

昼間帯および夜間帯のL-トリプトファン連続静脈内投与がホルスタイン種雄子牛のメラトニン分泌に及ぼす効果*

新宮博行・櫛引史郎・伊藤文彰^a・林征幸・守谷直子^b・小林寿美・山地佳代子・甫立孝一¹

農研機構畜産草地研究所 家畜生理栄養研究領域, つくば市, 305-0901

¹北里大学, 十和田市, 034-8628

要 約

L-トリプトファン (トリプトファン: L-Tryptophan) を静脈内投与する時間帯の相違が子牛のメラトニン (melatonin, *N*-acetyl-5-methoxytryptamine) 分泌に及ぼす影響を検討するため, 昼間帯 (12:00-14:00) および夜間帯 (19:00-21:00) の各時間帯において, 6 週齢で離乳した 3 ヶ月齢のホルスタイン種雄子牛 4 頭の静脈内に溶媒, または, トリプトファン溶液を 120 分間連続投与する試験をラテン方格法により実施した。これら 4 種類の静脈内投与試験において, 溶媒投与群には, 溶媒として, 糖液 (グルコース投与量: 324 mg/ (kg of BW)) を投与し, また, トリプトファン溶液投与群には, この溶媒にトリプトファンを溶解した溶液 (トリプトファン投与量: 36 mg/ (kg of BW)) を投与した。溶液の投与は供試牛の左頸静脈内に連続的に行い, 一方, 採血は右頸静脈から投与開始直前 (0 分: 基礎値) および開始後 30, 60, 90, 120 (投与終了時間), 180, 210 分に実施した。血漿メラトニン濃度は RIA を用いて測定した。各溶液の静脈内投与後に血液中に放出されるメラトニンの増減量の指標として, 血漿メラトニンの基礎値を示す直線と濃度曲線で囲まれる正味の反応曲線下面積 (net AUC: net area under the response curve) を算出した。メラトニンの血漿基礎値は, 昼間帯の投与試験時より夜間帯の投与試験時の方が有意に高くなった ($P < 0.001$)。昼間帯の投与試験において, 血漿メラトニン濃度は溶媒投与群, トリプトファン溶液投与群とも, 試験終了時までほぼ基礎値のレベルで推移し, すべての採血時間で両群間に有意差は認められなかった。また, net AUC も血漿濃度と同様に両群間に有意差はなかった。一方, 夜間帯の投与試験では, トリプトファン溶液投与群のメラトニンの血漿濃度および net AUC は溶媒投与群の値よりいずれも有意に高くなった ($P < 0.05$)。これらの結果から, 昼間帯におけるトリプトファンの供給はホルスタイン種雄子牛のメラトニン分泌にほとんど影響を与えないが, 夜間帯の供給はメラトニン分泌を顕著に促進させることが示唆された。

キーワード: L-トリプトファン, 昼間帯 (明期), メラトニン, 夜間帯 (暗期)

緒 言

メラトニンは, 生体リズム調節や睡眠誘導の作用を持つホルモンとして知られているが, 免疫機能の増強作用や強い抗酸化作用を持つ物質であることも明らかにされている⁵⁾。さらに, 成長ホルモンの分泌促進作用を持つこともヒト¹¹⁾, ウシ⁶⁾で報告されている。従って, そ

の分泌亢進は家畜の健康維持と生産性の向上に結びつくことが期待される。

体内におけるメラトニンの合成基質となるのは, 芳香族アミノ酸の一つであるトリプトファンである。トリプトファンからセロトニンが合成され, 次いで 2 種類の酵素, アリルアルキルアミン *N*-アセチルトランスフェラーゼ (AANAT: arylalkylamine *N*-acetyltransferase)

2012 年 10 月 7 日受付, 2012 年 12 月 7 日受理

* 本研究は, 独立行政法人日本学術振興会 (科学研究費補助金: No. 23580381) の支援を受けて実施された

^a 現 農研機構北海道農業研究センター

^b 現 農研機構畜産草地研究所 畜産物研究領域, つくば市, 305-0901

およびヒドロキシインドール-O-メチルトランスフェラーゼの作用によってメラトニンへと合成される。体内におけるメラトニンの合成速度は、基質であるトリプトファンの供給速度に影響を受けると考えられるが、それ以外に、その個体が置かれた光環境、すなわち、照度や明暗周期による強い影響を受けることがよく知られている。血中メラトニン濃度は明期または昼間に低く、暗期または夜間に高くなること¹⁾、哺乳類、鳥類などに共通して認められており、このパターンは光によるAANAT活性の変化によって形成されることが明らかにされている⁹⁾。ウシについても、ラットやヒトなどと同様に、血中メラトニン濃度は日中極めて低く、日没から上昇を始めて夜間に高くなること²⁾、また、暗期における光暴露でメラトニン合成が抑制されること⁷⁾などが報告されている。しかし、このような光環境の日周変化によるメラトニン分泌動態変化に対して、合成基質であるトリプトファンの体内供給量の変化がどの程度影響するかについては、まだ情報は少ない。

そこで、本研究では、メラトニンの分泌を増加させると考えられるトリプトファンの効果的な供給方法について検討するため、昼間帯および夜間帯、2種の明暗の時間帯においてトリプトファンの静脈内連続投与を行い、投与後のホルスタイン雄子牛のメラトニン分泌に及ぼす影響について調査を行った。

材料および方法

本研究は独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構畜産草地研究所動物実験指針に従って実施した。

6週齢で離乳した3ヶ月齢のホルスタイン種雄子牛4頭をフリーストール牛舎の房(床面積120 m²: 屋内部50 m²および屋外パドック部70 m²)に収容し、採食時間帯を除き、飲水と鉱塩の舐食が常時できるよう群飼した。給与飼料には切断型チモシー(63% TDN, 12% CP (DM換算))と配合飼料(80% TDN, 21% CP (DM換算))を用い、これら飼料の栄養価から、日本飼養標準・乳牛¹⁾の養分要求量(DG: 0.7 kg/day)に基づいたTDN充足率を100%充たすよう粗濃比1:2 (DM換算)で調整した飼料を朝夕の一日2回供試牛に給与した(8:45-10:00および15:45-16:30)。試験期間は10日間の馴致期間と以後16日間の本試験期間から構成され、この本試験期間において、4種類の静脈内投与試験を4日間隔で実施した(第1-4試験ステージ)。馴致最終日における供試牛の日齢は104 ± 4日齢(標準誤差)であり、その体重は102 ± 4 kg(標準誤差)であった。供試牛の

体重測定は試験日前日の12:00に行い、飼料給与量の変更は各試験終了後の次の給餌時間から、直近の体重測定の結果に基づいて実施した。

試験日の昼間帯試験の開始時刻は直近の給餌開始後から3時間15分後の12:00に、終了時刻は15:30とし、この間の試験用溶液の投与時間帯は12:00-14:00に設定した。また、昼間帯の試験時と同様に、夜間帯試験の開始および終了時刻は各々19:00、22:30とし、溶液の投与時間帯は19:00-21:00に設定した。これらの昼間および夜間の各時間帯において、供試牛の静脈内に溶媒、または、トリプトファン溶液を120分間連続投与する試験(昼間帯溶媒投与試験、昼間帯トリプトファン溶液投与試験、夜間帯溶媒投与試験、ならびに、夜間帯トリプトファン溶液投与試験)をラテン方格法により実施した。溶媒には、血中アミノ酸に占めるトリプトファンの比率を高めることでメラトニン合成速度の変動がより明確になることを期待して、生理食塩水にグルコース液(Otsuka Pharmaceutical Factory, Inc., Tokushima, Japan)を加えたものを用いた。グルコースによって分泌が促進されるインスリンは、筋肉組織への分岐鎖アミノ酸の取り込みを強く促進するが、トリプトファンの取り込みにはほとんど影響しないことが知られている³⁾。トリプトファン溶液には、この溶媒に粉末のトリプトファン(Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan)を溶解した。溶媒としてのグルコースおよびトリプトファンの投与量は、それぞれ324 mg/(kg of BW)および36 mg/(kg of BW)とした。投与試験開始1時間前までに、収容房の屋内部に繋留した供試牛の両頸静脈内に留置カテーテルを装着し、以後、試験終了時まで供試牛を安静にしておいた。溶液はペリスタリックポンプ(MINIPULS 3; Gilson, Inc., Middleton, USA.)を用いて、供試牛の左頸静脈内に連続投与し、一方、血液は右頸静脈から投与開始直前(0分:基礎値)および開始後30、60、90、120(投与終了時間)、180、210分に採取した。夜間帯の投与試験では、ヘッドライトから放たれる微弱な赤色光を基に、採血用カテーテルの血液採取口から採血を行った。採取した5 mLの血液は血漿メラトニン濃度測定用のヘパリン添加採血管に分けて注入し、ゆっくり攪拌した後、氷冷した。その後、1,600 × g, 4℃, 20分間の条件で遠心分離処理を行うことにより血漿を得た。得られた血漿サンプルは分析時まで-80℃で冷凍保存した。

本試験期間における日の出および日の入りの平均時刻はそれぞれ4:45、18:50であった。自然環境に沿った日周性を維持するため、畜舎への自然光の入射を除き、畜

舎内は常時消灯した。昼間帯および夜間帯の投与試験における収容房内の照度は、採血時間に携帯型照度計 (LM-331; AS ONE Corporation, Osaka, Japan) を用いて、供試牛の目元で10秒間測定した。

血漿メラトニン濃度はRIAキット (RK-MEL; BÜHLMANN Laboratories AG, Schönenbuch, Switzerland) を用いて測定した (メラトニンの測定内変動係数: 3.9%)。本研究では、投与溶液に反応して放出されるメラトニンの分泌量の指標に、血漿基礎値を示す直線と濃度曲線で囲まれる正味の反応曲線下面積 (net AUC: net area under the response curve) を用いた。

データは以下のモデルを用い、SAS・GLM プロシジャにより解析した (SAS Inst. Inc., Cary, U.S.A.)。

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \gamma_k + \varepsilon_{ijk}$$

Y_{ijk} : データ値, μ : 全体平均, α_i : 処理 i の効果, β_j : 試験ステージ j の効果, γ_k : 個体 k の効果, ε_{ijk} : 残差

処理の効果は F 検定により判定し、さらに Contrast ステートメントにより、投与時間帯の効果、投与溶液の効果について検定した。

また、平均値の差の検定には Duncan's multiple range test を用いた。

結 果

昼間帯の静脈内投与試験時における溶媒投与群およびトリプトファン溶液投与群の平均照度はそれぞれ、試験開始時刻 (12:00) で 1,340, 1,390 lx, 終了時刻 (15:30) で 650, 690 lx であり、これらを含むすべての照度計測時刻において、群間で有意差は認められなかった (データ未掲載)。また、夜間帯の静脈内投与試験時における平均照度は、19:00 の試験開始時刻で溶媒投与群、トリプトファン投与群の順に、10, 20 lx であり、群間で有意差はなかった。また、以後、終了時刻 (22:30) まで、両群とも照度は 0 lx であった。

メラトニンの血漿基礎値は、昼間帯の投与試験時より夜間帯の投与試験時の方が有意に高くなった (昼間帯試験時 (12:00) vs. 夜間帯試験時 (19:00): 0.9 vs. 8.4 pg/mL, $P < 0.001$)。Fig. 1 は昼間帯および夜間帯の投与試験時における血漿メラトニン濃度の変化を示す。昼間帯の投与試験における血漿メラトニン濃度は溶媒投与群、トリプトファン溶液投与群とも、試験終了時まで基礎値のレベルで推移し、すべての採血時間で群間に有意差は認められなかった。また、net AUC も血漿濃度と同様

の結果を示した (溶媒投与群 vs. トリプトファン溶液投与群: 1.2 vs. 6.7 pg·min·mL⁻¹)。一方、夜間帯の投与試験では、トリプトファン溶液投与群の血漿濃度は、試験開始後 120, 180, 210 分に溶媒投与群より有意に高い値を示した ($P < 0.05$)。また、net AUC もトリプトファン溶液投与群の方が溶媒投与群より有意に大きくなった (溶媒投与群 vs. トリプトファン溶液投与群: 870.4 vs. 1,962.3 pg·min·mL⁻¹, $P < 0.05$)。

考 察

メラトニンは、主に松果体のメラトニン産生細胞において、トリプトファンからセロトニンを経て合成される。セロトニンからメラトニンへの合成過程においては、AANAT の活性が反応の律速因子となっており、その活性は視交叉上核にある生体時計によって支配されている⁴⁾。哺乳類では、網膜から入力する光情報がこの生体時計を制御する最も重要な因子となっており、暗期における松果体の AANAT 活性は明期の 30-70 倍に上昇する⁹⁾。そのため、末梢血中のメラトニン濃度は昼間に比べ夜間で圧倒的に高くなること、反芻動物を含む多くの動物種で確認されている^{9,12)}。本研究においても、昼間帯のメラトニン濃度は極めて低く (全検体で 1.6 pg/mL 以下)、一方、夜間帯においては、試験開始時 (日没後約 10 分) において既に昼間帯の約 10 倍の値を示し、その後、直線的に増加した。この結果から、メラトニン分泌の増加は日没前から既に始まっていた可能性があると考えられる。ヒトでは、メラトニン分泌の制御が認められる最低照度が 100 lx 前後であることが報告されている¹³⁾。

末梢血中へのトリプトファン投与は、夜間帯における時間経過に伴うメラトニン濃度の上昇をさらに加速させた。昼間帯においてはメラトニン分泌に影響しなかった。同様の結果は、ルーメンバイパス処理したトリプトファンを経口投与した乳牛でも報告されている¹⁰⁾。これらの結果は、ウシの AANAT 活性が昼間に極めて低く、基質であるトリプトファンの供給速度を増加させてもメラトニンの合成速度はほとんど影響しないことを示唆している。従って、メラトニン分泌の亢進を目的とするウシへのトリプトファンの投与は、その血中への吸収が夜間に増加する場合にのみ有効であると考えられる。

血中トリプトファンの一部は、血液脳関門を通じて脳内に移行し、神経伝達物質であるセロトニンへと合成される。本研究とはほぼ同量・同速度でのトリプトファンの静脈内投与は、照明下のウシで脳脊髄液中セロトニン濃度を上昇させることが報告されている⁸⁾。血中トリプト

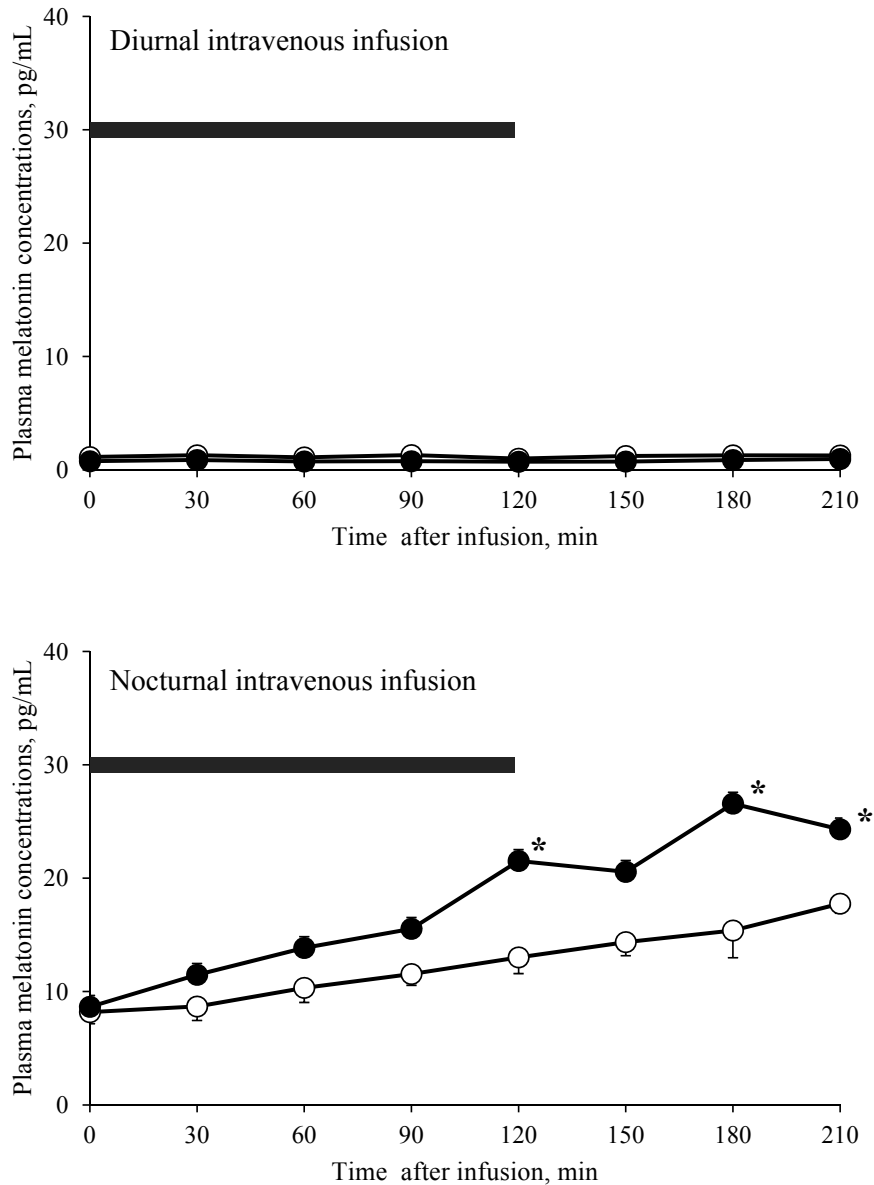


Fig. 1. Changes in plasma melatonin concentrations at diurnal (upper panel) and nocturnal (bottom panel) intravenous infusions in vehicle-infused calves (○) and tryptophan solution-infused calves (●). Values are the mean \pm SE. Asterisks indicate significant differences: * $P < 0.05$ compared with the corresponding values for vehicle-infused calves. Horizontal lines represent the intravenous infusion periods: 12:00 to 14:00 (upper panel); 19:00 to 21:00 (bottom panel). Tryptophan solution-infused calves were offered 36 milligrams of tryptophan per kg of BW for 120 min.

ファンのメラトニン合成への利用が夜間帯にのみ大きく増加するという本研究の結果から、トリプトファンの脳内移行とそれに起因する脳内セロトニン合成の増加は、夜間には昼間よりも小さくなる可能性があると考えられる。脳内セロトニンの機能は、体温調節、摂食行動、ストレス反応調節など多岐にわたることが知られているが、トリプトファン投与の時間帯の違いがそれらの生理機能に及ぼす影響については、今後の検討課題である。

謝 辞

本研究の遂行にご支援いただいた寺田文典博士（九州沖縄農業研究センター所長）、畜産草地研究所畜産研究支援センター業務第一科職員の諸氏、ならびに、中村則子非常勤職員（畜産草地研究所）に深く感謝の意を表します。

引用文献

- 1) Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council. (2006). Japanese feeding standard for dairy cattle, AFFRC, Tokyo, Japan.
- 2) Berthelot, X., Laurentie, M., Ravault, J.P., Ferney, J. and Toutain, P.L. (1990). Circadian profile and production rate of melatonin in the cow, *Domest. Anim. Endocrinol.*, 7, 315-322.
- 3) Fernstrom, J.D. and Wurtman, R.J. (1971). Brain serotonin content: increase following ingestion of carbohydrate diet, *Science*, 174, 1023-1025.
- 4) 飯郷雅之 (2011) . メラトニン研究の歴史, *時間生物学*, 17, 23-34.
- 5) Karasek, M. and Winczyk, K. (2006). Melatonin in humans, *J. Physiol. Pharmacol.*, 57 Suppl 5, 19-39.
- 6) Kasuya, E., Kushibiki, S., Sutoh, M., Saito, T., Ito, S., Yayou, K., Sakumoto, R. and Hodate, K. (2006). Effect of melatonin injected into the third ventricle on growth hormone secretion in Holstein steers, *J. Vet. Med. Sci.*, 68, 1075-1080.
- 7) Kasuya, E., Kushibiki, S., Yayou, K., Hodate, K. and Sutoh, M. (2008). Light exposure during night suppresses nocturnal increase in growth hormone secretion in Holstein steers, *J. Anim. Sci.*, 86, 1799-1807.
- 8) Kasuya, E., Yayou, K., Hashizume, T., Kitagawa, S. and Sutoh, M. (2010). A possible role of central serotonin in L-tryptophan-induced GH secretion in cattle, *Anim. Sci. J.*, 81, 345-351.
- 9) Klein, D.C., Coon, S.L., Roseboom, P.H., Weller, J.L., Bernard, M., Gastel, J.A., Zatz, M., Iuvone, P.M., Rodriguez, I.R., Bégay, V., Falcón, J., Cahill, G.M., Cassone, V.M. and Baler, R. (1997). The melatonin rhythm-generating enzyme: molecular regulation of serotonin N-acetyltransferase in the pineal gland, *Recent Prog. Horm. Res.*, 52, 307-357.
- 10) Kollmann, M.T., Locher, M., Hirche, F., Eder, K., Meyer, H.H. and Bruckmaier, R.M. (2008). Effects of tryptophan supplementation on plasma tryptophan and related hormone levels in heifers and dairy cows, *Domest. Anim. Endocrinol.*, 34, 14-24.
- 11) Valcavi, R., Zini, M., Maestroni, G.J., Conti, A. and Portioli, I. (1993). Melatonin stimulates growth hormone secretion through pathways other than the growth hormone-releasing hormone, *Clin. Endocrinol. (Oxf.)*, 39, 193-199.
- 12) Wehr, T.A. (1997). Melatonin and seasonal rhythms, *J. Biol. Rhythms*, 12, 518-527.
- 13) Zeitzer, J.M., Dijk, D.J., Kronauer, R., Brown, E. and Czeisler, C. (2000). Sensitivity of the human circadian pacemaker to nocturnal light: melatonin phase resetting and suppression, *J. Physiol.*, 526, 695-702.

Effects of Diurnal and Nocturnal Intravenous Infusions of L-tryptophan on Melatonin Secretion in Male Holstein Calves*

Hiroyuki SHINGU, Shiro KUSHIBIKI, Fumiaki ITOH^a, Masayuki HAYASHI, Naoko MORIYA^b,
Hisami KOBAYASHI, Kayoko YAMAJI and Koichi HODATE¹

Animal Physiology and Nutrition Research Division,
NARO Institute of Livestock and Grassland Science, Tsukuba, 305-0901 Japan

¹ Kitasato University, Towada, 034-8628 Japan

Summary

The present study was performed to examine the effects of diurnal and nocturnal intravenous infusions of L-tryptophan (Trp) on secretion of melatonin (*N*-acetyl-5-methoxytryptamine) in male Holstein calves. Four 3-month-old male calves, weaned at 6 week of age, were intravenously infused for 120 min with either vehicle or Trp solution at diurnal and nocturnal periods ranging from 12:00 to 14:00 and from 19:00 to 21:00. During these 4 challenge tests, vehicle-infused and Trp solution-infused calves respectively received infusions of physiological saline in which liquid glucose was added (a vehicle; glucose content: 324 mg/(kg of BW)) and the vehicle in which powdered Trp was dissolved (Trp content: 36 mg/(kg of BW)) in Latin square crossover design. The solutions were intravenously infused into left jugular vein of the calves, and a series of blood samples was collected from right jugular vein at 0 (just before the infusion; basal concentration of hormone), 30, 60, 90, 120 (at the endpoint of infusion), 150, 180, and 210 min after the infusion. Plasma melatonin concentrations were determined by RIA. As an indicator of the amount of change in blood hormone after the infusion, net area under the response curve (net AUC) was calculated. The net AUC was the residual area subtracted by the area under a hypothetical line of basal concentration, from total AUC of hormone in response to vehicle or Trp solution infused. Basal melatonin concentrations in plasma at the nocturnal challenge tests were greater than those at the diurnal challenge tests ($P < 0.001$). At the diurnal challenge tests, plasma melatonin concentrations after infusion were similar to basal concentrations in vehicle-infused and Trp solution-infused calves. Moreover, there were no significant differences in plasma concentrations and net AUC of melatonin between the groups of calves, respectively. In contrast, at the nocturnal challenge tests, plasma concentrations ($P < 0.05$) and net AUC of melatonin ($P < 0.05$) in Trp solution-infused calves increased as compared with those in vehicle-infused calves. These results suggest that supplement of Trp at diurnal period has almost no effect on the secretion of melatonin, but that at nocturnal period induces marked increase in the secretion in male Holstein calves.

Key words: diurnal period (light period), L-tryptophan, melatonin, nocturnal period (dark period)

^a Present address: NARO Hokkaido Agricultural Research Center, Sapporo, 062-8555 Japan

^b Present address: Animal Products Research Division, NILGS, Tsukuba, 305-0901 Japan

*The present study was supported by Grants-in-Aid for Scientific Research, KAKENHI (No. 23580381) from Japan Society for the Promotion of Science.