- 8) HASLER, J. F., MCCAULEY, A. D., SCHERMERHORN, E. C., et al.: *Theriogenology*, 19, 83~99 (1983).
- 9) 金川弘司: 繁殖技術, 94, 特別号 1~16 (1976).
- 10) 金川弘司: 牛の受精卵移植, 金川弘司編, 60~65, 近代出版, 東京 (1984).
- 11) 木田克弥, 前田宅明, 堀川忠広, ほか: 北獣会誌, 27, 146~148 (1983).
- 12) LOKHANDE, S. M., PATIL, V. H., MAHAJAN, D. C., et al.: *Theriogenology*, 20, 397~406 (1983).
- 13) 牧野拓雄: 日内分誌, 49, 629~645 (1973).
- 14) MAPLETOFT, R. J., JOHNSON, W. H. and ADAMS, W. M.: *Theriogenology*, 13, 102 (1980).
- 15) MARTINEZ, J. and THIBIER, M.: *Theriogenology*, 21, 569~581 (1984).
- 16) MARTINEZ, J. and THIBIER, M.: *Theriogenology*, 21, 583~590 (1984).
- 17) MCPHEE, S. R., DOYLE, M. W., DAVIS, I. F., et al.: *Aust. Vet. J.*, 60, 40~43 (1983).
- 18) MONNIAUX, D., CHUPIN, D. and SAUMANDE, J.: *Theriogenology*, 19, 55~81 (1983).
- 19) 守野 繁, 中尾敏彦, 角田修男, ほか: 家畜繁殖誌, 30, 61~67 (1984).
- 20) PETERS, A. R., HEWITT, D. S. and LAMMING, G. E.: *Anim. Reprod. Sci.*, 6, 103~110 (1983).
- 21) RAJAMAHENDRAN, R. and THAMOTHARAM, M.: *Anim. Reprod. Sci.*, 6, 111~118 (1983).
- 22) 笹本修司: 家畜繁殖学全書, 望月公子編, 23~39, 朝倉書店, 東京 (1984).
- 23) SINGH, G., SINGH, G. B., SHARMA, R. D., et al.: *Theriogenology*, 19, 323~329 (1983).
- 24) SINGH, G., SINGH, G. B., SHARMA, R. D., et al.: *Theriogenology*, 21, 859~867 (1984).
- 25) SPROTT, L. R., WILTBANK, J. N., SONGSTER, W. N., et al.: *Theriogenology*, 21, 349~356 (1984).
- 26) STEVENSON, J. S. and CALL, E. P.: *Theriogenology*, 19, 367~375 (1983).
- 27) 菅原七郎: 畜産の研究, 38, 84~88 (1984).
- 28) TROXEL, T. R. and KESLER, D. J.: *Theriogenology*, 21, 699~711 (1984).
- 29) VOSS, H. J., OLIVERA-ANGEL, M. and HOLTZ, W.: *Theriogenology*, 20, 615~625 (1983).

乳清総蛋白量の簡易測定による乳房炎診断法

白井良一*¹⁾ 長谷川生夫*²⁾ 田中享一*³⁾

(昭和 60 年 6 月 14 日受理)

Two Simple Methods of Determination of Total Whey Protein for Diagnosis of the Type of Mastitis
RYOICHI USUI (Tochigi Livestock Hygiene Service Center, Prefecture of Tochigi, Tochigi, Tochigi 328) et al.

SUMMARY

Total whey protein was considered to be useful for the diagnosis of the type of Mastitis. Two simple methods were devised to determine total whey protein.

Bromophenol blue (BPB) tube method (temporary name): Mix 0.5 ml of 0.2M acetic acid buffer solution, pH 4.0, and 0.5 ml of milk. Centrifuge at 2,000 rpm for 5 minutes. Isolate whey. Dilute whey 10~20 times with acetic acid buffer solution. Mix 1 ml of diluted whey and 4.0 ml of BPB solution (dissolve 5 mg of BPB with 100 ml of 0.2M citrate-HCl buffer solution pH 3.0). Determine with spectrophotometer at wavelength of 610 μ m.

BPB filter paper method (temporary name): Mix 0.2M acetic acid buffer solution, pH 4.0, and an equal volume of milk. Add 5 μ l of mixed solution to BPB filter paper (dissolve 100 mg of BPB with 100 ml of 1.0% citrate solution. Dip a piece of filter paper in the solution and dry). Compare the color and yellow ring size with the standard (made with bovine serum albumin).

*¹⁾ 栃木県栃木家畜保健衛生所 (栃木市箱森町 22-27)

*²⁾ 栃木県宇都宮家畜保健衛生所 (栃木県宇都宮市若草町 2-3-39)

*³⁾ 麻布大学獣医学部 (神奈川県相模原市淵野辺 1-17-71)

要 約

乳房炎を臨床検査および CMT 検査により潜在性、慢性、急性および壊疽性乳房炎に分類し、その乳清総蛋白量をそれぞれ測定した結果、乳房炎の程度にともない乳清総蛋白量が増加した。潜在性、慢性、急性および壊疽性乳房炎の乳清総蛋白量はそれぞれ 0.81, 0.90, 2.65 および 5.09 g/dl であり、潜在性および慢性乳房炎の 95% 信頼区間が少し重なるほかはまったく重ならず、それぞれの乳房炎をはっきり区分できた。そこで、乳清総蛋白量の簡易測定法を次に示す 2 種類開発した。

1) BPB 試験管法 (仮称): 0.2 M, pH 4.0 の酢酸緩衝液 0.5 ml に乳汁 0.5 ml を混和し遠心 (2,000 rpm) 後、中間層を採取し酢酸緩衝液で 10~20 倍に希釈する。この液 1 ml を BPB 試液 (0.2 M, pH 3.0 のクエン酸緩衝液に BPB を 0.005% の割合にとかしたもの) 4 ml に加えブランクを対照として 610 m μ で吸光度を測定する。

2) BPB 濾紙法 (仮称): 乳清 0.5 ml に 0.2 M, pH 4.0 の酢酸緩衝液 0.5 ml を混和する。この液 5 μ l をマイクロピペットで濾紙 [1% クエン酸溶液に BPB を 0.1% の割合にとかし、これに東洋濾紙 (No. 6) をひたし風乾したもの] に滴下し標準色調表 (市販の BSA で 0.6%, 0.8%, 0.9%, 2.6% および 5.1% に調整し、サンプルと同様に操作したもの) の色調および黄色のリングを比較し診断する。

乳房炎の理化学的検査法には細胞数を測定する方法があり、ブリード法³⁾, Wisconsin Mastitis Test, California Mastitis Test 北陸支場法²⁾ (CMT 変法), および平板乳汁 Granulation 法⁶⁾等がある。無機質を測定する方法にはシノテスト 7 号⁴⁾および電気伝導度測定法^{7,8)}がある。最近は酵素^{3,5,10)}の測定法が普及されつつある。しかし、1 種の検査だけでは乳房炎の型の識別は不可能である。そこで、著者らは臨床検査および CMT 変法により乳房炎を潜在性、慢性、急性および壊疽性乳房炎に分類し、これらの乳清総蛋白量をそれぞれ測定し検討した。また、ブロムフェノールブルー (BPB) 色素を用い、乳清総蛋白量を簡易に測定する方法を開発したので、その成績について報告する。

1. 材料および方法

供試材料: 屠畜場および酪農家で飼養されているホルスタイン種から採取した乳汁 298 例を供試した。

乳房炎型別分類基準: 臨床検査で異常を認めず、CMT 変法で陽性のものを潜在性乳房炎とした。臨床検査で腫瘍および硬結等の異常を認め、CMT 変法で“卅”以上のものを慢性乳房炎とした。臨床検査で乳房に腫脹および熱感を認め、体温の上昇、食欲不振等の全身的症状が認められ、CMT 変法で“卅”以上のものを急性乳房炎とした。体温の上昇、乳房皮膚の暗紫色化および冷感、血様乳汁の排泄、食欲不振等を認めるものを壊疽性乳房炎とした。

乳清の分離: 透析膜を利用した方法¹¹⁾および pH 4.0, 0.2 M 酢酸緩衝液と乳汁とを等量混和する方法によった。

乳清総蛋白量の測定: 市販の牛血清アルブミン (BSA) で標準液を作製し、ビウレット法により測定した。

BPB 試験管法 (仮称) 測定条件の検討: pH 3.0, 0.005% BPB 試液 4.0 ml に 0.05 g/dl および 0.3 g/dl (蛋白量) の乳清 1 ml と蒸留水 1 ml をそれぞれ加え、自記分光光度計を用いて 360 m μ から 680 m μ までの吸光度を測定した。BPB 試薬の pH を 2.0, 3.0 および 4.0 に調整し、BPB 濃度を 0.001%, 0.005% および 0.010% にした BPB 試液 9 種に BSA (蛋白濃度: 10~100 mg/dl), BSA+乳清 (蛋白濃度: 10~100 mg/dl) および免疫グロブリン (蛋白濃度: 10~100 mg/dl) をそれぞれ 1 ml 加え、分光光度計 (測定波長: 610 m μ) により吸光度を測定した。

BPB 濾紙法 (仮称) 測定条件の検討: BPB 濃度を 0.1%, クエン酸濃度を 0.5%, 1%, 2% および 3% に調整した 4 種溶液とクエン酸濃度を 1.0%, BPB 濃度を 0.005%, 0.025%, 0.1% および 0.5% に調整した 4 種溶液 (計 8 種溶液) に東洋濾紙 (No. 6) をひたし風乾後 0.6, 0.8, 0.9, 2.6 および 5.0 g/dl の BSA と 0.2 M, pH 4.0 酢酸緩衝液とを等量混和し、この液 5 μ l を BPB 濾紙に滴下し、色の変化と辺縁の黄色リングの大きさを観察した。

2. 成 績

1) 乳房炎型別乳清総蛋白量

常乳ならびに潜在性乳房炎、慢性乳房炎、急性乳房炎および壊疽性乳房炎の乳清総蛋白量の平均値およびその 95% 信頼区間は表 1 に示した。炎症の度合いにともない乳清総蛋白量が増加し、急性乳房炎は常乳の 4 倍、壊疽性乳房炎は常乳の 8 倍に増加した。

潜在性乳房炎の 95% 信頼区間の上限と慢性乳房炎の下限がわずかに重複したが、これ以外重複せず、それぞ

表1 乳房炎型別乳清総蛋白量 (g/dl)

	常乳	潜在性	慢性	急性	壊疽性
平均値	0.62	0.81	0.90	2.65	5.09
95%信頼区間	上限	0.63	0.87	0.94	3.12
	下限	0.60	0.73	0.85	2.17
分房数	175	12	70	29	12

れの乳房炎が明確に分類された(表1)。

2) BPB 試液 吸光度 曲線

BPB 試液 4ml に蒸留水を 1ml 加えた溶液(盲検)は 430m μ , 570m μ および 610m μ の波長で吸光度が上昇した。BPB 試液 4ml に乳清 1ml 加えた溶液の吸光度は 430m μ , 570m μ および 610m μ の波長で上昇したが, 430m μ では盲検より減少し, 570m μ および 610m μ では盲検より上昇した。570m μ および 610m μ の波長では蛋白濃度の増加にともない吸光度が上昇し, とくに 610m μ で著明であった(図1)。

3) BPB 試験管法における BPB 試液の濃度および pH の条件

(1) pH 2.0 BPB 試液の吸光度: 0.001%, 0.005% および 0.010% BPB 試液は蛋白濃度の増加にともない吸光度が上昇したが, 0.001% BPB 試液では蛋白濃度 100mg/dl 付近では吸光度の上昇は認められなかった。同一蛋白溶液の吸光度は BPB 濃度が高い順に吸光度が高い傾向であった。種類別蛋白溶液の吸光度は BSA>

図1 BPB 試液の吸光度曲線

BSA+乳清>IG の順であった(表2)。

(2) pH 3.0 BPB 試液の吸光度: (1)と同様, 蛋白濃度の増加にともない3種のBPB試液の吸光度が上昇した。0.005% BPB 試液の吸光度は 0.001% BPB 試液より高く, 0.010% BPB 試液では 10mg/dl の蛋白溶液が測定不能であった。3種の蛋白溶液の吸光度は(1)と同様であった。pH 3.0, 0.005% BPB 試液と3種の蛋白溶液の吸光度を図2に示したが, 3種とも原点を通る直線であった(表2, 図2)。

(3) pH 4.0 BPB 試液の吸光度: 0.010% BPB 試液は3種蛋白溶液の蛋白量が測定不能であった。0.001% および 0.005% BPB 試液は IG の蛋白量が測定不能であり, BSA および BSA+乳清の低蛋白濃度溶液が測定不能であった(表2)。

表2 BPB 濃度および BPB 試液の pH 変化による吸光度の変化(測定波長: 610m μ)

pH	2.0			3.0			4.0		
BPB (%)	0.001	0.005	0.010	0.001	0.005	0.010	0.001	0.005	0.010
BSA	10	0.013	0.018	0.022	0.035	0.040	—	—	—
	30	0.030	0.037	0.050	0.095	0.170	0.060	0.110	—
	50	0.040	0.070	0.088	0.130	0.250	0.155	0.086	0.270
	70	0.050	0.086	0.130	0.135	0.330	0.310	0.098	0.440
	90	0.055	0.116	0.180	0.155	0.430	0.450	0.120	0.580
	100	0.061	0.131	0.200	0.170	0.470	0.510	0.140	0.630
BSA + Whey	10	0.006	0.012	0.020	0.015	0.022	—	—	—
	30	0.018	0.025	0.040	0.030	0.092	0.045	—	—
	50	0.025	0.041	0.066	0.055	0.150	0.105	—	0.070
	70	0.031	0.056	0.090	0.085	0.215	0.182	0.020	0.150
	90	0.040	0.070	0.119	0.100	0.245	0.225	0.042	0.230
	100	0.041	0.080	0.130	0.115	0.275	0.280	0.043	0.270
IG	10	0.002	0.008	0.020	0.002	0.001	—	—	—
	30	0.006	0.015	0.036	0.006	0.028	0.001	—	—
	50	0.010	0.024	0.055	0.015	0.044	0.035	—	—
	70	0.011	0.030	0.070	0.020	0.066	0.070	—	—
	90	0.014	0.044	0.090	0.035	0.099	0.095	—	—
	100	0.015	0.045	0.100	0.038	0.110	0.100	—	—

注) —: 測定不能

図2 pH 3.0, 0.005% BPB 試液の吸光度

0.2 M, pH 4.0 酢酸緩衝液 0.5 ml + 乳汁 0.5 ml
 ↓
 遠心 (2,000 rpm, 5 分)
 ↓
 中間層 (酢酸緩衝液で 10~20 倍希釈する)
 ↓
 * 1 ml ← BPB 試液 4.0 ml
 (pH 3.0, 0.2 M クエン酸緩衝液に BPB を 0.005% の割合でとかしたものを)
 ↓
 ブランクを対照として 610mμ で吸光度測定
 * 標準乳清蛋白溶液 0.01%, 0.05% および 0.10% を調整し検量線を作成する (酢酸緩衝液で作成する)

図3 BPB 試験管法

以上のことから, BPB 試験管法として最適な方法は図3に示したとおりである。

4) BPB 濾紙法におけるクエン酸濃度および BPB 濃度の条件

(1) **クエン酸濃度の条件 (0.1% BPB)**: クエン酸濃度が増加すると中央の青色はうすく, クエン酸濃度が低下すると中央の青色は濃く着色した。中央の青色の外側に黄色リングが認められ, 蛋白濃度の増加にともない黄色リングが小さくなり, 急性乳房炎 (乳清蛋白濃度 2.6 g/dl) で黄色リングと中央の青色が重なった。クエン酸濃度は 1.0% で色調の変化が最も著明であった (図5)。

(2) **BPB 濃度の条件 (クエン酸 1.0%)**: BPB 濃度 0.005% および 0.025% では中央の青色の着色はほとんど認められなかったが, 0.100% では蛋白濃度が増加するのにもない中央の着色部は淡青色から濃青色に変化した。また, 0.1% BPB では外側の黄色リングが明確に認められ, 急性乳房炎 (乳清蛋白濃度 2.6 g/dl) で中央

乳清 0.5 ml + 0.2 M, pH 4.0 酢酸緩衝液 0.5 ml
 ↓
 できれば遠心 (2,000 rpm, 5 分)
 ↓
 5μl を濾紙に滴下
 ↓
 標準色調表の色および黄色のリングを比較する
 ※濾紙の作成法
 1% クエン酸溶液に BPB を 0.1% の割合にとかし, 東洋濾紙 (No.6) をひたした後風乾する
 ※標準色調表の作成法
 乳清を適当に希釈し, 蛋白溶液として 0.6%, 0.8%, 0.9%, 2.6% および 5.1% の割合になるように調整する
 この蛋白溶液についてサンプルと同様に操作し, 標準色調表を作成する

図4 BPB 濾紙法

図5 標準色調模式図

の青色と重なった (図5)。なお, 0.5% BPB は中央の着色が明瞭でなく, 外側のリングも認められなかった。

以上のことから, BPB 濾紙法として最適な方法を図4に示した。

3. 考 察

乳房炎型別乳清総蛋白量についてその平均値と95%信頼区間について検討した結果, 炎症の度合いにともない乳清総蛋白量が増加し, 95% 信頼区間は潜在性乳房炎の上限と慢性乳房炎の下限がわずかに重なったのみであり, その他は重ならなかったことから, 乳清総蛋白量を測定することは乳房炎の型を診断するのによい方法であると思われる。しかし, 乳清総蛋白量の測定¹¹⁾には時間および労力が必要であるため, 乳房炎の診断には応用されなかった。そこで, 著者らは乳清総蛋白量を正確かつ簡易に測定する方法の開発を試みた。

BPB 試液の吸光度は 430 mμ, 570 mμ および 610 mμ で上昇したが, 610 mμ で吸光度が蛋白濃度の増加にともない上昇したため, 610 mμ で測定するのがよいと判断した。BPB 試液の pH は高くなると感度が上昇するが, pH 4.0 では蛋白量 10~100 mg/dl の IG が測定不能で

あった。また、BPB 濃度は 0.005% が最も安定していた。このようなことから BPB 試液は pH 3.0, BPB 濃度は 0.005 が乳清総蛋白量を測定するのに最もよいと判断した。以上のことから、BPB 試験管法は図 3 に示した方法がよい。従来の乳清総蛋白測定法¹¹⁾ (ゼウレット法あるいはローリー法) に比較し、BPB 試験管法は乳清の pH 調整を要しないので短時間に乳清総蛋白量を測定できる。BPB 試験管法における発色性は BSA が最も高く、次いで BSA+乳清、IG の順であった。これは測定誤差の原因になりかねないが、炎症の度合いが増加するのにもない BSA が上昇する^{1,11,12)}ので、乳房炎を診断するうえでかえって適している。

BPB 色素を濾紙にしみこませ乾燥後、この濾紙に乳清を滴下し乳清総蛋白量を野外で測定することを目的として BPB 濃度およびクエン酸濃度を検討した。その結果、BPB 濃度は 0.1%, クエン酸濃度は 1% が最も判定しやすかった。本法は蛋白溶液が濾紙に浸透拡散することおよび BPB 色素と蛋白質との反応の 2 性質を利用したものであるが、蛋白濃度の増加により外側の黄色リングは小さくなり、中心部は蛋白濃度に応じて青変する。このため、BPB 濾紙法も精度上信頼できるものであり、野外での乳房炎診断に利用できると思われる。このようなことから BPB 濾紙法は図 4 に示す方法がよいと思われる。判定は中心部の青色の濃さと外側の黄色リングを標準色調表 (図 5) と比較して行い、炎症の程度と型別が

判定できる。とくに、中心部の青色と黄色リングが重なれば、CMT 変法、臨床診断と合わせ急性乳房炎がより確実に診断可能である。

なお、濾紙は密封しておけば数年間使用可能であり、使用した濾紙も密封し乾燥状態にあれば 1 年以上原色のまま保存できる。

参考文献

- 1) CARROL, E. J., SCHALM, O. W. and LASMANIS, J.: *J. Dairy Sci.*, 46, 1236~1242 (1963).
- 2) 桐沢 統, 兼清知彦: 日獣会誌, 11, 481~483 (1958).
- 3) KITCHEN, B. J., MIDOLETON, G. and SALMON, M.: *J. Dairy Res.*, 45, 15~20 (1978).
- 4) 乳質改善ハンドブック, 全国乳質改善協会 (1973).
- 5) 小原嘉昭, ほか: 第 86 回日本獣医学会講演要旨, 115 (1978).
- 6) 大室 守: 家畜衛試研究報告, 56, 1~8 (1968).
- 7) 大島正尚: 日畜会報, 46 (10) 585~587 (1975).
- 8) 大島正尚: 畜産の研究, 30 (3) 375~379 (1976).
- 9) 生乳検査法, 全国乳質改善協会 (1972).
- 10) SHAHANI, K. M., HARPER, W. J., JENGEN, R. G., et al.: *J. Dairy Sci.*, 56 (5) 531~543 (1973).
- 11) 白井良一, 本庄利男, 山本静男, ほか: 家畜衛生研究会報, 7, 42~51 (1978).
- 12) 白井良一, ほか: 家畜衛生研究会報, 14・15, 19~21 (1982).

公衆衛生

異常肉を生じた屠豚の血液および筋肉における生化学的諸性状

前田博之*¹⁾ 森 千恵子*¹⁾ 山田英清*¹⁾ 伊藤滋子*¹⁾ 湯浅 亮*²⁾ 横田 博*²⁾

(昭和 60 年 5 月 24 日受理)

Biochemical Properties of Blood and Muscle from Pigs in Usual or Experimental Slaughter

HIROYUKI MAEDA (Asahikawa Meat Inspection Center, Prefecture of Hokkaido, Asahikawa, Hokkaido 071-13) et al.

SUMMARY

In pigs which showed rapid rigor mortis in usual or experimental slaughter, quite remarkable changes were found (enzymes:CPK, GOT, GPT, α -HBD, LDH and their isozymes, lactic acid, lipids: TG, NEFA, and minerals:Pi, Ca) in blood and glycogen and lactic acid, decreasing rate of muscle glycogen, ATP, catabolizing pattern of ATP, and R values in muscle at 10 and 90 minutes after slaughter. The meat quality was DFD in some pigs and PSE in others, regardless of usual or experimental slaughter.

*¹⁾ 北海道旭川保健所旭川食肉検査事務所 (北海道旭川市東鷹栖 6-12)

*²⁾ 酪農学園大学酪農学部 (北海道江別市西野幌 582)