

血液自動分析システムによる乳中尿素態窒素量 測定のための諸要因の検討

生田健太郎*

要 約

血液自動分析システム (以下ドライケムと呼ぶ) による乳中尿素態窒素量 (以下MUNと呼ぶ) 測定法の確立のために, 測定法の比較, 乳汁の採取・保存条件, 乳成分とMUNの関係について検討した。

- 1 同時に採取した乳汁と血液中の尿素態窒素量をドライケムで測定したところ, 両検体の測定値間に相関係数0.982の有意な相関が認められた。よって, ドライケムによるMUNの測定は可能である。
- 2 同一検体のMUNをドライケムと吸光度法で測定したところ, 両法の測定値間に相関係数0.923の有意な相関が認められた。しかし, 乳中尿素量試験紙とドライケムの測定値間には有意な相関は認められなかった。
- 3 分房間または搾乳の前後におけるMUNの濃度差は認められなかった。MUNの日内変動は, 統計的には有意でないものの, 朝と夕方に比べ日中に高値を示す傾向があった。
- 4 乳汁の室温保存では, 採取24時間後の測定でMUNの低下が認められたが, 冷蔵保存では36時間後も低下は認められなかった。また, 凍結保存では90日後の測定でも変化は認められなかった。
- 5 同一検体のMUNと乳成分を測定したところ, 乳蛋白質率との間に相関係数-0.67の有意な負の相関が認められた。

Investigation of Factors on Determination of Milk Urea Nitrogen using an Auto Analyzer

Kentarou IKUTA

Summary

The objects of the present study were to confirm the measurement of milk urea nitrogen (MUN). Experiments have been performed to determine the comparison of every methods, the conditions of collecting and keeping of milk, and the relation to milk composition.

- (1) Blood urea nitrogen (BUN) and MUN were measured using an auto analyzer for blood (DRYCHEM), and significant correlation ($r=0.982$) was observed. Thus, it was confirmed that was possible to measure MUN by DRYCHEM.
- (2) In the comparison of DRYCHEM and absorbance (Urea Nitrogen B-test WAKO), significant correlation ($r=0.923$) was observed, but no relation was observed between DRYCHEM and the test paper for milk urea (AZOTEST).
- (3) There was no significant difference between concentration of MUN each quarter, before or after milking. There was no significant diurnal variation of MUN, however, it had a tendency to increase.
- (4) The samples were kept at room temperature, MUN decreased 24h after collection, but there were no changes, during cold storage or freezing.
- (5) Significant negative correlation ($r=-0.670$) was observed between MUN and the milk protein percent.

キーワード：乳牛, 乳中尿素態窒素量, 乳汁, 血液自動分析システム, 乳成分

緒 言

血中尿素態窒素量(以下BUNと呼ぶ)は、蛋白質代謝の重要な指標として従来から利用されている。最近、一般乳成分の分析装置にオプションで乳中尿素態窒素量(以下MUNと呼ぶ)を測定する装置が市販され、欧米ではすでに乳牛の栄養管理のほかに糞尿による環境汚染の防止、乳製品の製造管理面での利用もなされている^{1-4, 7)}。また、国内でも北海道をはじめとして、牛に採血によるストレスを与えず、簡易に採材・測定ができるMUNへの関心が高まりつつある^{5, 6, 9, 10)}。

しかし、国内において、MUNの測定法に関する詳細な解説や報告は少ない。そこで本試験では、血液自動分析システム(以下ドライケムと呼ぶ)によるMUN測定法の確立のために、測定法の比較、乳汁の採取・保存条件、乳成分とMUNの関係について検討した。

材料及び方法

1 供試牛および実施時期

県立淡路農業技術センターで繋養するホルスタイン種雌17頭(1~5産)を供試し、1995年6月から9月にかけて一連の試験を実施した。供試期間中の日乳量は10~33kg、泌乳ステージは前期(分娩後100日目まで)が6頭、中期(分娩後101~200日目)が6頭、後期(201日目以降)が5頭であった。なお、検討事項によって供試した頭数と個体は異なるが、すべてこの17頭のうちから偏りのないように選定した。

2 飼養管理状況

供試牛は対尻式パイプストール牛舎に繋養し、8時30分と16時に給餌と搾乳を行った。

粗飼料はトウモロコシサイレージにビートパルプ、ヘイキューブ、チモシー乾草、ルーサン乾草、イタリアン乾草、エンバク乾草を組み合わせた。濃厚飼料は市販の配合飼料(DM87.5%, CP14.9%, TDN74.0%)を主体とし、必要に応じ補助飼料として綿実、大豆粕、エネルギーサプリメント(DM86.5%, CP20.0%, TDN85.0%)を添加した。これらの飼料は別々に給与したが、全体として日本飼養標準の養分要求量を粗蛋白質(以下CPと呼ぶ)で100~120%、可消化養分総量(以下TDNと呼ぶ)で100~110%充足するように給与量を設定した。乾物摂取量は調査していないが、調査時に残飼の多い個体は対象から除外した。

3 BUNとMUNの関係

ドライケム(フジフィルム)によるMUN測定値の信頼性を確認するため、17頭を供試し、朝の搾乳時にミルクメーター(TRU-TEST)から乳汁を採取すると同時

に頸静脈より採血し、それぞれ、尿素態窒素量を測定した。なお、乳汁は3,000回転で5分間冷却遠心し、分離した脂肪を吸引除去して得られた脱脂乳を測定に供した。以下の試験も乳汁は測定に際して、すべて同様に処理した。また、血液は血漿を測定に供した。

4 各種測定法の相関性

日中手搾りで採取した17検体と次項の試験で供試した検体のうち26検体を用いて、ドライケムと吸光度法による測定値の相関性を検討した。吸光度法の試薬は、尿素窒素測定用キット(尿素窒素B-テストワコー)を用いた。

また、先の17検体については、乳中尿素量試験紙(A ZOTEST, compagnie chimique d'aquitaine, FRANCE)でも測定し、ドライケムとの相関性を検討した。この試験紙は、尿素量を呈色反応によって定性的に判定するものである。そのため、測定値を比較する上で尿素態窒素量=尿素量×28/60の関係^{8, 9)}から、判定値を尿素態窒素量に変換した。

5 乳汁の採取条件

搾乳の前後と分房間におけるMUNの濃度差を検討するため、8頭を供試し、朝の搾乳の前と後に分房ごとに手搾りで採取した64検体(8頭×4分房×2回)を吸光度法で測定した。

また、MUNの日内変動を検討するため、6頭を供試し、8時から18時まで2時間ごとに無作為の分房から手搾りで採取し、吸光度法で測定した。

6 乳汁の保存条件

保存条件の違いによるMUN濃度の経時的変化を検討するため、朝の搾乳時にミルクメーターから採取した3頭の乳汁を脱脂後室温放置、原乳のまま室温放置、脱脂後冷蔵保存、原乳のまま冷蔵保存の4区に分け、採取時、採取の3, 6, 9, 24時間後、さらに冷蔵保存では36時間後にもドライケムで測定した。

また、朝の搾乳時にミルクメーターから採取した5頭の乳汁を脱脂処理後6本の小試験管に分注し、1本は直ちにドライケムで測定、他は-20℃で凍結保存し、それぞれ、7, 14, 28, 60, 90日後に測定した。

7 乳成分とMUNの関係

乳成分とMUNの関係を検討するため、17頭を供試し、朝と夕方の搾乳時にミルクメーターから採取した34検体について、乳脂肪分率、無脂固形分率、乳蛋白質率、乳糖の4成分を近赤外分析装置(Milko-Scan 133B)で、MUNをドライケムでそれぞれ測定した。

結 果

1 BUNとMUNの関係

同時に採取した血液と乳汁の尿素態窒素量を測定したところ、BUNとMUN測定値間には相関係数0.982の有意な正の相関が認められ、その回帰式は $Y=0.939X-0.414$ であった (Fig. 1).

2 各種測定法の相関性

乳汁43検体のMUNをドライケムと吸光度法で測定したところ、両法の測定値間には相関係数0.923の有意な正の相関が認められ、その回帰式は $Y=1.073X+0.672$ であった (Fig. 2).

一方、乳中尿素量試験紙とドライケムの測定値間には有意な相関は認められなかった。

3 乳汁の採取条件

(1) 分房間におけるMUNの濃度差

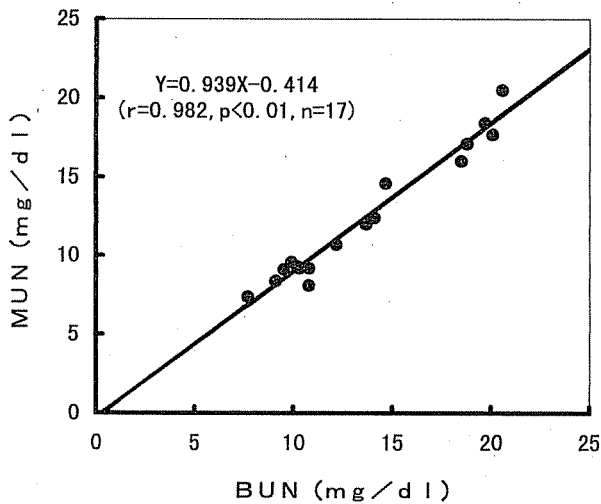


Fig. 1. Relationship between BUN and MUN.

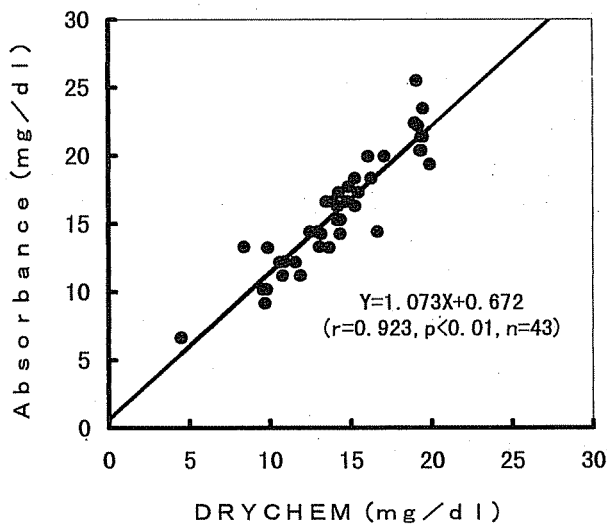


Fig. 2. Relationship between DRYCHEM and absorbance.

Table 1. MUN concentration in each quarter of udder.

Quarter	MUN (mg/dl)	n
Right / Front	14.9±4.0	16
Right / Rear	14.5±3.6	16
Left / Front	14.8±3.3	16
Left / Rear	14.9±3.4	16

Mean±SD

Difference of each quarter was non significant by analysis of variance ($F=0.041$, d. f. =3.60, $p<0.05$).

Table 2. MUN concentration before and after milking.

Before (n=32)	After (n=32)	Difference
15.3±3.3	14.3±3.7	1.0 NS

Mean±SD (mg/dl)

NS: non significant

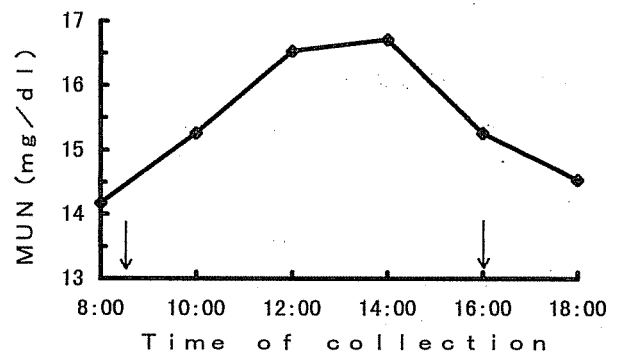


Fig. 3. The diurnal variation of MUN.

Allows are feeding

1分房当たり16検体ずつのMUNについて分散分析を行ったところ、分房間において有意な濃度差は認められなかった (Table 1).

(2) 搾乳の前後におけるMUNの濃度差

搾乳の前と後に採取した32検体ずつのMUNを比較したところ、有意な濃度差は認められなかった (Table 2).

(3) MUNの日内変動

8時～18時まで2時間ごとに乳汁を採取し、MUNの日内変動を調査したところ、各時間ごとの測定値に統計的な有意差は認められなかったが、朝と夕方と比べ、日中に高い値を示す傾向が認められた (Fig.3).

4 乳汁の保存条件

保存中のMUNの変化は、採取直後の測定値と比較して、室温保存では脱脂区、原乳区ともに24時間後の測定で低下が認められ、冷蔵保存では36時間後も低下は認められなかった (Fig.4). また、凍結保存では90日後の測定においても変化は認められなかった。

5 乳成分とMUNの関係

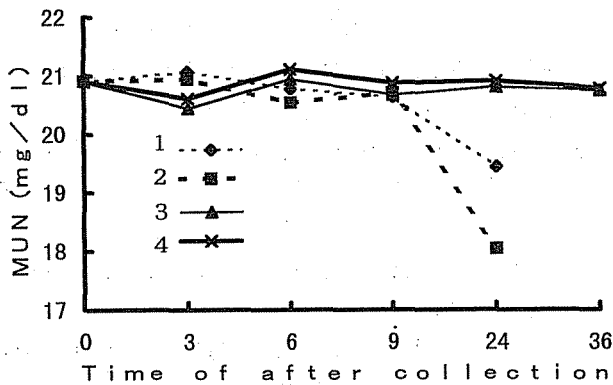


Fig. 4. Changing of MUN concentration by keeping condituin.

- 1: Skim milk kept on room temperature.
- 2: Rew milk kept on room temperature.
- 3: Skim milk kept in cold storage.
- 4: Rew milk kept in cold storage.

乳成分とMUNの関係を検討したところ、乳蛋白質率との間に相関係数-0.67の有意な負の相関が認められ、その回帰式は $Y = -0.059X + 3.882$ であった (Fig.5).

考 察

牛が摂取した蛋白質は、ルーメンで分解される分解性蛋白質と分解されず第四胃を通過し小腸に達する非分解性蛋白質に分けられる。分解性蛋白質と非蛋白質態窒素は、ルーメン内微生物によってペプチド、アミノ酸、アンモニアに分解される。ルーメン内微生物は、これらを基に炭水化物の発酵エネルギーを利用して蛋白質を再合成し、牛に利用される。一方、微生物に利用されなかった余剰のアンモニアは、胃壁から吸収され、肝臓で無毒化されて尿素となり、血液を介して腎臓へ運ばれ、尿へと排泄される他、一部は唾液を介してルーメンに再循環する。これらの過程で血液中の尿素態窒素をBUNといい、泌乳牛では乳汁中へも排泄され、これをMUNという。

今回、ドライケムおよび吸光度法で測定した159検体のMUNは4.5~26.2mg/dlの範囲にあり、その平均±標準偏差は14.4±4.3mg/dlであった。これに対し、佐藤ら¹¹⁾が吸光度法を用い、関東地方で行った測定では、3.8~22.6mg/dlの範囲で、牧場毎の平均が12.3~13.5mg/dlであった。また、扇⁵⁾によると北海道における乳成分分析装置 (Foss4000) による測定では、浜中農協管内が15.1±3.7mg/dl (n=5,732)、十勝農協連が12.7mg/dl (n=22,025)となっており、地域的な差もみられるとしている。さらに、アメリカ北東部のDHIA (牛群検定組合) では、乳成分分析装置で37,000検体を測定した結果、1グループベースの範囲は7.0~24.0mg/dl、

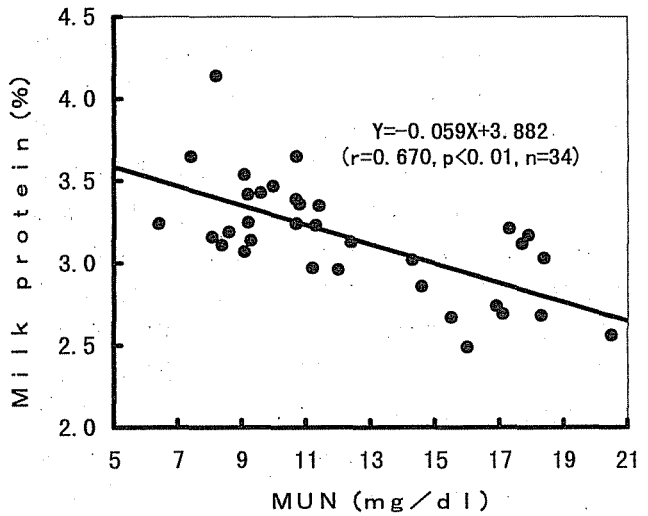


Fig. 5. Relationship between MUN and milk protein.

標準偏差の平均は約4.0mg/dlであった⁶⁾。

BUNとMUNの関係については、それぞれ測定方法や測定機種は異なるものの、いずれの報告^{6, 7, 10)}においても高い相関が示されている。一方、濃度についてはMUNはBUNの85~90%とする報告⁶⁾もあるが、これは採材と飼料給与の時間的な影響によるもので、理論的には等しいという結論が出されている⁹⁾。そこで、同時に採取した血液と乳汁の尿素態窒素をドライケムで測定したところ、高い相関が得られたことからドライケムによるMUNの測定が可能であることが確認された。

3種類の測定法によるMUN測定値の相関性を検討した。吸光度法とドライケムの測定値間には高い相関が得られ、吸光度法でもMUNの測定が可能であることが確認された。一方、乳中尿素量試験紙とドライケムには有意な相関は得られなかった。試験紙による測定では、乳中への浸漬時間と乳温が測定値に影響するため、そのガイドラインも最近提示されている⁹⁾。しかし、試験紙の色調変化を肉眼的に判断するため、測定者によるばらつきもあり、本法による正確な濃度の測定は困難であると考えられ、あくまで現場におけるMUN値の目安として利用すべきであろう。

搾乳の前後または分房間においてMUNの濃度差は認められなかった。したがって、乳汁を搾乳時以外に手搾りで採取する場合、搾乳の前後にかかわらず、いずれの分房からでも無作為に採取可能である。しかし、採食による影響⁹⁾と考えられる日内変動が認められたことから、比較調査などでは、給餌から採取までの時間を統一することが望ましい。

乳汁を室温で保存した場合、採取24時間後の測定値が低下した。これは細菌の増殖によるものと考えられてい

る⁹⁾。したがって、MUNの測定は採取後速やかに行うか、そうでない場合は、冷蔵保存するか、アジ化ナトリウム等の保存試薬を添加する必要がある⁹⁾。また、凍結による長期保存も測定値には影響しないものと考えられる。

MUNと乳成分の関係では乳蛋白質率との間に有意な負の相関が認められた。佐藤ら⁹⁾も泌乳後期において乳蛋白質率とBUNの間に有意な負の相関を報告し、さらに別の試験¹⁰⁾においても乳蛋白質率は泌乳初期・後期ともにMUNやBUNと負の相関にあったと報告している。乳蛋白質率は飼料中のエネルギー不足によって低下し、逆にMUNは蛋白質の摂取量に対し、エネルギーが相対的に不足すると上昇する^{9, 10)}。これらの相互作用によってMUNと乳蛋白質率に負の相関が認められたものと考えられる。

乳蛋白質率との相互判定による泌乳牛の栄養バランスの評価に用いるため、本試験ではドライケムによるMUNの測定法を確立するとともに、測定値に影響する諸要因を明らかにした。欧米では、このような栄養評価法におけるMUNと乳蛋白質率のガイドラインが作成されている^{1, 3-6)}。しかし、MUNと乳蛋白質率は粗飼料基盤、飼養形態等の条件によって、地域毎にその基準値は異なる。そのため、今後は試験研究や野外データの蓄積によって、県下の飼養条件に合致したMUNと乳蛋白質率のガイドラインを策定する必要がある。

引用文献

- (1) 井上 茂 (1996) : 乳中尿素態窒素の存在, その生理的背景と情報利用 : 乳質改善資料 105, 35-65
- (2) Nelson, A. J. (1994) : Information Needs of the Dairy Industry for Health and Nutrition Management : J. Dairy Sci. 77, 1984-1991
- (3) Nelson, A. J., 坂井秀敏 (訳) (1995) : 乳中尿素窒素 (MUN) 分析の実際的利用について : サイア 275, 10-16
- (4) 小野 斉 (1994) : 欧州では牛乳中の尿素に注目 : サイア 254, 9-11
- (5) 扇 勉 (1995) : 乳中尿素窒素測定で乳牛の栄養診断 : デーリイマン 45 (12), 42-43
- (6) 扇 勉 (1995) : ルーメンと肝臓 - とくに血中および乳中尿素態窒素 : Dairy Japan臨時増刊 ルーメン 4, 53-64
- (7) Roseler, D. K., J. D. Ferguson, C. J. Sniffen, and J. Herrema (1993) : Dietary Protein Degradability Effect on Plasma and Milk Urea Nitrogen and Nonprotein Nitrogen in Holstein Cows : J. Dairy Sci. 76, 525-534
- (8) 佐藤 博 (1986) : 乳牛における血液成分とその栄養生理的意義 : 日畜会報 57, 959-970
- (9) 佐藤 博 (1991) : 乳牛における乳脂率および乳蛋白質率と血漿成分の関係 : 日畜会報 62, 996-999
- (10) 佐藤 博・花坂昭吾・松本光人 (1992) : 乳牛における血漿成分, 栄養摂取, 牛乳窒素, 乳脂率および乳蛋白質率の関係 : 日畜会報 63, 1075-1080
- (11) 佐藤 博・西口靖彦・加藤寿次 (1996) : 牛乳の尿素濃度と受胎成績の関係 : 日畜会報 67, 58-63