酸化クロームを指標物質とする豚の消化試験に関する研究 (I)*

酸化クロームの排泄変動について

石 川 鹿 生 (三重大学農学部農芸化学科)

昭和 33 年 3 月 10 日 受 理

指標物質を用いて消化試験を行う場合の基礎条件の一つとして、排糞固形物中の指標物質及び栄養分の含有率に変動がないこと、又はあっても規則的な変動にとどまることが必要である。

酸化クローム (Cr_2O_3 以下 CR と略記する) を指標として、Irwin 等⁽¹⁾ は人について、Kane 等⁽²⁾、Hardison 等^(3,4)、亀岡等⁽⁵⁾ は反芻獣について、その給与法と排糞中の含有率の関係を明らかにし、消化率又は採食量を正確に査定するために必要な試料糞の採取法について述べている。これらの報告によると、消化器の構造並びに消化機構の相違により人と反芻獣では CR の排泄状態が著しく異なるようである。又糞塊中の CR 分布については、Irwin 等⁽¹⁾ が人について行った報告が見られるに過ぎない。

本実験は豚について指標物質としての CR の給与法と排泄変動との関係及び栄養分の排泄変動並びに個々の糞塊中の CR 分布を調べ、指標物質法の適用条件の一部を明らかにする目的で行われた。

実 験 方 法

試験動物としてヨークシャー種の豚 10 頭を用い、5 回に分けて実験を行った。第 3 回実験では飼育箱に、他はすべて 1 頭ずつコンクリート床の豚房に収容して、試験用飼料と飲水以外の摂取を絶ち、7 日間以上の予備飼育をする。引続き CR を添加採食せしめるのであるが、第 1~3 回実験においては CR 添加の日の夜間から試料糞の採取を始めた。採取は 1 日 3 回定められた給餌時 (A.M. 6.30 : A.M. 11.30 : P.M. 4.30) の間を午前・午後・夜の 3 部とし、第 1~3 回実験ではその間における 2 回の排糞中から大略同量を分取混合して新鮮糞試料 (200~250 g) とした。各時間内における排糞回数は 2~3 回で、1 回の場合もあるが 4 回以上は殆どなかった。

すべて試料糞はシャーレ中で細かく押し砕き約 90° で乾燥粉碎して分析用試料とした。

CR 添加率はすべて飼料給与量に対し 1% である。各実験における動物に関するデータ及び配合飼料組成は第 1 表に示した。

第 1 表 実験動物と配合飼料組成

実験	動物	月令	体重 kg	飼 料 組 成						
				水分	粗蛋白	純蛋白	粗脂肪	粗繊維	可溶性無窒物	粗灰分
第 1 回	Y-19	7	63	9.57	20.75	18.84	6.01	6.42	51.28	5.97
	Y-35	13	123							
第 2 回	Y-18	7	60	13.09	22.93	21.39	3.64	8.12	46.98	5.24
	Y-20	7	67							
第 3 回	Y-113	4	23	14.97	22.82	21.29	2.83	7.09	47.27	4.04
	Y-114	4	23							
第 4 回	Y-98	11	115	11.89	23.42	20.99	3.69	7.78	48.10	5.12
	Y-99	12	128							
第 5 回	Y-38	10	92	13.42	23.11	21.78	3.70	8.04	46.08	5.65
	Y-6	12	104							

配合率第 1 回 糠類 60、コーンミール 20、油粕類 15、魚粉 5。第 2~5 回 穀 8、大豆粕 3。すべて別に一定量の石灰・食塩を添加給与する。

第 1 回実験 1 頭

当り配合飼料 2.25 kg を 1 日 3 回に等分して給与する。給餌毎に給与量に対し 1% の CR を加え、水と共によく攪拌混合する。Y-19 は常に少量の残食が見られ飽食状態である。残食分は翌朝の給餌前に取り除き腐敗散

乱を防止した。Y-35 はよく採食し制限食の状態である。CR 混与期間は前者 6 日、後 8 日である。

第 2 回実験 1 日 1 頭当り飼料給与量は 1.68 kg である。CR 混与期間を前期 8 日間、後期 6 日間に分け、前期間の Y-18 と後期間の Y-20 には第 1 回同様の CR 給与法を採り、前期間の Y-20 と後期間の Y-18 に対しては CR の 1 日全量を朝飼に混合して摂取せしめる。同一動物について、指標物質の 1 日 1 回混与と 1 日 3 回分与による排泄変動を比較するためにこのような方法をとった。

*Chromic Oxide Indicator Method for Digestibility Studies with Swine (I). Variation in Chromic Oxide Excretion.

By Shikao ISHIKAWA (Department of Agricultural Chemistry, Faculty of Agriculture, Mie University)

第3回実験 1頭当り配合飼料 0.66 kg を1日3回に分与するが、CRは1日全量を二等分して朝夕の2回に混与する。即ち10時間と14時間の間隔給与法を採った。本実験は6日間続けたが、午前には排糞のない日があった。その場合は朝飼後第1回目の排糞全量を午前の試料として取扱った。

第4回実験 肉眼的観察によると CR を含む新鮮豚糞の内部は CR 独特の暗緑色に乏しく、含量の低いものでは普通の豚糞と見分けが付かない位である。しかるに表面は明らかに緑色を呈し、糞塊のまま乾燥すると一層あざやかな緑色となる。このような外見の相違は糞中の CR 分布が異なるためではないかと考え、糞塊の内外二層における CR 分布を調べるために行った実験である。

1日1頭当り配合飼料給与量は 2.10 kg で第1回同様の給飼法である。午前午後一回ずつ3日間排泄直後の糞塊を成形のまま採取する。糞塊の直径は 4~5 cm であったが、表面から直径に沿い厚さ約 5 mm の部を削り取り外層試料とし、残りの中心部を内層試料とした。1頭当り6対の試料糞を得た。

第5回実験 第1~3回実験により CR の排泄変動を小さくするには給飼毎の混与が最良であるという見通しを得た後に行った実験であり、CR を給与飼料全量と均一に混合することが不可能な場合を想定して行われた。給飼毎に規定量の CR を添加するが給飼全量に混合せず、その一部と混合して採食せしめた後に CR を含み残部を与えて CR の排泄変動及び糞塊中の分布状態を調べた。即ち1頭当り1回給与量 0.80 kg の中 0.25 kg に CR 8 g を混与し喰下し終ってから、残りの 0.55 kg を追給する。予備飼育期間に続き、このような CR 給与法を採り、その5日目から4日間試料を採取したが、この間に残食なく一定率の CR 摂取が行われたことになる。午前・午後・夜にそれぞれなるべく大型の糞塊を1個採取し、CR 分布を調らべるために中心線に沿って縦断して1対の試料糞とする。1頭当り1日3対の6試料を得る。

CR の分析定量は既報⁽⁶⁾の方法による。第2回試験における一部試料糞について行った有機物と粗蛋白質の定量並びに配合飼料の分析は常法⁽⁷⁾による。以下分析値はすべて固形物中の含有率である。

実験結果と考察

第1~3回実験における排泄糞中の CR 含有率の経時的变化は第1図に示す通りである。CR 3回分与の Y-35 及び Y-18 前期において、混与後2日経過すると含有率が一定となり、飽食せしめた Y-19 は 2.2 日でほぼ安

第1図 酸化クロームの排泄変動

第 2 表 酸化クローム 1 日 3 回分与時の排泄変動

変動因	Y-18			Y-35		
	自由度	平方和	平均平方	自由度	平方和	平均平方
全 体	17	0.254		14	0.091	
排糞時	2	0.015	0.0075	2	0.016	0.0080
排糞日	5	0.065	0.0130	4	0.027	0.0067
誤 差	10	0.174	0.0174	8	0.048	0.0060

第 3 表 酸化クローム及び栄養分の糞中平均含有率

動 物	試料数	成 分	平均値と標準偏差 %	変動係数 %
Y-19	10	酸化クローム	2.848±0.075	2.6
Y-35	15	"	2.584±0.084	3.2
Y-18	18	"	3.041±0.122	4.0
		粗蛋白質	13.829±1.069	7.6
		有機物	82.077±1.337	1.6
Y-20	9	酸化クローム	3.346±0.086	2.6
		粗蛋白質	13.377±0.723	5.4
		有機物	82.277±1.909	2.3

第 4 表 酸化クローム 1 日 1 回及び 2 回混与時の排泄変動

変動因	Y-20 (CR 1 日 1 回混与)			Y-113 (CR 1 日 2 回分与)		
	自由度	平方和	平均平方	自由度	平方和	平均平方
全 体	17	15.359		17	1.487	
排糞時	2	6.623	3.3115	2	0.997	0.4985
排糞日	5	2.125	0.4250	5	0.228	0.0456
誤 差	10	6.611	0.6611	10	0.262	0.0262
$F = \frac{3.3115}{0.6611} = 5.00^*$				$F = \frac{0.4985}{0.0262} = 19.02^{**}$		

時による排泄変動が著しく、前者では特に大きいことがわかる。これらの変動を前同様分散分析により検定すると、CR 含有率は何れも排糞時の間に有意差があることが認められた。それぞれの一例についての分散分析を第 4 表に示した。

排糞時による CR 排泄変動については、鶏は常時 CR 混合餌を与えても昼夜の排糞間に有意差が見られることが指摘されているが⁽¹²⁾、Irwin 等⁽¹⁾は人では 1 日 3 回又は採食毎の CR 給与では一様性を示し 1 日 1 回混与ではやや大きい変動を示すが、それぞれの場合から求められる消化率間に統計的有意差は存在しないと、Hardison 等⁽⁴⁾は 1 日 2 回給飼の成牛に対する CR 投与を給飼毎か又は給飼間の 2 回とする時の排泄変動は、1 回の時に較らば著減すると報じており、本実験の結果と同じ予期される傾向と言える。

排糞日による CR 排泄の変動については、給与法の如何に拘らず有意差が認められなかった。CR 1 日 1 回混与時における Y-18、Y-20 の 1 日毎の糞中 CR 平均含有率の実験期間中における平均値と標準偏差はそれぞれ $3.331 \pm 0.124\%$ 、 $3.366 \pm 0.376\%$ となる。たまたま Y-20 の値は同動物の 3 回分与時における平均値と近似しているが、この場合 1 日における排泄時により糞中の CR 含有率に変化があること及び本実験の如き試料糞採取法から考えて、各 1 日の午前・午後・夜の 3 試料糞個々の CR 含有率の平均値は、それらの間に有意差がなくとも、同動物の CR 3 回分与時における排糞時による変動に有意差のない CR 含有率と必ずしも一致しない筈である。従って各 1 日の平均値の実験期間中の平均値も、消化試験の常法である糞蒐集法により得られる試料、即ち実験期間中の排泄全糞に CR が均等に混和分布された場合の含有率の推定値とはなり得ない。このような試料糞個々の CR 含有率から CR が均一的に排泄される場合の含有率を知るには、Kane 等⁽²⁾、Hardison 等⁽³⁾が牛につい

第 5 表 糞の内外二層における酸化クローム分布

変動因	Y-98			Y-99		
	自由度	平方和	平均平方	自由度	平方和	平均平方
全 体	11	0.215		11	0.331	
内外差	1	0.001	0.0010	1	0.002	0.0020
排糞時	5	0.163	0.0326	5	0.178	0.0356
誤 差	5	0.051	0.0102	5	0.151	0.0302

定化している。Y-20 後期においても CR 3 回分与に切換えてから 2.2 日後には既に含有率が安定化していることがわかる。

1 日 1 回又は 2 回に指標物質を混与する場合の排泄も 2.2 日以上経過後にはそれぞれの特有状態に達するものと考え、それ以後の排泄変動について検討を加えた。

CR 混与予備期間は更に長くとり 3 日とすれば特有排泄状態に達するに十分であろう。他動物の場合は、人 1 日⁽¹⁾、鼠 3 日⁽⁸⁾、犬 3 日⁽⁹⁾、兎 5 日⁽¹⁰⁾、羊 3~4 日⁽¹¹⁾と報告されているが、人の最短を別として豚は同じ単胃雑食獣である鼠及び犬に似ている。

CR 1 日 3 回分与時の各動物毎の排泄変動を分散分析を施して調べたところ、試料糞の排泄時及び排泄日間にすべて有意差は認められない。第 2 表に分散分析を例示した。この場合は CR が実験誤差の範囲内で糞中に均等に排泄されることになる。第 3 表に 3 回分与時の糞中の CR 平均含有率及び標準偏差を示した。

CR 1 日 1 回及び 2 回混与の場合は排糞

て考察したような 1 日の各時刻における排糞中の CR の相対的回収率を示す標準雛型 (Excretion pattern) によらざるを得ないであろう。同じことが CR 1 日 2 回分与の場合についても言い得る。しかし第 3 回実験においては、1 日毎の CR 平均含有率の

第 2 図 糞内外層における酸化クローム

●—● 内層 ×---× 外層

実験期間中の平均値並びに標準偏差は Y-113 : 3.071 ± 0.123 , Y-114 : $2.952 \pm 0.120\%$ となり, 標準偏差は試料糞数の同じ 1 日 1 回混与時の Y-20 のその 1/3 に減少する.

第 4 回実験により得られた CR 含有率の変動は第 2 図に示した. 糞の内外二層における CR 含有率の差は第 5 表の統計処理の如く, 実験誤差範囲内であるとい得る. 従って糞塊の内外二層における肉眼的な緑色の濃淡は CR 含有率と関係がない.

第 5 回実験の結果は第 6 表に示す通りで, 各 1 対の

第 6 表 糞塊中の酸化クローム分布

		第 1 日			第 2 日			第 3 日			第 4 日		
		午前	午後	夜	午前	午後	夜	午前	午後	夜	午前	午後	夜
Y-38	(イ)	3.17	3.06	3.24	3.44	3.63	3.24	3.33	3.32	3.38	3.50	3.46	3.49
	(ロ)	3.17	3.09	3.40	3.33	3.41	3.40	3.51	3.24	3.33	3.49	3.48	3.35
	平均	3.17	3.08	3.32	3.39	3.52	3.32	3.42	3.28	3.36	3.50	3.47	3.42
Y-6	(イ)	3.42	3.18	3.03	3.51	3.42	3.52	3.52	3.44	3.49	3.41	3.32	3.40
	(ロ)	3.36	3.05	3.05	3.41	3.44	3.45	3.51	3.45	3.36	3.47	3.40	3.28
	平均	3.39	3.12	3.04	3.46	3.43	3.49	3.52	3.45	3.43	3.44	3.36	3.34

試料糞中の CR 含有率の差は僅少で実験誤差と考えられる. Irwin 等⁽¹⁾は人に CR を 1 日 1 回又は 3 回に混与した場合何れも糞塊中の CR 分布は均一であると報告している. 非反芻動物でも消化器内容物は部分的に反転混合されるためであろう.

次に各対の平均含有率について排糞時及び排糞日間の分散分析を行ったが第 7 表の如く何れも有意差は存在しない. 従って本実験における如き CR 分与法によっても排泄変動は実験誤差内にとどまり, 指標物質による消化率査定に支障を及ぼさないと考えられる.

第 7 表 酸化クロームの排泄変動

変動因	Y-38			Y-6		
	自由度	平方和	平均平方	自由度	平方和	平均平方
全 体	11	0.222		11	0.336	
排糞時	2	0.011	0.0055	2	0.039	0.0195
排糞日	3	0.064	0.0213	3	0.157	0.0523
誤 差	6	0.147	0.0245	6	0.140	0.0233

以上述べたところから, 豚の場合排糞中の CR 含有率を常に一定に保たしめ, 従って任意採取の試料糞により指標物質法の適用を可能ならしめるには給飼毎に一定率の CR を混与すべきである. この場合 CR を必ずしも各給飼時の全量と均等に混合する必要はない.

なお比較のため栄養分の排泄変動を CR 1 日 3 回分与時の試料糞について調べた. 即ち粗蛋白質と有機物含有率の経時変化を第 3 図に示したが, 念のため CR 含有率の場合同様, 排糞時及び排糞日間の分散分析を施した結果何れも有意差は認められなかった. 両成分の平均含有率とその標準偏差及び変動係数を第 3 表に併せ記載した. それによると CR の変動係数と両成分のそれとは同程度であると考えられる.

第 3 図 粗蛋白質と有機物の排泄変動

— Protein organic matter

指標物質法においては、CR 排泄変動に関連して CR 回収率が重要因子となるが、本実験における CR 1% 添加の場合の回収率は 97% を越える。この問題については別に報告するつもりである。

要 約

豚に指標物質法を適用する場合の酸化クローム給与法とその排泄変動の関係を調べた。酸化クローム添加率は飼料に対して 1% である。

- (1) 酸化クローム排泄が安定するに要する日数は 2.0~2.2 日であった。3 日とすれば十分であろう。
- (2) 1 日 3 回給飼毎に酸化クロームを混与する場合は排糞時及び排糞日による酸化クローム排泄変動は実験誤差範囲内にとどまり、指標物質法にとり最適の給与法であると言う見通しが得られた。この場合酸化クロームは給飼の一部と混合して摂取せしめてもよい。
- (3) 酸化クローム 1 日 3 回分与時の糞塊中に酸化クロームは均等に分布している。従って酸化クローム分析定量用の試料は糞塊の何れの部位から採取しても差支えない。
- (4) 1 日 3 回給飼の豚に酸化クロームを 1 回又は 2 回に混与すると、排糞時による排泄変動が大きく、統計的に有意差があることが検定される。
- (5) 酸化クローム 1 日 3 回分与時の排糞中の粗蛋白質及び有機物含有率の変動係数は酸化クロームのそれと同程度である。

終りに臨み本研究を行うにあたり終始御指導御鞭撻を賜った名大斉藤道雄教授に厚く感謝する。又試験動物の管理、試料採取に御協力頂いた三重県種畜場佐々木、野呂、沼田各技師に謝意を表する。

(1) M. I. Irwin, E. W. Crampton : <i>J. Nutrition</i> , 43, 77 (1951).	(7) 東大農学部農芸化学教室編 : 実験農芸化学, 106 (1952).
(2) E. A. Kane, W. C. Jacobson, L. A. Moore : <i>ibid.</i> , 47, 263 (1952).	(8) R. W. Carrol, G. W. Hensley, W. R. Graham, Jr. : <i>Science</i> , 115, 36 (1952).
(3) W. A. Hardison, J. T. Reid : <i>ibid.</i> , 51, 35 (1953).	(9) L. E. Lloyd, C. M. McCay : <i>J. Nutrition</i> , 53, 613 (1954).
(4) W. A. Hardison, R. W. Engel, W. N. Linkous, H. C. Sweeney, G. C. Graf : <i>ibid.</i> , 58, 11 (1956).	(10) T. C. Huang, H. E. Ulrich, C. M. McCay : <i>ibid.</i> , 54, 621 (1954).
(5) K. Kameoka, S. Takahashi, H. Morimoto : <i>J. Dairy Sci.</i> , 39, 462 (1956).	(11) L. E. Lloyd, B. E. Rutherford, E. W. Crampton : <i>ibid.</i> , 56, 265 (1955).
(6) 石川麗生 : 本誌, 32, 83 (1958).	(12) Werner J. Mueller : <i>ibid.</i> , 58, 29 (1956).

Mn 錯塩の紫外外部吸収を利用するビウレットの微量定量法*

渡 辺 保 人 (九州大学農学部農芸化学教室)

昭和 33 年 3 月 17 日 受 理

ビウレットは尿素が 2 分子縮合した化合物で、尿素を加熱するときに生成する。このビウレットの定量法としては、いわゆるビウレット反応に基づく比色定量法がある^(1,2)。これらはフェーリング溶液にビウレットを加えたときに生ずるビウレット-銅錯塩が、約 550 m μ に吸収極大を有することを利用したもので、いずれも尿素加熱物中のビウレットの定量のために提出された方法である。それらの定量限界は約 0.1 mg/ml であり、またビウレット反応はビウレットに特異的なものではないので、血液、尿、その他の生体物質中のビウレットの定量法としては不適當である。アミノ酸やペプチドが同様に銅錯塩を形成し、たとえばアラニン-銅錯塩は 620 m μ に吸収極大があることが知られている⁽³⁾。ついでこのアラニン-銅錯塩が紫外外部の 235 m μ に吸収極大を有し、しかもこの吸収は非常に強く、そのために 620 m μ による測定約 100 倍の精度が得られることがわかり、アミノ酸-銅錯塩の有する紫外外部の吸収極大を利用したアミノ酸およびペプチドの微量比色定量法が提出されている^(4,5)。

* Ultraviolet Spectrophotometric Micromethod for Determination of Biuret as Manganese Complexes. By Yasuto WATANABE (Department of Agricultural Chemistry, Faculty of Agriculture, Kyushu University)