

氏名 (本籍)	萩 森 一 郎 (愛媛)
学位の種類	獣医学博士
学位記番号	甲第 35 号
学位授与の要件	学位規則第 3 条第 1 項詳当
学位論文題名	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
論文審査委員	(主査) 教授 古 泉 巖 (副査) 神 立 誠 教授 杉 浦 邦 紀

### 論 文 内 容 の 要 旨

反芻胃内における繊毛虫類の存在が血漿遊離アミノ酸 (以下 PAA と略記) 濃度を減少させることは、Klopfenstein 等 (1966), Purser 等 (1966), 板橋等 (1976, 1979) によって明らかにされている。その要因として、上記研究者等が考察した内容 (Lys または、ある種のアミノ酸が制限因子となるため、反芻胃内揮発性脂肪酸 (以下 VFA と略記) に由来するエネルギー源の差) だけでは、繊毛虫の有無による PAA 濃度の相違を説明することが不十分であると考えられる。著者は、上記研究者等が考察した要因のほかに、繊毛虫体に何等かの物質が存在し、この物質の作用によって PAA 濃度が減少しているのではないかと考えた。

本論文は、PAA 濃度と同一と認められる測定の間易な血漿遊離アミノ態窒素 (以下 PAN と略記) 濃度を用いて繊毛虫体がヤギの 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て行った研究の結果を述べたものである。

#### I. 方法および材料

1. 供試動物には、ヤギ 4 頭 (在来種、去勢雄、5~8 歳) および小型ヤギ 4 頭 (シバヤギ、去勢雄、1 歳) を用い、常法により飼養管理した。反芻胃内繊毛虫の除去は Diocetyl sodium sulfosuccinate (Aerosol-OT) 溶液を経口投与して行い、その後は他の動物との接触を避けて飼養した。

ラットは SD 系、雄、体重約 400g および 360~380g のものをそれぞれ 14 匹ずつ用い、常法により飼養管理した。

2. 研究の過程で繊毛虫体をラットに給与して、同一のラットの PAN 濃度を経時的に測定する必要性が考えられたので、保定器を考案作製し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。

3. 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比色法を応用して、血漿の吸光度から血漿尿素態窒素 (以下 PUN と略記) による吸光度を差し引くことにより、PAN 濃度を測定する方法 (原法) を確定した。さらに家畜の臨床にも応用できるように迅速化、簡易化を試みて、改良法を確定した。つづいて改良法は、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て微量定量法を確定した。

4. 研究に必要な大量の繊毛虫体は、屠殺ウシの反芻胃内容物から分離採集した。

採集法 I では、ウシ 114 頭の反芻胃内容液 2,610.6l から 37.7kg の繊毛虫体を採集し、真空凍結乾燥して 6.4kg の乾燥繊毛虫 (以下 DP と略記) を得た。採集法 II では、ウシ 42 頭の反芻胃内容液

1, 205.4l から 13.1kg の織毛虫体を採集し凍結織毛虫（以下 EP と略記）を得た。採集した織毛虫体の一般成分含量は既報とほぼ一致した。

## II. 反芻胃内織毛虫類の有無および乾燥反芻胃内織毛虫の給与がヤギの血漿遊離アミノ態窒素濃度に与える影響

1. ヤギ 4 頭（在来種，去勢雄，5～8 歳）を用いて，織毛虫の有無および DP の給与がヤギの PAN 濃度に与える影響を検討した結果，無織毛虫（以下 DF と略記）ヤギの PAN 濃度は，有織毛虫（以下 F と略記）ヤギより 20～27% 増加した。その後，DF の PAN 濃度は約 18 ヶ月間常に F ヤギより高い値を維持していたが，織毛虫を移植したヤギ（F ヤギ）の PAN 濃度は，移植前の DF の値より 2～13% 減少した。

給与窒素量の 8, 12% 相当量の DP 給与時の PAN 濃度は，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。12% DP 給与後の PAN 濃度は，全個体とも 8, 12% DP 給与時より 4～9% 増加した。

8% DP 給与時の PAA 濃度は，全個体とも DP 給与前より 10～20% 減少したが，DP 給与による血漿 Lys 濃度の増加は認められなかった。

全卵粉（以下 WE と略記）給与時の PAN 濃度は，いずれの場合も WE 給与前後の値とほぼ等しく，変動は認められなかった。

PUN 濃度および PUN/PAN 濃度比は，DF より F ヤギ，DP および WE 給与 DF の値は，それぞれ DP および WE 給与 DF ヤギの方が高い値を示した。

2. 小型ヤギ 4 頭（シバヤギ，去勢雄，1 歳）を用いて，前述の結果の検討を試みた結果，DF の PAN 濃度および PAA 濃度は，F よりそれぞれ 4～7%，9～20% 増加した。DF の個々のアミノ酸濃度は，F より Glu（約 1/3 に減少），Ala, Arg が減少し，Cit（5～12倍に増加），Val, Ile, Orn が増加したが，Lys の変動は認められなかった。

つづいて前述のヤギ 4 頭を 2 頭ずつ 2 グループに分けて FP および WE の反転給与試験を試みた結果 FP 給与による PAN 濃度，PAA 濃度，血漿 Lys 濃度および WE 給与による PAN 濃度の変動は特に認められなかったが，P 給与後の PAN 濃度は，P 給与時より増加し，この点は先の実験結果と一致した。

DF ヤギの PAN 濃度は，約 10 カ月間常に F ヤギより高い濃度を維持していたが，織毛虫を移植したヤギ（F ヤギ）の PAN 濃度は，移植前の DF の値より 8～17% 減少し，再び織毛虫を除去すると，除去前の値より 6～13% 増加した。

次に飼料の給与量を 10% 増加したが，DF の PAN 濃度の変動は認められなかった。

PUN 濃度および PUN/PAN 濃度比は，先の結果とほぼ一致した。

## III. プロピオン酸の給与がヤギの血漿遊離アミノ態窒素濃度に与える影響

1. 飼料摂取後，2 時間の反芻胃内プロピオン酸（以下 C<sub>3</sub> と略記）濃度より全反芻胃内 C<sub>3</sub> 量を推定し，それぞれ 5, 10, 15, 20, 25% 相当量の C<sub>3</sub> を給与した結果，摂取後 2 時間の反芻胃内 C<sub>3</sub> モル% は，いずれの場合も C<sub>3</sub> 無給与時より約 10% 増加した。

2. 既報に示された織毛虫の有無時における反芻胃内 C<sub>3</sub> モル% の差を参考に，推定 C<sub>3</sub> 供給エネルギー

量の10%増加相当量のC<sub>3</sub>をDFヤギに給与した結果、C<sub>3</sub>給与時の摂取後2時間の反芻胃内VFAおよびC<sub>3</sub>濃度は、C<sub>3</sub>無給与時の値よりそれぞれ約0.5, 0.4~1.0mM/100ml増加したが、C<sub>3</sub>給与時のPAN濃度、PUN濃度、PUN/PAN濃度比は、C<sub>3</sub>無給与時のそれらの値とほぼ等しく、C<sub>3</sub>給与によるPAN濃度の減少は認められなかった。

C<sub>3</sub>給与後、直ちに織毛虫を移植した結果、移植されたヤギ(Fヤギ)の反芻胃内VFA濃度は、C<sub>3</sub>給与時の値とほぼ等しかったが、反芻胃内C<sub>3</sub>濃度は、C<sub>3</sub>給与時の値より0.7mM/100ml減少した。

FヤギのPAN濃度は、C<sub>3</sub>給与時の値より3~13%減少し、PUN濃度はC<sub>3</sub>給与時の値よりやや増加した。

#### IV. 凍結反芻胃内織毛虫類の給与がラットの尾静脈および頸静脈血漿遊離アミノ態窒素濃度に与える影響

1. 体重約400g, 日齢約150日, SD系雄ラット14匹(対照区7匹, 試験区7匹)を用いて, FP給与(給与粗蛋白質量の20%相当給与)がラットの尾静脈PAN濃度を減少させるか否かを検討した結果, FPを給与した試験区Ⅱ期の尾静脈PAN, PUN濃度は, FPを給与しない同区のⅠ・Ⅲ期, 対照区のⅡ期の値よりそれぞれ8~11%, 10~22%減少した。
2. さらに前述の結果を再検討するため, 体重360~380g, 日齢約70日, SD系雄ラット14匹(対照区7匹, 試験区7匹)を用いて, FP給与(給与純蛋白質量の20%相当給与)がラットの頸静脈PAN濃度を減少させるか否かを検討した結果, FP給与による頸静脈PAN濃度, PAA濃度の減少は認められず, 先の結果を再確認できなかった。試験区Ⅱ期(FP給与期)のPUN濃度は, FPを給与しない試験区Ⅰ期, 対照区Ⅱ期の値より9~14%減少し, この点は先の結果を再確認した。

#### V. 結 論

前述の研究結果より, 次のような結論が得られた。

1. ニンヒドリン法によるPAN濃度測定の改良法および微量定量法は, 家畜や小実験動物のPAN濃度測定に十分利用できると考えられる。
2. 無麻酔穿刺採血法によって, 経時的に頸静脈血を採取することが可能である。この方法は種々の研究に利用できると考えられる。
3. 屠殺ウシから大量の織毛虫体を採集する方法を開発した。この方法は織毛虫体に関する他の研究目的に応用できると考えられる。
4. FヤギのPAN濃度はDFヤギより明らかに減少していることが確定された。
5. DP給与時のDFヤギのPAN濃度, PAA濃度はDP給与前の値より減少したが, FP給与の再実験では, この結果を再確認できなかった。また, FP給与時のラットの尾静脈PAN濃度はFP給与前の値より減少したが, 頸静脈PAN濃度はFP給与によって減少せず, 尾静脈血の結果を再実験によって確認できなかった。
6. DP, FP給与後のDFヤギのPAN濃度およびFP給与後のラットの尾静脈PAN濃度は, それぞれの給与時の値より増加することが認められた。
7. DFヤギの血漿Lys濃度は, Fヤギの値とほぼ等しく, 減少が認められなかった。また, DP, FP給与時の値は, DP, FP給与前の値とほぼ等しいか, やや減少し, DP, FP給与による血漿Lys濃度の増加は認められなかった。

8. 飼料給与量の10%増加およびC<sub>3</sub>給与時のPAN濃度は、10%増加前およびC<sub>3</sub>給与前の値とはほぼ等しく、変動が認められなかった。
9. 絨毛虫の有無によるPAN濃度の相違は、本実験の範囲内ではヤギに供給される蛋白質、Lys、エネルギーの量的変化（蛋白質では質的变化を含む）と直接的関係は認められなかったことより、FヤギのPAN濃度の減少は、絨毛虫体に存在する物質がホルモン様物質として、またはホルモンを介して代謝調節に影響を与えたことによるものと推測された。
10. 今後、当面の研究課題は絨毛虫体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ろう。

### 論文審査の結果の要旨

反芻動物の前胃、なかでも第一、二胃（反芻胃）中には多数の微生物が生息し、活発な活動をして、寄主動物の栄養に大きな影響を与えている。反芻胃内微生物は大別してバクテリアと原生動物に分けられ、それぞれ独自の活動を行いつつ、相互に密接な関連を保って反芻胃の恒常性を保っている。

本論文は反芻胃内に特有な原生動物である絨毛虫類の寄主動物の栄養、特に蛋白質栄養に与える影響の一つとして血漿遊離アミノ酸濃度に与える影響の要因について研究した結果を述べたもので、結論および5章よりなる。

緒論は本研究の目的を述べたもので、反芻胃内絨毛虫類の除去（Defaunation）が反芻胃内の状態、さらに寄主動物に与える影響のうち血漿遊離アミノ酸（PAA）濃度に関する研究について従来の経過を述べ、Defaunation がヒツジおよびウシのPAA濃度を上昇させるというKlopfensteinら（1966）、板橋ら（1976、1979）の報告に基づき、この現象の要因として考えられている給与必須アミノ酸またはエネルギーの不足の外に絨毛虫体の成分が関与しているのではないかと考え、この点を明らかにすることを目的とした。

第I章は本研究のための実験動物、ヤギのDefaunation、ニンヒドリン比色法による血漿遊離アミノ酸（PAN）濃度の測定法、ヤギへの給与のための大量の絨毛虫体の採取法、ラットを無麻酔で頸静脈血を経時的に採取する方法等本研究を行うために著者が考案した基礎的技術について述べたものである。

前述のKlopfensteinら、板橋らはPAA濃度の測定はいずれもアミノ酸自動分析計を使用しているが、装置、所要経費等の点から多数の分析を行うことは困難である。この点を解決するため、PAAの代わりに血漿遊離アミノ酸（PAN）を用いることを考え、ニンヒドリン比色法によるPANの測定法を考案した。またこの方法をラットにも用いるため、微量化を試みて成功した。

血漿中の非蛋白ニンヒドリン陽性物質には遊離アミノ酸、尿素、アンモニアの外、ペプチド、クレアチン、クレアチニン、尿酸等の含窒素化合物が考えられるが、遊離アミノ酸、尿素以外の発色は極めて僅かであることが実験的に確かめられた。この結果に基づき除蛋白血漿のニンヒドリン発色度より尿素的発色度を差引くことによりPANが求められることを詳細な実験により明らかにして測定法を確立した。

第II章は反芻胃内絨毛虫類をヤギに給与してPAN濃度に与える影響を検討した2回の実験が述べられている。

(1) 通常の在来種（雑種）♂ヤギ（Fヤギ）4頭の絨毛虫類を除去し（DFヤギ）、さらにこれらに絨毛虫類を移植したものについてPAN濃度を測定した結果、DFヤギのPAN濃度はFヤギのそれより20~27%

高く、織毛虫類を移植すると移植前（DFヤギ）より2～13%低下し、PAA濃度と同様の傾向を示すことが確認された。次にPAN濃度の上昇しているDFヤギに給与窒素量の8、12%相当量の乾燥織毛虫体（DP）を給与してPAN濃度を測定した結果はいずれの場合も4頭中2頭はDP給与によりPAN濃度は低下したが、他の2頭には低下が認められなかった。8%DP給与時にPAA濃度を同時に測定した結果は全個体ともDP給与により10～20%低下した。然しLys濃度の上昇は認められなかった。

また12%DP給与後、DP給与を中止すると全個体ともPAN濃度は給与時より4～9%上昇し、DP給与はPAN濃度に対して低下の方向に働いていたことが示唆された。

DP給与によるPAN濃度の低下については一致した結果が得られなかった理由の一つとしてDPは約60%の体蛋白質を含み、その栄養価もすぐれているので、蛋白質の栄養価の相違が考えられる。この点を検討するため最高の栄養価を示す全卵粉（DP相当量）をDFヤギに投与したが、給与によるPAN濃度の変動は認められなかった。すなわちDefaunationによるPAN濃度の上昇は本研究の範囲内では給与蛋白質の栄養価の相違に基づくものではないことが明らかにされた。

血漿尿素態窒素（PUN）濃度、PUN/PAN濃度比はFヤギの方がDFヤギより高い値を示した。

この結果は反芻胃内アンモニア濃度がDefaunationにより低下することに対応するものである。

(2) (1)の実験結果を再検討するため給与DP量が少なくてよい小型ヤギ8（東大農場より分与のもの）4頭を用い(1)と同様の実験を行った。その結果はPAN濃度およびPAA濃度はDefaunationによりそれぞれ4～7%、9～20%増加した。PAA中Glu（約2/3）、Ala、Argは減少し、Cit（5～12倍）、Val、Ile、Ornは増加したがLysの変動は認められなかった。続いて2頭づつ2群に分け、凍結織毛虫類（FP）および全卵粉を給与窒素量の8%相当量をDFヤギに反転試験法によって給与した結果はFP給与によってPAN濃度、PAA濃度、血漿Lys濃度、および全卵粉給与によるPAN濃度の変動は認められず(1)の実験結果は再確認されなかった。FP給与後FP給与を中止した場合のPAN濃度には(1)の場合と同様に上昇の傾向が認められた。

この実験に用いたDFヤギは実験後10ヶ月間PAN濃度はFヤギより高い値を維持していたが、織毛虫類の移植によりPAN濃度は低下し、再びDefaunationにより上昇した。

また給与飼料を10%増加して飼育した場合でもPAN濃度は変動を示さず、給与エネルギー量は本実験の範囲内ではDefaunationによるPAN濃度の上昇には直接関与していないことが明らかとなった。

第三章はDefaunationによる反芻胃内容物の組成の変化のうち揮発性脂肪酸（VFA）中のプロピオン酸（ $C_3$ ）濃度とPAN濃度との関係を述べたものである。 $C_3$ はVFA中最も効率よくエネルギー源として利用されるとされているので、予備実験により求めた $C_3$ 濃度を参考としてDFヤギに10%相当量（反芻胃内約0.5mM/100ml）を給与してPAN濃度を測定した結果は $C_3$ 給与時のPAN濃度、PUN濃度、PUN/PAN濃度比はいずれも $C_3$ 無給与時のそれぞれの値とほぼ等しく $C_3$ 給与によるPAN濃度の変化は認められなかった。

また $C_3$ 給与後のDFヤギにも織毛虫類を移植した結果、移植によってVFA濃度は $C_3$ 給与時とほぼ等しかったが、 $C_3$ 濃度は約0.7mM/100ml減少した。PAN濃度は3～13%減少し、PUN濃度はやや増加した。

第四章は凍結織毛虫類（FP）をSD系8ラットに給与してPAN濃度の変動を測定した結果について述べた。実験は2回行い、最初は尾静脈中のPAN濃度を測定した結果、FP給与（給与粗蛋白質の20%相当量）

により、PAN 濃度は約10%低下し、ヤギでの結果と一致した。つづいて第2回として頸静脈血について同様の実験を反復したが、FP 給与による PAN 濃度、PAA 濃度の低下は認められなかった。

第V章は総合考察および総括である。

反芻動物の PAA 濃度についての既応の研究結果を総括して述べ、反芻胃内繊毛虫類が寄主動物の蛋白質栄養に与える影響を研究する手段として Defaunation による PAA 濃度の上昇を比較的容易に測定するための基礎的技術としてニンヒドリン比色法が、用いられることを確かめて PAN 濃度の測定によって前記の現象の要因を明らかにしようとした。そのために DF ヤギへの DP および FP の給与実験を行った。第1回の実験では半数の個体で DP の給与による PAN 濃度の低下、全個体で PAA 濃度の低下を認めた。また Klopfenstin によって Defaunation による PAA 濃度の上昇は繊毛虫体に豊富な Lys の供給不足によると考察されているが、そうであるとする PAA 中 Lys 濃度は優良蛋白質である全卵粉の給与によって増加するはずであるが、実験の結果ではそのような結果は認められなかった。この点は第2回の実験結果も同様であった。これらの結果より繊毛虫の有無による PAN 濃度の相違は Lys の供給が直接の原因ではないと述べている。

第1回の実験を確認するために同様の実験を小型ヤギを用い、今回は繊毛虫体成分の変化をできるだけ避けた FP を給与し、反転試験法で行ったが、FP 給与による PAN 濃度、PAA 濃度の低下は認められず第1回の実験を確認することができなかった。この理由については著者は理解し難い事実とだけ述べている。他方両回の実験とも DP または FP 給与後それぞれの給与を中止した後の PAN 濃度が上昇を示している事実より DP または FP 給与時には何らかの理由により現われなかった PAN 濃度低下の効果が給与後に現われたとも解釈することができ、繊毛虫体の成分が PAN 濃度を低下させる機能をもつとする著者の推定を示唆する結果としている。

また第2回実験で飼料給油量を10%増加して DF ヤギに給与した結果、PAN 濃度に変動が認められなかった結果から本実験の範囲内ではエネルギー供給量は PAN 濃度の変動に直接関係していないと結論している。この結論は VFA 中最も利用率の高い C<sub>3</sub> を推定濃度の10%相当量を DF ヤギに給与した場合に PAN 濃度の低下は認められなかった結果とも一致し、VFA、C<sub>3</sub> もまた PAN 濃度の低下に直接関係していないことを示していると述べている。

また実験に用いた DF ヤギに繊毛虫類を移植した結果、さらにこれらを Defaunation した結果 PAN 濃度の変動は前記の著者の実験、既応の成績とも全く一致した。

以上の実験を確認するためラットに FP を給与して PAN 濃度の変動を検討した結果、尾静脈ではヤギの場合と同様に低下の傾向を明らかに認めたが、頸静脈の場合には PAN 濃度、PAA 濃度に FP 給与による低下は認められなかった。この両実験の不一致についてはラットの PAA 濃度は給与蛋白質の質に関係なく食後18時間で一定になるという実験結果からの推定で頸尾両静脈間に FP 給与による PAN 濃度低下傾向の表われ方に差があるとは考え難いとし、今後の課題であると述べている。

以上の考察より Defaunation によるヤギの PAN 濃度の上昇または Faunation による低下は繊毛虫体中にある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物質であるという著者の推定は可成り確実になったと述べている。

以上を要約すると本論文は反芻胃内に生息し活発に活動している繊毛虫類の寄主動物に与える影響のうち蛋白質栄養にとって重要な血漿遊離アミノ酸濃度に与える影響の要因の1つに繊毛虫体中の成分が関与して

いる点をほぼ明らかにし、併せてエネルギー、プロピオン酸の給与、給与蛋白質の質、量は直接関与していないことを明らかにしたもので、反芻動物の栄養学ならびに獣医学の発展に寄与したものと認められる。よって著者は獣医学博士の学位を受けるに価するものと認定する。