

過炭酸ナトリウム給与が反芻家畜の  
メタン排出量, 消化率, ルーメン発酵性状,  
窒素およびエネルギー出納に及ぼす影響

平成 26 年  
(2014)

帯広畜産大学大学院畜産学研究科  
修士課程 畜産生命科学専攻  
永 野 雄 大

Effect of sodium percarbonate on  
methane emission, nutrient digestibility,  
rumen fermentation characteristics,  
nitrogen and energy balances in sheep

2014

NAGANO Yudai  
Master's Program in  
Life Science and Agriculture  
Graduate School of  
Obihiro University of Agriculture  
and Veterinary Medicine

## 目 次

第1章 緒 論	1
第2章 <i>in vitro</i> における過炭酸ナトリウム添加実験	
2-1. 材料および方法	5
2-2. 分析項目および分析方法	8
2-3. 結果および考察	10
2-4. 小括	14
第3章 めん羊における過炭酸ナトリウム給与予備実験	
3-1. 予備実験 I	
3-1-1. 材料および方法	17
3-1-2. 分析項目および分析方法	19
3-1-3. 結果および考察	19
3-2. 予備実験 II	
3-2-1. 材料および方法	20
3-2-2. 分析項目および分析方法	21
3-2-3. 結果および考察	21
3-3. 小括	22
第4章 めん羊における過炭酸ナトリウム給与本実験	
4-1. 本実験 I	
4-1-1. 材料および方法	23
4-1-2. 分析項目および分析方法	24
4-1-3. 結果および考察	26
4-2. 本実験 II	
4-2-1. 材料および方法	28
4-2-2. 分析項目および分析方法	29
4-2-3. 結果および考察	30
4-3. 小括	35
総 括	37
要 約	39
図 表	41
謝 辞	66
参考文献	67
SUMMARY	71

## 第1章

### 緒論

ウシ、ヤギ、ヒツジなどの反芻動物のルーメン内には、細菌（バクテリア）、原生動物（プロトゾア、繊毛虫）、真菌（ツボカビ類）からなる嫌気性微生物（増殖に酸素を必要としない生物）が多数生息し、反芻動物が摂取した飼料を、分解、発酵している。ルーメン微生物によって発酵作用を受けた飼料成分は、酢酸、プロピオン酸、酪酸などの揮発性脂肪酸（volatilefattyacid, 以下VFA）に転換され、反芻動物の主要なエネルギー源となる。

ルーメン内のような嫌気条件下で行われている有機物分解（嫌気発酵）においては、電子受容体が十分でないため、有機物の酸化が不完全であり、好気条件下で行われる完全酸化のように、二酸化炭素（CO<sub>2</sub>）と水（H<sub>2</sub>O）にまで分解されない。有機物（反芻動物では主に炭水化物）の酸化の際に遊離される還元当量（2e<sup>-</sup>+2H<sup>+</sup>; 代謝性水素）は、プロピオン酸や乳酸のような電子受容生成物を生成する反応に用いられるが、すべての還元当量がこのような反応によって処理されるわけではない。上述した嫌気性微生物は、そのような処理されなかった電子を、ヒドロゲナーゼ（酵素）を用いてH<sup>+</sup>に渡して水素（H<sub>2</sub>）を生成することによって電子を処理している。つまり、嫌気発酵においては、H<sub>2</sub>生成は還元当量を処理するための重要な手段となっている。

しかし、ルーメン内にH<sub>2</sub>が蓄積すると、ヒドロゲナーゼ反応によるH<sub>2</sub>生成が抑制され、電子処理の速度が落ち（Wolin, 1975）、ルーメン内pHの低下などルーメン発酵に悪影響を及ぼす。そのような中、ルーメン内で生成されるH<sub>2</sub>の大部分は、通常はメタン生成菌によって迅速にメタン生成に用いられるため、ルーメン内のH<sub>2</sub>分圧はきわめて低いレベルに保たれている（不飽和脂肪酸の水素添加もその一つ）。したがって、ルーメン内におけるメタン生成菌の存在は、反芻動物にとって重要な意味を持つ

ている。

メタン生成菌が生成したメタン ( $\text{CH}_4$ ) は、難溶性なために血中にはほとんど吸収されず、あい気 (ゲップ) として口から排出される。メタンガスの標準状態における燃焼熱は  $890 \text{ kJ/mol}$  であるが、あい気として放出される際に呼気と混合し、約 100 倍に希釈される。従って、呼気に含まれるメタンをエネルギーとして回収、再利用することは今のところ不可能とされている。

上述したように、 $\text{CH}_4$  は  $890 \text{ kJ/mol}$  のエネルギー価を持つため、メタン排出は摂取した飼料の総エネルギー (GE) の 2~12% のエネルギー損失となる (Johnson and Johnson, 1995)。そのため、このエネルギー損失を減らすために、反芻家畜におけるメタン生成を減らす試みが古くから行われてきた。

さらに近年、 $\text{CH}_4$  は地球温暖化の原因である温室効果ガスとしても注目されている。メタンの地球温暖化係数 (GWP) は  $\text{CO}_2$  の 25 倍 (IPCC, 2007) と言われており、世界の家畜からのメタン排出量は年間約 80Mt (世界のメタン排出量の約 16% を占める) と推定され、ブタなどの非反芻家畜からの発生は少なく、その約 80% がウシなどの反芻家畜の消化管内発酵に由来する。わが国においては、メタン発生源の約 70% を占める農業分野のうち、約 46% が反芻家畜の消化管内発酵由来のメタンである。

このように、反芻家畜におけるメタン生成の抑制は、反芻家畜のエネルギー効率の側面からだけではなく、地球温暖化の観点からも早急に解決すべき課題であると言える。

そのような中、本研究室では、トマトの表面から単離した植物性乳酸菌 *Lactobacillus plantarum* TUA1490L の生成する抗菌物質 (PRA-1) が、ルーメン発酵によるメタン生成を 96% 抑制することを観察した (阿佐ら, 2010)。また、味の素株式会社の社内研究において、その PRA-1 によるメタン生成の抑制効果は、カタラーゼを投与することによって失活することを確認した。カタラーゼは、過酸化水素 ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )

を水と酸素に分解する酵素であり、酸素代謝の結果生じる有毒物質から細胞を守る働きをしているが、通性嫌気性細菌である乳酸菌はカタラーゼを持っていない（柳田，1996）。また，一般にラクトバチルス属には，過酸化水素生成能の高い菌株が多いと言われている。さらに，過酸化水素濃度の高い培養液において，ルーメン発酵によるメタン生成が有意に抑制されたことが報告されている（橋本，2012）。これらのことから，*Lactobacillus plantarum* TUA1490L の生成する抗菌物質（PRA-1）は，過酸化水素である可能性が非常に高いと考えられている。

しかしながら，今後，過酸化水素を反芻家畜のルーメンメタン抑制剤として使用する場合，以下の問題が考えられる。まず，乳酸菌の生成する抗菌物質（過酸化水素）を得るためには，乳酸菌の培養に時間を要すること。本研究室の培養方法で行った場合，抗菌物質を得るためには，約 48 時間の培養が必要である（小財，2013）。さらに，その抗菌物質の生成度合が不安定な点も問題となる。次に，市販されている過酸化水素水を用いる場合，液体のために物質として不安定であり，家畜への給与が困難なことが考えられる。

そこで本研究では，ルーメン内での過酸化水素発生源として，炭酸ナトリウム過酸化水素付加物（ $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 1.5\text{H}_2\text{O}_2$ ，以下過炭酸ナトリウム）に着目した。過炭酸ナトリウムは，炭酸ナトリウムと過酸化水素が 2 : 3 のモル比で混合された付加化合物で，水溶性の白色の固体（粒状）である。粒状のため取扱いが容易であり，物質としても安定しており，家畜への給与も容易に行えると考えられる。また，漂白剤，除菌剤，消臭剤といった，一般消費者向けの過炭酸ナトリウムの販売価格は，概ね 1 グラム当たり 0.5 円程度と安価である。これらのことから，過炭酸ナトリウムの給与が，反芻家畜の消化率やルーメン発酵性状に悪影響を与えることなく，ルーメンメタン生成量を抑制することが出来れば，反芻家畜の新たな飼料利用効率改善剤，ルーメンメタン抑制剤として期待される。そのため本研究では，*in vitro* 実験およびめん羊を用いた *in vivo*

実験を行い、過炭酸ナトリウムの給与が、メタン排出量、飼料消化率、ルーメン発酵性状、窒素およびエネルギー出納に及ぼす影響を追究した。

本実験開始以後の平成 24 年 7 月 1 日から、本実験に用いた過炭酸ナトリウム(正式名称：炭酸ナトリウム過酸化水素付加物)が消防法上の第 1 類(酸化性固体：可燃物を酸化して、激しい燃焼や爆発を起こす固体)の危険物として規制された。それに伴い、過炭酸ナトリウムの貯蔵または取扱う数量によっては、消防法もしくは各地方公共団体の定める条例に基づいた届出が必要となった。このようなことから、実際の現場における利用のし易さや、過炭酸ナトリウム自体の安全性などに課題が生じることが予想される。しかしながら、取扱う数量が少ない場合には届出が不要であることや、過炭酸ナトリウムの性質の違いにより規制を受ける数量が異なること(第 1 種酸化性固体：指定数量 50kg, 第 2 種酸化性固体：指定数量 300kg, 第 3 種酸化性固体：指定数量 1000kg), さらに、一般的に市販されている酸素系漂白剤(過炭酸ナトリウムを主成分としているもの)は、他の物質を含むこと等により一般的に危険物には該当しないとされている。したがって、指定数量に配慮することや、一般的に市販されている酸素系漂白剤を用いること等により、上述した課題を回避できると考えている。

## 第 2 章

### *in vitro* における過炭酸ナトリウム添加実験

本実験で着目した過炭酸ナトリウムのルーメンメタン抑制効果を明らかにすることを目的とし、過炭酸ナトリウムを添加しない CTL 区と過炭酸ナトリウム添加量の異なる 3 処理区 (0.05mM 区, 0.1mM 区, 0.5mM 区) を準備し、各試験区間のガス (メタンおよび二酸化炭素) 生成量およびルーメン発酵性状を *in vitro* で調査した。

#### 2-1. 材料および方法

##### (1) 供試試薬および供試試薬添加量

ルーメン内における過酸化水素の発生源として、過炭酸ナトリウムを用いた。

過炭酸ナトリウムとは、炭酸ナトリウムと過酸化水素の付加化合物であり、水によく溶けて、炭酸ナトリウムと過酸化水素に分解する。また、粉末のため取り扱いが容易で、物質としても安定している。さらに、一般家庭向きに酸素系漂白剤としても流通しており、比較的安価で入手しやすい物質である。

供試試薬は、容積 800ml の発酵槽中の過酸化水素終濃度 (過炭酸ナトリウム添加量) が、それぞれ 0mM (0mg) , 0.05mM (5.6mg) , 0.1mM (11.2mg) , 0.5mM (56mg) となるように添加した。以下、各試験区は、CTL 区, 0.05mM 区, 0.1mM 区および 0.5mM 区とする。

##### (2) 供試動物およびルーメン液

ルーメン液を採取するために、ルーメンフィステル装着ホルスタイン種乾乳牛 2 頭を用いた。供試牛は、実験期間を通して本学畜産フィールド科学センター (FSC) 内の特別管理牛舎で繋留し、個別に飼養管理を行った。



飼料は、同 FSC で収穫されたチモシー主体の乾草を用い、午前 7 時と午後 4 時の 2 回に分けて維持量を給与した。また、水および固形塩（鉍塩セレニクス TZ、日本全薬工業株式会社、福島）は自由摂取とした。

ルーメン液の採取は、ルーメンフィステルから灯油ポンプを用いて汲み取り、ナイロン布で濾過し、温めておいた魔法瓶に入れて実験室に持ち帰り実験に使用した。また、ルーメン液は、ルーメン内微生物環境の安定具合を考慮し、個別の飼養管理を始めて 11 日目以降のものを用いた。

### (3) *in vitro* 連続発酵ガス解析システム

培養装置として、4 つの発酵槽からなる *in vitro* 連続発酵ガス解析システム（高杉製作所、東京）（図 1）を用い、24 時間攪拌培養を行った（4 反復）。

培養装置は試験前日に、pH 計、ORP 計、二酸化炭素分析計（可搬型赤外線ガスモニター RI557, RIKEN KEIKI, 東京）およびメタン分析計（汎用赤外線分析計 IR100, YOKOGAWA, 東京）の校正を行った。また、一部の滅菌出来ない器具を除き、すべての器具はオートクレーブ（121°C, 20 分）で滅菌処理を行った。試験当日、全ての発酵槽に、あらかじめ二酸化炭素を 1 時間通気しておいた McDougall 人工唾液（McDougall, 1948）（表 1）640ml, ルーメン液 160ml（供試牛 2 頭から 80ml ずつ）、粉末にした基質飼料 10g（粒度約 1mm, 粗濃比 1:1）（表 2）を投入した。さらに処理区には、それぞれ目的の過酸化水素終濃度になるように過炭酸ナトリウムを添加した。

発酵槽内の培養液温度は、発酵槽内の温度センサーにより感知し、コンピューターによる自動制御を行った（約 39°C）。発酵槽内の攪拌は、マグネット方式を採用し、回転速度をコンピューターによる自動制御を行った（約 33rpm）。発酵槽内の嫌気条件は、窒素ガスを流して槽内に残留する酸素を除去して確保した。発酵槽

を密封した時点を培養開始時とし，培養中は装置全体を布で覆い暗環境とした。さらに，PC レコーダソフト（MSR128，株式会社エム・システム技研，大阪）を用いて，得られたデータを全てコンピューターに自動保存した。

## 2-2. 分析項目および分析方法

### (1) pH, 酸化還元電位 (ORP) , メタン濃度, 二酸化炭素濃度

攪拌培養下における, pH, ORP, メタン濃度, 二酸化炭素濃度を測定した。

pH および ORP は, コンピューター上でリアルタイムにモニタリングを行い, 全発酵槽 1 分間隔で値を記録した。

メタンおよび二酸化炭素の濃度は, 赤外線分析計で連続測定し, コンピューター上でリアルタイムにモニタリングを行った。分析には, 各発酵槽を 30 分間隔で 10 分間ずつ測定して得られたデータのラスト 4 分間の平均値を用いた。そのようにして得られたガス濃度とガス流量から, 24 時間攪拌培養における累積メタン生成量および累積二酸化炭素生成量を算出した。

### (2) プロトゾア数, 揮発性脂肪酸 (VFA)

攪拌培養 0, 2, 4, 6, 8, 24 時間後における培養液をサンプリングし, プロトゾア数および VFA 濃度を測定した。サンプリングは, 窒素ガスの供給によって発酵槽内を陽圧にして, 培養液内に通した管のコックを開放し, チューブを通して内容液 10ml を採取した。内溶液のサンプリング後には, 同量の人工唾液をポンプを用いて補充した。

プロトゾア数は, Ogimoto and Imai の方法 (Ogimoto K. and Imai S., 1981) に従って測定した。つまり, 採取したルーメン液を MFS solution (Methylgreen-formalin-saline) を用いて 5 倍に希釈した後, フックスローゼンタール計算盤 (エルマ販売株式会社, 東京) を用いて測定した。

VFA 濃度の測定は, 前処理として, サンプルを 1.5ml ずつ採取して遠心分離 (4°C, 18000g, 15 分間) をした後, 上澄み液を 0.8ml ずつ採取し, そこに 0.2ml ずつ 25%メタリン酸を加えてよく混ぜ, 一晩冷凍庫で放置した。翌日解凍後, 再度

遠心分離（4℃, 8000g, 15 分間）を行い、オートインジェクター用のバイアルビンに上澄み液 0.5ml と 10mM の 2-ethylbutyric acid 0.5ml を加えて分析用サンプルを調製した。校正用標準液には、50mM 酢酸, 50mM プロピオン酸, 50mM 酪酸, 50mM イソ酪酸, 10mM 吉草酸, 10mM イソ吉草酸, 5mM カプロン酸, 5mM イソカプロン酸の混合液を用いた。前処理終了後、ガスクロマトグラフ（GC-2014, 株式会社島津製作所, 京都）を用い、Senevirathne らの内部標準液法に従って測定した（Senevirathne et al, 2012）。また、各 VFA 濃度の定量演算は、GC ワークステーション（GC-Solution, 株式会社島津製作所, 京都）の自動演算プログラムで行った。

### (3) 統計解析

各データの統計解析は、SAS（Statistical Analysis System）の GLM プロシジャを用い、処理区間の有意差検定は Tukey の多重比較検定によって行った。

## 2-3. 結果および考察

### (1) 累積メタン生成量および累積二酸化炭素生成量

*in vitro* 実験における、過炭酸ナトリウム添加による各試験区の累積メタン生成量および累積二酸化炭素生成量を図 2 および図 3 に示した。

累積メタン生成量は、過酸化水素終濃度 0.05mM 区, 0.1mM 区, 0.5mM 区において、過炭酸ナトリウムを添加していない対照区 (CTL 区) と比較して、それぞれ 36.5, 76.1 および 77.8%有意に減少することが示された ( $P<0.01$ )。したがって、過炭酸ナトリウムの添加は、*in vitro* において用量依存的にメタン生成量を抑制すると考えられた。

累積二酸化炭素生成量は、過酸化水素終濃度 0.05mM 区においては、CTL 区と比較して有意な差は認められなかった。しかし、過酸化水素終濃度 0.1mM 区においては、CTL 区よりも減少する傾向が見られた ( $P<0.10$ )。さらに、0.5mM 区においては、CTL 区と比較して 34.1%有意に減少することが示された ( $P<0.01$ )。ルーメン環境における二酸化炭素は、ルーメン内の微生物が活発に飼料片を発酵分解することで生成されるため、二酸化炭素生成量はルーメン内微生物活性の一つの指標となる。したがって、過酸化水素終濃度 0.5mM 区では、過炭酸ナトリウム添加によってルーメン内微生物の活性が低下した恐れがあると考えられた。

### (2) pH および ORP

*in vitro* 実験における、過炭酸ナトリウム添加による各試験区の pH および ORP の変動をそれぞれ図 4 および図 5 に示した。

pH は、過酸化水素終濃度 0.5mM 区において、培養開始後数時間の間、他の試験区と比較して有意に高い値 (7.4 程度) を示した ( $P<0.01$ )。これは、供試試薬である過炭酸ナトリウムが、弱アルカリ性であることが理由だと考えられた。しか

しながら、各試験区間で pH の変動に多少の違いはあるものの、ルーメン内の pH が通常でも 5.3 から 7.5 の範囲内で維持されている（堀口, 1994）ことから、過炭酸ナトリウム添加による pH の変動は一時的な現象であり、反芻家畜に悪影響を及ぼすことはないと考えられた。

ORP は、ルーメン内の嫌気度を示す指標であり、ORP の値が低いほど高い嫌気状態であると言える。したがって、ORP の値が高いほど嫌気状態が崩れていることを示す。通常ルーメン内の ORP は、飼料摂取や飲水によって -150 から -350mV の範囲を上下しながら維持されている（堀口, 1994）。しかし、*in vitro* 実験では、密閉された発酵槽を用いるため、通常では CTL 区のように速やかに ORP の値が低下し、高い嫌気状態を維持する。そのような中、過酸化水素終濃度 0.05mM 区では、開始直後に CTL 区と比較して、ORP が高くなる傾向が示された（ $P < 0.10$ ）。さらに、過酸化水素終濃度 0.1mM 区、0.5mM 区においては、培養開始以降、それぞれ 10 時間、18 時間の間、ORP の値が CTL 区と比較して有意に高い値を示した（ $P < 0.05$ ）。これは、添加した過炭酸ナトリウムが、発酵槽内で炭酸ナトリウムと過酸化水素に分解された後、その過酸化水素が、一部のルーメン内微生物が持つ酵素（カタラーゼ）によって分解されて酸素が生じ、発酵槽内の嫌気状態が一時的に崩れることが原因であると考えられた。

ルーメン内でメタンを生成しているメタン生成菌は、ORP が -300mV 以下という極めて高い嫌気状態下でないと生育できない偏性嫌気性菌である。したがって、過炭酸ナトリウムの添加によって一時的に嫌気状態が崩れることで、メタン生成菌の生育環境を乱したことが、ルーメン内におけるメタン生成量が減少した一つの原因ではないかと考えられた。

### (3) VFA 生成量およびプロトゾア数

*in vitro* 実験における、過炭酸ナトリウム添加による各試験区の VFA 生成量およびプロトゾア数を図 6 に示した。

酢酸生成量は、過酸化水素終濃度 0.05mM 区では、CTL 区と比較して有意な差は認められなかった。しかし、過酸化水素終濃度 0.1mM 区、0.5mM 区においては、CTL 区と比較して、酢酸生成量がそれぞれ 28.7% ( $P<0.05$ ) および 43.5% ( $P<0.01$ ) 有意に減少することが示された。酢酸は、反芻家畜の重要な栄養源であり、特に食物繊維の分解によって得られ、乳脂肪生成に大きく関わっている。我が国の飲用向けを主体とした生乳取引における乳脂肪分基準は、昭和 62 年度に 3.2% から 3.5% に引き上げられた。つまり、乳脂肪分 3.5% 基準が実質的に乳業者の原料乳の受け入れの下限値となっており、基準を下回ると生産者にはペナルティーが科せられ、乳価が下がる。したがって、酢酸生成は、酪農業にとって特に重要であり、酢酸生成量の減少は解決すべき課題である。

プロピオン酸生成量は、過酸化水素終濃度 0.05mM 区では、CTL 区と比較して 31.1% 有意に増加することが示された ( $P<0.05$ )。しかし、過酸化水素終濃度 0.1mM 区、0.5mM 区においては、CTL 区と比較して、プロピオン酸生成量がそれぞれ 35.1% ( $P<0.05$ ) および 78.0% ( $P<0.01$ ) 有意に減少することが示された。一般的に、メタン生成とプロピオン酸生成の間には負の相関がある。つまり、メタンの生成が減少するような場合には、プロピオン酸の生成が増加することが多い。これは、メタンの生成にもプロピオン酸の生成にも水素が必要であることに起因し、メタン生成菌が利用していた水素の代替消費系としてのプロピオン酸生成が向上すると考えられるためである。さらに、プロピオン酸は他の揮発性脂肪酸に比べて ATP 生成効率が高いことから、プロピオン酸生成の促進によって、飼料効率が改善されると言われており、過酸化水素終濃度 0.05mM 区は好ましい結果であ

ると考えられる。そのような中、上述したように、過酸化水素終濃度 0.1mM 区、0.5mM 区においては、メタン生成量の低下と相まって、プロピオン酸生成量も低下した。これは、過炭酸ナトリウムの添加によって、メタン生成菌だけではなく、プロピオン酸生成菌に対しても何らかのダメージを与えていると考えられる。

酪酸生成量は、過酸化水素終濃度 0.05mM 区、0.1mM 区、0.5mM 区において、CTL 区と比較して、それぞれ 23.5 (P<0.05)、48.5 (P<0.01) および 74.6% (P<0.01) 有意に減少することが示された。

総 VFA 生成量は、過酸化水素終濃度 0.05mM 区では、CTL 区と比較して有意な差は認められなかった。しかし、過酸化水素終濃度 0.1mM 区、0.5mM 区においては、CTL 区と比較して、総 VFA 生成量がそれぞれ 33.4% (P<0.01) および 56.2%

(P<0.01) 有意に減少することが示された。したがって、過炭酸ナトリウムは、過度に添加すると、総 VFA 生成量に悪影響を及ぼすと考えられる。酢酸を生成する細菌は酢酸と同時に酪酸も生成し、プロピオン酸を生成する細菌は同時に酢酸も生成することが多い。つまり、各酸生成に悪影響を及ぼすことは、結果として VFA 生成量に大きな影響を及ぼすことになる。反芻家畜の飼料要求量の 60~80% は、VFA のかたちで第一胃から吸収される。したがって、VFA は反芻家畜の主要なエネルギー源であり、総 VFA 生成量の減少は解決すべき課題である。

プロトゾア数は、全ての処理区において、CTL 区と比較して有意な差は認められなかった。ルーメン内に存在するプロトゾアは、ルーメン発酵において重要な役割を担っていると考えられる。したがって、プロトゾア数の結果だけを見ると、過炭酸ナトリウムの添加はルーメン発酵に悪影響は及ぼさないように思われる。しかし、前述したように、過炭酸ナトリウムの添加は、各 VFA 生成量に悪影響を及ぼす可能性があり、ルーメン発酵に及ぼす影響に関してさらなる検討が必要であると考えている。



#### 2-4. 小括

*in vitro* 実験における過炭酸ナトリウム添加は、全ての処理区において、CTL 区と比較して有意にメタン生成量を減少させた ( $P<0.05$ )。また、そのような過炭酸ナトリウムのメタン抑制効果は、用量依存的に確認された。

二酸化炭素生成量に関しては、過酸化水素終濃度 0.05mM 区、0.1mM 区では、CTL 区と比較して有意な差は見られなかったが、過酸化水素終濃度 0.5mM 区においては、CTL 区と比較して有意に減少した ( $P<0.01$ )。前述したように、ルーメン内における二酸化炭素は、ルーメン内の微生物が活発に飼料片を発酵分解することで生成されるため、二酸化炭素生成量はルーメン内微生物活性の一つの指標となる。したがって、過酸化水素終濃度 0.5mM 区では、ルーメン内の微生物活性が低下している恐れがあると考えられた。

pH に関しては、過酸化水素終濃度 0.5mM 区では、他の試験区と比較して培養開始後数時間の間、有意に高い値を示した ( $P<0.01$ )。しかし、このような変動は一時的なものであり、過炭酸ナトリウム添加による pH への影響は無いと考えられた。

ORP に関しては、過酸化水素終濃度 0.1mM 区、0.5mM 区において、CTL 区と比較して有意に高い値を示す時間が多く見られ ( $P<0.05$ )、これらの試験区では、過炭酸ナトリウム添加によって、嫌気条件が一時的に崩れ、高い嫌気条件下で活性するメタン生成菌の生育を阻害していると考えられた。

VFA 生成量に関しては、過酸化水素終濃度 0.05mM 区では、CTL 区と比較してプロピオン酸生成量が有意に増加した ( $P<0.05$ )。しかしながら、過酸化水素終濃度 0.1mM 区、0.5mM 区においては、CTL 区と比較して酢酸、プロピオン酸、酪酸および総 VFA 生成量が有意に減少した ( $P<0.05$ )。つまり、過酸化水素終濃度 0.05mM 区においては、メタン生成菌が利用していた水素の代替消費系としての

プロピオン酸生成が向上したが、過酸化水素終濃度 0.1mM 区、0.5mM 区においては、メタン生成菌以外のルーメン微生物に対しても生育を阻害している可能性が示唆された。

プロトゾア数に関しては、全ての処理区において、CTL 区と比較して有意な差は認められなかった。しかし、過酸化水素終濃度が高くなると、二酸化炭素生成量の減少 (0.5mM 区) や各 VFA 生成量の減少 (0.1mM 区および 0.5mM 区) が見られた。したがって、プロトゾアを測定する際に検出されるプロトゾアの数が少ない過ぎるために、過炭酸ナトリウム添加がプロトゾア数に及ぼす影響を正確に評価出来ていない可能性がある。

以上のことから、*in vitro* 実験における過炭酸ナトリウム添加は、過酸化水素終濃度 0.05mM 区の時には、発酵槽内の環境に大きな変化を与えることなく、メタン生成菌のみに影響を及ぼした結果、メタン生成量が減少し、メタン生成菌が利用していた水素の代替消費系として、プロピオン酸生成量が増加したと考えられた。また、過酸化水素終濃度 0.1mM 区、0.5mM 区においては、発酵槽内の嫌気状態が一時的に崩れることによって、発酵槽内の環境が大きく変化し、メタン生成菌だけではなく、他のルーメン内微生物に対しても悪影響を及ぼした結果、メタン生成量に加えて各 VFA 生成量までもが大きく減少したと考えられた。このことから、過炭酸ナトリウムは過度に添加すると、ルーメン内環境を変化させ、メタン生成菌以外のルーメン内微生物に悪影響を及ぼし、各 VFA 生成量およびルーメン内微生物活性を減少させる可能性が示唆された。したがって、*in vitro* 実験に関しては、過炭酸ナトリウムを添加しても、発酵槽内環境、二酸化炭素生成量および各 VFA 生成量に悪影響を及ぼすことなく、メタン生成量を抑制させることが出来た過酸化水素終濃度 0.05mM 区 (発酵槽 800ml に対して過炭酸ナトリウム 5.6mg) が最適添加量であると考えられた。

このように、本研究で着目した過炭酸ナトリウム（過酸化水素源）においても、ルーメンメタン生成の抑制効果を確認することが出来た。今後、過炭酸ナトリウムを反芻家畜へ給与する場合、嗜好性や消化率なども重要な要素として考えられる。したがって、第3,4章では、実際に反芻家畜（めん羊）に過炭酸ナトリウムを給与し、消化率やルーメン発酵性状等に及ぼす影響を検討することにした。

## 第3章

### めん羊における過炭酸ナトリウム給与予備実験

予備実験Ⅰでは、本実験を実施するにあたり、実際の生体内（めん羊）において、過炭酸ナトリウムをどの程度給与することで、メタン排出量を抑制出来るのかを明らかにすることを目的とし、過炭酸ナトリウム給与量を段階的に変え、各過炭酸ナトリウム給与量時のメタン排出量をめん羊を用いた *in vivo* で調査した。

予備実験Ⅱでは、本実験を実施するにあたり、試験期間を設定するために、過炭酸ナトリウム給与によるメタン排出量抑制効果の残効期間を明らかにすることを目的とし、過炭酸ナトリウムを給与していない時（無給与時）、過炭酸ナトリウム給与後および過炭酸ナトリウム給与停止後のメタン排出量をめん羊を用いた *in vivo* で調査した。

#### 3-1. 予備実験Ⅰ（*in vivo* 本実験に用いる過炭酸ナトリウム給与量の検討）

##### 3-1-1. 材料および方法

###### (1) 供試試薬

*in vitro* 実験と同様の過炭酸ナトリウムを用いた（本文 2-1 参照）。

###### (2) 供試動物

供試動物には、コリデール種去勢めん羊 4 頭を用いた（BW  $59.3 \pm 5.5$ kg）。

4 頭は、実験期間を通して本学中家畜舎において個別に飼養管理を行った。

###### (3) 供試飼料

供試飼料には、クレイングラス（タイセイ飼料株式会社、北海道）とマッシュ

タイプの濃厚飼料（中部飼料株式会社，愛知）を用いた（表 3）。マッシュタイプの濃厚飼料は，粉末の過炭酸ナトリウムを確実に供試動物に食べさせる目的で使用した。飼料は，過炭酸ナトリウムの給与のしやすさと，餌箱からの飼料の飛び出しを考慮して粗濃比（乾物比）7：3 に設定し，午前 8 時と午後 4 時の 2 回に分けて維持量（55gDM/BWkg<sup>0.75</sup>）を給与した。給与する際には，先に濃厚飼料をボールに入れて（過炭酸ナトリウムが摂食されやすいように）給与した後，供試動物が濃厚飼料を全てもしくはほとんど摂食したことを確認してからクレイングラスを給与した。その際，処理区には，濃厚飼料に過炭酸ナトリウムを混ぜて給与した（供試試薬の給与は朝のみ）。また，水および固形塩（鉍塩セレニクス TZ，日本全薬工業株式会社，福島）は自由摂取とした。

#### (4) 試験設定

試験区には，過炭酸ナトリウムを給与しない CTL 区とルーメン内における過酸化水素終濃度（過炭酸ナトリウム給与量 g/日）がそれぞれ，0.5mM（1.26g），1.0mM（2.52g），1.5mM（3.78g），2.0mM（5.04g）となるように過炭酸ナトリウムを給与する 4 処理区を準備した。以下，各試験区は，CTL 区，0.5mM 区，1.0mM 区，1.5mM 区および 2.0mM 区とする。各目的濃度は，めん羊のルーメン容積を 20 リットルとし，さらにその内の 90%が胃内容物であるとして換算した（松本，2011）。試験は，試験開始前に 10 日間の観察期間を設けた後，馴致期間 5 日間と呼吸試験 2 日間の計 7 日間を 1 期とし，全頭同時期に同処理を行う試験を連続して 5 期（1 期：CTL 区，2 期：0.5mM 区，3 期：1.0mM 区，4 期：1.5mM 区，5 期：2.0mM 区）行った。また，供試動物は呼気ガス（メタン）濃度を測定するために，ヘッドケージが併設された代謝ケージ（フード式開放型呼吸試験装置（藤田ら，1988））で飼養した。

### 3-1-2. 分析項目および分析方法

試験室内の空気およびヘッドケージ内の供試動物の呼気ガスをそれぞれ15分ずつ、45分間隔で48時間ブロアーを用いて吸引し、呼気ガス中のメタン濃度をCH<sub>4</sub>分析計（URA-207, 株式会社島津製作所, 京都）を用いて測定した。さらに、呼吸試験実行時の大気圧、呼気ガスの入口と出口の差圧、温度、湿度を測定した。それらの測定値は、全てコンピューターに自動入力され、メタン排出量を0°C, 1気圧の標準状態に換算した。それらをもとに、供試動物の1日のメタン排出量を求めた。

### 3-1-3. 結果および考察

*in vivo* 予備実験 I における、過炭酸ナトリウム給与による各試験区のメタン排出量を図 7 に示した。

メタン排出量は、過酸化水素終濃度 0.5mM 区, 1.0mM 区, 1.5mM 区において、CTL 区と比較してそれぞれ 5.1, 17.6 および 18.5%減少する傾向が見られた ( $P<0.10$ )。さらに、過酸化水素終濃度 2.0mM 区では、CTL 区と比較して 20.4%有意に減少することが示された ( $P<0.05$ )。したがって、*in vivo* 実験においても、*in vitro* 実験の結果と同様に、過炭酸ナトリウム給与は用量依存的にメタン排出量を減少させることが示された。しかしながら、生体内（めん羊）においてメタン排出量を抑制させるためには、*in vitro* よりも多くの過炭酸ナトリウム給与量が必要である可能性が示唆された。

## 3-2. 予備実験Ⅱ（過炭酸ナトリウムがメタン排出量に及ぼす残効期間の調査）

### 3-2-1. 材料および方法

#### (1) 供試試薬

*in vitro* 実験と同様の過炭酸ナトリウムを用いた（本文 2-1 参照）。

#### (2) 供試動物

供試動物には、コリデール種去勢めん羊 4 頭を用いた（BW 51.3±5.6kg）。

4 頭は、実験期間を通して本学中家畜舎において個別に飼養管理を行った。

#### (3) 供試試料

供試飼料には、クレイングラス（タイセイ飼料株式会社，北海道）とフスマ（横山製粉株式会社，北海道）を用いた（表 4）。フスマは，粉末の過炭酸ナトリウムを確実に供試動物に食べさせる目的で使用した。飼料は，過炭酸ナトリウムの給与のしやすさと，餌箱からの飼料の飛び出しを考慮して粗濃比（乾物比）7：3 に設定し，午前 8 時と午後 4 時の 2 回に分けて維持量（55gDM/BWkg<sup>0.75</sup>）を給与した。給与する際には，先にフスマをボールに入れて（過炭酸ナトリウムが摂食されやすいように）給与した後，供試動物がフスマを全てもしくはほとんど摂食したことを確認してからクレイングラスを給与した。その際，処理区には，フスマに過炭酸ナトリウムを混ぜて給与した（供試試薬の給与は朝のみ）。また，水および固形塩（鉍塩セレニクス TZ，日本全薬工業株式会社，福島）は自由摂取とした。

#### (4) 試験設定

試験は，供試試薬の給与開始前に 10 日間の観察期間を設けた後に呼吸試験を

行い、この時測定した呼気ガスを過炭酸ナトリウム無給与時 (CTL) とした。その後、過炭酸ナトリウムを7日間給与した後に呼吸試験を行い、この時測定した呼気ガスを給与7日目とした。その後、過炭酸ナトリウムの給与を止めてから7日目と10日目に呼吸試験を行い、この時測定した呼気ガスをそれぞれ停止7日目、停止10日目とした。また、供試動物は呼気ガス (メタン) 濃度を測定するために、ヘッドケージが併設された代謝ケージ (フード式開放型呼吸試験装置 (藤田ら, 1988)) で飼養した。

### 3-2-2. 分析項目および分析方法

*in vivo* 予備実験 I と同様に分析を行った。(本文 3-2 参照)

### 3-2-3. 結果および考察

*in vivo* 予備実験 II における、過炭酸ナトリウム給与前、給与後および給与停止後のメタン排出量を図 8 に示した。

メタン排出量は、過炭酸ナトリウム給与後 1 週間後には、給与前と比較して 34.4% 有意に減少することが示された ( $P < 0.01$ )。その後、過炭酸ナトリウム給与を止めてから7日目、10日目の供試動物のメタン排出量は、給与前のそれと差が認められなかった。したがって、過炭酸ナトリウムの給与によるメタン排出量への影響は、給与停止後 1 週間で消失すると考えられた。



### 3-3. 小括

*in vivo* 予備実験における過炭酸ナトリウム給与は, *in vitro* 実験の結果と同様に, 用量依存的にメタン排出量を減少させる傾向が見られた(過酸化水素終濃度 2.0mM 区では有意に減少した)。しかし, *in vitro* 実験で述べた最適添加量(過酸化水素終濃度 0.05mM 区)とは異なり, *in vivo* 実験ではルーメン内における過酸化水素終濃度が 2.0mM となるように過炭酸ナトリウムを給与した時に, 初めてメタン排出量が CTL 区と比較して有意に減少することが示された。これは, *in vitro* 実験に用いた培養装置(発酵槽)と供試動物の胃内の環境が異なることに起因すると考えられた。つまり, *in vitro* 実験では培養開始時に発酵槽に一度だけ供試試薬を投入するだけであるのに対して, *in vivo* 実験では朝に供試試薬を飼料とともに給与した後, 飲水や午後の給餌, さらに反芻などによって胃内の環境は常に流動的である。したがって, 生体において, 過炭酸ナトリウムを用いてメタン排出量を減少させるためには, ルーメン内における過酸化水素終濃度が 2.0mM 以上(過炭酸ナトリウム給与量 5.04g/日以上)となるように給与する必要があると考えられた。

また, 予備実験Ⅱの結果より, 上記のようなメタン排出量の抑制効果は, 過炭酸ナトリウムの給与を止めてから 1 週間後には消失することが示された。つまり, 生体において過炭酸ナトリウム給与実験を行う場合, 前の処理によるメタン排出量への残効を考慮し, 馴致期間は最短で 7 日間空ける必要があるということが示された。

## 第4章

### めん羊における過炭酸ナトリウム給与本実験

本実験で着目した過炭酸ナトリウムの生体内におけるメタン排出量，ルーメン発酵性状，消化率，窒素出納およびエネルギー出納に及ぼす影響を明らかにすることを目的とし，過炭酸ナトリウムを給与しない CTL 区と過炭酸ナトリウムを給与する処理区（ルーメン内における過酸化水素終濃度が 2.0mM となるように過炭酸ナトリウムを給与した）を準備し，呼吸試験および消化試験（本実験 I），ルーメン液採取試験（本実験 II）をめん羊を用いた *in vivo*（クロスオーバー法）で調査した。

#### 4-1. 本実験 I（呼吸試験および消化試験）

##### 4-1-1. 材料および方法

###### (1) 供試試薬

*in vitro* 実験と同様の過炭酸ナトリウムを用いた（本文 2-1 参照）。

###### (2) 供試動物

供試動物には，コリゲール種去勢めん羊 4 頭を用いた（BW 62.1±6.1kg）。

4 頭は，実験期間を通して本学中家畜舎において個別に飼養管理を行った。

###### (3) 供試飼料

*in vivo* 予備実験 I と同様の飼料を用いた（本文 3-1 参照）。

###### (4) 試験方法

試験区には，過炭酸ナトリウムを給与しない CTL 区とルーメン内における過

酸化水素終濃度（過炭酸ナトリウム給与量 g/日）が 2.0mM（5.04g）となるように過炭酸ナトリウムを給与する処理区を準備した。以下、各試験区は、CTL 区および処理区とする。各目的濃度は、めん羊のルーメン容積を 20 リットルとし、さらにその内の 90%が胃内容物であるとして換算した（松本, 2011）。

試験は、試験開始前に 10 日間の観察期間を設けた後、馴致期間 7 日間、消化試験 5 日間、呼吸試験 2 日間の計 14 日間を 1 期とし、クロスオーバー法に従った。また、供試動物は呼気ガス（二酸化炭素、メタン、酸素）濃度を測定するために、ヘッドケージが併設された代謝ケージ（フード式開放型呼吸試験装置（藤田ら, 1988））で飼養した。

代謝試験では、飼料給与量、残飼量、糞および尿の量をケージ毎に毎日記録した。糞は供試動物にハーネスを付け、それに糞回収用袋を取り付けて、午後の給餌時と翌朝の給餌前に回収し 1 日分の糞量とした。また、全ての糞は各代謝試験終了時まで冷凍庫で保存した。尿は朝のみ回収し、全量の約 10%の量をサンプルとして採取して分析まで冷凍庫で保存した。なお尿は、尿回収用バケツにガーゼ（スズラン株式会社, 愛知）を被せて不純物の混入を防ぎ、さらにアンモニアが揮発しないように尿回収用バケツに濃度 10%の硫酸を 100ml 入れておいた。

呼吸試験では、フード式開放型呼吸試験装置を用いて、羊の首にフードを付け、酸素消費量、二酸化炭素およびメタン排出量を 2 日間測定した。

#### 4-1-2. 分析項目および分析方法

##### (1) 飼料、糞および尿サンプルの一般成分

飼料は、60°Cで 48 時間通風乾燥させた後、室温で 24 時間放置して風乾物を調製した。糞は、各代謝試験終了後、ケージ毎に 5 日分を混合し、そこから約 200g のサンプリングを行い、アンモニアが揮発しないように 1N 塩酸を霧吹きで適量

吹きかけ、60℃で48時間通風乾燥させた後、室温で24時間放置して風乾物を調製した。それぞれ風乾物に調製したサンプルは、ウイレー型粉砕機（1029-A、株式会社吉田製作所、東京）で粒度約1mmに粉砕して分析に用いた。

分析項目は、乾物（DM）、中性デタージェント繊維（NDF）、酸性デタージェント繊維（ADF）、リグニン（ADL）、粗蛋白質（CP）、総エネルギー（GE）、有機物（OM）、粗灰分（CA）、粗脂肪（EE）とした。DMは135℃2時間乾燥法、NDFおよびADFはデタージェント分析法、CPはケルダール法（ケルダール蒸留装置ケルテック2100、フォス・ジャパン株式会社、東京）、EEはジエチルエーテル抽出法、CAは直接灰化法によって測定を行なった。また、GEはボンベ型熱量計（CA-4AJ、株式会社島津製作所、京都）を用いて測定した。尿に関しては、上述した方法でCPおよびGEを測定した。これらの分析結果より、消化率、窒素出納およびエネルギー出納を算出した。

## (2) 呼気ガス

試験室内の空気およびヘッドケージ内の供試動物の呼気ガスをそれぞれ15分ずつ、45分間隔で48時間ブローアールを用いて吸引し、呼気ガス中の酸素、二酸化炭素およびメタンの濃度をO<sub>2</sub>分析計（MAG-6000A、株式会社島津製作所、京都）、CO<sub>2</sub>分析計（URA-207、株式会社島津製作所、京都）およびCH<sub>4</sub>分析計（URA-207、株式会社島津製作所、京都）を用いて測定した。さらに、呼吸試験実行時の大気圧、呼気ガスの入口と出口の差圧、温度、湿度を測定した。それらの測定値は、全てコンピューターに自動入力され、二酸化炭素およびメタン排出量を0℃、1気圧の標準状態に換算した。それらをもとに、1日の供試動物の酸素消費量、二酸化炭素およびメタン排出量を求めた。

### (3) 統計解析

各データの統計解析は, SAS (Statistical Analysis System) の GLM プロシジャを用い, 処理区間の有意差検定は Tukey の多重比較検定によって行った。

## 4-1-3. 結果および考察

### (1) 消化試験

*in vivo* 本実験 I における, 各試験区の乾物摂取量 (DMI) および各成分消化率を表 5 に示した。

乾物摂取量に関しては, 処理区と CTL 区の間で有意な差は認められなかった。したがって, 過炭酸ナトリウムの給与によって, 供試動物の摂食は阻害されておらず, 過炭酸ナトリウムは嗜好性には問題無いと考えられる。

消化率に関しては, 処理区において, 乾物 ( $P<0.05$ ), 有機物 ( $P<0.05$ ), 粗蛋白質 ( $P<0.05$ ), 酸性デタージェント繊維 ( $P<0.01$ ), 中性デタージェント繊維 ( $P<0.05$ ), エネルギー ( $P<0.05$ ) 消化率が CTL 区と比較して有意に減少した。消化率とは, 飼料成分が消化管内で消化吸収される割合を示す。したがって, 過炭酸ナトリウムの給与によって, ルーメン内に生息する微生物に悪影響を及ぼし, 摂取した飼料を消化吸収する能力が低下したと考えられた。消化率が低下するということは, 飼料に含まれる栄養源が利用されずに糞として排泄させることを意味しており, 飼料利用効率の観点からは好ましくない結果である。

*in vivo* 本実験 I における, 窒素出納を表 6 に示した。

窒素出納では, 処理区において, 糞中窒素排泄量が CTL 区と比較して有意に増加した ( $P<0.05$ )。その結果, 可消化窒素含量が有意に減少した ( $P<0.05$ )。反芻家畜では, ルーメン内の微生物を介して窒素の代謝が行われている。すなわち, 処理区で可消化窒素含量が低下するということは, 過炭酸ナトリウムの給

与がルーメン内微生物に悪影響を及ぼし、飼料中の窒素を利用出来ていないと考えられる。

*in vivo* 本実験 I における、エネルギー出納を表 7 に示した。

エネルギー出納では、処理区において、メタンエネルギーが CTL 区と比較して有意に減少した ( $P<0.01$ )。これは、処理区においてメタン排出量が CTL 区と比較して有意に減少したことからも理解出来る。また、処理区においては、エネルギー消化率が CTL 区と比較して有意に低下し ( $P<0.05$ )、さらに、糞中エネルギー含量の増加、蓄積エネルギー含量の減少およびエネルギー蓄積率の低下といった傾向が見られた ( $P<0.10$ )。本実験では、供試動物を 4 頭しか用いておらず、供試動物の頭数を増やすことで、この傾向が明確になるかも知れない。

## (2) 呼吸試験

*in vivo* 本実験 I における、過炭酸ナトリウム給与による各試験区のメタン排出量、二酸化炭素排出量、酸素消費量を図 9 に示した。

メタン排出量は、処理区において、CTL 区と比較して 22.5% 有意に減少することが示された ( $P<0.01$ )。したがって、*in vivo* 実験 (生体内) においても、*in vitro* 実験の結果と同様に、過炭酸ナトリウム給与はメタン排出量を抑制させることが示された。

二酸化炭素排出量は、*in vivo* 予備実験 I の結果と同様に、処理区と CTL 区との間に有意な差は認められなかった。

また、酸素消費量に関しても、処理区と CTL 区との間に有意な差は認められなかった。

## 4-2. 本実験Ⅱ（ルーメン液採取試験）

### 4-2-1. 材料および方法

#### (1) 供試試薬

*in vitro* 実験と同様の過炭酸ナトリウムを用いた（本文 2-1 参照）。

#### (2) 供試動物

供試動物には、フィステル装着コリゲール種去勢めん羊 4 頭を用いた (BW 44.8 ± 3.7kg)。4 頭は、実験期間を通して本学中家畜舎において個別に飼養管理を行った。

#### (3) 供試試料

*in vivo* 本実験Ⅰと同様の飼料を用いた（本文 4-1-1 参照）。

#### (4) 試験方法

本実験Ⅰと同様に、試験区には、過炭酸ナトリウムを給与しない CTL 区とルーメン内における過酸化水素終濃度（過炭酸ナトリウム給与量 g/日）が 2.0mM (5.04g) となるように過炭酸ナトリウムを給与する処理区を準備した。以下、各試験区は、CTL 区および処理区とする。各目的濃度は、めん羊のルーメン容積を 20 リットルとし、さらにその内の 90% が胃内容物であるとして換算した（松本, 2011）。

試験は、試験開始前に 10 日間の観察期間を設けた後、馴致期間 7 日間、ルーメン液採取 1 日の計 8 日間を 1 期とし、クロスオーバー法に従った。

ルーメン液のサンプリングは、飼料給与後 0, 2, 4, 6, 8, 24 時間が経過した時点で、ルーメンカニューレからシリンジを用いて行った。

#### 4-2-2. 分析項目および分析方法

##### (1) pH および酸化還元電位 (ORP)

pH および ORP は、ルーメン液採取後、速やかに pH メーター (GST-2729C, 東亜ディーケーケー株式会社, 東京) および ORP メーター (PST-2739C, 東亜ディーケーケー株式会社, 東京) を用いて測定した。

##### (2) プロトゾア数および揮発性脂肪酸 (VFA)

プロトゾア数および VFA の測定は、*in vitro* 実験と同様に行った (本文 2-2 参照)。ただし、プロトゾア数の測定に関しては、*in vivo* 実験では、サンプルを MFS solution によって 20 倍に希釈して行った (*in vitro* 実験では 5 倍希釈; ルーメン微生物量に違いがあるため)。

##### (3) アンモニア態窒素 ( $\text{NH}_3\text{-N}$ )

アンモニア態窒素濃度の測定は、コーンウェイおよびオマレーによって報告された微量拡散法を一部改変した定量法を用いて測定した (Conway E.J. and O'Malley E., 1942)。つまり、拡散剤として飽和炭酸カリウム ( $\text{K}_2\text{CO}_3$ ) および吸着剤として 2%ホウ酸指示薬を用い、1/100N 硫酸で滴定を行った。ただし、通常、アンモニア態窒素濃度は飼料摂取後 1 から 2 時間後がピークとなる (生田, 2002) ことから、過炭酸ナトリウム給与前および給与 2 時間後のルーメン液サンプルに関してのみ測定を行った。そして、過炭酸ナトリウム給与前のアンモニア態窒素濃度を処理前、飼料給与 2 時間後のアンモニア態窒素濃度を処理後として表 8 に示した。



#### 4-2-3. 結果および考察

##### (1) pH および酸化還元電位 (ORP)

*in vivo*本実験Ⅱにおける、各試験区の pH および ORP の変動を図 10 に示した。

pH は、過炭酸ナトリウム給与 4 時間後の処理区において、CTL 区と比較して有意に低い値を示した ( $P<0.05$ )。これは、処理区と CTL 区における飼料摂取の偏りによるものと考えられる。CTL 区の供試動物は、濃厚飼料を摂食した後、すぐさま粗飼料 (クレイングラス) を摂食し、飼料給与後 1 時間後には全てを摂食し終わっていた。それに対して、過炭酸ナトリウムを給与した処理区においては、濃厚飼料を摂食した後 (供試動物によっては接触をためらったものもいた)、粗飼料 (クレイングラス) の摂食が遅くなる傾向が見られた (供試動物によっては午後の給餌の時まで午前の餌が残っていることがあった)。つまり、過炭酸ナトリウムを給与した処理区においては濃厚飼料が先にルーメン内微生物による発酵作用を受け、その結果として pH が一時的に低下したと考えられた。このようなことから、過炭酸ナトリウム給与は、反芻家畜の飼料摂取を阻害する恐れがあると考えられた。

ORP (前述したように ORP の値は、高くなる (プラスに傾く) ほど低い嫌気状態を示し、低くなる (マイナスに傾く) ほど高い嫌気状態であることを示す。) は、試薬給与 2, 4 時間後の処理区において、CTL 区と比較して有意に高い値を示した ( $P<0.01$ )。これは、過炭酸ナトリウムが過酸化水素に分解された後、ルーメン内の一部の微生物がもつカタラーゼ (酵素) によって水と酸素に分解されたためと考えられた。また、試薬給与 6, 8, 24 時間後には、ルーメン内の通常 ORP 値である  $-150$  から  $-350$  の範囲内 (堀口, 1994) に戻っており、このような変動は *in vitro* 実験と同様の結果であった。

## (2) プロトゾア数

*in vivo* 本実験Ⅱにおける、各試験区のプロトゾア数を図 11 に示した。

プロトゾア数は、過炭酸ナトリウム給与後全ての時間において、処理区が CTL 区と比較して有意に低い値を示した ( $P<0.05$ )。これは、過炭酸ナトリウムの給与がプロトゾアに悪影響を及ぼすことを示している。プロトゾアは、pH に対する抵抗性が弱く、pH6.0 以下の状態が長く続くとルーメン内から消失することがあると言われている (板橋久雄, 1998)。したがって、前述した pH の一時的な低下が、ルーメン液採取を行うまでの馴致期間の間に連続的 (7 日間) に生じたことにより、pH に対する抵抗性が弱いプロトゾアにとってルーメン内が活動しづらい環境となり、処理区においてプロトゾアの数に大幅な減少したと考えられた。

また、プロトゾアは酸素を消費することができ、その程度は好気性細菌類によるものとはほぼ等しく、ルーメン内での酸素除去に大きく寄与している。したがって一般的に、ルーメン内からプロトゾアを除去すると、飼料給与後にルーメン内の酸素濃度が一時的に上昇することで菌叢が変化し、水素とメタン生成は阻害されることが知られている (板橋久雄, 2006)。つまり、本実験においても、過炭酸ナトリウムの給与によってプロトゾアの数に減少したことも、メタン排出量が減少した一つの理由であると考えられた。

## (3) 揮発性脂肪酸 (VFA)

*in vivo* 本実験Ⅱにおける、各試験区の VFA 生成量をサンプリング時間 (飼料給与後 0, 2, 4, 6, 8, 24 時間後) ごとに図 12, 13, 14, 15, 16, 17 に示した。

飼料給与 0 時間後の VFA 濃度において、処理区では酢酸/プロピオン酸比 (以下 AP 比) が CTL 区と比較して有意に低い値を示した ( $P<0.05$ )。また、酢酸、プ

ロピオン酸, 酪酸および総 VFA 生成量には有意な差は認められなかった。

飼料給与 2 時間後の VFA 濃度において, 試験区間で AP 比に有意な差は認められなかったが, 処理区では, 酢酸, プロピオン酸, 酪酸および総 VFA 生成量が CTL 区と比較してそれぞれ 30.9% ( $P<0.05$ ), 41.4% ( $P<0.05$ ), 77.2% ( $P<0.01$ ), 39.4% ( $P<0.01$ ) 有意に低い値を示した。

飼料給与 4 時間後の VFA 濃度において, 処理区では AP 比が CTL 区と比較して有意に高くなり ( $P<0.05$ ), さらに, 酢酸, プロピオン酸, 酪酸および総 VFA 生成量が CTL 区と比較してそれぞれ 26.7% ( $P<0.05$ ), 53.5% ( $P<0.01$ ), 79.9% ( $P<0.01$ ), 38.8% ( $P<0.01$ ) 有意に低い値を示した。

飼料給与 6 時間後の VFA 濃度において, 試験区間で AP 比に有意な差は認められなかったが, 処理区では, 酢酸, プロピオン酸, 酪酸および総 VFA 生成量が CTL 区と比較してそれぞれ 29.2% ( $P<0.05$ ), 58.7% ( $P<0.05$ ), 75.9% ( $P<0.01$ ), 40.5% ( $P<0.05$ ) 有意に低い値を示した。

飼料給与 8 時間後の VFA 濃度において, 処理区では, 酪酸生成量が CTL 区と比較して 71.3% ( $P<0.05$ ) 有意に低い値を示した。

飼料給与 24 時間後の VFA 濃度において, 処理区では, 酪酸生成量が CTL 区と比較して 59.9% ( $P<0.05$ ) 有意に低い値を示した。

これらの結果から, 特に VFA 生成が盛んに行われ, ルーメン内の VFA 濃度が高まる飼料給与 2, 4, 6 時間後の処理区では, 各 VFA の生成が阻害されていることが示された。酢酸をはじめ, 各 VFA は反芻家畜の主要な栄養源であり, それらの生成量の減少は避けるべき課題である。また, 処理区では, AP 比の値が CTL 区と比較して低くなり, 酢酸の生成よりもプロピオン酸の生成が盛んに行われていると考えられた。これは, 処理区において, 飼料摂取に偏りが見られたこと (本文 4-2-3(1)を参照) とメタン生成が抑制されたことに起因する (理

由は本文 2-3 (3)を参照)。このような結果は *in vitro* 実験でも確認されており、過炭酸ナトリウムの過度な添加は、VFA 生成量を減少させた。したがって、*in vivo* 実験においても、ルーメン内における過酸化水素終濃度が 2.0mM (過炭酸ナトリウム給与量 5.04g/日)となる過炭酸ナトリウム給与量では、供試動物にとって過度に給与された可能性があり、*in vivo* 実験においては、過炭酸ナトリウム給与量をさらに検討する必要があると考えられた。

#### (4) アンモニア態窒素 (NH<sub>3</sub>-N)

*in vivo*本実験Ⅱにおける、供試動物ごとのルーメン液中アンモニア態窒素濃度を表 8 に示した。

アンモニア態窒素濃度においては、過炭酸ナトリウムを給与する前と給与した後の供試動物ごとのルーメン液中アンモニア態窒素濃度の差が統計的に意味のある差かどうかを検定するために *t* 検定を行ったが、有意な差は認められなかった (*t*=2.68, *df*=3, *P*=0.075)。これは、供試動物ごとの元々のアンモニア態窒素濃度の違いに大きな差があるためと考えられた。測定は微量拡散法にて、ルーメン液サンプルをアルカリ性にすることによって発生するアンモニアガスを酸に吸収させ、その滴定を行った。しかし、過炭酸ナトリウムを給与した処理区においては、その多くが測定限界以下であった(アンモニアガスの発生が少なくホウ酸指示薬の色の変化が見られなかった)ため、正確な値の測定が困難であった(測定限界以下は濃度 0 とした)。

ルーメン内のアンモニア濃度は、微生物タンパク質の合成効率の指標となり、5 から 10mg/dL が指摘濃度である(板橋久雄, 2006)。したがって、表 8 にも示したように、供試動物 1 (2.9mg/dL) と供試動物 3 (2.5mg/dL) は、ルーメン内のもともとのアンモニア態窒素濃度が低く、その結果、過炭酸ナトリウム給与

がルーメン内のアンモニア態窒素濃度へ及ぼす影響を正確に評価出来なかったと考えられた。しかしながら、統計的に有意な差は認められなかったものの、過炭酸ナトリウムを添加した処理区のサンプルの多くが測定限界以下であり、アンモニア態窒素濃度が低くなる傾向が見られた ( $P<0.10$ ) ことを考慮すると、繊維質の消化が阻害された (表 5) 原因として、アンモニア態窒素濃度の低下が原因とも考えられた。したがって、アンモニア態窒素濃度の観点からも、今回の過炭酸ナトリウム給与量は、供試動物に対して過度に給与された可能性があると考えられた。

#### 4-3. 小括

*in vivo* 本実験における過炭酸ナトリウム給与は、二酸化炭素排出量や酸素消費量に悪影響を及ぼすことなく、メタン排出量を有意に減少させた。また、処理区と CTL 区との間で、乾物摂取量に違いは見られなかった（過炭酸ナトリウムの給与によって飼料の摂食が阻害された恐れがあったが、過炭酸ナトリウムを給与しない午後の給餌から翌朝にかけてはほとんどが摂食されており、トータルとして乾物摂取量に有意な差は認められなかった）ものの、乾物、有機物、粗蛋白質、酸性デタージェント繊維、中性デタージェント繊維、エネルギー消化率が有意に減少した。一方、処理区と CTL 区でルーメン液を比較したところ、処理区ではルーメン内の pH やルーメン内の ORP の一時的な変化が見られ、さらに、処理区ではアンモニア態窒素濃度が低下する傾向があり、プロトゾア数や VFA 生成量が有意に減少した。

以上のことから、*in vivo* 実験で確認されたメタン排出量の減少は、過炭酸ナトリウムの給与によって、ルーメン内の環境が大きく変化することで、供試動物のルーメン内に生息する微生物の活性が阻害され、ルーメン発酵自体が抑制された結果であると考えられた。つまり、本研究で着目した過炭酸ナトリウムは、生体内（めん羊）においてもルーメンメタン生成を抑制することは可能であるが、本研究で用いた給与量（ルーメン内における過酸化水素終濃度 2.0mM；過炭酸ナトリウム給与量 5.04g/日）では、反芻家畜のルーメン内環境を変化させることでルーメン内の微生物活性を阻害し、反芻家畜にとって重要な飼料消化率や VFA 生成量に対して、負の影響を与える可能性が示唆された。したがって、*in vivo* 実験においては、今後さらに過炭酸ナトリウムの給与量を検討し、*in vitro* 実験で確認されたように、プロピオン酸生成を促進し、メタンの基質となる水素を競分することで、VFA 生成や微生物活性を阻害することなく、メタン排出

量を減少させることの出来る給与量を追究する必要があると考えられた。

## 総 括

過炭酸ナトリウム添加による、反芻家畜のルーメンメタン抑制効果を検討した結果、反芻家畜（めん羊）への給与は、本研究の給与量（ルーメン内における過酸化水素終濃度が 2.0mM となる場合；過炭酸ナトリウム給与量 5.04g/日）では、メタン排出量を抑制することは出来ても、反芻家畜にとって重要な飼料の消化率、酢酸やプロピオン酸などの揮発性脂肪酸（VFA）の生成に悪影響を及ぼす可能性が示唆された。その原因としては、過炭酸ナトリウム給与によって、ルーメン内の環境が一時的に変化し（pH の低下、嫌気状態の低下）、ルーメン発酵を司るルーメン内微生物にとって、ルーメン内が生息しづらい環境となり、ルーメン発酵自体が阻害されたためと考えられた。

しかしながら、*in vitro* 実験においては、VFA 生成やルーメン内微生物活性などの他の要素に悪影響を及ぼすことなく、メタン生成量を抑制出来る可能性が示唆されている。したがって、*in vivo* においても、過炭酸ナトリウムの給与量次第では、他の要素に悪影響を及ぼさずにメタン排出量を抑制することが出来るはずである。

緒論でも述べたように、本研究は過酸化水素が反芻家畜のルーメンメタン生成量を抑制することを発端とし、反芻家畜への過酸化水素の簡易的な給与法として、過炭酸ナトリウムに着目した。過炭酸ナトリウムは、比較的安価で、粉末のため物質としても安定しており、飼料に混ぜて給与することが出来るため、現場での利用も容易であると考えられる。さらに、過炭酸ナトリウムは極めて少ない給与量で、反芻家畜のメタン排出量を減少させることが示された。

今後、さらなる追加実験を行うにあたり、以下のような注意点が挙げられる。まず、本研究のめん羊を用いた *in vivo* 実験では、呼吸試験の際にはフィステルからのガス流出の危険性を回避するため、フィステルを装着していないめん羊を用いた（BW



62.1±6.1kg)。そして、ルーメン液を採取する際には、フイステルを装着しためん羊を用いた (BW 44.8±3.7kg)。つまり、今回の実験では試験間で供試動物の体重に約20kgの差があるものの、ルーメン容積を一定のサイズと考慮して処理 (過炭酸ナトリウム給与) を行った。したがって今後、供試動物ごとの正確なルーメンサイズを考慮することは難しいかもしれないが、前述したような試験間差や個体差に応じた給与量を設定することで、より正確な効果を評価出来ると考えている。また、本研究では供試動物に4頭しか用いていないが、供試動物の頭数を増やすことで、個体差のバラつきも少なくなり、供試試薬 (過炭酸ナトリウム) のより正確な効果が評価できると考えている。現に、*in vivo* 予備実験 I において、過酸化水素終濃度 1.0mM 区 (過炭酸ナトリウム給与量 2.52g/日) および 1.5mM 区 (過炭酸ナトリウム給与量 3.78g/日) では、*in vivo* 本実験に用いた給与量 (過炭酸ナトリウム 5.04g/日) とほとんど変わらないメタン排出量の抑制効果を確認している (図7参照)。

このような注意点を考慮した上で、今後さらなる給与量の検討により、過炭酸ナトリウム給与による飼料消化率の低下やVFA生成量の減少を回避し、反芻家畜に対する新規の飼料利用効率改善剤、ルーメンメタン生成抑制剤として活用できると考えている。

## 要 約

反芻家畜のルーメン発酵では、最終産物の一つとしてメタンが発生する。メタンは、890 kJ/mol のエネルギー価を持ち、さらには、二酸化炭素の約 25 倍もの温室効果能を持つ。したがって、反芻家畜からのメタン排出量の抑制は、飼料利用効率の改善と地球温暖化の緩和に貢献すると言える。そこで本研究では、過炭酸ナトリウムを用いて、反芻家畜のルーメンメタン生成の抑制を試みた。

第 2 章は、*in vitro* 連続発酵ガス解析システムを用いて、過炭酸ナトリウムによるルーメンメタン生成の抑制効果を検討した。実験方法は、過炭酸ナトリウム添加量の異なる 3 処理区（発酵槽内における過酸化水素終濃度 0.05mM 区、0.1mM 区および 0.5mM 区）と添加しない CTL 区を準備し、各試験区間におけるガス生成量、ルーメン発酵性状、プロトゾア数を比較した。その結果、過度な添加を避けることで、二酸化炭素生成量（ルーメン内微生物活性）および VFA 生成量に悪影響を及ぼすことなく、メタン生成量を抑制させることが出来る可能性が示唆された。

第 3 章は、めん羊を用いた *in vivo* の予備実験と位置づけ、過炭酸ナトリウムのルーメンメタン生成の抑制効果を検討した。実験方法は、供試動物に対して過炭酸ナトリウムを増給し（ルーメン内における過酸化水素終濃度が 0mM 区、0.5mM 区、1.0mM 区、1.5mM 区および 2.0mM 区）、各過炭酸ナトリウム給与量時におけるメタン排出量のみを測定、比較した。その結果、生体においてルーメンメタン排出量を有意に減少させるためには、*in vitro* 実験の結果よりもより多くの過炭酸ナトリウム給与量（ルーメン内における過酸化水素終濃度が 2.0mM となる量）が必要であることが示された。

第 4 章は、めん羊を用いた *in vivo* の本実験と位置づけ、過炭酸ナトリウムのルーメンメタン生成の抑制効果をクロスオーバー法に従って検討した。実験方法は、過炭酸ナトリウムを給与する処理区（ルーメン内における過酸化水素終濃度が 2.0mM とな

る量) と給与しない CTL 区を準備し, 試験区間におけるガス排出量, 飼料消化率, 窒素出納, エネルギー出納, ルーメン発酵性状およびプロトゾア数を比較した。その結果, 過炭酸ナトリウムの給与によって, 反芻家畜のルーメンメタン生成を抑制することは可能だが, 今回設定した給与量 (過炭酸ナトリウム給与量 5.04g/日) では, 反芻家畜のルーメン内微生物に悪影響を及ぼす可能性が示唆された。したがって今後, 過炭酸ナトリウムの給与量をさらに検討し, 反芻家畜にとって重要な飼料消化率の低下や VFA 生成量への悪影響を無くすことで, 反芻家畜のための新規の飼料利用効率改善剤, ルーメンメタン生成抑制剤としての可能性を検討する必要がある。

図 表

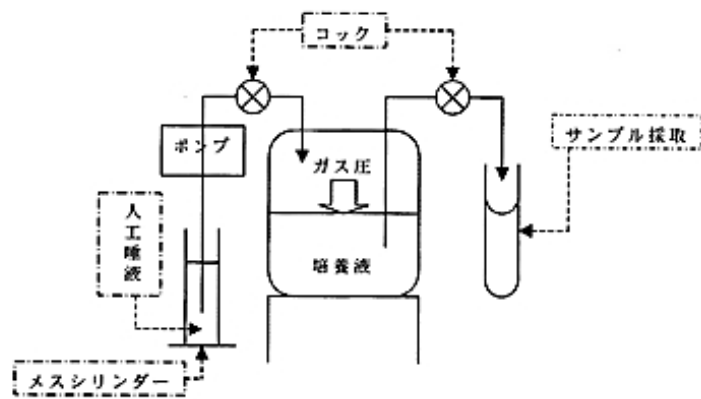
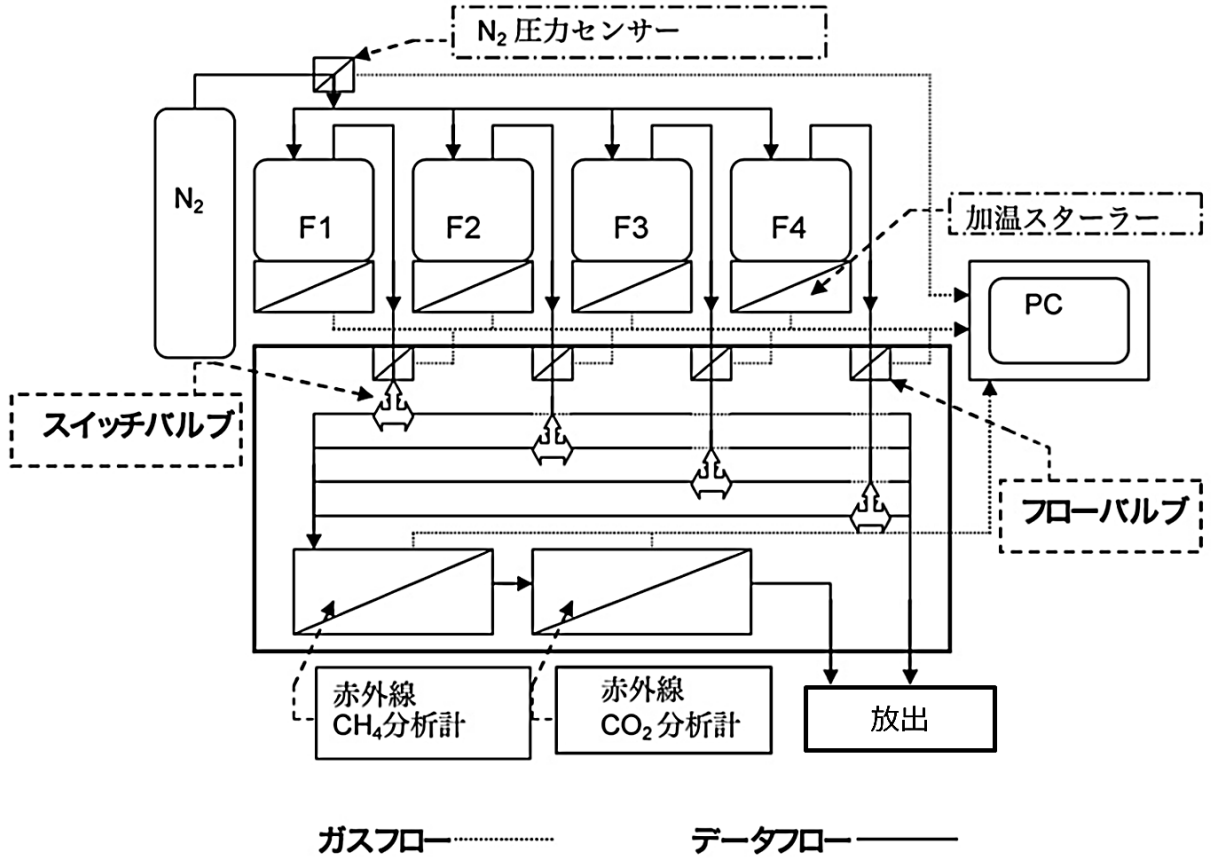


図 1. *in vitro* 連続発酵ガス解析システム (上図：本体, 下図：発酵槽)

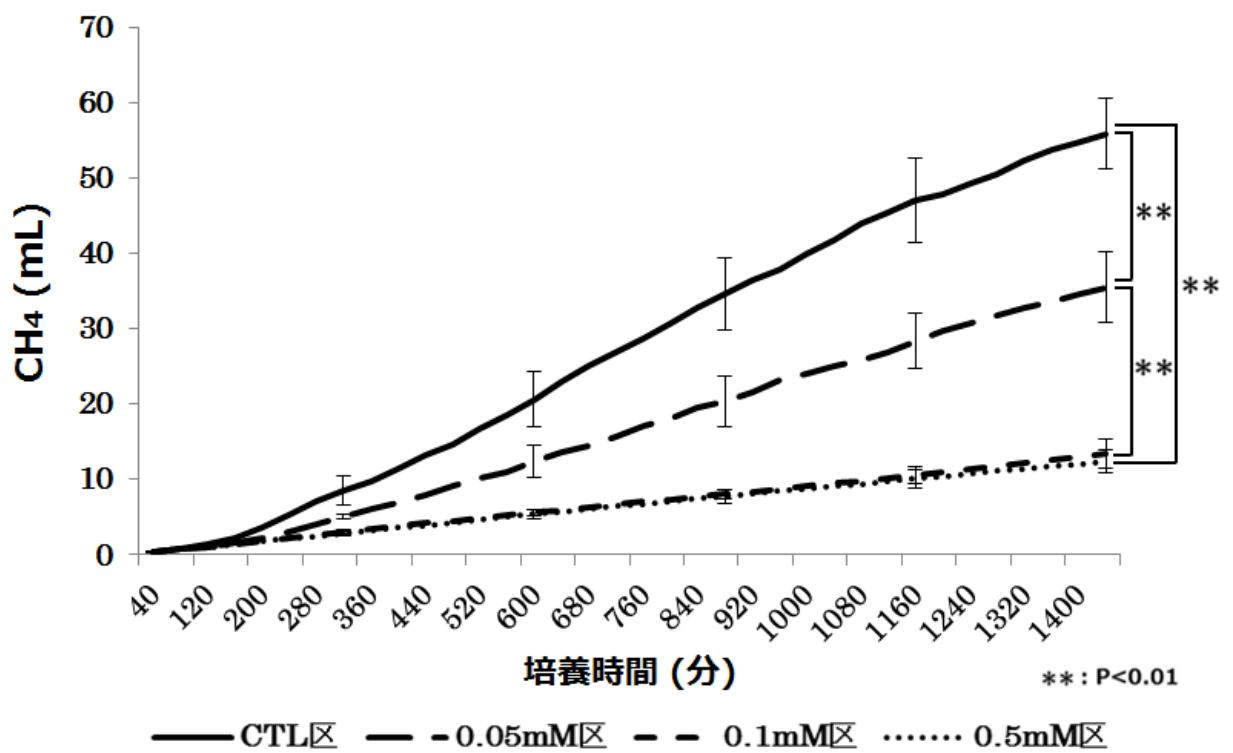


図 2. *in vitro* 実験における各試験区の累積メタン(CH<sub>4</sub>)生成量

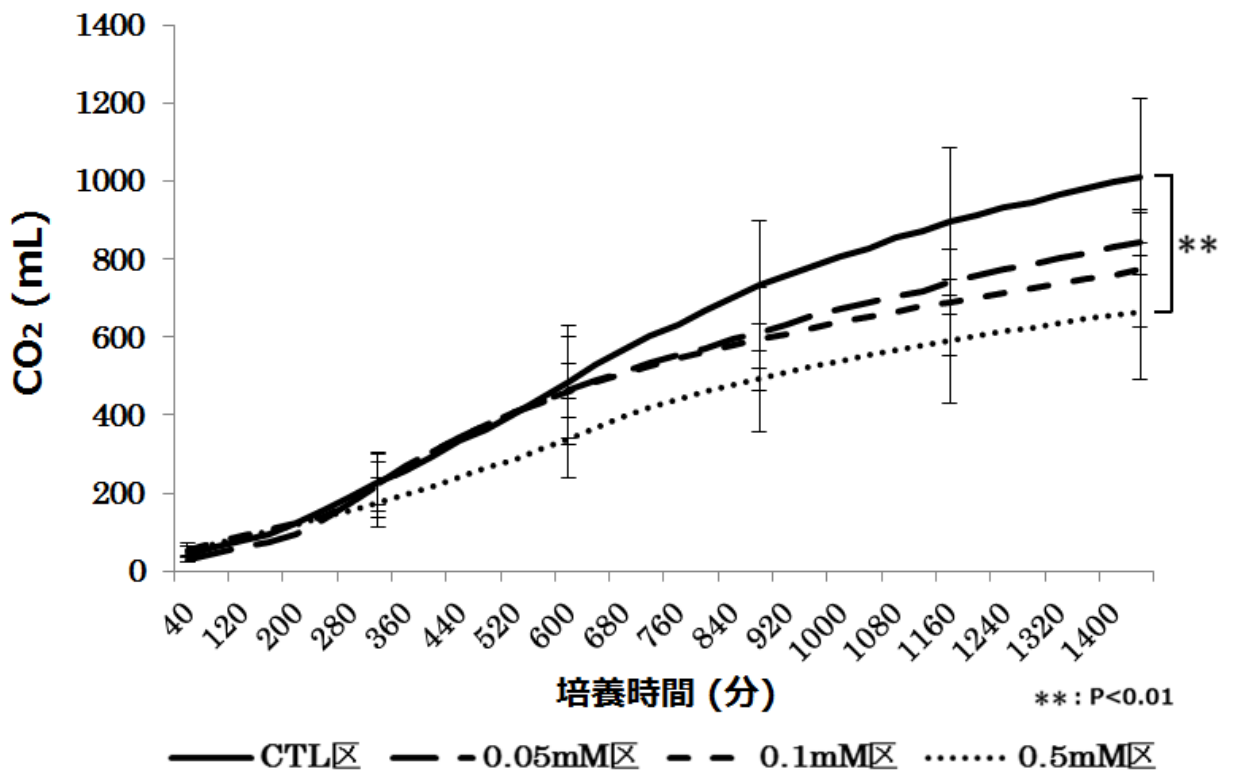


図 3. *in vitro* 実験における各試験区の累積二酸化炭素(CO<sub>2</sub>)生成量

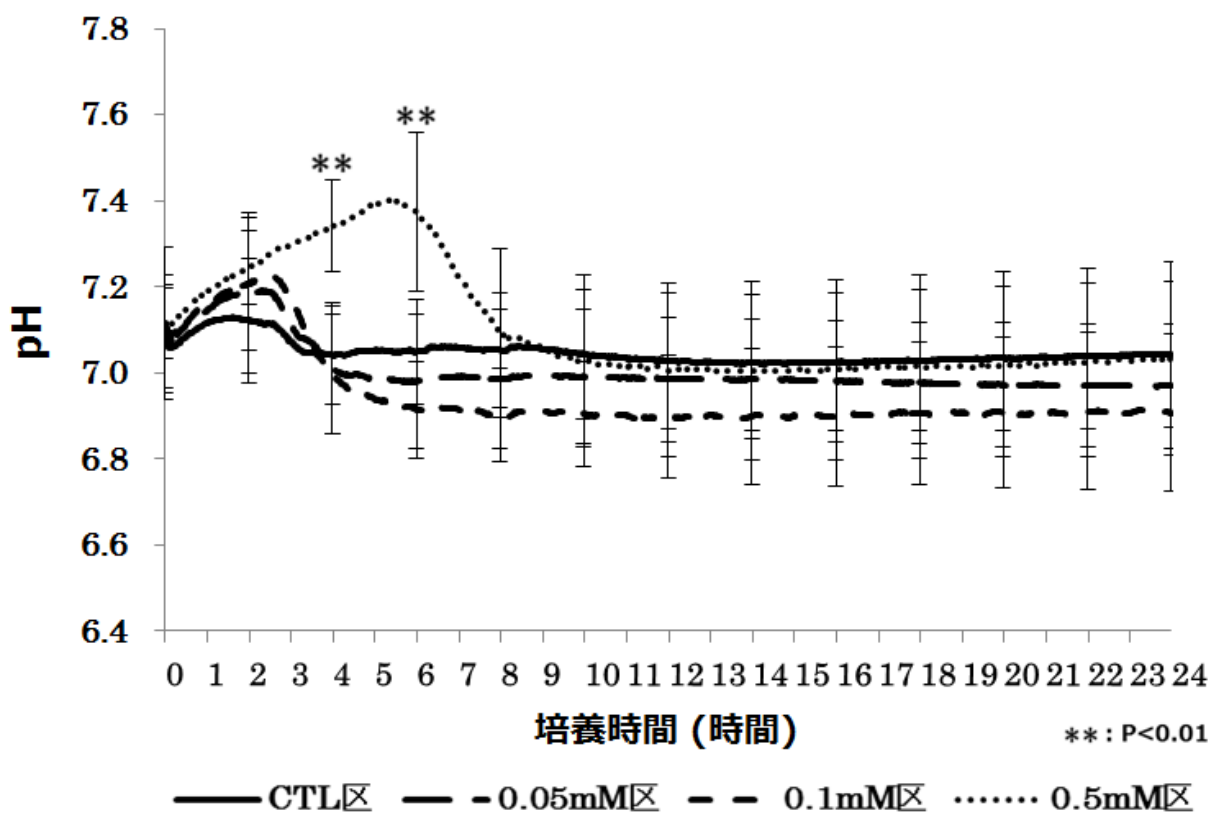


図 4. *in vitro* 実験における各試験区の pH 変動  
 (アスタリスクは CTL 区との有意差を示す)

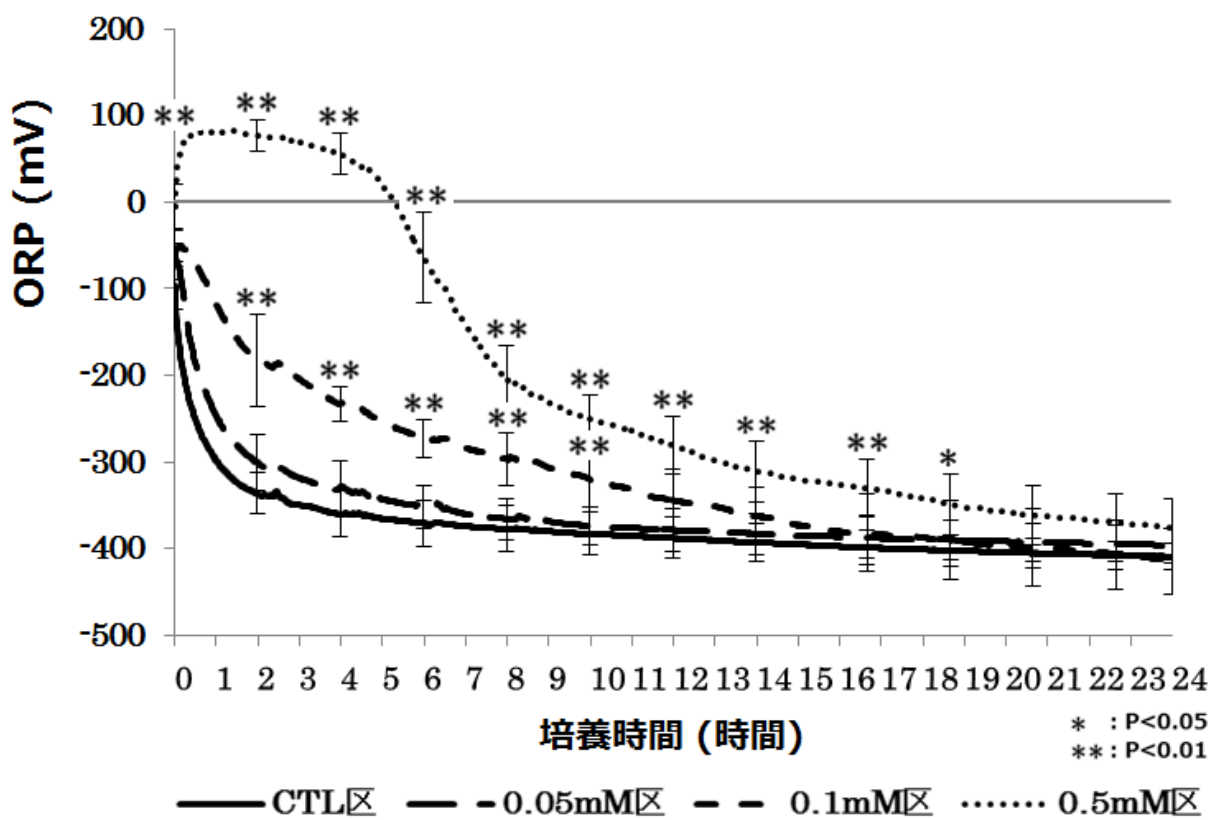


図 5. *in vitro* 実験における各試験区の酸化還元電位(ORP)の変動  
(アスタリスクは CTL 区との有意差を示す)



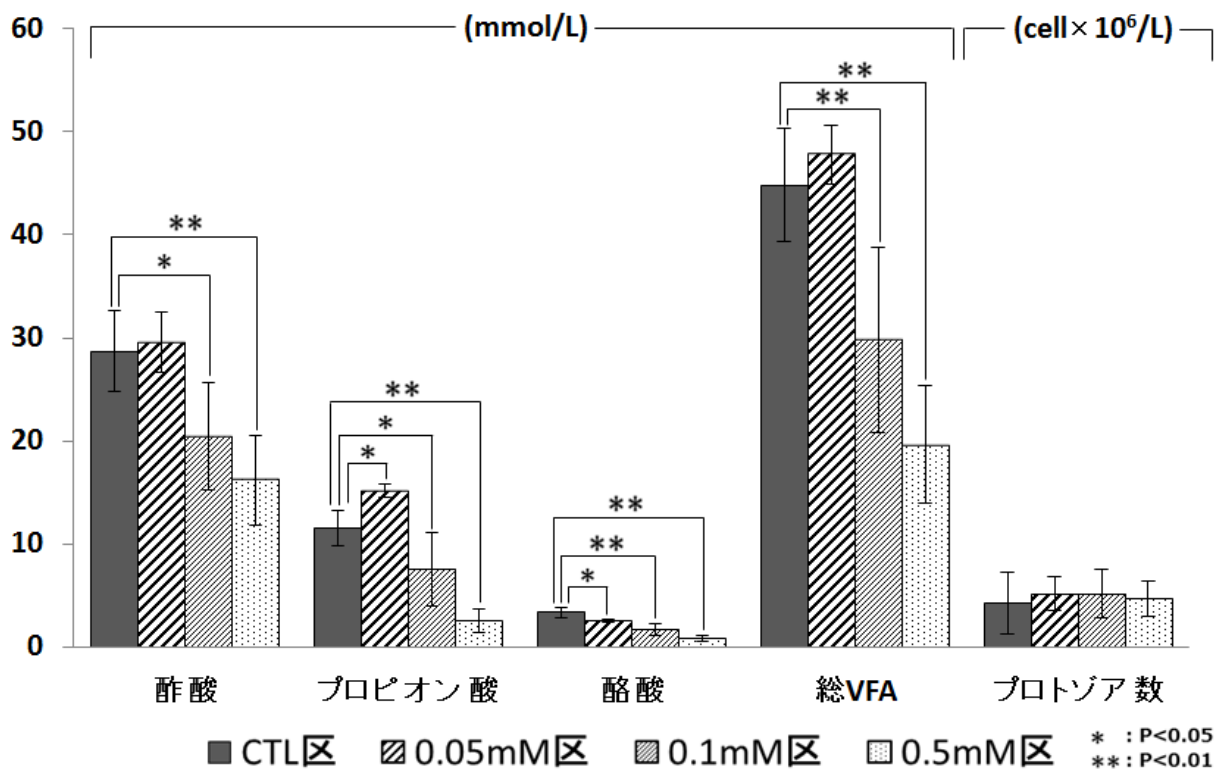


図 6. *in vitro* 実験における各試験区の VFA 生成量およびプロトゾア数

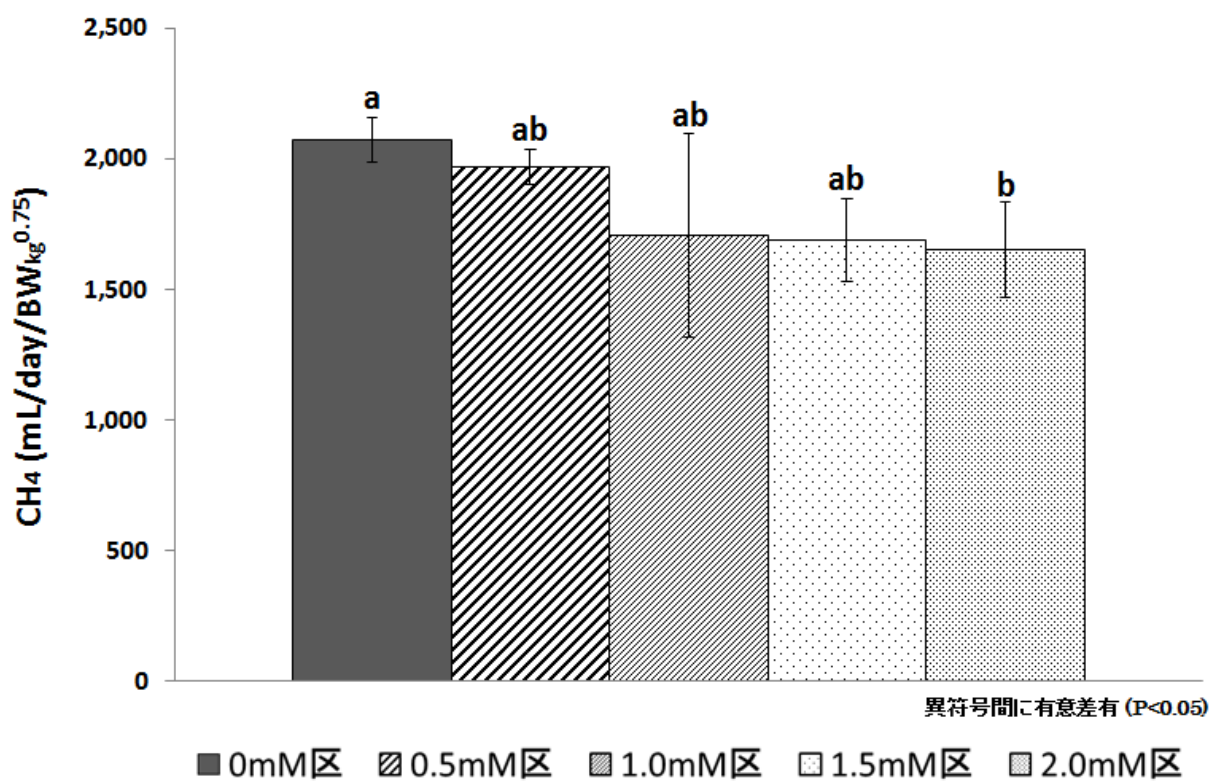


図 7. *in vivo* 予備実験 I におけるメタン(CH<sub>4</sub>)排出量

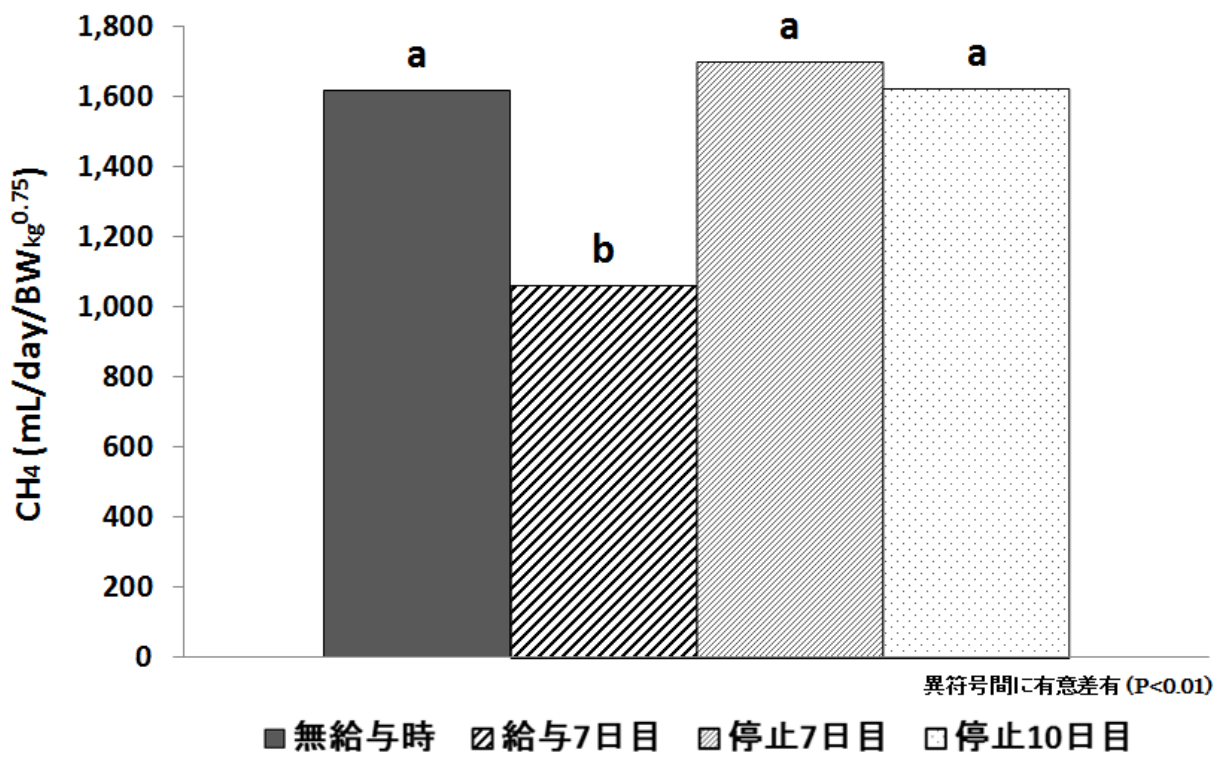


図 8. *in vivo* 予備実験Ⅱにおける過炭酸ナトリウム給与前, 給与後  
および給与停止 7 日目, 10 日目のメタン(CH<sub>4</sub>)排出量

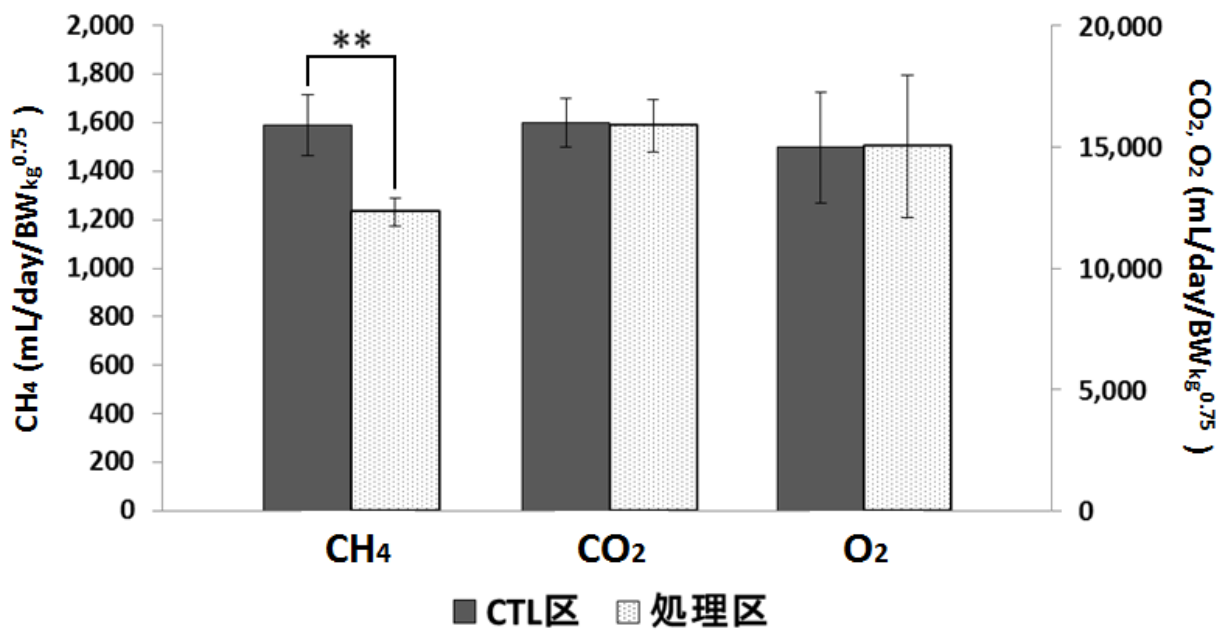


図 9. *in vivo* 本実験 I におけるメタン(CH<sub>4</sub>)および二酸化炭素(CO<sub>2</sub>)排出量と酸素(O<sub>2</sub>)消費量

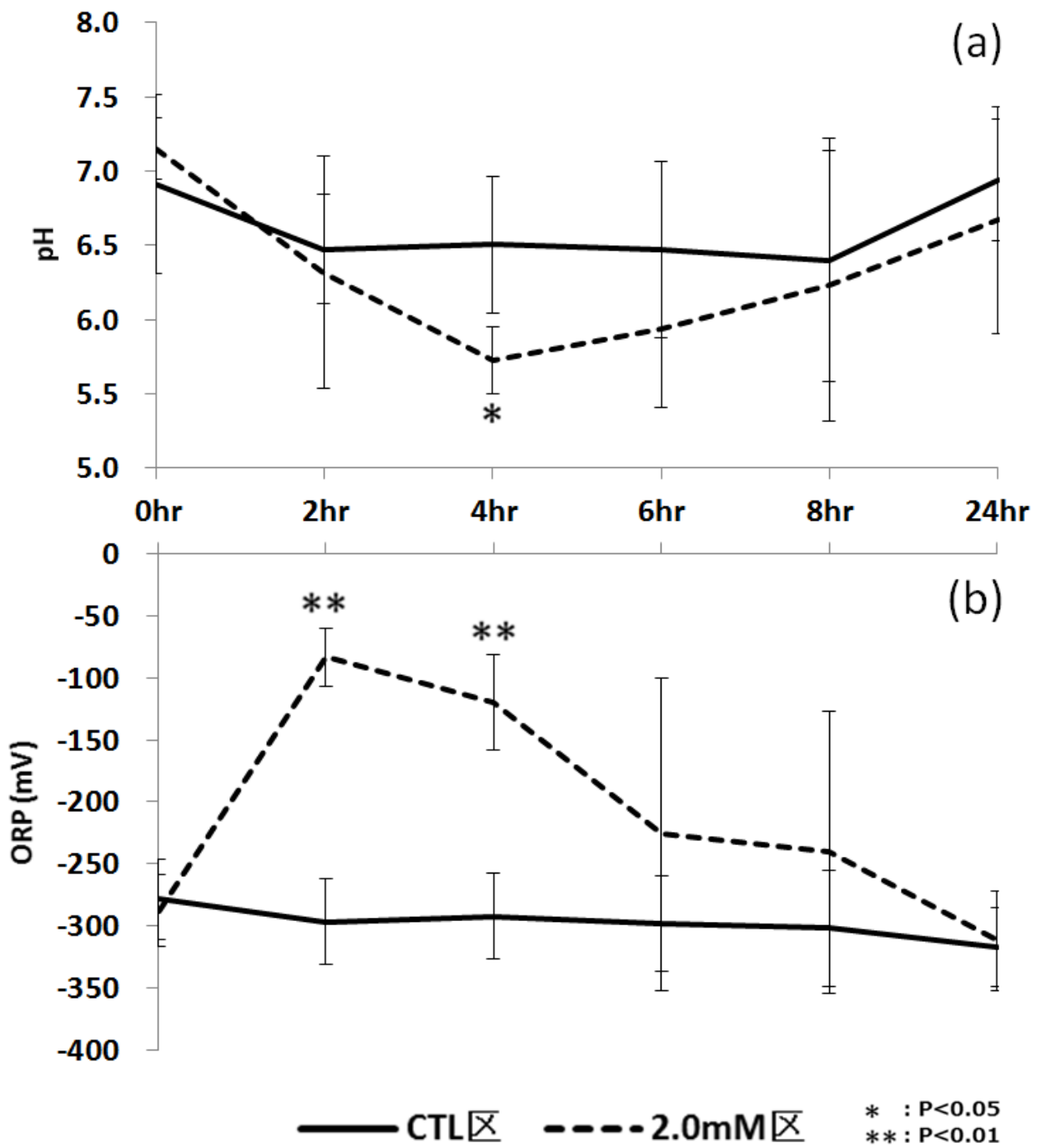


図 10. *in vivo* 本実験 II における各試験区の pH(a)および酸化還元電位(b)の変動  
 ((a), (b)ともに x 軸は飼料給与後の経過時間を示す)

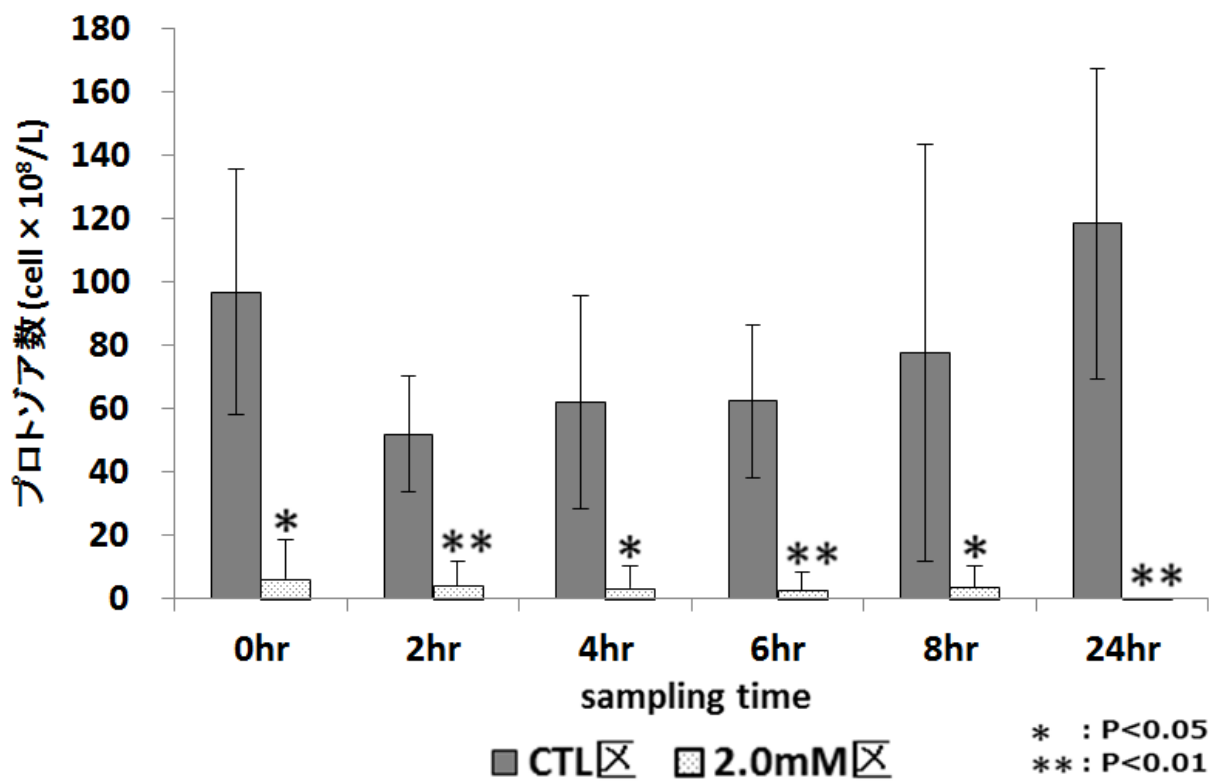


図 11. *in vivo* 本実験 II における各試験区のプロトゾア数  
(x 軸は飼料給与後の経過時間を示す)

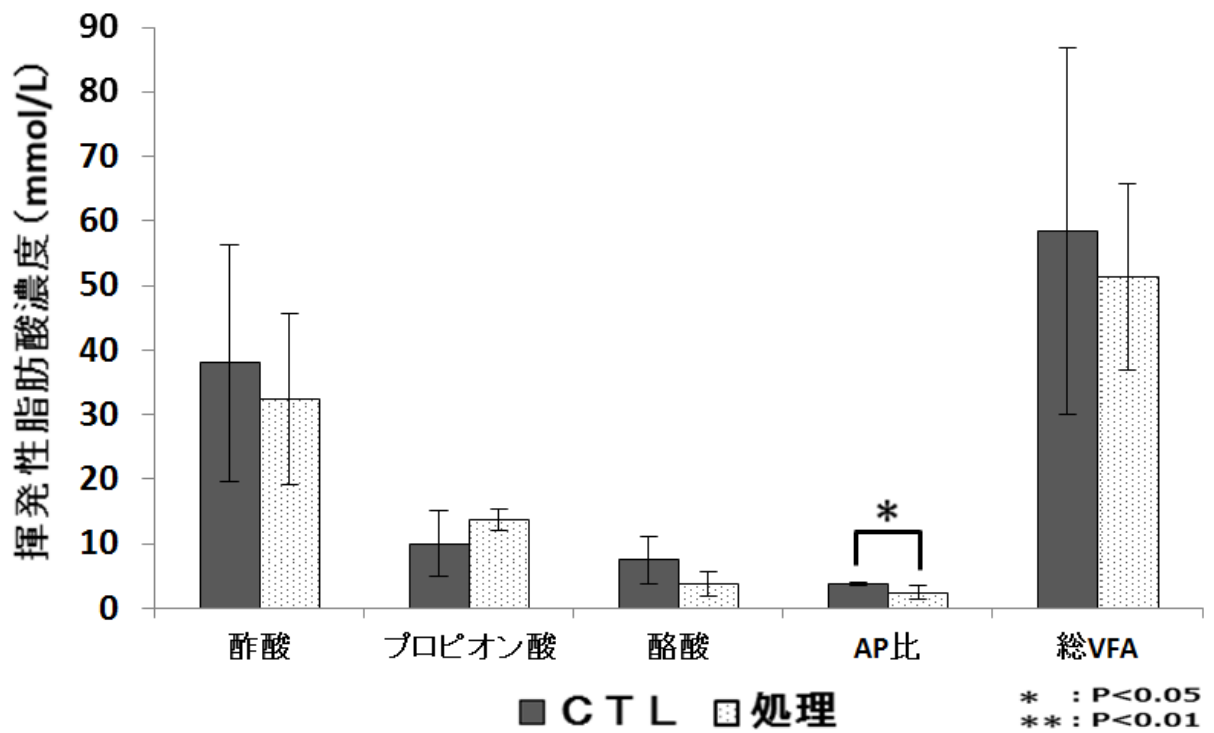


図 12. *in vivo* 本実験 II における飼料給与 0 時間後の揮発性脂肪酸(VFA)量

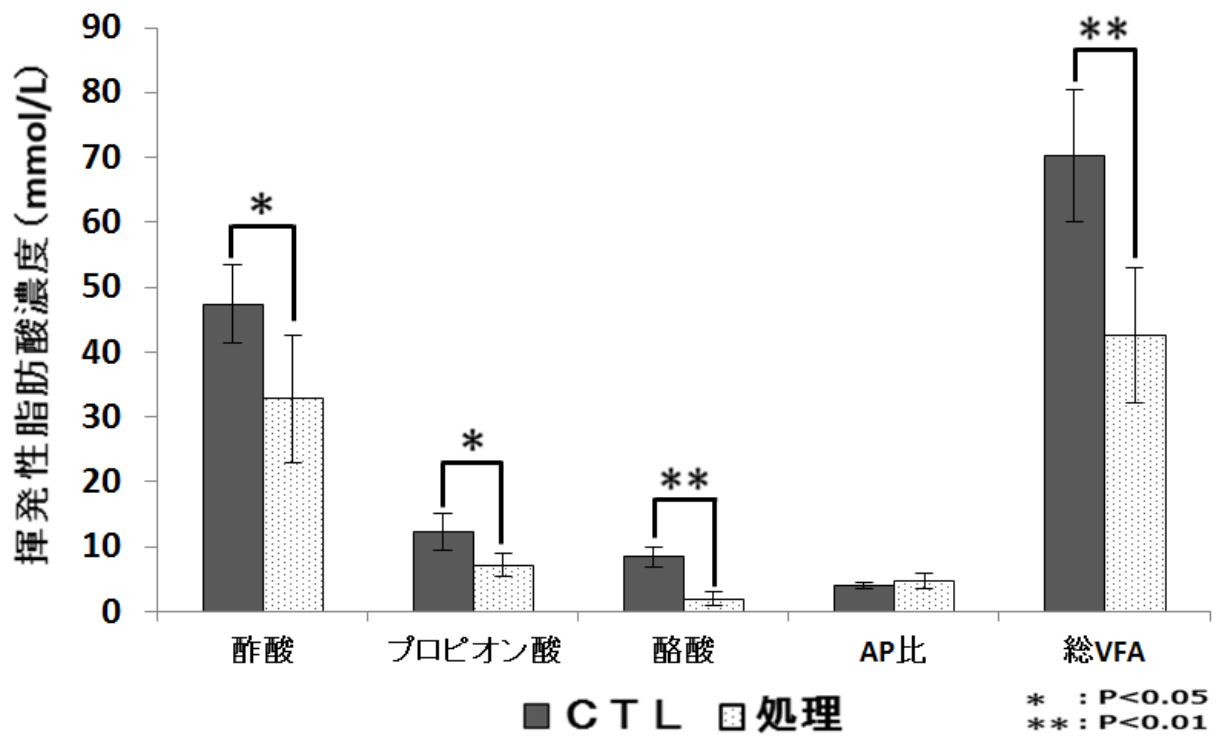


図 13. *in vivo* 本実験 II における飼料給与 2 時間後の揮発性脂肪酸(VFA)量



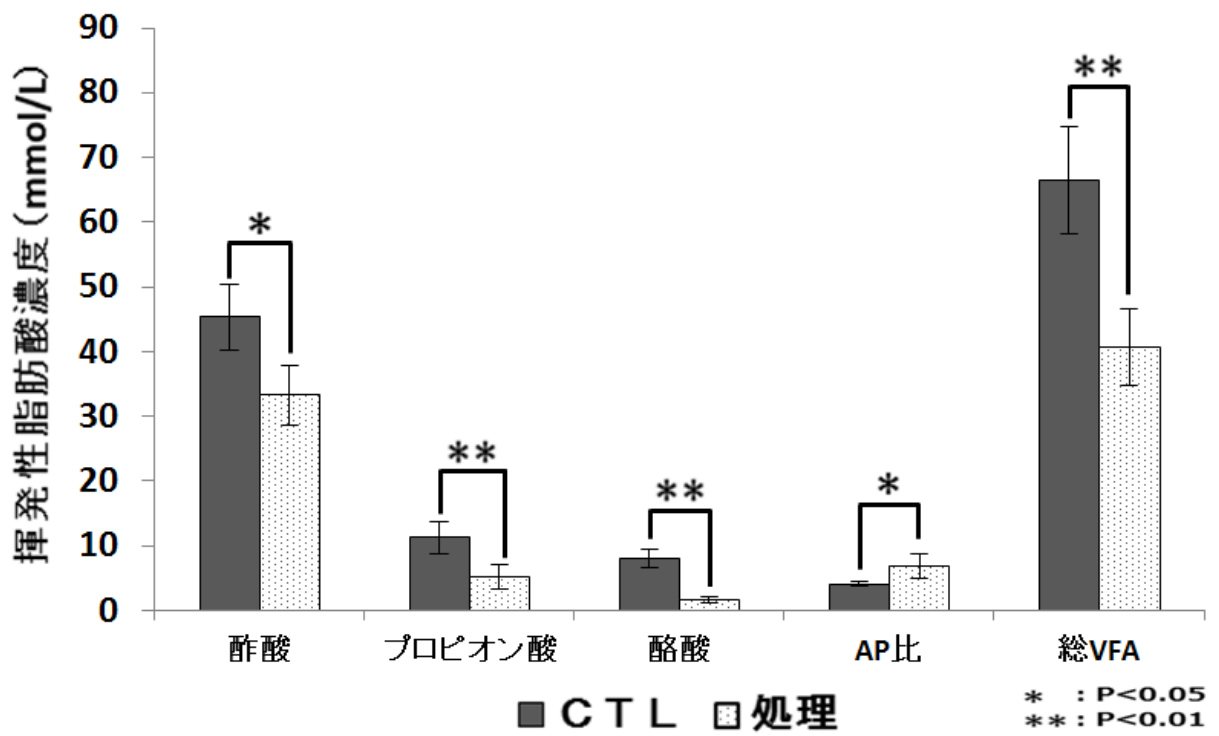


図 14. *in vivo* 本実験 II における飼料給与 4 時間後の揮発性脂肪酸(VFA)量

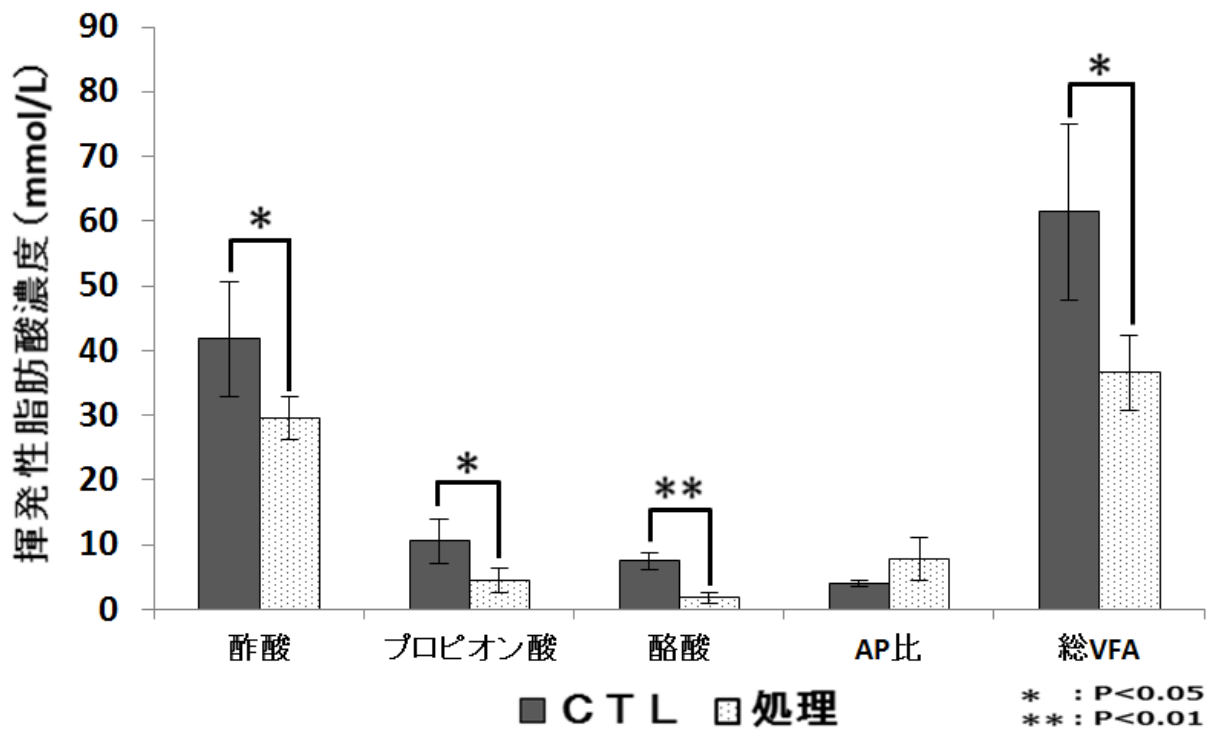


図 15. *in vivo* 本実験 II における飼料給与 6 時間後の揮発性脂肪酸(VFA)量

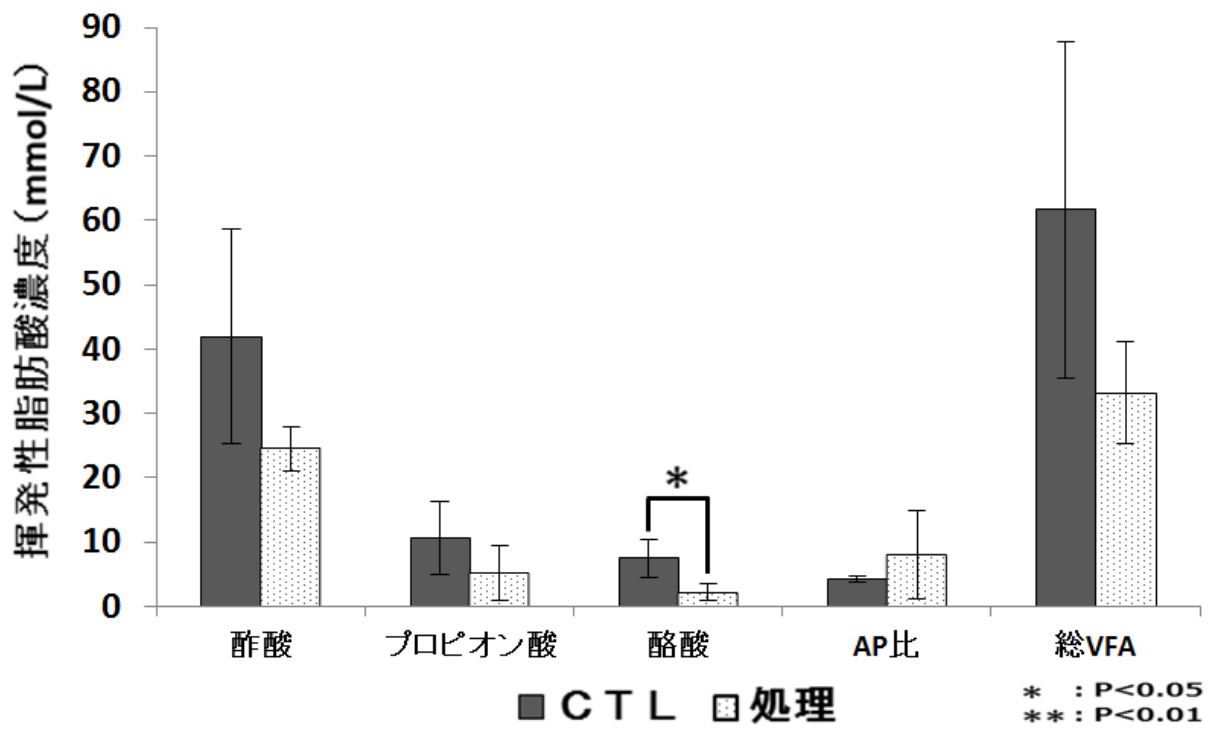


図 16. *in vivo* 本実験 II における飼料給与 8 時間後の揮発性脂肪酸(VFA)量

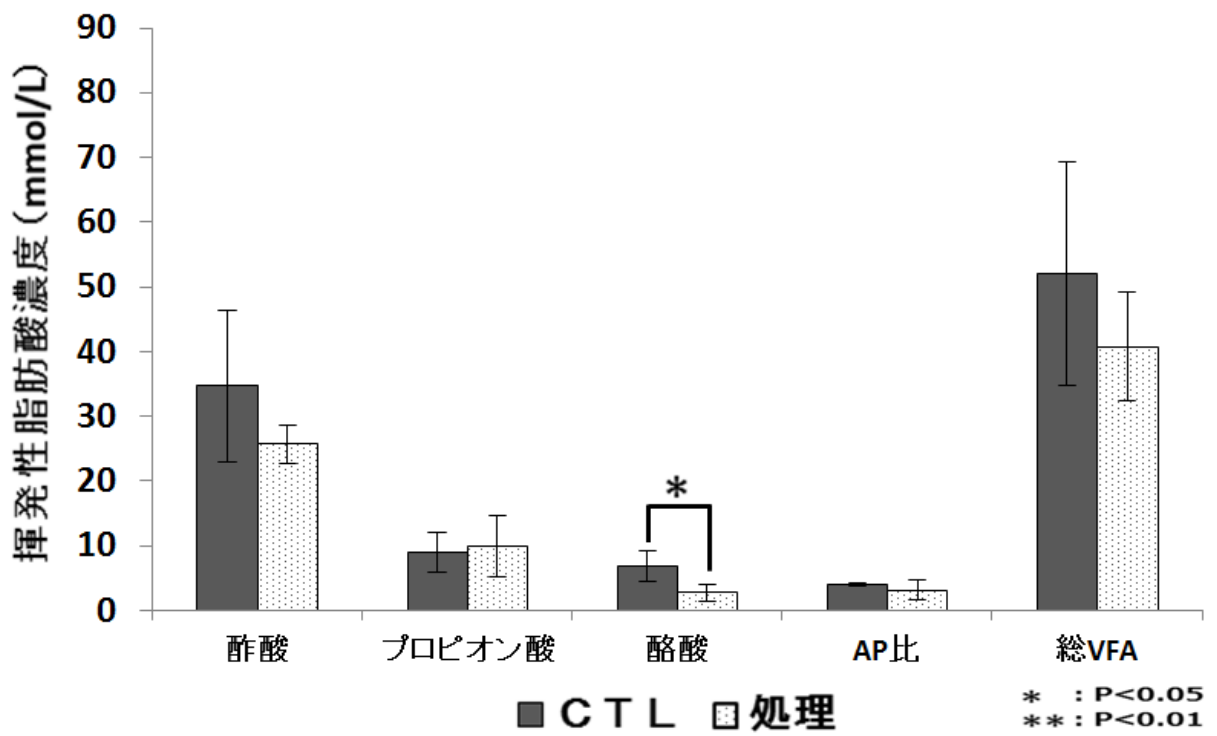


図 17. *in vivo* 本実験 II における飼料給与 24 時間後の揮発性脂肪酸(VFA)量

表 1. McDougall人工唾液の化学組成

試薬名	試薬量 (g / L)
炭酸水素ナトリウム	9.80
りん酸水素二ナトリウム	3.70
塩化ナトリウム	0.47
塩化カリウム	0.60
炭酸カルシウム	0.02
硫酸マグネシウム七水和物	0.07

表 2. *in vitro* 実験に用いた  
 基質飼料の化学成分およびエネルギー含量

	チモシー	濃厚飼料
	%FM	
DM <sup>1</sup>	95.5	92.5
	%DM	
OM <sup>2</sup>	92.8	94.5
CP <sup>3</sup>	9.7	18.2
NDF <sup>4</sup>	65.8	18.7
ADF <sup>5</sup>	39.1	6.9
ヘミセルロース	26.8	11.8
セルロース	3.8	1.0
ADL <sup>6</sup>	35.3	6.0
EE <sup>7</sup>	1.9	2.9
	MJ/kgDM	
GE <sup>8</sup>	18.9	18.5

1乾物 2有機物 3粗蛋白質  
 4中性デタージェント繊維 5酸性デタージェント繊維  
 6リグニン 7粗脂肪 8総エネルギー

表 3. *in vivo* 予備実験 I, 本実験に用いた  
供試飼料の化学成分およびエネルギー含量

	クレイングラス	濃厚飼料
	—————%FM—————	
DM <sup>1</sup>	87.9	86.6
	—————%DM—————	
OM <sup>2</sup>	92.4	96.7
CP <sup>3</sup>	13.2	10.7
NDF <sup>4</sup>	66.4	14.9
ADF <sup>5</sup>	32.6	4.0
ヘミセルロース	33.7	10.9
セルロース	3.0	0.5
ADL <sup>6</sup>	29.7	3.5
EE <sup>7</sup>	2.7	4.7
	—————MJ/kgDM—————	
GE <sup>8</sup>	18.4	18.7

1乾物 2有機物 3粗蛋白質  
4中性デタージェント繊維 5酸性デタージェント繊維  
6リグニン 7粗脂肪 8総エネルギー

表 4. *in vivo* 予備実験Ⅱに用いた  
供試飼料の化学成分およびエネルギー含量

	クレイングラス	フスマ
	—————%FM—————	
DM <sup>1</sup>	92.6	86.5
	—————%DM—————	
OM <sup>2</sup>	91.2	95.1
CP <sup>3</sup>	10.7	18.7
NDF <sup>4</sup>	68.5	39.8
ADF <sup>5</sup>	35.2	12.2
ヘミセルロース	33.3	27.6
セルロース	3.3	1.1
ADL <sup>6</sup>	31.9	11.2
EE <sup>7</sup>	1.9	5.8
	—————MJ/kgDM—————	
GE <sup>8</sup>	18.4	18.7

1乾物 2有機物 3粗蛋白質  
4中性デタージェント繊維 5酸性デタージェント繊維  
6リグニン 7粗脂肪 8総エネルギー



表 5. 乾物摂取量および各成分消化率

項目	CTL <sup>9</sup> 区	処理 <sup>10</sup> 区	SEM	P
DMI <sup>1</sup> , g/day/BW <sup>0.75</sup>	50.9	47.7	1.43	0.1625
DM <sup>2</sup> 消化率, %	69.8	61.7	2.16	0.0381
OM <sup>3</sup> 消化率, %	71.0	63.1	2.08	0.0352
CP <sup>4</sup> 消化率, %	67.3	57.6	2.48	0.0322
EE <sup>5</sup> 消化率, %	64.4	49.9	4.28	0.0537
ADF <sup>6</sup> 消化率, %	66.9	54.3	2.37	0.0095
NDF <sup>7</sup> 消化率, %	66.0	55.7	2.49	0.0264
E <sup>8</sup> 消化率, %	67.8	59.3	2.36	0.0425

1 乾物摂取量 2 乾物 3 有機物 4 粗蛋白質 5 粗脂肪

6 酸性デタージェント繊維 7 中性デタージェント繊維 8 エネルギー

9 過炭酸ナトリウム無給与 10 過炭酸ナトリウム給与

成分消化率 = 飼料摂取量中成分含量 ÷ 糞中成分含量 × 100

SEM: 標準誤差, P < 0.05 で有意差有

表 6. 窒素出納

項目	CTL <sup>2</sup> 区	処理 <sup>3</sup> 区	SEM	P
	—— g/day/BWkg <sup>0.75</sup> ——			
摂取N <sup>1</sup>	1.01	0.95	0.03	0.175
糞中N	0.33	0.40	0.02	0.032
尿中N	0.40	0.37	0.04	0.638
可消化N	0.68	0.55	0.03	0.031
蓄積N	0.28	0.18	0.05	0.183
	—— % ——			
N消化率	67.32	57.57	2.48	0.032
蓄積N/摂取N	27.77	18.36	4.93	0.226
蓄積N/可消化N	40.98	26.00	6.76	0.168

1 窒素 2 過炭酸ナトリウム無給与 3 過炭酸ナトリウム給与

可消化N = 摂取N - 糞中N

蓄積N = 摂取N - 糞中N - 尿中N

N消化率 = 可消化N ÷ 摂取N × 100

SEM: 標準誤差, P < 0.05 で有意差有

表 7. エネルギー出納

項目	CTL <sup>3</sup> 区	処理 <sup>4</sup> 区	SEM	P
	—— g/day/BWkg <sup>0.75</sup> ——			
摂取E <sup>1</sup>	0.939	0.881	0.027	0.175
糞中E	0.304	0.358	0.017	0.070
尿中E	0.042	0.046	0.010	0.770
メタンE	0.062	0.047	0.002	0.003
HP <sup>2</sup>	0.314	0.310	0.027	0.936
蓄積E	0.217	0.117	0.029	0.053
	—— % ——			
E消化率	67.8	59.3	2.355	0.043
E代謝率	56.8	48.7	2.539	0.065
E蓄積率	23.3	13.0	3.569	0.088

1 エネルギー 2 熱産生量

3 過炭酸ナトリウム無給与 4 過炭酸ナトリウム給与

蓄積E = 摂取E - 糞中E - 尿中E - メタンE - HP

E消化率 = (摂取E - 糞中E) ÷ 摂取E × 100

E代謝率 = (摂取E - 糞中E - メタンE) ÷ 摂取E × 100

E蓄積率 = 蓄積E ÷ 摂取E × 100

HP = 16.18O<sub>2</sub>消費量 + 5.16CO<sub>2</sub>産生量 - 5.90尿中空素排泄量 - 2.42CH<sub>4</sub>産生量

SEM: 標準誤差, P < 0.05 で有意差有

表 8. ルーメン液中アンモニア態窒素濃度 (mg/dL)

	供試動物1	供試動物2	供試動物3	供試動物4
処理前	2.9	7.6	2.5	12.1
処理後	1.0	0.0	1.3	5.1

処理前:過炭酸ナトリウムを給与する前

処理後:過炭酸ナトリウムを給与した後(給与後2時間後のルーメン液サンプル)

## 謝 辞

本実験の実施および本論文を作成するにあたり、本学畜産衛生学研究部門環境衛生学分野の西田武弘准教授には、大変お忙しい中、熱心にご指導ご鞭撻いただき、心より感謝申し上げます。研究室所属から大学院の約4年間、本当にお世話になりました。西田研究室に所属して良かったです。月1の飲み会ありがとうございました。

本学畜産生命科学研究部門家畜生産科学分野の花田正明准教授、河合正人准教授には、それぞれ主指導教官、副指導教官を快く引き受けていただき、心より感謝申し上げます。ありがとうございました。

山城隆樹博士には、実験装置の仕組みや修理方法、工具の使い方など、本当に多くのことを教えていただきました。また、何度も昼食に誘っていただき、ありがとうございました。山城さんのおかげで楽しい大学院生活を過ごすことが出来ました。

4年生、留学生の皆さん(泉田壮祐、栗林楓、高津弘起、明歩谷優佑、村上智也、アエミロさん)には、皆さんそれぞれ自分の研究があるにも関わらず、私の実験の手伝いをしていただき、本当に感謝しています。皆さんのおかげで卒業することが出来ます。ありがとうございました。

本実験の実施および本論文の作成にあたり、上記以外のたくさんの方々にも、多くのご指導ご鞭撻をいただきました。この場を借りてお礼申し上げます。ありがとうございました。

最後になりますが、本研究室の羊たちには、暑い時も寒い時も雨の時も雪の時も、私の実験に長い間付き合っただき、本当に感謝しています。君たちがいなければ、この研究室に所属することも無かったかも知れません。ありがとうございました。

## 参考文献

- Asa R., Tanaka A., Uehara A., Shinzato I., Usui N., Hirakawa K. and Takahashi J. 2010. Effects of Protease-resistant Antimicrobial Substances Produced by Lactic Acid Bacteria on Rumen Methanogenesis. Asian - Australasian Journal of Animal Sciences. Vol.23, No.6:700-707.
- 浅沼成人. 2000.  
ルーメン微生物の発酵調節機構の解明とルーメン機能の制御、特にメタン生成の抑制 平成 12 年度明治大学大学院博士学位請求論文
- Brouwer E. 1965.  
Report of sub-committee on constants and factors. Proceedings of the 3rd symposium on energy metabolism, Troon, 1964. European association for animal production, publication No.11:441-443.
- 畜産技術協会. 2002.  
畜産における温室効果ガスの発生制御（総集編）,  
平成 13 年度畜産関係温室効果ガス抑制技術等調査検討事業報告書
- Conway EJ and O'Malley E. 1942.  
Microdiffusion methods: ammonia and urea using buffered absorbents (revised methods for ranges greater than 10  $\mu\text{g N}$ ). Biochemical Journal 36:655-661
- 藤田裕, 高橋潤一, 松岡栄, 宗宮学. 1988.  
メン羊のガス代謝計測におけるフード式およびチャンバー式呼吸試験装置の比較  
日本畜産学会報 59(2):123-129.
- 橋本哲平. 2012.  
乳酸菌の生成する抗菌物質のルーメンメタン抑制効果,  
平成 23 年度帯広畜産大学大学院修士論文
- 堀口雅昭. 1994.  
反芻胃内消化基礎家畜飼養学（亀高正夫ら著）P.75-78, 養賢堂

- ・ 生田健太郎. 2002.  
 畜産技術ひょうご, 第 68 号 (公益社団法人兵庫県畜産協会)
- ・ IPCC. 2009.  
 地球温暖化第四次レポートー気候変動 2007ー, 中央法規出版
- ・ 板橋久雄. 2006.  
 ルミノロジーの基礎と応用ー高泌乳牛の栄養生理と疾病対策ー (小原嘉昭編),  
 P.25-50, 農文協.
- ・ 板橋久雄, 柴田正貴, 松本光人. 1998.  
 反芻動物の栄養生理学 (佐々木康之監, 小原嘉昭編), P.91, 107, 169, 211,  
 農文協.
- ・ 板橋久雄, 宮崎孔志, 浅沼成人, 日野常男. 2004.  
 新ルーメンの世界ー微生物生態と代謝制御ー (小野寺良次監, 板橋久雄編),  
 第 1, 3, 4 章, 農文協.
- ・ Johnson K.A. and Johnson D.E. 1995.  
 Methane emission from cattle. *Journal of Animal Science* 73:2483-2492
- ・ 小林泰男. 2011.  
 家畜からのメタン生成を低減する天然物質の探索,  
 日本農薬学会誌 36(1):124-126
- ・ 国立環境研究所. 2013.  
 温室効果ガスインベントリオフィス (報告書)  
<http://www-gio.nies.go.jp/aboutghg/nir/nir-j.html>
- ・ 小財千鶴. 2013.  
 乳酸菌の生成する抗菌物質のルーメンメタン抑制効果,  
 平成 24 年度帯広畜産大学卒業論文
- ・ MacDougall E.I.1948.  
 Studies on ruminal saliva. 1. The composition and output of sheep's saliva  
*Biochemical Journal* 43(1): 99-109.

- 松本哲朗. 2011.  
過酸化水素添加がルーメンメタン生成に及ぼす影響,  
平成 22 年度帯広畜産大学大学院修士論文
- Michelland RJ, Monteils V, Combes S, Cauquil L, Gidenne T, Fortun-Lamothe L. 2011. Changes over time in the bacterial communities associated with fluid and food particles and the ruminal parameters in the bovine rumen before and after a dietary change. *Canadian Journal of Microbiology* 57(8):629-637.
- 文部科学省. 2008-2010.  
反芻動物における温室効果ガス抑制効果を有する天然素材インベントリー  
<http://tech.obihiro.ac.jp/~takahashikaken/index.html>
- Morgavi DP, Martin C, Jouany JP and Ranilla MJ. 2012.  
Rumen protozoa and methanogenesis: not a simple cause-effect relationship.  
*British Journal of Nutrition* 107(3):388-397
- Phillipson A.T. 1969.  
University of Cambridge Physiology of digestion and metabolism in the ruminant: proceedings of the Third International Symposium, Cambridge, England, pp135-148
- Senevirathne N.D., Okamoto T, Takahashi J, Umetsu K, and Nishida T. 2012.  
Effect of Mixed Microbial Culture on Fermentation of Beverage Residues and the Effect of the Fermented Beverage Residues on in Vitro Rumen Fermentation and Methane Production.
- Ogimoto K. and Imai S. 1981.  
Atlas of rumen microbiology. Japan scientific societies press, Tokyo
- 岡本全弘. 2000.  
飼料へのポテトパルプの添加がめん羊の糞尿への窒素排泄に及ぼす影響  
*J Rakuno Gakuen Univ.*, 25(1):47~51



- 岡本全弘ら. 1984.  
ザ・ルーメンー第 1 胃の機能ー VOL.29 NO.3 FEB. 2 月臨時増刊号 P.52-60, 99-106, 114-120, デーリイジャパン社.
- Palmonari A, Stevenson DM, Mertens DR, Cruywagen CW and Weimer PJ. 2010.  
pH dynamics and bacterial community composition in the rumen of lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science* 93(1):279-287.
- Wolin M.J. 1975.  
Interactions between the bacterial species of the rumen. In *Digestion and metabolism in the ruminant*. In *Digestion and metabolism in the ruminant*. McDonald I.W, Warner A.C.I. (Eds.) pp135-148. University of New England Publishing Unit, Armidale.
- 柳田藤寿. 1996.  
2010 年 12 月, 京都大学学術出版会, 乳酸菌とビフィズス菌のサイエンス, 第 1 章乳酸菌の定義と分類・同定, 3 分離・培養・保存・同定法.
- Yáñez-Ruiz DR, Macías B, Pinloche E and Newbold CJ. 2010.  
The persistence of bacterial and methanogenic archaeal communities residing in the rumen of young lambs. *FEMS Microbiology Ecology* 72(2):272-278.
- 全国酪農協会 (牛飼い哲学と基礎技術連載 41, 43, 54, 56)  
<http://www.rakunou.org/index.html>
- Zhou M, Chung YH, Beauchemin KA, Holtshausen L, Oba M, McAllister TA and Guan LL. 2011. Relationship between rumen methanogens and methane production in dairy cows fed diets supplemented with a feed enzyme additive. *Journal of Applied Microbiology* 111(5):1148-58.
- Zhou M, Sanabria E.H. and Guan L.L. 2010.  
Department of Agricultural, Food and Nutritional Science, University of Alberta, Methane emission from cattle. *Journal of Animal Science*. 73:2483-2492 Michigan State University, East Lansing, Michigan 48824-1325

## SUMMARY

Effect of sodium percarbonate on  
methane emission, nutrient digestibility,  
rumen fermentation characteristics,  
nitrogen and energy balances in sheep

### Chapter1.

Methane is one of the major end products of fermentation in rumen organisms. Ruminants lose 2-12% of the gross energy in form of methane. And, Methane has about 25 times more global warming potential than carbon dioxide (CO<sub>2</sub>). By improving nutritive value of feeds, it is possible to reduce methane emission from ruminants and to mitigate global warming at the same time. The present study deals with mitigating effects of antibacterial agent derived from *Lactobacillus plantarum* TUA1490L on rumen methane emission. And, this antibacterial agent derived from lactobacillus bacteria is hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). A sodium percarbonate compound of sodium carbonate (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) with hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). It is more stable as materials and more easily used than antibacterial agent (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Thus in this study, the effect of sodium percarbonate on inhibiting methane emission, nutrient digestibility, rumen fermentation characteristics, nitrogen and energy balances was studied.

## Chapter2.

Effects on inhibiting methane emission by sodium percarbonate *in vitro* were studied. Four treatments: 0.05mM, 0.1mM, 0.5mM final concentration of hydrogen peroxide in fermenting vessel and a control (hay and concentrate at 50:50 ratios without sodium percarbonate) were prepared. In this study information on gas emission, characteristics of rumen fermentation and protozoa population were observed. The result indicated that, sodium percarbonate could inhibit methane production without negative impact on CO<sub>2</sub> production and VFA production. The use of 0.05mM of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was an optimum level for reducing methane emission without affecting other production parameters and ruminal conditions (pH and ORP).

## Chapter3.

*In vivo* preliminary experiment was conducted in order to observe effects of feeding sodium percarbonate on methane emission from sheep. Five treatments were considered :final concentration of hydrogen peroxide in rumen: 0mM (control), 0.5mM, 1.0mM, 1.5mM, 2.0mM. And, methane emission was observed. Based on the result the *in vivo* study on sheep, 2.0mM of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> has shown better response in reducing methane emission. This preliminary study indicated that in order to inhibit methane emission the level of sodium percarbonate required in *in vivo* study was higher than *in vitro* study.

## Chapter4.

*In vivo* experiment was conducted in order to observe effects of feeding sodium percarbonate on methane emission from sheep. Based on the preliminary study the best level (2.0mM) was selected for further study. Hence two treatments (final concentration of hydrogen peroxide in rumen: 2.0mM) and a control (without sodium percarbonate) were considered. Information on gas emission, nutrient digestibility, nitrogen balance, energy balance, characteristics of rumen fermentation and protozoa population were observed. Based on the result, sodium percarbonate could inhibit methane emission from sheep, but this amount (final concentration of hydrogen peroxide in rumen: 2.0mM) has negative impact on rumen microbes. So, the amount of inclusion level of sodium percarbonate need reconsideration when used in ruminants diet and eliminate the harmful effects on depressing nutrient digestibility and VFA production. Since the use of sodium percarbonate is new agent for improving nutritive value and as inhibitor of methane production, it requires further study.