



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	イオノフォア抗生物質サリノマイシンの反芻家畜栄養への作用機序に関する研究
Author(s)	小林, 泰男
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(農学)
Dissertation Number	乙第3938号
Issue Date	1991-06-28
DOI	https://doi.org/10.11501/3085857
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/32781
Type	doctoral thesis
File Information	3938.pdf



イオノフォア抗生物質サリノマイシンの 反芻家畜栄養への作用機序に関する研究

小 林 泰 男

イオノフォア抗生物質サリノマイシンの
反芻家畜栄養への作用機序に関する研究

小 林 泰 男

目次

第1編 緒論-----	1
第2編 サリノマイシンに対する発育成績とルーメン発酵の応答-----	8
第1章 肥育牛における発育成績とルーメン発酵の反応-----	8
材料および方法-----	8
結果-----	10
考察-----	17
第2章 哺育・育成牛における発育成績とルーメン発酵の反応-----	21
材料および方法-----	21
結果-----	24
考察-----	29
第3章 哺育・育成牛におけるルーメン微生物叢の反応-----	33
材料および方法-----	33
結果-----	36
考察-----	44
第3編 サリノマイシンの作用機序-----	47
第1章 ルーメン内消化・発酵におよぼす影響とその持続性-----	47
材料および方法-----	48
結果-----	49
考察-----	57
第2章 ルーメン内脱アミノ反応におよぼす影響-----	61
材料および方法-----	61
結果-----	63
考察-----	71
第3章 飼料の消化管内通過と養分利用におよぼす影響-----	74
材料および方法-----	74

結果-----	75
考察-----	78
第4章 消化管部位別にみた養分利用におよぼす影響-----	81
材料および方法-----	81
結果-----	82
考察-----	87
第4編 総合考察-----	91
要約-----	98
謝辞-----	101
参考文献-----	102

第 1 編 緒 論

反芻動物の分化とその栄養生理学的特徴

現在、地球上に棲息する植食哺乳類はその種も個体数も多い。その繁栄の主因は、地上いたるところに存在する樹木茎葉、野草、種子、果実および根等を食し、生命活動を営むことができる点にある。このような食性を可能ならしめたのは、彼らの進化にともないその消化管内環境に適応・定着した繊維質利用性微生物である。恒温動物の消化管は、本来微生物にとり安定したしかも増殖のための栄養源に富む場であったが、現存のような宿主との高度な共生関係が確立するには長い年月を要した。すなわち植食性への分化は中生代白亜期後期から新生代第三期暁新世（約6500万年前）にはじまり⁸⁸⁾、基本的には食する植物の種類や地域環境に徐々に適応しながら特有の消化器官と微生物叢を発達させ種の分化に至った。

今日までに家畜化された植食哺乳類の内、反芻動物は種の数も多く、全家畜個体数に占める割合も極めて高い。また産業的貢献度からしても他の動物の比ではないほどヒト社会への関与が深い²⁹⁾。反芻動物の分化は第三期始新世におこった⁸⁸⁾が、他の植食哺乳類（後腸発酵者）と決定的に異なるのは膨大な容積を持つ発酵槽としての前胃を獲得したところにある。この形質獲得と同時にまたはその後徐々に備えられていった前胃発酵者のもついくつかの有利性をあげてみると以下ようになる。

1. 多量の飼料を一度に食いだめできる。
2. 反芻再そしゃくによる飼料の物理的分解と微生物による分解が共同し、飼料成分のさらなる抽出・利用が可能となる。
3. 微生物の発酵・増殖の場が宿主の主な吸収の場である腸より前にあるため、増殖した微生物自体が家畜の栄養源として利用されうる。
4. 唾液成分等の働きにより微生物生育環境の制御が比較的容易となる。
5. 盲・結腸より外界に近いことから微生物叢がより複雑となり、緻密な代謝系が確立された結果、より安定かつ適応性に富む発酵槽となりうる。
6. 子孫への微生物叢の伝播が容易となる。

このような有利性を基盤に反芻動物はしだいにそのpopulation sizeを拡大していったものと推察される。家畜化された反芻動物の代表的なものとしてウシ、ヒツジ、

ヤギ等があげられる。彼らの前胃は第一胃（ルーメン）および第二・三胃（容積的にはルーメンよりはるかに小さい）からなり、ルーメン内容物中には約30種におよぶ細菌が $10^{10-11}/\text{ml}$ 、3科22属も知られる原生動物（プロトゾア）が $10^5-6/\text{ml}$ 棲息し、さらに少数の真菌等を含めた一大生態系が形成されている。この様な膨大な規模の微生物共存系は、地球広しと言えどもルーメン以外他に例を見ない⁶⁸⁾といわれている。この生態系は、基本的にはある特定の種のみ的大幅な増殖を決して許さない一方、ある種が生産した代謝産物をその他の種が利用する形で除去し、双方の適度の増殖が保証されるというような相互関係が高度かつ複雑に確立されたもので、反芻動物の食性に応じて構築された絶妙な栄養システム⁵⁶⁾の一環としてとらえることができる。

ルーメン発酵制御の意義と制御法の模索

このように精緻なシステムの一部とみなせるルーメンの代謝様式を人為的に制御し、人類の需要および飼料生産条件にみあった家畜生産をより効率的に行うことを最終目的として、近年様々な試みがなされてきている。古くは飼料の給与回数⁵⁸⁾の増加や緩衝成分を補給⁹³⁾することで発酵速度の均一化ないしは微生物叢の安定化がはかられた。しかしこれらはいずれもルーメン微生物活性の間接的な制御に外ならない。最近はより積極的にその制御をはかるため、いくつかの方法が開発されてきた。それらの主体は化学物質の適用であり、その物質自体が直接微生物叢や代謝様式に改変をもたらす方向で作用する。この様な制御法についてはすでにいくつかの総説^{20, 133)}で紹介されている。

化学物質による制御の方法は主に以下に示す4点に集約できる。すなわち、1)メタン生成抑制、2)プロピオン酸産生促進、3)タンパク質、ペプチド、アミノ酸の分解抑制、4)微生物成長因子等の補給、である。反芻家畜のメタン産生はエネルギー収支からみるとマイナス要因であり、平均して飼料から摂取する総エネルギーの7%程度が空気中に排泄される¹⁵⁾。したがってこの生成を抑えることは飼料ME価の上昇につながる。ハロゲン化合物はメタン菌自体に毒性を示すメタン生成阻害剤の代表的なものである。そのうちのひとつアミクロールは *in vitro*でのメタン生成を70%も抑制するが同時に H_2 の集積を招く²⁰⁾。嫌氣的発酵下で生じる H_2 が速やかに処理されず集積するということは発酵自体の停止を意

味する。この様にこれら薬物の実用化には大きな障壁がある。プロピオン酸は、ルーメンで生成される主な揮発性脂肪酸（VFA）のうちヘキソースエネルギーの転換効率がもっとも高く⁵⁷⁾、しかも糖原性物質であることから宿主体内でのアミノ酸節約に貢献する。これらの点がプロピオン酸生成増に注意が向けられる理由である。生成を助長する薬物として アボパルシン^{28, 60)}、クロルテトラサイクリン⁵⁹⁾あるいはペニシリン²⁸⁾等が知られているが、いずれも抗生物質で、家畜体内への残留性や作用機序について情報が不足している。飼料中のタンパク質はルーメンで分解され最終的にはアンモニアとなるが、微生物への同化に供されなかったアンモニアは胃壁をとおして吸収後おもに尿中へ排泄される。したがって過剰の分解が生じないような調節がN利用効率の向上に資することになる。Broderick and Balthrop¹⁸⁾は様々な化学物質による脱アミノ反応の制御性を調べ、ヒドラジンの脱アミノ抑制効果が高いことを指摘しているが、その他の物質を用いた他の報告¹⁷⁾も含めこの種の試験はほとんどin vitroでおこなわれている。これらの化学物質を直接家畜に投与しN出納の改善を認めた報告はきわめて少なく^{21, 52)}、なお検討の余地があろう。ルーメン微生物成長因子としてはナイアシン等のビタミン類が知られている。これらの添加は菌の増殖効率を上げるが、いずれもin vitroの結果でありしかも効果は一貫していない¹⁶⁾。

以上概説したいずれの制御法もある一面では著しい効果を有する一方、すでに述べたような不利益性をあわせもつ場合があったりする。これらのことはルーメン内代謝系の複雑さならびに相互関連性を示している¹³³⁾に外ならず、完璧な制御法の確立を困難にしている。またある化学物質が上掲の有益な作用を有していたとしても家畜産業への実用に直結するものではない。まずコスト面での採算の見通しを検討する必要がある。さらに反芻家畜の生産物は主としてヒトに食されるものなので、制御に用いた物質の安全性の保証なしに実用化はありえない。

ルーメン発酵制御物質モネンシンの登場

上述したようなルーメン機能の制御法は対象とする家畜における飼料事情等により適用が制約されたり、助長されたりしうる。例えば、最近では米国での穀物生産力の大幅な向上という背景のもと、肉牛肥育産業において穀物利用性をいかに改善するかという観点から制御法の模索が進んでいる。このような状況下で登場

したのがイオノフォア抗生物質モネンシン(MN)である。イオノフォアとは細胞膜を介した陽イオンの正常な輸送を乱す作用を持つ抗生物質の総称である。それらは特定の金属イオンとキレートをつくり、生体膜中のイオン運搬に関与する担体となる¹²⁴⁾。イオノフォアには微生物の産する抗生物質もあれば合成化合物もあり、いずれもイオン透過性をあげる道具として医学・生理学等幅広い分野で研究利用されている^{124, 35)}。一方、肥育産業及びその基礎研究分野で扱われているのはすべて抗生物質である。よって本論文では特にことわらない限りイオノフォアはイオノフォア抗生物質を指すものとする。MNは土壤中の放線菌Streptomyces cinamonensisの産するポリエーテル系イオノフォアで、コクシジウム原虫に強い生育阻害効果をもつことから鶏用飼料添加物として広く普及した。反芻家畜に給与すると飼料要求率が有意に改善される^{41, 104, 105, 112)}ことがわかり、その安全性およびメカニズム解明に関する研究が急速に進展した。MN投与ルーメンにおいてはプロピオン酸産生割合の高い発酵様相が導かれ^{3, 30, 41, 50, 51, 65, 32, 102, 105, 112, 126, 128, 129)}、メタン産生量が減少する^{126, 128, 129, 145)}。さらにin vitroでMNはルーメン微生物の脱アミノ反応を抑制することが示唆されている^{132, 146)}。これらの作用は上述したルーメン内代謝の制御系のほとんどを網羅するものであり、本物質の効力の多様性をうかがわせている。このようなルーメン発酵様相の変化は、MNによるルーメン微生物叢の変更に負うところが大である。すなわちMNはin vitroで酢酸および酪酸産生菌の生育を阻害する一方、プロピオン酸やコハク酸(プロピオン酸の前駆物質)産生菌には阻害作用を持たない²²⁾。また酢酸、酪酸や水素産生系のプロトゾア⁴⁶⁾および酢酸、ギ酸と水素を産生する真菌³⁹⁾の生育を抑える。一方、安全性に関しては生産元のEli Lilly社研究所で検討された。摂取されたMNの約50-60%は家畜体内へ吸収されるが、速やかに代謝変換を受け、胆汁を介して消化管へ戻り、吸収されなかった分とともに最終的には糞中へ排泄される^{31, 32)}。そのため家畜体組織への残留がほとんどない⁴⁵⁾。

MNについては基本的な作用の場がルーメンにあり、選択的な微生物生育阻害をとおした発酵様相の変化に効果の大部分が依存していることは間違いのないところである。しかし、Chalupa²⁰⁾が指摘しているように、MNによる飼料エネルギー利用効率の改善は、メタンおよびプロピオン酸の産生量から推定したルーメ

ンでのエネルギー収支の改善のみで説明するには大きすぎる。つまり、その他の有益な作用が潜在するものと考えられ、肥育産業に普及（米国で1975年・ECで1977年）した後も基礎的な作用機序解明のための試験が継続されている。その過程で、MNはルーメンでの分解を回避し下部消化管で利用される飼料タンパク質の割合を増やすこと^{83,102)}、MNの静注でインスリン分泌が高まる⁸⁾こと、MN給与はMgやPのみかけの吸収率を増加させる¹¹⁸⁾こと等がわかった。諸養分の吸収に及ぼす影響については情報が不足しているが、Bergen and Bates¹²⁾は、アミノ酸の吸収が電気化学勾配に依存するものであればMNは吸収を促進するが、Na⁺との共輸送系によるものならば吸収は阻害されると推察している。一方、鶏では小腸におけるグルコースやアミノ酸の消失にMNはなんら影響しないという報告¹⁰⁶⁾もあり、吸収への作用に関する統一の見解はでていない。その他の副次的効果として、乳酸アシドーシス^{84,86,89)}や鼓脹症¹¹³⁾の予防・治療作用が報告されている。これらはいずれも、発症に関与するとみられる特定細菌の異常増殖を抑える作用に基づくものと理解されている^{53,84,113)}。

サリノマイシン研究の必要性

MNの研究が進展しつつある一方で、MN以外のイオノフォアでルーメン発酵にMNと同様に作動するものが数多く発見された。サリノマイシン(SL)、ラサロシド(LD)、テトロナシン(TR)、ナラシン、ナイジェリシン、グラミシジンなどが反芻家畜のルーメン発酵制御物質としてスクリーニングをうけ^{20,133)}、SLおよびLDはいくつかの国で実用に至っている。SLは土壤中放線菌 *Streptomyces albus* が産するわが国で発見されたMNと同じポリエーテル系イオノフォアである⁸¹⁾。各種金属イオンとの親和性においてMNやLDとやや異なり、SLは特にK⁺との選択的結合性が強いことがわかっている⁸¹⁾。SLを肥育牛に給与すると増体量は増える⁷⁸⁾、または変わりなく⁸⁷⁾、飼料摂取量は減少する^{78,87)}ので結果的に飼料要求率が改善される^{78,87)}。ルーメンの微生物叢^{85,100)}、VFA組成^{11,37,76,78,87,100,114,137,144)}やメタン産生^{138,144)}に対してはMNとまったく同じ方向へ改変をもたらすようである。SLも当初は鶏の抗コクシジウム剤として畜産業界へ導入された。反芻家畜においても本来の効果は発揮され、SL給与は糞中に排泄されるオーシストの数を減少させる⁷⁸⁾。

MNの項で記載したように、SLも乳酸アシドーシス^{84,86)}や鼓脹症^{54,55)}に有効である。イオノフォアのうちSLで初めて指摘された作用として、ルーメン内トリプトファン分解の抑制⁹⁹⁾がある。トリプトファンの分解を通して牛の肺気腫・肺水腫の起因物質であるインドールやスカトールが生じるので、SLはこれらの予防剤として有効かもしれない。またin vitroの実験系においてSLは家畜の内・外分泌に極めて広範な作用を持つ^{61,62)}ことが示されている。

SLは1985年に肥育牛用飼料添加物としてMNとともに厚生省より認可を受け、現在わが国の肉牛肥育産業の現場で急速に普及しつつある。このような状況にもかかわらず、米国で得られた圧倒的な情報量を誇るMNに比べSLの研究は立ち後れている。とりわけ野外試験においては1-5ヶ月の投与例^{37,78,114)}がほとんどで、そのような情報が10ヶ月あるいはそれ以上の肥育期からなるわが国の体系にそのまま適用できるという保証はない。よってこの点を検討する必要がある。

一方、現在わが国でのSLの適用は6ヶ月齢以後の肥育牛に限定されているが、適用範囲の根拠が明確でなく、それ以前の幼齢牛には適用できないかという課題もある。大谷⁹⁸⁾は子牛のルーメン機能の発達を解剖学および栄養生化学的な側面からとらえ、機能の発達の完了は遅くとも12週齢前後には完了すると結論している。SLの効果は主にルーメン機能への働きかけによるものであるから、月齢を遡っての適用範囲の拡大は充分検討に値すると考える。しかしながら、幼齢牛へのSL投与試験は世界でまだ例がなく、他のイオノフォアについてみてもLDで1例⁶⁾あるだけである。

さらに決して豊富とは言えない現存の情報から察する限り、SLに対するルーメン微生物叢と発酵様相ならびに発育成績の反応はMNの場合とほぼ一致するようであるが、MNで知られるその他の有益な作用、例えばルーメン内アミノ酸分解の抑制^{132,146)}等に関する査定は行われていない。さらに、宿主栄養を議論する際に必須な情報となる下部消化管へ送られる諸養分の量的検討にいたっては、まったく手つかずの状態である。SLを有効に利用するには、まずその作用機序を明確にした上で、それらをふまえた応用がなされるべきである。

SLをはじめ、MN、LD等イオノフォアの一致した作用として、ルーメン内メタン産生の抑制効果¹³³⁾があることはすでに述べた。メタンは近年、地球温暖化を導く温室効果ガスとして注目され、その産生抑制法の模索がはじまっている。

家畜からのメタン放出は全地球放出量の約15%と見積られ⁴³⁾、その全てが反芻家畜由来でないにしても、仮にS Lの投与でルーメンでのメタン生成を40-63%減らすことができる¹⁴⁴⁾とすれば、その寄与は大きい。この様な見地からしても、メタン生成阻害がひき起こされる要因をルーメン発酵様式の変化の中で特定することは意義深い。

本研究は、S Lの反芻家畜栄養への作用機序を解明し、その応用に資することを目的とし、子牛への適用例を含む野外応用試験ならびに基礎試験をとおして、S L投与に対するルーメン内消化・発酵様式の反応およびそれらと宿主栄養との関連を解析しようとするものである。

第2編 サリノマイシンに対する発育成績とルーメン発酵の応答

第1章 肥育牛における発育成績とルーメン発酵の反応

日本におけるホルスタイン種去勢雄牛の肥育は、米国でのフィードロット肥育に比べ肥育期間が長い（10ヶ月以上）のが特徴である。さらに、伝統的な肥育方式を採用している地域の黒毛和種雌牛の肥育に至っては16-36ヶ月もの期間を費やす。しかしながら現在知られるフィールドレベルでのSL投与試験のほとんどではわずか1-5ヶ月程度の投与期しか設けておらず^{37,78,114}、もっとも長いものでも9ヶ月である⁸⁷。従って上記のような長い期間にわたりSLを継続投与することが効果的であるかについての検討は現段階では皆無といってよい。

本章では、上述したわが国の代表的な肥育体系に即した野外試験を通して、SL投与に対する肥育牛の発育成績およびルーメン発酵の反応と、その経時的推移を明らかにする。

材料および方法

試験1

ホルスタイン種去勢雄牛28頭（約7カ月齢、平均体重265kg）を7頭ずつの4群に分け、17ヶ月齢まで10ヶ月間群飼した。各々抗生物質無添加区（C）、SL20ppm添加区（SL20）、同30ppm添加区（SL30）およびMN30ppm添加区（MN30）とし、濃厚飼料に所定量のイオノフォアを添加したものを自由摂取させた。この際の両イオノフォアの添加量はそれぞれわが国の指定値（SLで20ppm、MNで30ppm）に準じるとともに、SLについては指定値の1.5倍量（30ppm）の区も設けた。供試飼料の成分組成を表1に示した。試験開始時より6カ月目までは肥育用配合飼料と圧べん大麦およびフスマを3:1:1で混合したものを、以後試験終了時（10ヶ月目）まではフスマのかわりに圧べんマイロを同じ比率で混合したものを不断給飼した。粗飼料としてイナワラを1日1頭当たり1.4-1.7kg相当量給与した。

Table 1. Chemical composition of concentrates used in experiment 1.

Feed	Moisture	Crude protein	Crude fat	NFE	Crude fiber	Crude ash
		(%)				
Formula feed	12.3	12.4	3.8	62.8	3.2	5.5
Rolled barley	14.8	11.3	1.7	66.4	3.7	2.1
Wheat bran ^a	11.9	17.5	5.1	53.2	7.7	4.6
Rolled milo ^b	12.9	9.4	3.1	70.8	2.1	1.7

a: Used for the first 192 days.

b: Used from 193 to 292 days.

Table 2. Chemical composition(%) of concentrate and daily feed supply(kg/head) for Japanese Black heifers in experiment 2.

	Formula feed A ^a	Formula feed B ^b	Wheat bran	Bran film	Crushed barley	(Total)
Moisture	11.2	9.9	11.9	9.3	14.8	
Crude protein	15.3	11.4	17.5	15.4	11.3	
Crude fat	3.4	3.1	5.1	4.5	6.7	
NFE	59.8	65.6	53.2	37.5	66.4	
Crude fiber	4.6	5.0	7.7	28.0	3.7	
Crude ash	5.7	5.0	4.6	5.3	2.1	
Periods [#]						
1- 29	2.80	0.70	1.20	0.28	0	4.98
30- 61	3.20	0.85	1.20	0.20	0	5.45
62- 91	3.20	0.85	1.20	0.20	0	5.45
92-114	4.00	0.50	1.20	0.30	0	6.00
115-148	4.00	0.50	1.20	0.30	0	6.00
149-180	3.00	1.00	1.00	0.50	1.00	6.50
181-217	3.00	1.00	1.00	0.50	1.00	6.50
218-245	2.50	1.00	1.00	0.50	1.50	6.50
246-277	2.50	1.00	1.00	0.50	1.50	6.50
278-307	2.00	1.00	1.00	0.50	2.00	6.50
308-337	2.00	1.00	1.00	0.50	2.00	6.50

a: Grain 59.0%(corn, milo and wheat), oil meal 16.0%(soybean meal and coconut meal), bran 11.0%(wheat bran and rice bran) and the rest 14.0%(alfalfa meal, molasses, calcium carbonate, sodium chloride and calcium phosphate).

b: Grain 75.0%(corn, milo, wheat and rye), oil meal 10.0%(rapeseed meal and safflower meal), bran 7.0%(corn gluten feeds and rice bran) and the rest 9.0%(peanut meal, calcium carbonate, sodium chloride and molasses).

[#]: Stated by days after starting experiment.

体重測定はほぼ2ヶ月毎に実施（試験開始後0, 61, 119, 187, 244および292日目の午前10時）し、同時にルーメン液を経口カテーテル（ルミナー；富士平工業KK）で採取した。濃厚飼料摂取量は体重測定日毎に給与量と残量から計算した。ルーメン液は採取後直ちに2重ガーゼでろ過し、ガラス電極にてpHを測定後、アンモニア態窒素（N）およびVFA測定用サンプルはHgCl₂で発酵をとめ-20℃で凍結保存し、一方プロトゾア計数用サンプルはMFS溶液⁶⁹⁾にて固定し、室温で保存した。飼料の成分分析はAOAC法⁷⁾によった。アンモニア態NはConway²⁵⁾の微量拡散法で、VFAは須藤¹²¹⁾のガスクロマトグラム法で定量した。プロトゾアは栗原・武智⁶⁹⁾の方法で分別・計数した。処理間の差の検定はスチューデントのt検定¹²⁸⁾で行った。

試験2

黒毛和種雌牛16頭（約9ヶ月齢、平均体重280kg）を8頭ずつの2群に分け、群飼（20ヶ月齢まで11ヶ月間）し、一方を対照（C）区、他方をSL給与区とした。飼料給与は、発育に応じて徐々に濃厚飼料を増給する体系（表2）に準じて行った。粗飼料は主としてイナワラを用いたが、試験期前半に一時期青刈り牧草や乾草を用いた。給飼は1日2回とし、SL区には1%のSL製剤を給与濃厚飼料に対し20ppm（わが国でのSL添加指定値）になるよう濃厚飼料にトップドレッシングして与えた。供試牛の体重を約1ヶ月毎に測定し、ルーメン液は約2ヶ月毎に採取したが、いずれも朝給飼約3時間後に行った。ルーメン液の採取法、その後のサンプルの処置、サンプルの分析項目および数値の統計処理法は試験1と同様であった。

結果

試験1

体重、平均日増体量、濃厚飼料摂取量および濃厚飼料要求率（1kg増体に要する濃厚飼料の量）の推移を表3に示した。約2ヵ月毎に計測した体重値には処理間で有意差は認められなかった。平均日増体量は一部の期間で処理間の差が認められたが一定の傾向はなく、通算では全区ともほぼ等しい値（1.27-1.28kg）であっ

Table 3. Effects of salinomycin and monensin on body weight, daily gain, concentrate intake and feed conversion ratio of Holstein steers in experiment 1 (Mean±standard error).

Days or periods#	Treatment ##			
	Control	SL20	SL30	MN30
Body weight (kg)				
0	267.3±18.9	266.1±24.3	265.7±18.5	262.1±19.5
61	387.0±19.5	387.1±14.4	382.0±18.3	386.9± 5.3
119	469.6±21.6	465.9±22.2	462.0±28.7	462.6± 9.8
187	536.6±15.2	538.3±22.0	537.5±44.8	542.4± 8.1
244	595.6±23.2	588.7±25.2	589.5±57.2	595.1±19.3
292	640.7± 6.1	635.9±29.3	637.7±59.7	637.3±19.2
Daily gain (kg/head/d)				
0- 61	1.97±0.38	1.98±0.49	1.91±0.11	2.04±0.33
61-119	1.42±0.13	1.36±0.28	1.38±0.26	1.31±0.22
119-187	0.99±0.12	1.06±0.09**a	1.11±0.34 ^b	1.17±0.06 ^{ab}
187-244	1.04±0.41	0.88±0.19	0.91±0.27	0.92±0.27
244-292	0.78±0.23	0.98±0.17	1.01±0.20	0.88±0.16
0-292	1.27±0.06	1.27±0.15	1.27±0.16	1.28±0.09
Concentrate intake (kg/head/d)				
0- 61	9.06(100)***	8.81(97)	8.77(97)	8.90(98)
61-119	10.15(100)	9.21(91)	10.29(101)	9.21(91)
119-187	8.91(100)	8.74(98)	8.92(100)	8.74(98)
187-244	9.61(100)	8.62(90)	9.36(97)	8.42(88)
244-292	9.72(100)	8.57(88)	9.17(94)	8.57(88)
0-292	9.45(100)	8.80(93)*	9.27(98)	8.78(93)*
Feed Conversion ratio (concentrate intake/gain)				
0- 61	4.60(100)	4.45(97)	4.59(100)	4.36(95)
61-119	7.14(100)	6.77(95)	7.46(104)	7.03(98)
119-187	9.00(100)	8.25(92)	8.03(89)	7.47(83)
187-244	9.24(100)	9.80(106)	10.29(111)	9.15(99)
244-292	12.46(100)	8.74(70)	9.08(73)	9.73(78)
0-292	7.44(100)	6.93(93)	7.30(98)	6.86(92)

*,**: In each row differences from control are significant at 5 and 1 % level. a,b: Values followed by different letters differ significantly at 5 % level. #: Expressed as days after starting experiment or periods stated by the days. ##: Diets with no antibiotic(Control), 20 or 30ppm salinomycin(SL20 or SL30) and 30ppm monensin(MN30) were used. ###: Values in parenthesis are relative values when the corresponding controls are 100.

た。濃厚飼料摂取量はイオノフォア投与時に減少し、全期間を通してみた場合、S L 20、S L 30およびM N 30区で各々7、2および8%の飼料摂取量の減少があった。よって増体量に差がないことから、濃厚飼料要求率は各々7、2および8%の改善が認められた。

ルーメン液のpH、V F A濃度および各V F Aモル比を表4に示した。pHおよび総V F A濃度は試験期後半に処理間の差が認められたが、各処理による一定の傾向はなかった。しかしながら、V F A組成にはイオノフォア給与による著しい変化が認められ、酢酸および酪酸比が減りプロピオン酸比が増加した。プロピオン酸比の変化は244日目のサンプルを除き、統計的に有意($p<.05$)であった。結果的に、A/P比(酢酸/プロピオン酸比)はイオノフォア給与区で低下した。このA/P比の変化の程度はイオノフォアを添加した3処理を比較した場合、S L 20区がM N 30区より有意($p<.05$)に大きかった。

ルーメン内アンモニア態N濃度は、試験期後半に処理間に差が認められ、244日目のサンプルでは、C区に比べ、イオノフォアを給与した他の3区で高い値になった($p<.05$)が、それ以外のサンプルでは全てC区よりも低い値であった(表5)。ルーメンプロトゾアは全てEntodinium属で構成されており、試験期後半に密度が増加したが、どの時期においても牛個体間の差が大きく、処理がもたらす一定の傾向はなかった(表5)。

試験2

S Lはトップドレッシングで与えたが、観察した限りではS Lによる忌避作用はなく、濃厚飼料の残食は認められなかった。表6に供試牛の体重、平均日増体、濃厚飼料要求率を示した。体重は試験開始時には処理間に差がなかったが、S L給与開始2ヶ月目以降(3ヶ月目を除き)C区よりもS L区で大きくなり、以後その傾向で推移した。試験期全体を通しての日増体量は、C区(0.63kg)よりS L区(0.71kg)で有意($p<.05$)に高かった。飼料摂取量は両区でほとんど差がないことから、濃厚飼料要求率はS Lにより増体が促進された分だけ改善(11%)された。しかしながら、この成績を試験期間別に見た場合、日増体量は7ヶ月目(217日目)までS L投与による著しい改善が認められるのに対し、それ以降は逆に対照区よりも低くなった。濃厚飼料要求率も同様に最後の3ヶ月間にS L区での成績が対

Table 4. Effects of salinomycin and monensin on rumial pH, total volatile fatty acids and their composition and acetate/propionate ratio of Holstein steers in experiment 1 (Mean±standard error).

Days for [#] sampling	pH	Total VFA (mM/dl)	Acetic	Propionic	Butyric	n-Valeic	i-Valeic	A/P ratio
			(%)					
0								
Control ^{##}	6.12	22.9	55.2	35.2	7.1	Tr.	2.6	1.58
SL20 ^{##}	5.85	23.3	57.1 ^a	34.7 ^{ab}	6.8	Tr.	2.0	1.67
SL30 ^{##}	6.20	22.1	54.8 ^b	35.8 ^a	7.0	Tr.	2.5	1.55
MN30 ^{##}	6.18	24.7	58.2 ^{*a}	33.4	6.7	Tr.	1.9	1.77
61								
Control	6.11	22.1	50.3	41.2	6.4	Tr.	2.2	1.27
SL20	6.16 ^a	21.3	49.1 ^a	45.8 ^{***}	4.1 ^{**}	Tr.	1.0	1.08 ^{**}
SL30	6.73 ^{*b}	16.2	50.9 ^{ab}	44.7 ^{**}	3.6 [*]	Tr.	0.9	1.14
MN30	6.44 ^{ab}	19.3	51.5 ^b	44.1 ^{**}	4.0 ^{**}	Tr.	0.4 ^{***}	1.17
119								
Control	5.91	23.9	46.0	42.4	9.2	Tr.	2.1	1.09
SL20	6.13	19.2 ^{*ab}	49.1 ^{*a}	44.9 [*]	4.4 ^{***a}	Tr.	1.4 ^{***ab}	1.10 ^a
SL30	6.38 [*]	17.7 ^{***a}	47.2 ^b	46.0 ^{**}	5.6 ^{***ab}	Tr.	1.2 ^{***a}	1.03 ^{ab}
MN30	6.11	22.4 ^b	46.0 ^{ab}	46.6 ^{***}	5.7 ^{***b}	Tr.	1.5 [*]	0.99 ^{***b}
187								
Control	7.01	9.3	55.6	35.8	6.1	1.1	1.1	1.60
SL20	6.61 ^{***a}	16.6 ^{***a}	47.4 ^{**}	45.1 ^{***a}	5.5	0.4 ^{***}	1.6	1.05 ^{***a}
SL30	6.13 ^{***b}	21.3 ^{***b}	48.4 [*]	44.1 ^{**ab}	5.8	0.2 ^{***}	1.5	1.10 ^{*ab}
MN30	6.66 ^{***a}	15.0 ^{***a}	50.6	42.0 ^{**b}	5.2 [*]	0.6 [*]	1.6	1.21 ^{*b}
244								
Control	6.31	25.3	52.2	39.0	5.3	0.9	2.6	1.35
SL20	6.81 ^{**}	16.4 ^{***}	51.0 ^a	42.4 ^a	3.7 ^{**}	0.8	2.2	1.22 ^a
SL30	6.83 ^{**}	13.7 ^{***}	50.1 ^a	42.9 ^a	3.9 [*]	0.8	2.3	1.18 ^a
MN30	6.69 [*]	17.9 ^{**}	55.5 ^{***b}	38.1 ^b	3.7 [*]	1.2	1.5	1.46 ^b
292								
Control	6.98	7.6	58.5	29.1	6.2	2.0	3.8	2.02
SL20	6.55 ^{*a}	11.3 [*]	49.6 ^{***a}	42.9 ^{***a}	4.2	0.6 ^{*a}	2.3	1.19 ^{***a}
SL30	6.69 ^{ab}	11.5 [*]	50.6 ^{***a}	44.0 ^{***a}	3.5	0.7 ^{*a}	1.9 [*]	1.14 ^{***a}
MN30	6.74 ^b	9.2	55.5 ^b	36.6 ^{***b}	4.4	1.4 ^b	2.1 [*]	1.55 ^{*b}

*,**,***: In each column differences from control are significant at 5, 1 and 0.1% level. a,b: Values followed by different letters differ significantly at 5% level. #,##: Refer to Table 3.

Table 5. Effects of salinomycin and monensin on ruminal ammonia nitrogen concentration and protozoa number of Holstein steers in experiment 1 (Mean±standard error).

Days for# sampling	Treatment ##			
	Control	SL20	SL30	MN30
Ammonia N (mg/dl)				
0	12.31±2.10	17.70±3.14	17.62±1.78	14.64±1.73
61	4.59±1.73	3.33±0.44	4.39±0.96	3.36±0.42
119	4.23±1.05	5.49±1.23	5.49±1.03	3.90±0.74
187	6.72±1.58	3.23±0.50*	3.01±0.75*	3.33±0.61*
244	1.71±0.33	4.74±0.81**ab	4.53±0.40**a	2.82±0.36*b
292	8.27±0.41	2.76±0.75***	2.08±0.77***	3.38±0.63***
Protozoa number (x10 ³ /ml)				
0	1.21± 0.47	1.00± 0.66	1.10± 0.24	2.08± 1.02
61	0.29± 0.15	2.79± 1.36	8.67± 6.75	5.47± 2.37
119	6.07± 2.48	15.57± 9.95	6.25± 2.21	41.29± 26.92
187	21.07±11.07	15.07± 6.22	26.17±15.90	19.93± 5.60
244	39.50±17.09	61.43±43.29	41.73±22.76	276.21±110.61
292	56.75±25.46	36.14±21.18 ^a	85.83±26.81 ^{ab}	247.71± 81.16 ^{*b}

*,**,***: In each row differences from control are significant at 5, 1 and 0.1% level. a,b: In each row values followed by different letters differ significantly at 5% level. #: Days after starting experiment. ##: Refer to Table 3.

Table 6 Effect of salinomycin on body weight, daily gain and feed conversion ratio of Japanese Black heifers in experiment 2(Mean±standard error).

Days(periods)#	Body weight(kg)		Daily gain(kg/d)		Feed conversion ratio	
	Control ^a	SL ^a	Control	SL	Control	SL
0	276.5±3.5	284.3±5.1				
29 (0- 29)	290.6±4.7	297.5±6.2	0.49±0.09	0.46±0.09	10.27	10.94
61 (29- 61)	314.3±4.3	331.3±6.4*	0.72±0.01	1.02±0.06	6.98	5.33
91 (61- 91)	335.4±5.0	349.3±7.0	0.70±0.05	0.60±0.06	7.81	9.12
114 (91-114)	345.4±5.2	368.1±7.9*	0.43±0.07	0.82±0.05***	13.99	7.31
148 (114-148)	371.1±5.5	400.6±8.5*	0.76±0.08	0.96±0.05*	7.93	6.27
180 (148-180)	386.3±7.9	421.4±8.6**	0.47±0.13	0.65±0.06	13.74	10.02
217 (180-217)	416.9±8.8	456.4±8.9**	0.83±0.09	0.94±0.06	7.85	6.89
245 (217-245)	432.8±9.5	470.8±8.6*	0.57±0.06	0.45±0.05***	11.46	9.73
277 (245-277)	451.1±10.9	485.3±9.5*	0.57±0.09	0.51±0.08***	11.32	14.35
307 (277-307)	470.0±10.1	502.8±9.3*	0.63±0.13	0.54±0.05***	10.33	11.99
337 (307-337)	487.1±9.9	519.5±8.3*	0.55±0.07	0.54±0.05	11.78	12.04
(0-337)			0.63±0.02	0.71±0.02*	9.76	8.65

a: Diet with 0(Control) or 20ppm salinomycin(SL) was offered.

*,**,***: Differences from control are significant at 5, 1 and 0.1% level.

#: Refer to Table 3.

Table 7. Effect of salinomycin on ruminal pH and ammonia N concentration of Japanese Black heifers in experiment 2 (Mean±standard error).

Days [#]	pH		Ammonia N(mg/dl)	
	Control ^a	SL ^a	Control	SL
0	6.35±0.10	6.28±0.13*	12.8±1.1	12.3±1.0
61	6.51±0.10	6.53±0.05	13.8±0.7	7.9±0.9***
114	6.77±0.08	6.63±0.04	11.2±0.9	7.8±0.8*
180	6.53±0.10	6.74±0.06	11.4±0.4	9.7±0.6*
245	-	-	8.3±0.8	7.9±0.9**
307	6.34±0.05	6.87±0.06***	7.6±1.0	7.2±0.5
337	6.29±0.10	6.46±0.05	6.0±0.8	5.5±0.6***

*,**,***: Differences from control are significant at 5, 1 and 0.1% level.

a,#: Refer to Tables 3 and 6.

Table 8. Effect of salinomycin on total VFA and their composition and acetate/propionate (A/P) ratio in the rumen of Japanese Black heifers in experiment 2 (Mean±standard error).

Days [#]	Total VFA (mM/dl)	Acetate (%)	Propionate (%)	Butyrate (%)	A/P ratio
0					
Control ^a	15.0±1.0	59.6±0.9	22.1±0.9	16.3±0.5	2.74±0.14
SL ^a	14.7±1.0	60.5±1.0	21.7±1.3	15.5±0.8	2.87±0.19
61					
Control	15.7±0.6	59.3±0.5	21.0±0.6	16.7±0.7	2.92±0.06
SL	16.5±0.4	53.2±0.7***	33.1±1.4***	10.8±0.6***	1.63±0.08***
114					
Control	15.6±0.7	59.1±0.7	18.8±0.5	19.4±0.2	3.23±0.34
SL	16.0±0.4	54.6±0.3***	31.3±0.4***	11.5±0.4***	1.75±0.08
180					
Control	16.0±0.9	58.5±0.5	21.4±0.6	17.1±0.3	2.76±0.10
SL	14.6±0.9	53.3±0.8***	31.7±1.1***	11.9±0.6***	1.71±0.10***
245					
Control	16.1±0.7	54.4±1.3	25.9±2.0	16.1±0.6	2.21±0.20
SL	14.6±1.0	50.8±0.8*	33.9±1.3**	11.2±0.6***	1.52±0.08**
307					
Control	17.3±1.2	50.8±1.8	35.5±2.4	9.3±0.9	1.51±0.18
SL	16.3±0.8	49.1±1.3	35.8±0.3	10.3±1.1	1.40±0.09
337					
Control	16.4±1.0	58.0±0.6	19.9±0.8	17.9±0.4	2.96±0.38
SL	15.3±0.5	50.9±0.9***	34.3±1.3***	10.8±0.8***	1.56±0.09**

*,**,***: Differences from control are significant at 5, 1 and 0.1% level.

a,#: Refer to Tables 3 and 6.

Table 9. Effect of salinomycin on protozoa number in the rumen of Japanese Black heifers in experiment 2 (Mean±standard error).

Days*	Total counts	Ophryoscoleids	Ophryoscoleids	Isotrichids
		(<60µm)	(>60µm)	
(x10 ⁶ /ml)				
0				
Control ^a	7.54±0.86	6.48±0.77	1.26±0.20	0.20±0.06
SL ^a	6.22±0.57	5.14±0.48	0.88±0.11	0.21±0.05
61				
Control	5.54±0.51	3.98±0.34	1.37±0.21	0.19±0.03
SL	1.84±0.12***	0.93±0.12***	0.61±0.07**	0.30±0.04*
114				
Control	6.22±0.55	3.88±0.40	2.10±0.21	0.24±0.06
SL	2.06±0.25***	1.18±0.22***	0.65±0.08***	0.23±0.04
180				
Control	4.34±0.27	2.13±0.09	1.76±0.21	0.43±0.12
SL	2.58±0.24***	1.64±0.16*	0.56±0.07***	0.38±0.07
245				
Control	4.49±0.58	2.57±0.28	1.32±0.24	0.61±0.11
SL	4.98±0.60	3.84±0.48*	0.61±0.09*	0.52±0.14
307				
Control	4.39±0.69	3.25±0.58	0.91±0.12	0.24±0.03
SL	4.62±0.35	4.05±0.31	0.19±0.03***	0.38±0.05*

*,**,***: Differences from control are significant at 5, 1 and 0.1% level.

a,#: Refer to Tables 3 and 6.

照区を下回った。

表7にルーメン液のpHおよびアンモニア態N濃度を示した。ルーメンpH値においては、SL投与にともなう特定の変化が認められなかった。濃厚飼料を多給する試験期後半でも異常に低い値になることもなく、いずれの値(6.3-6.9)も正常な範囲内にあった。SL投与は、ルーメン内アンモニア態N濃度を有意に減少させた($p<.05$)。またこの減少の度合は投与初期に大きく、試験末期になるにつれ小さくなった。

ルーメン内VFA濃度とその組成を表8に示した。総VFA濃度は試験期全体を通しほとんど一定のレベルを維持しており(14.6-17.3mM/dl)、処理間に差はなかった。SL投与はプロピオン酸のモル比を上昇させ、酢酸と酪酸のモル比を下げる傾向にあった(8ヶ月目までのサンプルではいずれも有意, $p<.05$)。しかしアンモニア態N濃度の推移と同様に、試験期後半(10ヶ月目)にC区との差が消失した。

表9にルーメン内プロトゾア密度とその種属構成を示した。SL投与はルーメン液中のプロトゾア数を顕著に減少させた。特にOphryoscolecidsの減少が著しく、一方Isotrichidsはまったく数の変化がなかった。Ophryoscolecidsの減少は特に試験期前半に明確だったが、小型(60 μ m以下)のもの(Entodinium属に相当)は、SL投与期間が長くなるにつれ徐々に回復をみせ、10ヶ月目には、C区との差がなくなった。

考 察

試験1においてSL20とMN30区の濃厚飼料要求率は各々7又は8%改善されており、指定添加濃度でSLはMNとほぼ同等の効果を発揮することを確認した(表3)。これは飼料摂取量の減少によるもので、本試験よりも短期のSL投与で得られている結果^{37,78,87)}とよく一致した。試験2のようなエネルギー含量の高い穀物を長期間制限給与するかなり特殊な飼養方式下でも、SL投与により11%の濃厚飼料要求率の改善(表6)が得られた。このような飼料要求率改善の主因として考えられるのが、ルーメン内発酵様相の変化である。すなわち、試験1のSL20とMN30区、および試験2のSL区とも、それぞれのC区に比べプロ

ピオン酸の産生比が有意に高まり、逆に酢酸と酪酸の産生比は下がった（表4・8）。既報のMNに関する数多くの研究も例外なくこの変化を認めている^{3,38,41,50,65,71,82,102,112,128,129}）。

プロピオン酸は主たるVFAのうち、飼料エネルギーの転換効率が最も高いものとして知られている。Hungate⁵⁷⁾によると、ヘキソースからの各VFA生成反応において、ヘキソースエネルギーが酢酸、プロピオン酸および酪酸の形で保留される割合は各々63, 109および78%である。したがって、理論上はプロピオン酸生成割合が高まると飼料エネルギーの利用効率も高まることになる。プロピオン酸はメタンと並びルーメン発酵における主要な電子（代謝性水素〔2H〕）処理生成物のひとつである⁴⁷⁾。上の値がプロピオン酸で100%を超えるのは他の反応から〔2H〕を貰い受けるためである。SLやMNや投与時にメタン産生量が減少する^{126,128,129,138,144,145)}ことが知られているが、同時にほとんどの報告でプロピオン酸産生量増加^{128,129,138,144)}が指摘されている。つまりプロピオン酸の増加はルーメン内で生じた代謝性水素〔2H〕の円滑な処理（嫌気的条件下での酸化反応の進行）に寄与しているものと思われる。換言するならば、イオノフォアの投与にともない、それまでメタンとして損失されていたエネルギーがプロピオン酸生成により捕捉されると解釈でき、これは飼料のME価の改善を意味する¹⁴⁵⁾。本試験ではメタン産生量は測定していないが、SL給与にともなうプロピオン酸産生割合の増加を確認した。一方、プロピオン酸は糖原性物質であるため、動物体内で糖新生に用いられるアミノ酸等の糖原性物質を節約する効果も考えられる。この効果については特にタンパク質供給の少ない飼料条件下で発現するものと思われるので、濃厚飼料を多給した本試験のようなケースではあまり貢献度は大きくないかもしれない。

SLやMNを投与した時にルーメン内アンモニア態N濃度^{41,51,82,102,112,114,145)}やプロトゾア密度^{65,100,102,114)}が低下するという報告が多いが、試験2の結果（表7・9）はこれらを支持するものであった。しかし試験1では一貫した変化はなく、とくに後者のパラメーターについては個体差が非常に大きく、しかも全体的に低密度であった（表5）。とりわけ試験期前半ではプロトゾアは非常に少なく、pHが低い（表4・5）。またプロピオン酸のモル比がC区においてさえ40%をこえている（表4）ことからすると、濃厚飼料多給時によくみら

れるルーメン性状であったことがわかる。このような場合には、イオノフォアの効力に依存するまでもなく、すでにルーメン内発酵様相はプロピオン酸をより多く産生するような微生物叢が形成されていると考えられる。既報の飼料要求率改善割合に比べ試験1のSL20およびMN30区のそれが低いのはこのような理由によるものと思われる。一方、SLを基準値より増量添加した場合（S30区）、ルーメン発酵様相の変化は認められた（表4）ものの、飼料要求率の改善は大きくなかった（表3）。しかしその理由は明確ではない。投与効果の大・小の解析については、SLが宿主栄養に及ぼすその他の要因を考慮する必要があるものと考えられる。

試験2の結果から特筆すべきことは、SLによる効果が試験後半で消失したことである。このような効果消失例は、去勢雄肥育牛にMN⁶³⁾あるいはSL⁸⁷⁾を投与した際に散見されるが、その機構の解明と対応策の検討が必要である。中嶋ら⁸⁷⁾は、SLを給与したホルスタイン種去勢雄牛の肥育成績（7-16ヶ月齢）は、最初の6ヶ月間に顕著な給与効果を示したものの、最後の3ヶ月間には効果がほとんど認められなかったと報告し、有力な原因のひとつとしてイオノフォアに対するルーメン微生物の耐性獲得の可能性をあげている。試験2ではSLにより減少したルーメンプロトゾアのうち、小型のOpryoscolecidsが試験期後半にその密度を回復しC区との差がなくなっている（表9）ことから、少なくとも小型Opryoscolecidsの大半を占めるEutodinium属は、SL耐性を有するものが増えると考えられる。大型Opryoscolecids（Diplodinium属等）は、SL投与開始から減少したままで、耐性獲得の傾向は示さないが、Isotrichidsは、SLに対しまったく反応を示していない（表9）。このように、薬物への反応の程度はもとより、耐性の生じ方にも不明の点が多い。例えば試験1では上のような傾向はまったくなく、耐性の観点からこれ以上野外試験結果を分析するには無理がある。ましてルーメン細菌については本試験では何の計測もしていない。Olumeyanら¹⁰⁰⁾によると、SL給与にともないルーメン内のSL抵抗性菌数が増加するようなので、より基礎的な実験で精査する必要がある課題と思われる。

プロトゾアは、それ自体水素を産生するが、体表面に付着するメタン菌との共同作用で、メタン産生に間接的に貢献している¹³⁶⁾といわれている。よってSLによるプロトゾア密度の低下は、メタン産生菌にとって増殖のための一つの場を

失うことを意味し、S L 投与時のメタン産生量の減少要因のひとつとも考えられる。またプロトゾアの代謝産物としては水素以外にアンモニア、酢酸および酪酸があり、プロトゾア数の増減は、直接ルーメン内発酵様相にも作用しうる⁴⁶⁾。試験2の後半では、これらのルーメン内濃度における処理間の差が小さくなってきており(表7・8)、これはプロトゾア密度の漸増の影響とも解釈できる。しかし、むしろS L 区の値は比較的一定(S L の効果は持続)で、試験期後半にC 区の値がS L 区に近づいてきているようにも見受けられる。つまり、一般に肥育末期には殆どの牛でイナワラの摂取量が減ることが経験的に知られているが、試験2でも同様であったとするならば、C 区においてさえルーメン発酵様相が高プロピオン酸産生型に傾いたものと考えられる。その結果、S L 投与の影響が明確に数字の差となって現れなかったと解釈した方が適切かもしれない。同様の考察が試験1でもあてはまるように、S L の効果発現は濃厚飼料と粗飼料の比といった飼料給与条件に左右されることは言うまでもなく、極端に濃厚飼料給与割合の高い飼養方式下では、顕著な効果があらわれにくいものと思われる。一方、肥育期後半はS L 摂取量(濃厚飼料摂取量)が増えないのに対し牛の体重そのものは増加を続ける。これは単位体重当たりのS L 摂取量の低下を意味し、効果低減の一因である⁸⁷⁾。また、ある成熟ステージを境にして牛の増体速度は低下しはじめることが知られているが、いわゆるその生理的臨界点にC 区よりも早く到達するため、試験期後半のS L 投与効果がみられなくなるという解釈も可能である。いずれの解釈が妥当なのか、試験2の結果から推測することは困難である。おそらく実際は、上述したいくつかの要因が重なりあった結果、本肥育試験期後半でのS L 効果低減が発現したものと思われる。

以上、わが国の肉牛肥育体系に即した野外試験において長期間のS L 投与を試みたところ、既報の短期試験結果とほぼ同じように、飼料要求率の改善とプロピオン酸産生主体型へのルーメン発酵の変化という反応が得られることが明らかになった。またその過程で、濃厚飼料超多給型の飼養方式下ではS L の効果はさほど期待できないこと、長期のS L 投与はルーメン微生物の耐性獲得を一因とした効果低減をひきおこす可能性があること等の問題点を提示した。

第2章 哺育・育成牛における発育成績とルーメン発酵の反応

SLは1985年に厚生省より飼料添加物として認可され、以後、我国の肥育産業に急速に普及しつつある。しかし、その適用は6ヶ月齢以降の肥育牛のみを対象としたものである。子牛のルーメン機能の発達を、解剖学および栄養生化学的な側面から扱った大谷⁹⁸⁾の報告では、機能の発達の完了は、早くて離乳後1週目、遅くとも慣行離乳方式(6週齢離乳)下での離乳牛で12週齢前後には完了すると結論されている。すなわち、ルーメン諸機能の発達は、VFA生成能(微生物叢の定着)、VFA代謝能、VFA吸収能、組織重量と容積、粘膜絨毛の順に進展し、しかもこれらの発達は単独で進行するのではなく、相互に関連していることが指摘されている。イオノフォアの効果は主にルーメン機能への働きかけによるものである^{12, 28, 110, 116, 133)}から、その適用範囲を子牛まで拡大することは、上の報告からみて充分可能と思われる。しかしながら、哺育・育成牛へのイオノフォア給与試験は、LDで一例⁶⁾あるのみで、SLについてはまったく試験例がない。したがって、第1章で述べたような成畜と同じルーメン発酵制御効果が発現し、発育成績にまで影響がおよぶかどうかは明かでない。本章ではこれらの点を検討するため、生後1週からSLを給与したホルスタイン種雄子牛の育成成績、ルーメンおよび血液性状にみられる反応について述べる。

材料および方法

ホルスタイン種雄子牛(平均体重43.1kg, 1週齢)10頭を無作為に5頭ずつの2群に分け、1頭づつストールで飼養した。一群(SL区)には、SLを15ppm添加した濃厚飼料(人工乳および育成用配合飼料)を、他群(C区)には添加しないものを1週齢より与えた。SL添加量は肥育牛への添加指定値(20ppm)よりいくぶん少な目の15ppmに設定した。ただし、C区に与えた人工乳はクロルテトラサイクリン50ppm添加のものを用いた。供試飼料の成分組成と飼養基準を表10および11に示した。子牛は代用乳哺育とし、6週齢で離乳させた。濃厚飼料は表11に示した日量を等分し9:00と17:00に与えた。イタリアンライグラス1番刈乾草と水は自由摂取させた。以上の飼養処理のもと、1週齢より2週間の処理適応期を設け

Table 10. Chemical composition of feeds.

	Moisture	Crude protein	Crude fat	Crude fiber	Crude ash	NFE ^a	NDF ^b	ADF ^c	ADL ^d
				(%)					
Milk replacer	5.4	27.5	19.0	0.2	6.0	41.9	1.0	0.7	-
Calf starter	13.1	17.6	3.9	4.0	5.5	55.9	12.3	6.4	0.5
Formula feed for growing calf	13.2	16.1	2.7	4.9	6.0	57.1	18.2	6.7	1.2
Italian ryegrass hay	11.7	3.8	1.1	31.0	5.1	47.3	62.8	37.7	4.6

a: Nitrogen free extracts.

b: Neutral detergent fiber.

c: Acid detergent fiber.

d: Acid detergent lignin.

Table 11. Feeding regime for calves.

Age (week)	Milk replacer	Calf starter	Formula feed for growing calf	Hay, Water
		(kg/d)		
1	↑	0.3		
2		0.5		
3	0.5	0.8		
4		1.1		
5	↓	1.5		
6		1.9		
7		2.1		
8		2.4		
9		2.7		
10		2.9		
11		3.2		
12		1.75	1.75	
13-16			4.4	
17-20			5.3	
21-25			6.7	

Free
choice

た後、3-25週齢にわたる育成試験を実施した。飼料摂取量は各給与時の残食を毎日測定し算定した。体重は毎週測定した。ルーメン液サンプルは5,7,9,11,13,17,21および25週齢時の朝給飼3時間後にカテーテルで経口採取した。5,9,13,17,21および25週齢時の同時刻（ルーメン液採取の直前）に頸静脈より血液サンプルを採取した。

血清のカルシウム、無機リン、マグネシウム、総コレステロールおよびグルコースは市販の臨床検査用キット（和光純薬；カルシウムCテスト、ホスファBテスト、マグネシウムBテスト、コレステロールBテスト、片山化学工業：血糖定量用キット）で分析した。血清の尿素態N、総タンパク質およびアルブミン含量は、各々ジアセチルモノオキシムの佐々木変法¹⁴⁹⁾、ビュレット法³⁸⁾およびブロムクレゾールグリーン法³³⁾で測定した。ルーメン液サンプルの処理およびpHとVFAの測定は、第1章に記載した方法で行った。アンモニア態Nは、フェノール・次亜塩素酸法¹⁴³⁾、 α -アミノ態Nは、Schroederら¹¹⁷⁾の加銅法で測定した。プロトゾアおよびバクテリアの分類と計数を5,9,13,17,21および25週齢に採取したサンプルを用いて実施した。プロトゾアは第1章で記述した方法に準じて計数した。細菌は、ホルマリン加生理食塩水で固定後、須藤¹²¹⁾の方法で検鏡、分別計数した。

ルーメン絨毛の観察は、7週齢時に両区から各々2頭ずつ体重のほぼ等しい子牛をえらび、Ohtaniら⁹⁷⁾のファイバースコープ法に従って実施した。用いたファイバースコープ（オリンパスCF-LBS）はカメラと光源をそなえた人体大腸用ファイバースコープであった。観察に先だって2日間絶食絶飲させ、温湯でルーメン内を充分洗浄した後、観察に供した。観察部位はルーメン前背盲のう部で、絨毛の外観から形態、色調を判定した。またスコープ先端にメジャーをとりつけ、一頭当たり、20本の絨毛の長さを測定した。

飼養試験終了後（26週齢）、両区より各4頭、計8頭を無作為に選び出し、5日間の全糞採取を行う消化試験に供した。飼料給与は25週齢時と同様に行った。消化試験初日朝の給飼時に、消化管内容物通過速度測定用マーカのポリエチレングリコール（PEG、分子量4000）を50g、クロム（Cr）を吸着させた中性デタージェント繊維（NDF）を40g（イタリアンライグラス乾草より調製）、これら双方を1 lの水に溶解又は懸濁し、全供試牛にカテーテルを通して投与した。

なおCr吸着NDFの調製はUdenら¹²⁷⁾の方法に準じた。その後、糞中への各マーカの排泄様相を経時的に測定し、以下に示すFaichney³⁴⁾の式によって両マーカの消化管内平均滞留時間を算定した。

$$\bar{t} = \frac{\sum_{i=1}^n C_i \times t_i}{\sum_{i=1}^n C_i}$$

$\bar{t}$:平均滞留時間、 C_i :マーカ投入後*i*回目の排糞サンプル中のマーカ濃度

t_i :マーカ投入後、*i*回目の排糞時の経過時間

PEGはSmithら¹¹⁹⁾の方法で、Crは小坂⁶⁷⁾の方法で定量した。飼料および糞の養分の分析は、AOAC法⁷⁾およびデタージェント法^{1,134,135)}で行なった。また可消化養分総量(TDN)摂取量を推算する際の各々の飼料のTDN価は、濃厚飼料については市販パッケージの保証値を、乾草は日本標準飼料成分表⁹⁴⁾の値を採用した。処理間の差の検定は、スチューデントの*t*検定¹²⁸⁾で行なった。

結果

平均日増体量、飼料摂取量および飼料要求率を表12に示した。試験期を通しての平均日増体量(3-25週齢)は、1.22kgで本試験で採用した肥育体系下での成績としては平均的で満足のいく発育状態であった。SL区の牛は、C区に比し増体量で10.3%まさったが、統計的に有意な差ではなかった。濃厚飼料(代用乳、人工乳、育成用配合飼料)、乾草、乾物(DM)、粗タンパク質(CP)、TDN摂取量は、SL給与時にやや多かった(有意差なし)。特に哺育期での人工乳摂取量はSL区で約13%も多く、逆に乾草摂取量は対照区をやや下回った。濃厚飼料、DM、CPおよびTDN摂取量はSL区で各々6.3, 5.0, 4.9および5.1%改善された。しかしながら、このようなSLの効果は21週齢までに認められ、最後の4週間は明確でなかった。

表13に子牛の主要血液成分を示した。いずれの成分値も週齢間に差がなかったため全サンプルの平均値を処理毎に求めて示した。カルシウム、マグネシウム、

Table 12. Average daily gain, feed intake and feed conversion ratio.

		Period [#]					
Treatment ^a		3-7	7-13	13-17	17-21	21-25	3-25
Average daily gain(kg)	Cont.	0.77±0.11	1.02±0.05	1.44±0.12	1.21±0.14	1.43±0.08	1.16±0.05
	SL	1.07±0.07	1.05±0.11	1.47±0.09	1.49±0.13	1.41±0.09	1.28±0.06
Feed intake							
Conc. ^b (DM kg/d)	Cont.	1.16±0.12	2.20±0.07	3.79±0.02	4.39±0.12	5.47±0.14	3.29±0.07
	SL	1.40±0.10	2.29±0.11	3.76±0.03	4.49±0.07	5.53±0.08	3.39±0.06
Hay(DM kg/d)	Cont.	0.19±0.09	0.40±0.21	0.49±0.21	0.66±0.26	0.50±0.16	0.44±0.18
	SL	0.13±0.01	0.38±0.10	0.53±0.11	0.68±0.13	0.55±0.09	0.45±0.08
Total(DM kg/d)	Cont.	1.35±0.17	2.60±0.15	4.28±0.20	5.05±0.31	5.96±0.29	3.70±0.23
	SL	1.54±0.10	2.67±0.17	4.29±0.12	5.18±0.17	6.08±0.14	3.84±0.12
Crude protein(g/d)	Cont.	282±26	459±12	725±12	844±30	997±62	643±25
	SL	329±20	477±25	722±9	865±18	1051±17	669±15
TDN ^c (kg/d)	Cont.	1.20±0.14	2.13±0.07	3.37±0.11	3.95±0.20	4.59±0.31	2.97±0.15
	SL	1.39±0.09	2.21±0.14	3.37±0.07	4.05±0.11	4.84±0.10	3.08±0.09
Feed conversion ratio							
Conc.(DM kg/gain kg)	Cont.	1.62±0.21	2.17±0.10	2.73±0.24	3.88±0.46	3.87±0.20	2.86±0.10
	SL	1.31±0.07	2.26±0.20	2.60±0.18	3.13±0.31	4.00±0.28	2.68±0.14
Total DM(kg/gain kg)	Cont.	1.82±0.15	2.61±0.28	3.04±0.16	4.43±0.48	4.05±0.28	3.18±0.10
	SL	1.44±0.06	2.61±0.28	2.96±0.16	3.58±0.25	4.40±0.30	3.02±0.11
Crude protein (g/gain kg)	Cont.	395±46	455±25	521±37	744±78	704±42	556±9
	SL	308±12	469±35	500±30	601±50	760±48	529±23
TDN(kg/gain kg)	Cont.	1.65±0.19	2.12±0.18	2.41±0.17	3.47±0.40	3.24±0.33	2.56±0.05
	SL	1.30±0.06	2.16±0.16	2.33±0.15	2.81±0.25	3.51±0.26	2.43±0.11

Each value represents mean±standard error(n=5). a: Calves for SL group were fed a calf starter or a formula feed for growing calf mixed with salinomycin at a level of 15ppm. b: Concentrates include a milk replacer, a calf starter and a formula feed for growing calf. c: Estimated TDN values of milk replacer, calf starter, formula feed for growing calf and Italian ryegrass hay are 110.0, 87.4, 82.9 and 47.4% of DM basis, respectively. #: Stated by weeks of age.

Table 13. Blood components of calves.

Components	Treatment ^a	
	Cont.	SL
Calcium	10.5	9.5
Magnesium	2.5	3.0
Inorganic P	7.7	7.9
Cholesterol	66.1	66.2
Glucose	71.1	72.5
Urea-N	11.3	10.3
Total protein(g/dl)	5.8	5.8
A/G ^b	2.02	1.70

Each value represents mean of all the values determined at 5, 9, 13, 17, 21 and 25 weeks of age(n=30)

a: Refer to Table 12.

b: Albumin to globulin ratio.

Table 15. Appearance of ruminal papillae in the cranodorsal sac.^a

Treatment ^b	Calf No.	Shape	Color	Length(mm)	
				Mean	Maximum
SL	1	foliate	dark	3.7	5
	3	foliate	dark	3.9	7
Cont.	7	foliate	dark	4.7	6
	10	foliate	dark	4.7	7

a: Twenty papillae per calf were observed by the fiberscope technique(Ohtani *et al.*, 1977).

b: Refer to Table 12.

Table 16. Digestibilities of nutrients and mean retention time of digesta.^a

Digestibility	Treatment ^b	
	Cont.	SL
	(%)	
Dry matter	79.2±1.4	79.3±0.3
Organic matter	80.4±1.4	80.9±0.3
Crude protein	79.0±1.0	80.1±0.4
Crude fat	80.6±3.3	82.6±0.8
Crude fiber	53.4±2.7	53.8±3.0
NFE ^{c)}	84.0±1.3	84.2±0.2
NDF ^{c)}	56.3±2.6	55.4±1.5
ADF ^{c)}	41.2±3.9	39.6±3.5
Mean retention time	(hrs)	
Liquid(PEG)	16.8±0.3	18.0±1.4
Particle(Cr-NDF)	46.4±1.8	48.3±1.5

Each value represents mean±standard error(n=4).

a: Determination was done at 26 weeks of age.

b: Refer to Table 12.

c: Refer to Table 10.

Table 14. Effect of salinomycin on microbial composition classified morphologically in the rumen of calves.

Weeks of age	Treatment	Total a($\times 10^{10}$ /ml)	-Cocci	+Cocci	-Curved rods	-Rods (Total)	-Rods (Small) ^b (%)	-Rods (M&L) ^c	+Rods	Protozoa (<i>Entodinium</i> spp.) ($\times 10^4$ /ml)
5	SL	2.0	18.1	0.6	3.3	71.4	61.6	9.8*	1.5	0
	C	2.3	15.3	1.6	2.5	76.1	59.0	17.1	1.5	0
9	SL	1.1	16.3	1.2	0.8	75.8	42.1	33.7	2.0	18.1
	C	1.3	21.5	3.3	0.9	67.9	42.2	25.7	2.7	0.1
13	SL	0.9*	10.0	1.9	1.0	81.0	45.8	35.1**	2.2	13.8
	C	1.5	15.1	2.7	0.7	74.4	50.6	23.8	4.9	0.3
17	SL	1.1	13.6	2.1	1.9	77.8	44.5	33.3*	2.9	3.8
	C	1.5	19.0	0.8	1.3	72.1	49.4	22.7	2.5	0.8
21	SL	1.3	18.5	1.6	1.2	75.9	51.9	23.9	1.3	0.1
	C	1.4	15.6	2.3	2.3	75.1	47.0	28.1	2.3	0.2
25	SL	1.0*	17.0	0.4	1.6	77.3	39.2	38.2	1.5**	0.6
	C	1.8	14.7	2.1	2.2	73.9	42.0	31.9	4.0	0.1

a: Refer to Table 12.

b: Gram negative small rods(0.9-2.0 $\times$ 0.35-0.7 μ m). c: Gram negative medium and large rods(1.2-4.5 $\times$ 0.7-1.7 μ m).

*,**: Means are significantly different from those in control group at levels of 5 and 1 %, respectively.

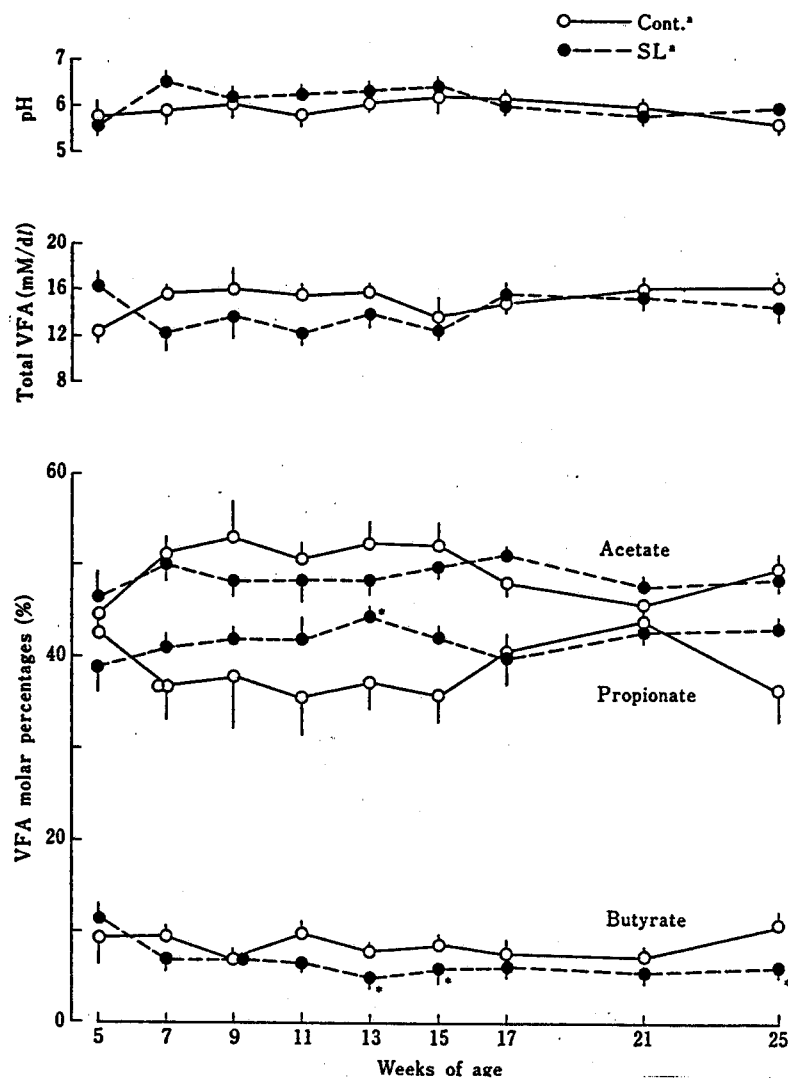


Fig. 1. Changes in ruminal pH, total VFA level and VFA molar percentages. The vertical bar indicates the standard error of means.

a) Refer to Table 12.

*) Means are significantly different from those in control group at a level of 5%.

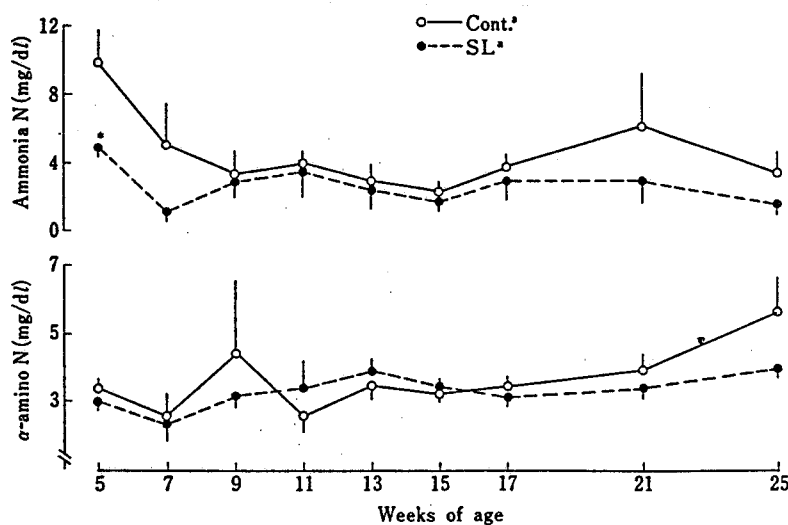


Fig. 2. Changes in ruminal ammonia and α -amino nitrogen concentrations. The vertical bar indicates the standard error of means.

a) Refer to Table 12.

*) Means are significantly different from those in control group at a level of 5%.

無機リン、総コレステロール、グルコース、尿素態N、総タンパク質、アルブミン/グロブリン比すべての値が通常の生理的範囲にあり、SL投与による明確な影響はなかった。

ルーメンpH、総VFA濃度およびその組成を図1に示した。pHと総VFA濃度は処理間で差がなかったが、VFA組成はSL給与時にプロピオン酸比が高く、酢酸および酪酸比が低くなる傾向にあった。しかしこの傾向は哺育期（5週齢）と育成後期（17および21週齢）では明確でなかった。SLは5週齢でアンモニア態N濃度を下げ（ $p<.05$ ）、以後このSLによる減少傾向は一貫していた。SLはまた α -アミノ態N濃度もやや低下させた（図2）。

ルーメン内微生物の分類・計数結果を表14に示した。ルーメン菌数は5週齢ですでに $\times 10^{10}/\text{ml}$ のオーダーにあり、この密度は25週齢までほとんど変わらなかった。SL給与により密度はやや低下した（13および25週齢で有意、 $p<.05$ ）。優占的な菌群は、グラム陰性かん菌および球菌で、各々総菌数の51-88および5-38%を占めていた。前者、特に中・大型のものはSL給与により増加する傾向にあった（13および17週齢で有意、 $p<.05$ ）。またSLはグラム陽性球菌とグラム陽性かん菌を減少させる傾向があった。プロトゾア密度はSL区の9および13週齢時に $\times 10^5/\text{ml}$ のオーダーまで増えたものの以後急減し、全体的に非常に低いレベルで推移した。また処理による明確な反応は認められなかった。表15に離乳直後（7週齢）の4頭の子牛について、ルーメン後背盲嚢部絨毛の観察結果を示した。SL投与によって絨毛の長さはやや短くなったが（SL区3.8mmに対しC区4.7mm）、絨毛の形状および色調は両処理で差がなく、葉状で暗褐色であった。

26週齢時（飼養試験終了直後）に行った消化試験および内容物通過速度の測定結果を表16に示した。SL区の牛の消化率は、NDF、酸性デタージェント繊維（ADF）でC区よりやや低かったが、DM、有機物（OM）、CP、粗脂肪、粗繊維および可溶無窒素物（NFE）ではC区とほとんど同じ値だった。消化管内容物液相（PEG）の平均滞留時間は固相（Cr）のそれより有意に短かったが（ $P<.001$ ）、いずれもSL投与牛で長くなる傾向にあった。

考 察

過去の報告では、S Lを肥育牛に給与すると増体量が増すか、ほとんど変わらず、飼料摂取量が減ることで、結果的に飼料要求率が改善される^{78,87)}。本試験では増体量及び飼料摂取量ともS Lによって促進され、飼料(TDN)要求率の改善はわずか5%にとどまった(表12)。このようなS Lに対する反応の違いは飼料、供試家畜の年齢や栄養状態の差に由来するものと思われる。一方、本試験で認められたS L投与に伴う子牛の飼料摂取量の増加それ自体は、ルーメン容積の拡張¹²²⁾、微生物の定着⁵⁾や代謝機能の発達⁴⁾にとって望ましいといえよう。

主要血液成分はS Lによって有意に変化しなかった(表13)が、これは中島ら⁸⁷⁾が報告した肥育牛の結果と一致した。このことから1週齢からのS Lの投与は、本試験の血液成分検査結果から判断する限りにおいては、子牛の肝および腎機能や酸・塩基平衡に有害な影響を及ぼすことはなさそうである。

S Lの投与はルーメン液のpHや総VFA濃度の変化なしに酢酸や酪酸の生成比を下げ、プロピオン酸のそれを上げる^{37,76,78,87,100,114,144)}のが一般的で、飼料要求率の改善はもっぱらこの発酵様相の変更と関連づけて議論されている。本試験でもこれと同様の傾向が認められた(図1)。Olumeyanら¹⁰⁰⁾によると成牛にS Lを投与した場合ルーメン内培養可能総菌に占めるデンプン利用菌の割合が高まる。デンプン利用菌はおもにプロピオン酸やその前駆物質である乳酸・コハク酸を産生する⁹⁵⁾ので、これら菌群の増加はルーメン内でのプロピオン酸生成割合の増加を説明しうる。Chen and Wolin²²⁾は *in vitro* において酢酸および酪酸産生菌がMNに対し感受性が高く、プロピオン酸やコハク酸を産生する菌はそれが低いと報告している。S Lでも全く同様なことを Nagaraja and Taylor⁸⁵⁾が *in vitro* で確認している。おそらく実際のルーメン内でもこのような菌種の選抜淘汰が生じているものと推察される。

本試験サンプルのルーメン菌を形態分類してみると、S L投与時にグラム陰性かん菌の占有率の増加が認められた(表14)。押尾・田畑¹⁰¹⁾は異なる飼料をあたえた雌牛ルーメン内のプロピオン酸モル比の増減がこの菌群の増減とよく一致することを示している。本試験でも両者に高い正の相関が得られた($r=.4841$, $p<.001$)ことから、この菌群がプロピオン酸の生成に深く関与していることはほぼ間違いない。プロピオン酸前駆体のコハク酸を産する *Bacteroides* 属菌は形態およびグラム染色性から判断するとこの菌群に含まれる⁹⁵⁾ので、S L投与時のプロ

ピオン酸生成比増はこのような菌種の占有率が上がったことに由来するものと思われる。また酢酸モル比とグラム陰性球菌のあいだにも有意な正の相関が得られた($r=.3143$, $p<.05$)が、S L 投与のこの菌群に対する影響は明確でなかった(表14)。一方S L はグラム陽性の球菌およびかん菌の割合を下げる傾向があった(表14)が、これらは酪酸生成との関連があることが指摘されている¹⁰¹⁾。この結果はS L 投与時の酪酸比の低下をある程度説明するかもしれない。

一般にイオノフォアはルーメン内のプロトゾア密度を下げ、菌密度を上げる^{100, 112, 114)}が、本試験では後者を下げる傾向にあった(表14)。この違いは本試験ではもともとプロトゾア密度が試験を通して極端に低かったことによると思われる。おそらく濃厚飼料多給によりひきおこされた低pHがプロトゾアの定着を阻害したのであろう。

一方、第1章において、S L を投与するまでもなくルーメン内プロピオン酸モル比が30-40%に達するような高濃厚飼料給飼時には、たとえS L を投与しても発酵様相の改善はあまり大きくないことを述べた。本試験の後半でV F A組成に両区であまり差がなく(図1)、増体成績へのS L の効果がさほど明確でない(表12)のはこの様な理由が上げられるだろう。さらに本試験で対照区に与えた人工乳にはクロルテトラサイクリンが添加されており、この抗生物質はS L と同様にプロピオン酸生成比を高める作用を有することが*in vitro*で確認されている⁵⁹⁾。よってこの抗生物質の存在も両処理間のV F A組成の差が顕著でなかった原因のひとつかもしれない。

ルーメン内アンモニア濃度はイオノフォア投与によって下がるという報告^{41, 51, 82, 102, 112, 114, 144)}は数多く、同時にN出納が改善されるという報告⁸²⁾もみうけられる。本試験でのルーメン内アンモニアおよび α -アミノN濃度はS L 区でやや低下する傾向にあった(図2)。もしこれらが飼料タンパク質のルーメンでの過剰な分解をS L が抑えた結果を示すものであるなら、下部消化管への飼料由来可消化タンパク質の流出増がみこまれ、N出納の改善にある程度貢献できるかもしれない。

消化管内容物の固相と液相の平均滞留時間はS L によって長くなる傾向にあり、同時に測定したN D FおよびA D F消化率はやや低下した(表16)。内容物の滞留時間を左右する主要因として飼料の粒度減少速度が挙げられる¹⁰³⁾。粒度の大

きな物（粗飼料片等が考えられる）が繊維含量が高いとすれば逆に繊維質消化の低下（すなわち粒度減少の遅滞）が内容物の通過を律速しているようにも思われる。Lemenagerら⁷¹⁾はMN投与時の液状部通過速度の低下を報告しているが、その機序については明言していない。上掲の推察、すなわち通過の律速要因としての繊維消化の妥当性についてはもっと詳細に検討する必要がある。滞留時間の増加は、換言するならば、ルーメン微生物や宿主の産する消化酵素に内容物がさらされる時間が長くなることを意味し、一方では飼料の摂取量自体の減少を導く。SLによる飼料利用性の改善を考える際、これらの相互関係を明確にすることが重要であろう。

ファイバースコープ法によるルーメン絨毛の観察結果から、その色調や形状についてSL投与による明確な影響は認められなかった（表15）。Ohtaniら⁹⁶⁾によると、乾草と濃厚飼料で飼養し、正常に発育中の10週齢の子牛のルーメン絨毛（前背盲囊部、本試験と同一部位）は、平均長が4.5mmで、色調が暗褐色、形状が指または葉状であった。我々の子牛と飼料や週齢が少し異なるが、その性状はよく一致していることから、幼齢牛へのSLの投与はルーメン絨毛の発達に対し極端な負の効果を示さないといえよう。ただし絨毛長に関してはSL区で少し短く、これは絨毛細胞の分裂を促進するVFA、特に酪酸¹¹¹⁾の生成がSLによって抑えられた結果かもしれない。

以上のことより、子牛へのSLの投与は、飼料（濃厚飼料）摂取量および増体量を高め、ルーメン内VFA産生様相やタンパク質分解様相を成畜でこれまで報じられてきたように有益に変更することで、飼料要求率を改善することがわかった。ルーメン内プロピオン酸産生比の増加は、ルーメン内グラム陰性かん菌の増加とよく連動しており、SL投与にともなう発酵様相の変化には微生物叢の変化が関与していることが明確となった。

第3章 哺育・育成牛におけるルーメン微生物叢の反応

母胎内の子牛は無菌的に保たれているが、生後間もなく種々の微生物が消化管内に定着し、飼料消化に貢献するに至る。適切なルーメン微生物叢が生育ステージの初期に形成されることは、固形飼料の摂取量増加につながり、子牛の発育、特にルーメン機能の発達にとって望ましい。

第2章で記したように、幼齢子牛へのSLの投与は増体量および飼料要求率を改善するが、これらは従来成畜で報告されてきたようなルーメン発酵様相の変化(37, 76, 87, 100, 114, 144)をともなっていた。しかもこの様な効果は、SLによる微生物叢の選抜の結果らしいことが検鏡による形態分類結果から明らかとなった。しかしながら菌によっては一貫したグラム染色性を示さない種があり、形態とかグラム染色性をもとにしたルーメン菌の分類には近年疑義が投げかけられている(108)。SLは哺育期の人工乳摂取量をやや高め、増体を促進したことから、適切なルーメン微生物叢の形成になんらかの働きかけがあったものとおもわれる。

本章ではこの点を明らかにするため、利用基質別にルーメン菌を分類できる嫌気性ロールチューブ培養法を用い、ルーメン微生物の定着様相におよぼすSLの影響を調査した試験結果について述べ、本イオノフォアの子牛への適用可能性について議論する。

材料および方法

ホルスタイン種雄子牛15頭(平均体重57.6kg, 2週齢)を平均体重が等しくなる様に5頭ずつの3群にわけ、個別にストールに繋養した。各々の群の子牛に抗生物質無添加、SL 20 ppm添加あるいはポートマイシン⁷⁰⁾(PT) 10ppm添加の濃厚飼料を第2章に示した飼養基準(表10)に従って給与した(各々C、SLおよびPT区)。給飼は日量を等分して9:00と17:00に行った。イタリアンライグラス乾草と水は自由摂取させた。供試飼料の成分組成を表17に示した。1週の予備期をおいた後3週齢から試験を開始し(開始時平均体重59.6kg)、25週齢まで飼養した。なお離乳は6週齢で実施した。

供試子牛へのルーメン微生物の感染機会を平等に与える目的で、成畜(放牧中

Table 17. Chemical composition of experimental feeds

Feeds	Moisture	Crude protein	Crude fat	Crude fiber	Crude ash	NFE ^a	NDF ^b	ADF ^c	ADL ^d
				(% as fed basis)					
Milk replacer	9.3	29.3	19.6	0.2	5.8	35.8	1.2	0.8	0.2
Calf starter	13.7	18.9	3.8	4.7	5.1	53.8	13.0	7.2	2.4
Formula feed for growing calf	12.1	16.2	3.1	6.6	6.7	55.3	19.5	9.7	2.3
Italian ryegrass hay	9.8	5.5	1.0	29.6	4.9	49.1	64.1	38.2	5.7

a: Nitrogen free extracts. b: Neutral detergent fiber. c: Acid detergent fiber.
d: Acid detergent lignin.

Table 18. Chemical composition of media for enumeration of rumen bacteria.

For cellulolytic bacteria		For total viable bacteria	
KH ₂ PO ₄	0.02g	Mineral solution I a)	7.5ml
K ₂ HPO ₄	0.03g	Mineral solution II b)	7.5ml
MgCl ₂	0.01g	Vitamin B mixture	1.0ml
CaCl ₂	0.01g	Hemin(0.01%)	1.0ml
NaCl	0.1g	Glycerol(1%)	5.0ml
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.1g	Glucose	0.05g
Cysteine-HCl	0.02g	Xylose	0.05g
Na ₂ CO ₃	0.4g	Cellobiose	0.05g
Rumen fluid c)	30ml	Maltose	0.05g
Cellulose d)	0.5g	Soluble starch	0.05g
Resazurin(0.1%)	0.1ml	Trypticase	0.2g
Distilled water	70ml	Rumen fluid c)	50ml
Agar	2g	Cysteine-HCl	0.05g
For lactate-utilizing bacteria		Na ₂ CO ₃	0.4g
Yeast extract	0.4g	Resazurin(0.1%)	0.1ml
Peptone	0.5g	Distilled water	30ml
MgCl ₂ ·6H ₂ O	0.03g	Agar	2g
NH ₄ Cl	0.05g	For amylolytic bacteria	
KH ₂ PO ₄	0.05g	Mineral solution I a)	7.5ml
Lactate(85%)	1ml	Mineral solution II b)	7.5ml
Cysteine-HCl	0.05g	Soluble starch	1g
Resazurin(0.1%)	0.1ml	Cysteine-HCl	0.05g
Distilled water	100ml	Na ₂ CO ₃	0.4g
Agar	2g	Rumen fluid c)	40ml
Adjust pH to 6.5 with Na ₂ CO ₃ solution		Distilled water	50ml
For proteolytic bacteria		Resazurin(0.1%)	0.1ml
Brain heart infusion	3.7g	Agar	2g
Yeast extract	0.5g	Dilution solution	
Casein	2g	Mineral solution I a)	7.5ml
Cysteine-HCl	0.04g	Mineral solution II b)	7.5ml
Na ₂ CO ₃	0.4g	Cysteine-HCl	0.05g
Resazurin(0.1%)	0.1ml	Na ₂ CO ₃	0.4g
Distilled water	100ml	Resazurin(0.1%)	0.1ml
Agar	2g	Distilled water	90ml

a) K₂HPO₄ 0.6g/Distilled water 100ml.b) NaCl 1.2g, (NH₄)₂SO₄ 1.2g, KH₂PO₄ 0.6g, CaCl₂ 0.12g, MgSO₄·7H₂O 0.25g / Distilled water 100ml.c) Rumen fluid from sheep on a hay-concentrate diet was stored at -20 C after bubbling with CO₂ and used after centrifugation at 25,000xg for 10 min.

d) Whatman No.1 filter paper.

のヘレフォード種雌牛)より採取した新鮮ルーメン液を3-9週齢の間毎週1回、子牛1頭当たり100ml量をカテーテルを通して子牛ルーメンへ投与した。投与したルーメン液は平均すると 2.0×10^7 /mlのプロトゾアを有しており、その構成は Entodinium 属(95.9%)、Isotricha 属(4.0%)および Diplodinium 属(0.1%)からなるものであった。

供試子牛の体重は毎週、飼料摂取量は毎日測定した。ルーメン液のサンプルは4,5,6,7,9,11,14,18および23週齢時朝給飼3時間後にカテーテルで採取した。

飼料の成分分析、ルーメン液のpH、アンモニア態N、 α -アミノ態NならびにVFAの分析、ルーメンプロトゾアの分別計数は第1章および第2章に記載したとおりである。

ルーメン菌の培養計数はHungate⁵⁷⁾の嫌気性ロールチューブ法に準じ、以下のようにして行った。すなわち培養可能総菌の計数にあたっては、増殖のための主要エネルギー源をすべてふくんだComplete Carbohydrate Agar培地を用い、デンプン利用菌、乳酸利用菌、タンパク質利用菌およびセルロース利用菌の培養計数には、主要エネルギー源として各々デンプン、乳酸、カゼインおよびセルロースパウダーを含む選択性培地を調製した。これら培地およびサンプル希釈液の成分を表18に示した。培地および希釈液成分は溶解後ハンゲイトチューブ(Pyrex製, 18x180mm)に各々5または4.5 mlずつ分注し、 O_2 -free CO_2 ガスを充分吹き込んでからブチルゴム栓を施し滅菌した。採取したルーメン液サンプル(0.5ml)は希釈液で 10^0 単位で適度に希釈し、あらかじめ溶解した所定の培地(45°C)に0.2mlずつシリンジで接種した。接種したチューブはただちに氷槽上で回転させロールチューブを作成後、これらを37°Cの恒温槽内で、7日(培養可能総菌)、2日(デンプンおよびタンパク質利用菌)、5日(乳酸利用菌)または21日(セルロース利用菌)培養した。培養後チューブ壁面に生じたコロニーを計数した。コロニー数に原ルーメン液の希釈率を乗じて菌数を算定した。

得られたデータは分散分析に供し、処理による影響が認められた場合は、各処理間の差をTukeyの検定法¹²⁸⁾で検定した。

結 果

供試牛15頭のうちC区の1頭は哺育期間中に原因不明の採食拒否を示したため試験から除外した。

他の14頭は試験期を通して良好な発育を示し、3-25週齢間の平均日増体量はC、S LおよびP T区で各々1.22, 1.29 および1.25 kgであった(表19)。S L、P Tいずれのイオノフォアも子牛の増体量を改善したが、統計的に有意なものではなかった(表19)。また、S Lは乾草摂取量のみ減少させたが、P Tは濃厚飼料と乾草いずれの摂取量も減少させた(表19)。その結果、両イオノフォア投与時の濃厚飼料要求率ならびに推定TDN要求率はC区にくらべ4-5%改善された(表19)。

表20にルーメン液のpH、アンモニアおよび α -アミノ態N濃度を示した。イオノフォアはpHに一貫した影響を及ぼさなかったが、S Lの投与は離乳前の時期(哺育期)のスターター摂取量をやや高め、pHを低くした。S LおよびP Tいずれのイオノフォアもアンモニアや α -アミノ態N濃度に顕著な影響を及ぼさなかったが、前者はやや低下、後者はやや増加した。

総VFA濃度はイオノフォア投与にともなう一貫した変化を示さなかったが、その組成は顕著な変化を示し、プロピオン酸比が高く($p<.05$)、酢酸比及び酪酸比の低い($p<.05$)組成となった(表21)。またこのVFA組成の変更は、離乳後濃厚飼料摂取量が増加するにつれてより明確になった(表21)。

プロトゾア総数とセルロース利用菌数の発育に伴う変化を図3に示した。4週齢時のルーメン内にすでにプロトゾアは定着しており、その密度は3処理の間で差がなかった。しかし7週齢時にはC区がイオノフォア投与のS LおよびP T区より有意に密度が高くなった($p<.05$)。それ以降処理間に明確な差はなかったが、全計測値をプールすると、S L区の値はC区より有意に低くなった($p<.05$)。プロトゾアはEntodinium属(82-100%)と Isotricha属(0-17%)で占められており、処理にともなう属構成の違いは認められなかった。Entodinium属はいずれの処理においても最初にルーメン内に定着(4週齢)し、Isotricha属の定着は9週齢でみられた。C区の1頭でのみ14週齢でPolyplastron multivesiculatumの出現(4×10^2 /ml)が認められたが、以後消失した。セルロース利用菌の数は処理による明確な影響は受けなかった。しかし離乳前の時期に限ってみるとC区がもっとも密度が高く、5週齢ですでに離乳直後(7週齢)のレベルにほぼ達しているのに比べ、イ

Table 19. Growth performance of experimental calves

Treatment ^a		Duration (Age in week)		
		3-13	13-25	3-25
Average daily gain (kg)	C	1.05(100)	1.36(100)	1.22(100)
	SL	1.12(107)	1.43(105)	1.29(106)
	PT	1.08(103)	1.39(102)	1.25(102)
Conc. ^b intake (kg/d)	C	2.24(100)	5.34(100)	3.93(100)
	SL	2.29(103)	5.33(100)	3.95(101)
	PT	2.15 (96)	5.22 (98)	3.83 (97)
Hay intake (kg/d)	C	0.57(100)	0.60(100)	0.59(100)
	SL	0.50 (88)	0.58 (96)	0.54 (92)
	PT	0.50 (88)	0.57 (95)	0.54 (92)
TDN ^c intake (kg/d)	C	1.95(100)	3.98(100)	3.06(100)
	SL	1.97(101)	3.96 (99)	3.06(100)
	PT	1.86 (95)	3.89 (98)	2.97 (97)
Feed conversion ratio				
(Conc. kg/gain kg)	C	2.15(100)	3.93(100)	3.22(100)
	SL	2.05 (95)	3.72 (95)	3.06 (95)
	PT	2.02 (94)	3.78 (96)	3.08 (96)
(TDN kg/gain kg)	C	1.87(100)	2.93(100)	2.51(100)
	SL	1.75 (94)	2.77 (95)	2.38 (95)
	PT	1.73 (93)	2.81 (96)	2.38 (95)

Values in parenthesis are percentages with respect to corresponding control. a: A calf starter and a formula feed for growing calf mixed with no antibiotic (C), 20 ppm salinomycin (SL) and 10 ppm portmicin (PT) were offered. b: Concentrates include a milk replacer, a calf starter and a formula feed for growing calf. c: Estimated TDN values of milk replacer, calf starter, formula feed for growing calf and Italian ryegrass hay are 105, 75, 70 and 40.8% (as fed basis), respectively.

Table 20. Changes with age in pH, ammonia and α -amino N levels in the rumen of calves

Treatment*		Age in week									Pooled
		4	5	6	7	9	11	14	18	23	
pH	C	5.48 ^{ab}	5.68	6.20	6.10	5.97	5.93	6.64	6.28	6.28	6.06
	SL	5.27 ^b	5.39	5.59	5.51	6.02	6.45	6.36	6.35	6.15	5.90
	PT	6.23 ^a	5.63	5.85	5.96	6.24	6.32	6.24	6.15	6.17	6.09
Ammonia N (mg/dl)	C	11.1	11.4	5.9	4.0	5.7	6.6	7.0	6.9	3.6	6.9
	SL	19.3	5.9	4.7	1.4	4.1	3.8	5.8	6.3	3.4	6.1
	PT	14.2	10.3	4.2	3.0	5.4	6.4	2.3	7.7	2.6	6.2
α -amino N (mg/dl)	C	2.2 ^a	2.3	1.7	2.1	1.4	1.6	1.4	0.8	2.0	1.7
	SL	3.9 ^b	2.5	2.3	2.0	2.7	0.8	2.8	0.7	2.1	2.2
	PT	2.5 ^{ab}	1.7	2.3	2.4	2.9	2.2	2.1	1.9	2.1	2.2

*: See Table 19. a, b: Values within a column without a same letter in their superscripts differ significantly ($p < .05$).

Table 21. Changes with age in total VFA level and VFA molar percentages in the rumen of calves

Treatment*		Age in week									Pooled
		4	5	6	7	9	11	14	18	23	
Total VFA (mM/dl)	C	17.7 ^a	16.6	11.8	14.2	13.3	14.8 ^a	7.7 ^a	11.2	12.5	13.3
	SL	17.7 ^a	17.6	14.5	16.9	13.5	10.7 ^b	10.0 ^b	9.6	11.1	13.5
	PT	13.3 ^b	15.6	14.2	13.4	12.6	12.2 ^{ab}	11.0 ^b	10.3	11.7	12.7
Acetate (%)	C	47.5	51.8	48.8	51.5	52.6	53.7	53.1	53.6	47.4	51.1 ^a
	SL	43.3	44.7	44.3	44.9	49.5	53.7	50.1	51.8	47.3	47.7 ^b
	PT	50.1	46.9	48.2	47.7	48.0	52.0	48.8	47.3	45.0	48.2 ^b
Propionate (%)	C	39.2	35.1	39.8	34.2 ^a	36.6	33.0	26.9 ^a	32.5	43.0	35.6 ^a
	SL	41.1	44.1	45.2	44.9 ^b	39.7	36.8	37.0 ^b	34.5	44.3	40.8 ^b
	PT	37.9	39.8	39.9	41.5 ^{ab}	39.9	36.8	43.8 ^c	36.2	45.3	40.1 ^b
n-Butyrate (%)	C	9.6	8.9	8.5	11.7	9.6	10.2	17.2 ^a	11.2	7.0	10.4 ^a
	SL	10.6	8.0	8.3	7.1	8.7	8.9	10.9 ^{ab}	10.4	5.8	8.7 ^b
	PT	7.8	9.2	8.4	7.9	9.5	8.5	5.8 ^b	12.9	6.9	8.5 ^b

*: See Table 19. a, b, c : Values within a column without a same letter in their superscripts differ significantly ($p < .05$).

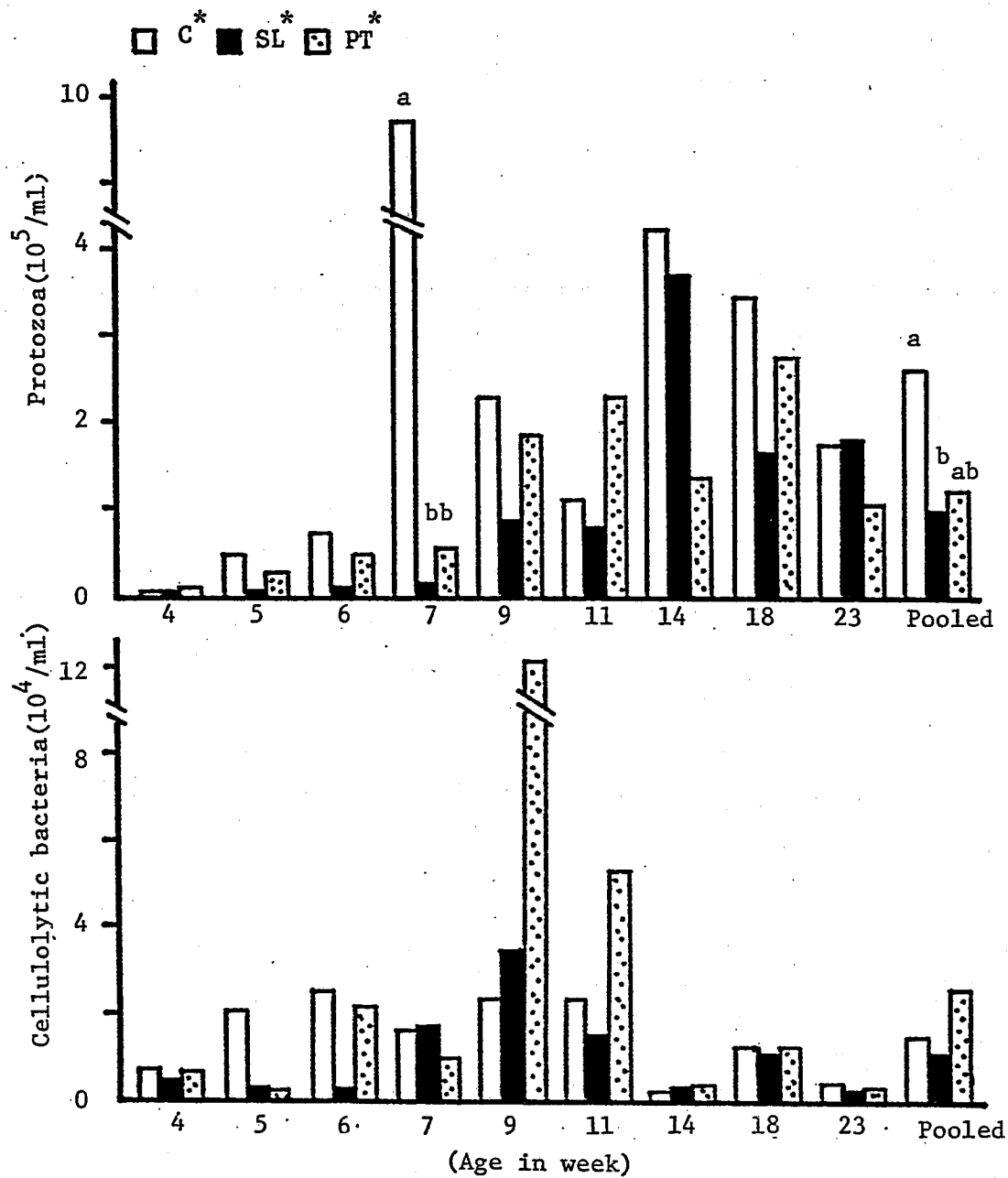


Fig. 3 Changes with age in counts of protozoa and cellulolytic bacteria in the rumen of calves.

a,b: Means without a same letter differ significantly ($p < .05$).

*: See Table 19.

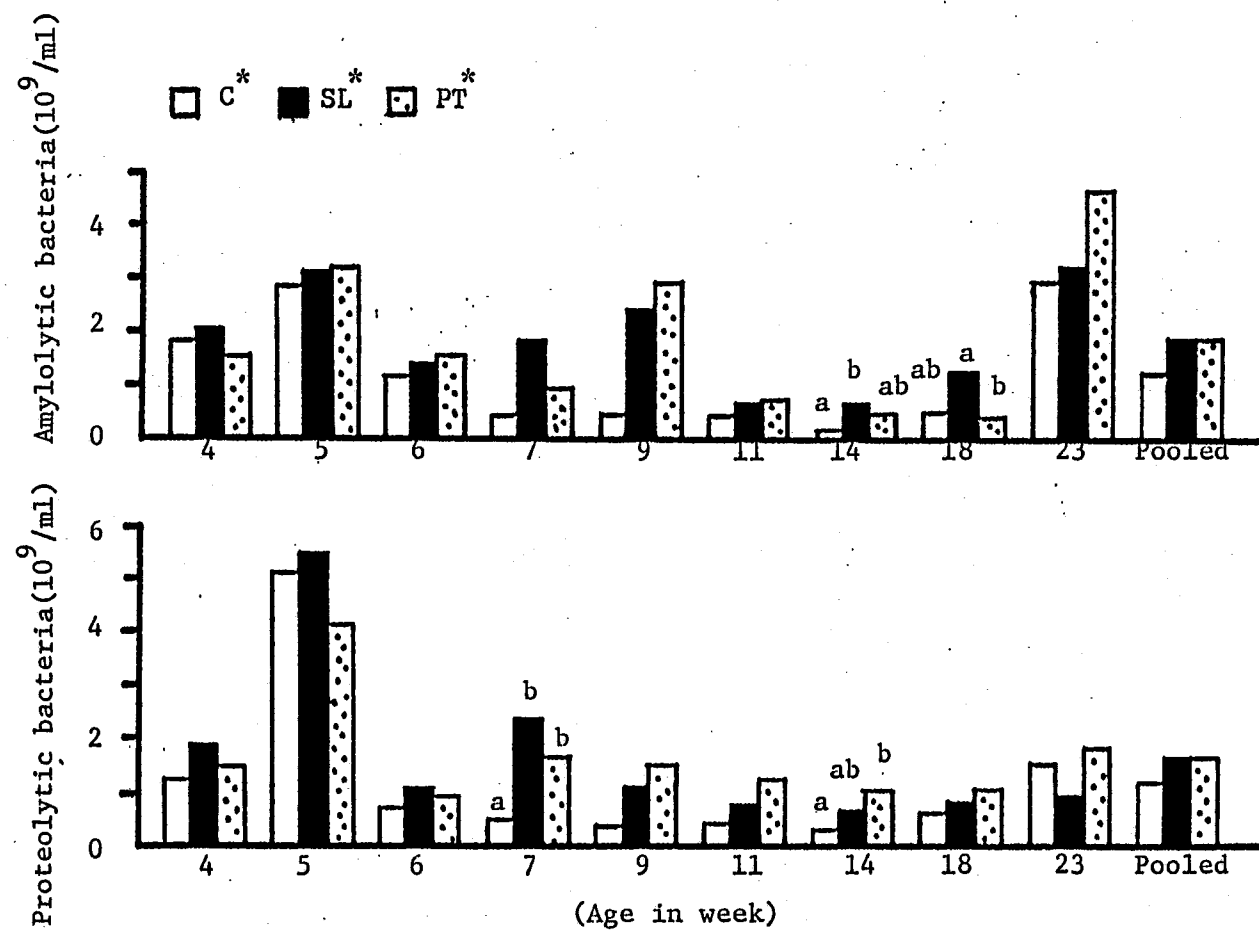


Fig. 4 Changes with age in counts of amylolytic and proteolytic bacteria in the rumen of calves.

a,b: Means without a same letter differ significantly ($p < .05$).

*: See Table 19.

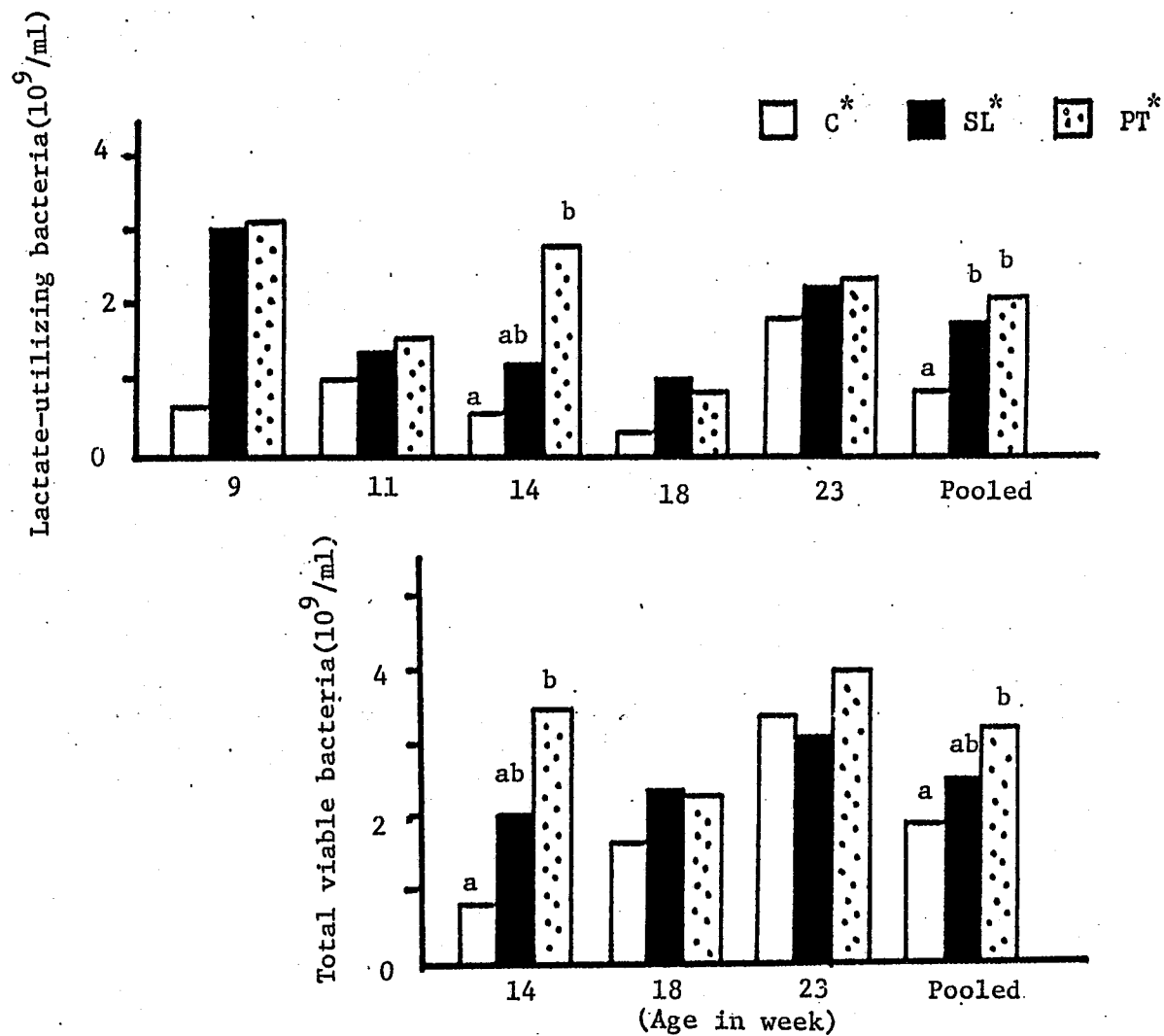


Fig. 5 Changes with age in counts of lactate-utilizing and total viable bacteria in the rumen of calves.

a,b: Means without a same letter differ significantly ($p < .05$).
 *: See Table 19.

オノフォア投与子牛、とくにS L投与子牛では密度が低い傾向にあった。

デンプン利用菌、タンパク質利用菌、乳酸利用菌および培養可能総菌数の発育に伴う変化を図4および5に示した。いずれのイオノフォアもデンプン利用菌およびタンパク質利用菌の数を増加させ、この効果はとくに離乳時以降に明確となった。すなわちデンプン利用菌数は、14週齢時にS L区でC区より多くなり($p < .05$)、タンパク質利用菌数は7週齢のS L区およびP T区、14週齢のP T区でいずれもC区より多くなった($p < .05$)。9週齢から計測した乳酸利用菌数はC区よりS L区およびP T区で多かった($p < .05$)。また培養可能総菌数も両イオノフォア、とくにP T投与時に増加した($p < .05$)。

考 察

Andersonら⁵⁾はわずか3日齢の子牛のルーメン内にすでに繊維分解菌やメタン生成菌が存在していることを報告している。このことは生後極めて早い時期に主要な細菌群がルーメンに潜在できることを示唆している。これら各種の菌群が常在菌として定着するかどうかは、ルーメンpHや抗生物質の有無といった種々のルーメン環境因子が個々の菌の生育に適しているか否かで決まるものと思われる。本試験でも開始当初(4週齢時)のルーメン微生物叢は3処理間で大きく異なることはなかった(図3および4)。

本試験と同様の濃厚飼料を比較的多給する育成方式下で飼養した子牛ルーメンにはまったくプロトゾアが定着できない^{5,6)}か、できても前章で述べた試験結果のように非常に低密度である。しかしこれらの試験では成畜からのプロトゾア感染状況についてまったく注意が払われていなかった。本試験で、成畜からのルーメン液の移植はプロトゾアの定着を早めることに成功したが、このことは成畜からの感染が定着の重要因子であることを示している。最初に定着したプロトゾアはEntodinium属であったが、これは哺育期のルーメンpHが低いことに由来すると思われる。しかしその後の密度の上昇はイオノフォア特にS Lの存在により阻害された(図3)。S L¹¹⁴⁾およびP T⁶⁶⁾両者とも成畜ルーメン内のプロトゾア(特にEntodinium属)密度を低下させることが知られており、子牛ルーメン内の定着やその後の占有率の増加にも負の作用を持つことを示唆している。

このようなプロトゾアの定着の遅れが子牛の発育にどのような影響を及ぼすか明かではないが、少なくともルーメン菌叢を変える可能性がある。一般にプロトゾア密度の低下（またはプロトゾアの除去）は菌の密度を増加させる¹⁴⁷⁾が、デンプン利用菌においては特に明確である。なぜならデンプン利用菌はおもに飼料中のデンプン粒子に付着するが、プロトゾア数の減少はプロトゾアによる捕食を免れるデンプン粒および付着性デンプン利用菌の生存を導くからである。このようなプロトゾアとデンプン利用菌との捕食・被捕食関係は脇田・星野¹⁴¹⁾が報告しており、両者のルーメン内密度の間には高い負の相関がある。本試験で両イオノフォア投与時にデンプン利用菌が増加したのは（図4）、このことが一因と思われる。Diplodinium属のような大型の貧毛類が定着できなかったのはイオノフォアの生育阻害作用^{46, 66)}よりはむしろ子牛ルーメン内pHの低さが原因だろう。

子牛の加齢にともなうセルロース利用菌の定着様相は、プロトゾアのそれとよく似ていた。すなわち7週齢時のセルロース菌密度は3処理間にほとんど差がなかったが、それ以前はイオノフォア、とくにSLによる増殖抑制作用がうかがわれた（図3）。SLは成牛の繊維消化を阻害する¹⁴⁴⁾が、これは個々の単離セルロース分解菌に対し強力な生育阻害作用を有する⁸⁵⁾ことで裏づけられている。一方、PTは成めん羊のルーメン内セルロース消失率を有意に低下させることが報告されており⁶⁶⁾、これもセルロース分解菌への負の作用を示唆している。このような両イオノフォアの作用は、本試験でみられたセルロース利用菌群の定着の遅れ（図3）を説明するものであろう。さらにSL区の子牛ではスターター摂取量が多くルーメンpHがやや低くなった（表20）が、これもセルロース菌群の定着には負の要因になったと思われる。

Van Nevel and Demeyer¹³²⁾は*in vitro*でルーメン混合菌をカゼインとともに培養した際、MNを同時に添加するとカゼインの分解量は変わらないのにアンモニア生成量が激減することを発見した。同時に α -アミノ態Nの集積が認められたことから、彼らはMNはルーメン菌の脱アミノ活性を抑制すると結論している。本試験でもSLまたはPT投与時に、ルーメン内アンモニア濃度が下がり α -アミノ態N濃度が上がる傾向がみられ（表20）、しかも同時に計測したタンパク質（カゼイン）利用菌の数も増加している（図4）。これらは両イオノフォアがタンパク質よりもむしろペプチドやアミノ酸を分解する系を阻害することを示唆す

るものであり、上掲の報告の結論を支持している。

いずれのイオノフォアもデンプン利用菌のルーメン内密度を上げたが、この傾向は子牛が離乳した後、濃厚飼料すなわちイオノフォア摂取量が高まるにつれ明確になった（図4）。このデンプン利用菌の変化によく同調して推移したのが乳酸利用菌数で、イオノフォア投与時に有意に増加した（図5）。デンプン分解性を有する菌は最終代謝産物としておもにコハク酸、プロピオン酸あるいは乳酸を生成する⁹⁵⁾。コハク酸はプロピオン酸の前駆物質であり、通常ルーメンに蓄積することではなく速やかにプロピオン酸に転換される。一方乳酸は、*Megasphaera elsedenii*や*Selenomonas ruminantium*といった乳酸利用菌によりプロピオン酸に変わるが、これら2種ともイオノフォア存在下でよく生育する^{22, 85, 98)}。これらのことから、本試験のSLあるいはPT投与牛で認められたデンプン利用菌や乳酸利用菌の増加は、ルーメン内プロピオン酸産生量の増加（表21）に大きく貢献しているものと思われる。デンプン分解性菌で、コハク酸を大量に産生し、しかもイオノフォアへの抵抗性を有する代表種として *Ruminobacter amylophilus*, *Bacteroides ruminicola*や*Succinomonas amylolytica*があげられるが、これらがSLやPT投与牛のルーメン内で優占種である可能性は高いだろう。

以上のことより、子牛へのSLの投与は、ルーメン内でプロトゾアやセルロース利用菌群の形成をやや遅らせることから、子牛の繊維消化能を低める可能性を持つ一方、プロピオン酸およびその前駆体を産生する菌の占有率を上げることで発酵様相の有益な変化をもたらすことが明かとなった。このようなプロピオン酸産生比の高い発酵様相への移行は、子牛の飼料要求率の改善に大きく貢献しているものと思われる。また本試験でSLとの比較対象として用いたイオノフォアPTは、程度の差こそあれ、SLとほぼ同様の効果をもつものと評価された。

前章記載の試験あるいは本試験で採用した若齢肥育方式にみられる幼齢時より濃厚飼料を比較的多給する飼養体系下では、SLの子牛への適用は有益であるように思われた。しかし、その使用を積極的に推奨するには、SL給与育成後の肥育成績や出荷時の肉質等について追跡調査が必要である。

第3編 サリノマイシンの作用機序

前編においては、実際の生産現場に準じて飼養した肥育牛及び哺育・育成牛における長期投与SLの作用効果について述べ、既報の成畜への短期投与例と同様SLに対する反応として、飼料要求率の改善とプロピオン酸産生主体型へのルーメン発酵様相の変化が現れることを示した。またこの効果は基本的にはルーメン微生物叢の変化を介して導かれることを明らかにした。しかし一方で、このようなルーメン発酵への作用の持続性の問題について検討を要することを指摘した。

VFA産生様相の変化にともない、ルーメンでのVFA生成以外の代謝反応系、内容物の移動速度、ルーメン内微生物タンパク質合成量やルーメンでの分解を免れる飼料成分量等の変化が予想されるし、SLがこれらの要因に直接作用する可能性もある。これらの要因は当然宿主の栄養に大きく影響を及ぼすことから、その量的な検討が必要である。

本編ではめん羊を供した基礎実験を通して、以上の課題に答えるべく、SLのルーメン内消化・発酵に対する作用様式とそれらの宿主栄養へのかかわりについて考察する。

第1章 ルーメン内消化・発酵におよぼす影響とその持続性

SL投与にともなうルーメン内発酵様相の変化は、特定のルーメン微生物の選抜淘汰⁸⁵⁾による微生物叢の変化に負うところが大きい。しかしながら、本来SLに対し抵抗性のない微生物種もSLの投与を長期間続けると耐性を獲得する可能性が考えられる。Olumeyanら¹⁰⁰⁾はSL給与牛のルーメン液中の菌数を嫌氣的培養法で計測する際、培地にSLを添加しSL抵抗性菌数を同時に測った。その結果、SL給与中のルーメンの方がSL抵抗性菌の数が多いこと、SL継続投与で抵抗性菌が増加することがわかった。もしこのような耐性菌の増加があらゆる条件下で生ずるのなら、SLの効果は投与期間が長くなるにつれて低減することもあると考えられる。

中島ら⁸⁷⁾はSL投与を9ヶ月継続した肥育牛の肥育成績が、最後の3ヶ月間にかぎり改善が全く認められなかったことから、SLに対する耐性の問題について

て詳細に検討する必要性を指摘している。また前編第2章で、黒毛和種雌牛肥育時にも同様な現象がおこり、しかも同時にSL耐性プロトゾアが増加することを明らかにした。ただしこれらの長期にわたる野外観察例は、飼料構成の変化や加齢等の要因が複雑に絡んで発現したものであるため、SL効果の持続性の問題についてはもっと単純化した試験設計のもとで検討する必要がある。しかし現在イオノフォア効果の持続性に焦点をあてた研究はまったくない。

本章では、比較的短期間でのSL継続投与が、一定の飼料構成で定量制限給飼下にあるめん羊のルーメン内消化・発酵におよぼす影響について述べる。

材料および方法

試験1

8頭の成めん羊（平均体重43kg，ルーメンフィステル装着）を4頭ずつの2群に分けて供試した。各めん羊には濃厚飼料（肉牛用配合飼料）500gとイタリアンライグラス乾草300gを8:30と17:30に等分して給与し、50日間個別飼養した。水は自由摂取させた。飼料の成分組成を表22に示した。最初の10日間を抗生物質を与えない対照期とし、つぎの30日間をそれぞれの群にSLまたはPTを含む飼料を与えるイオノフォア投与期とした。最後の10日間は再び抗生物質を含まない飼料で飼養した（投与中止期）。両イオノフォアは全飼料中濃度が20ppmになるように濃厚飼料に32ppm添加した。ルーメン液のサンプリングは図6に示したスケジュールに従って行った。サンプルは朝の給飼3時間後にフィステルを通して採取し、pH、VFA、アンモニアおよび α -アミノ態Nならびにプロトゾアの計測に供した。また各群4頭のうち2頭を用いて、ナイロンバッグ法⁷⁷⁾による飼料CPおよびセルロースのルーメン内分解率の測定を、対照期とイオノフォア投与期に実施した（図6）。用いたナイロンバッグは10x5cmの大きさで、ポアサイズは約45 μ mであった。バッグ内には給与飼料と同じもの（濃厚飼料と乾草を1.0mmに粉碎したものを5:3で混合した）を2.0g封入し、これをめん羊のルーメンへ朝の給飼時に挿入し、2, 4, 8, 15 および 24 時間浸漬した後とりだした。所定時間浸漬前後のバッグ内DM、CP、セルロース量の差を各成分分解量とした。

試験 2

3頭の成めん羊（平均体重39kg，ルーメンフィステル装着）を試験1と同様に50日間飼養した。供試イオノフォアはSLのみとした。図6に示したスケジュールにしたがいルーメン液サンプルをとり、プロトゾアおよび細菌を顕微鏡で分別計数した。ルーメン液のサンプリングと同じ日の朝給飼時に、各めん羊のルーメンへ4個のナイロンバッグ（2個は粉碎乾草、のこり2個は粉碎濃厚飼料を封入）を挿入し、いずれも24時間後にとりだした。乾草封入バッグについてはNDF消失率を、濃厚飼料のそれについてはCP消失率を測定した。

飼料の成分分析、ルーメン内容物のVFA、アンモニアおよび α -アミノ態Nの分析ならびにプロトゾアと細菌の分別計数は第2編第1・2章に記載した方法で実施した。セルロースはADFから酸性デタージェントリグニン（ADL）を差し引いて算出した。有意性の検定はスチューデントのt検定¹²⁸⁾を用いた。

結果

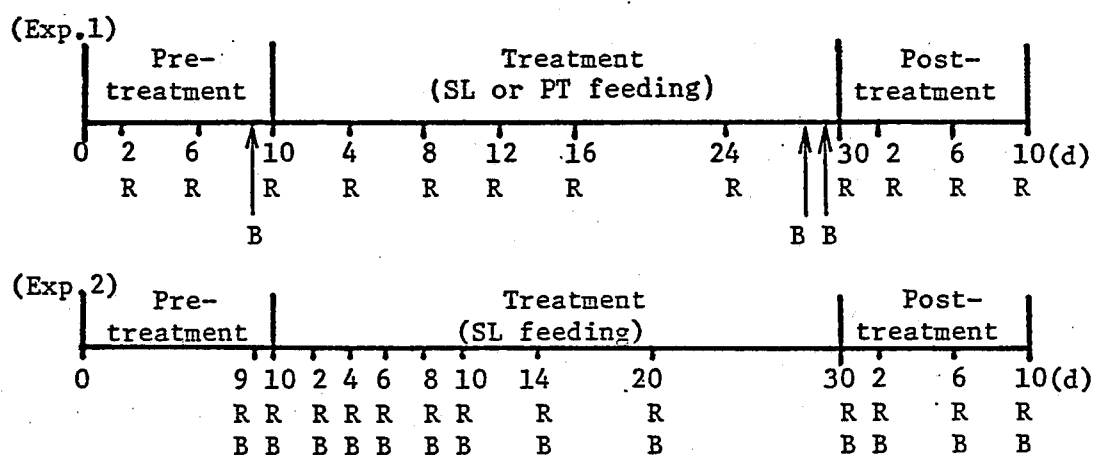
試験 1

ルーメン液のpH、総VFA濃度およびVFA組成の推移を図7に示した。SLおよびPTいずれのイオノフォアもpHと総VFA濃度に有意な影響を及ぼさなかった。しかしVFAの組成は両イオノフォア投与開始にともない急激に変化した。すなわち、酢酸および酪酸比は減り($p<.001$)、プロピオン酸比が増加した($p<.001$)。この変化は投与開始4日目で確認され($p<.05$)、以後投与期間中継続して維持された。一方、投与を中止するとSL群では中止6日目でこのような効果は消失した。PT群ではプロピオン酸比および酪酸比の変更は投与中止6日目で認められなくなったが、酢酸比は10日後でもまだ対照期より有意に低いレベルで維持されていた。

ルーメン内アンモニアおよび α -アミノ態N濃度の推移を図8に示した。SLは両者の値を有意に下げた($p<.05$)が、PTの場合はいずれも全体的に低下する傾向があったものの有意なものではなかった。いずれのパラメータもイオノフォアの投与を中止すると対照期のレベルへもどったが、この回復には少なくとも6日

Table 22. Chemical compositions of experimental feeds.

	Feeds	
	Formula feed	Italian ryegrass hay
Dry matter	87.3	86.5
	(% of DM basis)	
Crude ash	7.3	5.6
Crude protein	14.2	7.9
Crude fiber	4.9	33.4
Ether extracts	3.2	1.8
Nitrogen free extracts	70.4	51.3
Neutral detergent fiber	16.4	67.4
Acid detergent fiber	9.1	40.6
Acid detergent lignin	2.5	5.7



R) Ruminal fluid was sampled.

B) Nylon bag trial was carried out.

Fig. 6. Experimental periods and sampling days.

Table 23. Disappearances of dry matter, crude protein and cellulose from nylon bag suspended in the rumen (Exp.1).

Nutrients	Pre-treatment period ^{a)}					Treatment period(SL) ^{a)}				
	Hours after suspension in the rumen					Hours after suspension in the rumen				
	2	4	8	15	24	2	4	8	15	24
	(%)									
Dry matter	36.4	44.6	42.1	50.6	57.3	34.0	35.1	41.0	45.6	55.1
Crude protein	41.0	49.2	44.9	46.1	52.4	42.0	41.0	47.1	51.1	58.4
Cellulose	ND ^{b)}	ND	ND	ND	22.8	ND	ND	ND	ND	ND

Nutrients	Pre-treatment period					Treatment period(PT)				
	Hours after suspension in the rumen					Hours after suspension in the rumen				
	2	4	8	15	24	2	4	8	15	24
	(%)									
Dry matter	31.6	39.0	46.2	54.9	69.6	34.9	37.0	43.4	49.5	60.4
Crude protein	35.2	41.7	47.1	51.1	58.4	41.9	42.2	51.8	53.2	63.4
Cellulose	ND	ND	ND	ND	44.5	ND	ND	ND	ND	26.0*

* Means are significantly different from those in the pre-treatment period(p<.10).

a) Refer to Fig. 6. b) Not determined.

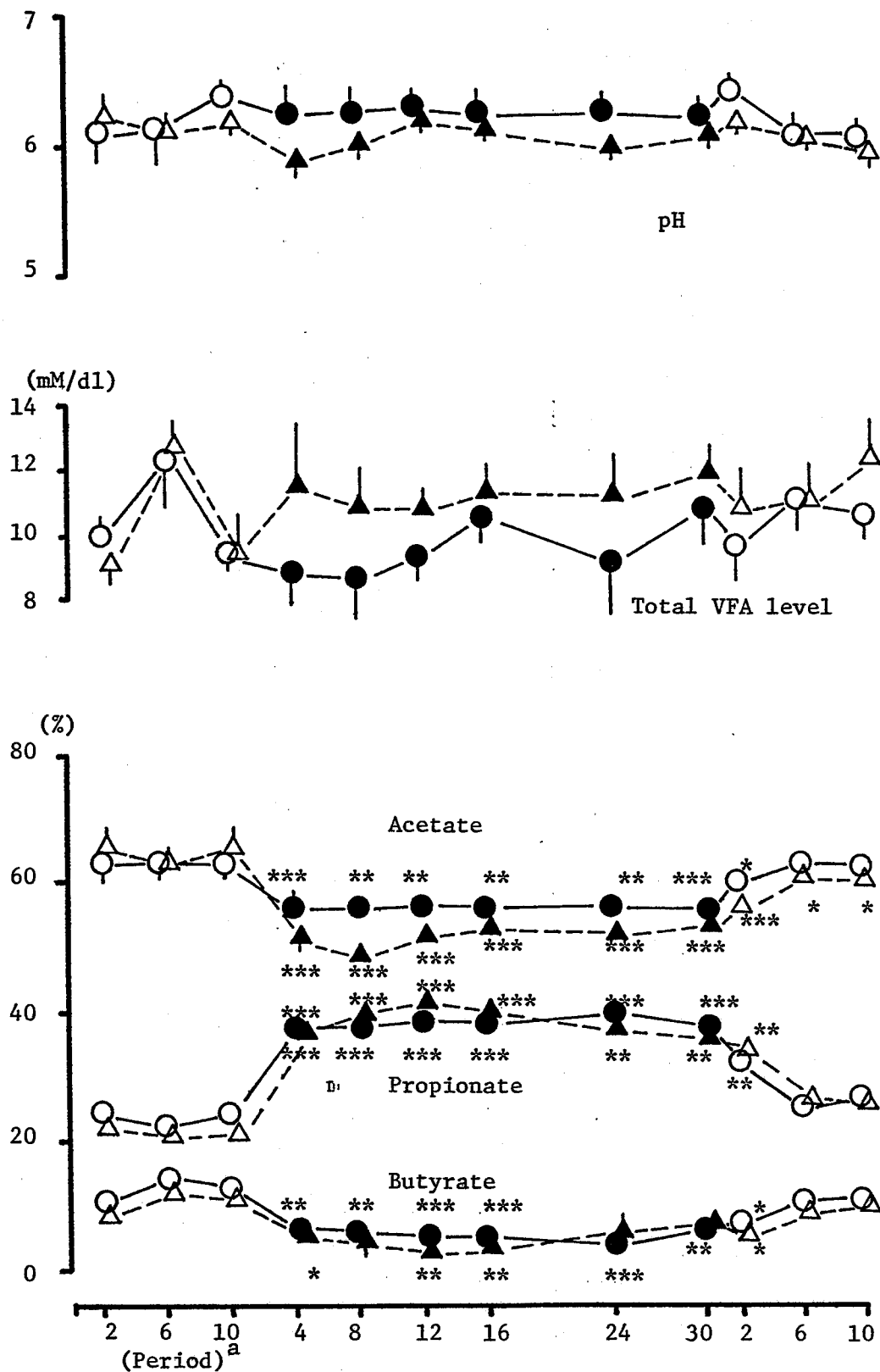


Fig. 7. Ruminal pH, total VFA level and VFA molar percentage (Exp.1).

a) Refer to Fig. 6. *, **, ***) Means are significantly different from those in the pre-treatment period at levels of 5, 1 and 0.1%, respectively. ●—●: SL feeding ▲—▲: PT feeding

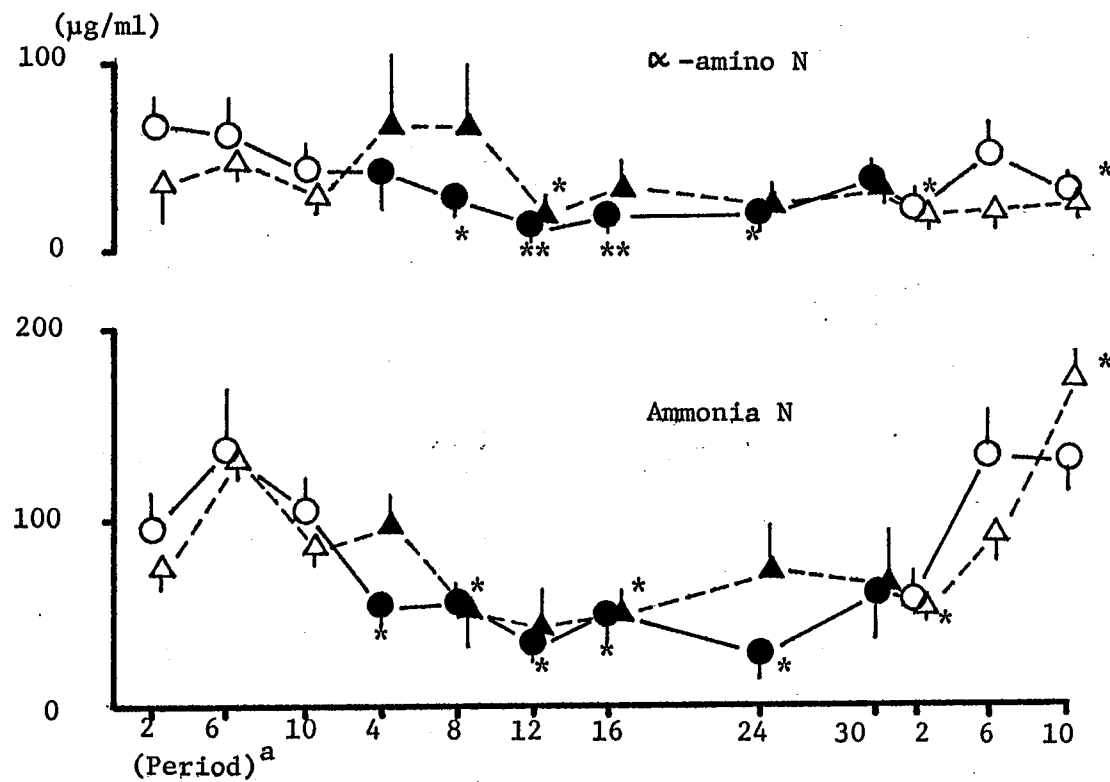


Fig. 8. Ruminal concentrations of α -amino and ammonia nitrogen (Exp.1).

a, *,**) Refer to Figs. 6 and 7.

●—●:SL feeding ▲---▲:PT feeding

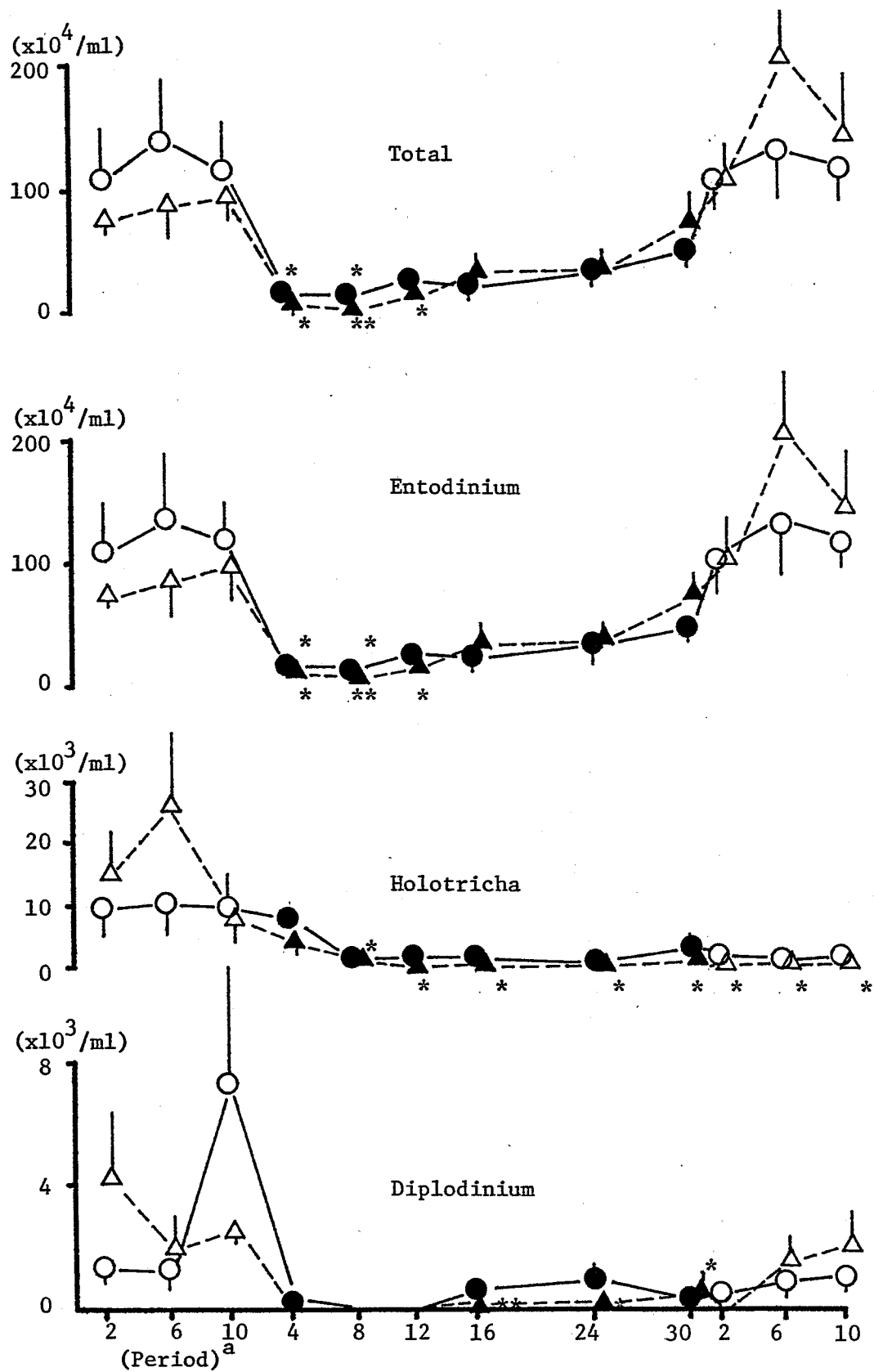


Fig. 9. Total and generic counts of rumen protozoa (Exp.1).
a, *,**) Refer to Figs. 6 and 7.

●——●: SL feeding ▲———▲: PT feeding

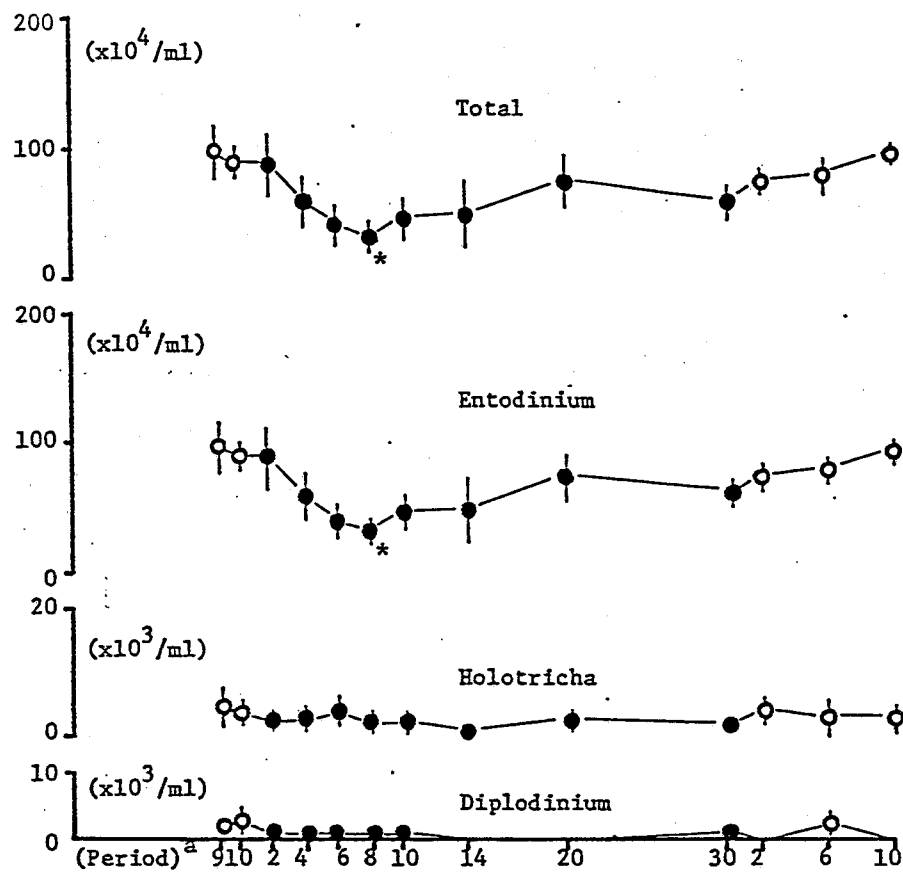


Fig. 10. Total and generic counts of rumen protozoa(Exp.2).
a, *) Refer to Figs. 6 and 7, respectively.

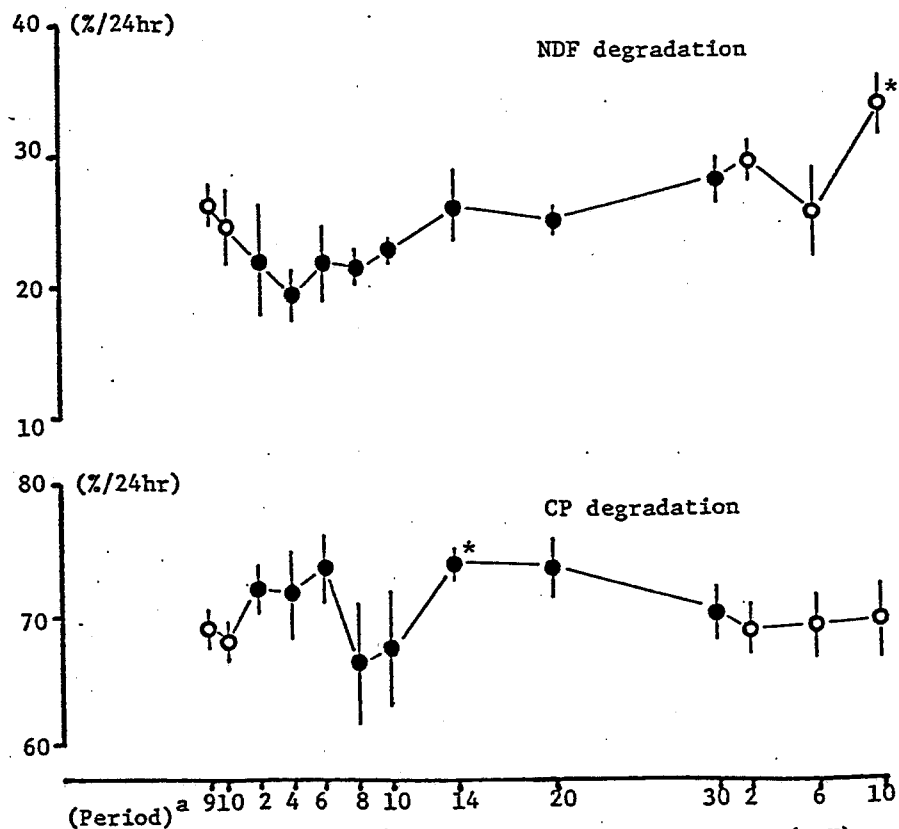


Fig. 11. Ruminal degradation of neutral detergent fiber(NDF) and crude protein(CP) determined by nylon bag technique(Exp.2).
a, *) Refer to Figs. 6 and 7, respectively.

Table 24. Rumen bacterial composition classified by Gram reaction and morphology.

Period ^{e)}	Total count (x10 ⁹ /ml)	Cocci(-)	Cocci(+)	Curved rod ^{a)}		Curved rod ^{b)}		Rod ^{c)}	Rod ^{d)}	Rod(+)
				[(-)Small]	[(-)≥Medium]	[(-)Small]	[(-)≥Medium]	[(-)Small]	[(-)≥Medium]	
Pre-T	10.2	45.4	3.0	0.5	0.2	44.4	2.3	1.6		
T-2	10.1	48.5	1.9	1.0	0.5	42.8	1.9	2.0		
T-4	19.0 ^{**}	49.8	1.5	1.2	0.3	41.9	2.8	0.7		
T-6	19.7	50.6	1.2	0.7	0.3	43.5	1.9	1.0		
T-8	13.8	50.0	1.5	1.2	-	42.4	1.8	1.5		
T-10	14.6	49.4	1.2	0.9	0.4	43.0	2.5	1.0		
T-14	12.5	47.2	0.9 [*]	0.8	0.5	45.5	2.9	0.9		
T-20	10.6	47.8	0.1 [*]	1.2	0.6	45.8	1.7	1.2		
T-30	13.3 [*]	49.6	1.9	0.8	0.1	41.4	1.3	1.5		
Post-2	11.2	52.6	1.9	0.6	0.4	39.5	1.3	1.0		
Post-6	13.1	47.8	1.6	1.3	0.1	41.6	2.0	2.8		
Post-10	10.8	48.4	2.0	0.8	0.4	44.0	1.3	1.7		

a) Gram negative small curved rod (0.8-4.0x0.2-0.4μm).

b) Gram negative medium and large curved rod (1.7-7.0x0.4-1.5μm).

c) Gram negative small rod (0.9-2.0x0.35-0.7μm).

d) Gram negative medium and large rod (1.2-4.5x0.7-1.7μm).

e) Refer to Fig. 6. *,**) Refer to Fig. 7.

を要した。

ルーメンプロトゾアの分別計数結果を図9に示した。両イオノフォアとも投与開始後4日目で総プロトゾア密度は有意に低下した($p < .05$)。SL投与時は8日目まで対照期より有意に低い値が観察されたが、それ以降徐々に密度は増加し投与前の値に近づいた。一方PT投与時は4-12日目の間有意な低下が認められたが、その後やはり対照期の密度に回復する傾向があった。このようなイオノフォアへの適応反応はEntodinium属のみにみられ、Holotricha属およびDiplodinium属はイオノフォア(とくにPT)による生育抑制作用が比較的よく維持されていた。いずれのイオノフォアも投与を中止すると、プロトゾア密度は速やかに投与前のレベルへ戻った。

表23にナイロンバッグ法で測定したルーメン内DM、セルロース、CP消失率を示した。DMおよびセルロース消失率は両イオノフォアとくにPT投与時に低下する傾向にあった。しかしCP消失率にはイオノフォアによる明確な影響は認められなかった。

試験2

プロトゾア密度の推移を図10に示した。SLはプロトゾア密度を低下させたが、対照期に比べ有意な低下が確認されたのは投与開始後8日目のみで、以降投与期間が長くなるにつれ対照期のレベルへ回復する方向へ漸増するという、試験1と同様な結果となった。このような結果はプロトゾアの大半を占めるEntodinium属の挙動が主因となっており、Holotricha属およびDiplodinium属はいずれもSLで生育抑制を受けたが、総プロトゾア密度の変化への影響はわずかなものであった。また、いずれのプロトゾアもSL投与中止により速やかに対照期のレベルへもどった。

表24にルーメン細菌の数及び組成に関する検鏡結果を示した。SL投与期を通して細菌数は対照期のそれよりも多い傾向にあった。いずれのサンプルにおいても優占種は、グラム陰性球菌(直径, $0.3-1.0\mu\text{m}$)、グラム陽性球菌(同, $0.5-1.1\mu\text{m}$)、グラム陰性小かん菌(長径 $\times$ 短径, $0.9-2.0\times 0.35-0.7\mu\text{m}$)、グラム陰性中・大かん菌(同, $1.2-4.5\times 0.7-1.7\mu\text{m}$)ならびにグラム陽性かん菌(同, $0.65-2.1\times 0.45-0.76\mu\text{m}$)であった。これらの構成割合に及ぼすSL投与の影響は明確ではな

かったが、グラム陽性球菌の割合がS L投与時にやや減少した。

ナイロンバッグ法で経日的にN D FおよびC P消失率の推移を測ったところ、前者はS L投与開始初期（2-10日目）にやや低下したものの、14日目以降は対照期と変わらぬ値を示した（図11）。後者は投与にともなう明瞭な変化がみられなかった（図11）。

考察

S LおよびP Tともルーメンp Hならびに総V F A濃度を変えることなくプロピオン酸産生割合を高め、酢酸および酪酸産生割合を低下させた（図7）。このV F A組成への影響は極めて明確で、しかも両イオノフォア投与期間中よく持続した（図7）。Nagaraja and Taylor⁸⁵⁾はS Lのルーメン単離菌への抗菌スペクトラムについて報告している。それによるとS Lは酢酸、ギ酸、水素および酪酸をおもな代謝産物とするルーメン菌の生育を抑制し、プロピオン酸やその前駆体のコハク酸を産生する菌にはなんら生育阻害を示さない。このような作用は本試験でも認められたように実際のルーメン内でのV F A産生様相の変化によく反映されており、イオノフォアの効果は主にルーメン微生物叢の変化によるものである^{12, 28, 110, 116)}ことを示している。酢酸および酪酸産生系であるプロトゾア⁴⁶⁾が両イオノフォア投与で減った（図9・10）ことも両方の酸の生成比が下がった（図7）ことを説明しうる。しかしながら本試験結果のうち特筆すべきことは、イオノフォア投与でいったん下がったプロトゾア密度が徐々に回復する（図9・10）事実である。前編第1章で記載した黒毛和種肥育牛を用いた野外試験でも、S L投与期間が本試験よりはるかに長いものの、同様なプロトゾア密度の回復傾向が観察されており、これらはS Lに対するプロトゾアの耐性獲得を示唆するものといえよう。しかしながら本試験でみられたプロトゾア密度の回復はV F A産生様相に有意な変化をもたらすことなく、S LあるいはP TのV F A組成に及ぼす効果はよく維持されている（図7）。

プロトゾアは細菌と栄養競合関係にあるのみならず、デンプン利用菌のような飼料粒子に付着する特定の菌を捕食することでルーメン生態系に影響を及ぼす重要因子である¹⁴¹⁾。よって耐性プロトゾアの出現はS Lによって変更を受けたル

ルーメン内消化様相をある程度修復する可能性もある。なかでも試験2で認められたSL投与にともなうルーメン内NDF消化の抑制傾向は、投与開始2週間目に明確でなくなり(図11)、プロトゾアの挙動(図10)とよく一致していることから、これにはプロトゾア密度の回復が関与しているらしいことがわかった。プロトゾア自身の繊維消化への貢献の有無については過去数十年間議論され続けてきている。プロトゾアのなかでも大型の貧毛類の代表種 *Diplodinium affine* や *Polyplastron multivesticulatum* はセルロースやキシランを消化できる¹³⁸⁾。またプロトゾア除去動物の繊維消化能はプロトゾアを有する動物のそれよりも一般に低い¹⁴⁷⁾ことから、プロトゾアの存在は直接または間接的に繊維消化促進に関与するという見解が大勢を占めている。本試験での優占種である *Entodinium* 属プロトゾアも直接にキシラン消化に貢献するという報告⁹⁾もあることから本結果はこれらの説をうらづけるものであろう。

SL投与時のルーメン菌を直接検鏡法で調査したところ、総菌数が増えた(表24)。これは、上述したように細菌を補食するプロトゾアが減少したための現象と解される。一方、グラム染色性と形態から分類した各種菌群の占有率は、SLによる変化がほとんどなく、わずかにグラム陽性球菌比が下がった程度であった(表24)。SLは元来グラム陽性菌の生育を抑制する⁸¹⁾ため、妥当な結果と思われるが、VFA組成が顕著な変化を示している割には各菌群構成比の動きがなさすぎる。前編で述べたように、牛のルーメン菌はSL投与時にグラム陰性かん菌比が高まりしかもこの比とプロピオン酸産生比とは高い正の相関がある。このような牛の場合の動向と本試験のめん羊での結果とは全く異なるものであった。本試験では培養法による菌叢の検索を実施していないが、同様な飼養条件下にあるめん羊でSL投与にともなうデンプン利用菌の増加やセルロース利用菌の減少が観察されており¹³⁹⁾、ルーメン菌叢は確実に変動したものと考えられる。にもかかわらず形態分類で顕著な差が生じないのは、両畜種間の常在菌種の違いを示すものかもしれない。

脇田ら¹³⁹⁾は本試験とほぼ同様の飼養条件にあるめん羊を用い、SL連続投与がやはりプロトゾアの漸増を誘起すること、同時に一旦減少したセルロース利用菌の増加をもたらすことを報告している。すなわち、SL投与前に約 1.3×10^7 /ml存在していたセルロース利用菌が投与4日目で 4.0×10^5 /mlまで減少するが、20日

目に $1.3 \times 10^7/\text{ml}$ まで回復する。この場合本来抵抗性のない菌種が耐性を得たのか、もともと抵抗性を持つ種が占有率を上げていったのか二通りの可能性が考えられる。いずれが優位かを考察する材料はないが、後者に属するセルロース分解菌に *Fibrobacter succinogenes* があり⁸⁵⁾、この様な種が優勢になっている可能性は比較的高いだろう。また脇田ら¹³⁹⁾の報告したセルロース利用菌の動向は本試験でみられたルーメン内 NDF 消失率の動向(図11)とよく一致しており、本試験結果にもこの様な考察が適用できるものと思われる。つまり、SLによる繊維質消化抑制作用は投与初期にみられる一過性の現象で、耐性プロトゾアや抵抗性を持つ繊維分解菌の増加にともない消失すると考えられる。これまでの報告でイオノフォア投与時の繊維質消化については、抑制される^{66, 102, 144)}、改善される¹⁴⁵⁾、変化がない³⁾と一貫していない。この原因として、消化率を測定した時点でのイオノフォア投与開始からの経過日数が試験間で同一でないことに留意する必要があることを指摘しておきたい。

ルーメン液のアンモニアおよび α -アミノ態N濃度はイオノフォア、とくにSL投与時に下がった(図8)。両者のルーメン壁を通しての吸収および下部消化管への流出速度が処理間であまり変化しないと仮定すると、飼料中タンパク質のルーメン内分解速度がSLにより低下したとも考えられる。しかしナイロンバッグからのCP消失率はSL投与による影響を受けなかった(表23)。Van Nevel and Demeyer¹³²⁾は *in vitro* でルーメン混合菌にカゼインを加えMNとともに培養すると、カゼインからのアンモニア産生が抑えられ α -アミノ態Nが集積することから、MNはタンパク質の分解よりむしろ脱アミノ作用を阻害するのではないかと推察している。CP消失率が変わらずアンモニア濃度が下がったという点から、本試験結果は彼らの推論を支持するものであるが、ルーメンでの脱アミノ作用に対するSLの影響についてはあまり詳細に検討されておらず、重要な検討課題として残されている。

VFAをはじめとするSLにより変更を受けたパラメータは、投与を中止することによって速やかに投与前のレベルにもどった(図7-10)。これはSLのルーメン発酵への残存効果が全くないことを意味している。換言するならば投与効果が耐性微生物等の増加で薄れることがあっても、適切な休薬期間を設けた後の再投与で効果の再現を計れる可能性を示唆するものである。以上、SL継続投与

がその効果の持続性に及ぼす影響に焦点をあて考察した。実際の肥育牛の肥育期間は本試験よりはるかに長いが、わずか30日の投与期間内でも上述のような薬物への適応反応が生じていることが明らかになった。この種の試験は連続的でしかも長期にわたる観察を要するが、今後微生物の耐性発現機構などを含め、更なる検討が必要と思われる。

第2章 ルーメン内脱アミノ反応におよぼす影響

前章において、SLがルーメンでのタンパク質の分解よりむしろペプチドやアミノ酸の分解を抑制する可能性についてふれた。このようなイオノフォアの作用は1977年にVan Nevel and Demeyer¹³²⁾がMNで初めて指摘している。彼らは、洗浄ルーメン混合菌のカゼイン分解性をMN存否条件下で検討したところ、MNはカゼインからのアンモニア産生を有意に抑え、同時に多量のアミノ酸およびペプチドの集積を促したことから、MNのアミノ酸およびペプチド分解抑制作用を示唆した。後にこの事実はWhetstoneら¹⁴⁶⁾により確認されている。

このようなイオノフォアの持つペプチド・アミノ酸分解活性抑制作用は、活性の高い菌種の混合系からの淘汰^{23, 24)}と抵抗性菌自体の活性の低下^{91, 92)}、両面からの解釈が現在の主流である。しかしこれらの試験研究はMNやTRが使用されており、SLの影響を調べたものはまだない。またこのようなアミノ酸分解抑制作用は分解に供されるアミノ酸の種類の影響を受けるのか否かについての議論は全くされていない。緒論で述べたように、アミノ酸分解の制御はルーメン機能制御の長い歴史の中での宿題である。この制御が可能ならば、宿主へのアミノ酸供給の効率化に資することができる。

本章では、SLの脱アミノ反応に及ぼす影響をin vitroで検討した試験結果について述べる。

材料および方法

試験1

めん羊(体重42kg・ルーメンフィステル装着)にイタリアンライグラス一番刈乾草(400g/d)と市販の肉牛用配合飼料(600g/d)を1日2回に分与(9:00と17:00)した。このめん羊から採取したルーメン液を材料に、一連のin vitro培養実験を実施した。供試微生物液として、24時間絶食させ飼料由来のN源をなるべく除いたルーメン内容濾液、または以下の方法で調製した洗浄微生物液を用いた。すなわち、ルーメン液(朝給飼前に採取)を低速(500xg, 5min.)で遠心分離し、飼料およびプロトゾアをのぞいた。上清(含細菌)をつぎに高速で遠心分離し(28000

xg, 15min.)、沈澱(細菌)を O_2 -free CO_2 を吹き込んだMaengら⁷⁴⁾のバッファー(pH 6.8)で2度洗浄遠沈したあと、同バッファーに懸濁したものを供試菌液とした。一方、供試プロトゾア液の調製は以下のように行った。まずガーゼ濾過したルーメン液に酢酸バッファーを等量加え39℃恒温槽内で静置すると飼料片が浮上する。これをアスピレーターで除去し、再度同バッファーを加え同じ操作を少なくとも10回繰り返すことで飼料由来の夾雑物を除いた。さらに上述のMaengら⁷⁴⁾のバッファーで洗浄・遠沈(500xg, 5min.)を5回行い、プロトゾア付着物を極力除いた。最後に同バッファーでプロトゾアを懸濁し、供試液とした。細菌・プロトゾア混合液は、菌液に上記の方法で回収した洗浄プロトゾアを、適当な細菌／プロトゾア比(約 $10^6:1$)になるように加えて調製した。細菌の無細胞抽出液は、上記の洗浄菌液を超音波処理した後に高速遠心し、上清をセルロース透析膜チューブ(三光純薬:Size 27/32)内で4℃・24時間透析したものをを用いた。

培養基質は、カゼインまたは各種アミノ酸(グリシン,Gly; アラニン,Ala; セリン,Ser; アスパラギン酸,Asp; グルタミン酸,Glu; シスチン,Cys; チロシン,Tyr; プロリン,Pro; リジン,Lys; トリプトファン,Trp; ヒスチジン,His; ロイシン,Leu; イソロイシン,Ile; フェニルアラニン,Phe; スレオニン,Thr; メチオニン,Met; バリン,Val; アルギニン,Arg)とした。タンパク質(カゼイン)およびアミノ酸の試験管内添加濃度は各々Van Nevel and Demeyer¹³²⁾およびBroderick and Balthrop¹⁸⁾に準じ、実際のルーメン内濃度に近似した値(各々5g/lおよび3.5mM/l)とした。これらの培養基質に、上記の絶食後ルーメン内容濾液(カゼインの場合)または微生物懸濁液・抽出液(各種アミノ酸の場合)を加え、39℃の恒温槽内で所定時間培養した(1処理につき3または4連で実施)。なお基質にあらかじめS LまたはP Tを添加(2.5ppm)する処理も設けた(P Tはカゼイン分解実験でのみ使用)。これらイオノフォアの添加はエーテルに溶かしたものを試験管に所定量加え、室温で放置しエーテルを揮散させることでおこなった。また目的に応じ脱アミノやアミノ基転移に関与する補因子(NAD, NADH, ピリドキサールリン酸または α -ケトグルタル酸)を加える区を設けた。培養後氷層につけ反応を停止し、ただちに冷却遠心分離した。ただし遠心分離条件は菌液の場合28000xg, 15 min.、プロトゾア液の場合500xg, 5min.、両者混合液の時は先に低速でプロトゾアを落とし、上清を高速遠心分離した。いずれの場合も遠心上清のア

ンモニア量を測定¹⁴³⁾し、脱アミノ活性とした。

検討事項は1)カゼインの分解におよぼすS LならびにP T添加の影響、2)各種アミノ酸の脱アミノにおよぼすS L添加と供試微生物液の影響、3)Asp脱アミノに及ぼす培養時間の影響、同反応に及ぼす4)S Lの添加濃度の影響と5)供試菌の無細胞抽出液使用とS L存否の影響、6)本実験条件下でのアミノ基転移を介したAsp脱アミノの可能性について、である。

試験 2

3頭のルーメンフィステル装着めん羊(平均体重37.5kg)に試験1で用いた乾草と濃厚飼料を各々8:2、5:5および2:8の比率で給与(日量1kgを9:00と17:00に等量分与)した。1処理14日間とする3×3ラテン方格法で試験を実施した。各処理の13および14日目朝の給飼前にルーメン液を採取し、試験1の方法で洗浄混合菌液を調製した。この菌液を用いてS L存否下でのAsp脱アミノ活性を測定し、飼養処理が異なる(菌叢が異なる)場合のS Lの作用程度の違いを検討した。比活性は菌液のDMまたはタンパク質の量あたりで表した。供試混合菌液のタンパク質はLowryら⁷³⁾の方法で定量した。なおS L添加濃度や培養時間は試験1の結果をふまえて各々2.5ppmおよび4時間とした。

なおいずれの試験の供試飼料も前章に記載したものとまったく同じものであった。統計分析には試験1ではスチューデントのt検定、試験2ではF検定を用いた¹²⁸⁾。

結 果

図12にカゼインからのアンモニアおよび α -アミノ態Nの生成様相を示した。2および4時間培養した際のアンモニア生成量はS LおよびP T添加により有意に減少した($p<.05$)。一方、 α -アミノN濃度は両イオノフォア添加時に高くなった(4時間培養時で有意差有り、 $p<.05$)。これらのことからいずれのイオノフォアも脱アミノ反応を抑制することが明らかとなった。

つぎにこのような脱アミノの抑制が、基質となるアミノ酸の種類に依存するの

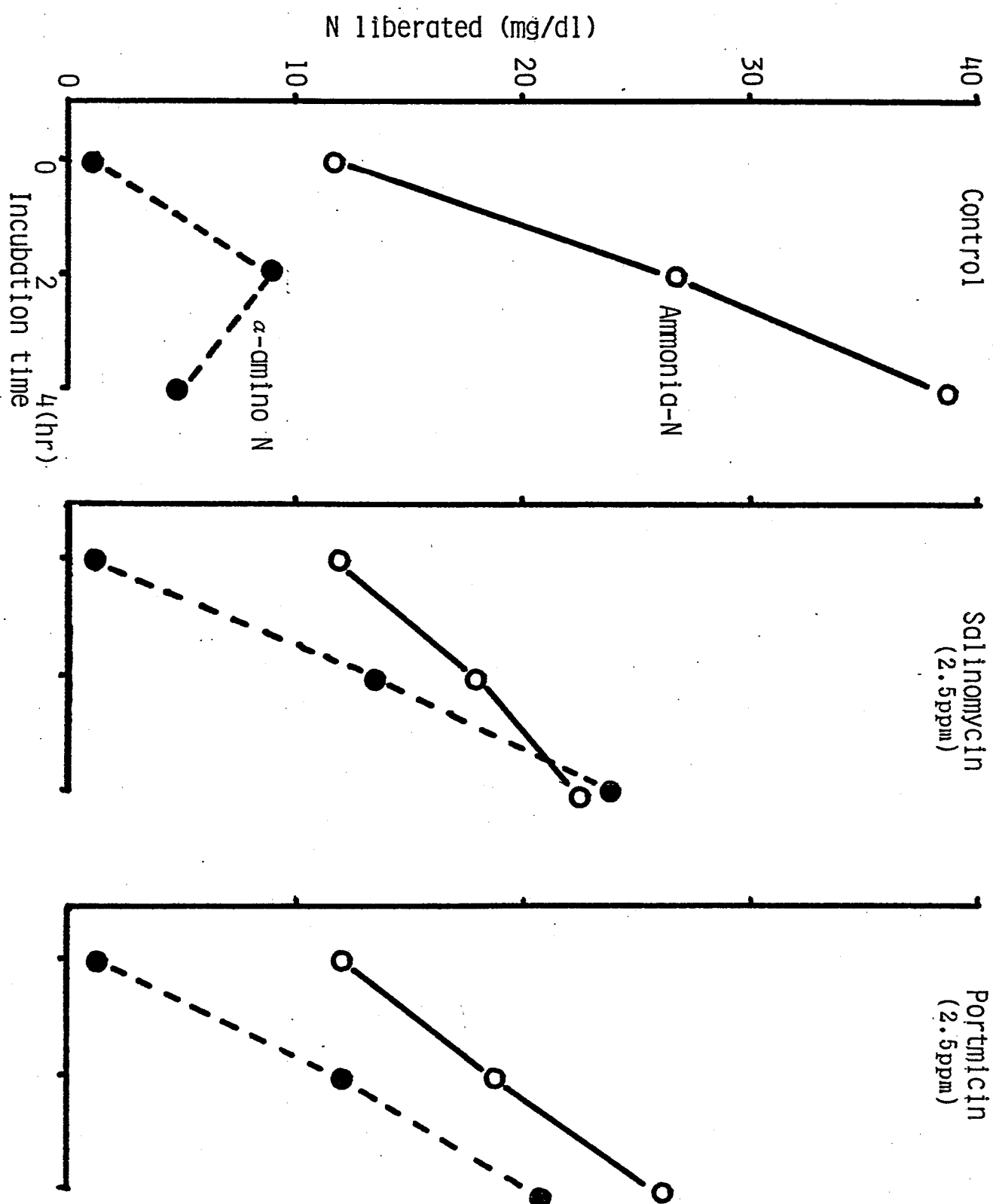


Fig. 12. Effects of ionophores on casein degradation by rumen microbes *in vitro*.

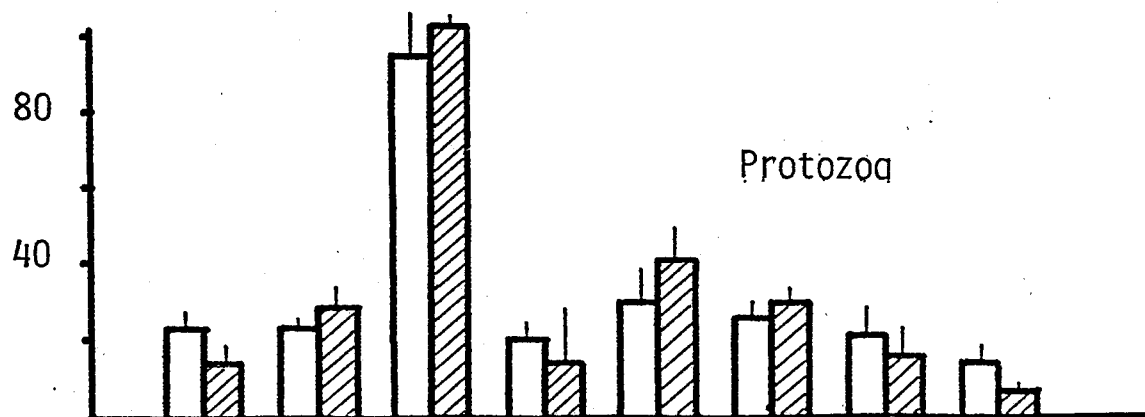
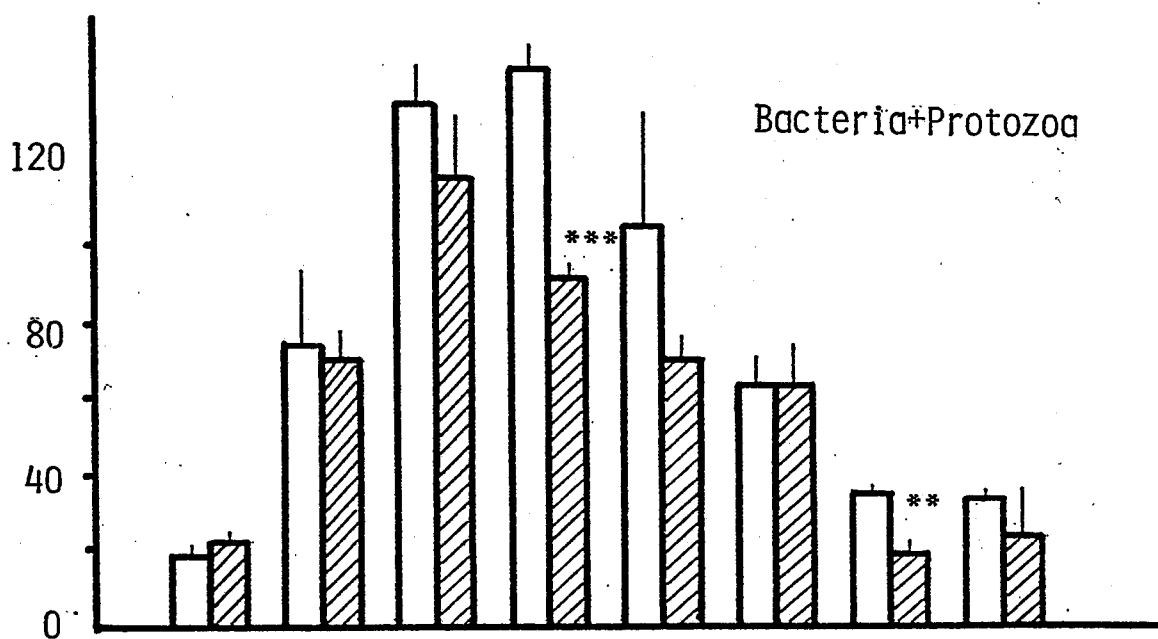
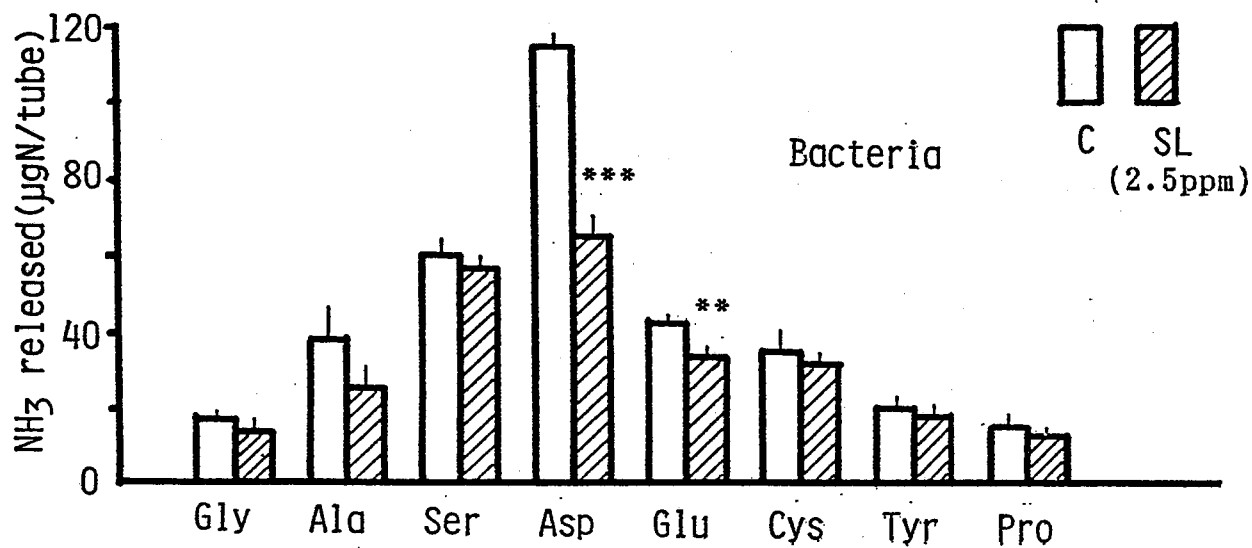


Fig. 13. Effect of salinomycin on deamination of individual non-essential amino acids by rumen microbes in vitro.

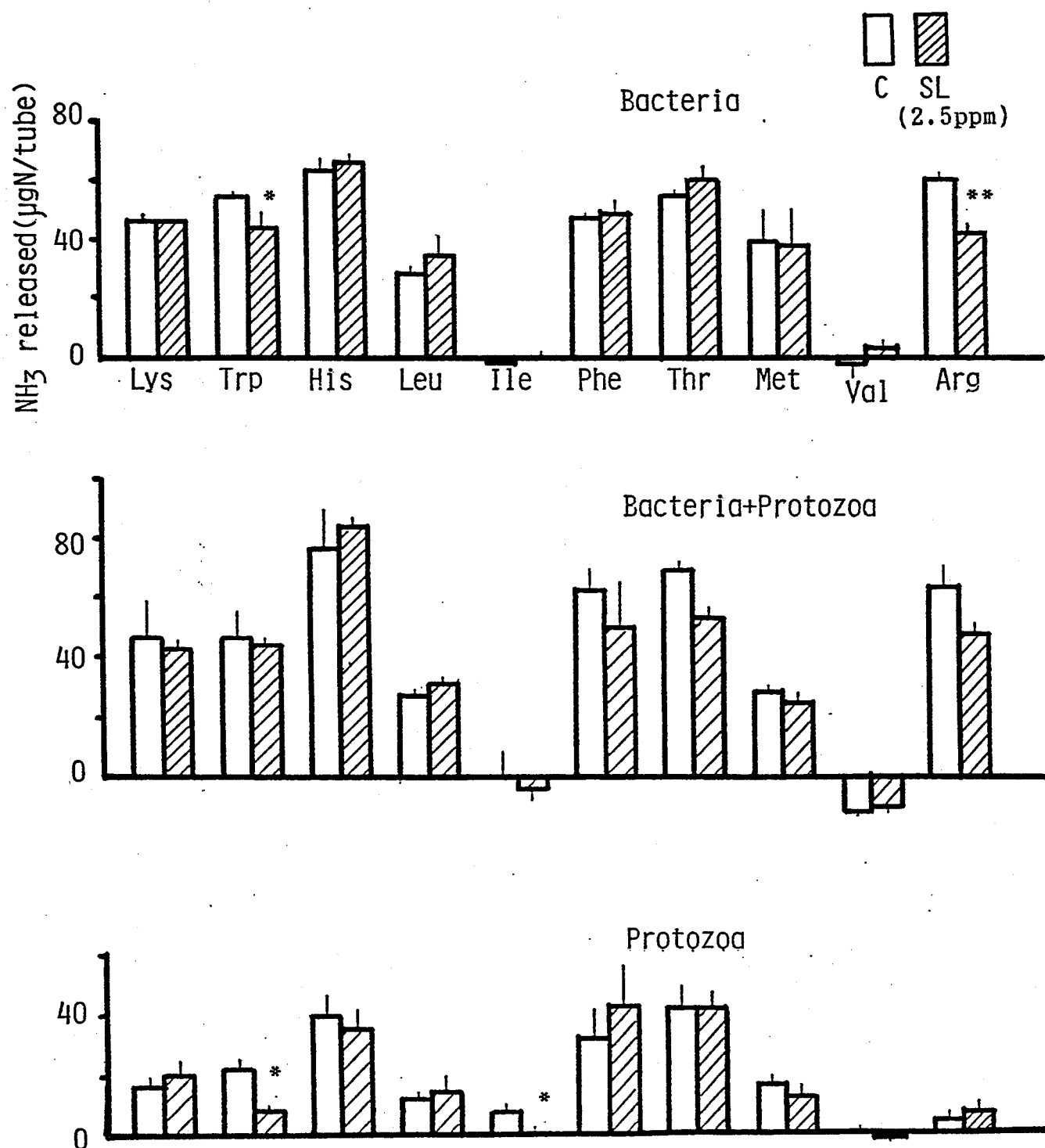


Fig. 14. Effect of salinomycin on deamination of individual essential amino acids by rumen microbes in vitro.

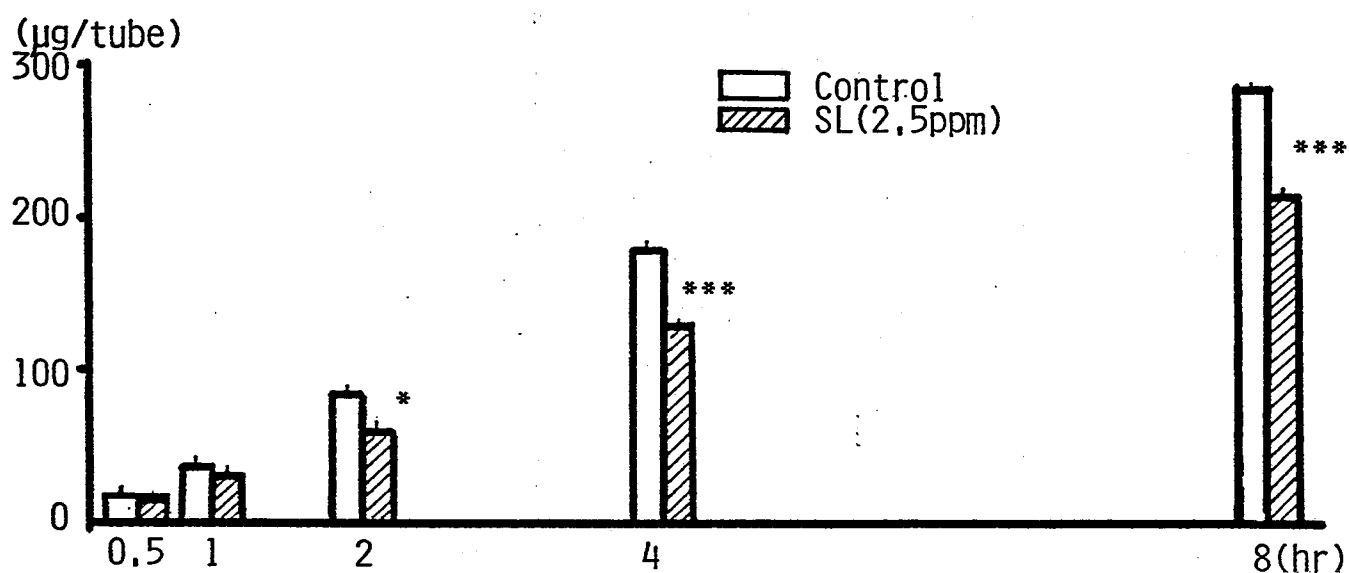


Fig. 15. Effects of salinomycin and incubation time on aspartate deamination by mixed rumen bacteria in vitro.

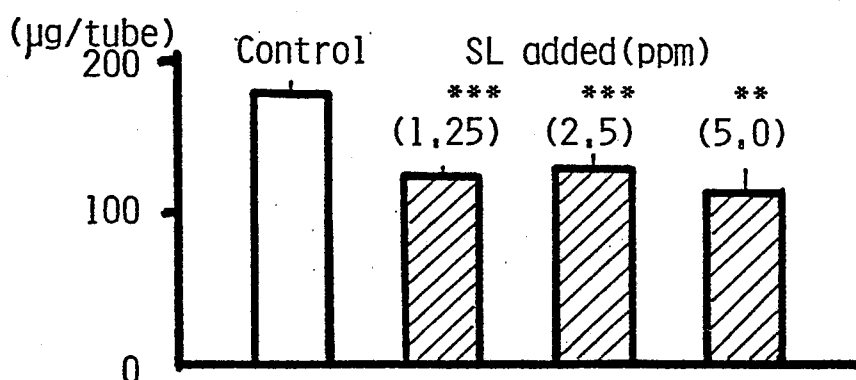


Fig. 16. Effect of dosing level of salinomycin on aspartate deamination by mixed rumen bacteria in vitro.

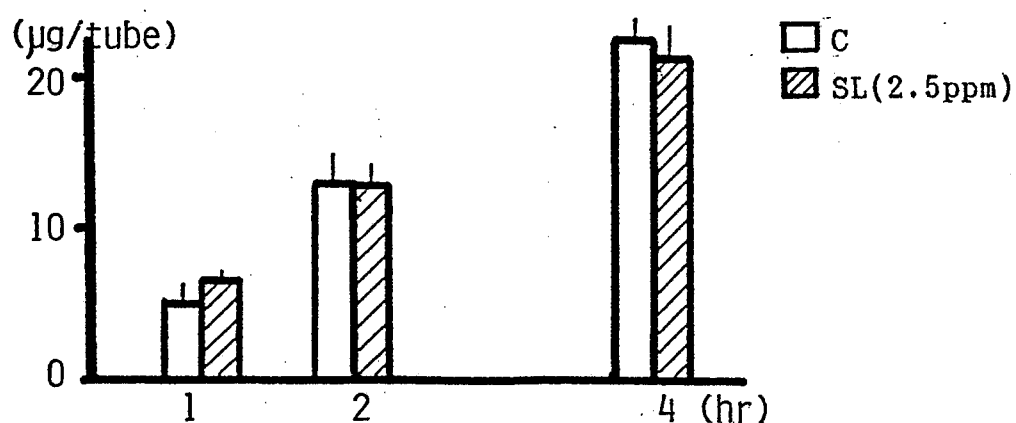


Fig. 17. Effect of salinomycin on aspartate deamination by cell free extracts of mixed rumen bacteria.

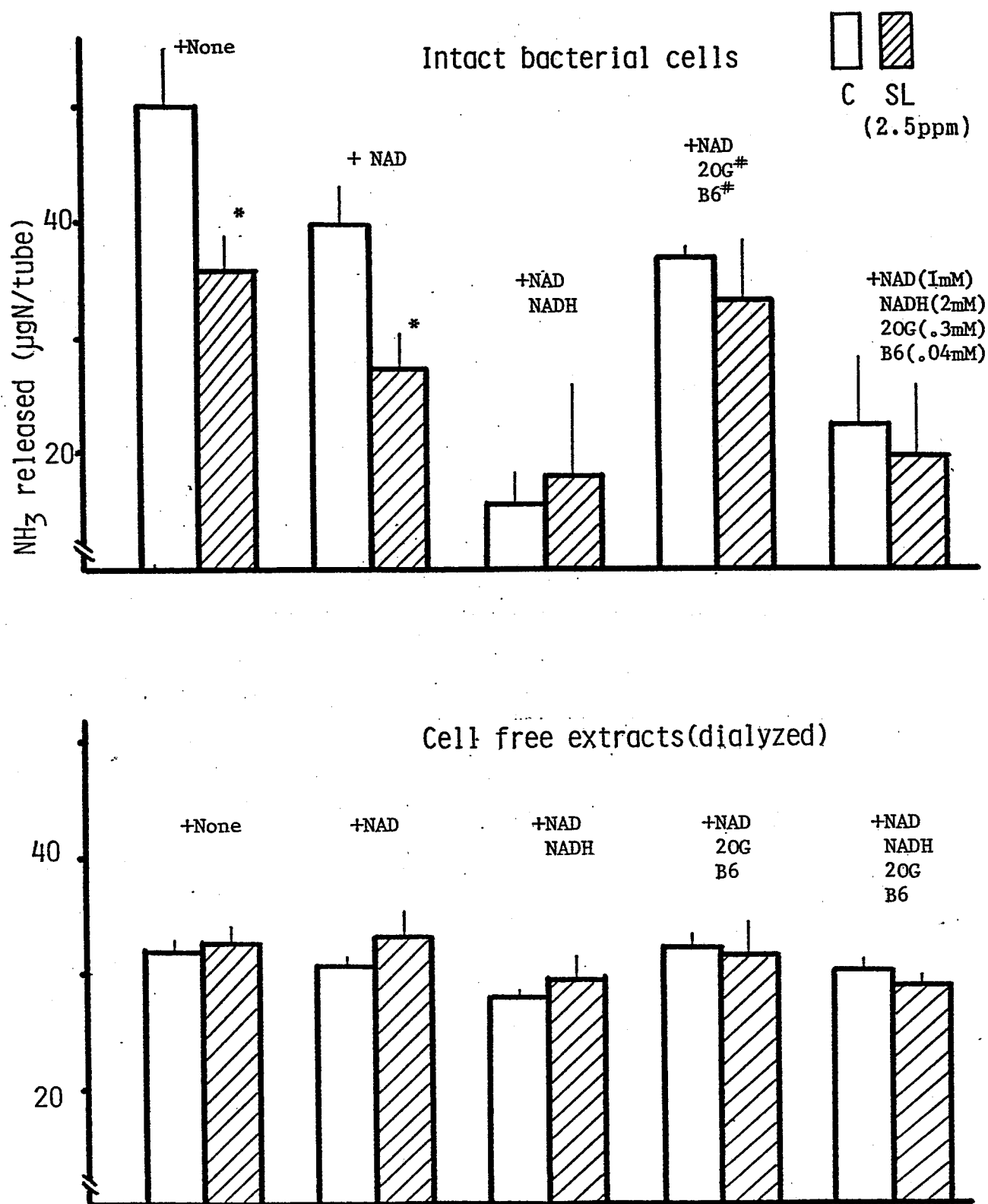


Fig. 18. Effect of salinomycin on aspartate deamination by intact rumen bacteria and their extracts.

2OG, 2-Oxoglutarate(α -Ketoglutarate); B6, Vitamin B6.

Table 25. Effects of diet and salinomycin on aspartate deamination by rumen bacteria. ^a

	Diets (conc.: hay)		
	A (8:2)	B (5:5)	C (2:8)
NH ₃ released from aspartate			
(mgN/4hr/mg DM of bacteria)	4.17±0.80	6.27±0.97	5.25±0.78
(mgN/4hr/mg protein)	1.90±0.71	1.99±0.28	2.49±0.88
Inhibition by SL (%)	35.7±2.8	45.7±5.5	53.3±1.5

a) Rumen bacteria from the sheep receiving 3 different diets are employed in in vitro analysis of aspartate deamination with or without 2.5ppm salinomycin.

か否かを確かめるため、計18種の単独アミノ酸を基質として検討した結果を図13及び14に示した。供試微生物液として細菌単独、細菌とプロトゾア混合およびプロトゾア単独の3種の系を用いたところ、プロトゾア単独系では脱アミノ活性が小さく、ルーメン内脱アミノ反応のほとんどを細菌が担っていることが確認された。アミノ酸のうちAsp, Ser, Glu, His, Arg等はよく分解され、Val, Ile等はほとんど脱アミノされなかった。SL添加による脱アミノ抑制効果は細菌単独系ではAsp, Glu, Trp, Argを基質としたとき、プロトゾア単独系ではTrpおよびIleを基質としたとき、混合系ではAsp, Tyrを基質としたときに認められた($p < .05$)。これらの内もっとも抑制程度が高いのがAspを基質にした時であった。

Asp脱アミノ反応系を詳細に検討した結果を図15-18に示した。SLによる阻害効果は、本培養条件下では2時間目以降に明確となり(図15)、SL添加濃度を1.25ppmまで下げても有意な抑制効果が得られた(図16)。一方、供試菌液のホモジェネイト上清(無細胞抽出液)を洗浄菌液の代わりに酵素標品として用いた場合、SLの脱アミノ抑制効果は全く認められなくなった(図17)。Aspはルーメン内で α -ケトグルタル酸へのアミノ基転移によりGluにかわりうるが、本実験で測定したAspから生成したアンモニアがすべてAspを直接脱アミノした結果生じたものという確証はない。そこでGluを介してのアンモニア生成の可能性を検討するため、アミノ基転移にかかわる補因子を加えたときのAspからのアンモニア生成を調べた結果を図18に示した。ピリドキサルリン酸および α -ケトグルタル酸を培養基に加えてもAsp脱アミノ活性は変わらず、Gluを経由しての脱アミノの可能性は小さいものと思われた。NADHを添加した際には、SLの存否にかかわらずAsp脱アミノ活性は急減した。一方、細菌のホモジェネイト上清で同様の検討をしたところ、SLあるいはいずれの補因子を加えても活性に明確な変化は認められなかった。

表25に、めん羊へ異なる飼料を与えルーメン菌叢をかえた場合のAsp脱アミノ活性の変化とSLによる抑制程度について示した。Asp脱アミノ活性は濃厚飼料多給時のルーメン菌液で最も低くなった。SLによる脱アミノ抑制は、いずれの飼料給与時の混合菌を用いても明確に認められた。なかでも乾草を多給した場合にSLによる抑制効果が大きいようであった。

考 察

供試微生物液の種類により脱アミノ活性は異なり、プロトゾア区分では活性が小さい(図13・14)ことから、ルーメン内脱アミノ反応のほとんどを細菌が担うものと推察された。これは通説⁴⁹⁾を支持するものであった。SLおよびPTとも明らかに*in vitro*での脱アミノ反応を阻害した(図12-14)。イオノフォアによる脱アミノ反応抑制のメカニズムについて明示した報告はいまのところ見あたらない。しかし、以下にあげる二通りの可能性が考えられる。

まず第一に、イオノフォアによる菌種選抜作用がもたらす効果があげられる。従来知られている優勢なタンパク質およびアミノ酸分解性菌、*Bacteroides ruminicola*はイオノフォアに耐性を示す^{22, 85, 90)}。この事実は上記の菌種選抜を介した効果に対する矛盾として指摘されていた。ところがChen and Russell^{23, 24)}が近年、*B. ruminicola*よりペプチド・アミノ酸からのアンモニア生成能の高い数種の菌株の分離に成功し、しかもこれらの株はMNへの感受性が高かった。彼らはこの様な菌株の淘汰により脱アミノ活性の低下を説明できるとしている。一方、この様な菌株の存在の普遍性そのものを疑問視するむきもあり、いまのところ決定的な説とはなっていない。

第二に、イオノフォアによって菌細胞内へのアミノ酸の透過そのものが阻害されている可能性があげられる。アミノ酸は菌細胞膜を通過したのち、菌細胞内で脱アミノに供される。本試験で菌ホモジェネイト上清を使用してAsp脱アミノ活性を測定した際、SLによる阻害がまったくない(図17・18)ことは、SLがアミノ酸の透過を阻害している可能性を強く示唆している。このようなアミノ酸透過性抑制を示唆する情報は他のイオノフォアでも得られている。すなわちNewboldら⁹²⁾はTRで予備培養しTRに適応させた*B. ruminicola*および*Ruminobacter amylophilus*は、非適応株に比べ著しく脱アミノ活性が低いことを発見している。このようなイオノフォア抵抗性菌においてもアミノ酸分解能が急変することから、従来の菌種選抜作用に加えて上掲の要因も考慮する必要がある。

以上、脱アミノ阻害効果の要因として2例を挙げた。しかし本試験で認められたようにSLがAsp脱アミノのみを極めて強く抑制する(図13)選択的阻害のメカニズムは現段階ではよくわからない。またこの阻害効果はVan Nevel and Deme-

yer¹³²⁾がMNで認めたときの添加濃度5ppmより更に低い1.25ppmで認められている(図16)。これは飼料中にSLを20ppm添加して給与した際のルーメン内濃度に換算した値(1日10mgのSL投与、ルーメン液容量10lとして換算)に近似する。よって、*in vivo*でも充分起こりうる現象と思われる。しかも、Aspは飼料・微生物双方のタンパク質構成アミノ酸の主要なものの一つであり、ルーメン内で比較的良好に分解されるアミノ酸である⁷²⁾ことから、宿主のアミノ酸利用性の制御をはかるうえで重要である。

Scheifingerら¹¹⁵⁾は数種のルーメン菌の各種アミノ酸分解活性を比較している。彼らによると各アミノ酸の分解率は菌種によりかなり相違があり、Asp分解率は*Butyrivibrio* sp.と*Selenomonas* sp.がもっとも高い。これらの菌種によるAsp分解能力を100とすると*Streptococcus* sp.は17に相当し、供試菌中最低であった。*Butyrivibrio* sp.はSLに対して感受性が高い⁸⁵⁾ので、この菌種の淘汰がSLによるAsp分解率抑制をある程度説明するかもしれない。しかし彼らの供試菌種は7種と極めて少なく、これが有力な原因とは考えにくい。試験2で、給与飼料構成を変えためん羊のルーメン混合菌(すなわち菌叢が飼料毎に大きく異なると思われる)を用いてAsp脱アミノ活性を測定したが、いずれの飼料給与時もSLによる阻害効果が認められた(表25)。このことはSLによる菌種選抜がAsp脱アミノ阻害の主因ではないことを示唆している。

Russellら¹⁰⁹⁾は数種のアミノ酸の菌細胞内への取り込みは、Na⁺依存型で、イオノフォア(MN)存在下ではアミノ酸とNa⁺との共輸送(Symport)が阻害され、アミノ酸透過率が下がることを示唆した。すなわちMNはNa⁺との親和性が高く、外液中のNa⁺を急速に細胞内へ運ぶ¹⁰⁷⁾ことで結果的にsymportを阻害する。また同時にイオノフォアは細胞内へのH⁺の取り込みをも助長し、細胞内のpHを下げる¹⁰⁷⁾。このpHの低下にともなって脱アミノ酵素活性が下がる可能性もあるだろう。Hino and Russell⁴⁸⁾はルーメン混合菌をMN添加培養すると、細胞内のNADH/NAD比が上がり、これが脱アミノ(特に酸化的脱アミノ)の抑制要因になることを示唆している。この様に種々の栄養素やイオンの透過性、ならびに電子供受体比の変更が直接または間接的に脱アミノ活性を左右していることは間違いないであろう。その際の影響の受け方がアミノ酸の種類により異なるのであろうが、これはおそらくどの様な輸送系に各物質の透過が依存しているかにかかっているもの

と思われる。本実験では脱アミノ活性値として各アミノ酸から生じたアンモニアを計測した。Aspはそのアミノ基を α -ケトグルタル酸に転移させルーメン内で容易にGluに変わりうる¹³⁾が、アミノ基転移にかかわる補因子(ピリドキサルリン酸・ α -ケトグルタル酸)を加え培養しても活性値が変わらない(図18)ことから、アミノ基転移を介しての脱アミノが生じた可能性は本試験に関する限り小さいと思われる。

最近、Wakitaら¹⁴⁰⁾はめん羊ルーメン混合菌の脂肪酸組成がSL給与により顕著に変化することを発見した。この新知見はSLによる菌組成の変化とともに、菌細胞膜性状(おもにリン脂質よりなる)の変化をもうかがわせており興味深い。膜脂質成分の変化はアミノ酸等の透過性に影響する可能性がある。よって本試験で認められた脱アミノ反応の抑制との関連を精査する必要がある。

以上、in vitroでSLがルーメン微生物(特にルーメン細菌)によるアミノ酸(特にAsp)の分解を抑制すること、しかも有効添加濃度がin vivo条件下でも充分おこりうる濃度であることを確かめた。さらに抑制効果は供試混合菌の組成をとわず常に認められる一方、菌抽出液を用いた際の抑制がまったくないことから、SLによる菌種選抜淘汰作用よりもむしろ菌細胞内へのアミノ酸透過の障害が主因であると推定した。

第3章 飼料の消化管内通過と養分利用におよぼす影響

本編第1章及び第2章において、SLによるルーメン内消化・発酵の変化をひきおこす諸要因について指摘した。しかしこれらの指摘はルーメン内あるいはルーメンを模倣した試験管内での現象を解析したものにとどまっており、SLによるルーメン内消化・発酵の変化自体が宿主栄養の改善へどの程度貢献しうるのかについての検討はできていない。

例えば本編第1章で記したように、SLの投与は一定時間ルーメン内に浸漬したナイロンバッグからのNDF消失率を下げる傾向にある。しかし極言するならば、このような *in situ* パラメータの増減が実際の消化率の増減を如実に反映しているという保証はない。飼料中のNDFは飼料の粒度減少にともない少しずつルーメン以降へ流出しているからである。つまり上掲のパラメータと実際の消化率を関連づけて議論するには、ルーメンからの飼料の流出速度を測る必要が生じる。

イオノフォア投与時のルーメン内飼料通過速度を測定した報告はあまり多くない。Lemenagerら⁷¹⁾はMN、Merchen and Berger⁷⁸⁾はSLを投与した際の液状マーカーのルーメン内回転率低下を報じている。しかし、ルーメン微生物や繊維質等の飼料粒子の動態をモニターする固相マーカーのそれについては報告がない。近年、物質の消化管内通過様相を数式化する試みが盛んとなり、シミュレーション自体の精度も向上している。

本章では、1973年にGrovm and Williams⁴⁹⁾が確立したTwo compartments design に従い、ルーメンおよび下部消化管での固・液両相の通過速度を推定するとともに、通過様相と密接に関連するパラメーターである消化率、さらにはN出納を測ることで、SL投与が飼料の消化管内移動と養分利用にどのようにかかわっているかについて検討した。

材料および方法

平均体重40kgのめん羊（ルーメンフィステル装着）4頭を無作為に2頭ずつの2群に分けた。各々の群のめん羊に1日1頭当たりSL添加（50ppm）または無添加の濃厚飼料を400gとアルファルファヘイキューブ600gを8:30と18:30に等分して

与えた。したがってS Lの全給与飼料中濃度は20ppmに相当した。給与飼料の養分組成を表26に示した。

めん羊は1頭ずつ代謝ケージに収容した。各処理毎に10日間の適応期とそれにつづく9日間の試験期を設けた。試験期終了後処理を反転した。飼料の消化管内通過速度を測定するため、試験期の初日朝給飼時に固・液両相の不消化マーカの1回投与を実施した。すなわち、固相マーカとしてCr吸着NDF¹²⁷⁾、液相マーカとしてPEG(分子量4000)を用いた。いずれも濃厚飼料によく混ぜて給与したが、給与後速やか(20分以内)に摂取された。投与量は各々7および10gとした。投与後156時間目まで3ないし6時間毎に排糞サンプルを採取した。糞中のPEGおよびCrを前編第2章に記載した方法で定量し、経時的にもとめたこれらマーカ濃度を以下に示す算式⁴⁰⁾にあてはめ、ルーメンおよび大腸内通過速度定数を推算した。

$$C_t = A e^{-k_1(t-TT)} - A e^{-k_2(t-TT)}$$

C_t : 糞乾物中のマーカ濃度

A : マーカのルーメン内初濃度

TT : 糞への初排泄に要する時間

t : マーカ投与後の時間

k_1 : 第一コンパートメント(ルーメン)での通過速度定数

k_2 : 第二コンパートメント(大腸)での通過速度定数

同時に試験期初日から7日目まで全糞尿サンプルをとり、消化率とN出納を調査した。処理最後の2日間、朝の給飼後0, 1, 3および5時間目にフィステルをとおしてルーメン内容物を取り、2重ガーゼ濾液のpHを測定後-20°Cで凍結保存した。これらのサンプルは後にアンモニアおよびVFAの分析に供した。

飼料、糞および尿の分析は常法⁷⁾で行い、ルーメン液のアンモニアとVFAは第2編第1章に記載した方法で測定した。結果はいずれもスチューデントのt検定¹²⁸⁾に供した。

結果

Table 26. Chemical compositions of experimental feeds.

Feeds	Dry matter	Organic matter	Crude protein	Crude fiber	Nitrogen free extracts	Ether extracts
	(%)	(% of DM basis)				
Formula feed	86.4	94.0	16.3	5.4	69.0	3.3
Alfalfa hay cube	86.7	86.2	21.1	28.2	35.4	1.5

Table 27. Passage rate constants of liquid and particulate phases.

		Treatment#	
		Control	SL
		Mean (SEM) ^a	Mean (SEM)
Liquid phase (PEG)	k ₁ ^b	0.1637 (0.0328)	0.1477 (0.0281)
	k ₂ ^c	0.2283 (0.0199)	0.2247 (0.0294)
Particulate phase (Cr)	k ₁	0.0500 (0.0058)	0.0378 (0.0033)
	k ₂	0.1297 (0.0122)	0.0973 (0.0139)

a) Standard error of mean. b,c) Passage rate constants of markers in the rumen and large intestine, respectively.

#) Diet with 0(Control) or 20ppm salinomycin(SL) was offered.

Table 28. Apparent digestibilities of nutrients and nitrogen balance.

	Treatment#			
	Control		SL	
	Mean	(SEM) ^a	Mean	(SEM)
	(%)			
Dry matter	69.6	(1.1)	68.8	(1.0)
Organic matter	73.7	(1.0)	72.6	(1.2)
Crude protein	76.6	(1.2)	76.1	(0.8)
Crude fiber	54.6	(1.9)	52.1	(2.5)
NFE	80.9	(0.5)	80.2	(1.2)
Ether extracts	55.0	(10.9)	51.0	(7.6)
N retention (%) ^b	30.9	(5.6)	35.8	(4.2)
(%) ^c	40.5	(6.5)	46.9	(5.1)

a) Standard error of mean. b,c) Percentages of ingested N and of digested N, respectively. #) Refer to Table 27.

Table 29. Ruminal VFA concentrations, VFA molar percentage and A/P ratio.

VFA concentration (mM/dl)	Treatment#									
	Control					SL				
	Time after feeding					Time after feeding				
	0	1	3	5	Pooled(SEM) ^a	0	1	3	5	Pooled(SEM)
Acetate	5.71	8.78	8.56	8.25	7.77(0.41)	4.77	7.52	9.26	7.63	7.30(0.52)
Propionate	1.68	3.50	2.89	2.60	2.67(0.22)	2.07*	3.90	4.88*	3.74*	3.65(0.33)*
Butyrate	1.21	1.51	1.33	1.29	1.34(0.06)	0.70*	0.83*	0.93*	0.83*	0.82(0.05)***
Total	8.97	14.25	12.92	12.39	12.13(0.67)	7.80	12.58	15.50	12.49	12.09(0.87)
VFA molar percentage(%)										
Acetate	63.7	61.8	64.6	66.8	64.2(0.7)	61.0	59.6	59.9*	61.1*	60.4(0.7)***
Propionate	18.7	24.5	22.4	20.9	21.6(0.7)	26.7*	31.2	31.3*	29.9*	29.8(1.0)***
Butyrate	13.4	10.6	10.3	10.5	11.2(0.5)	8.9*	6.6*	6.1*	6.7*	7.1(0.5)***
A/P ratio	3.41	2.53	2.89	3.19	3.01(0.11)	2.31**	1.94	1.93**	2.06**	2.06(0.09)***

*,**,***) Means are significantly different from those of control at 5, 1 and 0.1% level.

a) Data are means(standard errors) of samples taken 0, 1, 3 and 5 hr after feeding.

#) Refer to Table 27.

Table 30. Ruminal pH and ammonia nitrogen concentration.

	Treatment#									
	Control					SL				
	Time after feeding					Time after feeding				
	0	1	3	5	Pooled(SEM) ^a	0	1	3	5	Pooled(SEM)
pH	7.07	6.61	6.38	6.45	6.65(0.10)	7.08	6.70	6.43	6.52	6.68(0.08)
Ammonia N(mg/dl)	18.6	31.2	22.4	14.5	21.7(2.1)	17.1	29.9	26.4	17.4	22.7(1.8)

a,#) Refer to Tables 27 and 29.

固・液両相の通過速度定数 (k_1 および k_2) を表27に示した。液相の k_1 と k_2 は、S L 添加の有無を問わず、固相のそれらより有意に大きく、液状部が固状部よりもルーメンおよび大腸をすばやく移動することを示した。S L 添加飼料を与えた場合、P E G および C r の k_1 は各々9.8および24.4%低下した (後者は $p < .10$)。また C r の k_2 も S L 投与にともない25.0%減少した (有意差無し) が、P E G の k_2 は S L による一定の影響がなかった。

同時に計測した消化率とN出納の結果を表28に示した。D M、O M、C P、粗繊維、N F E および粗脂肪の消化率は、S L 投与時にやや低下する傾向にあったが、有意な変化ではなかった。また、N蓄積量を摂取Nあるいは可消化N量に占めるパーセンテージで示すと、いずれもS L 投与時に増加した (30.9→35.8および40.5→46.9%) (有意差無し)。

総V F A濃度とそのモル組成を表29に示した。酢酸濃度 ($p < .10$) とそのモル比 ($p < .001$)、酪酸濃度とそのモル比 (いずれも $p < .001$) は、S L 添加飼料給与時に低下したが、プロピオン酸濃度およびそのモル比は増加した ($p < .001$)。

ルーメン液のp HやアンモニアN濃度はS L 添加の影響を全くうけなかった (表30)。

考 察

飼料のルーメンからの流出を規制する要因は主に2つからなる。ひとつは飼料摂取量、もうひとつは内容物の粒度である。一般に前者が増すとルーメンでの飼料の平均滞留時間は短くなる¹⁰⁾。S L 添加は自由摂取下では飼料摂取量を抑える^{78, 87)}ので、これは通過速度を遅らせる要因となる。M N も同様に摂取量を抑え、しかも通過速度の低下が実際に同時観察されている⁷¹⁾。すなわち、M N 添加飼料を去勢肥育牛に自由摂取させると摂取量が約16%減り、同時に固・液両相のルーメン内通過速度定数が各々44および31%低下している。

本試験は飼料制限給与下で行ったものであるので、S L による通過速度の減少 (表27) は、摂取レベルにはなんら関連のないものである。つまり、後者の要因 (粒度減少) になんらかのS L による働きかけがあったものと考えられる。粒度減少の律速要因は、(1)反すうに費する時間とそしゃく回数、(2)ルーメ

ン微生物活性、の2つが主要なものである。Poppiら¹⁰³⁾によるとルーメンから流出する飼料粒子の臨界粒径は $1000\mu\text{m}$ となっている。本試験で用いた飼料の粒度分布や、供試羊の反すう行動等は計測していないので(1)の側からの解析はできない。よって、以下(2)の観点からの検討を加えることにする。

本試験のようにマッシュ状の濃厚飼料とヘイキューブを与えた場合、いわゆる第2-3胃孔非通過粒子群のほとんどがヘイキューブ由来の粒子で構成され则认为られる。ところがSL等イオノフォアは一般に繊維消化を阻害する傾向があるとみなされている。すなわち、Lemenagerら⁷¹⁾は牛のルーメンに浸漬したコットンセルローズの消失率がMN投与下で低下すると報じている。また、我々もSLで同じ様な例についてすでに記載した(本編第1章)。これらのことから、ルーメン内消化速度(特に繊維質の消化速度)の低下が粒度減少速度の低下をひきおこし、結果的に内容物の流出に対し抑制的に作動したものと考えられる。従って、SLによる通過遅滞作用は粗飼料割合の高い飼料の場合ほど現れやすいかもしれない。

一方、数式から算定した第2コンパートメント(大腸に相当)での内容物の通過もSLによりやや低下する傾向にあった(表27)。盲腸内容物と糞の粒度分布はほぼ等しい³⁶⁾ことから、大腸内の通過に対し粒度減少速度が律速要因になっているとは考えにくい。この点で明らかにルーメンからの流出と様式が異なるようである。しかし、今のところSLが大腸内滞留時間を長くする原因は明らかにできない。本来、反すう動物の大腸はルーメンの後方に位置する二次発酵槽で、飼料成分の再利用の場とみなせる。大腸での滞留時間が延びることで、SLによるルーメン消化の低減分をある程度代償できるのではないかと思われる。

通過速度の低下、すなわち滞留時間の延長は、飼料がルーメンあるいは大腸微生物による捕食や付着およびそれにともなうコロニー形成に対する機会を増すことに外ならず、いうまでもなく消化性の改善につながる要因である。しかし本試験で測定した全消化管消化率はSL投与による有益な変化がまったく認められなかった(表28)。このことは、上述したように、SLによる滞留時間の延長は消化速度の低下にともなう反応と解釈した方がよいことを示している。SL添加飼料を自由摂取させた際摂取量が下がるのも、ルーメンでの滞留時間の延長にともなう充満度の高さが一因となっているためかもしれない。

N 出納は S L 投与にともないわずかではあるが改善された (表 28)。これは主に尿中へ排泄される N 量の減少に由来していた。S L はルーメン内での脱アミノを抑制することから、飼料 N の利用性を改善する可能性があることを前章で指摘した。さらに本研究の一端として行った野外試験でも S L がルーメン内アンモニア濃度を下げることが明白だった (第 2 編第 1 - 3 章)。これらのことから上記の N 出納の改善は、ルーメン内での飼料 C P の過剰な分解が抑制された結果導かれたものと考えられる。ルーメンでの滞留時間が増す (表 27) にもかかわらず C P 分解が抑えられるとするならば、S L による分解抑制作用はかなり強力なものかもしれない。しかしながら、同時に定量したルーメン内アンモニア濃度には処理間に差がなかった (表 30)。この矛盾の原因は今のところ特定できない。

一方、本試験で定量したルーメン内 V F A 濃度及び組成は本研究で再三にわたり指摘してきたように S L 投与にともなって一貫した傾向 (総 V F A 濃度不変、プロピオン酸比増および酢酸・酪酸比低下) をみせた (表 29)。本試験の給与飼料は粗飼料割合の比較的高いものであったが、S L 投与にともなうプロピオン酸比の増加率は約 37% にもなった (表 29)。これは本研究における高濃厚飼料 (S L 20ppm 添加) 給与時のホルスタイン種去勢雄牛での平均増加率 17% (第 2 編第 1 章) よりもはるかに高い。換言すると、S L によるエネルギー効率からみたルーメン発酵改善程度は、濃厚飼料割合があまり高くない時の方が改善率が大いことになる。脇田ら¹⁴²⁾はサイレージ多給の肥育牛の飼料利用性が S L 投与により著しく高まることを報告している。これらには本試験で認めたような消化管内飼料通過の遅延が部分的に貢献していると思われる。つまり、繊維質含量の高い飼料ほど S L による粒度減少の抑制が明確となり、通過速度の低下も顕著になるからである。しかしながら、飼料中の繊維レベルが高すぎたり適切な N 補給が行われなかった場合、著しく消化が遅滞し、S L 投与が逆に負の要因となる可能性をもちあわせている。

以上、S L の投与は飼料の消化管内通過を遅くするが、これはルーメンでの飼料消化速度の低下にともなう滞留時間の延長に由来するらしいと推察された。S L は N 出納を改善する傾向があり、ルーメンで飼料 C P の過剰な分解が抑えられたための現象と思われるが、この現象を今後量的に明示する必要がある。

第4章 消化管部位別にみた養分利用におよぼす影響

S Lを投与すると、ルーメンでの過剰のアンモニア産生が抑えられ、利用可能な飼料C Pが下部消化管へ流出することでNの利用効率が高まる可能性があることを前章で指摘した。このような飼料タンパク質の消化部位の調節はM N⁸³⁾やL D¹²⁵⁾ではすでに証明されているが、S Lにおける量的検討はまだされていない。この種の研究は、ルーメン発酵様相の変化のみでは説明できなかった飼料要求率の改善割合²⁰⁾を解析する有用な材料になるものと思われる。

一方、近年Wakitaら¹⁴⁰⁾はS LまたはM N給与めん羊のルーメン混合菌の長鎖脂肪酸組成が不飽和酸割合の高いものに変わることを発見した。この結果について彼らは、飼料中の不飽和酸のルーメン内水素添加がS Lにより抑えられたため導かれた現象と考察している。もしそうならば、下部消化管に流下する不飽和酸量は増加し、宿主栄養ならびに家畜生産物の脂質組成に大きな影響を与えることになる。しかし実際にルーメン以降へ流出する内容物の脂質組成を検討した報告はまだない。

本章では、S L投与がめん羊の十二指腸へ到達する諸栄養素の量および質に及ぼす影響について調べ、それらが宿主栄養に果たす役割についての量的な検討を試みた。

材料および方法

4頭の成めん羊のルーメンと十二指腸にカニユーレを装着し、術後1ヶ月以上経過してから実験に供した。供試時の平均体重は34.8kgで、各々個別の代謝ケージに収容し、以下のように飼養した。めん羊は2頭ずつの2群に分け、1群には抗生物質を含まない濃厚飼料（市販の肉牛用配合飼料，500g/d/head）とイタリアンライグラス一番刈乾草（300g/d/head）を、他群にはS Lを32ppm添加した同じ濃厚飼料と乾草をそれぞれ同量与えた。総飼料中のS L濃度は20ppmに相当した。飼料の養分組成を表31に示した。飼料は日量を等分して9:00と19:00に与えた。水とミネラルブロックは自由摂取させた。1期14日間からなる上述の処理は3回反転させ計56日間試験を行った。各処理期の最初の5日間を飼料適応期、つぎの9

日間を試料採取期とした。試料採取期には飼料は1日分を8等分し3時間おきに与えた。同時に消化管内容物の固相流量推定用マーカーとして給与乾草から調製したCr吸着NDF¹²⁷⁾を8g飼料に混合して与えた。液相マーカーとしてPEG(分子量4000)を用いた。PEGは水に溶解し、ルーメンフィステルにつないだポリ細管をとおしてペリスタポンプで、1日当たり7.5gを定速注入した。各処理の9から12日目の4日間全糞・全尿を採取した。つぎの12および13日目には十二指腸カニュレをとおして内容物を3時間毎にとり、14日目にルーメン内容物を採取した。十二指腸内容物は遠心分離(28000xg, 10min.)し、固状部(沈澱)と液状部(上清)に分け、前者は凍結乾燥、後者は凍結保存(-20℃)した。ルーメン内容物は一部を凍結保存(-20℃)し、一部を本編第2章に記載した遠心分離に供し、細菌分画を得て、これを凍結乾燥した。

飼料、ルーメンおよび十二指腸内容物、ならびに糞・尿サンプルの一般成分組成は常法⁷⁾で分析した。ルーメン液のVFA、アンモニアおよび α -アミノ態Nの分析は既述(第2編第2章)のとおりである。十二指腸内容物の総脂質は、Bligh and Dyer法¹⁴⁾で抽出・定量した。ルーメン菌と十二指腸内容物のサンプルを用いて、ルーメン微生物体の指標物質である2,6-ジアミノピメリン酸(DAP)および核酸プリン塩基(PB)を分析した。各々、イオン交換クロマトグラフィー法²⁶⁾および紫外吸光度法¹⁵¹⁾に準じて測定した。ルーメンおよび十二指腸内容物ならびにルーメン菌サンプルは塩酸メタノールでメチルエステル化した後、ガスクロマトグラフ(島津GC-6A)で長鎖脂肪酸組成を測定した。

十二指腸へ到達する諸養分の量は、内容物サンプルの固・液両相のマーカーおよび各栄養素濃度から算出した³⁴⁾。処理間の差の検定は、処理を3回反転させる反転試験法の際に用いられるF検定¹⁵⁰⁾で行った。

結果

ルーメン液のVFA、アンモニアおよび α -アミノ態N濃度を表32に示した。いずれのパラメータも既報のものと同じ傾向を示し、SL投与時にプロピオン酸比が高く($p<.05$)、酢酸・酪酸比の低い(各々 $p<.01$ および $p<.05$)発酵様相をみせ、低アンモニア($p<.05$)・高 α -アミノ態N(有意差無し)の状況であった。

表33に飼料成分の全消化管消化率、ルーメン内消化率およびルーメン以降での消化率を示した。DM消化率は両区とも67.7%でSLによる影響はまったくなかった。しかし、消化管部位別にみるとルーメン内消化はSLにより2.4%下がり、逆に下部消化管で同じだけ上がった。OMおよび粗繊維の消化率も同様の傾向を示し、SL投与でルーメン内消化率が2-4%低下し、下部消化管内ではほぼ同程度増加した。結果的に全消化管における消化率には処理間でまったく差が認められなかった。

N出納成績を表34に示した。糞及び尿へのN排泄量はいずれもSL給与区の方が少なかった(有意差無し)。したがってN消化率、N蓄積量、ならびに摂取Nまたは可消化Nに占めるN蓄積効率はいずれもSL給与時に高まる傾向にあった(有意差無し)。

表35にルーメン細菌の増殖量と増殖効率を示した。菌サンプルのDAPおよびPB含量はSL区でやや減少し、十二指腸内容物サンプルのそれらはSL区で有意に低下した($p<.05$)。この結果十二指腸流下菌体DMおよびN量はいずれもSL給与時に減少した(有意差無し)。減少量はDMで約25g(DAPを指標物質として算定)または16g(同PB)、Nで約2.0g(同DAP)または1.4g(同PB)に相当した。一方、ルーメンでの細菌の増殖効率(12指腸流下細菌量をルーメン内でのみかけのOM消化量あたりで表したものはSL給与時に約10%程度低くなる傾向にあった(有意差無し)。

表36に十二指腸流下Nの組成について示した。SL給与によって十二指腸流下総N量および非アンモニア態N量がやや増加し、アンモニア態N量は減少した(有意差なし)。非アンモニア態N分画の内訳は、微生物体Nおよび飼料N(g/d)各々が対照区で11.2(13.1)および6.2(4.3)(PBより推定、ただしカッコ内はDAPより推定)、SL区で9.8(11.2)および8.0(6.6)(同)であった。つまり、SL給与によりルーメンでの微生物体N合成量が減少し、分解を免れた飼料Nがより多く下部消化管へ移行した。この際PBを用いて十二指腸へ流下する飼料由来N量を算出するとSL区で有意($p<.05$)に多くなった。

ルーメンおよび十二指腸内容物、ならびにルーメン混合菌サンプルの主要な長鎖脂肪酸組成と、十二指腸に流下する総脂質量を表37に示した。いずれのサンプルの脂肪酸組成も、SL給与により飽和脂肪酸(ステアリン酸)の割合が減少し、

Table 31. Chemical composition of experimental feeds.

	Formula feed	Italian ryegrass hay
	(%)	
Dry matter	87.2	82.4
	(% in DM)	
Crude ash	6.2	5.5
Crude protein	15.3	6.1
Crude fiber	5.2	32.8
Crude fat	1.8	1.1
NFE ^a	71.5	54.5

a) Nitrogen free extracts.

Table 32. Effect of salinomycin on ruminal VFA, α -amino N and ammonia N levels.

	Treatment [#]	
	Control	SL
Total VFA level(mM/dl)	15.8±0.8 ^a	15.4±1.0
Acetate(%)	65.6±1.0	58.4±0.7**
Propionate(%)	24.4±0.8	33.9±1.1*
n-Butyrate(%)	9.6±0.4	6.1±0.4*
i-Valerate(%)	0.4±0.3	1.5±0.6
α -amino N(mg/dl)	9.8±1.3	12.5±1.3
Ammonia N(mg/dl)	19.8±1.3	12.5±0.8

a) Mean $\pm$ standard error. *,**) Means are significantly different from control at levels of 5 and 1%, respectively. #) Diet with 0 (Control) or 20ppm salinomycin(SL) was offered.

Table 33. Effect of salinomycin on site and extent of digestion.

	Treatment [#]	
	Control	SL
Dry matter digestibility (%)		
in whole tract	67.7±0.8 ^a	67.7±1.0
in rumen	28.8±2.9	26.4±2.8
in lower tract	38.9±2.3	41.4±2.2
Organic matter digestibility (%)		
in whole tract	69.4±0.8	69.4±1.0
in rumen	38.9±2.4	37.0±2.5
in lower tract	30.5±1.9	32.4±2.1
Crude protein digestibility (%)		
in whole tract	67.2±1.0	70.2±1.0
in rumen	-42.0±4.2	-43.5±5.0
in lower tract	109.2±3.6	113.7±5.1
Crude fiber digestibility (%)		
in whole tract	50.4±1.0	50.0±1.9
in rumen	42.2±3.0	38.3±3.9
in lower tract	8.2±2.5	11.6±3.2

a) Mean $\pm$ standard error. #) Refer to Table 32.

Table 34. Effect of salinomycin on N balance

	Treatment#	
	Control	SL
N ingested (g/d)	13.1	13.1
N excreted in feces(g/d)	4.3±0.1 a	3.9±0.1
N excreted in urine(g/d)	5.3±0.3	4.8±0.5
N retained (g/d)	3.5±0.3	4.4±0.4
N digestibility (%)	67.2±1.0	70.2±1.0
N retained/N ingested(%)	26.7±2.4	33.6±3.4
N retained/N digested(%)	39.8±3.5	47.8±5.3

a) Mean ± standard error. #) Refer to Table 32.

Table 35. Effect of salinomycin on rumen microbial growth and its efficiency.

	Treatment#	
	Control	SL
Calculation based on DAP ^b		
DAP in rumen bacteria(mg/g)	3.4±0.3 a	2.6±0.1
DAP in duodenal digesta(mg/g)	1.1±0.1	0.7±0.1*
Bacterial DM at duodenum(g/d)	158.9±8.6	134.3±5.1
N at duodenum(g/d)	13.1±0.7	11.2±0.4
Growth efficiency(gN/kgOMDR ^d)	54.5±5.0	49.0±4.8
Calculation based on PB ^c		
PB in rumen bacteria(mg/g)	74.2±1.9	65.1±2.3
PB in duodenal digesta(mg/g)	20.3±0.3	15.0±0.5*
Bacterial DM at duodenum(g/d)	133.4±7.1	117.6±6.1
N at duodenum(g/d)	11.2±0.5	9.8±0.6
Growth efficiency(gN/kgOMDR)	47.2±5.6	43.5±4.8

a) Mean ± standard error. b) 2-6-diaminopimelic acid.

c) Nucleic purine bases. d) Organic matter apparently digested in the rumen. *) Means are significantly different from those in control (p<.05). #) Refer to Table 32.

Table 36. Effect of salinomycin on duodenal N flow.

	Treatment#	
	Control	SL
Total N (g/d)	18.6±0.6 ^a	18.8±0.7
Ammonia N (g/d)	1.2±0.1	1.0±0.1
Non ammonia N (g/d)	17.4±0.5	17.8±0.7
Bacterial N (g/d)		
DAP ^b	13.1±0.7	11.2±0.4
PB ^b	11.2±0.5	9.8±0.6
Dietary N (g/d)		
DAP	4.3±1.0	6.6±0.5
PB	6.2±0.3	8.0±0.6 *

a) Mean±standard error. b) Diaminopimelic acid and nucleic purine bases are used as indicators for calculation of bacterial flow through the duodenum.

*) Means are significantly different from those in control (p<.05). #) Refer to Table 32.

Table 37. Effect of salinomycin on long-chain fatty acid composition of digesta and total lipid flow at duodenum.

	Treatment#	
	Control	SL
	———— (% in weight) ————	
Ruminal digesta		
Palmitic	32.0 ± 1.8 ^a	29.6 ± 0.6
Stearic	51.5 ± 1.4	41.6 ± 2.4 *
Oleic	12.4 ± 2.1	23.3 ± 1.8 *
Linoleic	4.1 ± 0.8	5.6 ± 0.9
Rumen bacteria		
Palmitic	30.1 ± 1.6	25.2 ± 0.4
Stearic	52.4 ± 1.7	46.5 ± 1.8
Oleic	12.8 ± 1.1	24.2 ± 1.8 **
Linoleic	4.7 ± 1.0	4.1 ± 0.4
Duodenal digesta		
Palmitic	23.9 ± 0.5	25.6 ± 0.5
Stearic	62.3 ± 0.7	44.6 ± 1.7 **
Oleic	9.1 ± 0.4	23.6 ± 2.1 **
Linoleic	4.7 ± 0.6	6.2 ± 0.5
	———— (g/d) ————	
Total lipid flow at duodenum	28.7 ± 1.0	29.0 ± 1.1

a) Mean ± standard error.

*,**) Means are significantly different from those in control at levels of 1 and 5%, respectively.

#) Refer to Table 32.

不飽和脂肪酸（オレイン酸およびリノール酸）の割合が増加した。すなわち、ルーメン内容物サンプルではステアリン酸割合が51.5から41.6%に減少し($p<.05$)、オレイン酸割合が12.4から23.3%へ大きく増加している($p<.05$)。リノール酸割合も有意ではないが4.1から5.6%へ増加している。十二指腸サンプルでも同様に、ステアリン酸比が62.3から44.6%へ急激に減少($p<.01$)、オレイン酸比が9.1から23.6%へ急増($p<.01$)した。リノール酸比も4.7から6.2%へ増加傾向を示した（有意差なし）。ルーメン菌サンプルでもステアリン酸比の減少(52.4→46.5%, 有意差なし)とオレイン酸比の増加(12.8→24.2%, $p<.01$)が認められた。リノレン酸はいずれのサンプルからも検出されなかった。十二指腸へ流下する総脂質量を推算したところ、処理による明確な影響はみられなかった。

考 察

Muntiferingら⁸³⁾およびPoosら¹⁸²⁾はMNを投与した牛で、ルーメンでの分解を回避し下部消化管へ流れ出す飼料CPが増加することを指摘している。またThivend and Jouany¹²⁵⁾はLD投与羊で同様にCP消化部位のシフトが生ずることを報告している。SLを用いた本試験でも、ルーメン内アンモニア濃度の低下（表32）にともない十二指腸へ流下する飼料CPの量が増加しており（表36）、さらにN出納の改善傾向（表34）もあわせて観察された。本来これらのイオノフォアは、ルーメンでのプロピオン酸生成を高め、これを宿主体内で糖新生にふりわけることから、糖原性アミノ酸を節約するいわゆるProtein sparing effectをもつといわれてきた。しかし本結果を含め、上述の報告は、イオノフォアによるN消化部位のシフトが他の意味でのタンパク質節約効果(Second protein sparing effect)¹³³⁾をもたらすことを示唆している。すなわちイオノフォアはルーメンでの飼料CPの過剰な分解を抑え、アンモニア産生を減らす^{41, 51, 82, 112, 114, 144)}ことで、尿中へのN排泄が減少するものと思われる。一方、分解を免れた飼料CPは小腸以降でペプチドまたはアミノ酸として有効に吸収利用される可能性がある。しかしここで注意すべきなのは、このようなSecond protein sparing effectが宿主栄養に対し意義をもつにはいくつかの条件が必要なことである。例えば、飼料CPのルーメン内分解度が極端に低い様な場合はイオノフォアのA

ンモニア生成抑制作用の貢献は小さい。つまり、効果の発現には飼料CPの質や量が大きく関与すると考えられる。

Nでみられた消化部位のシフトは他の成分でも程度の差こそあれ認められた(表33)。ルーメンでの諸栄養素の消化が減少傾向にあるのは主にルーメン微生物の代謝活性の変化によるもので、SLがルーメン内微生物叢を変え、ある特定の代謝反応を抑制したりすることはすでに述べた。粗繊維のルーメン内消化率はSLにより約4%単位減少しているが、これはSLによるいくつかの種の繊維分解菌の選抜淘汰⁸⁵⁾と関連するものであろう。

本試験で計測した混合菌サンプルのDAPおよびPB濃度はいずれもSL投与により減少する傾向にあった(表35)。前者は菌細胞壁の主要構成成分であり、菌種により含量に差があることが知られている¹⁴⁸⁾。また後者についても同様で、菌のグアニン・シトシン含量は菌種同定の有力な手段となっている⁹⁵⁾。つまり、SLによるこれらの含有率の変更は菌叢の変更を示唆するものでもありうる。一方、これら2つの微生物体マーカーをもちいて十二指腸へ移行する微生物量を推定した結果、SL処理の影響はいずれのマーカーを使っても同様な傾向が現れている。すなわちSL投与で流下微生物体Nは約14%減少した(表36)。この結果はLD給与羊での観察結果¹²⁵⁾とよく一致しており、これらイオノフォアがルーメン内での微生物増殖量を規制する一要因となっていることを示唆している。一般にルーメン液中の細菌密度はイオノフォア投与にともない増加する^{100, 112, 114)}。これは、十二指腸流下微生物体量の減少結果と一見矛盾するようと思われる。しかし、SLはルーメン内容物の回転率を下げる(本編第3章)ことから、みかけ上のルーメン内密度増は説明可能であろう。微生物の増殖効率を算定したところ、有意差はないがSL区で少し低下した(表35)。この傾向はMN⁸³⁾で報告されたものと同様であった。イオノフォアは一般にルーメン内アンモニア生成を抑えるので、飼料条件によっては、ルーメン内微生物増殖における脱共役因子として作用することもありうるだろう。

以上のことから、ルーメン微生物活性を著しく阻害しない程度のSLの添加はCPをはじめとする飼料成分のルーメンでの分解量を調節することがわかった。同時に下部消化管への可消化成分の供給を増すことで代償的な消化を行う一方、VFA産生様相をプロピオン酸産生主体型に転換し、飼料エネルギーの利用性向

上がはかれるものと思われる。また、下部消化管での消化率の向上は、単なる代償性消化の発現以外に、S Lによる滞留時間の延長（本編第3章）、大腸微生物への働きかけ等の要因が考えられる。おそらくこれら複数の要素が合わさって、下部消化管消化率改善が発現すると考えられる。

Marmerら⁷⁵⁾はM N給与家畜の体組織の脂質組成を測定したところ、無給与家畜に比べ不飽和脂肪酸含量の高いことを発見した。以来この現象の発生メカニズムについて興味を持たれてきたが、明確な説明ができないままで今日に至っている。本試験でS L給与は十二指腸に流下する総脂質量には影響を及ぼさなかったが、十二指腸内容物の不飽和脂肪酸含量を顕著に増加させた（表37）。このことは従来報告されていない新知見であり、S Lが不飽和脂肪酸の十二指腸への流下を促進することを示唆するとともに、宿主体組織に移行する不飽和酸の増加⁷⁵⁾を裏づけるものと考えられる。

不飽和脂肪酸はルーメン液中で急速に水素添加を受け、飽和化されることがin vivoおよびin vitroで確認されている¹²³⁾。本試験で認められたS Lによる水素添加阻害が、どのような機序で生じているのか現在のところ明らかではない。ルーメンでの不飽和酸の水素添加に携わる微生物種は、現在知られている限りではかなり限定されている。プロトゾアのうちではEntodinium属が水素添加能を持つといわれている¹⁹⁾。一方、細菌では主要繊維分解菌であるButyrivibrio fibrisolvens, Ruminococcus albusあるいはEubacterium sp.等が水素添加に携わっている⁴²⁾。これら数種のプロトゾアおよび細菌は、いずれもイオノフォアに対する感受性が高い^{22, 46, 85, 98)}。従ってS Lによるこれらの選抜淘汰が水素添加阻害の主因と考えられる。本試験では消化管内容物に多量の集積がみられた不飽和酸のうち、特にオレイン酸の割合が高かった（表37）ことから、S Lはオレイン酸からステアリン酸への水素添加系を特異的に阻害しているものと考えられる。Harfoot and Hazelewood⁴²⁾によると、上掲の微生物はいずれもリノレン酸あるいはリノール酸の異性化反応ならびにリノール酸からオレイン酸への水素添加系にのみ貢献しており、オレイン酸水素添加能はもたない。この能力を有する菌として知られるのはFusocillus sp.⁶⁴⁾および未同定のグラム陰性かん菌⁴⁴⁾からなる3株のみである。これらの菌株がS Lに対し感受性が高いのか否かについてはなんら情報がなく、しかもこれらの菌のルーメン内占有率についてもわからな

い。よってこれ以上微生物学的側面からの考察はできない。

Wakitaら¹⁴⁰⁾はめん羊のルーメン混合菌の脂肪酸組成がS LまたはM N投与時に不飽和酸、とくにオレイン酸の割合が高まることを発見した。この様にルーメン菌細胞自身が不飽和酸のキャリアーとなっていること自体、興味深い。本試験でも同様に混合菌のオレイン酸含量がS Lにより増加している(表37)。このような現象の正確な解釈は現段階では難しいがつぎの3通りの解釈が可能であろう。すなわち(1)S Lの菌種選抜作用により不飽和酸含量の高い菌がルーメン内に残った、(2)S Lによる水素添加阻害でルーメン内に集積した不飽和酸を利用して自らの細胞膜を構築した、(3)S Lへの適応手段の一環として菌自ら膜の流動性を高めるような細胞膜を形成した。

ルーメン菌の脂肪酸組成は種によりかなり特徴的な像を有し、しかもこれは生育条件等によらずほぼ一定であることから、これを材料に菌種同定の試みがなされてきている⁸⁰⁾。S L不感受性菌でS L給与羊ルーメン内でおそらく占有率が高いであろうRuminobacter amylophilusは、他の種に比べオレイン酸含有率が高い⁷⁹⁾ことから、(1)の説は本試験結果をある程度うらずけるものと思われる。一方、混合菌の脂肪酸組成の変化は、菌叢の変化だけでは説明ができないほど劇的なものであることから、むしろ(2)の可能性をWakitaら¹⁴⁰⁾は支持している。最近、Newbold and Wallace⁹¹⁾は、T R抵抗性菌のBacteroides ruminicolaはT Rで予備培養した場合T Rとの結合率が低下することを報告した。彼らはその原因を菌外細胞膜の性状(流動性)の変化にもとめているが、これについては彼らは何の証拠も得ていない。したがって、(3)の説については今後の単離菌を用いた研究の進展にともない徐々にその是非が明らかになるだろう。

以上述べてきたように、S Lはルーメン内での不飽和脂肪酸の水素添加を阻害し、これら不飽和酸の下部消化管への流出を助長することが発見された。この作用は宿主自身の必須不飽和脂肪酸要求を満たすために有益であるばかりでなく、それらの酸の蓄積した生産物(肉・乳)を食するヒト栄養にも貢献できることを示唆している。

第4編 総合考察

本研究は、S Lの反芻家畜栄養への作用機序を解明し、その応用に資することを目的として、S L投与に対するルーメン微生物叢とルーメン内消化・発酵様式の反応を明らかにするとともに、それらが宿主栄養へ果たす役割について解析したものである。

ルーメン内消化・発酵様式の反応

イオノフォアによるルーメン微生物の選抜様式に関する最初の報告はChen and Wolin²²⁾によるもので、単離ルーメン菌をMNやLD共存下で純粋培養した際の生育が調べられた。両イオノフォアはプロピオン酸やその前駆体のコハク酸を産生する菌種には有意な生育阻害を示さないことから、これらの菌がルーメン内で占有率を上げることで、発酵様相の変化を説明できるとしている。S Lについても同様の試みがなされ、まったく同様の結果⁸⁵⁾が得られている。しかし、これらイオノフォアを実際に投与している家畜ルーメンからの棲息菌の分離同定報告は意外なことに皆無である。わずかにロールチューブ法を用いた基質利用性に基づく分類結果が報告されているにすぎないが、そのいずれもが上述の*in vitro*での結果を支持している。すなわちS L投与はデンプン利用菌や乳酸利用菌を増加させる一方、プロトゾアやセルロース利用菌を減らす傾向にある^{100, 139)}。すでに述べたように前二者はプロピオン酸産生に関与し、後二者は酢酸、酪酸、ギ酸および水素産生系の微生物である。本研究でもS L投与に対する各種微生物群の挙動を検討したところ、いくつかの例外を除き、S Lは肥育牛、ほ育・育成牛、成めん羊いずれにおいてもプロトゾアの密度を下げた。細菌密度はS Lによって増加する傾向を示し、しかもその組成は以下のような特徴を有するものに変わった。すなわち、グラム陰性かん菌、デンプン分解菌およびタンパク質利用菌の増加、ならびにグラム陽性球菌と同かん菌の減少が認められた。子牛で計測したセルロース利用菌はS L投与でルーメンへの定着がやや遅れる傾向にあったが、その後の密度は影響を受けなかった。グラム陰性かん菌の増加については同時に測ったプロピオン酸産生比増と高い正の相関が得られているし、同陽性菌は酪酸生成との関連がこれまでに指摘されている¹⁰¹⁾ので、これら形態分類に基づく結果

も、ルーメン発酵様相の変化をよく説明するものと考えられる。以上のような微生物の選抜淘汰を介し、ルーメン内消化・発酵様式が変わるものと思われるが、本研究で確証されたS Lに対する反応を以下に列挙する。

V F A産生はプロピオン酸産生主体型に転換され、酢酸と酪酸の生成比は減少する。この際V F Aの総量にはほとんど変化がないのが特徴である。 α -アミノ態N濃度は一貫した反応は示さないが、アンモニア態N濃度はほとんど例外なく減少する。アンモニア濃度の減少は飼料タンパク質のルーメン内分解度の低下を連想させるが、S L投与時にタンパク質（カゼイン）利用菌が増加すること、またルーメンに浸漬したナイロンバッグからの飼料C P消失速度がS Lの影響を受けなかったことから、タンパク質よりもむしろペプチドやアミノ酸の分解抑制を導いているものと考えられる。本研究ではこの点を*in vitro*実験で検討し、S Lは脱アミノ、特に飼料C Pの主要構成アミノ酸であるASPの脱アミノを抑制することを発見した（第3編第2章）。ただしこの効果は、供試混合菌の組成を問わず常に認められるし、菌抽出液で反応を検討した時にはまったく認められないことから、S Lによる菌叢の変化よりもアミノ酸の菌細胞内への透過阻害が主因と推察された。

S Lは代表的な繊維分解菌に対し生育阻害作用をもつ⁸⁵⁾ので、実際のルーメン内繊維消化に負の効果をもたらすように考えられるが、本研究において育成牛で行った消化試験結果、めん羊で測定したルーメン内消化率を見る限りは有意な抑制作用は無いと言える（第2編第2章、第3編第4章）。ただし、めん羊を用いたナイロンバッグ試験でN D F消失率を測ったところ、S L投与初期（2週間）でN D F消化の抑制傾向が観察された。この傾向はS L継続投与にともない消失していくことから一過性の現象であることを明らかにした（第3編第1章）。このことから、繊維分解菌の中にはS Lへの長期暴露により次第に耐性を獲得していくものが存在する、または*F. succinogenes*のように元来S Lに抵抗性をもつ⁸⁵⁾ものが次第に占有率を増すという二つの可能性が示唆された。一方、N D F消化の回復とほぼ同時期にプロトゾア密度の回復が認められたのでプロトゾアが繊維消化に深く関与している可能性がある。S L投与にともなうこのような耐性プロトゾアの増加は肥育牛でも確認した（第2編第1章）。

次に本研究で初めて証明された作用として、S Lによる不飽和脂肪酸の水素添

加阻害作用（第3編第4章）がある。不飽和脂肪酸はルーメン内で主に細菌の作用により急速に水素添加を受け飽和化されることが知られているが、SLの投与はルーメン内にこれら不飽和酸、とくにオレイン酸の集積をひきおこした。同時にルーメン混合菌に含まれるオレイン酸も有意に増加することから、ルーメンに集積したオレイン酸はかなりの割合で細菌細胞に分布していると推定される。つまり、細菌をキャリアーとした多量の不飽和酸のルーメン以降への流出が見込まれるわけで、この栄養学的意義については後述する。一般に不飽和酸の存在は多くのルーメン菌の生育に対して負の効果を持っており、メタン産生の低下を導く¹²³⁾と言われている。SLはメタン産生を抑える^{138, 144)}が、ここで明示した水素添加阻害作用はその一因を担いであることを示唆している。水素添加阻害のメカニズムは明確でないが、水素添加にかかわる細菌がSLにより淘汰される、または占有率を下げる場所にあるという考え方が理解し易い。これらの菌は数種の繊維分解菌で構成され⁴²⁾、SLに対し感受性が高い⁸⁵⁾ことがすでに確認されている。

下部消化管への流下成分とそれらの利用

反芻家畜は生命活動に必要なエネルギーの70%近くをルーメン発酵で生成しルーメン壁を通して吸収されるVFAでまかなうが、タンパク質に代表されるその他の養分の供給はもっぱら下部消化管で消化吸収されたものに依存する。従って宿主栄養、特にタンパク質栄養を議論する際には、ルーメン以降へ流下する内容物のN分画を解析する必要がある。宿主栄養を総合的に捉えうるという意味において、第四胃や十二指腸にカニユーレを装着した動物を供する試験研究が、反芻家畜栄養学の分野における現在の主流である。

本研究でSL投与時の十二指腸内容を量的に捉えたところ、ルーメンでの分解を回避した飼料CPが増加することを認めた（第3編第4章）。これは、ルーメンでの飼料CPのアンモニアへの分解が抑制されたための結果と解釈でき、SL投与時にあまねく認められるルーメン内アンモニア濃度の減少（第2編1-3章、第3編1・4章）や、in vitroで明示した脱アミノ反応の抑制（第3編第2章）等の証拠で裏づけられる。ルーメンでの過剰なCP分解を抑えるこのような作用

は、本研究でも認めたように家畜のN出納の改善傾向（第3編第3・4章）をもたらし、飼料CPの利用率向上に貢献しうることを証明した。ただしこの効果はバイパスしたCPの有効性が高い時に発現するので、給与飼料の種類により制約される可能性がある。すなわち、可溶タンパク質含量が高くエネルギー含量が低いような飼料を給与しているとき、この効果は最大限に発揮されると思われる。SL投与時のN出納改善にはこれ以外にも、プロピオン酸吸収増にともなう宿主体内での糖原性アミノ酸の糖新生への動員節約が貢献しているのは言うまでもない。

流下微生物量はSL投与で減少傾向にあったが、SLによるルーメン内の細菌密度の増加（第2編第3章・第3編第1章）と一見矛盾する。しかしSLは消化管内容物の移動を遅らせる働きがあり（第3編第3章）、見かけ上の密度増は説明できる。これらのことからSLの作用は、宿主へのタンパク質供給源をルーメン微生物体タンパク質から飼料タンパク質にある程度置き換える、いわば反芻動物固有のタンパク質消化様式を根本的な部分で一部修正するところにあるものと解釈できる。

SLは不飽和脂肪酸のルーメン以降への流出を促進することを明らかにした（第3編第4章）が、この作用は宿主自らの必須脂肪酸の体内吸収に資するものと思われる。一方この作用が家畜生産物の脂質への不飽和酸蓄積を助長するものであるならば、SLはこれらを食するヒトの栄養にまで貢献できるかもしれない。過去に乳・肉牛への補給リノール酸をカプセル化し、ルーメンでの水素添加を回避させることで生産物の脂質改善がはかられた²⁾。SLの飼料への微量添加でこれと同様な効果が期待できることを明らかにした点、またMN投与牛の体内脂質に占める不飽和酸割合が高いという事実⁷⁵⁾に理論的根拠を与えた点で本作用発見の意義は大である。また宿主への不飽和脂肪酸の供給増は、肉牛にみられる脂肪壊死症の予防に有効¹³¹⁾かもしれない。

サリノマイシン応用に際しての課題

本研究で明らかにした上述のSL作用機序を概括して図19に示した。なおSLのメタン産生抑制作用は本研究では査定しなかったが、他の研究者が確認済みなので記載した。また可能性はあるが証明が充分されていないその他の作用には、

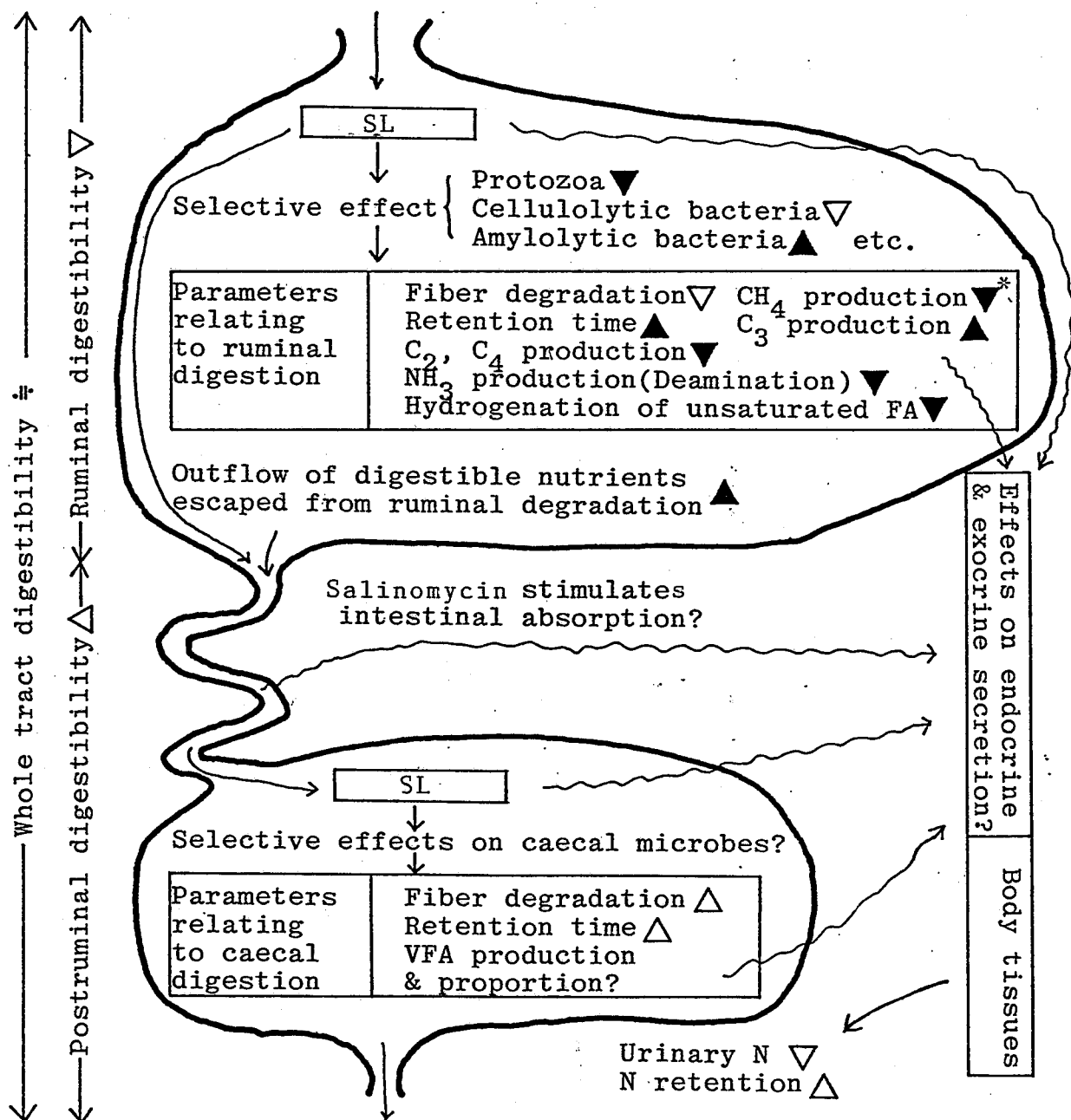


Fig.19. Possible effects of salinomycin(SL) on ruminants.

△ : increase ▲ : apparent increase
 ▽ : decrease ▼ : apparent decrease
 ≡ : no change

* Not assessed in the present study, but evidenced by others.
 ? Need assessing.

？印を付けて記した。SLの応用はこれらの作用機序を念頭においた、安全かつ有効なものであるべきである。

本研究では初めての試みとして、ほ育・育成子牛へのSLの適用を検討した（第2編第2・3章）。SLは成牛と同様にルーメン微生物叢に作用することで発酵様相を変え、飼料要求率を改善した。VFA組成への作用は子牛が離乳した後に明確になること、一方プロトゾアやセルロース分解菌の定着にはSLがやや負に働くことを考えあわせても、SLの適用は、少なくとも今回採用したような濃厚飼料を多給する育成方式下の離乳子牛には充分可能と思われる。

また肥育牛の試験において、プロピオン酸生成比が40%を超えるような濃厚飼料給与割合が極端に高い飼養条件下では、SLによるプロピオン酸増強効果はあまり期待できないことを指摘した（第2編第1章）。一方粗飼料給与割合が高い時、投与にともなうプロピオン酸生成比の上昇が著しいケースがあるが、逆に消化が著しく遅滞する危険性も考えられる。今後SLの効力発揮の為の「臨界点」とでも言うべき飼料構成を明らかにする必要がある。

またSLの長期投与は飼料要求率改善効果を消失させることから、特にルーメン微生物のSLへの耐性に関する検討が必要なことを指摘した（第2編第1章）。この問題については飼養条件をかなり限定しためん羊の試験で検討した（第3編第1章）が、比較的短かい投与期間にもかかわらず、SL継続投与で耐性プロトゾアが増加することを明らかにした。耐性細菌についての検討はしていないが、MNにおいて微生物細胞への生育抑制効果が外液中の K^+ 濃度が高まると弱まることが知られている²⁷⁾ので、投与効果減退にこのイオンのルーメンでの動態が関与しているかは要検討事項である。もし微生物の耐性獲得が主要な効果低減要因となっているのなら、(1)異なる種類のイオノフォアを交互に使用する (2)イオノフォアを他の適当な抗生物質と組み合わせて投与する、といった具体的な対策¹¹⁰⁾が推奨されるべきである。また本研究から明らかなように、SL投与を中止すると発酵様相は極めて速やかに投与前の状態に戻る（第3編第1章）。したがって適切な休薬期間を設けることも一策と考えられる。

以上、SLの反芻家畜栄養に対する作用機序を、まずルーメン消化・発酵様式の変化としてとらえ、さらにそれらとルーメン以降での養分利用との関連を明ら

かにすることで宿主栄養におよぼすS Lの作用を総合的に検証した本研究は、基礎・応用両面にわたりS Lの効果発現に関する多くの情報を提供するものである。

とりわけ(1)S Lは幼齡牛にも充分適用可能である、(2)S Lは不飽和脂肪酸のルーメンからの流出を増加させる、という証明は、世界的に前例の無かったものである。

要 約

本研究は、イオノフォア抗生物質サリノマイシン（SL）投与に対する反芻家畜ルーメン内消化・発酵様式の反応を明らかにし、それらと下部消化管での養分利用との関連を検討することで、宿主栄養改善にSLがどのようにかわるかを総合的に考察し、その応用に資することを目的としたものである。

まずSL投与に対する発育成績とルーメン発酵の応答をフィールドレベルの試験で明らかにするため、ホルスタイン種去勢雄肥育牛28頭、黒毛和種雌肥育牛16頭、ホルスタイン種雄子牛25頭を供試し、SL添加飼料給与にともなう飼料摂取量、増体量、ルーメン内消化・発酵にかかわる微生物の密度と組成、ならびに発酵生成物濃度等の変化について検討した。さらにSLに対するこれらの反応の詳細な解析と宿主栄養への貢献についての検討を目的とした、めん羊のべ23頭を供する基礎実験を行った。得られた結果は以下のように要約される。

1. ホルスタイン種去勢雄牛（7ヶ月齢）を10ヶ月間、SL 20ppm添加飼料自由摂取条件下で肥育したところ、増体量は無添加飼料給与時と変わらないが、濃厚飼料摂取量が減り、濃厚飼料要求率が8%改善された。SL投与に対するルーメン内性状の特徴的な反応として、アンモニア濃度と酢酸／プロピオン酸生成比（A／P比）の減少が認められた。このことから、これまで例のないわが国の典型的な肥育体系に即した長期のSL投与も効果的であることが示された。次に黒毛和種雌牛（9ヶ月齢）を11ヶ月間にわたりSL添加（20ppm）飼料制限給与条件下で肥育したところ、増体量はSL投与により有意に増加し、濃厚飼料要求率が約11%改善されるとともに、ルーメン内性状は上と同様な反応を示し、このような飼養方式下でもSLの効果が現れることがわかった。ただし試験期間を細分化して解析してみると、最終2ヶ月間にはSLの有効性はまったく認められず、それまでみられたルーメン内A／P比やプロトゾア密度の減少といったSL投与時の特徴的な反応が明確でなくなった。このことから、長期にわたるSLの投与は場合によっては効果の低減を招く可能性があること、その一因としてルーメン微生物のSLへの適応が考えられることが示された。

2. ホルスタイン種雄子牛にSL添加（15ppm）飼料を給与し、3-25週齢間の

発育およびルーメン内性状への影響を検討したところ、S L 投与は濃厚飼料要求率を6%改善するとともに、ルーメン内のアンモニア濃度とA/P比の低下をひきおこした。S Lによるプロピオン酸生成比の増加はルーメン内グラム陰性細菌の増加と連動していることから、S Lによる微生物群の選抜淘汰をとおして発酵様相が変化するという反応については、成牛と幼齢牛の間で基本的に違いがないことが明らかとなった。一方、ファイバースコープでルーメン絨毛を観察した結果、S L投与は絨毛の発育にやや抑制的に働くことが示された。

3. ホルスタイン種雄子牛を上と同様（ただしS L添加は20ppm）に同期間飼養し、子牛ルーメン内の微生物叢形成におけるS L投与の影響を検討したところ、S Lはプロトゾアやセルロース利用菌の定着をやや阻害する傾向を示した。しかし一方で、デンプン、タンパク質および乳酸をそれぞれ利用する菌群のルーメン内占有率を上げることでプロピオン酸産生主体型の発酵を導き、飼料利用性改善に貢献することを明らかにした。

4. めん羊にS L添加（20ppm）飼料を30日間継続して給与した場合の、S Lに対するルーメン内消化・発酵様相の反応が経日的にいかに移るかを調べたところ、アンモニア濃度とVFA生成比への作用は試験期間内でよく維持された。一方、S L給与開始初期はルーメン内NDF消失率がやや低下したが、給与開始約2週間後には回復したことから、S Lによる繊維消化抑制傾向は永続的なものではないと推察された。これとほぼ同じ時期にS L耐性プロトゾアが増加したことから、プロトゾアが繊維消化になんらかの形で関与していると推察された。

5. ルーメン内脱アミノ反応へのS Lの作用を検討するため、めん羊のルーメン液を用いて *in vitro* 実験を行ったところ、試験管への2.5ppmのS L添加は、カゼインからのアンモニア生成を抑え多量のアミノ態Nを集積させたことから、脱アミノを阻害することが明らかであった。次に各種アミノ酸の脱アミノの阻害程度を調べたところ、特にアスパラギン酸で顕著な阻害を受けた。この作用は供試菌細胞を超音波処理するとまったく認められなくなること、給与飼料構成の異なる、すなわち菌叢の異なるめん羊ルーメン液を用いても一律に認められることから、S L添加にともなう菌叢の変化よりもむしろアミノ酸の菌細胞内への透過阻害により発現するらしいことがわかった。

6. 消化率の規制要因になる飼料の消化管内通過速度のS L投与に対する反

応を、通過速度推定の数式モデルを使って検討したところ、飼料への20ppmのSL添加は、ルーメンでの固相ならびに液相の通過を遅らせる傾向にあった。この原因として、ルーメンから流出しにくいサイズの飼料片の大半を占めているであろう繊維成分の分解がSLによって抑えられることが考えられるが、実測した粗繊維消化率の低下傾向はこれを裏づけるものであった。

7. ルーメンと十二指腸にカニニューレを装着しためん羊を用いて、下部消化管への流下物におよぼすSLの影響を定量的にとらえ、宿主栄養との関係を検討した。SLは乾物、有機物および粗繊維のルーメン内消化率をやや低めるが、下部消化管で補完的な消化がなされることを明らかにした。飼料粗タンパク質(CP)のルーメン内分解度はSLにより抑えられ、ルーメン以降へ流出する飼料由来のCPが増加すると同時に、ルーメン内アンモニア濃度と尿中排泄N量の減少、N蓄積量の増加が認められたことから、SLはこの作用をとおして飼料CPの利用率改善をもたらすと推察した。SL投与にともない、ルーメン内容物、ルーメン混合菌および十二指腸内容物の不飽和脂肪酸割合が顕著に増加した。このことから、SLはルーメンでの不飽和酸への水素添加を抑制することが明らかであった。ルーメン以降への不飽和脂肪酸の流出増は、SLにより宿主生産物の脂質組成を変えうることを示唆している。

8. SL投与に対する反芻家畜のルーメン内消化・発酵様式の反応ならびにそれらと宿主栄養との関連を解析した結果、SLはルーメン内でのプロピオン酸生成の促進、飼料CP分解の抑制をとおし、飼料エネルギーおよびNの利用効率を改善する方向にルーメン発酵を制御することを明らかにした。またこれらの作用の基盤はSL投与にともなうルーメン微生物叢および微生物代謝様式の変化にあることを示した。

謝 辞

本研究のとりまとめに際し、終始懇切なる御指導を賜り、御校閲の労をおとりいただいた北海道大学農学部教授朝日田康司博士に厚く御礼申し上げます。また北海道大学農学部教授上山英一博士ならびに同助教授大久保正彦博士には御校閲の労をおとりいただき、有益な御助言を賜った。さらに三重大学生物資源学部教授星野貞夫博士ならびに同助教授脇田正彰博士には研究の終始にわたって懇切なる御指導と暖かい激励を賜った。ここに深甚なる謝意を表します。

実験に際し、ファイバースコープの使用法を岐阜大学農学部助教授大谷滋博士に、十二指腸カニューレ装着手術法を広島大学生物生産学部助教授谷口幸三博士に御教授いただいた。さらに三重大学農学部卒業生河合祐三、岡本明、瀧澤秀明の諸氏、ならびに三重大学農学部付属農場畜産部の職員各位には、実験に一方ならぬ御協力をいただいた。ここに衷心より感謝する次第である。

最後に、本研究の終始にわたって暖かく激励してくれた最愛の妻、勢津子に深謝する。

参考文献

- 1)阿部亮・堀井聡, 配合飼料原料および各種配合飼料に対するデタージェント法の適用. 日畜会報, 49:733-738. 1978.
- 2)阿部又信・山本嘉博・上原良吾・萩原国威・佐藤民雄, 乳牛、肥育牛に対するカプセル化サフラワー油給与試験. 日畜会報, 47:639-647. 1976.
- 3)Adams, D.C., M.L.Galyean, H.E.Kiesling, J.D.Wallace and M.D.Finkner, Influence of viable yeast culture, sodium bicarbonate and monensin on liquid dilution rate, rumen fermentation and feedlot performance of growing steers and digestibility in lambs. J. Anim. Sci., 53:780-789. 1981.
- 4)Anderson, K.L., T.G.Nagaraja and J.L.Morrill, Ruminant metabolic development in calves weaned conventionally or early. J. Dairy Sci., 70:1000-1005. 1987.
- 5)Anderson, K.L., T.G.Nagaraja, J.L.Morrill, T.B.Avery, S.J.Galitzer and J.E.Boyer, Ruminant microbial development in conventionally or early-weaned calves. J. Anim. Sci., 64:1215-1226. 1987.
- 6)Anderson, K.L., T.G.Nagaraja, J.L.Morrill, P.G.Reddy, T.B.Avery and N.V.Anderson, Performance and ruminal changes of early-weaned calves fed lasalocid. J. Anim. Sci., 66:806-813. 1988.
- 7)A.O.A.C., Official Methods of Analysis, 12th ed. Association of Official Analytical Chemists. Washington D.C., 1975.
- 8)Armstrong, J.D. and J.W.Spears, Intravenous administration of ionophores in ruminants: Effects on metabolism independent of the rumen. J. Anim. Sci., 66:1807-1817. 1988.
- 9)Bailey, R.W. and R.T.J.Clarke, Carbohydrase activity of rumen Entodinium species from sheep on a starch-free diet. Nature, 198: 787. 1963.
- 10)Balch, C.C. and R.C.Campling, Rate of passage of digesta through the ruminant digestive tract. in Physiology of digestion in the ruminant.

- (Dougherty, R.W., ed.) 108-123. Butterworth Inc. Washington D.C. 1965.
- 11) Barclay, R.A., D.B.Faulkner, G.C.Fahey, Jr. and G.F.Cmarik, Effects of salinomycin on performance characteristics and apparent dry matter digestion by grazing beef steers. *Nutr. Rep. Int.*, 33:43-54. 1986.
 - 12) Bergen, W.G. and D.B.Bates, Ionophores: their effect on production efficiency and mode of action. *J. Anim. Sci.*, 58:1465-1483. 1984.
 - 13) Bhatia, S.K., K.Pradhan and R.Singh, Microbial transaminase activities and their relationship with bovine rumen metabolites. *J. Dairy Sci.*, 62:441-446. 1979.
 - 14) 微生物研究法懇談会, 細胞成分の抽出および定量. 微生物実験法. 255-265. 講談社サイエンティフィック. 東京. 1975.
 - 15) Blaxter, K.L. and J.L.Clapperton, Prediction of the amount of methane produced by ruminants. *Br. J. Nutr.*, 19:511-522. 1965.
 - 16) Brent, B.E. and E.E.Bartley, Thiamine and niacin in the rumen, *J. Anim. Sci.*, 59:813-822. 1984.
 - 17) Brock, F.M., C.W.Forsberg and J.G.Buchanan-Smith, Proteolytic activity of rumen microorganisms and effects of proteinase inhibitors. *Appl. Environ. Microbiol.*, 44:561-569. 1982.
 - 18) Broderick, G.A. and J.E.Balthrop Jr., Chemical inhibition of amino acid deamination by ruminal microbes in vitro. *J. Anim. Sci.*, 49: 1101-1111. 1979.
 - 19) Chalupa, W. and A.J.Kutches, Biohydrogenation of linoleic-1-¹⁴C acid by rumen protozoa. *J. Anim. Sci.*, 27:1502-1508. 1968.
 - 20) Chalupa, W., Chemical control of rumen microbial metabolism. in Digestive Physiology and Metabolism in Ruminants, (Ruckebusch Y. and P.Thivend, eds.) 325-347. MTP Press Ltd. Falcon House. Laucaster. England. 1979.
 - 21) Chalupa, W., J.A.Patterson, R.C.Parish and A.W.Chew, Effects of diaryliodonium chemicals on nitrogen utilization in growing steers. *J.*

- Anim. Sci., 57:195-200. 1983.
- 22)Chen, M. and M.J.Wolin, Effect of monensin and lasalocid-sodium on the growth of methanogenic and rumen saccharolytic bacteria. Appl. Environ. Microbiol., 38:72-77. 1979.
- 23)Chen, G. and J.B.Russell, Fermentation of peptides and amino acids by a monensin-sensitive ruminal Peptostreptococcus. Appl. Environ. Microbiol., 54:2742-2749. 1988.
- 24)Chen, G. and J.B.Russell, More monensin-sensitive, ammonia-producing bacteria from the rumen. Appl. Environ. Microbiol., 55:1052-1057. 1989.
- 25)Conway, E.J., Microdiffusion analysis and volumetric error. 4th ed. Crosby, Lockwood and Sons, Ltd. London. 1957.
- 26)Czerkawski, J.W., Methods for determining 2-6-diaminopimelic acid and 2-aminoethylphosphonic acid in gut contents. J. Sci. Food Agric., 25: 45-55. 1974.
- 27)Dawson, K.A. and J.A.Boling, Effects of potassium ion concentrations on the antimicrobial activities of ionophores against ruminal anaerobes. Appl. Environ. Microbiol., 53:2363-2367. 1987.
- 28)De Jong, A., Comparison of in vitro and in vivo fermentation by rumen modifiers. Acta Vet. Scandin., now printing.
- 29)デンベック, H., 家畜のきた道, (小西正泰・渡辺清訳) 1-187. 築地書館. 東京. 1979.
- 30)Dinius, D.A., M.E.Simpson and P.B.Marsh, Effect of monensin fed with forage on digestion and the ruminal ecosystem of steers. J. Anim. Sci., 42:229-234. 1976.
- 31)Donoho, A.L., Biochemical studies on the fate of monensin in animals and in the environment. J. Anim. Sci., 58:1528-1539. 1984.
- 32)Donoho, A., J.Manthey, J.Occolowitz and L.Zornes, Metabolism of monensin in the steer and rat. J. Agric. Food Chem., 26:1090-1095. 1978.

- 33) Dumas, B.T., W.A. Watson and H.G. Briggs, Albumin standards and the measurement of serum albumin with bromocresol green. Clin. Chim. Acta, 31:87-96. 1971.
- 34) Faichney, G.J., The use of markers to partition digestion within the gastro-intestinal tract of ruminants. in Digestion and Metabolism in the Ruminant. (McDonald, I.W. and A.C.I. Warner, eds.) 277-291. The University of New England Publishing Unit. Armidale. N.S.W. 1975.
- 35) フィアネン, J.B., R. コールマン, R.H. ミッチェル, 生体膜と細胞活動. 第2版, (佐藤了・日野幸伸訳) 1-203. 培風館. 東京. 1977.
- 36) Fujikura, T., R. Oura and J. Sekine, Comparative morphological studies on digestion physiology of herbivores. 1. Digestibility and particle distribution of digesta and feces of domestic and feral animals. J. Fac. Agric., Tottori Univ., 25:87-93. 1989.
- 37) Fortenot, J.P., K.E. Webb, Jr. and D.M. Lucas, Effect of salinomycin on in vitro and in vivo ruminal fatty acids. J. Anim. Sci., 51(Abstr.): 360. 1980.
- 38) Gornall, A.G., C.J. Bardawill and M.M. David, Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. J. Biol. Chem., 177:751-766. 1949.
- 39) Grenet, E., G. Fonty, J. Jamot and F. Bonnemoy, Influence of diet and monensin on development of anaerobic fungi in the rumen, duodenum, cecum and feces of cows. Appl. Environ. Microbiol., 55:2360-2364. 1989.
- 40) Grovum, W.L. and V.J. Williams, Rate of passage digesta in sheep. 4. Passage of marker through the alimentary tract and the biological relevance of rate-constants derived from the changes in concentration of marker in faeces. Br. J. Nutr., 30:313-329. 1973.
- 41) Hanson, T.L. and T. Klopfenstein, Monensin, protein source and protein levels for growing steers. J. Anim. Sci., 48:474-479. 1979.
- 42) Harfoot, C.G. and G.P. Hazlewood, Lipid metabolism in the rumen. in

- The Rumen Microbial Ecosystem. (Hobson, P.N. ed.) Elsevier Appl. Sci. London and New York, 285-322. 1988.
- 43) 畠山史郎, 温暖化に關与する大氣微量成分の發生源. 地球規模の環境問題 (I). (大來佐武郎監修) 112-127. 中央法規出版. 東京. 1990.
- 44) Hazlewood, G.P., P.Kemp, D.Lander and R.M.C.Dawson, C_{18} unsaturated fatty acid hydrogenation patterns of some rumen bacteria and their ability to hydrolyse exogenous phospholipid. Br. J. Nutr., 35:293-297. 1976.
- 45) Hergert, R.J., J.A.Mantey, L.F.Richardson, C.O.Cooley and A.L. Donoho, Excretion and tissue distribution of ^{14}C monensin in cattle. J. Agric. Food Chem., 26:1087-1089. 1978.
- 46) 日野常男, ルーメンプロトゾアに対するモネンシンの作用. 日畜会報, 52: 171-179. 1981.
- 47) 日野常男, ルーメンにおけるエネルギー代謝. ルーメンの世界 - 微生物生態と代謝機能. (神立誠・須藤恒二監修) 474-601. 農山漁村文化協会. 東京. 1985.
- 48) Hino, T. and J.B.Russell, Effect of reducing equivalent disposal and NADH/NAD on deamination of amino acids by intact rumen microorganisms and their cell extracts. Appl. Environ. Microbiol., 50:1368-1374. 1985.
- 49) Hino, T. and J.B.Russell, Relative contributions of ruminal bacteria and protozoa to the degradation of protein in vitro. J. Anim. Sci., 64:261-270. 1986.
- 50) Horn, G.W., T.L.Mader, S.L.Armbruster and R.R.Frahm, Effect of monensin on ruminal fermentation, forage intake and weight gains of wheat pasturestocker cattle. J. Anim. Sci., 52:447-454.
- 51) Hornton, G.M.J., K.A.Bassendowski and E.H.Keeler, Digestion and metabolism in lambs and steers fed monensin with different levels of barley. J. Anim. Sci., 50:997-1008. 1980.
- 52) Hoshino, S., Studies on protein digestion in ruminants. 4. Effect of inhibitors of aspartase on the ammonia production and nitrogen

- balance in sheep. *Jpn. J. Zootech. Sci.*, 36:260-265. 1965.
- 53) 星野貞夫, 牛の鼓脹症と反芻胃性状. *日畜会報*, 54:153-164. 1983.
- 54) 星野貞夫・脇田正彰・小林泰男・大久保正彦・中嶋隆文・清水良彦・高野司郎・工藤英彦, 鼓脹症牛の第一胃液性状およびサリノマイシン投薬による治療効果. *日畜会報*, 57:833-841. 1986.
- 55) Hoshino, S., M.Wakita and Y.Kobayashi, Effects of salinomycin on grain bloat in fattening Japanese Black cattle. *Z. Tierphysiol., Tierernährg. u. Futtermittelkde.*, 57:123-129. 1987.
- 56) 星野貞夫, ヒトの栄養 動物の栄養. 1-188. 大月書店. 東京. 1987.
- 57) Hungate, R.E., *The Rumen and Its Microbes*. Chap.2. 20-30. Chap.6. 266-270. Academic Press. New York and London. 1966.
- 58) Ibrahim, E.A., J.R.Ingalls and G.D.Phillips, Effect of continuous feeding on the composition of rumen digesta. *Can. J. Anim. Sci.*, 49: 399-401. 1969.
- 59) 一瀬克章・川島良治, 反芻胃内微生物によるVFA産生能におよぼす各種抗生物質の影響. *日畜関西支部報*. 第83号. p.26. 1979.
- 60) Johnson, R.J., M.L.Herlugsen, L.B.Ojikutu, G.Cordova, I.A.Dyer, P. Zimmer and R.Delay, Effect of avoparcin and monensin on feedlot performance of beef cattle. *J. Anim. Sci.*, 48:1338-1342. 1979.
- 61) Katoh, K. and T.Tsuda, Effects of monensin and salinomycin on amylase release from the superfused parotid segments of sheep and rat. *Res. Vet. Sci.*, 41:297-210. 1986.
- 62) 加藤和雄, 牛下垂体組織からのGH分泌に関する基礎的研究. 第二回イオノフォア研究会講演要旨集. 18-23. 1990.
- 63) 川島良治・一瀬克章・斎田二郎, 和牛去勢牛の若齢肥育に関する研究. 第45報 モネンシンの投与が肥育成績ならびに枝肉に及ぼす影響(1)30ppm添加の場合. *京大家畜栄養学研業績*, 第54号, 1-16. 1979.
- 64) Kemp, P. and D.J.Lander, The hydrogenation of some cis- and trans-octadecenoic acids to stearic acid by a rumen *Fusocillus* sp. *Br. J. Nutr.*, 52:165-170.

- 65) 小林剛・松本光人・板橋久雄, サイレージと濃厚飼料を給与した牛のルーメン発酵の経時的变化に及ぼすモネンシンの影響. 日畜会報, 53:528-534. 1982.
- 66) Kobayashi, Y., M. Wakita and S. Hoshino, Comparison between influences of portmicin and of salinomycin on ruminal characteristics of sheep and growth of pigs. Z. Tierphysiol., Tierernährg. u. Futtermittelkde., 62:237-245. 1989.
- 67) 小坂清巳, 消化率指示物質. 動物栄養試験法. (森本宏監修) 第3章. 392-393. 養賢堂. 東京1971.
- 68) 栗原康, 有限の生態学—安定と共存のシステム—. 62-97. 岩波書店. 東京. 1975.
- 69) 栗原康・武智辰夫, ルーメンの検査. 牛の臨床検査法. (中村良一・米村寿男・須藤恒二編) 第6章. 14-39. 農山漁村文化協会. 東京. 1973.
- 70) Kusakabe, Y., N. Takahashi, Y. Iwagaya and A. Seino, Portmicin, a new antibiotic. J. Antibiotics, 40:237-238. 1987.
- 71) Lemenager, R.P., F.N. Owens, B.J. Shockey, K.S. Lusby and R. Totusek, Monensin effects on rumen turnover rate, twenty-four hour VFA pattern, nitrogen components and cellulose disappearance. J. Anim. Sci., 47:255-261. 1978.
- 72) Lewis, T.R. and R.S. Emery, Relative deamination rates of amino acids by rumen microorganisms. J. Dairy Sci., 46:765-768. 1963.
- 73) Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall, Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193:265-275. 1951.
- 74) Maeng, W.J., C.J. Van Nevel, R.L. Baldwin and J.G. Morris, Rumen microbial growth rates and yields: effect of amino acids and protein. J. Dairy Sci., 59:68-79. 1976.
- 75) Marmer, W.N., R.J. Maxwell and D.G. Wagner, Effects of dietary monensin on bovine fatty acid profiles. J. Agric. Food Chem., 33:67-70. 1985.
- 76) McClure, W.H., J.P. Fontenot, K.E. Webb, Jr. and D.M. Lucas, Feedlot performance of cattle fed different salinomycin levels. J. Anim.

- Sci., 51(Abstr.):380. 1980.
- 77) Mehrez, A.Z. and E.R. Orskov, A Study of the artificial fibre bag technique for determining the digestibility of feeds in the rumen. J. Agric. Sci., Camb., 88:645-650. 1977.
- 78) Merchen, N.R. and L.L. Berger, Effect of salinomycin level on nutrient digestibility and ruminal characteristics of sheep and feedlot performance of cattle. J. Anim. Sci., 60:1338-1346. 1985.
- 79) Minato, H., S. Ishibashi and T. Hamaoka, Cellular fatty acid and sugar composition of representative strains of rumen bacteria. J. Gen. Appl. Microbiol., 34:303-319. 1988.
- 80) Miyagawa, E., Cellular fatty acid and fatty aldehyde composition of rumen bacteria. J. Gen. Appl. Microbiol., 28:389-408. 1982.
- 81) Miyazaki, Y., M. Shibuya, H. Sugawara, O. Kawaguchi, C. Hirose, J. Nagatsu and S. Esumi, Salinomycin, a new polyether antibiotic. J. Antibiotics, 27:814-821. 1974.
- 82) Muntifering, R.B., B. Theurer, R.S. Swingle and W.H. Hale, Effect of monensin on nitrogen utilization and digestibility of concentrate diet by steers. J. Anim. Sci., 50:930-936. 1980.
- 83) Muntifering, R.B., B. Theurer and T.H. Noon, Effects of monensin on site and extent of whole corn digestion and bacterial protein synthesis in beef steers. J. Anim. Sci., 53:1565-1573. 1981.
- 84) Nagaraja, T.G., T.B. Avery, S.J. Galitzer and D.L. Harmon, Effect of ionophore antibiotics on experimentally induced lactic acidosis in cattle. Am. J. Vet. Res., 46:2444-2452. 1985.
- 85) Nagaraja, T.G. and M.B. Taylor, Susceptibility and resistance of ruminal bacteria to antimicrobial feed additives. Appl. Environ. Microbiol., 53:1620-1625. 1987.
- 86) Nagaraja, T.G. and G.W. Miller, Rumen microbial changes in ionophore antibiotic-treated steers with experimentally induced acidosis. Asian-Australasian J. Anim. Sci., 2:465-468. 1989.

- 87)中嶋隆文・増野朋也・坂内良二・星野貞夫, 肥育牛の飼料効率、第一胃液および血液性状におよぼすサリノマイシンの影響. 日畜会報, 53:541-546. 1982.
- 88)中村和夫, 植食動物と消化管内微生物の進化. ルーメンの世界－微生物生態と代謝機能－. (神立誠・須藤恒二監修) 648-678. 農山漁村文化協会. 東京. 1985.
- 89)Newbold, C.J. and R.J.Wallace, Effects of the ionophores monensin and tetracycline on simulated development of ruminal lactic acidosis in vitro. Appl. Environ. Microbiol., 54:2981-2985. 1988.
- 90)Newbold, C.J., R.J.Wallace, N.D.Watt and A.J.Richardson, Effect of the novel ionophore tetracycline (ICI 139603) on ruminal microorganisms. Appl. Environ. Microbiol., 54:544-547. 1988.
- 91)Newbold, C.J. and R.J.Wallace, Changes in the rumen bacterium, *Bacteroides rumenicola*, grown in the presence of the ionophore, tetracycline. Asian-Australasian J. Anim. Sci., 2:452-453. 1989.
- 92)Newbold, C.J., R.J.Wallace and N.Mckain, Effects of the ionophore, tetracycline, on nitrogen metabolism of ruminal microorganisms in vitro. J. Anim. Sci., 68:1103-1109. 1990.
- 93)Nicholson, J.W.G., H.M.Cunningham and D.W.Friend, Effect of adding buffers to all-concentrate rations on feedlot performance of steers, ration digestibility and intra-rumen environment. J. Anim. Sci., 22:368-373. 1963.
- 94)農林省農林水産技術会議事務局, 日本標準飼料成分表. 36-37. 中央畜産会. 東京. 1975.
- 95)Ogimoto, K. and S.Imai, Atlas of Rumen Microbiology, 9-125. Japan Sci. Soc. Press. Tokyo. 1980.
- 96)Ohtani, S., Y.Asahida and Y.Hirose, The effect of grazing on the development of ruminal mucosa and papillae in the young calf. Jpn. J. Zootech. Sci., 47:218-223. 1976.
- 97)Ohtani, S., S.Kondo, Y.Asahida and Y.Hirose, Evaluation for a possible use of the fiberoptic in the study of the bovine reticulo-

- ruminal development. Jpn. J. Zootech. Sci., 48:576-578. 1977.
- 98)大谷滋, 子牛における第一胃の発達に関する飼養学的研究. 北海道大学提出
博士論文. 1-143. 1981.
- 99)Onodera, R., Effect of salinomycin on tryptophan metabolism and
effects of indole and skatole on survival of protozoa and volatile
fatty acid production in rumen microbial suspensions. Appl.
Environ. Microbiol., submitting.
- 100)Olumeyan, D.B., T.G.Nagaraja, G.W.Miller, R.A.Frey and J.E.Boyer,
Rumen microbial changes in cattle fed diets with or without
salinomycin. Appl.Environ. Microbiol., 51:340-345. 1986.
- 101)押尾秀一・田畑一良, 第一胃内細菌の形態的分類と揮発性脂肪酸組成との関
係. 日畜会報, 58:222-227. 1987.
- 102)Poos, M.I., T.L.Hanson and T.J.Klopfenstein, Monensin effects on
diet digestibility, ruminal protein bypass and microbial protein
synthesis. J. Anim. Sci., 48:1516-1524. 1979.
- 103)Poppi, D.P., B.W.Norton, D.J.Minson and R.E.Hendricksen, The valid-
ity of the critical size theory for particles leaving the rumen. J.
Agric. Sci., Camb., 94:275-280. 1980.
- 104)Potter, E.L., C.O.Cooley, L.F.Richardson, A.P.Raun and R.P.
Rathmacher, Effect of monensin on performance of cattle fed forage.
J. Anim. Sci., 43:665-669.1976.
- 105)Raun, A.P., C.O.Cooley, E.L.Potter, R.P.Rathmacher and L.F.
Richardson, Effect of monensin on feed efficiency of feedlot cattle.
J. Anim. Sci., 43:670-677. 1976.
- 106)Riley, Jr. W.W., E.Esteve-Garcia and R.E.Austic, Intestinal absorpt-
ion of glucose and amino acids in chickens administered monensin.
Poultry Sci., 65:2292-2298. 1986.
- 107)Russell, J.B., A proposed mechanism of monensin action in inhibiting
ruminal bacterial growth: Effects on ion flux and proton motive
force. J. Anim. Sci., 64:1519-1525. 1987.

- 108) Russell, J.B. and H.J. Strobel, Effects of additives on in vitro ruminal fermentation: A comparison of monensin and bacitracin, another gram-positive antibiotic. J. Anim. Sci., 66:552-558. 1988.
- 109) Russell, J.B., H.J. Strobel, A.J.M. Driessen and W.N. Konings, Sodium-dependent transport of neutral amino acids by whole cells and membrane vesicles of *Streptococcus bovis*, a ruminal bacterium. J. Bacteriol., 170:3531-3536. 1988.
- 110) Russell, J.B. and H.T. Strobel, Effect of ionophores on ruminal fermentation. Appl. Environ. Microbiol., 55:1-6. 1989.
- 111) Sakata, T. and H. Tamate, Influence of butyrate on the microscopic structure of ruminal mucosa in adult sheep. Jpn. J. Zootech. Sci., 49:687-696. 1978.
- 112) 坂内良二・脇田正彰・星野貞夫, モネンシン給与による肥育牛第一胃内 VFA, アンモニア濃度と微生物相の変化. 日畜会報, 50:369-374. 1979.
- 113) Sakauchi, R. and S. Hoshino, Effects of monensin on ruminal fluid viscosity, pH, volatile fatty acids and ammonia levels, and microbial activity and population in healthy and bloated feedlot steers. Z. Tierphysiol., Tierernährg. u. Futtermittelkde., 46:21-33. 1981.
- 114) 坂内良二・星野貞夫, 肥育牛の飼料要求率および第一胃内性状におよぼすサリノマイシンの影響. 三重大農学報, 66:1-9. 1983.
- 115) Scheifinger, C., N. Russell and W. Chalupa, Degradation of amino acids by pure cultures of rumen bacteria. J. Anim. Sci., 43:821-827. 1976.
- 116) Schelling, G.T., Monensin mode of action in the rumen. J. Anim. Sci., 58:1518-1527. 1984.
- 117) Schroeder, W.A., L.M. Kay and R.S. Mills, Quantitative determination of amino acids by iodometric titration of their copper salts. Anal. Chem., 22:760-763. 1950.
- 118) Starnes, S.R., J.W. Spears, M.A. Froetschel and W.J. Croom Jr., Influence of monensin and lasalocid on mineral metabolism and

- ruminal urease activity in steers. J. Nutr., 114:518-525. 1984.
- 119) Smith, R.H., Development and function of the rumen in milk fed calves. J. Agric. Sci., Camb., 52:72-78. 1959.
- 120) Snedecor, G.W., Statistical methods. 5th ed. Ames. Iowa. The Iowa State College Press. 1956.
- 121) 須藤恒二, ルーメンの検査. 牛の臨床検査法. (中村良一・米村寿男・須藤恒二編) 第6章 39-44. 農山漁村文化協会. 東京. 1973.
- 122) Tamate, H., A.D. McGilliard, N.L. Jacobson and R. Getty, Effect of various dietaries on the anatomical development of the stomach in the calf. J. Dairy Sci., 55:408-420. 1962.
- 123) 田中桂一, 第一胃内における長鎖脂肪酸の代謝について. 日畜会報, 45: 307-318. 1974.
- 124) 田中信男・中村昭四郎, 抗生物質大要-化学と生物活性(第3版増補). 239-240. 東京大学出版会. 東京. 1984.
- 125) Thivend, P. and J.-P. Jouany, Effect of lasalocid sodium on rumen fermentation and digestion in sheep. Reprod. Nutr. Develop., 23: 817-828. 1983.
- 126) Thornton, J.H. and F.N. Owens, Monensin supplementation and *in vivo* methane production by steers. J. Anim. Sci., 52:628-634. 1980.
- 127) Uden, P., P.E. Colucci and P.J. Van Soest, Investigation of chromium, cerium and cobalt as markers in digesta. Rate of passage studies. J. Sci. Food Agric., 31:625-632. 1980.
- 128) 牛田一成・宮崎昭・川島良治, モネンシンの添加が粗飼料多給めん羊の第一胃内におけるガスおよびVFA産生像に及ぼす影響. 日畜会報, 53:412-416. 1982.
- 129) Ushida, K., A. Miyazaki and R. Kawashima, Effect of monensin on ruminal VFA and gas production of sheep fed high concentrate diet. Jpn. J. Zootech. Sci., 56:822-826. 1985.
- 130) Ushida, K., T. Kaneko and Y. Kojima, Effect of presence of large entodiniomorphid protozoa on the rumen bacteria flora, fauna

- composition of small entodinia and in vitro cellulolysis and xylanolysis. Jpn. J. Zootech. Sci., 58:893-902. 1987.
- 131)牛見忠蔵, 脂肪壊死症. 新乳牛の科学. (津田恒之監修/柴田章夫編). 354-363. 農山漁村文化協会. 東京. 1987.
- 132)Van Nevel, C.J. and D.I.Demeyer, Effect of monensin on rumen metabolism in vitro. Appl. Environ. Microbiol., 34:251-257. 1977.
- 133)Van Nevel, C.J. and D.I.Demeyer, Manipulation of rumen fermentation. in The Rumen Microbial Ecosystem. (Hobson, P.N. ed.) 387-443. Elsevier Applied Science. London and New York. 1988.
- 134)Van Soest, P.J., Use of detergents in the analysis of fibrous feeds: 2. A rapid method for the determination of fiber and lignin. J. Assoc. Official Anal. Chem., 46:829-835. 1963.
- 135)Van Soest, P.J. and R.H.Wine, Use of detergents in the analysis of fibrous feeds: 4. The determination of plant cell-wall constituents. J. Assoc. Official Anal. Chem., 50:50-55. 1967.
- 136)Vogels, G.D., W.F.Hoppe and C.K.Stumm, Association of methanogenic bacteria with rumen ciliates. Appl. Environ. Microbiol., 40:608-612. 1980.
- 137)Wakita, M. and S.Hoshino, Effect of salinomycin on volatile fatty acid metabolism in pigs and steers. Proc. 5th World Conf. Anim. Prod., 2:431-432. 1983.
- 138)Wakita, M., T.Masuda and S.Hoshino, Effects of salinomycin on the gas production by sheep rumen contents in vitro. Z. Tierphysiol., Tierernährg. u. Futtermittelkde., 56:243-251. 1986.
- 139)脇田正彰・小林泰男・星野貞夫, 反芻家畜の第一胃内微生物に対するサリノマイシンの影響. 日畜東海支部報, 第36号. 30-32. 1988.
- 140)Wakita, M., R.Sakauchi and S.Hoshino, Salinomycin alters cellular fatty acid composition of mixed rumen bacteria and genus Entodinium ciliates. J. Gen. Appl. Microbiol., 35:327-331. 1989.
- 141)脇田正彰, 星野貞夫, メン羊第一胃内におけるEntodinium属繊毛虫とデンプ

- ン利用菌との数量的関係. 日畜会報, 60:627-631. 1989.
- 142) 脇田正彰・小林泰男・星野貞夫・鈴木波太夫・山田陽稔, サイレージ多給肉牛の飼料利用性と第一胃液性状に対するサリノマイシンの給与効果. 日畜会報, 60:1060-1061. 1989.
- 143) Weatherburn, M.W., Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia. Anal. Chem., 39:971-974. 1967.
- 144) Webb, Jr.K.E., J.P.Fontenot and D.M.Lucas, Metabolism studies in steers fed different levels of salinomycin. J. Anim. Sci., 51 (Abstr.):407. 1980.
- 145) Wedegaertner, T.C. and D.E.Johnson, Monensin effects on digestibility, methanogenesis and heat increment of a cracked corn-silage diet fed to steers. J. Anim. Sci., 57:168-177. 1983.
- 146) Whetstone, H.D., C.L.Davis and M.P.Bryant, Effect of monensin on breakdown of protein by ruminal microorganisms in vitro. J. Anim. Sci., 53:803-809. 1981.
- 147) Williams, A.G. and G.S.Coleman, The rumen protozoa. in The Rumen Microbial Ecosystem. (Hobson, P.N. ed.) 77-128. Elsevier Appl. Sci. London and New York. 1988.
- 148) Work, E. and D.L.Dewey, The distribution of α, ϵ -diaminopimelic acid among various micro-organisms. J. Gen. Microbiol., 9:394-409. 1953.
- 149) 米村寿男, ジアセチルモノキシム法の佐々木変法. 牛の臨床検査法. (須藤恒二・米村寿男・中村良一編) 第8章 22-24. 農山漁村文化協会. 東京. 1973.
- 150) 吉田実, 反転試験法. 畜産を中心とする実験計画法. 116-124. 養賢堂. 東京. 1975.
- 151) Zinn, R.A. and F.N.Owens, A rapid procedure for purine measurement and its use for estimating net ruminal protein synthesis. Can. J. Anim. Sci., 66:157-166. 1986.