

尿中クレアチニンをマーカーとした泌乳牛の
タンパク質栄養状態の簡易判定法の開発

Development of the simple method for assessment of protein nutritional status
using urinary creatinine index in lactating dairy cows

2019. 9

田村 哲生

Tetsuo Tamura

目 次

略語および用語の一覧	iv
要旨	v
Abstract	viii
第 1 章 緒言	1
第 2 章 検体尿（4 時間尿）による尿成分の排泄日量の推定に関する検証 ...	9
緒言	10
材料および方法	10
結果	12
考察	15
小括	21
第 3 章 バルーンカテーテルを用いた採尿法の開発	22
第 1 節 最適なバルーン容量の検討	24
緒言	24
材料および方法	24
結果	28
考察	29
小括	35

第 2 節	カテーテル関連尿路感染症の防止策の検討	37
	緒言	37
	材料および方法	38
	結果	40
	考察	42
	小括	42
第 3 節	カテーテル関連尿路感染症の発生率の調査	44
	緒言	44
	材料および方法	45
	結果	47
	考察	50
	小括	51
第 4 節	カテーテル採尿法の有効性の検証	53
	緒言	53
	材料および方法	53
	結果	55
	考察	55
	小括	60
第 4 章	カテーテル採尿法により採取した検体尿（1.5 時間相当尿）による 尿成分の排泄日量を推定するための採尿時間帯に関する検証	62
	緒言	63
	材料および方法	63
	結果	65
	考察	68
	小括	78

第 5 章	スポット尿による尿成分の推定法の確立およびタンパク質栄養状態の 簡易判定法の開発	79
	緒言	80
	材料および方法	82
	結果	86
	考察	92
	小括	98
第 6 章	総合考察	100
謝辞	108
参考文献	110

略語および用語の一覧

本論文において使用する主な略語および用語を以下に列記する。

CAUIT: Catheter-Associated Urinary Tract Infection カテーテル関連尿路感染症

CP: Crude Protein 粗タンパク質

CreBW: クレアチニン体重係数 (mg/kg BW・日)

CreMBW: クレアチニン代謝体重係数 (mg/kg^{0.75} BW・日)

DMI: Dry Matter Intake 乾物摂取量

MCP: Microbial Crude Protein ルーメン微生物体粗タンパク質

RDP: Rumen-Degradable Protein 分解性タンパク質

RUP: Rumen-Uudegradable Protein 非分解性タンパク質

TMR: Total Mixed Ration 完全混合飼料

カテーテル: バルーンカテーテル

カテーテル採尿法: バルーンカテーテルを用いて検体尿を採取する方法

従来採尿法: 尿採取器を用いて検体尿を採取する方法

1.5 時間相当尿: 1.5 時間のうちに排泄が想定されている尿

4 時間尿: 4 時間のうちに排泄された尿

24 時間尿: 24 時間のうちに排泄された尿

要 旨

乳牛の飼養管理において、粗タンパク質（CP）給与量の適正化と、ルーメン内での微生物体粗タンパク質（MCP）合成量の最大化が重要視されている。これらの状態を把握するには、24 時間に排泄された尿（24 時間尿）中の総窒素およびアラントイン量を把握する必要があるが、労力が大きいという課題がある。排尿数回分の尿を検体尿として採取して、検体尿中のクレアチンを指示物質として 24 時間尿中の成分を推定する方法が提唱されている。しかしながら、作業の容易な日中に検体尿を採取して推定する方法は未確立である。そこで本研究の目的は、このような推定法を確立して、泌乳牛におけるタンパク質栄養状態の簡易判定法を開発することである。

第 2 章では、泌乳牛の外陰部に尿採取器を装着する採尿法（従来採尿法）により、4 時間のうちに排泄された尿（4 時間尿）を検体尿として 3 日間連続で採取して調査を実施した。総窒素/クレアチニン濃度比、およびアラントイン/クレアチニン濃度比は 1 日を通じてほぼ一定であった。代謝体重当たりの尿中クレアチニン排泄日量（CreMBW）は 107.2 mg/kg^{0.75} BW・日であった。これらのことから、式 [推定尿中総窒素（あるいはアラントイン）排泄日量（mg）＝検体尿中の総窒素（あるいはアラントイン）濃度（mg/dL）/ 検体尿中のクレアチニン濃度（mg/dL）× CreMBW × 代謝体重（kg^{0.75}）] が導かれた。日中の 4 時間尿（08:00-12:00 または 12:00-16:00）のデータを用いて前記式から算出された推定値と実測値との間には、有意な相関が認められ（ $r > 0.750$ 、 $P < 0.001$ ）、また、推定値＝実測値と判断された。以上により、前記式を用いることで日中に排泄された 4 時間尿から尿成分排泄日量が推定できることが明らかになった。

第 3 章では、第 2 章よりも更に短時間に排泄される尿を検体尿として採取して尿成分の推定の可能性を検討するために、バルーンカテーテル（カテーテル）を用いて、規定の時間に緻密かつ正確に採尿できるカテーテル採尿法の開発を目標とした。バルーン容量の異

なる3種のカテーテル（従来サイズ：70 mL、極小サイズ：30 mL、小サイズ：45 mL）をウシの膀胱に留置したところ、極小サイズはウシが異常行動を示したことから、バルーン容量30 mLのカテーテルはウシにとって小さすぎると考えられた。小サイズは従来サイズよりもカテーテル関連潜血（ > 50 red blood cell/high powered field）の発生率が有意に低く（ $P < 0.05$ ）、病理検査の結果、その原因はバルーンが膀胱壁を圧迫して損傷を与えていたことであった。従って、バルーン表面積が従来よりも小さいカテーテル（バルーン容量45 mL）がウシにとって適正と考えられた。一方、搾乳作業に伴う採尿の中断、採尿経路の分離および開放はカテーテル関連尿路感染症（CAUTI、尿中細菌数： $> 3.0 \times 10^2$ colony forming unit/mL）の発生原因となる。カテーテル端での採尿経路の分離（近位分離）と採尿経路末端での分離（遠位分離）とを比較したところ、遠位分離ではCAUTIが発生しなかった。このことから、膀胱から極力離れた部位で採尿経路を分離することで膀胱内への細菌侵入およびCAUTI発生を抑制できることが明らかになった。以上の成果に基づいたカテーテル採尿法によるCAUTI発生率は留置1日につき3.0%であり、CAUTIに罹患しても適正な治療で完治した。これらの知見からカテーテル採尿法の実用性が高まった。更に、従来採尿法およびカテーテル採尿法により3日間連続で出納試験を実施したところ、生産性、消化能力に遜色はなく、一方、カテーテル採尿法は尿の取りこぼしが少ないために出納試験の精度が高まることが明らかになった。これらの知見から、カテーテル採尿法は従来採尿法より精度の優れた採尿手段と位置づけられた。従って、目標としたカテーテル採尿法を開発することができた。なお、カテーテル採尿法により正確に測定したCreMBWは $123.94 \text{ mg/kg}^{0.75} \text{ BW} \cdot \text{日}$ であった。

第4章では、第3章で開発したカテーテル採尿法を用いて、乳牛の膀胱から日中の検体尿（08:30から16:00まで1.5時インターバルで採取：1.5時間相当尿）を含む24時間尿を採取して調査を実施した。CreMBWは暑熱環境の影響で個体間に差が生じるが、日間では一定であった。前記式に個体毎のCreMBWを用いて推定シミュレーションを実施したと

ころ、日中に採取したいずれの 1.5 時間相当尿であっても、総窒素およびアラントインの排泄日量を推定できることが明らかになった。このことから CreMBW は、暑熱環境にあつては個体毎の数値を、非暑熱環境にあつては $123.94 \text{ mg/kg}^{0.75} \text{ BW}\cdot\text{日}$ を用いて前記式を利用することで 24 時間尿中の成分排泄の推定できることが示唆された。

第 5 章では、第 4 章でカテーテルで採取した 1.5 時間相当尿から尿成分排泄日量が推定できることが明らかになったことから、カテーテルを用いずに採取した検体尿による尿成分の推定の可能性を検討するために、24 時間尿を採取する全尿採取法あるいは日中のスポット尿を採取して前記式 ($\text{CreMBW}: 123.94 \text{ mg/kg}^{0.75} \text{ BW}\cdot\text{日}$) を用いて 24 時間尿を推定するスポット尿採取法で出納試験を実施した。飼料は、メチオニン (Met) 要求量を満たさない、あるいはルーメン保護メチオニン (RPMet) を給与して満たすもののいずれかを給与した。生産性、出納試験成績、MCP 合成量の指標となる微生物体窒素の十二指腸流入量、微生物体アミノ酸代謝量および窒素出納の結果は、全尿採取法とスポット尿採取法とに大きな遜色は認められなかった。CreMBW について飼料間に差が認められなかったの
で、RPMet 添加の有無という異なる飼料条件であっても前記式が成立することが示唆された。

以上のことから、日中のスポット尿を検体尿として採取し、前記式 ($\text{CreMBW}: 123.94 \text{ mg/kg}^{0.75} \text{ BW}\cdot\text{日}$) を利用することで、24 時間尿中の総窒素およびアラントインの排泄量を推定する方法が確立された。この方法は、MCP 合成量および微生物体アミノ酸代謝量と、尿中総窒素排泄量から CP 給与量の適正性とをモニタリングできるので、泌乳牛におけるタンパク質栄養状態の簡易判定法が開発されたと結論付けた。

Abstract

On feeding management of dairy cattle, it is important to optimize the dietary amount of crude protein (CP) and maximize the synthesis of rumen microbial crude protein (MCP). To monitor those statuses, it is necessary to collect the total daily amount of nitrogen and allantoin excreted in 24-h (24-h urine), while there are some challenges that the urine collection requires significant work. A method has been proposed in which urine samples are collected from the urine excreted on short time to estimate the total daily components using urinary creatinine as an index. However, a method to collect the urine samples excreted in the daytime when work is easy to estimate the daily excretion of urinary total nitrogen and urinary allantoin is not established. Therefore, the purpose of this study is to establish such an estimation method and to develop a simple method for the assessment of protein nutritional status.

In chapter 2, the following examination was conducted: by the method (conventional method) using a urine collection cup attached to cow's vulva, the urine samples were collected from the urine excreted in 4-h (4-h urine) for three consecutive days. The urinary concentration ratio of total nitrogen per creatinine and allantoin per creatinine were almost constant throughout the day. The amount of urinary creatinine per metabolic body weight (CreMBW) was $107.2 \text{ mg/kg}^{0.75} \text{ BW} \cdot \text{day}$. From those results, the formula [estimated amount (mg/day) of urinary total nitrogen (or allantoin) = concentration (mg/dL) of total nitrogen (or allantoin) in the urine sample / concentration (mg/dL) of creatinine in the urine sample \times CreMBW \times metabolic body weight ($\text{kg}^{0.75}$)] was derived. Significant correlation was detected ($r > 0.750$, $P < 0.001$) between the estimated value calculated from the above formula inputting data for 4-h urine collected in the daytime (08:00–12:00 or 12:00–16:00) and the actual value, and it was determined that estimated

amount = actual one. Therefore, it became clear that the formula using 4-h urine collected during daytime has a feasibility of estimating the daily amount of urinary constituents.

In chapter 3, to explore the possibility of estimating daily urinary constituents from urine samples excreted shorter than 4-h intervals, a study was conducted for the development of the catheterized urine collection method (catheter method) that can sample exactly on a more finely worked-out time schedule. Three types of catheters with different balloon volumes (normal size: 70 mL, extremely small size: 30 mL, small size: 45 mL) were inserted into the cows' bladders. The extra small size was too small for the cow's bladder because it showed discomfort. Balloons cause bladder injury when pressed on the bladder wall, and the occurrence of catheter-associated hematuria (> 50 red blood cell/high powered field) was significantly lower ($P < 0.05$) in small size catheter than in normal size catheter. Thus, the small size (45-mL balloon) is appropriate for cows, as the surface area is smaller than the normal size. On the other hand, catheter-associated urinary tract infection (CAUTI, urinary bacteria: $> 3.0 \times 10^2$ colony forming unit/mL) can be caused when urine collection is stopped temporarily and the urine collection route is disconnected while milking. Comparison of separation of the urine collection route at the catheter end (proximal disconnection) and separation at the end of the urine collection route (distant disconnection) revealed that CAUTI did not occur in the distant disconnection. From this, it was clarified that bacterial invasion into the bladder and the occurrence of CAUTI can be prevented by disconnecting the drainage tube at the most distal location from the bladder. Under the urine collection by the modified catheter method based on the above results, the incidence of CAUTI was 3.0% per catheterized day, and cows with CAUTI can be recovered by appropriate treatment. Those results enhanced the practicality of the catheter method. While the metabolism trials for three consecutive days by the conventional method and the catheter method revealed that milk productivity and digestibility did not differ between the two methods, the catheter method

achieved more accurate metabolism trials since the method can collect urine accurately with little loss. From those results, the catheter method has been positioned as a superior urine collecting means to the conventional method. Therefore, the targeted catheter method was developed. The CreMBW from the urine samples collected accurately using the catheter method was $123.94 \text{ mg/kg}^{0.75} \text{ BW} \cdot \text{day}$.

In chapter 4, the 24-h urine samples including daytime ones (1.5-h interval of 08:30–16:00: 1.5-h equivalent urine) were examined, using the catheter method developed in chapter 3. CreMBW differed among cows under the heat environment; however, it was constant throughout the day. When an estimation of the simulation was performed by using the formula and individual CreMBW, it was found that any 1.5-h equivalent urine has a feasibility of estimating the daily amount of total urinary nitrogen and allantoin. Therefore, the results suggested that daily amount of urinary components can be estimated by using the formula and each of individual cow's CreMBW even if cows were under heat environment or $123.94 \text{ mg/kg}^{0.75} \text{ BW} \cdot \text{day}$ as CreMBW even if under no-heat environment.

In chapter 5, a metabolism trial was conducted by the whole urine collection method to collect 24-h urine and the spot urine collection method collecting spot urine during the daytime to estimate 24-h urine by using the formula (CreMBW: $123.94 \text{ mg/kg}^{0.75} \text{ BW} \cdot \text{day}$). Either two diets were fed that did not meet methionine (Met) requirements or that met them by supplying rumen-protected Met (RPMet). The results of milk production, metabolism trial parameters, microbial nitrogen flow to intestines as amount indicator of synthesized MCP, and nitrogen balance were almost equivalent between the two urine collection methods. It was suggested that the formula was established even under the different diet conditions such as whether RPMet was supplied or not, as there was no difference in CreMBW between the feeds.

The above results showed that the estimation method for the urinary amount of total nitrogen and allantoin in the 24-h urine was developed by collecting spot urine during the daytime as samples and using the formula ($\text{CreMBW}: 123.94 \text{ mg/kg}^{0.75} \text{ BW} \cdot \text{day}$). In conclusion, the simple method for assessment of protein nutritional status in lactating dairy cows was developed; the method can monitor the amount of synthesized MCP and of metabolized microbial amino acid, and optical status of dietary CP amount from urinary amount of total nitrogen.

第 1 章 緒論

酪農業をめぐる情勢

我が国は、「環太平洋パートナーシップに関する包括的及び先進的な協定」（TPP11）を 2018 年 3 月に、「経済上の連携に関する日本国と欧州連合との間の協定」（日 EU・EPA）を 2018 年 7 月に署名した。これに伴い、国産よりも安い畜産物の輸入量の増加が見込まれており、国内生産者の所得確保が懸念されている。一方、家畜飼養現場においては排泄物の堆肥化が求められているが、家畜糞尿に由来する地下水の硝酸態窒素汚染（倉持ら 1994）および飼料作物の硝酸態窒素含量の増加（飯島ら 1996）が危惧されている。1999 年には、「家畜排せつ物の管理の適正化及び利用の促進に関する法律」（平成 11 年法律第 102 号）が制定され、その目的の一つとして硝酸態窒素の排出抑制が含まれている。

このような背景から、今後の日本における畜産業は、価格の安い輸入畜産物に対抗するために生産費用を削減すると共に環境に配慮した飼養管理が求められている。

乳牛のタンパク質代謝

家畜に過剰に給与された粗タンパク質（crude protein: CP）は尿素に転換されて排出されるが、その際にエネルギーを浪費する（Dinn *et al.* 1998）。家畜の中でも乳牛は 1 頭当たりの窒素排泄量が多い。そのため、窒素給与量等の調節による窒素排泄量を抑制する飼養管理技術が報告されている（扇ら 1998、足立ら 2003）。特に乳生産において、飼料中の窒素は、生産される乳に対して約 2-3 倍が糞尿中に排出されるため（Broderick 2003）、飼料費削減につながる重要な要因と位置づけることができる。

農林水産省の統計によると、乳牛飼養頭数の減少により国内の生乳生産量は 2003 年次以降、前年割れで推移しており（農林水産省 2018）、慢性的な生乳不足が続いていたことが読み取れる。しかしながら 2 歳未満のホルスタイン種雌牛の飼養頭数は増頭傾向にあり、これらのウシが分娩時期を迎える 2019 年度からは、生乳生産量が増産に転じる見通

しとなっている（日刊酪農乳業速報 2019）。このことから、今後の乳牛飼養現場では環境に配慮した飼養技術が一層求められることが見込まれる。

ところで、乳牛に給与されるタンパク質は、分解性タンパク質（rumen-degradable protein: RDP）と非分解性タンパク質（rumen-undegradable protein: RUP）とに大別される（図 1-1）。RDP の多くは、ルーメン内でアンモニアに分解された後に微生物体粗タンパク質（microbial crude protein: MCP）となりルーメンから流出して十二指腸以下の下部消化管で吸収される。RUP の多くは、ルーメン内では分解されずに下部消化管で消化吸収される（松本 1996、河合 2006）。育種改良により泌乳量が増加しつつある今日の乳牛には、その乳量を支えるために、十分な RDP を給与して MCP 合成量を最大にし、不足したタンパク質およびアミノ酸を RUP に依存する必要性が示されている（National Research Council 2001a）。しかし、RDP を過剰に給与しても、MCP 合成量および乳量は増加せず、尿中の窒素化合物の排泄量が増加するだけである（Castillo *et al.* 2001、Hristov *et al.* 2004）。これは、RDP 過剰の場合は MCP 合成に利用されるアンモニアの割合が低下し、合成に利用されなかったアンモニアはルーメン粘膜で吸収されて肝臓で尿素等の窒素化合物として血中に放出され、腎臓から尿中に排泄されるからである（河合 2006）。血中尿素の一部は、乳中尿素態窒素（milk urea nitrogen: MUN）として乳中にも現れる。そのため MUN は、タンパク質摂取量と乳牛の体内での利用状況の指標となる（古村 2006a）。

タンパク質摂取量を下げること（Gordon & McMurray 1979）および RDP 摂取量を下げること（Westwood *et al.* 2000）で血中尿素窒素レベルを下げるができる。このレベルが下がることで受胎成績は高まり（Ferguson *et al.* 1993、Westwood *et al.* 2000）、一方、飼料中のタンパク質量が高まると繁殖成績は劣るとされている（National Research Council 2001a）。従って、飼料中の CP を有効利用することが重要といえる。

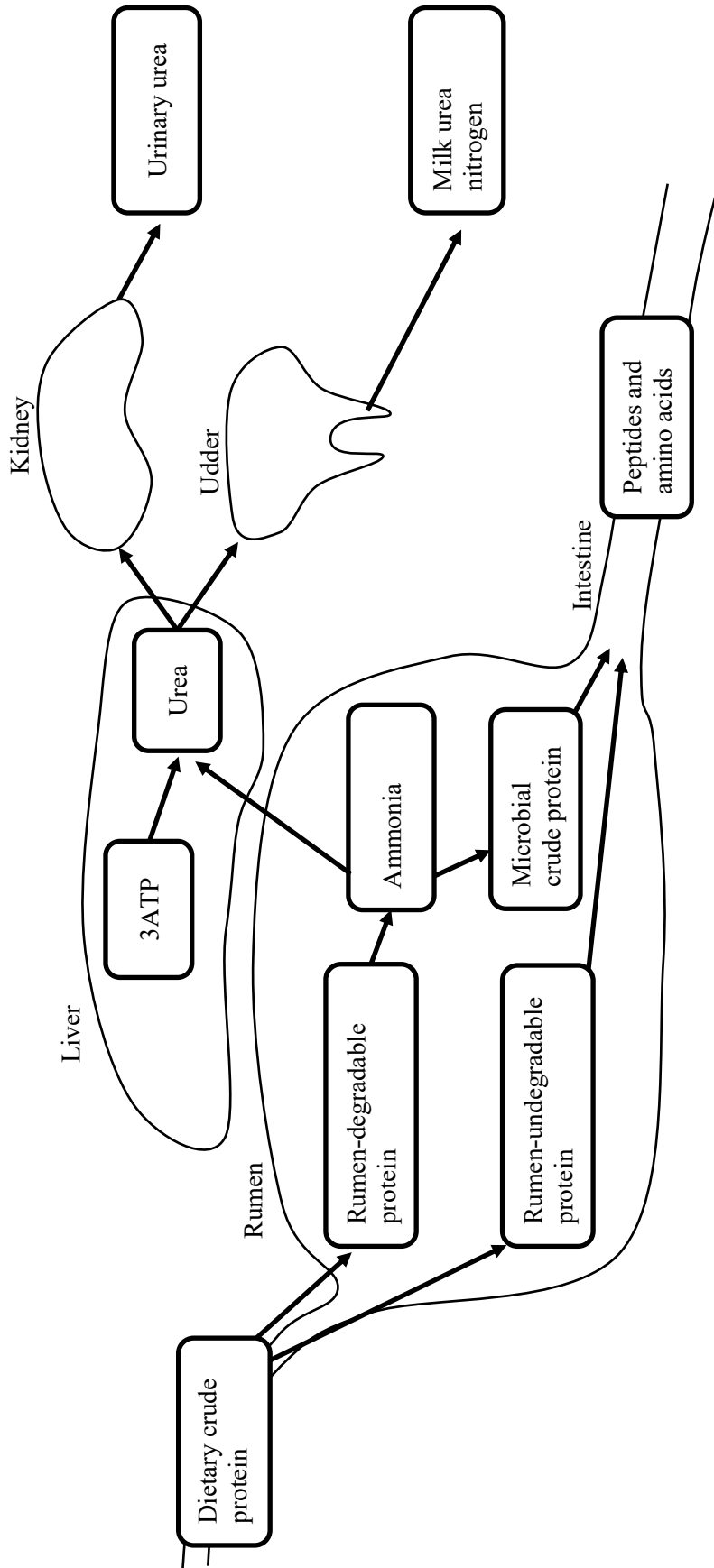


Figure 1-1. Schematic picture of protein metabolism.

アラントインによる微生物体窒素量の推定

飼料中の CP を十分に利用するには、MCP 合成量が最大となる飼料設計および飼料給与が重要であり、また設計した飼料が適正であるかをモニタリングすることも欠かすことができない。MUN は、乳を検体とするため容易に採取できるが、ルーメン内でのアンモニア生成量を推定するものであり、MCP 合成量をモニタリングする指標とはならない。また MUN は、生乳であることから検体が腐敗しやすく、測定時まで検体を冷蔵保管する必要があるという欠点もある。

MCP 合成量は直接測定できないため、消化管カニューレを利用した侵襲的方法で消化管内の内容物の流量から推定されている（松本 1996）。フィールドでの非侵襲的方法として、Topps & Elliott (1965) は、尿中のアラントインおよび尿酸が、飼料中タンパク質から MCP に合成される効率の指標となることを示唆している。また松本 (1996) は、尿中プリン塩基代謝物の排泄量が MCP 合成量の指標となることを紹介している。この方法は、ルーメン微生物がウシの消化管で吸収された後、微生物由来のアデニンおよびグアニンが、アラントイン、尿酸、ヒポキサンチンとして尿中に排泄されるため（図 1-2）、尿中のプリン塩基代謝産物量を測定することで MCP 合成量が推定できることが去勢雄ウシ、ヒツジ (Fujihara *et al.* 1987) およびヤギ (松本と板橋 1988) で報告されている。なお、飼料由来のプリン塩基はルーメン内で分解されるため、プリン塩基代謝産物の大半はルーメン微生物に由来し、MCP とプリン塩基との存在比は一定で、MCP 消化率は一定であり、また吸収されたプリン塩基は一定割合で代謝産物として尿中に排泄されることとされている。一方、プリン塩基代謝産物の多くはアラントインであるため、尿中アラントイン排泄量を測定することで MCP 合成量が推定できるだけでなく（藤原 2004）、ウシにおける MCP 代謝量も推定できるとされている（松本 1996）。

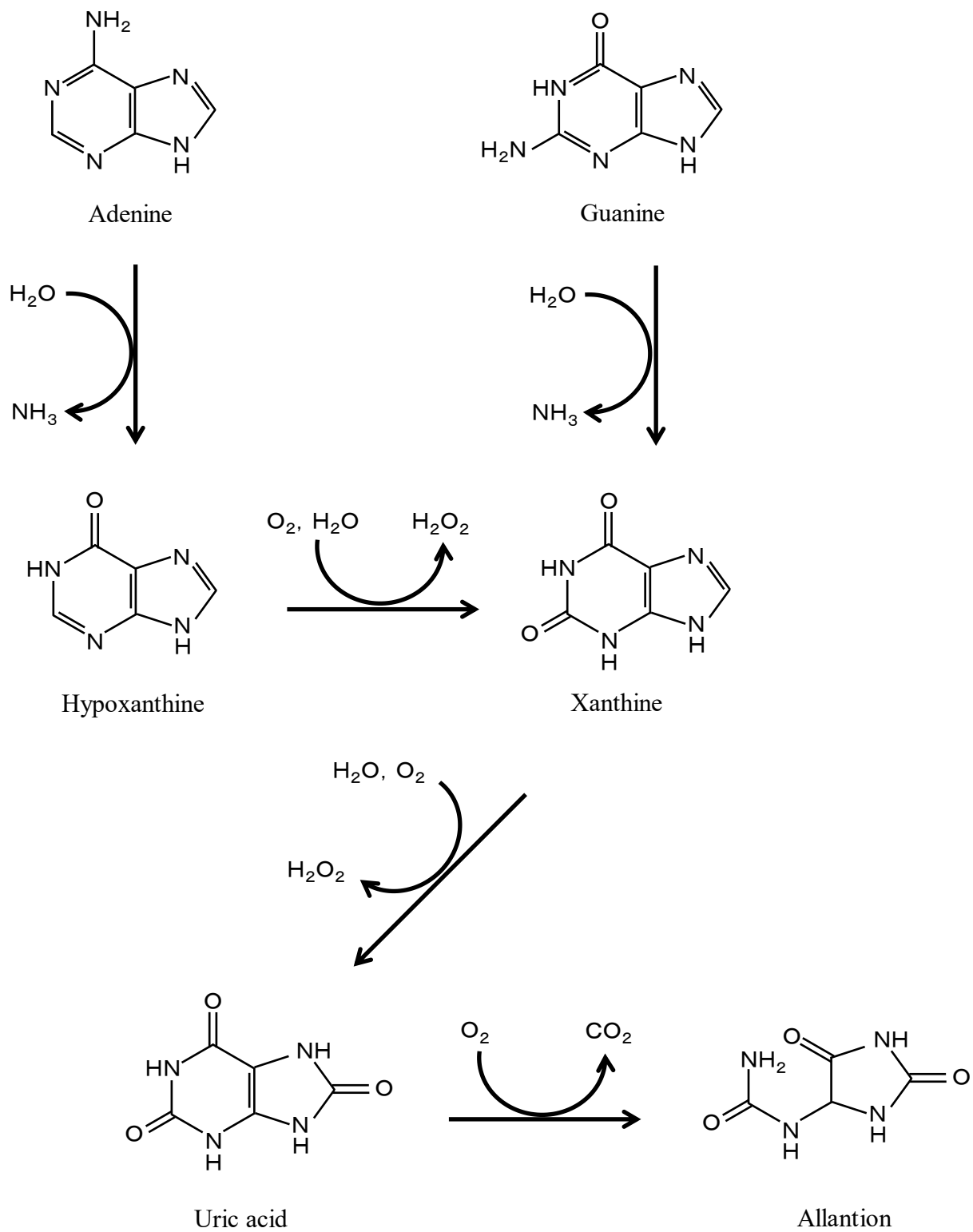


Figure 1-2. Catabolism of nucleic acid

クレアチニンを指標とした尿成分の推定と課題

尿中の総窒素量およびアラントイン量からタンパク質給与に関する栄養状態を把握するには、24 時間に排泄される尿（24 時間尿）を全て回収する必要があるため、乳牛の飼養現場での実施は容易ではない。

ヒトにおいては、尿中クレアチニンを指標として 24 時間尿中の成分量を推定する方法を Folin (1905) が提唱している。なお、河合ら (2001) はクレアチニンについて以下のように述べている。それは、クレアチニンは、筋肉内でクレアチンの一部が不可逆的に生成されたもので、腎臓から尿中に排泄される (図 1-3)。クレアチンは筋細胞内でクレアチンリン酸と平衡を保ち、筋収縮に必要なエネルギー源である ATP の供給に関係している。クレアチニン量は筋肉の総容積により著しい個人差がみられるが、次式で表されるクレアチニン係数は、ヒトにおいては個人差が少なく、同一人物では極めて一定した数値を示す。そのため、24 時間尿を採取する際に全量が回収されたか否かの判定に役立つ。そして、数時間の期間に排泄された肉牛 (Albin & Clanton 1966)、ブタ (Erb *et al.* 1970)、ヒツジ (Chen *et al.* 1995) および乳牛 (Valadales *et al.* 1999、Asai *et al.* 2005) の検体尿から、尿成分の排泄日量の推定した報告がこれまでもなされている。

$$\text{クレアチニン係数} = \text{クレアチニン排泄量 (mg/日)} / \text{体重 (kg)} \quad \dots\dots\dots \text{式}$$

しかしながら、作業が容易である日中に検体尿を採取して、総窒素およびアラントインの排泄日量の推定を通じたタンパク質栄養状態の判定法は未確立である。そこで本研究の目的は、これら尿成分の推定法を確立し、泌乳牛におけるタンパク質栄養状態の簡易判定法を開発することである。

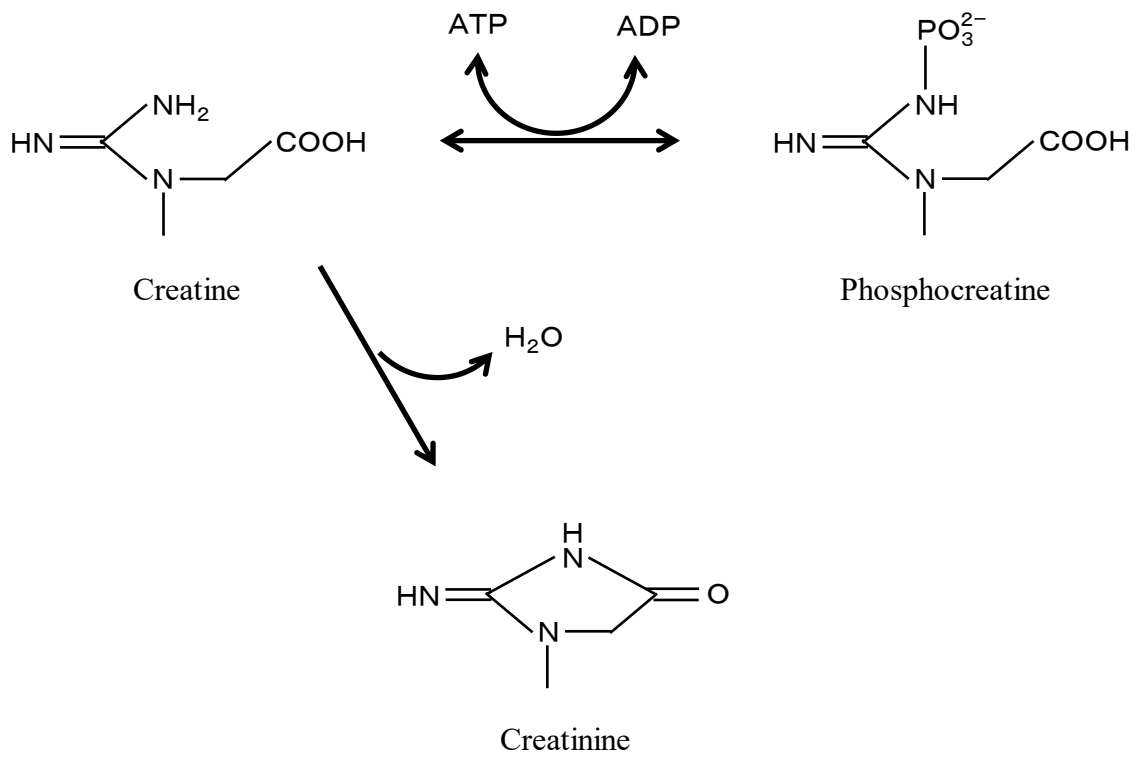


Figure 1-3. Dynamics of creatine, phosphocreatine and creatinine.

第 2 章 検体尿（4 時間尿）による尿成分の排泄日量の推定 に関する検証

2.1 緒言

数時間のうちに排泄された尿を検体尿として採取し、尿中クレアチニンを指示物質として尿成分の排泄日量の推定する方法を Folin (1905) が提唱している。これにより、反芻動物から検体尿を採取して尿成分の排泄日量の推定に関する多くの報告がなされている。Albin & Clanton (1966) は肉牛における総窒素の、Chen *et al.* (1995) はヒツジにおけるプリン誘導体の排泄日量の変化を調査している。また、ブタにおけるステロイド (Erb *et al.* 1970)、乳牛におけるアラントイン (Valadales *et al.* 1999) およびカリウム (Asai *et al.* 2005) の排泄日量の報告もされている。また、Albin & Clanton (1966) は、肉牛から検体尿を 1 日 1 回採尿する場合の採取時刻は、早朝あるいは夕方遅い時間帯を推奨している。

しかしながら、作業の容易な時間帯である日中に検体尿を採取して総窒素およびアラントインの排泄日量を推定する方法はこれまで報告されていない。そこで本章の目的は、日中の 4 時間のうちに排泄された尿 (4 時間尿) を検体尿として採取して、検体尿から泌乳牛の総窒素およびアラントインの排泄日量の推定の可能性を解明することである。

2.2 材料および方法

2.2.1 供試牛および飼養管理

東京都畜産試験場 (当時) の他、群馬県および長野県の公立畜産試験場で飼養している 2-5 産のホルスタイン種泌乳牛 7 頭 (年齢 : 3.3-7.3 歳、平均年齢 : 5.0 ± 1.5 歳、平均体重 : 677 ± 50 kg) を供試した。ウシの飼養管理は、「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」 (文部科学省 2006) に従った。供試牛は、自由に飲水できるようにし、後述する採尿時 (連続 3 日間) を除き、日中約 5 時間は給与飼料以外のものを摂取できない構造の運動場に放牧し、放牧時以外の時間帯はストールに繋留して飼料摂取が自由にできるようにした。

飼料は、採尿開始 3 週間前から、チモシー乾草、アルファルファ乾草および乳牛用配合飼料を乾物割合でそれぞれ 14.6%、14.6%および 70.8%として、完全混合飼料の形態で給与した。飼料の可消化養分含量は、日本飼養標準（農林水産省農林水産技術会議事務局 1999）の要求量を満たすように設計した。飼料は、午前中に 24 時間分の給与量を調製し、その 2/3 量を 15:00 に、残りを翌日 8:00 に給与した。泌乳最盛期を過ぎて乳量の増減が比較的安定して乳量の変化の影響を極力排除できると予見される分娩後 12-18 週のうちの連続 3 日間において、供試牛をストールに繋留して採尿を実施した。採尿期間中、体重は 1 回測定し、搾乳は 8:00 と 17:00 とに実施した。

2.2.2 採尿

供試牛の外陰部に尿採取器（三紳工業、神奈川）を装着して、自然排泄した尿を、20% (v/v) 硫酸を 60 mL 入れたタンクに回収した。タンクは、1 日 6 回（00:00、04:00、08:00、12:00、16:00 および 20:00）交換した。回収した 4 時間尿の重量を測定した後、サンプル（約 20 mL）を採取し、分析時まで -20°C で凍結保存した。なお、ウシの起床行動や排便行動により尿採取器の位置が外陰部から移動するため、少なくとも 2 時間に 1 度、装着位置を調整した。

2.2.3 尿分析

凍結保存した尿サンプルは、解凍した後、沈殿物を超音波発生装置（BRANSON SONIFIRE ; Model 450、セントラル科学貿易、東京）で破碎した。破碎は、20 kHz、400 W でサンプル 20 mL 当たり約 20 秒とした。

サンプル中のクレアチニン濃度は、Jaffe 法を基にした分析キット（クレアチニン-テストワコー、和光純薬工業、大阪）を用いて分析した。アラントイン濃度は Young & Conway の方法（1942）により測定した。総窒素濃度はケルダール法（阿部 1988）で分析した。

クレアチニン、アラントインおよび総窒素の排泄日量は、各 4 時間尿のそれらの濃度に尿容積を乗じて求めた。尿容積は、尿重量を尿比重で補正した。

2.2.4 統計解析

クレアチニン排泄日量は、一元配置の分散分析法で検定した。各 4 時間尿の時間帯間の差は Tukey 法で検定した。総窒素およびアラントイン排泄日量の実測値 (X) に対する推定値 (Y) の回帰性に関しては、回帰式 ($Y = aX+B$) をそれぞれ求め、 $a \neq 1$ および $b \neq 0$ とする帰無仮説の検定 (横内 1984) をした。いずれの検定においても、有意水準が 5%未満の場合は有意差があるものとした。

2.3 結果

尿採取器内に糞が混入し、尿に糞が混入することがあった。このような尿は、できる限り糞を取り除いた。

2.3.1 クレアチニン排泄日量

体重当たりの尿中クレアチニン排泄日量 (CreBW) は 21.0 ± 1.9 mg/kg BW・日、代謝体重当たりの尿中クレアチニン排泄日量 (CreMBW) は 107.2 ± 8.5 mg/kg^{0.75} BW・日であった。CreBW および CreMBW は、いずれも個体間および採尿日間に差は認められなかった ($P > 0.05$)。

表 2-1 に、個体間 (供試牛 7 頭間のデータ)、採尿日間 (試験日 3 日間のデータ) および全体 (7 頭 3 日間のデータ) における CreBW および CreMBW の変動係数を示した。全体の変動係数は、CreBW に対して CreMBW が小さかった。CreBW および CreMBW のいずれの変動係数も、全体が最も大きく、次いで個体間、採尿日間の順に小さかった。

2.3.2 クレアチニン、アラントインおよび総窒素の濃度の日内変動

クレアチニン、総窒素およびアラントインの濃度推移を表 2-2 に示した。クレアチニンおよび総窒素の濃度は、16:00-20:00 と 00:00-04:00 および 20:00-24:00 とに有意差が認

Table 2-1. Coefficient of variation (%) of daily excretion of creatinine in the urine

Item	Cow (<i>n</i> =7)	Day (<i>n</i> =3)	Cow×Day (<i>n</i> =21)
Creatinine, mg/kg BW·day	5.9	3.0	8.9
Creatinine, mg/kg ^{0.75} BW·day	4.0	3.0	7.9

Table 2-2. Diurnal variation in the concentration of creatinine, total nitrogen, and allantoin in the urine¹⁾

Time of day	Creatinine (mg / dL)	Total nitrogen (mg / dL)	Allantoin (mg / dL)
00:00-04:00	81 ± 20 ^a	728 ± 194 ^a	417 ± 77
04:00-08:00	98 ± 27 ^{ab}	818 ± 199 ^{ab}	494 ± 110
08:00-12:00	93 ± 17 ^{ab}	883 ± 244 ^{ab}	465 ± 133
12:00-16:00	101 ± 30 ^{ab}	862 ± 165 ^{ab}	465 ± 97
16:00-20:00	107 ± 30 ^b	986 ± 275 ^b	496 ± 131
20:00-24:00	84 ± 21 ^a	785 ± 167 ^a	415 ± 97
00:00-24:00	86 ± 5 ^{ab}	908 ± 148 ^{ab}	484 ± 39

1) Values are mean ± standard deviation.

^{ab}Means in the same column with the same superscript are not significantly different ($P < 0.05$).

められ ($P < 0.05$)、16:00-20:00 が 24 時間のうちで最も高かった。クレアチニン、アラントインおよび総窒素の濃度はいずれも、08:00-12:00 および 12:00-16:00 の 4 時間尿と、他の 4 時間尿および 24 時間尿とに差は認められなかった ($P > 0.05$)。

総窒素濃度/クレアチニン濃度比 (N/C 比)、およびアラントイン濃度/クレアチニン濃度比 (A/C 比) の推移を表 2-3 に示した。N/C 比および A/C 比のいずれも、4 時間尿間に差は認められず ($P > 0.05$)、また、各 4 時間尿と 24 時間尿とにも差は認められなかった ($P > 0.05$)。

2.4 考察

2.4.1 クレアチニン排泄日量

乳牛の CreBW について、Erb *et al.* (1977) は分娩前 28 日では 22.6 mg/kg BW・日、分娩後 20-60 日では 19.6-21.2 mg/kg BW・日と報告し、Asai *et al.* (2005) は分娩前 4 週では 22.8 ± 1.2 mg/kg BW・日、分娩前 1 週では 22.4 ± 1.0 mg/kg BW・日と報告している。本章における分娩後 12-18 週の CreBw (21.0 ± 1.9 mg/kg BW・日) がこれらの報告値の範囲内であることから、分娩前 4 週-分娩後 18 週の CreBW は一定と考えられた。

クレアチニンは筋肉に含まれるクレアチンリン酸の代謝産物であるため (河合ら 2001)、その排泄量は筋肉量および筋肉の代謝速度の影響を受ける。本章の供試牛の年齢が 3.3-7.3 歳であることから、筋肉の代謝速度および体重に占める筋肉量が年齢により異なり、その影響が個体間の変動係数に反映していると示唆される。また、これらの影響は代謝体重を利用することで補正されるため、全体の変動係数は CreBW に対して CreMBW が小さくなったと示唆される。このことから、CreMBW ($107.2 \text{ mg/kg}^{0.75} \text{ BW} \cdot \text{日}$) を利用することで、クレアチニン排泄日量 (mg) を正確に推定する式 2-1 が成立する。

$$C = 107.2 \times MBW \quad \dots\dots\dots \text{式 2-1}$$

ここで、

Table 2-3. Diurnal variation in the concentration ratio of total nitrogen / creatinine, and allantoin / creatinine in the urine¹⁾

Time of day	Total nitrogen/Creatinine (mg/dL per mg/dL)	Allantoin/Creatinine (mg/dL per mg/dL)
00:00-04:00	9.1 ± 1.9	5.2 ± 0.7
04:00-08:00	8.7 ± 1.9	5.2 ± 1.0
08:00-12:00	9.6 ± 2.4	4.9 ± 0.9
12:00-16:00	9.0 ± 2.4	4.7 ± 0.9
16:00-20:00	9.4 ± 2.2	4.7 ± 0.7
20:00-24:00	9.8 ± 3.0	5.0 ± 0.7
00:00-24:00	9.3 ± 1.8	5.0 ± 0.7

1) Values are mean ± standard deviation.

C : 尿中クレアチニンの排泄日量 (mg)

MBW : 代謝体重 ($\text{kg}^{0.75}$)

である。

2.4.2 クレアチニン、アラントインおよび総窒素の濃度の日内変動

Albin & Clanton (1966) はクレアチニン濃度および総窒素の濃度は午後にピークとなること、および、これらの比は4時間尿間で一定となることを報告しており、これらのことは本章の結果と一致する。このことから、本章におけるクレアチニン濃度および総窒素濃度の4時間尿間における有意な変化は、生理的な日内変動と示唆される。

4時間尿間の N/C 比および A/C 比に有意な変化がないことから ($P > 0.05$)、式 2-2 が成立する。そして、式 2-1 および式 2-2 から式 2-3 が成立し、この式 2-3 を利用することで尿中の総窒素あるいはアラントインの排泄日量が推定できる可能性がある。 N/C 比および A/C 比は飼料給与時刻であっても有意な変化を示さないことから ($P > 0.05$)、式 2-3 は飼料給与時刻の影響を受けないといえる。なお、式 2-3 を一般化して式 2-4 として表すことができる。

$$X/C = x/c \quad \dots\dots\dots \text{式 2-2}$$

$$X = x/c \times 107.2 \times MBW \quad \dots\dots\dots \text{式 2-3}$$

$$X = x/c \times CreMBW \times MBW \quad \dots\dots\dots \text{式 2-4}$$

ここで、

X : 尿中の総窒素 (あるいはアラントイン) の排泄日量 (mg)

C : 尿中のクレアチニン排泄日量 (mg)

x : 検体尿 (本章においては4時間尿) 中の総窒素 (あるいはアラントイン) 濃度 (mg/dL)

c : 検体尿 (本章においては4時間尿) 中のクレアチニン濃度 (mg/dL)

$CreMBW$: 代謝体重当たりのクレアチニン排泄日量 ($\text{mg}/\text{kg}^{0.75} \text{ BW} \cdot \text{日}$)

MBW : 代謝体重 ($\text{kg}^{0.75}$)

である。

2.4.3 推定シミュレーション

08:00-12:00 および 12:00-16:00 の 4 時間尿データを式 2-3 に入力して、総窒素およびアラントインの排泄日量の推定値を求めた。これらの推定値と実測値との関係を図 2-1 および図 2-2 に示した。総窒素の推定値と実測値との相関は、08:00-12:00 の 4 時間では $r = 0.897$ と有意に高く ($P < 0.001$)、12:00-16:00 の 4 時間尿も $r = 0.816$ と有意に高かった ($P < 0.001$)。アラントインの推定値と実測値との相関は、08:00-12:00 の 4 時間では $r = 0.750$ とやや低いものの有意であり ($P < 0.001$)、12:00-16:00 の 4 時間尿では $r = 0.881$ と有意に高かった ($P < 0.001$)。

図 2-1 および図 2-2 に示した実測値 (X) に対する推定値 (Y) の回帰性は有意であると判定された。以上のことから、式 2-3 により、日中の 4 時間尿 (08:00-12:00 あるいは 12:00-16:00) から総窒素およびアラントインの排泄日量の推定が可能であることが明らかになった。

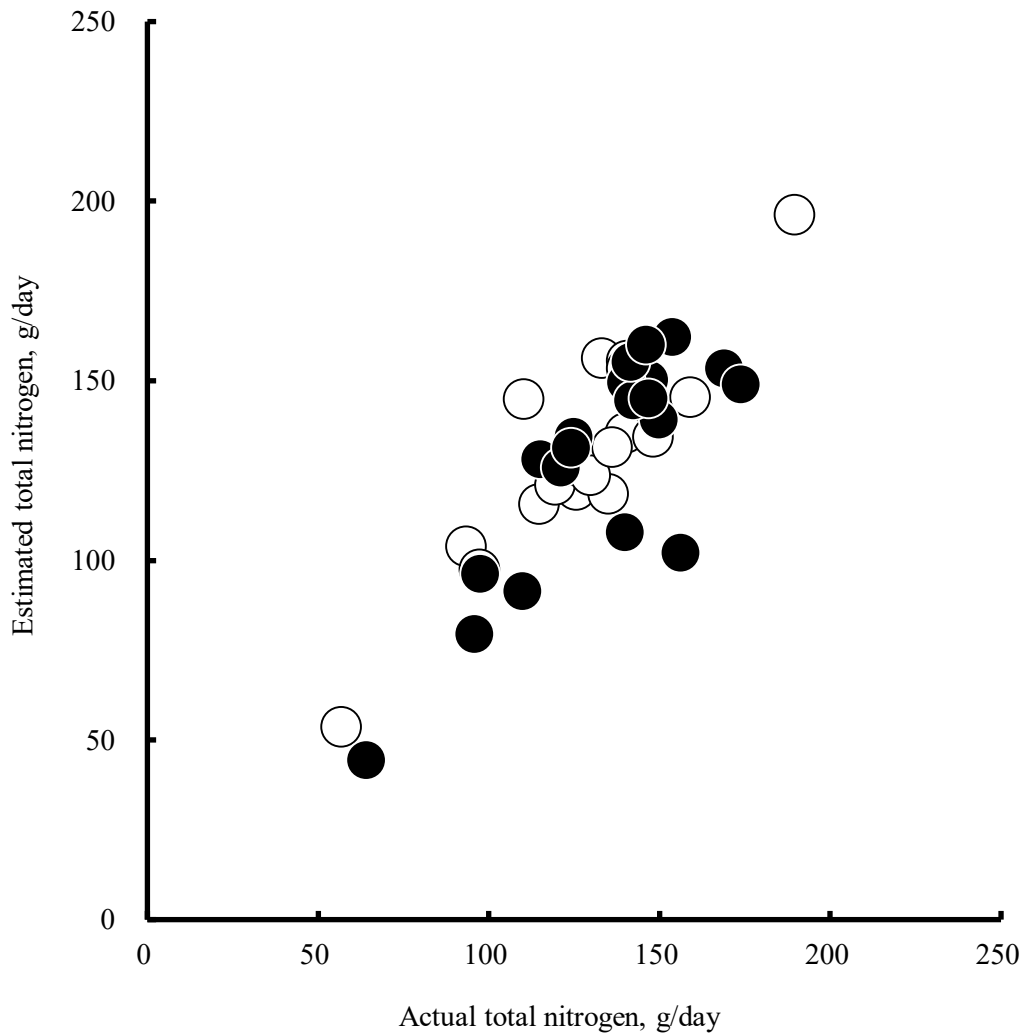


Figure. 2-1. Relationship between the actual daily excretion of total nitrogen (g/day) in the urine and the estimated one using the 4-h urine excreted between 08:00 and 12:00 (○: $r = 0.897$, $P < 0.001$, $n = 21$) or 12:00 and 16:00 (●: $r = 0.816$, $P < 0.001$, $n = 21$). Each point represents the data of a cow.

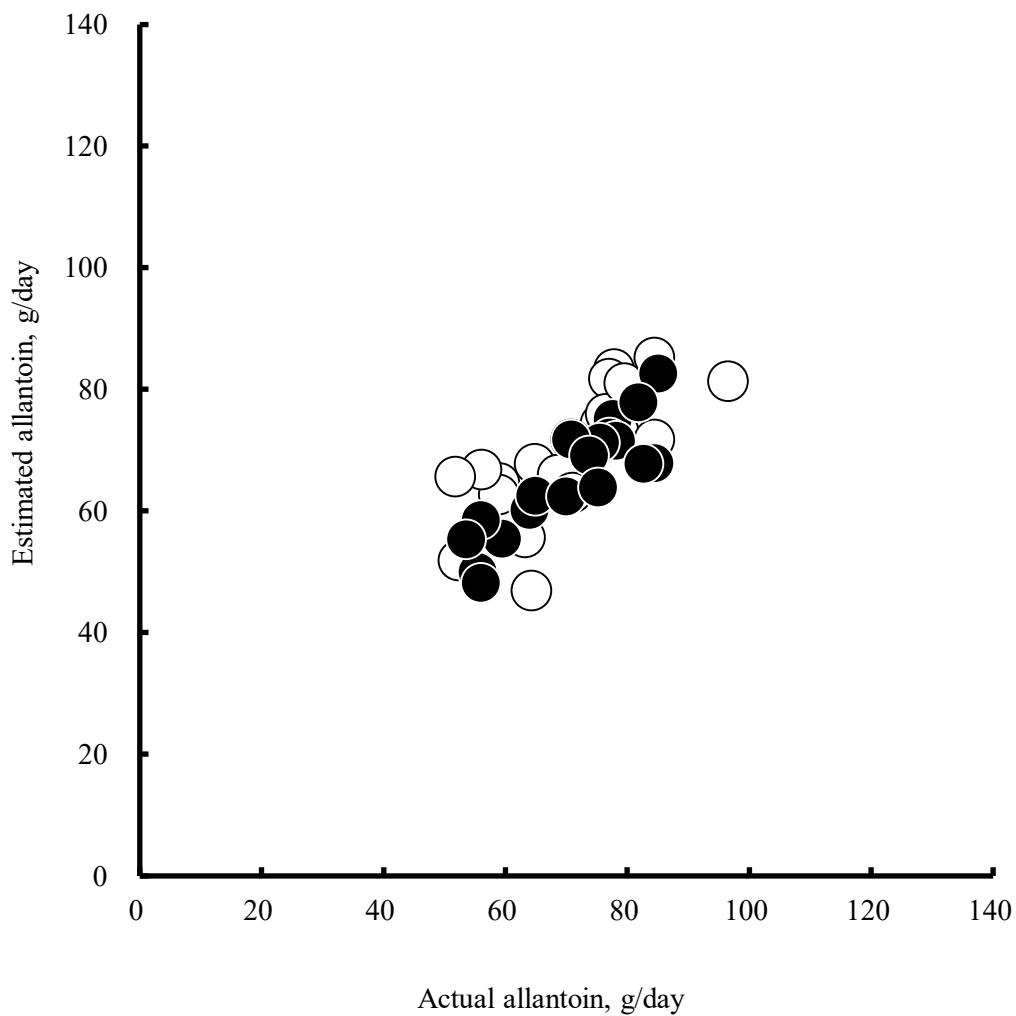


Figure 2-2. Relationship between the actual daily excretion of allantoin (g/day) in the urine and the estimated one using the 4-h urine excreted between 08:00 and 12:00 (○: $r = 0.750$, $P < 0.001$, $n = 21$) or 12:00 and 16:00 (●: $r = 0.881$, $P < 0.001$, $n = 21$). Each point represents the data of a cow.

2.5 小括

4時間のうちに排泄された泌乳牛の尿（4時間尿）を採取し、尿中クレアチニン、総窒素およびアラントインの濃度を調査した。総窒素/クレアチニン濃度比、およびアラントイン/クレアチニン濃度比は1日を通じてほぼ一定であった。代謝体重当たりの尿中クレアチニン排泄日量（*CreMBW*）は $107.2 \text{ mg/kg}^{0.75} \text{ BW}\cdot\text{日}$ であった。これらのことから、式 [推定尿中総窒素（あるいはアラントイン）排泄日量（mg） = 4時間尿の総窒素（あるいはアラントイン）濃度（mg/dL） / 4時間尿のクレアチニン濃度（mg/dL） × *CreMBW* × 代謝体重（ $\text{kg}^{0.75}$ ）] が導かれた。この式により算出された推定値と実測値との間に有意な相関が認められ（ $r > 0.750$ ）、また、実測値 = 推定値と判断された。以上により、前記式を用いることで日中の4時間尿（08:00-12:00 または 12:00-16:00）から総窒素およびアラントインの排泄日量の推定が可能であることが明らかになった。

第 3 章 バルーンカテーテルを用いた採尿法の開発

第2章では4時間尿を検体尿とすることで24時間尿が推定できることが明らかになった。しかしながら、第2章での4時間尿は4時間のうちに自然排泄した尿を4時間貯留した検体尿であり、膀胱内に4時間貯留した尿と同一とはいえない。24時間尿の推定精度は高く、かつ作業労力は少ないという理想的な検体尿は、乳牛の鼠径部を圧迫刺激すること等により人為的に排尿させて採取したものである。そのためには、その採取時間帯および膀胱内に何時間貯留した尿を検体尿とするかを明らかにする必要がある。また、膀胱内に貯留した尿を人為的に規定の時間に緻密に、かつとりこぼしなく正確に採尿することが求められる。

鼠径部の圧迫刺激による採尿は、規定の時間帯に採取できるが、排尿直前および排尿終了間際に尿の勢いが衰えるため、尿の取りこぼしが発生して検体尿の回収精度が低下する可能性があるため、適正な採尿法とはいえない。

バルーンカテーテル（カテーテル）を乳牛の膀胱に留置し、カテーテルと採尿バッグとを採尿チューブで接続して採尿するカテーテル採尿法をCunningham *et al.* (1955) およびCrutchfield (1968) は試みている。この採尿法は、膀胱内に貯留した尿を人為的に規定の時間に緻密に、異物を混入させることなく採取できる。また、とりこぼしを減らして正確に採尿できる可能性もある。

カテーテル採尿法による乳牛の飼養研究は数多く（Gressley & Armentano 2005、Hristov *et al.* 2000、Knowlton *et al.* 2002）報告されている。しかしながら、乳牛に対するカテーテル採尿法は、適正なバルーン容量、カテーテル関連尿路感染症（catheter-associated urinary tract infection: CAUTI）の防止策、CAUTIの発生率が不明、尿採取器により採尿する従来採尿法と同様の採尿手段といえるか未検証という課題がある。そこで本章では、これらの課題を解決することを目的とした。

第1節 最適なバルーン容量の検討

3.1.1 緒言

ヒトにおいては、バルーンの大いカテーテルを使用することは膀胱に損傷を与えられている (Robinson 2001)。バルーン容量に起因するリスクには CAUTI も含まれており、バルーン容量と CAUTI との関係が数多く検討および報告されている (Anderson 1979、Pomfret 2000、Robinson 2001)。しかし、乳牛の採尿に関して、Crutchfield (1968) はバルーン容量 75 mL のカテーテルを利用し、一方、Cunningham *et al.* (1955) はバルーン容量 50-75 mL を利用している。そして、バルーン容量に関して十分に検討されないまま、75 mL のカテーテルが多くの研究 (Birkelo *et al.* 2004、Burkholder *et al.* 2004、Erb *et al.* 1977) で利用されている。

本節では、バルーン容量の小さいカテーテルを利用することでバルーンが膀胱壁に接する面積が減少し、膀胱への損傷が低減するという仮説を立てた。この仮説を立証するために、従来サイズ (75 mL) とそれよりも小さいサイズ (30 mL および 45 mL) のカテーテルを留置して膀胱への影響を比較し、ウシにとって最適なバルーン容量を明らかにすることを本節の目的とする。

3.1.2 材料および方法

東京都農林総合研究センターで飼養しているホルスタイン種乾乳牛 21 頭を用意し、3 種のカテーテル (3.1.2.1 参照) を留置して、(1) カテーテルによる血尿 (カテーテル関連潜血) の発生率の調査、(2) 膀胱損傷の病理学的調査を実施した。ウシの飼養管理は、「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」(文部科学省 2006) に従った。供試牛はストールに繋留し、飼料摂取および飲水が自由にできるようにした。

病理学的調査は2004年12月から2005年8月に実施した。実施にあたり試験計画を策定し、その計画は、東京都畜産試験場（2004年当時）の獣医師を含む試験研究の専門家3名により、特に、（1）研究目的は適正であるか、（2）動物の頭数は最小限度であるか、（3）動物に必要以上の苦痛を与えていないかという基準等の精査を受け、承認された。更に調査は、「動物の愛護及び管理に関する法律」（昭和48年法律第105号）を遵守した。なお、動物に耐えがたい苦痛があると認めた場合は、獣医師指導のもと、人道的エンドポイントを設定した。

3.1.2.1 カテーテル関連潜血の調査

乾乳牛21頭を7頭毎に3区に分けた。各区のウシに、バルーン容量の異なる3種のカテーテルのいずれかを留置する計画とした。3種カテーテルは、従来サイズ（NBカテーテル：ヘマチュリアバルーンカテーテル；ヘマチュリア ストレート ラウンドチップ；70 mL；24 Fr、クリエイトメディック、神奈川）、極小サイズ（XSBカテーテル：オールシリコーンバルーンカテーテル；30 mL；24 Fr、ニプロ、大阪）および小サイズ（SBカテーテル：ノルタバルーンカテーテル；24 Fr；30 mL；最大容量45 mL、テルモ、東京）とし、それぞれNB区、XSB区およびSB区とした。カテーテルは後述する方法（3.1.2.3参照）で留置し、3日間連続で採尿を実施した。カテーテル挿入以後にウシがカテーテル留置による異常行動を示した場合、カテーテルの留置を中止し、また、異常行動を示した区での調査は中止した。

カテーテル留置日（d 1）を1日目としたとき、カテーテル留置4日目（d 4）に採尿チューブと採尿バッグとの接続部（図3-1-1、採尿チューブ遠位部）より検体尿を採取し、その後にカテーテルを抜去してカテーテルの留置を終了した。検体尿は尿沈渣法（Fuller *et al.* 2001）で検査し、400倍視野での赤血球数（red blood cell/high powered field: RBC/HPF）をカウントした。カテーテルを留置したヒトの90%が50 RBC/HPF以上

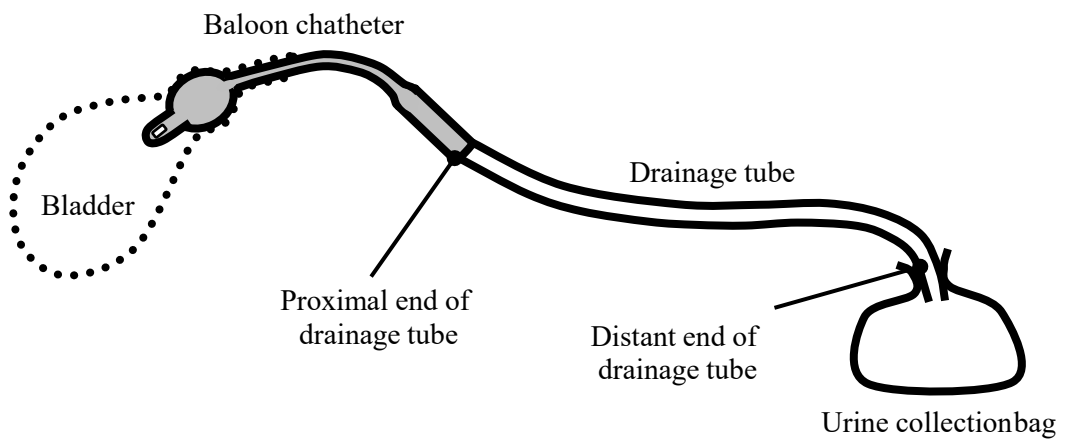


Figure 3-1-1. Schematic picture of the route of urine collection

であることから (Petursson & Weintraub 1975) 、この数値以上であった個体をカテーテル関連潜血とした。

3.1.2.2 膀胱損傷の病理学的調査

カテーテル関連潜血の調査直後 (d 4) 、各区からウシ 1 頭ずつを安楽殺し、膀胱を剖検した。ウシの安楽殺は、ウシの頸静脈にペントバルビタールナトリウム製剤 (ソムノペンチル、共立製薬、東京) を静脈注射した後、放血により実施した。

採取した膀胱は、膀胱突から外尿道口までの腹側を切開し、膀胱内部を観察した。また、膀胱壁を採取し、緩衝ホルマリン液で固定し、パラフィン包埋ブロックを作成した。その後、切片標本を作成し、光学顕微鏡で検査した。

また、膀胱内でのバルーンの位置を確認するために、カテーテルを留置していないウシ 1 頭を上記方法で安楽殺した。そして膀胱を採取し、そこに各カテーテルを留置して膀胱内を観察した。

3.1.2.3 カテーテルの留置

カテーテルの留置は、様々な方法 (Birkelo ら 2004、Center for Disease Control and Prevention 1981、Cunningham ら 1955、Weinstein 2005) に基づいて実施した。なお、それ以外の特別な方法は次のとおりである。

留置操作を容易にするために、全てのウシに 3-5 mL の 2%塩酸リドカイン (キシロカイン注射液 2%、アストラゼネカ、大阪) で尾椎硬膜外麻酔を施した。肛門および外陰部を石鹼を使用して洗浄した後に 0.01%逆性石鹼液 (塩化ベンザルコニウム液、武田薬品、大阪) で消毒した。膣鏡を用いて外尿道口を 0.01%逆性石鹼液で消毒した後、カテーテルはスタイレットを用いて膀胱に挿入した。腹腔内圧が陰圧であることに伴い膀胱内圧も陰圧となっている。そのため、カテーテルが膀胱内に到達すると同時にカテーテルを通じて外気が膀胱内に吸引される。この現象により、外気中の細菌が膀胱内に侵入、および膀胱内の尿の排液作用の阻害の可能性があるため、外気が膀胱内に侵入するのを防止するため

に、カテーテル挿入後、速やかにカテーテル端を鉗子で閉鎖した。バルーンは、滅菌蒸留水で最大容量まで拡張した。カテーテル端には、採尿チューブ（ビニールチューブ）および採尿バッグ（ビニール袋：45 L）をこの順で接続した（図 3-1-1）。採尿チューブは予め 0.01%逆性石鹼液を満たした。採尿チューブの長さは、外陰部から採尿バッグまでの距離に加えて、ウシがストール内で採食および飲水行動をしても採尿に支障のない長さ（3 m）とした。採尿経路の密閉性を高めるために、カテーテル端と採尿チューブとの接続部（図 3-1-1、採尿チューブ近位部）に耐水性シール（パラフィルム、Bemis、ウィスコンシン）を巻いた。採尿チューブを接続した後、カテーテル端の閉鎖を解除した。採尿バッグには予め 20%（v/v）硫酸を加えた。カテーテルは、膀胱から引き出される方向に採尿チューブの自重による力が加わる。この力を低減するために、カテーテル接続側の採尿チューブ近辺をウシの鼠径部に絆創膏で接着した。採尿バッグは毎日交換した。

3.1.2.4 統計処理

3 区間におけるカテーテル関連潜血の発生率について、SAS を用い、Fisher の正確確率検定を両側検定で検定した。有意水準が 5%未満の場合は有意差があるものとした。

3.1.3 結果

尾椎硬膜外麻酔の効果はカテーテルを留置してから約 3 時間後に全てのウシで消失した。XSB 区における最初の 1 頭で、留置 2 日目に、尾で外陰部を激しくはたく、臀部を左右に揺する等、カテーテル留置による異常行動が発見されたので、直ちに、採尿し、カテーテルを抜去した。そして、XSB 区での調査は中止した。NB 区および SB 区では、異常行動を示したウシは全頭で発見されなかった。

3.1.3.1 カテーテル関連潜血

XSB 区における尿中赤血球数のデータは 1 頭分のみ記録でき、d 1 では 3 RBC/HPF 未満、留置 2 日目では 500 RBC/HPF 以上であった。NB 区および SB 区における尿中赤血球数

を表 3-1-1 に示した。d 1 では、NB 区および SB 区のいずれにおいても尿中赤血球数は 3 RBC/HPF 未満であり、カテーテル関連潜血ではなかった。d 4 では、NB 区で 5 頭が 100 RBC/HPF を越えており、カテーテル関連潜血となった。一方 SB 区では、3 頭が 14-36 RBC/HPF となったが、カテーテル関連潜血となった個体はみられなかった。

d 4 におけるカテーテル関連潜血の発生率は、NB 区で 71.4% (7 頭中 5 頭が陽性)、SB 区で 0.0% (7 頭中 7 頭が陰性) となり、両区で有意差が認められた ($P = 0.030$)。

3.1.3.2 病理学的調査

NB 区および SB 区の d 4 での膀胱内壁を図 3-1-2 に示した。NB 区では、尿管柱 (columnae uretericae) および尿道稜 (urethral crest) で出血が認められ、また膀胱突 (apex of bladder) で充血が認められた。SB 区では、尿管柱および尿道稜で出血が認められ、また膀胱頸 (bladder neck) で出血斑が認められた。出血範囲は SB 区に対して NB 区が広域であった。

SB 区における出血部の膀胱壁断面の顕微鏡像を図 3-1-3 に示した。NB 区および SB 区のいずれにおいても粘膜固有層に出血を認めたが、両区の顕微鏡所見に組織学的な大差は無かった。

カテーテルを留置したことの無いウシの膀胱に NB カテーテルおよび SB カテーテルを留置した際の膀胱内の状態を図 3-1-4 に、この膀胱を図 3-1-2 と同様に切開してバルーンの留置を再現した状態を図 3-1-5 に示した。いずれのカテーテルにおいてもバルーンは膀胱頸に位置しており、バルーンと膀胱との接触面は SB カテーテルに対して NB カテーテルが広域であった。

3.1.4 考察

XSB 区で 1 頭が異常行動を示したこと、この個体の留置 2 日目の尿中赤血球数が高値 (500 RBC/HPF 以上) であることから、バルーン容量 30 mL のカテーテルはウシには不適

Table 3-1-1. Results of hematuria testing¹⁾

	Catheter group	Period	
		d 1	d 4
Cow 1	NB	< 3	3
Cow 2	NB	< 3	45
Cow 3	NB	< 3	> 100
Cow 4	NB	< 3	> 100
Cow 5	NB	< 3	> 100
Cow 6	NB	< 3	> 100
Cow 7	NB	< 3	> 500
Cow 8	SB	< 3	< 3
Cow 9	SB	< 3	< 3
Cow 10	SB	< 3	< 3
Cow 11	SB	< 3	< 3
Cow 12	SB	< 3	14
Cow 13	SB	< 3	22
Cow 14	SB	< 3	36

1) Value is urinary red blood cell/high powered field.

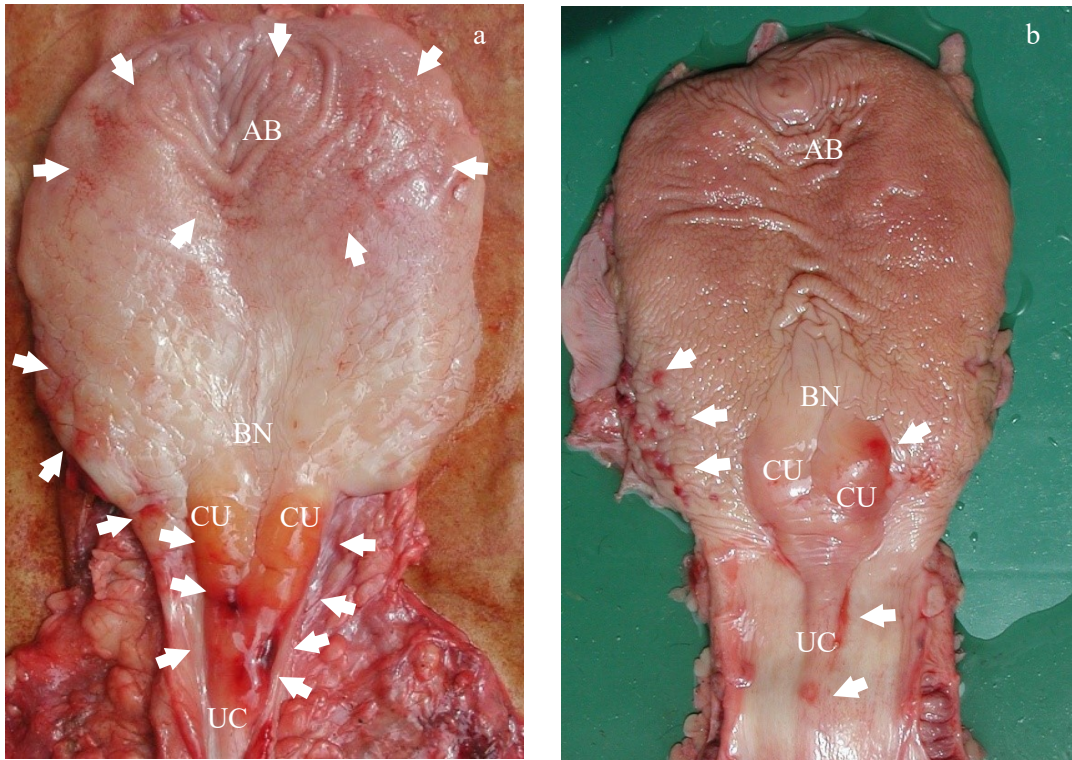


Figure 3-1-2. Macro-scale photograph of a bladder in which the catheter was inserted: (a) bladder in the NB catheter group, (b) bladder in the SB catheter group, (AB) apex of bladder, (BN) bladder neck, (CU) columnae uretericae, (UC) urethral crest. Arrows indicate bleeding.

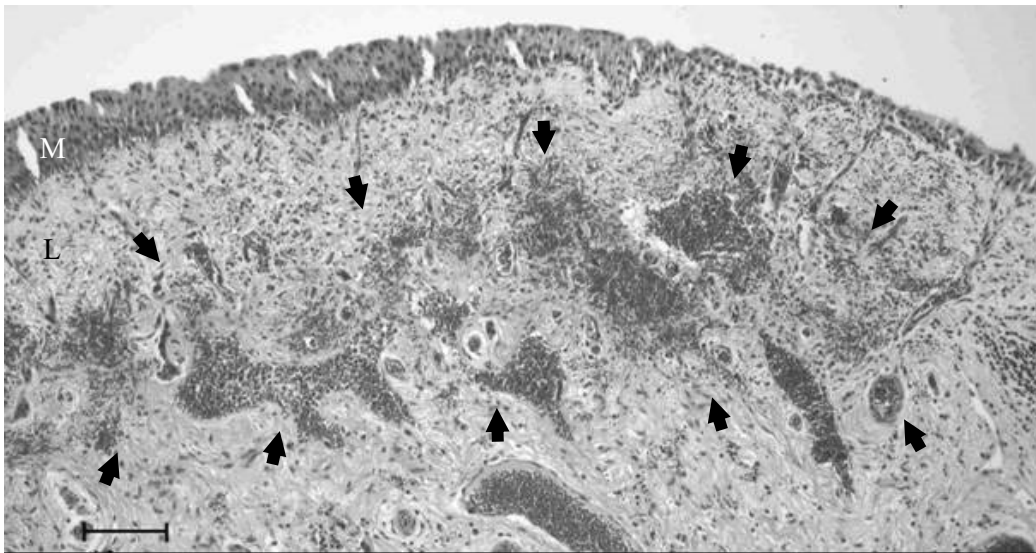


Figure 3-1-3. Micrograph of the cross-section of the SB-catheterized bladder (hematoxylin–eosin stained): (L) lamina propria mucosa, (M) mucosal epithelium. Arrows indicate bleeding. The magnification bar represents 10 μm .

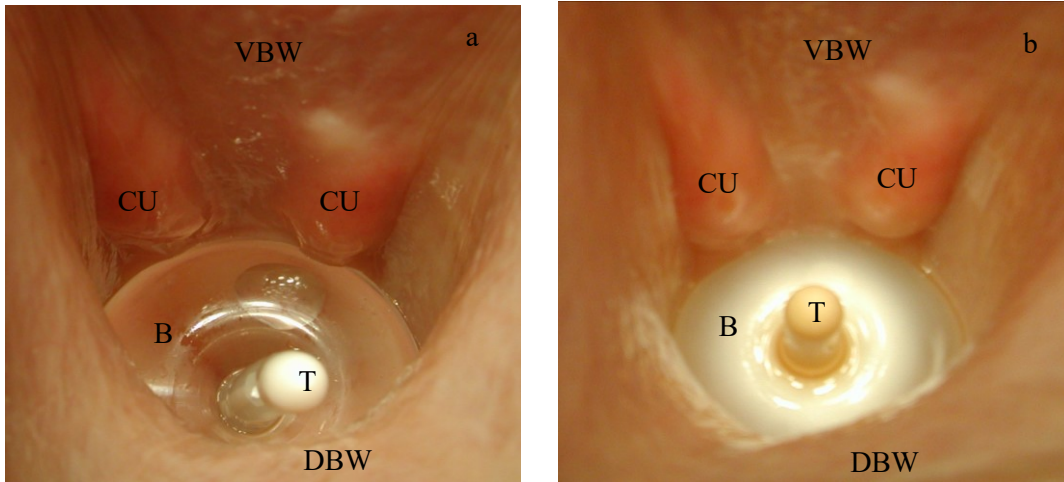


Figure 3-1-4. Inner view from apex of bladder to neck of bladder. Each bladder was identical; none had ever been catheterized: (a) a bladder catheterized with NB catheter, (b) a bladder catheterized with SB catheter, (B) balloon, (CU) columnae uretericae, (DBW) dorsal bladder wall, (T) tip of the catheter, (VBW) ventral bladder wall.

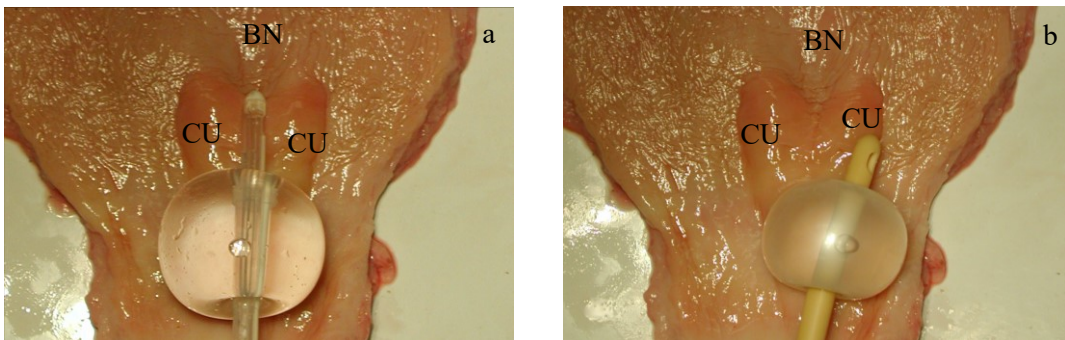


Figure 3-1-5. Reproduced position photograph of a bladder and catheters during catheterization. Each bladder was identical; none had ever been catheterized: (a) a bladder and NB catheter, (b) a bladder and SB catheter, (BN) bladder neck, (CU) columnae uretericae.

切と考えられた。XSB 区でウシが異常行動を示した原因は、バルーンがウシの膀胱に対して小さいため、留置 2 日目にはバルーンが尿道近辺まで移動して尿道を刺激したと推察される。バルーン容量が 45 mL 以上であれば、バルーンの尿道近辺への移動による刺激が生じないため、ウシは異常行動を示さないと推察される。なお、XSB カテーテルの使用を続行した場合、ウシの異常行動により採尿が妨げられるだけでなく、動物福祉にも反することが懸念された。

NB 区および SB 区における膀胱壁の充血部位あるいは出血部位（図 3-1-2）は、カテーテルの留置を再現した状態（図 3-1-4、図 3-1-5）におけるバルーンと膀胱との接触部位と一致していることから、充血あるいは出血はバルーンが膀胱壁を圧迫することで粘膜固有層に損傷を与えたものと考えられる。このことは、カテーテルを留置したヒトの膀胱で膀胱壁の損傷が認められる報告（Robinson 2001）と一致する。ヒトにおいてはバルーン容量の大きいカテーテルの使用は、膀胱頸部に重量負担をかけると報告されている（Robinson 2001）。NB カテーテル（70 mL）と SB カテーテル（45 mL）とのバルーン容量の差は 25 mL であり、重量差は 25 g である。これらの差やバルーン表面積の差が膀胱壁にかかる負担の差となり、出血範囲およびカテーテル関連潜血の発生率の違いとなって現れていると考えられる。なお、従来サイズのカテーテルとして Crutchfield（1968）は 75 mL を使用しているが、日本では 75 mL のカテーテルの入手は困難なため、本節では NB カテーテル（70 mL）を使用した。

ヒトにおいては、カテーテル留置での尿中赤血球数が増加すると報告されている（Anderson 1979）。本節において、膀胱壁からの出血が認められたことから、カテーテル関連潜血の原因はカテーテル留置による膀胱壁の損傷といえる。カテーテル関連潜血の発生率は NB 区と SB 区とで差が認められたこと（ $P < 0.05$ ）および膀胱壁の出血範囲に差が生じていたことから、バルーン容量の小さいカテーテルを利用することで膀胱への損傷が低減するという仮説を支持することができる。そのため、NB カテーテルに対して SB カテ

ーテルが優れているといえる。なお、本来ならば尿中赤血球数（RBC/HPF）はウシの正常値と比較すべきであるが、そのような数値は報告されていないため、本節ではNB区とSB区におけるカテーテル関連潜血の発生率を比較した。

以上のことから、バルーン容量 30 mL のカテーテルはウシにとって不適切であること、従来（バルーン容量 70 mL）よりもバルーン容量の小さい 45 mL のカテーテルがウシにとって最適であることが明らかになった。

3.1.5 小括

バルーンカテーテル（カテーテル）を乳牛の膀胱に留置して採尿する際、従来よりもバルーン容量の小さいカテーテルを利用することでバルーンが膀胱壁に接する面が少なく、膀胱への損傷が低減できるのでウシにとって最適であるという仮説を立てた。この仮説を立証するために、サイズの異なるカテーテル 3 種、（1）従来サイズ（NB区：70 mL）、（2）極小サイズ（XSB区：30 mL）、（3）小サイズ（SB区：45 mL）を留置して 3 日間採尿した。そして、カテーテル関連潜血を尿沈渣法で調査し、また膀胱損傷の状態を肉眼および顕微鏡下による病理学的調査を実施して、膀胱への損傷状態を判断した。XSB区でウシが異常行動を示したことから採尿を中止し、極小サイズはウシにとって小さく、不適切なサイズと判断した。留置 3 日目におけるカテーテル関連潜血（ > 50 red blood cell/high powered field）の発生率は、NB区（71.4%、 $n = 7$ ）に対してSB区（0.0%、 $n = 7$ ）が有意に低かった。また、病理学的調査では、NB区（ $n = 1$ ）に対してSB区（ $n = 1$ ）で膀胱壁の出血範囲が少なかった。しかし、NB区およびSB区の両区においても、膀胱壁の充血あるいは出血が認められ、バルーンが膀胱壁を圧迫することで粘膜固有層に損傷を与えていた。そして、これらの損傷がカテーテル関連潜血の原因であった。カテーテル関連潜血の発生率および膀胱壁の出血範囲はNB区とSB区とで有意差が認められたこと

から仮説は支持され、従来よりもバルーン容量の小さいカテーテル（SB区：45 mL）がウシにとって最適であることが明らかになった。

第 2 節 カテーテル関連尿路感染症の防止策の検討

3.2.1 緒言

第 1 節では、バルーン容量 45 mL のカテーテルがウシにとって最適なサイズであることが明らかになった。しかしながら、膀胱にカテーテルを留置すると CAUTI を起こす可能性があることが、ヒト (Walter 2005) およびウシ (David *et al.* 1996) で知られている。CAUTI の最も重要な防止策は、ヒトにおいては、カテーテルから採尿バッグまでの採尿経路の密閉状態を維持することであり、密閉状態の解除は CAUTI につながる事が知られている (Center for Disease Control and Prevention 1981、Robert 2005)。また、採尿経路に細菌が侵入する部位は、尿道とカテーテルとの間、カテーテルと採尿チューブとの接続部、および採尿チューブと採尿バッグとの接続部とされている (Walter 2005)。

泌乳牛に対してカテーテル採尿法を実施する場合、搾乳時にウシをミルクキングパーラー (パーラー) へ移動させるため、採尿を一時的に中断し、採尿経路の一部を分離およびその密閉状態を解除せざるを得ない。採尿経路の分離部位としては、カテーテルと採尿チューブとの接続部 (近位分離)、あるいは採尿チューブと採尿バッグとの接続部 (遠位分離) が考えられる。しかし、近位分離では分離作業が容易ではあるが、分離部が遠位分離に比較して肛門に接近しているため、糞便等で汚染される可能性が高い。一方、遠位分離は分離部が糞便等で汚染する可能性は低いですが、採尿バッグへの再接続操作、および分離した採尿チューブが牛床に接触して汚染するのを防止するための処置が必要となるため、近位分離に比較して作業量が多くなる。いずれにしても、搾乳作業に伴う採尿経路の分離は、CAUTI 発生率を高めることとなる。

しかしながら、ヒトにおける CAUTI の防止策は、入院患者における院内感染の防止を目的としたものであり、牛舎で飼育している健康なウシには該当しない可能性がある。そ

ここで本節での目的は、近位分離と遠位分離とによる CAUTI 発生率を比較して、採尿の中断および採尿経路の分離に伴う CAUIT の発生を抑制する方法を検討することである。

3.2.2 材料および方法

3.2.2.1 実験計画

東京都農林総合研究センターで飼養しており、尿路感染症を保有していないことが事前検査（3.2.2.3 参照）で判明しているホルスタイン種泌乳牛を供試した。ウシの飼養管理は、「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」（文部科学省 2006）に従った。ウシはストールに繋留し、飼料摂取および飲水が自由にできるようにした。搾乳は 1 日 2 回、パーラーで行った。

採尿経路を近位分離する近位分離区と遠位分離する遠位分離区との 2 区を設け、試験 1 回につき、各区にウシを 1 頭ずつ割り振り、カテーテルを 3 日間、留置して採尿を実施した。試験は最大 10 回実施し、CAUTI（3.2.2.3 参照）が 2 頭発生した区は試験を終了した。

3.2.2.2 カテーテルの留置および管理

カテーテルは本章第 1 節で良好な結果であった SB カテーテルを用いた。カテーテルの留置法は本章第 1 節（3.1.2.3 参照）と同じとしたが、近位分離区ではカテーテルと採尿チューブとの接続部に耐水シールを巻き付けなかった。

近位分離区では搾乳時に、カテーテルと採尿チューブとの接続部を 0.01%逆性石鹼液で十分に洗浄し、消毒用エタノールで清拭消毒し、カテーテル端と採尿チューブ近位端とをそれぞれ閉鎖し、同接続部で採尿経路を分離した後にウシをパーラーへ移動させた。遠位分離区では、採尿チューブ遠位端を閉鎖した後に採尿チューブと採尿バッグとの接続部で採尿経路を分離した。なお、遠位分離区では、図 3-2-1 に示したように、ウシの胴部にゴムバンドを装着し、そこに採尿チューブを折りたたんで固定した。両区とも、カテーテル

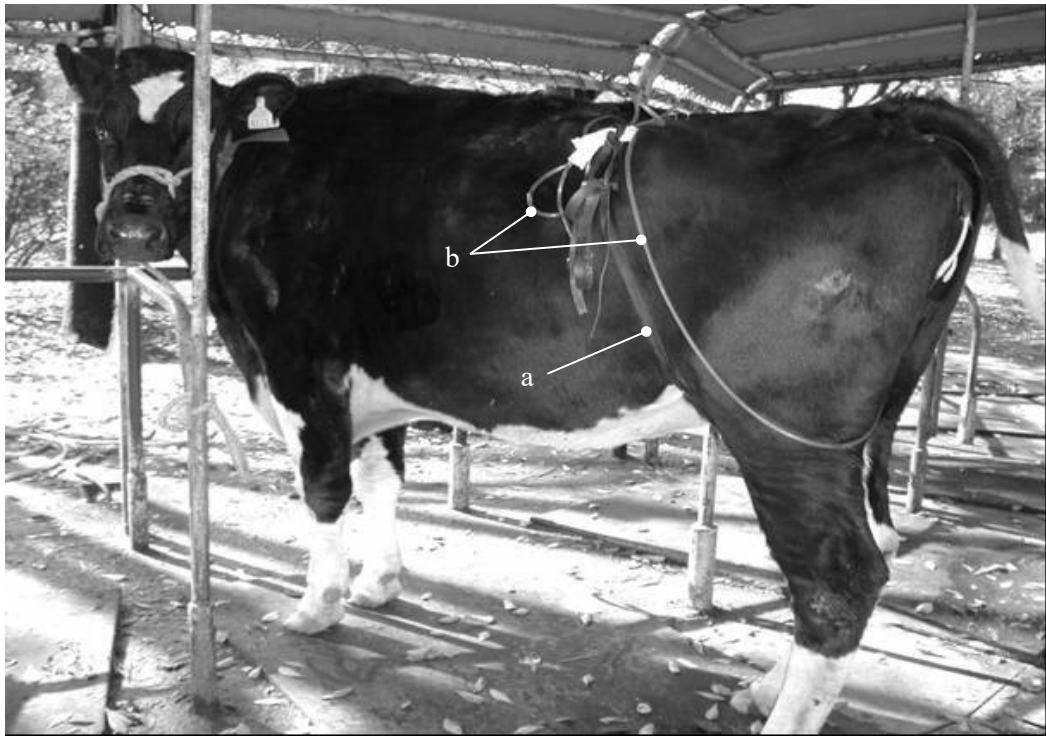


Figure 3-2-1. A cow inserted catheter and drainage tube that was folded and attached by rubber band: (a) rubber band, (b) drainage tube.

端あるいは採尿チューブ遠位端は、再接続時まで、消毒用エタノールを含ませたペーパータオルで被包した。また、搾乳後は分離部を消毒用エタノールで消毒した後に、再接続および採尿経路の閉鎖を解除した。

3.2.2.3 尿路感染症の判定

カテーテル留置前1週間以内（事前検査）、カテーテル留置日（d 1）、抜去日（d 4）およびカテーテル抜去1週間後（+1 w）に検体尿を採取し、尿中細菌数を測定した。事前検査および+1 wの検体尿は、消毒したネラトンカテーテル（尿道カテーテル、富士平工業、東京）を膀胱に挿入して採取した。d 1およびd 4の検体尿は、採尿チューブ遠位端を消毒用アルコールで清拭した後に採取した。検体尿は、希釈法により、一般細菌検査用のプレート培地（パールコア ハートインフュージョン寒天培地、栄研化学、東京）を用いて、37℃で16-24時間の好気培養をした。尿中細菌数が 3.0×10^2 colony forming unit/mL (cfu/mL)以上の個体を、事前検査時には尿路感染症と判定し、それ以外の検査時にはCAUTIと判定した。

3.2.2.4 統計解析

試験区間におけるCAUTIの発生率は、カイ二乗法により検定した。有意水準が5%未満の場合は有意差があるものとした。

3.2.3 結果

カテーテルを留置した約6時間後には、採尿チューブの内腔は尿で満たされ、その尿は排尿意識とは関係なくサイフォンの原理に従い持続的に採尿バッグに滴下した。

CAUTI発生率の推移を表3-2-1に示した。近位分離区は5頭供試した時点でCAUTIが2頭発生したので、近位分離区での試験は終了した。近位分離区のCAUTI発生率はd4および+1wいずれも40%であり、CAUTIとなった2頭はd 4および+1 wいずれも同一個体であ

Table 3-2-1. Incidence of catheter-associated urinary tract infection¹⁾ (%)

Period	Distant disconnection (<i>n</i> = 5)	Proximal disconnection (<i>n</i> = 10)
d1	0.0	0.0
d4	40.0 ^a	0.0 ^b
+1w	40.0 ^a	0.0 ^b

1) Urinary bacteria > 3.0×10^2 colony forming unit/mL.

^{ab}Means in the same row with the same superscript are not significantly different ($P < 0.05$).

った。遠位分離区では10頭供試してもCAUTIは発生しなかった。遠位分離区のCAUTI発生率は、d 4および+1 wいずれも近位分離区に比較して有意に低かった ($P < 0.05$)。

3.2.4 考察

ヒトのCAUTIは、採尿経路における密閉状態の解除が発生原因の一つとされている (Robert 2005、Walter 2005)。このことから、近位分離区におけるCAUTIの発生原因は、分離前後に採尿経路に対して十分な消毒処置を実施したが、カテーテルと採尿チューブとの接続部に細菌が侵入し、その細菌が膀胱に到達したことによるものと考えられる。CAUTIが発生しなかった遠位分離区でも、採尿チューブおよび採尿バッグの接続部から細菌が侵入する可能性はある。しかしながら、遠位分離区の採尿経路の分離部は、近位分離区に対して採尿チューブの長さ (3 m) だけ膀胱から遠位部にある。そのため、採尿チューブ遠位端の内腔から細菌が侵入しても、その細菌が3 mの採尿チューブ内を、尿の流れに逆らって膀胱に到達するのは困難であったと考えられる。

以上のことから、搾乳作業等により採尿経路を分離すると、ウシにおいてもCAUTIが発生することが明らかになった。また、搾乳作業により採尿経路を分離して密閉状態を解除する際、膀胱から可能な限り離れた部位で採尿経路を分離することで、採尿チューブを折りたたむ作業が必要となるが、CAUTI発生を抑制できることが明らかになった。

3.2.5 小括

採尿目的で泌乳牛の膀胱にバルーンカテーテル (カテーテル) を留置した際、搾乳作業に伴い採尿を中断、採尿経路の分離およびその密閉状態の開放する必要がある。本節では、泌乳牛にカテーテルを留置し、カテーテル、採尿チューブおよび採尿バッグをこの順に接続して3日間の採尿を実施した。1日2回、ミルクングパーラーにて搾乳を行う際、カテーテルと採尿チューブとの接続部で採尿経路を分離する近位分離区と、採尿チューブ

と採尿バッグの接続部で分離する遠位分離区とを設け、両区におけるカテーテル関連尿路感染症（CAUTI、尿中細菌数： $> 3.0 \times 10^2$ colony forming unit/mL）発生率を調査した。CAUTI 発生率は、近位分離区で 40%（ $n = 5$ ）、遠位分離区で 0%（ $n = 10$ ）であり、遠位分離区に対して近位分離区の発生率は有意に抑制された。以上のことから、膀胱から可能な限り離れた部位で採尿経路を分離および密閉状態を開放することで、CAUTI の発生を抑制できることが明らかになった。

第3節 カテーテル関連尿路感染症の発生率の調査

3.3.1 緒言

第2節では、第1節で最適と判断されたバルーンサイズのカテーテルを用いて、膀胱から離れた部位で採尿経路を分離および密閉状態を開放することで、CAUTIの発生が抑制され、その発生率は0% ($n = 10$) であるという結果が得られた。しかしながら、調査規模が小さいため、CAUTI発生率がゼロであるとは断言できない。なお、ヒトにおけるCAUTIの発生率は、カテーテル留置1日当たり3-5%であり (Walter 2005)、感染率は0%には至っていない。

CAUTI発生を防止する研究がヒトでは多くなされているが (Burke *et al.* 1983、Stamm 2005)、採尿チューブに抗生物質 (Warren *et al.* 1978) あるいは消毒薬 (Thompson *et al.* 1984) を滴下しても良好な結果は得られていない。そのため、感染を完全に防止することは困難といえるが、感染率を下げるためにアメリカ疾病管理予防センター (Center for Disease Control and Prevention: CDC) では、CAUTI防止のためのガイドライン (CDC 1981) を出している。

一方、ウシにおいては、CAUTI予防策としてペニシリンを投与した事例があるが (Vagnoni *et al.* 1997)、抗生物質の投与は一時的には効果があるものの (Smarick *et al.* 2004)、耐性菌の発生につながるとされている (Britt *et al.* 1977)。また、泌乳牛に抗生物質を投与すると、生乳中に抗生物質が残留して生乳が出荷できなくなるので、CAUTI防止を目的とした抗生物質の利用は不適切である。

ヒトおよびウシのいずれにおいてもCAUTI発生防止が困難とされているものの、ウシにおけるCAUTI発生率は明らかにされていない。そのため、ウシに対するカテーテル採尿法は、CAUTI発生のリスクを抱えながら実施することとなる。このような状況下では、カテ

ーテル採尿法の実用化は困難といえる。そこで本節の目的は、この問題を解消するために、カテーテル採尿法による CAUTI 発生率を明らかにすることである。

3.3.2 材料および方法

カテーテルを留置した際における、(1) CAUTI 発生率の調査、(2) 獣医学的調査を実施した。ウシの飼養管理は、「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」(文部科学省 2006) に従った。

東京都農林総合研究センターで飼養しているホルスタイン種泌乳牛を供試し、これらのウシにカテーテルを 3 日間留置し、採尿を実施した。ウシをストールに繋留し、飼料摂取および飲水が自由にできるようにした。搾乳は 1 日 2 回、パーラーで行った。

本節では、カテーテル留置の 1 週間前を -1 w、留置日を d 1、留置 4 日目 (カテーテル抜去日) を d 4、カテーテル抜去後 4 日目を +d 4 および抜去後 11 日目を +d 11 と表記した。

3.3.2.1 尿路感染症の調査

尿路感染症を保有していないことが事前検査で判明している泌乳牛 13 頭を用い、これらのウシにカテーテルを留置した。カテーテルの留置 3 日間を留置 1 回とし、最大 3 回まで留置を実施した。留置したウシは延べ 22 頭であり、その内訳は、留置 1 回が 6 頭、2 回が 5 頭、3 回が 2 頭である。同一牛にカテーテルを 2 回以上留置する場合、前回留置と今回留置との間に、最低 5 週間、留置しない期間を設けた。

CAUTI 検査に向けた採尿時期、採尿法、検査法および判定は、本章第 2 節 (3.2.2.3 参照) と同じとした。事前検査、+d 4 および +d 11 においては、ネラトンカテーテルを用いて採取した。d 4 あるいは +d 4 に CAUTI と判定された場合、その個体には CAUTI 治療を目的として抗生物質を 5 日間毎日投与し、+d 11 での検体尿は採取しなかった。また、治療

の効果調べるために、抗生物質投与の最終日を起点とした1ヶ月後に検体尿をネラトンカテーテルを用いて採取してCAUTIの検査をした。

3.3.2.2 獣医学的調査

泌乳牛6頭を供試した。-1 wおよびカテーテル留置中に尿pH、体温、血算および体重を測定した。また、留置期間中に検体尿を採取して、クレアチニン濃度を測定した。なお、この6頭は、前述したCAUTIの調査(3.3.2.1参照)の個体も含まれる。また、CAUTIの調査では、同一牛に対して反復調査をしているが、獣医学的調査では反復調査はしていない。

pH測定用の検体尿は、-1 wにおいては鼠径部を刺激して排尿したものを採取し、d4においては朝に採尿チューブ遠位端から採取した。尿pHは、採尿後速やかにpHメーター(モデルF-22、堀場製作所、京都)を用いて測定した。

体温は、-1 wのうちの連続3日間と、d1からd4までのうちの連続3日間とに、水銀体温計を用いて1日2回(08:30と13:30)、直腸温度を測定した。

血算測定用の血液は、-1 wのうちの1日とd4とに、ヘパリンナトリウム入り真空採血管(ベノジェクトII VP-H100、テルモ、東京)を用いて尾静脈から採取した。採血後速やかに、自動計数器(PC-608、エルマ、東京)を用いて、赤血球数、ヘマトクリット値、ヘモグロビン量および白血球数を測定した。

体重は、-1 wのうちの1日とd4とに1回ずつ測定した。

尿中クレアチニン分析用の検体尿は、カテーテル留置期間の3日間、毎日、採尿バッグに貯留した24時間尿から約100 mLを採取し、分析時まで-20℃で凍結保管した。検体尿中のクレアチニン濃度の分析は、第2章(2.2.3参照)と同じとした。

3.3.2.3 カテーテルの留置

カテーテルの留置法は本章第1節（3.1.2.3参照）と同じとした。用いたカテーテルは、本章第1節で良好な結果であったSBカテーテル（バルーン容量：45 mL）とした。搾乳時の尿路経路の分離方法は、本章第2節で良好な結果であった遠位分離とした。

3.3.2.4 統計解析

統計処理はSASを用いて解析した。獣医学的調査においては、カテーテル留置前と留置後のデータをWilcoxonの順位和検定で検定した。CAUTIの調査においては、1頭の個体に複数回留置した場合の尿路感染率への影響を検定するために、留置回数間（1回、2回および3回）のCAUTI発生率をFisherの正確確率検定で両側検定した。有意水準が5%未満の場合は有意差があるものとした。

3.3.3 結果

CAUTIの発生率については、カテーテルの留置回数間に差は認められなかった（ $P = 1.000$ ）。CAUTIの調査結果を表3-3-1に示した。CAUTIとなったのはd4の時点で2頭（9.1%）であり、+d4の時点でもこの2頭はCAUTIであった。なお、この2頭の尿中細菌数は、d4および+d4いずれも 10^5 cfu/mL以上であった。2頭には、感受性検査で有効であると判断された抗生物質（マイシリンゾル明治、Meiji Seika ファルマ、東京）を1日1回20 mLを5日間、筋肉注射した。注射1ヶ月後のCAUTIの検査では、2頭とも尿中細菌の存在は認められなかった。

獣医学的調査結果を表3-3-2に示した。尿pH、体温、血算および体重については、カテーテルの留置前と後との間に差は認められなかった（ $P > 0.05$ ）。尿中クレアチニン濃度は 115 ± 6 mg/dLであり、体重当たりのクレアチニン排泄日量は 21.4 ± 0.7 mg/kg BW・日（変動係数：3.3%）であった。

Table 3-3-1. Incidence of catheter-associated urinary tract infection¹⁾ (%)

Item	Period			
	d 1 (n = 22)	d 4 (n = 22)	+d 4 (n = 22)	+d 11 (n = 20) ²⁾
Catheter-associated urinary tract infection	0.0	9.1	9.1	0.0

1) Urinary bacteria > 3.0×10^2 colony forming unit/mL.

2) To care, cows with catheter-associated urinary tract infection on d 4 and +d 4 were excluded.

Table 3-3-2. Effect of catheterization on veterinary general conditions

Items	Period		P
	Pre-catheter	Placing catheter	
	Median (Mean, Range)	Median (Mean; Range)	
Urine pH	8.70 (8.67 , 8.41 to 8.79)	8.61 (8.63 , 8.45 to 8.81)	0.438
Body temperature, °C	38.8 (38.8 , 38.6 to 38.9)	38.9 (38.9 , 38.7 to 39.1)	0.250
Blood items			
Red blood cell, 10 ⁶ /μl	622 (624 , 534 to 745)	641 (654 , 550 to 799)	0.438
Hematocrit, %	29.2 (29.3 , 25.4 to 34.1)	30.2 (29.3 , 24.3 to 32.8)	0.844
Hemoglobin, g/dL	10.8 (10.9 , 9.6 to 11.6)	11.1 (10.6 , 8.3 to 12.0)	0.688
White blood cell, 10 ³ /μL	87 (88 , 67 to 106)	91 (90 , 69 to 109)	0.688
Body weight, kg	657 (649 , 582 to 690)	651 (640 , 572 to 687)	0.156
Urinary creatinine, mg/dL	— (— , —)	112 (115 , 97 to 136)	—
Urinary creatinine, mg/kg BW·day	— (— , —)	21.7 (21.4 , 20.4 to 21.9)	—

— No measure.

3.3.4 考察

CAUTI の調査結果から、d 4 の時点で CAUTI であった場合はカテーテル後であっても CAUTI は自然治癒しないと考えられる。一方、d 4 の時点で CAUTI でない場合は、d 4 以降も CAUTI は発生しないと考えられる。

本節における CAUTI の発生率は、留置 1 日あたりに換算すると 3.0%となる。留置 3 日間における CAUTI 発生率は、ヒトでは 8.7% (Burke *et al.* 1981)、9.1% (Huth *et al.* 1992) と報告されており、また留置 1 日あたりの発生率は、ヒトでは 3.0-10.0% (Weinstein 2005)、イヌでは 4.7% (Smarick *et al.* 2004) と報告されており、いずれも本節の結果と近似していた。このことから、本節の CAUTI 予防対策に不備はないと示唆される。

本節ではカテーテル留置回数はウシ 13 頭のうちの 7 頭が 2 回以上であり、本来はカテーテル留置を 1 回のみとして調査するべきである。しかしながら、乳牛の栄養状態に関する研究で採尿を実施している研究機関では、同一牛に対して生涯で複数回の試験を実施するため、カテーテルを複数回留置することは必然的である。また、留置回数間における CAUTI 発生率に差が認められないことから ($P > 0.1$)、カテーテル留置を複数回実施する場合であっても、無留置期間を 5 週間以上設けることで CAUTI 発生率に影響を与えないと考えられる。このことから、本節での CAUTI の発生率は、22 頭のウシに対してカテーテル留置を実施した場合の確率と見なしても支障はないと示唆される。なお、カテーテルの留置により膀胱に損傷が生じることが本章第 1 節 (3.1.4 参照) で明らかになっていることから、無留置期間 5 週間未満の範囲内では、膀胱に負担がかかる可能性があると考えられる。また、本節の治療成績から、CAUTI となっても抗生物質の投与による適切な治療を施すことで完治することが明らかになった一方、抗生物質の投与後の一定期間は生乳および生体の出荷が禁止されるという課題もある。

ウシの CAUTI では血尿を呈することが知られているが (Van Metre 2009) 、本節での CAUTI は尿中細菌数で判定している。本節では、尿中細菌が検出されたことで CAUTI と判定した個体に対して、尿潜血検査を実施していないため、尿中細菌数と尿潜血との関係は不明である。しかしながら、本章第 1 節の結果 (3.1.3.1 参照) によると、カテーテルの留置により尿中に赤血球が検出されることから、潜血検査に基づく CAUTI の判定は誤判定を招く可能性がある。従って、CAUTI の判定方法は、尿中細菌数検査が尿中潜血検査よりも適正と考えられる。

尿 pH、体温および血算は、いずれも正常値 (Smith 2009) の範囲であった。また、これらの検査項目結果が留置前と後とで変化していないことから ($P > 0.05$) 、カテーテルの留置はウシに著しい悪影響を与える可能性は低いと考えられる。

尿中クレアチニン濃度は、第 2 章の従来採尿法の結果 (表 2-2、81-107 mg/dL) と近似していた。体重当たりのクレアチニン排泄日量も、第 2 章の従来採尿法の結果 (2.3.1 参照、 21.0 ± 1.9 mg/kg BW・日) および Erb *et al.* (1977) の報告値 (19.6-21.2 mg/kg BW・日) と近似していた。これらのことから、カテーテルの留置は腎機能を中心とした泌尿器機能に影響を与えないと考えられる。

以上のことから、カテーテル留置 3 日間における CAUTI の発生リスクは 9.1%であり、感染しても適切な治療により完治することも明らかになった。また、カテーテルを留置しても、ウシに著しい悪影響を及ぼさないことが明らかになった。これらの知見から、カテーテル採尿法の実用化が高められたといえる。

3.3.5 小括

ウシの膀胱にバルーンカテーテル (カテーテル、バルーン容量 : 45 mL) を留置した場合におけるカテーテル関連尿路感染症 (CAUTI、尿中細菌数 : $> 3.0 \times 10^2$ colony forming unit/mL) の発生率を調査した。延べ 22 頭の泌乳牛にカテーテルを 3 日間留置したとこ

ろ、2頭が CAUTI となり、その発生率は留置3日間で9.1%、留置1日あたり3.0%であった。CAUTI となった個体はいずれも抗生物質治療に反応し、投与1ヶ月後に CAUTI は治癒した。また、泌乳牛6頭に対してカテーテルを留置し、尿 ph、体温、血算を検査した。各検査項目において、留置前と留置3日後とに差は認められず、またいずれも正常値の範囲であった。以上のことから、カテーテル留置3日間における CAUTI 発生率は9.1%であり、発生しても治療が可能であることが明らかになった。また、カテーテルの留置はウシに著しい悪影響を及ぼさないことが明らかになった。従って、これらの知見から、カテーテル採尿法の実用性が高められた。

第4節 カテーテル採尿法の有効性の検証

3.4.1 緒言

第3節の結果から、第1節および第2節により開発されたカテーテル採尿法の実用性が高まった。しかしながら、カテーテル採尿法は、尿採取器を用いた従来採尿法と同等の成績が得られるかは不明であるため、実用化には知見が不足しているといえる。

そこで本節の目的は、カテーテル採尿法が従来採尿法と同等の採尿手段として位置づけられることを検証するために、両採尿法による出納試験を実施してそれらの成績を比較検討することである。

3.4.2 材料および方法

3.4.2.1 供試牛および飼養管理

東京都農林総合研究センターの他、新潟県および愛知県の公立畜産試験場で飼養している産後週齢のそろったホルスタイン種泌乳牛32頭を用意して出納試験を実施した。ウシの飼養管理は、「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」（文部科学省2006）に従った。供試牛はストールに繋留し、飼料摂取および飲水が自由にできるようにした。

飼料は、チモシー乾草、アルファルファ乾草および乳牛用配合飼料を、完全混合飼料（total mixed ration: TMR）の形態で給与した。飼料の可消化養分含量は、日本飼養標準（農林水産省農林水産技術会議事務局1999）の要求量を満たすよう設計した。

3.4.2.2 出納試験

産後14-16週に連続3日間、24時間のうちに排泄される糞および尿を採取する出納試験を実施した。毎日、飼料摂取量および糞量を記録し、飼料を採材した。搾乳は1日2回、ミルクングパーラーで行い、毎回、乳量を記録し、また試料を採取した。

採尿法は、(1) 第 2 章記載 (2.2.2 参照) の尿採取器により採取する従来採尿法 ($n = 19$)、(2) 第 3 章第 3 節記載のカテーテルにより採取するカテーテル採尿法 ($n = 13$) のいずれかで実施した。それぞれの採取方法は、第 2 章 (2.2.2 参照) および第 3 章第 3 節 (3.2.2.3 参照) と同じとした。なお、第 2 章では 2 時間に 1 度、尿採取器の装着位置を調節しているが、本節では、日中は数時間に 1 度調整し、それ以外の時間帯は少なくとも 12 時間に 1 度調整した。

採取した尿は、700 mL の 20% (v/v) 硫酸の入った容器に回収した。回収した尿は、毎日、重量を測定した後、検体尿として約 20 mL を採取し、分析時まで -20°C で凍結保管した。

採取した TMR および生糞のサンプルは、 55°C で 48 時間乾燥させた後、1 mm のフルイに通したものを分析試料とした。なお、生糞サンプルの一部は総窒素分析用のために乾燥させずに保管して試料とした。

3.4.2.3 分析

乾物摂取量 (dry matter intake: DMI) の測定は古賀ら (2001) の報告と同じとした。TMR、乳、尿および糞の総窒素の分析は、定法 (Association of Official Analytical Chemists 1990) により実施した。アラントインおよびクレアチニンの尿中濃度の分析は、第 2 章記載の方法 (2.2.3 参照) と同じとし、微生物体窒素の十二指腸流入量は Chen (1989) の方法により算出した。

3.4.2.4 統計解析

統計処理は SAS の GLM プロシージャを用いて行った。有意水準が 5%未満の場合は有意差があるものとした。

3.4.3 結果

体重、DMI および乳量については（表 3-4-1）、採尿法間に差は認められなかった（ $P > 0.05$ ）。

尿量、生糞量、乾物消化率、窒素消化率、尿中総窒素濃度、尿中アラントイン濃度および微生物体窒素の十二指腸流入量については（表 3-4-2）、採尿法間に差は認められなかった（ $P > 0.05$ ）。カテーテル採尿法による尿量は、有意差は認められないものの（ $P = 0.237$ ）、従来採尿法よりも 1 日あたり 2.3 kg 多くなった。

摂取、乳、糞、尿および蓄積よりなる窒素量は（表 3-4-3）、いずれの項目も採尿法間に差は認められなかった（ $P > 0.05$ ）。窒素摂取量に対する分配率では、カテーテル採尿法の尿中総窒素分配率が従来採尿法に対して有意に高くなった（ $P = 0.020$ ）。また、カテーテル採尿法の蓄積窒素分配率は 0.0% であり、有意差は認められないものの（ $P = 0.349$ ）、従来採尿法に対して約 6.4 ポイント低くなった。

尿中クレアチニン濃度、CreBW および CreMBW については、いずれも採尿法間に差は認められなかった（表 3-4-4、 $P > 0.05$ ）。また、いずれの項目においてもカテーテル採尿法が従来採尿法よりも高く推移し、CreMBW については従来採尿法が 106.50、カテーテル採尿法が 123.94 mg/kg^{0.75} BW となった。

3.4.4 考察

体重当たりの乾物摂取量および乳量（表 3-4-1）、尿量、生糞量、各種消化率、尿成分濃度および微生物体窒素の十二指腸流入量（表 3-4-2）の結果から、カテーテル採尿法は、栄養摂取、乳生産性、消化機能に影響を与えることはなく、従来採尿法と同様の成績が得られると考えられる。このことは、窒素摂取量および排泄量の結果（表 3-4-3）からも支持できる。

Table 3-4-1. Effect of urine sampling method on body weight, dry matter intake and milk yield¹⁾

Item	Method		<i>P</i>
	Control	Catheter	
Body weight, kg	662 ± 15	653 ± 32	0.830
Dry matter intake, kg/day	23.8 ± 0.8	23.2 ± 1.7	0.808
Dry matter intake per body weight, %	3.6 ± 0.1	3.6 ± 0.3	0.883
Milk yield, kg/day	40.4 ± 1.5	34.3 ± 3.2	0.166

1) Values are least-squares means ± standard error.

Table 3-4-2. Effect of urine sampling method on output of urine and feces, digestibility, urinary content and microbial nitrogen flow to intestine¹⁾

Item	Method		P
	Control	Catheter	
Urine output, kg/day	12.4 ± 0.7	14.7 ± 1.4	0.237
Wet feces output, kg/day	55.5 ± 1.7	50.7 ± 3.7	0.340
Digestible ratio of dry matter, %	66.3 ± 0.9	67.8 ± 1.9	0.570
Digestible ratio of nitrogen, %	63.6 ± 1.2	64.5 ± 2.6	0.803
Urinary nitrogen, mg/dL	981 ± 53	1,156 ± 117	0.266
Urinary allantoin, mg/dL	468 ± 34	566 ± 49	0.209
Microbial nitrogen flow to intestine, g/day	362 ± 42	452 ± 60	0.342

1) Values are least-squares means ± standard error.

Table 3-4-3. Effect of urine sampling method on nitrogen balance¹⁾

Item	Method				<i>P</i>
	Control		Catheter		
Input and output of nitrogen, g/day					
Intake	560	± 21	536	± 45	0.687
Milk	196	± 6	172	± 14	0.191
Feces	203	± 7	189	± 16	0.490
Urine	123	± 10	166	± 21	0.139
Retention ²⁾	38	± 14	10	± 30	0.488
Rate from nitrogen intake, %					
Milk	35.6	± 1.3	32.4	± 2.8	0.399
Feces	36.4	± 1.2	35.5	± 2.6	0.804
Urine	21.6	± 1.4	32.1	± 3.2	0.020
Retention	6.4	± 2.3	0.0	± 5.0	0.349

1) Values are least-squares means ± standard error.

2) Retention = Intake - (Milk + Feces + Urine).

Table 3-4-4. Effect of urine sampling method on urinary creatinine¹⁾

Item	Method		<i>P</i>
	Control	Catheter	
Urinary creatinine, mg/dL	112 ± 6	113 ± 9	0.926
Creatinine, mg/kg BW·day	20.9 ± 1.6	24.7 ± 2.3	0.286
Creatinine, mg/kg ^{0.75} BW·day	106.5 ± 8.0	123.9 ± 11.5	0.336

1) Values are least-squares means ± standard error.

一方、カテーテル採尿法による尿量（表 3-4-2、 $P = 0.237$ ）および尿中総窒素量（表 3-4-3、 $P = 0.139$ ）について、差は認められないものの従来採尿法よりもそれらの数値が高いことから、カテーテル採尿法は従来採尿法よりも尿を取りこぼしが減り、正確に採尿が実施できていると示唆される。このことは、窒素摂取量に対する尿中総窒素分配率（表 3-4-3）は従来採尿法に対してカテーテル採尿法が有意に高くなったことから支持できる。また、カテーテル採尿法の蓄積窒素分配率がゼロという理想値に近いことから裏付けることができる。また、カテーテル採尿法の CreBW および CreMBW は、有意差は認められないものの従来採尿法よりも数値が高い。その理由は、前述したとおりカテーテル採尿法は尿の取りこぼしが少ないため、従来採尿法では未回収であった尿が回収可能となったことで、クレアチニンの尿中排泄量が多くなったと考えられる。

以上のことから、カテーテル採尿法は従来採尿法より精度の優れた採尿手段と位置づけられることが明らかになった。

3.4.5 小括

乳牛に対して 24 時間尿の採取作業を含む出納試験を実施する際、バルーンカテーテルを用いたカテーテル採尿法は、尿採取器を乳牛の外陰部に装着して採尿する従来採尿法と同等の成績が得られるかを比較検討した。泌乳牛 32 頭（従来採尿法： $n = 19$ 、カテーテル採尿法： $n = 13$ ）に対して、3 日間連続で、24 時間のうちに排泄される糞および尿を採取する出納試験を実施した。乾物摂取量、乳量、尿量、生糞量、消化率、尿成分濃度および微生物体窒素の十二指腸流入量は、採尿法間で差は認められなかった。摂取窒素量に対する尿中総窒素分配率は、カテーテル採尿法が有意に高くなった。代謝体重当たりの尿中クレアチニン排泄日量（CreMBW）は、カテーテル採尿法が高く推移した。以上のことから、カテーテル採尿法は栄養摂取、乳生産性、消化機能に影響を与えることはなく従来採尿法と同様の成績が得られること、従来採尿法に対して尿の取りこぼしが少ないために出

納試験の精度が高まること、および CreMBW を正確に求められることが明らかになった。

これらの知見から、カテーテル採尿法は従来採尿法より精度の優れた採尿手段と位置づけることができる。

第 4 章 カテーテル採尿法により採取した検体尿（1.5 時間相当尿）による尿成分の排泄日量を推定するための採尿時間帯に関する検証

4.1 緒言

第2章では、代謝体重当たりの尿中クレアチニン排泄日量であるクレアチニン代謝体重係数 (CreMBW、 $\text{mg}/\text{kg}^{0.75}\text{BW}\cdot\text{日}$) を利用して、検体尿として4時間尿を用いることで尿中の総窒素およびアラントインの排泄日量が推定できることが明らかになった。しかしながら、乳牛の排尿間隔は60-80分でなされることが最も多いことから(鈴木ら 1983)、4時間尿は排尿3-4回分に相当するだけではなく、排尿後に最大4時間にわたり畜尿タンク内に放置された検体尿といえる。乳牛の鼠径部を圧迫刺激して排尿1回分に近い尿を人為的に排泄させたものを理想的な検体尿とするならば、4時間尿を検体尿とした24時間尿の推定方法は理想から大きく解離している。

バルーンカテーテル(カテーテル)を用いた採尿法は、膀胱内に貯留する尿を人為的に規定の時間に採取できる。そして第3章で開発したカテーテル採尿法は、正確に採尿できるため、尿採取器を用いた従来採尿法より精度の優れた採尿手段と位置づけられた。これらのことから、カテーテル採尿法を用いることで、膀胱内に貯留してt時間後に排泄されると予想される尿(t時間相当尿)を計画的に正確に採取することが可能である。

そこで本章の目的は、乳牛の平均排尿間隔を1.5時間として、カテーテル採尿法を用いて採尿作業の容易な日中に1.5時間相当尿を採取して、24時間尿中の総窒素およびアラントインの排泄量を精度良く推定するのに適した採尿時間帯を検証することである。

4.2 材料および方法

4.2.1 供試牛および飼養管理

東京都農林総合研究センターで飼養している2産以上のホルスタイン種泌乳牛6頭(年齢:3.8-9.5歳、平均年齢:5.9±2.1歳、平均体重:640±95 kg)を供試した。ウシの飼養管理は、「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」(文部科学省

2006) に従った。供試牛はストールに繋留し、飼料摂取および飲水が自由にできるようにした。

飼料は、検体尿の採取開始の 5 週以上前から、東京都農林総合研究センターの泌乳牛用慣行飼料を完全混合飼料 (total mixed ration: TMR) の形態で給与した。飼料の粗タンパク質含量および可消化養分含量は、日本飼養標準 (農林水産省農林水産技術会議事務局 1999) の要求量を満たす設計とした。飼料は、午前中に 24 時間分の給与量を調製し、1 日量の 2/3 量を 15:00 に、残りを翌日 8:00 に給与した。搾乳は 8:00 と 17:00 とに実施した。

4.2.2 採材

検体尿である 1.5 時間相当尿の採取は、第 3 章で開発したカテーテル採尿法により 6-8 月に実施した。試験前日にカテーテルを留置し、留置翌日を 1 日目として、3 日間連続で採尿を実施した。カテーテルの留置操作および管理は、第 3 章第 3 節記載の方法 (3.2.2.3 参照) と同じとした。

1.5 時間相当尿は、8:30 から 16:00 までは 1.5 時間インターバルで (08:30-10:00、10:00-11:30、11:30-13:00、13:00-14:30 および 14:30-16:00) 、20% (v/v) 硫酸を 50 mL 入れた容器に回収した。また、16:00 から翌日 8:30 までの検体尿は 16.5 時間連続で、500 mL の 20% (v/v) 硫酸の入った容器に回収して 16.5 時間相当尿とした。回収した検体尿は、重量を測定した後、分析サンプルとして約 20 mL を分析時まで -20 °C で凍結保管した。

体重はカテーテル留置日と抜去日とに測定して、採尿期間中の平均値を算出した。

4.2.3 分析および計算

検体尿中のクレアチニン、アラントインおよび総窒素の濃度の分析は、第 2 章記載の方法 (2.2.3 参照) と同じとした。

16:00-08:30 (16.5 時間) および 0:00-24:00 (24 時間) に採取した検体尿には、それぞれ 1.5/16.5 と 1.5/24 と乗じて、クレアチニン、アラントインおよび総窒素量が 1.5 時間相当となるように排尿時間の補正計算をした。

4.2.4 統計解析

CreMBW、尿量、尿成分に関する統計処理は SAS の GLM プロシージャを用いて解析し、尿量および尿成分における時間帯間の差は LSD 法で検定した。アラントインおよび総窒素排泄日量の実測値に対する推定値の相関係数およびその有意性の検定は、SAS の CORR プロシージャを用いて実施した。また、それらの実測値と推定値とにおける回帰式の回帰性の検定は、第 2 章記載の方法 (2.2.4 参照) と同じとした。いずれの検定においても、有意水準が 5%未満の場合は有意差があるものとした。

4.3 結果

4.3.1 クレアチニン排泄日量

CreMBW を表 4-1 に示した。CreMBW の平均値は $129.2 \text{ mg/kg}^{0.75} \text{ BW}\cdot\text{日}$ 、範囲は $101.0\text{-}155.9 \text{ mg/kg}^{0.75} \text{ BW}\cdot\text{日}$ 、変動係数は 2.43%であり、個体間に有意差が認められ ($P < 0.001$)、採尿日間に差は認められなかった ($P = 0.026$)。

4.3.2 クレアチニン、アラントインおよび総窒素濃度の日内変動

クレアチニン、総窒素およびアラントインの濃度の推移を表 4-2 に示した。いずれの時間帯であっても、クレアチニン ($P = 0.462$)、総窒素 ($P = 0.711$) およびアラントイン ($P = 0.089$) の濃度に関して時間帯間に差は認められなかった。また、クレアチニン ($P > 0.20$)、総窒素 ($P > 0.20$) およびアラントイン ($P > 0.15$) の濃度に関して、いずれの時間帯と 24 時間尿とに差は認められなかった。

Table 4-1. Excretion of daily creatinine in the urine for each cows and for each day¹⁾

Item	Cow					Day			P				
	1	15	22	23	24	5	SE ²⁾	1	2	3	Cow	Day	
Creatinine, mg/kg ^{0.75} BW·day	139.9	101.0	123.4	130.5	124.5	155.9	1.8	126.6	128.2	132.8	1.3	<0.001	0.246

1) Values are least-squares means ± standard error.

2) Standare error.

Table 4-2. Diurnal variation in the concentration of creatinine, total nitrogen, and allantoin in the urine¹⁾

Time of day	Creatinine (mg / dL)	Total nitrogen (mg / dL)	Allantoin (mg / dL)
08:30–10:00	101.9 ± 3.9	1,187 ± 39	447 ± 19
10:00–11:30	101.0 ± 3.9	1,252 ± 39	437 ± 19
11:30–13:00	96.1 ± 3.9	1,204 ± 39	395 ± 19
13:00–14:30	97.9 ± 4.1	1,237 ± 41	394 ± 19
14:30–16:00	93.8 ± 3.9	1,258 ± 39	389 ± 19
16:00–08:30	104.7 ± 3.9	1,188 ± 39	445 ± 19
00:00–24:00	101.0 ± 3.9	1,186 ± 39	427 ± 19

1) Values are mean ± standard deviation.

4.3.3 クレアチニン、アラントインおよび総窒素の排泄量および尿量の日内変動

クレアチニン、総窒素およびアラントインの排泄量および尿重量の推移を表 4-3 に示した。クレアチニン排泄量は、08:30-10:00、13:00-14:30 および 14:30-16:00 の 1.5 時間相当尿と 24 時間尿とに有意差が認められた ($P < 0.05$)。総窒素排泄量は、13:00-14:30 および 14:30-16:00 の 1.5 時間相当尿と 24 時間尿とに有意差が認められた ($P < 0.05$)。アラントイン排泄量は、13:00-14:30 の 1.5 時間相当尿と 24 時間尿とに有意差が認められた ($P < 0.05$)。尿重量は、14:30-16:00 の 1.5 時間相当尿と 24 時間尿とに有意差が認められた ($P < 0.05$)。24 時間の平均尿量は 17.0 ± 2.2 kg であった。

総窒素濃度/クレアチニン濃度比 (N/C 比) およびアラントイン濃度/クレアチニン濃度比 (A/C 比) の推移を表 4-4 に示した。N/C 比は、10:00-11:30、11:30-13:00、13:00-14:30 および 14:30-16:00 の 1.5 時間相当尿と 24 時間尿とに有意差が認められた ($P < 0.05$)。A/C 比はいずれの 1.5 時間相当尿と 24 時間尿とにも差は認められなかった ($P > 0.05$)。

4.4 考察

4.4.1 クレアチニン排泄日量

本章における CreMBW ($129.2 \text{ mg/kg}^{0.75} \text{ BW} \cdot \text{日}$) は、第 2 章の結果 (2.3.1 参照、 $107.2 \text{ mg/kg}^{0.75} \text{ BW} \cdot \text{日}$) よりも高くなった。調査を実施した時期を比較すると、第 2 章は冬期 (2-3 月) であるのに対して、本章は夏期 (6 月-8 月、平均外気温 23.3°C 、最高外気温 31.2°C) であり、本章での平均外気温はホルスタイン種泌乳牛の適温域上限である 20°C (古村 2006b) を越えている。このことから、本章の調査は暑熱環境下でなされていたといえる。適温下より高温下では、筋肉の異化が起こり尿中のクレアチニン濃度が高まるため (Schneider *et al.* 1988)、本章での CreMBW は暑熱の影響で第 2 章の結果より高くなったと示唆される。そして、CreMBW を利用する際、調査環境が暑熱環境であるかを把握

Table 4-3. Diurnal variation in the excretion of creatinine, total nitrogen and allantoin in the urine, and urine output¹⁾

Time of day	Creatinine (mg)	Total nitrogen (g)	Allantoin (mg)	Urine (g)
08:30–10:00	874 ± 51 ^c	10.5 ± 0.68 ^{bc}	3,827 ± 216 ^c	918 ± 75 ^{bc}
10:00–11:30	936 ± 51 ^{bc}	11.7 ± 0.68 ^{bc}	3,939 ± 216 ^{bc}	988 ± 75 ^{bc}
11:30–13:00	929 ± 51 ^{bc}	12.0 ± 0.68 ^b	3,825 ± 216 ^c	1,072 ± 75 ^b
13:00–14:30	793 ± 53 ^c	10.0 ± 0.71 ^c	3,176 ± 225 ^d	831 ± 79 ^c
14:30–16:00	1,188 ± 51 ^a	15.7 ± 0.68 ^a	4,764 ± 216 ^a	1,357 ± 75 ^a
16:00–08:30 ²⁾	1,071 ± 51 ^{ab}	12.1 ± 0.68 ^b	4,531 ± 216 ^{ab}	1,027 ± 75 ^{bc}
00:00–24:00 ²⁾	1,031 ± 51 ^b	12.1 ± 0.68 ^b	4,334 ± 216 ^{abc}	1,028 ± 75 ^{bc}

1) Values are mean ± standard deviation.

2) Weights of 16.5-h urine and 24-h urine were converted to 1.5-h urine, respectively.

^{abc}Means in the same row with the same superscript are not significantly different ($P < 0.05$).

Table 4-4. Diurnal variation in the concentration ratio of total nitrogen / creatinine, and allantoin / creatinine in the urine¹⁾

Time of day	Total nitrogen/Creatinine (mg/dL per mg/dL)	Allantoin/Creatinine (mg/dL per mg/dL)
08:30–10:00	12.12 ± 0.23 ^{cd}	4.49 ± 0.07 ^a
10:00–11:30	12.73 ± 0.23 ^{bc}	4.33 ± 0.07 ^{ab}
11:30–13:00	12.90 ± 0.23 ^{ab}	4.19 ± 0.07 ^b
13:00–14:30	12.88 ± 0.24 ^{ab}	4.13 ± 0.08 ^b
14:30–16:00	13.41 ± 0.23 ^a	4.14 ± 0.07 ^b
16:00–08:30	11.48 ± 0.23 ^d	4.34 ± 0.07 ^{ab}
00:00–24:00	11.88 ± 0.23 ^d	4.31 ± 0.07 ^{ab}

1) Values are mean ± standard deviation.

^{abc}Means in the same row with the same superscript are not significantly different ($P < 0.05$).

する必要性があるといえる。暑熱環境であっても個体毎の CreMBW は日間で一定であったことから、CreMBW は、暑熱環境下では個体毎の数値を、非暑熱環境であれば第 3 章第 4 節のカテーテル採尿法で調査した CreMBW (3.4.3 参照、123.94 mg/kg^{0.75} BW・日) を用いて、式 2-4 を利用することで 24 時間尿中の成分排泄量が推定できる可能性が示唆された。

$$X = x/c \times CreMBW \times MBW \quad \dots\dots\dots \text{式 2-4}$$

ここで、

X: 尿中の総窒素 (あるいはアラントイン) の排泄日量 (mg)

C: 尿中のクレアチニン排泄日量 (mg)

x: 検体尿 (本章においては 1.5 時間相当尿) 中の総窒素 (あるいはアラントイン) 濃度 (mg/dL)

c: 検体尿 (本章においては 1.5 時間相当尿) 中のクレアチニン濃度 (mg/dL)

CreMBW: 代謝体重当たりのクレアチニン排泄日量 (mg/kg^{0.75} BW・日)

MBW: 代謝体重 (kg^{0.75})

である。

4.4.2 クレアチニン、アラントインおよび総窒素の濃度の日内変動

本章におけるクレアチニン、アラントインおよび総窒素濃度 (表 4-2) は第 2 章の結果 (2.3.2 参照) とは異なり有意な日内変動は認められなかった。一方、これら尿成分の排泄量 (表 4-3) には日内変動が認められた。尿量において、14:30-16:00 の 1.5 時間相当尿が他の時間帯に対して有意に高いのは (表 4-3、*P* < 0.05)、同時間帯におけるクレアチニン、総窒素およびアラントイン排泄量が各時間帯の中で最高値であることから、これらの尿成分を排泄するために尿量が増加したと示唆された。

N/C 比の時間帯間の比較結果から、24 時間尿に対して有意差が認められた 1.5 時相当尿を検体尿とすると、総窒素排泄日量の推定精度が劣る可能性が示唆された。なお、1.5 時

間相当を組み合わせて 3.0 時間、4.5 時間、6.0 時間および 7.5 時間相当尿としての N/C 比を算出しても、これらの相当尿のいずれかと 24 時間尿とに有意差が認められた ($P < 0.05$)。このことから、1.5 時間相当尿あるいはそれ以上の採尿インターバルで検体尿を採取しても、総窒素排泄日量の推定精度は劣る危惧がある。一方、A/C 比の時間帯間の比較結果から、いずれの 1.5 時間相当尿を検体尿としてもアラントイン排泄日量を精度良く推定できる可能性があると考えられた。

4.4.3 推定シミュレーション

08:30 から 16:30 までに採取した 1.5 時間相当尿から、08:30、10:00、11:30、13:00 および 14:30 を起点とした 3.0、4.5、6.0 および 7.5 時間相当尿としての N/C 比および A/C 比を算出し、式 2-4 および本章における個体毎の CreMBW を利用して総窒素およびアラントインの排泄日量を推定した。これらの推定値と実測値との相関係数を図 4-1 および図 4-2 に示した。

総窒素の推定排泄日量に関して (図 4-1)、08:30 を起点とした 1.5 時間相当尿 (08:30-10:00) による相関係数は 0.795 であるのに対して、3.0 時間相当尿 (08:30-11:30) では 0.818 と高まるが、4.5 時間相当尿 (08:30-13:00) では 0.775、6.0 時間相当尿 (08:30-14:30) では 0.792、7.5 時間尿相当尿 (08:30-16:00) では 0.779 と推移しており、採尿インターバルの長さで推定精度の上昇との関連は薄いと考えられた。

アラントインの推定排泄日量に関して (図 4-2)、08:30 を起点とした 1.5 時間相当尿による相関係数は 0.569 であるのに対して、3.0 時間相当尿では 0.888、4.5 時間相当尿では 0.888、6.0 時間相当尿では 0.928、7.5 時間相当尿では 0.946 と推移しており、採尿インターバルが長くなるのに伴い推定精度は高く推移すると考えられた。また、採尿開始時刻の起点を 08:30 とせず、あらゆる時間帯としても、1.5 時間相当尿よりも 3.0 時間相当尿を用いた方がアラントイン排泄日量の相関係数は高く推移した。これは、採尿インターバルを 1.5 時間よりも長くすることで、検体尿の A/C 比が 24 時尿のそれに近づいた

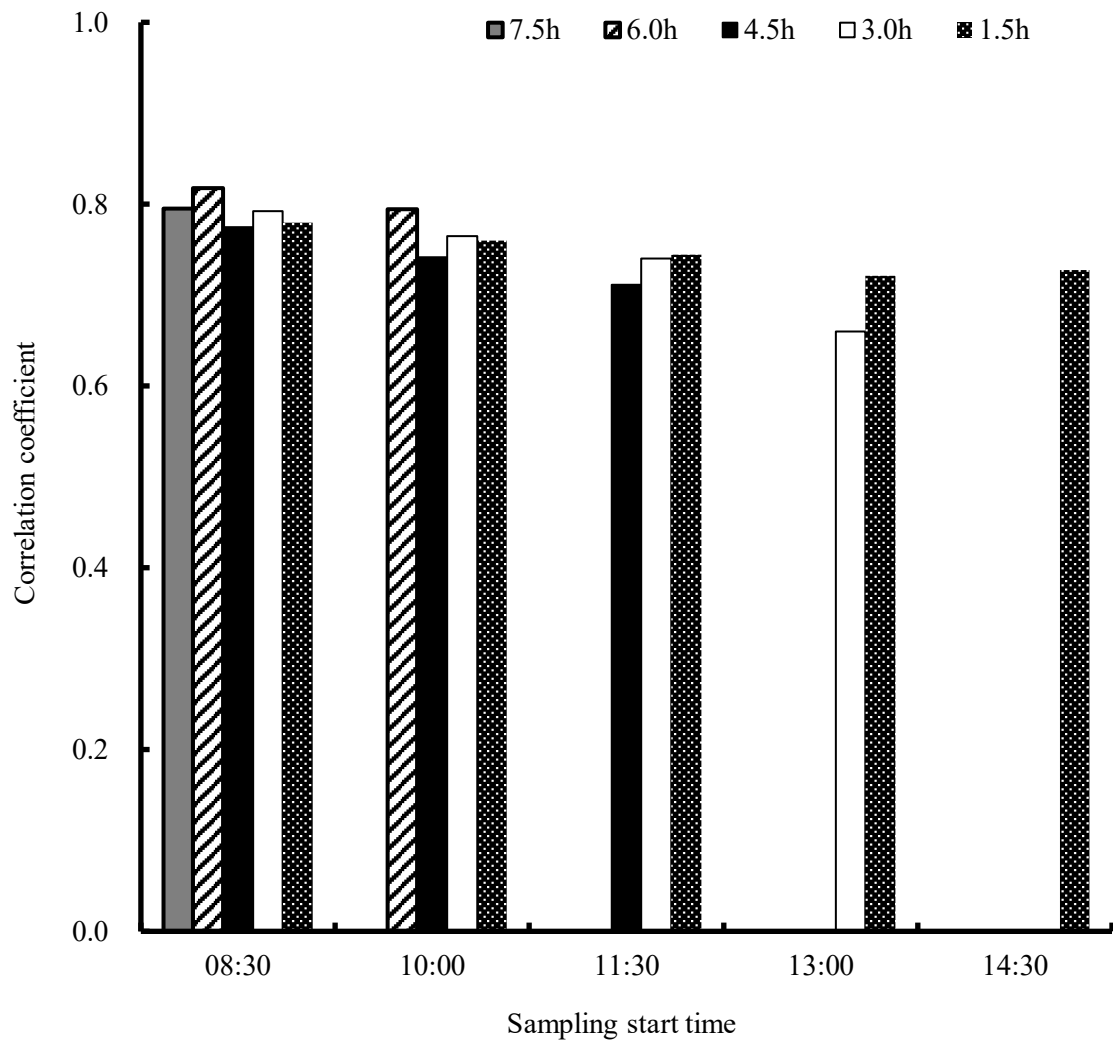


Figure 4-1. Correlation coefficients between the actual daily excretion of total nitrogen (g/day) in the urine and the estimated one using the 1.5, 3.0, 4.5, 6.0 or 7.5-h urine samples.

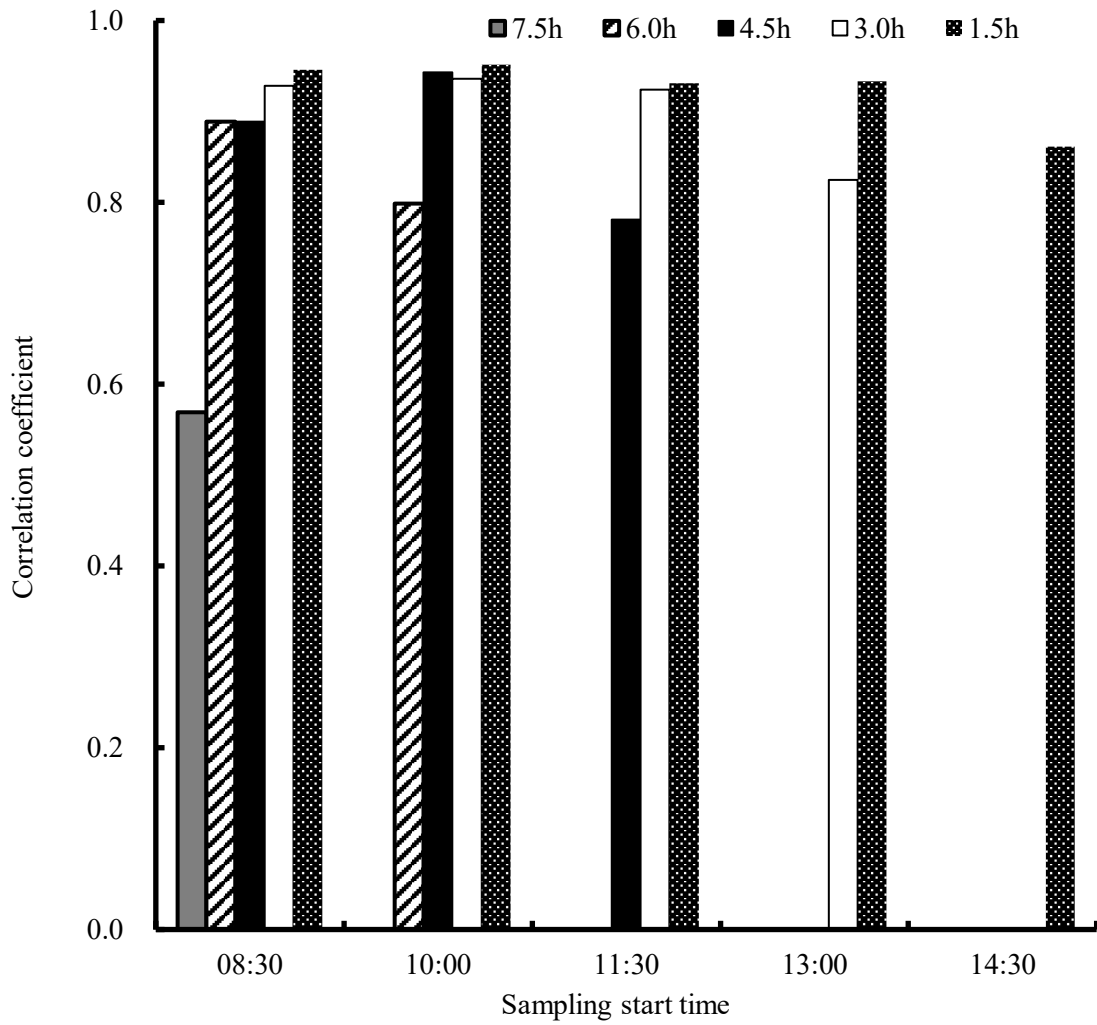


Figure 4-2. Correlation coefficients between the actual daily excretion of allantoin(g/day) in the urine and the estimated one using the 1.5, 3.0, 4.5, 6.0 or 7.5-h urine samples.

め、推定精度が高まると考えられる。短時間に排泄された尿から尿中カリウムの排泄日量を推定する際に、尿採インターバルが短くなるにつれて推定精度が低下すると報告されており（浅井 2006）、このことから本節における推定精度の関する知見は支持できる。

なお、すべての 1.5 時間相当尿から求めた推定値と実測値との相関係数は、総窒素では $r = 0.66-0.80$ であり有意に高く ($P < 0.004$)、アラントインでは $r = 0.57-0.86$ とやや低い範囲を含むものの有意であった ($P < 0.02$)。これらの相関係数はいずれも約 0.6 以上であるため、1.5 時間相当尿を検体尿とした推定値と実測値とには相関関係が存在すると考えられる。

各 1.5 時間相当尿から推定した総窒素およびアラントインの排泄日量の推定値 (Y) と実測値 (X) との回帰性は有意であると判定された。一例として、午前 (10:00-11:30) および午後 (13:00-14:30) の 1.5 時間相当尿における総窒素の推定値と実測値との関係を図 4-3 に、アラントインのそれを図 4-4 に示した。総窒素の推定値と実測値との相関は、午前では $r = 0.795$ ($P < 0.001$)、午後では $r = 0.660$ ($P \leq 0.005$) であり、アラントインのそれは、午前では $r = 0.799$ ($P < 0.001$)、午後では $r = 0.825$ ($P < 0.001$) であった。

以上のことから、08:30 から 16:00 までの日中に 1.5 時尿相当尿を採取し、暑熱環境であれば個体毎の CreMBW と式 2-4 とを利用することで、24 時間尿中の総窒素およびアラントインの排泄量を推定できることが明らかになった。また、非暑熱環境であれば、CreMBW として $123.94 \text{ mg/kg}^{0.75} \text{ BW} \cdot \text{日}$ を利用することで、尿成分の排泄日量が推定できると示唆された。

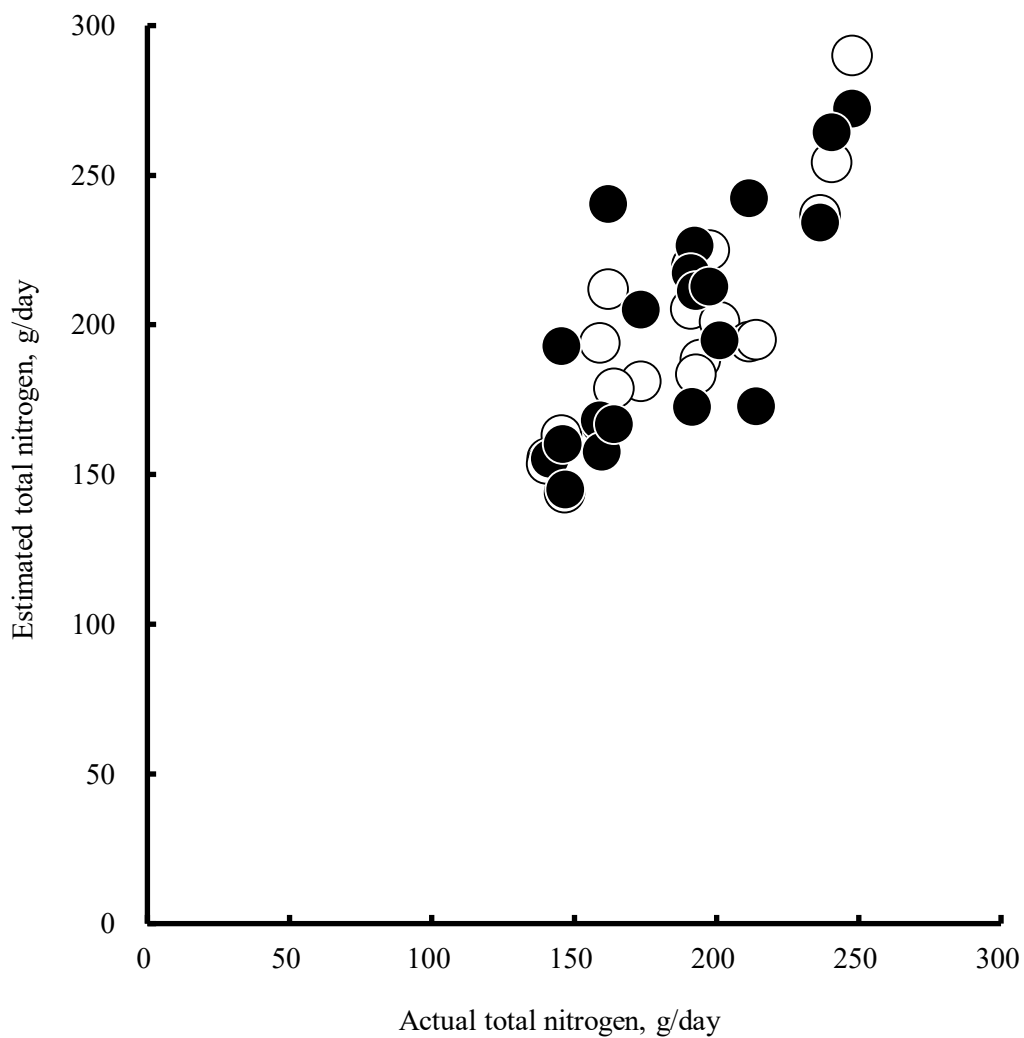


Figure 4-3. Relationship between the actual daily excretion of total nitrogen (g/day) in the urine and the estimated one using the 1.5-h urine excreted between 10:00 and 11:30 (○: $r = 0.795$, $P < 0.001$, $n = 18$) or 13:00 and 14:30 (●: $r = 0.660$, $P < 0.005$, $n = 17$). Each point represents the data of a cow.

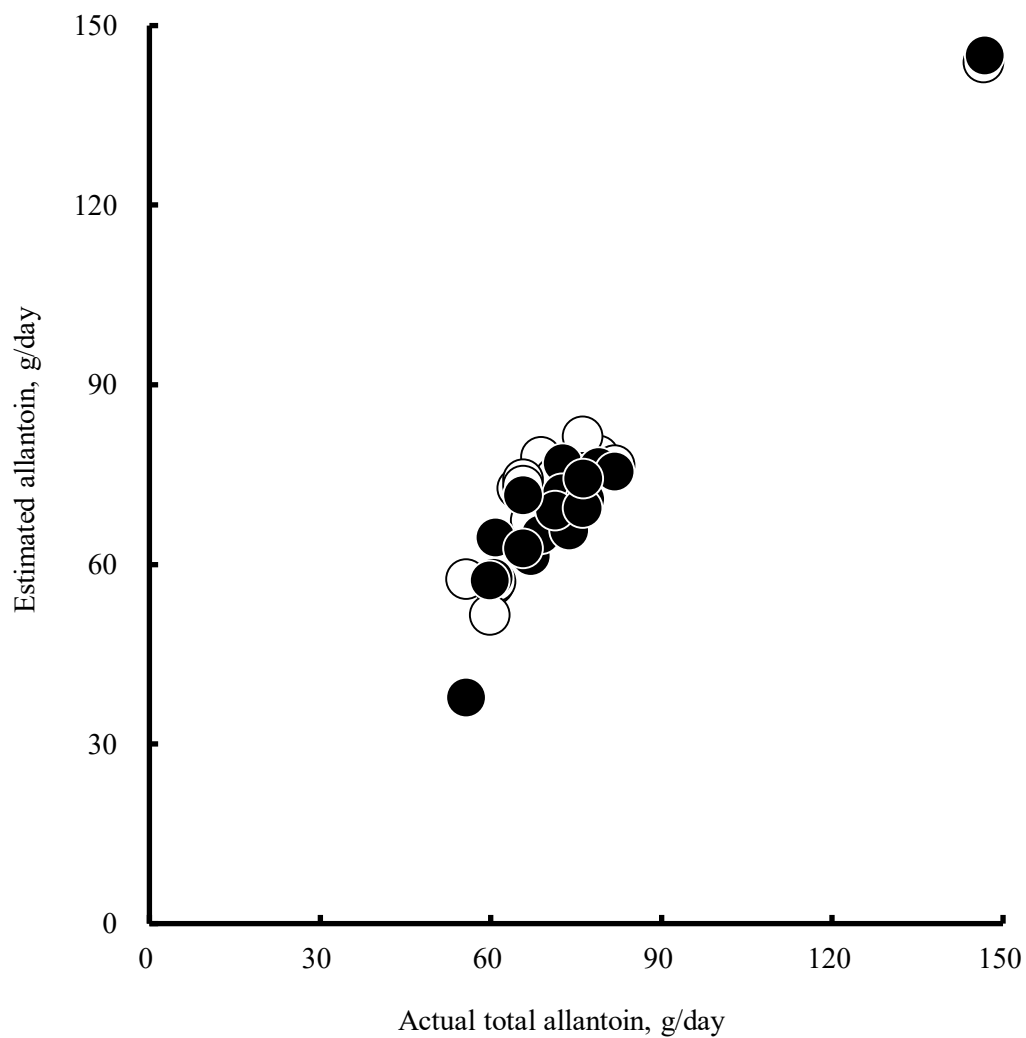


Figure 4-4. Relationship between the actual daily excretion of allantoin (g/day) in the urine and the estimated one using the 1.5-h urine excreted between 10:00 and 11:30 (○: $r = 0.799$, $P < 0.001$, $n = 18$) or 13:00 and 14:30 (●: $r = 0.825$, $P < 0.001$, $n = 17$). Each point represents the data of a cow.

4.5 小括

乳牛の平均排尿間隔を 1.5 時間と仮定して、作業の容易な日中の 1.5 時間のうちに排尿される検体尿を採取した場合、24 時間中の総窒素およびアラントインの排泄量を精度良く推定するのに最適な採取時間帯を検証した。カテーテル採尿法により泌乳牛の膀胱から検体尿を、08:30 から 16:00 までは 1.5 時間インターバル（1.5 時間相当尿）で、それ以外の時間帯（16:00 から翌日 08:30 まで）は連続で、3 日間採尿した。夏期（6 月-8 月、平均外気温：23.3 °C）に採尿したことによる暑熱の影響で、代謝体重当たりの尿中クレアチニン排泄日量（CreMBW）は、個体間に有意差が認められたが、採尿日間に差は認められなかった。尿中のクレアチニン、アラントインおよび総窒素の濃度は時間帯間に差は認められなかった。クレアチニン、アラントインおよび総窒素の排泄量、および尿量は、一部の 1.5 時間相当尿と 24 時間尿とに有意差が認められた。総窒素/クレアチニン濃度比は一部の 1.5 時間相当尿と 24 時間尿とに有意差が認められたが、アラントイン/クレアチニン濃度比に差は認められなかった。各 1.5 時間相当尿の分析値を式[推定尿中総窒素（あるいはアラントイン）排泄日量（mg）=1.5 時間相当尿の総窒素（あるいはアラントイン）濃度（mg/dL）/ 1.5 時間相当尿のクレアチニン濃度（mg/dL）× 個体毎の CreMBW × 代謝体重（kg^{0.75}）]に当てはめたところ、推定値と実測値との相関は、総窒素では $r = 0.66-0.80$ で有意に高く、アラントインでは $r = 0.57-0.86$ と低い値を含むものの有意であった。以上のことから、前記式と暑熱環境にあつては個体毎の CreMBW を利用することで、日中（08:30 から 16:00）に採取した 1.5 時間相当尿から 24 時間尿中の総窒素およびアラントインの排泄量が推定できることが明らかになった。また、非暑熱環境にあつては、CreMBW として $123.94 \text{ mg/kg}^{0.75} \text{ BW} \cdot \text{日}$ を利用することで、尿成分の排泄日量が推定できると示唆された。

第 5 章 スポット尿による尿成分の推定法の確立およびタンパク質栄養状態の簡易判定法の開発

5.1 緒言

第4章では、カテーテル採尿法により、08:30 から 16:00 の日中の時間帯に採取した検体尿（1.5時間相当尿）であれば、式2-4を利用することで24時間尿の成分排泄量が推定できるという結果が得られた。しかしながら、この1.5時間相当尿は、カテーテルが留置されていなければ膀胱内に約1.5時間貯留した後に排泄されると予想された検体尿である。乳牛の鼠径部を圧迫刺激して排尿1回分に近い尿を人為的に排泄させた尿（スポット尿）を検体尿として利用するのが理想であるが、そのためには1.5時間相当尿とスポット尿とによる推定値に遜色がないことを検証する必要がある。

$$X = x/c \times CreMBW \times MBW \quad \dots\dots\dots \text{式 2-4}$$

ここで、

X : 尿中の総窒素（あるいはアラントイン）の排泄日量（mg）

C : 尿中のクレアチニン排泄日量（mg）

x : 検体尿（本章においてはスポット尿）中の総窒素（あるいはアラントイン）濃度（mg/dL）

c : 検体尿（本章においてはスポット尿）中のクレアチニン濃度（mg/dL）

$CreMBW$: 代謝体重当たりのクレアチニン排泄日量（mg/kg^{0.75} BW・日）

MBW : 代謝体重（kg^{0.75}）

である。

乳牛の飼養現場において、リジン（Lys）とメチオニン（Met）は代謝タンパク質の中でも第一制限アミノ酸とされている（National Research Council 2001a、Xu *et al.* 1998）。そしてMetはLysに比べて不足しやすく、乳牛へのルーメン保護メチオニン（RPMet）の給与により乳生産性に変化が認められることが知られており（Socha *et al.* 2005）、またRPMetの給与により乳生産が改善されることも広く知られている。RPMetの給与により乳中純タンパク質含量が高まることがメタ分析で明らかにされている（Patton

2010)。また RPMet の添加により乾物摂取量 (dry matter intake: DMI) が高まり、また肝機能が改善されることで、乳量が増えることも報告されている (Batistel *et al.* 2017)。

阿久津ら (2002)、井上と坂田 (2002)、倉石と小尾 (2002)、佐藤ら (2002) は、飼料中の粗タンパク質 (crude protein: CP) 含量を 17.7-14.5%、ルーメン分解性タンパク質 (rumen-degradable protein: RDP) 含量を 11.5-8.2% に変化させたところ、RDP 含量の低下に伴い尿中窒素排泄量が低減し、肝臓への負担も軽減されると報告している。そして、乳生産性を鑑みると、CP16.0%、RDP9.8% が適正としている。また、日本飼養標準 (独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構 2006) によると、CP 含量は 15.5% が適正とされているが、井上ら (2003)、関ら (2003)、関ら (2005)、篠原ら (2004)、古賀ら (2009) は、CP を 17.7-14.5%、ルーメン非分解性タンパク質 (rumen-undegradable protein: RUP) 含量を 8.0-5.0% に変化させても乳生産に影響を及ぼさないことを明らかにしている。ところが、CP 含量を日本飼養標準の推奨値よりも 1 ポイント下げた CP14.5% の飼料を給与するには、飼料中アミノ酸のうち、特に Met が過不足なく給与される飼料設計の必要性が想定される。また、CP14.5% あるいはそれ以下の飼料における Met バランスに関する報告がなされていないことから、このような飼料条件での研究成果は価値が高い。

以上の知見を鑑みて、カテーテルを用いずに採取した日中のスポット尿を検体尿として 24 時間尿中の成分を推定する方法は、出納試験の採尿手段として利用が可能であり、かつ、乳牛のタンパク質栄養状態の簡易判定法として利用が可能であるという仮説を立てた。本章の目的は、この仮説を証明するために、24 時間尿を採取する全尿採取法と、スポット尿を採取するスポット尿採取法とで出納試験を実施して、生産性、尿成分、消化率、窒素出納、および Lys および Met 代謝量に関して採尿法間で比較検証することである。

5.2 材料および方法

5.2.1 供試牛と飼養管理

東京都畜産試験場（当時）の他、栃木県、群馬県、千葉県、新潟県、山梨県、長野県および愛知県の公立畜産試験場で飼養している2産以上のホルスタイン種泌乳牛36頭（産後8週の数值、年齢：2.9-8.4歳、平均年齢：5.0±1.6歳、平均体重：662±62 kg）を供試した。ウシの飼養管理は、「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」（文部科学省 2006）に従った。供試牛は、自由に飲水できるようにし、後述する採尿時（連続3日間）を除き、日中約5時間は給与飼料以外のものを摂取できない構造の運動場に放牧し、放牧時以外の時間帯はストールに繋留して飼料摂取が自由にできるようにした。

供試牛は、産次および前産時乳量が均等となるように2区に分け、2種の完全混合飼料（total mixed ration: TMR）のうちのいずれか1種をそれぞれ割り当てた。TMR飼料は、対照区（ $n = 17$ ）と試験区（ $n = 19$ ）であり、対照区にRPMetを加えたものを試験区とした。これらの飼料は、産後遅くとも8週から給与を開始し、午前中に24時間分の給与量を調製し、その2/3量を15:00に、残りを翌日8:00に給与した。泌乳最盛期を過ぎて乳量の増減が比較的安定して乳量の変化の影響を極力排除できると予見される産後14-17週のうちの連続3日間において、供試牛をストールに繋留して出納試験を実施した。RPMetは、メプロン（エボニック ジャパン、東京）を用いた。これらの飼料の構成および化学組成を表5-1に示した。試験区のRPMet給与量は、対照区の乾物量に対して0.034%とした。この給与量は、古賀ら（2009）が実施した試験飼料（CP14.5%、RUP5.2%）のルーメン非分解性Metとして用いた魚粉量に基づいた。

CP、RUP、中性デタージェント繊維（neutral detergent fibre: NDFom）、酸性デタージェント繊維（acid detergent fibre: ADFom）および可消化養分総量（total

Table 5-1. Ingredient and nutrient compositions of diets

Item	Diet	
	Control	Treatment ¹⁾
Ingredient, % of dry matter		
Timothy hay	14.54	14.53
Alfalfa hay	14.54	14.53
Steam-rolled maize	21.09	21.08
Barley	11.05	11.05
Cottonseed with lint	8.98	8.98
Beet pulp	10.16	10.16
Soybean meal	3.22	3.22
Soybean hull	5.11	5.11
Wheat bran	4.96	4.95
Corn gluten feed	3.04	3.04
Molasses sugarcane	1.66	1.66
Mepron ²⁾	–	0.034
Mineral and Vitamin mix ³⁾	0.26	0.26
Calcium carbonate	0.61	0.61
Dicalcium phosphate	0.45	0.45
Salt	0.34	0.34
Nutrient composition, % of dry matter		
CP ⁴⁾	14.3	14.3
RUP ⁵⁾	5.0	5.0
Ether extract	3.6	3.5
NDFom ⁶⁾	37.1	37.0
ADFom ⁷⁾	23.8	23.1
Crude ash	6.6	6.8
Non-fibrous carbohydrate ⁸⁾	38.6	38.6
Total digestible nutrients ⁹⁾	75.6	75.6
Amino acids composition, g/kg of dry matter		
Arginine	7.65	7.64
Histidine	3.20	3.20
Isoleucine	4.63	4.63
Leucine	10.05	10.05
Lysine	6.21	6.21
Methionine	1.85	2.11
Phenylalanine	6.38	6.38
Threonine	5.08	5.08
Valine	6.73	6.72

1) Control + rumen-protected methionine.

2) Rumen-protected methionine.

3) A mix of trace minerals (0.44% Fe, 0.35% Cu, 0.46% Zn, 0.33% Mn, 0.005% Co, 0.13% Mg, 0.04% I) and vitamins A, D, and E (2816 IU/g vitamin A, 264 IU/g vitamin D3, and 2.2 mg/g DL- α tocopherol acetate).

4) Crude protein.

5) Rumen-undegradable protein, designed value.

6) Neutral detergent fiber.

7) Acid detergent fiber.

8) Non-fibrous carbohydrate [%] = 100 – (CP [%] + Ether extract [%] + NDFom [%] + Crude ash [%]).

9) Designed value.

digestible nutrients: TDN) の含量は 2 飼料間で同じとなるように設計した。飼料の TDN は、日本飼養標準 (独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構 2006) の要求量を満たすように設計した。

飼料中のアミノ酸構成の設計は、飼料評価ソフトである AminoCow (version 3.5.2, Evonik Nutrition and Care GmbH) を用いた。対照区および試験区のアミノ酸充足率は、それぞれ、Met が 95%程度と 105%程度、その他のアミノ酸は両飼料とも 110%以上となるように設計した。

5.2.2 採材

出納試験において、体重は試験開始日と最終日とに測定して平均値を算出した。搾乳は 1 日 2 回、ミルクングパーラーで実施し、毎回、乳量を記録し、またサンプルを採取した。糞は 1 日分の全量を採取し、全糞重量および飼料摂取量を毎日記録した。全糞および TMR の一部を毎日採材した。採尿は、(1) 第 2 章記載 (2.2.2 参照) の尿採取器により 24 時間尿を採取する全尿採取法 (全尿群、対照区: $n = 5$; 試験区: $n = 7$)、(2) 乳牛の鼠径部を圧迫刺激して排泄したもの採取するスポット尿採取法 (スポット尿群、対照区: $n = 14$; 試験区: $n = 10$) のいずれかで実施した。前者では 24 時間尿を、毎日、予め 20% (v/v) 硫酸が 700 mL 入った容器に回収し、重量を測定した。後者では毎日、日中 (08:00-16:00) の時間帯にスポット尿を採取し、尿 100mL に対して 20% (v/v) 硫酸を 5 mL 加えた。なお、乳牛の 1 回の平均排尿量は 1.5 kg とされていることから (柏村 2006)、スポット尿の尿量がこの尿量よりも大幅に下回る場合は、時間を置いて再度の採尿をした。24 時間尿およびスポット尿のいずれも、検体尿として約 20 mL を分析時まで -20°C で凍結保管した。

採取した TMR および生糞のサンプルは、 55°C で 48 時間乾燥させた後、1 mm のフルイに通して分析サンプルとした。なお、生糞サンプルの一部は総窒素分析用のために乾燥させずに保管して試料とした。

5.2.3 分析

DMI の測定、TMR、乳、尿および糞の総窒素分析、尿中アラントインおよびクレアチニンの分析は第 3 章第 4 節記載の方法（3.4.2.3 参照）と同じとした。

乳成分はミルコスキャン（フォス、デンマーク）を用いて測定した。

飼料および糞の総エネルギーはボンブ熱量計（CA-4PJ；島津製作所、京都）を用いて測定した。

対照区、RPMet およびルーメン内培養残渣（後述するナイロンバッグ法参照）のアミノ酸は、高速液体クロマトグラフィー（L-8500A、日立ハイテクノロジーズ、東京）を用いて分析した。

微生物体粗タンパク質（microbial crude protein: MCP）代謝量および微生物体窒素の十二指腸流入量（MCP 合成量の指標）を、Chen（1989）の方法により算出した。

Lys および Met の代謝量は、ナイロンバッグ法（Lykos & Varga 1995）により推定したルーメン内培養残渣と、MCP 代謝量とから推定した。なお、ナイロンバッグ法の特殊な手法は次のとおりである。対照区飼料は、粉碎して 2 mm のフルイに通したものを、RPMet は粉碎せずに用いた。これら約 7.5 g を、それぞれナイロンバッグに入れ、対照区および RPMet に対してそれぞれ 4 バッグを準備した。バッグのルーメン内培養には、ルーメンフィステルを装着した 2 産以上の泌乳中期のウシ 2 頭を用いた。これらのウシの飼育には対照区飼料を用いた。ウシ 1 頭につき、2 バッグ（対照区と RPMet）を 06:00 から 18:00 までルーメン内で培養し、また、他の 2 バッグを 18:00 から翌日 06:00 まで培養した。Lys および Met のルーメン内消失率は、培養前後のそれらの試料中含量から求めた。培養残渣中のアミノ酸は小腸へ移行したものとした。DMI とルーメン内消失率とから、飼料由来のルーメン非分解性の Lys および Met の量を算出した。飼料由来のアミノ酸のうちの 80% が小腸で吸収されると仮定した（National Research Council 1989）。また、MCP の 80% を純タンパク質とし（National Research Council 1989）、十二指腸に流入した

それらの 80%が小腸で吸収される、つまり十二指腸に流入した MCP の 64%が純タンパク質として代謝吸収されると仮定した (National Research Council 2001a)。そしてコーネルモデル (Cornell Net Carbohydrate and Protein System; ver. 4.0.31 model、Fox *et al.* 2000) に従い、MCP 代謝量の 8.20%を Met として、2.68%を Lys として、微生物体の Lys および Met の代謝量を算出した。

5.2.4 計算および統計解析

全尿群においては、代謝体重当たりの尿中クレアチニン排泄日量であるクレアチニン代謝体重係数 (CreMBW、 $\text{mg}/\text{kg}^{0.75}\text{BW}\cdot\text{日}$) を算出した。スポット尿群の 24 時間尿中の成分排泄日量の推定は、式 2-4 と第 3 章第 4 節で正確に求めた CreMBW (3.4.3 参照、 $123.94 \text{ mg}/\text{kg}^{0.75} \text{ BW}\cdot\text{日}$) とを利用した。

統計処理は SAS の GLM プロシージャを用いて行った。有意水準が 5%未満の場合は有意差があるものとした。

5.3 結果

全尿群の一部の個体では、尿採取器が排糞による外陰部からのずれ、それにより尿採取器への糞の混入がみられた。

5.3.1 生産性

体重、DMI、乳量および乳成分を表 5-2 に示した。乳脂率のみ採尿法間で有意差が認められた ($P = 0.030$)、それ以外の項目は、採尿法間および飼料間に差は認められなかった ($P > 0.05$)。全尿群における乳脂率 3.0%未満となった個体の割合は、全尿群では 8.3%、スポット尿群では 13.0%であった。

生産性成績 (体重、DMI、乳量、乳成分等) に基づいて AminoCow を用いて Met 充足率を評価したところ、対照区は 96%、試験区は 108%であり、それ以外のアミノ酸の充足率は両区ともに 110%以上であった。

Table 5-2. Effect of urine sampling method and diet on body weight, dry matter intake, dry matter intake, and milk production parameters¹⁾

Item	Method			Diet			P		
	Total	Spot	Treatment ²⁾	Control	Treatment ²⁾	Method	Diet	Method×Diet	
Body weight, kg	689 ± 27	659 ± 17	664 ± 15	684 ± 17	664 ± 15	0.433	0.305	0.750	
Dry matter intake, kg/d	23.6 ± 1.6	25.4 ± 1.0	24.5 ± 0.9	24.6 ± 1.0	24.5 ± 0.9	0.421	0.828	0.347	
Dry matter intake per body weight, %	3.4 ± 0.2	3.8 ± 0.1	3.7 ± 0.1	3.6 ± 0.1	3.7 ± 0.1	0.072	0.232	0.095	
Milk yield, kg/day	38.6 ± 2.6	39.7 ± 1.7	38.8 ± 1.5	39.5 ± 1.6	38.8 ± 1.5	0.753	0.852	0.604	
4% FCM ³⁾ , kg/day	39.3 ± 2.4	35.9 ± 1.5	37.5 ± 1.3	37.7 ± 1.5	37.5 ± 1.3	0.370	0.817	0.328	
Milk composition									
Fat, %	4.09 ± 0.20	3.42 ± 0.13	3.80 ± 0.11	3.71 ± 0.12	3.80 ± 0.11	0.030	0.356	0.322	
Protein, %	3.26 ± 0.10	3.23 ± 0.06	3.21 ± 0.05	3.27 ± 0.06	3.21 ± 0.05	0.860	0.416	0.959	
Lactose, %	4.58 ± 0.09	4.62 ± 0.06	4.56 ± 0.05	4.63 ± 0.05	4.56 ± 0.05	0.714	0.385	0.467	
Milk urea nitrogen, mg/dL	12.95 ± 1.13	11.45 ± 0.32	12.25 ± 0.79	12.15 ± 0.77	12.25 ± 0.79	0.219	0.222	0.435	
Milk component yield									
Fat, kg/day	1.6 ± 0.1	1.3 ± 0.1	1.5 ± 0.1	1.5 ± 0.1	1.5 ± 0.1	0.112	0.618	0.236	
Protein, kg/day	1.3 ± 0.1	1.3 ± 0.1	1.2 ± 0.0	1.3 ± 0.1	1.2 ± 0.0	0.844	0.504	0.621	
Lactose, kg/day	1.8 ± 0.1	1.8 ± 0.1	1.8 ± 0.1	1.8 ± 0.1	1.8 ± 0.1	0.723	0.647	0.532	
Milk urea nitrogen, g/day	5.1 ± 0.7	4.5 ± 0.2	4.6 ± 0.5	5.0 ± 0.5	4.6 ± 0.5	0.427	0.494	0.280	

1) Values are least-squares means ± standard error.

2) Control + rumen-protected methionine.

3) 4% FCM, fat-corrected milk = (0.4 * kg of milk) + (15 * kg of milk fat).

5.3.2 尿成分

クレアチニン、総窒素およびアラントインの尿中濃度および尿中排泄日量、CreBW および CreMBW を表 5-3 に示した。尿成分濃度および排泄量はいずれも採尿法間および飼料間に差は認められなかった ($P > 0.05$)。CreMBW は飼料間に差は認められなかった ($P > 0.05$)。

5.3.3 消化率等

尿量、生糞量、乾物糞量、消化率および TDN を表 5-4 に示した。尿量および生糞量は採尿法間および飼料間に差は認められなかった ($P > 0.05$)。乾物、粗脂肪、NDFom および総エネルギーの消化率と TDN とに関しては、スポット尿採取法が全尿採取法に対して有意に高くなった ($P < 0.05$)。乾物および粗脂肪の消化率は、飼料間で有意差が認められた ($P < 0.05$)。

5.3.4 微生物体窒素量、リジンおよびメチオニンの推定代謝量

RPMet 中の Met は、ルーメン内培養後に 18.9%が消失した。十二指腸に流入した微生物体窒素量、Lys および Met の摂取量、飼料由来のルーメン非分解性アミノ酸の代謝量、微生物体アミノ酸代謝量およびアミノ酸総代謝量（ルーメン非分解性アミノ酸代謝量と微生物体アミノ酸代謝量との合計）を表 5-5 に示した。微生物体窒素量は、採尿法間および飼料間に差は認められなかった ($P > 0.05$)。Lys に関しては、摂取量、ルーメン非分解性の代謝量、微生物体由来の代謝量および総代謝量は、採尿法間および飼料間に差は認められなかった ($P > 0.05$)。Met に関しては、採尿法間でいずれの項目にも差は認められなかった ($P > 0.05$)。Met の摂取量およびルーメン非分解性の代謝量については、試験区が対照区に対して有意に高くなった ($P < 0.05$)。Met の総代謝量については、採尿法間および飼料間に差は認められなかった ($P > 0.05$)。

Table 5-3. Effect of urine sampling method and diet on concentration and excretion of urinary creatinine, allantoin and total nitrogen¹⁾

Item	Method			Diet			P	
	Total	Spot	Control	Treatment ²⁾	Method	Diet	Method×Diet	
Urinary concentration, mg/dL								
Creatinine	81 ± 7	89 ± 5	85 ± 4	85 ± 4	0.417	0.923	0.914	
Total nitrogen	1,023 ± 72	1,001 ± 46	1,017 ± 44	1,007 ± 41	0.899	0.850	0.235	
Allantoin	463 ± 51	519 ± 32	507 ± 31	475 ± 28	0.439	0.465	0.824	
Urinary excretion, g/day								
Creatinine	13.3 ± 0.8	15.4 ± 0.5	14.5 ± 0.5	14.2 ± 0.4	0.081	0.606	0.673	
Total nitrogen	174.4 ± 13.3	175.5 ± 8.4	179.0 ± 8.1	171.0 ± 7.4	0.876	0.734	0.163	
Allantoin	77.5 ± 6.6	89.6 ± 4.2	86.6 ± 4.0	80.5 ± 3.7	0.208	0.271	0.830	
Creatinine, mg/kg ^{0.75} BW·day ³⁾	98.0 ± 6.3	-	96.9 ± 10.0	99.2 ± 7.7	-	0.860	-	

1) Values are least-squares means ± standard error.

2) Control + rumen-protected methionine.

3) Total urine collected only.

- No measure.

Table 5-4. Effect of urine sampling method and diet on urine and feces output, digestibility and total digestible nutrients¹⁾

Item	Method			Diet			P	
	Total	Spot	Treatment ²⁾	Control	Method	Diet	Method×Diet	
							Method	Method×Diet
Urine output, kg/day	17.8 ± 1.6	18.3 ± 1.0	17.6 ± 0.9	18.4 ± 1.0	0.824	0.525	0.824	0.925
Wet feces output, kg/day	54.0 ± 2.6	54.4 ± 4.1	53.1 ± 2.3	55.2 ± 2.5	0.948	0.527	0.948	0.896
Dried feces output, kg/day	8.2 ± 0.5	7.7 ± 0.3	7.7 ± 0.3	8.3 ± 0.3	0.503	0.143	0.503	0.362
Digestibility, %								
Dry matter	64.7 ± 1.6	69.6 ± 1.0	68.4 ± 0.9	65.9 ± 1.0	0.038	0.038	0.038	0.826
Organic matter	66.3 ± 1.6	71.1 ± 1.0	69.8 ± 0.9	67.6 ± 1.0	0.043	0.078	0.043	0.886
Nitrogen	59.3 ± 1.7	63.6 ± 1.1	62.6 ± 1.0	60.3 ± 1.1	0.104	0.113	0.104	0.735
Ether extract	71.5 ± 2.7	80.0 ± 1.7	78.1 ± 1.7	73.3 ± 1.6	0.035	0.036	0.035	0.934
NDFom	47.4 ± 2.5	55.3 ± 1.6	52.8 ± 1.4	50.0 ± 1.6	0.036	0.165	0.036	0.846
ADFom	43.0 ± 2.8	50.3 ± 1.8	48.3 ± 1.6	44.9 ± 1.7	0.077	0.122	0.077	0.946
Non-fibrous carbohydrate	89.8 ± 1.0	92.7 ± 0.7	91.7 ± 0.7	90.8 ± 0.6	0.054	0.191	0.054	0.731
Gross energy	64.0 ± 1.6	68.8 ± 1.0	67.7 ± 0.9	65.2 ± 1.0	0.049	0.061	0.049	0.858
Total digestible nutrients, %	68.8 ± 1.6	73.6 ± 1.0	72.3 ± 0.9	70.2 ± 1.0	0.042	0.090	0.042	0.647

1) Values are least-squares means ± standard error.

2) Control + rumen-protected methionine.

Table 5-5. Effect of urine sampling method and diet on microbial nitrogen flow to the intestine, and flows of amino acids in the digestive tract¹⁾

Item	Method			Diet			P	
	Total	Spot	Control	Treatment ²⁾	Method	Diet	Method×Diet	
Microbial nitrogen flow to intestine ³⁾ , g/day	449 ± 42	527 ± 26	507 ± 25	469 ± 23	0.194	0.281	0.825	
Lysine, g/day								
Intake	146.8 ± 10.0	157.6 ± 6.4	152.5 ± 6.1	151.9 ± 5.6	0.421	0.832	0.347	
Absorbable rumen-undegradable feed ³⁾	70.4 ± 4.8	75.6 ± 3.1	73.1 ± 2.9	72.8 ± 2.7	0.422	0.833	0.347	
Absorbable microbial ³⁾	147.3 ± 13.6	172.9 ± 8.7	166.2 ± 8.3	154.0 ± 7.6	0.196	0.281	0.821	
Total metabolizable ⁴⁾	217.7 ± 16.9	248.5 ± 10.7	239.4 ± 10.3	226.8 ± 9.5	0.204	0.414	0.650	
Methionine, g/day								
Intake	46.6 ± 3.1	50.2 ± 2.0	45.3 ± 1.9	51.5 ± 1.8	0.396	0.008	0.333	
Absorbable rumen-undegradable feed ³⁾	27.3 ± 1.8	29.4 ± 1.2	26.2 ± 1.1	30.6 ± 1.0	0.393	0.002	0.329	
Absorbable microbial ³⁾	48.2 ± 4.5	56.5 ± 2.8	54.3 ± 2.7	50.3 ± 2.5	0.198	0.280	0.817	
Total metabolizable ⁴⁾	75.5 ± 5.7	85.9 ± 3.6	80.5 ± 3.5	80.9 ± 3.2	0.199	0.799	0.622	

1) Values are least-squares means ± standard error.

2) Control + rumen-protected methionine.

3) Estimated value.

4) Total metabolizable = Absorbable rumen-undegradable feed amino acid + Absorbable microbial amino acid.

5.3.5 窒素出納

窒素出納の結果を表 5-6 に示した。窒素摂取量と乳、糞、尿、蓄積、生産（乳および蓄積の合計）および排泄（糞および尿の合計）中の窒素量とについては、いずれも採尿法間および飼料間に差は認められなかった ($P > 0.05$)。窒素摂取量に対する乳、糞、尿、蓄積、生産および排泄中の窒素分配率については、いずれも採尿法間および飼料間に差は認められなかった ($P > 0.05$)。

5.4 考察

5.4.1 生産性

生産性の結果から、スポット尿採取法は乳脂率以外の生産性には影響を与えることはなく、全尿採取法と同様の成績が得られると考えられた。乳脂肪は、第一胃内の酢酸優先型発酵を維持して乳腺への酢酸供給量を促すことで高まるため、飼料中の NDFom 含量と繊維の消化性に関心を持つことが重要とされている（独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構 2006）。本章の飼料中の NDFom 含量は、採尿法間および飼料間で同じとなるように設計していることから、採尿法間での乳脂率の差が生じた要因のうちの飼料的要因は排除でき、それ以外の要因は不明である。以上のことから、スポット尿採取法での生産性成績は、全尿採取法とほぼ遜色ないと示唆された。

一方、飼料間に関する乳生産に関しては、RPMet を給与することで、DMI (Schingoethe *et al.* 1988、Sun *et al.* 2016)、乳量 (Batistel *et al.* 2017)、4%脂肪補正乳量 (Sun *et al.* 2016)、乳蛋白質量および乳蛋白質率 (Patton 2010) は変化したと報告されているが、本章での結果はこれまでの報告と異なった。そして、CP14.5%の飼料に RPMet を加えても、乳生産性に影響を与えないと考えられた。なお、生産成績に基づいたアミノ酸充足率の評価結果から、両飼料におけるアミノ酸のうち、要求量を満たしていな

Table 5-6. Effect of urine sampling method and diet on nitrogen balance¹⁾

Item	Method			Diet			P	
	Total	Spot	Control	Treatment ²⁾	Method	Diet	Method×Diet	
Input and output of nitrogen, g/day								
Intake	525.9 ± 39.1	586.6 ± 24.9	548.5 ± 24.0	564.0 ± 21.9	0.278	0.528	0.691	
Milk	197.3 ± 12.4	200.2 ± 7.9	202.7 ± 7.6	194.8 ± 7.0	0.845	0.506	0.612	
Feces	209.6 ± 12.0	213.5 ± 7.6	215.2 ± 7.3	207.9 ± 6.7	0.777	0.577	0.444	
Urine	174.4 ± 13.3	175.5 ± 8.4	179.0 ± 8.1	171.0 ± 7.4	0.876	0.734	0.163	
Retention ³⁾	-55.4 ± 23.9	-2.9 ± 15.2	-48.7 ± 14.6	-9.6 ± 13.4	0.152	0.069	0.431	
Product ⁴⁾	141.5 ± 30.7	197.6 ± 19.5	153.9 ± 18.8	185.1 ± 17.2	0.225	0.241	0.683	
Waste ⁵⁾	383.9 ± 18.1	389.2 ± 11.5	394.3 ± 11.1	378.9 ± 10.1	0.755	0.540	0.127	
Rate from nitrogen intake, %								
Milk	38.3 ± 2.0	34.2 ± 1.3	37.4 ± 1.2	35.1 ± 1.1	0.163	0.159	0.961	
Feces	40.7 ± 1.7	36.4 ± 1.1	39.7 ± 1.1	37.4 ± 1.0	0.104	0.117	0.729	
Urine	33.3 ± 2.8	30.2 ± 1.8	32.8 ± 1.7	30.7 ± 1.6	0.483	0.476	0.389	
Retention	-12.3 ± 4.2	-0.8 ± 2.7	-9.9 ± 2.6	-3.2 ± 2.4	0.075	0.077	0.461	
Product	26.0 ± 3.4	33.4 ± 2.2	27.5 ± 2.1	31.9 ± 1.9	0.162	0.169	0.382	
Waste	74.0 ± 3.4	66.6 ± 2.2	72.5 ± 2.1	68.1 ± 1.9	0.162	0.169	0.382	

1) Values are least-squares means ± standard error.

2) Control + rumen-protected methionine.

3) Retention = Intake - (Milk + Feces + Urine).

4) Product = Milk + Retention.

5) Waste = Feces + Urine.

いのは対照区の Met のみであることから、両飼料における Met 給与量は設計どおりであったと考えられる。

また、本章の結果を体重 680 kg、DMI24.5 kg、乳量 39 kg、乳脂率 3.8%としたとき、日本飼養標準（独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構 2006）が推奨する飼料中の CP 含量は 15.2%となるが、本章ではこれよりも約 1 ポイント低い飼料を給与している。従って、日本飼養標準の推奨値よりも低い CP14.5%の飼料であっても約 40 kg の乳量を確保できると考えられる。

5.4.2 尿成分

尿成分の結果から、スポット尿採取法は、尿中のクレアチニン、総窒素およびアラントインの濃度および排泄日量に影響を与えることはなく、全尿採取法と同様の成績が得られると考えられる。一方、RPMet の添加の有無に関しても、これらの項目に影響を与えないと考えられる。なお、本章の結果は、RPMet を飼料に加えても尿中アラントイン量は変化しない報告（Krober *et al.* 2000）と一致した。

本章のスポット尿（表 5-3）、第 4 章のカテーテル採尿法による 24 時間尿および 1.5 時間相当尿（表 4-2）における尿成分濃度をそれぞれ比較すると、クレアチニンは 89 ± 5 mg/dL、 101 ± 4 mg/dL、 $93.8-101.9$ mg/dL、総窒素は $1,001 \pm 46$ mg/dL、 $1,186 \pm 39$ mg/dL、 $1,187-1,258$ mg/dL、およびアラントインは 519 ± 32 mg/dL、 427 ± 19 mg/dL、 $389-447$ mg/dL であり、いずれの濃度もスポット尿採取法とカテーテル採尿法とに遜色はないと示唆された。このことから、第 4 章で明らかになったカテーテル採尿法で採取した 1.5 時間相当尿による尿成分の推定法は、スポット尿を検体尿としても適用できる可能性があると考えられた。

CreMBW に関しては、RPMet の有無という飼料条件を変えても影響を受けないと考えられた。このことから、飼料条件が異なっても、CreMBW は一定であり、式 2-4 は成立することが示唆された。ところで、本章の全尿採取法における CreMBW（表 5-3、 $98.0 \text{ mg/kg}^{0.75}$

BW・日) は、第 2 章 (2.3.1 参照、107.2 mg/kg^{0.75} BW・日) よりも低い。その理由は、第 2 章では少なくとも 2 時間に 1 度は尿採取器の装着状況を確認しているが、本章ではそのような頻度での確認作業をしなかったため、装着位置がずれて尿の取りこぼしが発生して、24 時間尿を全量回収できなかったと示唆される。なお、本章での全尿採取の手法は、第 4 章で開発したカテーテル採尿法を採用しなかった。カテーテル採尿法は採尿精度が高いが、留置操作に時間を要する。本章ではほぼ同一時期に出納試験を実施しており、複数頭に対して同時にカテーテルを留置するのは時間的に困難であるため、このような状況でも対応できる尿採取器を用いた採尿方法を選択した。

5.4.3 消化率等

尿量および糞量の結果から、スポット尿採取法は、これらの項目に影響を与えることはなく、全尿採取法と同等の成績が得られると考えられる。

一部の消化率と TDN とに採尿法間で差が生じたが、これらの項目の算出に尿量は関与しない。全尿採取法は尿採取器を装着することでウシにストレスが加わり、自律神経が影響を受けて消化管運動が抑制されたと示唆される。また、消化率等の結果から、RPMet の添加の有無はこれらの項目にあまり影響を与えないことが示唆された。

消化率の結果のうち、有機物 (Ha & Kennelly 1984、Miyaji *et al.* 2012)、NDFom および ADFom (Miyaji & Matsuyama 2016、Miyaji *et al.* 2012) は既報値と近い値であった。また、見かけの窒素消化率は、CP15.5%の飼料では 67.6-68.9% (Miyaji *et al.* 2012)、CP13%の飼料では 66.1% (Ha & Kennelly 1984) と報告されているが、本結果はこれらよりも低くなった。見かけの窒素消化率に関しては、飼料中のタンパク質含量が高まるとルーメン内の発酵が亢進して上昇することから (Ha & Kennelly 1984)、本章における飼料中の CP 含量が 14.5%と低いために見かけの窒素消化率が既報値よりも低くなったと考えられる。

5.4.4 微生物体窒素量、リジンおよびメチオニンの推定代謝量

微生物体窒素の十二指腸流入量、Lys および Met 代謝量の結果から、スポット尿採取法は、これらの項目に影響を与えることはなく、全尿採取法と同等の成績が得られると考えられる。

Lys に関しては、飼料間におけるその総代謝量に差がないことから、設計どおりの結果になったと考えられる。一方、Met に関しては、Met 摂取量および非分解性の代謝量は対照区が高くなっていることから、設計どおりの結果になったと考えられる。しかし、差は認められないものの試験区における微生物体 Met 代謝量が低く推移したことで、Met の総代謝量は飼料間に変化がみられなかったと示唆される。RPMet のルーメン内分解率は 18.9%と低いことから（5.3.4 参照）、RPMet がルーメン内で分解されたことに起因してルーメン微生物の下部消化管への流入量が阻害されたとは考えにくく、試験区における微生物体 Met 代謝量が低下した理由は不明である。

以上のことから、CP14.5%の飼料に RPMet を加えても Met の総代謝量は高まらないことが明らかになった。このことは、RPMet の給与が乳生産性に影響を与えなかったことを裏付けることができる。従って、スポット尿採取法によって、MCP 合成量および微生物体アミノ酸代謝量を適正にモニタリングできることが明らかになった。

5.4.5 窒素出納

窒素出納の結果から、スポット尿採取法であっても全尿採取法と同等のデータが得られると考えられる。

泌乳初期の乳牛では乳生産に伴うエネルギー要求量を満たすために体脂肪が導入されるため（National Research Council 2001b）、摂取窒素に対する窒素蓄積割合が負となることも考えられる。しかしながら、本章の研究は泌乳中期に実施していることから、窒素蓄積割合が負となることは考えられず、理論上はゼロとなる。従って、本結果における負の値は誤差と考えられる。なお、差は認められないものの、スポット尿採取法の窒素蓄積

割合（表 5-6、-0.8%）は全尿採取法（-12.3%）に対してゼロに近い。その理由は、全尿採取法では尿採取器内に糞が混入して正確な採尿ができなかったことに起因すると推察される。このことから、スポット尿採取法を採択した方が窒素出納の精度が優れると考えられる。

乳牛に魚粉を給与することで乳生産における不足しがちなアミノ酸が補給されるので、乳生産性に影響を与えることなく飼料中の CP 水準を下げることができ、また、尿中総窒素排泄量を下げることができる（寺田と塩谷 1998、扇ら 2002、扇ら 2003）。ところが本章の結果から、不足しがちなアミノ酸である Met を RPMet として CP14.5%の飼料に加えても、窒素出納に影響を与えないことが明らかになった。このことは、RPMet を給与しても Met の総代謝量に影響を与えなかったことを裏付けている。従って、スポット尿採取法により、尿中総窒素排泄量から CP 給与量の適正性をモニタリングできることが明らかになった。

5.4.6 結論

RPMet の添加の有無という異なる飼料条件であっても、式 2-4（CreMBW: 123.94 mg/kg^{0.75} BW・日）を用いて推定した 24 時間尿中の成分排泄量に関する試験成績は、採尿法間に大きな遜色が認められなかった。また、スポット尿採取法により、MCP 合成量および微生物体アミノ酸代謝量と、尿中総窒素排泄量から CP 給与量の適正性をモニタリングできた。これらのことから、本研究の仮説が証明された。スポット尿採取法は、全尿採取法と同様に出納試験における採尿手段として利用でき、かつ、乳牛のタンパク質給与水準の簡易判定法として利用できる。

なお、CP14.5%の飼料に RPMet を加えても総代謝 Met 量に変化がないので、乳生産に大きな影響を与えなかった。また、日本飼養標準の推奨値よりも低い CP14.5%の飼料であっても約 40 kg/日の乳量を確保できることが明らかになった。

5.5 小括

代謝体重当たりの尿中クレアチニン排泄日量 (CreMBW) を $123.94 \text{ mg/kg}^{0.75} \text{ BW} \cdot \text{日}$ とし、スポット尿を検体尿として採取し、式 [推定尿中総窒素 (あるいはアラントイン) 排泄日量 (mg) = スポット尿の総窒素 (あるいはアラントイン) 濃度 (mg/dL) / スポット尿のクレアチニン濃度 (mg/dL) \times CreMBW \times 代謝体重 ($\text{kg}^{0.75}$)] に当てはめて、24 時間尿中の総窒素およびアラントインの排泄量を推定するスポット尿採取法の確立を試みた。ホルスタイン種泌乳牛 36 頭を 2 区に分け、TMR 飼料 2 種のいずれかを給与し、出納試験を実施した。いずれの飼料も、粗タンパク質 (CP) 含量は日本飼養標準の推奨値よりも低い 14.5% であり、一方の飼料はメチオニン (Met) 要求量を満たさない (対照区、Met 充足率 96%、 $n = 19$)、他方は対照区にルーメン保護メチオニン (RPMet) を給与して満たす (試験区、Met 充足率 106%、 $n = 17$) ものとした。出納試験では、糞は全量を採取し、尿は尿採取器を用いた全尿採取法 ($n = 12$) あるいはスポット尿採取法 ($n = 24$) とした。体重、乾物摂取量、乳量 (約 40 kg/日) および乳脂率以外の乳成分、尿量および糞量は、採尿法間および飼料間に差は認められなかった。CreMBW は RPMet の有無という飼料条件を変えても差が認められなかったことから、異なる飼料条件であっても、CreMBW は一定であり、また前記式は成立することが示唆された。消化率等のうちの大半および可消化養分総量は、スポット尿採取区が有意に高くなり、また、これら項目の大半は飼料間に差は認められなかった。ルーメン微生物体粗タンパク質 (MCP) 合成量の指標となる微生物体窒素の十二指腸流入量は、採尿法間および飼料間に差は認められなかった。Met 摂取量および飼料由来ルーメン非分解性 Met 代謝量は試験区が有意に高くなったが、微生物体 Met 代謝量および Met 総代謝量 (非分解性と微生物体の合計) は飼料間に差は認められなかった。以上の結果から、CP 水準が日本飼養標準の推奨値よりも低い 14.5% の飼料であっても、約 40 kg/日の乳量が確保できることが明らかになった。RPMet を給与しても Met の総代謝量は変化しないので、乳生産に大きな影響を与えないと考えられた。また、スポ

ット尿採取法は全尿採取法による出納試験の成績と大きな遜色が認められないので、出納試験における採尿手段として利用できる。このスポット尿採取法は、MCP 合成量および微生物体アミノ酸代謝量と尿中窒素排泄量から CP 給与量の適正性を把握できるので、乳牛のタンパク質給与水準の簡易判定法として利用できることが明らかになった。

第 6 章 総合考察

6.1 目的

今後の我が国の畜産業においては、価格の安い輸入畜産物に対抗するために生産費用の削減と、環境に配慮した飼養管理の実現という課題がある。乳牛の飼養現場において、この課題を解決するには、粗タンパク質（CP）給与量の適正化とルーメン内での微生物体タンパク質（MCP）合成量の最大化とを図り、飼料費の削減および窒素の排泄を低減した飼養管理が必要である。乳中尿素態窒素は、ルーメン内でのアンモニア生成量を反映するので飼料中タンパク質の利用状況の指標となるが、MCP 合成量の指標とはならない。また、生乳であることから検体が腐敗しやすく、測定時まで検体を冷蔵保管する必要があるという欠点がある。24 時間に排泄される尿（24 時間尿）を採取して、尿中総窒素排泄量の把握、および尿中のアラントイン排泄量による MCP 合成量の推定は、CP 給与量の適正化と MCP 合成量の最大化とをモニタリングできるが、乳牛の飼養現場において 24 時間尿を回収することは容易ではない。

排尿数回分の尿を検体尿として採取し、検体尿中のクレアチニンを指示物質として 24 時間尿の成分を推定する方法が報告されている。しかしながら、作業が容易である日中に検体尿を採取して、総窒素およびアラントインの排泄日量を推定する方法は未確立である。そこで本研究の目的は、これらの尿成分の推定法を確立して、泌乳牛におけるタンパク栄養状態の簡易判定法を開発することである。

6.2 検体尿（4 時間尿）による尿成分の排泄日量の推定に関する検証

第 2 章では、日中 4 時間のうちに排泄された尿（4 時間尿）を検体尿として、泌乳牛の外陰部に尿採取器を装着する採尿法（従来採尿法）により、尿中の総窒素およびアラントインの排泄日量の推定について検証した。

体重当たりの尿中クレアチニン排泄日量（CreBW）および代謝体重当たりの尿中クレアチニン排泄日量（CreMBW）は個体間で一定であったが、CreBW よりも変動の少ない CreMBW（107.2 mg/kg^{0.75} BW・日）が 24 時間尿の推定指標となることが明らかになった。

総窒素濃度/クレアチニン濃度比 (N/C 比)、およびアラントイン濃度/クレアチニン濃度比 (A/C 比) は、各 4 時間尿と 24 時間尿とに差が認められなかったことから、式 2-4 が成立する。

$$X = x/c \times CreMBW \times MBW \quad \dots\dots\dots \text{式 2-4}$$

ここで、

X : 尿中の総窒素 (あるいはアラントイン) の排泄日量 (mg)

C : 尿中のクレアチニン排泄日量 (mg)

x : 検体尿中の総窒素 (あるいはアラントイン) の濃度 (mg/dL)

c : 検体尿中のクレアチニン濃度 (mg/dL)

MBW : 代謝体重 ($\text{kg}^{0.75}$)

式 2-4 の有効性を検証するために、式 2-4 を利用して日中の 4 時間尿 (08:00-12:00 または 12:00-16:00) のデータから推定値を求めた。その結果、推定値と実測値の間には有意な相関が認められ ($r > 0.750$ 、 $P < 0.001$)、また、推定値 = 実測値と判断された。以上のことから、式 2-4 を利用することで日中の 4 時間尿から、総窒素およびアラントインの排泄日量の推定が可能であることが明らかになった。

ところが採尿労力を鑑みると、検体尿は更に短時間に排泄される尿を用いる方が好ましいという課題が浮上した。そこで、短時間に排泄される尿の採取法を第 3 章で開発した後、この課題の解決を第 4 章以降で試みた。

6.3 バルーンカテーテルを用いた採尿法の開発

第 3 章では、第 2 章よりも更に短時間に排泄される尿を検体尿として採取して尿成分の推定の可能性を検討するために、バルーンカテーテル (カテーテル) を用いた採尿方法を開発して、規定の時間に緻密かつ正確に検体尿の採取が可能なカテーテル採尿法を開発した。

第1節では、バルーンの小さいカテーテルを利用することで、膀胱の負担が軽減できるという仮説を立てた。この仮説を証明するために、バルーン容量の異なる3種のカテーテル（従来サイズ：70 mL、極小サイズ：30 mL、小サイズ：45 mL）をウシの膀胱に留置して、膀胱損傷の指標としてカテーテル関連潜血（ > 50 red blood cell/high powered field）の発生率を比較した。極小サイズはウシが異常行動を示したことから、バルーン容量30 mLのカテーテルはウシにとって小さすぎることが判明した。小サイズは従来サイズよりもカテーテル関連潜血の発生率が有意に低いこと（ $P < 0.05$ ）、カテーテル関連潜血の発生原因はバルーンが膀胱壁を圧迫して損傷を与えていることから、仮説は証明され、バルーン容量45 mLのカテーテルは従来よりもバルーン表面積が小さいのでウシにとって最適であることが判明した。

第2節では、搾乳作業に伴う採尿の中断、採尿経路の分離および開放と、このことにより発生するカテーテル関連尿路感染症（CAUTI、尿中細菌数： $> 3.0 \times 10^2$ colony forming unit/mL）の抑制法を検討した。採尿経路をカテーテル端での分離（近位分離）と採尿経路末端での分離（遠位分離）とを比較したところ、遠位分離ではCAUTIが発生しなかった。このことから、膀胱からできる限り離れた部位で採尿経路を分離することで膀胱内への細菌侵入およびCAUTI発生が抑制できることが明らかになった。

第3節では、第1節および第2節の結果で明らかになったカテーテル採尿法によるCAUTIの発生率を調査した。CAUTIの発生リスクはカテーテル留置1日当たり3.0%であり、CAUTIに罹患しても抗生物質で治療できることが明らかになった。また、カテーテル留置前と後とで、尿pH、体温および血算に差が認められなかったことから、カテーテルの留置はウシへ著しい悪影響を与えないことが明らかになった。

第4節では、カテーテル採尿法による出納試験の成績が従来採尿法のものと遜色ないかを調査した。乾物摂取量、乳量、尿量、生糞量および消化率等は採尿法間に差が認められなかったことから、カテーテル採尿法は栄養摂取、乳生産性および消化機能に影響を与え

ることなく従来採尿法と同様の成績が得られることが明らかになった。またカテーテル採尿法は従来採尿法に対して、尿量が多いこと（有意差なし）、窒素摂取量に対する尿中総窒素分配率が有意に高いことから（ $P < 0.05$ ）、カテーテル採尿法は尿の取りこぼしを減らして正確に CreMBW を求められることが明らかになった。従って、カテーテル採尿法は従来採尿法よりも精度の優れた採尿手段と位置づけることができた。

6.4 カテーテル採尿法により採取した検体尿（1.5 時間相当尿）による尿成分の排泄日量の推定に関する検証

第 4 章では、正確に採尿できるカテーテル採尿法を第 3 章で開発したことから、乳牛の平均排尿間隔を 1.5 時間と仮定して、カテーテルが留置されていなければ膀胱内に 1.5 時間の貯留が想定された尿をカテーテル採尿法で、作業の容易な日中に採取した検体尿（08:30 から 16:00 まで 1.5 時間インターバルで採取：1.5 時間相当尿）を含む 24 時間尿を採取し、この 1.5 時間相当尿から 24 時間尿の総窒素およびアラントインの排泄量を精度良く推定するのに適した採尿時間帯を検証した。

CreMBW は、第 2 章の結果とは異なり個体間に差が認められた。暑熱環境での調査であったことから筋肉の異化が生じて、尿中のクレアチニン濃度が高まったと示唆された。しかし個体毎の CreMBW は日間で差は認められず一定といえることから、暑熱環境であっても個体毎の CreMBW を調査してそれを採用することで、式 2-4 は成立し、24 時間尿の成分推定の可能性が示唆された。

N/C 比においては、一部の 1.5 時間相当尿と 24 時間尿とに有意差が認められたことから、1.5 時間相当尿を利用した 24 時間尿中の総窒素排泄量の推定精度は劣る懸念があった。一方、A/C 比においては、各 1.5 時間相当尿と 24 時間尿とに差は認められなかったことから、1.5 時間相当尿を利用したアラントイン排泄量の推定精度は高いことが示唆された。

式 2-4 および個体毎の CreMBW を用いて各 1.5 時間尿から 24 時間尿を推定したところ、推定値と実測値との間に有意な相関が認められ（総窒素： $r = 0.66-0.80$ ； $P < 0.004$ 、アラントイン： $r = 0.57-0.86$ ； $P < 0.02$ ）、また、総窒素およびアラントインに関して、いずれの 1.5 時間相当尿においても、回帰性の検定結果から推定値＝実測値と判断された。

以上のことから、CreMBW は暑熱環境では個体毎の数値を、非暑熱環境では 123.94 mg/kg^{0.75}BW・日を用いて式 2-4 を利用することで、08:30 から 16:00 までの日中に採取した 1.5 時尿相当尿のいずれを採用しても、24 時間尿中の総窒素およびアラントインの排泄量が推定できることが示唆された。

6.5 スポット尿による尿成分の推定法およびタンパク質給与水準の簡易判定法の検証

第 5 章では、カテーテル採尿法による 1.5 時間相当尿から尿成分排泄日量が推定できることが第 4 章で明らかになったことから、カテーテルを用いずに採取した日中のスポット尿を検体尿として採取して式 2-4 を利用して 24 時間尿を推定するスポット尿採取法は、出納試験の採尿手段として利用が可能であり、かつ、乳牛のタンパク質給与水準の簡易判定法として利用が可能であるという仮説を立てた。この仮説を証明するために、従来採尿法で 24 時間尿を採取する全尿採取法と、スポット尿採取法とで出納試験を実施した。ホルスタイン種経産牛を 2 区に分け、メチオニン（Met）要求量を満たさない、あるいはルーメン保護メチオニン（RPMet）を給与して満たす飼料のいずれかを給与した。なお飼料の CP 含量は、日本飼養標準の推奨値よりも 1 ポイント低い 14.5%とした。

生産性に関する成績は、採尿法間および飼料間であまり差が認められなかったことから、スポット尿採取法は生産性に大きな影響を与えることはなく、全尿採取法と同様の成績が得られると考えられた。また、日本飼養標準の推奨値よりも低い CP14.5%の飼料であ

っても約 40 kg/日の乳量を確保できること、このような飼料に RPMet を加えても乳生産性に大きな影響を与えないことが明らかになった。

尿成分、尿量および糞量に関して、採尿法間および飼料間に差は認められなかったことから、スポット尿採取法はこれらの項目において全尿採取法と同等の成績が得られると考えられた。

CreMBW は、RPMet の有無という飼料条件を変えても差が認められなかったことから、飼料条件が異なっても、CreMBW は一定であり、また式 2-4 は成立することが示唆された。

消化率に関しては、全尿採取法における一部の項目が有意に低くなった。その理由は、尿採取器の装着がウシにストレスを与え、自律神経が影響を受けて消化管運動が抑制されたと示唆された。なお、RPMet の添加の有無は消化率に大きな影響を与えないことが示唆された。

微生物体窒素の十二指腸流入量（MCP 合成量の指標）および Met の総代謝量は、飼料間および採尿法間で差は認められなかった。このことから、スポット尿採取法は全尿採取法と遜色ないことが明らかになった。

窒素出納に関するいずれの測定項目も採尿法間および飼料間に差は認められなかったが、スポット尿採取法において、窒素摂取量に対する蓄積窒素分配率はゼロという理論値に近い（全尿採取法：-12.3%、スポット尿採取法：-0.8%）、スポット尿採取法は推定精度が優れていることが明らかになった。また、不足しがちなアミノ酸である Met を RPMet として CP14.5%の飼料に加えても、窒素出納に影響を与えないことが明らかになった。このことは、RPMet を給与しても Met の総代謝量に影響を与えなかったこと、および生産性に影響を与えなかったことを裏付けている。

以上のことから、CP14.5%の飼料に RPMet を加えても Met の総代謝量は変化しないため、乳生産に大きな影響を与えないこと、日本飼養標準の推奨値よりも低い CP14.5%の飼料であっても約 40 kg/日の乳量を確保できることが明らかになった。また、日中のスポ

ット尿を検体尿として採取して 24 時間尿中の成分を推定する方法は、出納試験における採尿手段として利用でき、かつ、泌乳牛におけるタンパク質栄養状態の簡易判定法として利用できるという仮説が証明されたことが明らかになった。

6.6 結論

日中のスポット尿を検体尿として採取し、式 2-4 ($\text{CreMBW: } 123.94 \text{ mg/kg}^{0.75} \text{ BW} \cdot \text{日}$) を利用することで、24 時間尿中の総窒素およびアラントインの排泄量が推定できる。この推定法は、MCP 合成量および微生物体アミノ酸代謝量と、尿中総窒素排泄量から CP 給与量の適正性をモニタリングできるので、泌乳牛におけるタンパク質栄養状態の簡易判定法として利用できることが明らかになった。この簡易判定法は、全尿採取法に比較して少ない労力が出納試験が実施できるので、乳牛飼養に関する研究の発展に寄与するものといえる。

なお、本研究（第 5 章）による判定法は、（1）ウシの平均年齢が 5.0 ± 1.6 歳、（2）産後 14-17 週、（3）ストールで飼養、（4）完全混合飼料を給与、という条件下で開発したものである。血中クレアチニンは筋肉の疲労あるいは怪我による筋肉の損傷で高値となることが知られているため、これに伴い尿中クレアチニン濃度も高まると予見される。このことから、本研究と異なる条件下（例えば、育成牛、高齢牛、産直後、発情期あるいは放牧から畜舎飼養への飼養形態の変更直後、激しい運動後等）では、判定を誤る可能性がある。今後は、このような条件における尿成分推定法の開発が課題といえる。

謝 辞

本博士論文をまとめるにあたり、主査として多大なご指導、ご助言ならびにご高閲を賜りました東京農工大学大学院 農学研究院 生物生産科学部門 教授 佐藤 幹 博士、予備審査の段階から細部にわたり御指導頂きました宇都宮大学 農学部 生物資源科学科 教授 長尾 慶和 博士に謹んで深謝申し上げます。論文を提出するにあたり、副査としての確かつ貴重なご助言を賜りました東京農工大学大学院 農学研究院 生物生産科学部門 教授 新井 克彦 博士、茨城大学 農学部 食生命科学科 教授 豊田 淳 博士、東京農工大学大学院 農学研究院 生物生産科学部門 准教授 杉村 智史 博士に深謝申し上げます。

筆者は現在、東京都産業労働局 農林水産部 農業振興課に配属されていますが、本論文は東京都畜産試験場 応用技術部（後に、公益財団法人東京都農林水産振興財団 東京都農林総合研究センター 畜産技術科）配属時の研究成績をまとめたものです。大家畜である乳牛の飼養に関する研究は、筆者一人では到底なし得るものではなく、多岐にわたりご指導およびご協力を賜りました。

実験計画および統計解析分野について、農林水産省畜産草地研究所（現 国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構 畜産草地研究部門） 松本 光人 博士（現 日本獣医生命科学大学 客員教授）、寺田 文典 博士（現 東北大学大学院 農学研究科 教授）、栗原 光規 博士（現 同機構 本部）、梶川 博 博士（現 日本大学 生物資源科学部 教授）にご指導ご協力賜りました。貴重なご指導に深く感謝申し上げます。

研究遂行にあたり、多大なご指導、ご協力およびご配慮を賜りました元東京農工大学 農学部 教授 板橋 久雄 博士、東京都農林総合研究センター 初代所長 故 中村 浩 博士、元同所長 保科 次雄 博士、同所長 望月 龍也 博士、元同センター 畜産技術科長 大久保 光行 氏（現 東京都農業共済組合）に謹んで感謝申し上げます。

本研究の一部は、農林省畜産試験場（当時） 故 亀岡 暄一 博士により発足した関東東海北陸の乳牛協定研究に関連しており、第2章および第5章は長野県を主査とした「環

境に配慮した高泌乳牛のための飼養管理技術の確立」(2002年度試験)、第3章第4節は新潟県を主査とした「動物質飼料に依存しない高泌乳牛の飼養管理技術の確立」(2004年度および2005年度試験)および「先端技術を活用した農林水産研究高度化事業」(2004年度および2005年度試験、課題番号:1675)の研究成績に基づくものです。研究成績を学位論文として利用することにご承諾下さいました公立畜産試験場研究員である長野県 古賀 照章 氏(長野県主査時研究統括者)、大久保 吉啓 氏、新潟県 関 誠 氏(新潟県主査時研究統括者)、栃木県 阿久津 和弘 氏、群馬県 篠原 晃 氏、千葉県 齊藤 公一 氏、山梨県 倉石 照美 氏、愛知県 佐藤 精 氏、東京都 坂田 雅史 氏、西木 秀人 氏、井上 和典 氏に厚く感謝申し上げます。また、研究遂行にご協力賜りました各公立畜産試験場関係者各位に御礼申し上げます。第3章第1節の病理学的調査は、元東京都家畜保健衛生所 中村 博 氏にご協力を頂きました。心より御礼申し上げます。

筆者が国立精神・神経センター(現 国立研究開発法人国立精神・神経医療研究センター) 神経研究所 遺伝子疾患治療研究部に在職していた際、武田 伸一 博士(現 同センター理事)、鈴木 友子 博士 から、日々、厳しいご指導の下、研究の基本と研究哲学をご教授賜りました。両博士によるご教授が無ければ、仕事、家事、育児等と並行して17年にわたり本研究活動を継続させることは到底不可能でした。重ねて御礼申し上げます。

本研究データは多数の乳牛によって裏付けされています。データを得るために研究に協力してくれた彼女達に感謝致します。

最後に、論文投稿から博士論文をまとめる今日まで、研究活動を陰ながら応援して頂いた東京都農林総合研究センター研究員の方々をはじめ、同僚、友人、妻、子ども、両親に感謝申し上げます。

東京府種畜場(東京都畜産試験場の前身) 創設 100 年目の年
令和元年(2019年) 8月12日 自宅にて 田村 哲生

参考文献

阿部 亮. 1988. 炭水化物成分を中心とした飼料分析法とその飼料栄養評価法への応用. 畜産試験場研究資料 2.

足立 憲隆・宇多 三男・小林 宏子・阿部 正彦・富田 道則・稲葉 満・林 登・藤井 清和・瀬尾 哲則・野中 敏道・清水 正裕・野中 最子・寺田 文典. 2003. ルーメンバイパスメチオニン製剤の利用による乳生産の効率化と窒素排泄量の低減. 日本畜産学会報 74, 397-405.

阿久 津和弘・磯 健司・古賀 照章・大久保 吉啓・篠原 晃・松原 英二・木村 容子・関 誠・齊藤 公一・井上 和典・内田 哲二・佐藤 精・清水 景子・倉石 照美・梶川 博・寺田 文典. 飼料中の粗蛋白質および分解性蛋白質含量が泌乳前期の乳生産に及ぼす影響：1 飼料摂取量および乳生産. 日本畜産学会 第 100 回大会 講演要旨, 128-10.

Albin RC, Clanton DC. 1966. Factors contributing to the variation in urinary creatinine and creatinine-nitrogen ratios in beef cattle. *Journal of Animal Science* 25, 107-112.

Association of Official Analytical Chemists. 1990. Kenneth H. ed. Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 15th edition. Association of Official Analytical Chemists. Arlington.

Asai H, Hayashi N, Takai N, Yoshimura Y, Nakamura Y, Yokota H, Kita K. 2005. Estimation of daily urinary potassium excretion using urinary creatinine as an index substance in prepartum dairy cows. *Animal Science Journal* 76, 51–54.

浅井 英樹. 2006. 近赤外分光法を利用した乳牛の栄養診断法の開発. 東京農工大学学位論文.

Anderson RU. 1979. Response of bladder and urethral mucosa to catheterization. *Journal of the American Medical Association* 242, 451–453.

Batistel F, Arroyo JM, Bellingeri A, Wang L, Saremi B, Parys C, Trevisi E, Cardoso FC, Loor JJ. 2017. Ethyl-cellulose rumen-protected methionine enhances performance during the periparturient period and early lactation in Holstein dairy cows. *Journal of Dairy Science* 100, 7455–7467.

Birkelo CP, Brouk MJ, Schingoethe DJ. 2004. The energy content of wet corn distillers grains for lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science* 87, 1815–1819.

Britt MR, Garibaldi RA, Miller WA, Hebertson RM, Burke JP. 1977. Antimicrobial prophylaxis for catheter-associated bacteriuria. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 11, 240–243.

Broderick GA. 2003. Effects of varying dietary protein and energy levels on the production of lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science* 86, 1370–1381.

Burke JP, Garibaldi RA, Britt MR., Jacobson JA, Conti M, Alling DW. 1981. Prevention of catheter-associated urinary tract infections. Efficacy of daily meatal care regimens. *American journal of medicine* 70, 655–658.

Burke JP, Jacobson JA, Garibaldi RA, Conti MT, Alling DW. 1983. Evaluation of daily meatal care with poly-antibiotic ointment in prevention of urinary catheter-associated bacteriuria. *Journal of Urology* 129, 331–334.

Burkholder KM, Guyton AD, McKinney JM, Knowlton KF. 2004. The effect of steam flaked or dry ground corn and supplemental phytic acid on nitrogen partitioning in lactating cows and ammonia emission from manure. *Journal of Dairy Science* 87, 2546–2553.

Castillo AR, Kebreab E, Beever DE, Barbi JH, Sutton JD, Kirby HC, France J. 2001. The effect of protein supplementation on nitrogen utilization in lactating dairy cows fed grass silage diets. *Journal of Animal Science* 79, 247–253.

Center for Disease Control and Prevention. 1981. Guideline for Prevention of Catheter-associated Urinary Tract Infections. http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/gl_catheter_assoc.html (2005/3/22 閱覽)

Chen XB. 1989. Excretion of purine derivatives by sheep and cattle and its use for the estimation of absorbed microbial protein. Ph.D. Thesis. University of Aberdeen. Aberdeen.

Chen XB, Mejia AT, Kyle DJ, Ørskov ER. 1995. Evaluation of the use of the purine derivative: creatinine ratio in spot urine and plasma samples as an index of microbial protein supply in ruminants: studies in sheep. *Journal of Agricultural Science, Cambridge* 125, 137–143.

Crutchfield, W. O. 1968. A technique for placement of an indwelling catheter in the cow. *Veterinary medicine, small animal clinician* 63, 1141–1144.

Cunningham HM, Frederick GL, Brisson GJ. 1955. Application of an inflatable urethral catheter for urine collection from cows. *Journal of Dairy Science* 38, 997–999.

David C, Van M, Thomas JD. 1996. Ruminant Renal System. In: Bradford PS ed. *Large animal internal medicine: Diseases of horses, cattle, sheep, and goat*. 2nd edition. pp. 975–1000. Mosby. St.Louis.

Dinn NE, Shelford JA, Fisher LJ. 1998. Use of the Cornell net carbohydrate and protein system and rumen-protected lysine and methionine to reduce nitrogen excretion from lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science* 81, 229–237.

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構編. 2007. 日本飼養標準・乳牛（2006年版）. 中央畜産会. 東京.

Erb RE, Surve AH, Randel RD, Garverick HA. 1977. Urinary creatinine as an index of urinary excretion of estrogen in cows prepartum and postpartum. *Journal of Dairy Science* 60, 1057–1063.

Erb RE, Tillson SA, Hodgen GD, Plotka ED. 1970. Urinary creatinine as an index compound for estimating rate of excretion of steroids in the domestic sow. *Journal of Animal Science* 30, 79–85.

Ferguson JD, Galligan DT, Blanchard T, Reeves M. 1993. Serum urea nitrogen and conception rate: The usefulness of test information. *Journal of Dairy Science* 76, 3742–3746.

Folin O. 1905. Approximately complete analysis of thirty "normal" urines. *American Journal of Physiology* 13, 45–65.

Fox DG, Tylutki TP, Van Amburgh ME, Chase LE, Pell AN, Overton TR, Rasmussen CN, Tedeschi LO, Durbal VM. 2000. The net carbohydrate and protein system for evaluating herd nutrition and nutrient excretion CNCPS version 4.0.31. Model documentation. Cornell University, Ithaca, NY.

藤原 勉. 2004. 核酸の代謝. 新ルーメンの世界—微生物生態と代謝制御. 小野寺良次 監修・板橋久雄 編. 第1版. pp. 279-299. 農山漁村文化協会. 東京.

Fujihara T, Ørskov ER, Peeds PJ, Kyle DJ. 1987. The effect of protein infusion on urinary excretion of purine derivatives in ruminants nourished by intragastric nutrition. *Journal of Agricultural Science, Cambridge* 109, 7–12.

古村 圭子. 2006a. 搾乳の生理と乳量および乳成分に影響する要因. 乳牛管理の基礎と応用 (柏村 文郎・増子 孝義・古村 圭子). 2006年改訂版. pp. 128-144. デーリィ・ジャパン. 東京

古村 圭子. 2006b. 乳牛と泌乳. 乳牛管理の基礎と応用 (柏村 文郎・増子 孝義・古村 圭子). 2006年改訂版. pp. 35-62. デーリィ・ジャパン. 東京

Fuller CE, Threatte GA, Henry JB. 2001. Basic examination of urine. In: Henry JB, Davey FR, Herman CJ, McPherson RA, Pincus MR, Threatte GA, Woods GL eds. Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods. 20th edition. pp. 367-402. Saunders. Philadelphia.

Gordon FJ, McMurray CH. 1979. The optimum level of protein in the supplement for dairy cows with access to grass silage. *Animal Science* 29, 283-291.

Gressley T F, Armentano LE. 2005. Effect of abomasal pectin infusion on digestion and nitrogen balance in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science* 88, 4028-4044.

Ha JK, Kennelly JJ. 1984. Effect of protein on nutrient digestion and milk production by Holstein cows. *Journal of Dairy Science* 67, 2302-2307.

Hristov AN, Etter RP, Ropp JK, Grande KL. 2004. Effect of dietary crude protein level and degradability on ruminal fermentation and nitrogen utilization in lactating dairy cows. *Journal of Animal Science* 82, 3219-3229.

Hristov AN, McAllister TA, Cheng KJ. 2000. Intraruminal supplementation with increasing levels of exogenous polysaccharide-degrading enzymes: effects on nutrient digestion in cattle fed a barley grain diet. *Journal of animal science* 78, 477-487.

Huth TS, Burke JP, Larsen RA, Classen DC, Stevens LE. 1992. Clinical trial of junction seals for the prevention of urinary catheter-associated bacteriuria. *Archives of internal medicine* 152, 807-812.

飯島 昭人・松浦 一人・藤本 順子・岩瀬 信夫. 1996. 分析依頼粗飼料の硝酸態窒素濃度-ソルゴーに対する窒素施用量と硝酸態窒素の関係. *畜産の研究* 50, 693-697.

井上 和典・坂田 雅史. 2002. 乳牛の飼養技術と肉質生体測定試験：平成 12～14 年度：環境に配慮した高泌乳牛のための飼養管理技術の確立. *東京都畜産試験場年報 平成 13 年度 (2001 年)*, 12-13.

井上 和典・坂田 雅史・西木 秀人・関 誠・古賀 照章・大久保 吉啓・阿久津 和弘・佐藤 精・齊藤 公一・石崎 重信・篠原 晃・倉石 照美・梶川 博・栗原 光規. 2003. 飼料中の粗蛋白質および非分解性蛋白質含量が泌乳前期の乳生産に及ぼす影響：1 飼料摂取量および乳生産. *日本畜産学会 第 101 回大会 講演要旨*, 94.

柏村 文郎. 2006. 乳牛の行動. 休息、運動、排泄行動. 乳牛管理の基礎と応用 (柏村 文郎・増子 孝義・古村 圭子). 2006 年改訂版. pp. 198-209. *デーリィ・ジャパン*. 東京.

河合 正人. 2006. 乳牛の飼養標準. 乳牛管理の基礎と応用. (柏村 文郎・増子 孝義・古村 圭子). 2006年改訂版. pp. 322-332. デーリィ・ジャパン. 東京.

河合 忠・屋形 稔・伊藤喜 久 編集. 2001. クレアチニン、クレアチニン. 異常値の出るメカニズム. 第4版. pp.122-125. 医学書院. 東京

Knowlton KF, McKinney JM, Cobb C. 2002. Effect of a direct-fed fibrolytic enzyme formulation on nutrient intake, partitioning, and excretion in early and late lactation Holstein cows. *Journal of Dairy Science* 85, 3328–3335.

古賀 照章・斉藤 友喜・吉田 宮雄・石崎 重信・室井 章一・関 誠・清水 景子・加藤 泰之・内田 哲二・砂長 伸司・木村 容子・川嶋 賢二・竹中 昭雄・永西 修・寺田 文典. 2001. NDF と脂肪含有量に富む食品製造副産物の給与が泌乳前期の乳生産に及ぼす影響. *日本畜産学会報* 72, 351-358.

古賀 照章・岸本 剛・久保田 和弘・平澤 博一・田中 章人. 2009. 窒素排せつ量を低減させる泌乳前期の高泌乳牛への栄養指標. *長野県畜産試験場研究報告* 31号, 80-86.

Krober TF, Kulling DR, Menzi H, Sutter F, Kreuzer M. 2000. Quantitative effects of feed protein reduction and methionine on nitrogen use by cows and nitrogen emission from slurry. *Journal of Dairy Science* 83, 2941–2951.

倉石 照美・小尾 一夫. 2002. 低・未利用資源の活用技術の確立：環境に配慮した高泌乳牛のための飼養管理技術の確立：飼料中の粗蛋白質および分解性蛋白質含量が泌乳前期の

乳生産に及ぼす影響. 平成 13 年度 試験成績報告書 平成 14 年 3 月 山梨県酪農試験場,
49-53.

倉持 寛太・永田 修・佐久間 敏雄. 1994. 草地酪農地域における地下水と草地排水の窒素およびリンによる汚染-根釧台地における事例研究 I. 日本土壤肥料学雑誌 65, 522-529.

Lykos T, Varga GA. 1995. Effects of processing method on degradation characteristics of protein and carbohydrate source in situ. *Journal of Dairy Science* 78, 1789-1801.

松本 光人. 1996. ルーメン内窒素代謝と生産性 (5). ルーメンにおける微生物タンパク質生産と核酸プリン塩基の代謝. 畜産の研究 50, 1229-1234.

松本 光人・板橋 久雄. 1988. 酵母摂取にともなう哺乳子ヤギの尿中へのアラントイン排泄の増加. 日本畜産学会報 59, 395-401.

Miyaji M, Matsuyama H. 2016. Lactation and digestion in dairy cows fed ensiled total mixed ration containing steam-flaked or ground rice grain. *Animal science journal* 87, 767-774.

Miyaji M, Matsuyama H, Hosoda K, Nonaka K. 2012. Effect of replacing corn with brown rice in a total, mixed, ration silage on milk production, ruminal fermentation and nitrogen balance in lactating dairy cows. *Animal science journal* 83, 585-593.

文部科学省．2006．研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針．平成 18 年
文部科学省告示第 71 号．

National Research Council. 1989. Nutrient requirements and signs of deficiency. In: Nutrient
Requirements of Dairy Cattle. 6th revised edition. pp. 2–51. National Academy Press.
Washington, DC.

National Research Council. 2001a. Protein and amino acids. In: Nutrient Requirements of Dairy
Cattle. 7th revised edition. pp. 43–104. National Academy Press. Washington, DC.

National Research Council. 2001b. Energy. In: Nutrient Requirements of Dairy Cattle. 7th
revised edition. pp. 13–27. National Academy Press. Washington, DC.

日刊酪農乳業速報．2019．全国の生乳生産、3 年後に最大 35 万トン拡大へ．2019 年 2 月
18 日号．p. 1．酪農乳業速報．東京．

農林水産省．2018．牛乳乳製品統計調査．生乳生産量累年統計（昭和 60 年～平成 29 年、
調査年月：2017 年）．

農林水産省農林水産技術会議事務局編．1999．日本飼養標準・乳牛（1999 年版）．中央
畜産会．東京．

扇 勉・花田 正明・峰崎 康裕・藤田 眞美子・高橋 雅信・斉藤 繁. 2002. 牧草サイレー
ジ主体飼養における泌乳初期牛の乳生産および血液成分に及ぼす魚粉給与の影響. 日本畜
産学会報 73, 489-494.

扇 勉・糟谷 広高・藤田 眞美子・斉藤 繁・原 悟志. 2003. 魚粉利用による泌乳牛の窒
素排泄量低減. 日本畜産学会報 74, 509-515.

扇 勉・峰崎 康裕・西村 和行・糟谷 広高. 1998. 乳牛の糞尿量および糞尿窒素量の低
減. 栄養生理研究会報 42, 155-165.

Patton RA. 2010. Effect of rumen-protected methionine on feed intake, milk production, true
milk protein concentration, and true milk protein yield, and the factors that influence these
effects: a meta-analysis. *Journal of Dairy Science* 93, 2105–2118.

Petursson SR, Weintraub M. 1975. Incidence and range of microscopic hematuria in patients with
indwelling urinary catheters. *Research communications in chemical pathology and pharmacology*
12, 513–520.

Pomfret I. 2000. Catheter care in the community. *Nursing Standard*. 14, 46–51.

Robert AW. 2005. Hospital-acquired infections. In: Dennis LK, Anthony SF, Dan LL, Eugene B,
Stephen LH, J. Larry J eds. *Harrison's principles of internal medicine*. 16th edition. pp.775–781.
McGraw-Hill. New York.

Robinson J. 2001. Urethral catheter selection. *Nursing Standard* 15, 39–42.

佐藤 精・古賀 照章・大久 保吉啓・阿久津 和弘・関 誠・篠原 晃・松原 英二・木村 容子・齊藤 公一・井上 和典・内田 哲二・清水 景子・倉石 照美・梶川 博・寺田 文典・鈴木 知之. 2002. 飼料中の粗蛋白質および分解性蛋白質濃度が泌乳前期の乳生産に及ぼす影響：2 第一胃内容液・血液性状および窒素出納. 日本畜産学会 第 100 回大会 講演要旨, 128-11.

Schingoethe DJ, Casper DP, Yang C, Illg DJ, JL Sommerfeldt, Mueller CR. 1988. Lactational response to soybean meal, heated soybean meal, and extruded soybeans with ruminally protected methionine. *Journal of Dairy Science* 71, 173–180.

Schneider PL, Beede DK, Wilcox CJ. 1988. Nycterohemeral patterns of acid-base status, mineral concentrations and digestive function of lactating cows in natural or chamber heat stress environments. *Journal of Animal Science* 66, 112–125.

関 誠. 2005. 給与する蛋白質を効率よく牛乳生産に結びつけ、窒素排せつ量をできるだけ少なくするために：動物質飼料に頼らない効率的な蛋白質給与を目指して. *Dairy Japan* 6月号, 35-62.

関 誠・井上 和典・坂田 雅史・西木 秀人・古賀 照章・大久保 吉啓・阿久津 和弘・佐藤 精・齊藤 公一・石崎 重信・篠原 晃・倉石 照美・梶川 博・栗原 光規. 2003. 飼料中の粗蛋白質および非分解性蛋白質含量が泌乳前期の乳生産に及ぼす影響：2 第一胃内容液・血液性状および窒素出納. 日本畜産学会 第 101 回大会 講演要旨, 94.

篠原 晃・古賀 照章・田村 哲生・井上 和典・石崎 重信・渡邊 晴生・阿久津 和弘・倉石 照美・横山 紅子・佐藤 精・関 誠・梶川 博・栗原 光規. 2004. 低蛋白質飼料の飼料構成が泌乳前期の乳生産に及ぼす影響：1 飼料摂取量および乳生産. 日本畜産学会 第103回大会 講演要旨, 41.

Sun F, Cao Y, Cai C, Li S, Yu C, Yao J. 2016. Regulation of nutritional metabolism in transition dairy cows: Energy homeostasis and health in response to post-ruminal choline and methionine. *PloS one*, 11 e0160659.

Smarick SD, Haskins SC, Aldrich J, Foley JE, Kass PH, Fudge M, Ling GV. 2004. Incidence of catheter-associated urinary tract infection among dogs in a small animal intensive care unit. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 224, 1936–1940.

Smith PB. 2009. *Large Animal Internal Medicine*, 4th ed., Mosby, St. Louis.

Socha MT, Putnam DE, Garthwaite BD, Whitehouse NL, Kierstead NA, Schwab CG, Ducharme GA, Robert JC. 2005. Improving intestinal amino acid supply of pre- and postpartum dairy cows with rumen-protected methionine and lysine. *Journal of Dairy Science* 88, 1113–1126.

Stamm WE. 2005. Urinary tract infections and pyelonephritis. In: *Harrison's Principles of Internal Medicine* (Kasper DL, Braunwald E, Fauci AS, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL, eds.). 16th edition. pp. 1715–1721. McGraw-Hill. New York.

鈴木 省三・大田 孝治・佐藤 修・柏村 文郎. 1983. 乳牛における排泄の行動的背景. 帯広畜産大学学術研究報告 13, 79-84.

寺田 文典・塩谷 茂. 1998. 泌乳牛の窒素排泄量に及ぼす魚粉給与と環境温度の影響. 日本畜産学会報 69, 620-624.

Thompson RL, Haley CE, Searcy MA, Guenther SM, Kaiser DL, Groschel DH, Gillenwater JY, Wenzel RP. 1984. Catheter-associated bacteriuria: Failure to reduce attack rates using periodic instillations of a disinfectant into urinary drainage systems. *Journal of the American Medical Association* 251, 747-751.

Topps JH, Elliott RC. 1965. Relationship between concentrations of ruminal nucleic acid and excretion of purine derivatives by sheep. *Nature* 205, 498-499.

Valadares RFD, Broderick GA, Valadares Filho SC, Clayton MK. 1999. Effect of replacing alfalfa silage with high moisture corn on ruminal protein synthesis estimated from excretion of total purine derivatives. *Journal of Dairy Science* 82, 2686-2696.

Vagnoni DB, Broderick GA, Clayton MK, Hatfield RD. 1997. Excretion of purine derivatives by Holstein cows abomasally infused with incremental amounts of purines. *Journal of Dairy Science* 80, 1695-1702.

Van Metre DC. 2009. Urinary tract infection. In: Smith PB ed. *Large Animal Internal Medicine*, 4th edition. pp. 961-963. Mosby. St. Louis.

Walter ES. 2005. Urinary tract infections and pyelonephritis. In: Dennis LK, Anthony SF, Dan LL, Eugene B, Stephen LH, J. Larry J eds. Harrison's principles of internal medicine. 16th edition. pp. 1715–1721. McGraw-Hill. New York.

Warren JW, Platt R, Thomas RJ, Rosner B, Kass EH. 1978. Antibiotic irrigation and catheter-associated urinary-tract infections. *New England journal of medicine* 299, 570–573.

Weinstein RA. 2005. Hospital-acquired infections. In: Kasper DL, Braunwald E, Fauci A S, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL eds. Harrison's Principles of Internal Medicine. 16th edition. pp. 775–781. McGraw-Hill. New York.

Westwood CT, Lean IJ, Garvin JK, Wynn PC. 2000. Effects of genetic merit and varying dietary protein degradability on lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science* 83, 2926–2940.

Xu S, Harrison JH, Chalupa W, Sniffen C, Julien W, Sato H, Fujieda T, Watanabe K, Ueda T, Suzuki H. 1998. The effect of ruminal bypass lysine and methionine on milk yield and composition of lactating cows. *Journal of Dairy Science* 81, 1062–1077.

横内 圀生. 1984. 相関と回帰. 畜産における統計的方法 (吉田 実・安部 猛夫 監修). 第2版. pp. 140-184. 社団法人中央畜産会. 東京.

Young EG, Conway CF. 1942. On the estimation of allantoin by the Rimini-Schryver reaction. *The Journal of Biological Chemistry* 142, 839–853.