

氏 名 (本籍)	さわ 澤	あきら 明		
学位の種類	農	学	博	士
学位記番号	農博第	174	号	
学位授与年月日	昭和51年	3月25日		
学位授与の要件	学位規則第5条第1項該当			
研究科専攻	東北大学大学院農学研究科 (博士課程) 畜産学専攻			
学位論文題目	反芻動物の第一胃内発酵に対するマクロミネラルの役割			

論文審査委員 (主査)

教授 松本達郎

教授 津田恒之

教授 勝野正則

論文内容要旨

序論 (第一章)

一般に Na, K, Mg, Ca, P および Cl は体内分布量の大きなことからマクロミネラル (Macro-nutrient mineral) と称されている。これら 6 元素の第一胃内発酵に対する役割の解明は、それぞれ第一胃微生物の要求量を手がかりにして検索がなされているが、しかしながら各元素とも研究者間で最適濃度および毒性発現濃度が異なることはもちろん、第一胃微生物にとって必須であるか否かについても見解が異っている。

これはミネラルの持つ二面性、すなわち specific な作用と nonspecific な作用を混同視していることが主たる原因と考えられる。そこで本研究はマクロミネラルの第一胃内発酵に対する役割を明らかにするために次の様な点について検討した。

①第一胃内液中の各ミネラル濃度の変動の様子、およびミネラル濃度の変動に伴う第一胃内消化の変化を観察し、②in vitro により各元素の第一胃内発酵に対する役割を specific な作用および nonspecific な作用の二面について検討し、③ミネラルの nonspecific な浸透圧作用についてセルロースの利用性を指標にしてめん羊の第一胃内発酵に対する役割を示した。

第一胃内液中のミネラル濃度 (第二・三章)

反芻動物が慣用飼料として利用している飼料 6 種類を選び、それらのミネラル組成がそれぞれ異なること (表 1) から各ミネラルの摂取量は飼養条件によって著しく異なること (表 2) を示した。

これらの飼料をめん羊に給与した場合、ミネラルバランスが正常な出納を示すことを確認して後、給与飼料およびミネラル摂取量の変化と採食後の第一胃内液中のミネラル濃度の変化との関係を検討した。その結果 (図 1) 第一胃内液中の各ミネラルについて次のように要約された。

i) 高濃度元素として Na, K および P、また比較的低濃度元素として Mg, Ca および Cl に分類された。

ii) Mg と Ca の濃度は主に摂取量の影響を直接受け、Na は唾液を通して影響され、K と Cl は両者の影響を受けて変動していたが、一方 P の濃度は飼料により著しく異なり、しかも経時的変動がわずかで、飼料および唾液の影響の解析は明らかに出来なかった。

iii) Na と K 濃度の間には相互に counter ion 的な関係が顕著であったが、その他の元素については特に相互関係が認められなかった。

iv) ミネラルによって与えられる第一胃内浸透圧は飼料の種類によって異なり、かつ採食後には変動していることが認められた。

ここで用いた飼料は Na および Ca 含量がそれぞれ K および P に比べて低かったため、飼料に NaHCO_3 および CaCO_3 を添加して、Na 対 K および Ca 対 P の比率を 1 対 1 に調整して第一胃内

での飼料の消化に与える影響について検討した結果、第一胃内液のVFA濃度には影響を及ぼさなかったが、アンモニア濃度が有意に変化し(表3)、このことから第一胃内液中のミネラル組成が第一胃内発酵になんらかの作用を及ぼしていることが示唆された。

第一胃内発酵に対するマクロミネラルの役割

＝in vitroによる解析＝ (第四・五・六章)

第一胃微生物のin vitroによる培養条件を確立した後、マクロミネラル6元素の第一胃内発酵に対する役割をVFA生成能を指標にして検討を行った。

はじめに、NaおよびKについて第一胃内で観察された濃度を中心に、それぞれの炭酸塩で調整して培養した。その結果(表4)、VFAの生成量はNa濃度が100～200mg/100ml、K濃度が45～200mg/100mlのとき最大となり、これらの濃度の前後で減少した。しかしNaおよびKをそれぞれの炭酸塩で調整すると培地の緩衝能が強まる反面、NaとKの添加量によってpHが異なり、NaおよびKのspecificな作用とnonspecificな作用、あるいは第一胃内で見られるNaとKの相互作用の意義などについて考察するには十分でないことがわかった。

次に、第一胃内液中のNaとKの相互作用に基づいて、pHおよび浸透圧の影響が等しくなるように培地の条件を設定し、検討した結果から、一定の浸透圧が与えられているとき第一胃微生物がspecificに必須とするNaおよびK濃度はそれぞれ75および25mg/100mlであることが示唆された(図2)。一方、第一胃内液中でのNaとKのcounter ion的相互関係は第一胃内浸透圧の恒常性を維持するうえで意義の深い役割を演じていることが考察された。同時に第一胃微生物のspecificな要求量以上のNaおよびKはnonspecificな浸透圧作用に関与し、その高低が第一胃内発酵を左右していることが推察された。

そこで、第一胃微生物に対するNaとKのnonspecificな浸透圧作用について検討したところ、VFA生成量と培地浸透圧(180～900mOsm/lの範囲)との間には基質がセルロースおよびコーンスターチの場合、相関係数がそれぞれ-0.94および-0.96と極めて高い負の相関がみられ、共に培地浸透圧が250～300mOsm/l附近をピークに、高張化するに伴い漸減していた。なお高Na、K濃度による浸透圧が極端に高い場合(900mOsm/l)には乳酸発酵が進むことも確認された。

以上の結果に基づいて、NaおよびKの第一胃内発酵に対する主な役割がnonspecificな浸透圧作用であり、NaとKが相互に代償し得ることが考察された。

従って同一量のNa、およびK量を添加する場合、用いる塩の種類により解離して生じる浸透圧は異なり、第一胃内発酵に及ぼす影響が異なるはずである。そこで培地のNa、K濃度

を NaCl と KCl、および Na₂SO₄ と K₂SO₄ で調製して培養したところ(図3)、兩培地で VFA 生成量は培地の Na、K 濃度とではなく、それぞれの塩が解離して生じる浸透圧を基準とした場合に一致することが認められた。この結果からもすでに示した Na と K の第一胃内発酵に対する nonspecific な浸透圧作用の正しいことが支持された。

つづいて第一胃内発酵に対する Mg、Ca、P および Cl の役割について検討を行った。

はじめに各元素とも第一胃内液中での変動範囲内の濃度についてそれぞれ検討した。その結果、(図4)、各元素とも第一胃内液中の濃度が第一胃内発酵を促進し、あるいは抑制していないことが認められた。しかしながら各元素ともそれぞれの浸透圧が第一胃内発酵に影響していることが推察された。

各元素を含む塩を等浸透圧なポリエチレングリコール(平均分子量200、以下PEGと略す)で代替したところ、4元素とも代替が可能であることが認められた(図5)。さらに4元素を同時に等浸透圧なPEGで代替しても有意の差を生じなかった(図6)ことなどからこれら4元素の第一胃微生物に対する nonspecific な浸透圧作用が考察された。VFA の生成量と各元素によって生じる培地浸透圧との間には極めて高い負の相関が認められた。なお第一胃微生物に specific に必要な Mg、Ca、P および Cl の各濃度はそれぞれ 0.6、0.6、15 および 2.5 mg/100 ml であり、いずれも通常の飼養の第一胃内各濃度の 1/6 ~ 1/10 という低い値であった。

以上の結果に基づいて、飼料中の Mg、Ca、P および Cl の第一胃内発酵に対する主な役割は nonspecific な浸透圧作用であり、第一胃微生物が specific に必要とする量は極くわずかであることが明らかになった。

第一胃内発酵に対するマクロミネラルの nonspecific な作用

めん羊を用いての解析 (第七章)

これまでに *in vitro* で確認したマクロミネラル6元素の第一胃内発酵に対する nonspecific な浸透圧作用の効果をめん羊を供試して検討した。浸透圧以外の第一胃内性状を一定に保つために基礎飼料を3時間々隔でめん羊に給与し(C区)、浸透圧を減少させる場合には 39°C、CO₂ 飽和水を(W区)、上昇させる場合には PEG を(P区)それぞれ3時間毎に第一胃フィステルから注入した。C区、W区およびP区についてナイロンバッグ内封入試料(10種)を第一胃内にそれぞれ所定の時間放置した後、セルロースの消失量を求めた。さらに濃厚飼料の試料については各区の第一胃内容物を inoculum source として *in vitro* による培養を行い、VFA の生成量を検討した。その結果、第一胃内浸透圧はC区、W区およびP区が各々 400、270 および 800 mOsm/l であった。第一胃内では(表5)W区のオーチャード乾草、稲ワラ、テンブン粕のセルロース

消化率がC区に対して高くなっており、P区のオーチャード乾草、稲ワラ、ヘイキューブ、ホワイトクローバー乾草のセルロースの消化率がC区に対して低下していた。これらはいずれもセルロース含量の高い試料であるが、穀類のようなセルロース含量の比較的低い試料では、第一胃内でのセルロース消化率がC区、W区、P区にほとんど差がみられなかった。しかし穀類試料についても *in vitro* の検討から(表6)各試料ともVFAの生成量はC区に対してW区の方が高く、逆にP区では低くなっていた。従って、第一胃微生物の活性は低浸透圧の場合に高まり、高浸透圧の場合に低下しているものと考えられる。

以上の知見に基づいて、各元素の *specific* に必要な最低濃度をみだし、ミネラルによる浸透圧の変化をPEGの添加にて調節した培地の浸透圧を通常飼養の第一胃浸透圧の変動範囲(220~450mOsm/l)を中心にして変化させ、第一胃微生物の活性に対する影響を *in vitro* で検討した。その結果(表7)、基質がセルロースの場合も、コーンスターチの場合も289mOsm/l (standard)の培地に比較して、VFAの生成量は低張化するに伴い有意に増加し、高張化するに伴って有意に減少することが確認された。

第一胃内液のミネラル組成は、飼料の種類および摂取量、唾液性状、採食後の経過時間、その他の影響を受けて変動し、第一胃内発酵に影響を及ぼしているが、その影響の主要な原因は個々のマクロミネラルの *specific* な作用によるものではなく、*nonspecific* な浸透圧作用に基づくところが大きいことを解明した。また、第一胃微生物の活性は浸透圧の低い場合に増加し、浸透圧が高い場合に減少することから、繊維含量の高い飼料の給与に際しては第一胃浸透圧を高めないように保つことの重要性が指摘された。

以上の結果から、食塩やカルシウム等は摂取飼料の分解、発酵が旺盛に行なわれている時期を避けて給与したり、食塩水として給与することなどによって第一胃内浸透圧の上昇を少なくすることは、飼料の利用性を高めるのに役立つ可能性が示唆された。第一胃内液での濃度が比較的高く、しかも他元素と *counter ion* 的相互関係を持たないPについては、その濃度を著しく高めるような飼料、たとえば米糠やフスマの多給は第一胃内液の浸透圧を高める危険性が大きいので、第一胃内発酵の観点から特に注意すべきであると考えられる。

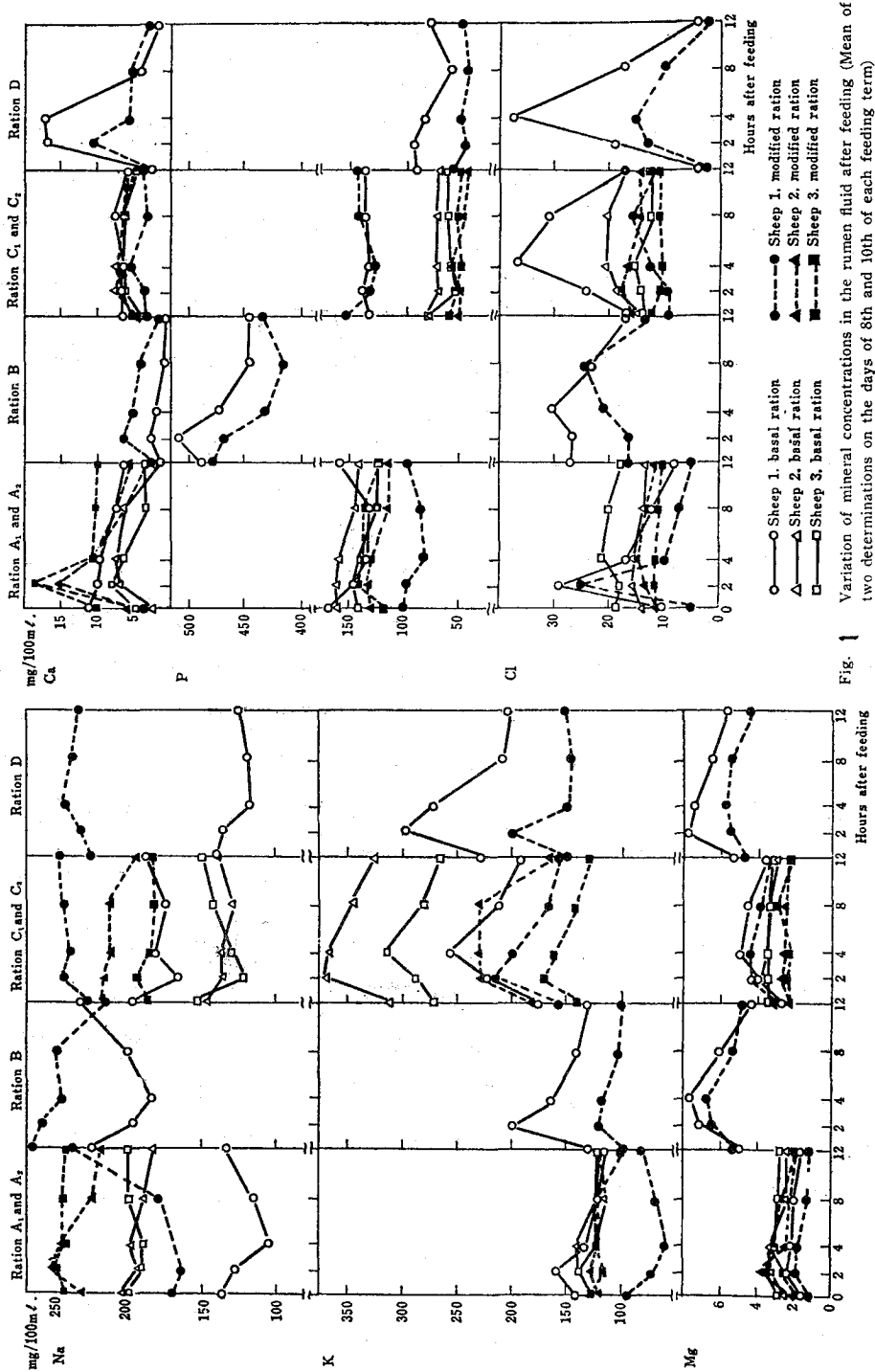


Fig. 1 Variation of mineral concentrations in the rumen fluid after feeding (Mean of two determinations on the days of 8th and 10th of each feeding term)

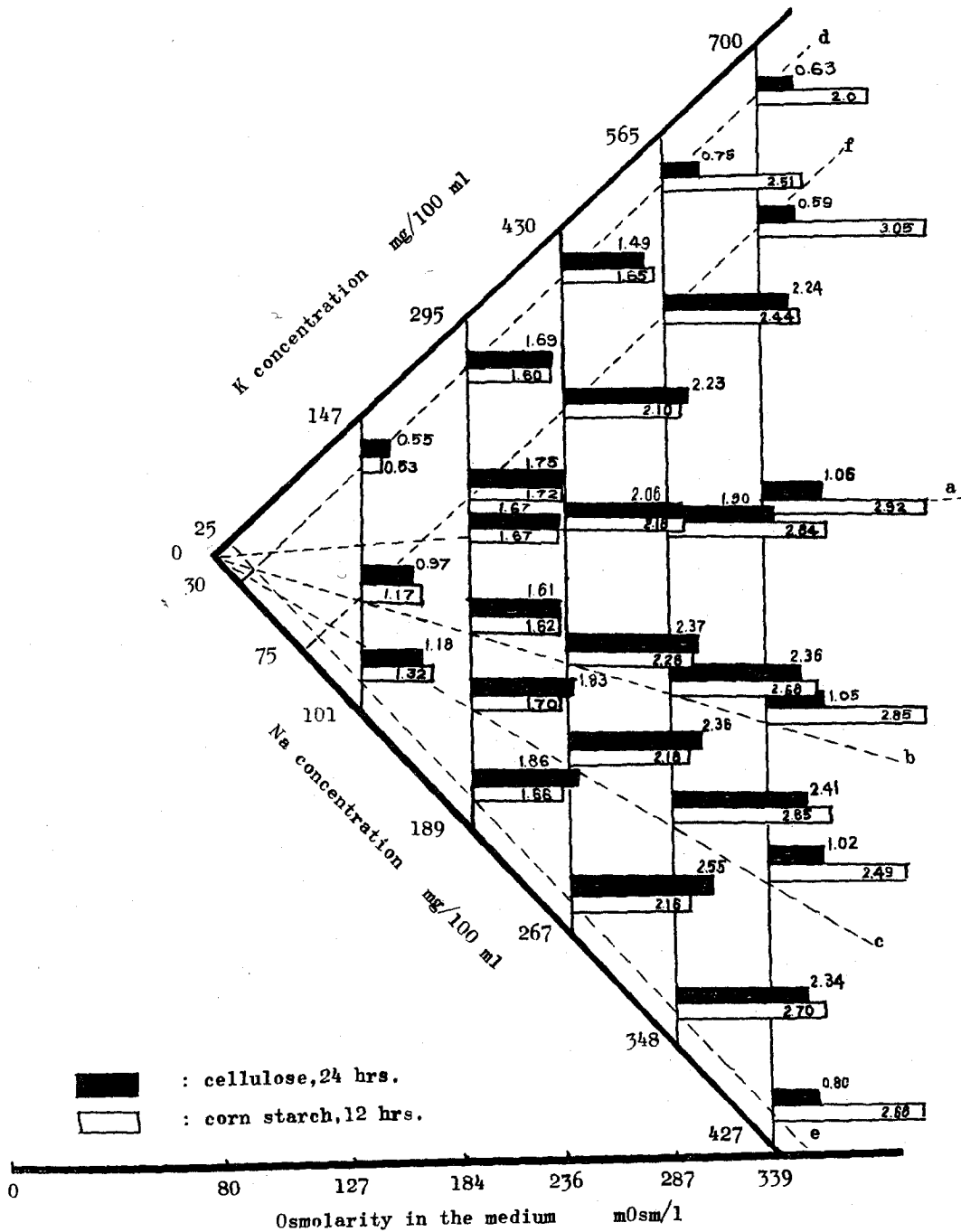


Fig.2 Effect of Na/K ratio (a:0.8, b:1.6, c:3.0) and concentration of Na, K upon production of VFA (mmol/20 ml).

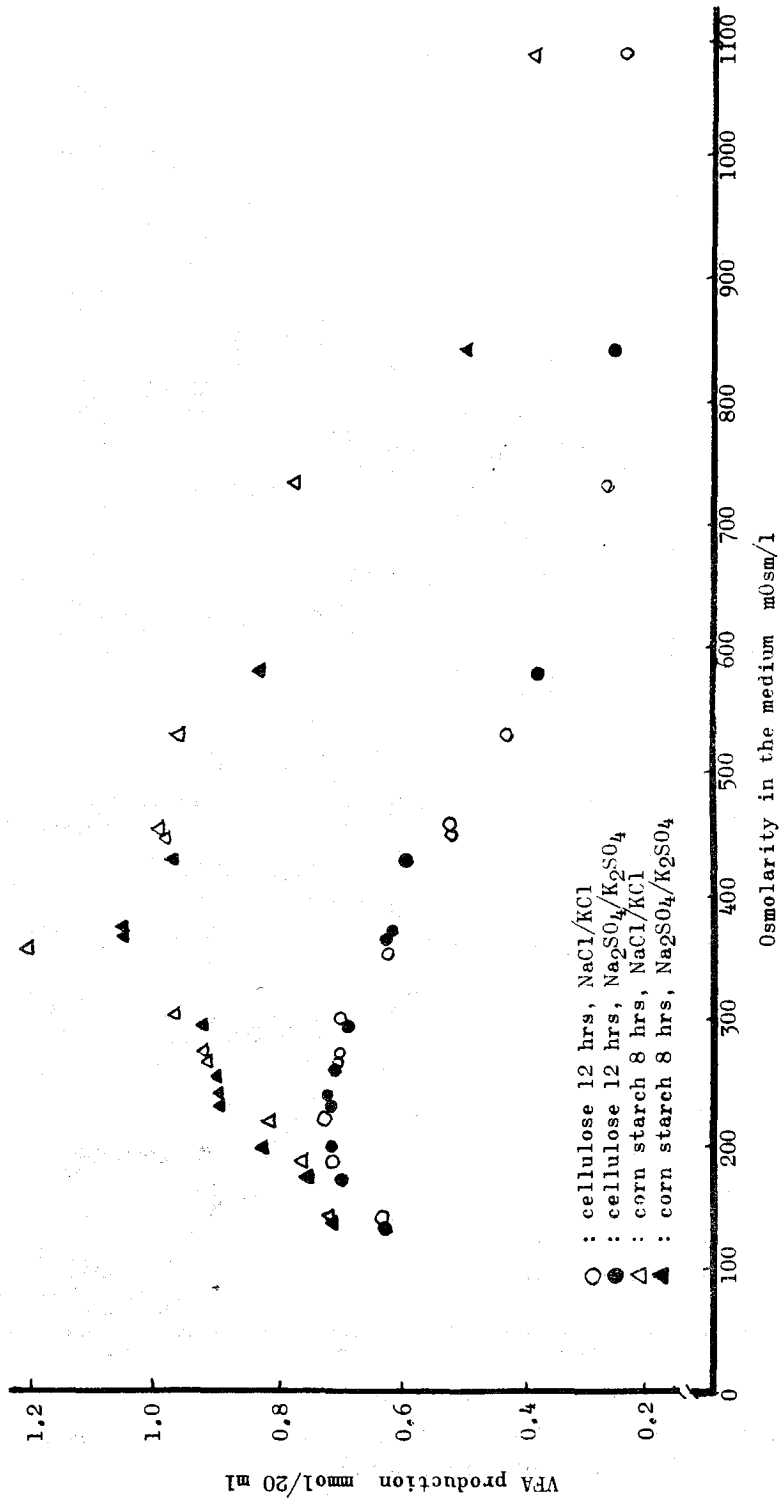
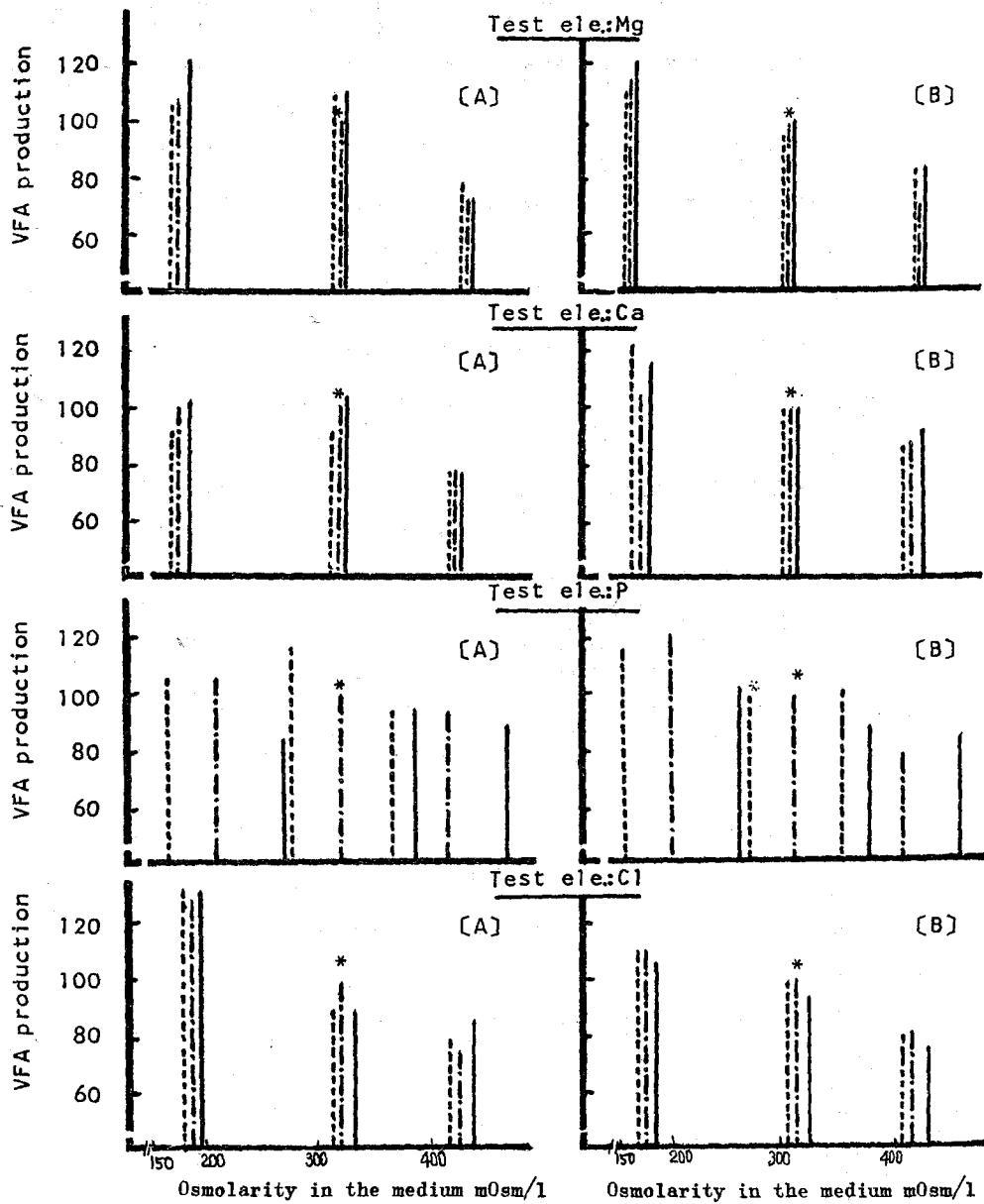
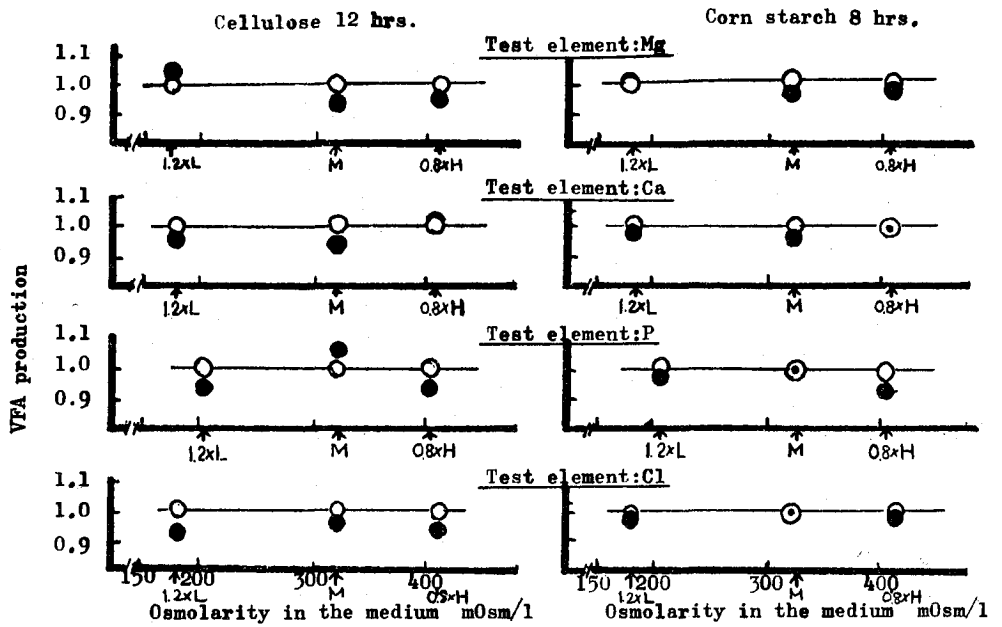


Fig. 3 Effect of osmolarity based on NaCl/KCl or Na₂SO₄/K₂SO₄ in the medium upon VFA production.



Concentration of test element; — : 120 percent of the highest, - - - : average, and ····· : 80 percent of the lowest concentration in the rumen fluid.

Fig. 4 Effect of each test element upon VFA production on the substrate (A): cellulose 12 hours and (B) : corn starch 8 hours. VFA production expressed as percent of production in the standard medium(*).



Concentration of test element: M¹⁾ and the other five elements: 1.2xL²⁾, M²⁾ and 0.8xH³⁾ group.

- 1): Average concentration in the rumen fluid
- 2): The lowest concentration in the rumen fluid
- 3): The highest concentration in the rumen fluid

Fig.5 Effect of non-specific osmotic role of Mg, Ca, P, and Cl upon VFA production expressed as compared "PEG substituted" (●) with "control"(○).

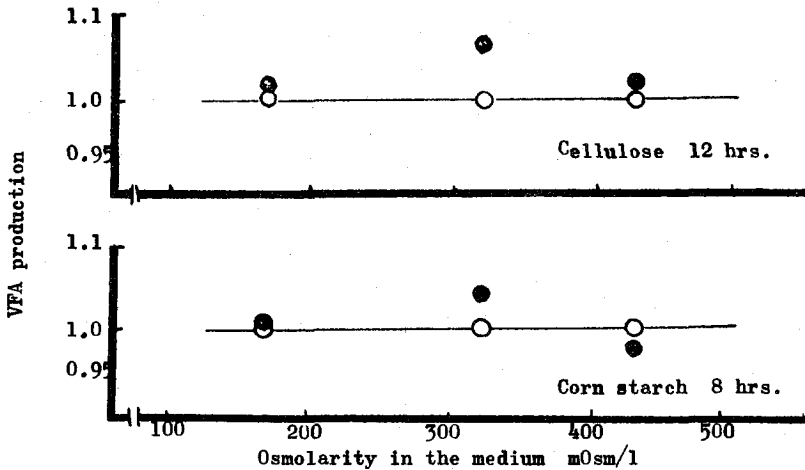


Fig.6 Effect of non-specific osmotic role of Mg, Ca, P, and Cl upon VFA production expressed as compared "PEG substituted"(●) with control(○).

Table 1 Mineral composition of the rations

	Na	K	Mg	Ca	P	Cl	Ratio		Crude ash %
	%	%	%	%	%	%	Na/K	Ca/P	
Corn (1)	0.02	0.45	0.02	0.01	0.30	0.10	0.04	0.03	1.30
Corn (2)	0.03	9.48	0.02	0.01	0.38	0.13	0.06	0.03	1.18
Barley (1)	0.02	0.50	0.02	0.03	0.42	0.22	0.04	0.07	1.62
Barley (2)	0.02	0.53	0.02	0.04	0.47	0.25	0.04	0.09	1.59
Rice bran	0.04	1.50	0.14	0.03	1.02	0.14	0.03	0.03	9.01
Wheat bran	0.04	1.40	0.10	0.05	0.80	0.08	0.03	0.06	5.28
Orchard grass hay (1)	0.02	2.64	0.29	0.25	0.23	1.63	0.01	1.09	9.85
Orchard grass hay (2)	0.03	1.51	0.28	0.21	0.31	1.77	0.02	0.68	8.70
Alfalfa meal	0.12	4.82	2.53	0.77	1.06	1.10	0.02	0.73	15.20

Table 2 Mineral intake from the experimental rations and the supplements (g/day/sheep)

Ration	Components of the ration (g/day)	Intake from the ration						Intake from the suppl. ¹	
		Na	K	Mg	Ca	P	Cl	Na	Ca
A ₁	Corn (1): 300 Barley (1): 300	0.3	2.9	0.1	0.1	2.7	0.8	2.6	2.6
B	Rice bran: 250 Wheat bran: 250	0.2	7.2	0.6	0.2	4.5	0.5	7.0	4.3
C ₁	Orchard grass hay (1): 700	0.1	17.0	1.8	1.6	1.5	10.3	16.9	0
D	Alfalfa meal: 700	0.8	38.8	16.1	4.8	6.7	7.0	38.1	1.9
A ₂	Corn (2): 300 Barley (2): 300	0.2	2.1	0.1	0.1	2.0	0.8	1.9	1.9
C ₂	Orchard grass hay: 700	0.2	10.8	1.8	1.4	2.1	12.2	10.6	0.7

*: modified ration, supplemented with NaHCO₃ and CaCO₃ to adjust ratios of Na:K and Ca:P to 1:1, respectively.

Table 3 Concentrations¹⁾ of VFA and ammonia in the rumen fluid after feeding on the ration A₂ and C₂.

Sheep No.	Ration	0 hr.	2 hr.	4 hr.	8 hr.	12 hr.
VFA concentration mmol/100 ml						
2	A ₂ : basal	6.7	8.6	8.2	7.5	6.9
	A ₂ : modified ²⁾	6.6	8.6	8.3	7.5	6.8
	C ₂ : basal	5.7	7.6	7.2	6.5	5.9
	C ₂ : modified ²⁾	5.5	7.7	7.2	6.5	5.9
3	A ₂ : basal	6.1	8.7	8.5	7.6	6.0
	A ₂ : modified ²⁾	6.2	8.6	8.1	7.5	6.2
	C ₂ : basal	5.2	7.2	7.0	6.2	5.5
	C ₂ : modified ²⁾	5.0	7.2	6.9	5.7	5.3
ammonia concentration mg/100 ml						
2	A ₂ : basal	9.1	15.5	13.7	11.1	6.7
	A ₂ : modified ²⁾	9.1	15.3	11.9	11.4	10.1
	C ₂ : basal	15.8	35.2	23.6	12.6	11.3
	C ₂ : modified ²⁾	20.1	41.1	25.1	20.9	20.1
3	A ₂ : basal	10.3	18.3	14.5	11.9	9.2
	A ₂ : modified ²⁾	11.1	22.9	14.7	11.1	10.7
	C ₂ : basal	14.7	33.8	23.5	17.7	15.2
	C ₂ : modified ²⁾	13.2	39.8	28.5	19.5	15.1

1): Mean of two determinations on the days of 8th and 10th of each feeding term

2): Supplemented with NaHCO₃ and CaCO₃ to adjust ratios of Na:K and Ca:P to 1:1, respectively.

Table 4. Effect of concentration of Na ($\text{Na}_2\text{CO}_3\text{-Na}$) and K ($\text{K}_2\text{CO}_3\text{-K}$) in the medium upon VFA production.

	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII
Osmolarity in the medium(mOsm/l)	135	171	194	230	236	257	296	366	372	426	580	675	840
	VFA production. mmol/20ml. substrate:rice straw												
Incubation time													
12 hr.	0.61	0.73	0.75	0.88	0.83	0.80	0.59	0.49	0.43	0.34	0.17	0.13	0.07
20 hr.	1.08	1.10	1.22	1.20	1.27	1.48	0.82	0.50	0.50	0.36	0.34	0.20	0.21
24 hr.	1.33	1.41	1.46	1.52	1.60	1.58	1.00	0.52	0.55	0.45	0.37	0.37	0.23
	VFA production. mmol/20ml. substrate:corn starch												
8 hr.	0.68	0.74	0.98	1.27	1.24	1.38	0.76	0.14	0.19	0.14	0.14	0.06	0.05
12 hr.	0.87	0.99	1.58	2.80	2.60	1.99	1.41	0.45	0.46	0.44	0.37	0.18	0.06

Table 5. Cellulose digestibility of each sample suspended during each fixed hour in the rumen.

	Cellulose contents (%)	C 400 mOsm/l (%)	W 270 mOsm/l (%)	P 800 mOsm/l (%)
Orchard grass hay	30.5	28.0	31.6	23.8
Kentucky bluegrass hay	29.8	38.2	37.2	39.3
Rice straw	28.8	32.4	33.1	26.6
Hay cube	27.2	18.5	18.5	17.5
Starch pulp	24.4	21.5	22.3	22.1
White clover hay	20.7	22.2	21.4	18.7
Rice bran	11.8	10.2	10.1	9.9
Wheat bran	8.6	9.8	9.9	10.6
Barley	4.6	5.2	5.2	5.1
Corn	1.6	3.2	3.3	3.2

Table 6. Effect of inoculum source upon VFA production in vitro.

	Cellulose contents (%)	C 400 mOsm/l	W 270 mOsm/l	P 800 mOsm/l
	(%)	mmol/20ml		
Rice bran	11.8	0.86	1.14	0.38
Wheat bran	8.6	0.99	1.30	0.36
Barley	4.6	1.31	1.70	0.49
Corn	1.6	1.30	1.67	0.45

Table 7. Effect of osmolarity in the medium upon VFA production.

Osmolarity (mOsm/l)	Substrate	
	Cellulose mmol/20ml	Corn starch mmol/20ml
87	0.99 (105)*	1.41 (112)***
137	1.02 (109)*	1.42 (113)***
249	0.92 (98) n.s.	1.26 (100) n.s.
289:standard	0.94 (100)	1.26 (100)
342	0.88 (94)*	1.13 (90)**
435	0.85 (90)**	1.07 (85)***
535	0.83 (88)**	1.03 (82)***
640	0.83 (88)**	1.01 (80)***

Ratios of VFA production to each standard are shown in parenthesis.

*P<.1 **P<.05 ***P<.01 differs from standard.

審査結果の要旨

反芻動物では、摂取した飼料は一旦第一胃内に貯えられ、第一胃微生物による活発な発酵を受けた後、動物体に利用される。特に、粗飼料中に多量に含まれている繊維素は第一胃発酵によってはじめに動物体に利用可能なかたちにかえられており、反芻動物の栄養上、第一胃微生物の果たしている役割は極めて大きい。本論文は、飼料中のミネラルの大部分を占めている Na, K, Mg, Ca, P および Cl の 6 元素について、第一胃内発酵に対するその役割を追求したものである。

反芻動物の慣用飼料として給与している 6 種類の飼料を選んでめん羊に給与し、第一胃内液中の各ミネラル濃度の変化を比較検討した。Mg と Ca は摂取した飼料の種類によって大きく変化した。Na は飼料による変動は小さく、主として唾液を通して影響されており K と Cl は摂取量と唾液の両方の影響を受けて変動した。P は飼料摂取後の経時的変動が小さく、各飼料毎に異なる濃度がほぼ一定に保たれるという特異な様相を示した。Na と K の濃度は経時的にそれぞれ大きく変動したが、この両者の合計は常にはほぼ一定に保たれていた。その他のミネラルについては、このような相互関係は認められなかった。また、これらのミネラルによって与えられる第一胃内液の浸透圧は、飼料の種類によって大きく異なっていた。

第一胃微生物を *in vitro* で培養し、マクロミネラル 6 元素の第一胃内発酵に対する役割を、揮発性脂肪酸 (VFA) を指標にして検討した。Na および K については、それぞれ塩酸塩と硫酸塩とを比較することにより、また、Mg, Ca, P および Cl については、それぞれ等浸透圧を示すポリエチレングリコールをもって代替することによって、培地の浸透圧と VFA の生成量およびその組成との関係を種々異なるミネラル濃度で検討した。第一胃微生物が栄養素として特異的に必要とする各ミネラルの濃度は極めて僅かであることが明らかにされ、必要量さえ満たされていれば、培地の浸透圧は低い程 VFA の生成量が多くなることが確かめられた。

実際に、第一胃内液の浸透圧を、中、低、高の 3 段階でそれぞれほぼ一定に保たれているように飼養しためん羊の第一胃内に、ナイロンバックに封入した各種の飼料を所定の時間放置して、粗繊維の消失量を比較した結果、粗繊維含量の多い飼料は、浸透圧が高い場合には消失量が減少し、低い場合には増加することが確かめられ、第一胃内液の浸透圧の上昇を少なくするように工夫することが、飼料の利用性の向上につながることを示唆された。

以上、本論文はマクロミネラル 6 元素の第一胃内発酵に対する影響を詳細に検討していくつかの新知見を加え、家畜飼養学の進展に寄与するところが大きい。よって審査員一同は著者が農学博士の学位を授与される資格を有するものと判定した。