

# インドネシア薬品品質管理プロジェクト 実験動物用飼料調査報告書

昭和60年3月

医療協力部  
国際協力事業団

医協

JR

85-20



JICA LIBRARY



1048174[5]



インドネシア薬品品質管理プロジェクト  
実験動物用飼料調査報告書

昭和60年3月

医療協力部  
国際協力事業団

国際協力事業団	
受入 月日 85. 3. 25	108
登録No. 11275	99
	MCF

## は　じ　め　に

インドネシア国保健省薬品食品品質管理試験所（NQCL）の機能の強化を行うことによって、インドネシア国民を不良医薬品から保護することを目的として、昭和58年4月1日から技術協力を実施中の本プロジェクトの主要な目標のひとつに、インドネシア国で初めての本格的な動物実験の実施がある。

無償資金協力によって昭和60年3月に完成する最新の動物舎を備えた研究棟で、毒性・パイロジェン試験などの動物実験を成功させるためには、実験動物の飼育・繁殖が大きなカギとなる。また、有効な試験結果を得るためには、適切な飼料を与えて動物の質を一定以上の水準に保たなければならない。しかし、NQCLスタッフは動物飼育の経験に乏しく、現在市販されている実験動物飼料についてもその適切性を判断するための栄養・汚染分析の結果が不明であったため、インドネシア側は飼育の計画段階からの助言を日本側に求めてきたものである。

本報告書は、この要請を受けて国際協力事業団が59年9月に派遣した専門家チームの調査結果と国内支援体制整備費、適正技術開発経費により、日本クレア株式会社に委託した飼料分析・評価・設計の結果をとりまとめたものである。本報告書がインドネシア薬品品質管理プロジェクトの実施に寄与することを願うとともに、貴重なご助言・ご指導をいただいた国立衛生試験所 高仲 正 薬理部長他関係機関の各位に深甚なる謝意を表する次第であります。

昭和60年3月

国際協力事業団

医療協力部長 長谷川 豊





## 目 次

第 1 章	インドネシア国薬品品質管理プロジェクトに関する 飼料分析調査実施の経緯と手順	1
1・1	飼料分析調査実施の経緯と必要性	1
1・2	飼料分析調査実施の手順	1
1・3	第一次飼料及び原料分析	3
	1) 第一次分析の目的	3
	2) 第一次分析の材料と方法	3
	3) 第一次分析の試験成績	3
	4) 第一次分析の考察と結論	4
第 2 章	飼料専門家チームによるインドネシア国の現状調査	5
2・1	飼料専門家チームの調査目的及び手順	5
	1) 調査目的	5
	2) メンバーと日程	5
2・2	調 査 結 果	6
2・3	飼料専門家チームの調査結論	10
第 3 章	第二次分析並びにインドネシア国薬品品質管理 プロジェクト用配合設計(案)	10
3・1	第二次分析の目的と結論	10
	1) 目 的	10
	2) 材料と方法	10
	3) 結果と考察	11
	4) 結 論	12
3・2	インドネシア国薬品品質管理プロジェクト用配合設計(案)	12
	1) 配合設計の基本的考え方	12
	2) マウス・ラット用配合設計(案)	12
	3) ウサギ・モルモット用配合設計(案)	13
3・3	配合設計(案)に基づく製造方法と経済性	14
	1) 製造方法	14
	2) 経 済 性	15

第 4 章	インドネシア国薬品品質管理試験所における実験動物の飼育、繁殖に関する提言	15
4・1	マウス・ラットの飼育、繁殖	15
4・2	ウサギ・モルモットの飼育、繁殖	15
4・3	結 び	16

参 考 資 料

1.	Local Made Rabbit Food in Indonesia	19~22
2.	Good Laboratory Practice for Nonclinical Laboratory Studies § 58.90	23
3.	Maximum Allowable Concentrations of Toxic Feed Contaminants	24
4.	インドネシア農業事情	25
5.	LC <sub>50</sub> Values of 5 insecticides to 16 colonies of housefly larvae in Indonesia	26
6.	LD <sub>50</sub> values for 9 insecticides of the adult female house flies in Indonesia	26
7.	Current Problem on Human Hazard, Environment & Food Pollution and the Development of Pesticides in Fungi & Insects	27~29
8.	第一次分析の結果	30~34
9.	EPA Report No. 600/1-81-040	35
10.	インドネシア国の資料分析値	36
11-(a)	Parametric Statistics—Toxic Elements	37
11-(b)	Parametric Statistics—Toxic Molecular Contaminants	37
12.	Results of Analyses of Commercial Diets	38
13-(1)	Found Contamination in Raw Materials—U.K.1979	39
13-(2)	Found Contamination in Diets	40
14.	GLP 対応に関する実験動物飼料協会案	41~42
15.	Hipki “Mekar”	43
16.	Mimosine	44
17.	Kapo Trading 価格表	45~46
18.	第二次分析の結果	47~51
19.	1983 Feedstuffs Analysis Table	53
20.	The Determination of Mimosine and 3,4-dihydropyridine in biological material	55~65
21.	嗜好試験の結果	66
22.	原料価格	67

## 第 1 章 インドネシア国薬品品質管理プロジェクトに関する飼料分析調査実施の経緯と手順

### 1・1 飼料分析調査実施の経緯と必要性

インドネシア国薬品品質管理プロジェクトにおける薬理学・毒性学等の動物実験を成功させ、同試験所の検査・試験機能を強化するための基礎は、実験動物の飼育の成功である。しかし、動物飼育の経験に乏しいインドネシア国で、しかも経験者の殆どいない国立薬品食品品質管理試験所 (NQCL、インドネシア語略 P. P. O. M.) において飼育を行うためには、まず飼育・繁殖にふさわしい飼料の調達、または製造の方策を定めることから始めなければならない。実験動物用飼料の特殊目的及び特徴を網羅するには多くの資料と調査が必要である。

このような目的をもって1984年、実験動物用飼料をインドネシア国にて製造するための資料収集と面会調査を行い、情報収集活動を中心に模索を開始した。

当初より、インドネシア国での実験動物用飼料製造については、ウサギ・モルモット用飼料に使用する繊維源の確保、また微粉碎及びプレミックス等が問題点として上げられており、その解決方法を見出すことに全力を注いでいる中、高仲先生を通じてインドネシア国、P.T. Otsuka Indonesia 佐々木氏より、ウサギ並びにウサギ飼料についての情報をいただいた。(資料1)

その資料によると P.T. Otsuka では、ウサギはインドネシア国の Java 島 Batu area (around 25km from Malang) 産、体重 1.5~2.7kg を使用しており、飼料は Kang Kung-Carrot 等の野菜、Self made (P.T. Otsuka) 飼料及び Consentrat TU (EKA Poultry Industrial Enterprise 製) 等の飼料を使用している。飼料の比較試験データは、大変に本件の参考になった。

日本での調査中に、日本配合飼料協会の関係会社であり、インドネシア国 Jakarta に籍を置く P.T. Bina Satwa の高木氏が運良く帰国中であり、面会してインドネシア国の原料状況等の情報提供を受けたが、内容は次の通りであった。

穀類と輸入油粕等は問題がないが、インドネシア国産原料は注意が必要であり、特に魚粉は問題が多い。また、乾草は特殊事情があり、検討の必要がある。

以上の点から、飼料分析調査を実施することについて検討を行い、下記の点について調査の必要性ありと判断した。

- (i) 現地ウサギの品種、能力及び血液性状データ収集
- (ii) 実験動物用飼料としての原料事情調査
- (iii) 現地飼料メーカーの調査
- (iv) 飼料分析に関する技術力の調査
- (v) 乾草原料及びプレミックスに対する検討
- (vi) 自家製造及び委託製造の検討

### 1・2 飼料分析調査実施の手順

実験動物用の飼料の条件とはどんなものなのか。それは、アメリカの FDA の GLP (Part 58 Good Laboratory Practice for Nonclinical Laboratory Studies) § 58.90 Animal

Care (g) の中で謳っている。“実験に支障をきたす可能性が知られており、かつ動物用飼料または水の中に存在することが論理的に期待されるような汚染物質……定期的に分析されるものとする。”(資料2)

汚染物質とは、例えば(U.S.) Health Effects Research Lab.の J.P. Bercz が Temporal Variability of Toxic Contaminants in Animal Diets の中で報告している、Cd, Pb, As, Hg, Se, PCBs, DDTs, Malathion, Lindane, Dieldrin, Aflatoxins (Total), Estrogenic Activity(DES Equiv.)であり、これらの基準は EPA(U.S. Environmental Protection Agency) と NCTR(The National Center for Toxicological Research) の数値が参考になるであろう。(資料3)

このように、実験目的及び実験責任者によって実験動物用飼料が規制されていることが分かる。実験動物用飼料は単純に Food Habit, Nutrient Requirements 及び Palatability だけを考えれば良いものではない。

よって我々は、インドネシア国飼料分析調査を考えるに当って、日本で手に入る情報によるインドネシア国飼料製品及び飼料原料の事前分析が必要と判断した。

我々にとって必要な情報は、飼料原料中の残留農薬、Mycotoxins、酸化及び微生物汚染等であり、特に残留農薬は注意を要する。

そのため、情報収集は残留農薬を中心に行い、その他は事前分析によって予測することにした。事前分析(第一次分析)の結果は、次の1・3にて述べることにし、ここでは残留農薬について検討する。

熱帯農業15(2)で服部は、インドネシア国の Dieldrin, Aldrin, DDT, BHC, Malathion, Parathion 等の農薬輸入許可リストを発表しており、また、インドネシア国の農業は農薬を入れると、米の産出量が2倍から3倍になり、農薬代が pay すると言われている。(資料4)

林等は、インドネシア産イエバエ幼虫の殺虫剤感受性は Malathion に対し日本産イエバエ幼虫よりも低い傾向にあると明らかにした。

成虫についても Malathion に対して抵抗性が発達し、特に Java 島の Jakarta 市内のハエには殺虫剤使用の影響が考えられる。(資料5~6)

名古屋大学土壌学 Dr. 桑塚の“インドネシア農薬の現状について”の講演においても、農薬処理による米の生産が300~400kg/10aで、未処理の100~180kg/10aに比較して2~3倍の収穫ができるという。農薬は Insecticide として fenitrothion, carbofuran, carbaryl, diazinon, Fungicide では chlorothainil, mancozeb, Rodenticide では brodifacoum, coumarin が良いとされている。

DDTは一応禁止されているが、Malaria 用として病院から購入できるとのことである。ちなみに、インドネシア国の米の生産高は1982年23,160,000M/Tとのことである。

JICA の Country Report 1983. Group Training in Pesticide Utilization for Plant Protection の current problem on human hazard, enviromental & food pollution and the development of pesticides in fungi & insects の中でも新技術使用前後では、米生産が1.5~2.0ton/haから4~5ton/haに増加したこと、インドネシア国では Pesticides が 370 formulations あり、内115 formulations は仮免許、残る225は永久免許を取得しているこ

とが述べられている。(資料7)

以上の情報を得た後に、分析項目を決定して第一次分析を実施した。

### 1・3 第一次飼料及び原料分析

P.T.Otsuka Indonesia 佐々木氏の資料を元に、インドネシア国産の飼料及び原料分析の方針を立て、佐々木氏に飼料及び原料のサンプルを日本に送付していただいた。

サンプルの日本到着は1984年7月末日。一部サンプルは虫発生のため、焼却処分及び燻蒸処理を植物検疫にて施された。

#### 1) 第一次分析の目的

インドネシア国薬品品質管理プロジェクトにおいて、上記試験所が飼育・繁殖する実験動物の飼料に関する調査・助言の飼料専門家チーム派遣のため、その予備知識として、インドネシア国の飼料及び原料の事前分析を実施する。

P.T.Otsuka Indonesia 佐々木氏のウサギ飼育繁殖データ、並びにP.T.Bina Satwa 高木氏の飼料原料事情等により、必要と考えられる事前分析項目を選定した。

分析項目は、GLPのKnown interfering contaminantを中心に実施し、さらに1・2で述べたようにMycotoxinsや微生物汚染等を検査した。

#### 2) 第一次分析の材料と方法

材料は、P.T.Otsuka Indonesia から提供された製品2点と原料5点の合計7点である。製品のConcentrate BU & TUはEKA Poultry Industrial Enterprise 製で、ウサギ繁殖用と飼育用で、これらの製品に使用されている主な原料は、Soybean meal, Corn, Rice bran, Fish meal, Skim milkの5点であった。

分析項目は、五成分、化学汚染物質、マイコトキシン、微生物、エストロジェン、ニトロソアミン、酸価、過酸化価等合計46項目である。(資料8)

分析方法については、GLP基準の中で日本の各メーカーが用いている標準方法であり、詳細は専門の図書を参考にさせていただきたい。

アメリカにおいてもAOAC 1975 (Association of Official Analytical Chemists) を参考にしており、EPA Report No. 600/1-81-040において謳っている。(資料9)

しかし、Known interfering contaminantsの基準が高いため、Limit of Detection との問題も考慮しなければならない。

#### 3) 第一次分析の試験成績

この分析は、飼料専門家チーム派遣のために実施する事前分析であり、その目的の枠を越えることはできなかった。例えば、サンプリングの状態、製品の製造月日、飼料原料の加工過程等不明の部分が多くあった。

試験成績の数値で問題になるのは、Mould, Coliform group, Acid value, Peroxid value であり、今後も継続的検査が必要と考えられた。(資料8)

#### 4) 第一次分析の考察と結論

五成分において、EKAの製品はメーカーの思想プラス、インドネシア国の飼育条件・動物種により確立されて製品に feedback なされているだろうから、意見は調査後まで差し控えたい。

原料の Soybean mealは国内における圧搾加工による粕らしい。Cornは Protein が少なく、また Moistureの多いのは輸送中の条件によるものかと思われる。Rice branも Protein が少なく、他の成分も日本標準飼料成分や日本配合飼料俵から提供された“インドネシア国の飼料分析値”とも合わない。(資料10)

Fish mealは成分値から予測すると輸入物のような。Skim milkは問題ない。五成分における原料全体に言えることは Moistureが高めで、保管及び輸送中に吸湿したものと考えられる。

化学汚染物質については、実験動物用飼料として重要なため、世界のデータと比較検討することにし、EPA Report No. EPA 600/1-81-040, NCTR Greenmanの Commercial Laboratory Animal Diets, Toxicant and Nutrient Variability, J.K. Evaの Quality Control in Diets - the Attainable, そして日本実験動物飼料協会の GLP対応に関する実験動物飼料協会案等アメリカ、イギリス、日本の現状と比較した。(資料11~14)

各国のデータは1974年~1982年の結果であり、インドネシア国の分析結果と重金属は大差なかった。残留農薬においては文献検索上は問題ありと予想されたが、全ての分析農薬において検出されなかった。

しかし、安心するのは早計であり油断はできない。長期的に継続分析をすべきである。

マイコトキシンにおいては、Aflatoxin, Deoxynivalenol & Nivalenol(Trichothecenes), Ochratoxinの計4点の飼料原料で問題になっている毒物を検査したが、全て検出されなかった。

微生物検査において、Viable total countはRice branを除いてきれいである。Mouldは大変に多い。これはMoistureとの関係が深そうだ。Coliform groupのMPNは多く、保管・製造等全てにおいて不潔きわまりなく、衛生面に問題を残す。

NitrosamineはNon detectで、一応安心できる。しかし、Estrogenは多少問題があり、継続検査の必要な項目である。

Acid Value & Peroxid Valueも高めに検出されているが、品質管理を徹底すれば改善されるであろう。

以上、若干の考察を付け加えたが、結論としては衛生面において非常に問題がある。また、今回の検査では異常がなかったが、今後問題が発生する可能性が大である項目も多数あり、定期検査によって後日、インドネシア国の集積データにおいて総合判断をすることが望ましい。

## 第 2 章 飼料専門家チームによるインドネシア国の現状調査

### 2・1 飼料専門家チームの調査目的及び手順

飼料専門家チームは1984年7月に組織され、9月の出発までの間に作業分担等の役割が決められ、各自の役務に励んだ。

#### 1) 調査目的

インドネシア国薬品品質管理プロジェクトにて使用する実験動物のマウス・ラット・モルモット及びウサギの飼育・繁殖用飼料を、現地にて自家製造するための必要条件を調査することが目的である。

調査目的を遂行するため、事前に文献検索による情報収集並びに飼料原料の事前分析による検討を行った。

特に、1・1で指摘した(i)~(vi)の項目について最善の努力を払った。

#### 2) メンバーと日程

日本からのメンバーは、国立衛生試験所・安全性生物試験研究センター・毒性部・厚生技官の會田喜崇、日本クレア(株)・東京営業所・営業業務課課長・安藤洋次、日本配合飼料(株)・新市場開発室・副参事・吉田米男、同じく日本配合飼料(株)・知多工場・原料製造課・主管補・日下 進の計4名で、役務分担はそれぞれ実験動物、配合設計、品質管理及び製造であった。

インドネシア国到着後、川村次良チームリーダー及びインドネシア国側のカウンターパート Dr. Pudjoprajitno と合流し、調査を開始した。

次に、調査日程は1984年9月2日～9月16日の計15日間で視察施設は13ヶ所であった。詳細は下記の通りである。

9月2日(日)	Narita～Jakarta	ホテルにて川村チームリーダーとスケジュール調整
3日(月)	NQCL(P.P.O.M.)	視察・打合せ、C.B.R.視察
4日(火)	Jakarta～Ciawi	B.P.T.視察
5日(水)	Ciawi～Bandung Bandung～Bogor	Hipki "Mekar" 視察 Bio Farma 視察
6日(木)	Bogor～Jakarta	調査団ミーティング
7日(金)	Jakarta～Bogor	L.P.P.H.視察、P.T.Hirema 視察 P.T.Bina Satwa 視察
8日(土)	Jakarta	調査団ミーティング・整理
9日(日)	Jakarta～Surabaya～Tretes	
10日(月)	Tretes～Malang Malang～Surabaya	P.T.Otsuka Indonesia 視察
11日(火)	Surabaya～Semarang	
		EKA Poultry Industrial Enterprise 視察
	Semarang～Surakarta	
12日(水)	P.T.Air Mancur 視察 Surakarta～Yogyakarta～Jakarta	

9月13日(木) Jakarta~Bogor P.T.Bina Satwa 打合せ  
P.T.Pfizer Indonesia 視察  
P.T.Vaksindo Satwa Utama Raya 視察  
P.T.Kapo Trading Company LTD. 視察

14日(金) P.T.Bina Satwa 飼料・原料サンプリング、調査団視察レポート作成

15日(土) NQCL (P.P.O.M.)にて報告会

16日(日) Jakarta~Hong Kong~Narita

## 2・2 調査結果

視察並びに見学概要を13施設について下記に述べる。

### (i) Biomedical Research Center (CBR)

実験動物用飼料の製造設備として、下記のものがあった。

- 粉碎機 奈良機械 3HP 一台
- ペレット・ミル CPM 2HP 一台
- リボンミキサー 宮坂精機 一台(約300kg)
- 乾燥器 一台

実験動物用飼料は上記設備で製造給与されているが、ペレット・ミルで成型する場合、蒸気を用いないため、ペレットが柔らかく、給与状況を見ると粉末部のこぼれが目立つ。実験動物のマウスはSwiss系、ラットはWistar系で全てCross mating、ウサギは西部Javaのやや大型を自家繁殖して自給している。ケージ内は床敷として、おがくずや野草を使用。

飼料の製造は、マウス・ラット用とウサギ用の2種類で $\phi$ 3/16inchのpelletであった。

### (ii) Project of Animal Research and Development (B.P.T.)

B.P.Tはオランダの協力で建設された施設である。研究室並びに設備してある化学分析機器は最新式のものがあり、非常に充実している。飼料分析は五成分・重金属・マイコトキシン(アフラトキシン)・ホルモン・農薬・PCB等を実施しているとのことで、NQCL飼料分析に関して今後協力を求めたい施設である。

飼料の成型用ペレット・ミルは英国製の水平型が3台設備されていた。しかし、乾燥器がないため、飼料調整室のコンクリート床上面にて放置乾燥していた。

### (iii) Hipki "Mekar"

肉・毛皮用のウサギを生産しているBreederで近隣の仲間12人と組合組織を結成している。種ウサギ4ヶ月令オス1羽メス1羽の価格が45,000Rp、肉相場は3,000Rp/kgとのことであった。ケージのサイズは日本の繁殖用ケージより1.5倍大きく良好である。

肉と毛皮用のウサギ生産のため、純系を各種導入しながら、全てCross matingしているため、純系保存ができていないのは非常に残念である。しかしBreederとしての技術は確立されており、技術指導すれば委託生産が可能と思われる。



飼料は Rice bran & Elephant Grass が中心で、他に野草を給与していた。(資料15)

(iv) Bio Farma

実験動物はマウス・ラット・ハムスターで、最近サルを飼育し始めたとのことである。サルを除き他の動物は自家生産をして実験に供し、要望があれば各機関や大学等にも配布している。

マウスは Swiss 系、ラットは Wistar 系、ハムスターは Golden Hamstar、それにサルは Rhesus Monkeys であった。

ケージはプラスチックでサイズは良好であり、1部屋7列4段のラックが18個入っていた。

飼料は昔、自家製造していたが、現在は Charoen Phoc Phand より購入している。マウス・ラット用としてブタ人工乳後期(Ø 3/16inch × 5 mm)、ウサギ用として成鶏用 Mash、あるいはブタ用人工乳後期と Elephant Grass、サルにはブタ用飼料を使用しているとのことであった。

また、マウス・ラットの床敷はもみがらを使用していた。Bio Farma の月平均使用動物数はモルモット400~700匹、ウサギ20~100羽、サル30~100匹、マウス14,000~18,000匹、離乳マウス7,000~10,000匹であり、インドネシア国の中では一番良い状態で動物を飼育している施設であった。

(v) Inst. of Animal Disease Research (L.P.P.H.)

オーストラリアの援助により完成したこの試験場は、マウス・ラット・ウサギ・モルモットを飼育し、ウサギを除いて試験的に繁殖しているとのことであった。ウサギは近隣の Breeder から購入しており、病気は Coccidium、Psoroptic mange が最も多いそうだ。

各研究室は設備が整い、病理や微生物検査が行われていた。

実験動物は比較的頭数も少なく、飼料はマウス・ラット用(Ø 6 mm × 15 mm)と、モルモット・ウサギ用の2種類が自家製造されているとのことであったが、ウサギ用は見受けられず Setaria Grass が給与されていた。

各種の飼料原料を拝見したが、特に魚粉は悪臭が顕著でココナッツミールは“カビ”が発生し固化しており、その他の原料も推して知るべしである。これらの原料はペットフードショップより購入しているとの説明があった。

(vi) P.T.Hirema

この飼料工場はインドネシア唯一の独立資本の会社であり、1977年より稼働している。製品の主体は Layer 飼料であり、最近の需要動向からして現在、Broiler 用飼料設備としてペレット・ミルを取付中であった。製造能力は58トン/日(約7時間)であり、現在の販売能力は600トン/月程度とのこと。製造設備全体は至って小規模でアメリカ方式の立体型で、原料や製品タンクの下に累積計量器があり、また、その下の地下室に1トンキサーが設置されている構造であった。

なお、成型用ペレット・ミル(40HP)に蒸気配管が無いのは不可解であった。

(vii) P.T. Bina Satwa

P.T. Bina Satwaでは、インドネシアで利用できる原料について打合せ、検討した。なお、実験動物用飼料として利用可能な原料は日本に持ち帰り、分析検討することにした。分析用サンプルは下記の通りである。

Corn, Milo, Rice bran, Wheat pollard, Soybean meal (Brazil), Fish meal (Peru & Domestic), Meat & Bone meal (New Zealand), Coconut meal, Daun Petai Cina (meal & leaves), Sesame meal (China), Papaya leaves, Cassava leaves, Elephant Grass, Green bean (L.P.P.H.), Groundnut meal (L.P.P.H.), Setaria Grass, Lumuput Lapangan, Cocoa residu.

計20種で、他にC.B.R., L.P.P.H.及びBio Farmaにて、給与していた飼料をサンプリングし、合計23種類となった。

(viii) P.T. Otsuka Indonesia

調査前にウサギのデータを送付していただいたので視察はスムーズであった。

ウサギは西部JavaのLembangに比較すると、同じ肉用ウサギでも非常に小さい。ここ東部Java・Malangはウサギは成兎で体重1.5~2.0kgであり、Pyrogen Test用としてP.T. Otsukaでは使用している。購入価格は約2kgで1,800Rpとのこと。現在、Malangのウサギは小さ過ぎるので、Cross matingして3ヶ月令で使用可能になっている。

飼料は次の視察先であるSemarangのEKA Poultry Industrial Enterprise製 Concentrate TU (ウサギ飼育用)を使用し、繁殖にはオリエンタル酵母工業のRC-4を給与していた。

ウサギは種親として400羽で70~80羽/月生産しており、リッターサイズ5~8羽、離乳率70~80%程度とのことである。

施設・飼育条件は全体的に良であるが、繁殖技術を覚えればさらに良くなるであろう。

(ix) EKA Poultry Industrial Enterprise

事前分析したデータに基づき、ウサギ飼料について種々討議した。

その中でも、粗繊維含量が中心話題となり、日本で使用しているAlfalfaはインドネシア国では価格が高く苦慮している由、その代償としてPetai CinaやPapaya leavesを使用しているとのこと。また、Petai Cinaは7%程度、これ以上ウサギに使用すると“Mimosine”により脱毛するとの由。Papaya leavesは18%程度使用可能との説明があった。(資料16)

EKAのウサギ飼料に使用している原料はCorn, Rice bran, Soybean meal, Meat & Bone meal, Fish meal, Groundnut meal (=Peanut meal)が主体であると説明を受けた。また、カビの発生には苦慮しているようで、非防バイ剤を使用することを強調していた。工場は小規模で設備は英国のLister社製であった。主たる製品は養鶏飼料で約6トン/日、その内70%がLayer用で30%がBroiler用との由。

(x) P.T. Air Mancur

生薬を主体とした製薬会社である。図書室、分析並びに研究室を視察した。屋外に薬草の生育場があり、これらは実験用に供する由であった。

実験動物はウサギ・ハムスター・マウス・モルモットが飼育され、その飼料にはハムスターとマウスは自家製造の錠剤(直径 2 cm)を給与しており、ウサギにはKang Kungを給与していた。

動物試験は、製剤の簡単な毒性試験を行い安全性を確認する程度との由。

(xi) P.T. Pfizer Indonesia

P.T. Pfizer Indonesiaは東南アジアにおける重要な販売拠点であり、品質管理衛生面でも中心的役割を果たしているとの説明があり工場内を見学する。

インドネシア国は高温・高湿であり、原料や製品の在庫場所は空調機付きで、特に低温保管を要する物は低温倉庫を利用し、先入れ先出しが厳守できるように配置やラベル表示が工夫されていた。

薬剤の各調整室は、工場内を小さく間仕切りし、個室の集団構造ともいえるような組織で、各室には1~2人程度で作業が行われて、空調設備等を含めて綿密な配慮がなされた設計の建物で非常に参考になった。また、作業者は各々作業内容に適応した保護具を着用し、各作業室のドアにその日の作業内容・作業者氏名・作業時間等を記入したカードが差込まれていたことは印象に残った。

各試験室は広く、かつ設備的にも十分完備していた。実験動物はPyrogen Test用のウサギでKang Kungを給与していた。

(xii) P.T. Vaksindo Satwa Utama Raya

日本の日生研の技術指導と援助を得て1980年に建設を開始し、1982年完成、1984年1月より動物用ワクチン4種類の製造開始していた。ワクチン製造は水が命であり、井戸の深さは約180 mとの由で、規模的にも大きな浄水施設を備え使用していた。

実験動物は少数のウサギ・マウス・イヌ・ニワトリ・ヤギを飼育しており、マウス用飼料はC.B.R.の飼料を与えていた。

(xiii) P.T. Kapo Trading Company LTD.

プレミックスを製造している会社であり、インドネシア国におけるRoche, Ciba-Geigy, Abbott社の輸入総代理店である。

注文生産は、ビタミンまたはミネラルのある原料単位の最少量が1 kg以上であれば引受ける由。

工場内を見学したが、設備的には混染の危険が高い設備である。Kapo Tradingの価格表を添付する。(資料17)

## 2・3 飼料専門家チームの調査結論

インドネシア国の調査を終わって考えるに、ウサギは東部 Java の小さいウサギを Closed Colony で繁殖飼育すれば、良い実験動物となり得るだろう。それには各種のデータが必要になるが、これは長期計画に基づき、微生物コントロール・遺伝的コントロール・環境コントロールによって達成できることである。

実験動物用飼料原料は事前分析データで予想されたごとく、腐敗・変敗・カビ等衛生面に問題が残る。また、繊維源として期待していた Petai Cina は Mimosine により使用はむずかしい。しかし、今回の計画では原料を熱処理することになっているので Mimosine の破壊を期待できるだろう。

いずれにせよ、インドネシア国の気象条件を考慮して、原料・製品の保管や品質管理は十分な注意と技術を必要とする。

結論はサンプリングした分析結果を待って、改めて検討する。

飼料メーカーの中小メーカーは、設備・技術共に利用できない。大手の P.T. Bina Satwa 以上のクラスでなければ利用する価値がない。

飼料分析に関しては、視察先の一つであった Project of Animal Research Development (Balai Penelitian Ternak - B.P.T.) の設備と技術を利用しながら進めることが良いだろう。しかし、Cross check は必要不可欠である。

乾草原料については Petai Cina の他に、Elephant Grass, Setaria Grass, Papaya leaves, Cassava leaves, Lumuput, Lapangan (野草) をサンプリングしてきたので、この中から良い原料を見つけたいと思い、持ち帰り分析した。

プレミックスは、NQCL (P.P.O.M.) で自家製造するか、外部へ委託するか、現地で再検討してから結論を出すべき問題である。

自家製造についても、完全自家製造か半自家製造かは、今後の作業能力等により結論を導き判断することが最良であろう。

## 第 3 章 第二次分析並びにインドネシア国薬品品質管理プロジェクト用配合設計(案)

### 3・1 第二次分析の目的と結論

#### 1) 目的

第二次分析の目的は、インドネシア国で実験動物用飼料を製造する場合に、如何なる原料を用い、どのような組合せで各種実験動物に適した飼料を作るかの最小必要分析をすることである。

#### 2) 材料と方法

3・1・1)の目的のため、調査時の視察先である P.T. Bina Satwa にて、現地で入手可能な原料及び野草 (Alfalfa の代替原料として) 16 種 18 点、また L.P.P.H. より採集した原料 2

種 2 点、さらに製品 3 種の合計 23 点を分析材料とする。

詳細は下記の通りである。

- (i) P.T.Bina Satwa にて採集した原料及び野草 16 種 18 点について、  
Maize, Milo, Rice bran, Wheat Pollard, Soybean meal (Brazil), Coconut meal, Fish meal (Peru & Domestic), Meat & Bone meal (New Zealand), Sesame meal (China), Cocoa residu  
繊維源として、  
Daun Petai Cina (meal & leaves), Papaya leaves, Cassava leaves, Elephant Grass, Setaria Grass, Lumuput Lapangan
- (ii) L.P.P.H. (Inst. of Animal Disease Research) にて採集した原料 2 種 2 点について、  
Green bean, Groundnut meal (Peanut meal)
- (iii) 製品 3 種について、  
Commercial pig starter of CIAROEN POKPHAND (Bio Farma), Feed for rabbit (L.P.P.H.), Feed for mouse & rat (C.B.R.)

以上が第二次分析用の材料であり、その分析方法については、1・3・2)の第一次分析時と同様である。

### 3) 結果と考察

18 種 20 点の原料分析結果 (資料 18) を日本配合飼料 (株) の分析データ、並びに Feedstuffs (Feb. 14, 1983) の 1983 Feedstuffs Analysis Table と比較検討してみることにする。  
(資料 10, 19)

Maize, Milo は問題ない。Rice bran は脂肪が若干高めであり、また灰分も同様である。しかし、第一次分析のデータの結果よりは低い。多分、製造工程の違いによるのだろう。

Wheat pollard は Wheat shorts と同様のものと考えられる。Soybean meal (Brazil) は蛋白が高く日本産の抽出と似ている。

Fish meal は Peru 産も国内産も AV と POV が第一次分析よりも良く、我々は内心ほっとした。しかし、Peru 産においては脂肪が高過ぎるようだ。

Meat & Bone meal と Coconut meal は問題ない。中国産の Sesame meal は蛋白・脂肪が若干低いようである。

繊維源としての原料を見ると、Daun Petai Cina は Mimosine の毒性で動物に脱毛を起こさせるため配合しづらいと考えるが、Mimosine は熱処理によって破壊させることができるとのこと。参考に、Mimosine の測定法の文献 The determination of mimosine and 3,4-dihydropyridine in biological material (Aust. J. Agric. Res., 1964, 15, 168-179) を紹介しておく。(資料 20)

しかし、調査時の視察からすると、使用可能原料は Elephant Grass と Setaria Grass の 2 種が考えられるが、それを原料として使用するには事前調整が必要である。他の原料はこの 2 原料の代替として位置づけられるであろう。

製品3種類の分析結果は、Pig starterのAVが高く、また Antibacterials が(-)であったのは驚きである。L.P.P.H.のウサギ飼料は蛋白は低く、繊維は非常に少ないため、完全配合飼料ではないのだろうと考えられる。また AVも高く、Mould, Coliform groupも悪く、CaとP比も悪い。

C.B.R.のマウス・ラット用飼料はAVとMouldを除けば良いであろう。

いずれにせよ、原料から予測できる製品内容の結果であった。

他に VBN (Volatile basic nitrogen) を Fish meal と Meat & Bone meal について実施してみたが、結果は良である。AV, POV, NaClも実施し、結果は資料18の通りである。

以上が、原料と製品の分析結果である。

#### 4) 結論

インドネシア国の気候条件、原料流通並びに保管技術、飼料製造技術等を考えれば上記の分析結果は良い方であろう。しかし、今回我々が製造する飼料は、今後の動物実験に対して再現性の大きな要素であり、実験動物と同様に重要である。

飼料原料は良く吟味すべきであり、原料検査表を作成し、入庫の都度、検査することにより同じ品質の原料を入手し、使用することが大事である。特に Sensory Test 実行を期待する。

微生物問題は、加工工程の中の蒸気によって殺菌効果が期待でき、さらに乾燥工程で動物にとって問題のない水準まで下げることが可能と考えられる。あとは、再汚染の防止を心掛け、保管することである。

### 3・2 インドネシア国薬品品質管理プロジェクト用配合設計(案)

#### 1) 配合設計の基本的考え方

プロジェクト用実験動物飼料は、GLPに適合するように Known interfering contaminant が少なく、また動物実験の再現性を守るべく一度確立した飼料は組成を変えないこと、さらに、多くの原料を使用して製品の分析値がばらつかないように心掛けることを配合設計(案)の基本とした。

#### 2) マウス・ラット用配合設計(案)

第一次(案)の配合設計により調査時採集してきた分析用原料の残りで1kgの試験的配合を試み、かつ簡単な嗜好試験を実施した結果、若干、嗜好性に乏しいため、第二次(案)の配合設計も示しておく。(資料21)

しかし、第一次(案)は pellet にできる程度の原料がなく、mash で実施したための影響も多分にあり、第一次(案)を放棄したわけではない。

#### <第一次(案)配合設計>

Maize & Milo	30 %
Wheat Pollard	20 %
Soybean meal	15 %
Fish meal ( Peru )	10 %

Coconut meal	10 %
Sesame meal or leaves	5 %
Cassava meal	9 %
Vit. & Mine. Mix	1 %

---

Total 100 %

分析値は(資料18)に示す通りであり、五成分は下記の通りであった。

粗蛋白質 23.3%, 粗脂肪 5.1%, 粗繊維 4.9%, 粗灰分 5.3%, 水分 11.2%。この結果より可溶性無窒素物(Nitrogen free extracts. NFE)は 50.2%と計算される。

他のビタミン・ミネラル等の分析値は pre-mix 用計算のためである。

第一次(案)配合には pre-mix の添加はしていない。

<第二次(案)配合設計>

Maize	18.0 %
Milo	13.0 %
Wheat Pollard	20.0 %
Soybean meal (Brazil)	15.0 %
Fish meal (Peru)	13.0 %
Coconut meal	5.0 %
Sesame meal	5.0 %
Cassava meal	8.0 %
Coconut oil	0.5 %
Molasses	0.5 %
Salt	0.5 %
CaCO <sub>3</sub>	0.8 %
* Pre-mixes	0.7 %

---

Total 100.0 %

\* Pre-mixes は飼料 100g に下記の数値になるよう、調整する。

Vitamin A	1,000 iu
" D <sub>3</sub>	200 iu
" E	10 mg
" B <sub>1</sub>	1.5 mg
" B <sub>2</sub>	1.5 mg
" B <sub>6</sub>	1.5 mg
" B <sub>12</sub>	7 μg

3) ウサギ・モルモット用配合設計(案)

第一次(案)の配合設計により 3・2・2)と同様に、分析原料の残りで試験的配合及び嗜好試験を試みる。結果は、マウス・ラット用と同様に嗜好性に乏しいため、第二次(案)の配合設計も示しておく。

<第一次(案)配合設計>

Mize & Milo	20 %
Wheat Pollard	20 %

Soybean meal ( Brazil )	10 %
Fish meal ( Peru )	5 %
Coconut meal	4 %
Elephant grass & Setaria grass	40 %
Vit. & Mine. Mix	1 %

---

Total	100 %
-------	-------

分析値は(資料18)に示す通りであり、五成分としては下記の通りであった。

粗蛋白質17.8%, 粗脂肪3.7%, 粗繊維13.7%, 粗灰分8.1%, 水分9.0%。NFEは47.7%であった。しかし、粗繊維が計算値と大幅に違うため確認、検討を要する。

なお、マウス・ラット同様、pre-mixesは添加していない。

#### <第二次(案)配合設計>

Maize	8.0 %
Milo	6.3 %
Wheat Pollard	20.0 %
Soybean meal ( Brazil )	15.0 %
Fish meal ( Peru )	5.0 %
Coconut meal	2.0 %
Coconut oil	1.0 %
Molasses	0.5 %
Cassava meal	10.0 %
Elephant grass	15.0 %
Setaria grass	15.0 %
Salt	0.7 %
CaCO <sub>3</sub>	0.8 %
Vit. C	150mg/100g
** Pre-mixes	0.7 %

---

Total	100.0 %
-------	---------

\*\* Pre-mixesはマウス・ラット用と共有できるように、最終的に調整するように考える。

### 3・3 配合設計(案)に基づく製造方法と経済性

#### 1) 製造方法

製造方法として、完全自家製造か半自家製造の方法で問題解決をする。

半自家製造というのは、原料購入に際して3~5個の半製品(Mash)を仕入れて、最終的にはNQCLにて製造する方式である。

これは、作業従事者の配合間違いを極力除くことができ、また原料保管場所の効率的運用並びに在庫管理の徹底を期すことができるからである。

なお、ウサギ・モルモット用に使用する乾草の粉碎のため、Ultra cutting millを必要とする。



製造方法のシステムを考えるに当っては、1985年4月の製造訓練時に最終判断するべきである。

## 2) 経済性

経済性は、その製品の持っている目的・特長を考慮しないことには判断できないが、一応入手し得る情報を使っての配合設計(案)の価格を計算してみよう。資料は P.T. Bina Satwa より提供していただいた。(資料 22)

マウス・ラット用の第一次(案)原料価格は Rp 224/kg、ウサギ・モルモット用の第一次(案)原料価格は Rp 158/kg であった。また第二次(案)についても Rp 230/kg と Rp 160/kg 程度であろう。いずれも pre-mixes 価格は含まれていない。

インドネシア国で市販されている飼料価格を見ると、EKA Poultry Industrial Enterprise の Concentrate TU Rp 325/kg, SU Rp 350/kg であり、Bio Farma で使用していた Charon Phoc Phand の豚人工乳後期は Rp 362/kg であった。

しかし、NQCL で使用する原料は実験動物用であり、再現性を重要視すれば原料吟味が厳しくなり、価格アップは避けられないと考えられる。

## 第 4 章 インドネシア国薬品品質管理試験所における実験動物の飼育、繁殖に関する提言

### 4・1 マウス・ラットの飼育、繁殖

マウス・ラットの飼育、繁殖に対する提言については、クローズド・コロニーによる管理マニュアルを整備し、動物における基本データを集積することに尽きる。例えば、成長曲線・飲水量・摂餌量・尿量・血液データ・妊娠率・リッターサイズ・離乳率等であり、他は専門書を参考にされたい。

また、微生物統御については、インドネシア国における実験動物の病気に対する基礎データが必要であろう。特に、SPF に関する病気から調査をするのが良い。人畜共通伝染病には注意をすることが肝心である。

提言を要約すれば、微生物統御、環境統御、遺統御、栄養統御が実験動物の要になっており、マウス・ラットは必ず統御すべきである。

### 4・2 ウサギ・モルモットの飼育、繁殖

インドネシア国産のウサギ・モルモットを使用することが望ましい。

モルモットについては特に繁殖がむずかしいので、L.P.P.H のように平飼いが良い。あるいはケージサイズは、広く大きい方が良くであろう。また、繁殖用モルモットには固型飼料のみでなく、新鮮な野菜も必要である。

ウサギについては、東部 Java の小さい系統をクローズド・コロニーから始めることが最良である。

#### 4・3 結 び

本報告書は、インドネシア国薬品品質管理試験所において飼育、繁殖する実験動物用飼料の配合設計をすることが本旨であり、そのために飼料専門家チームをインドネシア国に派遣し、並びに調査前後にインドネシア国の飼料原料と製品を分析するに至って、本報告書を作成することができた。

なお、報告書作成において、国立衛生試験所の高仲 正薬理部長、田中室長、日本配合飼料(株)本間研究員、(株)東京顕微鏡院 石橋検査事業部長、土橋科長、加藤主任、その他関係者に多大な御援助をいただきましたことに、感謝の意を表します。

## 参 考 资 料



PT. OTSUKA INDONESIA

JL. SUMBER WARAS 25

LAWANG - INDONESIA.

LOCAL MADE RABBIT FOOD  
IN INDONESIA

PREFACE

Since 1975 PT. Otsuka Indonesia has been using rabbits for pyrogen analysis. Rabbits used are, between 1,5 - 2,7 Kg of weight, originated from Batu area, around 25 Km from Malang.

Due to the difficulties in obtaining suitable qualified rabbit food from Japan ( Type RC-4, Oriental Yeast Co. Ltd. ), investigations have been conducted for,

1. rabbit breeding
2. suitable local made rabbit food .

RESULTS OF INVESTIGATIONS MADE

1. Fresh vegetables consisting of "kangkang" ( Ipomoea sp. ) and carrot ( Daucus carota ).

Result :-well accepted by rabbits

- dirty cages
- less healthy rabbits , eg. too slow increase of body weight .

2. Self made rabbit food (pellet-form) consisting of :

- corn powder 30 %
- soy bean 20 %
- coconut powder 15 %
- finely ground rice 10 %
- green pea 10 %
- fish powder 15 %

Result : - well accepted by rabbits

- less healthy rabbits, eg. too slow increase of weight
- not practical to produce because of facility and capacity .

Data : refer to no. 5.

資料 1-(2)

3. Rabbit food Konsentrat TU (pellet-form) , product of EKA Poultry Industrial Enterprise ,

- protein 16 %
- coarse fibre 10 %
- fat 2 %
- vitamins
- mineral

Result : - well accepted by rabbits

- increase of body weight similar to RC-4 type
- healthy rabbits

- price Rp. 325 ,- per Kg ( RC-4 : Rp. 1870 ,- per Kg )

Data : refer to no. 5

4. For the purpose of breeding :

from pregnancy until child birth and breast feeding given rabbit food type Konsentrat TU.

Result : - less healthy mother and child , increase of body weight and abnormal of body-hair growth .

( It is about 10 - 15 % )

Correction by giving the Konsentrat SU type or RC-4 type could normalize the condition .

Further investigations are being conducted to give the Konsentrat BU type especially for expectant females , and the Konsentrat SU type for breast feeding .

Note : - SU type well accepted by rabbit

- price : Rp. 350 ,- per Kg

5. Data :

5.1. Data of 5 rabbits given self made rabbit food (see no.2)

body weight (g) after the...day	No.1	No.2	No.3	No.4	No.5
0	1040	1290	1320	1200	1320
1	1060	1320	1300	1200	1320
2	1120	1290	1300	1190	1320
3	1170	1330	1310	1240	1310
4	1100	1310	1310	1210	1330
5	1100	1240	1320	1220	1350
6	1100	1250	1330	1210	1340
8	1120	1300	1360	1260	1380
9	1170	1300	1360	1260	1410
10	1170	1360	1340	1260	1410

資料 1-(3)

body weight (g) after the...day	No.1	No.2	No.3	No.4	No.5
11	1190	1390	1380	1220	1460
12	1230	1300	1370	1220	1400
13	1220	1430	1370	1300	1430
total	180 g	140 g	50 g	100 g	110 g

5.2. Data of 6 rabbits given Konseutrat TU (see no.3)

body weight (g) after the...day	No.1	No.2	No.3	No.4	No.5	No.6
0	1200	1120	1000	1210	990	890
1	1220	1000	940	1210	990	920
2	1280	1130	1060	1210	920	940
3	1320	1190	1070	1260	1010	960
4	1300	1220	1100	1240	1070	990
5	1340	1250	1120	1240	1070	1010
7	1380	1290	1130	1210	960	1070
8	1380	1320	1140	1240	1030	1100
9	1420	1330	1170	1160	1040	1130
10	1450	1350	1200	1240	1030	1120
11	1450	1360	1200	1280	1070	1150
12	1520	1390	1230	1320	1030	1180
14	1510	1400	1270	1320	1120	1240
total	340 g	280 g	330 g	110 g	130 g	350 g

5.3. Data of 5 rabbits given RC-4 .

body weight (g) after the...day	No.1	No.2	No.3	No.4	No.5
0	1380	1240	1220	1280	1400
1	1430	1260	1300	1280	1450
2	1440	1320	1280	1290	1470
3	1460	1310	1300	1300	1470
4	1430	1370	1310	1280	1400
5	1400	1300	1400	1290	1410
7	1450	1300	1370	1320	1460
8	1450	1440	1380	1350	1500
9	1500	1400	1410	1370	1490
10	15200	1500	1420	1360	1580

body weight (g) after the...day	No.1	No.2	No.3	No.4	No.5
11	1520	1520	1460	1410	1600
12	1520	1490	1500	1380	1600
14	1560	1550	1460	1450	1640
total	130 g	310 g	260 g	150 g	240 g

5.4. Summary data of increasing body weight after 14 days .

No.	Konsentrat TU	Self made	RC - 4
1	340 mg	180 mg	180 mg
2	280 mg	140 mg	310 mg
3	330 mg	50 mg	260 mg
4	110 mg	100 mg	150 mg
5	130 mg	110 mg	240 mg
6	350 mg		
average	256,7 g	116 g	228 g

CONCLUSION

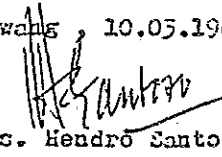
1. Eventhough further investigations are still needed, there is a bright future to replace the rabbit food imported from Japan, type RC-4 Oriental Yeast Co. Ltd. by the local made products rabbit food type Konsentrat TU , BU , SU from EKA Poultry Industrial Enterprise, Jl. Ikan Bonjol 133 B Semarang.
2. Breeding is made possible especially because of the low cost rabbit food .

---Oco---

NOTE :

- \* Now we are doing the experimentation of Konsentrat SU for breeding.

Lawang, 10.05.1984

  
Drs. Hendro Santoso

manager



資料 2

§58.90 Animal Care.

- (a) There shall be standard operating procedures for the housing, feeding, handling, and care of animals.
- (b) All newly received animals from outside sources shall be placed in quarantine until their health status has been evaluated. This evaluation shall be in accordance with acceptable veterinary medical practice.
- (c) At the initiation of a nonclinical laboratory study, animals shall be free of any disease or condition that might interfere with the purpose or conduct of the study. If, during the course of the study, the animals contract such a disease or condition, the diseased animals shall be isolated. If necessary, these animals may be treated for disease or signs of disease provided that such treatment does not interfere with the study. The diagnosis, authorizations of treatment, description of treatment and each date of treatment shall be documented and shall be retained.
- (d) Warm-blooded animals, excluding suckling rodents, used in laboratory procedures that require manipulations and observations over an extended period of time or in studies that require the animals to be removed from and returned to their home cages for any reason (e.g., cage cleaning, treatment, etc.), shall receive appropriate identification (e.g., tattoo, toe clip, color code, ear tag, ear punch, etc.). All information needed to specifically identify each animal within an animal-housing unit shall appear on the outside of that unit.
- (e) Animals of different species shall be housed in separate rooms when necessary. Animals of the same species, but used in different studies, should not ordinarily be housed in the same room when inadvertent exposure to control or test articles or animal mixup could affect the outcome of either study. If such mixed housing is necessary, adequate differentiation by space and identification shall be made.
- (f) Animal cages, racks and accessory equipment shall be cleaned and sanitized at appropriate intervals.
- (g) Feed and water used for the animals shall be analyzed periodically to ensure that contaminants known to be capable of interfering with the study and reasonably expected to be present in such feed or water are not present at levels above those specified in the protocol. Documentation of such analyses shall be maintained as raw data.
- (h) Bedding used in animal cages or pens shall not interfere with the purpose or conduct of the study and shall be changed as often as necessary to keep the animals dry and clean.
- (i) If any pest control materials are used, the use shall be documented. Cleaning and pest control materials that interfere with the study shall not be used.

Maximum Allowable Concentrations of Toxic Feed Contaminants

CONTAMINANT	UNIT	USEPA	NCTR	MIN. REQ.
Cadmium	mcg/g	0.16	0.05	-
Lead	mcg/g	1.5	1.00	-
Arsenic	mcg/g	1.0	0.25	-
Mercury	mcg/g	0.1	0.05	-
Selenium	mcg/g	0.6	0.5	0.1
PCBs	ng/g	50	50	-
DDTs	ng/g	100	50	-
Malathion	mcg/g	2.5	0.5	-
Lindane	ng/g	20	10	-
Dieldrin	ng/g	20	10	-
Aflatoxins (Total)	ng/g	5	1.0	-
Estrogenic Activity (DES Equiv.)	ng/g	1	2	-

第5表 インドネシア農薬事情

① インドネシア商業省、農業用農薬輸入許可  
リスト, 1970, May 8  
リスト番号 Directorate Impor 2306/DIN/70

有機燐素剤	有機リン剤	その他
Dieldrin	Malathion	Walfatox
Aldrin	Parathion (E)	Copper Sulphate
DDT	◇ (M)	Zinc Phosphate
BHC	Sumithion	
	Dipterex	
	Diazinon	
	Dimcron	

② 農業資材供給公社農業在庫表 1970  
リスト番号 Stc. No. 182/v/92/70

農薬名	在庫量 kl or ton	
	1月/70	3月/70
Endrin (19.5% EC)	872. kl	810. kl
BHC (6% G)	1,175. ton	1,082. ton
Diazion (60EC)	668. kl	770. kl
Sumithion (50 EC)	123. ◇	112. ◇
Malathion (50 EC)	30. ◇	29. ◇
Thiodan (50 EC)	353. ◇	353. ◇
Dipterex (85 WS)	36. ◇	36. ◇
(E) Parathion (50 EC)	8. ◇	7. ◇
Zinc Phosphate	163. ton	158. ton

③ ビマス計画における農業投資の事例  
(米作における農業)

1969 乾期作 西ジャワ州

品目	所要量 /Ha	単価 Rp/kg or lt.	必要経費* Rp/Ha
Urea	100 kg	35	3,500
T. S. P.	50 ◇	30	1,500
Sumithion	4.2 l	610	2,560
Zinc Phosphate	0.1 kg	500	50
Sprayer (hand)	1台/15 Ha	—	245
Seed (PB-5)	30 kg	40	1,200
Extension fee	—	—	600
Total			9,657/Ha

\* 増産予定 3.5 ton by wet padi. 約 1.0 ton の  
増収当時の米価 12~15 Rp=Yen/kg wet padi.  
注 Rp=Yen

④ キャベツ耕作者の農業投資の事例  
(畑作における農業)

1970, 雨期 北スマトラ州

品目	必要経費 Rp/Ha
Seed (From Takil)	7,200
Fertilizer (Urea Tsp)	30,000
Insecticide (12回/season)	37,000
Fungicide (5回/◇)	18,500
Labour charge (散布者)	62,500
Total	155,200 Rp/Ha

注 Export price of cabbage 7 Rp/kg  
Production 25 ton/Ha/season  
cost : ca. 6.2 Rp/kg  
7-6.2=0.8 Rp/kg  
ca. 20,000 Rp/Ha/season=4 month.

資料 5

LC<sub>50</sub> values of 5 insecticides to 16 colonies of housefly larvae in Indonesia (ppm).

Colony name	Diazinon	Sumithion	Malathion	DDT(tech.)	γ-BHC
No. 1. Java	30.12	13.77	23.92	95.24	23.36
No. 2. Java	137.74	44.25	36.22	233.64	18.59
No. 3. Java	34.48	30.67	29.41	92.93	23.55
No. 4. Java	194.55	176.68	61.50	239.23	22.83
No. 5. Java	12.82	9.29	12.85	38.76	24.51
No. 6. Sumatra	26.74	10.92	11.18	53.53	6.44
No. 7. Sumatra	29.41	6.74	16.18	52.36	97.47
No. 8. Sumatra	18.11	5.47	14.41	274.73	244.41
No. 9. Celebes	60.09	154.32	25.64	190.11	12.25
No. 10. Celebes	26.18	7.39	17.73	480.76	190.66
No. 11. Ambon	17.30	3.78	10.20	369.71	46.73
No. 12. Celebes	21.09	5.35	14.41	190.11	3.88
No. 13. Flores	161.81	0.37	90.91	92.94	6.01
No. 14. Bali	44.64	8.68	19.01	165.56	19.01
No. 15. Timor	0.14	0.30	2.83	378.78	38.61
No. 16. Lombok	3.79	0.67	9.52	322.58	22.83
Takatsuki	1.15	1.59	4.76	362.31	82.91

出典=防虫科学 第39卷-N

資料 6

LD<sub>50</sub> values for 9 insecticides of the adult female house flies in Indonesia (μg/Insect).

Colony name (Collection site)	Alle-thrin	Pyre-thrins	Sumi-thion	Dia-zinon	Maln-thion	DDVP	Baytex	γ-BHC	DDT
No. 1. Java (Bogor)	0.423	0.110	0.224	0.171	0.710	0.060	0.133	0.312	1.397
No. 2. Java (Jakarta)	0.307	0.146	0.407	0.330	0.787	0.143	0.216	0.515	1.062
No. 3. Java (Jakarta)	0.285	0.182	0.560	0.259	0.220	0.126	0.151	0.327	1.542
No. 4. Java (Jakarta)	0.198	0.103	0.615	0.273	1.292	0.094	0.185	0.358	0.603
No. 5. Java (Cirebon)	0.497	0.213	0.146	0.175	0.467	0.033	0.110	1.611	3.752
No. 6. Sumatra (Medan)	0.154	0.188	0.072	0.126	0.318	0.021	0.043	0.330	1.449
No. 7. Sumatra (Berastagi)	0.369	0.150	0.178	0.204	0.393	0.039	0.089	0.509	4.249
No. 8. Sumatra (Kabanjahe)	0.543	0.191	0.435	0.309	0.698	0.066	0.174	0.906	2.932
No. 9. Celebes (Ujung Pandang)	0.534	0.188	0.069	0.075	1.854	0.032	0.051	0.394	0.703
No. 10. Celebes (Ujung Pandang)	0.487	0.269	0.246	0.235	0.582	0.076	0.128	1.404	7.251
No. 11. Ambon (Ambon)	0.070	0.280	0.054	0.089	0.217	0.011	0.034	0.153	2.683
No. 12. Celebes (Manado)	0.142	0.423	0.076	0.171	0.249	0.011	0.025	0.033	1.567
No. 13. Flores (Maumere)	0.160	0.071	0.024	0.019	0.269	0.007	0.018	0.006	0.433
No. 14. Bali (Denpasar)	0.247	0.095	0.058	0.128	0.222	0.029	0.041	0.116	0.406
No. 15. Timor (Kupang)	0.326	0.153	0.013	0.015	0.097	0.029	0.016	0.179	0.830
No. 16. Lombok (Mataram)	0.087	0.044	0.049	0.084	0.097	0.013	0.027	0.105	0.908
Takatsuki	0.481	0.387	0.088	0.293	0.454	0.076	0.135	4.547	46.900

出典=防虫科学 第39卷-III

CURRENT PROBLEM ON HUMAN HAZARD, ENVIRONMENT & FOOD  
POLLUTION AND THE DEVELOPMENT OF PESTICIDES IN FUNGI  
& INSECTS

Indonesia is developing its agricultural sector in order to increase agricultural production and job opportunities, ensuring increase of the per capita income of the farmers.

Food production must be increased to 3.8 - 4 percent annually in order to be able to fill the need of food for the people, which is increasing at the rate of about 2.34 percent annually.

Foreign exchange earning from the plantation sub sector must be increased step by step, to replace petroleum export, to support industry and to increase societies income. All of these make us use new technology. For example: rice product. Before using a new technology the agricultural production was about 1.5 - 2 ton rice per hectare. Now by using new technology agricultural production reaches about 4 - 5 ton rice per hectare. This high production can be reached by energy input: rice seedling, fertilizer, mechanization, pesticides (insecticide, herbicide, fungicide), and frequency of planting (3 times annual, 5 x 2 annual).

The use of pesticides for Bimas (Massive Guidance) was about 1.26 l/kg/ha in 1979 and 1.34 l/kg/ha in 1980.

Pests

Pests include insects, pathogens and weeds which are injurious to plants. Pests multiply very fast, so may be harmful to man and cause great economic

loss by damaging or destroying agricultural crops and other valuable plants.

In Indonesia, Nilaparvata lugens is known to exist and multiply since 1972 until now.

In 1975 - 1979 losses to the rice reached 300.000 ton of the annual agricultural production.

Pest also can damage 19 - 24. percent of the annual agricultural production.

#### Pesticide

Pesticide is used for controlling various kind of pests. Pesticide has been used since the past century. People first used organic matter from plant such as pyrethrum, nicotine. Then, sulfur and copper sulfur mixed to quick lime.

The synthetic pesticide has been used since the second world war with the discovery of DDT [C<sub>14</sub> H<sub>9</sub> Cl<sub>9</sub>] di chloro diphenyl trichloro ethane]. Since that time plenty of synthetic pesticides were found and hundred of formulations of pesticides were flooding the world markets.

Recently, there are 370 formulations of pesticides which have been licensed in Indonesia, 115 formulations by provisional license and 255 formulations by permanent license. These sixteen formulations are in just restricted use and need the permit from the Agriculture Minister or Chairman of Pesticide Committee if we use these pesticides.

資料 7-(3)

To know the risk of using pesticide, the way of quality model of pesticide application is given below:

1. Pesticide sprayed in air will soon mix with air and will be affected by the sun.
2. Pesticide can decompose in air.
3. Pesticide can undergo percolation, carried by air current.
4. Part of the pesticide falls on plant.
5. Pesticide can stick and spread and cover surface of plant.
6. Pesticide can enter plant through mouth of leaf.
7. Pesticide can have a phytotoxic effect on plant.
8. Pesticide can change in body of plant.
9. Insect pests infesting the plant will be killed if they come in contact with the pesticide (contact poisons). If they bite the plant, they will be killed (stomach poisons).
10. Predators and parasites will be killed by pesticide too.
11. Insects with pollinizing activity, frog, snake and so on will be killed by pesticide too.
12. Pesticide will fall on soil and water. Here pesticide will have influence on water insect, soil arthropod, microbia and so on.
13. Pesticide degrades in water and soil.
14. Persistent pesticide (DDT, Aldrin, Dieldrin) will not undergo degradation in soil, but will communicate in soil.
15. In water, pesticide can result in the increase in size biologically (particularly persistent pesticide).
16. If granular formulation is used, they will enter the body of plant and evaporate around the plant, if they have systemic action. Granular is not destroy predator and parasite, but they will have negative influence to fauna and water.

CERTIFICATE

Analitical result of feedstuffs and products  
in Indonesia

5 Oct. '84  
GLEA JAPAN INC.  
YOJI ANDO D.V.M.



Name Subject	Concentrate BU	Concentrate TU	Realizable Limit	Method
Moisture	10.7 %	11.6 %		135 ± 2° C 2hr
Crude Protein	16.4 %	16.8 %		Kjeldahl
Crude Fat	7.7 %	8.7 %		Soxhlet s extractor
Crude Ash	12.2 %	12.1 %		550° C 2hr
Crude Fiber	3.8 %	4.8 %		AOAC
Total Mercury	non detect	non detect		FL-AASP
Cadmium	0.08 ppm	0.11 ppm	0.01 ppm	AASP
Lead	0.5 ppm	0.8 ppm		AASP
Arsenic	0.32 ppm	0.40 ppm		Colorimetry
Nitrite	non detect	non detect	0.5 ppm	Colorimetry
D D T	non detect	non detect	0.005 ppm	ECD-GC
B H C	non detect	non detect	0.005 ppm	ECD-GC
Dieldrin	non detect	non detect	0.005 ppm	ECD-GC
Heptachlor	non detect	non detect	0.005 ppm	ECD-GC
Malathion	non detect	non detect	0.005 ppm	FPD-GC
Selenium	non detect	non detect	0.1 ppm	Fluorescence
P C B	non detect	non detect	0.005 ppm	ECD-GC
Aflatoxin	negative	negative	5 ppb	ILC
Aldrin	non detect	non detect	0.005 ppm	ECD-GC
Parathion	non detect	non detect	0.005 ppm	FPD-GC
Chromium	3.8 ppm	2.9 ppm		AASP
Deoxynivalenol	non detect	non detect	0.05 ppm	HPLC
Nivalenol	non detect	non detect	0.05 ppm	HPLC
Ochratoxin	non detect	non detect	0.05 ppm	HPLC

ECD-GC: Electron Capture Detector - Gas Chromatography  
 FPD-GC: Flame Photometric Detector - Gas Chromatography  
 TEA-GC: Thermal Energy Analyzer - Gas Chromatography  
 HPLC: High Performance Liquid Chromatography  
 AASP: Atomic Absorption Spectrophotometer  
 FL-AASP: Flame Less - Atomic Absorption Spectro Photometer  
 TLC: Thin Layer Chromatography  
 RIA: Radio Immuno Assay  
 AOAC: Association of Official Analytical Chemists

Name	Concentrate BU	Concentrate IU	Realizable limit	Method
Subject				
Visible total count				
Mould	1.2 x 10 <sup>4</sup> /g	1.1 x 10 <sup>4</sup> /g	0.01 /g	Modified The Sanitaion Low in Japan
Staphylococcus	100 /g	50 /g	0.01 /g	
Enterococcus	negative	negative	negative /3g	Bio Assay TEA-GC TEA-GC TEA-GC RIA RIA RIA Titrant Titrant Colorimetry Fluorescence Colorimetry AASP Colorimetry TLC
Pseudomonas aeruginosa	negative	negative	negative /20g	
Salmonella	negative	negative	negative /0.333g	
Coliform Group	230 MPN/100g	negative	negative /50g	
Antibacterials	negative	negative	1 ppb	
N-nitrosopyrrolidine	non detect	non detect	1 ppb	
N-nitrosomorpholine	non detect	non detect	1 ppb	
N-nitrosodimethylamine	non detect	non detect	1 ppb	
Estron	1.0 ppb	1.8 ppb		
Estradiol	0.9 ppb	0.7 ppb		
Acid Value	0.5 ppb	0.9 ppb		
Peroxid Value	144	148		
Retinol	93 meq/kg	78 meq/kg		
Vitamin B <sub>1</sub>	0.25 mg%(830IU/100g)	0.22 mg%(730IU/100g)		
Vitamin C	0.79 mg%	0.86 mg%		
Calcium	non detect	non detect	3 mg%	
Phosphorus	2533 mg%	2544 mg%		
Benzo(a)pyrene	1172 mg%	1340 mg%		
	non detect	non detect	5 ppb	

Name Subject	Soybean meal	Corn	Rice bran	Realizable limit	Method
Moisture	10.7 %	15.6 %	13.6 %		135 ± 2° C 2hr
Crude Protein	39.5 %	7.9 %	11.5 %		Kjeldahl
Crude Fat	2.4 %	4.3 %	17.2 %		Soxhlet's extractor
Crude Ash	7.8 %	1.3 %	9.2 %		550° C 2hr
Crude Fiber	6.3 %	1.4 %	7.9 %		AOAC
Total Mercury	non detect	non detect	non detect		FL-AASP
Cadmium	0.14 ppm	0.15 ppm	0.18 ppm	0.01 ppm	AASP
Lead	1.4 ppm	0.7 ppm	1.1 ppm		AASP
Arsenic	0.19 ppm	0.08 ppm	0.14 ppm		Colorimetry
Nitrite	non detect	non detect	non detect	0.5 ppm	Colorimetry
D D T	non detect	non detect	non detect	0.005 ppm	ECD-GC
B H C	non detect	non detect	non detect	0.005 ppm	ECD-GC
Dieldrin	non detect	non detect	non detect	0.005 ppm	ECD-GC
Heptachlor	non detect	non detect	non detect	0.005 ppm	ECD-GC
Malathion	non detect	non detect	non detect	0.005 ppm	FPD-GC
Selenium	non detect	non detect	non detect	0.1 ppm	Fluorescence
P C B	non detect	non detect	non detect	0.005 ppm	ECD-GC
Aflatoxin	negative	negative	negative	5 ppb	ILC
Aldrin	non detect	non detect	non detect	0.005 ppm	ECD-GC
Perathion	non detect	non detect	non detect	0.005 ppm	FPD-GC
Chromium	0.8 ppm	0.1 ppm	1.0 ppm		AASP
Deoxynivalenol	non detect	non detect	non detect	0.05 ppm	HPLC
Nivalenol	non detect	non detect	non detect	0.05 ppm	HPLC
Ochratoxin	non detect	non detect	non detect	0.05 ppm	HPLC
Viable total count	2.7 × 10 <sup>4</sup> /g	8.3 × 10 <sup>5</sup> /g	2.8 × 10 <sup>8</sup> /g		
Mould	720 /g	36000 /g	16000 /g		
Staphylococcus	negative	negative	negative	0.01 /g	Modified
Enterococcus	negative	negative	negative	0.01 /g	The Sanitaion
Pseudomonas aeruginosa	negative	negative	negative	negative /3g	Low in Japan
Salmonella	negative	negative	negative	negative /20g	
Coliform group	230 MPN/100g	110000 MPN/100g	110000 MPN/100g	negative /50g	Bio Assay
Antibacterials	negative	negative	negative		Titrate
Acid Value	-	-	142		Titrate
Peroxid Value	-	-	60 meq/kg		

Name	Fish meal	Skim milk	Realizable limit	Method
Subject				
Moisture	10.2 %	11.1 %		135 ± 2° C 2hr
Crude Protein	62.1 %	34.0 %		Kjeldahl
Crude Fat	7.2 %	0.2 %		Soxhlet's extractor
Crude Ash	16.9 %	7.9 %	0.1 %	550° C 2hr
Crude Fiber	non detect	non detect		AOAC
Viable total count	2.2 x 10 <sup>3</sup> /g			Modified
Mould	150 /g		0.01 /g	The Sanitation
Staphylococcus	negative		0.01 /g	Low in Japan
Enterococcus	negative		negative /3g	
Pseudomonas aeruginosa	negative		negative /20g	
Salmonella	negative		negative /50g	
Coliform group	430 NPN/100g			Bio Assay
Antibacterials	negative			AASP
Calcium	4502 mg%			Colorimetry
Phosphorus	2960 mg%			Titrate
Acid Value	52			Titrate
Peroxiid Value	135 meq/kg		0.01 ppm	FL-AASP
Total Mercury	non detect			AASP
Cadmium	0.93 ppm			AASP
Lead	1.3 ppm			

Table II

CONTAMINANT	AUTHOR, OR REFERENCE	LIMIT OF DETECTION
Arsenic	AOAC 1975	.05 mcg/g
Cadmium	AOAC 1975	.05mcg/g
Manganese	AOAC 1975	.11 mcg/g
Lead	AOAC 1975	.05 mcg/g
Selenium	Gutteman and Lisk 1961	.05 mcg/g
Mercury	Hatch and Ott 1968	.05 mcg/g
All Others by ICP		
Aflatoxin (B <sub>1</sub> ,B <sub>2</sub> ,G <sub>1</sub> ,G <sub>2</sub> )	Pons et al., 1975	2.00 ng/g
Organophosphorus & Chlorinated Insecticides	AOAC 1975	5.00 ng/g
Polychlorinated Biphenyls	AOAC 1975	10.00 ng/g
Chlortetracycline	AOAC 1975	.55 mcg/g
Oxytetracycline	AOAC 1975	1.21 mcg/g
Penicillin	AOAC 1975	2.20 mcg/g
Streptomycin	AOAC 1975	2.80 mcg/g
Estrogenic Activity (DES Equiv.)	NCTR 1973	4.00 ng/g

インドネシア飼料原料 (平均値)		日本標準飼料成分 (1975年版)											
原料	項目	% Moist	% C.Pro	% C.Fat	% C.Fib	% C.Ash	原料	項目	% Moist	% C.Pro	% C.Fat	% C.Fib	% C.Ash
とうもろこし		12.0	9.4	4.0	2.3	1.4	とうもろこし		13.5	9.0	4.0	2.0	1.4
マ	イ	13.9	9.1	2.8	2.9	1.6	マ	イ	12.9	9.5	3.1	2.0	1.7
ヤ	シ	9.9	19.7	10.1	10.5	6.4	ヤ	シ	10.8	20.9	8.5	9.7	6.9
大豆	粕(ブラジル)	11.3	43.6	1.5	5.8	6.4	大豆	粕 (抽)	11.9	46.3	1.3	5.0	6.0
"	( US )	12.4	49.7	0.8	4.2	5.9							
"	( 国内産 )	10.6	34.9	16.2	7.1	7.1							
米	ぬ	12.2	13.3	12.9	8.5	10.3	米	ぬ	12.8	15.0	17.1	7.2	8.5
魚	粉 (A)	1.35	47.8	4.7		32.1							
"	(B) 国内産	10.4	52.4	14.5		18.6	魚	粉 (荒)	8.7	50.5	12.0		25.1
"	(C) 輸入	10.3	59.8	3.7		23.1	"	(ペルー)	9.2	64.3	7.6		17.4
乾草	(パナイヤ)	13.8	22.3	4.5	8.4	15.2	フルアルブア	(デハイ)	8.9	18.5	3.4	20.8	10.3
乾草	(ペティチナ)	10.2	29.3	5.5	12.9	3.7							

(a) PARAMETRIC STATISTICS - TOXIC ELEMENTS

ELEMENT (mcg/g)	CAT	MONKEY	G. PIG	RODENT	RABBIT	DOG
<b>PB</b>						
N	41	38	35	40	17	11
$\bar{X}$	1.12	.37	.55	.58	.60	1.11
Median	.79	.19	.48	.48	.52	.90
SD	.92	.44	.24	.40	.24	.42
CV%	82	118	42	69	40.7	37.9
Range	.2-5.8	.06-2.47	.26-1.34	.26-2.59	.33-1.4	.6-1.87
<b>Cd</b>						
N	41	38	35	40	17	11
$\bar{X}$	.19	.15	.17	.15	.14	.19
Median	.15	.12	.17	.15	.13	.07
SD	.09	.14	.04	.05	.04	.4
CV%	47.9	94.4	21.0	30.5	29.7	200
Range	.09-.48	.07-.96	.10-25	.09-.26	.1-.29	0-1.3
<b>AS</b>						
N	41	38	35	40	17	11
$\bar{X}$	.36	.09	.18	.39	.13	.05
Median	.33	.10	.17	.38	.15	0
SD	.15	.08	.08	.09	.11	.07
CV%	40.2	92.4	41.7	22.9	82.0	140.4
Range	.11-.72	0.0-.23	0.0-.40	.17-.58	0-.39	0-1.17
<b>Se</b>						
N	41	38	35	40	17	11
$\bar{X}$	.38	.21	.35	.42	.43	.37
Median	.31	.12	.26	.36	.34	.18
SD	.18	.23	.18	.16	.22	.32
CV%	47.6	110.9	55.6	39.1	50.6	86.5
Range	.15-.96	.04-1.05	.11-.90	.24-1.04	.14-.85	.05-.94

(b) PARAMETRIC STATISTICS - TOXIC MOLECULAR CONTAMINANTS

TOXICANT (Unit)	CAT	MONKEY	G. PIG	RODENT	RABBIT	DOG
<b>Malathion (mcg/g)</b>						
N	41	38	35	40	17	11
$\bar{X}$	.08	.09	.17	.11	.09	.05
Median	0	.04	.1	.11	.06	.01
SD	.16	.10	.23	.07	.77	.06
CV%	199.4	115.2	129.4	62.6	83	124.4
Range	0-.96	0-.400	0-1.20	0-.36	0-.28	0-.18
<b>PCBs (ng/g)</b>						
N	40	37	33	39	17	11
$\bar{X}$	6.75	2.51	4.48	19.61	2.23	0
Median	0	0	0	0	0	0
SD	14.73	7.31	8.19	33.59	5.06	0
CV%	218.2	290.7	182.6	171.2	226.1	-
Range	0-57	0-36	0-31	0-185	0-15	0-0
<b>DDTs (ng/g)</b>						
N	40	37	34	39	17	11
$\bar{X}$	3.1	.22	2.73	13.74	.35	0
Median	0	0	0	0	0	0
SD	7.57	1.31	9.2	21.8	1.46	0
CV%	244	608	336	158	412	-
Range	0-26	0-8	0-47	0-84	0-6	0-0

Results of Analyses of Commercial Diets

Analyte	Annual average					Accumulated 5-Yr value	
	1974 (n=14)	1975 (n=15)	1976 (n=54)	1977 (n=34)	1978 (n=31)	Mean (n=148)	Minimum value
Lindane (ppm)	0.002	0.006	0.002	0.001	<0.001	0.002	<0.001
Heptachlor (ppm)	0.003	0.004	0.001	<0.001	<0.001	0.001	<0.001
Malathion (ppm)	0.11	0.38	0.62	0.1	0.1	0.33	0.005
DDT (ppm)	0.014	0.152	0.139	0.018	0.010	0.028	<0.001
PCB (ppm)	<0.001	<0.001	<0.001	0.02	0.017	0.009	<0.001
Dieldrin (ppm)	0.005	0.012	0.001	0.001	<0.001	0.002	<0.001
Cd (ppm)	0.079	0.085	0.086	0.093	0.087	0.087	0.005
As (ppm)	0.038	0.01	0.38	0.32	0.01	0.25	0.01
Pb (ppm)	0.39	0.89	0.42	0.34	0.55	0.47	0.02
Hg (ppm)	0.036	0.037	0.023	0.019	0.02	0.024	0.007
Vitamin A (IU/100g)	3695	2768	4908	4031	3873	4160	1150
Vitamin B <sub>1</sub> (mg/100g)	7.36	8.91	9.03	9.45	9.61	9.1	5.7
Protein (%)	—	—	24.4	23.8	24.5	24.2	21.7
Fat (%)	—	—	5.3	5.7	5.5	5.5	4.0

Note) Greenman, D. L. et al. NCTR. 1980 : Commercial Laboratory Animal Diets, Toxicant and Nutrient Variability: J. Toxicol. Environ. Health 6 : 235-246



TABLE 2 Found Contamination in Raw Materials - U.K. 1979

Contaminant		Cereals	Cereal Byproduct	Vegetable Proteins	Animal Proteins	Fish Meals	Grass Meals
NaNO <sub>2</sub>	ppm	ND-4	ND-3	ND-3	ND-100	NO-7	ND-10
NaNO <sub>3</sub>	"	ND-23	ND-29	ND-9	NO-200	2-33	NO-4000
Pb	"	NO-1.00	NO-1.00	NO-4.00	2.0-30.0	1.0-10.0	NO-10.0
As	"	ND	ND	ND	NO-5.0	2.0-12.0	NO-5.0
Cd	"	ND	ND-0.2	NO-0.3	NO-4.0	NO-1.2	NO-1.0
Hg	"	NO-0.08	ND-0.06	0.01-0.03	NO-0.02	0.10-0.25	NO-0.05
Se	"	0.03-0.16	0.04-0.90	0.09-0.26	0.04-0.10	1.00-1.30	NO-0.05
Dieldrin	ppb	ND	ND-8	ND-6		NO-23	
DDT's	"	ND-94	ND-70	ND-50		NO-60	
Lindane	"	ND-13	3-48	1-10		2-10	
Heptachlor	"	ND-30	ND-10	ND-4		NO-5	
P.C.B's	"	ND	ND	ND		ND	
Malathion	ppm	ND-36.0	ND-1.0	ND-0.01		ND	
Aflatoxins	ppb	ND-8.0	ND	ND-60		ND	ND
T.V.O.	/g	10 <sup>3</sup> -10 <sup>7</sup>	10 <sup>3</sup> -10 <sup>6</sup>	10 <sup>5</sup> -10 <sup>7</sup>	10 <sup>4</sup> -10 <sup>6</sup>	10 <sup>3</sup> -10 <sup>5</sup>	10 <sup>4</sup> -10 <sup>7</sup>
Meso.Spores	"	10 <sup>2</sup> -10 <sup>5</sup>	10 <sup>2</sup> -10 <sup>4</sup>	10 <sup>4</sup> -10 <sup>6</sup>	10 <sup>3</sup> -10 <sup>5</sup>	10 <sup>2</sup> -10 <sup>4</sup>	10 <sup>4</sup> -10 <sup>6</sup>
Coliforms	"	Rare	Rare	Rare	Frequent	Frequent	Frequent
E.Coli 1	"	"	"	"	"	"	"
Salmonellae	"	ND	ND	ND	Rare	Rare	Rare
Fung.Spores	"	10 <sup>2</sup> -10 <sup>4</sup>	10 <sup>2</sup> -10 <sup>4</sup>	10 <sup>3</sup> -10 <sup>4</sup>	ND-10 <sup>4</sup>	ND-10 <sup>4</sup>	10 <sup>2</sup> -10 <sup>3</sup>
Antibiotics	"	ND	ND	ND	ND	ND	ND

notes:- Rare - found in not more than 10% of samples tested.  
 Frequent - found in more than 20% of samples tested.  
 E.Coli 1 - confirmed in about 10% of samples in which  
 Coliforms were found.

The majority of micro-contaminants found in diets directly reflect the levels of those contaminants in the raw materials. In considering attainable quality in diets it is necessary to have some idea of desirable quality and Table 3 illustrates various published values - there is considerable divergence of opinion.

TABLE 4 Found Contamination in Diets

Contaminant		Mean	Range
Pb (+Meat & Bone Meal)	ppm	2.9	0.5 - 6.5
" (- " " " " )	"	1.3	0.5 - 4.0
Cd (+ " " " " )	"	0.65	0.2 - 1.1
" (- " " " " )	"	0.35	0.05 - 0.9
NaNO <sub>3</sub> (+Grass Meal)	"	440.0	1.0 - 900.0
" (- " " " )	"	15.8	1.0 - 70.0
NaNO <sub>2</sub>	"	1.8	1.0 - 7.0
F (+Meat & Bone + Phosphate)	"	43.4	11.0 - 70.0
" (+Phosphate only)	"	18.3	10.0 - 35.0
" (Low Phosphate only)	"	5.1	1.0 - 11.0
Hg	"	0.02	0.01 - 0.12
As	"	0.3	0.20 - 1.10
Se	"	0.19	0.02 - 0.66
Lindane	1978 "	0.017	0.001 - 0.170
(overall Mean 0.013 ppm)	1979 "	0.023	0.001 - 0.300
	1980 "	0.006	0.001 - 0.035
	1981 "	0.004	0.001 - 0.011
Heptachlor	1978 "	0.001	0.001 - 0.011
(overall Mean 0.004 ppm)	1979 "	0.008	0.001 - 0.065
	1980 "	0.003	0.001 - 0.010
	1981 "	0.001	0.001 - 0.002
Dieldrin	1978 "	0.003	0.001 - 0.120
(overall Mean 0.003 ppm)	1979 "	0.006	0.001 - 0.035
	1980 "	0.002	0.001 - 0.014
	1981 "	0.001	0.001 - 0.002
DDT's	1978 "	0.033	0.001 - 0.250
(overall Mean 0.023 ppm)	1979 "	0.039	0.001 - 0.165
	1980 "	0.011	0.001 - 0.070
	1981 "	0.009	0.001 - 0.018
Malathion	1978 "	0.190	0.02 - 1.00
(overall Mean 0.148 ppm)	1979 "	0.330	0.02 - 4.80
	1980 "	0.030	0.02 - 0.09
	1981 "	0.025	0.02 - 0.06
Total Viable Organisms	/g	7300	1000 - 75000
Mesophilic Spores	"	3400	100 - 100000
Fungal Spores	"	83	ND - 1100

Cadmium and Lead are quite specifically related to formulation, significantly higher levels being found in diets containing Meat and Bone Meal. Lead levels are 3x higher and Cadmium levels are 2x higher than those levels found in diets not containing this ingredient. With respect to certain published permitted maxima, there is no way in which diets containing Meat and Bone Meals could be made in the U.K. to comply regularly with a Lead limit of 1.5 ppm, and no diet at all would regularly comply with a Cadmium limit of 0.25 ppm.

Certain other contaminants also show specific raw material relationships - Nitrate levels are very high in diets containing Grass Meal and Fluoride is related both to Meat and Bone Meal and to Mineral Phosphates. For the majority of these contaminants there are no real problems in achieving levels similar to, or rather less than, published maxima.

GLP 対応に関する実験動物飼料協会案

仲川 憲一

日本実験動物飼料協会 会長

Table 1. 各所におけるコンタミネントの値

		EPA	ビュリナ	ウエイン	アグウェイ	飼料協会 (案)
	アフラトキシン (ppb)	5	10	10	5	10
	エストロゲン活性 ( # )	1				
	カドミウム (ppm)	0.16	0.5	0.5	0.2	0.5
	ひ素 ( # )	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
	鉛 ( # )	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5*
	水銀 ( # )	0.1	0.2	0.2	0.1	0.2
	セレン ( # )	0.1~0.6				
	P C B ( # )	0.05	0.15	0.15	0.05	0.15
	ニトロサミン (ppb)	10				
有機塩素系	BHC (ppm)	0.02	0.05	0.05	0.05	0.05
	ヘプタクロール ( # )	0.02	0.05	0.03	0.03	0.05
	ヘプタクロール エポキシサイド (ppm)		0.05	0.03	0.03	
	DDT(含類縁物質) ( # )	0.1	0.15	0.15	0.1	0.15
	デルドリン ( # )	0.02	0.05	0.03	0.03	0.05
	アルドリン ( # )		0.05	0.03	0.03	0.05
	エンドリン ( # )		0.05	0.03	0.03	
	クロルデン ( # )		0.05	0.05	0.05	
	トキサフェン ( # )				0.2	
	マラチオン ( # )	2.5	0.5	0.5	0.1	2.5
有機りん系	チメット ( # )		0.5	0.5	0.2	
	ダイアジノン ( # )		0.5	0.5	0.3	
	ジサルファトン ( # )		0.5	0.5	0.3	
	メチルパラチオン ( # )		0.5	0.5	0.3	
	パラチオン ( # )		0.5	0.5	0.3	0.5
	チオダン ( # )		0.5	0.5	0.3	
	エチオン ( # )		0.5	0.5	0.3	
トリチオン ( # )		0.5	0.5	0.3		

\* イヌ用は、3.0ppm

Reference: Trial proposal quality control of experimental animal feed.

Table 2. 各社コンタミネント過去3年間の最大値

	検出限界 (ppm)	マウス・ラット用		ウサギ・モルモット用		イヌ用	
		分析数	最大値 (ppm)	分析数	最大値 (ppm)	分析数	最大値 (ppm)
アフラトキシン	0.005	144	ND	62	ND	32	ND
カドミウム	0.01	252	1.18	200	0.46	72	0.24
ひ素	0.1	251	0.7	204	0.5	72	0.6
鉛	0.05	254	1.6	202	1.5	68	2.0
水銀	0.01	251	0.05	197	0.07	70	0.03
P C B	0.01	143	0.04	89	0.03	36	ND
B H C	0.05	143	ND	62	ND	36	ND
ヘプタクロール	0.01	140	ND	62	ND	36	ND
DDT(含類縁物質)	0.1	143	ND	62	ND	36	ND
デルドリン	0.01	143	ND	62	ND	36	ND
アルドリン	0.01	128	ND	48	ND	28	ND
マラチオン	0.05	125	1.61	59	2.10	32	0.77
パラチオン	0.05	128	ND	48	ND	28	ND

ND : Not detected

Table 3. 各社コンタミネント分析値集計結果

項目	品目	分析数	ND数	統計 供試数	平均値 (ppm)	最大値 (ppm)	最小値 (ppm)
鉛	マウス・ラット用	254	0	254	0.55	1.6	0.03
	ウサギ・モルモット用	202	25	177	0.65	1.5	0.02
	イヌ用	68	0	68	0.75	2.0	0.25
カドミウム	マウス・ラット用	252	0	252	0.12	1.18	0.01
	ウサギ・モルモット用	200	21	179	0.14	0.46	0.02
	イヌ用	72	0	72	0.11	0.24	0.01
クロム	マウス・ラット用	147	4	143	1.13	5	0.09
	ウサギ・モルモット用	57	5	52	2.04	8.54	0.11
	イヌ用	29	0	29	1.70	4	0.55
水銀	マウス・ラット用	251	99	152	0.011	0.05	0.005
	ウサギ・モルモット用	197	101	96	0.013	0.07	0.005
	イヌ用	70	47	23	0.012	0.03	0.005
ひ素	マウス・ラット用	251	13	238	0.23	0.7	0.03
	ウサギ・モルモット用	204	47	157	0.11	0.5	0.004
	イヌ用	72	1	71	0.14	0.6	0.01
亜硝酸根	マウス・ラット用	115	34	81	0.61	1.3	0.3
	ウサギ・モルモット用	41	18	23	0.54	1.0	0.3
	イヌ用	19	9	10	0.61	1.5	0.3
マラチオン	マウス・ラット用	125	13	112	0.55	1.61	0.05
	ウサギ・モルモット用	59	9	50	0.66	2.10	0.03
	イヌ用	32	6	26	0.20	0.77	0.04

5 Sep. '84

HIPKI " MEKAR "  
TERNAK PEMBIBITAN KELINCI  
JENIS UNGGUL  
JLN.DR.SETYA BUDHI KM.12,7  
LEMBANG - BANTUNG.

AYUM SUWITA  
Pimpinan



CARA-CARA BETERNAK KELINCI.

1. UKURAN KANDANG.

- a. Kandang induk dan anak-anaknya.
- a. Panjang kandang : 1 meter.
  - b. Lebar kandang : 75 centi meter.
  - c. Tinggi kandang : 60 centi meter.
- b. Kandang pejantan.
- a. Panjang kandang : 75 centi meter.
  - b. Lebar kandang : 75 centi meter.
  - c. Tinggi Kandang : 60 centi meter.
- c. Tinggi tiang dari permukaan tanah (kolongnya) 1 meter.

2. JENIS KELINCI.

- a. Jenis Belanda : Planceres.
- b. Jenis Australia : Blouwinder.
- c. Jenis Jerman : Jerman.
- d. Jenis Jepang : Yamamoto (Anggora).
- e. Jenis Lokal : Kelinci pribumi.

3. BIBIT KELINCI YANG BAIK.

- a. Telinganya panjang dan lebar, berbadan besar, ekor hampir lurus dengan punggung.
- b. Sehat dan tidak berpenyakit.

4. CARA MENGAWINKAN.

- a. Bila sudah sudah berumur 6 atau 7 bulan, sudah cukup waktunya untuk dikawinkan.
- b. Cara mengawinkannya sang betina (induk), dibawa ke kandang pejantan selama 20 menit (3 kali puas). Kalau ada waktu perkawinannya dilihat supaya jelas.
- c. Tanggal perkawinannya dicatat supaya tidak lupa.
- d. Lama hamil (mengandung) hanya 1 bulan, jadi bila kawin tanggal 1 April, tanggal 1 Mei melahirkan.

5. WAKTU MEMISAHKAN ANAK DARI INDUKNYA.

- a. Anaknya mencapai umur 50 hari, harus dipisahkan (dipindahkan) dari induknya.
- b. Induknya istirahat selama 10 hari, untuk menunggu perkawinan yang ke dua kali (selanjutnya).
- c. Tepat umur anaknya 2 bulan, induknya dikawinkan lagi. Jadi kelinci dalam 1 tahun bisa beranak 4 kali.

6. WAKTU MEMBERI MAKAN.

- a. Pagi hari kira-kira jam 8.00, diberi dedak (huut) yang sudah dilarutkan (tidak terlalu lembek), sedikit diberi garam.
- b. Siang hari kira-kira jam 12.00, diberi makan rumput separuh makan sore (malam).
- c. Sore hari kira-kira jam 17.00, diberi makan rumput secukupnya.

7. WAKTU MEMISAHKAN JANTAN DAN BETINA.

- a. Umur anak kelinci mencapai 3 bulan, harus sudah dipisahkan antara jantan dan betina.
- b. Maksud pemisahan ini supaya tidak kawin muda.

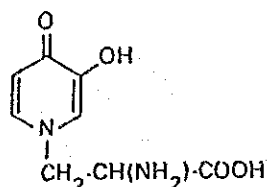
8. PERAWATAN DAN KEBERSIHAN KANDANG.

- a. Tiang dari kandang harus selalu bersih.
- b. Bila perlu kandang harus di pel (digosok)
- c. Kolongnya jangan sampai becek, tempat pembuangan kotorananya sebaiknya jauh dari kandangnya.

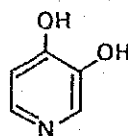
## Mimosine

When diets contain less than 30 percent leucaena (dry weight), cattle thrive for prolonged periods. But when leucaena makes up more than half the diet, and feeding is continued for more than 6 months, the result may be general ill-health with loss of tail and rump hairs, excessive salivation (drooling), and poor growth. The cause has recently been traced to the underproduction of thyroxine by the animal's thyroid gland, which results in goiter.† Swollen thyroids (goiters) are common among cattle feeding on leucaena. The cause is 3,4-dihydroxypyridine (DHP) 2\* created in the animals' rumens by bacteria that produce it by chemically transforming the amino acid mimosine 1. Mimosine comprises 3-5 percent (dry weight basis) of the protein of the now-available leucaena types. In single-stomached animals (horses, pigs, rabbits, etc.), mimosine causes hair to fall out. In cattle, the rumen microorganisms transform it to DHP so quickly that even when animals are fed on a diet rich in leucaena their blood, meat, and milk is quite free of mimosine.

Fear of mimosine's effects have for years been a barrier to leucaena's wider use as forage. Today, with better understanding of its pharmacology, much of this fear is being dispelled.



1 Mimosine



2 3,4-dihydroxypyridine

Under field conditions, cattle with goiter don't die; the effects are reversible and can be seen early enough that the animals can be removed from the leucaena pasture to recover. Leucaena contains little or no cyanide, selenium, or bloat-causing agents that *do* kill cattle feeding on pastures such as white clover or alfalfa.‡ Mimosine has no known effect on the meat or milk of ruminants that can be detrimental to humans.

Nonetheless, mimosine is a concern, and searches are being made for low-mimosine varieties. Most leucaena strains have about equal mimosine levels, but some from Colombia and other species such as *Leucaena pulverulenta* (from northern Mexico and southern United States) have much less. Pioneering researchers in Hawaii and Australia have crossed leucaena (i.e., *L. leucocephala*) with *L. pulverulenta* to obtain hybrids with less than half leucaena's mimosine content (Figure 24). The research in Australia has reached an advanced stage, and low-mimosine leucaena lines should be available for grazing trials in 2 years. Goat-feeding trials have shown that, compared with strains available today, the new hybrids markedly reduce adverse effects caused by mimosine.\*

When fresh moist leucaena leaves are heated, their mimosine content decreases, causing their feed value to increase. The reduction is greatest at temperatures above 70°C (158°F). Adding ferrous sulfate to rations containing unheated leucaena leaf meal also reduces mimosine toxicity.†

\*Information supplied by E. M. Hutton and R. J. Jones.

†Matsumoto et al. 1951. See Selected Readings.

DAFTAR HARGA OBAT-OBATAN HEWAN

Product :	Packing :	Price p.Unit :
A G R I B O N	10 g/zak	Rp. 400,--
	100 g/zak	Rp. 3.300,--
	100 g/tin	Rp. 4.050,--
	1 kg/tin	Rp. 29.400,--
	5 kg/tin	Rp. 139.150,--
C O R Y L S P	10 g/zak	Rp. 500,--
	100 g/zak	Rp. 4.500,--
	1 kg/tin	Rp. 41.000,--
	5 kg/tin	Rp. 190.000,--
D O D E C A L	5 g/zak	Rp. 150,--
	10 g/zak	Rp. 300,--
	100 g/zak	Rp. 2.550,--
	1 kg/tin	Rp. 23.000,--
	5 kg/tin	Rp. 105.000,--
D I M E T O C H I N A	1 Lt/btl	Rp. 21.500,--
L I Q U A C Y C L I N E	100 cc/btl	Rp. 5.000,--
R O V I M I X 428	20 kg/box	Rp. 440.000,--
	5 kg/alfol	Rp. 112.500,--
R O V I M I X 430	20 kg/box	Rp. 465.000,--
R O V I M I X AB2D3E	1 kg/tin	Rp. 24.000,--
	5 kg/tin	Rp. 110.000,--
R O V I M I X AD3 500/100	5 kg/tin	Rp. 160.000,--
R O V I S O L AD3EC ORAL	100 cc/btl	Rp. 2.300,--
	1 Lt/btl	Rp. 17.500,--
	6 Lt/btl	Rp. 90.500,--
I N J A C O M A D E I N J E C T A B L E GALLIMYCIN (ERYTHROMYCIN ABBOTT)	100 cc/btl	Rp. 9.550,--
	25 gr/zak	Rp. 600,--
	0,5 lb/zak	Rp. 4.850,--
	1 kg/tin	Rp. 18.300,--
	2,5 kg/tin	Rp. 447.850,--
	50 Lb/drm	Rp. 9.200,--/Lbs
GALLIMYCIN - 50 PREMIX		
S P E C T A M W.S.	200 g/btl	Rp. 48.000,--
S P E C T A M I N J E C T A B L E	500 cc/btl	Rp. 42.000,--
I O D O P H A X 12,5	5 Lt/drm	Rp. 22.750,--
A L B A C Z I N C B A C I T R A C I N 10%	25 kg/zak	Rp. 2.800,--/kg
Z O O S O L K A P O	1 Lt/btl	Rp. 21.000,--
I V A L B O N I N J E C T A B L E	100 ml/btl	Rp. 6.500,--

Catatan: Harga-harga tersebut diatas tidak terikat dan dapat berubah setiap waktu tanpa pemberitahuan terlebih dahulu.

SOLE DISTRIBUTOR/IMPORTIR : PT. KAPO TRADING CO, LTD.

Head Office : Jl. K.S. Tubun 11C/30

Telp. : 540622,540885,540343, JAKARTA-BARAT

Telex : 45369 CIGYFC IA

Jakarta, 1 Juli 1984

DAFTAR HARGA OBATZAN UNTUK HEWAN  
EX CIBA - GEIGY

<u>P R O D U C T :</u>	<u>P A C K I N G :</u>	<u>P R I C E P . U N I T :</u>
ACTOPHOR	4 x 5 ltr	Rp. 11.000,--/ltr
ACEDIST	1 x 100 tablet	Rp. 31.500,--/tin
BRADOPHEN	25 kg/ Drum	Rp. 32.500,--/kg
COSUMIX PLUS	500 gr/tin	Rp. 25.000,--/tin
	50 gr/zak	Rp. 2.650,--/zak
ESB3	25 kg/ Drum	Rp. 51.575,--/kg
	30 gr/zak	Rp. 1.850,--/zak
ERTILEN	100 ml/btl	Rp. 8.530,--/btl
ERTILEN CO	100 ml/btl	Rp. 9.840,--/btl
IOSAN CCT	4 x 5 ltr	Rp. 6.400,--/ltr
IOSAN CCT	100 ml/btl	Rp. 725,--/btl
ILCOCILLINE DRY POW	4 x 10 ml (box)	Rp. 9.450,--/box
ILCOCILLINE P.S.	100 ml/btl	Rp. 12.500,--/btl
LOPATOL	1 x 12 Tab/Box	Rp. 16.650,--/box
NEOCIDOL 40 WP	1 kg/zak	Rp. 16.275,--/kg
	20 gr/zak	Rp. 425,--/zak
OSTRILAN	100 ml/btl	Rp. 6.150,--/btl
OPTICORTENOL S.	20 ml/btl	Rp. 8.660,--/btl
OXYTOXIN INJEC.SOLUTION	50 ml/btl	Rp. 6.770,--/btl
OXYSENTINA	100 ml/btl	Rp. 8.670,--/btl
SOCATYL PASTE	200 gr/tube	Rp. 7.875,--/tube
UTOCYL FORTE	10 pess/box	Rp. 12.700,--/box
VEBONOL 2,5% INJEC.SOL	10 ml/btl	Rp. 18.700,--/btl
VETIBENZAMINE	100 ml/btl	Rp. 8.270,--/btl
VECORTENOL - VIOFORM OINT.	10 gr/Tube	Rp. 5.050,--/tube
VETIDREX 5% INJEC. SOLUTION	10 ml/btl	Rp. 4.460,--/btl
VIOFORM AEROSAL 0,5% SPRAY	70 gr/btl	Rp. 3.800,--/btl
VESULONG 20% INJEC. SOLUTION	100 ml/btl	Rp. 4.600,--/btl
BELORAN 500	5 lt/ Drum	Rp. 8.400,--/ltr

Catatan : Harga2 tersebut diatas tidak mengikat dan dapat berubah setiap waktu tanpa pemberitahuan terlebih dahulu.

SOLE DISTRIBUTOR/IMPORTIR : PT. KAPO TRADING COY LTD.  
 Jl. Aipda K.S. Tubun 11C/30  
JAKARTA  
 Phone : 540622 - 540885 - 540343  
 Telex : 45369 CIGYFC IA

Jakarta, 1 Agustus 1984



資料 18-(1)

The Laboratory of Food Hygiene,  
Tokyo Kenbikyo-in  
(The Institution authorized by  
the Ministry of Health & Welfare of Japan)  
8-32, Kudan-Minami 4-chome  
Chiyoda-ku, TOKYO  
102 JAPAN  
Telephone: 03-265-6606

CERTIFICATE


No. E-0575-51~55

Applicant: CLEA JAPAN, INC.

Sample: As per attached sheet

Subject: As per attached sheet

As a result of tests carried out on the sample submitted under the above-mentioned name on October 19, 1984, we are enclosing here with as attachment.

  
Fumio H. Yaguchi, M. Sc., Ph.D.  
The Laboratory of Food Hygiene,  
Tokyo Kenbikyo-in

Trans., December 19, 1984

財団法人 東京顕微鏡院

資料 18-(2)

E-0575-51

Name		1. Maize	2. Milo	3. Rice Bran	4. Wheat Pollard	5. Soy Bean Meal (Brazil)
Subject						
C. Pro	%	8.7	8.6	11.9	15.7	47.3
C. Fat	%	3.9	2.9	14.2	4.3	0.4
C. Fib	%	2.1	2.6	12.7	6.3	4.0
C. Ash	%	1.0	1.5	11.7	3.7	5.8
Moist	%	13.1	14.1	12.4	12.3	12.7
Ca	%	0.01	0.02	0.07	0.09	0.28
P	%	0.19	0.23	1.36	0.71	0.61
AV		-	-	148.5	-	-
POV	meq/kg	-	-	17.4	-	-
Retinol		non detect	non detect	non detect	non detect	non detect

E-0575-52

Name		6. Fish Meal (Peru)	7. Fish Meal (Domestic)	8. Meat & Bone Meal	9. Coconut Meal	10. Daun Petai Cina (Meal)
Subject						
C. Pro	%	62.9	55.6	51.7	19.5	14.7
C. Fat	%	12.4	14.4	10.4	11.0	7.8
C. Fib	%	-	-	-	15.5	8.1
C. Ash	%	14.0	18.8	31.3	5.6	13.0
Moist	%	8.9	9.4	6.4	11.4	11.8
Ca	%	5.16	6.21	10.92	0.16	2.70
P	%	2.41	3.24	5.22	0.54	0.19
AV		15.0	37.6	6.6	-	-
POV	meq/kg	4.4	0.6	34.9	-	-
VBN	mg%	0.01	0.13	0.01	-	-
NaCl	%	1.42	1.04	-	-	-
Retinol		0.08mg%(270IU/100g)	non detect	non detect	non detect	non detect

E-0575-53

Name		11. Sesame Meal	12. Papsyu Leave	13. Cassava Leave	14. Daun Petai Cina	15. Napier or Elephant Grass
Subject						
C. Pro	%	41.9	17.8	17.7	24.2	6.7
C. Fat	%	1.5	10.0	5.7	4.5	0.7
C. Fib	%	7.5	15.3	23.3	13.3	16.3
C. Ash	%	13.9	11.2	8.2	7.4	5.5
Moist	%	10.6	12.7	11.5	10.3	53.5
Ca	%	2.01	2.19	1.25	1.79	0.15
P	%	1.43	0.27	0.24	0.16	0.08
Retinol		non detect	non detect	non detect	non detect	non detect

資料 18-(3)

E-0575-54

Name		16. Bio Farma Bandung	17. Green Bean (LPPH)	18. Groundnut Meal (LPPH)	19. Setaria Grass	20. Feed for Rabbit (LPPH)
Subject						
C.Pro	x	19.2	24.1	14.6	8.4	11.9
C.Fat	x	5.6	0.7	4.8	1.2	5.3
C.Fib	x	4.0	4.5	13.8	26.4	7.0
C.Ash	x	6.7	3.3	12.1	9.2	17.0
Moist	x	11.5	15.1	10.4	43.0	9.4
Antibacterials		negative	-	-	-	negative
Ca	x	1.24	0.13	0.70	0.21	4.77
P	x	0.82	0.39	1.16	0.15	0.63
AV		112	-	-	-	159
POV	meq/kg	15	-	-	-	12
Mould	/g	20	-	-	-	700
Coliform group		negative	-	-	-	2400 BPN/100g
Retinol		-	non detect	non detect	non detect	-

E-0575-55

Name		21. Lumiput Lapangan	22. Cocoa Residu	23. CBR
Subject				
C.Pro	x	7.4	17.0	21.1
C.Fat	x	1.4	8.0	7.6
C.Fib	x	26.8	17.4	-
C.Ash	x	7.9	4.4	13.7
Moist	x	11.7	13.3	7.9
Antibacterials		-	-	negative
Ca	x	0.51	0.29	1.88
P	x	0.19	0.43	1.17
AV		-	-	135
POV	meq/kg	-	-	18
Mould	/g	-	-	30
Coliform group		-	-	negative
Retinol		non detect	non detect	-

資料 18-(4)

E-0619-41

Name	Feed for Project		Limit of detection	Method
	1. Mouse-Rat	Rabbit 2. Guinea pig		
Subject				
Crude Protein %	23.3	17.8		AOAC method
Crude Fat %	5.1	3.7		AOAC method
Crude Fiber %	4.9	13.7		AOAC method
Crude Ash %	5.3	8.1		AOAC method
Moisture %	11.2	9.0		AOAC method
Calcium mg%	580	325		Atomic Absorption Analysis
Phosphorus mg%	720	493		Colorimetric
Retinol	non detect	non detect	0.03 mg%	Absorptiometry
Magnesium mg%	249	228		Atomic Absorption Analysis
Potassium mg%	1021	1336		Flame Photometric Analysis
Sodium mg%	82	102		Flame Photometric Analysis
Manganese mg%	8.17	7.37		Atomic Absorption Analysis
Copper mg%	0.87	0.86		Atomic Absorption Analysis
Zinc mg%	5.92	4.60		Atomic Absorption Analysis
Iron mg%	20.7	47.8		Colorimetric
Cobalt mg%	0.02	0.02		Atomic Absorption Analysis
Iodine mg%	non detect	non detect	0.5 mg%	Titration
Linoleic acid %	1.25	0.99		Gas Chromatography

E-0619-42

Name	Feed for Project		Limit of detection	Method
	1. Mouse-Rat	Rabbit 2. Guinea pig		
Subject				
Vitamin B <sub>1</sub> mg%	0.51	0.43		Fluorescence analysis
Vitamin B <sub>2</sub> mg%	0.33	0.45		Fluorescence analysis
Vitamin B <sub>6</sub> mg%	0.55	0.46		Bioassay
Vitamin B <sub>12</sub> μg%	2.8	1.3		Bioassay
Vitamin C	non detect	non detect	3 mg%	Absorptiometry
Vitamin U <sub>3</sub> IU/100g	50	110		High Performance Liquid Chromatography
Vitamin E mg%	5.5	2.2		Gas Chromatography
Pantothenic acid mg%	1.20	1.22		Bioassay
Folic acid mg%	0.14	0.13		Bioassay
Niacin mg%	6.07	6.61		Bioassay
Choline mg%	180	110		Bioassay
Biotin μg%	28.4	28.2		Bioassay
Inositol mg%	176	81		Bioassay

資料 18-(5)

E-0619-43

Name	Feed for Project		Limit of detection	Method
	1. Mouse-Rat	Rabbit 2. Guinea pig		
Subject				
Fatty acid composition				Gas Chromatography
C <sub>10</sub>	1.1 %	0.4 %		
C <sub>12</sub>	11.3 %	6.8 %		
C <sub>14</sub>	5.9 %	3.9 %		
C <sub>15</sub>	0.1 %	0.6 %		
C <sub>16</sub>	16.5 %	17.5 %		
C <sub>16:1</sub>	1.9 %	1.5 %		
C <sub>17</sub>	traces	traces		
C <sub>17:1</sub>	0.3 %	0.2 %		
C <sub>18</sub>	2.8 %	2.7 %		
C <sub>18:1</sub>	17.7 %	17.2 %		
C <sub>18:2</sub>	27.6 %	33.0 %		
C <sub>18:3</sub>	2.8 %	4.9 %		
C <sub>18:4</sub>	0.9 %	0.7 %		
C <sub>20</sub>	0.3 %	0.6 %		
C <sub>20:1</sub>	0.6 %	0.7 %		
C <sub>20:4 (ω3)</sub>	0.5 %	0.2 %		
C <sub>20:4 (ω6)</sub>	0.2 %	0.2 %		
C <sub>20:5</sub>	3.7 %	2.4 %		
C <sub>22:1</sub>	0.4 %	0.3 %		
C <sub>22:5</sub>	0.5 %	0.3 %		
C <sub>22:6</sub>	3.6 %	3.0 %		
C <sub>24:1</sub>	0.6 %	0.3 %		
non identification	0.7 %	2.6 %		

E-0619-44

Name	Feed for Project		Limit of detection	Method
	1. Mouse-Rat	Rabbit 2. Guinea pig		
Subject				
Amino acid composition				Amino acid Automatic Analysis
Arginine	1.70 %	1.10 %		
Lysine	1.30 %	0.96 %		
Histidine	0.62 %	0.45 %		
Phenylalanine	1.12 %	0.87 %		
Tyrosine	0.70 %	0.44 %		
Leucine	1.89 %	1.40 %		
iso-Leucine	0.97 %	0.75 %		
Methionine	0.44 %	0.28 %		
Valine	1.25 %	0.96 %		
Alanine	1.32 %	0.98 %		
Glycine	1.16 %	0.87 %		
Proline	1.23 %	0.90 %		
Glutamic acid	3.94 %	2.70 %		
Serine	1.14 %	0.78 %		
Threonine	0.92 %	0.69 %		
Aspartic acid	2.17 %	1.60 %		
Tryptophan	0.32 %	0.25 %		
Cystine	0.40 %	0.28 %		

# 1983 FEEDSTUFFS ANALYSIS TABLE

This chart published to assist feed manufacturers and students of nutrition in so that the feed should contain at least as much protein, fat, minerals and vitamins, formulating feeds. The values are not average, but carry a "margin of safety" and not as much fiber as the final calculations show.

Copyright 1983 by Charles H. Hubbell

Pro- tein %	Fat %	Fiber %	Ash %	Phosphorus %		Dry Matter %	Swine- Metabo- lizable energy Cal/b.	Poultry Metabo- lizable energy Cal/b.	True Metabo- lizable energy Cal/b.	Ribo- flavin	Niacin	Panto- thenic acid	Thia- mine	Chol- ine	Bio- lin	Folic Acid	Pya- doxine	Caro- tene	Xan- tho- phyll	Alpha toco- pherol				
				Total	Avail.																			
20	3.5	21.0	1.45	0.27	0.22	10.5	Alfalfa leaf meal (dehy.)	93	1,100	385	740	755	7.0	21.0	14.9	1.8	730	0.15	1.2	3.6	72	128	60	
17	3.0	25.0	1.4	0.23	0.16	9.0	Alfalfa meal (dehydrated)	93	1,050	300	720	640	5.5	20.0	13.5	1.5	680	0.15	0.95	3.0	54	85	50	
15	2.0	27.0	1.2	0.22	0.17	8.5	Alfalfa meal (dehydrated)	93	580	240	680	510	4.8	19.0	9.0	1.3	600	0.11	0.7	2.8	33	75	40	
13	1.5	33.0	1.20	0.20	0.16	9.0	Alfalfa meal (either type)	89	820	200	250	4.0	9.0	8.0	3.00	—	—	—	—	—	—	—	—	18
11.5	1.8	6.5	0.06	0.36	0.12	2.5	Barley	89	1,320	800	1,140	1,375	0.70	(24.0)	2.8	2.3	500	0.05	0.14	1.8	—	—	10.0	
8.5	1.8	6.5	0.05	0.33	0.11	2.5	Barley (Pacific Coast)	88	1,335	780	1,180	1,380	0.50	(20.0)	3.3	0.4	450	0.04	0.13	1.3	—	—	6.1	
22	1.0	4.5	0.10	0.40	0.13	6.0	Beans (navy cut)	90	1,540	450	1,060	—	0.9	11.0	0.9	2.8	800	0.05	0.59	0.13	—	—	—	
8	0.5	18.0	0.60	0.10	0.03	5.6	Beet pulp, dried	91	1,020	200	290	—	0.30	7.0	0.7	0.2	370	—	—	—	—	—	—	
9	0.6	15.5	0.5	0.05	0.02	8.0	Beet pulp & molasses	92	1,000	200	300	955	0.3	7.4	0.7	—	—	—	—	—	—	—	—	
9.5	1.0	1.0	0.28	0.22	0.22	4.5	Blood meal, flash dried	91	1,050	1,010	1,250	1,435	0.65	14.0	0.5	0.2	340	0.04	0.04	2.0	—	—	—	
27	6.6	13.5	0.25	0.6	0.15	6.6	Brewers dried grains	93	1,040	1,000	1,140	1,400	0.6	(20.0)	3.9	0.3	950	0.03	0.1	0.77	—	—	11.0	
45	1.0	3.0	0.10	1.40	1.4	6.5	Brewers dried yeast	93	1,400	570	920	1,335	15.0	200.0	45.0	1,750	0.34	5.0	19.7	—	—	0.9		
11	2.5	11.0	0.06	0.30	0.1	2.1	Buckwheat	88	1,300	820	1,185	1,230	0.6	(8.0)	5.5	1.5	200	—	—	1.2	—	—	—	
32	5.0	0.4	1.30	0.9	0.9	9.6	Buttermilk, dried	93	1,380	780	1,250	—	12.0	3.8	1.3	830	0.13	0.19	1.0	—	—	—		
6	3.4	13.5	2.00	0.10	0.03	6.3	Citrus pulp, dried	90	1,100	420	600	—	1.00	9.0	5.5	0.6	350	—	—	—	—	—	—	
15	3.5	28.0	0.5	0.2	0.15	6.0	Coastal bermudagrass (dehydrated)	90	—	—	—	—	4.0	28.0	6.0	—	—	—	—	—	—	—	33	
21	6.0	13.0	0.30	0.55	0.18	6.5	Coconut oil meal (copra)	92	1,520	600	680	—	1.4	11.0	2.9	0.5	420	—	0.5	2.0	—	—	—	
8.5	3.8	2.5	0.01	0.25	0.08	1.5	Corn (yellow)	86	1,500	1,100	1,530	1,610	0.50	(9.0)	1.7	1.5	230	0.03	0.13	2.1	0.9	7	7.7	
10.1	4.0	3.7	0.02	0.20	0.07	1.8	Corn, high lysine	90	1,560	1,130	1,530	—	0.5	(9.0)	1.7	1.5	230	0.03	0.13	2.1	1.0	7	7.7	
7.5	3.0	8.2	0.04	0.20	0.07	1.5	Corn & cob meal (yellow)	86	1,300	900	1,290	—	0.40	(7.2)	1.7	1.0	160	0.02	0.09	0.8	0.8	5.6	4	
2.3	0.4	32.5	0.11	0.04	0.01	1.5	Corn cobs	90	140	—	240	—	0.5	(3.8)	1.7	—	0.01	—	—	—	—	—	—	
20.0	1.0	12.0	0.30	0.50	0.17	4.0	Corn germ meal (wet milled)	90	1,360	520	770	—	1.7	(19.0)	2.0	2.8	800	0.1	0.09	2.7	0.9	—	39	
22	2.5	9.0	0.30	0.75	0.27	7.3	Corn gluten feed	90	1,120	510	785	1,075	1.0	(30.0)	7.5	0.9	690	0.08	0.09	6.8	1.0	10	6.7	
40	2.0	5.0	0.1	0.4	0.13	4.5	Corn gluten meal 41%	91	1,425	895	1,300	1,440	0.70	(20.0)	4.5	0.5	200	0.08	0.1	3.6	1.0	50	9.2	
62	2.0	2.5	0.02	0.5	0.2	1.8	Corn gluten meal 60%	90	1,600	1,240	1,820	1,810	0.7	(37.0)	1.6	0.1	150	0.08	0.1	2.8	2.0	120	11.7	
23	0.0	0.0	0.06	1.8	1.5	7.8	Corn term. extractives, cond.	52	920	—	707	545	2.7	(40.0)	6.8	1.3	1,270	0.15	—	4.0	—	—	—	
50	1.0	8.5	0.15	1.2	0.5	6.0	Cottonseed meal (solvent)	91	1,150	750	1,140	—	2.00	20.0	4.5	2.3	1,370	0.24	1.0	1.8	—	—	4.0	
41	3.7	14.0	0.15	0.9	0.3	6.5	Cottonseed meal (expeller)	91	1,245	690	900	—	1.9	17.0	3.2	2.3	1,270	0.25	1.24	2.2	—	—	6.0	
41	0.5	13.0	0.15	0.95	0.32	6.5	Cottonseed meal (solvent)	90	1,130	590	970	—	1.9	18.0	3.2	2.5	1,300	0.25	1.21	1.8	—	—	4.0	
27	9.0	13.0	0.05	0.35	0.35	2.1	Dist. dr. grains (light) (corn)	92	930	800	900	—	1.5	17.0	2.5	0.9	400	0.4	0.4	—	—	—	2.2	
28	8.0	8.5	0.14	0.9	0.9	4.5	Dist. dr. gr., with sol. (corn)	91	1,180	890	1,100	1,335	4.1	33.0	5.0	1.5	1,400	0.3	0.4	3.0	1.0	1	13	
27	9.0	4.0	0.33	1.4	1.4	7.2	Distillers dr. solubles (corn)	95	1,600	1,020	1,350	1,415	7.6	52.0	9.0	3.1	2,200	0.5	0.5	5.9	1.0	0.8	25	
9.5	1.5	1.5	0.06	0.24	0.1	4.0	Dried bakery product	91	1,850	1,315	1,750	—	0.7	8.5	6.6	0.6	560	0.3	0.07	14.0	—	—	11	
85	2.5	1.5	0.20	0.75	0.75	3.8	Feathers (hydrolyzed poultry)	95	395	770	1,385	1,825	0.8	7.5	3.5	0.5	400	0.02	0.1	2.0	—	—	—	
83.5	10.0	1.0	3.6	2.4	2.4	16.5	Fishmeal, anchovy	92	1,500	860	1,490	1,350	4.3	42.5	4.4	0.3	1,700	0.09	1.0	1.4	—	—	—	
72	8.4	1.0	2.0	1.5	1.5	10.5	Fish meal, herring	93	1,265	950	1,380	1,740	4.00	40.0	5.0	0.3	1,800	0.09	0.15	2.0	—	—	6	
61	9.4	1.0	5.2	2.9	2.9	19.0	Fish meal, menhaden	92	1,300	940	1,300	1,530	2.1	25.0	3.8	0.3	1,300	0.09	0.1	1.2	—	—	3	
57	8.0	1.0	6.4	3.4	4.0	25.3	Fish meal, red fish	86	1,175	866	1,455	1,680	3.0	18.5	3.5	0.1	1,400	0.09	0.09	—	—	—	—	
52	7.0	1.0	7.7	4.0	4.0	25.0	Fish meal, tuna	93	1,060	900	1,300	—	3.0	30.0	4.0	—	1,400	0.04	—	—	—	—	—	
50	4.0	1.0	7.0	3.50	3.5	22.0	Fish meal, white	91	1,200	825	1,330	1,520	4.00	30.0	3.0	0.7	700	0.03	—	2.7	—	—	2.5	
31	5.5	0.5	0.2	0.59	0.59	8.6	Fish solubles (cond.)	50	730	470	800	—	6.00	75.0	16.0	2.5	1,500	0.06	0.17	1.2	—	—	—	
10	6.0	5.0	0.05	0.50	0.17	3.0	Hominy feed (yellow)	91	1,525	850	1,310	—	0.9	(20.0)	3.4	0.5	430	0.06	0.13	5.0	0.6	1.6	—	
1.0	2.5	2.5	0.02	0.3	0.1	1.5	Kafir corn	89	1,480	1,080	1,560	1,560	0.6	(16.0)	5.0	1.4	200	0.04	0.09	—	—	—	—	
32	4.0	9.0	0.4	0.8	0.27	6.0	Linseed meal (expeller)	91	1,250	510	690	—	1.6	16.0	8.0	2.3	810	0.15	1.3	2.5	—	—	3.5	
33	0.5	9.5	0.4	0.8	0.27	5.0	Linseed meal (solvent)	91	1,145	450	640	1,210	1.30	20.0	6.4	4.2	635	0.16	0.8	2.5	—	—	2.6	
25	1.2	15.0	0.20	0.70	0.2	6.5	Malt sprouts, dried	92	1,000	540	670	—	1.4	23.0	4.2	3.8	770	—	0.09	—	—	—	1.9	
45	8.6	2.1	10.00	5.1	5.1	38.0	Meat and bone meal	94	790	660	840	—	0.9	19.0	2.1	0.2	600	—	—	—	—	—	—	
50	10.0	2.8	8.1	4.1	4.1	32.7	Meat and bone meal	94	1,000	760	900	1,320	1.7	19.0	2.5	0.2	870	0.02	0.2	0.7	—	—	0.3	
54	7.1	2.5	7.4	3.8	3.8	29.0	Meat meal	94	1,200	760	910	—	2.3	26.0	2.2	0.2	900	0.02	0.2	0.7	—	—	0.3	
9	2.5	2.7	0.02	0.27	0.09	1.8	Milo maize	89	1,450	1,100	1,560	1,560	0.5	(18.0)	5.0	1.8	300	0.08	0.1	1.7	—	—	4.5	
6	0.0	0.0	0.10	0.02	0.01	9.0	Molasses, beet	77	1,060	710	875	—	1.00	18.0	2.0	—	400	—	—	—	—	—	2	
3	0.0	0.0	0.8	0.08	0.04	8.5	Molasses, cane	75	1,000	715	890	—	1.3	15.0	17.0									



## THE DETERMINATION OF MIMOSINE AND 3,4-DIHYDROXYPYRIDINE IN BIOLOGICAL MATERIAL

By M. P. HEGARTY,\* R. D. COURT,\* and PEGGY M. THORNE†

[Manuscript received March 13, 1963]

### Summary

A simple, specific method is described for the determination of mimosine and 3,4-dihydroxypyridine (DHP) in extracts of leaves and seeds of *Leucaena glauca* Benth. and in urine.

Plant material is extracted with cold 0.1N hydrochloric acid, and interfering substances are removed by chromatography on a cation-exchange resin. Organic cations are displaced from the resin with 2N ammonium hydroxide and the concentrated eluate chromatographed in one direction with the use of mesityl oxide : formic acid : water (41 : 7 : 6 by volume). The spots of mimosine and DHP, revealed with a ferric chloride spray, are cut out and the colour fully developed and measured. Urines are analysed in the same way except for a preliminary hydrolysis of the conjugated DHP. The method is satisfactory for estimating amounts of mimosine and DHP in the range 10-160 µg applied to the paper. Recoveries of these substances added to various extracts and to urine have varied between 98-102%.

Appreciable destruction of mimosine, with the formation of some DHP, occurred when fresh *L. glauca* leaves were dried even under mild conditions. In fresh material no loss of mimosine occurred when it was placed immediately in 0.1N hydrochloric acid.

The ready hydrolysis of mimosine to DHP by boiling 0.1N hydrochloric acid has been demonstrated for the first time.

### I. INTRODUCTION

Mimosine,‡  $\beta$ -[N-(3-hydroxypyridone-4)]- $\alpha$ -aminopropionic acid, occurs in the shoots and stems of *Mimosa pudica* L. and in large amounts in the leaves, stems, and seeds of *Leucaena glauca* Benth., a tropical shrub legume. Wibaut (1953) and Klingsberg (1960) have reviewed the detailed chemical investigations, which showed that the compounds isolated from *M. pudica* and *L. glauca* were identical (Kleipool and Wibaut 1950). The correct structural formula was determined from degradation studies and confirmed by synthesis (Wibaut 1946; Adams and Johnson 1949).

Owen (1958) has summarized the extensive literature on the depilatory and other toxic effects caused by feeding *L. glauca*, or its active principle mimosine, to rats, mice, pigs, horses, and ruminants. The depilatory effects of mimosine have recently been studied in greater detail. Crouse, Maxwell, and Blank (1962) have shown that mimosine, an analogue of tyrosine, caused inhibition of growth of anagen (growing) hairs in mice, and suggest that mimosine may interfere with tyrosine

\* Division of Tropical Pastures, CSIRO, Cunningham Laboratory, St. Lucia, Qld.

† Division of Tropical Pastures, CSIRO, Cunningham Laboratory, St. Lucia, Qld.; present address: Department of Agriculture, Stock and Fisheries, Port Moresby, Territory of Papua and New Guinea.

‡ The *Chemical Abstracts* nomenclature for mimosine is 3-hydroxy-4-oxo-1(4H)-pyridine-alanine, but because of widespread usage the older nomenclature is used here.



## DETERMINATION OF MIMOSINE AND 3,4-DIHYDROXYPYRIDINE

metabolism. Hegarty, Schinckel, and Court (1964) have shown that administration of mimosine to sheep caused inhibition of mitotic activity in the wool follicle bulb, resulting in shedding of the fleece. These workers have also shown that mimosine is readily detoxicated in the rumen of sheep to 3,4-dihydroxypyridine (DHP), which is subsequently excreted in the urine, partly in conjugated form.

A sensitive and specific method for the estimation of mimosine and DHP in biological extracts was needed for investigations into the metabolism of these compounds in plants and animals. Existing methods for the determination of mimosine (Yoshida 1944; Matsumoto and Sherman 1951) are based on the extraction of mimosine from plant material with boiling 0.1N hydrochloric acid, clarification of the extract, and colorimetric estimation of mimosine as its purple ferric chloride complex at 535 m $\mu$ . Under these conditions of extraction some mimosine is hydrolysed to DHP, which has a ferric complex of similar colour. Thus the Matsumoto and Sherman method, while sensitive, lacks specificity. Paper chromatographic studies showed that even mild conditions of drying fresh *L. glauca* leaves caused destruction of mimosine and production of some DHP. DHP had not been reported previously in extracts of *L. glauca*.

Carañal and Catindig (1955) and Hegarty (1957) examined the free amino acids of *L. glauca* by use of two-directional chromatography. The former authors suggested that mimosine could be estimated as its ferric complex on paper chromatograms, but gave no details of technique or results.

This paper describes methods for the quantitative extraction of mimosine and DHP from leaves and seeds of *L. glauca* and from urines. Specific chromatographic techniques are described for the analysis of these extracts. The method requires only simple apparatus and has been used for the analysis of large numbers of samples.

## II. EXPERIMENTAL

## (a) Materials

*Hydrochloric acid*: 0.1N, 0.2N, 6N, 10N.

*Cation-exchange resin*: Dowex 50-X4 (100-200 wet mesh) (H<sup>+</sup> form), from Bio-Rad Laboratories, Richmond, California, U.S.A.

*Ethanol*: 80%.

*Paper*: Whatman No. 1 filter paper sheets ("for chromatography"), 55 by 40 cm, were used for all experiments. The paper was not pretreated in any way.

*Solvent mixture*: Mesityl oxide : formic acid : water (41 : 7 : 6 by volume) was used at 10  $\pm$  1°C. These formed a single phase mixture stable down to 0°C. Commercial grade mesityl oxide was distilled under an efficient fractionating column (75 cm of glass helices) and the fraction boiling at 127-128°C was collected and stored at -20°C. Distillation of the solvent without fractionation gave a solvent mixture in which mimosine and DHP streaked badly. Formic acid (A.R. 98%) was used.

M. P. HUGARTY, R. D. COURT, AND PEGGY M. THORNE

*Ferric chloride*: 0.05% in 0.02N hydrochloric acid.

*Mimosine*: Crude mimosine was isolated from seeds of *L. glauca* by the method of Bickel and Wibaut (1946) and purified as described by Yoshida (1944). It was finally recrystallized several times from hot water.

*DHP*: Chromatographically pure DHP was prepared by vacuum pyrolysis of mimosine (Adams, Jones, and Johnson 1947) but a more convenient method with use of boiling 0.1N hydrochloric acid is described later in this paper.

#### (b) Methods

##### (i) Extraction of Mimosine and DHP and Separation from Interfering Substances

(1) *Procedures for Plant Material*.—Small samples (1–5 g) of fresh leaf material are preserved by placing immediately in sufficient 0.2N hydrochloric acid (HCl) to give a final concentration of approximately 0.1N after making allowance for the moisture content of the sample. The leaves are later ground in a glass pestle and mortar, and the insoluble material is filtered or centrifuged off, and washed with 0.1N HCl until the washings give a negative test with ferric chloride. The washings and extracts are combined and made up to a known volume with distilled water. A volume of 50–100 ml/2 g fresh weight is convenient. Larger quantities of leaves are similarly preserved in 0.1N HCl, extracted in a macerator, filtered, washed, and made up to volume.

Dry leaf material and seed are ground in a micro-hammer mill to pass a 1.0 mm sieve and stored in screw-capped bottles for analysis. Leaf material (0.5 g) and seed (0.2–0.5 g) are thoroughly ground with 0.1N HCl (20–30 ml) in a glass pestle and mortar and allowed to stand overnight. The contents of the mortar are transferred to a 50 ml centrifuge tube with 0.1N HCl (5 ml) and centrifuged. The residue is washed with 0.1N acid (5 ml) and recentrifuged. The residue is transferred with 20–30 ml of 0.1N HCl to a 50 ml conical flask which is stoppered and shaken for 5 hr on a mechanical shaker. The suspension is centrifuged and the residue washed with 2×5 ml of 0.1N HCl. All extracts and washings are combined and made up to 200 ml with distilled water—which should make the solution about 0.05N with respect to hydrochloric acid.

(2) *Ion-exchange Resin Chromatography*.—The plant extract (20–40 ml containing 6–8 mg of mimosine) is purified on a column (80 by 7 mm) of Dowex 50-X4 cation-exchange resin (H<sup>+</sup> form). The extract is allowed to pass through the column under gravity and the column is then washed with distilled water (18 ml). Ethanol (80%, 18 ml) is then put through the column to desorb polyphenolic substances (Thompson, Morris, and Gering 1959). The ethanol is eluted with distilled water (15 ml). Air pressure (3 in. of mercury) applied to the top of the column has been used to speed up the ethanol and water washes. Organic cations are displaced from the column with 2N ammonium hydroxide (NH<sub>4</sub>OH) (15 ml), the effluent being

## DETERMINATION OF MIMOSINE AND 3,4-DIHYDROXYPYRIDINE

collected in a tapered 15 ml tube which has been accurately calibrated in the region of 1.5 ml. Collection of eluate is commenced when the ammonia front is within 1 cm of the bottom of the resin bed. The eluate is concentrated in the tube at 40°C under reduced pressure to a volume of approximately 1 ml. One drop of 2N  $\text{NH}_4\text{OH}$  is added and the tube carefully tilted and rotated to dissolve material on the walls. The solution is finally made up to the calibration mark, transferred to a small stoppered sample tube, and stored at 5°C for analysis.

(3) *Procedures for Urines.*—Urices are stored at -20°C. Samples for analysis are allowed to come to room temperature, thoroughly mixed, and centrifuged. In the analysis for mimosine and free DHP an aliquot (5 ml) of the supernatant in a centrifuge tube is acidified to pH 3 with 2N HCl, and an equal volume of absolute ethanol is added. The mixture is kept at 5°C overnight and then centrifuged. The supernatant is removed and the residue washed with 2×2 ml of 50% ethanol. The combined supernatant and washings are concentrated to less than half their original volume at 40°C under reduced pressure. Urine concentrates are diluted to three times their volume and absorbed on columns (130 by 7 mm) of Dowex 50-X4. The columns are washed with water and 80% ethanol, and cations are displaced with ammonium hydroxide as described in subsection (2) above.

Total DHP in urines is estimated after acid hydrolysis. Suspended material is removed, and the urine (2 ml) is made 6N with respect to hydrochloric acid and is hydrolysed in a sealed tube at 110°C for 4 hr. The sample is then centrifuged and the precipitate washed with 2×1 ml of 6N HCl. Supernatant and washings are combined and concentrated to dryness *in vacuo* at room temperature. Water (3 ml) is added and the solution treated with absolute ethanol as described for mimosine and free DHP analyses.

(ii) *Paper Chromatography and Quantitative Estimation*

Aliquots (10-50  $\mu\text{l}$ ) of the prepared samples are applied in duplicate on sheets of Whatman No. 1 paper together with aliquots (10-80  $\mu\text{l}$ ) of standard solutions of mimosine (1.98 mg/ml) and DHP (1.11 mg/ml). Papers are placed in tanks for descending chromatography, and allowed to equilibrate with the solvent mixture at  $10 \pm 1^\circ\text{C}$  for 5 hr. The sheets are developed with the solvent mixture (30 ml per sheet) at 10°C for approximately 15 hr. They are withdrawn from the tanks and dried in a fume hood at room temperature.

The paper is lightly sprayed with ferric chloride reagent to reveal the ferric-positive substances. Tracings of typical chromatograms are shown in Figure 1. Mimosine and DHP, which appear as orange-red spots, are cut out in  $\frac{3}{8}$  in. squares and placed in 3 by 1 in. flat-bottomed sample tubes. Blank areas of similar dimensions and positions on the paper are treated in the same way. Ferric chloride reagent (5 ml) is added to each tube, completely covering the pieces of filter paper, and the tubes are stored in the dark for 15 min, and are gently agitated twice during this period. The absorbance of the purple solution is read against a distilled water blank at 535  $m\mu$  in a 2 cm cuvette, after allowing 30 sec for detached paper fibres to settle.

M. P. HEGARTY, R. D. COURT, AND PEGGY M. THORNE

(c) *Tests of Methods*

(i) *Recoveries*

The methods have been tested on fresh leaves of *L. glauca*, on leaves dried at different temperatures, on seeds, and on sheep urines containing mimosine and DHP

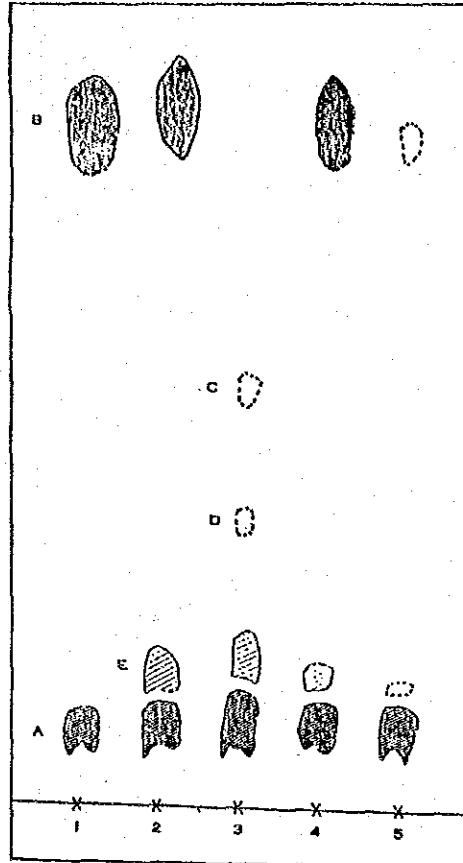


Fig. 1.—Typical chromatograms of extracts of *L. glauca* and sheep urine. Mesityl oxide : formic acid : water (41 : 7 : 6 by vol.) was used as the solvent. Colour was developed with ferric chloride solution. 1, standards; 2, urine from sheep fed on mimosine via the rumen; 3, urine from sheep fed on mimosine intravenously; 4, *L. glauca* dried at 60°C; 5, fresh *L. glauca*. A is mimosine; B is DHP; C, D, and E are unidentified compounds. Hatching indicates approximately the intensity of the coloured spots.

(Table 1). Recoveries of mimosine added to extracts of the samples mentioned above have been within the range 98–102%. The recoveries of DHP added to various plant extracts and urines have also been satisfactory (Table 1).

## DETERMINATION OF MIMOSINE AND 3,4-DIHYDROXYPYRIDINE

TABLE I  
ESTIMATIONS AND RECOVERIES OF MIMOSINE AND DHP

Sample	Mimosine (mg)		Recovery (%)
	Added	Found	
Fresh <i>L. glauca</i> leaf extract: 5 ml 2 ml (3.34 mg mimosine)	4	8.35 ± 0.07*	100 ± 3*
		7.32 ± 0.10*	
<i>L. glauca</i> leaf air-dried: 0.5 g 0.5 g	20	32.70 ± 0.57†	102 ± 1*
		53.08 ± 0.42*	
<i>L. glauca</i> leaf dried at 45°C: 0.5 g	20	29.05 ± 0.26†	98 ± 1*
<i>L. glauca</i> leaf dried at 60°C: 0.5 g 0.5 g		21.74 ± 0.13*	
		41.30 ± 0.18*	
<i>L. glauca</i> seed ground: 0.5 g 0.028 g (2.46 mg mimosine)	4	42.7 ± 0.75†	99 ± 3†
		6.44 ± 0.10†	
Fresh white clover leaf extract: 5 ml	4	3.89 ± 0.04	97 ± 1
Sheep urine: 5 ml 5 ml	10	5.7 ± 0.09*	100 ± 2*
		15.7 ± 0.15*	
Sheep urine: 5 ml 5 ml	2	0.07 ± 0.01*	102 ± 3*
		2.10 ± 0.06*	
	DHP (mg)		
	Added	Found	
Sheep urine: 5 ml 5 ml	1.387	0.129 ± 0.01*	101 ± 2*
		1.525 ± 0.03*	
<i>L. glauca</i> leaf dried at 60°C: 0.5 g 0.5 g	2	3.59 ± 0.05*	100 ± 2*
		5.54 ± 0.08*	

\* Standard deviation of determinations on three separate aliquots of plant extract or urine sample.

† Standard deviation of determinations on three separate samples.

## (ii) Specificity of Chromatographic Techniques

Since there are no other published methods specific for the estimation of mimosine and DHP in biological extracts we have checked the specificity of our chromatographic techniques in the following ways.

M. P. HEGARTY, R. D. COURT, AND PEGGY M. THORNE

Various purified extracts were chromatographed in two directions in phenol : water and butanol : acetic acid : water (Smith 1960) and in one direction in the proposed solvent mixture. No additional ferric-positive spots were detected on the two-directional chromatograms. Other solvent systems were investigated. Phenol : water, butanol : ammonia : water, and lutidine : water (Smith 1960) were unsuitable because of poor separations, excessive streaking, or high paper blank. Butanol : acetic acid : water (120 : 30 : 50 by volume) at room temperature (Smith 1960) gave separations qualitatively similar to those obtained with the mesityl oxide solvent mixture. Quantitative measurements of mimosine in various extracts were carried out in the two solvent mixtures.

There was good agreement in the mimosine content of extracts of dried leaf in the two solvents. However, in fresh leaf extracts the butanol solvent gave higher mimosine values (6.16 mg/2 ml) than the proposed solvent (5.67 mg/2 ml). This suggested that either the separation of mimosine from other ferric-reactive substances was inferior in the butanol solvent or that losses of mimosine occurred in the proposed solvent. The quantitative recoveries obtained in the mesityl oxide solvent and variable recoveries in the butanol solvent showed that only the former was suitable for quantitative analysis.

#### (iii) *Completeness of Extraction*

Samples of dried leaf and seed (0.5 g) were extracted as previously described, but the extracts from the two stages were kept separate. The residue was shaken with 0.1N HCl (20 ml) for a further 12 hr. All three extracts were then analysed. The three extractions removed 96.2, 3.7, and 0.1% respectively of the total extractable mimosine of dried leaf. Similar results were obtained for seed and for DHP in dried leaf. The third extraction was therefore considered unnecessary.

#### (iv) *Stability of Colour*

The development and stability of the final colour were found to depend on the pH of the ferric chloride solution, in agreement with the results of Matsumoto and Sherman (1951). Below pH 1.5, colour development was low; above pH 2.8 the typical purple colour was not produced. The ratio of ferric chloride to mimosine or DHP was found not to be critical. Standard solutions of mimosine and DHP developed with ferric chloride solutions containing 0.25 to 0.75 g per litre gave the same absorbance.

Light was found to cause rapid fading of the purple ferric chloride complex in the test-tube, a fact not previously reported. The absorbance of solutions decreased by up to 50% on standing in diffused daylight for 30 min, but no change in absorbance occurred in solutions kept in the dark for 4 days. The colour developed on the lightly sprayed paper was stable. No decrease in absorbance of the eluted colour was observed in chromatograms which had been kept in diffused daylight for 5 hr after spraying. Sprayed chromatograms kept for 7 days in the dark also showed no loss of colour.

#### (v) *Losses during Storage of Samples*

Analyses were usually completed within 3 weeks of collection of the sample. Under these conditions mimosine and DHP added at the initial extraction were

## DETERMINATION OF MIMOSINE AND 3,4-DIHYDROXYPYRIDINE

recovered quantitatively (Table 1). The following observations were made on changes during storage in the mimosine content of the original samples, extracts, and final solutions.

The mimosine content of a 0.1N HCl extract of fresh leaf material decreased from 8.7 to 8.1% on storage at 4°C for 6 months. The mimosine content of the dried samples also decreased on storage at room temperature in dark, screw-capped bottles. Leaf material dried at 60°C decreased from 5.0 to 4.6% mimosine over 6 months and to 4.2% after a further 16 months. No changes in mimosine content occurred in urines stored at -20°C for 12 months, but a slight increase in free DHP was noticed, presumably due to slow hydrolysis of the conjugated form(s). The greatest losses on storage have been observed in the final solutions for paper chromatography. Losses of mimosine of up to 25% in 9 months' storage at 4°C have been observed in the final solutions from urines, while similar solutions from plant material have shown a loss of 40% in 5 months.

(vi) *Stability of Mimosine in Plant Material*

Matsumoto, Smith, and Sherman (1951) showed that considerable decomposition of mimosine occurred when fresh leaves of *L. glauca* were subjected to conditions of moist heat. These authors were attempting to produce maximum decomposition of mimosine so that the material could be used as a poultry ration. One object of the present study was to devise conditions for the drying and preserving of plant materials such that decomposition of mimosine would be minimized.

A large quantity (1500 g) of fresh *L. glauca* leaves (including petioles) was collected. The collection was limited to the unopened leaf and the fully opened two top leaves of the plant. These were cut in two and the whole thoroughly mixed before subsampling. Four subsamples, each 250 g, were treated as follows. One (sample 1, Table 2) was placed immediately in sufficient 0.2N HCl to give a final concentration of 0.1N. Samples 2, 3, and 4 were dried at room temperature in a current of air, in a forced draught at 45°C for 10 hr, and at 60°C for 3 hr respectively. The samples were then analysed. The results, expressed on an oven-dry basis, are shown in Table 2.

The substance of high  $R_F$  value on chromatograms of extracts of samples in Table 2 (see Fig. 1) was shown to be identical with DHP by cutting out the spot, eluting the compound, and co-chromatographing it with authentic DHP. The chromatography was carried out in two directions with four different solvent mixtures.

(d) *Conversion of Mimosine to DHP by Boiling 0.1N Hydrochloric Acid*

Previous investigators (Yoshida 1944; Matsumoto and Sherman 1951) extracted mimosine from plant material by boiling with 0.1N HCl for 1-2 hr. Adams *et al.* (1945) showed that mimosine was unaffected by long refluxing with constant boiling hydrobromic or hydriodic acids. Bickel and Wibaut (1946) recovered one of the nitrogen atoms of mimosine as ammonia, but only after 28 days at 170°C in 38% hydrochloric acid. However when mimosine was refluxed with 0.1N HCl for short periods (1-3 hr) and the reaction mixture analysed by the paper chromatographic

M. P. HEGARTY, R. D. COURT, AND PEGGY M. THORNE

method, a new substance chromatographically identical with DHP was detected. This substance was isolated and identified in the following experiment.

Mimosine (2.8 g) was refluxed with 0.1N HCl (200 ml) for 3 hr and the solution concentrated to dryness in a rotary evaporator. The crystalline residue was dissolved in water and placed on a column (15 by 2 cm) of Dowex 50-X4 (H<sup>+</sup> form) (100-200 mesh), and the column was washed with water (300 ml), after which 0.1N HCl (900 ml) was used to elute the DHP, leaving unhydrolysed mimosine on the column. The acid eluate was concentrated to dryness to give a yellow crystalline hydrochloride (1.8 g) which was converted to the free base (1.3 g) by the method of Hirs, Moore, and Stein (1954). This was purified by recrystallization from absolute ethanol, high vacuum sublimation, and finally by recrystallization from ethanol. The product was obtained as white needle-like crystals, m.p. 243-244°C (after sintering at 235°C), undepressed on admixture with an authentic sample of DHP of the same melting point. (Found: C, 53.9; H, 4.6; N, 12.6%. Calc. for C<sub>5</sub>H<sub>5</sub>O<sub>2</sub>N: C, 54.0; H, 4.5; N, 12.6%.) The infrared spectrum\* was identical with that of an authentic sample of 3,4-dihydropyridine.

TABLE 2  
EFFECT OF DIFFERENT TREATMENTS ON THE MIMOSINE AND DHP CONTENT OF FRESH L. GLAUCA LEAF  
Results expressed on oven-dry basis

Sample	Treatment	Mimosine (%)	DHP (%)
1	Fresh leaf in 0.1N hydrochloric acid	8.7	Tr.*
2	Air-dried at room temperature	6.4	Tr.
3	Dried at 45°C for 10 hr in forced draught	6.3	0.2
4	Dried at 60°C for 3 hr in forced draught	5.0	0.7

\* Tr., trace.

The hydrolysis of mimosine by boiling dilute acid was further investigated by refluxing mimosine (39.6 mg, 0.2 mmole) with 0.1N HCl (20 ml) and withdrawing aliquots at hourly intervals. After removal of the acid, these were analysed for mimosine and DHP. The results are presented in Figure 2.

After 0.5 hr of refluxing, 16% conversion of mimosine to DHP had occurred. Boiling 0.1N acid should therefore not be used to extract mimosine from biological material. Mimosine is stable in 0.1N HCl at room temperature for several weeks. When mimosine was refluxed with concentrated hydrochloric acid no appreciable conversion to DHP occurred, which confirmed the results of Adams *et al.* (1945). Mimosine added to urine and hydrolysed with 6N HCl at 110°C for 4 hr was recovered quantitatively.

\* The infrared spectra were measured in Nujol and hexachlorobutadiene by Mr. H. J. Schnitzlering, CSIRO, Veterinary Parasitology Laboratory, Yeerongpilly, on a Perkin-Elmer model 21 spectrophotometer.



## DETERMINATION OF MIMOSINE AND 3,4-DIHYDROXYPYRIDINE

## III. DISCUSSION

The low solubility of mimosine in aqueous solvents and almost complete insolubility in organic solvents have been a major problem in developing quantitative methods. The unusual lability of mimosine in hot, dilute acid and its insolubility in cold 80% ethanol necessitated the two-stage, cold acid extraction. Concentrated eluates from the resin columns may contain up to 15 mg of mimosine, and the technique of adjusting to final volume was devised to overcome the difficulty of redissolving the mimosine crystallized on drying. The insolubility of mimosine has been one of the limiting factors in the choice of chromatographic solvents (see Section II(c)(ii)). The two-phase solvent mixture of Bryant and Overell (1951) was modified to a suitable single-phase mixture by the technique of Smith (1960). In it mimosine and DHP were separated from all interfering substances. Brown pigmented material present in solutions for chromatography remained at the point of application.

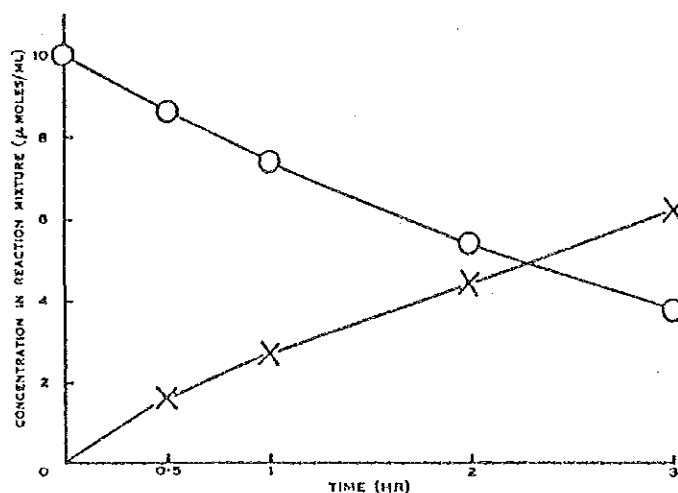


Fig. 2.—Conversion of mimosine to DHP in boiling 0.1N HCl.  
 ○ Mimosine; × DHP.

Other compounds giving ferric chloride colours similar to that of mimosine and DHP have been detected on some of our chromatograms (see Fig. 1) but usually in amounts too small for quantitative analysis. As little as  $2\ \mu\text{g}$  of mimosine can be detected visually on paper, but about  $10\ \mu\text{g}$  is needed for accurate measurement of absorbance under the conditions of the method. These other compounds have not been identified, but as they are well separated on the chromatograms it is likely that once identified, they could be estimated by the proposed method.

The ease with which DHP was separated from mimosine on a Dowex 50 column by elution with 0.1N hydrochloric acid made it necessary to control the pH and volume of the acid extract placed on the column. No loss of DHP was observed with volumes of extract up to 40 ml (approx. 0.05N) containing up to 2.2 mg of

M. P. HEGARTY, R. D. COURT, AND PEGGY M. THORNE

DHP. In early work 0.5N hydrochloric acid was used as an extracting agent, but the two-stage extraction was found necessary for quantitative results, and the 0.5N acid extract could not be applied directly to the columns without loss of DHP.

It can be seen (Table 2) that even mild conditions of drying caused appreciable losses of mimosine. The most convenient method of preserving fresh plant material with the minimum loss of mimosine has been to place it immediately in 0.2N hydrochloric acid. Samples 1 and 2 contained only traces of DHP. In other experiments, sap from *L. glauca* leaves was expressed on to a filter paper sheet, dried rapidly in a stream of cool air, and chromatographed. Trace amounts of DHP were found. It is not known whether the DHP was present in the intact leaf or was an artefact of the method of extraction. Drying fresh *L. glauca* leaves at higher temperatures resulted in increased formation of DHP, but approximately 25% of the mimosine originally present in the fresh leaf (sample 1) could not be accounted for as mimosine plus DHP in samples 2, 3, and 4. No increase in mimosine content of sample 4 resulted after hydrolysis for 4 hr at 110°C in 6N hydrochloric acid, which showed that no mimosine was present in combined form. The fate of the mimosine which could not be accounted for is not known. The results shown in Table 2 indicated the need for careful control of preparative techniques in studying the variation in mimosine content among strains of *L. glauca*. An investigation of this variation is at present being made by means of the described analytical method.

The conversion of mimosine to DHP (which probably exists as 3-hydroxy-4-pyridone) by boiling 0.1N hydrochloric acid is of interest because of the stability of mimosine to hot, concentrated acids. The dissociation constants of mimosine are:  $pK_1$ , 2.1 (COOH);  $pK_2$ , 7.2 (NH<sub>3</sub><sup>+</sup>);  $pK_3$ , 9.2 (OH) (Spenser and Notation 1962), and in acid solution it will exist as a mixture of uncharged and variously charged forms. Those forms relevant to the present discussion are thought to be the uncharged molecule (I), the form (II) in which the  $\alpha$ -amino group is protonated, the form (III) in which the ring nitrogen is protonated, and the form (IV) in which both nitrogen atoms are protonated. In 0.1N hydrochloric acid, II will predominate, but there seems to be no mechanism by which this form can undergo N-alkyl cleavage. Cleavage of IV would be expected to be an extremely slow reaction (Hine 1956). The equilibria  $II \rightleftharpoons I \rightleftharpoons III$  are likely to be immeasurably fast, and it is suggested that mimosine is converted to DHP in boiling 0.1N acid by an attack on the primary side-chain carbon atom of III by the neighbouring  $\alpha$ -amino group (Hine 1956), and resultant N-alkyl cleavage. It is also suggested that in concentrated acids the stable form IV predominates to the almost complete exclusion of other forms.

## 嗜好試験結果

## (I) CE-2とPPOM(ラット用)の比較

供試動物： JCL:Wistar (32週令・体重454g)、2匹

試験日数： 2日間

		総採食量 (g)	嗜好比	選択
試験飼料	CE-2	198.2	3.0	2
	PPOM	65.3	1.0	0
試験飼料 (乾物)	CE-2	91.2	3.7	2
	PPOM	24.9	1.0	0

## (II) CR-1とPPOM(ウサギ用)の比較

供試動物： 日本白色種(5ヶ月令・体重3,700g)、2羽

試験日数： 2日間(5時間/日)

		総採食量 (g)	嗜好比	選択
試験飼料	CR-1	710	12.5	2
	PPOM	57	1.0	0
試験飼料 (乾物)	CR-1	289.7	13.6	2
	PPOM	21.3	1.0	0

資料 22

〒221 横浜市中区神奈川区守屋町3丁目9番地  
日本配合飼料株式会社  
新市場開発室

3822564NIPPAL J8888  
3822564NIPPAL J

2222001HITSUI J

ZCZC TLT758 COT0403  
TKNTT TKPNY DJAAV DJAPP  
.DJAPSHB DJA3889 (RPT/CRT) DEC27 1231 K

TKNTT 3822564NIPPAL J  
+++++

NIPPAL SHINSIJOU KAIHATSU SHITSU  
MR Y.YOSHIDA.

- 1) GENRYO KAKAKU (RP/KG)  
MAIZE 160, MILO 125, RICE BRAN 70, WHAT POLLARD 105, SOY BEAN  
MEAL (IMPORT) 325, FISH MEAL (PERU, THAILAND) 635, MEAT BONE MEAL  
(AUSTRALIA) 405, COCONUT MEAL 120, SESAME MEAL 295,  
CASSAVA LEAF (DRY MATTER)  
125, ELEPANT GRASS (DRY MATTER) 75, SETARIA GRASS (DRY MATTER) 75,  
SODIUM CHLORIDE 165, CALCIUM CARBONATE 24, CALCIUM PHOS-  
PHATE TRIBASIC (NASHI) DICALICIUM PHOSPHATE 380.
- 2) BST DEWA RP. 35.000 / TON DESU GA RP. 15.000 / TON GURAI WO  
KANGAE RE BAYOI.
- 3) A) NO KAKAKU RP. 224/KG  
B) NO KAKAKU RP. 158/KG  
IZUREMO GENRYO MOHI DESU, PLASTIC BAG WA RP5/KG  
MAO, CASSAVA LEAF WA CONTRACT-SURU  
ELEPANT GRASS WA TAKUSAN ARI  
SETARIA GRASS WA SEISAN GA SUKUMAI  
IZUREMO DRY MATTER NI TSUITE FARM MATAWA TRADE TO CONTRACT  
SURU KOTO HI NARU.

-BST-

(TKNTT0289)  
DEC 27 1912

NNNN  
3822564NIPPAL J





JICA