

乳牛のルーメン液アンモニア態窒素の迅速測定法と飼料給与形態の違いが体内窒素濃度の変動に及ぼす影響

生田健太郎*・福尾憲久**・廣崎里麻*・篠倉和己*・小嶋 睦*

要 約

ルーメン液アンモニア態窒素を簡易かつ迅速に測定するため、乳牛26頭を供試し、乾式血液自動分析装置を用いた測定法(以下迅速法と呼ぶ)を検討した。さらに、飼料給与形態の違いとルーメン液アンモニア態窒素と血中尿素態窒素の相関性や飼料摂取後の体内窒素濃度の経時的変動について比較検討した。

- 1 ルーメン液59検体のアンモニア態窒素を水蒸気蒸留法(y)と迅速法(x)とで測定したところ、両法の測定値間には相関係数0.976の有意な正の相関が認められ、その回帰式は $y=1.098x-1.686$ ($r^2=0.952$) であった。
- 2 迅速法による測定値の再現性を検討したところ、変動係数は2.86%で、良好であった。
- 3 検体の保存条件を検討したところ、ルーメン液アンモニア態窒素濃度は、採取後1時間以内であれば比較的安定しているが、2時間以上経過すると室温・冷蔵いずれの保存でも変動がみられた。
- 4 飼料給与形態の異なる牛でルーメン液アンモニア態窒素と血中尿素態窒素の相関性を比較したところ、完全混合飼料給与搾乳牛・非搾乳牛・分離給与搾乳牛の順に、それぞれ有意 ($p<0.05$, $p<0.01$, $p<0.001$) な相関 ($r=0.479, 0.657, 0.860$) が認められた。
- 5 ルーメン液アンモニア態窒素は飼料摂取後2時間程度で最高値に達したのち、急速に低下した。これに呼応する形で、血中アンモニア態窒素、血中尿素態窒素および乳中尿素態窒素も変動した。これらの変動率は完全混合飼料給与の方が分離給与よりも小さかった。

The Rapid Method of Measurement of Rumen Ammonium Nitrogen and Effects of Feeding Conditions on Nitrogen Metabolism in Dairy Cows

Kentarou IKUTA, Norihisa FUKUO, Rima HIROSAKI, Kazumi SASAKURA and Mutsumu KOKAMO

Summary

The objectives of this study were to investigate the effectiveness of the rapid method for measuring rumen ammonium nitrogen (R-NH₃N) and to compare the metabolism of R-NH₃N between different feeding conditions.

- (1) R-NH₃N of 59 rumen fluids were measured by the steam-distill method(y) and the rapid method(x). Significant correlation ($r=0.976$) was observed between R-NH₃N values measured by the two methods and the regression formula is $y=1.098x-1.686$.
- (2) Coefficient of variance of the estimated values by the rapid method was 2.86%.
- (3) R-NH₃N concentrations of rumen fluid were constant within 1 hour after sampling, but significantly increased after 2 hours storage either at room temperature or in cold conditions.
- (4) Significant correlation was observed between R-NH₃N and blood urea nitrogen (BUN) concentration.
- (5) The peak of R-NH₃N was observed about 2 hours after feeding and then decreased rapidly. Blood-NH₃N, BUN and milk urea nitrogen correlated with the change of R-NH₃N. These changes were smaller in cows fed TMR than cows on separate feeding.

キーワード：ルーメン、アンモニア態窒素、乳牛、血液自動分析装置、尿素態窒素

1999年8月30日受理

* 淡路農業技術センター ** 現洲本農林水産事務所

緒 言

反芻家畜が摂取した飼料中の粗蛋白質は、ルーメン内において6～7割が溶解もしくはルーメン微生物による分解を受けてアンモニアとなる。このアンモニアを基質に炭水化物の発酵エネルギーを利用して微生物体蛋白質が合成されるが、余剰のアンモニアはルーメン壁から吸収され、肝臓で無毒化されて尿素となり血液を介して多くは体外へと排泄される。

このことから、反芻家畜の血中尿素態窒素（以下 BUN と呼ぶ）は、給与飼料中の蛋白質とエネルギーのバランスをみる指標とされている。しかし、BUN はアミノ酸の異化作用によっても生じるため、必ずしもルーメン内における蛋白質の分解・利用状況を的確に反映していない。これに対し、ルーメン液アンモニア態窒素（以下 R-NH₃N と呼ぶ）はルーメン内の状況を直接的に把握できる重要な指標の一つであるが、その測定には蒸留や滴定等の煩雑な手法と特殊な測定装置を要するため、実験室以外で測定されることはなかった。

近年、酪農家の庭先で血液検査を中心とした牛群の栄養検診が各地で盛んに行われているが、反芻家畜における飼料消化の特徴的な部位であるルーメン液の検査はほとんど行われていない。そこで、現地でも実施可能な乾式血液自動分析装置（以下ドライケムと呼ぶ）による R-NH₃N の迅速測定法（以下迅速法と呼ぶ）を確立するとともに、飼料給与形態の違いが R-NH₃N と BUN の関連性や飼料摂取に伴う体内窒素濃度の変動に及ぼす影響について比較検討した。

材料及び方法

1 供試牛及び実施期間

ホルスタイン種雌牛26頭（未経産牛3頭、経産牛23頭）を供試し、1998年4月から6月の間に実施した。

2 飼養管理状況

供試牛はパイプストールまたは単房に収容し、8時30分と16時に飼料を給与した。

搾乳牛は分離給与もしくは完全混合飼料（以下 TMR と呼ぶ）給与で飼養した。分離給与では乾草（チモシー、ルーサン、エンバク）・ヘイキューブ・ビートパルプと自家配合濃厚飼料を組み合わせ、各個体毎の養分要求量を充足するように給与量を設定した。TMR ではトウモロコシサイレージ・チモシー乾草・ヘイキューブ・ビートパルプ・圧片または粉碎トウモロコシ・大豆粕・綿実を混合し、乾物率60%、粗蛋白質率17.9%、可消化養分総量73.4%、中性デタージェント繊維率30.6%に調整したものを自由採食させた。

非搾乳牛にはトウモロコシサイレージ・乾草（エンバク、イタリアン）・ヘイキューブ・ビートパルプを組み合わせ、乾物換算で体重の2%程度給与した。

3 ルーメン液の採取

ルーメン液は朝の飼料給与から約4時間後の13時に市販の胃汁採取器（ルミナー；富士平工業社製）を用いて経口的に300～500ml 採取し、4重にしたガーゼでろ過したのち、測定に供した。

4 検討項目

(1) 水蒸気蒸留法との相関性

ルーメン液59検体（搾乳牛43検体、非搾乳牛16検体）を供試し、水蒸気蒸留法（以下従来法と呼ぶ）と迅速法とで R-NH₃N を測定した。

従来法は蒸留水 90ml、KOH (2N) 4ml 及びルーメン液 20ml を混和し、自動蒸留装置（ペーパースチル；三田村理研社製）で蒸留した。蒸留液は4% ほう酸水で受け、MM 指示薬を用いて1/20N の硫酸で滴定した。

迅速法はメスフラスコ（100ml）にメスピペットを用いてルーメン液を1ml 入れ、蒸留水でメスアップし100倍希釈したものを検体として、ドライケム（富士写真フイルム社製）の血中アンモニア測定用スライド（NH₃-W II）で測定した。なお、希釈検体の測定単位は μ g/dl であり、原液中の mg/dl 単位に変換するには測定値に0.1を乗じる。

(2) 測定値の再現性

ルーメン液の希釈操作及びスライドへの点着操作によって生じる誤差の程度を検討した。

任意のルーメン液1検体を供試し、毎回希釈操作を行ってから測定する場合（以下希釈+点着と呼ぶ）と同一希釈検体を連続して測定する場合（以下点着と呼ぶ）で、それぞれ10回測定し、平均値・標準偏差・変動係数・変動幅を求め、メーカー提示値と比較した。

(3) ドライケム間の比較

従来法で測定した R-NH₃N 濃度の異なる10本の標準サンプルセットを作成し、県内の畜産関係機関に配備されているドライケム（3機種7台）間の測定精度を比較した。

(4) 検体の保存条件

室温・冷蔵・凍結の各保存条件における R-NH₃N 濃度の変化を検討した。

室温と冷蔵では各3検体を供試し、50ml のポリエチレン容器を用いて、前者は原液のまま、開封と閉栓状態で保存する2区、後者は閉栓状態で、希釈検体と原液で保存する2区について、採取直後から1時間間隔で4時間後まで経時的に測定した。

凍結では7検体を供試し、凍結前と凍結融解後の測定値を比較した。

(5) BUN との相関性

R-NH₃NとBUNの相関性を異なる飼料給与形態間で比較するため、搾乳牛の2形態(TMR, 分離給与)と非搾乳牛から、それぞれ20検体ずつルーメン液と血液を同時に採取し、ドライケムで測定した。

(6) 飼料摂取に伴う体内窒素濃度とルーメン液 pH の変動

分離給与とTMR給与から各3頭供試し、朝の飼料給与前(8時)から夕方の飼料給与前(16時)まで2時間間隔でルーメン液・血液・乳汁を採取し、飼料摂取に伴うR-NH₃N・血中アンモニア態窒素(以下B-NH₃Nと呼ぶ)・BUN・乳中尿素態窒素(以下MUNと呼ぶ)・ルーメン液pH(以下pHと呼ぶ)の経時的変動を観察した。

結 果

1 従来法との相関性

従来法によるルーメン液59検体のR-NH₃N濃度は、1.0~18.2mg/dlの範囲に分布し、その平均値は6.7mg/dl、標準偏差は3.8mg/dlであった。

従来法(y)と迅速法(x)の測定値間には相関係数0.976の有意な正の相関が認められ、その回帰式は $y=1.098x-1.686$ ($r^2=0.952$)であった(図1)。

2 測定値の再現性

10回測定した平均値・標準偏差・変動係数をメーカー提示値と比較したところ、希釈+点着でも変動係数は2.86%で、低濃度と中濃度の範囲内であった。

また、希釈+点着、点着とも平均値を中心に上下で約4μg/dlの変動幅が認められた(表1)。

3 ドライケム間の比較

7台のドライケムによるR-NH₃N測定値は、いずれも従来法との相関係数が0.9以上であった。このうち、機関名DとGの測定値は従来法に比べ、有意に高値を示した(表2)。

4 検体の保存条件

室温保存では開封・閉栓にかかわらず、3時間後の測定において有意に高値を示した(図2)。

冷蔵保存では希釈・原液ともに2時間後まで上昇し、3時間後に一旦低下する傾向が認められたが、4時間後の測定値は有意に高値を示した(図3)。

凍結保存では凍結前 6.34 ± 7.18 mg/dlが融解後の測定では 7.03 ± 6.66 mg/dlと有意($p < 0.05$)に高値を示した。

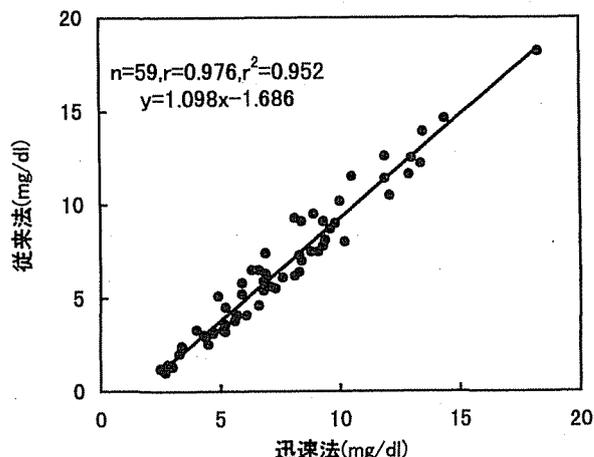


図1 従来法と迅速法の測定値相関

表1 迅速法による測定値の再現性

測定操作	希釈+点着	点着	メーカー提示値 ¹⁾	
			低濃度	中濃度
平均値 ²⁾ (μg/dl)	91.1	93.2	27.7	132.9
標準偏差	2.60	2.35	1.06	3.51
変動係数 (%)	2.86	2.52	3.82	2.64
最大値 ³⁾ (μg/dl)	95(3.9)	97(3.8)		
最小値 ³⁾ (μg/dl)	87(-4.1)	89(-4.2)		

- 1) 供試検体は血液
- 2) 測定数はすべて10回
- 3) () 内の数値は平均値との差を示す

表2 県内他機関におけるドライケムと従来法の相関性

機関名	機種	測定数	平均±標準偏差	相関係数	有意水準	回帰式	寄与率
A	DC100N	10	7.9 ± 3.3	0.988	P<0.001	y=1.178x-1.332	0.976
B	DC5500	9	7.1 ± 3.3	0.976	P<0.001	y=1.171x-0.692	0.953
C	DC5500	10	7.2 ± 2.8	0.960	P<0.001	y=1.361x-1.831	0.922
D	DC5500	10	10.9 ^b ± 4.7	0.989	P<0.001	y=0.839x-1.125	0.977
E	DC5500	10	7.4 ± 3.1	0.945	P<0.001	y=1.227x-1.085	0.892
F	DC5500	10	8.4 ± 3.5	0.998	P<0.001	y=1.147x-1.565	0.995
G	DC3030	10	10.2 ^b ± 4.2	0.998	P<0.001	y=0.938x-1.524	0.995
従来法		10	8.0 ^a ± 4.0				

ab:p<0.001

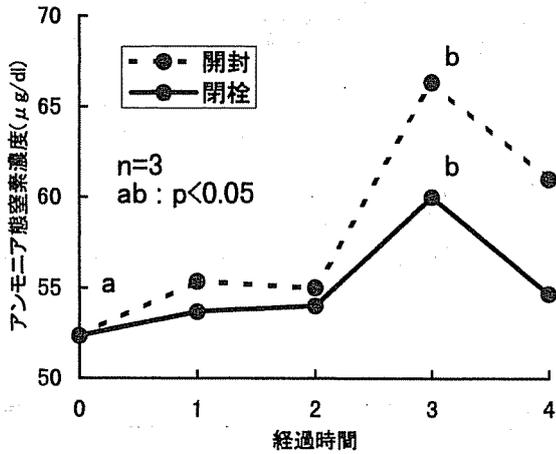


図2 室温保存における濃度変化

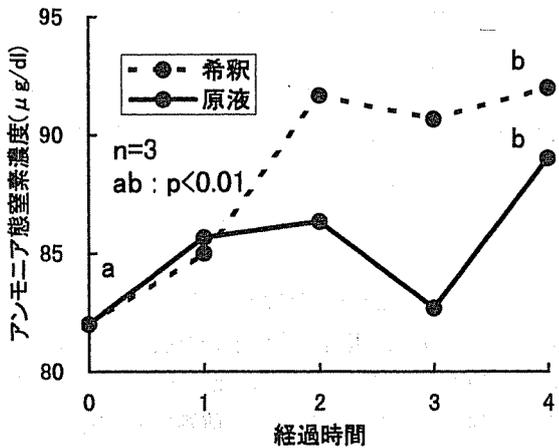


図3 冷蔵保存における濃度変化

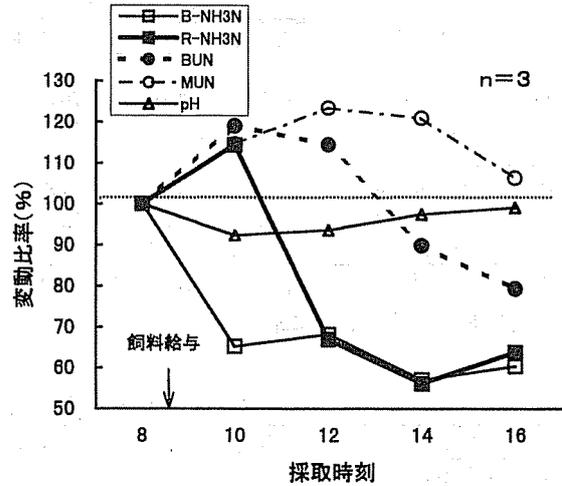


図4 分離給与区の体内窒素濃度とルーメン液 pH の変動比率

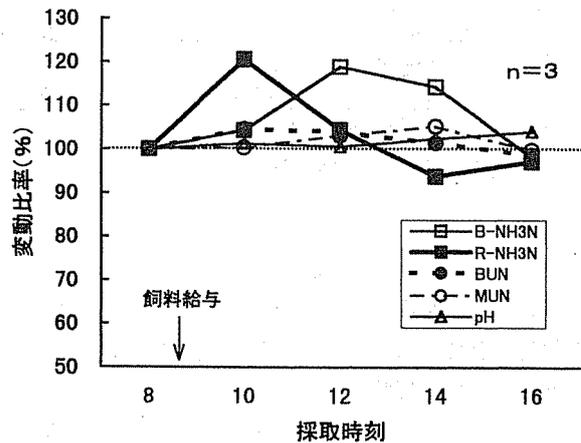


図5 TMR 給与区の体内窒素濃度とルーメン液 pH の変動比率

表3 飼料給与形態別のルーメン液アンモニア態窒素と血中尿素態窒素の相関性

飼料給与形態	測定数	相関係数	有意水準	回帰式	寄与率
TMR	20	0.479	p<0.05	y=0.556x+10.405	0.230
分離給与	20	0.860	p<0.001	y=1.789x+ 0.098	0.740
非搾乳牛	20	0.657	p<0.01	y=1.556x- 0.788	0.432
全体	60	0.847	p<0.001	y=1.649x+ 0.202	0.718

5 BUNとの相関性

R-NH₃NとBUNとの濃度間にはいずれの飼料給与形態においても有意な正の相関が認められたが、相関係数、有意水準、回帰式の寄与率は分離給与と搾乳牛が最も高く、次いで非搾乳牛、TMR 給与と搾乳牛が最も低かった(表3)。

6 飼料摂取に伴う体内窒素濃度とルーメン液 pH の変動

飼料摂取に伴う R-NH₃N・B-NH₃N・BUN・MUN・pH の経時的変動を表4・表5に実測値で示した。また、比較を容易にするため、図4・図5に8時の濃度を100とし

た変動比率で示した。

分離給与では R-NH₃N と BUN が飼料摂取後最初の採取時点(10時)でピークに達し、その後、R-NH₃N は急速に、BUN は緩やかに低下した。MUN は BUN より2時間遅れてピークに達し、緩やかに低下した。pH と B-NH₃N は飼料摂取後低下し、pH は徐々に給与前の値へと回復したが、B-NH₃N は観察時間内では回復しなかった(表4、図4)。

TMR では R-NH₃N と BUN は分離給与の場合と同様に飼料摂取後最初の採取時点でピークに達し、その後、R-NH₃N は急速に、BUN は緩やかに低下した。B-NH₃N は R-NH₃N より2時間遅れてピークに達し、緩やかに低下した。MUN は BUN より4時間遅れてピークに達し、低下した(表5、図5)。

分離給与と TMR で各項目の変動比率を比較した場合、いずれも TMR の方が小さく、とくに BUN・MUN・pH では最大でも5%程度の変動であった。

表4 分離給与区の体内窒素濃度とルーメン液pHの変動

(n=3)

測定項目	給与前(8時)	10時	12時	14時	16時
アンモニア態窒素					
血液 ($\mu\text{g/dl}$)	117.0a \pm 30.0	76.3 \pm 5.7	79.7 \pm 9.5	66.7b \pm 2.3	70.7b \pm 11.8
ルーメン液 (mg/dl)	9.6 \pm 4.8	10.9 \pm 3.9	6.4 \pm 1.7	5.4 \pm 0.8	6.1 \pm 2.6
尿素態窒素					
血液 (mg/dl)	12.4 \pm 6.4	14.8 \pm 7.5	14.2 \pm 7.4	11.1 \pm 5.4	9.8 \pm 4.7
乳汁 (mg/dl)	11.0 \pm 5.5	12.6 \pm 6.4	13.5 \pm 6.7	13.3 \pm 6.7	11.7 \pm 6.0
ルーメン液 pH	6.73c \pm 0.01	6.21de \pm 0.25	6.30de \pm 0.06	6.56 \pm 0.04	6.67f \pm 0.11

平均 \pm 標準偏差 ab: p<0.05, cd, ef: p<0.01

飼料は8時30分~9時に給与した。

表5 TMR給与区の体内窒素濃度とルーメン液pHの変動

(n=3)

測定項目	給与前(8時)	10時	12時	14時	16時
アンモニア態窒素					
血液 ($\mu\text{g/dl}$)	109.3 \pm 5.7	114.0 \pm 13.9	130.0 \pm 10.1	125.0 \pm 15.1	107.3 \pm 12.1
ルーメン液 (mg/dl)	13.8 \pm 2.8	16.6 \pm 1.6	14.4 \pm 1.0	12.9 \pm 1.5	13.4 \pm 2.0
尿素態窒素					
血液 (mg/dl)	17.7 \pm 1.1	18.5 \pm 1.1	18.4 \pm 1.4	17.9 \pm 2.2	17.4 \pm 2.7
乳汁 (mg/dl)	17.8 \pm 1.1	17.9 \pm 1.0	18.4 \pm 1.8	18.7 \pm 1.4	17.8 \pm 2.1
ルーメン液 pH	6.52a \pm 0.07	6.60a \pm 0.07	6.56a \pm 0.07	6.68 \pm 0.06	6.79b \pm 0.02

平均 \pm 標準偏差 ab:p<0.01

飼料は8時30分~9時に給与した。

考 察

反芻家畜の蛋白質代謝指標としてB-NH₃Nの検討が数例報告されている^{5,6,8,9)}。しかし、飼料給与状況との関連性について、反映しているとする報告⁹⁾と直接的には反映しないとする報告⁸⁾があり、実用的な栄養診断の基準は未だ定かではない。これはB-NH₃Nが濃度的に微量で、測定手技や大気中のアンモニアの影響を受け易く⁵⁾、測定値の安定性に欠けることが原因と考えられる。一方、R-NH₃Nは濃度的に高いため、測定上の多少の誤差は測定結果に影響せず、診断的価値は高いと考えられる。

近年、血液検査を中心とした農家の庭先での牛群検診が各地で行われているが、ルーメン液については飼料給与の影響を直接的に反映している¹⁰⁾にも係わらず、検査対象になることはほとんどない。これはR-NH₃Nや揮発性脂肪酸(VFA)等の測定法が煩雑で特殊な装置を必要とすることに加え、ルーメン液の採取に手間がかかるため、技術者が敬遠していることも考えられる。この点については、経口的に採取するタイプの胃汁採取器(ルミナー)を用いれば、牛に苦痛を与えることなく、頭部の軽い保定により一人でも採取が可能である。

R-NH₃Nの測定は実験室以外では難しいと考えられていたが、今回、ドライケムを用い簡易かつ迅速に測定する方法を検討した。ドライケムには簡単に持ち運びできるアンモニア専用の小型機種もあり、現場サイドでの測

定に適している。この装置は微量の検体を多層フィルムに滴下するだけで、蛋白質等の余分な成分は上層のフィルムでろ過され、アンモニアのみが下層の反応層および検出層に到達するので除蛋白等の前処理も不要である。従って、測定に要する時間は希釈操作を含めても1検体当たり約5分以内と、従来法での分析装置の立ち上げや試薬の調整等に要する時間や労力と比較しても格段に速く、簡易である。また、ドライケムの測定可能範囲は10~500 $\mu\text{g/dl}$ であり、一般的な飼養条件下でのR-NH₃N濃度は5~40mg/dl(5,000~40,000 $\mu\text{g/dl}$)の範囲にある¹²⁾ので、ルーメン液を100倍に希釈すれば十分測定可能な濃度となる。

迅速法によるR-NH₃Nの測定値は従来法と高い相関が認められ、測定値の再現性も良好であったことから、迅速法によりR-NH₃Nを確実に測定できることが示唆された。しかし、同一機種であっても個々の装置によって従来法の測定値と有意差を生じる場合があったことから、あらかじめ、従来法による既知濃度の校正サンプルで測定し、補正のための回帰式を求めておくことが望ましい。

また、検体の保存条件を検討したところ、冷蔵保存でも時間経過とともに濃度が高くなることが確認された。これは検体中に生存するルーメン微生物の活動によるものと推察される。この点に対しては、測定値に影響を与えることなく、ルーメン微生物を死滅させる方法も考え

られるが、むしろ、迅速法の利点を活かし、採取後できるだけ早く測定する方が現実的である。

R-NH₃N と BUN との相関性を飼料給与形態別に検討したところ、TMR 給与搾乳牛、分離給与搾乳牛、非搾乳牛いずれにおいても有意な正の相関が認められた。しかし、相関の強さが飼料給与形態によって異なることから、BUN はどのような飼料給与形態でも同程度に R-NH₃N の産生量を反映するとはいえない。また、B-NH₃N と BUN との相関性を検討した報告^{6,8)}でも有意な相関が認められているが、それらの相関係数も R-NH₃N と BUN との相関に比べて低い。

今回、著者らが観察した R-NH₃N の飼料摂取に伴う変動パターンは TMR、分離給与ともに約 2 時間後にピークに達し、低下した。これは阿部ら¹⁾の報告と類似していた。従って、R-NH₃N は飼料摂取の約 2 時間後の濃度が飼料中蛋白質のルーメン内における分解量を反映するものと考えられる。

一方、B-NH₃N の変動についてみると、TMR では採食後 R-NH₃N の産生を反映して上昇し、R-NH₃N のピークから 2 時間遅れてピークに達したが、分離給与では採食後逆に低下した。既報^{5,8,9)}においても給与方法によって採食後上昇する場合と低下する場合の両方が観察されている。B-NH₃N 濃度に大きく影響する要因はルーメン内の NH₃N 濃度と pH であり、これらはアンモニアの吸収量を決定する^{4,7)}。すなわち、易発酵性炭水化物の発酵によって産生するプロピオン酸はルーメン液 pH を低下させ、アンモニアの吸収を抑制するため、分離給与のように採食後急速に発酵が進行する飼料給与形態では B-NH₃N の低下が起こったと考えられる。このように、B-NH₃N は飼養条件によって、採食後の濃度変化が全く逆のパターンを示すことがあり、飼料給与との関連性を考察することを難しくしていると考えられる。

次に、BUN の変動をみると、本報ではそのピークが R-NH₃N と同じ採取時刻であったが、Gustafsson ら²⁾の観察では理論通り BUN ピークは R-NH₃N ピークの 1.5～2.0 時間後であった。しかし、BUN と MUN の変動パターンと飼料給与方法によって両濃度の変動時差に 1～3 時間の開きがあることは本報と既報^{2,3)}ではほぼ一致していた。

また、TMR では BUN や MUN の変動が分離給与に比べて小さかった。その理由として、分離給与では短時間に濃厚飼料を集中して摂取するため、ルーメン内での分解や発酵が急激に進行するのに対して、TMR では成分バランスのとれた飼料を常時摂取し、ルーメン内の環境が安定していることが考えられる。

以上より、R-NH₃N はルーメン内における蛋白質の分

解・利用状況を B-NH₃N、BUN、MUN よりも鋭敏に反映していることが示唆された。ルーメン内における蛋白質の分解、すなわちアンモニアの生成と炭水化物の発酵を同期化すれば、微生物体蛋白質の生産量を最大にし、消化ロスと窒素排泄量を最小限に止めることが可能となる。このような飼料給与法の開発にも R-NH₃N 変動の把握は有用であると考えられる。今後、飼料の構成や給与順序等の条件を変えて体内窒素濃度の動態を検討したい。

引用文献

- (1) 阿部又信・中川洋子・入来常徳 (1986) : 粗 : 濃比の異なる飼料給与時の牛における第一胃内異部位間の性状比較 : 日畜会報 57 (5), 395-403
- (2) Gustafsson, A.H. and D.L. Palmquist (1993) : Diurnal Variation of Rumen Ammonia, Serum Urea, and Milk Urea in Dairy Cows at High and Low Yields : J. Dairy Sci. 76, 475-484
- (3) 上甲正志・谷口只敏・井原晴喜・尾崎陽一・光沖唯広 (1999) : 日内変動を考慮した BUN の再評価と MUN の利用性 : 家畜診療 46 (6), 347-353
- (4) 神立 誠・須藤恒二 (監修) (1985) : ルーメンの世界 (農山漁村文化協会) 628-632
- (5) 近藤寧子・島田泰孝・小野和弘・長谷川 隆・吉浦尚子 (1995) : 乳牛の血中アンモニア濃度測定のための基礎的検討 : 家畜診療 388, 13-17
- (6) 工藤幸裕・菊川良男・細谷 修・野満匡祐 (1993) : 乳牛の血中アンモニア (NH₃) 濃度の分布と変動要因の考察 : 家畜診療 356, 17-19
- (7) Lana, R.P., J.B. Russell and M.E. Van Amburgh (1998) : The Role of pH in Regulating Ruminant Methane and Ammonia Production : J. Anim. Sci. 76, 2190-2196
- (8) 正井景太・平田義一 (1998) : 直接除蛋白法による乳牛の血中アンモニア濃度の測定 : 家畜診療 45 (7), 455-460
- (9) 岡田啓司・佐藤忠弘・下山茂樹・赤坂 茂・佐々木重荘・佐々木洋子・高橋覚志・平田統一 (1997) : 高蛋白・高デンプン飼料給与と乳牛における血中アンモニア・乳酸濃度 : 日獣会誌 50, 705-708
- (10) 柴田章夫・菊池正武・田野 仁 (1982) : 再生草の粗蛋白質含量と放牧牛のルーメンアンモニア濃度の関係ならびに補助飼料給与の影響 : 日草誌 28 (3), 336-338
- (11) 津田恒之 (監修)・柴田章夫 (編集) (1987) : 新乳牛の科学 (農山漁村文化協会) 141-143
- (12) 全国家畜産物衛生指導協会 (1998) : 生産獣医療システム 乳牛編 2 (農山漁村文化協会) 26