

新生子牛における成牛ルーメン微生物
の早期定着技術とその有用性に関する
研究

北 満 夫

新生子牛における成牛ルーメン微生物
の早期定着技術とその有用性に関する
研究

北 満 夫

目次

	ページ
緒言	1
実験Ⅰ：哺乳子牛のルーメン微生物叢の発達および発育におよぼす成牛ルーメン液経口投与の影響	
1.目的	6
2.材料および方法	6
1) 供試動物	
2) ルーメン液	
3) 試験方法	
4) 試験期間	
5) 給与飼料	
6) 検査項目および方法	
3.結果	13
1) 発育の推移	
2) ルーメン内細菌数の推移	
3) ルーメン細菌のルーメン壁への付着状況	
4) プロトゾア数の推移	

- 5) ルーメン内容液 pH の推移
- 6) ルーメン内総 V F A 濃度の推移
- 7) ルーメン内容物中のアンモニア態窒素濃度の推移

4. 考 察 19

5. 小 括 28

実験 II : 無菌ヤギの消化管内へのルーメン細菌の定着試験

1. 目 的 31

2. 材料および方法

- 1) 供試動物
- 2) 胎子の無菌的摘出法
- 3) アイソレータ
- 4) 飲料水および飼料の滅菌
- 5) 飼料の給与方法および給与期間
- 6) 無菌ヤギへのルーメン細菌の投与方法
- 7) ルーメン細菌の分離培養法
- 8) 分離ルーメン細菌の同定法

3.結 果 39

- 1) ルーメン細菌投与後3週目における消化管内各部位のpH
- 2) 総菌数および特定細菌種の消化管内の各部位での菌数
- 3) 3週目における投与ルーメン細菌のルーメン内構成
- 4) 消化管内の各部位における総VFA濃度および組成率

4.考 察 40

5.小 括 41

実験Ⅲ：ルーメン液早期経口投与による腸管内へ病原性大腸菌の定着阻止試験

1.目 的 43

2.材料および方法 45

- 1) 供試病原性大腸菌
- 2) 供試ルーメン液
- 3) 供試動物
- 4) 試験方法
- 5) 検査材料
- 6) 検査方法

3.結 果	47
1) 消化管内容、組織中の大腸菌数	
2) 消化管内容の揮発性脂肪酸濃度	
4.考 察	49
5.小 括	52
総 括	54
要 旨	59
Summary	62
謝 辞	63
引用文献	64
表および図	69

緒 言

牛や山羊のような反芻家畜は、草のみで生きていくことができる。この特異とも言うべき食性は、ルーメン内に生息する微生物の活動に依存している。ルーメン内の環境は主に動物体によって与えられる。この環境は体温によって維持されている恒温性（38℃）、胃容積の一定性、大量の微アルカリ性の唾液により胃内pHが中性付近に維持されている中性系、食道の噴門と第二胃、第三胃口とで空気の流通の封鎖された嫌気系といった特徴を備えていて、これらは嫌気性微生物の発育に好適な条件になっている。

反芻家畜は、摂取した飼料をそのままの形で利用するのではなく、ルーメン内に生息する微生物の発酵作用によって産生された酢酸、プロピオン酸、酪酸のような揮発性脂肪酸類（以下VFAと略す）を胃壁から吸収し必要なエネルギー源として利用し、またその発酵作用を通じて増殖した細菌やプロトゾアを第四胃以下で消化・吸収して主要なタンパク質源としている。したがって、ルーメン内でいかなる微生物叢が成立しているかは、反芻家畜の栄養生理上、極めて重要である。

近年、酪農および肉用牛経営の規模拡大に伴い、搾乳牛あるいは若齢肥育牛としての子牛の育成も集団化、多頭化の傾向が進み、より経済的で手間のかからぬ育成法が必要とされている。この条件を満たしてくれるのが早期離乳による子牛育成法である。飼料の利用性のすぐれた素牛を育成できる早期離乳技術は、成牛ルーメン微生物の早期定着技術の開発によって向上させられると考えられる。

子牛や子山羊での飼料摂取とルーメンの発育との関連については、これまで、以下に記述するようにいくつかの報告がみられるが、ルーメン微生物の定着との関連についての研究はあまりない。

反芻家畜は生後4~5日目から固形飼料を食べ始める。しかし、生後1ヵ月以内の栄養は主として牛乳や代用乳などの液状飼料に依存している。この液状飼料は食道を通して直接第四胃に流入するので、反芻胃の存在とは関係なく、単胃動物型の栄養を営むことになる。WATSON^{4,6)}らは、子牛が食欲にかられ牛乳を飲む場合、哺乳器からでもバケツからでも牛乳が定量的に第四胃に流入することを観察し、子牛が牛乳を見て頭や尾を振るといった運動をすることも、子牛の牛乳に対する食欲の強さの徴候であるとした。

その後、食道と第三胃との間のパイプの前部を形成する食道溝の閉鎖はそれらが液状飼料に含まれる化学物質の刺激によって生じるのではないかと疑われた。この化学的刺激説は正しい説ではあるが、ORSKOVら^{3,3)}および阿部ら¹⁾は子牛が聴覚、視覚、嗅覚を通して牛乳を識別し飲もうとするときにも食道溝が閉鎖するという条件反射説を提唱した。

子牛の早期離乳技術では、できるだけ初期から子牛に栄養価の高い固形飼料（人工乳や乾草）を多く摂取させなければならない。

出生時、反芻家畜の前胃は未発達であるが、生後、固形飼料の摂取に伴って前胃の発達を生じ、単胃動物型栄養から複胃動物型栄養へと質的転換をとげていく。初期には、粗剛な粗飼料様物質の物理的刺激作用によって反芻胃の発達が起こると考えられていた。WARNERら^{4,7)}とBROWNLEE⁵⁾が独立に、ルーメンの発達は固形飼料の化学的性質の影響を受け、ルーメン内の乳頭突起の発達には粗飼料よりもエネルギー含量の高い濃厚飼料のほうが効果のあることを示し、ルーメン内で生産されるVFAが第一胃絨毛の発達の刺激物質となる可能性を示唆した。さらにFLATTら⁹⁾は、牛乳を飲ませている子牛に、ルーメンフィステルを通して直接ルーメン内にVFA混合物を投与しつづけることによって、乳頭突起が発達すこ

とを実証した。SANDEEら³⁷⁾とTAMATEら⁴²⁾は、VFAの中でも酪酸(プロピオン酸)酢酸の順に乳頭突起の発達に対し効果があり、グルコース、無機塩、プラスチック、スポンジなどは有効でないことを示した。

TAMATEら⁴³⁾は粗飼料の物理性が第一・二胃の容積と第一胃筋層の発達に寄与することを示し、HARRISONら¹³⁾は第一胃の乳頭突起と筋層の発達は独立して生じ、前者はVFAの化学的刺激作用によるが、後者は粗飼料様物質の物理的作用によるという仮説を提供した。HARRISONら¹³⁾と同様に、STOBOら⁴¹⁾も反芻胃の形態的变化が固形飼料の質(濃厚飼料と粗飼料の給与比率)の変化に短期間に適応できることを実証した。これらの事実から、子牛ルーメン内への成牛ルーメン微生物の早期投与による早期定着は、ルーメン内でのVFAの生産を促進し第一胃乳頭突起の発達を促すことが考えられる。また、早期に固形性飼料の摂取量を増加させることによって、子牛ルーメンの筋層発達を促すと考えられる。

これまでは、食滞や鼓脹症の治療に健康な成牛のルーメン液を経口投与する試みがなされてきた。しかし、子牛への成牛由来ルーメン微生物の早期定着について、微生物学的研究はあまり行なわれていない。子牛の消化管内へのルーメン細菌の定着についての研究は無菌反芻家畜を用いて実施することができると考えた。無菌動物に、限定された種類の細菌を定着させたいいわゆるノトバイオート動物は、正常な腸内細菌叢を欠くため、普通の動物とは生理、栄養、免疫、発癌率などかなり異なった状態にある。それ故、普通動物との比較において常在細菌の研究や微生物の感染機構の研究などに有用な手段を提供している。今日では、微生物学的研究はもとより医学、生物学を含めた広範囲の研究にノトバイオート動物が使用され、その重要性が明らかにされてきている。

これまでに多くの小動物で無菌化が試みられ、マウス、ラットなどでは無菌状

態で維持繁殖が行なわれている。家畜ではブタのSPF化が進んでいるものの、大動物のノトバイオートについての報告はきわめて少ない。反芻動物ではルーメンが発酵槽となり、繊維分解菌やプロトゾアが常在し、栄養生理上きわめて重要な役割を果たしている。また、ルーメンの発達は飼料摂取で始まり、特に微生物の作用によって生産されるVFAにより促進される。したがって、ノトバイオート化反芻動物は、生体の生理機能や栄養代謝に大きな変化をもたらす。無菌反芻家畜へのルーメン細菌の定着試験は、ノトバイオート反芻家畜の作出のみならず、新生子牛への成牛ルーメン細菌の早期定着技術の開発のための基礎的資料を提供できると思われた。

子牛への成牛ルーメン微生物の早期定着技術の開発は、外来性病原菌の排除のためにも重要である。

腸内常在菌に外来病原菌の増殖を抑える力のあることがしばしば報告されている。湊および植村²⁷⁾は、ヒツジのルーメン内に大量に投与した*Escherichia coli* K-12が、ルーメン液の希釈速度に比べ、はるかにすみやかにルーメン内から消失すると報告した。HOLLOWELL and WOLIN¹⁹⁾は、連続培養型人工ルーメン内に投与した大量の*E. coli* K-12が増殖せず、人工胃内の内容物から洗出されることを報告した。このルーメン微生物生態系からの*E. coli* K-12の排除要因は、酸化還元電位、温度、pH、微量の重金属、バクテリオファージ、炭酸水素塩などの環境要因ではなく、ルーメン汁中に存在する物質であることが明らかにされた⁴⁹⁾。この増殖阻害物質は、熱安定性であり、63%エチルアルコールで沈殿せず、陰イオン交換樹脂処理で捕捉され、陽イオン交換樹脂を通過することから、ルーメン汁中のVFAであろうと想定された。実際に、培地中に添加されたVFAは*E. coli* K-12の増殖を阻害した。しかし、この阻害効果の発現はpH依存性で

実験 I

哺乳子牛のルーメン微生物叢の発達と発育におよぼす成牛ルーメン液経口投与の影響

1. 目的

子牛におけるルーメンの発達は、その後の肥育あるいは泌乳期における牛の生産性にとって重要である。子牛ルーメン内に成牛ルーメン微生物叢を早期に成立させることは、VFA生産能を高め、固形性飼料の摂取量を増加させ、結果としてルーメンの発達および子牛の発育を促進するであろうと考えた。そこで、健康成牛の新鮮なルーメン内容物（新鮮ルーメン液）と加圧滅菌処理したルーメン内容物（A T-R）を、生後数時間以内に経口投与し、新生子牛のルーメン内微生物叢および発育に与える影響について調べた。ルーメン内微生物のうち、*Escherichia coli*、*Streptococcus*、*Lactobacillus*、セルロース分解菌、メタン生成菌、澱粉分解菌、ペクチン分解菌、キシラン分解菌およびプロトゾアの定着について調べた。また、ルーメン液のVFA濃度および各VFAモル比およびアンモニア態窒素濃度の推移について検査した。子牛の発育指標として、増体量、体高、体長、胸囲などの推移を測定した。

2. 材料および方法

1) 供試動物：本実験に供試した試験牛は、石川県羽咋郡押水町ナ部14で生まれ飼育されていたホルスタイン種の子牛雌（12頭）雄（8頭）の計20頭（NO. 1～

20) と、石川県内灘町字湖西で生まれ飼養されていたジャージー種の雄子牛4頭 (NO. 1~4) である。

2) ルーメン液

供試の新鮮ルーメン液は石川県畜産試験場で飼育していた健康な搾乳牛より、朝の飼料給与4時間後に経口胃汁採取器(ルミナー)を用いて採取した。この搾乳牛には、朝夕2回、市販の配合飼料の他に、クローバーとオーチャードグラスからなる混播乾草、それにコーンサイレージを給与していた。また、その内容中には1ml当たりメタン生成菌が 10^7 個、乳酸利用菌が 10^8 個、セルロース分解菌が 10^7 個、澱粉分解菌が 10^7 個、キシラン分解菌が 10^9 個、ペクチン分解菌 10^9 個含まれていた。

3) 試験方法：ホルスタイン種20頭は、新鮮ルーメン液投与群5頭(試験区1)、新鮮ルーメン液と加圧滅菌処理ルーメン液(AT-R)は、(食肉センターより採取したルーメン内容液を、外科用一重ガーゼで濾過後 121°C 15分間加圧滅菌処理した液)投与群5頭(試験区2)、AT-R投与群5頭(試験区3)、ルーメン液非投与群5頭(対照区)にわけた。ジャージー種は、試験区1、2、3および対照区に1頭ずつ供試した。試験区1の子牛には、1日当たり100mlの新鮮ルーメン液を生後3日間、飼料給与2時間後に胃カテーテルで経口投与した。試験区2は試験区1と同様に生後3日間新鮮ルーメン液を経口投与し、同時に1日当たり500mlのAT-Rを飼料給与2時間後(ジャージー種は250ml)に離乳期まで42日間経口投与した。試験区3は1日当たり500ml(ジャージー種は250ml)のAT-Rのみを離乳まで経口投与した。

4) 試験期間：ホルスタイン種供試牛のルーメン内容調査期間は90日、発育調査は182日間とした。ジャージー種供試牛は10日齢で、キシラジンを体重1kg当たり0.02ml投与後、安楽殺し検査材料とした。

5) 給与飼料：各区とも1日齢から3日齢までは初乳を体重の10%を上限として与えた。4日齢から42日齢までは代用乳（カーフトップ、全農）を初乳同様に給与した。離乳は43日齢で実施した。市販の人工乳（ニューメイク、全酪）、粗飼料（クローバーとオーチャードグラスの混播2番乾草）および飲水は全期間を通じて自由摂取とした。

6) 調査項目および方法

①発育調査

7. 体重、体高、胸囲および、体長は朝給餌4時間後に測定し、2週毎に26週齢まで続けた。生時日を100%とし、その後は増加率で表示した。

4. 飼料摂取量

毎朝一定量の飼料を給与し、翌朝残飼の重量を測定した。

②ルーメン細菌の検索法

7. *E. coli*、*Streptococcus*および*Lactobacillus*属菌群の検索法

培地および培養方法：*E. coli*計数用としてはマッコンキー寒天培地（Difco）、*Streptococcus*属菌計数用としてはSF寒天培地（Difco）、*Lactobacillus*属菌計数用としてはROGOSA寒天培地（Difco）をそれぞれを用いた。培養は、濾過ル

ルーメン内容物を適切に段階希釈した後、その段階希釈液0.1mlを各寒天培地に接種する平板塗抹培養法で実施した。菌液を接種した各寒天培地は、それぞれ好氣的に37℃で24時間から48時間孵置した。

培養菌種判定および菌数算出法：発育した集落の形態、菌のグラム染色性および形態から当該する菌群を判別し、その集落数から検体原液1ml当たりの菌数を算出した。菌数は材料1ml中の菌数の対数値の平均±標準偏差で表示した。

4. 機能別細菌群の検索法

培地および培養方法：ルーメン内容物中の細菌群はメタン生成菌、乳酸利用菌、セルロース分解菌、澱粉分解菌、キシラン分解菌およびペクチン分解菌の6種の機能菌群について、それぞれPaynterおよび Hungate の培地（PH培地）²⁴⁾、乳酸培地、セルロース培地、澱粉培地、キシラン培地、ペクチン培地を用い培養・計数した。これら細菌群の計数のための培養法の大要を図1-1に示した。嫌気性希釈液でルーメン内容物1mlを検体とし、9倍量の希釈液を加え検体の10希釈液とする。検体と希釈液の入った試験管はCO₂ガスで満たしゴム栓をする。希釈した検体をもとにして、CO₂ガス通気下で順次10倍段階希釈して調製した菌液の0.2mlを各培地に3本あて接種し37℃で培養した。培地のガス相は、PH培地で80% H₂・20% CO₂の混合ガス、ペクチン培地及びキシラン培地で90% N₂・10% CO₂の混合ガス、その他の培地では100% CO₂ガスとした。菌計数のための培養日数は、PH培地およびセルロース培地で2週間、ペクチン培地、キシロース培地および乳酸培地で1週間、澱粉培地で5日間とした。

培地中における細菌の発育の有無の判定法：メタン生成菌の発育は、PH培地の気相中に生成されるメタンガスの有無で判定した。メタンガス検出はTCD型検出器を装着しているガスクロマトグラフ（日立184型）によった。ガスクロマト

グラフにはモレキュラーシーブ5Aを充填した2mのステンレスカラムを装着した。注入口および恒温槽の温度は、それぞれ125℃および50℃、ヘリウムをキャリアガスとして用い、30mℓ/minで流した。

乳酸利用菌群の発育は、培地中でのVFA産生および乳酸の消失を指標として判定した。すなわちFID型検出器を装着したガスクロマトグラフにより以下の方法で分析測定した。

培養菌液 (2.5mℓ) + メタリン酸24% (W/V) を含む3N-硫酸 (0.5mℓ)

↓ 1夜静置

遠心処理 (3,500 r p m, 15分)

↓

上清 (0.5mℓ) + 2-メチルバレリアン酸3m mol/dℓ (0.5mℓ)

↓

混合静置

↓

FID型検出器装着ガスクロマトグラフに注入 (1μℓ)

(注) 内部標準物質

充填剤 20% EGA + 2% H₂PO₄ on chromosrb AW (60/80)

カラム ガラスカラム2m

注入口温度 190℃

恒温槽温度 140℃

キャリアーガス (N₂) 30mℓ/min

水素ガス 30mℓ/min

空気

0.8 ℓ /min

セロース分解菌群の発育は、培地中の濾紙の溶解の有無により判定した。

澱粉分解菌群の発育は、澱粉培地で培養した菌液にヨード・ヨードカリ溶液の1滴を加え、澱粉の残存の有無により判定した。

キシランおよびペクチン分解菌群の発育は、培養菌液のpHを測定し、菌無添加対照培地のそれと比較して判定した。

機能別菌群の菌数は、各群それぞれの陽性試験管の希釈倍率および陽性試験管の本数から算出（最確数法）し、材料1ml中の菌数の対数値の平均±標準偏差で表示した。

③ルーメン内容物中のVFAおよびアンモニア態窒素（ $\text{NH}_3\text{-N}$ ）濃度の測定法

7. ルーメン内容物中のVFA濃度の測定法

前出の方法（10頁）に従った。

4. ルーメン内容物中のアンモニア態窒素（ $\text{NH}_3\text{-N}$ ）濃度の測定法

ルーメン内容物中の $\text{NH}_3\text{-N}$ 濃度はKaplan²⁾の方法に従って比色法で測定した。

④走査電子顕微鏡によるルーメン細菌のルーメン壁への付着状況の検索には、以下の方法により試料作製を実施した。

ルーメン壁を取り出し生食水に入れる

↓

1%グルタルアルデヒド-0.1Mリン酸緩衝溶液 (pH7.3) で前固定

↓

24時間後生食水で洗浄しながら両刀のカミソリで組織を細かく切断し、新しい1%グルタルアルデヒド-0.1Mリン酸緩衝溶液に入れ、さらに24時間前固定

↓

細かく切断した試料をさらにパラフィン板上で、厚さが1~3mm位の断面を両刀カミソリで作し、生食水で断面を充分洗浄する

↓

1%オスミウム酸溶液中で2時間振盪しながら固定

↓

アルコール系列脱水

↓

酢酸イソアミル (100%) で2回洗浄

↓

乾燥

↓

試料をブロックに固定し、カーボンと金を蒸着

⑤プロトゾアの検索

プロトゾアの検索には、採取直後の検体試料液に等量の20%のホルマリン添加生理的食塩水を加え、よく振って保存したものを検査材料とした。プロトゾアの検索には、検索材料2mlに、FMS染色液 (精製水で10倍に希釈したホルマリン1

0.1 ml に NaCl 8.5g とメチルグリーン 0.5g とを溶解したもの) 3 ml を混合し、1 晩放置後その 0.1 ml をプランクトン計数盤上に載せ、カバーガラスをかけて 50 倍の光学顕微鏡によって鏡検した。

⑥ pH

ガラス電極式 pH メーターにより測定した。

⑦ 統計処理方法

群間の有意差の検定については、t 検定により行なった。なおいずれの検定も有意水準は両側 5% とした。

3. 結 果

1) 発育の推移

① 給与飼料摂取量

45 日齢までの人工乳摂取量は、試験区 2 および 3 は対照区より多く、それら間でそれぞれ有意差 ($p < 5\%$) が認められた (表 1-1、図 1-2)。この期間、DM (乾物量) および TDN 摂取量も、試験区と対照区間で有意差を認めた。しかし、46 日齢から 90 日齢間では差がなかった (表 1-2、図 1-3)。

② 増体量の推移

増体量の推移を表 1-3 および図 1-4 に示した。調査中は試験区間に有意差は認められなかったが、試験区 1 が 42 日齢から高く推移した。期間毎の増体量は 6 週齢

と8週齢に、対照区と試験区1および3区に有意差があった。その後13週齢になると試験区1と対照区の間だけで有意差が認められた。観察終了時には試験区1で平均、140.0kg、2区で130.2kg、3区で136.0kgとなり、いずれの区も対照区の118.2kgより大きかった。

③体高の推移

体高の推移を表1-4および図1-5に示した。観察終了時には試験区1で1.42倍、試験区2は1.4倍、試験区3は1.35倍となり、対照区の1.50倍より小さかったが有意差は認められなかった。しかし実際の体高は試験区1で平均34.0cm、2区で31.9cm、3区で28.2cmの増加しており、1および2区の値は対照区の29.0cmより大きい。

④体長の推移

体長の推移を表1-5および図1-6に示した。観察終了時には試験区1で1.65倍、2および3区でそれぞれ1.56倍、対照区で1.63倍に大きくなったが、有意差はなかった。しかし、期間毎の体長増をみると、13および18週齢で試験区1と対照区の間、試験区1と2および3の間に有意差が認められた。観察終了時の平均体長増は試験区1で44.4cm、2区で38.1cm、3区で39.4cmとなり、いずれも対照区の36.9cmより長かった。

⑤胸囲の推移

胸囲の推移を表1-6および図1-7に示した。観察終了時の胸囲は試験区1で1.67倍、2区および3区でそれぞれ1.64倍、対照区で1.65倍となったが、有意差はなか

った。期間毎の胸囲増にも有意な差は認められなかった。観察終了時の実際の胸囲増は、試験区1で48.6cm、2区で48.2cm、3区で39.4cm、対照区の50.0cmであった。

2) ルーメン細菌数の推移

① *E. coli*、*Streptococcus*属菌および*Lactobacillus* 属菌数の推移

E. coli、*Streptococcus*属菌および*Lactobacillus* 属菌数の推移を表1-7~9および図1-8~10に示す。

*E. coli*は、各試験区ともに生後10日齢で $10^3 \sim 10^4$ /mℓ個の範囲で検出され、その後、日齢を増すごとに減少し、90日齢時には $10^2 \sim 10^3$ /mℓ個であった。90日齢には試験区1と試験区2、試験区2と対照区の間には1%の危険率で有意差が、試験区2と試験区3との間に5%の危険率で有意差が認められた(表1-7、図1-8)。傾向としては、対照区に比べ試験区1と3の*E. coli*が低いレベルで推移した。

*Streptococcus*属菌数は、生後10日齢で $10^4 \sim 10^6$ /mℓ個のレベルで存在していた。各試験区とも $10^3 \sim 10^6$ /mℓ個で試験期間を推移し、試験区間で差は認められなかった。しかし、試験区1では低レベルで推移する傾向を示したのに対して、試験区3では高いレベルで推移を示した。全体としては対照区に比べ試験区は高いレベル推移する傾向がみられた(表1-8、図1-9)。

Lactobacillus 属菌数は、各試験区とも試験期間中 $10^3 \sim 10^6$ /mℓ個で推移した。表1-9、図1-10に示したように、*Streptococcus*属菌と同様、試験区3で高レベルで推移する傾向を認めた。40日齢で試験区2と3および試験区3と対照区との間にそれぞれ5%の、90日齢で試験区1と2および試験区1と3区の間には、それぞれ5%の危険率で有意差を認めた。とくに、90日齢では試験区1で他の試験区に比べ

低いレベルであった。対照区に比べ試験区が高いレベルで推移する傾向を示した。

②機能別細菌群の推移

メタン生成菌数の各試験区の推移を表1-10および図1-11に示した。メタン生成菌は試験期間中 $10^2 \sim 10^6$ /ml個で推移した。試験区では対照区に比べて高いレベルで推移した。20日齢で試験区2と1および対照区の間、また70日齢で各試験区と対照区の間それぞれ5%の危険率で有意差が認められた。

セルロース分解菌数の推移を、表1-11および図1-12に示した。メタン生成菌と同様、3試験区とも期間中は $10^4 \sim 10^6$ /ml個で推移したが、対照区はそれよりも一般に低く、 $10^2 \sim 10^5$ /ml個であった。60日齢で3試験区と対照区との間にまた70日齢で試験区1、2と対照区との間に5%の危険率でそれぞれ有意差が認められた。

乳酸利用菌数の推移を表1-12および図1-13に示した。試験区、対照区とも期間中の推移は類似していて、有意な差が認められなかった。

キシラン分解菌数の推移を表1-13および図1-14に示した。試験区1、2、3は試験期間中同様な推移を示した。10、20、30、40、60および90日齢において、対照区と各試験区との間に5%の危険率で有意差が認められた。すなわち、対照区に比べて各試験区とも高いレベルで推移した。

ペクチン分解菌数の推移を表1-14および図1-15に示した。キシラン分解菌と同様、試験期間中10、20、30、40、60および90日齢に、各試験区と対照区との間に5%の危険率で有意差が認められた。すなわち、各試験区とも対照区に比べて高いレベルで推移した。

澱粉分解菌数の推移を表1-15および図1-16に示した。ペクチンおよびキシラン分解菌数と同様の推移を示し、20、30、40、50、60および90日齢に、各試験区と対照区との間に1~5%の危険率で有意差が認められた。すなわち、各試験区とも対照区に比べて高いレベルで推移した。

3) ルーメン細菌のルーメン壁への付着状況

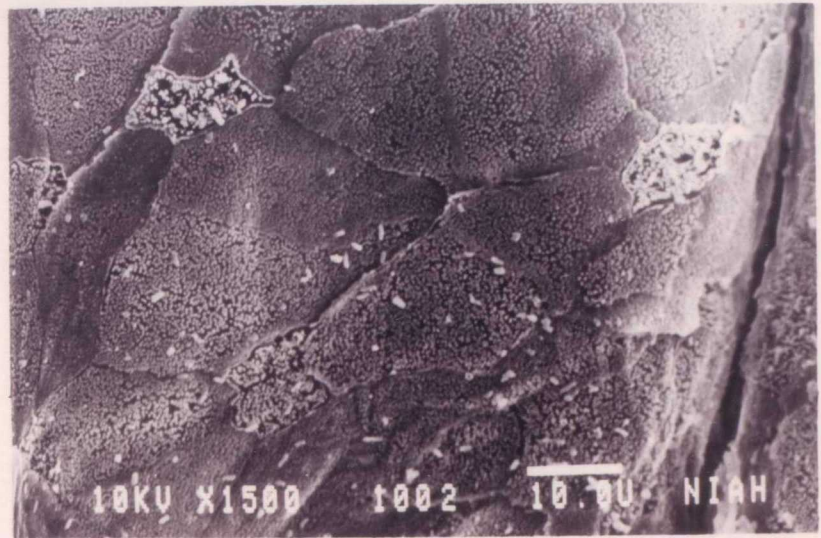
試験開始10日目に殺処分したジャージー種、のルーメン壁について走査電子顕微鏡で細菌の付着状況を観察した。表1-16に示すように、ルーメン液を経口投与した3試験区の、ルーメン壁には多数のルーメン細菌の付着が観察された。

写真-1、2は対照区のルーメン底部および左側壁の電子顕微鏡写真である。写真-3、4は試験区1のルーメンの底部および左側壁の顕微鏡写真である。また、写真5、6および3も同部位の写真である。これらを比較すると、写真3から8では明らかにルーメン壁に多数のバクテリアが付着しているが、対照区のそこには、少数のバクテリアの集合体を認めるだけである。

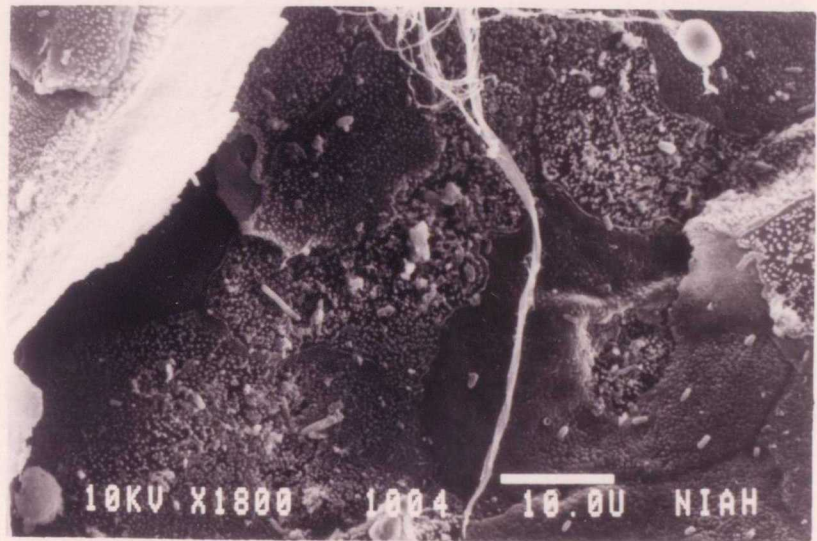
4) プロトゾア数の推移

M F S 染色液で染色したルーメン液の検査材料についてプロトゾアの定着状況を検索した。その成績を表1-17および図1-17に示す。試験区1、2では10日齢からプロトゾアの定着がみられた。その後は $10^2 \sim 10^5 / \text{mL}$ のオーダーで推移し、試験区1では20日齢よりプロトゾア数が低下しはじめ、生後60日齢（離乳後20日齢）から再び増加した。試験区2は、50日齢で最低になり、その後再び増加した。試験区3では生後40日齢、対照区は50日齢よりプロトゾアが出現した。しかし、試験区3では90日齢まで $10^1 / \text{mL}$ オーダーで推移した。

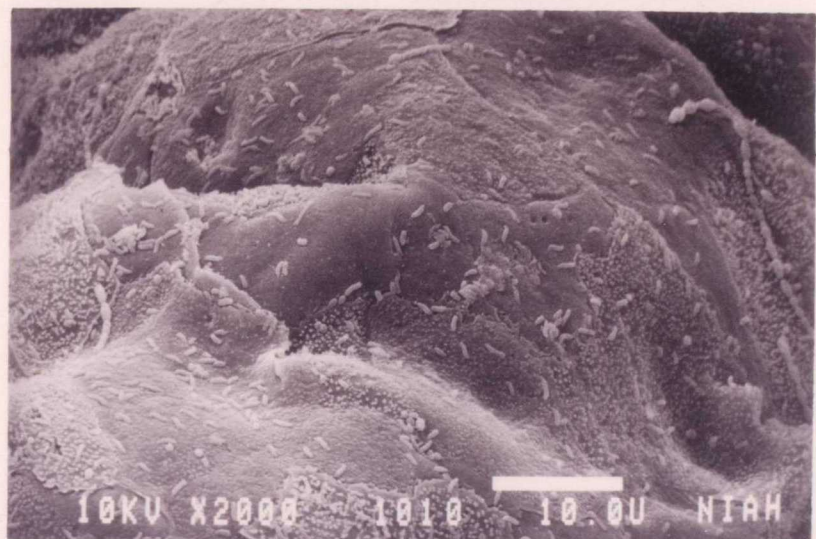
ルーメン壁底部
対照区 (写真-1)



ルーメン壁左側部
対照区 (写真-2)

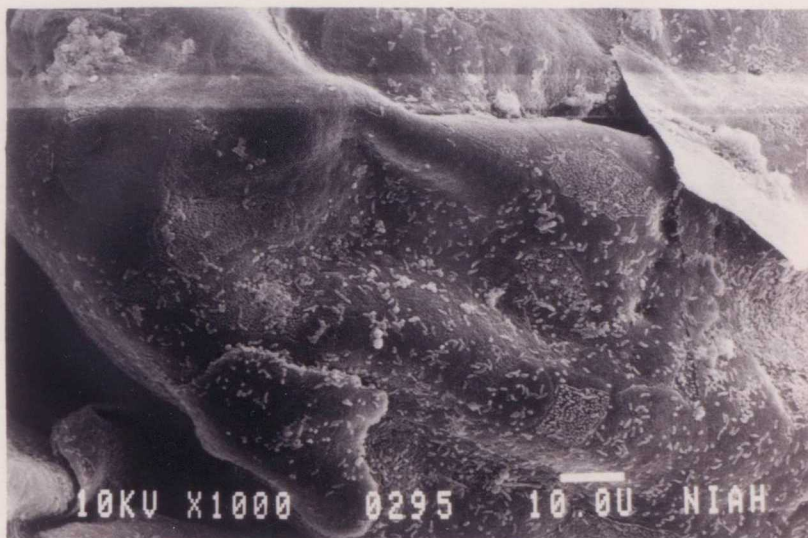


ルーメン壁底部
試験区1 (写真-3)



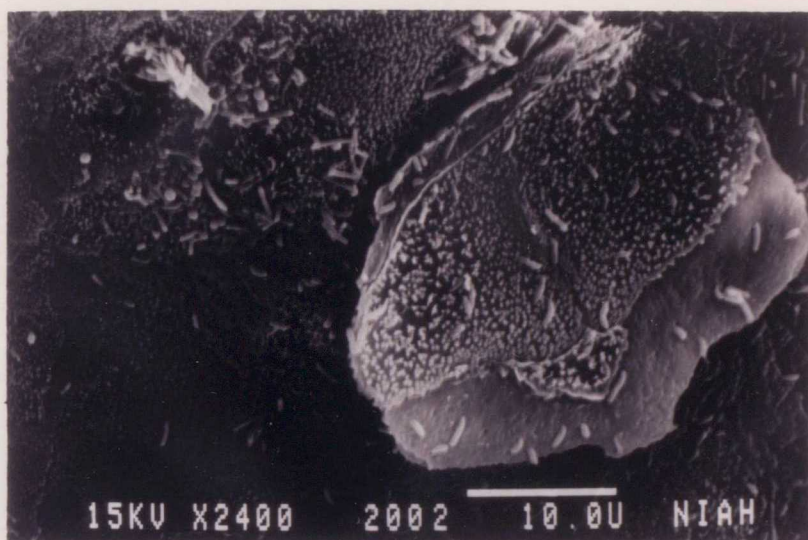
ルーメン壁左側部

試験区1 (写真-4)



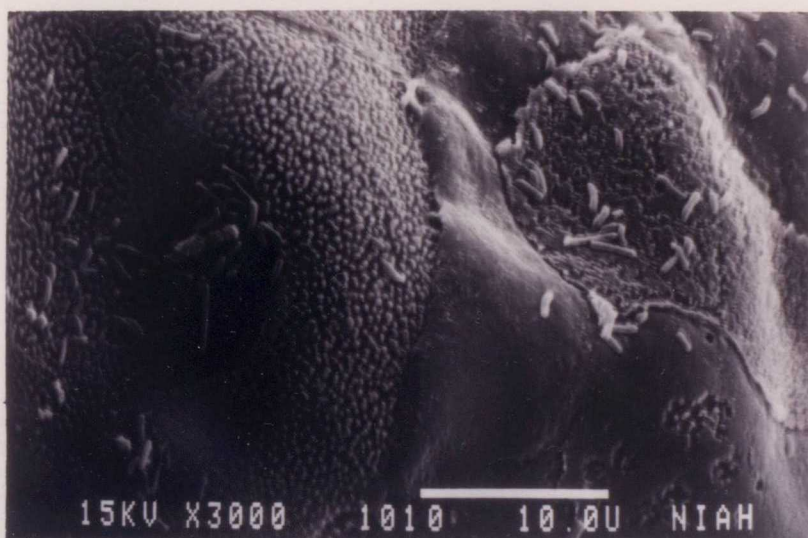
ルーメン壁底部

試験区2 (写真-5)



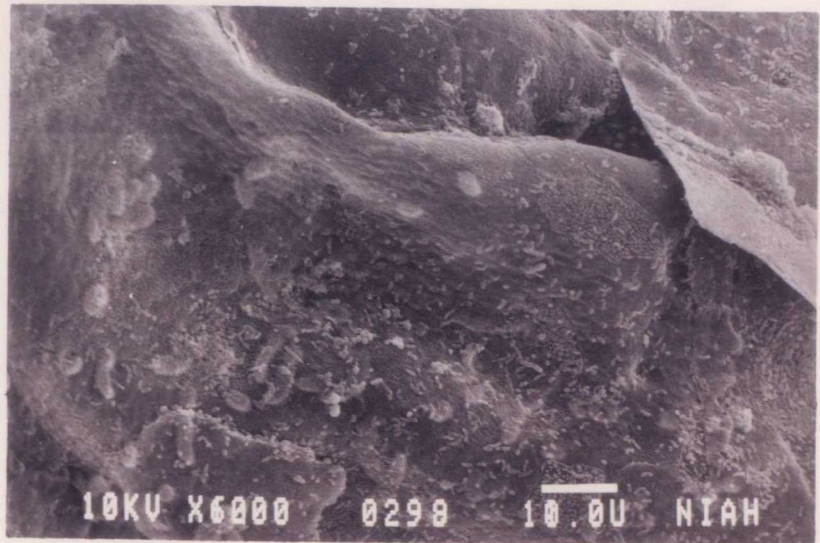
ルーメン壁左側部

試験区2 (写真-6)



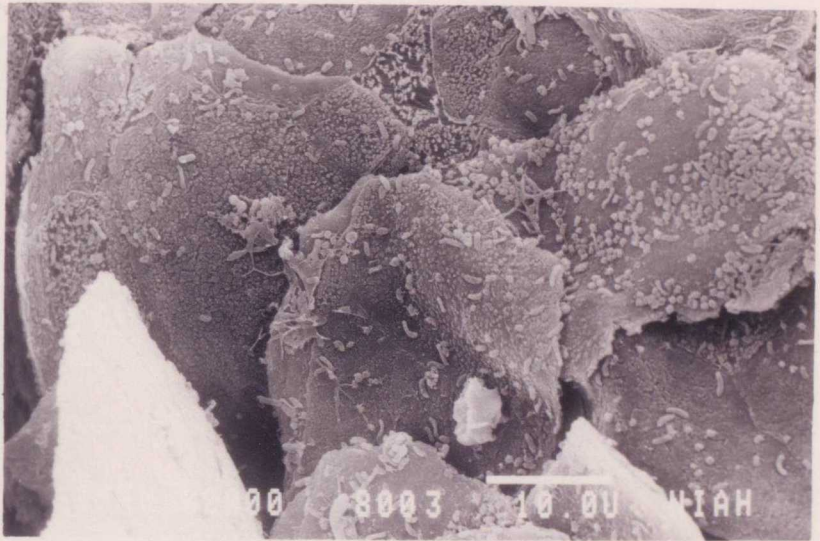
ルーメン壁底部

試験区3 (写真-7)



ルーメン壁左側部

試験区3 (写真-8)



5) ルーメン内容液のpHの推移

表1-18および図1-18に示すように、対照区のpHは10日齢より試験終了の90日齢まで6~7の間で推移した。

試験区1のpHは対照区に比べて、40日齢まで低下しているが、試験区2と3では低下が見られなかった。

6) ルーメン内総VFA濃度の推移

表1-19および図1-19に示すように、試験区は10日齢より20日齢の間に急激な増加が認められ、40日齢をピークに高濃度で推移した後、50日齢以降は4~5mM/dlで推移した。一方、対照区は50日齢まで徐々に増加し、70日齢以降は試験区と同様な値で推移した。20日齢に試験区1および2と対照区の間で、また、40日齢には試験区1と2、試験区2と対照区、および試験区2と3の間でそれぞれ有意差を認めた ($p < 0.05$)。

ルーメン内の総VFA濃度中にしめる酢酸比率は、表1-20および図1-20に示す如く推移した。試験期間を通して、酢酸比率は試験区および対照区でも50%から70%で推移した。40日齢までは、対照区に比べて、試験区での酢酸比率が低かった。

プロピオン酸比率の推移は、試験区1と対照区および試験区2と3が同様の推移をしていた。50日齢までは対照区に比べて、試験区でプロピオン酸の割合が高かった。その後は各区とも25%前後で推移した (表1-21、図1-21)。

酪酸比率は、各試験区とも試験期間を通じて同様に推移した。対照区は30日齢期に酪酸比率の低下がみられたが、有意ではなかった。50日齢までは対照区に比

べ、試験区での酪酸比率が幾分高かった（表1-22、図1-22）。

7) ルーメン内容物中アンモニア態窒素濃度の推移

10日齢では3試験区とも14mg-N/100ml以上の値を示したが、以後減少し、50日齢前後で10mg-N/100mlと安定した推移を示した。対照区は、発育初期より15mg-N/100ml前後での推移がみられた（表1-23、図1-23）。

4. 考 察

新鮮ルーメン内容液の生後3日間、投与あるいは加圧滅菌処理ルーメン液（A-T-R）の離乳時までの連続投与が、子牛のルーメン内発酵機能の発達（ルーメン微生物叢の推移、ルーメン内容液性状の変化）および子牛発育におよぼすした影響について考察する。

1) 発育の推移

①飼料摂取量

幼齢子牛での飼料摂取量は、反芻胃の発達度合いを示す一つの指標になりうる。飼料摂取量と反芻胃の発達の関連を直接調べた例は少ないが、子牛を安楽殺して反芻胃の重量を測ったところ、それまでに摂取した乾物摂取量と反芻胃重量との間に高い関連性があったという報告¹⁸⁾がある。また、生体のまま測定したルーメン内容液量もその時の乾物摂取量と比例関係¹⁸⁾にあった。

本試験における、離乳前の乾物摂取量は、対照区に比べて全試験区で有意に増

加していた。A T-Rを投与した試験区2と3では乾物摂取量が特に増加していた。これは、A T-Rの投与によりペクチン、キシラン、セルロースなどを分解する細菌が対照区に比べて早期に多数定着したことの反映であろう。いいかえれば、成牛由来のA T-Rは、そのもっている緩衝能の他に、ルーメン内機能別細菌群の早期定着の促進に有効な成分を含んでいることを示唆している。また、新鮮ルーメン液を3日間投与した試験区1および2でも対照区に比べて乾物摂取量が増加していた。これもまた、ルーメン内機能別細菌群が早期に多数定着していたためと考えられる。このことから、成牛由来の混合ルーメン微生物が定着し、ルーメン内で主導性を発揮する機能別細菌群の、増殖に必要とする栄養素を供給することによって、キシラン、ペクチン、セルロース分解菌が多数定着したと考えられる。これらのことから、新鮮ルーメン液もA T-Rもルーメン細菌の定着促進に類似の効能を示すものと考えられる。

ARMSTRONGら³⁾、GRODFREY¹²⁾、McARTHUR²⁵⁾、PRESTONら³⁴⁾は、子牛は3ヵ月齢以前に成牛なみに牧草を消化できるようになると報告している。HAMADAら¹⁴⁾は哺乳子牛にイタリアンライグラス乾草だけを給与し、経時的に消化試験を実施したところ、子牛が乾草を摂取し始めて4~5週間以内に成牛水準まで消化能力が高まることを報告している。

大森ら²⁹⁾は1日当たり300~400gの乾草摂取量に達すると子牛の粗繊維消化能力が一定水準になることを証明し、浜田ら¹⁵⁾も、人工乳を摂取量が1日平均500g以上になれば離乳できるとし、年齢よりも固形飼料の摂取水準が離乳時期により大きく影響することを示した。本実験においても、成績には示さなかったが、1日当たり1kgの人工乳摂取量に達する日齢は、試験区1で 31.0 ± 3.16 日齢、試験区2で 28.2 ± 4.02 日齢、試験区3で 29.8 ± 3.1 日齢、対照区は 35.6 ± 5.31 日齢であ

った。20日齢前後になると、人工乳摂取量は対照区に比べ全試験区で多かった。その要因は、ルーメン内での飼料消化に重要な役割を果たす偏性嫌気性菌の密度が高かったことによるのであろう。このことから、子牛の固形飼料摂取量と飼料消化との関連することがうかがわれる。

以上のように、この実験では、哺乳子牛への健康な成牛の新鮮ルーメン液あるいは成牛由来A T-Rの投与は、子牛のルーメン内への偏性嫌気性菌群の早期定着に有効であること、ひいてはそれが離乳前の乾物摂取量を増強させているということを示した。

この原因は、A T-Rに含まれる成分がLactobacillus菌叢の数を増加させる

②体重、体高、体長、胸囲

観察期間中はどの調査項目も有意差はなかった。しかし、期間毎の体重増から以下のことが考察される。6ヵ月齢までの1日増体量は13週齢まで試験区で大きかった。とくに試験区の離乳前後6～8週齢で大きかった（1 kg前後）。13週齢以降は対照区とほぼ同じように推移した。体高と体長は試験区、対照区でほぼ同じ傾向をたどったが、胸囲は6～8週齢で試験区3が高く推移した。30日齢から50日齢までは、試験区のセルロース分解菌、澱粉分解菌、キシランおよびペクチン分解菌などのルーメン内細菌数レベルが対照区より高く、さらにはルーメン内VFA濃度も試験区で高かった。試験区における増体量の推移はこれらの所見から説明できる。

をためであった可能性を承認している。

2) ルーメン細菌叢の推移

通常、子牛のルーメン内では1週齢までStreptococcusやE. coliが多数を占め、その後徐々に減少し、3週齢では成牛のルーメン内密度までになるとされてい

る⁴⁹⁾。

試験区1および3の*E. coli*密度は、10日齢から70日齢まで対照区に比べて低かった。これは、新鮮ルーメン液の生後3日間投与、およびA T-Rの離乳期までの投与で、機能性細菌群が早期に多数定着し、その結果としてV F A濃度が高まり、ルーメン内p Hが低下し、*E. coli*がルーメン内から排除されたためと考えられる。この現象は、凌ら²⁷⁾、HOLLOWELLら¹⁹⁾、WOLIN⁴⁹⁾の報告と一致する。他方、新鮮ルーメン液とA T-Rを投与された試験区2では、対照区に比べてルーメン細菌の定着密度が高かったにもかかわらず、*E. coli*の密度は対照区と同じであった。この原因は、A T-Rの緩衝作用によって試験期間中、対照区に比べてp Hが低下しなかったためと考えられる。

*Streptococcus*属菌の密度は、新鮮ルーメン液を投与した試験区1で、試験期間を通じて対照区とあまり差異を認めなかった。他方A T-Rを離乳期まで投与しつづけた試験区2と3では対照区に比べて、高い菌密度で推移した。この原因はA T-R中の成分が*Streptococcus*属菌の発育に有効に作用していたためと考える。

*Lactobacillus*属菌は、通常2週齢ころより増加し始め、5週齢や3ヵ月齢の子牛のルーメン内で多数を占めるといわれている⁵⁰⁾。今回の成績では各試験区とも対照区に比べ、*Lactobacillus*属菌が高密度で推移している。それは、新鮮ルーメン液およびA T-R中に含まれる成分が*Lactobacillus*属菌の発育を促進するのに有効であった可能性を示唆している。

次に、子牛のルーメン内における機能性細菌群の推移について考察する。

メタン生成菌群は対照区に比べ試験区でほとんど常に高い密度で存在していた。すなわち、新鮮ルーメン液およびA T-Rの経口投与はメタン生成菌の子牛ル

ーメン内への定着を促進することが示された。

セルロース分解菌群は子牛のルーメン内に1から3週齢時に出現するといわれている⁹⁾。今回の成績でも、10日齢の子牛のルーメン内にすでに出現していた。対照区でその菌密度は、80日齢まで不安定な変動を示していたが、試験区のそれではいつでも対照区に比べ高い菌密度を維持していた。このことから、新鮮ルーメン液および加圧滅菌したルーメン液の経口投与はルーメン内へのセルロース分解菌の定着の促進に有効であることを示している。

乳酸利用菌は3週齢までの子牛のルーメン内に多数存在し、ついで減少し始めるといわれている⁶⁾。

今回の成績では、対照区および試験区とも日齢にともなわずかではあるが乳酸菌群の密度が低下する傾向あり、対照区と試験区の間には差異を見出すことはできなかった。

ペクチンおよびキシラン分解菌群は、対照区に比べ試験区で10日齢以後90日齢まで安定して高い密度で推移した。

澱粉分解菌群も、対照区で幾分不安定な動きを示していたが、試験区では早期に定着して、安定して高い密度で推移した。

以上の成績は、ルーメン微生物を含む新鮮ルーメン液およびA T-Rの子牛への経口投与がルーメン内へのセルロース分解菌、澱粉分解菌、キシランおよびペクチン分解菌、メタン生産菌などの早期定着に有効であることを示している。

ルーメン内の発酵作用に重要な働きをしているこれらのルーメン細菌の早期定着は、ルーメン内でのV F A産生能の強化および子牛の発育に有効に作用した。したがって、ルーメン液の子牛への経口投与は早期離乳技術を改善しうるということが明らかになった。

3) ルーメン細菌のルーメン壁への付着状況

ルーメン壁に付着して生息する微生物の主要菌群は、通性嫌気性菌であることが知られている⁸⁾。これらの細菌はルーメン壁を通じて拡散してくる酸素の除去者として働いている。この機能はルーメン壁固着菌群およびルーメン内容物中の偏性嫌気性菌を酸素による障害から保護するのに役立っている。

本実験では、新鮮ルーメン液あるいはA T-Rを投与した試験区の子牛のルーメン壁には、対照区に比べ多数の細菌が付着していた。このことは、対照区子牛のルーメン内に比べて、各試験区子牛のルーメン内がより嫌氣的に維持され、偏性嫌気性菌の定着を促進したものと考えられる。

4) プロトゾア数の推移

試験区1、2では10日齢にそれぞれ $6.0 \times 10^4 / \text{ml}$ とおよび $1.1 \times 10^5 / \text{ml}$ の密度でプロトゾアの生存が認められた。試験区3は30日齢、対照区は50日齢までプロトゾアの定着は認められなかった。しかし試験区1では、その後徐々に減少傾向をたどり、60日齢から再び増加に転じた。試験区2においても同様な傾向を示した。その後、試験区3では40日齢に $1.0 \times 10^4 / \text{ml}$ 、対照区では60日齢に $3.1 \times 10^2 / \text{ml}$ の密度でプロトゾアの定着が認められた。このように、新鮮ルーメン液を投与した試験区1、2においてはプロトゾアの定着が早期に認められた。加圧滅菌ルーメン液のみの投与ではプロトゾアの定着を促進しなかった。これはプロトゾアの定着には、先住する細菌群の一定の複雑さを必要とする報告¹⁰⁾によって支持される。試験区1に比べて試験区2でプロトゾアの定着傾向が強かった要因の一つは、両区におけるpHの差と考えられる。

しかしいずれの区においても、離乳後よりプロトゾアは増加し始めた。

5) ルーメン内容液 pH の推移

ルーメン内は唾液や飼料に由来する炭酸水素塩やリン酸水素塩による緩衝能の高い環境で、給与される飼料によって、ルーメン内 pH は8付近から pH 5以下にまで変化する。ルーメン内の pH は、ルーメン内で増殖しうる細菌の種類、細菌の増殖速度、利用された単位基質量当たりの細胞収量、細菌の発酵産物生成パターンなど幅広い影響を与えるようである。

SLYTERら³⁹⁾は、連続型的人工ルーメンを用いた試験の結果、系の pH が6.0以下になると、発酵パターンは著しく変化し、酢酸、酪酸の生産およびメタンガスの生産が低下すること、pH 環境を異にするこれらの人工胃内では、発酵生産物パターンのみでなく、その系に安定化したルーメン細菌にも差がみられると報告している。

生後10日齢では試験区で6.75前後の値を示した。20~40日齢までは、試験区1と2は対照区に比べていくぶん低い pH で推移していた。これは対照区に比べて固形飼料摂取量が多かったこと(表1-1)と関係していると考えられる。なお、試験区2では試験期間を通して他の群にみられたような急激な変動がなかった。このことは、新鮮ルーメン内容液および緩衝能の高いA T-Rの継続投与でルーメン内が緩衝化されたためと考えられる。その結果、試験区2のプロトゾア数、および pH に感受性の高いと言われるセルロース分解菌の推移に影響を与えたと思われる。細菌を含む新鮮ルーメン液を投与された試験区1の pH は20日齢から40日齢まで対照区よりも低かったが、これはこの試験区における細菌活動の激しさを反映していると思われる。その後40日頃から徐々に上昇傾向を示し、80日齢以降は pH 7を越える値を示した。同様に他の試験区でも60日齢以降は pH が6.5

から7.5の間で推移した。これらは離乳を境にしてルーメン内の内容物の変化やルーメン機能の発達によるものと推察された。

6) ルーメン内容液中の総VFA濃度と各VFA組成率の推移

飼料の最も大きな部分を占める澱粉、糖類、繊維質などの炭水化物は、微生物により発酵分解され、終末産物としてVFAを産出する。そのVFAは主として酢酸、プロピオン酸、酪酸、吉草酸、カプロン酸などからなり、反芻家畜の主要エネルギーとして利用されている。この発酵生産物を測定することで、ルーメン微生物系の発達度合を推測することができる。

生後10日齢から40～50日齢までの期間各試験区のルーメン内VFA濃度は6～8 mM/dlで、ルーメン内生産が認められる。その後離乳を境に4mM/dlと成牛レベルで推移した。各試験区は成牛のルーメン内容物投与により、ルーメン細菌のルーメン内への定着が進みルーメン微生物系が急速に発達し、それがルーメン内のVFA産生作用に活発に関与したと考えられる。その後の低下は、発酵によって生産されたVFAが、ルーメン内粘膜から吸収されたためと解される。またルーメン内容積そのものが増加していくことを考えれば、VFA濃度としては一定レベルで横這いなるが、むしろやや低下したとしても、産生量そのものは増大しているのではないかと考えられる。これに対して対照区のVFA濃度は生後40日齢頃までゆるやかに上昇して4から5mM/dlに達し、その後は横這いで推移したことから、試験区とくらべて明らかに低かったことから、試験区のVFA濃度の推移はルーメンの発達を示唆する成績と思われた。

VFA組成率は、給与飼料によって左右される度合いが大きいので、発育との関連は必ずしも明確ではないが、若齢子牛では成牛にくらべて酢酸の割合が低い

とされている。0日齢から45日齢までの人工乳摂取量の少な区順に酢酸比率が高く推移している。その後46日齢から90日齢間では区間の人工乳摂取量に差がなくなっている。酢酸比率も各試験区で差が認められなくなった。そのことは、子牛の日齢に伴い生後50日齢までの酢酸の割合は、試験区1と対照区では70%前後、これに対し、試験区2および3でそれは55%前後で推移し、その後は全区とも60%前後となった。このことからVFA中の各組成率は給与飼料に影響されると思われ、特に子牛のルーメンの発育との関連は見いだせなかった。同様に60日齢以後では、酢酸比率が対照区と試験区の間で差はなくなったことから、いずれの区も乾物摂取量に対して人工乳の摂取割合に差が無いことが影響していると考えられた。

プロピオン酸比率は、酢酸比率と対照的な推移を示している。すなわち生後10～50日齢までは、試験区1と対照区のプロピオン酸比率は、20～25%の間を変動していたのに対し、試験区2および3におけるそれは27～32%であった。60日齢以後はどの試験区の値も18～25%の間で推移した。このことも酢酸同様に給与飼料との関係が考えられた。

7) アンモニア態窒素濃度の推移

反芻胃内では、飼料の窒素化合物の多くの部分が微生物によってアンモニアまで分解される。この産生されたアンモニア態窒素の一部はルーメン内微生物の窒素源として利用され、微生物の体タンパク質の合成に使われる。

本試験でのルーメン内アンモニア態窒素の濃度は、10日齢では3試験区ともに14mg-N/dl以上の値を示したが、30日齢以降は試験区2で20日齢の増加を除き減少傾向を示した。また、対照区は10日～20日齢で16mg-N/dlであったが、徐々に減

少し60日～90日齢間は10mg-N/dl前後に推移した。しかし、試験区1,3は急激な減少を示し、試験区2は激しく上下したが、対照区は徐々減少する傾向を示した。ルーメン微生物系との関連で考えて見ると、対照区に比べて早期に機能別細菌群が多数に定着していた各試験区で、20～30日齢の時期に急速にアンモニア態窒素濃度が低下していた。これは、ルーメン内に高密度に定着したルーメン細菌の増殖のためにアンモニア態窒素が消費されたと考えられる。産生されたアンモニア態窒素を利用してルーメン細菌が、微生物体タンパク質を合成する能力は、対照区に比べて十分発達していると思われた。この成績は、子牛のルーメン内のアンモニア態窒素濃度は出生後高く、その後ルーメン細菌増殖で減少するとしたGRODFREY¹²⁾の成績と一致する。他方、大森ら³⁰⁾は、早期離乳子牛のアンモニア態窒素濃度の推移は離乳後に増加すると報告している。今回の成績は各試験区でそのような傾向が認められただけで、証明するにはいたらなかった。しかし離乳後の各試験区でのアンモニア濃度の上昇は、飼料摂取量の増加に伴う粗蛋白質の増加によるものと考えられる。

5. 小 括

健康な成牛の新鮮ルーメン液と加圧滅菌処理したルーメン液（A T-R）を、生後数時間以内に経口投与することで新生子牛のルーメン内微生物叢および発育に与える影響について検討した。その結果、以下のことが明らかになった。

(1)新鮮ルーメン液投与群（試験区1）、新鮮ルーメン液とA T-R投与群（試験区2）およびA T-R投与群（試験区3）では、ルーメン液非投与群（対照区）よりも早い日齢でルーメン微生物群が定着し、ルーメン内総V F A濃度も高かった。

(2)ルーメン内好気性菌および通性嫌気性菌群のうち、乳酸菌数は対照区に比べ各試験区で試験期間を通じて高く推移した。*Streptococcus*属菌群は試験区1と対照区では差異を認めなかったが、A T-Rを継続投与した試験区2および3は他に比べ高いレベルで推移した。*Lactobacillus*属菌群は対照区に比べ各試験区で高いレベルで推移した。*E. coli*は対照区に比べ各試験区で低いレベルで推移した。ルーメン細菌が各試験区で高いレベルで推移したことから、新鮮ルーメン液の経口投与およびA T-Rの投与が、ルーメン内微生物叢の早期成立に関与したと考えられた。

(3)機能別細菌群のうち、乳酸を利用する菌群は試験期間を通じて試験区と対照区で差異を認めなかった。対照区に比べて各試験区で、ペクチンおよびキシラン分解菌、セルロース分解菌、メタン産生菌群の子牛ルーメン内への早期定着が確認された。

(4)新鮮ルーメン液の経口投与は、ルーメン内へのプロトゾアの定着の促進に有効であることを示した。試験区3区では他の試験区に比べてプロトゾアの定着が促進されなかった。

(5)ルーメン内のV F A濃度は、各試験区で対照区に比べ50日齢まで高いレベルで推移し、70日齢以後は4~5mM/dℓで推移した。対照区は50日齢をピークにその後は、試験区と同様に推移した。各試験区の総V F A中の酢酸比率は50日齢まで対照区に比べ低く、逆にプロピオン酸比率が高く推移した。90日齢では対照区と各試験区で差がなかった。

(6)各区の体重は、0～45日齢および46～90日齢の飼料要求量から見ても、各試験区と対照区間に有意差 ($p < 0.05$) が認められた。

以上、新鮮ルーメン液100mlを生後3日間投与することによって、早期に正常なルーメン微生物叢が作られることを明らかにした。

実験 II

無菌ヤギの消化管内へのルーメン細菌の定着試験

1. 目 的

無菌動物に、限定された種類の細菌を定着させたいいわゆるノトバイオート動物は、正常な腸内細菌叢を欠くため、通常の動物とは生理、栄養、免疫、発癌率などかなり異なった状態にある。したがって常在細菌の研究や微生物の感染機構の研究などに対して有用な手段を提供している^{4, 23, 48)}。今日では、微生物学的研究はもとより医学、生物学を含めた広範囲の研究においてノトバイオート動物が使用され、その重要性が明らかにされてきている。

これまでに多くの小動物で無菌化が試みられ、マウス、ラットなどでは無菌状態で維持、繁殖が行なわれている。家畜においてはブタのSPF化が進んでいるものの、大動物のノトバイオートについての報告はきわめて少ない。本実験では、無菌シバヤギを作出し、これに限定された種類のルーメン細菌を経口的に投与し、それらがルーメンおよび下部消化管内にいかにかに定着するかを調べた。

2. 材料および方法

1) 供試動物

妊娠末期のシバヤギ1頭から、子宮切断術により胎子が無菌的に摘出し、ビニールアイソレータ内で無菌飼育した。

2) 胎子の無菌的摘出法

子宮摘出は、おおむねブタの方法²⁾¹⁾に準じて分娩予定の5日前に行なった。まず妊娠シバヤギの腹部全体の被毛を電動バリカンで毛刈し、腹部の洗浄を行なった。保定紐で後肢を保定し、電動ホイストで逆さ吊りにした。腹部全体をヨードチンキで消毒した後、ドライアイスを入れた布製バケツに頭部および前肢を入れ炭酸ガス吸引麻酔を行なった。シバヤギの動作が停止した時点で、乳房付着部側の正中線上に約10cmの腹腔まで達する切り込みをいれた。次に、握り手を腹腔内にいれて一気に肋骨まで切開した。ついで子宮を腹腔外に引き出し、子宮頸部を切断した。切断した子宮は、胎子摘出用アイソレータ装置の消毒槽を通してアイソレータ内に搬入し、直ちに蘇生作業を実施した。蘇生に成功した個体を飼育用アイソレータに移し、以後の実験に供した。

3) アイソレータ

摘出した胎子が無菌的に飼育するためには、ステンレス・スチール槽（800X660X500mm）、ステンレス・スチールケージを保護槽として内装するビニールチャンパー（800X660X600mm）および無菌送風装置からなる飼育用アイソレータを使用した（図II-1）。豚用アイソレータには仕切板および蓋があるが、シバヤギはブタに比べて体高が高いのでこれを取り除き、またビニールチャンパーを噛み破られないように改良した。

4) 飲料水および飼料の滅菌

7. 高圧蒸気滅菌器による飲水の滅菌

使用した高圧滅菌器は、高さ1180mm、幅880mm、奥行1300mmで、内部の空気を

吸引し真空度を高めた後に高圧蒸気と置換して滅菌を行なう機能を有した。

飲料用の水は高温高圧滅菌に耐えられるポリ容器にいれ、121℃、15分間で滅菌した。給与期間は生後15日齢から56日齢までとした。

4. エチレンオキサイドガスによる給与飼料の滅菌

エチレンオキサイドガスによる滅菌は高圧蒸気滅菌法と同様に、反芻動物用飼料は繊維含量が多く、これに由来するグラム陽性有芽胞桿菌の菌量が多い。したがって反芻動物用飼料を実験小動物用飼料の滅菌方法によらないエチレンオキサイドガスで滅菌することとした。窯（900×650×1300mm）の内部の空気を吸引した後ガスを充満させ一定時間感作後、ガス抜きのために空気置換を行なう機能のあるエチレンオキサイドガス滅菌機を使用した。

滅菌は配合飼料の約150gを入れた蓋付き小アルミ缶を滅菌缶に収容し、またハイキューブを滅菌用フィルムで封入し、50℃で5時間感作後ガス抜きのための空気置換回数を20回実施した。

5) 飼料の給与方法および給与期間

ガス滅菌した配合飼料とハイキューブを15日齢から少しずつ量を増やし、給与期間はそれぞれ生後15日齢から56日齢まで給与した。

人工乳は無菌人工乳（缶詰製品）を生後0日齢から21日齢まで給与した。

飲料水は高温高圧滅菌処理水を生後0日齢から56日齢まで給与した。

以上いずれの給仕用器具は、滅菌処理した器具を使用し、その取り扱いは無菌的实施した。

6) 無菌ヤギへのルーメン細菌の投与方法

ルーメン細菌の経口投与方法および投与菌量は表II-1に示した。生後35日齢時に *Streptococcus bovis* (A-30) の $1.17 \times 10^{10} / \text{mL}$ と *Lactobacillus plantarum* (YIT 0101) の $5.3 \times 10^{10} / \text{mL}$ を、36日齢時には *Veillonella alcalescens* (BGM-61) の $7.0 \times 10^8 / \text{mL}$ と *Megasphaera elsdenii* (ATCC 25940) の $1.95 \times 10^9 / \text{mL}$ を、2日後の38日齢時には *Butyrivibrio fibrisolvens* (ATCC 19171) の $7.8 \times 10^{10} / \text{mL}$ 、*Prevotella* (*Bacteroides*) *ruminicola* ss. *brevis* (ATCC 19188) の $5.5 \times 10^{10} / \text{mL}$ 、*Enterococcus faecium* (YIT2004) の $2.28 \times 10^{10} / \text{mL}$ とを、翌日39日齢時には *Ruminobacter* (*Bacteroides*) *amylophilus* (7-6) の $7.05 \times 10^9 / \text{mL}$ と *Ruminococcus albus* (ATCC 27210) の $1.25 \times 10^9 / \text{mL}$ の9種類のルーメン細菌、を経口的に投与した。

7) ルーメン細菌の分離培養法

最初の菌投与後3週間目に安楽殺後ルーメン内、盲腸内および直腸内における細菌の種類を非選択および選択培地を用いて検査した。

ルーメン細菌の培養はprereduced培地を用いた嫌気性ロールチューブ法により行なった^{16, 17, 31)}。これらのルーメン細菌分離および培養法の大要は図I-1に示した。採取したルーメン内容物をCO₂ガス噴射下で希釈液を用いて段階希釈して接種用の希釈菌液を作製した。分離培養に際しては、これらの各希釈溶液をあらかじめ試験管に分注し溶解してあるRGMCSA培地に0.5mLずつ加え、すばやくブチルゴム栓で封入して、これをロールチューブ作製器で回転させロールチューブとした。チューブ作製後、37°C5日間培養後出現した集落を無作為に釣菌して、RGMCSA斜面培地に接種後、37°C、24~48時間培養した。培養後、グラム染色を行

い鏡検後、その純培養を確認した。純培養を確定した菌株は、再び斜面培地に継代培養し、37℃、24時間培養した菌株は一連番号を付して次の同定作業まで-80℃に凍結保存した。

8) 分離ルーメン細菌の同定法

ルーメン内容物から分離した細菌はV P I ManualおよびBergey's Manual of Systematic Bacteriologyの方法に準拠し、グラム染色による形態、終末代謝産物の分析、運動性、芽胞形成試験、および生化学的諸性状試験などの成績を勘案して同定した。

①発育性

偏性嫌気性菌か通性嫌気性菌かは、TS寒天平板培地 (Difco) で好氣的に24時間培養による発育性から判定した。

②グラム染色性

RGCMSA斜面培地で37℃、24時間培養後にグラム染色を行ない、菌の染色性および形態を観察した。

③運動性

0.3%寒天加PY培地 (半流動) に供試菌を穿刺線にそって培地全体が混濁しているものを運動性有りと判定した。

④H₂S産生試験

H₂S培地に穿刺して37℃48時間培養後、培地全体が黒変したものをH₂S産生能有りと判定した。

⑤インドール産生試験

0.3%寒天加PY培地 (半流動) で37℃1週間穿刺培養後、Kovacs試薬を数滴加え

赤変したものをインドール陽性と判定した。

⑥ エスクリン加水分解性試験

0.5%濃度にエスクリンを添加したPY培地で37℃1週間培養後、1%クエン酸鉄アンモニウム溶液を数滴加え培地が黒変したものをエスクリン加水分解陽性と判定した。

⑦ 澱粉の加水分解試験

0.5%濃度にデンプンを添加したPY培地で37℃1週間培養後、ルゴール液を数滴加え、培地が青変しなかったものを澱粉加水分解陽性と判定した。

⑧ セルロース分解性試験

セルロース培地を用い濾紙片の溶解性の有無によって、セルロース分解能を判定した。

⑨ 脂肪酸の産生性

TYG液体培地で37℃、5～7日嫌気培養した培養液を除タンパク後、遠心分離によって上清を得、この一部をVFAを前出の方法（10頁）で分析し、また別の一部をメチル化処理し乳酸、コハク酸などのnon-VFAを以下の方法で分析した。分析はヒュレットパッカー社製、HP5880A型を使用したガスクロマトグラフにより行なった。

non-VFAの分析のための試料調製法および装置操作法

ルーメン内容物および培養菌液（2.5ml）+メタリン酸24%（W/V）を含む3N-硫酸（0.5ml）

↓ 1夜静置

遠心処理（3,500rpm, 15分）

↓

上清 (0.5ml) + フマル酸2mM/dl (0.5ml)

↓ + BF₃* (等量混合)

静置 (1夜放置)

↓ + クロロホルム (0.5ml)

転倒混合 (20回)

↓

静置

↓

FID型検出器装着ガスクロマトグラフに注入 (下層1μl)

(注) 内部標準物質

(*) Boron Trifluorid 20% Metanol

ガスクロマトグラフィーの条件

充填剤	Chromosorb AW (60/80)
カラム	ガラスカラム2m
注入口温度	190℃
恒温槽温度	110~120℃
キャリアーガス (N ₂)	30ml/min
水素ガス	30ml/min
空気	0.8 l/min

9) 菌種群別菌数の検索

①総菌数、*Megasphaera elsdenii*、*Veillonella alcalescens*、*Streptococcus bovis*、*Enterococcus faecium*、*Lactobacillus plantarum*の検索

培地および培養法：総菌数はRGCMSA寒天培地、*M. elsdenii*、*V. alcalescens*の測定用としては*Veillonella* (Difco) 培地を、*S. bovis*、*E. faecium*の測定用としてはSF (Difco) 培地を、また*L. plantarum*の計数用としてはRogosa (Difco) 培地をそれぞれ用いた。総菌数の計測には図1-1の方法により、CO₂ガスを吹き込みながら各希釈検体試料液の0.2mlをあらかじめ50℃に加温溶解したRGCMSA寒天培地に接種して行なう嫌気性ロールチューブ法で37℃で、5日間嫌気培養 (CO₂ 100%) により行なった。*Veillonella*培地、SF培地およびRogosa培地による菌数計測では各検体試料0.1mlを各寒天培地上に接種する平板培養法で実施した。菌液を接種したSF培地およびRogosa培地は、それぞれ好気性で37℃で24時間あるいは48時間培養を、*Veillonella*培地ではガスパック法によって嫌気性培養を37℃で48時間行なった。

培養菌判定および菌数算出法：それぞれの各培地に発育した集落について無作為に10集落を釣菌し、その集落形態、グラム染色性、生化学的諸性状および菌形態から当該する菌群を判別し、その集落数から検体原液の1ml当たりの菌数を算出した。平板塗抹培地は各試料に1枚の培地を用いたが総菌数はそれぞれ2本の培地を用い、50～100個の集落が出現している培養管の平均菌数から試料1ml当たりの菌数を算出した。

②ルーメン内容液中および細菌培養液中のVFAおよびnon-VFAの測定、採取

直後のルーメン内容物VFAの分析には、ヒューレットパッカード社製ガスクロマトグラフ（HP5880A）を用いて、前出の方法（10頁）に従って実施した。

3. 結果

1) ルーメン細菌投与後3週目における消化管内各部位のpH

殺処分後のノトバイオトシバヤギのルーメン内容物のpHはルーメン内で7.0、第四胃内で2.9、盲腸内は8.1であった。

2) 総菌数および特定細菌種の消化管内の各部位での菌数

総菌数および特定細菌種のルーメン、盲腸、直腸内で総菌数を表II-2に示した。総菌数はルーメン内で 4.47×10^9 /g、盲腸内で 3.05×10^8 /g、直腸内で 2.95×10^9 /gの密度で検出された。*M. elsdenii*はルーメン内で 8.0×10^5 /g、盲腸内では 1.6×10^6 /g、直腸では 2.0×10^6 /gの密度で検出された。*V. alcalescens*はルーメン内で 9.1×10^7 /g、盲腸内では 1.0×10^5 /g、直腸では 10^4 /g以下のレベルで存在していた。*S. bovis*はルーメン内で 8.9×10^8 /g、盲腸内では 2.8×10^6 /g、直腸では 7.1×10^6 /gのレベルでの定着が見られた。*E. faecium*はルーメン内で 3.9×10^5 /g、盲腸内で 1.0×10^6 /g、直腸で 1.8×10^6 /gの密度で検出された。*L. plantarum*は第一胃内で 9.6×10^6 /g、盲腸内で 1.6×10^6 /g、直腸で 2.8×10^6 /gのレベルでの定着が認められた。

3) 3週目における投与ルーメン細菌のルーメン内構成

表II-3に示したように十分な投与ルーメン細菌の定着が認められた。

4) 消化管各部位における総VFA濃度およびVFA組成率

9種類のルーメン細菌投与後3週目の、ルーメン、盲腸、および直腸内容物中におけるVFA濃度および各脂肪酸の比率を表II-4に示した。ルーメン内容物中の各VFA組成率は、この時期の通常飼育ホルスタイン哺乳子牛のそれと似ていた(表II-5)。

4. 考 察

無菌の反芻家畜の消化管内に特定細菌種を定着させた、いわゆるノトバイオール反芻家畜の作出は、最初に英国のケンブリッジ大学^{44, 45)}およびローウエット研究所^{36, 40)}で、その後フランスの農務省研究所(INRA)¹¹⁾で試みられている。牛の無菌動物の作出には大型の飼育装置の開発が必要なので、ここでは比較的取り扱い易い動物としてシバヤギを用い、その無菌動物の作出を試みた。本実験では、ブタの無菌飼育のために開発されたアイソレータを改良して用いた。今回は1頭だけの成績ではあるが、生後35日齢の菌投与時までは無菌状態で飼育することに成功した。

投与細菌として、子牛のルーメン内に早期に定着し、優勢菌種として認められている9種類を選んだ。他の細菌による汚染を避けるように注意を払い、生後35日齢の無菌ヤギに5日間かけて、無菌飼育装置内でこれらを経口的に投与した。最初の投与から3週間目に消化管内の各部位における投与菌の定着状況を検査した。投与した9菌種のうち、セルロース分解菌である*R. albus*以外の8菌種はいずれも高いレベルでルーメン内に定着した。直腸や盲腸内では、5菌種の存在レベルについてのみ調べたが、*V. alcalescens*や*S. bovis*は盲腸や直腸に比べて、ルーメン内に100から1000倍も高いレベルで定着した。この成績から、これらの細菌

の主な定着部位はルーメン内であることを示している。通常の飼育条件下の子牛のルーメン内には、セルロース分解菌が5日齢頃から出現してくるが、今回の試験では、35日齢以降投与したにも拘らず、セルロース分解菌は定着しなかった。この結果は、セルロース分解菌の栄養要求は厳しく、他の細菌の生産するVFAやビタミン類などに依存して存在する可能性を示している¹⁴⁾。実際の子牛のルーメン内にはより多種類のルーメン細菌が定着しており、セルロース分解菌の定着を支援しているものと思われる。しかし、セルロース分解菌の反芻家畜への早期定着にはいかなるルーメン細菌の共存が必要なのかは今後の検討問題である。

ルーメン内に定着した投与細菌の構成比は表II-3に示してあるが、この構成比は子牛のルーメン内にのそれに近似していた。ノトバイオートヤギのルーメン内のVFA濃度や各組成率も、子牛のルーメン内のそれに近いものであった。したがって、これらの定着細菌は反芻動物の種を越えて、VFA産生の面で有用な細菌群として寄与していることを示唆している。

ノトバイオートシバヤギは、ルーメン細菌と各種臓器の発達との関連、ルーメン細菌と家畜の生理機能や栄養代謝との関連、ルーメン内における微生物の相互作用、有害微生物のルーメン細菌による排除技術の開発などの研究のための有用な実験動物になりうると思われる。今後は60日齢以降長期間飼養するための研究が必要である考える。

5. 小 括

無菌ヤギの摘出は子宮切断により、無菌飼育はビニール・アイソレータ内で行なわれた。この無菌ヤギに9種類のルーメン細菌を5日間にかけて投与し、3週後に殺処分し、ルーメン内、盲腸内、直腸内における細菌の種類を非選択および選択培地を用いて検査した。その結果、以下のことが明らかにされた。

(1)安楽殺したヤギのルーメン内容物のpH値は6.98、揮発性脂肪酸濃度は2.59 mM/dlで、その組成比は健康ヤギのそれと似ていた。

(2)*Veillonella alcalescens*や*Streptococcus bovis*の密度は他の消化管内に比べて約1000倍近くルーメン内で高かった。

(3)投与した9菌種の内、ルーメン内で多数を占めていたのは、*S. bovis*、*Prevotella (Bacteroides) ruminicola ss. brevis*、*Ruminobacter (Bacteroides) amylophilus*、*Butyrivibrio fibrisolvens*であった。

実験Ⅲ

ルーメン液早期経口投与による新生子牛腸管内への病原性大腸菌の定着阻止

試験

1. 目的

新生子牛下痢症は犢白痢などと呼ばれ、病原性大腸菌の感染により、生後0～3日以内に水様下痢便を排泄し、脱水状態で敗血症死するものである。いったん牛群内で発症すると死亡率も高く、経済的損失の大きい疾病で、そのため予防法の確立が急務となっている。本症の予防法の一つとしてワクチン接種が試みられている。しかし血清型が多岐にわたること、および免疫能の未発達な時期に感染発症するため、一定した成績が得られていない。

一方、Nurmi^{2,8)}とRantalaら^{3,5)}は、鶏の正常細菌叢の発達した成鶏の盲腸内容物（新鮮糞便）またはその嫌気培養液を孵化後1日以内にプロイラー雛に経口投与し、投与24時間後に経口投与したサルモネラ菌の感染を防御できることを報告している。この方法はヌルミ法、別名CE法（競争的排除法）とも言われている。このように、腸内正常細菌が病原細菌の腸管内定着を阻止する事実が以前からいくつか報告^{2, 3, 2)}されている。そこで、ここでは生後2～3時間以内の新生子牛へ健康成牛の保存ルーメン液を経口投与し、病原性大腸菌の消化管内増殖への影響を調べた。

2. 材料および方法

1) 供試病原性大腸菌

新生子牛下痢症由来 *E. coli* NAS-10 (O-9:K-99:STa⁺:LT⁻) 株からナリジクス酸 100 µg (力価/mℓ) 含有マッコンキー寒天平板培地 (Difco) で耐性株を選択し、Trypticase soy Agar (Difco) 上で24時間培養後、コロニーをかきとり滅菌生理食塩水に懸濁し、1mℓ当たり10⁹個を含む菌懸濁液100mℓを調製し投与した。

2) 供試ルーメン液

慣行法で飼養されている (ハイキューブ、スーダングラス、コーンサイレージ、濃厚飼料) 同居ジャージー牛より、飼料給与後3時間後に胃汁採取器で採取したものを、2重外科用ガーゼで濾過後-80℃で保存した。また、その内容中には、1mℓ当たりメタン生成菌が10⁶個、乳酸利用菌が10⁸個、セルロース分解菌が10⁷個、澱粉分解菌が10⁷個、キシラン分解菌が10⁸個、ペクチン分解菌10⁸個含まれていた。

3) 供試動物

実験に供試した試験牛は石川県内灘町字湖西で生まれ、飼養されていたジャージー種0日齢の新生雄子牛7頭である。

4) 試験方法

供試牛を以下の4群に分けて試験した (表Ⅲ-1)。生後48時間の対照牛 (1頭)、生後24時間目に *E. coli* NAS-10 で攻撃した新生子牛 (1頭)、生後2~3時間以内にルーメン液を投与した新生子牛 (2頭)、ルーメン液投与後21時間目に、*E. coli* NAS-10 で攻撃した新生子牛 (3頭) の計4群に分けて、それぞれ1日当たり3ℓの初乳を与え観察を続けた。ルーメン液投与後 *E. coli* NAS-10 で攻撃しなかつ

た新生子牛2頭は投与48時間目、96時間目にそれぞれ1頭づつを安楽殺後剖検し材料を採取した。また、ルーメン液投与後*E. coli* NAS-10で攻撃した3頭については攻撃後24時間目、48時間目、72時間目にそれぞれ1頭づつを安楽殺後剖検し材料を採取した。なお、安楽殺まではどの子牛にも1日当り3ℓの初乳を与え観察した。初乳中の*E. coli* NAS-10に対する抗体を、試験管内凝集反応によって調べたが、検出されなかった。

5) 検査材料

消化管内の細菌検索のため、ルーメン、十二指腸、直腸の内容物および腸管壁、さらには脳、心臓、肺、腎臓、肝臓、腸管膜リンパ節などの実質臓器を採取した。

6) 検査方法

①消化管内容物、組織中の大腸菌検索方法

E. coli NAS-10菌数の計測のためには、100mlの滅菌生理食塩水で軽く洗浄した管壁、および無菌的に採取した実質臓器をガラスホモジナイザー中でホモジナイズした。これらの乳剤および消化管内容物を生理食塩水で10倍段階希釈菌液の0.1mlを、ナリジクス酸100 μ g（力価）/ml含有マッコンキー寒天平板培地上に滴下し、コンラージ棒で広げた後、38℃24時間培養した。なおこれら材料中の大腸菌群の総数は、ナリジクス酸を含有しないマッコンキー寒天平板培地を用いて検査した。

②消化管内容物、組織中の細菌構成および菌数の検索方法

消化管内の細菌構成の検査は、直接鏡検法²⁶⁾（湊の分類法）に従って実施した。

ア. 塗抹標本の作製法：ホルマリンで固定したルーメン液2mlを試験管にとり、これに8mlの生理食塩水を加え、1分間よく振とうする。10分静置後、液の中心部から2mlをとり、分光光度計（島津分光光度計UV-240型）を用い、McFarland No. 1の混濁度になるよう生理食塩水を加えて調整する。調整した菌液の0.5mlに加温溶解させた0.2%寒天溶液の0.5mlを加えてよく混和する。これを滴下ピペットに吸い取り、5cmの高さからスライドグラス上に1滴ずつ2箇所滴下する。これを約1cm径の円形に広げ自然乾燥後、グラム染色を施し封入する。

イ. 鏡検法：染色塗抹標本の観察は、双眼鏡筒の一方に方眼マイクロメーターを入れ1000倍視野で行なった。1標本について400区画に出現する細菌を、湊等の分類方法により分別計数した。

ウ. 総細菌数の計算法：総細菌数は次式から求められる。

$$\text{総細菌数 (mlあたり)} = N / 4 \cdot A / a \cdot 2 \cdot D \cdot 50$$

Nは400区画で計数された全細菌数、Aは塗布円の面積 (cm²)、aは方眼マイクロメーターの100区画を通して見える塗布円の面積 (cm²)、Dはルーメン液をMcFarland No. の濃度に調整するのに要した希釈倍数。Aは次式で求める。

$$A = 3.14 \times \{ \text{塗布面の縦の直径 (cm)} + \text{横の直径 (cm)} \}^2 / 16$$

③消化管内容物中の脂肪酸濃度および乳酸、コハク酸濃度測定法

ルーメンおよび下部消化管内容物中のVFAおよびnon-VFAの分析には前出の方法（10頁、36頁）に従って実施した。

④各種下痢症ウイルスの検査方法

同時に消化管内容物中のロタウイルスの有無は、ロタレックス（第一化学）を使用し、コロナウイルスは、逆受身赤血球凝集反応試験により検査した。

⑤消化管内のpH測定法

ガラス電極式pHメータを用いた。

3. 結果

1) 消化管内容物および組織中の大腸菌数

生後24時間目に*E. coli* NAS-10で攻撃し死亡した新生子牛のルーメン内容物、十二指腸内容物および直腸内容物中には、攻撃菌はそれぞれ1g当たり 1.6×10^6 個、 1.9×10^9 個、 2.8×10^9 個検出された。また、*E. coli* NAS-10はルーメン壁に比べて十二指腸および直腸の腸壁から著しく多数に分離された（図Ⅲ-1、2、3）。

死亡した新生子牛の小腸リンパ節には、1g当たり 1.2×10^7 個の*E. coli* NAS-10が検出された。

E. coli NAS-10で攻撃された新生子牛では、脳、心臓、肺、肝臓、腎臓、脾臓から攻撃菌がそれぞれ1g当たり 3.7×10^2 個、 2×10^2 個、 1.2×10^2 個、 10^2 個、 2.3×10^2 個、 2.1×10^2 個検出された。

一方、ルーメン液投与後、*E. coli* NAS-10で攻撃した子牛では、軽度の軟便を呈したのみで、24時間後には回復した。これらの新生子牛の十二指腸および直腸の内容物と管壁中での*E. coli* NAS-10および総大腸菌数は、ルーメン液を投与せずにこの菌の攻撃によって死亡した牛に比べて著しく低かった。これらの新生子牛の十二指腸でのこの菌の存在数は、時間の経過と共に増加する傾向は認められ

なかった（図Ⅲ-2、3）。

なお、子牛の脳、肺臓、肝、腎臓、脾臓、心臓からは、*E. coli* NAS-10は分離されなかった。

また、病理組織学的所見では *E. coli* NAS-10で攻撃された新生子牛で、小腸粘膜の腫脹および一部上皮細胞の剥離が認められただけで、他の臓器には著変は認められなかった。また、ロタウイルスおよびコロナウイルスの検査においても、各ウイルスは検出されなかった。

これは攻撃に用いた大腸菌の分離培養での成績で裏付けされている（図Ⅲ-1）。それに対して、ルーメン液を投与した子牛のルーメン内では投与後、24、48、72時間後のいずれの時間においても多種多様の細菌が存在していた（図Ⅲ-4）。

ルーメン液を投与した新生子牛の十二指腸内では、ルーメン由来と思われるグラム陽性の球菌やグラム陽性の桿菌が多数鏡検された。これと対照的に、ルーメン液を投与されなかった子牛の十二指腸内では、これらの細菌は検出されなかった（図Ⅲ-5）。

ルーメン液投与新生子牛の直腸内では、ルーメン液非投与の新生子牛に比べて多種類の細菌が鏡検された（図Ⅲ-6）。

2) 消化管内容物中のVFA濃度

対照新生子牛、*E. coli* NAS-10攻撃新生子牛、ルーメン液投与群、ルーメン液投与後*E. coli* NAS-10攻撃群の消化管内各部位におけるVFA濃度と各組成を調べたところ（表Ⅲ-2）、ルーメン液投与新生子牛では時間と共にVFA濃度が増加する傾向を示した。*E. coli* NAS-10攻撃後24時間目（生後48時間）の新生子牛では、生後48時間目の対照子牛の十二指腸内に比べて、より高濃度にコハク酸が

検出された。それに対して、対照新生子牛十二指腸内では、48時間目に乳酸とコハク酸が検出されたが、*E. coli* NAS-10攻撃新生子牛では乳酸は検出されなかった。VFAは両群の十二指腸内で検出されなかった。また、ルーメン液を投与された新生子牛および対照子牛群では、十二指腸内で乳酸が有意に検出されたがルーメン液を投与せずに生後24時間目に*E. coli* NAS-10で攻撃された群の十二指腸内では、乳酸は検出されなかった。また、ルーメン液を投与したいずれの新生子牛の直腸内でもVFAが検出されているのに対して、ルーメン液を投与しなかった新生子牛ではVFAは検出されなかった（表III-2）。

ルーメン液投与後96時間目に安楽殺した新生子牛では、他の試験に供した新生子牛と異なり、十二指腸および直腸内で高濃度にVFAが検出された。以上のように、ルーメン液を投与された子牛の下部消化管内では、VFAが検出された。

4. 考 察

成羊にルーメン内に投与された*Escherichia coli* K-12は、ルーメン液の希釈速度よりもはやい速度でルーメン内から消失することが見いだされている^{24, 27)}。そして、*E. coli* K-12のルーメン内から消失にかかわる要因の一つは、ルーメン微生物によって産生されるVFAの殺菌作用であることが明らかにされている。これらの事実は、新生子牛のルーメン内に成牛ルーメン微生物を早期に定着させれば、外来の病原性大腸菌などをルーメン内から排除できる可能性を示している。今回の実験で得られた成績はこの可能性を実験的に証明したもので、さらにはルーメン細菌が新生子牛の下部消化管内にも定着し、病原性大腸菌の定着を阻止することも明らかにしている。

すなわち、成牛ルーメン液を経口投与された新生子牛のルーメン内には、投与後24、48、72時間目のいずれの時点においても、ルーメン液を投与されなかった子牛のルーメン内に比べて多種類の細菌が定着していた（図Ⅲ-4）。さらには、成牛ルーメン液を経口投与された子牛の十二指腸内にはグラム陽性の球菌とグラム陽性桿菌を主とする細菌が、また直腸にはより多種類の細菌が定着していた（図Ⅲ-2、3）。

生後24時間目に病原大腸菌、*E. coli* NAS-10で攻撃された子牛は24時間以内に死亡した。

死亡した子牛のルーメン、十二指腸、直腸内からは高密度に*E. coli* NAS-10が検出され、さらには、肝、腎、脾をはじめとする多くの臓器からも*E. coli* NAS-10が検出された。それに対して、成牛ルーメン液を経口投与後、21時間目に *E. coli* NAS-10 で攻撃された子牛は死亡することなく、しかも実質臓器から該菌が分離されることはなかった。さらには、ルーメン液を投与することなく、*E. coli* NAS-10 で攻撃された子牛に比べて、ルーメン、十二指腸、直腸内での *E. coli* NAS-10の菌密度は著しく低く、かつこれらの部位にルーメン由来と思われる多種類の細菌が定着していた（図Ⅲ-4、5、6）。

これらの成績は、ルーメン細菌が新生子牛にルーメン、十二指腸、直腸への早期定着が病原大腸菌の定着阻止および増殖抑制に有効に作用していることを示している。

新生子牛は初乳を哺乳することで、初乳に含まれる免疫グロブリンを飲作用（ピノサイトーシス）で腸管粘膜から吸収している。生後36時間内では胃酸濃度も低く、また、初乳はトリプシン阻害物質を多く含んでいるために、初乳中の抗体は変性を受けることなく小腸粘膜からピノサイトーシスによって体内に取り込ま

れ、血中に移行して、移行抗体として働くことになる。初乳中の抗体は一部小腸粘膜上に存在して、ウイルスや細菌の感染阻止に働いている。抗体の中でも最も多量に存在する免疫グロブリンG (IgG) は小腸粘膜上皮のレセプターに結合して、ピノサイトーシスによって取り込まれる。他方、ウイルスや細菌のような大きな粒子はピノサイトーシスによって小腸粘膜から取り込まれることはない。微生物の腸管粘膜からの侵入はそれらの生産する毒素による粘膜の障害によって成立する。したがって、哺乳子牛にルーメン液を投与しても、ルーメン細菌が腸管から取り込まれ子牛に敗血症を惹起させる可能性はないと思われる。

成牛ルーメン液を経口投与された新生子牛および投与されなかった対照新生子牛のいずれの十二指腸内でも乳酸濃度が高かった。それに対して*E. coli* NAS-10で攻撃された新生子牛の十二指腸内では乳酸は検出されず、コハク酸が高濃度に検出された(表Ⅱ-2)。これは、*E. coli*が嫌氣的条件下でコハク酸を生成するので、*E. coli* NAS-10が十二指腸内で増殖し、コハク酸を生成したと思われる。*E.*

coli NAS-10で攻撃された新生子牛の十二指腸内で乳酸が検出されなかったことは、十二指腸に定着能を有する乳酸菌が*E. coli* NAS-10によって定着を阻止されたためと思われる。その結果として、十二指腸壁に定着し病原性細菌の侵入の障壁層を形成している乳酸菌が少なかったために*E. coli* NAS-10が増殖し、管壁に障害を与え、管壁から侵入し、血流にのって種々に臓器に到達したものと考えられる。

成牛ルーメン液を経口投与された新生子牛の直腸内ではVFAがかなりの濃度で検出された、他方ルーメン液を投与しなかった対照新生子牛および*E. coli* NAS-10で攻撃した新生子牛のいずれの子牛の直腸内でもVFAは検出されなかった(表Ⅱ-2)。腸内に過剰にVFAが蓄積されると、他の微生物学的要因と絡み

あって下痢を発生させる可能性はある^{3,8)}。しかし、この試験で検出された程度のVFA濃度は、供試した子牛で下痢を発生していないところから子牛の下痢を惹起させる心配はないと思われた。また、大腸菌やサルモネラ菌は、試験管内の試験でVFAによってそれらの増殖が阻害されることが報告されている^{4,9,7)}。これらの成績を考えると、ルーメン液投与牛の消化管内での病原性大腸菌、*E. coli* NAS-10の増殖阻害の一要因は、消化管内で生産されたVFAおよびそれに伴うpHの低下によるものと推察される。

この実験で得られた成績からすれば、新生子牛に成牛ルーメン液を経口投与し早期にルーメン細菌をルーメン、十二指腸、直腸内に定着させることで、犢白痢をはじめとする下痢症の発生を防除できる可能性があると思われる。

5. 小 括

新生子牛に生後2～3時間以内に健康成牛由来の保存ルーメン液を経口投与し、消化管内容物および管壁に有用細菌を早期に定着させることで、病原性大腸菌の消化管内への定着を阻止する試験を実施した。その結果、以下のことが明らかにされた。

(1)ルーメン液を投与しなかった新生子牛では、*E. coli* NAS-10の攻撃によって水様下痢便を排泄し死亡した。一方ルーメン液投与後*E. coli* NAS-10で攻撃された新生子牛群では、下痢の発生は見られなかった。

(2)十二指腸での*E. coli* NAS-10の存在菌数はルーメン液を投与せずに*E. coli* NAS-

10で攻撃された子牛に比べて、前もってルーメン液を投与後に該菌で攻撃された子牛で著しく低かった。

(3)ルーメン液を投与しなかった新生子牛に比べて、投与した新生子牛のルーメン、十二指腸、直腸では、形態的に多種類の細菌の定着が認められた。

(4)ルーメン液を投与された新生子牛の下部消化管内でのVFA濃度はルーメン液非投与の新生子牛のそれに比べて著しく高かった。

以上のことから、今回の成績では新生子牛へのルーメン液投与は病原性大腸菌の腸管内定着を抑制する効果のあることを示していた。

これら一連の成績は子牛のルーメン内における成牛ルーメン微生物叢の早期確立技術の開発のための基礎資料として重要である。

総 括

子牛のルーメン内における成牛ルーメン微生物叢の早期確立は、子牛の増体促進および病原微生物の排除のためにも重要であると考えられた。従って、この研究はこれらの想定を実験的に確立するために実施された。この論文は子牛における成牛ルーメン微生物叢の早期確立技術の開発のために、実施した研究成果およびこの技法の病原性大腸菌の腸管への定着阻止への有効性を調べた研究成績をまとめたものである。

実験Ⅰ 哺乳子牛のルーメン微生物叢の発達と発育におよぼすルーメン液経口投与の影響

健康な成牛の新鮮ルーメン液あるいはA T-Rを、生後数時間以内に経口投与することで、新生子牛のルーメン内微生物叢の早期確立について検討した。その結果、新鮮ルーメン液あるいはA T-Rを経口投与した投与群と非投与（対照）群との間には、子牛のルーメン微生物叢に差異のあることを明らかにした。

新鮮ルーメン液投与群（試験区1）、新鮮ルーメン液とA T-R投与群（試験区2）、A T-R投与群（試験区3）はルーメン液非投与群（対照区）に比べ早い日齢でのルーメン微生物群の定着成立に伴う、ルーメン内V F A濃度の増加促進などが確認された。

ルーメン内の微生物叢のうち好気性菌および通性嫌気性細菌群の子牛の日齢に伴うルーメン内での推移については、乳酸菌（*Lactobacillus*属菌）数は対照区に比べ各試験区で試験期間を通じて高く推移した。*Streptococcus*属菌群の菌数は試験区1と対照区では差異を認めなかったが、A T-Rを投与した試験区2および3では他に比べ高いレベルで推移した。*E. coli*は対照区に比べ試験区で低いレ

ベルで推移した。一方、機能別細菌群については乳酸を利用する菌群は試験期間を通じて試験区と対照区の違いを認めなかった。各試験区とも対照区に比べて、ペクチンおよびキシラン分解菌、セルロース分解菌、メタン産生菌群の子牛ルーメン内への早期定着が確認された。

ルーメンプロトゾアの定着に関しては、生菌を含む新鮮ルーメン液の経口投与は、ルーメン内へのプロトゾアの定着促進に有効であることが示唆された。しかし予想に反し、A T-Rの経口投与は対照区に比べてプロトゾアの定着を促進しなかった。

各試験区のルーメン内V F A濃度は対照区に比べて、50日齢まで高いレベルで推移した。各試験区で高いV F A濃度は早期に定着したルーメン細菌群の活動を反映している。対照区は50日齢をピークに、その後は各試験区と同様に推移し、70日齢にはルーメン内総V F A濃度は4~5mM/dlであった。各V F A組成比は50日齢までは対照区に比べ各試験区とも、酢酸の比率が低く、逆にプロピオン酸の比率が高く推移した。この時期には、プロピオン酸生成菌が比較的多数を占めていることを示唆している。この成績は実験Ⅱでの結果とよく一致している。90日齢では各試験区とも対照区と差異はなかった。

各区の発育の推移は、0~45日齢の飼料要求量から見ても、各試験区と対照区間に有意差が認められたが、そのことが増体量、体高、体長、胸囲等の発育成績には表れなかった。

以上の結果、新生子牛に健康な成牛の新鮮ルーメン液の100mlを生後3日間投与するだけで、そのルーメン内に早期に成牛ルーメン微生物叢が確立されることが示唆された。

実験Ⅱ 無菌ヤギの消化管内へのルーメン細菌の定着試験

新生子牛へ健康な成牛の新鮮ルーメン液の経口投与が成牛のルーメン微生物叢の早期確立に有効であることを認めた。そこで、この原因を部分的に説明するために、無菌ヤギのルーメン内および下部消化管内への主要な単離ルーメン細菌の経口投与による定着試験を実施した。

無菌子牛の作出は困難なので、ここでは実験動物として無菌ヤギの作出を試みた。子宮切断術により、摘出した子ヤギをビニール・アイソレータ内で無菌飼育し、この無菌状態で飼育したヤギに生後35日齢から5日間かけて9種類のルーメン細菌を経口投与し、菌投与後3週間目に安楽殺し、ルーメン内、盲腸内および直腸内における細菌の定着状況を、非選択および選択培地を用いて検査した。

その結果、安楽殺したヤギのルーメン内容物のpHは6.98、VFA濃度は2.59 mM/dlで、その組成比は健康子牛（表II-5）のそれと似ていた。

経口投与した9種類のルーメン細菌のうち、セルロース分解菌である *Ruminococcus albus* 以外の8菌種はいずれも高い菌数レベルでルーメン内に定着した。とくに、投与した9菌種のうち、ルーメン内で多数を占めていたのは、*S. bovis*、*Prevotell (Bacteroides) ruminicola ss. brevis*、*Ruminobacter (Bacteroides) amylophilus*、*Butyrivibrio fibrisolvens* はルーメン内で多数を占め、*Veillonella alcalescens* や *Streptococcus bovis* の菌濃度は下部消化管内に比べて約1,000倍近くルーメン内で高かった。従って、これらの細菌の主要な定着部位はルーメン内であることを示していた。一方、*Megasphaera elsdenii* と *Enterococcus faecium* はルーメン内に比べて下部消化管内で2~4倍高いレベルで定着した。

他方、セルロース分解菌は通常の子牛のルーメン内で5日齢頃より分離され始めるが、今回の試験では35日齢以後に投与したにもかかわらず定着しなかった。

これはセルロース分解菌の栄養要求が厳しく、定着には他のルーメン細菌の共存を必要とすることを示唆している。

このように、無菌ヤギに主要なルーメン細菌を経口投与すると、ルーメン内は勿論のこと、盲腸や直腸などの下部消化管内にも定着できることを示す成績が得られた。

実験Ⅲ ルーメン液早期経口投与による新生子牛腸管内への病原性大腸菌の定着阻止試験

子牛における成牛のルーメン微生物叢の早期確立の有用性を証明するための1例として、病原性大腸菌の定着阻止についての試験を実施した。新生子牛に生後2～3時間以内に健康成牛由来の保存ルーメン液を経口投与し、消化管内容物および管壁に有用細菌を早期に定着させることで、病原性大腸菌の消化管内への定着を阻止する試験を実施した。

実験動物としてジャージー種雄の新生子牛を用い、慣行法により飼養管理した新生子牛（対照）、生後48時間目に病原性大腸菌のひとつである *Escherichia coli* NAS-10 (09:K99:STa⁺:LT⁻) で攻撃した新生子牛、生後数時間以内にルーメン液を投与した新生子牛群、ルーメン液投与後の生後24時間目に病原性大腸菌 *E. coli* NAS-10 で攻撃した新生子牛群について、消化管各部位における *E. coli* NAS-10 の分布状況と細菌構成、および消化管内容物の性状について検査した。

結果、ルーメン液を投与しなかった新生子牛は、*E. coli* NAS-10 の攻撃によって水様下痢便を排泄し死亡した。一方ルーメン液投与後に *E. coli* NAS-10 で攻撃された新生子牛群では、下痢の発生は見られなかった。十二指腸での *E. coli* NAS-10 の存在菌数はルーメン液を投与せずに *E. coli* NAS-10 で攻撃された子牛に比べて、前もってルーメン液を投与後に該菌で攻撃された子牛で著しく低かった。ま

た、ルーメン液を投与しなかった新生子牛に比べて、投与した新生子牛のルーメン、十二指腸および直腸内には、形態的に多種類の細菌の定着が認められた。しかも、ルーメン液を投与された新生子牛のVFA濃度はルーメン液非投与の新生子牛のそれに比べて著しく高かった。

以上の結果を総合すると、以下のことが明らかにされた。

(1)新生子牛への新鮮ルーメン液の経口投与は成牛ルーメン微生物叢の早期確立に有効であった。

(2)無菌ヤギへの主要なルーメン細菌の経口投与試験により、セルロース分解菌以外のルーメン細菌はルーメン内には勿論のこと下部消化管内にも定着しうることを確認した。

(3)ここで作出したノトバイオトヤギは、ルーメン微生物と反芻家畜の生理・栄養状態との関連、ルーメン微生物および下部消化管内正常微生物叢と病原微生物との関連などの研究のための有用な実験動物となりうると思われる。

(4)新生子牛へのルーメン液投与は病原性大腸菌の腸管内定着を抑制する効果のあることを示していた。

要 旨

子牛のルーメン内微生物叢の早期確立は、子牛の発育促進および病原微生物の排除のためにも重要であると考え、そのために子牛のルーメン微生物叢の早期確立技術の開発試験を実施した。すなわち、実験Ⅰでは健康な成牛の新鮮ルーメン液あるいは加圧滅菌処理したルーメン液（A T-R）を生後数時間以内に経口投与することで、新生子牛のルーメン内微生物叢および発育に与える影響について検討した。結果、(1)新鮮ルーメン液投与群（試験区1）、新鮮ルーメン液とA T-R投与群（試験区2）、A T-R投与群（試験区3）はルーメン液非投与群（対照区）に比べ早い日齢でルーメン微生物群の定着成立が確認された。(2)ルーメン内の微生物叢のうち好気性菌および通性嫌気性菌群の子牛の日齢に伴うルーメン内の推移については、乳酸菌（*Lactobacillus*属菌）数は対照区に比べ各試験区試験期間を通じて高く推移した。*Streptococcus*属菌群は試験区1と対照区では差異を認めなかったが、試験区2および3は他に比べ高いレベルで推移した。対照区に比べ各試験区で高いレベルで推移した。*E. coli*は対照区に比べ各試験区で低いレベルで推移した。(3)機能別細菌群については乳酸を利用する菌群は試験期間を通じて試験区と対照区に差異を認めなかった。対照区に比べて各試験区とも、ペクチンおよびキシラン分解菌、セルロース分解菌、メタン産生菌群の子牛ルーメン内への早期定着が確認された。(4)ルーメンプロトゾアの定着に関しては、生菌を含む新鮮ルーメン液の経口投与は、ルーメン内へのプロトゾアの定着の促進に有効であることを示したが、予想に反し、A T-Rの経口投与は対照区に比べてプロトゾアの定着を促進しなかった。(5)ルーメン内のV F Aの濃度は各試験区では対照区に比べて、50日齢まで高いレベルで推移した。70日齢以後では4~5mM/dlで推移したが、対照区は50日齢をピークにその後は、試験区と同様に推移した

。各VFA中の組成率に関しては50日齢までは対照区に比べ各試験区で酢酸の比率が低く、逆にプロピオン酸の比率が高く推移した。90日齢では対照区と各試験区で差異はなかった。(6)各区の発育の推移は、0～45日齢および46～90日齢の飼料要求量から見ても、各試験区と対照区間に有意差が認められ、そのことが日増体量、体高、体長、胸囲等の発育成績に表れている。なかでも、試験区1は他の試験区に比べ高く推移した。

以上の結果、新生子牛に新鮮ルーメン液100mlを生後3日間投与するだけで、子牛のルーメン内に早期に正常なルーメン微生物叢が作られることが示唆された。

実験Ⅰでは新生子牛へ健康な成牛の新鮮ルーメン液の経口投与が成牛のルーメン微生物叢の早期確立に有効であることを認めた。そこで、実験Ⅱではこの原因を部分的に説明するために、無菌ヤギのルーメン内および下部消化管内への主要な単離ルーメン細菌の経口投与による定着試験を実施した。結果、(1)安楽殺処分したヤギのルーメン内pHは6.98、揮発性脂肪酸濃度は2.59mM/dlで、その組成比率は健康ヤギのそれと似ていた。(2)*Veillonella alcalescens*や*Streptococcus bovis*の密度は他の消化管内に比べて約1000倍近くルーメン内で高かった。(3)投与した9菌種のうち、ルーメン内で多数を占めていたのは、*S. bovis*、*Prevotella (Bacteroides) rumincola ss. brevis* *Ruminobacter (Bacteroides) amylophilus*、*Butyrivibrio fibrisolvens*等であった。

このように、無菌ヤギに主要なルーメン細菌を経口投与すると、ルーメン内は勿論のこと、盲腸や直腸などの下部消化管内にも定着できることを示す成績が得られた。

実験Ⅲでは、子牛における成牛のルーメン微生物叢の早期確立の有用性を証明するための1例として、病原性大腸菌の定着阻止についての試験を実施した。

新生子牛に生後2～3時間以内に健康成牛由来の保存ルーメン液を経口投与し、消化管内容物および管壁に有用細菌を早期に定着させることで、病原性大腸菌の消化管内への定着を阻止する試験を実施した。結果、(1)ルーメン液を投与しなかった新生子牛は、*E. coli* NAS-10の攻撃によって水様下痢便を排泄し死亡した。一方、ルーメン液投与後*E. coli* NAS-10で攻撃された新生子牛群では、下痢の発生は見られなかった。(2)十二指腸での*E. coli* NAS-10の存在菌数はルーメン液を投与せずに*E. coli* NAS-10で攻撃された子牛に比べて、前もってルーメン液を投与後に該菌で攻撃された子牛で著しく低かった。(3)ルーメン液を投与しなかった新生子牛に比べて、投与した新生子牛のルーメン、十二指腸、直腸内では、形態的に多種類に細菌の定着が認められた。(4)ルーメン液を投与された新生子牛のVFA濃度はルーメン液非投与の新生子牛のそれに比べて著しく高かった。今回の成績では新生子牛へのルーメン液投与は病原性大腸菌の腸管内定着を抑制する効果のあることを示していた。

以上の結果を総合すると、以下のことが明らかにされた。(1)新生子牛への新鮮ルーメン液の経口投与は成牛ルーメン微生物叢の早期確立および子牛の発育促進に有効であった。(2)無菌ヤギへの主要なルーメン細菌の経口投与試験により、セルロース分解菌以外のルーメン細菌はルーメン内には勿論のこと、下部消化管内にも定着することを確認した。(3)ここで作出したノトバイオトヤギは、ルーメン微生物と反芻家畜の生理・栄養状態との関連、ルーメン微生物および下部消化管内正常微生物叢と病原微生物との関連などの研究のための有用な実験動物となると思われる。(4)新生子牛へのルーメン液投与は病原性大腸菌の腸管内定着を抑制する効果のあることを示していた。

Summary

It was assumed that the early establishment of rumen microorganisms in calves would be important for both the improvement of animal growth and the inhibition of colonization of pathogenic bacteria in the intestinal tract. Therefore, to develop techniques for the early establishment of rumen microorganisms in calves, several experiments were carried out and the following results were obtained. (1) Oral administration of fresh rumen fluid from healthy adult cattle to new born calves was effective in both the early establishment of rumen microorganisms in calves and the improvement of animal growth. (2) Experiments in oral administration of major representative rumen bacteria isolated from the rumen to a germ-free goat, enabled to confirm that rumen bacteria except cellulolytic bacteria colonized not only the rumen of the goat, but also the intestinal tract. (3) The gnotobiotic goat prepared in this study could become a suitable model animal for the clarification of the following subjects, namely 1) the relationship between rumen microorganisms and, physiology and nutrition of animals, 2) the relationship between rumen microorganisms and normal intestinal microorganisms, and pathogenic bacteria, and so on. (4) It was found that the oral administration of rumen fluid to new born calves exerted inhibitory effects on the colonization of pathogenic *Escherichia coli* in the intestinal tract.

The results obtained in this study may supply basic information for the development of techniques for the early establishment of rumen microorganisms in young calves.

謝 辞

本稿を終えるに臨み終始御指導を頂いた茨城大学農学部生物生産学科湊一教授、麻布大学獣医学部獣医学科内科学第二講座小林好作教授に謹んで感謝の意を表します。

実験遂行にあたり御協力頂いた農林水産省家畜衛生試験場、飼料安全性研究部ズーノシス研究室中沢宗生博士、三谷賢治衛生検査専門官、石川県農林水産部畜産関係職員の皆様に感謝します。

また、本論文の校閲と御指導を頂いた麻布大学獣医学部獣医学科栄養学講座阿部又信教授、内科学第三講座松浦健二教授および微生物第一講座田淵清教授に深謝します。

引用文献

1. Abe, M., Iriki, T, K. Kondoh and H. Shibui (1979) Effect of nipple or bucket feeding of milk substitute on rumen by-pass and on rate of passage in calves. Br. J. Nutr., 41:175-181.
2. Kaplan, A. (1969) In Methods of Biochemical Analysis, Vol. 17, ed. by D. Glick, Interscience Publishers, New York, p. 311.
3. Armstrong, D. G., T. R. Preston, and R. H. Armstrong (1954) Digestibility of a sample of pasture grass by calves. Nature, 174, 1182.
4. Bomba A, Kralicek L, Koniarova I, Lesnik F, Posivak J, Bucko V, Zitnan R (1993) The recovery and rearing of gnotobiotic lambs and their use in veterinary medicine. Vet Med (Praha). Jan;38(7):403-411. Slovak.
5. Brownlee, A (1956) The development of rumen papillae in cattle fed on different diets. Brit. Vet. J., 112, 369.
6. Bryant, M. P., N. Small, C. Bouma and I. M. Robinson (1958) Studies on composition of the ruminal flora and fauna of young calves. J. Dairy Sci., 41, 1747.
7. Chambers, P. G. and Lysoms, R. J (1979) The inhibitory effect of bovine rumen fluid on *Salmonella typhimurium*. Res. Vet. Sci. 26:273-276.
8. Cheng, K.-J. and J. W. Costerton (1980) Adherent rumen bacteria—their role in the digestion of plant material, urea and epithelial cells, in Digestive Physiology and Metabolism in Ruminants, (Ruckebusch, Y. and P. Thivend, eds.), 227-250. MTP Press. Lancaster.
9. Flatt, W. P., R. G. Warner and J. K. Loosli (1958) Influence of purified materials on the development of the ruminant stomach. J. Dairy Sci., 41, 1
10. Fonty, G., Ph. Gouet, J. P. Jouany and J. Senaud, Ecological factors determining establishment of cellulolytic bacteria and protozoa in the rumen of merxenic sheep.

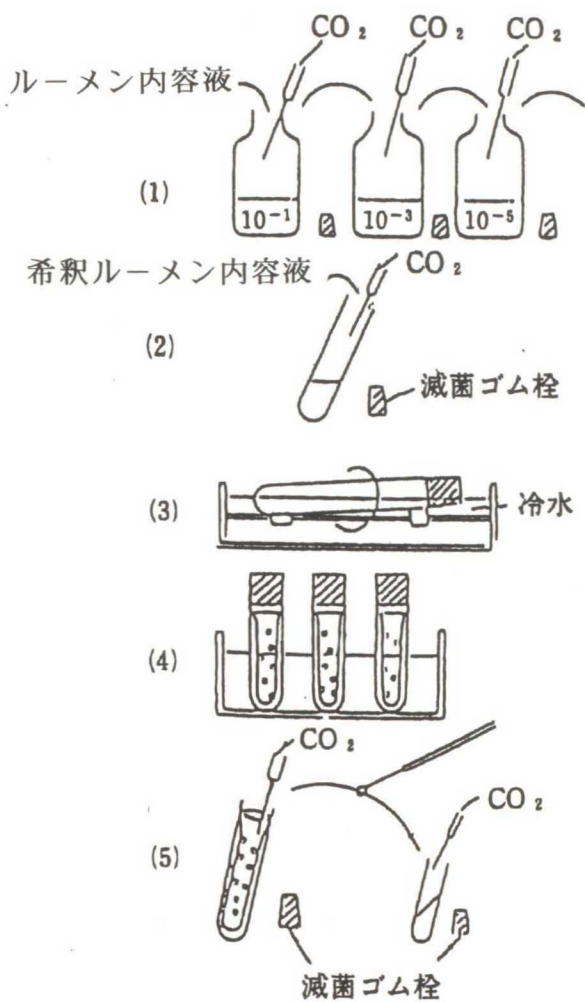
11. G. Fonty, P.H. Gouet, J. P. Joanty and J. Senaud (1983) Ecological Factors Determining Establishment of Cellulolytic Bacteria and Protozoa in the Rumen of Meropenic Lambs. *Journal of General Microbiology*, 129, 213-223.
12. Grodfrey, N.W (1961) The functional development of the calf. Development of rumen function in the calf. *J. Agr. Sci., Camb.*, 57, 177.
13. Harrison, H. N., R. G. Warner, E. G. Sander and J. K. Loosli (1960) Changes in the tissue and volume of the stomachs of calves following the removal of dry feed or consumption of inert bulk. *J. Dairy Sci.*, 43, 1301.
14. Hamada, T., K. Kameoka, S. Omori and H. Morimoto (1965) Digesting ability of dairy calves to milk and hay during early growth stage. *Jap. J. zootec h. Sci.*, 36, 468.
15. 浜田龍夫 (1972) 子牛の早期離乳における固形飼料採食量に対する液状飼料給与の影響. *畜試年報*, 12, 47.
16. Hobdon, P. N (1969) Rumen bacteria. In *Methods in Microbiology Vol. 3B*, ed. J. R. Norris and D. W. Ribbons. Academic Press, London, 133-149.
17. Holdeman, L. V., Cato, E. P. and Moore, W. E. C (1977) *Anaerobe Laboratory manual*. Virg. Polytech. Inst. Blacksburg.
18. Hodgison, J (1971) The development of solid intake in calves. 4. The effect of addition of material to the rumen, or voluntary food intake. *Anim. Prod.*, 13, 581.
19. Hollowell, C. A. and M. J. Wolin (1965) Basis for the exclusion of *Escherichia coli* from the rumen ecosystem. *Appl. Microbiol.*, 13: 918-924
20. Hollowell, C. A. and M. J. Wolin., Basis for the exclusion of *Escherichia coli* from the rumen ecosystem. *Appl. Microbiol.*, 13: 918-924, 1965.
21. 柏崎守、波岡茂郎、湯本健吾、柴田重孝、赤池洋二：無菌豚の飼育に関する研究。(1967) . *実験動物*, 16, p85-92.
22. Lafont, J., Bree, A., Yvore, P., Guillot, J. F. and Chaslusdancla, E. (1983) Experimental study of salmonella in chickens. *Rds. Vet. Sci.* 34: 16-20.

23. Livingston and CW Jr, et al (1983). Experimental bluetongue infection in gnotobiotic lambs and kids. Am J Vet Res. Jan 1;44(1):129-131.
24. Paynter, M. J. B and Hungate, R. E (1968) Characterization of *Methanobacterium mobilis*, sp., isolated from the Bovine Rumen. J. Bacteriol., 95, 1943-1951.
25. McArthur, A. T. G (1957) The ability of cows and calves to digest grass. N. Z. J. Sci. Tech., A38, 696.
26. Minato, H. and Suto, T (1981) Technique for fractionation of bacteria in rumen microbial ecosystem. IV. Attachment of rumen bacteria to cellulose powder and elution of bacteria attached to it. J. Gen. Appl. Microbiol. 27:21-31.
27. 湊 一・植村定治郎(1970)ルーメン発酵と微生物、発酵と微生物III (相田・植村編)、198-299. 朝倉書店. 東京.
28. Nurmi, E. and Rantala, M. (1973). New aspects of *Salmonella* infection in broiler production. Nature 241, 627-630.
29. 大森昭一郎・小林 剛・川端麻夫・浜田龍夫・亀岡暄一(1966) 子牛の第一胃における乾草粗繊維消化能力の発達。 畜試研究報告, 12, 1.
30. 大森昭一郎・小林 剛・川端麻夫(1969) 子牛の第一胃内の低級脂肪酸、乳酸、アンモニア濃度の採食後の変動と発育にともなう推移について。 畜試研究報告, 19, 33.
31. Ogimoto, K. and Imai, S (1981) Atlas of rumen microbiology. JSSP. Tokyo.
32. Olga, M., Weinack, O. M., Snoeyenbos, G. H., Smyser, C. F. and Soerjadi, A. S. (1981) Competitive exclusion of intestinal colonization of *Escherichia coli* in chicks. Avian diseases. 25:696-705.
33. Orskov, E. R., D. Benzeie and R. N. B. Kay (1970) THE effects of feeding proced on closure of the esophageal groove in young sheep. Br. J. Nutr., 4, 75.

34. Preston, T. R., J. D. H. Archibald and W. Tinkler (1957) The digestibility of gass by young calves. *J. Agr. Sci., Camb.*, 48, 259.
35. Rantala, M, and Nurmi. E (1973) Prevention of the growth of *Salmonella infantis* in chicks by the flora of the alimentary of chickens. *British Poultry Science* 14, 627-630
36. Lysons, R. J, and Alexander, T. J (1971) Establishment of Limited Rumen microflora in Gnotobiotic Lambs. *Res. Vet. Sic.* 12, 486-487.
37. Sandee, E. G., R. G. Warner, H. N. Harrison and J. K. Loosli (1959) The stimulatory effect of sodium butyrate and sodium propionate on the development of rumen mucosa in the young calf. *J. Dairy Sci.*, 42, 1600.
38. Sissons, J. W. (1991) Aetiology of diarrhoea in pigs and per-ruminant calves. p. 261. In recent advances in animal Nutrition. W. Haresign and D. J. A Cole, eds. Butterworths, London. 1989; Read, N. W. The role of motility in diarrheal. p. 173. in *Diarrheal Diseases*. M. Field, ed. Elsevier, New York
39. Slyter, L. L., R. R. Oltjen, E. E. Willians, JR and R. L. Wilson (1971) Influence of urea, biuret and starch on amino acid patterns in ruminal bacteria and blood plasma and on nitrogen balance of steers of steers fed high fiber purified diets. *J. Nutr.*, 101:839-846.
40. Mann, S. O and Sterart, C. S (1974) Establishment of Limited Rumen Flora in a Gnotobiotic Lambs Fed on a Roughage Diet. *Journal of General Microbiology*, 84, 379-382.
41. Stobo, I. JF., J. H. B. Roy and H. J. Gaston (1966) Rumen development im the calf. 1. The effect of diets containing different proportions of conce ntrate to hay on rumen development. *Br. J. Nutr.*, 20, 171.
42. Tamate, H., K. Ishida, Y. kondo, F. Hoshino, and Y. Toryu (1962) Studies on the stomach growth of young dairy calves. 1. The forestomach growth in young dairy calves fed on hay or dried native grass as rughage, and on starter. *Tohoku J. Agr. Res.*, 13, 351.
43. Tamate, H., A. D. Mcgilliaro, N. L. Jacobson and R. Getty (1962) Effect of various dietaries on the anatomical development of the stomach in the

calf. J. Dairy Sci., 45, 408.

44. Laleander, T. Lysono, R. J. M. Elliott and Patricia D. Wellstead (1973)
Equipment for rearing gnotobiotic lambs. *Laboratory Animals*. 7, 195-217
45. Laleander, T. J. Lysono, R. J. M. Elliott and Patricia D. Wellstead (1973)
Techniques for rearing gnotobiotic lambs. *Laboratory Animals*. 7, 239-254
46. Watson, R. H. (1943) A note on factors affecting the course taken by liquid into the stomach in ruminants. *Aust. Vet. J.*, 19, 86.
47. Warnere R. G., W. P. Flatt. and J. K. Loosli (1956) Dietary factors influencing the development of the ruminant stomach. *J. Agr. Food Chem.*, 4, 788.
48. Wells CL, Sugiyama H, Bland SE. (1982) .Resistance of mice with limited intestinal flora to enteric colonization by *clostridium botulinum*. *J Infect Dis*. Dec; 146(6):791-796.
49. Wolin, M. J. (1969) Volatile fatty acids and the inhibition of *Escherichia coli* growth by rumen fluid. *Appl. Microbiol.*, 17:83-87.
50. Zirolecki, A. and C. A. F. Briggs (1961) The microflora of the rumen of the young calf: II. Source, nature and development. *J. Appl. Bacteriol.*, 24:148-163. 1961.



ルーメン内容液を嫌氣的に希釈

↓

無菌、嫌気条件下で接種

↓

ロールチューブ作製

↓

培養

↓

菌数測定、菌分離

図1-1 ルーメン細菌の分離培養手順

表 1-1 飼料摂取量 (期間の平均値)

区 分	0～ 45日 齡			
	人工乳 (kg)	乾草 (kg)	DM (kg)	TDN
対照区	14.0 ^a ±6.9	1.8±1.1	30.0 ^a ±6.2	30.9 ^a ±6.5
試験区 1	24.0 ±3.1	1.6±0.7	40.4 ^b ±3.0	40.9 ^b ±2.8
試験区 2	26.9 ^b ±6.3	3.1±1.2	43.9 ^b ±5.1	43.5 ^b ±4.6
試験区 3	27.0 ^b ±3.5	3.8±1.0	44.0 ^b ±2.5	43.7 ^b ±2.6

各試験区内で同列符号間に有意差有り (p<0.05)

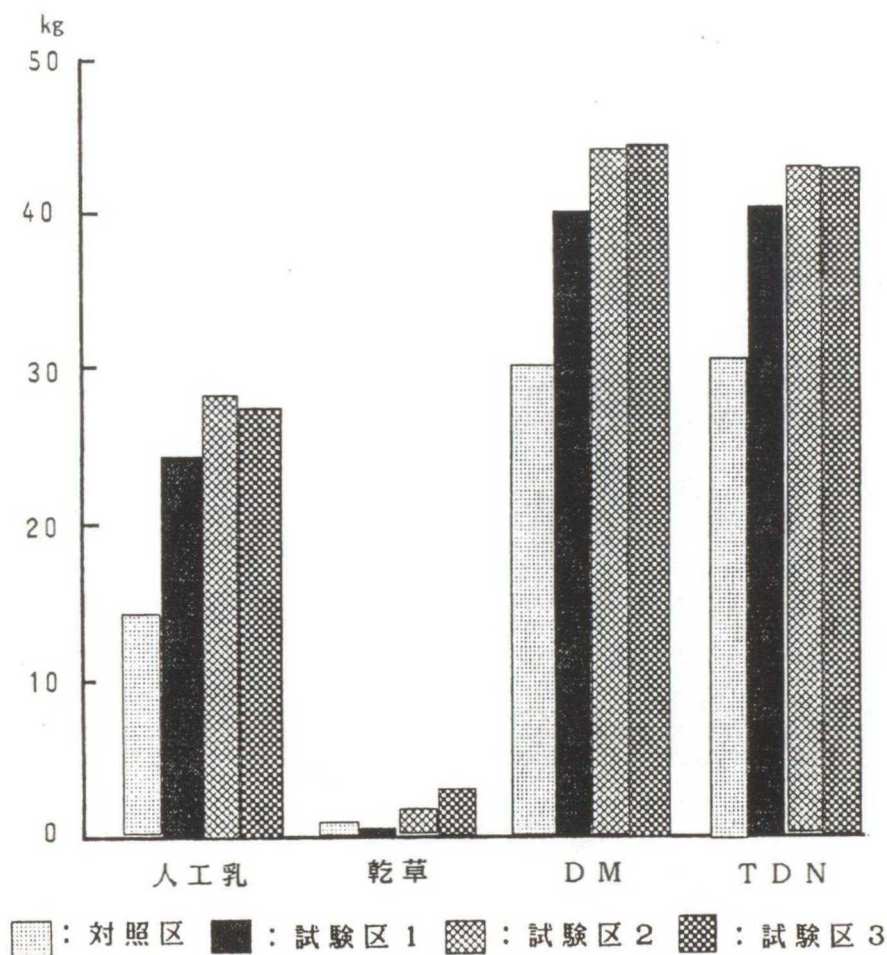


図 1-2 飼料摂取量 (0日 齡～45日 齡)

表 1-2 飼料摂取量 (期間の平均値)

46～90日齢				
区 分	人工乳 (kg)	乾草 (kg)	DM (kg)	T D N
対照区	122.4± 5.0	22.4± 3.5	138.5± 6.4	124.3±6.2
試験区 1	126.2± 6.7	27.3± 2.5	146.5± 7.3	130.8±5.9
試験区 2	117.3± 9.9	36.1± 4.1	145.8±10.6	127.6±8.9
試験区 3	129.0±10.7	34.6±10.3	154.5± 6.0	136.1±5.2

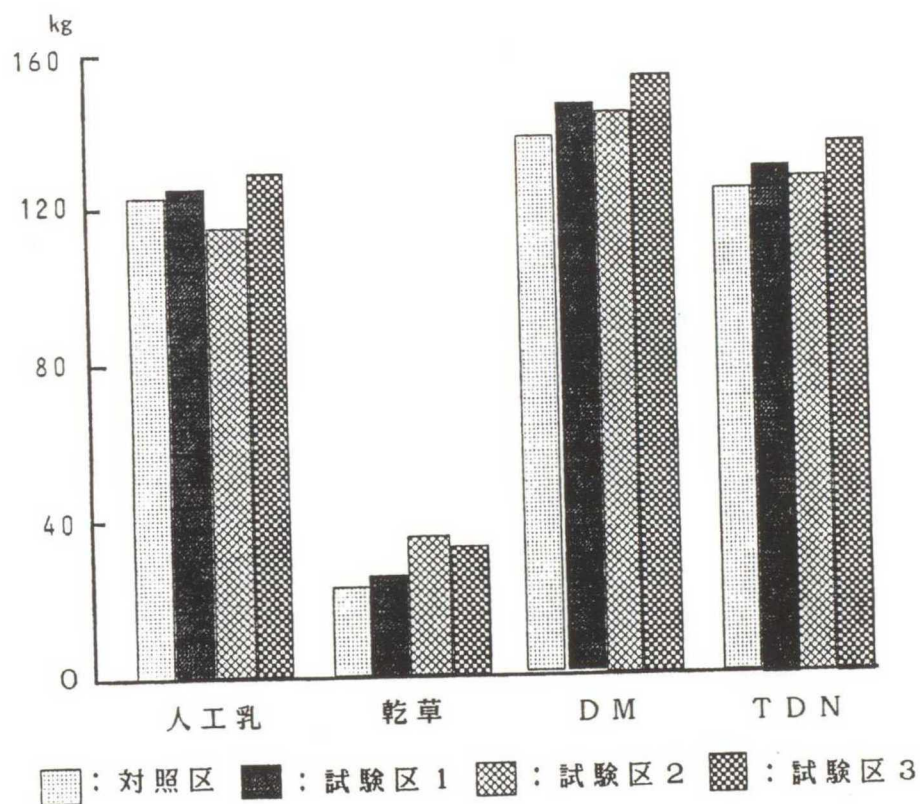


図 1-3 飼料摂取量 (46日齢～90日齢)

表 I-3 体重曲線の推移

%

	0日齢	14日齢	28日齢	42日齢	56日齢	91日齢	126日齢	154日齢	182日齢
対照区	100	110	120	150	180	260	330	380	430
試験区 1	100	110	130	160	190	270	350	390	440
試験区 2	100	110	120	150	180	240	300	360	420
試験区 3	100	110	130	160	200	270	320	360	420

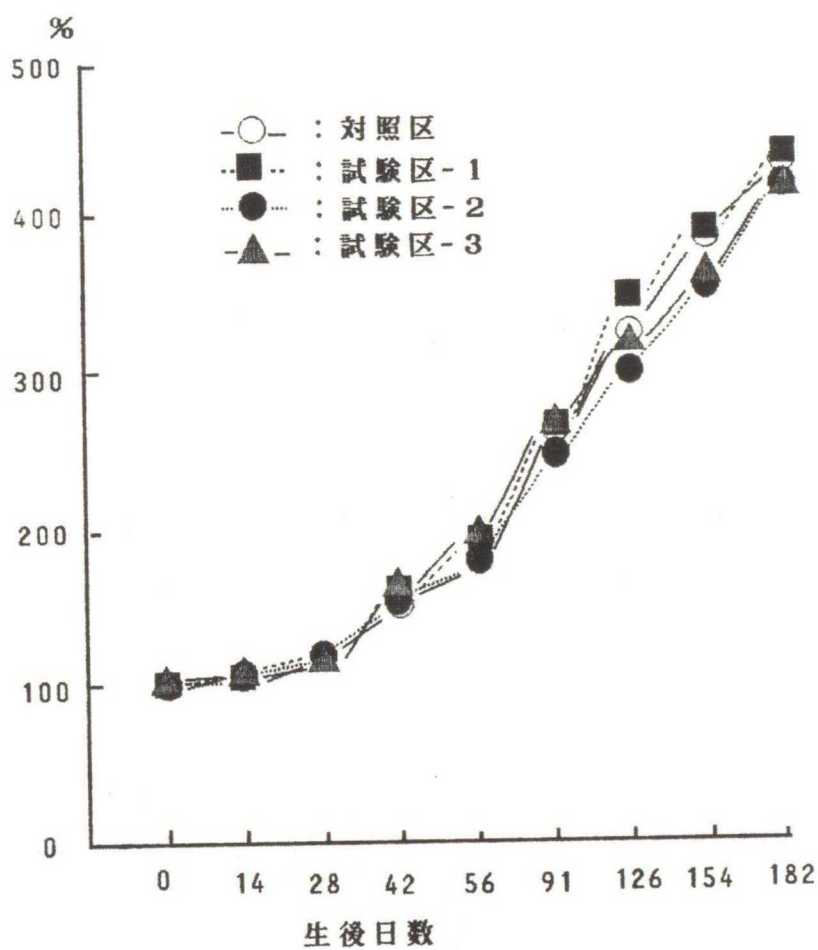


図 I-4 体重曲線

表 1-4 体高曲線の推移

%

	0日齢	14日齢	28日齢	42日齢	56日齢	91日齢	126日齢	154日齢	182日齢
対照区	100	102	106	109	113	121	128	135	150
試験区 1	100	103	105	107	113	121	129	133	142
試験区 2	100	104	107	110	116	122	128	136	143
試験区 3	100	101	104	108	112	119	126	129	135

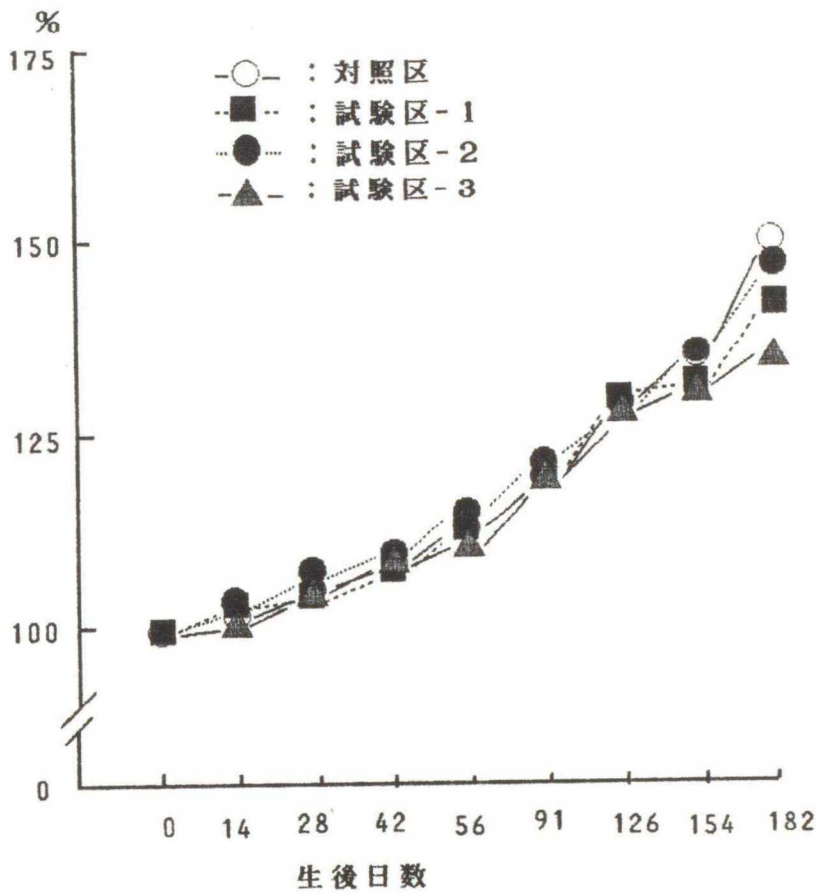


図 1-5 体高曲線

表 I-5 体長曲線の推移

%

	0日齢	14日齢	28日齢	42日齢	56日齢	91日齢	126日齢	154日齢	182日齢
対照区	100	108	113	115	122	135	150	157	163
試験区 1	100	105	105	117	122	140	151	159	165
試験区 2	100	105	110	114	120	131	142	151	156
試験区 3	100	105	109	114	119	132	142	152	156

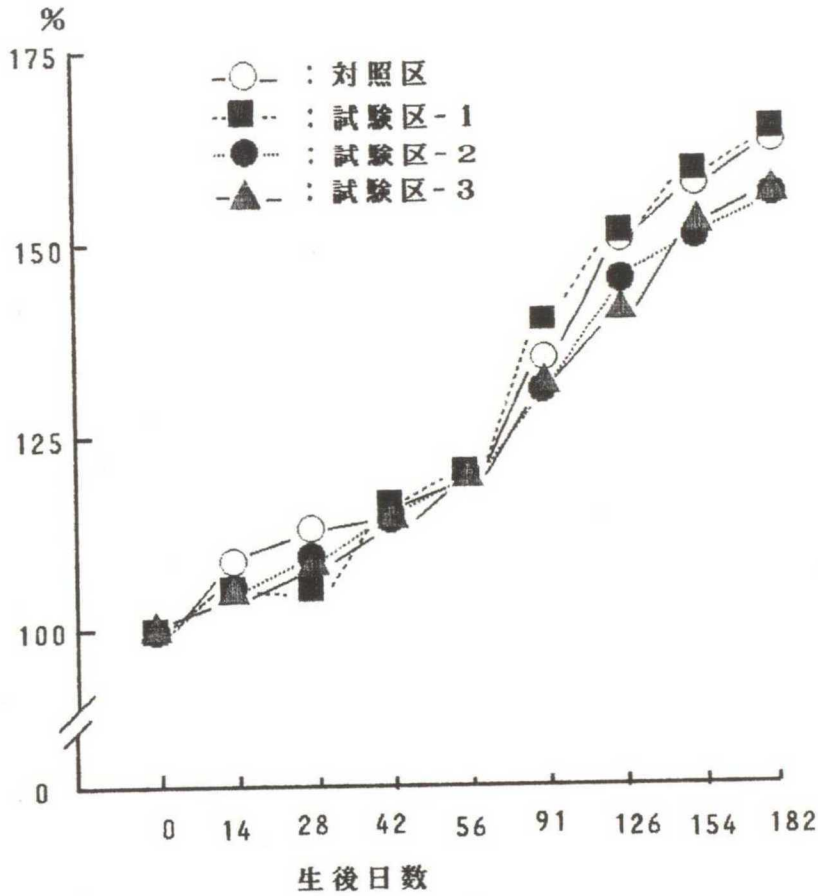


図 I-6 体長曲線

表 I-6 胸囲曲線の推移

%

	0日齢	14日齢	28日齢	42日齢	56日齢	91日齢	126日齢	154日齢	182日齢
対照区	100	104	106	116	121	136	148	159	165
試験区 1	100	105	108	118	125	141	152	161	167
試験区 2	100	103	109	115	124	135	145	153	164
試験区 3	100	103	108	117	127	139	150	154	164

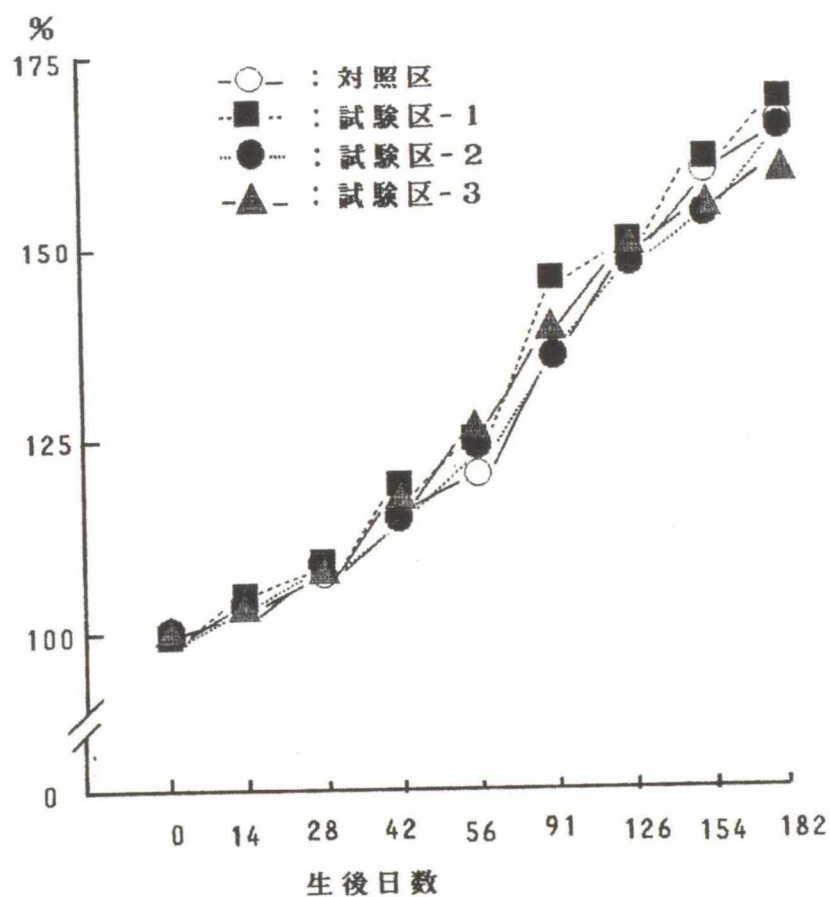


図 I-7 胸囲曲線

表 1-7 E. coli菌数の推移

(log/ml)

	10日齢	20日齢	30日齢	40日齢	50日齢	60日齢	70日齢
対照区	4.4±0.4	4.1±1.8	4.1±0.3	2.8±0.5	3.4±0.7	3.5±0.4	2.8±0.5
試験区 1	3.5±1.4	2.5±2.4	3.2±1.2	2.9±0.5	2.9±1.8	2.5±1.7	2.4±1.5
試験区 2	4.4±1.2	3.8±1.1	4.0±1.4	2.9±1.7	2.8±2.1	3.2±1.0	3.8±1.1
試験区 3	3.7±0.0	2.0±2.3	3.1±2.0	3.2±2.3	2.7±2.8	2.6±2.3	1.5±2.1

	80日齢	90日齢
対照区	3.1±0.7	3.2±2.2 ^a
試験区 1	3.0±1.0	2.8±1.9 ^a
試験区 2	2.8±0.5	2.7±0.2 ^{b a b}
試験区 3	2.8±0.7	3.3±0.9 ^b

同列異符号間に有意差あり (p<0.05)

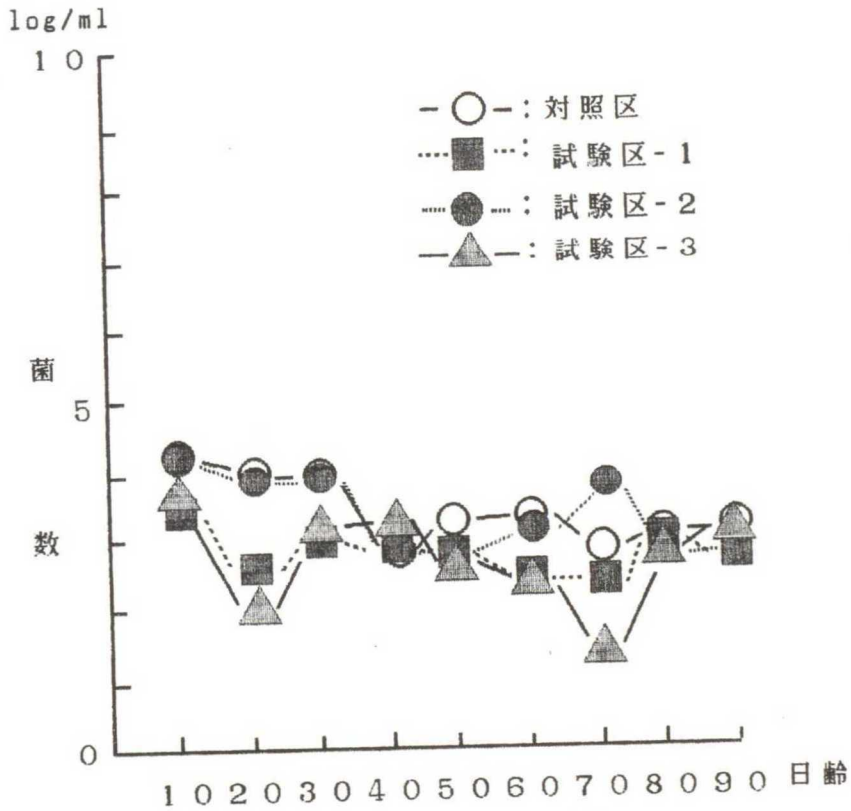


図 I-8 E. coli菌数の推移

表 I-8 Streptococcus属菌数の推移

(log/ml)

	10日齢	20日齢	30日齢	40日齢	50日齢	60日齢	70日齢
対照区	4.5±1.5	4.4±0.6	4.0±0.9	3.9±0.7	4.1±0.5	4.2±0.6	3.4±0.8
試験区 1	5.2±3.1	4.9±0.9	4.7±0.3	4.1±1.2	5.8±0.3	4.3±1.4	4.7±1.0
試験区 2	5.6±1.3	5.1±0.6	5.5±0.7	4.8±1.2	5.3±0.8	5.3±0.6	5.2±1.3
試験区 3	6.1±2.0	5.4±0.5	5.4±0.6	6.6±0.9	6.9±1.4	5.9±0.5	5.6±0.4

	80日齢	90日齢
対照区	4.2±0.4	4.0±0.3
試験区 1	3.7±1.0	4.2±0.6
試験区 2	5.2±2.3	6.1±1.6
試験区 3	5.9±0.2	6.1±0.6

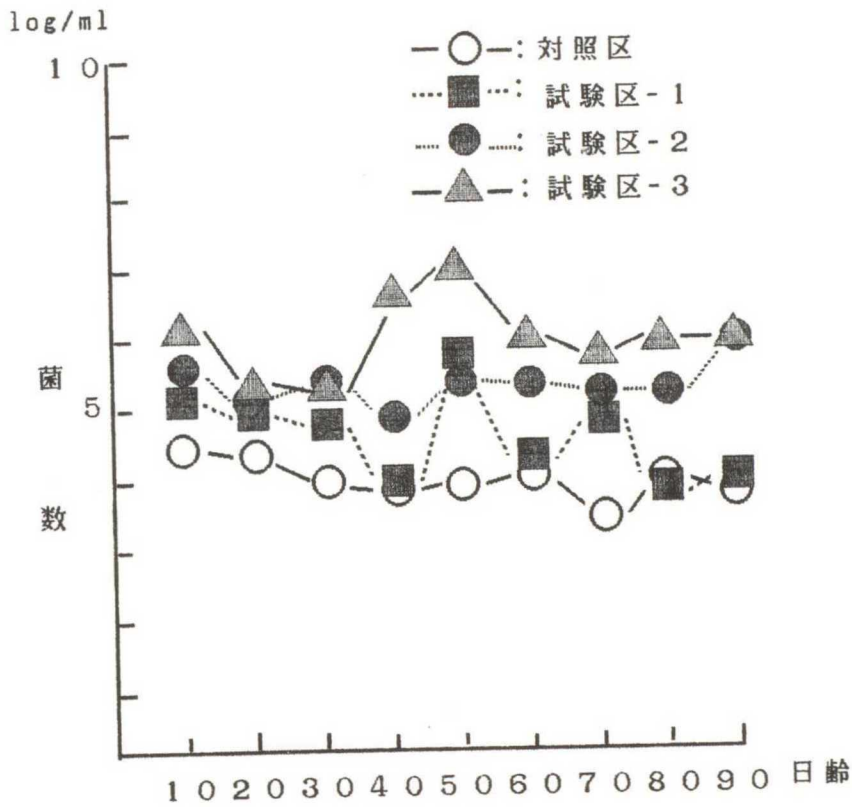


図 I-9 Streptococcus属菌数の推移

表 I-9 *Lactobacillus*属菌数の推移 (log/ml)

	10日齢	20日齢	30日齢	40日齢	50日齢	60日齢	70日齢
対照区	4.1±0.7	3.2±0.7	3.9±0.9	3.2±0.5	^a 3.8±1.1	3.3±0.4	3.4±1.0
試験区 1	4.2±1.8	4.5±1.0	4.4±1.4	4.4±1.1	5.2±0.7	4.7±1.4	3.9±0.7
試験区 2	5.0±1.0	4.5±0.3	3.8±0.7	3.7±1.3 ^a	4.2±1.8	4.9±0.1	4.4±0.9
試験区 3	5.7±1.1	3.8±0.7	4.5±0.9	5.7±0.7 ^b	^b 5.7±0.9	5.4±1.3	5.7±1.4

	80日齢	90日齢
対照区	4.2±0.8	3.5±0.3
試験区 1	4.4±0.7	4.5±0.1 ^{aa}
試験区 2	4.2±0.2	4.9±1.3 ^b
試験区 3	5.4±0.5	5.9±0.5 ^b

同列異符号間に有意差あり (p<0.05)

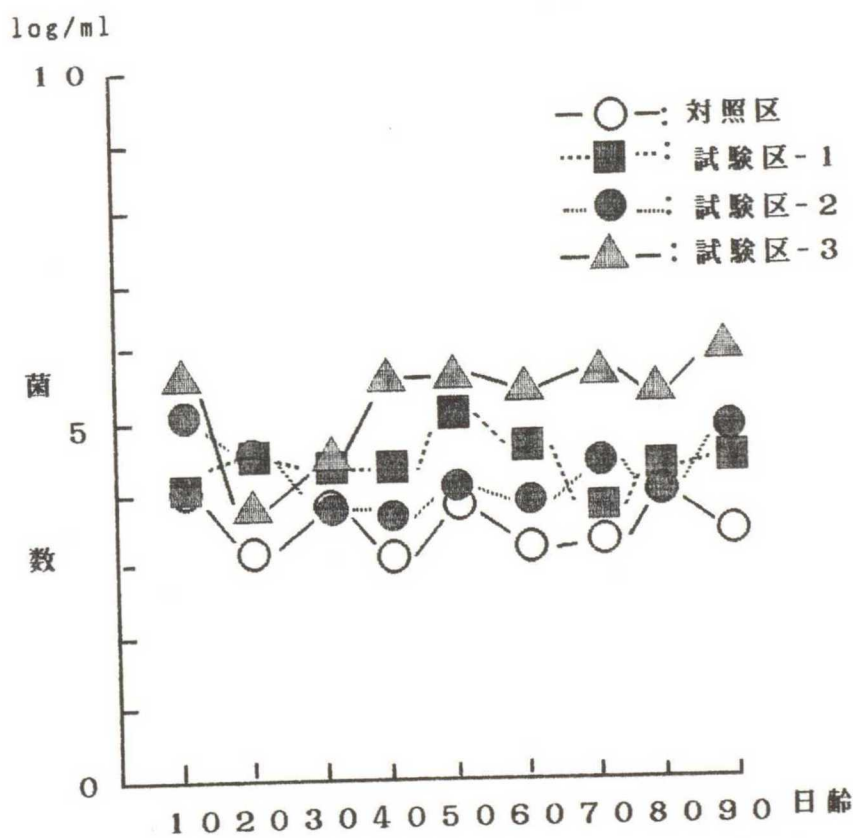


図 I-10 *Lactobacillus*属菌数の推移

表 I-10 メタン生成菌数の推移

(log/ml)

	10日齢	20日齢	30日齢	40日齢	50日齢	60日齢	70日齢
対照区	3.0±1.0	2.8±1.0	4.0±0.0 ^a	2.9±0.8	3.6±0.3	3.3±0.0	3.0±0.3 ^a
試験区 1	3.3±0.3	1.8±1.1 ^a	5.7±0.9	4.4±0.0	6.4±0.0	5.4±1.7	4.4±1.4 ^b
試験区 2	3.7±0.5	4.8±0.2 ^b	3.4±1.8	4.9±0.2	4.9±0.3	2.3±0.0	4.6±1.4 ^b
試験区 3	3.1±1.3	3.7±1.1	5.0±0.5	6.1±0.3	4.2±1.1	4.6±0.6	4.0±2.3 ^b

	80日齢	90日齢
対照区	3.1±1.4	4.1±1.3
試験区 1	5.7±1.0	4.9±1.8
試験区 2	4.8±1.7	3.5±2.2
試験区 3	4.3±1.5	3.5±1.4

同列異符号間に有意差あり (p<0.05)

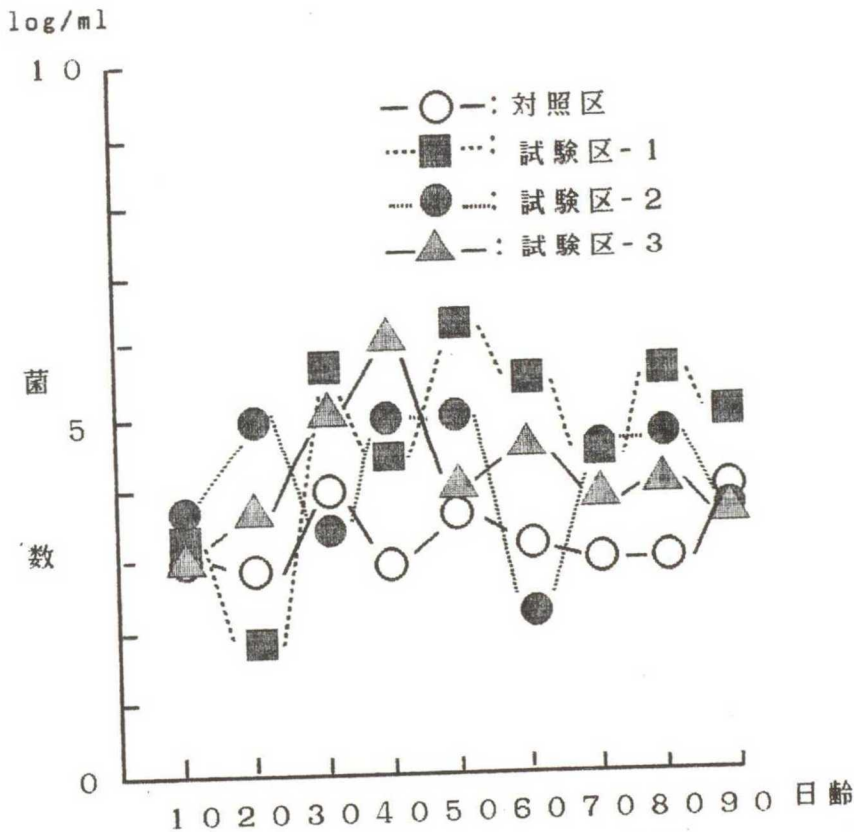


図 I-11 メタン生成菌数の推移

表 1-11 セルロース分解菌数の推移

(log/ml)

	10日齢	20日齢	30日齢	40日齢	50日齢	60日齢	70日齢
対照区	3.4±0.8	3.0±1.2	4.5±2.0	3.0±1.1	4.6±1.2	3.4±0.7 ^a	3.0±1.0 ^a
試験区 1	4.9±1.4	4.0±1.9	3.8±1.2	4.1±0.5	4.9±1.0	5.5±1.3 ^b	5.7±1.7 ^b
試験区 2	5.7±1.1	4.3±1.6	4.5±0.6	4.7±1.1	5.3±1.2	5.6±0.5 ^b	5.5±0.3 ^b
試験区 3	4.3±0.8	3.3±0.7	4.4±1.2	4.8±1.3	4.8±1.6	5.9±0.8 ^b	5.2±1.4

	80日齢	90日齢
対照区	4.5±1.8	4.6±1.4
試験区 1	5.2±0.9	5.0±1.4
試験区 2	5.3±1.1	4.3±0.5
試験区 3	6.1±0.4	5.1±0.5

同列異符号間に有意差あり (p<0.05)

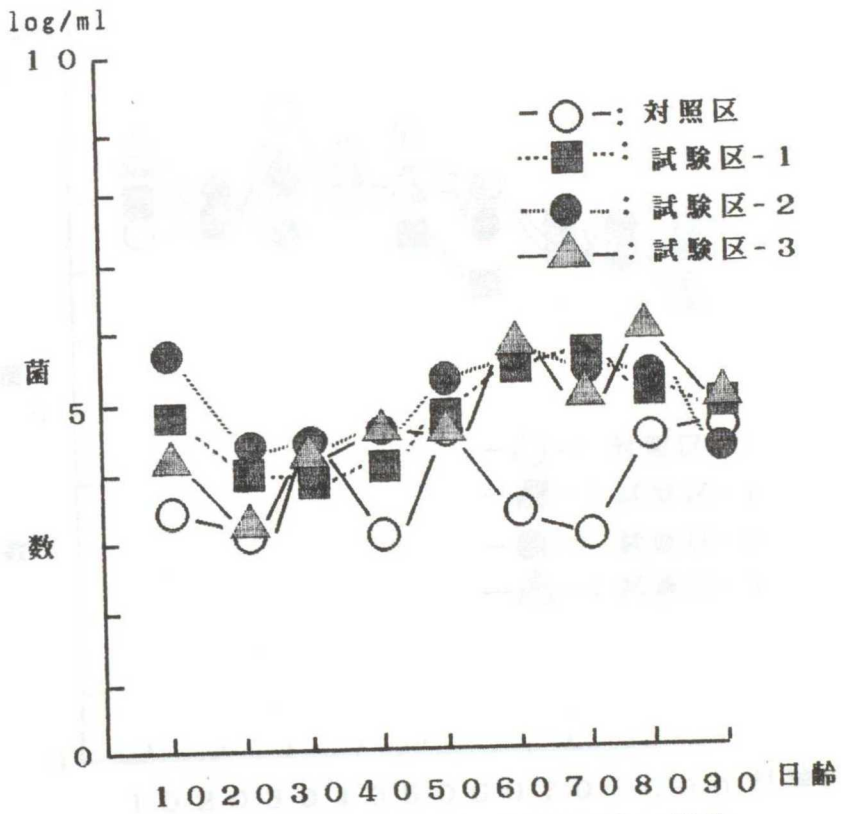


図 1-12 セルロース分解菌数の推移

表 1-12 乳酸利用菌数の推移

(log/ml)

	10日齢	20日齢	30日齢	40日齢	50日齢	60日齢	70日齢
対照区	7.5±0.4	7.6±0.6	9.4±0.0	7.0±7.6	7.6±0.3	8.1±0.0	7.2±0.9
試験区 1	8.0±1.2	7.6±1.4	8.1±0.0	8.4±0.0	7.5±0.5	6.6±0.7	7.5±1.1
試験区 2	8.9±0.3	8.1±1.5	7.4±0.6	7.6±1.3	7.9±0.8	7.5±1.2	7.5±0.8
試験区 3	8.6±1.0	7.7±0.6	8.5±1.1	8.4±0.3	8.3±1.1	8.0±0.9	7.3±0.3

	80日齢	90日齢
対照区	7.5±0.0	7.0±1.0
試験区 1	7.4±0.6	7.2±0.2
試験区 2	7.0±0.5	7.7±0.6
試験区 3	7.3±0.3	6.5±1.4

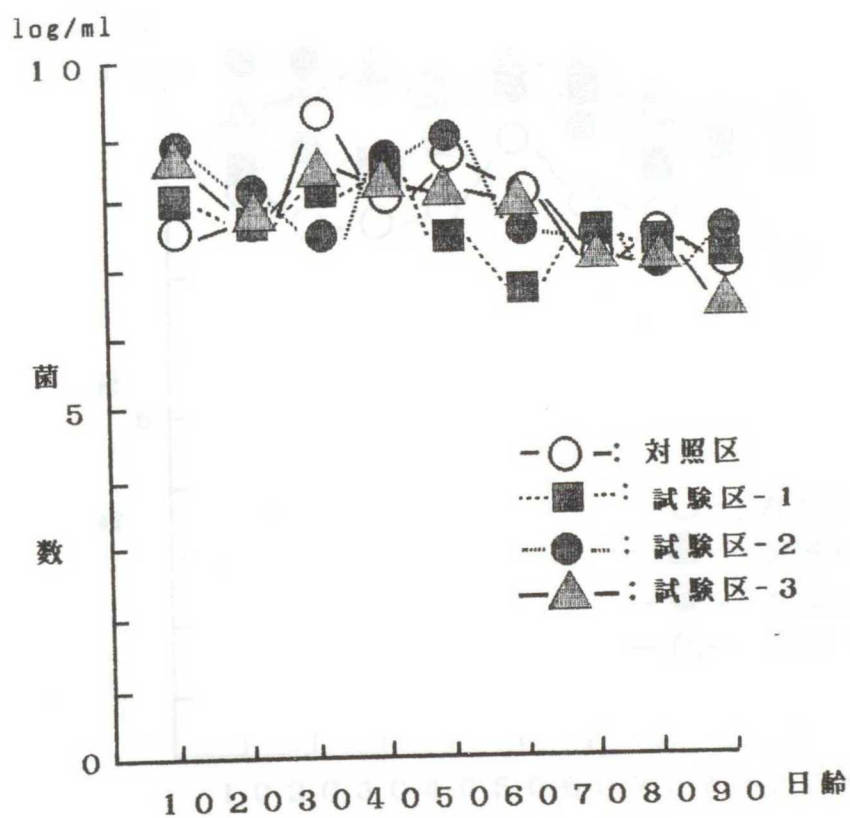


図 I-13 乳酸利用菌数の推移

表 1-14 ペクチン分解菌数の推移

(log/ml)

	10日齢	20日齢	30日齢	40日齢	50日齢	60日齢	70日齢
対照区	8.3±0.9 ^a	7.7±0.7 ^a	7.7±0.5 ^a	8.0±0.3 ^a	9.0±0.8	8.0±0.5 ^a	7.8±1.2
試験区 1	8.6±1.1 ^a	8.9±1.1 ^b	8.7±1.4 ^a	9.1±0.5 ^b	9.7±0.7	9.7±0.8 ^b	8.5±1.6
試験区 2	10.2±.3 ^b	10.2±.7 ^b	9.7±0.5 ^b	9.6±1.1 ^b	9.5±0.6	9.2±0.4 ^b	9.4±0.7
試験区 3	9.5±0.5 ^b	9.7±0.7 ^b	10.0±.4 ^b	9.6±0.8 ^b	10.1±.5	10.1±.4 ^b	9.4±1.2

	80日齢	90日齢
対照区	8.1±0.8	7.2±0.7 ^a
試験区 1	8.8±1.0	8.6±1.2 ^b
試験区 2	9.2±0.4	8.8±0.3 ^b
試験区 3	9.4±0.6	9.5±0.7 ^b

同列異符号間に有意差あり (p<0.05)

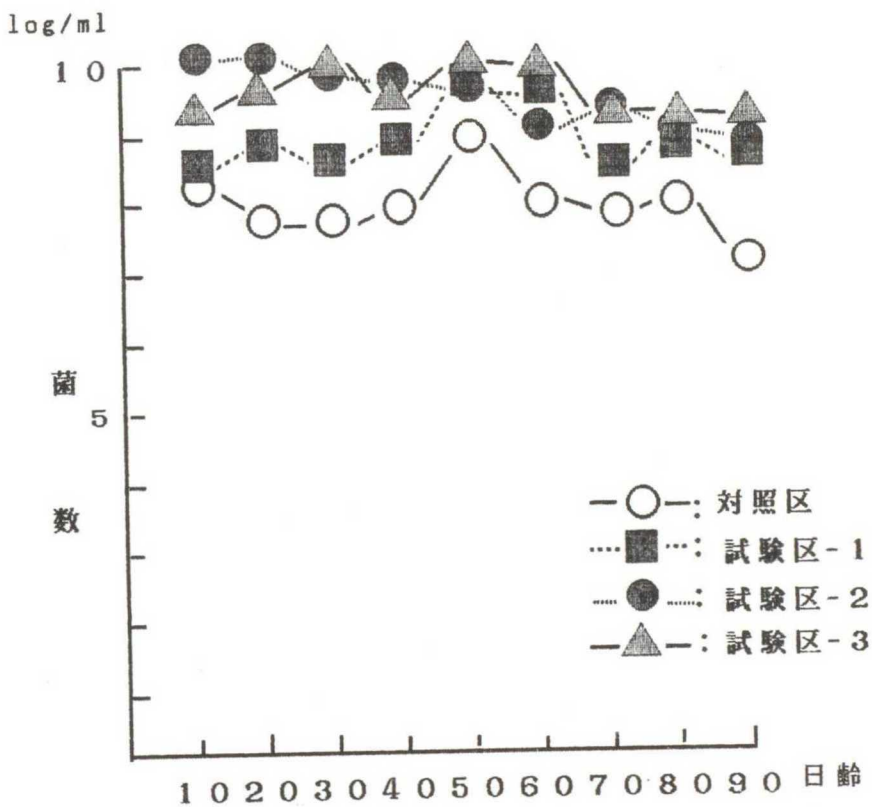


図 I-15 ペクチン分解菌数の推移

表 I-15 澱粉分解菌数の推移

(log/ml)

	10日齢	20日齢	30日齢	40日齢	50日齢	60日齢	70日齢
対照区	9.2±0.8	7.4±0.8 ^a	7.4±0.4 ^a	7.7±0.6 ^a	8.8±0.4 ^a	7.4±1.3 ^a	7.9±1.5
試験区 1	9.3±1.0	9.4±1.0 ^b	9.5±0.6 ^b	9.4±0.6 ^b	9.5±1.5 ^{b a}	9.2±0.9 ^b	9.1±1.3
試験区 2	10.1±.4	9.9±0.3 ^b	9.9±0.6 ^b	9.5±0.9 ^b	9.9±0.4 ^b	9.6±0.3 ^b	9.5±0.5
試験区 3	9.8±0.4	9.9±0.1 ^b	10.1±.7 ^b	9.6±1.0 ^b	9.9±0.4 ^b	9.9±0.6 ^b	9.4±0.9

	80日齢	90日齢
対照区	8.0±1.0	7.4±0.9 ^a
試験区 1	9.0±1.1	8.8±0.9
試験区 2	9.2±0.6	9.0±0.2 ^b
試験区 3	9.7±0.5	9.8±0.5 ^b

同列異符号間に有意差あり (p<0.05)

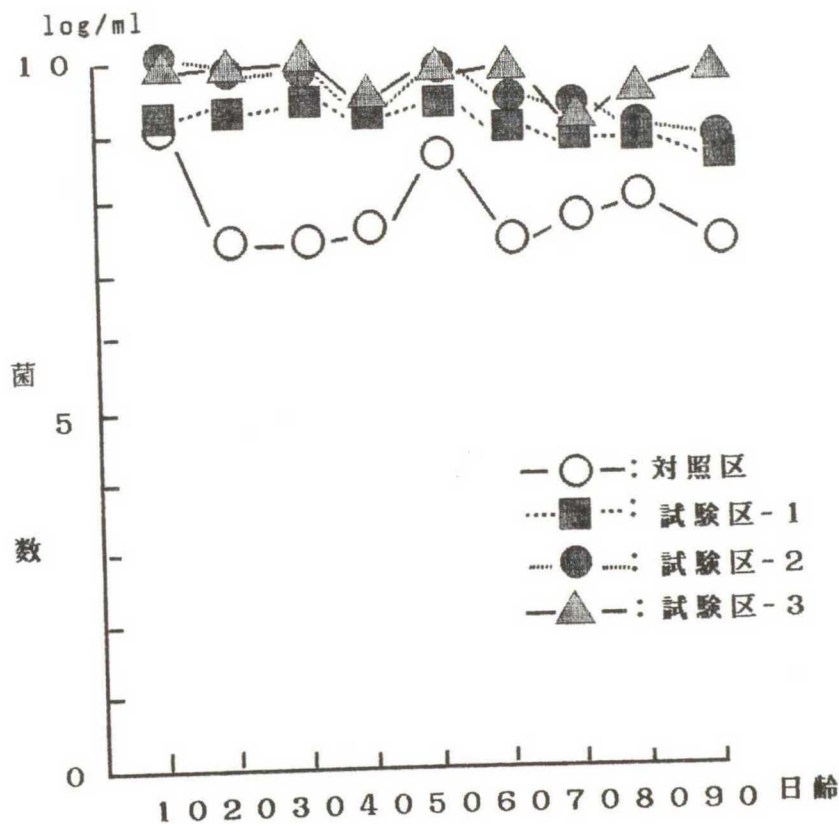


図 I-16 澱粉分解菌数の推移

表1-16 ルーメン内細菌のルーメン壁への付着状況

	背部	左側壁	右側壁	底部
対照区	+1	+1	+1	+1
試験区-1	+1	+3	+3	+3
試験区-2	NT	+2	+2	+3
試験区-3	NT	NT	+3	+3

NT：材料なし

+1：10 μm^2 当たりルーメン内細菌10個以内の付着が認められた。

+2：10 μm^2 当たりルーメン内細菌10~20個の付着が認められた。

+3：10 μm^2 当たりルーメン内細菌20個以上の付着が認められた。

表 I-17 プロトゾア数の推移

(log/ml)

	10日齢	20日齢	30日齢	40日齢	50日齢	60日齢	70日齢
対照区	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.6±1.4	3.2±2.9
試験区 1	3.3±2.04	0.8±1.8	1.9±1.8	0.7±1.6	0.8±1.8	1.9±2.7	2.8±2.6
試験区 2	3.8±2.2	3.4±2.1	3.4±2.1	2.6±2.7	2.0±2.8	2.2±2.0	3.8±2.4
試験区 3	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.7±1.6	1.3±1.8	0.7±1.6	0.7±1.6

	80日齢	90日齢
対照区	4.2±2.4	5.6±0.6 ^a
試験区 1	3.4±3.1	3.6±3.3
試験区 2	4.9±1.3	5.1±1.1 ^a
試験区 3	0.8±1.9	1.0±2.4 ^b

同列異符号間に有意差あり (p < 0.05)

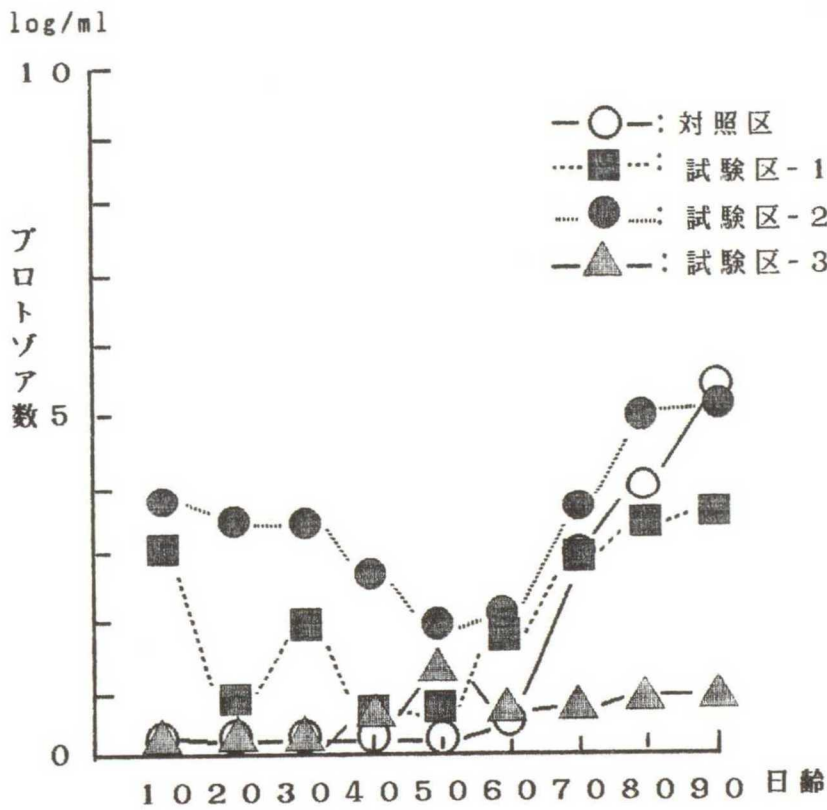


図 I-17 プロトゾア数の推移

表 I-18 ルーメン内容液の pH の推移

	10日齢	20日齢	30日齢	40日齢	50日齢	60日齢
対照区	6.1±0.7	6.4±0.7	6.2±0.9	6.5±0.5	6.6±0.6	6.7±0.3
試験区 1	6.9±0.1	6.4±0.5	5.9±0.6	5.8±0.7	7.0±0.1	6.5±0.3
試験区 2	6.6±0.6	6.3±0.3	6.2±0.6	6.2±0.8	6.3±0.6	6.9±0.3
試験区 3	6.7±0.4	5.7±0.3	6.5±0.8	6.8±0.4	7.1±0.2	6.5±0.1

	70日齢	80日齢	90日齢
対照区	6.8±0.3 ^a	7.1±0.1	7.1±0.2
試験区 1	7.1±0.1	6.9±0.4	7.1±0.2
試験区 2	7.3±0.2 ^b	7.0±0.2	6.9±0.3
試験区 3	7.1±0.2	7.5±0.2	6.9±0.1

同列異符号間で有意差あり (p<0.05)

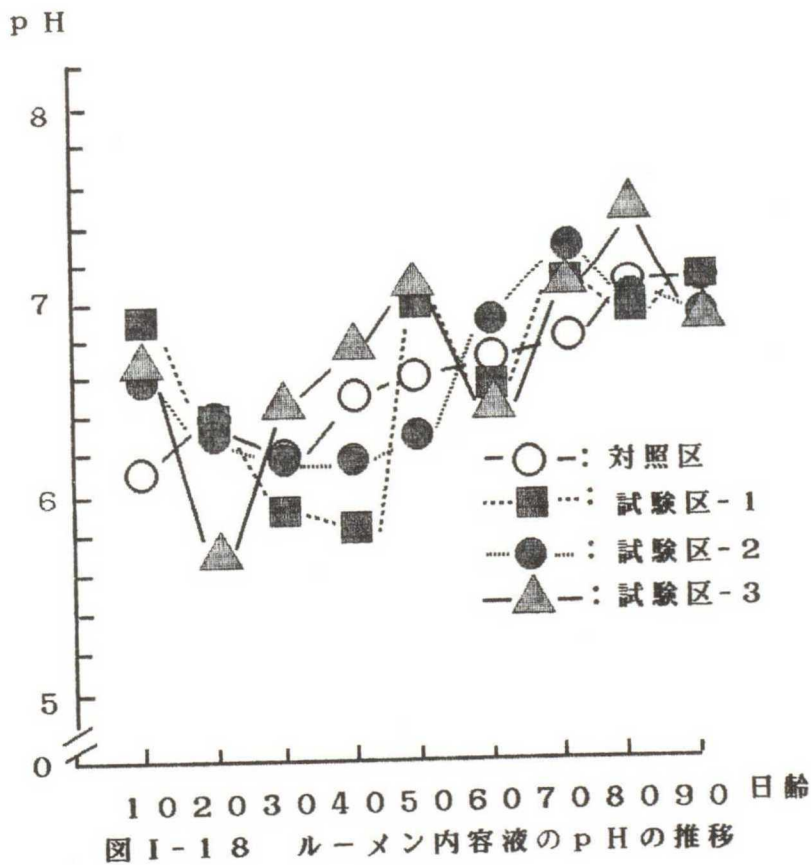


表 I-19 総揮発性脂肪酸 (VFA) 濃度の推移

(mM/dl)

	10日齢	20日齢	30日齢	40日齢	50日齢	60日齢	70日齢
対照区	2.5±0.8	3.1±1.0 ^a	4.4±1.8	4.7±1.8 ^a	5.3±1.5	5.2±2.5	5.0±2.6
試験区 1	3.9±1.9	7.1±2.7 ^b	7.5±2.9	7.9±2.8 ^a	6.7±2.3	4.6±1.9	5.3±2.0
試験区 2	3.7±1.4	7.2±2.1 ^b	7.5±1.6	6.1±2.7 ^b	7.3±2.1	4.4±1.8	5.2±1.2
試験区 3	4.2±2.4	6.1±1.0	7.5±2.6	6.3±2.5	4.6±0.9 ^b	4.3±1.0	4.7±2.2

	80日齢	90日齢
対照区	3.9±2.5	4.9±1.9
試験区 1	4.9±1.1	5.5±1.7
試験区 2	5.9±1.1	5.1±0.8
試験区 3	4.0±1.4	4.0±2.0

同列異符号間で有意差あり (p<0.05)

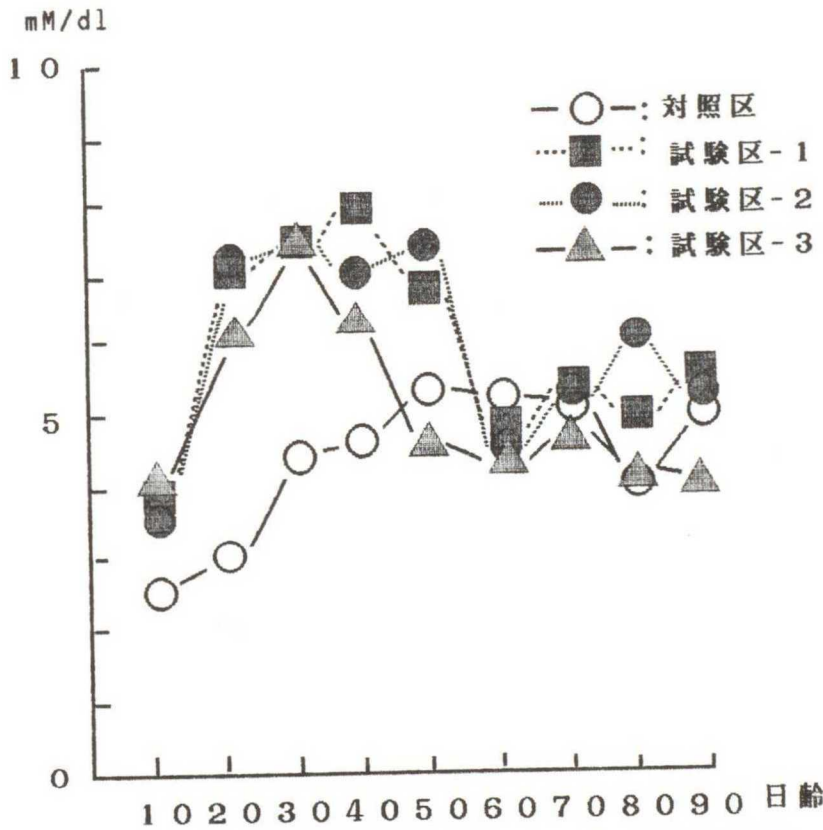


図 I-19 総揮発性脂肪酸 (VFA) 濃度の推移

表 I-20 VFA中の酢酸比率の推移

(Mol%)

	10日齢	20日齢	30日齢	40日齢	50日齢	60日齢
対照区	75.0±6.8	66.1±4.7	71.0±5.9 ^a	67.7±5.5	64.5±8.2	66.1±3.2
試験区 1	72.7±13.2	61.1±7.6	65.5±10.9 ^b	63.5±8.8	65.8±12.6	61.7±10.8
試験区 2	61.3±9.6	55.1±10.4	54.0±5.5 ^b	59.4±10.6	55.0±5.9	63.8±6.7
試験区 3	66.6±13.8	52.7±7.5	55.8±5.7 ^b	55.7±3.2	57.4±2.5	61.7±6.8

	70日齢	80日齢	90日齢
対照区	65.5±4.0	65.7±6.4	66.7±3.5
試験区 1	63.2±10.1	64.1±1.8	64.1±2.9
試験区 2	60.4±4.0	60.9±7.3	65.3±2.5
試験区 3	58.9±6.0	61.3±5.4	61.1±3.2

同列異符号間で有意差あり (p<0.05)

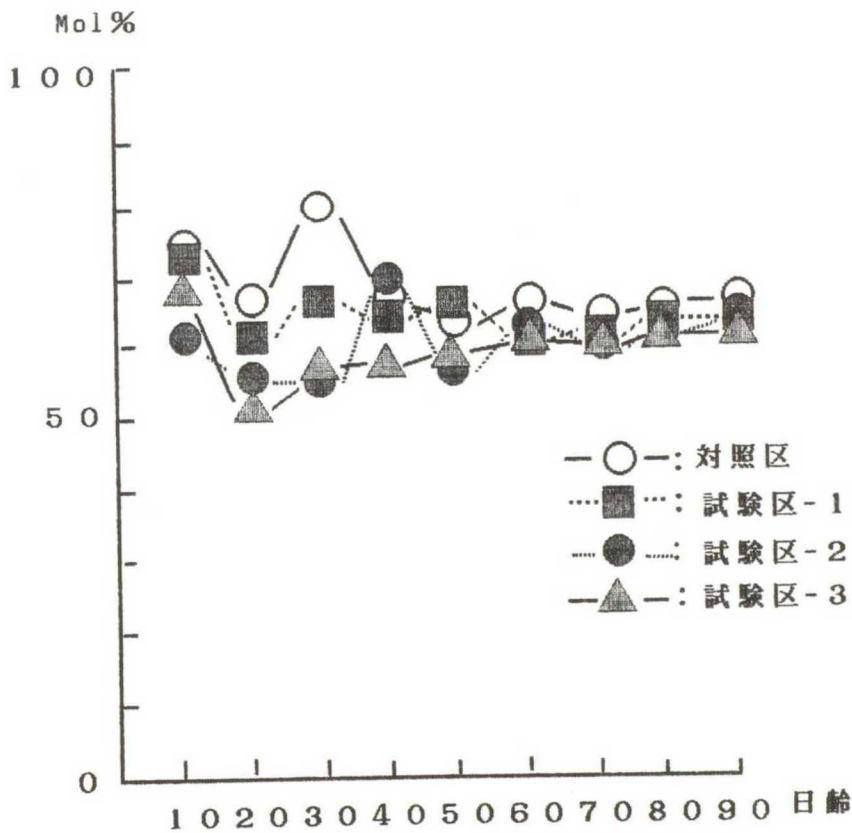


図 I-20 VFA中の酢酸比率の推移

表 I-21 VFA中のプロピオン酸比率の推移

(Mol%)

	10日齢	20日齢	30日齢	40日齢	50日齢	60日齢
対照区	17.6±7.5	21.8±6.2	19.6±2.3 ^a	20.1±3.5	22.6±6.0	20.0±5.9
試験区 1	18.7±5.9 ^a	23.9±9.4	24.9±6.5	19.0±4.5 ^a	24.6±10.6	21.3±5.5
試験区 2	27.3±7.4	31.1±8.8	31.9±7.2 ^b	26.7±9.0	29.4±6.1	24.1±6.3
試験区 3	29.7±6.1 ^b	28.6±5.2	27.0±5.0	28.8±1.8 ^b	28.6±3.5	22.3±5.1

	70日齢	80日齢	90日齢
対照区	21.9±2.7	20.0±2.5 ^a	17.9±1.6
試験区 1	19.8±6.7	19.4±1.7 ^a	18.1±2.9
試験区 2	26.2±13.6	22.2±8.3 ^b	18.0±1.3
試験区 3	21.9±6.0	23.6±3.2 ^b	18.2±6.6

同列異符号間で有意差あり (p<0.05)

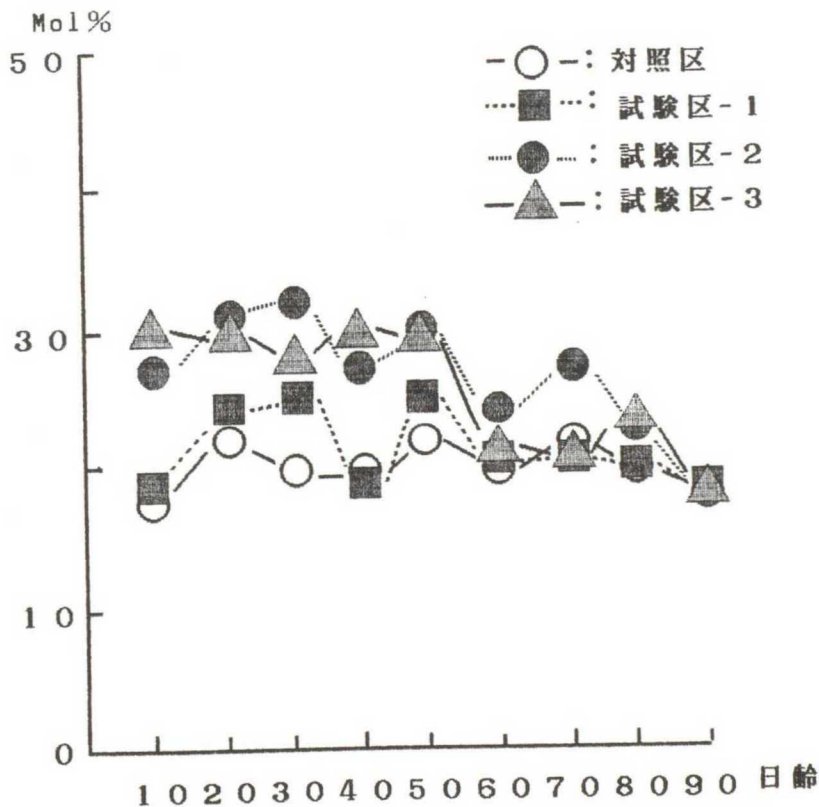


図 I-21 VFA中プロピオン酸比率の推移

表 I-22 VFA中の酪酸比率の推移

(Mol%)

	10日齢	20日齢	30日齢	40日齢	50日齢	60日齢
対照区	7.8±5.7	10.2±5.8	5.9±4.2	8.7±1.7	9.4±3.4	10.8±4.7
試験区 1	6.1±6.4	11.3±12.0	12.0±3.2	12.4±9.2	9.2±2.3	12.2±4.0
試験区 2	9.6±4.8	10.5±2.0	11.0±2.1	11.0±3.8	10.3±6.1	9.5±4.5
試験区 3	8.1±3.2	13.6±4.3	11.7±4.8	11.5±2.0	10.1±1.5	12.1±2.0

	70日齢	80日齢	90日齢
対照区	9.6±1.8	9.5±1.7	13.4±3.1
試験区 1	12.3±2.4	12.8±3.5	12.5±2.2
試験区 2	10.4±4.0	12.7±2.7	12.3±2.0
試験区 3	13.4±1.3	12.4±2.4	13.6±6.6

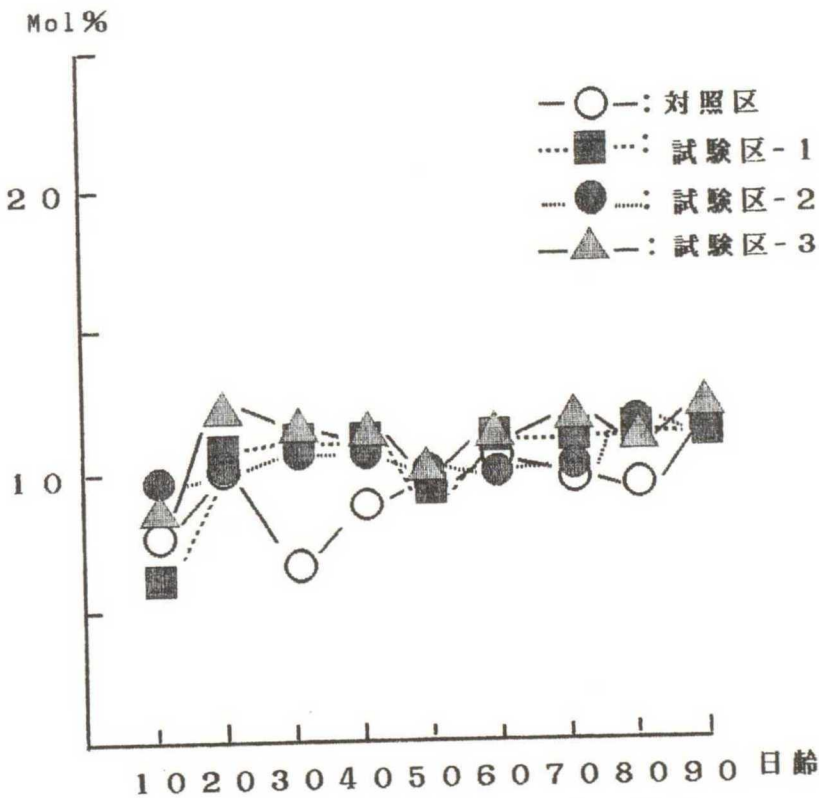
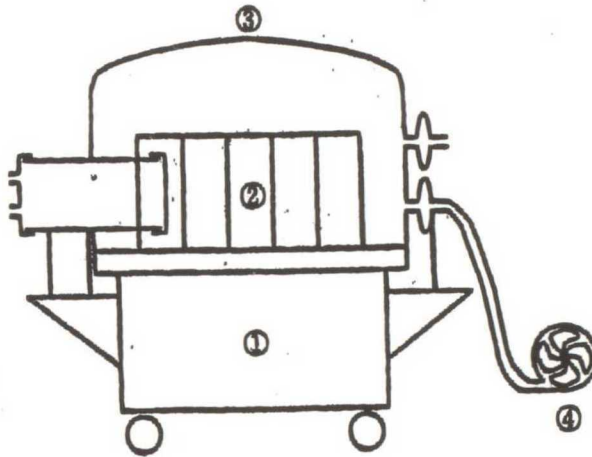


図 I-22 VFA中の酪酸比率の推移



- | | |
|--------------|--------|
| ① ステンレススチール槽 | ② 保護槽 |
| ③ ビニールチャンバー | ④ 送風装置 |

図11-1 シバヤギ用に改良したブタ飼育用アイソレータ (略図)

表 II-1 ルーメン細菌の経口投与のスケジュール

細菌投与日齢	35日齢 ↓	36日齢 ↓	38日齢 ↓	39日齢 ↓	56日齢(安楽殺)
1. 17×10^{10}	↓ <i>S. bovis</i>				
5. 30×10^{10}	<i>L. plantarum</i>	↓			
7. 00×10^8		<i>V. alcalescens</i>			
1. 95×10^9		<i>M. elsdenii</i>			
7. 80×10^{10}			↓		
5. 50×10^{10}			<i>B. fibrisolvens</i>		
2. 28×10^{10}			<i>P. ruminicola ss. brevis</i>		
7. 05×10^9			<i>E. faecium</i>		
1. 25×10^{10}				↓	
				<i>R. amylophilus</i>	
				<i>R. albus</i>	

表 II-2 特定細菌種の消化管内の各部位での菌数

細菌	ルーメン	盲腸	直腸
総菌数	$4.47 \times 10^9/g$	$3.05 \times 10^8/g$	$2.95 \times 10^9/g$
<i>M. elsdenii</i>	$8.0 \times 10^5/g$	$1.6 \times 10^6/g$	$2.0 \times 10^6/g$
<i>V. alcalescens</i>	$9.1 \times 10^7/g$	$1.0 \times 10^5/g$	$10^4/g$ 以下
<i>S. bovis</i>	$8.9 \times 10^8/g$	$2.8 \times 10^6/g$	$7.1 \times 10^6/g$
<i>E. faecium</i>	$3.9 \times 10^5/g$	$1.0 \times 10^6/g$	$1.8 \times 10^6/g$
<i>L. plantarum</i>	$9.6 \times 10^6/g$	$1.6 \times 10^6/g$	$2.8 \times 10^6/g$

表 II-3 ルーメン細菌投与後 3 週目におけるルーメン細菌構成および構成比

①	<i>S. bovis</i>	$1.78 \times 10^9 / \text{g}$ (48.56%)
②	<i>B. fibrisolvens</i>	$2.20 \times 10^8 / \text{g}$ (6.00%)
③	<i>R. amylophilus</i>	$6.70 \times 10^8 / \text{g}$ (18.28%)
④	<i>P. ruminicola ss. brevis</i>	$8.94 \times 10^8 / \text{g}$ (24.39%)
⑤	<i>E. faecium</i>	$3.90 \times 10^5 / \text{g}$ (0.01%)
⑥	<i>M. elsdenii</i>	$8.00 \times 10^5 / \text{g}$ (0.02%)
⑦	<i>V. alcalescens</i>	$9.10 \times 10^7 / \text{g}$ (2.48%)
⑧	<i>L. plantarum</i>	$9.60 \times 10^6 / \text{g}$ (0.26%)
⑨	<i>R. albus</i>	0.00 (0.00%)

表 II-4 ノトバイオートシバヤギの消化管各部位の揮発性脂肪酸濃度と組成

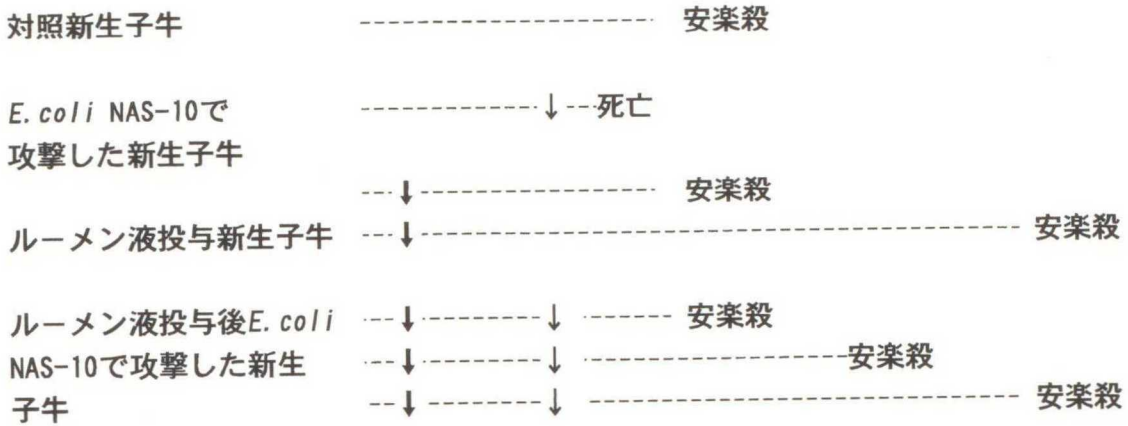
部 位	組 成 (モル比)					総揮発性脂肪酸濃度 (mM/dl)
	酢酸	プロピオン酸	酪酸	吉草酸	カプロン酸	
盲 腸	78.7	9.1	11.9	0.3	0.0	9.56
直 腸	76.1	15.2	8.7	0.0	0.0	9.15

表 II-5 ノトバイオトシバヤギおよび慣行飼育ホルスタイン子牛のルーメン内揮発性脂肪酸濃度と組成

	頭数	組 成 (モル比)					総揮発性脂肪酸濃度 (mM/dl)
		酢酸	プロピオン酸	酪酸	吉草酸	カロン酸	
子 牛*	5	66.1	20.5	10.8	1.1	0.6	5.20
ノトバイオトシバヤギ	1	59.5	26.6	8.5	3.5	1.9	2.59

* : 石川県畜産総合センター繋養子牛 (60日齢)

表 III-1 ルーメン液投与後 *E. coli* NAS-10 攻撃スケジュール



↓ : ルーメン液投与
↓ : *E. coli* NAS-10 投与

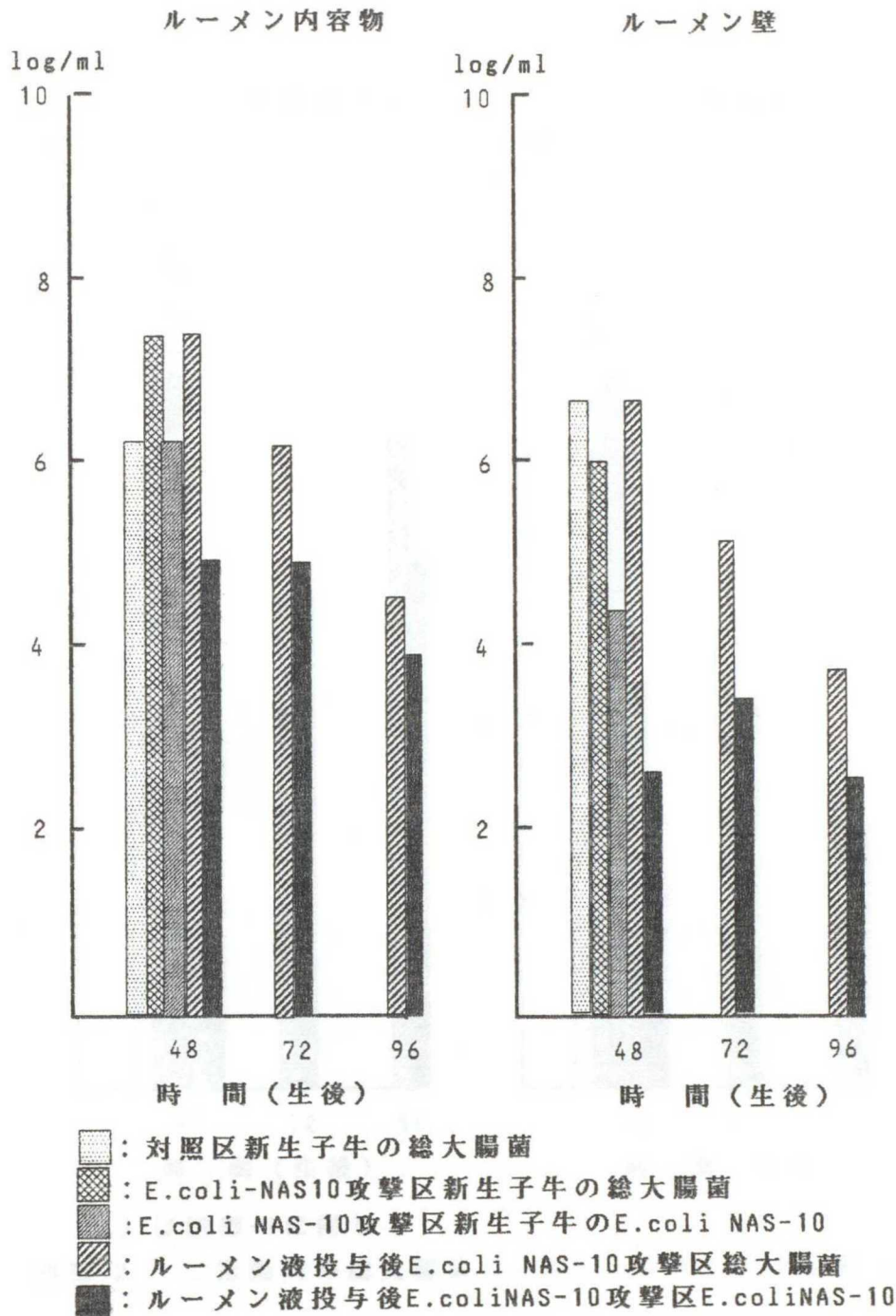
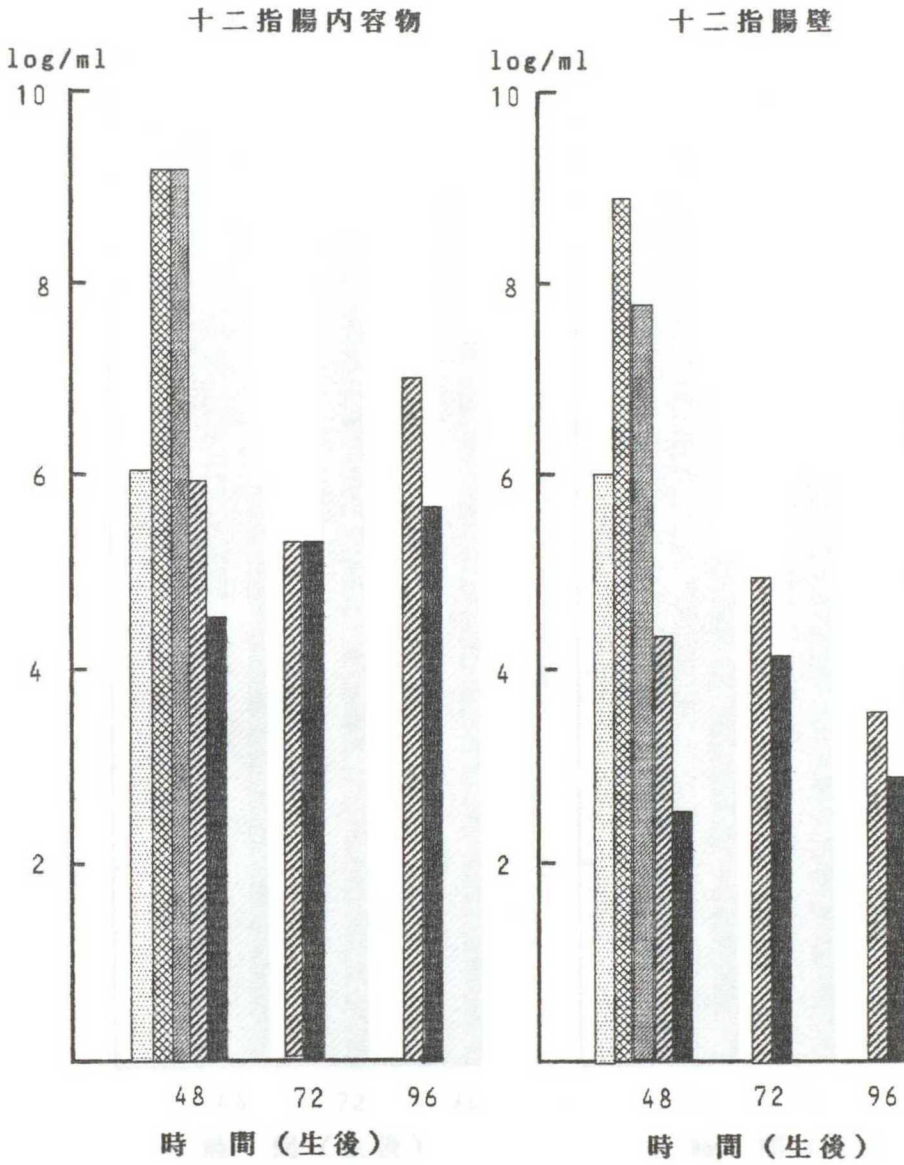
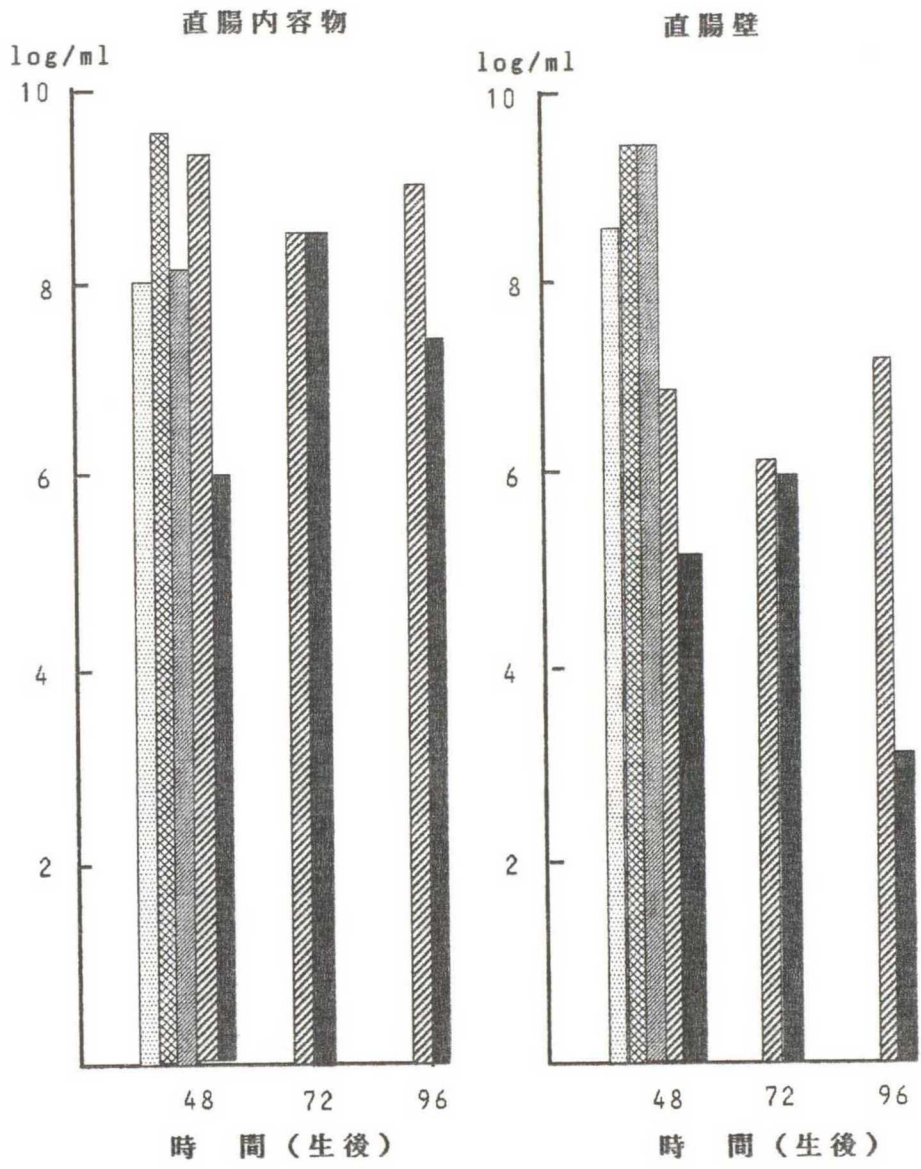


図 III-1 ルーメン内の大腸菌およびE.coliNAS-10の菌数分布



注) は図Ⅲ-1に同じ

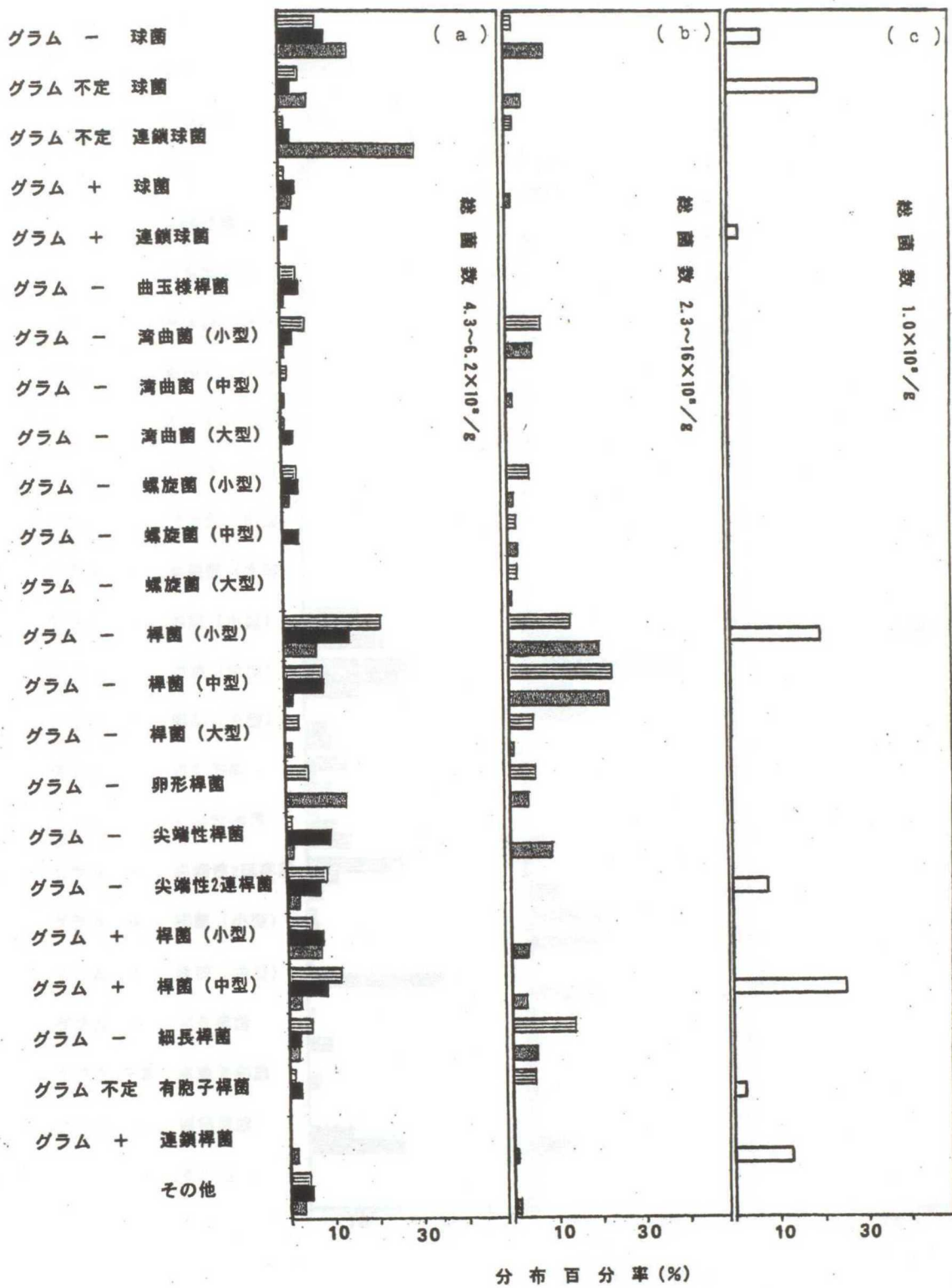
図Ⅲ-2 十二指腸内の総大腸菌およびE.coliNAS-10の菌数分布



注) は図Ⅲ-1に同じ
 図Ⅲ-3 直腸内の総大腸菌およびE.coliNAS-10の菌数分布

表Ⅲ-2 各試験区の新生子牛の消化管内におけるVFAおよびnon-VFAの濃度

試験区	内容物	VFA (mM/dL)			non-VFA (mM/dL)		
		酢酸	プロピオン酸	酪酸	吉草酸	カブロン酸	乳酸
対照新生子牛 (生後48時間目)	ルーメン 十二指腸 直腸	0.9				0.5	0.4
						3.3	0.6
E. coli NAS-10で攻撃 した新生子牛 (生後24時間目)	ルーメン 十二指腸 直腸	1.6	0.3	0.1	0.03	0.1	1.7
							0.02
ルーメン液投与新生子牛	生後48時間目 ルーメン 十二指腸 直腸	1.0	0.3	0.1		0.9	0.1
						3.1	0.2
						1.4	1.4
生後96時間目	ルーメン 十二指腸 直腸	2.4	0.7	0.2		0.9	0.1
						0.9	0.1
						1.5	0.1
生後48時間目	ルーメン 十二指腸 直腸	1.0	0.3	0.01		0.1	0.02
						1.5	0.1
						1.1	1.1
ルーメン液投与後E. coli NAS-10で攻撃した新生 子牛	生後72時間目 ルーメン 十二指腸 直腸	0.6	0.3	0.1		1.4	3.6
						2.9	1.2
生後96時間目	ルーメン 十二指腸 直腸	1.5	0.2	0.1	0.04	0.8	0.1
						1.8	0.5
						0.9	2.9



(a)ルーメン液投与後E. coli NAS-10攻撃の試験区
 (b)ルーメン液投与の試験区
 (c)E. coli NAS-10攻撃の試験区

≡: ルーメン液投与後48時間目の新生子牛
 ■: ルーメン液投与後72時間目の新生子牛
 ▨: ルーメン液投与後96時間目の新生子牛

図 Ⅲ-4 新生子牛のルーメン内における細菌構成パターン

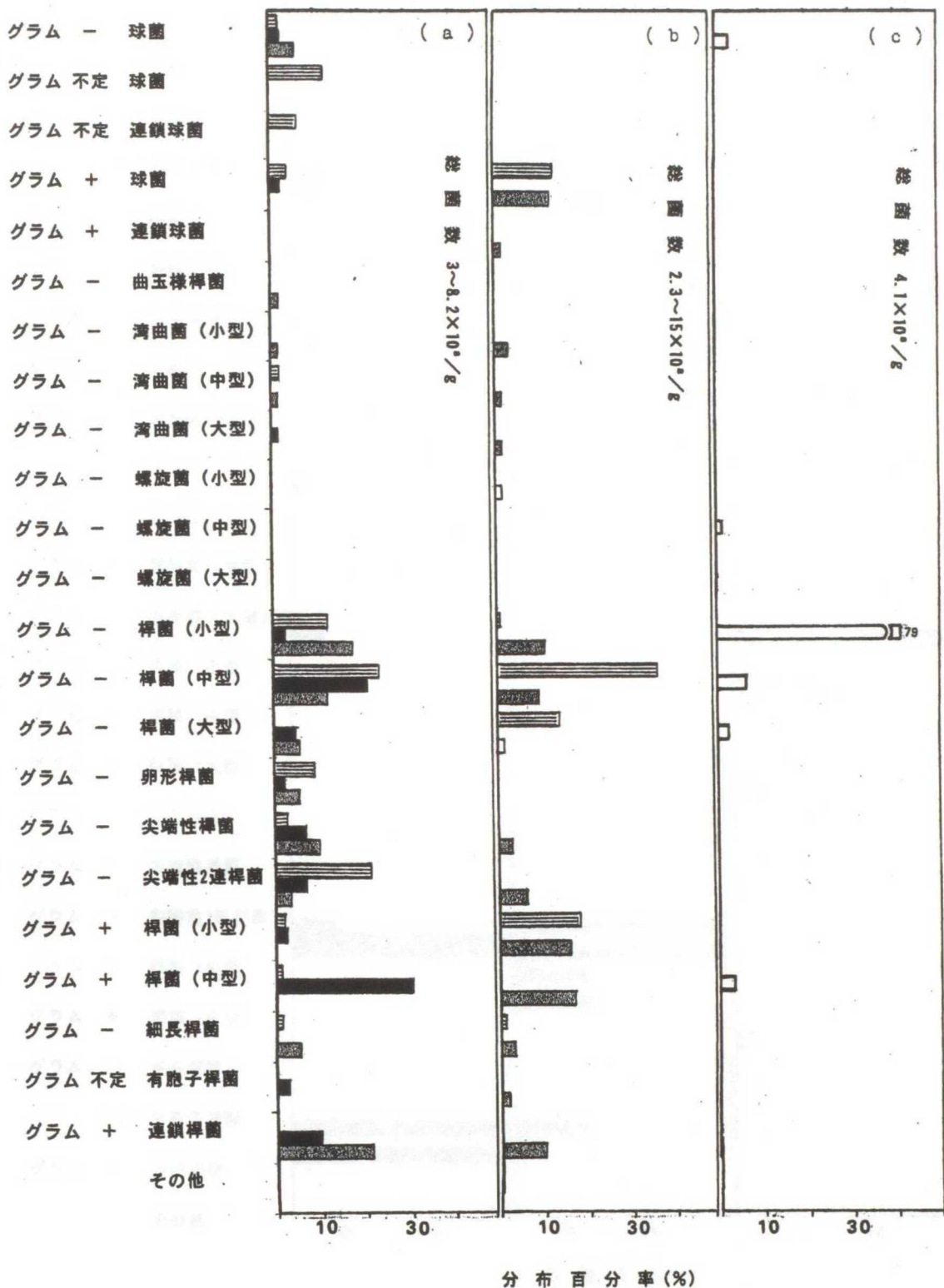


図 III-5 新生子牛の十二指腸内における細菌構成パターン

注) は図 III-4に同じ

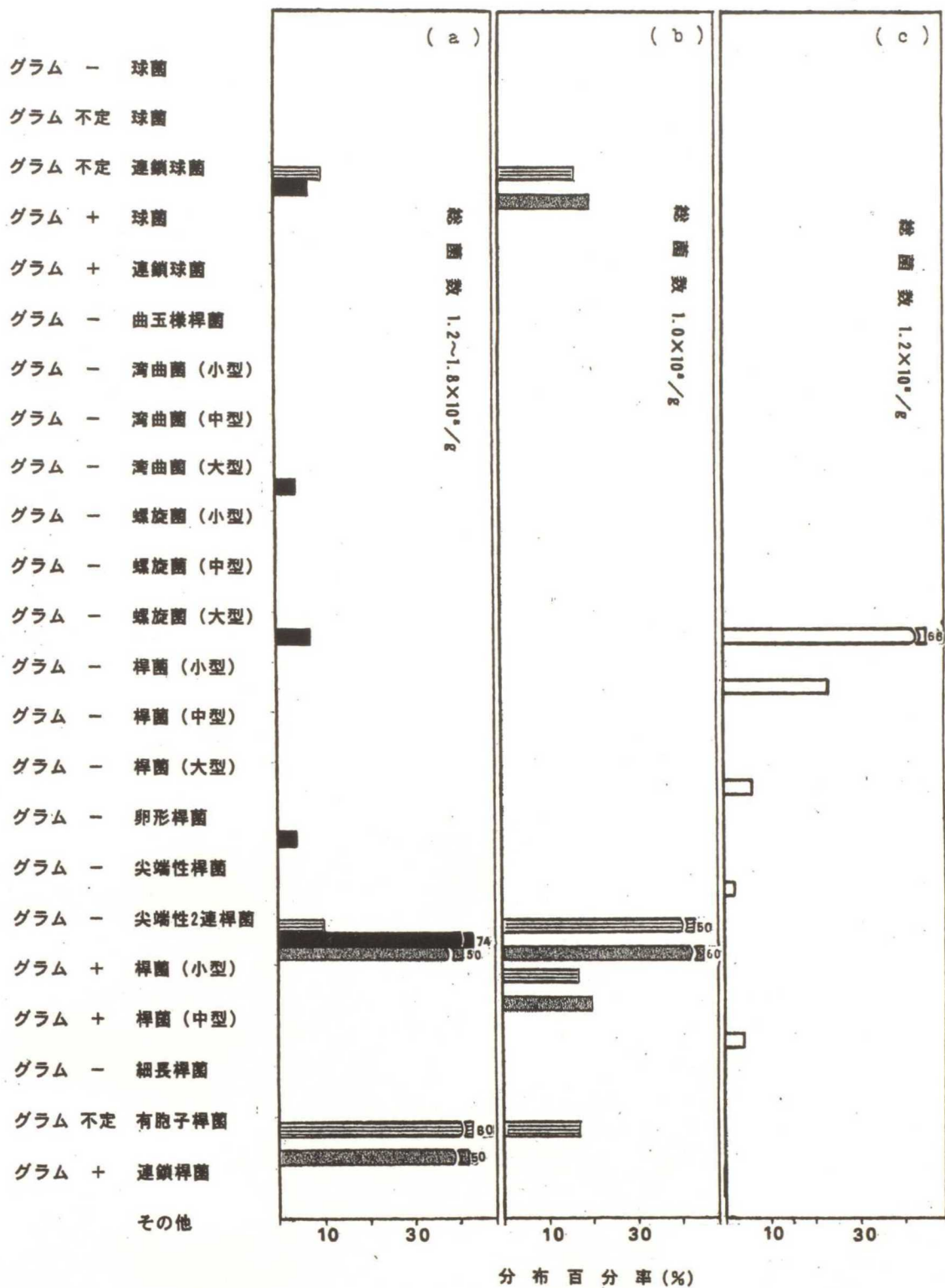


図 III-6 新生子牛の直腸内における細菌構成パターン

注) は図 III-4に同じ