

低蛋白質または低エネルギー飼料摂取がラットおよび牛の骨成長に及ぼす影響

誌名	栄養生理研究会報
ISSN	02864754
著者	矢野, 秀雄 松井, 徹 舟場, 正幸
巻/号	32巻2号
掲載ページ	p. 123-141
発行年月	1988年9月

低蛋白質または低エネルギー飼料摂取がラット および牛の骨成長に及ぼす影響

矢野秀雄・松井 徹*・舟場正幸・川島良治 (京都大学農学部)

若令期における家畜の生育過程における発育の良否は、その後の生産性にも影響を及ぼす。発育は骨格と筋肉の成長によるところが大きく、また骨格筋の成長は骨の成長と深い関連がある。骨の成長は、栄養状態によって左右され、一般に低栄養条件下では成長が抑制される。長骨成長は、骨端成長板軟骨の増殖、軟骨の石灰化および骨化による伸長と、骨幹骨膜下における骨沈着および骨内膜における骨吸収による骨幅の成長という2種の機構が共役して生じると考えられている¹⁾。

うさぎを用いた組織学的研究により、低蛋白質および低エネルギー飼料摂取は、骨端成長板軟骨の増殖を抑制し、また骨芽細胞の活性を低下させることが明らかにされている²⁾。NAKAMOTOとMILLER³⁾は、ラットを用いて、蛋白質およびエネルギー摂取制限が、骨の石灰化と関連の深い骨中アルカリ性フォスファターゼ活性を低下させることを報告している。さらにLEROITHとPIMSTON⁴⁾は、蛋白質欠乏により、ラットの長骨伸長および骨重量増加が抑制されることを示している。

一方蛋白質とエネルギー摂取制限のそれぞれが骨成長特に骨幅の成長に及ぼす影響についての研究報告はほとんどない。

本研究は、まずラットを用いて、低蛋白質または低エネルギー飼料摂取が、長骨成長すなわち伸長と幅の成長に及ぼす影響について検討し、次に、同様の処理を子牛に対し行ない、長骨成長の変化を検討するとともに、低栄養による血中ホルモン濃度の変化の様相も合わせて検討した。

1. 低蛋白質または低エネルギー飼料摂取がラットの長骨成長に及ぼす影響⁵⁾

体重約100gの雄ウィスター系ラット91匹に対し、表-1に示した正常蛋白質・正常エネルギー飼料を1週間給与した。次に84匹を21匹ずつ4群に分けそれぞれ正常蛋白質・正常エネルギー飼料区(NN)、正常蛋白質・低エネルギー飼料区(LE)、低蛋白質・正常エネルギー飼料区(LP)および低蛋白質・低エネルギー飼料区(LL)とした。体重が250gに達するまでは、表-1に示した飼料を次の式にしたがい給与した。

$$\text{給与量 (g/日)} = 0.067 \times \text{体重 (g)} + 8.34$$

* 現在：島根大学農学部

体重が250g以上になると1日当たり25.1gの飼料を与えた。この給与量は、NN区飼料を飽食させた場合に、ラットが摂取する飼料の量にほぼ相当している。LEとLL区の飼料中炭水化物量は、NN、LP区の50%であり、LPとLL区の蛋白質含量は、NN、LE区の24%である。

表-1 飼料内容 (%)

	NN	LE	LP	LL
コーンスターチ	48	24	48	24
しょ糖	5	2.5	5	2.5
カゼイン	25	25	6	6
とうもろこし油	6	6	6	6
セルロースパウダー	8	34.5	27	53.5
ミネラル混合物	6	6	6	6
ビタミン混合物	2	2	2	2

試験開始時に7匹、開始後15、30、45日目に各区それぞれ7匹ずつから10:00-12:00の間に採血を行ない、屠殺後大腿骨および脛骨を採取した。左大腿骨の骨長、骨幅、乾重量および体積を計測の後灰化し、灰分含量とCa含量を測定した。右大腿骨はホルマリンで固定した後脱灰し、骨端部の切片を長軸方向に平行して作製し、成長板厚を顕微鏡下で計測した。脛骨は、生理的食塩水中でホモゲナイズした後上澄みのアルカリ性フォスファターゼ (alp) 活性⁹⁾、酸性フォスファターゼ (acp) 活性⁹⁾ および可溶性蛋白質濃度⁷⁾ を測定した。また血液は血清とし、血清中Ca濃度を測定した。

図-1で示すように、体重増加はNN区で著しく速くLP、LE区ではほぼ同程度であり、LL区で最も遅れた。体重の変化がLPとLE区ではほぼ同じであったことから、本試験において蛋白質不足とエネルギー不足が骨成長に及ぼす影響を比較することは可能であると考えられた。

表-2は大腿骨長と骨幅の変化を示している。NN区における大腿骨の伸長は、試験開始30日目までは他の区と比較し著しく速く、その後伸長速度はやや低下した。一方LE、LP区では、試験期間を通じほぼ一定速度で同程度の大腿骨の伸長があった。他の区と比較するとLL区における伸長速度は低かったが、30日目と45日目の間に回復傾向を示した。NN区における大腿骨の幅の成長は、他の区と比べ著しく速く、LP、LL区の幅の成長はLE区と比べ遅かった。

次にHUXLEYとTEISSIERのアロメトリー式⁹⁾に骨長、骨幅をあてはめることにより、骨長に対する骨幅の相対成長係数を求めた。相対成長係数はNN、LE区では大きな差は認められなかったが、これら2つの区と比較するとLP、LL区の係数は著しく低い値となった。本試験では蛋白質欠

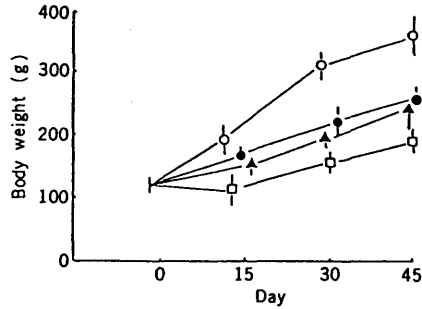


図-1 低栄養飼料摂取がラットの体重増加に及ぼす影響(平均±標準偏差)
 ○正常エネルギー・正常蛋白質飼料給与(NN)、●低エネルギー・正常蛋白質給与(LE)、
 ▲正常エネルギー・低蛋白質飼料給与(LP)、□低エネルギー・低蛋白質飼料給与(LL)

表-2 ラットにおいて蛋白質またはエネルギー欠乏が大腿骨長、骨幅に及ぼす影響

	NN	LE	LP	LL	F検定		
					P	E	PXE

大腿骨長(mm)							
開始時	20.7±0.9						
15日目	24.6±0.4	22.8±0.7	22.5±0.5	22.1±0.4	**	*	NS
30日目	29.0±0.8	25.8±0.4	25.0±0.5	23.2±0.7	**	**	NS
45日目	31.3±0.6	29.5±0.6	28.8±0.7	27.2±0.5	**	**	NS

大腿骨幅(mm)							
開始時	2.93±0.16						
15日目	3.50±0.08	3.41±0.07	3.19±0.06	3.10±0.08	**	**	NS
30日目	3.80±0.12	3.65±0.12	3.38±0.13	3.21±0.09	**	**	NS
45日目	4.04±0.25	3.81±0.17	3.56±0.04	3.39±0.15	**	**	NS

相対成長係数							
	0.75±0.04	0.71±0.05	0.56±0.09	0.52±0.03	**	NS	NS

平均±標準偏差

P:蛋白質欠乏の効果、E:エネルギー欠乏の効果

NS:有意差なし、*:P<0.05、**:P<0.01

相対成長係数 (a):骨幅=b x (骨長)^a

乏とエネルギー欠乏ではほぼ同程度に体重増加および大腿骨の伸長は抑制された。しかし骨幅成長はエネルギー欠乏と比べ、蛋白質欠乏でより強く抑制されることが示された。

表-3 ラットにおいて蛋白質またはエネルギー欠乏が脛骨中アルカリ性フォスファターゼ活性および酸性フォスファターゼ活性に及ぼす影響

	N N	L E	L P	L L	F 検定		
					P	E	P X E
アルカリ性フォスファターゼ*							
開始時							
			179.5±16.7				
15日目	204.3±10.8	163.5±9.5	168.9±16.6	154.9±10.7	**	**	*
30日目	188.6±8.8	147.4±14.3	156.4±8.6	109.6±16.0	**	**	NS
45日目	119.9±8.0	134.2±10.2	144.7±17.7	130.6±14.9	*	NS	*
酸性フォスファターゼ*							
開始時							
			107.8±13.2				
15日目	104.5±11.4	82.6±11.7	74.8±12.5	62.9±12.6	**	*	NS
30日目	98.9±12.8	87.5±10.0	75.1±12.9	49.0±7.3	**	**	NS
45日目	101.9±7.1	100.6±9.1	68.6±14.7	54.9±7.2	**	NS	NS

平均±標準偏差

* 骨ホモジネート上澄み中の可溶性蛋白質mg当りの1時間で産出されるパラニトロフェノール量をmMで示した

P:蛋白質欠乏の効果、E:エネルギー欠乏の効果

NS:有意差なし、*:P<0.05、**:P<0.01

NN区の脛骨中alp活性は15日目に最大となりその後低下した(表-3)。LE、LP区のalp活性はNN区と比べ低く、試験期間中徐々に低下し、またLL区のalp活性は試験開始15日目、30日目で他の区と比べ低い傾向を示した。骨中alpは主に骨芽細胞に存在し、骨格成長が速い時に活性が高まることが知られている⁹⁾。本試験でも、NN区において骨伸長が速いと考えられる試験開始15日目にalp活性が高値を示した。これらのことから、エネルギー欠乏も蛋白質欠乏と同様に骨中alp活性を低下させ、この低下が骨伸長遅延に関与している可能性のあることが示された。またNAKAMOTOとMILLER⁹⁾はラットにおいて蛋白質およびエネルギー欠乏が本酵素活性を低下させることを報告している。

NN区の骨中acp活性は試験期間を通じ大きく変動しなかったが、LE区では15日目に低下し、その後回復傾向を示した。LP区では、15日目の本酵素活性は低く、この低下はLE区と比較しても明らかであり、30、45日目においてもacp活性の回復は認められなかった。LL区のacp活性は他の3区と比較し試験期間を通じ著しく低かった。骨中acpは骨の吸収に関与していると考えられている¹⁰⁾。

さらにHARRISとHEANY¹¹⁾は骨吸収と骨形成は共役して生じており、骨吸収の低下は骨形成を抑制することを示唆している。これらの結果より、低蛋白質飼料摂取は、低エネルギー飼料摂取と異なり強く骨吸収を抑制していることが明らかになるとともに、蛋白質欠乏時の骨吸収低下が、骨幅の成長を遅延する可能性が考えられた。

表-4は大腿骨遠位成長板軟骨厚の変化を示したものである。いずれの区においても、成長板軟骨厚は試験開始時に最も厚く、試験開始30日目には薄くなっていた。一方、成長板軟骨の厚さはNN>LE≒LP>LLの順であった。成長板軟骨厚が薄くなる原因としては、軟骨細胞の増殖低下または軟骨の骨化促進が考えられるが、本試験では低栄養条件下において、骨中alp活性が低下していることから、軟骨の骨化が促進されているとは考えにくく成長板軟骨細胞の増殖速度が低下していると推察された。

表-4 ラットにおいて蛋白質またはエネルギー欠乏が試験開始30日目に大腿骨遠位成長板軟骨厚に及ぼす影響

開始時	N N	L E	L P	L L	F 検定		
					P	E	P X E
0.50±0.03	0.34±0.05	0.24±0.03	0.22±0.03	0.19±0.03	**	**	*
平均±標準偏差 (mm)							
P: 蛋白質欠乏の効果、E: エネルギー欠乏の効果							
NS: 有意差なし、*: P<0.05、**: P<0.01							

一般的に骨成長には成長ホルモン(GH)が大きく関与していることが知られている。またラットにおいて、長期的な蛋白質およびエネルギー欠乏は、血漿中GH濃度を上昇させることが報告されている¹²⁾。近年GHの軟骨細胞増殖作用は直接的ではなく、ソマトメジン類を介して作用していると考えられるようになってきた¹³⁾。さらに蛋白質欠乏やエネルギー欠乏が、血漿中ソマトメジンC濃度を低下させることが報告されており¹⁴⁾、本試験において認められた低栄養による骨伸長抑制は、血漿中ソマトメジン濃度低下による成長板軟骨細胞の増殖速度低下が、一因である可能性がある。

低栄養時に血中GH濃度が上昇するにもかかわらずソマトメジン濃度が低値を示す原因についてはいまだ明らかになっていないが、BURSTEINら¹⁵⁾は甲状腺ホルモンが、GHによる血中ソマトメジン濃度上昇に影響を及ぼしていることを報告している。また我々¹⁶⁾は本試験で用いたLL飼料を15日間給与すると、血中サイロキシン濃度が6.19 μg/100mlから3.64 μg/100mlへと低下することを認めており、低栄養による甲状腺ホルモン濃度低下が、ソマトメジン濃度上昇を抑制しているとも考えられる。さらに甲状腺ホルモンの骨への直接的な作用は明らかになっていないが、甲状腺

機能低下時には全ての骨における細胞の活性が低下することおよび骨化が抑制されて骨成熟の遅延が生じることが知られており¹⁷⁾、低栄養による甲状腺ホルモン濃度低下がソマトメジンを介さずに骨成長を抑制している可能性も考えられる。

表-5は、試験開始時および45日目の骨密度、骨灰分中Ca含量%および血清中Ca濃度を示したものである。試験開始時と比較し、45日目にはいずれの区においても、骨密度は高く、血清中Ca濃度は若干低い傾向を示したが、区間差は認められなかった。ラットにおいて、蛋白質欠乏は、小腸でのCa吸収を抑制し、血清中Ca濃度を低下させることが報告されている¹⁾。しかしながら本実験では、蛋白質の摂取を制限した区でも、血清中Ca濃度および骨灰分中Ca含量%は明らかな変化が認められなかった。これらの結果から本実験で用いた低蛋白質飼料摂取は、Caの恒常性に大きな影響を及ぼしていないと考えられた。

表-5 ラットにおいて蛋白質またはエネルギー欠乏が試験開始45日目に血清中Ca濃度、骨密度および骨中Ca含量%に及ぼす影響

	開始時	NN	LE	LP	LL
血清中Ca (mg/l)	103±3	99±4	95±3	98±3	97±2
骨密度 (g/cm ³)	0.54±0.02	0.83±0.05	0.83±0.06	0.84±0.03	0.81±0.04
% of Ca	32.7±0.9	36.7±2.7	35.8±1.4	35.4±1.2	34.2±1.2
平均±標準偏差					

2. 低蛋白質飼料摂取ラットに対するトリヨードサイロニンおよび上皮小体ホルモン投与が長骨成長に及ぼす影響¹⁸⁾

先の試験でラットにおいて蛋白質欠乏は骨成長、特に骨幅成長を抑制することが示された。またこの骨成長抑制には、血中サイロキシン濃度低下が関与している可能性があると考えられた。

骨幅の成長を調節する因子については不明な点が多いが、TAMら¹⁹⁾は、上皮小体ホルモン(PTH)投与により、骨幅成長が促進すると報告している。また先の試験では、低蛋白質給与により骨中acp活性が低下し、これが骨幅成長を抑制した一因ではないかと推察されたが、PTHは破骨細胞に作用しacp活性を高める働きを持っている²⁰⁾。

そこで本実験では、低蛋白質飼料摂取ラットに対し、活性型甲状腺ホルモンであるトリヨードサイロニン(T3)およびPTHを投与し、蛋白質欠乏による骨成長抑制が回復するかどうかを検討した。

体重約150gのウイスター系雄ラット36匹に表-1で示した正常飼料(NN)、または低蛋白質飼

料 (LP) を先の試験で示した方法に従い給与した。NN区およびLP区ラットそれぞれ6匹に対し、生理的食塩水に溶かしたT3 (0.5 μg/100g/day)、PTH (1u/day) または生理的食塩水のみを腹腔内に14日間連続して投与した。

試験開始後15日目の10:00~12:00の間に屠殺し、左大腿骨の骨長、骨幅および右大腿骨のalp⁶⁾、acp⁶⁾ 活性および可溶性蛋白質⁷⁾ を測定した。

表-6に示したように、LP区では試験開始7日目にはすでに体重増加が遅延し、この傾向は14日目まで続いた。またいずれの栄養状態でも、ホルモン投与はラットの体重増加に影響を及ぼさなかった。

表-6 蛋白質欠乏ラットにおいて上皮小体ホルモン (PTH) およびトリヨードサイロニン (T3) 投与が体重増加に及ぼす影響

	開始時	7日目	15日目
正常飼料給与			
対照区	151.6±7.6	213.6±4.9	258.3±7.2
PTH投与	152.0±7.3	210.0±9.7	258.2±13.1
T3投与	152.0±7.6	204.8±14.0	253.0±15.5
低蛋白質飼料給与			
対照区	151.6±8.8	168.0±7.7**	185.0±9.4**
PTH投与	152.0±7.6	157.2±11.7**	178.3±14.9**
T3投与	151.4±8.0	163.2±4.5**	181.7±6.4**

平均±標準偏差 (g)

** : 同じ処理を行なった正常飼料給与区との間にt検定により有意差 (P < 0.01) あり

表-7は大腿骨長、骨幅および酵素活性を示したものである。NN区と比較し、LP区では先の試験と同様に骨長、骨幅とも成長が遅延した。NN区では骨長、骨幅成長ともにホルモン投与の影響を受けなかったが、LP区では、T3、PTH投与により、骨伸長は抑制傾向を示し、骨幅成長は有意に遅延した。これらの結果から、低蛋白質飼料摂取による骨成長の抑制は、甲状腺ホルモン血中濃度低下に関連がないことが示唆された。またPTHの骨幅成長促進作用は、蛋白質欠乏時には消失している可能性が考えられた。

ホルモンを投与しない場合、LP区の骨中alp活性は、NN区より低い傾向が認められた。またLP区の本酵素活性はPTH投与により低下し、NN区でも低下傾向が認められた。骨中alp活性はPTH投与により低下することが報告されており²⁰⁾、本実験の結果と一致した。さらに本実験ではPTHの

表-7 蛋白質欠乏ラットにおいて上皮小体ホルモン (PTH) およびトリヨードサイロニン (T3) 投与が大腿骨に及ぼす影響

	骨長(mm)	骨幅(mm)	アルカリフォスファターゼ ^a	酸性フォスファターゼ ^a
正常飼料給与				
対照区	26.7±0.9	4.05±0.34	118.4±32.8	64.2±11.3
PTH投与	26.9±0.5	4.08±0.19	93.2±26.4	65.4±12.1
T3投与	27.1±0.8	4.02±0.10	87.2±23.6	65.6±5.2
低蛋白質飼料給与				
対照区	26.1±0.6	3.68±0.05 ^{**}	72.6±20.0	63.6±18.4
PTH投与	25.5±0.6 ^{**}	3.45±0.23 ^{**}	54.4±12.4 ^{**}	48.0±12.4
T3投与	25.7±0.5 ^{**}	3.57±0.11 ^{**}	105.0±28.6 [*]	59.0±15.4

平均±標準偏差

^a 骨ホモジネート上澄み中の可溶性蛋白質mg当りの1時間で産出されるパラニトロフェノール量をmMで示した

^{**}: 同じ処理を行なった正常飼料給与区との間にt検定により有意差 (P<0.01) あり

^{*}: 対照区 (生理的食塩水投与) と比べt検定により有意差 (P<0.05) あり

alp 活性低下作用は、蛋白質欠乏時に強まっていると考えられた。

T3投与はLP区の骨中alp活性を有意に増加させた。低蛋白質飼料摂取時には、甲状腺機能が低下し、血清中甲状腺ホルモン濃度が減少することは報告されている¹⁹⁾。低蛋白質飼料摂取による骨中alp活性の低下はT3投与によって回復したことから、蛋白質欠乏時のこの酵素活性減少は甲状腺機能低下が一因であると推察された。一方LP区におけるT3投与はalp活性を回復させたにもかかわらず、骨成長を回復させなかった。これは、蛋白質欠乏時の骨成長抑制には、骨中alp活性低下が第一の制限要因ではないことを示しているであろう。

PTHおよびT3を投与をしない場合、NN区の骨中acp活性は、LP区との間で差は認められなかった。PTH投与によりLP区ではacp活性が低下する傾向を示したが、NN区では変化は見られなかった。PTHは骨吸収の指標である骨中acp活性を高めることが知られている²⁰⁾。しかしながら、本実験の結果から通常はPTHにより促進されると考えられている骨吸収が蛋白質欠乏時には逆に抑制されていると推察された。蛋白質欠乏時のPTHに対するこのような骨の反応性の変化が、PTHの骨幅成長促進作用を消失させるとともに、骨成長特に骨幅成長の遅延に関係している可能性が考えられた。T3、PTH投与により骨幅成長が遅延した原因は明らかではないが、蛋白質欠乏に対する動物の適応をこれらのホルモン投与が乱しているのかもしれない。

3. 低蛋白質または低エネルギー飼料摂取が子牛の骨成長に及ぼす影響^{21, 22)}

反芻動物では単胃動物と異なり、蛋白質、エネルギー摂取制限はまず反芻胃における飼料消化に作用するため、これらの栄養素不足による骨成長抑制は単胃動物と反芻動物では様相が異なると考えられる。本実験では低蛋白質飼料または低エネルギー飼料を子牛に給与した場合の長骨成長の変化を検討した。

体重約120～140kg（生後約3ヶ月）のホルスタイン種雄子牛20頭を用いた。第一試験では表-8に示した正常飼料（NN）、低エネルギー飼料（LE）、低蛋白質飼料（LP）および低エネルギー、低蛋白質飼料（LL）をそれぞれ2頭ずつに飽食させた。NN区の飼料は1日当り増体量が約1kg期待できる程度のDCP、TDN含量になるように、またLP区のDCP含量、LE区のTDN含量は、1日当り増体量が0.5kg程度期待できる含量とした。LL区のDCP含量はLP区と同量に、またTDN含量はLE区と同量とした。

表-8 飼料内容

	NN	LE	LP	LL
配合割合（％）				
圧べんとうもろこし	55.4	0	70.7	0
だいず粕	15.0	21.0	0	0
ふすま	7.5	17.1	0	41.2
コーンコブ	20.0	60.0	27.0	57.0
食塩	0.4	0.4	0.4	0.4
炭酸カルシウム	0.9	0.7	0.5	1.1
リン酸三石灰	0.6	0.6	1.2	0.1
微量無機物混合物	0.1	0.1	0.1	0.1
ビタミン混合物	0.1	0.1	0.1	0.1
成分含量*				
DM	88.4	90.8	88.5	90.6
CP	13.6	14.0	7.0	8.0
DCP	11.1	11.0	4.9	4.9
TDN	69.6	54.6	68.8	52.6
Ca	0.63	0.63	0.62	0.63
P	0.42	0.43	0.40	0.42

* 成分含量は日本飼料成分表（1980）により計算した。

第1試験では飼料摂取量が区間でかなり異なったため第2試験では同様の飼料を、摂取量が最も少なかったLP区にあわせて、各区2頭ずつに給与した(表-9)。

表-9 第2試験における飼料給与量の基準

体重 (kg)	給与量 (kg)
100	2.7
110	3.0
120	3.2
130	3.4
140	3.6
150	3.9
160	4.1
170	4.3
180	4.5
190	4.8
200	5.0
210	5.2
220	5.4
230	5.7
240	5.9
250	6.1

第1、第2試験ともに試験開始時に2頭ずつ、そして試験開始12週後にのこりすべてを屠殺した。脛骨長、骨幅、骨皮質厚を計測し、骨幹部骨皮質中骨灰分密度、灰分中Ca、P、Mg含量、alp⁶⁾、acp⁶⁾活性を測定した。さらに近位骨端成長板付近を長軸方向に切取り、脱灰後切片を作製し、軟骨増殖速度の指標として、柱状構造1つあたりの軟骨細胞数を計測した。また試験期間中4週ごとに、給餌4時間後に採血を行ない血清中Ca、P、Mg、蛋白質⁷⁾、尿素態窒素濃度²³⁾、alp活性⁶⁾、PTH²⁴⁾、インスリン²⁵⁾、成長ホルモン²⁶⁾、総サイロキシン²⁷⁾濃度を測定した。

表-10に示したように、第1試験では飼料を飽食させたため、制限給餌を行なった第2試験と比べ、全体的に増体量が大きかった。また両試験ともNN区が増体量が大きく、ついでLE、LL、LP区の順であった。ラットを用いた先の試験と異なり蛋白質水準だけが低いLP区は、蛋白質水準のみでなくエネルギー水準も低いLL区より増体が悪かった。ORSKOVら²⁸⁾は、めん羊を用いた試験で、蛋白質摂取が少ない場合に可消化有機物摂取量が増加すると蛋白質の消化率が低下することを報告している。そこでLP区ではLL区よりも蛋白質の消化率が悪く蛋白質欠乏の程度が大きくなったため増体が良くなかったのかもしれない。

表-10 子牛において蛋白質またはエネルギー欠乏が体重増加に及ぼす影響

	第一試験				第2試験			
	NN	LE	LP	LL	NN	LE	LP	LL
開始時	137	134	135	138	124	126	129	134
4週目	164	159	152	153	151	146	144	143
8週目	205	188	177	181	181	161	156	155
12週目	248	219	206	212	217	179	169	176
増体量	111	85	71	74	93	53	40	42
一日当りの増体量	1.32	1.01	0.85	0.88	1.11	0.63	0.48	0.50
2頭の平均								

両試験の開始時に屠殺した2頭と、12週後に屠殺した8頭の脛骨の大きさを表-11に示した。試験終了時の脛骨長および骨幅は両試験ともNN区が他の3区より大きかった。またLP区の骨幅は特に小さかった。骨皮質厚は他の3区と比較し、NN区で著しく厚かったが、LP区では特に薄くなり、開始時と比較しても明らかに減少していた。この結果は低栄養、特に蛋白質摂取制限は、骨の大きさとともに骨皮質幅に影響し、骨の強度を低下させることを示している。

表-11 子牛において蛋白質またはエネルギー欠乏が脛骨の大きさに及ぼす影響

	第一試験					第2試験				
	開始時	NN	LE	LP	LL	開始時	NN	LE	LP	LL
骨長(cm)	27.4	32.6	31.7	31.1	30.4	27.0	32.1	30.1	30.1	30.4
骨幅(cm)	2.72	3.34	3.24	2.97	3.11	2.64	3.14	2.89	2.74	3.07
骨皮質厚(cm)	0.63	0.88	0.68	0.57	0.65	0.63	0.82	0.61	0.55	0.67
軟骨細胞数 ^a	23.5	28.0	16.1	16.6	18.8	39.0	27.4	14.7	16.4	23.7
2頭の平均										

^a近位骨端成長盤軟骨1柱状構造当りの軟骨細胞数

長骨の伸長は骨端成長盤軟骨細胞の増殖が大きく関与している。成長盤軟骨細胞は、増殖帯で分裂し、増殖した細胞は骨幹の方に向かって列をなして伸び、軟骨細胞の小柱を形成する¹⁾。本実験では

表-11に示したように成長盤骨端の切片を作製し、柱状構造1つ当りの軟骨細胞数を計測した。NN区は他の3区と比べ1列中の軟骨細胞が多く軟骨細胞の増殖が速く生じていることを示している。一方、LE、LP、LLの各区では柱状構造そのものが短く、分裂速度が低下しているようであった。

表-12に示したように、骨灰分密度、灰分中PおよびMg含量%は両試験で栄養水準による明らかな差は認められなかったが、第1試験ではLP区の骨中Ca含量%が他の区より低い傾向を示した。

表-12 子牛において蛋白質またはエネルギー欠乏が
脛骨成分に及ぼす影響

	骨灰分密度 (g/cm ³)	Ca含量 (灰分中%)	P含量 (灰分中%)	Mg含量 (灰分中%)	アルカリ性 ^a フォスファターゼ [~]	酸性 ^a フォスファターゼ [~]
第一試験						
開始時	1.23	35	18	0.5	659	33
NN	1.34	36	22	0.6	493	53
LE	1.09	38	20	0.6	465	30
LP	1.09	33	19	0.5	304	30
LL	1.30	35	20	0.4	385	29
第二試験						
開始時	1.15	35	21	0.5	472	41
NN	1.09	36	21	0.7	451	47
LE	1.27	36	20	0.7	366	33
LP	1.22	36	20	0.6	233	34
LL	1.24	36	21	0.7	333	38

2頭の平均

^a 骨ホモジネート上澄み中の可溶性蛋白質mg当りの1時間で産出される
パラニトロフェノール量をmMで示した

骨中alp活性は両試験とも試験開始時に高く、12週後では、NN>LE>LL>LPの順となり、特にLP区で活性が低かった。acp活性は、他の区と比べNN区で高い活性を示したが、他の3区の間では明らかな差は認められなかった。子牛において低栄養は骨皮質中alpと骨中acp活性を低下させることがこの結果から示された。

表-13は血清中成分の変化を示したものである。血清中Ca濃度はいずれの区においても徐々に低下し、特にLP区で著しい低下傾向を示した。また第1試験においてLP区の骨灰分中Ca含量は低い値を示した。これらのことから、LP区はほかの区と比べCaが不足傾向にあり、このCa不足がLP

表-13 子牛において蛋白質またはエネルギー欠乏
が血清中各種成分濃度に及ぼす影響

	第1試験				第2試験			
	NN	LE	LP	LL	NN	LE	LP	LL
Ca (mg/l)								
開始時	118	122	120	119	117	113	112	119
4週目	116	113	110	120	108	104	102	113
8週目	113	111	109	116	113	104	96	105
12週目	110	112	96	112	110	102	92	106
P (mg/l)								
開始時	89	85	88	84	66	65	59	67
4週目	89	92	82	79	74	69	75	70
8週目	76	89	86	71	68	64	70	69
12週目	94	85	82	79	67	64	61	66
Mg (mg/l)								
開始時	22	21	22	21	19	21	20	22
4週目	21	25	24	22	21	21	21	24
8週目	22	20	22	21	23	23	21	24
12週目	23	21	22	21	22	22	21	23
蛋白質(mg/l)								
開始時	75	77	78	76	100	96	98	94
4週目	77	75	75	84	94	89	84	92
8週目	80	79	80	82	93	87	80	80
12週目	80	83	87	79	101	100	90	95
尿素態窒素(mg/l)								
開始時	146	134	141	166	99	64	77	79
4週目	98	197	53	121	71	99	31	56
8週目	94	190	49	105	75	90	38	61
12週目	114	159	49	109	87	105	39	57
アルカリ性フォスファターゼ活性 (B.L.U.)								
開始時	1.6	1.5	1.2	1.1	1.5	1.4	2.9	2.0
4週目	3.3	1.5	2.3	1.6	2.3	0.9	3.2	1.4
8週目	2.9	1.8	2.4	1.8	2.4	1.1	4.6	1.7
12週目	1.8	2.1	2.3	1.9	2.0	0.9	2.9	1.3
2頭の平均								

区における骨成長抑制、特に骨皮質厚の減少に関与している可能性が考えられた。本実験では飼料中Ca含量は試験飼料間で一定となるように設定されているにもかかわらずLP区のみでCa不足傾向が生じた原因は2つ考えられる。その1つは、低蛋白質飼料摂取によるCa吸収の減少である。LEROI THとPIMSTONE²⁾はラットを用いた試験で、蛋白質欠乏時にはCa吸収が低下したことを報告している。さらにBRAITHWAITE²⁹⁾は、蛋白質欠乏めん羊では、Ca吸収が低下し、Ca蓄積が減少することを報告している。本試験においても、蛋白質摂取制限によるCa吸収低下がCa不足の原因となっている可能性がある。

また、蛋白質摂取と比較し、エネルギー摂取が多い場合、尿中へのCa排泄が増加することも考えられる。濃厚飼料多給により生じるアシドーシスが、尿中Ca排泄を増加させることは良く知られているが、本試験ではLL区と比べ、エネルギー摂取量の多いLP区でCa欠乏傾向が著しいことから、このエネルギーの多量摂取が、尿中Ca排泄を促進した可能性もある。

血清中P、Mgおよび蛋白質濃度は各区の間で明らかな違いは見られなかった。一方血清中尿素態窒素濃度は両試験ともLE>NN>LL>LPの順になっており、とくにLP区で低値を示した。血清中alp活性は、時期により大きく変動したが、両試験ともNN区とLP区で高い傾向を示した。血清中alpは若齢動物では骨由来のものが大部分を占め、骨成長の指標となると考えられている³⁰⁾。しかしながら本試験では、骨成長の抑制されたLP区での血清中alp活性は高く、骨中alp活性は逆に低かった。この原因については明らかではなかったが、血清中alp活性の上昇が骨由来であるとは考えにくく、蛋白質摂取制限および蛋白質、エネルギー摂取量のアンバランスにより他の器官すなわち肝臓や小腸由来の酵素が血清中alp活性を上昇させたものと推察された。

試験期間中の血清ホルモン濃度の変化を表-14に示した。血清中PTH濃度はNN区とLP区で高い傾向を示した。LP区におけるPTH濃度の上昇は、血清中Ca濃度の低下によると考えられた。

血清中インスリン濃度は第1試験のNN区で著しく高い値となったが、これはこの区において養分摂取量が特に多かったことと関係があると思われる。また第2試験においてもNN区は他の区と比べインスリン濃度が高い傾向を示した。インスリンは骨のコラーゲン生成を促進し、骨成長に必要であると考えられており³¹⁾、低栄養におけるインスリン低値は、骨成長を抑制している可能性がある。

血清中成长ホルモン濃度は試験区および時期の間で、明らかな違いを示さなかった。ラットにおいて、長期的な蛋白質欠乏は血漿中成长ホルモン濃度を上昇させることが知られているが¹²⁾、本試験ではLP区においてもそのような変化を生じなかった。単胃動物と反芻動物では蛋白質欠乏に対する成長ホルモン分泌反応が異なるか、あるいは本試験で用いた蛋白質欠乏飼料は、ラットで用いられている蛋白質欠乏飼料と比べ欠乏程度が穏やかであるため、さらに反芻動物では唾液経由の窒素循環という窒素節約機構のため、単胃動物で発生する著しい蛋白質欠乏にはなりにくい可能性がある。本試験の結果から、低栄養時の骨成長遅延は、血中成长ホルモン濃度には関連なく生じると考えられた。しかしながら成長盤軟骨像から、低栄養時には軟骨細胞分裂速度が低下していると推察され、

表-14 子牛において蛋白質またはエネルギー欠乏
が血清中ホルモン濃度に及ぼす影響

	第1試験				第2試験			
	NN	LE	LP	LL	NN	LE	LP	LL
上皮小体ホルモン(IU/l)								
開始時	3.4	3.2	2.2	2.4	2.9	2.9	2.3	1.7
4週目	3.8	2.9	2.8	3.1	3.1	2.6	4.0	3.3
8週目	3.3	3.3	4.1	3.4	3.7	2.8	4.3	2.6
12週目	3.3	2.7	3.5	3.5	2.8	2.4	3.9	1.9
インスリン(mU/l)								
開始時	9.3	10.5	6.9	6.6	5.7	7.3	9.7	6.8
4週目	23.6	5.4	6.4	5.6	9.0	8.2	6.0	12.1
8週目	34.0	7.2	3.7	6.7	10.9	12.5	4.1	8.3
12週目	16.5	10.3	5.6	5.9	13.6	11.9	6.4	11.5
成長ホルモン(μ g/l)								
開始時	8.3	9.3	6.4	5.3	8.4	5.5	6.8	8.8
4週目	8.3	9.5	7.5	6.8	7.8	8.5	7.2	10.2
8週目	7.9	9.7	9.7	8.3	6.6	7.7	9.5	7.5
12週目	5.3	10.4	9.5	6.2	6.7	8.4	10.3	9.1
総サイロキシン(μ g/l)								
開始時	67	61	65	76	72	64	72	62
4週目	71	53	43	50	68	46	50	50
8週目	71	50	49	51	76	51	55	51
12週目	73	64	57	56	79	53	46	47
2頭の平均								

低栄養がソマトメジン分泌を直接的にあるいは間接的に抑制している可能性があると思われた。ラットにおいて低栄養は血中ソマトメジン活性を低下させるだけでなく、軟骨自体の活性を減少させることが報告されている²⁾。本試験における低栄養条件下での骨伸長抑制も、この軟骨の活性低下が大きな要因となっているかもしれない。

血清中T4濃度は、ラットの場合と同様に、低栄養条件下で低下した。そのため、骨中alp活性低下は、このT4濃度低下が関与していると考えられたが、先の試験で示したように、骨中alp活性低下が骨成長抑制の第一制限因子ではないと考えられた。

まとめ

- 1) ラット、牛において、蛋白質欠乏またはエネルギー欠乏は明らかに長骨成長を抑制する。
- 2) 蛋白質欠乏またはエネルギー欠乏による長骨伸長の抑制は骨端成長板軟骨の増殖を抑制することにより生じる。
- 3) エネルギー欠乏と比較し、蛋白質欠乏はより強く骨幅成長を抑制する。
- 4) 蛋白質、エネルギー摂取制限による骨成長の抑制には成長ホルモン、甲状腺ホルモン、上皮小体ホルモンは関与していない。
- 5) 蛋白質欠乏時の骨中アルカリ性フォスファターゼ活性の低下は、血中サイロキシン濃度低下が関与していると考えられる。
- 6) 低栄養飼料摂取時の骨中アルカリ性フォスファターゼ活性低下は、骨成長抑制の第1制限要因ではない。
- 7) 牛において蛋白質欠乏時にエネルギーを充分給与すると血中Ca濃度、骨灰分中Ca%および骨皮質幅は減少する。

今後の課題

- 1) どのような機構で蛋白質欠乏は、骨伸長より骨幅成長を強く抑制したのか、またこの骨幅成長抑制と骨中酸性フォスファターゼ活性低下の関連はどのようになっているのか。
- 2) 本試験では、低栄養時の骨成長の抑制と内分泌の変化の関係が明らかにならなかった。今後は、血中ソマトメジン濃度、軟骨の活性、さらには組織のソマトメジンに対する反応性について検討する必要がある。また低栄養時の遊離グルココルチコイドの変化、グルココルチコイドの骨への直接的、またはソマトメジンを介した作用についても考える必要があるであろう。

文 献

- 1) BLOOM, W., and D. W. FAWCETT, 1975, Bone, In A text book of histology, pp. 244-287. Saunders Co. (Philadelphia)
- 2) SCHNEIDER, M., and U. ADAR, 1964, Effect of inanition of rabbit growth cartilage plates, Arch. Pathol., 78 : 149-156.
- 3) NAKAMOTO, T., and S. A. MILLER, 1979, Physical and biochemical changes of the mandible and long bone in proteinenergy malnourished newborn rat, J. Nutr., 109 : 1477-1482.
- 4) LEROITH, D., and B. L. PIMSTONE, 1973, Bone metabolism and composition in the protein-deprived rats, Clin. Sci. 44 : 305-319.
- 5) KURAMITSU, N., T. MATSUI, H. YANO and R. KAWASIMA, 1985, The influence

- of protein and/or energy deficiency on the growth of long bone in rats, *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 31 : 189-196.
- 6) LOWRY, O. H., N. R. ROBERTS, M. L. WU, W. S. HIXTON and E. J. CRAWFORD, 1954, The quantitative histochemistry of brain, II Enzyme measurement, *J. Biol. Chem.*, 207 : 19-37.
 - 7) LOWRY, O. H., N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR and R. J. RANDOLL, 1951, Protein measurement with Folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.*, 193 : 265-275.
 - 8) 山岸 宏、1987、成長の比較生物学、動物の成長と発育（猪 貴義、後藤 信男、星野 忠彦、佐藤 博）、pp. 194-218、朝倉書店、（東京）
 - 9) 大久保 昭行、1976、アイソザイムの分類と臨床的意義、代謝、13 : 285-292.
 - 10) HAMMARSTROM, E. L., and G. HASSELGREM, 1974, Acid phosphatase in developing teeth and bone of man and macaque monkey, *Scand. J. Dent. Res.*, 82 : 381-395.
 - 11) HARRIS, W. H., and R. P. HEANY, 1969, Skeletal renewal and metabolic bone disease, *New Engl. J. Med.*, 280 : 253-259.
 - 12) PIMSTONE, B. L., 1976, Endocrine function in protein-caloric malnutrition, *Clin. Endocrinol. (Oxf)*, 5 : 79-84.
 - 13) PHILLIPS, L. S., and R. VASSILOPOULOU-SELLIN, 1980, Somatomedins, *New Engl. J. Med.*, 302 : 371-380.
 - 14) PREWITT, T. E., A. J. D'ERCOLE, B. R. SWITZER and J. J. VAN WYK, 1982, Relationship of serum immunoreactive somatomedin-C to dietary protein and energy in growing rats, *J. Nutr.*, 112 : 144-150.
 - 15) BURSTEIN, P. J., B. DRAZNIN, C. J. JOHNSON and D. S. SCHALCH, 1979, The effect of hypothyroidism on growth, serum growth hormone, the growth hormone-dependent somatomedin, insulin-like growth factor and its carrier protein in rats, *Endocrinol.*, 104 : 1107-1111.
 - 16) KANAGAWA, Y., T. MATSUI, H. YANO and R. KAWASHIMA, 1986, Effect of malnutrition on thyrotropin releasing hormone-induced thyroxine secretion in rats, *Jpn. J. Zootech. Sci.*, 57 : 546-548.
 - 17) VAUGHAN, J., 1981, Some biological factors in skeletal homeostasis, In *The physiology of bone*, pp. 173-200, Clarendon Press, Oxford.
 - 18) MATSUI, T., H. YANO and R. KAWASHIMA, in preparation for publication
 - 19) TAM, C. S., J. N. M. HEERSCHE, T. M. MURRAY and J. A. PARSONS, 1982,

- Parathyroid hormone stimulates the bone apposition rate independently of its resorptive action: Differential effects of intermitted and continuous administration, *Endocrinol.*, 110 : 506-512.
- 20) COHN, D. V., and G. L. WONG, 1979, The actions of parathormone, calcitonin and 1, 25-dihydroxycholecalciferol on isolated osteoclast-and osteoblast-like cell in culture, In *Endocrinology of calcium metabolism*, (COPP, D. H., and R. V. TALMAGE eds.), pp. 241-252, Excerpta Medica, Amsterdam.
 - 21) KANAGAWA, Y., N. KURAMITSU, T. MATSUI, M. NAKANISHI, H. YANO and R. KAWASHIMA, 1986, Effect of protein and/or calorie malnutrition on growth and metabolism of bone in calves, *Jpn. J. Zootech. Sci.*, 57 : 65-70.
 - 22) 金川 佳弘、齋田 二郎、野久保 隆、矢野 秀雄、川島 良治、1986、低カロリーまたは低蛋白質飼料が給餌された場合における子牛の骨成長、*日畜会報*、57 : 385-389.
 - 23) COULOMDE, J. J., and L. FAVREAU, 1963, A new simple semimicro method for colorimetric determination of urea, *Clin. Chem.*, 9 : 102-108.
 - 24) 福永 仁夫、森田 陸司、高坂 唯子、土光 茂治、山本 逸雄、鳥塚 莞爾、1980、PTH RIA Kit (CIS) による血中副甲状腺ホルモンの測定、*核医学*、17 : 69-75.
 - 25) STARR, J. I., D. L. HORWITZ, A. H. RUBENSTEIN and M. E. MAKO, 1979, Insulin, In *Methods of hormone radioimmunoassay*, (JAFFE, B. M., and H. R. BEHRMAN eds.) pp. 613-642, Academic Press, New York.
 - 26) PEAKE, G. T., J. MORRIS and M. T. BUCKNAN, 1979, Growth hormone, In *Methods of hormone radioimmunoassay*, (JAFFE, B. M., and H. R. BEHRMAN eds.) pp. 223-244, Academic Press, New York.
 - 27) 中島 言子、小西 淳二、森田 陸司、奥野 龍興、笠木 寛治、遠藤 啓吾、池窪 勝治、鳥塚 莞爾、1977、T₄リアパックによる血中サイロキシン濃度の測定に関する基礎的ならびに臨床的検討、*核医学*、14 : 123-130.
 - 28) ORSCOV, E. R., 1982, Nitrogen in the rumen, In *Protein nutrition in ruminants*, pp. 40-84, Academic Press, New York.
 - 29) BRAITHWAITE, G. D., 1978, The effect of dietary protein intake on calcium metabolism of the pregnant ewe, *Br. J. Nutr.* 40 : 505-507.
 - 30) 大場 康寛、佐々木 匡秀、1967、日常検査としての超微量定量法、*臨床病理*、15 : 105-113.
 - 31) RAISZ, L. G., E. M. CANALIS, J. W. DIETRICH, B. E. KREAN and S. C. GWOREK, 1978, Hormonal regulation of bone formation, *Rec. Prog. Horm. Res.* 34 : 335-356.
 - 32) PRICE, D. A., J. M. WIT, S. VAN-BUUL-OFFERS, A. M. K-VAN-MALE, A.

K. M. VAN-ROOYEN-WEHMEIJER, C. HOOGERBRUGGE and J. L. V. DEN
BRANDE, 1979, Serum somatomedin activity and cartilage metabolism in acutely
fasted, chronically malnourished and refed rats, *Endocrinol.*, 105 : 851-861.