

論文審査の結果の要旨

申請者名 長谷川 悦子

論文題目：鳥類の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 Avian)

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商業鶏のみである。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。

本研究は以上のような背景のもと、食性に関わりなく代謝されるクレアチ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うことを目的として実験動物の位置づけでブロイラーにおいて基礎知見を得、また方法開発を開発し、代謝的裏づけを行った。さらに肉食性の鳥類であるヨーロッパコノハズク (*Otus scops*) を用いて食性が異なる場合でも応用可能かを検討したものである。

まず実験動物であるブロイラーにおいて、指標の検討を行った。クレアチンはアルギニン、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。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、さらに文献的に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されていることを理由に、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仮説を立てた。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察して、ブロイラーヒナで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. 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。

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。

3. 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、ブロ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。

以上のように、本論文は、いままで難しいとされてきた尿中の早期反応性のマーカーとしてクレアチニンが有効である可能性を示し、様々な局面での応用による[可能性を示した研究であり、学術上のみならず動物飼育現場に貢献するところが少なくない。

よって審査委員一同は、本論文が修士（応用生命科学）の学位論文として十分な価値を有するものと認め、合格と判定した。