研究ノート

シロネズミ尿中ウロカニン酸排泄におよぼす 飼料タンパク質含量の影響

Influence of the Protein Content in the Diet on Urocanic Acid Excretion in Urine of Rats

国立栄養研究所栄養生化学部 (Division of Biochemistry, The National Institute of Nutrition)

小 島 義 樹 (Yoshiki Kobatake) 岩 谷 昌 子 (Masako Iwaya)

田 村 盈之輔 (Einosuke Tamura)

Male Wistar rats (80~130 g) were fed diets containing 0, 5, 25 or 60% casein. Experimental diets were consumed during a 2-week dietary adjustment period followed by a 2-week metabolic period. During the metabolic period the rats were given L-histidine solution dosed orally, and samples of urine were collected at 4 day-intervals.

By increasing the amount of histidine dosed, excretion of free histidine and urocanic acid in urine was increased in rats fed any diet. Ratios of urocanic acid to histidine and urocanic acid to creatinine were higher in the non-protein group than that of the other groups, while these ratios were not so different among the groups of rats fed 5, 25 or 60% casein diets.

タンパク質不足の栄養状態では、Histidine の中間代謝物である Urocanic acid の尿中への排泄が増加することが Whitehead らによって見出され、栄養状態判定の一つの指標として有用ではないかと提唱された¹⁾。その後、軽度のタンパク質不足では尿中 Urocanic acid はそれ程増加せず、血中アルブミン濃度との関係から見ても鋭敏でないことが指摘された²⁾。一方シロネズミによる実験において、飼料タンパク質レベルの低下にとともに、肝 Urocanase 活性が比例的に低下することが報告されていることから^{3)~5)}、尿中 Urocanic acid 量がタンパク質栄養状態判定の指標となる可能性を残していると考えて、一時的に多量に負荷した Histidine に対する各種栄養状態のシロネズミの反応を調べた。特に尿中成分の量的関係を Urocanic acid に対する比較として 2, 3 検討し、栄養状態の指標についての考察を試みた。

実 験 方 法

実験は 2 回に分けて行なった。いずれの実験でも、シロネズミは体重 60 g 前後の wistar 系、雄を日本ラット飼から購入、固型飼料 (日本クレア製、CE-2) で飼育し、体重変化の激しいものを除いて実験に使用した。

実験 I : 体重 75~100 g のシロネズミを各群 4 匹、3 群に分けた。I 群には Non-protein diet, II 群には 5% Casein diet, III 群には 25% Casein diet を与え、2 週間それぞれの飼料で飼育した。体重増加量は Table 1 に示した。基本飼料組成はシュクロース 15%, 大豆油 (10% 肝油含有) 5%, ビタミン混合 (15% 塩化コリン含有) 1%, 塩類混合 4%, 粉末沪指 2%, α -トウモロコシ澱粉で 100% となるようにしたが、Casein 添

加する時はトウモロコシ澱粉と入れ替えて混合した。

2週間の飼育後、それぞれの群について Histidine 投与を行なった。投与期間と投与量は12日間を3区分し、最初の4日間は対照として水を胃管で投与し、次の4日間は 50 mg/100 g B.W. の割合で、アルカリで中和した L-Histidine 水溶液を胃管で投与、最後の4日間は 100 mg/100g B.W. の割合で L-Histidine 水溶液を1日1回 12 a.m.~2 p.m. の間に胃管で投与、シロネズミをメタボリックケージに入れて、各期間採尿した。尿はエバポレーターで一定量に濃縮後、冷凍して保存した。

実験Ⅱ：実験条件はほぼ実験Ⅰの場合と

等しくしたが、投与飼料が3群のそれぞれに対して、5% Casein diet, 25% Casein diet, 60% Casein diet になっていた。またシロネズミの初体重が 120~130 g と実験Ⅰよりやや大きいものを使用した。

尿中 Creatinine 定量は Owen の方法⁶⁾を用い、Urocanic acid 定量は Dowex-1-acetate に吸脱着させる方法⁷⁾を用いた。遊離のヒスチジン含量は L. Mesenteroides P-60 を用いる微生物法⁸⁾によった。

実験結果と考察

実験Ⅰと実験Ⅱの2週間飼育のシロネズ

ミ体重増加量は Table 1に

示した。無タンパク質飼料では明らかに体重は低下していたが、5% Casein 飼料では1日 0.5~1g の体重増加が観察された。また5%Casein 飼料と 25% Casein 飼料の体重増加には大きな差が見られたが、60% Casein 飼料と 25% Casein 飼料の間には差が見られなかった。

Casein含量の異なった飼料を投与した各群のシロネズミに L-Histidine・HCl 50mg/100g B.W.または100 mg/100g B.W.を1日1回投

Table 1. Initial and final body weight and weight gain of rats in Experiment 1 and Experiment 2

Diet	Body weight		Weight gain (g/2Weeks)
	Initial (g)	Final (g)	
(Experiment 1)			
Non-protein	80.5±4.5*	61.0±3.0	-19.5±1.5
5% Casein	81.0±6.3	86.5±5.0	5.5±3.4
25% Casein	79.0±3.7	157.0±14.0	77.7±14.6
(Experiment 2)			
5% Casein	132.3±2.1**	137.0±3.7	5.0±1.4
25% Casein	132.4±2.0	216.2±4.8	83.8±4.1
60% Casein	132.4±2.1	220.0±7.1	87.6±5.3

* Mean±S. E. (n=4) ** Mean±S. E. (n=5)

Table 2. Effects of oral dosed histidine on excretion of creatinine, histidine and urocanic acid in urine of rats fed different levels of casein (Experiment 1)

Group	Non-protein Diet	5% Casein Diet	25% Casein Diet
(μmoles/day)			
Creatinine			
Control	13.1±0.6*	18.4±1.3	28.4±8.0
His. dose (50 mg/100 g B.W.)	7.9±2.1	16.7±1.2	33.4±8.7
(100 mg/100 g B.W.)	5.1±0.9	13.4±2.0	41.4±5.1
Histidine			
Control	0.5±0.1	0.8±0.1	1.7±0.4
His. dose (50 mg/100 g B.W.)	0.8±0.1	1.6±0.8	2.5±0.3
(100 mg/100 g B.W.)	3.3±0.3	78.4±22.6	7.5±2.0
Urocanic acid			
Control	0.4±0.1	0.5±0.1	0.5±0.1
His. dose (50 mg/100 g B.W.)	2.9±0.6	1.3±0.4	0.9±0.1
(100 mg/100 g B.W.)	6.3±2.2	2.3±0.9	4.0±0.9

* Mean±S. E. (n=4)

与した場合の尿中の Creatinine, Histidine, Urocanic acid を定量した結果を Table 2, 3 に示した。Creatinine 排泄が体重に強く関係しているのは Table 2 で明らかであるが, Histidine 投与により無タンパク質飼料では Creatinine 排泄の低下が起っており, 逆に 25% Casein では排泄増加の傾向が見られる。この理由については十分説明出来ない。Histidine の排泄はどの群でも Histidine の投与量を増加する時増加するが, 特に 5% 程度の低

タンパク質飼料摂取において増加が著しい。これは一般にアミノ酸分解酵素活性の低下が低タンパク質で起りやすいと思われる。Histidine 分解酵素についても同様の傾向が知られている⁴⁾⁵⁾。特に Histidase と Urocanase が飼料タンパク質含量に影響を受け易いようである⁵⁾。次に Urocanic acid の排泄は対照群では飼料タンパク質レベルが高いほど排泄も多い傾向にあるが, Histidine を多量に投与した場合には, 飼料中タンパク質レベルが低い群のシロネズミの方が明らかに Urocanic acid の排泄は増加していた (Table 2, 3)。これは肝臓の Urocanic acid 分解酵素活性が低タンパク質飼料投与により低下するという上記の知見⁵⁾と矛盾しない。またタンパク質レベルが 5% 以下になると急激に Urocanic acid の排泄が増加するようであった。

Creatinine の排泄は Histidine 投与により多少影響を受けるとしても, 体重に対してはほぼ一定であること

から Creatinine に対する Urocanic acid の比を求めることにより, Urocanic acid の体重当りの排泄量を比較することが出来ると考えた。Table 4 から 25% Casein 飼料と 5% Casein 飼料の間には Urocanic acid と Creatinine の比に大きな差が見られなかったが, これらの群と無タンパク質群の間には大きな差が

Table 3. Effects of oral dosed histidine on excretion of creatinine, histidine and urocanic acid in urine of rats fed different levels of casein (Experiment 2)

Group	5% Casein Diet	25% Casein Diet	60% Casein Diet
(μmoles/day)			
Creatinine			
Control	20.8±1.8*	37.2±2.6	34.5±2.9
His. dose (50 mg/100 g B.W.)	21.6±3.4	43.2±6.0	38.2±3.5
(100 mg/100 g B.W.)	18.6±2.8	37.8±4.1	31.1±6.4
Histidine			
Control	0.9±0.5	0.8±0.1	1.4±0.3
His. dose (50 mg/100 g B.W.)	2.1±0.3	2.1±0.2	4.9±0.9
(100 mg/100 g B.W.)	46.2±10.5	5.3±0.9	4.8±1.1
Urocanic acid			
Control	0.4±0.0	0.7±0.1	0.8±0.1
His. dose (50 mg/100 g B.W.)	1.2±0.2	1.2±0.2	1.3±0.2
(100 mg/100 g B.W.)	8.0±1.8	1.8±0.3	1.6±0.3

* Mean ± S. E. (n=5)

Table 4. Urocanic acid : creatinine and urocanic acid : histidine ratios in urine of rats fed different levels of casein (Experiment 1)

Group	Non-protein Diet	5% Casein Diet	25% Casein Diet
Urocanic acid/creatinine×100 (μ mole/μ mole)			
Control	3.0±1.0*	2.5±0.7	1.8±0.3
His. dose (50 mg/100 g B.W.)	52.6±23.4	7.7±2.2	2.9±0.4
(100 mg/100 g B.W.)	120.6±23.7	18.8±8.6	10.2±2.7
Urocanic acid/histidine×100 (μ mole/μ mole)			
Control	73.4±23.4	57.9±11.6	28.8±3.9
His. dose (50 mg/100 g B.W.)	406.5±86.2	56.3±11.2	35.7±5.3
(100 mg/100 g B.W.)	128.1±19.3	7.9±4.9	56.7±11.9

* Mean ± S. E. (n=4)

見られることから、5% Casein 以下の体重維持が出来ないようなタンパク質レベルでこの比が明らかに上昇するものと考えられた。

また、Urocanic acid の排泄と同時に尿中に排泄された遊離 Histidine は経口的に体重当り一定量投与された Histidine が体内で分解されないまま排泄されたものと思われるが、Table 2, 3 に示すように、5% Casein 飼料群で急増し、その前後で少ない傾向にあった。この理由は不明であるが、更に検討する必要がある。尿中遊離 Histidine は投与 Histidine 量が少ない時 (50 mg/100 g B.W.) には影響があらわれにくい、Histidine 分解経路のうちタンパク質レベルにより影響を受けにくい酵素、例えば Histidine pyruvate transaminase⁴⁾ などの関与により比較的分解が一定しているためかも知れない。Urocanic acid と Histidine の比を求めることにより、タンパク質の不足で影響を受けやすい Urocanic acid の代謝経路と他の Histidine 代謝経路の関係も表現出来る可

能性も考えられる。Table 4 の結果から見て、無タンパク質飼料では明らかにこの比が高まっていたが、5%, 25%, 60% Casein 群の間でははっきりした関係は見られなかった。Table 5 についても同様の結果が得られた。

これらのことから、タンパク質栄養の条件により、体内の Histidine 代謝が変

Table 5. Urocanic acid : creatinine and urocanic acid : histidine ratios in urine of rats fed different levels of casein (Experiment 2)

Group	5% Casein Diet	25% Casein Diet	60% Casein Diet
Urocanic acid/creatinine×100 (μ mole/ μ mole)			
Control	2.0±0.4*	1.9±0.4	2.3±0.4
His. dose (50 mg/100 g B.W.)	6.2±1.6	3.0±0.7	3.5±0.9
(100 mg/100 g B.W.)	53.3±17.4	5.4±1.3	7.0±3.4
Urocanic acid/histidine×100 (μ mole/ μ mole)			
Control	56.6±13.8	100.0±22.8	61.2±11.5
His. dose (50 mg/100 g B.W.)	68.1±18.1	59.4±9.2	25.8±12.8
(100 mg/100 g B.W.)	20.8±6.3	38.7±8.6	40.0±14.6

* Mean±S. E. (n=5)

動することを目安とした栄養状態の判定には、経口的に Histidine を単独に負荷した場合の尿中の Creatinine に対する Urocanic acid の比がある程度指標になると思われるが、かなり激しいタンパク質不足でなければ明瞭な差が得られない可能性を確認した。W. D. Block ら⁹⁾ によると、人体に L-Histidine を負荷した時、Urocanic acid 排泄量が増加していることを示しているが、栄養状態との関係は考慮していない。また、Brown ら¹⁰⁾ は人間、猿、シロネズミの L-Histidine-¹⁴C から Urocanic acid-¹⁴C への変化の比較を尿中成分について行ない、動物による Histidine 代謝の相違を検討している。これによると、人間とシロネズミではかなり Histidine 代謝産物の量的比率が異なっているようであった。それ故栄養状態指標の検討を実験動物から人間に適用することは注意を要すると考えられる。

要 約

1) 無タンパク質、5%, 25%, 60% Casein 飼料の各群のシロネズミ (Wistar 系, 雄, 体重 80~130g) を 2 週間飼育し、飼育期間の終りに L-Histidine を経口的に負荷して、尿中に排泄される Urocanic acid, Creatinine, 遊離 Histidine を定量した。

2) Histidine の投与量を増加すると尿中 Histidine と Urocanic acid はいずれの飼料群でも増加した。尿中 Histidine に対する Urocanic acid の比は無タンパク質飼料群で明らかに上昇したが、5%, 25%, 60%

Casein 飼料群の間では明瞭な傾向は見られなかった。また Creatinine に対する Urocanic acid の比も無タンパク質飼料群でのみ明らかに高まった。

文 献

- 1) R. G. Whitehead, and H. R. V. Arnstein: *Nature*, **190**, 1105 (1961)
- 2) R. G. Whitehead: *Proc. Nutr. Soc.*, **28**, 1 (1969)
- 3) D. R. Rao, A. D. Deodhar, and K. Hariharan: *Biochem. J.*, **97**, 311 (1965)
- 4) S. C. Lee, and A. E. Harper: *Biochem. Biophys. Acta*, **244**, 135 (1971)
- 5) M. D. Schirmer, and A. E. Harper: *J. Biol. Chem.*, **245**, 1204 (1970)
- 6) J. A. Owen, B. Iggo, F. J. Scandrett, and P. Stewart: *Biochem. J.*, **58**, 426 (1954)
- 7) Herbert Tabor: *Method in Enzymology*, vol. **VI**, p. 581, Edited by S. P. Colowick, and N. O. Kaplan, Academic Press, New York and London (1963)
- 8) 鈴木, 村岡: ビタミン・アミノ酸の微生物定量法, 南山堂 (1956)
- 9) W. D. Block, M. H. Westhoff, and B. F. Steele: *J. Nutrition*, **91**, 189 (1967)
- 10) D. D. Brown, O. L. Silva, P. B. McDonald, S. H. Snyder and M. W. Kies: *J. Biol. Chem.*, **235**, 154 (1960)

(受付: 昭和48年 7 月11日)