

排泄クレアチンを指標とした非侵襲的な蛋白質お
よびアミノ酸栄養評価方法の検討

**(Studies on noninvasive method to estimate nutritional condition of
protein and amino acids for animals)**

長谷川悦子

排泄クレアチンを指標とした非侵襲的なタンパク
質およびアミノ酸栄養評価方法の検討

(Studies on noninvasive methods to estimate nutritional condition of protein and
amino acids for animals)

長谷川悦子

日本獣医生命科学大学大学院獣医生命科学研究科
応用生命科学専攻博士後期課程平成 26 年入学

(指導教員：太田能之)

平成 29 年 3 月

目次

第 I 章. 緒論	1
第 II 章. 実験動物であるブロイラーを用いた指標の検討	
第 1 節. 飼料中メチオニンおよびアルギニン含量がブロイラーヒナの排泄クレアチニン量におよぼす影響	
1. 緒言	8
2. 材料と方法	9
3. 結果	15
4. 考察	22
第 2 節. 飼料中蛋白質含量がブロイラーヒナの排泄クレアチニン量におよぼす影響	
1. 緒言	24
2. 材料と方法	27
3. 結果	33
4. 考察	42
第 III 章. 肉食性鳥類における指標の再現性の検討	
ヨーロッパコノハズク (<i>Otus scops</i>) における飼料中メチオニンおよび蛋白質が排泄クレアチニン量におよぼす影響	
1. 緒言	46
2. 材料と方法	47
3. 結果	54
4. 考察	59
第 IV 章. 総括	61
参考文献	66
謝辞	715

略語

アルギニン : Arg

アルギニングリシンアミジノトランスフェラーゼ : AGAT

クレアチニン : Crn

クレアチン : Cr

メチオニン : Met

略語形は Wyss と Kaddurah-daouk (2000) を参考にした。

第 I 章 緒論

近年、生息域の環境悪化などにより生息数が減少している野生動物種が増え
てきている。とりわけ肉食性の動物は生態系の中で高次消費者に位置するため、
環境問題による影響を強く受けてしまい、日本のみならず世界の中で個体数の
減少が危ぶまれている(レッドデータブック, 2014; Drewitt と Langston, 2006)。
鳥類だけを見ても、日本に生息する約 35 種の肉食性鳥類のうち半数近くが絶滅
危惧種に指定されている(レッドデータブック, 2014)。また肉食性のみならず
日本固有の種については、生息域における保護だけでは個体数の維持あるいは
増殖を行うことが困難であるため、動物園や保護施設などの生息域外での保護
が必要となっている。ニホンライチョウ (*Lagopus muta japonica*) は 30 年前と
比べ約 20% も生息数を減らしたと言われており、2012 年のレッドリストでは絶
滅危惧 II 類から絶滅危惧 IB 類に変更された(レッドデータブック, 2014)。そ
のため 2012 年からライチョウ保護増殖事業計画が進められている。これらの野
生動物を生息域外において個体数を増やすためには、繁殖技術の確立とともに、
飼育下での適正な栄養管理を行うことが重要である。

動物の栄養管理は栄養要求量の推定と使用可能な飼料原料の選定とそれに基づ
いた飼料配合設計を行い給与することで行われる。しかしこれらすべてが可
能な動物は多くない。生息域外保全により飼育下にある絶滅危惧種や動物園動
物などにおいては種間差や個体差も大きく、またそもそも栄養要求量が明らか
にされていない動物がほとんどである。

栄養要求量が求められている動物は、哺乳類においてはウシ、ウマ、ブタと
いう産業動物、サル、イヌ、ネコという実験動物、伴侶動物が挙げられる。こ
れらの動物について食物や消化管の構造の違いだけでなく、各栄養素の要求量
や代謝的な特徴が明らかになっている。一方鳥類は、草食性であり反芻動物の

ように胃内発酵を行っているツメバケイ (Goday-vitorino ら, 2008) から, 肉食性である猛禽類まで, 哺乳類と同様にさまざまな食性の種が存在しているが, 鳥類では栄養学的な研究が進んでいるのはニワトリなどの雑食性の種ばかりである。また, これらの動物においても, 同じ飼料で画一的な過栄養管理が可能なわけではない。

遺伝的多様性の少ないコマーシャル鶏やマウス, ラットなどの実験動物の場合, ライフステージごとに飼養標準に基づいて画一的な栄養管理が可能である。コマーシャル鶏は実験動物として登録もされており, 栄養管理も週齢単位で全体管理が行われている (日本飼養標準・家禽, 2011)。一方で, ウシやブタなどの場合は個体差が大きく, 乳量や乳質のモニタリングを行うことで個体ごとの栄養管理に対応するか, 形質の近い個体を集め一括管理に対応している (DePeters と Cant, 1992 ; Ikuta ら, 2000)。またブタでは週齢よりも体重を基準としている (日本飼養標準・豚, 2005)。

個性が尊重されるペットや, 遺伝的多様性が維持された状態で飼育されなければならない絶滅危惧種などの保護飼育下にいる動物は, 同じ種であっても個体差が大きく, 画一的な栄養管理は行えない。これらの動物の栄養管理を行うためには, 栄養状態のモニタリングとそれぞれの個体に合ったテーラーメイドの栄養管理が必要である。

栄養素には大別するとエネルギー源となる栄養素, 体を構成するための栄養素, 代謝を行うために必要となる栄養素がある。これらの栄養素はすべて動物の生命維持のために必須であるが, まず優先されるのは生命活動の基礎となるエネルギー源となる栄養素である。そのため栄養要求量を求める際には, まずエネルギー要求量を求める (飼養標準・家禽, 2011)。エネルギー源となる 3 大栄養素のうち, 蛋白質はエネルギー源であるとともに体を構成する主な成分

であり、またポストゲノムの中核をなす分子栄養の要となる栄養素でもあり、他の栄養素に比べ重要性が高い。また3大栄養素のバランスが悪いと、蛋白質から糖新生が行われ、糖が脂肪に変換されるなど代謝調節が行われる。このときの代謝において補酵素として働くビタミン要求量が影響を受ける。そのためエネルギー源となる栄養素の中で異なる役割を持つ蛋白質と、その他二つの栄養素のバランス、すなわちエネルギー量と蛋白質の比率は重要であり、簡便な栄養管理の為にモニタリング項目としてもっとも重要である。エネルギー要求量については代謝体重からの計算による推測が可能であるが、蛋白質・アミノ酸についてはそのような法則が存在しない。そのため蛋白質・アミノ酸要求量については実験的に求めていかなければならない。しかしながら、すべての動物種について試験を行い、要求量を求めることは困難である。とりわけ絶滅危惧種などは実験上の制限が多いか、あるいはそもそも実験そのものを行えない種がほとんどである。そのため既に蛋白質・アミノ酸要求量が求められている動物の値を応用するか、近縁種を実験動物として選定し実験的な要求量の推定が必要である。

また栄養要求量は動物の生理状態によって変動し、その生理状態は飼育環境、ライフステージ、飼料の利用性、ストレスなど様々な要因により変動する。ストレスは血中のコルチコステロン濃度を上昇させ、コルチコステロンは糖新生を促進し血糖値をあげる。モニタリングを行う際の保定や採血は、動物にストレスを与えることで生理状態に影響を及ぼす可能性がある。そのため、実験的な栄養要求量の推定と、日常のモニタリングを動物にストレスを与えずに行うためには、動物に直接触れずに行える非侵襲的な方法が必要となる。

非侵襲的な方法は同一個体を連続して使用することが可能であるため、日々のモニタリングに有用である。家畜や家禽においても増体重や、乳量・乳質、

産卵率などを指標として用いている。しかしこれらの指標はモニタリングできるステージが成長期や繁殖期などステージが限られるため、日常的なモニタリングには適用しにくい。尿中の最終代謝産物は、蛋白質・アミノ酸の要求量を求めることができる非侵襲的な代謝指標のひとつである。特に制限アミノ酸など栄養的に制限因子となりやすい物質を前駆体とする物質は代謝を反映しやすい。前駆体となる物質が栄養制限因子となっているときは、指標となる物質の合成および排泄量は低く、逆に制限因子でなくなれば合成および排泄量が増加するからである。既存の方法として排泄タウリンを指標とした試験方法がある。これは排泄物中のタウリンが含硫アミノ酸である Met やシスチンの代謝を直接反映する指標であることを利用した方法であり、ラットなどの哺乳類をはじめとして、鳥類のニワトリにおいてもアミノ酸要求量を求める指標としての有効性が証明されている (Tojo ら, 1986 ; Ohta と Ishibashi, 1995)。しかし肉食性のコノハズクで試験を行ったところ、シスチンの過剰投与が排泄タウリン量に反映されなかった (木崎, 2008)。哺乳類のネコではタウリンを合成することができないことが知られているが、その理由としてネコが肉食性であることが挙げられる。肉食性の動物は、動物性の栄養素に対する高い代謝能力を持つが、同時に植物性の栄養素からの必須栄養素の合成能力は損失している (Rogers と Morris, 1982 ; Legrand-Defretin, 1994)。とりわけタウリンは植物性飼料にはほとんど見られず、動物性飼料に多量に含まれているため、肉食性のネコではタウリン合成能力を失ってしまったと考えられる。同様の理由から肉食性鳥類であるフクロウもこの排泄タウリンを指標として用いることはできないと考えられる。

そこで、タウリンと同じく尿中に排泄される最終代謝産物の一つであり、肉食性の動物でも代謝される可能性があるものとして **C_{rn}** に注目した。**C_{rn}** は、

Arg, グリシンおよび Met という 3 つのアミノ酸の代謝から合成される Cr の最終代謝産物である (Wyss と Kaddurah-daouk, 2000)。Cr はそのほとんどが Cr リン酸の形で筋肉中に存在し、筋中の ATP へのリン酸供給源としての働きを持つ生体内物質である。体内の Cr の約 2% が非酵素的に脱水され、Crn に変換され、Crn は腎臓で再吸収されることなく尿中に排泄される。Cr 合成過程には 2 段階あり (Fig. I-1), まず Arg とグリシンを基質として Arg・グリシンアミノトランスフェラーゼ (AGAT, E.C.2.1.4.1) がグアニジノ酢酸を合成する。次いでグアニジノ酢酸をメチル化するグアニジノ酢酸メチルトランスフェラーゼ (GAMT, E.C.2.1.1.2) が働き Cr が合成される。AGAT 活性は動物種によって活性がみられる組織が異なり、ラットやマウス、イヌ、ネコでは腎臓に活性が確認され、ヒトやウシ、ブタ、鳥類においては肝臓で活性が確認できる (Wyss と Kaddurah-daouk, 2000)。一方で GAMT 活性は主に肝臓において活性が確認されている。Cr 合成に必要なとされるメチル基は S-アデノシル Met 由来のものであり、Met は Cr 合成のメチル基供与源である (Walker, 1979)。ニワトリヒナにおいて、飼料中の過剰な Arg が Crn 排泄量を増加させたことが報告されており (Austic と Nesheim, 1972), 排泄 Crn 量がこれら 3 つのアミノ酸の代謝を反映する可能性が示唆されている。Cr は生命活動において重要な働きを持ち、また肉食性の哺乳類であるネコにおいても、Cr 合成酵素 AGAT および GAMT の活性が確認されていることから (Greenhaff, 1997), Cr は食性に関わりなく合成および代謝され、Crn として排泄されていると考えられ、蛋白質やアミノ酸の代謝指標として有用である可能性がある。

絶滅危惧種の生息域外保全や、動物園での動物の飼育において適正な栄養管理を行うためには、その動物の情報収集、栄養要求量の推定とそれに基づいた飼料の給与、そしてモニタリングによる個体ごとの調整といった戦略的なテー

ラーメイドの栄養管理方法の確立が必要である。そこで本研究は飼育下動物の栄養管理のための、非侵襲的な蛋白質・アミノ酸栄養状態評価方法の開発を目的とした。採血やと殺を行わず、かつ食性に関わりなく蛋白質やアミノ酸栄養状態の評価が可能な方法として、排泄 Crn 量を指標とした方法に着目し、栄養状態評価方法確立のため 6 つの試験を行った。

まず、第 II 章では実験動物での立証を目標とし、排泄 Crn 量が蛋白質アミノ酸栄養状態評価の指標となりうるのか調べた。アミノ酸要求量を求めるための様々な指標が確立されているブロイラーヒナを用い、指標の中でもわかりやすい増体重が飼料中の蛋白質やアミノ酸の増加にともない変化する水準において、排泄 Crn 量の反応に変化が見られるか検討し、またその反応が代謝を反映しているか検討を行った。

III 章では排泄 Crn 量が食性に関わりなく用いることのできる指標であるか確認するために、雑食性のブロイラーで見られた飼料中のアミノ酸や蛋白質含量に対する排泄 Crn の反応が、動物性の栄養素の合成能力が低い肉食性鳥類においても再現性がみられるか検討した。肉食性鳥類のうち比較的運動量が少なく、また排泄物の回収が容易なフクロウ類の実験への利用を考え、その中でも小型のヨーロッパコノハズク (*Otus scops*) を対象として、飼料中 Met および蛋白質の量的試験を行い、排泄 Crn 量について雑食性のブロイラーと同様の反応が見られるか確認を行った。

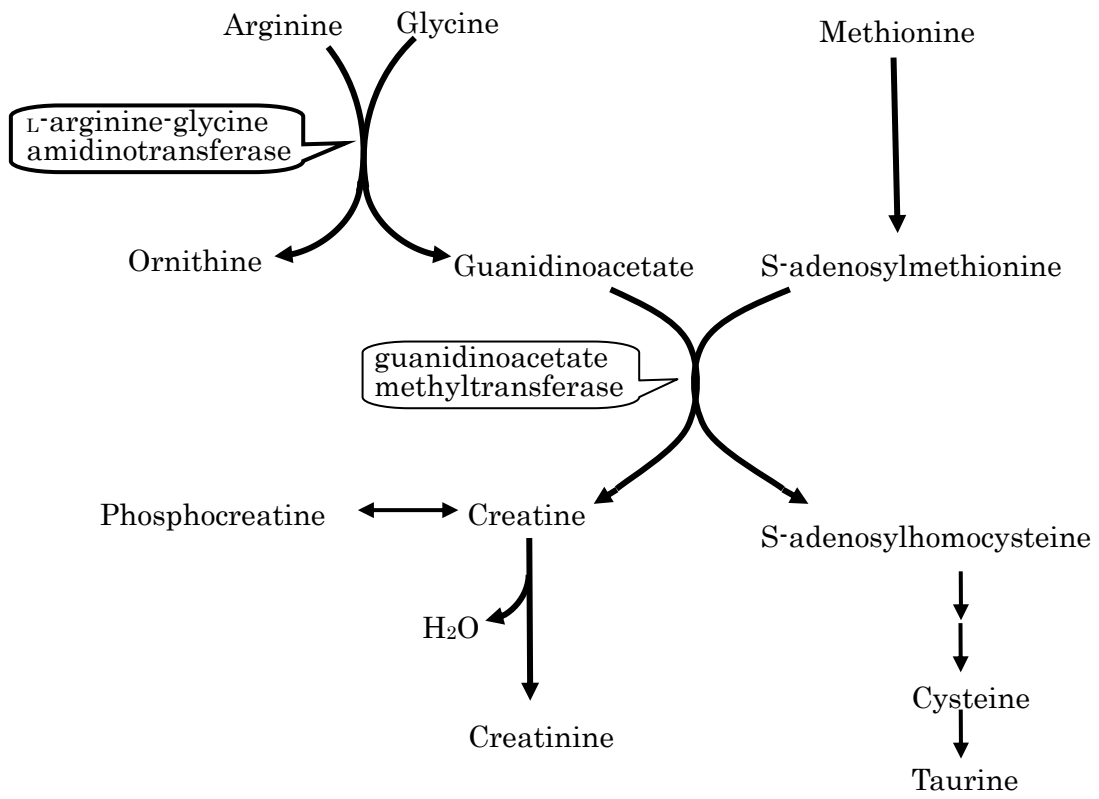


Fig. I-1. Metabolic pathway of creatinine.

第一節 飼料中メチオニンおよびアルギニン含量がブロイラーヒナの排泄クレアチニン量におよぼす影響

1. 緒言

動物において尿中のアミノ酸最終代謝産物は、蛋白質・アミノ酸の栄養状態を評価できる指標の一つである。既存の方法として含硫アミノ酸の代謝を直接反映する排泄タウリンを指標とした方法があり、ラットなどの哺乳類をはじめとして、鳥類のニワトリにおいてもアミノ酸要求量を求める指標としての有効性が示されている (Tojo ら, 1986 ; Ohta と Ishibashi, 1995)。しかし肉食性のコノハズクで試験を行ったところ、シスチンの過剰投与が排泄タウリン量に反映されなかった (木崎, 2008)。

そこでタウリンと同じく尿中に排泄される最終代謝産物の一つであり、肉食性の動物でも代謝される可能性があるものとして Crn に注目した。Crn は, Arg, グリシン, Met から合成される Cr の最終代謝産物であり、ニワトリヒナにおいて筋肉中 Cr 量が飼料中の Arg 要求量の指標になりうることが報告されている (Chamruspollert ら, 2002a)。Cr は非酵素的に Crn へ転換され腎臓で再吸収されずに排泄される (Wyss と Kaddurah-daouk, 2000 ; Brosnan, 2011)。このことから排泄 Crn 量も筋中 Cr 量と同様に Cr 合成の基質であるアミノ酸の栄養状態の指標となる可能性がある。

そのため本章では、Crn の前駆体である Cr の合成材料となる Met および Arg の飼料中含量の変動に対する、排泄 Crn の反応を確認する試験を行った。実験動物における立証を目標とし、鳥類の中でも実験動物として登録されており、またアミノ酸要求量を求めるための様々な指標が確立されているブロイラーヒナを用い、指標の中でもわかりやすい増体重が飼料中 Met または Arg 含量の増加にともない変化する水準において、排泄 Crn の反応の変化を調べた。さらに、

Cr 合成系の律速酵素である肝臓中の Arg・グリシンアミジノトランスフェラーゼ (AGAT) 活性を調べて比較し、排泄 Crm 量が代謝を反映しているか検討した。

2. 材料と方法

1) 動物

試験 1 および 2 ともに 8 日齢のチャンキー系ブロイラーヒナ雄をそれぞれ 15 羽供試した。温度 37.8°C, 相対湿度 60% 以上で孵卵させたニワトリヒナを 7 日齢までブロイラー餌付用市販飼料 (ジョイスタークランブル, 日本農産, ME: 3.2Mkcal/kg, CP: 23%) を給与し飼養した。8 日齢に体重測定を行い平均体重が等しくなるように, 試験 1 では飼料中 Met 含量が 0.25%, 0.50%, 0.75% の 3 区, 試験 2 では飼料中 Arg 含量が 0.85%, 1.44%, 2.04% の 3 区にそれぞれ 5 羽ずつ分け, 試験飼料を与え自由摂取, 自由飲水させた。試験期間を 7 日間とし, 試験開始および終了時に体重を測定した。11 日齢にヒナを一羽ずつ代謝ケージ (30cm x 50cm x 25cm) に入れ, 1 日に 2 回排泄物を全量採取し, 3% スルホサリチル酸水溶液中にて 3 日分をプールし, Crm 分析の試料とした。試験期間中の気温は 22°C ± 3, 照明時間は 14 時間で行った。

試験終了時に頸椎脱臼にて安楽死させたのち, 肝臓および回腸末端部の内容物を採取した。肝臓は AGAT 活性測定に供した。回腸末端は盲腸との境界から 3 センチメートル部分の内容物を採取し Crm 分析に供した。

動物の管理およびと殺は「日本獣医生命科学大学動物実験規定」のもと承認を得て行った (13-79)。

2) 試験飼料

試験 1 および 2 ともに, トウモロコシ・大豆粕中心の試料を用いた。試験 1

では Met 含量が飼養標準の示す要求量に対し不足の 0.25% 区, 至適の 0.50% 区もしくは過剰の 0.75% 区の 3 飼料区 (ME : 3.2Mcal/kg, CP : 16.2%) を設定した (Table.II-1; Table.II-2)。試験 2 では Arg 含量が飼養標準の示す要求量に対し不足の 0.85% 区, 至適の 1.44% 区もしくは過剰の 2.04% 区の 3 飼料区 (ME : 3.2Mcal/kg, CP : 20.7%) を設定した (Table.II - 3 ; Table.II - 4)。試験 1 の飼料は太田と石橋 (1994; 1997a; 1997b) を参考にした。飼料中の Met あるいは Arg 以外のアミノ酸は日本飼養標準の要求量に合うように結晶アミノ酸粉末を添加した。Met あるいは Arg 含量を変動させた際, 相補的にグルタミン酸の添加量を変動させた。

3) Crn 分析

回収した排泄物は 3 日分をプールし, 3% スルホサリチル酸水溶液中でホモゲナイズを行った。3,000rpm, 10 分で遠心分離したのち, 得た上清について Crn アッセイキット (Cayman Chemical Company, Michigan, USA) を用い, アルカリ・ピクリン酸法にて分析を行った。

4) AGAT 活性測定

AGAT 活性は Van Pilsum ら (1970) の方法を参考に測定した。試験 2 で採取したニワトリヒナの肝臓サンプルはホモゲナイズしたのち 1% になるように希釈し, Arg・グリシン基質溶液と Arg 基質溶液にそれぞれ分注し, 37°C で 1 時間インキュベートしたのち 0.6N 塩素酸溶液にて酵素の反応を止め, ニンヒドリン色試薬で反応させ 500nm で測定した。活性は $\mu\text{mol ornithine/h/mg protein}$ で示した。

6) 統計処理

得られた結果は両試験とも一元配置分散分析を行った。有意性の判定は危険率 5% で行った。

Table II-1. Composition of experimental diets in experiment 1 (%)

Ingredient	
Corn	74.20
Soybean meal (44% CP)	17.15
Soybean oil	2.80
Vitamin mineral premix ¹	0.25
Calcium carbonate	0.50
Calcium phosphate tribasic	2.20
Choline chloride	0.20
Sodium chloride	0.40
Amino acids ²	2.30
Total	100.00
Metabolizable energy (Mcal/kg)	3.20
CP (%)	16.18
Methionine (%)	0.26-0.75

¹ Supplies per kilogram of diet: vitamin A, 6,500,000 I.U. ; vitamin D₃, 2,500,000 I.U. ; dl- α -tocopherol acetate 40,000 mg ; menadion sodium bisulfite, 3,836 mg ; thiamine-HNO₃, 2,000 mg ; riboflavin, 4,500 mg ; pyridoxine-HCl, 2,000 mg ; cyanocobalamine, 10 mg ; Ca-pantothenate, 7,500 mg ; nicotinic acid, 30,000 mg ; folic acid, 1,000 mg ; d-biotin, 75 mg ; FeSO₄, 54,400 mg ; MnSO₄, 137,450 mg ; ZnSO₄, 123,450 mg ; CuSO₄, 18,840 mg ; Ca(I₃)₂, 768 mg.

² See Table 2.

Table II-2. Amino acid composition of mixtures and diets in experiment1 (%)

Amino acid	Amino acid mixture	Experimental diet
Arginine	0.43	1.37
Histidine	0.00	0.35
Lysine	0.57	1.14
Isoleucine	0.11	0.76
Leucine	0.00	1.42
Valine	0.00	0.79
Tryptophan	0.05	0.22
Phenylalanine + Tyrosine	0.00	1.29
Threonine	0.16	0.76
Glycine + Serine	0.04	1.43
Cystine	0.14	0.40
Methionine	0.00 - 0.49	0.26-0.75
Glutamic acid	0.80 - 0.31	
Total	2.30	

Table II-3. Composition of experimental diets in experiment 2 (%)

Ingredient	
Corn	62.40
Corn starch	5.03 - 5.50
Corn gluten	14.00
Soybean meal (44% CP)	8.00
Soybean oil	1.00
Vitamin mineral premix ¹	0.25
Calcium carbonate	1.20
Calcium phosphate tribasic	2.40
Choline chloride	0.25
Sodium chloride	0.30
Amino acids ²	3.35 – 3.38
Total	100.00
Metabolizable energy (Mcal/kg)	3.19
CP (%)	20.70
Arginine (%)	0.85-2.04

¹See Table 1.

²See Table 4.

TableII-4. Amino acid composition of mixtures and basal diet in experiment 2 (%)

Amino acid	Amino acid mixture	Experimental diet
Histidine	0.00	0.35
Lysine	0.85	1.20
Isoleucine	0.06	0.80
Leucine	0.00	1.35
Valine	0.00	0.82
Tryptophan	0.09	0.23
Phenylalanine + Tyrosine	0.00	1.34
Threonine	0.14	0.80
Methionine + Cystine	0.13	0.93
Arginine	0.00 - 1.20	0.85-2.04
Glutamic acid	2.11 - 0.88	
Total	3.38 - 3.35	

3. 結果

試験 1 では、増体重は飼料中の Met 含量が増加するにともない 0.50% 区まで有意に増加し ($p < 0.05$)、その後一定となった (Table. II-5)。飼料摂取量は 3 区間とも有意な差は認められなかった。飼料効率も飼料中 Met 含量 0.50% 区が 0.25% 区よりも高い値を示したが ($p < 0.05$)、0.75% 区は他の 2 区との違いがみられなかった (Table. II-5)。排泄 Crn 量は増体重と同様に飼料中 Met 含量の増加にともない有意に 0.50% 区まで増加し ($p < 0.05$)、その後一定となった (Fig. II-1)。一方で、肝臓 AGAT 活性は飼料中 Met 含量の増加にともない有意に 0.50% 区まで低下し ($P < 0.05$)、その後一定となった (Fig. II-2)。

試験 2 では、増体重は飼料中の Arg 含量が増加するにともない 1.44% 区まで有意に増加し ($p < 0.05$)、その後一定となった (Table. II-6)。飼料摂取量は 3 区間とも有意な差は認められなかった。飼料効率は飼料中 Arg 含量 1.44% 区が 0.85% 区よりも高い値を示したが ($p < 0.05$)、2.04% 区は他の 2 飼料区との違いは認められなかった (Table. II-6)。排泄 Crn 量は飼料中 Arg 含量の増加にともない 1.44% 区まで増加し ($p < 0.05$)、その後一定となった (Fig. II-3)。肝臓 AGAT 活性は飼料中 Arg 含量の増加にともない 1.44% 区まで低下し ($p < 0.05$)、その後一定となった (Fig. II-4)。

両試験において、回腸末端部の内容物中から Crn は検出されなかった。

Table II–5. Effects of dietary methionine (Met) levels on performance of broilers from 8 to 14 days of age in Experiment 2.

Met	Body weight gain		Feed intake		Feed efficiency
(%)	(g/day)				(gain : feed)
0.25	16.1 ±	6.2 ^b	48.7 ±	7.9	0.32 ± 0.10 ^b
0.50	29.0 ±	3.3 ^a	58.1 ±	4.3	0.53 ± 0.11 ^a
0.75	22.4 ±	5.6 ^a	55.5 ±	4.6	0.41 ± 0.13 ^{ab}

Values are means ± SD for 5 chicks.

^{a, b} Means in the same column with no common superscripts differ significantly ($p < 0.05$).

Table II - 6. Effects of dietary arginine (Arg) levels on performance of broilers from 8 to 14 days of age in Experiment 1.

Arg (%)	Body weight gain (g/day)		Feed intake		Feed efficiency (gain : feed)
0.85	18.0 ±	5.4 ^b	42.5 ±	2.6	0.34 ± 0.07 ^b
1.44	28.3 ±	4.8 ^a	50.3 ±	5.1	0.46 ± 0.05 ^a
2.04	26.9 ±	5.0 ^a	50.9 ±	2.7	0.44 ± 0.08 ^{ab}

Values are means ± SD for 5 chicks.

^{a, b} Means in the same column with no common superscripts differ significantly ($p < 0.05$).

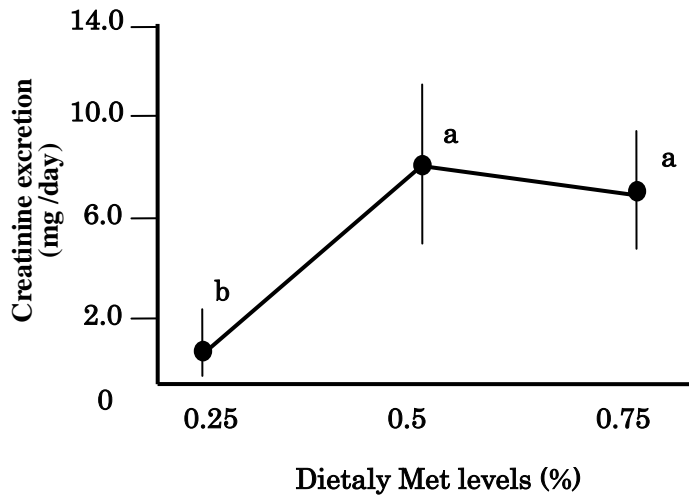


Fig. II-1. Effects of dietary methionine (Met) levels on the creatinine excretion of 12 to 14-day-old broilers (experiment 1). Values are the means \pm SD for 5 chicks. ^{a,b}Means with no common letters differ significantly ($p < 0.05$).

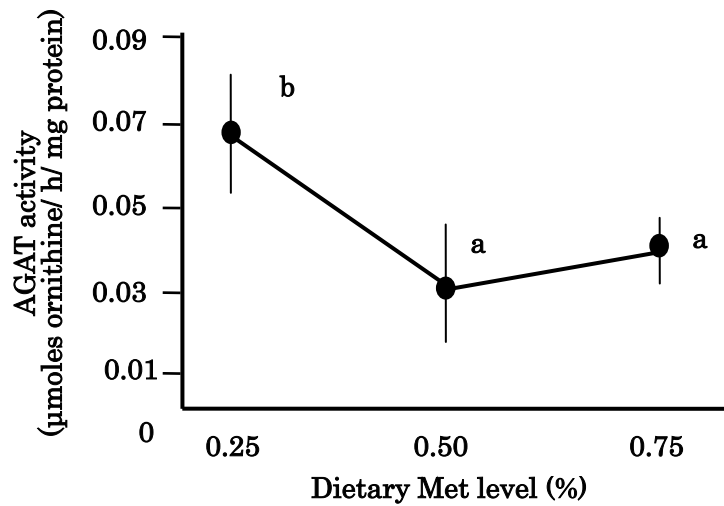


Fig. II - 2 Effects of dietary methionine (Met) levels on the hepatic L-arginine-glycine amidinotransferase (AGAT) activity of 14 day-old broilers (experiment 1). Values are means \pm SD of 5 chicks. ^{a,b}Means with no common letters differ significantly ($p < 0.05$).

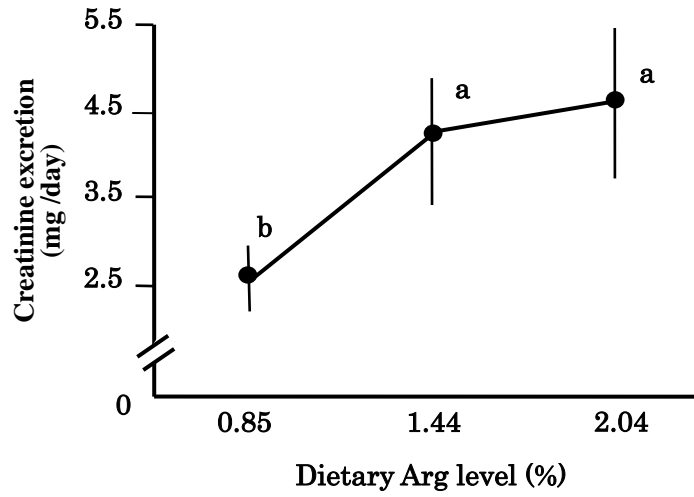


Fig. II-3 Effects of dietary arginine (Arg) levels on the urinary creatinine excretion 12 to 14-day-old broilers (experiment 2). Values are means \pm SD of 5 chicks. ^{a,b}Means with no common letters differ significantly ($p < 0.05$).

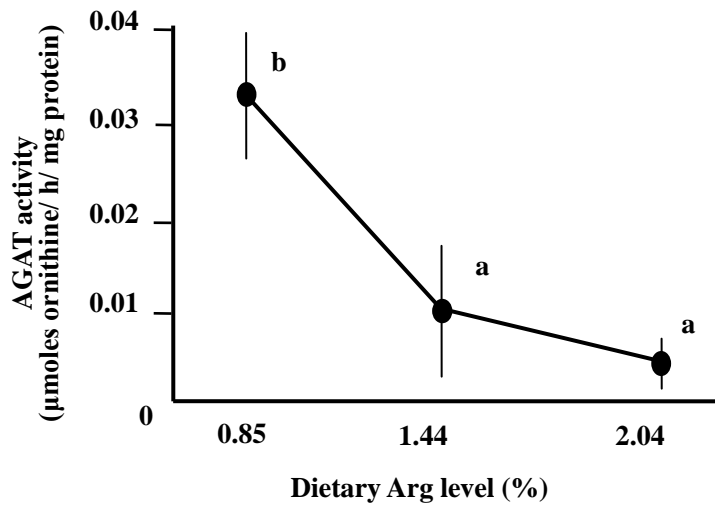


Fig. II-4. Effects of dietary arginine (Arg) levels on chick hepatic L-arginine-glycine amidinotransferase (AGAT) activities of 14-day-old broilers (experiment 2). Values are means \pm SD of 5 chicks. ^{a,b}Means with no common letters differ significantly ($p < 0.05$).

4. 考察

排泄 Crn 量が蛋白質・アミノ酸の栄養状態を反映する指標となるか検討するために、Cr の合成材料である Met および Arg の飼料中含量に対し排泄 Crn 量の変動を確認した。

両試験において、排泄 Crn 量は飼料中の Crn 前駆体が要求量に対し不足から至適にかけて増加し ($p<0.05$)、その後一定となった。一方で、肝臓 AGAT 活性は飼料中の Crn 前駆体が要求量に対し不足から至適にかけて減少し ($p<0.05$)、その後一定となり、排泄 Crn 量とは逆の反応を示した。

両試験とも回腸末端部の内容物から Crn は検出されなかった。このことから、排泄物中の Crn 量は主に尿由来のものであると推察された。しかしながら、一方で総排泄腔からの盲腸への逆流の現象が報告されており (Karasawa と Maeda, 1994)、今回の分析結果からは、逆流による盲腸内の腸内細菌の Crn 量への影響については分からなかった。

Chamruspollert ら (2002b) はブロイラーヒナにおいて飼料中 Arg 含量が筋肉中の Cr 濃度に影響を及ぼすことを報告した。Cr は非酵素的に Crn に転換され、腎臓内で再吸収されることなく尿中へ排泄される (Wyss と Kaddurah-daouk, 2000 ; Brosnan, 2011)。従って、尿中の Crn 量が Cr 合成量を反映しうると考えられた。

飼料中の Met あるいは Arg が要求量に対し不足の区では、Met あるいは Arg が Cr 合成において制限アミノ酸となっていると考えられる。そのため Cr の必要量を賄うために AGAT 活性は高い値を示したが、Cr 合成材料のうちの一つのアミノ酸が不足しているために Cr 合成量は少なく (Chamruspollert ら, 2002b)、その結果排泄 Crn 量も低い値を示したものと推察された。

飼料中 Met0.50%区あるいは Arg1.44%区はブロイラーのそれぞれの要求量に

対し至適状態であるため、AGAT 活性は不足のそれぞれの区に対し低い値を示し、一方で Cr 合成材料のアミノ酸の供給が満たされているため Cr 合成量は飼料中の Met あるいは Arg 含量の増加にともない増加し、結果排泄 Crn 量も増加したと考えられた。

飼料中 Met0.75%区あるいは Arg2.04%区では、その他の前駆アミノ酸が Cr 合成の制限因子となり、Cr 合成量は飼料中の Met または Arg 含量の増加にともなう変化が見られず、結果 AGAT 活性も排泄 Crn 量も至適と差がみられなかったと考えられた。過剰な Met 由来のメチル基や Arg は別経路で代謝されたと推察された (Bertolo と McBreairty, 2013)。

以上の試験より排泄 Crn は飼料中の Met あるいは Arg 含量の変化に伴い、用量依存的に変化することが示され、アミノ酸栄養状態を反映する指標になりうることを示された。

第2節 飼料中蛋白質含量がブロイラーヒナの排泄クレアチニン量におよぼす影響

1. 緒言

排泄 Crm 量が飼料中の前駆体である Met や Arg 量に対し容量依存的な反応を示すか証明しようとした II 章 1 節では、排泄 Crm 量は飼料中の Met や Arg に対し容量依存的な反応を示し、飼料中の Cr 前駆体のアミノ酸の過不足を反映する指標となりうる可能性が示された。

栄養要求量で最初に求められるべきはエネルギー要求量であり、次にエネルギー源ともなり体を構成する主な成分となる蛋白質要求量であることは、各動物の飼養標準からも明らかである（日本飼養標準・豚，2005；日本飼養標準・家禽，2011）。とりわけ蛋白質はポストゲノムの中核をなす分子栄養の要となる栄養素であり、他の栄養素に比べ重要性が高い。そのため、エネルギー要求量の次には蛋白質要求量が求められる。またエネルギー源となる 3 大栄養素のバランスが悪いと、蛋白質から糖新生が行われ、糖が脂肪に変換されるなど代謝調節が行われる。このときの代謝において補酵素として働くビタミン要求量が影響を受ける。そのためエネルギーと蛋白質の比率は重要であり、簡便な栄養管理の為のモニタリング項目として最も重要である。

蛋白質は 20 種類のアミノ酸から構成されるが、これらのアミノ酸は体蛋白質の合成材料となるだけでなく様々な生体物質の前駆体となり、またそれ自体がホルモンのような働きをするアミノ酸もある。またアミノ酸によって生命維持に使われる割合と体蛋白質合成に使われる割合が異なるため、低蛋白質の際にはそれぞれのアミノ酸の利用性が変化する。

Cr の前駆体である Met は、飼料原料によって第一、第二制限アミノ酸になりやすく、システインやグルタチオン、ポリアミン、タウリンなどの合成材料と

なる他、葉酸生成や DNA、蛋白質のメチル化反応の際のメチル基供与体としても働く、生命活動の根幹に関わるアミノ酸であるため、蛋白質量が変動しても Met 要求量はあまり変化しない (Tesseraud ら, 2009; Bertolo と Mcbreairty, 2013)。一方でその他のアミノ酸は蛋白質量の変動に対して利用される量が変化するため、蛋白質量の変化によって Met とその他のアミノ酸の相対的なバランスが変わると思われ、Met に対し容量依存的に変化する排泄 Crn 量の反応から、飼料中蛋白質含量の過不足も評価が可能であると考えられる。

低蛋白質時には Met が他のアミノ酸に対して相対的に不足状態であるため、Cr 合成および Crn 排泄量は低くなり、逆に高蛋白質時には Met が過剰となるため、Cr 合成量および Crn 排泄量が増加すると推察され、Fig.II - 5 のような飼料中の蛋白質含量に対し用量依存的な反応が観察されると予測される。

そこで本節では、飼料中の蛋白質含量に対しても排泄 Crn 量が用量依存的な反応を示すか検討した。

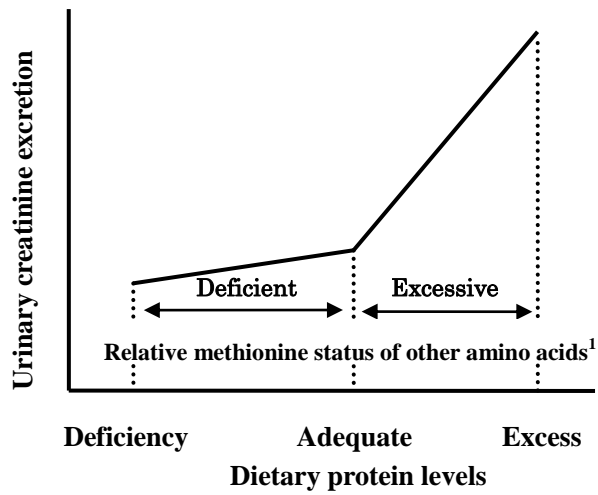


Fig. II-5. Predictive dose response of urinary creatinine excretion to dietary protein levels. ¹The model is predicted by hypothesis based on that methionine differ from other amino acids in the using role for maintenance and production of animal body.

2. 材料と方法

1) 動物

試験 3 および 4 とともに 8 日齢のチャンキー系ブロイラーヒナ雄を用い、試験 3 では 15 羽、試験 4 では 20 羽供試した。温度 37.8°C、相対湿度 60% 以上で孵卵させたニワトリヒナを 7 日齢までブロイラー餌付用市販飼料（ジョイスター クランブル、日本農産、ME : 3.2Mkcal/kg, CP : 23%）を給与し飼養した。8 日齢に体重測定を行い平均体重が等しくなるように、試験 3 では飼料中蛋白質含量が 17%、20%、23% の 3 飼料区、試験 4 では飼料中 Arg 含量および Met 含量をそれぞれ 2 段階設定し組み合わせた 4 飼料区にそれぞれ 5 羽ずつ分け、試験飼料を与え自由摂取、自由飲水させた。試験期間を 7 日間とし、試験開始および終了時に体重を測定した。11 日齢にヒナを一羽ずつ代謝ケージ (30cm x 50cm x 25cm) に入れ、1 日に 2 回排泄物を全量採取し、3% スルホサリチル酸水溶液中にて 3 日分をプールし、Crm 分析の試料とした。試験期間中の気温は 25°C ± 2、照明時間は 14 時間で行った。試験終了時に頸椎脱臼にて安楽死させたのち、肝臓を採取し AGAT 活性測定に供した。

動物の管理およびと殺は「日本獣医生命科学大学動物実験規定」のもと承認を得て行った (28s-25)。

2) 試験飼料

試験 1 および 2 とともに、トウモロコシ・大豆粕中心の飼料を用いた。試験 1 では蛋白質含量が飼養標準の示す要求量に対し不足の 17% 区、至適の 20% 区もしくは過剰の 23% 区の 3 飼料区 (ME : 3.2Mcal/kg) を設定した (Table.II - 7; Table.II - 8)。試験 2 では Arg 含量が飼養標準の示す要求量に対し至適の 1.21% もしくは過剰の 2.66% の 2 段階、Met 含量が飼養標準の示す要求量に対し不足の 0.32% もしくは至適の 0.46% の 2 段階をそれぞれ組み合わせ 4 種類の試験飼

料区 (ME : 3.2Mcal/kg, CP : 20.7%) を設定した (Table.II - 9; Table.II - 10)。飼料中の Met あるいは Arg 以外のアミノ酸は日本飼養標準 (2011) の要求量に合うように結晶アミノ酸粉末を添加した。試験 4 で補正 Met あるいは Arg 含量を変動させた際、相補的にグルタミン酸の添加量を変動させた。

3) Crn 分析

回収した排泄物は 3 日分をプールし、3%スルホサリチル酸水溶液中でホモゲナイズを行った。3,000rpm, 10 分で遠心分離したのち、得た上清について Crn アッセイキット (Cayman Chemical Company, Michigan, USA) を用い、アルカリ・ピクリン酸法にて分析を行った。

4) Arg・グリシンアミジノトランスフェラーゼ活性測定

AGAT 活性は Van Pilsum ら (1970) の方法を参考に測定した。試験 2 で採取したニワトリヒナの肝臓サンプルはホモゲナイズしたのち 1%になるように希釈し、Arg・グリシン基質溶液と Arg 基質溶液にそれぞれ分注し、37°Cで 1 時間インキュベートしたのち 0.6N 塩素酸溶液にて酵素の反応を止め、ニンヒドリン色試薬で反応させ 500nm で測定した。活性は $\mu\text{mol ornithine/h / mg protein}$ で示した。

5) 統計処理

得られた結果は、試験 3 は一元配置、試験 4 は二元配置の分散分析を行った。有意性の判定は危険率 5%で行った。

Table II-7. Composition of basal diets in experiment 3 (%).

Ingredient	17%	20%	23%
Corn	54.50	42.50	30.50
Corn starch	11.00	13.00	15.00
Soybean meal (44% CP)	26.36	35.68	45.00
Soybean oil	3.00	4.18	5.36
Vitamin mineral premix ¹	0.35	0.35	0.35
Calcium carbonate	1.04	1.04	1.04
Calcium phosphate tribasic	1.90	1.90	1.90
Choline chloride	0.05	0.05	0.05
Sodium chloride	0.30	0.30	0.30
Amino acids ²	0.41	0.26	0.11
Glutamic acid	0.09	0.24	0.39
Cellose	1.00	0.50	0.00
Total	100.00	100.00	100.00
ME (Mcal/kg)	3.1	3.1	3.1
CP (%)	17.0	19.9	22.9

¹Supplies per kilogram of diet: vitamin A, 6,500,000 I.U. ; vitamin D₃, 2,500,000 I.U. ; dl- α -tocopherol acetate 40,000 mg ; menadion sodium bisulfite, 3,836 mg ; thiamine-HNO₃, 2,000 mg ; riboflavin, 4,500 mg ; pyridoxine-HCl, 2,000 mg ; cyanocobalamine, 10 mg ; Ca-pantothenate, 7,500 mg ; nicotinic acid, 30,000 mg ; folic acid, 1,000 mg ; d-biotin, 75 mg ; FeSO₄, 54,400 mg ; MnSO₄, 137,450 mg ; ZnSO₄, 123,450 mg ; CuSO₄, 18,840 mg ; Ca(I₃)₂, 768 mg.

²See Table 2.

Table II-8. Amino acid composition of mixtures and basal diet in experiment 3 (%).

Amino acid	17%	20%	23%
Arginine	0.087	0.058	0.028
Lysine	0.146	0.146	-
Methionine + Cystine	0.176	0.130	0.084
Total	0.409	0.334	0.112

Table II-9. Composition of basal diets in experiment 4 (%)

Ingredient	
Corn	60.10
Soybean meal (44% CP)	30.50
Soybean oil	4.00
Vitamin mineral premix ¹	0.40
Calcium carbonate	1.00
Calcium phosphate tribasic	1.90
Choline chloride	0.10
Sodium chloride	0.30
Amino acids ²	0.21
Arginine	0.00-1.45
Methionine	0.00-0.14
Glutamic acid	1.59-0.00
total	100.10
Metabolizable energy (Mcal/kg)	3.1
CP (%)	20.1

¹Supplies per kilogram of diet: vitamin A, 6,500,000 I.U. ; vitamin D₃, 2,500,000 I.U. ; dl- α -tocopherol acetate 40,000 mg ; menadion sodium bisulfite, 3,836 mg ; thiamine-HNO₃, 2,000 mg ; riboflavin, 4,500 mg ; pyridoxine-HCl, 2,000 mg ; cyanocobalamine, 10 mg ; Ca-pantothenate, 7,500 mg ; nicotinic acid, 30,000 mg ; folic acid, 1,000 mg ; d-biotin, 75 mg ; FeSO₄, 54,400 mg ; MnSO₄, 137,450 mg ; ZnSO₄, 123,450 mg ; CuSO₄, 18,840 mg ; Ca(I₃)₂, 768 mg.

²See Table 4.

Table II-10. Amino acid composition of mixtures
and basal diet in experiment 2 (%)

Amino acid	
Lysine	0.20
Threonine	0.01
Total	0.21

3. 結果

試験 3 では、増体重は飼料中蛋白質含量が増加するにともない、17%区から20%区まで有意に増加し ($p<0.05$)、その後 23%区まで一定となった (Table.II-11)。飼料摂取量は飼料中蛋白質含量 17%区において他の 2 区、20%区および 23%の区よりも有意に低い値を示した ($p<0.05$; Table.II-11)。飼料効率は 17%区において他の 2 区よりも低い値を示した。排泄 Crn は飼料中蛋白質含量が 23%の区において高い値を示したが ($p<0.05$; Fig.II-6)、蛋白質摂取量当たりの排泄 Crn 量は、飼料中蛋白質含量が増加するに伴い 17%区から 20%区まで減少し、その後 23%区において増加に転じた ($p<0.05$; Fig.II-7)。肝臓 AGAT 活性も同様の反応を示した ($p<0.05$; Fig.II-8)。

試験 4 で得られた結果を Table.II - 12 および Fig.II - 9, II-10 に示した。増体重は Arg と Met の間で交互作用は認められなかったが、飼料中 Arg 含量が至適の区において過剰の区よりも有意に高い値を示し ($p<0.05$)、飼料中 Met 含量が至適の区において不足の区よりも有意に高い値を示した ($p<0.05$; Table.II-12)。飼料摂取量は 4 区とも有意な違いが認められなかったが、飼料効率は交互作用が認められ、Met 不足の 0.32%の 2 区において、Arg が過剰の区が至適の区よりも有意に低い値を示した ($p<0.05$; Table.II-12)。排泄 Crn 量は Arg と Met の間で交互作用がみられ、飼料中 Arg 含量が過剰の 2.66%で Met 含量が不足の 0.32%の区において特異的に高い値を示した ($p<0.05$; Fig.II-9)。肝臓 AGAT 活性は Met 含量に関わらず、Arg 含量が 2.66%の過剰の 2 区において Arg 含量 1.21%の至適の区に対し低い値を示した ($p<0.05$; Fig.II-10)。

Table II-11. Effects of dietary protein levels on performance of 8 to 14 day-old broilers in Experiment 3.

CP	Body weight gain		Feed intake		Feed efficiency	
(%)	(g/day)				(gain : feed)	
17	13.1 ± 2.1	^b	32.3 ± 3.2	^b	0.41 ± 0.06	^b
20	28.6 ± 3.8	^a	45.8 ± 4.8	^a	0.63 ± 0.11	^a
23	23.0 ± 4.2	^a	48.7 ± 6.7	^a	0.47 ± 0.07	^b

Values are means ± SD for 5 chicks.

^{a, b} means in the same column with no common superscripts differ significantly ($p < 0.05$).

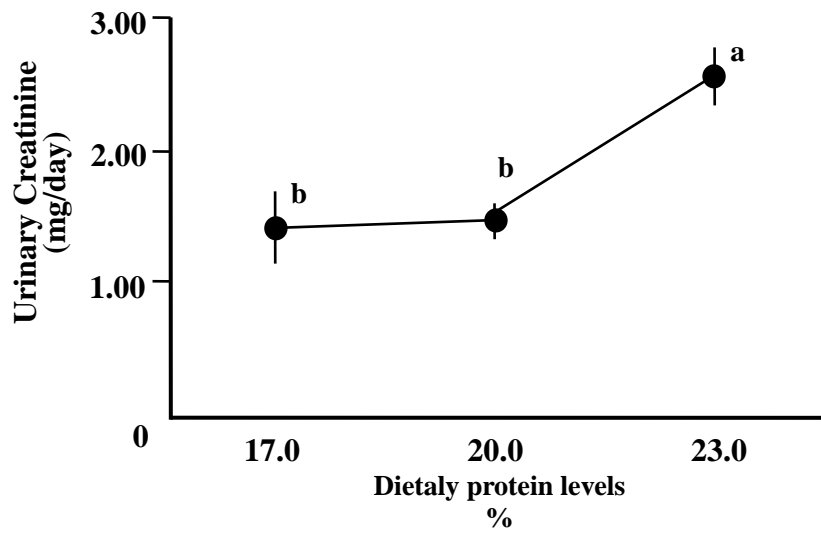


Fig.II - 6. Effects of dietary protein levels on the creatinine excretion of 12 to 14-day-old broilers (experiment 3). Values are means \pm SD for 5 chicks. ^{a, b} means with no common letters differ significantly ($p < 0.05$).

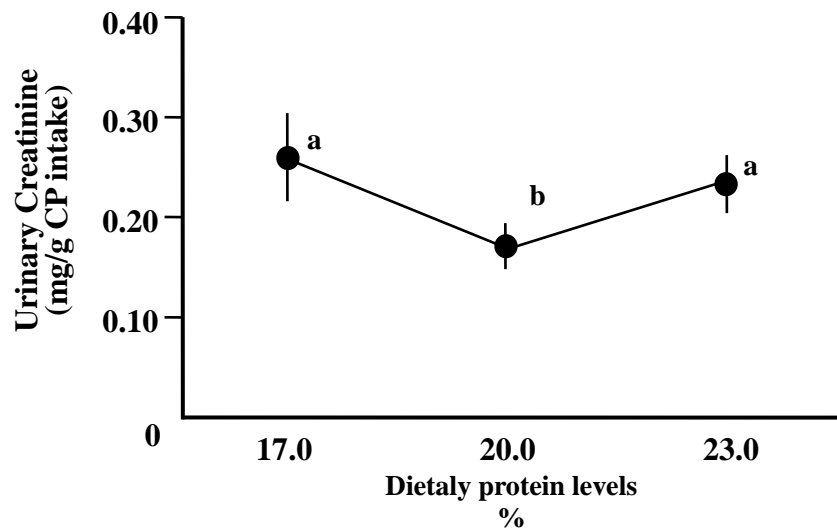


Fig. II-7. Effects of dietary protein levels on the creatinine excretion per protein intake of 12 to 14-day-old broilers (experiment 3). Values are means \pm SD for 5 chicks. ^{a, b} means with no common letters differ significantly ($p < 0.05$).

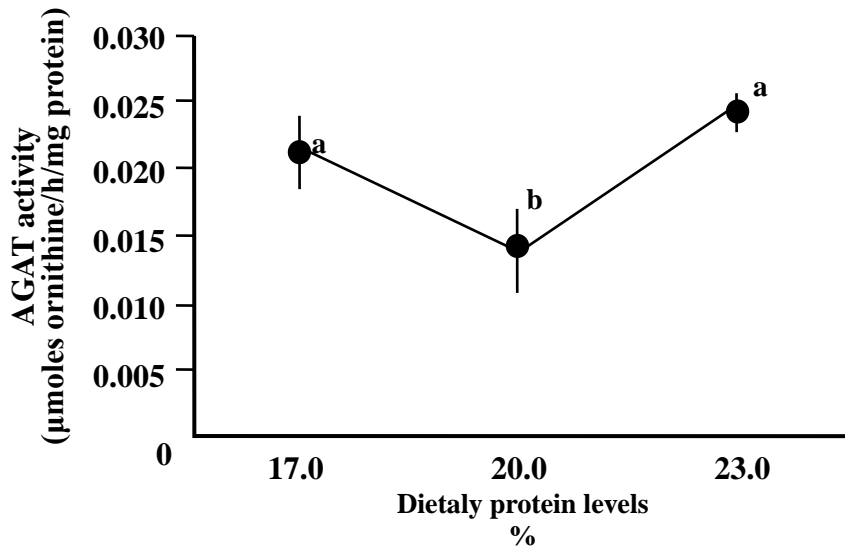


Fig.II- 8. Effects of dietary protein levels on the hepatic L-arginine-glycine amidinotransferase (AGAT) activity of 14 day-old broilers (experiment 3). Values are means \pm SD for 5 chicks. ^{a, b} means with no common letters differ significantly ($p < 0.05$).

Table II-12. Effects of dietary arginine (Arg) levels on performance of 8 to 14 day-old broilers in Experiment 4.

Arg	Met	Body weight gain	Feed intake	Feed efficiency
(%)		(g/day)		(gain : feed)
1.21	0.32	22.1 ± 0.8	40.3 ± 1.6	0.55 ± 0.01 ^b
1.21	0.46	31.4 ± 1.6	44.1 ± 1.7	0.71 ± 0.01 ^a
2.66	0.32	20.1 ± 2.3	43.3 ± 2.3	0.46 ± 0.04 ^c
2.66	0.46	27.0 ± 0.8	41.7 ± 1.3	0.65 ± 0.03 ^a
Arg		0.05	Ns	0.05
Met		0.05	Ns	0.05
Arg x Met		Ns	Ns	0.05

Values are means ± SE for 5 chicks.

^{a, b, c} means in the same column with no common superscripts differ significantly ($p < 0.05$).

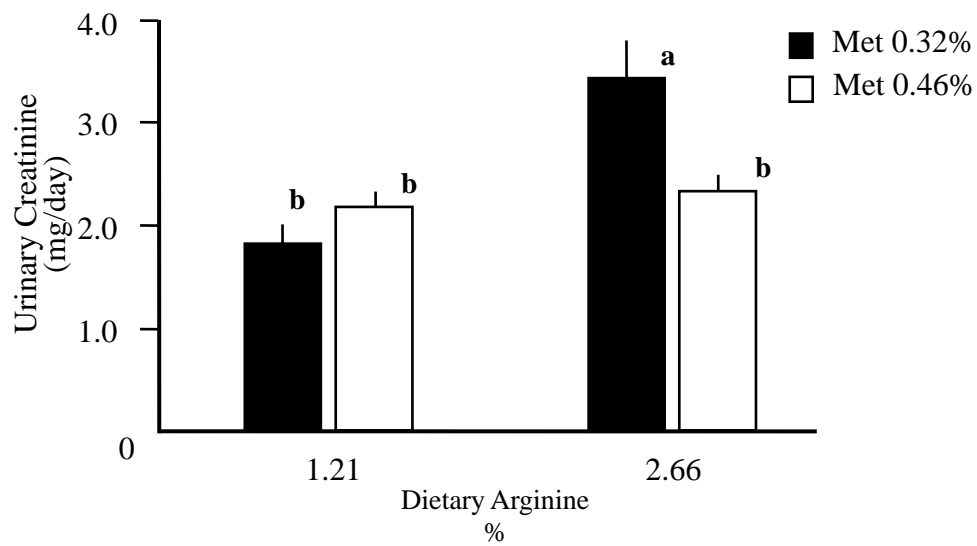


Fig. II-9. Effects of dietary arginine (Arg) and methionine (Met) levels on the creatinine excretion of 12 to 14-day-old broilers (experiment 4). Values are means \pm SE for 5 chicks. *a,b,c* means with no common letters differ significantly ($p < 0.05$).

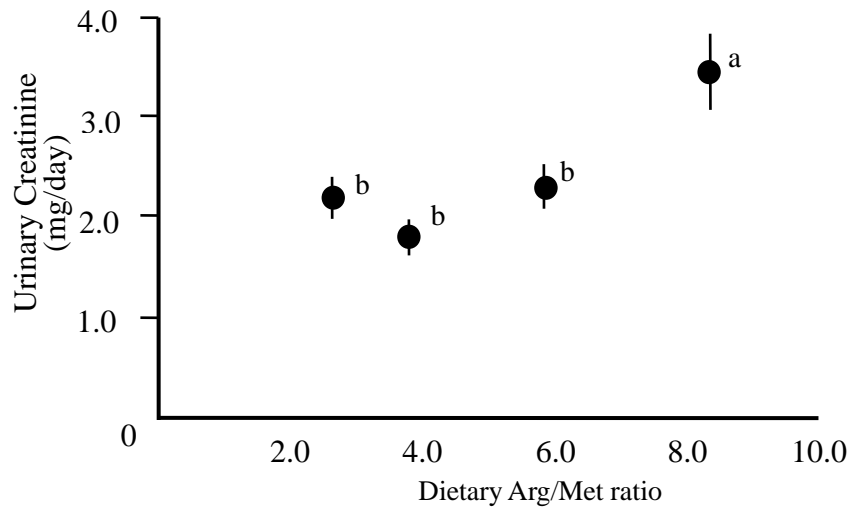


Fig. II-10. Effects of dietary arginine (Arg): methionine (Met) ratio levels on the creatinine excretion of 12 to 14-day-old broilers (experiment 4). Values are means \pm SE for 5 chicks. a, b means with no common letters differ significantly ($p < 0.05$).

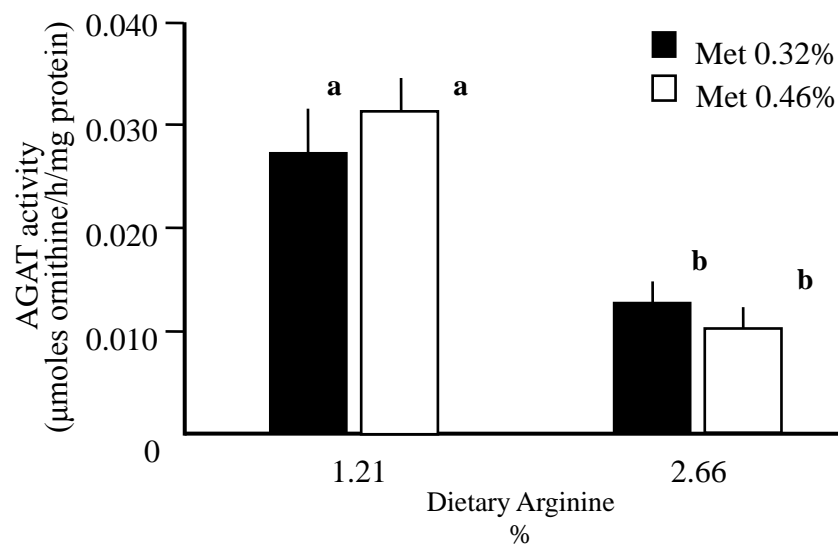


Fig. II-11. Effects of dietary arginine (Arg) and methionine (Met) levels on the hepatic L-arginine-glycine amidinotransferase (AGAT) activity of 14 day-old broilers (experiment 4). Values are means \pm SE of 5 chicks. ^{a,b} means with no common letters differ significantly ($p < 0.05$).

4. 考察

Cr の前駆体である Met は生命活動の根幹に関わるアミノ酸であるため、蛋白質量が変動しても Met 要求量はあまり変化しない (Tesseraud ら, 2009; Bertolo と Mcbreairty, 2013)。一方でその他のアミノ酸は蛋白質量の変動に対して利用される量が増えるため、蛋白質量の変化によって Met とその他のアミノ酸の相対的なバランスが変わると思われ、Met に対し容量依存的に変化する排泄 Crn 量の反応から、飼料中蛋白質含量の過不足も評価が可能であると考えられる。

低蛋白質時には Met が他のアミノ酸に対して相対的に不足状態であるため、Cr 合成および Crn 排泄量は低くなり、逆に高蛋白質時には Met が過剰となるため、Cr 合成量および Crn 排泄量が増加すると推察され、Fig.II-5 のような飼料中の蛋白質含量に対し容量依存的な反応が観察されると予測される。そこで飼料中の蛋白質含量に対しても排泄 Crn 量が用量依存的な反応を示すか検討した。

試験 3 では、排泄 Crn 量は飼料中蛋白質含量が 23% 区において増加した ($p < 0.05$; Fig.II-6)。この結果は予測された排泄 Crn 量の反応と一致した。しかし、蛋白質摂取量当たりの排泄 Crn 量は飼料中蛋白質含量が増加するにともない 17% から 20% の区まで低下し、その後 23% の区で増加に転じ ($p < 0.05$; Fig.II-7)、肝臓 AGAT 活性も同様の变化を示した ($p < 0.05$; Fig.II-8)。

蛋白質含量が 23% の区は蛋白質要求量に対し過剰であり、過剰な蛋白質のうち Cr 合成の基質となるアミノ酸の過剰分を処理するために Cr 合成が促進され、肝臓 AGAT 活性および Crn 排泄量が高い値を示したと推察された。

飼料中蛋白質含量が 20% の区は、蛋白質要求量に対し至適であるため、蛋白質代謝の合成と分解が平衡状態となり、そのため Cr 合成も過不足なく効率よく行われ、他の 2 区、17% 区および 23% 区と比べて肝臓 AGAT 活性、排泄 Crn 量ともに低い値を示したと推察された。

飼料中蛋白質含量が 17% 区は、蛋白質含量に対し不足の状態である。この区は飼料摂取量が他の 2 区、20% 区および 23% 区よりも低く、蛋白質摂取量も少ないにもかかわらず、至適である 20% 区と比較して蛋白質摂取量当たりの排泄 Crn 量が高い値を示した。また、肝臓 AGAT 活性も同様に 20% 区よりも高い値を示した。このことから、低蛋白質状態の時に排泄 Crn 量を増加させる何らかの要因があることが推察された。Cr の前駆体である Met は、システインやグルタチオン、ポリアミン、タウリンなどの合成材料となる他、葉酸生成や DNA、蛋白質のメチル化反応の際のメチル基供与体としても働く、生命活動の根幹に関わるアミノ酸である。そのため蛋白質合成の際の第一制限アミノ酸となりやすく、他のアミノ酸は蛋白質合成に有効に使われることなく Met に対し相対的に過剰状態となると推察された。このことから Cr の基質の一つである Met とその他のアミノ酸の利用性の違いが、蛋白質摂取量に対する排泄 Crn 量が至適区よりも高い値を示した要因なのではないかと考えられた。

Keshavarz と Fuller (1971a, b) および Chamrupollert ら (2002b) は Arg 過剰飼料におけるブロイラーヒナの成長低下と筋中 Cr 量の増加が、Met 添加によって緩和されることを報告し、過剰な Arg を処理するために Cr 合成系が促進され、その結果 Met 不足を引き起こし、Met 添加によってこの現象が緩和されたと考察した。本章 1 節にて、ブロイラーヒナを用いて Arg の dose response 試験を行った際、Arg 過剰の 2.04% 区において至適の 1.44% 区と比較して、排泄 Crn 量が増加する現象は見られず変化は見られなかった。そのため、Arg 過剰による Cr 合成の増加という現象は、Met が要求量よりも不足している場合、あるいは Arg と Met の比率が一定以上の場合に引き起こされるのではないかと推察された。

そこで試験 4 では飼料中の Arg が過剰で、Met が不足の時に排泄 Crn 量が増加するか検討を行った。飼料中 Arg 含量を至適の 1.21% と過剰の 2.66% の 2 段

階, Met 含量を不足の 0.31%と至適の 0.46%の 2 段階に設定した要因解析試験を行った。その結果, 排泄 Crn 量は Arg 過剰である 2.66%で Met 不足である 0.32%の区において特異的に高い値を示した (Fig. II-9)。この反応を Arg : Met 比で見ると, 2.63 から 5.78 にかけて排泄 Crn 量が一定で, 8.36 の際に排泄 Crn 量が増加した (Fig. II-10)。このことから, Arg 過剰時に排泄 Crn 量が増加する減少は Met が不足時, Arg : Met 比が一定以上の場合に起こることが推察された。この現象は Chamruspollert ら (2002a, b) が報告した飼料中の Arg 過剰時の筋中 Cr 量の増加と一致し, Cr 合成の段階でこの現象が引き起こされていると推察された。試験 3 における, 蛋白質摂取量あたりの排泄 Crn 量が蛋白質要求量に対し不足の 17%区が至適の 20%区よりも高い値を示したことは, 低蛋白質状態により Met と Arg の利用性が変化したことにより, Arg が Met に対し相対的に過剰状態になり Cr 合成が促進され, その結果排泄 Crn 量も増加したためと考えられた。

試験 3 において, 低蛋白質区の肝臓 AGAT 活性は至適区と比べて高い値を示したのに対し, 試験 4 では Arg 過剰区は Met 含量に関わらず低い値を示した。Cr は主に骨格筋や心筋において Cr リン酸の形で ADP へのリン酸供与体として働く (Wyss と Kaddurah-daouk, 2000)。すなわち, Cr は骨格筋中のエネルギー代謝に関与している生体物質である。試験 3 における蛋白質含量 17%区は蛋白質が不足状態であり, 蛋白質の合成と分解のバランスが崩れた状態になっていると推察された。そのため Arg だけでなくその他のアミノ酸も蛋白質合成に有効に使われずに分解されていると考えられる。筋肉中の蛋白質代謝にエネルギーが消費されるとすると, エネルギー代謝に関与している Cr も消費される

(Clark ら, 2014)。その結果 Cr 合成の要求が増加したことで AGAT 活性が促進されたと推察され, 両試験における AGAT 活性の違いは, 飼料中蛋白質含量

によると考えられた。一方で、試験 4 では飼料中の蛋白質含量は至適であるため、Arg と Met のみバランスが崩れた状態であると推察された。そのため低蛋白質時のような Cr 消費は促進されず、ラットの (Da Silva ら, 2014) に見られるような合成物質によるフィードバック現象か、あるいは AGAT のもう一つの基質であるグリシンが制限因子となり AGAT 活性を下げる要因となったのではないかと推察された。

以上の試験より、排泄 Crm 量は飼料中の蛋白質含量の変化に対し至適を境に反応が変化し、蛋白質の変動により起きるアミノ酸の利用性と代謝の変化を反映していることが示され、アミノ酸および蛋白質の栄養状態を評価する指標になりうると考えられた。

ヨーロッパコノハズク (*Otus scops*) における飼料中メチオニンおよび蛋白質が 排泄クレアチニン量に及ぼす影響

1. 緒言

排泄 Crn が実験動物であるブロイラーにおいてアミノ酸や蛋白質栄養状態を評価する指標となりうるか確認した II 章では、排泄 Crn 量は飼料中の Cr の前駆体であるアミノ酸や蛋白質含量に対し容量依存的な反応を示し、指標となることが示された。

肉食性動物は動物性の栄養素について高い代謝能力を持つが、同時に植物性の栄養素からの必須栄養素の合成能力は損失している。尿中の最終代謝産物の一つであるタウリンはアミノ酸要求量推定の指標として有用であるが、肉食性の動物では用いることができない (Rogers と Morris, 1982 ; Legrand-Defretin, 1994)。動物組織に多量に含まれるタウリンやビタミン A などは雑食性や草食性の動物では合成能力が認められるが、肉食性動物は動物性の栄養素に依存するため過剰摂取の問題から合成能力が低いと考えられている (木崎, 2008)。

そこで本章では排泄 Crn 量が食性に関わらず用いることができる指標となるか確認するために、雑食性のブロイラーで見られた飼料中のアミノ酸や蛋白質含量に対する排泄 Crn の反応が、動物性の栄養素の合成能力が低い肉食性鳥類においても再現性が見られるか確認を行った。肉食性鳥類のうち比較的運動量の少なく、また排泄物の回収が容易なフクロウ類の実験への利用を考え、その中でも小型のヨーロッパコノハズク (*Otus scops*) を対象とした。また、予備試験として肉食性鳥類のための摂取組成がコントロール可能な飼料の開発を行った (Fig.III-1)。この試験試料を用いて、コノハズクにおける飼料 Met および蛋白質含量に対し排泄 Crn 量が容量依存的な反応を示すか確認した。

2. 材料と方法

1) 動物

成鳥のヨーロッパコノハズク (*Otus scops*) を4羽 (雌4羽, 101 ± 3.5 g) 供試した。試験期間中の気温は $25 \pm 1^\circ\text{C}$, 照明時間は12時間で行った。動物の管理は「日本獣医生命科学大学動物実験規定」のもと, 承認を得て行った (13-82)。

2) 試験飼料

試験飼料は, 飼料用として市販されている冷凍の生後2日以内のマウス (*Mus musculus*; 1.67 ± 0.22 g, GE: 4.87kcal/g, CP: 64.2%) をアウルルーム (東京都) および猛禽プロショップテイクオフ (福岡県) を通して月夜野ファーム (群馬県) より購入した。重量を測定して選別し, 解凍したのち試験飼料として用いた。試験5では, II章試験1で設定したブロイラーの試験飼料中の Met 含量の変動幅をもとに, 飼料中 Met 含量が 0.22%, 0.35%, 0.60% もしくは 0.72% になるように結晶アミノ酸粉末を配合した (Table. III-1)。試験6では, II章試験3で設定したブロイラーの試験飼料中の蛋白質含量の変動幅をもとに, 飼料中カロリー・タンパク質比が 0.113, 0.125, 0.135, 0.150 になるようにカゼインとラードを配合した。配合した結晶アミノ酸粉末および, カゼインとラードは日本薬局方空カプセル#5の中に入れ, マウスの体内に挿入したものを飼料として用いた (Fig.III-1)。

3) 試験デザイン

実験はラテン方格法に基づき行った。4羽を飼料中 Met 含量もしくはカロリー・タンパク質比が4水準の飼料区に割り当て, 4期間試験を行った (Fig.III-2; III-3)。試験期間は4日間試験飼料を給与し, このうちの最終1日間は代謝ケージ内で排泄物を全量採取し, 3%スルホサリチル酸水溶液中にて保存した

(Fig.III-4)。

4) Crn 分析

回収した排泄物は3日分をプールし、3%スルホサリチル酸水溶液中でホモゲナイズを行った。3,000rpmで遠心分離し、得た上清についてCrnアッセイキット (Cayman Chemical Company, Michigan, USA) を用い、アルカリ・ピクリン酸法にて分析を行った。

6) 統計処理

得られた結果についてはラテン方格法の計算方法に基づき、飼料中Met含量×個体×試験期の三元配置分散分析を行った。有意性の判定は危険率5%で行った。試験5においてMet要求量の推定は、ブロイラーにおける飼料中Met含量に対する増体重のDose responseを評価した太田ら(1996)に基づき、Toyomizura(1988)の式

$$Y = (A - BX) (1 - e^{-C(X+D)})$$

$$Y = \text{Crn 排泄量 (mg/日)}$$

$$X = \text{飼料中 Met 含量 (\%) あるいは Met 摂取量 (mg/日)}$$

を用い、最小二乗法により回帰を行い最高値の95~100%が得られる量をMet要求量と推定した。

試験飼料の作成方法



コノハズクの代謝試験で用いた試験飼料。
生後 2 日以内のマウスにアミノ酸粉末入り
カプセルを挿入したもの。



①マウスの喉部分にハサミで切れ目を入れる。



②ハサミを閉じた状態で入れ、体と皮膚を分離させるよう
にハサミを広げる。



③下腹の方までハサミを進めたら、ピンセット
でカプセルを体と皮膚の間に挿入する。

※このとき切り口の皮膚を巻き込むと突っ張
りうまく挿入できないので注意する。



④カプセルが出てきてしまわない
ように奥まで挿入する。

Fig. III-1. 試験 5 および 6 における試験飼料の作成方法. 上記の飼料を摂取組成
がコントロール可能な飼料として用いた.

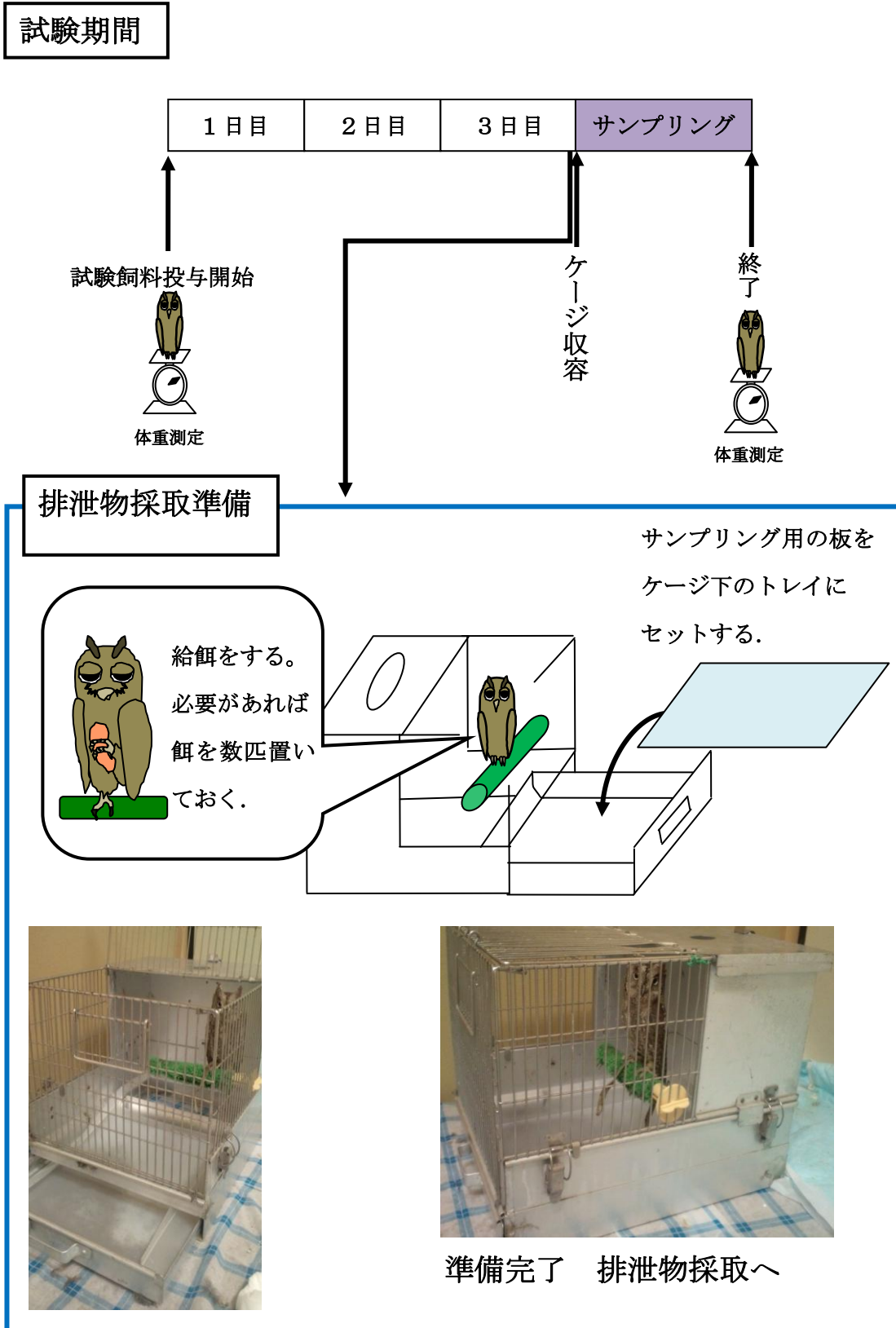


Fig. III-2. 試験 5 および試験 6 における試験スケジュールとサンプリング準備手

III百

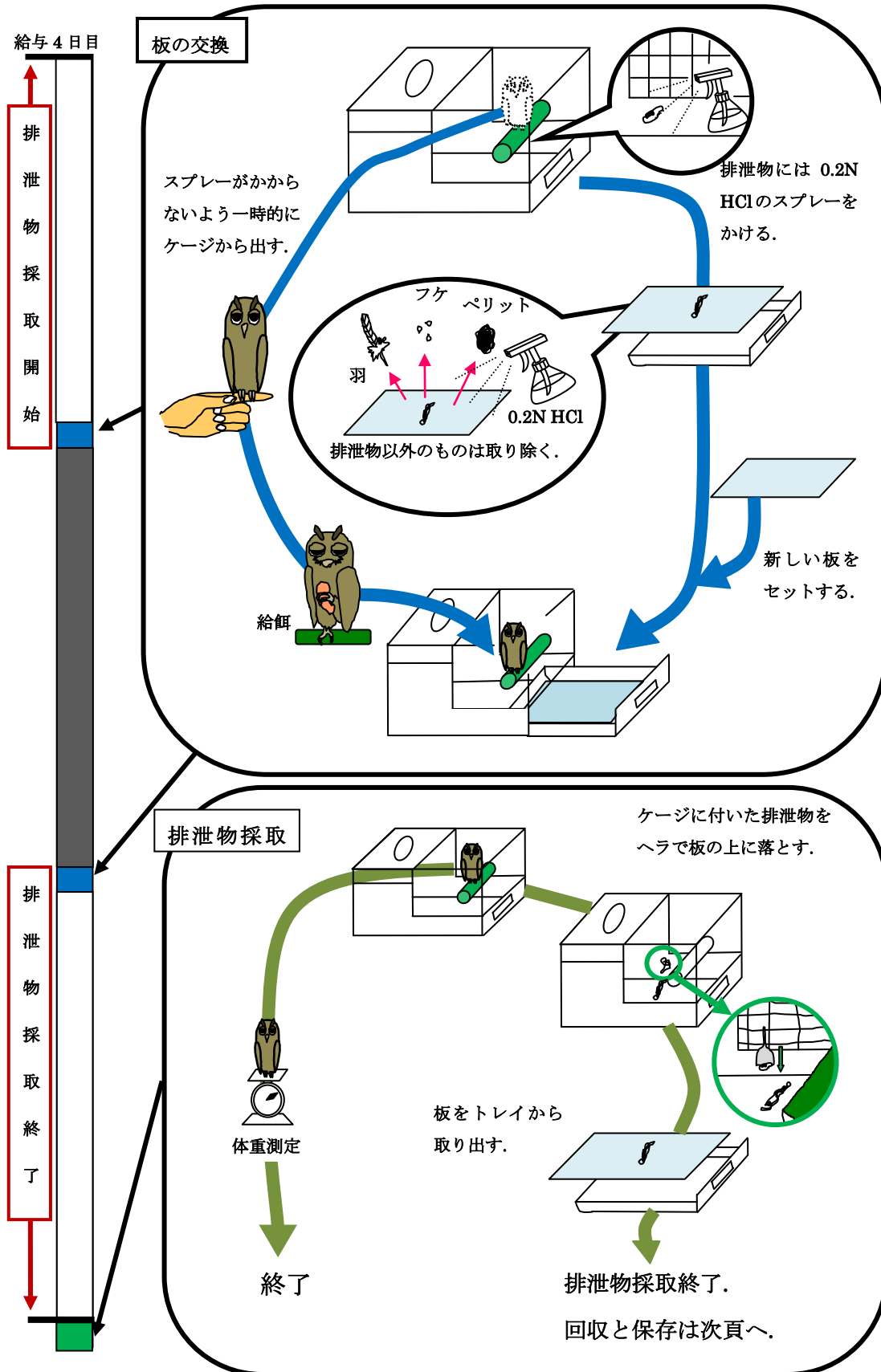


Fig. III-3. 試験 5 および試験 6 における試験スケジュールとサンプリング準備手

排泄物回収と試料調整

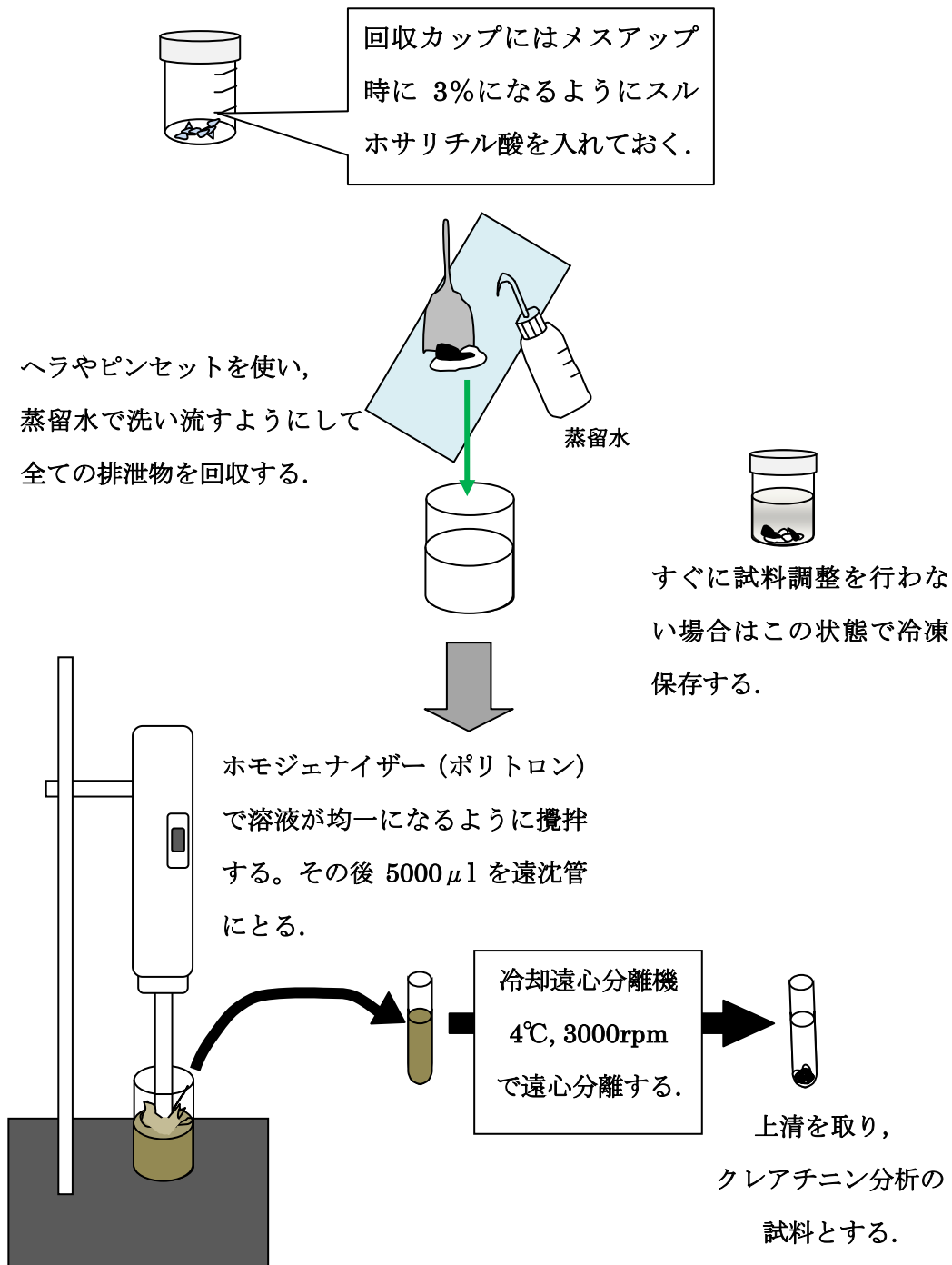


Fig. III-4. 排泄物回収後のクレアチニン分析のための試料調整作業手順.

Table. III-1. Amino acid composition of experimental diets in experiment 5 and 6.

Amino acids	Mouse neonatal	Experimental diet
	(%)	
Tau	0.28	0.34
Asp	1.42	1.74
Glu	2.60	3.18-3.68
Pro	0.51	0.62
Ala	1.24	1.52
Val	0.80	0.99
Leu	1.30	1.59
Tyr	0.53	0.65
Phe	0.66	0.81
His	0.40	0.48
Arg	0.75	0.92
Lys	0.19	0.23
Ile	0.48	0.59
Thr	0.60	0.74
Gly	1.10	1.35
Ser	0.86	1.05
Cys	0.15	0.15
Met	0.22	0.22-0.72

3. 結果

試験 5 において、コノハズクの排泄 Crn 量は飼料中 Met 含量 0.60% まで増加しその後 0.72% で低下した ($p < 0.05$; Table.III-2 ; Fig.III-5)。体重変化は見られなかった。この反応より Toyomizu らの式を用いて回帰を行った結果、コノハズクの飼料中の Met 要求量は 0.42%~0.48% と推定された (Fig.III-5)。

試験 6 において体重変化、飼料摂取量に変化は見られなかった (Table.III-3)。排泄 Crn 量は飼料中カロリー・蛋白質比の増加にともない 0.113 から 0.125 まで減少し、その後 0.150 で増加に転じた ($p < 0.05$; Fig.III-6)。摂取エネルギーの平均は $19.7 \pm 0.2 \text{kcal/日}$ であった。

Table. III-2. Effects of dietary methionine (Met) levels on performance and creatinine (Crn) excretion of Eurasian scops owls (*Otus scops*) in experiment 5.

Met	Body weight change	Feed intake	Crn excretion
(%)	(g/day)	(g/day)	(mg/day)
0.22	0.6 ± 1.4	19.7 ± 3.4	0.5 ± 0.2^b
0.35	0.9 ± 0.4	21.0 ± 3.2	2.4 ± 0.3^a
0.60	1.0 ± 1.3	21.4 ± 3.0	2.5 ± 0.6^a
0.72	1.0 ± 0.7	21.4 ± 2.7	0.9 ± 0.1^b

Values are means ±SE for 4 owls.

^{a, b} Means in the same column with no common superscripts differ significantly (p<0.05).

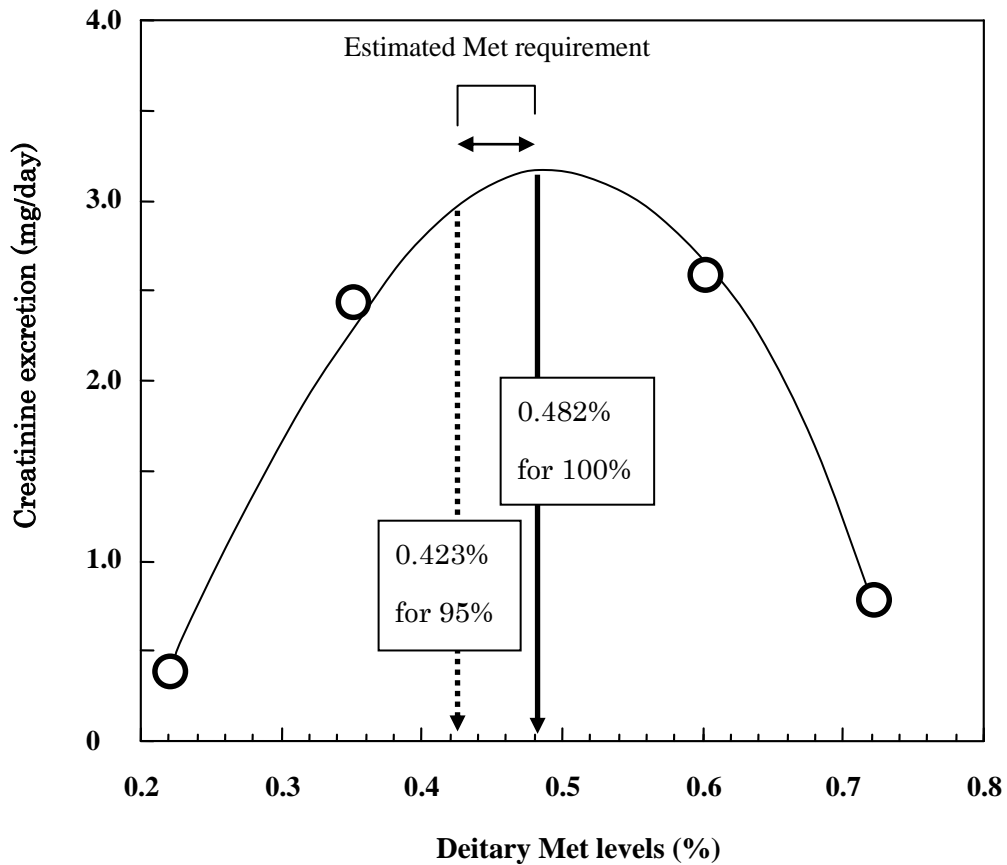


Fig. III-5. Effects of dietary methionine (Met) levels on creatinine excretion of Eurasian Scops owls (*Otus scops*). Values are means for 4 owls. Equation recommended of Toyomizu et al. (1998) was employed, and regression coefficients of fitted curve were A= -6.60, B= -33.0, C= -1.79, and D= -0.7476 ($R^2=0.99$). Vertical arrows show estimated Met requirement for 95% and 100% maximum excretion.

Table III-3. Effects of dietary protein levels on performance of broilers from 8 to 14 days of age in Experiment 1.

Protein: energy ratio	body weight change		feed intake		Crn excretion			
	(g)		(g/day)		(mg/day)		(mg/CP intake)	
0.113	0.6	± 0.6	20.3	± 2.3	1.46	± 0.16 ^a	0.64	± 0.07 ^a
0.125	1.0	± 0.2	21.0	± 2.4	0.98	± 0.11 ^b	0.42	± 0.03 ^b
0.138	0.8	± 0.9	21.0	± 1.9	1.13	± 0.14 ^b	0.45	± 0.04 ^{b,c}
0.150	1.1	± 0.2	21.3	± 2.0	1.49	± 0.15 ^a	0.51	± 0.02 ^c

Values are means ± SE for 4 owls.

^{a, b} Means in the same column with no common superscripts differ significantly ($p < 0.05$).

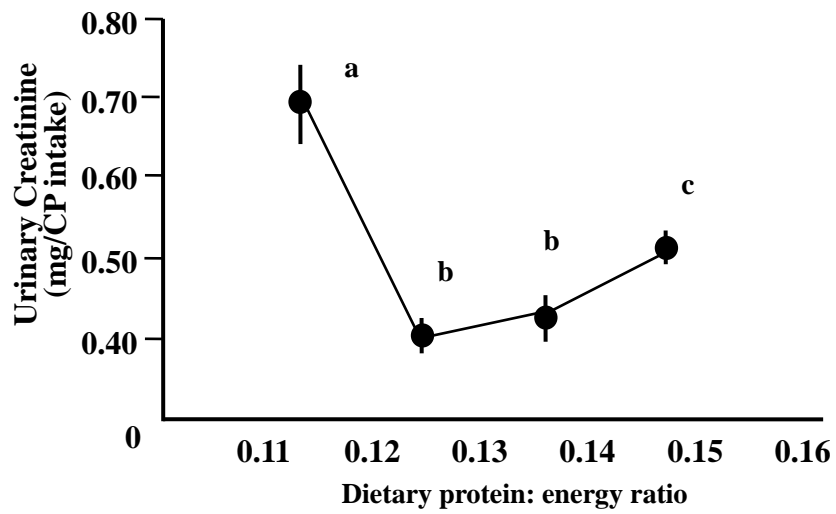


Fig. III-6. Effects of dietary protein: energy ratio on urinary creatinine excretion of Eurasian scops owls (*Otus scops*). Values are means for 4 birds \pm SE. ^{a, b} means in the same column with no common superscripts differ significantly ($p < 0.05$).

4. 考察

本章では、II章において雑食性のブロイラーヒナで見られた飼料中 Met に対する排泄 Crn の量的反応が肉食性鳥類であるコノハズクにおいても再現性がみられるか確認を行った。

試験 5 および 6 ともに、コノハズクは成鳥を用いた。そのため体重に有意な変化は見られなかった。しかし、排泄 Crn 量はブロイラーヒナと同様の変化を示したことから、排泄 Crn の反応は成長による体重変動に影響されずに飼料中 Met および蛋白質含量に対する過不足が反映されたと推察された。

試験 5 では飼料中 Met 含量を 0.22% から 0.72% まで 4 水準の飼料を給与したところ、コノハズクの排泄 Crn 量は飼料中の Met 含量 0.60% まで増加し、その後 0.72% で低下した。飼料中 Met 含量 0.72% で排泄 Crn 量が低下する現象は、おそらく飼料中 Met が過剰状態にあるためと推察された。Met が過剰の際は硫黄転換経路で代謝されるが、この経路での Met 代謝過程において、グリシンはグルタチオンの合成材料として、シスタチオニンの合成に必要なセリンの前駆体としてなど様々な場所で必要とされる (Tateishi ら, 1977)。そのため Met 過剰の際はグリシンがより多く必要となり、その結果 Cr 合成過程でグリシンが制限となり Crn 排泄量が低下したと考えられた。

排泄 Crn 量の反応から回帰を行った結果、ヨーロッパコノハズクの飼料中 Met 要求量は 0.42% ~ 0.48% と推定された。このことから、排泄 Crn を指標とし、飼料摂取量からの要求量推定が可能であることが示された。

また、前章試験 4 において、ブロイラーでは飼料中の Arg が過剰で Met が不足の際に Crn 排泄量が増加したが、今回の試験において、低 Met 区においてそのような現象が見られなかった。このことから、マウスの Arg 含量はコノハズクの要求量に対し過剰ではない可能性が推察された。

試験6では飼料中のカロリー蛋白質比を0.113から0.150まで変動させたところ0.125まで低下し、その後増加に転じた。この反応は試験3におけるブロイラーヒナの摂取蛋白質あたりの排泄Crn量と同様の反応であった。試験6でのコノハズクの場合、試験区ごとの飼料摂取量に有意差は見られず、結果排泄Crn量が蛋白質摂取量あたりの排泄量を反映させた反応となったと思われた。

4羽の平均体重よりコノハズクの維持エネルギー要求量は、代謝体重より算出し12.5kcal/日と推定された(Dolphin, 1987)。今回の試験6において摂取エネルギーは平均 19.7 ± 0.2 kcal/日であり、このことから試験期間中の飼料摂取量は維持エネルギー要求量を満たしていると考えられた。

Crnの前駆体であるCrは体内で主に骨格筋や心筋内においてCrリン酸の形で存在し、ADPへのリン酸供与体としての役割を持っている。Crの働きは食性に関わりなく重要なものであると考えられ、またCr合成に関わる酵素活性が肉食性哺乳類のネコにおいても確認されている(Greemhaff, 1997)。そのため雑食性だけでなく肉食性においても用いることのできる指標であると考えられた。コノハズクの排泄Crn量は雑食性のブロイラーヒナと同様の反応を示したことから、排泄Crnは肉食性においても蛋白質アミノ酸栄養状態を反映する指標になりうることが示された。

第IV章 総括

近年、生息域の環境悪化などにより生息数が減少している野生動物が増えてきており、生息域内での保護だけでは個体数の維持あるいは増殖を行うことが困難となってきている。そのため、動物園や保護施設などの生息域外での保護が必要となっている。生息域外において個体数を増やすためには、飼育下での適正な栄養管理が行えなければならない。また、傷病鳥獣を保護した際も、治療中あるいは野生復帰へのトレーニング中における栄養管理は重要である（文献）。動物の栄養管理は、栄養要求量の推定と使用可能な飼料原料の選定とそれに基づいて飼料を配合し給与することで行われる。しかし栄養要求量が求められている動物の中でも、その飼養標準に基づいて画一的な栄養管理が行えるのは、遺伝的多様性の少ない実験動物やコマーシャル鶏のみである。その他の家畜やほとんどの動物は個体差が大きく、ウシでは乳質や乳量を用いてモニタリングを行うことで個々の栄養補正が行われており、ブタでは週齢よりも体重を基準として飼養標準設定がなされている（文献）。絶滅危惧種や希少動物の場合、種間差や個体差が大きく、またそもそも栄養要求量が明らかにされていない動物がほとんどであり、その飼育目的から遺伝的多様性が維持された状態で飼育されなければならないため、日々モニタリングを行い、それぞれの個体に合ったオーダーメイドの栄養管理を行うべきである。

様々な栄養素の代謝にエネルギーと蛋白質のバランスが影響を及ぼすことから、これら二つは最初に行われなければならないモニタリング項目である。しかし体重から推定できる維持エネルギーと異なり、蛋白質は食性の影響を受けるため、実験的モニタリングが必要である。また、ストレスは動物の血中コルチコイド濃度を高めて代謝に影響することから非侵襲的な代謝指標が必要である。

本研究は飼育下動物の栄養管理のための、非侵襲的な蛋白質・アミノ酸栄養状態評価方法の開発を目的とした。採血やと殺を行わず、かつ食性に関わりな

く蛋白質・アミノ酸要求量推定が可能な方法として、排泄 Crn 量を指標とした方法に着目し、要求量推定方法確立のため 6 つの試験を行った。

まず、第 II 章では実験動物での立証を目標とし、排泄 Crn 量が蛋白質アミノ酸栄養状態評価の指標となりうるのか調べた。アミノ酸要求量を求めるための様々な指標が確立されているブロイラーヒナを用い、指標の中でもわかりやすい増体重が飼料中の蛋白質やアミノ酸の増加にともない変化する水準において、排泄 Crn 量の反応に変化が見られるか検討し、またその反応が代謝を反映しているか検討を行った。排泄 Crn 量が飼料中の前駆体である Met や Arg 量に対し容量依存的な反応を示すか証明しようとした II 章 1 節では、排泄 Crn 量は飼料中の Met や Arg 含量の増加にともない不足から至適にかけて増加し ($p<0.05$)、その後一定となった一方で、肝臓 AGAT 活性は飼料中 Cr 前駆体のアミノ酸含量の増加にともない不足から至適にかけて低下し ($P<0.05$)、その後一定となった。この反応から排泄 Crn は飼料中の Cr 前駆体のアミノ酸含量が低い時にはそのアミノ酸が Cr 合成の制限因子となり排泄量が決まり、過剰の際には Cr 合成における他の前駆体のアミノ酸が制限因子になると推察され、排泄 Crn 量は飼料中の Cr 前駆体のアミノ酸に対し用量依存的な反応を示し、これらのアミノ酸の過不足を反映する指標となりうる可能性が示された。

この結果より飼料中蛋白質含量についても低蛋白質時には Met が他のアミノ酸に対して相対的に不足状態であるため、Cr 合成および Crn 排泄量は低くなり、逆に高蛋白質時には Met が過剰となるため、Cr 合成量および Crn 排泄量が増加すると推察され、飼料中の蛋白質含量に対し容量依存的な反応が観察されると予測される。そこで 2 節では飼料中の蛋白質含量に対しても排泄 Crn 量が用量依存的な反応を示すか検討した。排泄 Crn 量は飼料中蛋白質含量が 23% 区において高い値を示した ($p<0.05$)。この結果は予測された反応と一致したが、しか

し、蛋白質摂取量当たりの排泄 Crn 量は飼料中蛋白質含量が増加するにともない 17%から 20%の区まで低下し、その後 23%の区で増加に転じ ($p<0.05$)、肝臓 AGAT 活性も同様の变化を示した ($p<0.05$)。Cr の前駆体である Met と Arg の利用性の違いが、蛋白質摂取量に対する排泄 Crn 量が至適区よりも高い値を示した要因なのではないかと考えられ、次に飼料中 Arg 含量が過剰で Met 含量が不足の際に、特異的に排泄 Crn 量の増加がみられるか検討を行った。飼料中 Arg 含量を至適と過剰の 2 段階、Met 含量を不足と至適の 2 段階に設定した要因解析試験を行った。その結果、排泄 Crn 量は Arg 過剰で Met 不足の区において特異的に高い値を示した ($p<0.05$)。このことから、Arg 過剰時に排泄 Crn 量が増加する現象は Met が不足時、Arg : Met 比が一定以上の場合に起こることが推察され、低蛋白質時の摂取蛋白質あたりの排泄 Crn 量が、蛋白質含量が至適の区と比較して高い値を示したことも、Met に対し Arg が相対的に過剰となったためと考えられた。以上の試験より、排泄 Crn 量は飼料中の蛋白質含量の変化に対し蛋白質量の変動により起きるアミノ酸の利用性と代謝の変化を反映していると考えられ、アミノ酸および蛋白質の栄養状態を評価する指標になりうると考えられた。

次に III 章では排泄 Crn 量が食性に関わりなく用いることのできる指標であるか確認するために、雑食性のブロイラーで見られた飼料中のアミノ酸や蛋白質含量に対する排泄 Crn の反応が、動物性の栄養素の合成能力が低い肉食性鳥類においても再現性がみられるか検討した。肉食性鳥類のうち比較的運動量の少なく、また排泄物の回収が容易な小型のフクロウ類のヨーロッパコノハズク (*Otus scops*) を対象として、飼料中 Met および蛋白質の量的試験を行い、排泄 Crn 量について雑食性のブロイラーと同様の反応が見られるか確認を行った。その結果、コノハズクの排泄 Crn 量は飼料中 Met あるいは蛋白質含量に対し雑

食性のブロイラーヒナと同様の反応を示した。II 章の試験に用いた日齢のブロイラーの平均重量は 350g であり，一方 III 章の試験で用いたコノハズクの体重は 100g である。そのためブロイラーとコノハズクの間での排泄 Cr 量の違いは体重による違いであると考えられた。Cr の働きは食性に関わりなく重要なものであると考えられ，また Cr 合成に関わる酵素活性が肉食性哺乳類のネコでも確認されている。これらの結果より雑食性だけでなく肉食性においても用いることのできる指標であることが示された。

以上，本研究より排泄 Cr_m 量は飼料中のアミノ酸や蛋白質含量の過不足を反映する指標となりうる可能性が示された。また肉食性のコノハズクにおいても雑食性のブロイラーと同様の反応が得られたことから，食性に関わらず用いることのできる指標であることが示され，排泄 Cr_m を指標とし，非侵襲的にタンパク質およびアミノ酸の栄養評価が可能であることが示された。代謝性指標は摂取した食餌の栄養に対し反応が速いため，栄養不均衡による様々な障害がおこる前に予測可能であり，予防医療的なテーラーメイドの栄養管理につながるものと期待される。この方法は家禽においても，暑熱や寒冷による環境変化の際の栄養補正にも有用な方法である。実際にはこの方法をもちいてニホンライチョウの域外保全のための飼料評価が行われた。また，部分尿からの評価方法の開発を，イエネコを用いて行い，その方法をツシマヤマネコの域外保全の栄養管理にも応用されている。

近年，遺伝情報からの代謝特性の特定を行うニュートリジェネティクスと，栄養素による遺伝子レベルでの代謝を調整するニュートリゲノミクスという 2 つの分野からなる，栄養を分子レベルでとらえる分子栄養学が一つの学問分野として確立している。これらの分野と代謝モニタリング方法を組み合わせると以下のことが可能である。1) ニュートリジェネティクス的方法により遺伝情

報から動物の栄養代謝特性の分類を行い、2) その情報に基づいた飼料原料の調達、3) 体重情報から維持エネルギー要求量の算出と、代謝モニタリングにより栄養調整を行う。4) 成長期や繁殖期などは生理条件の変化にともなう代謝モニタリングを行う。5) 代謝障害時や、飼育下から野生復帰を行う際にはニュートリゲノミクスによる代謝制御を行う。このような栄養管理戦略を立てることで現場レベルでの簡便なオーダーメイドの栄養管理が可能である。しかし、このような理想の栄養管理を行うためには、様々な種、様々な代謝特性を持つ動物の栄養特異性を明らかにしていく必要がある。

参考文献

- Austic RE and Nesheim MC. Arginine and creatine interrelationships in the chick. *Poultry Science*, 51: 1098-1105. 1972.
- Benevenga NJ and Harper AE. Effect of glycine and serine on methionine metabolism in rats fed diets high in methionine. *Journal of Nutrition*, 100: 1205-1214. 1970.
- Bertolo RF and McBreaity LE. The nutritional burden of methylation reactions. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, 16: 102-108, 2013.
- Brosnan JT. The metabolic burden of creatine synthesis. *Amino Acids*, 40: 1325-1331. 2011.
- Chamruspollert M, Pesti GM, Bakalli RI. The influence of labile dietary methyl donors on the arginine requirement of young broiler chick. *Poultry Science*, 81: 1142-1148. 2002a.
- Chamruspollert M, Pesti GM, Bakalli RI. Dietary interrelationships among arginine, methionine, and lysine in young broiler chicks. *British Journal of Nutrition*, 88: 655-660. 2002b.
- Clark, R.V., A.C. Walker, R.L. O'Connor-Semmes, M.S. Leonard, R.R. Miller, and W.J. Evans. Total body skeletal muscle mass: estimation by creatine (methyl-d3) dilution in humans. *Journal of Applied Physiology*. 116: 1605-1613. 2014.
- Da Silva RP, Clow K, Brosnan JT, and Brosnan ME. Synthesis of guanidinoacetate and creatine from amino acids by rat pancreas. *British Journal of Nutrition*, 111: 571-577. 2014.
- DePeters EJ and Cant JP. Nutritional factors influencing the nitrogen composition of bovine milk: A review. *Journal of Dairy Science*, 75: 2043-2070.1992.

- Dolphin RE. Feeding and nutrient disorders. In: Burr EW (ed.): Companion Bird Medicine. Iowa State University, pp.66-71. 1987.
- Drewitt L, and Langston RHW. (2006) Assessing the impacts of wind farms on bird. *Ibis* 148: 29-42
- Geraert PA, Padilha CF, and Guillaumin S. Metabolic and endocrine changes induced by chronic heat exposure in broiler chickens: growth performance, body composition and energy retention. *British Journal of Nutrition*, 75: 195-204, 1996.
- Goday-Vitorino F, Ley RE, Gao Z, Pei Z, Ortiz-Zuazaga H, Pericchi LR, Gracia-Amado MA, Michelangeli F, Blaser MJ, Gordon JI, and Dominguez-Bello MG. Bacterial community in the crop of the Hoatzin, a neotropical folivorous flying bird. *Applied and environmental microbiology*, 74: 5905-5912. 2008.
- Greemhaff PL. The nutritional biochemistry of creatine. *Journal of nutritional biochemistry*, 8: 610-618. 1997.
- Ikuta K, Kokamo M, Sasakura K, and Hakogi E. Evaluation of nutritional condition on the basis of milk urea nitrogen and milk protein concentrations in dairy cows. *Journal of the Japan Veterinary Medical Association*, 53: 289-292, 2000.
- Karasawa Y, and Maeda M. A role of caecum in nitrogen nutrition of the chicken fed moderate protein diet and low protein diet plus urea. *British Poultry Science*, 35: 383-391, 1994.
- Keshavarz K, and Fuller HL. Relationship of arginine and methionine in the nutrition of the chick and the significance of creatine biosynthesis in their interaction. *Journal of Nutrition*, 101: 217-222. 1971a.

- Keshavarz K, and Fuller HL. Relationship of arginine and methionine to creatine formation in chicks. *Journal of Nutrition*, 101: 855-862. 1971b.
- Legrand-Defretin V. Differences between cats and dogs: a nutritional view. *Proceedings of the Nutrition Society*, 53: 15-24. 1994.
- Morris SM Jr. Enzymes of arginine metabolism. *Journal of Nutrition*, 134: 2743-2747, 2004.
- Ohta Y and Ishibashi T. Dietary levels and ratio of methionine and cysteine for maximum performance of Broilers. *Japanese Poultry Science*, 31: 369-380, 1994.
- Ohta Y and Ishibashi T. Effects of days after changing diets, body weight and feed consumption on excretion of taurine in broilers. *Japanese Poultry Science*, 34: 282-291, 1997a.
- Ohta Y and Ishibashi T. Alleviatory effects of individual essential amino acids on reduced performance induced by dietary excess methionine in broilers. *Japanese poultry science*, 34: 414-418, 1997b.
- Rogers QR and Morris JG. Do cat really need more protein? *Journal of Small Animal Practice*, 23: 521-532. 1982.
- Tateishi N, Higashi T, Naruse A, Nakashima K, and Shiozaki H. Rat liver glutathione: possible role as a reservoir of cysteine. *Journal of Nutrition*, 107: 51-60. 1977.
- Tesseraud S, Coustard SM, Collin A, and Seiliez I. Role of sulfur amino acids in controlling nutrient metabolism and cell functions: implications for nutrition. *British Journal of Nutrition*, 101: 1132-1139. 2009.
- Tojo H, Sasajima I, Hosokawa Y, Sato I, Niizeki S, and Yamaguchi K. Study of essential amino acid requirement on the basis of sulfur amino acid metabolism in

rats. *Sulfaur Amino Acids*, 10: 165-172. 1986.

Toyomizu M, Hayashi H, Yamashita K, and Tomita Y. Response surface analyses of the effects of dietary protein feeding and growth patterns in mice from weaning to maturity. *Journal of Nutrition*, 118: 86-92. 1988.

Van Pilsum JF, Taylor D, Zakis B, and McCormick P. Simplified assay for transaminase activities of rat kidney homogenates. *Analytical Biochemistry*, 35: 277-286, 1970.

Veldkamp T, Ferket PR, Kwakkel RP, Nixey c, and Noordhuizen JPTM. Interaction between ambient temperature and supplementation of synthetic amino acids on performance and carcass parameters in commercial male turkeys. *Poultry Science*, 79: 1472-1477, 2000.

Walker JB. Creatine: biosynthesis, regulation and function. *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology*, 50: 177-24. 1979.

Wyss M, Kaddurah-daouk R. Creatine and Creatinine metabolism. *Physiological Reviews*, 80: 1107-1213. 2000.

環境庁自然環境局野生生物課編（2014）改訂・日本の絶滅のおそれのある野生生物 1 哺乳類，財団法人自然環境研究センター，東京都

環境庁自然環境局野生生物課編（2014）改訂・日本の絶滅のおそれのある野生生物 2 鳥類，財団法人自然環境研究センター，東京都

木崎航. アオバズクとヨーロッパコノハズクを用いた猛禽類における含硫アミノ酸代謝・排泄機構の有無. 卒業論文. 2008.

太田能之・石橋晃. ブロイラーの含硫アミノ酸要求量. 栄養生理研究会報, 40: 17-39. 1996.

農林水産省農林水産技術会議事務局編. 日本飼養標準・豚. 中央畜産会. 2005.

農林水産省農林水産技術会議事務局編. 日本飼養標準・家禽. 中央畜産会. 2011.

謝辞

本試験は数多くの方々の多大なる協力無しでは成し得ませんでした。本試験の遂行ならびに博士論文作成にあたり、ご助言およびご指導賜りました日本獣医生命科学大学教授 太田能之 博士（農学）に心から感謝いたします。また、本試験を進めるにあたって、ご助言下さいました同学助教 白石純一 博士（農学）に深く感謝いたします。

そして本試験の遂行ならびに学生生活を通じて、ともに協力し励ましあった日本獣医生命科学大学 動物生産化学教室室員諸氏に感謝の意を表します。

最後に、3年間の大学院生活を様々な形で支えて下さった両親に心から感謝いたします。ありがとうございました。