

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 22 号

Bulletin of the
Hokkaido Prefectural Shintoku
Animal Husbandry Experiment Station

No. 22

平成10年 8 月
1998

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 22 号

目 次

黄色ブドウ球菌に対するモノクローナル抗体の作製および同抗体を用いた ELISA法による牛の乳汁由来黄色ブドウ球菌の検出 平井 綱雄・恒光 裕・工藤 卓二・米道 裕爾・森 清一	1
泌乳初期におけるビートパルプペレットの給与割合の違いが乾物摂取量, 第一胃内容液性状および乳生産に及ぼす影響 大坂 郁夫・原 悟志・糟谷 広高・小倉 紀美・遠谷 良樹	9
馬におけるチモシー乾草・サイレージの栄養価および可消化エネルギーの推定 前田 善夫・出口健三郎・田村 忠	17
場外学術雑誌掲載論文抄録	25

Bulletin
of the
Hokkaido Prefectural Shintoku
Animal Husbandry Experiment Station

No. 22

Contents

Originals

- Detection of *Staphylococcus aureus* Isolated from Bovine Milk by Enzyme-Linked
Immunosorbent Assay, Using Monoclonal Antibody.
Tsunao HIRAI, Hiroshi TSUNEMITSU, Takuji KUDO,
Hiromi YONEMICHI and Kiyokazu MORI 1
- The Effect of Different Feeding Level of Beet Pulp Pellet on Dry Matter Intake,
Rumen Fluid and Milk Production of Multiparous Cows in Early Lactation.
Ikuo OSAKA, Satoshi HARA, Hirotaka KASUYA,
Noriyoshi OGURA, Yoshiki TOOYA 9
- Nutritive Value of Timothy Hay and Silage and Prediction of Digestible Energy in Horses
Yoshio MAETA, Kenzaburo DEGUCHI and Tadashi TAMURA 17

Others

- Summaries of papers by staff appearing in other scientific journals 25

黄色ブドウ球菌に対するモノクローナル抗体の作製および同抗体
を用いた ELISA 法による牛の乳汁由来黄色ブドウ球菌の検出

平井 綱雄・恒光 裕*・工藤 卓二**・米道 裕爾***・森 清一

黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) の標準株の一つである *Sta. aureus* Wood46 に対するモノクローナル抗体を作製した。このモノクローナル抗体は *Sta. aureus* Wood46 の他、これも標準株の一つである *Sta. aureus* Cowan I との反応が認められたのに対して、*Staphylococcus intermedius*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus hyicus*, *Staphylococcus xylosus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis* および *Escherichia coli* の標準株との反応は認められなかった。このモノクローナル抗体とウサギの免疫血清から作製した同菌に対するポリクローナル抗体を用いたサンドイッチ ELISA 法による *Sta. aureus* Wood46, *Sta. aureus* Cowan I および牛の乳汁から分離された *Sta. aureus* の検出について検討した結果、標準株および野外株ともに 10^7 ないし 10^8 CFU/ml 以上の濃度で検出が可能であることが明かとなった。

乳房炎の原因菌のなかで *Staphylococcus aureus* (以下 *Sta. aureus*) は最も多く検出される細菌の一つであり¹⁶⁾・¹⁷⁾、臨床型乳房炎になると治癒率が低くなると報告されている¹⁴⁾。乳汁中の同菌を検出する方法としては乳汁培養法が最も一般的であるが、培養から細菌の同定までに時間がかかり、多検体処理にもあまり適していない。このため、同菌の簡易で正確な検出法の開発が待たれている。

Köhler と Milstein¹⁰⁾ がその作製法を確立したモノクローナル抗体は単一の抗原を認識するため特異性が高いという特長を持っており、これを細菌の検出に応用しようとする試みが行われてきている。

その一つは ELISA 法と組み合わせて細菌の表面抗原を検出しようとするものである^{1, 2, 3, 5, 6, 12, 15)}。モノクローナル抗体ではなくポリクローナル抗体を用いた報告もある^{11, 13, 19)}。これ以外にも凝集反応を利用した細菌の同定、検出を行う方法がポリクローナル抗体を用いる方法も含めて検討されている^{4, 7, 8)}。

本試験では抗原との反応における特異性の高さを考慮して、*Sta. aureus* の標準株の 1 つである *Sta. aureus* Wood46 に対するモノクローナル抗体を作製し、この抗体とウサギの免疫血清から作製したポリクローナル抗体を用いたサンドイッチ ELISA 法による牛の乳汁から分離された *Sta. aureus* の検出について検討した。

材料および方法

I *Sta. aureus* Wood46 に対するモノクローナル抗体の作製*Sta. aureus* Wood46 に対するモノクローナル抗体産生ハイブリドーマの作製

ホルマリン不活化 *Sta. aureus* Wood46 2×10^9 CFU/ml とフロイントのコンプリートアジュバントを等量混合し、油中水滴の状態にしたもの $200 \mu\text{l}$ を BALB/c マウスの腹腔内に注射した。その 2 週間後にアジュバントをフロイントのインコンプリートアジュバントに変更し、同様に油中水滴の状態にしたもの $200 \mu\text{l}$ を同じマウスの腹腔内に注射した。さらにその 2 週間後にホルマリン不活化 *Sta. aureus* Wood46 2×10^8 CFU を尾静脈内に注射した。その 3 日後に脾臓を取り出し細胞浮遊液を調製し、脾細胞とマウスミエロマ細胞 (P 3 U 1) をポリエチレングリコール 4000 を用いて融合させた。これらの細胞を HAT 培地に浮遊させ 96 穴マイクロプレートを用いて 37°C 、5% CO_2 下で培養した。その後、ハイブリドーマの増殖の認められたウェルの中から以下に示す ELISA 法を用いたスクリーニングにより培養上清中の抗体濃度の高いウェルを選択した。選択されたハイブリドーマから限界希釈法によるクローニングによりモノクローン化された抗体産生ハイブリドーマを得た。

Sta. aureus に対する抗体測定 ELISA 法ホルマリン不活化 *Sta. aureus* を炭酸緩衝液 (pH

*現在 農林水産省家畜衛生試験場北海道支場

**現在 北海道立中央農業試験場

***現在 北海道立滝川畜産試験場

9.5)で 2.0×10^8 CFU/mlに調製する。この溶液を100 μ lずつ96ウェルマイクロプレートの各ウェルに分注し、4℃で一昼夜静置する。0.05% Tween20 加PBS (PBS Tween)で4回洗浄する。

ウシプール血清を150 μ lずつ各ウェルに分注し、室温で1時間静置する。PBS Tweenで4回洗浄する。培養上清を100 μ l加え、37℃で2時間静置する。PBS Tweenで4回洗浄する。ペルオキシダーゼ標識抗マウスIgA + IgG + IgM 0.1 mlを各ウェルに分注し、37℃で2時間静置する。PBS Tweenで4回洗浄する。基質・発色液 (オルソフェニレンジアミン20mg および30% H_2O_2 10 μ lをクエン酸緩衝液 (pH4.8) 50mlに溶解したもの)を100 μ lずつ各ウェルに分注し、遮光して室温で30分間静置する。3 N H_2SO_4 を50 μ lずつ各ウェルに分注し、反応を停止する。マイクロプレートリーダーで吸光度(測定波長492nm, 対照波長620nm)を測定する。

モノクローナル抗体のクラス・サブクラスの決定

免疫拡散法を用いたキット (ICN社) により以下の方法を行った。

プレートを室温にする。免疫グロブリン各クラス・サブクラスに対する抗血清9~10 μ lを小さいウェルに加える。室温で15分間静置する。陽性コントロールおよび試料 (培養上清) 75 μ lを中央の大きなウェルに加える。保湿箱に入れ、室温で24時間静置後沈降線の有無を観察する。

モノクローナル抗体の精製

血清非添加RPMI1640で 2.0×10^7 個/mlに調製した前述のハイブリドーマを、免疫抑制剤のプリスタン (2, 6, 10, 14-テトラメチルペンタデカン) 500 μ lを腹腔内に注射して3週間以上経過したBALB/cマウスの腹腔内に注射した。細胞注射1~2週間後、腹部が肥大した後開腹して腹水を採取した。腹水からヒドロキシアパタイトカラムを用いた高速液体クロマトグラフによりモノクローナル抗体の精製を行った。

モノクローナル抗体と*Sta. aureus*標準株の特異的結合の確認

今回作製したモノクローナル抗体 (クラスIgM) と*Sta. aureus*の特異的結合を確認するため、*Sta. aureus* Wood46および免疫グロブリンと非特異的に結合する性質を持つプロテインAを多く含む*Sta. aureus* Cowan I⁹⁾ とこのモノクローナル抗体およびマウスIgMとの反応をELISA法を用いて調べた。ELISA法は前述の方法と同様であるが抗原吸着に用いた細菌の

濃度は 5×10^8 CFU/mlである。

モノクローナル抗体と*Sta. aureus*標準株および野外株との反応性

標準株である*Sta. aureus* Wood46, *Sta. aureus* Cowan I および牛の乳汁から分離された*Sta. aureus*野外株1株と今回作製したモノクローナル抗体との反応性をELISA法により調べた。ELISA法は基本的には前述の方法と同様であるが、吸着に用いた細菌の濃度は各細菌とも $10^9 \sim 10^{12}$ CFU/mlに段階的に調製した。また、モノクローナル抗体は400倍希釈 (IgM0.425 μ g/ml) で用いた。

モノクローナル抗体と*Sta. aureus*以外の細菌の標準株との反応性

乳汁中から検出される主な細菌あるいは*Sta. aureus*と生化学的性状が類似している細菌の標準株とモノクローナル抗体との反応性をELISA法により調べた。今回用いた細菌は、*Staphylococcus intermedius* (ATCC 29663), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 14990), *Staphylococcus hyicus* subsp. *hyicus* (ATCC 11249), *Staphylococcus xylosus* (DSM 20226), *Streptococcus agalactiae* (NCTC 8181), *Streptococcus dysgalactiae* (NCDO 2023), *Streptococcus uberis* (DSM 20569), *Escherichia coli* (ATCC 11775) である。

II モノクローナル抗体およびポリクローナル抗体を用いたサンドイッチELISA法による*Sta. aureus*の検出

Sta. aureus Wood46に対するポリクローナル抗体の作製

Sta. aureus Wood46に対するポリクローナル抗体をYOSHIDAの方法¹⁸⁾に準じて作製した。ホルマリン不活化*Sta. aureus* Wood46を滅菌した0.01M PBSで 1.0×10^9 CFU/mlに調製し、免疫原とした。免疫動物はウサギを用い、免疫原の接種は耳静脈内に、3日間連続を4日間間隔で4回行うというスケジュールで行った。

最終免疫後2週間目に採血し、血清を33%飽和硫酸アンモニウムにより塩析して、IgGを精製した。

モノクローナル抗体およびポリクローナル抗体を用いたサンドイッチELISA法における*Sta. aureus*および他の細菌標準株の反応性

以下に示したサンドイッチELISA法における*Sta.*

aureus および他の細菌の標準株の反応性を検討した。検討した標準株は前述と同様である。各標準株は1%ホルマリンで不活化した後、0.01M PBSにより $10^9 \sim 10^{12}$ CFU/mlに調製した。

サンドイッチELISA法

抗*Sta. aureus* Wood46ポリクローナル抗体を炭酸緩衝液で400倍に希釈し、96ウェルマイクロプレートに100 μ lずつ分注し、4℃で一昼夜静置する。PBS Tweenで4回洗浄する。1%ウシ血清アルブミン加PBSを150 μ lずつ各ウェルに分注し、室温で1時間静置する。PBS Tweenで4回洗浄する。細菌浮遊液を100 μ l加え、37℃で2時間静置する。PBS Tweenで4回洗浄する。牛プール血清を150 μ lずつ各ウェルに分注し、室温で1時間静置する。PBS Tweenで4回洗浄する。抗*Sta. aureus* Wood46モノクローナル抗体 (IgM0.425 μ g/ml) を100 μ lずつ各ウェルに分注し、37℃で2時間静置する。PBS Tweenで4回洗浄する。ペルオキシダーゼ標識抗マウスIgMを100 μ lずつ各ウェルに分注し、37℃で2時間静置する。PBS Tweenで4回洗浄する。基質・発色液 (前述したものと同様) を100 μ lずつ各ウェルに分注し、遮光して室温で30分間静置する。

3 N H_2SO_4 を50 μ lずつ各ウェルに分注し、反応を停止する。マイクロプレートリーダーで吸光度 (測定波長492nm, 対照波長620nm) を測定する。

モノクローナル抗体およびポリクローナル抗体を用いたサンドイッチELISA法による*Sta. aureus*野外株の検出

十勝支庁管内6戸 (3市町) の酪農家の搾乳牛の乳汁から分離された24株の*Sta. aureus*を1%ホルマリンで不活化した後、0.01M PBSにより 10^9 から 10^5 CFU/mlの各濃度に調製し、前述したELISA法による吸光度の測定を行った。

*Sta. aureus*の増菌法

液体培地および乳汁中における*Sta. aureus* Wood46の増殖の比較を行った。液体培地としてはブレインハートインフュージョン培地を用い、乳汁は、5%子牛血液加寒天培地に塗布後、37℃、18時間培養を行い、細菌のコロニーが認められなかったものを用いた。培養開始時の*Sta. aureus* Wood46の濃度をほぼ $10, 10^2, 10^3$ CFU/mlに調製し、37℃で振盪培養を行った。生菌数は培養開始時、6時間後、12時間後、18時間後および24時間後に前述した血液寒天培地を用いた培養法により測定した。

結 果

本試験で作製したモノクローナル抗体は免疫拡散法を用いたキットで免疫グロブリン各クラス・サブクラスに対する抗血清のうちIgMに対する抗血清との間にのみ沈降線が認められた。前述の方法によりマウスの腹水から精製を行い、IgM濃度が170 μ g/mlのモ

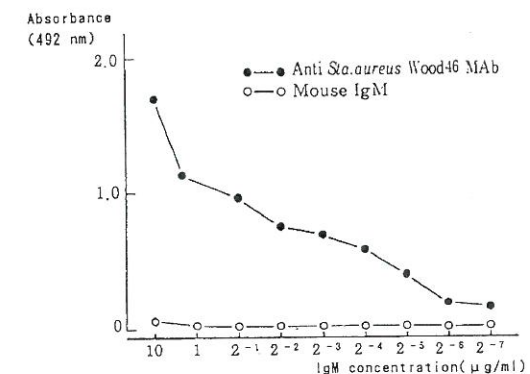


Fig 1. ELISA absorbance values of serial dilution of anti-*Sta. aureus* Wood46 monoclonal antibody (MAb) and mouse IgM with *Sta. aureus* Wood46. Each well of Microtiter plate was coated overnight at 4℃ with inactivated *Sta. aureus* Wood46 (5×10^8 CFU/ml) followed by incubation of pooled bovine serum 1 hour at room temperature. The plate was then reacted with serial dilution of the monoclonal antibody or mouse IgM 2 hours at 37℃, followed by incubation of peroxidase labelled anti-mouse IgM 2 hours at 37℃.

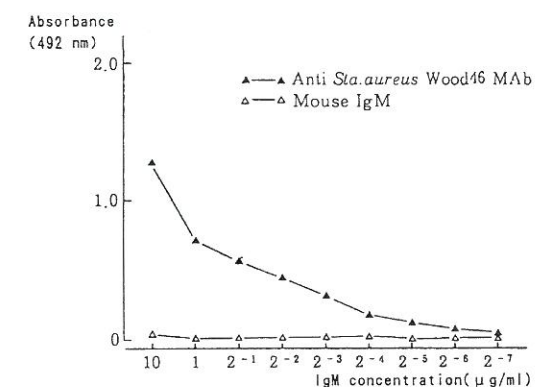


Fig 2. ELISA absorbance values of serial dilution of anti-*Sta. aureus* Wood46 MAb and mouse IgM with *Sta. aureus* Cowan I. Each well of microtiter plate was coated overnight at 4℃ with inactivated *Sta. aureus* Cowan I (5×10^8 CFU/ml).

ノクローナル抗体を得た。

本試験で作製したモノクローナル抗体 (IgM) およびマウスIgMと *Sta. aureus* Wood46および *Sta. aureus* Cowan I との反応をELISA法で比較した結果, IgM濃度が10から 2^{-7} $\mu\text{g}/\text{ml}$ の範囲においてモノクローナル抗体は両株との間に濃度依存性の反応が認められたが, マウスIgMは反応が認められなかった (図1, 図2)。

$10^2 \sim 10^9$ CFU/ml の濃度の菌液でマイクロプレートに各種細菌を吸着させモノクローナル抗体との反応性を比較した結果, 前記の *Sta. aureus* 標準株2株および野外株1株は 10^7 ないし 10^8 CFU/ml 以上の濃度で吸着を行ったウェルで反応が認められた (図3)。

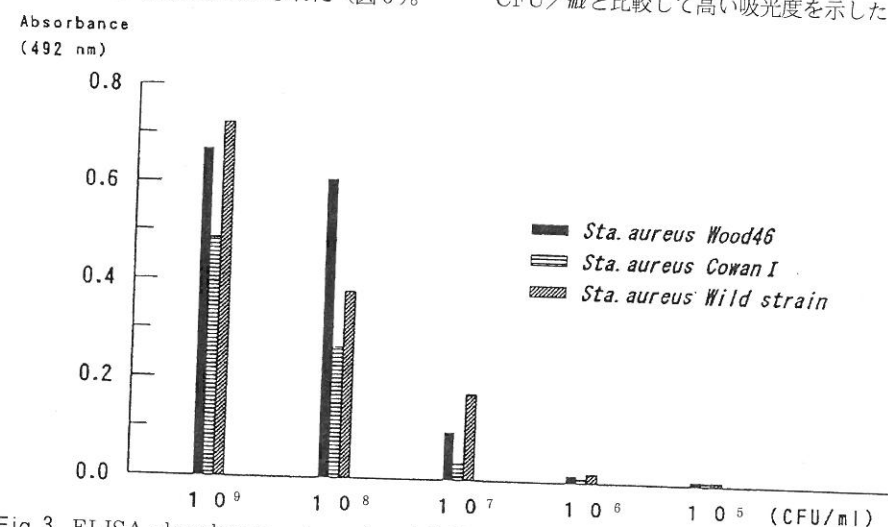


Fig 3. ELISA absorbance values of serial dilution of 3 strains of *Sta. aureus* with anti - *Sta. aureus* Wood46 MAb.

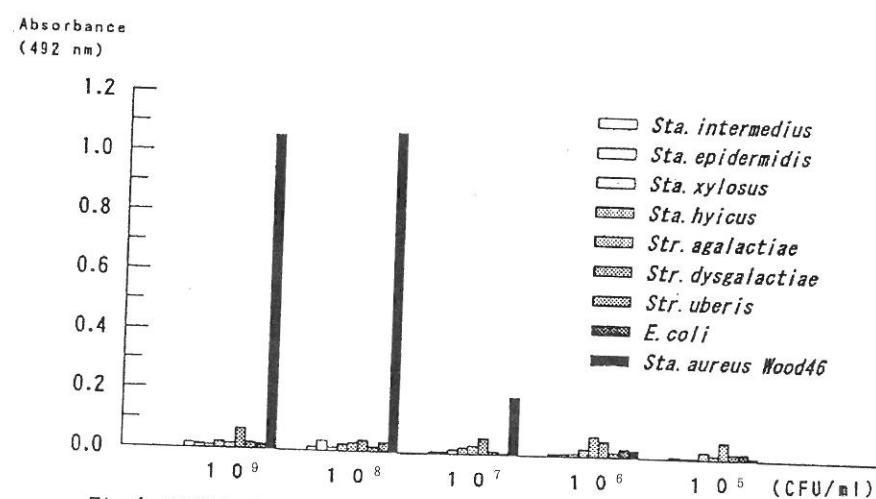


Fig 4. ELISA absorbance values of serial dilution of 9 standard strains of bacteria with anti - *Sta. aureus* Wood46 MAb.

これに対して *Sta. intermedius*, *Sta. epidermidis*, *Sta. xy-losus*, *Sta. hyicus*, *Str. agalactiae*, *Str. dysgalactiae*, *Str. uberis* および *E. coli* との反応は認められなかった (図4)。

モノクローナルおよびポリクローナル抗体を用いたサンドイッチELISA法における *Sta. aureus* およびそれ以外の細菌の標準株の反応性を検討した結果, *Sta. aureus* 標準株2株は 10^8 CFU/ml 以上の濃度で反応が認められた。これに対してそれ以外の細菌の標準株との反応は認められなかった (図5)。

同ELISA法による *Sta. aureus* 野外株24株の反応性について検討した結果, 10^7 CFU/ml 以上の濃度で0 CFU/ml と比較して高い吸光度を示した (図6)。

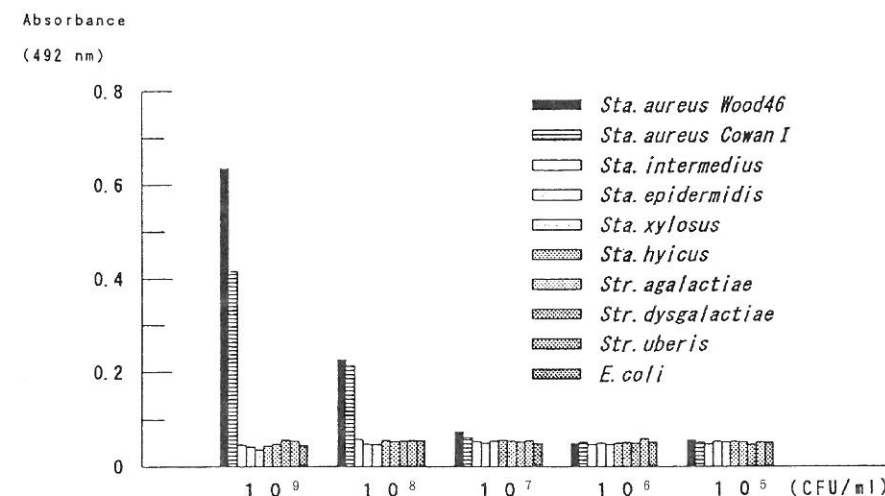


Fig 5. Sandwich ELISA values of serial dilution of 10 standard strains of bacteria. Each well of Microtiter plate was coated overnight at 4°C with anti-*Sta. aureus* Wood46 polyclonal antibody. After incubation of serial dilution of each strain 2 hours at 37°C, the plates were reacted with anti-*Sta. aureus* Wood46 MAb 2 hours at 37°C, followed by incubation of peroxidase labelled anti-mouse IgM 2 hours at 37°C.

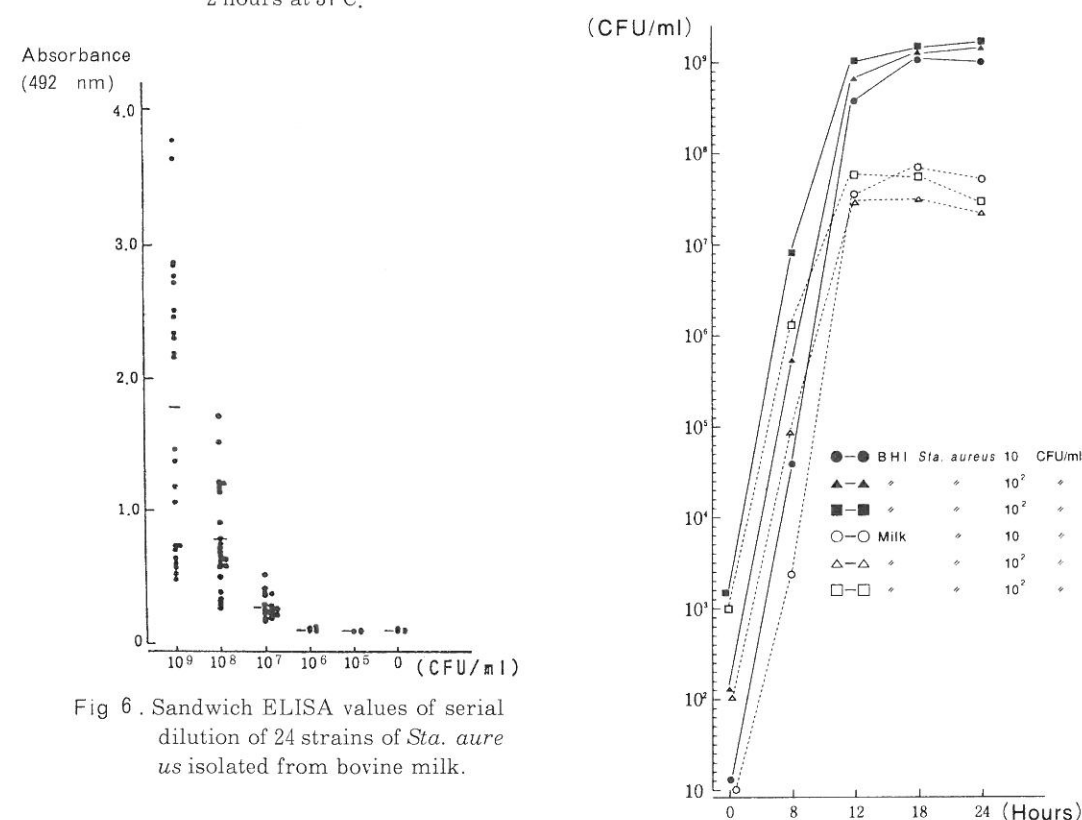


Fig 6. Sandwich ELISA values of serial dilution of 24 strains of *Sta. aureus* isolated from bovine milk.

Fig 7. Proliferation of *Sta. aureus* Wood46 in brain heart infusion medium (BHI) and bovine milk at 37°C.

考 察

*Sta. aureus*は免疫グロブリンと非特異的に結合する性質を持つプロテインAを含有しているため、作製したモノクローナル抗体が*Sta. aureus*と特異的に結合することを確認する必要がある。本試験では作製したモノクローナル抗体のクラスがIgMであったため同抗体およびマウスIgMと*Sta. aureus*の標準株との反応性をELISAを用いて検討した。標準株はモノクローナル抗体の作製に用いた*Sta. aureus* Wood46およびプロテインAを多く含有する*Sta. aureus* Cowan I⁹⁾を用いたが、両株ともモノクローナル抗体との反応が認められたのに対し、そのモノクローナル抗体と同じ濃度範囲のマウスIgMとは反応が認められなかった。したがって、このモノクローナル抗体と*Sta. aureus*の反応は特異的なものであると考えられた。

また、*Sta. aureus*以外の8種の細菌の標準株とはELISA法で反応が認められなかったことからこのモノクローナル抗体が認識する抗原は*Sta. aureus*に特異的なものである可能性が高いと考えられた。

サンドイッチELISA法においても同様の*Sta. aureus*およびそれ以外の細菌の標準株を用いて反応を行ったが、*Sta. aureus*以外の細菌の標準株とは反応が認められなかったことからこのELISA法の特異性は高いと考えられた。また*Sta. aureus*野外株24株すべてが同ELISA法で反応が認められたことから、モノクローナル抗体は*Sta. aureus*標準株および野外株に共通して存在する抗原を認識するものであると考えられた。感度に関しては野外株では 10^7 CFU/ ml 以上の濃度において吸光度が0 CFU/ ml と比較して高い値を示した。しかし、乳汁中の*Sta. aureus*の濃度は 10^4 CFU/ ml 以下であることが多いため、このELISA法で同菌の検出を行うためには試料中の*Sta. aureus*の濃度を 10^7 CFU/ ml 以上にする必要がある。ELISA法による乳汁中の細菌の検出に関する他の報告においても感度を上昇させるために試料中の細菌濃度を上昇させているものがある^{2, 3, 15)}。その方法の一つは遠心により濃縮を行うものである²⁾。それ以外には乳汁¹⁵⁾あるいは乳汁を液体培地に加えたもの³⁾を培養して試料中の細菌濃度を上昇させる方法がある。本試験では*Sta. aureus*を液体培地と乳汁中で培養して比較を行

ったが、液体培地の場合は37℃で培養12時間後には 10^8 CFU/ ml 以上になった。これに対し、乳汁の場合は12時間後に 10^7 CFU/ ml 以上になったが、その後培養を続けても 10^8 CFU/ ml を越えることはなかった。判定をより正確に行うためには 10^8 CFU/ ml 以上の濃度があることが望ましいと考えられるので、乳汁を一定割合液体培地に加えて培養する方法が適当と考えられた。

モノクローナル抗体を用いたELISA法は試料中の細菌の菌体あるいは可溶性抗原を直接検出する他に寒天培地に出現したコロニーの同定に用いることも可能である^{1, 5, 6, 12)}。したがって、本試験で作製した*Sta. aureus* Wood46に対するモノクローナル抗体は特異性が高いことから*Sta. aureus*と他の化学的性状が類似した細菌との鑑別に応用することも可能であると考えられた。

謝 辞

モノクローナル抗体作製法について御教示いただき、細菌の標準株を分与していただきました農林水産省家畜衛生試験場生理活性物質研究室長 横溝祐一博士、細菌の標準株の分与をしていただきました東京都立衛生研究所 五十嵐英夫博士、家畜衛生試験場北海道支場第1研究室長 江口正志博士、家畜衛生試験場細菌第1研究室の関係者各位および特殊法人理化学研究所の関係者各位ならびにマウスミエローマ細胞を分与していただきました家畜衛生試験場北海道支場第3研究室長(現在 家畜改良事業団 家畜改良技術研究所) 児玉 道博士に深謝致します。

文 献

- 1) AINSWORTH, A. J. and G. CAPLEY: Monoclonal antibodies produced to *Streptococcus agalactiae*. Am. J. Vet. Res., 47: 1211-1213. (1986)
- 2) BALL, H. J., D. P. MACKIE, D. FINLAY, J. Mc NAIR, and D. A. POLLOCK: An antigen capture ELISA test using monoclonal antibodies for the detection of *Mycoplasma californicum* in milk. Vet. Immunol. Immunopathol., 25: 269-278. (1991)

- 3) BOOTHBY, J. T., R. MUELLER, D. E. JASPER and C. B. THOMAS: Detecting *Mycoplasma bovis* in milk by enzyme-linked immunosorbent assay, using monoclonal antibodies. Am. J. Vet. Res., 47: 1082-1084. (1986)
- 4) BROWN, W. J.: Comparison of a yellow latex reagent with other agglutination methods for the identification of *Staphylococcus aureus*. J. Clin. Microbiol., 23: 640-642. (1986)
- 5) DE SOET, J. J., P. J. VAN DALEN, B. J. APPELMELK, and J. DE GRAAFF: Identification of *Streptococcus sobrinus* with monoclonal antibodies. J. Clin. Microbiol., 25: 2285-2288. (1987)
- 6) GUSTAFSSON, B. and P. ASKELOF: Monoclonal antibody-based sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Bordetella pertussis* filamentous hemagglutinin. J. Clin. Microbiol., 26: 2077-2082. (1988)
- 7) HEALEY, M. C., H. M. GHARPURE, S. J. KLEINSCHUSTER, H. H. HWANG and A. V. JOHNSTON: Use of monoclonal antibodies to identify outer membrane antigens of *Actinobacillus* species. Am. J. Vet. Res., 47: 1446-1451. (1986)
- 8) HOGAN, J. S., A. CORNETTA and J. W. PANKEY: Comparison of four test procedures to identify *Staphylococcus aureus* isolated from bovine intramammary infections. Am. J. Vet. Res., 47: 2017-2019. (1986)
- 9) KING, B. F. and B. J. WILKINSON: Binding of human immunoglobulin G to protein A in encapsulated *Staphylococcus aureus*. Infect. Immun., 33: 666-672. (1981)
- 10) KÖHLER, G. and C. MILSTEIN: Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature, 256: 495-497. (1975)
- 11) MOHAMMED, A. H., D. E. Mc CALLUS, N. L. NORCROSS: Development and evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for endotoxin in milk. Vet. Microbiol., 18: 27-39. (1988)
- 12) NELLES, M. J., C. A. NISWANDER, W. W. KARAKAWA, W. F. VANN and R. D. ARBEIT: Reactivity of type-specific monoclonal antibodies with *Staphylococcus aureus* clinical isolates and purified capsular polysaccharide. Infect. Immun., 49: 14-18. (1985)
- 13) NIELSEN, P. B., C. KOCH, H. FRIIS, I. HERON, J. PRAG and J. SCHMIDT: Double-antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for rapid detection of toxin-producing *Corynebacterium diphtheriae*. J. Clin. Microbiol., 25: 1280-1284. (1987)
- 14) PHILPOT, W. N.: Control of mastitis by hygiene and therapy. J. Dairy Sci., 62: 168-176. (1979)
- 15) SUTRA, L. and B. POUTREL: Detection of capsular polysaccharide in milk of cows with natural intramammary infection caused by *Staphylococcus aureus*. Am. J. Vet. Res., 51: 1857-1859. (1990)
- 16) WATTS, J. L. and W. E. OWENS: Prevalence of staphylococcal species in four dairy herds. Res. Vet. Sci., 46: 1-4. (1989)
- 17) WILSON, C. D. and M. S. RICHARDS: A survey of mastitis in the British dairy herd. Vet. Rec., 106: 431-435. (1980)
- 18) YOSHIDA, K.: Demonstration of serologically different capsular types among strains of *Staphylococcus aureus* by the serum-soft agar technique. Infect. Immun., 3: 535-539. (1971)
- 19) ZORAH, K. T., R. C. W. DANIEL and A. J. FROST: Detection of bacterial antigens in milk samples from clinical cases of bovine mastitis in which culture is negative. Vet. Rec., 27: 208-210. (1993)

Detection of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine milk by enzyme-linked immunosorbent assay, using monoclonal antibody.

Tsunao HIRAI, Hiroshi TSUNEMITSU*, Takuji KUDO**,
Hiromi YONEMICHI*** and Kiyokazu MORI

Summary

Hybrid cell lines producing monoclonal antibodies against *Staphylococcus aureus* (*Sta. aureus*) Wood46 were established. The specificity of the antibodies was ascertained by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The sandwich ELISA using the monoclonal antibody as detecting antibody and polyclonal antibody as capture antibody was developed for detection of *Sta. aureus* isolated from bovine milk. The sensitivity of the test was $10^7 - 10^8$ colony forming units per ml.

Key words : Bovine Mastitis, *Staphylococcus aureus*, monoclonal antibody

* Present address : Hokkaido Branch Laboratory, National Institute of Animal Health

** Present address : Hokkaido Prefectural Central Agricultural Experiment Station

*** Present address : Hokkaido Prefectural Takikawa Animal Husbandry Experiment Station

泌乳初期におけるビートパルプペレットの給与割合の違いが乾物摂取量、第一胃内容液性状および乳生産に及ぼす影響

大坂 郁夫・原 悟志*・糟谷 広高*・小倉 紀美・遠谷 良樹*

要 約

泌乳初期（分娩当日から14週）のホルスタイン経産牛16頭を供試して濃厚飼料からビートパルプペレットへ代替する割合が異なる3種類の混合飼料（ビートパルプ割合0%：BP0区、15%：BP15区、30%：BP30区）給与が乾物摂取量、第一胃内容液性状および乳生産に及ぼす影響を比較検討した。第一胃内容液の酢酸割合はビートパルプ給与割合が高まるとともに上昇し乳脂肪率もビートパルプを給与した区で高まる傾向を示した。しかし、BP30区は乾物摂取量が有意に低かった（ $p < 0.05$ ）ためにTDN要求量を充足せず、乳タンパク質率が低下する傾向にあった。

泌乳初期に粗濃比を50：50とした混合飼料で濃厚飼料の15%をビートパルプペレットに代替する給与は、乾物摂取量を低下させずに第一胃内発酵や乳成分を安定化させるのに有効と考えられた。

緒 言

わが国の乳牛飼養は、乳量向上とともに年々濃厚飼料への依存が高まり、特に泌乳初期においては要求量を充足させるため栄養価の高い濃厚飼料が多給されている。しかしながら、近年では濃厚飼料割合を高めても乳生産に対する飼料効果は小さく、逆に過給による繊維不足から代謝病の発生が危惧されている。そのような中でビートパルプ（以下、BP）は、乾草やサイレージ等の粗飼料よりTDN含量が安定して高く、かつ穀類（トウモロコシ、大麦等）や油粕類（大豆粕、ナタネ粕等）などの濃厚飼料より繊維含量が高いため、エネルギーおよび繊維源を供給する飼料として位置づけることができる。また、デンプン質飼料と比較すると第一胃内で急速にpHが低下せず、セルロース分解菌の数や活性を減少させないため、粗飼料の摂取量を低下させないと言われている⁸⁾。さらにはBPは乳脂肪源となる第一胃内容液中の酢酸割合を高めることも多くの試験で確認されている^{10, 15, 17, 21)}。このように、BPは泌乳初期に不足しがちなエネルギーと繊維源を補給し、乾物摂取量および乳脂肪率を向上させる効果

が期待できる。

BPの給与効果に関しては、分離給与^{3, 4)}や泌乳中期¹⁷⁾以降で乾物摂取量、第一胃内容液の脂肪酸組成および乳生産について報告されているが、混合飼料あるいは泌乳初期においては不明である。そこで本報告では、泌乳初期におけるビートパルプの給与割合の違いが乾物摂取量、第一胃内容液性状および乳生産に及ぼす影響について比較検討した。

材 料 と 方 法

供試飼料は混合飼料としBP割合を変えて3処理を設定した。本試験に使用した飼料の成分組成およびTDN含量を表1に示した。粗飼料はトウモロコシサイレージおよびチモシー主体の牧草サイレージとした。濃厚飼料には泌乳牛用の自家配合飼料（表2）、大豆粕、BPを用いた。BPはペレット状のものを加水せずに用いた。供試飼料の原料組成と化学成分を表3に示した。各試験区とも粗濃比（%）は乾物で50：48.5、ミネラル剤1.5%、粗飼料中のトウモロコシサイレージおよび牧草サイレージの乾物比は2：1とした。全乾物中の0、15、30%を自家配合飼料からBPに代替し、それぞれBP0区、BP15区、BP30区とした。各試験区のCP含量は16%となるように大豆粕で調整した。これらの飼料は定置式混合機で2～3日分をとりまとめて十分に混合し給与した。

Key Words : 泌乳初期 混合飼料 ビートパルプ割合 第一胃内発酵 乾物摂取量

* 現在 北海道立根釧農業試験場

表1 飼料の化学成分

	トウモロコシサイレージ	牧草サイレージ	配合飼料	大豆粕	ビートパルプ
乾物率 (%)	32.3	29.7	87.0	88.1	88.0
粗タンパク質	9.3	12.6	22.2	51.4	12.8
粗脂肪	3.1	3.5	3.7	1.1	0.7
粗灰分	4.3	7.8	6.2	6.2	5.0
N D F	40.9	66.6	20.0	11.8	43.3
A D F	24.5	39.8	9.2	9.7	24.0
T D N	70.1	68.0	85.1	87.6	76.0

表2 配合飼料の原料組成

原 料	原物割合 (%)
大 麦	25.0
トウモロコシ	21.6
脱脂米糠	6.0
フスマ	20.0
大豆粕	10.0
アマニ粕	10.0
ビートパルプペレット	5.0
防腐剤	0.2
ビタミンA, D	0.1
ミネラルミックス	0.1
食塩	2.0
全 体	100.0

北海道立新得畜産試験場で1989年11月から1990年6月に分娩したホルスタイン経産牛(2産以上)16頭を試験に供用した。これらを産次、分娩季節を考慮して試験処理BP0区、BP15区、BP30区に各6, 5, 5頭に振り分けて分娩当日から14週間泌乳試験をおこなった。供試牛は個体ごとに繋養し飲水は自由とした。混合飼料の給与量は約10%の残飼を生じる量とし1日1回全量を10時30分に給与した。残飼は翌朝9時に取り出し計量した。給与量から残飼量を差し引いた量を飼料摂取量とした。搾乳は供試牛をミルクパーラーに移動して1日2回、6時と16時におこなった。乳量はその都度計量した。乳試料は2週間に1度2日間連続して採取した。体重は分娩当日と、その後1週間ごと飼料給与前に測定をおこなった。第一胃内容液は分娩後1, 2, 4, 8および14週に胃液採取機(ルミナー)を用いて飼料給与前に経口的に採取し直ちにpHを測定した後、分析に供するまで-20℃で凍結保存した。

飼料の化学成分は常法¹²⁾によった。乳試料は赤外線牛乳分析器(ミルコスキャン104デンマーク・フォス

表3 給与飼料の原料組成と化学成分

処 理 区	BP0	BP15	BP30
原料組成割合			
トウモロコシサイレージ	33.3	33.3	33.3
牧草サイレージ	16.7	16.7	16.7
配合飼料	48.5	28.2	7.9
大豆粕	0.0	5.3	10.6
ビートパルプ	0.0	15.0	30.0
ミネラル	1.5	1.5	1.5
化 学 成 分			
粗タンパク質	16.0	16.1	16.2
粗脂肪	3.4	2.8	2.2
粗灰分	5.7	5.6	5.4
A D F	19.3	21.5	23.8
N D F	34.4	37.5	40.6
T D N	76.0	74.7	73.5

エレクトリック社製)を用いて乳脂肪率、乳タンパク質率および乳糖率を測定した。これらの結果からSFN率を算出した。第一胃内容液のアンモニア態窒素はコンウェイの微量拡散法を用いて測定した。第一胃内容液の揮発性脂肪酸(以下VFAと略)はメタリン酸を用いて除タンパクした後、ガスクロマトグラフィ(GC-15A島津製作所)でクロトン酸を内部標準として測定した。

泌乳牛の粗タンパク質およびTDNの要求量は日本飼養標準¹⁶⁾から算出した。また混合前の各飼料の栄養価は、4頭のめん羊を用いて実施した消化試験の値からTDN含量を算出した。

統計処理は分散分析を用いて有意性を検討した。また処理間については最少有意差法を用いた¹⁹⁾。

結 果

飼料の消化率を表4に示した。有機物消化率は大豆粕が最も高く次いで配合飼料、BPの順であった。粗タンパク質消化率も同様の傾向が認められ、特にBPの消化率は低かった(BP55.6%, 配合飼料82.3%,

表4 飼料の消化率

	トウモロコシサイレージ	牧草サイレージ	配合飼料	大豆粕	ビートパルプ
乾 物	68.2	68.9	84.1	91.9	78.6
有 機 物	69.3	70.5	87.2	92.7	80.0
粗タンパク質	45.5	59.2	82.3	91.4	55.6
粗脂肪	85.1	69.5	79.4	83.5	—
N D F	56.0	72.7	73.2	75.0	83.6
A D F	54.8	70.4	73.8	79.6	81.2

大豆粕91.4%)。しかしながら、NDF消化率は配合飼料(73.2%)と大豆粕(75.0%)は同程度であったのに対し、BPは10%以上高い値(83.6%)を示した。

乾物摂取量、TDN摂取量、TDNおよびCP充足率を表5に示した。乾物摂取量、TDN摂取量ともにBP0区とBP15区の処理間に有意な差は認められなかったが、BP30区は他と比較して低く推移し分娩後2~8週で有意差が認められた(p<0.05)。その結果、TDN摂取量はBP0区が分娩後8週で、BP15区が10週でそれぞれ要求量を充足したのに対し、BP30区では試験処理期間中要求量を満たさなかった。また、CPはBP0区、BP15区ではほぼ充足したがBP30区が充足したのは10週以降であった。

表6に第一胃内容液性状を示した。pH、アンモニア態窒素および総VFA濃度では処理間および試験期

間中で有意差はみられなかった。しかし、BP給与割合が高まるにつれて酢酸含量は増加、プロピオン酸含量は減少する傾向にあり、分娩後2週ではBP0区とBP15区およびBP0区とBP30区の間で有意差が認められた(p<0.05)。

表7に体重の変化を示した。BP15区、30区がほぼ横ばいに推移したのに対し、BP0区では漸増する傾向が認められた。しかしながら、個体差が大きく処理間の差は見られなかった。

FCM量および乳成分の推移を表8に示した。FCM量および乳成分とも有意な差は認められなかったものの、FCM量はBP15区が他の区と比較して高まる傾向があった。乳脂肪率ではBP0区で、乳タンパク質率およびSFN率ではBP30区で低くなる傾向が認められた。

表5 乾物摂取量、TDN摂取量、TDN充足率およびCP充足率

分娩後週	2	4	6	8	10	12	14	平均
乾物摂取量 (kg/日)								
BP0	16.9 ^a	20.4 ^a	21.7 ^a	21.4 ^a	22.8	22.6	23.1	21.3 ^a
BP15	18.5 ^a	22.2 ^a	23.3 ^a	22.7 ^a	23.1	22.6	22.3	21.1 ^a
BP30	14.9 ^b	17.0 ^b	18.8 ^b	19.2 ^b	20.1	20.1	19.9	18.6 ^b
TDN摂取量 (kg/日)								
BP0	12.8 ^a	15.5 ^a	16.5 ^a	16.3 ^a	17.3	17.1	17.4	16.1 ^a
BP15	13.8 ^a	16.5 ^a	17.3 ^a	16.9 ^a	17.3	16.9	16.6	16.5 ^a
BP30	11.0 ^b	12.6 ^b	13.8 ^b	13.9 ^b	14.7	14.1	14.0	13.4 ^b
TDN充足率 (%)								
BP0	92	95 ^a	98	103	105	107	107	101 ^a
BP15	81	87 ^a	93	99	100	104	103	95 ^a
BP30	77	83 ^b	88	90	93	92	94	88 ^b
CP充足率 (%)								
BP0	106	105 ^a	108	110	113	114	109	109 ^a
BP15	96	98 ^a	101	105	109	115	115	106 ^a
BP30	85	86 ^b	92	96	101	104	104	96 ^b

a, b: 異文字間に有意差あり (p<0.05)

表6 第一胃液性状

分娩後週	1	2	4	8	14
pH					
B P 0	6.43	6.69	6.92	6.63	6.90
B P 15	6.76	6.71	6.82	6.78	6.80
B P 30	6.67	6.78	6.65	6.68	6.47
アンモニア態窒素 (ml/dl)					
B P 0	6.4	8.8	8.8	7.7	9.9
B P 15	6.0	6.2	6.2	5.4	9.2
B P 30	6.1	8.5	7.2	8.5	9.0
総VFA (mmol/dl)					
B P 0	8.6	8.8	8.9	8.5	7.4
B P 15	8.9	8.4	8.7	8.5	8.4
B P 30	9.3	9.2	9.9	9.3	9.7
酢酸 (mol%)					
B P 0	61.6 ^a	60.7 ^a	64.4	64.2	66.4
B P 15	64.0 ^{a,b}	65.3 ^b	65.2	65.4	67.4
B P 30	65.9 ^b	67.0 ^b	66.0	67.6	68.1
プロピオン酸 (mol%)					
B P 0	23.1	26.3 ^a	22.7	23.0	20.0
B P 15	22.1	21.1 ^b	21.6	21.7	19.0
B P 30	20.3	18.8 ^b	18.7	19.4	18.2
酢酸/プロピオン酸 比					
B P 0	2.67	2.30 ^a	2.84	2.80	3.32
B P 15	2.89	3.08 ^b	3.02	3.02	3.55
B P 30	3.24	3.57 ^b	3.53	3.49	3.75

a, b : 異文字間に有意差あり (p < 0.05)

表7 分娩後の体重増加量

分娩後週	分娩時 (kg)	2	4	6	8	10	12	14
B P 0	636	5	7	16	21	25	28	29
B P 15	646	-7	-11	-9	-5	-5	-8	-5
B P 30	645	10	-5	-4	-5	-7	-10	-3

表8 乳生産成績

分娩後週	2	4	6	8	10	12	14	平均
4%FCM量 (kg/日)								
B P 0	26.3	31.9	32.3	30.9	31.1	30.6	31.7	30.7
B P 15	30.5	35.1	34.2	32.1	32.1	30.9	29.4	32.0
B P 30	28.1	31.3	31.5	31.0	30.4	29.6	29.4	30.2
乳脂肪 (%)								
B P 0	3.33	3.23	3.23	3.23	3.32	3.27	3.53	3.30
B P 15	3.70	3.44	3.28	3.27	3.58	3.63	3.53	3.49
B P 30	3.54	3.31	3.28	3.36	3.39	3.50	3.58	3.41
乳タンパク質 (%)								
B P 0	3.20	2.91	2.92	2.97	3.00	2.97	2.92	2.98
B P 15	3.25	2.89	2.85	2.85	2.87	2.97	3.07	2.96
B P 30	3.00	2.70	2.73	2.76	2.75	2.76	2.78	2.78
SNF (%)								
B P 0	8.71	8.50	8.55	8.58	8.59	8.64	8.54	8.58
B P 15	8.92	8.61	8.55	8.55	8.52	8.58	8.63	8.62
B P 30	8.52	8.29	8.29	8.30	8.29	8.29	8.32	8.33

考 察

乾物摂取量

本試験ではBP30区の乾物摂取量が有意に低下した。この要因として①BPの形状、②NDF含量、③BPの理化学特性である膨潤性の3点が考えられた。

① BPの形状

乾燥BPは約5倍量の水を吸着させて軟化した状態で給与すると家畜が摂取しやすいといわれている¹³⁾。しかし、本試験に用いたBPはペレット状で摂取しやすい大きさであり、粗飼料に多汁質飼料であるサイレージを用いて混合飼料としたので粗飼料から水分を吸着することを想定して加水しなかった。実際、前日に飼料混合機で調製したものを給与しているため、ペレットは形状を保っているものの手で容易に解すことが可能であった。また、混合飼料は2〜3日ごとにつくり置きをしており水分を吸着して軟化するには十分な時間があつたことから、BPの堅さが乾物摂取量の低下には影響を及ぼしていないと考えられた。

② NDF含量

飼料中のNDF含量と乾物摂取量は負の相関がある¹⁴⁾。粗飼料由来のNDFは第一胃内のparticle sizeが大きく、反芻時間や第一胃内の滞留時間が長くなり含量が多い場合は乾物摂取量を低下させる^{5,6,11)}。本試験でも、NDF含量が最も多いBP30区で乾物摂取量が低下した。しかしながら、Beaucheminら²⁾ および原ら⁹⁾ の報告では乾物摂取量の低下が認められた時のNDF含量は乾物中25〜30%であったのに対し本試験では40.6%であった。前者のNDFは主に粗飼料由来のものであり本試験では主にBP由来のものであったことから、この違いは粗飼料由来のNDFとBP由来のNDFでは質的に異なるためと考えられる。濃厚飼料由来のNDFでも第一胃内のparticle sizeが大きい場合は粗飼料由来のNDFと同様な物理的効果が期待できる。しかしながら、綿実・綿実粕あるいは蜜柑粕のような柑橘系のパルプを除けば、他の濃厚飼料は相対的に物理的効果は低いといわれている⁶⁾。BPについてはClarkら⁵⁾ が粗飼料の中でも第一胃内におけるparticle sizeが小さいといわれているアルファルファサイレージの半分以下(アルファルファ: 6.47mm, BP: 2.59mm)であったことを報告している。第二胃から下部に流出するのに必要なparticle sizeは3.6mm

以下といわれている¹⁸⁾ こと、また本試験においてもBPのNDF消化率は高かったことからBPのNDFは物理的効果が小さく結果的にNDF含量が40%程度になるまで摂取量の低下が見られなかったと推察された。

③ 膨潤性

田中ら²¹⁾ はBPの膨潤性について報告をしている。それによると、水中沈定体積(SV値: settling volume in water)を膨潤性の指標として各飼料について比較検討した結果、膨潤性が高かったアルファルファミールや脱脂米粕よりも乾燥BPではさらに1.5倍程度高くなり、第一胃内容液で行った試験においても同様の結果が得られている。本試験ではBPは軟化しているが十分に膨潤していない形態で摂取されている。BP割合の高いBP30区では第一胃内で飲水や内容液の水分によりBPが膨潤して乾物摂取量を制限した可能性も考えられた。

これらのことから、BP30区の飼料摂取量の低下についてBPの形状、飼料中NDF含量およびBPの膨潤性の3点から考察した結果、飼料中のNDF含量およびBPの膨潤性の相互作用により乾物摂取量が制限された可能性が高いと考えられた。

第一胃内容液性状

BP15区、BP30区とBP割合が高まるとともにVFAの酢酸割合が高まりプロピオン酸割合が減少した。BPは、穀類、油粕類などの濃厚飼料と比較して繊維質含量が多く、セルロース、ヘミセルロースおよびペクチンがほぼ同量に乾物中20〜25%含まれている^{7,21)}。セルロースはADF、ヘミセルロースはNDFからADFを差し引いたものとされており^{1,7)}、表1のBPの成分から算定すればほぼ一致している。また本試験ではペクチンの分析はおこなっていないが、BPの他の構成成分においても田中ら²¹⁾ の分析値と類似していることから、ペクチンも同程度含まれているものと推定される。セルロース、ヘミセルロースおよびペクチンは細胞壁構成成分であるが、前者2つは構造性炭水化物(以下SCと略)なのに対しペクチンはデンプンと同じ非構造性炭水化物(以下NSCと略)に属する。原ら⁹⁾ が分析した値を基に本試験で使用したBPと配合飼料の乾物中NSCおよびデンプン含量を推定すると、それぞれBP36.6%, 0.5%, 配合飼料49.7%, 30.7%であった。このことからBPのNSCにはほとんどデンプン

ブンが含まれずペクチン含量が高いと考えられた。したがって、本試験で配合飼料をBPへ代替することは、NSC中のデンプン割合を減少させてペクチン割合を高めたことになる。

in vitroでおこなった試験²¹⁾では、BP由来のペクチンはプロピオン酸量を微増させたにすぎなかったが、酢酸を短時間で大量に産生しており、一方BP由来のADF, NDFでは酸産生は認められなかった。また、デンプンと異なりペクチンは乳酸を生産せずに酢酸を増加することが報告されている²⁰⁾。本試験で、BP割合の増加とともに繊維分画(ADF, NDF)が増加したことよりもむしろNSC内のデンプン割合の減少、ペクチン割合の増加により酢酸産生が高まり、相対的にプロピオン酸割合が減少したと考えられた。

ペクチンは、第一胃内で急速かつ大量に酢酸を産生するが速やかに吸収されるため、デンプンや糖などの様に乳酸を産生してアシドーシスやpHの低下を起こすことはないといわれている²⁰⁾。しかしながら、本試験では処理によるpHの一定の傾向は見られなかった。第一胃内容液を経口的に採取したため唾液混入の可能性があり明確な差とならなかったのかもしれない。

第一胃内アンモニア態窒素はBP給与で顕著に低下することが知られている^{10, 15)}が、本試験ではアンモニア態窒素濃度に有意な差はみられなかった。西埜¹⁵⁾らは、BP給与でアンモニア態窒素が低くなる理由としてタンパク質摂取量の違いよりも非分解性のタンパク質割合が多いためであると結論づけている。また、和泉¹⁰⁾も、BPは全窒素中の可溶性窒素割合が低いことにより同様の考察をしている。最近の報告⁹⁾でも、BPのタンパク質中の非分解性タンパク質割合は44%であること、また本試験においてBPのタンパク質消化率が低かったことからこれらの結果を支持できる。それにもかかわらず、同様の結果とならなかったのは飼料中のタンパク質含量を調整するのに第一胃内の分解率が高い大豆粕を用いており、タンパク質含量が低いBPの割合が高くなるにつれて大豆粕割合も上昇したため処理区に差がなかったと推察された。

乳生産

BP 0区では乳脂肪率が低い傾向を示した。乳脂肪の主要な原料は第一胃内容液中の酢酸であり、泌乳初期で飼料中のADF含量が21% (乾物中) 以下になる

と酢酸の生産が減少してプロピオン酸が増加し乳脂肪率が低下する^{14, 16)}。本試験でBP 0区は飼料乾物中のADF含量が19.3%であったこと、酢酸割合が低下したことからもこれらの報告と一致した結果となった。また、個体差が大きかったもののBP 0区で体重が増加傾向にあったのは、プロピオン酸生産量が増加したことにより体脂肪合成に利用された可能性が考えられた。一方、BP30区で乳タンパク質率が低い傾向を示したのは試験期間中TDN要求量を充足していなかったことからエネルギー不足となり飼料中に含まれるタンパク質がエネルギー源として利用されたことに起因していると考えられた。

14週間の平均乳量はBP 0区およびBP15区は同程度でBP30区がわずかながら低かった (BP 0区: 34.4kg/日, BP15区34.7kg/日, BP30区33.2kg/日)。しかしながら、BP 0区は乳脂肪率が低いためFCM量に換算すると、BP15区で高く、BP 0区とBP30区は同程度となった (表8)。

BP15区は乾物摂取量が低下するほどのBP含量ではなかったため乳タンパク質率はBP30区よりも高くなる傾向に、またBP給与により第一胃内の酢酸割合が増加したためBP 0区よりも乳脂肪産生量が多くなりFCM量が増加する傾向にあったと考えられた。

BP給与により第一胃内容液の酢酸割合が上昇し乳脂肪率も高まる傾向を示した。しかし、BPの給与量を飼料中30%に高めると乾物摂取量が低下したため、TDN要求量を充足せずに乳タンパク質率が低下する傾向が認められた。泌乳初期に粗濃比50:50で濃厚飼料をビートパルプに代替する給与条件では、飼料乾物中15%程度のビートパルプ給与は乾物摂取量を低下させずに第一胃内発酵や乳成分を安定化させるのに有効と考えられた。

引用文献

- 1) 阿部亮: 炭水化物成分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, 第2号 (1988)
- 2) BEAUCHEMIN, K. A and L. M. RODE: Minimum versus optimum concentration of fiber in dairy cow diets based on barley silage and concentrates of barley or corn. J. Dairy Sci., 80: 1629-1639 (1997)

- 3) CASTLE, M. E., A. D. DRYSDALE and J. N. WATSON: The effect of dried sugar-beet pulp on the intake and production of dairy cows. J. Dairy Res., 33: 123-128 (1966)
- 4) CASTLE, M. E., M. S. GILL and J. N. WATSON: Silage and milk production; a comparison between barley and dried sugar-beet as silage supplement. Grass and Forage Science., 36: 319-324 (1981)
- 5) CLARK, P. W. and L. E. ARMENTAON: Influence of particle size on the effectiveness of beet pulp fiber. J. Dairy Sci., 80: 898-904 (1997)
- 6) GLANT, R. J.: Interaction among forage and nonforage fiber source. J. Dairy Sci., 80: 1438-1446 (1997)
- 7) HALL, M. B.: Pectin; The structural non-structural carbohydrate. Cornell Nutrition Conference for Feed Manufacturers proceeding, 29-36 (1994)
- 8) HARESIGN, W. and D. J. A. COLE: Recent Advances in Animal Nutrition, 175-193. Butterworth, London. (1989)
- 9) 北海道立新得畜産試験場: 単味飼料の成分組成と混合飼料中のNDFとデンプンの給与比率; 平成6年度北海道農業試験成績会議資料 (1995)
- 10) 和泉康史: 各種飼料の給与が第一胃内揮発性脂肪酸の産生に及ぼす影響. 日畜会報, 46(1): 11-18 (1975)
- 11) MERTENS, D. R.: Creating a system for meeting the fiber requirement of dairy cows. J. Dairy Sci., 80: 1463-1481 (1997)
- 12) 森本宏監修: 動物栄養試験法. 初版187-393. 養賢堂, 東京. (1971)
- 13) 内藤元男監修: 畜産大辞典飼料の特性. 第7版 501-504. 養賢堂, 東京. (1989)
- 14) National Research Council Nutrient Requirements of Dairy Cattle Six Revised Edition Update. (1989)
- 15) 西埜進, 和泉康史, 小林道臣, 大橋尚夫: ビートパルプ給与が第一胃内揮発性脂肪酸生成, 飼料摂取量および乳量に及ぼす影響. 新得畜試研報, 2: 5-10 (1971)
- 16) 農林水産技術会議事務局編: 日本飼養標準・乳牛 (1994)
- 17) 佐渡谷裕朗, 佐藤忠, 田中勝三郎, 岡本明治: とうもろこし, イネ科牧草アルファルファヘイキューブと比較したビートパルプの乳牛における産乳性. 日畜会報66(6): 540-547 (1995)
- 18) SHAVER, R. D., A. J. NYTES, L. D. SATTER and N. A. JORGENSEN: Influence of feed intake, forage physical form, and forage fiber content on particle size of masticated forage, ruminal digesta, and feces of dairy cows. J. Dairy Sci., 71: 1566-1572 (1988)
- 19) 新城明久: 生物統計学入門-計算マニュアル- 朝倉書店 (1986)
- 20) STROBEL, H. J. and J. B. RUSSELL: Effect of pH and energy spilling on bacterial protein synthesis by carbohydrate-limited cultures of mixed rumen bacteria. J. Dairy Sci., 69: 2941-2947 (1986)
- 21) 田中勝三郎: 甜菜製糖副産物の反芻家畜飼料資源としての特性に関する研究 博士論文 (北海道大学) (1994)

The effect of different feeding level of beet pulp pellet on dry matter intake, rumen fluid and milk production of multiparous cows in early lactation

Ikuo OSAKA, Satoshi HARA*, Hirotaka KASUYA*,
Noriyoshi OGURA and Yoshiki TOOYA*

Summary

Sixteen multiparous cows were used to investigate the effect of different feeding level of beet pulp pellet (BP) on dry matter intake, rumen fluid and milk production in early lactation. Cows were fed one of three kinds of total mixed ration (TMR): without BP (BP0), with 15% BP in dry matter (BP15), and 30% BP (BP30) instead of concentrate between partum and 14th week postpartum. With an increase in the feeding level of BP, the proportion of acetate acid in rumen fluid and milk fat tended to increase although both of them were not significant. Dry matter intake (DMI) was significantly lower ($p < 0.05$) in BP30 than in other groups. As a result, cows were deficient in the TDN requirement of the Japanese feeding standard and milk protein proportion tended to decrease in BP30.

It was suggested that rumen fermentation and milk composition were kept in balance without a decrease of DMI on condition that cows were fed TMR which included 50% forage and 15% BP in dry matter instead of concentrate.

Key words : early lactation, total mixed ration, feeding level of beet pulp pellet, rumen fluid, dry matter intake

*Present address : Hokkaido Prefectural Konsen Agriculture Experiment Station

馬におけるチモシー乾草・サイレージの栄養価 および可消化エネルギーの推定

前田 善夫・出口健三郎・田村 忠

要 旨

馬の主要な飼料である乾草および今後利用が期待される牧草サイレージについて採食量、栄養価を調べた。また、飼養標準ではエネルギーの要求量は可消化量で示されているため、可消化エネルギーの推定方法を検討した。チモシーの1, 2番草の乾草およびサイレージを北海道和種馬に給与し、消化試験を実施した。その結果、同一草地から同一時期に収穫調製した乾草およびサイレージの採食量、栄養価に差は見られなかった。馬の維持に要するエネルギーを満たすためにはチモシー早生品種の1番草は出穂期に、2番草では生育日数60日以内に収穫する必要がある。可消化エネルギー (DE) 含量と低消化性繊維 (Ob) 含量との間には $DE = -0.038 \times Ob (\%) + 4.38$ ($r = -0.898$) の関係があった。この式からDE含量の推定が可能であると考えられた。

緒 言

北海道は日本における馬の有数な産地であるが、馬の栄養に関する研究は牛に比べて著しく少ない。北海道日高地方は日本の軽種馬の80%以上を生産する一大産地であり、釧路を中心とした道東地方は重種馬の産地を形成している。しかし、飼料の給与や管理に関する情報の不足から、生産者は長年の経験に基づき馬の生産を行っている。一方で、馬に関する飼養標準作成の要望を受けて、平成10年3月に「軽種馬飼養標準」⁹⁾が刊行された。飼養標準を有効に活用するためには、給与する飼料の栄養価の把握が必要となる。とくにエネルギーは可消化エネルギーとして要求量が示される^{8,9)}ため、粗飼料の可消化エネルギーを簡易に推定する方法の確立が望まれる。

馬の飼料の多くを占める牧草は軽種馬ではそのほとんどが乾草と生草で給与され、冬季間は乾草が主体となる。乾草の品質は調製過程の天候に大きく左右されるが、サイレージ調製ではその程度は小さい。したがって、良質な粗飼料を給与するためにはサイレージを有効に活用することも一つの方策である。これまで、馬にサイレージを給与することを避けてきた根拠は必ずしも明確でない。馬は反芻家畜に比較して、カビ等が産生する毒素の影響を受けやすいとされており^{6,8)}、これがサイレージの利用を避けてきた要因の一つと考

えられる。良好に調製されたサイレージであれば馬の飼料としても有効に活用できると考えられる^{3,6)}。

本報告では馬でのサイレージの利用を図るため、乾草とサイレージの採食量、栄養価の比較および「飼養標準」を有効に活用するため可消化エネルギーの簡易な推定方法を検討した。

材 料 と 方 法

1) 供試乾草およびサイレージ

1994年~1996年にかけてチモシー主体草地より収穫した1番草および2番草の乾草、サイレージを供試した。チモシーは早生品種を供試した。乾草とサイレージを対で供試したものは同一の草地より同時期に収穫して調製した。サイレージは予乾した後ロールペールとし、ラップフィルムで被覆して調製した。施肥は早春に窒素-リン酸-カリを各々4-7-15kg/10aを施用し、1番草収穫後1.7-1.4-2.9kg/10aを施用した。

2) 消化試験方法

消化試験には北海道和種馬3頭を用いた。用いた北海道和種馬は試験年次によって異なるが、平均体重は400kgであった。供試飼料はフォレージカッターで細切して給与した。給与量は残食量が給与量の10%程度となる量とした。朝、夕2回に分けて給与し、その都度残食量を測定した。給与飼料および残食は毎日その

一部を採取し分析試料とした。予備期を5～7日間とし、本期は5日間の全糞採取法で行った。水および鈹塩は自由摂取とした。

3) 牧草および糞の分析

牧草および糞の一般成分の分析は常法⁵⁾で行った。中性デタージェント繊維 (NDF), 酸性デタージェント繊維 (ADF) の測定はVAN SOEST⁵⁾の方法に準拠した。低消化性繊維 (Ob) の測定は阿部の方法によった⁵⁾。カロリーは熱量計を用いて測定した。本文中の成分含有率はすべて乾物当たりの量として示した。

4) 可消化エネルギーの推定

消化試験の実測値と飼料中の成分含有率の関係の回帰式を導き、その有意性を検定し推定式とした。

表1 供試サイレージおよび乾草の成分含有率²⁾

収穫日 ¹⁾	区 分	水 分	有機物	CP	NDF	ADF	Ob	エネルギー
1 番草	6.12 サイレージ	66	90.5	13.9	62.9	38.5	49.0	4.54
	6.16 サイレージ	63	92.5	10.2	67.4	40.7	53.6	4.53
	7.20 サイレージ	26	93.1	9.3	71.8	42.1	65.9	4.49
	7.20 乾 草		93.2	7.6	70.0	42.1	62.9	4.33
	7.26 サイレージ	35	94.0	7.8	73.8	45.2	72.2	4.62
	7.26 乾 草		93.9	8.2	77.4	46.8	70.3	4.38
2 番草	40 サイレージ	50	91.1	14.7	59.2	34.4	54.1	4.81
	40 乾 草		90.9	14.9	64.4	35.4	55.1	4.51
	50 サイレージ	27	90.2	14.7	58.8	32.7	53.2	4.64
	60 サイレージ	37	93.4	13.6	66.2	38.6	69.8	4.70
	60 乾 草		89.7	12.9	64.8	36.5	61.6	4.46
	63 サイレージ	35	91.7	11.9	61.5	35.3	55.1	4.54
	63 乾 草		92.9	10.7	63.0	35.7	54.8	4.44

1) : 2 番草は1 番草収穫からの生育日数。

同一収穫日あるいは日数のサイレージと乾草は同一草地より収穫調製した

2) : 水分は%, ほかは乾物中%で示した。ただしエネルギーは乾物中Mcal/kg

サイレージおよび乾草の乾物および各成分の消化率を表2に示した。1 番草では、サイレージの場合も乾草⁷⁾と同様に収穫が遅くなるにともない乾物および各成分の消化率は低くなった。サイレージの場合4例と例数は少ないが、6月1日から収穫までの日数と乾物消化率との間の関係から1日あたり0.5%乾物消化率が低下することが示された。この低下の割合は乾草の場合⁷⁾と同様であった。有機物は乾物とほぼ同程度の消化率であった。NDFおよびADFの消化率は乾物と同程度かやや低い消化率であった。生育が進むと

結果および考察

供試した乾草およびサイレージの成分含有率を表1に示した。1 番草は6月中旬から7月下旬にかけて収穫した。当然のことながら収穫が遅くなるにともない、粗タンパク質 (CP) 含有率は低くなり、繊維成分の含有率は高くなった。2 番草でも生育日数が延びるにともないCP含有率は低くなり、繊維成分含有率は高くなる傾向にあった。有機物含有率には一定の傾向はみられなかった。乾草、サイレージとも調製時の牧草反転作業によると考えられる土壌の混入が観察された。有機物含有率の変動には土壌の混入が影響していると考えられた。サイレージの水分含有率は27%～66%と幅広い分布となった。ともに予乾して調製したが、1 番草の早い時期に収穫したサイレージで水分含有率は高かった。

NDFやADFの消化率は乾物の消化率に比較して低くなる傾向がみられた。繊維成分の生育が進むのにもなう消化率の低下はCPや有機物に比較して大きいと考えられる。CPの消化率は乾物消化率に比べて高い値となった。

2 番草をみると、1 番草収穫から2 番草収穫までの生育日数と消化率の関係は、例数が少ないため1 番草ほど明確ではないが、生育日数が延びると低くなる傾向にあることが伺えた。

表2 サイレージおよび乾草の各成分の消化率

	収穫日		消化率 %					
			乾 物	有機物	CP	NDF	ADF	エネルギー
1 番草	6.12	サイレージ	61	61	70	60	61	59
	6.16	サイレージ	52	52	60	47	48	50
	7.20	サイレージ	43	44	58	41	36	44
	7.20	乾 草	44	44	54	38	35	42
	7.26	サイレージ	35	35	50	32	28	36
	7.26	乾 草	37	38	50	38	34	35
2 番草	40	サイレージ	50	53	54	53	51	50
	40	乾 草	51	53	49	56	51	46
	50	サイレージ	52	53	63	48	42	52
	60	サイレージ	40	42	51	42	39	39
	60	乾 草	45	45	53	46	42	41
	63	サイレージ	48	49	58	45	41	48
	63	乾 草	48	49	44	47	43	46

収穫日: 2 番草は1 番草収穫からの生育日数。

同一収穫日あるいは日数のサイレージと乾草は同一草地より収穫調製した

同一草地より収穫調製したサイレージと乾草を比較すると、CPの2 番草生育日数63日でその差が14%とサイレージで高かったが、それ以外のいずれの収穫時においても各成分の消化率の差は0～5%の範囲にあり、かつサイレージが高い例と乾草で高い例があることから、サイレージと乾草で各成分の消化率に差はないと考えられた。また、供試したサイレージの乾物率は74%～34%まで幅があった。同一ステージで乾物率の異なる試料がないため比較は出来ないが、同一ステージの乾草の消化率とサイレージの消化率との間に差がないことから、サイレージの水分含量は消化率に影響していないと考えられた⁴⁾。乾草とサイレージで各成分の消化率に差はないと考えられることから、以下の論議は乾草とサイレージを区分しないで行った。

表3に乾物摂取量、乾物排泄量および可消化エネルギー (DE) 含量を示した。乾物摂取量および乾物排泄量は体重100kg当たりのkgで示した。乾物摂取量は2 番草サイレージの生育日数40日および60日を除いて、2 kg以上であり、体重の2.01～2.78%摂取した。1 番草では2.43～2.71%であった。反芻家畜では乾物消化率の低下にともない乾物摂取量は減少するが、馬の場合にはこの関係はみられない。サラブレッド種を用いた試験でも同様の結果を得ており⁷⁾、北海道和種馬でも乾物消化率と乾物摂取量の間には関係がなく、乾物消化率が低下しても採食量の低下はなくほぼ一定量の乾物を摂取すると言える。2 番草でも、やや摂取

量にバラツキがみられたものの、消化率にかかわらず一定量を摂取するものと考えられた。2 番草サイレージの生育日数40および60日で乾物摂取量が少なかったことについては要因が明らかでなかった。乾物排泄量は体重の0.72%～1.70%の範囲にあり、乾物消化率に影響されないことから、乾物消化率が低くなるにともない多くなる。

可消化エネルギー含量は1 番草では1.55～2.68Mcal/kgの範囲にあり、収穫が遅く乾物消化率が低くなるにともない低くなった。NRC⁸⁾で示している養分要求量では、成馬の維持のエネルギー要求量を満たすためには飼料中のDE含量は2.00Mcal/kg必要であり、維持の飼料は乾草で与えることとしている。このことから、馬の飼料として牧草に求められる最低の栄養的品質は維持の要求量を満たすものであると考えることができる。DE含量が2.00Mcal/kg以上の乾草あるいはサイレージを調製するためにはチモシー早生品種の1 番草では出穂期までに収穫することが必要と考えられる⁷⁾。2 番草では1.83～2.44Mcal/kgの範囲にあった。1 番草同様に、2 番草でも収穫までの生育日数が長くなるにともなってDE含量は低下することが伺える。2 番草について生育日数を長くした試料を供試できなかったため、維持の要求量を満たすDE含量の乾草あるいはサイレージを調製するためには生育日数を的確に指摘することができないが、60日程度を目安とすることができる。

表3 乾物摂取量、乾物排泄量より可消化エネルギー

			乾物摂取量	乾物排泄量	DE	TDN
			—— kg/100kg体重 ——	——	Mcal/kg	%
1 番草	6.12	サイ レ ー ジ	2.55	0.99	2.68	57
	6.16	サイ レ ー ジ	2.43	1.17	2.25	50
	7.20	サイ レ ー ジ	2.71	1.54	1.96	43
	7.20	乾 草	2.55	1.43	1.81	42
	7.26	サイ レ ー ジ	2.62	1.70	1.65	34
	7.26	乾 草	2.59	1.63	1.55	36
2 番草	40	サイ レ ー ジ	1.43	0.72	2.44	51
	40	乾 草	2.10	1.03	2.09	49
	50	サイ レ ー ジ	2.21	1.06	2.39	51
	60	サイ レ ー ジ	1.27	0.76	1.84	41
	60	乾 草	2.01	1.11	1.83	41
	63	サイ レ ー ジ	2.76	1.44	2.19	46
	63	乾 草	2.75	1.43	2.04	46

収穫日：2 番草は1 番草収穫からの生育日数。

同一収穫日あるいは日数のサイレージと乾草は同一草地より収穫調製した

CPおよびADF含有率とその消化率との関係を図1に示した。CP含有率が高くなるとCPの消化率が高くなるとされ、CP含有率からその消化率が推定可能とされている¹⁾。しかし、牧草の場合、1 番草ではその関係がみられるが、2 番草では当てはまらないことが示唆された。等分散性および傾きの検定から、1 番草と2 番草では全く異質なものと考えることができる。したがって、CPの評価は1 番草と2 番草では別

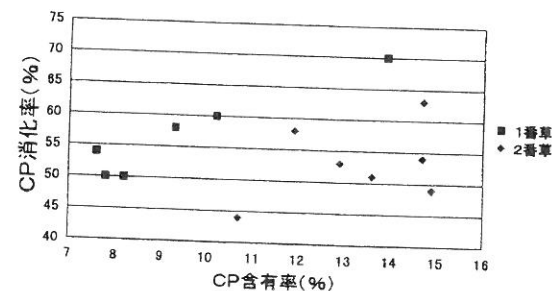
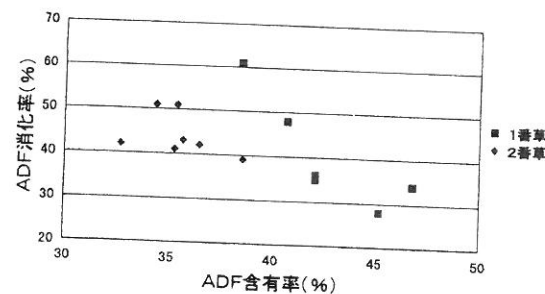


図1 CPおよびADF含有率とその消化率の関係

馬の飼養にあたって養分要求量に対し過不足ないよう飼料の給与を行うことが望ましい。馬の養分要求量に合った飼料給与を行うため、NRCから出版されている「Nutrient Requirement of Horses」が一部で利用されている。日本においては、1998年3月に軽種馬飼養標準が出版された。これらの中で、養分要求量のうちエネルギーについては可消化量で示されてい

に考える必要があると考えられる。

ADFについてみると、消化率が同程度であっても1 番草の含有率は2 番草の含有率より高い。ADF含有率が同程度であれば1 番草のADF消化率は2 番草のそれより高いことが伺われ、1 番草のADFは2 番草のそれと比較して消化されやすいと考えられた。馬の場合に繊維の必要量は明らかでないが、繊維の役割を検討する際には考慮する必要があると考えられた。



り⁷⁾、牧草をCPと粗繊維から¹⁰⁾、粗飼料やエン麦などをCPとADF含量²⁾から推定する方法がある。推定方法としては、各地の飼料分析センター等で一般に分析している項目を利用できることが必要であることから、ADF、Ob含量から推定が可能かどうか検討した。

ADF含有率とDE含量の関係を図2に示した。1 番草と2 番草では等分散性、傾きの検定では差は認められないが、高さ(Y切片)に有意な差があり、1、2 番草を込みにした関係を導きだすことはできない。従って、1 番草と2 番草では別の推定式を作成しなければならない。1 番草のADF含有率とDE含量の間には

$$DE \text{ (Mcal/kg)} = -0.131ADF (\%) + 7.57 \quad (r = -0.939) \text{ の関係式が成り立つ。2 番草では}$$

$$DE \text{ (Mcal/kg)} = -0.116ADF (\%) + 6.24 \quad (r =$$

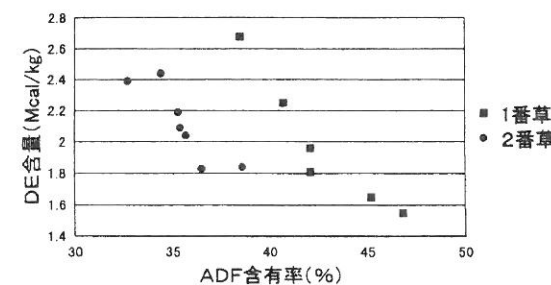


図2 ADFとDEの関係

Ob含有率とDE含量の関係を図4に示した。1 番草ではOb含有率とDE含量の間に

$$DE \text{ (Mcal/kg)} = -0.043Ob (\%) + 4.68 \quad (r = -0.952) \text{ の関係が、2 番草では}$$

$DE \text{ (Mcal/kg)} = -0.031Ob (\%) + 3.91 \quad (r = -0.776) \text{ の関係がある。1 番草ではOb含有率から高い精度でDE含量が推定できることが示されたが、2 番草では相関係数が低い。1 番草と2 番草の回帰式について検討すると、等分散性、傾きおよび高さに有意な差がないことから、1、2 番草を込みにした回帰式を作成することが可能である。1、2 番草を込みにすると}$

$$DE \text{ (Mcal/kg)} = 4.22 - 0.111ADF (\%) + 0.0332 (\%) + 0.00112 (ADF)^2 \text{ の重回帰式で、決定係数は}$$

-0.872)で、1 番草に比べて相関係数が小さくなる。1 番草ではADF含有率からDE含量の推定は可能と考えられるが、2 番草では精度が低い。ADF含有率と乾物消化率(DMD)の間には(図3)

1 番草では

$$DMD (\%) = -3.0ADF (\%) + 174 \quad (r = -0.935),$$

2 番草では

$$DMD (\%) = -2.1ADF (\%) + 122 \quad (r = -0.927)$$

の関係式が成り立つ。等分散性、傾きの検定では有意な差は認められないが、式の高さにはDE含量の場合と同じように差があるため、1、2 番草を込みにして推定することはできない。ADF含有率とADF消化率の関係(図1)からみても1 番草と2 番草のDE含量あるいは乾物消化率を込みにして推定することはできないと言える。

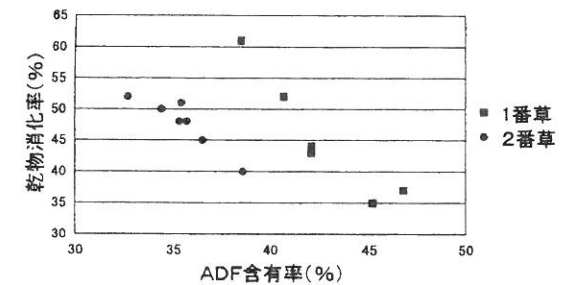


図3 ADFと乾物消化率の関係

0.80である。Obを用いた1、2 番草込みの推定式の決定係数は0.807とほぼ同じ値であり、定数項もほぼ同じ値とみることができる。飼料分析センターでOb含有率の測定は一般に行われており、活用できる推定式と考える。

Ob含有率と乾物消化率の関係をみると(図5)、1 番草では

$$DMD (\%) = -1.04Ob (\%) + 110 \quad (r = -0.988),$$

2 番草では

$$DMD (\%) = -0.65Ob (\%) + 85 \quad (r = -0.954)$$

とともに高い相関がある。これらの等分散性および高さに有意な差がない。しかし、傾きに有意な差があることから、1、2 番草を込みにして回帰式を作成することは理論的にはできない。これは乾物の消化に対するObの寄与が1 番草と2 番草で異なることを示唆している。さらに例数を増やして検討する必要がある。

しかし、1番草と2番草を込みにしてその関係をみると
 $DMD(\%) = -0.87Ob + 99$ ($r = -0.955$) と有意な関係式が得られる。この場合の決定係数は0.912,

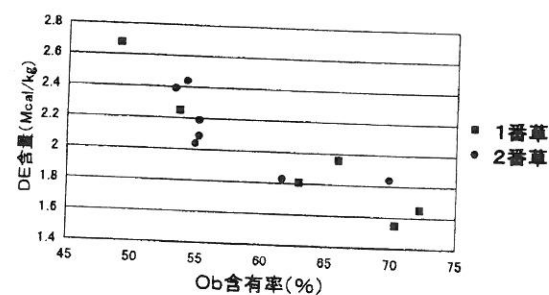


図4 Ob含有率とDE含量の関係

引用文献

- 1) EVANS, J. L. : Forage for horses. In ; Heath, M. E., R. F. Barnes and D. S. Metcalfe (ed), Forages, 4th ed., p. 597-604 (1985)
- 2) FONESBECK, P. V. : Estimating Digestible energy and TDN for Horses with Chemical Analysis of Feeds, J. Anim. Sci., 53 (Suppl. 1), 241-242 (Abstract) (1981)
- 3) 五十嵐義任・柴田幸雄・湊 弘 : 馬のグラスサイレージ給与試験, 北農, 33(10), 35-39 (1966)
- 4) 和泉康史 : サイレージ多給による搾乳牛の飼養技術に関する研究. 北海道立農業試験場報告, 69号 (1988)
- 5) 自給飼料品質評価研究会編 : 粗飼料の品質評価ガ

回帰からの標準誤差は2.17であり、実用的には1, 2番草を込みにして乾物消化率をOb含有率で推定可能であると考えた。

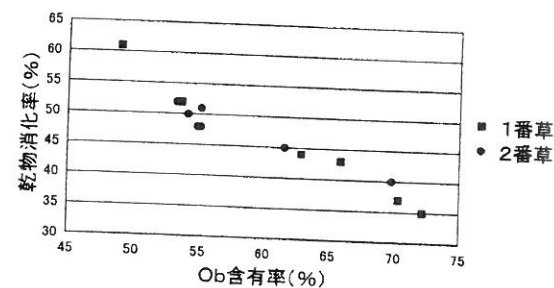


図5 Ob含有率と乾物消化率の関係

イドブック, 日本草地協会 (1994)

- 6) LEWIS, L. D., 尾高福松訳, 永田雄三監修 : 馬の飼養管理, p 54, 日本中央競馬会 (1983)
- 7) 前田善夫 : 北海道軽種馬生産地帯における草地土壌の養分状態および馬における牧草の栄養価に関する研究. 北海道立農業試験場報告, 88号 (1996)
- 8) National Research Council : Nutrient Requirements of Horses, 5th rev. ed, p. 1-100, National Academy Press Washington, D, C. (1989)
- 9) 日本中央競馬会競走馬総合研究所編 軽種馬飼養標準 (1998年版) (1998)
- 10) VANDER NOOT, G. W. and J. R. TROUT : Prediction of Digestible Components of Forages by Equines, J. Anim. Sci., 33(1), 38-41 (1971)

Nutritive Value of Timothy Hay and Silage and Prediction of Digestible Energy in Horses

Yoshio MAETA, Kenzaburo DEGUCHI and Tadashi TAMURA

Summary

Experiment was carried out to measure digestibility and voluntary intake in horses of timothy hays and silages harvested at different times and to compare with digestibility and voluntary intake of hays and silages harvested on the same swards. The relationship between digestible energy (DE) content and chemical component of forages was ascertained to predict DE contents of hay and silage for horses.

There was no difference between hay and silage harvested at the same time in digestibility, nutritive value and voluntary intake. Dry matter digestibility and nutritive value decreased with maturity advancement in both the first and second crop. In early varieties of timothy, DE content in the first crop harvested at the heading stage satisfied the DE maintenance requirement of in adult horses.

A significant relationship was found between the digestible energy content and organic b fraction content. The calculated regression equation for these of factors was found to be $Y = -0.038 \times X + 4.38$ ($r = -0.898$) ; Where Y is digestible energy content and X is organic b fraction content.

Key words : horse, prediction of DE, nutritive value

場外学術雑誌掲載論文抄録

Theileria sergenti の胎内感染

尾上 貞雄・平井 綱雄・森 清一・小原 潤子・松井 義貴
杉本 千尋¹⁾・久保田修一¹⁾・小沼 操¹⁾・田中 雅之²⁾・米道 裕爾³⁾

北海道家畜寄生虫研究会報 10巻 4-5 (1994)

冬季の *T. sergenti* の疫学調査において、舎飼での感染状況を検討した。当場で発生したヘレフォード22頭、アンガス41頭、黒毛和種30頭、ホルスタイン4頭と交雑種3頭の総数100頭の子牛から出生1日または2日後と3月から7月までの毎月および9月に採血をした。血液はPCR法によりDNA診断を行い、血液塗抹鏡検法により *T. sergenti* 寄生率を調べた。出生1日または2日後の100頭のうち8頭はPCR法により *T. sergenti* に特異的なDNAの増幅があり、そのうち5頭は鏡検法により *T. sergenti* が認められた。寄生率は0.01%から0.06%であり、*T. sergenti* に特徴的な構造物Veil、barと4連球菌型の原虫が赤血球内

にみられた。放牧数日前の5月において23頭がPCR陽性であり、出生1日または2日後に感染がみられた8頭を含む13頭はPCRと鏡検法ともに陽性であったが、10頭はPCRだけが陽性であった。13頭の寄生率は0.02%から2.78% (平均0.69%) であった。放牧前に感染していた子牛は放牧後に感染した子牛と同様の寄生率で放牧後推移した。この調査における出生1日または2日後の *T. sergenti* のピロプラズムの検出は *T. sergenti* の胎内感染を強く示唆した。出生1日または2日後のPCRで陰性であったが放牧前に陽性になった15頭の子牛は、媒介動物を特定できないが舎内感染したと考えられた。

-
- 1) 北海道大学
 - 2) 微生物化学研究所
 - 3) 北海道立滝川畜産試験場

Prenatal Infections of *Theileria sergenti* in Calves

Sadao ONOE, Chihiro SUGIMOTO¹⁾, Masayuki TANAKA²⁾, Syuichi KUBOTA¹⁾,
Tsunao HIRAI, Hiromi YONEMICHI³⁾, Kiyokazu MORI and Misao ONUMA¹⁾

J. Protozool. Res. Vol 4 119-123 (1994)

One hundred calves, including 22 Hereford, 41 Angus, 30 Japanese Black, 4 Holstein and 3 calves of mixed breed were investigated. Blood samples were collected from the calves 1 or 2 days after birth and several days before grazing in pasture. Thereafter, blood samples were examined monthly from March to July, and September, 1993. Giemsa-stained blood smears were microscopically examined for *T. sergenti* infection. For polymerase chain reaction (PCR) to detect *T. sergenti* infection, DNA was extracted. PCR-amplification of parasite-specific DNA was carried out. PCR-amplified products were examined by agarose gel electrophoresis to detect specifically amplified band of 875bp. Five out of 100 blood samples of 1 or 2 days old calves were microscopically positive for *Theileria*-like organisms. Veil and bar structures which are characteristic morphologies of *T. sergenti* were observed in erythrocytes. DNA

samples of the 5 giemsa-positive calves and 3 giemsa-negative ones were prepared and tested for PCR. The results of PCR completely agreed with those obtained by Giemsa-staining. Blood samples were collected from the same 100 calves several days before grazing in pasture and tested. Thirteen samples including 5 neonatally positive ones were both microscopically and PCR-positive, and 10 were only PCR-positive. The results of this study indicated a possibility of intra-uterine transmission of *T. sergenti* from infected cows. The detection of piroplasms of *T. sergenti* within a few days of birth in this study strongly suggests prenatal infection with *T. sergenti* in calves. Prenatal infections of piroplasmosis are known in *Babesia bovis* and *Babesia equi*, but our report is the first record of such an event in *T. sergenti*.

- 1) Department of Epizootiology, Faculty of Veterinary Medicine, Hokkaido University, Sapporo, Hokkaido, Japan
- 2) Division of Veterinary Microbiology, Kyoto Biken Laboratories, Uji, Kyoto, Japan
- 3) Hokkaido Prefectural Takikawa Animal Husbandry Experiment Station, Takikawa, Hokkaido, Japan

Alteration of Ganglioside Composition in the Erythrocytes Associated with *Theileria sergenti* Infection

Shinobu WATARAI¹⁾, Chihiro SUGIMOTO²⁾, Sadao ONOE, Misao ONUMA²⁾,
and Tatsuji YASUDA¹⁾

J. Vet. Med. Sci. Vol 56 No. 5 841-847 (1994)

The changes in ganglioside composition of bovine erythrocytes associated with *Theileria sergenti* infection were investigated using the erythrocytes before and after the infection. The erythrocytes before infection with *T. sergenti* had GM3, sialosylparagloboside (SPG), i-active, and I-active ganglioside as predominant gangliosides. After infection with *T. sergenti* merozoites, the contents of SPG and i-active ganglioside were slightly less, and I-active ganglioside content was much less in the erythrocytes, though GM3 content did not so vary. The decreased I-active

ganglioside content showed a recovery as the parasitemia waned to low levels in the infected cattle. The total amount of lipid-bound sialic acid also decreased in the erythrocytes after the infection. Similar changes were also caused by the incubation of liposomes containing ganglioside fraction obtained from bovine erythrocytes with *T. sergenti* piroplasms. These results suggest that the reduction of the contents of SPG, i-active, and I-active ganglioside on the erythrocytes was related to the *T. sergenti* infection.

- 1) Department of Cell Chemistry, Institute of Cellular and Molecular Biology, Okayama University Medical School, Shikata-cho, Okayama 700, Japan
- 2) Faculty of Veterinary Medicine, Hokkaido University, Sapporo, Hokkaido 060 Japan

Gangliosides as a Possible Receptor on the Bovine Erythrocytes for *Theileria sergenti*

Shinobu WATARAI¹⁾, Chihiro SUGIMOTO²⁾, Sadao ONOE,
Misao ONUMA²⁾, and Tatsuj YASUDA¹⁾

J. Vet. Med. Sci. Vol 57 No. 1 17-22 (1995)

To elucidate whether or not gangliosides on the bovine erythrocytes serve as a receptor for *Theileria sergenti* merozoites, the reactivities of the *T. sergenti* piroplasms with gangliosides were studied by the liposome agglutination test. The parasites reacted weakly with I-active ganglioside containing *N*-acetylneuraminic acid (NeuAc) and strongly with I-active ganglioside containing *N*-glycolylneuraminic acid (NeuGc). However, none of the other gangliosides expressed on the bovine erythrocytes, such as GM3 (NeuAc), GM3 (NeuGc), sialosylparagloboside (SPG) (NeuAc), SPG (NeuGc), i-active ganglioside (NeuAc), and i-active ganglioside (NeuGc), were recognized. After infection with

T. sergenti, furthermore, the content of I-active ganglioside (NeuAc) was less ($P < 0.05$), and I-active ganglioside (NeuGc) content was much less in the erythrocytes ($P < 0.01$), though the contents of other NeuAc- and NeuGc-containing gangliosides did not so very with *T. sergenti* infection. These results suggest that the parasites recognize the I-active gangliosides as their receptor and bind preferentially to NeuGc-carrying the I-active ganglioside rather than to NeuAc-type in the target cell membranes, and that the reduction of the contents of I-active gangliosides (NeuAc and NeuGc) on the erythrocytes was related to *T. sergenti* infection.

1) Department of Cell Chemistry, Institute of Cellular and Molecular Biology, Okayama University Medical School, Shikata-cho, Okayama 700, Japan

2) Faculty of Veterinary Medicine, Hokkaido University, Sapporo, Hokkaido 060 Japan

セレン・ビタミンE 合剤注射液投与による子牛白筋症の予防

森 清 一

畜産技術 第478号 2-8 (1995)

新得畜試において飼養しているヘレフォード、アバディーンアンガス、黒毛和種の母牛43頭および子牛133頭を供試し、Se、ビタミンE 合剤注射液 (Se2.5 mg/ml、ビタミンE 68 IU/ml、以下Se-V. E注射液と略)を用いた子牛白筋症予防のための効果的な投与時期、投与量および投与回数について検討した。

分娩1か月前におけるSe-V. E注射液体重45kg当たり1mlの1回注射では、子牛の血清 α -トコフェロールの上昇効果がほとんど無く、血清Seも出生3週後以降20ppb以下に低下し、潜在的筋肉障害が疑われる子牛が対照群と同じく供試牛の1/4に認められたことから、十分な子牛白筋症予防効果は期待できないことが示唆された。

出生後子牛に対するSe-V. E注射液1ml注射では、血清Seは4週後以降約15ppbの低値で推移したことから、3週後に追加投与した方が望ましいと考えられた。

出生後子牛に対するSe-V. E注射液2ml1回注射は、出生数日後と3週の2回各1ml1注射および各2ml注射と比較し、血清Se、 α -トコフェロール上昇効果の持続に大きな差がなく、血液グルタチオンペルオキシダーゼ活性が9週後においても30eu/gHb程度を維持していたことから、この方法により少なくとも9週齢程度までは白筋症の予防が可能であることが明らかとなった。

Effects of Electrical Stimulation on the Peptide and Free Amino Acid Contents of Beef Homogenate and Sarcoplasm During Storage

Masayuki MIKAMI, Mari NAGAO, Mitsuo SEKIKAWA,
Hiroyuki MIURA and Yasuhisa HONGO*

Anim. Sci. Technol. (Jpn.) 65 (11) : 1034-1043, 1994

Abstract To investigate the peptide and free amino acid contents of beef treated with electrical stimulation (ES), Hereford steers were slaughtered. ES was carried out at a low voltage (40V and 13.8Hz) for 0 (cont.), 30 sec (ES30) and 60 sec (ES60). Homogenate and sarcoplasm from *M. biceps femoris* muscles were prepared and stored at $2 \pm 1^\circ\text{C}$ for 0 (6hrs), 2, 7, 14 and 21 days after slaughter. The peptide contents in both the ES30 and ES60 homogenates were greater than in the control from day 0 after slaughter. The amount of peptides in the control, the ES30 and the ES60 homogenates were 162.5, 192.1 and 198.6mg per 100 g meat on day 0, respectively and 356.4, 409.7 and 405.5mg per 100 g meat 21 days after slaughter, respectively. The total amount of free amino acids increased during storage, but did not significantly differ between the control and the ES homogenates. However,

the content of Glu increased with ES treatment from day 0; measuring 23.3, 31.1 and 32.0mg per 100 g meat in the control, the ES30 and the ES60 homogenates 21 days after slaughter, respectively. It seems that ES contributed to the improvement of meat flavor or taste, by increasing the peptides and free amino acids, especially Glu. In the stored sarcoplasm, the peptide and free amino acid contents were also investigated under the same conditions as the homogenate. Total amounts of peptides and free amino acids increased during storage in the sarcoplasm also, although these increments corresponded to 45.8-48.5% and 53.9-69.7% of the homogenate storage 21 days after slaughter, respectively. These findings indicate that origins of peptides and free amino acids are derived from myofibrillar proteins as well as sarcoplasm.

Obihiro University * Hokkaido Prefectural Shintoku Animal Husbandry Experimental Station

牛肉の色調に対する電気刺激の影響

関川 光男・背野 公江・三上 正幸・三浦 弘之・本郷 泰久*

北畜会報 37 : 43-46 (1995)

ヘレフォード種去勢牛(25-27か月齢)を、3頭ずつ対照区、30秒区および60秒区の3区に設定し電気刺激を行った。と殺直後に温と体除骨を行い、得られた背最長筋、大腿二頭筋および横隔膜を用いて色調とpHを経日的に測定した。電気刺激によりpHは早期に低下するが、2日目以降から処理間で大きな差はなかった。色調値の平均値を比較すると、L*, a*およびb*ともに、電気刺激区の方が対照区よりも、横隔膜を除きいずれの経過日数においてもおおむね高い値を

示した。また、各試料ともに0日目の処理間差が最大で、特に大腿二頭筋において顕著であった。L*, a*およびb*の平均値は、全てと殺後1あるいは2日目に最大値を示し、以降低下する傾向が認められ、特にL*で顕著であった。これらの結果から、電気刺激はと殺後の初期に牛肉の色調に大きな影響を与えるが、その程度や経日的変化には個体間や個体内の筋肉間で差があることが推察された。

帯広畜産大学 *北海道立新得畜試試験場

核移植技術により作出したクローン胚の移植

森安 悟・陰山 聡一・南橋 昭・山本 裕介・芦野 正城
北野 則泰・伊東 季春

北海道牛受精卵移植研究会会報 第13号 29-32 (1994)

1987年にPratherらが牛において核移植によるクローン産子の作出に成功した。これを受けて1993年から核移植に関する研究を進めてきたが、今回核移植によるクローン牛の作出に成功した。

レシピアント卵子は、と体卵巣から採取後25時間成熟培養し、核を極体とともに除去した。ドナー細胞は過剰排卵処理を施したアバディーンアンガスから回収した6日目胚(29、38細胞期胚)を用い、Ca²⁺を含まないM2中でピペッティングにより細胞を単離し

た。両者をZimmerman細胞融合液中で90V/mm, 60μsec, 2回の電気刺激(島津SSH2)を加えて融合させた。融合率はいずれも90%以上であった。融合したクローン胚は卵管上皮細胞と共培養し、培養7日目に8個のクローン胚が得られた。このうち胚盤胞1個および初期胚盤胞3個をアンガス×ホルスタイン交雑種の経産牛1頭に移植したところ、35日目の超音波画像診断で受胎を確認し、69日目の診断で胎児の心拍動を確認した。

季節繁殖・集約放牧組合せにおける 乳牛の飼養技術とそのモデル化

川崎 勉*・坂東 健**・石田 亨**・寒河江洋一郎**

北農 第61巻 第4号 68-75 (1994)

ペレニアルライグラス主体草地を利用した早期放牧育成および乳牛の季節繁殖・集約放牧組合せ飼養を実践する経営について精査解析した。その結果、これらの飼養方式は、ゆとりある豊かな酪農経営を達成する

上で極めて効果的であることが認められた。そこで実態調査の成果を基にして、これらの技術モデルを策定した。

* 北海道立天北農業試験場（現北海道立新得畜産試験場）

** 北海道立天北農業試験場

乳用育成牛への牧草サイレージ給与が 飼料摂取量および発育に及ぼす影響

藤田眞美子¹⁾・遠谷 良樹²⁾・小倉 紀美

北農 第62巻 第3号 257-261 (1995)

育成期の粗飼料の違いが飼料摂取量および発育に及ぼす影響を検討した。供試牛は育成牛8頭を用い、牧草サイレージ主体区（S区）および乾草主体区（H区）に分け、哺育期から育成中期（14か月齢）まで飼養した。試験期間中の粗飼料乾物摂取量はS区、H区各々1,531, 1,407kgとS区がやや多かった。TDN摂取量は両区とも日本飼養標準の日増体重0.7kgの要求量とほぼ同様かそれ以上で推移し、CP摂取量は育成中期

の要求量を大きく上回った。試験期間中の日増体重はS区、H区各々0.88、0.84kgと両区とも標準発育を上回り、骨格の発育も標準を上回った。

これらのことから、育成牛の粗飼料として良質乾草の代わりに牧草サイレージを用いても、飼料摂取量および発育に差異がないことが明らかとなり、さらにCP摂取量を高めることにより発育が高まることが示唆された。

1) 北海道立根釧農業試験場

2) 現北海道立根釧農業試験場

とうもろこし（サイレージ用）品種比較試験における TDNの簡易推定

石 栗 敏 機

北農 第62巻 第3号 56-58 (1995)

とうもろこし（サイレージ用）品種比較試験の成績を用いてTDNの含有率と収量を推定する方法として、子実の熟度が乳、糊、黄、完熟期の順に、TDN含有

率を茎葉部分が63、60、58、53%、雌穂が76、80、80、78%とし、乾雌穂重割合から推定する式を示した。

Sex Determination in Domestic Pig by DNA Amplification Using the HMG-box Sequence

K. Sathasivam^a, S. Kageyama^b, K. Chikuni^b, E. Notarianni^a

Animal Reproduction Science 38 (1995) 321-326

We describe a rapid, reliable method for the sexing of domestic pigs (*Sus scrofa domestica*) by amplification of Y-chromosome specific sequences in male genomic DNA using the polymerase chain reaction (PCR). Oligonucleotide primers were selected from a conserved sequence motif, the HMG box, in the sequence of porcine Sry. These primers permit amplification of a defined 146 bp fragment only from male-specific genomic DNA. As a control, autosomal-specific

primers were also used in the PCR reactions, recognising a sequence from a porcine homeobox gene that is amplifiable in genomic DNA from both males and females. This sensitive method will find application in the sexing of biopsied, pre-implantation embryos and fetuses used for the derivation of embryonic cell lines and germ-cell derivatives, for use in new biotechnologies; and in the analysis of male-specific sequences in intersex pigs.

^a Department of Development and Signalling, The Babraham institute, Babraham, Cambridge CB2 4AT, UK

^b Shintoku Animal Husbandry Experiment Station, Shintoku, Hokkaido, 081 Japan

血清添加修正 TALP によるウシ体外受精胚の培養

南橋 昭・森安 悟・陰山 聡一・山本 裕介
北野 則泰・芦野 正城・伊東 季春

北海道牛受精卵移植研究会会報 第14号 6-16 (1995)

体外受精胚を効率的に生産する体外培養法を確立するために、血清を添加した培地を用い、1) 低酸素濃度下において発生培地の組成および発生培地へのアミノ酸の添加が体外受精胚の発生に及ぼす影響および、2) 発生培地として修正TALP (mTALP) を用い、卵丘細胞との共培養および酸素濃度が体外受精胚の発生に及ぼす影響を検討した。体外成熟および体外受精したウシ卵子をアミノ酸添加 (aa (+) 区) あるいは無添加 (aa (-) 区) で3%ウシ血清 (CS) 添加のBMOC 3、CR 1、およびmTALPの6種類の発生培地で培養した。培養条件は、39℃、5%CO₂、5%O₂、90%N₂とし、授精後72、168、192および216時間目に発生状況を観察した。

いずれの培地においても胚盤胞が得られた。胚盤胞以上への発生率は、aa (-) 区ではmTALPおよびCR 1が高く、aa (+) 区ではCR 1が最も高かった。mTALPの分割率および8-16細胞期への発生率を除き、BMOC 3、CR 1およびmTALPのいずれの培地でも、変性率、分割率、8-16細胞期胚および胚盤胞への発生率において、aa (-) 区とaa (+) 区に有意差は見られなかったことから、ウシ胚において、3%CSを添加したこれらの培地を用いての低酸素濃度下での培養では、アミノ酸は胚の発生に効果のないことが示された。

発生培地に、アミノ酸無添加で3%CSを添加した

mTALPを用い、気相条件を39℃、5%CO₂、95%空気 (20%O₂区) および39℃、5%CO₂、5%O₂、90%N₂ (5%O₂区) の2区、培養条件を卵丘細胞との共培養 (cc (+) 区) および非共培養 (CC (-) 区) の2区の合計4区として培養を行った。20%O₂区においては、CC (-) 区とCC (+) 区で、変性率、分割率、8-16細胞期および胚盤胞への発生率に有意差はなかったことから、また、5%O₂区においては、CC (-) 区の方がCC (+) 区よりも、変性率が有意に低く、分割率、8-16細胞期および胚盤胞への発生率が有意に高かったことから、3%CSを添加したmTALPでは、酸素濃度の高低にかかわらず、卵丘細胞との共培養は効果のないことが示された。低酸素濃度の条件下では、CC (+) 区は、他の区と比較して変性率は有意に高く、分割率および発生率は有意に低かった。CC (+) 区においては、5%O₂区と20%O₂区で、変性率、分割率、8-16細胞期および胚盤胞への発生率に有意差がなかったことから、3%CSを添加したmTALPでは、酸素濃度はウシ胚の発生に影響を及ぼさないことが示された。

本実験において、発生培地に3%CSを添加したmTALPを用い、共培養によらず、39℃、5%CO₂、5%O₂、90%N₂または5%CO₂、95%空気の条件下でウシ体外受精胚を培養することにより、高率 (48.2%または40.1%) に胚盤胞が得られることが示された。

乳汁中特異抗体測定による黄色ブドウ球菌乳房内感染牛の診断

平井 綱雄・西部 潤¹⁾・川喜田 眞²⁾・手塚 文治²⁾・
工藤 卓二³⁾・米道 裕彌⁴⁾・森 清一

畜産の研究, 49(5), 603-606, 1995.

ELISA法を用いた乳汁中特異抗体測定による黄色ブドウ球菌感染牛診断の有効性を検討するため培養法との比較を行った。2戸の酪農家の搾乳牛から分房乳を1か月間隔で3回採取し、同一個体の分房乳を等量混合し、個体乳サンプルを作製した。培養検査を分房乳について行い、黄色ブドウ球菌が検出された牛は分房乳および個体乳、検出されなかった牛は個体乳の抗体の測定を行った。

分房乳から黄色ブドウ球菌が検出された牛の個体乳のなかで抗体が陽性あるいは擬陽性と判定されたものの割合 (感度) は1回目72.7%、2回目75.0%、3回目66.7%であった。黄色ブドウ球菌が検出されなかった牛の個体乳のなかで抗体が陰性と判定されたものの割合 (特異性) は1回目83.3%、2回目75.0%、3回目71.4%であった。1回目に黄色ブドウ球菌が検出さ

れ、抗体が陰性と判定された3頭のうち2頭は2回目以降抗体が陽性あるいは擬陽性となった。1頭は3回とも抗体が陰性と判定されたが、陽性コントロールの吸光度に対する比率は上昇する傾向が認められた。黄色ブドウ球菌が検出されないにもかかわらず抗体が陽性と判定された個体乳サンプルが存在した理由としては、抗生物質による治療により同菌が消失したこと、感染していても乳汁中への排菌が培養で検出できるレベル以下であったことなどが考えられるが本試験では詳細について明らかにすることはできなかった。

以上の成績から、特異性の点で検討の余地が残されたものの、定期的な乳汁中の抗体測定は黄色ブドウ球菌感染牛摘発のためのスクリーニングテストとして有用であると考えられた。

- 1) 十勝農業協同組合連合会生乳検査センター
- 2) フォス・エレクトリック・ジャパンKK
- 3) 北海道立中央農業試験場
- 4) 北海道立滝川畜産試験場

Reproductive Respons in Seasonally Anestrous Ewes After a Treatment Combining Melatonin Feeding and the 'Male effect'

Naohito KUSAKARI and Mutsuo OHARA¹⁾

J. Reprod. Dev., 42, 209–212 (1996)

Fifty-eight anestrous Suffolk ewes, raised in Hokkaido, were randomly divided into 2 groups, with or without melatonin feeding as follows: Group 1 ewes (n=33) were fed melatonin daily for 45–90 days from the early or mid-anestrous season (late March to June) and Group 2 ewes (n=25) were not. All the ewes were introduced to fertile rams for 6–12 weeks starting between April and July. The incidence of estrus in Group 1 ewes during the joining of the rams was higher than that in Group 2 ewes (100% vs. 32%, $p < 0.01$). The first estrus in Group 1 was observed 7–10 weeks after the beginning of melatonin

feeding. The intervals from the ram introduction to the onset of estrus in 8 ewes that showed estrous response in Group 2 were not distinguishable from those of the ewes fed melatonin for over 5 weeks before the ram introduction in Group 1. The conception rate in Group 1 was higher than that in Group 2 (93.9% vs. 8%, $p < 0.01$). The prolificacy rate in the Group 1 and 2 ewes was 148% and 8%, respectively. These results indicate that 5-weeks of melatonin feeding is useful for enhancing the male effect in Suffolk ewes during the early and mid-anestrous seasons.

1) Takikawa Animal Husbandry Experiment Station of Hokkaido, Takikawa, Hokkaido 073 Japan

Effect of Melatonin Feeding on Early Onset of Reproductive Activity in Postpartum Suffolk Ewes Lactating During Anestrous Season.

Naohito KUSAKARI and Mutsuo OHARA¹⁾

J. Reprod. Dev., 43(1), 97–100 (1997).

Seasonally or postpartum anestrous Suffolk ewes were divided into the following 4 groups: Groups 1 (barren, n=5), 2 (Postpartum/non-lactating, n=5) and 3 (Postpartum/lactating, n=5) ewes were fed 4mg melatonin daily for 60 days from 26 June (Day 1), and control ewes in Group 4 (postpartum/lactating, n=3) were fed vehicle pellets not containing melatonin. The plasma concentration of progesterone was monitored to assess the resumption of ovulatory cyclicity. The ewes were teased by a vasectomized ram daily from Day 4 onward, and introduced to fertile rams on Day 41. The resumption of ovulatory cyclicity in postpartum ewes fed melatonin was significantly earlier than that in post-

partum ewes in the control ($p < 0.05$). However, there was no difference in the timing of the onset of ovulatory cyclicity and return to estrus between non-lactating and lactating ewes treated with melatonin. The interval from the start of melatonin feeding to the onset of ovulatory cyclicity in postpartum ewes was longer than that in barren ewes ($p < 0.05$). These results suggest that the physiological status in early postpartum ewes results in a delay of the reproductive response to melatonin administration mimicking the short-day pattern, but that the lactational suppression of gonadal function could be overcome by the melatonin treatment.

1) Takikawa Animal Husbandry Experiment Station of Hokkaido, Takikawa, Hokkaido 073 Japan

牛凍結胚のダイレクト移植試験

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

北海道牛受精卵移植研究会会報 第15号 15-19 (1996)

ダイレクト移植法に用いる耐凍剤のプロピレングリコールとエチレングリコールの比較および各耐凍剤における凍結速度の0.3℃/分と0.5℃/分の比較を行うと同時に、グリセリンを用いた従来法の試験も行い、ダイレクト移植法の実用性を検討した。

プロピレングリコールでの受胎率は30.1%、エチレングリコールでの受胎率は43.1%で、エチレングリコールの方が受胎率の高いことが示された。また、エチ

レングリコールでの受胎率は、対照区のグリセリンを用いた従来法での受胎率40.0%と差がなかった。従って、少なくとも耐凍剤にエチレングリコールを用いた凍結胚移植法は、ダイレクト移植技術として実用性の高いものと考えられた。また、凍結速度については0.3℃/分と0.5℃/分で差はなく、より凍結時間の短い0.5℃/分の凍結速度が適用できることが示された。

牛栄養膜細胞作成ならびに凍結

青木 美幸¹⁾・松崎 重範¹⁾・斉藤 千代¹⁾・南橋 昭・山本 裕介・浜野 晴三²⁾

北海道牛受精卵移植研究会会報 第15号 1-3 (1996)

牛栄養膜細胞は、胚の体外培養において胚と共培養することにより胚の発生を促進する効果、胚移植において胚と共に移植することにより受胎率を改善する効果等が報告されている。

本試験は、牛栄養膜細胞を確実にまた大量に得る方法を確立することを目的として実施した。

体外受精により作成した新鮮胚あるいは凍結胚平均52個(7-200個)を性周期7-8日目のホルスタインあるいは黒毛和種11頭に移植し、14-16日目に子宮灌流により回収し、メスで切断後体外培養して胎状化した栄養膜細胞を作成した。また、作成した栄養膜細胞は、耐凍剤にエチレングリコールまたはグリセリンを用いて凍結し、一部の胚を融解後培養して生存性の

判定を行った。受胎牛11頭中9頭から10-70mmの伸長期胚を回収した。回収率は平均29%(0-100%)で、移植胚数が7個と少なかった1例および200個と多かった1例では回収率は0%および3%と低かった。耐凍剤にグリセリンを用いた胚の融解後およそ24時間目の生存率は63%および0%、耐凍剤にエチレングリコールを用いた胚の融解後27時間目の生存率は40%と変動が大きかった。これらのことにより、体外受精胚を性周期7-8日目の牛に移植し、14-16日目に回収することにより、確実にまた大量に栄養膜細胞を作成することが示された。また、凍結保存方法については、融解培養後の生存率の変動が大きかったことから、今後さらに検討する必要がある。

1) 北海道家畜改良事業団 2) 家畜バイオセンター

簡易な器具による連続経膈採卵

松崎 重範¹⁾・松村 篤¹⁾・早川 宏之¹⁾・南橋 昭・山本 裕介

北海道牛受精卵移植研究会会報 第15号 29-32 (1996)

近年、ヒトで行われていた生体からの卵子の吸引採取、いわゆる経膈採卵法が、ウシにも適応できることが明らかになり、経膈採卵法により採取されたウシ卵子の体外受精について、いくつかの報告が見られるようになってきた。これらの報告では、超音波診断装置により小卵胞を確認しながら、卵子を採取しているが、これらの機器は未だ非常に高価である。そこで、本研究では、ディスボザブルの注射針にステンレスパイプとテフロンチューブを取り付けただけの簡易な器具を自作し、超音波診断装置を用いないで、すなわち、卵胞を確認すること無く、卵子の経膈採取を試みた。

黒毛和種2頭およびホルスタイン1頭の合計3頭を用い、7日間隔で延べ20回の採取を行った。1頭1回あたり平均7.6個の卵子を回収した。しかし、いずれの供試牛においても低品質で胚盤胞へ発生する見込みの無い卵子が56%以上と非常に高率であり、良質卵子は1%以下と非常に低率であった。本実験において低品質卵子の割合の高かった原因は、供試牛の個体差、針の太さおよび長さ、ポンプの吸引圧などの器具および採取技術などが考えられる。これらについて今後の検討が必要である。

1) 北海道家畜改良事業団

膈内プロゲステロン製剤(CIDR)を用いた黒毛和種の過剰排卵成績について

早川 宏之¹⁾・松村 篤¹⁾・青木 美幸¹⁾・斉藤 千代¹⁾・松崎 重範¹⁾・山本 裕介
陰山 聡一・森安 悟・南橋 昭・北野 則泰・芦野 正城・伊東 季春

北海道牛受精卵移植研究会会報 第15号 36-42 (1996)

複数の牛から胚回収をより簡便に、しかも計画的に行う方法の確立のため、膈内留置型プロゲステロン製剤(CIDR)を利用した過剰排卵処置について、その胚回収成績を検討した。

発情日を除く性周期の任意の日にCIDRを膈内挿入し、挿入日を0日として9日目から、FSH減量投与法による過剰排卵処置を実施した。挿入から12日目にCIDRを抜去し1-2日後の発情を確認し適宜人工授精を行った。北海道家畜改良事業団での胚回収成績は、回収胚数、正常胚数および正常卵率が試験区でそれぞ

れ16.0個、6.9個および42.9%、対照区でそれぞれ12.1個、5.2個および42.9%であり、CIDRの留置率は95.5%、胚回収実施率は90.9%であった。新得畜試での胚回収成績は、試験区でそれぞれ11.5個、8.1個および70.3%、対照区でそれぞれ11.7個、9.9個および84.3%であり、CIDRの留置率は93.3%、胚回収実施率は100%であった。以上のことより、CIDRを使用することで、複数の供胚牛について、性周期に左右されず胚回収のスケジュールを予め決定することができ、凍結保存可能な正常胚を回収し得ることが示された。

1) 北海道家畜改良事業団

とうもろこし（サイレージ用）収穫時総体乾物率に対する 茎葉と雌穂の乾物率および生雌穂重割合の関係

石 栗 敏 機

北農 第63巻 第4号 66-71 (1996)

とうもろこし（サイレージ用）品種比較試験の収穫時の茎葉と雌穂の乾物率および生雌穂重割合の成績を用い、総体乾物率に対するこれらの相互の関係を調べた。

収穫時の総体乾物率に対するこれら三者の相対的な影響の程度は、熟期によって異なるが、品種の特性としてある程度検討可能なことが示唆された。

Enhancement of Passive Immunity with Maternal Vaccine Against Newborn Calf Diarrhea

Junko KOHARA, Tsunao HIRAI, Kiyokazu MORI,
Hiroshi ISHIZAKI^{1)*}, and Hiroshi TSUNEMITSU²⁾

Journal of Veterinary Medical Science 59 : 1023-1025, 1997

ABSTRACT. The effects of a maternal vaccine against newborn calf diarrhea associated with group A bovine rotavirus (BRV), bovine coronavirus (BCV), bovine parvovirus and K99 *Escherichia coli* (*E. coli*) were examined on a beef cow-calf herd. After vaccination, serum or colostrum antibody titers to BRV, BCV and *E. coli* K99 in the vaccinated cows were significantly higher than those in unvaccinated control cows.

Serum antibody titers to BRV, BCV and *E. coli* K99 in calves from the vaccinated cows were also significantly higher than those in calves from the control cows for 3-4 weeks after birth. These results suggested that the immunization of cows with the maternal vaccine enhanced the passive immunity levels in calves against BRV, BCV and K99 *E. coli*.

Shintoku Animal Husbandary Experiment Station, Shintoku, Hokkaido 081,

¹⁾ Department of Veterinary Microbiology, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine, Inada-cho, Obihiro, Hokkaido 080, and ²⁾ Hokkaido Research Station, National Institute of Animal Health, Hitsujigaoka 4, Toyohira, Sapporo, Hokkaido 062, Japan

*Present address : Animal Hygiene Laboratory, Department of Grazing Production, National Grassland Research Institute, Nishinasuno, Tochigi 329-27, Japan

農家の庭先における牛胚の性判別

山本 裕介・陰山 聡一・南橋 昭・森安 悟・芦野 正城

北野 則泰・松崎 重範¹⁾・早川 宏之¹⁾・松村 篤¹⁾

北海道牛受精卵移植研究会会報 第16号 19-21 (1997)

性判別施設から遠く離れた地域での性判別胚移植は時間的に困難であるので、その解決策として農家の庭先で胚回収から、性判別、移植までを行う方式の有効性を実証する。

胚回収、移植機材のほか、マイクロマニピュレータ、CO₂インキュベータ、PCR装置、電気泳動装置等性判別用の機材をET車(移動胚移植車)に積み込み、2ヶ所の農家庭先(浜中町、伊達市)で一連の作業を試みた。

性判別を行った17個の胚(ホルスタイン)のうち、4個を雌、9個を雄と判定し、4個が判定不能であった。雌と判定した胚4個、雄と判定した胚2個および判定不能の胚4個を受胎牛に移植し、雌と判定した胚を移植した2頭と雄と判定した胚を移植した1頭が受胎した。3頭とも判定どおりの性別の子牛を分娩した。胚回収から移植までの所要時間は約8時間であり、1日の作業時間内で処理できた。

1) 北海道家畜改良事業団

牛胚の性判別におけるキャピラリーPCRの検討

陰山 聡一・南橋 昭・森安 悟・澤井 健

芦野 正城・北野 範泰・山本 裕介

北海道牛受精卵移植研究会会報 第16号 14-18 (1997)

PCRによる牛胚性判別の所要時間短縮を目指して、独自に設計したプライマーS4-Bを用いてキャピラリーPCRの条件を検討し、従来のマイクロチューブ型PCRとの比較を行った。キャピラリーPCRとは、反応容器として0.6mlマイクロチューブの代わりにガラスまたはプラスチック製のキャピラリー(毛細管)を用い、温度の上昇・降速度の速い遺伝子増幅装置で反応を行うものである。

実験の結果、キャピラリーPCRでは、マイクロチューブ型PCRの条件より酸素量やマグネシウム量を増やし、反応初期サイクルにおける各ステップの時間を十分にとることにより、安定した増幅が得られた。所要時間は1時間10分とマイクロチューブ型PCRよりも約50分短縮できたが、検出限界は1pgであり、マイクロチューブ型PCRの0.5pgには及ばなかった。

肉用牛の過剰排卵処理におけるジノプロストと クロプロステノールの比較

北野 則泰・芦野 正城・南橋 昭・澤井 健
陰山 聡一・森安 悟・山本 裕介

繁殖技術 第17巻 41-42 (1998)

牛の過剰排卵処理に使用するプロスタグランジンF₂α類緑物質には数種類の製品があり、投与液量や容器の形態が異なる。そのうち本試験ではジノプロストとクロプロステノールについてその過剰排卵成績を比較検討した。

新得畜試で繁殖する経産肉用牛25頭を用いて延べ50

回の過剰排卵処理を行ったところ、推定黄体数、回収胚数、正常胚数、回収胚の品質構成およびスタンディング発情確認時期に有意な差はなかった。従って肉用牛の過剰排卵処理に用いるプロスタグランジンF₂α製剤について、ジノプロストとクロプロステノールでは、その過剰排卵成績に差がないことが示された。

とうもろこし（サイレージ用）品種の 栽培場所別の生育および収量

石 栗 敏 機

北農 第64巻 第3号 27-32 (1997)

とうもろこし（サイレージ用）品種比較試験における12品種の絹糸抽出期、収穫時の総体と雌穂の乾物率、生雌穂重割合、乾雌穂と乾物の収量について各担当試験地の順位を示したが、似かよった熟期の品種では順位が近似していた。早生品種を栽培している場所のう

ちで、絹糸抽出期から収穫までの積算気温が700℃台の場所では各項目の年次間変動が大きく、特に乾物収量より乾雌穂収量の変動が大きかった。晩生品種を栽培している場所で同じく800℃台の場所でも同様であった。

とうもろこし（サイレージ用）早生品種栽培地域 における6月の気象を基にした生育予測

石 栗 敏 機

北農 第65巻 第1号 29-35 (1998)

とうもろこし（サイレージ用）品種比較試験で早生品種の主な試験場所の8か所の成績を用い6月の平均気温と日照時間の積算値と絹糸抽出期の関係を調べた。絹糸抽出期と収穫時の収量と乾物率の関係も調べ

た。6月の気象から慣行の収穫時の収量の増減、乾物率や子実の登熟等を十分な精度ではないが予測可能なことを示した。

新得畜試研究報告 No.22 1998.8

平成10年8月31日 印刷

平成10年8月31日 発行

編集兼 北海道立新得畜産試験場
発行所 北海道上川郡新得町西4線40
☎ (01556) 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)
