

No. 2

フィリピン・ボホール農業開発計画に係るイピルイピルの
毒性除去法を中心とした飼料化についての研究

報告書

昭和61年3月

国際協力事業団

農開技
JR
86-27

JICA LIBRARY



1044845[4]

序

本報告書はフィリピン・ボホール農業開発計画より要請のあった適正技術開発研究の中で、特にイピルイピルの毒性除去法を中心とした研究事業の結果をとりまとめたものである。

ボホール農業開発計画は、昭和58年2月2日の討議議事録により5ヶ年の技術協力が実施されている。本プロジェクトはボホール島の東西で大きく異なる土壌の特性（東部－酸性，西部－アルカリ性）を栽培試験施肥試験を通じて把握し、現地に適した稲作・畑作の作付・栽培技術を開発し、訓練・普及することが、その協力の主たる目的である。

現在、協力は4年目に入り、研究・開発した技術の普及段階を迎えようとしている。

本研究を通じて、検討されたイピルイピルに含有するミモシンの毒性についての試験結果（除去法を含む）は、今後のイピルイピルの飼料としての効率的利用促進に役立つものと予想され、これによる畜産振興はプロジェクトの最終目標でもある、フィリピン・ボホール島の農業生産向上及び農家所得向上の一助になるものと大いに期待される。

最後に、本研究事業を進めるにあたり受託協力して頂いた(社)日本科学飼料協会、直接研究に従事された琉球大学、及び(株)中島農畜産研究所の関係者の方々、研究を円滑にすすめるにあたって貴重な御意見・御助言を頂いた研究委員の方々に感謝の意を表すると共に、本プロジェクトに対する今後一層の御支援をお願いする次第である。

昭和61年3月

国際協力事業団
農業開発協力部長
田 内 堯

国際協力事業団	
受入 月日 61.8.25	118
	82.3
登録No. 15268	ADT

目 次

まえがき

I. ミモシンの効率的な減少法の検討	7
I a ミモシンの簡易・経済的分離精製法および分析法	9
I b イピルイピル各部位におけるミモシン含量の測定	14
I c 支販品を含めた酵素類によるミモシンの分解	21
I d 鉄塩添加の影響に関する基礎的研究	29
I e ミモシン自己分解酵素の影響	38
I f ミモシン分解に伴う分解生成物の毒性の検討およびその除去法	47
II. イピルイピル貯蔵法の確立及び実用化のための給餌基準の作成	53
II a イピルイピル茎葉部のサイレージ調製	55
II b ミモシン含量を減少させたイピルイピルの動物に対する給餌基準の検討	61
II c 給与動物における病理組織学的所見	80
II d ペレットマシンの改良, 試作	109

まえがき

熱帯から亜熱帯にかけて広く分布しているマメ科の多年生植物であるイピルイピル (*Leucaena Leucocephala de wit*) の茎葉は、蛋白質資源に乏しい熱帯地域における飼料原料として価値の高いことが多くの研究者によって指摘されている。フィリピン・ボホール島においても、かなりの生育面積を有しており、常緑で高収量 (生草 5 t/10a, 6 回刈取/年) であることから、我が国が協力して、現在実施中のボホール農業開発計画の中でも、その栽培法の改善による収量の増加と有効利用を図るべく活動が開始されている。しかし、家畜がこれを継続的に採食すると、その中に含まれるアミノ酸の一種であるミモシン (mimosin, B-[N-(3-hydroxy-4-oxypyridyl)]-2-aminopropionic acid) によって、発育阻害、繁殖障害および脱毛などの病的症状が発現すること、また、ミモシンの反芻胃内分解生成物である 3-hydroxy-4 (IH)-pyridone が甲状腺腫を発症させること等が報告されている。このような家畜に対するミモシンの毒性作用を低下させるための手法も種々報告されているが、いずれも有効成分の損失その他の問題があって、ほとんど実用されていない。したがって、イピルイピルの飼料としての利用は、畜種毎に、ミモシンの毒性作用が発現しない範囲に制限して給与しているのが現状であって、これの保有している飼料価値を十分に活用しているとは言えないように思われる。

このため、本研究は、国際協力事業団の委託により、上述の問題点を解決してイピルイピルの飼料資源としての利用性を向上させ、効率的に活用するための方法を検討して、現地における技術指導を援助することを目的として実施したものである。

なお、本試験の試験計画および試験結果の検討等については、次にあげる委員各位のご指導、ご協力を得ており、ミモシンの効率的な減少法の検討並びにイピルイピルの貯蔵法およびめん羊を用いた実用化のための効果の確認試験は琉球大学農学部イピルイピル研究会の各位にご担当いただき、イピルイピルのペレット化のためのマシンの改良、試作は株式会社中島農畜産(研究所)にご担当いただいた。謹んで、関係各位に深甚の謝意を表する次第である。

社団法人 日本科学飼料協会

理事長 森 本 宏

研究委員（五十音順，敬称略）

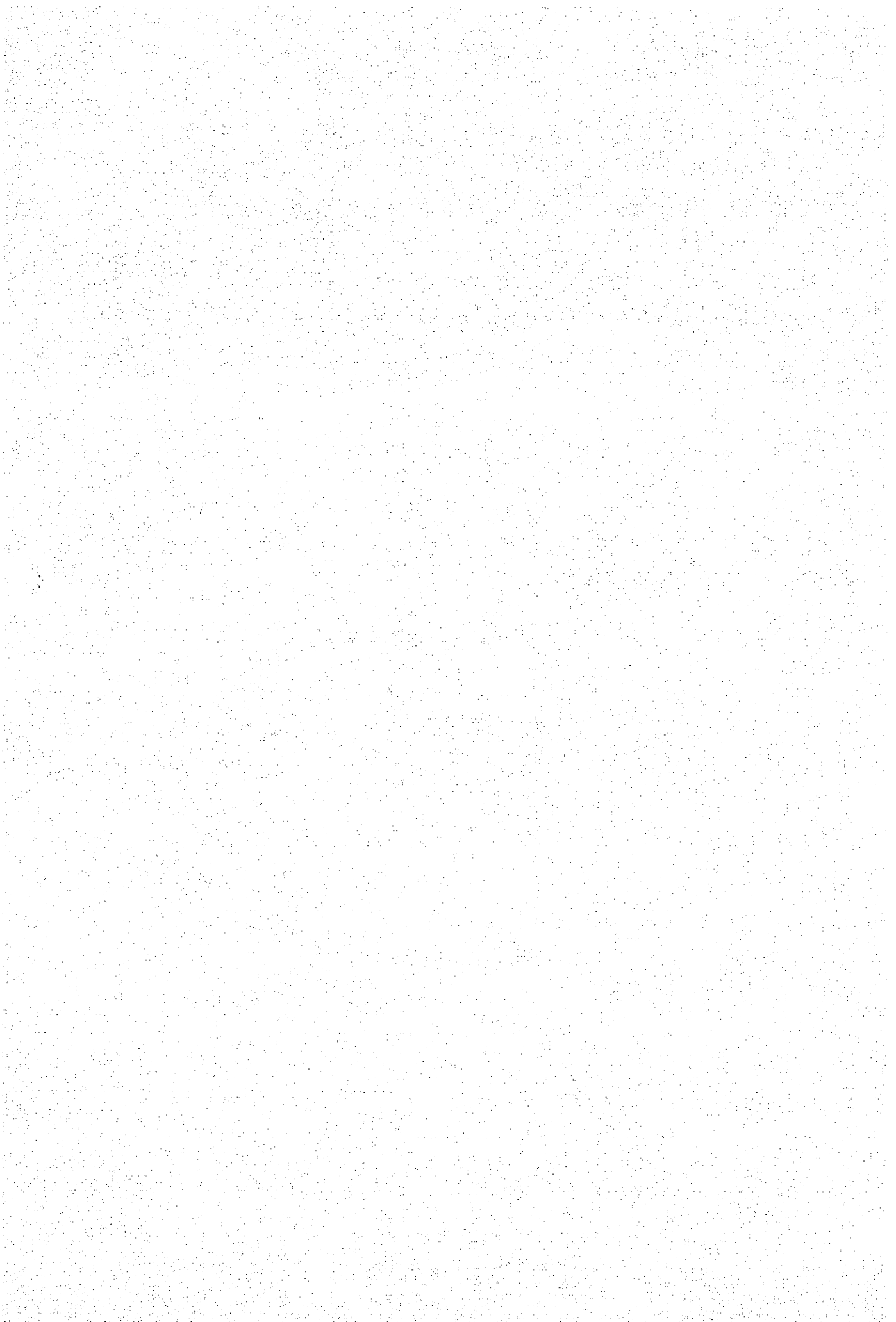
氏名	所属
緒方 宗雄	国際協会総合研修所 国際協力専門員
川島 由次	琉球大学 農学部 畜産学科 家畜解剖学，生理学 助教授
小坂 清巳	農林水産省畜産試験場 栄養部 飼料品質管理研究室長
滝川 明宏	農林水産省畜産試験場 栄養部 飼料資源開発研究室長
本郷 富士弥	琉球大学 農学部 畜産学科 畜産利用学，草地学助教授
水沢 莊太郎	(株)中島農畜産研究所 営業部長
森本 宏	(社)日本科学飼料協会 理事長

I ミモシンの効率的な減少法の検討

- I a ミモシンの簡易・経済的分離精製法および分析法
- I b イピルイピル各部位におけるミモシン含量の測定
- I c 市販品を含めた酵素類によるミモシンの分解
- I d 鉄塩添加の影響に関する基礎的研究
- I e ミモシン自己分解酵素の影響
- I f ミモシン分解に伴う分解生成物の毒性の検討およびその除去法

琉球大学農学部 多和田 真 吉

琉球大学農学部 屋 我 嗣 良



I a ミモシンの簡易・経済的分離精製法および分析法

I a-1 ミモシンの簡易，経済的分離精製法

緒 言

Hegarty等¹⁾は透析法を用いイビルイビル種子からミモシンを精製しており，本郷等²⁾は再結晶法により同じく種子からミモシンを精製している。イビルイビル種子は着実開花が8月頃であり、種子からのミモシン精製は時期的に制限されていることから沖縄でも年中得る事のできるイビルイビル茎葉部からのミモシン単離法を検討した。最近Lowry等³⁾もイビルイビル茎葉部からのミモシン単離法を報告しているが、これを少し改良したものが最も良い方法と思われた。

ミモシン単離法及び結果

イビルイビル新緑葉1kgを沸湯水10ℓに入れ、10分間沸湯を続ける。沸湯水でなくぬるま湯だとミモシンがDHPに変換されるので注意する。水抽出液を室温まで冷却後、抽出液に等量の95%エタノールを加え生じる沈澱物を濾去後Amberlite IRA120H⁺型の樹脂を通し、脱イオン水1ℓそれから80%エタノール1.5ℓで洗う。ミモシンは2N NH₄OH (1ℓ)で溶出し、溶出液を40℃で濃縮すると油状物が得られる。6N HClを用いpHを4.5~5.0にするとミモシンが沈澱するので、アンモニア液とHCl液で5回再結をくり返す。精製ミモシンが5g程得られる。Lowry等の方法と違うところはエタノールを加え沈澱物を除去するところで、この操作法を加えないとカラム中に沈着して、溶媒の流速が妨げられる。

引用文献

1. Hegarty, M.P., and R.D.Court, Aust.J. Agric.Res., 15 : 165-166, 1964
2. 本郷富士弥, 川島由次, 城間定夫, 深沢利行
日畜会報, 54 : 217-223, 1983
3. Lowry J.B., T.S.Gouw and B.Tangendjaja, Leucaena Research Reports, 5 : 50, 1980

I a-2 ミモシンの分析及び定量法

緒 言

ミモシンは単胃動物同様 反芻胃動物の成長を阻害し、イピルイピルの家畜飼料としての利用を制限している。植物及び動物中でもミモシンの代謝物として同定されている3-ヒドロキシ-4 (1H) ピリドン (DHP) もまた家畜に色々な異常を起こす事が報告されている。イピルイピルの飼料化に関する研究を行うには飼料中のミモシン及びDHPを同時定量する事が必須条件であると思われる。現在までのミモシン及びDHPの分析法としてはペーパークロマトグラフィー法¹⁾、ガスクロマトグラフィー法²⁾、アミノ酸分析機を用いる方法³⁾、比色法⁴⁾と多種報告されている。しかし、これらの方法はすべてミモシンあるいはDHPを個々に分析しなければならないか、または複雑な操作を必要とした。植物及び動物からの抽出液中のミモシン、DHPの秀れた同時分析法はTangendjaja等のHPLC法⁵⁾があり、比較的簡単で便利な方法のひとつである。彼らはWatersの高速液体クロマトグラフィー (モデルALC/GPC 244) を用い、 μ Bondapak C₁₈カラム、波長280nmで検出しており良い結果を得ている。用いた溶媒は0.2% (w/v) orthophosphoric acid水溶液で流速1 ml/minでミモシン1ng、DHP 2 ngのレベルで分析を行なっている。彼らの分析法では波長を280nmで測定しているのでミモシンとDHP以外の物質は何も検出されていない。実際には植物あるいは動物からの抽出液中にはかなり種類の化合物が含まれており、ミモシンとDHPを同時分析すると同時にまた他のUV吸収を有する物質が現われても定量できた方が望ましいと思われる。筆者等の新しい分析法は同じくHPLC法であるが、彼らとは少し違うので以下に分析例と結果を示す。

方法及び結果

凍結乾燥したイピルイピル茎葉部をウィレー式粉碎機で微粉末とした試料2gに0.1N HCl 50 mlを加え、氷冷しながらポリトロンで10分間、ホモジナイズした。得られた溶液状のイピルイピルを12,000rpmで遠心分離 (日立20PR) を行い、上澄液をさらに東洋濾紙No.52を用い吸引濾過後、0.1N HClにて100mlに定容した。この溶液をさらにエキクロディスク25を通した後、2 μ lを高速液体クロマトグラフィー (島津LC-6A) を用い分析した。高速液体クロマトグラフィー (以下HPLCと呼ぶ) の測定条件はShim-pack CLC-ODS (15cm \times 6mm, d.) のカラムを用いその温度を50 $^{\circ}$ Cとし、移動相として10mM Potassium-di-hydrogen phos

phate : 10mM Phosphoric acid : Acetonitrile (45 : 45 : 10) の混合溶液に0.1% Sodium 1-octanesulfonateを加え全体としてpH2.9とした混合溶液を用い、流速1.5ml/minで波長250 nmの条件で測定した。

Fig. 1a-1はミモシン72 μ g, DHP8.2 μ gの混合溶液を分析したものを示した。保持時間はミモシンが2.847分でDHPが5.917分であった。

Tawata

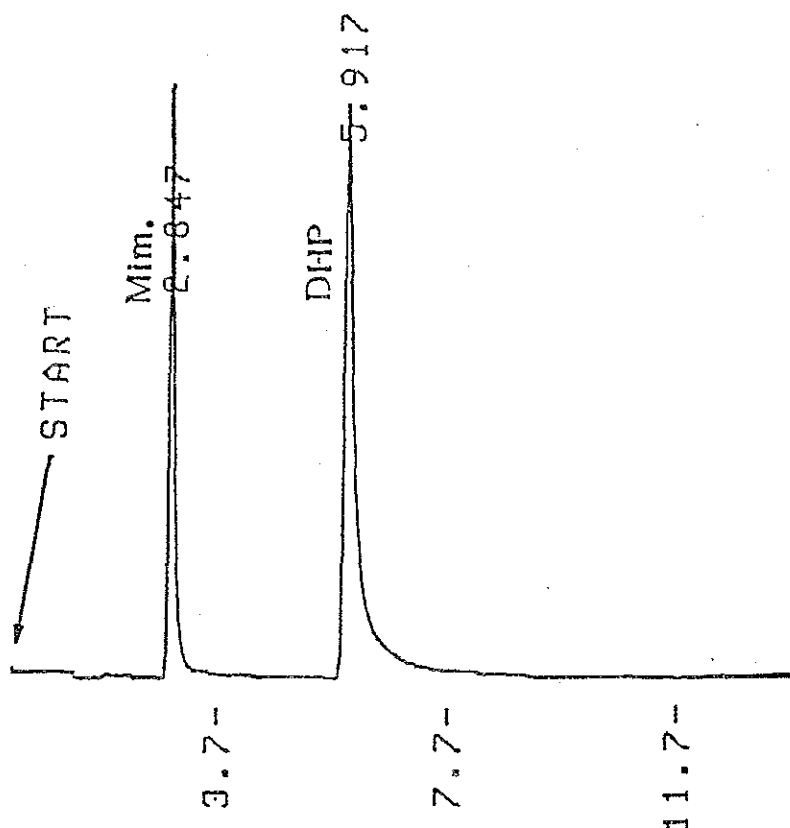
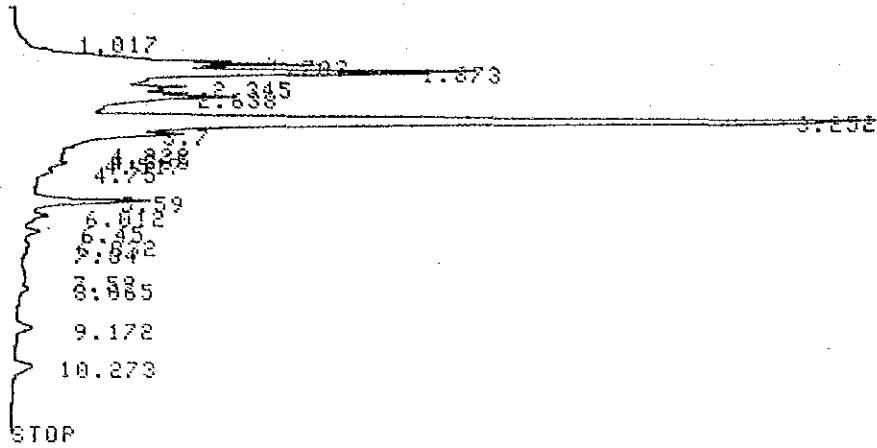


Fig. 1a-1 Typical chromatogram of mimosine and DHP. HPLC conditions: Column; shim-pack CLC-ODS(15 cm x 6 mm i.d.), Mobile phase; 10 mM Potassium di-hydrogen phosphate : 10 mM Phosphoric acid : Acetonitrile (45 : 45 : 10) with 0.1% Sodium 1-octanesulfonate pH=2.9, Detector; UV 250 nm, Flow rate; 1.5ml/min, Column temperature; 50°C; Injection size; 2 μ l.

Tawata

START
DATE 00/00/00 TIME 08:13:57



CHROMATOPAC C-R3A
SAMPLE NO 0
REPORT NO 82

FILE 0
METHOD 444
SAMPLE WT 100

PKNO	TIME	AREA	MK	IDNO	CONC	NAME
1	1.017	80				
2	1.703	8245	V			
3	1.873	13973	V			
4	2.345	3697	V			
5	2.638	8220	V			
6	3.252	28338	V	2	0.0356 MIN	
7	3.7	4623	V	2		
8	4.232	479	V			
9	4.365	522	V			
10	4.517	689	V			
11	4.75	316	V			
12	5.59	2200				
13	6.012	281				
14	6.45	285		1		
15	6.832	116		1		
16	7.04	60	V	1		
17	7.59	197				
18	8.065	202	V			
19	9.172	431				
20	10.273	770				
TOTAL		73723				

Fig. Ia-2 Typical chromatogram of Ipil-ipil extracts.

Fig. 1a-2は、イピルイピル葉を分析した1例を示した。この場合はミモシンが3.252分に出ているが、他にも19種類の未知物質が含まれている事がわかる。このHPLC法ではイピルイピルを処理した場合、ミモシンとDHPの変動だけでなく他の未知物質のピークの変化も観察する事ができる。また、分析時間は10分以内で済み、迅速で正確な分析値を得る事ができた。

引用文献

1. Hegarty, M.P., R.D. Court and P.M.Thorne, Aust.J.Agr.Res., 15 : 168-179, 1964
2. Mee, J.M.L. and C.C. Brooks, J. Chromatogr., 62 : 141-143 (1971)
3. Mzik, J. J.Chromatogr., 144 : 146, 1977
4. Megarrity, R.G., J.sci. Food Agr., 29 : 182-186, 1978
5. Matsumoto, H. and G.D.Sherman Arch. Biochem Biophys., 33 : 195-200, 1951
6. Tangendjaja, B. and R.B.H.wills J.Chromatogr., 202 : 317-318, 1980

I b イピルイピル各部位におけるミモシン含量の測定

緒 言

イピルイピルは、熱帯、亜熱帯に広く分布しており、タンパク質資源の乏しい地域では高タンパク質飼料源として高い価値を有する。しかしながら含有される毒性アミノ酸ミモシンにより発育阻害、脱毛などの障害を発現することが報告されている。ミモシン含量の少ないギンネムの品種あるいは部位を見出だすため沖縄自生のイピルイピル (Native) 及び外来種である K 72a, K 8, K 28 を用い、各部位ごとのミモシン含有量、品種別の一般化学成分の分析を行なった。また品種ごとのリグニン含有量の分析も行なった。

材料及び方法

1. 試 料

琉球大学農学部近傍の高さ約 3 m の自生のイピルイピルより茎、葉、種子及び他の部位を採取し試料に用いた。また 1983 年に植栽したハワイ及び台湾由来のイピルイピル K 72a, K 8, K 28 も同様に用いた。

2. ミモシン含量の測定

ギンネムの分析に用いた部位は、茎葉部の若葉、若茎、成熟葉、成熟茎、つぼみ、花、完熟サヤ、未熟サヤ、完熟種子、未熟種子、木質、樹皮、及び根部の木質部、皮質、毛根の植物全部位であった。

3. リグニン及び一般成分の分析

リグニンは J I S 法、一般成分分析は、(社)日本飼料協会発行の一般飼料分析法¹⁾に従って分析した。

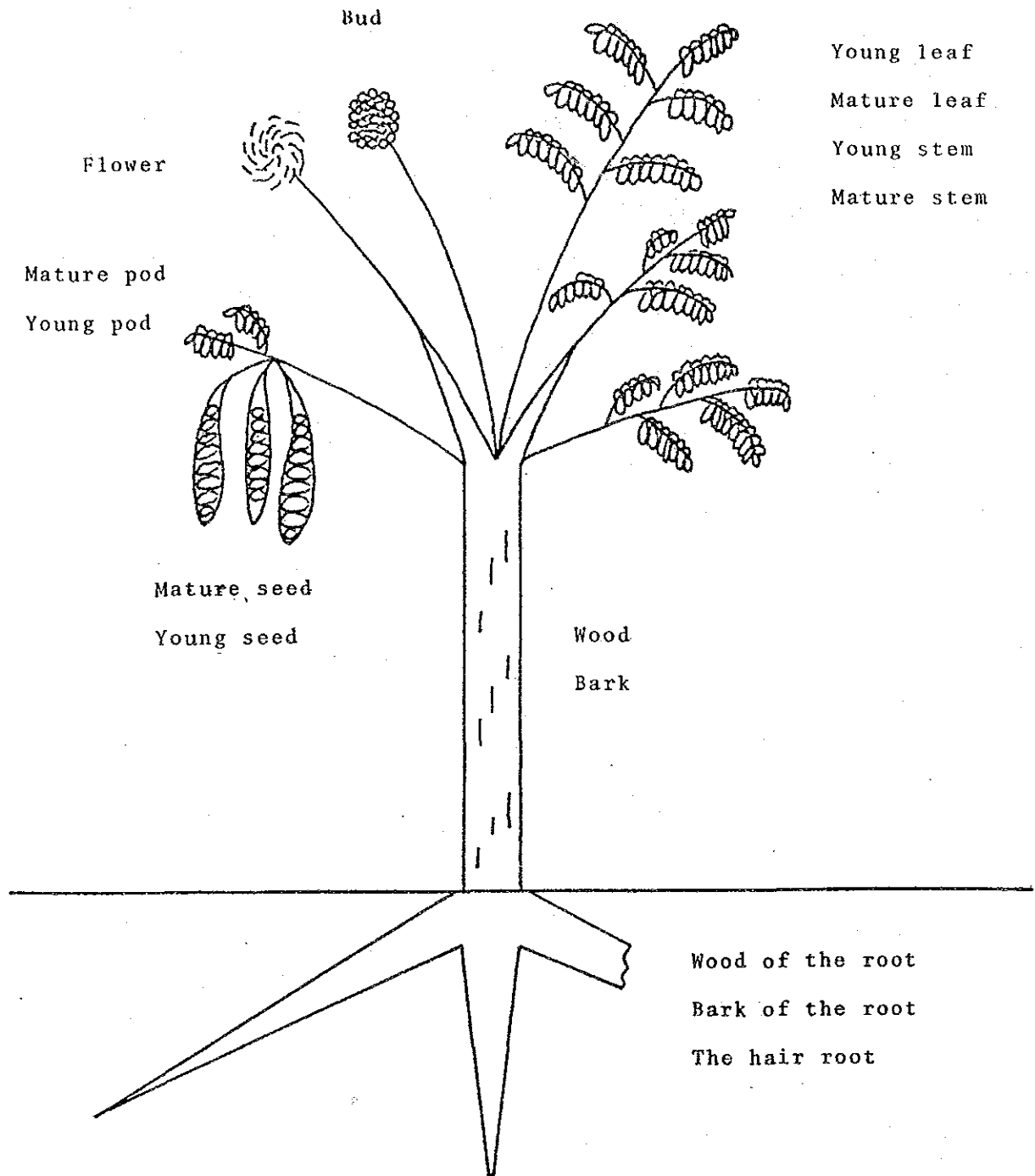


Fig. Ib-1 Analytical sites of the Ipil-ipil.

結果及び考察

1. イピルイピル各部位におけるミモシン含量

Fig. 1b-1は、イピルイピル各部位を図示したものである。

Fig. 1b-2は、供試した4品種、Native, K72a, K8及びK28の茎葉部のミモシン含量の結果を示している。Native 1.25%, K72a 1.3%, K8 1.19%及びK28が1.45%で分析した4品種の中では、K28が最もミモシン含量が高くK8が最も低い値を示した。

Fig. 1b-3はイピルイピル各部位におけるミモシン含量について最も高い若葉から最も低い木質部まで棒グラフで表わしたものである。次に各品種ごとの各部位におけるミモシン含量を測定した結果をそれぞれ、Table 1b-1に示した。4品種の若葉中のミモシン含量の平均は、2.66%でミモシン含量の最も高いのはK28で、最も低いのはK8であった。成熟葉の4品種の

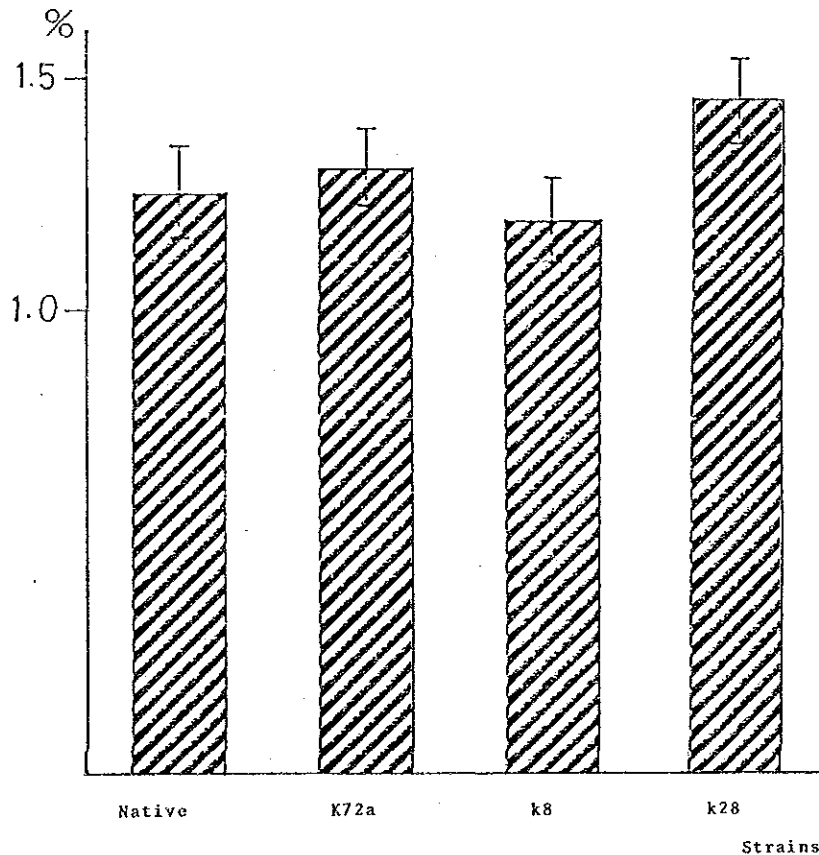


Fig. 1b-2 Mimosine content in the different strains.

平均は0.48%で、同じくK 28が最も高く、K 8が最も低い値を示した。若茎の平均は1.50%で、成熟茎の平均は0.54%である。この様に同じ茎葉部でも試料の採取部位により大きくミモシン含量は異なり、正確な値というのではなく相対的なものであることがわかった。Krishnamurthy等²²や本郷等²³も各部位ごとのミモシン含量を報告しており同じ品種でも地域、条件により差のあることを述べているが、彼らは、根部や花の分析は行なっていない。つぼみと花のミモシン含量は、つぼみの方がやや高く、種子中のミモシン含量は、未熟種子より完熟種子の方が2倍以上も高い値を示した。木幹部のミモシン含量は樹皮部が高く、木質部は全部位中で最も低い値を示した。根部では皮質部と毛根がやや高い値を示し、木質部は、木幹部の木質部同様に低い値を示した。全部位を品種ごとに平均するとK 28は1.14%と最も高く、K 8が0.88%と最も低い値を示し、これは茎葉部だけの分析結果と一致していた。

Fig. 1b-3 Mimosine content of the various parts of Ipil-ipil.

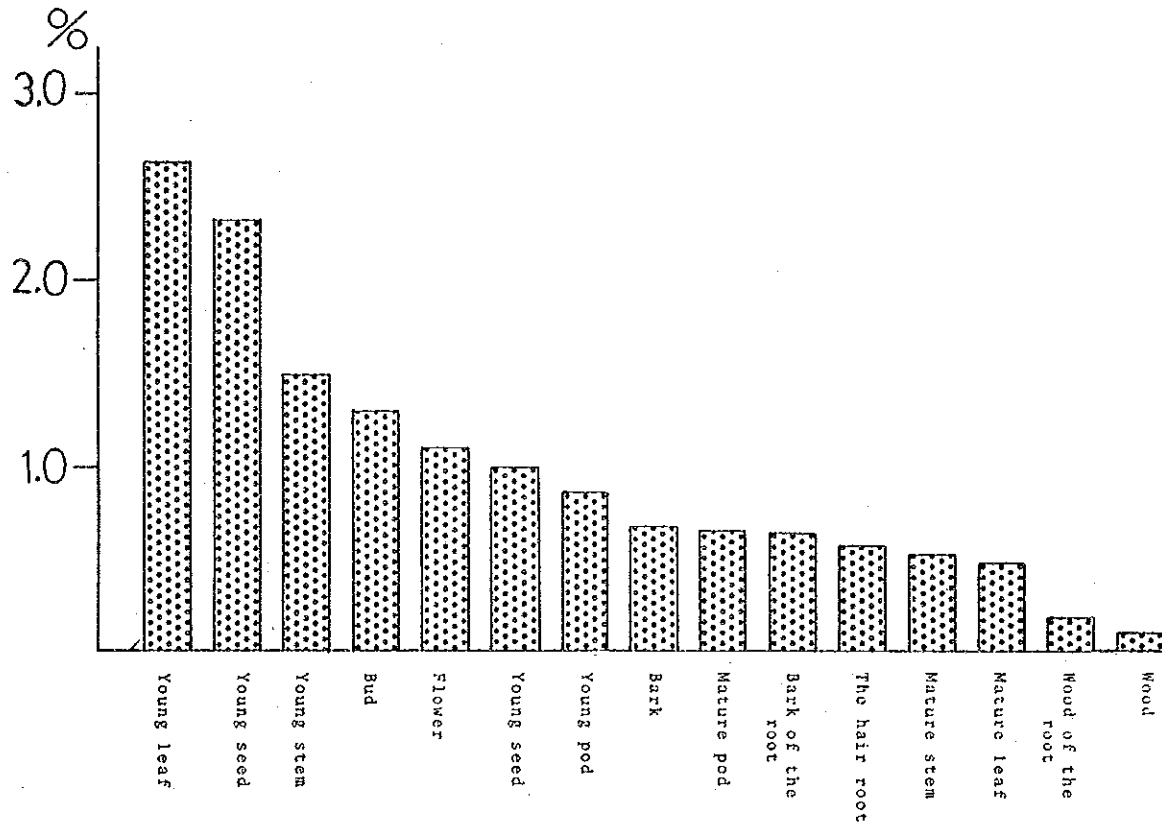


Table Ib-1 Mimosine content of the various parts of Ipil-ipil.

	Native	K 72a	K 8	K 28	Average
Young leaf	2.71	2.53	2.54	2.88	2.66
Mature leaf	0.38	0.61	0.27	0.67	0.48
Young stem	1.41	1.48	1.56	1.54	1.50
Mature stem	0.48	0.58	0.39	0.72	0.54
Bud	1.43	1.35	1.05	1.52	1.34
Flower	1.30	1.97	1.03	1.39	1.17
Mature seed	2.53	3.19	1.83	2.25	2.37
Young seed	1.41	0.71	0.92	0.96	1.00
Mature pod	0.70	0.67	0.68	0.68	0.68
Young pod	0.90	0.89	0.74	1.02	0.89
Bark	0.43	0.96	0.27	1.11	0.69
Wood	0.10	0.11	0.09	0.10	0.10
Wood of the Root	0.13	0.09	0.36	0.71	0.18
Bark of the Root	0.88	0.25	0.76	0.73	0.66
The hair root	0.97	0.19	0.71	0.85	0.57
Average	1.05	1.04	0.88	1.14	

2. イピルイピル4品種の木質部と樹皮部の一般成分分析

Table Ib-2は、木質部と樹皮部の一般成分分析の結果を示している。木質部の大部分は粗繊維と可溶性無窒素物が占めており、粗蛋白質含量は、3%程度、粗脂肪は1%にも満たない値を示した。樹皮中の成分は木質と比較して灰分と粗蛋白質が相対的に高い値を示した。品種間による一般成分の違いはK28の樹皮中の粗蛋白質含量がK8より6%程高いことを除けば、大きな差は見られなかった。

Table Ib-2 General composition of the wood and bark of Ipil-ipil.

	Crude Ash	Crude Fiber	Crude Lipid	Crude Protein	Water Soluble Carbohydrate
The Woody Parts					
Native	0.88	56.13	0.45	2.75	39.78
K 72a	1.48	56.16	0.44	2.75	39.16
K 8	1.10	55.83	0.29	2.25	40.62
K 28	1.47	56.00	0.54	4.21	37.78
Average	1.23	56.03	0.43	2.99	39.34
The Parts of Bark					
Native	6.60	21.77	1.85	10.77	59.02
K 72a	7.25	24.80	1.57	10.82	55.56
K 8	6.53	19.31	1.11	8.83	63.76
K 28	6.85	23.44	1.70	14.00	54.00
Average	6.81	22.33	1.56	11.11	58.09

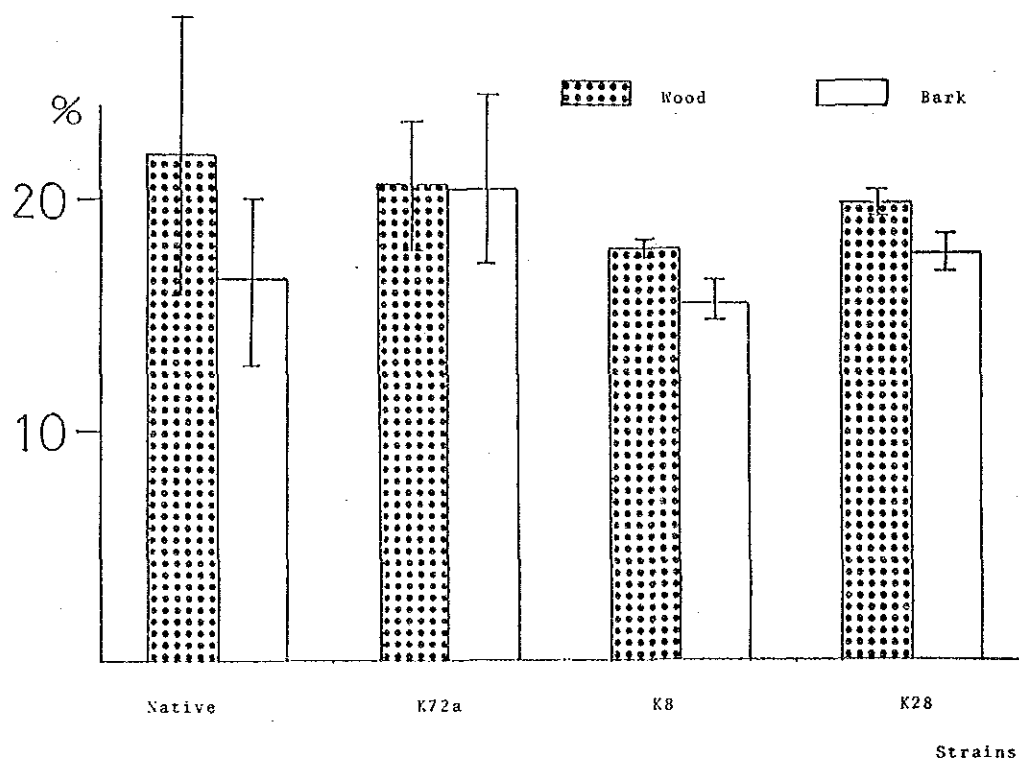


Fig. Ib-4 Lignin content in the various strains of Ipil-ipil.

3. 木幹部のリグニン含有量

木幹部のリグニン含有量の分析結果をFig. 1 b-4 に示した。木質部のリグニン含量の最も高いのはNativeで、最も低いのはK 8であった。樹皮中のリグニン含量はK 72aが最も高く、K 8が最も低い値を示した。木質部のリグニン含量は平均して20%前後であるが、残りはセルロースおよびヘミセルロースが大部分を占めており、このリグニンを分解あるいは除去すればイピルイピル木質部は莫大な家畜粗飼料源となり得ると思われた。

引用文献

- 1) 飼料分析基準研究会編 飼料分析基準注解, (社)日本飼料協会発行, p6-16
- 2) Krishnamurthy, K. and M.K.Mune Gowda Leucaena Research Reports, 4 : 27, 1983
- 3) 本郷富士弥, 川島由次, 城間定夫, 福沢利行, 日畜会報 54 : 217-223, 1983

I c 市販品を含めた酵素類によるミモシンの分解

緒 言

イピルイピルを給餌した動物は甲状腺腫を引き起こす¹⁾。甲状腺腫は、イピルイピル中の毒性アミノ酸ミモシンが植物内での自動分解²⁾、あるいは微生物の作用³⁾により生じるDHPが原因⁴⁾である事が報告されている。北部オーストラリアにおける反芻胃動物のイピルイピル毒性問題は、第一胃内にミモシンをDHPにまで分解する能力のある微生物がいないためという事が明らかにされた⁵⁾。最近、ハワイやインドネシアの一部地域では反芻胃動物に、全くイピルイピルによる毒性が発現しない事が発見され、これは胃内微生物がミモシンだけでなくDHPまでも分解無毒化するためであり、この場合、多量にイピルイピルを給餌しても尿中からは1%以下のDHPしか検出されなかったと報告されている⁶⁾。沖縄県においても、ヤギ及び牛で胃内微生物がミモシンを分解し、イピルイピルの毒性を下げる事が明らかにされている^{7, 8)}。

この研究は黒毛和牛第一胃内微生物の生産するプロデアーゼに対するミモシンの影響を調べ、また、さらに市販タンパク分解酵素類を用い、ミモシン分解性に及ぼす影響を調べたものである。

材料及び方法

1. 材 料

牛第一胃内容物は沖縄畜産加工株式会社で屠殺された黒毛和牛の第一胃を切開して採取し実験に供した。またミモシンは前報のようにして得た⁹⁾。酵素類のトリプシン、 α -キモトリプシン、ペプシン、パンクレアチン、パパインなどは市販のものを用いた。

2. 牛第一胃内容物の処理

胃内容物は主として神立等^{10, 11)}の方法に準拠して行なった。胃内容物を2層のガーゼで固型物を除去し、濾液を38°Cで60分インキュベート後、上層の浮遊物を除去した。下層部を1,000rpmで10分間遠心分離を行ないプロトゾア分画(PF)を得て、0.5Mリン酸緩衝液(pH7.0)で洗浄した。再び上澄液を12,000rpmで20分間遠沈し、バクテリア分画(BF)を沈澱させた。上澄液はプロトゾアおよびバクテリアのない分画に(PBFF)とし、それぞれ分画に20倍容

の冷却アセトンを加え、数回洗浄後、直ちに減圧乾固してアセトン粉末とした。

3. 粗酵素液の調製

各分画のアセトン粉末を5g, 0.5Mリン酸緩衝液 (pH7.0) 50mlに溶解し, 15,000rpmで10分間遠心分離後, 上澄液を24時間5℃で透析したものを粗酵素液 (タンパク濃度約0.17%) とした。

4. 基質の作成

基質としてカゼインを使用し, 酸性側用とアルカリ性側用の2種類を調製した。Hammarstene casein 1.0gに水70mlを加え, 酸性側用には0.1N HCl 4 mlを加え, アルカリ性側用には0.1N NaOH約5 mlをそれぞれ加え, 60℃で5分間, 加温溶解し, 室温まで冷却後, 水を加え50mlに定容し, これを基質 (2%カゼイン) として実験に供した。緩衝液は, pH 1~5においてはCitrate-HCl, pH 5~6においてはTris-HCl, pH 8~11においてはNaOH-Na₂HPO₄を用いて作成した。

5. 酵素活性の測定

粗酵素液 1 ml, 2%カゼイン0.5mlをそれぞれ適当な緩衝液中で適温度条件下で一定時間, 反応させ, 10%過塩素酸2.5mlを加えることにより反応を停止し, 15,000rpmで30分間遠心分離を行なった。その上澄液の吸光度を280nmで測定し, ブランク値 (反応前に過塩素酸を加えた場合のOD 280の値) に対する増分に希釈度を乗じた値の活性をもって粗酵素液の比活性とした。

6. 粗酵素液中のタンパク質含量の測定

牛血清アルブミン1~10mg含む溶液 1 mlにBiuret reagent 4.0mlを加えて攪拌する。これを30分間, 室温に放置後, 分光光度計により540nmにおける吸光度を測定し検量線を作成した。次に測定しようとする粗酵素液1mlにBiuret reagent 4.0mlを加え上記の方法と同様にして540nmにおける吸光度を測定し, 検量線よりタンパク質含量の定量を行なった。

7. タンパク分解酵素に対するミモシン及び金属イオンの影響

PB, BF, およびPB FF分画のタンパク分解活性を測定後, ミモシンおよび金属イオ

ンの影響を調べた。ミモシンを0.1N citrate-NaOH (pH5.0) およびToris緩衝液 (pH7.2) に最低濃度4.0mMになる様に溶かした。金属イオン, CaCl_2 , ZnCl_2 , MnCl_2 , MgCl_2 および HgCl_2 もまた最終濃度が5 mMになる様に緩衝液に溶解した。それぞれの阻害剤1 mlを粗酵素液1 mlに加え阻害率を測定した。

8. ペプシン, トリプシンおよび α -キモトリプシンに対するミモシンの影響及び酵素類によるミモシンの分解性

ペプシンを0.2M KCl-HCl 緩衝液 (pH2.0) に, トリプシンおよび α -キモトリプシンを0.2M リン酸緩衝液 (pH7.0) にそれぞれ溶解した。酵素液2 ml, 緩衝液2 ml酸性および中性緩衝液中の2%カゼイン1 mlと0~10mMのミモシン溶液1 mlを加え, 38°Cで30分間, インキュベートした。酵素反応は16% TCAを加える事により停止させ, 5,000rpmで70分間遠心分離後, 上澄液を吸光度280nmで測定した。またトリプシン, α -キモトリプシン, ペプシン, パンクレアチンおよびババインなどを用い, それぞれの最適条件下におけるミモシンの分解性を調べた。緩衝液2 mlに0.25mMミモシン2 mlを入れ30分および24時間, 最適温度でインキュベート後, 16% TCAで除タンパク後HP < Cでミモシンの減少率を測定した。

結果及び考察

1. 酵素活性に及ぼすpH, 温度の影響

Fig. 1c-1は4頭の異なる牛の第1胃内から調製されたPF分画のタンパク分解活性に及ぼすpHの影響を調べたものである。pH3付近とpH7付近に活性の極大が見られた。プロテアーゼがタンパク質を分解する能力に個体差が見られたが, 至適pHには個体差は見られなかった。pH3付近では至適pHの範囲が狭いが, pH7付近では巾広い範囲にわたっていた。PF分画のプロテアーゼ活性に及ぼす温度の影響をFig. 1c-2に示した。pH3.3における至適温度は, 45°Cで, pH7.0におけるプロテアーゼの至適温度は70°Cであった。PF, BFおよびPBFFの三分画から得られたプロテアーゼの至適pH, 至適温度は一括してTable 1c-1に示した。それぞれの分画とも酸性領域 (pH3.4~5.2) と中性領域 (pH7.0~7.8) に至適pHをもち, それぞれ表に示した様に相当する温度でプロテアーゼ活性は最大であった。

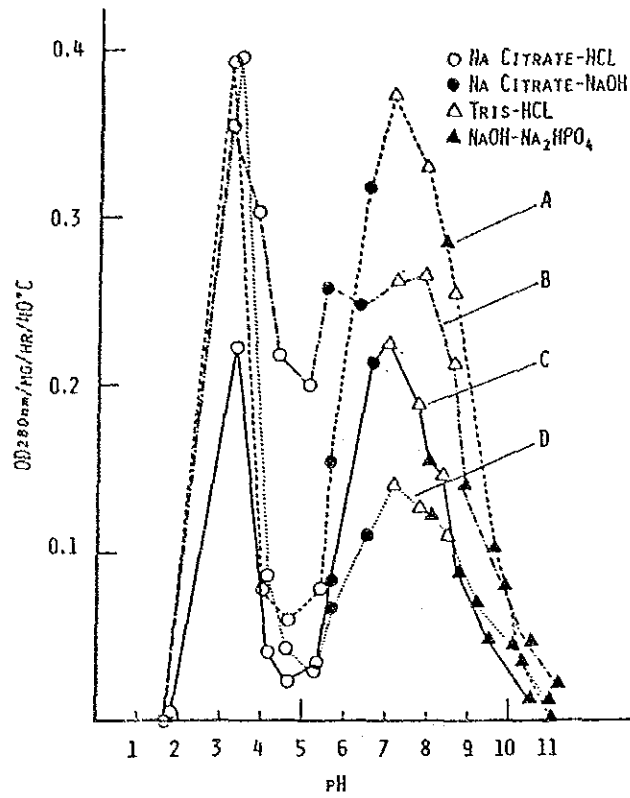


Fig. 1c-1 Effect of pH on proteolytic activity of PP from different rumen sources.

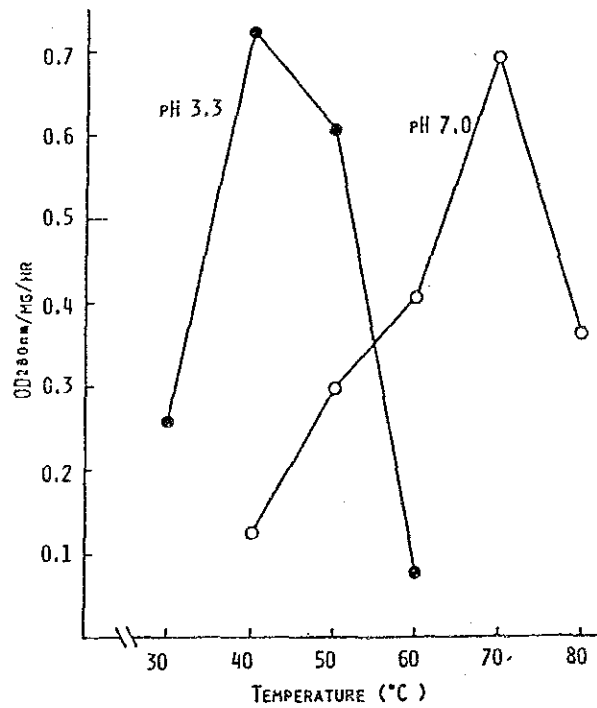


Fig. 1c-2 Effect of temperature on proteolytic activity of PP.

Table Ic-1 Optimum pH, temperature, specific activity.

	pH	temperature(°C)	specific activity(mg/hr)
Protozoa	3.4	45	0.32
	7.1	70	0.60
Bacteria	5.2	40	0.79
	7.0	50	0.90
Rumen liquid	5.2	50	0.78
	7.8	40	0.38

2. プロテアーゼ活性に及ぼす透析の影響

Table Ic-2 には PF, BF および PBFF のプロテアーゼ活性に及ぼす透析の影響を示した。透析前のプロテアーゼ活性は表に示した様に低くこれらのプロテアーゼは透析によりかなり活性が高まることが解った。

Table Ic-2 Effect of dialysis on proteolytic activity of PF, BF and PBFF.

	Reaction pH	Treatment	Exptl.	Blanks	Difference	Specific Activity
Protozoa	3.4	Dialyzed	1.02	0.33	0.69	0.46
		Undialyzed	0.31	0.31	0	-
	7.1	Dialyzed	0.56	0.32	0.24	0.16
		Undialyzed	0.29	0.34	0	-
Bacteria	5.4	Dialyzed	1.14	0.88	0.26	0.86
		Undialyzed	1.82	1.72	0.10	0.27
	7.0	Dialyzed	0.91	0.85	0.06	0.20
		Undialyzed	1.75	1.72	0.03	0.09
Microorganism-free fraction	5.6	Dialyzed	1.15	0.79	0.36	0.36
		Undialyzed	1.48	1.30	0.18	0.13
	8.0	Dialyzed	0.91	0.77	0.14	0.14
		Undialyzed	1.40	1.30	0.10	0.07

3. プロテアーゼに及ぼすミモシンと金属イオンの影響

ミモシンの最終濃度が4.0mMの場合と金属イオンの最終濃度が5.0mMの場合の酸性および中性プロテアーゼ活性に及ぼす影響をTable I c-3に示した。ミモシンは、酸性プロテアーゼに対して80~100%まで活性を低下させるが中性プロテアーゼは、ミモシンによって阻害されなかった。またプロテアーゼ活性は、5.0nM Hg⁺⁺によって阻害されたが、Zn⁺⁺ではわずかに阻害され、Cu⁺⁺やMg⁺⁺では、ほとんど阻害されなかった。Fukuda⁽¹⁾らはイピルイピル種子中には、トリプシンおよび α -キモトリプシンを阻害する物質が含まれている事を報告しているが、ミモシンの影響については試験していない。ミモシンが牛第一胃中の微生物中性プロテアーゼを阻害することがわかったので市販の酵素を用い、ミモシンの影響を調べてみた。Fig. I c-3は基質として2%カゼインを用い、酵素ペプシン、トリプシン(牛)、トリプシン(豚)およびキモトリプシンの活性に及ぼすミモシン(0~5.0mM)の影響を調べたもので、30分間38℃でインキュベートした時の阻害率を示している。その結果、 α -キモトリプシンだけが22%程阻害され、ペプシンおよびトリプシンには何の影響もない事がわかった。Table I c-4は、市販タンパク分解酵素により、ミモシンが分解されるかどうか試験した結果を示している。市販酵素

Table I c-3 Effect of various metal ions and mimosine on the activity of proteolytic enzymes.

	Relative activity (percentage)						
	No addition	CaCl ₂	ZnCl ₂	MnCl ₂	MgCl ₂	HgCl ₂	Mimosine
Protozoa fraction							
pH 3.3	100	94	92	97	95	0	20
pH 7.1	100	95	98	71	93	0	70
Bacteria fraction							
pH 5.2	100	95	95	96	95	80	0
pH 7.1	100	97	20	75	98	0	100
Microorganism-free fraction							
pH 5.2	100	98	80	67	94	0	0
pH 7.1	100	98	19	77	93	0	100

Concentrations: 5 mM for each metal ion addition; 4 mM for mimosine.

類のトリプシン、 α -キモトリプシン、ペプシンパンクレアチン、およびパパインを用いたがいずれも全く活性が見られず、ミモシンの市販酵素類による分解法は困難であると判断された。酵素を用いるのならば、イピルイピル中に存在するミモシン分解酵素を検討した方が良いと思われた。

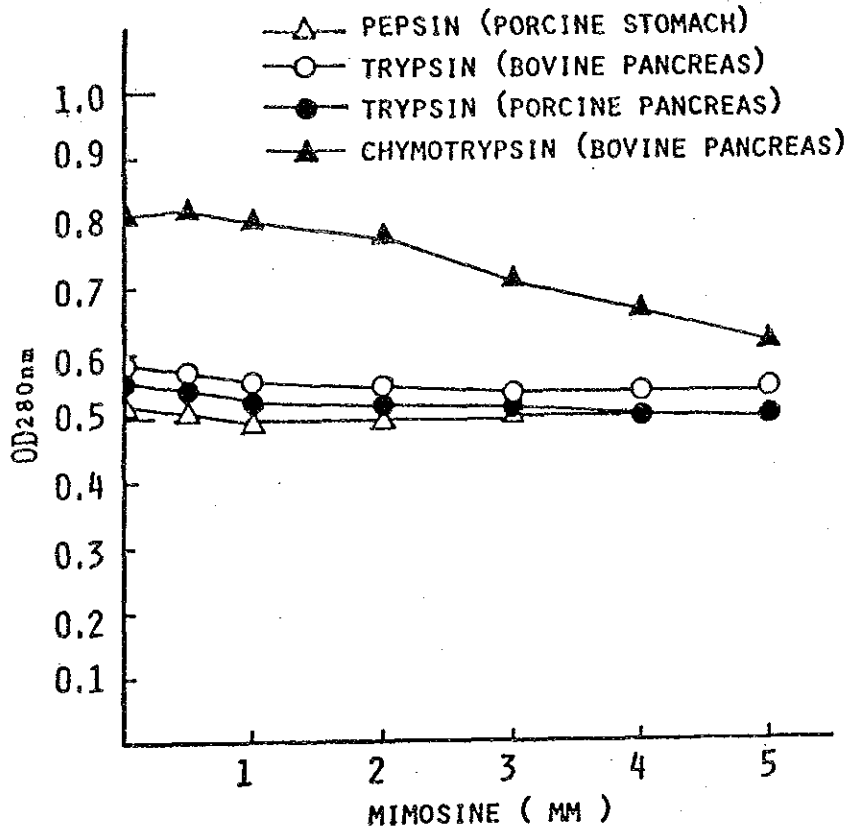


Fig. Ic-3 Effect of mimosine on proteolytic activity of pepsin, trypsin and chymotrypsin.

Table Ic-4 Degradation of mimosine by commercial enzymes.

	Retention time	Area	Degradation rate (%)
Trypsin	2.97	2279	103
α -Chymotrypsin	2.98	2304	105
Pepsin	2.97	2268	103
Pancreatin	2.98	2272	103
Papain	2.98	2294	104
Control	2.98	2209	100

引用文献

- 1) Jones, R.J. Wild Anim. Rev., 31 : 13--23, 1979
- 2) Lowry, B.J. Maryanto and B.Tangendjaja J.Sci. Ford Agric., 34 : 529-533, 1983
- 3) Hegarty, M.P., P.G. Schimckel, and R.D court. Arst. J.Agric.Res., 15 : 153--167, 1964
- 4) Hegarty, M.P. C.P.Lee, G.S.Christie, R.D.Court, and K.P.Hay Arstr. J.Biol. sci., 32 : 27-40, 1979
- 5) Janes, R.J., Austr.vet.J., 57 : 55-56, 1981
- 6) Lowry, J.B., Leucaena Research Reports, 2 : 31, 1983
- 7) 城間定夫, 赤司 景, 日畜会報, 47 : 739-747, 1976
- 8) 本郷富士弥, 城間定夫, 琉大農学校, 26 : 379-387, 1979
- 9) 本郷富士弥, 川島由次, 城間定夫, 深沢利行 日畜会報, 54 : 217-223, 1983
- 10) 神立 誠, 高橋直身 日農化誌, 30 : 06-99, 1956
- 11) 新地修士, 神立 誠, 日畜会報, 54 : 290-296, 1983
- 12) 福田亘博, 古謝 隆, 知念 功, 本郷富士弥, 城間定夫, 四方治五郎, 日農化誌, 54 : 1015-1019, 1980

I d 鉄塩添加の影響に関する基礎的研究

緒 言

吉田及び松本らは硫化鉄をイピルイピルのエサに混ぜると動物に対する毒性が減少する事を始めて報告¹⁾した。Acamovic等²⁾もまた鉄やアルミニウムの影響を報告し、さらにFe(III)の方がAl(III)やFe(II)よりもミモシンの毒性を減少することを報告³⁾した。

イピルイピルに鉄塩を添加すると尿中のミモシンよりも糞中のミモシンが増える事は良く知られている事である。これは動物の消化器官である小腸でのミモシンの吸収が鉄とのキレート結合により阻止されるためと思われるが、まだ詳しくは確認されていない。

そこで本実験では、透析膜及び豚小腸を用い、ミモシンの移行性及び吸収に及ぼす各種酸類、塩類の影響を調べてみた。また、ミモシンと鉄塩との混合比による最大錯体生成量を求め、ミモシンと鉄の作る錯体の構造式も推定した。

材料および方法

1. 材 料

透析膜は三光純薬株式会社のセルロース膜20/32を用いた。豚小腸は、沖縄県食肉センターで屠殺された豚の小腸を採取し、実験に供した。

2. ミモシンの膜移行性

Fig. I d-1には透析膜中のミモシンの透過性に関する方法を示した。すなわち、5 mMのミモシン溶液と等モル、等量の酸類(HCl, H₂SO₄, HCOOH, CH₃COOH, CCl₃COOH, CH₃CH(OH)COOH), 塩類(NaOH, KOH, KCl, CaCl₂, NaCl, CH₃COONa, MgCl₂, ZnCl₂, MnCl₂, FeCl₂, FeCl₃, FeSO₄)を混合したものを透析膜に注入し、外液として蒸留水を用いてスターラーで攪拌しながら室温で3時間透析した。透析後、経時的に0.5, 1, 2, および3時間目に外液および内液中のミモシン含量をHPLCで測定した。

次に5 mMのミモシン溶液のみを透析膜に注入し、外液として等モルの酸類、塩類の水溶液を用いてスターラーで攪拌しながら室温で3時間透析し、上記と同様にHPLCで測定した。

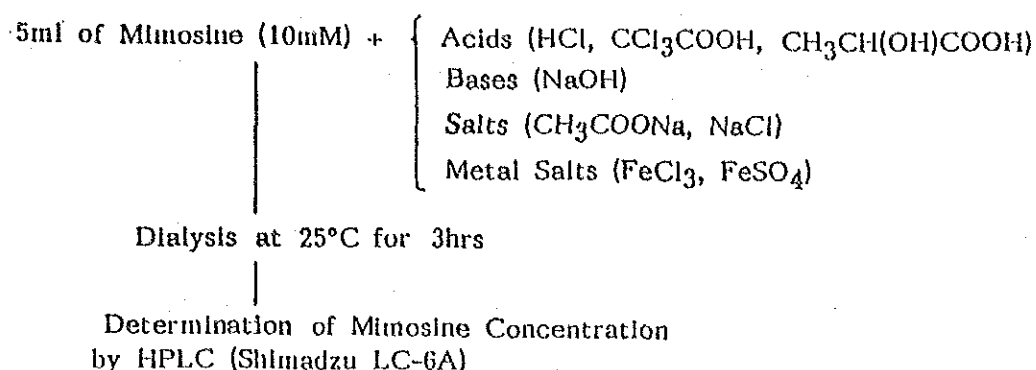


Fig. Id-1 Permeability of mimosine in the dialysis membrane.

3. 豚小腸におけるミモシンの透過性

10mMのミモシン溶液と等モル・等量の酸類、塩類を豚小腸に注入し、外液として蒸留水を用いてスターラーで攪拌しながら室温で経時的にミモシン含量の変化を3時間にわたりHPLCで測定した。

4. 最大錯体生成量

FeCl₂, FeCl₃およびFeSO₄の1mM溶液とミモシンの1mM溶液を用意し、それぞれのモル比が0~1.0となる様に混合液を作り、よく混合した後、15分間放置した。その後、分光光度計(日立2010型)を用い5.35nmでそれぞれの吸光度を測定しFig. Id-9より錯体の最大生成量を求めた。

結 果

1. 透析膜中のミモシンの透過性に及ぼす塩類および酸類の影響

等モルの塩類とミモシンを透析膜に注入した時、その移行性は顕著に抑制された。Fig. Id-2にNaOHとKOHの影響を調べたものを示した。対照としてミモシンのみを透析膜に注入したものを示した。KCl, CaCl₂, NaClおよびCH₃COONaの様な中性塩の場合はFig. Id-3に示した様にミモシンの膜移行性にあまり影響を及ぼさなかった。Fig. Id-4には金属塩類のミモシン膜透過性に及ぼす影響を示した。MgCl₂, ZnCl₂およびMnCl₂はほとんど影響を及ぼさなかったが、FeCl₂, FeCl₃およびFeSO₄の様な鉄塩は顕著な抑制を示した。酸類の影響はFig. Id-5

i示した。HClおよび CH_3COOH は若干ミモシンの透過性を高めた。このことから、透析膜内にミモシンと共存する化合物はアルカリおよび鉄塩に限って30~40%も抑制するが、中性塩や酸類は影響しない事がわかった。次に透析膜内に5 mMミモシンのみを注入し、外液として等モルの各種塩類を用いたときのミモシン移行性を調べたものをFig. 1d-6に示した。外

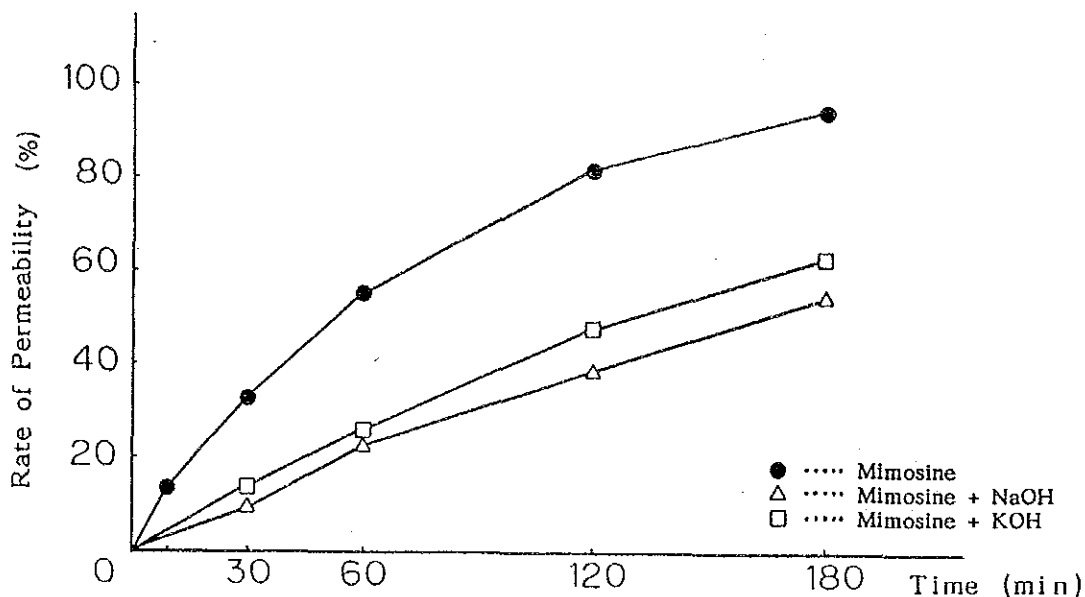


Fig. 1d-2 Effect of bases on permeability of mimosine in the dialysis membrane.

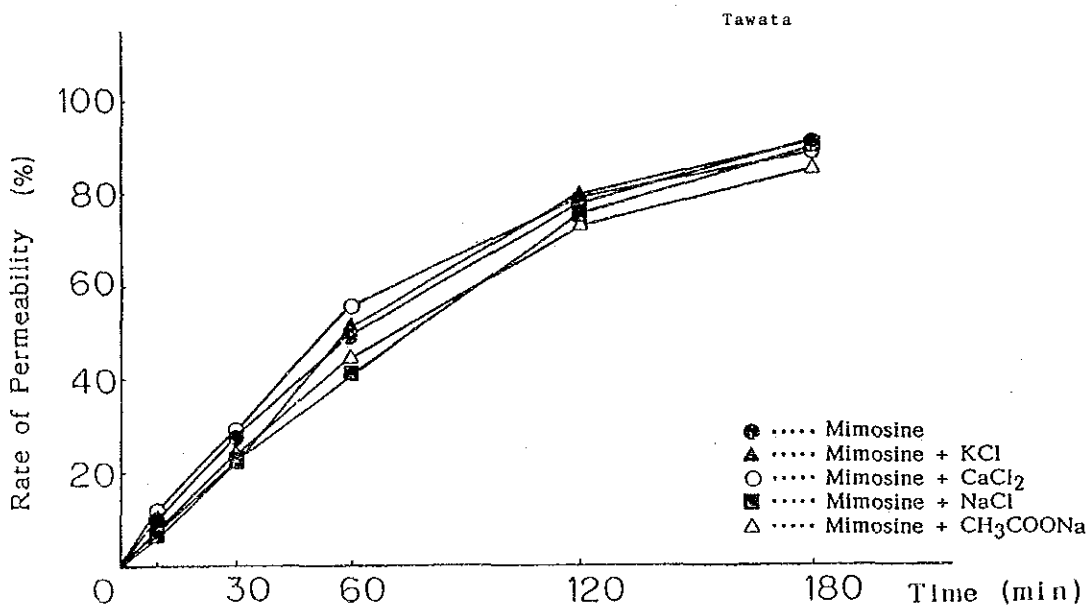


Fig. 1d-3 Effect of salts on permeability of mimosine in the dialysis membrane.

液として中性塩類のNaClやCH₃COONaを用いた場合は、内液同様にミモシン透過性にあまり影響を及ぼさなかった。FeCl₂やFeSO₄は内液にそれがある場合と同じ程度の抑制が見られたが、NaOHの場合は特に内液に入れたものより外液に入れたものの方がさらに20%程ミモシンの移行性を抑制することがわかった。外液がHCl及びCCl₃COOHの場合はミモシンの移行性を若干促進し、Fig. 1d-7に示した様に特にCCl₃COOHはその傾向が明確であった。

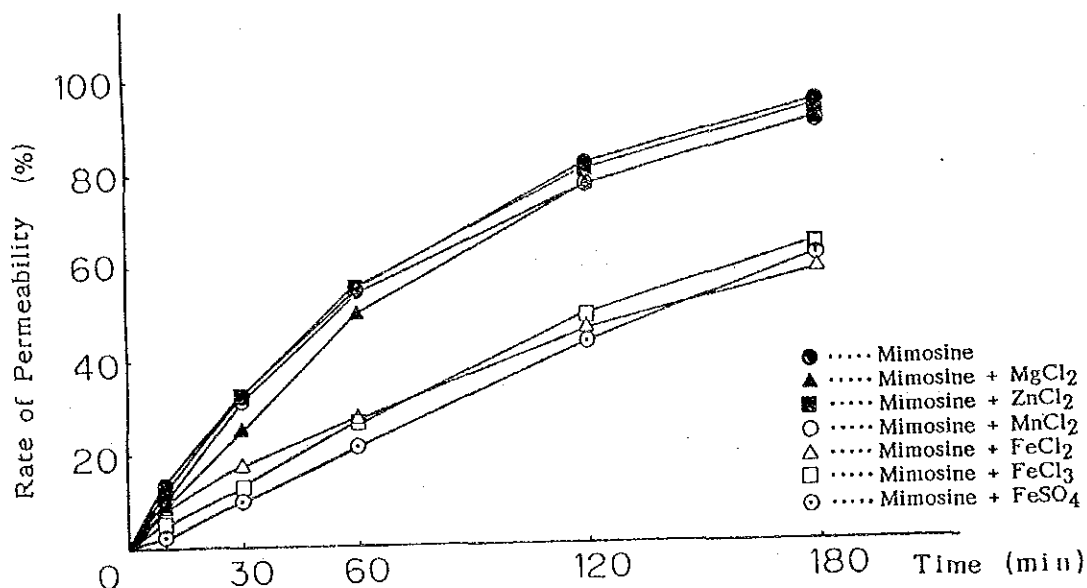


Fig. 1d-4 Effect of metal salts on permeability of mimosine in the dialysis membrane.

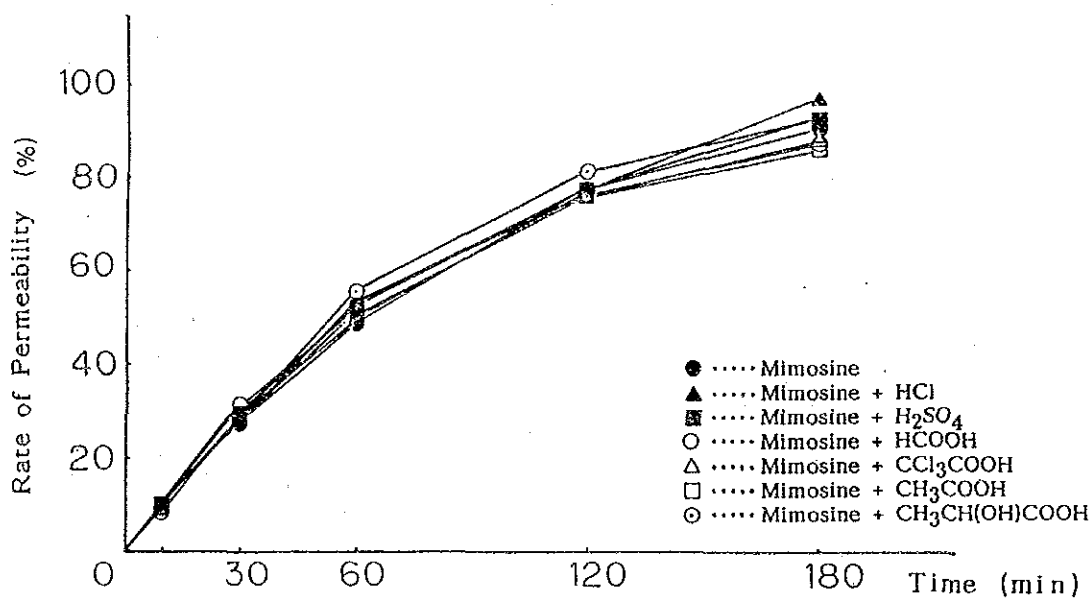


Fig. 1d-5 Effect of acids on permeability of mimosine in the dialysis membrane.

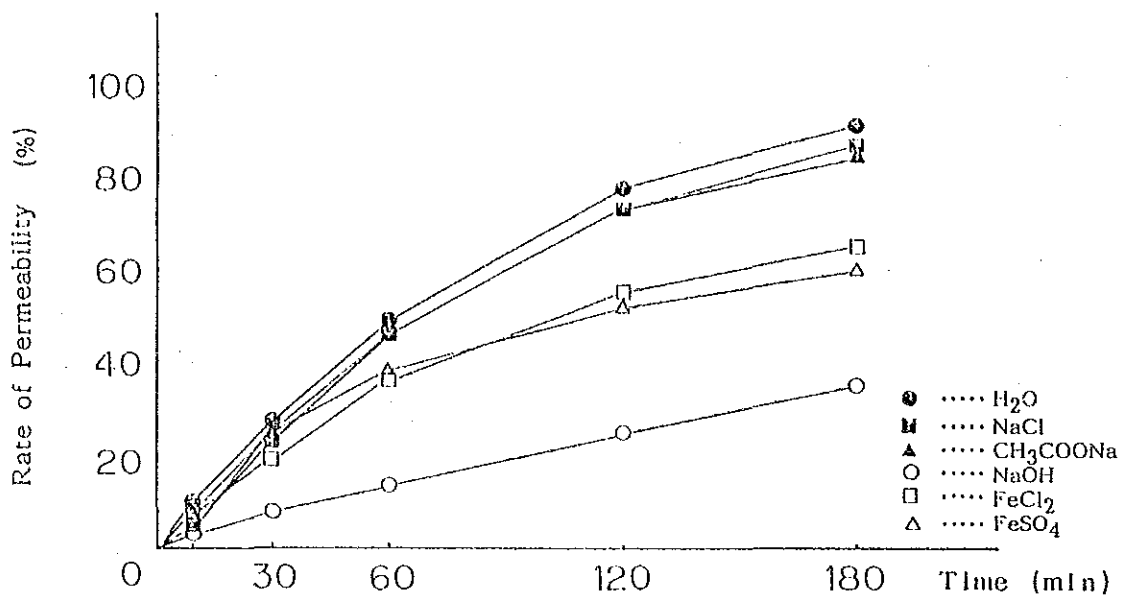


Fig. 1d-6 Effect of salts in the outside solutions of the membrane on changes of mimosine permeability rate.

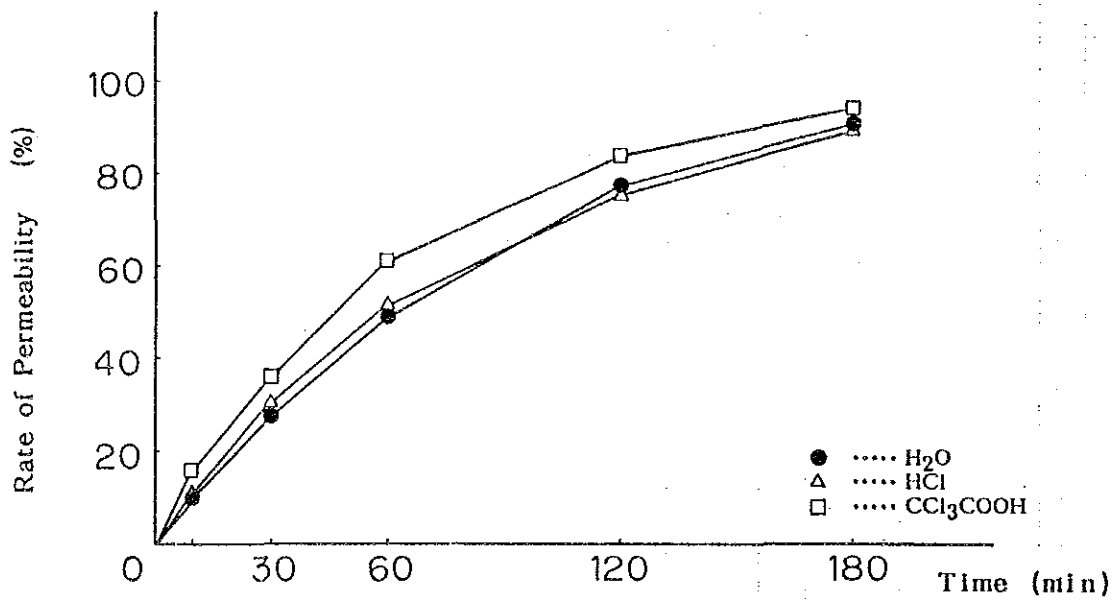


Fig. 1d-7 Effect of acids in the outside solutions of the membrane on changes of mimosine permeability rate.

2. 錯体の生成

Fig. 1d-8は0.025mMミモシンの紫外吸収スペクトルを左図に、また1mMの FeCl_3 とミモシンとを2 : 8で混合して生成する錯体の可視部吸収スペクトルを右図に示した。ミモシンは鉄と錯体を形成することにより460nmに極大吸収を有する様になり、キレート結合能のあることがわかる。Jobの連続変化法を用いてミモシンと鉄塩との混合比による最大錯体生成量を求めたものをFig. 1d-9に示した。この図からミモシン FeSO_4 との錯体生成率は混合比が6 : 4のとき最大であり、また FeCl_3 の場合には3 : 7のとき最大であることがわかった。Fig. 1d-10にはこのことから推定されるミモシンと FeSO_4 との錯体の推定構造式を示した。

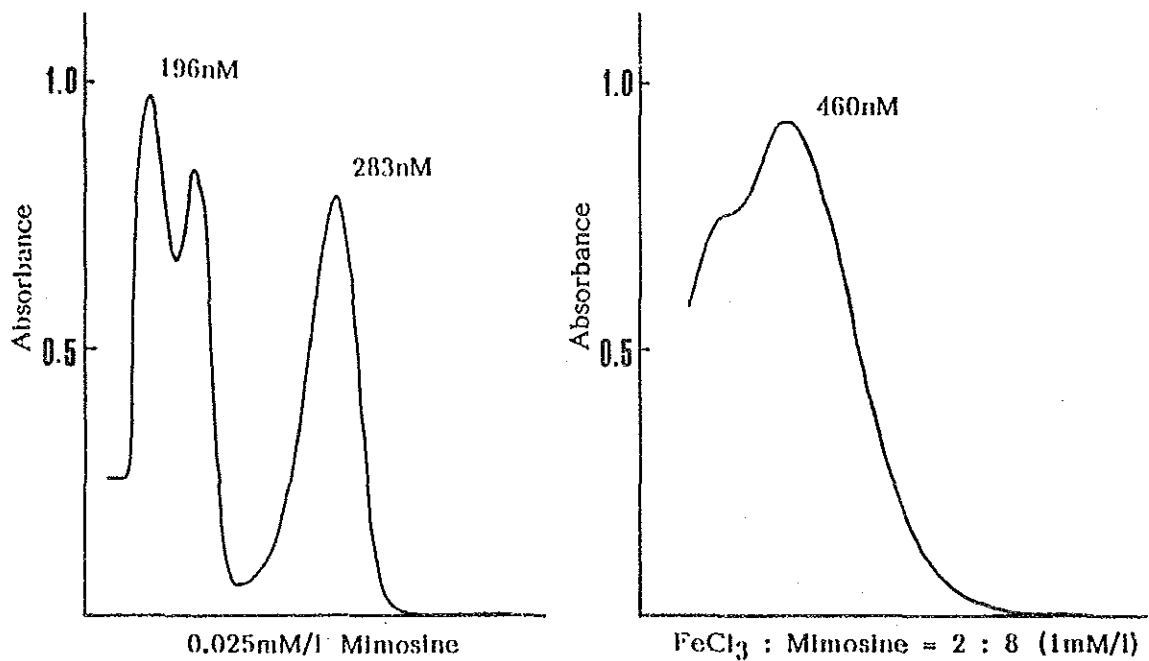


Fig. 1d-8 Ultraviolet and visible rays absorption of mimosine.

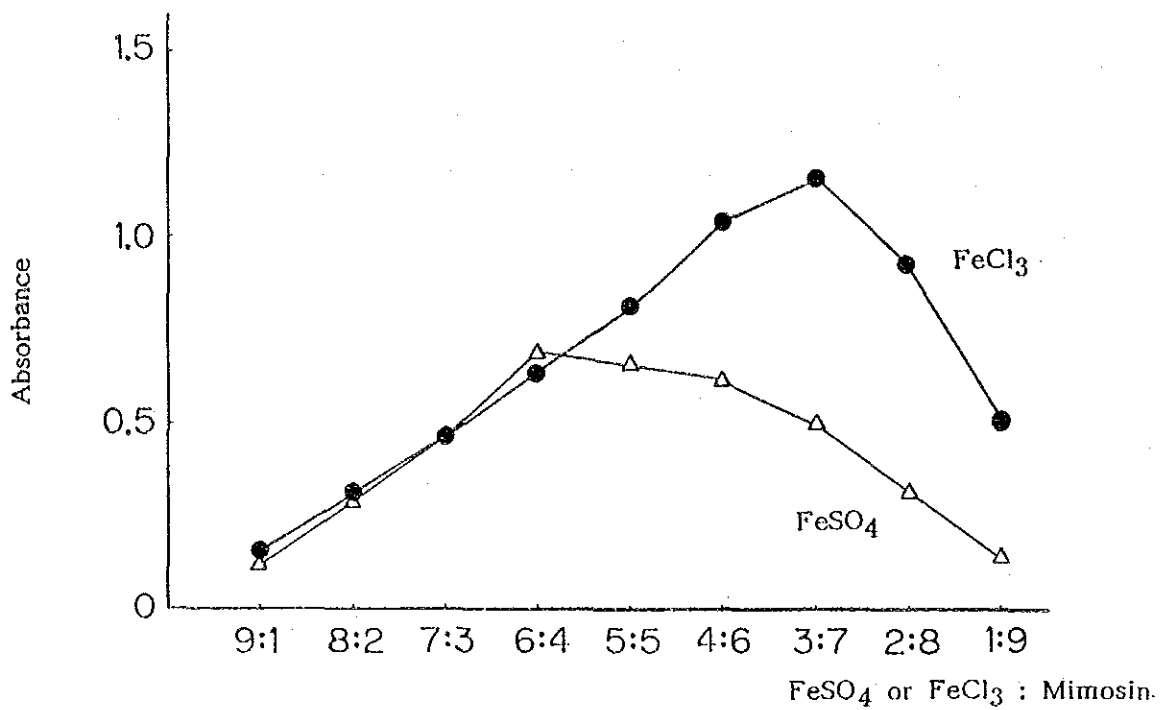


Fig. Id-9 Maximum formation rates of the complex between mimosine and metal ions.

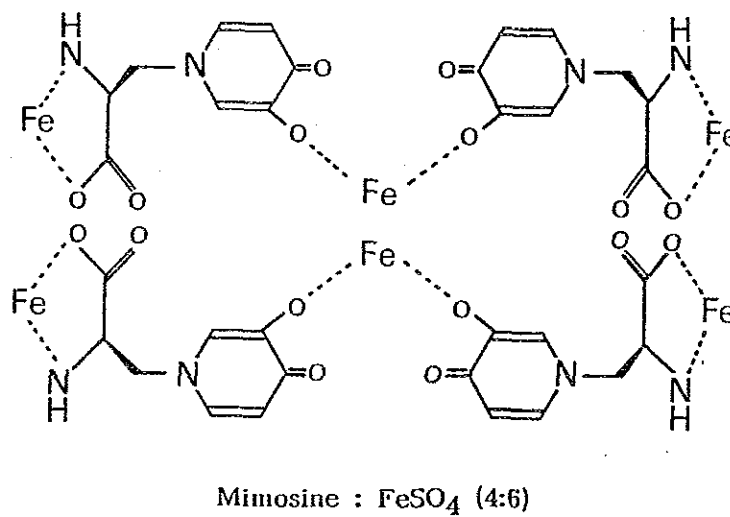


Fig. Id-10 Presumed chemical structure of the complex between mimosine and ferrous sulfate.

3. 豚小腸におけるミモシンの移行性

ミモシンと等モル、等量の酸類、塩類を豚小腸に注入し、内液中のミモシン含量の変化を経時的に調べた。その結果をFig. 1d-11と1d-12に示した。NaOHは透析膜の場合とは異なり、ミモシンの移行性にはほとんど影響を及ぼさなかった。中性塩のNaClや CH_3COONa もあまり影響しなかったが、 FeCl_3 および FeSO_4 は透析膜同様顕著にミモシン移行性を抑制することがわかった。また酸類のHClと CCl_3COOH は初期の30分程まではミモシン移行性を促進する傾向が見られた。 $\text{CH}_3\text{CH}(\text{OH})\text{COOH}$ は透析膜ではあまり影響をしめさなかったが、豚小腸ではかなり抑制する事がFig. 1d-12より解る。

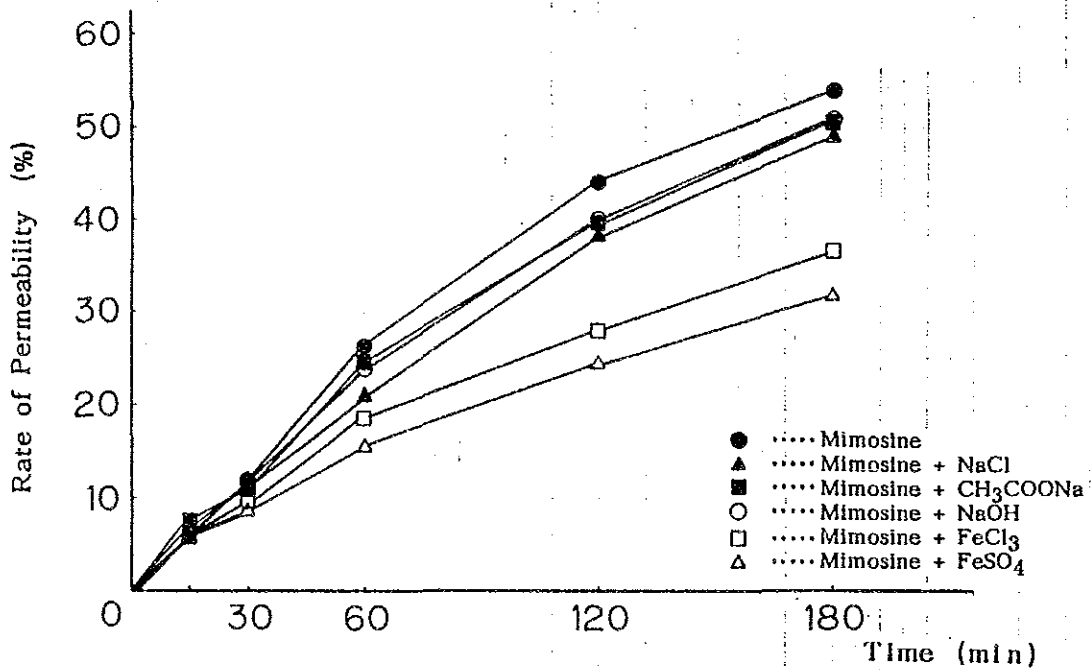


Fig. 1d-11 Effect of salts on permeability of mimosine in the small intestine of swine.

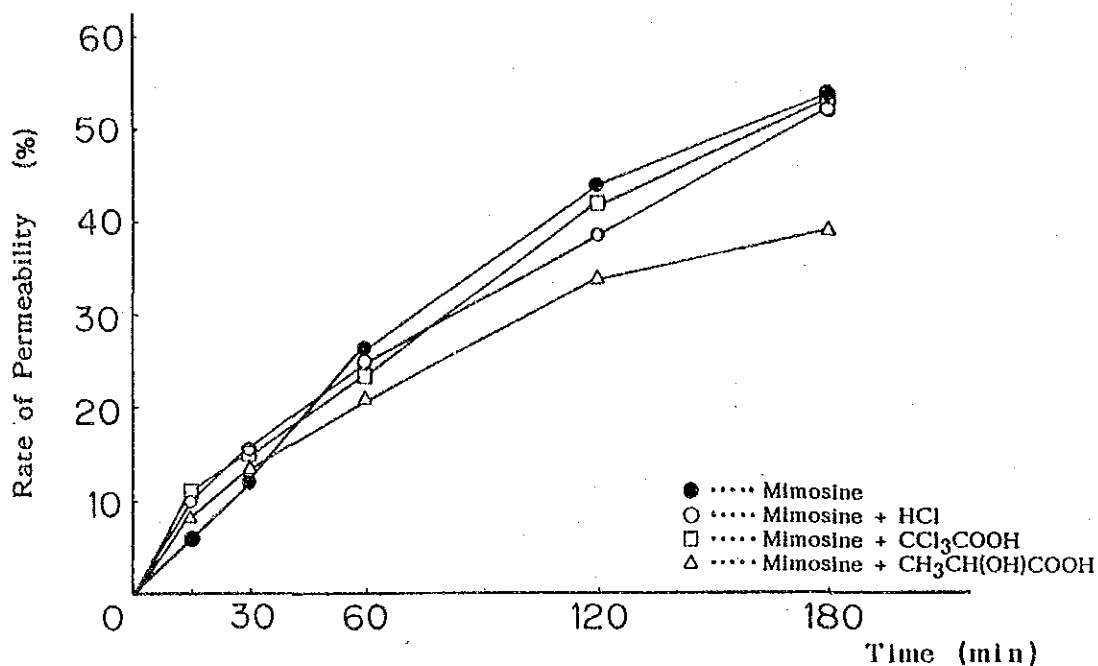


Fig. 1d-12 Effect of acids on permeability of mimosine in the small intestine of swine.

考 察

本研究の結果、ミモシンの膜移行性は薬品により大きな影響を受ける事がわかった。現在まで鉄の様にミモシンとキレート結合する化合物だけがイピルイピルの毒性を低減させるのに利用されてきたが、今後は有機化合物の中にも見出だされる可能性がある事が示唆された。反対にミモシンの移行性を促進するものもあり、透析膜ではHClとCH₃CH(OH)COOH、また豚小腸ではCCl₃COOHをあげる事ができ、これらの試薬を用い動物実験を試みるのも興味ある事と思われた。またこの簡易試験法は簡単に短時間に結果を得る事ができるので、FeSO₄以外にもっと効果的な化合物を見出だすための方法としても応用できると思われた。

引用文献

1. Matsumoto, H, E.G.Smith, G.D.Sherman Arch. Bio chem. Bio phys., 33 : 201-211, 1951
2. Acamovic, To, and J.P.F.D' Mello Leucaena Newsletter, 1 : 38, 1980
3. Acamovic, To, and J.P.F.D' Mello Leucaena Research Reports, 2 : 60-61, 1981

1e ミモシン自己分解酵素の影響

緒 言

イピルイピル中のミモシンは、ルーメン微生物¹⁾や加熱処理²⁾によって分解する事が知られている。また、本郷等³⁾はイピルイピルのサイレージ調整や各種有機酸類処理によってもミモシンは分解される事を報告している。最近、Lowry等⁴⁾はイピルイピルを細切した緑葉中に存在するある種の酵素の作用により、ミモシンは簡単にDHPに分解される事を報告している。無傷のイピルイピル生葉を70℃で10分間加熱すると80%のミモシンが分解されるとTangedjuja等⁵⁾は報告しているが、これも酵素の作用と思われる。DHPは家畜に甲状腺腫を引き起こす⁶⁾と報告されているが、ミモシンよりも低毒性であるので、何らかの方法でミモシンをDHPに変えた方がイピルイピルを家畜飼料とする際、実用的な価値があるものと思われる。本実験はイピルイピル中に存在する酵素を利用してミモシンを分解し、DHPに変換する事により安全な飼料が作成可能かどうかを検討した。

材料及び方法

1. 加圧法によるイピルイピル中のミモシンの減少

イピルイピル細切物を、サイレージ調整する事なしに室温と冷蔵庫中に埋蔵した時のミモシンの変化を調べた。イピルイピル緑葉部を3~5mmの長さに細かく切断し、ポリ袋に入れて密封したものを円筒形容器に重石をのせて埋蔵した。埋蔵してから0, 1, 2, 3, 5, 7, 14, 21日目にそれぞれポリ袋より5gの内容物を取り出し、0.1N HCl 150mlを加え、5分間冷却したのち、粉碎した。これを16,000rpmで遠心分離して得られた上澄液を0.1N HCl で100mlに定容し、HPLCでミモシン含量とDHP量を測定した。Fig・1e-1にはこの方法を図示した。次に重石の重量を0, 10, 20, 30, 40, 40及び、50g/cmに調節し、埋蔵中のミモシン量とDHP量の変化を測定した。また、イピルイピル緑葉部の切断の長さを大(5mm以上)、中(3~5mm)および小(3mm以下)の3試験区に分け、重圧法によるミモシンの変化を調べた。

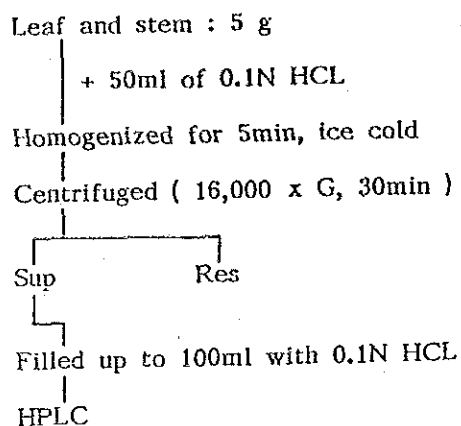


Fig. 1e-1 Analysis method of mimosine and DHP in Ipil-ipil.

2. イピルイピル緑葉中に存在するミモシン分解酵素活性の測定法

イピルイピル緑葉部40gにリン酸緩衝液 (pH7.0) 80mlを加え冷却しながら10分間ポリトロンでホモジナイズし、16,000rpmで遠心分離した。得られた上澄液を粗酵素液として、この液4mlずつを試験管にとり、60°Cで加温しながら経時的に取り出し、10%TCAで除蛋白後、遠心分離を行い、ミモシン量とDHP量を測定した。この方法はFig・1e-2に図示した。

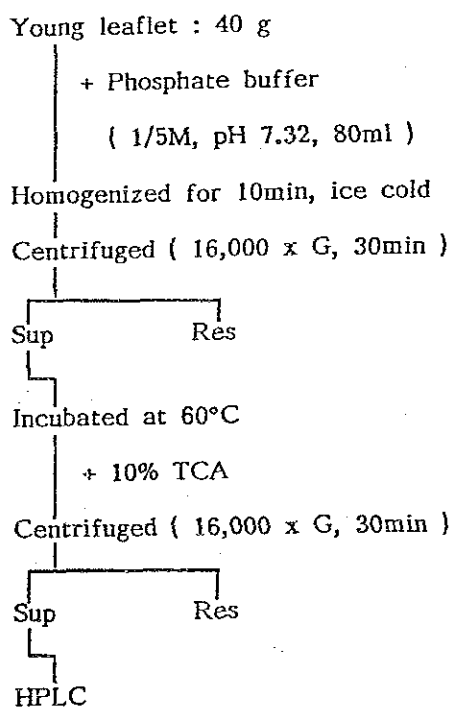


Fig. 1e-2 Measurement of activity of the mimosine degradation enzyme in Ipil-ipil

3. イピルイピル緑葉部に対する粗酵素液の影響

イピルイピル緑葉部200gに水400mlを加え、水抽出粗酵素液を作り、この液50mlにイピルイピル細切物1gを浸漬させ40℃で加温しながら、上澄液のミモシン量とDHP量を経時的にHPLCで測定した。この略図をFig・1e-3に示した。

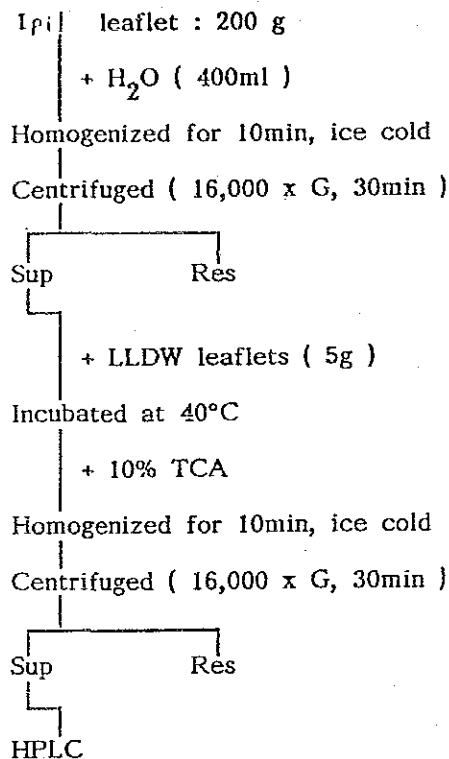


Fig. 1e-3 Extraction of the mimosine degradation enzyme from Ipil-ipil.

結 果

1. 加圧法によるイピルイピル中のミモシン、葉 DHP及びpHの変化

Fig・1e-4はイピルイピル緑葉部を細切した直後のミモシン量を100とし、DHPを0とした時の加圧法による経時変化を示している。左縦軸はミモシン量及びDHP量、右縦軸はpH値、横軸は日数を表している。ミモシン量は日数とともに減少し、7日目に76%、28日目で90%のミモシンが減少し、それ以降はほぼ一定の値を示した。pHは調整時6.2であったが、埋蔵後低下し始め、7日目に6.0、21日目に5.7となり、28日以後は一定の値を示した。

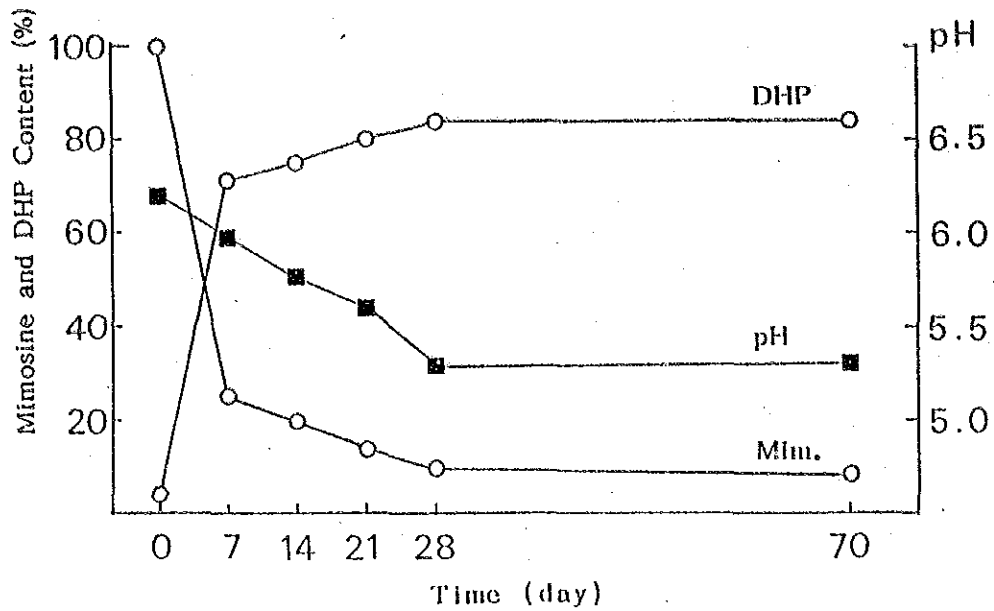


Fig. 1e-4 Changes in pH, mimosine and DHP under the pressure conditions.

2. 低温下での加圧法によるミモシンの減少

Fig. 1e-5 は加圧法により冷蔵庫内で10℃に保ったまま埋蔵した時のミモシンとDHPの変化を示したものである。埋蔵5日目までは、ミモシン含量、DHP含量ともに大きな変化はなく、埋蔵21日目までに約35%のミモシンが減少し、約30%のDHPが生成した。室温(25℃)で同様の実験を行なったものをFig. 1e-6 に示した。ミモシンの分解は7日目で最大となり、それ以後はほとんど変化がなかった。

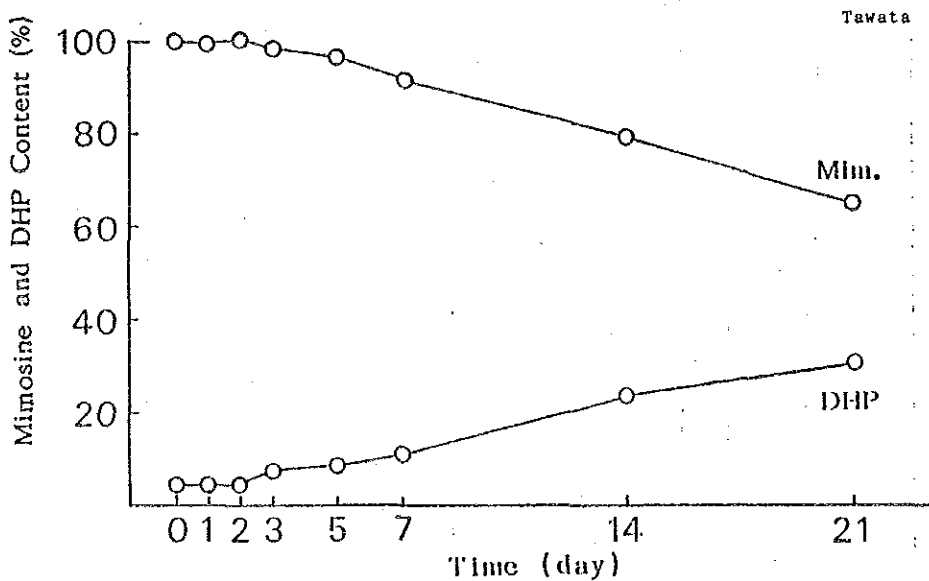


Fig. 1e-5 Changes in mimosine and DHP in the case of the standing at 10°C.

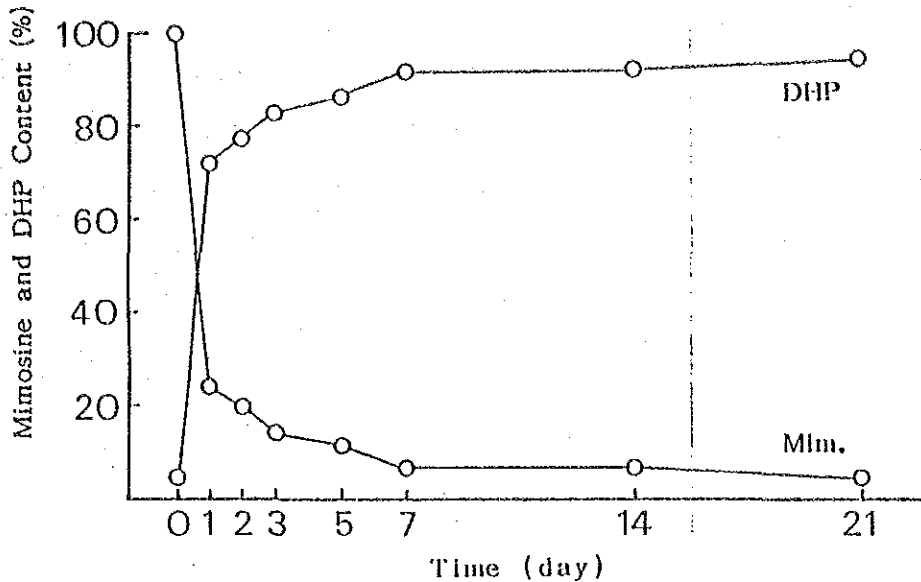


Fig. 1e-6 Changes in mimosine and DHP in the case of the standing at room temperature (25°C).

3. 重石の重量によるミモシンの減少

Fig. 1e-7は重石を0, 10, 20, 30, 40, 50g/cm²になる様に調節した場合のミモシン含量の変化を調べたもので、最もミモシンの減少に効果的なものは40g/cm²であり、21日目で約86%のミモシンが減少した。重石をのせない試験区では、埋蔵後ミモシン含量は加圧した試験区よりゆるやかに減少した。なお、この試験区は14日目以降カビが生じ、腐敗の徴候が見られた。Fig. 1e-8は同様にDHPの生成の様子を表したグラフで、同じく40g/cm²の試験区でDHPの生成量は最も高く、21日目で約85%が生成された。Fig. 1e-9は加圧法による各試験区のpHの変化を示している。重石をのせない試験区は埋蔵後直ちにpHが低下し始め、7日目以降は一定の値を示した。重石をのせた試験区は、埋蔵後3日目に急激に低下し、その後徐々にpH値は低くなった。Fig. 1e-10はイピルイピル緑葉部の切断の長さを変えた場合のミモシン含量とDHP含量の変化を示している。切断の長さを5mm以上、3~5mm、3mm以下の3試験区に分けた場合、切断の長さが小さくなるにつれて、ミモシンの減少率は高くなり、DHPは増加した。しかし、3試験区とも埋蔵後7日目までは5%程度の有意差が認められた。14日、21日目ではあまり有意の差があるとは思えなかった。Fig. 1e-11は、緑葉部から抽出した粗酵素液のミモシン分解活性を調べた結果を示している。ミモシンの減少は実験開始後急激に進行し、30分で70%となり、その後はほぼ一定の値を示した。DHPも同様に短時間で生成し、その後はほぼ一定の値を示した。Fig. 1e-12は、水で抽出した粗酵素液がイピルイピル細切中のミモシン含量に及ぼす

影響を調べたものである。ミモシン含量は反応後30分で4%，120分で35%と除々に減少している。

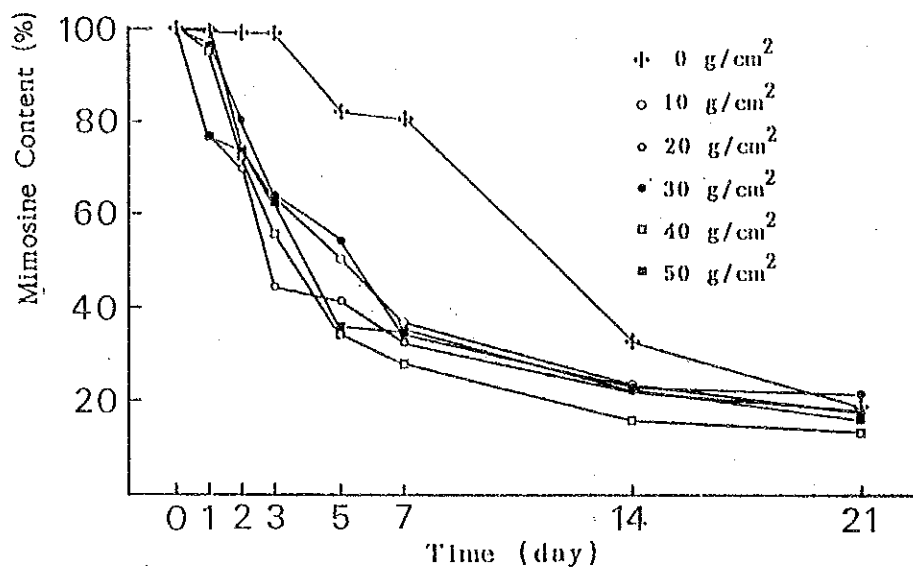


Fig. 1e-7 Changes in mimosine under the different pressures.

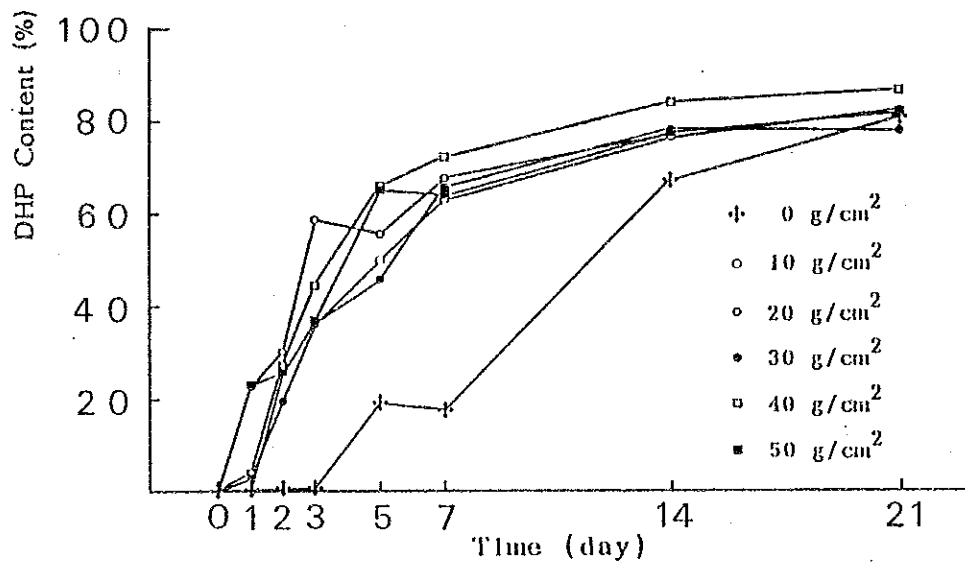


Fig. 1e-8 Changes in DHP under the different pressures.

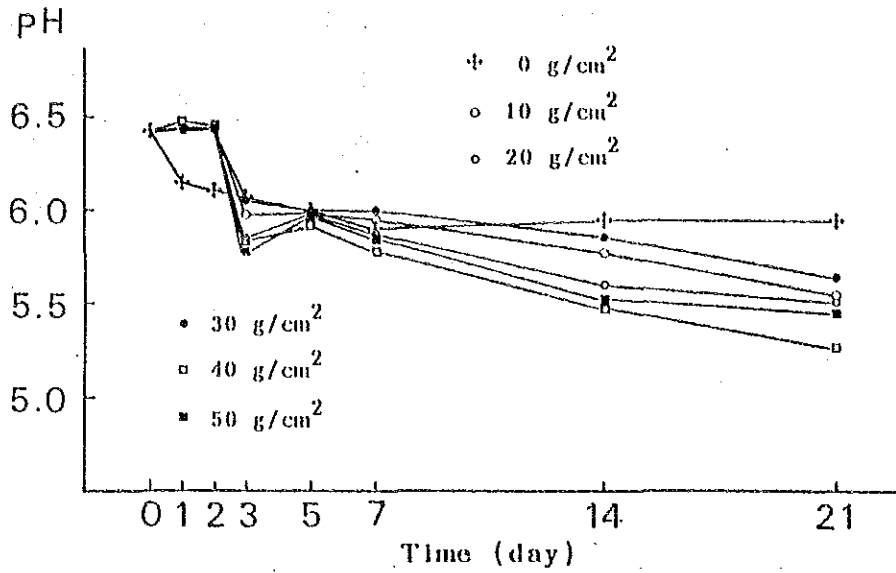


Fig. 1e-9 . Changes in pH under the different pressures.

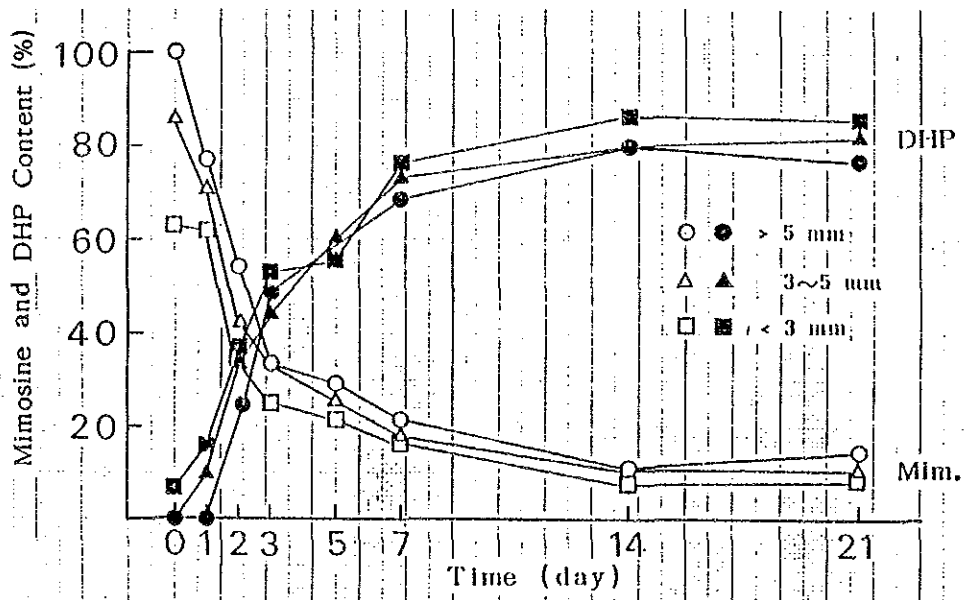


Fig. 1e-10 Changes in mimosine and DHP under the different cutting sizes.

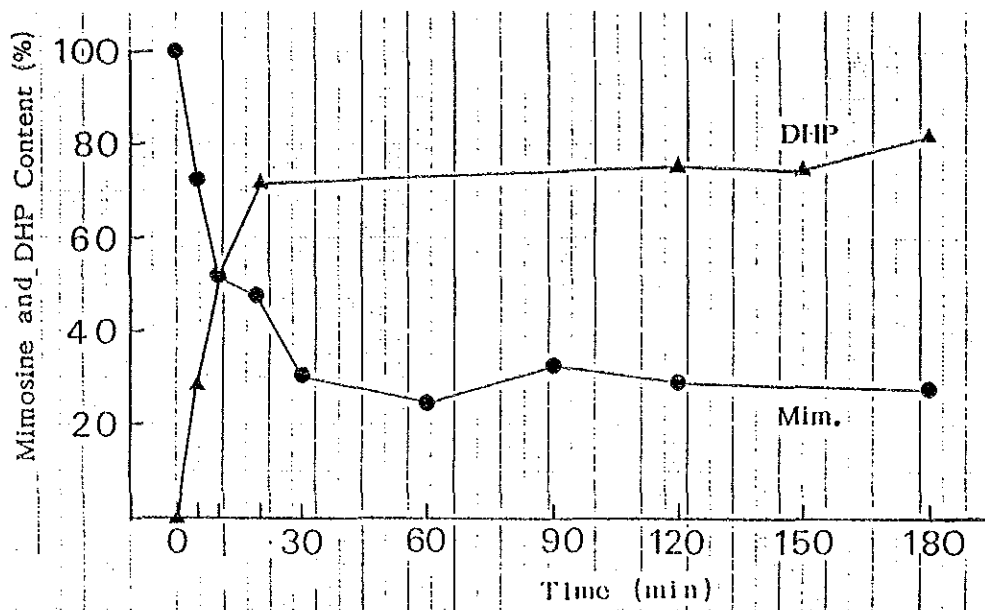


Fig. 1e-11 Effect of incubation time on mimosine degradation.

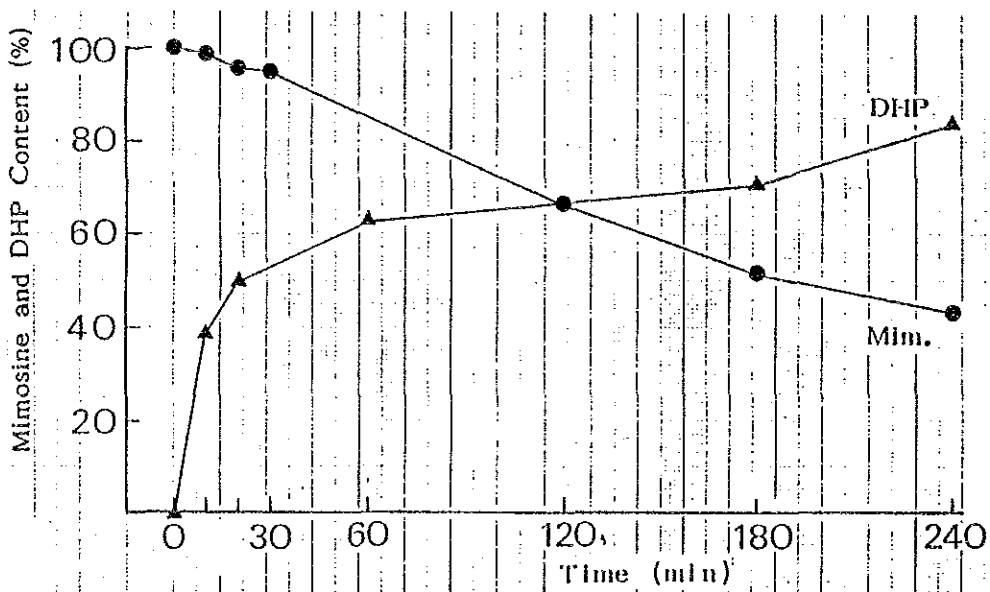


Fig. 1e-12 Effect on mimosine degradation by extracts from Ipil-ipli leaves.

考 察

この実験によりイピルイピル緑葉部にはミモシン分解酵素が存在する事が確認された。またミモシン分解の程度は、温度や重石の重さ及び、切断の長さによって差がある事も確認された。水抽出による粗酵素液は活性の程度は低かったが、イピルイピル細切物中のミモシンを分解する事が明らかとなった。

引用文献

1. Tangendjaja, B., J.P.Hogan, R.B.H., Wills Aust.J.Agrtc.Res., 34 : 289-293, 1983
2. Smith, L.K., and L.Fowden J.Exp.Bot., 17 : 750-760, 1966
3. 本郷富士弥, 多和田真吉, 渡辺由美, 城間定夫, 日畜会報, 5 : 000-000, 1986 印刷中
4. Lowry, J.B., Natyanto and B.Tangendjaja J.Sct.Food Agric., 34 : 529-533, 1983
5. Tangendjaja, B., J.B.Lowry, and R.B.H.Wills, J.Sct.Food Agric., 35 : 613-616, 1984
6. Hegarty, M.P., C.P.Lee, G.S.Christie, R.D.Court, and K.P.Haydock Aust.J.Biol. Sct., 32 : 27-40, 1979

II ミモシン分解に伴う分解生成物の毒性の検討 およびその除去法

緒 言

ミモシンの分解生成物 3-ヒドロキシ-4 (1H) ピリドン (DHP) は家畜及びマウスに対して甲状腺腫を引き起こす事が知られている¹⁾。現在までのイピルイピルの飼料利用法としては牛に対し30%、豚で10%、鶏では5%以下の給餌は家畜の成長に対する悪影響はないと報告されている。この様にイピルイピルを畜種別に制限して給餌する方法 以外に、茎葉部の熱処理²⁾によるミモシン減少法、ミモシン分解酵素を利用する方法³⁾、茎葉部に鉄塩⁴⁾を添加してミモシンの錯体生成による体内吸収阻止などが報告されている。しかしこれらの方法はいずれも有効成分の損失やDHPの生成、鉄の過剰摂取などの点からまだ問題があるものと考えられている。本研究はイピルイピルの蛋白質の損失なしにミモシン及びDHPを効果的に除去し、安全な飼料として利用できる様する事を目的として行なわれたものである。

材料及び方法

0.1N濃度の塩類、酸類の各1ℓ溶液中に、イピルイピル茎葉部100gをナイロン製袋に詰めたものを室温で24時間浸漬し、容出されたミモシンおよびDHP、まだ処理イピルイピル中の残存ミモシンおよびDHPをHPLCで同時定量し、無処理イピルイピル中のミモシン含量と比較した。また浸漬前と浸漬後の一般成分の変化を調べ粗蛋白質の損失の程度を調べた。

結 果

家畜にイピルイピルを給餌するためにはミモシンの除去あるいは分解が必須条件である。現在までに知られているイピルイピルの効果的な無毒化法としては鉄塩添加および加熱処理法があるが、ミモシン分解産物DHPの生成が新たな問題となっている。Table II-1は無処理イピルイピル中のミモシン含量を100%とした場合、水、塩類、および酸類の0.1N溶液中にイピルイピルを25℃、24時間浸漬した後のミモシン残存量をHPLCで分析した結果を示している。表からは水だけで処理した方が最も効果的で92.8%ものミモシンが除去される事が確認された。金属塩類であるCuCl₂、ZnCl₂、FeCl₂、FeSO₄などはむしろミモシン溶出性を抑制する様であった。NaCl、KClおよびCuCl₂などよりもCH₃COONaおよび有機酸類の方がミモシン溶出性に効果的であ

った。NaOHはイピルイピルを変色させる事と、処理後多量の水で洗浄しないといけない事から酢酸ナトリウムおよび多量に存在する海水を、用いて重点的に検討する事にした。Fig. 1f-1は無処理イピルイピル中のミモシン含量を100%とした場合、0.01~1.0N酢酸ナトリウムおよび0~100%濃度の海水中に25℃、24時間浸漬した場合のミモシン残存量を示したものである。この図からは0.05N酢酸ナトリウムが最も効果的であった。60%の海水を用いた場合90.1%のミモシンが除去でき、水を節約するには海水の利用も有効な方法と思われた。Fig. 1f-2にはミモシンとDHPをHPLCで分析した場合の典型的か一例を示してある。左側のグラフは0.05N酢酸ナトリウムにイピルイピルを25℃で24時間浸漬した場合、溶出液をそのままHPLCで分析した結

Table 1f-1 Mimosine reduction by the leaching method with each 0.1N solution.

Untreated Ipil	100 (%)
H ₂ O	7.2
HCl	31.2
NaOH	3.6
NaCl	12.0
KCl	13.2
CaCl ₂	13.2
CH ₃ COONa	8.7
CuCl ₂	31.5
ZnCl ₂	39.4
MgCl ₂	10.7
FeCl ₃	36.1
FeSO ₄	27.4
Formic acid	11.6
Acetic acid	8.8
Lactic acid	7.8
Fumaric acid	10.2
Succinic Acid	8.2
Malic acid	10.2
Tartaric acid	11.2

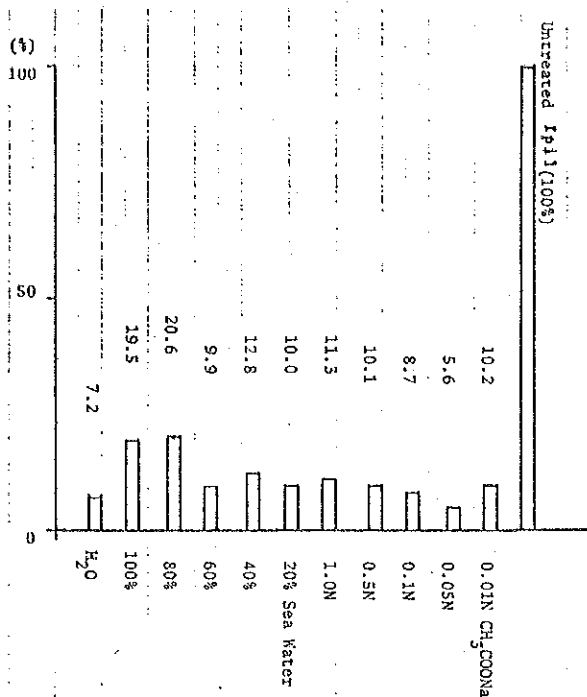
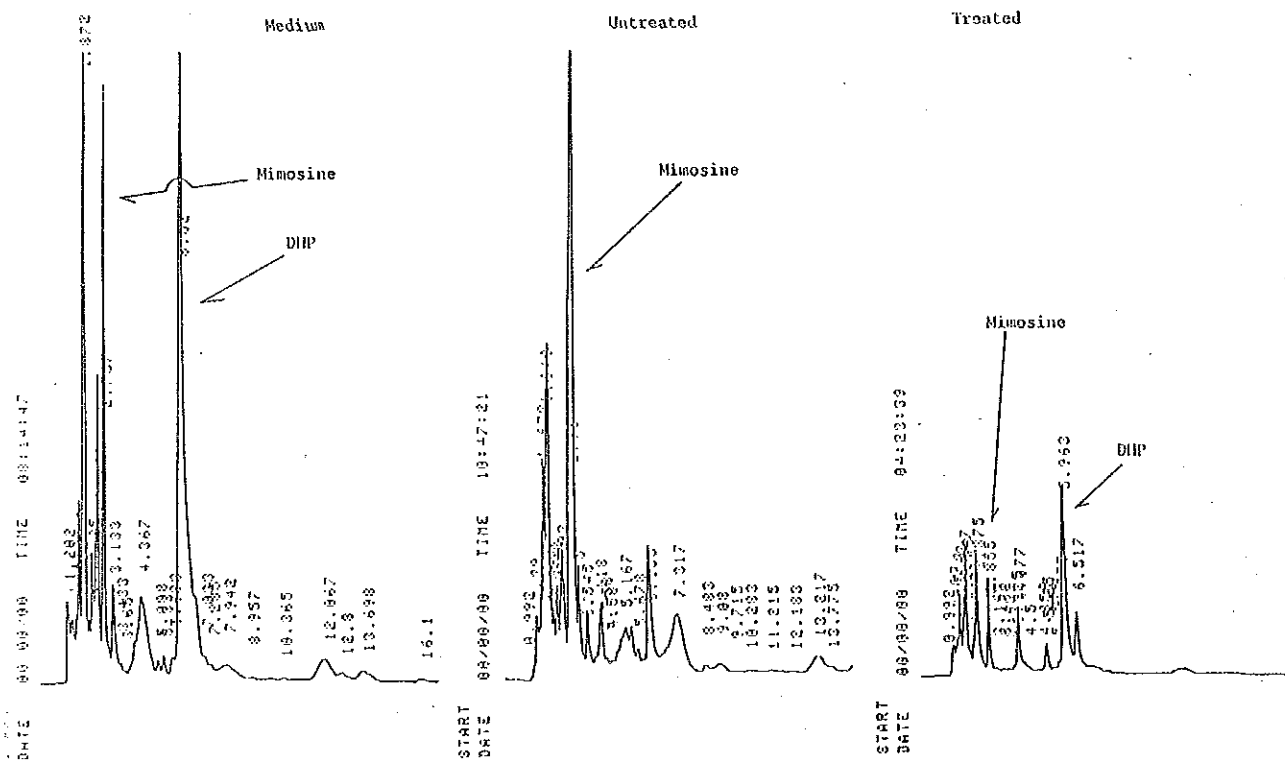


Fig. If-1 Mimosine reduction by the leaching method with sea water and CH₃COONa.



果を示している。真中のグラフは無処理のイピルイピルを分析したものを示しているが、この中にはDHPが存在しない事がわかる。多量のミモシンが浸漬中に自動的にDHPにまで分解される様であり、これはイピルイピル内のミモシン分解酵素のためと思われた。右側のグラフからは浸漬後には処理イピルイピル中にほんの少量のミモシンとDHPが存在する事を示している。ミモシンの残存率は4.5%であり、ほとんどのDHPも溶液中に移行する様であった。Fig. If-3は0.01N~1.0N酢酸ナトリウムおよび水溶液中にイピルイピルを浸漬した場合、溶媒中のミモシン、DHPおよびイピルイピル中の残存ミモシン、DHP量を分析した結果を示している。イピルイピル中のDHP生成量は水処理よりも0.05N酢酸ナトリウム処理の方が約半分程少なく、DHPの毒性も考慮するのならば0.05N酢酸ナトリウムを用いる浸漬法は最も効果的であり、より安全な飼料が作成できる事が確認された。Table If-2は、0.05N酢酸ナトリウムで処理したイピルイピルと無処理のイピルイピルの一般成分分析を比較したものを示している。浸漬処理すると全体的に3%程度、重量が減少した。成分的には灰分4.1%、可溶性無窒素化物1.8%、粗蛋白質が0.9%減少した。家畜飼料としての栄養源である粗繊維、粗脂肪は、それぞれ4.7%及び2.1%相対的に増加していた。イピルイピル中には微量の遊離アミノ酸、及び1%程度のミモシンが含まれており、K, Ca, P, などの無機イオンと共に溶液中に溶脱されるものと考えられ、細胞質内に存在する蛋白質の様な高分子は、ほとんど溶脱されないものと考えられた。

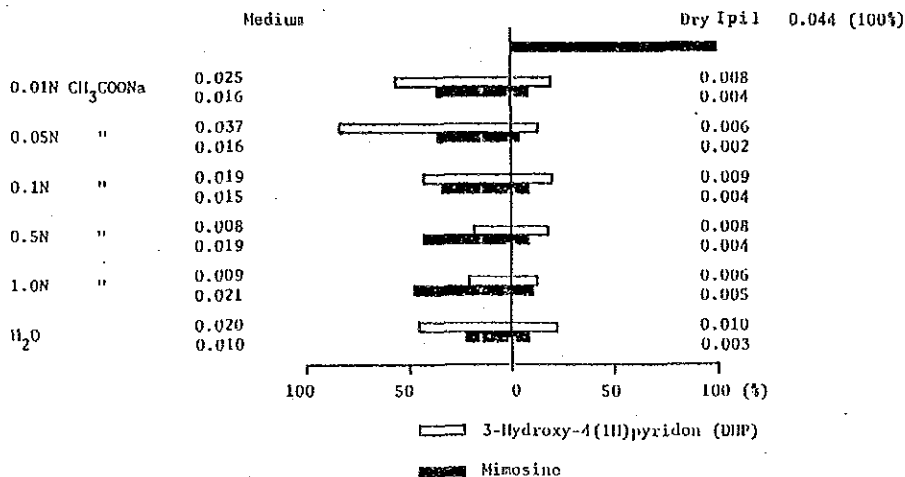


Fig. If-3 Analyses of mimosine and DHP in the extract solutions and treated Ipil-ipil leaves.

Table 1f-2 General composition of untreated and treated Ipil-ipil.

	Crude ash	Crude fiber	Crude fat	Crude protein	Water soluble Carbohydrate	Mimosine (%)
Treated Ipil	5.4	17.8	8.3	20.8	47.7	5.6
Untreated Ipil	9.5	13.1	6.2	21.7	49.5	100

Ipil : Loucenn loucocephala de Wit

Untreated : Dry basis Ipil leaves

Treated : Ipil leaves was leached in 0.05N CH_3COONa for 24 hrs at 25°C

考 察

以上の研究により沖縄県にも至る所に自生して野生化している未利用資源イビルイビルは浸漬処理法によりミモシンを約95%も除去でき、また、家畜飼料としての栄養源である粗繊維、粗脂肪、粗蛋白質の損失がほとんどないことから今後はイビルイビルを100%利用することも可能である事が示された。浸漬法はSzyzka等⁵⁾も検討してみた様であるが詳しくは報告していない。この方法は比較的簡単であり、DHPの除去も兼ねることから最も優れた方法と思われる。農家における小規模な処理法から企業による大規模生産まで応用できる実用的な方法であると思われた。

引用文献

- 1) Hegarty, M. P., C.P.Lee, C.S.Christie, R.D.Court, and K.P.Haydock
- 2) Tangendjaja, B., J.B.Lowry, and B.H.Wills J.Sci.Food Agric., 35 : 613-616, 1984
- 3) Lowry, J.B., Maryanto, and B.Tangendjaja J.Sci.Food Agrica, 34 : 529-533, 1983
- 4) Matsumoto, H., E.G.Smith, G.D.Sherman Arch.Biochem.Biophys., 33 : 201-211, 1951
- 5) Szyzka, M., U.T.Meulen, and E.H.A.El-Harith Leucaena Reseach Reports, 4 : 13, 1983

Ⅱ イピルイピル貯蔵法の確立及び実用化のための給与基準の作成

Ⅱ a イピルイピル茎葉部のサイレージ調製

.....琉球大学農学部 本郷富士弥

Ⅱ b ミモシン含量を減少させたイピルイピルの動物に対する給与基準の検討

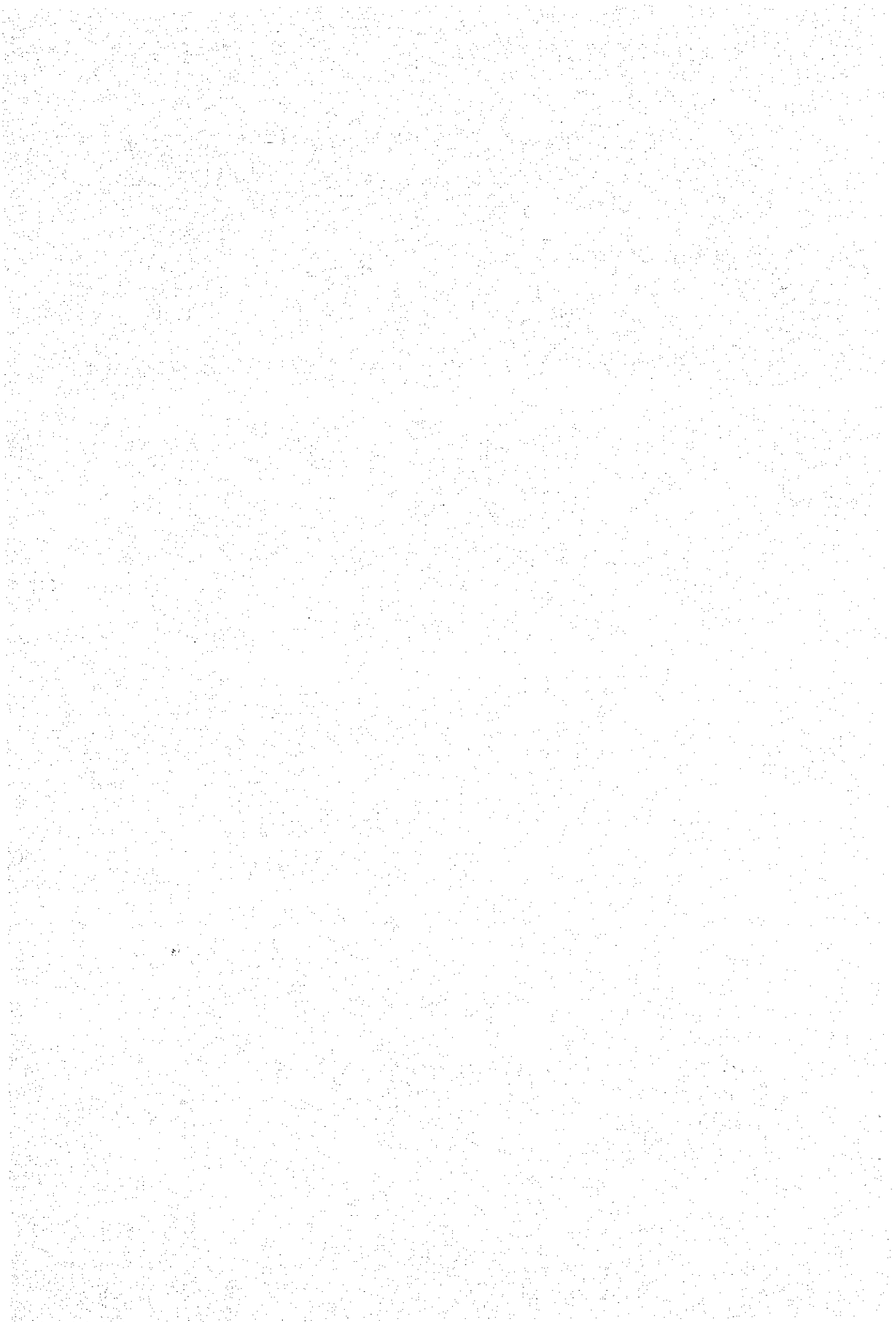
.....琉球大学農学部 砂川勝徳

Ⅱ c 給与動物における病理組織学的所見

.....琉球大学農学部 川島由次

Ⅱ d ペレットマシンの改良，試作

.....株式会社中島農畜産研究所 水沢荘太郎



II a イピルイピル茎葉部のサイレージ調整

緒 言

牧草や飼料作物は、刈り取ったまま放置しておくとも微生物の作用によって急速に腐敗が進行する。よって、このような材料を乾燥して水分含量を15%程度以下に調整した乾草は、長期間安全に貯蔵することができるものの熱帯地域における天日乾燥は、天候に影響されやすく、また機械的に熱源を使用する乾燥は経済的に問題が残るものと考えられる。特にイピルイピルのような材料を用いて乾燥材料を調整しても、比較的熱に安定であるミモシンシの効率的な減少ははかりにくいであろう。たとえば、Matsumotoら¹⁾は、茎葉部を85°Cで48時間連続的に過熱しても、約65%のミモシンが減少したにすぎないことを報告している。これまでにミモシンは、Rumen内微生物群によって3-hydroxy-4-(1H)-pyridone (DHP) に分解されることが良く知られている²⁾。このことから、本試験ではこれまでに報告されていないギンネム茎葉部のサイレージを調製することによって、その発酵過程における種々の化学成分とミモシン含量の測定を行ない、貯蔵飼料としての利用価値とミモシンの減少効果の有無について検討した。

材料および方法

1. 材料

1985年7月下旬に本学農学部近傍に自生している高さ約2.3mのイピルイピル灌木林より茎葉部（直径約1.5cm程度の茎部）を採取した。なお、本材料の主な化学組成は表1に示すとおりである。

Table 1. Chemical composition of ensiled LLDW materials (%)

	Moisture	Crude protein	Crude fat	Nitrogen free extract	Crude fiber	Crude ash	Water soluble carbohydrate	Mimosine
Wet basis	65.8	6.6	1.6	17.0	6.3	2.7	1.4	0.9
Dry basis	—	21.8	5.6	50.7	12.8	9.1	4.1	2.6

LLDW: *Leucaena leucocephala* de Wit

2. サイレージの調製

イピルイピル茎葉部は、採取後直ちに5~10mmに切断し、そのままの区(対照区)および生重量当たり糖蜜を2.5, 5, 10および15%添加した試験区に区分けし、Kemble³²の方法に準じ1ℓ容のガラスびんを用いて調製した。各試験区は、詰め込み時および詰め込み後、7, 14, 21および70日間経過した後に各サイロを1基ずつ開封して各種成分の分析を行った。

3. サイレージの分析

サイレージの分析は、次の方法によった。すなわち、pHは試料約10gに水20mlを加え、24時間冷所において得られた抽出液をpHメーターで測定した。水分は100℃、18時間通風乾燥³³によって恒量を求めた。乳酸はBarnett⁵²の改変したBarker-Summerson法⁵²によって比色定量した。揮発性脂肪酸は、水蒸気蒸留を行って得られた溜出液を0.1N水酸化ナトリウムで滴定した後、滴定液に少量のアルカリを滴下し蒸発乾固後、リン酸を加えてエーテル抽出を行った液についてガスクロマトグラフ(日立, 073型)により定量した。

ミモシン含量の測定は、以下の方法によった。すなわち、試料5gに50mlの塩酸を加え、冷却しながらホモゲナイズ後、遠心分離(16,000xg, 30分)し、上澄液を残渣とに分け、残渣についてさらに同じ操作を3回くり返し、得られた上澄液を合せてミモシンの抽出液とした。この抽出液を0.1N水酸化ナトリウム溶液で中和した後、50℃以下で減圧乾固した。さらにこの乾固物をアミノ酸分析用の試料希釈液であるクエン酸緩衝液(pH2.2)にて一定量(50ml)とし、その0.5mlをアミノ酸自動分析装置(日立液体クロマトグラフ, 034型)に注入し、クエン酸緩衝液(pH3.25, pH4.25およびpH5.28の3種類)を3段階溶出することによるワンカラム法(カラム: 9×400mm, イオン交換樹脂: HITACHI Cuslum#2611, 緩衝液流速: 60ml/hr, ニンヒドリン流速: 30ml/hr, カラム温度55℃, 波長: 440nm, 570nmおよび640nm同時測定)によりミモシンの分析を行った。得られたクロマトグラフは、あらかじめ同一条件で分析した標準のクロマトグラフと比較し、溶出位置によりミモシンを定性し、またいわゆるHW法によりミモシン含量を算出した。

試験結果および考察

1. サイレージ埋蔵過程における発酵成分の変化

サイレージ調製に供したイピルイピル材料の詰め込み時における水分含量は、約66%であった。図1に各試験区の埋蔵期間の経過に伴うpH値、有機酸含量の経時的变化を示した。詰め込み時におけるpH値は、各試験区とも6.3でありいずれも埋蔵期間の経過に伴って低下した。しかし、対照区、2.5%および5%糖蜜添加区におけるpH値の低下は緩慢であり70日目でも5.3~5.5の範囲で高い値を示していた。一方、10%および15%糖蜜添加区におけるpH値は、埋蔵後直ちに低下し7日目でそれぞれ4.4および4.0であり、10%糖蜜添加区では、21日目から4.0まで低下し70日目までの変化はほとんどみられなかったが、15%添加区では7日目以降安定した値を示した。

有機酸含量は、対照区、2.5%および5%糖蜜添加区などでは70日間埋蔵しても、乳酸含量はそれぞれ0.25、0.30および0.70%と極めて低い値を示し、酢酸含量もそれぞれ0.20、0.23および0.22と各試験区ともほぼ同じ値を示し対照区では若干の酪酸の生成が認められた。一方、10%および15%糖蜜添加における有機酸含量は7日目までの増加が著しく、乳酸含量はそれぞれ2.24および2.4%を示し、15%添加区では14日目で3.20%となり、その後70日目まで目立った変化はみられなかった。酢酸含量は、10%添加区では14日目で0.22%、15%添加区では7日目で0.22%を示しその後安定した値を示していた。

これらのことから、イピルイピル茎葉部を材料としてサイレージを調整する場合、糖蜜を添加することが必要であり、その添加量は少なくとも原材料に対し10%程度の添加量が必要であるものと考えられた。10%添加区では埋蔵後21日目より、また15%添加区では埋蔵後14日目より、それぞれpHおよび有機酸含量ともに安定した値を示し、芳香性の酸臭を有する良質のサイレージが得られた。

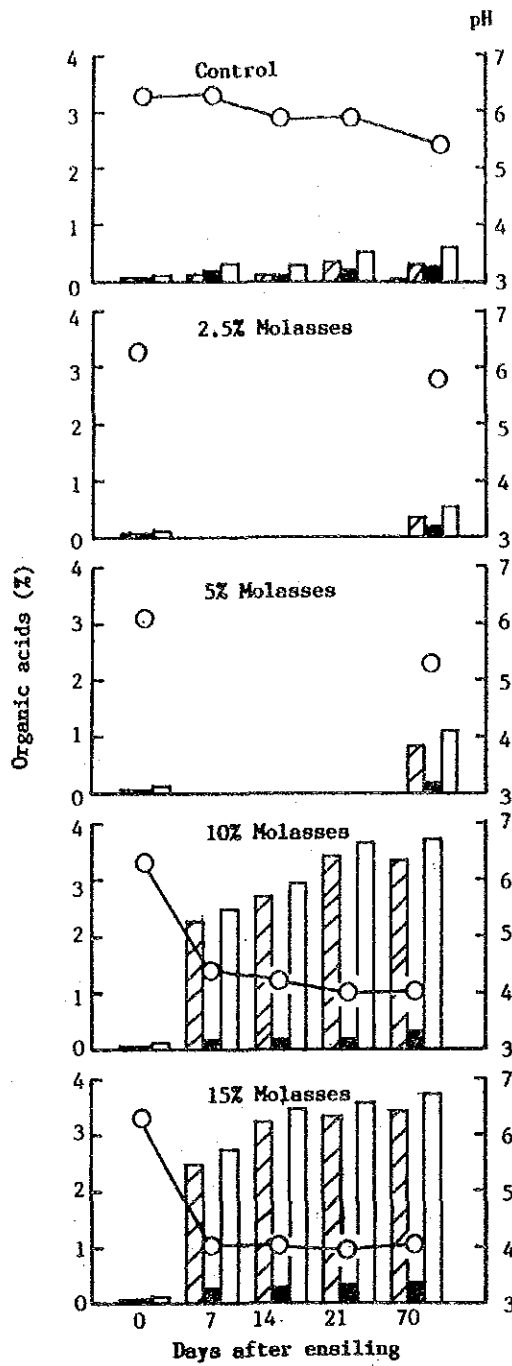


Fig. 1. Effect of the addition of molasses on pH, organic acid composition in ensiled *Leucaena* silage. —○—: pH, ▨: Lactic acid, ▩: Acetic acid, ■: Butyric acid, □: Total acid

2. サイレージ埋蔵過程におけるミモシン含量の変化

サイレージ調製に供したイピルイピル材料中のミモシン含量は、約0.9%（乾物中約2.6%）であった。対照区と10%糖蜜添加区の埋蔵期間の経過に伴うミモシン含量の経時的変化は図2に示すとおりである。いずれの試験区においても発酵の盛んな初期の7日目頃までにミモシンの減少が著しく、糖蜜添加区では14日目頃から0.1%程度となりその後ほぼ一定の値を示した。対照区では14日目まではやや高い値を示していたが、その後漸減し21日目からほぼ一定であった。両区とも埋蔵後70日目における減少率は約90%を示した。以上のとおり、サイレージを調製することによって埋蔵期間の経過に伴うミモシン含量の著しい減少効果が認められたが、前述したとおり、ミモシンはルーメン内微生物群によってDHP12分解されることから²⁾、サイレージの埋蔵期間に伴うミモシン含量の減少も発酵初期に増殖の盛んな乳酸菌による分解が考えられた。しかし、発酵が極めて緩慢であった対照区においても同様にミモシン含量の著しい減少がみられた。このことは、詰め込み材料と共存するバクテリア類による分解かまたは茎葉部自体による自己分解作用（Autolysis）⁶⁾も関与しているものと考えられるが今後明らかにする必要がある。

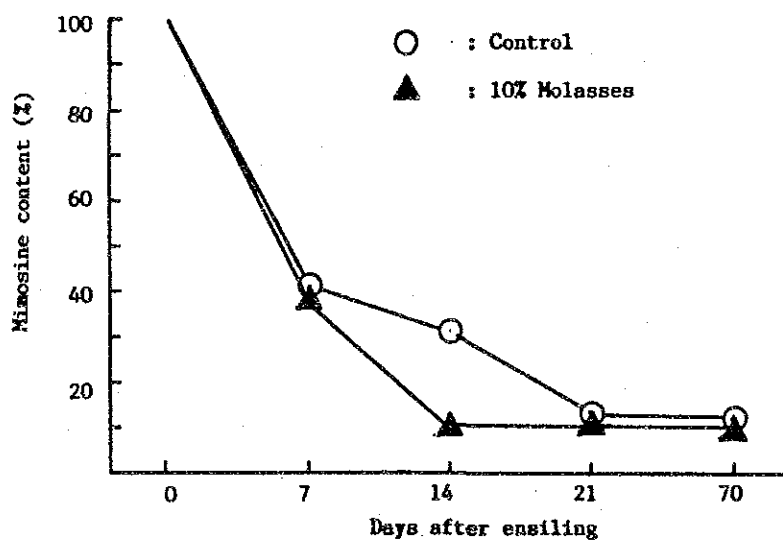


Fig. 2. Changes of mimosine content in *Leucaena* silage

要 約

本項では糖蜜の添加量を変えて各種のイピルイピルサイレージを調製し、埋蔵過程におけるpH、有機酸組成およびミモシン含量の経時的変化を測定することによって、サイレージとしての利用価値について検討した。得られたのは次のとおりである。

- 1) イピルイピル茎葉部のみを材料としてサイレージを調製した場合、埋蔵期間の経過に伴うpHの低下や有機酸の生成は極めて緩慢であり良質のサイレージは得られなかった。しかし、糖蜜を10%および15%添加することによってpHの低下や有機酸の生成量が著しく、10%添加区では埋蔵後21日目より、また15%添加区では14日目より、それぞれpH4.0および有機酸含量は3.4および3.2%であり、その後70日目まで安定した値を示した。
- 2) イピルイピルサイレージの埋蔵期間の経過に伴うミモシン含量の減少は、茎葉部のみを材料として調製した区および糖蜜添加区のいずれの試験区においても発酵初期の7日目頃までの減少が著しく、埋蔵後70日目における減少率は約90%であった。

引用文献

- 1) Matsumoto, H., E.G. Smith and G.D. Sherman, Arch. Biochem. Biophys., 33 : 201-211. 1951.
- 2) Hegarty, M.P., R.D. Court and P.M. Thorne, Aust. J. Agric. Res., 15 : 168-179. 1964.
- 3) Kemble, A.R., J. Sci. Food Agric., 7 : 125-130. 1965.
- 4) 農林省草地試験場, サイレージ試験法値, 37-60. 1975.
- 5) Barnett, A.J.G., J. Biol. Chem., 49 : 527-529. 1951.
- 6) Barker, S.B. and W.H. Summerson, J. Biol. Chem., 138 : 535-554. 1961.
- 7) Lowry, J.B., Maryanto and B. Tangendjaja, J. Sci. Food Agric., 34 : 529-533. 1983.

Ⅱb ミモシン含量を減少させたイピルイピルの 動物に対する給与基準の検討

緒 言

家畜がイピルイピルを継続的に採食すると含有されるミモシンによって、発育阻害、繁殖障害および脱毛などの病的症状を発現することが知られており、完全な飼料資源として効果的に利用されているとは言えない。これまでに、Jones¹⁾は、一般に牛におけるイピルイピルの配合量は、30%以下が適量であるとし、また松田²⁾は、豚で10%、鶏では5%程度の給与は、成長に対する悪影響がほとんどみられなかったことを報告している。これらの報告では、イピルイピルの葉だけを対象としており、Reis³⁾らの報告から葉には少なくとも4.4%（乾物当り）以上のミモシンを含有とていたものと推測される。Szyszkaら⁵⁾は、鶏、兎、牛、山羊、羊において摂取されるミモシンの許容量がそれぞれ0.16, 0.23, 0.18, 0.14g/kg/dayであることを報告している。また、ミモシン含量はイピルイピルの各部位（茎、葉、木質部等）で顕著に異なり、若葉中に最も高いことが明らかにされている（本郷、未発表）。さらに、本郷らは、イピルイピル葉のミモシン含量がサイレージ調整で80%以上減少することを明らかにしている。これらのことから、家畜におけるサイレージ調整イピルイピル茎葉の配合量は従来のギンネム配合量よりも増加されることが予想される。

本実験では、サイレージ調整イピルイピル茎葉ペレットの66%給与割合がめん羊の増体量、甲状腺機能状態、脱毛および育毛状態に及ぼす影響を検索し、同時に飼料価値についても検討した。

材料および方法

1. 動物

実験には雑種去勢雄めん羊（サフォーク種×サウスダウン種、1.5才齢、体重 37.0~42.5kg）8頭を供試した。実験開始4ヶ月前から動物を消化試験用ケージで予備飼育した。この間、動物にはアルファルファペレット1200gを1日2回（9, 17時）に分けて給与した。飲水は自由とした。また、脳脊髄糸状虫感染症防止のため、スパトニン注射液12mg/3mlを1月1回皮下に注射した。

2. イピルイピル茎葉部のサイレージペレットおよび乾草ペレットの調整

本学部近傍に自生する高さ約1~2mのイピルイピル灌木より茎葉部を採取し、ハンマーミール機で細切した。サイレージ調整のため、細切ギンネムの10%に相当する糖蜜を添加し、2週間埋蔵した。開封後、3日間天日乾燥した。また乾草調整のため、同様にして採取した細切イピルイピルを3日間天日乾燥した。これらの天日乾燥したサイレージおよび乾草をペレットマシン(中島農畜研)でペレット(径約8mm)化した。

3. 実験方法

動物を3実験区すなわちA, H, S区にそれぞれ2頭(体重37.0, 38.0kg), 3頭(39.5±0.87kg), 3頭(39.5±2.65kg)を割り当てた。A区には1頭当たりアルファルファペレット1200g, S区にはイピルイピルサイレージペレット800gおよびアルファルファペレット400g, H区にはイピルイピル乾草ペレット800gおよびアルファルファペレット400gを1日2回(9, 17時)に分けて等量ずつ給与した。飲水は自由とした。これらの飼料給与期間は、1985年9月30日から12月9日までの10週間であった。その間、1週間間隔で朝の給餌前9時より一般生理反応(呼吸数, 心拍数, 直腸温), 採食量, 飲水量, 排糞量および体重の測定を行った。また、頸静脈血液20mlおよび糞100gを採取した。採食量および飲水量の測定は、午後の給餌直前にも行った。排糞量は測定前日の午前の給餌直後から測定日の午前の給餌前までの24時間に排糞された量とした。脱毛状態は肉眼的に観察し、一方被毛の発育状態は左または右側腹部に市販脱毛剤を用いて10×10cmの脱毛部を形成し、新たに発育した被毛重量を測定した。

4. 分析

血液をヘパリン処理した注射器へ採取し、あらかじめ水で冷却してあるポリエチレン遠沈管へ速やかに移した後、血漿を4℃で分離した。血漿については血漿中ミモシン濃度, 血漿中DHP(3-hydro-4-1(H)-pridine)濃度, 血漿中チロニン(T_4)濃度, 血漿中トリヨードチロニン(T_3)濃度, 血漿中GOT活性および血漿中GPT活性を測定した。血漿中ミモシンおよびDHP濃度は高速液体クロマトグラフ(LC-6A型, 島津製作所)を用い、UV法によって測定した。血漿中 T_4 および T_3 濃度はChepraの方法⁹⁾に準じて、ラジオイムノアッセイで測定した。血漿中GOTおよびGPT活性はBlood Analyzer Mark IIを用い、ユニキットGOTおよびGPT(中外製薬)で測定した。糞は各個体ごとに100gずつを70℃の通風乾燥器で24時間乾燥し、粉碎したのち、

分析に供するまで-20℃で保存した。飼料についても糞と同様に行った。飼料および糞中各成分の分析は日本飼料協会発行の飼料分析基準注解⁷⁾に準じて行った。

5. 計算

アルファルファペレット（アルファルファと略す）、イピルイピルサイレージペレット（サイレージと略す）およびイピルイピル乾草ペレット（乾草と略す）中の各成分の消化率は、森本の動物栄養試験法⁸⁾に準拠し、乾物中各成分含量、飼料摂取量（採食量）および排糞量を用いて以下の式により算出した。

〈アルファルファ中成分の消化率〉

$$\text{消化率(\%)} = \frac{\text{飼料摂取量} \times \text{成分含量(\%)} - \text{排糞量} \times \text{成分含量(\%)}}{\text{飼料摂取量} \times \text{成分含量(\%)}} \times 100$$

〈サイレージ、乾草中成分の消化率〉

$$\text{消化率(\%)} = \frac{a - (b - c)}{a} \times 100$$

a : サイレージまたは乾草に由来する摂取成分量 = 飼料摂取量 × サイレージ

または乾草の配合率 × サイレージまたは乾草中成分含量

b : 糞中成分量 = 排糞量 × 糞中成分量

c : アルファルファに由来する糞中成分量 = 飼料摂取量 × アルファルファの配合率

× アルファルファ中の成分含量 × (100 - アルファルファ中成分の消化率) / 100

6. 統計処理

有意差の検定には、Paired t testを用い、結果はMeanまたはMean ± SDで表した。

結 果

1. 飼料成分

結果を表1に示した。粗蛋白質含量は、サイレージおよび乾草ともにアルファルファとほぼ等しかった。粗脂肪および可溶無窒素物含量は、サイレージおよび乾草ともにアルファルファよりも低かった。しかし、粗繊維含量は両方ともにアルファルファよりも高かった。サイレー

ジの粗灰分量はアルファルファと等しかったが、乾草ではアルファルファよりも低かった。水分含量は、アルファルファ、サイレージおよび乾草ともにほぼ等しかった。サイレージのミモシン含量は乾草の1/3に減少したが、一方、DHP含量は乾草の約2倍に増加した。

Table 1. Chemical composition of alfalfa, ipil-ipil and ipil-ipil silage pellets.

	Alfalfa pellet	Ipil-ipil silage pellet	Ipil-ipil pellet
Moisture (%)	13.56±0.21	12.24±0.18	14.47±2.49
Crude ash (%)	7.89±0.37	7.84±1.30	5.87±0.19
Crude protein (%)	17.17±4.90	19.12±2.59	16.61±1.66
Crude fat (%)	2.61±0.09	2.01±0.31	2.27±0.17
Crude fiber (%)	17.98±1.43	20.99±1.30	23.87±1.23
NFE (%)	40.78±5.87	37.80±2.65	36.92±0.89
Mimosine (%)		0.26±0.02	0.75±0.06
DHP (%)		0.46±0.06	0.26±0.01

Ipil-ipil and ipil-ipil silage pellets contain leaf and green stem.

Values are means ± S.D. from three determinations.

2. 畜舎環境および一般生理反応

畜舎温度は0～4週では25～27℃、5～7週では19～20℃、8～10週では16～18℃であった。相対湿度は2、4、7、9および10週では90～95%、その他の週でも72～88%と高かった。心拍数は65±5回/分(A、H、S区をこみにした値の平均値±標準偏差)と実験期間を通してほぼ一定であった。呼吸数は1～5週では94±12回/分であったが、6週以後は66±9回/分へ低下した。また直腸温は1～7週では39.2±0.16℃であったが、8週以後は39.0±0.15℃へ低下した。呼吸数および心拍数ともにA、H、S区間に差はなかったが、直腸温では1～6週においてA区がH、S区よりも高い傾向であった(図1)。

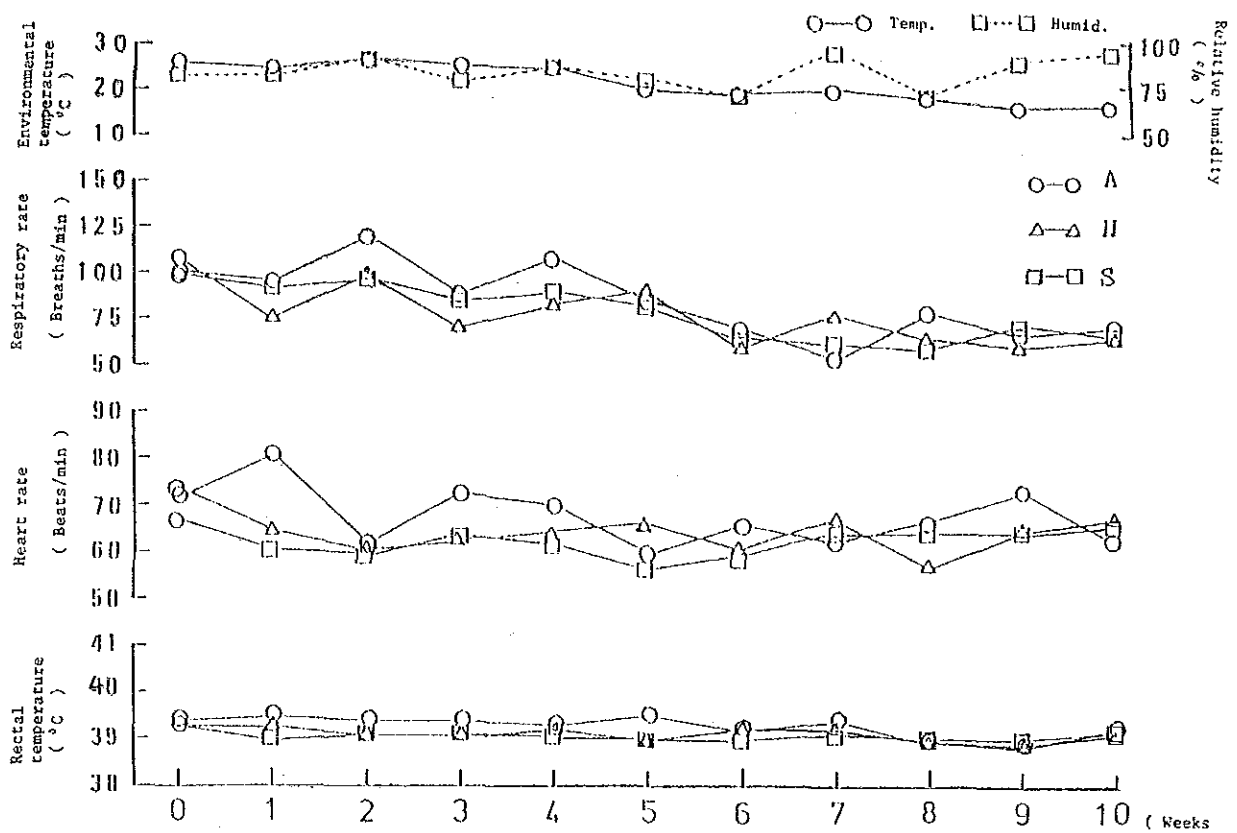


Fig. 1. Respiratory rate, heart rate and rectal temperature in sheep fed alfalfa (A), alfalfa 34% + ipil-ipil 66% (H) and alfalfa 34% + ipil-ipil silage 66% (S).

3. 採食量および飲水量

A区の採食量は実験期間を通して一定であった。S区は1週でわずかに減少したが、2週以降は0週と等しかった。H区は1~3週で減少したが、4週以降は0週とほぼ等しかった。S区はA区と比べて1週でわずかに低かったが、その他の週では等しかった。またH区は1~3週で低かったが、4週以降はA区とほぼ等しかった。飲水量は 6.0 ± 1.1 l/日 (A, H, S区をこみにした1~10週の平均値±標準偏差)であった。A, H, S区間に差は認められなかった(図2)。

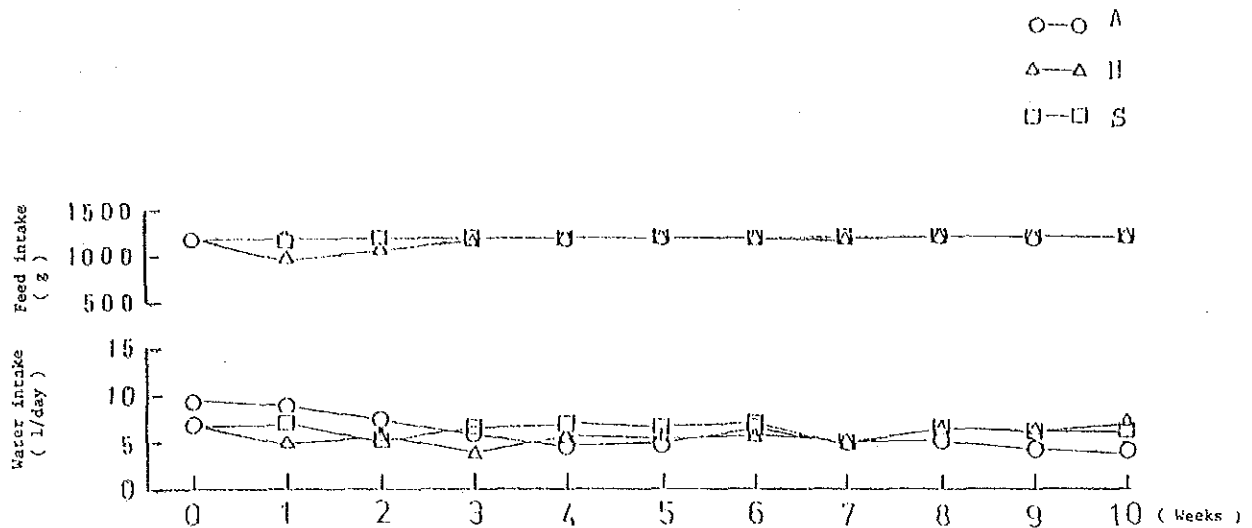


Fig. 2. Feed and water intake of sheep fed alfalfa (A), alfalfa 34% + ipil-ipil 66% (H) and alfalfa 34% + ipil-ipil silage 66% (S).

4. 血漿成分

SおよびH区の血漿中ミモシン濃度はともに1週の $204 \mu\text{g/dl}$ から2週の $121 \pm 16 \mu\text{g/dl}$ (S, H区の平均値±標準偏差)へ減少したが, その後7週までは一定となり, 7週以降は漸増した。またS区の血漿中DHP濃度は1週でH区よりも低く, その他の週ではH区とほぼ等しかった(図3)。S区の血漿中 T_4 濃度は0週ではA区と比べて低く, H区はA区とほぼ等しかった。A, H, S区はそれぞれ3, 2, 1週まで減少したが, その後漸増した。S区はA区に比べて全ての週で低く, H区も3週を除く全ての週で低かった。S区はH区と比べて1週を除く全ての週で低かった。SおよびH区の血漿中 T_3 濃度は0週でともにA区よりも低く, S区はH区とほぼ等しかった。A, H, S区はそれぞれ4, 3, 2週まで減少したが, その後漸増した。S区はA区と比べて1週を除く全ての週で低く, H区は全ての週で低かった。S区は3週まではH区よりも高く, 4週以降はH区よりもわずかに高い傾向であった(図4)。血漿中GOT活性は0週でA, H, S区の順であった。S区は4週を除く全ての週で一定であり, A区も2, 6週を除く全ての週でほぼ一定であった。しかし, H区は実験期間にしたがい漸増した。また血漿中GPT活性もGOT活性と同様に0週でA, H, S区の順であった。AおよびS区はともに全ての週で一定であったが, H区では2週以降は0週より増加し, 高い値となった(図5)。

1~10週をこみにしたA, H, S区の血漿成分を0週と比べると, A区の T_4 , T_3 濃度はわずかに減少したが有意ではなく, SおよびH区では有意に減少した。一方, AおよびS区のGOT,

GPT活性はそれぞれ0週の値と等しかったが、H区のGOTは増加傾向を示し、GPTは有意に増加した(表2)。

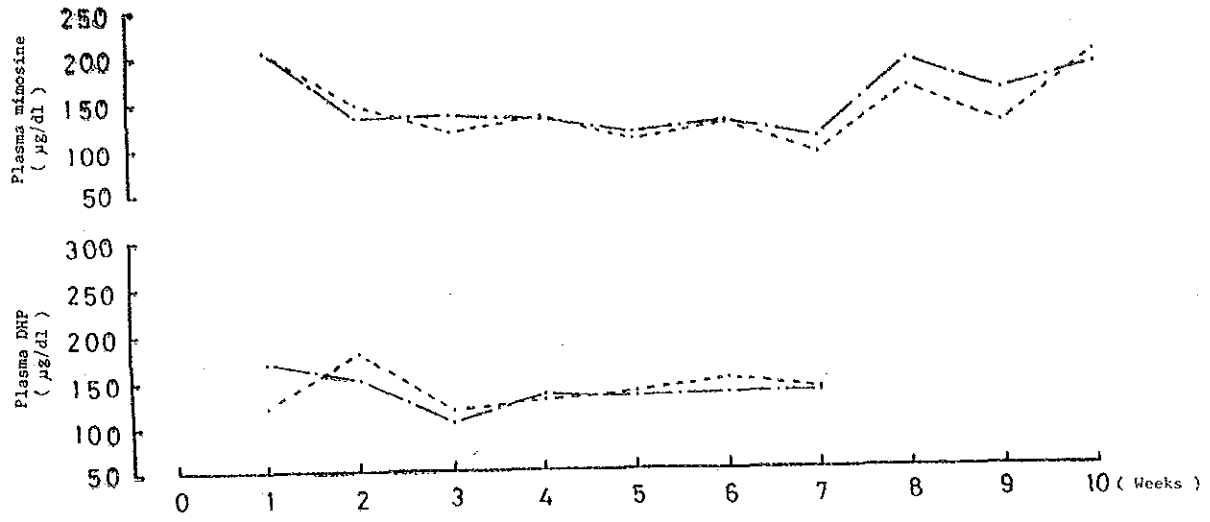


Fig.3. Plasma mimosine and 3-hydroxy-4(1H)-pyridone (.DHP) concentrations in sheep fed alfalfa 34% + ipil-ipil 66% (H) and alfalfa 34% + ipil-ipil silage 66% (S).
H —, S - - -

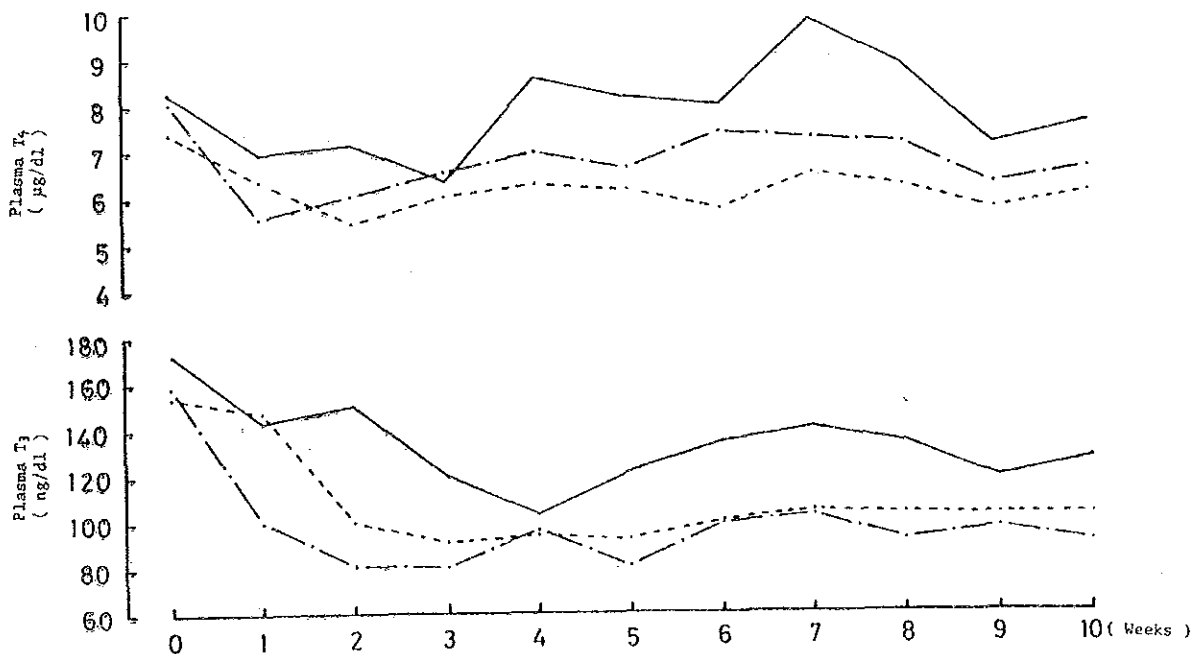


Fig.4. Plasma thyroxine (T₄) and tri-iodothyronine (T₃) levels in sheep fed alfalfa (A), alfalfa 34% + ipil-ipil 66% (H) and alfalfa 34% + ipil-ipil silage 66% (S).
A —, H - - -, S - . - .

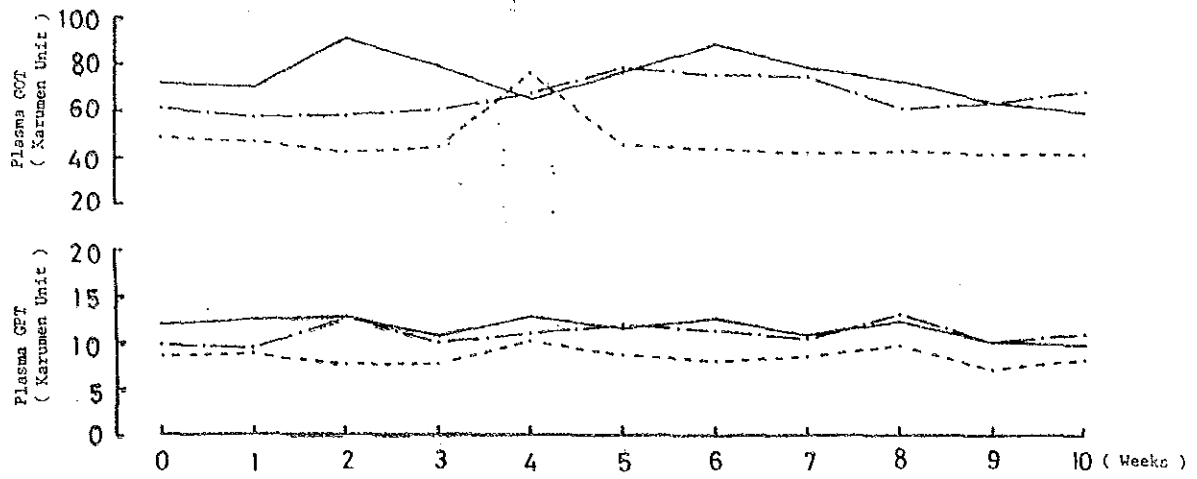


Fig.5. Plasma glutamate oxaloacetate transaminase (GOT) and glutamate pyruvate trasaminase (GPT) activities in sheep fed alfalfa (A), alfalfa 34 % + ipil-ipil 66 % (H), alfalfa 34 % + ipil-ipil silage 66 % (S). A —, H — —, S — — —

Table 2. Plasma components in sheep fed alfalfa, alfalfa 34% + ipil-ipil 66% and alfalfa 34% + ipil-ipil silage 66%.

Group		Week			
		0	1 ~ 10		
Feed		Alfalfa 100%	Alfalfa 34% + Ipil-ipil silage 66%	Alfalfa 34% + Ipil-ipil 66%	Alfalfa 100%
aminosine ($\mu\text{g}/\text{dl}$)	A				
	H			14.73 \pm 40.9	
	S		144.1 \pm 48.8		
DHP ($\mu\text{g}/\text{dl}$)	A				
	H			142.7 \pm 53.9	
	S		136.7 \pm 20.8		
T ₄ ($\mu\text{g}/\text{dl}$)	A	8.3 \pm 1.8			7.7 \pm 1.6
	H	8.0 \pm 1.2		** 6.6 \pm 0.9	
	S	7.4 \pm 1.6	** 6.1 \pm 1.1		
T ₃ (ng/dl)	A	172 \pm 4			131 \pm 17
	H	158 \pm 48		** 92 \pm 15	
	S	153 \pm 50	** 103 \pm 23		
GOT (Karmen Unit)	A	73 \pm 27			74 \pm 26
	H	61 \pm 15		66 \pm 9	
	S	49 \pm 9	46 \pm 14		
GPT (Karmen Unit)	A	12 \pm 3			12 \pm 2
	H	10 \pm 0		** 11 \pm 2	
	S	9 \pm 2	9 \pm 1		

Values that are significantly different from component at 0 week are indicated by ** (P < 0.01).

5. 被毛の成長および脱毛の観察

脱毛はH, S区とも実験期間を通して観察されず, 脱毛クリームによった脱毛した部位での被毛の成長もA, H, S区間に差はなく同様に再生した。

6. 飼料成分の消化率

アルファルファ中粗蛋白質, 粗脂肪, 可溶無窒素物, 粗繊維, 粗灰分の消化率はともにA, H, S区間(0週の値)で差がなかった。乾草およびサイレージ中粗蛋白質, 可溶無窒素物の消化率はアルファルファと比べると, サイレージ中粗蛋白質では7週, サイレージ中可溶無窒素物では5週を除き, とともに全ての週で低かった。しかし, 乾草およびサイレージ中粗灰分の消化率はアルファルファと比べて6週を除く全ての週で高かった。一方, 乾草およびサイレージ中粗脂肪の消化率はアルファルファと比べてそれぞれ7~8週および10週では高かったが, その他の週ではともにアルファルファとほぼ等しかった。また乾草およびサイレージ中粗繊維の消化率はアルファルファと比べてともに10週では高かったが, その他の週ではアルファルファとほぼ等しかった(図6~10)。

1~10週をこみにしたサイレージ, 乾草およびアルファルファ中成分の消化率を0週の値と比べると, 粗蛋白質および可溶無窒素物ではサイレージ, 乾草とも有意に低かったが, 粗脂肪および粗灰分では有意に高かった。また, 粗繊維では乾草は有意に高かったが, サイレージはほぼ等しかった(表3)。

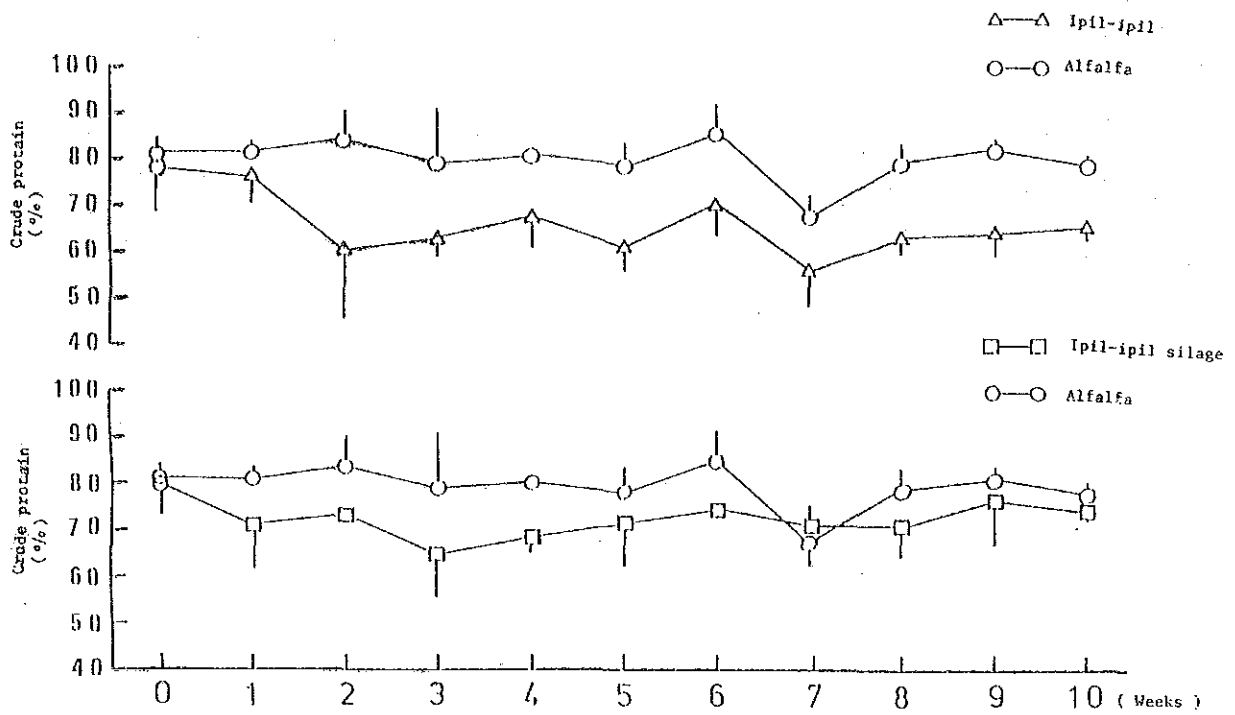


Fig.6. Digestibility of crude protein. The bars indicate the S.D. of means for three animals.

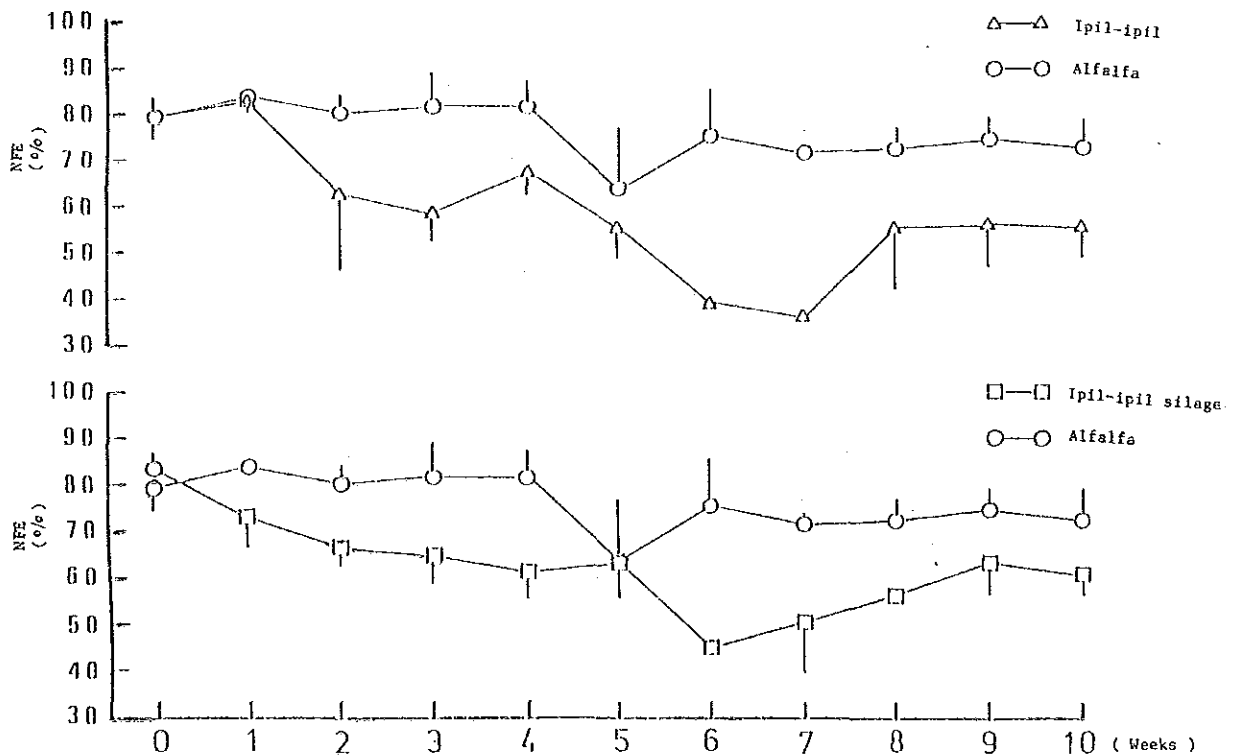


Fig.7. Digestibility of nitrogen free extract (NFE). The bars indicate the S.D. of means for three animals.

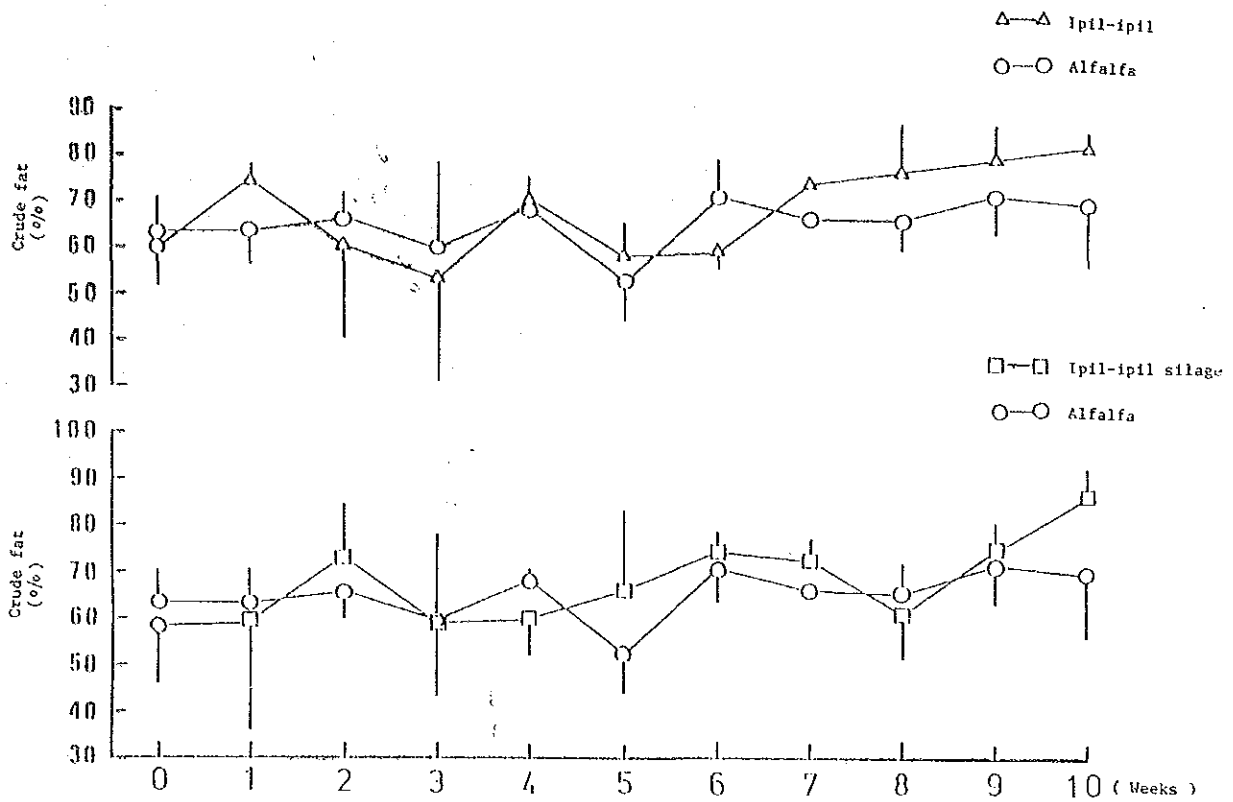


Fig. 8. Digestibility of crude fat. The bars indicate the S.D. of means for three animals.

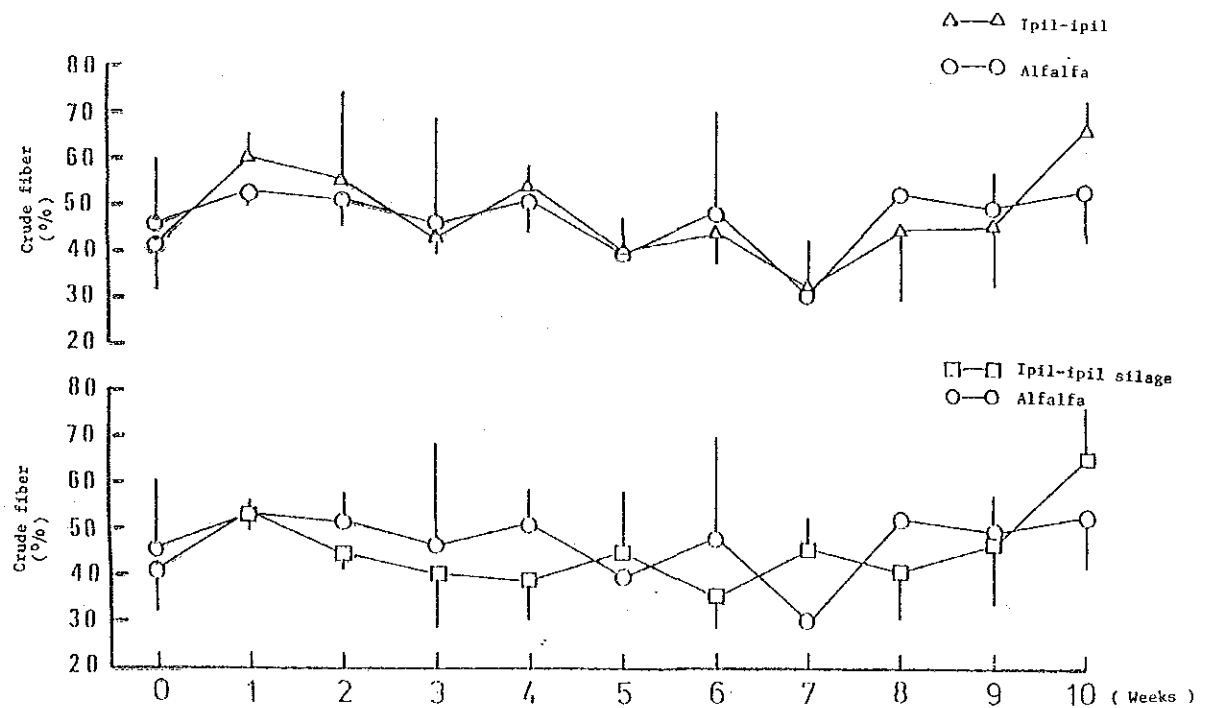


Fig. 9. Digestibility of crude fiber. The bars indicate the S.D. of means for three animals.

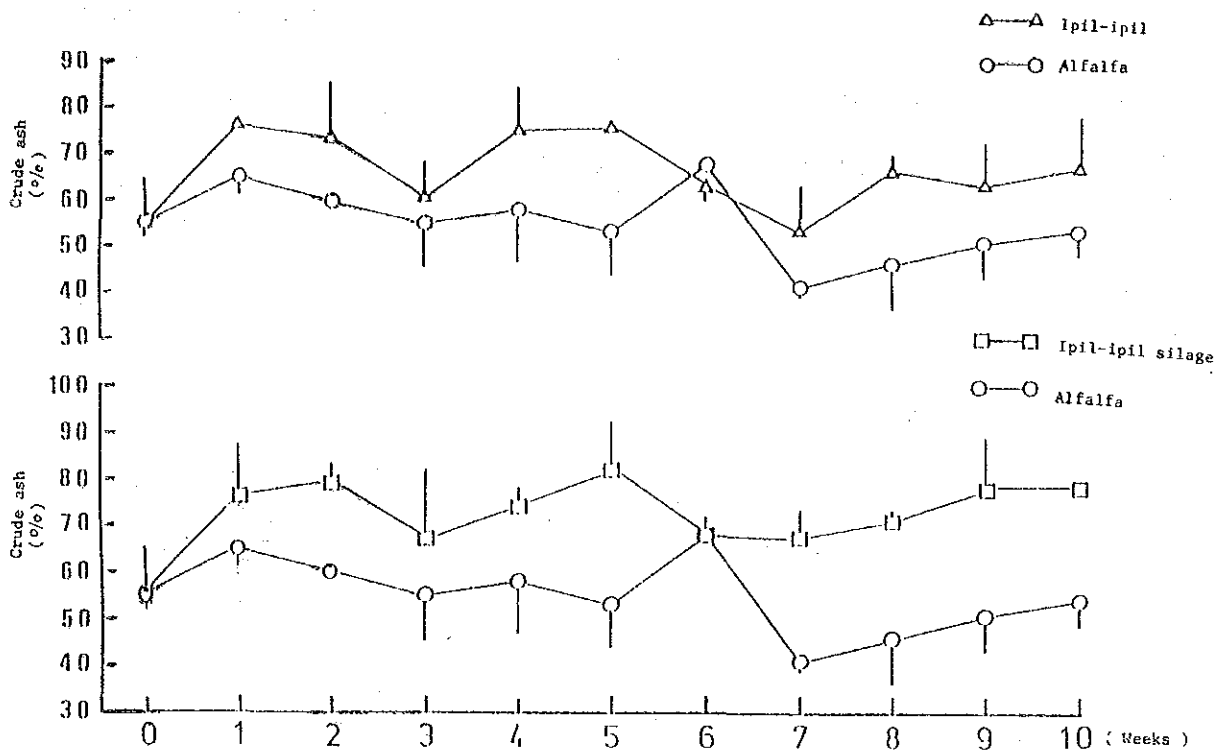


Fig. 10. Digestibility of crude ash. The bars indicate the S.D. of means for three animals.

Table 3. Digestibility of the components of alfalfa, ipil-ipil and ipil-ipil silage pellets.

Group		Week	0		1 ~ 10	
		Feed	Alfalfa	Ipil-ipil silage	Ipil-ipil	Alfalfa
Crude ash	A		55.19 ± 3.13			54.00 ± 9.16
	H		55.01 ± 9.61		** 67.02 ± 9.87	
	S		55.86 ± 10.03	** 74.37 ± 8.44		
Crude protein	A		81.53 ± 2.76			79.57 ± 6.15
	H		78.04 ± 9.17		** 84.38 ± 7.56	
	S		79.82 ± 6.07	** 72.08 ± 6.47		
Crude fat	A		63.61 ± 6.89			65.45 ± 8.53
	H		59.85 ± 8.00		** 68.50 ± 13.26	
	S		58.74 ± 12.50	* 68.55 ± 13.47		
Crude fiber	A		45.92 ± 14.06			47.85 ± 10.23
	H		41.49 ± 9.74		* 47.97 ± 12.53	
	S		41.57 ± 9.23	45.57 ± 11.43		
NFE	A		79.36 ± 4.58			75.94 ± 7.67
	H		79.59 ± 4.39		** 58.26 ± 12.75	
	S		83.57 ± 3.20	** 60.61 ± 9.29		

Values are means ± S.D. (%) from three animals. Values that are significantly different from digestibility of alfalfa at 0 week are indicated by *(P < 0.05) and ** (P < 0.01).

A: Alfalfa, H: Ipil-ipil, S: Ipil-ipil silage

7. 飼料の栄養価

飼料成分および飼料成分の消化率から算出した栄養価を表4に示した。乾物含量(DM)はサイレージ、乾草、アルファルファ間に差はなかった。サイレージ中可消化粗蛋白質量(DCP)はアルファルファと等しかったが、乾草はアルファルファよりも低かった。一方、サイレージ、乾草中可消化養分総量(TDN)はアルファルファよりもともに低かった。

Table 4. Nutritive value of alfalfa, ipil-ipil and ipil-ipil silage pellets.

	DM	DCP	TDN
Ipil-ipil silage	87.76±0.18	13.78±1.24	49.86±5.34
Ipil-ipil	85.53±2.49	10.69±1.26	48.01±7.40
Alfalfa	86.44±0.21	13.66±1.06	57.74±5.10

(%, Means±S.D.)

8. 採食した飼料全体の栄養価と増体量

S区が採食した飼料のDCP含量は、7週を除く全ての週でA区のそれと等しかったが、H区は全ての週でA区よりも低かった。一方、S、H区が採食した飼料のTDN含量はほぼ等しく、A区と比べると全ての週でともに低い傾向であった。A区の累積増体量は実験期間を通して漸増した。SおよびH区の累積増体量は1週で減少したが、2週では増加し、3週では再び減少した。4週以降はともにA区と類似して漸増した。しかし、漸増の程度はA、S、H区の順となった(図11)。

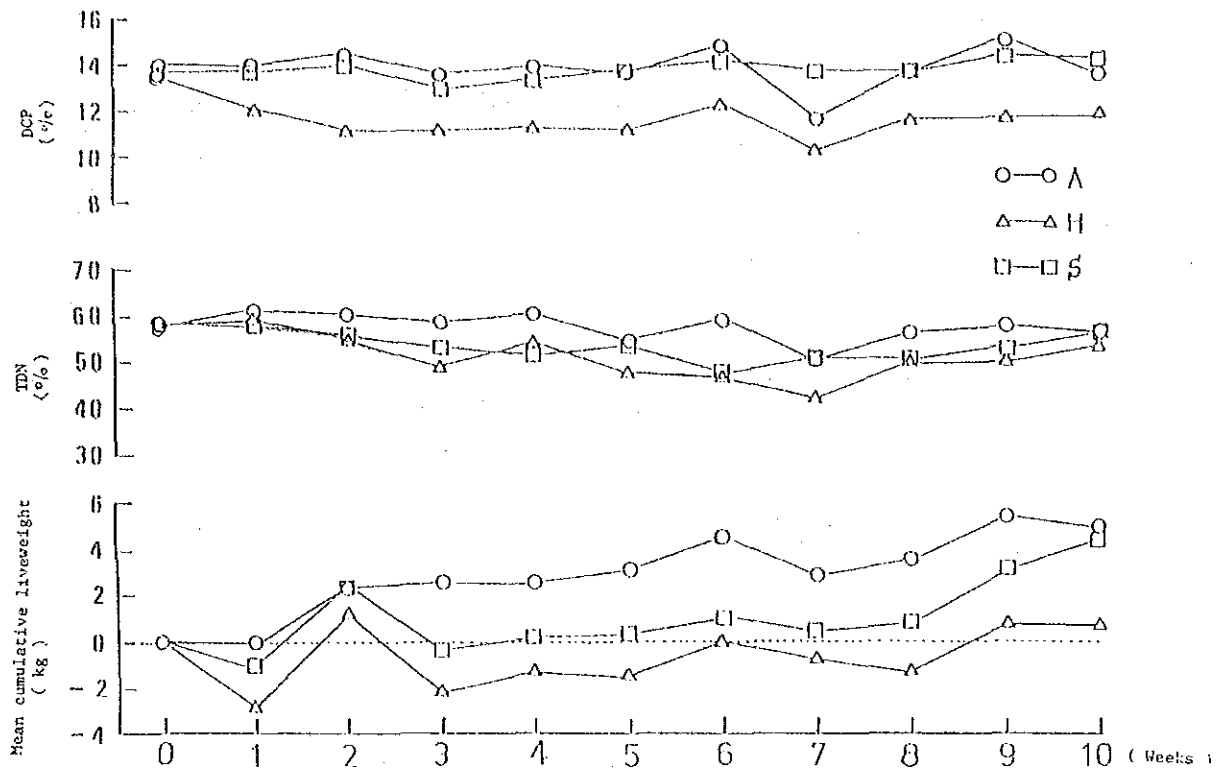


Fig.11. Mean cumulative liveweight change of sheep fed alfalfa (A), alfalfa 34% + ipil-ipil 66% (H) and alfalfa 34% + ipil-ipil silage 66% (S).

考 察

表1からミモシンおよびDHP摂取量を計算すると、S区ではそれぞれ52.0、91.9mg/kg/日であり、H区では155.6、53.9mg/kg/日であった。すなわちS区のミモシン摂取量はH区よりも少なかったが、S区のDHP摂取量はH区よりも多かった。しかし、血漿中ミモシン濃度はSおよびH区間に差がなく、また血漿中DHP濃度も1週でS区がH区より低かったものの、その他の全ての週ではSおよびH区間に差は認められなかった(図3)。めん羊において200または300mg/kgのミモシンを2日間経口投与した場合、3日間で投与量の82%が排泄され、24時間後の血漿中ミモシン濃度がそれぞれ約247、1980μg/dlであったというReisらの報告⁴⁾と比べると、本実験におけるS、H区のミモシン摂取量はきわめて少なかった。そのためS、H区の花漿中ミモシン、DHP濃度は両区に差が認められないほど微量となった。本実験ではS、H区に脱毛症状は見られず、被毛の成長もA、S、H区間に差はなかった。ちなみにReisらの報告⁴⁾では、200mg/kg/日投与めん羊では脱毛症状は確認されず、300mg/kg/日投与めん羊2頭のうち

1頭で脱毛を認めている。ところが、SおよびH区の血漿中 T_4 、 T_3 濃度はともにA区と比べて有意に低下した(図4, 表2)。S区の血漿中 T_4 濃度は2週以降H区よりも低かったが、これは0週でS区がH区より低いことによものであり、2週間以降の各週を0週と比べたときの低下の程度はS、H区ともに等しかった。一方、S区の血漿中 T_3 濃度は0週ではH区とほぼ等しかったが、1~3週ではH区よりも高かった。4週以降はH区よりわずかに高い傾向であった。Hegatyら⁹⁾は単胃および反すう胃動物いずれにおいてもミモシンそのものは甲状腺腫をひきおこすことはなく、ミモシンの分解産物であるDHPによるものと報告している。ところが、S区の血漿中 T_3 濃度はH区よりも高く、DHP摂取量の相違によっては説明できなかった。これらのことから、甲状腺の T_4 産生機能はS、H区とも同程度に抑制されたが、一方、 T_3 産生機能に対する抑制の程度はS区よりもH区で大きかったものと推察される。

甲状腺ホルモンが熱発生量を増加させることはよく知られている。SおよびH区の直腸温が1~6週でA区よりも低い傾向であったことには、1~3週での T_4 、 T_3 濃度の低下に伴う代謝量の減退、さらに2~3週の採食量減少の影響であると考えられる(図1, 2)。AおよびS区のGOT、GPT活性はそれぞれ0週と比べて1~10週の各週ともにほぼ等しかったが、H区のGOT、GPT活性はともに漸増した(図5)。GOT、GPTはめん羊においては心筋、骨格筋、肝臓および腎臓に主に分布することが報告¹⁰⁾されており、H区の血漿中GOT、GPT活性の増加はこれらの臓器のいずれかに軽度の障害が起きていることを示している。

従来のイピルイピル給与試験¹¹⁾では葉のみが利用されており、それは4.4% (乾物当り) 以上のミモシンを含有している。本試験で調整したイピルイピル茎葉乾草ペレットのミモシン含量は0.75%ときわめて少なく、葉は含有されるミモシン量の1/5~1/6であった(表1)。これは木質部の割合が多いこと(木質部のミモシン含量は他部位より少ない、本郷)および天日乾燥過程でミモシンが酵素分解¹²⁾されたことによるものであろう。ミモシン含量の低いことが、配合割合を従来¹²⁾の2倍以上に高めても毒性症状を発現するまでに至らなかった理由であろうと考えられる。

飼料の繊維含量が高くなると、有機物の消化率は低下することがよく知られている。本実験においても、サイレージおよび乾草中粗蛋白質および可溶無窒素物の消化率はアルファルファより低かったものと考えられる。しかし、サイレージおよび乾草中粗脂肪の消化率はアルファルファよりも高かった。また、イピルイピル中蛋白質の第一胃での溶解度が非常に低いという報告¹³⁾から、サイレージおよび乾草中粗蛋白質の消化率がアルファルファより低かったことには各々の蛋白質の溶解度の相違も関与しているのではなかろうかと考えられる。さらにミモ

シンは膵臓のキモトリプシン活性を阻害するという報告¹⁴⁾から、ミモシンの消化酵素に対する阻害効果も消化率に影響しているものと考えられる。粗灰分の消化率は、無機物の内因性糞中排泄量、飼料中の他の成分および給与した動物にかなり依存するので、各々の飼料についての平均値はほとんど意味をもたないことが報告¹⁵⁾されている。ところが、本実験のアルファルファ中粗灰分の消化率はA, H, S区間で差がなかったことから、サイレージおよび乾草中粗灰分の消化率がアルファルファよりも低かったことは動物に依存する差とは考え難く、むしろ飼料の相違に由来するものであろう。サイレージ中粗繊維の消化率はアルファルファとほぼ等しかったが、乾草はアルファルファと比べて高かった(図9)。サイレージのDCPはアルファルファとほぼ等しかったが、乾草よりも高かった(表4)。このことは、乾草中粗蛋白質の消化率がアルファルファおよびサイレージよりも著しく低いことによるものであった。一方、サイレージおよび乾草のTDNがアルファルファと比べて低い傾向であったことは、サイレージおよび乾草中可溶無窒素物含量、可溶無窒素物の消化率がともにアルファルファよりも低かったからであった。S区の動物が採食した混合飼料のDCPはA区とほぼ等しかったが、H区よりも高かった。これは、アルファルファ、サイレージ、乾草中粗蛋白質の消化率の相違によるものであった(表3)。一方、SおよびH区のTDNはA区よりも低い傾向であった(図11)。これらの相違が、3週以降のA, S, H区の累積増体量に反映しているものと考えられる。また、A, S, H区の10週間の累積増体量はそれぞれ 4.8 ± 1.06 , 4.3 ± 1.9 , 0.7 ± 1.8 kgであった。S区の累積増体量がH区に比べて大きかったことには、サイレージおよび乾草中DCPに差があったこと、および T_3 濃度がH区よりも高い傾向であったことに起因するものと考えられる。また、A, H, S区のDCP摂取量はそれぞれ4.37, 3.54, 4.15g/kg/dayであり、TDN摂取量はそれぞれ18.46, 15.56, 15.95g/kg/dayであって、NRC飼養標準における育成雌めん羊の値と比較すると、DCPは高水準であったが、TDNは低水準であった。

以上のことから、イビルイビル茎葉サイレージペレットは未処理の乾草ペレットと比べて毒性低減効果を有し、飼料価値としてはアルファルファにほぼ匹敵することが判明した。

引用文献

- 1) JONES, R. J., WORLD ANIM REV, 31 : 13-23. 1979.
- 2) 松田祐一, 沖縄畜産, 2 : 4-10. 1967.
- 3) 松田祐一, 琉大農学報, 7 : 389-392. 1960.
- 4) REIS, P. J., D. A. TUNKS and M. P. HEGARTY, AOST. J. BIOL. Sci., 28 : 495-501. 1975.
- 5) SZYSZKA, M. U. TER MEULEN, BOONLOM CHEVA-ISARAKUL, S. POSRI and N. POTIKANOND, LEOC. RES. REPTS. 5, 5-11. 1984.
- 6) CHOPRA, I. J., in Handbock of Radicimmontasay. (ABRAHAM, G. E. ed.) 679-703, Marcel Dekker Inc. New York and Basel. 1977.
- 7) 飼料分析基準研究会編, 飼料分析基準注解, 3-16. 日本飼料協会. 東京. 1983
- 8) 森本 宏 動物栄養試験法, 192-199. 養賢堂. 東京. 1971.
- 9) HEGARTY, M. P., SCHINCKEL, P. G. and COORT, R. D., AUST. J. AGYIC. RES., 15 : 108-. 1964.
- 10) 友田 勇, 日猷会誌, 31 : 728-739. 1978.
- 11) LOWRY, J. B., B. TANGENDAJAJA and B. MARYANTO, J. SCI. FOOD AGRIC., 34 : 529-. 1983.
- 12) JONES, R. J. WORLD ANIM. REV. 31 : 13-23. 1979.
- 13) ALVAREZ, F. J., A. WILSON and T. R. PRESTON, TROP. ANIM. PROD., 2 : 288-291. 1977.
- 14) FUJIYA, H. and S. TAWATA, LEUC. RES. REPTS. 6, 64. 1985.
- 15) 神立 誠, 家畜栄養学, 182-183. 国立出版. 東京. 1981.

Ⅱc 給与動物における病理組織学的所見

目 的

ピルイピルを給与した動物（ヒツジ）の組織における病変の有無を検索した。

材料と方法

アルファルファベレットのみを給与した対照区、イピルイピルのサイレージ給与区（S区と略す）およびイピルイピルの天日乾燥給与区（D区と略す）の各ヒツジを、給与試験終了後ただちにと殺し（放血死）、各種臓器を摘出してブアン液に固定した。組織片を50%アルコールでよく洗浄後、脱水・透徹そしてパラフィンに包埋後、4～5mmに薄切しH・E染色をほどこして光学顕微鏡的に観察し病理組織学的に検討した。

結 果

1. イピルイピルサイレージ給与区の病理所見

(1) 第一胃

第一胃乳頭の角質層の肥厚及び角化細胞の膨化が認められた。しかしその他の異常は認められなかった。

(2) 肝臓

軽度のクッパー星細胞の活性化が認められた。

(3) 肺

軽度の円形細胞の浸潤巣が認められ、肺胞壁が全体的にやゝ肥厚し、また終末細気管支上皮の変性も散見され、軽度の「間質性肺炎」と判断した。

(4) 大脳・小脳・延髄

おもにこれらの三臓器に共通して、不明な結晶様物質（“X小体”と仮称）が出現した。このX小体は出現部位が一定しておらず、また実質中にも血管内にも出現するが前者のケースの方

が多い。形状は不定形であるが楕円形の場合が多く、サイズは変化に富み長径が10mm前後から大型のものでは125×100mmに達するものもある。本物質はヘマトキシリンに弱く染まり、約2.5mmの規則的な横じまが存在する。

その他で検索した第二胃・第三胃・第四胃・小腸（回腸）・大腸（直腸）・肝臓・膵臓・肺・腎臓・膀胱・下垂体・甲状腺・松果体・副腎・心筋・脾臓・大脳・小脳・延髄などに異常はみられなかった。

2. イピルイピル天日乾燥給与区の病理所見

(1) 甲状腺

全般的に濾胞（小胞ともいう）のサイズが小さくなり、小型ないし圧迫された濾胞が多くなり、甲状腺組織の萎縮像とみなされる。

一部の濾胞上皮に過形成の傾向が認められ、また結合組織の少量の増加があった。これらの組織を総合して「甲状腺機能低下症」と診断した。

(2) 胃

サイレージ給与区と同じ所見であった。

(3) 小腸（回腸）

粘膜上皮の部分的な壊死と出血巣が認められた。

(4) 肝臓

サイレージ給与区と同じ所見であった。

(5) 大脳・小脳・延髄

サイレージ給与区と同じ所見であった。

その他の臓器においては異常は認められなかった。

考 察

今日まで、イピルイピルを家畜・実験動物・家禽などに給与した実験は多数あるが、ヒツジに調整したイピルイピルのサイレージを給与した試験の報告は見あたらない。Jones^{2 3)}は生

葉イピルイピルの放牧牛に対する反応として、生体重の減少・唾液分泌の過多・脱毛・listlessness（けん怠感・元氣喪失）・食欲不振・甲状腺腫などを報告しており、甲状腺腫の原因物質はミモシンの分解産物であるDHPであると指摘している。Owen²¹はイピルイピル給与のヒツジへの反応として、膀胱炎・直腸炎をあげている。今回、調整したイピルイピルペレットのミモシン含有量は、S区で $0.26 \pm 0.02\%$ 、D区で $0.75 \pm 0.06\%$ でミモシン量はD区がS区よりも約3倍高い値を示した。また、DHPの含有量はS区で $0.46 \pm 0.06\%$ 、D区で $0.26 \pm 0.01\%$ とDHP量はS区の方がD区よりも約2倍高い値であった。イピルイピルサイレージのヒツジ給与実験の報告が見あたらないので直接比較できないが、今回の実験で最も注目に値する現象は、D区で見られた甲状腺の反応であった。Jones²²はウシで甲状腺腫を呈した甲状腺の重量は、対照牛の約10倍に達すると報告している。今回のヒツジの甲状腺重量は、対照区：2.85g、S区：3.60g、D区：2.90g（固定後全重量）であり、S区はやゝ大きかったが病理組織学的には何ら異常は認められなかった。D区の甲状腺は重量が対照区とほとんど同程度にもかかわらず、病理学的には「甲状腺機能低下症」といえるものであった。今回の実験で甲状腺に関しては、Jonesの成績とはまったく正反対の結果を示した。その理由として考えられることは、①ウシとヒツジ（肉用種）という種差の問題、②今回のイピルイピルペレット中のミモシン・DHP含有量が1%以下と低かったこと、③給与期間が60日間と短かったことの3点が指摘できる。甲状腺機能低下症の原因には2つがあり、①甲状腺自身に起因するときと、②下垂体の機能低下に伴いTSHの分泌低下による場合である（飯島）。②のケースでは常に副腎と性腺の異常を伴うが、今回の実験では副腎には何ら異常は認められていないので、①のケースと考えられる。しかし、もっと本質的な問題も一方にある。すなわち、オーストラリア以外の亜熱帯・熱帯諸国において「甲状腺腫」の報告がないことであり、この点についてJonesも記載をしている。大陸内部の山間地方には人においてヨード欠乏により、「地方病性甲状腺腫」が見い出されている。Jonesの実験に用いた場所は、オーストラリアの中でもヨード欠乏気味な地方だったのでなかろうか？すなわち、「ヨード不足傾向がイピルイピル給与」という条件が甲状腺腫を発生させるのではないだろうか。そして、DHPの甲状腺腫のaccbatorとして作用したのではないだろうか。なぜなら、ヨードは甲状腺腫の治療剤として用いられており、沖縄島をはじめとする島嶼地帯の土壌中には比較的多くのヨードを含有しているからである。沖縄島においてイピルイピルを給与しても甲状腺腫が発生しないのは、家畜が植物よりヨードを十分に摂取しているからである。沖縄島では反すう獣において、DHPよりもミモシンが「甲状腺機能低下症」の発症の主役をになっているのではないだろうか。

大脳と小脳におもに出現し、ヘマトキシリンに弱染して不整形・大小不同で2.5mmのシマ模様を有する結晶様物質（X小体と仮称）の正体については、今日のところ不明である。ただしこの小体は対照群には出現せず、イピルイピル給与群（S区しD区）に出現するので、ミモシンまたはDHPのいずれかの作用か、または両物質の作用の結果なのかもしれない。Jonesはイピルイピル給与の一つの反応として“listlessness”（けん怠感、無関心）をあげている。このX小体が増加すると、listlessnessとなるのかは不明であるが、今回の実験に用いたヒツジ群において実験終了時においてもlistlessnessらしい状態は観察されなかった。今後、X小体を組織化学的に詳しく追求したい。

S区のヒツジに軽度の間質性肺炎を認めたが、DHPの影響かどうかは不明である。

D区の回腸において粘膜上皮よりの小型出血巣をかなり認めた。イピルイピル給与による食欲不振の一因は、ミモシンの小腸粘膜への直接的な障害作用と思われる。

結論として、今回のイピルイピル給与試験の結果、S区の方がD区よりも生体に対する反応の程度がより小であったといえる。しかし、サイレージの給与量は今後若干の検討が必要であろう。

要 旨

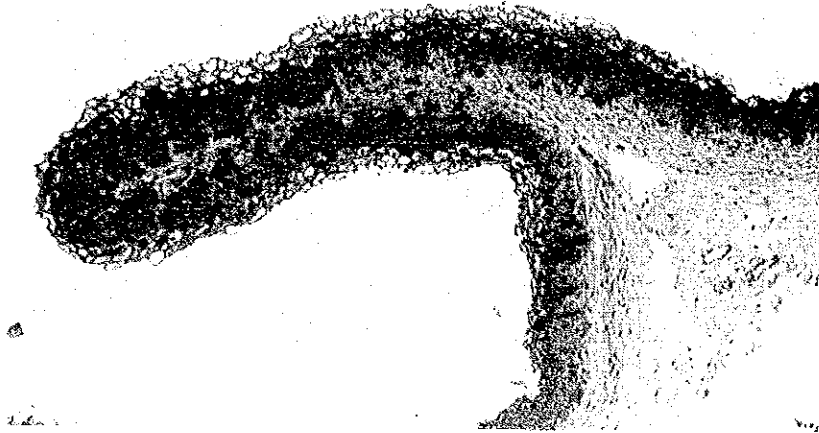
ヒツジ（去勢雄）にイピルイピルを調製したサイレージ飼料（S区）と天日乾燥飼料（D区）を60日間給与し、諸内臓を病理組織学的に検索し下記の成績を得た。

- (1) イピルイピル給与区でみられた共通の所見は、つぎの3点であった。
 - 1) 肝臓のクッパー星細胞に軽度の活性化が認められたこと。
 - 2) 第一胃乳頭角質層の肥厚。
 - 3) 大脳・小脳を中心としてヘマトキシリンに弱染する不整形で大小不同の結晶体（小体と仮称）が出現したこと。
- (2) S区の肺には、軽度の間質性肺炎が認められた。
- (3) D区において甲状腺は「甲状腺機能低下症」を呈し、「甲状腺腫」は認められなかった。小腸の粘膜上皮に出血が認められた。
- (4) イピルイピル調製飼料の中で、S区の方がD区よりも毒性は低いことが判明した。

引用文献

1. 飯島 宗一編 病理学各論 (第2版) 261-290, 文光堂, 1979
2. Jones, R.J. et al. Tropical Grasslands, 10, 113-116, 1976
3. Jones, R.J. et al. CSIRO information Service, 41-4, 1-4, 1982
4. Owen, L.N. Veterinary Record, 70, 454-457, 1958

Fig.1



rumen

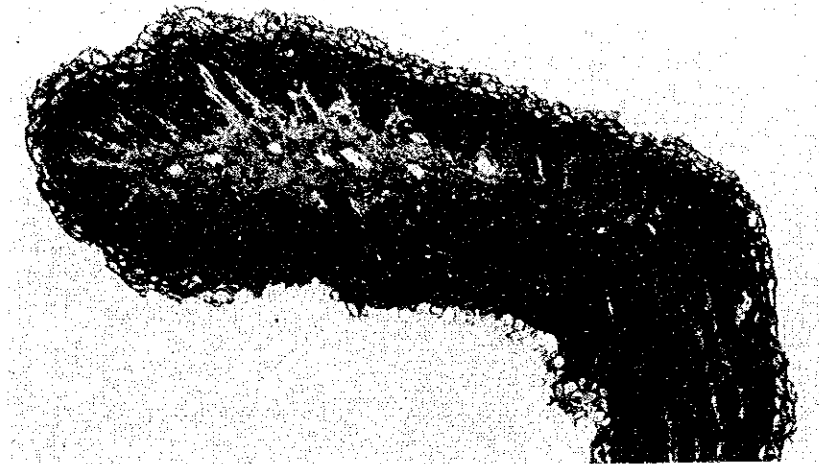
alfalfa group

Fig.2



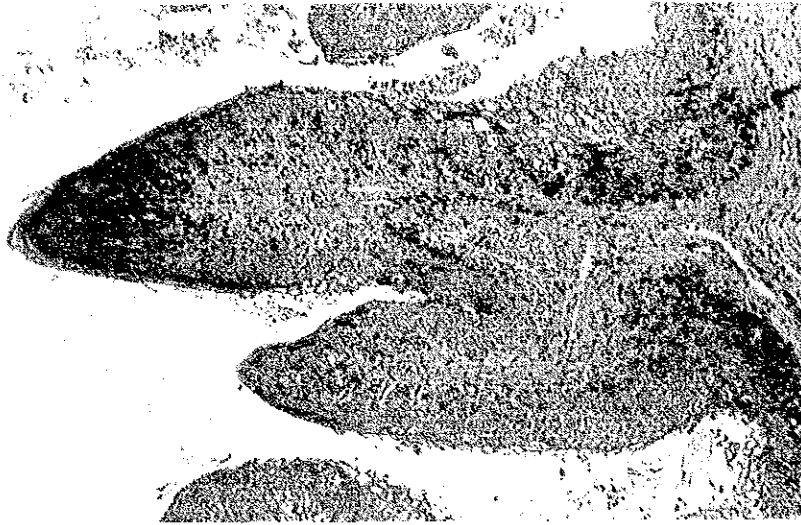
silage group

Fig.3



haylage group

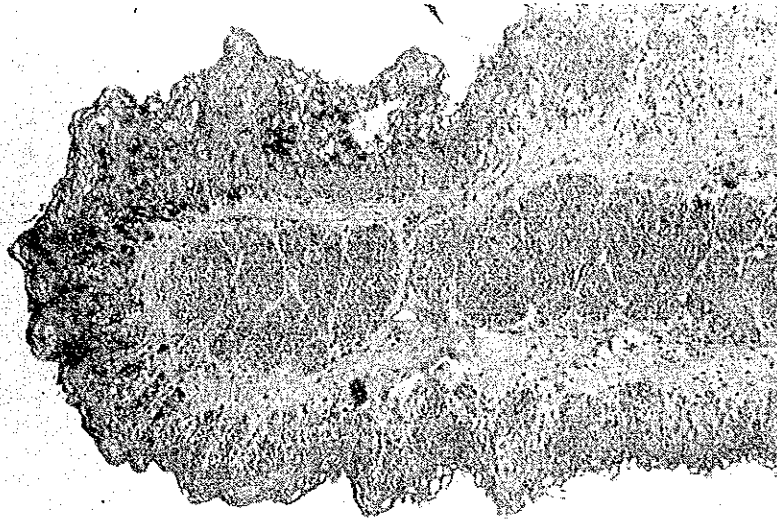
Fig.4



reticulum

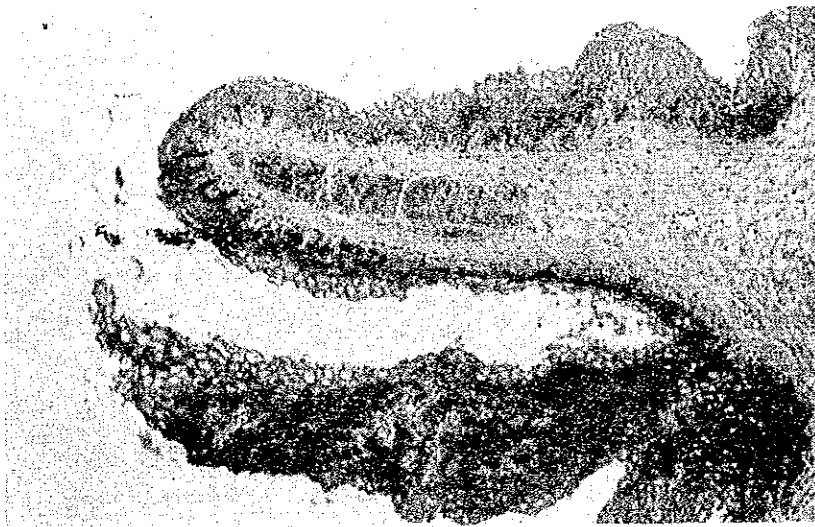
alfalfa group

Fig.5



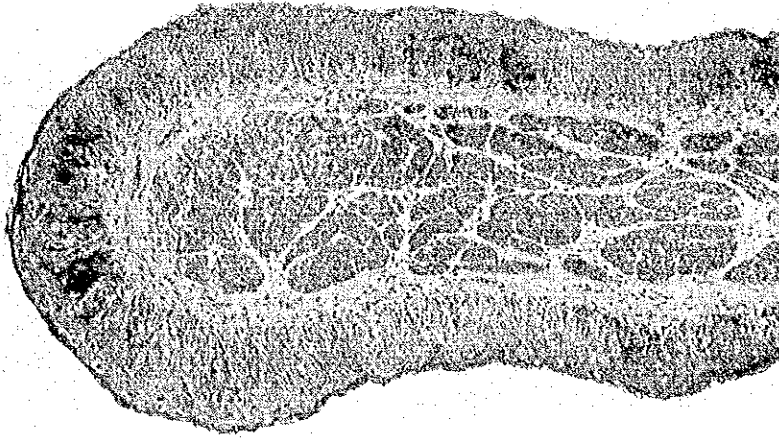
silage group

Fig.6



haylage group

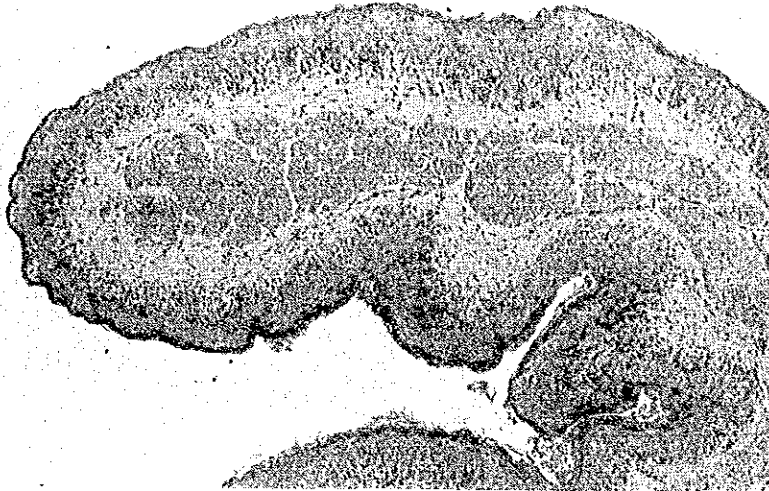
Fig.7



omasum

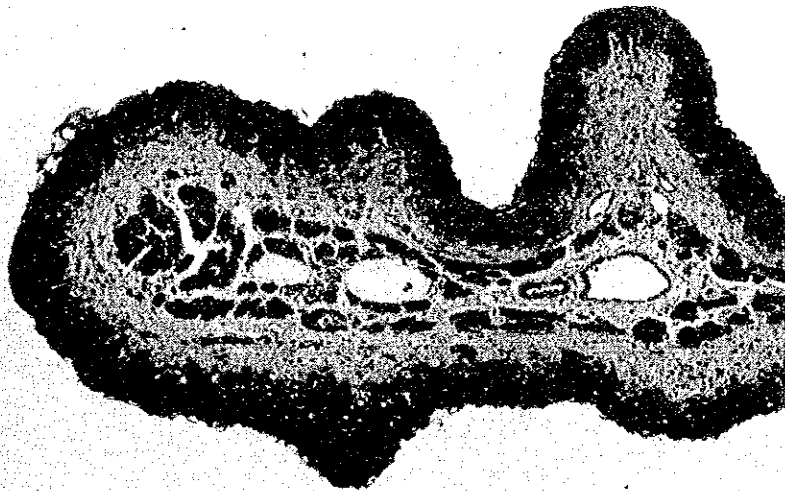
alfalfa group

Fig.8



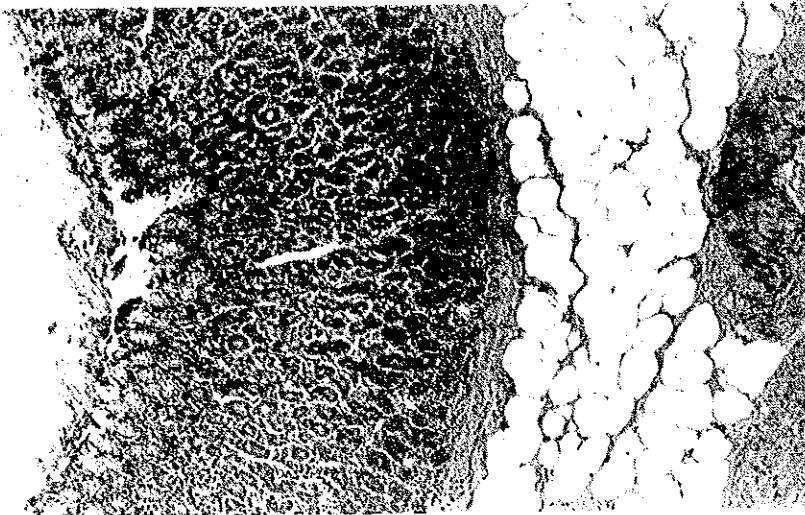
silage group

Fig.9



haylage group

Fig.10



abomasum

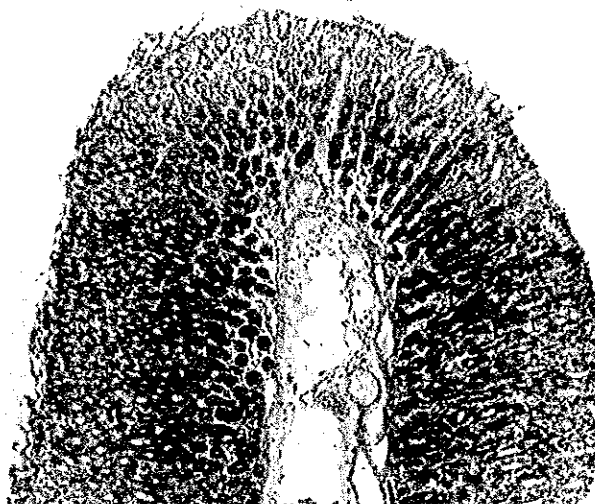
alfalfa group

Fig.11



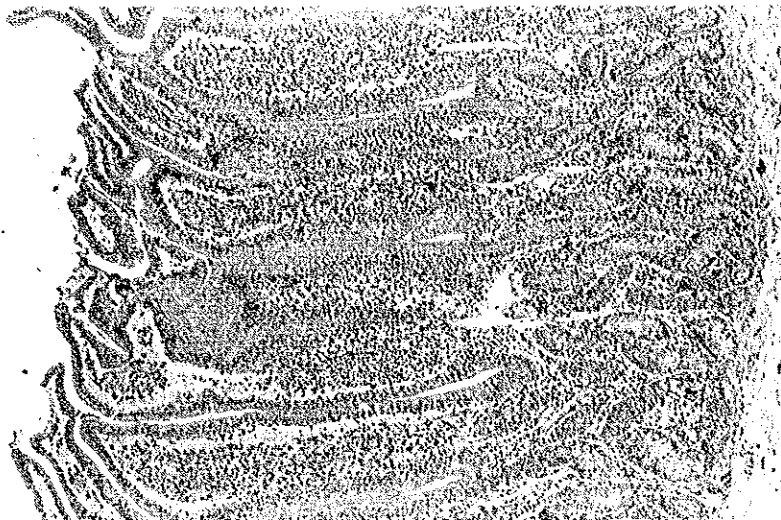
silage group

Fig.12



haylage group

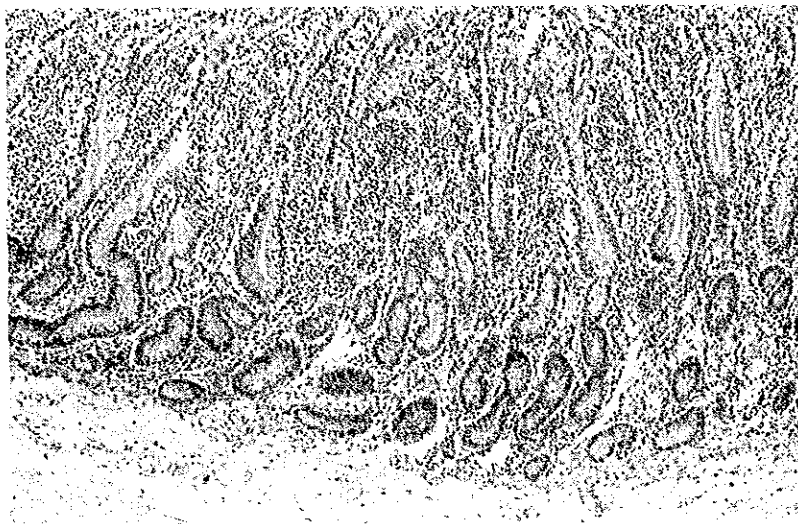
Fig.13



ileum

alfalfa group

Fig.14



silage group

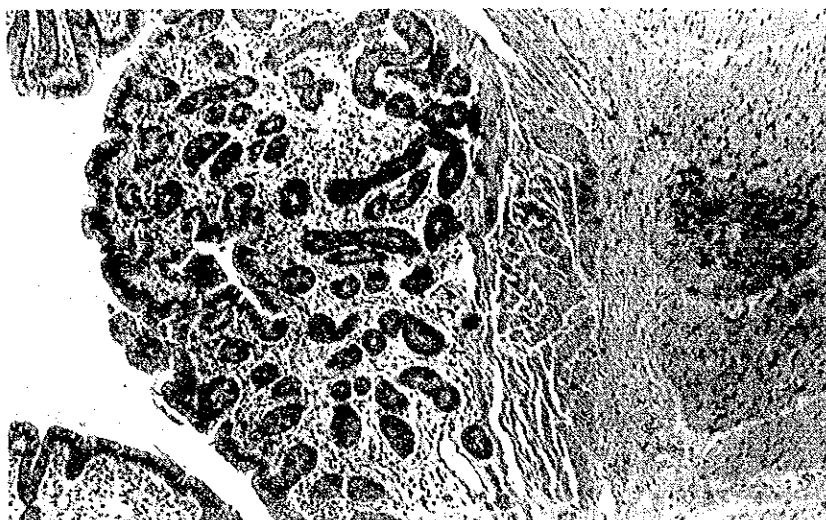
Fig.15



haylage group

hamorrhage and degeneration of epithelium

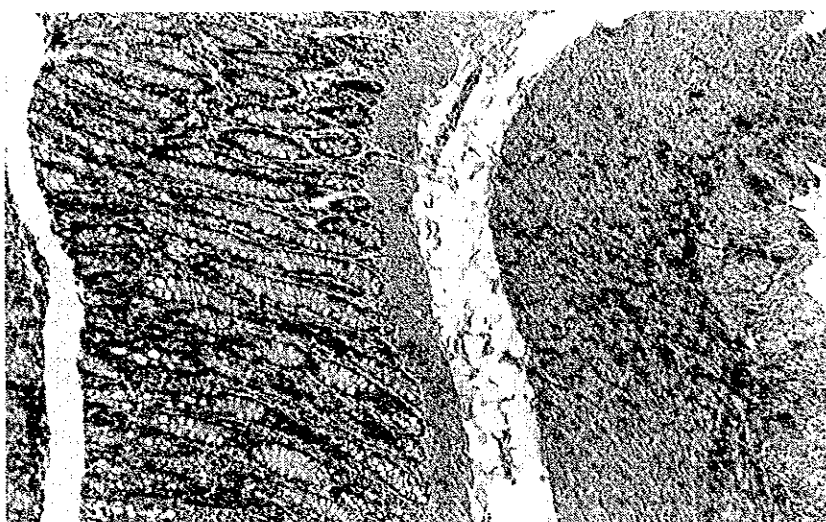
Fig.16



rectum

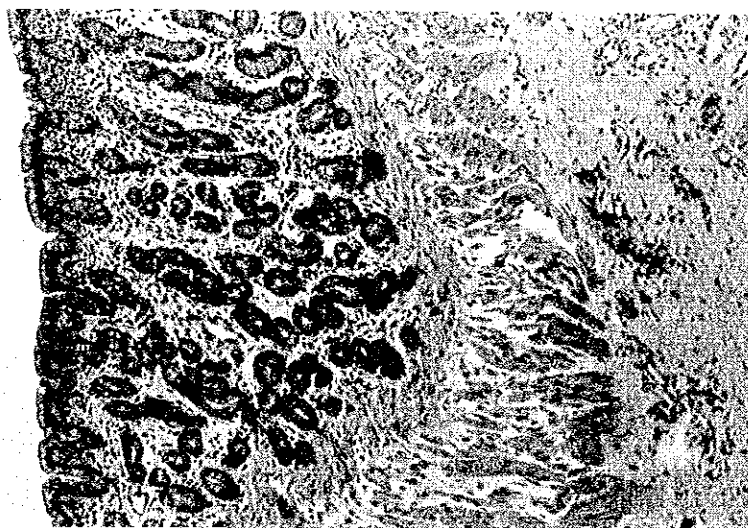
alfalfa group

Fig.17



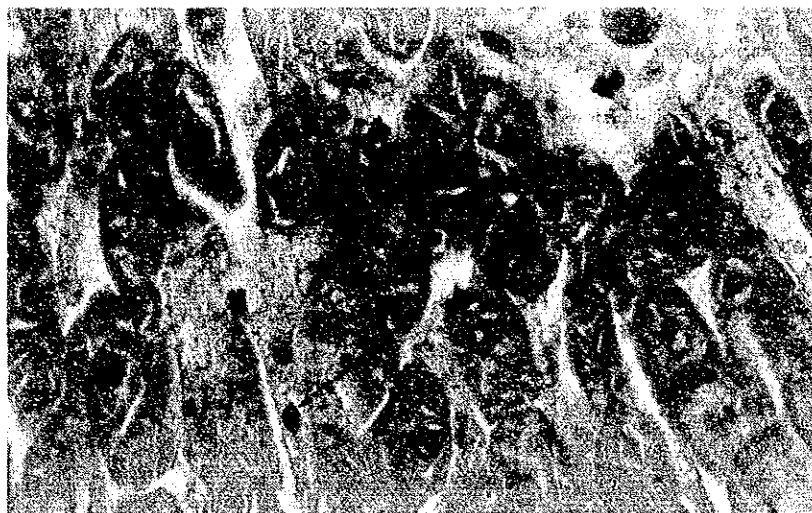
silage group

Fig.18



haylage group

Fig.19

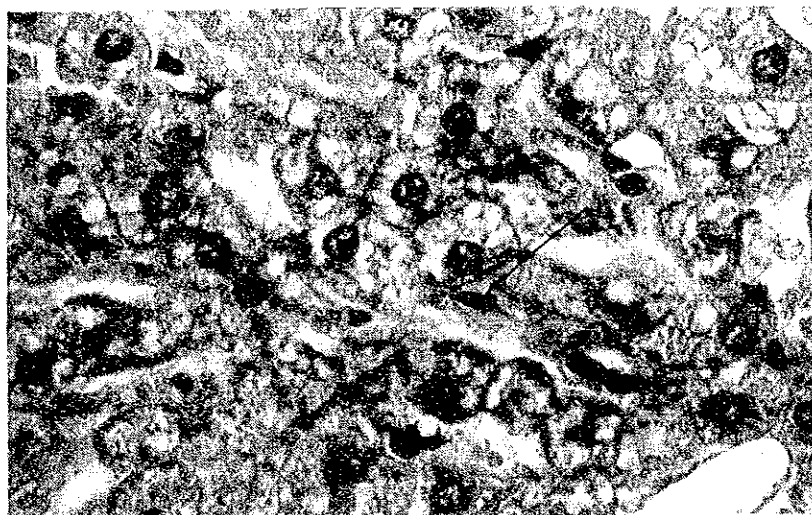


liver

alfalfa group

stellate cells of Kupffer (arrow)

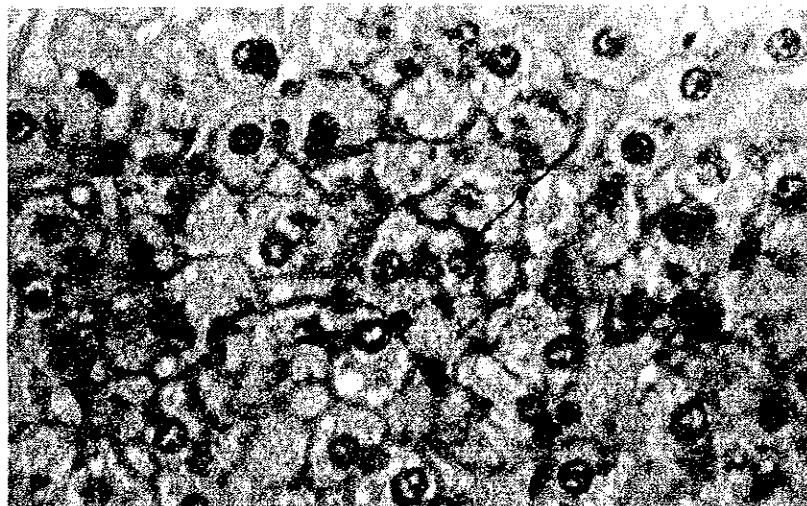
Fig.20



silage group

weak activation of stellate cells of Kupffer (arrow)

Fig.21



haylage group

weak activation of stellate cells of Kupffer (arrow)