

滝川畜産試験場研究報告

第 24 号



昭和 63 年 12 月

北海道立滝川畜産試験場

滝川畜産試験場研究報告 第24号

(1988年12月)

目 次

低温及び凍結融解後に生じる豚精子凝集の防止と その精子生存性に及ぼす影響	1 ~ 6 p.
大原 睦生・河部 和雄・草刈 直仁	
めん羊の性周期中における外陰部所見, 子宮頸管粘液の pH および重量ならびに膣スメア像の変化	7 ~ 12 p.
草刈 直仁・岸 昊司・大原 睦生	
ビタミンA投与羊における血漿中レチノール及び レチニルパルミテート濃度の定量	13 ~ 20 p.
仙名 和浩	
豚糞・稲わら混合物の夏期における腐熟の様相について	21 ~ 30 p.
阿部 英則・小松 輝行・大原 益博・山川 政明	
鶏種卵の鋭端を上にした貯卵姿勢がふ化率におよぼす効果 (貯卵期間4週間まで)	31 ~ 36 p.
小関 志雄・田村 千秋・高橋 武・森崎 七徳・田中 正俊	
場外誌掲載論文抄録	37 ~ 39 p.

BULLETIN OF THE
TAKIKAWA ANIMAL HUSBUNDRY EXPERIMENT STATION

No.24 (Dec.1988)

CONTENTS

- The Prevention of Boar Spermatozoa Agglutination and the Motility of Spermatozoa by the Washing with Buffer and the Addition of Detergent during Liquid and Frozen Boar Semen Storage. 1 ~ 6 p.
Mutsuo OHARA, Kazuo KAWABE and Naohito KUSAKARI
- Changes in Vulva, pH and Weight of Cervical Mucus, and Vaginal Smear of Ewes during Estrous Cycle. 7 ~ 12 p.
Naohito KUSAKARI, Kohji KISHI and Mutsuo OHARA
- Simultaneous Analysis of Plasma Retinol and Retinyl Palmitate in Ewes before and after Oral Administration of Vitamin A. 13 ~ 20 p.
Kazuhiro SEN-NA
- Composting Process of Swine Dung Mixed with Rice Straw in the Summer. 21 ~ 30 p.
Hidenori ABE, Teruyuki KOMATSU, Masuhiro OHARA and Masaaki YAMAKAWA
- Hatchability of Chicken Eggs Stored small End Up, up to Four Weeks. 31 ~ 36 p.
Tadao OZÉKI, Chiaki TAMURA, Takeshi TAKAHASHI
Shichinori MORISAKI and Masatoshi TANAKA

APPENDIX

- Summaries of the Papers on Other Journals Reported by Staff. 37 ~ 39 p.

滝川畜試研報
No.24 1~6P 1988

1

低温及び凍結融解後に生じる豚精子凝集
の防止とその精子生存性に及ぼす影響

大原 睦生 河部 和雄 草刈 直仁

要約 豚精子の低温時及び凍結時において観察される精子の凝集を防止するため、精子の洗浄に用いる緩衝液の組成並びに希釈液に添加する界面活性剤について検討した。

今回検討した9種の緩衝液の中では Kiev 液 (10mMEDTA2Na, 14mMNaHCO₃, 13mMクエン酸, 3.3Mブドウ糖) が凝集防止効果が高く、精子の運動性維持では Kiev 液、HEPES-EDTA4Na 液が良好であった。

今回検討した界面活性剤6種の中では精子凝集の防止、精子運動性の維持の点から、LDAO (0.6ml/100ml) を希釈液 mBF5 に添加するのが効果的であった。

これらの結果から、凍結前の精子洗浄に Kiev 液を用い、凍結用希釈液には LDAO を添加する事で凍結後良好な精子生存性が見られた。

緒 言

豚精子の凍結保存は種豚の改良と衛生の面から重要であると考えられるが受胎率の面で問題点が残されている。その原因は牛の様に確立された凍結方法が未だなく、これまで研究された方法には問題点が多く¹⁾凍結融解後の精子生存性が低い点にあると考えられる。

豚精液を冷却する時、精子が凝集して運動が阻害されているのが観察されることがある。また、凍結融解後の精液で精子運動性の悪い精液では精子の凝集が著明に観察されるので、精子の凝集を防止することによる精子生存性の改善について検討した。

精子の凝集の防止と生存性の維持のために使用する緩衝剤と界面活性剤の効果について検討した。

材料及び方法

供試した精液は北海道立滝川畜産試験場に飼養している3頭の成熟した大ヨークシャー種雄豚から膠様物を除去して、分離採取した濃厚部精液を用いた。精子活力、精子生存性及び pH の検査後実験に用いた。

1. 緩衝液の精子の凝集と生存性に及ぼす影響について

精液 2 ml と等量の表 1 に示す緩衝液を試験管内で混合し、18℃で7日間保存した。精子の凝集の型と程度については Shulman²⁾方法に従い以下に示す5つの型と程度に分類した。凝集の型は A: 精子頭部-精子頭部, B: 精子尾部-精子尾部, C: 精子尾部先端-精子尾部先端, D: 精子頭部-精子頭部及び精子尾部-精子尾部の混合, E: 不規則な混乱した凝集とし、また、凝集の程

(受理 1988. 4. 19)

度については、0：凝集精子なし，1：1凝集当たり10精子以下，2：1凝集当たり10-50精子，3：大きな精子の塊，4：精子のほとんどが凝集，

と言う5段階で表示した。精子生存性の指標としては著しく活発な前進運動を示す精子の割合で示した。

表1 精子の凝集防止について検討した緩衝液の組成

緩衝液	緩衝液の組成
EDTA2Na ^{*1} -EDTA4Na ^{*2}	10mMEDTA2Na, 10mMEDTA4Na, 3.3Mブドウ糖
PIPES ^{*3} -EDTA4Na	10mMPIPES, 10mMEDTA4Na, 3.3Mブドウ糖
BES ^{*4} -EDTA4Na	10mMBES, 10mMEDTA4Na, 3.3Mブドウ糖
MOPS ^{*5} -EDTA4Na	10mMOPS, 10mMEDTA4Na, 3.3Mブドウ糖
TES ^{*6} -EDTA4Na	10mTES, 10mMEDTA4Na, 3.3Mブドウ糖
HEPES ^{*7} -EDTA4Na	10mHEPES, 10mMEDTA4Na, 3.3Mブドウ糖
Kiev	10mMEDTA2Na, 14mMNaHCO ₃ , 13mMクエン酸, 3.3Mブドウ糖
MOPS-TRIS ^{*8}	10mMOPS, 10mMTRIS, 3.3Mブドウ糖
TES-TRIS	10mTES, 10mMTRIS, 3.3Mブドウ糖

- ^{*1} Ethylenediaminetetraacetic Acid Disodium Salt
^{*2} Ethylenediaminetetraacetic Acid Tetrasodium Salt
^{*3} Piperazine N, N'-bis(2-ethanesulfonic acid)
^{*4} N, N-Bis(2-hydroxyethyl)glycine
^{*5} 3-(N-Morpholino)propanesulfonic acid
^{*6} N-Tris(hydroxymethyl)methyl-2-aminoethane sulfonic acid
^{*7} N-2-Hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid
^{*8} Tris(hydroxymethyl)-aminomethane

2. 界面活性剤の室温における精子の凝集と生存性に及ぼす影響について

精液1mlと界面活性剤を含む希釈液を等量混合し、18℃で保存した。検討した界面活性剤はGENPOL X080 (X080), Lauryldimethylamine Oxide (LDAO), Nonidet P40 (NP-40), Polyoxyethylene(10)Octylphenyl Ether (POE), Polyoxyethylene Sorbitan Monostearate (Tween60), Sodium Dodecyl Sulfate (SLS)であり、それぞれの界面活性剤を凍結用希釈液 Modified BF5 (mBF5)及び Modified TF1 (mTF1)に0.15, 0.3, 0.6, 1.2nl/100ml希釈液になるように溶かした。ただし、SLSについてはg/100ml希釈液である。mBF5及びmTF1の組成はそれぞれ表2に示した。精子凝集の表示は2時間後凝集している精子の割合によって6段階(0, 1, 2, 3, 4, 5)に表示した。凝集精子がない時を0とし、凝集している精子が10%の時を1.0, 以下同様に、凝

集している精子が20%：2.0, 凝集している精子40%：3.0, 凝集している精子60%：4.0, 凝集している精子70%：5.0, として表示した。生存性の指標としては1.と同様に示した。

表2 希釈液の組成

成分	希釈液	
	mBF5 ^{*3}	mTF1 ^{*3}
TES ^{*1}	1.2g	1.2g
TRIS ^{*2}	0.2g	0.4g
ブドウ糖	3.2g	3.1g
卵黄	20.0ml	20.0ml

- ^{*1} N-Tris(hydroxymethyl)methyl 2-aminoethane sulfonic acid
^{*2} Tris(hydroxymethyl)methyl aminoethane
^{*3} 成分を溶解させ、蒸留水で100mlとする。
2次希釈液はこれらにグリセリン2%を添加した。

3. 界面活性剤の低温及び凍結融解精子の生存性に及ぼす影響について

今回の実験で設定した界面活性剤の濃度は試験2における結果と Pursel & Johnson^{5,6)}及び副島ら⁹⁾の報告から LDAO (0.6及び1.2ml/100ml), Tween60(0.6及び1.2ml/100ml), X080(0.15ml/

100ml)及びSLS(0.6g/100ml)とし、これらを希釈液 mBF5に添加して凍結し、低温及び凍結融解精子の生存性を検討した。凍結の方法は図1に示した。生存性の指標としては精子生存性を低温時としてグリセリン平衡終了(5℃)及び凍結融解後1.及び2.と同様に示した。

1. 精液採取, 精液検査
↓
2. Kiev液による希釈(精液:Kiev液=1容:1~2容)
↓
3. 保持時間(22℃, 2.0時間)
↓
4. 遠心分離(1,300r.p.m.,15分間)
↓
5. 上澄の除去
↓
6. 1次希釈(精液:1次希釈液=1容:1容)
↓
7. 温度降下(22→5℃, 2.0~2.5時間)
↓
8. 2次希釈(希釈精液:2次希釈液=1容:1容)
↓
9. グリセリン平衡(1.0時間)
↓
10. 凍結

図1 豚精子の凍結方法

結果及び考察

1. 緩衝液の精子凝集に及ぼす影響

今回検討した9種の緩衝液では表3に示すように、Kiev液が最も凝集防止効果が高かった。また、精子生存性の維持にはKiev液、HEPES-EDTA4Naが効果的であった。

凝集は7日間の観察では1日目の程度からほとんど変化しなかった。

今回の実験ではEDTAを含む緩衝液では凝集がE0~1.5の範囲であり、凝集の程度は低かったが、

EDTAを含まないトリス系の緩衝液ではE1.5~2.0と高く凝集防止にEDTAが有効であると考えられた。

このようにEDTAを含む緩衝液(Kiev液など)が精子の凝集防止と精子活力の維持に効果的なことが認められ、Weitzeら⁹⁾の報告と同様の結果だったので、彼らと同様に、凍結前の精子洗浄に用いると良いと考え、以後の精子の凍結の実験に用いた。低温におかれた豚精漿が凝集し、沈殿することはBoursnellらによって^{1,2)}報告され、この沈殿の発生については豚の個体差があるが³⁾、精子耐凍性との関連は明らかになっていない。また、精漿の

表3 緩衝液の精子凝集に及ぼす影響

緩衝液	凝集の型と程度*	70%の精子が活発な運動を維持した日数
EDTA2Na-EDTA4Na	E1.5	4.8
PIPES-EDTA4Na	E1.13	5.5
BES-EDTA4Na	E1.25	5.3
MOPS-EDTA4Na	E1.25	5.8
TES-EDTA4Na	E0.3	5.8
HEPES-EDTA4Na	E1.25	6.0
Kiev	E0	6.0
MOPS-TRIS	E2.0	3.5
TES-TRIS	E1.5	3.5

*Shulmann(1978)の分類と表示による

沈殿はEDTAによって防止されることが認められているが¹⁾、精子の低温凝集の防止と精漿の沈殿防止とが同じ機序によるかどうかについては今回の実験では判らない。

2. 界面活性剤の室温における精子の凝集と生存性に及ぼす影響

豚精子の凍結において、界面活性剤が希釈液に添加され利用されている^{4,5,6,8,9)}。BF5⁵⁾及びTF1⁸⁾で

は、Orvus ES Paste (OEP) が用いられ、LEY⁶⁾ではEquex STMが用いられているが、これらは現在国内での入手が難しいので、これに代わる界面活性剤の利用が必要である。今回、6種類の界面活性剤を精子の凍結に先立って、豚精液の液状保存温度において精子に対する凝集性と生存性に関して検討した。

表4 精子の室温保存における界面活性剤の凝集に及ぼす影響

界面活性剤	希釈液	界面活性剤濃度 (ml 又は g/100ml)				
		0	0.15	0.3	0.6	1.2
X080*1	mBF5	1.5	0.3	2.0	1.0	2.0
	mTF1	1.7	2.0	2.7	2.0	1.0
LDAO*2	mBF5	1.5	1.3	1.2	1.2	0.83
	mTF1	1.7	0.8	1.0	1.0	1.0
NP-40*3	mBF5	1.5	2.3	2.3	1.7	1.3
	mTF1	1.7	2.3	2.0	1.7	0.7
POE*4	mBF5	1.5	2.3	2.3	1.3	1.0
	mTF1	1.7	2.0	2.7	2.3	1.3
Tween60*5	mBF5	1.5	1.2	1.3	1.7	1.3
	mTF1	1.7	1.7	2.3	1.3	1.3
SLS*6	mBF5	1.5	4.0	4.7	5.0	5.0
	mTF1	1.7	4.0	4.3	5.0	4.7

*1 GENPOL X080

*2 Lauryldimethylamine Oxide

*3 Nonidet P40

*4 Polyoxyethylene(10)Octylphenyl Ether

*5 Polyoxyethylene Sorbitan Monostearate

*6 Sodium Dodecyl Sulfate

その結果は表4に示したようにSLSが凝集性が強く、LDAO及びTween60の凝集性が弱かった。界面活性剤の種類によって凝集に差が出る理由は今回の実験では判らないが、凝集の弱い界面活性剤は表5に示すように精子の生存性の低下が小さく、凝集が精子の生存性に悪影響をもたらしていると思われた。界面活性剤の精子生存性に及ぼす影響では表5に示したように、mBF5に添加した時、X080(0.15ml/100ml)、LDAO(0.15~1.2ml/100ml)、Tween60(0.15~0.3ml/100ml)、SLS(0.15~0.3g/ml)で70%以上の著しく活発な前進

運動を示す精子が認められ、また、mTF1に添加した時では、LDAO(0.15~0.6ml/100ml)、Tween60(0.15~0.3ml/100ml)、SLS(0.15g/ml)で70%以上著しく活発な前進運動を示す精子が認められた。

界面活性剤の種類によって、精子生存性の低下を示す濃度に差が認められ、これは界面活性剤の精子に対する毒性の差を示すものと考えられた。NP-40及びPOEのように0.15ml/100mlで著しく精子生存性の低下を示す界面活性剤は凍結に利用出来ないと考えられた。

表5 精子の室温保存における界面活性剤の生存性に及ぼす影響

界面活性剤	希釈液	界面活性剤濃度 (ml 又は g/100ml)				
		0	0.15	0.3	0.6	1.2
X080	mBF5	73.3*	71.7*	31.7*	25.0*	0*
	mTF1	73.3	33.3	26.7	13.3	0
LDAO	mBF5	73.3	78.3	80.0	80.0	70.0
	mTF1	73.3	75.0	78.3	73.3	23.3
NP-40	mBF5	73.3	33.3	33.3	10.0	0
	mTF1	73.3	8.3	7.7	5.0	0
POE	mBF5	73.3	41.7	36.3	10.0	0
	mTF1	73.3	13.3	13.3	3.3	0
Tween60	mBF5	73.3	80.0	78.3	66.7	56.7
	mTF1	73.3	76.7	78.3	66.7	36.7
SLS	mBF5	73.3	78.7	73.3	18.3	0
	mTF1	73.3	73.3	60.0	28.3	16.0

*著しく活発な前進運動を示す精子(%)

3. 低温及び凍結精子の生存性に及ぼす界面活性剤の影響

精子生存性に関する結果は表6に示したように、SLSを除いてグリセリン平衡終了時ではそれぞれの界面活性剤で精子生存性に大きな差はなかったが、凍結終了後ではLDAO0.6ml/100mlが今回検討した界面活性剤の中では最も良い精子生存性を

示し、これはTF1⁸⁾や、BF5⁵⁾で用いられている濃度と同じである。しかし、LDAOを用いた凍結でも産業的に利用するには十分な精子生存性とはいえず、今後さらに凍結後の精子生存性を高める研究が必要と思われる。

表6 低潜及び凍結精子の生存性に及ぼす界面活性剤の影響

界面活性剤	濃度(mg 又は g/100ml)	5℃グリセリン平衡終了時	-35℃凍結時
LDAO	0.6	75.0*	11.7*
	1.2	61.7	1.7
Tween60	0.6	75.0	8.3
	1.2	66.7	5.0
X080	0.15	83.3	0
SLS	0.6	25.0	1.6

*著しく活発な前進運動を示す精子(%)

引用文献

- 1) Bournsnel, J. C. & T. K. Robert (1974) J. Reprod. Fert., 36 : 91-99.
- 2) Bournsnel, J. C. & E. A. Mustill (1975) J. Reprod. Fert., 43 : 153-157.
- 3) 北海道農業試験研究成績・計画概要集 (1986) 北海道農業試験場編
- 4) 梶田博司, (1987)凍結保存—動物, 植物, 微生物—, (酒井昭編) p.141. 東京, 朝倉書店
- 5) Pursel, V. G. & L. A. Johnson (1975) J. Anim. Sci., 40 : 99-102.
- 6) Pursel, V. G. & C. S. Park (1987) Theriogenology, 28 : 683-690.
- 7) Shulmann, S., (1978) In Spermatozoa antibodies and infertility (J. Cohen & W. F. Hendry, eds) p. 84. London, Black well Scientific Publications
- 8) 副島昭彦, 梶田博司, 和出靖, 松川善昌(1983) 人工授精研誌, 5 : 6-8.
- 9) Weitze, K. F., Fazano & D. Rate (1985) In Proceedings first international conference on deep freezing of boar semen (L. A. Johnson & K. Larsson eds) p.268-278. Uppsala University of Agricultural Science

めん羊の性周期中における外陰部所見, 子宮頸管粘液の pH および重量ならびに膣スメア像の変化

草刈 直仁 岸 昊司 大原 睦生

要約 繁殖季節である11~12月に, 雌羊の外陰部所見, 子宮頸管粘液の pH および重量ならびに膣スメア像が性周期に伴ってどのように変化するかについて調査した。

外陰部は発情前日 (day-1) から発情開始日 (day 0) にかけて腫脹が観察されたが, それ以外の日における外陰部所見との明瞭な区別は難しいと考えられた。

性周期を通しての子宮頸管粘液の pH 値は6.2~7.6にわたって分布していた。このうち day 0~day 2 の間の平均値は6.58~6.68を示し, それ以外の日の6.94~7.41と比べると低い値であった。子宮頸管粘液重量の平均値は day-1~day 1 の間で0.13~0.68g を示し, そのピークは day 0 で認められた。それ以外の日の粘液重量は0.02~0.10g であった。膣スメアにおける角化上皮細胞の比率は性周期の推移に伴って大きく変動し, day 0~day 2 の間で52~93%と高い値を示した。

結 言

めん羊の性周期の進行に伴って外陰部所見⁹⁾, 子宮頸管粘液の分泌量^{10,12)}, 牽縷性¹²⁾, 透明度¹²⁾, 化学成分¹¹⁾および結晶形成像⁹⁾などが変化することが知られている。これらの変化は周期的に変動する内分泌動態を反映しているものであり, なかでも発情期の前後には大きく変動する。したがって, 子宮頸管粘液の分泌量, 牽縷性および結晶形成像は, 発情の発見に有用であると考えられている。しかし, 発情期以外では, これらによって性周期のどのステージにあるかを判断するのは困難と思われる。

一方, 膣スメアにおける角化細胞の出現割合も, 発情期の前後に変化することが知られており⁸⁾, これらは主に形態的な相違にもとづいて判定されて

いた⁸⁾。しかし, Ghannam ら³⁾は, トルイジン・ブルーとミクロムを用いた染色法によって角化細胞を黄色に染め分け, めん羊の膣スメア所見は性周期の各ステージによって異なると報告している。また, 森ら⁶⁾は, 牛の子宮頸管粘液の pH を生体内で測定し, 一定の傾向を確認しているが, めん羊の子宮頸管粘液の pH を測定した報告は少なく^{1,7)}, 主に発情期の前後に限ったものである。さらに, これら種々の項目を関連づけて調べた報告は見当たらない。

そこで今回, めん羊の外陰部, 子宮頸管粘液の分泌量および pH ならびに膣スメアが性周期の進行に伴ってどのように変化するかについて調査を行った。

材料および方法

供試羊は、滝川畜産試験場に飼養する2歳のサフォーク種未経産雌羊6頭である。これらの雌羊に対し1985年11月16日にプロスタグランジンF₂αを15mg筋注し、11月28日から12月14日までの期間、実験に供した。

発情の発見は1日2回(6:00, 18:00)、精管切断雄羊による乗駕許容の有無によって行った。発情周期の表し方は、発情発見当日を発情周期の0日(day 0)とし、日数の経過に伴って発情の後を1, 2, 3...日;発情の前を-1, -2, -3...日(day 1, 2, 3...; day-1, -2, -3...)として表示した。

外陰部の観察ならびに子宮頸管粘液および膣スメアの採取は、1日1回13時から14時の間に実施した。外陰部所見は、Sabaら⁹⁾の方法に準じ、腫脹の程度と膣前庭粘膜の露出の有無によって3段階(ステージ1, 2, 3; 3が最も高度)に分類し、それぞれ0, 0.5, 1と点数をつけて表した。

子宮頸管粘液のpHは、膣鏡で膣部を開口したのち全長20cmの鉗子を用いてブロム・チモール・ブルー(BTB)試験紙を子宮外口部の粘液に浸すことによって測定した。子宮頸管粘液の重量は、pH測定が終わったのち滅菌綿棒によって粘液を採取し、採取前後の綿棒の重量差から算出した。

膣スメアは、子宮頸管粘液を採取したのち、さらに別の綿棒によって子宮外口部の周囲から採取し、スライドガラス上に綿棒をころがすようにして塗抹した。塗抹後、直ちに95%エチルアルコールで湿固定し、パパンニコロウ染色⁵⁾をしたのち鏡検した。鏡検により、ライトグリーンによって緑色に染まる未分化細胞、エオジンによって赤色に染まる分化した上皮細胞および細胞質がオレンジGによって橙色に染まる角化上皮細胞などが観察されたが、これらの細胞に占める角化上皮細胞の比率を指数(%)として表した。

結果および考察

発情周期各日における外陰部所見、子宮頸管粘液のpHおよび重量ならびに膣スメアの指数をFig. 1に示した。

外陰部の点数は、day-1からday 2の間で平均0.63(0~1)を示し、他の日と比較して高い傾向があった。Sabaら⁹⁾はこのような方法によってホルモン処理した雌羊における外陰部の発情性変化を観察しているが、今回の調査においては外陰部所見から発情を発見することは困難と考えられた。

子宮頸管粘液のpH値は、day-6からday-1までは平均7.3(6.8~7.6)であるが、day 0およびday 1では平均6.6(6.5~7.0)と低値を示し、その後上昇してday 5には平均7.1(6.9~7.4)を示した。このようにめん羊における子宮頸管粘液のpHは発情期に低下し、おおむね牛⁶⁾と似たパターンで変動すると考えられた。しかし、発情終了後のpHの上昇は緩やかであり、day-5およびday 10ではわずかながらpHの低下が認められた。発情期におけるこのようなpHの低下は、この時期に増加する血中エストロジェンの作用の結果と考えられている⁶⁾。めん羊では、血中エストロジェンのピークは性周期の13日~発情期、1~3日および7~10日に見られている²⁾ことから、今回のpH値の変動は、このような内分泌的变化に起因するものと考えられた。

子宮頸管粘液の重量はday-1から増加し始め、day 0には0.676(0.455~1.073)gとピークに達しday 2以降はほとんど検出されない程度にまで減少した。子宮頸管粘液の分泌は、エストロジェンによって増加し、プロジェステロンによって減少すると言われている⁴⁾。今回のように発情期にのみ分泌量が増加し、プロジェステロンの血中濃度が高い黄体期ではほとんど分泌の見られないという結果は、これに一致すると考えられた。

膣スメアの指数はday-1までは1~6%と低値であるが、day 0では59.8%、day 1では93.3%と高値を示し、以後漸減してday 5には23.6%とな

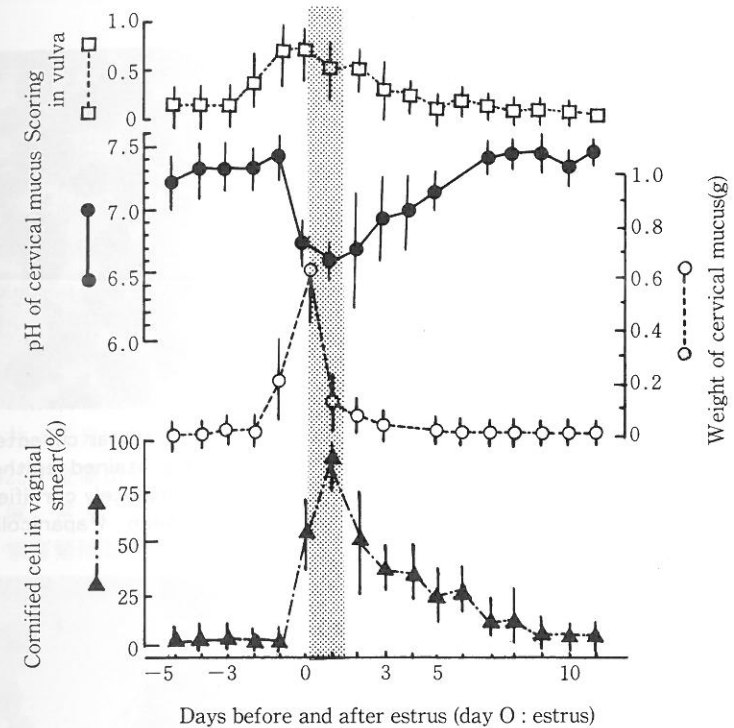


Fig. 1 Scoring in vulva, pH and weight of cervical mucus and cornified cell in vaginal smear of ewes during estrous cycle. The shaded area represents estrous stage.

った。性周期の各ステージにおける膣スメアはそれぞれ特徴的な所見を呈した。すなわち、day-6~-1の雌羊における膣スメアでは、そのほとんどが、ライトグリーン好性の未分化な小円形ないし不整形の上皮細胞からなり、少数の多形核白血球を伴っていた(Fig. 2)。しかし、day 0では、オレンジG好性の完全に角化した上皮細胞がほぼ半数を占め、他に分化の程度が様々な各種の上皮細胞が認められた(Fig. 3)。day 1では、角化上皮細胞がほとんどを占める(Fig. 4)が、day 2では、day 0に類似した所見を呈した。day 3~6では、ライトグリーン好性の円形ないし不整形の上皮細胞が多かったが、角化上皮細胞も2~3割程度認められ、多形核白血球が多数見られた(Fig. 5)。day 7~10では、ライトグリーン好性の円形上皮細胞がほとんどであった(Fig. 6, 7)。Ghannamら³⁾も、めん羊の性周期に伴う膣スメアの変化をトルイジン・ブルーおよびミクロム染色によって観察

しており、角化細胞はday 2~day 4に最も多く見られると述べているが、パパンニコロウ染色を用いた今回の我々の結果では、day 1~day 2で角化細胞が最も多く観察された。しかし、これは、彼らが2~8歳のプレ・アルプス種およびイル・デ・フランス種雌羊を用いていることから年齢および品種の違いによって、その内分泌状態が異っていたことによるのかもしれない。

このように、外陰部所見、子宮頸管粘液の分泌量およびpHならびに膣スメア所見を総合的に判断することによって、性周期のどのステージにあるかを、よりの確に判定することが可能であると考えられた。また、人工授精時の頸管粘液のpH値は受胎に影響を及ぼすとの報告もあり¹⁾、授精適期の判定にも有用と思われることから、今後、検討してみる必要があると考えられた。

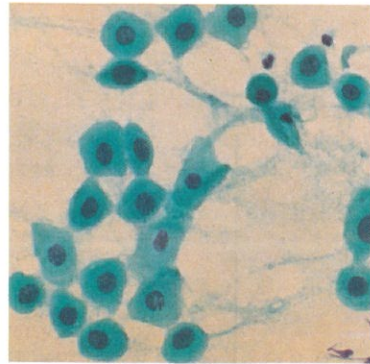


Fig. 2 Vaginal smear collected from ewe on day -3. Large numbers of darkly stained epithelial cells with light green were seen. Papanicolaou's stain; $\times 200$

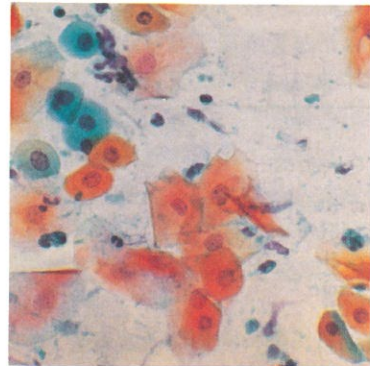


Fig. 3 Vaginal smear collected from ewe on day 0. Completely and partially cornified cells, differentiated and spherical cells were seen. Papanicolaou's stain; $\times 200$

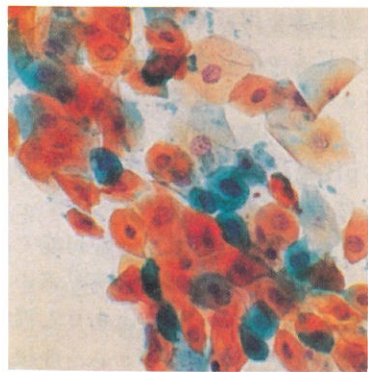


Fig. 4 Vaginal smear collected from ewe on day 1. Large numbers of completely cornified cells were seen. Papanicolaou's stain; $\times 200$

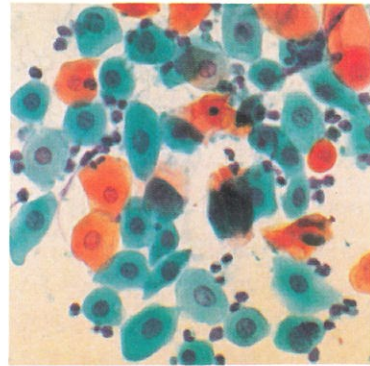


Fig. 5 Vaginal smear collected from ewe on day 3. Darkly stained epithelial cells with light green, completely cornified cells and leukocytes were seen. Papanicolaou's stain; $\times 200$

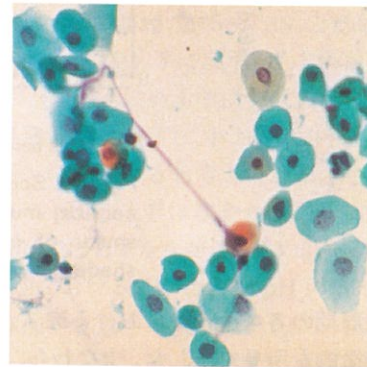


Fig. 6 Vaginal smear collected from ewe on day 8. Small round cells and flattened epithelial cells were seen. Papanicolaou's stain; $\times 200$

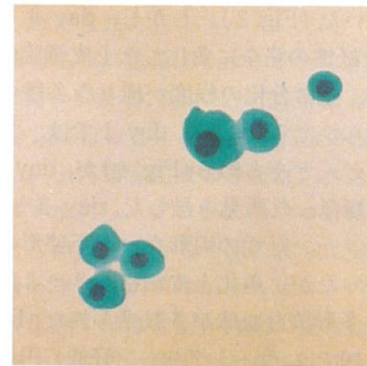


Fig. 7 Vaginal smear collected from ewe on day 10. Medium-sized round cells were seen. Papanicolaou's stain; $\times 200$

文 献

- 1) Brückner, G. and Kämpfer, I. (1984) Anim. Breeding Abst., 52 (8) : 597.
- 2) 福井 豊 (1982) 畜産の研究, 36 : 1255~1258.
- 3) Ghannam, S. A. M., Bosc, M. J. and du Mesnil du Buisson, F. (1972) Am. J. Vet. Res., 33 : 1175~1185.
- 4) 市川 茂孝 (1984) 家畜繁殖学全書 (望月公子編) 71~74, 朝倉書店, 東京.
- 5) 金井 泉, 金井 正光 (1983) 臨床検査法提要, 1324~1325, 金原出版, 東京.
- 6) 森 純一, 富塚 常夫, 広木 政昭, 仮屋 堯由 (1979) 家畜繁殖誌, 25 : 6~11.
- 7) Rawal, C. V. S. (1985) Anim. Breeding Abst., 53 (9) : 735.
- 8) Robinson, T. J. (1959) Reproduction in Domestic Animals (edited by Cole, H. H and Cupps, P. T.) pp300~304, Academic Press, New York and London.
- 9) Saba, N., Cunningham, N. F., Symons, A. M. and Miller, P. G. (1975) J. Reprod. Fert., 44 : 59~68.
- 10) Smith, J. F. and Allison, A. J. (1971) J. Reprod. Fert., 24 : 279~282.
- 11) van der Westhuysen, J. M. and van Niekerk, C. H. (1970) Vet. Bulletin, 40 : 419~420.
- 12) 吉岡 善三郎 (1957) 新訂家畜人工授精の技術 (伊藤 祐之ら共著) 231~234 産業図書, 東京.

Changes in Vulva, pH and Weight of Cervical Mucus, and Vaginal Smear of Ewes during Estrous Cycle

Naohito KUSAKARI, Kohji KISHI
and Mutsuo OHARA

(Received : Apr. 13. 1988)

Summary

Cyclic changes in Vulvae, pH and weights of cervical mucus, and vaginal smears of 6 Suffolk ewes, aged 2 years, were investigated between late November and December.

The vulvae on day-1 and day0 (the day of estrus) showed estrous change, though it seemed to be difficult that the appearance was distinguished with that in another days during estrous cycle. The pH values of cervical mucus measured during the cycle ranged between 6.2 and 7.6. The mean pH values (6.58~6.68) of the mucus measured between day0 and day2 were lower than those (6.94~7.41) in another days. The mean weights of cervical mucus collected between day-1 and day1 were 0.13~0.68g, and the peak was observed on day0. The mean weights of the mucus in another days ranged between 0.02~0.10g. Appearance of epithelial cell in vaginal smear largely changed through the cycle. The percentage of cornified cell in the smears between day0 and day2 were higher than those in another days.

ビタミンA投与羊における血漿中レチノール 及びレチニルパルミテート濃度の定量

仙名 和浩

要約 グラジエント逆相高速液体クロマトグラフィーによりめん羊血漿中レチノール及びレチニルパルミテート濃度を定量した。定量の重複再現性(CV値)は、レチノールが平均濃度 $37.39\mu\text{g R Eq/dl}$ (中濃度域)及び $50.32\mu\text{g R Eq/dl}$ (高濃度域)でそれぞれ1.07%, 0.93%, レチニルパルミテートが平均濃度 $0.632\mu\text{g R Eq/dl}$ (低濃度域)及び $24.93\mu\text{g R Eq/dl}$ (中濃度域)でそれぞれ5.05%, 1.73%であった。血漿量を $250\mu\text{l}$ とした時の定量限界(SN比=5)はレチノール, レチニルパルミテート共に $0.23\mu\text{g R Eq/dl}$ であった。体重1kg当たり6mg R EqのビタミンAをめん羊に経口投与したところ(n=3), 投与前及び投与6時間後の血漿中レチノール濃度は $34.60\pm 2.29\mu\text{g R Eq/dl}$ (平均±S. D.)から $48.27\pm 3.06\mu\text{g R Eq/dl}$ に, 血漿中レチニルパルミテート濃度は $0.727\pm 0.665\mu\text{g R Eq/dl}$ から $21.17\pm 3.09\mu\text{g R Eq/dl}$ に上昇した。めん羊血漿中には, レチニルパルミテート以外のレチニルエステルと考えられるピークが認められた。そのうちの1つは, ビタミンAの投与によりレチニルパルミテートよりも顕著な血漿中濃度の増高が認められた。

緒言

近年, ビタミンAの生理作用が医学領域で明らかにされると共に, 畜産分野でもその生理作用による家畜生産の増大や疾病予防を期待したビタミンAの大量投与がしばしば行われるようになった。このような家畜に対するビタミンAの適正利用技術の確立には, 単に投与量と生産値との因果関係のみを検討するのではなく, 投与後の体内動態及び細胞や組織における作用を解明していくことが必要である。

ビタミンAは経口的に摂取され, 腸管から吸収された後, レチニルエステルとして肝臓(以下肝)に輸送, 貯蔵される。肝からビタミンA要求組織・

細胞へは, レチニルエステルが加水分解を受けレチノールとなり肝で合成されたレチノール結合蛋白質(retinol-binding protein, 以下RBP)と結合して血液中に放出・運搬される。このような特徴的な体内動態のために血中濃度についても総ビタミンAとしてでなく生理的意義の異なるレチノールとレチニルエステルとを分離して定量する必要がある。そこで本研究では, めん羊にビタミンAを大量投与した際の血漿中レチノール及び主要レチニルエステルであるレチニルパルミテート濃度の高速液体クロマトグラフィーによる定量を試みた。

材料及び方法

1. ビタミンAの定量

レチノール, レチニルアセテート及びレチニルパルミテート (以上シグマ, U. S. A.) を標準物質として用いた。また溶媒には和光純薬 (日本) の液体クロマトグラフ用エタノール, メタノール, イソプロパノール, n-ヘキサン及びテトラヒドロフラン (以下各々EtOH, MtOH, IPA, n-Hex, THF) を用いた。

高速液体クロマトグラフ (以下 HPLC) 装置は 600型マルチソルベント送液システム, U6K型ユニバーサルインジェクター, 490型多機能検出器 (以上ウォーターズ, U. S. A.) を用いた。カラムはノバパック C₁₈ (4μm 粒径, 3.9mm×15cm, ウォーターズ, U. S.A.) を使用した。

定量は, レチニルアセテートを内部標準物質 (以下 IS) として用いる^{1,4)} 内部標準法によった。血漿からのビタミン A の抽出は, Bieri et al¹⁾, Driskell et al⁴⁾ の抽出系を用い, 血漿量を変更した⁹⁾。すなわち, 血漿250μl を試験管にとり, IS の EtOH 溶液を等量加え激しく混合した後, n-Hex を 1 ml 加え 1 分間激しく混合した。次に 2000 回転, 5 分間遠心分離し, n-Hex 層を約 800μl とし, 窒素気流で乾固, IPA50μl に再溶解しそのうちの 25μl を HPLC に注入した。移動相は予備的にいくつかの条件を検討した結果, 水・MtOH・THF の 3 液によるグラジェント移動相を用いることにした。初期条件 (試料注入時) を MtOH : 水 = 94 : 6 (体積比, 以下同様) とし 9 分後に MtOH : THF = 85 : 15, 9.8 分後に最終条件の MtOH : THF = 75 : 25 になるよう直線的に変化させた。その後 10.5 分から 0.5 分間で初期条件に復帰させ, 22 分後までカラムの再平衡を行った。流速は 1.5ml/分, カラムは 40℃ に保持した。溶離液はサンプルを注入後から 5.4 分まで 325nm, 5.4 分から 12 分まで 292nm, 12 分からは再び 325nm での吸光度を記録した。予め標準溶液により一定量の内部標準物質に対するレチノール及びレチニルパルミテートのピーク高さ比から検量線を作成した。次いでプールしため

ん羊血漿を 10 回反復分析し, 得られたクロマトグラムより各物質の濃度を決定し, これを標準血漿とした。各サンプルの定量はこの標準血漿によりその都度検量線を求め行った。

2. ビタミンAの大量投与

サフォーク種成雌羊 3 頭を用いた。供試羊は畜舎内で群飼し, 1 日 1 頭当たり 1.8~2.0kg の乾草と 150g のえん麦を給与し, 自由飲水とした。ビタミン A の投与は体重 1 kg 当たり 6 mg REq (REq : レチノール当量, 1 μg REq = 3.33IU) を強制経口的に行い, 投与前及び投与 6 時間後に頸静脈からヘパリン加真空採血管に血液を採取した。血液は遠心分離し, 血漿をビタミン A 測定時まで -20℃ にて保存した。

結 果

本分離条件では, レチノールとレチニルアセテート (IS) は良く分離した (図 1)。まためん羊血漿の分析では, レチノールとレチニルパルミテートの他に 325nm で検出されるピークが認められた (図 1 中ピーク 5, 6, 7)。それらのうち, ピーク 5 はレチニルパルミテートとの分離がやや悪かったが, 分離能 (Rs^{*1}) は 1.2 程度でありレチニルパルミテートの定量には支障が無かった。

プール血漿を定量した際に得られた, 本定量法の重複再現性を表 1 に示した。レチノールの CV 値は血漿 1 (中濃度域) 及び血漿 2 (高濃度域) でそれぞれ 1.07%, 0.93%, レチニルパルミテートの CV 値は血漿 1 (低濃度域) 及び血漿 2 (中濃度域) でそれぞれ 5.05%, 1.73% であった。SN 比 = 5 とした場合の定量限界はレチノール, レチニルパルミテート共に 0.23μg REq/dl であった。

ビタミン A 投与前後の血漿中レチノール及びレチニルパルミテート濃度を表 2 に示した。ビタミン A の投与前の血漿中レチノール濃度は 32.0~36.3μg REq/dl であった。ビタミン A の投与により 6 時間後で 46.4~51.8μg REq/dl に上昇した。

ビタミン A 投与前の血漿中レチニルパルミテ

ト濃度は定量限界に近い 0.27~1.49μg REq/dl であった。ビタミン A の投与により著しく増加し, 6 時間後で 18.4~24.5μg REq/dl となった。

レチニルパルミテートより遅れて溶出された未知ピークの高さは, ビタミン A 投与によって明らかに増加し, その内のピーク 7 の増加率はむしろレチニルパルミテートよりも大きかった (表 3)。

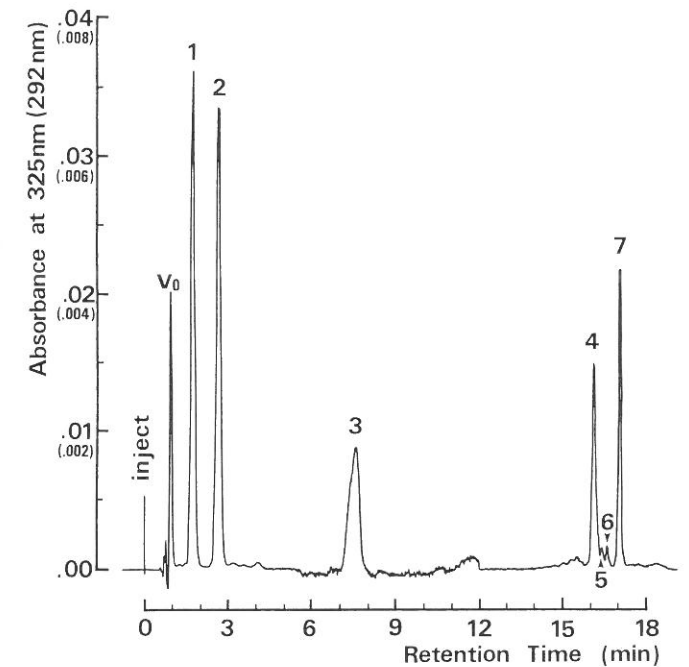


図 1 ビタミンA大量投与羊血漿の分析例

このクロマトグラムはビタミン A 投与後 6 時間のめん羊血漿を分析したものである。Vo はボイドボリューム, ピーク 1 はレチノール, 2 はレチニルアセテート (内部標準), 3 は未同定だが恐らく α-トコフェロール, 4 はレチニルパルミテート, 5, 6 及び 7 は未同定だがレチニルエステルの可能性がある。なお分析の 0~5.4 分及び 12 分~終了までは 325nm, 5.4 分~12 分は 292nm で吸光度をモニターし, ベースラインは 490 型多機能検出器によって補正している。

表 1 めん羊血漿中レチノール及びレチニルパルミテート濃度定量の重複再現性

	レチノール (μgREq/dl)		レチニルパルミテート (μgREq/dl)	
	血漿 1 (中濃度域)	血漿 2 (高濃度域)	血漿 1 (低濃度域)	血漿 2 (中濃度域)
	38.2	50.3	0.66	25.3
	37.5	49.8	0.65	24.8
	37.3	50.5	0.69	25.6
	37.0	50.1	0.63	24.8
	37.7	49.4	0.65	24.9
	37.5	50.3	0.60	24.8
	36.9	50.8	0.63	24.2
	37.5	51.0	0.62	24.5
	36.9	50.6	0.61	24.9
	37.4	50.4	0.58	25.5
平均	37.39	50.32	0.632	24.93
σ _{n-1}	0.3985	0.4686	0.0319	0.4321
CV%	1.07	0.93	5.05	1.73

* 1

$$Rs = 2 \times \frac{\text{ピーク b の保持時間} - \text{ピーク a の保持時間}}{\text{ピーク a の幅} + \text{ピーク b の幅}}$$

表2 ビタミンA投与前後の血漿中レチノール及びレチニルパルミテート濃度

	めん羊No.	投与前(μgREQ/dl)	投与6時間後(μgREQ/dl)
レチノール	1	35.5	46.6
	2	36.3	51.8
	3	32.0	46.4
	平均	34.60	48.27
	σ_{n-1}	2.29	3.06
レチニル パルミテート	1	0.27	24.5
	2	0.42	18.4
	3	1.49	20.6
	平均	0.727	21.17
	σ_{n-1}	0.665	3.09
レチノール+ レチニル パルミテート	1	35.8	71.1
	2	36.7	70.2
	3	33.5	67.0
	平均	35.33	69.43
	σ_{n-1}	1.65	2.15

表3 ビタミンA投与前後におけるレチニルパルミテート、ピーク5、6及び7のピーク高さの推移

	めん羊No.	投与前*1	投与6時間後	増加率*2
レチニル パルミテート	1	1	89.9	89.9
	2	1.6	67.4	43.4
	3	5.5	75.6	13.9
ピーク5	1	ND*3	10.8	—
	2	ND	8.1	—
	3	ND	9.5	—
ピーク6	1	ND	11.5	—
	2	ND	8.6	—
	3	ND	9.2	—
ピーク7	1	1.2	171.0	143.5
	2	2.1	159.8	72.8
	3	6.0	134.8	22.4

*1：めん羊1のビタミンA投与前のレチニルパルミテートのピーク高さを1としたときの各ピークの高さで、内部標準による補正済み。*2：投与6時間後値÷投与前値。*3：検出されず。

考 察

本定量法は定量限界に近い低濃度域を除き、極めて再現性の高いものであった。一般に内部標準法を用いたHPLCによる血漿中レチノール及びレチニルエステル濃度の定量精度は高く、多くの報告でCV値が1~4%を示す^{1,2,3,9)}。しかし、それらの多くは単一濃度移動相によるものである。今回再現性が問題とされるグラジエント移動相によっても、十分な定量精度が得られることが確かめられた。

本研究においてビタミンAをめん羊に大量経口投与すると、数時間の内に血漿中レチノール及びレチニルパルミテート濃度が上昇することが確認された。レチニルパルミテートの血漿中濃度の上昇は、ビタミンAが腸管から吸収された後、まずレチニルエステルとして血中に入るといふ機序によると考えられた。そして血漿中レチノール濃度の上昇は、ビタミンA投与にともなうレチニルエステルの血漿中濃度の上昇が肝からのRBPの分泌を促し、二次的に生じたものと考えられる。すなわち、ビタミンA欠乏ラットにレチニルエステルを経口投与すると、血中RBP濃度が急速に上昇すること⁶⁾、またビタミンA含有カイロミクロンを静脈内投与するとその投与量に応じて肝からRBPが放出されることが認められることから⁷⁾、ビタミンAがRBPの分泌過程を調節していると考えられているからである⁷⁾。

一方、325nmで検出されるいくつかの未同定ピークがめん羊血漿中に認められた。これらのピークはビタミンA投与によって明らかに血漿中濃度が上昇しており(表3)、ヒトにおいてもビタミンAを経口投与した場合に、血漿中にはレチニルパルミテートの他に、いくつかのレチニルエステルが検出されている²⁾ことから、パルミチン酸以外の脂肪酸とのレチニルエステルと考えられた。このうちピーク7は、その溶出位置とヒトでもレチニルパルミテートに次いで血漿中濃度の高いことから²⁾レチニルステアレートと考えられた。本実験でピーク7はビタミンAの投与によりレチニルパル

ミテートよりも血漿中濃度の増加率が大きく、ビタミンAの大量投与時のビタミンA吸収の上で重要なレチニルエステルと考えられた。ピーク5及び6もレチニルエステルと考えられるが、他の分離条件^{2,5)}での成績との相同からの同定は難しく、標準物質(レチニルパルミテート以外は市販されていない)による確認が必要である。

ところで、このようなビタミンAの投与に伴う血漿中レチノール及びレチニルエステル濃度の推移にはいくつかの要因が関与すると考えられる。すなわち第一点は、腸管からの吸収率であり、第二点は貯蔵臓器である肝へのレチニルエステルの取り込み率である。この両者がビタミンA摂取レベルによって変動することが子羊で知られている³⁾。すなわち、腸管から血液中へのビタミンAの吸収率はビタミンA欠乏子羊で高く、また吸収後欠乏子羊では血漿中ビタミンAはほとんどがレチノールとなるのに対し、過剰子羊ではほとんどが肝に取り込まれずレチニルエステルのまま血漿中に存在していることが認められている。第三点はレチノールとしての血中への分泌である。肝におけるRBP合成の抑制もしくは低下はレチノール濃度を低下させる。その1例として、ヒトにおいて低蛋白質栄養状態におけるビタミンA欠乏が知られている(Protein-energy malnutrition)⁸⁾。これは、蛋白質不足によりRBP合成が低下し、ビタミンAを十分摂取していても結合蛋白質の欠乏によりレチノールとして利用されないためである。

以上のように、ビタミンA投与後の血漿中レチノール及びレチニルエステル濃度の推移を観察することによって、被投与個体のビタミンA代謝の状態を推測することが可能と考えられる。そして、この目的のためのレチノール及びレチニルエステルの分別定量は意義が深く、今後の研究に欠かせないものである。さらに血漿中RBP濃度の定量も重要と考えられる。

謝 辞

本研究に当たり、HPLC装置を快く貸与下さった日本ミリポア・リミテッド ウォーターズクロマトグラフィー事業部に深謝する。

文 献

- 1) Bieri, J. G., Tolliver, T. J. and Catignani, G. L. (1979) *Am. J. Clin. Nutr.*, 32 : 2143-2149.
- 2) DeRuyter, M. G. and DeLeenheer, A. P. (1978) *Clin. Chem.*, 24 : 1920-1923.
- 3) Donoghue, S., Donawick, W. J. and Kronfeld, D. S. (1983) *J. Nutr.*, 113 : 2197-2204.
- 4) Driskell, W. J., Neese, J. W., Bryant, C. C. and Bashor, M. M. (1982) *J. Chromatogr.*, 231 : 439-444.
- 5) Furr, H. C., Cooper, D. A. and Olson, J. A. (1986) *J. Chromatogr.*, 378 : 45-53.
- 6) Muto, Y., Smith, J. E., Milch, P. O. and Goodman, D. S. (1972) *J. Biol. Chem.*, 247 : 2542-2550.
- 7) 武藤泰敏 (1973) 代謝, 10 : 884-902.
- 8) 武藤泰敏, 森脇久隆, 二ノ宮三生, 河合潔 (1983) 内科, 52 : 1013-1018.
- 9) Nichoalds, G. E. (1983) *Clin. Chem.*, 29 : 708-712.

Simultaneous Analysis of Plasma Retinol and Retinyl Palmitate in Ewes before and after Oral Administration of Vitamin A.

Kazuhiro SEN-NA

(Received : Apr. 11. 1988)

Summary

Ovine plasma retinol and retinyl palmitate were determined simultaneously by reversed-phase gradient high-performance liquid chromatography. Under the selected analytical condition, within-day coefficients of variation (CV) were 1.07% and 0.93% for retinol with means of 37.39 μ g REq/dl and 50.32 μ g REq/dl, respectively. CV for retinyl palmitate were 5.05% and 1.73% with means of 0.632 μ g REq/dl and 24.93 μ g REq/dl, respectively. In plasma (250 μ l), lower detection limit (S/N=5) was about 0.23 μ g REq/dl for both components. To three ewes, 6mg REq/kgBW of vitamin A was orally administered. Plasma concentrations of retinol and retinyl palmitate before administration of vitamin A were 34.60 \pm 2.29 μ g REq/dl (mean \pm SD) and 0.727 \pm 0.665 μ g REq/dl, respectively. Plasma retinol and retinyl palmitate were increased to 48.27 \pm 3.06 μ g REq/dl and 21.17 \pm 3.09 μ g REq/dl at 6hours after administration of vitamin A, respectively. In addition to retinyl palmitate, several peaks considered to be retinyl esters were detected in ovine plasma. One of these peaks increased more remarkably than retinyl palmitate after administration of vitamin A.

豚糞・稲わら混合物の夏期における腐熟の様相について

阿部 英則 小松 輝行 大原 益博 山川 政明

要約 豚糞の堆肥化をうながすため、稲わらを混合して腐熟させ、品温、堆積高さ、各種成分および微生物相の推移を調べた。試験は夏期に行った。

1. 稲わらを0, 5, 15, 30%混合して腐熟したところ、15%混合した場合の温度上昇がすみやかであり、高温の持続時間も長く、稲わらの混合割合を15%と設定した。
2. 腐熟開始1ヶ月後まで品温は高く推移した。堆積高さの低下は2ヶ月後までみられ、乾物、有機物、セルロースの減少は32~42日後にはゆるやかとなった。
3. 微生物相は開始直後は変動したものの、42日後と320日後の間に違いは認められず、42日後では安定しているものと思われた。
4. 以上の点を勘案して、夏期において、活発な有機物分解を伴う腐熟についてはおおむね2ヶ月間の堆積により終息するものと考えられた。

結 言

家畜糞は腐熟化させたのち、堆肥として田畑に還元するのが望ましい。糞を敷料など粗大材料と混合して適切な水分、通気性を保つと好気醗酵が起こる。この醗酵により混合物中の易分解成分は減少して微生物作用に対しかなり安定化し、最終的には緩効性肥料である堆肥となる。一方では、未熟糞施用によって起こる窒素飢餓や有害ガス発生を腐熟化により防ぐことができ、さらに醗酵熱で病原菌や雑草の種子を死滅させるともいわれており、糞の腐熟促進をはかることは極めて重要である。

腐熟は微生物の作用によるもので、温度によって大きな影響を受け、夏期と冬期ではその様相が異なることは当然考えられ、寒冷な冬期間ではと

くに腐熟の遅れが目立っている。

腐熟を促進するには前述の如く粗大材料(副資材)と混合して適切な水分、通気性を保つこと、並びに醗酵の立上がりを速めるために腐熟物の一部を微生物源として再利用することが考えられる。これらの点から、効果的な急速腐熟化法として以下に示す方法が想定される。すなわち、糞と副資材を混合して腐熟化をはかり、腐熟が進んだ時点で一部は微生物源として新たな糞および副資材と混合して再度腐熟を開始する。残りは直接ないしは後熟を経たのち、堆肥として用いる。これを順次繰返すわけであるが、そのためには副資材の混合割合や一回の腐熟に要する期間を知る必要があり、さらに夏期および冬期における違いについても明らかにせねばならない。

本試験は豚糞および副資材として稲わらを用い、腐熟をはかるために両者の適切な混合割合を設定

し、さらに温度、各種成分の消長および微生物の変化を通して腐熟の様相をさぐり、また北海道の夏期において腐熟に要する期間を推測しようとした。

試験方法

供試糞は滝川畜産試験場雌豚舎から排出され敷料(蓐草)の混入が比較的少ない豚糞であり、また水分や通気調整用の副資材には細断稲わら(2cm程度)を用いた。豚糞と稲わらはトラクターに装着したロータベータを用いて攪拌し、均一に混合した。混合物は底部、側面からも自然通気されるフレーム型発酵槽内に堆積して腐熟させた。発酵槽の容量は1m³(縦1×横1×高さ1m)ないし2m³(1×1×2m)である。

試験は回分式処理で行った。

試験構成は以下の2つである。

1. 豚糞と稲わらの混合割合

豚糞と稲わらの適切な混合割合を知るために、豚糞と稲わらを重量比で100:0, 95:5, 85:15, 70:30の比率で混合した4処理区を設け、1m³の発酵槽内で50日間腐熟させた。通気を促進するための切返しは行なわなかった。

この間、経時的に品温、堆積高さを調べ、また腐熟による分解の目安として水可溶部の割合を調べた⁵⁾。品温は発酵槽中心部の底部からおおむね20, 40, 60, 80, 100cmの部分にセンサーを埋めこんで自記温度計で記録した。

2. 豚糞・稲わらの混合物の品温、成分および微生物相の推移

上記1の試験で設定された適切な割合、すなわち豚糞85に対して稲わら15を混合し、2m³の発酵槽内に堆積して昭和61年6月22日から320日間腐熟させた。この間、腐熟により一旦上昇した品温がおおむね50℃を下回る場合は切返しを行った。また、水分減少が著しい場合は切返し時に水を加えて、開始時水分含量と同程度となるようにした。

腐熟期間を通して品温、堆積高さを経時的に調べた。

腐熟開始0, 25, 32(第1回切返し), 42(第2

回切返し), 56(第3回切返し), 320日後に試料を採取し、有機物、繊維成分、アンモニア態窒素(NH₃-N)、硝酸態窒素(NO₃-N)、亜硝酸態窒素(NO₂-N)含量および水抽出液のpHを測定した。また0, 3, 25, 42, 320日後の試料について微生物相(好気性中・高温菌, 放線菌, 糸状菌, 大腸菌群, 孢子形成菌)を調査した。

繊維成分の測定にはデタージェント分析法⁶⁾を用いた。灰分を差し引いた、中性デタージェント不溶物をNDF、酸性デタージェント不溶物をADFとした。酸性デタージェント不溶物中の硫酸不溶物から灰分を引いた残りをリグニンとし、ADFからリグニンを引いた残りをセルロースとした。NH₃-N, NO₃-N, NO₂-Nの測定はBremnerの同時定量法⁷⁾を用いた。

微生物の計測は平板培養による生菌数を測定した。すなわち試料10gを滅菌水90mlに懸濁し、ホモゲナイザーで5分間攪拌した。次いで二重ガーゼでろ過し、ろ液を10倍ずつ適宜希釈し、希釈液を平板に塗抹して培養した。好気性中・高温菌は0.5%グルコース加普通寒天培地、放線菌はエッグアルブミン寒天培地、糸状菌はポテトデキストロース寒天培地、大腸菌群はDHL寒天培地で、また孢子形成菌は100℃、1分間熱処理した希釈液を0.5%グルコース加普通寒天培地で培養した。好気性中温菌、放線菌、孢子形成菌は30℃、好気性高温菌は55℃、糸状菌は25℃、大腸菌群は38℃で培養した。

試験結果および考察

1. 豚糞と稲わらの混合割合

腐熟過程における品温の推移を図1に、水分含量、堆積高さおよび水可溶部の変化を表1に示した。

稲わらの混合割合は品温や水可溶部の増加量に大きく影響していた。稲わらを混合しない場合、品温上昇はみられず、水可溶部の増加も認められなかった。

稲わら5%区においては、ゆるやかに品温が上昇して1週間後にピークに達するものの、50℃以

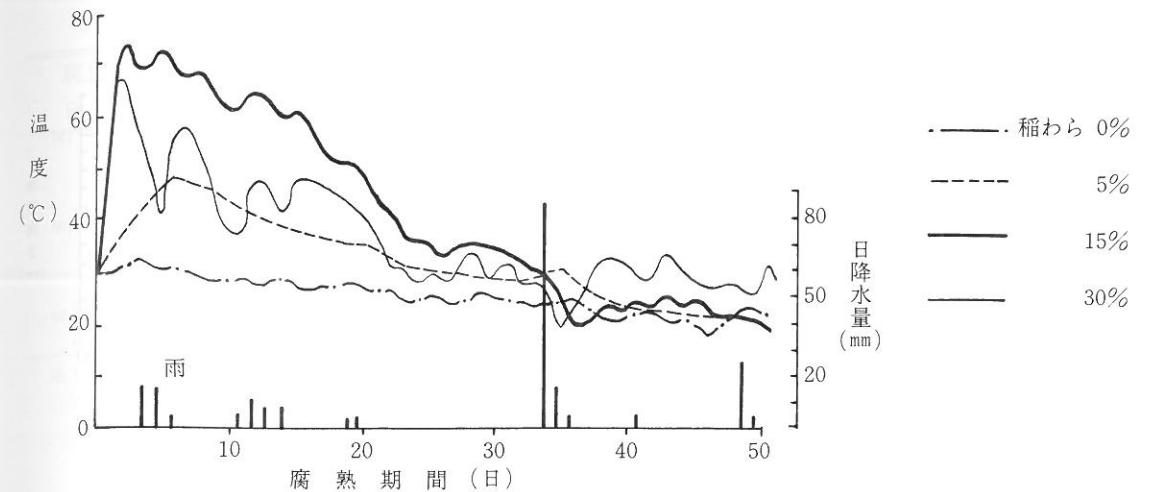


図1 稲わらの混合割合が異なる腐熟過程における品温の変化

表1 稲わらの混合割合が異なる腐熟過程における水分含量、堆積高さ、水可溶部の変化

混合割合	水分含量(%)			堆積高さ(cm)			水可溶部(%)		
	0	17	50日	0	17	50日	0	17	50日
0%	76	71	—	88	73	72	73	74	—
5	70	69	—	94	71	70	60	72	—
15	62	35	—	95	61	54	55	73	—
30	57	25	—	92	65	57	40	43	—

上に上昇することはなかった。水可溶部についてはやや増加し堆積高さも低下することからみて、分解はやや進行していると思われた。

稲わら15%区および30%区の品温は堆積開始後ただちに上昇し、翌日には70℃前後でピークに達した。しかし、前者では品温がゆるやかに低下していくのに対し、後者での低下は急激であった。稲わら30%区では降水直後品温が再上昇する程度が大きいことから、水分不足が腐熟化の大きな阻害要因であると推察される。

他区と比べて、15%区は堆積高さの低下度合、水可溶部の増加量とも大きく、豚糞への稲わらの適切な混合割合は15%付近にあると判断した。

2. 豚糞・稲わら混合物の品温、成分および微生物相の推移

豚糞へ稲わらを15%混合して腐熟させた。切返

しは開始32, 42, 56日後に行い、1回目の切返し時にのみ水分を調整した。

1) 品温、堆積高さの推移

腐熟過程における品温、堆積高さの変化を図2に示した。

品温は開始翌日には全層にわたって70~80℃の高温に達し、55℃以上の高温発酵が1ヶ月程持続した。この1ヶ月間に堆積高さは44%低くなった。その後1, 2回目の切返しにより品温は再上昇し、おおむね60℃に達したが、その持続期間は短かった。しかしながら、この間にも堆積高さの低下は続き、開始56日後の低下率は71%に達した。3回目の切返し以後は、品温はほとんど上昇せず、堆積高さの低下もほとんど認められなくなった。

以上のことから急激な分解過程は約2ヶ月間で終息したものと推察される。

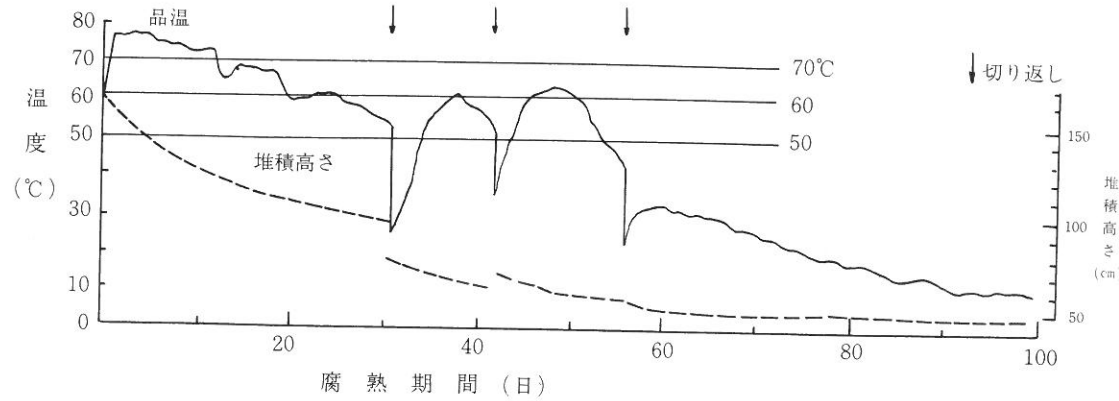


図2 腐熟過程における品温、堆積高さの変化

2) 成分の推移

腐熟過程における乾物、およびセルロース、リ

グニンの変化を表2に示した。

表2 腐熟過程における乾物、セルロース、リグニンの変化

腐熟日数	乾物		セルロース		リグニン	
	-(kg)-	-(乾物%)-	-(kg)-	-(乾物%)-	-(kg)-	-(乾物%)-
0	277(100)	25.3	70.1(100)	11.0	30.5(100)	
32	174(63)	12.2	21.2(30)	19.0	33.1(109)	
42	164(59)	11.2	18.4(26)	23.0	37.7(124)	
56	149(54)	9.6	14.3(20)	22.2	33.1(109)	
320	129(47)	10.6	13.7(20)	19.8	25.5(84)	

注1) 乾物、セルロース、リグニンは発酵槽当り重量

2) () 内は開始時量を100とする%表示

腐熟が進むと乾物量やセルロース含量、セルロース量は低下するのに対して、リグニン含量、リグニン量はともに大きく高まった。易分解性成分の減少により難分解性成分であるリグニンの含量が相対的に高まることは当然といえる。しかしリグニン量についても増加がみられており、開始42日後には約25%高まった。このことは腐熟過程において酸性デタージェント不溶物中のリグニン画分が増えているものと考えざるを得ない。

堆肥の緩効性は腐植の存在にあるといえる。この腐植は発酵による高温下で難分解性成分であるリグニンと微生物菌体の蛋白質が結合したリグノプロテインであると考えられていた²⁾³⁾。その後、リグニンも分解されること、その分解産物と微生物

物に由来する蛋白質、アミノ酸、ペプチドが縮重合するという複雑な過程を経て腐植は生成することが判明してきた²⁾。いずれにせよ、腐熟過程におけるリグニン画分の増加は蛋白質やアミノ酸などの結合によるものとしてもさしつかえないと考えられる。そこで、リグニン画分中の窒素を測定し、それに相当する蛋白質を差し引いてリグニン含量を補正し、表3に示した。

それによると、リグニン画分窒素含量は42日後まで増加がみられその後はゆるやかに減少し、これは補正しないリグニン含量の変動に対応していた。また、補正リグニン量は開始時のそれを上回ることなく、補正したリグニン含量値はほぼ妥当であると考えられた。

表3 腐熟物におけるリグニン補正

腐熟日数	リグニン	リグニン画分窒素	補正リグニン	
	-(乾物%)-	-(乾物%)-	-(乾物%)-	-(kg)-
0	11.0	0.32	9.0	24.9(100)
32	19.0	0.88	13.5	23.5(94)
42	23.0	1.14	14.7	24.1(97)
56	22.2	1.09	15.4	22.9(92)
320	19.8	0.97	13.7	17.7(71)

注1) 補正リグニン：リグニン-リグニン画分窒素×6.25

2) () 内は開始時リグニン量を100とする%表示

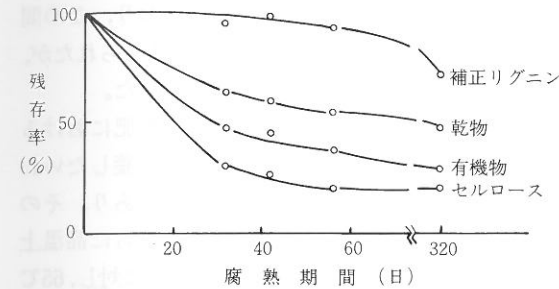


図3 腐熟過程における有機物、繊維成分の変化
注) 残存率：開始時量を100とする%表示

腐熟過程における有機物、繊維成分の変化を図3に示した。

腐熟が進むにつれてセルロース量は大きく減少したが、リグニン量は発熱がほぼ終息した56日以降からゆるやかな減少がみられた。セルロース、有機物、乾物量はいずれも開始32~42日後にかけて減少がゆるやかになっており、この間において活発な有機物分解はほぼ終息するものと思われた。開始42日後における各成分の減少率は乾物41%、有機物55%、セルロース74%であった。

NDF、ADF含量およびNDF画分、リグニン画分窒素含量を表4に示した。

表4 腐熟物のNDF、ADF含量およびNDF画分、リグニン画分窒素含量

腐熟日数	NDF	ADF	(乾物%)	
			NDF画分窒素	リグニン画分窒素
0	48.5	36.3	-	0.32
32	29.1	31.2	1.09	0.88
42	28.8	34.2	1.15	1.14
56	25.3	31.8	1.22	1.09
320	22.7	30.4	1.06	0.97

ADF含量と比べて、NDF含量は腐熟開始時は高かったものの、32日以降はすべて低かった。NDFはADFにヘミセルロースを加えたものであり、ADF含量より高いか同じはずであり、ADF含量がNDF含量を上回るとは奇妙といえる。ADFはセルロースとリグニンより構成されるが、前述の如く蛋白質やアミノ酸と結合したリグニン画分の増加に

より、ADF含量がNDF含量を上回る可能性があげられる。しかし、NDF画分窒素含量はリグニン画分窒素含量を下回ることなく、リグニン画分における蛋白質やアミノ酸が中性デタージェントで溶出するとは考えられない。リグニンは腐熟によって分解、代謝され、ポリフェノール、キノン、セミキノン等が生成する²⁾が、中性デタージェント

でこれらが溶出する可能性も否定されず、その場合はヘミセルロースが過小評価されることになり、本試験ではヘミセルロースを算出しなかった。豚糞堆肥に対するデタージェント分析の適用例⁷⁾はあるものの、この場合はシャーレ中の100gの試料を60℃に強制加温しており、本試験のように自らの発酵熱で70~80℃に達するような場合とはおのずから成分の挙動は異なると考えられる。以上のように、腐熟物に対するデタージェント分析の適用についてはさらに検討を要するとともに、腐熟化の指標として腐植を測定する必要があると考えられた。

腐熟過程におけるNH₃-N、NO₃-N、NO₂-N含量およびpHの変化を図4に示した。

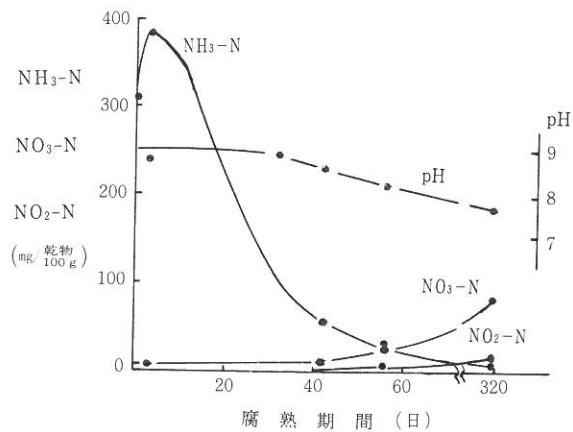


図4 腐熟過程におけるNH₃-N、NO₃-N、NO₂-N含量およびpHの変化

腐熟初期には多くのアンモニアが発生するが、品温の低下とともに発生量が減少し、おおむね40日以降からNO₃-Nの増加がみられ、少量ながらNO₂-Nも増加した。このことは腐熟が好気的条件下で行なわれていることを物語っている。NH₃-Nの減少、NO₃-Nの増加につれpHは低下した。NH₃-Nの発生がほぼ終息した42日後の全窒素の消失率は16%であった。

3) 微生物相の推移

腐熟過程における好気性中・高温菌、孢子形成菌数の変化を図5に、放線菌、糸状菌数の変化を

図6に示す。

新鮮豚糞における糸状菌数は10³/g程度である⁶⁾のに対して、腐熟開始時のそれは10⁵/gであり、また土壌に主として存在する放線菌が多数検出されることは、供試豚糞が排出後一定期間経過していることを示している。腐熟による品温上昇に伴って、中温菌、放線菌、糸状菌および孢子形成菌は減少し糸状菌は3日後には検出されなくなった。その後、開始25日後には中温菌、放線菌、孢子形成菌が、42日後には糸状菌が再び増加した。一方、高温菌は他の菌群とは異なり品温上昇とともに菌数が増え、開始42日後までその増加は続いたものの中温菌数を越えることはなかった。

供試材料は開始翌日には80℃近くまで達し、60~80℃の高温が約25日間継続しており、この間に高温菌が優占種になることは充分考えられたが、高温菌は中温菌を上回ることはなかった。

品温が80℃近くまで上昇した牛糞堆肥における微生物調査例¹⁰⁾によると、26、55℃で培養したいわゆる中・高温菌の多くが有孢子桿菌であり、その多くが65℃では生育し得ないこと、さらに品温上昇につれて55℃培養菌数は減少するのに対し、65℃培養菌数は逆に増加するという。また、最大温度が75℃を越える都市ゴミコンポストの微生物調査例⁹⁾によると、50℃で培養し、分離した菌株のすべてが孢子形成能を有するBacillus属でその多くは生育上限温度が55℃以下であるものの、より高い温度で生育可能なBacillus stearothermophilusの存在が示唆されている。これらのことは堆肥中の高温菌はこれまで50~55℃で培養されてきた⁴⁾⁵⁾⁹⁾¹⁰⁾が、品温が70~80℃に達するような堆肥においては55℃より高い、おそらくは65℃付近に生育の至適温度を有する好熱菌が存在することを示しており、このような高温菌の挙動を調べるには65℃付近における生菌数測定が必要であると思われる。

本試験においても55℃で培養し、任意に分離した菌株中10/12に孢子形成が認められた。70~80℃の高温下ではある種の好熱性ないし耐熱性菌を除いて微生物は増殖し得ず、多くの菌は死滅するかあるいは休眠孢子として存在する。本試験の30、

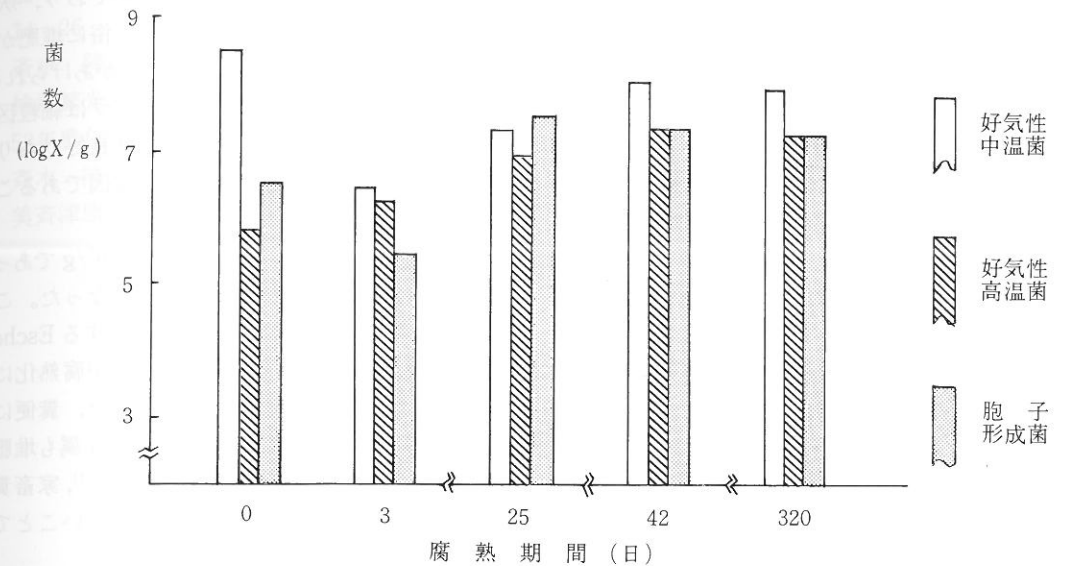


図5 腐熟過程における好気性中・高温菌、孢子形成菌数の変化

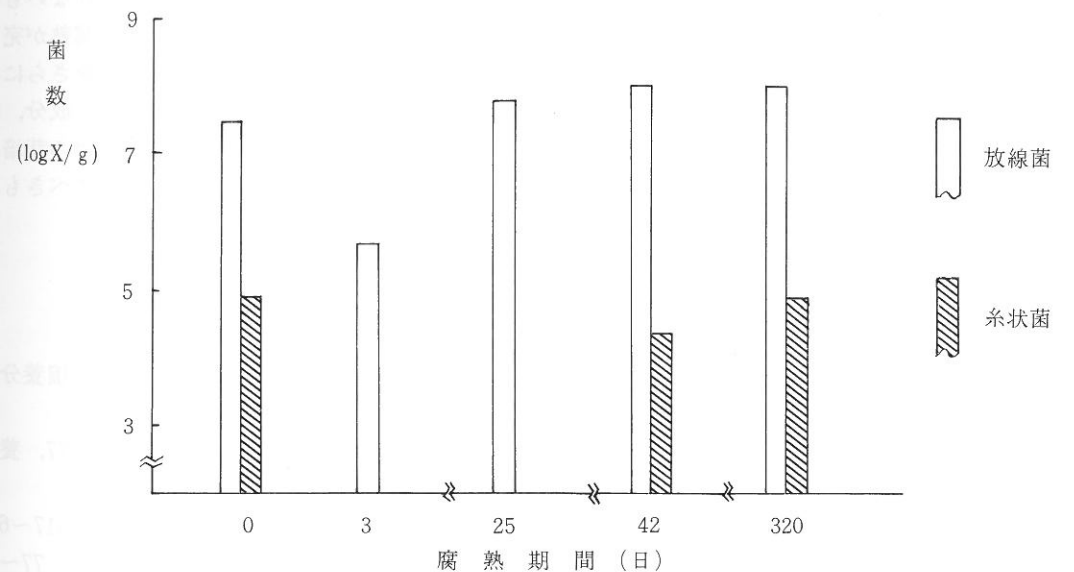


図6 腐熟過程における放線菌、糸状菌数の変化

55℃の培養においてはこの休眠孢子を計数しているものと考えられ、このことは高温下での腐熟が進むにつれ、すなわち休眠孢子が形成されるにつれ中温、高温菌および孢子形成菌の菌数、挙動に大きな違いがなくなることからもうかがわれる。また、55℃では孢子が発芽できない菌種もあり、そのために高温は中温菌を越えることがなかったものと推察される。

以上のように、堆積後しばらくの間は腐熟により高温が発生し各種菌群は変動したが、熱発生が終息している320日後と42日後を比べて菌群の菌数に違いは認められず、開始42日後では微生物相はほぼ安定したものと思われる。

豚糞堆肥における微生物の検討例は少なく、副資材に稲わらを用いた場合についてはその例を見かけない。加藤ら⁹⁾は副資材にモミガラ、オガ屑等を用いた豚糞堆肥における微生物相を検討し、副資材により腐熟の様相が異なることを示している。すなわち、モミガラを用いた場合は開始直後の品温上昇はすみやかであり、乾物や全炭素の減少量も大きかった。この間は細菌が優先的に増殖し、放線菌、糸状菌は品温が低下した時期に増殖が認められたもののその菌数は少なく、発酵・分解には細菌が主たる役割を果しているという。

一方、オガ屑を用いた場合は品温が50℃以上になるまでの期間が長く、乾物や全炭素の減少もゆるやかであった。この間まず細菌が、次いで放線菌、さらに糸状菌の順で増殖が認められた。これら菌群の増殖は、腐熟物中の水溶物、それに続く不溶物中の易分解性炭素の減少に対応しており、主として細菌が可溶性成分の、糸状菌が繊維成分の分解に関与し、放線菌はその中間的な役割を果しているものと推察されている。

副資材に稲わらを用いた本試験では開始直後の品温上昇やセルロースの減少はすみやかであり、糸状菌については有機物分解がゆるやかになった時期に増殖が認められたもののその菌数は少なく、モミガラを用いた場合の様相に類似していた。本試験ではモミガラの場合と比べて放線菌の増殖が高かったが、これは前述の如く開始時においてすでに放線菌が多く検出されることや、高温のため

に腐熟物の内部の乾燥がかなり進んでおり、灰白色の放線菌菌糸が全体にみられて、俗に堆肥が焼けた¹³⁾という状態になっていたことがあげられる。

オガ屑と比べて、稲わらやモミガラは細粒区分の少ない粗大材料で、その通気性は良好であり、豚糞の腐熟については通気性が主要因であることがうかがわれた。

大腸菌群については開始時菌数は $10^7/g$ であったが、3日後以降は全く検出されなくなった。このことは大腸菌群に含まれ、病原性を有する *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*¹²⁾が腐熟化により死滅することをうかがわせる。また、糞便に由来する代表的病原菌である *Salmonella* 属も堆肥化の過程で死滅することが知られており¹¹⁾、家畜糞を腐熟させることは衛生面からも望ましいことである。

以上の点を総合的に勘案して、活発な有機物分解を伴う腐熟についてはおおむね2ヶ月の堆積により終息するものと考えられる。しかしながら、2ヶ月以降においても熱発生こそみられないものの、リグニン分解が認められており、腐熟が完了したとはいいがたい。2ヶ月間腐熟物をさらに後熟させることの必要性については品温、成分、微生物からの検討ばかりでなく、被験植物の栽培を含めた腐熟物の施用試験によって判定すべきものである。

引用文献

- 1) 土壤養分測定法委員会編 (1986) 土壤養分分析法 197~200, 養賢堂, 東京。
- 2) 船引真吾 (1974) 土壤学講義 75~77, 養賢堂, 東京。
- 3) 檜垣繁光 (1978) 畜産の研究 32(5): 617~621
- 4) 樋浦康一郎 (1984) 東北大農研報 36: 77~81
- 5) 加藤博美, 早川岩夫, 沢田守男, 山川芳男 (1981) 愛知農総誌研報 13: 453~460
- 6) 光岡知足 (1978) 日獣会誌 31: 199~207
- 7) 瑞穂 当, 美斉津康民, 山田 豊 (1985) 日豚研誌 22(1): 10~17

- 8) 農水省畜産試験場 (1981) 畜試資料 56-1 14~26
- 9) 斉木 隆, 伊沢敏彦, 森本国夫, 美斉津康民, 檜垣繁光, 別府輝彦, 有馬 啓 (1977) 昭52年農化大会講演要旨 247
- 10) 斉木 隆, 大貫哲男, 伊沢敏彦, 森本国夫, 美斉津康民, 檜垣繁光, 都留信也, 別府輝彦

- (1978) 昭53年農化大会講演要旨 61
- 11) Strauch, D (1987) COMPOST: PRODUCTION, QUALITY AND USE 210~229 Elsevier Applied Science, London.
- 12) 都留信也編著 (1979) 環境と微生物 192 共立出版 東京。
- 13) 鶴飼信義 (1978) 畜産の研究 33(1): 57~62

Composting Process of Swine Dung Mixed with Rice Straw in the Summer

Hidenori ABE, Teruyuki KOMATSU,
Masuhiro OHHARA and Masaaki YAMAKAWA

(Received : Jun. 8. 1988)

Summary

This study was conducted to elucidate the process of composting swine dung-rice straw mixture in the summer season.

Swine dung mixtures containing 0, 5, 15 and 30% of dried rice straw in fresh weight basis were put into four 1 m³ wire net boxes. Temperature in the mixture with 15% of straw rose rapidly and maintained higher and longer than the others.

Therefore, swine dung with 15% of rice straw was piled in a 2 m³ wire net box and temperature, heap height, chemical composition and microflora were measured. The temperature was kept apparently higher during the first month, while heap height continued for two months after piling. The amount of dry matter, organic matter and cellulose were decreased rapidly before 32 days but the decreasing rate was lowered after 42 days. Microflora was checked at 0, 3, 25, 42 and 320 days after piling. In the earlier composting stage, microflora was varied remarkably, and was stabilized at 42 days after piling.

Result obtained above indicated that initial rapid stage of decomposition was almost completed approximately 2 months after piling.

鶏種卵の鋭端を上にした貯卵姿勢が孵化率に およぼす効果 (貯卵期間 4 週間まで)

小関 忠雄 田村 千秋 高橋 武
森崙 七徳 田中 正俊

要約 4週間まで貯卵した種卵について、鋭端上の姿勢(鋭端上)で静置貯卵した場合の孵化率に及ぼす効果について、鋭端下の姿勢(鋭端下)との比較試験を行った。種卵は15℃、相対湿度70%の環境に1~28日間貯卵し孵化試験に供した。

全期間を通して計算すると、鋭端上が鋭端下よりも高い孵化率($P < 0.05$)を示した。貯卵日数との関係では、3週を越えると、貯卵姿勢の違いにかかわらず急速に孵化率は低下した。見かけの受精率も貯卵期間が3週を越えると急速な低下が認められたが、これは貯卵中に胚が死亡した種卵が増えたためと考えられた。見かけの受精率の低下についても、貯卵姿勢の違いによる差は認められなかった。

緒言

鶏の受精卵(種卵)は、孵化開始前の貯卵期間が1~7日以内においては孵化率にそれ程影響しないが、それ以上長くなるにつれて孵化率は徐々に低下する。したがって、現在コマーシャル雛を生産する孵卵場では、貯卵期間は3~7日間程度であり、育種を目的としたような特別な場合でも2週間程度にとどまっている。貯卵条件と孵化率の関係については、貯卵温度および湿度、種卵の包装、窒素ガス等の封入による包装、貯卵姿勢や貯卵中の転卵などの検討を行った報告があり、田名部⁵⁾や Mays and Takeballi¹⁾がその総説で紹介している。

このうち貯卵姿勢について Proudfoot^{2,3,4)}は、通常行われている貯卵姿勢とは逆に、鋭端を上に向けて貯卵を行った結果、孵化率が良くなったことを報告している。特に7日間貯卵した種卵につい

ては、繰り返し7回行った実験で証明されている⁴⁾。3週間および4週間貯卵の場合も、鋭端上の方が孵化率が良くなったとしているが³⁾、1967年の報告²⁾では1~2週間の比較的短期間貯卵する場合は鋭端上の孵化率が若干高かったが、3週間、4週間では鋭端上のほうが低い孵化率を示す傾向であった。

ここでは4週間までの長期貯卵をした種卵について、鋭端上の姿勢で静置貯卵した場合の孵化率に及ぼす効果を確認するために、鋭端下の姿勢との比較試験を行った。

方 法

試験に用いた種卵は人工授精法によった。複数の雄鶏から採取した新鮮精液を混合して用い、約0.2mlを膣部に注入した。この方法により白色レグホーン種雌鶏60羽を用いて、一回の精液注入後の

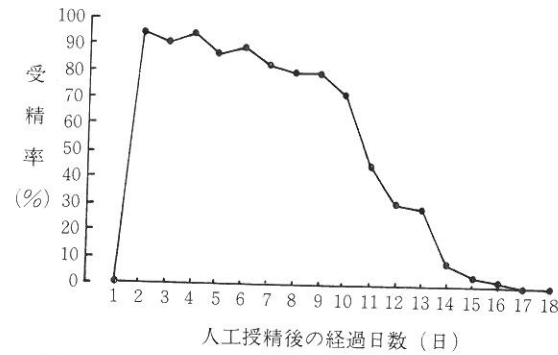


図1 人工授精による精液注入後の受精持続期間

受精能持続期間を調べたところ、図1に示したようになった。したがって、供試種卵の採取には6日おきに人工授精を行い、受精率に差がでないようにした。

白色レグホーン種雌鶏125羽に、上記方法により人工授精を行い、28日間連続して種卵を採取し総数2,229個を孵化試験に供した。供試種卵は毎日半数を鋭端上の姿勢（以下鋭端上という）で、残りの半数を鋭端下の姿勢（以下鋭端下という）で静置し、室温15℃、相対湿度70%の環境に貯卵した。孵卵機への入卵の際には、両者とも鋭端を下にして孵化を行った。入卵後8日目に透過光による検卵を行い、無精卵および発生中止卵を調査した。

試験結果

表1に貯卵姿勢と孵化率の関係について、対入卵孵化率（孵卵機に入卵した総供試卵に対する孵化率）で示した。1～28日間の全体を通した孵化率は、鋭端上が63.0%、鋭端下が58.4%であり鋭端を上にした貯卵姿勢の方が高い（ $P < 0.05$ ）孵化率を示した。貯卵日数を1週間単位で分けて計算をした孵化率においても、鋭端上の貯卵姿勢が全ての週で鋭端下よりも上回る傾向を示した。鋭端上の孵化率の向上について、鋭端下の孵化率に対する比率を見ると、8～14日間の貯卵ではややその差は小さかったが、その他の週では、鋭端上が鋭端下に対し、109%前後の孵化率を示した。

図2に貯卵日数と孵化率の関係について示した。

表1 貯卵姿勢と卵化率¹⁾の関係 (%)

貯卵姿勢	貯卵日数 (日)				1～28
	1～7	8～14	15～21	22～28	
鋭端上	75.3	80.0	69.2	27.3	63.0 ^{a2)}
鋭端下	69.1	76.8	63.0	25.1	58.4 ^b

1) 対入卵孵化率
2) 異符号間に有意差あり ($p < 0.05$)

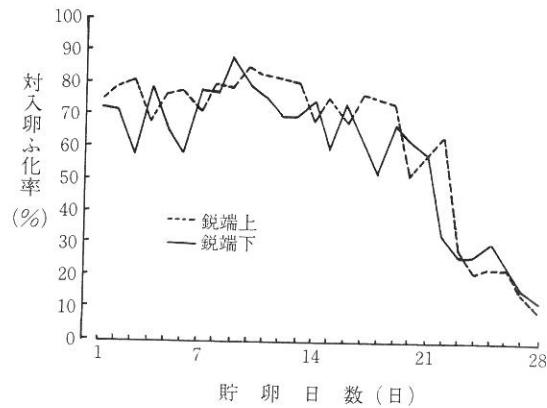


図2 種卵の貯卵日数と孵化率の関係

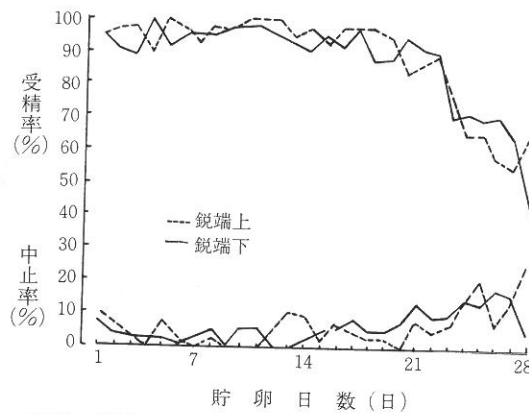


図3 種卵の貯卵日数と受精率、中止率の関係（入卵後8日目の透過光検卵による）

孵化率は貯卵日数が2週間を越え長くなると徐々に低下してくる傾向がうかがえるが、3週間を越えると急速な低下を示した。こうした傾向は貯卵姿勢による違いは認められず、鋭端上では孵化率の急速低下が始まる貯卵日数がわずかに1日遅れて貯卵23日めからになったのにとどまった。

図3に入卵後8日目の検卵による、見かけの受精率および中止率（胚の発生途中死亡率）と貯卵日数の関係を示した。見かけの受精率も孵化率と同様貯卵期間が3週間を越えると急速な低下が見られた。中止率についても受精率ほどの大きな変化ではないが、3週間を越えると増加傾向を示した。見かけの受精率と中止率のこうした傾向についても、貯卵中の貯卵姿勢による違いは認められなかった。

表2 非孵化卵の出現数 (個)

	貯卵日数 (日)			
	1～7	8～14	15～21	22～28
入卵数	554	551	570	554
無精卵 ¹⁾	30	19	41	173
中止卵 ¹⁾	19	18	31	73
死籠卵 ²⁾	105	82	121	163

1) 入卵後8日目の検卵による。
2) 8日目を以降の胚の死亡と21日を超えても孵化しなかったものの合計。

表2には、入卵した種卵のうち発生しなかったものの内訳を、貯卵姿勢による差が認められなかったことから両貯卵姿勢を込みにして示した。22～28日間貯卵した種卵では、無精卵、中止卵、死籠卵（8日目を以降の胚の死亡と、正常の孵化日数21日を越えても孵化しなかったものの合計）ともに増加しているが、特に無精卵の増加が著しいことが認められた。

考察

種卵の鋭端を上にした貯卵方法は、現在一般に行われている鋭端を下にした貯卵方法に比べると、孵化率を向上させることが認められた。これは静置貯卵の場合、鋭端上の貯卵姿勢が孵化率を改善させることについて Proudfoot⁴⁾が述べているのと同様の結果であった。貯卵期間の長短と、鋭端上の貯卵姿勢の孵化率に及ぼす効果の関係については、貯卵日数を1週間単位で分けた場合には統計的な有意差は認められなかったが、短期間の貯卵

日数の時と同様に、2週間を越える15～21日間および22～28日間の貯卵期間でも鋭端上の姿勢が鋭端下よりも孵化率が高い傾向を示した。こうした結果より、鋭端を上にした貯卵姿勢は、短期間から4週間までの長期の貯卵期間まで孵化率の改善効果があったといえよう。この効果は Proudfoot^{3,4)}が指摘しているように、鋭端を上にして貯卵すると卵黄の浮上を防ぎ、孵卵機に入卵する際に鋭端を下にした時点では卵黄が赤道部に保持されることによるのであろう。

本試験では1～28日間の貯卵期間を通して鋭端を上にした貯卵姿勢で孵化率の改善が認められた。ただし図2にも示したように、貯卵日数によってはその関係が逆転する場合も見られたが、これは1日単位で見た場合では供試種卵数が少なかったことによるものと考えられた。貯卵日数が3週間を越えると孵化率は急速な低下を示した。この傾向については貯卵姿勢による違いは認められず、鋭端上では孵化率の急速低下がはじまる貯卵日数が1日延びた程度にとどまり、貯卵姿勢の変更のみによる貯卵期間の延長は期待できない。

見かけの受精率についても、貯卵日数が3週間を越えると同様の低下傾向が認められた。しかし本来受精率は貯卵日数には関係ないことを考えると、透過光による検卵方法では受精卵についても貯卵中に胚が死亡した種卵は無精卵と判断されたことによるものと考えられた。

貯卵期間が3週間を越える種卵の孵化率の低下について、貯卵期間中、孵卵機へ入卵後8日目まで、および8日目より発生時までの3段階に分けて胚が死亡するのはどの時期が多いかという点から次に検討を行う。無精卵の増加を貯卵中の胚の死亡と仮定すると、表2に示したようにこの貯卵中の胚の死亡の増加割合が最も大きい。また中止卵、死籠卵についても増加しており、下卵数（入卵数から無精卵および中止卵の数を差し引いたもの）に対する孵化率を計算すると、1～7、8～14、15～21、22～28日間貯卵で、それぞれ順に、79.8、84.0、75.7、47.1、%となっており、22～28日間貯卵した種卵では、貯卵中および孵卵初期に胚の死亡をまぬがれた種卵であっても、最終の雛の発

生にまでたどり着けない種卵が半数以上存在した。こうした点では、種卵の長期保存をはかるには、貯卵中の胚の死亡を防ぐ貯卵条件を検討するとともに、長期間保存した種卵の最適孵化条件についても再検討が必要であろう。

引用文献

- 1) Mayes, F. J. and M. A. Takeballi (1984) World's Poultry Science Journal, 40: 131-
- 2) Proudfoot, F. G. (1967) Can. J. Animal Sci., 47: 142-143
- 3) Proudfoot, F. G. (1969) Can. J. Animal Sci., 49: 29-35
- 4) Proudfoot, F. G. (1969) The Fertility and Hatchability of the Hen's Egg. Carter, T. C. and B. M. Freeman, p. 127-141 Oliber & Boyd, Edinburgh
- 5) 田名部雄一 (1983) 鶏卵の孵化率の向上・鶏病研報, 19: 1-8

140

Hatchability of Chicken Eggs Stored Small End Up, up to Four Weeks.

Tadao OZEKI, Chiaki TAMURA,
Takeshi TAKAHASHI, Shichinori MORISAKI
and Masatoshi TANAKA

(Received: May, 23, 1988)

Summary

Hatching trial conducted to evaluate the hatchability of eggs held in the small end up position (SEU) compared with eggs held in the small end down position (SED) during storage up to four weeks at 15°C and 70% relative humidity. The overall hatchability of SEU was significantly higher ($p < 0.05$) than SED. In relation to storage period, the hatchability rapidly decreased after three weeks storage. There was no difference on this tendency between SEU and SED. Apparent percent fertilization also decreased after three weeks storage. This is considered that embryo died during storage. There was no difference on this tendency between SEU and SED.

場外誌掲載論文抄録

APPENDIX

Summaries of papers on other journals reported by the staff

北海道の夏期における子牛の カーフハッチ内滞在時間と気象環境

干場 信司* 五十部 誠一郎** 佐藤 義和*
堂腰 純*** 曾根 章夫**** 岡本 全弘

家畜の管理 23 : 73~80 (1988)

一般型、通風型、FRP製および連鎖型の4種のカーフハッチに8頭の子牛を収容し、夏期における気象環境と利用率との関係を検討した。連鎖型のカーフハッチ以外では日中の利用率は52~60%で、冬期の80%に比べ低かった。冬期にカーフハッチ利用率と相関の高かった風速は、夏期には、通風型カーフハッチの1頭を除いて、有意な相関は認められなかった。降雨日には、無降雨日の1.3~1.6倍の利用率であった。通風型および一般型カーフハッチに収容される牛のうち、それぞれ1頭は外気温および屋外黒球温度と利用率との間に正の相関を認めた。素地のままのFRP製

カーフハッチに収容された子牛では、日射量および日照時間とカーフハッチ利用率との間に有意な負の相関が認められ、FRP製カーフハッチが防暑効果をもたないことが推察された。

北海道において、カーフハッチは冬期には防風、夏期には雨よけとしての機能を持つことが明らかになった。

*農業土木試験場・**食品総合研究所

***日本気象協会北海道本部

****新得畜産試験場

非繁殖季節における発情誘起法の違いが めん羊の繁殖成績に及ぼす影響

草刈直仁 岸 昊司 大原睦生

日緬研会誌 23巻 : 6~9 (1986)

非繁殖季節である7月から8月に発情を誘起するため、19頭のサフォーク未経産雌羊をI群；プロジェステロン膈内スポンジおよびPMSG注射区、II群；PMSG16日間隔2回注射区、III群；短日処理(8L:16D)区、IV群；無処理対照区、の4群に分け、発情誘起および繁殖成績について検討した。

IおよびII群における発情誘起率は100%および60%であり、III群では短日処理開始後58日目までに5頭全頭(100%)に発情が見られ、無処理の対照区と比べ32日早く発情を示した。

7月から8月までの自然交配による各群の分娩率および産子率はI群で60%、2.0、II群で40%、1.5、III群で40%、1.0、IV群では0%であった。また、この時期に発情誘起された雌羊は、周期的な発情を繰り返し、本来の繁殖季節につながると考えられた。

これらのことから、非繁殖季節の後期である7月および8月における発情誘起法としては、プロジェステロン膈内スポンジ法および短日処理法が効果的であるが、繁殖成績は膈内スポンジ法が良好であった。

Summit Metabolism of Newborn Calves with and without Colostrum Feeding

Okamoto, M., J. B. Robinson*, R. J. Christopherson* and B. A. Young*

Can. J. Anim. Sci. 66 : 937~944 (1986)

13頭のホルスタイン初生雄子牛(生後2.5~15時間)の休息時代謝および頂上代謝を温水および冷水に浸漬して測定した。6頭の子牛には、測定開始30分前に1kgの初乳を給与したが、残りの7頭には測定の終了まで何も与えなかった。休息時代謝、頂上代謝ならびに冷水中で直腸温が35℃に低下するに要した時間には、初乳給与の影響は認められなかった。直腸温が35℃に低下するに要した時間は、子牛の体重が増加するにつれて増し、体重1kgの増加当り2.9分の延長をみた。休息時代謝は $2.0 \pm 0.1 \text{ w/kg}$ で、この時、

直腸温は $39.1 \pm 0.2^\circ\text{C}$ であった。頂上代謝は $7.2 \pm 0.4 \text{ w/kg}$ であり、この時、直腸温は $35.4 \pm 0.3^\circ\text{C}$ であった。これは休息時代謝の 3.7 ± 0.2 倍に相当した。冷水による冷却にともない、血糖値および血漿遊離脂肪酸濃度が上昇した。急激な寒冷暴露の30分前の初乳給与は、子牛の低体温に対する抵抗性を強化しなかった。

*アルバータ大学農林学部

Metabolic Rate and Rewarming Speed of Hypothermic Neonatal Lambs Given Thermal Assistance or Added Insulation

J. B. Robinson*, M. Okamoto, B. A. Young*
and R. J. Christopherson*

Anim. Prod. 43 : 115~120 (1986)

低体温に陥った子羊の体温回復法を検討するため、19頭の初生子羊($4.9 \pm 0.34 \text{ SE kg}$)を冷水槽に浸漬して、直腸温を35℃に低下させた。子羊は、20~25℃の室内で厚手の綿布にくるむ、赤外線ランプ下におく、38℃の温水に浸漬するという、3種の方法で体温回復を図ったが、その際、産熱量と直腸温を連続的に測定した。当初の12分間は、いずれの処理においても直腸温は直線的に上昇したが、温水に浸漬した子羊の回復が他の処理に比べて速やかであった。

この時、綿布にくるみ補助熱の供給がなかった子羊の産熱は温水に浸漬した子羊に比べて高かった。以上より、温水に浸漬した子羊では、体温上昇に寄与する程度の熱の流入があったことが示唆された。いずれの処理においても、直腸温は18~20分後に安定した。供試した全ての子羊は、実験による健康上の悪影響は認められなかった。

*アルバータ大学農林学部

Takikawa Animal Husbandry Experiment Station of Hokkaido.

735 Higashi-Takikawa, Takikawa-shi,
Hokkaido, 073 JAPAN

Bull. Takikawa Anim. Husb. Exp. Stn

滝川畜試研報 No.24

— Dec. 1988 —

昭和 63 年 12 月 1 日 印 刷
昭和 63 年 12 月 24 日 発 行

編集兼
発行者 北海道立滝川畜産試験場
北海道滝川市東滝川 7 3 5
☎2211~2213 郵便番号073

印刷所 (株) 総 北 海
旭川市神楽岡 14 条 5 丁目
☎2101 郵便番号 078
