研 究 ノ ー ト

2 種類の窒素源飼料を摂取した普通 および無菌マウスにおける 代謝性糞窒素量の測定

山中 聖 敬*, 亀 高 正 夫**

* 財団法人実験動物中央研究所

** 共立女子大学家政学部食物学科

Measurement of Metabolic Fecal Nitrogen in Conventional and Germ-free Mice Given Diets with Two Types of Nitrogen Source

Masanori YAMANAKA*
and Masao KAMETAKA**

* Central Institute for Experimental Animals,
Kawasaki 213

** Department of Food Science and Nutrition,
Faculty of Home Economics, Kyoritsu Women's
University, Chiyoda-ku, Tokyo 101

Nippon Eiyō Shokuryō Gakkaishi (J. Jpn.
Soc. Nutr. Food Sci.) 46, 512~516 (1993)

Protein nitrogen from undigestible food residue is not present in the feces of mice fed a diet containing an amino acid mixture (AA) as the nitrogen (N) source, and protein N from intestinal microbes and related materials is not present in the feces of germ-free (GF) mice. In order to study fecal proteins, a WE diet containing 6, 10% or 14% (as N(%) $\times$ 6.25) purified whole-egg protein (WE), AA diets with the same amino acid composition as the WE diet, and a protein-free diet were given to conventional (CV) and GF mice. Protein (as protein N(%) $\times$ 6.25) excretion in the feces was then compared between mice fed the WE and AA diets or between CV and GF mice. In general, protein excretion in the feces of the WE diet-fed mice was much higher than that of the AA diet-fed mice, and a larger quantity of protein was excreted into the feces of CV mice than into the feces of GF mice. Fecal protein excretion differed according to the N content of the diet; mice fed the 14% diet showed the highest level, whereas mice fed the protein-free diet showed the lowest. The

fecal protein originating from undigestible food residue and intestinal microbes was related to the dietary N content, and mice fed diets with a low N content excreted less protein in the feces. However, excretion of protein originating from debris of intestinal mucosa and digestive juice was not related to the dietary N content. The protein corresponding to metabolic fecal N in the feces, i.e., protein of feces less the protein originating undigestible food residue (as protein) in the feces of the CV mice fed the AA diet, per g of food dry matter intake was as follows: protein-free diet, 7.7 mg; 6% diet, 8.4 mg; 10% diets, 9.6 and 11.7 mg; 14% diet, 11.2 mg. The protein corresponding to metabolic fecal N per 100 g dry matter in the feces was as follows: protein-free diet, 4.49 g; 6% diet, 5.42 g; 10% diets, 6.37 and 7.28 g; 14% diet, 7.31 g.

Key Words metabolic fecal nitrogen, intestinal microbes, mice, diet containing amino acid mixture.

(Received December 10, 1992)

ヒトも含めた動物の糞便中の窒素 (N) 形態は、1) 未消化の食物残渣由来のもの、2) はく離した消化管上皮や消化液由来のもの、3) 消化管内微生物とこれの存在により派生した物質由来のもの、に大きく分けられる¹⁾。これら3者が糞中にどの程度の割合で含まれているかは、分別測定する手段がなく、いまだ明らかでない。1) のうちの固形物については、酸化第二クロムのような指標物質を用いることによって、間接的測定がある程度可能である。上記2) と3) を併わせたもののNは、代謝性糞N (metabolic fecal nitrogen, 以下MFN) と呼ばれている²⁾³⁾。現在では、消化管内微生物を欠く無菌 (germ-free, 以下GF) のラットやマウスを用いて、上記糞成分の3) を欠く糞が得られるので、MFN の内訳の測定もある程度可能になってきた。

結晶アミノ酸混合物を唯一のN源とする飼料で動物を飼育したときの糞中には、1) すなわち、未消化の飼料残渣由来の純タンパク質態Nは含まれていない。普通 (conventional, 以下CV) 動物とGF動物とに、タンパク質飼料、結晶アミノ酸混合物飼料、または、無タンパク質飼料を与え、とくに糞中の純タンパク質態Nに着目したとき (Table 1), タンパク質飼料摂取 CV 動物の糞には、上述の1) から3) までのすべてに由来する純タンパク質態Nが含まれるが、結晶アミノ酸混合物または無タンパク質飼料給与時の糞には、上述のとおり、1) の未消化の飼料残渣由来の純タンパク質態Nは存在しない。

* 〒213 川崎市宮前区野川 1430

** 〒101 東京都千代田区一ツ橋 2-2-1

Table 1. Origin of the protein in feces of conventional (CV) and germ-free (GF) mice given diets containing purified whole-egg protein (WE) or crystalline amino acid mixture (AA) and protein-free diet.

Mice Diets	CV			GF		
	WE	AA	(P. free)	WE	AA	(P. free)
1) True protein from undigestible food residue	+	—	(—)	+	—	(—)
2) True protein from debris of intestinal mucosa and digestive juice	+	+	(+)	+	+	(+)
3) True protein from intestinal microbes and related materials	+	+	(+)	—	—	(—)

CV : conventional mice, GF : germ-free mice, WE : diet containing purified whole-egg protein as the nitrogen source, AA : diet containing crystalline amino acid mixture as the nitrogen source, P. free : protein-free diet, + : presence, — : absence.

一方、GF 動物の糞では、3) の消化管内微生物とその関連物質由来の純タンパク質態Nを欠き、とくに、結晶アミノ酸混合物または無タンパク質飼料給与時は、1) と3) の二つを欠いた、2) のはく離した消化管上皮および消化液由来の純タンパク質態Nだけの糞が得られる。このように、分別測定する手段がない状況とはいえ、動物、飼料、糞組成の測定項目によっては、上述の糞組成の由来別割合とか摂取飼料のN含有量とMFN量との関連等、その実体にかかなり近づきうるのではと考えられる。

本研究は、CV マウスと GF マウスとを用い、精製全卵タンパク質 (purified whole-egg protein, 以下 WE) をN源とする飼料、WE と同じアミノ酸組成⁴⁾をもつ結晶アミノ酸混合物 (crystalline amino acid mixture, 以下 AA) をN源とする飼料、無タンパク質 (protein-free, 以下 P. free) 飼料の3種を合目的的に組み合わせて、糞Nの由来別分別定量の可能性を検討するために行われた。

実験方法

1. 飼料

飼料組成は前報⁵⁾に記したが WE および AA とともに N(%) $\times$ 6.25 で 6, 10, 14% 含む飼料と、P. free 飼料とを固型 (ペレット) にし、さらに、コバルト 60 を 50 KGy (5 Mrad) 照射して滅菌処置を施した。

2. 実験動物とその飼育試験の手順

8 週齢でオスの ICR 系 CV および GF マウスの各 6 匹を、細断濾紙を床敷に用いたプラスチックケージに個別に収容するとともに、同一個体でN含有量の異なる飼料を2週間ずつ与える試験を繰り返した。P. free 飼料の例は除き他の飼料では、飼料切り替え後の5日目から10日間分のマウスごとの飼料摂取量の測定と、その

間の糞の全量を採取した⁵⁾。

3. 糞の分析

本実験では、異なるN源、異なるN含有量の飼料を CV および GF マウスに与えたときの、糞中の純タンパク質量にとくに視点が当てられた。乳鉢でつぶした糞をバルンスタイン沈澱法⁶⁾に準拠して処理し、傾斜法で濾液と沈澱とに分離、沈澱を濾紙に移したあとも、10 回以上の蒸留水による洗浄を繰り返し、その沈澱のN量をセミマイクロエルダール法で測定した^{7,8)}。このN量に 6.25 を乗じた値を純タンパク質 (以下、タンパク質) 量とし、摂取飼料ごと、マウスごとの量を求めた。また、105°C の常圧加熱乾燥法による糞の乾燥重量も測定した。なお、実験成績の統計学的検索は Student's の *t*-検定によった。

実験結果

摂取飼料乾物 1g 当りの糞のタンパク質量を Table 2 に示した。同一飼料摂取 CV と GF マウスとでは、一般に、CV マウスの量が多かった。WE と AA 飼料との差は未消化の飼料残渣由来のタンパク質量とみなしうるが、CV, GF マウスとも、14% 飼料摂取時の量が多かった。P. free および AA 飼料を摂取した CV マウスの糞には、未消化の飼料残渣由来のタンパク質は含まれず、MFN 相当のタンパク質とみなされる。その量は、摂取飼料のN含有量にほぼ比例した。同じ P. free および AA 飼料を摂取した GF マウスの糞のタンパク質は、はく離した消化管上皮および消化液由来と考えられ、飼料N含有量の多少にかかわらず近似した数値であった。

乾物 100g 当りでみた糞のタンパク質量を Table 3 に示した。上述の Table 2 と同じ傾向で、MFN 相当分の糞のタンパク質は摂取飼料のN含有量に比例して増加

Table 2. Fecal true protein (mg) per g of dry matter intake of conventional (CV) and germ-free (GF) mice.^{a)}

Diets	Exp. No.	CV	GF	Signif. ^{b)}	(CV-GF)
P. free	II	7.7±0.9	6.9±0.6	NS	(0.8)
WE- 6	I	11.1±2.7	10.9±1.9	* _{1c)}	(0.2)
AA-6	I	8.4±2.4	8.2±1.6		(0.2)
(WE-6) - (AA-6)		(2.7)	(2.7)		
WE-10	I	12.6±1.5	10.1±2.2	* _{8c)}	(2.5)
AA-10	I	9.6±1.3	6.8±0.7		(2.8)
(WE-10) - (AA-10)		(3.0)	(3.3)		
WE-10	II	14.6±0.7	11.0±1.3	* _{4c)}	(3.6)
AA-10	II	11.7±0.8	8.4±0.5		(3.3)
(WE-10) - (AA-10)		(2.9)	(2.6)		
WE-14	I	16.0±0.9	13.8±1.4	* _{4c)}	(2.2)
AA-14	I	11.2±0.5	8.0±0.7		(3.2)
(WE-14) - (AA-14)		(4.8)	(5.8)		

^{a)} Means±SD. Each group consisted of 6 mice. ^{b)} Statistical difference was assessed between CV and GF mice. NS : not significant. ^{c)} Statistical difference was assessed between mice fed diets of the same nitrogen contents. *₁ $p<0.05$, *₃ $p<0.01$, *₄ $p<0.001$. For abbreviations, see Table 1.

Table 3. True protein in feces (g) per 100 g of fecal dry matter of conventional (CV) and germ-free (GF) mice.^{a)}

Diets	Exp. No.	CV	GF	Signif. ^{b)}	(CV-GF)
P. free	II	4.49±0.77	3.92±0.28	NS	(0.57)
WE- 6	I	6.96±1.69	6.18±0.71	NS	(0.78)
AA- 6	I	5.42±1.61	5.21±1.02	NS	(0.21)
(WE-6) - (AA-6)		(1.54)	(0.97)		
WE-10	I	8.11±0.68	5.99±1.25	* _{2c)}	(2.12)
AA-10	I	6.37±0.42	4.45±0.55		(1.92)
(WE-10) - (AA-10)		(1.74)	(1.54)		
WE-10	II	8.91±0.49	6.50±0.42	* _{4c)}	(2.41)
AA-10	II	7.28±0.51	5.27±0.20		(2.01)
(WE-10) - (AA-10)		(1.63)	(1.23)		
WE-14	I	9.69±0.41	7.53±0.55	* _{4c)}	(2.16)
AA-14	I	7.31±0.19	5.21±0.40		(2.10)
(WE-14) - (AA-14)		(2.38)	(2.32)		

^{a)} Means±SD. Each group consisted of 6 mice. ^{b)} Statistical difference was assessed between CV and GF mice. NS : not significant. ^{c)} Statistical difference was assessed between mice fed diets of the same nitrogen contents. *₂ $p<0.02$, *₄ $p<0.001$. For abbreviations, see Table 1.

した。Table 右端の CV-GF の数値を、消化管内微生物とこれの関連物質由来のタンパク質とみなされるが、P. free と 6% 飼料給与時は小さい値であった。

考 察

糞に含まれる N には大きく分けて非タンパク態とタンパク態の N とがあり、MFN にも非タンパク態 N が当然含まれると考えられる。本実験では、AA 飼料給与時の

糞中のタンパク質 (タンパク態量から求めた値) には、未消化の飼料残渣由来分は含まれない、という前提にたち、MFN 中の非タンパク態の N を無視し、タンパク態 N のみに注目して、糞中 N の由来別分類について考察を進める。

Table 2 と 3 より、P. free 飼料と 6% 飼料給与時の (CV-GF)、つまり、消化管内微生物とこれの関連物質由来のタンパク質量は、10% あるいは 14% 飼料給与時よ

り少ない傾向が認められた。これらの成績は、糞中の消化管内微生物およびこれの関連物質由来のタンパク質量と、摂取飼料のN含有量との間には相関があることを示している。一方、MFNの大部分を占めるはく離した消化管上皮および消化液由来のタンパク質量（未消化の飼料残渣由来分と消化管内微生物およびその関連物質由来分の存在しない、AA飼料摂取GFマウス糞のタンパク質量）は、低値であった10%飼料給与の実験I群以外、摂取飼料のN含有量が異なっても、ほぼ一定の値であった。

本実験では、MFNの定義に従って未消化の飼料残渣由来分が存在しない、AA飼料を摂取したCVマウスの糞中のタンパク質量を、MFN相当分と考えた。AA10%飼料を摂取した実験IIの例は、AA14%飼料摂取時と変わらなかったものの、Table2と3より、摂取飼料のN含有量に比例してMFN相当のタンパク質量は増加した。一方、同じく未消化の飼料残渣由来分の存在しない、P.free飼料を摂取したCVマウスの糞中のタンパク質もMFN相当分だが、その量は、6%AA飼料摂取CVマウスのそれより少なかった。通常、食品タンパク質の生物価測定に際し、P.free飼料給与時の糞のNをMFNとみなしているが、本実験の成績からみると、このMFNの正確性が疑問視される。糞の場合と同様に、P.free飼料給与時の尿Nをもって内因性Nの損失分とみなしているが、前報⁵⁾のTable3に示したとおり、P.free飼料摂取時における尿へのN排泄量は最も少なく、給与飼料のN含有量に比例してその量は多くなっていった。つまり、MFNの場合と同様に、内因性Nの損失量は摂取飼料のN含有量によって異なる可能性を示唆しているものとも考えられた。

筆者らの別の実験⁹⁾でも、本試験と同様のWE10%またはAA10%飼料をCVおよびGFマウスに与えたときの、糞のタンパク質量を測定した。その実験では、1ケージ当り3匹から5匹の群飼方式をとり、糞の分析点数も少なかったが、未消化の飼料残渣由来のタンパク質が糞乾物中に1.23%、はく離した消化管上皮および消化液由来のタンパク質は5.1%、消化管内微生物とこれの関連物質由来のタンパク質はWE10%飼料群で0.94%、AA10%飼料群で2.18%の成績を得た。この成績と本実験のTable3の結果とを比較するとき、両者間に著しい差異はなく、本実験の成績はほぼ妥当なものと考えられた。また、無抗原飼料を与えられてきたCVおよびGFマウスについて、7週齢から11週齢までの糞を合一し、このタンパク態N量を測定したところ、1週間につきマウス1匹当りCV:7.6mg、GF:5.3mgの値となり¹⁰⁾、消化管内微生物を有するCVマウスで多く、本実験の傾向はこの成績にも近似していた。

既述のとおり、ヒトも含めた動物の糞便中には1)未消化の食物(飼料)残渣由来のもの、2)はく離した消化管上皮や消化液由来のもの、3)消化管内微生物とこれの存在により派生した物質由来のものに分けた3者が混在しており、おのおのがどの程度の割合で含まれているかは分別測定する手段がなく、いまだ明らかでない。本実験は、飼料(WEとAA飼料)、動物(CVとGFマウス)、分析項目(糞中タンパク態N)を選び、摂取飼料間、CVとGFのマウス間の比較により、マウスの糞に含まれる上記3者の量を明らかにするとともに、MFNについても言及し、その定義づけの再考や値を明確にする必要を述べた。つまり、MFN相当のタンパク質量は摂取飼料のN含有量にほぼ比例して増加していた。この知見からすれば、P.free飼料摂取時における糞中N量をMFNとみなしてきた、従来の慣用的な定義づけを再検討するとともに、たとえば、AA飼料の活用も一つの方策と考えられるが、食品や飼料の栄養的価値の判定をより正確に可能とする、方法論的研究の進展が期待される。

要 約

精製全卵タンパク質(WE)、WEと同じアミノ酸組成をもつ結晶アミノ酸混合物(AA)を、窒素(N)×6.25でそれぞれ6、10、14%含む飼料と、無タンパク質(P.free)飼料とを、CVおよびGFマウスに与え以下の試験をした。すなわち、AA飼料はアミノ酸態のNのみを含み、この飼料を摂取したマウスの糞中には、未消化の飼料残渣由来のタンパク態Nは存在しないこと、さらに、GFマウスの糞中には消化管内微生物とこれの存在により派生した物質由来のタンパク態Nが存在しないことから、WEとAA飼料、CVとGFマウスで糞への純タンパク質(タンパク質)排泄量にどれほどの違いがあるかを比較した。一般的に言えば、WE飼料群がAA飼料群より、CVマウスがGFマウスより、糞へのタンパク質排泄量が多かった。また、飼料のN含有量によっても異なり14%群が多く、P.free飼料群は著しく少なかった。未消化の飼料残渣由来分と消化管内微生物ならびにその存在により派生した物質由来分の糞中タンパク質量は、摂取飼料のN含有量と関連があり、N含有量の低い飼料ほど少ない傾向であったが、はく離した消化管上皮や消化液由来分の糞中タンパク質量には、前2者におけるような傾向はなかった。未消化の飼料残渣由来分を除いた、いわゆる、代謝性糞N(MFN)分に相当する糞のタンパク質量は、摂取飼料乾物1g当りでP.free飼料群が7.7mg、6%飼料群は8.4mg、10%飼料の2群では9.6と11.7mg、14%飼料群は11.2mgであった。つぎに糞乾物100g当りでみると、P.

free 飼料群が 4.49 g, 6% 飼料群は 5.42 g, 10% 飼料の 2 群は 6.37 と 7.28 g, 14% 飼料群は 7.31 g であった。

結晶アミノ酸をご恵与いただいた協和発酵工業㈱に謝意を表します。

文 献

- 1) 芦田 淳：栄養化学概論, 227 (1962), 養賢堂 (東京)
- 2) 亀高正夫, 堀口雅昭, 石橋 晃, 古谷 修：基礎家畜飼養学, 148 (1984), 養賢堂 (東京)
- 3) 田先威和夫, 大谷 勲, 吉原一郎, 松本達郎：家

畜飼養学, 125 (1973), 朝倉書店 (東京)

- 4) Yamaguchi, M. and Kandatsu, M.: *Agric. Biol. Chem.*, **37**, 809 (1973)
- 5) 山中聖敬, 亀高正夫：栄食誌, **46**, 507 (1993)
- 6) 岩田久敬：食品化学, **16** (1955), 養賢堂 (東京)
- 7) Yamanaka, M., Nomura, T. and Kametaka, M.: *Environ. Control Biol.*, **15**, 11 (1977)
- 8) Yamanaka, M., Nomura, T., Tokioka, J. and Kametaka, M.: *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **26**, 435 (1980)
- 9) 山中聖敬, 亀高正夫：栄食誌, **40**, 141 (1987)
- 10) 梅原恵子, 山中聖敬, 橋本一男, 佐々木正五：実験動物, **33**, 77 (1984)

(1992 年 12 月 10 日受理)