無菌白ネズミと通常化白ネズミの糞中各態窒素化合物 および非たん白部アミノ酸組成について

岩 渕 明*, 秋 場 克 彦*
務 台 方 彦*, 神 立 誠**

* ㈱ヤクルト本社中央研究所

** 麻布獣医科大学

On the Nitrogen Compound Distribution and Amino Acid Composition of Nonprotein Fraction in the Feces from Germfree and Conventionalized Rats

Akira IWABUCHI,* Katsuhiko AKIBA,* Masahiko MUTAI,*
Makoto KANDATSU**

* *Yakult Central Institute for Microbiological Research, Kunitachi, Tokyo*

** *Azabu Veterinary College, Sagamihara, Kanagawa*

To assess the role of the gastrointestinal microflora in the digestion, the nitrogen compound distribution in feces and particularly the amino acid composition in nonprotein fraction in them were analyzed on germfree and conventionalized rats.

The germfree and conventionalized rats in experiments (weighing approximately 230 g) were fed on autoclaved casein 18% or protein free diet.

In the feces of germfree rats, more peptide-N, amino-N, amide-N and urea-N were excreted than in those of conventionalized rats, on the contrary true protein-N and ammonia-N were excreted more than in conventionalized rats. The differences of the amount of excreted ammonia-N between germfree and conventionalized rats on the protein free diet were not significant.

On the casein diet, the main nitrogen compound in the feces of germfree rats were peptide-N and amino-N, but in those conventionalized rats were true protein-N and peptide-N. On the protein free diet, the main nitrogen compound in the feces of germfree rats were peptide-N, amino-N and true protein-N, whereas in those of conventionalized rats were true protein-N.

The total and free amino acid composition (g/16 g N) of nonprotein fraction in the feces were different between germfree and conventionalized rats.

All the 15 amino acid determined (except His and Cys on the casein diet) in nonprotein fraction of the feces were at higher level in germfree than in conventionalized rats (g/16 g N). On the diet experimented, the higher proportion of Glu, Ser, Asp, Lys and Thr were observed in nonprotein fraction of the feces in germfree and conventionalized rats. The amino acid pattern (g/16 g N) of nonprotein fraction of germfree rats fed on the casein diet was similar to that of the protein free diet, whereas in that of conventionalized rats were different between the casein and the protein free diet.

The results obtained suggested that the gastrointestinal microflora acts not only on dietary proteins, but also on endogenous proteins.

(Received October 13, 1980)

* 〒186 国立市谷保 1796

** 〒229 相模原市淵野辺 1-17-71

著者は、消化管内微生物は白ネズミのたん白質の消化吸収を助けていることを本誌¹⁾に報告した。同様な報告は数多くあり^{2)~5)}、そのなかで Corring ら⁵⁾は、無菌白ネズミの総胆管を結紮すると、たん白質の消化吸収率は低下するが、通常白ネズミでは低下しないことを報告し、消化管内微生物のたん白質の消化吸収に対する作用が大きいことを示している。このような作用は主として微生物の数および種類の多い⁶⁾⁷⁾、回盲部以下の大腸で行なわれていると推定されており、無菌白ネズミ盲腸内容物中には通常白ネズミよりアミノ酸、尿素⁸⁾、消化酵素⁹⁾およびムコたん白質¹⁰⁾が多いことが報告されている。さらに、Yoshida ら¹¹⁾は家兎で、Salter ら¹²⁾は鶏で、それぞれ無菌動物と通常動物の糞中アミノ酸の違いについて報告している。また、Whitt ら¹³⁾は無菌マウスと通常マウスでは、消化管各部位の遊離アミノ酸の分布状態が異なることを報告し、遊離アミノ酸への消化管内微生物の関与を示している。このような無菌動物と通常動物の違いは、消化管内微生物の食餌たん白質に対する消化管内での作用を示していると考えられる。

本実験は、窒素出納試験では明らかにすることができなかった消化管内微生物の食餌および内因性たん白質に対する関与を知るために行なった。

実験方法

1. 実験動物

実験動物は、同腹およびこれと前後して生まれた異腹の Fischer 344/Yit 雄無菌白ネズミ 10 匹を、ほぼ同じ条件となるように無菌白ネズミ区と通常化白ネズミ区に 5 匹ずつ 2 群に分けた。無菌白ネズミ区は、一般飼育室内 (室温 24°C, 湿度 55%) のビニールアイソレーター中で無菌的に飼育した。他の群の無菌白ネズミは、通常白ネズミの盲腸内容物を生理食塩水で希釈して経口投与し、通常白ネズミと同一条件で飼育した。盲腸内容物投与後、10 日前後で糞便細菌叢は安定したが、さらに 20 日間同一条件で飼育し、この白ネズミ群を通常化白ネズミ区とした。すべての白ネズミは、それぞれの飼育条件で代謝ケージに個別飼いと、滅菌カゼイン 18% 飼料とビタミン水溶液 (Table 3) で 7 日間予備飼育した後、実験に供した。実験開始時の白ネズミの体重は 230 g 前後 (12 週齢) であった。また、通常化白ネズミの糞便細菌叢は Table 1 に示したとおりである。なお、無菌白ネズミの無菌検査および通常化白ネズミの糞便細菌叢検査は、前報¹⁾に準じて行なった。

2. 実験飼料

実験飼料は、Table 2 に示したとおりに配合した粉末のカゼイン 18% 飼料および無たん白飼料を用いた。飼料配合では、脂溶性ビタミン類は大豆油に溶解して添加

Table 1. Bacterial flora in the feces of conventionalized rats.

Organisms	Viable counts ^a
Lactobacilli	9.3±0.7 ^b
Bacteroides	8.7±0.6
Streptococci	8.1±0.4
Enteric bacteria	6.8±0.9
Staphylococci	6.4±2.2
Total viable counts	10.5±0.2

^a Log₁₀/g fresh feces.

^b Mean±S.D. for 5 rats

Table 2. Composition of diets.

Ingredients	Protein diet (18% casein) (%)	Protein free diet (%)
β-Wheat starch	70.5	88.5
Casein	18.0	0
Soybean oil ^a	5.0	5.0
Mineral mixture ^b	4.0	4.0
Cellulose powder	2.0	2.0
Inositol	0.3	0.3
Choline chloride	0.2	0.2

^a Soybean oil contains following ingredients (mg/100 g):

vitamin A palmitate	8,000 I.U
vitamin D ₂	0.05
dl-α-tocopherol	120
menadion	2.0

^b Mineral mixture: Phillips Hart's salt No. 4.

したが、水溶性ビタミン類は、Table 3 に示した組成のビタミン水溶液として、飲用水の代わりとして与えた。ビタミン水溶液にアスコルビン酸を加えた理由は、加熱滅菌によるチアミンの安定化のためである。なお、飼料配合に用いた小麦澱粉は三和工業、カゼインは岩井化学薬品、大豆油 (日本薬局方) は三光製薬の各製品である。濾紙粉末は、東洋濾紙工業製の飼料用濾紙粉末 D を、無機塩類は Phillips-Hart の混合塩 No. 4¹⁴⁾ を用いた。飼料およびビタミン水溶液は 126°C, 30 分間蒸気加圧滅菌を施して用いた。

3. 糞の採取方法

予備飼育に続いて、すべての白ネズミにカゼイン 18% 飼料を 6 日間与えて、たん白飼料期とした。続いて無たん白飼料を 9 日間与えて、無たん白飼料期とした。糞の採取は、たん白飼料期は 6 日間、無たん白飼料期は、末期 6 日間にわたり毎日行なった。無菌白ネズミ区は、糞

Table 3. Composition of vitamin solution.

Ingredients	mg/dl
Ascorbic acid	200.0
Nicotinic acid	3.0
Calcium pantothenate	2.4
Riboflavin	1.0
Pyridoxine hydrochloride	1.0
p-Aminobenzoic acid	1.0
Thiamine hydrochloride	0.8
Folic acid	0.8
Biotin	0.1
Cyanocobalamin	6.0 μ g
Ethyl alcohol	1.5 ml

窒素化合物に対する微生物の関与がないために、9時に1回、また通常化白ネズミ区は、生体外での糞窒素化合物に対する微生物の影響をできるだけ少なくするために、9時と21時の2回に分けて行なった。糞はただちに全重量を秤した後、肉眼的に尿汚染のある糞と汚染のない糞に分け、試験管に入れて密栓し、分析するまで -20°C に保存した。尿汚染のあった糞は分析試料としないで、糞分析値を求めるときにその重量を汚染のない糞に加えて糞重量とした。

4. 分析方法

それぞれの白ネズミごとに尿汚染のない糞を6日分ずつまとめて乳鉢で混合した。その糞の一部をテフロンホモゲナイザーに採取し、蒸留水を加えて冷却下で混合磨砕した。次いで、20% トリクロル酢酸溶液を加えて、トリクロル酢酸最終濃度を10%にして混合した。室温に5時間放置した後、 5°C 、12,000gで20分間遠心分離し、その上清を非たん白部として、窒素化合物の分布およびトリプトファン以外の17種のアミノ酸を分析した。沈殿部は純たん白部として窒素を求めた。窒素の分析はColeman 窒素分析計29B型で行なった。非たん白部アミノ態窒素は銅錯塩ヨウ素比色法¹⁵⁾で定量した。ペプチド態窒素は6N塩酸で 110°C 、24時間加水分解した後、全アミノ態窒素を定量し、これからアミノ態窒素を差し引いて求めた。尿素態窒素はウレアーゼ法¹⁶⁾によって、アンモニア態窒素と同様にConway微量拡散法¹⁷⁾で求めた。アミド態窒素は常法¹⁸⁾に従って分析した。また、未定量窒素は全窒素から各窒素化合物窒素量の合計を差し引いて求めた。遊離アミノ酸は遠心上清について分析した。カゼイン18%飼料および非たん白部全アミノ酸は、それぞれ上記の方法で加水分解して、遊離アミノ酸と同様に日立アミノ酸自動分析計KLA-3B型で分析した。

実験結果

1. 糞中窒素化合物

たん白飼料期および無たん白飼料期における、無菌白ネズミ区（以下無菌区）および通常化白ネズミ区（以下通常化区）の糞中窒素化合物排泄量をTable 4に示した。たん白飼料期における飼料摂取量は、通常化区が無菌区より有意に高かった。糞中窒素排泄量は、両区の間には有意差がなかったが、表には示さなかったものの飼料摂取10gあたりに換算すると、無菌区が $29.2 \pm 1.7 \text{ mg}$ で、通常化区の $22.5 \pm 2.0 \text{ mg}$ （平均土標準偏差）/日より有意に高かった。ペプチド態、アミノ態、アミド態および尿素態の各窒素排泄量は、無菌区が通常化区より有意に高かった。それに対して、純たん白態およびアンモニア態窒素排泄量は、通常化区が無菌区より有意に高かった。通常化区の尿素態窒素排泄量は無菌区と比較して顕著に低く、 0.4 mg/日 以下であった。未定量窒素は両区の間には有意差がなかったが、通常化区が無菌区より高い傾向があった。無たん白飼料期における飼料摂取量は、両区の間には有意差がなかった。糞中窒素排泄量は、無菌区が通常化区より有意に高かった。アンモニア態窒素以外の各窒素化合物排泄量は、たん白飼料期と同様に、純たん白態窒素は通常化区が無菌区より有意に高く、その他の窒素化合物は、いずれも無菌区が通常化区より有意に高かった。アンモニア態窒素は、両区の間には有意差がなかった。未定量窒素は、無菌区が通常化区より有意に高かった。

糞全窒素に占める各窒素化合物の割合は、両飼料期のいずれにおいても、無菌区が通常化区より、ペプチド態、アミノ態、アミド態および尿素態の各窒素が有意に高かった。それらとは逆に、純たん白態およびアンモニア態の両窒素は、通常化区が有意に高かった。たん白飼料期における、無菌区のおもな糞中窒素化合物は、ペプチド態およびアミノ態窒素であって、両者の合計が糞全窒素の61%であった。それに対して、通常化区では純たん白態およびペプチド態窒素であって、両者の合計が73%であった。無たん白飼料期における、無菌区のおもな糞中窒素化合物は、アミノ態、ペプチド態および純たん白態の各窒素であって、これらの合計が71%であった。それに対して、通常化区では、純たん白態窒素が糞全窒素の77%を占め、両飼料期のそれぞれにおいて、無菌区より高分子窒素化合物によって占められていた。

無菌および通常化区のそれぞれにおける、両飼料期の間の糞中排泄量の違いは、無菌区においては、たん白飼料期が無たん白飼料期より全窒素、ペプチド態、アミド態、尿素態およびアンモニア態の各窒素排泄量が有意に高かった。純たん白態およびアミノ態窒素は両期の間には有意差がなかった。

Table 4. Composition of nitrogen compounds in the feces from germfree and conventionalized rats.

	Protein (18% casein) diet		Protein free diet	
	G.F. ^a	Conv. ^b	G.F.	Conv.
Food intake (g/day)	12.0±0.8	14.3±0.6 ^d	13.5±2.9	11.6±1.9 ^e
Nitrogen (mg/day)	34.0±2.6	32.2±3.3	26.1±4.6 ^e	18.1±1.5 ^{d,e}
(%)	100	100	100	100
True protein-N (mg/day)	4.7±0.7	13.9±1.3 ^d	5.7±0.8	14.0±0.8 ^d
(%)	13.8±1.3	43.2±3.7 ^d	21.8±3.1 ^e	77.3±2.7 ^{d,e}
Nonprotein-N (mg/day)	29.3±2.0	18.3±3.0 ^d	20.4±4.1 ^e	4.1±0.9 ^{d,e}
(%)	86.2±1.2	56.8±1.8 ^d	78.2±1.3 ^e	22.6±4.4 ^{d,e}
Peptide-N (mg/day)	13.1±1.2	9.7±1.5 ^d	6.2±1.5 ^e	2.0±1.6 ^{d,e}
(%)	38.3±3.1	30.2±2.2 ^d	23.7±2.7 ^e	11.0±2.5 ^{d,e}
Amino-N (mg/day)	7.8±1.5	2.7±0.6 ^d	6.7±0.3	0.4±0.3 ^{d,e}
(%)	22.9±2.9	8.4±1.3 ^d	25.7±3.1	2.3±1.4 ^{d,e}
Amide-N (mg/day)	2.6±0.3	0.7±0.1 ^d	1.4±0.5 ^e	0.2±0.1 ^{d,e}
(%)	7.8±0.6	2.2±0.2 ^d	5.5±1.2 ^e	1.1±0.4 ^{d,e}
Ammonia-N (mg/day)	0.5±0.1	1.5±0.4 ^d	0.3±0.1 ^e	0.4±0.1 ^e
(%)	1.5±0.2	4.6±1.0 ^d	1.1±0.2 ^e	2.2±0.9 ^{d,e}
Urea-N (mg/day)	4.0±0.6	<0.4 ^d	1.7±0.4 ^e	<0.1 ^d
(%)	11.8±1.7	<1.2 ^d	6.5±0.7 ^e	<0.6 ^d
Unknown-N (mg/day)	1.4±0.5	3.3±1.8	4.1±1.8 ^e	1.0±0.2 ^{d,e}
(%)	4.1±2.9	10.2±0.9 ^d	15.7±4.8 ^e	6.0±0.7 ^{d,e}

^a Germfree rats. ^b Conventionalized rats. ^c Mean±S.D.^d Difference from germfree rat significant at $p<0.05$.^e Difference between protein and protein free diet significant at $p<0.05$.

<: Less than the maximum among the values.

有意差がなかった。純たん白態窒素排泄量は、飼料摂取 10 g あたりに換算すると、たん白飼料期が 3.9 ± 0.2 mg ((平均±標準偏差)/日) で、無たん白飼料期が 4.3 ± 0.4 mg であった。また、アミノ態窒素は、たん白飼料期が 6.5 ± 1.3 mg で、無たん白飼料期が 5.0 ± 0.8 mg であって、純たん白態およびアミノ態窒素のいずれも、両飼料期の間に有意差がなかった。未定量窒素は無たん白飼料

期のほうが有意に高かった。通常化区においては、たん白飼料期が無たん白飼料期より、純たん白態窒素以外のいずれの窒素化合物も有意に高かった。純たん白態窒素排泄量は、両飼料期の間に差がなかったが、飼料摂取 10 g あたりに換算すると、無たん白飼料期が 12.7 ± 1.5 mg で、たん白飼料期の 9.7 ± 0.6 mg より有意に高かった。未定量窒素は、無菌区とは逆に、たん白飼料期の

Table 5. Total amino acid composition of nonprotein fraction in the feces from germfree and conventionalized rats.

(g/16 g N)

	Protein (18% casein) diet			Protein free diet	
	diet	G.F. ^a	Conv. ^b	G.F.	Conv.
Essential amino acid					
Lys	7.9	4.6±0.7 ^c	3.1±0.3 ^d	4.0±0.3	0.9±0.1 ^{de}
Thr	4.5	4.3±0.7	1.4±0.3 ^d	6.2±1.2 ^e	0.4±0.1 ^{de}
Ile	5.3	3.4±0.6	2.1±0.2 ^d	3.3±0.3	0.4±0.1 ^{de}
Val	6.2	3.0±0.3	1.8±0.2 ^d	3.4±0.3	0.3±0.1 ^{de}
Arg	3.2	2.5±0.5	0.7±0.1 ^d	2.7±0.2	0.2±0.1 ^{de}
Leu	9.6	2.2±0.2	1.3±0.3 ^d	2.7±0.2 ^e	0.4±0.1 ^{de}
His	2.3	1.0±0.2	1.3±0.4	1.1±0.1	0.1±0.0 ^{de}
Phe	4.5	0.5±0.1	0.2±0.1 ^d	1.0±0.1 ^e	0.3±0.1 ^d
Met	1.8	0.2±0.1	0.1±0.1	0.2±0.1	<0.1 ^d
Sum	45.3	21.7±2.3	11.7±1.3 ^d	24.7±1.9	3.0±0.5 ^{de}
Non-essential amino acid					
Glu	23.8	15.9±1.7	8.6±0.9 ^d	11.3±0.9 ^e	2.4±0.2 ^{de}
Ser	6.2	7.7±0.4	3.9±0.5 ^d	6.5±0.5 ^e	0.5±0.1 ^{de}
Asp	7.4	7.5±1.8	3.1±0.5 ^d	7.9±2.2	1.6±0.2 ^{de}
Pro	10.8	4.1±0.9	1.8±0.3 ^d	5.9±1.6	0.3±0.1 ^{de}
Ala	3.4	2.0±0.2	1.0±0.1 ^d	2.8±0.2 ^e	0.6±0.1 ^{de}
Gly	1.7	1.9±0.1	0.8±0.1 ^d	3.3±0.1 ^e	0.6±0.1 ^{de}
Tyr	4.4	0.5±0.1	<0.1 ^d	0.7±0.1 ^e	0.1±0.1 ^d
Cys cys	0.2	<0.1	0.2±0.1 ^d	<0.1	<0.1 ^e
Sum	57.9	39.6±4.4	19.6±1.8 ^d	38.2±4.5	6.2±0.5 ^{de}
Total sum	103.0	61.4±6.7	31.2±3.0 ^d	63.1±5.5	9.0±0.1 ^{de}

^{a, b, c, d, e}: See footnotes of table 4.

<: Less than the maximum among the values.

ほうが有意に高かった。

2. 非たん白部全アミノ酸

糞中非たん白部全アミノ酸組成 (g/16 gN) は Table 5 に示したとおりである。たん白飼料期においては、無菌区が通常化区よりヒスチジン、含硫アミノ酸以外のいずれのアミノ酸も有意に高かった。スレオニン、ヒスチジン、シスチン以外のアミノ酸においては、両区ではほぼ同じアミノ酸パターンを示した。必須および可欠アミノ酸のそれぞれの合計は、無菌および通常化区のいずれにおいても、可欠アミノ酸が必須アミノ酸より、有意に高かった。また、全アミノ酸の合計は、無菌区が通常化区より有意に高かった。無菌および通常化区のそれぞれにおいて、最も高い必須アミノ酸はリジンであった。次いで、無菌区ではスレオニン、イソロイシンであった。ま

た、通常化区ではイソロイシン、バリンであった。可欠アミノ酸では、両区のいずれにおいてもグルタミン酸が最も高く、次いで、セリン、アスパラギン酸であった。グルタミン酸は 17 種のアミノ酸のうちで、無菌および通常化区のいずれにおいても最も高く、含硫アミノ酸は最も低かった。無たん白飼料期においては、無菌区と通常化区で異なるアミノ酸パターンを示した。量的な関係では、無菌区が通常化区よりシスチン以外のいずれのアミノ酸も有意に高かった。全アミノ酸、必須および可欠アミノ酸のそれぞれの合計は、いずれもたん白飼料期と同様に、無菌区が通常化区より有意に高かった。無菌区で最も高い必須アミノ酸はスレオニンで、次いでリジンであった。通常化区では、たん白飼料期と同様に、リジンが最も高かった。可欠アミノ酸では、無菌および通常

Table 6. Free amino acid composition of nonprotein fraction in the feces from germfree and conventionalized rats.

(g/16 g N)

	Protein (18% casein) diet		Protein free diet	
	G.F.	Conv.	G.F.	Conv.
Essential amino acid				
Lys	1.7±0.2	1.0±0.3 ^d	1.5±0.2	0.4±0.1 ^{de}
Thr	1.1±0.1	0.1±0.1 ^d	0.9±0.1	0.2±0.1 ^d
Ile	0.9±0.4	<0.1 ^d	0.7±0.1	0.1±0.1 ^d
Val	1.0±0.2	0.2±0.1 ^d	1.2±0.3	0.1±0.1 ^d
Arg	0.9±0.1	* ^d	1.0±0.1	<0.1 ^d
Leu	0.8±0.1	0.1±0.1 ^d	0.9±0.1	0.1±0.1 ^d
His	0.8±0.1	* ^d	0.8±0.1	* ^d
Phe	0.7±0.1	0.1±0.1 ^d	0.7±0.1	0.1±0.1 ^d
Met	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
Sum	7.7±0.4	1.7±0.3 ^d	7.8±0.9	1.1±0.4 ^{de}
Non-essential amino acid				
Glu	3.7±0.5	1.1±0.4 ^d	1.8±0.2 ^e	1.0±0.3 ^d
Ser	2.4±0.2	0.1±0.1 ^d	1.4±0.3 ^e	0.1±0.1 ^d
Asp	1.0±0.1	0.3±0.1 ^d	1.0±0.2	0.2±0.1 ^d
Pro	0.8±0.1	0.1±0.0 ^d	0.8±0.1	0.1±0.1 ^d
Ala	0.6±0.1	0.2±0.1 ^d	0.8±0.1	0.3±0.1 ^d
Gly	0.6±0.1	0.1±0.1 ^d	0.7±0.1	0.2±0.1 ^d
Tyr	0.8±0.1	<0.1 ^d	0.9±0.3	<0.1 ^d
Cys	0.1±0.1	*	0.1±0.1	*
Sum	9.6±0.8	2.1±0.6 ^d	7.4±0.6 ^e	2.0±0.5 ^d
Total sum	18.0±1.1	3.9±0.9 ^d	15.3±1.4 ^e	3.2±0.5 ^d

a, b, c, d, e: See footnotes of table 4.

<: Less than the maximum among the values.

*: Trace or none.

化区のいずれにおいてもグルタミン酸が最も高く、次いでアスパラギン酸であった。含硫アミノ酸は、両区のいずれにおいても最も低かった。

無菌および通常化区のそれぞれにおける、両飼料期の間の違いは、無菌区では、無たん白飼料期がたん白飼料期よりスレオニン、ロイシン、フェニールアラニン、アラニン、グリシン、チロシンが有意に高かった。グルタミン酸、セリンは、たん白飼料期が無たん白飼料期より有意に高かった。全アミノ酸、必須および可欠アミノ酸のそれぞれの合計は、いずれにおいても両飼料期の間に有意差がなかった。通常化区では、フェニールアラニン、メチオニン、チロシンは両飼料期の間に有意差がなかった。これらのアミノ酸以外のいずれのアミノ酸も、

たん白飼料期が無たん白飼料期より有意に高かった。全アミノ酸、必須および可欠アミノ酸のそれぞれの合計は、いずれもたん白飼料期が無たん白飼料期より有意に高かった。

3. 糞中遊離アミノ酸

糞中遊離アミノ酸組成 (g/16 gN) は Table 6 に示したとおりである。たん白飼料期および無たん白飼料期のいずれにおいても、メチオニン以外のアミノ酸は、無菌区が通常化区より有意に高かった。糞中遊離アミノ酸で最も高いアミノ酸は、無菌および通常化区のいずれにおいても、ほぼ非たん白部全アミノ酸と同様であったが、無たん白飼料期における無菌区の必須アミノ酸では、リジンが最も高かった。可欠アミノ酸ではグルタミン酸が

最も高く、次いでセリンであった。また、通常化区で最も低い必須アミノ酸は、アルギニン、ヒスチジン、イソロイシン、メチオニンであった。可欠アミノ酸ではチロシン、シスチンが最も低かった。これらのアミノ酸のうち、とくに、アルギニン、ヒスチジンは、たん白飼料期において最も低くトレース以下であった。無菌区では、両飼料期のいずれにおいても、含硫アミノ酸が最も低かった。

無菌および通常化区のそれぞれにおける、両飼料期の間の違いは、無菌区では、たん白飼料期が無たん白飼料期より、グルタミン酸、セリンが有意に高かった。通常化区では、たん白飼料期が無たん白飼料期より、リジンが有意に高かった。その他のアミノ酸は、無菌および通常化区のそれぞれにおいて、両飼料期の間に有意差がなかった。全遊離アミノ酸、必須および可欠アミノ酸のそれぞれの合計は、無菌区においては全遊離アミノ酸、可欠アミノ酸のそれぞれは、たん白飼料期が無たん白飼料期より有意に高かった。必須アミノ酸は両飼料期の間に有意差がなかった。通常化区においては、必須アミノ酸の合計が、たん白飼料期のほうが無たん白飼料期より高かった。全遊離アミノ酸、可欠アミノ酸のそれぞれ合計は、両飼料期の間に有意差がなかった。

考 察

消化管内微生物は、食餌たん白質に作用していることが知られている¹¹⁻¹³。Salter は¹⁹、消化管内微生物の食餌たん白質に対する作用として、未消化たん白質からのアミノ酸の遊離、アミノ酸からのアンモニアの産生およびアミノ酸の菌体たん白質への利用の可能性を示している。本実験では、たん白飼料期および無たん白飼料期のいずれにおいても、通常化白ネズミの糞中窒素化合物は、無菌白ネズミより高分子窒素化合物で占められていた。とくに、無たん白飼料期の無菌白ネズミでは、糞全窒素に占める純たん白態、ペプチド態およびアミノ態の各窒素は、それぞれ 20% 程度であるのに対して、通常化区では、純たん白態窒素の割合が糞全窒素の 77% と高く、量的な関係ではペプチド態、アミノ態、アミド態の各窒素の順位であるが、アミノ態窒素の減少が最も大きい。このようなアミノ態窒素の通常化白ネズミにおける減少は、たん白飼料期においても同様に認められる。これらの事実から、消化管内微生物は、ペプチド態およびアミド態窒素よりも、アミノ態窒素に対して容易に作用することが示唆された。アミノ酸に対する消化管内微生物の作用は、糞中遊離アミノ酸組成 (Table 6) で示されるように、通常化白ネズミでは、たん白飼料期でイソロイシン、アルギニン、ヒスチジン、セリン、チロシンの低下が顕著であり、これらのアミノ酸に対する作用

が大きいことが示された。また、神立ら²⁰は、白ネズミの糞中遊離アミノ酸をペーパークロマトグラフィによって、16 種のアミノ酸を検出し、ヒスチジン、シスチン、オルニチンの存在には疑問があったことを、本学会に報告している。Yoshida ら¹¹は、通常家兎においては、ヒスチジン以外の糞中アミノ酸 (g/Ng) が無菌家兎よりも高いことを報告している。これらのことから、消化管内微生物のアミノ酸に対する作用はアミノ酸の種類によって異なると思われる。消化管内微生物のアミノ酸に対する作用としては、脱アミノ反応あるいは脱炭酸反応によって、アンモニアやアミンを産生することが知られている²¹。また、微生物は増殖のために各種のアミノ酸を要求し、とくに白ネズミの糞中に多い乳酸菌群のアミノ酸要求は、多岐にわたっている²²。これらのことから、消化管内微生物は、消化管内の食餌たん白質、ペプチドおよびアミノ酸に作用し、これらの一部をアンモニアのような体内に吸収される物質に、また、一部を菌体たん白質に転換していると推察される。

カゼインたん白質中窒素の大部分は、純たん白態窒素であるが、たん白飼料期における無菌白ネズミの糞中純たん白態およびアミノ酸窒素排泄量は、両飼料期の間に有意な違いがなかった。しかし、ペプチド態窒素排泄量は、たん白飼料期のほうが無たん白飼料期より高かった。この事実は、たん白飼料期の糞中純たん白態およびアミノ態窒素は内因性のものであり、ペプチド態窒素の相当部分は、食餌たん白質由来であることを示していると考えられる。したがって、無菌白ネズミにおいては、カゼインは消化酵素によって、ほぼ完全にペプチドとアミノ酸に分解され、アミノ酸の大部分は宿主によって吸収されるが、カゼインの一部は、ペプチドとして糞中に排泄されると推察される。

一方、通常化白ネズミにおけるカゼインの消化には、消化酵素以外に消化管内微生物の作用が加わり¹⁵、無菌白ネズミ以上に消化が促進される。事実、カゼインの消化吸収率は、通常化白ネズミが無菌白ネズミより高く、通常化白ネズミでは、ほぼ完全に消化吸収される²³。また、内因性窒素においては、無菌白ネズミの盲腸内容物中に多いムコたん白質^{9,10}、トリプシン、キモトリプシン⁹は、通常白ネズミでは僅少であることが報告されている。さらに、内因性窒素の大部分は再吸収されることが述べられている²⁴。これらのことから、通常化白ネズミの糞中には、カゼイン由来の純たん白態窒素は含まれず、それは、消化管内微生物由来のものと推定される。また、その排泄量は体重 100 g 当たり 6.7 ± 0.4 mg (平均±標準偏差) であり、これは後述の神立らの値と有意差がない。

神立ら²⁰は、代謝性糞中窒素の研究において、Wister

系成熟白ネズミ（体重 380～550 g）を、小麦澱粉はなお窒素を含むため、窒素をほとんど含まないショ糖を、90% 含む無たん白飼料を用いて飼育した場合の糞中窒素化合物について研究し、生体重 100 g 当たり全窒素 9.0 ± 0.1 mg（平均±標準偏差）の値を得た。また、各種溶剤を用いて抽出試験の結果、全窒素中それぞれ水溶性 39.8%, 10% NaCl 溶性 17.3%, 0.3% NaOH 溶性 14.0%, 0.3% アルカリ性 60% 熱アルコール溶性 20.1%, 抽出合計 91.1% で、水溶性窒素は約 40% を占め、最も多量であった。水溶性窒素中、たん白態窒素は約 30% で、非たん白態窒素が 70% を占めていた。また、非たん白態窒素のうちでは無たん白飼料期間 4～8 日（前期）、8～13 日（後期）とでは値が変化したが、アミド態窒素が過半を占め（前期 55.6%, 後期 74.5%）、ペプチド態窒素が前期 20.0%, 後期 18.2%, アンモニア態窒素が前期 16.7%, 後期 6.4% を示し、これらのものの重要性を報告した。

Gibson ら²⁵⁾は、ヒトの体内で合成された尿素の 20% が分解されることを報告している。また、小橋ら²⁶⁾は、 C^{14} 尿素を無菌および通常白ネズミに経口投与すると、無菌白ネズミでは尿素は分解されないが、通常白ネズミでは分解されることを報告している。本実験においては、両飼料期のいずれにおいても、無菌白ネズミの糞中に尿素が排泄されたが、通常化白ネズミの尿素態窒素排泄量は 0.4 mg/日以下であり、消化管内微生物は消化管内尿素のほとんどを分解していることが示された。また、無たん白飼料期におけるアンモニア態窒素排泄量は、無菌白ネズミと通常化白ネズミの間に差がなかったが、カゼイン飼料摂取によって、無菌白ネズミでは尿素排泄量が、また、通常化白ネズミではアンモニア排泄量が増加した。この通常化白ネズミにおける、アンモニア態窒素排泄量の増加は、尿素の分解に由来するものと思われる。Warren ら²⁷⁾は、モルモットの門脈血中アンモニア量は、摂取たん白レベルの増加に伴って高くなることを報告し、通常動物では、消化管内尿素がアンモニアとして、再び吸収されることを示している。これらのことから、消化管内微生物は、尿素の体内における循環に大きな役割をはたしていると考えられる。

無菌白ネズミの糞中非たん白部全アミノ酸組成 (Table 5) は、たん白飼料期と無たん白飼料期がほぼ同じであったが、必ずしも一致した組成ではなかった。これは、カゼイン飼料摂取の影響と思われる。一方、通常化白ネズミでは、両飼料期のそれぞれにおける、糞中非たん白部全アミノ酸の各アミノ酸およびその合計は、いずれの飼料期においても無菌白ネズミより低く、無たん白飼料期のアミノ酸組成は無菌白ネズミと異なった。この事実、消化管内微生物の食餌および内因性たん白

質、ペプチドおよびアミノ酸に対する作用を示していると思われる。

無菌白ネズミのおもな内因性窒素は、消化液と消化管粘膜剝離物であり、無菌白ネズミの盲腸内容物中には、通常白ネズミより消化酵素⁹⁾、ムコタン白質¹⁰⁾が多いことが報告されている。無菌白ネズミの無たん白飼料期における、糞中非たん白部全アミノ酸では、これらの内因性たん白質の主な構成アミノ酸^{28)・31)}であるグルタミン酸、アスパラギン酸、セリン、スレオニン、プロリンが高い。これらのアミノ酸は、糞中非たん白部全アミノ酸と糞中遊離アミノ酸から求めると、結合型が多いことがわかる。これに対して、通常化白ネズミでは無菌白ネズミより結合型アミノ酸が少なく、糞中非たん白部全アミノ酸組成は両飼料期の間で異なるパターンを示した。これらのことは消化管内微生物の内因性たん白質、ペプチドおよびアミノ酸に対する作用形式を示す重要な事実と思われる。

両飼料期のいずれにおいても、糞中非たん白部全アミノ酸 (Table 5) のうちで、通常化白ネズミで最も含量の高い必須アミノ酸はリジンで、可欠アミノ酸ではグルタミン酸であった。無菌白ネズミでは、たん白飼料期で最も高いアミノ酸は通常化白ネズミと同様であったが、無たん白飼料期ではスレオニンが最も高い必須アミノ酸であった。また、たん白飼料期においては、ヒスチジンは無菌白ネズミと通常化白ネズミとの間に差がなかったが、遊離アミノ酸では、ヒスチジンを含むメチオニン以外のすべてのアミノ酸が、通常化白ネズミの場合に無菌白ネズミより低かった。これらの事実は、他のアミノ酸の変化と対比して興味のかかる点である。

なお、カゼイン飼料中のメチオニン量は、食品のアミノ酸含有量表³²⁾掲載値から求めた値より少なかった。これは、飼料配合の際の小麦澱粉との混合および蒸気加圧滅菌による損失と思われる。

要 約

たん白飼料（カゼイン 18%）および無たん白飼料を、それぞれ無菌白ネズミと通常化白ネズミに与え、糞中窒素化合物と、とくに糞中非たん白部アミノ酸を分析した。その結果を要約すると次のとおりである。

1) たん白飼料期および無たん白飼料期のいずれにおいても、飼料摂取単位当たりの糞中排泄窒素量は、無菌白ネズミ区が通常化白ネズミ区より有意に高かった。

2) たん白飼料期および無たん白飼料期のいずれにおいても、無菌白ネズミ区が通常化白ネズミ区より、ペプチド態、アミノ態、アミド態および尿素態の各窒素排泄量が有意に高かった。純たん白態窒素排泄量は、これらとは逆に、通常化白ネズミ区のほうが有意に高かった。

アンモニア態窒素は、たん白飼料期では通常化白ネズミ区のほうが有意に高かったが、無たん白飼料期では、無菌白ネズミ区と通常化白ネズミ区に有意差がなかった。

3) 通常化白ネズミ区の尿素態窒素排泄量は、無菌白ネズミ区に比べて非常に低く、0.4 mg/日以下であった。

4) たん白飼料期における、無菌白ネズミ区の糞中主窒素化合物は、ペプチド態およびアミノ態窒素であって、通常化白ネズミ区では、純たん白態およびペプチド態窒素であった。無たん白飼料期では、無菌白ネズミ区の主窒素化合物は、アミノ態、ペプチド態および純たん白態の各窒素であって、通常化区では、純たん白態窒素であった。

5) 糞中非たん白部全アミノ酸 (g/16 gN) は、たん白飼料期では、ヒスチジン、シスチン以外の 15 種のアミノ酸が、また、無たん白飼料期では、シスチン以外のすべてのアミノ酸が、無菌白ネズミ区のほうが通常化白ネズミ区より有意に高かった。

6) 糞中非たん白部全アミノ酸組成 (g/16 gN) は、無菌白ネズミ区では、たん白飼料期と無たん白飼料期ではほぼ同アミノ酸パターンであったが、通常化白ネズミ区では、異なるアミノ酸パターンを示した。

7) たん白飼料期における、無菌白ネズミ区の糞中非たん白部全アミノ酸 (g/16 gN) で、最も高い必須アミノ酸はリジンであった。可欠アミノ酸ではグルタミン酸が最も高かった。無たん白飼料期では、必須アミノ酸ではスレオニン、可欠アミノ酸ではグルタミン酸が最も高かった。通常化白ネズミ区では、両飼料期のそれぞれにおいて、必須アミノ酸ではリジン、可欠アミノ酸ではグルタミン酸が最も高かった。

8) 糞中遊離アミノ酸 (g/16 gN) は、両飼料期のそれぞれにおいて、メチオニン以外のいずれのアミノ酸も、無菌白ネズミ区が通常化白ネズミ区より有意に高かった。

9) たん白および無たん白飼料期のそれぞれにおいて、糞中遊離アミノ酸 (g/16 gN) で、最も高い必須アミノ酸は、両白ネズミ区のいずれにおいてもリジンであった。可欠アミノ酸ではグルタミン酸が最も高かった。

以上の結果から、消化管内微生物は食餌および内因性たん白質、ペプチドおよびアミノ酸に対して、作用していることが示唆された。

文 献

- 1) 岩渕 明, 高橋徳太郎, 務台方彦, 神立 誠: 栄養と食糧, 30, 141 (1977)
- 2) Levenson, S.M. and Tennant, B.: *Fed. Proc.*, 22, 109 (1963)
- 3) Eyraud, E., Hoet, P.P., Eyssen, H., Charlier, H. and Saquet, E.: *Brit. J. Exp. Path.*, 45, 409 (1964)
- 4) Heneghan, J.B.: *Germfree Research*, 305 (1973), Academic Press (New York and London)
- 5) Corring, T., Moreau, C. and Ducluzeau, R.: *Am. J. Clin. Nutr.*, 32, 1231 (1979)
- 6) Watanabe, T., Morotomi, M., Kawai, Y. and Mutai, M.: *Microbiol. Imm.*, 21, 49 (19577)
- 7) Vander Hyde, H. and Henderickx, H.: *Zbl. Bakt. I. Org.*, 195, 215 (1964)
- 8) Coates, M.E.: *The Germfree Animal in Research*, 164 (1968), Academic Press (London and New York)
- 9) Loesche, W.J.: *Pro. Soc. Exp. Biol. Med.*, 128, 195 (1968)
- 10) Lindstedt, G., Lindstedt, S. and Gustafsson, B.E.: *J. Exp. Med.*, 121, 201 (1965)
- 11) Yoshida, T., Pleasants, J.R., Reddy, B.S. and Wostmann, B.S.: *J. Nutr.*, 101, 1423 (1971)
- 12) Salter, D.N. and Fulford, R.T.: *Brit. J. Nutr.*, 32, 625 (1974)
- 13) Whitt, D. and Demoss, R.D.: *Appl. Microbiol.*, 30, 609 (1975)
- 14) 東京大学農学部農芸化学教室: 実験農芸化学, 上巻, 173 (1960), 朝倉書店 (東京)
- 15) 馬場茂明, 奥田 清: 医化学実験講座 (臨床化学 II), 85 (1973), 中山書店 (東京)
- 16) 関根隆光, 笹川泰治, 森田茂広, 木村徳次, 倉富一興: 光電比色法, 各論 2, 59 (1960), 南江堂 (東京)
- 17) 関根隆光, 笹川泰治, 森田茂広, 木村徳次, 倉富一興: 同上, 46.
- 18) 東京大学農学部農芸化学教室: 実験農芸化学, 上巻, 120 (1960), 朝倉書店 (東京)
- 19) Salter, D.N.: *Proc. Nutr. Soc.*, 32, 65 (1973)
- 20) 神立 誠, 佐藤民雄: 第11回本学会総会にて講演発表 (1957)
- 21) Munro, H.N.: *Mammalian Protein Metabolism*, Vol. 4, 481 (1970), Academic Press (New York and London)
- 22) Laskin, A.I. and Lechevalier, H.A.: *Handbook of Microbiology*, Vol. 4, 1 (1974), CRC Press (Cleveland)
- 23) Carlson, H.K. and Baley, B.H.: *J. Nutr.*, 100, 1353 (1968)
- 24) Bigwood, J.E.: *Protein and Amino Acid Function*, 73 (1972), Pergamon Press (Oxford, New York, Toronto, Braunschweig)
- 25) Gibson, N.T., Park, G., Sladen, E. and Dawson, A.M.: *Clin. Sci. Mol. Med.*, 50, 51 (1976)
- 26) 小橋恭一, 竹部幸子, 原田直美, 長谷純一: 無菌生物, 4, 11 (1974)
- 27) Warren, K.S. and Newton, W.L.: *Am. J. Phys.*, 197, 717 (1959)
- 28) 栄養学ハンドブック編集委員会編: 栄養学ハンドブック, 1172 (1958), 技報堂 (東京)
- 29) Corring, T. and Jung, J.: *Nutr. Rep. Int.*, 6, 187 (1972)
- 30) Bella, A. and Kim, Y.S.: *Arch. Biochem. Biophys.*, 150, 679 (1972)
- 31) Code, C.F.: *Handbook of Physiology (Alimentary Canal, Vol. 5)*, 2499 (1968), Williams & Wilkins Co. (Maryland)
- 32) 大磯敏雄編: 食品のアミノ酸含有量表, 17(1957), 第一出版 (東京)

(昭和 55 年 10 月 13 日受理)