

# 琉球大学学術リポジトリ

## [報文]ブロイラ-雛でのギンネム種子粉末を用いたミモシン中毒症の誘発とその防止法

メタデータ	言語: 出版者: 南方資源利用技術研究会 公開日: 2014-10-26 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 鎌田, 靖弘, 大城, 伸明, 屋 宏典, 本郷, 富士弥, 知念, 功, KAMADA, Yasuhiro, OSHIRO, Nobuaki, OKU, Hirosuke, HONGO, Fujiya, CHINEN, Isao メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/20.500.12000/0002016574">http://hdl.handle.net/20.500.12000/0002016574</a>

## ブロイラー雛でのギンネム種子粉末を用いた ミモシン中毒症の誘発とその防止法

鎌田靖弘・大城伸明・屋 宏典・本郷富士弥・知念 功  
(琉球大学農学部生物資源科学科\*)

Induction and Prevention of Mimosine Toxicity in Broiler Chicks  
Fed *Leucaena leucocephala* Seed Powder

Yasuhiro KAMADA, Nobuaki OSHIRO, Hirosuke OKU,  
Fujiya HONGO<sup>†</sup> and Isao CHINEN  
*Laboratories of Applied Biochemistry and Applied Bioresource  
Science<sup>†</sup>, Faculty of Agriculture, University of The Ryukyus,  
Nishihara, Okinawa, 903-01, Japan*

### 緒 言

熱帯、亜熱帯性マメ科飼料木ギンネムは、栄養価が高く、旺盛に繁殖するため、飼料資源の乏しい熱帯地域では家畜の飼料として用いられている。しかし、毒性アミノ酸ミモシンが存在するため、飼料として家畜に継続給与すると食欲不振、体重増加の抑制、脱毛等の中毒障害が起こることから、飼料としての利用は制限されている<sup>1-3)</sup>。ギンネムを安全な飼料として開発するには、ミモシンを除去または無毒化する必要がある。それにはまず実験動物に中毒症を誘発させ、次にその諸症状および機構を研究する必要がある。本来ならこの中毒症を誘発させるにはミモシンのみを投与すべきだが、ミモシン調製に時間を要する為、本実験では比較的ミモシン含量の高いギンネム種子粉末を調製し市販飼料に配合して、まずブロイラー雄雛に12日間自由給与し、ミモシン中毒症を惹起させ諸症状を観察し、次にピリドキサルリン酸等をギンネム種子粉末飼料に添加し、ミモシン中毒症の誘発防止法を検討した。

### 材料および方法

#### 1. 材 料

##### 1) ギンネム粉末種子の調製

褐色化した完熟ギンネム種子を入手(琉球バイオリソース株式会社)し、粉碎後、20メッシュの篩にかけギンネム種子粉末を調製した。

##### 2) 粗ミモシン調製

粉碎種子350gに水2400mlを加えて1時間加熱抽出した。次に同量のエタノールを加え不純物を沈澱させ吸引ろ過し除去した。そのろ液を8時間冷凍保存し沈澱させ、不純物を遠心分離(5000rpm、20分)し除去した。その上清はロータリーエバポレーターで100-150mlに濃縮した。その後冷蔵庫に保存しミモシンを沈澱させ遠心分離(500rpm、20分)し、約5gの粗ミモシンを調製した。

##### 3) 実験動物

実験動物のブロイラー雄雛はコブ系の雑種で、ふ化したばかりのものを入手し(沖縄畜産開発会社石川ふ卵場)、1週間市販のブロイラー前期飼料(沖縄県飼料協同組合)で予備飼育した。

#### 2. 実験方法

まず、中毒症を惹起させるに必要なギンネム

\*沖縄県西原町千原一

種子粉末量を決定するために、市販飼料にギンネム種子粉末を10%（ミモシン含量0.65%）、15%（ミモシン含量0.98%）および20%（ミモシン含量1.30%）添加した飼料群を設けた。次に、15%種子粉末飼料と同じミモシン含量になるように、粗ミモシン飼料を1%添加した群を設け、15%種子群と比較した。これらの実験では全て対照群を設け、市販飼料のみを給与した。各群は5羽ずつ設定し12日間自由給与した。その間、毎日体重と採食量を測定し、最終日には総排泄物を採取した。屠殺後、血液、肝臓、腎臓、精巣、甲状腺、胸筋、大腿二頭筋、皮膚、羽毛、冠を摘出しミモシン含量をHPLCにより測定した。次に1週齢の雛に15%種子粉末飼料を12日間自由給与し、ミモシン中毒症を誘発させた雛に市販飼料を20日間給与し、市販飼料給与後、4日ごとに4羽ずつ屠殺し、各組織中のミモシン含量を測定しその代謝を調べた。最後に15%種子粉末飼料にアスコルビン酸1.0%、ピリドキサルリン酸1.0%、クルクミン0.5%、生ニンニク5.0%を各々添加した飼料群を設け、12日間給与後同様に各測定を行い、15%種子群と比較し、ミモシン中毒症の誘発防止法を検討した。

なお、全ての実験飼育はステンレスケージで個別飼育し、飼料は粉餌用給餌器を用い、室温 $25 \pm 2^\circ\text{C}$ 、除湿機を用い湿度を調節し、12時間の明暗交代の環境下の動物室で飼育を行った。

### 3. 各組織中のミモシン含量の測定法

試料1.0gに対して0.1N塩酸溶液を6.0ml加えてホモゲナイズし、次に15%トリクロロ酢酸(TCA)溶液を4.8ml加え20分放置後、遠心分離(12,000rpm、20分)し、沈殿物を除去した。得られた上清はHPLC用フィルターを通した後、その濾液の5-15  $\mu\text{l}$ をHPLCに注入し分析した。血清は1.0mgに対し15%TCA溶液を0.8ml加えた。HPLCは前報告<sup>4)</sup>の通り、Shimpack CLC-ODS (150 $\times$ 0.6cm)のカラムを用い、波長250nmで測定した。

## 結 果

### 1. ギンネム葉と種子のミモシン含量

種子のミモシン含量は茎葉部と比較して約6倍多かった。また、種皮を除去して得られる胚種は、更に種子の3倍多かった。粉碎機で粉碎した種子を20メッシュの篩にかけ、大部分の種皮を除いた種子粉末は、種子より約2倍多かった。そのため、本実験では比較的ミモシン含量の高い種子粉末を用いた。なお、粗ミモシンの精製率は87.2%であった (Table 1)。

Table 1. Mimosine Content of Young Leaf, Seed, Germ, Seed Powder, and Crude Mimosine of *L.leucocephala* (%FM)

	Mimosine
Young leaf	0.56
Seed	3.46
Germ	11.07
Seed powder	6.55
Crude mimosine	87.20

FM= Fresh matter

### 2. ギンネム種子粉末飼料によるミモシン中毒症

採食量および体重は対照群では日々順調に増加したが、各種子群では1日目まで低下し、その後も増加は全く認められず極度の食欲不振および体重増加の減少が認められた。対照群と比較すると10%種子群は採食量で2日目から、体重で4日目から、15%および20%種子群は採食量で1日目から、体重で3日目から各々有意 ( $p < 0.01$ ) に低下し、特に15%以上の種子群では食欲不振の症状が顕著であった (Table 2)。また各種子群で4日目から座り込み、足を痙攣させる特異的な脚弱症状が見られ、解剖所見では腎臓の肥大化も見られた。また15%および20%種子群で各々20%、40%の死亡が見られた。

屠殺後、殆どの組織中でミモシンが検出された。大部分のミモシンが排泄物中に検出され、日々の採食量からその値を差し引き、体内に取

り込まれたミモシンの割合を求めると約35%であった。また組織では特に腎臓、羽毛、皮膚でミモシン含量が高かった。各種子群でミモシン含量を比較すると組織によって差はあったが15%種子群で高かった (Table 3)。

次に1%粗ミモシン飼料を給与し、ミモシン由来の中毒症であるかを確認した。その結果、採食量および体重は対照群では順調に増加したが、15%種子および1%ミモシン群では共に1日目よりそれらの増加は見られなかった。対照

群と比較すると両群の採食量は1日目より、体重は5日目より有意 ( $p < 0.01$ ) に低下した。体重増加量も15%種子群で5.5g/day、1%ミモシン群で7.0g/dayであり、1%ミモシン群は15%種子群と全く同様の食欲不振、体重増加の減少が見られた。(Table 4)。また特異的な脚弱症状および腎臓の肥大も15%種子群と同様に認められ、各組織中のミモシンもほぼ同じ濃度存在した。

Table 2. Growth of Chicks Fed Commercial Diets with 0,10,15 and 20% *L.leucocephala* Seed Powder

		Control diet	10% seed diet	15% seed diet	20% seed diet
Food intake (g/day)	Initial	22.5 ± 2.7	23.6 ± 2.6	23.0 ± 2.5	22.5 ± 4.4
	Final	68.8 ± 7.9 <sup>a</sup>	21.4 ± 5.5 <sup>b</sup>	18.7 ± 8.1 <sup>b</sup>	13.7 ± 3.9 <sup>b</sup>
Body weight (g)	Initial	112.4 ± 11.2	115.8 ± 8.1	113.4 ± 14.2	113.0 ± 17.2
	Final	408.0 ± 39.8 <sup>a</sup>	180.8 ± 20.0 <sup>b</sup>	142.2 ± 37.7 <sup>b</sup>	134.3 ± 9.1 <sup>b</sup>
Body weight gain (g/day)		24.7 ± 2.4 <sup>a</sup>	4.7 ± 1.1 <sup>b</sup>	2.7 ± 3.1 <sup>b</sup>	1.8 ± 0.9 <sup>b</sup>

Means ± S.D., n = 5

The different superscript letters show statistically significant difference at  $p < 0.01$

Table 3. Mimosine Content in Tissues of Chicks Fed Commercial Diet with 10,15 and 20% of *L.leucocephala* Seed Powder ( $\mu\text{g/g}$ )

Tissues	10% Seed	15% Seed	20% Seed
Feather	213.6 ± 54.7	377.5 ± 238.8	303.4 ± 40.1
Skin	119.9 ± 51.4	241.0 ± 55.1	117.3 ± 36.5
Kidney	154.4 ± 130.7	142.1 ± 99.7	73.3 ± 45.0
Biceps femoris muscle	31.1 ± 7.9	54.5 ± 19.3	46.2 ± 36.7
Pectoral muscle	35.7 ± 17.7	75.5 ± 25.1	48.9 ± 36.8
Serum	27.2 ± 15.6	76.6 ± 36.6	64.8 ± 18.2
Crown	149.8 ± 71.6	289.6 ± 277.7	351.9 ± 272.4
Testis	143.2 ± 54.2	243.8 ± 59.8	221.3 ± 57.7
Thyroid gland	80.0 ± 19.1	74.2 ± 32.9	130.9 ± 117.5
Liver	20.2 ± 19.9	41.1 ± 15.0	48.5 ± 5.6
Excretion	24661.9 ± 3560.0	24359.6 ± 2008.2	23553.3 ± 4008.7

Means ± S.D., n = 5

Table 4. Growth of Chicks Fed Commercial Diets with 0, 1 % of Crude Mimosine and 15 % *L.leucocephala* Seed Powder

		Control diet	15 % seed diet	1 % mimosine diet
Food intake (g/day)	Initial	19.6 ± 3.0	23.2 ± 4.1	22.0 ± 4.0
	Final	49.8 ± 6.9 <sup>a</sup>	16.8 ± 8.8 <sup>b</sup>	19.2 ± 3.0 <sup>b</sup>
Body weight (g)	Initial	75.0 ± 11.5	75.0 ± 12.2	75.2 ± 11.6
	Final	341.8 ± 51.7 <sup>a</sup>	140.6 ± 38.7 <sup>b</sup>	159.0 ± 11.4 <sup>b</sup>
Body weight gain (g/day)		22.3 ± 3.5 <sup>a</sup>	5.5 ± 3.1 <sup>b</sup>	7.0 ± 1.2 <sup>b</sup>

Means ± S.D., n = 5

The different superscript letters show statistically significant difference at  $p < 0.01$

### 3. ミモシン中毒症雛のミモシンの代謝

15%種子粉末飼料を12日間給与すると、採食量および体重が対照群と比較して1日目から低くなり採食量が4日目より、体重で5日目より有意差 ( $p < 0.01$ ) が認められ、更に座り込み、足の痙攣等の中毒症状を認めたので、次に市販飼料を給与した。その結果、採食量は急激に増加し市販飼料給与後17日目では対照群との有意差が認められなくなった (Fig. 1)。体重もそれに呼応して増加し有意差はあるものの市販飼料給与後9日目より徐々にその増加が対照群と等しくなった (Fig. 2)。また市販飼料給与後、4日ごとに屠殺し各組織中のミモシン含量を調べた結果、羽毛、甲状腺では他の組織と比較して、20日目でもかなりのミモシンが検出され、中毒時を100%とする20日目では羽毛は約13%、甲状腺は約50%に減少した。それに対し、腎臓、血清、肝臓は4日目から、総排泄物は8日目から検出されなくなった。その他の組織でもかなり減少し、中毒時を100%とする20日目では皮膚で1.2%、大腿二頭筋で0.2%、胸筋で6.7%、冠で3.0%、精巣で6.7%までに低下した (Table 5)。

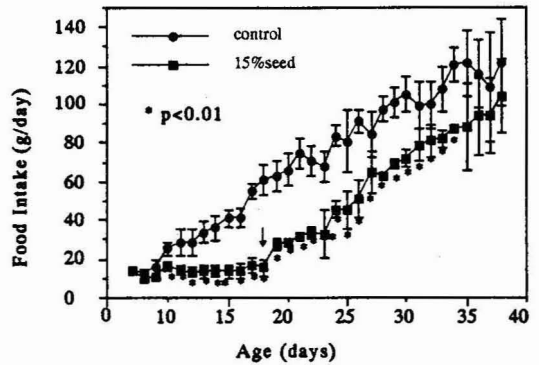


Fig. 1 Food Intake of Chicks Fed Commercial Diet for 20 Days after Feeding Commercial Diet with 15 % *L.leucocephala* Seed Powder for 12 Days  
↓ Means the first day changed to commercial diet

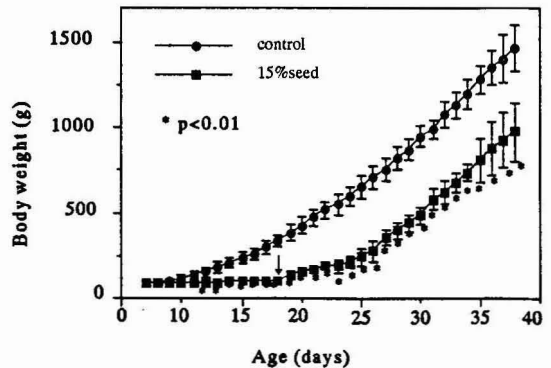


Fig. 2 Body Weight of Chicks Fed Commercial Diet for 20 Days after Feeding Commercial Diet with 15 % *L.leucocephala* Seed Powder for 12 Days  
↓ Means the first day changed to commercial diet

Table 5. Mimosine Content in Tissues of Chicks Fed Commercial Diet for 20 Days after Feeding Commercial Diet with 15 % of *L.leucocephala* Seed Powder for 12 Days ( $\mu\text{g} / \text{g}$ )

Tissues	0 Days	4 Days	8 Days	12 Days	16 Days	20 Days
Feather	698.5± 400.7	434.5± 99.0	499.0±220.4	198.5±66.9	251.1±45.0	81.4±45.5
Skin	944.7± 323.6	89.9± 68.9	41.0± 27.0	18.6±16.5	4.1± 3.3	10.9± 4.1
Kidney	91.2± 62.9	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Biceps femoris muscle	81.9± 33.4	19.4± 3.4	17.2± 4.4	13.4±8.8	3.7± 1.5	0.2± 0.1
Pectoral muscle	92.4± 37.6	11.0± 1.0	10.0± 1.1	7.0±3.0	5.3± 2.0	6.2± 1.8
Serum	69.6± 53.3	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Crown	215.9± 20.7	41.4± 11.0	54.0± 25.1	13.6±5.2	10.4± 4.2	6.4± 0.4
Testis	191.0± 66.0	43.9± 17.7	49.2± 24.9	15.4±15.2	9.4± 6.5	12.8±10.1
Thyroid gland	101.4± 58.1	45.6± 8.6	80.5± 56.1	47.3±27.7	24.9±20.0	58.9±34.0
Liver	43.1± 31.0	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Excretion	26182.6±4419.9	386.0±309.0	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

Means±S.D., n= 4

Table6. Growth of Chicks Fed Commercial Diets Added 1 % Ascorbic Acid, 1 % Pridoxal Phosphate, 0.5 % Crucumin and 5 % Garlic to 15 % of *L.leucocephala* Seed Powder

		Control	15 % seed	15% seed+1% Ascorbic acid	15% seed+1% Pridoxal phosphate	15% seed+ 0.5% Crucumin	15% seed+ 5% Garlic
Food intake (g/day)	Initial	23.1± 3.7	23.4± 4.6	24.2± 4.4	22.6± 3.3	22.4± 2.6	23.2± 2.3
	Final	64.2±15.6 <sup>a</sup>	17.1± 2.8 <sup>b</sup>	19.7± 2.3 <sup>b</sup>	17.2± 1.9 <sup>b</sup>	20.4± 1.7 <sup>b</sup>	18.3± 1.4 <sup>b</sup>
Body weight (g)	Initial	88.4±12.8	85.8± 6.0	85.6± 7.4	87.8± 9.0	88.2± 8.0	74.5±10.6
	Final	348.6±71.9 <sup>a</sup>	126.4±20.7 <sup>b</sup>	141.2±13.5 <sup>b</sup>	128.5±14.5 <sup>b</sup>	136.4±17.8 <sup>b</sup>	138.6± 8.6 <sup>b</sup>
Body weight gain (g/day)		23.5± 5.6 <sup>a</sup>	3.7± 1.5 <sup>b</sup>	5.1± 0.9 <sup>b</sup>	3.7± 1.1 <sup>b</sup>	4.4± 1.3 <sup>b</sup>	5.7± 0.7 <sup>b</sup>

Means±SD, n= 5, The different superscript letters show statistically significant difference at  $p < 0.01$

Table7. Mimosine Content in Tissues of Chicks Fed Commercial Diets Added 1 % Ascorbic Acid, 1 % Pridoxal Phosphate, 0.5 % Crucumin and 5 % Garlic to 15 % of *L.leucocephala* Seed Powder ( $\mu\text{g} / \text{g}$ )

Tissues	15% Seed	15% seed+1% Ascorbic acid	15% seed+1% Pridoxal phosphate	15% seed+ 0.5% Crucumin	15% seed+ 5% Garlic
Feather	576.1± 441.6	486.1± 292.9	379.2±134.6	749.2±513.4	139.3±98.7*
Skin	59.9± 44.4	87.4± 23.5	56.0± 18.7	77.3± 17.2	23.4±15.9
Kidney	116.4± 74.8	126.8± 48.1	91.0± 42.0	133.1± 88.3	93.6±24.9
Biceps femoris muscle	41.1± 14.5	60.0± 11.9*	23.2± 17.7*	34.2± 9.6	35.7± 7.8
Pectoral muscle	75.4± 19.7	57.0± 35.3	66.1± 31.1	77.2± 36.6	27.2± 8.4*
Serum	26.8± 11.3	33.6± 13.9	26.2± 16.6	20.9± 17.0	21.7± 6.9
Crown	43.2± 39.5	69.7± 50.8	88.8± 78.4	107.8± 63.3	46.7±10.6
Testis	1244.7± 572.2	534.2± 513.6	852.0±604.5	830.3±370.6	52.5±18.9*
Thyroid gland	993.7± 551.8	1121.4± 515.3	1516.7±751.2	1328.6±1036.4	N.D.
Liver	19.9± 17.1	32.4± 25.4	N.D.	32.5± 15.6	67.0±33.5*
Excretion	15079.8±3479.0	12295.2±1518.0	6022.1±649.6*	11282.4±719.6*	

Means±S.D., n= 5, \* Significantly different from 15% seed group at  $P < 0.01$

#### 4. ミモシン中毒症の誘発防止の検討

採食量および体重はアスコルビン酸、ピリドキサルリン酸、クルクミン、生にんにくのいずれを添加しても、対照群と比較して3日目より有意 ( $p < 0.01$ ) に低下し、食欲不振および体重増加の抑制は防止できなかった (Table 6)。一方、各組織中のミモシン含量は15%種子群と比較して、1%ピリドキサルリン酸添加群では大腿二頭筋および排泄物において、生にんにく添加群では羽毛、胸筋、精巣において有意 ( $p < 0.01$ ) に低下した。しかし、アスコルビン酸添加群の大腿二頭筋および生にんにく添加群の肝臓中のミモシン含量は、15%種子群と比較して有意 ( $p < 0.01$ ) に増加した。組織全体としてのミモシン含量は、1%ピリドキサルリン酸添加群が最も減少する傾向を示した (Table 7)。

#### 考 察

ギンネム種子粉末飼料を給与した場合、極度の食欲不振、体重増加の減少が見られ、更に座り込み、足を痙攣させる特異的な脚弱症状が見られた。また、各組織中でミモシンの蓄積が見られた。これらの中毒症は粗ミモシン含有飼料を給与した場合にも同様同程度に見られた事から、この中毒症はミモシンによる中毒症であると断定され、7日齢のプロイラー雄雛に15%ギンネム種子粉末飼料を12日間自由給与すると、迅速かつ簡易にミモシン中毒症を誘発することが判明した。

各組織でのミモシンの代謝を調べた結果、羽毛、甲状腺では20日目でもミモシンが残留したが、その他の組織では検出されないか、極少量検出された。このことはミモシンは継続的に投与しない限り羽毛など以外では蓄積されることはなく、分解されるか排泄されると推察された。排泄経路については、ミモシン含有飼料給与時はミモシンの大部分は総排泄物中に排泄され、8日目から排泄物中にミモシンが検出されなかったが、皮膚、大腿二頭筋、胸筋、冠、精巣中の

ミモシンは8日後も徐々に減少している事より、ミモシンは排泄されるのではなく代謝分解されているのではないかと推察された。また、脱毛が見られることから羽毛中のミモシンは脱毛によっても排泄されると推察された。今回の実験では各組織中のミモシン濃度は各々の実験で多少の差異が見られた。これは各組織での分解や排泄能力に差があることによるとも考えられる。

アスコルビン酸、ピリドキサルリン酸、クルクミン、生にんにくを添加して、ミモシン中毒症の誘発防止法を検討したが、食欲不振および体重増加の抑制についてはいずれも効果を示さなかった。しかし、各組織中のミモシン含量はピリドキサルリン酸添加群で減少傾向を示した。この事から、ミモシンの添加を少量にした場合は効果を示すのではないかと思われた。また、この群で組織中のミモシン含量が減少したのは、体内に存在するピリドキサルリン酸を補酵素とする酵素の作用によってミモシンが分解されたのか、あるいは試験管内で容易にピリドキサルリン酸とミモシンがシッフ塩をつくる事から、それにより排泄されたとも考えられる。

#### 要 約

本研究ではプロイラー雛にギンネム種子粉末を給与し、ミモシン中毒症の誘発方法を見だし、次にピリドキサルリン酸等をギンネム種子粉末飼料に添加し、ミモシン中毒症の誘発防止法を検討した。

7日齢のプロイラー雄雛にギンネム種子を粉碎し20メッシュの篩を通した種子粉末を、市販飼料に0, 10, 15, 20%添加し各々12日間自由給与した。その結果、各種子群では食欲不振、体重増加の減少がみられ、更に座り込み、足を痙攣させる特異的な脚弱症状、および腎臓の肥大がみられた。また各組織でミモシンが検出され、特に羽毛、皮膚および腎臓で高い値が得られた。更に1%粗ミモシン飼料を自由給与すると、15%種子群と全く同程度の中毒症が認めら

れミモシン中毒症と断定された。次にミモシン中毒症の雛に市販飼料を20日間給与し4日ごとに屠殺し、体内でのミモシンの代謝を調べた。その結果、まず市販飼料を給与した初日から食欲が回復し、採食量は市販飼料給与後17日目で対照群と有意差が認められなくなった。それに伴って体重も増加した。また各組織のミモシン濃度は羽毛、甲状腺では20日目でもミモシンが認められた。それに対し腎臓、血清、肝臓は4日目から、総排出物は8日目から検出されなくなった。皮膚、筋肉、冠、精巣は20日目でも極少量のミモシンが検出された。

最後にアスコルビン酸、ピリドキサルリン酸、クルクミン等を添加してミモシン中毒症の誘発防止法を検討した。その結果、食欲不振および体重増加の抑制には効果がなかったが、各組織中のミモシン含量は15%種子群と比較して、1%ピリドキサルリン酸添加群で最も減少する傾向を示した。

### 謝 辞

本実験を遂行するにあたり、材料を御提供頂いた琉球バイオリソース株式会社様、沖縄畜産開発会社様、および沖縄県飼料協同組合様に深く感謝致します。なお、本研究は笹川科学研究助成により行われた。

### 文 献

- 1) D'Mello JPF, Taplin DE. *Leucaena leucocephala* in poultry diets for the tropics. World Anim. Prod., 14 : 41-47. 1978.
- 2) D'Mello JPF, Acamovic T. *Leucaena leucocephala* in poultry nutrition-A review. Anim. F. Sci. Tech., 26 : 1-28. 1989.
- 3) Jones R.J. The value of *Leucaena leucocephala* as a feed for ruminants in the tropics. World Anim. Rev., 31 : 13-23. 1979.
- 4) Y. Kamada, N. Oshiro, H. Oku, F. Hongo and I. Chinen. Degradation of toxic mimosine by a hydrolytic enzyme of *Leucaena Psyllids* (jumping plant lice). Biosci. Biotech. Biochem., 60 : 351-352. 1996.