

## 幼若期雌ラットのミネラル出納に及ぼす飼育期間の検討

大塚静子 前田宜昭 阿左美章治

## Study of Feeding Period on Mineral Balance in Young Female Rats.

SHIZUKO OTSUKA YOSHIAKI MAEDA and SHOJI AZAMI

The effect of feeding period on calcium (Ca) utilization in rats fed on the same experimental design was investigated. The food efficiency varied with the difference of trial period. The deviation of balance test that starting time is different has shown significant difference of Ca absorption, urinary Ca excretion and Ca retention. The weight of kidney and its Ca content varied according to the difference of trial period.

The Ca utilization was affected by the difference of feeding period in the same protocol.

日本人の食生活では、穀類や野菜、魚介類を中心とした日本型食生活から、肉類や乳製品など動物性食品を中心に、たんぱく質、脂肪を多く摂取する欧米型食生活が営まれるようになってきている。このような食生活の欧米化に伴う摂取栄養素の変化は長年その摂取量の不足が指摘されているカルシウム(以下Caと略)の体内利用に影響を及ぼすと考えられる。このことは、日本人の高齢化に伴い、骨粗鬆症をはじめとするCaの摂取不足を主要因とする疾患の増加が大きな問題となっている背景の一つでもある。その改善には早い時期からの日常生活における運動や活動を高めることや、Ca、ビタミンDを多く含む食品を摂取することなど栄養素摂取に対する配慮が重要とされている。これまでに著者らはCa利用に及ぼす摂取たんぱく質<sup>1)</sup>や脂肪<sup>2)</sup>の影響

について研究をすすめてきた。ところでこれらミネラル代謝に関する栄養実験には被検動物としてラットが一般的に用いられている。動物実験を行う場合、その結果がヒトの体内においても同様なものかどうかはいつも問題となるところであるが、少なくとも結果の再現性については確かでなくてはならない。ラットの生理現象は、ヒトに似ていると言われ、寿命は2～3年であることから、その1日はヒトの30日に相当すると考えられる。このことから著者らも加齢や、経時的変化を知る目的で幼若のラットを使用してきた。しかし、動物実験の結果を比較すると同様の実験計画であっても必ずしも同じ結果が得られるとは限らない。

そこで、本稿では著者らの一連の実験で常に標準食として用いられているAIN-76精製

Key Words: Calcium balance, Feeding period

飼料(一部改変、カゼイン20%、脂肪5%)を与えた場合のラットの飼育開始週齢や初体重、さらには飼育日数の違いがミネラル利用に及ぼす影響についてCaを中心に検討を行った。

## 実験方法

### 1. 実験動物

実験動物として実験1期(生後4週齢、体重45~55g)、実験2期(生後5週齢、体重70~

90g)、実験3期(生後4週齢、体重50~60g)、実験4期(生後4週齢、体重45~60g)のFischer系雌ラット6匹ずつを4回にわたり計24匹を日本チャールスリバー社(株)より購入した。AIN-76精製飼料を一部改変したカゼイン20%、脂肪5%食にて1週間予備飼育した後、実験1期45日間、2期40日間、3期37日間、4期40日間の飼育を行った。図1に飼育計画を示した。

図1 飼育計画

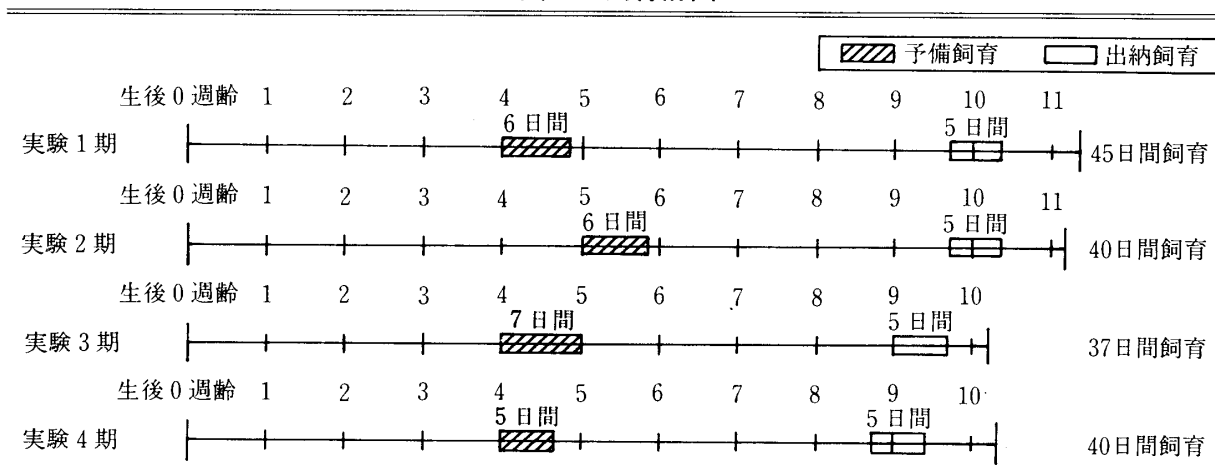


表1 飼料組成 (g/100g)

原 料	実 験 期				平均値
	1期	2期	3期	4期	
ミルクカゼイン	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0
$\alpha$ -コンスターチ	63.3	63.3	63.3	63.3	63.3
大豆油	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
セルロースパウダー	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
ミネラル混合 <sup>1)</sup>	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5
ビタミン混合 <sup>2)</sup>	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
重酒石酸コリン	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
DL-メチオニン	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
第二リン酸カルシウム	1.17	1.27	1.27	1.21	1.23
炭酸カルシウム	0.43	0.37	0.37	0.42	0.40
酸化マグネシウム	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08
合 計	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
ミネラル含有量 (mg/100g)					
カルシウム	492.4	493.5	535.7	517.4	509.8
リン	451.5	422.6	441.8	468.8	446.2
マグネシウム	41.0	48.8	50.4	46.3	46.6

1) AIN-76ミネラル混合 (J. Nutr. 107.1340. (1977)), 第二リン酸カルシウムと酸化マグネシウムを除く。

2) AIN-76ビタミン混合 (J. Nutr. 107.1340. (1977))。

### 2. 実験飼料

実験に用いた各期の飼料組成を、表1に示した。飼料はたんぱく質源をミルクカゼイン(オリエンタル酵母(株))とし、その含有量をい

ずれも20%にあわせ、脂肪の給源には大豆油を用いその含有量も5%にあわせた。すなわちカゼイン20%、脂肪5%を標準飼料とし用意した。また、各飼料中のCa量、リン量(以

下Pと略)、マグネシウム量(以下Mgと略)はCa 0.52%、P 0.40%、Mg 0.05%に調製し、その実測値も示した。

### 3. 飼育条件

ラットは6連の個飼いステンレス網製のカゴを使用し1日12時間明暗(午前7時~午後7時)、飼育温度 $23 \pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度 $50 \pm 5\%$ の動物室で飼育した。なお、飼料および飲料水(脱イオン水)は自由摂取させ、午前10時~12時の間に給餌、給水、体重測定等の作業を行った。

### 4. 出納実験

出納実験は、代謝ケージへの慣らし飼育を3日間行った後、飼育開始5週目から5週間にわたり実施した。出納実験期間には代謝ケージを使用し、飼料はカルミンをマーカーに用い糞尿を分離採取した。糞尿は毎日採取し、糞については体毛を除去し、乾燥機で恒量になるまで乾燥した後、コーヒーマルで粉末にした。尿は5N塩酸10mlを予め添加したビーカーに採取し、脱イオン水で一定量に定容したものをそれぞれの試料とした。飼料摂取量と飼料中のCa含有率、および糞、尿中へのCa排泄量から次式により見かけの吸収率(以下吸収率)および体内保留率を算出した。

ミネラル摂取量 = 飼料摂取量  $\times$  ミネラル含有率

見かけの吸収率 =  $\frac{\text{摂取量} - \text{糞中排泄量}}{\text{摂取量}} \times 100$

保留率 =  $\frac{\text{摂取量} - \text{糞中排泄量} - \text{尿中排泄量}}{\text{摂取量}} \times 100$

### 5. 分析方法

出納実験終了後エーテル麻酔下で屠殺し、

採血を行い腎臓、大腿骨を採取し重量を測定した。腎臓(左)はミネラル量を測定した。分析に供する飼料、糞、および尿はその一定量を分解用硬質試験管に採取し、硝酸を加え、アルミドライブロックバスにて湿式分解した。 $230^\circ\text{C}$ で乾固後0.5N塩酸を加え、超音波処理したのち沸騰水中で20分間加熱、放冷し同液にて一定量に定容としたものを分析に供した。Ca、Mg測定は原子吸光法<sup>3)</sup>、PはGOMORI法<sup>4)</sup>を用いて定量した。腎臓は糞尿と同様の処理を行い分析に供した。大腿骨は湿重量及び乾燥重量を測定後、Calvo<sup>5)</sup>らの方法により、クロロホルム：メチルアルコール(2:1)混液で48時間、エチルエーテル：エチルアルコール(1:1)混液で72時間脱脂した。脱脂後乾燥重量を測定し、湿式分解を行い同様の処理を行い分析に供した。血液は3,000r.p.m.で20分間遠心分離し、得られた血清を和光純薬工業(株)のキットを用いCa(OCPC法)<sup>6)</sup>、P(Taussky法)<sup>7)</sup>、Mg(キシリジルブルー法)<sup>8)</sup>の測定を行った。

### 6. 統計処理

実験結果の統計処理はすべての分散が等しいことを確認し、一元配置分散分析を用い、t検定により有意差を求めた。危険率は5%とした。

## 結 果

### 1. 体重増加量および飼料効率

飼育期間中の体重増加曲線、飼料摂取量、および飼料効率は図2、表2、表3に示した。

図2 体重増加曲線

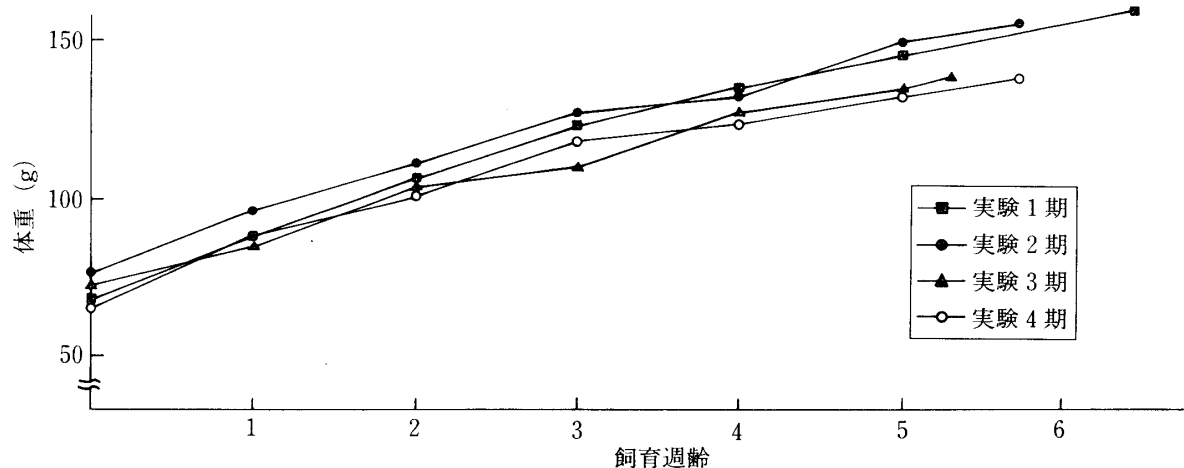


表 2 飼料摂食量

	実 験 期			
	1 期	2 期	3 期	4 期
第 1 週 (g)	82.5±2.3*	121.6±2.4	90.1±1.9	93.8±1.0
第 2 週 (g)	150.0±3.4	193.0±2.7	161.0±2.3	171.8±1.6
第 3 週 (g)	217.7±5.1	268.8±3.0	235.8±4.2	246.0±6.3
第 4 週 (g)	288.1±7.4	330.3±3.0	293.7±4.5	265.0±5.5
第 5 週 (g)	352.0±7.3	420.2±2.6	362.1±5.3	376.1±5.6
解剖時 (g)	441.3±9.3	431.8±3.0	362.1±5.3	376.1±5.6

\* : M±SE ; n = 6 . 解剖時 = 総摂食量

表 3 飼料効率

	実 験 期			
	1 期	2 期	3 期	4 期
第 1 週 (g)	0.26±0.01*	0.17±0.01	0.14±0.02	0.24±0.01
第 2 週 (g)	0.26±0.01	0.19±0.01	0.20±0.01	0.21±0.01
第 3 週 (g)	0.25±0.00	0.19±0.01	0.16±0.01	0.21±0.00
第 4 週 (g)	0.23±0.00	0.17±0.01	0.19±0.00	0.21±0.01
第 5 週 (g)	0.22±0.00	0.17±0.01	0.17±0.01	0.18±0.00
解剖時 (g)	0.20±0.00	0.18±0.00	0.18±0.00	0.19±0.00

\* : M±SE ; n = 6 .

成長の指標となる体重についてみると飼育全期間の体重増加量は飼育日数の長さと同様に飼料総摂取量に準じて高い値を示した。しかし、その成長度合は各週毎の飼育効率が示すように各実験期の全飼育期間で一様のものでないことが示された。特に出納週において懸念された飼育環境の変化は、飼料効率で見ると通常飼育との間に差が無いことが認められた。

## 2. Ca出納

Ca出納結果を表 4 に示した。Ca摂取量は成長に伴う飼料摂取量の増加を反映し、飼育日

数が長い実験期ほど高い値を示した。各実験期の比較する数値についてはCa摂取量に違いがあることから摂取量に対する割合(%)とした。Caの吸収率は実験 1 期で54.2%、実験 2 期で36.4%、実験 3 期で28.9%、実験 4 期で41.5%でありいずれの実験期にも有意差が認められた。Ca吸収率の 4 実験期の平均値は40.2%であった。尿中排泄率については最高1.80%から最低0.77%の範囲内であった。また、体内保留率は、52.5%~28.0%の範囲であり吸収率と同様の傾向を示した。平均値は

表 4 Ca 出納

	実 験 期				平均値
	1 期	2 期	3 期	4 期	
摂食量 (mg/日)	73.96±1.93*	50.47±1.72	47.08±3.31	45.53±1.96	54.26±2.63
吸収率 (%)	54.22±2.50	36.35±2.85	28.88±3.57	41.45±2.23	40.22±2.33
吸収量 (mg/日)	40.02±1.78	18.44±1.67	13.89±2.28	18.89±1.36	22.81±2.27
尿中排泄率 (%)	1.80±0.35	1.25±0.12	0.83±0.03	0.77±0.09	1.16±0.12
尿中排泄量 (mg/日)	1.31±0.26	0.62±0.06	0.40±0.03	0.35±0.04	0.67±0.10
保留率 (%)	52.45±2.32	35.12±2.89	28.02±3.56	40.68±2.30	39.07±2.78
保留量 (mg/日)	38.71±1.63	17.82±1.67	13.49±2.26	18.54±1.39	22.14±2.20

\* : M±SE ; n = 6 .

39.1%であった。

### 3. 臓器重量

腎臓1個の重量は、各実験期の終体重の違いを反映した重さではなく低体重である実験4期656.7mgと最も重い値を示した。また体重100g当たりの腎臓重量においても同様に実験4期が他の実験期の腎臓重量に対し100mg以上重い値を示した。

大腿骨重量においても体重の違いを反映するものではなく、各実験期の大腿骨重量に有意差は認められなかった。

### 4. 腎臓及び大腿骨中のCa量

腎臓及び大腿骨中のCa量を表5に示した。腎臓中Caは総量において実験3期(0.27mg) < 実験4期(0.42mg) < 実験2期(0.71

mg) < 実験1期(0.97mg)の関係であり有意の差が認められた。腎臓1g当たりのCa量においても同様の傾向を示した。いずれの場合においても実験1期と実験3期のCa量には3倍以上の違いが認められた。

脱脂大腿骨1g中のCa量は、実験3期(34.9mg) < 実験4期(46.5mg) < 実験2期(52.4mg) < 実験1期(60.2mg)の関係にあり、平均値は48.5mgであった。

### 5. 血清中ミネラル量

血清中ミネラル量を表6に示した。各実験期による総Ca量に有意差は認められず9.6~10.6mg/dlの範囲内にあった。平均値は10.5mg/dlであった。

表5 腎臓及び大腿骨中ミネラル含有量

	実験期				平均値
	1期	2期	3期	4期	
腎臓重量(mg/1個)	578.3±10.4*	591.6±23.3	511.7±14.2	656.7±26.9	584.6±14.2
mg/体重100g	365.1±5.2	386.7±11.9	372.3±4.8	475.8±13.5	399.9±10.3
腎臓中Ca量(mg/1個)	0.97±0.11	0.71±0.04	0.27±0.03	0.42±0.08	0.59±0.07
mg/腎臓1g	1.67±0.19	1.19±0.04	0.51±0.05	0.63±0.12	1.00±0.11
大腿骨重量(mg)	386.9±5.9*	319.4±33.5	318.3±10.8	348.3±7.5	343.2±10.3
脱脂骨重量(mg)	250.7±4.7	226.1±5.3	202.9±4.5	213.7±6.3	223.3±4.4
mg/体重100g	158.2±2.1	148.7±3.0	147.7±1.8	154.9±2.4	152.3±1.4
脱脂骨中Ca量(mg)	60.2±1.1	52.4±1.3	34.9±0.7	46.5±1.5	48.5±2.0
mg/脱脂骨1g	240.2±1.9	231.4±0.9	172.3±2.0	217.7±1.6	215.4±5.5

\*: M±SE; n=6.

表6 血清中ミネラル含有量

	実験期				平均値
	1期	2期	3期	4期	
Ca (mg/dl)	10.59±0.16*	10.97±0.19	9.62±0.12	10.66±0.54	10.46±0.18
P (mg/dl)	6.81±0.09	6.88±0.43	7.43±0.16	5.83±0.21	6.74±0.17
Mg (mg/dl)	2.36±0.07	2.43±0.08	1.75±0.04	1.70±0.01	2.06±0.08

\*: M±SE; n=6.

## 考 察

ヒトにおける栄養素の代謝を知るため、あるいは栄養調査などから得られた結果を実証

するためには、あらかじめ実験動物によるデータの集積が必要である。また栄養実験にはラットの生理的要因や栄養条件、飼育環境などを同一条件に揃えても実験期ごとに実験動

物の反応性に多少の変動を生じ実験結果に影響を及ぼすことを考慮する必要がある。

今回の実験に用いたFischer系ラットは飼料摂取量が少量であることや成長が比較的遅いことなど特徴がある。成長に及ぼす飼料摂取量や体重増加量などについてみると実験期ごとに違いが認められた。すなわち4実験期のラット購入時週齢は4～5週齢、本飼育までの予備飼育日数5～7日間、本飼育日数37～45日間と実験期ごとに条件が異なった。

しかし、ほぼ同一の条件であった1期と4期(生後4週齢、6日間の予備飼育、初体重)においても本飼育の終了時では、2期間に飼料総摂取量では65g、体重増加量では20gの違いがみられ、飼料効率にもその差が認められた。この結果は、栄養素要求の高い幼若期ラットにおいて、成長や代謝に対する大きな影響要因になりうると考えられ、飼育期間や飼料組成の異なる動物実験では実験条件全般に亘る条件設定の同一性が必要なことが示唆された。一方、出納実験の問題として飼育環境の変化に伴う飼料摂取量の低下などがあげられる。著者らの出納実験では代謝ケージを用いることから通常の飼育ケージから代謝ケージへの切り替えは大きな環境変化となりうる。そこで著者らは出納期3日前にラットを代謝ケージに移し慣らし飼育を行い環境変化を最小におさえている。

Caの体内バランスを維持する要因には腸管からのCa吸収、腎臓でのCa排泄および再吸収、骨形成と骨吸収などが関係している。さらにこのことにはCaの吸収に働くビタミンDやイオンの形で吸収されるCaの溶解性に作用する腸管内のpHなどの関与も考えられる。実験に用いた生後4～5週齢のラットは成長と発育が著しいことから生体のCa要求性が強く求められる時期でもある。今回のCa出納実験の結果は表6のようでありCaの摂取量と吸収量は一定のパターンを示す一様のものでないことが示された。

尿中Ca排泄にはCaの血中濃度や腎臓の糸球体濾過率、PTH作用が働く腎尿細管での再

吸収能のほか過剰のたんぱく質やNa量などが影響を及ぼす。今回の実験ではこれら因子との関係は不明だが0.77%～1.80%、平均で1.16%のCa排泄を示し、各実験期間でのCaの尿中排泄に違いが認められた。

腎臓についてみると重量では実験4期が重く、体重100g当たりにおいても他の3実験期に対し有意に高値を示した。腎臓の重量増加は低たんぱく質<sup>9)</sup>や高リン食投与<sup>10)</sup>に伴う腎石灰化由来のミネラルの増加が原因との報告もある。Ca量についてみると腎臓重量が増加した実験4期の腎臓1g当たりのCa量に増加は認められなかった。このことは飼料中たんぱく質量が20%であることやFischer系ラット、特に雌ラットは腎の石灰化を起こしやすいという特徴を考慮してもCa量が腎臓重量の増加原因とは考えにくく、ラットの持つ生理的反応性の違いではないかと考えられる。

血清中Ca濃度はPTH、カルシトニン、ビタミンDなどが関与して一定に保たれているが、Caの摂取量や腸管からのCa吸収の低下が長時間持続すると血清中Ca濃度は低下をきたし骨からのCaの溶出を生じる。Ca摂取量や吸収率及び保留率の違いは認められるものの各実験期の血清中Ca濃度は正常範囲内であった。また、体重100g当たりの脱脂大腿骨中のCa量に有意の差が認められた。このことは骨からのCaの溶出ではなく飼育期間、飼料摂取量、体重増加量の違いが影響を及ぼしたものと考えられる。

## 要 約

実験開始週齢や飼育期間の異なるラットに同一飼料を与えた場合のCa利用について検討した。

その結果

1. 飼料効率に実験期の差が認められた。
2. Caの吸収率、尿中排泄率及び体内保留率に実験期の違いが認められた。
3. 腎臓の重量やCa含有量に実験期の違いが認められた。

このことは同系ラット、同一飼料を用いた

実験でも実験条件の違いが結果に影響を及ぼすことを意味し、さらにこのことは飼料組成の異なる栄養実験では各実験期に共通な標準飼料群の設定が常に必要なことを示唆している。

本実験を行うにあたり、ご指導ご助言を下さいました熊本大学医学部、北野隆雄博士に感謝いたします。

## 文 献

- 1) 平塚静子、前田宜昭、阿左美章治：聖徳栄養短期大学紀要、**27**、18(1996)
- 2) 阿左美章治、平塚静子、北野隆雄、江指隆年：栄養学雑誌、**47**、103(1996)
- 3) 竹内次夫、鈴木正己：原子吸光分光分析、改稿第一版、南江堂(東京)、P101(1978)
- 4) GOMORI, G.: J. Lab. Clin. Med., **27**, 955 (1942)
- 5) CALVO, M. S., BELL, R. R. and FORBES, R. M.: J. Nutr., **112**, 1401(1982)
- 6) CONERTY, H. V., BRIGGS, A. R.: Am. J. Clin. Path., **45**, 290(1966)
- 7) TAUSSKY, H. H. and SHORR, E.: J. Biol. Chem., **202**, 675(1953)
- 8) YOUNG, A., SWEET, T. R. and BAKER, B. B.: Anal. Chem., **27**, 356(1955)
- 9) 阿左美章治、平塚静子、北野隆雄、江指隆年、前田宜昭：第49回日本栄養・食糧学会講演要旨集、P230(1995)
- 10) 松崎宏志、上原万里子、鈴木和春、佐藤茂、五島孜郎：日本栄養・食糧学会誌、**48**、217(1995)