生乳中ラクトフェリンおよびリゾチームの *Bacillus stearothermophilus* に対する抗菌作用

岡田雪男¹⁾ 原文男¹⁾ 新井伸雄¹⁾ 原 正三¹⁾

安食 隆¹⁾ 白石忠昭²⁾ 多久和 正³⁾ 長尾壮七⁴⁾

1) 島根県家畜衛生研究所 (出雲市神西沖町 918-4, 〒699-08)

2) 島根県農林水産部 (松江市殿町 1, 〒690)

3) 島根県隠岐支庁 (隠岐郡西郷町, 〒685)

4) 日本大学農獣医学部 (藤沢市亀井野 1866, 〒252)

(平成 4 年 2 月 24 日受付・平成 4 年 10 月 16 日受理)

Inhibitory Activity of Lactoferrin and Lysozyme in Raw Cow Milk against *Bacillus stearothermophilus*

Yukio OKADA¹⁾, Fumio HARA¹⁾, Nobuo NI¹⁾, Masami HARA¹⁾, Takasi ANZIKI¹⁾,
Tadaaki SIRAISI²⁾, Tadasu TAKUWA³⁾ and Sousiti NAGAO⁴⁾

1) Institute of Animal Health, Shimane Prefecture, Izumo-shi, Shimane-ken 699-18, Japan

2) Agriculture Forestry and Fisheries Department, Shimane Prefecture, Matsue-shi, Shimane-ken 690, Japan

3) Oki Branch Office, Shimane Prefecture, Saigo-cho, Oki-gun, Shimane-ken 695, Japan

4) College of Agriculture and Veterinary Medicine, Nihon University, Fujisawa-shi, Kanagawa-ken 252, Japan

SUMMARY

Properties of raw milk, which derived from dairy cows having no antibiotic treatment but showed inhibitory activity against *Bacillus stearothermophilus* in a paper disk test (PDT), were studied cytologically and biochemically. The total number of cells, the number of polymorphonuclear leukocytes (PMN), and the concentration of lactoferrin (Lf) and lysozyme (Ly) in PDT-positive milk were higher than in PDT-negative milk. A correlation was found between the diameter of the inhibition zone and the total number of cells, the number of PMN, or the concentration of Lf and Ly. The Lf showed the highest correlation with the diameter of the inhibitory zone. The egg Ly showed the highest inhibiting activity against the bacterial suspension when the suspension was examined by the optical density, followed by PDT-positive whey, human Lf, PDT-negative whey, and penicillin. When bacterial cells were observed by transmission electron microscopy, morphological changes caused by PDT-positive whey resembled those of human Lf. The results indicate that the PDT-positive reaction with milk with no antibiotic residue is caused mainly by Lf derived from PMN originating from mammary gland inflammation, and that the reaction is accelerated by the presence of Ly. — **Key Words** : lactoferrin, lysozyme, paper disk test, polymorphonuclear leukocytes.

-----J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 46, 103~107 (1993)

要 約

抗菌製剤無投与牛から搾乳した生乳が残留抗生物質検査法 (ペーパーディスク法; PD 法) で偽陽性反応を示す原因検索を行った。PD 法疑陽性乳は、陰性乳に比較して総細胞数、多形核球数、ラクトフェリン (Lf) およびリゾチーム (Ly) 量とも高値であり、これら成分と PD 法阻止円直径との間には有意な相関がみられ、特に、Lf 量との相関が高かった。また、比濁法による *Bacillus stearothermophilus* (検定菌) に対する抗菌作用の比較では、Ly が最も強く、次いで PD 法陽性乳清、Lf、PD 法陰性乳清、ペニシリンの順に弱くなった。なお、この時の検定菌の形態を透過型電顕と比較したところ、PD 法疑陽性乳清添加と人 Lf 添加の間には類似した変化が観察された。以上のことから、PD 法疑陽性反応は乳腺組織の炎症性変化にともなって生乳中に増加した多形核球由来の Lf に起因するものであり、Ly の存在でより顕著な反応がおきるものと考えられた。

—— **キーワード** : ラクトフェリン, リゾチーム, 残留抗生物質検査, 多形核球数.

-----日獣会誌 46, 103~107 (1993)

牛乳、乳製品におけるペニシリン (PC) など残留抗菌性物質の簡易検査法としてペーパーディスク法 (PD 法) が用いられている。この方法は、検定菌である *Bacillus stearothermophilus* の発育阻止の有無を指標とする微生物学的検定法であるため、抗菌性製剤以外の抗菌性物質によっても陽性反応の出現する可能性がある。しかしながら、どのような物質がこの反応に関与するのか十分に解明されていない。

著者らは、抗生物質製剤などを投与していない乳牛から搾取された生乳が PD 法で陽性反応 (PD 偽陽性) を示す事例に遭遇し、このような反応は総細胞数の増加した生乳に高率に認められることを明らかにした¹⁵⁾。また、この原因物質は PD 法偽陽性乳の乳清に存在し非透析性で、トリプシンにより不活化され、80℃・60 分の加熱に若干抵抗性を示した¹⁵⁾。すなわち、PD 法“疑陽性反応”には生乳中に存在するある種の蛋白質が関与していることが示唆された。

生乳中に存在し抗菌活性を示す可能性のある蛋白質としてラクトフェリン (Lf) およびリゾチーム (Ly) がある^{13, 17, 18)}。本研究では、これらの生乳由来抗菌性物質の PD 法試験に与える影響の有無を明らかにする目的で、Lf 量および Ly 量と PD 法における阻止円直径、総細胞数、細胞の種類との関係 (実験 I) ならびに乳清、Lf, Ly および PC の *B. stearothermophilus* に対する抗菌活性 (実験 II) について比較検討した。

材料および方法

材 料

実験 I で検査に供試した生乳は 1985 年 12 月に生乳検査所に搬入されたものの中から総細胞数が 2 万個 / ml から 940 万個 / ml の間にあった個体乳 96 例を用い、実験 II では 1986 年 12 月に生乳検査所に搬入されたものの中から総細胞数が 90 万個 / ml から 742 万個 / ml の間にあった個体乳 10 例を、それぞれ供試した。

方 法

試 薬 調 整: 透析乳清、濃縮乳清の調整として実験 II の生乳を山本らの方法²¹⁾に準じて処理し、調整した Lf は人ラクトフェリン (H, Lf)* を 1/15M-PBS に溶解後、0.2M 酢酸ナトリウム-0.2M リン酸-ナトリウム-0.4M EDTA 溶液で 4℃, 12 時間透析した。その後さらに蒸留水で 4℃, 12 時間透析し検体とした。Ly は卵白リゾチーム (E, Ly)* を 1/15M-PBS (pH 6.8) に溶解し供試

した。PC は標準品を 1/15M-PBS (pH 6.8) に溶解し供試した。なお、前述した透析乳清、濃縮乳清、H・Lf 溶液、E・Ly 溶液および PC 溶液は、孔径 0.22μm ミリポアフィルター*でろ過滅菌し供試した。

測 定 法: 生乳中の総細胞数および細胞の種類は Breed 法²³⁾で検査した。PD 法は国際酪農連盟 (IDF) の方法に従って実施し⁵⁾、阻止円直径 11mm 以上を陽性とした。Lf 量は単円免疫拡散法¹⁾で定量した。Ly 量は CHADAN らの方法³⁾に準じて測定した。すなわち、被検体 0.5ml を *Micrococcus luteus* の菌液 [0.067M-リン酸緩衝液 (pH 7.9) に懸濁し、吸光度が波長 540nm で 0.1 になるように調整] 2ml に加え、35℃で 10 分間反応させた後吸光度 (540nm) を測定し、標準品で作成した検量線から Ly 量を求めた⁸⁾。

トリプシン処理は 0.5% トリプシン溶液 (DIFCO, 1:250 を蒸留水に溶解) 0.2ml を被検乳 1ml に添加して室温で 10 分間作用させた後、抗菌活性を PD 法で検査した。乳清の加熱処理として 80℃・30 分 (恒温水槽) 加熱後、室温にまで速やかに冷却し、PD 法で抗菌活性を検査した。比濁法による測定は PD 法における検定菌である *B. stearothermophilus* を保存培地から増殖用液体培地*2ml に 1 白金耳接種してふ卵器で 55℃・1 夜培養した。この培養菌液に、ろ過滅菌した透析乳清 (10 例)、1mg/ml の H・Lf 溶液、20μg/ml の E・Ly 溶液および 0.16IU/ml の PC 溶液 0.2ml を加え、55℃のふ卵器内に静置した。経時的に波長 540nm における吸光度 (OD 値) を測定し、添加直後の OD 値を 100 とする相対率で各検体の抗菌活性を求めた。

形 態 変 化: 抗菌活性の検査と同様の方法で調整した *B. stearothermophilus* の菌液 2ml にろ過滅菌した各抗菌性物質溶液 0.2ml を加え、55℃のふ卵器で、E・Ly の場合は 30 分、その他の場合は 4 時間それぞれ作用させた。その後、3000rpm, 30 分遠心分離して、上清を除去した後、沈渣に 2% 酢酸アンモニウム溶液 2ml を添加して浮遊液とした。この操作を再度繰り返した後、沈渣に 2% 酢酸アンモニウム 0.5ml を添加し菌浮遊液とした。この菌浮遊液 0.5ml に 1% リンタングステン酸ナトリウム溶液を 2~3 滴加えた後、コロジオン支持膜上に 1 滴移し、余分な水分をろ紙で吸い取る方法でネグティブ染色した。*B. stearothermophilus* の形態変化は透過型電子顕微鏡*を用い 5,000 倍に拡大して観察した。

成 績

実 験 I

乳汁中における各成分の相互関係: 乳汁中の総細胞数を 5 段階に区分し、各項目の平均値±標準偏差値は表 1 に示すとおりである。総細胞数の増加にともなって PD 陽性数、Lf 量、Ly 量、多形核球数、単核球数とも増加

* 人ラクトフェリン: CALBIOCHEM-BEHRING CORP. 製
* 卵白リゾチーム: E・Ly, CALBIOCHEM-BEHRING CORP. 製
* ミリポアフィルター: MILLIPORE CORPORATION
* 増殖用液体培地: 日水製薬(株), BC 増菌培地
* 透過型電子顕微鏡: (株)日立製作所, H-300

傾向が認められた。特に、総細胞数が51万個/ml以上の乳汁では多形核球数およびLf量の増加が著明であった。また、Ly量は総細胞数11万個/ml以上の乳汁で増加がみられた。

PD法阻止円直径との相互関係：阻止円直径にもとずいて区分した総細胞数、多形核球数、単核球数、Lf量およびLy量（平均値±標準偏差値）は表2に示すとおりである。阻止円直径の拡大にともなって総細胞数、多形核球数、単核球数、Lf量、Ly量とも増加傾向が認められた。阻止円直径10mmに比較して直径11mm以上では、総細胞数、多形核球数、単核球数は有意（ $p < 0.05 \sim 0.001$ ）に高く、Lf量は直径12mm以上、Ly量は直径13mm以上で、それぞれ有意（ $p < 0.001$, $p < 0.01$ ）に高い値であった。

各成分間の相関係数値および寄与率：阻止円直径、総細胞数、多形核球数、Lf量およびLy量間の相関係数

値は表3に示すとおりである。阻止円直径との相関係数値が最も高い項目はLf量であり、相関係数値が最も高い項目は総細胞数と多形核球数の0.994であった。

また、重回帰分析（変数指定法）による各項目間の寄与率の比較は表4に示すとおりである。阻止円直径に対して最も寄与率の高いものはLf量の60.01%であり、総細胞数に対しては多形核球数の98.83%が最も高かった。

実 験 II

供試乳の細胞数および抗菌活性：試験に供試した生乳10例の細胞数と抗菌活性は表5に示すとおりである。総細胞数は90万個/mlから742万個/mlの範囲にあった。No. 1, 4および5の3例においてはPD法による阻止円直径は、全乳、トリブシン処理、加熱処理および透析乳清のいずれも10mmであり、陰性と判定された。これに対し、他の7例では全乳、加熱処理および透

表1 総細胞数と細胞の種類、ラクトフェリン量、リゾチーム量およびPD法陽性数

総細胞数 (10^4 個/ml)	例数	多形核球数 (10^4 個/ml)	単核球数 (10^4 個/ml)	ラクトフェリン (mg/ml)	リゾチーム (μ g/dl)	PD 陽性数
0～10	31	1.5 ± 1.3	3.4 ± 2.4	0.25 ± 0.16	165.6 ± 92.4	5
11～50	21	13.8 ± 10.6	13.8 ± 7.5	0.35 ± 0.23	242.6 ± 137.8	8
51～100	19	45.7 ± 15.4	27.6 ± 9.1	0.51 ± 0.22	272.0 ± 171.8	13
101～500	21	155.8 ± 62.7	49.1 ± 19.9	0.57 ± 0.24	348.2 ± 196.2	19
>501	4	502.7 ± 136.4	189.8 ± 59.7	0.98 ± 0.08	446.7 ± 607.2	4

平均値±標準偏差値

表2 阻止円の直径と総細胞数、細胞の種類、ラクトフェリン量およびリゾチーム量の比較

阻止円 (mm)	例数	総細胞数 (10^4 個/ml)	多形核球数 (10^4 個/ml)	単核球数 (10^4 個/ml)	ラクトフェリン (mg/ml)	リゾチーム (μ g/dl)
10	47	25.9 ± 34.4	13.3 ± 22.4	11.0 ± 11.6	0.27 ± 0.09	174.3 ± 110.0
11	15	62.3 ± 81.4	41.0 ± 62.7	21.2 ± 21.2	0.38 ± 0.14	280.8 ± 148.6
12	13	80.8 ± 59.5	57.6 ± 50.2	27.3 ± 14.1	0.53 ± 0.13	253.0 ± 190.3
13	5	142.8 ± 84.8	99.7 ± 67.9	43.1 ± 20.3	0.72 ± 0.19	424.0 ± 130.3
>14	15	331.2 ± 255.0	248.3 ± 181.0	82.9 ± 79.4	0.76 ± 0.28	428.0 ± 274.7

平均値±標準偏差値

表3 阻止円直径、総細胞数、多形核球数、ラクトフェリン量、リゾチーム量間の相関係数値の比較

総細胞数	0.687			
多形核球数	0.698	0.994		
ラクトフェリン	0.775	0.703	0.701	
リゾチーム	0.534	0.481	0.451	0.463
	阻止円直径	総細胞数	多形核球数	ラクトフェリン

n=95 各係数値とも； $P < 0.01$

表4 阻止円直径、総細胞数、多形核球数、ラクトフェリン量、リゾチーム量間の寄与率の比較

総細胞数	47.17			
多形核球数	48.70	98.83		
ラクトフェリン	60.01	49.41	49.08	
リゾチーム	28.50	23.12	20.33	21.42
	阻止円直径	総細胞数	多形核球数	ラクトフェリン

表5 供試乳の細胞数と抗菌活性

供試乳 No.	細胞数 ¹	P D 法 ⁴					ラクトフェリン量 ⁵		リゾチーム量 ⁶
		全乳	Tp ²	加熱乳清 ³	透析乳清	判定	透析乳清	濃縮乳清	透析乳清
1	90	10	10	10	10	—	0.27	0.32	24.4
2	92	12	10	10	12	+	0.44	1.09	36.4
3	96	12	10	10	12	+	0.44	1.30	35.0
4	108	10	10	10	10	—	0.23	0.9	16.0
5	118	10	10	10	10	—	0.44	0.73	36.0
6	142	13	10	13	12	+	0.58	1.09	93.3
7	156	12	10	12	12	+	0.23	0.44	111.1
8	164	12	10	12	12	+	0.51	0.9	22.2
9	302	12	10	12	12	+	0.44	1.09	13.3
10	742	14	10	12	12	+	0.44	0.9	53.3

¹: $\times 10^4/\text{ml}$ ²: トリプシン処理 ³: 80°C 30分 ⁴: 阻止円 mm ⁵: mg/ml ⁶: $\mu\text{g}/\text{dl}$

図1 抗菌活性の比較

- 注 1. PD+: PD法陽性 (Nos. 1, 4および5の平均値)
 2. PD-: 陰性透析乳清 (Nos. 2, 3および6~10の平均値)
 3. 対照: 生理食塩液

析乳清は直径12mmから14mmの阻止円の形成を示し、陽性と判定された。しかし、これら7例の全乳をトリプシン処理したところ、いずれの場合も阻止円の直径が10mmに縮小した。Lf量は、透析乳清では0.23mg/mlから0.58mg/ml、濃縮乳清では0.32mg/mlから1.30mg/mlの範囲にあった。No. 1を除き、乳清の濃縮によりLf量は2~4倍に増加した。また、Ly量は透析乳清で13.3 $\mu\text{g}/\text{dl}$ から111.1 $\mu\text{g}/\text{dl}$ であった。

比濁法による抗菌活性: PD陰性乳 (No. 1, 4, 5) およびPD陽性乳 (No. 2, 3, 6~10) の透析乳清ならびにH·Lf, E·LyおよびPC溶液の抗菌活性の経時的推移は図1に示すとおりである。E·Ly添加による菌液のOD値は、1時間後に急激に低下して、50%台に達し、3時間後はさらに低下して30%台となった。その後のOD値は変化なく推移した。H·Lf添加による菌

液のOD値は1時間後に80%台、3時間後には70%に、それぞれ低下し、その後は変化なく推移した。PC添加による菌液のOD値は、1時間後に85%に低下したが、その後はOD値に変化は認められなかった。

いっぽう、乳清添加による菌液のOD値の推移ではPD(-), PD(+)とも1時間後には85%に低下し両者間に差はみられなかったが、3時間後ではPD(-)は78%にPD(+)は68%と異なっていた。3時間目以後は緩慢な漸減傾向を示し、PD(-)はH·Lf添加とはほぼ同様の70%で推移したが、PD(+)は59%まで低下しE·LyとH·Lfの中間値を示した。

各種添加剤による菌の形態変化: 無添加対象は細胞壁、鞭毛、細胞質とも明瞭で一部には芽胞も観察された。これに対し、E·Ly添加例では細胞壁と鞭毛は消失し、細胞質が流出するなど菌体の破壊がうかがえる形態変化が、PC添加例では細胞壁の一部欠損、鞭毛消失、細胞質の無構造化などの形態変化が、H·Lf添加例では菌体の膨化、鞭毛消失、細胞壁の一部粗ざう化、細胞質の変性と無構造化などの形態変化が観察された。また、PD法偽陽性乳清添加 (Nos. 6, 10) でも菌体の膨化、鞭毛消失、細胞壁の一部粗ざう化、細胞質の変性などH·Lf添加に類似した形態変化が観察された。

考 察

著者ら¹⁵⁾は、1982年に島根県で発生した偽陽性反応の事例について種々検討を加えた結果、Lfは総細胞数が50万個/ml以上の乳汁中には明らかに高濃度存在し総細胞数の増加にともない増量することを報告した。これは乳房炎乳でLfが増加するという諸報告の成績^{2, 9, 10-12, 14, 16, 18, 19)}と一致するものである。本研究においてはこの事実に基づき、PD法と総細胞数、細胞の種類、LfおよびLy量との相互関係を検討した (実験I)。総細胞数の増加は多形核球数と単核球数の増加によるものの、総細胞数51万個/ml以上の乳汁では前者による影響が顕著であった。Lf量は既報¹⁵⁾の成績と同様であっ

た。また、Ly 量も他の諸報告^{3, 6, 20, 22)}におけると同様に総細胞数 11 万個 /ml 以上の乳汁中に高濃度に存在し、総細胞数の増加にともない増量する傾向を示した。さらに、阻止円直径は乳汁中の総細胞数、多形核球数の増加に比例して増大し、Lf および Ly 量の増加にともない拡大する傾向が強く認められた。ただし、阻止円直径との相関係数および寄与率から考えて、PD 法における偽陽性反応は Ly の増加よりも、総細胞数と多形核球数の増加にともない乳汁中に増加した Lf が主として関与しているものとみなされた。

H・Lf は、pH6.8、濃度 0.5mg/ml の条件で *B. stearothermophilus* の発育を抑制し、阻止円を形成する¹⁵⁾。総細胞数が 51 万個 /ml 以上の生乳中 Lf 量 (0.51~0.98 mg/ml) は H・Lf の最低発育抑制濃度 (0.5mg/ml) 以上であり、Lf 量が 0.5mg/ml 以上の生乳で偽陽性反応の出現が高率に認められたことから、この反応への Lf の関与が強く推察された。

いっぽう、E・Ly は pH6.8、濃度 500 μ g/dl 以上の場合に *B. stearothermophilus* に対する抗菌作用を示し阻止円を形成する¹⁵⁾。今回の成績では総細胞数が 500 万個 /ml 以上の乳汁の Ly 量は平均 446.7 μ g/dl であり、阻止円直径が 13mm 以上を示す乳汁で平均 424.0 μ g/dl であることが判明した。したがって、Ly による *B. stearothermophilus* の発育抑制は総細胞数が 500 万個 /ml 以上、阻止円直径 13mm 以上の乳汁でおきているものと考えられる。なお、H・Lf および E・Ly の *B. stearothermophilus* 発育阻止作用はそれぞれの単独の場合よりも両者を混合した場合に阻止円が拡大することを認めた¹⁵⁾。

したがって、乳房炎乳汁のように総細胞数が著しく増加した乳汁では、Lf と Ly の相乗作用によるより顕著な PD 偽陽性反応が発生することを示唆している。PD 法偽陽性反応乳汁が *B. stearothermophilus* 発育阻止を起こす機序を知る目的で、PD 偽陽性乳清、陰性乳清、H・Lf、E・Ly および PC の抗菌活性を比濁法により比較検討した (実験 II)。PD 法偽陽性乳清の活性は E・Ly より低く、H・Lf より高く推移した。また、電子顕微鏡で検定菌の形態変化を観察したところ、E・Ly では溶菌作用をとまう変化が強く認められた。

いっぽう、H・Lf では膨化、鞭毛消失、細胞壁の一部粗ざら化および細胞質の変性など、PD 偽陽性乳清の場合と類似した形態変化が観察され、Lf が偽陽性反応の主要因であることを示唆していた。したがって、抗菌性製剤を投与されていない牛由来の生乳が PD 法で偽陽性反応を示す主たる原因は、乳腺組織の炎症反応にとも

なって乳汁中に増量した Lf が主体となり、さらに 500 万 /ml 以上の高細胞数乳の場合には Ly の相乗作用も加味されてより顕著な反応が発現するものと考えられた。

供試乳の採集にご協力いただいた島根県家畜産物衛生指導協会生乳検査所岡田および宇谷技師、電子顕微鏡の使用に便宜をいただいた島根県農業試験場病虫科山本主任研究員および牛ラクトフェリン抗血清の分与をいただいた農林水産省畜産試験場小原嘉昭博士に謝意を表します。

引用文献

- 1) 阿部恒夫, 中野光志: 日畜会報, 43, 493-498 (1972)
- 2) BISHOP JG, SCHANBACHER FL, FERGUSON LC et al: Infect Immun, 14, 911-918 (1976)
- 3) CHANDAN RC, PARRY RM, SHAHANI KM: Biochim Biophys Acta, 110, 389-398 (1965)
- 4) CHEESEMAN GC and JAYNE-WILLIAMS DJ: Nature, 204, 688-689 (1964)
- 5) 慶田雅洋: 衛生試験法注解 (日本薬学会編) 沢村良二編, 258-259, 金原出版, 東京 (1980)
- 6) 遠藤恭介, 中村 大, 古川岩雄ほか: 家畜衛生研究会報, 19, 1-6 (1984)
- 7) 藤田正光, 平田敏雄, 佐々木康夫ほか: 家畜診療, 224, 37-40 (1982)
- 8) 船津 勝: 医化学実験法講座一生体構成成分 I, 山川氏夫編, 151-156, 中山書店, 東京 (1971)
- 9) HARMON RJ, SCHANBACHER FL, FERGUSON LC et al: Am J Vet Res, 36, 1001-1007 (1975)
- 10) HARMON RJ, SCHANBACHER FL, FERGUSON LC et al: Infect Immun, 13, 533-542 (1976)
- 11) 岩佐達男: 家畜診療, 387, 31-37 (1987)
- 12) 小松正憲, 森地敏樹, 阿部恒夫: 農林水産省畜産試験場研究報告, 34, 47-53 (1978)
- 13) KORHONEN H: World Animal Review, 35, 23-29 (1980)
- 14) OBARA Y, KOMATU M: J Dairy Sci, 67, 1043-1046 (1984)
- 15) 岡田雪男, 原文男, 白石忠昭ほか: 日獣会誌, 39, 97-101 (1986)
- 16) RAINARD P: Vet Microbiol, 13, 159-166 (1987)
- 17) REITER B, ORAM JD: Nature, 216, 328-330 (1967)
- 18) SCHANBACHER FL, SMITH KL: J Dairy Sci, 58, 1048-1062 (1975)
- 19) SMITH KL, CONRAD HR, PORTER RM: J Dairy Sci, 54, 1427-1435 (1971)
- 20) TODOROV D: Vet Med Nanki Sof, 9, 63-72 (1972)
- 21) 山本静雄, 本庄利男: 家畜電気泳動研究会誌, No. 6, 7 合併号, 54-64 (1974)
- 22) 与 齊 篤, 清原博光, 中島知子ほか: 獣畜新報, No. 762, 40-42 (1985)
- 23) 米村寿男: 牛の臨床検査, 11, 5, 中村良一編, 農文協, 東京 (1973)