

博士論文

モルモットの栄養素消化および窒素利用に
及ぼすフラクトオリゴ糖の影響に関する研究

平成 26 年 3 月

川崎 淨教

目次

要 約	1
第 1 章 緒論	3
第 2 章 モルモットの栄養素消化率および窒素利用性に及ぼす フラクトオリゴ糖の影響	13
第 3 章 窒素利用性改善効果における食糞の意義.....	23
第 4 章 モルモットの繊維消化率および消化管内容物滞留時間に及ぼす フラクトオリゴ糖の影響	28
第 5 章 モルモットの盲腸内微生物態窒素への血中尿素態窒素の移行量に及ぼす フラクトオリゴ糖の影響	35
第 6 章 総括	49
引用文献	53
謝辞.....	65

要 約

機能性甘味料として広く用いられている FOS はラットで Ca、Mg などのミネラルの吸収を促進すること、ウサギで窒素利用性を向上させることなど、飼料中栄養素の利用にも影響することが報告されており、これらの FOS の効果には大腸内微生物の活動への関与が強く示唆されている。モルモットは、ウサギと同様に、微生物発酵の場として大きな盲腸を備えており、日常的に食糞を行う。しかし、モルモットの大腸機能はウサギとは大きく異なっており、FOS 摂取の効果がウサギと同様に発現するかについては検証が必要である。本研究ではモルモットの窒素 (N) 利用性や栄養素消化に及ぼすフラクトオリゴ糖 (FOS) の影響とその発現機構の一部を調べた。

はじめに、成熟雄モルモットを用いて、栄養素消化率および窒素利用性に及ぼす FOS の影響をグルコースを対照糖として調べた。FOS3% 添加飼料を与えた時には粗灰分消化率が高まったが、ウサギで確認された N 利用性の向上は見られなかった。一方 FOS5% 添加飼料を与えた時は、尿中窒素排泄量が低下し、体内 N 保持量が増加することで、N 利用性が向上した。一方では繊維画分 (acid detergent fiber: ADF) 消化率が低下した。

次に FOS 摂取時の窒素利用性の向上に食糞が関与しているかを解明するために、食糞を阻止した状態で、FOS5% 添加飼料を与えたモルモットの窒素利用性をグルコース添加飼料と比較した。その結果、食糞を阻止しない時には認められた N 利用性向上効果が発現せず、FOS 摂取時の N 利用性の向上は食糞を介して発現することが示された。

更に、ADF 消化率に影響する要因の一つと考えられる消化管内容物の滞留時間や通過時間に及ぼす FOS 摂取の影響を調べた結果、消化管内容物の液相および固相マーカーの盲腸における平均滞留時間が減少した。したがって、FOS5% 添加飼料摂取時の ADF 消化率の低下は、盲腸内で繊維成分が微生物による消化を受ける時間が減少したことによって引き起こされた可能性が示された。

最後に、FOS による N 利用性向上の発現メカニズムの一部を明らかにするために、静脈内に投与した ^{15}N -尿素が盲腸内微生物や尿中へ移行する量に及ぼす FOS 摂取の影響を調べた。その結果、FOS 摂取時のモルモットの盲腸内微生物への血中尿素の移行量が増加し、尿中窒素への移行量は低下した。このことから FOS 摂取の効果は微生物増殖への血中尿素-N の再利用が増大することによってもたらされることを明確に示すことができた。

以上の結果から、FOS5% の食餌への添加はモルモットの ADF 消化率を低下させるが、尿中 N 排泄量を低下させ、N 平衡を増大させることが示された。FOS の摂取による N 利用性向上効果は、盲腸内微生物増殖が促進されることにより、血中尿素-N の盲腸内微生物

への取り込み量が増加し、それに伴う尿中 N 排泄量の低下によって発現する可能性が示された。この効果は大腸が発達した単胃動物で普遍的に起こる可能性が考えられ、飼料タンパク質利用性の改善だけでなく、環境への N 負荷軽減にもつながるので、単胃家畜や実験動物の飼料設計に応用できる可能性が高い。

第 1 章

緒論

1-1 後腸発酵動物

地球上に生息する哺乳類を食性によって大まかに分類すると肉食動物、雑食動物、草食動物に分けられる。これらの動物は草食性に偏っている動物ほど消化管の形態が複雑になり、繊維成分を多く含む食餌に適応した消化管機能を備えている。雑食動物や草食動物は消化管の形態から、前胃発酵動物（foregut fermenter）（複胃動物）と後腸発酵動物（hindgut fermenter）（単胃動物）に大きく分けられる。

後腸発酵動物にはヒトやブタなどの雑食動物の他に、ウサギやモルモット、ウマなどの草食動物も含まれる。特に、小型の後腸発酵動物であるウサギやモルモットは微生物発酵槽として大きな盲腸を備えている。

1-2 食糞

微生物発酵の場として盲腸を備えている小型の動物は、日常的に食糞を行う。食糞の意義は、主に大腸内で増殖した微生物の体タンパク質（微生物態タンパク質）や、微生物が合成したビタミン B 群、ビタミン K を利用することである（Ebino 1993）。図 1 はタンパク質栄養における食糞の役割を示している。体内タンパク質代謝回転の中で不要になった窒素の再利用に貢献し、結果として摂取した飼料窒素の利用性を向上させることになる。

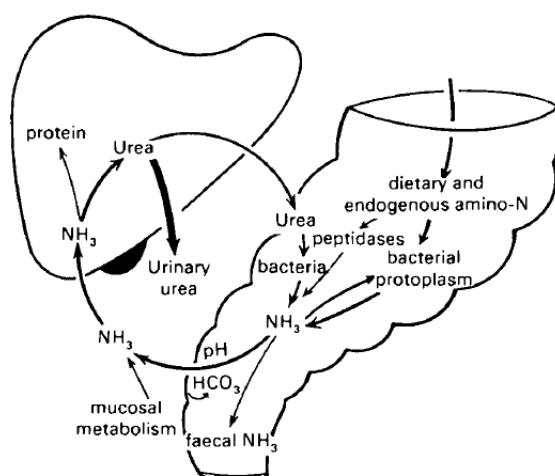


図 1. The origins and fates of intestinal ammonia. From Wrong & Vince (1984).

いくつかの食糞を行う動物種では 2 種類の糞、すなわち休息時に排泄して摂取する軟糞（盲腸糞）と主に活動時に排泄して摂取しない硬糞（普通糞）を作ることが知られている（図 2）。この明確に区分できる軟糞を摂取することを盲腸糞食

（Cecotrophy）という。軟糞には硬糞に比べてタンパク質が多く含まれ、繊維含量は低く水分含量が高い（Pehrson 1983）。最も効果的な盲腸食糞を行う動物としてウサギやリングテイルポッサムが知られている。このような動物の大腸には、液状あるいは

は微粒子状の内容物を盲腸に選択貯留する機能が備わっており、これが低い繊維消化率をもたらす要因になっていることがある (Corks *et al.* 1999)。



図 2. ウサギの硬糞 (左) と軟糞 (右)。

1-3 小型後腸発酵動物の大腸機能

大腸の内容物の貯留様式は動物種によって異なり、盲腸発酵動物の大腸内容物の貯留様式は特徴的な 2 つのパターンに分類される。すなわち、消化管内容物の液状部分 (液相) と固形粒子状部分 (固相) をほとんど分離することなく盲腸内で均一に攪拌される型 (図 3-A)、そして液相が固相部分から分離され盲腸内に選択的に貯留される型 (図 3-B) である (Sakaguchi 2003)。前者はモルモットやヌートリア、デグーなどの南米を起源とする齧歯類に多く見られ、これらの動物種では繊維消化率は後腸発酵動物の中では比較的高い (Table 1)。後者では液相内容物の選択貯留の程度が動物種によって異なり、ラット、ハムスターは比較的低度の選択貯留が認められる。ウサギがこの型の機能を備える典型的な動物であり、盲腸内には微粒子状の食事残渣を含む液相内容物が他の食事残渣と明確に分離され選択的に貯留される。

Table 1. Type of colonic separation mechanism (CSM) and concentration of crude protein (% of dry matter) in soft feces and hard feces in some small hindgut fermenters

Animal	Type of CSM	Diet (commerccail pellets)	Soft feces	Hard feces
Mouse	Mucus-trap	26.2	22.9	18.1
Guinea-pig	Mucus-trap	18.6	19.4	12.5
Nutria	Mucus-trap	15.4	19.1	13.4
Rabbit	Wash-back	17.3	35.5	13.6

From Sakaguchi (2003).

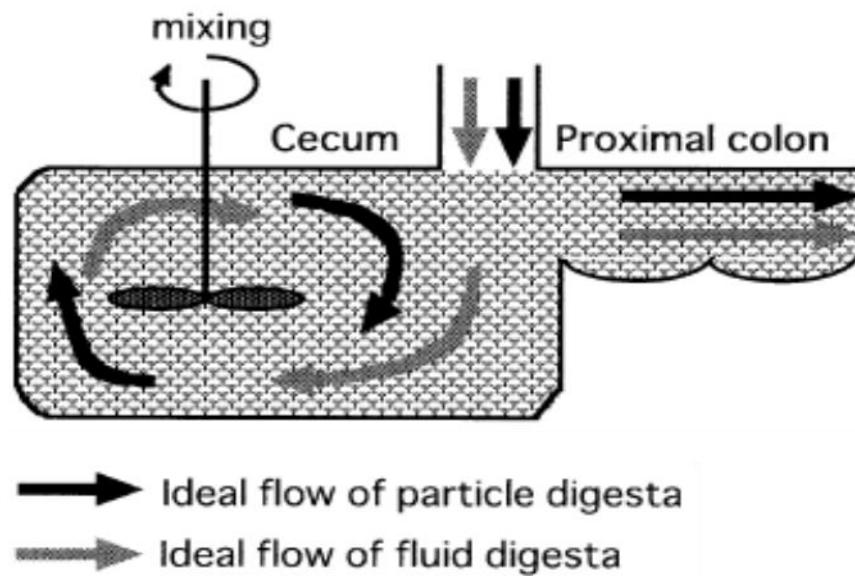


図 3-A. 内容物非選択貯留：内容物の固相と液相は消化管全体をほぼ同じ速度で移行する（Sakaguchi 2003）。

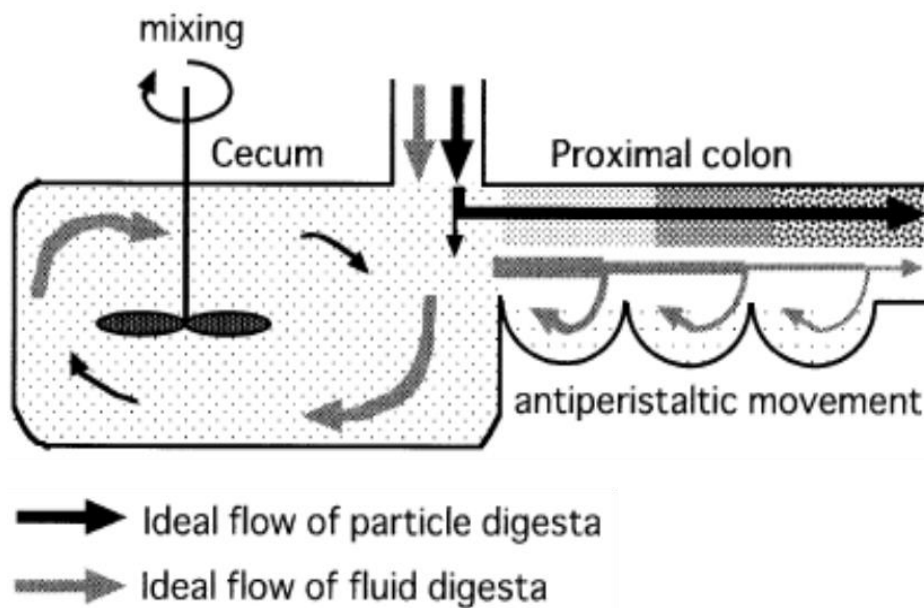


図 3-B. 液相内容物選択貯留：液相内容物は結腸で固相内容物から分離され、盲腸に逆送される（Sakaguchi 2003）。

1-4 小型後腸発酵動物の結腸における内容物分離機能

1-3 で述べたように小型後腸発酵動物には、微生物の大腸への定着を促し、大腸内微生物活性を高度に保つためと考えられる機能が備わっている。それは液相内容物分

離や微生物を選択的に分離する結腸分離機構（colonic separation mechanism）と呼ばれる機能であり、以下の2つの型に分けられる。

1つは粘液トラップ（mucus-trap）型と呼ばれる粘液依存性分離機構である（図4-A）（Corks *et al.* 1999）。この分離機構では、まず結腸内に分泌される粘液に結腸内容物から微生物が移行し選択的に保持される。次に微生物が混ざった粘液は結腸内の前後方向に走る2列の膨起に挟まれた溝の部分に移行する（図4-B）。そしてこの部分の逆蠕動によって微生物は粘液とともに盲腸に運ばれる（Sperber *et al.* 1983）。この分離機構は大腸で固相と液相が明確に分離されない種々の齧歯類に認められる

（Holtenius *et al.* 1985; Takahashi and Sakaguchi 1998）。モルモットの結腸には分離機構として、mucus-trap 型が備わっている。

もう1つの分離機構は固液分離（wash-back）型と呼ばれ、固相内容物から液相内容物を分離する機構である（図4-C）（Corks *et al.* 1999）。結腸の蠕動運動と盲腸側に向かって動く逆蠕動との組み合わせが液相内容物の盲腸への選択的な貯留をもたらすとされている（Ruckebusch and Fioramonti 1976）。液相内容物には可溶性の栄養素や微粒状の食餌成分、微生物などが含まれ、これらが盲腸内に集積することになる。この分離機構はウサギの結腸に最も顕著に認められる（図4-D）（Bjornhag 1972; Bjornhag 1981）。

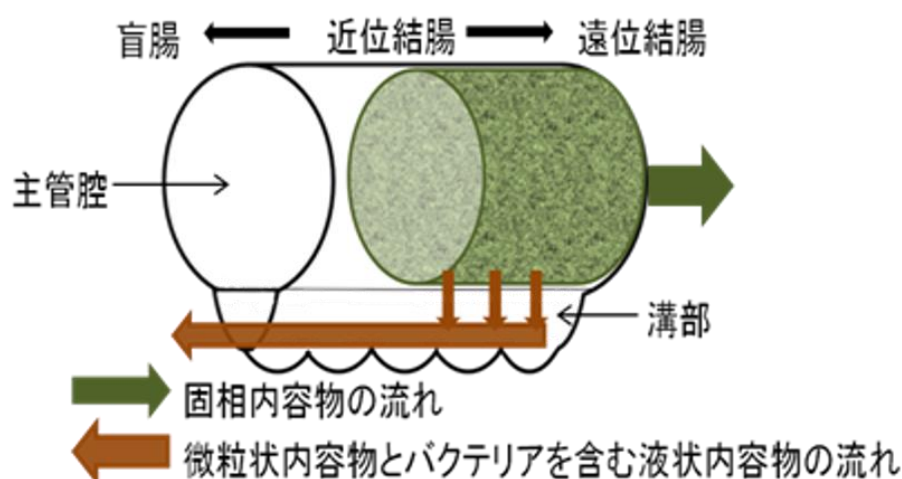


図4-A. 結腸内容物分離機構（mucus-trap型）。

結腸から分泌される粘液によってトラップされた液相内容物が固相と分離され、結腸憩室の逆蠕動によって液相が盲腸に逆送され貯留される。



図 4-B. モルモットの近位結腸（上）と盲腸（下）.

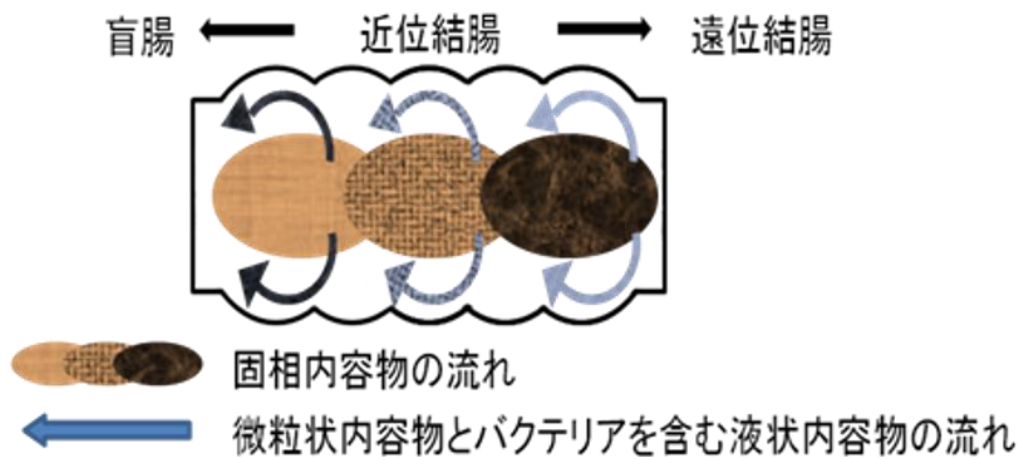


図 4-C. 結腸内容物分離機構（wash-back 型）.

結腸の固・液分離機能によって液相内容物が固相と分離され、結腸憩室の逆蠕動によって液相が盲腸に逆送され貯留される。



図 4-D. ウサギの近位結腸（上）と盲腸（下）

1-5 モルモット (Guinea pig, *Cavia porcellus*)

(1) 生産的意義

モルモットは齧歯目モルモット科の草食動物である。モルモットは病気・栄養・遺伝・毒物の研究や血清の開発、その他の医学生物学的研究に実験動物として世界中で広く用いられている。しかしながら一方では、モルモットは齧歯類小家畜種の代表的なものであり、南米のペルーやエクアドルでは重要な肉資源であり、アフリカの数か国でも飼育されている。

(2) 消化生理

モルモットの繊維消化能力は単胃動物の中では高い方に位置し、馬と同程度の消化能力を持つ。モルモットはよく発達した盲腸を持つ草食動物で、盲腸の内容物重量は体重の4～5%に及び、結腸の前半部と共同して内容物を貯留し、巨大な発酵槽を形成している。モルモットの大腸では固相と液相ともに混合貯留される (Sakaguchi 2003)。モルモットの結腸には、mucus-trap 型と呼ばれる、バクテリアを粘液にトラップし、その粘液を結腸壁の前後方向に走る溝を通して盲腸内に逆流させる機構が備わっている。

1-6 ウサギ (Rabbit, *Oryctolagus cuniculus*)

(1) 生産的意義

家畜として飼育されているウサギ（ウサギ目ウサギ科）はアナウサギを改良したもので、ノウサギ（Hare）とは異なる。ウサギは世界中に広く分布し、多くの地域では食用ならびに毛皮用とされている。特にヨーロッパでは良質なタンパク質、低脂肪、低カロリー、低コレステロールの食肉として人気が高い。ウサギの肉は日本ではあまり一般的でないが、主に秋田県で中仙ジャンボウサギが食用として品種改良、飼育されている。

(2) 消化生理

ウサギは容量が大きくかつ形態が特徴的な盲腸を持つ小型の盲腸発酵動物である。ウサギは他の草食動物と比べ、繊維消化能力が低く、雑食性のラットとほとんど変わらない。ウサギの低い繊維消化能力は、ウサギに特徴的な大腸分離機構によってもたらされる。

ウサギの結腸には消化管内容物の粒子状繊維画分と腸内細菌を含む可溶性非繊維画分を分離し（固液分離能）、繊維質を速やかに排泄する一方、消化や発酵しやすい非繊維画分を盲腸内に逆走して、長時間滞留させる働き（液相内容物選択貯留）が備わっている。

1-7 フラクトオリゴ糖 (FOS)

フラクトオリゴ糖は、ショ糖にフラクトースが1～3個結合した難消化性のオリゴ糖であり、I-kestose、nystose、fructosyl nystoseなどの混合物である。甘味度はショ糖の約30～60%で、ショ糖を原料として、糖加水分解酵素であるフラクトシルトランスフェラーゼを用いて生産されている。FOSは、アスパラガス、ニンニク、ゴボウ、タマネギなどの野菜類や蜂蜜にも含まれている。FOSは消化されずに大腸まで届き、腸内細菌叢の改善、便通の改善などの整腸作用を発揮することから、機能性甘味料として広く用いられている。人での有効性については、「おなかの調子を整える食品」、「ミネラルの吸収を助ける食品」として、FOSを関与成分とした特定保健用食品が許可されている。

1-8 ラットに及ぼすフラクトオリゴ糖の影響

ラットではフラクトオリゴ糖摂取により、Ca、Mgなどのミネラル吸収が促されると報告されている。ラットにおける主な微生物発酵部位である盲腸を切除した場合、FOSのCa吸収促進作用がほとんど消失し、Mgの吸収促進作用も70%程度に減少したことから、FOS摂取によるミネラル吸収促進作用に大腸および大腸内発酵が関与していることが明らかとなっている（Ohta 2005）。

また、ラットの盲腸および消化管全体での内容物滞留時間が、FOS10%含有飼料摂取時に延長されると報告されている（Sakaguchi *et al.* 1998）。

1-9 ウサギに及ぼすフラクトオリゴ糖の影響

当研究室のこれまでの研究により、フラクトオリゴ糖を飼料に 2% 添加した場合、ウサギの窒素利用性が向上することが明らかとなっている。これにはウサギの結腸に備わっている固液分離 (wash-back) 型微生物分離機構が関与している。結腸微生物分離機構により微生物は盲腸へ選択的に貯留される。盲腸内で増殖した微生物は軟糞として排泄され、食糞により再び摂取される。このとき、体外へ尿として排泄される尿素の一部が微生物増殖に利用される。したがって、FOS により増殖が促進された微生物を微生物態タンパク質として摂取するため、ウサギの窒素利用性は向上すると言える (Tsuzuki and Sakaguchi 2010)。

また、飼料に FOS5% 添加した場合、ラットで見られるような盲腸や消化管全体での内容物滞留時間の延長はウサギではみられないことが当研究室のこれまでの研究から示されている (未発表データ)。

1-10 Cr-CWC (Cr 標識細胞壁成分)

植物の細胞壁構成物質に Cr を媒染して作成したものである。食餌成分に近いため、消化管内容物と近い動きをすると考えられており、固相マーカーとして用いる。

〈作成方法〉

アルファルファやチモシーなどの植物を刈り取り、天日干しし粉碎する。植物の色素を抜くために、粉碎した植物サンプルを 3 l ビーカーに入れ、水を 1.5 l 程度入れ沸騰させる。乾燥後、3 l ビーカーに 1 l の水とサンプル 20 g 程度を入れ、サンプルの重さの約 13% となるように、 $\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ を加える。アルミホイルでフタをし、約 100°C で 24 時間加熱する。放冷後、バットの上に篩を置き、そこでサンプルと液体とを分離し、Cr を回収する。液体が透明になるまで水を加えて分離を繰り返し、サンプルを 65°C で乾燥させる (Udén *et al.* 1980)。

1-11 Co-EDTA (エチレンジアミン四酢酸コバルト塩)

市販の化学物質であり、液相マーカーとして用いる。マーカー中の Co 濃度は約 13% である。

1-12 研究目的

前述のように、FOS はラットで Ca、Mg などのミネラルの吸収を促進することや消化管内容物滞留時間を延長させること、ウサギで窒素利用性を向上させることなど、飼料中栄養素の利用にも影響することが報告されており、これらの FOS の効果には大腸内微生物の活動が関与することが強く示唆されている。大腸の構造や機能すなわち、内容物分離能や微生物貯留能は動物種間で異なり、動物の栄養に対する大腸内微生物活動の関与は動物種間で量的・質的に異なると予想され、FOS 摂取の効果が動物種間で異な

る可能性が考えられる。本研究では結腸に粘液トラップ型の微生物逆送機構を備えているモルモットの栄養素消化や窒素利用性に及ぼす影響と、その作用メカニズムの一部と考えられる消化管内容物の滞留時間や通過時間および盲腸への血中尿素の移行量に及ぼす影響を調べた。

第 2 章

モルモットの栄養素消化率および
窒素利用性に及ぼすフラクトオリゴ糖の影響

2-1 目 的

本実験で用いるフラクトオリゴ糖（FOS）は難消化発酵性糖質に分類される。難消化発酵性糖質は小腸で消化されずに大腸に届き、腸内微生物によって発酵されることが知られている。この他にも、ラットにおいては FOS の摂取によるミネラル吸収促進効果（Ohta *et al.* 1994）や腸内ビフィズス菌や乳酸菌量の増加（Matsuura *et al.* 2001）が報告されており、ヒトにおいても FOS の摂取により腸内ビフィズス菌量が増加することが報告されている（Mitsuoka *et al.* 1987; Tokunaga *et al.* 1993）。さらに、ウサギにおいては飼料へ FOS を 2%、5% 添加することにより、ウサギの窒素（N）蓄積率の向上と尿中窒素排泄量の低下が報告されている（Tsuzuki and Sakaguchi 2010; Xiao L *et al.* 2011）。ウサギは大きな盲腸を持ち、そこで増殖した微生物を摂取（盲腸食糞）することが知られている。

難消化性炭水化物が微生物のデアミナーゼやウレアーゼ活性を促進することで、アンモニアが生成され、このアンモニアは微生物の主な窒素源として利用されることが報告されている（Varel *et al.* 1974）。またラットにおいて難消化発酵性糖質の摂取により盲腸内および糞中微生物態窒素量の増加と尿中窒素排泄量の減少が報告されている（Levrat *et al.* 1991; Yones *et al.* 1995）。この現象は難消化発酵性糖質摂取により血中尿素の盲腸への流入量が増加することによって引き起こされる可能性が示唆されている（Rémésy and Demigné 1989）。

モルモットはウサギと同様に大きな盲腸を持ち、食糞を行うことが知られている。しかし、大腸に備わる微生物分離機構はモルモット（mucus-trap 型）とウサギ（wash-back 型）で異なる構造をしている（Sperber *et al.* 1983; Cork *et al.* 1999）ため、FOS が及ぼす影響は動物種間で異なる可能性が考えられる。

そこで本実験では、いまだ報告が行われていないモルモットの栄養素消化や窒素出納に及ぼす FOS の影響を検討した。

2-2 材料と方法

実験 1

(1) 試験飼料および試験群

試験飼料は市販固形飼料（ラボ G スタンダード 日本農産工業株式会社）にグルコース（ナカライテスク株式会社）および FOS（明治フードマテリア株式会社）を 3% 添加して作成した（Table 2-1）。

Table 2-1. Compositions of the experimental diets

Sugar (%)	Glucose	FOS
	3	3
Analyzed chemical composition (g/kg)		
Dry matter	901	901
Crude protein	166	172
Crude fat	35	39
Acid-detergent fiber (ADF)	219	225
Crude ash	95	93

FOS: fructooligosaccharide

(2) 供試動物

実験動物は Hartley 系の成熟雄モルモット（平均体重 435 ± 66 g）を 12 頭用いた。動物の飼育は、室温 $24 \pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度 50–60%、12 時間明期（7:00–19:00）の恒温温室で行った。モルモットは 1 頭ずつ金網底の代謝ケージに収容して飼育した。実験動物は日本 SLC 株式会社から購入した。

(3) 試験方法

馴化期間を 3 日間設けた後、5 日間代謝試験を行った。試験期間中の給餌量は各群 50 g/day とし、水は自由摂取とした。すべてのモルモットの摂食量を毎日測定した。摂食量は給餌量から残食糧を差し引いたものとした。体重は試験開始時と試験終了時に測定した。試験は岡山大学動物実験委員会の承認を得て、規則に従い行った。

(4) サンプル採取

試験期間中の試験飼料消化率および窒素出納を測定するため、代謝試験期間中は代謝ケージの下にトレイと金網を置き、糞と尿を個別に全量採取した。全糞は 60°C 、24 時間通風乾燥し、全尿は分析まで 4°C で保存した。尿中窒素の消散を防ぐため、尿を回収するときに 1.5% ホウ酸溶液を用いた。金網で作製した糞トラップの網目に付いた尿は 1.5% ホウ酸溶液で洗い流した。

(5) 分析方法

(a) 粗タンパク質

採取した糞は通風乾燥機（ 60°C 、24h）で乾燥し、秤量後、粉碎した物を試料として用いた。

糞中、尿中、飼料中の窒素量をケルダール法により測定した。なお、滴定には 0.05N

ホウ酸標準溶液を用いた。粗タンパク質消化率、窒素蓄積率は、以下の計算式によって算出した。

$$\text{粗タンパク質消化率 (\%)} = (\text{摂取窒素量} - \text{糞中窒素量}) / \text{摂取窒素量} \times 100$$

$$\text{窒素蓄積率 (\%)} = (\text{摂取窒素量} - \text{糞中窒素量} - \text{尿中窒素量}) / \text{摂取窒素量} \times 100$$

(b) 粗灰分

粗灰分の測定には、粉碎した飼料と糞を試料に用いた。試料約 1 g をあらかじめ 550℃ で灰化して恒量を求めたルツボにとり、ガスバーナーで加熱した。試料が炭化し煙が出なくなった後、電気炉に入れ 550℃ で 8 時間灰化して放冷後秤量した。粗灰分消化率は、以下の計算式によって算出した。

$$\text{粗灰分消化率 (\%)} = (\text{摂取灰分量} - \text{糞中灰分量}) / \text{摂取灰分量} \times 100$$

(c) 繊維画分

繊維画分の測定には、粉碎した飼料と糞を試料に用いた。酸性デタージェント繊維 (acid detergent fiber ; ADF) の定量法により、ADF の測定を行った。粗繊維消化率は、以下の計算式によって算出した。

$$\text{繊維画分(ADF)消化率(\%)} = (\text{摂取繊維量} - \text{糞中繊維量}) / \text{摂取繊維量} \times 100$$

(d) 乾物

試料約 1 g をあらかじめ 550℃ で灰化して恒量を求めたルツボにとり、135 ℃ の高温乾燥機に入れて 2 時間乾燥後、取り出し、デシケーター中で 30 分間放冷後、重量を測定した。乾物消化率、有機物消化率は以下の計算式によって算出した。

$$\text{水分含量 (g)} = \text{最初の重量(サンプル+ルツボ)} - \text{乾燥後の重量}$$

$$\text{乾物重量 (g)} = \text{サンプルの湿重量} - \text{水分含量}$$

$$\text{乾物消化率 (\%)} = (\text{摂取乾物量} - \text{糞中乾物量}) / \text{摂取乾物量} \times 100$$

$$\text{有機物消化率 (\%)} = \text{乾物消化率} - \text{灰分消化率}$$

(6) 統計処理

対象群と FOS 群との比較は t 検定 (Microsoft Office Excel 2007; Microsoft Corporation, Redmond, Washington, United State of America) で行った。危険率 5%以下を有意差とした。

実験 2

(1) 試験飼料および試験群

試験飼料は市販固形飼料（ラボ G スタANDARD 日本農産工業株式会社）にグルコース（ナカライテスク株式会社）および FOS（明治フードマテリア株式会社）を 5% 添加して作成した（Table 2-2）。

Table 2-2. Compositions of the experimental diets

Sugar (%)	Glucose	FOS
	5	5
Analyzed chemical composition (g/kg)		
Dry matter	901	900
Crude protein	165	160
Crude fat	115	110
Acid-detergent fiber (ADF)	222	210
Crude ash	94	92

FOS: fructooligosaccharide

(2) 供試動物

実験 1 と同様に、実験動物として Hartley 系の成熟雄モルモット（平均体重 607 ± 25 g）を 18 頭用いた。動物の飼育は、室温 $24 \pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度 50–60%、12 時間明期（7:00–19:00）の恒温室で行った。モルモットは 1 頭ずつ金網底の代謝ケージに収容して飼育した。

(3) 試験方法

実験 1 と同様に、馴化期間を 3 日間設けた後、5 日間代謝試験を行った。試験期間中の給餌量は各群 50 g/day とし、水は自由摂取とした。すべてのモルモットの摂食量を毎日測定した。摂食量は給餌量から残食量を差し引いたものとした。体重は試験開始時と試験終了時に測定した。試験は岡山大学動物実験委員会の承認を得て、規則に従い行った。

(4) サンプル採取

実験 1 と同様に、試験期間中の試験飼料消化率および窒素出納を測定するため、代謝試験期間中は代謝ケージの下にトレイと金網を置き、糞と尿を個別に全量採取した。全糞は 60°C 、24 時間通風乾燥し、全尿は分析まで 4°C で保存した。尿中窒素の消散を防ぐため、尿を回収するときに 1.5% ホウ酸溶液を用いた。金網で作製した糞トラップの網目に付いた尿は 1.5% ホウ酸溶液で洗い流した。

(5) 分析方法

実験 1 と同様の分析方法で、試料中粗タンパク質、粗灰分、粗繊維、乾物含量を測定し、モルモットの栄養素消化率および窒素出納を算出した。

(6) 統計処理

対象群と FOS 群との比較は t 検定 (Microsoft Office Excel 2007; Microsoft Corporation, Redmond, Washington, United State of America) で行った。危険率 5%以下を有意差とした。

2-3 結 果

実験 1

(1) 飼料成分の見かけの消化率 (Table 2-3)

代謝試験期間中の飼料成分の粗灰分消化率は、グルコース群と比べ、FOS 群で有意に増加した。ADF の消化率が FOS 群で増加したが、有意差は見られなかった。

Table 2-3. Fecal concentrations and digestibilities or absorption rates of nutrients in guinea pigs (n=6)

Item	Glucose	FOS
Fecal concentration (% of dry matter)		
Crude protein	13.7±0.50	14.0±0.42
Crude ash	14.1±0.33	13.7±0.33*
ADF	40.0±0.85	39.2±1.08
Digestibility or absorption rate (%)		
Dry matter	56.3±0.34	57.4±2.44
Crude protein	67.0±1.75	67.7±1.66
Crude ash	33.1±7.13	44.9±9.64**
ADF	25.1±2.43	29.9±4.98

Values are means ± SD.

*, ** Significantly difference from the animal in glucose group ($P<0.05$ and $P<0.01$, respectively).

(2) 摂食量および窒素出納 (Table 2-4)

試験期間中の摂食量に FOS 添加による影響は見られなかった。グルコース群に比べ、FOS 群でモルモットの尿中窒素排泄量が低下傾向 ($P=0.06$) を示し、窒素蓄積率が増加傾向 ($P=0.051$) を示したものの、有意差は見られなかった。

Table 2-4. Feed intake, nitrogen balance and nitrogen retention rates in guinea pigs (n=6)

Item	Glucose	FOS
Feed intake (g/day)	46.3±4.8	47.8±7.6
Nitrogen intake (g/day)	1.29±0.11	1.32±0.21
Nitrogen excretion in feces (g/day)	0.42±0.06	0.42±0.06
Nitrogen excretion in urine (g/day)	0.50±0.07	0.48±0.11
Nitrogen retention (g/day)	0.36±0.06	0.41±0.10
Nitrogen retention rate based on intake (%)	28.3±4.54	31.3±5.76
Nitrogen retention rate based on digested (%)	42.2±6.60	46.2±8.02

Values are means ± SD.

実験 2

(1) 飼料成分の見かけの消化率 (Table 2-5)

代謝試験期間中の飼料成分の ADF 消化率は、グルコース群と比べ、FOS 群で有意に低下した。

Table 2-5. Fecal concentrations and digestibilities or absorption rates of nutrients in guinea pigs (n = 9)

Item	Glucose	FOS
Fecal concentration (% of dry matter)		
Crude protein	13.9±0.56	14.1±0.94
Crude ash	10.8±0.70	10.6±0.59
ADF	38.3±2.84	40.0±1.20*
Digestibility or absorption rate (%)		
Dry matter	55.3±2.54	54.4±4.12
Crude protein	65.4±2.21	64.6±2.48
Crude ash	61.8±5.92	58.8±8.23
ADF	26.1±7.09	19.1±5.97*

Values are means ± SD.

* Significant difference from the animal in glucose group ($P < 0.05$).

(2) 摂食量および窒素出納 (Table 2-6)

試験期間中の摂食量に FOS 添加による影響は見られなかった。グルコース群に比べ、FOS 群で窒素蓄積量や窒素蓄積率が有意に高い値を示し、尿中窒素排泄量が有意

に低下した。

Table 2-6. Feed intake, nitrogen balance and nitrogen retention rates in guinea pigs (n=9)

Item	Glucose	FOS
Feed intake (g/day)	46.6±4.5	44.4±7.0
Nitrogen intake (g/day)	1.22±0.11	1.20±0.11
Nitrogen excretion in feces (g/day)	0.42±0.06	0.42±0.06
Nitrogen excretion in urine (g/day)	0.42±0.12	0.29±0.11**
Nitrogen retention (g/day)	0.38±0.09	0.47±0.10*
Nitrogen retention rate based on intake (%)	31.1±8.39	40.3±9.08*
Nitrogen retention rate based on digested (%)	47.9±12.0	61.2±13.9*

Values are means ± SD.

*, ** Significantly difference from the animal in glucose group ($P<0.05$ and $P<0.01$, respectively).

2-4 考 察

実験 1 では、モルモットの窒素出納や粗タンパク質消化率、窒素蓄積率（（摂取 N-糞と尿中排泄 N）/摂取 N）に対して、フラクトオリゴ糖添加の影響は見られなかった。しかし、実験 2 では FOS 添加飼料によってモルモットの尿中窒素排泄量が有意に低下し、窒素蓄積率が有意に増加した。ウサギでは FOS 添加による窒素利用性の向上が認められており（Tsuzuki and Sakaguchi 2010）、本実験でもモルモットで FOS5% 添加によりウサギと同様の結果が得られた。しかし、FOS3% 添加では窒素出納に及ぼす影響は見られなかった。ウサギでは FOS2% 添加と、モルモットよりも少量の添加量で窒素出納を向上させたが、今回モルモットでは 5% の FOS 添加が必要であった。この動物間の効果発現に必要な容量の違いは盲・結腸の微生物貯留機能に一部起因する可能性が考えられる。

結腸における微生物を盲腸へ逆輸送する仕組みが、ウサギとモルモットは、それぞれ wash-back 型と mucus-trap 型で異なる（Bjornhag 1972; Bjornhag 1981; Holtenius *et al.* 1985; Takahashi and Sakaguchi 1998）。結腸の微生物逆輸送機能により盲腸内の微生物増殖が促され、食糞による微生物体タンパク質摂取量の増大が窒素利用性を向上すると考えられるので、モルモットの微生物貯留様式はウサギのものと比べると、微生物量の増大を食糞量の増大へと結びつける観点からは劣る方式と考えられる。すなわちモルモットの結腸における微生物逆輸送機能は粘液に微生物をト

ラップすることによって盲腸側に輸送するもので、ウサギのような内容物から微生物を絞り出して逆輸送する方式に比べると、結腸内の微生物のうち逆送される割合がモルモットでは低い可能性がある。

またモルモットでは、内容物の固相と液相は分離されることなく盲腸内に流入・貯留攪拌され、盲腸から一部ずつ連続的に排出される (Sakaguchi *et al.*)。モルモットと同じ微生物分離機能を備えるヌートリアでは、摂取しない硬糞にも盲腸内容物が一定量含まれることが示されている (Takahashi and Sakaguchi 1998, 2000)。一方ウサギでは、微生物を含む液状内容物が結腸で固相から分離され、選択的に盲腸に貯留されることで微生物の増殖が保証される (Sakaguchi 2003)。さらに、盲腸内容物は1日のうちの一定時間内に排出され、排出される内容物は軟糞としてほとんど摂取されるので、盲腸内容物はモルモットに比べると効率よく摂取されと考えられる。

これらの点はウサギの大腸機能がモルモットのそれに比べ、より優れた微生物逆輸送機能と貯留能力を備えていることを示唆するものであり、FOS 添加による盲腸内の微生物増殖量の増大を、タンパク質栄養に対してより鋭敏に反映できるものと考えられる。

実験 1 において、FOS 3% 添加により繊維消化率は増加傾向 ($P=0.059$) を示した。FOS の飼料への添加はラットの盲腸の肥大を招き、内容物滞留時間を延長させるという報告がある (Sakaguchi *et al.* 1998)。これは大腸内に流入した FOS の浸透圧効果による内容物中水分の保持量が増し、内容物の容積が増大することも原因の一つと考えられるが、盲腸内容物の増大と滞留時間の延長は繊維消化にとっては好都合とみなされる。モルモットでも FOS の添加によって大腸内容物の滞留時間の遅延を来たしたとすれば、このことが繊維消化率の上昇をもたらす原因の一つと考えられる。

反芻動物の反芻胃内では、バクテリア間の相互依存関係がある。すなわち、デンプンなどの易発酵性の糖質を分解利用するバクテリア増殖に伴って生成される分岐鎖アミノ酸が繊維分解菌の増殖の必須因子であることが示されている (Miura 1983)。このような現象が FOS を摂取したモルモットの盲腸でも起こった可能性は否定できない。以上のように繊維消化率の向上は FOS による大腸内容物貯留と盲腸内バクテリアに及ぼす効果によってもたらされた可能性が考えられる。モルモットは小型の後腸発酵動物の中では比較的消化率が高い (Sakaguchi *et al.* 1987; Sakaguchi and Nabata 1992)。FOS によって更に消化率が高まると、飼料エネルギーの利用効率が有意に向上する可能性も考えられる。

しかし、実験 2 において、モルモットで FOS 5% 添加により繊維消化率が低下した。反芻動物に対して高デンプン食を与えると、繊維消化率が低下することはよく知られている。デンプンが大量に流入した反芻胃では、デンプンの速やかな発酵により生成する乳酸の蓄積に伴う pH の低下を来し、これが繊維分解菌の活性低下につながる。このような理由によって比較的低下量の FOS 3% 添加と異なり、FOS 5% 添加で

は繊維消化率が低下した可能性が考えられる。

FOS 3%添加飼料ではモルモットの灰分消化率が FOS 添加で有意に高くなった。ラットではフラクトオリゴ糖摂取により、Ca、Mg などのミネラル吸収が促進されると報告されている。さらにラットにおける主な微生物発酵部位である盲腸を切除した場合、FOS の Ca 吸収促進作用がほとんど消失し、Mg の吸収促進作用も 70%程度に減少したことから、FOS 摂取によるミネラル吸収促進作用に大腸および大腸内発酵が関与するとされている(Ohta 2005)。

以上本実験の結果から、難消化発酵性糖質である FOS は、モルモットにおいても、ウサギで認められている飼料窒素の利用性を改善する効果が認められた。しかし、その効果発現には、ウサギと比較して FOS の高用量を必要とすることが示唆された。

第 3 章

窒素利用性改善効果における食糞の意義

3-1 目 的

前章では、飼料へのフラクトオリゴ糖（FOS）の添加が、モルモットの栄養素消化率および窒素利用性に及ぼす影響について検討した。その結果、FOS5%添加時にモルモットの尿中窒素排泄量が低下し、窒素蓄積率が増加した。

モルモットは大きな盲腸を備えており、そこで増殖した微生物態タンパク質を摂取（食糞）することにより、食餌由来成分に加えてビタミンの摂取や体内代謝回転で不要となった窒素を再利用している。モルモットは日常的に食糞を行う動物であり、モルモットの栄養生理における食糞の意義は大きいと言える。

窒素利用性向上の効果は FOS の摂取により、盲腸内微生物態タンパク合成に利用される血中尿素態窒素の盲腸への移行量が増加し、盲腸内微生物増殖が促進されることと、それに伴う尿中窒素排泄量の低下および食糞による微生物態タンパク質の摂取によって発現する可能性が考えられる。

そこで、本章では窒素利用性の向上が食糞を介してもたらされるかを解明するために、モルモットの食糞を阻止し、飼料へ FOS を 5%添加して、栄養素消化率および窒素出納に及ぼす FOS の効果について調べた。

3-2 材料と方法

(1) 試験飼料および試験群

試験飼料は市販固形飼料（ラボ G スタンダード 日本農産工業株式会社）にグルコース（ナカライテスク株式会社）および FOS（明治フードマテリア株式会社）を 5%添加して作成した（Table 3-1）。

Table 3-1. Compositions of the experimental diets

Sugar (%)	Glucose 5	FOS 5
Analyzed chemical composition (g/kg)		
Dry matter	924	926
Crude protein	163	164
Crude fat	114	109
Acid-detergent fiber (ADF)	236	232
Crude ash	92	91

FOS: fructooligosaccharide

(2) 供試動物

実験動物は Hartley 系の成熟雄モルモット（平均体重 955 ± 77 g）を 12 頭用いた。動物の飼育は、室温 $24 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 、湿度 50–60%、12 時間明期（7:00–19:00）の恒温温室で行った。モルモットは 1 頭ずつ金網底の代謝ケージ内に木枠（ $9 \times 9 \times 33$ cm）を設置して、木枠の中に収容して飼育した。

(3) 試験方法

馴化期間を 3 日間設けた後、5 日間代謝試験を行った。試験期間中の給餌量は各群 50 g/day とし、水は自由摂取とした。すべてのモルモットの摂食量を毎日測定した。摂食量は給餌量から残食糧を差し引いたものとした。体重は試験開始時と試験終了時に測定した。試験は岡山大学動物実験委員会の承認を得て、規則に従い行った。

(4) サンプル採取

前章と同様に、試験期間中の試験飼料消化率および窒素出納を測定するため、代謝試験期間中は代謝ケージの下にトレイと金網を置き、糞と尿を個別に全量採取した。全糞は 60°C 、24 時間通風乾燥し、全尿は分析まで 4°C で保存した。尿中窒素の消散を防ぐため、尿を回収するときに 1.5% ホウ酸溶液を用いた。金網で作製した糞トラップの網目に付いた尿は 1.5% ホウ酸溶液で洗い流した。モルモットの硬糞と軟糞は形状が似ているため、食糞阻止によって得られた糞は分別せずに、まとめて糞サンプルとした。

(5) 分析方法

前章と同様の分析方法で、試料中粗タンパク質、粗灰分、粗繊維、乾物含量を測定し、モルモットの栄養素消化率および窒素出納を算出した。

(6) 統計処理

対象群と FOS 群との比較は t 検定（Microsoft Office Excel 2007; Microsoft Corporation, Redmond, Washington, United State of America）で行った。危険率 5% 以下を有意差とした。

3-3 結 果

(1) 飼料成分の見かけの消化率（Table 3-2）

食糞阻止条件下では、飼料への FOS 添加が代謝試験期間中の栄養素消化率に及ぼす影響は見られなかった。

Table 3-2. Fecal concentrations and digestibilities or absorption rates of nutrients in guinea pigs prevented from cecotrophy (n=6)

Item	Glucose	FOS
Fecal concentration (% of dry matter)		
Crude protein	16.4±0.62	16.3±0.78
Crude ash	11.4±0.10	11.4±0.44
ADF	40.4±0.90	39.9±1.00
Digestibility or absorption rate (%)		
Dry matter	52.3±2.05	51.4±2.13
Crude protein	53.2±4.41	53.0±1.39
Crude ash	44.1±2.82	42.3±2.31
ADF	20.2±5.34	17.7±6.83

Values are means ± SD.

(2) 摂食量および窒素出納 (Table 3-3)

食糞阻止条件下では、モルモットの摂食量に及ぼす FOS の影響は見られなかった。また、グルコース群に比べ FOS 群でモルモットの尿中窒素排泄量が低下傾向 ($P=0.07$) を示し、糞中窒素排泄量が増加傾向 ($P=0.09$) を示した。しかし、モルモットの窒素蓄積率に及ぼす FOS の影響は見られなかった。

Table 3-3. Feed intake, nitrogen balance and nitrogen retention rates in guinea-pigs prevented from cecotrophy (n=6)

Item	Glucose	FOS
Feed intake (g/day)	42.5±6.1	41.9±4.2
Nitrogen intake (g/day)	1.11±0.18	1.10±0.11
Nitrogen excretion in feces (g/day)	0.49±0.06	0.52±0.45
Nitrogen excretion in urine (g/day)	0.26±0.07	0.23±0.07
Nitrogen retention (g/day)	0.36±0.09	0.38±0.10
Nitrogen retention rate based on intake (%)	32.0±5.30	34.4±8.76

Values are means ± SD.

3-4 考 察

本章の実験では、モルモットの食糞行動を阻止して、飼料への FOS5%添加がモルモットに及ぼす影響を調べた。その結果、FOS 群でモルモットの尿中窒素排泄量の低下傾向や糞中窒素排泄量の増加傾向が見られたものの、モルモットの栄養素消化率および窒素蓄積に及ぼす FOS の影響は確認されなかった。

以上の結果から、モルモットでみられる、飼料への FOS5%添加による窒素利用性改善効果は食糞を介すことで発現する可能性が示された。また、ADF 消化率の低下も食糞阻止条件下でみられず、前章の実験 1、2 と比べて粗タンパク質消化率や ADF 消化率が低いことから、モルモットの栄養生理にとって食糞行動は欠かせないものであることが示唆される。

第 4 章

モルモットの繊維消化率および消化管内容物
滞留時間に及ぼすフラクトオリゴ糖の影響

4-1 目 的

第2章で、飼料へのフラクトオリゴ糖（FOS）5%添加により、モルモットの繊維画分（acid detergent fiber: ADF）消化率が低下した。

反芻動物において、飼料へデンプンを多量に添加すると繊維消化率が低下することが報告されている（Moe *et al.* 1965; Broun 1966; Tyrrell and Moe 1975）。また、ヒツジにおいて、FOS の摂取により繊維消化率が低下するという報告もなされている（Li *et al.* 2011）。これらの反芻動物でみられる繊維消化率の低下の要因として、反芻胃内で起こるデンプンの発酵に伴う、乳酸生成の増加や pH の低下による繊維分解菌の活性の低下が示唆されている。

一方、ラットにおいて、FOS の添加による ADF 消化率の低下は報告されておらず（Sakaguchi *et al.* 1998）、ウサギにおいても ADF 消化率の低下は報告されていない（未発表データ）。しかし、ラットやウサギと同じく後腸発酵動物であるウマにおいて、飼料への FOS の添加が ADF 消化率を低下させる傾向があるという報告（Gürbüz *et al.* 2010）がなされており、動物種間で FOS の繊維消化率に及ぼす影響は異なる可能性が示唆される。本研究で用いるモルモットはウサギやラットと同じ小型の後腸発酵動物であるが、繊維消化能力は反芻動物やウマと同等である。

ウサギにおいて、繊維消化率は消化管内容物滞留時間に依存するという報告（Chiou *et al.* 1998）があり、モルモットにおいても、FOS 摂取による盲腸内 pH の低下や消化管内容物滞留時間の減少が、ADF 消化率低下の要因として考えられるが、そのような報告は見られない。

そこで本章では、第2章で確認された、飼料への FOS5%添加時にモルモットの ADF 消化率が低下した要因の一つとして考えられる、消化管内容物滞留時間の減少が、飼料への FOS5%添加によってみられるか検討することとした。

4-2 材料と方法

（1）試験飼料および試験群

試験飼料は市販固形飼料（ラボ G スタンダード 日本農産工業株式会社）にグルコース（ナカライテスク株式会社）および FOS（明治フードマテリア株式会社）を 5% 添加して作成した（Table 4-1）。

Table4-1. Compositions of the experimental diets

Sugar (%)	Glucose	FOS
	5	5
Analyzed chemical composition (g/kg)		
Dry matter	913	922
Crude protein	165	160
Crude fat	34	33
Acid-detergent fiber	219	216
Crude ash	95	95

FOS: fructooligosaccharide.

(2) 供試動物

実験動物は Hartley 系の成熟雄モルモット（平均体重 575 ± 33 g）を 12 頭用いた。動物の飼育は、室温 $24 \pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度 50–60%、12 時間明期（7:00–19:00）の恒温室で行った。モルモットは 1 頭ずつ金網底の代謝ケージに収容して飼育した。実験動物は日本 SLC 株式会社から購入した。

(3) 使用マーカー

固相マーカーとしては Cr 標識細胞壁成分（Cr-CWC）を用い、液相マーカーとしてエチレンジアミン四酢酸コバルト塩（Co-EDTA）を用いた。

(4) 試験方法

馴化期間を 5 日間設けた後、滞留時間測定試験として 7 日間、経時的にモルモットの糞を採取した。試験期間中の給餌量は各群 50 g/day とし、水は自由摂取とした。すべてのモルモットの摂食量を毎日測定した。摂食量は給餌量から残食糧を差し引いたものとした。体重は試験開始時と試験終了時に測定した。馴化期間終了後、モルモットに Cr-CWC 0.3 g、Co-EDTA 0.3 g を水と片栗粉に混ぜ、経口投与した。マーカー投与後は通常通り飼料を与えた。

マーカー投与 1 時間後から、1 時間間隔で 12 時間（12 サンプル）、12 時間後から、2 時間間隔で 24 時間（12 サンプル）、36 時間後から、6 時間間隔で 120 時間（20 サンプル）、経時的に糞を採取した。試験期間は 7 日間とした（最大で計 44 サンプル）。

滞留時間測定試験期間中の後半 5 日間は全尿を前章と同様に回収した。試験は岡山大学動物実験委員会の承認を得て、規則に従い行った。

(5) 分析方法

モルモットから採取した糞は、通風乾燥機（ 60°C 、24h）で乾燥し、秤量後、粉碎した

物をマーカースンプルとして用いた。また、各糞サンプル重量の 10%を収集し、栄養素消化率および窒素出納分析用のサンプルとした。栄養素消化率および窒素出納の分析方法は前章と同様に行った。

マーカースンプルを原子吸光度分析法により分析し、糞中に排泄された Cr および Co の吸光度から濃度を算出した。

本実験で用いた固相マーカースンプル (Cr-CWC) と液相マーカースンプル (Co-EDTA) は塩酸処理法により分析を行った。

〈塩酸処理法〉

粉碎した糞を秤量し、ルツボに入れ予備灰化後 550℃の電気炉で 8 時間以上灰化した。灰化後常温まで冷却し、17.5%塩酸を 5 ml 加えて攪拌し、50 ml 容メスフラスコに溶液を蒸留水で洗いこみ 50 ml にメスアップした。よく混合した後にプラスチックカップに移し、不溶解物を沈殿させ、上澄みをバイアル瓶に採取した。採取した溶液は原子吸光度計を用いて測定した。

(6) 消化管内容物平均滞留時間の算出

消化管内容物平均滞留時間 (MRT : mean retention time) は、糞中に排泄された固相および液相マーカースンプルの濃度の経時的減衰に対して指数回帰式

$$Y=A \times e^{-kt}$$

を求め、それをもとに算出した。ここで、Y はマーカースンプル投与後の経過時間 t における糞中のマーカースンプル濃度、A はマーカースンプル投与量に応じた定数、k は回帰定数で消化管内貯留部位での希釈率を表す。t はマーカースンプル投与後の経過時間 (h) であり、それぞれのサンプル採取時間と、その前のサンプル採取時間の中央の時間で表した。

求めた回帰定数 k の逆数である 1/k は、消化管内貯留部位におけるマーカースンプルの平均滞留時間とみなされる。後腸発酵動物の場合、消化管内貯留部位は盲腸とされる。

MRT は、1/k とマーカースンプルの最短通過時間 (TT : transit time) の和として算出される。TT はマーカースンプル投与後、最初に糞中にマーカースンプルが検出された時間のことで、内容物が貯留槽以外の消化管を通過する時間を表す。

$$MRT=1/k + TT$$

(7) 統計処理

各データの比較は t 検定 (Microsoft Office Excel 2007; Microsoft Corporation, Redmond, Washington, United State of America) で行った。危険率 5%以下を有意差とした。

4-3 結 果

(1) 飼料成分の見かけの消化率 (Table 4-2)

代謝試験期間中の飼料成分の ADF 消化率は、グルコース群と比べ、FOS 群で有意に低下した。

Table 4-2. Digestibilities or absorption rates (%) of nutrients in guinea pigs (n = 6)

	Glucose	FOS
Dry matter	55.0±1.84	54.0±1.70
Crude protein	63.4±1.88	64.0±0.72
Crude ash	63.4±2.94	64.0±2.64
Acid-detergent fiber	29.6±3.62	24.9±2.49*

Values are means ± SD.

* Significant difference from animals in the glucose group ($P < 0.05$).

(2) 摂食量および窒素出納 (Table 4-3)

試験期間中の摂食量に FOS 添加による影響は見られなかった。グルコース群に比べ、FOS 群で窒素蓄積量や窒素蓄積率が有意に高い値を示し、尿中窒素排泄量が有意に低下した。

Table 4-3. Feed intake, nitrogen balance and nitrogen retention rates in guinea pigs (n = 6)

Item	Glucose	FOS
Feed intake (g/day)	48.9±0.75	48.9±0.6
Nitrogen intake (g/day)	1.27±0.02	1.27±0.02
Nitrogen excretion in feces (g/day)	0.43±0.02	0.42±0.01
Nitrogen excretion in urine (g/day)	0.46±0.08	0.32±0.01*
Nitrogen retention (g/day)	0.28±0.08	0.42±0.11*
Nitrogen retention rate based on intake (%)	23.9±6.45	36.1±9.83*
Nitrogen retention rate based on digested (%)	37.7±10.4	56.4±15.3*

Values are means ± SD.

* Significant difference from animals in the glucose group ($P < 0.05$).

(3) 消化管内容物滞留時間 (Table 4-4)

液相マーカーの盲腸での滞留時間 (1/k、h) は、グルコース群に比べ FOS 群で有意

($P<0.05$) に減少したが、最短通過時間 (TT, h) および平均滞留時間 (MRT, h) に FOS 添加による影響は見られなかった。

固相マーカーの盲腸での滞留時間 (1/k, h) および平均滞留時間 (MRT, h) はグルコース群に比べ FOS 群で有意 ($P<0.01$, $P<0.05$) に減少したが、最短通過時間 (TT, h) に FOS 添加による影響は見られなかった。

また、液相マーカーと固相マーカー間の比較では、固相マーカーの盲腸での滞留時間 (1/k, h) および平均滞留時間 (MRT, h) が有意 ($P<0.01$, $P<0.05$) に減少した。

Table 4-4. Turnover time (1/k, h), transit time (TT, h) and mean retention time (MRT, h) of digesta markers in guinea pigs (n = 6)

	Glucose	FOS
Co-EDTA(Liquid Marker)		
1/k	11.7±1.42	10.4±0.76*
TT	2.67±3.17	3.17±1.03
MRT	14.4±1.65	13.5±0.70
Cr-CWC(Particle Marker)		
1/k	11.7±2.00	8.96±0.78**‡
TT	2.67±3.33	3.33±0.98
MRT	14.4±2.03	12.3±1.34*†

Values are mean \pm SD.

*, ** Significantly different from glucose groups ($P<0.05$, $P<0.01$, respectively).

†, ‡ Significantly different from Co-EDTA ($P<0.05$, $P<0.01$, respectively).

Co-EDTA, Ethylenediamine-N,N,N', N'-tetraacetic acid, cobal (II), disodium salt, tetrahydrate; Cr-CWC, chromium mordanted cell-wall constituents.

4-4 考 察

本章においても、飼料への FOS5%添加による、モルモットの ADF 消化率の低下および窒素利用性の向上効果が認められた。

飼料への FOS の添加は、ラットの繊維消化率に影響は及ぼさないものの、消化管内容物滞留時間を延長すると報告 (Sakaguchi *et al.* 1998) されており、本章で得られたモルモットにおける FOS の効果とは大きく異なる。これらの FOS の添加効果の違いは、動物種間の大腸機能や構造の違いによるものと考えられる。モルモットは結腸に粘液トラップ (mucus-trap) 型と呼ばれる粘液依存性分離機構を備えているものの、大腸で固相内容物と液相内容物が明確に分離されないと報告されている

(Takahashi and Sakaguchi 1998)。一方、ラットは大腸で僅かな液相内容物分離が起こり、モルモットとは異なる大腸内容物貯留形式を備えていることが報告されている(坂口 1989)。この動物種間の大腸内容物貯留形式の違いが、FOS の消化管内容物滞留時間に及ぼす影響の違いをもたらしたと考えられる。

すなわち、モルモットにおける消化管内容物滞留時間の減少は、FOS の飼料への添加により、大腸内容物の増大がもたらされるものの、固相・液相内容物の明確な分離が起こらないため、増大した内容物が貯留部位から連続的に結腸側へと流出することによって引き起こされたと考えられる。

繊維消化率には消化管内容物滞留時間が影響すると考えられており、本章において、液相マーカーおよび固相マーカーの貯留部位での滞留時間が低下したことから、ADF 消化率の低下は FOS 摂取による繊維質の消化管（特に盲腸）での滞留時間が低下し、発酵・分解を十分に受けることができなかったことにより発現した可能性が示唆された。

第 5 章

モルモットの盲腸内微生物態窒素への
血中尿素態窒素の移行量に及ぼす
フラクトオリゴ糖の影響

5-1 目 的

前章までの試験で示されたように FOS5%添加飼料摂取によりモルモットの窒素利用性が向上する。ヒトでは難消化発酵性糖質の摂取は、腸内微生物のデアミナーゼやウレアーゼ活性を促進し、腸内微生物のタンパク質合成に必要なアンモニアの生成量が増加することが報告されている (Varel *et al.* 1974)。また、ラットにおいて、難消化発酵性糖質摂取時のアンモニア生成量の増加が盲腸内および糞中微生物態窒素量の増加をもたらし、併せて尿中窒素排泄量が低下することが報告されており (Levrat *et al.* 1993; Yones *et al.* 1995)、これらの効果発現には、難消化発酵性糖質摂取時に起こる、血中尿素の大腸への流入量増加が関係していると示唆されている (Rémésy *et al.* 1989)。さらに、ウサギにおいて、難消化発酵性糖質であるマンニトールを飼料へ添加すると血中尿素の盲腸内微生物態窒素への取り込み量が増加することで、窒素利用性の向上をもたらすことが報告されている (Xiao *et al.* 2012)。しかし、モルモットでは難消化発酵性糖質摂取時の窒素動態は解明されておらず、ウサギと異なる大腸機能を備えているため、難消化発酵性糖質が血中尿素態窒素の動態に及ぼす影響は動物種間で異なる可能性が考えられる。

そこで、本章では窒素利用性向上効果の作用メカニズムとして考えられる、血中尿素態窒素の盲腸内微生物による取り込み量の増加が FOS を摂取したモルモットで見られるか検討した。

5-2 材料と方法

(1) 試験飼料および試験群

試験飼料は市販固形飼料（ラボ G スタンダード 日本農産工業株式会社）にグルコース（ナカライテスク株式会社）および FOS（明治フードマテリア株式会社）を 5% 添加して作成した (Table 5-1)。

Table 5-1. Compositions of the experimental diets

Sugar (%)	Glucose	FOS
	5	5
Analyzed chemical composition (g/kg)		
Dry matter	920	921
Crude protein	163	164
Crude fat	30	32
Acid-detergent fiber	236	232
Crude ash	91	93

FOS: fructooligosaccharide.

(2) 供試動物

実験動物は Hartley 系の成熟雄モルモット（平均体重 891 ± 62 g）を 8 頭用いた。動物の飼育は、室温 $24 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 、湿度 50–60%、12 時間明期（7:00–19:00）の恒温室で行った。モルモットは 1 頭ずつ金網底の代謝ケージに収容して飼育した。

(3) 試験方法

試験期間を 7 日間とした。試験期間中の給餌量は各群 50 g/day とし、水は自由摂取とした。すべてのモルモットの摂食量を毎日測定した。摂食量は給餌量から残食糧を差し引いたものとした。体重は試験開始時と試験終了時に測定した。試験は岡山大学動物実験委員会の承認を得て、規則に従い行った。

(4) サンプル採取

試験最終日の朝 6:00 から 9:00 まで、各群に対応した糖液（グルコース 2 g もしくは FOS2 g を 5 ml の水に溶かしたもの）を経口投与し、糖液投与 2 時間後に、ペントバルビタールによって麻酔し、 ^{15}N 尿素（99.2 atom %; SI サイエンス株式会社）を 20mg、2ml の生理食塩水（8.5%）中に溶かし、耳介静脈から注入した。 ^{15}N 尿素注入 1 時間後に、動脈血および門脈血、肝臓、小腸、盲腸、近位結腸、遠位結腸、直腸、尿を採取した。

血液は氷冷下で自然凝固させ、その後 3000 rpm、15 分間遠心分離後、血清サンプルを得た。血清サンプルは分析まで -30°C で保存した。 ^{15}N 尿素注入後から尿を採取し、膀胱に残った尿も 1.5% ホウ酸溶液を用い洗浄しながら回収した。尿サンプルは分析まで 4°C で保存した。肝臓および消化管内容物は分析まで -30°C で保存した。近位結腸と遠位結腸の境目の判断は、文献（Snipes 1982）を参考にして行った。

(5) 分析方法

(a) 血清

- ・尿素態窒素（Urea-N）およびアンモニア態窒素（Ammonia-N）

血清サンプルを 25 ml にメスアップし、10 ml と 15 ml のサンプルに分けた。10 ml サンプルを pH6.0 に調節し、ウレアーゼ（EC3.5.1.5 ; ナカライテスク株式会社）を用い、サンプル中に含まれる尿素をアンモニアに変換した。15 ml サンプルはウレアーゼ処理を施さず、そのままサンプルとして用いた。

ウレアーゼ処理サンプル、未処理サンプルをそれぞれ蒸留し、0.01N 硫酸フェノールレッド指示薬（pH=4.65）に回収した。

<計算方法>

ウレアーゼ処理サンプル=Ammonia

未処理サンプル=Ammonia + Urea

ウレアーゼ処理サンプル－未処理サンプル=Urea

上記の計算式により、血清中尿素態窒素およびアンモニア態窒素量を算出した。

・¹⁵N 分析

尿素態窒素およびアンモニア態窒素を測定する際に滴定した溶液を 105℃で乾燥した。完全に水分が無くなる前に、30 ml ビーカーに移し、乾燥した。乾燥後、ビーカーの底に残る硫酸アンモニウム塩を石英綿に回収し、サンプルを得た。

¹⁵N 測定には、安定同位体比質量分析装置（MSI-150-MT-600 NC Model, Quadrupole Mass Spectrometry System, Ulvac Corporation., Japan）を使用した。

(b) 盲腸

・盲腸内容物および組織重量、pH

重量測定後、氷冷下で内容物を取り出し攪拌した後、pH を pH メーター（HORIBA AS-211）で測定した。このとき水分、タンパク質、有機酸分析用にサンプルリングした後、分析時まで－30℃で保存した。盲腸組織は生理食塩水（8.5%）でよく洗った後、余分な水分を除いて重量を測定した。内容物量は、全重量から組織重量を差し引いたものとした。

・内容物中水分含量

あらかじめ 1.5 ml 容エッペンドルフチューブの重量を 105℃の乾燥機に 2 時間以上入れ、放冷後測定しておく。この重量を恒量とする。重量既知のチューブに盲腸内容物を 200－300 mg 採取し、105℃の乾燥機に一晩入れ、乾燥重量を測定した。水分含量測定で使用した乾燥後のサンプルは総窒素（Total N）測定用サンプルとした。

・短鎖脂肪酸濃度

内部標準法を用いて高速液体クロマトグラフィー（HPLC）で測定を行った。サンプル調整と HPLC 分析条件は以下の通りである。

(サンプル調製)

内容物 200－300 mg を 2.0 ml あるいは 1.5 ml 容エッペンドルフチューブに採取し、1mM クロトン酸 in 10mM NaOH を 1.0 ml 加えホモジネイトする。12,000 rpm、4℃で 10 分間遠心分離する。上清を 2.0 ml 容エッペンドルフチューブに分取し

た後、0.8 ml のクロロホルムを加え、約 30 秒間振とうする。10,000 rpm、4℃で 15 分間遠心分離し、上層を 1.5 ml 容エッペンドルフチューブに採取し、分析まで-30℃で保存した。

凍結したサンプルは沈殿物ができるので、解凍したサンプルを 14,000 rpm、4℃で 12 分間遠心分離した後、上清 500 μ l をフィルター付きエッペンチューブ (Ultrafree-MC、0.22 μ m) で遠心ろ過 (5000 rpm、4℃、5 分間) する。ろ過後得られたサンプルから 10 μ l をインジェクトした。

(HPLC 分析条件)

<分離条件>

カラム：Shim-pack SCR-102H

移動相：5mM p-トルエンスルホン酸水溶液

流 量：0.8 ml/min

温 度：40℃

<検出条件>

試 薬：5 mM p-トルエンスルホン酸水溶液と 100 μ M EDTA を含む 20 mM Bis - Tris 水溶液

流 量：0.8 ml/min

検出器：電気伝導度検出器 (CDD-10A VP ; 島津製作所)

・総窒素 (Total N)

Total N はケルダール法によって測定した。測定方法は第 2 章と同様に行った。

・タンパク態窒素 (Protein N)

2.0 ml 容エッペンドルフチューブ 3 本に約 1-2 g の内容物を採取する。各エッペンドルフチューブに、50%トリクロロ酢酸溶液 (TCA) を 300 μ l 加え、12,000 rpm、4℃で 20 分間遠心分離する。上清は尿素態窒素・アンモニア態窒素測定用に 2.0 ml 容エッペンドルフチューブに分取し-30℃で保存した。

沈殿物に対し 5%TCA を 200 μ l 加え、ホモジナイズし 12,000 rpm、4℃で 20 分間遠心分離する。この作業を 2-3 回繰り返し、沈殿物を乾燥機で 105℃、24 時間以上乾燥し、サンプルとした。Protein N はケルダール法によって測定した。測定方法は第 2 章と同様に行った。

・微生物態窒素 (Bacterial N)

2.0 ml 容エッペンドルフチューブ 2 本に約 1-2 g の内容物を採取する。各エッペン

ドルフチューブに生理食塩水（8.5%）を 200 μ l 加え、500 rpm、4℃で 5 分間遠心分離する。上清を 1.5 ml 容エッペンドルフチューブに分取し、14,000 rpm、4℃、20 分間の遠心分離を 2 回行う。このときの沈殿物をサンプルとした。Bacterial N はケルダール法によって測定した。測定方法は第 2 章と同様に行った。

- ・ Urea-N および Ammonia-N

血清サンプルと同様の処理を行い、測定した。

(c) 肝臓および小腸、近位結腸、遠位結腸、直腸

- ・ 内容物および組織重量

重量測定後、氷冷下で内容物を取り出し攪拌した後、水分、タンパク質用にサンプリングした。盲腸組織は生理食塩水（8.5%）でよく洗った後、余分な水分を除いて重量を測定した。内容物量は、全重量から組織重量を差し引いたものとした。

- ・ 肝臓および内容物中水分含量

あらかじめ 1.5 ml 容エッペンドルフチューブの重量を 105℃の乾燥機に 2 時間以上入れ、放冷後測定しておく。この重量を恒量とする。重量既知のチューブに肝臓および内容物を 200–300 mg 採取し、105℃の乾燥機に一晩入れ、乾燥重量を測定した。水分含量測定で使用した乾燥後のサンプルは Total N 測定用サンプルとした。

- ・ Total N および Protein N、Bacterial N、Urea-N、Ammonia-N

血清サンプルおよび盲腸内容物サンプルと同様の処理を行い、測定した。

(6) 統計処理

対象群と FOS 群との比較は t 検定（Microsoft Office Excel 2007; Microsoft Corporation, Redmond, Washington, United State of America）で行った。危険率 5%以下を有意差とした。

5-3 結 果

(1) 摂食量

試験期間中の摂食量はグルコース群で 46.7 ± 3.12 g/day、FOS 群で 47.3 ± 1.95 g/day であった。群間に有意差は認められなかった。

(2) 肝臓および消化管、内容物、組織重量 (Table 5-2)

グルコース群に比べ FOS 群で盲腸組織および近位結腸の組織重量が有意

($P<0.01$) に増加した。また、盲腸内容物重量も FOS 群で有意 ($P<0.05$) に高い値を示した。しかし、肝臓およびその他の消化管に FOS 添加の影響は認められなかった。

Table 5-2. Liver and gut weight of guinea pigs fed a diet containing either 5 % glucose or 5 % FOS

	Glucose	FOS	Glucose	FOS
	Fresh weight (g)		% of body weight	
Body weight	906 \pm 26	876 \pm 88	-	-
Liver	24.6 \pm 1.4	26.5 \pm 1.8	2.71 \pm 0.13	3.05 \pm 0.32
Small Intestine				
Total weight	20.7 \pm 4.4	20.6 \pm 2.8	2.29 \pm 0.54	2.39 \pm 0.46
Tissue weight	7.27 \pm 1.27	6.45 \pm 1.04	0.80 \pm 0.12	0.74 \pm 0.12
Content weight	13.4 \pm 5.1	14.2 \pm 3.4	1.49 \pm 0.60	1.65 \pm 0.47
Cecum				
Total weight	47.6 \pm 9.5	56.7 \pm 8.7	5.25 \pm 1.01	6.46 \pm 0.56*
Tissue weight	4.72 \pm 0.43	5.45 \pm 0.88	0.52 \pm 0.04	0.62 \pm 0.04**
Content weight	42.9 \pm 9.2	51.3 \pm 7.9	4.73 \pm 0.98	5.84 \pm 0.54*
Proximal Colon				
Total weight	10.5 \pm 2.3	13.3 \pm 5.4	1.16 \pm 0.24	1.49 \pm 0.47
Tissue weight	2.79 \pm 0.27	4.02 \pm 0.92	0.31 \pm 0.02	0.45 \pm 0.06**
Content weight	7.72 \pm 2.15	9.31 \pm 4.53	0.85 \pm 0.23	1.04 \pm 0.42
Distal Colon				
Total weight	8.68 \pm 0.62	8.49 \pm 1.63	0.96 \pm 0.10	0.96 \pm 0.10
Tissue weight	2.94 \pm 0.36	2.65 \pm 0.29	0.32 \pm 0.04	0.30 \pm 0.03
Content weight	5.74 \pm 0.63	5.85 \pm 1.46	0.63 \pm 0.09	0.66 \pm 0.11

Data are mean \pm standard deviation (n=4). Content weight = total weight – wall weight.

*, ** Significant difference from the glucose group ($P<0.05$, $P<0.01$, respectively).

(3) pH および SCFA 濃度 (Table 5-3)

グルコース群に比べ FOS 群で盲腸内容物 pH が有意 ($P<0.01$) に低い値を示した。また、FOS 群で盲腸内容物中 SCFA 濃度および量が有意 ($P<0.05$) に高い値を示した。

Table 5-3. Luminal pH, concentration ($\mu\text{mol/g}$ contents) and total amount of SCFA (μmol) in the cecal content of guinea pigs fed a diet containing either 5 % glucose or 5 % FOS

	Glucose	FOS
pH	7.13 ± 0.10	$6.85 \pm 0.13^{**}$
Concentration		
Acetic acid	12.4 ± 2.7	$22.0 \pm 7.5^*$
Propionic acid	3.04 ± 0.72	$5.16 \pm 1.85^*$
Butyric acid	1.80 ± 1.24	$8.03 \pm 4.99^*$
Total SCFA	18.2 ± 2.3	$36.9 \pm 13.9^*$
Total amount of SCFA	764 ± 118	$1864 \pm 904^*$

Data are mean \pm standard deviation (n=4).

*, ** Significant difference from the glucose group ($P < 0.05$, $P < 0.01$, respectively).

(4) 総窒素 (Total N、Table 5-4)

グルコース群に比べて FOS 群で盲腸内容物中 total N 濃度が有意 ($P < 0.01$) に低い値を示したが、盲腸内容物中 total N および ^{15}N 量、 ^{15}N atom % excess が有意 ($P < 0.05$ 、 $P < 0.01$ 、 $P < 0.05$) に高い値を示した。さらに、FOS 群で尿中 total ^{15}N atom % excess が低下傾向 ($P = 0.08$) を示し、尿中 total ^{15}N 量が有意 ($P < 0.05$) に低い値を示した。しかし、その他の消化管内容物中 total N 濃度および量 ^{15}N atom % excess、 ^{15}N 量に FOS 添加による影響は認められなかった。

(5) タンパク態窒素 (Protein N、Table 5-5)

グルコース群に比べて FOS 群で盲腸内容物中 protein N および ^{15}N 量、 ^{15}N atom % excess が有意 ($P < 0.01$ 、 $P < 0.05$ 、 $P < 0.05$) に高い値を示した。しかし、肝臓およびその他の消化管内容物中 protein N および ^{15}N 量、 ^{15}N atom % excess に FOS 添加による影響は認められなかった。

(6) 微生物態窒素 (Bacterial N、Table 5-6)

グルコース群に比べて FOS 群で盲腸内容物中 bacterial N および ^{15}N 量が有意に高い値を示した。また、FOS 群で盲腸内容物中 ^{15}N atom % excess が増加傾向を示した。しかし、その他の消化管内容物中 bacterial N および ^{15}N 量、 ^{15}N atom % excess に FOS 添加による影響は認められなかった。

(7) アンモニア態窒素および尿素態窒素 (Ammonia-N および Urea-N、Table 5-7)

FOS 群で盲腸内容物中 urea-N 濃度が有意 ($P < 0.05$) に低い値を示し、盲腸内容物中 urea- ^{15}N atom % excess が有意 ($P < 0.05$) に高い値を示した。しかし、その他の N および ^{15}N atom % excess に FOS 添加による影響は認められなかった。

Table 5-4. Total N and ^{15}N in gut contents and urine of guinea pigs fed a diet containing either 5% glucose or 5% FOS

Item	Glucose	FOS
N (g)		
Small Intestine	0.16 ± 0.05	0.16 ± 0.01
Cecum	0.24 ± 0.02	$0.28 \pm 0.02^*$
Proximal colon	0.06 ± 0.01	0.07 ± 0.03
Distal colon	0.05 ± 0.01	0.05 ± 0.01
Urine	0.01 ± 0.01	0.02 ± 0.02
N (% of DM)		
Small Intestine	10.9 ± 0.35	9.77 ± 1.21
Cecum	2.84 ± 0.00	$2.63 \pm 0.11^{**}$
Proximal colon	2.77 ± 0.07	2.81 ± 0.22
Distal colon	2.39 ± 0.43	2.66 ± 0.56
Urine	-	-
^{15}N (atom % excess)		
Small intestine	0.65 ± 0.54	0.81 ± 0.53
Cecum	0.75 ± 0.33	$1.18 \pm 0.21^*$
Proximal colon	1.18 ± 0.39	1.26 ± 0.27
Distal colon	0.89 ± 0.03	0.90 ± 0.14
Urine	2.83 ± 0.78	1.45 ± 1.56
^{15}N (mg)		
Small Intestine	1.21 ± 1.13	1.26 ± 0.78
Cecum	1.78 ± 0.62	$3.32 \pm 0.53^{**}$
Proximal Colon	0.70 ± 0.32	0.86 ± 0.45
Distal Colon	0.45 ± 0.05	0.48 ± 0.13
Urine	0.29 ± 0.13	$0.13 \pm 0.01^*$
^{15}N (% of injected)		
Small Intestine	13.0 ± 12.2	13.6 ± 8.47
Cecum	19.2 ± 6.70	$35.9 \pm 5.76^{**}$
Proximal Colon	7.61 ± 3.45	9.29 ± 4.91
Distal Colon	4.86 ± 0.57	5.20 ± 1.44
Urine	3.16 ± 1.45	$1.43 \pm 0.06^*$

Data are mean \pm standard deviation (n=4).

*, ** Significant difference from the glucose group ($P < 0.05$, $P < 0.01$, respectively).

Table 5-5. Protein N and ^{15}N in liver and gut contents of guinea pigs fed a diet containing either 5% glucose or 5% FOS

	Control	FOS
N (g)		
Liver	0.66 ± 0.04	0.71 ± 0.07
Small Intestine	0.13 ± 0.02	0.12 ± 0.01
Cecum	0.21 ± 0.02	$0.26 \pm 0.02^{**}$
Proximal Colon	0.05 ± 0.02	0.06 ± 0.02
Distal Colon	0.05 ± 0.01	0.05 ± 0.01
N (% of DM)		
Liver	9.09 ± 0.49	9.25 ± 0.38
Small Intestine	8.89 ± 1.46	7.58 ± 1.78
Cecum	2.46 ± 0.08	2.44 ± 0.17
Proximal Colon	2.31 ± 0.56	2.45 ± 0.31
Distal Colon	2.22 ± 0.44	2.44 ± 0.66
^{15}N (atom % excess)		
Liver	0.08 ± 0.02	0.12 ± 0.06
Small Intestine	ND	ND
Cecum	0.65 ± 0.21	$1.16 \pm 0.42^*$
Proximal Colon	1.01 ± 0.57	1.14 ± 0.42
Distal Colon	0.81 ± 0.24	0.82 ± 0.28
^{15}N (mg)		
Liver	0.50 ± 0.15	0.83 ± 0.40
Small Intestine	ND	ND
Cecum	1.36 ± 0.37	$3.06 \pm 1.20^*$
Proximal Colon	0.50 ± 0.39	0.71 ± 0.47
Distal Colon	0.38 ± 0.15	0.39 ± 0.12
^{15}N (% of injected)		
Liver	5.37 ± 1.63	8.95 ± 4.29
Small Intestine	-	-
Cecum	14.7 ± 4.02	$33.1 \pm 13.0^*$
Proximal Colon	5.35 ± 4.21	7.71 ± 5.06
Distal Colon	4.13 ± 1.67	4.23 ± 1.25

Data are mean \pm standard deviation (n=4). ND: not detected.

*, ** Significant difference from the glucose group ($P < 0.05$, $P < 0.01$, respectively).

Table 5-6. Bacteria N and ^{15}N in large intestinal contents of guinea pigs fed a diet containing either 5 % glucose or 5 % FOS

	Glucose	FOS
N (g)		
Cecum	0.18 ± 0.02	$0.22 \pm 0.01^{**}$
Proximal Colon	0.04 ± 0.01	0.05 ± 0.02
Distal Colon	0.04 ± 0.01	0.04 ± 0.01
N (% of DM)		
Cecum	2.11 ± 0.43	2.03 ± 0.10
Proximal Colon	2.01 ± 0.14	2.11 ± 0.14
Distal Colon	1.99 ± 0.29	2.08 ± 0.34
^{15}N (atom % excess)		
Cecum	0.55 ± 0.36	0.92 ± 0.26
Proximal Colon	0.91 ± 0.25	0.91 ± 0.06
Distal Colon	0.73 ± 0.05	0.74 ± 0.04
^{15}N (mg)		
Cecum	1.03 ± 0.78	$2.04 \pm 0.66^*$
Proximal Colon	0.37 ± 0.10	0.43 ± 0.16
Distal Colon	0.30 ± 0.04	0.33 ± 0.03
^{15}N (% of injected)		
Cecum	11.1 ± 8.38	$22.0 \pm 7.12^*$
Proximal Colon	3.99 ± 1.04	4.64 ± 1.68
Distal Colon	3.19 ± 0.40	3.57 ± 0.38

Data are mean \pm standard deviation (n=4).

*, ** Significant difference from the glucose group ($P < 0.05$, $P < 0.01$, respectively).

Table 5-7. Concentration of ammonia N, urea N, and ^{15}N (atom % excess) in cecal contents and serum of guinea pigs fed a diet containing either 5 % glucose or 5 % FOS

	Glucose	FOS
N		
Cecal Ammonia N (mg/100 g fresh content)	7.48 ± 0.94	6.01 ± 3.49
Cecal Urea N (mg/100 g fresh content)	3.22 ± 0.51	$1.76 \pm 1.00^*$
Arterial blood serum Ammonia N (mg/dL)	0.21 ± 0.12	0.23 ± 0.06
Arterial blood serum Urea N (mg/dL)	14.4 ± 4.82	16.3 ± 7.72
Portal blood serum Ammonia N (mg/dL)	0.34 ± 0.12	0.32 ± 0.06
Portal blood serum Urea N (mg/dL)	13.6 ± 10.7	14.3 ± 8.38
^{15}N (atom % excess)		
Cecal Ammonia N	0.50 ± 0.40	$1.22 \pm 0.19^{**}$
Cecal Urea N	1.77 ± 1.53	1.61 ± 1.11
Arterial blood serum Ammonia N	2.29 ± 0.49	2.01 ± 0.22
Arterial blood serum Urea N	2.47 ± 0.56	2.52 ± 0.38
Portal blood serum Ammonia N	0.81 ± 0.56	1.48 ± 0.54
Portal blood serum Urea N	2.00 ± 1.38	2.86 ± 0.76

Data are mean \pm standard deviation (n=4).

* Significant difference from the glucose group ($P < 0.05$).

5-4 考 察

難消化発酵性糖質である FOS がモルモットの尿中窒素排泄量を低下させ、窒素利用性を向上させることがこれまでに分かっており、この現象はウサギでも報告されている (Xiao *et al.* 2011; Xiao *et al.* 2012)。さらに、ウサギにおいて、難消化発酵性糖質であるマンニトールを飼料へ添加すると血中尿素の盲腸内微生物態窒素への取り込み量が増加することで、窒素利用性の向上をもたらすことが報告されている (Xiao *et al.* 2012)。

本章では、FOS の摂取によりモルモットの尿中総 ^{15}N 量が低下し、盲腸内物中総 ^{15}N 量および ^{15}N atom % excess、盲腸内容物中タンパク態 ^{15}N 量および ^{15}N atom % excess、盲腸内容物中微生物態 ^{15}N 量および ^{15}N atom % excess が高い値を示した。このことから、小腸で消化されずに大腸に届いた FOS が微生物増殖を促進し、盲腸内に流入する血中尿素態窒素量が増加し、この血中尿素態窒素を微生物が体タンパク合成に利用する。このようにして、FOS 摂取による微生物増殖促進と尿中窒素排泄量低下が起こり、増殖した微生物を食糞によって再摂取することで、窒素利用性の向上が発現すると考えられる。

FOS 摂取により、盲腸内容物中アンモニア態 ^{15}N atom % excess が高い値を示したが、盲腸内容物中アンモニア態窒素濃度や尿素態 ^{15}N atom % excess に影響は認められなかった。また FOS 摂取により、盲腸内容物中尿素態 N 濃度は低い値を示した。このことから、尿素態窒素は血中から盲腸へと運ばれると速やかにアンモニアに変換される可能性が示唆された。

ウサギにおいて、難消化発酵性糖質摂取による盲腸内微生物態 N 濃度の増加が報告されている (Xiao *et al.* 2012)。しかし本章では、モルモットの盲腸内微生物態 N 濃度に FOS 摂取による影響は認められなかった。また、モルモットの盲腸内微生物態 N 濃度はウサギの半分程度であることが示された。この違いは、ウサギとモルモットの大腸に備わる微生物分離機構の違いによる微生物分離能の差によるものと考えられる。

また、FOS の摂取により、盲腸内容物中 pH が低い値を示し、SCFA 濃度および量が高い値を示した。さらに盲腸組織重量が増加した。これらの現象は、ラットやウサギにおいても報告されている (Tokunaga *et al.* 1987; Oku 1996; Xiao *et al.* 2012)。反芻動物の *in vivo* (Dobson *et al.* 1971; Thorlacius *et al.* 1971; Remond *et al.* 1993; Remond 2002; von Engelhardt *et al.* 2007) および *in vitro* (Abdoun *et al.* 2010) 試験で SCFA と CO_2 が反芻胃への尿素輸送を促進すると報告している。すなわち FOS の摂取により、モルモットにおいても反芻動物と同様に、盲腸内で増加した SCFA が血中尿素の盲腸への流入を促進した可能性が考えられる。

以上のことから、FOS の摂取による窒素利用性向上効果は、盲腸内微生物増殖促進

による血中尿素態窒素の盲腸内微生物への取り込み量の増加と、それに伴う尿中窒素排泄量の低下によって発現する可能性が示された。

この FOS 摂取による窒素利用性向上効果は、大腸機能が異なるウサギでも示されていることから、大腸が発達した単胃動物で普遍的に起こる可能性が考えられる。さらにこの効果は飼料タンパク質利用性の改善だけでなく、環境への窒素負荷軽減にもつながるので、単胃家畜や実験動物の飼料設計に応用できる可能性が高い。

第 6 章

総括

フラクトオリゴ糖（FOS）は難餾食性であることや、腸内細菌叢の改善、便通の改善などの整腸作用を発揮することから、機能性甘味料として広く用いられている。また、FOS はラットで Ca、Mg などのミネラルの吸収を促進すること、ウサギで窒素利用性を向上させることなど、飼料中栄養素の利用にも影響することが報告されており、これらの FOS の効果には大腸内微生物の活動の関与が強く示唆されている。大腸の構造や機能すなわち、内容物分離能や微生物貯留能は動物種間で異なり、動物の栄養に対する大腸内微生物活動の関与は動物種間で量的・質的に異なることが予想される。したがって、FOS 摂取の栄養生理効果は動物種間で異なる可能性が考えられる。

FOS 摂取の効果として窒素利用性の向上が見られたウサギと同様に、モルモットは微生物発酵の場として大きな盲腸を備えており、日常的に食糞を行う。しかし、モルモットの大腸内容物分離能や微生物貯留機能はウサギとは大きく異なっている。このことから、ウサギでみられる FOS 摂取の効果がモルモットでも発現するかどうかは、比較栄養生理学的観点からも重要な知見となる。

そこで、本研究ではモルモットの栄養素消化や窒素利用性に及ぼす FOS の影響と、その作用メカニズムの一部と考えられる消化管内容物の滞留時間や通過時間および盲腸への血中尿素の移行量に及ぼす影響を調べた。

1. FOS の飼料への添加が栄養素消化率と窒素利用性に及ぼす効果

FOS3%添加飼料を、Hartley 系成熟雄モルモットに与えて、栄養素消化率および窒素利用性を調べ、グルコース 3%添加飼料を対象として比較した結果、粗灰分消化率が増加し、ラットと同様の効果が認められた。しかし、ウサギで確認された窒素利用性の向上は見られなかった。ウサギでは FOS2%添加飼料条件下で、窒素利用性の向上が確認されているが、盲腸内への微生物集積能がウサギに比べて劣るモルモットの窒素利用性向上には、FOS の添加量がウサギよりも多く必要である可能性が考えられた。そこで、飼料への FOS 添加量を 5%に増加させ、モルモットの栄養素消化率および窒素利用性に及ぼす FOS の効果について調べた。供試動物は Hartley 系成熟雄モルモットを用いた。その結果、尿中窒素排泄量が低下し、体内窒素保持量が増加することで、窒素利用性が向上した。しかし、ウサギとは異なって繊維画分（acid detergent fiber: ADF）消化率は低下した。この動物種間の違いは消化管構造と機能の違いによってもたらされる、FOS 摂取による消化管内容物の滞留時間や通過時間の変化の様相に差異がある可能性を示すものと考えられる。

2. 食糞が FOS 摂取による窒素利用性改善効果に及ぼす影響

FOS 摂取時にもたらされる窒素利用性の向上が食糞を介して行われているかを解明するために、モルモットの食糞を阻止し、飼料へ FOS を 5%添加し、グルコース 5%添加飼料を対象として、栄養素消化率および窒素出納に及ぼす FOS の効果について調

べた。供試動物は Hartley 系成熟雄モルモットを用い、食糞阻止はトンネル状の木枠にモルモットを収容して行った。その結果、食糞阻止しない状態で FOS5%添加時に認められた ADF 消化率の低下や窒素利用性の向上は認められなかった。このことからモルモットにおける FOS 摂取時の窒素利用性の向上は食糞を介して行われることが明らかとなった。

3. ADF 消化率低下効果の作用機序

FOS5%添加時にモルモットの ADF 消化率が低下した要因として考えられる、消化管内容物の滞留時間や通過時間の変化が FOS 摂取により引き起こされるかグルコースを対照として調べた。消化管内容物の滞留時間の測定は、経口的に単一投与したマーカの糞中への排泄パターンから数学的に消化管内の貯留部位での滞留時間を算出する方法である、シングルコンパートメント解析法を用いて行った。このときの貯留部位はモルモットでは盲腸とみなされている。また、滞留時間測定に用いたマーカは、液相マーカとしてコバルト標識エチレンジアミン四酢酸 (Co-EDTA) を、固相マーカとしてクロム標識植物細胞壁成分 (Cr-CWC) を用いた。その結果、飼料への FOS5%添加により、モルモットの ADF 消化率の低下と窒素利用性の向上が再び認められた。この時、消化管内容物の液相マーカおよび固相マーカの盲腸での平均滞留時間が低下した。このことから、モルモットの ADF 消化率の低下は、飼料への FOS5%添加による消化管内容物貯留部位での平均滞留時間の低下によって引き起こされた可能性が示された。

4. 窒素利用性改善効果の作用機序

FOS 添加飼料摂取時にモルモットで認められる窒素利用性向上の作用機序を明らかにするために、盲腸内微生物への血中尿素の移行量および尿中窒素量に及ぼす FOS 摂取の影響を調べた。血中尿素態窒素動態の評価には、安定同位体である ^{15}N 尿素をトレーサーに用い、耳介静脈血中に単回投与し、消化管や尿への ^{15}N の移行量を測定した。その結果、グルコースと比較して FOS 摂取時に盲腸内微生物量の増大と微生物中 ^{15}N 量が増加し、尿中 ^{15}N 量が減少したことから、モルモットの血中尿素の盲腸内微生物への移行量が増加し、尿中窒素への移行量が低下することが示された。

以上のことから、FOS の食餌への添加はモルモットの ADF 消化率を低下させるものの、窒素利用性を向上させることが明らかとなった。この FOS の摂取による窒素利用性向上効果は、盲腸内微生物増殖促進による血中尿素態窒素の盲腸内微生物への取り込み量の増加と、それに伴う尿中窒素排泄量の低下によって発現する可能性が示された。

この FOS 摂取による窒素利用性向上効果は、大腸機能が異なるウサギでも示されていることから、大腸が発達した単胃動物で普遍的に起こる可能性が考えられる。さらにこの効果は飼料タンパク質利用性の改善だけでなく、環境への窒素負荷軽減にもつながるので、単胃家畜や実験動物の飼料設計に応用できる可能性が高い。

引用文献

- Abdoun K, Stumpff F, Wolf K, Martens H. 2005. Modulation of electroneutral Na transport in sheep rumen epithelium by luminal ammonia. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 289 (3), G508-G520.
- Abdoun K, Stumpff F, Rabbani I, Martens H. 2009. Modulation of urea transport across sheep rumen epithelium in vitro by SCFA and CO₂. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 298, G190-G202.
- Alexander RM. 1993. The relative merits of foregut and hindgut fermentation. *Journal of Zoology (London)* 231, 391–401.
- Anderson RA, Kozlovsky AS. 1985. Chromium intake, absorption and excretion of subjects consuming self-selected diets. *The American Journal of Clinical Nutrition* 41, 1177-1183.
- Association of Official Analytical Chemists. 1990. *Official Methods of Analysis* 15th edition. Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC, USA.
- Belenguer A, Balcells J, Fondevila M, Torre C. 2002. Caecotrophes intake in growing rabbits estimated either from urinary excretion of purine derivatives or from direct measurement using animals provided with a neck collar: effect of type and level of dietary carbohydrate. *Animal Science* 74, 135–144.
- Belenguer A, Balcells J, Guada JA, Decoux M, Milne E. 2005. Protein recycling in growing rabbits: contribution of microbial lysine to amino acid metabolism. *British Journal of Nutrition* 94, 763-770.
- Belenguer A, Abecia L, Belanche A, Milne E, Balcells J. 2012. Effect of carbohydrate source on microbial nitrogen recycling in growing rabbits. *Livestock Science* 150, 94-101.

- Bellier R, Gidenne T, Vernay M, Colin M. 1995. In vivo study of circadian variations of the cecal fermentation pattern in postweaned and adult rabbits. *Journal of Animal Science* 73, 128–135.
- Bindelle J, Kinsama A, Picron P, Umba di M'Balu J, Kindele E, Buldgen A. 2009. Nutritive value of unconventional fibrous ingredients fed to Guinea pigs in the Democratic Republic of Congo. *Tropical Animal Health and Production* 41, 1731-1740.
- Björnhag G. 1972. Separation and delay of contents in the rabbit colon. *Swedish Journal of Agricultural Research* 2, 125-136.
- Björnhag G. 1981. The retrograde transport of fluid in the proximal colon of rabbits. *Swedish Journal of Agricultural Research* 11, 63–69.
- Björnhag G. 1987. Comparative aspects of digestion in the hindgut of mammals. The colonic separation method (CSM). *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift* 94, 33-36.
- Brandt CS, Thacker EJ. 1958. A concept of rate of food passage through the gastrointestinal tract. *Journal of Animal Science* 17, 218–223.
- Broun LD. 1966. Influence of intake on feed utilization. *Journal of Dairy Science* 49, 223-230.
- Carabaño R, Fraga MJ, Santomá G, de Blas JC. 1988. Effect of diet on composition of cecal contents and on excretion and composition of soft and hard feces of rabbits. *Journal of Animal Science* 66, 901–910.
- de Blas C, Wiseman J. 2010. *Nutrition of the Rabbit* 2nd Edition. CABI press.
- Chilcott MJ, Hume ID. 1985. Coprophagy and selective retention of fluid digesta: Their role in the nutrition of the common ringtail possum, *Pseudocheirus*

- peregrinus. *Australian Journal of Zoology* 33, 1-15.
- Chiou PW, Yu B, Lin C. 1998. The effect of different fiber components on growth rate, nutrient digestibility, rate of digesta passage and hindgut fermentation in domesticated rabbits. *Laboratory Animals* 32, 276–283.
- Cork S, Hume ID, Faichney G. 1999. Digestive strategy of non-ruminant herbivores: The role of the hindgut. In: H-J.G. Jung, G.C. Fahey Jr (eds) *Nutritional ecology of herbivores*, pp. 210-260. American Society of Animal Science, Savoy, Illinois, USA.
- Davies RR, Davies JAER. 2003. Rabbit gastrointestinal physiology. *Veterinary Clinics of North America. Exotic Animal Practice* 6, 139–153.
- De Blas C, García J, Carabaño R. 1999. Role of fibre in rabbit diets. A review. *Annales de Zootechnie* 48, 3–13.
- Demigné C, Rémésy C. 1979. Urea cycling and ammonia absorption in vivo in the digestive tract of the rat. *Annals of Biology Animal Biochemistry and Biophysiology* 19, 929-935.
- Demigné C, Rémésy C. 1985. Stimulation of absorption of volatile fatty acids and minerals in the cecum of rats adapted to a very high fiber diet. *Journal of Nutrition* 115, 53-60.
- Dobson A, Sellers AF, Thorlacius SO. 1971. Limitation of diffusion by blood flow through bovine ruminal epithelium. *American Journal of Physiology* 220 (5), 1337-1343.
- Dwivedi BK. 1991. Sorbitol and mannitol. In: Nabors LO, Gelardi RC (eds) *alternative Sweeteners*, 2nd edition, pp. 333-348. Marcel Dekker, New York.
- Ebino K. 1993. Studies on coprophagy in experimental animals.

- Experimental Animals 42, 1-9.
- von Engelhardt W, Dycker C, Lechner-Doll M. 2007. Absorption of short-chain fatty acids, sodium and water from the forestomach of camels. *Journal of Comparative Physiology B* 177 (6), 631-640.
- Forsythe SJ, Parker DS. 1985. Nitrogen metabolism by the microbial flora of the rabbit cecum. *Journal of Applied Bacteriology* 58, 363-369.
- Gidenne T. 1997. Caeco-Colic digestion in the growing rabbit: impact of nutritional factors and related disturbances. *Livestock Production Science* 51, 73-88.
- Gürbüz E, İnal F, Ata SÜ, Çitil ÖB, Kav K, Küçükkaya F. 2010. Effects of supplemental fructo-oligosaccharide and mannanoligosaccharide on nutrient digestibilities, volatile fatty acid concentrations, and immune function in horses. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Science* 34 (1), 39-44.
- Hanieh H, Sakaguchi E. 2009. Effect of d-mannitol on feed digestion and cecotrophic system in rabbits. *Animal Science Journal* 80, 157-162.
- Heaney RP, Recker RR, Stegman MR, Moy AJ. 1989. Calcium absorption in women: Relationship to Calcium intake, Estrogen status, and age. *Journal of Bone and Mineral Research* 4, 469-475.
- Hintz HF. 1969a. Comparisons of digestion coefficients obtained with cattle, Sheep, rabbits and horses. *Veterinarian* 6, 45-51.
- Hintz HF. 1969b. Effect of coprophagy on digestion and mineral excretion in the guinea pig. *Journal of Nutrition* 99, 375-378.
- Hongo R, Nakamura S, Oku T. 2010. Utilization of orally administered D-[14C] mannitol via fermentation by intestinal microbes in rats. *Journal of nutritional science and vitaminology* 56 (6), 387-395.
- Hörnigke H. 1981. Utilization of caecal digesta by caecotrophy (soft faeces

- ingestion) in the rabbit. *Livestock Production Science* 8, 361–366.
- Holtenius K, Björnhag G. 1985. The colonic separation mechanism in the guinea pig (*Cavia porcellus*) and the chinchilla (*Chinchilla laniger*). *Comparative Biochemistry and PhysiologyA* 82, 537-542.
- Hume ID. 2002. Digestive strategies of mammals. *Acta Zoologica Sinica* 48, 1-19.
- Kawasaki K, Min X, Nishiyama A, Sakaguchi E. 2013. Effect of fructooligosaccharide on nitrogen utilization in guinea pigs. *Animal Science Journal* 84, 328-333.
- Kishi K, Goda T, Takase S. 1998. Maltitol increases transepithelial diffusional transfer of calcium in rat ileum. *Life Sciences* 59, 1133–1140.
- Knutson RS, Francis RS, Hall JL, Moore BH, Heisinger JF. 1977. Ammonia and urea distribution and urease activity in the gastrointestinal tract of rabbits (*Oryctolagus* and *Sylvilagus*). *Comparative Biochemistry and Physiology* 58A, 151–154.
- Laplace JP. 1978. Le transit digestif chez les monogastriques. 3. Comportement (prise de nourriture, ceacotrophie), motricité et transit digestif, et pathogénie des diarrhées chez le lapin. *Annales de Zootechnie* 27, 225–265.
- Levrat MA, Behr SR, Rémésy C, Demigné C. 1991. Effects of soybean fiber on the cecal digestion in rats previously adapted to a fiber-free diet. *Journal of Nutrition* 121, 672-678.
- Li X, Min X, Tsuzuki Y, Sakaguchi E. 2011. Effect of indigestible sugars on nitrogen utilization in adult rabbits. *Animal Science Journal* 82, 296-301.
- Li X, Min X, Xiao J, Kawasaki K, Ohta N, Sakaguchi E. 2012. Utilization of dietary urea nitrogen is stimulated by D-mannitol feeding in rabbits. *Animal Science Journal* 83, 605–609.

- Lobley GE, Bremner DM, Zuur G. 2000. Effect of diet quality on urea fates in sheep as assessed by refined, non-invasive [$^{15}\text{N}^{15}\text{N}$] urea kinetics. *British Journal of Nutrition* 84, 459-468.
- Marini JC, Klein JD, Sands JM, Van Amburgh ME. 2004. Effect of nitrogen intake on nitrogen recycling and urea transporter abundance in lambs. *Journal of Animal Science* 82, 1157-1164.
- Matsuura T, Horina M, Kishimoto M, Ichikawa T. 2001. Effect of fructooligosaccharide-supplemented elemental diet on the intestinal microflora of rats. *Journal of Japan Society of Nutrition and Food Science* 54, 229-234.
- Mitsuoka T, Hidaka H, Eida T. 1987. Effect of fructooligosaccharides on intestinal microflora. *Molecular Nutrition & Food Research* 31, 427-436.
- Miura H, Horiguchi M, Ogimoto K, Matsumoto T. 1983. Nutritional interdependence among rumen bacteria during cellulose digestion in vitro. *Applied and Environmental Microbiology* 45, 726-729.
- Moe PW, Reid JT, Tyrrell HF. 1965. Effect of level of intake on digestibility of dietary energy by high-producing cows. *Journal of Dairy Science* 48, 1053-1061.
- Molis C, Flourie B, Ouarne F, Gailing MF, Lartigue S, Guibert A, Bornet F, Galmiche JP. 1996. Digestion, excretion, and energy value of fructooligosaccharides in healthy humans. *The American Journal of Clinical Nutrition* 64, 324-328.
- Morales, E. 1995. *The Guinea Pig: Healing, Food, and Ritual in the Andes*. The University of Arizona Press.
- Nishiyama A, Nishioka S, Islam MS, Sakaguchi E. 2009. Mannitol lower fat digestibility and body fat accumulation in both normal and cecectomized rats.

- Journal of Nutritional Science and Vitaminology 55, 242-251.
- National Research Council. 1991. Microlivestock: Little-known small animals with a promising economic future. National Academy Press.
- Nowicki PT, Granger DN. Gastrointestinal Blood Flow: In Textbook of Gastroenterology. Yamada T, ed. 5th Edition. pp 540–566.
- Ohta A, Ohtuki M, Takizawa T, Inaba H, Adachi T, Kimura S. 1994. Effects of fructooligosaccharides on the absorption of magnesium and calcium by cecectomized rats. International Journal for Vitamin and Nutrition Research 64, 316–323.
- Okazaki M, Fujikawa S, Matsumoto N. 1990. Effect of xylooligosaccharide on the growth of bifidobacteria. Bifidobacteria and Microflora 9, 77-86.
- Oku T. 1996. Oligosaccharides with beneficial health effects: A Japanese perspective. Nutrition Reviews 54, S59-S66.
- Okuda H, Fujii S. 1966. Direct colorimetry of ammonia in the blood. Saishin Igaku 21(3), 622-627.
- Pehrson A. 1983. Caecotrophy in caged mountain hares (*Lepus timidus*). Journal of Zoology 199, 563-574.
- Kvietys PR, Granger DN. 1981. Effect of Volatile Fatty Acids on Blood Flow and Oxygen Uptake by the Dog Colon. Gastroenterology 80, 962-969.
- Pieper R, Neumann K, Kröger S, Richter JF, Wang J, Martin L, Bindelle J, Htoo K, Vahjen V, Van Kessel AG, Zentek J. 2012. Influence of fermentable carbohydrates or protein on large intestinal and urinary metabolomic profiles in piglets. Journal of Animal Science 90, 34-36.
- Rémésy C, Demigné C. 1989. Specific effects of fermentable carbohydrates on blood urea flux and ammonia absorption in the rat cecum. The Journal of Nutrition

119, 560-565.

Remond D, Chaise JP, Delval E, Poncet C. 1993. Net transfer of urea and ammonia across the ruminal wall of sheep. *Journal of Animal Science* 71 (10), 2785-2792.

Remond D, Noziere P, Poncet C. 2002. Effect of time of starch supply to the rumen on the dynamics of urea and ammonia net flux across the rumen wall of sheep. *Animal Research* 51, 3-13.

Sakaguchi E, Heller R, Becker G, Engelhardt W. 1986. Retention of digesta in the gastrointestinal tract of the guinea pig. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 55, 44-55.

Sakaguchi E, Itoh H, Uchida S, Horigome T. 1987. Comparison of fibre digestion and digesta retention time between rabbits, guinea pigs, rats and hamsters. *British Journal of Nutrition* 58, 149-158.

坂口 英. 1989. 後腸発酵動物における飼料消化能力と消化管内容物移行の様相. 栄養生理研究会報 33, 101-126.

Sakaguchi E, Kaizu K, Nakamichi M. 1992. Fibre digestion and digesta retention from different physical forms of the feed in the rabbit. *Comparative Biochemistry and Physiology* 102A (3), 559-563.

Sakaguchi E, Sakoda C, Toramaru Y. 1998. Caecal Fermentation and energy accumulation in the rat fed on indigestible oligosaccharides. *British Journal of Nutrition* 80, 496-476.

Sakaguchi E. 2003. Digestive strategies of small hindgut fermenters. *Animal Science Journal* 74, 327-337.

Sands JM. Mammalian urea transporters. *Annual Reviews of Physiology* 65, 543-566.

- Snipes RL. 1982. Anatomy of the guinea pig cecum. *Anatomy and Embryology* 165, 97-111.
- Southern NH. 1940. Coprophagy in the wild rabbit. *Nature, London* 145, 262-262.
- Sperber I, Björnhag G, Ridderstrade Y. 1983. Function of proximal colon in lemming and rat. *Swedish Journal of Agricultural Research* 13, 243-256.
- Sperber I. 1985. Colonic separation mechanism (CSM). *Acta Physiologica Scandinavica* 124 (suppl.), 87-87.
- Stumpff F, Lodemann U, Van Kessel AG, Pieper R, Klingspor S, Wolf K, Martens H, Zentek J, Aschenbach JR. 2013. Effect of dietary fibre and protein on urea transport across the cecal mucosa of piglets. *Journal of Comparative Physiology B* 183(8), 1053-1063.
- Takahashi T, Sakaguchi E. 1998. Behaviors and nutritional importance of coprophagy in captive adult and young nutrias (*Myocastor coypus*). *Journal of Comparative Physiology B* 168, 281–288.
- Takahashi T, Sakaguchi E. 1999. Significance of coprophagy in the utilization of dietary nitrogen in the guinea pig. *Experimental Herbivora* 23, 43–48.
- Takahashi T, Sakaguchi E. 2006. Transport of bacteria across and along the large intestinal lumen of guinea pigs. *Journal of Comparative Physiology* 176, 173-178.
- Thorlacius SO, Dobson A, Sellers AF. 1971. Effect of carbon dioxide on urea diffusion through bovine ruminal epithelium. *American Journal of Physiology* 220 (1), 162-170.
- Timmer RT, Klein JD, Bagnasco SM, Doran JJ, Verlamder JW, Gunn RB, Sands JM. 2001. Localization of the urea transporter UT-B protein in human and rat erythrocytes and tissues. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 281,

C1318-C1325.

- Tokunaga T, Oku T, Hosoya N. 1989. Utilization and excretion of a new sweetener, fructooligosaccharide (neo-sugar), in rats. *Journal of Nutrition* 119, 553-559.
- Tokunaga T, Nakada Y, Tashiro Y, Hirakawa M, Hidaka H. 1993. Effects of fructooligosaccharides intake on the intestinal microflora and defecation in healthy volunteers. *Bifidus* 6, 143-150.
- Tsuzuki Y, Sakaguchi E. 2010. Utilization of dietary nitrogen is improved by the addition of fructooligosaccharide to the diet in rabbits. *Experimental Herbivora* 33, 13-18.
- Tyrrell HF, Moe PW. 1975. Effect of intake on digestive efficiency. *Journal of Dairy Science* 58, 1151-1163.
- Udén P, Colucci PE, Van Soest PJ. 1980. Investigation of chromium, cerium and cobalt as markers in digesta rate of passage studies. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 31, 625-632.
- Varel V.H, Bryant M.P, Holdeman L.V, Moore W.E.C. 1974. Isolation of Ureolytic *Peptostreptococcus productus* from feces using defined medium: failure of common urease tests. *Applied Microbiology* 28, 594-599.
- Viallard V. 1984. Endogenous urea as a nitrogen source for microorganisms of the rabbit digestive tract. *Annals of Nutrition and Metabolism* 28, 151-155.
- Williams CH, David DJ, Iismaa O. 1962. The determination of chromic oxide in faeces samples by atomic absorption spectrophotometry. *Journal of Agricultural Science* 59, 381-385.
- Wrong OM, Vince A. 1984. Urea and ammonia metabolism in the human large intestine. *Proceedings of the Nutrition Society* 43, 77-86.
- Xiao L, Xiao M, Jin X, Kawasaki K, Ohta N, Sakaguchi E. 2012. Transfer of blood

- urea nitrogen to cecal microbial nitrogen is increased by mannitol feeding in growing rabbits fed timothy hay diet. *Animal* 6 (11), 1757-1763.
- Younes H, Rémésy C, Behr SR, Demigné C. 1995a. Resistant starch exerts an uremia lowering effect by enhancing urea disposal in the large intestine. *Nutrition Research* 15, 1199-1210.
- Younes H, Garleb K, Behr S, Rémésy C, Demigné C. 1995b. Fermentable fibers of oligosaccharides reduce urinary nitrogen excretion by increasing urea disposal in the rat cecum. *Journal of Nutrition* 125, 1010-1016.
- Younes H, Rémésy C, Behr SR, Garleb K, Demigné C. 1996. A blend of dietary fibers increases urea disposal in the large intestine and lowers urinary nitrogen excretion in rats fed a low protein diet. *Journal of Nutritional Biochemistry* 7, 474-480.
- Younes H, Rémésy C, Behr SR, Demigné C. 1997. Fermentable carbohydrate exerts a urea-lowering effect in normal and nephrectomized rats. *American Journal of Physiology* 272, G515-G521.
- Younes H, Alphonse JC, Behr SR, Demigné C, Rémésy C. 1999. Role of fermentable carbohydrate supplements with a low protein diet in the course of chronic renal failure: Experimental bases. *American Journal of Kidney Diseases* 4, 1-15.
- Younes H, Alphonse JC, Abdelkader MH, Rémésy C. 2001. Fermentable carbohydrate and digestive nitrogen excretion. *Journal of Renal Nutrition* 11, 139-148.

謝辭

本研究の機会を与えてくださり、さらに本研究の遂行にあたり、懇切丁寧なご指導、ご鞭撻賜りました坂口 英教授に深く感謝の意を表します。

また、本研究にご指導、ご助言をいただきました近藤 康博教授、宮本 拓教授、西野 直樹准教授、荒川 健祐助教に深く感謝の意を表します。

実験にご協力いただきました家畜栄養学研究室の在学生、卒業生の皆様には心から感謝の意を表します。

また、安定同位体比質量分析装置の使用にあたり、ご指導いただいた嶋 一徹准教授に深く感謝の意を表します。

本研究以外にも研究や勉学に対してご指導、ご協力いただいた宮崎大学の長谷川 信美教授、森田 哲夫教授、西脇 亜也教授、加藤 悟郎氏、岡山県畜産研究所の金岡 孝和氏、高崎 緑女史、高取 健治氏、長尾 伸一郎氏、水木 剛氏、行森 美枝女史に深く感謝の意を表します。

私を励まし、応援してくれた友人、学業を修めるにあたり、私を理解し温かく見守ってくれた家族に深く感謝いたします。

最後に、私の研究に多大なる貢献をしてくれた、ウサギ、ウシ、ヌートリア、モルモット、ラットに心から感謝の意と敬意を表します。