

反芻胃内繊毛虫類の有無がヤギの血漿遊離

アミノ態窒素濃度に与える影響

萩 森 一 郎

反芻胃内絨毛虫類の有無がヤギの血漿遊離
アミノ酸窒素濃度に与える影響

麻布大学大学院

獣医学研究科 博士課程

萩 森 一 郎

目次

序論	5.
第I章．実験方法および材料	19.
第1節．血漿遊離アミノ態窒素測定法の検討	19.
1．ニンヒドリン法による血漿遊離アミノ態窒素の定量法	21.
2．ニンヒドリン法による血漿遊離アミノ態窒素定量法の改良	33.
3．ニンヒドリン法による血漿遊離アミノ態窒素定量の微量化	43.
4．要約	53.
第2節．無麻酔採血法の検討	56.
1．ラット尾静脈および頸静脈より無麻酔採血の目的	56.
2．ラット無麻酔尾静脈穿刺採血法	57.
3．ラット無麻酔頸静脈穿刺採血法	62.
4．要約	68.

第3節 . 反芻胃内絨毛虫類採集法の検討	70.
1 . 反芻胃内絨毛虫類の採集目的	70.
2 . ウシの反芻胃内絨毛虫類大量採集法 (採集法 I · II)	72.
3 . 要約	78.
第II章 . 反芻胃内絨毛虫類給与がヤギの血漿遊離アミノ態窒素濃度に与える影響	80.
第1節 . 乾燥反芻胃内絨毛虫類の給与実験	80.
1 . 実験目的	80.
2 . 実験方法	81.
3 . 結果および考察	86.
4 . 要約	103.
第2節 . 凍結反芻胃内絨毛虫類の給与再実験	106.
1 . 実験目的	106.
2 . 実験方法	106.
3 . 結果および考察	111.

4 . 要約	133.
第III章 . プロピオン酸給与がヤギの血漿 遊離アミノ態窒素濃度に与える 影響	136.
第1節 . プロピオン酸給与量の検討	136.
1 . 実験目的	136.
2 . 実験方法	138.
3 . 結果および考察	142.
4 . 要約	145.
第2節 . プロピオン酸給与実験	147.
1 . 実験目的	147.
2 . 実験方法	148.
3 . 結果および考察	151.
4 . 要約	159.
第IV章 . 反芻胃内絨毛虫類給与がラットの 血漿遊離アミノ態窒素濃度に 与える影響	161.
第1節 . 凍結反芻胃内絨毛虫類の給与 実験	161.
1 . 実験目的	161.

2 . 実験方法	162.
3 . 結果および考察	165.
4 . 要約	172.
第2節 . 凍結反芻胃内絨毛虫類の給与 再実験	174.
1 . 実験目的	174.
2 . 実験方法	175.
3 . 結果および考察	178.
4 . 要約	185.
第V章 . 総合考察および総括	187.
第1節 . 総合考察	187.
第2節 . 総括	200.
謝辞	212.
引用文献	213.

序 論

反芻動物の第一胃と第二胃は栄養上區別することが困難であることから両者を併せて反芻胃⁽⁵⁵⁾と呼ばれている。反芻胃には数十種類の細菌と絨毛虫が生息しており、これらの微生物は宿主動物が摂取した飼料成分を好気的および嫌気的に分解して自身の代謝に利用すると同時に、代謝産物を反芻胃内に放出している。従って、反芻動物の栄養は複胃の構造とそこに生息する微生物の活動とによって大きく支配されており、反芻動物の栄養を理解するには、それぞれの胃の機能と微生物（細菌および絨毛虫）の機能を解明しなければならない。

また反芻動物の複雑な複胃の構造と反芻胃内微生物の作用は、鼓張症・外傷性第二胃横隔膜炎その他の前胃疾患、第四胃変位その他の第四胃疾患、ケトーシスその他の代謝障害

など反芻動物特有の疾病を発症させる原因となり、反芻胃内微生物とその作用は宿主動物の栄養のみならず広く健康状態にも影響を与えるものと考えられている。

反芻動物が古くから家畜として飼養され、その生産物に対する期待が大きかったこともあり、反芻動物の反芻胃および反芻胃内微生物に関する研究は比較的早い時代から研究者たちの関心を集め、これらの研究が行なわれていた。その結果、多くの知識が集積され、現在ではルミノロジー (Ruminology) という学問分野を形成し、この分野における知識はすでに多くの成書にまとめられている。
(22, 23, 28, 37, 64, 71, 95, 106, 125)

反芻動物と反芻胃内微生物の関係は、動物と微生物の生理的相互関係をもつ最も代表的な例の一つであり、このことは畜産学および獣医学の各学問分野に関係する多くの研究課題を包含している。本研究は家畜栄養学の立場から反芻胃内絨毛虫類 (絨毛虫) の有無が宿主動物の蛋白質栄養ことに血漿遊離アミノ

態窒素 (PAN) 濃度に与える影響について研究した。このため序論では、これまでに知られている繊毛虫の機能および繊毛虫の有無による種々の相違点について家畜栄養学の立場から論じた。

反芻動物が摂取した飼料は、反芻胃内でその大部分が微生物 (主として細菌) により代謝され、反芻胃内微生物は飼料成分を利用し、同時に多量の代謝産物 (アンモニア・揮発性脂肪酸・発酵ガス) を反芻胃内に放出する。宿主動物は反芻胃壁から速やかに多量のアンモニアおよび揮発性脂肪酸 (VFA) を吸収し、発酵ガスは嘔気として口から放出する。

一方、反芻胃内には飼料のほかに大量の唾液が流入し、唾液には尿素や塩類が含まれ、尿素は反芻胃壁からも分泌されている。宿主動物のこれらの生理機能は反芻胃内環境の恒常性に役立っており、その結果、反芻胃内は微生物にとって好適な培養槽となっている。

反芻胃内微生物の細菌および繊毛虫の殆ど

は嫌気性であり、通常、胃内容液 1 ml 当りそれぞれ 10^6 と 10^5 個体含まれている。⁽³⁸⁾ この莫大な数の反芻胃内微生物は、反芻胃という共通の環境下で相互に密接な関連を持ちながら相互の物質代謝や増殖に影響を与えていると考えられる。

繊毛虫は 1843 年、Grudy と Delafond⁽³²⁾ により発見された。それ以後、繊毛虫の形態学的分類は当時の顕微鏡で観察が可能であったことより比較的早くから発展した。⁽³⁸⁾ 反芻胃内細菌の代謝機能は人工培養の可能なものについて、多くの研究が行なわれた結果、細菌の代謝機能についてはかなり解明されているが、繊毛虫の代謝機能は繊毛虫の培養が難しいこともあって発展が遅れていた。1942 年に Hungate⁽³⁸⁾ は、*in vitro* における繊毛虫の長期培養に成功し、それ以後、多くの研究者がこの培養を応用発展させて除々に繊毛虫の機能が解明されてきた。しかし、現在でも繊毛虫の純粋培養は成功されていないため、繊毛虫の培

養実験は細菌の共存下で行なわれており、得られた結果は細菌による影響も含まれていることから、その解釈には十分注意を払う必要がある。

これまでの研究により絨毛虫の蛋白質は細菌のそれよりも消化率が高い、^(14, 15, 73) 絨毛虫および細菌の体蛋白質のアミノ酸組成は摂取飼料による影響が少ない、^(15, 74, 127) 絨毛虫および細菌の種類間のアミノ酸組成の差は殆ど無い、^(40, 132) 絨毛虫は Lys 含量が多いことから宿主動物の蛋白質栄養に貢献しているとする根拠になっている。⁽³⁵⁾

Horiguchi 等は、絨毛虫体蛋白質のアミノ酸組成を検討中に C-P 結合をもつ特殊なアミノ酸 (2-アミノエチルホスホン酸) を発見した。⁽⁹⁰⁾

Omodera 等は絨毛虫が ϵ -ジアミノピメリン酸 (DAP) からの Lys 生成能をもつことを認め、細菌の細胞壁の DAP が Lys 合成の材料として絨毛虫に利用されると考えた。^(87, 88, 93) 絨毛虫の粒食性は彼らの食物摂取法として重要であり、^(87, 88, 93) 摂取した飼料片および細菌は体蛋白質の合成、

多糖類の貯蔵、VFAの産生に利用される。これらの絨毛虫の機能に関する知識は、絨毛虫が反芻動物の栄養に重要な役割を果たしていることを明らかにしたが、絨毛虫の反芻胃内生息の意義については今だ統一的な見解が得られていない。

すでに述べた絨毛虫の種々の機能は、絨毛虫の生息の意義を解明するために主として *in vitro* の実験により間接的に検討されたもので、直接的な検討は有絨毛虫 (Faunated animal, F) 動物と無絨毛虫 (Defaunated animal, DF) 動物の諸機能の相違点を比較することによって推測しようとするものである。

Becker⁽¹²⁾ 等は絨毛虫の有無による影響を *in vivo* で明らかにする目的で硫酸銅溶液を用いて絨毛虫を死滅させて F ヤギと DF ヤギの消化率を比較した。その後、Eadie⁽²⁵⁾ 等は出生直後のメン羊を隔離して DF メン羊を作出し、F メン羊と成長速度を比較した。その後、Abou Akkada⁽⁷⁾ 等は Dioctyl sodium sulfosuccinate (Aerosol

OT) を用いて DFウシを作出し、Bird等⁽¹⁶⁾は Nomyl phenol ethoxylate (teric GNa) を用いて DFの子ウシを作出した。このように DF動物を作出する方法の発達によって F動物と DF動物に関する多くの相違点が報告されている。

DF動物の細菌数は F動物のそれより著しく多くなり^(24, 57)、DF動物は F動物に比べて細菌の活性が高いと考えられている^(27, 59)。絨毛虫の有無による細菌の種類構成は一般に変化する場合が多いが^(26, 27, 67)、変化の少ない場合も報告されている⁽⁵⁹⁾。

F動物の成長や飼料効率^(5, 21, 58)は DF動物のそれより良かったという報告と両動物間での相違は認められなかったという報告がある^(12, 20, 25, 27, 100, 132, 133)。Bird等⁽¹⁶⁾は子ウシに低蛋白質・高エネルギー飼料を給与したときと子ヒツジに蛋白質水準 4.6% までの飼料を給与したとき⁽¹⁷⁾、これらの動物の成長と飼料効率は Fよりも DFの方が高かったが、蛋白質水準が 6.3% 以上になると差がなくなる⁽¹⁷⁾と報告されている⁽¹²⁵⁾。高橋等は尿素 1.5% を含む飼料(粗蛋白質含量約 10%) をヤギに給

与して絨毛虫の有無による窒素保留率を検討した結果、FヤギよりDFヤギの方が窒素保留率が高いことを報告している。以上の結果より絨毛虫の有無が宿主動物の成長、飼料効率、窒素保留率に与える影響は給与飼料の条件、特に、栄養水準により異なるものと考えられている。

⁽¹⁰⁰⁾ Poundem, ⁽²⁷⁾ Eadie, ⁽¹³²⁾ Williams, ⁽⁵¹⁾ 板橋等はDF動物の腹囲がF動物のそれより大きいことを報告しており、この結果は絨毛虫の有無が宿主動物の体形にまで影響を与えていることを示している。

F動物とDF動物の反芻胃内における種々の物質代謝については次のような相違点が報告されている。粗飼料多給時と濃厚飼料多給時における粗繊維の消化率は前者では差異が認められないが、後者ではF動物の方が低い。⁽⁶⁸⁾

反芻胃内容物の移動速度はF動物とDF動物間の差異が認められない。⁽⁶⁶⁾ F動物の反芻胃内アミンモニア濃度はDF動物のそれより高い。^(5, 21, 27, 47, 49, 51, 58, 69, 125) F動

物の反芻胃内VFA濃度はDF動物のそれより通常^(20, 21, 47, 51, 58)高いが、大麦を給与したウシではFよりDF^(130, 131)の方が高く、またF動物とDF動物間の差異が^(49, 58, 68)認められないこともある。F動物の反芻胃内^(49, 51, 58, 69)VFA組成は酪酸またはプロピオン酸が高まる^(5, 27, 133)という報告があり、結果は一致していない。

Youssef, 阿部等⁽⁴⁾による *in vitro* の培養実験の結果から絨毛虫は細菌に比べて酪酸の産生が多いことからF動物では酪酸濃度が高まるものと考えられる。F動物の反芻胃内遊離アミノ^(10, 48)態窒素濃度および反芻胃内遊離アミノ⁽⁴⁸⁾酸濃度⁽⁵⁰⁾はDF動物のそれより高い。この要因としてDF動物では蛋白質の分解が減少したためと考えられており、前途の反芻胃内アンモニア濃度の相違は主として反芻胃内遊離アミノ⁽⁵⁰⁾酸濃度の差に基づくものと考えられている。

F動物とDF動物の血液諸成分については次のような相違点が報告されている。F動物の血漿尿素態窒素(PUN)濃度はDF動物のそれより通常^(51, 58, 125)高いが、逆にDF動物の方がF動物の

(6)
 それより高いことも報告されている。Klopfemsteim⁽⁵⁸⁾等は高蛋白質低エネルギー・低蛋白質高エネルギー・高蛋白質高エネルギーの飼料をヒツジに給与して絨毛虫の有無による影響を検討した。その結果、Fヒツジの反芻胃内アンモニア濃度およびPUN濃度は高蛋白質飼料給与のときDF動物のそれより高く、低蛋白質飼料のときの反芻胃内アンモニア濃度はFヒツジの方が高いにもかかわらずPUN濃度はDFヒツジの方が多少高いことを報告した。これらの結果から絨毛虫の有無がPUN濃度と与える影響は給与飼料とその栄養水準によって相違することが示された。しかし、F動物の反芻胃内アンモニア濃度はDF動物より常に高いこと(5, 21, 27, 47, 49, 51, 58, 69, 125)から、F動物のPUN濃度はDF動物のそれより通常高いものと考えられる。

F動物の血漿遊離アミノ酸(PAA)濃度は⁽⁵⁸⁾DF動物のそれより低いことが、Klopfemsteim,⁽¹⁰¹⁾ Pursler,⁽⁵⁸⁾ 板橋等⁽¹⁰²⁾によって報告されている。KlopfemsteimやPursler等は、この要因としてLys

が制限アミノ酸となるためとし、⁽⁵⁰⁾板橋等もある種のアミノ酸が制限因子となる可能性を指摘した。その後、⁽⁵⁸⁾Klopfensteinや⁽¹⁰²⁾Purser等が反芻動物の制限アミノ酸の検索に用いた方法^(2, 3, 51, 58, 102)では飼料その他の条件の相違にかかわらず^(3, 97, 98)LysまたはIleが第一制限アミノ酸になることが多く、この方法で得られた結果は既知⁽⁹⁷⁾の蛋白質の制限アミノ酸と必ずしも一致しないなどの問題が指摘され、彼等の結果について再検討⁽⁵¹⁾する必要があると考えられる。また板橋等はDFウシの血漿中Lys含量がFウシのそれより高いという前述の諸結果と矛盾した結果、絨毛虫の有無によるPAA濃度の相違は反芻胃内VFAに由来する蛋白質合成のためのエネルギー源の差に基づく結果であると推察した。

しかし、絨毛虫の有無が反芻胃内VFA濃度およびその組成(特にプロピオン酸)に与える影響^(5, 20, 21, 27, 47, 49, 51, 58, 68, 69, 130, 133, 137)は給与飼料の組成によって一定でないことから、これらの考察から絨毛虫の有無によって生じたPAA濃度の相違を説明するのは、

不十分であると考えられた。その理由は反芻動物のPAA濃度が単胃動物のそれに比べて攝取飼料^(45, 65, 103, 115)その他の影響にかかわらず比較的安定^(45, 65, 103, 115)であることが知られていることから、F動物のPAA濃度がDF動物のそれより低い現象の要因は、先の研究者等が考察した要因のほかに何かPAA濃度に差をもたらす因子が存在するのではないかと考えられるからである。そして著者は、絨毛虫の体成分の中にこの因子と成り得る物質が存在し、この因子の作用によって反芻動物のPAA濃度が減少しているのではないかと考えた。

F動物とDF動物における相違には絨毛虫と細菌の共有する機能をどれだけ細菌が代替できるかに基づく差異と細菌では代替することのできない絨毛虫特有の機能に基づく差異が含まれている。すでに述べたF動物とDF動物の種々の相違点の中で、PAA濃度の差異は動物の種類、年齢、飼料、栄養水準にかかわらず認められることより、絨毛虫特有の機能に

基づく差異によるものと推定される。

血漿中の遊離アミノ酸濃度は蛋白質栄養と極めて密接な関係があり、既に詳細に論じられている。⁽⁶¹⁾ この場合、蛋白質およびアミノ酸栄養の指標として用いられているのは、

1. 個々の必須アミノ酸 / 総必須アミノ酸比。
2. 総必須アミノ酸 / 総不可欠アミノ酸比。
3. 総必須アミノ酸 / 総アミノ酸比。

などである。これらの比はアミノ酸分析の結果から計算で求められることもあって、直接血漿中のアミノ酸総量はあまり問題とされなかった。またアミノ酸総量(アミノ態窒素)を定量する簡便な定量法がなかったことも、その原因の一つであろう。

著者はアミノ酸自動分析計を用いずに直接簡便に血漿中のアミノ酸総量をアミノ態窒素として定量する方法を考案し、この方法によるアミノ態窒素の測定値をもつて、既に明らか^(50, 51, 58, 102)にされているF動物とDF動物のPAA濃度の¹⁰変動を表すことができることを確認したので、

血漿遊離アミノ態窒素 (PAN) 濃度を用いて
本研究を進めることにした。

本論文は絨毛虫体が反芻動物 (ヤギ) の PAN
濃度を減少させる機能を有するか否かの検討
を目的とし、そのための実験方法として、屠
殺ウシの反芻胃内容から大量の絨毛虫を分離
採集し、これを DF ヤギに給与した結果をまと
めたものである。

第I章. 実験方法および材料

第1節. 血漿遊離アミノ態窒素定量法の検討

蛋白質、酵素、一部のホルモンなどを構成するアミノ酸の分離法や定量法は、多くの学問分野において極めて重要であり、古くから種々の方法が考案され、発展を続けている。

Moore と Stein 等は、Martin と Symge のシリカゲルカラムによるアミノ酸分離を引き継いで発展させデンブンカラム(121)により遊離アミノ酸の分離に成功したのち、イオン交換樹脂(77) (Dowex 50-8X) を用いて溶出液の比色定量とその記録の自動化に成功してアミノ酸自動分析法(119)を確立した。その後、この方法は迅速化と微量化の方向に改良が加えられ、最良のアミノ酸分析法として広い分野で利用されている。

PAAの研究はアミノ酸自動分析計の普及に伴い栄養学、内分泌学、広く医学、獣医学の分野で盛んに行なわれている。しかし、PAAは殆ど問題とされてい¹ない。PANの測定はヒトや家畜の蛋白質代謝機能診断の指標として、血清蛋白、血中尿素窒素およびアンモニアなどと共に重要な意義を有していると考えられる。

PANの定量法としては滴定法、ガス分析法、⁽⁷⁹⁾比色法、加銅法などがあるが、これらの方法は操作が繁雑で特別の装置を必要とするか、⁽¹¹⁾あるいは定量精度が低い等の問題がある。このため臨床にも応用できる比較的操作が簡単で、特別の装置を必要としないニンヒドリン⁽¹³⁸⁾による比色法の応用を試みた。

ニンヒドリン法を応用するPANの定量に当つては、先ず血漿中に存在するアミノ酸以外のニンヒドリン発色物質の影響を除去する方法について検討し、使用できることを確認した。ついでニンヒドリン法による定量の迅速

化、簡易化を試みた。また本研究の過程で、ラットなどの小動物を使用する可能性が考えられたのでニンヒドリン法の微量化を試みた。

1. ニンヒドリン法による血漿遊離アミノ窒素の定量法

A. 検量線の作成

a. 実験方法

(76, 78)

(105)

Moore と Stein により提案され、Rosem によって改良されたニンヒドリン法に準じて、0.14, 0.18, 0.42, 0.56, 0.63, 0.73, 0.84 mg^N/100ml に調整した L-Leu (溶液) の検量線、ヒトの血漿中濃度⁽¹²⁹⁾を参考にして、アミノ酸以外の発色物質として尿素(溶液)とクレアチン、クレアチニン、尿酸(混合液, Mix. A) の検量線ならびに L-Leu 溶液に同量の L-Leu 濃度に対応している尿素と Mix. A を加えた混合液 (Mix. B) の検量線を作成した。なお、アンモニアとペプチドは血漿中濃度が極めて小さいため、

考慮の対象から除外し、Mix・B 以外の各成分の濃度は推定血漿中濃度の最低値の $\frac{1}{2}$ 、最低値、平均値、最高値、最高値の 2 倍（尿素は最高値の 1.25, 1.5 倍）とした。

6. 結果および考察

図 1 に示したように、Mix・B の吸光度から対応する尿素の吸光度を差し引いた値は L-Leu の検量線の値と一致した。従って、Mix・B の吸光度に与える Mix・A の影響は本実験の目的であるアミノ態窒素の定量よりみれば無視し得る程度であった。すなわち、ニンヒドリン法による血漿中の遊離アミノ態窒素の測定は血漿中の尿素含量を定量し、その値を考慮することによって可能であるとの見通しを得た。なお、L-Leu, 尿素, Mix・A 溶液の窒素に対する吸光係数 ($\text{mg}/100\text{ml}$) およびモル吸光係数 ($\text{M}/1000\text{ml}$) は、それぞれ 15.90, 0.23, 0.09 と 22, 263.3, 634.9, 446.4 であった。このことは、ニンヒドリン法を用いて PAN を定量する場合

にアミノ酸以外の物質の吸光度に与える影響が極めて小さいことを意味している。

B. 検量線の検討

a. 実験方法

実際に、ニンヒドリン法を用いてPANを定量する場合に血漿の適当な希釈倍数は10であつたから、Mix-Aを推定最高値濃度の $\frac{3}{10}$ 倍、尿素を推定最低値濃度の $\frac{1}{10}$ 、 $\frac{3}{10}$ 、 $\frac{3}{10}$ 、 $\frac{4}{10}$ 倍にして、これらが種々のL-Leu濃度の吸光度に与える影響を検討した。すなわち、4個の100 mlメスフラスコ4組を準備し、すべてにMix-A溶液(6.06 mgN/100 ml) 10 mlをとり、さらに各組にはそれぞれL-Leu溶液(14.01 mgN/100 ml) 0, 2, 4, 6 mlをいれ、ついで各組ごとにそれぞれ0.93, 1.87, 2.80, 3.73 mgNの尿素を加え、フラスコを蒸留水で定容とした。従つて、それぞれの組のL-Leu濃度はそれぞれ0, 0.28, 0.56, 0.84 mgN/100 mlとなり、各組内の尿素濃度はそれぞれ0.93, 1.87, 2.80, 3.73 mgN/100 mlとなる。

これらの溶液の吸光度を測定し、L-Leu 濃度ごとの検量線を作成した。

4. 結果および考察

図2に示したように、L-Leu 0, 0.28, 0.56, 0.84 mg N / 100 ml 溶液のそれぞれに血漿中の推定最低濃度の $\frac{1}{10}$, $\frac{2}{10}$, $\frac{3}{10}$, $\frac{4}{10}$ に相当する尿素を加えた溶液の吸光度は、いずれも尿素含量に比例し、その検量線は直線を示した。しかも、それらの回帰係数にはL-Leu 濃度による有意差が認められなかった。そこで4組の測定値をプールした回帰係数を求めると 0.0087 (相関係数 $r = 0.9211$) となり、尿素濃度 1 mg N / 100 ml 当りの吸光度 0.0087 をそれぞれの溶液の吸光度より差し引けばL-Leu のみの吸光度が得られる。尿素の窒素に対する吸光係数 (mg / 100 ml) およびモル吸光係数 (M / 1000 ml) は、それぞれ 0.232, 651.5 であり、先の実験 (A) で示したそれぞれの値 (0.227, 634.9) と一致した。従って、Conway⁽⁴⁶⁾ の微量拡散法によって PUN 含量

を定量し、血漿の吸光度から尿素濃度 $1 \text{ mg N} / 100 \text{ ml}$ 当り 0.0087 を差し引いて得た数値を L-Leu の検量線に当て嵌めることにより血漿中の遊離アミノ酸濃度を求めることができる

C. 血漿のトリクロール酢酸による除蛋白がその吸光度と尿素測定値に与える影響

a. 実験方法

血漿の除蛋白に用いるトリクロール酢酸 (TCA) が血漿の吸光度と尿素の測定値に与える影響を検討するため、L-Leu $0.56 \text{ mg N} / 100 \text{ ml}$ 溶液 (A), L-Leu $5.60 \text{ mg N} / 100 \text{ ml}$ 溶液 (B) を調製した。B 溶液 1 ml をそれぞれ 3 本の試験管に入れ、1 本は蒸留水で 10 ml とし (B'), 他の 2 本にはそれぞれ 10% TCA 溶液 4 ml を入れ、その 1 本には約 5 ml のエチルエーテルを加えて、激しく振盪したのを静置して上層のエチルエーテルを除き、同様の操作を 3 回繰り返す。ついで 0.01 N NaOH 溶液 2.9 ml を加えて pH を調整

したのうち蒸留水で10 mlにした (B')。残りの1本はTCAを除かないで2.5 N NaOH溶液1.15 mlを加えてpHを調整したのうち蒸留水で10 mlにした (B'')。これらの調製溶液の吸光度を測定して比較した。

つぎに尿素9.33 mg N/100 ml溶液 (A)、尿素9.33 + L-Leu 0.56 mg N/100 ml溶液 (A')、尿素93.33 mg N/100 ml溶液 (B)、尿素93.33 + L-Leu 5.60 mg N/100 ml溶液 (C)を調製した。B溶液1 mlずつ2本の試験管にいれ、1本は蒸留水で10 mlとした (B')、残りの1本には10% TCA溶液4 mlを加え、約5 mlのエチルエーテルでTCAの抽出操作を3回行なってから0.01 N NaOH溶液2.9 mlを加えてpHを調整したのうち蒸留水で10 mlにした (B'')。C溶液についてもB溶液の場合と同じようにして、 C' 、 C'' 溶液を調製した。このように調製したA, A' , B' , B'' , C' , C'' 溶液の吸光度と尿素量を測定して比較した。

b. 結果および考察

L-Leu A, B', B'', B''' 溶液の吸光度は表 1 に示した。表 1 より A 溶液の吸光度は B', B'' 溶液の吸光度と殆ど同じ値であったが、B''' 溶液の吸光度はこれらの溶液の吸光度よりもやや高い値を示し、L-Leu 溶液中に含まれる TCA は L-Leu の吸光度を高める傾向が認められた。

つぎに A, A', B', B'', C', C'' 溶液の吸光度は表 2, 尿素の測定値は表 3 に示した。表 2 より B', B'' 溶液の吸光度は A 溶液の吸光度と殆ど同じ値を示した。また C', C'' 溶液の吸光度は A' 溶液の吸光度とほぼ等しい値を示した。表 3 より A, A', B', C' 溶液の尿素的定量値はほぼ一致したが、B'', C'' 溶液の尿素的定量値はほぼ一致したが、B'', C'' 溶液の尿素量は A 溶液の尿素量に比べて約 5.6% 少ない値を示した。これはエチルエーテルによる TCA 抽出操作中に尿素が損失では実験結果が示すように吸光度に与える影響は殆ど認められなかった。

表2, 3に示された結果より、除蛋白血漿中のTCAはその吸光度を高める傾向があり、TCAをエチルエーテルで抽出除去することにより、尿素はやや損失するがTCAが吸光度に与える影響は除くことができる。

D. 除蛋白血漿のpHが吸光度と尿素量の測定値に与える影響

a. 実験方法

ニンヒドリン法によつてPANを定量するためには、除蛋白血漿の吸光度の測定と尿素の定量を必要とする。このためニンヒドリン法⁽⁴⁶⁾とComway法の両分析法に適する血漿のpHについて検討した。また、両分析法の緩衝液の緩衝能を知るため、pHをそれぞれ3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0付近に調整した蒸留水にComway法のウレアゼ・リン酸緩衝液とニンヒドリン法のシアン化ナトリウム・酢酸ナトリウム緩衝液をそれぞれ定量操作時の割合で加え、その溶液のpHをpHメーター (HITACHI・HORIBA) で測

定した。

つぎに 9.33 mg N/100ml の尿素と 0.53 mg N/100 ml の L-Leu を含む混合溶液の pH をそれぞれ 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0 付近に調整して、それぞれの溶液の吸光度と尿素量を両分析法で測定した。

4. 結果および考察

ウレアーゼ・リン酸緩衝液とシアン化ナトリウム・酢酸ナトリウム緩衝液の緩衝能はそれぞれ表 4、表 5 に示した。pH をそれぞれ 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0 付近に調整した蒸留水に両緩衝液をそれぞれの定量操作時の割合に加えた結果、蒸留水の pH はそれぞれ緩衝液の pH に一致した。

つぎに表 6 に示したように、それぞれ pH を 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0 付近に調整した尿素と L-Leu 混合溶液の吸光度と尿素の回収率はほぼ等しかった。これらの結果から、除蛋白血漿の pH は 3.0 ~ 7.0 の範囲内であれば実験上問題とならないことが示された。このため PAN を定

量する除蛋白血漿の pH は 5.0 付近に調整することにした。

E. 血漿の調製および処理法

と D の実験結果より、ニンヒドリン法に供試する血漿は、つぎのように処理することにより満足すべき結果が得られた。すなわち、頸静脈より採取したヘパリン加血液を 2,000rpm で 15 分間遠心分離し、得られた血漿 1 ml を 10% TCA 4 ml とともに遠心管に入れ攪拌し、15 分間静置後、2,500rpm で 15 分間遠心分離して除蛋白血漿 (5 倍希釈) を得る。この 3 ml を試験管に採取し、等量のエチルエーテルを加えて、正確に 30 回激しく振盪したのち、静置して上層のエチルエーテルを注意深く除去する。この操作を 3 回繰り返し、残存する少量のエチルエーテルを自然蒸発させるために 1 時間静置したのち、0.02 N NaOH 1 ml を加えて pH を 5.0 付近に修正する。pH 修正後の血漿はヒト

(129)

の PAN 量と L-Leu の検量線の窒素量とを考慮して、最終希釈倍数が10になるように2 ml の蒸留水を加える。

F. 定量精度の検討

a. 実験方法

ニンヒドリン法による PAN の定量精度を検討するために、ヤギの血漿 2 ml に、L-Leu の 2.30 または 3.70 mg N/100 ml 相当量、尿素の 13.06 または 22.39 mg N/100 ml 相当量、L-Leu 2.30 + 尿素 13.06 mg N/100 ml 相当量および L-Leu 3.70 + 尿素 22.39 mg N/100 ml 相当量の溶液それぞれ 0.5 ml を添加し、無添加血漿の 1.25 倍希釈を対照として、L-Leu-N の添加回収率および尿素有添加したときのアミノ態窒素の測定値に与える影響を検討した。

つぎにヤギの血漿 4 ml に、それぞれ 2.60 および 4.10 mg N/100 ml に相当する Gly 溶液 1 ml を添加し、無添加血漿の 1.25 倍希釈を対照として、アミノ態窒素量を本法と銅錯塩ヨウ素比

(111)
色法で測定して Gly の添加回収率を求め、両分析法を比較検討した。

さらに、8検体のヒツジおよびヤギの血漿を用いて、本法による測定値とアミノ酸自動分析計（日立 KLA-3B）による測定値を比較した。

ホ. 結果および考察

表7、表8に示したように、ヤギ血漿にそれぞれ2レベルの L-Leu または L-Leu + 尿素を添加したときの L-Leu-N の添加回収率の平均値は、それぞれ $100.2 \pm 3.8\%$ 、 $102.4 \pm 8.9\%$ であった。

表9に示したように、ヤギ血漿に2レベルの尿素を添加したときの PAN 量の測定値は、尿素を添加しないときの値に比べて平均 $100.7 \pm 1.9\%$ となり殆ど等しい値を示した。

本法と銅錯塩ヨウ素比色法⁽¹¹¹⁾の測定値を比較した結果を表10に示した。銅錯塩ヨウ素比色法の値は本法の $95.6 \pm 3.2\%$ となり、本法より

やや低い値を示した。また本法と銅錯塩ヨウ素比色法による2レベルで添加したGly-Nの添加回収率は、それぞれ $99.1 \pm 2.1\%$ 、 $87.8 \pm 6.1\%$ であり、本法は銅錯塩ヨウ素比色法に比べて Gly-N の添加回収率が高く、同時に安定した測定値を示した。

ヒツジおよびヤギの血漿⁽¹¹⁹⁾8検体について、本法とアミノ酸自動分析法の測定値を比較した結果を表IIに示した。本法とアミノ酸自動分析法の値は、それぞれ $5.58 \pm 0.92 \text{ mg N/100 ml}$ となり、本法の方が自動分析法より $6.3 \pm 7.7\%$ 高い値を示した。

以上の実験よりPANを定量するためにニンヒドリン法を応用した本法は、比較的定量精度の高い簡便法として十分に利用できることが明らかとなった。

2. ニンヒドリン法による血漿遊離アミノ態窒素定量法の改良

A. 改良の目的

1項において、ニンヒドリン法によるPANの定量法(原法)をほぼ確定した。しかし、原法の血漿の除蛋白に用いたTCAをエチルエーテルで抽出除去する操作は、やや繁雑であり、約90分の時間を要するために改良の余地が残されていた。原法がPANの定量法として臨床面で活用されるためには、この点を改良して一層迅速で容易に行なえるようにすることが望ましいと考えられる。このため血漿の除蛋白の改良を試みた。

B. 検量線の検討

a. 実験方法

1項のcの実験結果より除蛋白血漿に含まれるTCAは、吸光度を高める傾向が認められたため、TCAをエチルエーテルで抽出除去しなければならなかった。この操作を省くためTCAに代わる血漿の除蛋白剤として、アミノ

酸自動分析法の除蛋白剤に用いられているス
(30, 33)
 ルホサリチル酸を取り上げて検討した。

L-Leu 14.01 mg N/100 ml, 24% スルホサリチル
 酸, 3.75 N NaOH 溶液を調製し, 5 個の 100 ml X ス
 フラスコ 3 組を準備し, 各組にはそれぞれ L-
 Leu 14.01 mg N/100 ml 溶液 0, 1, 3, 5, 7 ml を入れ、
 フいですべての X スフラスコに 24% スルホサ
 リチル酸溶液 10 ml と 3.75 N NaOH 溶液 5.16 ml を
 加え、蒸留水で定容とした。従って、それぞ
 れの組は L-Leu 濃度が 0.0, 0.14, 0.42, 0.70, 0.98 mg
 N/100 ml となり、すべてのフラスコは 2.4% スル
 ホサリチル酸を含み、pH は 5.1 付近となる。

盲検には L-Leu を含まない溶液を用い、各
 組ごととにそれぞれの吸光度を測定し、L-Leu
 の検量線を作成した。

4. 結果および考察

2.4% スルホサリチル酸を含む L-Leu 溶液の
 各組ごとのそれぞれの吸光度を測定し、その
 吸光度を回帰分析した結果、図 3 に示したよ

うな回帰直線 ($Y = 0.7173x + 0.0023$) が得られた。また L-Leu の窒素に対する吸光係数 ($\text{mg}/100\text{ml}$) およびモル吸光係数 ($\text{M}/1000\text{ml}$) はそれぞれ 15.9, 22, 210.9 であり、1項の A で示したこれらの値 (15.9, 22, 262.3) とほぼ一致した。

c. 検量線の検討

a. 実験方法

前項の結果より 2.4% スルホサリチル酸を含む L-Leu 溶液の吸光度は L-Leu 濃度に比例することが明らかとなった。つぎにヒトの血漿中濃度⁽¹²⁹⁾を参考にして、アミノ酸以外のニンヒドリン発色物質として尿素 (溶液) やクレアチン, クレアチニン, 尿酸 (混合液, Mix. A) が L-Leu の吸光度に与える影響を検討した。

なお、アンモニアとペプチドは血漿中濃度が極めて小さいため考慮の対象から除外した。

最初に L-Leu 14.01 mg N/100 ml, 24% スルホサリチル酸, 3.75 N NaOH 溶液をそれぞれ調製した。つぎに尿素溶液の濃度はそれぞれヒトの

(129)

血漿中濃度の最低値の $\frac{1}{2}$ 、最低値、最高値、最高値の2倍とし、尿素 4.67, 9.33, 14.00, 27.99 mg N/100 ml 溶液をそれぞれ調製した。さらに血漿中濃度の最高値の2倍量の Mix. A 6.06 mg N/100 ml 溶液を調製した。

これらの溶液を用いて、それぞれの成分を定めた濃度にするため、7 ぎのように混合した。すなわち、5 個の 100 ml x ス フラスコ 5 組を準備し、すべてに 24% スルホサリチル酸溶液 10 ml, 3.75 N NaOH 溶液 5.16 ml, Mix. A 6.06 mg N/100 ml 溶液 10 ml をとり、さらに各組には L-Leu 14.01 mg N/100 ml 溶液をそれぞれ 0, 1, 3, 5, 7 ml 入れ、ついで各組ごとにそれぞれ尿素 4.67, 9.33, 14.00, 27.99 mg N/100 ml 溶液を 0, 10, 10, 10, 10 ml 入れ、蒸留水で定容とした。従って、それぞれの組の L-Leu 濃度はそれぞれ 0, 0.14, 0.42, 0.70, 0.98 mg N/100 ml となり、各組内のスルホサリチル酸濃度は 2.4%、pH は 5.1 付近、尿素はそれぞれ 0, 0.47, 0.93, 1.40, 2.80 mg N/100 ml, Mix. A 濃度は全部 0.61 mg N/100 ml となる。

100mlのメスフラスコに24%スルホサリチル酸溶液を10ml, 3.75N NaOH溶液を5.16ml入れ、蒸留水で定容とした溶液を盲検として、それぞれの溶液の吸光度を測定し、L-Leu濃度ごとの検量線を作成した。

長. 結果および考察

図4に示したように、尿素濃度0のL-Leu + Mix. A溶液の吸光度は、いずれもL-Leuの検量線の吸光度と殆ど一致した。この結果、Mix. A (推定血漿中最高濃度の2倍)の吸光度がL-Leuの吸光度に与える影響は極めて少なく無視し得る程度であった。

L-Leu 0, 0.14, 0.42, 0.70, 0.98 mg N/100 ml 溶液に、それぞれ推定血漿中最低濃度の0.5, 1.0, 1.5, 3.0倍に相当する尿素を加えると、いずれのL-Leu濃度においても、吸光度は尿素含量に比例した直線となり、しかもその回帰係数にはL-Leu濃度による有意差が認められなかった。5組の測定値をプールした回帰係数を求めると、

0.0124 (相関係数 $r = 0.9984$) となり、尿素濃度 $1 \text{ mg N}/100 \text{ ml}$ 当り吸光度を 0.0124 差し引けば L-Leu のみの吸光度が得られる。また尿素の窒素に対する吸光係数 ($\text{mg}/100 \text{ ml}$) およびモル吸光係数 ($\text{M}/1000 \text{ ml}$) は、それぞれ 0.236, 666.1 であり、1項の B で示したこれらの値 (0.232, 651.5) とほぼ一致した。

従って改良法では、ウレアーゼ・インドフェノール法⁽¹¹⁾によって直接に血漿尿素を測定し、その $\frac{1}{10}$ 量の尿素濃度 ($\text{mg N}/100 \text{ ml}$) に 0.0124 を乗じて尿素による吸光度を算出し、血漿の吸光度からその吸光度を差し引いて得た数値を L-Leu の検量線に当て嵌めるか、あるいは L-Leu の検量線の回帰直線式より、血漿中の遊離アミノ態窒素濃度を求めることができる。

D. 血漿の調製および処理法

ニンヒドリン法による PAN 定量の改良法に供試する血漿は、つぎのような方法で処理す

る。すなわち採血したヘパリン加血液を2500 rpm で15分間遠心分離し、得られた血漿0.5 (1) ml を6% スルホサリチル酸溶液2 (4) ml とともに遠沈管に入れて攪拌し、15分間静置したのち、2500 rpm で15分間遠心分離して除蛋白血漿(5倍希釈)を得る。この2 (4) ml を試験管に採取し、1.40% NaOH 溶液2 (4) ml を加え(10倍希釈)攪拌する。盲検に用いる溶液は蒸留水0.5 ml と6% スルホサリチル酸溶液2 ml をともに試験管に入れて攪拌し、この2 ml を別の試験管に採取し、1.55% NaOH 溶液2 ml を加えて調製する。比色に用いるこれらの溶液のpHは、いずれも5.1付近となる。

E. 定量精度の検討

a. 実験方法

血漿の除蛋白にスルホサリチル酸を用いて実験を行なった結果、原法のTCA使用時に比べて、はるかに定量操作が容易で所要時間も短縮することができたので、この改良法によ

る PAN の定量精度を検討した。

通常飼養条件下におけるヤギ(5頭)からそれぞれ4回ずつ定時に頸静脈より採血して、両定量法による PAN の測定値を比較した。

つぎにヤギの血漿に L-Leu-N の添加濃度がヒトの PAN 濃度⁽¹²⁹⁾の最低値、平均値、最高値相当量の3レベル、尿素態窒素の添加濃度がヒトの PUN 濃度⁽¹²⁹⁾の最低値の1/2、平均値、最高値の2倍相当量の3レベルになる L-Leu 溶液と L-Leu + 尿素溶液をそれぞれ調製した。すなわちヤギの血漿 1 ml に L-Leu の 4.0, 6.0, 8.0 mg N/100 ml 相当量, L-Leu 4.0 + 尿素 4.67, L-Leu 6.0 + 尿素 11.66, L-Leu 8.0 + 尿素 27.99 mg N/100 ml 相当量のそれぞれの溶液 3 ml を添加し、無添加血漿の4倍希釈を対照として、両定量法による L-Leu-N の添加回収率を比較した。

6. 結果および考察

表12に示したように、ヤギ5頭(計20検体)の PAN を原法と改良法で測定し、その値を比

較した結果、原法の測定値に比べて改良法の測定値は、20検体の平均値が $10.01 \pm 2.3\%$ となり、殆ど等しい値を示した。

つぎに表13・14に示したように、ヤギの血漿に3レベルのL-Leu およびL-Leu + 尿素を添加したときのL-Leu-Nの添加回収率を両定量法で比較した結果、L-Leu-Nの添加回収率の平均値は、それぞれ原法では $100.1 \pm 1.5\%$ 、 $99.8 \pm 1.6\%$ となり、改良法では $100.5 \pm 1.3\%$ 、 $99.9 \pm 1.6\%$ となった。両定量法のL-Leu-Nの添加回収率は殆ど等しい値を示し、尿素レベルの変化によるL-Leu-Nの添加回収率に与える影響も殆ど認められなかった。

以上の実験より、原法のTCAに代わる除蛋白剤としてスルホサリチル酸を用いることによつて、ニンヒドリン法によるPAN定量法の改良法を確定した。改良法の定量精度は原法とほぼ等しく、定量操作は原法に比べて容易で、所要時間を約90分短くすることができた。

3. ニンヒドリン法による血漿遊離ア ミノ態窒素定量の微量化

A. 微量化の目的

ニンヒドリン法を応用して臨床的にも利用
できる迅速で操作の容易なPANの定量を試み
た結果、2項で確定した改良法によつて、ほ
ぼ目的を達成した。しかし、本研究を進める
段階で、ラットに絨毛虫を給与したときのPAN
濃度に与える影響を検討してみる必要が生じ
た。このためには供試ラットから経時的に採
血してPANを測定するための定量法や採血法、
特に採血量を考慮しなければならない。

本項では、まずPANの微量定量化について
検討した。PANの微量定量法としてはDNP法
があるが、これまでのニンヒドリン法を応用
したPAN定量の実験結果から、ニンヒドリン
法のPANの微量定量化も可能であることが示

唆されたので検討した。

はじめに微量化に必要な最少血漿量は改良法の血漿量0.6mlの約 $\frac{1}{4}$ 量の0.15mlを目標にした。

ラットは体重100g当りの全血⁽¹³⁾量および血漿量は体重増加に伴って少なくなる。体重200g-300gラットの全血量および血漿量は体重100g当り、それぞれ5.27-7.51 ml, 3.02-3.88 mlである。このため分析に必要な血漿0.15mlを得るには0.3~0.5(約0.5) mlを採血しなければならぬ。仮りに体重200~300gのラットから0.5 mlを採血すると全血量の約2~4%の採血割合となるが、この程度の経時的(3~4日間隔)な採血量であれば、ラットに与える生理的影響は、殆どないものと判断して、ニンヒドリン法による微量定量法の実験を試みた。

B. 検量線の作成


a. 実験方法

L-Leu の検量線を作成するために14.01 mg N / 100ml, 38% スルホサリチル酸, 3.75 N NaOH 溶液

を準備し、各組にはそれぞれ L-Leu 14.01 mg N / 100 ml 溶液 0, 1, 2, 4 ml 入れ、ついで全部のメスフラスコに 38% スルホサリチル酸溶液 10 ml と 3.75 N NaOH 溶液 8.23 ml を加え、最後に蒸留水を加え定容とした。従つて、それぞれの組の L-Leu 濃度は 0.0, 0.14, 0.28, 0.42, 0.56 mg N / 100 ml となり、スルホサリチル酸濃度はすべて 3.8% となり、pH はすべて 5.1 付近となる。

はじめに 1 組の溶液を用いて、50% イソプロパノール溶液 8, 10, 15, 20 ml による L-Leu の濃度対吸光度標準曲線を作成した。これに基づいて 50% イソプロパノール溶液の希釈量を決め、各組ごとの L-Leu 溶液それぞれの吸光度を測定し、L-Leu の検量線を作成した。

4. 結果および考察

50% イソプロパノール溶液の希釈量ごとの L-Leu 濃度対吸光度標準曲線は  5 に示したとおりである。ラットの PAA 濃度より算出したアミノ態窒素量 (4.95 - 5.75 mg N / 100 ml) と

(81)

Ringbom プロットから 50% イソプロパノール
 の希釈量は 10 ml が適当であった。この結果に
 基づいて、各組ごとの L-Leu 溶液の吸光度を
 測定し、その吸光度を回帰分析した結果、図
 6 に示したような回帰直線 ($Y = 1.344 X + 0.004$)
 が得られた。また L-Leu の窒素に対する吸光
 係数 ($\text{mg}/100\text{ml}$) およびモル吸光係数 ($M/1000\text{ml}$)
 は、それぞれ 16.2, 22809.1 であり、第 3 節の
 B 項で示したこれらの値 (15.9, 22210.9) と
 ほぼ一致した。

C. 検量線の検討

a. 実験方法

ニンヒドリンによるアミノ酸以外の発色物
 質として尿素やクレアチン、クレアチニン、
 尿酸混合液 (Mix. A) が L-Leu の吸光度に与
 える影響についてラットの血清中濃度⁽⁷⁵⁾を参考
 にして検討した。なおクレアチンの濃度は記
 載されてないため、ヒトの血漿中のクレアチン
 とクレアチニン濃度⁽⁸²⁾の比率を用いてラットの

(75)

クレアチニン濃度より算出した。また、アンモニアとペプチドは血漿中濃度が極めて小さいため、これまでと同様に考慮の対象から除外した。

はじめに L-Leu 14.01 mg N/100 ml, 38% スルホサリチル酸, 3.75 N NaOH 溶液を調整し、つぎに尿素溶液の調製濃度はラット血清中濃度の最低値の 0.75 倍, 最低値, 平均値, 最高値, 最高値の 1.5 倍とし、尿素それぞれ 15.02, 20.01, 68.02, 116.02, 174.00 mg N/100 ml 溶液を調製した。

また血清中濃度の最高値の 1.5 倍量の Mix. A 1.22 mg N/100 ml の溶液を調製した。

これらの溶液を用いて、それぞれの成分を定めた濃度にするために、つぎのように混合した。すなわち、それぞれ 6 個の 100 ml x スラスコ 5 組を準備し、すべてに 38% スルホサリチル酸溶液 10 ml, 3.75 N NaOH 溶液 8.23 ml, Mix. A 1.22 mg N/100 ml 溶液 15 ml とり、さらに各組にはそれぞれ L-Leu 14.01 mg N/100 ml 溶液を 0, 1, 2, 3, 4 ml を加え、蒸留水で定容とし

た。

したがってそれぞれの組の L-Leu 濃度は、それぞれ 0, 0.14, 0.24, 0.56 mg N/100 ml となり、各組内のスルホサリチル酸濃度は 3.8%、pH が 5.1 付近、尿素濃度はそれぞれ 0, 0.20, 0.68, 1.16, 1.74 mg N/100 ml, Mix. A 濃度はすべて 0.18 mg N/100 ml となる。100 ml × スフラスコに 38% スルホサリチル酸溶液 10 ml, 3.75 N NaOH 溶液 8.23 ml を入れて蒸留水で定容とした溶液を盲検として、それぞれの溶液の吸光度を測定し、L-Leu 濃度ごとの検量線を作成した。

長、結果および考察

図 7 に示したように、尿素濃度が 0 の L-Leu + Mix. A 溶液の吸光度は、いずれも図 6 に示した L-Leu の検量線を作成したときの吸光度と殆ど一致した。この結果、Mix. A (推定血清中最高濃度 1.5 倍) の吸光度が L-Leu の吸光度に与える影響は極めて少なく無視しうる程度であった。

0, 0.14, 0.28, 0.42, 0.56 mg N/100 ml の L-Leu 溶液に、血清中の推定最低値濃度の 0.75 倍, 1 倍, 1.5 倍に相当する尿素をそれぞれ加えた場合、いずれの L-Leu 濃度においても、吸光度は尿素含量に比例した直線となり、しかもその回帰係数には L-Leu 濃度による有意差は認められなかった。5 組の測定値をプールした回帰係数は 0.016 (相関係数 $r = 0.7526$) となり、尿素濃度 1 mg N/100 ml 当り吸光度を 0.016 差し引けば L-Leu のみの吸光度が得られる。また尿素の窒素に対する吸光係数 (mg/100ml) およびモル吸光係数 (M/1000ml) は、それぞれ 0.226, 633.9 であり、2 項 c で示したこれらの値 (0.236, 666.1) とほぼ一致した。

従って微量定量法では、ウレアーゼ・インドフェノール法⁽¹¹⁾によつて PUN 含量を微量定量 (血漿 0.03 ml) し、その $\frac{1}{25}$ の尿素濃度 (mg N/100 ml) に 0.016 を乗じて尿素による吸光度を算出し、血漿の吸光度からその吸光度を差し引いて得た数値を L-Leu の検量線に当て嵌めるかある

いはL-Leuの検量線の回帰直線式より、PAN濃度を求めることができる。

D. 血漿の調製および処理法

ニンヒドリン法によるPANの微量定量法に供試する血清は、つぎの方法で調製処理する。まず抗凝固剤としてEDTAを用いて採血した血液を2500 rpmで15分間遠心分離し、得られた血漿0.1 mlを5%スルホサリチル酸溶液1.9 mlとともに遠心管に入れて攪拌し、15分間静置したのち2500 rpmで15分間遠心分離して除蛋白血漿(20倍希釈)を得る。つぎに2本の発色用試験管に、この除蛋白血漿を0.8 mlずつ採取し、ついで5.6% NaOH溶液0.2 mlをそれぞれに加えて(25倍希釈)攪拌する。これに3%ニンヒドリン溶液0.5 mlとシアニ化ナトリウム・酢酸ナトリウム緩衝液0.5 mlを加えて加熱発色させる。

盲検に用いる溶液は、蒸留水0.1 mlを5%ス

ルホサリチル酸溶液1.9mlとともに試験管にいれて攪拌し、この0.8mlを発色用試験管に採取し、5.6% NaOH溶液0.2mlを加えて調製する。比色に用いるこれらの溶液のpHは、いずれも5.1⁵付近となる。

E. 定量精度の検討

a. 実験方法

ニンヒドリン法によるPANの微量定量法の定量精度を検討した。

はじめに通常飼養条件下のラット(20匹)から頸静脈採血(エーテル麻酔下で頸部皮膚切開による)した血液のPANを原法と本法によって測定し、その濃度を比較した。

つぎにラットの血漿⁽¹⁸⁾に対するL-Leu-Nの添加濃度がラットのPAAより算出したPAN濃度(4.9, 5.4mg/100ml)を参考とした5.0mg/100mlの0.5, 1.0, 1.5倍相当量、尿素態窒素⁽⁷⁵⁾の添加濃度がラットの血清中尿素態窒素濃度の最低値、平均値、最高値相当量になるL-Leu溶液とL-Leu+

尿素溶液をそれぞれ調製した。すなわちラットの血漿 1 ml に対して、それぞれ 2.5, 5.0, 7.5 mg N/100 ml 相当量の L-Leu, L-Leu 2.5 + 尿素 5.0, L-Leu 5.0 + 尿素 17.0, L-Leu 7.5 + 尿素 29.0 mg N/100 ml 相当量のそれぞれの溶液 1 ml を添加し、無添加血漿の 2 倍希釈を対照として、血漿に対して L-Leu を 3 レベル添加した場合と L-Leu + 尿素を 3 レベル添加した場合の両定量法による L-Leu-N の添加回収率を比較した。

ホ. 結果および考察

表 15 に示したように、ラット 20 匹の PAN を原法と微量定量法で定量し、その測定値を比較した結果、原法の測定値に比べて本法の測定値は、平均値が $9.91 \pm 2.0\%$ となり、殆ど等しい値を示した。

次に表 16, 17 に示したように、ラットの血漿にそれぞれ 3 レベルの L-Leu および L-Leu + 尿素有添加したときの L-Leu-N 添加回収率を両定量法で比較した結果、それぞれの L-Leu-

Nの添加回収率は、原法が $100.0 \pm 2.7\%$ と $100.7 \pm 2.6\%$ となり、本法は $100.6 \pm 3.6\%$ と $102.1 \pm 2.7\%$ となった。両定量法のL-Leu-Nの添加回収率は殆ど等しい値を示した。尿素レベルの変化によるL-Leu-Nの添加回収率は、本法の添加回収率が2.1%高い値を示したが、この程度ならば定量法として問題ないものと判断した。

以上の実験より、ニンヒドリン法によるPANの微量定量法を確定した。本法の定量操作および定量時間は改良法とほぼ等しく、その定量精度は原法と等しいことから、本法が微量血漿中のアミノ態窒素の定量法として使用できることが明らかとなった。

4. 要約

ニンヒドリン法を応用してPANの定量を試みた結果、定量精度が比較的の高い定量法(1項)、改良法(2項)、微量定量法(3項)を確定した。改良法および微量定量法は、定

量操作が容易で、しかも定量時間が短いので、十分利用できる定量法であると考えられる。

ニンヒドリン法を応用したこれらの定量法は、いずれもアミノ酸以外の発色物質として血漿中の尿素含量を測定し、血漿の吸光度から尿素による吸光度を差し引いてPANを求めるため、結果的にPANとPUNを同時に定量する方法である。

ヒトや家畜の臨床では、血清蛋白質のアルブミンとグロブリンや血清中のCaとPのそれぞれの値と合せてA/G比やCa/P比が診断の手掛りとして用いられることがある。

本節で確定したニンヒドリン法によって、PANを定量する方法は、PANを定量するためにPUNも同時に定量することから、両者の測定値の考察ができると同時に、PANに対するPUNの濃度比(PUN/PAN濃度比)を知ることがもできる。PUN/PAN濃度比が体内の蛋白質やアミノ酸の栄養と代謝の状況を示す指標になるのではないかと推測されるので、本法はそ

の測定法としても利用できるであろう。

5

10

15

第2節. 無麻醉採血法の検討

1. ラット尾静脈および頸静脈より無 麻醉採血の目的

本研究の目的である絨毛虫が宿主動物のPAN濃度に与える影響を明らかにするため、ラットを用いる必要が生じた。このため前節の3項において、絨毛虫をラットに給与したときのPAN濃度を測定するために必要なPANの微量定量法を確定した。

また一方で、必要なラットの部分採血法について検討した。

ラットの部分採血法には、尾静脈採血法として尾静脈を切る、尾端を切断する、ラットを40°C位の温室に入れて温める、吸引装置を使用する方法がある。眼窩静脈叢採血法としてガラス毛细管や1/2の毛细ヘマトクリット管を静脈洞に挿入する方法がある。その他の方

法として頸静脈⁽¹⁰⁴⁾穿刺、尾動脈⁽³⁹⁾穿刺、頸動脈⁽¹²⁰⁾および大動脈カニキュレーション⁽³¹⁾がある。

これらの採血法は、いずれも採血前や採血時に手術や麻酔操作が必要であったり、一定の採血量を得ることが難しいことから、本実験の採血法として適当でなかった。このため、本節では、経時的⁽⁴⁴⁾に採血できること、麻酔による種々の影響⁽⁴⁴⁾をできるだけ避けること、採血量が確保できることおよびその量はラットの状態に殆ど影響を与えないなどの条件を満たす採血法を考案した。

2. ラット無麻酔尾静脈穿刺採血法

A. 尾静脈穿刺法

a. 実験方法⁽³⁹⁾

Hurwitz は、エーテル麻酔したラットの尾動脈に皮下注射針を穿刺して採血する方法を報告している。この注射針を使用した採血法は、ラットに与える外傷も小さく、その影響

も殆どないものと考えられる。また、尾部からの採血法ならばラットの保定法を工夫することによって無麻酔で経時的に、しかも一定量(0.5 ml)を採血できると予想されたため、まず体重が300~500gのSD系ラット10匹を交互に使用して、エーテル麻酔し尾静脈から種々の注射針を用いて採血を試みた。

4. 結果および考察

尾静脈穿刺法によってエーテル麻酔したラットの左、右の尾静脈から次のような術式で0.5~1.0 mlの血液を採血できた。すなわち、採血部位は尾根部より5~8 cm、穿刺尾静脈は左、右尾静脈、注射針の大きさは24 Gまたは25 G、穿刺方法は、まず穿刺する尾静脈を親指と人差し指で左、右から押し上げるように摘み、両指で押し上げられた部分の側面から青くみえる尾静脈に向けて、注射針の切り口を上にして尾根部の方向に45°の角度で刺す。はじめ皮膚を通過するとき抵抗があるが2~

3 mmぐらゐで尾静脈に達する。その状態を維持しながら片手の薬指で注射筒のポンプをゆっくり引くと採血できる。採血後は速やかに注射針を抜きとり、しばらく指圧しておくとおと出血しない。

以上の実験から、PANの定量に必要な血液(血漿 0.15 ml)は左、右の尾静脈から採血でき、ラットの保定法を工夫すれば無麻酔で採血できる可能性が認められた。

B. 保定による無麻酔尾静脈穿刺法

a. 実験方法

尾静脈穿刺法が無麻酔で行なえるようにするためにラットの保定器を考案した。

つぎに自作した保定器を用いて体重が300~550gのSD系ラット10匹からPANの定量に必要な血液0.5 mlをそれぞれ4日間隔で3回ずつ採血し、その採血時間を測定した。

長. 結果および考察

写真1, 2は、製作した無麻酔尾静脈穿刺採血用保定器の部品とその保定器によるラットの保定状態を示し、写真3, 4は保定器を使用したときの採血状態を示している。

10匹のラットからそれぞれ3回ずつ 0.5 ± 0.05 mlの血液を採取したときの所有時間は表18に示した。すなわち、保定器を使用することによって無麻酔で尾静脈穿刺採血を行うことができ、血液 0.5 ± 0.05 mlを採血に要する時間は、尾の大きさや尾静脈の太さによる個体差があるけれども3分～13分であった。

短. 無麻酔尾静脈穿刺法による血液の処理法

B項の実験結果より、PANの微量定量に必要な 0.5 mlの血液は、無麻酔で尾静脈から採血できることが可能となった。この血液から分析用の血漿を得る方法は、つぎのように処理

することにより満足すべき結果が得られた。

すなわち注射針 (24G または 25G) の結合部分中に微量の EDTA (約 0.01 mg) を入れ、これを 1 ml の注射筒に強く結合して採血する。

このようにして EDTA 加血液を採血し、血液を漏らさないように注射筒のポンプを抜き取る。つぎに注射針 1 cm を残すようにペンチで切断し、この先端を遠心器の遠心管筒に入る大きさ (0号または1号) のゴム栓に差し込み、注射器筒内に血液が入っている状態で遠心 (3,000 rpm, 15分間) し、分離した血漿をパスツール・ピペットで別の試験管に採取する。このような方法で採血し分離すると比較的容易に血漿を得ることができ、また、注射筒の目盛りを参考にして血漿量も知ることができ。

D. ラットの尾静脈血漿遊離アミノ態窒素濃度の測定

2. 実験方法

ラット用市販飼料を不断給餌しているSD系ラット10匹(表18に示したラット)の尾静脈から無麻酔でそれぞれ4日間隔で3回ずつ採血し、微量定量法によってPAN濃度を測定した。

3. 結果および考察

体重300~550gのSD系ラットの尾静脈血中のPAN濃度とPUN濃度をそれぞれ3回測定し、その平均値を表19に示した。ラット10匹のPAN濃度およびPUN濃度の平均値は、それぞれ $6.83 \pm 0.21 \text{ mg/100ml}$ 、 $12.13 \pm 0.91 \text{ mg/100ml}$ であった。

以上の実験より、ラットの無麻酔尾静脈穿刺法によって得た血液を用いてPANの定量が可能となった。

3. ラットの無麻酔頸静脈穿刺採血法

A. 保定による無麻酔頸静脈穿刺法

a. 実験方法

前節の採血法を用いて、ラットに絨毛虫を
 給与したときのPAN濃度に与える影響を検討
 する実験(第IV章, 第1節)を実施した結果、
 尾静脈穿刺法は、個体によって採血の難易の
 度合が異なるため採血時間が一定しない欠点
 があったため、さらに採血法を検討する必要
 があった。このためRenaud⁽¹⁰⁴⁾による頸静脈穿刺
 法が無麻酔で行なえるようなラットの保定器
 を製作することにした。

金武⁽⁵³⁾等は、無麻酔でラットの連続頸静脈採
 血できる保定器を考案しているが、著者は無
 麻酔頸静脈穿刺法と前節の尾静脈穿刺法の両
 法に使用できる独自の保定器を考案し製作し
 た。つぎに自作した保定器を使用して尾静脈
 および頸静脈よりの採血を試みた。

b. 結果および考察

写真5は、自作した無麻酔頸静脈・尾静脈

穿刺採血用保定器の部品を示し、写真6, 7は、頸静脈採血用保定器とラットが保定された状態を示している。写真8, 9は保定器を使用して無麻酔で頸静脈穿刺採血をしている様子を示している。参考として注射針を穿刺する位置と採血後の出血状態を写真10, 11に示した。

以上の写真に示したように保定器を使用すると無麻酔で切皮することなくラットの左、右の頸静脈から短時間に必要量を採血することができた。その採血方法はつぎのようである。胸部をアルコール綿で清拭したのち、仰向けに保定したラットの胸骨柄の先端を指で触知し、その位置から1.5~2.5cm下方の胸骨上に指を移動し、その位置の左、右0.5~1.5cmの位置から注射針を刺す。注射針の切り口は上に向け、穿刺する角度は胸骨上に描いた正中線の左、右10~20度、水平面に対して30度前後である。つぎに穿刺した注射針が皮膚を通過して横行胸筋に達したときに注射筒内を少

し陰圧し、そのままゆっくり穿刺する。注射針が頸静脈壁を通過するときやや抵抗があり、針先が静脈内に入ると直ちに血液が注射筒内に流入する。その状態で必要量を採血し、採血後は速やかに注射針を抜きとる。

Remaud の穿刺方法に従って、注射針を胸筋に穿刺してから頸静脈採血をすると写真11のように採血後の出血は極少量であった。

写真13, 14は、この保定器を使用して、ラットの尾静脈から無麻酔で穿刺採血している様子を示している。尾静脈穿刺採血は前節A項の方法で行なった。

頸静脈・尾静脈穿刺採血の両採血法に使用できるラットの保定器を考案製作し、両採血法を試みた結果、容易にラットの保定ができ、しかも両採血法に使用できる保定器を製作した。

B. ラットの頸静脈血および尾静脈血の血漿遊離アミノ酸窒素濃度の比較

a. 実験方法

ラットの頸静脈血と尾静脈血のPAN濃度とPUN濃度を比較するために下記の実験を試みた。

市販飼料を不断給餌している体重350-550gのSD系ラット10匹の頸静脈血をほぼ同時に無麻酔穿刺法によって採血し、ニンヒドリン法による微量定量法でPAN濃度を測定した。

下記に同じラットに市販飼料を午前9時から午後5時まで7日間自由採食させて、翌朝の採食前に頸静脈血および尾静脈血を採血し、微量定量法でPAN濃度を測定した。また両採血法の採血所要時間を測定した。

b. 結果および考察

表20に示したように、市販飼料を不断給餌しているラットの頸静脈血および尾静脈血中のPAN濃度は、それぞれ平均6.26, 7.37 mg/100ml, PUN濃度は、それぞれ平均19.72, 18.29 mg/100mlであった。この結果、PAN濃度は尾静脈血の

方が頸静脈血よりも多く、有意差 ($P < 0.01$) が認められた。PAN 濃度は頸静脈血の方が尾静脈血よりも多い傾向を示したが、有意差は認められなかった。

つぎに表21に示したように、同じラットに市販飼料を制限給餌したときの頸静脈血および尾静脈血中のPAN濃度は、それぞれ平均5.51, 6.52 mg/100 mlで、有意差 ($P < 0.05$) が認められた。PAN濃度は、それぞれ平均13.79, 11.52 mg/100 mlで、有意差は認められなかった。ラットに市販飼料を制限給餌したときの両静脈血中のPAN濃度およびPUN濃度は、不断給餌したときのそれぞれの値より低い値を示した。これは飼料蛋白質の摂取量や飼料摂取後の採血時間などによる影響と考^(8.84)えられる。

また、飼料を制限給餌および不断給餌したときの尾静脈血PAN/頸静脈血PAN濃度比は、等しい値 (1.18) を示したが、尾静脈血PUN/頸静脈血PUN濃度比は、制限給餌 (0.84) のときより不断給餌 (0.93) のときの方がやや

高い値を示した。

生体内の主要組織における動静脈血中のPAN濃度は異なり、^(9, 135) マウスでは採血部位によって血液の血球成分が異なることより、^(52, 107) 両静脈血中のPAN濃度およびPUN濃度の差異は当然の結果と考えられる。

頸静脈穿刺法の採血所要時間は、約3分であった。すなわち、この方法は個体による採血の難易がなく、容易にしかも短時間に採血できるので、採血のみを目的とする場合は、無麻酔尾静脈穿刺法よりも優れている。

4. 要約

本章では、ラットから無麻酔で経時的に採血できる方法を試みた。自作したラットの保定器を使用して無麻酔尾静脈穿刺法(2項)と無麻酔頸静脈穿刺法(3項)を確定した。製作した保定器は、ラットを極めて簡単に、しかも短時間に保定でき安全であり、保定器

の大きさをかえれば、マウスの頸静脈穿刺採血にも利用できる。

無麻酔尾静脈穿刺法は、体重300g以上の尾部がよく発達しているラットであれば容易に採血できるが、より小さいラットではより多くの時間が必要である。

これに対して無麻酔頸静脈穿刺法は、注射針を穿刺する位置と角度を習熟すると切皮することなく、1回の穿刺で頸静脈から採血できる。採血量も必要量に応じて調節でき、全採血も可能であるから、無麻酔頸静脈穿刺法は、種々の研究への利用が期待される。

第3節．反芻胃内絨毛虫類採集法の検討

1. 反芻胃内絨毛虫類の採集目的

DFヤギまたはラットに絨毛虫を給与する実験は、絨毛虫の有無が供試動物のPAN濃度と与える影響を研究するための手段として重要である。この実験を実施するには、大量の純粋な絨毛虫を必要とする。このため本節では絨毛虫の大量採集を試みた結果について述べる。

反芻胃内容物中の絨毛虫は、比重や大きさの類似した細菌や飼料細粉とともに混在しているため、純粋な絨毛虫を分離採集するには、細菌や飼料細粉を除去する必要がある。このためには、最初に、反芻胃内容物をガーゼで濾過して、濾液中の飼料細粉を浮上させるために濾液を39-40℃保温する。⁽³⁴⁾ つぎに、この濾液を遠心して絨毛虫区分を採集し、生理食

塩水または種々の塩類溶液で洗浄を繰り返すことにより、殆ど純粋な絨毛虫を得る方法が行われている。
(15, 35, 86)

これまでの比較的多量の絨毛虫採集例として、McNaught⁽⁷³⁾等は絨毛虫の体蛋白質の栄養価を測定するために、ウシの反芻胃内容液 878 l から 447 g の絨毛虫を採集した。また、Horiguchi⁽³⁵⁾等は絨毛虫のアミノ酸組成を研究するためにヒツジの反芻胃内容物 50 Kg から 203 g の絨毛虫⁽¹⁵⁾を採集し、Bergem⁽¹⁵⁾等は絨毛虫の制限アミノ酸を決定するために、ヒツジの反芻胃内容物から約 450 g の絨毛虫を採集した。

以上の絨毛虫採集例は、いずれもフィステルを装着したウシまたはヒツジから定期的に反芻胃内容物を採取して分離採集が行なわれた。本研究では、前述の採集量の数十倍の絨毛虫を必要とするため、膨大な反芻胃内容物から絨毛虫を分離採集しなければならない。

このための対策として、屠殺したウシの反芻胃内容物から絨毛虫を分離採集する方法を

試みた。

2. ウシの反芻胃内絨毛虫類大量採集法 (採集法 I・II)

A. 絨毛虫の採集量とその体成分

a. 実験方法

採集法 I : 屠殺したウシの反芻胃内容物から絨毛虫を分離採集する方法は、写真 14 ~ 19 に示した方法で行った。すなわち、屠殺したウシの I, II 胃と III, IV 胃を分離してから、I, II 胃の内容物を全て採取する (写真 14)。採取した内容物を麻袋に入れ (写真 15)、自作した圧搾器で内容液を得る (写真 16)、⁽³⁴⁾得た内容物を 1.8ℓ のビンに分注して 39 ~ 40℃ で保温する (写真 17)、保温したのうち、絨毛虫の沈降している部分 (写真 18) のみを吸引採取する (写真 19)。絨毛虫を吸引採取したのうち、ビンを再び保温して絨毛虫を沈降させる。この操作を 2 - 3 回繰り返すと内容液中の殆

どの絨毛虫を採取できる。

このようにして絨毛虫濃縮胃内容液をポリ
タンクに集め、実験室に持ち帰る。

実験室では直ちに、小野寺等⁽⁸⁶⁾の方法によつ
て絨毛虫濃縮胃内容液から絨毛虫を分離し、
小野寺等⁽⁸⁹⁾のB.9塩類緩衝液(嫌氣的でない)
で洗淨を繰り返して純粹な絨毛虫を採集した。
絨毛虫の採集はウシの個体別に行ない、絨毛
虫は99.5%エタノールに浸して4~5℃で保
存した。

つぎに、乾燥した絨毛虫を得るために、45
~55℃で60~90分間真空蒸留してエタノール
を除去したのち、-20℃で2日間予備凍結し、
さらに、-20℃で2日間真空凍結乾燥して乾
燥絨毛虫(DP)を得た。

このようにして得たDPの一般成分とアミノ
酸組成を常法によつて分析した。

採集法Ⅱ：採集法Ⅰでは屠殺したウシから
個体別に絨毛虫を分離採集したが、採集法Ⅱ
では、1日に処理した数頭のウシの絨毛虫濃

縮胃内容液（写真19）を1つのポリタンクに集めて分離採集した。分離採集した絨毛虫は、直ちに -20°C で凍結保存し、最後に凍結保存している絨毛虫全部を混合して、ひき続き凍結保存した。

このようにして得た凍結絨毛虫（FP）の一般成分およびその一部を真空凍結乾燥した乾燥絨毛虫（DP）のアミノ酸組成を常法によって分析した。

採集法I, IIにおいて、絨毛虫を分離採集したウシの産地、種類、性別、年齢、採集した胃内容液量、胃内容物中の主な飼料片、屠体の病変などを記録した。

6. 結果および考察

採集法I：表22に示したような114頭のウシの胃内容物から絨毛虫を分離採集した結果、114頭のウシの年齢と胃内容液量、胃内容液量と絨毛虫採集量（表23）の相関係数は、それぞれ $r = 0.352$, $r = 0.260$ となり、ともに有意

差が認められたが、ウシの年令と絨毛虫採集量または胃内容液1ℓ当りの絨毛虫採集量および胃内容液量と胃内容液1ℓ当りの絨毛虫採集量の相関係数は、それぞれ $r = 0.166$, $r = 0.016$, $r' = 0.131$ となり、有意差が認められなかった。

114頭のウシからの絨毛虫採集量は、表23のような分布を示した。表24に採集法Iの結果をまとめて示した。この結果、2610.6ℓの胃内溶液から37695.1gの絨毛虫を分離採集した。

この絨毛虫を個体別に真空凍結乾燥して、これまでの採集量⁽⁷³⁾447g, ⁽³⁵⁾203g, ⁽¹⁵⁾450gを上回る6443.7gのDPを得た。

7ぎにDPの一般成分を表24に示した。粗蛋白質および純蛋白質の含量は絨毛虫の一般成分⁽⁵⁵⁾とほぼ一致した。粗繊維含量はMcNaught等⁽⁷³⁾の1.7%より低く、比較的純粹に絨毛虫が分離採集されたものと考えられる。

無作為に取り上げた3個体のDPのアミノ酸自動分析計によるアミノ酸組成を表25に示し

た。3個体のアミノ酸組成を平均した結果、
 絨毛虫を構成する主なアミノ酸は、Glu > Asp
 > Lys > Leu > Ile の順に多く、これらのア
 ミノ酸は、全体の57.7%を占め、Bergen⁽¹⁵⁾等や
⁽¹²⁷⁾Wellerの結果とほぼ一致した。

採集法II：表26に示したような42頭のウシ
 の胃内容物から絨毛虫を分離採集した結果、
 42頭のウシの年令と胃内容液量の相関係数は、
 $r = 0.367$ となり有意差が認められた。

¹⁰ 絨毛虫採集量とFPの体成分を表27に示した。
 すなわち、1205.4 lの胃内容液から13107.6gの絨
 毛虫を分離採集した。FPの粗蛋白質、純蛋白
 質、粗繊維含量を乾物当りに換算すると、そ
 れぞれ45.67, 22.55, 1.15%となり、採集法Iの
¹⁵値に比べて粗繊維含量がかなり高かった。

採集法IIのDPのアミノ酸組成を表25に示し
 た。絨毛虫を構成する主なアミノ酸は、Glu >
 Asp > Lys > Leu > Ile の順に多く、採集法
 Iの絨毛虫のアミノ酸組成とほぼ一致した。
 この結果は、絨毛虫体蛋白質のアミノ酸組成

は、飼料条件などの影響をあまり受けないうためと考えられる。

採集法Ⅰ, Ⅱを試みた結果、1頭のウシからの絨毛虫採集量は、10g以下のときや1000g以上のときがあり、かなり個体差があった。

1頭のウシから大量の絨毛虫を分離採集したときには、写真20のようによく発達した第一胃乳頭や第二胃小室に絨毛虫が密集し、これらの絨毛虫は写真21のような集団を形成していた。

この集団を構成している絨毛虫の種類についての検討は直接行わなかったが、絨毛虫の純度を知るためにB・9塩類緩衝液で洗浄した絨毛虫を顕微鏡で確認した結果、1頭からの採集量が1000g以上になるときの絨毛虫は、

殆ど *Emtodiinium* 属によつて構成されていた。

また、絨毛虫の大量採集のために200頭近くのウシの反芻胃壁を観察した結果から、反芻胃壁の絨毛虫密集部は腹底部に限局していた。このことは絨毛虫が物理的に沈降した結果と考えることもでき、今後この点について検討

する必要がある。

3. 要約

本研究の実験に必要な大量の純粋な絨毛虫を得るため、屠殺したウシの胃内容物から絨毛虫を分離採集した。採集法Ⅰでは114頭のウシから37695.1gの絨毛虫を採集し、採集法Ⅱでは42頭のウシから13107.6gを採集した。分離採集した絨毛虫の粗蛋白質、純蛋白質、粗繊維、アミノ酸組成は、既報の絨毛虫成分含量とほぼ一致し、絨毛虫の純度も比較的に高かった。

以上の結果より、屠殺したウシの胃内容物から大量の絨毛虫を比較的純粋に分離採集できることを実証した。大量の胃内容物から胃内容液を採取する方法および大量の胃内容液から絨毛虫を純粋に分離採集する方法などを改良すれば、比較的短時間に、しかも容易にkg単位の絨毛虫を採集できると考えられる。また、この絨毛虫の大量採集法は、単に大

量の絨毛虫を採集するための方法だけでなく、
絨毛虫に関する他の研究目的にも応用できる
ものと考えられる。

5

10

15

第Ⅱ章．反芻胃内絨毛虫類給与がヤギの血漿 遊離アミノ酸窒素濃度に与える影響

第1節．乾燥反芻胃内絨毛虫類の給与実験

1．実験目的

序論で述べたように宿主動物体内での絨毛虫の機能と役割を解明する方法としてF動物とDF動物を比較する研究によつて、多くの知識が得られている。この中でKlopfenstein, Purser, 板橋等は、DF動物(ヒツジまたはウシ)のPAA総量がF動物のそれより高いことを報告した。この原因として著者は、宿主動物に供給される微生物蛋白質の量とそのアミノ酸組成およびVFA産生量とその組成の変化による影響の他に、絨毛虫体中の何らかの物質が宿主動物のPAN濃度を減少させているのではないかと考えた。

本章はこの仮定に基づいて絨毛虫の有無がヤギのPAN濃度と与える影響を検討し、つぎに屠殺ウシから採集したDP(第1章、第3節、採集I)をDFヤギに給与してPAN濃度と与える影響を検討した。

2. 実験方法

A. 供試動物および飼養管理

供試ヤギは、3頭の去勢成熟ヤギ(表28)を使用した。

給与飼料は、糖蜜配合飼料、ハイキューブ、稲ワラをメシ羊の維持の栄養要求量(日本飼養標準)に準じて給与した(表29)。配合飼料とハイキューブの給与割合は、可消化粗蛋白質(DCP)要求量のそれぞれ50%相当量とし、このとき不足する可消化養分総量(TDN)の要求量を稲ワラで補足した。これらの飼料はAM 8:30~9:00とPM 4:00~4:30に等量

ずつ給与し、飲水は自由摂取させた。

絨毛虫除去後のヤギに絨毛虫を感染させないため、実験当初から個体ごとに隔離して飼養し、調整した飼料は1日以上経過させてから給与した。また、絨毛虫除去後は定期的に絨毛虫の有無を確認した。

B. 実験期間

10 供試ヤギの実験期間は図8に示した。すなわち、G1, G2, G3はF1期, F2期とし、G4はDF1期より実験に加えた。つづいてG1, G3には2, 4, 8, 16%の全卵粉(WE)を給与(2, 4, 8, 16% WE期)し、G2, G4には2, 4%のDP, 8, 16%のWEを給与(2, 4% DP期, 8, 16% WE期)した。引き続き、全個体ともDF2期, 8, 12%のDP給与(8, 12% DP期), DF2期, F2期の順に実験を行った。

c. 反芻胃内絨毛虫類の除去および移植

F1期のG1, G2, G3の絨毛虫の除去は、各個体のPAN濃度の測定値が平均値になった翌日から、Abou AKKada⁽⁷⁾等の方法で行なった。予備実験として、彼等が投与したAero solo-OTの濃度(体重1kg当り約0.08g)を参考に予備ヤギ(G4)を用いて絨毛虫の除去を試みた。

その結果、彼等の投与量では絨毛虫を除去できなかつたため、Aero solo-OTの投与量を増加するとAero solo-OTの副作用が認められた。

このため、本実験では0.10, 0.15, 0.18g/kgのAero solo-OTを数日間連続投与した。

DF3期のヤギ全てに対する絨毛虫の移植は、DF3期実験終了の翌日にFヤギの反芻胃液(G1, G2, G4に300ml, G3に600ml)を胃カテーテルで経口投与し、絨毛虫を移植した。

D. 乾燥反芻胃内絨毛虫および全卵粉の 給与方法

第1章, 第3節の絨毛虫採集法 I によつて得た DP の給与量は、Weller⁽¹²⁸⁾等による絨毛虫の移行量(反芻胃から三胃へ)を参考にして設定した。すなわち絨毛虫体窒素の移行量は、⁽¹²⁸⁾一日当りの食餌性窒素の2%以下であることから、絨毛虫体窒素として給与飼料窒素量のそれぞれ2, 4, 8, 12%相当量を給与し、対照としてWEを窒素として給与飼料窒素量のそれぞれ2, 4, 8, 16%相当量を給与して比較した。

DPおよびWEの給与方法は、まずG2, G4に2, 4% DPを給与し、対照としてG1, G3に2, 4%のWEを給与した。引き続きG1, G2, G3, G4に8, 16%のWEを給与し、その後もとの給与飼料に戻した。WEおよびDP給与期の給与飼料窒素は、表30に示したように糖蜜配合飼料で一定に調整した。2~16% WE期および2~12

% DP期の T D N 給与量は、それぞれ 1.8 ~ 15.2%, 1.4 ~ 8.8% 減少したが、この T D N については、特に調整しなかった。これらの給与方法は、1日当りの給与量のそれぞれ等分量を糖蜜配合飼料に混ぜて給与した。

12% DP 給与後、再びもとの給与飼料で飼養した。

E. 測定項目

採食量および体温：ヤギの全実験期間を通して、毎日の採食量および早朝採食前の体温を測定した。

絨毛虫数の計数および有無の検査：Aero sol-OT 投与および絨毛虫の移植による絨毛虫数の変化を観察するための反芻胃内容物の採取は、早朝採食前に胃カテーテルを用いて行った。採取した胃内容物を二重ガーゼで濾過して得た反芻胃液は、M F S 固定液⁽⁶⁰⁾で5倍希釈して好酸球計算盤により絨毛虫を計数した。各DF

期のヤギの反芻胃内容物を定期的に採取し、絨毛虫の有無を検査した。

血漿成分：PAN濃度の測定は第I章、第1節に記載した原法で行った。そのための採血は5日間隔で早朝採食前に頸静脈から、それぞれ10 mlずつヘパリン加注射器で行った。WEおよびDP給与期のPAN濃度の測定は、それらの給与開始後6日目から5日間隔でそれぞれ5回ずつ測定した。8% DP給与前（DF2期）3回と給与時3回のPAA濃度をアミノ酸自動分析計（日立KLA-3B）で分析した。

3. 結果および考察

A. Aerosol-OTの絨毛虫除去効果について

Aerosol-OT投与によるG3, G1, G2の絨毛虫の除去効果を図9, 10, 11に示した。絨毛虫の除去の開始時期は各個体によって異なり、G3, G1, G2の順序で行った。G3の除去では、

0.1g/kg の Aero sol-OT を 8 日間連続投与しても
絨毛虫の生存が認められたため、0.15g/kg を 2
日間投与して経過を観察した。この間の採食
率および体温の変化は比較的少なかった。投
与を中止してから 8 日目(19 日目)に再び絨
毛虫数の増加が観察されたため 0.18g/kg を 3 日
間連続投与した結果、G3 は横臥、体温上昇、
食欲廃絶の状態に陥った。このため補液療法
を施して回復させた。G3 の経験から G1, G2 に
対する Aero sol-OT の投与量は 0.15g/kg とし、3~
4 日間連続投与した。その結果、G1, G2 と
も投与開始後 2~3 日目から横臥、体温上昇、
食欲廃絶(3~7 日間)の状態に陥ったのち
除々に回復した。

G3, G1, G2 の絨毛虫の除去は、いずれも食
欲廃絶から回復したのちに達成されたことから、
ヤギの絨毛虫の除去には、0.15g/kg の Aerosol-
OT を 3, 4 日間連続投与することが適当と考
えられる。しかし、この投与量ではヤギに副
作用を与えるため、この副作用を軽減させる

工夫が必要である。

B. Aerosol-OT投与がヤギの血漿遊離アミノ酸窒素濃度および血漿尿素窒素濃度にとえる影響

Aerosol-OTを投与した各個体の絨毛虫除去期のPAN濃度, PUN濃度, PUN/PAN濃度比を表31に示した。

前述したように, Aerosol-OTの投与によって, ヤギの採食量は著しく減少したにもかかわらず, 絨毛虫除去期の各個体および全個体のPAN濃度は, いずれの場合もF期のそれよりやや減少した程度であった。これに対して, 絨毛虫除去期の各個体および全個体のPUN濃度は, いずれの場合もF1期のそれより明らかに増加し, G3に有意差 ($P < 0.01$) が認められた。絨毛虫除去期の各個体および全個体のPUN/PAN濃度比は, いずれの場合もF1期のそれより増加し, G3と全個体に有意差 ($P < 0.05$)

が認められた。

絨毛虫除去期のヤギのPAN濃度およびPUN濃度の変動は、投与したAerosol-OTの影響より、むしろAerosol-OTの投与による採食量の減少による影響を強く反映していると考えられることより、ヤギのPAN濃度は、PUN濃度と比べて厳密な恒常性を保持しているものと考えられる。PUN濃度の増加は採食量の著しい減少に伴う体蛋白質の分解による影響と考えられる。また、PUN濃度の増加は、PUN/PAN濃度比を増加させることより、飼料摂取量が著しく不足しているヤギのPUN濃度およびPUN/PAN濃度比は増加することが明らかとなった。

と、反芻胃内絨毛虫類の有無がヤギの血漿遊離アミノ態窒素濃度および血漿尿素態窒素濃度と与える影響

各個体および全個体のF1期, DF1, 2, 3期のPAN濃度, PUN濃度, PUN/PAN濃度比,

PAN濃度とPUN濃度の相関係数を表32, 34, 36, 40に示し、それぞれのF1期とDF1, 2, 3期、PAN濃度、PUN濃度、PUN/PAN濃度比の平均値の有意差の有無を表33, 35, 37, 41に示した。

PAN濃度：G1, G2, G3および全個体のDF1・2・3期のPAN濃度は、いずれの場合もF1期のそれより高く（表32, 34, 36, 40）、全てに有意差（ $P < 0.01$ ）が認められた（表33, 35, 37, 41）。絨毛虫の有無によって生じたPAN濃度の相違は既報による総PAA濃度の相違(50, 51, 58, 102)とほぼ等しい傾向を示し、PAN濃度の相違はDFの状態を維持する限り長期間認められた。

PUN濃度：G1のDF1, 2, 3期のPUN濃度はF1期のそれより低い値を示し（表32）、DF2, 3期とF1期に有意差（ $P < 0.01$ ）が認められた（表33）。G3のPUN濃度はF1期よりDF1, 2, 3期の方が高い値を示し（表36）、F1期とDF2期に有意差（ $P < 0.01$ ）が認められた（表37）。G2のPUN濃度はF1期に比べて

DF1期が低く、DF2, 3期は逆に高い値を示した(表34)が、有意差は認められなかった(表35)。全個体のF1期とDF1, 2, 3期のPUN濃度(表40)は、いずれの場合も有意差が認められなかった(表41)。絨毛虫の有無がPUN濃度に与える影響は同一の飼養条件で異なることが示された。

PUN/PAN濃度比：各個体および全個体のPUN/PAN濃度比はいずれの場合もF1期よりDF1期の方が低い値を示し(表32, 34, 36, 40)、G1, G2, 全個体に有意差($P < 0.01$)が認められた(表33, 35, 41)。F1期に比べてDF1期のPUN/PAN濃度比が低下した理由は、DF1期のPAN濃度がF1期より増加し、DF1期のPUN濃度はF1期より減少したことによるものと考えられる。

PAN濃度とPUN濃度の相関：各個体および全個体のF1期とDF1期のPAN濃度とPUN濃度の相関には、いずれの場合も有意差が認められなかった(表32, 34, 36, 40)。

D. 乾燥絨毛虫、全卵粉の給与がヤギの血漿遊離アミノ態窒素濃度および血漿尿素態窒素濃度に与える影響

a. 全卵粉の給与

FP給与の対照として、給与窒素量の2・4%相当量のWEをG1, G3に、8, 16%相当量のWEをG1~G4の各個体に給与した。各個体と全個体のPAN濃度, PUN濃度, PUN/PAN濃度比, PAN濃度とPUN濃度の相関係数は表32, 34, 36, 38, 40に示し、G1, G3のDF1期と2, 4%WE期, 各個体および全個体のDF1・2期と8, 16%WE期のPAN濃度, PUN濃度, PUN/PAN濃度比の平均値の有意差の有無は表33, 35, 37, 39, 41に示した。

PAN濃度：各個体および全個体のWE給与時のPAN濃度は、それぞれのDF1期, DF2期の値とほぼ等しく(表32, 34, 36, 38, 40)、WE給与がヤギのPAN濃度に与える影響は殆ど認められなかった。

PUN濃度：各個体および全個体のWE給与時

のPUN濃度は、WEの給与割合の増加に伴って増加する傾向が認められ(表32, 34, 36, 38, 40)、有意差はG1, G2, 全個体のDF1期と8%WE期($P < 0.05$, $P < 0.01$), 各個体および全個体のDF1・2期と16%WE期($P < 0.05$, $P < 0.01$)に認められた(表33, 35, 37, 39, 41)。

WE給与により給与飼料蛋白質(窒素量は一定)を改善してもPAN濃度は殆ど変動しなかったが、PUN濃度は比較的敏感に変動することが明らかとなった。反芻動物のPUN濃度は(41, 42, 43)摂取蛋白質量や摂取エネルギー量、また摂取窒素量(101, 117)によって増減することが知られていることより、本実験のような場合には、PUN濃度は摂取窒素量よりも摂取蛋白質の良否により敏感に変動するものと考えられる。

PUN/PAN濃度比：各個体のPUN/PAN濃度比は、WE給与によるPUN濃度の増加に伴って、DF1期の比より次第に大きくなり、PUN濃度が著しく増加したときにPUN/PAN濃度比にも

有意差 ($P < 0.05$, $P < 0.01$) が認められ、8, 16% WE期とFI期の比はほぼ一致した。16% WE期の比に比べてDF2期の比は各個体および全個体とも有意差が認められ、DF1期とDF2期の比はほぼ等しかった。WE給与期のPUN/PAN濃度比の変動はPAN濃度より、むしろPUN濃度の変動によって生じた。

PAN濃度とPUN濃度の相関：各個体のWE給与時のPAN濃度とPUN濃度の相関の有意差は、いずれの場合も認められず、これまでの結果と一致した。

カ. 乾燥絨毛虫の給与

給与飼料窒素量の2, 4%相当量のDPをG2, G4に、8, 12%相当量のDPをG1~G4の各個体に給与した。各個体と全個体のPAN濃度, PUN濃度, PUN/PAN濃度比, PUN濃度とPAN濃度の相関係数は表32, 34, 36, 38, 40に示し、G2, G4のDF1期と2, 4% DP期, 各個体および全個体のDF2期と8, 12% DP期, 12% DP期

と DF 3 期の PAN 濃度, PUN 濃度, PUN/PAN 濃度比の平均値の有意差は表 33, 35, 37, 39, 41 に示した。

PAN 濃度: G2, G4 の DF 1 期と 2, 4 % DP 期, DF 2 期と 8, 12 % DP 期の PAN 濃度は、ほぼ等しく (表 34, 38)、DP 給与による影響は認められなかったが、G1, G3 の 8, 12 % DP 期の PAN 濃度は、DF 2 期のそれより減少し (表 32, 36)、G3 の DF 2 期と 8, 12 DP 期に有意差 ($P < 0.05$) が認められた (表 37)。また、各個体および全個体の DF 3 期の PAN 濃度は、いずれの場合も 12 % DP 期のそれより増加し (表 32, 34, 36, 38, 40)、G2, G4, 全個体に有意差 ($P < 0.05$, $P < 0.01$) が認められた (表 35, 39, 41)。

PUN 濃度: G4 の DF 1 期と 2, 4 % DP 期の PUN 濃度は、ほぼ等しかった (表 38) が、G2 の 2・4 % DP 期の PUN 濃度は DF 1 期のそれよりやや増加し (表 34)、DF 1 期と 4 % DP 期に有意差 ($P < 0.01$) が認められた。各個体および全個体の 8, 12 % DP 期の PUN 濃度は、いずれの

場合も 12% DP 期のそれより減少 (表 32, 34, 36, 38, 40)、G1, G3, G4, 全個体に有意差 ($P < 0.01$) が認められた (表 33, 37, 39, 41)。

PUN/PAN 濃度比: 各個体および全個体の DP 給与期の PUN/PAN 濃度比は、WE 給与期の比とほぼ同じ傾向を示し (表 32, 34, 36, 38, 40) DF 2, 3 期と 8, 12% DF 期の全てに有意差 ($P < 0.05$, $P < 0.01$) が認められた (表 33, 35, 37, 39, 41)。

PAN 濃度と PUN 濃度の相関: 各個体の DP 給与期の PAN 濃度と PUN 濃度の相関の有意差は、いずれの場合も認められなかった (表 32, 34, 36, 38, 40) が、全個体の 8% DP 期にのみ有意差 ($P < 0.05$) が認められた。

WE および DP 給与期の TDN 給与量は、無給与期 (DF 1, 2, 3) より 2-16% 少ないが、これらの給与期および給与期前後のヤギの体重は各個体とも一定であり、DF 1 期、DF 2 期、DF 3 期の稲ワラの採食率は、WE および DP 給与

期の採食率とほぼ同じか、あるいはそれよりやや高いことより(表42)、ヤギのエネルギー摂取量が不足したとは考えられない。また、この程度のTDN給与量の変化ではPAN濃度やPUN濃度に与える影響はないものと考えて、DP給与実験の結果を考察した。

8, 12% DP期と8, 16% WE期のPUN濃度およびPUN/PAN濃度比の変動はほぼ同じ傾向を示したが、PAN濃度は異なる傾向を示したことより、DPはPUN濃度に対して、WEと同様な摂取蛋白質の良否による影響を示したものと考えられるが、PAN濃度に対する影響はDPとWEで多少異なり、絨毛虫体の給与はヤギのPAN濃度を減少させる傾向があると考えられる。

また、12% WE期とDF3期のPUN濃度およびPUN/PAN濃度比の関係は、16% WE期とDF2期のそれらの関係とほぼ同じ傾向を示しているので、DPはWEに匹敵する良質の蛋白質であることを示している。

16% WE期とDF2期のPAN濃度はほぼ等しか

したが、DF3期のPAN濃度は12% DF期のそれより増加した。

この結果より、DPはWEに存在しない何等かの機能を有していることを示唆している事実と考えることができる。

E. 乾燥絨毛虫の給与がヤギの血漿遊離アミノ酸濃度と与える影響

各個体および全個体の8% DP給与前 (DF2期) と8% DP期のPAA濃度 (mg N/100ml) を表43, 44, 45, 46, 47に示した。

各個体および全個体の8% DP期の総PAA濃度、総必須PAA酸、総可欠PAA濃度は、いずれの場合もDF2期のそれらより減少し (表43, 44, 45, 46, 47)、G2の総PAA濃度、総可欠PAA濃度 (表44) および全個体の総PAA濃度、総可欠PAA濃度、総必須PAA濃度 (表47) に有意差 ($P < 0.05$, $P < 0.01$) が認められた。

個々のPAA濃度は、G1のGlu · Pro · Cit ·

Orm · Lys (表43), G2のGlu (表44), 全
 個体のGlu · Tyr · Phe · His (表47)に有
 意差 ($P < 0.05$, $P < 0.01$) が認められた。

DP給与によって減少した個々のPAA濃度の
 順位は、G1がVal > Cit > Gly > Lys · Orm
 (表43), G2がCit > Gly > Lys > Asm > Glu
 · Arg (表44), G3がLys > Arg > Asm > Leu
 > Ile (表45), G4がArg > Lys > Orm > Val
 > Ile (表46), 全個体がLys > Arg > Orm
 > Val > Ile (表47)であった。

DF2期と8%DP期の総必須PAA/総可欠PAA
 濃度比, 総必須PAA/総PAA濃度比は、いずれ
 の場合もほぼ等しく、DP給与による影響は認
 められなかった。

これまでの結果より、DP給与によるヤギの
 PAA濃度は、PAA濃度の結果とほぼ同様に減
 少傾向を示した。反芻動物の血漿中Gly濃度
 は、栄養状態が悪化すると増加することが知
 られているが、8%DP期の各個体のGly濃度
 は、DF2期の値とほぼ等しいが、DF2期の値

より減少したことより、8% DP期の栄養状態は、DF2期と殆ど等しいか、やや改善されたものと考えられる。DP給与によるPAA濃度の減少は、栄養状態の変化による影響より、むしろ、絨毛虫体に存在する物質がヤギのPAA濃度を減少させたものと考えられる。

F. 反芻胃内絨毛虫類の移植がヤギの血漿遊離アミノ態窒素濃度および血漿尿素態窒素濃度と与える影響

DF3期の実験終了後（F1期から約18ヶ月後）にFヤギの反芻胃内胃液を経口投与して絨毛虫を移植（F2期）させ、各個体の絨毛虫数を図12、各個体および全個体のPAN濃度、PUN濃度、PUN/PAN濃度比、PAN濃度とPUN濃度の相関係数は表32、34、36、38、40、各個体および全個体のDF3期とF2期のPAN濃度、PUN濃度、PUN/PAN濃度比の平均値の有意差の有無は表33、35、37、39、41に示した。

絨毛虫数：各個体の絨毛虫数は、移植後5日目にF1期の絨毛虫数に達し、その後はやや減少しながら推移した。

PAN濃度：各個体および全個体のF2期のPAN濃度は、いずれの場合もDF3期の値より減少し（表32, 34, 36, 38, 40）、G3, G4, 全個体に有意差（ $P < 0.05$ ）が認められた（表37, 39, 41）。絨毛虫の有無により、ヤギのPAN濃度は確実に相違することが認められた。

PUN濃度：各個体のDF3期とF2期のPUN濃度は、ほぼ等しい値を示し（表32, 34, 36, 38）、絨毛虫の有無によるPUN濃度の相違は認められなかった。

PUN/PAN濃度比：各個体および全個体のF2期のPUN/PAN濃度比は、PAN濃度の増加を反映して、いずれの場合もDF3期の比より高い値を示し（表32, 34, 36, 38, 40）、G3, G4, 全個体に有意差（ $P < 0.01$ ）が認められた（表37, 39, 41）。

PAN濃度とPUN濃度の相関：PAN濃度とPUN

濃度の相関の有意差は、各個体では認められなかった(表32, 34, 36, 38)が、全個体のDF3期とF2期に認められた($P < 0.01$, 表40)。

これまでの結果より、F動物の反芻胃内ア
(5, 27, 47, 49, 58, 69, 125)
 ニモニア濃度はDF動物のそれより高いことか
 う、FヤギのPUN濃度は、DFヤギのそれより
 高いことが推測されたが、本実験のF1期およ
 びF2期のPUN濃度は、DF1期およびDF3期の
 それよりやや高い傾向を示しただけで明らか
 な相違は認められなかった。

各個体の8, 16% WE期および8, 12 DP期の
 PUN濃度は、各個体ともDF1, 2期およびDF
 2・3期のそれより高い値を示し、有意差(
 $P < 0.01$)が認められた。

従って、絨毛虫の有無がヤギのPUN濃度に
 与える影響は、WEおよびDP給与による影響よ
 りかなり小さいものと考えられる。

摂取飼料の非蛋白態窒素および蛋白質が微
(7)
 生物蛋白質に転換される割合について、阿部、
(96) Pilglim, Satter (108) 等の割合を参考にすると、

WEおよびDPの殆どは微生物蛋白質および飼料蛋白質としてヤギに消化吸収されたと考えられるため、PAN濃度の変動はこれらの給与によりヤギに消化吸収される蛋白質が改善されたためと考えられる。

このときのPAN濃度はWE給与期では変動せず、DP給与期で減少する傾向が認められたことより、絨毛虫の有無がヤギのPAN濃度に与える影響は、消化吸収される蛋白質の影響より絨毛虫体に存在する何等かの物質によることを示唆していると考えられる。

4. 要約

絨毛虫の有無がヤギのPAN濃度に与える影響を検討した結果、DFヤギのPAN濃度は、Fヤギのそれより高い値を示し、有意差 ($P < 0.01$) が認められた。DFヤギに絨毛虫を移植するとPAN濃度は減少し、FヤギのPAN濃度は、DFヤギのそれより常に低い値であること

を認めた。FヤギのPUN濃度はDFヤギのそれより高い傾向を示したが、PAN濃度のようない明確な差異は認められなかった。

DFヤギにDPおよびWEを給与した結果、8、12% DP期のPAN濃度および総PAA濃度は、DP給与前のDF2期のそれより減少する傾向が認められた。

2、4、8、16% WE期のPAN濃度はWE給与前後のDF1、2期のそれとほぼ等しい値であった。WE給与期のPUN濃度は、WEの給与量の増加に伴って、DF1、2期のそれより高くなる傾向が認められた。

Fヤギの各個体の各実験期間のPUN/PAN濃度比は、DFヤギより高く、DPおよびWE給与期は給与前のDF1、2期より高かった。

各個体の各実験期間のPAN濃度とPUN濃度の相関関係を調べた結果、両者の相関関係は認められなかったが、全個体の8% DP期、DF3期、F2期の相関に有意差 ($P < 0.05$, $P < 0.01$) が認められた。

以上の実験より、繊毛虫体にはヤギのPAN濃度を減少させる作用を有する物質の存在が示唆された。

第2節．凍結反芻胃内絨毛虫類の給与再実験

1. 実験目的

第1節の実験から絨毛虫は、ヤギのPAN濃度を減少させる機能をもっていることが示唆されたが、確認するまでには至らなかった。

このため前節の実験結果を再検討するための同様な実験を試みた。再実験では前節の実験結果を再現するためできるだけ供試ヤギの条件を整え、絨毛虫の給与量および給与法を検討して実施した。

2. 実験方法

A. 供試動物および飼養管理

供試ヤギは、シバヤギ⁽⁵⁶⁾（去勢雄，年齢1歳，

体重 20 ~ 23 Kg) を 5 頭 (内予備 1 頭) 使用した。給与飼料は糖密配合飼料, ハイキューブ, 乾草, ビートパルプをメシ羊の維持の栄養要求量 (日本飼養標準) に準じて給与し (表 48)、各飼料の給与割合は DCP 要求量のそれぞれ 40, 30, 20, 10% とした。給与方法および飼養管理は前節同様に行った。

B. 実験期間

供試ヤギの実験期間は図 13 に示した。まず、供試ヤギの各個体は有絨毛虫 (F) 1 期, 無絨毛虫 (DF) 1 期とし、つぎに FP と WE の反転試験法に準じて給与するため、供試ヤギを 2 グループ (S1 と S2, S3 と S4) に分けて、それぞれを給与した。すなわち、FP 反転給与試験の S1 と S2 グループは、8% FP 1 期, 0% FP 2 期, 8% FP 3 期, S3 と S4 グループは 0% FP 1 期, 8% FP 2 期, 0% FP 3 期とし、引き続き WE 反転給与試験の S1 と S2 グループは、0%

WE1期, 8% WE2期, 0% WE3期, S3とS4グループは、8% WE1期, 0% WE2期, 8% WE3期とした。WE反転給与試験後のS1, S2, S3, S4は、DF2期, F2期, DF3期, DF4期(飼料給与量10%増加)の順に行った。予備のヤギ(S5)はF1期, DF1期とし、その後は、この状態を持続させ(図13)、供試ヤギがDF4期のときS5の飼料給与量も10%増加した。

10 c. 絨毛虫の除去および移植

Fヤギからの絨毛虫の除去は、F1期(5頭)とF2期(4頭)実験終了の翌日から前節の方法で行った。⁽⁷⁾ Aero sol-OTの給与量は前節の結果から体重1kg当り0.15gを2日間連続給与し、その後は絨毛虫の有無とヤギの健康状態を観察しながら完全にDFとなるまで給与した。

ヤギに対する絨毛虫の移植は、DF2期(4頭)実験終了の翌日にFヤギの反芻胃液200mlずつを胃カテーテルで経口給与した。

D. 凍結絨毛虫および全卵粉の給与方法

ヤギの PAN 濃度の減少に有効と考えられる絨毛虫体の物質が、絨毛虫採集の過程で変化し、その効力が低下する可能もあり得ると考へ、再実験での給与絨毛虫は採集後、直ちに凍結保存したもの（第 I 章、第 3 節、採集法 II）とした。FP の給与量は前節の結果を考慮して給与飼料窒素量の 8% 相当量とし、FP 給与時の給与飼料窒素量は糖蜜配合飼料で一定に調整したが、TDN 給与量は特に調整（な⁽¹³⁶⁾）
かった（表 49）。FP の給与方法は、反転試験法に準じてヤギ 4 頭を 2 グループ（S1 と S2, S3 と S4）に分けて給与した。

FP 給与による反転試験終了後、直ちに FP 給与の対照として同じヤギ（S1 と S2, S3 と S4）に WE 給与による反転試験を実施した。

E. 測定項目

採食量：絨毛虫の除去期以外の給与飼料の残食は全くなかった。

5 体格：DFの状態^(27, 51, 100, 132)で育成したウシの腹囲は、Fウシに比べて大きくなり太鼓腹を呈することが知られている。前節の供試ヤギの腹囲（特に計測しなかった）も同様に太鼓腹の様相を呈していたので再実験では、体重、胸囲、
10 腹囲、腹幅、腹深の測定をF1期および絨毛虫除去後、約5、10、15ヶ月経過したときのWE反転給与2期、DF3期の前期、DF3期の後期のPM3:00~4:00に行った。

絨毛虫数の計数および有無の検査：ヤギのF1期とF2期の反芻胃内容物を前節の方法で定期的⁽⁶⁰⁾に採取し、絨毛虫数を前節の方法で計数した。各DF期のヤギの反芻胃内容物を定期的に採取し、絨毛虫の有無を検査した。

血漿成分：PAN濃度の測定は、第1章、第2節に記載した原法で行った。そのための採

血は、4日間隔で早朝採食前に頸静脈から、それぞれ6mlずつヘパリン加注射器で行った。S1, S2, S3, S4各ヤギのF1期, DF1期, FP反転給与試験(WE1, 2, 3期)の血漿それぞれを各個体ごとに混合し、PAA濃度を全自動アミノ酸分析計(Dionex D-500型)で測定した。各実験期間のPAN濃度の測定回数は、最低9回以上とし、各実験期間の初回の測定値は予備飼育期間の値であるため採用しなかった。

3. 結果および考察

A. Aerosol-OTの絨毛虫除去効果について。

再実験ではF1期とF2期の実験終了後に2回の絨毛虫の除去操作を実施し、その結果を表50と表51に示した。

初回の絨毛虫の除去操作は、前節での絨毛虫除去の結果を参考に実施した。その結果、

Aero so 1-OT を体重 1 kg 当り 0.15g を投与してもヤギは採食を続け、一度 DF となった後も不定期に絨毛虫が発現した。このため、飼料給与を午前と午後のどちらか一回（給与量の 50%）にし、Aero so 1-OT の投与量を体重 1 kg 当り 0.20g あるいは 0.25g に上げて行った。しかし、これでもヤギは採食を続け、絨毛虫も発現した。この結果からヤギが採食を続けている状態では、大量の飼料片が絨毛虫の隠れ場となり、また、投与した Aero so 1-OT は飼料への吸着や内容物の第Ⅲ胃移行によって反芻胃内での濃度低下を生じることにより絨毛虫の除去効果が低下することが考えられた。このため絨毛虫の除去が非常に困難だったヤギ（S1, S2）に飼料を給与しない（2~3日）で Aero so 1-OT を投与した結果、容易に絨毛虫を除去することができた。

この結果から2回目の絨毛虫の除去操作は、体重 1 kg 当り Aero so 1-OT 0.20g を3日間連続投与し、この間4日間飼料を給与しないで補液

療法を併用した(表51)。このような方法により、容易に絨毛虫を除去することができたが、ヤギの副作用も生じた。

以上の結果から Aero sol-OTによる絨毛虫の除去方法は、体重1kg当り Aero sol-OT 0.1~0.2gを3日間連続投与し、この間、2~3日間は絶食させることが望ましいと考えられる。

B. 反芻胃内絨毛虫類の有無がヤギの腹囲に与える影響

各個体のF1期の体重、胸囲、腹囲、腹幅、腹深に対する絨毛虫除去後5、10、15ヶ月経過した時の各個体のそれらの割合(%)を表52に示した。

この結果、各個体の腹囲は体重の増加に伴って徐々に増加し、腹囲の増加割合は、体重の増加割合よりやや高かった。(27, 51, 100, 132)

DF動物は、太鼓腹を呈することから、DFヤギの腹囲はFヤギのそれより増加することが

考えられる。

本実験では対照区を設けなかったため、腹囲と体重の増加割合の差異が、絨毛虫の有無による影響であるか、否かについて断定はできなかつた。この点については、改めて検討する必要があるものと考えられる。

②. Aero so 1-OTの投与がヤギの血漿遊離アミノ窒素濃度および血漿尿素窒素濃度に与える影響

Aero so 1-OTによる絨毛虫除去のPAN濃度、PUN濃度、PUN/PAN濃度比を表53に示した。

絨毛虫除去期は、ヤギの飼料摂取量と健康状態が著しく変化した時であるが、各個体のPAN濃度、PUN濃度、PUN/PAN濃度比の平均値は、F1期、DF1期のそれらとほぼ一致した。それぞれの標準偏差は、F1期、DF1期のそれらと大きく異なり、Aero so 1-OTの投与および飼料摂取量の変化によつてこれらの値が変動

したものと考えられる。この点は前節の絨毛虫除去期の結果と一致していることより、PAN濃度、PUN濃度、PUN/PAN濃度比はヤギの栄養および健康状態の指標としての意義をもつことが示唆された。

D. 反芻胃内絨毛虫類の有無がヤギの血漿遊離アミノ態窒素濃度および血漿尿素態窒素濃度に与える影響

各個体および全個体のF1期、DF1期、F2期、DF3期のPAN濃度、PUN濃度、PUN/PAN濃度比、PAN濃度とPUN濃度の相関係数を表54、56、58、60、62、64に示し、それぞれのF1期とDF1期、F2期とDF3期のPAN濃度、PUN濃度、PUN/PAN濃度比の平均値の有意差の有無を表55、57、59、61、63、65に示した。

PAN濃度：F1期とDF1期のPAN濃度は同じか（表56）、DF1期の方がやや高い濃度（表54、58、60、62、64）を示したが、いずれの

場合も有意差は認められなかった(表55, 57, 59, 61, 63, 65)。この実験では絨毛虫の有無によるヤギのPAN濃度の変動が比較的少ないことの原因として、絨毛虫の除去が長期に及んだ(表50)ことによる影響と考えられる。

F1期から約12ヶ月後、S1, S2, S3, S4に絨毛虫を移植したF2期とDF3期のPAN濃度は、いずれもDF3期の方が高い値(表54, 56, 58, 60, 64)を示したが、いずれの場合も有意差は認められなかった(表55, 57, 59, 61, 65)。

再実験の結果より、絨毛虫の有無によるヤギのPAN濃度は、前節の実験結果ほど明確でなかったが、DFヤギのPAN濃度はFヤギのPAN濃度より高いことは確実であり、この点^(50, 51)は絨毛虫の有無によるPAA濃度の変動傾向と一致^(58, 102)した。

PUN濃度：F1期とDF1期のPUN濃度は、いずれの場合もDF1期の方が低い値(表54, 56, 58, 60, 62, 64)を示し、S5のみに有意差($P < 0.05$)が認められた(表63)。

F2期とDF3期のPUN濃度は、S4のF2期の方がやや高く(表60)、その他はDF3期の方が低い値(表54, 56, 58, 64)を示した。いずれの場合も有意差は認められなかった(表55, 57, 59, 61, 65)。

再実験の結果より、FヤギのPUN濃度はDFヤギのそれより幾分高い濃度を示し、この結果は前節の実験結果および他の報告と一致した:とより、一般にF動物のPUN濃度はDF動物のそれより高いことがほぼ明らかとなった。

PUN/PAN濃度比: F1期とDF1期のPUN/PAN濃度比は、いずれの場合もDF1期の方が低い値を示し(表54, 56, 58, 60, 62, 64)、S5のみ有意差($P < 0.01$)が認められた(表63)。

F2期とDF3期のPUN/PAN濃度比は、いずれの場合もDF3期の方が低い値を示したが(表54, 56, 58, 60, 64)、全てに有意差は認められなかった(表55, 57, 59, 61, 65)。

以上の結果より、FヤギのPUN/PAN濃度比はDFヤギのそれより常に高い値を示し、前節

の実験結果とほぼ一致した。F期とDF期のPAN濃度およびPUN濃度の相互の変動傾向は、F期で比を大きく、DF期で比を小さくさせるように変動したことが明らかとなった。

5 PAN濃度とPUN濃度の相関：各個体のF1期、DF1期、F2期、DF2期のPAN濃度とPUN濃度の相関は比較的に小さく、相関に有意差（ $P < 0.05$ ）が認められたのはS2のF1期のみであった（表56）。全個体では、DF1期とF2期の相関に有意差（ $P < 0.01$ ）が認められた（表64）。

すなわち、再実験の結果では、PAN濃度とPUN濃度の相関は当初推察していたよりも小さく、自由度（測定回数）がかなり大きくなつたときに負の相関が認められた。

15 E. 凍結織毛虫、全卵粉の給与がヤギの血漿遊離アミノ態窒素濃度および血漿尿素態窒素濃度に与える影響

各個体、₅ S1とS2グループ、₁₀ S3とS4グループ ₁₅

の DF 1 期 (FP 給与前) と FP 1, 2, 3 期 (FP 反転給与試験)、WE 1, 2, 3 期 (WE 反転給与試験)、DF 2 期 (WE 給与後) の PAN 濃度、PUN 濃度、PUN/PAN 濃度比のそれぞれの平均値および PAN 濃度と PUN 濃度の相関係数を表 54, 56, 58, 60, 66, 68 に示した。それぞれの DF 1 期の各測定値の平均値と FP 1, 2, 3 期、WE 1, 2, 3 期、DF 2 期の各測定値の平均値、それぞれの FP 2 期の各測定値の平均値と FP 1, 3 期の各測定値の平均値、それぞれの WE 2 期の各測定値の平均値と WE 1, 3 期の各測定値の平均値の有意差の有無をそれぞれ表 55, 57, 59, 61, 67, 69 に示した。S1 と S2 グループおよび S3 と S4 グループの DF 2 期の各測定値の平均値と FP 1, 2, 3 期、WE 1, 2, 3 期の各測定値の平均値の有意差の有無をそれぞれ表 67, 69 に示した。

PAN 濃度：DF 1 期と FP 1, 2, 3 期 (FP 反転給与試験) の PAN 濃度はほぼ等しいか (表 58, 60, 68 の DF 1 期と FP 2 期)、FP 給与時の

方がやや高い濃度を示し(表54, 56, 66のDF1期とFP1期, FP3期)、S1のFP3期のみ有意差が認められた(表55)。

S1, S2, S1とS2グループのFP2期(FP無給与時)とFP1期(FP給与時)のPAN濃度はほぼ等しく(表54, 56, 66)、FP2期とFP3期(FP給与時)のPAN濃度はFP3期の方がやや高い値を示したが(表56, 66)、いずれも有意差は認められなかった(表57, 67)。FP給与時とFP給与後のPAN濃度とでは、一般にFP給与後の方が高い濃度を示したが(表54のFP2期, WE1期, 表56, 66のWE1期, 表58, 60, 68のFP3期)、いずれの場合も有意差は認められなかった(表55, 57, 59, 61, 67, 69)。

FP給与後にPAN濃度が高くなる傾向は、前節のDP給与実験の結果とほぼ一致した。

S1とS2グループおよびS3とS4グループのDF2期とFP1, 2, 3期のPAN濃度は、いずれの場合もDF2期の方が高い値を示し(表66, 68)、S3とS4グループのDF2期とFP1, 2,

3期に有意差 ($P < 0.01$) が認められた (表 69)。

S1 と S2 グループ および S3 と S4 グループ の FP 反転給与試験 (FP 1, 2, 3 期) の PAN 濃度⁽¹³⁶⁾ を反転試験法に準じて統計処理した結果、有意差は認められなかった。

FP の給与がヤギの PAN 濃度を減少させる機能を再確認できなかったが、FP 給与後の PAN 濃度は FP 給与時のそれより幾分高くなる傾向を再確認した。

DF 1 期と WE 1, 2, 3 期 (WE 反転給与試験) の PAN 濃度は、いずれも WE 給与時の方が高い値を示し (表 54, 56, 58, 60, 66, 68)、S1 の DF 1 期と WE 1, 2, 3 期, S2 の DF 1 期, WE 1, 2 期, S3 の DF 1 期と WE 2 期, S4 の DF 1 期と WE 2 期, S1 と S2 グループ の DF 1 期と WE 1, 2, 3 期, S3 と S4 グループ の DF 1 期と WE 2 期に、それぞれ有意差 ($P < 0.05, P < 0.01$) が認められた (表 55, 57, 59, 61, 67, 69)。

WE 反転給与試験中の PAN 濃度は WE 給与の有無

にかかわらずDF1期のそれより高い値を示しており、WE給与による影響より、むしろヤギの何らかの変化による影響と考えられる。

S1, S2, S1とS2グループのWE2期（WE給与時）とWE1期（WE給与時）のPAN濃度は、ほぼ等しいか（表54, 66）、WE1期の方がやや高く（表56）、WE2期とWE3期（WE無給与時）のPAN濃度は、ほぼ等しいか（表54）、WE3期の方がやや低い値を示した（表56, 66）が、いずれの場合も有意差が認められなかった（表55, 57, 67）。

S3, S4, S3とS4グループのWE2期（WE無給与時）のPAN濃度は、WE1期とWE3期（WE給与時）より幾分高い値を示し（表58, 60, 68）S4のWE1期とWE3期に有意差（ $P < 0.01$, $P < 0.05$ ）が認められた（表61）。

WE給与時とWE給与後のPAN濃度は、WE給与後の方が低い場合（表54, 56, 66）と高い場合が認められた（表58, 60, 68）。

S1とS2グループおよびS3とS4グループのWE

反転給与試験 (WE1, 2, 3 期) の PAN 濃度 (136) を反転試験法に準じて統計処理した結果、有意差は認められなかった。

WE 給与がヤギの PAN 濃度に与える影響は、個体により相違することが認められた。また、前節の実験のヤギの PAN 濃度は、比較的安定していたのに対し、今回の実験のヤギの PAN 濃度は、DF 状態の経過 (DF1 期から DF2 期) とともに除々に高くなる傾向が認められ、S5 (予備) の PAN 濃度の変動傾向もほぼ等しかった。

PUN 濃度: DF1 期と FP1・2・3 期の PUN 濃度は、FP の給与にかかわらず FP 反転給与試験中の方が比較的低い値を示し (表 54 の FP1・2 期, 表 56 の FP1, 2, 3 期, 表 58 の FP1 期, 表 60 の FP1 期, 表 66 の FP1, 2, 3 期, 表 68 の FP1 期)、表 57 の DF1 期と FP2 期、表 59 の DF1 期と FP3 期に有意差 ($P < 0.01$, $P < 0.05$) が認められた。

FP 反転給与試験中で DF1 期より比較的高い

濃度を示した個体またグループは、S3のFP3期（表58）、S3とS4グループのFP3期（表68）で、これらはFP反転給与試験中のFP無給与の場合であった。

FP反転給与試験中のFP給与時のPUN濃度は、FP無給与時のそれより高い濃度を示す傾向が認められ、前節の実験とほぼ一致したが、希にFP給与時とFP無給与時の濃度がほぼ等しいか（表54のFP1期）、むしろFP無給与時の方が高い値を示す場合も認められた（表58のFP3期、表68のFP3期）。

WE反転給与試験中のWE給与時のPUN濃度は、いずれの場合もDF1期のそれより高い値を示し、前節の実験とほぼ一致した。WE給与時のPUN濃度は、WE無給与時のそれより明らかに高い値を示す場合が多く、前節の実験とほぼ一致した。WE給与時のPUN濃度はFP給与時のそれより常に高い濃度を示した。これはFPの蛋白質の栄養価がWEの蛋白質よりやや劣ることによる相違と考えられる。

以上の結果より、FPおよびWE給与がヤギのPUN濃度に与える影響は、前節の実験とほぼ一致した。先の実験で考察したように、ヤギのPUN濃度は摂取蛋白質の良否に比較的敏感に反応することが認められた。

PUN/PAN濃度比：FP反転給与試験およびWE反転給与試験のPUN/PAN濃度比は、DF1期のそれより全般にやや低い値を示し（表54, 56, 58, 60, 66, 68）、表55のFP2期、表57のFP2期、WE1期、表59のWE3期、表61のWE2期、表66のFP2期、WE1期、表68のWE2期に有意差（ $P < 0.05$, $P < 0.01$ ）が認められた。

FP反転給与試験中のFP給与時およびWE反転給与試験中のWE給与時のPUN/PAN濃度比は、FP無給与時およびWE無給与時のそれより高い値を示す場合が多く、前節の実験とほぼ同じ傾向を示した。

PAN濃度とPUN濃度の相関：各個体の各実験期間（DF1期からWE3期）のPAN濃度とPUN濃度の相関は一般に低く、相関に有意差が認め

められたのは、S2のDF1期とWE3期のみであった(表56)。S1とS2グループ(表66)およびS3とS4グループ(表68)の各実験期間のPAN濃度とPUN濃度の相関は、表66のDF1期と表68のWE2期にのみ有意差が認められた。

PAN濃度とPUN濃度の相関は、当初推測した程の高い相関関係ではないが、一般に負の相関関係を示すことが多かった。

F. 絨毛虫の有無および凍結絨毛虫の給与がヤギの血漿遊離アミノ酸濃度に対する影響

絨毛虫の有無によるPAA濃度：S1, S2, S3, S4のDF1期の総PAA濃度は、F1期のそれより高く(表70, 71, 72, 73)、それぞれの個体のF1期とDF1期のPAA濃度を平均した結果、Cit(約7倍), Val, Ile, Orm, 総PAA, 総可欠PAA濃度はDF1期の方が有意($P < 0.01$, $P < 0.05$)に高く、Glu(約1/2倍), Ala,

Arg 濃度は DF1 期の方が有意 ($P < 0.01$, $P < 0.05$) に低い濃度を示した (表 74)。絨毛虫の有無による総 PAA 濃度の相違は、これまでの報告と一致し、Val, Ile 濃度の相違は板橋等の報告と一致した。Cit, Glu 濃度の著しい相違は、これまで報告されていないので、絨毛虫の有無が Cit, Glu 濃度を与える影響について検討する必要性が示唆された。

総必須 PAA / 総可欠 PAA 濃度比は、DF1 期に比べて F1 期の方が高い傾向を示した。

以上の結果より、絨毛虫の有無による PAA 濃度の相違は、再度確認された。

FP 給与による PAA 濃度: S1, S2, S3, S4 の FP 給与時の総 PAA 濃度は、FP 給与前のそれよりもやや高い濃度を示す場合が多く (表 70 の FP 1 期, 表 71 の FP 1 期, FP 3 期, 表 72, 73 の FP 2 期)、前節の実験結果と一致しなかった。FP 給与後の総 PAA 濃度は、FP 給与時の濃度に比べて減少する場合 (表 71 の FP 2 期) と増加する場合 (表 72 の FP 3 期) が認められた。FP

反転試験中の総必須PAA/総PAA濃度比および総必須PAA/総可欠PAA濃度比は、著しい相違が認められなかった。

FP反転給与試験のS1とS2グループ、S3とS4グループごとにPAAの分析結果を表75に示した。

S1とS2グループおよびS3とS4グループのFP給与時の総PAA濃度は、FP給与前のそれよりやや高い値を示し、両グループの傾向は一致した。FP給与時の総PAA濃度に対するFP給与後の総PAA濃度の両グループの傾向は一致しなかった。両グループのFP反転給与試験中の総PAN濃度を反転試験法に準じて統計処理した結果、有意差は認められなかった。

以上の結果より、FP給与時の総PAA濃度はFP給与前のそれより幾分高い値を示し、前節の実験と一致しなかった。

G. 絨毛虫の移植がヤギの血漿遊離アミノ態窒素濃度および血漿尿素態窒素に与える影響

WE 3 期以後のヤギは、一定期間 DF の状態で飼養し (DF 2 期)、つぎに他の通常のヤギの反芻胃液を DF ヤギに投与して絨毛虫を移植させたとき (F 2 期) の PAN 濃度および PUN 濃度に与える影響を検討した。

PAN 濃度: S1, S2, S3, S4 の DF 2 期と F 2 期の PAN 濃度は、いずれの個体も F 2 期の方が低い値を示し (表 54, 56, 58, 60), S3 と S4 に有意差 ($P < 0.05$, $P < 0.01$) が認められ (表 59, 61)、前節の結果とほぼ一致した。

この結果から、先に述べた FP 給与時および WE 給与時の PAN 濃度および PAA 濃度の変動が前説の結果と一致しなかった理由について、先の結果は、絨毛虫の体成分にヤギの PAN 濃度を減少させる物質が存在していないと考えるよりは、むしろ供試ヤギに対する FP および

WEの給与量が適当であったか否か、あるいはヤギの感受性の良否等の影響が多分に関与した結果であると推察される。

PUN濃度：S1, S2, S3, S4のDF2期とF2期のPUN濃度は、S2を除いてF2期の方が高い値を示したが（表54, 58, 60）、いずれの場合も有意差が認められなかった。

この結果は、前節の結果および本実験のF1期とDF1期、F2期とDF期の結果とほぼ一致したことより、FヤギのPUN濃度は、DFヤギのそれより幾分高い値を示すものと考えられる。

PUN/PAN濃度比：各個体のF2期のPUN/PAN濃度比は、いずれの個体もDF2期のそれより高い値を示し（表54, 56, 58, 60）、これまでの結果とほぼ一致した。

PAN濃度とPUN濃度の相関：PAN濃度とPUN濃度の相関の有意差は、いずれの場合にも認められなかった。

絨毛虫総数：各個体のF2期の絨毛虫総数はF1期より高い値を維持した（図14）。

H. 飼料給与量の増加がヤギの血漿遊離アミノ窒素濃度および血漿尿素窒素濃度に与える影響

DF3期のヤギの飼料給与量を10%増加(DF4期)した際にPAN濃度およびPUN濃度はどのように変動するかを検討した

PAN濃度: S1, S2, S3, S4, S5, 全個体のDF3期とDF4期のPAN濃度は、S1を除いてDF4期の方がやや高い値を示した(表56, 58, 60, 62, 64)。いずれも有意差は認められなかったが(表57, 59, 61, 63, 65)、飼料摂取量の増加によりPAN濃度はやや高くなる傾向を示すものと考えられる。

PUN濃度: S1, S2, S3, S4, S5, 全個体のDF3期とDF4期のPUN濃度は、いずれもDF4期の方が低い値を示し(表54, 56, 58, 60, 62, 64)、S1, S4, S5に有意差($P < 0.01$)が認められた(表55, 61, 63)。また各個体および全個体のDF4期のPUN濃度は、S2のFP

2期(表56)を除く全ての実験期間のそれより低い値を示した(表54, 56, 58, 60, 62, 64)。

反芻動物のPUN濃度は、低エネルギー、低蛋白質飼料給与条件下では減少⁽⁴²⁾し、摂取エネルギーが等しいか、エネルギー要求量を満たす飼養条件下では摂取粗蛋白質量の増加^(41, 43)に比例して増加することが知られているが、DF4期の結果は、これらの報告と明らかに矛盾した。本来ならばDF4期のPUN濃度は、PAN濃度の変動が示したように、やや増加することが推測されたが、結果は反対に減少した。この原因については、さらに検討する必要がある。

PUN/PAN濃度比：各個体および全個体のDF3期とDF4期のPUN/PAN濃度比は、いずれの場合もDF4期の方が明らかに低い比を示し、各個体および全個体のDF4期の比は、他の全ての実験期間のそれより低い値を示した(表54, 56, 58, 60, 62, 64)。

PAN濃度とPUN濃度の相関：PAN濃度とPUN濃度の相関の有意差は全個体のDF4期（ $P < 0.05$ ）にのみ認められた（表64）

4. 要約

絨毛虫の有無および給与がヤギのPAN濃度に与える影響を再検討した結果、DF期のPAN濃度および総PAA濃度はF期のそれより幾分高く、DFヤギに絨毛虫を移植させるとPAN濃度は減少し、再び絨毛虫を除去するとPAN濃度は増加し、DF期のPAN濃度はF期のそれより常に高い濃度を示すことが認められた。F期PUN濃度は、DF期のそれよりやや高い値を示すことが認められたが、PAN濃度のような明確な差異は認められなかった。F期のPUN/PAN濃度比は、DF期のそれより高い値を示す傾向が認められた。

DFヤギにFPおよびWEを給与した結果、FP反転給与試験のFP1, 2, 3期のPAN濃度およ

びPAA濃度は、DF1期のそれよりやや高い濃度を示した。FP反転給与試験中のFP給与時とFP無給与時のPAN濃度の変動は認められなかったが、FP給与後にPAN濃度の増加傾向が認められた。FP給与期のPUN濃度は、DF1期のそれとほぼ等しいが、やや低い値を示した。

FP反転給与試験中のFP給与時とFP無給与時のPUN濃度は、FP給与時の方が高い値を示した。

FP反転給与試験中のFP給与時とFP無給与時のPUN/PAN濃度比は、FP給与時の方が高い値を示した。

WE反転給与試験中のWE給与時とWE無給与時のPAN濃度、PUN濃度、PUN/PAN濃度比は、FP反転給与試験中のFP給与時とFP無給与時のそれらの傾向と類似した。

DF3期の飼料給与量を10%増加したDF4期でのPAN濃度は、DF3期のそれよりやや高い値を示したが有意差が認められなかった。DF4期のPUN濃度およびPUN/PAN濃度比はDF3期のそれより低い値を示し、有意差($P < 0.01$),

$P < 0.05$) が認められた。

各個体, S1とS2グループ, S3とS4グループ, 全個体それぞれの実験期間ごとのPAA濃度とPUN濃度の相関を検討した結果、大部分相関に有意差は認められなかった。

以上の再実験の結果、繊毛虫の有無がヤギのPAN濃度を変動させることを再確認した。しかし、繊毛虫の給与がヤギのPAN濃度を減少させる点については、再確認できなかった。このため、再度実験を行なう必要性が示唆された。

第三章 . プロピオン酸の給与がヤギの血漿遊離アミノ窒素濃度に与える影響

第1節 . プロピオン酸給与量の検討

1. 実験目的

第二章、第四章において絨毛虫がヤギおよびラットのPAN濃度⁵に与える影響を検討した結果、絨毛虫は、ヤギおよびラットのPAN濃度を減少させる機能を有していることが認められた(第二章第1・2節, 第四章第1節)。

絨毛虫の有無により宿主動物のPAA濃度^(50, 51, 58, 102)が異なることは、すでに報告されており、この要因の一つとして、板橋等⁽⁵¹⁾はDFウシの血漿中Lys含量がFウシのそれより高いと...う矛盾した事実から、絨毛虫の有無によるPAA濃度の差は、VFAに由来する蛋白質合成のためのエネルギー源の差に基づく結果であると推

察した。

単胃動物のエネルギー源は、主にグルコースとして吸収されるのに対して、反芻動物のエネルギー源は主にVFAとして第一胃壁粘膜より吸収され、この点が両動物の摂取エネルギー利用形態の大きな相違点である。反芻動物が摂取した可消化エネルギーの約50~60%は第一胃内でVFAに変換され吸収され、吸収されたVFAは、酢酸(C_2)と酪酸(C_4)が脂肪形成的に利用され、プロピオン酸(C_3)は、糖形成物質として利用される。^(62, 91, 92)
⁽¹¹⁰⁾

F動物のVFAモル比は、DF動物のそれより C_4 が高いという報告と C_3 が高いという報告があり、後者の報告はDF動物のPAA濃度がF動物のそれより高いことの要因として、先に板橋等が考察した内容の根拠になっていると考えられる。⁽⁵¹⁾

序論で述べたように、絨毛虫の有無がVFA濃度およびVFA組成(特に C_3 モル比)に与える影響は、給与飼料の組成により相違す

ることから、これらの相違によりPAN濃度およびPAA濃度の変動したとは考えられないが、実験で確認されていないため、DFヤギにC₃を給与してPAN濃度に対する影響を検討するため、C₃給与の予備実験を試みた。

2. 実験方法

A. 供試動物および飼養管理

供試動物は、シバヤギ（去勢雄、年齢2.5歳、体重21~25 kg）を5頭（内予備1頭）を使用した。給与飼料は糖蜜配合飼料、ハイキューブ、乾草、ビートパルプをメン羊の維持栄養要求量（日本飼養標準）に準じて給与し（表76）、各飼料の配合割合、給与方法、飼養管理は第二章、第2節の方法に準じて行った。

B. プロオン酸給与量および給与方法

供試ヤギ5頭の飼料摂取後2時間(午前)の平均 C_3 濃度は、 $2.88 \text{ mM}/100 \text{ ml}$ (表78)であり、この濃度からヤギの全反芻胃液中 C_3 量を推定した。すなわち、神立等⁽⁵⁴⁾のヤギ反芻胃液容積を準用し、ヤギの反芻胃液容積を 10 l に見積り全 C_3 量を $28.8 \text{ mM}/10 \text{ l}$ とした。 C_3 はナトリウム塩($C_3 \cdot Na$)として給与し、給与量は、全 C_3 量の5, 10, 15, 20, 25%に相当する14.4, 28.8, 43.2, 57.6, 72.0 mMとした。 $C_3 \cdot Na$ の給与量は各個体別にS1: 14.4, S2: 28.8, S3: 43.2, S4: 57.6, S5: 72.0 mMとした。 $C_3 \cdot Na$ は給与糖蜜配合飼料に混ぜ、 $0.1 \text{ N H}_2\text{SO}_4$ 溶液でpH 6.0~7.0に調整して給与した。

C. 測定項目

VFAおよびVFA各酸の濃度測定: VFA
およびVFA各酸の定量はクロトン酸を内部

(124)

標準物質とするガスクロマトグラフ分析法で行った。分析装置はFID付属ガスクロマト装置（島津製作所、GC-6AM型）を用い、カラムは内径3mm、長さ2mのガラスカラムを使用した。充填剤は10% DEGA (Diethylene glycol adipate) + 2% H_3PO_4 をC-22 (60~80 μ シュ) に吸着させたものを使用した。

VFA標準酸溶液として100ml当り C_2 : 4.43mM, C_3 : 2.06mM, C_4 : 1.75mM, イソ酪酸 (iC_4): 0.56mM, 吉草酸 (C_5): 0.56mM, イソ吉草酸 (iC_5): 0.56mM, クロトン酸: 1.50mM を含む溶液を調製し、この溶液5mlに25% \times タリン酸含有5N- H_2SO_4 溶液1mlを加えた H_2SO_4 酸性液をガスクロ標準酸試料とした。分析条件はカラム温度: 110~150°C, N_2 ガス流速: 60ml/分, 昇温速度: 4°C/分, チャート速度: 10mm/分とした。

供試反芻胃液の調製には、胃液5mlに25% \times タリン酸含有5N- H_2SO_4 溶液1.0mlを加え攪拌し、6時間静置したのち3000rpmで30分間遠心分

離した。つぎに上清2mlを採取し、これにクロトン酸9.0mM/100ml溶液0.4mlを加えて試料とした。胃液中のVFA各酸およびVFA濃度の算出は常法に準じた。

VFAおよびVFA各酸の回収率：前述のVFA標準溶液のVFA各酸の濃度の50%、100%に相当するVFA各酸をヤギの反芻胃液に添加したときのVFA各酸およびVFAをガスクロマトグラフ分析法で、VFA各酸およびVFAの回収率を求めた。

飼料摂取前および後のVFAおよびVFA各酸の濃度測定：各個体の飼料摂取前0時間・摂取後2, 4, 6時間およびC₃含有飼料摂取前0時間・摂取後2, 4, 6時間の反芻胃液を胃カテテルで採取し、それぞれの反芻胃内VFA濃度およびVFA各酸の濃度を前述の方法で分析した。

3. 結果および考察

A. VFAおよびVFA各酸の回収率

クロトン酸を標準物質とするガスクロマトグラフ分析法によるVFAおよびVFA各酸の回収率は表78に示した。

添加量I, IIにおけるVFAおよびVFA各酸の回収率は比較的良好であり、この方法を用いて以下の実験を試みた。

B. 飼料摂取およびプロピオン酸給与がヤギの反芻胃内VFA濃度に与える影響

各個体の飼料摂取前の時間、摂取後2・4・6時間の反芻胃内VFA濃度は表78に示した。各個体の反芻胃内 C_2 , C_3 , C_4 , VFA濃度は飼料摂取後2時間で最高に達し、摂取後6時間まで比較的高濃度を持続した。 C_3 濃度は

各個体とも摂取後2時間が最高値を示し、その後徐々に減少した(表78)。

各個体の C_3 含有飼料摂取前の時間、摂取後2, 4, 6時間の反芻胃内VFA濃度は表79に示した。各個体の反芻胃内 C_3 , VFA濃度は飼料摂取後2時間で最高に達し、その後徐々に減少したが、反芻胃内 C_2 , C_4 濃度は摂取後2時間から6時間までほぼ等しい高濃度を持続した。各個体の飼料摂取後2時間の反芻胃内 C_3 濃度の平均値(表79)を参考に全反芻胃内 C_3 量を算出し、それの5, 10, 15, 20, 25%相当量をS1, S2, S3, S4, S5のヤギに給与した結果、 C_3 含有飼料摂取後2時間の各個体の反芻胃内 C_3 濃度は、通常飼料摂取後2時間の各個体の反芻胃内 C_3 濃度と比べて、S1を除いて他の個体は全70.5~2.5 mM/100ml高い濃度を示し、 C_3 摂取による反芻胃内 C_3 濃度の増加が認められた(表79)。

通常飼料摂取時(表78)と C_3 含有飼料摂取時(表79)のヤギの反芻胃内VFA各酸のモ

14% は表 80 に示した。各個体の C_3 含有飼料摂取後 2, 4, 6 時間の C_2 モル% は、通常飼料摂取後のそれらより、いずれの場合も低い値を示した。 C_3 含有飼料摂取後 2 時間の C_3 モル% は通常飼料摂取後 2 時間のそれより、いずれの個体も 10% 程度高い値を示し、 C_3 摂取後 4, 6 時間の C_3 モル% は、除々に減少し、通常飼料摂取後 4, 6 時間の値に接近した。 C_3 含有飼料摂取後 2, 4, 6 時間のそれらより、やや高い値を示した。 C_3 含有飼料摂取後 2, 4, 6 時間の C_5 モル% は、通常飼料摂取後 2, 4, 6 時間のそれらとほぼ等しい値を示し、 C_3 給与による C_5 モル% の影響は認められなかった。

以上の結果より、 C_3 給与による反芻胃内 C_3 濃度の増加は、推定全反芻胃内 C_3 量の 10% 相当量以上の C_3 給与より認められた。 C_3 給与による反芻胃内 C_3 モル% の増加は、推定全反芻胃内 C_3 量の 5% 相当量以上の C_3 給与より認められ、 C_3 含有飼料摂取 2 時間の C_3 モル% は、

通常飼料摂取後2時間の C_3 モル% より、いずれの個体も約10% 高い値を示した。

4. 要約

C_3 の給与がヤギの PAN 濃度を与える影響を検討するための予備実験として、 C_3 の給与レベルが反芻胃内 C_3 濃度および C_3 モル% に対する影響について検討した。反芻胃内 VFA 各酸および VFA 濃度の測定は、クロトン酸を標準物質としたガスクロマトグラフ分析法により行った。この分析法による VFA および VFA 各酸の回収は良好であった。

飼料摂取による反芻胃内 C_2 , C_3 , VFA 濃度の変動は、各個体とも摂取後2時間が最高濃度を示し、その後徐々に減少した。 C_3 含有飼料摂取後2時間の各個体の反芻胃内 C_3 濃度は、S1を除いて全て、通常飼料摂取後、2時間のそれより約10% 高い値を示した。

以上の実験により、 C_3 の給与量と反芻胃内

C_3 濃度および C_3 モル%の変動の程度を知ることができた。

第2節 . プロピオン酸の給与実験

1. 実験目的

前節の $C_3 \cdot Na$ 給与実験において、供試ヤギの反芻胃内 C_3 濃度および VFA 濃度に与える影響を検討し、 C_3 給与レベルと C_3 モル% の変動の程度を知ることができた。

(5)

(27)

Abou Akkada⁽⁵⁾ 等および Eadie⁽²⁷⁾ 等は、F 仔ヒツジの C_3 モル% が DF 仔ヒツジの C_3 モル% より平均 5 ~ 8 % 高いことを報告した。本節の実験では、供試ヤギの C_3 モル% が約 10 % 高くなるように C_3 を給与し、 C_3 給与が供試ヤギの PAN 濃度¹⁵ に与える影響を検討した。 C_3 の給与量を設定する際に、前節の実験結果を参考にした。

2. 実験方法

A. 供試動物および飼養管理

前節のヤギ5頭の内4頭(S1, S3, S4, S5)を用い、給与飼料および飼養管理は前節に準じた(表76)。

B. プロピオン酸の給与量および給与方法

反芻動物の第一胃内でのVFA産生量は摂^(62, 91, 92)取可消化エネルギーの約60%であることより、供試ヤギの給与可消化エネルギー量のうちVFAとして吸収されるエネルギー量を算出した。すなわち、S1, S3, S4は1267.2 Kcal/日のうち871.0 Kcal/日がVFAエネルギーとして吸収されることになる。DF5期の各個体の平均C₃モル% (表81)を引用し、VFAエネルギーのうちC₃が占めるエネルギーを算出した。

この結果、C₃のエネルギー量はS1: 295.8,

S3 : 296.5, S4 : 285.1, S5 : 339.7 Kcal/日となる。

このC₃エネルギー量の10%に相当するC₃をC₃·Naとして給与した。すなわち、C₃·Naの給与量はS1・S3・S4 : 79.1, S5 : 92.4_mM/日となり、

この給与量は前節の実験の反芻胃液全C₃量の15%に相当し、全C₃量の15%相当量を給与したとき、S3のC₃のモル%は、給与しないときのC₃モル%より約11%高い(表80)ため、本実験の目的に合致した給与量であると判断した。C₃·Naの給与方法は、1日当り給与量の1/2量を給与糖蜜配合飼料に混ぜ、0.1N-H₂SO₄溶液でpH 6.0~7.0に調整して朝夕定時に給与した。

c. 絨毛虫の移植

C₃給与実験終了後、直ちに、通常ヤギの反芻胃液200mlずつを各個体に胃カテーテルで経口投与した。

D. 測定項目

VFA および VFA 各酸の濃度測定：各実験期間（DF₅, DF_{C3}, F₃期）を通じて5日間隔ごとにそれぞれ5回ずつ、食後2時間（午前）の反芻胃液を胃カテーテルで採取（PAN濃度測定の翌日）し、反芻胃液は前節の方法に準じて調製し、反芻胃内VFA濃度およびVFA各酸の濃度の測定は、前節のガスクロマトグラフ分析法の分析条件⁽¹²⁴⁾に準じて行なった。

絨毛虫数の計数：F₃期の絨毛虫数を5日間隔（VFA測定のための胃液採取と並行して）⁽⁶⁰⁾で計数した。

PAN濃度の測定：各実験期間を通じて5日間（各実験期間の初回のみ10日間）ごとに早朝採食前の血液を頸静脈より約3mlずつ採血し、直ちに血漿を分離した。PAN濃度の測定はニンヒドリン改良定量法（第I章、第1節）で行った。

3. 結果および考察

A. 絨毛虫の移植

C₃ 給与実験終了後、直ちに、通常ヤギの反芻胃液を経口投与した結果、各個体の絨毛虫総数は図15に示したとおりである。

各個体の絨毛虫総数は移植後5日間で60~75万/mlの数に達し、その後は各個体により著しく相違した。S1の絨毛虫数はF2期(第5章, 第2節)のそれとほぼ一致したが、S4の絨毛虫数は、F2期のそれより少ない値を維持した(図15)。この結果、ヤギの絨毛虫総数は給与飼料が同じであっても個体によって相違することが認められた。

B. プロピオン酸の給与および絨毛虫の有無がヤギの反芻胃内VFA濃度に与える影響

C₂無給与期 (DF 5期)、C₃給与期 (DF C₃期)、有絨毛虫期 (F3期) の反芻胃内VFAおよびVFA各酸の濃度は表82に示した。

反芻胃内C₂濃度：各個体のDF 5期とDF C₃期の反芻胃内C₂濃度はほぼ等しかった。各個体のDF 5期とF3期の反芻胃内C₂濃度は、F3期の方がやや高い値を示し、S1のDF 5、DF C₃期とF3期に有意差 ($P < 0.05$, $P < 0.01$) が認められた (表82)。

反芻胃内C₃濃度：各個体のDF C₃期の反芻胃内C₃濃度は、いずれの個体もDF 5期のそれより約0.5 mM/100 ml高い値を示し、S4, S5のDF 5期とDF C₃期に有意差 ($P < 0.05$) が認められた (表82)。各個体のF3期の反芻胃内C₃濃度はDF C₃期より低い値を示し、S1, S3, S4, 全個体のDF C₃期とF3期に有意差 ($P < 0.05$) が認め

められた(表 82)。各個体の DF 5 期と F3 期の反芻胃内 C_3 濃度はほぼ等しい値を示し、これまでの報告と一致しなかった。
(5, 27, 133)

反芻胃内 C_4 濃度：各個体の DF C_3 期の反芻胃内 C_4 濃度は、S1 を除いて DF 5 期のそれよりやや高い値を示し、S3 の DF 5 期と DF C_3 期に有意差 ($P < 0.05$) が認められた(表 82)。各個体の F3 期の反芻胃内 C_4 濃度は S1 を除いて DF 5 期のそれより高く、S3, S5, 全個体の DF 5 期と F3 期に有意差 ($P < 0.01$) が認められた(表 82)。

以上の結果より、F ヤギの反芻胃内 C_4 濃度は、DF ヤギのそれより幾分高い値を示すことが認められ、これまでの報告と一致した。
(49, 51, 58, 69)

反芻胃内 C_5 濃度：S1 を除く各個体の DF C_3 期と F3 期の反芻胃内 C_5 濃度は、DF 5 期のそれより幾分高い濃度を示し、S3 の DF 5 期と DF C_3 , F3 期に有意差 ($P < 0.01$) が認められた(表 82)。

反芻胃内 VFA 濃度：各個体の DF C_3 期の反

反芻胃内VFA濃度は、いずれの個体もDF5期のそれより0.4~1.0 mM/100ml高い値を示し、S1のDF5期とDFC₃期に有意差 ($P < 0.05$) が認められた(表82)。各個体のF3期の反芻胃内VFA濃度は、DF5期のそれとほぼ等しいか (S3, S4)、DF5期のそれより高い値 (S1, S5, 全個体) を示し、S1のDF5期とF3期に有意差 ($P < 0.05$) が認められた(表82)。

これらの結果より、Fヤギの反芻胃内VFA濃度は、DFヤギのそれより幾分高い値を示す(20, 21, 47, 51, 58)ものと考えられ、これまでの報告とほぼ一致した。しかし、絨毛虫の有無による反芻胃内VFA濃度の相違は飼料の条件だけでなく個体差もあることが認められた。

反芻胃内C₃モル% : 表81より算出した全個体のDF5, DFC₃, F3期の反芻胃内C₃モル%は、それぞれ38.5%, 41.7%, 34.0%であった。反芻胃内C₃モル%はC₃給与により3%程度増加し、絨毛虫の移植により4.5%程度減少した。

反芻胃内C₄モル% : 表81より算出した全個

体の DF 5, DF C₃, F3期の反芻胃内 C₄モル%は、それぞれ 7.3%, 7.9%, 9.3%であった。反芻胃内 C₃モル%は、C₃給与による影響は殆ど認められなかったが、絨毛虫の移植により 2%程度増加した。

反芻胃内 C₂/C₃モル比：表 81より算出した全個体の DF 5, DF C₃, F3期の反芻胃内 C₂/C₃モル比は、それぞれ 1.36, 1.18, 1.64であった。反芻胃内 C₂/C₃モル比はC₃給与によりやや減少し、絨毛虫の移植により増加した。

反芻胃内 C₂/C₄モル比：表 81より算出した全個体 DF 5期, DF C₃期, F期の反芻胃内 C₂/C₄モル比は、それぞれ 7.73, 6.31, 5.97であった。反芻胃内 C₂/C₄モル比は、C₃給与によりやや減少し、絨毛虫の移植によりさらに減少した。

反芻胃内 C₃/C₄モル比：表 81より算出した全個体の DF 5, DF C₃, F3期の反芻胃内 C₃/C₄モル比は、それぞれ 5.61, 5.36, 3.91で、C₃給与によりやや減少し、絨毛虫の移植によりさらに減少した。

c. プロピオン酸の給与および絨毛虫の有無がヤギの血漿遊離アミノ態窒素濃度および血漿尿素態窒素濃度に対する影響

各個体および全個体の DF₅, DF_{C₃}, F₃期の PAN 濃度および PUN 濃度は表 83 に示した。

PAN 濃度：各個体および全個体の DF₅ 期と DF_{C₃} 期の PAN 濃度はほぼ一致し、C₃ 給与による影響は認められなかった（表 83）。この結果より絨毛虫の有無による PAN 濃度の相違は、反芻胃内 C₃ 濃度の相違によるエネルギー供給量の変動で生じたものではないことが証明された。各個体および全個体の F₃ 期の PAN 濃度は、DF₅, DF_{C₃} 期のそれより低い値を示し、S₁, S₃, S₅ の DF_{C₃} 期と F₃ 期、全個体の DF₅, DF_{C₃} 期と F₃ 期にそれぞれ有意差 ($P < 0.05$, $P < 0.01$) が認められた（表 84）。すなわち、ヤギの PAN 濃度の減少は、C₃ 給与では認められなかったが、絨毛虫の移植により認められ

た。これらの結果から糞毛虫の有無によるPAN濃度の相違は、反芻胃内VFA濃度、特にC₃濃度⁽⁵¹⁾に由来するエネルギー源の差に基づく相違でないことが証明されたことにより、PAN濃度の相違は糞毛虫の体成分に存在する何等かの物質の影響であることがより有力となった。

PUN濃度：各個体および全個体のDF5期とDFC₃期のPUN濃度はほぼ一致し、C₃給与による影響は認められなかった(表83)。各個体に糞毛虫を移植した結果、S3, S5, 全個体の3期のPUN濃度はDF5, DF C₃期のそれより高い値を示したが、有意差は認められなかった(表84)。S4のF3期のPUN濃度は、DF5, DF C₃期のそれよりやや低い濃度を示したが、有意差は認められなかった(表84)。S1のF3期のPUN濃度は、DF5期のそれより低い値であったが、DF C₃期のそれとほぼ等しい値を示した(表84)。

これまでの実験から、FヤギのPUN濃度は、

DFヤギのそれより、通常、高い濃度を示すものと考えられる。

PUN/PAN濃度比：各個体および全個体のDF5期とDFC₃期のPUN/PAN濃度比はほぼ等しかったが、F3期の比はDF5期とDFC₃期のそれより幾分高い値を示し、これまでの結果と一致した。各個体のDF5, DFC₃, F3期のPUN/PAN濃度比は、第II章, 第1, 2節の供試ヤギのそれより著しく低い値を示した。

PAN濃度とPUN濃度の相関：各個体および全個体のDF5, DFC₃, F3期のPAN濃度とPUN濃度の相関は全般に低く、いずれの場合も有意差が認められなかった(表82)。

以上の結果より、C₃給与がヤギのPAN濃度およびPUN濃度に与える影響は認められなかったが、絨毛虫の移植によりヤギのPAN濃度は減少し、PUN濃度は増加する傾向が認められた。

4. 要約

C_3 の給与がヤギの PAN 濃度に与える影響を検討するための C_3 給与量は、ヤギの給与可消化エネルギーとして供給される量を推定し、その 10% 相当量とした。

C_3 給与によつて反芻胃内 VFA 濃度は約 0.4 ~ 1.0 mM/100 ml 増加し、反芻胃内 C_3 濃度は約 0.5 mM/100 ml (C_3 モル% で 3%) 増加した。この時のヤギの PAN 濃度、PUN 濃度、PUN/PAN 濃度比、PAN 濃度と PUN 濃度の相関は、殆ど変動しなかった。つぎに絨毛虫を移植した結果、F3 期の反芻胃内 C_3 濃度は、DF 5 期のそれとほぼ等しい値を示し、絨毛虫の有無による相違が認められなかった。これに対して F3 期の反芻胃内 C_4 濃度は、DF 5 期と DF C_3 期のそれらより幾分増加し、F ヤギの反芻胃内 C_4 濃度は DF ヤギのそれより高い値であることが認められた。F3 期の反芻胃内 VFA 濃度は、DF C_3 期のそれとほぼ等しい値であったが、DF 5 期のそれよ

り幾分増加する傾向が認められた。この時のPAN濃度は、DF5, DF₃期のそれより明らかに減少傾向を示した。

これらの結果より、絨毛虫の有無による反芻胃内VFA濃度、特に、反芻胃内 C_3 濃度の相違は、絨毛虫の有無によるPAN濃度の相違の直接の要因ではないことが明らかとなった。F3期のPAN濃度はFD5期のそれより幾分増加傾向を示す個体もみられたが、これまでの結果ほど、明確ではなかった。F3期のPAN/PUN濃度比は、DF5, DF₃期のそれより幾分高い値を示した。PAN濃度とPUN濃度の相関は、全般に低く有意差が認められなかった。

以上の結果より絨毛虫の有無によるヤギのPAN濃度の相違は、エネルギー供給量の差に基づくものではなく、絨毛虫の体成分の何等かの物質がヤギのPAN濃度を減少させていることが強く示唆された。

第IV章 . 反芻胃内絨毛虫類給与がラットの血漿遊離アミノ態窒素濃度に与える影響

第1節 . 凍結反芻胃内絨毛虫類の給与実験

1. 実験目的

第II章, 第1, 2節の実験により絨毛虫の有無は、ヤギのPAN濃度およびPAA濃度を變動させることが認められた。DPおよびFP給与時のヤギのPAN濃度, PAA濃度の結果は、一致しなかったが、DPおよびFP給与後のヤギのこれらの濃度は、DPおよびFP給与時の濃度よりもいずれも高くなることが認められた。

以上の実験結果から、絨毛虫の体成分の中にヤギのPAN濃度およびPAA濃度を減少させる物質の存在が示唆された。実験に用いたヤギは反芻動物としては小型であるが、これら

の動物に絨毛虫を給与してPAN濃度の減少を検討するためには、多量の絨毛虫体を必要とし、このため供試動物の数も限定される等の問題点があった。

5 絨毛虫の給与が給与動物のPAN濃度に与える影響を明確にするためには、前述の供試絨毛虫体量を考慮して供試動物にラットを用いることにした。ヤギとラットでは、消化器の構造は大きく異なっているが、生体内の代謝機構は基本的に同じであると仮定してラットを使用した。

2. 実験方法

15 A. 供試動物および飼養管理

供試ラットは体重約400g, 日齢約150日, SD系雄ラット14匹(チャールス・リバーより購入)を対照区7匹, 試験区7匹に分け、個体ごとに飼養した。

(123)
 ラットの栄養要求量(成熟体重の70%)に対する給与飼料の成分量は表85に示した。飼料配合に用いたWEIは、オリエンタル酵母工業、小麦澱粉は千葉製粉、大豆油は和光純薬工業、飼料用浈紙粉末Dは東洋浈紙、フィリップス・ハート氏の無機質混合は岩井化学薬品、オリエンタル配合のビタミン混合はオリエンタル酵母工業の各製品である。対照飼料および試験飼料は、表86に示した配合割合で調製し、それぞれ1匹当り20g1日、23.5g1日を給与した。

対照飼料の給与期間は対照区のI, II, III期と試験区のI, III期とし、試験飼料は試験区のII期にのみ給与した。

飼料給与はAM8:00~PM7:00までとし、PM7:00に給餌器を回収した。残食飼料は翌日の給与飼料に加え、飲水は吸水ビンにて自由摂食させた。ラットの飼養施設の照明はPM5:00~PM7:00までとし、室温は20~24℃に調節した。対照区および試験区の実験期間は、それぞ

れⅠ，Ⅱ，Ⅲ期とし、両区の名実験期間の予備飼育日数および実験飼育日数は、それぞれ10，25日間とした。

B. 凍結織毛虫の給与量および給与法

第Ⅰ章，第3節の織毛虫採集法Ⅱにより得たFPの給与量は、1日当り給与粗蛋白質量の20%相当とし、FP給与時の給与粗蛋白質量はWEで、給与全エネルギー量は小麦澱粉で一定に調整したが、給与純蛋白質量は、特に調整しなかつた(表86)。ラット1匹当りの試験飼料の給与量は対照飼料18.9gとFP4.6gの計23.5g/日とし、給与方法は、2項のAに準じて行つた。

C. 測定項目

採食量：毎日測定し、ラットのPAN濃度測定ごとの採食率を算出した。

体重：ラットのPAN濃度測定のための採血時に測定し、PAN濃度測定ごとの摂取飼料100g当りに対する各個体の増体量(g)を算出した。

5 血漿成分：各実験期間を通じて5日間(各実験期間の初回のみ10日間)ごとに早朝採食前の血液を左右の尾静脈より交互に無麻酔尾静脈穿刺採血法(第1章, 第2節)によって、約0.5mlずつ採血し、直ちに血漿を分離した。

10 PAN濃度測定はニンヒドリン微量定量法(第1章, 第1節)で行った。

3. 結果および考察

A. 凍結絨毛虫の給与がラットの採食率および増体量に与える影響

採食率：対照区および試験区の各個体および全個体の各実験期間(I, II, III期)ごとの採食率は表87に示した。対照区の各個体お

よび全個体の採食率は、I期 > II期 > III期の順に低下した。試験区の各個体および全個体の採食率は、試験飼料（FP含有）を給与したII期が最も高く、III期が最も低かった。試験区の全個体のII期の採食率は、試験区のII期および対照区のII期のそれよりやや高い傾向を示した。対照区・試験区の各個体および全個体のI期とIII期、II期とIII期のそれぞれの採食率に有意差（ $P < 0.01$, $P < 0.05$ ）が認められた（表87）。

FPを含む試験飼料に対するラットの嗜好性は、対照飼料よりも良好であった。対照区および試験区のIII期の採食率の低下は、実験が長期間に及んだことによる影響と考えられる。

摂取飼料100g当りの増体量（g）：対照区および試験区の各実験期間（I期、II期、III期）ごとの各個体および全個体の増体量は表87に示した。

対照区の各個体および全個体の各実験期間ごとの増体量は、いずれもI期 > II期 > III期

の傾向を示し、採食率の場合と類似した。試験区の各個体の各実験期間ごとの増体量は、一定の傾向が認められなかった。全個体では、I期、II期の増体量に対してIII期の増体量がやや低かった。

対照区II期と試験区II期における全個体の増体量は、ほぼ等しい値を示し、FP給与による増体量の差異は認められなかった。

B. 凍結絨毛虫の給与がラットの血漿遊離アミノ態窒素濃度および血漿尿素態窒素濃度に与える影響

対照区および試験区の各個体および全個体の各実験期間ごとのPAN濃度とPUN濃度は表88・89に示した。

PAN濃度：対照区の各個体のII期のPAN濃度は、No.2, No.4, No.7の個体がI期のそれよりやや低い濃度を示したが、他の個体はほぼ一定であった。また、III期のPAN濃度は、

7匹中6匹の個体がⅡ期のそれよりやや高い濃度を示したが、いずれの場合も有意差は認められず(表88)、対照区のPAN濃度の変動の程度は、試験区のそれと著しく相違した。

5 試験区の各個体のⅡ期のPAN濃度は、7匹中6匹がⅠ期のそれより低い濃度を示し、No.12に有意差($P < 0.05$)が認められ、各個体ともⅢ期のそれより低い濃度を示し、No.11に有意差($P < 0.05$)が認められた(表89)。試

10 験区の全個体のⅡ期のPAN濃度は、Ⅰ期のそれより7.7%、Ⅲ期のそれより11.7%低い濃度を示し、Ⅰ期とⅡ期およびⅡ期とⅢ期のPAN濃度にそれぞれ有意差($P < 0.01$)が認められ

た(表89)。また、Ⅲ期のPAN濃度は、Ⅰ期のそれより3.3%高い濃度を示した。対照区の全個体のⅡ期のPAN濃度は、Ⅰ期のそれより3.5%低い濃度を示し、Ⅲ期のそれより4.6%低い濃度を示した。試験区のⅠ期とⅢ期のPAN濃度は、対照区のⅠ期とⅢ期のPAN濃度とほぼ一致したが、試験区のⅡ期のPAN濃度は、

対照区のⅡ期のそれより7.1%低い濃度を示し、有意差 ($P < 0.01$) が認められた (表 90)。

以上の結果より、絨毛虫はラットのPAN濃度を減少させる機能を有することが示唆された。また、この結果は第Ⅱ章、第1節のヤギの実験結果とほぼ一致し、DPおよびFPの給与によつてヤギやラットのPAN濃度が減少したことより、絨毛虫がPAN濃度を減少させる機能は、反芻動物だけでなく単胃動物にも作用することが示唆された。FP給与時 (試験区Ⅱ期) のラットのPAN濃度の減少は、純蛋白質の摂取量の低下による影響ではないかと考えることもできるが、試験区Ⅱ期の試験飼料の採食率は、試験区のⅠ、Ⅲ期および対照区のⅡ期のそれより高いことより、試験区Ⅱ期のPAN濃度の減少は摂取蛋白質量の低下による影響ではないと考えられる。また、PAN濃度の測定は、早朝採食前の血漿であることより、PAN濃度はアミノ酸吸収量の影響より、むしろアミノ酸代謝の影響を強く反映していること

考えられる。

PUN 濃度：対照区の各個体のⅡ期の PUN 濃度は 7 匹中 6 匹がⅠ期のそれより 6 ~ 20% 低い濃度を示したが、有意差が認められる個体はいなかった。また、対照区の各個体のⅢ期の PUN 濃度は 7 匹中 3 匹がⅡ期のそれよりやや高い濃度を示したが、有意差は認められなかった（表 88）。試験区の各個体のⅡ期の PUN 濃度は全個体がⅠ期のそれより 10 ~ 40% 低い濃度を示し、No. 8 に有意差 ($P < 0.05$) が認められ、7 匹中 3 匹がⅢ期のそれより明らかに低い濃度を示した（表 89）。対照区的全個体のⅡ期の PUN 濃度は、Ⅰ期のそれより 10%、Ⅲ期のそれより 5.5% 低い濃度を示し、Ⅰ期とⅡ期の PUN 濃度に有意差 ($P < 0.05$) が認められたが、Ⅱ期とⅢ期の PUN 濃度には有意差が認められなかった。試験区のⅠ期とⅢ期の PUN 濃度は、対照区のⅠ期とⅢ期の PUN 濃度とほぼ一致したが、試験区のⅡ期の PUN 濃度は対照区Ⅱ期のそれより 9% 低い濃度を

示し、有意差 ($P < 0.05$) が認められた (表90)。

以上の結果より、FPの給与によってラットのPUN濃度は、明らかに減少した。この結果はヤギの実験結果 (第二章, 第1, 2節) と正反対であった。

PUN/PAN濃度比：対照区の各個体および試験区の各個体の各実験期間のPUN/PAN濃度比は、試験区のNo.8とNo.12のⅡ期とⅢ期の比に有意差 ($P < 0.01$) が認められた。対照区および試験区のⅠ期の比は、Ⅱ期、Ⅲ期の比よりやや高く、両区のⅠ期、Ⅱ期、Ⅲ期の比はほぼ等しかった (表88, 89)。ラットのPUN/PAN濃度比は、いずれもヤギの比の約1/2であった。これは反芻動物のPUN濃度が他の動物より比較的高濃度であることによるものと考えられる。

PAN濃度とPUN濃度の相関：対照区および試験区の各個体および全個体のPAN濃度とPUN濃度の相関係数は、大部分正の係数を示し、ヤギの場合と異なった。有意の相関は、対照

区の No.3 の III 期, No.4 の II 期, 全個体の I 期, II 期, III 期, 試験区の No.11 の II 期のそれぞれに認められた(表 88, 89)。

4. 要約

絨毛虫がラットの PAN 濃度を与える影響を検討するため、給与粗蛋白質量の 20% に相当する FP を給与飼料に混ぜて給与した。対照区と試験区の採食率および増体量は、いずれも I 期(対照飼料給与)および II 期(対照飼料, 試験飼料給与)より III 期(対照飼料給与)の方が低かった。FP を含む試験飼料の採食率は対照飼料より高かった。FP を給与した試験区 II 期の PAN 濃度および PUN 濃度は、FP を給与しない I 期, III 期および対照区のそれらより有意に低い濃度を示した。

この結果、絨毛虫の体成分には、ラットの PAN 濃度を減少させる機能をもつ物質の存在が示唆された。FP の給与がラットの PUN/PAN

濃度比およびPAN濃度とPUN濃度の相関に与
える影響は、特に認められなかった。

5

10

15

5

10

15

c

第2節. 反芻胃内絨毛虫類の給与再実験

1. 実験目的

前節の実験より絨毛虫は、ラットのPAN濃度およびPUN濃度を明らかに減少させることが認められ、これまでのヤギおよびラットを用いた実験より絨毛虫の体成分には、これらの動物のPAN濃度を減少させる物質の存在がほぼ確認されたものと考えられる。しかし、

(I)、前節の実験に用いたラットの条件(体重、日令)は一定でなく、

(II)、試験飼料(FP含有)給与時の1日当りの給与純蛋白質量は対照飼料給与時のそれより約10%(0.24g/日)少なく、

(III)、1日当りの飼料給与量はやや多く、

(IV)、採血部位は尾静脈で、血漿成分の分析を目的とした部位としては一般的でない等の考慮すべき点があった。

これらの点を考慮してラットの条件を一定にし、FP給与量を1日当りの給与純蛋白質量の20%相当量にし、飼料給与量を前節の実験の給与量の90%にし、採血部位を広く行われている頸静脈として再度、絨毛虫の給与がラットのPAN濃度に与える影響を検討した。また、再実験では、絨毛虫の給与がラットの主要臓器重量に与える影響についても検討した。

2. 実験方法

A. 供試動物および飼養管理

体重360-380gのSD系雄ラット14匹(チャールス・リバーより購入)を対照区7匹、試験区7匹に分け個体ごとに飼養した。

給与飼料およびその配合割合は前節の実験に準じ、対照飼料の給与量は前節の実験の90%(18g/日)とし、これに試験飼料(FP含有)窒素量に対する対照飼料窒素量の不足をL-Glu

(関東化学の製品)で調整した(表91・92)。

すなわち、対照飼料18gとL-Glu 0.84gの計18.84g/日を1匹当りの対照飼料給与量とした。給与方法および給与時間は前節の実験に準じ、給餌器の回収はPM5:00に行った。その他の飼養管理は前節の実験に準じた。

対照区および試験区の実験期間は、それぞれI, II, III期とした。両区の予備飼育日数は、IとIIIが10日間、II期が7日間とし、両区の実験飼育日数を各実験期間ともそれぞれ25日間とした。

B. 凍結絨毛虫の給与量および給与方法

第1章、第3節の絨毛虫採集法IIにより得たFPの給与量は、1日当り給与純蛋白質量の20%相当量とし、FP給与時の飼料窒素量はL-Gluで、代謝エネルギー量は小麦澱粉で一定に調整して(表92)、対照および試験飼料の各成分量を一定にした。ラット1匹当りの1

日の試験飼料給与量は、対照飼料16.9gとFP8.2gの計25.1g/日とした。

試験飼料の給与方法は、前節の実験に準じて行った。

ㄷ. 測定項目

採食量：毎日の採食量を測定し、ラットのPAN濃度測定ごとの採食率を算出した。

体重：ラットのPAN濃度測定のための採血時に測定し、PAN濃度測定ごとの摂取飼料100g当りに対する各個体の増体量(g)を算出した。

主要臓器の重量：実験終了後、直ちに各個体の体重、肝臓、腎臓、脾臓、膵臓の重量を測定し、体量100g当りの重量比を算出した。

この際、副腎については極めて軽量なため重量比を求めなかった。

血漿成分：各実験期間を通じて5日間（実験期間ⅠとⅢ期の初回は10日間，実験期間Ⅱ期の初回は7日間）ごとに早朝採食前の血液

を左右頸静脈より交互に無麻酔頸静脈穿刺採血法（第1章，第2節）で約0.7ml採血し、直ちに血漿を分離した。PAN濃度測定は、前節の測定法で行った。対照区および試験区の各個体の血漿を各実験期間ごとに混合（0.1ml × 7匹 × 5回 = 3.5ml）し、両区の各実験期間ごとのPAAをアミノ酸自動分析計（日本電子・JLC-6AM型）により分析した。

3. 結果および考察

A. 凍結絨毛虫の給与がラットの採食率および増体量に与える影響

採食率：対照区および試験区の各個体および全個体の各実験期（Ⅰ，Ⅱ，Ⅲ期）ごとの採食率は、表93に示した。

採食率の有意差は、対照区のNo.1のⅡ期とⅢ期，No.2のⅠ期とⅡ期，Ⅱ期とⅢ期，No.4のⅡ期とⅢ期，全個体のⅡ期とⅢ期，試験区

のNo.4のⅡ期とⅢ期, No.14のⅠ期とⅢ期に認められた。両区の採食率は、ともにⅢ期の採食率が他より低かったが、両区の採食率はほぼ等しかった。試験飼料を給与した試験区Ⅱ期の採食率(98.9 ± 2.5%)は、前節の試験区Ⅱ期の採食率(98.4 ± 2.3%)とほぼ一致した。

摂取飼料100g当りの増体量: 対照区および試験区の各実験期間(Ⅰ, Ⅱ, Ⅲ期)ごとの各個体および全個体の増体量は表93に示した。試験区Ⅱ期の増体量は、Ⅰ期、Ⅲ期のそれとほぼ一致した。試験区の全個体のⅡ期の増体量は、対照区のⅡ期よりやや低かったが、Ⅰ期、Ⅲ期はほぼ等しかった。

FP給与によるラットの増体量の変動は、特に認められなかった。

B. 凍結絨毛虫の給与がラットの臓器重量に与える影響

対照区と試験区の主要臓器の体重に対する

重量比は、表94に示した。

腎臓、脾臓、膵臓の重量比は、両区でほぼ一致したが、肝臓の重量比は、対照区より試験区の方が4.4%高い比を示した。しかし、有意差は認められなかった。

絨毛虫の給与がラットの肝臓重量に与える影響について、今後検討する必要性が示唆される。

① 凍結絨毛虫の給与がラットの血漿遊離アミノ態窒素濃度および血漿尿素態窒素濃度を与える影響

対照区および試験区、両区のPAN濃度とPUN濃度は、表95・96に示した。

PAN濃度：対照区の各個体の各実験期間のPAN濃度は、7匹中3匹がほぼ等しい濃度を示したが、7匹中4匹がI期の濃度よりII期が減少し、No.2に有意差($P < 0.01$)が認められた(表95)。対照区5のII期10とIII期15のPAN

濃度は、5匹中5匹（対照区Ⅲ期のNo.10とNo.5のラットは、事故と肺炎により淘汰）がほぼ等しい濃度を示した。No.2のⅢ期のPAN濃度は、Ⅰ期のそれより低く、有意差（ $P < 0.01$ ）が認められた（表95）。試験区の各個体の各実験期間ごとのPAN濃度は、7匹中6匹がⅠ期＞Ⅱ期＞Ⅲ期の順で徐々に減少し、No.11のみが前節の結果と一致した（表96）。対照区および試験区の全個体のPAN濃度は、両区ともⅠ期＞Ⅱ期＞Ⅲ期の順に減少し、対照区のⅠ期とⅢ期のPAN濃度に有意差（ $P < 0.01$ ）が認められたが、両区の各実験期間のPAN濃度はほぼ等しかった（表97）。

以上の結果より、FP給与によるラットのPAN濃度の減少は、認められず、前節の結果を再確認することができなかつた。この結果はヤギの再実験の結果と一致し、絨毛虫がヤギおよびラットのPAN濃度を減少させる機能の再現性が低いことを示した。ラットの実験で尾静脈血漿には明らかにPAN濃度の減少が認め

られたのに対して、頸静脈血漿では認められなかった点は理解し難い事実である。

絨毛虫体中にヤギおよびラットのPAN濃度を減少させる機能をもつ物質の存在を確認するためには、ラットを用いて、より精密な条件下（年齢、飼料中蛋白質含量など）で試験を反復することが必要であると考えられる。

PUN濃度：対照区の各個体のⅡ期のPUN濃度は、Ⅰ期のそれより高い濃度の個体（No.3, 4, 5, 6）と低い濃度の個体（No.1, 2, 7）があり、No.4に有意差（ $P < 0.05$ ）が認められた。Ⅲ期のPUN濃度は、Ⅱ期のそれより高い濃度の個体（No.2）と低い濃度の個体（No.4, 6, 7）があり、No.7のⅠ期とⅢ期に有意差（ $P < 0.01$ ）が認められた（表95）。

対照区的全個体のⅡ期のPAN濃度は、Ⅰ期とⅢ期のそれよりやや高い濃度を示したが、有意差は認められなかった。試験区の各個体のⅡ期のPUN濃度は、7匹中4匹がⅠ期のそれより減少し、No.12に有意差（ $P < 0.05$ ）が認め

められたが、3匹はほぼ等しい濃度を示した。Ⅱ期のPUN濃度は、7匹中4匹がⅡ期のそれよりさらに減少し、No.12のⅠ期とⅢ期に有意差 ($P < 0.05$) が認められた。No.9のみは、前節の結果とほぼ一致した。試験区の全個体のⅡ期とⅢ期のPUN濃度はⅠ期のそれより低い濃度を示し、ともに有意差 ($P < 0.01$) が認められた。対照区のⅡ期とⅢ期のPUN濃度は試験区のⅡ期とⅢ期のそれらより高い濃度を示し、ともに有意差 ($P < 0.01$) が認められた (表95, 96)。対照区の全個体のⅡ期のPUN濃度は、試験区のそれより高く有意差 ($P < 0.01$) が認められた (表97)。この結果は前節の結果とほぼ一致した。Ⅲ期のPUN濃度は、すべてⅡ期のそれよりやや低濃度を示し、前節の結果と一致しなかった。

以上の結果より、絨毛虫はラットのPUN濃度を減少させる機能を有することが再確認された。

PUN/PAN濃度比：対照区と試験区の各個体

の各実験期間のPUN/PAN濃度比は有意差が認められなかった。両区の全個体のI期の比は、ほぼ等しかったが、II期とIII期は対照区の方が高く、II期に有意差($P < 0.01$)が認められた。両区の比は、前節の結果より低い傾向が認められた(表95, 96)。

PAN濃度とPUN濃度の相関：対照区，試験区の各個体および全個体のPAN濃度とPUN濃度の相関の有意差は、対照区のNo.1のII期($P < 0.05$)とNo.4のII期($P < 0.05$)にのみ認められた(表95, 96)。

ラットにFPを給与した結果、FPを給与した試験II期のPUN濃度は、対照区II期および試験区I期のそれらより有意に低い濃度を示し、前節の実験結果とほぼ一致したが、FP給与によるPAN濃度の減少は認められなかった。

D. 凍結絨毛虫の給与がラットの血漿遊離アミノ酸濃度に与える影響

対照区および試験区の全個体のⅠ期とⅡ期のPAA濃度は、表98に示した。

両区のⅢ期のPAA濃度は、異常に低い値を示したため棄却検定により除いた。

PAA濃度：両区のⅠ期とⅡ期のPAA濃度はほぼ等しい濃度を示し、FP給与による影響は認められなかった。また、個々のPAA濃度の相違は認められなかった。両区のⅠ期とⅡ期の総必須PAA / 総PAA濃度比および総必須PAA / 総可欠PAA濃度比は、ほぼ等しい比を示した。

以上の結果よりFP給与によるラットのPAA濃度の減少は認められなかった。

4. 要約

絨毛虫がラットのPAN, PUN, PAA濃度と与える影響を再検討するため、給与純蛋白質の20%に相当するFPを給与飼料に混ぜて給与した。対照区と試験区の採食率および増体量

はほぼ一致し、FP給与による相違は認められなかった。

実験終了後の両区の各個体の主な臓器の体重に対する重量比は、試験区の肝臓の重量比が対照区のそれよりやや高い比を示したが、他の臓器の重量比はほぼ等しかった。

FP給与によるPAN濃度およびPAA濃度の減少は認められなかったが、PUN濃度はFP給与によつて減少し、前節の結果とほぼ一致した。FPの給与がラットのPUN/PAN濃度比およびPAN濃度とPUN濃度の相関に与える影響は、特に認められなかった。

以上の再実験の結果は、絨毛虫がラットのPUN濃度を減少させる点については前節の結果を再確認できたが、PAN濃度を減少させる点については再確認できなかった。

第V章 総合考察および総括

第1節 総合考察

本研究は絨毛虫体がヤギのPAA濃度を減少させる機能を有するか否かを検討する目的で行なわれた。既に、反芻胃内に絨毛虫類の存(58)存がPAA濃度を減少させることはKlopfenstein,(50, 51)板橋等によって明らかにされている。

PAAは組織中の遊離アミノ酸と共にアミノ酸プールを形成しており、PAA濃度は動物の性、年齢、種類、種々のホルモン、摂取栄養素(蛋白質、エネルギー、ビタミン)(61, 80)によって変動することが知られている。PAA濃度は、腸管からのアミノ酸の吸収と体内での組織蛋白質への取り込みと放出およびアミノ酸自身の代謝による収支の差を反映していると考えられることから、動物の蛋白質栄養の良否を判定する指標としても用いられている。

単胃動物のPAA濃度は摂取蛋白質により直接の影響を反映するため、動物のアミノ酸供給の状態を比較的容易に知ることができる。

反芻動物は単胃動物と異なり、反芻胃内微生物により飼料のアミノ酸が組み換えられるためPAA濃度とそのパターンは、摂取飼料の影響を受けにくいことが知られている。^(45, 65, 103, 115)反芻動物の小腸へ移行した微生物蛋白質のアミノ酸

パターンは、一般的に飼料蛋白質源と比較的無関係であり、⁽¹⁰³⁾このため反芻動物では飼料蛋白質の大部分が第四胃へ素通りしない限り、

PAAと飼料蛋白質との関係を推定し難いと考⁽⁹⁹⁾えられている。反芻動物のPAA濃度およびPAA

パターンは、良好な蛋白質栄養状態のとき比較的一定であり、とりわけGly濃度の減少、

側鎖アミノ酸濃度やPhe濃度の増加、総必須アミノ酸濃度の増加を示すことが一般に知ら⁽¹¹⁶⁾れている。^(10, 85, 109, 115)

これに対して、尿素を窒素源とする飼料や低蛋白質飼料給与によって血漿Gly濃度は増加し、加熱処理またはホルマリニ^(113, 114)ン処

理した大豆ミールを給与したときの血漿 Gly / 側鎖アミノ酸濃度比は処理しない大豆ミール⁽⁸³⁾ 給与のときのそれより低くなったことより、第一胃を素通りする蛋白質の増加が血漿 Gly 濃度を減少させるものと考えられ、このため血漿 Gly 濃度は、反芻動物の蛋白質栄養の判定に適用できるとされている。

Papas⁽⁹⁴⁾等 は調和のとれたアミノ酸混合物と調和のとれない混合物を仔メシ羊の第四胃に注入したときの PAA 濃度を比較し、前者では総必須アミノ酸濃度と総必須アミノ酸 / 総可欠アミノ酸比が増加することを報告している。また、Fuji hara⁽²⁹⁾等はヤギの第四胃内に種々のレベルのカゼインを投与し、血漿中の Gly / Val および側鎖アミノ酸濃度比が飼料蛋白質の栄養的な判定の指標となり得ることを報告している。これらの報告が示すように反芻動物の PAA 濃度とそのバターの変動は、特別の飼料給与と給与法によって認められているにすぎない状態である。

他方、反芻動物の栄養生理における絨毛虫の生息の意義を解明するための一手段として、F動物とDF動物を比較検討することにより、その動物間の種々の相違点が知られている。著者はF動物とDF動物の種々の相違点の中で、DF動物のPAA濃度がF動物のそれより高い値を示していることに着目した。さらに、その相違の要因が絨毛虫の体成分に存在する何等かの物質によるものと推定されたため、絨毛虫がヤギのPAA濃度を減少させる機能を有するか否かを検討した。

PAA濃度は、現在、アミノ酸分析計によって求められているが、多数の測定を行うには器具、経費等に困難があるためPAA濃度の代わりにPAN濃度の測定値を用いることができるか否かを最初に検討した。

方法にはアミノ酸の定量に最も広く用いられているニンヒドリンによる比色法を用い、尿素、その他のアミノ化合物による発色を考慮した場合、尿素の寄与分のみを差引けばPAN

濃度測定法として十分使用できることを確認した。次に本研究の目的にPAA濃度の代りとしてPAN濃度を用いられるか否かを検討した。

第II章, 第1, 2節の実験より, ヤギのPAN濃度は比較的一定の値を示して, 反芻動物の特徴が認められた。また, DFヤギのPAN濃度はFヤギのそれより明らかに高い値を示し, 既に報告されている絨毛虫の有無によるPAA濃度の相違^(50, 51, 58, 102)と一致した。DFヤギのPAN濃度は長期間Fヤギのそれより常に高い値を維持した。

これらの結果より, 本研究の目的にはPAN濃度はPAA濃度に代って十分使用できることが確認された。

次にDFヤギのPAN濃度がFヤギのそれより高い事実から, 反芻胃内絨毛虫体成分にヤギのPAN濃度を減少させる機能があるか否かを明らかにするために, 屠殺牛より調製した反芻胃内絨毛虫体(乾燥)を直接DFヤギに給与窒素量の8, 12%を給与してPAN濃度の減少

を検討した。この場合には併せてPAA濃度の測定も行った。その結果、DFヤギのPAN濃度(第1節)は、4頭中2頭が8%DP給与前のそれより減少する傾向が認められた。8%DP給与時のPAA濃度は、全個体とも8%DP給与前のそれより明らかに減少した。

Klop fem ste im, Purser 等は、DF動物のPAA濃度増加はLysが制限アミノ酸であつて絨毛虫により供給されなかつたもののLys不足によるものと考察しているのので、この点を確かめるため、栄養上完全に近いと認められているWEを給与する実験を行った結果、PAN濃度の減少は認められなかつた。DF動物のPAA濃度の増加がLysの不足によつて生じたものであれば、Lys含量の多いDP給与によつて血漿Lys濃度は他の遊離アミノ酸より著しく増加するものと考えられるが、そのような結果は認められなかつた。また、再実験(第2節)の結果より、DFヤギの血漿Lys濃度はFヤギのそれとほぼ等しい値を示した。

以上の結果、絨毛虫の有無によるPAN濃度の相違は、Lys 供給が直接の原因ではないと考えられる。^(58, 102)

前述した第1節の実験では、DFヤギ4頭中2頭にはDP給与によるPAN濃度の減少が認められたが、他の2頭にはDP給与によるPAN濃度の変動が認められなかった。

従って、この現象を再確認するため、絨毛虫体の給与実験を再度試みた(第2節)。今回は、絨毛虫体成分をできるだけ変化させずに試験するため凍結絨毛虫体(FP)を用いた。

その結果、FP給与によるヤギのPAN濃度およびPAA濃度の減少は認められず、先の実験結果と一致しなかったが、FP給与後のPAN濃度はFP給与時のそれより高い値を示し、先の実験結果と一致した。FP給与時のヤギのPAN濃度が減少しなかった点については、理解し難い事実である。しかし、WE給与や飼料給与量を10%増加してもDFヤギのPAN濃度はほぼ等しい値を維持し、絨毛虫を移植すると、PAN

濃度は減少した結果より、FヤギとDFヤギのPAN濃度の相違は、アミノ酸やエネルギーの供給等による栄養の問題と直接無関係であると考えられる。

この点については、 C_3 給与の場合およびラットにFPを給与した場合とを合せて後で更に述べる。

また、再実験で、DFヤギの血漿Cit濃度がFヤギのそれより著しく（約5～12倍）増加した事実は、絨毛虫体の何等かの物質の影響を表わしている可能性があり、興味深いことであると考えられる。

絨毛虫の存在が反芻胃内VFA、特に C_3 の濃度を高めると報告されている点より絨毛虫の有無によるPAAの相違が反芻胃内VFA、特に C_3 濃度の変動による影響によるものとする報告もあるので、この点を検討するため、DFヤギに C_3 を給与してPAN濃度を判定した（第五章）。その結果、DFヤギに C_3 を給与してもPAN濃度は減少しなかった。DFヤギに絨毛

虫を移植した結果、Fヤギの反芻胃内VFA₄ (20, 21, 47, 51, 58)
 (49, 51, 58, 69)濃度はDFヤギのそれらより高い値を示し、
 これまでの報告と一致した。Fヤギの反芻胃
 内C₃濃度はDFヤギのそれとほぼ等しい濃度を
 示し、絨毛虫の存在は反芻胃内C₃濃度を高めた
 (5, 27, 133)たとする報告と一致しなかつた。Fヤギの反
 芻胃内VFA濃度は、C₃給与時のそれとほぼ
 等しい濃度であつたにもかかわらず、Fヤギ
 のPAN濃度はDFヤギのそれより減少した。

この結果より、絨毛虫の有無によるPAN濃
 度の相違は、反芻胃内VFAおよびC₃に由来
 (51)するエネルギー源の差異に基づく影響ではな
 いことが明らかとなつた。

第II章の実験では反芻胃内絨毛虫体の給与
 がDFヤギのPAN濃度を減少させる事実を確定
 することができなかつたので、供試動物をヤ
 ギからラットに移して実験を行った。その理
 由は、絨毛虫が有していると考えられるPAN
 濃度を減少させる機能が反芻動物のみならず
 単胃動物にも有効であるならば、ヤギを用い

るよりラットの方が動物の条件を整え易く、比較的少量の絨毛虫で例数を多くすることが出来るため、ラットにFPを給与してPAN濃度によえる影響を検討した。第四章、第1節の実験では、FP給与によつてラットの尾静脈のPAN濃度はFP給与前後のそれより明らかに減少した。

この結果は、絨毛虫体の何等かの物質がラットのPAN濃度を減少させたことによるものと考えられ、この点に関して、絨毛虫体がヤギのPAN濃度を減少させる機能はラットにも同様に作用するものと推定される。

PAA濃度測定 of 採血部位は、一般に頸静脈であり、ラットでは多くの測定値が発表されてゐることより、再実験ではFP給与による頸静脈のPAN濃度、PAA濃度の変動を検討した。

その結果、FP給与による上記の減少は認められなかった。すなわち、FP給与によるラットのPAN濃度の減少は、採血部位により異なる結果が得られた。この要因については理解

できない。ラットの食後18時間のPAA濃度は、
 給与蛋白質の質に⁽⁷²⁾関係ないとされている点か
 うみても、FP給与によるラットのPAN濃度の
 減少の表われ方が、頸部と尾部の両静脈間で
 異なるとは考え難い。

今後、更に実験を重ねることが必要である。

PAA、組織中遊離アミノ酸、組織蛋白質中
 アミノ酸の三者は動的平衡状態にあり、各組
 織のアミノ酸代謝には特異性が認められ、種
 々の酵素とホルモン等によって代謝調節され
 ている。^(61, 80)このため、絨毛虫の有無および給与
 によるヤギヤラットのPAN濃度の減少は、エ
 ネルギーやアミノ酸の供給による直接的なも
 のではなく、むしろホルモンか、またはホル
 モンを介して影響を与える代謝調節的なもの
 によると推定される。

本研究の結果からは、絨毛虫体に存在する
 物質がこれらの動物の蛋白質(アミノ酸)代
 謝を直接的または間接的に変動させ、その結
 果としてPAN濃度が減少しているものと考え

られるが、断定するまでには至らなかった。

なお追加的なものとして考察すれば、第二章、第1節のDFヤギに絨毛虫体を給与した場合のPAN濃度およびPAA濃度は減少することが認められたが、第2節の両実験では認められなかった。この理由は理解し難い事であるが、エネルギー、特にVFA、 C_3 の給与に基づくもの。またWEの給与実験よりアミノ酸の供給に基づくものではない事は明らかである。

第1、2節の実験において、DFまたはFP給与後（無給与期）のPAN濃度は給与期より、いずれも増加しており、この点では一致した結果が得られている。この理由には動物側の条件等種々考えられるけれども、絨毛虫体の有効物質が給与期には作用していたが、給与をやめれば作用しなくなつて、PAN濃度が増加したものと考えられる。第2節の再実験の場合は、絨毛虫体（有効物質）の給与量が不十分だったために、その作用の影響はPAN濃度に表われなかったが、その後の無給与期に

なつて有効物質の影響が表われてきたものと考
えれば矛盾なく説明できる。

実験が長期にわたつたため同一個体でも飼
養の時期によりDF期のPAN濃度は変動し、春
より夏にかけて増加する傾向にあることを度
々経験したので、絨毛虫体給与期のPAN濃度
を給与直後の無給与期と比較することは無意
義ではないと考えられる。

今後の研究課題は、先ずラットに絨毛虫を
給与して尾静脈と頸静脈PAN濃度に与える影
響を再検討することであろう。また、ヤギを
用いる実験には、絨毛虫体の給与量、年齢、
品種等についての検討が必要であろう。さら
に、絨毛虫がPAN濃度の減少に関与する物質
を体外に分泌している可能性をも考慮するこ
とが必要であろう。

第2節. 総括

本研究の実施に必要と考えられるPANの定量法、ラットの無麻酔採血法、大量の絨毛虫採集等について検討した結果について述べた。

第1章、第1節では、アミノ酸自動分析計を用いずにPAA総量をPAN総量として定量する方法について述べた。すなわち、ニンヒドリン法を応用するPANの定量には、先ず血漿中に存在するアミノ酸以外のニンヒドリン発色物質の影響を除去する方法について検討し、血漿の吸光度からPUNによる吸光度を差し引くことによりPANが定量できる方法(原法)を確定した。原法における血漿の除蛋白操作はやや繁雑であったため、血漿の除蛋白法の改良を検討し、原法によるPAN濃度測定迅速化、簡易化を試みた結果、原法に比べて定量精度は同様に高く、定量操作は容易で、所要時間は90分短縮することができた(改良

法)。

また、改良法はラットなどの小実験動物の PAN 濃度測定に使用できるように微量化を試みた。その結果、改良法の定量精度、定量操作、所要時間に匹敵するニンヒドリン法による微量定量法を確定した。ニンヒドリン法による改良法および微量定量法は、PAN 濃度測定の簡便法として十分利用できる方法であると考えられる。

本研究では、これらの定量法を用いて PAN 濃度の測定を行った。

第2節では、本研究の過程でラットに絨毛虫を給与したときの PAN 濃度に与える影響を検討する必要性が考えられたので、同一のラットから経時的に無麻酔で採血できる方法を検討した。その結果、自作の保定器を用いてラットの無麻酔尾静脈および頸静脈穿刺採血法を確定した。無麻酔頸静脈穿刺採血法は注射針を穿刺する位置と角度を習熟すると切皮することなく容易に、しかも迅速に一定量を

採血できることより、PAN濃度測定のみならず他の研究へ利用できると考えられる。

第3節では、絨毛虫がヤギのPAN濃度を減少させる機能を有するか否かを検討する実験に必要な大量の絨毛虫を、屠殺ウシの反芻胃内容物から分離採集した結果について述べた。採集法Iでは、114頭のウシの反芻胃内容液2610.6ℓから36.7kgの絨毛虫を採集し、6.4kgのDPを得た。採集法IIでは、42頭のウシの反芻胃内容液1205.4ℓから13.1kgの絨毛虫を採集し、凍結保存してFPを得た。

分離採集した絨毛虫の粗蛋白質、純蛋白質、アミノ酸組成、粗繊維は、既報の絨毛虫の成分含量とほぼ一致し、絨毛虫の純度も比較的に高かった。

第II章はヤギに屠殺ウシより分離した反芻胃内絨毛虫体を給与した実験結果である。

第1節では、4頭のヤギを用いて、絨毛虫の有無および絨毛虫の給与がヤギのPAN濃度に与える影響を検討した。その結果、DPヤギ

のPAN濃度はFヤギのそれより20~27%増加し、既報の絨毛虫の有無によるPAA濃度の相違と一致した。

WE給与によるDFヤギのPAN濃度の変動は殆ど認められなかったが、DPを給与したDFヤギのPAN濃度は、給与窒素量8%、12%相当量のDP給与時に4頭中2頭がDP給与前より6~8%減少したが、他の2頭の変動は認められなかった。8%DP給与時のPAA濃度は、全個体とも8%DP給与前のそれより10~20%に減少した。

この結果より絨毛虫の有無によるPAN濃度およびPAA濃度の相違は、絨毛虫の体成分に存在する何等かの物質がPAN濃度を減少させていることが示唆された。8%、12%DP給与後DP給与を止めた場合のPAN濃度は、全個体とも8%、12%給与時のそれより4~9%増加し、DP給与の影響が給与後にも認められた。

DFヤギのPAN濃度は、絨毛虫除去後約18ヶ月の間Fヤギのそれより高い値を維持した。

その後、DFヤギに絨毛虫を移植するとPAN濃度はDFヤギのそれより2~13%減少した。

この結果より、DFヤギのPAN濃度は、Fヤギのそれより常に高いことが再確認された。

FヤギのPUN濃度およびPUN/PAN濃度比は、DFヤギのそれよりやや高いことが認められた。

この結果は絨毛虫の有無による反芻胃内アンモニア濃度の差に起因するものと考えられる。また、DPおよびWE給与時のPUN濃度はDP、WE給与前および給与後の濃度より増加し、DP、WE給与による反芻胃内アンモニア濃度の増加より、むしろ消化吸収される蛋白質の栄養価改善による影響と考えられた。各個体の全実験期間を通し、PAN濃度とPUN濃度の相関の有意差は、殆ど認められなかった。

第2節は、4頭のヤギを用いて第1節の結果の再検討を試みた結果である。

その結果、DFヤギのPAN濃度はFヤギのそれより4~7%増加し、これまでの結果とほぼ一致したが、PAN濃度の増加量は前節の結果

果より少なかった。PAA濃度は、FヤギよりDFヤギの方が9~24%高い値を示し、既報の結果と一致した。FヤギからDFヤギへの移行に伴う個々のアミノ酸濃度の変動は、Glu, Ala, Argがそれぞれ減少したのに対してCit, Val, Ile, Ornが増加した。この中でもGlu濃度は約1/2に減少し、Cit濃度は約5~12倍に増加し、絨毛虫の有無による変動が著しかった。

また、ヤギ2頭ずつを2グループに分けてFP給与(給与窒素量の8%相当量)による反転試験を試みた結果、PAN濃度およびPAA濃度の減少は認められず、前節の結果は再確認できなかった。FP給与後のPAN濃度はFP給与時のそれより増加し、この点については前節の結果と一致した。

つぎにDFヤギに絨毛虫を移植すると、PAN濃度は約8~17%減少し、再び絨毛虫を除去するとPAN濃度は約6~13%増加した。最後に飼料の給与量を10%増加したが、DFヤギのPAN濃度は変動しなかった。

以上の結果より、絨毛虫の有無によるヤギのPAN濃度の相違はヤギの実験条件の範囲内の栄養水準と直接無関係であることを示している。

PUN濃度およびPUN/PAN濃度比は、DFヤギに比べてFヤギ、FP・WE無給与期に比べて、FP・WE給与期の方がやや高い傾向を示し、前節の結果とほぼ一致した。この結果、ヤギのPUN濃度は、摂取蛋白質の良否によって変動し、PUN/PAN濃度比は、PUN濃度の変動に対応して変動することが示された。

PAN濃度とPUN濃度の相関は、予測されたよりも低く、各個体の全実験期間を通じて有意差が認められる例は稀であった。

第IV章は、 C_3 の給与がヤギのPAN濃度に与える影響を検討した結果である。

第1節は、 C_3 の給与がヤギのPAN濃度に与える影響を検討するための予備実験について述べた。供試ヤギは第二章の第2節の実験に用いた個体を使用し、飼料摂取による反芻胃

内VFAおよび各酸濃度の変化をガスクロマトグラフ内標準法で測定した。

その結果、反芻胃内 C_2 , C_3 , C_4 , VFA濃度は、飼料摂取後之時間より増加した。飼料摂取後之時間の反芻胃内 C_3 濃度より全反芻胃内 C_3 量を推定し、それぞれ5, 10, 15, 20, 25%相当量の C_3 を給与した結果、摂取後之時間の C_3 モル%は、 C_3 を給与しないときのそれより、いずれも約10%増加した。

第2節は、上記の結果を参考に実験を試みた結果である。

C_3 の給与量は、既報に示された絨毛虫の有無における反芻胃内 C_3 モル%の差を参考に、推定 C_3 供給エネルギー量の10%増加に相当する C_3 をDFヤギに給与した。 C_3 を給与したヤギの摂取後之時間の反芻胃内 C_3 濃度は、給与しないときのそれより $0.5\text{mM}/100\text{ml}$ 増加し、同時に反芻胃内VFA濃度も $0.4\sim 1.0\text{mM}/100\text{ml}$ 増加した。 C_3 給与によるPAN濃度、PUN濃度、 PUN/PAN 濃度比は、いずれも変動しなかった。こ

の結果、絨毛虫の有無によるヤギのPAN濃度の相違は、反芻胃内VFAおよび C_3 より供給されるエネルギー源の差に基づく差ではないことが示された。

C_3 給与後のヤギに絨毛虫を移植した結果、移植したヤギ(Fヤギ)の反芻胃内VFA濃度は C_3 給与時のそれとほぼ等しい値であったが、反芻胃内 C_3 濃度は、 $0.7\text{mM}/100\text{ml}$ 減少した。

FヤギのPAN濃度は C_3 給与時より約3~13%減少し、PUN濃度はやや増加傾向を示した。

この結果からも絨毛虫の有無によるヤギのPAN濃度の相違は、絨毛虫の有無による反芻胃内VFA濃度、特に反芻胃内 C_3 濃度と直接無関係であることが示された。

第IV章では、供試動物をヤギからラットに移し、絨毛虫の給与がラットのPAN濃度を減少させるか否かについて検討した結果を述べた。

第1節は、体重約400g、日齢約150日、SD系雄ラット(対照区7匹、試験区7匹)を用い、

FPの給与がラットの尾静脈PAN濃度に与える影響を検討した結果である。

FPを給与した試験区Ⅱ期のPAN濃度は、FPを給与しない同区のⅠ・Ⅱ期および対照区Ⅱ期のそれらより8~11%減少し、絨毛虫がラットのPAN濃度を減少させる機能を有することが認められた。

試験区Ⅱ期のPUN濃度はFPを給与しない同区のⅠ・Ⅳ期および対照区Ⅱ期のそれらより10~22%減少し、FP給与による影響が認められたが、ヤギの結果とは異なつた。

FP給与によるPUN/PAN濃度比の変動は、特に認められなかつたが、ラットの比は、ヤギの比より約50%低い値を示した。これはヤギに比べてラットのPUN濃度が著しく低いことによるものと考えられた。

FP給与によるPAN濃度とPUN濃度の相関の相違は、特に認められなかつたが、ヤギの相関よりラットの相関の方がやや高い傾向を示した。

第2節は、第1節の結果の再検討を試みた結果である。

再実験では、体重約360~380g、日齢約70日、SD系雄ラット（試験区7匹、対照区7匹）を用い、FPの給与が頸静脈PAN濃度を減少させるか否かについて検討した。再実験ではFP給与によるPAN濃度の減少は認められず、前節の結果を再確認することができなかつた。FP給与によるPAA濃度の減少も認められなかつた。

第1節の結果が何故再確認できなかつたかについては、再度実験を試みる必要がある。

FPを給与した試験区Ⅱ期のPUN濃度は対照区Ⅱ期のそれより減少し、先の結果と一致した。FPの給与がPUN/PAN濃度比およびPAN濃度とPUN濃度の相関に与える影響は、特に認められなかつた。

結論、以上を要約すると、

1. 絨毛虫の有無によるヤギのPAN濃度は明らかにFヤギよりDFヤギの方が高い。

その要因について検討した結果、

2. DFヤギにおけるPAN濃度の増加は、実験の範囲内ではヤギに供給される蛋白質やエネルギーの量的質的变化と直接的関係はない。
3. 反芻胃内絨毛虫体の給与によってヤギのPAN濃度、PAA濃度およびラットの尾静脈のPAN濃度は減少することが示されたが、両実験の結果は、この事実を確認することができなかつた。
4. 絨毛虫の有無によるヤギのPAN濃度の相違は、絨毛虫の体成分中に存在する何等かの物質の作用によるという推定が本研究の結果によって可成り確実となつたと考えられる。

今後の研究課題は絨毛虫の給与実験における再現性の検討、特にラットにおける再現性の検討であらう。

謝 辞

本研究は、前麻布獣医科大学教授神立誠博士の御指導により行われたもので、研究なかばにして退職された後も終始かわらぬ御指導を与えて頂いたことに謹んで感謝の意を表します。

絨毛虫の真空凍結乾燥ならびにアミノ酸分析に多大の御協力を賜った株式会社ヤクルト中央研究所岩淵明氏に謝意を表するとともに、アミノ酸分析に多大の御協力を賜った岩手大学農学部農芸化学科助教授西沢直行博士に謝意を表します。また、絨毛虫の採集に多大の御配慮を賜った旧津久井食肉センターの職員各位に感謝いたします。

本研究をまとめるにあたり、御指導、御助言を賜った麻布大学教授古泉巖博士に厚く感謝いたします。また、実験遂行にあたり御協力下さいました麻布大学栄養学研究室の皆様にも感謝いたします。

- 1) 阿部又信・神立誠 (1969). 反芻動物における非蛋白態窒素化合物の利用. II. 反芻胃内微生物による尿素態窒素の利用性. 日畜会報 40 (7), 290-298
- 2) 阿部又信・浅井仁志・入来常徳 (1975). 尿素または大豆蛋白質を窒素源とする精製飼料を稲わらとともに給与中の牛の第一胃内性状および血漿遊離アミノ酸. 日畜会報 46(11), 621-629.
- 3) 阿部又信・入来常徳・近藤啓一・河井武則 (1976). 代用乳における市販脱脂大豆粉末による脱脂粉乳の代替効果. 子牛の成長, 消化率に及ぼす影響および血漿遊離アミノ酸濃度に基づくアミノ酸有効性の検討. 日畜会報 47(5), 254-264.
- 4) 阿部周二・神立誠 (1980). *In vitro*法により各飼料から反芻胃内微生物によつて産生されるVFAの組成について. 日畜会報 49(19), 637-647.
- 5) Abou Akkada, A.R., and El-Shazly, K. (1964). Effect of absence of ciliate protozoa from the rumen on microbial activity and growth of lambs. *Appl. Microbiol.*, 12, 384-390.
- 6) Abou Akkada, A.R., and El-Shazly, K. (1965). Effect of presence or absence of rumen ciliate protozoa on some blood components, nitrogen retention, and digestibility of food constituents in lambs. *J. Agric. Sci.*, 64, 251-255.
- 7) Abou Akkada, A.R., Bartley, E.E., Fina, L.R., Meyer, R.M., Henriks, D., and Julius, F. (1968). Simple method to remove completely ciliate protozoa of adult ruminants. *Appl. Microbiol.*, 16(10), 1475-1477.
- 8) Adibi, S.A., Modesto, T.A., and Morse, E.L. (1973). Amino acid levels in plasma, liver, and skeletal muscle during protein deprivation. *Ame. J. Physiol.*, 225(2), 408-414.
- 9) Aikawa, T., Matsutaka, H., Yamamoto, H., Okuda, T., Ishikawa, E., Kawano, T., and Matsumura, E. (1973). Gluconeogenesis and amino acid metabolism. II. Inter-organal relations and roles of glutamine and alanine in the amino acid metabolism of fasted rats. *J. Biochem.*, 74, 1003-1017.
- 10) Annison, E.F. (1956). Nitrogen metabolism in the sheep. Protein digestion in the rumen. *Biochem. J.*, 64, 705-714.
- 11) 馬場茂明・奥田清編 (1973). 臨床化学II. 医化学実験法講座3B, 中山書店, 東京, 72-89.

- 12) Becker, E.R., Schulz, J.A., and Emmerson, M.A. (1930). Experiments on the physiological relationships between the stomach infusoria of ruminants and their host. With a bibliography. Iowa. State. Coll. J. Sci., 4, 215-257.
- 13) Belcher, E.H., and Harriss, E.B. (1957). Studies of plasma volume, red cell volume and total blood volume in young growing rats. J. Physiol., 139, 64-78.
- 14) Bergen, W.G., Purser, D.B., and Cline, J.H. (1968). Effect of ration on the nutritive quality of rumen microbial protein. J. Anim. Sci., 27, 1497-1501.
- 15) Bergen, W.G., Purser, D.B., and Cline, J.H. (1968). Determination of limiting amino acids of rumen-isolated microbial proteins fed to rat. J. Dairy. Sci., 51(10), 1698-1700.
- 16) Bird, S.H., and Leng, R.A. (1978). The effects of defaunation of the rumen on the growth of cattle on low-protein high-energy diets. Br. J. Nutr., 40, 163-167
- 17) Bird, S.H., Hill, M.K., and Leng, R.A. (1979). The effects of defaunation of the rumen on the growth of lambs on low-protein-high-energy diets. Br. J. Nutr., 42, 81-87.
- 18) Boomgaardt, J., and McDonald, B.E. (1969). Comparison of fasting plasma amino acid patterns in the pig, rat and chicken. Can. J. Physiol. Pharmacol., 47, 392-395.
- 19) Bruckner-kardoss, E., and Wostmann, B.S. (1974). Blood volume of adult germfree and conventional rats. Lab. Anim. Sci., 24(4), 633-635.
- 20) Bryant, M.P., and Small, N. (1959). Observation on the ruminal microorganisms of isolated and inoculated calves. J. Dairy. Sci., 43, 654-667.
- 21) Christiansen, Wm.C., Kawashima, R., and Burroughs, W. (1965). Influence of protozoa upon rumen acid production and liveweight gains in lambs. J. Anim. Sci., 24, 730-734.
- 22) Coleman, G.S. (1980). Rumen ciliate protozoa. Advances in parasitology. Academic Press, London, Vol., 18, 121-161.
- 23) Dougherty, R.W., Allen, R.S., Burroughs, W., Jacobson, N., and McGillirad, A.D. (1965). Papers presented at the second international symposium on the physiology of digestion in the ruminant. Ames, Iowa; August, 1964. Physiology of digestion in the ruminant. Butherworths, London.
- 24) Eadie, J.M., and Hobson, P.N. (1962). Effect of presence or absence of rumen ciliate protozoa on the total rumen bacterial count in lambs. Nature, 198, 503.
- 25) Eadie, J.M. (1962). The development of rumen microbial population in lambs and calves under various conditions of management. J. Gen. Microbiol., 29, 563-578.
- 26) Eadie, J.M. (1967). Studies on the ecology of certain rumen ciliate protozoa. J. Gen. Microbiol. 49, 175-194.

- 27) Eadie, J.M., and Gill, J.C. (1971). The effect of the absence of rumen ciliate protozoa on growing lambs fed on a rough-concentrate diet. *Br. J. Nutr.*, 26, 155-167.
- 28) Enta, T., Lockey, S.D.Jr., and Reed, C.E. (1968). A rapid safe technique for repeated blood collection from small laboratory animals. The farmers wife method. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 127, 136-137.
- 29) Fujinara, T., and Tasaki, I. (1980). The effect of dietary casein level on the concentration of plasma amino acids in goats sustained by abomasal feeding. *Jpn. J. Zootech. Sci.*, 51(5), 352-359.
- 30) Gerritsen, T., Rehberg, M.L., and Waisman, H.A. (1965). On the determination of free amino acids in serum. *Anal. Biochem.*, 11, 460-466.
- 31) Grice, H.C. (1964). Methods for obtaining blood and for intravenous injections in laboratory animals. *Lab. Anim. Sci.*, 14(6), 483-493.
- 32) Gruby, D., and Delafond, O. (1843). Recherches sur des animalcules se developpant en grande nombre dans l'estomac les intestins, pendant la digestion des animaux herbivores et carnivores. *C. R. Hebd. Seances, Acad. Sci.* 17, 1305-1308. (Intestinal flagellates, histomonads, trichomonads, amoeba, opalinids, and ciliates. Parasitic protozoa. Academic Press, New York, Vol., II, 655-656.より引用)
- 33) Hamilton, P.B. (1962). Ion exchange chromatography of amino acids-microdetermination of free amino acids in serum. *Annal. New York. Academ. Sci.*, 102, 55-75.
- 34) Heald, P.J., Oxford, A.E., and Sugden, B. (1952). A convenient method for preparing massive suspensions of virtually bacteria-free ciliate protozoa of the genera isotricha and dasytricha for manometric studies. *Nature*, 1055-1056.
- 35) Horiguchi, M., and Kandatsu, M. (1959). Isolation of 2-aminoethane phosphonic acid from rumen protozoa. *Nature*, 901-902.
- 36) 堀口雅昭・(1960). 反芻胃絨毛虫類に関する栄養化学的研究—主として蛋白質及びアミノ酸について— 博士論文, 東京大学.
- 37) Hungate, R.E. (1966). *The rumen and its microbes.* Academic Press, New York.
- 38) Hungate, R.E. (1978). *The rumen protozoa. Intestinal flagellates, histomonads, trichomonads, amoeba, opalinids, and ciliates. parasitic protozoa.* Academic Press, New York, Vol., II, 655-691.
- 39) Hurwitz, A. (1971). A simple method for obtaining blood samples from rats. *J. Lab. Clin. Med.*, 78, 172-174.
- 40) Ibrahim, E.A., and Ingalls, J.R. (1972). Microbial protein biosynthesis in the rumen. *J. Dairy. Sci.*, 55(7), 971-978.

- 41) Ide, Y., Shimbayashi, K., and Yonemura, T. (1966). Effect of dietary conditions upon serum- and milk-urea nitrogen in cows. I. Serum- and milk-urea nitrogen as affected by protein intake. Jap. J. Vet. Sci., 28, 321-327.
- 42) Ide, Y., Shimbayashi, K., and Yonemura, T. (1967). Effect of dietary conditions upon serum- and milk-urea nitrogen in cows. II. Effect of low energy diets. Jap. J. Vet. Sci., 29, 33-39.
- 43) Ide, Y., Shimbayashi, K., and Yonemura, T. (1967). Serum-urea nitrogen as indices of protein intake in ruminants. Jap. J. Zootech. Sci., 38(3), 110-116.
- 44) 稲本晃・(1968). 麻酔. 現代外科学大系, 木本誠ニ監修, 中山書店, 東京, 第2巻, 30-42.
- 45) 入来常徳・阿部又信・荒井仁志 (1981). 子ウシにおける小腸内容物のアミノ酸組成と内因性窒素分泌の影響. 日畜会報 52(2), 110-117.
- 46) 石坂音治 (1969). 揮発性塩基. 微量拡散分析試験法, 南江堂, 東京, 31-33.
- 47) Itabashi, H., and Kandatsu, M. (1975). Influence of rumen ciliate protozoa on the concentration of ammonia and volatile fatty acid in connection with the utilization of ammonia in the rumen..Jap. J. Zootech. Sci., 46(7), 409-416.
- 48) 板橋久雄・神立誠 (1975). 反芻胃内遊離アミノ酸濃度に及ぼす繊毛虫類の影響. 日畜会報 46(11), 600-606.
- 49) 板橋久雄・堅田彰 (1976). 牛の反芻胃内繊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繊毛虫類の影響について. 東北農試研報 52, 161-168.
- 50) 板橋久雄・堅田彰 (1976). 牛の反芻胃内繊毛虫類の栄養生理的意義に関する研究. 第2報. 反芻胃内容物諸画分および血漿中のアミノ酸含量に及ぼす繊毛虫類の影響. 東北農試研報 52, 169-176.
- 51) 板橋久雄・松川正 (1979). 牛の反芻胃内繊毛虫類の栄養生理的意義に関する研究. 第3報. 異なる栄養水準下での子牛の発育速度, 採食量, 反芻胃内発酵および血漿成分に及ぼす繊毛虫類の影響. 東北農試研報 59, 111-128.

- 52) 蒲地康郎・小園昇・伊藤和郎・田中信夫・鎌田七男・岡田浩佑・奥崎美江子・佐々木隆子 (1965). ddNマウスの正常血液像並に採血部位による変異. 九州血液研究同好会誌 15(2), 95-101.
- 53) 金武朝春・荒川清二 (1973). 簡易で確実なラットの固定法と連続静脈採血法について. 蛋白質, 核酸, 酵素. 18(7), 750-752.
- 54) 神立誠・矢津則之・森山昭 (1956). 反芻胃の消化に関する研究. VII. 胃内容積に就て. 日畜会報 27(2), 77-80.
- 55) 神立誠・堀口雅昭・久保辰雄・高橋直躬 (1965). ルーメン内の蛋白質および関連化合物の転移(原生動物を中心として)に関する研究. 農林水産技術会議研究成果 21, 153-175.
- 56) 加納康彦・沢崎徹・小山徳義 (1977). 小型ヤギ(わゆるシバヤギ)の生物学的特性. 一東大牧場コロニー6年間の記録一. Exp. Anim., 26, 239-246.
- 57) Klopfenstein, T.J., Purser, D.B., and Tyznik, W.J. (1964). Influence of aureomycin on rumen metabolism. J. Anim. Sci., 23, 490-495.
- 58) Klopfenstein, T.J., Purser, D.B., and Tyznik, W.J. (1966). Effects of defaunation on feed digestibility rumen metabolism and blood metabolites. J. Anim. Sci., 25, 765-773.
- 59) Kurihara, Y., Eadie, J.M., Hobson, P.N., and Mann, S.O. (1968). Relationship between bacteria and ciliate protozoa in the sheep rumen. J. Gen. Microbiol., 51, 267-288.
- 60) 栗原康 (1969). 反芻動物の第一胃(ルーメン)における繊毛虫相の検索と計数. 日獣会誌 22, 132-153.
- 61) Leatham, J.H. (1968). Protein nutrition and free amino acid patterns. Rutgers University Press, New Brunswick.
- 62) Leng, R.A., Corbett, J.L., and Brett, D.J. (1968). Rates of production of volatile fatty acids in the rumen of grazing sheep and their relation to ruminal concentrations. Br. J. Nutr., 22(1), 57-68.
- 63) Levine, G., and Lewis, L.L. (1973). A vacuum-assisted technic for repetitive blood sampling in the rat. Lab. Anim. Sci., 23(4), 556-558.
- 64) Lewis, D. (1961). Proceedings of the university of nottingham, seventh easter school in agricultural science, 1960. Digestive physiology and nutrition of the ruminant. Butterworths, London.

- 65) Lewis, T.R., and Emery, R.S. (1962). Metabolism of amino acids in the bovine rumen. *J. Dairy. Sci.*, 45, 1487-1492.
- 66) Lindsay, J.R., and Hogan, J.P. (1972). Digestion of two legumes and rumen bacterial growth in defaunated sheep. *Aust. J. Agric. Res.*, 23, 321-330.
- 67) Lough, A.K. (1968). Component fatty acids of plasma lipids of lambs with and without rumen ciliate protozoa. *Proc. Nutr. Soc.*, 27, 30A-31A.
- 68) Luther, R., Trenkle, A., and Burroughs, W. (1966). Influence of rumen protozoa on volatile acid production and ration digestibility in lambs. *J. Anim. Sci.*, 25, 1116-1122.
- 69) Males, J.R., and Purser, D.B. (1970). Relationship between rumen ammonia levels and the microbial population and volatile fatty acid proportions in faunated and defaunated sheep. *Appl. Microbiol.* 19(3), 485-490.
- 70) Martin, A.J.P., and Synge, R.L.M. (1941). A new form of chromatogram employing two liquid phases. 1. A theory of chromatography. 2. Application to the micro-determination of the higher monoamino-acid in proteins. *Biochem. J.*, 35, 1358-1368.
- 71) McDonald, I.W., and Warner, A.C.I. (1975). Proceedings of the IV international symposium on ruminant physiology. Sydney, Australia, August 1974. Digestion and metabolism in the ruminant. University of New England Publishing Unit, Armidale.
- 72) McLaughlan, J.M., and Morrison, A.B. (1969). Dietary factors affecting plasma amino acid concentrations. Protein nutrition and free amino acid patterns, Tokyo University International Edition No. 43, Tokyo University Press, Tokyo, 7.
- 73) McNaught, M.L., Owen, E.C., Henry, K.M., and Kon, S.K. (1954). The utilization of non-protein nitrogen in the bovine rumen. 8. The nutritive value of the proteins of preparations of dried rumen bacteria, rumen protozoa and brewer's yeast for rats. *Biochem. J.*, 56, 151-156.
- 74) Meyer, R.M., Bartley, E.E., Deyoe, C.W., and Colenbrander, V.F. (1967). Feed processing. I. Ration effects on rumen microbial protein synthesis and amino acid composition. *J. Dairy. Sci.*, 50, 1327-1332.
- 75) Mitruka, B., and Howard, M.R. (1977). Clinical biochemistry. Clinical biochemical and hematological reference values in normal experimental animals. Hasson Publishing, New York, 121-126.
- 76) Moore, S., and Stein, W.H. (1948). Photometric ninhydrin method for use in the chromatography of amino acids. *J. Biol. Chem.*, 176, 367-388.
- 77) Moore, S., and Stein, W.H. (1951). Chromatography of amino acids on sulfonated polystyrene resins. *J. Biol. Chem.*, 192, 663-681.
- 78) Moore, S., and Stein, W.H. (1954). A modified ninhydrin reagent for the photometric determination of amino acids and related compounds. *J. Biol. Chem.*, 211, 907-913.

- 79) 森本宏編 (1971). 栄養実験のための理化学的分析方法. 動物栄養試験法. 養賢堂, 東京, 324-329.
- 80) Munro, H.N., and Portugal, F.H. (1972). Free amino acid pools. Protein and amino acid functions, International encyclopaedia of food and nutrition, Bigwood, E.J., editor, Pergamon Press, Oxford, Vol., 11, 197-213.
- 81) 日本化学会編 (1977). 光学的分析法. 分析化学Ⅱ, 新実験化学講座 9, 丸善, 東京, 243-256.
- 82) 日本化学会編 (1979). 体液成分. 生化学データブックⅠ, 東京化学同人, 東京, 1548.
- 83) Nishimuta, J.F., Ely, D.G., and Boling, J.A. (1974). Ruminal bypass of dietary soybean protein treated with heat, formalin and tannic acid. J. Anim. Sci., 39(5), 952-957.
- 84) 奥田豊子・高谷小夜子・吉岡利治・小石秀夫 (1972). 摂取たん白レベルと血漿遊離アミノ酸濃度. 栄養と食糖 25(7), 565-571.
- 85) Oltjen, R.R., and Putnam, P.A. (1966). Plasma amino acids and nitrogen retention by steers fed purified diets containing urea or isolated soy protein. J. Nutr., 89, 385-391.
- 86) 小野寺良次・神立誠 (1968). 反芻胃内繊毛虫類のアミノ酸および蛋白質代謝. 日畜会報 39(5), 206-211.
- 87) 小野寺良次・神立誠 (1969). 反芻胃内繊毛虫類のアミノ酸および蛋白質代謝. Ⅱ. ^{14}C -アミノ酸および ^{14}C ラベル細菌の取り込み. 日畜会報 40(5), 205-211.
- 88) 小野寺良次・神立誠 (1970). 反芻胃内繊毛虫類のアミノ酸および蛋白質代謝. Ⅲ. 繊毛虫類の粒食性について. 日畜会報 41(11), 14-21
- 89) 小野寺良次・神立誠 (1970). 反芻胃内繊毛虫類のアミノ酸および蛋白質代謝. V. 内因性N化合物の検索に要する人工緩衝液の検討. 日畜会報 41(7), 343-348.
- 90) Onodera, R., and Kandatsu, M. (1973). Synthesis of lysine from α, ϵ -diaminopimelic acid by mixed ciliated rumen protozoa. Nature New Biol., 244, 31-32.
- 91) Oshio, S., Tahata, I., Kobayashi, H., and Ami, T. (1977). Volatile fatty acids production in the rumen of young heifers given diets containing a large proportion of concentrate. Jap. J. Zootech. Sci., 48(10), 545-553.

- 92) Oshio, S., Tahata, I., Kobayashi, H., and Ami, T. (1981). Volatile fatty acids production in the rumina of calves fed dried or frozen herbage. *Jap. J. Zootech.*, 52(11), 805-812.
- 93) Oxford, A.E. (1951). The conversion of certain soluble sugars to a glucosan by holotrich ciliates in the rumen of sheep. *J. Gen. Microbiol.* 5, 83-90.
- 94) Papas, A., Hatfield, E.E., and Owens, F.N. (1974). Responses of growing lambs to abomasal infusion of corn oil, starch, casein, and amino acid mixtures. *J. Nutr.*, 104, 1543-1553.
- 95) Phillipson, A.T. (1970). Proceedings of the third international symposium. Cambridge. England, August 1969. Physiology of digestion and metabolism in the ruminant. Oriel Press, Newcastle upon Tyne.
- 96) Pilgrim, A.F., Gray, F.V., Weller, R.A., and Belling, C.B. (1970). Synthesis of microbial protein from ammonia in the sheeps rumen and the proportion of dietary nitrogen converted into microbial nitrogen. *Br. J. Nutr.* 24, 589-598.
- 97) Potter, E.L., Purser, D.B., and Cline, J.H. (1968). Effect of various energy sources upon plasma free amino acids in sheep. *J. Nutr.*, 95, 655-664.
- 98) Potter, E.L., Purser, D.B., and Bergen, W.G. (1972). A plasma reference index for predicting limiting amino acids of sheep and rats. *J. Anim. Sci.*, 34(4), 660-671.
- 99) Potter, E.L., and Bergen, W.G. (1974). Duodenal protein infusions and plasma glucose, urea and acid levels in sheep. *J. Anim. Sci.*, 39(4), 775-779.
- 100) Pouden, W.D., and Hibbs, J.W. (1950). The development of calves raised without protozoa and certain other characteristic rumen microorganisms. *J. Dairy. Sci.*, 33, 639-644.
- 101) Preston, R.L., Schnakenberg, D.D., and Pfander, W.H. (1965). Protein utilization in ruminants. I. Blood urea nitrogen as affected by protein intake. *J. Nutr.*, 86, 281-288.
- 102) Purser, D.B., Klopfenstein, T.J., and Cline, J.H. (1966). Dietary and defaunation effects upon plasma amino acid concentrations in sheep. *J. Nutr.*, 89, 226-234.
- 103) Purser, D.B. (1970). Nitrogen metabolism in the rumen. Microorganisms as a source of protein for the ruminant animal. *J. Anim. Sci.*, 30, 988-1001.
- 104) Renaud, S. (1969). Jugular vein technique for blood collection and intravenous injection in the rat. *Lab. Anim. Sci.*, 19, 664-665.
- 105) Rosen, H. (1957). A modified ninhydrin colorimetric analysis for amino acids. *Arch. Biochem. Biophys.*, 67, 10-15.
- 106) Ruckebusch, Y., and Thivend, P. (1979). Proceedings of the 5th international symposium on ruminant physiology, held at clermont-ferrand, on 3rd-7th September, 1979. Digestive physiology and metabolism in ruminants. Mtp Press Ltd., Falcon House Lancaster.

- 107) 神馨・田中亨一・平沢澄 (1961). マウスにおける眼穿刺法と断尾法の採血による血液学的所見. 実験動物 10(1), 14-19.
- 108) Satter, L.D., and Roffler, R.E. (1975). Nitrogen Requirement and utilization in dairy cattle. J. Dairy. Sci., 58(8), 1219-1237.
- 109) Schelling, G.T., Hinds, F.C. and Hatfield, E.E. (1967). Effect of dietary protein levels, amino acid supplementation and nitrogen source upon the plasma free amino acid concentrations in growing lambs. J. Nutr., 92, 339-347.
- 110) 柴田章夫 (1981). 反芻動物の比較栄養生化学(12). 畜産の研究 35(3), 463-468.
- 111) 柴田進・北村元仕 (1963). 定量法各論, 日常臨床生化学定量法, 中山書店, 東京, 44-47.
- 112) Shimbayashi, K. and Yonemura, T. (1965). Influence of nutritional aiteration on the plasma amino acids of the milking cow. II. Low-protein low-calorie diet, and high-protein low-calorie diet. Nat. Inst. Anim. Hith Quart., 5(4), 213-224.
- 113) Shimbayashi, K., Ide, Y., and Yonemura, T. (1967). Observation on plasma free amino acids of cow under different feeding. Agr. Biol. Chem., 31(5), 628-632.
- 114) Shimbayashi, K., and Yonemura, T. (1970). An aspect of urea cycle enzymes in goat. Agr. Biol. Chem., 34(11), 1603-1609.
- 115) 新林恒一・小原嘉昭・米村寿男 (1975). 尿素飼料給与時のめん羊の反芻胃および血中の遊離アミノ酸について. 日畜会報 46(3), 146-153
- 116) 新林恒一 (1981). 反芻動物の比較栄養生化学(20). 畜産の研究 35(11), 1379-1385.
- 117) Somers, M. (1961). Factors influencing the secretion of nitrogen in sheep saliva. I. the distribution of nitrogen in the mixed and parotid saliva of sheep. Aust. J. Exp. Biol., 39, 111-122.
- 118) Sorg, D.A., and Buckmer, B. (1964). A simple method of obtaining venous blood from small laboratory animal. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 115, 1131-1132.
- 119) Spackman, D.H., Stein, W.H., and Moore, S. (1958). Automatic recording apparatus for use in the chromatography of amino acids. Anal. Chem., 30(7), 1190-1206.
- 120) Staub, J-F., and Coutris, G. (1979). A technique for multiple, high-rate blood samplings via an external cannula in rats. J. Appl. Physiol., 46, 197-199.
- 121) Stein, W.H., and Moore, S. (1949). Amino acid composition of a-lactoglobulin and bovine serum albumin. J. Biol. Chem., 178, 79-91.

- 122) Stone, S.H. (1954). Method for obtaining venous blood from the orbital sinus of the rat or mouse. *Science*, 119, 100.
- 123) Subcommittee on Laboratory Animal Nutrition, Committee on Animal Nutrition Agricultural Board, Nation Reserch Council. (1972). Nutrient requirements of the laboratory rat. 10. Nutrient requirements of laboratory animals. Nutrient requirements of domestic animals. National Academy of Sciences, Washington, D.C.
- 124) 須藤恒二 (1976). ルーメンの検査. 牛の臨床検査法, 中村良一・米村寿男・須藤恒二共編, 農山漁村文化協会, 東京, 6-39-6-42.
- 125) 高橋三夫・亀高正夫 (1976). 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(4), 192-196.
- 126) 梅津元昌編 (1966). 乳牛の科学, 農山漁村文化協会, 東京.
- 127) Weller, R.A. (1957). The amino acid composition of hydrolysates of microbial preparations from the rumen of sheep. *Aust. J. Biol. Sci.*, 10, 384-389.
- 128) Weller, R.A., and Pilgrim, A.F. (1974). 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, 341-351.
- 129) White, H., Handler, P., and Smith, E.L. (1973). Composition of blood plasm. *Principles of biochemistry*. McGraw-hill book company, New York, 5th ed, 801-802.
- 130) Whitelaw, F.G., Hyldgaard-jensen, J., Reid, R.S., and Kay, M.G. (1970). Volatile fatty acid production in the rumen of cattle given an all-concentrate diet. *Br. J. Nutr.*, 24, 179-195.
- 131) Whitelaw, F.G., Eadie, J.M., Mann, S.O., and Reid, R.S. (1972). Some effects of rumen ciliate protozoa in cattle given restricted amounts of a barley diet. *Br. J. Nutr.*, 27, 425-437.
- 132) Williams, P.P., and Dinusson, W.E. (1972). Composition of the ruminal flora and establishment of ruminal ciliated protozoal species in isolated calves. *J. Anim. Sci.*, 34(3), 469-474.
- 133) Williams, P.P., and Dinusson, W.E. (1973). Rumen volatile fatty acid concentrations and weight gains protozoa. *J. Anim. Sci.*, 36(3), 588-591.
- 134) Yale, C.E., and Torhost, J.B. (1972). Critical bleeding and plasma volumes of the adult germfree rat. *Lab. Anim. Sci.*, 22(4), 497-502.
- 135) Yamamoto, H., Aikawa, T., Matsutaka, H., Okuda, T., and Ishikawa, E. (1974). Interorganal relationships of amino acid metabolism in fed rats. *Ame. J. Physiol.*, 226(6), 1428-1433.
- 136) 吉田実 (1978) 反転試験法. 畜産を中心とする実験計画法, 養賢堂, 東京, 116-124.

- 137) Youssef, F.G., and Allen, D.M. (1968). Part played by ciliate protozoa in rumen function. *Nature*, 217, 777-778.
- 138) 有機微量分析研究懇談会編 (1972). 有機原子団の定量分析法.
有機微量定量分析, 南江堂, 東京, 488 - 491.