シロネズミにおけるアンモニウム塩の利用 (I)

The Utilization of Ammonia Nitrogen from Various Ammonium Salts in the Growing Rats Fed an Amino Acid Diet Lacking in Nonessential Amino Acids (I)

成長速度, 肝トランスアミナーゼ活性, および血漿アミノ酸パターン
におよぼす影響*

Effect of Ammonia Nitrogen on the Growth Rates, Liver Transaminase
Activities and Plasma Amino Acid Patterns

(昭和45年7月13日受理)

市原百合子** 桐山修八** 吉田 昭**
(Yuriko Ichihara) (Shuhachi Kiriyaama) (Akira Yoshida)

Growth-supporting capacity of various non-specific N sources were compared each other and with a non-essential amino acid mixture, when replaced isonitrogenously for the latter. As non-specific N sources, ammonium salts of citric (DAC), stearic (ASt), caproic (ACap), butyric (ABut), acetic(AAc), gluconic (AGlu), bicarbonic (ABc) and sulfuric (ASul) acids and glutamic acid (Glu) were individually incorporated in place of the non-essential amino acid mixture of the diet containing 80% level of amino acids patterned after Rama Rao *et al.* In all rats fed ammonium salts, considerable weight losses were observed during first 24 hrs., and they restored the weight gain afterwards.

In experiment 1, the weight gain in DAC and AAc groups were almost the same and both of them were lower than that of the control group. This difference mainly resulted from the initial growth retardation of the formers. ASt group also lost weight but not so great and grew later at very slow rate. Liver alanine aminotransferase (GPT) and aspartate aminotransferase (GOT) activities in the rats fed ammonium salts were rather lower than those of the control group, even after the ammonium salt-fed groups acquired almost the same growth rate as the control group (at the time, one can suppose that non-essential amino acids necessary for body protein synthesis are being synthesized from non-specific N source(NH₃) at the sufficiently rapid rate); especially, in GPT activity, there being significant differences between the control and ammonium salt-fed groups. In GOT activity, the values of these 2 groups did not differ significantly.

In experiment 2, AGlu group showed severe continuous diarrhea and slowly restored. The ABut group gained weight at the rate comparable to the control group with a slight growth retardation on the first day and its final body weight was higher than that of Glu group.

In experiment 3, addition of ten times more of water-soluble vitamin mixture did not appear to improve ammonia utilization. When the ABc group was shifted on 15th day to ABc diet in which one-third of nitrogen of ammonium bicarbonate was replaced by glutamic acid, the growth rates of these rats were distinctly improved and when the rats receiving the ABut diet was shifted to ABc diet after 11 days, they successively grew well without any initial retardation. The ASul group showed the greatest initial and prolonged growth retardation and afterwards slowly restored. When shifted to ACap diet, however, they exhibited rapid restoration. Similarly, when ABc group was switched on the ABut diet on 13th day, their growth rate was rapidly increased, gaining upon the control group at 15th day. In adequacy of ASul and AGlu to meet non-essential amino acid requirement would be due to adverse effect of their acid radicals.

Of the plasma free amino acids, the level of alanine, glycine, and serine always decreased significantly in rats fed ammonium salts.

* 本研究は第23回日本栄養・食糧学会総会(1969. 4. 21)
において発表した。なお、本研究の一部は昭和42年度

文部省科学研究費(試験研究)によった。
** 徳島大学医学部栄養学科

低たんぱく食時に飼料中のアンモニウム態窒素がリジン以外の各種アミノ酸、さらには体たんぱく中にとりこまれていることがすでに Foster ら¹⁾, Rittenberg ら²⁾, Sprinson および Rittenberg³⁾ の N^{15} -クエン酸アンモニウム投与による実験で明らかにされている。その後、シロネズミにおいて、アミノ酸混合物を唯一の窒素源としたとき、アンモニウム塩が非必須アミノ酸のかわりとしてかなりよく利用されることが Lardy および Feldott⁴⁾, Rose ら⁵⁾ によって報告されている。その他にもクエン酸アンモニウム、尿素、酢酸アンモニウムなどの効果を非必須アミノ酸単独投与の場合と比較検討している例はあるが⁶⁾, いずれも最終体重増加量のみで成長過程の詳細は示されておらず、系統的に検索した例はないようである。

本実験では、アミノ酸混合飼料時の新しい非特異的窒素源の検索を目的として、各種アンモニウム塩のシロネズミの成長におよぼす影響をしらべ、酪酸アンモニウムがクエン酸アンモニウムよりさらに効果の大きなことを見出した。また、その他のアンモニウム塩も条件によっては利用率を向上させうる可能性のあることを知った。

実験方法

動物 全実験を通じて実験動物にはウィスター系雄シロネズミを用い、金網底の個別ケージ中で飼育し、毎朝一定時刻に体重を測定した（実験ごとに初体重は異なる

ので図表脚注に記載した）。室温は $23 \pm 2^\circ\text{C}$ に調節した。5～8 日間、固形飼料（オリエンタル酵母工業製）と水を自由に与えたのち、各 5 匹ずつの群に分けた。試験食期間も実験ごとにそれぞれ異なるので表または図に記載した。

実験 1 では成長の他に肝 GPT (L-Alanine : 2-oxo-glutarate aminotransferase), GOT (L-Aspartate : 2-oxoglutarate aminotransferase) 活性を測定し、実験 3 では実験期間終了後、血中遊離アミノ酸パターンの変化を調べた。

飼料 試験食の飼料組成は表 1 に示した。アミノ酸混合物は Rama Rao¹⁰⁾ らの報告したネズミの最大成長に要する最低必要量パターンにしたがい、特に記載した場合を除いて、対照飼料中の全アミノ酸含量は Rama Rao らの 80 % とした。これは必須アミノ酸レベルを最低必要量よりもわずかに低くすることによって必須アミノ酸から非必須アミノ酸への窒素の転用をなるべく抑えた方がアンモニウム態窒素の利用度をより一層鋭敏にとらえうると考えたからである。試験飼料は対照飼料中の非必須アミノ酸の代りにそれと等窒素量になるようにアンモニウム塩を加え、両者の重量差は炭水化物源で代償した。実験 1, 2 では炭水化物源としてデキストリンを、実験 3 では α -澱粉の蔗糖と等量混合物を用いた。

アンモニウム塩の合成 入手できないアンモニウム塩については当研究室で下記のようにして合成した。

Table 1. Composition of experimental diet

Constituents	Control diet(%)	Test diet (%)
EAA-mixture ^{a)}	4.3	4.3
NEAA-mixture ^{a)}	6.4	—
Test substance	—	*
Corn oil ^{b)}	5.5	5.5
Salt mixture ^{c)}	4.0	4.0
Vitamin-mixture ^{c)}	1.0	1.0
Cellulose	2.0	2.0
Choline-Cl	0.15	0.15
NaHCO ₃	0.4	0.4
Dextrin or Starch+Sucrose (1:1)	made to 100.0	made to 100.0
* NH ₄ -citrate	5.90% (8.0%)	NH ₄ -butyrate 6.50%
NH ₄ -stearate	15.72	NH ₄ -caproate 7.30
NH ₄ -bicarbonate	4.40	NH ₄ -sulfate 3.44
NH ₄ -gluconate	11.70	Glutamic acid 7.66
NH ₄ -acetate	4.02	EAA-mix. 5.73

- a) This mixture was made after the minimum requirement pattern reported by Rama Rao *et al.*, but the dietary level of the mixtures was reduced to 80% of the original level (see text).
 b) Mixed with vitamin A palmitate and vitamin D dispersed in water and α -tocopheryl acetate to provide 6,000IU, 600IU and 100 mg/kg diet, respectively, prior to preparing the diet.
 c) This was identical with Harper's mixture. (11)

グルコン酸アンモニウム：グルコン酸の50%水溶液400mlを三角フラスコにとり攪拌下分液ロートより濃アンモニア水(NH₃ 28%以上) 50mlを滴下し(この量はほぼ当量に相当する), さらに少量のアンモニア水を加え完全にアルカリ性としたのち, 約3倍量のエタノール中へ攪拌下滴下するとグルコン酸アンモンが白色非結晶性の沈澱となって析出する。これをブフナー上に集めアルコールでよく洗ってから風乾する。純度: 97.8% (N定量による)。

カプロン酸アンモニウム：*n*-カプロン酸を2倍容のエーテルにとかし, これにアンモニアガスを通じる。減少するエーテルを時々補なう。上澄液がアルカリ性を呈するようになったのを確かめて反応を止め, 吸引ろ過し, 濾紙上の結晶をエーテルで2回洗浄する。真空デシケータの中に放置し乾燥する。白色鱗片状結晶。吸湿性強くN定量にもとづく純度は95%であった。

酪酸アンモニウム：*n*-酪酸に直接アンモニアガスを通じる。アンモニアの臭気が強く残るまで通じて止める。製品は固化せず, また凍結乾燥によっては完全に昇華消失してしまうので液状のまま実験に供した。窒素定量では理論値の88.5%の純度であった。上記2種の脂肪酸塩が見かけ上純度が低いのは, 主として含まれている水分によるものであると思われる。

GPT, GOT 活性の測定 酵素液: 15日間の試験食期終了後, ネブタール麻酔したネズミの心臓から全血を採取したのち, ただちに肝臓をとり出し碎氷中で冷却する。肝全重量を測定後, うち1gを秤取し, 冷脱イオン水9mlとともにテフロン製ホモジナイザーで氷冷しつつ磨砕し酵素液とする。

GPT 活性は Rosen ら¹¹⁾の方法にしたがって測定した。すなわち, 反応液は0.5Mのアラニン溶液0.2ml, 0.1Mの α -ケトグルタル酸溶液0.1ml, 0.2Mのリン酸緩衝液(pH 7.4) 0.9mlに酵素液0.025mlを加えて反応を開始し, 37°Cで10分間インキュベートしたのち, 50%トリクロル酢酸溶液0.15mlを加えて反応を停止させる。この反応液へ0.1%の2,4-ジニトロフェニルヒドラジンの2N塩酸溶液1mlを加え, 5分間室温に保ち, トルエン2mlを加えて混合し, トルエン層0.5mlを取り, これに1%アルコール性水酸化カリウム溶液5mlを加えて30分後に島津-ボッシュロム比色計で520m μ の吸光度を測定した。

GOT 活性は酵素液0.02mlと0.2Mアスパラギン酸溶液(L-アスパラギン酸を0.1M Na₂HPO₄溶液にとかし, pH 7.4に調整したもの) 0.5mlを混合, あらかじめ37°Cの恒温水槽中で3分間おき, 温度平衡に達したのち, 0.1Mの α -ケトグルタル酸溶液(pH 7.4) 0.2mlを加

えて反応を開始し, 正確に10分後, 0.15mlの50%トリクロル酢酸溶液を吹きこみ反応を止める。これに0.1mlのクエン酸溶液(アニリンと1g/ml濃度のクエン酸水溶液との等量混合物)を加えてよく混合して10分間37°Cで振盪する。次いで1.0mlの0.1% 2,4-ジニトロフェニルヒドラジン溶液を加えて37°Cで5分間保ったのち2.0mlのトルエンを加え強く5分間振盪して上層1mlを5mlのアルコール性水酸化カリウム溶液に加えて発色させ5~10分間放置後, 水1mlを加えて混合し520m μ で比色した。

血漿遊離アミノ酸の定量 ネブタールを腹腔内注射して麻酔し, ヘパリン処理した注射器で心臓から採血, 遠心し血漿を分離する。各群とも5匹分をブールしその中3mlを遠心管にとり, 1%ピクリン酸液15mlを加え, よく攪拌し遠心分離し, 上澄液15mlをDowex 2 $\times$ 10Cl-型樹脂に通しピクリン酸を除く。全部通したのち, 管壁, 樹脂床を0.02N塩酸約3mlで5回洗浄する。洗液を前の濾液と合わせロータリーエバポレーターで減圧濃縮し乾固させる。これに脱イオン水3mlを加え, 1N水酸化ナトリウムでpHを7~8とし, 4時間室温に放置しシステインをシスチンに酸化させる。これを再び1N塩酸でpH 2としロータリーエバポレーターで減圧濃縮し蒸発乾固させる。これにpH 2.2の稀釈用緩衝液(クエン酸三ナトリウム, 19.6g; 濃塩酸, 16.5ml; *n*-カプリル酸, 0.1g; チオジグリコール, 20.0ml; Brij-35, 2.0mlに水を加えて1lとしたもの) 5mlを加え, 残渣を完全に溶かす。アンプルに入れて封管し, 120°C, 10分間加熱し, グルタミンをグルタミン酸に加水分解する。この液1mlについて, テクニコン自動アミノ酸分析器を用いてアミノ酸の定量を行なった。

結果と考察

実験1では5.9%および8.0%クエン酸二アンモニウム食(5.9%DAC (0.73%N) および8.0%DAC(1.0%N)), 4.02%酢酸アンモニウム食(AAc), および15.7%ステアリン酸アンモニウム食(ASt)についてしらべた。

体重増加量と飼料摂取量は第1図に示した。ネズミの初体重は平均80g。成長曲線で特徴的なことは対照群以外はすべて試験食に変えた直後1日間は体重が減少するという点で, これは共通の現象であった。その後, 直ちに回復したが成長速度は塩類の種類によって異なった。15日間の体重増加量は5.9% DAC と AAc はほとんど差がなく, 比較的よい成長を示した(それぞれ32.5g, 32.6g)が対照群の49.6gに対しては有意に低かった。8% DAC 群中1匹が10日目に原因不明の体重減少を起こしたが, 他のものは5.9%の場合と変わらなかった。

Fig. 1. Growth curves and food intakes of rats fed on experimental diets* for 15 days

*Test diets contained the same amount of N from ammonium salts as non-essential amino acid nitrogen (0.733%) in the control diet and compensated by altering carbohydrate level (Exp. 1). Average initial body weight was 79.2 g (71~88 g).

一般にアンモニウム塩を与えると最初の1日は体重が低下しまもなく回復するが、8% DAC 群はその回復がおそかった。この最初の体重減少が全期間内の体重増加量を対照群より低くしている主な理由である。しかし ASt

群では初期の体重減少は少なかったが全期間の体重増加量は低く15日で24.7gで最低であった。またこの群の糞量は非常に多く、銀白色を呈していることから、摂取したステアリン酸のほとんどがそのまま糞中へ排泄されてきているものと思われる。

摂取量を比較すると、1日目よりむしろ2日目に大きく減少し、5.9% DAC食に比べるとAAc食の方が常に摂取量が少ない。9日目頃から5.9% DACの摂取量は対照群とほとんど差はなくなってくる。

以上のように、アンモニウム塩を全非必須アミノ酸の代りに用いても初期の体重低下以後は十分な速度で成長することができるから、実験開始後2,3日目からすでにアンモニア態窒素を十分成長に見合った速度で非必須アミノ酸の合成に利用していることが予想される。アンモニア態窒素が非必須アミノ酸の合成に直接利用される経路はグルタミン酸脱水素酵素により、 α -ケトグルタル酸を還元的にアミノ化する段階しか知られていないが成長に伴う体たんぱく合成が十分な速度で進むためには、この段階以後、さらにアミノ基転位反応によってすべての非必須アミノ酸が十分な速度で合成されなければならないわけである。アンモニウム塩投与後、順調な成長に回復した段階では、この非必須アミノ酸の相互転換速度を上げるため肝GPT, GOT活性も上昇しているかもしれないと考えて、これらの活性度測定を行なった。

GPT, GOT活性度の測定結果を表2に示した。これから明らかなように対照群に比べるとアンモニウム塩群の方がすべて低くなっている。GPTの全活性度は対照群の70.7に対し5.9% DAC群が42.4でバラツキが大きく有意差はなかったが約40%低下していた。8% DAC, AAc, ASt群はいずれも対照群の約1/2で有意に低かつ

Table 2. Liver weight, liver GPT and GOT activities of rats fed on experimental diets

Diets	Liver wt. g	Liver GPT			Liver GOT		
		Unit act. I Py ^a mg/g liver	Unit act. II Py mg/N mg	Total act. Py mg/liver /100 g B. wt.	Unit act. I Py mg/g liver	Unit act. II Py mg/N mg	Total act. Py mg/liver /100 g B. wt.
Control	5.68±0.39 ^{b)}	16.4±2.91	0.615±0.106	70.7±12.4	25.2±1.49	0.95±0.053	111.0±9.4
DAC ^{c)} (5.9%)	5.14±0.22	9.1±2.44	0.376±0.107	42.4±11.4	23.2±0.86	0.98±0.028	109.6±2.5
DAC (8.0%)	5.05±0.22	7.1±1.09 ^{c)}	0.298±0.44 ^{e)}	33.9±5.4 ^{f)}	23.9±1.51	1.02±0.075	114.3±4.8
NH ₄ -acetate	4.83±0.12	8.5±1.28 ^{f)}	0.352±0.056	35.6±4.4 ^{f)}	23.8±0.90	0.99±0.068	100.4±3.0
NH ₄ -stearate	4.10±0.21 ^{d)}	8.6±1.22 ^{f)}	0.331±0.039 ^{f)}	33.2±3.8 ^{e)}	26.1±1.91	1.03±0.073	102.7±6.6

a) Py represents pyruvate formed

b) SE of the mean

c) Diammonium citrate

d) Significantly different from the control group (0.005<P<0.01)

e) Significantly different from the control group (0.01<P<0.025)

f) Significantly different from the control group (0.025<P<0.05)

Fig. 2. Growth curves and food intakes of rats fed experimental diets* for 19 days

*Test diets contained the same amount of N from ammonium salts as non-essential amino acid nitrogen (0.733%) in the control diet and compensated by altering carbohydrate level (Exp. 2). Average initial body weight was about 68.1 g (59~76 g).

た。それ故、アンモニウム塩摂取群ではアラニンの生成速度が低下している可能性もあると思われる。GOT については対照群と他の試験食群との間で有意差はみとめられなかった。単位活性度においてもほとんど同様の傾向であった。すなわち、非必須アミノ酸の相互転換のうち少なくとも生成したグルタミン酸からアスパラギン酸を合成する段階は制限因子になっていないと推定される。しかし初期の体重低下は非必須アミノ酸の合成速度が低いため起こった現象でなく、アンモニア毒性の結果によるものかもしれない。すなわち解毒系が適応しきれていないためかもしれない。また、両者の重なった影響かもしれない。

実験 2 では試験食として対照群から非必須アミノ酸混合を除いた群 (-NEAA)、この飼料に、除いた非必須アミノ酸混合と等窒素量の必須アミノ酸混合を加えた群 (2EAA) の他に -NEAA 食に試験試料としてグルコン酸アンモニウム (AGlu)、重炭酸アンモニウム (ABc)、酪酸アンモニウム (ABut)、あるいはグルタミン酸 (Glu) の添加によりそれぞれ対照飼料と等窒素量にした飼料について比較した。

初体重は平均 68 g。体重増加量と飼料摂取量は図 2 に示した。

2EAA 群は非必須アミノ酸を全く摂取していないわけだが対照群とほとんど等しい成長を示した。一般に必須アミノ酸のみでは非必須アミノ酸の必要量をまかないきれないといわれているが⁹⁾¹²⁾、本実験においては対照飼料でもアミノ酸混合の量は最大成長量でなく、必須アミノ酸が最低必要量の 80% しか入っていないので、非必須アミノ酸に対する要求もそれに応じて低くなり¹³⁾、必須アミノ酸からも十分な速度で供給できるのかもしれない。また、Frost and Sandy の実験⁹⁾ ではアルギニンを除いた 9 種の必須アミノ酸混合物を用いたが、われわれの必須アミノ酸混合には半必須であるアルギニンが含まれていることも 1 つの原因かもしれない。

AGlu 群は下痢がひどく第 1 日目に約 2 g 体重が減少し、1 週間で約 6 g 減少した。これはグルコン酸部分の影響と思われる。しかし、この群も徐々に回復し、19 日目には -NEAA 群を追いこした。これはグルコン酸部分に対する適応 (グルコン酸の大量摂取を無害化する能力の獲得) さえできればアンモニウム態窒素を摂取する方が成長に有利であるといえる。ABc 群は単独では回復もおくれ、成長もあまり良好でないが 15 日目に飼料中の重炭酸アンモニウムの 1/3 をグルタミン酸で置きかえた飼料に変えると急速に成長がよくなり、同時に摂取量も増加した。ABut 群は最初の体重減少も少なく対照群と大差ない成長を示し、Glu 群より良くなっている。ABut 飼料を長く (調査実験では 2 日間行なったが) 空気中に放置するとアンモニアが完全に消失してしまうので、それを防ぎうればさらに利用性は良くなる可能性があるように思われる。摂取量もはじめの 2~3 日は少ないがその後対照群との差はなくなった。

実験 3 は平均体重約 59 g からはじめた。試験食群として酪酸アンモニウム食 (ABut)、ABut 食に水溶性ビタミン混合を 10 倍量加えたもの (ABut+Vit)、カプロン酸アンモニウム食 (ACap)、硫酸アンモニウム食 (ASul) および ABc 食について比較した。

その結果、ABut 食では前回同様、初期の体重減少もみられず良い成長を示したが、これにビタミン混合を 10 倍量増してもそれ以上の好影響はみられず、12 日での体重増加量は ABut 群が 24.0 g、ABut+Vit 群が 24.1 g で差はなかった。それ故、アンモニウム塩の利用に際してこれら B ビタミン類の必要量は対照飼料中のレベルですでに十分満たされていると考えられる。また、成長のよい ABut 群に対して、12 日目から、より悪いわけの ABc 食を与えたが成長のおくれはみられず、ABut 食と同じ速度で体重が増加した。このことは一旦アンモニウム塩

Fig. 3. Growth curves and food intakes of rats fed experimental diets* for 15 days

*Test diets contained the same amount of N from ammonium salts as non-essential amino acid nitrogen (0.733%) in the control diets and compensated by altering carbohydrate level. In this experiment, the level of essential amino acid mixture was 4.0% (Exp. 3). Average initial body weight was about 58.9g (52~67.5 g).

に適応した場合、よほどその酸部分に害作用がない限り窒素源として同等の効果をもつものと考えられる。ACap食では1日目に2.6g体重減少があり、その後の成長も劣った。またこれにビタミン混合を10倍量に増しても、ABut食の場合と同様にそれ以上の効果はみられなかった。ASul群では1日目に6.6gも体重減少が起こったが徐々に回復し、13日目には初体重より8g増加した。ここでACap食に変えたところ、摂取量は特に増加しないにもかかわらず体重は急速に増加した。またABC食も前回同様、初めはあまり良い成長を示さなかったが13日目にABut食に変え、やはり成長は目立って改善され15日では対照群と有意差はなくなった。これは非必須アミノ酸すべてが欠けているときアンモニウムイオンはその合成に必要であり、また十分利用されるものであるにもかかわらず、ASulなどにおいては硫酸根が有機酸よりも生育に害作用が強く、不要の SO_4^{--} の排泄除去に動物が適応しきれないためと思われる。

15日目に血液をとり、血漿中の遊離アミノ酸濃度を測定した結果を図4に示した。この中で特に目立った相違は対照群に比べ、アンモニウム塩ではすべてセリン、グ

Fig. 4. Plasma free amino acid pattern in the control and test rats fed various ammonium salts

Group 1, fed ABut diet for 12 days, then switched to ABC diet on 13th day; group 2, fed ABut diet supplemented with 10 times more water-soluble vitamin mixture; group 3, fed ACap diet for 12 days and then switched to the same diet supplemented with 10 times more water-soluble vitamin mixture on 13th day; group 4, fed ASul diet for 13 days and switched to ACap diet on 14th day; group 5, fed ABC diet for 13 days and switched to ABut diet on 14th day (Exp. 3).

リシンが著しく低下しており、次いでスレオニン、アラニンもかなり低くなっていることである。これらのうちセリン、グリシン、スレオニンは代謝的に密接な相関関係にあるアミノ酸であり、これらの変動とアンモニウム塩の利用との関係も興味深いものであり、ひきつづき検討している。

文 献

- 1) Foster, G. L., Schenheimer, R., Rittenberg, D.: *J. Biol. Chem.*, **127**, 319(1939)
- 2) Rittenberg, D., Schoenheimer, R., Keston, A. S.: *J. Biol. Chem.*, **128**, 603(1939)
- 3) Sprinson, D. B., Rittenberg, D.: *J. Biol. Chem.*, **180**, 707(1949)
- 4) Lardy, H. A., Feldott, T.: *J. Biol. Chem.*, **179**, 509(1949)
- 5) Lardy, H. A., Feldott, G.: *J. Biol. Chem.*, **186**, 85(1950)
- 6) Rose, W. C., Smith, L. C., Womack, M., Shane, M.: *J. Biol. Chem.*, **181**, 307(1949)
- 7) Rose, W. C., Dekker, E. E.: *J. Biol. Chem.*, **223**, 107(1956)
- 8) Frost, D. V., Sandy, H. R.: *J. Biol. Chem.*, **189**, 249(1951)
- 9) Rechcigl, M. Jr., Loosli, J. K., Williams, H. H.: *J. Nutr.*, **63**, 177(1957)
- 10) Rama Rao, P. B., Norton, H. W., Johnson, B. C.: *J. Nutr.*, **73**, 38(1961)
- 11) Rosen, F., Robert, N. R., Nichol, C. A.: *J. Biol. Chem.*, **234**, 476(1959)
- 12) Frost, D. V.: in *Protein and Amino Acid Requirements of Mammals*, edited by A. A. Albanese, Academic Press, New York(1950)
- 13) Yoshida, A., Ashida, K.: *Agr. Biol. Chem.*, **33**, 43(1969)