小動物用ガス代謝量測定装置の試作

中塚 晴夫, 庄司 芳男, 津田 恒之
東北大学農学部畜産学科家畜生理学教室

An Apparatus for Measuring Gas Metabolism of Small Animals

Haruo NAKATSUKA, Yoshio SHOJI,
Tsuneyuki TSUDA

Laboratory of Animal Physiology, Faculty of
Agriculture, Tohoku University, Sendai

Nippon Eiyō Shokuryō Gakkaishi (*J. Jpn. Nutr. Food Sci.*) 36, 125~128 (1983) A simple and inexpensive closed circuit apparatus for measuring gas metabolism of small animals is described.

A hand-made spirometer was used to measure O_2 consumption. The movement of the spirometer bell was calibrated by removal of known quantities of O_2 from the system and a linear relationship was confirmed between the two measurements.

For measurement of CO_2 production, the titration method in which CO_2 absorbed by NaOH was neutralized with HCl was found to be better than a gravimetric method in which CO_2 was absorbed with sodalime.

This apparatus is quite satisfactory for practical use.

(Received July 31, 1982)

近年、動物の酸素消費量、二酸化炭素産出量の測定に迅速、正確な測定方法・装置が考案、生産販売されるようになった¹⁾。しかし、これらの装置はいまだ高価であり、利用には高度な知識が求められる。そこで安価かつ容易に作製、使用できる小動物用閉鎖式ガス代謝量測定装置を試作した。

材料および方法

1) スパイロメータ本体 本体は銅製2重円筒とその上へ伏せた bell (鐘) から成る。2重円筒の間に流動パラフィンを満たし、内筒に酸素循環のために直径1 cm のパイプ2本を設けた (Fig. 1)。この bell (280 g) と分銅 (220 g) を滑車で誘導した尻糸で結んだ。この本体は鉄製のフレーム上に保定した (Fig. 2)。

2) チャンバー 動物を入れるチャンパーには 5 l 広口びん (ガラス製、直径 16 cm, 肩までの高さ 27 cm,

口の直径 10 cm) を用い、酸素循環用ガラス管を1本は底まで、他の1本はびん上部までの長さに装着したゴム栓で密閉した。

3) ポンプ ダイアフラムポンプ (イワキ製作所、型式 112P) で酸素を循環させ、スライダックで電圧を調節し流量を約 0.4 l/min に保った。

4) 除湿 結露防止のため、250 ml 容の洗気びんに濃硫酸を入れて使用した。

5) 酸素 動物の酸素消費にともなう酸素分圧低下を防ぐため、系内には純酸素を満たした。酸素は系内に三方コックを設けてポンプから供給した。

6) 配管 配管はビニールチューブ (弘進ゴム社製、外径 7 mm あるいは 20 mm, 肉厚 1 mm) を用いた。ビニールチューブの伸縮による酸素消費量測定 of 誤差が懸念された。そこでチャンパーからポンプに至る配管の一部をU字形に曲げ、水を満たした 500 ml メスシリンダーに沈めて装置を運転し、水面に変化が見られるかを観察した。その結果、本チューブは測定値に誤差を与えることはないことが確認された。

7) 酸素消費量測定 酸素消費量は bell の下降距離から求めた。下降距離: 体積検量線は、配管用ビニールチューブに注射針を差し、注射筒で空気を定量的に排除し、bell の下降距離を測ることで求めた。動物とポンプの発熱による系内温度の上昇を知るため、チャンパー内スパイロメータ出入口付近のビニールチューブ内の3か所に温度計を入れ、運転時の系内温度変化を測定した。また酸素体積を標準状態へ補正するため大気圧と環境温度を測定した。

8) 二酸化炭素産出量測定

(1) 重量法 二酸化炭素をソーダライム管へ吸収させ、ソーダライムから放出される水分はシリカゲル管へ吸収させて運転前後の重量差から二酸化炭素生産量を算出した。この方法での配管は、酸素の流れの方向に従って、硫酸びん→ソーダライム管→シリカゲル管の順とした。

(2) 滴定法 二酸化炭素を 250 ml 容洗気びん中の 1 N-水酸化ナトリウム水溶液 200 ml へ吸収させ (Fig. 1), その 10 ml を 1 N-塩酸水溶液で滴定し (指示薬フェノールフタレイン), 次に 0.1 N-塩酸水溶液で滴定 (指示薬メチルオレンジ) した²⁾。

以上の2法を比較検討した。回収率の検討は既知量の二酸化炭素を系内に導入して行なった。

9) 濃硫酸によるアンモニア吸収 除湿用濃硫酸は排泄物から発生するアンモニアを吸収し、系内環境の維持にも役立つと期待された。その効果は以下の方法で確認した。まず Fig. 1 に示した二酸化炭素吸収用水酸化ナトリウムに代え、水酸化ナトリウム飽和水溶液 50 ml を

Fig.1. Apparatus for measuring gas metabolism of small animals.

Fig.2. Spirometer.

入れた 500 ml 三角フラスコを置いた。この三角フラスコは通気用の 2 本のガラス管のほかに 1 本の注入用ガラス管を設けたゴム栓をした。注入用ガラス管の外側は一端をとじたゴム管でふさいだ。マグネチックスターラでかくはんしつつビューレットから 2.64% 硫酸アンモニウム水溶液を、このゴム管に刺した注射針を経て、2 ml/min の速度で注入した。濃硫酸を入れた洗気びんの後に 0.01 N-硫酸水溶液を 200 ml 入れた 250 ml 容洗気びんを置き、ここへ捕集されるアンモニアをネスラー法³⁾によって定量した。

10) 運転時間 1 回の運転時間は 40~60 分間とした。

Fig.3. Relationship between the volume of O_2 and the distance of the bell movement.

結果および考察

1) 酸素消費量 bell の下降距離と体積の関係を Fig.3 に示す。両者はほぼ完全に直線に回帰する。ラットをチャンバーへ入れポンプを運転させても系内温度が環境温度より高くなり、酸素消費量の温度補正には環境温度を測定すれば十分であると結論された。

2) 二酸化炭素産出量 重量法では二酸化炭素の見かけの回収率が $32 \pm 4\%$ ($n=3$) と低かった。その原因は二酸化炭素がソーダライムに吸収されないのではなく、シリカゲルは濃硫酸に比べて水の蒸気圧が高く、ソーダライムから放出される水分がシリカゲル管を素通りして硫酸に集められてしまうからであると考えられた。より蒸気圧の低い水酸化カリウムをシリカゲルの代わりに用いた結果、回収率は 2 回測定してそれぞれ 64%, 65% と上がったが、なお不十分であった。

中大動物の二酸化炭素産出量の測定には、ソーダライム管から放出される水分の吸収に濃硫酸が用いられ、除湿用の濃硫酸と蒸気圧が釣り合うようにする⁴⁾。その重量測定には秤量 10 kg、感度 0.1 g 程度的大型天秤が使用される。一方、小動物では感度 1 mg 程度の天秤が必要であるが、一般の直示天秤の秤量は 200 g 前後である。したがって重い濃硫酸を入れた洗気びんの重量は測定できず、重量法は小動物には不適であると結論された。

滴定法では、二酸化炭素の回収率は $102 \pm 3\%$ ($n=4$) であった。

以上二つの結果から二酸化炭素の定量には滴定法を採用した。

3) 濃硫酸によるアンモニア吸収 アンモニアの回収率は $0 \pm 0\%$ ($n=3$) で、供給されたアンモニアはすべて除湿用濃硫酸に吸収された。

小動物用飼育舎のアンモニア濃度は 20 ppm 以下が望まれる⁵⁾。本実験で用いた条件では注入したアンモニウムイオンがただちにアンモニアガスとなると仮定する

Table 1. Gas metabolism of rats.

No.	B.W. (kg)	O ₂ consumption (ml)	CO ₂ production (ml)	RQ	Heat production (kcal/hr)	Heat production (kcal/kg ^{3/4} hr)
1	0.241	492	419	0.853	2.39	6.96
2	0.283	568	468	0.825	2.74	7.08
3	0.243	462	365	0.789	2.21	6.38
4	0.242	529	467	0.883	2.59	7.50
5	0.252	510	414	0.813	2.45	6.92
6	0.216	383	277	0.724	1.80	5.67
7	0.287	529	468	0.885	2.59	6.63
8	0.292	570	524	0.919	2.82	7.08
9	0.245	547	439	0.802	2.62	7.54
10	0.248	565	588	0.961	2.94	8.38
Mean	0.255	516	443	0.845	2.52	7.01
S.D.	0.024	55	80	0.069	0.31	0.69

Gas metabolism of rats measured at 25°C for 1 hr by the apparatus illustrated in Fig.1.

と、毎分供給されるアンモニアガスは硫酸アンモニウムの分子量が 132 であるから

$$(2 \text{ ml} \times 2.64\% \div 100) \div 132 \times 22.4 = 8.96 \times 10^{-3} \text{ l}$$

となり、毎分 0.4 l の酸素を循環させているから

$$8.96 \times 10^{-3} \div 0.4 \times 10^6 \div 2.2 \times 10^4 \text{ ppm}$$

となったと考えられる。この濃度は 20 ppm の 1,000 倍以上であり、アンモニアが水から拡散する速度が多少遅くても本実験の目的には十分なアンモニアガス濃度となろう。事実、三角フラスコから吐出される気体は強いアンモニア臭を持ち、目を激しく刺激した。しかし濃硫酸を通った気体にはまったくアンモニア臭はなかった。

以上の結果から、本装置において除湿用濃硫酸はアンモニアガス除去にも役立っており、また、小動物用の実験装置を作製する場合に濃硫酸はアンモニアガス除去の手段として非常に効果的であると結論された。

4) 運転時間 運転時間の上限は本装置の場合には系の酸素量と水酸化ナトリウム水溶液の二酸化炭素吸収可能量によって決まる。その考察および計算手段を示すために測定の一例を示す。

(1) 動物 ウィスター系ラット、体重 241 g

(2) 条件 気温 25°C、気圧 756 mmHg、運転時間 60 分

(3) 結果 酸素消費量：bell の下降距離は 4.25 cm であり、Fig. 3 から読み取ると、見かけの酸素消費量は 540 ml であった。これを標準状態へ補正すると

$$540 \text{ ml} \times (273^\circ\text{K}/298^\circ\text{K}) \\ \times (756 \text{ mmHg}/760 \text{ mmHg}) = 492 \text{ ml}$$

の酸素消費量が算出された。

二酸化炭素産出量：水酸化ナトリウム水溶液 10 ml を

滴定中和するのに、 $f=1.01$ の 0.1 N-塩酸水溶液を 9.27 ml 消費した。したがって二酸化炭素産出量は $9.27 \text{ ml} \times 0.1 \text{ N} \times 1.01 \times (200 \text{ ml}/10 \text{ ml}) \times 22.4 = 419 \text{ ml}$ であった。RQ は $419 \text{ ml}/492 \text{ ml} = 0.853$ であり、この RQ では酸素 1 l 当たり 4.86 kcal となるから、熱生産量は $4.86 \times 0.492 = 2.39 \text{ kcal/hr}$ となった。

上の例では 60 分間に bell は 4.25 cm 下降したが、Fig.1 に示したとおり、bell の下降限度は 19 cm、安全を考えて 17 cm とすると、 $17 \div 4.25 = 4$ 時間が酸素消費量から見た運転時間の上限である。

二酸化炭素産出量から見ると、200 ml の 1 N-水酸化ナトリウム水溶液中のナトリウムイオンすべてを炭酸ナトリウムに変えるには、二酸化炭素を 2.24 l 必要とする。60 分間で二酸化炭素が 0.419 l 産出されるならば、 $2.24 \div 0.419 = 5.35$ 時間となるが、安全を考えれば 4 時間以下となろう。

運転時間の下限は bell の下降距離の読取り限界によって決まると考えられるが、誤差を少なくするには、mm 単位で 2 桁は必要であろう。上の例では bell は 10 mm 下降するのに約 15 分かかっている。したがって下限は 15 分程度と考えられるが、この程度では動物の慣れの問題が起こる。

動物は新しい環境に入れられると落ち着きがなくなり代謝量も多くなる。本装置を用いた実験でも、始めの 15 分間は落ち着かないラットが多く、また毎日、本装置で測定を受けるとしだいに落ち着くまでの時間が短くなる傾向が観察された。したがって本装置で動物の代謝量を測定するには、測定前に 1 週間以上、毎日 1 時間程度、動物をチャンバー内に置く訓練を行ない、測定は、約 15

分間装置を予備運転し動物が落ち着いた後に水酸化ナトリウム水溶液を新しいものと交換し、以後1時間程度の本測定を行なうとよいと思われる。

本項で述べた運転の上・下限時間あるいは訓練方法は、その測定目的、たとえば安静や絶食時の代謝量の測定か、運動時あるいは採食中または採食直後かなど、さらに動物の大きさによって大きく異なってくるので、目的に応じた方法を考えねばならない。

5) 実施例 本装置で測定したウィスター系ラット10匹の代謝量をTable 1に示す。測定は25°C環境下で1時間行なった。

一般に動物の基礎代謝はマウスから象に至るまで体重(kg)の3/4乗当たり3kcal/hrであるといわれる⁶⁾。この値とTable 1の値を比べると、後者がはるかに高い。その原因として、第1には本実験では基礎代謝を測定することを目的としなかったのも、動物に絶食を負荷していないこと、第2にはラットをチャンバーに入れる訓練を行わずに測定しており、かつ前項で述べた予備運転も行なわなかったこと、などが考えられる。

要 約

安価かつ容易に作製できる小動物用閉鎖式ガス代謝量測定装置を試作した。

酸素消費量測定にはスパイロメータを用いた。一定量の酸素を系外へ除去して測定法を評定し、十分な精度を

確認した。二酸化炭素産出量測定は、一定量の二酸化炭素を系内へ注入することにより2種の方法を比較検討し、1N-水酸化ナトリウム水溶液へ吸収させ塩酸で滴定する滴定法が簡便で十分な信頼性を持つことを見いだした。

以上のことから、本装置は十分実用に耐えることが確認された。

スパイロメータ本体の作製に当たっては、名古屋大学農学部柴田章夫氏のご協力を得た。記して感謝の意を表する。

文 献

- 1) 永坂鉄夫：代謝，16 (1)，13 (1979)
- 2) 有井発巳雄：詳説実験化学・分析編，275 (1959)，内田老鶴圃（東京）
- 3) 京都大学農学部農芸化学教室編：農芸化学実験書，第1巻，134 (1965)，産業図書（東京）
- 4) 森本 宏：動物栄養試験法，226 (1971)，養賢堂（東京）
- 5) 田嶋嘉雄，前島一淑，江崎孝三郎，藤原公策，沢崎 坦：実験動物学概論，91 (1979)，朝倉書店（東京）
- 6) McDonald, P., Edwards, R.A. and Greenhalgh, J.F.D. (阿部又信訳)：家畜栄養学，248 (1981) 国立出版（東京）

(昭和57年7月31日受理)