

アンモニア処理草中の4(5)-メチルイミダゾールの マンセル分析とそのhyperexcitability発症の 簡易予見への活用

横江泰彦*・後藤正和**・西川司朗**・萬田富治***

*三重大学大学院農学研究科，現在揖斐川工業株式会社，

三重大学生物資源学部，*農林水産省中国農業試験場

Munsell Color Analysis of 4(5)-Methylimidazole Produced in Ammonia-treated Forage Relating to a Simple Prediction of Hyperexcitability in Cattle fed These Types of Forage

Yasuhiko YOKOE*, Masakazu GOTO**, Shiroh NISHIKAWA**
and Tomiharu MANDA***

*Graduate School of Bioresources, Mie University, Kamihama-cho, Tsu, Mie 514-8507, Japan

**Faculty of Bioresources, Mie University, Kamihama-cho, Tsu, Mie 514-8507, Japan

***Department of Animal Production Chugoku National Agricultural Experiment Station
Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries, 60 Yoshinaga, Kawai, Oda, Shimane 694-0013, Japan

Abstract

The contents of 4(5)-methylimidazole (4-MI) in hay and cereal straw treated with different levels of ammonia were investigated by combining ion-pair extraction with reversed-phase ion-pair liquid chromatography (HPLC) and together with photometry of the Ehrlich diazo coupling products ($\lambda = 498$ nm). The diazo coupling colors corresponding to 4-MI contents in treated roughage were verified and subjected to a panel test, in order to develop a simple procedure for semi-quantitative determination capable to be used on farms.

Ammonia-treated hay ($3\% \text{NH}_3 \text{DM}^{-1}$) contained 14-81 $\mu\text{g g}^{-1} \text{DM}$ of 4-MI and the values were increased by increasing the levels of ammonia. 4-MI was not detected in ammonia-treated rice and wheat straw, irrespective of the ammonia levels. A significant correlation between the visible absorbance of 4-MI and HPLC values was found for the ammonia-treated ones. The diazo coupling colors at different 4-MI contents were assigned as follows, according to the standard Munsell color table (4-MI; $0 \mu\text{g g}^{-1} \text{DM} = 5\text{Y } 8/14$; $30 \mu\text{g g}^{-1} \text{DM} = 5\text{YR } 7/14$; $50 \mu\text{g g}^{-1} \text{DM} = 5\text{YR } 6.5/13$; $80 \mu\text{g g}^{-1} \text{DM} = 2.5\text{YR } 6.5/12$; $100 \mu\text{g g}^{-1} \text{DM} = 5.5/12$; $150 \mu\text{g g}^{-1} \text{DM} = 9\text{R } 5.5/14$; $200 \mu\text{g g}^{-1} \text{DM} = 6\text{R } 5.5/14$). The panel test showed that the 4-MI contents in the ammonia-treated hay were estimated by four groups of None, 30-50, 80-100 and $>100 \mu\text{g g}^{-1} \text{DM}$, according to the Munsell analysis.

Key Words : ammonia treatment • cereal straw • diazo coupling colors • hay •
4(5)-methylimidazole analysis

平成9年9月29日受理

*岐阜県大垣市万石 1-168-203

**三重県津市上浜町 1515

***島根県大田市川合町吉永 60

緒言

イネ科薬稈など、低質な粗飼料草に対するアンモニア処理技術は、ほかの処理方法よりも簡便で、また安価に、その栄養価を高める方法として広く普及している。たとえば、稲わらの平均的可消化養分総量はおよそ40%とされているが、乾物当たり3%のアンモニアによって処理された場合、55%程度まで改善されることが認められている¹⁾。アンモニア処理草に対する飼料安全法も整備され、委託業務による「ロールベール集草・梱包とアンモニア処理」事業が本格化しようとしており、その処理量は現在の実績処理量20万トンを大幅に上まわることが予想される²⁾。

しかし、極めて稀なケースとして、アンモニア処理牧草の給与が一因とみられる急性疾病の事例が報告されている^{3, 7, 8, 9, 10, 12)}。授乳中の子牛の発病例では、アンモニア処理した飼料草を摂取した母牛からの乳成分濃縮を介して発症し、急性の全身痙攣を伴い、ほとんどの場合、発病2~3時間後に急死することが観察されている。急性疾患に至らない場合でも、ルーメン微生物の消化活性への負作用が観察されている^{1, 2)}。とくに、アンモニア処理が乾草調製に失敗した材料のかび防止にも役立つことなどの理由から、若くて可溶性糖類に富む牧草類に対してアンモニア処理が施された場合に多く認められる。これは、アンモニア処理過程において副生される様々な成分のうち、可溶性糖類とアンモニアとのメーラード反応で生じる4(5)-メチルイミダゾールの生理作用と密接に関係するものと推察されている^{7, 8, 9)}。したがって、4(5)-メチルイミダゾールや類似物質の濃度と疾病発生との関係、処理材料の種類やアンモニア処理の条件、家畜側の要因など(月齢、性別、畜種)を検討する必要がある。これまで、4(5)-メチルイミダゾール含有率を酸性デタージェント繊維中の窒素含有率から推定することが試みられている。さらに、簡便に、また精度よく、4(5)-メチルイミダゾールを生産現場で測定できることになれば、未だにこれらの疾病を防止することができるので、その簡易な測定方法の開発にも期待が寄せられる。

一般食品、薬品、動物臓器中の4(5)-メチルイミダゾールは、ジアゾカップリング反応による分光光度法、薄層クロマトグラフ法、ガスクロマトグラフ法、液体クロマトグラフ法によって測定されている^{11, 14)}。Thomsen &

Willumsen¹¹⁾はイオンペア抽出とイオンペア高速液体クロマトグラフ法を検討して、従来のガスクロマトグラフ法よりも精度、迅速性ともに優れていることを示した。また、山崎ら¹³⁾は、この方法がアンモニア処理した飼料草からの4(5)-メチルイミダゾール定量に有効であると報告している。

本研究では、混播牧草、稲わら、小麦稈を用いて、アンモニア濃度(無処理、1%、2%、3%、4%、6%、9%、乾物当たり%)を変えて処理したときの4(5)-メチルイミダゾール生成量の違いをイオンペア抽出・イオンペア液体クロマトグラフ法で検討した。また、7段階の4(5)-メチルイミダゾール濃度に対するジアゾカップリング呈色反応のマンセル値と標準色彩表(色相・明度・彩度)¹⁵⁾を求め、それら飼料草中の4(5)-メチルイミダゾール濃度を推定することができるかどうかを、パネルテストによって検討した。

材料と方法

(1) 供試材料とアンモニア処理

1番刈りの牧草(オーチャードグラス、チモシー、ホワイトクローバの混播)、稲わら、小麦稈をロールベールに収穫、ラッピングした後、「ほくのうSシステム」⁴⁾によって液化アンモニアを注入、処理した。アンモニア処理濃度は材料乾物当たり1%~9%の範囲とし、牧草サンプルでは3%処理区5点、6%処理区2点、9%処理区2点の計9点、稲わらサンプル無処理区1点、1%処理区1点、2%処理区1点、3%処理区3点、4%処理区1点、6%処理区4点の計11点、小麦稈サンプルは無処理区1点、3%処理区2点の計3点、合計23サンプルについて検討した。アンモニア処理期間はそれらの消化率の改善が十分に期待される期間とし、外気温を考慮して8週~11週間とした。

(2) 4(5)-メチルイミダゾール分析

A. イオンペア高速液体クロマトグラフ法

風乾物0.5gを0.2Mリン酸緩衝液4ml(pH6.0に調整)で抽出した後、さらに抽出物を0.1M2-エチルヘキシルリン酸を含むクロロホルム液4mlで抽出、クロロホルム層を回収した。このクロロホルム液2mlを0.1Mリン酸液2mlで逆抽出し、フィルター(0.45 μ m)で濾過後、液体クロマトグラフ法で分離定量した¹¹⁾。カラ

ムは Finepak SILC8-5 (250×4.6mm I. D., 日本分光) を使用し, メタノール-0.2M リン酸二水素カリウム-水 (32.5 : 25 : 42.5 ; 0.005M ドデカンスルホン酸ナトリウムを含有) を 1.0ml/min で送液し, 215nm で検出した⁹⁾。なお, 無処理の小麦稈 (4(5)-メチルイミダゾールを含有していないもの) への 4(5)-メチルイミダゾール添加試験 (1, 2.5, 5, 10, 35, 50, 100, 150, 200 $\mu\text{g g}^{-1}\text{DM}$) を行って, イオンペア高速液体クロマトグラフ法による検出精度を検討し, 本実験系では 5 $\mu\text{g g}^{-1}\text{DM}$ 以上の濃度において正確に測定できることを確認した。また, 牧草サンプル (3 サンプルを供試) 中の 4(5)-メチルイミダゾールの回収率 (反復例数 3) は 20 分抽出区を 100 とした場合, 3 分区 83.4

±6.7%, 5 分区 83.2±3.8%, 10 分区 99.0±1.5% であったので, 以後, 抽出時間は 10 分間とした。

B. ジアゾカップリング呈色反応

牧草サンプル (No.1, No.2, No.3, No.5 ; Table 1 を参照) と稲わら (No.5 ; 同表参照) を用いて, 4(5)-メチルイミダゾール添加量 (50, 100, 150 $\mu\text{g g}^{-1}\text{DM}$) に対するジアゾカップリング呈色反応を分光光度法で求め, アンモニア処理草からの 4(5)-メチルイミダゾール定量のその有効性について検討した。前述の方法で得たリン酸抽出液 1.5ml に, ジアゾ試薬 0.75ml と 6% 炭酸ナトリウム溶液 0.75ml を加えて発色させ¹⁰⁾, 希釈した後, 498nm における吸光度を測定した。

Table 1. 4(5)-methylimidazole concentrations of ammonia-treated hay and cereal straws.

Sample	Ammonia treatment (%DM)	Mean±S.D. (n=3) ($\mu\text{g g}^{-1}\text{DM}$)
Grass hay		
No.1	3.0	37.8 ±0.7
No.2	3.0	30.4 ±0.1
No.3	3.0	trace
No.4	3.0	13.5 ±1.1
No.5	3.0	80.7 ±1.8
No.6	6.0	100.0 ±4.4
No.7	6.0	175.8 ±0.6
No.8	9.0	126.7 ±2.0
No.9	9.0	190.0 ±8.4
Rice straw		
No.1	untreated	ND
No.2	1.0	0.2 ±0
No.3	2.0	0.2 ±0.1
No.4	3.0	0.2 ±0.1
No.5	3.0	trace
No.6	3.0	0.2 ±0.1
No.7	4.0	2.4 ±0.8
No.8	6.0	trace
No.9	6.0	0.2 ±0.1
No.10	6.0	1.3 ±0.5
No.11	6.0	0.2 ±0
Wheat straw		
No.1	untreated	ND
No.2	3.0	trace
No.3	3.0	0.4 ±0

また、牧草サンプル (No. 3) に 4(5)-メチルイミダゾールを添加して、ジアゾカップリング呈色反応による 7 段階のマンセル値と標準色彩表 (色相, 明度, 彩度) を作成し、牧草サンプル 4 点と稲わら 1 点の発色性からのマンセル値正解率の検討を農学系学生 32 名によるパネルテストで実施した。なお、各濃度の 4(5)-メチルイミダゾールのマンセル値と標準色彩表は、 $0 \mu\text{g g}^{-1}\text{DM}$, 5Y8/14=タンポポ色; $30 \mu\text{g g}^{-1}\text{DM}$, 5YR7/14=黄赤色; $50 \mu\text{g g}^{-1}\text{DM}$, 5YR6.5/13=オレンジ色; $80 \mu\text{g g}^{-1}\text{DM}$, 2.5YR6.5/12=人参色; $100 \mu\text{g g}^{-1}\text{DM}$, 10R5.5/12=丹色; $150 \mu\text{g g}^{-1}\text{DM}$, 9R5.5/14=金赤色; $200 \mu\text{g g}^{-1}\text{DM}$, 6R5.5/14=朱色¹⁵⁾であった。

結果と考察

アンモニア処理中に副生された 4(5)-メチルイミダゾール量は、牧草とイネ科藁種との間で顕著に異なった (Table 1)。稲わらや麦稈からの 4(5)-メチルイミダゾールは、アンモニア処理の濃度と関係なく、ほとんど検出されなかった。一方、牧草の場合には、アンモニア濃度 3% 処理区で $14\sim 81 \mu\text{g g}^{-1}\text{DM}$, 6% 処理区 $100\sim 176 \mu\text{g g}^{-1}\text{DM}$, 9% 処理区 $127\sim 190 \mu\text{g g}^{-1}\text{DM}$ と、アンモニア濃度の増加に対応して 4(5)-メチルイミダゾール生成量が増加した。とくに、6%以上のアンモニア濃度で処理された牧草では、家畜に対する有害性が顕在化するとされる、 $125 \mu\text{g g}^{-1}\text{DM}$ 付近 (萬田ら, 私信) ないしはそれをうまわるのが観察された。また、アンモニア 3% 処理区のなかにも、危険域に近い高濃度の 4(5)-メチルイミダゾール量が検出された。これらのことは、アンモニア処理された牧草を給餌された家畜のみに hyperexcitability 発症例がみられることと一致する^{3, 6, 9, 10, 12)}。

一般に、アンモニア処理の過程では加水分解による発熱をとまうが、これはアンモニアの処理濃度が高いほど、また材料の水分含有率が高いほど高くなることが知られている。すなわち、ラップ内温度は、アンモニア注入後数時間目から上昇し始めて一兩日中にはしばしば $60\sim 70^\circ\text{C}$ 以上にも達し、以後、徐々に下降して 2 週間ぐらいで外気温に収束する⁵⁾。したがって、このようなラップ内の高温度が、牧草中の可溶性糖類とアンモニアとのメイラード反応を促進し、しかも高濃度アンモニア処理区において 4(5)-メチルイミダゾールを含む含窒素環状

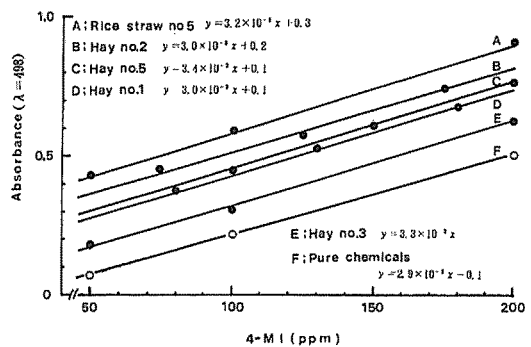


Fig.1. Diazocoupling values of added 4-MI (methylimidazole) in various roughages.

化合物を多く生成させたものと推察される⁷⁾。また、ロールベールの中心部ほど高温になりやすいことや、梱包材料の底部ほどアンモニア濃度が高くなりやすいことから、同一ラップ内における品質の不均一さも生じやすい。とくに、バックサイロやスタックサイロによるアンモニア処理に際しては、これらの点に注意して材料の水分含有率、サイロの大きさ、梱包密度、密封作業、保管場所などを十分に考慮する必要があると考えられる⁸⁾。なお、アンモニア 3% 処理区で観察された 4(5)-メチルイミダゾール生成量のサンプル間のばらつきが、可溶性糖類など、処理材料中の構成成分量によるかどうかは明らかでなかった。

ジアゾ試薬による呈色反応は、生化学の分野などで、たとえば、フェノール物質やイミダゾールの検出に広く用いられてきている。牧草や藁種などの構成成分そのもののなかにはジアゾ試薬とカップリング反応するものが多いことから、まず、それら夾雑物の影響の有無について検討した。牧草サンプル 4 点と稲わらサンプル 1 点に対する 4(5)-メチルイミダゾール添加実験の結果 (Fig. 1), 4(5)-メチルイミダゾール量と吸光度との間には有意に高い正の相関関係が認められた ($r=0.989$, $P<0.001$)。一方、牧草サンプル No.1, No.2, No.5 の Y 軸上切片は近似した値であったのに、No.3 のそれとはかなり異なった。このことは、稲わらサンプルと牧草サンプルとの間、両飼料サンプルと標準曲線の間にも観察された。各サンプルのリン酸抽出液そのものに認められる有色性が Y 軸上切片に及ぼす影響は小さかったことから (いずれも 498nm における吸光度が 0.04 程度)、これはジ

アゾ試薬とのカップリング反応によると考えられるが、リン酸抽出液中にフェノール酸とそのアルデヒド類、アミノ酸がまったく検出されなかったため、飼料中のどのような成分とのメイラード反応による副生物、あるいはそれ以外の要因によるかは明らかでなかった。したがって、アンモニア処理された飼料草の4(5)-メチルイミダゾール量をジアゾカップリング反応による分光光度法で測定することは分析精度が低くなるものの、ある範囲で推定するには有効であると考えられた。

そこで、4(5)-メチルイミダゾール濃度 (0, 30, 50, 80, 100, 150, 200 $\mu\text{g g}^{-1}\text{DM}$) のジアゾカップリング呈色反応のマンセル値と標準色彩表を作成し、稲わらや牧草サンプル中の4(5)-メチルイミダゾール含有量を推定できるかをパネルテスト法で検討した (Table 2)。供試した6サンプルのうち、4(5)-メチルイミダゾール濃度がそれぞれ0 $\mu\text{g g}^{-1}\text{DM}$ (ブランク)、50 $\mu\text{g g}^{-1}\text{DM}$ 、176 $\mu\text{g g}^{-1}\text{DM}$ の牧草サンプルに関する正解率は、それぞれ100%、87.5%、96.0%ときわめて高かった。一方、正解率が18.8%と低かった30 $\mu\text{g g}^{-1}\text{DM}$ の濃度区の場合は50 $\mu\text{g g}^{-1}\text{DM}$ のものと、正解率が31.3%となった100 $\mu\text{g g}^{-1}\text{DM}$ の濃度区の場合は80 $\mu\text{g g}^{-1}\text{DM}$ のものと判定された。また、稲わらサンプルは標準色彩表の30 $\mu\text{g g}^{-1}\text{DM}$ レベルに相当すると判定され、夾雑物による判定精度への影響もうかがわれた。これは、先に得られた吸光法のそれとも一致する結果となった。した

がって、この方法の実用的に利用できる範囲は、アンモニア処理された飼料草を給餌された家畜に発症例がみられる hyperexcitability を誘因する危険性がきわめて低い50 $\mu\text{g g}^{-1}\text{DM}$ 以下、要注意あるいは再検を要する80~100 $\mu\text{g g}^{-1}\text{DM}$ レベル、絶対危険の150 $\mu\text{g g}^{-1}\text{DM}$ 以上の3段階のレベルとするのが妥当であると考えられた。さらに、抽出、分離過程を簡便化するための吟味がなされれば、牧草中の硝酸態窒素濃度の簡易測定器と同様に、生産現場での簡易検定法として活用されうるとも考えられる。

要 約

アンモニア処理された粗飼料中に副生される4(5)-メチルイミダゾール量を、材料の種類 (牧草、イネ藁、麦稈) やアンモニア濃度 (0, 1, 2, 3, 4, 6, 9%) との関係を検討した。また、生産現場などで簡単に4(5)-メチルイミダゾール量を検出する方法として、ジアゾカップリング呈色反応によるマンセル値と標準色彩表 (色相・明度・彩度) が有効であるかどうかを、パネルテストで判定した。

稲わらや麦稈からの4(5)-メチルイミダゾールは、アンモニア処理の濃度と関係なく、ほとんど検出されなかった。一方、牧乾草の場合には、アンモニア濃度3%処理区で14~81 $\mu\text{g g}^{-1}\text{DM}$ 、6%処理区100~176 $\mu\text{g g}^{-1}\text{DM}$ 、9%処理区127~190 $\mu\text{g g}^{-1}\text{DM}$ と、アンモニア

Table 2. Panel test of diazo coupling colors for estimating 4(5)-methylimidazole in ammonia-treated roughages.

Sample †	Percentage of Correct answer		Percentage of incorrect answers (Color,%)						
	Color	%	5y8/14 (0 $\mu\text{g g}^{-1}$ DM)	5yr7/14 (30 $\mu\text{g g}^{-1}$ DM)	5yr6.5/13 (50 $\mu\text{g g}^{-1}$ DM)	2.5yr6.5/12 (80 $\mu\text{g g}^{-1}$ DM)	10r5.5/12 (100 $\mu\text{g g}^{-1}$ DM)	9r5.5/14 (150 $\mu\text{g g}^{-1}$ DM)	6r5.5/14 (200 $\mu\text{g g}^{-1}$ DM)
Blank	5y8/14	100	—	0	0	0	0	0	0
Rice straw No.2	5y8/14	0	—	96.9	3.1	0	0	0	0
Hay No.2	5yr7/14	18.8	0	—	75.0	6.2	0	0	0
Hay No.1 ‡	5yr6.5/13	87.5	0	3.1	—	9.5	0	0	0
Hay No.6	10r5.5/12	31.3	0	0	3.1	65.6	—	0	0
Hay No.7	9r5.5/14	96.9	0	0	0	0	3.1	—	0

† The samples tested here were noted in Table 1.

‡ The 4(5)-methylimidazole concentration of Hay No.1 was adjusted to 50ppm by adding the pure chemicals.

濃度の増加に対応して4(5)-メチルイミダゾール生成量が増加した。

マンセル値と標準色彩表に基づいたパネルテストによる4(5)-メチルイミダゾールの濃度判定結果は、その濃度が $0 \mu\text{g g DM}^{-1}$ (ブランク), $50 \mu\text{g g}^{-1}\text{DM}$, $176 \mu\text{g g}^{-1}\text{DM}$ においてそれぞれ100%, 87.5%, 96.0%とわけて高かった。18.8%の正解率となった $30 \mu\text{g g}^{-1}\text{DM}$ サンプルはおもに $50 \mu\text{g g}^{-1}\text{DM}$ と、31.3%の正解率となった $100 \mu\text{g g}^{-1}\text{DM}$ サンプルは $80 \mu\text{g g}^{-1}\text{DM}$ と判定された。総じて、パネリストによる判定は正確なものであった。

謝 辞

本研究の遂行に当たり、社団法人北海道草地協会ならびに財団法人伊藤記念財団から助成を受けました。ここに、記して厚く御礼申し上げます。

引用文献

- 1) AKIN, D.E. 1982 Forage cell wall degradability and p-coumaric, ferulic and sinapic acids. *Agron. J.* 74 : 424-428.
- 2) CHESON, A., STEWART, C.S. & R.J. WALLACE 1982 Influence of plant phenolic acids on growth and cellulolytic activity of rumen bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 44 : 597-603.
- 3) La BORE, D.E., MIKHCH, D. & L.B. NEWMAN 1984 Bovine Bonkers. *Herd Health Memo* 9. pp.85-90. Univ. of Kentucky.
- 4) MANDA, T & M. GOTO 1996 Ammonia treatment system of cereal straws for ruminant feeding. *The 8th AAAP Anim. Sci. Congr.* Vol.1 pp 261-270.
- 5) 萬田富治 1994 ロールベールサイレージシステムの基本と実際. 酪農総合研究所
- 6) MANASON, V.C., COOK, J.E., DHANOA, M.S., KEENE, A.S., HOADLEY, C.J. & R.D. HXARTLEY 1990 Chemical composition, digestibility in vitro and biodegradability of grass hays oven-treated with different amounts of ammonia. *Anim. Feed Sci. Tech.* 29 : 237-249.
- 7) NISHIE, K., WAISS, A.C. & A.C. KEYL 1969 Toxicity of methylimidazoles. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 14 : 301-307.
- 8) PERDOK, H.B. & R.A. LENG 1987 Hyperexcitability in cattle fed ammoniated roughages. *Anim. Feed Sci. Tech.* 17 : 121-143.
- 9) RAY, A.C., RAISOR, M.J., HERD, D.B., MURPHY, M.J. & J.C. REAGOR 1984 Methylimidazole content of ammoniated forages associated with toxicity in cattle. *Am. Assoc. Veterinary Laboratory Diagnosticians, 27th Annu. Proc.* pp.337-348.
- 10) SIMMS, D., KUHLE, G. & J. BRETHOUR 1984 Toxicity problems with ammoniated dry forages. *Cattleman's Day. Report of progress* 448. Kansas State Univ., Manhattan, pp78-79.
- 11) THOMSEN, M. & D. WILLUMSEN 1981 Quantitative ion-pair extraction of 4(5)-methylimidazole from caramel colour and its determination by reversed-phase ion-pair liquid chromatography. *J. Chromato.* 211 : 213-221.
- 12) WEISS, W.P., CONRAD, H.R., MARTIN, C.M., CROSS, R.F. & W.L. SHOCKEY 1986 Etiology of ammoniated hay toxicosis. *J. Anim. Sci.* 63 : 525-532.
- 13) 山崎昭夫・萬田富治・村井勝・鶴川洋樹 1991 アンモニア処理粗飼料中の4(5)-イミダゾールの検出法. 第84回日畜学会, pp.166.
- 14) 吉川俊一・藤原光雄 1981 薄層クロマトグラフィによる食品中の4(5)-イミダゾールの分析. *食衛誌*, 22 : 189-197.
- 15) 向学図書・言語研究所編集, 1986 色の手帳, 小学館発行