タンパク質栄養研究におけるマウスの利用

中 田 忍, 木 村 利 三

大阪教育大学教育学部家政学教室

Availability of Mice in Protein Nutrition Study

Shinobu NAKATA and Toshizo KIMURA

Department of Home Economics, Osaka Kyoiku University, Ikeda 563

Nippon Eiyō Shokuryō Gakkaishi (*J. Jpn. Soc. Nutr. Food Sci.*) 40, 111~116 (1987)

Availability of mice, male ddY strain, in the nutritional evaluation of protein as experimental animals was investigated under their separated feeding, one mouse per cage, or their grouped feeding, six mice per cage, conditions. The effects of protein contents and those of supplemented protein and amino acids in the diet on the growth of mice were observed markedly as in the case of rats. These effects were more appreciable in mice under the separated feeding condition, in which the amount of food consumed per mouse could be estimated, than in mice under the grouped feeding condition. The amount of food consumed per body weight in mice was approximately twice as much as that per body weight in rats, whereas the optimal dietary protein level in mice was nearly one-half of that in rats. These experimental results demonstrate that mice, under the separated feeding condition, as well as rats are useful in the protein nutritional study as experimental animals.

(Received August 11, 1986)

実験動物としてのマウスはその多様な系統的遺伝特性のあることから、医学および薬学研究では広範に、かつ、多数用いられている。しかし、わが国の栄養学研究におけるマウスの利用は比較的少なく、実験動物のほとんどがラットである。それは本誌の過去3年間の報文中の供試動物としてのマウスの利用件数は数件にすぎないことからもうかがい知れることであるが、この分野の発展の経過から当然と考えられる。一方、最近3年間の *J. Nutr.* の報文の供試動物中のラットとマウスの使用件数の割合は前者7に対し後者1であり、マウスの利用の著しい増加を示している。これは全般的な栄養学研究においてマウスの系統的遺伝特性を導入しての展開が進んでいる現われであろう。しかし、このような栄養学研究でのマウスの利用増加にもかかわらず、食品栄養評価の指標動物としてのマウスの利用は少ないようである。それは、1) マウスの飼育に関する成書¹⁾²⁾はあるが、栄養評価の指標動物としての個体別飼育に関する具体的な記述が少ない、2) 前記のようにマウスは多種の系統的遺伝特性があり、その選択が必要である、3) マウスはラットに比べ、軽量で運動性が高く、計測などで取扱いが困難である、4) 環境条件、とくに室温の変化に対する

抵抗性がラットに比較して非常に低い、などの理由から、この指標動物としてのマウスの利用がラットとの生態的類似性および経済性から望まれながら容易に実行されなかったと考えられる。しかし、近年の科学機器の発達とその導入により、マウスの取扱いおよび環境制御が容易になり、また実験動物としての系統別マウスの安定した供給が可能になってきた。そこで、著者らの属する教育機関における栄養学教育の教材としての有効性と経済性への期待から、従来より使用しているラット用の飼育装置を改良利用してのマウスによる食品タンパク質の栄養評価の可能性を検討した。

実 験 方 法

1. 実験動物および飼料

動物は静岡実験動物農協の4週齢の雄性 ddY 系マウスを用いた。このマウスは4週齢から6週齢の段階で良質な飼料の摂取により1日当たり1g前後の体重増加が期待され、また、安定な供給が可能であることから本研究に用いた。入手したマウスは実験飼育に先立って数日間固形飼料(F-2、船橋農場)を自由摂取させた。飼育環境条件として、室温は $23\pm1^{\circ}\text{C}$ に保ち、照明は明期12時間(8:00~20:00)、暗期12時間(20:00~8:00)とした。実験飼料の組成はタンパク質源以外は植物油5

Fig. 1. Apparatus for feeding of mice.

%, ミネラル混合 (AIN-76™) 4%, ビタミン混合 (オリエンタルビタミン配合, オリエンタル酵母) 1% とし, 残りを炭水化物源として可溶性デンプンを用いた。

2. 飼育条件

飼育ケージは Fig. 1 に示したような従来から使用されているラット用の金属ケージ (幅 17cm, 奥行 25cm, 高さ 17cm) に上野工作所 (大阪) と共同試作した付属器具を装着してマウスの個別飼育に用いた。ラットケージの両側面に留め金を取り付けて本体とし, その本体の底部外側にステンレススチールの金網 (メッシュ, 2 mm), 吸湿紙とバネ付き底ケースの順に装着する。ついで本体内部に蓋付き隔離板 (separator) を入れ, それをバネブロック (steel spring block) で固定した。このようにセットしたケージは通常のようにケージ棚に挿入し, 飼育に用いた。給水はケージ前面に 3 本の給水びんを取り付け金具で保持することにより, 個別給水した。また, 隔離板の奥正面に留め金を取り付け飼料入れ (diet cup) を装着し, 給餌を行なった。なお, 集団飼育の場合は隔離板とバネブロックを使用せず, また, 長方形の大容量の飼料入れを用いた以外は個別飼育と同じ装置を使用した。通常のマウスの飼育では床敷を使用するが, 本研究においても一部の飼育実験は床敷 (ソフトチップ, 静岡実験動物農協) を使用した。飼育実験でのこのケージの使用にあたって床敷を使用した場合とは 2 日ごとに洗浄済みのケージと交換した。また, 床敷を使用しない場合は底部の金網, 紙および底ケースを毎日交換し, ケージ全体については 2 日ごとに洗浄済みのケージと交換した。

3. 飼育実験

1) 実験 1 マウスの集団飼育および個別飼育条件で

の飼料のタンパク質含量による成長への影響を調べることを目的とした。実験飼料はカゼインを 8, 16 あるいは 24% とし, 他の成分量は上記のとおりで, 残りを可溶性デンプンで充足した。各群の頭数は 6 とし, 飼育期間は 14 日間で, その間の体重は電子天秤 (EB-L 600, 島津製作所) とマウス収容器 (厚さ 1 mm のアルミニウム板製, 15cm×15cm×15cm) を用いて正確に, かつ, 容易に計測し得た。なお, 本実験では床敷を使用した。

2) 実験 2 マウスの集団飼育および個別飼育条件下での飼料中のタンパク質の種類による成長への影響を調べることを目的とした。実験飼料はタンパク質源として脱脂大豆粉 (粗タンパク質量 48.4%, 不二製油) および小麦グルテン (粗タンパク質量 71.1% 和光純薬) を用い, 飼料タンパク質含量を 10% に調整し, 炭水化物以外の他の成分量は上記と同様にし, 残りを可溶性デンプンで充足調整した。また, これら 2 種の飼料を等分に混ぜた混合飼料も実験飼料として用いた。床敷を使用して 13 日間の飼育を行い, その間の体重変化を計測した。

3) 実験 3 マウスの集団飼育および個別飼育条件下でのカゼイン飼料へのメチオニン添加による成長と肝脂肪量への影響を調べることを目的とした。実験飼料は 10% カゼイン飼料とその飼料にメチオニンを 0.3% 添加した飼料である。床敷を使用し, 飼育期間は 13 日間とし, その間の体重変化を計測するとともに, 終了時に肝臓の脂肪含量をソックスレー抽出器による常法で定量した。

4) 実験 4 このマウスケージの使用における床敷の有無によるマウスの成長への影響を調べることを目的とした。マウスを 6 頭あて 2 群に分け, 1 群は床敷を使用し, 他の群は使用せずに 20 日間, 20% カゼイン飼料で飼育し, その間の体重変化を計測した。

5) 実験 5 目的は実験 1 と同様であるが, 本実験では個別飼育のみを行ない, 飼料摂取量を測定することとした。実験飼料は 6, 12 および 18% カゼイン飼料を用い, 飼料摂取量の計測を容易にするために, 床敷を使用せず, これらの粉末飼料に水を加えて練り餌とし, 飼料入れに詰め散乱を防ぎ, 乾物算定の投与量と残量の差から飼料摂取量を測定した。飼育期間は 10 日間でその間の体重変化を計測した。

6) 実験 6 この実験の目的は実験 2 と同じであるが, 床敷を使用しない個別飼育だけを行ない, 飼料摂取量を測定した。実験飼料はタンパク質源として, グルテン (粗タンパク質含量 71.1%, 和光純薬) と, 分離大豆タンパク質 (SPI, Fuji Pro R, 粗タンパク質含量 74.7%, 不二製油) を用い, 飼料タンパク質含量を 10% に調整し, 他の成分量は前の実験と同様に調整した。また, これら 2 種の飼料を等量混ぜた混合飼料も実験飼料

Table 1. Effect of protein content in a diet on growth in mice (Experiment 1).*

	Separated feeding			Grouped feeding		
	Casein content (%)			Casein content (%)		
	8	16	24	8	16	24
Initial body wt. (g)	24.7±0.39 ^a	24.3±0.54 ^a	24.8±0.58 ^a	24.5±0.50 ^a	24.5±0.53 ^a	24.3±0.36 ^a
Change in body wt. (g/14-day)	3.15±0.44 ^a	6.00±0.53 ^b	6.30±0.58 ^b	3.15±0.35 ^a	6.46±0.50 ^b	6.33±0.69 ^b

* Values are means±SEM; n=6. Means in the same row with unlike superscript letters are significantly different ($p<0.05$).

Fig. 2. Effect of 10% protein diets on growth in mice (Experiment 2).

Values without common superscript letters are significantly different at $p<0.05$.

とした。飼育期間は 10 日間とし、その間の体重測定および飼料摂取量測定は実験 5 と同様の方法で行なった。

4. 統計解析

実験結果として得られたデータの統計的有意差の検定は分散分析法³⁾により行なった。

実験結果および考察

個別飼育と集団飼育条件下での飼料タンパク質含量によるマウスの成長への影響を実験 1 で調べ、その結果を Table 1 に示す。個別飼育、集団飼育条件ともに 14 日間の体重増加量はカゼイン含量の高い飼料で高く 16 および 24% カゼイン飼料群の体重増加量は 8% カゼイン飼料群の約 2 倍である。しかし、いずれの飼育条件でも 16% カゼイン飼料群と 24% カゼイン飼料群との間には体重増加量に有意な差は見られなかった。

実験 2 は 10% タンパク質含量の飼料摂取における飼料タンパク質の種類によるマウスの成長への影響を調べたもので、その結果を Fig. 2 に示す。いずれの飼育条件でも、13日間の体重増加量は混合飼料群が最も高く、ついでグルテン飼料群、脱脂大豆飼料群の順であった。ラットで観察される飼料タンパク質の補足効果⁴⁾が本実験結果からも同様に観察されることは、Fig. 2 の混合飼料群の体重増加量が最高を示すことから明らかである。しかし、この補足効果は集団飼育より個別飼育条件の場合

に顕著に現われた。

また、ラットでは低カゼイン飼料に少量のメチオニンの添加による補足効果、その飼料摂取による成長促進とともに肝臓脂肪量の増加が観察される⁵⁾。これらのことがマウスにおいても観察されるか、否かを調べる目的で実験 3 を行ない、その結果を Table 2 に示した。10% カゼイン飼料への 0.3% メチオニンの添加による成長促進効果は個別飼育、集団飼育条件ともに明らかに観察されたが、その傾向は個別飼育でより顕著であった。肝臓重量はいずれの飼育条件でもメチオニン添加飼料群で有意な差ではないが、大きい傾向を示した。肝臓脂肪量はいずれの飼育条件でもメチオニン添加飼料群で高値を示したが、個別飼育に比し、集団飼育条件でのそれらの値は高い傾向を示した。

以上の実験 1 から 3 までの結果はタンパク質の栄養評価のための指標動物としてのマウスがラットと同様に有効である可能性を示している。これらの結果を通じて、集団飼育より個別飼育条件が飼料タンパク質の質および量の影響を明確に示す傾向が見られる。しかし、実験 3 における肝臓脂肪量の測定結果で見られるように個別飼育より集団飼育条件で高い傾向が見られたことは興味ある事実であるが、これはマウスの 1 ケージ当たりの飼育頭数により、それらの生理機能に相違があることが知られており⁶⁾⁻⁸⁾、この飼育条件による肝臓脂肪量の違いは

Table 2. Effect of 10% casein diet supplemented with methionine on growth and liver fat content in mice (Experiment 3).*

	Separated feeding		Grouped feeding	
	Diet		Diet	
	10% Casein	10% Casein +0.3% Met	10% Casein	10% Casein +0.3% Met
Initial body wt. (g)	25.3±0.52 ^a	25.1±0.36 ^a	25.2±0.30 ^a	25.2±0.67 ^a
Change in body wt. (g/13-day)	4.07±0.86 ^a	6.88±0.48 ^b	4.02±0.75 ^a	5.35±0.78 ^{ab}
Liver wt. (g)	1.31±0.05 ^a	1.47±0.08 ^a	1.27±0.05 ^a	1.44±0.10 ^a
Liver fat content (mg/g fresh liver)	4.78±0.39 ^a	6.21±0.52 ^{bc}	4.99±0.19 ^{ab}	7.48±0.52 ^c

* Values are means±SEM; *n*=6. Means in the same row with unlike superscript letters significantly different (*p*<0.05).

Fig. 3. Effect of presence or absence of chip in cages on growth in mice (Experiment 4).

○ Without chip; ● with chip.

Vertical bars represent the SE of the mean for six mice.

その反映によるものと考えられる。しかし、タンパク質の栄養評価の指標動物の飼育条件は上記の実験条件とともに各マウスの飼料摂取量を容易に、かつ、確実に測定しうることが必要である。

実験1から3は従来のマウス飼育と同様に床敷を使用した。床敷は飼育環境の温度と衛生維持に非常に有効であるが、その存在は摂取飼料量の測定には不都合である。そのため、床敷を使用しない場合の温度維持はより精度の高い温度制御を行ない、衛生維持には、底部の金網、吸湿紙および底ケースを毎日交換して衛生環境を保つ条件で、床敷の有無によるマウスの成長に対する影響を実験4で調べ、その結果をFig. 3に示した。20日間の飼育によって床敷の有無にかかわらず、マウスの体重増加量は両者間にまったく差が観察されなかった。この結果から、本研究の条件で床敷を使用せずにマウスをほぼ正常に飼育しうることが認められたので、以後の実験においては床敷を用いずに衛生環境を保ち、粉末飼料に水

Fig. 4. Effect of protein content in a diet on growth and food intake under the separated feeding condition (Experiment 5).

Values without common superscript letters are significantly different at *p*<0.05.

を加えて練り餌として飼料入れに詰め、その散乱を可及的に防止して、より正確なマウス個体の飼料摂取量の測定を可能にした条件で、食品タンパク質の栄養評価の指標動物としてのマウスの可能性をさらに確かめることとした。

このような立場から、実験5で飼料タンパク質含量のマウスの成長に対する影響を調べ、その結果をFig. 4に示した。飼料カゼイン含量は実験1と若干異なり、6、12および18%であるが、実験1の結果とはほぼ同じ傾

Fig. 5. Effect of 10% protein diets on growth and food intake in mice under the separated feeding condition (Experiment 6).

Values without common superscript letters are significantly different at $p < 0.05$.

向の結果を示した。すなわち、12 および 18% カゼイン飼料群の体重増加量は 6% カゼイン飼料群の体重増加量の 2.5 倍以上で有意な差を示した。しかし、12% と 18% カゼイン飼料群の間には差は見られなかった。一方、飼料摂取量についてはいずれの飼料摂取群間にもまったく差が見られなかった。

実験 6 では実験 5 と同様な目的で 10% タンパク質含量の飼料摂取における飼料タンパク質の種類によるマウスの成長および飼料摂取量への影響を調べ、その結果を Fig. 5 に示した。ここでは実験 2 と異なり、SPI とグルテンをタンパク質源としたが、グルテンあるいは SPI 飼料群のいずれの体重増加量に対してもそれらの混合飼料群の体重増加量は有意に高く飼料タンパク質の補足効果が認められた。しかし、これら 3 飼料群間の飼料摂取量にはまったく有意な差は見られなかった。また、グルテン飼料群と SPI 飼料群の体重増加量には有意な差はなかったが、ラットでの飼育試験結果と同様に SPI 飼料群のそれが高い傾向を示した。しかし、実験 2 において、脱脂大豆飼料群の体重増加量に比し、グルテン飼料群のそれは高い傾向を示した。われわれの研究室におけるラットの飼育実験では脱脂大豆と SPI とのこのような差

Fig. 6. Relationship between protein content in a diet and growth in mice under the separated feeding condition.

● Experiment 1; ○ Experiment 5.

These values are expressed as percentage of the weight gain in mice given a 24% casein diet in Experiment 1 or a 18% casein diet in Experiment 5.

を示す傾向を観察しえなかったことから、脱脂大豆中にマウスの飼料摂取あるいは摂取タンパク質の利用を抑制する物質の存在が示唆される。

実験 1 から実験 5 までの結果、とくに実験 4 と 5 の結果はマウスの食品タンパク質の栄養評価の指標動物としての有効性を積極的に示すものであるが、マウスにおける飼料タンパク質含量による成長への影響を調べた実験 1 および 4 の結果からはラットでのそれらの関係と若干異なる成績を示している。ラットでは飼料タンパク質含量が 25% 程度までの増加と成長の増加が段階的に進行するが¹⁰、本研究のマウスにおける結果では飼料のカゼイン含量が 6 および 8% と 12% 以上との両者間に明確な違いのあることを示唆している。このことを具体的に Fig. 6 で示した。マウスの飼料タンパク質含量の成長への影響はラットの場合と異なり、飼料タンパク質含量としてはラットの半分である 10 ないし 12% 程度が至適含量である。このような飼料タンパク質含量と成長との関係におけるマウスとラットの違いの一因は両者の体重当たりの飼料摂取量の違いによると考えられる。ラット 4 週齢から 6 週齢期での 1 日の飼料摂取量は体重 100 g 当たり 10 g である¹⁰ のに対して、マウスの場合の飼料摂取量は実験 5, 6 の結果から、体重 100 g 当たり、20 g に相当し、ラットのそれの 2 倍である。このことは、マウスを食品タンパク質の栄養評価に用いる場合に、ラットの場合と異なり、比較的低いタンパク質含量で行なう必要があろう。また、本研究で使ったマウス

は ddY 系だけであるが、当研究室では ICR 系雄性マウスについても同じ傾向の結果を得ている。マウスを実験動物として利用する現代的意義はその飼育の経済性ととも系統的特性にあることから、この指標動物にも一定の系統選択の配慮が必要であろう。このマウスの食品タンパク質の栄養評価の指標動物としての可能性を、さらに高める課題として飼育装置の改善と投与飼料の組成および形状の改善が望まれ、現在、当研究室において、検討中である。

要 約

タンパク質栄養評価の指標動物としてのマウス（雄性 ddY 系）の利用性を個別飼育（1頭/ケージ）あるいは集団飼育（6頭/ケージ）の条件で検討した。マウスによる飼料タンパク質含量の成長への効果ならびに食餌タンパク質およびアミノ酸の補足効果はラットの場合と同様に顕著に発現した。また、これらの効果は集団飼育より個別飼育条件下のマウスで明確に現われた。その個別飼育はマウス個体の飼料摂取量の計測を可能にし、その結果、体重当たりの飼料摂取量はラットのその2倍であり、他方、マウスにおける成長に対する至適飼料タンパク質含量はラットの場合のほぼ半分の値であることを示した。これらの実験結果から、マウスは個別飼育条件下

で、タンパク質の栄養研究の指標動物として、ラットと同様に有用であることを示した。

本研究を行なうに当たりご協力いただいた名古屋大学名誉教授並木満夫先生ならびに大豆試料の提供をいただいた不二製油株式会社に感謝します。

文 献

- 1) 田嶋嘉雄：実験動物学，各論編 58，技術編，151（1977），朝倉書店（東京）
- 2) 高橋和明，信永利馬：実験動物叢書，第二巻，203（1979），ソフトサイエンス社（東京）
- 3) Snedecor, J.J. and Cochran, W.G.（畑村ら訳）：統計的方法，246（1967），岩波書店（東京）
- 4) 芦田 淳：栄養化学概論，202（1962），養賢堂（東京）
- 5) 吉田 昭，芦田 淳：蛋白質 核酸 酵素，6，657（1961）
- 6) Christian, J.J. : *Am. J. Physiol.*, 181, 477（1955）
- 7) Davis, D.E. and Christian, J.J. : *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 94, 728（1957）
- 8) 武田 満：実験動物，8，101，104（1954）
- 9) Muramatsu, K. and Ashida, K. : *Agric. Biol. Chem.*, 26, 25（1962）
- 10) Kimura, T., Maji, T. and Ashida, K. : *J. Nutr.*, 100, 691（1970）

（昭和61年8月11日受理）