

新得畜試研究報告
Bull. Shintoku Anim.
Husb. Exp. Stn

ISSN 0388-0044

北海道立新得畜産試験場研究報告

第 21 号

Bulletin
Hokkaido Prefectural Shintoku
Animal Husbandry Experiment Station

No. 21

平成 6 年 11 月
1994

北海道立新得畜産試験場

北海道上川郡新得町

Hokkaido Prefectural Shintoku
Animal Husbandry Experiment Station

Shintoku, Hokkaido, Japan

北海道立新得畜産試験場研究報告

第 21 号

目 次

ウシ体外受精においてピルビン酸、グルコースおよび乳酸が精子の侵入および受精に及ぼす影響 南橋 昭・森安 悟・陰山 聡一・山本 裕介・伊東 季春	1
双胎妊娠牛の妊娠末期の代謝エネルギー要求量 佐藤 幸信・斉藤 利朗・杉本 昌仁・本郷 泰久・川崎 勉	9
北海道和種子馬の生育初期における吸乳・採食行動ならびに姿勢 杉本 昌仁・本郷 泰久・川崎 勉	15
短報 アバディーンアンガスならびにヘレフォードにおける 子牛の血清総蛋白質濃度と母牛の乳量ならびに子牛の増体量との関連性 藤川 朗・田村 千秋	21
短報 トウモロコシサイレージ主体飼養が乳用後継牛の乾物摂取量に及ぼす影響 糟谷 広高・黒沢 弘道・原 悟志・大坂 郁夫・小倉 紀美・遠谷 良樹	25
場外学術雑誌掲載論文抄録	29

Bulletin
of the
Hokkaido Prefectural Shintoku
Animal Husbandry Experiment Station

No. 21

Contents

Originals

Effects of Pyruvate, Glucose and Lactate on in vitro Fertilization of Bovine Oocytes Matured in vitro
Akira MINAMHASHI, Satoru MORIYASU, Souichi KAGEYAMA, Yusuke YAMAMOTO and Sueharu ITO 1

Metabolizable energy requirement during the last period of gestation in pregnant beef cows with twin
Yukinobu SATO, Tosiro SAITO, Masahito SUGIMOTO, Yasuhisa HONGO and Tutomu KAWASAKI 9

Observations on the suckling, eating behaviour and the posture of foals in Hokkaido native pony
Masahito SUGIMOTO, Yasuhisa HONGO, and Tutom KAWASAKI 15

Short Report

Relationships of serum total protein concentration in calves to milk yield of cows and daily gain of calves in Aberdeen Angus and Hereford
Akira FUJIKAWA and Chiaki TAMURA 21

Effect of Corn Silage-Based Ration on Feed Intake of Dairy Heifer
HirotaKa KASUYA, Hiromichi KUROSAWA, Satoshi HARA, Ikuo OSAKA, Noriyoshi OGURA and Yoshiki TOOYA 25

Others

Summaries of the papers by the staff appearing on other scientific journals 29

ウシ体外受精においてピルビン酸, グルコースおよび
乳酸が精子の侵入および受精に及ぼす影響

南橋 昭・森安 悟・陰山 聡一・山本 裕介・伊東 季春

ウシ体外受精において受精培地に添加したピルビン酸, グルコースおよび乳酸が精子の侵入, 精子頭部の膨化および雄性前核の形成に及ぼす影響を検討した。受精培地にはBRACKETT and OLIPHANT¹⁾の培養液(BO液)からピルビン酸およびグルコースを除き, ヘパリンを加え, ウシ血清アルブミン(BSA)の濃度を変更したもの(mBO液)を用いた。mBO液のみを対照区(mBO区)とし, mBO液にピルビン酸を添加した区(mBO+P区), グルコースを添加した区(mBO+G区), 乳酸を添加した区(mBO+L区), ピルビン酸とグルコースを添加した区(mBO+PG区), ピルビン酸と乳酸を添加した区(mBO+PL区), グルコースと乳酸を添加した区(mBO+GL区)およびピルビン酸とグルコースと乳酸を添加した区(mBO+PGL区)の合計8処理の受精培地を作成して体外受精を行った。

精子の侵入, 精子頭部の膨化および雄性前核の形成はいずれの区においても授精後3時間目, 5時間目および7時間目に見られた。授精後18時間目の精子侵入率, 精子頭部膨化率および雄性前核形成率はmBO区のそれぞれ47.5%, 47.5%および45.9%に比べ, mBO+G区, mBO+L区, mBO+PG区, mBO+GL区およびmBO+PGL区でそれぞれ84.6-90.9%, 84.6-90.9%および82.3-87.3%と有意(P<0.05)に高く, 有意差の見られなかったmBO+P区およびmBO+PL区においてもそれぞれ71.9%と73.0%, 71.9%と73.0%および65.6%と73.0%とmBO区よりも高かった。また, mBO区を除いて, 単独区と併用区の間には有意差は見られなかった。

以上から, ヘパリンを含むmBO液を受精培地として用いたときには, 受精培地へのピルビン酸, グルコースおよび乳酸の添加の有無にかかわらずウシ精子の受精能獲得誘起および先体反応は授精後3時間以内に起こることが示された。また, 受精培地に添加されたピルビン酸, グルコースおよび乳酸はそれぞれ単独でウシ精子の受精能獲得誘起または先体反応を促進させるが, それらを併用しても協力作用のないことが示された。

体外受精において受精培地に添加されたピルビン酸, グルコースなどのエネルギー源が精子の受精能獲得誘起, 先体反応または受精に重要な影響を及ぼすことが, ヒト²⁾, ラット^{3, 4)}, モルモット⁵⁾, ハムスター^{6, 7)}, マウス^{8, 9, 10)} およびウシ¹¹⁾などで報告されている。しかし, 精子のエネルギー源に対する反応は動物種により異なり, また, 同一動物種においても報告者により異なる。

ウシでは受精培地にTALP液を用いたとき, ピルビン酸と乳酸の存在下でグルコースが精子の受精能獲得誘起を遅延させる¹¹⁾ことが報告されている。しかし, ウシ体外受精の受精培地として広く使用されているBRACKETT and OLIPHANT¹⁾の培養液(BO液)にはピルビン酸とグルコースが添加されており, グルコースにより精子の受精能獲得誘起の遅延, さらに発生の遅延を起こしている可能性がある。また, ウシにおいてピルビン酸, グルコースおよび乳酸のそれぞれを単独で受精培地に添加して精子の受精能獲得誘起および

受精に及ぼす影響を検討した報告はない。さらに, ウシ精子の受精能獲得誘起に要する時間については, 受精培地としてヘパリンを含むTALP液¹³⁾, カフェインとヘパリンを含むBO液^{14, 15)}を用いて検討されているが, ヘパリンのみを含むBO液を用いて検討した報告はない。そこで著者らはウシの体外受精においてピルビン酸とグルコースを除き, ヘパリンを加えたBO液を基礎培地として用い, ピルビン酸, グルコースおよび乳酸の受精培地への添加が, 精子の侵入, 精子頭部の膨化および雄性前核の形成に及ぼす影響を精子侵入の経時的变化を観察することにより検討した。あわせて, 精子の受精能獲得誘起に要する時間についても検討した。

材料と方法

卵子の採取および体外成熟培養

卵巣は食肉処理場で採取し, 滅菌生理食塩水に浸して25°C前後に保温して3時間以内に実験室に持ち帰っ

た。卵子は直径2-5mmの小卵胞から卵胞液とともに吸引採取し、ウシ血清アルブミン (BSA) の代わりに3%ウシ血清 (New Born Calf Serum; 三菱化成) を添加したPB1¹²⁾で2回、10%ウシ血清を添加したTCM199 (TCM-199 with Earle's salts, sodium bicarbonate, L-glutamine and 25 mM hepes buffer; Gibco Laboratories) で1回洗浄した。実験には卵丘細胞が緊密に付着し、細胞質が均質な卵子のみを選別して供した。成熟培養は、10%ウシ血清を添加したTCM199の小滴0.1mlに卵子を10個入れ、ミネラルオイル (mineral oil; E.R.Squibb & Sons, Inc.) を重層して24-26時間行った。なお、本実験における培養はすべて、39°C, 5% CO₂, 95% 空気の条件で行った。

受精培地の作成

ピルビン酸およびグルコースを除き、ヘパリンを加え、BSAの濃度を変更したBO液 (mBO液) を基礎培地として用いた。用いた試薬は、ヘパリン (ヘパリンナトリウム注射液, 腸粘膜由来; Novo Industries A/S), BSA (Albumin, Bovine, Crystallized and lyophilized; Sigma Chemical Co.), ピルビン酸 (Pyruvic Acid Sodium Salt Crystalline; Sigma Chemical Co.), グルコース (Dextrose, Anhydrous; 和光純薬工業) および乳酸 (DL-Lactic Acid Sodium Salt Approx.60% Syrup Grade DL-V; Sigma Chemical Co.) である。mBO液にピルビン酸, グルコースおよび乳酸のそれぞれを添加あるいは無添加として以下の8処理の受精培地を作成した。なお, それぞれの受精培地はヘパリン, BSA, ピルビン酸, グルコースおよび乳酸の最終濃度がそれぞれ2 units/ml, 5 mg/ml, 0.5 mM, 13.9 mMおよび10.0 mMとなるように作成した。

- mBO 区: mBOのみ (対照区)。
- mBO+P 区: mBOにピルビン酸を添加。
- mBO+G 区: mBOにグルコースを添加。
- mBO+L 区: mBOに乳酸を添加。
- mBO+PG 区: mBOにピルビン酸とグルコースを添加。
- mBO+PL 区: mBOにピルビン酸と乳酸を添加。
- mBO+GL 区: mBOにグルコースと乳酸を添加。
- mBO+PGL区: mBOにピルビン酸とグルコースと乳酸を添加。

精子の処理

精子は1頭のアバディーンアングスの凍結精子を用いた。これを37°Cの温湯で融解して試験管に入れ、基礎培地を加えて586G (1800rpm) で5分間2回遠心分離して洗浄した。精子濃度を 2×10^7 sperm/mlに調整した後, この精子浮遊液を8つに区分し, それぞれに8処理の受精培地を等量加えて希釈した。従って, 精子の最終濃度は 1×10^7 sperm/mlである。希釈した精子浮遊液を0.1 mlの小滴とし, ミネラルオイルを重層した後, 前培養は行わず授精に供した。

授精および受精の判定

授精は, 精子浮遊液に体外成熟培養を終了した後ベッティングにより卵丘細胞を剥離した卵子を導入することにより行った。卵子の数は1小滴に10-15個とした。授精後3, 5, 7または18時間目に卵子を25%アセトアルコールで固定し, 1%アセトアルセインで染色してホルマウント標本を作製した。これを位相差顕微鏡の1,000倍で検査し, 以下の基準で受精の判定を行った。

- 成熟卵: 第2成熟分裂中期の核を有する卵子。
- 精子侵入卵: 精子および第2成熟分裂後期または終期の核を有する卵子。
- 膨化精子頭部を持つ卵: 膨化精子頭部および第2成熟分裂後期または終期の核を有する卵子。
- 雄性前核形成卵: 前核および精子尾部を有する卵子、または2つ以上の前核および第2極体を有する卵子。

また, 成熟卵, 精子侵入卵, 膨化精子頭部を持つ卵および雄性前核形成卵の合計に対する精子侵入卵, 膨化精子頭部を持つ卵および雄性前核形成卵の合計の割合を精子侵入率, 膨化精子頭部を持つ卵および雄性前核形成卵の合計の割合を精子頭部膨化率および雄性前核形成卵の割合を雄性前核形成率とした。なお, 有意差の検定は分散分析により行った。また, 実験は3回以上繰り返して行い, 合計2,189個の卵子を使用した。

結 果

ピルビン酸, グルコースおよび乳酸の添加が精子侵入に及ぼす影響を図1に示した。精子侵入はいずれの区においても授精後3時間目に見られ, 授精後7時間目にほぼピークに達した。授精後3時間目の精子侵入

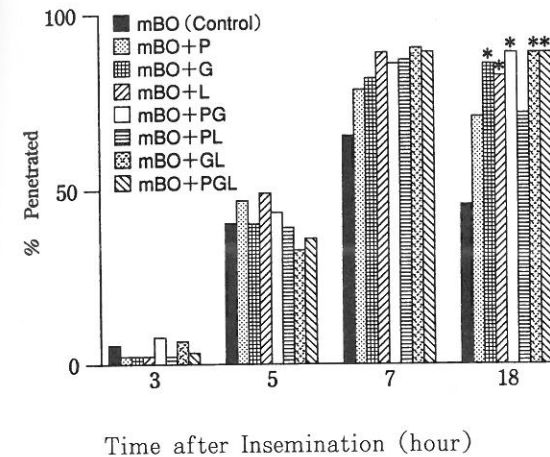


Fig 1. Effect of pyruvate, glucose and lactate on in vitro penetration of bovine oocytes matured in vitro. Bovine sperm was suspended in modified BO medium with 2 units/ml heparin and 10 mg/ml BSA (mBO; control), containing 0 or 0.5 mM pyruvate (P), 0 or 13.9 mM glucose (G), and 0 or 10.0 mM lactate (L), and immediately inseminated to oocytes without cumulus cells. Oocytes were fixed and stained at 3, 5, 7 or 18 hours after insemination. An * indicates a significant difference between mBO (control) and the other seven groups at that time ($P < 0.05$).

率は1.9-8.2%, 5時間目の精子侵入率は33.3-50.0%で各区分において有意差は見られなかった。授精後7時間目の精子侵入率は66.1-91.4%で各区分において有意差は見られなかったが, いずれの区もmBO区より高かった。授精後18時間目の精子侵入率はmBO区の47.5%に比べ, mBO+G区で85.5%, mBO+L区で84.6%, mBO+PG区で90.5%, mBO+GL区で90.9%およびmBO+PGL区で90.9%と有意 ($P < 0.05$) に高く, 有意差の見られなかったmBO+P区およびmBO+PL区においてもそれぞれ71.9%および73.0%とmBO区よりも高かった。また, mBO区を除いて, 単独区と併用区の間には有意差は見られなかった。

ピルビン酸, グルコースおよび乳酸の添加が精子頭部の膨化に及ぼす影響を図2に示した。精子頭部の膨化はいずれの区においても5時間目に初めて見られ, 7時間目, 18時間目と増加した。授精後5時間目の精

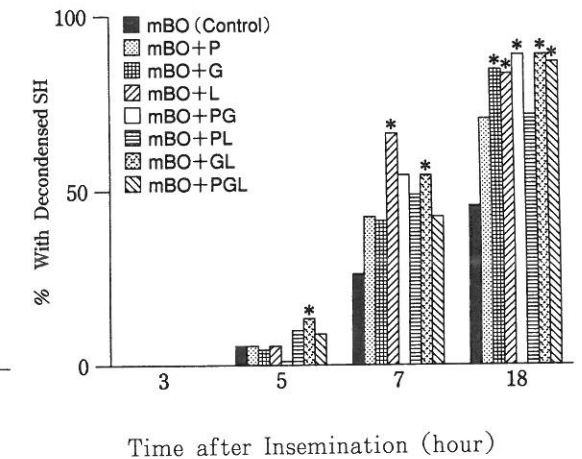


Fig 2. Effect of pyruvate, glucose and lactate on sperm head (SH) decondensation with bovine oocytes matured in vitro. Bovine sperm was suspended in modified BO medium with 2 units/ml heparin and 10 mg/ml BSA (mBO; control), containing 0 or 0.5 mM pyruvate (P), 0 or 13.9 mM glucose (G), and 0 or 10.0 mM lactate (L), and immediately inseminated to oocytes without cumulus cells. Oocytes were fixed and stained at 3, 5, 7 or 18 hours after insemination. An * indicates a significant difference between mBO (control) and the other seven groups at that time ($P < 0.05$).

子頭部膨化率はmBO区の5.3%と比べるとmBO+GL区において12.5%と有意 ($P < 0.05$) に高かったが, 他の区では1.3-9.9%であり, mBO区との有意差が見られなかった。授精後7時間目の精子頭部膨化率はmBO区の27.4%と比べるとmBO+L区およびmBO+G区でそれぞれ67.2%および55.2%と有意 ($P < 0.05$) に高かった。その他の区では42.2-55.6%であり, 有意差が見られなかったが, いずれの区もmBO区より高かった。授精後18時間目の精子頭部膨化率はmBO区の47.5%に比べ, mBO+G区で85.5%, mBO+L区で84.6%, mBO+PG区で90.5%, mBO+GL区で90.9%およびmBO+PGL区で89.4%と有意 ($P < 0.05$) に高く, 有意差の見られなかったmBO+P区およびmBO+PL区においてもそれぞれ71.9%および73.0%とmBO区よりも高かった。また, mBO区を除いて, 単独区と併用区の間には有意差は見られなかった。

ピルビン酸、グルコースおよび乳酸の添加が雄性前核の形成に及ぼす影響を図3に示した。雄性前核形成はいずれの区においても7時間目に初めて見られた。授精後7時間目の雄性前核形成率は1.6-12.5%で各区间において有意差は見られなかった。授精後18時間目の雄性前核形成率はmBO区の45.9%に比べ、mBO+G区で82.3%、mBO+L区で84.6%、mBO+PG区で87.3%、mBO+GL区で84.8%およびmBO+PGL区で84.8%と有意 ($P<0.05$) に高く、有意差の見られなかったmBO+P区およびmBO+PL区においてもそれぞれ65.6%および73.0%とmBO区よりも高かった。また、mBO区を除いて、単独区と併用区の間には有意差は見られなかった。

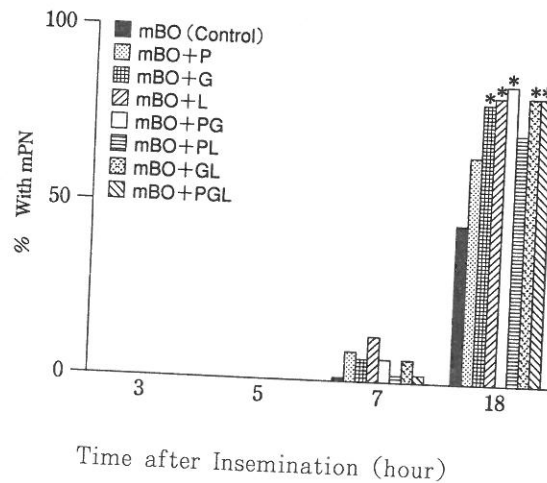


Fig 3. Effect of pyruvate, glucose and lactate on male pronucleus (mPN) formation within bovine oocytes matured in vitro.

Bovine sperm was suspended in modified BO medium with 2 units/ml heparin and 10 mg/ml BSA (mBO; control), containing 0 or 0.5 mM pyruvate (P), 0 or 13.9 mM glucose (G), and 0 or 10.0 mM lactate (L), and immediately inseminated to oocytes without cumulus cells. Oocytes were fixed and stained at 3, 5, 7 or 18 hours after insemination. An * indicates a significant difference between mBO (control) and the other seven groups at that time ($P<0.05$).

考 察

本実験ではいずれの区においても精子侵入が授精後3時間目に観察されたことから、ヘパリンを含むmBO液を受精培地として用いたときには、受精培地へのピルビン酸、グルコースおよび乳酸の添加の有無にかかわらずウシ精子の受精能獲得誘起および先体反応は授精後3時間以内に起こることが示された。XU and GREVE¹³⁾は卵丘細胞が付着したままの卵子を用い、ウシ精子をヘパリンを含むTALP液で前培養の後体外受精に供したとき、精子侵入は授精後6時間目から観察されたと報告している。PARK et al.¹⁴⁾はヘパリンとカフェインの両方を含むBO液を受精培地として用いて体外受精を行い、同様の観察を行った。あらかじめ卵丘細胞を除去した卵子を用いたときには、前培養の有無にかかわらず、精子侵入および精子頭部の膨化は授精後1時間目に観察されたことから、ヘパリンとカフェインを併用すれば、ウシ精子の受精能獲得誘起および先体反応は授精後1時間以内に起こると報告している。また、卵丘細胞が付着したままの卵子を用いたときには、精子侵入および精子頭部の膨化は授精後3時間目に観察されたことも合わせて報告している。この中で、受精能獲得および先体反応の誘起に要した時間がXU and GREVE¹³⁾のヘパリン単独処理よりも短かったのはヘパリンとカフェインの協力作用によるものであることを示唆した。福島ら¹⁵⁾も卵丘細胞が付着したままの卵子を用い、ヘパリンとカフェインの両方を含むBO液を受精培地として同様の観察を行い、精子侵入は授精後3時間目、精子頭部の膨化は4時間目に観察されたと報告した。これらの報告は、受精培地としてカフェインを含まず、ヘパリンのみを含むmBO液を用い、授精前にあらかじめ卵丘細胞を除去した卵子を用いた本実験結果を支持するものである。

ピルビン酸、グルコースおよび乳酸の影響についてそれぞれを単独で受精培地に添加して検討した報告は少ない。ラット³⁾、ハムスター⁷⁾およびマウス⁹⁾の体外受精において受精培地にピルビン酸のみを添加したときの受精率はそれぞれ0%、6%および0%、乳酸のみを添加したときの受精率はそれぞれ2-6%、23%および0%であり、これらの動物種ではピルビン酸と乳酸は単独では精子の受精能獲得誘起、先体反応および受精を促進しないと報告されている。グルコー

スのみを添加したとき、ラット³⁾での受精率は0-1%であったが、ハムスター⁷⁾およびマウス⁹⁾での受精率は89-96%および97.3%であり、ハムスターおよびマウスではグルコースが精子の受精能獲得誘起、先体反応または受精に必要であると報告されている。一方、多くの動物種ではピルビン酸、グルコースまたは乳酸のいずれか2つあるいは3つを併用することにより精子の受精能獲得誘起、先体反応または受精が促進されることが知られており、ラット^{3, 4)}およびヒト²⁾ではピルビン酸、グルコースおよび乳酸、モルモット⁵⁾およびウシ¹¹⁾ではピルビン酸と乳酸、ハムスター^{6, 10)}ではグルコースと乳酸およびマウス⁸⁾ではピルビン酸とグルコースの併用により高い先体反応の誘起率、精子侵入率あるいは受精率が得られたと報告されている。本実験では授精後18時間目にピルビン酸、グルコースおよび乳酸のいずれも無添加のmBO区においても45.9%と比較的高い雄性前核形成率が得られたが、授精後18時間目の精子侵入率、膨化精子頭部形成率および雄性前核形成率はグルコースのみを添加したmBO+G区および乳酸のみを添加したmBO+L区がmBO区に比較して有意 ($P<0.05$) に高かったこと、また、ピルビン酸のみを添加したmBO+P区がmBO区に比較して有意差はないが高かったことから、ヘパリンを含むmBO液を受精培地として用いたとき、受精培地に添加されたピルビン酸、グルコースおよび乳酸はそれぞれ単独でウシ精子の受精能獲得誘起または先体反応を促進させることが示された。しかし、mBO区を除いて、単独区と併用区の間には有意差が見られなかったことから、ピルビン酸、グルコースまたは乳酸を併用しても協力作用のないことが示された。

PARRISH et al.¹¹⁾は、ウシ体外受精において受精培地としてヘパリンを含むTALP液を用いたとき、受精培地にグルコースが添加されていると、受精能獲得誘起および精子侵入が阻害されること、また、前培養時間を延長したときには、グルコースが添加されていても受精能獲得誘起および精子侵入がグルコース無添加のときと同様に起こることから、受精培地に添加されたグルコースは受精能獲得誘起を遅延させると述べている。しかし、本実験では受精培地へのグルコース添加の有無にかかわらず、精子侵入は授精後3時間目に観察された。同様に精子頭部の膨化、雄性前核形成の始まる時間にもグルコース添加の有無による差は認められなかった。また、彼らの用いたTALP液には

ピルビン酸および乳酸が添加されているので、本実験において同様の添加条件と考えられるピルビン酸および乳酸添加のmBO+PL区とピルビン酸、乳酸およびグルコース添加のmBO+PGL区とを比較してみると、授精後18時間目における精子侵入率、精子頭部膨化率および雄性前核形成率には有意差は見られないが、いずれもグルコース添加のmBO+PGL区の方が高かった。これらのことから、ピルビン酸および乳酸の存在下で、グルコースはウシ精子の受精能獲得誘起を促進はしても、遅延させたりあるいは阻害したりしないと考えられた。さらに、PARK et al.¹⁴⁾はウシ体外受精においてヘパリンおよびカフェインを含むBO液を受精培地として用いたとき、前培養の有無にかかわらず受精能獲得誘起および先体反応は授精後1時間以内に起こると報告している。彼らはグルコースの有無の影響については検討していないが、彼らの用いたBO液にはグルコースが添加されており、グルコースの存在下においても短時間に受精能獲得誘起および先体反応の起こることが示された。この報告は本実験結果と一致する。一方、乳酸に対するマウス精子の反応は受精培地の塩類の組成、すなわちカルシウム濃度により異なることが示唆されている¹⁰⁾。PARRISH et al.¹¹⁾は受精培地としてTALP液、本実験とPARK et al.¹⁴⁾の実験では受精培地としてBO液を用いており、ウシ精子に及ぼすグルコースの影響を評価するには、受精培地中のピルビン酸、グルコースおよび乳酸の濃度の影響、さらにグルコースとエネルギー源以外の要素との相互作用についても検討する必要がある。

以上から、ヘパリンを含むmBO液を受精培地として用いたときには、受精培地へのピルビン酸、グルコースおよび乳酸の添加の有無にかかわらずウシ精子の受精能獲得誘起および先体反応は授精後3時間以内に起こることが示された。また、受精培地に添加されたピルビン酸、グルコースおよび乳酸はそれぞれ単独でウシ精子の受精能獲得誘起または先体反応を促進させるが、それらを併用しても協力作用のないことが示された。したがって、ピルビン酸およびグルコースを含むBO液は受精培地として適当なものであると考えられた。

文 献

- 1) BRACKETT, B. G. and OLIPHANT, G.: Capacitation of rabbit spermatozoa in vitro. Biol.

- Reprod., **12**: 260-274. (1975)
- 2) ROGERS, B. J. and PERREAULT, S. D. : Importance of glycolysable substrates for in vitro capacitation of human spermatozoa. Biol. Reprod., **43**: 1064-1069. (1990)
- 3) TSUNODA, Y. and CHANG, M. C. : In vitro fertilization of rat and mouse eggs by ejaculated sperm and the effect of energy sources on in vitro fertilization of rat eggs. J. Exp. Zool., **193**: 79-86. (1975)
- 4) NIWA, K. and IRITANI, A. : Effect of various hexoses on sperm capacitation and penetration of rat eggs in vitro. J. Reprod. Fert., **53**: 267-271. (1978)
- 5) ROGERS, B. J. and YANAGIMACHI, R. : Retardation of guinea pig sperm acrosome reaction by glucose : the possible importance of pyruvate and lactate metabolism in capacitation and acrosome reaction. Biol. Reprod., **13**: 568-575. (1975)
- 6) DRAVLAND, E. and MEIZEL, S. : Stimulation of hamster sperm capacitation and acrosome reaction in vitro by glucose and lactate and inhibition by the glycolytic inhibitors α -chlorohydrin. Gamete Res., **4**: 515-523. (1981)
- 7) IMAI, H., NIWA, K. and IRITANI, A. : The importance of the presence of metabolizable sugars in a medium for in vitro fertilization of hamster eggs with postovulatory oviduct contents. J. Exp. Zool., **220**: 261-265. (1982)
- 8) HOPPE, P. C. : Glucose requirement for mouse sperm capacitation in vitro. Biol. Reprod., **15**: 39-45. (1976)
- 9) FRASER, L. R. and QUINN, P. J. : A glycolytic product is obligatory for initiation of the sperm acrosome reaction and whip-lash motility required for fertilization in the mouse. J. Reprod. Fert., **62**: 25-35. (1981)
- 10) NEILL, J. M. and OLDS-CLARKE, P. : Incubation of mouse sperm with lactate delays capacitation and hyperactivation and lowers fertilization levels in vitro. Gamete Res., **20**: 459-473. (1988)
- 11) PARRISH, J. J., SUSKO-PARRISH, J. L. and FIRST, N. L. : Capacitation of bovine sperm by heparin : Inhibitory effect of glucose and role of intracellular pH. Biol. Reprod., **41**: 683-699. (1989)
- 12) WHITTINGHAM, D. G. : Survival of mouse embryos after freezing and thawing. Nature, **233**: 125-126. (1971)
- 13) XU, K. P. and GREVE, T. : A detailed analysis of early events during in-vitro fertilization of bovine follicular oocytes. J. Reprod. Fert., **82**: 127-134. (1988)
- 14) PARK, C. K., OHGODA, O. and NIWA, K. : Penetration of bovine follicular by frozen-thawed spermatozoa in the presence of caffeine and heparin. J. Reprod. Fert., **86**: 577-582. (1989)
- 15) 福島護之・富永敬一郎・秦谷 豊・内海恭三 : ウン体外受精における精子前培養時のヘパリンおよびカフェインが体外受精とその後の胚発生に及ぼす影響. 繁殖技術会誌, **15**: 19-28. (1993)

Effects of Pyruvate, Glucose and Lactate on in vitro Fertilization of Bovine Oocytes Matured in vitro.

Akira MINAMIHASHI, Satoru MORIYASU, Souichi KAGEYAMA

Yusuke YAMAMOTO and Sueharu ITO

Summary

The effect of pyruvate, glucose and lactate in culture medium for in vitro fertilization on sperm penetration, sperm head decondensation and male pronucleus formation of bovine oocytes matured in vitro was studied. Brackett and Oliphant's medium¹⁾ (BO medium) with heparin and a high concentration of bovine serum albumine (BSA), without pyruvate and glucose, was used as a control medium (mBO) for in vitro fertilization. A total of eight sets, including mBO (control), pyruvate (mBO+P), glucose (mBO+G), lactate (mBO+L), pyruvate and glucose (mBO+PG), pyruvate and lactate (mBO+PL), glucose and lactate (mBO+GL), and pyruvate, glucose and lactate (mBO+PGL) was examined.

Sperm penetration, sperm head decondensation and male pronucleus formation in the ooplasm were observed 3 hr, 5 hr and 7 hr after insemination in all eight groups. The percentage of oocytes penetrated, with decondensed sperm head and formed male pronucleus 18 hr after insemination was significantly higher in the mBO+G, mBO+L, mBO+PG, mBO+GL and mBO+PGL groups (84.6-90.9%, 84.6-90.9% and 82.3-87.3%, respectively) than that in the control group (47.5%, 47.5% and 45.9%, respectively) ($P < 0.05$). Percentages were also higher in the mBO+P and mBO+PL groups 18 hr after insemination (71.9% and 73.0%, 71.9% and 73.0% and 65.6% and 73.0%, respectively) than that in the control group. No differences were observed in the percentages among the seven non-control groups.

The present study indicated that capacitation and acrosome reaction of bovine sperm are induced within 3 hr in mBO medium with heparin, either in the presence or absence of pyruvate, glucose and/or lactate, and that pyruvate, glucose and lactate stimulate capacitation or acrosome reaction of bovine sperm in a mBO medium with heparin, although there are no synergistic effects of pyruvate, glucose and lactate on capacitation or acrosome reaction.

Key Words : bovine, in vitro fertilization, sperm, heparin, pyruvate, glucose, lactate

双胎妊娠牛の妊娠末期の代謝エネルギー要求量

佐藤 幸信・斎藤 利朗*・杉本 昌仁・本郷 泰久・川崎 勉

双胎妊娠牛の妊娠末期に要する代謝エネルギー量について検討した。

受精卵を移植したアバディーンアンガスおよびヘレフォード経産牛延べ51頭を用いた。双胎妊娠牛は26頭、単胎妊娠牛は25頭である。妊娠末期90日間の飼料給与量は、日本飼養標準一肉用牛一（1987年版）⁷⁾に基づいた。すなわち、単胎妊娠牛では母牛の維持の可消化養分総量（TDN）に胎児1頭の発育に要する量としてTDN0.9kgを加給した。双胎妊娠牛では、単胎妊娠の母牛と同様に維持TDN量に加えて、胎児1頭の発育に要するTDN量の1倍量、2倍量、2.5倍量および3倍量を加えて給与する区の4処理区とし、それぞれ8頭、6頭、4頭および8頭を割り当てた。

双胎妊娠牛の胎児の発育に要した代謝エネルギー量（ME_p）は平均で4.9Mcal/日であり、単胎妊娠牛の3.2Mcal/日の約1.5倍となった。双胎妊娠牛の維持に要した代謝エネルギー量（ME_m）は平均142.0kcal/kg^{0.75}/日であり、単胎妊娠牛の117.8kcal/kg^{0.75}/日の約1.2倍となった。双胎妊娠牛では単胎妊娠牛に比べME_pばかりでなくME_mも増加していることが推察された。この増加量を450kg~650kgの体重に換算すると、代謝エネルギー（ME）で2.4Mcal~3.1Mcal単胎妊娠牛より多くなった。したがって、双胎妊娠牛の妊娠末期に増給する必要のある1日当たりのME量は、妊娠末期の胎児の発育に必要なME量4.9Mcalおよび維持の増加ME量2.4Mcal~3.1Mcalを合計したME量7.3Mcal~8.0Mcalと計算された。

近年、受精卵の2卵移植による双子生産技術は、高資質素牛の増産対策および子牛生産効率の向上による素牛費の大幅な低減対策として期待され、現在すでに実用技術として活用され始めている。これまで単胎妊娠牛の妊娠末期の養分要求量に関する試験は数多く見られる^{1, 4, 6, 8)}。一方、双胎妊娠牛については単胎妊娠牛に比べ妊娠末期の養分要求量が高いとの報告^{5, 10)}があるが詳細な検討は少なく、妊娠末期の飼料給与指標については十分明らかにされていない。

そこで本試験では、胎児が急速に発育する妊娠末期90日間について双胎妊娠牛のTDN給与量の違いが母牛の体重変化に及ぼす影響を調査するとともに、双胎妊娠に要した代謝エネルギー量を推定し、妊娠末期に増給する必要のある1日当たりの代謝エネルギー給与量を求めた。

材料と方法

(1) 供試牛

アバディーンアンガス（以下アンガスと略）、ヘレフォード、黒毛和種および黒毛和種精液による交雑（×ホルスタイン、×アンガス）の受精卵を移植したアンガスおよびヘレフォードの2産以上の経産牛延べ

51頭を用いた。双胎妊娠牛は26頭、単胎妊娠牛は25頭である。

(2) 試験区分

1989年6月から1993年8月5年間に計6回の飼養試験を行なった。妊娠末期90日間の飼料給与量は、日本飼養標準一肉用牛一（1987年版）⁷⁾に基づいた。すなわち、単胎妊娠牛では母牛の維持のTDNに胎児1頭の発育に要する量としてTDN0.9kgを加給し、各回2~8頭づつ、計25頭を供試した（対照区、以下SM+P区と略）。双胎妊娠牛では、単胎妊娠の母牛と同様に維持TDN量に加えて、胎児1頭の発育に要するTDN量の1倍量、2倍量、2.5倍量および3倍量を加えて給与する区の4処理区（試験区、以下それぞれTM+P区、TM+2P区、TM+2.5P区およびTM+3P区と略）とし、それぞれ8頭、6頭、4頭および8頭を割り当てた。

(3) 飼料給与

6回の飼養試験のうち、最初の2回では乾草および濃厚飼料を用い、乾草を1日当たり7kg定量給与し、それぞれの必要TDN量に合致するように濃厚飼料で調整し給与した。以降の4回ではトウモロコシサイレージ、濃厚飼料および乾草を用い、TDN比で4:5:

1の割合で混合し、それぞれの必要TDN量に合致するように給与した。飼料の給与は屋内の個別給餌器を用い、個体毎に1日2回行った。供試牛は維持に必要なTDN量を含む飼料で2~3カ月間馴致した後、分娩予定日の12週間前から設定した飼料を給与した。水および固形塩は自由摂取させた。また、ミネラルとビタミンは毎日飼料に添加した。供試牛は朝、夕2回の飼料給与時を除き屋外のパドックで群飼した。

(4) 調査項目

1) 飼料摂取量

毎朝、残食量を測定し、残食がある場合には給与量から残食量を差し引いて1日の摂取量とした。

2) 体重

供試牛の体重は2週間隔で一定時刻に測定した。母牛の分娩日が予定日と一致せず分娩直前に測定できないことがあるため、および個体の変動を考慮し、分娩90日前の体重(以下開始時体重と略)および分娩前体重は、2週間隔の測定値を使って計算した直線回帰式から求めた。母牛の分娩後体重および子牛の生時体重は、分娩後2日以内に測定した。分娩前90日間の母牛のみの増体量は、分娩後体重から開始時体重を差し引いて求めた。胎盤など付属器官を含めた双子の合計体重は、分娩前体重から分娩後体重を差し引くことにより求めた。

3) 代謝エネルギー量

胎児の発育に要した代謝エネルギー量(以下ME_pと略)および妊娠牛の維持に要した代謝エネルギー量(以下ME_mと略)量の推定は、Koong et al.⁵⁾の式を用いた。すなわち、ME_pは以下の式に基づき推定した。

$$ME_p = (EC_t - EC_i) \times Q / 0.15$$

ここで EC_t : 分娩直前の胎児の正味エネルギー含量
 EC_i : 分娩3カ月前の胎児の正味エネルギー含量
 係数0.15 : 岩崎⁴⁾による胎児へのエネルギー蓄積に対する代謝エネルギー(以下MEと略)の利用効率
 Q : 生時体重に基づく補正係数

なおEC(kcal)およびQは Ferrell et al.¹⁾による次の式から求めた。

$$EC = 2.197 \times \exp(0.558T - 0.000804T^2)$$

$$Q = \text{子牛の生時体重} / 5.839 \times \exp(0.0512T - 0.0000707T^2)$$

ここで T : 妊娠期間

ME_mは代謝エネルギー摂取量(kcal)(以下ME_iと略)をNRC(1984)⁹⁾により、また体エネルギー変化量(kcal)をGarrett²⁾の式で計算し推定した。

$$ME_m = ME_i - ME_p - (1.16 \times \text{体エネルギー増加量}) \text{あるいは}$$

$$ME_i - ME_p + (1.18 \times \text{体エネルギー減少量})$$

$$ME_i = \text{TDN摂取量} \times 3.608$$

$$\text{体エネルギー変化量} = 73 \times \text{MBS} \times \text{母牛のみの増体量}$$

ここで MBS : 開始時(分娩90日前)代謝体重, kg^{0.75}
 母牛のみの増体量 : 分娩後体重 - 開始時体重

結果および考察

1日当たりの養分摂取量および養分充足率を表1に示した。各処理区とも養分摂取量は設定量に応じていたが、乾物(DM)充足率約80%、可消化蛋白質(DCP)充足率約120%と一定し、TDN充足率についても96~103%の範囲でほぼ計画どおりとなった。

Koong et al.⁵⁾は、双胎妊娠牛に粉碎エンバクわらとアルファルファ乾草を1:1の割合で自由摂取させたところ、妊娠末期に飼料摂取量が低下し体重が減少したことを報告している。双胎妊娠牛に乾草と濃厚飼料を7:3の割合で給与したTerada et al.¹⁰⁾も同様の低下を認めている。両報告ともに、この摂取量の低下は胎児の発育にともなうルーメン容積の減少のためであるとして、双胎妊娠牛の妊娠末期の体重の減少を防ぐためには給与飼料のエネルギー濃度を高め

Table 1. Mean daily dry matter, DCP and TDN intake, and percentage of requirement for each designs

Item	No of animals	Daily intake			% of requirement		
		DM	DCP	TDN	DM	DCP	TDN
		kg			%		
TM+P	8	7.2	0.47	4.6	80.1	119.0	96.1
TM+2P	6	8.6	0.62	5.5	81.5	126.4	97.0
TM+2.5P	4	9.2	0.62	6.4	80.1	116.0	103.3
TM+3P	8	9.5	0.66	6.6	81.1	117.3	102.7
SM+P	25	7.3	0.49	4.9	80.1	122.9	101.8

ることが必要であるとしている。本試験はこれらの報告に比べ粗飼料の給与割合に対する濃厚飼料の給与割合が高かったため、双胎妊娠牛の妊娠末期の飼料摂取量の減少は見られなかった。

母牛の体重変化および胎盤など付属器官を含めた産子の合計体重を表2に示した。妊娠期間の日増体重はTM+P区、TM+2P区、TM+2.5P区およびTM+3P区でそれぞれ0.42kg、0.69kg、0.99kgおよび1.18kgとなり、設定したTDN給与量が多くなるに依り増加する傾向があった。また、単胎妊娠牛のSM+P区では0.59kgであった。分娩前体重から分娩後体重を差し引くことにより求めた胎盤など付属器官を含めた双

子の合計体重は、処理区間で差がなく双子平均で86.1kgであり単子の54.8kgの約1.6倍であった。双胎妊娠牛の産子の合計体重は、処理区間で差がなく双子平均で63.6kgであり、単子の40.1kgの約1.6倍であった。分娩直後の体重から開始時の体重を差し引いた母牛自身の増体量は、TM+P区-54.5kg、TM+2P区-25.3kg、TM+2.5P区2.1kgおよびTM+3P区27.1kg、SM+P区-1.5kgとなり、TM+P区、TM+2P区では体重が減少し、TM+3P区では体重が増加したのに対して、TM+2.5P区およびSM+P区では開始時の体重を維持した。

Table 2. Average weight change of the dams and sum of birth weight of calves

Item	Initial weight	Weight at	Average	Weight gain	Conceptus	Sum of birth weight	
	weight	prepartum	Weight at	of dam ²⁾	weight ³⁾	of calves	
		kg	postcalving	daily gain ¹⁾	kg		
		kg/day					
TM+P	616.9	654.5	562.5	0.42 ^a	-54.5 ^a	92.0 ^a	
TM+2P	594.0	656.0	568.7	0.69 ^a	-25.3 ^b	87.3 ^a	
TM+2.5P	636.5	725.8	638.6	0.99 ^c	2.1 ^c	87.2 ^a	
TM+3P	580.3	686.0	607.4	1.18 ^c	27.1 ^d	78.6 ^a	
Average of twin pregnancy						86.1	63.6
SM+P	628.1	681.4	626.6	0.59 ^{a,b}	-1.5 ^c	54.8 ^b	

a, b, c, d. Means in the same row with different superscripts are significantly different (p<0.01).

1) Live weight at prepartum minus initial weight divided by the length of a trial (90 days).

2) Live weight at postcalving minus initial weight.

3) Live weight at prepartum minus live weight at postcalving.

日本飼養標準(1987年版)⁷⁾では単胎妊娠の経産牛の妊娠末期の飼料給与方法として、胎児とその付属器官の成長による増加分に相当する増体があればよいとしている。上述のように、本試験では胎盤など付属器官を含めた双子の合計体重は単子の約1.6倍であった。したがって、双胎妊娠牛では維持量に胎児1頭の発育に要する約1.6倍量のTDNを加えて給与すれば良いことになる。しかし、本試験の結果から、母牛の体重を維持したまま双子の胎児とその付属器官の成長を単子の約1.6倍にするためには、胎児1頭の発育に要

する量の2.5倍量のTDNを維持量に加えて給与することが必要であると推察され、胎盤など付属器官を含めた双子の合計体重から推定した値よりも明らかに多くなった。

本試験の結果に基づいて推定したME_i、ME_pおよびME_mを表3に示した。ME_iは胎児の発育に要するTDN量を増やすともない増加した。ME_pは双胎妊娠牛の処理区間に差がなく平均で4.9Mcal/日(20.5MJ/日)であったのに対し、単胎妊娠牛では3.2Mcal/日(13.4MJ/日)であった。

Table 3. Metabolizable energy intake, pregnancy energy requirement and maintenance energy requirement of Angus and Hereford cows during the last trimester of single and twin pregnancies

Item	Metabolizable energy intake (ME _i)	Pregnancy energy requirement (ME _p)	Maintenance energy requirement (ME _m)
	kcal ME/kg ^{0.75} /day	Mcal ME/day	kcal ME/kg ^{0.75} /day
TM+P	134.2±5.2 ¹⁾	5.1 ^a ±0.4	144.9 ^a ±16.9
TM+2P	162.2±3.6	4.7 ^a ±1.0	147.4 ^a ±23.3
TM+2.5P	183.2±6.6	4.8 ^a ±0.8	143.2 ^a ±15.4
TM+3P	201.8±10.2	4.9 ^a ±0.3	134.3 ^{a,b} ±14.8
Average of twin pregnancy	169.0±28.2	4.9 ^a ±0.7	142.0 ^a ±18.6
SM+P	141.6±7.6	3.2 ^b ±0.5	117.8 ^b ±13.8

a, b Means in the same row with different superscripts are significantly different (p<0.01)
1) Mean±S. D.

Terada et al.¹⁰⁾は黒毛和種の受精卵を移植したホルスタインの双胎および単胎妊娠牛を用いてエネルギー代謝試験を行いME_pを検討した。それによると、妊娠末期90日間に妊娠に必要なME_pは双胎妊娠牛では5.7Mcal/日(23.8MJ/日)、単胎妊娠牛では3.4Mcal/日(14.1MJ/日)であったと報告している。またKoong et al.⁵⁾は、ヘレフォードとアンガスを交雑した受精卵を移植したヘレフォード初産牛および経産牛を用い、本試験と同様に飼養試験結果からME_pを推定した。その結果は双胎妊娠の初産および経産牛では、それぞれ6.1Mcal/日および6.5Mcal/日、単胎妊娠牛の初産および経産では3.9Mcal/日および3.8Mcal/日であったと報告している。これらの値と比べ今回の成績は双胎および単胎妊娠牛ともやや低い値ながらME_pはほぼ近似した値を示した。

本試験の双胎妊娠牛のME_pは単胎妊娠牛の1.5倍で

あった。これは本試験の胎盤などの付属器官を含めた双子の合計体重が単子の約1.6倍であったこととほぼ一致した。Koong et al.⁵⁾は双胎妊娠牛のME_pの増加は双胎の発育に要求されるME増加量の単純な反映であるとしている。

次にME_mについてみると、双胎妊娠牛では処理区間に差はなく平均142.0Kcal/kg^{0.75}/日であった。これに対して単胎妊娠牛では117.8Kcal/kg^{0.75}/日となり、双胎妊娠牛のME_mは単胎妊娠牛の約1.2倍となった。Koong et al.⁵⁾は双胎妊娠牛では平均142.5Kcal/kg^{0.75}/日、単胎妊娠牛では124.2Kcal/kg^{0.75}/日であったとし、本試験と同様に双胎妊娠牛では単胎妊娠牛よりME_mが増加することを示唆している。一方、Terada et al.¹⁰⁾は、双胎妊娠牛のME_mの増加はないとして橋爪ら³⁾がホルスタインで測定した116.3Kcal/kg^{0.75}/日を採用している。妊

娠牛のME_mが非妊娠牛に比べ増加するかしないかの問題は、妊娠牛の基礎代謝量の測定が困難であること、胎児の発育にともなう生じる熱と母牛の代謝活動によって生じる熱の分画が困難であること⁴⁾などからいまだ明らかとなっていない。岩崎⁴⁾は、黒毛和種成雌牛の基礎代謝量は、非妊娠時では66.6kcal/kg^{0.75}/日、単胎妊娠牛の分娩直後では75.3kcal/kg^{0.75}/日であったが、妊娠中の絶食代謝量が直接測定できず、飼料給与時の測定熱発生量のみからは、非妊娠時と妊娠時との間で違つか明らかな結論を出すに至らなかったとしている。

しかし、本試験の結果から、妊娠末期の母牛の体重推移およびME_mの推定によって、双胎妊娠牛では単胎妊娠牛に比べME_pばかりでなくME_mも増加していることが推察された。また、双胎妊娠牛と単胎妊娠牛とのME_mの差はKoong et al.⁵⁾の報告よりもやや大きかった。

本試験の結果を用いてME_pから妊娠末期に胎児の発育に要した1日当たりのTDN量を計算すると、双胎妊娠牛では1.36kg(=4.9Mcal/3.608)となった。なお、単胎妊娠牛では0.89kg(=3.2Mcal/3.608)となり、日本飼養標準(1987年版)⁷⁾に示された妊娠末期に胎児の発育に必要なTDN量0.9kgと一致した。

また、双胎妊娠牛では単胎妊娠牛に比べME_mも増加したが、この増加量を450kg~650kgの体重に換算すると、MEで2.4Mcal~3.1Mcal、TDNで0.66kg~0.86kg単胎妊娠牛より多くなる。したがって、双胎妊娠牛の妊娠末期に増給する必要のある1日当たりのME量は、妊娠末期の胎児の発育に必要なME量4.9Mcalおよび維持の増加ME量2.4Mcal~3.1Mcalを合計したME量7.3Mcal~8.0Mcal(30.6MJ~33.5MJ)となった。また、1日当たりのTDN量では、妊娠末期の胎児の発育に必要なTDN量1.36kgと維持の増加TDN量0.66kg~0.86kgとを合計したTDN量2.02kg~2.22kgと計算された。このTDN量は単胎妊娠牛の妊娠末期の胎児の発育に要するTDN量0.9kgの2.3~2.5倍となり、前述のTM+2P区が開始時の体重を維持したことを裏づける結果となった。

文 献

- 1) FERRELL, C. L., W. N. GARRETT and N. HINMAN: Growth development and composition of the udder and gravid uterus of beef heifers during pregnancy., J. Anim. Sci., **42**: 1477-1489. (1976).
- 2) GARRETT, W. N.: Energy gain in mature nonpregnant beef cows., J. Anim. Sci., **39**: 238 (Abstr.). (1974).
- 3) 橋爪徳三・森本 宏・浜田龍夫・増淵敏彦・阿部道夫・堀井 聡・田中孝之介・高橋正也・海藍義男・安保庄一郎: 乳牛の飼養標準に関する研究。畜試特報, **2**: 5-77. (1964).
- 4) 岩崎和雄: 黒毛和種牛の妊娠時におけるエネルギー代謝とエネルギー利用効率。畜試研報, **45**: 25-92. (1986).
- 5) KOONG, L. J., G. B. ANDERSON and W. N. GARRETT: Maternal energy status of beef cattle during single and twin pregnancy., J. Anim. Sci., **54**: 480-484. (1982).
- 6) 農林水産技術会議: 肉用牛の日本飼養標準に関する研究。研究成果, **42**: 1-172. (1970).
- 7) 農林水産省農林水産技術会議事務局編: 日本飼養標準, 肉用牛(1987年版)。中央畜産会, 東京。(1987).
- 8) 農林水産省中国農試: 肉用牛(黒毛和種)の分娩前後の飼料給与指標の確立に関する研究。近畿中国地域共同研究成果集報, **7**: 1-73. (1979).
- 9) NRC (National Research Council): Nutrient Requirements of Domestic Animals, Requirement of beef cattle, 6th rev.ed, National Academy of Sciences Washington D. C. (1984).
- 10) TERADA, F., T. NISIDA and M. SHIBATA: Metabolizable energy requirements of Holstein cows during single and twin pregnancy with different breed's fetuses (Japanese black breed)., Energy Metabolism of Farm Animals., EAAP Publ, **58**: 341-344. (1991).

Metabolizable energy requirement during the last period of gestation in pregnant beef cows with twins.

Yukinobu SATO, Tosiro SAITO*, Masahito SUGIMOTO,

Yasuhisa HONGO and Tutomu KAWASAKI

Summary

A study was conducted to determine the metabolizable energy requirement during the last period of gestation in pregnant beef cows with twin fetuses. Fifty-one multiparous Aberdeen Angus and Hereford cows which were impregnated by embryo transfer. Twenty-five cows were impregnated with a single fetus and twenty-six cows were impregnated with twin fetuses. They were given diets according to the Japanese Feeding Standard for Beef Cattle (1987) during the last 90 days of gestation. The cows carrying a fetus were fed the TDN requirement for maintenance of a dam plus the TDN requirement for pregnancy with a single offspring (0.9kg TDN). Those with twins were fed at four levels of TDN, which is the TDN for maintenance of a dam plus 1, 2, 2.5 and 3 times the TDN requirement for cows with a single offspring. There were 8, 6, 4 and 8 pregnant cows with twins in each treatment respectively.

The ME requirement for pregnancy in cows with twins fetus was 1.5 times greater than that of pregnant cows with a single (4.9 Mcal/day versus 3.2 Mcal/day). The ME requirement for maintenance in pregnant cows with twins was 1.2 times greater than that of pregnant cows with one fetus (142.0 Kcal/kg^{0.75}/day versus 117.8 Kcal/kg^{0.75}/day). This study suggested that the twin pregnancy increased the ME requirement for maintenance as well as that for pregnancy compared with a single pregnancy. Assuming a body weight range of 450 to 650 kg, the ME requirement in pregnant cows with twins was 2.4 to 3.1 Mcal/day greater than that of pregnant cows carrying a single fetus. This study indicated that the ME requirement during the last period of gestation in pregnant cows with twins was 7.3 to 8.0 Mcal/day, on the sum of the ME requirement for pregnancy (4.9 Mcal/day) and the maintenance requirement (2.4 to 3.1 Mcal/day).

Key Words : Energy Requirement, Twin Pregnancy, Beef Cow

*Present address : Hokkaido Prefectural Takikawa Animal Husbandry Experiment Station

北海道和種子馬の生育初期における 吸乳・採食行動ならびに姿勢

杉本 昌仁・本郷 泰久・川崎 勉

北海道和種子馬の生育初期における行動特性を調べる目的で、吸乳・採食行動ならびに姿勢について調査した。子馬2頭を供試した。供試馬は母子同一管理とし、自然哺乳させた。調査は子馬の生後1, 3, 5, 9, 15週齢に実施し、吸乳・採食行動ならびに子馬の姿勢について観察記録した。観察時間は6時から18時までの12時間とした。吸乳行動については秒単位で連続観察し、採食ならびに姿勢については10分間隔の点観察とした。

6時から18時までの総吸乳時間は生育が進むにつれて減少し、1週齢では2頭でそれぞれ4,941秒と5,761秒、15週齢ではそれぞれ1,179秒と735秒であった。1回当たりの吸乳持続時間は5週齢まで減少する傾向が見られたが、5週齢以降はおよそ60秒台で推移した。1時間当たりの平均吸乳回数についても減少する結果となった。吸乳行動については明確な周期性が見られず、どの時間帯でも観察された。採食時間については1週齢から15週齢へと増加する傾向が見られ、吸乳時間と逆の関係になることがうかがわれた。姿勢については、いずれの観察時においても立位の頻度が最も高かった。

馬はその飼養目的(乗用・役用等)ゆえに人間による行動の制御が可能となつてはじめて家畜としての価値が生じる^{3, 5)}。家畜の行動の制御は幼齢期からの馴致が必要⁸⁾で、そのためにも子馬の行動特性を把握することは重要であると考えられる。また、馬は母子同一集団で飼育されることが多く、長期的な母子関係が形成されるため、哺乳・姿勢・位置関係などの母子行動様式は管理上の最重要項目とされている⁵⁾。

北海道和種子馬は駄載能力に優れ持続力を有するため、輸送の手段として長く用いられてきた。しかし、その飼養管理技術について体系的に集約された記述はほとんど無く、調査・研究の対象とされた例^{2, 12)}も少

ない。

そこで本試験では、北海道和種子馬の生育初期における行動特性を知る目的で、子馬の吸乳・採食行動ならびに姿勢について調査した。

材料および方法

北海道立新得畜産試験場で生産された北海道和種子馬2頭(子馬A(雌), 子馬B(雄)とする)を供試した。供試馬は平成5年5月生まれの半きょうだいで、生後は母子同一管理として自然哺乳させた。子馬の生後1, 3, 5, 9, 15週齢時に行動調査を実施し、吸乳・採食行動ならびに姿勢について観察・記録した。

Table 1. Date, weather, precipitation and days after birth of foals in each observation

Age	Date	Weather	Precipitation	Days after birth	
				Foal A ¹⁾	Foal B ²⁾
weeks			mm/12h ³⁾	days	
1	May 9	cloudy	0.0	8	10
3	May 22	clear	0.0	21	23
5	June 6	rainy	4.5	36	38
9	July 3	clear	0.0	63	65
15	Aug. 14	rainy	4.0	105	107

1) : Filly foal

2) : Colt foal

3) : From 6h to 18h

観察日における子馬の日齢と天候を表1に示した。観察時間は6時から18時までの12時間とした。吸乳行動については、子馬の鼻鏡が母馬の乳房に接触した時点から離脱するまでの時間を秒単位で連続観察した。なお、呼吸のため乳房から一瞬離れた時間は吸乳継続中として解析した。採食行動ならびに姿勢については10分間隔の点観察とした。姿勢は立位、伏臥、横臥の3つに分類して記録し、それぞれの頻度を算出した。立位については休息だけでなく、疾走や歩行等も含めた。観察はいずれも厩舎に隣接するパドックで実施した。1, 3週齢の観察は、火山灰を敷いたパドックで行い、乾草を自由採食とした。5週齢以降では牧草のあるパドックで行い、乾草も適宜給与した。水ならびにミネラル固形塩は自由摂取させた。

結果および考察

6時から18時における総吸乳時間（以下、総吸乳時間）の生育に伴う推移を図1に示した。1週齢における総吸乳時間が最も長く、生育が進むとともに減少した。子馬Aでは1週齢の4,941秒から15週齢の1,979秒へと減少した。また、子馬Bでは5,761秒から735秒の約8分の1になった。個体間の差は非常に小さく、2頭ではほぼ同様の推移を示した。1週齢から5週齢までの減少割合が大きく、5週齢以降は緩やかな減少傾向を示した。

1回当たりの吸乳持続時間（以下、持続時間）を表2に示した。持続時間は1週齢で最も長く子馬Aでは83.7秒、子馬Bでは77.9秒であった。持続時間は5週

Table 2. Duration of suckling by hokkaido native ponies

Age weeks	Foal A 1)	Foal B 2)
1	83.7±29.3	77.9±24.9
3	72.4±28.0	76.8±18.4
5	66.7±19.0	58.7±19.5
9	60.4±18.4	63.2±16.4
15	69.4±13.6	61.3±22.4

1) : Filly foal
2) : Colt foal

しかし5週齢以降、15週齢までは明確な減少は見られず、これらの報告とは異なった傾向を示した。

1時間当たりの平均吸乳回数（以下、吸乳回数）は

齢まで減少する傾向が見られたが、5週齢以降はおおよそ60秒台で推移した。辻井¹³⁾は木曾馬で調査しており、吸乳持続時間が5日齢で67秒、30日齢で51秒、60日齢で48秒と減少傾向を示したが、平均値間に差は見られなかったとしている。また、KUSUNOSE and SAWAZAKI⁴⁾は、Throughbredの吸乳行動を25週齢以降まで調査しているが、平均吸乳持続時間は子馬の週齢とともに減少すると報告した。しかし、その平均値間に統計的な有意差はなかったとしている。TYLER¹⁴⁾は、New forest ponyにおける吸乳持続時間の中央値が週齢とともに有意に減少することを報告している。本試験の結果でも5週齢までは吸乳持続時間の減少する傾向が見られた。

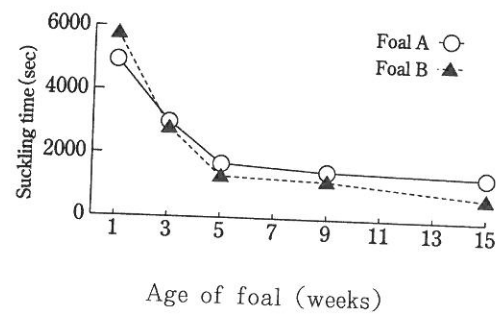


Fig 1. Change in suckling time by age of foals in Hokkaido native pony

Foal A : filly foal
Foal B : colt foal

1週齢が最も多く子馬Aで6.2回、子馬Bで4.9回であった（表3）。3週齢から15週齢までは、子馬Aで3.3, 2.2, 2.0および1.4回、また、子馬Bでは2.8, 1.9, 1.7

および1.2回といずれも減少する結果となった。30日齢の木曾馬における6時から18時までの平均吸乳回数は1.4回/hrという報告がある¹³⁾。今回の和種馬によ

る調査では、5週齢（約35日齢）で2.2回（子馬A）と1.9回（子馬B）の吸乳回数を示した。

Table 3. Sucking frequency per hour by hokkaido native ponies

Age weeks	Frequency times/hour	
	Foal A 1)	Foal B 2)
1	6.2±1.5	4.9±1.4
3	3.3±1.6	2.8±0.9
5	2.2±0.9	1.9±1.0
9	2.0±0.6	1.7±0.8
15	1.4±0.6	1.2±0.4

1) : Filly foal
2) : Colt foal

各時間帯の吸乳頻度（その時間帯の吸乳回数/総吸乳回数）を図2に示した。どの時間帯においても吸乳行動が観察され、吸乳頻度の明確な周期性は見られなかった。

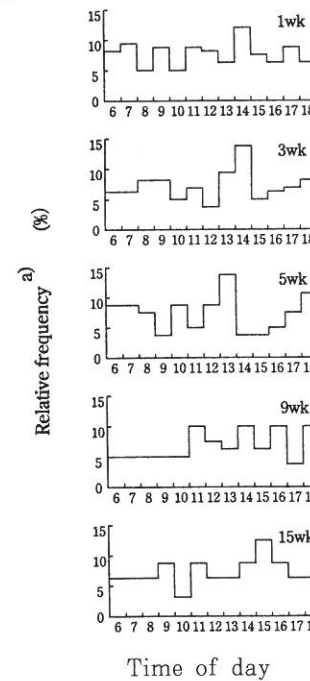


Fig 2. Suckling pattern of foals in Hokkaido native pony

a) The ratio of the number of suckling for one hour to the total number

平均吸乳間隔の推移を図3に示した。吸乳間隔は、子馬Aおよび子馬B共に、週齢がすすむにつれて長くなる結果となった。しかし、いずれの観察時においても子馬Aより子馬Bの方が吸乳間隔が長いという結果

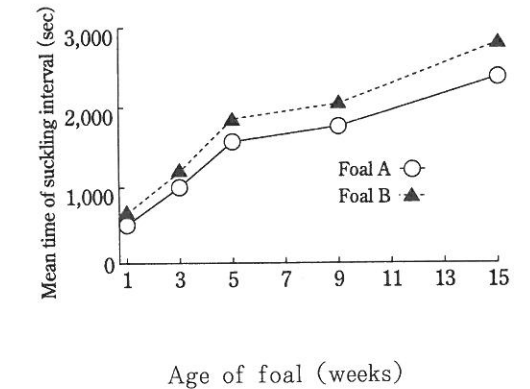


Fig 3. Changes with age in the mean suckling interval

Foal A : filly foal
Foal B : colt foal

であった。この原因については個体の誤差、性による影響あるいは母馬の乳量の影響等が考えられる。牛（黒毛和種）では乳量と1日当たりの吸乳時間に有意

な相関が見られたという報告がある¹¹⁾。また、一般に、母畜の乳量は幼畜の生育に大きな影響を与えたとされている。馬においても乳量によって吸乳行動や生育が左右されている可能性が考えられる。NEUHAUS⁶⁾は、その総説の中で馬の日乳量について紹介しているが、研究者により報告値には大きな開きがあることを指摘している。北海道和種については乳量測定された例は無く、今後は母馬の乳量と子馬の行動あるいは発育との関連性についても調査を進めることが必要であろう。

採食時間の推移を図4に示した。1週齢から5週齢にかけて採食時間は増加した。しかし、5週齢以降は大きな変動が見られなかった。採食時間における2個体の変動は小さく、ほぼ同様に推移した。また、採食時間の推移は総吸乳時間と正反対の関係を示した(図1, 図4)。今回の観察結果によると子馬は1週齢から採食行動(nibbling and chewing)は観察されるとしており、この点に関して本試験でも同様の結果となった。TYLER¹⁴⁾の報告では、1週齢の子

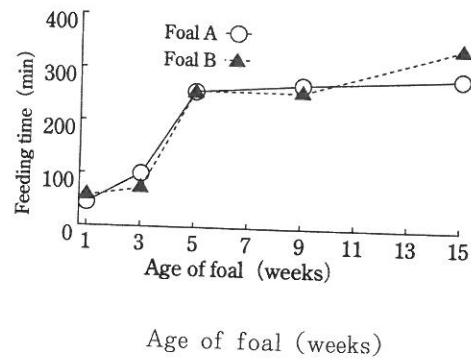


Fig 4. Change in feeding and grazing time by age of foals in Hokkaido native pony

Foal A : filly foal
Foal B : colt foal

馬の平均採食時間は3.5min/hrとしている。本試験の結果から、1週齢における1時間当たりの平均採食時間を算出すると4.2min/hrとなり近似する値が得られた。しかし、生後1週齢では子馬の歯は完全に生

え揃っていない⁸⁾ため、採食行動は観察されても実際の採食量については疑問が持たれる。この点についてはTYLER¹⁴⁾も、子馬の採食行動は早いうちから観察されるが、胃内への流入はわずかであることを指摘している。吸乳時間が生育とともに減少し、逆に採食時間が増加するという本試験の結果から、子馬への養分供給の比率が母乳から摂取飼料へと移行していくことがうかがわれる。大島と布施¹⁰⁾は、乳期が進んだ時期(特に3か月齢以上)には乳汁が子馬の栄養上はたす役割は小さいとしている。また、16週齢までは吸乳頻度と日増体量との間に有意な正の相関が見られるが、16週齢以降で相関がなくなるという報告⁴⁾もある。また、乳期の進行にともなって馬の日乳量は直線的に減少するとされている¹⁾。NRC⁹⁾でも馬の泌乳は分娩後8週まで高く、その後減少していくことが示されている。これらのことから、生後1~2か月齢の子馬の栄養は主として母乳に依存しており、3か月齢以降では牧草など摂取飼料からの養分供給割合が増加するものと推察される。

姿勢の頻度を図5に示した。子馬Aの立位姿勢では15週齢で最も頻度が高く、約90%となった。子馬Bの1週齢ならびに15週齢で立位姿勢をとる頻度が高く、いずれも80%を越えていた。KUSUNOSE and SAWAZAKI⁴⁾の試験では、放牧地における立位姿勢は週齢とともに増加し、9週齢以降では95%に達したとしている。本試験でも、15週齢では約90%を占めており高い頻度を示した。しかし、週齢とともに増加するという明確な傾向は見られなかった。生後1週齢の子馬は、母馬の移動等に追従する傾向が強かったため、3週あるいは9週齢と比較して1週齢における立位の頻度が相対的に高くなったものと推察される。同じくKUSUNOSE and SAWAZAKI⁴⁾は、立位、伏臥、横臥の比率は、放牧地と厩舎内で異なることを報告した。この原因については牧草の有無および遮蔽物の有無ではないかとしている。本試験では、いずれの観察も舎外で実施したが、3週齢以前と5週齢以降ではパドックにおける牧草の有無という点で異なった。この条件の差が子馬の姿勢にも影響を及ぼした可能性が考えられる。また、日常管理下(朝・夕は放牧、夜間および日中は舎飼)にある成馬(アラブ種)では、日中ほとんど立位姿勢をとっているという報告⁷⁾もある。今回の観察結果から、子馬でも立位の頻度が最も高いということが認められた。さらに、KUSUNOSE and SAWAZAKI⁴⁾は、9週齢以

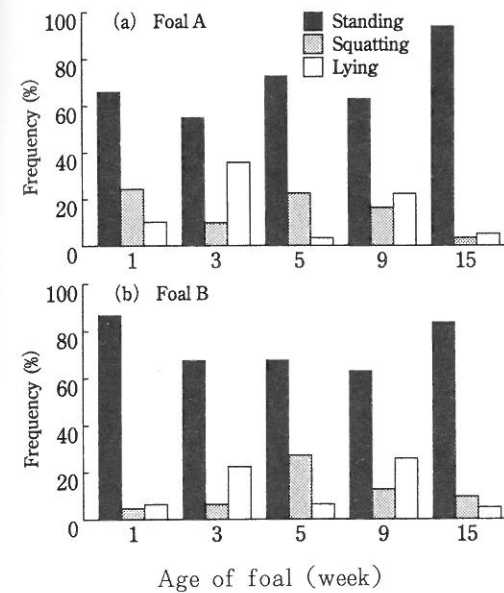


Fig 5. Changes with age in the proportion of time which foals spent standing, squatting and lying

降の子馬で横臥姿勢をとるのは、草地在乾燥した状態のときであるとしている。本試験の結果でも観察日が雨天であった5週齢ならびに15週齢で横臥姿勢をとる頻度が低くなった。

本試験の結果、和種馬の吸乳時間および吸乳回数は生育の早い段階から減少していることが示唆された。また、吸乳時間の減少と採食時間の増加は対照的であることが確認された。しかし、今回の試験では1週齢および3週齢での観察条件(牧草の有無)と5週齢以降の観察条件が異なるため子馬の採食行動に及ぼす生育(週齢)の影響を明確にするには到らなかった。また、供試動物の頭数も2頭と少なかった。さらに詳細なデータを得るためには、観察条件を同一にした上で行動に影響を与える種々の要因を考慮した調査を実施する必要があるだろう。

文 献

1) GIBBS, P. G., G. D. POTTER, R. W. BLAKE and W. C. MCMULLAN : Milk production of quarter horse mares during 150 days of

lactation. *J. Anim. Sci.*, **54** : 496-499. (1982).

2) 八戸芳夫 : 日本在来馬の保存活用に関する調査成績, 1-53. 日本馬事協会, 東京. (1977).

3) HERID, J. C., A. M. LENNON and R. W. BELL : Effects of early experience on the learning ability of yearling horses. *J. Anim. Sci.*, **53** : 1204-1209. (1981).

4) KUSUNOSE, R and H. SAWAZAKI : The behavioral development of thoroughbred foals and the relationship between dams and foals. *Jpn. J. Zootech. Sci.*, **55** (4) : 263-271. (1984).

5) 三村 耕 編著 : 家畜行動学, 第2版, 養賢堂, 東京 (1991).

6) NEUHAUS, U. : Milch und Milchgewinnung von Pferdestuten. *Z. Tierz. Züchtungsbiol.*, **73** : 370-392. (1959).

7) 野村和男・楠瀬 良・徳力幹彦・野村晋一 : 日常の管理下における馬の行動の分析. *日畜会報*, **51** (11) : 786-795. (1980).

8) 野村晋一 : 概説馬学. 第3版, 西川書店, 東京 (1986).

9) NRC : Nutrient Requirements of horses. No. 6. (4th Ed.). National Academy Press. Washington DC. (1978).

10) 大島正尚・布施 洋 : サラブレッドの乳汁の乳糖, 電解質およびクエン酸濃度について. *日畜会報*, **52** (8) : 616-618. (1981).

11) 島田和宏・居在家義昭・鈴木 修・小杉山基昭 : 肉用牛における母牛の乳量と子牛の吸乳行動の関係. *日畜会報*, **60** (12) : 1071-1075. (1989).

12) 杉本昌仁・佐藤幸信・川崎 勉 : 北海道和種馬における乾草とエンバクの消化率. *新得畜試研究報告*, **20** : 11-17. (1993).

13) 辻井弘忠 : 木曾馬の吸乳行動について. *信州大学農学部紀要*, **23** : 57-64. (1986).

14) TYLER, S. J. : The behaviour and social organization of the new forest ponies. *Anim. Behav. Monogr.*, **5** : 85-196. (1972).

Observations on the suckling, eating behaviour and the posture of foals in Hokkaido native pony

Masahito SUGIMOTO, Yasuhisa HONGO, Tutomu KAWASAKI

Summary

We observed the behaviour of Hokkaido native ponies during the period from the 1st week to the 15th week of age. Two foals were used for the present investigation. Suckling, feeding activity and posture (standing, squatting and lying) were recorded and analyzed. In this study, foal behaviour was observed for a 12h period (from 6am to 6pm) at 1, 3, 5, 9, 15 weeks postpartum. The foals' suckling and feeding activity was observed and recorded every ten minutes; posture was observed continuously.

Suckling time per 12 hour period decreased with the age of foals. At the 1st week, the suckling time of the two foals was 4,941 and 5,761 seconds respectively. At the 15th week, the suckling time was 1,179 and 735 seconds respectively. Duration of suckling decreased up to the 5th week after birth, but was unchanged from the 5th to the 15th week after birth. The number of sucklings per hour also decreased with age. Suckling activity was observed at all times of the day. The feeding time increased with the age of the foals. The standing posture was most often seen during each observation.

Key Words: Behaviour, Hokkaido native pony

— 短 報 —

アバディーンアンガスならびにヘレフォードにおける 子牛の血清総蛋白質濃度と母牛の乳量ならびに 子牛の増体量との関連性

藤 川 朗・田 村 千 秋

Relationships of serum total protein concentration in calves to milk yield of cows and daily gain of calves in Aberdeen Angus and Hereford.

Akira FUJIKAWA and Chiaki TAMURA

初乳免疫は初生子牛が抗病性を獲得する上で非常に重要であり、初乳抗体の取得に影響する要因の把握が必要である。

人工哺乳が一般的である乳用種においては詳細な調査が行われ、子牛の初乳抗体の取得に対する主要な要因として出生から初乳摂取までの時間、初乳摂取量および初乳中免疫グロブリン濃度が報告されている^{9, 10)}。しかし、自然哺乳が一般的である肉専用種においてはこれら主要因を把握することが困難であり、母牛の泌乳能力と子牛の初乳抗体の取得との関係についての検討はほとんど行われていない。

一方、初乳摂取後の子牛の血清免疫グロブリン濃度と総蛋白質濃度との間には高い相関関係が認められることが知られている^{4, 5)}。このため、迅速かつ安価な測定方法である屈折計による総蛋白質の測定値を初乳抗体の取得の指標として用いる研究が行われている^{1, 6)}。

そこで、本報告ではアバディーンアンガスならびにヘレフォードにおける子牛の血清総蛋白質濃度と母牛の乳量ならびに子牛の日増体量との関連性を検討した。

Key words: serum total protein, milk yield, daily gain

材料と方法

北海道立新得畜産試験場において1989年から1992年(1月~3月)に分娩したアバディーンアンガス25頭とヘレフォード20頭の母牛とその子牛を調査対象とした。母牛と子牛の飼養管理、乳量調査、体重測定および日増体量の算出方法は既報³⁾に示したとおりである。

子牛の血液は生後2日齢の午前8時~9時に採取し、血清分離後屈折計により総蛋白質濃度(TP)を測定した。分娩日に最も近い乳量測定値として分娩後1週目における1日乳量を用い、1乳期の泌乳能力の指標として220日乳量を用いた。また哺乳初期の増体量として生時から60日までの日増体量(60日DG)を用い、離乳前の増体量として生時から220日までの日増体量(220日DG)を用いた。

子牛血清TPに対する独立変数として1週目1日乳量と220日乳量を取り上げ回帰分析を行った。また60日DGと220日DGに対する独立変数として子牛血清TPを取り上げ回帰分析を行った。それぞれの回帰分析は品種別に行い、さらに両品種をプールして行った。回帰係数の一様性検定はSokalとRohlfの方法¹¹⁾によった。

結 果

生後2日齢の子牛血清TPの平均はアバディーンアンガスにおいて $6.04 \pm 0.66 \text{ g/dl}$ であり、ヘレフォードにおいて $5.73 \pm 0.67 \text{ g/dl}$ であった。両品種間に有意差は認められなかった。

意差は認められなかった。

表1に1日乳量と220日乳量に対する子牛血清TPの回帰係数と両形質間の相関係数を品種別に示した。両品種において相関係数は正の有意な値が推定された。推定された回帰係数は両品種とも正の有意な値であった。

Table 1. Regression coefficients (b) of TP on milk yield (Daily at 1wk of age and 220-d) and correlation coefficients (r) between both traits by breeds.

Breed	Daily milk yield at 1 wk of age		Estimated 220-d milk yield	
	b ± SE	r	b ± SE	r
Angus	0.185 ± 0.057^a	0.56**	0.726 ± 0.289^a	0.46*
Hereford	0.206 ± 0.059^a	0.63**	1.356 ± 0.363^a	0.66**
Pooled	0.200 ± 0.041	0.59**	0.970 ± 0.218	0.56**

** : P<0.01, * : P<0.05

a : There were no significant differences between the regression coefficients for both the breeds.

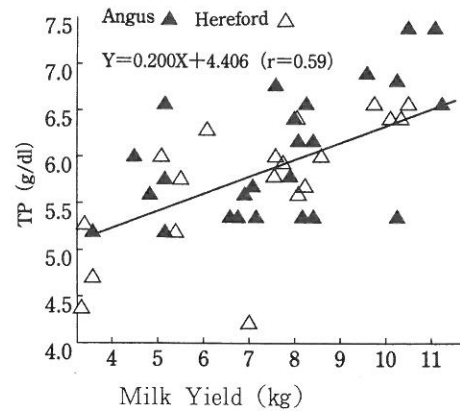


Fig 1. Scatter graph depicting the variation observed for TP by daily milk yield at 1 wk of age.

Table 2. Regression coefficients (b) of DG (60-d and 220-d) on TP and correlation coefficients (r) between both traits by breeds.

Breed	60-d Daily Gain		220-d Daily Gain	
	b ± SE	r	b ± SE	r
Angus	0.060 ± 0.059	0.21N.S.	0.041 ± 0.035	0.23N.S.
Hereford	0.146 ± 0.034	0.71**	0.090 ± 0.028	0.61**
Pooled	0.107 ± 0.035	0.42**	0.067 ± 0.022	0.41**

N.S. : The regression and correlation coefficients were not significant.

** : P<0.01, * : P<0.05

たが、両品種の回帰係数の間に有意差は認められなかった。図1に母牛の1日乳量と子牛血清TPとの散布図を示し、両品種をプールして推定した回帰直線を示した。

表2に子牛血清TPに対する60日DGと220日DGの回帰係数と両形質の相関係数を品種別に示した。相関係数はヘレフォードにおいて有意な高い値が推定されたが、アバディーンアンガスでは有意な値は推定されなかった。ヘレフォードでは血清TPと60日DGとの相関係数が220日DGとの相関係数より高かった。図2に子牛血清TPと60日DGの散布図を示し、ヘレフォードについて推定した回帰直線を示した。

考 察

著者ら^{2,4)}は肉専用種子牛の初乳抗体の取得に対する品種の影響について検討し、ヘレフォード子牛の血清TPはアバディーンアンガスや黒毛和種よりも低かったことを報告している。本調査においても、ヘレフォードの血清TPは有意ではなかったが、アバディーンアンガスより低い数値であった。

久馬ら⁵⁾は黒毛和種において1週目の日哺乳量と子牛血清TPとの相関係数を約0.5と報告している。本調査では子牛血清TPと1週目1日乳量ならびに220日乳量との間に約0.6の高い相関係数が得られており、この報告とほぼ一致していた。したがって、アバディーンアンガスならびにヘレフォードにおいても母牛の泌乳能力が子牛の初乳抗体の取得に大きな影響を及ぼしているものと考えられる。

Muggliら⁷⁾はアバディーンアンガス、ヘレフォードおよびレッドポールの数系統からなる集団において離乳時までの増体と生後24から48時間の子牛血清IgG濃度との間の相関係数が0.19 (P<0.01)であったことを報告している。また、Robinsonら⁸⁾はホルスタイン雌子牛において同時期の子牛血清IgG濃度は生時から180日までの各期間中のDGに対して有意な回帰係数が推定されたことを報告している。本調査ではアバディーンアンガスでは相関係数は有意でなかったが、ヘレフォードでは0.6~0.7の高い値であった。ヘレフォードでは初乳抗体の取得が良好な子牛はその後の発育も良好であることが示唆された。

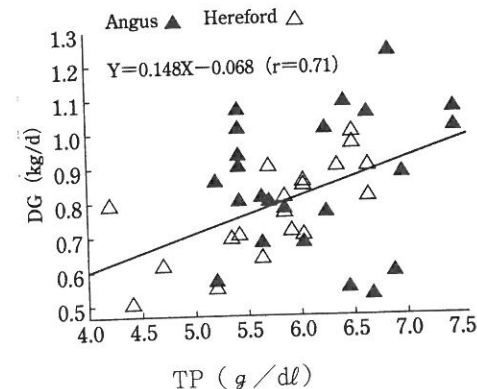


Fig 2. Scatter graph depicting the variation observed for 60-d DG by TP. Regression line is estimated for Hereford.

文 献

- 1) DONOVAN, G.A., L.Badinga, R.J.Collier, C. J. Wilcox and R.K.Braun : Factors influencing passive transfer in daily calves. J. Dairy Sci., **69** : 754-759 (1986)
- 2) 藤川 朗・恒光 裕 : 肉専用種子牛における初乳抗体の取得と発育との関連性, 新得畜試研究報告, **16** : 9-17 (1988)
- 3) 藤川 朗・田村千秋:アバディーンアンガスならびにヘレフォードにおける母牛の乳量と子牛の発育との関連性, 新得畜試研究報告, **20**:1-9 (1993)
- 4) 藤川 朗・恒光 裕・宝寄山裕直・田村千秋:肉専用種子牛の生後2日齢における死亡率と初乳抗体の取得に及ぼす分娩難易度の影響, 肉用牛研究会報, **56** : 34-35 (1993)
- 5) 久馬 忠・菊池武昭・高橋政義・滝沢静雄:肉用種子牛における免疫グロブリンの取得と発育に関する研究, 東北農試研報, **64** : 77-102 (1981)
- 6) Mohammed, H.O., J.K.Shearer and J.S. Brenneman : Transfer of immunoglobulins and survival of newborn calves. Cornell Vet., **81** : 173-182 (1991)
- 7) Muggli, N.E., W.D.Hohenboken, L.V. Cundiff and D.E.Mattson : Inheritance and interaction of immune traits in beef calves. J. Anim. Sci., **64** : 385-393 (1987)
- 8) Robinson, J.D., G.H.Stott and S.K. Denise : Effects of passive immunity on growth and survival in the dairy heifer. J. Dairy Sci., **71** : 1283-1287 (1988)
- 9) Stott, G.H., D.B.Marx, B.E.Menefee and G.T.Nightengale : Colostral immunoglobulin transfer in calves. III. Amount of absorption. J. Dairy Sci., **62** : 1902-1907 (1979)
- 10) Stott, G. H. and A.Fellah : Colostral immunoglobulin absorption linearly related to concentration for calves. J. Dairy Sci., **66** : 1319-1328 (1983)
- 11) Sokal, R. R. and F. J. Rohlf : Biometry 2nd edition. pp 499 W.H.Freeman and Company, New York (1981)

— 短 報 —

トウモロコシサイレージ主体飼養が乳用後継牛の
乾物摂取量に及ぼす影響糟谷 広高・黒沢 弘道*・原 悟志・大坂 郁夫
小倉 紀美**・遠谷 良樹Effect of Corn Silage-Based Ration
on Feed Intake of Dairy HeiferHirotaka KASUYA, Hiromichi KUROSAWA, Satoshi HARA, Ikuo OSAKA
Noriyoshi OGURA and Yoshiki TOOYA

育成期におけるサイレージの給与は、反芻胃の発達阻害や体型的なくずれの誘因となることが従来から指摘されており¹⁾、また、乾物摂取量が低下するとの報告^{2, 3)}があるため推奨されておらず、乾草の単用給与が慣行の飼養法となっている。しかし、トウモロコシサイレージの場合、乾草との混合給与により乾物摂取量が増加したとの報告もあり⁴⁾、必ずしも一致した見解には至っていない。北海道の畑作酪農地帯での主要自給飼料であるトウモロコシサイレージは、嗜好性が良く、その高エネルギー価から濃厚飼料の代替効果が期待できるなど多くの利点を備えているため、我が国でも、従来から泌乳期や乾乳期における給与効果の検討が行われているが^{5, 6, 7, 8)}、育成期全般にわたってその給与効果を検討した報告はない。

そこで、本試験ではトウモロコシサイレージ主体給与が乳用後継牛の乾物摂取量、反芻胃機能に及ぼす影響を明らかにするため、乾草併給時におけるトウモロコシサイレージの給与効果について検討した。

* 現在 自営

** 北海道立根釧農業試験場

Key words: Heifer, Corn silage, DMI

材 料 と 方 法

供試牛は北海道立新得畜産試験場で哺育したホルスタイン雌牛10頭を用いた。試験処理期間は、離乳時から分娩予定日の2週間前までとした。供試牛は、1991年3月13日から1991年3月25日までに生まれた6頭をトウモロコシサイレージ区(以下、CS区)とし、1991年3月31日から1991年5月8日までに生まれた4頭を乾草区とした。粗飼料は、CS区はトウモロコシサイレージと乾草を乾物比1:1で混合給与し、乾草区は乾草のみを給与した。両区ともスーパーハッチにより群飼した。給与量は、両区とも、毎日約10%の残食が出る程度の量とした。濃厚飼料は、両区とも配合飼料と大豆粕をトップドレスで給与し、日増体が日本飼養標準の中間値である0.7kg/日になるように調整した。体重は2週間毎、体尺値は毎月測定し、第一胃容積発達を見るため、腹囲も同時に測定した。3か月齢から3か月毎に、ストールにおいて個体毎の採食量、消化率の測定および第1胃液の採取を行った。消化率は、酸化クロム法により行った。第一胃液は、ルーメンカテーターにより経口的に採取した。一般分析用サンプルは、CSおよび乾草では1か月毎に、また配合飼料と大豆粕については購入時にそれぞれ採取した。

分析方法は、乾物および粗蛋白質含量については常法で、ADFおよびNDF含量については、阿部らの方法⁹⁾により分析した。TDNは、めん羊を用いた消化試験により算出した。供試飼料の一般成分について表1に示した。第一胃液について、pHはpHメーター

(TOA HM-305)を用いて、アンモニア態窒素はConway & O'mallyの微量拡散法により、低級脂肪酸(VFA)は、ガスクロマトグラフィー(SHIMADZU GC-15A)により、それぞれ分析した。

Table 1. Chemical composition and nutritive value of feeds

	Dry matter	Crude protein	Ether extract	NDF	ADF	TDN
	(%)	(% of dry matter)				
Corn silage	32.0	8.2	2.9	42.6	24.7	69.3
Hay	86.2	8.8	1.9	70.8	43.1	65.5
Soybean meal	87.5	50.1	0.9	11.8	8.4	84.9
Formula feed	87.3	20.7	3.9	14.7	8.8	84.7
Starter	85.0	23.4	3.3	12.1	6.5	85.0

結果および考察

本試験において、育成期におけるトウモロコシサイレージ給与のCS区は、良質切断乾草との併給により、

乾草単用給与した乾草区と同等かそれ以上の乾物摂取量で推移した。しかし、18か月齢以降では逆に低下した(表2)。従来よりサイレージのような発酵飼料は、その飼料中の有機酸やアミン類、アンモニア態窒素の

Table 2. The changes of dry matter, CP, NDF and TDN intake of dairy heifer fed connsilage or hay-based ration

Age (months)	Dry matter		Crude protein		NDF		TDN	
	CS	HAY	CS	HAY	CS	HAY	CS	HAY
3	2.97	2.65	0.50*	0.44*	1.25*	0.95*	2.12	1.87
6	4.02	4.45	0.59*	0.65*	1.91*	2.54*	2.78	2.98
9	4.88	5.28	0.59*	0.69*	2.52*	2.99*	3.21	3.62
12	6.40*	5.80*	0.68*	0.81*	3.46	3.49	4.27*	3.66*
15	8.02	7.44	1.02*	1.23*	3.99*	4.44*	5.09	4.93
18	8.74*	9.18*	1.06*	1.39*	4.53*	5.37*	5.95*	6.43*
21	8.36	9.03	1.10	1.20	4.00*	5.30*	5.09	5.98

Means separated by asterisk were significantly different (* : P<0.05)

影響により乾物摂取量を低下させると考えられているが¹⁰⁾、トウモロコシサイレージ給与の場合、その嗜好性が優れていることから、乾物摂取量を高める効果が報告されている⁵⁾。しかし、その効果は、給与された飼料の養分含量や併給する飼料の品質や給与比率によって変わってくる⁵⁾ものと思われる。育成期は、反芻胃が発達する時期であるため、トウモロコシサイレ

ージ主体給与による影響は、成牛とは異なってくるということが予想される。GRIEVEらは育成期におけるトウモロコシサイレージ給与の試験の中で、トウモロコシサイレージ単用および乾草、牧草サイレージと組み合わせによる違いを検討し、トウモロコシサイレージ単用給与の乾物摂取量の推移は、18か月齢まで他の併用給与と比べ差がなかったが、18か月齢以降、乾草併給

より低い傾向を示したと報告している^{11,12)}。これらの試験では我が国で慣行となっている育成期における乾草単用給与との比較は行っていないが、本試験ではトウモロコシサイレージと乾草の併給は、乾草単用給与と同じ乾物採食量を示し、育成後期においては低い傾向を示した。これは、本試験においてCS区は約1か月受胎月齢が早く(CS区14.5か月齢、HAY区15.9か月齢)、増体、妊娠による影響が関与しているものと推測されるが明らかではない。しかし、成牛においても乾乳期のトウモロコシサイレージ給与による疾病等

の問題も報告されていることから、今後、育成期におけるトウモロコシサイレージ主体飼養においても、妊娠期における影響を検討する必要があると思われる。

表3に育成期における消化率について示した。本試験では、離乳後すなわち2か月齢以降、トウモロコシサイレージ給与の処理を行ったが、CS区はHAY区と比較して12か月齢までは、乾物消化率に差は認められなかった。また、CP消化率、NDF消化率は、CS区は乾草区に比べて低い傾向を示した。育成期における反芻胃機能、とくに消化機能は、3か月齢前までに成

Table 3. The changes of Apparent digestibility and nutritive value for dairy heifer fed corn silage or hay-based ration

Age (months)	Apparent digestibility (%)						Nutritive value TDN	
	Dry matter		Crude protein		NDF		CS	HAY
	CS	HAY	CS	HAY	CS	HAY	CS	HAY
3	71.9	70.7	75.5	72.5	61.9	52.2	71.1	71.0
6	68.6	67.7	66.8	69.6	62.3	65.6	69.1	66.9
9	65.1	69.4	61.9*	70.2*	57.7*	67.6*	65.6	68.5
12	66.5	62.9	58.9*	66.1*	61.0	62.8	66.5*	63.1*
15	62.7*	68.6*	62.5*	75.9*	54.0*	68.3*	63.2	66.2
18	65.6*	71.7*	61.8*	71.4*	62.2*	71.4*	62.0	68.6
21	69.9	65.7	71.0	67.8	68.1	72.2	67.0	66.0

Means separated by asterisk were significantly different (* : P<0.05)

牛並に発達することが示されている¹³⁾。両区のCP摂取量、NDF摂取量に差があることから、これらの養分の消化率の差は、トウモロコシサイレージの影響より養分摂取量の影響によるもの大きいと考えられる

が明らかではない。

第一胃液のアンモニア態窒素はHAY区で高い傾向を示した(表4)。アンモニア態窒素含量は、CP摂取量によって影響することから¹⁴⁾、本研究においても、

Table 4. The changes of pH, NH₃-N and VFA in Ruminal fluid for dairy heifer fed corn silage or hay-based ration

Age (months)	pH		NH ₃ -N (mg/dl)		Total VFA (mol/dl)		Acetate (mol/dl)		Propionate (mol/dl)		A/P ratio	
	CS	HAY	CS	HAY	CS	HAY	CS	HAY	CS	HAY	CS	HAY
3	7.23	7.39	7.2	7.3	3.16	4.06	2.19	2.84	0.65	0.84	3.61	3.50
6	7.26	7.41	5.8	5.6	5.79*	3.34*	4.50*	2.56*	0.96	0.57	4.48	4.40
9	7.22	7.13	4.1*	6.3*	5.20	6.27	3.81	4.78	0.86	0.96	4.44	5.08
12	6.73	6.87	3.8*	5.2*	5.76	6.59	4.27	5.02	1.01	1.04	4.26*	4.83*
15	6.94	7.10	4.2	5.1	4.89	7.20	3.58	5.50	0.84	1.09	4.29*	5.03*
18	7.09	7.16	3.7	4.7	6.95*	8.93*	5.20*	6.72*	1.14	1.36	4.59*	4.93*
21	7.22	7.19	4.9*	7.2*	7.37	9.43	5.48	7.00	1.17	1.50	4.68	4.68

Means separated by asterisk were significantly different (* : P<0.05)

アンモニア態窒素の差は、CP摂取量の差によるものと考えられる。VFAは、第一胃粘膜上皮の成長に影響するが¹³⁾、本試験でCS区のVFA生産量は、乾草区と比較して低い傾向を示した。しかし、6か月齢、18か月齢を除いて有意な差が示されなかったことから、第一胃粘膜上皮の発達において、両区に差はなかったものと推測された。

以上のことにより育成期におけるトウモロコシサイレージ主体飼養は、第一胃機能の発達を阻害せず、乾草単用給与並の乾物摂取量で推移することが示された。しかし、育成後期では乾物摂取量、消化率、VFA生産が低い傾向もみられたため、今後、初産分娩後の乾物摂取量、乳生産の推移を検討する必要があると思われる。

文 献

- 1) 川崎 勉・藤田 裕・橋爪徳三：幼齢牛における粗飼料の利用能力。帯大研報，7：271-279 (1971)。
- 2) 若雌牛に対する牧草サイレージの多量給与に関する試験成績。昭和45年度北海道農業試験会議資料 (1970)。
- 3) 西邑隆徳・佐藤幸信・齊藤利明・裏 悦次：ホルスタイン去勢牛の育成期におけるトウモロコシサイレージ給与量が産肉性に及ぼす影響。新得畜試研究報告，17：41-51 (1990)。
- 4) J. D. QUIGLEY, III, R. E. JAMES, and M. L. MCGILLIARD: Dry Matter Intake in Dairy Heifers. 1. Factors Affecting Intake of Heifers Under Intensive Management. J. Dairy Sci., 69: 2855-2862 (1986)。
- 5) 出岡謙太郎・岡本全弘・原 悟志・伊東春季：とうもろこしサイレージを主体とする混合飼料の給与が飼料摂取量と乳生産に及ぼす影響。新得畜試研究報告，16：25-30 (1988)。
- 6) 坂東 健・出岡謙太郎・原 悟志・森 清一・南

橋 昭：トウモロコシサイレージ主体混合飼料における粗飼料と濃厚飼料の比率並びに粗蛋白質含量が高泌乳牛の泌乳前期における飼料摂取量と乳生産に及ぼす影響。新得畜試研究報告，18：47-58 (1991)。

- 7) 坂東 健・出岡謙太郎・岡本全弘・曾根章夫：チモシー牧草とトウモロコシサイレージの採食比率が飼料摂取量および乳生産に及ぼす影響。新得畜試研究報告，16：1-7 (1988)。
- 8) 坂東 健：トウモロコシサイレージを基本飼料とする乳生産に関する飼養学的研究。北海道立農業試験場報告，81：16-22 (1993)。
- 9) 阿部 亮：炭水化物を中心とした飼料分析法とその飼料栄養価評価法への応用。畜試研資，2：16-17, 23-25 (1988)。
- 10) National Research Council: Nutrient Requirements of Dairy Cattle, Sixth Revised Edition: 4-5 (1988)。
- 11) D.G.GRIEVE, J.B.STONE, G.K.MACLEOD and R. A. CURTIS: All Silage Forage Programs for Dairy Cattel. 1. Heifer Performance from Birth to Eighteen Months of age. J. Dairy Sci., 59: 912-918 (1975)。
- 12) D.G.GRIEVE, J.B.STONE, G.K.MACLEOD and R.A.CURTIS: All Silage Forage Programs for Dairy Cattel. 2. Performance Through Three Lactations. J. Dairy Sci., 63: 594-600 (1980)。
- 13) 浜田龍夫：子牛の早期離乳技術に関する研究 1. 代用乳に用いる脱脂粉乳の品質の検討 2. 固形物飼料摂取と反芻胃の発達との関係。畜産試験場年報 23。(昭和58年度)，：125-139 (1984)。
- 14) D. W. CLAYPOOL, M. C. PANGBORN and H. P. ADAMS: Effect of Dietary Protein on High-Producing Dairy Cows in Early Lactation. J. Dairy Sci., 63: 833-837 (1980)。

場外学術雑誌掲載論文抄録

Bovine Parthenogenetic Blastocysts Following In Vitro Maturation and Oocyte Activation With Ethanol

Akira MINAMHASHI, Andrew J. WATSON¹⁾, Patricia H. WATSON²⁾, Robert B. CHURCH¹⁾ and Gilbert A. SCHULTZ¹⁾

Theriogenology Vol 40 No. 8 63-76 (1993)

The appropriate in vitro bovine oocyte maturation and ethanol activation conditions for preimplantation bovine embryo parthenogenetic development to the blastocyst stage were investigated. A 7% ethanol concentration significantly enhanced ($P < 0.05$) the proportion of activated, in vitro-matured bovine oocytes (7% ethanol, $83.4 \pm 3.2\%$ versus 0% ethanol, $63.9 \pm 2.0\%$). The proportion of activated oocytes was significantly higher ($P < 0.05$) by treatment with 7% ethanol for a minimum of 2 minutes (2 minutes, $89.8 \pm 4.0\%$ versus 0.5 minutes $63.4 \pm 4.9\%$). Oocyte maturation for periods ranging from 30, 34, 38 and 44 hours resulted in a significant increase ($P < 0.05$) in the proportion of activated oocytes, and in oocytes displaying 2 or 3 pronuclei versus oocytes matured for 26 hours. The pro-

portion of cleaved, activated oocytes (2-cell stage), 4-cell stage and parthenogenetic morula /blastocysts was significantly higher ($P < 0.05$) within the 34-hour oocyte maturation treatment group. Although the 44-hour oocyte maturation treatment group displayed the highest proportion of activated oocytes with 2 pronuclei, it did not display the highest cleavage frequency, possibly due to the effects of postovulatory aging. Several morphologically normal parthenogenetic bovine blastocysts developed from oocytes that were in vitro matured for 34 hours. The ability to produce such parthenogenetic embryos will eventually facilitate investigation into the role(s) of the maternal and paternal genomes during bovine early development.

1) Department of Medical Biochemistry University of Calgary, Calgary, Alberta, Canada T2N 4N 1

2) Department of Medicine University of Calgary, Calgary, Alberta, Canada T2N 4N 1

Detection of *Theileria sergenti* Infection in Cattle by Polymerase Chain Reaction Amplification of Parasite-Specific DNA

Masayuki TANAKA¹⁾, Sadao ONOE, Takashi MATSUBA²⁾, Shigeji KATAYAMA¹⁾, Morimasa YAMANAKA¹⁾, Hiromi YONEMICHI³⁾, Kazuhisa HIRAMATSU¹⁾, Byeongkirl BAEK⁴⁾, Chihiro SUGIMOTO³⁾, and Misao ONUMA²⁾

Journal of Clinical Microbiology, Vol 31 No10. 2565-2569, (1993)

A pair of synthetic oligonucleotide primers, designed from the gene encoding a 32-kDa intraerythrocytic piroplasm surface protein of *Theileria sergenti*, were used to amplify parasite DNA from the blood of *T. sergenti*-infected cattle by means of the polymerase chain reaction (PCR). PCR-amplified DNA was examined by electrophoresis and by dot blot or microplate hybridization using a parasite-specific cDNA probe. PCR was specific for *T. sergenti*, since no amplification was detected with DNA from *Anaplasma centrale*,

Babesia ovata, uninfected erythrocytes, and leukocytes. This method was sensitive enough to detect about 4.5 parasites per μ l of blood with a 10- μ l sample volume. Moreover, of 66 specimens from grazing cattle, 40 were microscopically positive, whereas PCR revealed that 54 samples were positive. Therefore, PCR provides a useful diagnostic tool for detecting *T. sergenti*-infected cattle, and it is significantly more sensitive than the current methods.

1) 京都微研 2) 北海道大学 3) 滝川畜産試験場 4) CHONBUK NATIONAL UNIVERSITY

ダイレクト法による牛凍結胚の移植試験成績

山本 裕介・南橋 昭・陰山 聡一・森安 悟・芦野 正城
北野 則泰・伊東 季春・紋別市農業共済組合

北海道牛受精卵移植研究会会報 第12号 27-30 (1993)

耐凍剤にエチレングリコールまたはプロピレングリコールを用いて牛胚を凍結し、融解後耐凍剤を除去することなく直接移植するダイレクト法について、その移植成績を検討した。エチレングリコールでは60.5% (23/38)、プロピレングリコールでは46.7% (14/30) の受胎率であり、対照区

の56.3% (9/16) に比べ有意差は認められなかった。従って、ダイレクト法による凍結胚移植では、グリセリンを耐凍剤とした従来の方法と同等の受胎率が得られ、実用性の高い凍結胚移植技術として期待できることが示された。

牛と体に対する低電圧電気刺激処理が肉質に及ぼす影響

本郷 泰久・川崎 勉・田村 千秋

北農 61巻 3号 67-70 (1994)

9頭のヘレフォード去勢牛の枝肉に対して、40V、13.8Hzの低電圧電気刺激処理を行い、上腕三頭筋、胸最長筋、半腱様筋の理化学性状に及ぼす影響を検討し、以下のような結果を得た。

1. と畜当日のクッキングロス、どの部位においても電気刺激処理を行った場合に多くなり、筋肉構造が崩壊していることが示唆された。

2. と畜当日の胸最長筋および半腱様筋の剪断力価は、電気刺激処理区で小さい傾向にあり、この2部位

の筋肉において死後硬直の発現を抑制する効果が確認された。上腕三頭筋においては電気刺激処理の効果が明らかではなかった。

3. 電気刺激処理は肉色を明るく、かつ鮮やかにする効果を持ち、特に半腱様筋においてこの効果が現れやすいものと思われた。また、肉色はカット後2日目以降に退色していくが、明度は電気刺激処理区で高かった。

細菌検査および個体乳の体細胞数を基にした牛乳房炎の診断とその治療成績

平井 綱雄・工藤 卓二¹⁾・米道 裕彌¹⁾・尾上 貞雄・恒光 裕²⁾
松井 義貴・櫻井 辰壽³⁾・篠原 靖彦

北獣会誌 37巻 4号 3-7 (1993)

1988年1月から1991年12月の期間に新得畜産試験場において行われた牛乳房炎の泌乳期治療の成績をまとめた。新得畜産試験場では分娩後3日以内、個体乳の体細胞数が10万(個/ml)を越える場合、乳汁あるいは乳房に異常が認められる場合および乾乳前に分房乳の細菌検査を行い、この結果を基に乳房炎牛の治療を行っている。治療は乳房炎軟膏の注入および必要に応じた抗生物質の全身投与などを原則として1日1回、3日間連続を1クールとして行った。治療終了5日後に起因細菌が検出されなくなった分房の割合は、

Staphylococcus aureus 95.9% (71/74分房), *Streptococcus uberis* 87.8% (36/41分房), *Streptococcus dysgalactiae* 100% (13/13分房)および *Coliform* 93.5% (29/31分房)であり、これに要した平均治療回数はそれぞれ、1.2, 1.3, 1.4および1.1クールであった。これらの結果から乳房炎罹患牛の早期発見に努め、感受性のある抗生物質による治療を行えば、一般的に治療率が乾乳期治療に比べて低いとされる泌乳期治療においても高い治療率が得られることが示唆された。

1) 北海道立滝川畜産試験場 2) Onio State University
3) 自営

Effects of Maternal Genetics on Passive Immunity in Beef Calves

A. FUJIKAWA, H. TSUNEMITSU¹⁾, H. HOKIYAMA²⁾, and C. TAMURA

Proceedings of the 5th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production Vol.20 302-305 (1994)

Serum protein (SP) were measured in calf at 2 days of age from a purebred herd comprising Angus, Hereford and Japanese Black. Data on SP was analyzed by the least-squares analysis of variance to examine the environmental effects and to estimate variance components of sire, maternal grandsire and dam. The breed, year, month, age of dam, calving ease and regressions on birth weight had

significant effects on SP. The direct heritability estimates for SP were low and nonsignificant. However, the maternal heritability estimates for SP were 0.53, 0.44 and 0.69 for Angus, Hereford and Japanese Black, respectively. The repeatabilities of dams were also estimated to be moderate to high. These estimates indicate that the passive immunity in beef calves could be improved by selection of dams.

1) Food Animal Health Research Program, Ohio Agricultural Research and Development Center, The Ohio State University, Wooster, Ohio 44691, USA

2) Takikawa Animal Research Center of Hokkaido, Takikawa, Hokkaido 073, JAPAN

新得畜試研究報告 No.21 1994. 11

平成6年11月15日 印刷

平成6年11月25日 発行

編集兼
発行所 北海道立新得畜産試験場
北海道上川郡新得町西4線40
☎ (01566) 4-5321

印刷所 ソーゴ印刷株式会社
帯広市西16条北1丁目25番地
☎ (0155) 34-1281代
