

トピックス

実験動物飼料の選択がデータ解釈を混乱させる

Lack of knowledge about laboratory rodent diets confuses data interpretation

はじめに

げっ歯類の動物実験用飼料には、非精製飼料と精製飼料がある。市販の非精製飼料は、タンパク質源、脂質源、炭水化物源である動物性や植物性の天然原料に、不足するビタミン類やミネラル類を添加した飼料である。注意すべきは、用いられているタンパク質、脂質、炭水化物の具体的な種類が公表されておらず、詳細な成分が不明であるばかりか、製造時期によって成分や含量が異なる点である。このように、非精製飼料は中身の分からない「ブラックボックス」であるため、栄養素に対する生体応答の解析には適さない。一方、動物実験用飼料のゴールドスタンダードとして世界中で使用されている精製飼料は、1993年に American Institute of Nutrition (AIN) が発表した AIN-93 飼料¹⁾であり、タンパク質、脂質、炭水化物、ビタミン類、ミネラル類の種類と量が明確に定められている。AIN-93 飼料には、成長期・妊娠期・授乳期に適した AIN-93G 飼料と、

成長期を過ぎた成熟期に適した AIN-93M 飼料があり、AIN-93G 飼料は AIN-93M 飼料に比べてタンパク質、脂質、ミネラルの含量が多い。栄養学研究では成長期のげっ歯類を用いる場合が多いため、AIN-93G 飼料の使用頻度が圧倒的に高い。そこで本稿では、AIN-93G 飼料を便宜的に AIN-93 飼料と記述することとする。

AIN-93 飼料の組成

AIN-93 飼料は、全米科学アカデミーおよび全米研究会議 (NAS-NRC) が発表したげっ歯類の栄養素必要量をもとに、AIN が、1977年発表の AIN-76 飼料と 1980年発表の AIN-76A 飼料の飼料組成を改良し、成長、妊娠、授乳などが良好となる飼料組成を定めたものである。AIN-93 飼料は、カゼイン(牛乳タンパク質)、L-シスチン、コーンスターチ、スクロース、粉末セルロース、精製大豆油、第3ブチルヒドロキノン(TBHQ、酸化防止剤)、ミネラル混合物、ビタミン混合物、重酒石酸コリンから構成されている(表1)¹⁾。

表1 AIN-93G 飼料組成

栄養素	成分	含量(%)
タンパク質	カゼイン	20.0
	L-シスチン	0.3
炭水化物	コーンスターチ	39.7486
	デキストリン化コーンスターチ	13.2
	スクロース	10.0
	粉末セルロース	5.0
脂質	精製大豆油	7.0
	第3ブチルヒドロキノン	0.0014
ミネラル	ミネラル混合物 (AIN-93G-MX)	3.5
ビタミン	ビタミン混合物 (AIN-93-VX)	1.0
その他	重酒石酸コリン (41.1%コリン含有)	0.25
エネルギー量 (kcal/kg)		4030
PFC 比 (%エネルギー)	タンパク質	20
	脂質	16
	糖質	64

市販 AIN-93 飼料のビタミン組成の実際

AIN-93 飼料は研究者が自作する他、複数の市販品が存在する。Joshi と Fiorotto は、日本、アメリカ、ヨーロッパ、オーストラリア、中国、ブラジルで販売されている AIN-93 飼料 15 製品の飼料組成を調査している²⁾。調査された市販品のうち、ビタミン含量が公表されているものが 11～12 製品、ミネラル含量が公表されているものが 7～13 製品、その他の栄養素含量が公表されているものが 9～11 製品であり、栄養素含量が全ての製品で公表されているわけではない。ビタミン含量の公表数が 11～12 製品という記述は、ビタミン 12 種類のうち、あるビタミンは 11 製品で公表され、別のビタミンでは 12 製品で公表されていることを示す。

ビタミン含量が公表されている製品のビタミン E、ビタミン K、ビタミン B₁ (チアミン)、ビタミン B₂ (リボフラビン)、ビタミン B₁₂ の含量は、AIN-93 飼料組成の数値と比較して、それぞれ 55～100%、83～533%、100～240%、100～267%、100～412% であり、製品間の差が大きいことに驚く (表 2)。100% を上回る製品は飼料保存中のビタミン分解を考慮したとも考えられるが、下回る製品については不足が懸念される。このように、「AIN-93 飼料」と謳った製品であっても製造業者による差が存在し、論文に“AIN-93 飼料を用いた”と記載されていたとしても、AIN が定めた AIN-93 飼料と同一組成であるとは限らない。市販 AIN-93 飼料の組成の差が実験結果に影響を与える可能性を考慮する必要がある。

AIN-93 飼料のビタミン K

上述の Joshi と Fiorotto の研究において、ビタミン K が正しく配合された製品は 15 製品中わずかに 5 製品であった。AIN-93 飼料ではビタミン K₁ (フィロキノン) を使用することが定められているが、4 製品ではビタミン K₃ (メナジオン) が使用されていた。以前の AIN-76 飼料にはビタミン K としてビタミン K₃ が 50 µg/kg 飼料添加されていたが、ビタミン K 依存性出血が生じたため、その改良版である AIN-76A 飼料ではビタミン K₃ 500 µg/kg 飼料に増量された。次いで、ビタミン K₃ は過剰摂取による毒性が懸念されたため、AIN-93 飼料ではビタミン K₁ 750 µg/kg 飼料に変更された。このような科学的経緯があるにもかかわらず、ビタミン K₃ を含む AIN-93 飼料が 4 製品も存在することは驚きである。

ビタミン混合物のビタミン K₁ 含量は、タンパク質源としてカゼインを飼料中に 200 g/kg 添加した時、ビタミン K₁ がカゼイン 200 g 当たり 160 µg 含まれると想定して定められているが、タンパク質源として用いられるカゼインのビタミン K₁ 含量は製品によって大きく異なる。大豆油にも比較的少量のビタミン K₁ が含まれるが³⁾、大豆油由来のビタミン K₁ 含量は考慮されていない。このように、飼料中ビタミン K 含量は、飼料のタンパク質源や脂質源の量や種類の影響を強く受けることに注意を払うべきである。

表 2 市販 AIN-93G 飼料のビタミン含量 (文献 2 より抜粋)

ビタミン	含量 (AIN-93 組成に対する割合 (%))	AIN-93 組成と一致した製品数※
ビタミン A	100-104	11/12
ビタミン D ₃	100-125	11/12
ビタミン E	55-100	10/11
ビタミン K	83-533	5/11
チアミン	100-240	7/12
リボフラビン	100-267	10/12
ニコチン酸	97-100	11/12
ピリドキシン	97-117	8/12
ビタミン B ₁₂	100-412	10/12
葉酸	100	12/12
D-ビオチン	100	11/11
パントテン酸塩	100-110	10/12

※分母は調査した 15 製品のうち各ビタミン含量を公表している製品数を、分子は AIN-93 組成と一致した製品数を示す。

AIN-93G 飼料のビタミン E

私たちが摂取する野菜や植物油に含まれる天然の α -トコフェロールは、*RRR*- α -トコフェロールである。一方、AIN-93 飼料のビタミン混合物に含まれる α -トコフェロールは、コストと酸化安定性に優れた合成型の *all-rac*- α -トコフェロール酢酸エステルである。*all-rac*- α -トコフェロールは、*RRR*- α -トコフェロールを含む8種類の立体異性体の混合物であり、*RRR*- α -トコフェロール単独に比べて代謝されやすくビタミン E 活性が低い。また、大豆油には、試薬として販売されている精製大豆油であっても、大豆由来のビタミン E 同族体（主に γ -、 δ -トコフェロール）が無視できないほどの量で含まれている上に、食用の大豆油には酸化防止剤として合成型の α -トコフェロールやその誘導体も添加されている。そのため、飼料中の脂質の種類や量を変更すると、それに連動して飼料中のビタミン E 同族体の含量も大きく変動する⁴⁾。

また、AIN-93 飼料では、不飽和脂肪酸欠乏の予防のために、脂質源が AIN-76A のコーン油から α -リノレン酸に富む大豆油に、含量が5%から7%に変更され、飼料中の脂質の酸化防止のために、大豆油に対して0.02% (w/w) のTBHQが添加された。TBHQは、ビタミン E と同様に体内において抗酸化性を発揮し、両者の生体内での生理作用を区別することは困難である。このように、飼料のビタミン混合物中の α -トコフェロール異性体、油脂源に夾雑するビタミン E 同族体、酸化防止剤 TBHQ の存在が、 α -トコフェロール代謝やビタミン E 活性、脂質代謝に影響を与えることを忘れてはならない。

おわりに

AIN-93 飼料は世界中どこでも同一であると信じられてきたが、市販 AIN-93 飼料の中には看過できない相違のある製品が存在することが明らかになった。AIN が定めた組成どおりに調製された AIN-93 飼料であっても、タンパク質源や油脂源に少なからぬ量のビタミン類が含まれるため、表1のような飼料組成表から正

確なビタミン含量を読み取ることは不可能である。このように、データの解釈と再現性に大きな影響を及ぼす因子が、栄養学研究の根幹をなす実験飼料に潜在していることを念頭において、研究を進めるべきである。動物実験に携わる方は、実験飼料の成分・含量を確認してみてもいいだろうか。

Key words: AIN-93 diet, dietary composition, rodent diet

¹Nagoya University of Arts and Sciences

²College of Nagoya Women's University

³Osaka Metropolitan University

Saiko Ikeda¹, Misato Kobayashi¹, Tomoko Banno²,

Dong-Ho Kim³, Shigeru Saeki³

¹名古屋学芸大学, ²名古屋女子大学短期大学部,

³大阪公立大学

池田 彩子¹, 小林 美里¹, 阪野 朋子², 金 東浩³, 佐伯 茂³

開示すべき利益相反なし

(2024.5.7 受付)

文 献

- 1) Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC Jr. (1993) AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr* **123**, 1939–1951
- 2) Joshi TP, Fiorotto ML. (2021) Variation in AIN-93G/M Diets across different commercial manufacturers: not all AIN-93 diets are created equal. *J Nutr* **151**, 3271–3275
- 3) 文部科学省科学技術・学術審議会資源調査分科会報告(2021) 日本食品標準成分表 2020 年版(八訂), pp.213, 全国官報販売協同組合, 東京
- 4) 池田彩子, 小林美里, 田路莉子, 金東浩(2024) ビタミン E 研究における実験飼料選択の注意点, *化学と生物* **62**, 62–63