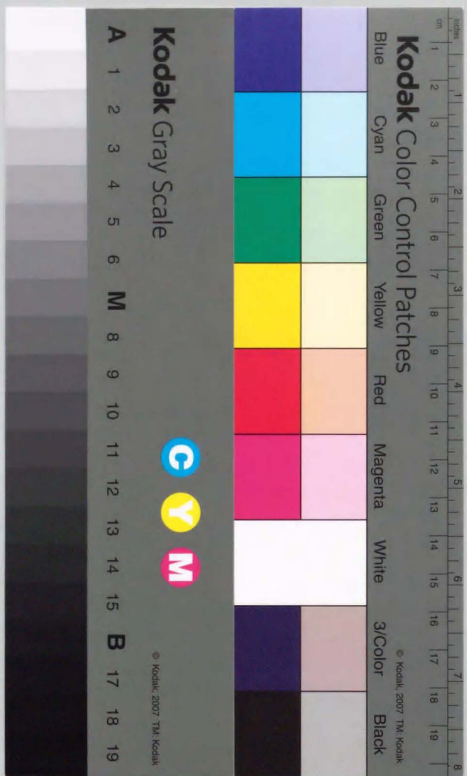


反芻家畜の蛋白質栄養状態の  
評価法に関する研究

松 本 光 人



①

# 反芻家畜の蛋白質栄養状態の

## 評価法に関する研究

松 本 光 人



## 目 次

第1章	序 論	1
第2章	反芻家畜の消化管内における核酸の分布	
	緒 論	7
第1節	反芻家畜の消化管内容物中の核酸分画定量法の簡易化	
	緒 言	8
	実験方法と結果	8
	考 察	12
第2節	牛消化管内容物中の核酸分布	
	緒 言	15
	材料および方法	15
	結 果	16
	考 察	26
第3章	尿中アラントイン排泄量を指標とする代謝蛋白質中の 微生物体蛋白質量の推定	
	緒 論	29
第1節	核酸摂取に伴う哺乳子ヤギの尿中へのアラントイン排泄の増加	
	緒 言	33
	材料および方法	33
	結 果	35
	考 察	38
第2節	飼料由来の核酸が尿中アラントイン排泄量に及ぼす影響	
	緒 言	43
	材料および方法	43
	結果と考察	44

第3節 絶食前後のルーメン内容物中の核酸含量と尿中アラントイン 排泄量の変化	
緒言	47
材料および方法	47
結果と考察	48
第4節 飼料蛋白質の給与水準・ルーメンでの分解率と 尿中アラントイン排泄量	
緒言	57
材料および方法	57
結果	60
考察	62
第5節 低蛋白質飼料摂取時における可消化有機物摂取量と 尿中アラントイン排泄量との関係	
緒言	65
材料および方法	65
結果と考察	65
第4章 ルーメンプロトゾアの存否と窒素代謝 尿中アラントイン排泄を中心として	
緒論	71
第1節 混合プロトゾアが尿中アラントイン排泄に及ぼす影響	
緒言	73
材料および方法	75
結果	75
考察	80
第2節 反芻家畜におけるアミノ酸の見かけの消化率測定の意義と 混合プロトゾア存否の影響	
緒言	83
材料および方法	83
結果	84

考 察	86
第3節 特定の種・属のプロトゾアのルーメンへの定着とその影響 ルーメンプロトゾアに対する脂肪酸の影響	
緒言	89
材料および方法	90
結 果	92
考 察	95
第4節 <i>Epidinium caudatum</i> あるいは <i>Dasytricha ruminantium</i> のみを 定着させたヤギの作出とルーメン発酵、窒素代謝の特徴	
緒言	97
材料および方法	97
結 果	98
考 察	105
第5章 代謝蛋白質の全体量の評価について	
緒 論	109
第1節 尿中酸可溶性ペプチド態アミノ酸(ASP)排泄量測定による 代謝蛋白質の評価法の提案	
緒言	110
材料および方法	110
結 果	113
考 察	118
第6章 総合討論	123
要 約	131
謝 辞	137
引用文献	139

本論文中で用いた主な略語を下記に示した。

Term	Meaning	
A I A	Acid insoluble ash	酸不溶性灰分
A S P	Acid soluble peptides	酸可溶性ペプチド
B W	Body weight	体重
C P	Crude protein	粗蛋白質 (N × 6.25)
D C P	Digestible crude protein	可消化粗蛋白質
D M	Dry matter	乾物
D O M	Digestible organic matter	可消化有機物
E t O H	Ethanol	エタノール
F O M	Fermentable organic matter	(ルーメン) 発酵性有機物
I S P	Isolated soy protein	分離精製大豆蛋白質
M B P	Microbial protein	(ルーメン) 微生物体蛋白質
M B S	Metabolic body size	代謝体重 (BW <sup>0.75</sup> )
M F N	Metabolic fecal nitrogen	代謝性糞中窒素
N	Nitrogen	窒素
N P N	Non-protein nitrogen	非蛋白窒素
R D P	Rumen degradable protein	ルーメン分解性蛋白質
R U D P	Rumen undegradable protein	ルーメン非分解性蛋白質
V F A	Volatile fatty acids	揮発性脂肪酸



## 第 1 章 序 論

反芻動物は、第一胃 (Rumen) および第二胃 (Reticulum) (両者は空間的には連続しており、以下一括してルーメンと略称する)、に生息する多種多様な微生物群により、セルロースや非蛋白窒素化合物 (non-protein nitrogen: NPN) などの利用を可能にし、草食に高度に適応した。このことはヒトとの食餌上の競合を避けることとなり、家畜として広範に利用されてきた大きな要因となった。人口圧力が増大し、開発途上国の食糧消費が穀物中心から畜産物摂取の拡大に向かう中で、今後もその重要性が減ずることはないであろう (1)。飽食の時代と言われる日本においても、他の食品の消費が停滞する中で、牛肉や酪農製品の消費量は確実に増大しており (2)、家畜としての反芻動物の生産性を高めることがより一層求められている。そのためには、反芻動物の代謝を特徴づけているルーメン内における物質とエネルギーの代謝について十分に解明し、その効率を高めることが必要である。従来から、ルーメンを中心とした反芻動物の生理・栄養に関する研究は、ルミノロジー (Ruminology) として広範に展開され、その成果は多くの成書にまとめられてきた (e. g. 3-7)。

述べるまでもなく反芻動物における N 代謝の特徴は、ルーメンにおける N 化合物 (蛋白質、NPN を含めて) の分解と微生物体蛋白質 (Microbial Protein; MBP) への再合成にある。主要なルーメン微生物である細菌と原生動物 (おもに繊毛虫類; Ciliate protozoa、以下プロトゾア) の体蛋白質は、イネ科牧草などの植物蛋白質に比較してアミノ酸組成が優れ、生物価も高い (8)。このことは草食に適応した反芻動物には有利に働いてきた。しかし、家畜の生産性を高めるために大豆粕などの良質蛋白質を高水準に給与する飼養条件では、このいわゆる『平準効果 (leveling effect)』 (9) は必ずしも有利とは言えない。

そこで近年、育成初期や乳量の高い泌乳牛などではルーメンで生産される MBP だけでは家畜の蛋白質要求量を満たせないことが指摘されてきた (10, 11)。このため、飼料蛋白質をルーメンで微生物によって分解されずに、宿主の消化吸収部位である第四胃以下の下部消化管に流下する蛋白質 (ルーメン非分解性

蛋白質: Rumen undegradable protein, RUDP) とルーメンで微生物により分解される蛋白質 (Rumen degradable protein, RDP) の二つに分けて表現し、それぞれの蛋白質の要求量を表示した飼養標準が発表されるに至っている(12, 13)。すなわち、高位生産においてはMBPのみでは要求量を満たせないで、積極的にRUDPを給与しようとするものである。

(RUDPを『ルーメンバイパス蛋白質』と表現する場合も多いが、『ルーメンバイパス』という概念は、幼齢反芻動物の液状飼料摂取時にそれが食道溝反射によりルーメンを通過することなく第四胃に流下する現象(14)についてのものであり、ルーメンにおける蛋白質の分解に関して使用することは好ましくないと考える。)

この考え方は、飼料蛋白質を熱あるいは化学処理してルーメンでの分解率を低下させたり(15, 16)、制限アミノ酸をルーメンで微生物作用を受けない形に加工して給与する飼養方法(脂肪によるコーティング(15, 16)や、ルーメンと第四胃のpHの差を利用したpH感受性膜の使用(17, 18)など)などとして応用利用されつつある。

さらに、アミノ酸・蛋白質だけではなくエネルギーの給与面においてもこの考え方が応用されている。一般には、高エネルギー飼料の給与としては高炭水化物飼料、いわゆる濃厚飼料の多給が行われてきたが、過剰の濃厚飼料の給与は乳酸の生成と蓄積を招き、ルーメンpHの低下や結果としてルーメン発酵の効率の低下を招く(19)。このため、高エネルギー飼料である脂肪をルーメンで溶解しない形に加工し(高脂肪飼料はルーメン微生物に悪影響を及ぼし、セルロースの消化率を低下させることなどが知られている)、反芻家畜自身へのエネルギー供給量を高めると共に牛乳脂肪の素材として利用させようとする試みなどがある(20, 21)。また、高エネルギー飼料を粗飼料と完全に混合して自由採食させる給餌方法(22)や濃厚飼料の給与を多回数に分けて行ない急激なルーメンpHの低下を防ぐ給餌方法(23, 24)などの新しい飼養方法も導入されつつある。

反芻動物における蛋白質消化吸収部位である下部消化管に供給される蛋白質は、MBP(RDPから生産される)とRUDPからなる。このうち消化吸収される蛋白質・アミノ酸を『代謝蛋白質・アミノ酸(Metabolizable Protein or Amino Acids)』とする概念が提案されている(25)。前述のように、反芻家畜においては単胃動物と異なり飼料蛋白質のアミノ酸組成が消化吸収されるアミノ酸組成に直接は反映されないで、代謝蛋白質の概念は重要と言える。図1-1にルーメンを中心とした反芻動物のN代謝の概念図を示した(26原図、一部訂正)。

代謝蛋白質は代謝エネルギー(ME)に擬せられる概念であり、動物体内で利用可能な蛋白質(アミノ酸)量として定義される。しかし、代謝エネルギーが可消化エネルギー(DE)から尿およびメタンとして失われるエネルギーを差し引いて求められるのに対し、代謝蛋白質では尿中へのアミノ酸排泄を考慮していない点で異なる。さらに、エネルギー代謝においては代謝エネルギーの利用効率 $k$ が導入され正味エネルギーNEは $NE = k \cdot ME$ として表現される(27)。代謝アミノ酸においても吸収された後の利用効率を求めることが必要となろう。

単胃動物においては、小腸で消化吸収される蛋白質量を飼料蛋白質の「見かけの消化率」を求めることにより比較的簡便、かつ、正確に求めることができる(28)。さらに、アミノ酸の吸収量も「見かけの消化率」から推定できる(28)。一般的には、飼料蛋白質のアミノ酸組成が栄養価評価の直接の対象となる(29)。しかし、反芻家畜においては、RUDPとMBPの量とそのアミノ酸組成を知らなければ、代謝蛋白質の量やそのアミノ酸組成、あるいは栄養価を判断することはできない。

反芻家畜としての特性を発揮させながらその生産性を高めるためにはルーメン微生物の活性を高めかつ正常な発酵を維持し、その機能を十分に引出すことが最も重要である。この観点から、前述の方法や概念を実際の生産の場において利用しようとする時、全く問題がないのではなく、解決されるべき課題が多



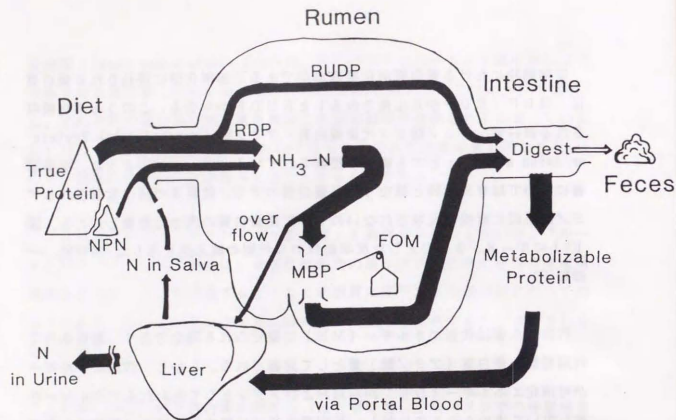


Fig. 1-1. Schematic summary of nitrogen utilization by the ruminant.

#### 図1-1の説明

ルーメンに供給されるN ( $CP = N \times 6.25$ ) としては飼料に由来するN以外に、唾液中の尿素に由来するN (リサイクルN) がある。飼料蛋白質は、真の蛋白質 (TP, True protein) とNPN (Non-protein nitrogen: 非蛋白窒素) よりなる。このNPNとリサイクルNおよびTPのうちルーメン分解性蛋白質 (Rumen degradable protein: RDP) のNはルーメン  $NH_3-N$  のプールに入る。TPのうちルーメン非分解性蛋白質 (Rumen undegradable protein: RUP) はルーメンでの分解を免れて第4胃以下の下部消化管に流下する。ルーメン  $NH_3-N$  はルーメン微生物体蛋白質 (Microbial protein: MBP) に再合成される。この時にはエネルギーが必要で、ルーメン発酵性有機物 (Fermentable organic matter: FOM) の量がその合成量を左右する。図では、FOMの大きさに応じてゲートが開き、 $NH_3-N$  からのMBP合成量を調節していることを模式的に示している。過剰の  $NH_3-N$  はルーメン壁から吸収され尿素に合成される。この一部はリサイクルNとして唾液に分泌される。この過剰  $NH_3-N$  とリサイクルN量が均衡していればこの部分は全体のNの流れの中で量的に考慮しなくて良いことになる。MBPとRUPは小腸で消化作用を受ける。このうち吸収された部分が代謝蛋白質である。MBPにはNPNとして核酸態Nが必ず含まれており、吸収された核酸由来のプリン塩基はアラントインとして尿中に排泄される。尿中Nは大部分尿素態Nであるが、一部アミノ酸やペプチド態Nとして排泄される。吸収されなかったNは糞中に排泄される。

く残されている。

例えば、RUDPとRDPの分画定量法は確立されていない。概念のみが先行しているのが現状と言えよう。ルーメンでの蛋白質の分解量の推定法としてはBrskovら(30)がナイロンバッグ法を提案しているが、その公定法は定められていない。また、ルーメンにおける飼料蛋白質の分解率は飼料に固有の値ではなく、動物の飼養条件によって変化するパラメータといえる。RUDPが必要以上に強調されると、ルーメン微生物に供給されるRDPが減少し、MBP生産量やルーメン内の消化活性の低下が予想される。また、低分解性のみが強調されそのアミノ酸組成が考慮されない場合には、代謝蛋白質の量の増大が必ずしも栄養価の改善につながらないことや、代謝蛋白質に占めるMBPの割合が低下し、その栄養価が変化することも予想される。

これらの点から、ルーメンにおけるMBPの合成量を定量的に把握することが重要と言える。そのため、様々な方法が開発され、比較検討されている(31-35)。しかし、これらを簡便性や経済性などの観点から見ると必ずしも優れているとは言えない。筋肉蛋白質の代謝回転の研究に用いられている尿中の3-メチルヒスチジン排泄量(36)のようにサンプリングや分析が比較的容易で、非侵襲的な指標を確立することができれば、種々の飼養条件下での代謝蛋白質の栄養価の判定——すなわち、その質と量の推定が可能となるものと考えられる。

この点、Blaxter & Martin(37)やElliott & Topps(38)によって示唆された核酸プリン塩基の代謝産物であるアラントインの尿中排泄量を指標とする方法は、利用価値が高いものと考えられる。尿中アラントイン排泄量をMBP生産量の指標とすることの有効性に関しては、既に多くの報告があるが(39-59)、給餌条件が厳密にコントロールされているものばかりではない。

そこで、本論文では、尿中アラントイン排泄量をルーメンで生産されるMBPの指標としてのみではなく、代謝蛋白質のうちのMBP量(可消化のMBP量)の指標としても捉え、飼養条件を厳密にコントロールしながら種々の検討を加えてその概念の有効性を確立し、MBP生産に関与する諸因子について、給与飼料の条件だけではなく、ルーメン微生物のバイオマスとして細菌と匹敵しながらルーメンでのN代謝や宿主である反芻家畜の蛋白質栄養における役割について議論が分れている(60-63)プロトゾアの存否の影響についても検討し



た。さらに、最近新たに提案されたラットやヒトにおける蛋白質栄養状態を尿中酸可溶性ペプチド態アミノ酸(Acid soluble peptides-form amino acids)排泄量を指標として判断する方法(64, 65)を、反芻家畜における代謝蛋白質全体の非侵襲的な評価方法として適用することを試みた。また、尿中アラントイン排泄量に関する報告は多いが、その供給源となるMBP中の核酸の消化吸収についての報告は少なく(66-69)、この点についても新たな知見を加えた。

このように、本研究は反芻家畜のN代謝と蛋白質栄養における代謝蛋白質という新しい概念を基本に、反芻家畜の蛋白質栄養状態を非侵襲的に評価、解析したものである。

## 第2章 反芻家畜の消化管内における核酸の分布

### 緒言

微生物態N化合物の大部分は蛋白質・アミノ酸として存在するが、10ないし20%は核酸態である(70)。そのため、反芻家畜ではMBPと同時に多量の核酸が下部消化管に流下する。この核酸を消化するため、反芻家畜ではすい液中の核酸分解酵素活性が単胃動物に比較して高いことが知られている(71)。このように、消化管内におけるN代謝を検討する時、消化管内容物中の核酸の動態を無視することはできない。

従来、反芻家畜の消化に関する研究はルーメンに焦点が当てられてきた。ルーメンが反芻家畜に特有な存在であり、可消化有機物の60-70%がルーメンで発酵されることを考えれば当然とも言える。しかし、ルーメンで生産されるMBPの主な消化吸収部位である下部消化管での消化吸収過程においても反芻家畜の特異性が指摘され、研究がなされつつある(10, 72, 73)。しかし、ルーメンでの核酸合成量や核酸の消化吸収の実態を反映していると考えられる消化管内容物中の核酸の分布について検討した報告は少ない(66-69)。これは、多数のサンプルを一度に処理する簡便な分析法が確立されていないことも一因として考えられた。

そこで、まずルーチン分析法として利用可能な分析法を確立し(74)、さらに、消化管における核酸の消化吸収の動態を解明しようとした(75, 76)。

## 緒言

一般的には細胞内の核酸の全量を分画・定量する方法としては Schmidt-Thannhauser-Schneiderの方法(STS法)(77)が行われている。STS法は、動物組織の核酸定量法として別々に報告されたSchneider法(78)とSchmidt & Thannhauser法(79)をSchneiderが比較検討し、Schmidt & Thannhauser法を改良して確立した方法である。その後も様々な変法が開発され広く利用されている。一方、植物組織の核酸定量法としてOgur-Rosen法(80)があるが、核酸の抽出率が低い場合があるなどの理由からSTS法ほど一般的には利用されていない。

反芻家畜の消化管内容物には飼料に由来する物質とルーメン微生物由来の物質とが含まれているが、STS法により分画・定量する場合、RNA定量の妨害物質が存在することなどの理由から、原報のままの形ではSTS法を適用できない(81)。McAllan & Smith(81)はSTS法を改良し、反芻家畜の消化管内容物中の核酸定量法を確立し、反芻家畜における核酸代謝の研究を展開している。また、Ling & Buttery(82)は植物組織について報告されたGuinnの抽出法(83)を改良した分析法を提案している。しかし、彼らの報告(82)は学会講演要旨のみで改良の詳細については不明な点も多い。McAllan & Smith法(81)については、凍結乾燥、脂質画分の除去方法、遠心分離条件など煩雑な点もあり、改良、簡易化の余地が残されているものと考えられた。そこで、STS法(77)のMcAllan & Smithによる改良法(81)を基本に、Ogur-Rosen法(80)を参考とし、酸可溶性画分(Acid Soluble Fraction: ASF)と脂質画分の抽出法を変更、簡易化してルーチンの分析法としてはば満足しうる結果を得た(74)。

## 実験方法と結果

分画定量法の概略を図2-1-1に示した。

本法では、エタノール(EtOH)によるサンプル処理、脂質画分およびASFの

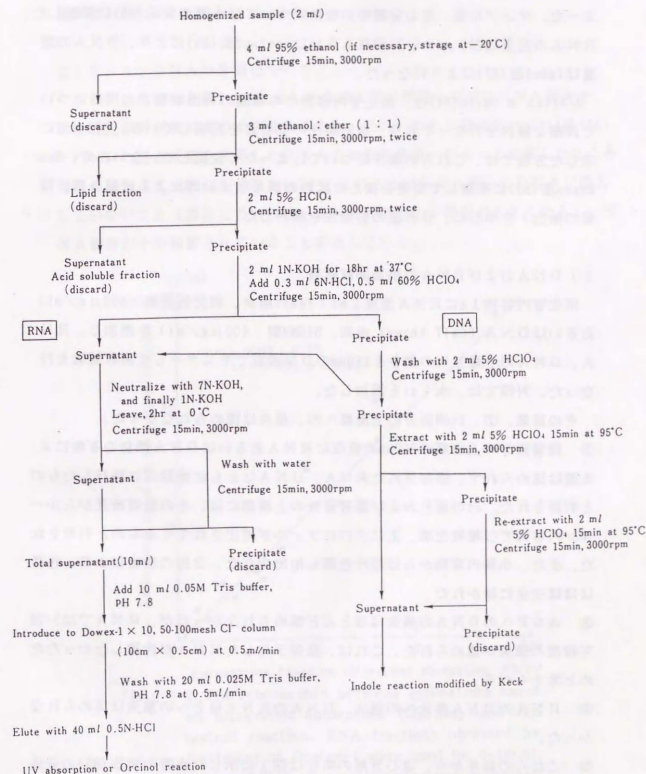


Fig. 2-1-1. Schematic outline of the standard procedure finally adopted for the extraction and estimation of RNA and DNA in digesta samples. All reagents were kept at 4°C and all operations were carried out at 0-4°C.



抽出除去はOgur-Rosen法(80)により、その後のRNAとDNAの分画および陰イオン交換樹脂によるRNA画分の精製操作(84)はMcAllan & Smith法(81)によった。サンプル量、遠心分離等の条件については水野の変法(85)に準拠した。RNAの定量は260 nmのUV吸収あるいはorcinol法(86)により、DNAの定量はindol法(87)により行なった。

McAllan & Smith(81)は、消化管内容物中の核酸の抽出率などの問題について詳細な検討を行っており、抽出条件の妥当性を証明している。図2-1-1に示した方法では、これらの条件についてはまったく変更していないので、Ogur-Rosen法(80)に準拠して変更を加えた試料の前処理(EtOHによる沈殿分別、脂質の抽出)を中心に、分析法の妥当性を検討した。

#### 1) DNAおよびRNAの添加回収試験

消化管内容物1gにRNA溶液1ml(Yeast由来、和光純薬製: 500 $\mu$ g/ml)あるいはDNA(Calf thymus 由来、SIGMA製: 400 $\mu$ g/ml)を添加し、RNA、DNAの各画分への動きを260nmのUV吸収でモニターして回収試験を行なった。対照では、水1mlを添加した。

その結果、① EtOH画分の上清部への、損失は認められなかった。

② 脂質画分の上清部の260nmの吸収にRNAあるいはDNA添加の有無による差は認められず、添加されたRNA、DNAとともに沈殿部に移行したものと判断された。EtOH画分および脂質画分の上清部には、その吸収波長からルーメン内容物では植物色素、主にクロロフィルが抽出されてくるものと判断された。また、小腸内容物からは胆汁色素も抽出された。2回の抽出により、色素はほぼ完全に除かれた。

③ ASFへのDNAの損失はほとんど認められなかったが、RNAでは5-10%程度の損失が認められた。これは、低分子化したRNAが沈殿しなかったためと考えられる。

④ RNAのDNA画分への損失、DNAのRNA画分への損失は認められなかった。

⑤ これらの結果から、遠心分離の条件は図1に示した水野の変法(85)の条件で十分と考えられた。

⑥ 十二指腸内容物を用いて行なった3回の回収試験の結果、回収率(平均値)はDNAで90.3%、RNAで88.1%と、RNA、DNAともにほぼ90%の値が得られた。

#### 2) RNAとDNAの分画について

ルーメン内容物を図2-1-1に示した方法に従い処理して得たRNA画分を、異なる化学的性質に基づく測定法である、260nmのUV吸収とorcinol法(86)-riboseの発色反応を利用したRNAの比色定量法—によって定量したところ両者の値はよく一致した(図2-1-2)。このことはRNA画分にDNAが混入していないこと(混入していれば、DNA分だけUV吸収が大きくなる)、RNA画分が十分精製されていることを示している。

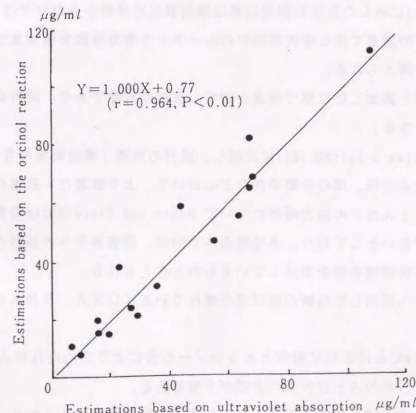


Fig. 2-1-2. The relationship between estimations based on ultraviolet absorption (260 nm) and the orcinol reaction. RNA fractions obtained by treatment on Dowex-1 were used for determination of RNA. Orcinol reaction was performed according to KAJIRO(86).



### 3) 未知試料へ適用した場合について

40点の消化管(ルーメン、第4胃、小腸、盲腸)内容物について2連で分析を行なったときの測定値の差は平均値に対してDNAで $5.2 \pm 4.7\%$ (平均値 $\pm$ 標準偏差)、RNAで $6.7 \pm 4.1\%$ であった。このことから、核酸含量未知の試料中の核酸含量を一定の精度で測定できることが確認された。

### 考 察

あらゆる試料中の核酸を、ある一つの分析法によりRNAとDNAとに分画・定量することは困難である。目的とするそれぞれ特定の試料について、精度と操作性が優れた方法を用いる必要がある。

図2-1-1に示した方法の評価は単に核酸標品の分析からだけでは得られないが、以下の諸点で消化管内容物中のルーチンの簡易核酸分画定量法として適当な方法と考えられる。

- ① EtOHを添加した状態で低温( $-20^{\circ}\text{C}$ )保存が可能であり、同時に一部の色素も除去できる。
- ② McAllan & Smith法(81)に比較し、試料の処理(凍結乾燥の有無)、脂質画分の除去方法、遠心分離条件などにおいて、より簡易化・迅速化されている。脂質画分とASFの抽出順序について Munro and Fleck(88)は脂質画分を先にした方が良好としており、本処理条件でEtOH、脂質画分への核酸の損失は認められず、前処理条件を満足しているものと考えられる。
- ③ 試料へ添加した核酸の回収率が優れている(DNA、RNAとも90%近かった)。
- ④ 260nmにおけるUV吸収とオルシノール法により求めたRNA量がよく一致するなど、RNAとDNAの分離が十分である。
- ⑤ 同一サンプルを繰り返し分析した時の変動係数が小さく、目的とする試料の核酸含量を一定の分析精度で求められる。

核酸含量が未知の試料について、得られた値が真の値とどの程度の差があるのかを確認することは、目的とする試料について真の値を知り得る方法がない

限り不可能である。しかし上述の結果から、図2-1-1に示した方法により、反芻家畜の消化管内容物の核酸含量の定量が、一定の精度を保ちながらMcAllan & Smith 法(81)に比較し、より簡便に行なえるものと考えられた。

## 緒 言

前節で確立した分析法を用いて、牛の消化管各部位におけるRNAとDNAの分布を検討し、両者の消化吸収の動態を明らかにしようとした(75,76)。

## 材料および方法

実験1：ホルスタイン種去勢牛4頭(16-17か月齢、BW 330-400kg)を用いた。供試飼料(89)(表2-2-1)は大豆を主なN源とする混合飼料で、生大豆を用いたものをSB飼料(ルーメン分解率大)、加熱大豆を用いたものをHSB飼料(分解率少)とした。それぞれの飼料を2頭ずつに1日あたり7.5kg、朝、夕の2回に分けて1週間給与した。給与飼料は30分以内に採食された。最終給餌の12時間後に屠殺し、ルーメン、第四胃、小腸上部・下部(長さを基準に二等分した)、および盲腸の内容物を採取した。

内容物は直ちに等量の水を加え氷冷しながらポリトンホモジナイザーで均質化し、分析まで-20℃にて保存した。

Table 2-2-1. Ingredient and chemical compositions (%) of experimental diets.

	SB diet	HSB diet
Soybean	13.8	---
Heated soybean	---	12.6
Orchard grass hay	16.0	16.0
Hay cube	16.0	16.1
Beet pulp	16.5	15.1
Corn cob	5.0	6.0
Corn	9.9	9.1
Rolled barley	10.1	9.2
Wheat bran	9.1	11.9
Molasses	1.9	2.1
Others <sup>1)</sup>	--1.8--	
TDN in DM	74.2	74.3
CP in DM	16.5	16.5
Rumen degradability	77	59

1) Vitamin & minerals 0.7; NaCl 0.5; Tricalcium phosphate 0.6.

Details are shown in reference (89)

実験2: ホルスタイン種去勢牛8頭 (BW170-530kg) を用いた。各牛とも午前9時と午後4時30分に飼料 (イタリアンライグラス乾草と畜試指定配合飼料、給与量は維持水準 (90) とした) を等量給与した。屠殺は午前中に行った。4頭については屠殺日の朝の給餌を行ない、他の4頭については行わなかった。ルーメン、第四胃、小腸および盲腸の内容物を採取した。小腸はその長さを基準に4ないし7等分して、それぞれの各部位の内容物を採取した。内容物は実験1と同様に処理した。

分析: 内容物中の核酸含量は、前節で確立した方法 (74) により分析した。NはKjeldahl法 (91) によった。また、実験2では、これらに加えて消化管内容物のpH、VFA (92) および乾物 (DM) (91)、さらに消化吸収のマーカーとして酸不溶性灰分 (acid insoluble ash; AIA) (93) を測定した。

## 結 果

実験1: 図2-2-1に消化管内容物1gあたり、および内容物中のN1mgあたりの核酸量 ( $\mu\text{g}$ ) を示した。その変動のパターンは類似していた。小腸上部ではN含量が他の部位に比較して高くなったが、これは消化酵素等の分泌などの影響と考えられる。

RNAのルーメン内濃度 ( $\mu\text{g/g}$  内容物) は、SB飼料給与の場合HSB飼料給与の2倍ほどに高まった (330 vs 600)。しかし、第四胃では給与飼料によらずルーメン内容物に比較して濃度が高まり、1250  $\mu\text{g}$  程度で差は認められなかった。小腸上部から盲腸にかけても給与飼料の違いによる差は認められず、ほぼ一定の値で推移した。これは、RNAが他のN成分などと同様の消化吸収のパターンを示したためと考えられる。これに対してDNAは、各サンプリング部位とも、ルーメン内容物中のRNAで認められたような給与飼料による大きな差はなかった。しかし、RNAやNと異なり、小腸下部で濃度が高まる特徴的な変動を示した。

実験2: 実験2の結果は平均せず、各個体の定量値をそのまま示した。これは、小腸のサンプリング部位の分画が個体で異なったこと、小腸内容物の成分値に個体差が大きかったことなどのためである。しかし、それぞれの分析項目

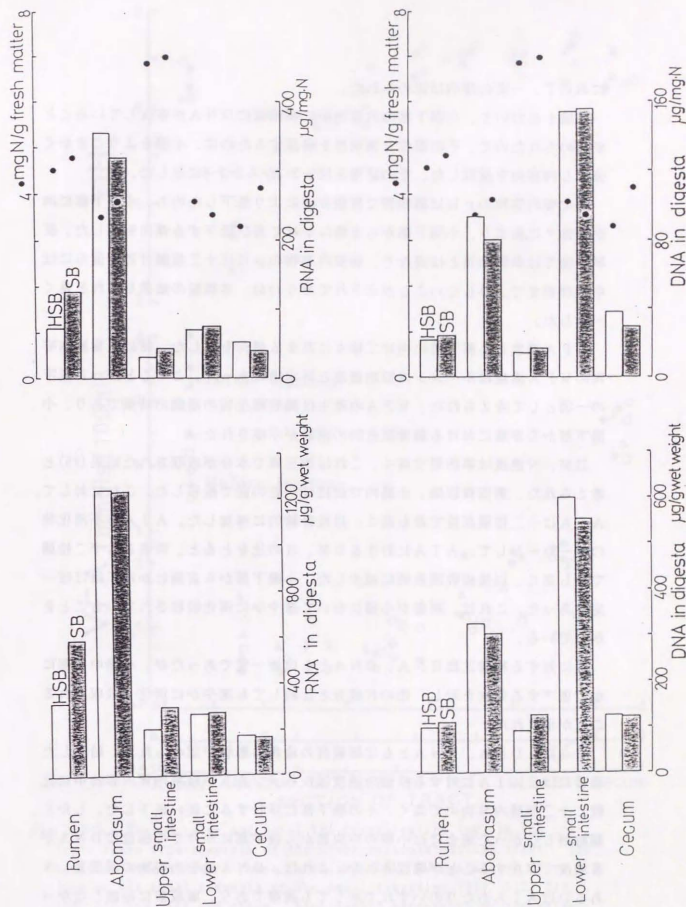


Fig. 2-2-1. The distribution of DNA and RNA in the contents taken from the steer gastrointestinal tracts in Expt 1. Values of the steer fed HSB and SB diets are shown as white columns and shadowed columns, respectively. Values are means for two animals.



において、一定の傾向は認められた。

実験1において、小腸下部の内容物中に高濃度にDNAが存在していることが認められたので、その部位と再現性を確認するために、小腸をよりこまかく分画し内容物を採取した。その結果を図2-2-2から2-2-8に示した。

消化管内容物のpHは第四胃で胃酸分泌により低下したのち、小腸下部に向かい徐々に高まり、小腸下部から盲腸にかけて再び低下する傾向を示した。反芻動物では単胃動物とは異なり、腸管内容物のpHは十二指腸付近で直ちには中性付近まで上昇しないことが示されており(94)、本実験の結果もこれと良く一致した。

VFA濃度も小腸下部に向けて徐々に高まる傾向を示した。特に、盲腸内容物のVFA濃度はルーメン内容物濃度と同水準にあった。このことがpH低下の一因として考えられた。VFAの産生は腸管微生物の活動の結果であり、小腸下部から盲腸における腸管微生物の活動が示唆された。

DM、N濃度は第四胃で高く、これは第三胃で水分が吸収された結果(95)と考えられた。第四胃以降、小腸内ではほぼ一定の値で推移した。これに対して、AIAは十二指腸部位で最も高く、以後直線的に増加した。AIAを不消化物のマーカーとして、AIAに対するDM、Nの比をとると、両者とも十二指腸で最も高く、以後指数関数的に減少した。小腸下部から盲腸にかけてはほぼ一定であった。これは、両者が小腸において速やかに消化吸収されていることを示している。

Nに対する核酸比はRNA、DNAともほぼ一定であったが、小腸中央部にかけて低下する傾向を示し、他のN成分と比較しても速やかに消化・吸収されることが示された。

さらに、DNA、RNAともに屠殺前の給餌の影響が認められた。給餌した場合には、AIAに対する核酸の濃度はルーメンあるいは第四胃内容物中に比較し十二指腸内容物中で高く、その後下部に移行するに従い低下した。しかし、朝給餌しなかった場合には小腸の中央部から後半部にかけての部位にDNAが高濃度で存在することが確認された。これは、DNA量を内容物の湿重量、NあるいはAIAあたりのいずれで示しても同様であり、屠殺前に給餌しなかった実験1の結果を再確認するものであった。RNA濃度も屠殺前に給餌しな

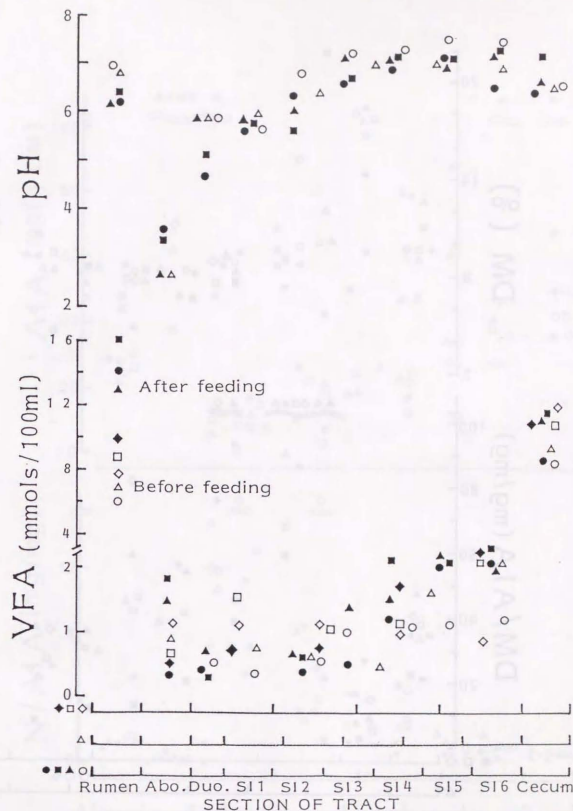


Fig. 2-2-2. The pH value and total VFA concentration (mM) in the contents taken from segments of the steer gastrointestinal tract. The sections examined were rumen, abomasum(ab.), duodenum(duo), four, five or six equal segments of the small intestine (SI1, SI2, SI3, SI4, SI5 and SI6) and cecum. Each symbol represents as the value obtained from individual steer. Steers shown as closed symbols were killed just after feeding, and those shown as open symbols were killed just before feeding (about 20 hr after the last feeding).

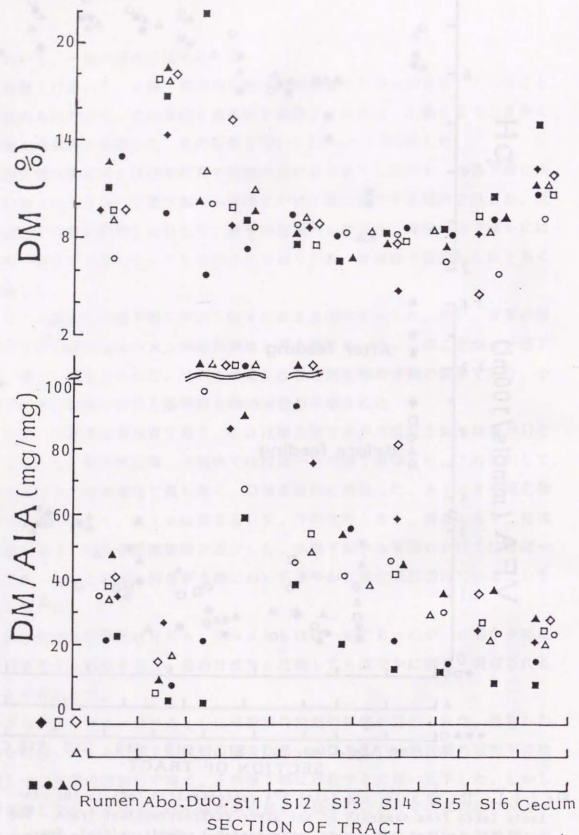


Fig. 2-2-3. The distribution of DM and DM/AIA ratio in the gastrointestinal contents.

See Fig. 2-2-2 legend for other details.

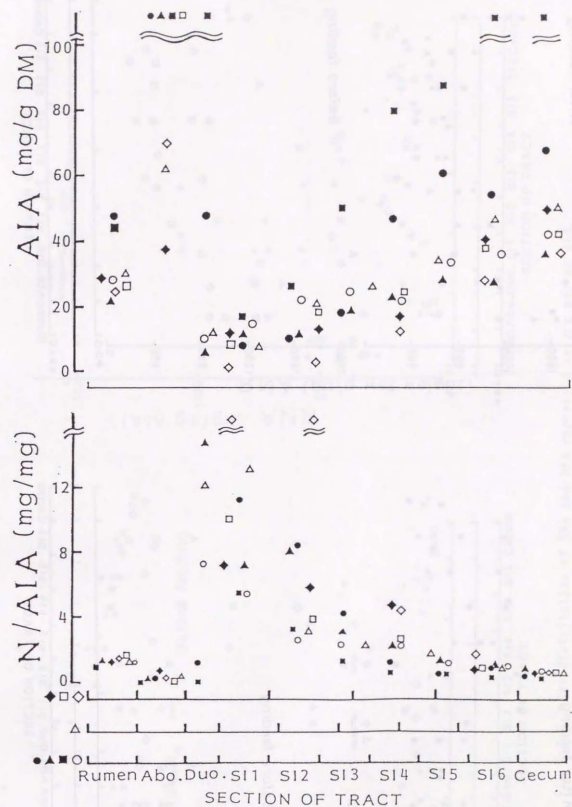


Fig. 2-2-4. The distribution of AIA (mg/g DM) and N/AIA ratio

See Fig. 2-2-2 legend for other details.

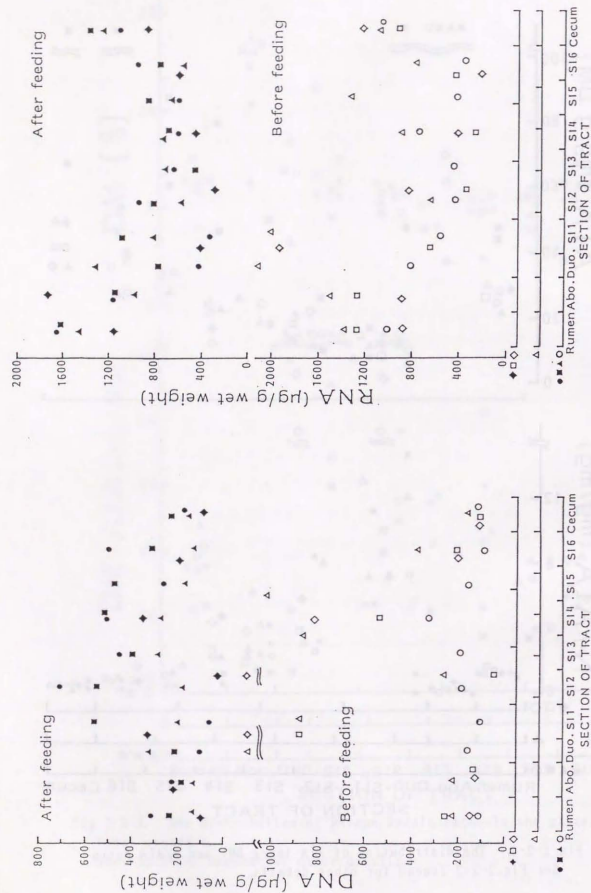


Fig. 2-2-5. The distribution of RNA and DNA expressed as  $\mu\text{g}$  per g wet weight.

See Fig. 2-2-2 legend for other details.

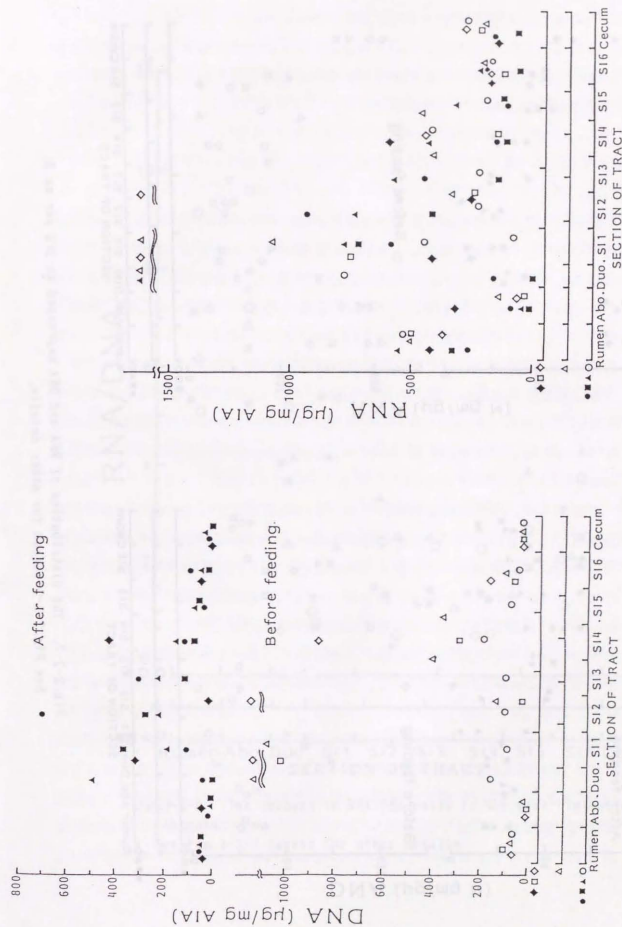


Fig. 2-2-6. The distribution of RNA and DNA expressed as  $\mu\text{g}$  per mg ALA.

See Fig. 2-2-2 legend for other details.



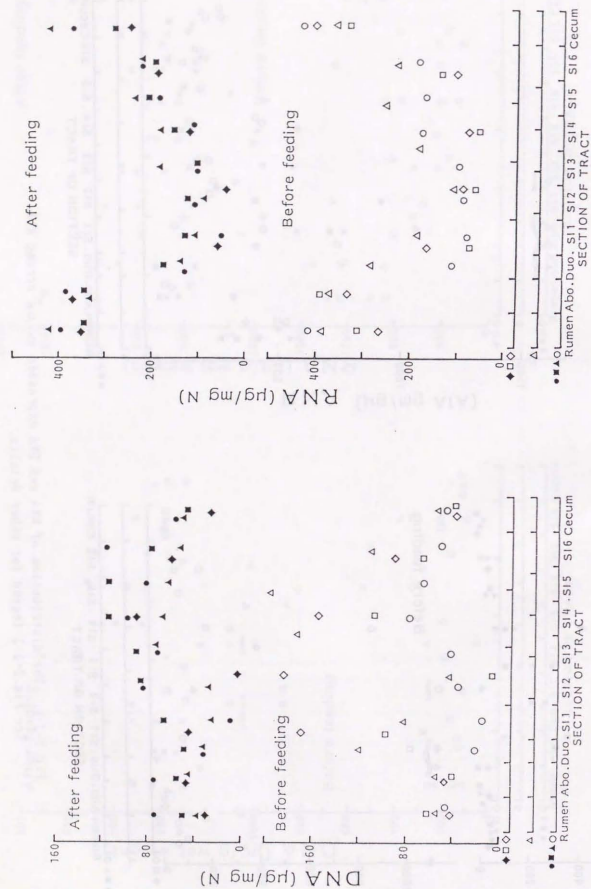


Fig. 2-2-7. The distribution of RNA and DNA expressed as  $\mu\text{g}$  per mg N.  
See Fig. 2-2-2 legend for other details.

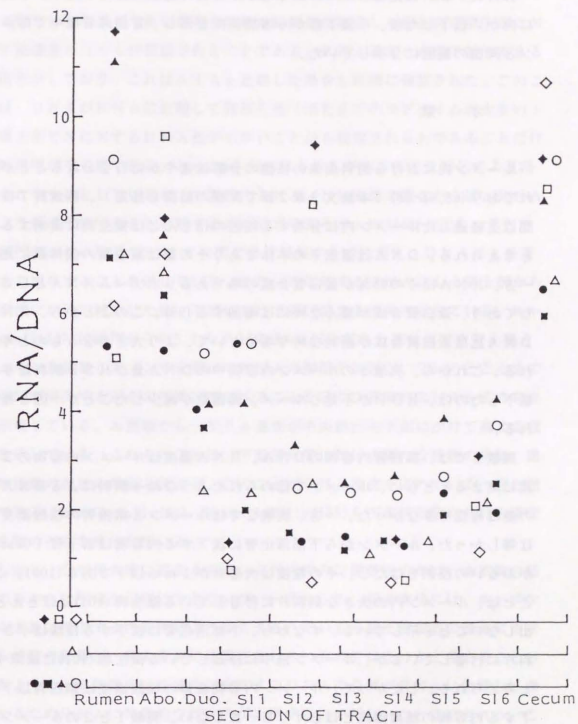


Fig. 2-2-8. The changes in RNA/DNA ratio in the gastrointestinal contents.  
See Fig. 2-2-2 legend for other details.

った場合には小腸下部でいったん高まる傾向を示した。

RNA/DNA比は、ルーメンでは5から12の範囲に分布したが、小腸下部に向かい低下した後、小腸下部から増加傾向を示し、盲腸内容物中ではルーメンと同様の範囲に分布していた。

## 考 察

ルーメン内における飼料由来の核酸の分解は速やかに行なわれることが示されており(68, 96-98)(本論文3章2節で同様の結論を推定)、採食終了後16時間以上経過したルーメン内に分布する核酸のほとんどは微生物に由来するものと考えられる。DNAは遺伝子の本体でありその量は微生物の個体数に比例し、一方、RNAはその85%が蛋白質合成の場であるリボソームRNAとして存在しており、蛋白質合成が盛んな時には増加する(99)。このことから、RNA/DNA比は蛋白質合成が活発な時や場において、より大きくなるものと考えられる。これから、実験1のルーメン内容物中のDNA量がHSB飼料給与時に低下したのは、RDPが不足しルーメン細菌数が減少したことが一因と推定される。

実験1では、第四胃内容物のDNA、RNA濃度はルーメン内容物の2倍程度に高まるとともに、ルーメンで認められたような給与飼料によるRNA濃度の差は確認できなかった。一方、実験2ではルーメンと第四胃の核酸濃度はほぼ等しかった。ルーメンから下部消化管に流下する内容物は第三胃(Omasum)がふるいの役割をはたし、その粒度は大部分が1mm以下である(100)。このことは、ルーメン内の大きな飼料片に付着している微生物(101)はほとんど流出しないことを示している。すなわち、下部消化管に流下する核酸は小さな飼料片に付着しているか、ルーメン液中に浮遊している微生物(101)に由来するものと考えられる。したがって、ルーメン内容物全体の核酸濃度は第四胃以下に流下する内容物の核酸濃度とは必ずしも一致しない。実験1と2のルーメンと第四胃での核酸分布の差異については、実験1では、ルーメン内に浮遊している微生物が飼料片に付着しているものよりも多く、実験2では、その分布に大差がなかったものとも解釈できる。その原因は明らかではないが、飼料の給与量

やルーメンでの分解率の差、あるいは分解されるまでのラグタイム(102)の差などがルーメン微生物の存在場所に影響するのかも知れない。

実験1、2を通じて最も顕著な特徴は給餌前に屠殺した個体の小腸下部において高濃度のDNAが確認されたことである。RNA濃度も小腸下部で高まる傾向を示しており、これはAIAと比較した場合も同様に確認された。このことは、DNAがRNAに比較して難消化性(消化までのラグタイムが大きい: 小腸上部でNに対するDNA比が大きいことから推定される)であることだけでは説明が不可能である。Jacksonら(66)はDNAがRNAに比較してより消化されやすいとしているが、本実験のRNA/DNA比の変化からは、RNAがより易消化性であると判断するのが妥当であろう。McAllan(68)も、RNAは幽門部から小腸長の1/4までの間にほぼ消失するのに対し、DNAはより遠位まで残存することを示している。また、Nに対するRNA比も小腸上部から中央部にかけて減少した後、下部にかけて再び高まる傾向を示している。Ben-Ghedalia(69)は幽門から0.5、1.3、7、15あるいは25m離れた部位にT字型小腸カニューレを装着したメ羊を用いてRNAの動態を検討し、7mのところまでで84%が消失するがその後再び増加することを示し、正味のRNA合成の存在を示唆している。本実験でも、VFA濃度が中央部から下部にかけて高まる傾向を示している。これらのことは、下部消化管における新たな核酸の供給、微生物活動の存在の傍証と言える。このことがDNA濃度を高めている一因と推定できる。Ben-Ghedalia(94)、Mason & White(103)も下部消化管における腸管微生物の存在を推定している。

しかし、なぜ採食前に高まるのか、DNAのみに顕著なのは、本実験の結果のみからは明確な説明はできないが、一因として、採食直後には、ルーメンから大量に流下する内容物によりマスクされている小腸上皮細胞の脱落に由来する核酸の影響が、採食直前には顕在化しているのではないかと考えることができよう。上皮細胞では核膜内に存在するDNAの分解がRNAに比較して遅くなるためDNAに特徴的なピークが出現するのではないかと推定される。これは一つの仮定であり、今後の解明を待つ課題であることは述べるまでもない。

また、腸管の上部細胞に由来する核酸が消化吸收される核酸のうちどの程度を占めるかは今後解決されるべき問題点の一つである。



ここで消化管内における消化率推定のための内部指示物質としてのAIAの有効性について考察しておきたい。第四胃から、十二指腸にかけてN/AIA比が急激に増加したが、原因としてAIA含量が第四胃内容物中で高かったことが考えられる。これは、第四胃が解剖学的に腹部の下方に位置するため、砂などの高比重粒子が胃底部に滞留し、AIA含量を高めたためではないかと推論される。AIAには分布の片寄りがあり、個体差も大きい(舍外で放し飼いし、土を採食したと考えられる個体では濃度が高くなった)。これらのことから、第四胃と小腸との間の消化をAIAを指標として判断するには問題が残る。Jacksonら(66)はCr<sub>2</sub>O<sub>3</sub>とPEGを比較し、PEGがマーカーとして優れているとしており、固体マーカーの適用には注意が必要と考えられる。しかし、小腸におけるAIA、N、DMの分布から判断すると、小腸管内における消化吸収のマーカーとしてのAIAの利用は有効と考えられる。

反芻家畜の消化に関する研究は、主にルーメンに焦点が当てられてきた。これは、ルーメンが反芻家畜に特有な存在であり、かつ、可消化有機物の3分の2がルーメンで発酵されることを考えれば当然と言える。しかし、RUDPやMBPの主な消化吸収部位は小腸であり、今後、下部消化管における消化に関するより詳細な研究が必要である。この時、AIAのマーカーとしての利用が考えられよう。

### 第3章 尿中アラントイン排泄量を指標とする代謝蛋白質中の微生物体蛋白質量の推定

#### 緒 論

序章において既に述べたように、ルーメンにおけるMBP合成量を求めることは、反芻家畜における蛋白質栄養を解析する上での必要条件の一つである。そのため、種々の方法が開発利用されてきた。その原理は、ルーメン微生物体に特有な物質をマーカーにして、ルーメン内容物あるいは下部消化管内容物のマーカー量から微生物量全体を推定することにある。以下、これまでに提案利用されている代表的な方法について、その有効性と限界について考察してみたい。

DAPA法(104-107)；DAPA (diaminopimelic acid: ジアミノピメリン酸)はルーメン細菌の細胞壁の構成成分であり、かつ、植物には含まれていないので、ルーメン細菌合成量推定のマーカーとして広く利用されている。しかし、細菌の種類によってDAPA含量が変動するため、基準値が必ずしも一定ではなく、それぞれの設定により推定値が異なること(108)、ルーメンにおいて細菌が分解される場合、細胞壁は細胞内成分に比較し難分解性であるためDAPAが蓄積する可能性があること(103)(細菌合成量を過大評価する)などの諸点が指摘されている。DAPAは一般にはプロトゾアの構成成分ではないので、プロトゾア体蛋白質合成量の推定には利用できないが、プロトゾア体にも微量のDAPAが認められる(109)ことから、細菌量推定時の誤差となる可能性がある。

AEP法(106,110)；自然界におけるAEP (aminoethylphosphonic acid)の存在は、プロトゾアの体成分として初めて報告された(111)。これをマーカーとしてプロトゾア体蛋白質合成量を推定しようとする方法である。当初、AEPはプロトゾアに特有に存在する化合物と考えられていたが、その後、生物界に広く存在することが明らかにされ、プロトゾア量を過大評価する可能性が



指摘されている(112,113)。さらにAEPはプロトゾア量推定の指標としては適さないとの報告(114)もあり、AEPの利用については検討が必要と考えられる。

核酸法(112)：微生物体Nの10-20%が核酸態であること(70)から核酸をマーカーとする方法も行なわれている。この方法によれば細菌とプロトゾアの両者の評価を同時に行なえる。しかし、微生物種やその成長ステージ、栄養状態などによる核酸含量の変動や(96,115-117)、飼料、特に魚粉などの動物性蛋白質飼料のルーメンにおける分解性などの影響(112)が問題点として指摘されている。

アミノ酸プロフィル法(118)：細菌とプロトゾアおよび内因性の蛋白質(第四胃で分泌される消化酵素)のアミノ酸組成と第四胃あるいは十二指腸内容物中のそれとを比較し、それぞれの存在割合を推定しようとする方法である。細菌やプロトゾアのアミノ酸組成が比較的一定で変動が少ない点から有力な方法の一つであるが、内因性あるいは飼料由来のアミノ酸の寄与を十分に把握できない点が問題点として指摘できる。

同位体法(119-121)：上述の方法は、本来ルーメン微生物の体構成成分として存在する物質をマーカーとする方法であるが、同位体を微生物体に取込ませてマーカーとする方法も種々開発されている。<sup>35</sup>S(119)、<sup>32</sup>P(120)、<sup>15</sup>N(121)などが利用されているが、これらの同位体の微生物体内における分布が微生物により異なることや、他のマーカーの場合も同様であるが、マーカーとしての標準含量を求める場合ルーメン液中に浮遊する細菌が利用されることが多く、飼料片などに付着している細菌(101)の寄与が無視されることなどの問題点が指摘できる。さらに大、中家畜に応用する場合には施設あるいはコスト上の問題もあり使用が制限される点も指摘できよう。

これらの方法はルーメンにおけるMBPの生産量の推定を主な目的としており、可消化のMBP量の推定という視点には重点がおかれていない。下部消化管へ移行するMBP量を求めようとすると、十二指腸カニューレ装着が必要となる。可消化MBP量を求めようとすると、回腸末端にもカニューレを装着しなければならない。現在実用化されている反刍家畜は一般の実験動物に比較

し大型で、外科的手術により種々のカニューレーションを実施した動物を維持管理することやアイソトープの使用が困難であったりする現状では、実際の飼養現場において応用可能な非侵襲的な方法の開発が、反刍家畜の蛋白質栄養を解析する上で必要不可欠と言える。

反刍動物ではルーメン微生物が常時、多量に下部消化管に流下し、単胃動物に比較して腸管に流入する核酸量が多くなることは、第2章で述べたとおりである。このためすい液中の核酸分解酵素活性が著しく高く(71)、小腸におけるRNA、DNAの消化率は80-90%とアミノ酸、蛋白質のそれに匹敵することが示されている(122)。吸収された核酸構成成分のうちのプリン塩基の反刍動物における最終代謝産物はアラントインであり、ピリミジン塩基はβ-アラニン(β-Ala)あるいはβ-アミノイソ酪酸を経て代謝される(73)。もし、これらの代謝産物が尿中に定量的に排泄されるならば、その量から消化吸収された核酸量、さらに上記のようにこの核酸をマーカーとして消化吸収されたMBP量(すなわち代謝蛋白質のうちのMBP量)が推定できる。この点から、尿中に排泄されるアラントインが注目されてきた。尿中アラントイン排泄量を指標としてMBPを求めようとする方法は、間接法ではあるが直接可消化MBP量を推定する方法と言える。

Topps & Elliott(39)が尿中アラントイン排泄量とルーメン内容物中のプリン塩基量との間に高い相関があることを示して以来、尿中アラントイン排泄に関して多くの研究が行なわれてきた。Gieseckeら(47)、Fujihara(51)は、消化管内給餌法(123)を用いて第四胃に投与されたRNAやMBPと尿中アラントイン排泄量との間に比例関係が成立することを示した。また、Lindberg(54)は十二指腸カニューレ装着メシ羊を用いて、十二指腸に流下するMBPと尿中アラントイン排泄量との間に同様の関係を認めた。

さらに、ルーメン微生物合成の最も大きな制限因子は、微生物のエネルギー源としてルーメンで発酵される有機物量(Fermentable organic matter:FOM)と、微生物合成の基材としてのRDPと考えられることから、乾物摂取量(42)、エネルギー摂取量(41,43,46,48-50)やC P摂取量(40,42,46,48,49,52-55)とアラントイン排泄量との関係についての報告も多い。

しかし、これらの報告は必ずしも乾物・エネルギー・C Pの摂取量を規定して行ったものばかりではなく、実験条件の既密な設定がこれらの関係を証明するためには必要と考えられた。また、RDPとRUDPと尿中アラントイン排泄量との関連についての報告は少ない(55)。また、核酸をマーカーとする方法について指摘された問題点は尿中アラントイン排泄量を指標とする場合も同様に指摘できる。特にルーメン微生物叢と尿中アラントイン排泄量との関係は未解決の課題として残されている。

これらの諸点を中心に、尿中アラントイン排泄量を代謝蛋白質中のMBP量(可消化MBP量)推定のための指標とする時の問題点を解明し、さらにこれを指標として可消化MBP量に及ぼす諸要因を検討することを目的として実験を行った。

## 第1節 核酸摂取に伴う哺乳子ヤギの尿中へのアラントイン排泄の増加

### 緒 言

成反刍家畜をもちいて第4胃以下に流下する微生物態Nや核酸Nの量を把握、制御することは容易ではない。Brskovらは、Intragastric nutrition(消化管内給餌法)(123)を用いて研究を行っているが、この方法は複雑で、外科的手術を施した動物の維持管理に技術的熟練を要する難点がある。そこで、哺乳中の反刍家畜の食道溝反射(14)を利用して、第4胃以下に核酸を直接送りこみ、給与した核酸量と尿中アラントイン排泄量との関係を検討し、本法の有効性を確認した(124)。

### 材料および方法

動物: 実験は2回行った。それぞれ、当牧場の日本ザーネン種子ヤギ4頭ずつを用いた。これらの子ヤギは、父親が同じ半兄弟であった。新生子ヤギに3日間初乳を与えた後、室温が22℃に保たれた動物室の個体別に糞尿分離可能な飼育ケージに収容し、液状飼料のみを与えた。

実験1: ケージ収容後牛乳を朝夕300mlずつ哺乳びんから乳首を用いて与え、3週齢時(生後21日目、平均体重5.2kg)から、1日尿を20日間にわたり毎日採取した。最初の5日間は牛乳を朝夕300mlずつ給与し、つづいて、蛋白質源をトルラ酵母あるいは分離精製大豆蛋白質(ISP)とする酵母代

Table 3-1-1. Ingredient composition of milk replacer fed in Expt 1

Ingredient	Yeast <sup>1)</sup> diet	ISP <sup>2)</sup> diet
	— (%) —	
Protein source	45.0	30.0
Lard	15.0	18.0
Lactose	32.1	44.1
Macro mineral mix. <sup>3)</sup>	— 6.4 —	—
Micro mineral mix. <sup>4)</sup>	— 0.6 —	—
Vitamin mix. <sup>5)</sup>	— 0.8 —	—
Antibiotic <sup>6)</sup>	— 0.1 —	—

1) Torula dried yeast: 83.5 mg-N/g(fresh matter basis)

2) Isolated soybean protein: 135.4 mg-N/g(fresh matter basis)

3) Contained (g/kg diet): CaHPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 34.6, KCl 18.5, KHCO<sub>3</sub> 3.1, K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 3.1, MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 4.7

4) Contained (mg/kg diet): ZnO 123.6, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 252.0, MnSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 219.6, CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 78.0, KI 1.4, CoSO<sub>4</sub>·TH<sub>2</sub>O 2.4, Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 1.2

5) Panvitan powder (Takeda Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan)

6) Providing 55 mg chlortetracycline per kg diet.



用乳、ISP代用乳をそれぞれ7日間給与した。実験終了時の平均体重は6.0 kgであった。核酸の給源として用いたトルラ酵母の核酸含量は11.1%、プリン塩基含量は2.5%であった。代用乳の組成は表3-1-1に示した。代用乳の1回の給与量は50 gとし、5倍量の温湯に溶かして牛乳と同様の方法により1日2回朝夕に与えた。

実験2：実験1と同様に牛乳で子備哺乳し(実験開始時の平均体重3.6kg)、牛乳に酵母(実験1と同一製品)を添加した液状飼料を1週間ずつ与え、後半3日間にわたり1日尿を採取した。牛乳の給与量と酵母の添加量を表3-1-2に示した。酵母の1日あたりの給与量は15、30、45あるいは60 gとし、15および45 gについては、2頭のみで実施した。液状飼料の給与方法および回数は実験1と同様とした。

分析方法：実験1では、尿中の総NをKjeldahl法(91)、アラントインをYoung-Conway法(125)、尿酸をFolin-Wu法(126)、クレアチニンをピクリン酸法(126)、尿素態Nをインドフェノール法(126)および $\beta$ -Alaと $\beta$ -AIBAを下記のアミノ酸自動分析法により測定した。実験2では、総Nとアラントインのみを測定した。

トルラ酵母中の核酸含量はSchmidt-Thannhauser-Schneider法の水野の変法(85)により定量した。

$\beta$ -Ala、 $\beta$ -AIBAの定量：尿に1/4量の15%スルホサリチル酸(SSA)を加えて得た除蛋白上澄液をDowex 50x4(200-400メッシュ)、H<sup>+</sup>型カラムで脱塩した。吸着したアミノ酸を3N-NH<sub>3</sub>でカラムから溶出させ、ロータリーエバポレーターで乾固した。これを一定量の1/50N-HClに溶解し、一部はそのままアミノ酸分析に供し、一部は等量の12N-HClを加え、105℃で20時間加水分解したの

ち、アミノ酸分析に供した。アミノ酸は、日立835型アミノ酸分析計(生体成分分析用カラム)を用いて分析した。 $\beta$ -Alaと $\beta$ -AIBAはPheと $\alpha$ -アミノ酪酸の間に溶出した。加水分解しない試料では $\beta$ -Alaおよび $\beta$ -AIBAのピーク付近に、ペプチドと考えられるピークが重なり、定量を妨害したので $\beta$ -Ala、 $\beta$ -AIBAの定量は、すべて加水分解後のサンプルについて行った。

トルラ酵母中のプリン塩基の定量：試料を1.0N-HClで、100℃、60分間加水分解し、ガラスフィルターでろ化後、ろ液をDowex 50x8(200-400メッシュ)、H<sup>+</sup>型カラムに注入し、1.0N-HClで洗った後、4N-HCl溶出画分を得た(127)。これをロータリーエバポレーターで乾固後、1.0N-HClにて一定量に希釈し、下記の操作条件に従い高速液体クロマトグラフィー(HPLC)に供した。HPLC条件は、カラム：Shodex OHpak Q802(8mm i.d.x 250mm)、カラム温度：40℃、移動相：0.25% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>/H<sub>2</sub>O、流速：1.0ml/min、測定波長：260nm、であった。この条件下で、HPLCではアデニンとグアニンのみのピークが認められ、他のピークは検出されなかった。

## 結 果

供試したトルラ酵母のプリン塩基含量は2.5%、酵母100 g中のアデニンとグアニンの存在量は、それぞれ、10.2、7.4mmolであった。

実験1：N-摂取量は牛乳給与<酵母代用乳給与<ISP代用乳給与の順に増加し、それに対応して、尿中のN排泄量も図3-1-1に示すように増加した。尿中尿素態Nが総Nの80ないし90%を占め、総Nと同様の動きで変化した。一方、尿酸量、体重1 kgあたりのクレアチニンの排泄量は試験期間中を通じてほぼ一定値を示した。

アラントインの尿中排泄量が最も顕著な変化を示した(図3-1-1)。すなわち、牛乳給与期間中はほぼ100mg(0.63mmol)/日だったものが、酵母代用乳に切り替えると速やかに増加し、切り替え3日目以降は600-700mg(3.8-4.4mmol)/日のレベルでほぼ一定となった。切り替え3日目以降のアラントイン値は、牛乳給与時に比較し有意(p<0.01)に高かった。その後、ISP代用乳に切り替えると、牛乳給与時のレベルまで速やかに低下した。

Table 3-1-2. Feeding schedule in Expt 2

Period	No of Kids	Daily intake			
		Yeast (g)	Milk (ml)	TotalN (g)	Purine base (mmole)
1	2	15	570	3.97	2.64
2	4	30	930	6.96	5.28
3	2	45	560	6.44	7.92
4	4	60	1100	10.27	10.56

The kids were fed the above mixture of yeast and milk by nipple-fed. The Torula dried yeast and cow's milk fed contained 83.5 mg-N/g and 4.78 mg-N/ml, respectively. Each period was successively and consisted of 1 week.



$\beta$ -Alaの排泄量 ( $\mu\text{mol}/\text{日}$ 、平均 $\pm$ 標準誤差)を各給与期の後半3日間の合尿について求めたところ、牛乳給与期  $11.9 \pm 2.7$ 、酵母代用乳給与期  $14.8 \pm 4.2$ 、ISP代用乳給与期  $10.7 \pm 2.0$  であった。同様に、 $\beta$ -AIBAの排泄量は、各期それぞれ、 $1.3 \pm 1.3$ 、 $4.3 \pm 1.7$ 、 $3.2 \pm 1.9$  であった。酵母代用乳給与により $\beta$ -Ala、 $\beta$ -AIBAの排泄量が増加する傾向は示されたが、有意差は認められなかった。また、量的にもアラントインと比較すると1/1000のオーダーであった。

実験1終了後、2頭の子ヤギを酵母代用乳哺乳直後屠殺解剖した結果、ルーメンに固形物は認められず、哺乳した代用乳は直接第四胃以下に達したものと確認された。

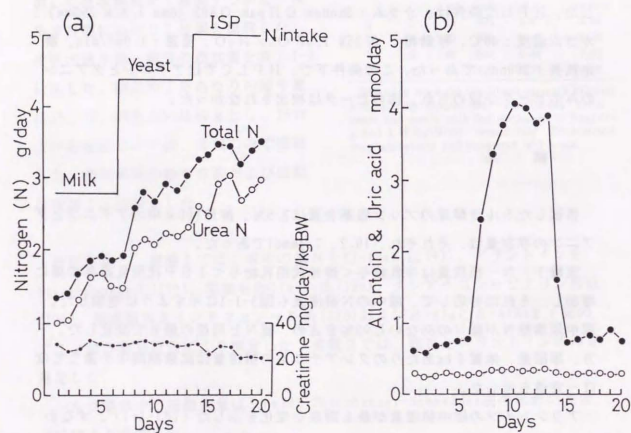


Fig. 3-1-1. Expt 1. (a) Changes in N intake and urinary excretion of total-N, Urea-N and creatinine in the kids fed cow's milk (days 1-6), yeast milk replacer (days 7-13) and ISP milk replacer (days 14-20). Each value is the mean of four kids. (b) Changes in urinary excretion of allantoin (●-) and uric acid (○-).

実験2：酵母15g、30g、45gおよび60g給与時の尿中N排泄量 ( $\text{g}/\text{日}$ 、平均 $\pm$ 標準誤差)は、 $1.06 \pm 0.14$ 、 $2.20 \pm 0.15$ 、 $3.18 \pm 0.12$ および $4.61 \pm 0.21$ であった。N摂取量は酵母30g給与時の方が多かったにもかかわらず、尿中N排泄量は酵母45g給与時の方が多かったのは、酵母Nの生物価が牛乳と比較して低かったためと考えられる。

実験1の酵母代用乳給与期の後半3日間についてのアラントイン日平均排泄量を求め、この値を含めてアラントイン排泄量と酵母の摂取量との関係を検討したところ、両者の間に有意な正の相関が認められ ( $r=0.973$ ,  $p<0.01$ )、尿中アラントイン排泄量 ( $\text{mmol}/\text{日}$ )  $= 0.506 \times$  アリントイン摂取量 ( $\text{mmol}/\text{日}$ )  $- 0.065$  の回帰式が得られた (図3-1-2)。実験1の酵母代用乳給与時のアラントイン排泄量 (後半3日間の平均値)は、図3-1-2に示したように、実験2の酵母45g/日摂取の場合と同じ範囲に分布していた。

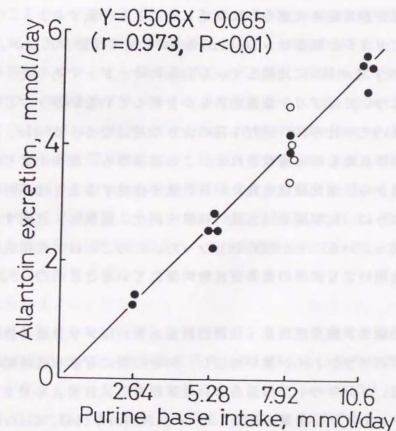


Fig. 3-1-2. Relationship between purine base intake (X) and urinary excretion of allantoin (Y) in the kids fed Torula dried yeast with cow's milk and yeast milk replacer. Each symbol represents as the value of individual kid. ○: Expt 1, ●: Expt 2.

成反刍家畜のすい液中の核酸分解酵素活性は、他の単胃動物に比較して非常に高く(71)、十二指腸以下に達する大量の微生物由来の核酸の消化に有効である。また、小腸におけるDNA、RNAの消化率は個々のアミノ酸に比較しても遜色なく、80%以上であることも報告されている(122)。今回、実験1において、全く固形飼料を摂取していない哺乳子ヤギでも、食道溝反射により投与された酵母中に含まれる核酸を速やかに消化、吸収、排泄できることが示された。さらに、尿酸の変化が一定なのに対し、プリン塩基の代謝産物であるアラントインの排泄は酵母給与に対し速やかに反応した。これは、アラントインがプリン代謝の最終産物であるラットに42%酵母飼料を給与した神立・斎藤の実験(128)においても、尿酸は大きな変化を示さなかったのに対し、アラントインの排泄量が酵母給与に速やかに反応したことに一致する。

一方、ビリミジン塩基は $\alpha$ -Ala、 $\beta$ -Alaを経て代謝されるが、これらの尿中濃度はアラントインに比較して、1/1000のオーダーであった。酵母核酸中の塩基組成についてはプリン塩基のみしか分析していないが、プリン塩基とビリミジン塩基のモル比率に1000対1程の大きな差はなく、 $\beta$ -Ala、 $\beta$ -Alaは、体内で代謝されたものと推察される。この結果から、尿中のビリミジン塩基の代謝産物量から、消化吸収されたMBP量を推定することは不可能と結論された。このように、反刍家畜は大量の核酸を消化、吸収し、代謝する能力を、離乳前から持っていることが明らかとなった。このことは、代用乳の蛋白質源として酵母を用いても子牛の成長が比較的に優れていたこと(129)によっても裏づけられる。

実験2の結果、酵母摂取量(核酸摂取量あるいはプリン塩基摂取量)に比例して、尿中のアラントイン量が増加し、両者の間に有意な直線関係が成立した。この結果は、メン羊の十二指腸あるいは第四胃に、RNAやMBPを注入して尿中アラントイン排泄量を測定したAntoniewiczら(44)、Gieseckeら(47)やFujiharaら(51)の結果、さらに、十二指腸カニューレ装着メン羊において十二指腸に流下したMBP量と尿中アラントイン排泄量との間に正の相関を認めたLindbergら(54)の結果と一致する。また、酵母摂取量45g/日について比較す

ると、実験1と実験2のアラントイン排泄量は同じ範囲に分布しており、液状飼料の組成に拘らず、再現性が示された。

核酸中のプリン塩基は、尿酸、アラントインのほかはキサンチン、ヒポキサンチン、グアニンなどとしても尿中に排泄されるが(47)、本実験ではこれらの成分については測定していない。しかし、回帰式  $Y = 0.506X - 0.065$  は、摂取されたプリン塩基のうちの50.6%が、尿中にアラントインとして排泄されることを示している。この値は、Gieseckeら(47)の、小腸に投与したプリン塩基1mmolあたり尿中へのプリン塩基の代謝産物が0.52mmol増加したとの報告とほぼ一致するものである。この結果は、単胃動物におけるトルラ酵母のCPの消化率(130)から、酵母核酸の消化率を70ないし80%とし、吸収後アラントインとして排泄されるプリン塩基の割合を80-90%と仮定するとほぼ説明できる。

これらのことから、尿中アラントイン排泄量が反刍家畜の下部消化管で消化吸収されるMBP量推定の一つの指標となることが再確認された。

牛乳給与時のアラントイン排泄量(100mg/日)は、代謝体重(MBS)あたり30mg前後で、内因性のアラントイン排泄量としてLindberg(56)が哺乳子ヤギで報告している19-38mg/MBS、Fujiharaら(51)がメン羊で示した総プリン排泄量26mg/MBSと同水準にある。Chenら(57)も同様の値を報告している。また、Antoniewicz & Pisulewski(45)は消化管内給餌法を用いてメン羊の内因性尿中アラントイン排泄量として3-7mg/MBSを示しており、後述の絶食試験で得られた12-15mg/MBSはこれらの中間値を示している。これから、ヤギ、メン羊の内因性の尿中アラントイン排泄量は最大でも30-40mg/MBS程度と考えられる。

一方、酵母摂取量を0に外挿した時のアラントイン排泄量 $-0.065\text{mmol}(-10.4\text{mg})$ /日も内因性のプリン代謝量を示すものと言える。体内のプリン塩基の代謝プールが変化しない定常状態を仮定すると、de novoのプリン塩基の合成(図3-1-3)があれば、それに見合う排泄が存在するはずである。さらに、de novoの生合成系の活性が食餌由来のプリン塩基の代謝の影響を受けなければ、酵母摂取時のアラントイン排泄量は飼料由来と内因性の両者を加えた量になり、酵母(核酸)摂取量0の時のアラントイン排泄量は内因性のプリン塩基のde novo合成に対応した量になるはずである。すなわち、核酸摂取量が0の時のア



ラントイン排泄量の外挿値は、内因性のプリン代謝量を示すことになる。

ところが本実験ではこの外挿値が0に近く、核酸の摂取時には（結果的には

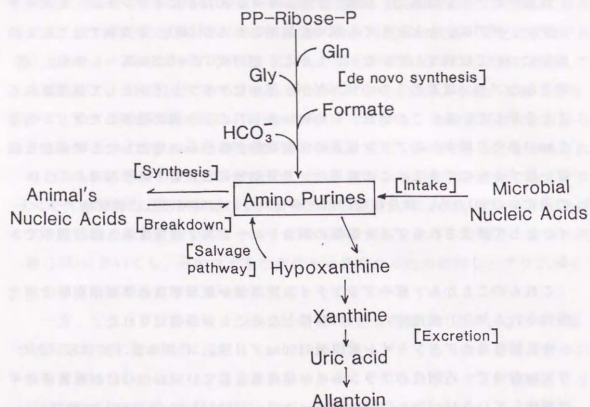


Fig. 3-1-3. Schematic summary of amino purine metabolism in ruminants.

プリン塩基の吸収)、de novo 合成が減少することが示唆される。すなわち、食餌由来のプリン塩基と de novo 合成されるプリン塩基とが同じ代謝プールに入り、食餌由来のプリン塩基の流入に伴い de novo 合成が低下することが示唆される。

この推論は、成反刍家畜においては $^{14}\text{C}$ -glyの核酸分画への取込みが認められないこと(131)や、 $8\text{-}^{14}\text{C}$ -Adenineを取込ませた微生物体をメン羊に給与した時、メン羊の体組織の核酸分画に放射能が取込まれること(132, 133)などの報告と矛盾しない。

最近、Chenら(58)は、消化管内給餌法を用いて吸収されたプリン塩基量(X; mmol/day)と尿中へのプリン代謝産物量(Y; mmol/day)との間に $Y = 0.84X + 0.15\text{ MBS}e^{-0.29X}$ の関係が成立つことを報告している。このことはXが大きい、すなわち食餌由来のプリン量が多い時には内因性のアラントイン排泄量

が減少することを示しており、上述の推論を裏づける結果である。また、Yが $0.6\text{ mmol/MBS/day}$ を越える範囲ではほぼ $Y = 0.84X$ の直線関係が成立し、本実験で直線回帰が得られたこととも一致する。

反刍家畜のルーメン内で微生物体成分として生合成された核酸は、宿主のN栄養上の損失であるとの指摘もあるが(134)、微生物由来の核酸成分が反刍家畜体内の核酸に取込まれるとすれば、N栄養上の直接の効果(135)ばかりでなく、塩基成分の生合成に伴うATPの消費の節約を通して、エネルギーの利用面での寄与も考えられる。



## 緒 言

第1節の結果から、第四胃以下に流下する核酸（プリン塩基）は定量的に尿中にアラントインとして排泄されることが示された。成反刍家畜では下部消化管に流下する核酸として、主にはルーメン微生物由来のものと飼料由来のものが考えられるが、McAllan & Smith (68, 96-98)は、ルーメン内に投与されたRNA、DNAの標品あるいは乾草中の核酸が、ルーメン内容物の流下速度に比較しより速やかに減少することを示し、下部消化管に未分解のまま流下する飼料由来の核酸量はルーメン微生物由来のそれに比較して小さいとした。しかし、飼料に含まれる核酸についてはルーメン内における分解を明確に示した報告は少ない。

飼料のN化合物のルーメン内での分解率は一般にナイロンバッグ法を用いて推定されているが(30)、家畜側の条件（採食量、飲水量など）や飼料側の条件（加工状態、N化合物の存在形態など）などで異なり、飼料の化学組成のように一義的には決まらない。このことは核酸の場合にも当てはまり、各飼料ごとにその核酸のルーメン分解率を一義的に決めることはできない。

そこで、ルーメンでの未分解の核酸量が増大するようMBPを大量に給与し、飼料由来の核酸が尿中アラントイン排泄量に対してどの程度影響するかを検討した(136, 137)。

## 材料および方法

動物：前節の実験に用いた子ヤギを引き続き本実験に供した。飼育環境は前節と同様である。食道溝反射を維持させるために、牛乳250mlを一日一回午前9時に給与するとともに、乾草と配合飼料を与えた。9週齢時には一日あたりの採食量が乾草150g、配合飼料100gに達し、ほぼルーメンの機能と容積が十分に発達したものと判断されたので、以下の実験に供した。

実験：9週齢時から図3-2-1に示した飼養計画にしたがい、乾草と配合飼料

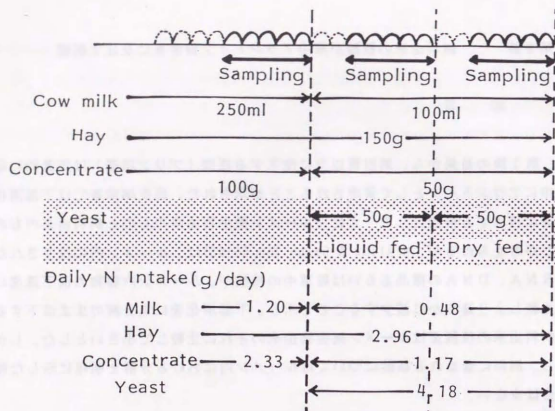


Fig. 3-2-1. Feeding schedule of the experiment.

を基礎に、Ⅰ期牛乳-Ⅱ期液状酵母（牛乳100mlと水100mlに酵母を懸濁させ哺乳ビンより給与）-Ⅲ期粉末酵母をそれぞれ1週間ずつ追加給与した。酵母は、前節と同一ロットのトルラ酵母を用いた。各期の後半五日間全尿を採取しN成分の分析に供した。分析方法は、前節と同様である。

各期の平均体重 (kg) は 7.76、7.86、8.21 であった。また、N摂取量 (g/日) は各期それぞれ液状飼料から1.20、4.66、0.48、固形飼料から5.29、4.13、8.31であった。

#### 結果と考察

摂取Nの増加に伴い尿中への総N、尿素態Nの排泄が増加した。酵母を粉餌した場合には、液状給与 (nipple-fed) に比較し総N、尿素態Nが共に高い傾向が示された。これは、飼料、特に酵母のルーメン内における分解の結果、N<sub>H4</sub>の生成量が増加し尿素Nの排泄量が増加したためと考えられる。

尿中への尿酸排泄量には有意差は認められなかったが、アラントイン排泄量

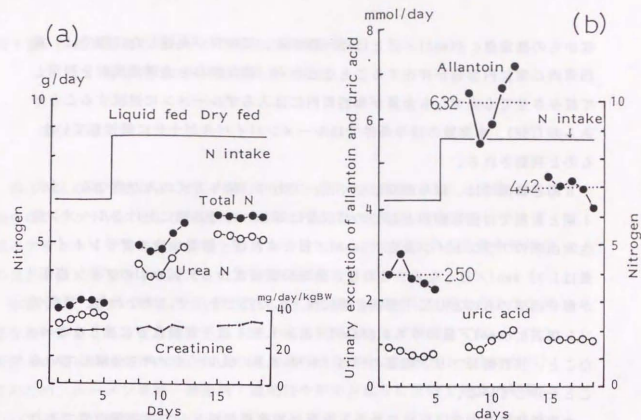


Fig. 3-2-2. (a) Nitrogen intake and urinary excretion of total-N, urea-N and creatinine in the kids fed liquid yeast (days 6-12) and dried yeast (days 13-19).

(b) Urinary excretion of allantoin (●) and uric acid (○). Each value is the mean of four kids. (-----) is the mean of 5 days observations of four kids.

(前節の実験から下部消化管への核酸の投与量を変化させた時アラントイン排泄量が3日目以降は一定となることから5日間の平均値を用いた)は、Ⅰ期 2.50mmol/日、Ⅱ期 6.32mmol/日、Ⅲ期 4.42mmol/日と各期の間に有意差 ( $p < 0.05$ ) が認められた。

プリン塩基の給与量はⅠ、Ⅱ期とも 8.8mmol/日であるので前節で得られた回帰式  $Y = 0.506X - 0.065$  から給与酵母が全量ルーメンバイパスしたと仮定すればアラントイン排泄量は 4.39mmol/日増加すると推定される。一方、Ⅰ期のアラントイン排泄量は 2.50mmol/日であり、C/P濃度がほぼ一定であるので固形飼料の摂取量がMBP合成量に比例するとすれば、Ⅱ期ではルーメン微生物由来のアラントインは 2mmol/日と推定される ( $2.50 \times 200 / 250$ )。この値とⅡ期のアラントイン排泄量 6.32mmol/日との差は 4.32mmol/日であり、回帰



式からの推定値4.39mmol/日とほぼ一致する。反芻胃が発達した状態では、第四胃内に常に内容物が存在することなどから、液状飼料を食道溝反射を利用して投与させても必ずしも全量が第四胃内には入らずルーメンに逆流することがあるが(138)、本実験の給与条件ではルーメンバイパスが十分に機能していたものと判断される。

Ⅱ期とⅢ期では、給与飼料は全く同一であり、給与方式のみが異なる。また、Ⅰ期とⅢ期では固形飼料としての摂取量は等しいのでⅢ期におけるルーメン微生物由来のアラントイン量を2.5mmol/日とすれば、酵母由来のアラントイン量は1.92 mmol/日となる。これは、上述の回掃式から3.92mmolのアリン塩基が酵母由来のものとして下部消化管に流下したことを示す。すなわち、摂取アリン塩基8.8mmol/日のうち4.88mmol (8.8-3.92) は下部消化管に達しなかったこと、摂取酵母アリン塩基の55% (4.88/8.8) がルーメン内で分解していることを示している。

本実験はC P 23% (D M あたり) と反芻家畜用飼料としては高蛋白質であり、かつ、その50%が酵母由来と言う極端な組成であったにもかかわらず、酵母核酸の55%がルーメンで分解され、尿中アラントインに占める酵母由来の核酸の寄与率は44%程度 ( $(4.42-2.50) / 4.42 \times 100$ ) であると推定された。また、給与した酵母は微粉末であり、ルーメンでの滞留時間が短いと推定され(100)、通常の形態の飼料に比較してルーメンでの分解率が低下していたことが示唆される。これらのことから、核酸含量が低く(例えば核酸含量が1/3、C P 13%)、一定の物理性を持ち、ルーメンでの滞留が予想される飼料においては、飼料由来の核酸が尿中アラントイン排泄量に占める寄与率は20%以下、逆にルーメン微生物由来の寄与は80%以上と推定される。これは、筋肉蛋白質の代謝回転における指標の一つとして利用されている尿中3-メチルヒスチジンのうち、骨格筋に由来するものの割合が75%程度とされていること(36)と比較しても遜色ない値と言える。

これらの結果・考察から尿中アラントインに占める飼料由来の核酸の影響は大きなものではないと判断された。

### 第3節 絶食前後のルーメン内容物の核酸含量と

#### 尿中アラントイン排泄量の変化

#### 緒言

第1および第2節において、下部消化管に流下する核酸(アリン塩基)は、尿中にアラントインとして定量的に排泄されることを確認した(124)。そこで、尿中アラントイン排泄量を指標としてルーメンにおけるM B P生産量や可消化のM B P量に影響すると考えられる諸要因の解析を試みた。

本節では、絶食の影響について検討した。舎飼いの場合には絶食のような苛酷な条件が生じることは稀であろうが、放牧利用される反芻家畜では、干ばつ、豪雪その他の環境条件の変化により絶食状態が生ずることが珍しくない(139)。そのため、ルーメン発酵・微生物・運動性や尿中N成分に及ぼす絶食の影響についての多くの研究がある(139)。さらに、基礎代謝量の推定のために絶食条件が良く用いられる(140)。しかし、ルーメン内の核酸含量の変動と絶食との関係についてはほとんど報告されていない。そこでこれらの基礎的データを得ることも目的の一つとして以下の実験を行った(141, 142)。

#### 材料および方法

実験1: 絶食とその後の再給餌期間中のルーメン内容物中のDNAおよびRNA含量の変化を、試験開始時の平均体重が48kgの日本ザーネン種去勢ヤギ3頭(平均25か月齢)を用いて検討した。絶食開始まではイタリアンライグラス乾草800gと配合飼料500g(表3-3-1)を午前9時に給与した。4日間絶食させた後、絶食前と同じ条件で再給餌した。この間水は自由に与えた。胃内容物は胃チューブを用いて、絶食直前の給餌後4時間(0日)、1日、2日、3日および4日目と、再給餌開始後4時間、3日および6日目に採取しRNA・DNA(74)、総N(91)、NH<sub>3</sub>-N濃度・VFA組成(92)の分析に供した。同時に頸静脈血を採取し、血糖および血漿尿素態N(143)の分析に供した。

実験2: 絶食前後の尿中N化合物排泄量の変化を、14か月齢の日本ザーネン



種去勢やギラ頭（絶食開始時平均体重30.2kg）を用いて検討した。絶食前の給餌量はイタリアンライグラス2番草乾草300gと配合飼料400gとし1日1回午前9時に与えた。絶食前2日間、絶食中7日間、再給餌後10日間毎日全尿を採取し、第1節と同様の方法によりN成分の分析を行った。なお、特に記述しない場合は第1節で述べた方法によって分析を行った。

Table 3-3-1. Ingredient composition of concentrate mixture.

Ingredient	(%)
Barley	20.0
Corn	20.0
Milo	30.0
Wheat bran	10.0
Alfalfa meal	10.0
Urea	1.0
Molasses	5.5
Vitamins and minerals <sup>1)</sup>	3.5

1) This contains 1.8% calcium carbonate, 0.5% dicalcium phosphate, 1.0% sodium chloride, 0.1% trace mineral mixture and 0.1% vitamin A,D,E, mixture.

#### 結果と考察

実験1： 絶食に伴いルーメン内容物中のRNA濃度は直線的に減少した（図3-3-1）。一方、DNA濃度の減少は2ないし3日目以降に始まった。また、再給餌後の回復はRNAでは速やかであったが、DNAでは遅く、RNA/DNA比（図3-3-1）にその傾向が明らかに示された。DNAは微生物個体数に比例し、リボゾームRNAが大部分を占めるRNA（99）は蛋白質合成に関連していると考えられる。VFAや総N、NH<sub>3</sub>-N濃度の低下に見られるように（図3-3-2）エネルギー源とN源の減少により、まず、MBP合成のためのRNA量が減少した後、微生物の個体数が減少したと考えられる。再給餌後の変化も、まず蛋白質合成の場としてのリボゾームが合成され、その後微生物が増加したものと解釈できる。

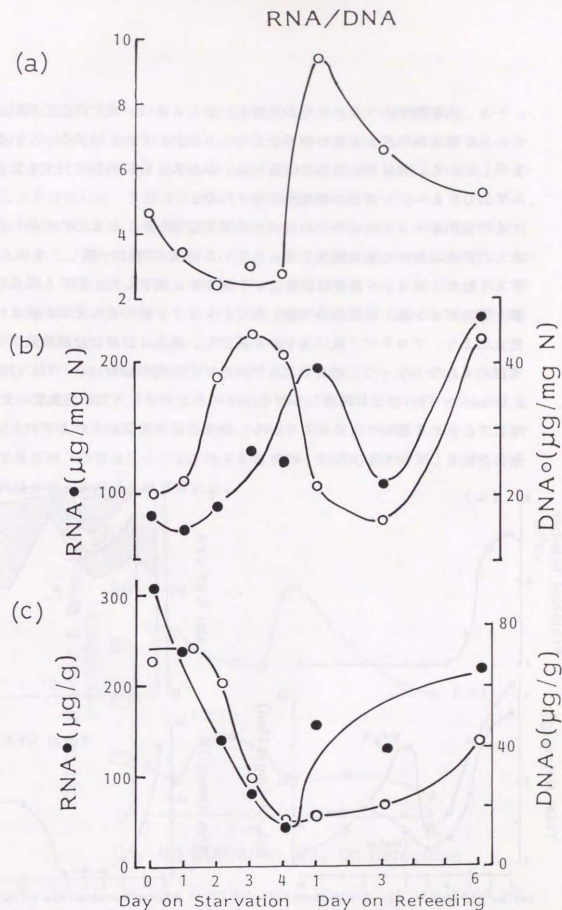


Fig. 3-3-1. Expt 1. Changes in RNA/DNA ratio (a), those in RNA and DNA concentrations expressed as  $\mu\text{g}/\text{mg N}$  (b), and expressed as  $\mu\text{g}/\text{g}$  wet weight (c) in the rumen contents of goats during starvation and the subsequent refeeding periods. Each value is the mean of three goats.

一方、内容中のN量あたりのRNA、DNA量は一定ではなく(図3-3-1)、ルーメン微生物の流出速度が飼料など他のN成分のそれとは異なっていることを示している。再給餌6日目にはRNA、DNAともに総Nに対する比が高まっており、ルーメン細菌の増殖が示唆された。

その他のルーメン内容中の諸成分の変化は図3-3-2にまとめて示した。これらの変化は従来の絶食試験で得られている結果(139)と一致し、ルーメンVFA、総N、 $\text{NH}_3\text{-N}$ 濃度は絶食により速やかに低下した。VFA組成では酢酸・プロピオン酸・酪酸以外の酸、特にバレイリアン酸のモル比率が高まった。絶食により、プロトゾア数は速やかに減少し、絶食4日目には顕微鏡下では全く認められなくなった。絶食によるプロトゾアの消失はWarner(127)、Potter & Dehority(128)なども報告しており、ルーメンプロトゾアが栄養素の欠乏に対してきわめて弱いことを示している。絶食は反芻家畜におけるプロトゾアの除去方法として有効な方法の一つと考えられる。

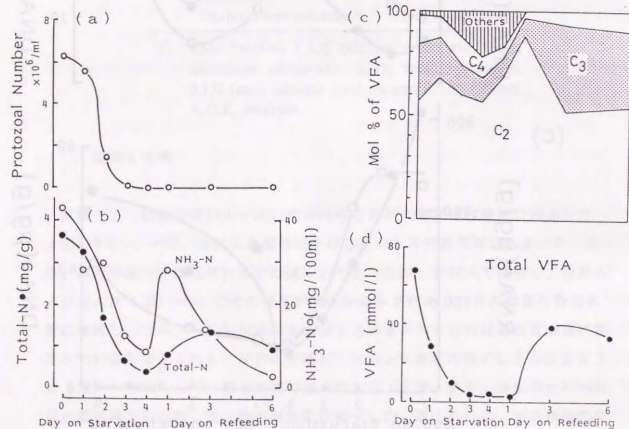


Fig. 3-3-2. Expt 1. Changes in rumen protozoal number (a), those in total-N and ammonia-N (b), those in molar percentages of VFA (c), and those in total VFA concentration (d) in the rumen contents of goats during starvation and the subsequent refeeding periods. Each value is the mean of three goats.

再給餌によってもプロトゾアが確認されなかった他は、給餌再開後、VFA、総Nおよび $\text{NH}_3\text{-N}$ 濃度は高まった。しかし、絶食前の水準には回復しなかった。これは、再給餌後1日目は給与量(絶食前と同量)の80%を採食したのに対し2日目は31%、3日目では26%と採食量が少なかったためと考えられる。6日目の採食率は93%と残飼が認められた。ルーメン $\text{NH}_3\text{-N}$ 濃度が再給餌直後に高まり、それ以後再び低下したことも、この採食量の変化に対応した結果であろう。再給餌1日目に、特に $\text{NH}_3\text{-N}$ 濃度が高まったのは配合飼料に尿素が1%含有されていたこと、ルーメン微生物の減少による $\text{NH}_3\text{-N}$ の利用性が低下したことなどによるものと考えられる。

血漿グルコース、尿素態N濃度の変化を図3-3-3に示した。絶食による血漿グルコース濃度の低下と再給餌後の上昇はやぎに対するエネルギー供給が変化したことを示している。ルーメンからの $\text{NH}_3\text{-N}$ の吸収が減少しているにも拘わらず尿素態Nが絶食により高まっているのは、体蛋白質の分解、エネルギー供給の減少などの結果と考えられる。

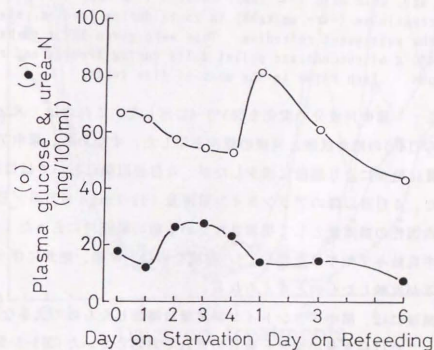


Fig. 3-3-3. Expt 1. Changes in blood plasma glucose (o) and urea-N (●) concentrations of goats during starvation and the subsequent refeeding periods. Each value is the mean of three goats.



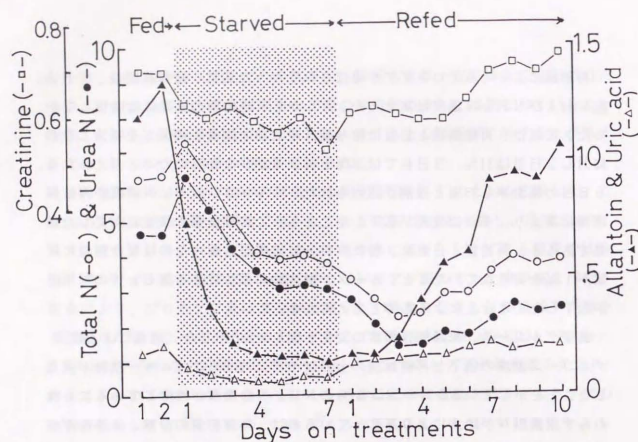


Fig. 3-3-4. Expt 2. Changes in daily urinary excretion of allantoin ( $\Delta$ , mg), uric acid ( $\Delta$ , mg), total-N ( $\circ$ , g), urea-N ( $\bullet$ , g) and creatinine ( $\circ$ , mg/kgBW) in goats during feeding, starvation and the subsequent refeeding. They were given 300 g of hay wafer and 400 g of concentrate pellet daily during feeding and refeeding periods. Each value is the mean of five goats.

実験2：尿中N成分の変化を図3-3-4に示した。これらは、メン羊を用いた松岡ら(146)の絶食試験と同様の傾向を示した。すなわち、尿中アラントイン排泄量は絶食により急激に減少したが、4日目以降においてはほぼ一定値で推移した。4日目以降のアラントイン排泄量(12-15mg/MBS/日)は、いわゆる内因性の排泄量として提案されている値の範囲内にあった(3章1節参照)。牛乳給与子ヤギと比較して1/2程度なのは、年齢、絶食に伴う体代謝全体の低下が反映したものと考えられる。

再給餌後は、尿中アラントイン排泄量は増加したものの大きな個体差が認められ、これは採食量の変化と数日の遅れで対応していた(図3-3-5)。さらに、このアラントインの変化は、試験1でのルーメン内容物の核酸含量の変化と対応する変動パターンを示した。これらから、成反芻家畜の尿中アラントイン排泄量は可消化MBP量をよく反映しているものと考えられた。

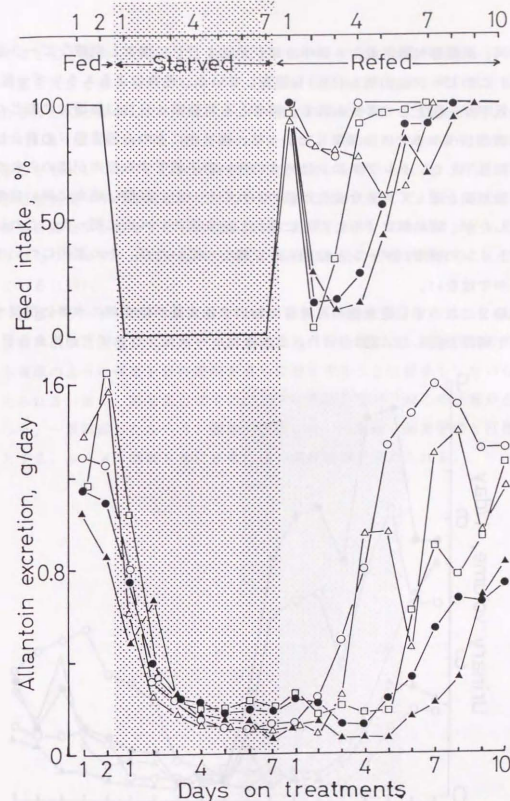


Fig. 3-3-5. Expt 2. Changes in feed consumption rate during refeeding (top) and those in urinary allantoin excretion throughout the experiment (bottom). Each symbol represents as the value of individual goat.

総N、尿素態N排泄量は5頭中3頭が絶食1日目に増加し明瞭なピークを示した。このピークは松岡ら(146)も報告している。絶食によるエネルギー供給量の低下が一因として考えられる。両者とも再給餌4日目以降増加に転じたが、絶食前のレベルまでには回復しなかった。総N中に占める尿素態Nの割合は絶食以降低下した。クレアチニンは絶食に伴い若干低下する傾向が認められたが、全実験期間を通して大きな変化は認められなかった。尿酸は絶食に伴い急激に低下したが、再給餌によりただちに増加し絶食前のレベルに戻った。これはアラントインの排泄パターンとは明らかに異なっていたが、その原因については明らかではない。

実験2においても絶食後の再給餌において採食量が絶食前の水準に回復するのに1週間を要した(図3-3-5)。これは、ルーメンプロトゾアが絶食3日目

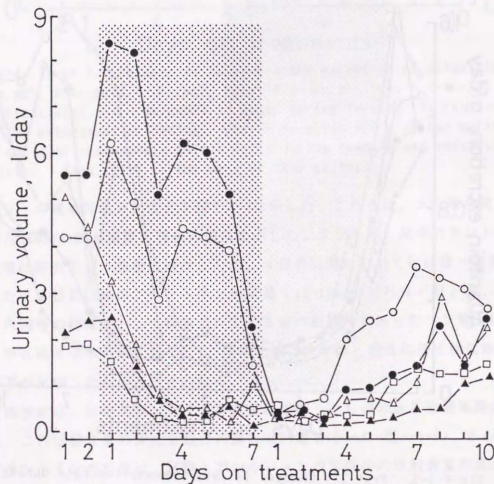


Fig. 3-3-6. Expt 2. Changes in urinary volume (ml/day) during experimental periods. Each symbol represents as the value of individual goat. The same symbol in Fig. 3-3-5 means the same individual.

でほとんど消失したように、絶食によりルーメン微生物叢が変化し(144)、その量も大きく減少したにも拘らず、再給餌1回目に絶食前と同一量を給与、これをほとんど採食したため、ルーメン機能の破綻を招いた結果と考えられる。Fowle & Church(147)は、絶食後の再給餌によりルーメン内の乳酸濃度が高まることを示しており、これが食欲低下の一因とも考えられる。彼ら(147)は、5日間絶食やぎの食欲回復には4日間必要であったとしている。また、絶食後低蛋白質乾草を給与すると食欲は直ちに回復するが、これにカゼインを添加給与したりアルファルファ乾草を与えた場合は食欲の回復が遅れることが示されている(139)。

尿量のデータ(図3-3-6)から判断すると、再給餌10日後までに飲水量も絶食前の水準に回復していない。絶食負荷後の再給餌には、高蛋白質飼料、特に本実験のように尿素を含む飼料を直ちに給与することは好ましくないものと考えられる。また、給与量も徐々に増加させることなど、細心の注意が必要であろう。一度破綻したルーメン機能の回復には、注意深い飼養管理と日数を必要とする。ルーメン機能を常に正常に保つ飼養技術が求められる。



第4節 飼料蛋白質の給与水準・ルーメンでの分解率と  
 尿中アラントイン排泄量

緒言

MBP合成における最も大きな制限因子は、微生物のエネルギー源として利用されるFOM量と、窒素(N)源となる飼料中RDP量と考えられる。事実、成反芻家畜においてエネルギー摂取量(41, 43, 46, 48-50)、乾物摂取量(42)や飼料の蛋白質水準(40, 42, 46, 48, 49, 52-55)などが、尿中アラントイン排泄量に影響することが報告されている。しかし、これらの実験ではエネルギーあるいは蛋白質の給与量が一定に設定されていないため、両者が同時に変動し、それぞれの単独の効果が必ずしも明らかにされていない場合も多い。さらに、蛋白質のルーメンでの分解率との関連についての報告(55)は少ない。

そこで、本節では飼料の給与量とエネルギー濃度を一定に設定し、飼料の粗蛋白質(CP)濃度とルーメンでの分解率が尿中アラントイン排泄量に与える影響を検討し、これらの諸要因が可消化MBPに及ぼす影響について明らかにすることを目的として実験を行った(148)。

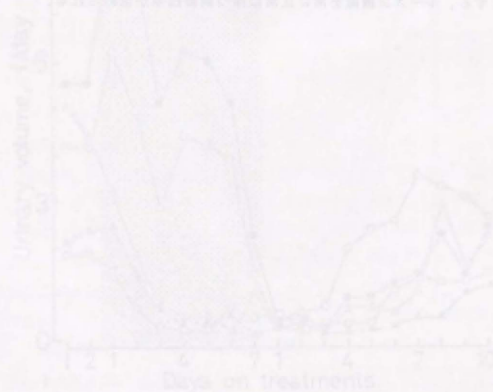


Fig. 2. Effect of dietary protein concentration on urinary volume during the first 10 days of treatment. Each symbol represents a different dietary protein concentration. The data are from Table 1 of the paper.

#### 第4節 飼料蛋白質の給与水準・ルーメンでの分解率と 尿中アラントイン排泄量

##### 緒言

MBP合成における最も大きな制限因子は、微生物のエネルギー源として利用されるFOM量と、窒素(N)源となる飼料中RDP量と考えられる。事実、成反芻家畜においてエネルギー摂取量(41, 43, 46, 48-50)、乾物摂取量(42)や飼料の蛋白質水準(40, 42, 46, 48, 49, 52-55)などが、尿中アラントイン排泄量に影響することが報告されている。しかし、これらの実験ではエネルギーあるいは蛋白質の給与量が一定に設定されていないため、両者が同時に変動し、それぞれの単独の効果が必ずしも明らかにされていない場合も多い。さらに、蛋白質のルーメンでの分解率との関連についての報告(55)は少ない。

そこで、本節では飼料の給与量とエネルギー濃度を一定に設定し、飼料の粗蛋白質(CP)濃度とルーメンでの分解率が尿中アラントイン排泄量に与える影響を検討し、これらの諸要因が可消化MBPに及ぼす影響について明らかにすることを目的として実験を行った(148)。

##### 材料および方法

動物： 実験は3回行い、それぞれ畜産試験場産の日本ザーネン種去勢ヤギ4頭ずつ(合計12頭)を用いた。実験開始時の平均体重と月齢はそれぞれ、実験1で26.7kg・10か月齢、実験2で19.2kg・8か月齢、実験3では17.0kg・8か月齢であった。各ヤギとも、室温22℃に保たれた動物室の糞尿分離可能な飼育ケージに個体別に収容し、飼育した。いずれの実験でも飼料は1日1回午前9時に給与し、飲水は自由に与えた。なお、3か月齢時に、成ヤギから採取したルーメン液をすべてのヤギに接種した。実験時には各個体ともルーメン液1mlあたり10<sup>5</sup>水準のアプトゾアが存在し、その80-90%は*Entodinium* spp.であった。

実験1: 乾物中のCP含量を14.4%、17.0%あるいは20.0%とする3種類の混合飼料(89)(表3-4-1)を、この順に連続する2週間ずつ給与した。1日あたりの給与量は600g(原物)とした。給与量は維持(149)の1.05-1.20倍と推定された。これらの飼料のTDNおよびDOM含量(乾物中)は72.0%および69.0%、蛋白質のルーメンでの推定分解率はそれぞれ、69.70.71%であった(89)。各混合飼料給与期の後半5日間に全尿を採取し、尿中N成分の分析に供した。

Table 3-4-1. Ingredient and nutrient compositions (%) of diets and amounts of intake (g/day) in Expt 1

Item	Diet		
	CP 14	CP 17	CP 20
Ingredient composition			
Alfalfa hay cube	39.5	40.6	41.0
Beet pulp	30.0	27.2	25.3
Corn	21.5	18.8	13.0
Soy bean meal	0.1	5.0	11.5
Defatted rice bran	4.4	5.0	5.0
Linseed meal	0.1	0.9	1.6
Molasses	3.0	1.0	0.9
Tallow	0.1	0.2	0.4
Others <sup>1)</sup>	1.3	1.3	1.3
Nutrient composition <sup>2)</sup>			
Dry matter (DM)	87.2	87.5	87.6
TDN in DM	72.0	72.0	72.0
CP in DM	14.4	17.0	20.0
Rumen CP degradability	69	70	71
Daily intake			
Fresh matter (FM)	600	600	600
CP <sup>3)</sup>	75.6	89.4	105
TDN <sup>3)</sup>	377	378	378
DOM <sup>4)</sup>	360	360	360

<sup>1)</sup> Dicalcium phosphate 0.4, Vitamin A, D, E mixture 0.2, Trace mineral mixture 0.2, NaCl 0.5

<sup>2)</sup> Calculated value. Details are described in the reference (89).

<sup>3)</sup> Digestible Organic Matter

実験2: イタリアンライグラス乾草ウエハーの割合を一定とし、圧片トウモロコシと大豆の配合割合を変えCP濃度を9%から20%まで5段階に設定した飼料(表3-4-2)を、CP濃度の低い順に2週間ずつ給与した。給与量は400g/日とし、維持(149)の1.07-1.18倍と推定された。なお、ミネラルブロック(日本全薬KK)を自由に与えた。TDN含量は78%ないし89%、DOM含量は73%ないし77%であった。また、大豆の割合が高まるに伴い蛋白質の推定分解率は44%から72%に増加した。そのため、RUDP給与量は18.1から19.3g/日の範囲になり、各区間の差はほとんどなかった。各期の後半5日間全糞尿を採取し、尿中N成分の分析に供した。

Table 3-4-2. Ingredient and nutrient compositions (%) of diets and amounts of intake (g/day) in Expt 2

Item	Diet				
	CP 9	CP 12	CP 14	CP 16	CP 20
Ingredient composition					
Soy bean	—	10.0	20.0	26.25	40.0
Corn	60.0	50.0	40.0	33.75	20.0
Italian ryegrass hay	40.0	40.0	40.0	40.0	40.0
Nutrient composition <sup>1)</sup>					
Dry matter (DM)	88.9	89.1	89.2	89.4	89.3
TDN in DM	81.4	78.1	82.0	81.3	88.8
CP in DM	9.0	11.8	14.5	16.3	19.9
Rumen CP degradability <sup>2)</sup>	44	56	64	67	72
Daily intake					
Fresh matter (FM)	400	400	400	400	400
CP	32.2	42.1	51.9	58.0	70.9
TDN	289	278	293	290	317
DOM	277	260	268	262	276

<sup>1)</sup> Values were determined by the digestion trial

<sup>2)</sup> See reference (89)

実験3: ルーメンでの蛋白質の分解率が比較的高い大豆粕(SBM)あるいは分解率が低いコーングルテンミール(CGM)を主な蛋白質源とした2種類の混合飼料(89)(表3-4-3)を用いた。両飼料のCP含量(18%)とTDN含量(72.5%)、DOM含量(69%)はほぼ同一とした。SBM飼料(推定分解率69%)、CGM飼料(推定分解率49%)の順に4週間ずつ、1日あたり600gを給与した。TDN給与量は維持(149)の1.40-1.60倍と推定された。各期の後半5日間に全尿を採取して、尿中N成分の分析に供した。

Table 3-4-3. Ingredient and nutrient compositions (%) of diets and amounts of intake (g/day) in Expt 3

Item	Diet	
	SBM	CGM
Ingredient composition		
Soy bean meal	12.0	—
Corn gluten meal	—	8.7
Barley	35.0	35.0
Timothy hay	30.0	30.0
Alfalfa hay cube	14.5	15.1
Beet pulp	7.1	9.8
Others <sup>1)</sup>	1.4	1.4
Nutrient composition <sup>2)</sup>		
Dry matter (DM)	87.7	87.8
TDN in DM	72.5	72.5
CP in DM	17.5	17.8
Rumen CP degradability <sup>3)</sup>	62	49
Daily intake		
Fresh matter (FM)	600	600
CP <sup>3)</sup>	91.8	94.2
TDN <sup>3)</sup>	382	382
DOM <sup>2)</sup>	363	363

<sup>1)</sup> Tricalcium phosphate 0.6, NaCl 0.4, Vitamin A, D, E mixture 0.2, Trace mineral mixture 0.2

<sup>2)</sup> Calculated value

<sup>3)</sup> See reference (89)



分析方法: 尿中のアラントイン、尿素素(N)およびクレアチニンは前節と同様の方法により測定した。尿素素Nはウレアーゼインドフェノール法(和光純薬)により求めた。本法で求めた尿素素Nにはアンモニア態Nも含まれる。実験2の飼料および糞の一般成分は常法(91)により分析し、TDNおよび可消化有機物(Digestive organic matter:DOM)量を求めた。

## 結 果

消化試験によって求めた実験2の給与飼料のTDNおよびDOM含量を、表3-4-2に示した。大豆中の粗脂肪含量が18.2%と高いため、大豆の摂取割合が40%の場合(CP20%区)では、TDN含量が89%と高くなった。脂肪はルーメンでの分解をほとんど受けず、微生物のエネルギー源としては利用されにくいので(150)、ルーメン微生物へのエネルギー供給量としてはDOMによる表現がTDNより適切と考えられる。実験1および3のDOM含量については、日本標準飼料成分表(130)から求めた計算値を表3-4-1、3に示した。

表3-4-4に実験結果をまとめて示した。

実験1のアラントイン排泄量はCP14%区、17%区および20%区とも1,100mg/日(6.9 mmol/日)前後で、CP濃度(摂取量)に拘らず一定であった。日本標準飼料成分表(117)から求めたDOM摂取量(g/日)は3区とも360gで、1gあたりの尿中アラントイン排泄量は3.12ないし3.16mgであった。

実験2では、CP9%区の尿中アラントイン排泄量が他の区に比較して有意( $p<0.05$ )に低く、CP12%区もCP14%以上の3つの区と比較して低い傾向が示された。消化試験から求めた各区のDOM摂取量(g/日)は260から280の範囲にあり、DOM摂取量1gあたりの尿中アラントイン排泄量は、CP14%以上の区で2.55-2.74mgであった。

実験3のSBM区、CGM区ともDOM摂取量は実験1の各区と同一水準にあり、SBM区の尿中アラントイン排泄量は1,077mg/日で実験1の各区とはほぼ等しかったが、CGM区では801mg/日で、実験1あるいはSBM区に比較して低い傾向が示された。DOM1gあたりの尿中アラントイン排泄量はSB

Table 3-4-4. Effects of dietary CP content and rumen degradability on the urinary excretions of allantoin(mg/day), total-N(g/day), creatinine(mg/kgBW/day) and the ratio of allantoin (A) excretion to DOM intake (mg/g) in goats

Diet	Intake(g/day)		Excretion		Creatinine		A/DOM
	N	DOM	Allantoin	Total-N	Mean	SE	
Expt 1							
CP 14(69) <sup>1)</sup>	12.08	360	Mean <sup>a</sup>	Mean <sup>a</sup>	25.3	0.7	3.17
CP 17(70)	14.28	360	1138	7.60 <sup>a</sup>	27.8	1.2	3.11
CP 20(71)	16.82	360	1123	8.43 <sup>a</sup>	25.6	0.9	3.14
Expt 2							
CP 9(44)	5.16	277	457 <sup>b</sup>	10.6 <sup>b</sup>	22.9	0.6	1.66
CP 12(56)	6.74	260	630 <sup>bc</sup>	3.11 <sup>b</sup>	23.5	0.9	2.42
CP 14(64)	8.31	268	684 <sup>b</sup>	4.01 <sup>c</sup>	22.2	1.5	2.54
CP 16(67)	9.29	262	718 <sup>bc</sup>	4.26 <sup>bc</sup>	22.6	1.2	2.75
CP 20(72)	11.35	276	726 <sup>c</sup>	6.64 <sup>d</sup>	26.4	1.6	2.63
Expt 3							
SBM(62)	14.69	363	1077	6.14 <sup>a</sup>	26.8	2.8	2.98
CGM(49)	15.07	363	801	8.66 <sup>b</sup>	26.0	2.5	2.20

1) Figures in parentheses are estimated CP degradabilities in the rumen of diets.  
2) Allantoin, total-N and creatinine excretion were expressed as mean with their standard errors of three goats. Daily intakes of N and DOM (g) and allantoin to DOM ratio (mg/g) were shown as mean value.

3) Daily amounts (g) of diets were 600, 400 and 600 in Expt 1, 2 and 3, respectively. a, b, c, d: Means within the same experiment that do not share a common superscript letter differ significantly ( $p<0.05$ )

M区では2.97mgと実験1と同一水準にあったのに対し、CGM区では2.21mgと実験2よりも低くなった。

実験1、2とも、尿への総Nおよび尿素態N排泄量は、摂取Nの増加に伴い増加した。しかし、尿素態N以外の、N排泄量には処理区間で有意差は認められなかった。体重1kgあたりの尿中クレアチニン排泄量(mg/kg/日;クレアチニン係数)は、実験1、2および3を通じて各処理間に有意差はなく、ほぼ一定であった。

#### 考 察

本実験では、DOM摂取量が各処理区間に差がなく、FOM量にも大きな差はないものと推定されること、さらにDOMあるいはTDNがルーメン発酵を正常に保ちうる濃度の上限に近いこと(11)などから、MBP合成量に最も影響を与えた因子は飼料蛋白質の濃度とルーメンでの分解率(RDP量)と考えられる。

尿中アラントイン排泄量を指標としてみると、実験1および2の条件下では飼料乾物中のCPが14%あるいは16%程度でルーメン微生物の合成量が最大に達し、CP12%ないし14%以下の場合にはCP摂取量がルーメン微生物合成の制限因子となるものと解釈される。松岡らは、DCP摂取量が要求量の24から111%(CP濃度は11%以下と推定される)に増加するのに伴って尿中アラントイン排泄量が増加すること(52)、DCP摂取量が要求量の100から300%の範囲では、尿中アラントイン排泄量に変化がないこと(53)を示した。Kreuzerら(49)はCP濃度を5から30%まで6段階に変化させた場合、アラントイン排泄量はCP11%以上では有意差がなくCP14%の時に最も高かったとしている。また、Lindberg(48)は、CP12.8%から23.5%の範囲で尿中アラントイン排泄量がDOM摂取量に比例して変動し、DOM1gあたりのアラントイン排泄量は2.79から3.46mgの範囲にあったとしている。これらは本実験結果とよく一致するが、DCP(CP)含量を高めるためにルーメンでの分解率が低いと推定される魚粉、コーングルテンなどをエネルギー源と置き換えて用いており、F

OM量やRDP量の変化が及ぼす影響について、十分な検討は行われていなかった。

また、Vercoe(42)およびTopps & Elliott(40)はCP摂取量の増加に伴い尿中へのアラントイン排泄量が増加することを示したが、彼らはCP摂取量を高めるために飼料給与量を増加させているので、必ずしもCP摂取量の増加のみがアラントイン排泄の増加に寄与したのではなく、乾物摂取量の増加に伴ったFOMとCP摂取量の平行した増加が、MBP合成量を高めたと考えられる。DOM摂取量をほぼ同一とした本実験によりCP摂取量の影響がより明確に示された。

実験3では、TDN摂取量、CP摂取量ともに等しいにも拘わらず、CGM区のアラントイン排泄量はSBM区の70%に減少した。CGM飼料のルーメンでの推定分解率はSBM飼料の80%であり(89)、MBP合成量を最大にするためのRDP量がCGM飼料では不足し、このことが尿中アラントイン排泄量の減少に反映されたものと考えられる。Laurent and Vignon(46)は可溶性N量と尿中アラントイン排泄量との間に正の相関を認めている。これらの結果は、CP濃度が14%以上の場合にも、ルーメン分解率が低い飼料では、MBP合成量が低下することを示している。

上記の推定の妥当性について考察してみる。

本実験では直接ルーメン内のMBP量を求めていないが、Stern & Hoover(34)は、ルーメン微生物の生産量を求めた64の実験から、FOM100gあたりのMBP生産量として6.3から30.7g(平均16.9g)を示している。また、Hagemisterら(10)は、泌乳牛を用いた実験から、FOMとDOMとの間には $FOM = 0.7DOM - 0.68$ の関係が成立し、FOM100gあたり22.1gのMBPが合成されるとしている。これ(10)を実験1、3にあてはめると、合成可能なMBP量は55g程度と推定される。CPのルーメン分解率が75%の場合にはCP濃度が14%で55gのRDPがルーメンに供給されるが、50%の場合にはCP濃度が21%以上でないと供給できない。これは、CGM飼料給与においてRDPの供給量が不足したとの考察とよく一致する。同様に、実験2では分解率を考慮するとCP14%以下の時にはルーメンに供給されるRDP量が不足することが示される。



一方、1節の回帰式を実験1のアラントイン排泄量にあてはめると、下部消化管に達したプリン塩基量は約2.2gと推定される。ルーメン微生物中の核酸含量を15から20%とすると(13, 70, 134)、下部消化管へのMBP流入量は45ないし60gとなる。この値はFOMからの推定値と同一範囲にある。このことは、尿中アラントイン排泄量が下部消化管で消化吸収されるMBP量推定の指標として有効であることを示している。

反芻家畜の尿中アラントインはおもにルーメン微生物の核酸に由来しており(68, 96-98, 136, 137)、RNAをルーメンでの微生物合成の指標とする場合と同様、アラントイン排泄量を指標とする場合にも、MBPと核酸の比が飼料やルーメン内環境により変動することが不正確さの一因となりうる。しかし、本節では、供試動物の条件、飼料の給与水準や給与方法などがそれぞれの実験ではほぼ一定であり、ルーメンプロトゾアの構成も変らなかったことから、微生物体中の塩基含量やその下部消化管への流出速度、消化率が大きく異なるとは考えられない。したがって、本実験の尿中アラントイン排泄量の変動は、可消化MBP量の変動を反映したものと判断される。

クレアチニン係数は実験を通じて大きな変動はなく、アラントインとクレアチニンの比を考えれば部分尿での評価も可能と考えられる(45, 48, 51)。この点に関しては、第6章で改めて論ずることとする。

## 第5節 低蛋白質飼料摂取時における可消化有機物摂取量と

尿中アラントイン排泄量との関係

### 緒言

飼料中の可消化有機物(DOM)濃度がMBP合成の制限因子にならない条件下における飼料の蛋白質あるいはRDP濃度と尿中アラントイン排泄量との関係について、前節まで検討してきた。その結果、RDP濃度がルーメン微生物のN要求量を満たす範囲内では、RDP濃度を高めてもMBP生産量は増加しないこと、すなわち、DOM摂取量がMBP生産の制限因子となることを明らかにした。本節では、低蛋白質飼料摂取時におけるDOM摂取量と尿中アラントイン排泄量との関係を、これまで述べてきた一連の実験および第4章の実験結果を踏まえて検討、考察することとした(137)。

### 材料および方法

低蛋白質、低DOM濃度飼料摂取時の尿中アラントイン排泄量の変動に関しては実験を実施していないので、Elliott & Topps(151)およびTopps & Elliott(40)のデータを引用し、検討した。彼らは、実験動物として18か月齢から3才の去勢メス羊16頭(体重19から49kg)を用い表3-5-1に示した16種の飼料を自由採食させ、尿中のN諸成分を分析している。

本論文で実施した第3章4節実験および第4章1節、4節についての結果を参考のため表3-5-2にまとめて示した。

### 結果と考察

本論文で実施した実験では(表3-5-2)、ルーメン微生物へのN供給量が十分と考えられるCP濃度範囲では尿中アラントイン排泄量はDOM摂取量に比例しており、DOM摂取量と尿中アラントイン排泄量の比(mg/g)は、ほぼ3前後になった。Lindberg(48)も泌乳ヤギを用いた実験において、DOM摂取量800

から1800g/日の範囲で同様の値を示しており、この比の値はルーメン微生物の機能発揮やMBP合成に十分なNが供給されているかの指標の一つとなるものと考えられる。表3-5-1の中でRDPが不足すると判断される飼料ではこの比が低下している。

低蛋白質・低DOM飼料については Elliott & Topps (151) および Topps & Elliott (40) のデータを用いたが、彼らの報告には有機物としての摂取量や消化率が示されていないので、便宜的に乾物の摂取量と消化率をもちいて可消化乾物量 (Digestible dry matter intake: DDMI) を求め、アラントイン排泄量との関係について表3-5-1に示した。

Table 3-5-1. Relationship between digestive dry matter intake (DDMI) and urinary allantoin excretion in sheep fed low protein diets. Data were summarized from the experiments of Elliott & Topps (151) and Topps & Elliott (40).

Diet	CP in diet	CP DNI <sup>1)</sup>	N retention	DDMI	Allantoin	A/DDMI <sup>2)</sup>
	(%)		(g/day)	(mg/day)	(mg/g)	
A	4	0.67	-0.54	246	564	2.29
	6	3.85	2.19	427	1016	2.38
	8	9.70	4.61	624	2060	3.30
	10	13.84	5.32	647	1918	2.97
B	4	0.04	-1.35	160	621	3.88
	6	2.88	0.73	323	847	2.62
	8	5.03	0.87	322	990	2.45
	10	7.68	0.69	299	959	3.21
C	4	-0.28	-1.72	144	423	2.94
	6	1.96	-0.73	276	762	2.76
	8	2.34	-0.65	246	593	2.41
	10	5.71	0.25	346	988	2.86
D	2.6	-0.40	-1.89	81	282	3.47
	3.5	-0.60	-2.00	171	451	2.64
	5.5	1.47	0.08	284	677	2.38
	8.2	2.91	10.43	343	1044	3.04

Diet A; Equal parts of roughage (Rhoes grass hay) and concentrate (cassava, maize meal, groundnut cake).

B; 6 parts of roughage with 1 parts of concentrate.

C; All roughage (Rhodes grass and Lucerne hay)

D; Cut and dried Veldt grass (differ in harvesting time)

1) Digestible nitrogen intake.

2) The ratio of urinary allantoin excretion to DDMI (mg/g).

DOM摂取量のかわりに乾物摂取量を用い、ルーメンでの有機物の分解率をグループAでは65%、B-Dでは60%、蛋白質のルーメンでの分解率を70%、FOM100gあたりのMBP生産量を22.1gなどと仮定すると、彼らの実験ではC P摂取量がMBP生産量の制限因子と推定される場合が多く、エネルギーの摂取量が制限因子となるのはグループB、DのC P10%、グループCのC P8、10%の場合と推定された。

Table 3-5-2. Relationship between daily DOM intake (g/day) and urinary allantoin excretion (mg/day).

Expt.	CP (DM%)	Fauna DOM intake	Allantoin	A/D <sup>1)</sup>	
Chapter3-Section5					
Expt 1	14.4	Mix <sup>2)</sup>	360	1140	3.17
	17.0	Mix	360	1120	3.11
	20.0	Mix	360	1130	3.14
Expt 2	9.0	Mix	277	460	1.66
	11.8	Mix	260	630	2.42
	14.5	Mix	268	680	2.54
	16.3	Mix	262	720	2.75
Expt 3	19.9	Mix	276	726	2.63
	17.5 (SBM)	Mix	363	1080	2.98
	17.8 (CGM)	Mix	363	800	2.20
Chapter4-Section1					
Expt 1	14.4	PF <sup>3)</sup>	668	2292	3.43
	14.4	Mix	704	1972	2.80
	14.3	PF	491	1691	3.44
	14.3	Mix	517	1611	3.12
Expt 2	12.8	PF	497	1375	2.77
	12.8	Mix	508	1129	2.22
	15.1	PF	487	1612	3.31
	15.1	Mix	507	1079	2.12
	17.0	PF	523	1697	3.24
	17.0	Mix	505	993	1.97
Chapter4-Section4					
Expt 1	11.7	PF	327	1133	3.47
	11.7	Epi <sup>4)</sup>	325	1105	3.40
	11.7	Das <sup>5)</sup>	326	907	2.78
Expt 2	18.2	PF	328	1118	3.41
	18.2	Epi	326	1035	3.18
	18.2	Das	323	984	3.04

1) The ratio of urinary allantoin excretion (mg/day) to digestible organic matter intake (g/day).

2) Faunated (mixed ciliated protozoa) goats.

3) Protozoa-free goats.

4), 5) Goats with *Epidinium caudatum* and *Dasytricha ruminantium* as single species of ciliate, respectively.



彼らのデータの特徴は、エネルギー摂取量が制限因子になるケースは少ないにも拘らず、CP濃度の増加に伴いA/DDMI比が高まるのはA飼料区のみであり、他の3飼料区ではCP4%のA/DDMI比が最も高く、6%でも高い傾向を示したことにある。A区あるいはCP8ないし10%区の変化は、これまで議論してきたルーメン微生物に供給されるNとエネルギーの関係から説明可能であるが、より低CP濃度における結果は一見これらと矛盾するように見える。

A/DDMI比が高いのは、総アラントイン排泄に占める内因性アラントイン排泄の割合が大きくなった結果と考えられる。これは、本章3節において示したように絶食時においても一日に150mg前後のアラントイン排泄が認められたことから支持される。絶食時には計算上A/DDMI比は無限大となるはずである。

Chenら(58)は、最近、第3章1節でも述べたようにメン羊では可消化アリン塩基量(X; mmol/day)と尿中プリン代謝物排泄量(Y; mmol/day)との間に $Y = 0.84X + 0.15MBSe^{-0.25X}$ の関係が成立することを報告している。この関係式は可消化アリン塩基量、すなわち、可消化MBP量の減少に伴い内因性のプリン代謝物量の割合が高まることを示しており、低蛋白質飼料摂取におけるA/DDMI比の上昇は、内因性アラントイン排泄量の割合の増加が原因とする推論を支持するものである。

低蛋白質飼料(特に粗飼料)給与時見かけのDNIが負になっているが、これは反芻家畜では代謝性糞中N(Metabolic fecal nitrogen:MFN)排泄量にルーメン微生物由来のN含まれ、MFN量が5gN/kg・乾物摂取量程度(152)と単胃動物に比較して高くなるためである。そのため、摂取飼料のCP濃度が3%前後以下では見かけのN消化率は負となる、すなわちDNIは負となる。実験動物の体重などの条件から、彼らが供試した動物の絶食時のアラントイン排泄量は我々が絶食試験で得た値と大差ないものと考えられるので、可消化N摂取量(Digestible nitrogen intake:DNI)が負の飼養条件下でもルーメンMBPの合成が行なわれ、これに由来する尿中アラントイン排泄が存在したものと考えられる。(なお、見かけの消化率と真の消化率との関係については第4章2節で詳しく論ずることとする。)

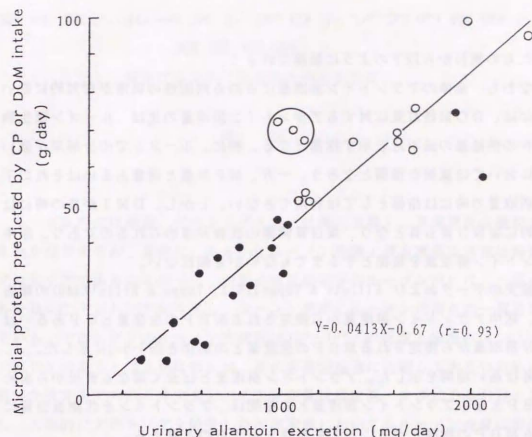


Fig. 3-5-1. Relationship between urinary allantoin excretion (mg/day) and the amount of rumen microbial protein predicted by CP or DOM intake. ●: Data from Topps and Elliott, ○: data from this thesis.

The following assumptions form the basis for estimating microbial protein.

For energy

$$FOM = 0.70 \times DOMI - 0.68$$

$$100 \text{ g FOM} = 22.1 \text{ g microbial protein}$$

(FOM: Fermentable organic matter,

DOMI: Digestible organic matter intake)

For nitrogen

Thirty-five % of dietary CP escapes degradation in the rumen.

Sixty-five % of dietary CP passes through the rumen ammonia pool.

The amounts of N recycled into the rumen is equal to 12 % of dietary CP intake. All of them pass through the ammonia pool. Ninety % of all ruminal ammonia produced is incorporated into microbial CP when the diet fed does not exceed the upper limit value.

The amount of microbial protein was calculated by the above two methods, by energy supply or by nitrogen supply. Lesser value of two methods was used as predicted value.

これらの検討から以下のように結論されよう。

すなわち、全体のアラントイン排泄量に占める内因性の排泄が相対的に低い場合には、DOM摂取量に対するアラントイン排泄量の比は、ルーメン微生物へのNの供給量の過不足を示す指標となる。特に、ルーメンでの分解率が低い飼料においては重要な指標となろう。一方、MFN量と同量あるいはそれ以下のN摂取量の時には指標としては利用できない。しかし、DMIが負の時には必然的に蓄積N量も負となり、蛋白質栄養の改善が求められるのであり、尿中アラントイン排泄量を指標とするまでもないかも知れない。

本論文のデータおよび Elliott & Topps (151)、Topps & Elliott (40)の報告から、尿中アラントイン排泄量から推定されるMBPの生産量とC/PあるいはDOM摂取量から推定されるMBPの生産量との関係を図3-5-1に示した。この両者は高い相関を示した。アラントイン排泄量とは全く異なる前提から求めたMBPと尿中アラントイン排泄量との相関は、アラントインを代謝蛋白質に占めるMBPの指標とすることの妥当性を示すものと言える。

また、この回帰から上に外れる場合については予想されるMBP合成量に比較し、アラントイン排泄量が少ない、すなわち実際の合成量が少ないことを示唆している。例えば、図の丸に囲まれたポイントである。これは、第4章1節実験2のプロトゾア存在区のデータで、原因についてはそこで論じることとするが、回帰から外れる場合にはそのポイントの飼養条件を検討することにより、より合理的な飼養方法の開発に繋がる可能性がある。

## 第4章 ルーメンプロトゾアの存否と窒素代謝

尿中アラントイン排泄を中心として

### 緒 論

ルーメン内には細菌、プロトゾア（多くは纖毛虫類）、真菌類等多種類の微生物が共存するが、量的に、あるいはルーメン発酵上最も重要な存在は細菌とプロトゾアである(35, 60-63)。一般の成反刍家畜のルーメン内には、一部の例外を除いてプロトゾアが生息し、ルーメン発酵、ルーメン内消化の一翼を担っている。プロトゾアのルーメン内密度は $10^5$ — $10^6$ /ml程度と細菌の $10^8$ — $10^{11}$ /mlに比較するとはるかに低いが、その容積が細菌に比較して大きいため、一般的な共存系でのバイオマスとしての存在量はほぼ同一水準にある(35)。しかし、人為的にプロトゾアを除去した反刍家畜においてもルーメン発酵は維持され、正常な成長、生産が可能であり、プロトゾアの存在は宿主である反刍家畜にとって必須ではない。そのため、その存在の意義と家畜の生産性との関連をめぐり多くの議論があり、実験がなされてきた(35, 60-63)。

最近、両者がルーメン内に存在すると同様の割合では下部消化管に流下しないこと、すなわち、プロトゾアの流下量が細菌に比較して少ないことが指摘された(153-155)。このことについては異論(156)もあるが、ほぼ定説となっている。また、プロトゾアの存在は細菌数を減少させる(157-160)。これらの事実は、プロトゾア共存系では下部消化管に流下するMBP量が減少することを示唆する。このことはプロトゾア不在の場合には尿中へのアラントイン排泄量が増加することを予想させるが、ルーメンプロトゾアの存否と尿中アラントイン排泄量との関係についてはほとんど検討されていない。

一方、プロトゾア不在により、糞中へのNの排泄量が増加し、見かけの消化率が低下する傾向が示されている(158, 161)。一般に、プロトゾアはルーメンでの蛋白質や有機物・セルロースの分解を促進し、 $\text{NH}_3\text{-N}$ 濃度を高めるが、一方で、ルーメンからの飼料蛋白質の流出量を減少させることが指摘されてい



る(35, 60-63)。これらのことから、プロトゾア不在の場合には、第四胃以下の下部消化管に流下するMBP量および飼料蛋白質量が増加するものの、消化率が低下し糞中へのN排泄量が増加する結果、第四胃以下に流下するN量の増加がN蓄積の増加に必ずしも結びつかない可能性が示唆される。これは、下部消化管に達するN化合物の化学組成がルーメンプロトゾアにより影響を受け、その消化性が変化するためとも考えられる。

ルーメンプロトゾアの存否と尿中アラントイン排泄量との関係を、糞中のN成分などの変動と合せて検討することから、ルーメンにおけるN代謝に及ぼすプロトゾアの影響をより明確にできるものと考えられる。

ところで、プロトゾアの機能と役割を研究している実験の多くは、混合系のプロトゾア群をもつ動物を用いており、特定の種・属のルーメン機能における役割、影響をin vivoで検討した報告(162-165)は少ない。尿中アラントイン排泄との関連についての研究はほとんどみあたらない。

本章では、尿中アラントイン排泄量に及ぼす混合系のプロトゾアの影響を、他のN代謝と同時に検討するとともに(166)、in vivoにおいて特定の種・属のプロトゾアが存在する系を新たな方法で作出し、その影響をプロトゾア不在の、あるいは混合プロトゾアの場合と比較検討した(165)。

## 第1節 混合プロトゾアが尿中アラントイン排泄に及ぼす影響

### 緒言

本節では、混合プロトゾアが尿中アラントイン排泄量に及ぼす影響を、給与飼料条件を変えて検討した(166)。

### 材料および方法

実験1： 実験開始時10か月齢(4か月齢時に去勢)の日本ザーネン種去勢ヤギ6頭(平均体重35.6 kg)を用いた。各個体とも生後3日目に母ヤギより隔離し、接触によるプロトゾアの感染を防止しながら育成した。このうち3頭については、5ないし6週齢時にルーメンフィステル装着成ヤギより採取したルーメン内容液を接種し、プロトゾアを定着させた(Faunated, Fヤギ)。他の3頭はそのままプロトゾア不在で維持した(Unfaunated, Uヤギ)。各個体とも室温24℃に保った飼育室のお互いに接触できない糞尿分離可能な代謝ケージに収容し、1期3週間の代謝試験を2期行なった。

実験の概要を図4-1-1に示した。

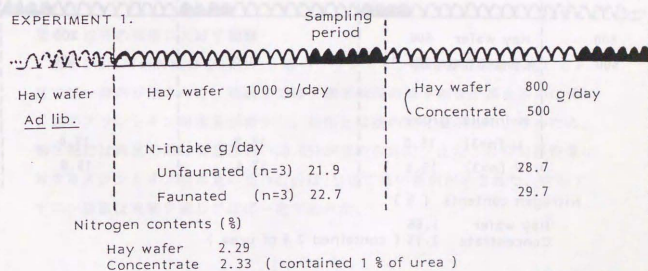


Fig. 4-1-1. Experimental schedule of Expt 1.

第1期には1日1頭あたりオーチャードグラス 乾草ウエハー1000gを、第2期には乾草ウエハー 800 gと濃厚飼料ペレット 500 g(表4-1-1)をそれぞれ3週間給与し、各期の後半1週間全糞尿を採取してN成分の分析に供した。各期の最終日の給餌 0、0.5、1、1.5、2、4 および 6 時間後に頸静脈血を採取し血漿尿素態Nとグルコース濃度を測定した(161)。また、給餌4時間後には採血後ルーメン内容物をカテーテルを用いて採取し、ルーメン液中の $\text{NH}_3\text{-N}$ 濃度、VFA組成、プロトゾア数を測定した(161)。なお、給餌は午前9時に行い、水とミネラルブロックは全期間を通じて自由に与えた。表4-1-1に飼料の一般成分を示した。

実験2： 7-8か月齢の日本ザネン種ヤギ6頭を用いた。実験1と同様の方法により3頭はUヤギ、他の3頭はFヤギとした。これにイタリアンライグラス乾草と配合飼料ペレット(表4-1-1)を、1日あたりそれぞれ600g-200g、400g-400g、200g-600g、連続した3期間2週間ずつ与え、各期の後半4日間全糞尿を採取し分析に供した(図4-1-2)。なお、各期の最終日の給餌開始4時間後にルーメン内容物と頸静脈血を採取し、ルーメン $\text{NH}_3\text{-N}$ と血漿尿素態Nを測定した。

#### EXPERIMENT 2.

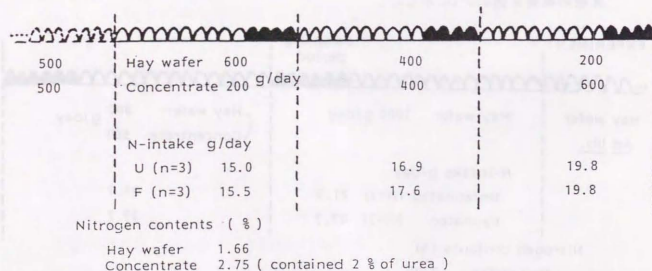


Fig. 4-1-2. Experimental schedule of Expt 2.

分析方法： 糞は60℃で24時間通風乾燥し、風乾物とした後、粉碎し一般成分の分析(91)に供した。

Table 4-1-1. Chemical and Ingredient Compositions (g/kg) of Diets Used in the Experiments

Item	Expt 1		Expt 2	
	Orchard grass hay	Conc. 1)	Italian Ryegrass hay	Conc. 2)
Dry matter (DM)	877	886	924	902
Crude protein (CP)	143	145	103	172
Crude fiber (CF)	239	48	221	50
N-free extracts (NFE)	360	611	486	592
Ether extracts	27	25	29	28
Crude ash	108	57	85	61

- 1) Concentrate pellet given in Expt 1 provide (g/kg): milo 300, barley 200, maize 200, wheat bran 100, alfalfa meal 100, molasses 55, urea 10, vitamins & minerals 35 (See Table 3-3-1).
- 2) Ingredient composition of the concentrate pellet given in Expt 2 was the same as that given in Expt 1 except for the contents (g/kg) of molasses and urea were 45 and 20, respectively.

#### 結 果

尿中N成分の排泄に及ぼす影響

表4-1-2に尿中N成分を示した。尿中アラントイン排泄量は実験を通じてF区で低い傾向が示された。実験2では、濃厚飼料の給与割合が高まるのに伴いF区のアラントイン排泄量が減少し、U区とは逆の変化を示した。そのため、第3期には両区間に有意差( $p < 0.05$ )が認められた。また、DOM摂取量に対するアラントイン排泄量の比(mg/g)は、U区で高い傾向が示された。クレアチニン係数は実験を通じてほぼ一定であった。



Table 4-1-2. Effect of ciliate protozoa on the urinary excretion of allantoin (mg/day), total-N (g/day), creatinine (mg/kgBW/day) and allantoin/DM (mg/g) in goats

		Fauna	N	Intake		Allantoin		Excretion		Creatinine		A/DM <sup>3)</sup>
				DOM <sup>2)</sup>	DOM <sup>2)</sup>	Mean	SE	Total-N	Mean	SE		
Expt 1	Period 1	U	21.86	491	1691	211	9.31	0.61	27.3	1.0	3.44	
		F	22.65	517	1611	124	10.67	0.34	27.1	0.9	3.12	
	Period 2	U	28.73	668	2292	242	11.48	0.67	27.1	0.8	3.43	
		F	29.65	704	1972	158	13.38	1.16	24.4	2.2	2.80	
Expt 2	Period 1	U	14.99	497	1375	31	6.15	0.57	26.6	1.2	2.77	
		F	15.41	508	1129	96	5.66	0.59	25.3	1.8	2.22	
	Period 2	U	16.86	487	1612	275	6.87	0.67	27.1	1.4	3.31	
		F	17.59	507	1079	86	7.28	0.59	27.1	1.9	2.12	
Period 3	U	19.77	523	1637 <sup>a</sup>	64	8.92	0.48	26.6	0.5	3.24		
	F	19.77	505	993 <sup>b</sup>	32	9.14	0.25	27.0	1.2	1.97		

1) U: Unfaunated goats, F: Faunated goats.

2) DOM: Digestible organic matter intake (g/day) determined by digestible experiments.

3) A/DM: The ratio of urinary allantoin excretion to digestible organic matter intake (mg/g).

In Expt 1, 1000g of hay, and 800g of concentrate (containing 1% of urea) were given daily, in Period 1 and 2, respectively. In Expt 2, daily amounts (g) of hay and concentrate (containing 2% of urea) fed were 600-200, 400-400 and 200-600 in Period 1, 2 and 3, respectively.

Allantoin, total-N and creatinine excretion were expressed as mean with their standard errors of three goats. Intakes of N and DOM (g/day) and allantoin to DOM ratio (mg/g) were shown as mean value.

a, b: Means within the same Period that do not share a common superscript letter differ significantly ( $p < 0.05$ ).

消化率、N出納に及ぼす影響

試験1の1期、2期ともに、粗脂肪、粗繊維、NFEの消化率には両区間でほとんど差は認められなかったが、CPの消化率はFヤギがUヤギに比較し高い傾向が示された(表4-1-3)。DMの消化率は実験2の第1期を除いてFヤギで高い傾向を示した。これはUヤギにおいて残飼が生じたためであり、プロトゾアの存在が採食量を高める可能性を示唆している。また、粗繊維の消化率は濃厚飼料の給与割合が高まるとともに低下した。プロトゾア、特に *Entodinium* spp. は繊維の消化率を高めるとの報告が多く(62)、実験1の第2期でその傾向が認められたが、実験全体を通してその傾向をはっきり確認することはできなかった。

Table 4-1-3. Effect of rumen ciliate protozoa on the apparent digestibilities of dry matter (DM), crude protein (CP), crude fiber (CF), nitrogen-free extracts (NFE) and ether extracts (EE).

Treatment		DM		CP		CF		NFE		EE	
Expt 1											
Period 1	U	64.2	2.2	58.0	1.7	71.7	3.0	62.0	1.6	67.3	2.1
	F	65.4	0.6	63.4	1.6	70.3	1.4	62.8	0.9	68.8	1.2
Period 2	U	65.8	1.1	58.7	1.1	56.5	4.1	70.0	2.0	74.4	0.4
	F	67.1	0.9	64.1	2.3	60.1	1.3	67.4	1.1	73.6	0.0
Expt 2											
Period 1	U	75.1	1.2	66.3	1.7	70.6	2.3	82.8	1.0	72.5	2.0
	F	74.5	0.4	69.0	0.2	67.8	0.4	81.8	0.5	74.8	1.2
Period 2	U	75.8	1.2	69.4	0.6	65.1	2.7	82.7	0.9	74.0	3.0
	F	76.6	1.1	74.1*	1.2	66.4	3.0	82.3	1.0	78.3	0.5
Period 3	U	80.1	0.8	79.9*	0.2	57.1	3.9	86.4	0.8	82.4	0.4
	F	77.2*	0.1	77.8*	0.7	52.6	1.0	83.6*	0.4	83.1	0.5

U: Unfaunated goats, F: Faunated goats.

a: Mean  $\pm$  standard error of mean (n=3).

\*, Significantly different from the U-goats ( $p < 0.05$ ).

FヤギではCPの消化率が高く糞中N排泄量が減少したが、尿中総N排泄量が増加する傾向が示され、N蓄積量には差は認められなかった(表4-1-4)。この点については次節でさらに検討することとする。尿素態Nは総Nと比例して変動した。尿中への尿素態N排泄の増加はルーメンNH<sub>3</sub>-Nの増加の結果と考えられる。

Table 4-1-4. Effect of ciliate protozoa on nitrogen metabolism of goats.

Treatment		N-intake		Fecal N		Urinary N		N retention	
Expt 1									
Period 1	U	21.86	0.46	9.20	0.56	9.31	0.61	3.36	0.58
	F	22.65	0.15	8.30	0.40	10.67	0.34	3.68	0.57
Period 2	U	28.73	0.68	11.85	0.37	11.48	0.67	5.40	1.23
	F	29.66	0.11	10.66	0.71	13.38	1.16	5.62	0.95
Expt 2									
Period 1	U	14.99	0.41	5.03	0.14	6.15	0.57	3.81	0.61
	F	15.41	0.00	4.78	0.03	5.66	0.59	4.97	0.60
Period 2	U	16.86	0.73	5.17	0.31	6.87	0.68	4.82	0.50
	F	17.59	0.00	4.56	0.21	7.28	0.59	5.75	0.39
Period 3	U	19.77	0.00	3.97	0.05	8.92	0.48	6.89	0.47
	F	19.77	0.00	4.40*	0.13	9.14	0.25	6.23	0.38

Each value expressed as mean  $\pm$  standard error of mean (n=3).

Nitrogen values are in g/day.

U; Unfaunated goats, F; Faunated goats

\*; Significantly different from the U-goats ( $p < 0.05$ ).

ルーメン発酵と血漿成分に及ぼす影響

試験1、2ともルーメンプロトゾアの80%以上は *Entodinium* spp.であり、実験1(表4-1-5)では濃厚飼料の供給(第2期)により3倍程度に増加した。この濃厚飼料の供給によるプロトゾア数の増加は従来からよく知られている(167, 168)。FヤギではルーメンVFAのうちプロピオン酸のモル比率が低く、酪酸のモル比率は高くなった。また、 $\text{NH}_3\text{-N}$ 濃度も高まる傾向が示された。これらは従来の報告と一致する(62)。また、実験1の第2期、実験2(表4-1-5)の2、3期にはFヤギの $\text{NH}_3\text{-N}$ 濃度がUヤギに比較して有意に高くなった。これは、一つにはプロトゾアが高い蛋白質分解活性を持つこと(169-171)、さらに、濃厚飼料に含まれていた尿素から急速に発生する $\text{NH}_3\text{-N}$ の利用がプロトゾアの存在により低下したこと(172)などが原因と考えられる。

実験1(図4-1-3)では血漿尿素態N濃度に差が認められなかったが、実験2(表4-1-6)ではFヤギが高まる傾向が示された。これは、ルーメン $\text{NH}_3\text{-N}$ 濃度が反映した結果と考えられる。

Table 4-1-5. Effect of ciliate protozoa on molar proportions of volatile fatty acids (%) and concentration of ammonia-N (mg/100 ml) in rumen fluid of goats! (Mean values with their standard errors for three goats)

Expt 1 Period	Group	No. of protozoa in rumen fluid ( $\times 10^9/\text{ml}$ )	Molar proportions of VFA								Ammonia-N		
			Acetic		Propionic		Butyric		Others				
			Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE	
			Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE	
1	Faunated	4.5	0.7	64.4	1.2	20.8	1.4	10.9	1.5	3.8	0.8	5.1	0.9
	Unfaunated	—	—	64.5	2.3	22.8	3.6	8.2	2.6	4.5	0.9	2.5	0.6
2	Faunated	12.0	1.8	60.7	1.6	22.4	1.3	13.0	1.6	3.9	0.5	12.4*	1.5
	Unfaunated	—	—	59.3	1.5	27.0	1.2	9.5	1.0	4.2	0.5	6.9*	1.4

\*Means within experiments that do not share a common superscript letter differ significantly ( $P < 0.05$ ).

!Samples were taken 4 h after feeding.

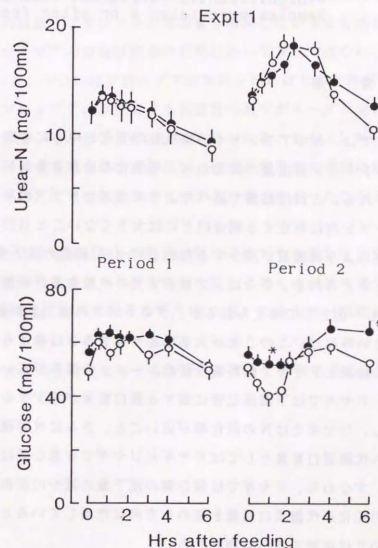


Fig. 4-1-3. Time course of concentrations of plasma urea-N (top) and glucose (bottom) after feeding in faunated (-●-) and unfaunated (-○-) goats. Values are means for three goats with their standard errors.

\*; Significantly different from the comparable unfaunated value ( $p < 0.05$ ).



Table 4-1-6. Effect of ciliate protozoa on the concentrations of rumen  $\text{NH}_3\text{-N}$  and plasma urea-N in Expt 2.

Period	Protozoa	Rumen NH <sub>3</sub> -N		Plasma urea-N	
		mgN/100ml			
1	U	5.4	2.3a	10.8	1.2
	F	11.3	2.7	14.6	1.5
2	U	16.0	4.3	13.9	0.9
	F	31.4	1.7*	17.7	2.6
3	U	16.6	5.4	17.0	2.4
	F	51.4	6.9*	19.5	2.4

a: Mean  $\pm$  standard error of mean (n=3).  
 \*: Significantly different from the U-goats.  
 Samples were taken 4 hr after feeding.

## 考 察

ここでは、尿中アラントイン排泄量の変化を中心に考察することとする。

アラントイン排泄量の変化から、可消化のMBP量がFヤギで少ないことが示唆される。これは緒論で述べたように、プロトゾアのルーメンからの流出量がルーメン内に存在する割合ほどには大きくないこと(153-155)、プロトゾアが存在により細菌数が減少するため(157-160)細菌の流下量が減少することが原因と考えられる。さらに、プロトゾアの核酸含量が細菌に比較して低いこと(150)も一因として考えられるが、プロトゾアの流下量が細菌のそれに比較して小さい時には、このことが大きな寄与をするとは考えられない。

この結果とFヤギで飼料蛋白質のルーメン分解率が高いことを考え合わせると、Fヤギでは下部消化管に達する蛋白質量が減少することが推定される。しかし、UヤギではNの消化率が低いこと、さらにN蓄積量に有意差がないことから代謝蛋白質量としてはFヤギとUヤギで有意な差はないものとも推定される。すなわち、Fヤギでは蛋白質の流下量の減少の反面、アミノ酸組成や消化率の変化が代謝蛋白質量を高める方向に作用していると考えられる。この点については次節でさらに検討する。

実験2のUヤギの尿中アラントイン排泄量は、第1期で低く、第2期と第3

期の間には差がなかった。DOM摂取量は各期間に差はなかったため、CP含量が第1期で低かったことがアラントイン排泄量減少の原因として考えられる。これらの結果は、前章までの実験結果とよく一致する。

しかし、FヤギではUヤギとは対照的にCP摂取量の増加に伴い尿中アラントイン排泄量が低下する傾向が示された。実験2に用いた濃厚飼料ペレットには尿素が2%含まれており、濃厚飼料の摂取量の増加に伴い尿素摂取量と摂取総Nに対する尿素由来Nの割合が増加した。この結果、Fヤギでは第2、3期においてルーメン $\text{NH}_3\text{-N}$ 濃度が有意( $p < 0.01$ )に高まった(表4-1-6)。一方、Uヤギでは有意な変化は認められなかった。このことから、 $\text{NH}_3\text{-N}$ の利用がFヤギでは不十分であったためCP摂取量が増加したにも拘らずMBP合成量が増加せず、その結果、アラントイン排泄量も増加しなかったものと考えられる。これは、プロトゾアが存在が尿素の利用において有効ではないとの報告(172)と一致している。一つにはプロトゾアが $\text{NH}_3\text{-N}$ をほとんど利用しないこと(35)、さらにプロトゾアが存在による細菌数の減少がルーメン全体の $\text{NH}_3\text{-N}$ 利用率の低下を招いたことなどが原因と考えられる。ルーメン $\text{NH}_3\text{-N}$ 濃度の上昇にもかかわらず有意な尿中尿素態N、血漿尿素態Nの増加は認められなかった。このことはF区では尿素Nのリサイクル率が高まったためと考えられる。

実験2で認められたような $\text{NH}_3\text{-N}$ の同化が著しく低下する場合などを除けば、プロトゾアの存否などのルーメン微生物叢の変化そのものが尿中アラントイン排泄量に及ぼす影響は、飼料の給与水準や蛋白質、エネルギー摂取量が及ぼす影響ほどには大きくないものと考えられる。しかし、プロトゾアがルーメンでのN代謝や反刍家畜の生産性に与える影響について、今後のさらに詳細な検討が必要であろう。

## 第2節 反芻家畜におけるアミノ酸の見かけの消化率測定の意義と

### 混合プロトゾア存否の影響

#### 緒 言

これまでの議論で、下部消化管に達するN化合物の化学組成がルーメンプロトゾアの影響を受け消化性が変化するため、Fヤギでは下部消化管に流下する蛋白質量が減少するにも拘らず代謝蛋白質量には差がないと推論した。もしそうであれば、Uヤギにおける糞中N排泄量の増加にはアミノ酸排泄量の増加が伴っているはずである。そこで、前節実験1について飼料アミノ酸の見かけの消化率を求め、さらにその持つ意義について考察した(173)。

#### 材料および方法

給与飼料中のアミノ酸含量は表4-2-1に示した。また、ルーメン細菌とプロトゾアのアミノ酸組成については文献値(174)を参考のため再録した。

Table 4-2-1. Amino acids composition of rumen bacteria and protozoa (from Ørskov<sup>174</sup>) and of the diets given to goats in Periods I and II (Values are expressed as g amino acids/100 g total amino acids)

	Bacteria	Protozoa	Period I	Period II
Lysine	8.8	10.4	4.7	4.3
Histidine	2.2	1.9	1.9	2.2
Arginine	5.4	4.7	6.0	6.1
Aspartic acid	11.6	13.7	12.2	10.6
Threonine	5.6	5.2	5.2	4.7
Serine	4.3	4.4	4.8	4.8
Glutamic acid	13.1	14.6	14.1	16.8
Proline	3.6	3.8	5.6	6.8
Glycine	5.7	4.7	6.2	5.5
Alanine	7.4	5.0	7.6	7.3
Valine	6.2	4.9	6.3	5
Methionine	2.5	2.2	1.7	1.7
Isoleucine	5.9	6.5	4.9	4.5
Leucine	7.9	8.0	9.4	9.7
Tyrosine	4.6	4.5	3.1	3.3
Phenylalanine	5.1	5.4	6.6	6.2



糞については前節の実験1のサンプルをアミノ酸分析に供した。

なお、飼料および糞のアミノ酸分析は常法によった。すなわち、試料に6N-HClを加え十分脱気し、105℃で18時間加水分解後、日立835型アミノ酸分析計により、Na-クエン酸緩衝液を用いて分析した。なお、本分析においてはTrpとCysは加水分解中に破壊されるので、実験結果の解析から除外した。

## 結 果

表4-2-2に糞中のアミノ酸組成 (mg/g-N)を示した。

糞中のアミノ酸濃度はウヤギで高い傾向が示され、第1期ではMet、Pheが、第2期ではTyr濃度がウヤギで有意 ( $p < 0.05$ ) に高かった。また、1期と2期とを比較すると、ウヤギ、Fヤギともに2期で糞中アミノ酸が高い傾向が示された。

表4-2-3に飼料アミノ酸のみかけの消化率を示した。

1、2期ともにウヤギで消化率が低下する傾向が示された。1期ではArg、Ser、Pro、Met、Tyr、Pheの、2期では Thr、Glu、Tyrの消化率がウヤギで有意 ( $p < 0.05$ ) に低かった。

この結果から、ルーメンプロトゾア不在によるCP消化率の低下には、糞中のアミノ酸排泄量の増加を伴うことが明らかとなった。しかし、糞中Nに対するアミノ酸量 (表4-2-2)の両区間での差は、みかけの消化率の差ほどには大きくなく、ウヤギにおいて、アミノ酸が他のN成分に比較して消化されにくいとは断定できなかった。

1期、2期を通じてウヤギ、FヤギともにLysおよびIleの消化率は45-60%であり、他のアミノ酸のそれと比べ低かった。Lys、Thr、Gly、Val、AlaおよびIleの給与飼料中の含量は1期の方が高く、みかけの消化率も1期で高い傾向が示された。逆に、2期において飼料中の含量が高かった Proの消化率は、2期で高かった。

Table 4-2-2. Effect of rumen ciliate protozoa on the amino acid content of feces of goats (Values are expressed as mg amino acids/g nitrogen)

Amino acids	Period I		Period II		Period II	
	Faunated	Unfaunated	Faunated	Unfaunated	Faunated	Unfaunated
Lysine	Mean 147	SE 7	Mean 155	SE 8	Mean 160	SE 168
Histidine	42	2	43	2	46	1
Arginine	99	2	106	2	108	2
Aspartic acid	247	8	253	9	257	4
Threonine	126	5	143	6	144	0
Serine	109	2	114	5	116	1
Glutamic acids	299	11	310	11	336	5
Proline	118	3	123	6	126	3
Glycine	155	5	160	6	155	2
Alanine	181	7	185	7	199	2
Valine	143	6	151	5	151	8
Methionine	32	1	37*	1	33	4
Isoleucine	159	5	161	5	174	5
Leucine	206	8	206	5	225	1
Tyrosine	77	3	97	10	85	1
Phenylalanine	136	4	150*	0	142	3
Total amino acids	2290	80	2400	80	2460	20

a:  $p < 0.05$  compared with Faunated group.  
Data were statistically analyzed by a t-test.

Table 4-2-3. Effect of rumen ciliate protozoa on the apparent digestibilities of dietary amino acids in goats

Amino acids	Period I		Period II		Period II	
	Faunated	Unfaunated	Faunated	Unfaunated	Faunated	Unfaunated
Lysine	Mean 60.5	SE 3.5	Mean 52.6	SE 1.6	Mean 54.2	SE 4.2
Histidine	72.2	2.1	67.7	1.0	74.5	1.7
Arginine	79.2	1.2	74.2*	0.5	76.6	1.1
Aspartic acid	74.7	1.9	70.4	0.9	70.3	1.5
Threonine	67.7	2.6	60.9	0.8	62.5	2.3
Serine	71.5	1.8	66.0*	0.3	70.5	2.0
Glutamic acid	73.5	2.1	68.7	0.6	75.7	1.3
Proline	73.4	1.7	68.5*	0.3	77.5	1.5
Glycine	68.5	2.3	62.9	1.0	65.5	1.9
Alanine	70.2	2.4	65.2	1.7	66.5	2.6
Valine	71.5	2.4	65.8	1.0	67.9	2.2
Methionine	76.2	1.9	68.1*	1.2	75.9	3.7
Isoleucine	59.2	2.8	52.8	1.6	52.5	2.2
Leucine	72.6	2.2	68.7	1.4	71.7	1.9
Tyrosine	68.8	2.7	55.6*	3.2	68.8	2.1
Phenylalanine	74.3	1.9	67.5*	1.3	72.0	1.8
Total amino acids	71.4	2.2	65.9	0.8	70.1	1.9

a:  $p < 0.05$  compared with Faunated group.  
Data were statistically analyzed by a t-test.

アミノ酸のみかけの消化率は(アミノ酸摂取量-糞中アミノ酸量)/アミノ酸摂取量 $\times 100$ で表現される。単胃動物では消化部位に達するアミノ酸組成は、消化酵素由来のそれを除けば、本質的に飼料中のアミノ酸組成と変わらないものと考えられるから、みかけの消化率は飼料アミノ酸の真の消化率〔みかけの消化率+代謝性糞中アミノ酸量/摂取アミノ酸量 $\times 100$ 〕を反映した値であり、蛋白質評価上の重要な指標といえる。しかし、反芻動物では摂取された蛋白質の多くの部分がルーメン内で分解され、さらに細菌あるいはプロトゾアなどのMBPに再合成される。表4-2-1に示すように、MBPのアミノ酸組成は飼料のアミノ酸組成とはかなり異なっている場合が多く、また、下部消化管に達する内容物中のMBPの割合も高い(33)ので、そのアミノ酸組成に大きく影響する。その結果、下部消化管に達する内容物のアミノ酸組成と飼料のそれとは異なってくる(9)。そのため、飼料のアミノ酸組成に基いて計算されたみかけの消化率あるいはそれから導かれる真の消化率とも、単胃動物の場合に持つような意味はないものと考えられる。これは蛋白質の場合も同様といえる。

しかし、ルーメン内での分解率が高く、NH<sub>3</sub>の生成とそのルーメンからの吸収が大きい時には、みかけのアミノ酸消化率は高まることが予想される。また、分解率が同程度でもルーメンで再合成されたMBPの量やそれらの消化率の差異は、みかけの消化率に反映されるはずである。このように、反芻動物におけるアミノ酸のみかけの消化率は、飼料Nのルーメン内での代謝や腸管での消化・吸収性を反映しているものと考えられる。特に、ルーメンプロトゾアが不在の場合には、プロトゾアが高い蛋白質分解活性を持つこと(169-171)、細菌体に比較してプロトゾア体のアミノ酸の消化率が高いこと(8)などから、みかけのアミノ酸消化率は低くなることが予想される。

本実験の結果はこれらの推測を裏づけるものであり、プロトゾアはヤギにおける飼料アミノ酸のみかけの消化率を高めることが明らかにされた。

総アミノ酸の消化率(各アミノ酸の消化率の加重平均)を基準に比較したとき、Lys, Thr, Ile, Tyrは消化率が低く、Arg, Ser, Glu, Pro, Leu, Pheの

消化率は高くなった。前者のアミノ酸は飼料蛋白質の組成に比較してMBPにおける割合が高く、後者では低くなっている。MBPアミノ酸の小腸での消化率は、ほとんどのアミノ酸で85-90%であることが示されている(122,175)。このことは、小腸に到達するアミノ酸総量が増加するに伴い不消化分も増加し、その割合はアミノ酸の種類によらずほぼ一定であることを意味する。すなわち、飼料中含量に比較しルーメンで再合成されたMBP中のアミノ酸量が多ければみかけの消化率は低く、それが少なければ高くなるはずであり、本実験の結果とよく一致する。これはいわゆる標準化効果(9)の結果であり、十二指腸に出現するアミノ酸組成を比較した結果と一致する(176)。

Uヤギでは糞中へのNおよびアミノ酸排泄量が増加した。前述のようにプロトゾア体に比べ細菌体のアミノ酸の消化率が低いこと(8)がその一因と考えられる。これは、蛋白質そのものの消化率が低いことよりも、表4-2-2で示したように単位N量あたりのアミノ酸量がU区で高いことから、細菌に存在する細胞壁が細胞内蛋白質の消化を妨げているためと考えられる。さらに、Itabashiら(176)は、十二指腸へのNの流入量がU牛ではF牛に比較し増加することを示しており、消化管へのNおよびアミノ酸流下量の増大が寄与するところも大きいものと考えられる。一方、十二指腸内容物のアミノ酸組成はU牛とF牛では大きな差は認められていない(176)。このことが、各アミノ酸の小腸での消化率がほぼ一定であること(122,175)と伴って、U区とF区で良く似た糞中アミノ酸組成パターンを与えたものと考えられる。

N化合物である核酸はプロトゾアより細菌でその含量が高い(70)、核酸の小腸での消化率はアミノ酸と大差ないことが示されており(175)、核酸含量の差異がN排泄量の増加に直接寄与する可能性は少ないものと考えられる。さらに、消化酵素などに由来するアミノ酸(ルーメン微生物由来のものを除いた)も、消化管内容物中に占める割合が比較的小さく(9)、糞中アミノ酸組成に与える影響は少ないものと考えられる。

本実験で用いた飼料はルーメンでの分解率が高く、MBPのアミノ酸組成や下部消化管への流下量が糞中の組成やみかけの消化率の変化により反映されたものと考えられる。

近年、高生産性の反芻家畜におけるRUDPの利用が注目されており、その



評価方法としてナイロンバッグ法によるルーメン内での蛋白質・アミノ酸の消失率が用いられている(30)。しかし、RUDPの下部消化管での消化・吸収については十分に明らかにされていない。本実験の結果から、糞中のアミノ酸組成、みかけのアミノ酸消化率の測定は、RUDPの下部消化管における消化・吸収の程度を推定する一助となるものと考えられる。

### 第3節 特定の種・属のプロトゾアのルーメンへの定着とその影響 ルーメンプロトゾアに対する脂肪酸の影響

#### 緒言

既に述べたように、ルーメン発酵やN代謝、宿主の蛋白質栄養におよぼすプロトゾアの影響については膨大な研究があり、多くの総説もまとめられている(6, 7, 34, 35, 60-63)。しかし、これらの多くは、前節の実験がそうであるように、いわゆる混合系のプロトゾアが存在する動物と存在しない動物を比較したものであり、特定の種・属のみのプロトゾアの影響について *in vivo* で検討した報告(162-165)は数少ない。多種多様なルーメンプロトゾア(177)と比較するならば、ほとんど未踏の領域とも言える。

Joany et al. (162)は、*Polyplastron multiventricula*, *Entodinium* spp. あるいは *Isotoricha* spp. のみを定着させたメン羊を用いた実験から、ルーメンプロトゾアとして単独種・属のみしか存在しない場合には、混合系の場合とはルーメン発酵や消化の様相が異なることを示した。しかし、その原因については十分に解明されていない。また、尿中アラントイン排泄量については記述されていない。また、彼らが取り上げたプロトゾア以外の種・属においてどのような結果が得られるのか、興味深い点が多い。特定のプロトゾアのみが定着した動物を作出するためには、顕微鏡下で選別した特定のプロトゾアをプロトゾアを除去した動物に接種する方法が一般に行われるが、他の種・属のプロトゾアの混入を防ぐのはなかなか困難である。

ところで、高泌乳牛の泌乳初期には採食量が制限因子となりエネルギー摂取量が要求量を満たせないために、エネルギー供給源としてルーメンで溶解しない形態に加工された脂肪が利用されていること(20)は序論でも述べた。この目的のために脂肪酸のCa塩の利用が研究されている(21)。我々も脂肪酸Ca塩の利用の可能性について実験を進めているが、その過程で、中鎖脂肪酸Ca塩の給与時にプロトゾア数が著しく減少する現象を見出した。

一方、古くから高度不飽和脂肪酸がプロトゾアに対して毒性を持つこと(Defaunation効果)が知られている(178)。また、油脂の脂肪酸組成により脂肪の

defaunation効果が異なることが最近報告された(179)。

これらのことから、中鎖脂肪酸を用いることによりプロトゾアの除去が可能ではないか、さらに、特定のプロトゾアのみを定着させることができるのではないかと考え実験を行った。その結果、中鎖脂肪酸を用いることにより、プロトゾアの除去とプロトゾアとして *Epidinium caudatum* あるいは *Dasytricha ruminantium* のみを定着させたヤギの作出に成功し、そのヤギにおけるN代謝について若干の知見を得ることができた(165)。本節では、中鎖脂肪酸を中心として飽和脂肪酸がプロトゾアに与える影響について述べる。

#### 材料および方法

動物と給与飼料： 体重13から17kgの日本ザーネン種去勢ヤギ9頭を用いた。ヤギはお互いに接触できないよう個体別にケージに収容した。基礎飼料としてイタリアンライグラス乾草300g、圧ペントウモロコシ175g、糖蜜25gを1日1回午前9時によく混合して与えた。ミネラルブロックと水は自由に与えた。*Entodinium* spp., *D. ruminantium*、および *Isotricha* spp.は全てのヤギにおいて認められた。*Epi. caudatum* は3頭に、残りの6頭には *Polyplastron multivesiculatum* と *Ophryoscolex caudatus* が認められた。給餌前のプロトゾア数が、 $1.0 \times 10^8$ /ml以上の個体を用いて各種脂肪酸(表4-3-1)の給与試験を行った。脂肪酸の投与試験によりプロトゾアが除去されたヤギについては必要に応じて成ヤギから採取したルーメン液を接種し混合プロトゾアを定着させ、再度給与試験に供した。

Table 4-3-1. Saturated fatty acids and their derivatives used in the experiment.

Fatty acids	Caprylic acid ( $C_8$ )
	Capric acid ( $C_{10}$ )
	Lauric acid ( $C_{12}$ )
	Myristic acid ( $C_{14}$ )
	Palmitic acid ( $C_{16}$ )
	Stearic acid ( $C_{18}$ )
Ca-salts	$C_8$ -Ca and $C_{10}$ -Ca
Tri-glycerides (TG)	$C_8$ -TG and $C_{10}$ -TG

遊離脂肪酸の給与試験： カプリル酸( $C_8$ )からステアリン酸( $C_{18}$ )までの飽和偶数脂肪酸のうちの一つを1日あたり25g、基礎飼料に添加し5日間与えた。それぞれの脂肪酸について2ないし4頭のヤギをあてた。ルーメン内容を脂肪酸給与開始直前と給与後5日間給餌直前に胃カテーテルを用いて採取しプロトゾア数を計数した。

カプリル酸トリグリセライド( $C_8$ TG)あるいはカプリン酸トリグリセライド( $C_{10}$ TG)の給与試験：  $C_8$ TGあるいは $C_{10}$ TG 25gを基礎飼料に添加して12日間給与した。その後10日間は基礎飼料のみを与え、この間のプロトゾア数の変化を調べた。

カプリル酸カルシウム( $C_8$ -Ca)あるいはカプリン酸カルシウム( $C_{10}$ -Ca)の給与試験： 25gないし50gの $C_8$ -Caあるいは $C_{10}$ -Caを基礎飼料とよく混合して8日間給与した。その後14日間は基礎飼料のみを与えプロトゾア数の変化を調べた。

硬化バーム核油の給与試験： 硬化バーム核油(エコナL S(H)、花王KK)の脂肪酸組成は表4-3-2に示すようにラウリル酸( $C_{12}$ )が50%以上を占める。本試験では脂肪酸給与試験で得た $C_{12}$ の効果を2頭のヤギを用いて確認した。このうち1頭は、プロトゾア構成が*Entodinium* spp., *D. ruminantium* および *Epi. caudatum* からなり、硬化バーム核油 30gを25日間添加給与した。他の1頭は *Epi. caudatum* のみが確認された。これには硬化バーム核油 30gを10日間給与し、その後は基礎飼料のみを与えプロトゾア数の変化を調べた。

Table 4-3-2. Fatty acid composition (%) of hydrogenated palm kernel oil.

Caprylic acid	3
Capric acid	3
Lauric acid	52
Myristic acid	15
Palmitic acid	7.5
Stearic acid	19.5



## 結 果

遊離脂肪酸の給与がルーメンプロトゾアに及ぼす影響を図4-3-1に示した。図からも明らかなように、 $C_{10}$ 、 $C_{12}$ 、 $C_{14}$ (ミリスチン酸)の効果、特に $C_{10}$ のプロトゾア除去効果が最も強かった。これらの脂肪酸を連続して5日間給与したところルーメン内容物サンプル中にはプロトゾアが認められなくなった。しかし、 $C_{12}$ 給与の場合にはその後 *Epi. caudatum* のみが再び確認された。 $C_8$ 、 $C_{16}$ 、 $C_{18}$ ではプロトゾア数は減少したものの完全には消失しなかった。このうち、 $C_8$ の効果は *D. ruminantium*、*Isotoricha* spp. に比較し *Entodinium* spp. において大きい傾向が示めされた。

トリグリセライドの給与試験の結果を図4-3-2に示した。遊離脂肪酸給与の場合と同様、 $C_{10}$ TG給与ヤギから採取したルーメン液ではプロトゾアが確認できなくなったのに対し、 $C_8$ TGではいったん減少はするもののまた元のレベルに回復した。 $C_{10}$ TG給与中止後1頭のヤギで再びプロトゾアが確認された。確認されたプロトゾアは *Epi. caudatum* のみであり他の種、属のプロトゾアは認められなかった。

図4-3-3に示したようにCa塩の給与試験の結果はトリグリセライドの給与試験の場合と同様であった。

硬化バーム核油の給与試験の結果、混合プロトゾアヤギでは *Epi. caudatum* 以外のプロトゾアは給与3日目には確認できなくなった。*Epi. caudatum* も給与後2週間は減少したがそれ以降は増加した。25日目には *Entodinium* spp. も確認された。一方、*Epi. caudatum* のみが認められたヤギでは、10日間の給与でも *Epi. caudatum* は消失しなかった。給与中止後も他のプロトゾア種は認められず、この状態は1年以上にわたって維持された。また、*Entodinium* spp. が出現した個体においても、10日間25gの $C_{12}$ を給与することにより *Epi. cau-*  
*datum* のみが定着し、1年以上にわたりその状態が維持された。

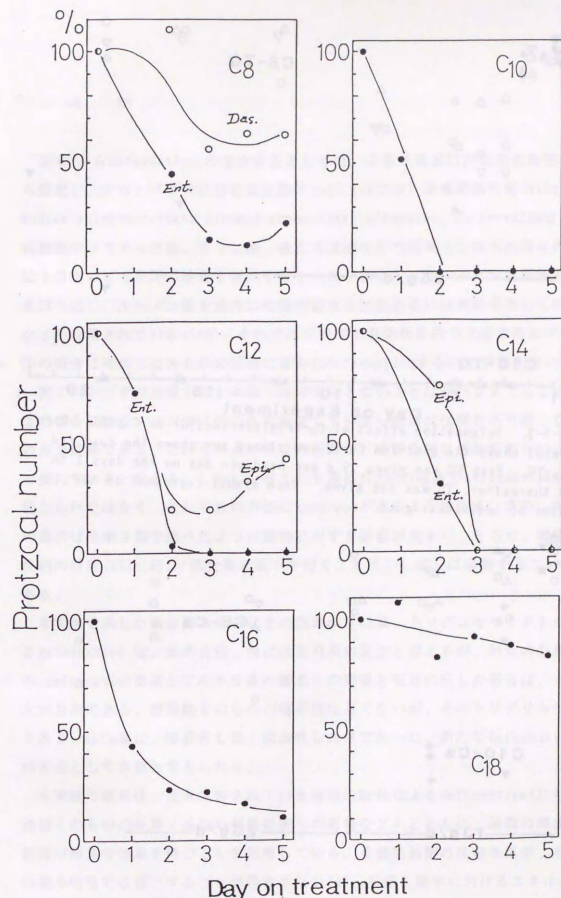


Fig.4-3-1. Effect of saturated fatty acids on the concentration of protozoa in the rumen contents of goats. Values are expressed as percentages of those just before fatty acids feeding. Each value is the mean of the results from 2 to 4 animals.

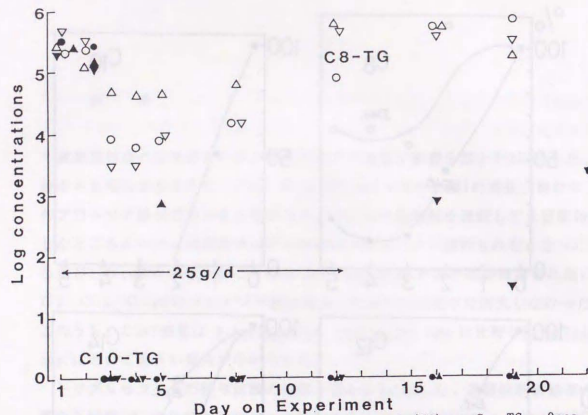


Fig. 4-3-2. Defaunation effect of  $C_8$ -triglyceride (TG) or  $C_{10}$ -TG. Open symbol shows the goat fed  $C_8$ -TG and closed one shows the goat fed  $C_{10}$ -TG. Each TG was given 25 g per head per day on the days 1 to 13, thereafter, TG was not given. Each symbol represent as the value of individual goat.

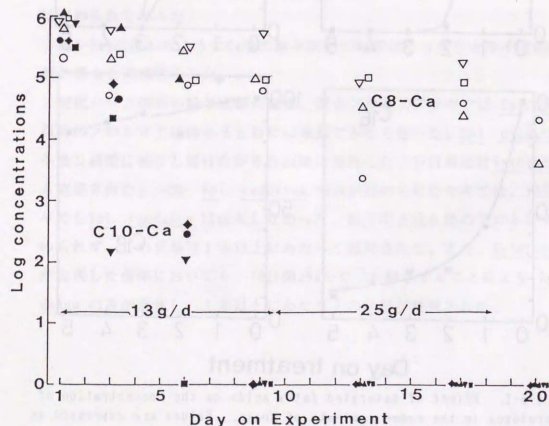


Fig. 4-3-3. Defaunation effect of calcium salt of  $C_8$  or  $C_{10}$  ( $Ca-C_8$  or  $C_{10}-Ca$ ). On the days 1 to 9, 13 g of  $Ca$ -salt was given and on the days 10 to 18, 25 g of  $Ca$ -salt was given. Other details is the same as shown in Fig. 4-3-2.

## 考察

従来から defaunation の主な方法としては、①生後数日以内に親の集団から隔離し、プロトゾアの経口伝染を防ぐ (unfaunation)、②表面活性剤 (dioctyl sodium sulphosuccinate, alcohol ethoxylate, alkanates,  $Ca$  peroxide など)、硫酸銅やココナツ油、アマニ油、硬化大豆油などの投与 (これらの投与の前に 1 日ないし 3 日間の絶食を併用するケースが多い)、③ルーメン内容物を全量取り出し、ルーメン壁を洗浄した後内容物を加熱あるいは凍結処理して戻す、などが利用されている (180)。それぞれが特徴と有効性を持つ方法であるが、

①の場合は確実にあるが必要時に直ちに defaunation することができない、(一度プロトゾアが伝播すると本法では除去できないことは述べるまでもない) ③の場合にはルーメンフィステルを装着していない場合には実行不可能、などの点が指摘できる。これらの点から②の方法が、必要な時に供給可能という点で優れていると言える。しかし、必ずしも常に 100% の確率で defaunation が可能なおけではなく、それぞれの方法に know-how があるようである。また、絶食の負荷は 3 章 3 節で述べたように動物に対する影響が大きい。さらに、表面活性剤の利用 (181-183) が採食量の低下を招くことは、しばしば経験することである。

本実験で示した脂肪酸あるいはその誘導体 ( $Ca$  塩、トリグリセライド) による defaunation は、②の方法、特に油脂利用の変法と言えるが、特定の脂肪酸の defaunation 効果とアルキル基の鎖長との関係を明確に示した報告は、本論文が最初である。脂肪酸そのものの嗜好性は良くないが、そのトリグリセライドあるいは  $Ca$  塩は、嗜好性も良く採食性も良好であった。新たな defaunation の方法として有効と考えられる。

本実験の結果は、従来報告されている油脂の給与による defaunation (179) が、油脂そのものの効果 (油脂の細胞表面への吸着など) とともに、油脂の構成脂肪酸が特異な効果を持つことを示唆している。長鎖脂肪酸の抗菌作用が、その  $Ca$  塩や  $Mg$  塩では低下することが報告され (184)、高位生産牛におけるエネルギー源として脂肪酸  $Ca$  の利用が推奨されている (20, 21) が、その利用においては脂肪酸組成、特に、中鎖脂肪酸を多く含む油脂原料に十分な注意が必要であ



ること、また、ルーメン微生物叢に対する影響を十分に検討すべきことが本実験から明かとなった。

中鎖脂肪酸が、殺菌あるいは静菌作用を持つことは古くから知られており(185)、多くの誘導体が商品化され広く利用されている(186, 187)。また、ルーメン細菌に対する脂肪酸の影響についての研究もあり(188, 189)、その作用機構については、細胞表面への脂肪酸の吸着(190)、表面活性による細胞膜構造の破壊(191)などの要因が指摘されているが、十分には解明されていない。プロトゾアに対する脂肪酸の効果もこれらの要因の複合的な影響の結果と考えられるが、効果がプロトゾアの種・属により異なることなど興味深い点が多い。しかし、その原因の究明は今後に残された課題である。

#### 第4節 Epidinium caudatumあるいはDasytricha ruminantiumのみを

定着させたヤギの作出とルーメン発酵、窒素代謝の特徴

##### 緒言

前節の実験結果から中鎖脂肪酸に対するプロトゾアの反応がその種により異なることが示された。すなわち、Epi. caudatumはC<sub>10</sub>あるいはC<sub>12</sub>の給与に対して抵抗性があり、この給与により完全に除去することはできなかった。また、D. ruminantiumはC<sub>8</sub>給与による個体数の減少が他のプロトゾアに比較して小さかった。このことは中鎖脂肪酸とその誘導体を利用することにより特定のプロトゾア種のみを定着させた動物の作出が可能なことを示唆する。

従来、特定のプロトゾア種のみを定着させる方法としては、混合プロトゾアから目的とするプロトゾアを顕微鏡下で選別し、defaunationした動物にこれを接種すること(183)が一般的であったが、100%他のプロトゾア、特に小型のEntodinium spp.を除去することは困難である。しかし、中鎖脂肪酸をいわゆる選択培地的に利用できれば簡便に特定のプロトゾア種のみを定着させ得る。この手法を用いてEpi. caudatum あるいは D. ruminantium のみを定着させたヤギを作出することができた。このヤギにおけるルーメン発酵の特徴を観察すると共に、尿中アラントイン排泄において認められた混合プロトゾアの影響が単一種の場合にも認められるかを検討した(165)。

##### 材料および方法

動物： 前節の実験に供した日本ザーネン種去勢ヤギ(8か月齢、平均体重22 Kg)を引き続き供試した。給与飼料および給餌法は前節と同一条件とした。

Epi. caudatum のみを定着させたヤギ(Eヤギ)の作出：Epi. caudatum を含む混合プロトゾアがルーメン内に生息するヤギ3頭にC<sub>10</sub>を1週間5%添加給与することによりEヤギを作出した。

D. ruminantium のみを定着させたヤギ(Dヤギ)の作出：C<sub>10</sub>Caを1週間基礎飼料に5%添加給与し、Defaunationを行なったヤギ(Protozoa free、

P Fヤギ) 3頭を用いた。*D. ruminantium*を含むルーメン液を牛より採取し、2重ガーゼでろ過後、ろ液を分液ロートに移しショトウ(g/l)を含む生理的食塩水を等量加え温水中に静置した。下層に沈降した*D. ruminantium*に富む部分を採取しP Fヤギに接種した。接種後はC<sub>10</sub>Caを10%添加給与し毎日検鏡し、*D. ruminantium*のみを定着させた。

P Fヤギの作出： 残りの3頭についてはC<sub>10</sub>Ca給与によりプロトゾアを除去し、P Fヤギとして供試した。

実験1： DヤギあるいはEヤギのプロトゾア数が $10^5$ /mlの状態に達した後、4週間基礎飼料を給与した。22日目から26日目にかけ全糞尿を採取しN成分の分析に供した。また、27日目にルーメン液と頸静脈血を給餌の直前(0時間)と2、4および6時間後に採取し分析に供した。

実験2： 基礎飼料にN源として1日当り10gの尿素を添加し給与した。他の方法等は実験1と全く同様に行った。

## 結 果

ルーメン発酵に与える影響について

図4-4-1にルーメン液中の*Epi. caudatum*および*D. ruminantium*数の経時変化を示した。両者とも採食後に著しい低下が認められた。一般に、採食直後には*Epi. caudatum*のような貧毛虫類はルーメン内容物中の個体密度が減少するのに対し、*D. ruminantium*のような全毛虫類では増加することが報告されている(144)。*D. ruminantium*数の変化は、隠棲(Sequestration)していた個体が採食に伴い増加する可溶性糖類を求めてルーメン内全体に拡散することがその一因であると指摘されているが(192)、本実験では従来の報告とは明らかに異なる変動パターンを示した。従来の結果は、混合プロトゾアの中での全毛虫類の変化を観察したものであり、ピーク時にもその個体数は $10^4$ /mlレベルの場合が多い。本実験では $10^5$ /mlを超える*D. ruminantium*が単独種として存在しており、他の貧毛虫類との共存、競争関係は存在しない。このことが異なる変動パターンを与えた一因とも考えられる。ルーメン生態系におけるプロトゾアの相互関係はPolyplastronと*Epidinium* spp. との関係を中心に分類され

るが(193)、単独種のみが存在する系やこれらの種の人為的組み合わせにおける変動パターンの検討などから、隠棲の生態学的な意味や、さらにプロトゾア相互の詳細な関係が明らかにされる可能性がある。

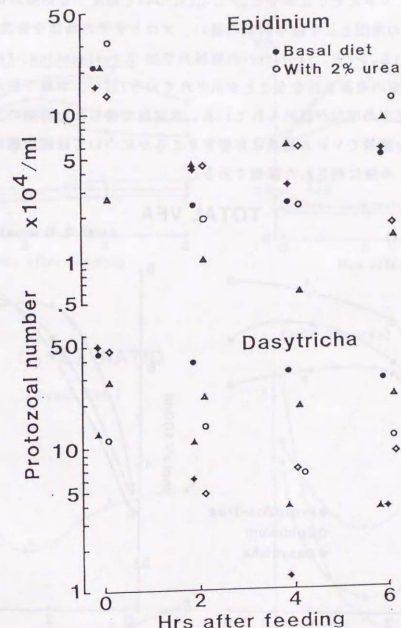


Fig. 4-4-1. Changes in the number of *Epidinium caudatum* or *Dasytricha ruminantium* in the rumen contents of goats established *E. caudatum* or *D. ruminantium* as single rumen protozoal species. Each symbol is shown as individual value. The closed symbols represent as values of goats given a basal diet, and open symbols represent as those given a basal diet supplemented with 2 % of urea.



VFA産生における特徴は、プロトゾアの存在によるプロピオン酸モル比率の高まりと、それに伴うC<sub>2</sub>/C<sub>3</sub>比の低下であった(図4-4-2,3)。これはEヤギでより顕著であり、実験1、2共に同様の結果を得た。混合プロトゾアを用いた実験では、VFAモル比率やC<sub>2</sub>/C<sub>3</sub>比について相反する結果が得られており(133)、その原因として給与飼料の違い、プロトゾアの種類や密度の差異が指摘されている。一方、*in vitro*の実験系では *D. ruminantium*, *Epi. caudatum* は酢酸優勢型の発酵を行なうことが示されており(173)、本章1節の実験でも酢酸のモル比率の増加が認められている。本実験で得られた特定のプロトゾアがどのような機構でVFA組成に影響を与えるかについては細菌叢の変化との関係を含め、今後に残された課題である。

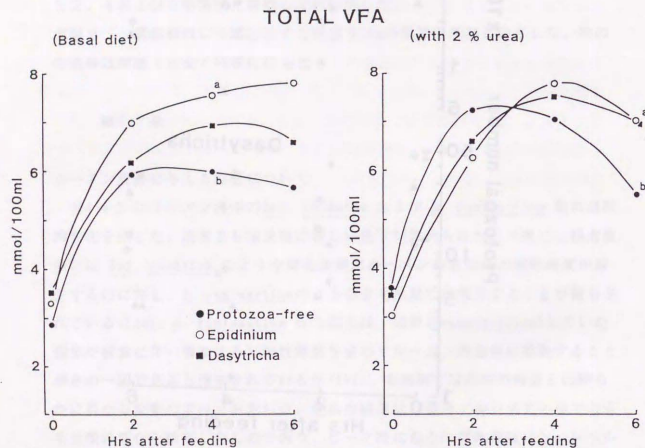


Fig. 4-4-2. Postprandial changes in rumen total VFA concentration in protozoa-free goats (●), *D. ruminantium*-goats (■) and *E. caudatum*-goats (○). They were fed the diet supplemented with (right) or without (left) urea. Each value is the mean of three goats. a, b: Means within the same sampling time share a different super-script letter differ significantly ( $p < 0.05$ ).

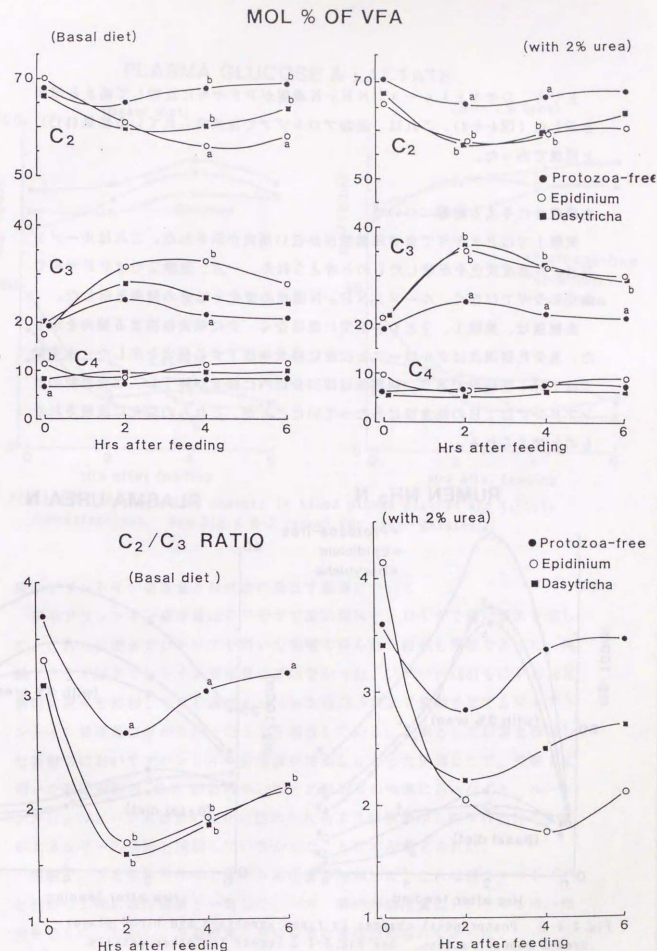


Fig. 4-4-3. Postprandial changes in molar percentages of acetic(C<sub>2</sub>), propionic(C<sub>3</sub>) and butyric(C<sub>4</sub>) acids and C<sub>2</sub>/C<sub>3</sub> ratio in the rumen fluid. See Fig. 4-4-2 legend for other details.

Eヤギ、DヤギともルーメンNH<sub>3</sub>-N濃度がPフヤギに比較して高まる傾向を示した(図4-4-4)。これは、混合プロトゾアで従来得られている結果(135)と同様であった。

血液成分に与える影響について

実験1ではPフヤギで血漿尿素態Nが低い傾向が示された。これはルーメンNH<sub>3</sub>-N濃度変化を反映したものと考えられた。一方、実験2ではPフヤギで高くEヤギでは低く、ルーメンNH<sub>3</sub>-N濃度の変化とは逆の傾向を示した。

血糖値は、実験1、2とも各区間に差はなく、共に採食後高まる傾向を示した。血漿乳酸濃度はグルコースとは逆に採食後低下する傾向を示した。本実験では1日1回給餌であり、給餌後は30分以内に採食が終了し、採食直前のサンプリングは1日の絶食後にあたっていたことが、これらの変化に反映されたものと考えられる。

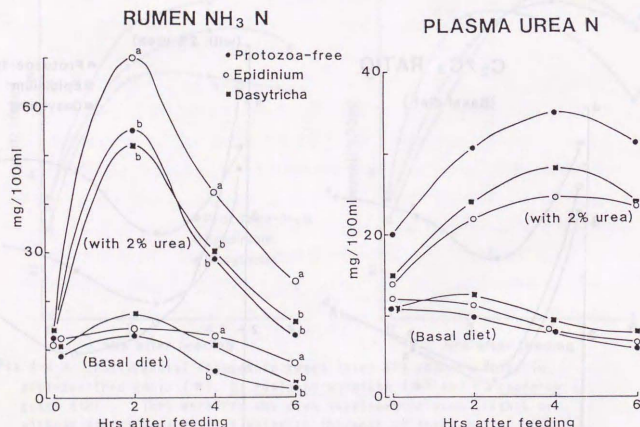


Fig. 4-4-4. Postprandial changes in rumen ammonia-N and blood plasma urea-N concentrations. See Fig. 4-4-2 legend for other details.

## PLASMA GLUCOSE & LACTATE

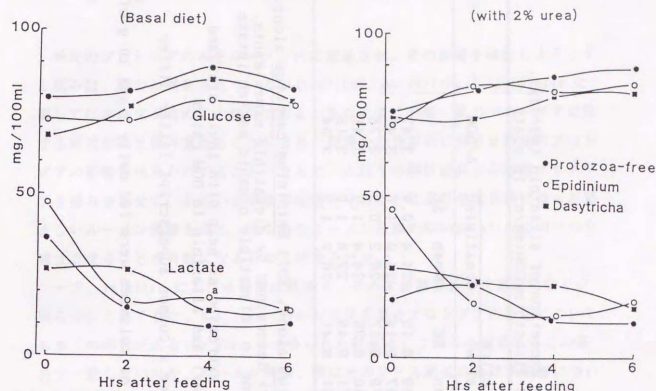


Fig. 4-4-5. Postprandial changes in blood plasma glucose and lactate concentrations. See Fig. 4-4-2 legend for other details.

尿中アラントイン排泄量とN代謝に及ぼす影響について

尿中アラントイン排泄量はPフヤギで高い傾向を、Dヤギで低い傾向を示した。これらは混合プロトゾアを用いた実験で得られた結果と同様であった。実験1と2ではアラントイン排泄量に差はなかった。Lindberg (48)もCP 12.8%飼料に尿素を添加してCP濃度を14.6%から23.5%まで変動させても尿中アラントイン排泄量に差がなかったことを報告している。N源として尿素を添加した実験2においてアラントイン排泄量が増加しなかった原因として、実験1に用いた基礎飼料のCPが乾物中12%と比較的高い水準にあったこと、ルーメンNH<sub>3</sub>-NとVFA濃度の変化に認められるように尿素からのNH<sub>3</sub>-Nの生成がエネルギーの供給と同調していなかったことなどが考えられた。

実験1、2ともPフヤギで糞中N排泄量が増加した。これは混合プロトゾアと比較して得られた結果と一致した。一方、尿中N排泄量はPフヤギで低い傾向を示した。しかし、N蓄積量と共に有意な差は認められなかった。



Table 4-4-1. Effect of ciliate protozoa on the urinary excretion of allantoin (mg/day), total-N(g/day), creatinine(mg/kgBW/day) and allantoin/DOM(mg/g) in goats

	Fauna	Intake		Excretion				Creatinine		A/DOM
		N	DOM	Total-N				Mean	SE	
				Allantoin		Mean	SE			
Period 1	PF	8.28	327	1133	88	3.89	0.15	24.4	0.4	3.47
	Epi	8.28	325	1105a	43	3.87	0.14	26.0	1.0	3.40
	Das	8.28	326	907b	6	3.79	0.17	26.2	0.9	2.78
Period 2	PF	12.95	328	1118	75	7.40	0.36	24.4	1.0	3.41
	Epi	12.95	326	1035	44	7.71	0.45	27.8	1.0	3.18
	Das	12.95	323	984	154	7.61	0.41	26.7	1.3	3.04

1) PF; Protozoa-free, Das; *Dasytricha ruminantium* alone, Epi; *Epidinium caudatum* alone,  
2) DOM; Digestible organic matter intake (g/day) determined by digestible experiments,  
3) A/DOM; the ratio of urinary allantoin excretion to digestible organic matter intake (mg/g).

Allantoin, total-N and creatinine excretion were expressed as mean with their standard errors of three goats. Intakes of N and DOM (g/day) and allantoin to DOM ratio (mg/g) were shown as mean value.

a, b; Means within the same Period that do not share a common superscript letter differ significantly ( $p < 0.05$ ).

In Period 1, 300g of hay, 175g of corn and 25g of molasses were fed daily, and 10 g of urea was added in Period 2.

## 考 察

特定のプロトゾアのみをルーメン内に定着させ、その影響を検討しようとする試みは、幾つか報告されているが(162-165), *Dasytricha* と *Epidinium* に関しては本論文が初めての報告である。さらに多くの種・属のプロトゾアに関する研究結果を積み重ねることにより、細菌との共生系における特定のプロトゾアの影響を明らかにすること、さらに、これらの解析結果から各種プロトゾアを組み合わせて、あるいは単独で定着させることにより生産目的に合った望ましいルーメン発酵を得る、すなわちルーメン発酵のManipulation法の一つを確立させることが可能になるものと考えられる。

一方、in vitro における研究は数多く、その栄養要求性や代謝産物などが明らかにされてきた。また、in vivo における混合プロトゾアの影響についても多くの研究がある(60-63)。今回得られた結果は、これらの結果と多くの部分で一致していたが、ルーメン発酵、特にそのVFA組成に及ぼす影響については従来とは異なる結果が得られた。このことは、前述のプロトゾアによるルーメン発酵の調節の可能性を示唆するものと言える。

アラントイン排泄量はDヤギで最も低かった。特に、実験1ではEヤギとの間に有意差が認められた。これは、全毛虫類は貧毛虫類に比較し、MBPの下部消化管への流下量を減少させることを示している。全毛虫類の隠棲(155)が一因として考えられるが、本実験における*Dasytricha*の変動パターンは従来知られている全毛虫類の変動パターンとは異なり、貧毛虫類と同様のパターンを示しており、隠棲がその原因とは断定できない。また、EヤギとPFヤギの尿中アラントイン排泄量とは差が認められなかった。このことは混合プロトゾア系における種・属構成が可消化のMBP量の変動を通して代謝蛋白質の供給量に影響することを示唆している。

ルーメンプロトゾアの種・属構成の差異がルーメン発酵に影響を与えることは本実験からも明らかにされたが、尿中アラントイン排泄量の変動から、蛋白質代謝、ひいては反芻家畜の生産性にも影響を与えることが示された。今後、尿中アラントイン排泄量を指標としてさらに詳細な検討が必要と考える。

図4-4-6に給餌直前(①、③)と2時間後(②、④)にルーメンプロトゾアとして *Epi. caudatum* あるいは *D. ruminantium* のみが棲息するヤギから採取したルーメン内容(メチルグリーン・ホルマリン・食塩水で5倍希釈した)の顕微鏡写真(100倍)を示した。給餌前にはプロトゾアが飢餓状態にあり体が透けて見える。また、給餌後のプロトゾア密度の減少が認められる。

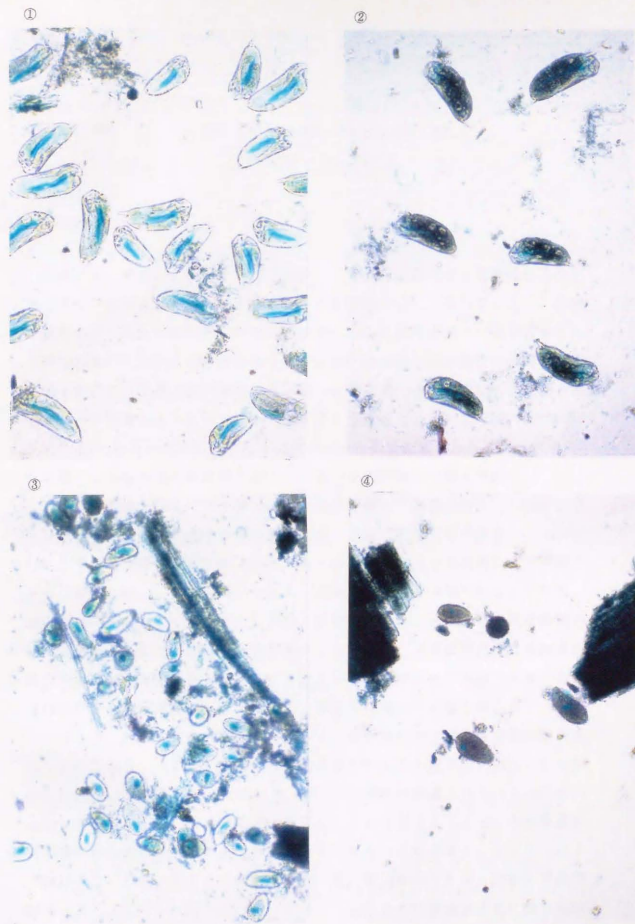


Fig. 4-4-6. ①, ②; *Epi. caudatum* (X100). ③, ④; *D. ruminantium* (X100).  
①, ③: Rumen fluid was taken by a stomach tube just before feeding.  
②, ④: Rumen fluid was taken 2 hr after feeding.  
One ml of rumen fluid was added to 4 ml of methylgreen-formalin-saline solution. The nuclei of the protozoa are stained.



## 第5章 代謝蛋白質の全体量の 評価について

### 緒 論

前章まで、アラントイン排泄量を指標として、下部消化管で消化吸収されるMBP(可消化MBP量)に影響を与える諸要因について述べてきた。これは、序論でも述べたようにRUDPとMBPからなる代謝蛋白質の一部を評価する方法である。MBPは代謝蛋白質の多くの部分を占め、反芻家畜の蛋白質栄養上最も重要であるが、蛋白質要求量が高い離乳直後の育成牛や泌乳最盛期の乳牛では一定水準以上のRUDP給与が必要とされる(12,13)。しかし、飼養標準(12,13)に示されたRUDPあるいは代謝蛋白質量は動物試験により求められた値ではなく一種の推定値であり、今後、その評価が必要とされる。

RUDP量は一般にはナイロンバッグ法を利用して推定されている(30)。RUDPや下部消化管に達する蛋白質全体量の小腸での消化率の推定は、*in vitro*法や十二指腸および回腸末端カニキュレ装着動物などの利用により可能である(28)。しかし、これらはインタクトな動物における評価ではなく、また、カニキュレションなども必ずしも簡便ではない。また、カニキュレ装着動物の採食量を高めることは困難なことが多い。もちろん、成長試験により代謝蛋白質全体の評価は可能であるが、ラットなどの実験小動物とは異なり家畜においては飼料代や飼育期間など多くの労力と資金を必要とする難点がある。

ところで、最近、ラットやヒトにおいて、蛋白質代謝や蛋白質栄養状態推定のための指標の一つとして、尿中への酸可溶性ペプチド態アミノ酸(acid soluble peptides from amino acids, ASP)の排泄量が提案されている(64,65)。ASPの特徴として、①代謝の最終産物としての性質を示すこと、②食餌蛋白質の質や量に敏感に反応すること、③MBSあたりの排泄量が、ラットとヒトではほぼ等しいこと、④アミノ酸組成が食餌蛋白質に影響されず、無蛋白質摂取時のパターンによく一致すること、⑤MBSあたりの排泄量が成長に伴い減少すること、⑥蛋白質摂取水準の変化に応じ、総N、3-MeHisとは異なる変動パターンを示すこと、などの諸点が指摘されている。

ラットやヒトは共に単胃動物であり、飼料蛋白質のアミノ酸組成と消化吸収されるアミノ酸（すなわち代謝アミノ酸）の組成はほぼ一致するものと考えられ、このことが飼料アミノ酸組成による栄養価判定(29)を可能にしている。単胃動物における飼料蛋白質の評価は代謝蛋白質を評価していると見てもできる。一方、飼料のアミノ酸組成と代謝アミノ酸組成が異なる反芻動物においては、ASPが代謝蛋白質の栄養価を評価する指標として有効なことを示唆している。そこで、ASPによる反芻家畜の代謝蛋白質評価の可能性について検討し、その有効性を確認しようとした(195)。

# 第1節 尿中酸可溶性ペプチド態アミノ酸(ASP)排泄量測定による代謝蛋白質の評価法の提案

## 緒言

緒論で述べた可能性を確認するため、前章までの実験において採取した尿サンプルについてASPの分析を行なった(195)。

## 材料および方法

実験1 哺乳子ヤギ尿中へのASPの排泄： 第3章1節の試験で採取した尿サンプルについて、各液状飼料給与期の後半3日間についてのASP量を求めた。

また、ヤギのASP排泄と比較するため、ISP代用乳、酵母代用乳(表3-1-1)をそれぞれ固形のまま、あるいは無蛋白質精製飼料、24%カゼイン精製飼料(表5-1-1)を糞尿分離可能な代謝ケージで個体別に収容した6週齢のウイスター系雄ラット(各区4ないし5匹、体重130-140g)に10日間給与し、最後の2日間採取した尿についての尿中ASP量を分析した。

実験2 絶食前後のASP排泄： 第3章3節で採取した尿サンプルについて、絶食直前と絶食7日目の1日尿中のASP量を求めた。

実験3 摂取蛋白質量とASP排泄： 第3章4節実験2において採取した尿サンプルについて、各区3頭の後半4日間のASP排泄量を求めた。また、大豆を50%エタノールで30分間浸漬処理した(196)C P 17%飼料およびコーディングトリプトファン(Trp含量30%)を1%添加したC P 9%飼料を給与した場合についても同様に検討した。

エタノール処理が大豆のルーメン内における分解率に及ぼす影響を検討するため、ナイロンバッグ法により未処理およびエタノール処理大豆の乾物(DM)とNの消失パターンを検討した。

Table 5-1-1.

## Ingredient composition of protein-free (PF) and 24% casein (24C) diets fed in Expt 1

	PF diet	24C diet
	(%)	
Casein	0.0	24.0
Starch	84.3	60.3
Soybean oil	5.0	
Mineral mixture	5.0	
Vitamin mixture	0.5	
Choline Cl	0.2	
Cellulose	5.0	

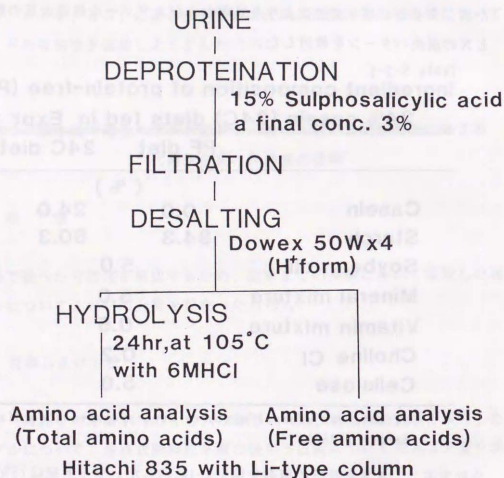
Vitamin and mineral mixtures were prepared according to Rogers & Harper (1965).

分析方法： ASP分析の概要を図5-1-1に示した。ラット尿は15%スルホサリチル酸(Sulfosalicylic acid:SSA)を含む三角フラスコに採取しSSAの終濃度が3%となるよう定容化(100-150ml)した後、Toyoろ紙No. 5Aでろ化、ろ液10mlを第3章1節で示した方法により脱塩した。得たサンプルは1/50N-HCl4mlに溶解後、半量はそのまま、残りの半量は等量の12N-HClを加え105℃で20時間加水分解した後、それぞれアミノ酸分析に供した。前者を尿中遊離アミノ酸量、後者を尿中総アミノ酸量とし、その差をASPアミノ酸量とした。分析は日立アミノ酸分析計835型(Li型カラム)を用いて行った。ヤギ尿では、



尿6 mlに15%SSA 1.5 mlを加え除蛋白質し、以後は、ラットの場合と同様に分析した。本分析法の加水分解条件ではArg、Met、CysおよびTrpが破壊されるので分析結果の検討から除外した。また、ヤギ尿の加水分解サンプルではIleに未同定のピークが重なり定量を妨害したので、結果から除外して解析した。Fig. 5-1-1.

### Determination of ASP-form amino acids



### ASP-form amino acids = Total amino acids - Free amino acids

未処理およびエタノール処理大豆のDMあるいはNのルーメンでの消失率はルーメンフィステル装着牛2頭(体重約250kg)を用いて測定した。供試牛にはイタリアンライグラス乾草と畜試指定配合飼料(1:1)を維持量、午前9時と午後4時の2回に分け給与した。分析飼料としては粗びき大豆をそのまま約

5g、5.5X10cm(200メッシュ)のナイロンバッグに精秤し、午前の給餌後ルーメン内に浸漬した。8、16および24時間後にルーメンから取り出し流水中でルーメン液の色が溶出なくなるまで洗った後残渣DMおよびN量を求め、浸漬前の値との差を消失量とした。なお、秤量後ルーメン内に浸漬せず直ちに水洗したサンプルの消失量を浸漬0時間の値とした。

### 結果

実験1および2の結果を図5-1-2~4に示した。

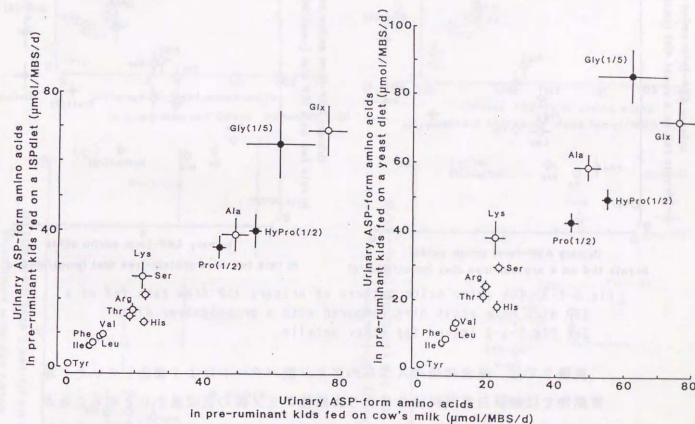


Fig. 5-1-2. Expt 1. The amino acid pattern of urinary acid-soluble peptides (ASP) from pre-ruminant kids fed on a ISP milk replacer (left) or a yeast milk replacer (right) compared with that of fed on cow's milk. Values are means with their standard errors for four kids for each group. Vertical lines represent the standard errors of the means for the kids fed on the ISP milk replacer or the yeast milk replacer and horizontal lines those for the kids fed on the cow's milk. Values for glycine and proline, hydroxyproline and glutamin/glutamic acid (Glx) are reduced to a scale of one-fifth and of half the actual size, respectively.

哺乳子ヤギのASPのアミノ酸パターンは給与飼料にかかわらず非常に良く一致した。哺乳子ヤギでは摂取アミノ酸がルーメンで代謝されないで、単胃動物の場合と同様、摂取蛋白質のアミノ酸組成は代謝蛋白質のアミノ酸組成とはほぼ一致するが、液状飼料のアミノ酸組成が異なるにも拘わらず(図5-1-6)、ASPのアミノ酸パターンは良く類似していた。さらに、哺乳子ヤギのASPのアミノ酸パターンはラットのそれとも類似したものであった。また、MBSあたりのASP排泄量はラットと子ヤギで同一水準にあった。

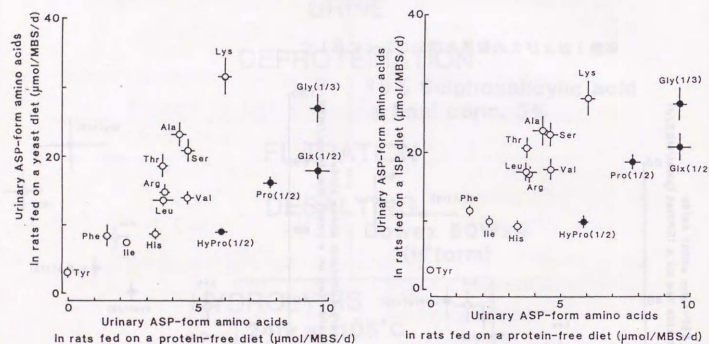


Fig. 5-1-3. The amino acids pattern of urinary ASP from rats fed of a ISP diet or a yeast diet compared with a protein-free diet. See Fig. 5-1-2 legend for other details.

実験2では、絶食前後のASPのアミノ酸パターンはよく類似していた。単胃動物では無蛋白質飼料給与により食餌性アミノ酸の吸収量を0とすることができるが、反刍動物では無蛋白質飼料を給与しても唾液由来の尿素などを利用してルーメンでMBPが合成されるので同様の実験手法は適用できない。そこで、無蛋白質給与の代わりに絶食条件を設定した。第3章3節で示したように1週間の絶食負荷条件下では腸管からのアミノ酸の吸収はほとんどないものと推定され、絶食7日目のASPは体蛋白質の分解に由来する、いわゆる内因性の排泄、体内蛋白質代謝の最終産物と考えられる。絶食前後でASPのパターンが類似していることは、ASPが体内代謝の最終産物であること、絶食により体蛋白質の分解量が減少していることを示唆している。

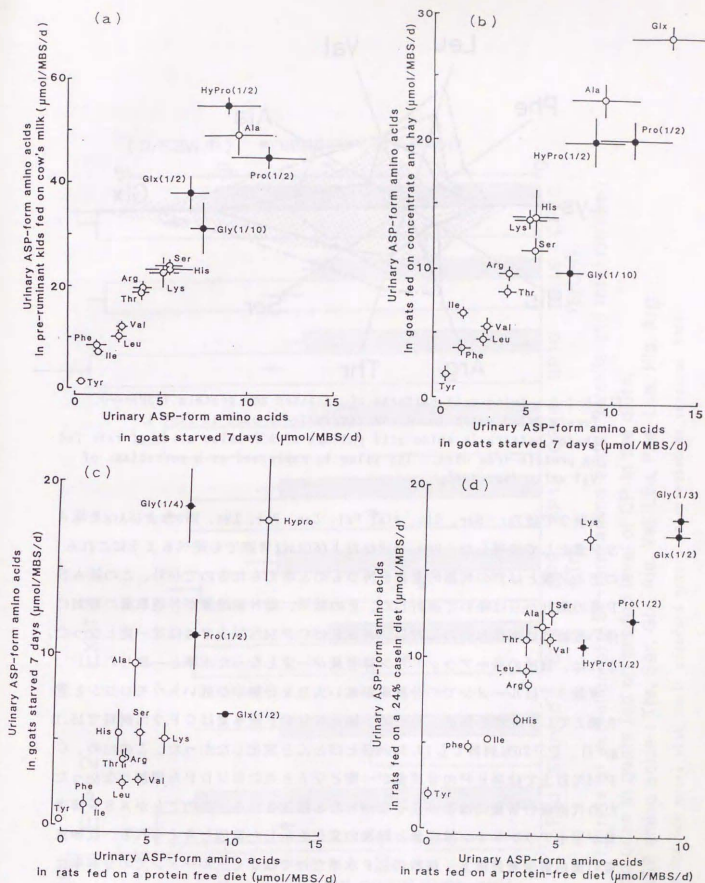


Fig. 5-1-4. The excretion of ASP-form amino acids in (a): kids fed on cow's milk or goats starved 7 days, (b): goats fed on concentrate and hay or those starved 7 days, (c): goats starved 7 days or rats fed on a protein free diet, (d): rats fed of a 24 % casein diet or those fed on a protein-free diet. See Fig. 5-1-2 legend for other details.



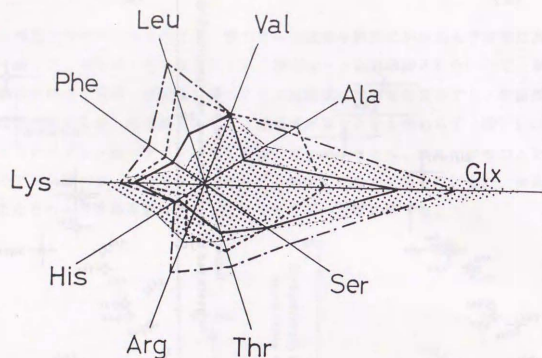


Fig. 5-1-6. Amino acid patterns of isolated soy protein (ISP---), Torula dried yeast (----) and casein (—) used in Expt 1. Shadow pattern is amino acid pattern of ASP-amino acids of rats fed on protein-free diet. The value is expressed as a percentage of Val value (Val=100).

実験3ではThr, Ser, Glx, Ala, Val, Leu, Phe, Lys, HisおよびArgを総ASP量として表現した。Pro, HyProおよびGlyは考察でも述べるようにこれらのアミノ酸とは別の代謝的意義を持つものと考えられるので(65)、この総ASP量の集計からは除いて検討した。その結果、総N排泄量がN摂取量の増加に伴い直線的に増加したのに対し、ASPはCP14%以上ではほぼ一定となった。これは、前述の尿中アラントイン排泄量が一定となった水準と一致した。

実験3ではルーメンでの分解率が高い大豆を分解率が低いトウモロコシと置き換えてCP水準を調整したため、推定RUDP給与量はCP9%飼料で18.1g/日、CP20%飼料でも19.3g/日とほとんど変化しなかった。このため、CP14%以上ではMBPの合成量が一定となると共にRUDPも増加しなかったため代謝蛋白質量には差が生じなかったと推定される。このことがASP排泄量が尿中アラントイン排泄量と同様の变化を示した原因と考えられる。反芻家畜の蛋白質栄養評価上、飼料のCP水準だけでなく、ルーメンでの分解率についての情報が重要であるが、尿中アラントインおよびASP排泄量はナイロンバッグ法によるルーメン分解率の推定結果の妥当性を評価する指標として有効なことが示された。

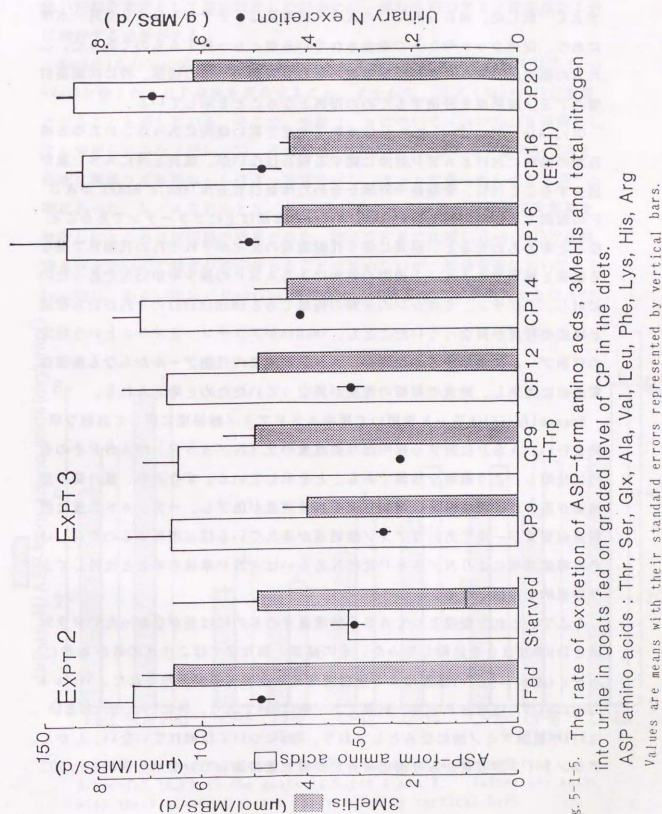


Fig. 5-1-5. The rate of excretion of ASP-form amino acids, 3MeHis and total nitrogen into urine in goats fed on graded level of CP in the diets. ASP amino acids: Thr, Ser, Glx, Ala, Val, Leu, Phe, Lys, His, Arg. Values are means with their standard errors represented by vertical bars.

ASPのアミノ酸パターンは供試動物やその飼養条件、飼料蛋白質源によらずよく一致した。MBSあたりのASP排泄量は、子ヤギとラットで同一水準にあり、従来ラットやヒトで報告されている値とも一致するものであった。これらの結果は、ASP量が反芻家畜の蛋白質栄養の一つの指標、特に代謝蛋白質のアミノ酸組成を評価するための指標となることを示している。

Gly、Ala、Glx、Pro、HyProは哺乳子ヤギで高い傾向にあった。いわゆる哺乳期の動物におけるASP排泄に関する報告はないが、成長と共にASP量が減少すること(65)、骨格筋や肝臓を含めた体蛋白質全体(Whole Body)がASPの起源であるのに対しGly、Pro、HyProの起源は主にコラーゲンであることなどと考えあわせると、成長に伴う代謝速度の変化がそれぞれの代謝系で異なる結果と解釈できよう。1週間の絶食によるASPの減少率が55%であったのに対し、アクチン、ミオシンの分解の指標である3MeHis(36)のそれが25%程度と反応の程度が異なっていたことも、3MeHisがアクチン、ミオシンという特定の代謝プールに由来するのに対し、ASPが複数の代謝プールからなる体蛋白質全体に由来し、絶食の影響の程度が異なっていたためと考えられる。

Noguchiら(65)はラットを用いて尿中ASPアミノ酸排泄に関して詳細な研究を行い、ASPに対する尿中総N排泄量の比( $N/ASP$ )がASPそのものに比較し、より鋭敏な指標であることを示している。すなわち、蛋白質の生物価が高ければ蓄積N量は増加し尿中N排泄量が低下し、一方、ASP量は摂取蛋白質量が一定であればアミノ酸組成が優れているほど増加するので(64, 65)その相乗効果により $N/ASP$ 比はNあるいはASP単独の場合と比較してより効果的な指標となる。

そこで、これを指標としてASP排泄量そのものには差がなかったCP9%区とTrp添加区とを比較してみた。その結果、添加区ではこの比の値が有意に小さく(表5-1-2)、Trp添加による蛋白質栄養の改善効果が示唆された。Storm & Ørskov(197)はMBPの第一制限アミノ酸はMetであり、時にLys、ArgあるいはHisが制限アミノ酸になるとしており、Trpについては触れていない。しかし、アラントイン排泄量から可消化MBPが最大量に達していないと判断されるC

P9%区ではRUDPのアミノ酸組成が代謝蛋白質全体の制限アミノ酸(栄養価)の決定に関与したと考えられる。トウモロコシのアミノ酸組成から判断するとTrpが不足していた可能性がある。本実験のようにルーメンでの分解率が低い飼料を主体として飼料設計した場合には、飼料原料のアミノ酸組成を十分に検討する必要がある。

Noguchiら(65)は総ASP量の代わりとしてASP態(Leu+Val)〔以下(Leu+Val)と略〕がASP全体を代表すること、すなわち、 $N/(Leu+Val)$ が指標となることも示している。そこで、実験2、3について(Leu+Val)を指標としても解析してみた(図5-1-7)。その結果、(Leu+Val)は総ASP量の8-10%と処理に関係なく各個体ともほぼ一定値を示し、ラットで得られた値とも同一水準にあった。 $N/ASP$ 比と $N/(Leu+Val)$ 比により実験3の結果の有意差を検討したところほぼ同様の結果を得た。総ASP量に比較し(Leu+Val)では情報量が少ないので精度が若干落ちることは否めないが、反芻家畜においても(Leu+Val)、あるいは $N/(Leu+Val)$ が指標として有効なことが明らかとなった。

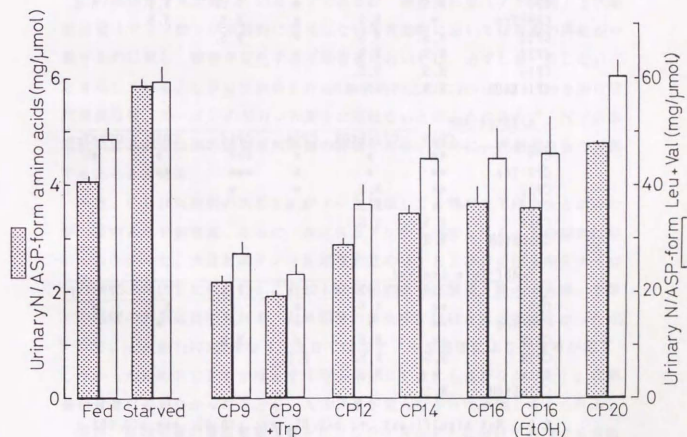


Fig. 5-1-7. Urinary nitrogen (N)/ASP-form amino acids (▨) or N/Leu+Val (□) in the goats in Expts 1 and 2. Values are means with their standard errors represented by vertical bars.



Table 5-1-2. Summary of statical analysis of Expt 3.

N/MBS	CP20	CP16EtOH	CP16	CP14	CP12	CP9+Trp
CP9	**	*	**	***	*	N.S.
CP9+Trp	**	*	**	**	N.S.	
CP12	**	N.S.	***	*		
CP14	**	N.S.	*			
CP16	*	N.S.				
CP16EtOH	*					

Total ASP	CP20	CP16EtOH	CP16	CP14	CP12	CP9+Trp
CP9	N.S.	N.S.	*	N.S.	N.S.	N.S.
CP9+Trp	*	N.S.	*	N.S.	N.S.	
CP12	N.S.	N.S.	*	N.S.		
CP14	*	*	N.S.			
CP16	N.S.	N.S.				
CP16EtOH	N.S.					

ASP-form Leu+Val	CP20	CP16EtOH	CP16	CP14	CP12	CP9+Trp
CP9	N.S.	*	*	N.S.	N.S.	N.S.
CP9+Trp	*	N.S.	*	N.S.	N.S.	
CP12	N.S.	N.S.	*	N.S.		
CP14	N.S.	N.S.	*			
CP16	N.S.	N.S.				
CP16EtOH	N.S.					

N/Total ASP	CP20	CP16EtOH	CP16	CP14	CP12	CP9+Trp
CP9	**	*	*	***	*	**
CP9+Trp	**	*	*	***	**	
CP12	**	N.S.	*	*		
CP14	*	N.S.	N.S.			
CP16	N.S.	N.S.				
CP16EtOH	N.S.					

N/ASP-form Leu+Val	CP20	CP16EtOH	CP16	CP14	CP12	CP9+Trp
CP9	**	N.S.	*	*	N.S.	*
CP9+Trp	**	*	*	*	*	
CP12	**	N.S.	*	N.S.		
CP14	N.S.	N.S.	N.S.			
CP16	*	N.S.				
CP16EtOH	N.S.					

N.S.: Not significant, \*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ , \*\*\*:  $p < 0.001$ .

ここで、反刍動物におけるN/ASP比の有効性について考察してみたい。

単胃動物の尿中Nの起源は直接は体組織に由来するNを含め消化吸収されたアミノ酸Nに由来するものと考えられる。すなわち、N/ASP比は代謝蛋白質そのものを評価していることになる。ところが反刍家畜の尿中Nにはルーメンから吸収された  $\text{NH}_3\text{-N}$  に由来するNが含まれ、小腸から吸収された代謝アミノ酸Nのみに由来するのではない。飼料蛋白質の分解率が高く、かつ、ルーメン微生物による  $\text{NH}_3\text{-N}$  の同化量が少ない場合には、 $\text{NH}_3\text{-N}$ 由来のNの割合が相対的に高まろう。そのため、N/ASP比の分子の尿中N排泄量は必ずしも代謝蛋白質量を直接に反映していないので、N/ASP比を代謝蛋白質そのものの指標とすることは必ずしも妥当とは言えないかもしれない。しかし、ルーメンから  $\text{NH}_3\text{-N}$  として吸収されるNは一般的には蛋白質栄養上の損失と言えるから、それが増加することは飼料蛋白質栄養価のものが低いことを意味し、N/ASP比は飼料蛋白質の栄養価の指標と言える。

この議論は一見矛盾しているようであるが、飼料蛋白質(アミノ酸)と代謝蛋白質(アミノ酸)が本質的に変化しない単胃動物においては両者の評価が一致するのに対し、両者が変化する反刍家畜においては、必ずしも一致しないことを示している。CP9%飼料とTrp添加飼料の比較においては、Trpを除けば代謝蛋白質、ルーメンの  $\text{NH}_3\text{-N}$  産生に差はないと考えられるので、N/ASP比による評価は飼料蛋白質栄養価の評価であり、同時に、代謝蛋白質の評価でもあると言える。

一方、CP16%飼料の大豆をエタノール処理して分解率を下げようと試みたが、尿中ASP排泄量、さらに、N/ASP比から判断しても、その効果は認められなかった。大豆とエタノール処理大豆のDMおよびNの消失率をナイロンバッグ法により比較したところ、水可溶性の画分(浸漬0時の消失率)を除くと処理の効果は認められず、24時間後の消失率にはほとんど差はなかった(図5-1-8)。大豆粕(197)と異なり、大豆ではエタノール処理により分解率が低下しなかったためRUDPが増えず(可消化MBP量にも差がなかった)、代謝蛋白質量に差がなかったことが、ASP量が変らなかった原因と考えられる。

現在、反刍家畜の蛋白質要求量をRUDPとRDPとに分けて表現する方向にある(12,13)。飼料蛋白質のルーメンでの分解率の推定法として in situ 法

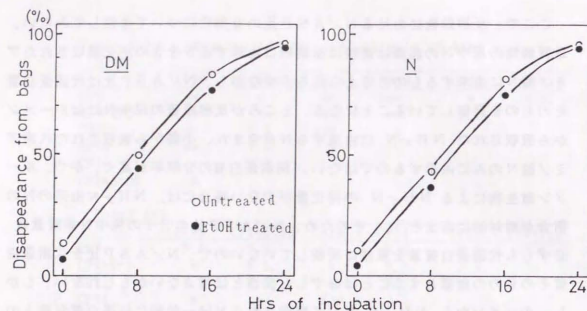


Fig. 5-1-8. Time course of disappearance of DM (right) and N (left) from the nylon bags placed in the rumen of steers with a well established rumen fistula. The percent ruminal DM or N degraded and/or lost from the bags was determined as 100 minus the percent those remaining. The residue of 0 hr was determined by rinsing the bags with tap water to remove water soluble materials. See references (89) and Methods and Materials for other details.

としてのナイロンバッグ法が広く利用されているが、その数値の *in vivo* での妥当性についての評価は困難な点が多かった。実験3で示したように、ASPとアラントインの尿中排泄量から代謝蛋白質と可消化MBP量の推定を行なうことにより、ナイロンバッグ法で求めた値の非侵襲的な評価が可能であることが示された。

本実験から、反芻家畜においても単胃動物と同様、尿中ASP排泄量が蛋白質栄養の状態を判断する指標、特に代謝蛋白質の質と量の評価指標として有効であることが明らかとなった。さらに、N/ASP比が反芻家畜における飼料蛋白質の栄養価を示す指標となることを考察した。手術などのストレスがない本法は泌乳牛や分娩前後の牛などにおける蛋白質栄養の評価法として特に有効と考えられる。今後、これらの方面における応用が期待できる。

## 第6章 総 合 討 論

反芻家畜の蛋白質栄養において最も重要な因子と考えられるルーメンで生産され下部消化管で吸収されるMBP量、いわゆる代謝蛋白質のうちのMBP量（可消化MBP量）の推定方法として尿中アラントイン排泄量を指標とする方法に注目して、本法の有効性を示した。さらに、本法を用いて可消化MBP量に影響を与え得る種々の因子について検討した。

反芻家畜の蛋白質栄養状態の判定においては、単胃動物とは異なり飼料のアミノ酸組成、あるいはその消化率（見かけあるいは真の）は、直接の指標とはなり得ない。すなわち、単胃動物ではこれらは腸管で吸収されるアミノ酸量に直接反映されるのに対し、反芻家畜ではルーメンにおけるNの代謝により飼料のアミノ酸組成と吸収されるアミノ酸組成が異なってくる(9)。このため、代謝蛋白質・アミノ酸の概念が提案されてきた(25)。反芻家畜の蛋白質栄養をアミノ酸レベルで記述するためには、今後、代謝アミノ酸の概念をさらに発展させる必要があろう。

代謝蛋白質量を求めるためには十二指腸と回腸末端にダブルカニューレを装着し、その間の蛋白質の吸収量を測定することが必要となる。しかし、この場合でも内因性の蛋白質の寄与については評価が困難である。さらに、手術手技の困難さの他にも、消化管内容物の定量的ためには24時間にわたる内容物の測定（この場合には個体に大きなストレスを与える）、あるいは内容物の流下速度を一定としてサンプリング時間を短縮するためには多回数給与（1時間毎に定量給餌するアワーフィーディングなど）が必要となる。すなわち、得られた値がいわゆる通常の飼育条件下におけるものとは必ずしも言えない。さらに、3章の緒論で論じたように消化管内容物中の蛋白質に占めるMBP量を求めることには誤差を伴うことから、代謝蛋白質中のMBP量の直接定量が必ずしも精度の高いものとは言えない。また、下部消化管に流下するRUDP量は総蛋白質量からMBP量を差し引いて求めるのが一般的であるが、多くの場合MBP量に比較してRUDP量は量的に少ないことから変動係数がより大きくなる。これらの点から、直接法ではないが尿中アラントイン排泄量を指標と



する本法は、前章まで示してきたように非侵襲法として、定量的な間接法と言えよう。

代謝蛋白質全体の非侵襲的な推定方法として、単胃動物で提案されている尿中ASP排泄速度の利用(64, 65)の可能性を示した。本論文の中ではその可能性を指摘するにとどまり、その確立のためには今後さらに実験が求められる。しかし、上述のように直接的な定量法に大きな困難を伴うことから本法をさらに発展させる必要がある。

代謝蛋白質はMBPとRUDPとに由来する。RUDP量はルーメンでの分解速度とルーメン内容物の流出速度の関数として表現可能であるが、RUDPの下部消化管における消化性の推定に飼料アミノ酸の見かけの消化率が一つの情報を提供し得ることが示された。

このように、尿、糞中のN成分の情報から可消化MBP量の変動を推定できることを明らかにした。現在実用化されている反芻家畜は一般の実験動物にくらべると大型であり、外科的手術により種々のカニューレーションを実施した動物を維持したり、アイソトープの使用が困難であったり、高価である現状では、正確さに欠ける面があるとしても、安価で、かつ、非侵襲的な方法の開発は反芻家畜の蛋白質栄養状態を評価する上で必要不可欠と言えよう。その意味で、本論文で提案した方法は有効と言える。従来から示されている種々の方法と共に、それぞれ適切な場面に応用利用しデータを積み重ねることにより、より信頼性の高い方法として確立されるものと考えている。

今後、この方法をより実用的な飼養条件下に適用していく場合、さらに解決されるべき点がいくつか指摘できる。この点を中心に考察してみたい。

本論文では1日尿を採取し、1日あたりのアラントイン排泄量を求め、この値を中心に議論を進めてきた。アラントイン/DOM比などもその一例である。しかし、大型の反芻家畜である牛の1日尿を正確に採取するためには大がかりな装置を必要とし、実際の飼養現場における適用は不可能に近い。

その点から、前章まで、部分尿を採取しそのクレアチニン濃度を指標としてアラントイン/クレアチニン比を比較する、あるいは1日尿量を推定しそれから1日あたりのアラントイン排泄量を求めるなどの方法について示唆してきた。

第3章および第4章のデータによると、1日あたりの尿中クレアチニン排泄

量は体重1 kgあたり25.8mgであった。この値から、3章、4章の実験に用いたヤギの1日尿量を個体別に推定したところ〔推定尿量(ml) = (25.8 × 体重) / 尿中クレアチニン濃度(mg/ml)〕、推定尿量と実尿量の間には図6-1に示すように高い相関が認められた。さらに、この推定尿量から求めた推定アラントイン排泄量と実アラントイン排泄量との関係を図6-2に示した。本実験は供試ヤギの

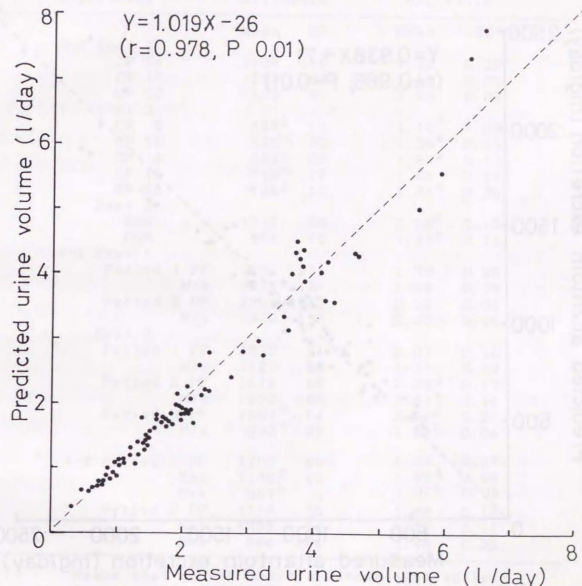


Fig. 6-1. The relationship between urine volume measured and that predicted by urinary creatinine excretion in goats (---: line of unity). The regression equation is  $Y=1.019X-25.5$ . The predicted urine volume was positively correlated to the measured values ( $n=88$ ,  $r=0.9782$ ,  $p<0.01$ ).

体重や飼料給与量の変化が小さく、尿中アラントイン排泄量の変動も大きなものではなかったが、両者の間には有意な正の相関が成立した。もちろん、母集団の平均からその集団中の個々の値を推定しているので、回帰直線の傾きが1に近いことは当然であるが、バラツキが小さく相関が高いことは部分尿の利用が十分に可能であることを示している。

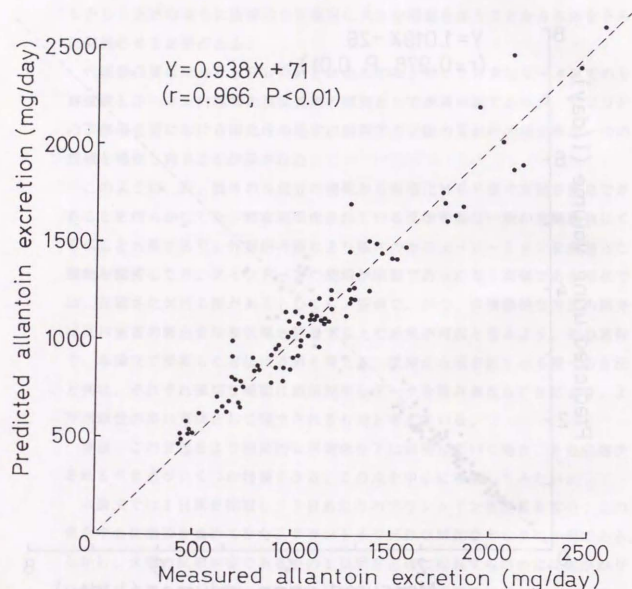


Fig. 6-2. The relationship between measured and predicted urinary allantoin excretion (mg/day) in goats (---:line of unity). The regression equation is  $Y=0.938X+70.9$  ( $r=0.9663$ ,  $p<0.01$ ).

尿中のアラントインとクレアチニンの濃度比は、体重が大きく異なる場合には体重による補正が必要であるが、同一群における給与飼料の差異の影響などを検討する上では一つの指標となろう(表 6-1)。

Table 6-1 The comparison of urinary allantoin excretion (mg/day) and urinary allantoin/creatinine ratio (A/C, mg/mg)

Experiment	Allantoin		A/C ratio	
	Mean	SE	Mean	SE
3-4 Expt 1				
CP 14	1138	118	1.72	0.22
CP 17	1123	82	1.53	0.20
CP 20	1125	57	1.59	0.09
Expt 2				
CP 9	457 <sup>a</sup>	13	1.10 <sup>a</sup>	0.08
CP 12	630 <sup>bc</sup>	35	1.38 <sup>b</sup>	0.15
CP 14	684 <sup>b</sup>	22	1.62 <sup>b</sup>	0.16
CP 16	718 <sup>bc</sup>	16	1.65	0.28
CP 20	726 <sup>c</sup>	10	1.24 <sup>b</sup>	0.06
Expt 3				
SBM	1077	96	2.38 <sup>a</sup>	0.19
CGM	801	48	1.45 <sup>b</sup>	0.11
4-1 Expt 1				
Period 1 PF	1691	211	1.78	0.26
Mix	1611	124	1.68	0.17
Period 2 PF	2292	242	2.29	0.31
Mix	1972	158	2.20	0.26
Expt 2				
Period 1 PF	1375	31	2.07	0.16
Mix	1129	96	1.71	0.08
Period 2 PF	1612	96	2.23 <sup>a</sup>	0.17
Mix	1079	86	1.51 <sup>b</sup>	0.14
Period 3 PF	1697 <sup>a</sup>	64	2.31 <sup>d</sup>	0.21
Mix	993 <sup>b</sup>	32	1.33 <sup>b</sup>	0.04
4-4 Period 1 PF	1133	88	1.91	0.27
Epi	1105 <sup>a</sup>	43	1.82 <sup>a</sup>	0.06
Das	907 <sup>b</sup>	6	1.37 <sup>b</sup>	0.08
Period 2 PF	1118	75	1.89	0.18
Epi	1035	44	1.72	0.11
Das	984	154	1.48	0.25

Means that do not share a common superscript letter differ significantly ( $p<0.05$ ).



本論文では尿中アラントイン排泄量に注目してきたが、今後はさらに、尿に比較して採取が容易な血液について、種々の飼養条件におけるアラントイン濃度の変化を明らかにしていくことが求められよう。すでにヒトでは痛風などとの関連から血中の尿酸レベルの測定は日常の臨床検査項目となっている(199)。実験的にも核酸摂取量と血中尿酸量との間には高い相関があることが示されており(200)、アラントインがプリン塩基の最終代謝産物である反刍動物においては可消化MBP量と血中アラントイン濃度との間に相関関係が存在するだろうことが示唆される。また、血中アラントイン濃度の日内変動の解析から、腸管におけるMBPの吸収を動的に捉えることが可能になるかも知れない。

従来から血液生化学的・生理学的な視点から、反刍家畜の栄養状態を解析しようとする試みがなされているが(201)、その項目にはアラントインは含まれていない。今後、アラントインの分析も進めることから、より正確な栄養状態の解析が可能になるものと考えられる。

また、本論文ではルーメンにおけるMBPの生産量をルーメンで微生物に利用可能なエネルギーとN量の関数として議論してきた。そしてこれらの供給源として飼料のみを考えてきた。エネルギーの利用の面ではこれは原則的に正しいと考えられるが、Nでは飼料以外に唾液あるいはルーメン壁からの尿素Nの流入(リサイクル)がある。摂取N量が増加すればリサイクル率は減少し、このN量がMBP生産における制限因子となることはない。また、NRC(1988年版、13)では、微生物に利用可能なNの利用効率は0.9、飼料Nに対するリサイクルNの割合は0.15として計算しており、蛋白質のルーメン分解率が高い場合には両者は相殺され、微生物に利用可能なNからのMBP生産量には大きな誤差は生じないであろう。しかし、N含量やルーメンでの分解率が低い場合には、リサイクルNのMBP合成に対する影響について、さらに検討する必要がある。

序論でも述べたように、近年反刍家畜の遺伝能力を最大限に発揮させるために様々な飼養方法が提案され、特に、RUDP給与の必要性が強調されている。しかし、いたずらにRUDPのみを給与することはルーメン微生物へのNの供給を不足させることにつながり、ルーメンMBP合成量が減少することを示した(第3章4節)。MBP合成の低下は微生物機能の低下の反映でもある。い

たずらなRUDPや脂肪の多給は避けるべきである。繰り返し述べるまでもなく反刍家畜飼養における基本はルーメン機能を正常かつ十分に発揮させることにある。この視点に立って、新たな飼養法の問題点を克服しながら、それらをさらに発展させていくことが求められよう。その点においても、尿中アラントイン排泄量は、ルーメン機能を示す指標として有効である。今後の活用、応用範囲は広いと言えよう。

## 要 約

反芻家畜における窒素(N)代謝の特徴は、ルーメンにおける飼料蛋白質の分解と、それに続く微生物体蛋白質(MBP)の再合成にある。このため、小腸に流下する蛋白質は、MBPとルーメンで分解されなかった飼料蛋白質(Rumen undegraded protein:RUDP)とからなり、このうちの可消化部分を代謝蛋白質(アミノ酸)とする概念が提案されている。このように、ルーメンにおいて飼料蛋白質の質と量の転換が行なわれる反芻家畜においては、飼料蛋白質ではなく代謝蛋白質の質と量が蛋白質栄養状態を決定づけていると言える。一般的にはMBPが代謝蛋白質の過半を占め、そのアミノ酸組成も比較的一定であることから、可消化MBP量の推定が反芻家畜の蛋白質栄養を評価する上で最も重要と考えられる。しかし、実用化されている反芻家畜は大型であり、蛋白質栄養状態の評価のために手術を実施した実験動物を維持、管理したり、アイソトープを利用することが困難であることから、非侵襲的な評価方法の確立が必要と考えられた。

そこで、本研究では、まず、可消化MBP量の評価法として尿中アラントイン排泄量を指標とする方法の有効性を示した。そして、本法により飼料蛋白質の水準やルーメンでの分解率、ルーメンプロトゾアの存否など、可消化MBP量に影響すると考えられる諸要因を解析した。さらに、非侵襲的な方法が確立されていない代謝蛋白質全体の評価について、ラットやヒトにおいて蛋白質代謝・栄養の新たな評価法として提案されている尿中酸可溶性ペプチド態アミノ酸(ASP)を指標とする方法を用いて解析し、この方法の有効性を示した。

### 1. 反芻家畜の消化管内容物中の核酸分布

反芻家畜の尿中アラントインは主にルーメン微生物中核酸のアリン塩基に由来するとされている。そこで、核酸の消化吸収の動態を知るために消化管内容物中の核酸の分布を調べた。

(1) McAllan & Smithの核酸分画定量法を凍結乾燥処理の省略、遠心分離操作・脂質画分抽出操作の簡略化などにより簡易化した。その結果、短時間での多数サンプルの処理が可能になった。



(2) (1)で確立した定量法を用い、牛の消化管内容物中のRNA、DNAの分布を調べた。その結果、(1) RNAはDNAに比較し速やかに消失し、RNAがDNAに比較し易消化性であることが示された。しかし、両者の小腸上部での消失パターンは総Nと類似しており、核酸は蛋白質と同様の消化性を示すことが明らかにされた。(2) 小腸下部においてDNA濃度が高まる傾向が認められ、この傾向は給餌前に屠殺し内容物を採取した時顕著であった。この原因として、腸管微生物の存在、消化管上皮細胞の脱落の影響などが考えられた。

## 2. 尿中アラントイン排泄量を指標とする可消化MBP量推定

微生物態N化合物には蛋白質と同時に核酸が必ず含まれており、消化吸収された核酸中のプリン塩基は、反刍動物では最終的にアラントインとして尿中に排泄される。可消化MBP量と可消化核酸量、可消化核酸量と尿中アラントイン排泄量との間にそれぞれ比例関係が成立すれば、尿中アラントイン排泄量は可消化MBP量を示す指標となる。そこで、まず尿中アラントイン排泄量が可消化MBP量の指標となることを確認し、さらに、尿中アラントイン排泄量を指標として飼料蛋白質の濃度やルーメンでの分解率、ルーメン微生物叢の差異などの諸要因が可消化MBP量に与える影響について検討した。

(1) 下部消化管に達するプリン塩基量と尿中アラントイン排泄量との関係をトルラ酵母(プリン塩基源)を食道溝反射を維持した哺乳子ヤギに投与して検討した。その結果、下部消化管に酵母を投与すると尿中アラントイン排泄量は速やかに増加し、投与を中止すると投与前の水準に速やかに減少した。さらに、尿中アラントイン排泄量(Y: mmol/day)と投与プリン塩基量(X: mmol/day)との間に  $Y = 0.506X - 0.065$  ( $r=0.973$ ,  $p<0.01$ ) の回帰式を得た。このことから可消化MBP量推定の指標としての尿中アラントイン排泄量の有効性が示された。

(2) 飼料に含まれる核酸が尿中アラントイン排泄量に及ぼす影響を食道溝反射を維持した子ヤギに酵母を液状飼料として給与した場合と固形飼料として給与した場合とを比較することにより検討した。その結果、飼料中のCP含量23% (50%は酵母由来)、核酸N/総Nが12%以上という高核酸飼料給与条件において、ルーメンでの飼料核酸の分解率は55%、尿中アラントインのうちル

ーメン未分解飼料核酸に直接由来する割合は44%程度と推定された。これから、通常の飼料給与条件下では飼料中核酸が尿中アラントイン排泄に占める割合は20%以下と推定された。

(3) 絶食時のルーメン内容物中の核酸濃度と尿中アラントイン排泄量の変化をヤギを用いて検討した。その結果、絶食によりルーメン内容物中のRNAがまず速やかに低下し、DNAは1日程度のラグタイムを示して減少した。総Nに対するRNA、DNAの割合は絶食の進行に従い高まり、微生物Nが他のN成分に比較し下部消化管に流下しにくいことが示された。尿中アラントイン排泄量は絶食により速やかに減少し、4日以降はほぼ一定値(12-15mg/MBS/day)となった。これは内因性のアラントイン排泄量として従来から報告されている値の範囲内にあった。

(4) 飼料蛋白質の濃度やルーメン分解率と尿中アラントイン排泄量との関係を調べた。実験は3回行なった。すなわち、飼料のエネルギー含量を高水準で一定とし、飼料蛋白質のルーメンでの分解率は70%前後でほぼ一定で、CP水準を14、17あるいは20%の3水準に設定した場合、飼料の蛋白質源としてルーメンでの分解率が比較的高い大豆を用いてCP水準を9%から20%に変化させた場合、CPは17%とし主な蛋白質源としてルーメンでの分解率が高い大豆粕(蛋白質の推定分解率62%)とそれが低いコーングルテンミール(CGM)を用いた場合(推定分解率49%)とについて、それぞれヤギを用いて検討した。その結果、CGM飼料を除いて可消化有機物(DOM)量に対する尿中アラントイン排泄量はCP14%以上ではほぼ一定となり、一日あたりの尿中アラントイン排泄量(mg)とDOM摂取量(g)との比は3(mg/g)前後となった。このことから、可消化MBP量を最大にするためには、飼料蛋白質の分解率が比較的高い場合にはCP濃度14%で十分であるが、分解率が50%の時にはCP17%でもルーメン微生物に対するN供給が不足することが明らかにされた。

## 3. ルーメンプロトゾアが尿中アラントイン排泄量に及ぼす影響

通常の反刍家畜ではプロトゾアがルーメンにおけるバイオマスのほぼ50%を占める。そこで、ルーメン微生物叢の変化が尿中アラントイン排泄量に及ぼす影響を、プロトゾア在否の影響を中心に検討した。

(1) 混合プロトゾアの影響をプロトゾア存在および不在ヤギを用いて検討した。その結果、プロトゾアの存在により尿中アラントイン排泄量が減少する傾向が示された。飼料中に非蛋白窒素(NPN)の割合が高い時に減少の程度が大きかった。このことから、混合プロトゾアがルーメンから下部消化管に流下するMBP量を減少させ、可消化MBP量を減少させることが明らかとなった。しかし、この変化は飼料中のNPN濃度が低い時には、採食量や飼料のC/P水準の変化が及ぼす影響ほど顕著ではなかった。また、混合プロトゾアは飼料アミノ酸の見かけの消化率を高めることが明らかにされた。

(2) 反芻家畜のN代謝に及ぼすプロトゾアの影響に関する研究の多くは、混合プロトゾアが存在する個体と全く存在しない個体を比較検討したものであり、特定の種あるいは属のプロトゾアの影響についての検討はほとんどない。そこで、特定のプロトゾアの存在する動物の作出を試み、*Dasytricha ruminantium*あるいは*Epidinium caudatum*のみを定着させたヤギを作出し、尿中アラントイン排泄量に及ぼす影響について検討した。

① ある種の油脂・脂肪を持つプロトゾア除去効果の原因がその構成脂肪酸にあると考え、C<sub>8</sub>からC<sub>18</sub>までの脂肪酸のプロトゾア除去効果を検討したところ、C<sub>10</sub>、C<sub>12</sub>の効果が最大であった。また、*D. ruminantium*あるいは*E. caudatum*に対するC<sub>8</sub>あるいはC<sub>12</sub>の効果は他のプロトゾアに比較し小さく、C<sub>8</sub>あるいはC<sub>12</sub>の給与によりこれらのプロトゾアが単独に存在するヤギを作出できた。

② ①で得たヤギを用いてルーメン発酵やアラントイン排泄量を中心としたN代謝に及ぼす*D. ruminantium*あるいは*E. caudatum*の影響について検討した。その結果、プロトゾア不在ヤギに比較しルーメンVFA中のプロピオン酸のモル比率が高まるとともに、*D. ruminantium*存在ヤギでは尿中アラントイン排泄量に有意に減少した。これから、ルーメンにおけるN代謝や発酵に対してそれぞれのプロトゾアが特有の効果を持つことが示唆された。

#### 4. 代謝蛋白質の全量の評価方法について

代謝蛋白質全体を非侵襲的に評価する方法は確立されていない。そこで、ラットやヒトにおける蛋白質・アミノ酸の栄養状態を示す指標として新たに提案

された尿中酸可溶性ペプチド態アミノ酸(ASP)排泄量を、反芻家畜における代謝蛋白質の評価に応用することを試みた。

その結果、反芻家畜においても尿中ASP量は、ラットやヒトで確認された、①体内代謝の最終産物としての性質を示す、②代謝体重(MBS)あたりの排泄量がラット、ヒトと同一水準にある、③アミノ酸組成が種々の飼養条件下において一定、などの諸性質を示すことが確認された。

これらの結果は、ラット、ヒトなどの単胃動物では尿中ASP量が飼料のアミノ酸組成(消化吸収されるアミノ酸組成、すなわち代謝アミノ酸と本質的に同一と考えられる)を反映したものであるのに対し、反芻家畜においては代謝蛋白質のアミノ酸組成(栄養価)を反映したものであることを示しており、飼料蛋白質のアミノ酸がルーメンで質・量とも変化する反芻家畜の蛋白質栄養評価法としてASPを指標とする方法の有効性が示された。また、総尿中N排泄量とASPとの比が飼料蛋白質の反芻家畜における栄養価の指標となることを示した。

以上のように、尿中アラントイン排泄量が代謝蛋白質中のMBP量(可消化MBP量)の変化を示す指標として有効であることを明らかにし、これを指標として、飼料中のC/P水準だけではなく、ルーメン微生物のN源として供給されるルーメン分解性蛋白質量がMBP合成量の制限因子として重要であることを示した。さらに、尿中ASPやN/ASP比を指標とすることにより代謝蛋白質や、飼料蛋白質そのものの評価が可能であることを明らかにした。非侵襲的に採取可能な尿を用いる蛋白質栄養状態のこれらの評価方法は、小型実験動物での手法の応用が困難な実用大型反芻家畜の蛋白質栄養の解析に有効であり、今後の飼養技術の発展に寄与するものと考えられる。



本論文の作成にあたり、東京大学農学部教授野口 忠博士に終始懇切な御指導と御援助をいただき、さらに、御校閲を賜わった。また、農林水産省畜産試験場生理部長上家 哲 博士には、取りまとめの機会と終始激励をいただいた。ここに、心からの感謝の意を表する。

本研究は、農林水産省畜産試験場生理部生理第四研究室において1980年から89年までに行った試験成績を取りまとめたものである。この間共同研究者として絶大な御指導と御協力をいただいた生理第四研究室長板橋久雄博士、ならびに小林 剛主任研究官、竹中昭雄博士に心から感謝する。

東京農工大学教授船引龍平博士には学生時代より終始変わらぬ御指導と激励をいただき、アラントインの分析方法についても教えていただいた。また、本研究の一部は1985年東京大学農学部農芸化学科栄養化学・家畜飼養学教室における国内留学中に行われたものであり、東京大学名誉教授内藤 博博士（現在共立女子大学教授）には暖かい励ましをいただき、門脇基二博士（現在ペンシルバニア州立大学）、高橋伸一郎博士（現在東京農工大学）にはアミノ酸分析をはじめ実験について御指導いただいた。さらに、千葉県畜産センター酪農試験場飼養技術研究室藤城清司室長からは一部の試験飼料を御恵みいただいた。（株）花王和歌山研究所林 正治研究員からは中鎖脂肪酸をはじめとする油脂サンプルを御恵みいただいた。ここに記して、深く謝意を表する。

1990年夏 著者記す

# 引用文献

- 1) Church, D.C.: The classification and importance of ruminant animals. in The Ruminant Animal Digestive Physiology and Nutrition. 1-13. (edi. D.C.Church), Prentice Hall, Englewood Cliff, 1988.
- 2) 昭和63年度食料需給表、農林大臣官房調査課編、農林統計協会、東京、1990.
- 3) Hungate, R.E., The Rumen and Its Microbes, Academic Press, New York, 1966.
- 4) 乳牛の科学、(梅津元昌監修)、農文協、東京、1966.
- 5) 新乳牛の科学、(津田恒之監修・柴田章夫編)、農文協、東京、1987.
- 6) ルーメンの世界—微生物生態と代謝機能—、(神立 誠・須藤恒二監修) 農文協、東京、1985.
- 7) The Rumen Microbial Ecosystem, (edi. P.N.Hobson), Elsevier Applied Science, London, 1988.
- 8) Bergen, W.G., D.B.Purser and J.H.Cline: Determination of limiting amino acids of rumen-isolated microbial proteins fed to rat. J.Daily Sci., 51: 1698-1699. 1968.
- 9) Kay, R.N.B.: Digestion of protein in the intestines of adult ruminants. Proc.Nutr. Soc., 28: 140-151. 1969.
- 10) Hagemeister, H., W.Lupping and W.Kaufmann: Microbial protein synthesis and digestion in the high-yielding dairy cow. in Recent Advances in Animal Nutrition-1980. (edi. by W.Haresign) 67-84. Butterworths, London, 1980.
- 11) Ørskov, E.R., M.Hughes-Jones and I.McDonald: Degradability of protein supplements and utilization of undegraded protein by high-producing dairy cows. in Recent Advances in Animal Nutrition-1980. (edi. W.Haresign) 85-98. Butterworths, London, 1980.
- 12) Agricultural Research Council. The nutrient requirements of ruminant livestock. Commonwealth Agricultural Bureaux, Slough, 1980.



- 13) National Research Council. Nutrient requirements of dairy cattle. 6th revised edition. National Academy of Science, Washington D.C., 1988.
- 14) Ørskov, E.R. and D. Benzie: Studies on the oesophageal reflex in sheep and on the potential use of the groove to prevent the fermentation of food in the rumen. *Br. J. Nutr.*, 23: 415-420. 1969.
- 15) Chalupa, W.: Rumen bypass and protection of proteins and amino acids. *J. Dairy Sci.*, 58: 1198-1218. 1975.
- 16) Kaufmann, W. and W. Lüpping: Protected proteins and protected amino acids for ruminants. in Protein contribution of feedstuffs for ruminants: application to feed formulation. (eds. E. L. Miller, I. H. Pike and A. J. H. Vans) 36-75. Butterworth, London, 1982.
- 17) Papas, A. M., J. L. Vicini, J. H. Clark and S. Peirce-Sandner: Effect of rumen-protected methionine on plasma free amino acids and production by dairy cows. *J. Nutr.*, 114: 2221-2227. 1984.
- 18) Oke, B. O., S. C. Loerch and L. E. Deetz: Effects of rumen-protected methionine and lysine on ruminant performance and nutrient metabolism. *J. Anim. Sci.*, 62: 1101-1112. 1986.
- 19) 日野常男: ルーメン細菌 *Streptococcus bovis* における乳酸生成の調節—特にルーメン・アシドーシスとの関連、栄養生理研究会報、30: 59-80. 1986.
- 20) Palmquist, D. L. and T. C. Jenkins: Fat in lactation rations: Review, *J. Dairy Sci.*, 63: 1-14. 1980.
- 21) Schneider, P., D. Sklan, W. Chalupa and D. S. Kronfeld: Feeding calcium salts of fatty acids to lactating cows. *J. Dairy Sci.*, 71: 2143-2150. 1988.
- 22) Owen, J. B.: Complete-diet feeding of dairy cows. in Recent Developments in Ruminant Nutrition (eds. W. Haresign and D. J. A. Cole) 312-324. Butterworths, London, 1981.
- 23) Kaufmann, W.: Influence of the composition of the ration and the

- feeding frequency on pH-regulation in the rumen and on feed intake in ruminants. *Livest. Prod. Sci.*, 3: 103-114. 1976.
- 24) Kaufman, W., H. Hagemeister and G. Dirksen: Adaptation to changes in dietary composition, level and frequency of feeding. in Digestive Physiology and Metabolism in Ruminants (eds. Y. Ruckebusch and P. Thivend) 587-602. AVI Publ. Co., Westport, CT, 1980.
- 25) Burroughs, W., A. H. Trenkle and R. L. Vettler: Some new concepts of protein nutrition of feedlot cattle (Metabolizable protein or metabolizable amino acids). *Vet. Med. Small Anim. Clin.*, 66: 238-247. 598. 1971.
- 26) Satter, L. D. and R. E. Roffler: Nitrogen requirement and utilization in dairy cattle. *J. Dairy Sci.*, 58: 1219-1237. 1975.
- 27) 岩崎和雄、新乳牛の科学 (津田恒之監修・柴田章夫編)、164-175、農文協、東京、1987.
- 28) 古谷 修: 小腸フィステル装着豚に基づく飼料栄養評価法の開発に関する研究. *日畜会報* 60: 899-907. 1989.
- 29) 蛋白質の品質評価—蛋白質食品の栄養評価のために— P. L. Pellett and V. R. Young編、星合和夫訳、国際連合大学、光琳、東京、1981.
- 30) Ørskov, E. R. and I. McDonald: The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage. *J. agric. Sci., Camb.*, 92: 499-503. 1979.
- 31) Buttery, P. J.: Protein synthesis in the rumen: its implication in the feeding of non-protein nitrogen to ruminants. in Principle of Cattle Production. (eds. H. Swan and W. H. Broster) 145-168. Butterworths, London, 1976.
- 32) Buttery, P. J. and D. J. A. Cole: Chemical analysis: Sources of error. *Proc. Nutr. Soc.*, 36: 211-218. 1977.
- 33) Buttery, P. J.: Aspects of the biochemistry of rumen fermentation and their implication in ruminant productivity. in Recent Advances in Animal Nutrition-1980. (ed. W. Haresign) 140-156. Butterworths.

London, 1981.

- 34) Stern, M. D. and W. H. Hoover: Methods for determining and factors affecting rumen microbial protein synthesis: A review. *J. Anim. Sci.*, 49: 1590-1603. 1979.
- 35) Leng, R. A. and J. V. Nolan: Nitrogen metabolism in the rumen. *J. Dairy Sci.*, 67: 1072-1089. 1984.
- 36) 西沢直行:  $N^E$ -メチルヒスチジン(3-メチルヒスチジン)による骨格筋ミオフィブリルタンパク質の分解速度の測定法の確立とその応用、日本栄養食糧学会誌 36: 409-423. 1983.
- 37) Blaxter, K. L. and A. K. Martin: The utilization of protein as a source of energy in fattening sheep. *Br. J. Nutr.*, 16: 397-407. 1962.
- 38) Elliott, R. C. and J. H. Topps: Nitrogen metabolism of African cattle fed diets with or on adequate energy, low-protein content. *Nature*, 197: 668-670. 1963.
- 39) Topps, J. H. and R. C. Elliott: Relationship between concentrations of ruminal nucleic acids and excretion of purine derivatives by sheep. *Nature*, 205: 498-499. 1965.
- 40) Topps, J. H. and R. C. Elliott: Partition of nitrogen in the urine of African sheep given a variety of low protein diets. *Anim. Pro.*, 9: 219-227. 1967.
- 41) Pfeffer, E., J. Klapsing und C. Besecke: Untersuchungen über den Einfluss von Zulagen verschiedener Kohlenhydrate oder flüchtiger Fettsäuren auf den Stickstoffumsatz von Hammeln. *Z. Tierphysiol., Tierernährg. u. Futtermittelkde.*, 35: 101-112. 1975.
- 42) Vercoe, J. E.: Urinary allantoin excretion and digestible dry-matter intake in cattle and buffalo. *J. agric. Sci., Camb.*, 86: 613-615. 1976.
- 43) Offer, N. W., R. F. E. Axford and R. A. Evans: The effect of dietary energy source on nitrogen metabolism in the rumen of sheep. *Br. J. Nutr.*, 40: 35-44. 1978.
- 44) Antoniewicz, A. M., W. W. Heinemann and E. M. Hanks: The effect of

changes in the intestinal flow of nucleic acids on allantoin excretion in the urine of sheep. *J. agric. Sci., Camb.*, 95: 395-400. 1980.

- 45) Antoniewicz, A. M. and P. M. Pisulewski: Measurement of endogenous allantoin excretion in sheep urine. *J. agric. Sci., Camb.*, 98: 221-223. 1982.
- 46) Laurent, F. und B. Vignon: Veränderungsfaktoren der Allantoinausscheidung bei Schafen und Ziegen. *Arch. Tierernähr.*, Berlin 33: 671-681. 1983.
- 47) Giesecke, D., M. Stangassinger and W. Tiemeyer: Nucleic acid digestion and urinary purine metabolites in sheep nourished by intragastric infusions. *Can. J. Anim. Sci.*, 64 (Suppl.): 144-145. 1984.
- 48) Lindberg, J. E.: Urinary allantoin excretion and digestible organic matter intake in dairy goats. *Swedish J. agric. Res.*, 15: 31-37. 1985.
- 49) Kreuzer, M., M. Kirchgesner, R. J. Kellner und F. X. Roth: Nährstoffverdaulichkeit, N-Stoffwechsel und Allantoinausscheidung von Hammeln bei Variation der Protein- und Energiekonzentration. *Z. Tierphysiol., Tierernährg. u. Futtermittelkde.*, 55: 144-159. 1986.
- 50) Bickel-Baumann, C. und J. Landis: Allantoinausscheidung im Harn und Gesamtstickstoffausscheidung in Kot als Indikatoren für die mikrobielle Proteinsynthese im Pansen des Wiederkäuers. *Z. Tierphysiol., Tierernährg. u. Futtermittelkde.*, 56: 275-281. 1986.
- 51) Fujihara, T., E. R. Ørskov, P. J. Reeds and D. J. Kyle: The effect of protein infusion on urinary excretion of purine derivatives in ruminants nourished by intragastric nutrition. *J. agric. Sci., Camb.*, 109: 7-12. 1987.
- 52) 松岡 栄・松岡 豊・藤田 裕: 蛋白質とエネルギー摂取量および蛋白質給源の違いがメン羊の尿中窒素成分の分布に与える影響、日畜会報 59: 261-268. 1988.
- 53) 松岡 栄・村上光男・藤田 裕: 蛋白質の過剰摂取がメン羊の尿中窒素成



- 分の分布に及ぼす影響、帯大研報Ⅰ、16: 1-5. 1988.
- 54) Lindberg, J.E., H. Bristav and A.R. Manyanga: Excretion of purines in the urine of sheep in relation to duodenal flow of microbial protein. *Swedish J. agric. Res.*, 19: 45-52. 1989.
  - 55) 入来常徳・伊藤謙一・阿部又信: 3-6カ月齢子牛において飼料のC:P水準とN源が異なる場合の増体、N出納および尿中プリン誘導体排泄量、日畜会報 60: 916-922. 1989.
  - 56) Lindberg, J.E.: Nitrogen metabolism and urinary excretion of purines in goat kids. *Br. J. Nutr.*, 61: 309-321. 1989.
  - 57) Chen, X.B., E.R. Ørskov and F.D. Deb. Hovell: Excretion of purine derivatives by ruminants: endogenous excretion, differences between cattle and sheep. *Br. J. Nutr.*, 63: 121-129. 1990.
  - 58) Chen, X.B., F.D. Deb. Hovell, E.R. Ørskov and D.S. Brown: Excretion of purine derivatives by ruminants: effect of exogenous nucleic acid supply on purine derivative excretion by sheep. *Br. J. Nutr.*, 63: 131-142. 1990.
  - 59) Chen, X.B., F.D. Deb. Hovell and E.R. Ørskov: Excretion of purine derivatives by ruminants: recycling of allantoin into the rumen via saliva and its fate in the gut. *Br. J. Nutr.*, 63: 197-205. 1990.
  - 60) Veira, D.M.: The role of ciliate protozoa in nutrition of the ruminant. *J. Anim. Sci.*, 63: 1547-1560. 1986.
  - 61) 板橋久雄: 牛の消化生理におけるルーメンプロトゾアの機能、畜試年報、26: 104-117. 1988.
  - 62) Williams, A.G. and G.S. Coleman: The rumen protozoa. In: *The rumen microbial Ecosystem* (ed. P.N. Hobson) 77-128. Elsevier Applied Science, London & New York, 1988.
  - 63) Bird, S.H., J.V. Nolan and R.A. Leng: The nutritional significance of rumen protozoa. Regulation of microbial metabolism in the rumen ecosystem. (edis. S. Hoshino, R. Onodera, H. Minato and H. Itabashi), Japan Scientific Societies Press, Tokyo, 1990. (in the press)
  - 64) Noguchi, T., A. Okiyama, H. Naito, K. Kaneko and G. Koike: Some Nutritional and physiological factors affecting the urinary excretion of acid soluble peptides in rats and women. *Agric. Biol. Chem.*, 46: 2821-2828. 1982.
  - 65) Noguchi, T., T. J. Nam., H. Kato and H. Naito: Further studies on the nutritional factors affecting the urinary excretion of acid-soluble peptides in rats. *Br. J. Nutr.*, 60: 321-337. 1988.
  - 66) Jackson, T.C., G.T. Schelling, G.E. Mitchell, Jr. and R.E. Tucker: Ingesta DNA-RNA in sheep fed purified or natural diets. *J. Anim. Sci.*, 41: 405. 1975.
  - 67) Jackson, T.C., G.T. Schelling, G.E. Mitchell, Jr. and R.E. Tucker: Nucleic acid bases in sheep ingesta. *J. Anim. Sci.*, 43: 325-326. 1976.
  - 68) McAllan, A.B.: The degradation of nucleic acids in, and the removal of breakdown products from the small intestine of steers. *Br. J. Nutr.*, 44: 99-112. 1980.
  - 69) Ben-Ghedalia, D.: Fate of digesta ribonucleic acid in small intestine of sheep. *J. Dairy Sci.*, 64: 2422-2425. 1981.
  - 70) 板橋久雄: ルーメンの世界—微生物生態と代謝機能—(神立 誠・須藤恒二監修)、354-365. 農文協、東京、1985.
  - 71) Barnard, E.A.: Biological function of pancreatic ribonuclease. *Nature*, 221: 340-344. 1969.
  - 72) Smith, R.H.: Synthesis microbial nitrogen compounds in the rumen and their subsequent digestion. *J. Anim. Sci.*, 49: 1604-1614. 1979.
  - 73) McAllan, A.B.: The fate of nucleic acids in ruminants. *Proc. Nutr. Soc.*, 41: 309-317. 1982.
  - 74) 松本光人・板橋久雄: 反芻家畜の消化管内容物中の核酸分画定量法の簡易化、畜試研報 47: 97-101. 1988.
  - 75) 松本光人・織部治夫・小林 剛・板橋久雄: 牛の消化管内の核酸分布とルーメン内での飼料蛋白質の分解率。第79回日本畜産学会大会講演要旨、110. 1987.

76) 松本光人・小林 剛・板橋久雄：牛の消化管内容物の核酸分布。第80回日本畜産学会大会講演要旨、27、1988。

77) Schneider, W.C.: Phosphorus compounds in animal tissues.

III. A comparison of methods for the estimation of nucleic acids. J. Biol. Chem., 164: 747-751. 1946.

78) Schneider, W.C.: Phosphorus compounds in animal tissues.

I. Extraction and estimation of desoxypentose nucleic acid and of pentose nucleic acid. J. Biol. Chem., 161: 293-303. 1945.

79) Schmidt, G. and S.J. Thannhauser: A method for the determination of desoxyribonucleic acid, ribonucleic acid, and phosphoproteins in animal tissues. J. Biol. Chem., 161: 83-89. 1945.

80) Ogur, M. and G. Rosen: The nucleic acids of plant tissues.

I. The extraction and estimation of desoxypentose nucleic acid and pentose nucleic acid. Arch. Biochem., 25: 262-276. 1950.

81) McAllan, A.B. and R.H. Smith: Nucleic acid metabolism in the ruminant. Determination of nucleic acids in digesta. Br. J. Nutr., 23: 671-682. 1969.

82) Ling, J.R. and P.J. Buttery: The fraction of microbial nitrogen entering the duodenum of sheep. Proc. Nutr. Soc., 35: 39A-40A. 1976.

83) Guinn, G.: Extraction of nucleic acids from lyophilized plant material. Plant Physiol., 41: 689-695. 1966.

84) De Deken-Grenson, M. and R.H. de Deken: Elimination of substances interfering with nucleic acids estimation. Biochim. Biophys. Acta, 31: 195-207. 1959.

85) 水野重樹：核酸の一般的分離・定量法1. 6-111. 学会出版センター、東京、1969。

86) 上代淑人：医化学実験講座第1巻A 生体構成成分I (山川民夫編) 55-59. 中山書店、東京、1971。

87) Keck, K.: An ultramicro technique for the determination of desoxypentose nucleic acid. Arch. Biochem., 63: 446-451. 1956.

88) Munro H.N. and A. Fleck: The determination of nucleic acids.

In Methods of Biochemical Analysis (ed. D. Click), vol 14. 113-176. Interscience and Wiley, New York. 1966.

89) 千葉県畜産センター特別研究報告第1号、千葉県畜産センター、1987。

90) 日本飼養標準乳牛(1974年版)、農林省農林水産技術会議事務局編、中央畜産会、1974。

91) 田野良衛・寺田文典・武政正明・阿部亮・細・山羊による消化試験と飼料分析法、畜試年報、26: 118-133. 1986。

92) 小林 剛・松本光人・板橋久雄：サイレージと濃厚飼料を給与した牛のルーメン発酵の経時的変化に及ぼすモネンシン添加の影響、日畜会報、53: 528-534. 1982。

93) 寺田文典・岩崎和雄・田野良衛・針生吉：反芻家畜における消化率測定のための内部指示物質としての酸不溶性灰分の利用、畜試研報、36: 75-80. 1979。

94) Ben-Ghedalia, D., H. Tagari, A. Bondi and A. Tadmor: Protein digestion in the intestine of sheep. Br. J. Nutr., 31: 125-142. 1974.

95) Van Soest, P.J., Nutritional Ecology of the Ruminant. 195-196. Cornell University Press. Ithaca. 1982.

96) Smith, R.H. and A.B. McAllan: Nucleic acid metabolism in the ruminant. 2. Formation of microbial nucleic acids in the rumen in relation to the digestion of food nitrogen, and the fate of dietary nucleic acids. Br. J. Nutr., 24: 545-556. 1970.

97) McAllan, A.B. and R.H. Smith: Degradation of nucleic acids in the rumen. Br. J. Nutr., 29: 331-345. 1973.

98) McAllan, A.B. and R.H. Smith: Degradation of nucleic acid derivatives by rumen bacteria in vitro. Br. J. Nutr., 29: 467-474. 1973.

99) Molecular Biology of the Gene, 4th ed., (eds. J.D. Watson, N.H. Hopkins, J.W. Roberts, J.A. Steits and A.M. Weiner), 83. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc., Menlo Park. 1987.

100) 寺田文典：飼料の物理性の指標としての粒度の活用について、栄養生理



研究会報 33: 143-154. 1989.

- 101) Cheng, K. J. and J. W. Costerton: Adherent rumen bacteria—their role in the digestion of plant materials, urea and epithelial cells. in *Digestive Physiology and Metabolism in Ruminants*. 227-250. (eds. Y. Ruckebusch and P. Thivend) M. T. P. Press, Lancaster, U.K., 1980.
- 102) Mertens, D. R. and J. R. Lofton: The effect of starch on forage fiber digestion kinetics in vitro. *J. Dairy Sci.*, 63: 1437-1446. 1980.
- 103) Mason, V. C. and F. White: The digestion of bacterial mucopeptides constituents in the sheep. 1. The metabolism of 2,6-diaminopimelic acid. *J. agric. Sci., Camb.*, 77: 91-98. 1971.
- 104) Weller, R. A., F. V. Gray and A. F. Pilgrim: The conversion of plant nitrogen to microbial nitrogen in the rumen of the sheep. *Br. J. Nutr.*, 12: 421-429. 1958.
- 105) Hutton, K., F. J. Bailey and E. F. Annison: Measurement of the bacterial nitrogen entering the duodenum of the ruminant using diaminopimelic acid as a marker. *Br. J. Nutr.*, 25: 165-173. 1971.
- 106) Czerkawski, J. W.: Methods for determining 2-6-diaminopimelic acids and 2-aminoethylphosphonic acid in gut contents. *J. Sci. Food Agric.*, 25: 45-55. 1974.
- 107) Dufva, G. S., E. E. Bartley, M. J. Arambel, T. G. Nagaraja, S. M. Dennis, S. J. Galitzer and A. D. Dayton: Diaminopimelic acid content of feeds and rumen bacteria and its usefulness as a rumen bacteria marker. *J. Dairy Sci.*, 65: 1754-1759. 1982.
- 108) Work, E. and D. L. Deway: The distribution of  $\alpha$ - $\epsilon$ -diaminopimelic acid among various microorganisms. *J. Gen. Microbiol.*, 9: 394-409. 1953.
- 109) Coleman, G. S. and F. J. Hall: Electron microscopy of the rumen ciliate *Entodinium caudatum*, with special reference to the engulfment of bacteria and other particulate matter. *Tissue and Cell* 1: 607-618. 1969.

- 110) Abou Akkada, A. R., D. A. Messmer, L. A. Fina and E. E. Bartley: Distribution of 2-aminoethylphosphonic acid in some rumen microorganisms. *J. Dairy Sci.*, 51: 78-81. 1968.
- 111) Horiguchi, M. and M. Kandatsu: Isolation of 2-aminoethane phosphonic acid from rumen protozoa. *Nature*, 184: 901-902. 1959.
- 112) Ling, J. R. and P. J. Buttery: The simultaneous use of ribonucleic acid,  $^{35}\text{S}$ , 2,6-diaminopimelic acid and 2-aminoethylphosphonic acid as markers of microbial nitrogen entering the duodenum of sheep. *Br. J. Nutr.*, 39: 165-179. 1978.
- 113) Whitelaw, F. G., J. M. Eadie, L. A. Bruce and W. J. Shand: Microbial protein synthesis in cattle given roughage-concentrate and all-concentrate diets: the use of 2,6-diaminopimelic acid, 2-aminoethylphosphonic acid and  $^{35}\text{S}$  as markers. *Br. J. Nutr.*, 52: 249-260. 1984.
- 114) Rahnama, S. H. and B. Theurer: Comparison of various amino acids for estimation of microbial nitrogen in digesta. *J. Anim. Sci.*, 63: 603-612. 1986.
- 115) Smith, R. H. and A. B. McAllan: Some factors influencing the chemical composition of mixed rumen bacteria. *Br. J. Nutr.*, 31: 27-34. 1974.
- 116) Arambel, M. J., E. E. Bartley, G. S. Dufva, T. G. Nagaraja and A. Dayton: Effect of diet on amino and nucleic acids of rumen bacteria and protozoa. *J. Dairy Sci.*, 65: 2095-2101. 1982.
- 117) Bates, D. B., J. A. Gillett, S. C. Barao and W. G. Bergen: The effect of specific growth rate and stage of growth on nucleic acid-protein values of pure cultures and mixed ruminal bacteria. *J. Anim. Sci.*, 61: 713-724. 1985.
- 118) Evans, R. A., R. F. E. Axford and N. W. Offer: A method for estimating the quantities of microbial and dietary proteins flowing in the duodenal digesta of ruminants. *Proc. Nutr. Soc.*, 34: 65A-66A. 1975.
- 119) Walker, D. J. and C. J. Nader: Measurement in vivo of rumen microbial protein synthesis. *Aust. J. Agric. Res.*, 26: 689-698. 1975.

- 120) Bucholtz, H.F. and W.G. Bergen: Microbial phospholipid synthesis as a marker for microbial protein synthesis in the rumen. Appl. Microbiol., 25: 504-513. 1973.
- 121) Pilgrim, A.F., F.V. Gray, R.A. Weller and C.B. Belling: Synthesis of microbial protein from ammonia in the sheep's rumen and the proportion of dietary nitrogen converted into microbial nitrogen. Br. J. Nutr., 24: 589-598. 1970.
- 122) Storm, E., D.S. Brown and E.R. Ørskov: The nutritive value of rumen microorganisms in ruminants. 3. The digestion of microbial amino and nucleic acids in, and losses of endogenous nitrogen from, the small intestine of sheep. Br. J. Nutr., 50: 479-485. 1983.
- 123) Ørskov, E.R., D.A. Grubb, G. Wenham and W. Corrigan: The sustenance of growing and fattening ruminants by intragastric infusion of volatile fatty acid and protein. Br. J. Nutr., 41: 553-558. 1979.
- 124) 松本光人・板橋久雄: 酵母摂取にともなう哺乳子ヤギの尿中へのアラントイン排泄の増加、日畜会報、59: 395-401. 1988.
- 125) Young, E.G. and C.F. Conway: On the estimation of allantoin by the Rimini-Schryver reaction. J. Biol. Chem., 142: 839-853. 1942.
- 126) 臨床化学分析Ⅱ—含窒素成分—、日本分析化学会編、分析ライブラリー3、斎藤正行・北村元仕・丹羽正治編、東京化学同人、東京、1968.
- 127) Heinrich, M.R., V.C. Dewey, R.E. Praks, Jr. and G.W. Kidder: The incorporation of 8-azaguanine into the nucleic acid of *Tetrahymena geleii*. J. Biol. Chem., 197: 199-204. 1952.
- 128) 神立 誠・斎藤洋子: 酵母蛋白質の栄養価(第Ⅲ報)、栄養と食糧、12: 334-337. 1960.
- 129) Soliman, H.S., E.R. Ørskov, N.T. Davies and I. McDonald: Utilization of proteins from milk and raw or acid-treated *Toprina* Yeast by newly born ruminant lambs and growing rats. J. agric. Sci., Camb., 98: 377-389. 1982.
- 130) 日本標準飼料成分表、農林省農林水産技術会議事務局編、中央畜産会、

- 東京、1975.
- 131) Condon, R.J., G. Hall and E.E. Hatfield: Metabolism of abomasally infused <sup>14</sup>C labeled ribonucleic acid, adenine, uracil and glycine. J. Anim. Sci., 31 (Abstr.): 1037-1038. 1970.
- 132) Smith, R.C., N.M. Moussa and G.E. Hawkins: Utilization of the nucleic acids of *Escherichia coli* and rumen bacteria by sheep. Br. J. Nutr., 32: 529-537. 1974.
- 133) Razzaque, M.A., J.H. Topps, R.N.B. Kay and J.M. Brockway: Metabolism of the nucleic acids of rumen bacteria by preruminant and ruminant lambs. Br. J. Nutr., 45: 517-527. 1981.
- 134) Smith, R.H.: Reviews of the progress of dairy science. J. Dairy Res., 36: 316-331. 1969.
- 135) Ellis, W.C. and W.H. Pfander: Rumen microbial polynucleotide synthesis and its possible role in ruminant nitrogen utilization. Nature, 205: 974-975. 1965.
- 136) 松本光人・小林 剛・板橋久雄: アラントインの尿中への排泄と第4胃に達する核酸量との関係、第75回日本畜産学会大会講演要旨、174. 1984.
- 137) 松本光人・板橋久雄: 尿中アラントイン排泄量からみたルーメン微生物体蛋白質合成に關与する諸要因、栄養生理研究会報 34: 51-67. 1990.
- 138) 浜田龍夫・奥 透・松本光人・高橋敏治: 脱脂乳または全乳を給与したルーメンバイパス牛の血液および牛乳成分に関する觀察、畜試研報 40: 45-49. 1983.
- 139) Church, D.C. Digestive Physiology and Nutrition of Ruminant. vol.2. 662-673. O & B Books. Corvallis. 1971.
- 140) Kleiber, M. (亀高正夫・堀口雅昭共訳)、生命の火—動物エネルギー—、養賢堂、東京、1987.
- 141) 松本光人・小林 剛・板橋久雄: ルーメン内容物中の核酸定量法の検討と絶食に伴う内容物中の核酸含量の変化、日本畜産学会第74回大会講演要旨、9、1983.
- 142) 松本光人・小林 剛・板橋久雄: 山羊尿中への核酸関連物質の排せつパ



- ターンの変化に及ぼす絶食と再給餌の影響、日本畜産学会・第77回大会講演要旨、44、1985。
- 143) 松本光人・小林 剛・板橋久雄：去勢牛の血漿遊離アミノ酸、尿素態窒素、インスリンおよびグルコース濃度の経時的変化に及ぼすモネンシン添加の影響、日畜会報、53：547-552、1982。
  - 144) Warner, A.C.I.: Some factors influencing the rumen microbial population. *J. gen. Microbiol.*, 28: 129-146. 1962.
  - 145) Potter, E.L. and B.A. Dehority: Effects of changes in feed level, starvation, and level of feed after starvation upon the concentration of rumen protozoa in the ovine. *Appl. Microbiol.*, 26: 692-698. 1973.
  - 146) 松岡 栄・古川 修・藤田 裕：メン羊の絶食進行にともなう尿中窒素成分排泄量の経日的変化、日畜会報、59：752-754、1988。
  - 147) Fowle, K.E. and D.C. Church: Effect of starvation and refeeding in goats. *J. Anim. Sci.*, 28: 865. 1969.
  - 148) 松本光人・小林 剛・板橋久雄：飼料蛋白質の給与水準とルーメンでの分解率が尿中アラントイン排泄量に及ぼす影響、日畜会報、61：505-511、1990。
  - 149) National Research Council, Nutrient Requirements of Goats. National Academy of Science, Washington D.C., 1981.
  - 150) 板橋久雄、ルーメンの世界—微生物生態と代謝機能—(神立 誠・須藤 恒二監修)、407-429、農文協、東京、1985。
  - 151) Elliott, R.C. and J.H. Topps: Voluntary intake of low protein diets by sheep. *Anim. Prod.*, 5: 269-276. 1963.
  - 152) 小野寺良次・星野貞夫・板橋久雄・日野常男・秋葉征夫・長谷川信、家畜栄養学、187、川島書店、東京、1989。
  - 153) Weller, R.A. and A.F. Pilgrim: Passage of protozoa and volatile fatty acids from the rumen of the sheep and from a continuous in vitro fermentation system. *Br. J. Nutr.*, 32: 341-352. 1974.
  - 154) Harrison, D.G., D.E. Beever and D.F. Osbourn: The contribution of protozoa to the protein entering the duodenum of sheep. *Br. J. Nutr.*, 45: 521-527. 1979.
  - 155) Abe, M., T. Iriki, N. Tobe and H. Shibui: Sequestration of holotrich protozoa in the reticulo-rumen of cattle. *Appl. Environ. Microbiol.*, 41: 758-765. 1981.
  - 156) Steinhour, W.D., M.R. Stokes, J.H. Clark, J.A. Rogers and C.L. Davis: Estimation of the proportion of non-ammonia-nitrogen reaching the lower gut of the ruminant derived from bacterial and protozoal nitrogen. *Br. J. Nutr.*, 48: 417-431. 1982.
  - 157) Eadie, M.J. and P.N. Hobson: Effect of the presence or absence of rumen ciliate protozoa on the total rumen bacterial count in lambs. *Nature*, 193: 503-505. 1962.
  - 158) 板橋久雄・神立 誠：消化率、窒素蓄積率および反芻胃内容物アミノ酸組成に及ぼす反芻胃内纖毛虫類の影響、日畜会報、45：585-591、1974。
  - 159) 板橋久雄・堅田 彰：牛の反芻胃内纖毛虫類の栄養生理的意義に関する研究 第1報 反芻胃内の微生物群と物質代謝に及ぼす纖毛虫類の影響について、東北農試研報 52：161-168、1976。
  - 160) 脇田正彰・星野貞夫：メン羊第一胃内における *Entodinium* 属纖毛虫とデンプン利用菌との数量的関係、日畜会報、60：627-631、1989。
  - 161) Itabashi, H., T. Kobayashi and M. Matsumoto: The effects of rumen ciliate protozoa on energy metabolism and some constituents in rumen fluid and blood plasma of goats. *Jpn. J. Zotech. Sci.*, 55: 248-256. 1984.
  - 162) Jouany, J.P., B. Zainab, J. Senaud, C.A. Groliere, J. Grain and P. Thivend: Role of the rumen ciliate protozoa *Polyplastron multivesiculatum*, *Entodinium* sp. and *Iso trichia prostoma* in the digestion of a mixed diet in sheep. *Reprod. Nutr. Develop.*, 21(6A): 871-884. 1981.
  - 163) Williams, P.P. and W.E. Dinusson: Composition of the ruminal flora and established of ruminal ciliated protozoal species in isolated calves. *J. Anim. Sci.*, 34: 469-474. 1972.

- 164) Williams, P. P. and W. E. Dinusson: Ruminant volatile fatty acid concentrations and weight gains of calves reared with and without ruminal ciliated protozoa. *J. Anim. Sci.*, 36: 588-591. 1973.
- 165) Matsumoto, M., A. Takenaka, T. Kobayashi and H. Itabashi: The effect of *Epidinium caudatum* or *Dasytricha ruminantium* on the rumen fermentation and nitrogen metabolism in goats. *A. J. A. S.*, 2: 483-484. 1989.
- 166) 松本光人・小林 剛・板橋久雄: 消化率と尿への窒素化合物の排泄に及ぼすプロトゾア不在の影響. 日本畜産学会第73回大会講演要旨, 12, 1985.
- 167) Warner, A. C. I.: Diurnal changes in the concentrations of micro-organisms in the rumens of sheep fed limited diets once daily. *J. gen. Microbiol.*, 45: 213-235. 1966.
- 168) Abe, M., H. Shibui, T. Iriki and F. Kumeno: Relation between diet and protozoal population in the rumen. *Br. J. Nutr.*, 29: 197-202. 1973.
- 169) 小野寺良次・神立 誠: 反芻胃内纖毛虫類のアミノ酸および蛋白質代謝. IV. カゼインの代謝. 日畜会報, 41: 307-313. 1970.
- 170) 新地周二・神立 誠: 反芻胃内纖毛虫の細胞外および細胞内蛋白質分解活性の性質. 日畜会報, 52: 861-868. 1981.
- 171) Forsberg, C. W., L. K. A. Lovelock, L. Krumholz and J. G. Buchanan-Smith: Protease activities of rumen protozoa. *Appl. Environ. Microbiol.*, 47: 101-110. 1984.
- 172) 高橋二三夫・亀高正夫: 尿素含有飼料給与ヤギにおける尿素利用におよぼすプロトゾア存否の影響. 日畜会報, 47: 192-196. 1976.
- 173) 松本光人・小林 剛・板橋久雄: ヤギにおける飼料中アミノ酸のみかけの消化率に及ぼすルーメンプロトゾアの影響. 日畜会報, 60: 547-552. 1989.
- 174) Ørskov, E. R. Protein nutrition in ruminants, 35, Academic Press, London, 1982.
- 175) Tas, M. V., R. A. Evans and R. F. E. Axford: The digestibility of amino acids in the small intestine of the sheep. *Br. J. Nutr.*, 45: 167-174. 1981.
- 176) Itabashi, H., T. Kobayashi, M. Matsumoto and K. Kameoka: Effect of rumen protein degradability on nitrogen flow and milk production in Holstein cattle. *Proc. XIII Int. Cong. Nutr.*, 11. 1985.
- 177) Ogimoto, K. and S. Imai, Atlas of rumen microbiology, Japan Scientific Societies Press, Tokyo, 1981.
- 178) Dawson, R. M. and P. Kemp: The effect of defaunation on the phospholipids and on the hydrogenation of unsaturated fatty acids in the rumen. *Biochem. J.*, 115: 351-352. 1969.
- 179) Newbold, C. J. and D. G. Chamberlain: Lipids as rumen-defaunating agents. *Proc. Nutr. Soc.*, 47: 154A. 1988.
- 180) Jouany, J. P. and K. Ushida: Protozoa and fibre digestion in the rumen. Regulation of microbial metabolism in the rumen ecosystem. (eds. S. Hoshino, R. Onodera, H. Minato and H. Itabashi) Japan Scientific Societies Press, Tokyo, 1990. (in the press)
- 181) Abou Akkade, A. R., E. E. Bartley, R. Berube, L. N. Fina, R. M. Meyer, D. Henricks and F. Julius: Simple method to remove completely ciliate protozoa of adult ruminants. *Appl. Microbiol.*, 16: 1475-1477. 1968.
- 182) Wright, D. E. and M. W. Curtis: Bloat in cattle. XLII. The action of surface-active chemicals on ciliated protozoa. *N. Z. J. Agric. Res.*, 19: 19-23. 1976.
- 183) Oprin, C. G.: Studies on the defaunation of the ovine rumen using dioctyl sodium sulphosuccinate. *J. appl. Bacteriol.*, 43: 309-318. 1977.
- 184) Galbraith, H., T. B. Miller, A. M. Paton and J. K. Thompson: Antibacterial activity of long chain fatty acids and the reversal with calcium, magnesium, ergocalciferol and cholesterol. *J. appl. Bact.*, 34: 803-813. 1971.
- 185) Nieman, C.: Influence of trace amounts of fatty acids on the growth of microorganisms. *Bacteriol. Rev.*, 18: 147-163. 1954.
- 186) Freese, E., C. W. Sheu and E. Galliers: Function of lipophilic acids as antimicrobial food additives. *Nature*, 241: 321-325. 1973.



- 187) 内堀 毅: 抗菌剤としての界面活性剤の利用、表面 21: 182-193. 1983.
- 188) Henderson, C.: The effects of fatty acids on pure cultures of rumen bacteria. J. agric. Sci., Camb., 81: 107-112. 1973.
- 189) Maczulak, A. E., B. A. Dehority and D. L. Palmquist: Effects of long-chain fatty acids on growth of rumen bacteria. Appl. Environ. Microbiol., 42: 856-862. 1981.
- 190) Maxcy, R. B. and C. W. Dill: Adsorption of free fatty acids on cells of certain microorganisms. J. Dairy Sci., 50: 472-476. 1967.
- 191) Tsuchido, T., T. Hiraoka, M. Takano and I. Shibasaki: Involvement of autolysin in cellular lysis of *Bacillus subtilis* induced by short- and medium-chain fatty acids. J. Bacteriol., 162: 42-46. 1985.
- 192) Abe, M. and T. Iriki: Mechanism whereby holotrich ciliates are retained in the reticulo-rumen of cattle. Br. J. Nutr., 62: 579-587. 1989.
- 193) Eadie, J. M.: Interrelationships between certain rumen ciliate protozoa. J. Gen. Microbiol., 29: 579-588. 1962.
- 194) 原生動物図鑑、(猪木正三編)、652-674、講談社、東京、1981.
- 195) 松本光人・小林 剛・板橋久雄・野口 忠: 尿へ排泄される酸可溶性ペプチド (ASP) のヤギにおける動態。第82回日本畜産学会大会大会要旨、3、1989.
- 196) van der Aar, P. J., L. L. Berger, G. C. Fahey, Jr. and N. R. Merchen: Effect of alcohol treatments of soybean meal on ruminal escape of soybean meal protein. J. Anim. Sci., 59: 483-489. 1984.
- 197) Storm, E. and E. R. Ørskov: The nutritive value of rumen microorganisms in ruminants. 4. The limiting amino acids of microbial protein in growing sheep determined by a new approach. Br. J. Nutr., 52: 613-620. 1984.
- 198) Rogers, Q. R. and A. E. Harper: Amino acid diets and maximal growth in the rat. J. Nutr., 87: 267-273. 1965.
- 199) 加賀美年秀: 蛋白・窒素化合物 尿酸、総合臨床 27: 2125-2132. 1978.

- 200) Zollner, N.: Purine and pyrimidine metabolism. Proc. Nutr. Soc., 41: 329-342. 1983.
- 201) 佐藤 博: 乳牛における血液成分とその栄養生理的意義、日畜会報、57: 659-670. 1986.

