

# 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 methods to estimate nutritional condition of protein and amino acids for animals )**

学位論文の内容の要約

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

長谷川悦子  
(指導教員：太田能之)

## 排泄クレアチニ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

長谷川悦子（動物生産化学教室）

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。絶滅危惧種や希少動物の場合は、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指標が必要である。尿中のアミノ酸最終代謝産物は非侵襲的に蛋白質・アミノ酸の要求量を求めることができる指標である。しかし雑食性動物で有効な尿中の排泄タウリンを指標とする方法は、肉食性では代謝的に応用することができない。そこで本研究は食性に関わりなく代謝されるクレアチニンの排泄量を指標とする蛋白質およびアミノ酸栄養状態評価方法の検討を行った。まず雑食性であり実験動物でもあるブロイラーを用いて、排泄クレアチニンが蛋白質やアミノ酸栄養状態を判定するための指標となりうるか検討を行った。次いで肉食性においても再現性が得られるか、肉食性の鳥類であるヨーロッパコノハズク (*Otus scops*) を用いて検討した。

### 1. 指標の検討

クレアチニンはアルギニン、グリシン、メチオニンの3つのアミノ酸から合成されるクレアチンを前駆体に持つ、尿中に排泄される最終代謝産物の一つである。これら3つのアミノ酸は鳥類において必須アミノ酸である。とりわけメチオニンは生体内でのメチル基のおもな供給源であり、また制限になりやすいアミノ酸である。Chamruspollert ら (2002a) において飼料中のアルギニンとメチオニン含量が筋肉中のクレアチン含量を変動させることが報告されており、さらに Chamruspollert ら (2002b) は筋肉中のクレアチン含量がアルギニン要求量の指標になりうると示唆している。クレアチニンはクレアチンから非酵素的に転換され、腎臓で再吸収されることなく尿中に排泄される。このことは尿中の排泄クレアチニンは筋肉中のクレアチン量あるいはクレアチン合成量を反映していると考えられる。従って尿中の排泄クレアチニン量は飼料中のクレアチンの前駆体のアミノ酸量の過不足を反映すると考えられる。

そこでブロイラーヒナを用い、要求量推定の指標の一つである増体重が飼料中のアミノ酸蛋白質含量の増加に伴い変化する水準において、飼料中のメチオニン、アルギニンおよび蛋白質の量的試験を行い、排泄クレアチニン量およびクレアチン合成経路における律速酵素であるアルギニングリシンアミジノトランスフェラーゼ (AGAT) の活性を調べた。さらに蛋白質含量の量的試験を行った際に得られた結果を検証するために、アルギニンとメチオニンの交互作用の検討も行った。

1-1. クレアチニンの前駆体であるメチオニンあるいはアルギニンの飼料中含量が排泄クレアチニンに及ぼす影響

試験 1, および 2 では 8 日齢のチャンキー系ブロイラーヒナを 5 羽 (雄 5 羽) ずつ 3 区に割り当て、試験 1 では飼料中メチオニン含量が 0.25%, 0.50%, 0.75%, 試験 2 ではアルギニン含量が 0.85%, 1.44%, 2.04% の 3 段階のトウモロコシ主体の試験飼料を 7 日間給与した。最終 3 日間に排泄物を全量採取し、クレアチニン量測定サンプルとした。試

験最終日にニワトリヒナを頸椎脱臼にて安楽死させたのち肝臓を採取し、AGAT 活性を測定した。

試験 1 ではニワトリヒナの増体重は飼料中メチオニン含量の増加にともない 0.50% まで有意に増加し、その後一定となった ( $P<0.05$ )。排泄クレアチニン量も同様な変化を示した ( $P<0.05$ )。AGAT 活性は飼料中メチオニン含量 0.50% まで有意に低下し、その後一定となった ( $P<0.05$ )。試験 2 において飼料中アルギニン含量に対しても同様な変化を示した。クレアチニンは飼料中のクレアチンの前駆体であるアミノ酸含量が低い時にはそのアミノ酸がクレアチン合成における制限となり排泄量が決まり、過剰の際はクレアチン合成における他の前駆体が制限因子になると推察された。このことから排泄クレアチニンは飼料中クレアチン前駆体のアミノ酸の過不足を反映していると考えられた。

#### 1-2. 飼料中蛋白質含量が排泄クレアチニン量に及ぼす影響

試験 3, および 4 では 8 日齢のチャンキー系ブロイラーヒナを用い、試験 3 では 5 羽 (雄 5 羽) ずつ 3 区に割り当て、蛋白質含量が 17%, 20%, 23% の 3 段階のトウモロコシ主体の試験飼料を 7 日間給与した。試験 3 の反応を検証するために、試験 4 では 5 羽ずつ 4 区に割り当て、飼料中アルギニン含量が (1.21%, 2.66%) とメチオニン含量が (0.32%, 0.46%) による 2×2 要因解析法により 4 種類の飼料を設定した。排泄物および肝臓採取は試験 1 および 2 と同様に行った。

試験 3 では排泄クレアチニン量は飼料中蛋白質含量の増加にともない 20% まで減少しその後増加した。肝 AGAT 活性も同様の反応を示した。試験 4 では排泄クレアチニン量は飼料中アルギニン過剰でメチオニン欠乏の区で高い値を示した。肝 AGAT 活性はアルギニン摂取量の増加にともない低下した。クレアチン合成経路においてはアルギニンが過剰の場合はメチオニンが不足でもクレアチン合成が促進され排泄クレアチニン量も増加すると推察された。このことから試験 3 における低蛋白質飼料で排泄クレア

チニン量が高い値を示したことは、飼料蛋白質量の不足によりアミノ酸の利用性が変化し、メチオニンに対しアルギニンが相対的に過剰となったためと推察された。

以上の試験より、排泄クレアチニン量は飼料中の蛋白質アミノ酸の過不足を反映する指標となることが示された。

## 2. 肉食性鳥類における指標の再現性の検討

肉食性鳥類について栄養・代謝的な知見は非常に少なく、その原因のひとつとして挙げられるのは、実験上の制限が多いことである。種によっては希少種あるいは絶滅危惧種に指定されており、法による制限を受ける。また、肉食性鳥類はストレスに敏感であり、餌に対する嗜好性も高い。このような種について実験を行うためには、従来の栄養要求量推定方法では困難である。

1において、ブイラーヒナを用いて排泄クレアチニンはアミノ酸および蛋白質の代謝的指標となる可能性が示された。そこで、本章では雑食性のニワトリヒナで見られた排泄クレアチニンの反応と同様の反応が肉食性でも見られるか確認を行った。

試験5および6では、4個体のヨーロッパコノハズク (*Otus scops*) を用い、4段階の飼料中メチオニンまたは蛋白質水準、および4期間でのラテン方格法を用いて試験5では飼料中メチオニン、試験6では飼料中蛋白質の量的試験を行った。試験飼料は結晶アミノ酸粉末入りカプセルを、生後2日以内のマウス (*Mus musculus*) の体内に挿入し、摂取アミノ酸組成のコントロールが可能な飼料として用いた。試験5ではメチオニン含量が0.22%、0.35%、0.60% および0.72%の4水準飼料区、試験6では飼料中カロリー蛋白質比が0.113、0.125、0.138、0.150の4水準を設定した。試験期間は4日間とし、最終1日に排泄物を全量採取しクレアチニン量測定サンプルとした。

試験5では、排泄クレアチニン量は飼料中のメチオニン含量が増加するにともない0.35%まで増加し一定となり、その後0.72%で低下した。試験6では、排泄クレアチニン量は飼料中のカロリー蛋白質比の増加に伴い0.125まで減少し、その後増加に転じた。

これらの結果はニワトリヒナの排泄クレアチニン量と同様に有意な変化を示した ( $p < 0.05$ )。このことから肉食性鳥類においても蛋白質アミノ酸要求量推定の指標となることが示された。

以上の試験より、クレアチニン排泄量は飼料中のアミノ酸や蛋白質の過不足を反映することが示された。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ができる指標であることが示され、排泄クレアチニンを指標とし、非侵襲的に蛋白質およびアミノ酸栄養状態の評価が可能であることが示された。

Chamruspollert M, Pesti GM, Bakalli RI. Dietary interrelationships among arginine, methionine, and lysine in young broiler chicks. *British Journal of Nutrition*, 88: 655-660. 2002a.

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. 2002b.