあるいは60gを静脈内投与した時の血中各種アミノ酸濃度やアンモニア（NH<sub>3</sub>）、尿素（Urea）、血漿中グルコース（GLU）、クレアチン（CRE）、トリグリセリド（TG）、一酸化窒素（NO）の代謝産物である亜硝酸イオン（NO<sub>2</sub><sup>-</sup>）、硝酸イオン（NO<sub>3</sub><sup>-</sup>）濃度を測定し、Argがどのような機序で妊孕性に影響するのか検証した。
- (4) 黒毛和種経産牛27頭と日本短角種経産牛1頭を用い、Arg5gを静脈内投与した後の子宮動脈血流量を測定するとともに、定時人工授精（tAI）、または定時胚移植（tET）を行い、生殖器への血流量と妊孕性の関係を検討した。
- (5) 黒毛和種牛7頭を用い、Argが卵胞液中に移行するか確認するために、Argを投与しなかった場合とArg60g投与後3、5時間の血中・卵胞液中各種アミノ酸濃度について検討した。
- (6) 食肉処理場由来ウシ卵子の成熟培養液、体外受精液、前期発生培養液、後期発生培養液にArg100μg/mlあるいはアルギナーゼや一酸化窒素合成酵素阻害剤を添加して胚発生に及ぼす影響を検討した。
- (7) ウシ卵子の体外成熟培養液にArg100μg/mlを添加、もしくは添加せずに成熟培養した後、得られた成熟卵子和胚盤胞の遺伝子発現の相違をRNA-seq法により網羅的に検証した。

### 4. 研究成果

- (1) 対照群の受胎率27.3%（3/11頭）に対して、Arg5g投与群は66.7%（8/12頭）、Arg60g投与群は72.7%（8/11頭）であり、Arg5g投与群とArg60g投与群ともに対照群に比べて有意に（P<0.05）高い値となった。排卵前卵胞径や排卵後7日目の黄体径に有意な差はなかった。7日目の血中プロゲステロン濃度は60g投与群が最も高かった。
- (2) Arg5g投与群の受胎率は76.2%（16/21）で、対照群の47.6%（10/21）よりも有意に（P<0.05）高い値となった。排卵前卵胞径に有意な差はなかった。
- (3) 血中Arg濃度は、投与後15分にピークを形成し60g区の値は5g区の11.6倍だった。60g区の血中オルニチン（Orn）濃度は、血中Arg濃度のピークから遅れて、投与後1-2時間に投与前の濃度の7.2倍前後のプラトー値となり、3時間後にも高値のままだった（図1）。血中NH<sub>3</sub>濃度は、60g区が投与後3時間でも94.0%の低い値のまま推移したのに対し、5g区に有意な差はみられなかった。Arg60g投与後の血中尿素濃度は、投与開始後3時間に投与前の1.2倍の最高値となった（図2）。このようなOrnやNH<sub>3</sub>、尿素濃度の動態は、ArgからOrnが生成されるオルニチン回路を良く反映して合理的であると思われる。NO代謝物濃度はArg60g投与後15分以降上昇し続け、NOの合成が促進したことが示唆された（図3）。
- (4) Arg5g投与後の子宮動脈血流量はArg投与後30分、1時間に増加した（P<0.01）。しかし、子宮動脈血流量の増加と受胎の成否との間に有意な関係を認めなかった。
- (5) Arg60g投与後の卵胞液中Arg濃度は投与後3時間に血清中に比べて高濃度で（P<0.01）、またArg投与前に比べ5時間後でも卵胞液中のArg濃度は有意に高かった（P<0.01）（図4）。

受胎率から判断するとArg5g投与は、60g投与と同様に有効であるように考えられ、tAI前2日あるいは3日にArgを投与することは簡易で安価な新しい繁殖技術として有

効であることが示された。Arg 投与に継続してオルニチン回路が活発に働くことにより妊孕性を障害するアンモニアの血中濃度が減少し、タンパク合成が促進され、また一酸化窒素が合成されて卵巣や子宮に対する血流が上昇することなどが妊孕性の改善に作用する可能性が示されたものの、Arg の投与量によって生体反応に相違がみられることから、Arg は卵巣内の卵胞成熟、卵子発育能獲得に直接的に働くことが推測され、その初期の証明として Arg が血中から卵胞液中に移行することを明らかにした。

- (6) ウシ卵子体外成熟培養液のみに Arg 100  $\mu$ g/ml を添加すると非添加に比べて 5 細胞期以上への分割率や胚盤胞への発生率が有意に ( $P < 0.05$ ) 改善するが、成熟培養液から前期・後期の発生培養液まで Arg を添加し続けると逆に胚盤胞率は低下した。成熟培養液に添加する Arg 量を 50, 100, 200  $\mu$ g/ml で検討したところ、100  $\mu$ g/ml 添加区のみで有意な発生成績の改善がみられた。成熟培養液にアルギナーゼ阻害剤の N $\omega$ -Hydroxy-nor-Arginine (nor-NOHA) を 50  $\mu$ M 添加したところ胚発生に影響がみられず、一酸化窒素合成酵素阻害剤の Diphenyleneiodonium chloride (DPI) を 50nM 添加した場合、5 細胞期以上の分割率が有意に ( $P < 0.05$ ) 悪化したことから、Arg 添加効果は一酸化窒素に代謝されることで発揮されると考えられた。一方で nor-NOHA 50  $\mu$ M と DPI 50nM を併用した場合、両阻害剤の間には相乗効果がみられなかったことから、アルギナーゼの関与は低いことが示唆された (図 5)。これらウシ胚体外生産系における Arg 添加効果の試験結果は、Arg がウシ卵子の発育能獲得に直接関与する可能性を示唆するものである。
- (7) そこで、ウシ卵子の体外成熟培養液にアルギニン 100  $\mu$ g/ml を添加、もしくは添加せずに成熟培養した後に得られた成熟卵子や胚盤胞の遺伝子発現の相違を RNA-seq 法により網羅的に検証したところ、Arg 添加の有無によって、成熟卵子では 43 個、胚盤胞では 14 個の遺伝子発現が有意に (遺伝子発現量が 4 倍以上の相違で  $q < 0.25$ ) 異なっていた。

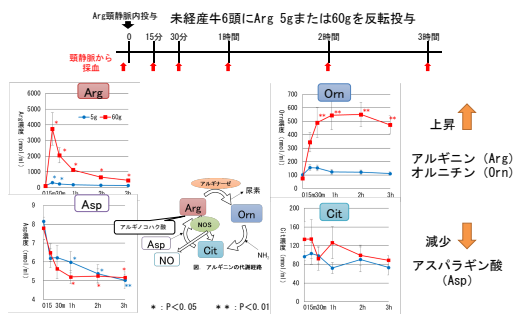
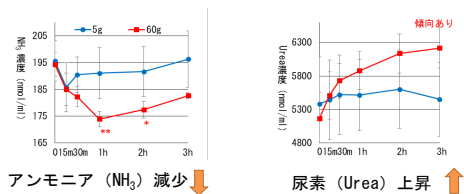


図 1 Arg 5gまたは60g投与後のArg, Orn, Asp濃度の測定結果



- Arg, Orn, Cit, Asp, NH<sub>3</sub>、尿素の濃度動態からオルニチン回路の亢進が示唆された。  
→胚や胎子にとって有害なNH<sub>3</sub>の無毒化が促進された。
- Argの投与量 (5g, 60g) によって反応の様相が異なった。

図 2 Arg 5gまたは60g投与後のNH<sub>3</sub>, Urea濃度の測定結果

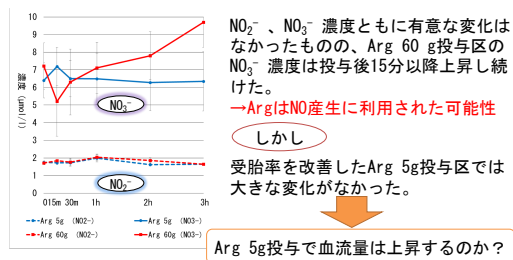
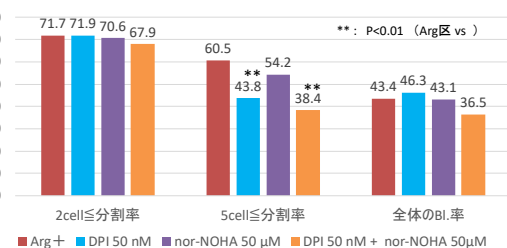
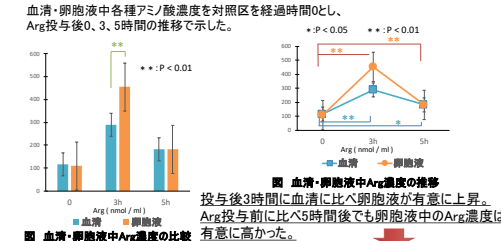


図 3 Arg 60g投与後のNO代謝物測定結果



Arg区と比較し、D区では5cell以上分割率が有意に ( $P < 0.01$ ) 減少した。N区では胚発生成績に影響はなかった。一方、D+N区では、5cell以上分割率が有意に ( $P < 0.01$ ) 減少した。

図 5 体外成熟培養液に添加したDPIやnor-NOHAが牛胚発生成績に及ぼす影響



- Argは卵胞液中に移行し、卵子成熟に直接作用する可能性がある。
- Argが卵胞液中に能動的に取り込まれる可能性がある。一方、代謝速度のちがいに、見かけ上卵胞液中のArg濃度が血中濃度を上回った可能性がある。

図 4 Arg 60g投与後の血中・卵胞液中アルギニン濃度測定結果

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 10 件)

- (1) 平田統一, 阿部佳代子, 鈴木幸太, 松崎 駿, 千田広幸, 佐々木 修, 佐々木修一, 桃田優子, 田尻和之 (2018)  
定時胚移植周期の卵胞成熟期におけるアルギニン静脈投与がウシの受胎率に及ぼす影響. 第68回東北畜産学会大会講演要旨: 35.
- (2) 阿部佳代子, 平田統一, 鈴木幸太, 松崎 駿, 千田広幸, 佐々木 修, 佐々木修一, 桃田優子, 田尻和之 (2018)  
アルギニン静脈投与によるウシの子宮動脈血流量への影響. 第68回東北畜産学会大会講演要旨: 25.
- (3) 鈴木幸太, 松崎 駿, 阿部佳代子, 平田統一 (2018)  
成熟培養液に添加したアルギニンがウシ卵子の核成熟や胚発生成績に, および媒精液に添加したアルギニンが胚発生成績に及ぼす影響. 第68回東北畜産学会大会講演要旨: 25.
- (4) 鈴木幸太・阿部佳代子・平田統一 (2018)  
成熟培養液に添加したアルギニンおよび Diphenyleneiodonium chloride と N $\omega$ -Hydroxy-nor-Arginine がウシ卵子の体外発生成熟に及ぼす影響. 第59回日本卵子学会大会講演要旨: S62.
- (5) 阿部佳代子, 平田統一, 千田広幸, 佐々木 修, 佐々木修一, 谷澤里沙, 川嶋夏輝, 喜多一美, 関 誠 (2018)  
アルギニンの静脈内投与が定時人工授精後の牛の受胎性と卵胞液中のアミノ酸濃度に及ぼす影響. 第124回日本畜産学会大会講演要旨: 212.
- (6) 鈴木幸太, 阿部佳代子, 平田統一 (2017)  
成熟培養液に添加した Diphenyleneiodonium chloride と N $\omega$ -Hydroxy-nor-Arginine がウシ卵子の体外発生成熟に及ぼす影響. 第67回東北畜産学会青森大会講演要旨: 34.
- (7) 阿部佳代子, 平田統一, 東海林篤志, 鈴木幸太, 赤坂 茂, 千田広幸, 佐々木 修, 佐々木修一, 桃田優子, 喜多一美, 岡田 徹 (2017)  
アルギニン5あるいは60gの静脈内投与が排卵同期-定時人工授精後のウシの受胎性に及ぼす影響. 第122回日本畜産学会大会講演要旨: 108.
- (8) 平田統一, 阿部佳代子, 赤坂 茂, 千田広幸, 佐々木 修, 佐々木修一, 桃田優子, 喜多一美, 岡田 徹 (2016)  
アルギニン5あるいは60gの静脈内投与が排卵同期処置-定時授精後のウシの受胎性に及ぼす影響. 第66回東北畜産学会大会講演要旨: 21.
- (9) 阿部佳代子, 平田統一, 赤坂 茂, 千田広幸, 佐々木 修, 佐々木修一, 桃田優子, 牧野良輔, 伊藤 謙, 喜多一美, 岡田 徹 (2016)  
アルギニン5gの静脈内投与が排卵同期処置後のウシの受胎性に及ぼす影響. 第57回日本卵子学会大会講演要旨: S52.
- (10) 平田統一, 赤坂 茂, 千田広幸, 佐々木修一, 佐々木 修, 桃田優子, 牧野良輔, 伊藤 謙, 喜多一美, 岡田 徹 (2016)  
定時人工授精の卵胞成熟時に静脈内投与したアルギニンの投与量がウシの受胎性に及ぼす影響. 第121回日本畜産学会大会講演要旨: 192.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

## 6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名: 喜多 一美

ローマ字氏名: KITA, Kazumi

所属研究機関名: 岩手大学

部局名: 農学部

職名： 教授

研究者番号（8桁）：20221913