

牛のルーメン液浸透圧の測定条件の検討

石井 沢 径¹⁾ 大橋 傳²⁾ 新井 鐘 蔵^{2)†}

- 1) 鹿児島県鹿児島中央家畜保健衛生所 (〒899-2201 日置市東市来町湯田1678)
 2) 独農業・食品産業技術総合研究機構 動物衛生研究所 (〒305-0856 つくば市観音台3-1-5)

(2010年1月20日受付・2010年6月4日受理)

要 約

牛のルーメン液の前処理法や測定条件の違いが、氷点降下法による浸透圧の測定値に及ぼす影響について検討した。フイステルを装着した健康牛からルーメン液を採取し、浸透圧計の結晶化温度を、血漿の一般的な条件である -5.6°C に設定したところ、測定値が得られなかった。ルーメン液を過冷却すると $-3.9\sim-5.5^{\circ}\text{C}$ の範囲で凝固を開始するため、結晶化温度を -3.7°C に設定したところ、再現性のよい測定値が得られた。また、2重ガーゼで濾過しただけのルーメン液は、遠心分離やメンブレンフィルターで前処理したルーメン液に比べて浸透圧が高値を示す傾向がみられ、凍結・融解後のルーメン液では、凍結前に比べて浸透圧が有意に低下した。
 —キーワード：牛，ルーメン液，ルーメン液浸透圧。

----- 日獣会誌 63, 785~788 (2010)

牛ルーメン液の浸透圧は、採食に伴うルーメン内の揮発性脂肪酸やミネラルの濃度変化、および水の吸収の程度と密接に関係する [1] ことが知られている。また、ルーメンアシドーシスを呈した牛では、病態の悪化に伴うルーメン液浸透圧の上昇 [2] が報告されており、ルーメン環境を把握するうえで浸透圧の測定は有用と考えられている。ルーメン液では、氷点降下法 [3] による浸透圧値が報告されているが、前処理法や測定条件についてはさまざまで、一定していない [2, 4-8]。そこで、ルーメン液の前処理法や測定条件の違いが、氷点降下法による浸透圧の測定値に及ぼす影響について検討した。

材 料 お よ び 方 法

供試材料：第一胃にフイステルを装着した健康なホルスタイン種成牛3頭 (牛No. 1：雌，No. 2および3：去勢雄，体重535~565kg) を用いた。牛には、粗飼料を主体とした1日2回の制限給餌 (1日量：乾草5kg，配合飼料2kg) を行った。試験に用いたルーメン液は、朝給餌から4時間後にフイステルより採取した。

材料の前処理法：採取したルーメン液は、すみやかに氷冷保存し、2重ガーゼで濾過してサンプル原液とした。サンプル原液は、メンブレンフィルター (Minisart NML, Sartorius, 孔径：0.45および $0.20\mu\text{m}$, Germany) による濾過と遠心分離の組み合わせにより、9

通りの前処理を実施した (図1)。遠心分離の条件としては、加速度 $1,000g$ ，10分間， 4°C および加速度 $12,000g$ ，30分間， 4°C ，メンブレンフィルターとしては孔径が $0.45\mu\text{m}$ および $0.20\mu\text{m}$ のものをを用いた。前処理したサンプルは、測定直前まで 4°C で保存した。

浸透圧の測定：自動浸透圧計 (Advanced 3D3 Single-Sample Osmometer, ADVANCED INSTRUMENTS, INC, U.S.A.) を用いて、同一サンプルについて10回測定し、平均値，標準偏差 (SD) および変動係数 (CV) を求めた。

実験手順：まず、供試牛1頭 (No. 1) から採取したルーメン液に、前述した9通りの前処理を行い測定用サンプルとした。浸透圧計の結晶化温度を、血漿目的の一般的な浸透圧測定条件 [3] である -5.6°C に設定して、浸透圧を同一サンプルについて10回測定した。

また、過冷却中の測定用サンプルが、結晶化温度に達する前に凝固した場合、凝固を開始する温度 (凝固開始温度) を測定した。測定は同一サンプルについて10回実施した。

次に、浸透圧計の結晶化温度を -3.7°C に設定して、供試牛3頭から採取したルーメン液に前述の9通りの前処理を行い測定用サンプルとし (表1)，同一サンプルについて、10回ずつ浸透圧を測定した。浸透圧測定後の余剰サンプルは、 -30°C で凍結保存した。

† 連絡責任者：新井鐘蔵 (独農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究所生産病研究チーム)

〒305-0856 つくば市観音台3-1-5 ☎・FAX 029-838-7810 E-mail: sarai@affrc.go.jp

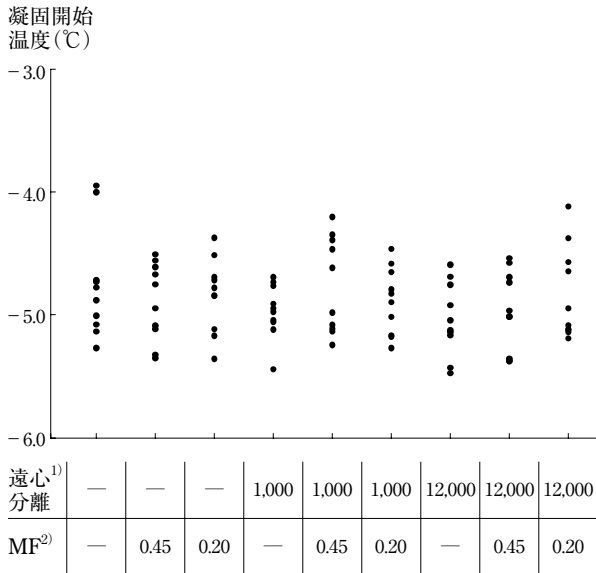


図1 ルーメン液の各種前処理後の過冷却中の凝固開始温度の分布

- 1) 遠心分離：遠心分離操作の有無。数値は加速度 (g)
- 2) MF：メンブレンフィルターによる濾過の有無。数値はフィルター孔径 (μm)

さらに、これらの凍結サンプルを融解した後、同一サンプルについて10回ずつ浸透圧を測定し、凍結・融解処理による影響について比較検討した。

統計解析：各前処理サンプル間の比較は一元配置分散分析 (ANOVA) により実施した。凍結前と凍結処理の比較はStudent's-*t*検定により実施した。それぞれ、危険率5%未満を有意な差とした。

成 績

浸透圧計の結晶化温度を-5.6℃に設定して、9通りの前処理を行った測定用サンプル (牛No. 1) すべてで上記の結晶化温度まで過冷却できず、測定値を得ることができなかった。

そこで、9通りの前処理を行った測定用サンプルの過冷却中の凝固開始温度を計測したところ、-3.9℃から-5.5℃の範囲に分布していた (図1)。

凝固開始温度の測定結果から、浸透圧計の結晶化温度を-3.7℃に設定して、供試牛3頭について9通りの前処理を行ったサンプルを測定したところ、すべて測定可能となり、変動係数 (CV) は0.35~1.12%と良好な再現性を示した (表1)。また浸透圧の範囲は、231~283mOsm/kgであった。遠心分離およびメンブレンフィルター濾過の前処理を行った測定用サンプル群間では浸透圧に有意な差は認められなかった。いっぽう、前処理をしていないサンプル原液の浸透圧には高値を示す傾向が認められ、特に牛No. 2とNo. 3では、有意な高値 ($P < 0.05$) を示した (表1)。

表1 ルーメン液の各種前処理後の浸透圧

	前処理法		平均値 ¹⁾ (mOsm/kg)	SD ⁴⁾	CV ⁵⁾	
	遠心分離 ²⁾	MF ³⁾				
牛No. 1	—	—	281.6	2.26	0.80	
	—	0.45	280.4	2.17	0.77	
	—	0.20	279.3	2.21	0.79	
	1,000	—	282.1	2.26	0.80	
	1,000	0.45	281.7	2.50	0.89	
	1,000	0.20	280.2	2.15	0.77	
	12,000	—	281.6	3.17	1.12	
	12,000	0.45	282.6	2.22	0.79	
	12,000	0.20	282.3	1.91	0.68	
牛No. 2	—	—	280.9 ^{a)}	1.36	0.49	
	—	0.45	276.4 ^{b)}	0.97	0.35	
	—	0.20	275.1 ^{b)}	1.60	0.58	
	1,000	—	276.4 ^{b)}	1.92	0.70	
	1,000	0.45	276.1 ^{b)}	1.97	0.71	
	1,000	0.20	275.6 ^{b)}	1.58	0.57	
	12,000	—	277.1 ^{b)}	1.81	0.65	
	12,000	0.45	276.6 ^{b)}	1.24	0.45	
	12,000	0.20	274.9 ^{b)}	1.73	0.63	
	牛No. 3	—	—	234.6 ^{a)}	1.65	0.70
		—	0.45	231.4	1.88	0.81
		—	0.20	231.1 ^{b)}	1.66	0.72
1,000		—	233.2	1.81	0.78	
1,000		0.45	232.5	1.78	0.77	
1,000		0.20	231.6	1.71	0.74	
12,000		—	231.7	1.41	0.61	
12,000		0.45	232.1	2.32	1.00	
12,000		0.20	231.8	2.15	0.93	

- 1) 浸透圧計の結晶化温度を-3.7℃に設定して測定 (各n=10)。
- 2) 遠心分離：遠心分離操作の有無。数値は加速度 (g)
- 3) MF：メンブレンフィルターによる濾過の有無。数値はフィルター孔径 (μm)
- 4) SD：標準偏差
- 5) CV：変動係数 (%)

異符号 (a, b) 間に有意差あり ($P < 0.05$)。

さらに、凍結・融解処理後に浸透圧を測定したところ、各供試牛の平均値 (mOsm/kg) および標準偏差は、おのおのNo. 1が 274 ± 2.0 、No. 2が 271 ± 4.8 、No. 3は 226 ± 1.9 であった。いっぽう、凍結前の測定値はNo. 1が 281 ± 2.5 、No. 2が 277 ± 2.3 、No. 3が 232 ± 2.0 で、凍結・融解処理後の浸透圧は、凍結前に比べて有意な低値 ($P < 0.01$) を示した。

考 察

氷点降下法による浸透圧測定では、一般的にサンプル液を約-6℃の結晶化温度まで十分に過冷却し、結晶化を誘起して急速に凝固させている [3, 9, 10]。しかし、ルーメン液は、-6℃まで過冷却されないうちに凝固を開始してしまうため、測定値が得られないことがわかった (図1)。水溶液の凍結には溶液中に氷核が生成される

必要があり、氷核生成促進物質として、硫化銅などの無機物や *Pseudomonas* sp. などの微生物由来タンパクが知られている [9]。また過冷却状態におかれた水中の油脂分子は、不純物の存在下で結晶化しやすいことが知られており [9]、ルーメン液中の微生物タンパク、飼料由来の無機物や油脂成分等が、過冷却中のルーメン液の凝固を促進した可能性が考えられた。本試験結果より、ルーメン液の浸透圧を測定する場合、分析機の結晶化温度を、血漿等を目的とした -5.6°C ではなく、 -3.7°C に設定する必要があることが示された。

遠心分離やメンブレンフィルターによる前処理を一切おこなわないルーメン液の浸透圧は、これらの前処理後に比べて高値を示す傾向が認められた。希薄水溶液の氷点降下は、溶液中の溶質の重量モル濃度に比例する [3]。しかし、サンプル中に固形物が混入していると過冷却が十分にできないこともあり [10]、サンプル原液に多く含まれる飼料等の夾雑物が測定値に影響を与えた可能性が考えられた。また、本試験で得られた浸透圧値 ($231 \sim 283\text{mOsm/kg}$) は、既報値 ($265 \sim 378\text{mOsm/kg}$) [6-8] より低値であったが、飼料の種類と給与量、飼料給与からルーメン液採取までの時間などの差異によるものと推察された。

凍結・融解処理後のルーメン液浸透圧は、凍結前に比べて有意な低値を示した。ルーメン液には牛が摂取した粗飼料や配合飼料が多く含まれている。たとえば大豆由来のリン脂質から成るリポソームは小型の脂質二重膜構造であるが、凍結・融解すると大型の単層リポソームへと構造が変化し、凍結前に比べて電解質や高分子を取り込む容量が大きくなることが知られている [11, 12]。本試験で用いた配合飼料にも大豆等が含まれており、このような飼料成分を含むルーメン液を凍結・融解することで重量モル濃度に変化が起り、浸透圧に影響を与えた可能性が考えられた。

以上の結果から、ルーメン液の浸透圧を氷点降下法で測定する場合、測定機器の結晶化温度を -3.7°C に設定し、採取したルーメン液は2重ガーゼでの濾過に加え、遠心分離あるいはメンブレンフィルター濾過の前処理をして測定に供することが望ましいと考えられる。また、凍結保存したルーメン液は浸透圧が低下するため、凍結保存は避けるべきである。

牛のルーメンアシドーシスの病態把握には、ルーメン液中の揮発性脂肪酸やエンドトキシン濃度の測定が有用であるが [13]、コストが高く測定操作も煩雑なため臨床現場での汎用は難しい面もある。浸透圧の測定は、操作が簡便で結果も短時間で得られる利便性があることから、今後は臨床的な汎用性と有用性を生かすために、さまざまな病態や給餌条件下でのデータ蓄積を進めることが重要と考える。

本研究の一部は農林水産省委託プロジェクト「粗飼料多給による日本型家畜飼養技術の開発」で実施した。

引用文献

- [1] Carter RR, Grovum WL : A review of the physiological significance of hypertonic body fluids on feed intake and ruminal function : salivation, motility and microbes, *J Anim Sci*, 68, 2811-2832 (1990)
- [2] Khafipour E, Krause DO, Plaizier JC : Alfalfa pellet-induced subacute ruminal acidosis in dairy cows increases bacterial endotoxin in the rumen without causing inflammation, *J Dairy Sci*, 92, 1712-1724 (2009)
- [3] Richterith R : 重量モル浸透圧濃度, 臨床生化学 基礎と臨床, 麻生芳郎訳, 第3版, 219-224, 廣川書店, 東京 (1974)
- [4] Kelly JM, Vaage AS, Milligan LP, McBride BWT : In vitro ouabain-sensitive respiration and protein synthesis in rumen epithelial papillae of Hereford steers fed either timothy hay or timothy hay supplemented with cracked corn once daily, *J Anim Sci*, 73, 3775-3784 (1995)
- [5] Anderson PH, Bergelin B, Christensen KA : Effect of feeding regimen on concentration of free endotoxin in ruminal fluid of cattle, *J Anim Sci*, 72, 487-491 (1994)
- [6] Kelly JM, McBride BW, Milligan LP : In vitro ouabain-sensitive respiration and protein synthesis in ruminal epithelial papillae of Hereford steers fed either alfalfa or bromegrass hay once daily, *J Anim Sci*, 71, 2799-2808 (1993)
- [7] Froestschel MA, Amos HE : Effect of dietary fiber and feeding frequency on ruminal fermentation, digesta water-holding capacity, and fractional turnover of contents, *J Anim Sci*, 69, 1312-1321 (1991)
- [8] Bevans DW, Beauchemin KA, Schwartzkopf-Genswein KS, McKinnon JJ, McAllister TA : Effect of rapid gradual grain adaptation on subacute acidosis and feed intake by feedlot cattle, *J Anim Sci*, 83, 1116-1132 (2005)
- [9] 松野隆一 : 食品製造基盤技術, 食品工学ハンドブック, 日本食品工学会編, 第1版, 55-160, 朝倉書店, 東京 (2006)
- [10] 椎貝達夫 : 水電解質代謝の測定法, 水電解質の基礎と臨床, 加藤暎一編, 第4版, 27-29, 真興交易(株)医書出版部, 東京 (1973)
- [11] Kasahara M, Hinkle PC : Reconstitution and purification of the D-glucose transporter from human erythrocytes, *J Biol Chem*, 252, 7384-7390 (1977)
- [12] Pick U : Liposomes with a large trapping capacity prepared by freezing and thawing of sonicated phospholipid mixtures, *Arch bioch biophys*, 212, 186-194 (1981)
- [13] 元井茂子 : ルーメン環境の変化と反芻動物の疾病, 新ルーメンの世界, 板橋久雄編, 560-572, (社)農山漁村文化協会, 東京 (2004)

Examination of the Measurement Condition of Rumen Osmolality of Cattle

Takumichi ISHII*, Tsutai OOHASHI and Shozo ARAI†

* *Kagoshima Central Livestock Hygiene Service Center, 1678 Yuda, Higashiichiki, Hioki, 899-2201, Japan*

SUMMARY

We examined the effect of the measurement conditions of rumen osmolality in cattle using freezing point methods. Rumen fluid was collected from ruminally cannulated healthy Holstein cattle. When the crystallization temperature of the osmometer was set as -5.6°C , the standard for blood plasma, osmolality was not able to be measured in the samples at all. When rumen fluid samples were subjected to supercooling, the samples were coagulated in the range of -3.9 to -5.5°C . Therefore, when the crystallization temperature of the osmometer was set as -3.7°C , osmolality was able to be measured in all samples. The osmolality of rumen fluid filtered using a double cheesecloth had a high level compared with samples carried out by centrifugation, or filtration with the membrane filter (0.45 or 0.20 μm pore-sized). After it was frozen and then thawed, rumen fluid showed a lower osmolality than samples that had not been frozen.

— Key words : cattle, rumen fluid, ruminal osmolality.

† *Correspondence to : Shozo ARAI (National Institute of Animal Health)*

3-1-5 Kannondai, Tsukuba, 305-0856, Japan

TEL · FAX 029-838-7810 E-mail : sarai@affrc.go.jp

J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 63, 785 ~ 788 (2010)