れるものであるから、食中毒原因食としても、また二次汚染源としても重要な要素を含み、食品衛生の面で適切な対策を早急に確立することが切に望まれる次第である。

本研究は第 17 回日本食品衛生学会および第 110 回日本獣医公衆衛生学会で報告した。

終わりにのぞみ、ご指導ご協力をいただいた国立衛生試験所鈴木昭博士、ならびに河西勉技官に深謝致します。

文 献

1) 渡辺昭宣, ほか: 食衛誌, 8, 2, 141 (1967). 2) 坂

崎利一: ニッサンメディヤ No. 31. 3) 坂崎利一: メディヤサークル 14, 8, 353 (1969). 4) 坂井千三: 第 27 回日本公衆衛生学会抄録 (1969). 5) 桑原 寛: 同上. 6) 来住輝彦: 同上. 7) 鈴木雄三: 同上. 8) 坂井千三: メディヤサークル 14, 8, 315 (1969). 9) 深沢 平: メディヤサークル 14, 8, 333 (1969). 10) J. DIXON & F. POOLEY: *J. Hygiene*, 59, 343 (1961).

11) 小菅儀平, ほか: 日獣会誌 20, 159 (1969). 12) 橋本秀夫: 日獣会誌 21, 109 (1968).

家畜衛生

わが国における豚からの *Vibrio coli* の検出、 とくに豚赤痢に関連して

柏崎 守* 波岡茂郎* 佐藤洋三郎**

(昭和 44 年 12 月 4 日受付)

Isolation of *Vibrio coli* from Pigs in Japan

M. KASHIWAZAKI, S. NAMIOKA and Y. SATOH*

(National Institute of Animal Health, Kodaira, Tokyo, and *Yamato Livestock Sanitary Service Center, Yamato, Kanagawa)

SUMMARY

Isolation of *Vibrio coli* from the feces of pigs in Japan was carried out by a selective filtration technic using millipore filters 0.65 μ in pore size. The results obtained were as follows.

1. The isolation was positive in 57 pigs (75.0%) of 76 with clinical or pathological signs of dysentery, and 37 pigs (30.6%) of 121 having close contact with diseased animals. Of 105 pigs maintained in herds known to be free from the occurrence of dysentery, 12 pigs (11.4%) were positive for isolation. No organisms were demonstrated in the feces of 35 pigs

maintained in a disease-controlled (SPF) herd.

2. The distribution of the vibrio in the gastrointestinal tracts was noteworthy in pigs affected with dysentery. A number of vibrios were isolated from the large intestine, but not from the small intestine or stomach.

3. On the basis of H₂S production and 1% glycine tolerance, the isolates were divided into three biotypes; that is, biotype I, H₂S (+) and 1% glycine (+), biotype II, H₂S (+) and 1% glycine (—), and biotype III, H₂S (—) and 1% glycine (—).

豚赤痢 (swine dysentery) は諸外国、とくに欧米では古くから存在しており、1924 年 WHITING¹⁹⁾ はかなり詳細な発生報告を行なっている。これらの国では該疾病による経済的損失がきわめて大きく、永年にわたってその対策に苦慮しており現在に至っている。いっぽう、わが国では 1965 年北海道における単発的な発生報告¹¹⁾があるのみで、これまでとくに注目されるほどの流行が発見されず、家畜衛生上等閑視されてきた。しかし、1968 年頃から各地で豚赤痢の集団発生例の情報がにわかに増加

し、わが国における該疾病の常在はいまや確定的となっている^{7,14)}。

ところで、豚赤痢は粘血下痢便をとまなう急性または慢性大腸炎で、これの原因は *Vibrio coli* による大腸感染症であるとするのが一般的である^{2,5)}。しかし、該菌は病豚の大腸粘膜や糞便などから比較的高頻度に検出される反面、健康豚からもしばしば検出されており、また培養菌による人工感染が必ずしも成立しないことから、いっぽうではこれを豚赤痢の病因として疑問視するむきも少なくない^{3,18)}。このような病因論の相違は宿主における感染の場がほぼ大腸に局限しているため、該部における

* 農林省家畜衛生試験場

** 神奈川県大和家畜保健衛生所

腸内菌叢の存在とあいまって複雑化されているところに由来しているとみられる。

したがって、豚赤痢罹患豚の体内、とくに腸管に *Vibrio coli* がどのような状況で存在しているのかを明らかにすることは、該疾病の病因を検討するにあたってきわめて重要である。そこで、著者らはわが国における病的および健康豚の主として糞便から該菌の検出をこころみ、豚赤痢と *Vibrio coli* とに関する二、三の興味ある知見を得た。以下その成績を述べる。

材料および方法

検索材料：検索材料は主として糞便であり、1968年11月から1969年10月までのあいだに、つぎの3豚群のものからそれぞれ採取した。

1) 豚赤痢の発生豚群：臨床病理および細菌学的にみて豚赤痢の発生が確認された13養豚場からそれぞれ5～30頭ずつをえらび、合計197頭について糞便の採取を行なった。この豚群には少数の哺乳豚および繁殖豚が含まれているが、1～4カ月齢のものが大部分である。このうち76頭は明らかな赤痢症状を示しているもの（発症豚）であり、残りの121頭は病豚と同一の豚房、または豚舎に飼育されていたが、糞便の採取時には臨床上なら異常がみとめられなかったもの（同居豚）である。

2) 健康豚群：過去において豚赤痢の発生がみられていないと考えられた5養豚場をえらび、ここで生産された主として2～4カ月齢の临床上健康な豚の10～30頭ずつ、合計105頭について採便を行なった。

表1 豚赤痢の発生豚群、健康豚群およびSPF豚群における *Vibrio coli* の検出成績

豚 群	供試頭数	直接塗抹*	分離培養 (検出率)
発生豚群			(%)
発 症 豚	76	38/42	57(75.0)
同 居 豚**	121	7/26	37(30.6)
(合 計)	197	45/68	94(47.7)
健康豚群	105	3/32	12(11.4)
SPF豚群	32	0/12	0(0.0)

* 陽性数/供試数

** 病豚と同一の豚舎で飼育されていたが臨床症状のないもの

表2 糞便における *Vibrio coli* の菌数

糞 便 供試数	菌 数 の 程 度*		
	+	++	+++
粘血下痢便	57 10(17.5%)	18(31.6%)	29(50.9%)
正 常 便	49 27(55.1%)	18(36.7%)	4(8.2%)

* 汚過培養における平板培地上の出現集落数；+ 1～20, ++ 21～100, +++ 101<

3) SPF (specific pathogen free) 豚群：厳重に規制された農場で飼われている子宮切断由来の豚のうち、1～4カ月齢のもの32頭をえらび、これらから糞便の採取を行なった。

排泄直後の糞便または直腸便の2～3gずつを滅菌試験管に採取した。と殺または死亡豚については消化管の各部（胃、十二指腸、空腸、回腸、盲腸、結腸および直腸）を二重結紮して採取するとともに、腸間膜淋巴節および一般臓器（脳、心、肺、肝、脾および腎）も同時に採材した。これらの検索材料はおおむね24時間以内に処置された。

細菌検索：糞便または腸内容物における *Vibrio coli* の検索法については、さきに報告⁸⁾したとおりであるが、すなわち、糞便などを滅菌生理食塩水で5～10倍に希釈して均等な乳剤とし、これをそのまま1～2時間程度静置するか、またはかるく遠心（2,000回転、5分以内）して夾雑物を除いたのち、上清を孔径0.65μのmilliporeフィルター*で汚過し、汚液の1～2滴を10%羊脱線血加 trypticase soy 寒天 (BBL) 平板に塗抹した。培養は乾燥状態が保たれるように乾燥剤（シリカゲル）を入れたデシケーター中で行ない、10% CO₂ または混合ガス（N₂ : 85%, CO₂ : 10%, O₂ : 5%）の展張条件下で37℃、2～4日間の培養を行なった。

なお、本実験で使用したmilliporeフィルターは図1に示したように直径13mmのディスク(A)で、これをホルダー(B)に装着し、ロック式注射筒(C)に連結して用いた。

腸間膜淋巴節および一般臓器については血液寒天平板に直接塗抹し、前述した培養条件下で *Vibrio coli* の検索を行なうとともに、一般の細菌検索も同時に行なった。いっぽう、腸内細菌叢の検索法は波岡ら¹²⁾(1965)の報告に準拠した。

生化学性状検査：*Vibrio coli* における生化学性状検査は従来の報告^{4,10,17)}に二、三の方法を追加し、つぎの項目について行なった。すなわちカタラーゼ産生能、硫化水素産生能、硝酸塩還元能、ゼラチン液化能、インドール産生能、糖分解能**、VP-MR反応、コレラ赤色反応、3%食塩耐性能、1%グリシン耐性能などである。

直接塗抹：糞便乳剤の上清をスライドガラスに塗抹し、風乾して火焰固定後、石炭酸フクシン液で染色するか、またはグラム染色を行なった。

成 績

汚過による *Vibrio coli* の分離培養状況：糞便中に

* 日本ミリポア・リミテッド、東京

** ブドウ糖、乳糖、白糖、マルトース、トレハロース、サリシン、キシロース、マンニット、ガラクトース、イノシトール

Vibrio coli が存在した場合、この乳剤を孔径 0.65μ の millipore フィルターで汙過すると、該菌はほとんど選択的に汙過され、ほぼ純粋に分離培養された。しかし、ごく少数例に *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, streptococci などが混入することもあったが、これとてもその菌数は比較的少数であり、*Vibrio coli* の分離に際してはほとんど影響を与えなかった。また、5~10倍糞便乳剤の汙液の1~2滴を培養した場合、平板培地における集落は1~500個内外の範囲で形成され、その集落数を算定することによって糞便中の菌数をかなり正確に推定することが可能であった。いっぽう、糞便乳剤をそのまま平板培地に塗抹培養しても *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, streptococci などの菌種が毎常優位に培養されるため、*Vibrio coli* を分離するにはきわめて固難な場合が多かった。

図1 汙過器

A: フィルター B: アダプター C: ロック式注射筒

豚赤痢の発生豚群、健康豚群および SPF 豚群における *Vibrio coli* の検出成績: その成績は表1に示したとおりである。すなわち、まず豚赤痢の発生豚群における *Vibrio coli* の検出率についてみると、このうち発症豚(76頭)では 75.0% (57頭)、また病豚との同居豚(121頭)では 30.6% (37頭)であり、該豚群(197頭)における検出率は平均 47.7% (94頭)であった。これに対し、健康豚群(105頭)における検出率は 11.4% (12頭)であり、発生豚群におけるそれに比較して明らかに低かった。いっぽう、SPF 豚群(32頭)では検索頭数の範囲で *Vibrio coli* が検出されるようなことはなかった。

以上、*Vibrio coli* が検出された糞便について、その分離培養の状況から糞便中の菌数を概算したところ、表2のようであった。すなわち、発生豚群(発症豚)由来の粘血下痢便からは該菌が多数検出される傾向にあった反面、発生豚群(同居豚)および健康豚群由来の正常便から該菌が検出されても、その菌数は一般に少数であった。このことは後ほど述べる直接塗抹による成績からも明らかである。

すなわち、糞便の直接塗抹による *Vibrio coli* の検査成績はつぎのようであった(表1参照)。鏡検によって該菌の特有な形態(長ラセン状、S字状およびコマ状)を示す菌体の有無を調べたところ、粘血下痢便では多数の

vibrio 様菌体がほとんどのものにみとめられた。このようなものでは分離培養によっても該菌が多数検出されてくることが多く、直接塗抹による検索成績と分離培養によるそれとは比較的一致する傾向にあった。この反面、正常便の直接塗抹で *vibrio* 様菌体がみとめられることは少なく、一般にその菌数は少数であった。しかし、鏡検によって *vibrio* 様菌体がみとめられても分離培養ではそれが検出されなかったり、またその逆の場合も少なくなかった。このように、正常便では直接塗抹による検索と分離培養によるそれとは必ずしも一致しなかった。以上のことから、直接塗抹による *Vibrio coli* の検索は粘血下痢便に限って実施されることが望ましい。

表3 豚赤痢罹患豚における *Vibrio coli* の体内分布

豚番号	胃	十二指腸	空腸	回腸	盲腸	結腸	直腸	腸間膜リンパ節	一般臓器*
1(殺)	+	++	+	•	卅	卅	卅	—	—
2(死)	—	—	—	+	卅	卅	卅	—	—
3(殺)	—	—	—	•	卅	卅	卅	+	—
4(殺)	—	—	—	—	+	卅	+	—	—
5(殺)	—	—	—	—	+	+	+	—	—

* 一般臓器: 脳, 心, 肺, 肝, 脾, 腎。

** 直接または汙過培養における 平板培地上の出現集落数; + 1~20, ++ 21~100, 卅 101<

図2 豚赤痢罹患豚の腸内菌叢

Escherichia coli, Lactobacilli, Streptococcus faecalis, Bacteroides, Staphylococci, Bacilli, Yeasts

*2頭(10および12週齢)の平均

豚赤痢罹患豚における *Vibrio coli* の体内分布: 豚赤痢罹患豚(5頭)の各部消化管(胃, 十二指腸, 空腸, 回腸, 盲腸, 結腸および直腸), 腸間膜リンパ節および一般臓器(脳, 心, 肺, 肝, 脾および腎)について *Vibrio*

coli の検索を行ない、該菌の体内分布はどうであるかについて調べた。その成績は表3に示したとおりである。まず、各部消化管における該菌の分布状態はいずれの供試豚も盲腸、結腸および直腸に多い反面、胃、十二指腸、空腸および回腸では存在しないか、または存在してもその菌数は大腸におけるそれに比較して少数であった。いっぽう、消化管以外の臓器から該菌が検出されたのは腸間膜淋節の1例のみで、これもその検出菌数はきわめて少数であった。以上のように、*Vibrio coli* はほぼ大腸に限局して存在する傾向にあり、実質臓器に侵入増殖しているようなことはなかった。

豚赤痢罹患豚における腸内菌叢：豚赤痢に罹患した場合、腸内菌叢の動行はどうであるかについてしらべた。図2はその罹患豚2頭（10および12週齢）の各部消化管における腸内菌叢を示したものである。この成績から明らかに、上部消化管における *Escherichia coli* の増殖が目立っており、その菌数は腸内容物 1g 中約 10^7 個（2頭の平均）に達していた。しかし、このような上部消化管における *Escherichia coli* の著しい増殖が、宿主に対して二次的にどのような影響を与えているかについては明らかでない。ちなみに離乳後の健康豚の場合、該部には *Escherichia coli* がほとんど存在していないのが普通である¹²⁾。

***Vibrio coli* の生化学性：**わが国の豚から分離された *Vibrio coli* の主要な生化学性性状はつぎのようであった。すなわち、いずれの分離菌株もカタラーゼ産生(+)、硝酸塩還元(+), VP-MR 反応(-), ゼラチン液化(-), インドール産生(-), 糖分解(-), コレラ赤色反応(-), 3%食塩耐性(-)であった。しかし、硫化水素産生能および1%グリシン添加培地における発育能の成績はいろいろであった。以上の硫化水素産生および1%グリシン耐性から、供試 *Vibrio coli* (15株)は表4のような生物型に分類された。すなわち、I(8株)、硫化水素産生(+), 1%グリシン耐性(+), II(4株)、硫化水素産生(+), 1%グリシン耐性(-), III(3株)、硫化水素産生(-), 1%グリシン(-)の3型である。

表4 *Vibrio coli* の生物型

生物型(15株)	硫化水素産生	1%グリシン耐性
I(8株)	+	+
II(4株)	+	-
III(3株)	-	-

考 察

いままで述べてきたように、わが国における豚赤痢の発生が明らかとなり、それにともない本邦の豚から検出される *Vibrio coli* は該疾病の病因としてもきわめて重要な関連をもつことが確認された。いっぽう、スイスの Fl-

ETCHER & BERTSCHINGER(1964)⁶⁾は豚赤痢の発生豚群、および健康豚群の糞便について、著者らとおおむね同じ方法で *Vibrio coli* の検索を行なったところ、それぞれ48.8%, および20.7%の検出率であったという。このように、*Vibrio coli* は病豚から高頻度に検出されるいっぽう、健康豚からもしばしば検出されており、該菌は豚の大腸にかなり広範囲に常在しているものと考えられる。しかし、病豚から検出される菌と健康豚由来のそれとは病原性の面から同一視できるか否か現在のところ明らかでない。したがって *Vibrio coli* と同定された菌が、ある豚群から検出されたとしても、その時点でなんら臨床症状がみられない場合、これをただちに豚赤痢の診断の目安にするわけにはいかない。

いっぽう、豚赤痢罹患豚における *Vibrio coli* の動行をみると、それはほとんど大腸に限局して増殖するものとみなしてよく、原則として他の臓器に侵入増殖するようなことはない。このような病豚における *Vibrio coli* の動行、およびこれに伴う宿主の反応は、豚赤痢の成因に関与してきわめて興味ある基礎的事実を示唆している。すなわち、豚赤痢における主病変はほぼ大腸に限局されているとみてよいが、その部位における炎症は粘膜下層にまでおよぶことは比較的まれであり、粘膜上皮から粘膜固有層にわたってみられることが多い⁹⁾。さらに、豚赤痢でみられる下痢は大腸粘膜下層の浮腫や主として盂細胞の粘液分泌亢進によるもので、急性胃腸炎にみられるような小腸の水分吸収障害、または小腸をととしての体内水分の異常排泄によるものではないことが明らかである。また、豚赤痢罹患豚の血清または糞便中に感染菌に対する特異抗体が産生されるかどうかは明らかでない。最近、ANDRESS ら¹¹⁾(1968)は gnotobiot 豚を使用して豚赤痢の人工感染を行なっているが、血清中には *Vibrio coli* に対する抗体の上昇がほとんどみとめられなかったことを報告している。しかし、宿主におけるなんらかの免疫反応の発現は当然予想されることであり、とくに糞便中の抗体(copro 抗体)は腸管における局所免疫、または組織免疫の動態を知るうえで重要であり、血清抗体との関連において豚赤痢の発生機序を解明するうえで詳細に検討する必要がある。

このような二、三の事実から推定されるように、*Vibrio coli* の大腸における著しい増殖が直接、または間接的に宿主に対していろいろな障害、すなわち粘血性下痢や粘膜上皮の障害にもとづく表在性の出血性大腸炎などをもたらすものと考えられる。この場合、上部消化管における *Escherichia coli* の増殖が確認されたが、このような腸内菌叢の変動は豚伝染性胃腸炎や豚コレラにおいてもみとめられている¹³⁾¹⁵⁾。ともあれ *Vibrio coli* が単純に管腔内で増殖し、その結果産生された毒素の吸収によって赤痢症状が惹起されるものと考えてよいのか、それとも該菌

が腸管の粘膜上皮細胞内に侵入増殖することが発症のために必要条件であるのかは明らかでない。しかし、現在までの病理学的検査の範囲では *Vibrio coli* が細胞内で増殖している所見は得られていない(中川、未発表)。

ところで、*Vibrio coli* の細菌学、とくに分類学上の位置に関する詳細、かつ系統的な知見は不十分な点が多く、これに属する菌種間の異同や類縁性についてはほとんど未整理のままである。今回著者らが行ったわが国の豚から検出された *Vibrio coli* の生化学性状、すなわち硫化水素産生能および 1% グリシン耐性能から少なくとも 3 生物型に分けることができた。しかし、これとても *Vibrio coli* と *Vibrio fetus* との異同を明確にすることはできない¹⁶⁾。また、さきほど述べた *Vibrio coli* の生物型と病原性との相関性は現在のところ不明であり、さらに現時点での血清学的性状の成績から、該菌には比較的多くの血清型が存在していることが明らかとなっている(波岡、未発表)。したがって、豚赤痢の病因と *Vibrio coli* の病原性との相関性を明らかにするためには、該菌の諸性状を多角的に検討することが強く望まれる。

要 約

豚赤痢の発生豚群、健康豚群および SPF 豚群の主として糞便について *Vibrio coli* の検索を行ない、つぎの成績を得た。

1) 糞便の 5~10 倍乳剤を孔径 0.65 μ の millipore フィルターで濾過すると、乳剤中の *Vibrio coli* は選択的に濾過され、ほとんど純粋に分離培養された。

2) 豚赤痢の発生豚群(197頭)における *Vibrio coli* の検出率についてみると、この豚群のうち発症豚(76頭)では 75.0%(57頭)、また病豚との同居豚(121頭)では 30.6%(37頭)であり、平均 47.7%(94頭)の検出率であった。これに対し、健康豚群(105頭)では 11.4%(12頭)の検出率であった。いっぽう、SPF 豚群(32頭)から該菌が検出されるようなことはなかった。

3) 豚における *Vibrio coli* はほとんど大腸に限局して存在しており、原則として実質臓器に侵入増殖するようなことはなかった。

4) 豚赤痢罹患豚の腸内菌叢をみると、上部消化管における *Escherichia coli* の増殖が目立ち、その内容物 1g 中の菌数は 10⁷ 個内外に達していた。

5) わが国の豚から分離された *Vibrio coli* は硫化水素産生能および 1% グリシン耐性能から、I. 硫化水素産生(+), 1% グリシン耐性(+), II. 硫化水素産生(+), 1% グリシン耐性(-), III. 硫化水素産生(-), 1% グリシン(-) の 3 生物型に分けられた。

文 献

- 1) ANDRESS, C.E., BRANUM, D.A. and THOMSON, R.G.: *Can. J. Comp. Med.*, **32**, 522-528 (1968).
- 2) DAVIS, J.W.: *J. Amer. Vet. Med. Assoc.*, **138**, 471-483 (1961).
- 3) DEAS, D.W.: *Vet. Rec.*, **72**, 65-69 (1960).
- 4) DILELLO, L.R., POELMA, L.J. and FABER, J.E.: *Amer. J. Vet. Res.*, **20**, 532-536 (1959).
- 5) DOYLE, L.P.: *Amer. J. Vet. Res.*, **9**, 50-51 (1948).
- 6) FLETCHER, R.D. and BERTSCHINGER, H.U.: *Zbl. Med.*, **11**, 469-474 (1964).
- 7) 藤原 弘, 岩本雅幸, 杉山公宏, 寺松正孝: 第 68 回日本獣医学会, (山口) (1969).
- 8) 柏崎 守: 日獣会誌, **22**, 283-287 (1969).
- 9) LUSSIER, G.: *Can. Vet. J.*, **3**, 228-237 (1962).
- 10) LUSSIER, G.: *Can. Vet. J.*, **3**, 267-278 (1962).
- 11) 宮前武雄, 東海林昌夫, 水戸利秋: 日獣会誌, **9**, 26-29 (1965).
- 12) 波岡茂郎, 村田昌芳, 長田 久, 石沢武彦, 黒岡良治: 日獣会誌, **27**, 221-231 (1965).
- 13) NAMIOKA, S., URUSHIDO, M. and SAKAZAKI, R.: *Jap. J. Med. Sci. Biol.*, **11**, 141-151 (1958).
- 14) 尾田 進, ほか: 第 68 回日本獣医学会, (山口) (1969).
- 15) OGATA, M. and MORISHITA, Y.: *Jap. J. Vet. Sci.*, **31**, 71-82 (1969).
- 16) RINGEN, L. and FRANK, F.W.: *J. Bact.*, **86**, 344-345 (1963).
- 17) SMIBERT, R.M.: *Amer. J. Vet. Res.*, **26**, 320-327 (1965).
- 18) SWEENEY, E.J.: *Vet Rec.*, **78**, 372-375 (1966).
- 19) WHITING, R.A.: *J. Amer. Vet. Med. Assoc.*, **64**, 600-610 (1924).

下なので鼓脹を起さない。運動により鼓脹がなおることもある。

鼓脹を起す飼料(レッド, ホワイトおよびラジノクロローバー, スイートクロローバー, アルファルファ)は総蛋白質量の 1/3 が 18 S 蛋白で、オーチャードグラス, イタリアンライグラス等には少ない。鼓脹食は 14~20% の可溶性の蛋白を含み、鼓脹症を起さないものの含量は 3.5~11% である。したがって、アルファルファやラジノクロローバーは 18 S 蛋白を 2% 以下にするため、他の飼料を加える必要がある。

(J.M. McARTHUR and J.E. MILTMORE: *Can. J. Anim. Sci.* **49**(1), 59 (1969)).

鼓脹症における pH と蛋白質

鼓脹症は第一胃内の pH が 6 以下で、活発なガス産生、2% 以上の 18 S 蛋白、蛋白を表面に付着させる陽イオンがある時に発症する。pH が 18 S 蛋白の等電点(5.4~5.6)に近づくと粘着性は最大となり、泡が安定な状態になる。粘着力は陽イオン(とくに Ca, Mg)の濃度に関係し、過剰にこれを含む食物は鼓脹を強める。

ラジノクロローバーはアルファルファより pH を下げるが、過酸症と鼓脹の重篤度、経過との相関はない。オーチャードグラスは pH を 6 以下にしないが、穀類と併用すると pH 5.5 まで下げる。しかし 18 S 蛋白が 2% 以