フィッシュ・ソリュブルに関する研究—II.

シロネズミを用いた

市販フィッシュ・ソリュブルの大量投与試験

大西登史良・村山繁雄・金田尚志

(1964年10月7日受理)

STUDIES ON FISH-SOLUBLES—II.

NUTRITIVE VALUE OF COMMERCIAL
FISH-SOLUBLES IN RATS AND MICE

Toshio ONISHI, Shigeo MURAYAMA and Takashi KANEDA*

When the diet of chickens contains more than 10 % of commercial fish-solubles sometimes toxic effects are seen. The toxicity results from an excess or imbalance of the minerals which are present. However, the nutritive value of commercial fish solubles has great variability apparently depending on the raw material or the processing methods. It may be that this variability depends upon the presence of substances resulting from putrefaction.

The present experiments were conducted to determine the effect of 4 lots of commercial fish-solubles as the sole source of protein in the diets of growing rats. Paired-feeding was used for the comparison. Three lots showed high nutritive value but one produced a slight loss in weight (Table 3, Exp. 1). The volatile basic nitrogen content of this lot was very high (Table 1). Removal of volatile components from the fish-solubles by steam distillation improved the nutritive value slightly (Table 3, Exp. 2). The toxicity of this preparation of fish-solubles was further examined with rats and mice. The alcohol-soluble fraction was toxic for mice by intraperitoneal injection (Table 8). Histamine and tyramine were shown to be present by paper chromatography (Table 11). These substances are probably produced by putrefaction of the raw material.

I. 緒 言

フィッシュ・ソリュブルを養鶏飼料として多量に使用すると害作用を生ずるとされており¹⁾²⁾³⁾, その原因として一般にミネラルの過剰ないしアンバランスが考えられている。しかし、市販のフィッシュ・ソリュブルは、原料および製造工程の差により品質に著しい差を生じ⁴⁾, なかには鮮度低下の結果有害な腐敗生成物を相当量含むものもあると予想される。したがってソリュブルの大量給与による有害作用は、ソリュブルの品質低下による有害因子の存在に起因するとも考えられる。

フィッシュ・ソリュブルの品質については、日本科学飼料協会その他により一応の基準が定められているが、ソリュブル中の有害因子の規制といった面では、揮発性塩基量が制限されている以外考慮されていない。

著者らはニワトリに対する予備試験として、シロネズミを用いる動物試験によつて市販ソリュブルを多量に与えた場合の栄養効果を検討し、その結果、市販製品中には多量に与えても害作用を示さず良好な栄養価を示すものと、シロネズミの発育を阻害するもののあることを認めた。またシロネズミの発育を阻害した製品についてはその原因を検討したのでこれらの結果を報告する。

* 東海区水産研究所 (Tokai Regional Fisheries Research Laboratory, Tsukishima, Tokyo).

II. 実験の部

供試品: 市販フィッシュ・ソリュブル4種を実験材料として用いた。これらは焼津市ならびに塩釜市日本水産工業、静岡市林兼水産工業および横須賀市太平飼料株式会社の製品である。試料の表示は1~4(順不同)とした。これらの試料についての成分分析結果を Table 1 に記した。

Table 1. Analytical data of commercial fish solubles used.

Sample No.	Moisture %	Crude protein %	Crude fat %	Crude ash %	Water-soluble nitrogen mg %	Amino-nitrogen mg %	Volatile basic-nitrogen mg %
1	34.4	49.5	4.9	4.1	6500 (82)	2250 (28)	830 (10.5)
2	46.5	39.5	2.7	3.9	5600 (89)	2150 (34)	280 (4.4)
3	43.7	41.5	3.7	4.0	6140 (93)	2395 (36)	325 (4.9)
4	40.4	40.0	6.0	6.6	6040 (95)	1710 (27)	350 (5.5)

	Vitamin A IU/g	Vitamin B ₂ r/g	Vitamin B ₆ r/g	Folic acid r/100 g	Vitamin B ₁₂ r/100 g
1	122	12.5	1.2	170	5.2
2	124	21.4	4.5	160	5.6
3	174	7.0	5.6	140	3.6
4	156	5.0	2.1	140	15.2

Remark; Numerals in parentheses indicate the percentage to total nitrogen.

Table 2. Composition of diets used in Experiments 1 and 2.

Lot	Starch	Protein	Cotton seed oil	Beer yeast	M.C. salt	Fish liver oil	Supplement to basal ration
Exp. 1.							
1	72	10 (Fish soluble -1,20.2)	10	5	3	0	
2	72	10 (Fish soluble -2,25.3)	10	5	3	0	
3	72	10 (Fish soluble -3,24.1)	10	5	3	0	
4	72	10 (Fish soluble -4,25.0)	10	5	3	0	
5 (control)	72	10 (Casein, 10.0)	10	5	3	10 I.U./day/animal	
Exp. 2.							
6	72	10 (Fish soluble -1,20.2)	10	5	3	0	
7	72	10 (Deodorized fish soluble-1,29.8)	10	5	3	0	
8 (control)	72	10 (Casein, 10)	10	5	3	10 I.U./day/animal	
9	72	10 (Casein, 10)	10	5	3	10 I.U./day/animal	Volatile acidic Fr. from fish soluble-1
10	72	10 (Casein, 10)	10	5	3	10 I.U./day/animal	Volatile alkaline Fr. from fish soluble-1

実験方法および結果:

(実験1)―市販ソリュブルの大量給与試験

シロネズミを用い前記各試料の栄養価の程度ないし毒性の有無を検討した。シロネズミは、南加大系、生後1カ月体重50g前後の雄を使用した。各試料の比較には、飼料中のタン白含量を一定にし各試料を飼料中唯一のタン白源として用いる方法をとった。各試験区の飼料組成は Table 2 (Exp. 1) に示す。各区8匹のシロネズミを用い、Table 2 に示す飼料を各区に同量ずつ与え制限食による飼育試験を5週間行つた。その間のシロネズミ体重の変化をTable 3 (Exp. 1) および Fig. 1 に示す。

その結果、使用したソリュブルの種類によりネズミの体重増加にかなり差が見られた。試験区4はカゼインをタン白源とした対照区の体重増加とほぼ等しかつたが、試験区1では5週間飼育後かえつて体重の減少が見られ、試料―1 中にはネズミの正常な発育を阻害する有害因子の存在することが推察された。なお試験開始直後一様に体重が減少しているのは、予備飼育期間中市販の固形飼料を飽食させてあつたためと考える。

Table 3. Growth response of rats in Experiments 1 and 2.

Lot	Initial average weight of rats g.	Average weight of rats after 35 days g.	Average weight gain g.	Remarks
Exp. 1. 1	52.6	48.8	- 3.8	8 rats per lot
2	48.6	65.5	+16.9	”
3	51.1	70.9	+19.8	”
4	51.4	76.4	+25.0	”
5 (control)	53.4	81.5	+28.1	”
		Average weight of rats after 40 days g.		
Exp. 2. 6	110.1	113.5	+ 3.4	6 rats per lot
7	111.3	125.7	+14.4	”
8 (control)	111.0	142.8	+31.8	”
9	114.5	135.0	+20.5	3 rats per lot
10	107.7	117.3	+ 9.6	”

Fig. 1. Growth response of rats to fish solubles. (Experiment 1)

試験終了後、各ネズミ肝臓の重量および含油量を測定した結果が Table 4 (Exp. 1) である。肝臓重量の体重に対する割合は対照区が最も小さく、栄養価の低い試験区が大きい傾向がうかがえる。しかし含油量については各試験区の間には一定の傾向は認められなかった。

(実験2)一有害ソリュブルより、揮発性物質除去の効果

前記試験において試料一1を投与した試験区1の飼育結果がはなはだしく悪かったが、この試料は Table

1に見られるように、他の三種の試料に比べて揮発性塩基の含量が著しく高いが目立っている。そこで試料一1から揮発成分を除去した試料についてさらにシロネズミ飼育試験を行なった。

すなわち試料一1に等量の水を加え塩酸性 (pH 5.0) で約1時間水蒸気蒸留したのち、苛性ソーダでアルカリ性 (pH 8.0) にして再び1時間水蒸気蒸留し、中和後湯浴上で濃縮して脱臭ソリュブルを得た。この製品の粗タン白質含量は 33.6%，揮発性塩基態窒素含量は 149 mg% (全窒素に対し 2.7%) であった。水蒸気蒸留によつて留出した揮発性酸の総量は原料 100 g より 6.0 m mol (一塩基酸として)、揮発性塩基の総量は 40.2 m mol (一酸塩基として) であった。

試験区を5区 (6~10) に分け、各区の飼料組成を Table 2 (Exp. 2) に示す。試験区9および10では、留出除去された揮発性酸および揮発性塩基をカゼインに添加してその影響を見た。添加量はネズミ1日1匹当り揮発性酸 0.1 m mol、揮発性塩基 0.5 m mol で、これは試験区6の飼料中に含まれている量にほぼ相当する量である。体重 110 g 前後の雄シロネズミを試験区6~8においては各区6匹、試験区9、10においては各区3匹用い、40日間飼育した。その間のネズミの体重変化を Table 3 (Exp. 2) および Fig. 2 に示す。

Fig. 2. Growth response of rats to deodorized fish soluble and volatile substances in fish soluble. (Experiment 2)

Table 4. Liver weight and liver total lipids of rats in Experiments 1 and 2.

Lot	Average weight of liver g.	Average percentage of liver to body weight %	Average liver lipids %
Exp. 1. 1	2.64	5.41	2.57
2	3.60	5.49	3.80
3	3.67	5.18	5.84
4	3.84	5.07	3.29
5	3.76	4.61	4.08
Exp. 2. 6	4.95	4.36	2.91
7	5.63	4.48	4.66
8	5.02	3.51	3.68

その結果、試料—1 の脱臭製品を投与した試験区 7 は、もとのソリュブルを投与した試験区 6 に比べていくぶん体重増加量が多く、揮発性物質の除去によつて栄養価は多少改善されたようである。また試験区 9, 10 は対照区 8 に比べいづれも劣つており、この程度の量の揮発性物質とくに揮発性塩基がネズミの発育を明らかに阻害するものであることがわかつた。

(実験 3) —有害ソリュブル中の毒性区分の検索

前記試験において試料—1 から揮発性物質を除去したのちも、なお対照区に比べてはるかに劣つており、試料—1 中には揮発性物質以外の有害成分の存在が予想されたので、これをさらに追求するため、試料—1 にエタノールを加えて分別し、その各区分についてハツカネズミおよびシロネズミを用いて毒性試験を行なつた。

Table 5. Flowsheet illustrating preparation of fractions of fish soluble.

Table 5 に分別の方法を示す。すなわち試料—1 から揮発性物質を除去したのち、これにエーテルを加えて脂質部と不溶部を除き、水溶部を適当な濃度に減圧濃縮したのちこれにエタノールを表示濃度になるように加えて生成した沈殿を分別し、順次エタノールの濃度を高めて分別した。さらに 95 % エタノール可溶部をエタノール除去後水にうつし、イソブタノールを加えて水溶部とイソブタノール可溶部に分別した。試料—1 1 kg より得られた各区分 (A—K) の収量および窒素の形態を Table 6 および Table 7 に示す。

E, F および H は白色の微細な沈殿であつたが、G および I は褐色の極めて粘稠な沈殿で濃厚な旨味を有し、また収量も多く両者を合わせると試料—1 の全水溶性窒素化合物の 70 % 近くを占めており、試料中のアミノ酸の大半がこの辺で沈殿してくるよう考えられる。95 % エタノール可溶区 J, K はいずれも不快臭強く、著しい苦味ないし辛味を有した。

(実験 3—1)

上記 D~K を水で適当に稀釈して試料とし、ハツカネズミに腹腔注射をしてその毒性をしらべた。

各区 6 匹のネズミ (雄 3 匹, 24~28 g, 雌 3 匹, 19~25 g) を使用し, 試料を 0.35~0.75 ml/匹投与した結果, Table 8 に示す通り毒性の大部分がエタノール可溶区に認められた。すなわち K が最も毒性が強く 0.5 ml の注射で 30 分以内に試験動物は全部死亡した。J がこれにつぎ, E, F でも試験動物は 1 匹ずつ死亡したが, その他の区分では毒性が認められなかった。

(実験 3-2)

E, F, J, K の区分について, さらにシロネズミを用い経口投与による毒性試験を行なった。各区 6 匹のネズミ (雌雄各 3 匹, 40~50 g) にタン白源としてカゼインを与え, 実験 3-1 でハツカネズミに注射した試料をストマック・チューブで 1.5 ml/匹 ずつ (固形物含量 0.1~0.2 g*) 投与した。毒性試験 19 日後における体重増加量を Table 9 に示す。この程度の投与量では, 予期に反してネズミに何ら異状が認められず, 体重増加量も大差を示さなかつたので, 20 日目以後は前記の経口投与以外に, 飼料中に各試料 5 ml/匹 を混入し, ネズミの状態を観察した。1 匹当り 8 g の飼料を与えたが, J および K を混入した 4, 5

区では飼料を食べ残すようになり, 4 区では 3 日後に 1 匹死亡した。その肝臓は対照区のネズミの肝臓の色に比べ, 著しく黒味を帯びていた。5 日目に試験を終了し, 各ネズミの肝臓重量を測定した。その結果は Table 10 に示すように, 試料 J, K を与えた試験区 4, 5 のネズミ肝臓重量は対照に比べて大きく, 体重

Table 6. Yield of each fraction of fish soluble.
(from 1000 g fish soluble)

Fraction	Yield	Defatted dry matter	Total nitrogen
A*			
B*			
C**			
	g.	g. %	g. %
D	725	188.8 (31.1)	27.2 (34.3)
E	448	32.5 (5.4)	3.5 (4.4)
F	104	13.4 (2.2)	1.5 (1.9)
G	293	127.1 (20.9)	19.0 (24.0)
H	143	16.4 (2.7)	2.1 (2.6)
I	233	91.0 (15.0)	11.9 (15.0)
J	460	42.3 (7.0)	4.8 (6.1)
K	317	23.4 (3.9)	3.5 (4.4)
total	2723	534.9 (88.1)	73.5 (92.7)

* Amount of A was 48 m mol as mono basic and B was 267 m mol as mono acidic.

** Amount of C was 96.0 g.

Remark: Numerals in parentheses indicate the percentage to the original weights of each column which were found 607 g and 79.3 g respectively.

Table 7. Amino-nitrogen of each fraction of fish soluble.

Fraction	Total nitrogen (% to dry matter)	Amino-nitrogen (% to dry matter)		
		By formol method	By alcohol titration method*	
			Peptide-NH ₂	Amino acid-NH ₂
D	14.39	0.45 (3.1)	0.22	0.22
E	10.67	8.58 (80.3)	6.20	2.16
F	11.13	7.78 (69.9)	6.63	1.39
G	14.93	9.94 (66.5)	7.46	2.33
H	12.62	8.38 (66.4)	6.53	2.80
I	13.13	7.39 (56.3)	6.44	2.28
J	11.34	6.42 (56.6)	4.24	2.15
K	14.75	4.39 (29.8)	3.03	0.81

Remark: Numerals in parentheses indicate the percentage to total nitrogen.

* Willstätter, R., Waldschmidt-Leitz, E., Ber., 54, 2988 (1921).

* E, J, K については, 実験 1 (試験区 1) の摂取飼料中に含まれる量の約 2 倍量, F については約 8 倍量に相当する。

Table 8. Toxicities of fractionated fish soluble in mice by intraperitoneal injection.

Fraction	Composition of fraction		Volume injected ml.	Number of dead animals (per 6 mice)			
	Dry matter %	Total nitrogen %		after 30 min.	after 60 min.	after 120 min.	after 24 hrs.
D	2.61	0.37	0.5	0	0	0	0
E	7.27	0.77	0.5	0	0	1	0
F	12.88	1.43	0.5	0	0	1	0
			0.35	0	0	0	0
G	8.67	1.29	0.5	0	0	0	0
H	11.48	1.44	0.5	0	0	0	0
I	7.80	0.99	0.5	0	0	0	0
J	9.20	1.04	0.75	1	1	0	1
			0.5	1	0	0	0
			0.35	0	0	0	0
K	7.38	1.08	0.5	6			
			0.35	4	0	0	0

Table 9. Growth response of rats in Experiment 3—2.

Lot	Fraction added to basal diet	Initial average weight of rats g.	Average weight of rats after 19 days g.	Average weights gain after 19 day g.
1	none (control)	69.7	101.7	32.0
2	E	69.7	97.2	27.5
3	F	73.3	100.2	26.9
4	J	63.2	96.2	33.0
5	K	69.3	99.8	30.5

Remark: Composition of basal diet: Starch 62, Casein 20, Cotton seed oil 10, Yeast 5, M.C. salt 3, Liver oil Vitamin A, 10 I.U./day/animal.

に対するその重量比も高い傾向が認められた。

(実験 3—3)

以上の試験結果から有害塩基類の存在が予想されたので、E, F, J, K について、
 紙クロマトグラフィーにより、代表的腐敗アミンであるヒスタミン、チラミンの定性を試みた。常法により、Nアンモニヤ飽和

n-ブタノールで展開しジアゾ試薬で発色

させた結果、Table 11 のように J にヒスタミン、K には明瞭にチラミンの存在を認めた。

なお、各試料のエタノール抽出液について比較試験を行つた結果、チラミンは試料—1 にのみ検出され、ヒスタミンは試料—1 および試料—3 において僅かに認められた。

今回の試験では、ヒスタミンおよびチラミンの定量を行わなかつたが、
 紙上の発色の程度からみて、ヒスタミンよりもチラミンの含量が高いと想像される。実験 3—1 に見られるように、K の毒性が最も強かつ

Table 10. Liver weight of rats in Experiment 3—2.

Lot	Average weight of liver g.	Average percentage of liver weight to body weight %
1	4.91	4.42
2	4.96	4.68
3	4.32	3.95
4	5.27	4.72
5	5.96	5.55

Table 11. Tyramine and Histamine by paper chromatography.

Fraction of fish soluble	Tyramine	Histamine and Imidazole acetic acid
E	—	—
F	—	—
J	±	+
K	±	±

たことから、有害作用はチラミンの毒性に負うところが大きいと考えられる。

III. 考 察

著者らの実験の結果では、市販ソリュブルをシロネズミに多量に投与したとき、良好な発育を示すものと極めてけん著に害作用を与えるものがあることが明らかになった(実験1)。そして有害品は揮発性塩基の含量がはなはだしく高かった。この試験の場合、飼料中の全タン白をソリュブルで置きかえているため、タン白質の良否がある程度試験結果に反映してくることも考えられるが、有害ソリュブルの揮発性物質を除去したら栄養価が改善されたこと(実験2)、また有害ソリュブルをアルコールで分別した結果アルコール可溶区に毒性が強く認められ(実験3)、ヒスタミンおよびチラミンが同区で検出されたこと、さらに揮発性塩基の比較的少ない他の3種のソリュブルでは概して良好な発育を示したことから、供試ソリュブルの害作用の原因の大部分は原料あるいは製造工程中の腐敗生成物によると考えてよいようである。なお腐敗生成物のうち、定性を試みたのはヒスタミン、チラミンのみであるが、その他にも有害な塩基類が存在することが予想される。

今回使用した市販ソリュブルは、いずれも日本科学飼料協会の推奨規準に合格するものであるが、使用量のいかんによつては害作用を与えるものもあることがわかった。ただしシロネズミとニワトリではヒスタミン、チラミンのごとき有毒物質に対する解毒作用を異にすることが考えられるし、またミネラルについては全然考慮を払わなかつたので、著者らの実験の結果をそのままニワトリにあてはめ得るとは考えないが、市販のソリュブルを多量に投与するにあつては、その品質、性状を吟味することが望ましいといえる。

IV. 摘 要

ネズミを用いる動物試験によつて、市販フィッシュ・ソリュブルを多量に使用した場合の栄養効果を検討し、次の結果を得た。

- 1) 市販ソリュブルのなかには、多量に使用するとネズミの発育を阻害するものが見られた。
- 2) 有害ソリュブルは揮発性塩基含量が著しく高く、揮発性物質を除去すると栄養価がやや改善された。
- 3) 有害ソリュブルをエタノールで分別して毒性試験を行つた結果、エタノール可溶区に強く毒性が認められた。
- 4) エタノール可溶区にヒスタミンおよびチラミンを検出した。

以上の結果より市販ソリュブルを多量に使用した場合の害作用は、ソリュブルの鮮度低下による有害成分の生成に起因すると考えられる。

ビタミンB群の測定ならびに動物試験にあつて御援助を賜つた東海区水産研究所藥瀬正明技官および荒井君技官に厚く謝意を表する。

本研究は農林省特別試験研究費「濃厚飼料資源の開発利用」によつた。

文 献

- 1) 森本 等：科飼給与報, 24 (1955).
- 2) 中村亮八郎・大原嘉典：茨大農學術報, 5, 69 (1957).
- 3) 中村亮八郎・坂藤忠之：茨大農學術報, 7, 93 (1959).
- 4) 東 秀雄・村山繁雄・築瀬正明：東海水研報, 31, 317 (1961).