erob. 15, 368 (1967). 14) LICCIARDELLO, J.J., RONSIVALLI, L.J. and SLAVIN, J.W.: *J. Appl. Bact.* 30, 239 (1957). 15) KAZANAS, N. and EMERSON, J.A.: *Appl. Microb.* 16, 242 (1968). 16) LEE, J.S. and HARRISON, J.M.: *Appl. Microb.* 16, 1937 (1968). 17) LERKE, P., ADAMS, R. and FARBER, L.: *Appl. Microb.* 11, 458 (1963). 18) ADAMS, R., FARBER, L. and LERKE, P.: *Appl. Microb.* 12, 277 (1964). 19) LERKE, P., ADAMS, R. and FARBER, L.: *Appl. Microb.* 13, 625 (1965). 20) LERKE, P., FARBER, L., and ADAMS, R.: *Appl. Microb.* 15, 770 (1967). 21) LEVIN, R.E.: *Appl. Microb.* 16, 1734 (1968). 22) CHAI, T., CHEN, C., ROSEN, A. and LEVIN, R.E.: *Appl. Microb.* 16, 1738 (1968). 23) GABY, W.L. and HADLEY, C.: *J. Bact.* 74, 356 (1957). 24) SHEWAN, J.M., HODGKISS, W. and LISTON, J.: *Nature*, 173, 208 (1954). 25) LISTON, J.: *J. Gen. Microb.* 16, 205 (1957). 26) GEORGALA, D.L.: *J. Gen. Microb.* 18, 84 (1958). 27) BAUMANN, P., DOUDOROFF, M. and STANIER, R.Y.: *J. Bact.* 95, 1520 (1968). 28) GRIFFITHS, F.P.: *Food. Res.* 2, 121 (1937). 29) GUELIN, A.: *Ann. Inst. Pasteur* 83, 46 (1952). 30) GUELIN, A.: *Ann. Inst. Pasteur* 86, 303 (1954). 31) LEIFSON, E., COSENZA, B.J., MURCHELANO, R. and

CLAVERDON, R.C.: *J. Bact.* 87, 652 (1964). 32) 清水潮, 相磯和嘉: 日水誌, 28, 1133 (1962). 33) 中村一成, 大住 享, 滝沢金次郎, 宮本 泰, 永井三夫, 小金井正一, 渡辺博之, 水島清治: 日獣会誌, 15, 376 (1962). 34) KAZANAS, N.: *Appl. Microb.* 16, 128 (1957). 35) 志賀信雄, 竹内端弥, 豊浦秀世, 長谷川広吉, 中村喜之助: 腐敗研究所報告 (8), 39 (1955). 36) 相磯和嘉: 腐敗研究所報告 (9), 1 (1956). 37) 相磯和嘉: 腐敗研究所報告 (10), 87 (1957). 38) LOBBEN, J.C. and LEE, J.S.: *Appl. Microb.* 16, 1320 (1968). 39) 中村勇蔵, 畔柳養子: 共立薬大研究年報 (1), 29 (1955). 40) 持永泰輔, 田口 昭: 食衛誌, 4, 217 (1963). 41) 大石純一, 市川忠次: 都衛生学会誌 (32), 27 (1964). 42) 大石純一, 西田 博, 田中錠太郎, 上田陽司, 中村 賛: 都衛研事業月報 (182), 33 (1964). 43) 太田 馨, 坂田由紀子, 原田松子: 京都女子大食物学会誌 (16), 24 (1964). 44) LERKE, P. and FARBER, L.: *Appl. Microb.* 17, 197 (1969). 45) STANSBY, M.E.: *Food Tech.* 12, 260 (1958). 46) FARBER, L.: *Food Tech.* 17, 476 (1963). 47) STANSBY, M.E.: *Fishery Leaflet No. 94, U.D. Fish. & Wildlife Serv., Dept. Interior, Washington, D.C.* (1944).

家畜衛生

飼料に起因するヒナの Blindness に関する研究

II. 魚粉より有毒物質 Ammeline の分離

松原弘道* 久葉 昇**

(昭和 44 年 12 月 17 日受付)

Studies on Blindness of Chicks Caused by Commercial Feeds II. Isolation of a Toxic Substance, Ammeline, from Feeds

H. MATSUBARA and* N. KUBA (Departments of Agricultural Chemistry* and Veterinary Pathology, Faculty of Agriculture, Gifu University, Gifu)

SUMMARY

Two S-triazine compounds, ammeline and melamine, were isolated from some fish meal which had caused blindness of baby chicks. A toxic substance was extracted from the meal by fractionation.

Two S-triazine compounds, ammeline and melamine, were isolated from some fish meal which had caused blindness of baby chicks. A toxic substance was extracted from the meal by fractionation and hydrostatic settling in organic solvents. Further extraction was performed by hydrochloric acid

solution and dimethylsulfoxide solution of sodium carbonate.

Feeding experiments were conducted on baby chicks with melamine, ammeline, and four compounds related to them. It was proved that blindness of chicks was caused by the administration of feeds containing ammeline. This substance was added to fish meal for the purpose of increasing the nitrogen content of commercial chick feeds.

I. 緒 言

先に西日本 12 府県にわたり, 特定養鶏飼料によるヒ

* 岐阜大学(農芸化学科) ** 岐阜大学(獣医学科)

ナの Blindness (B.) が発生し, 重大な社会問題となり, また飼料取締りの面からもその毒物の本態の究明が要望されている状態である。著者ら³⁾は前報においてヒナに B. をひき起こす特異物質は, 飼料中に故意に混入された

未知の有機化合物に強い疑いがもたれることを見出し、さらに従来蛋白質欺妄剤として飼料中に混入されたことのある高窒素含量のジシアンジアミド関連化合物および新規の *S*-triazine 系化合物を添加した飼料をヒナに投与し、これら諸化合物のうちアンメルリン (ammeline) のみがヒナに B. をひき起こす事実を認め、また魚粉中の未知化合物によって起こるヒナの B. の臨床、病理解剖ならびに眼球の病理組織学的所見が、アンメルリンを飼料に添加して投与したヒナのそれと一致することを報告した。そこで著者らはヒナに B. を与える毒性魚粉中から有毒物質の分離を試み、分離した化合物の理化学的性質の検討およびヒナに対する毒性試験から、その本態を解明し得たのでここに報告する。

II. 実験材料および有毒部分の分別

試料として用いた魚粉添加物は兵庫県下N飼料会社から提供されたもので、これを養鰯飼料中に 10% 内外配合し、ヒナに投与する時は B. を発現する有毒魚粉である。

まず、図1に示すように、試料 1kg を採り、2mm の篩を通過する部分と粒径 2mm 以上の不通過の2部分に分け、さらに 2mm 以下の粒径の部分、四塩化炭素 (S.G. 1.60) ならびに S.G. 2.00 に調整した四塩化炭素とブロモホルム (S.G. 2.90) との混合物を用いて比重選を行ない、(A) (S.G. 1.60 以下)、(B) (S.G. 1.60)、(C) (S.G. 1.60~2.00)、(D) (S.G. 2.00) および (E)

図1 有毒魚粉の分別

表1 魚粉の各画分の収率、窒素含量およびヒナに対する Blindness の発現

画 分	収率(%)	窒素含量(%)	Blindness
直径 2mm 以上	19.9	8.6	—
(A) (S.G. <1.60)	48.3	12.0	—
(B) (S.G. 1.60)	3.4	21.8	+
(C) (S.G. 1.60~2.00)	9.3	7.6	+
(D) (S.G. 2.00)	0.7	4.3	—
(E) (S.G. >2.00)	9.7	13.7	—

(S.G. 2.00 以上) の 5 部分に分別し、その収率を求め、さらに各部分の窒素含有量をキルダール法によって定量し、またそれらをヒナの飼料に 10% 混合してヒナに投与し、B. の発現の有無を検定し、表 1 のような結果を得た。この際収率合計が 100% とならないのは、溶媒中に溶出した油脂分の損失によるものである。またヒナに対する B. 発現実験の結果、(B) および (C) 部分に有毒成分が含まれていることがわかり、とくに (B) 部分は粗蛋白質としての含量は 136% に相当し、高窒素化合物の混在が予想された。さらに (B) および (C) の一部を鏡検すると、魚肉や軟骨片と明らかに異なる白色澱粉様の小粒状異物の混在が観察された。

Ⅲ. 高窒素含有化合物 (NMM, NAM) の抽出および分離

前項の実験により (B) および (C) の两部分に有毒成分が含有されていることが明らかとなったが、(C) 部分の窒素含量が最も高いので、この部分から高窒素含有化合物の抽出を試みた。シヤナミド誘導体の分離については滝本⁴⁾の研究があるが、複雑な操作を必要とするので別法を試みた。

図2 NMMの分離

すなわち図2に示すように2gの(B)部分を採り、常温で5%の塩酸で抽出し不溶物を沝過後、沝液にほぼ等容のエチルアルコールを添加、冷所に長時間放置する時は白色針状結晶の析出をみた。これを沝取し、炭酸ソーダ(無水)をジメチルスルフォキシaid(DMSO)と水との混合液に加熱溶解、沝過、放冷すると白色針状結晶(NMM)が0.06g得られた。これは魚粉に対して0.066%に相当する。5%塩酸不溶部は熱炭酸ソーダのDMSO溶液にて処理、沝過、沝液を放冷しても全く析出物が得られなかった。

別に(B)部分 4g を採り、図3に示す順序に従い、最初炭酸ソーダの熱 DMSO 溶液で抽出を試みたが、軟骨等の混在のため汙過がほとんど不可能であったので、セライトを添加汉過し、残渣と汉液に分け、赤褐色の熱

図3 NAM の分離

透明母液をす早く水冷し、析出するコラーゲン様物質の母液を容易にするため再び少量のセライトを添加し、直ちに母液を過し、放置すると間もなく白色沈澱が析出する。この沈澱を再び前記の炭酸ソーダ溶液に溶解再結し、さらに5%塩酸に溶解、不溶の蛋白性不純物を母液を去し、後炭酸ソーダで中和する時は白色粉末状沈澱を析出する。これを母液を去り炭酸ソーダ溶液から再結、さらに再び5%塩酸に溶解し、前と同様の方法を繰り返して精製すると白色粉末状物質 (NAM) が 0.077g 得られた。これは魚粉に対して 0.11% に相当する。

IV. メラミンおよびアンメリンの確認

前項実験で得た NMM の赤外線吸収スペクトルを測定し (Nujol 法) 図4に示すような結果が得られた。また純メラミン (99.2%) (MM) の吸収スペクトルも同時に測定した。

すなわち両者はその吸収スペクトル^{1,5)}がよく一致し、ともにメラミン特有の3,700および3,620- cm^{-1} に芳香環、3,310 および 1,650- cm^{-1} に NH_2 、1,550- cm^{-1} に環伸縮、1,468- cm^{-1} に C-N、1,025- cm^{-1} に環伸変角、815- cm^{-1} にトリアジン環面外振動の吸収を示す。ケルダール法による窒素含量も 66.79% で理論値 (66.65%) に一致し、NMM とピクリン酸溶液とを加熱して作ったピクレ-

図4 NMM および純メラミン (MM) の赤外線吸収スペクトル

図5 NAM および純アンメリン (AM) の赤外線吸収スペクトル

トの黄色針状細晶の形も、純メラミンから作ったものと一致し、毒性魚粉添加物から分離した NMM はメラミンであることを確認した。

また同様に前実験で得た NAM の赤外線吸収スペクトルを測定し (Nujol 法)、図5に示すような結果が得られた。また純アンメリン (AM) の吸収スペクトルも同時に測定した。

すなわち両者はその吸収スペクトル^{2,5)}が一致し、ともにアンメリンに特有の 1,640- cm^{-1} に NH_2 挟み、1,468- cm^{-1} に C-N、793- cm^{-1} に環面外振動の吸収を示す。また別に NAM の紫外線吸収スペクトルも測定したが、アンメリンの吸収⁶⁾とよく一致し、窒素含量 (ケルダール法) は 54.43% で、理論値 (55.12%) に近い。常法によって NAM から作ったピクレートの結晶もアンメリンから作ったものと一致し、NAM はアンメリンであることを確認した。

なお (C) 部分はヒナに対して毒性をもつが、この部分からは上記の操作では、アンメリンの抽出および分離は困難であった。これはその部分中における含有量が少ない上に、多量のコラーゲン様物質が混在するためと考えられる。

また S-triazine 系化合物であるアンメリド、シヤヌール酸およびメレムの赤外線吸収スペクトルも測定した

が、NMM および NAM のそれとはいずれも一致しなかった。

V. アンメリン、メラミンおよび関連化合物の化学構造とヒナに対する Blindness の発現との関係

前項の実験から毒性魚粉添加物中には異物としてアンメリンおよびメラミンが含有されている事が明らかとなったので、このうちいずれの化合物がヒナに対して B. を発現せしめるかを明らかにするため、分離した両化合物の純粋なもの、および他の関連化合物4種をヒナの飼料に表2に示すようにそれぞれの%に混入し、孵化後2日目の Warren Sex-Sal-Link 種に投与し、B. 発現の有無を検し、表2に示すような結果を得た。

すなわち供試 ジシアンジアミドおよび *S*-triazine 系の6化合物中ヒナに対して B. を発現せしめるものはア

表2 アンメリン、メラミンおよび関連化合物の化学構造とヒナに対する毒性との関係

化合物名	化学構造	飼料添加 %	Blindness
ジシアンジアミド		6	—
メラミン		10	—
アンメリン		10	+
アンメリド		0.5	—
シアヌール酸		10	—
メレム		0.5	—

ンメリンのみであることが判明した。なお毒性魚粉添加物中から分離された他の成分であるメラミンの添加はB. の発現はないが、体重の増加をみず死亡するのを観察した。

VI. 考 察

以上実験によりヒナに B. を与える毒性魚粉添加物から *S*-triazine 系化合物であるメラミンおよびアンメリンの2化合物を分離確認することができた。本化合物の窒素含量はそれぞれ 66.65%, 55.12%, であり、現在取締法規によるケルダール窒素定量法では、総てこれらは粗蛋白質として定量され、しかも栄養学的には全く無価値である上、かえって有害の化合物である。無論これらは蛋白質量の不足な飼料に蛋白質欺妄の目的で混入したものと思われぬものである。さらにこれら異物を混入した飼料によるヒナの B. が各地で出現し、それが如何なる化合物に起因するか早期の解決をせまられていたが、本実験により供試したジシアンジアミドおよび *S*-triazine 系の6化合物中、アンメリンのみがヒナにB. を与えることから、今回問題となったヒナの B. は、蛋白質欺妄剤として魚粉中に故意に混入せられた有毒物質アンメリンによって起こったものと断定することができる。なお同じく *S*-triazine 環を有し、かつアミノ基ならびに水酸基を置換基としてもつ近縁化合物のうち、アミノ基2個、水酸基1個を有するアンメリンのみ何故ヒナに対して B. を発現せしめるかは興味ある問題で、その解明にはアンメリンのヒナ体中の代謝および B. の発現機作、さらにアンメリンの諸誘導体の合成ならびにそれらによる B. の発現の有無などについて研究を進める必要がある。

また別にこれら蛋白質欺妄剤と純蛋白質とを区別して定量可能な新しい分析法の開発も要望される。

VII. 総 括

ヒナに Blindness を与える毒性魚粉添加物の比重選別により、比重 1.60 の部分を分別し、その部分の塩酸および炭酸ソーダのジメチルスルホキシド溶液抽出物から2種の *S*-triazine 系化合物を分離した。これらの赤外線吸収スペクトル、窒素含量およびその他の理化学的性質の検討から、本化合物はメラミンおよびアンメリンであることを確認することができた。またメラミン、アンメリンおよび関連構造の6化合物のヒナに対する投与試験から、アンメリンがヒナに Blindness を発現せしめる本体であることを確証し、本化合物は蛋白質欺妄剤として故意に魚粉中に混入せられたものと断定した。

本研究の一部は文部省科学研究費の援助を受けた。ここに謹んで感謝の意を表する。

(文献 391 ページ)

文 献

1) 農林省神戸肥料検査所：飼料鑑定法(第2報), 23 (1968). 2) 農林省神戸肥料検査所：飼料鑑定法(第3報), 7 (1969). 3) 久葉 昇, 橋本芳信, 西村元喜,

近藤正彦, 松原弘道：日獣会誌, 23, 291(1970). 4) 滝本雅祥：シヤナミド誘導体の分離定量法の研究, 26 (1961). 5) 滝本雅祥：日化, 85, 168 (1964). 6) 滝本雅祥：日化, 85, 159 (1964).

技術講座

豚 の 衛 生 (7)

農林省家畜衛生試験場

2. ウイルスによる疾病

2.1 口蹄疫

本病は、口腔粘膜や蹄部、乳房の皮膚に水泡を生じるウイルス性の急性伝染病で、牛、豚、めん羊、山羊などの偶蹄類動物がかかる。死亡率はふつう5%以下で、無視しうる程度のばあいが多い。経済的被害は、泌乳停止、乳房の損傷、体重減、運動障害などの生産性の低下と輸出入の制限によるものが大きい。多くのばあい、集団的に発生し、大流行を起こすことが少なくないので、一国の畜産経済全体に大きな影響をおよぼす。わが国では、1919~33年に検疫所内でしばしば発生したが、その後発生をみない。現在清浄な国はオーストリア、ニュージーランド、カナダ、スカンジナビア諸国、日本、韓国、台湾など小数の国にすぎず、南米、アジア、アフリカ、ヨーロッパの大半の国では永年常在している。したがって、日本はつねに口蹄疫侵入の危険にさらされているといつてよい。

2.1.1. 診 断

2.1.1.1. 症状および発生状況

症状としては、水泡とそのあとにみられる爛斑が特徴である。水泡は舌、唇、歯齦、咽頭、口蓋、蹄部、乳房、鼻鏡、外陰部、陰囊などに出現するが、口と蹄に最もよく出現する。水泡は急速に大きくなり、破裂する。牛のばあいはとくに早く、ふつう24時間以内に破裂するが、豚のばあいは比較的におそく、2~3日で破裂する。豚の口内部水泡は牛のばあいに比べて小さく、5~10mm 大のことが多い。豚の水泡はむしろ蹄部に著明に出現し、跛行によって気づくことが多い。破裂し上皮がはがれて、なまなましい爛斑ができるが、急速に修復し、悪質な細菌の2次感染がなければ1~3週間で回復する。子豚のばあいは、水泡形成にいたるまでに心筋変性で急死することがある。

口蹄疫の疫学的な特徴は、ほとんどのばあい、伝播がきわめて急速で、感染率が高く、牛、豚、めん羊などの偶蹄類動物のみが発病することである。潜伏期はふつう3~8日で、豚の潜伏期は牛のそれより長い。潜伏期中から、呼吸、唾液、膿粘液、乳汁中にウイルスの排泄が

はじまっている。飛沫感染をふくむ近接動物との直接接触、人、犬、ネズミなどの地上動物あるいは鳥類、車輛、飼料などによる間接接触、風によるウイルスの飛散などによって発生が急速に拡がる。風による伝播は気象条件に支配され、高湿度、降雨、夜間の場合は、風によって伝播しやすい。感染牛、とくに潜伏期の牛乳、あるいはその脱脂乳を豚に供与することによる伝播もある。本病に感受性のある動物は、牛、水牛、豚、めん羊、山羊などの偶蹄類家畜のほか、ラクダ、トナカイ、シカ、イノシンなどの偶蹄類野獣やハリネズミ、ヤマアラシなどの野性動物で、いずれも発病する。人もまれに感染し、水泡を生じる。ふつう、牛、豚、めん羊の順に感受性が高く、病変も著しいが、その時のウイルスによっておもに豚がおかれ、牛での発病はそれ程多くない場合もある。

2.1.1.2. 病理学的診断

症状の極期には、水泡や爛斑が、口や蹄のほか、喉頭、気管、食道、胃、腸などにもみられることがある。咽喉頭粘膜のカタル性炎、漿膜下とくに心外膜下の小出血、透明な心嚢液の増量、弁膜の浮腫、肺肋膜の漿液浸潤などもまれに認められる。脾はときに軽度で腫大している。

水泡の形式は、まず上皮胚芽層のなかで始まり、細胞変性に陥った小さい病巣はだんだん大きくなって液化が起こり、麦桿色の透明な液を入れるようになる。水泡の上蓋は淡明層と一部の胚芽層から形成される。上皮の剝離した潰瘍は、底面に残った胚芽層および病巣周辺から修復組織となり、回復する。幼若動物が甚急性に死亡した場合は、心筋変性と出血がみられる。成畜が亜急性経過をたどっているうちに、突然卒中死することがあるが、このような動物の左右心室、中隔の心筋に不整形の灰白色ないし灰黄色の線状病巣が認められる。この病巣は、組織学的には、変性と炎性病巣が認められる。甚急性では変性が主で、亜急性、慢性例では炎症性増殖過程がおもな像をなしている。

2.1.1.3 病原学的診断

口蹄疫ウイルスは、径 24 m μ の小型ウイルスで、