

第4節 異なる飼料を給与したメンヨウの第一胃発酵の解析とプロトゾ

アの観察

反芻動物（ウシ、スイギュウ、ヤギ、メンヨウ、ラクダ、シカ等）は、単胃のヒトやブタ等と異なり、草類や木質系資源を飼料として用いて栄養を摂取し、生命活動の維持、成長、泌乳等を行うことができる。この特性は、大きな容積（体重 500kg のウシで 100L 以上、体重 50kg のメンヨウで 10L 以上）の第一胃内に生息している、多種多様な嫌気性細菌や真菌類のはたらきに負うところが大きい。反芻動物は第一胃内において、デンプンや糖類のみならずセルロースやヘミセルロース等を基質とする嫌気性発酵により生成される揮発性脂肪酸（VFA：酢酸、プロピオン酸、酪酸等）をエネルギー源として利用することができる他、微生物そのものを下部消化管で消化吸収し、窒素源として利用している。反芻動物は家畜として、乳肉生産、役用、堆肥生産に活用されるが、乳肉生産に特化した場合はエネルギーやタンパク質に富んだ濃厚飼料（穀類や糟糠類を配合した飼料）を多給されることも多く、飼養管理状況の違いが、採食性や第一胃発酵の様相に及ぼす影響は大きい。

この実験ではメンヨウをモデルとして取り上げ、給餌前後における第一胃液性状（色、臭気、粘性、pH、VFA 濃度、アンモニア濃度等）の変化や飼料による違いを調べる。併せて、第一胃内に存在する寄生性の繊毛虫や鞭毛虫（プロトゾア）を観察した上で生息数を数え、摂取飼料の違いがその生息状況に及ぼす影響を調べる。

各自用意するもの

汚れてもよい服装（メンヨウに接し、第一胃液を取り扱います）、白衣、電卓、ノート。サンダル履きは禁止します。

注意事項

実験にあたっては、担当教員と畜産資源学分野院生の指示に従うこと

- 1) 飼育棟は衛生管理区域に指定されています。以下の事項を厳守して下さい。
 - ・ 過去一週間以内に海外から帰国した人は飼育棟に入らないこと。
 - ・ 過去四ヶ月以内に海外で使用した衣服および靴を着用して飼育棟に入らないこと。
 - ・ 出入りは西側のフェンスドアのみ使用し、中央部の玄関は使用しないように。出入りの際は、手指と靴を消毒すること。
- 2) 後片付けも実験の大切な要素です。実験終了後は飼育棟のペンを清掃し、実験室で使った容器は洗浄すること。

4.1 体重測定、第一胃内容物採取、第一胃液性状調査および前処理

【材料・器具】

飼育棟： 第一胃カニューレを装着したメンヨウ（コリデール系種去勢、各班 1 頭、計 4 頭）、体重計、飼料秤量用はかり、真空ポンプ、カテーテル、採取ビン、200ml 三角フラスコ、ゴム手袋、ノート（各人）

実験室： ガーゼ、漏斗、200ml 三角フラスコ、pH メーター、遠沈管、卓上遠心機、ピペットマン（P1000）

【方 法】

給餌前

飼育棟での作業

- ① メンヨウをパドックから出し、動物用体重計（あらかじめゼロ調整しておく）に乗せて測

定する。体重を基に以下の飼料を設計し、秤量しておく。各班が各1頭のメンヨウを担当する。

メンヨウ番号	飼料内容	濃厚飼料	トールフェスク乾草
1	濃厚飼料多給	体重の0.7%	体重の0.3%
2	濃厚飼料多給	体重の0.7%	体重の0.3%
3	粗飼料のみ給与	なし	体重の1%
4	粗飼料のみ給与	なし	体重の1%

② 真空ポンプと採取ビンのカテーテルに装着し、第一胃カニューレから第一胃内容物を約100ml吸引する。得られた内容物は三角フラスコに移し、実験室に持ち帰る。

③ 直ちにメンヨウをペンに入れ、設計した飼料を給餌する。給餌時刻を記録する。

実験室での作業

① 四重にしたガーゼで内容物をろ過して第一胃液を得る。第一胃液の色、粘性および臭気と比較する。この液は以下のpH測定と「2. 第一胃プロトゾアの観察・計測」に用いる。

② pHメーター（あらかじめpH7と4で2点校正しておく）で第一胃液のpHを測定する。

③ 第一胃液の一部を遠沈管にとり、500gで5分間遠沈する。上澄みを別な遠沈管に取る。この上澄みは「3. 第一胃液アンモニア濃度の測定」と「4. 第一胃液VFA濃度の測定」に用いる。

給餌2時間後

① メンヨウをペンから出し、再び第一胃内容物を採取する。残餌量を測定する。

② メンヨウをパドックに戻し、所定の飼料を給餌する。

③ ペンを清掃する。

④ 上記の実験室での作業を繰り返す。

4.2 第一胃プロトゾアの観察・計測

【試薬】

MFS (Metylgreen in formalin solution:30mg のメチルグリーンと 0.85g の塩化ナトリウムを、100ml の10%(v/v)ホルマリンに溶解したもの)、

【材料・器具】

四重ガーゼでろ過した第一胃液、恒温槽、ガーゼ、ゴム手袋、pHメーター、ピペットマン(P1000、P50、P10)、スライドグラス、カバーグラス、光学顕微鏡、血球計算盤(フックスローゼンタル盤)、血球計算盤用カバーグラス、カウンター、ノート(各人)、スケッチ用紙(各人)

【観察法】

① 第一胃液が入った三角フラスコを、38℃の恒温槽に入れる。

② 始めに、採取したろ液そのものを、純水でよく洗浄して拭き取ったスライドグラスにピペットを用いて採り、カバーグラスをかけて検鏡する。プロトゾアの運動や摂食の様子を観察する。

③ 第一胃液をよく攪拌して0.5ml採取し、4.5mlのMFSを加えて固定する。固定した液を攪拌しながら、血球計算盤(フックスローゼンタル盤)に10μl採り、血球計算盤用カバーグラスをかけ、目盛りの内部にあるプロトゾアをすべて数える(各自異なる第一胃液を各1回-計4回)。

④ 写真や図を参考にして種類を同定する。同定したプロトゾアをスケッチする。

⑤ 約1時間30分後、一時観察を切り上げ、動物舎に行き、1.の給餌後の作業を行う。

4.3 第一胃液アンモニア濃度の測定

【試薬】

指示薬含有 2%ホウ酸、0.01N 塩酸標準液、 K_2CO_3 飽和溶液、ワセリン、ガラス棒

【材料・器具】

給餌前後の第一胃液を遠沈した上澄み、ピペットマン(P1000、P50、P10)、コンウェイユニット、ノート (各人)、

【方法】

第一日目

- ① コンウェイユニット外室の摺りあわせ部にワセリンを薄く塗る。
- ② ユニット内室に指示薬含有 2%ホウ酸を 1ml 入れる。
- ③ 外室の一方に給餌前後の第一胃液を遠沈した上澄みを正確に 1ml 入れる。
- ④ 外室の他方に K_2CO_3 飽和溶液 1ml を入れ、直ちにユニットのふたを閉じる。
- ⑤ ユニットの静かに回転させて外室の両液を混合する。

第二日目

24 時間後にピペットマン(P50、P10)を用いて 0.01N 塩酸標準液で滴定する。

4.4 第一胃液 VFA 濃度の測定

【試薬】

10%メタリン酸液、内部標準液

【材料・器具】

給餌前後の第一胃液を遠沈した上澄み、ピペットマン、遠沈管、卓上遠心機、シリンジフィルター (孔径 $0.45\mu m$)、ガスクロマトグラフィー (オートサンプラー搭載)、ノート (各人)

【方法】

第一日目

- ① 給餌前後の第一胃液を遠沈した上澄み 1ml に等量の 10%メタリン酸を加えよく混合させる。
- ② 3000rpm で 30 分間遠心分離を行い、上澄み液をシリンジフィルターでろ過する。
- ③ ろ液を内部標準液と等量混合し、E203 実験室のガスクロマトグラフィーのオートサンプラーにセットする。

第二日目

分析チャートのデータを解析する。

データの取り扱い

プロトゾアの種類の同定および同定したプロトゾアのスケッチは、各自が行うこと。残りのすべてのデータは、まず各班で結果をとりまとめた上でグループ全員で共有し、レポートを作成すること。当然のことながら得られた結果の考察は、各自で行う。オリジナリティーの高いレポートを期待する。