

ヒマシ粕の飼料化に関する研究 I : 除毒法

船津, 勝
九州大学農学部生物化学教室

村瀬, 克彦
九州大学農学部生物化学教室

松岡, 昌彦
九州大学農学部生物化学教室

高橋, 孝雄
九州大学農学部生物化学教室

他

<https://doi.org/10.15017/21624>

出版情報 : 九州大学農学部学藝雑誌. 20 (3), pp.247-258, 1963-03. 九州大学農学部
バージョン :
権利関係 :



ヒマシ粕の飼料化に関する研究 I

除 毒 法

船津 勝・村瀬克彦・松岡昌彦
高橋孝雄・石黒正恒・岡本正幹*
五斗一郎*

Studies on utilization of castor pomace for an animal feed
I. Detoxification of castor pomace

Masaru Funatsu, Katsuhiko Murase, Masahiko Matsuoka,
Takao Takahashi, Masatsune Ishiguro,
Seikan Okamoto* and Ichiro Goto*

緒 言

実験材料および方法

大豆、綿実、サフラワーなど植物種子の脱脂粕の多くは蛋白質源として家畜の飼料に配合されている。ヒマシ粕は蛋白質含量およびアミノ酸組成において、これらの脱脂粕に劣るとは思われ^{1,2)}。しかし強い毒性を有するために飼料として未利用のまま放置されている現状であった。

ヒマシの毒性に関する研究は古くからなされており、³⁻¹¹⁾ 著者らもヒマシ毒性蛋白質リシンについて数年来その本態の究明を行なつて来た。¹²⁻¹⁵⁾ また粕の無毒化の試みも Kodras,¹⁶⁾ Gardner¹⁷⁾ らによつてなされているが、まだ工業的利用のための詳細な報告はなく、検討の余地が残されていた。

ここに報告する研究では主として飼料化のための無毒化を目的として、ヒマシ粕に各種条件において熱処理を施し、毒性の消失をヒヨコを用いて検討し、更に毒性の消長とヒマシ粕中に含まれる毒性以外の生理的活性因子の消長との関係ならびに熱処理による粕の物理化学的性質の変化と毒性消失との関係などを追求した。また毒性を示さなかつた処理標品についてアレルギー現象に関する検討も行なつた。

その結果、ヒマシ粕を温度 125°C、圧力 2 kg/cm² で 5 分間熱処理するという簡単な方法で能率的にしかも完全に除毒できることが明らかとなつたのでここに報告する。

1. 試料 (a) ヒマシ脱脂粕の調製：供試ヒマシ粕として2種の脱脂粕を用いた。即ち1つは製油工場において工業的な圧搾、溶剤抽出により脱脂された粕で脱脂工程中既に最高 105°C の加温をうけたものである（以下これを C-P と称する）。他は同一ヒマシを実験室においてできるだけ低温で脱脂して得た粕である（以下これを L-P と称する）。即ち、機械的に殻を除いたヒマシに氷冷した石油エーテルを加え、ホモゲナイザーを用いてホモゲナイズした後、厚い布に包んで圧搾脱脂し、この操作を更に1回繰返した後得られた脱脂粕を風乾したものである。

(b) 脱脂粕の加熱処理：C-P の熱処理は下記のようにケトル（加熱釜）およびオートクレーブ（加圧釜）を用いて行ない、第1表に示すように15種類の加熱処理粕を調製した。

i) ケトル処理：ケトルはその中心に攪拌翼があり周囲はジャケットになつていて、内部に蒸気を吹込むため底部に有孔パイプを配置した開放型を用いた。105°C で処理を行なう間絶えず蒸気を吹込み、そのため試料は充分水分を添加された状態で加熱された。しかしケトルが開放型であるため圧力はかかつていない。処理時間は5分、10分、20分、30分、60分、90分の6段階に分け、得られた標品をそれぞれ K-5、K-10、K-20、K-30、K-60、K-90 と称した。

ii) オートクレーブ処理：攪拌翼をもつたオートクレーブを用い直火により加熱した。C-P は約 10% の

九州大学農学部生物化学教室

* 九州大学農学部畜産学第一教室

水分を含んでいるが、処理前含水率が15%となるようにあらかじめ水を添加した後加熱処理を行なつた。処理温度は125°C、処理圧力は約2 kg/cm²で、この条件に達するまでに約40分を要した。処理時間はこの条件に達した後、0分、5分、10分、20分、30分の5段階とし、得られた標品の名称をそれぞれA-0、A-5、A-10、A-20、A-30とした。なおこのような方法では加熱処理中粕に塊が出来、加熱が均一に行なわれない欠陥があつた。従つてA群は全て塊の部分を除いたものを試料標品とした。

C-P にあらかじめ水を添加することなく、上記A群と同じ条件でオートクレーブ処理を行なうと塊の生成を防止することが出来た。このようにして得られた標品をAD群とし、処理時間に応じそれぞれの名称をAD-0、AD-5、AD-10、AD-30とした。

第1表. 調製試料.

試料記号	処理名	処理時間(分)	処理温度(°C)	処理圧力(kg/cm ²)	水分状態
K-5	ケ	5	105	0	処理時 気飽和 中
K-10	ッ	10			
K-20	ト	20			
K-30	ル	30			
K-60	処理	60			
K-90	処理	90			
A-0	オー	0	125	2	処を含 理添水調 前加率整 にし15 水で劣
A-5	ー	5			
A-10	ー	10			
A-20	ー	20			
A-30	ー	30			
AD-0	乾ト	0	125	2	水ずま をC-P 添を 加そ せ
AD-5	燥ク	5			
AD-10	オー	10			
AD-30	ー	30			

(c) 粕より毒性蛋白質の分離ならびに注射用粗リシン溶液の調製：本研究では毒性試験をヒナに対する注射により行なつたため、ヒマシ粕より毒性蛋白質を抽出、分離し、注射用溶液を調製する必要があつた。従つて Le Breton および Moulè の方法⁷⁾ にならぬ第2表の如き操作により、上記各標品から毒蛋白質リシンの区分を塩析沈澱として分離し、水に透析することにより溶液とし、適当な濃度に調節した後注射用粗リシン溶液として用いた。なお Moulè らは更にリシンの純化精製を行なつているが、著者らの実験の目的には第2表の精製過程で試料として充分と考え、この精製段階のものを粗リシンとして毒性試験に供した。

(d) L-P より分離した粗リシンの熱処理：L-P より第2表の方法により調製した粗リシンの濃厚水溶液

第2表. 粗リシンの分離法.

調製試料
↓ 10%食塩水抽出
上澄液
↓ 水に対し24時間透析
上澄液
↓ 硫酸飽和
沈澱(粗リシン)

を試験管内に封じ込み100°Cの水浴中でそれぞれ5分、10分、20分間処理した後、凝固した部分を濾別し、濾液をそれぞれ注射用標品 LH-5、LH-10、LH-20 とした。

2. 実験方法

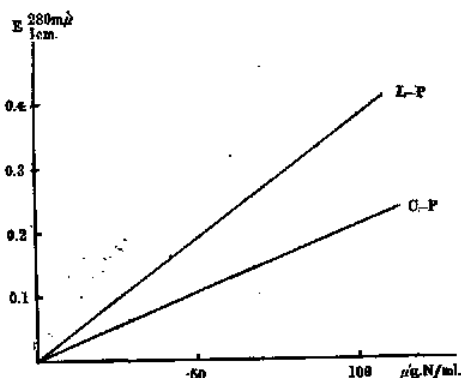
(a) 蛋白質濃度の測定法

(i) 全窒素測定による法：micro Kjeldahl 法により全窒素を定量し蛋白質量を求めた。

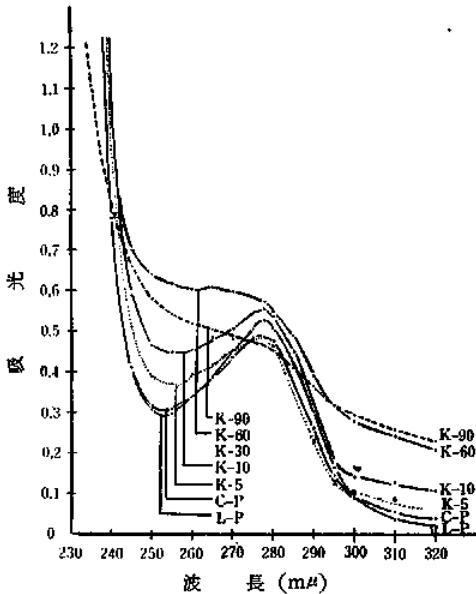
(ii) 紫外線吸収による法：Beckman DU 型分光々度計を用い、280 m μ における吸光度からあらかじめ作製した標準曲線(第1図)を用い窒素量を求めた。但し C-P が熱処理されるに従つて、それから分離した粗リシン溶液の紫外線吸収スペクトルは第2図及び第3図に示すように280 m μ 付近における蛋白質特有のピークが不明瞭となり、特に A および AD 群は AD-0、AD-5 を除き全くピークを示さなかつた。従つてこのN定量法は L-P、C-P および後記する CB-Allergen に対してのみ適用した。

(b) 粕の残存水溶性蛋白質の測定法：

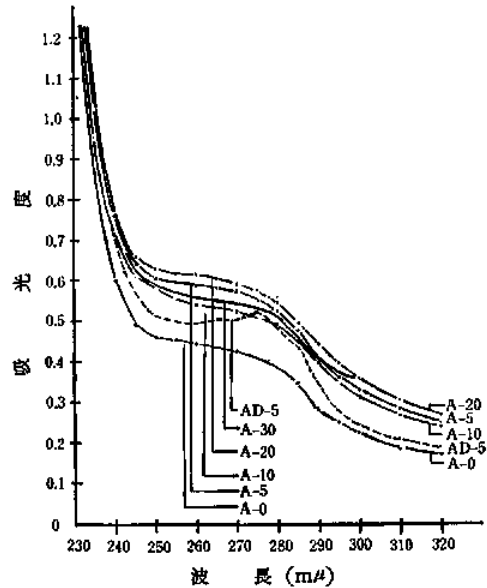
(i) 標品100gを10%食塩水400gに浸漬し、約10°Cにおいて時々攪拌しながら12時間抽出し、その上澄液を水に対し24時間透析し、透析液を濾過、遠沈した後、その上澄液のN量をmicro Kjeldahl 法により定量し、抽出時および透析時における液の増減によ



第1図. 粗リシンのN量と吸光度との関係.



第2図. 粗リシンの紫外線吸収スペクトル (L-P, C-P 及び K 系).



第3図. 粗リシンの紫外線吸収スペクトル (A 及び AD 系).

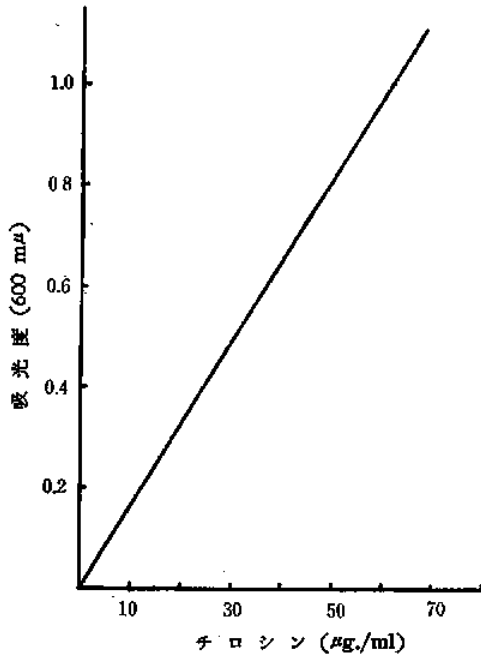
る補正を行ない、標品 100 g 中の水溶性蛋白質の N 量を算出した。

(ii) 上記水溶性蛋白質は微量であるため比濁法による測定も検討した。蛋白質沈澱剤として 5% スルホサリチル酸水溶液および 2% クエン酸中にピクリン酸を 1% 溶解した溶液の 2 種を調製した。スルホサリチル酸を用いる場合は Looney ら¹⁰⁾の方法に基づき蛋白液 2 ml に 0.5 ml の Ferric Iron Solution¹⁰⁾ を加えよく攪拌し、更に 5% スルホサリチル酸溶液を 2 ml 加え、再びよく振盪し 5 分以上放置後、比色計または分光光度計により 550 mμ での透過度 (T%) を測定した。透過度測定時の対照液には蒸留水を用いた。ピクリン酸の場合も前者とはほぼ同様である。即ち蛋白液 2 ml に 10% アラビアゴム水溶液 1 ml を加え、よく振盪し、更にピクリン酸溶液 1 ml を加え、よく振盪した後、T% を測定した。対照液には蒸留水を用いた。蛋白液は前項 (i) で調製した A-5, AD-0 の N 定量液を用いた。

(c) 毒性試験：上記 1-(c) の方法で得た粗リシンの沈澱を少量の蒸留水に溶解し、これを水に対して 24 時間透析した後、濾過し、その濾液を更に生理食塩水に対し 12 時間透析し、遠心分離 (10,000 r.p.m., 30 分, 5°C) し、その上澄液を適当な蛋白濃度に調整した後注射溶液として毒性試験に供試した。試験動物は白色レ

グホン種、雄の初生雛 (ふ化 1 週間後のもの) を用い、注射前 12 時間絶食させた後 0.5 ml の試料溶液を腹腔内に注射し、その後 24 時間毎にその死亡羽数を記録した。対照区には溶媒である生理食塩水を、また特に注射液の N 量が多量である区の対照としては卵白アルブミンを用いた。更に結晶リシン C₁¹⁴⁾ の毒性を同様の方法で試験し毒力の標準とした。

(d) プロテアーゼ作用の測定：上記のようにして調製した各標品の粗リシン溶液について pH 3 および 6¹²⁾におけるプロテアーゼ活性をカゼインを基質として萩原ら²⁰⁾の方法により測定した。即ち試料溶液 1 ml に pH 3 或は 6 の 0.6% カゼイン溶液 5 ml をそれぞれ加え、37°C、20 時間 incubate した後、0.44 M TCA 溶液 5 ml を加え 30°C に 30 分以上放置した後、東洋濾紙 No. 4 (径 9cm) にて濾過し、得られた濾液 2 ml に 0.55 M Na₂CO₃ 5 ml、次に 1/5 稀釈 Folin 試薬 1 ml を添加振盪し、30°C に 30 分放置後 660 mμ における吸光度を測定した。また試料溶液に pH 3 および 6 において 0.44 M TCA 溶液 5 ml を添加した後、0.6% カゼイン溶液 5 ml を加え、以下同様にして吸光度を測定し盲験値とした。プロテアーゼ活性単位は 20 時間 incubate した時に得られた吸光度から盲験値を差引いた値を第 4 図に示す標準曲線を用い、チロシン μg 単位に換算し [PU]_{0.5, 37.°C} として表わした。



第4図. Folin 呈色によるチロシンの標準曲線.

i) pH 3 の基質の調製: Merck 製 Hammarsten Casein 1.2 g を 0.05 M の乳酸 160 ml に加温溶解し pH 3 に調整後, 水を加えて 200 ml とした.

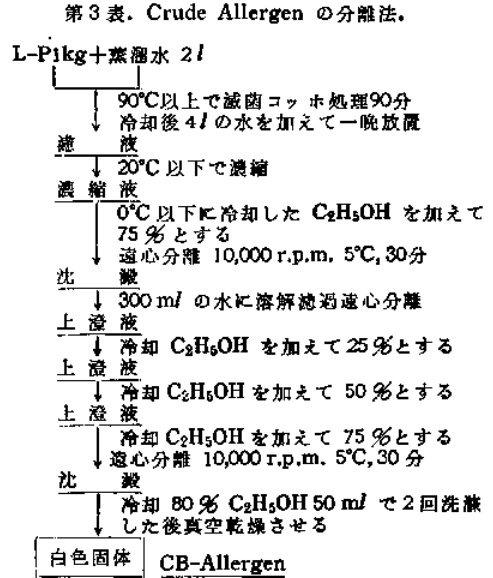
ii) pH 6 の基質の調製: 同じ Casein 1.2 g を 0.05 M Na_2HPO_4 160 ml に加温溶解し pH 6 に調整後水を加えて 200 ml とした.

(e) 赤血球凝集作用の測定: 毒性試験に供試した相りシンの生理食塩溶液について赤血球凝集作用を検討した. 家兎の血液を遠心分離 (2,500 r.p.m. 以下) して得られた赤血球を生理食塩水で遠心分離して 3~5 回洗滌した後, 赤血球の生理食塩水 4% 浮遊液を調製し凝集試験に用いた.

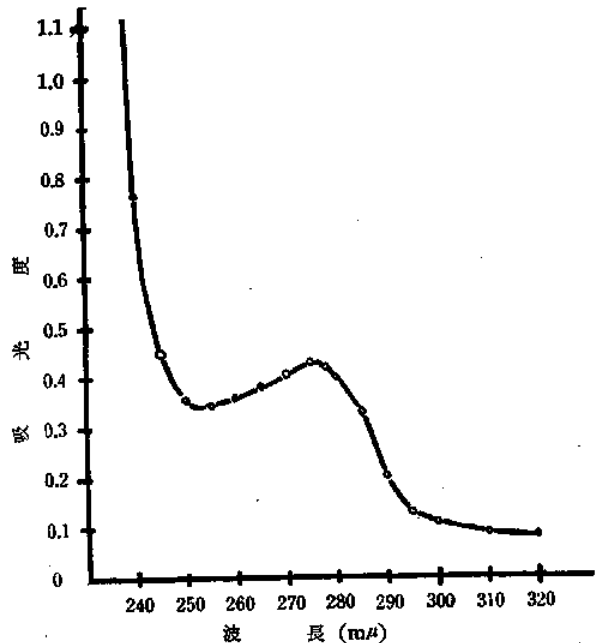
種々濃度の各標品リシン溶液 0.5 ml に上記赤血球浮遊液 0.2 ml を加え, 37°C で 2 時間 incubate した後, 赤血球凝集の有無を肉眼的に判定し, 凝集に要する試料溶液の最小 N 量をもつて赤血球凝集力を表わした.

(f) アレルゲンの分離: Spiesら¹⁰⁾の方法に基き第3表に示す方法で標品 L-P よりヒマシ-アレルゲン (CB-Allergen) を分離した.

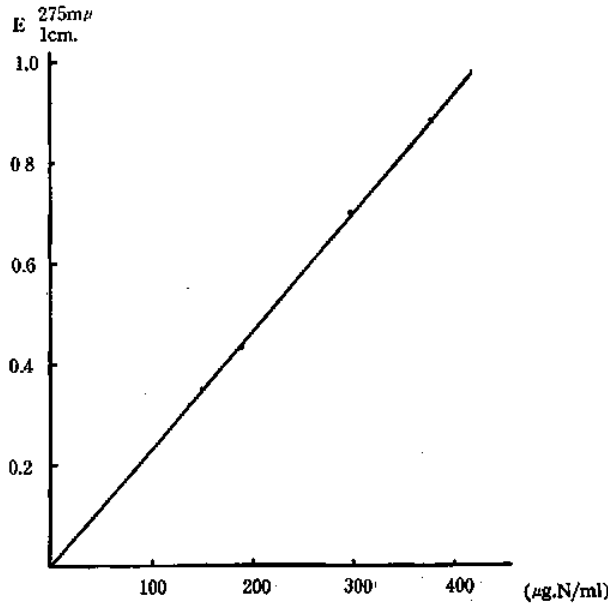
(g) アレルゲンの生体試験: 分離した CB-Allergen は第5図に示すごとく波長 275 mμ



にピークをもつ典型的な蛋白質の紫外線吸収スペクトルを示したので, 275 mμ での吸光度と N 量との関係図を第6図の如く作製し, N 量の定量を行なつた. 先ず標品 A-5 および AD-5 を 2.5% および 5% 配合した飼料を調製し, ハンプホーン種雄の初生雛に 7 週間これを給与した後, CB-Allergen の生理食塩溶液をそ



第5図. CB-Allergen の紫外線吸収スペクトル.



第6図. CB-AllergenのN量と吸光度との関係.

の翼下静脈に注射しアレルギー症状の有無を観察した。注射N量は768μgおよび1,920μgであった。

実験結果

1. 毒性試験：結晶リシンC₁および各試料標品について毒性試験を行なった結果は第4～8表に示す通りである。

- a) 結晶リシンC₁の毒性試験(第4表)
- b) L-PおよびC-Pの毒性試験(第5表)
- c) K群の毒性試験(第6表)
- d) A群およびAD群の毒性試験(第7表)
- e) LH群の毒性試験(第8表)

2. 処理粕の水溶性蛋白質：プロテアーゼ作用および赤血球凝集作用測定結果は第9表に示す。

3. アレルゲンの生体試験：ヒマシ粕給与雛の体重増加は第10表の通りで、給与期間中雛には何らのアレルギー症状も見られなかった。給与中8週間目にCB-Allergenを静脈注射したが、その後何らのアレルギー症状も見られず、さらにその後2週間観察を続けたが異状は見られなかった。

4. 水溶性蛋白質定量法としての比濁法の検討：この方法にて沈澱剤としてスルホサリチル酸およびピクリン酸を用い測定した透過度と同一溶液についてmicro Kjeldahl法によりあらかじめ測定したN量と

第4表. 結晶リシンC₁の毒性試験.

試料	注射量 (μg·N)	羽数	死亡羽数			
			24hrs	48hrs	72hrs	計
結晶 RICIN C ₁	2.5	16	14			14
	1.25	16	9		1	11
	0.63	16	9	1		10
	0.32	16	5	9	1	15
	0.16	16	2	3	3	8
	0.08	10			2	2
対照	0	16				0

第5表. L-P及びC-Pの毒性試験.

試料	注射量 (μg·N)	羽数	死亡羽数			
			24hrs	48hrs	72hrs	計
L-P	25	6	6			6
	12.5	12	9	2		11
	6.25	12	5	5		10
	3.13	12	4	4		8
	2.25	10	3	5		8
	1.13	10	1	2	1	4
	0.56	10		3	2	5
C-P	50	6	6			6
	25	6	5			5
	12.5	12	8			12
	6.25	12	3	3		9
	3.13	6		6		2
	1.56	6		2		0

第6表. K群の毒性試験.

試料	注射量 ($\mu\text{g}\cdot\text{N}$)	羽数	死亡羽数			
			24hrs	48hrs	72hrs	計
K-5	200	6	2	3	1	6
	100	6		3	1	4
	50	6		2	1	3
	25	6				0
K-10	200	6	2	1	2	5
	100	6		2		2
	50	6				0
K-20	200	12	4	2	1	7
	100	12		2	1	3
	50	12			1	1
	25	6				0
K-30	1600	6	3	1	1	5
	800	6		4		4
	400	6				0
K-60	1970	10	8			8
	985	10	1	7		8
	493	10	1	1	1	3
	241	10				0
K-90	1270	10	1	2	3	6
	635	10	1	2	1	4
	318	10		1	1	2
	159	10				0

第7表. A群及びAD群の毒性試験.

試料	注射量 ($\mu\text{g}\cdot\text{N}$)	羽数	死亡羽数			
			24hrs	48hrs	72hrs	計
A-0	1840	10	1			1
	397	6				0
	200	6				0
	100	6				0
A-5	1290	10				0
	320	6				0
A-10	1730	10				0
	500	6				0
A-20	1300	10				0
	369	6				0
A-30	905	6				0
AD-0	1000	16	4	8	1	13
AD-5	1000	6				0
AD-10	1000	6				0
卵白-Alb	5000	10				0
対照	0	28				0

第8表. LH群の毒性試験.

試料	注射量 ($\mu\text{g}\cdot\text{N}$)	羽数	死亡羽数			
			24hrs	48hrs	72hrs	計
LH-5	111	6			1	1
	2000	10	6	4		10
LH-10	2000	10				0
LH-20	2000	10				0
対照	0	10				0

第9表. 水溶性蛋白質, プロテアーゼ活性価及び血球凝集価.

試料	毒性の有無	水溶性蛋白質(N%)	プロテアーゼ活性価(チロシン $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{hr}^{-1}$)		血球凝集価($\mu\text{g}\cdot\text{N}$)
			[PU]		
			pH 3	pH 6	
L-P		1.95	2.48	2.43	0.16
C-P	有	1.16	0.79	0.56	2.5
K-5		1.10	0.050	0.031	100
K-10		1.03	0.074	0.053	100
K-20		0.98			200
K-30	有	0.82	0.044	0.025	200
K-60		0.84	0.045	0.025	
K-90		0.74	0.029	0.028	
A-0		0.41	0.061	0.122	
A-5		0.27	0.112	0.153	
A-10	無	0.21	0.106	0.191	
A-20		0.27			
A-30		0.24	0.118	0.235	
AD-0	有	0.70			
AD-5		0.31			
AD-10	無	0.32			
AD-30		0.22			

の関係をもとめると第11表および第12表ならびに第7~9図に示すような結果が得られた.

a) スルホサリチル酸の場合(第11表および第7図)

b) ピクリン酸の場合(第12表および第8, 9図)

考 察

毒性試験の結果から明らかなようにヒマンは極めて強力な毒性をもつが, 熱処理によつて比較的容易にその毒性を低下した. しかし熱処理を常圧で行なう場合には除毒に高温と長時間を要し, しかも不完全な除毒しか行なわれなかつた. たとえば, 開放型ケトル処理の場合, 処理時間を長くするにつれて毒性も次第に低減したが, 90分処理においてなおかつ完全な除毒は行なわれなかつた. また, C-Pを常圧下165°Cの乾燥空気で60分処理した場合にもいぜんとしてわずかな

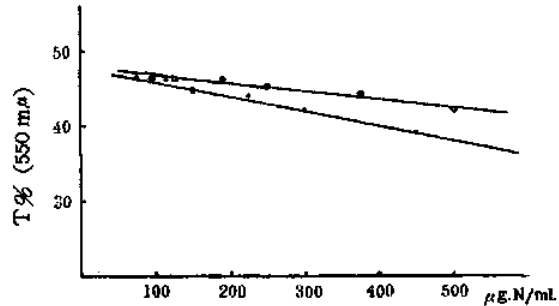
第10表. ヒマシ粕給与雛体重増加.

試料	配合率	0週	1週	2週	3週	4週	5週	6週	7週
A-5	2.5%	34.2	65.2	117.3	190	271	403	522	659
A-5	5.0	34.0	62.3	107.1	183	261	381	499	630
AD-5	2.5	34.3	63.7	114.0	183	264	392	517	649
AD-5	5.0	34.1	61.2	109.9	181	261	372	486	633
対照区	—	34.2	65.3	117.5	182	278	401	535	666

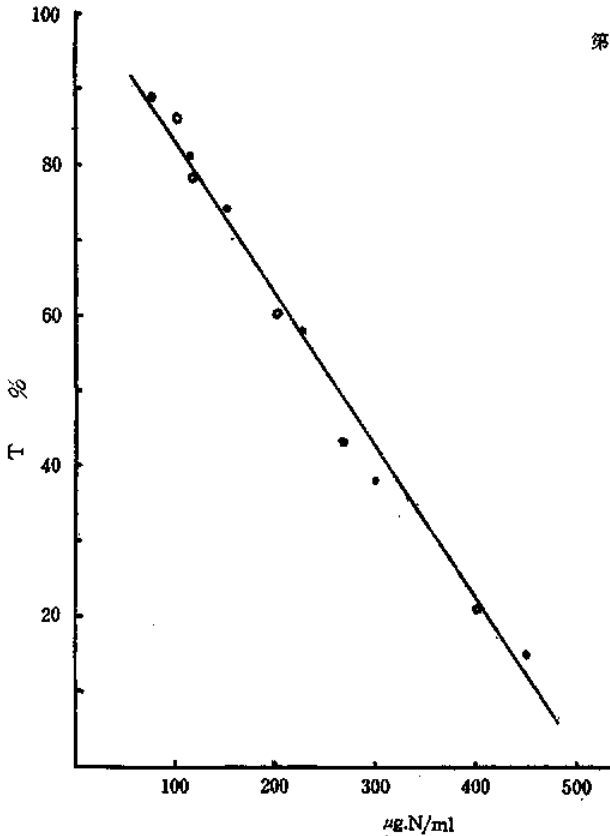
(1区 30羽の平均体重 (g))

第11表. スルホサリチル酸による懸濁液の N量と透過度の関係.

AD-0	$\mu\text{g}\cdot\text{N}/\text{ml}$	500	375	250	188	125	94
	T %		42	44	45	46	46
A-5	$\mu\text{g}\cdot\text{N}/\text{ml}$	450	300	225	150	113	75
	T %		39	42	44	45	46



第7図. 水溶性蛋白質の N量と T%の関係.
(沈澱剤 スルホサリチル酸).
●, A-5; ○, AD-0.



第8図. 水溶性蛋白質の N量と T%の関係
(沈澱剤 ピクリン酸).
●, A-5; ○, AD-0.

から毒性が残存していた。このような高温、長時間の加熱は粕の褐変、栄養上有効な成分の損失、特にアミノ酸の分解を招来し、処理粕の品質を低下させることになるので、飼料工業的に常圧加熱法は不適當と考えられる。

これに反して、オートクレーブ中で 125°C 、 $2\text{ kg}/\text{cm}^2$ の加圧下で処理した場合、わずか5分間の処理で既に完全に除毒された。この加圧処理において試料の水分含量が除毒に大きな影響を与えることが明らかとなった。即ち、処理前粕に予め水を添加した A-0 では完全な除毒が見られたにもかかわらず、水を添加しない AD-0 では毒性が残存していた事実は除毒のためには粕の水分含量を充分大きくする必要があることを示すものである。充分な水分の存在が必要であることは、更に上記 C-P を 165°C の乾燥空気処理した結果からも明らかに推定されることである。

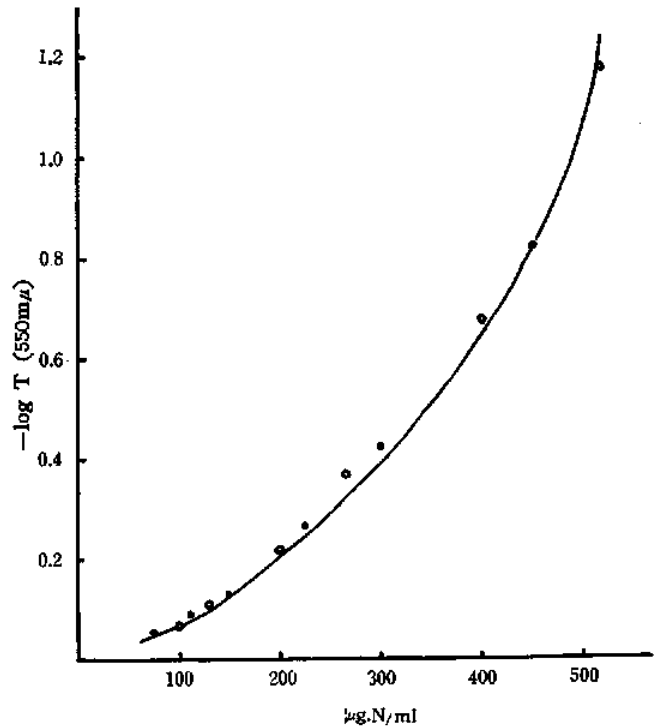
加圧処理の場合完全な除毒に必要な最低温度は 125°C 、圧力は $2\text{ kg}/\text{cm}^2$ であつた。この条件で5分間処理した試料は雛に注射する毒性試験で全く毒性を示さなかつたが、試料を経口的に雛に給与する試験の場合には注射

第 12 表. ピクリン酸による懸濁液の N 量と透過度の関係.

試 料	調整後経過した時間(分)	各 N 量での T% 及び $-\log T$						
		$\mu\text{g}\cdot\text{N}/\text{ml}$	532	399	266	200	130	100
AD-0	5 ~ 30	T%	6.2	21	43	60.0	78	86
	5 ~ 30	$-\log T$	1.180	0.678	0.366	0.218	0.108	0.065
	60	T%	4.5	12.5	34	51	71	80
A-5	5 ~ 30	$\mu\text{g}\cdot\text{N}/\text{ml}$	450	300	225	150	113	75
	5 ~ 30	T%	15	38	58	74	81	89
	60	$-\log T$	0.822	0.421	0.267	0.130	0.092	0.051
		T%	12	33.5	52.5	70	78	86

でわずかながら、しかし明らかに毒性を示す試料でも毒作用を示さなかつた。即ち、例えば 105°C, 60 分処理され、注射による毒性試験で明らかに毒性を示した K-60 を 5% および 10% 配合した飼料を初生 雛に約 4 週間給与する試験において雛は何らの異状を示さず、正常な成長を遂げた。この試験はさらに長期間継続する必要があるが、著者らが既にマウスについて行なつた毒性試験¹³⁻¹⁵⁾の結果から推定しても、注射による毒性試験の最低致死量と経口的毒性試験の場合の最低致死量との間には明らかな差があり、前者の方が遙かに少量であると考えられる。換言すれば注射による毒性試験は毒性の有無に対して給与試験より遙かに鋭敏であり、したがつて注射によつて毒性を示さない試料は経口的給与でも全く無毒であるといふことができる。

精製されたリシンと異なり、¹⁶⁾ヒマシ粕或は粗リシン標品は毒作用とともに赤血球凝集作用、プロテアーゼ作用^{7,8)}を示すことが既に古くから知られている。加熱変性によるリシンの無毒化に際し、蛋白質である赤血球凝集素²¹⁾およびプロテアーゼもまた変性を受け失活するはずである。したがつて加熱処理による毒性の変化とともに赤血球凝集力およびプロテアーゼ活性変化を検討し、これら三つの生理的活性の変化の間に関連を見出すことができれば、動物を用いる毒性試験より遙かに簡単な赤血球凝集力或はプロテアーゼ活性測定によつて試料の毒性のレベルを判定しうる可能性が考えられた。このようなことは特に工業的にヒマシの除毒を行なう場合、迅速に除毒の程度を



第 9 図. 水溶性蛋白質の N 量と $-\log T$ の関係
(沈澱剤 ピクリン酸).
●, A-5; ○, AD-0.

知る必要があり、そのためにも検討すべき点であつた。既に Liener ら²²⁾は大豆を加熱した場合の栄養価の向上と赤血球凝集作用の減退との間の関連を報告している。

ヒマシ粕より上記の方法により粗リシンを調製するとき赤血球凝集素およびプロテアーゼもともに同一行動をとり¹³⁾粗リシンの区分に含まれる。したがつて、粗リシン区分を試料として赤血球凝集力およびプロテ

アゼ活性を測定した。その結果は一括して第9表に示す通りである。

まず赤血球凝集力の変化を見ると熱処理時間が長くなるにつれて凝集力の低下が見られたが、凝集力の弱い試料の場合には高濃度の試料溶液を必要とし、このような高濃度溶液、特にそのN量が200 μ g以上の溶液を用いる場合には溶血がおり、ために正確な凝集価を測定することが不可能であつた。特に最も重要な微量の毒力が残存する粕について残存凝集力との間に精密な相関関係を見出すことができなかった。したがつて Gardner ら¹⁷⁾が報告しているように赤血球凝集力によつて毒性を判定することは妥当でないと考えられる。

次にプロテアーゼ活性の消長を見ると、強い毒性を示すC-PのpH3およびpH6の両方のプロテアーゼ活性が毒力において大差のないL-Pの両プロテアーゼ活性より遙かに低い値を示した。また、ケツル処理(K群)とオートクレーブ処理(A群)を比較すると毒性を全く示さないA群の方が毒性をもつK群より寧ろ強いプロテアーゼ活性を示し、更に処理時間による差異がほとんど認められなかつた。したがつて加熱による毒性の消長とプロテアーゼ活性の消長との間には何らの相関も見出すことができなかった。

以上の結果、ヒマシ粕を熱処理した際の毒性の消失を赤血球凝集力、プロテアーゼ活性の失活度合によつて判定することは定量的には勿論定性的にも不可能なことが明らかとなつたが、熱処理ヒマシ粕の残存水溶性蛋白質量に毒性の有無に関連して或限界があることが判明した。

ヒマシ粕蛋白質の熱変性に伴う不溶化は蛋白質の種類、存在形態などに応じて段階的に起こり、毒性蛋白質の不溶化が完全に起る限界は残存水溶性蛋白質量0.4%以下となるところ(上述実験方法の部に記載した条件により測定した標品100g中の水溶性蛋白質N%)にあるように見える。第9表から明らかのように毒性を残存するK群およびAD-0はいずれも残存水溶性蛋白質量が0.7%以上であり、無毒であつたAおよびAD群の水溶性蛋白質量はいずれも0.4%以下であつた。純化単離された毒蛋白質と粕中に存在する毒蛋白質とでは加熱に対する態度を異にすることは勿論であるが、実際的には処理粕の残存水溶性蛋白質量が0.4%以下になるよう加熱すれば完全に毒蛋白質は変性失活するものと推定できる。換言すれば加熱処理ヒマシ粕の水溶性蛋白質を測定し、もし0.4%以下になつてお

れば毒性も失われたものと判定することができる。

以上述べたところより処理粕の残存水溶性蛋白質量は工業的処理において毒性の程度を判定する目安となりうる事が明らかとなつたので、micro Kjeldahl法による蛋白態N測定法以外に簡単、迅速に水溶性蛋白質量を知る方法を検討した。

一般に微量の蛋白質を迅速に定量する方法として種々の方法が知られているので、ヒマシ粕抽出液について各の方法を検討した。まず蛋白質溶液の280m μ における吸光度を測定することにより蛋白質を定量する方法は微量の蛋白質を定量する最も普遍的な方法として用いられているが、既に述べたように、熱処理ヒマシ粕の抽出液は280m μ にpeakをもつた蛋白質特有の吸収スペクトラムを与えず、したがつて抽出液について280m μ の吸光度から直接蛋白質を定量することが不可能であつた。更に、フェノール試薬による比色法を抽出液の蛋白質量に適用しようと試みたが、混濁を生じ吸光度の測定が不可能であつた。また、所謂蛋白計を用い屈折率測定による定量を試みたが、1%以下の微量の蛋白質濃度に対しては正確な測定が不可能であり、蛋白計を利用することができなかった。

蛋白質の沈澱剤を用い溶液の混濁濁を測定する比濁法も蛋白質の微量定量法としてしばしば用いられている。沈澱剤として上述スルホサリチル酸、ピクリン酸の他、三塩化酢酸、磷モリブデン酸、磷タングステン酸、珪タングステン酸を用い検討した結果、重金属による沈澱の懸濁液は安定性に乏しく、比濁が困難であつた。これに対し有機酸の場合沈澱は安定な懸濁液を与えた。したがつて、この内最も安定な懸濁液となるスルホサリチル酸およびピクリン酸について精細な検討を行なつた。

第7図に示すようにスルホサリチル酸を用いる場合には透過度(T%)とN量との間に直線関係が認められたが試料によつて異なり、例えばAD-0とA-5は同一直線上にplotされなかつた。さらに500 μ g/ml以下のN濃度においてはT%の変化が極めて小さく40~50の間の値を示した。これに反してピクリン酸の場合にはAD群とA群はT%とNの間に全く同一の直線関係を与え、また第8図に示すようにT%は500 μ g/mlのN濃度において約10から90の広い範囲の変化を示し、測定精度が高いことが推察された。またピクリン酸を用いた場合の懸濁液の安定性を検討した結果は第12表に示すように、30分間T%に殆んど変化なく安定であることが判明した。したがつてピク

リン酸を用いる比濁法によつて残存水溶性蛋白質量をより迅速に定量し粕の毒性を判定することが可能となつた。

ヒマシ中にはアレルギー物質が含まれており、熱に対してかなり安定であることが知られている。ヒマシ粕を飼料化する場合、毒性の検討とともにアレルギーの作用も同時に考慮する必要があつた。ヒマシから最初にアレルギーを分離したのは Spies ら^{10,11)}である。即ち縮実からアレルギーを分離したと同様の方法でヒマシから nontoxic allergic protein-polysaccharidic fraction を分離し、CB-1A と命名した。この CB-1A はモルモット体重 1kg 当り CB-1A N 量 58 μ g で感作させ、21 日後 3.3 μ g で fatal anaphylaxis を起したと報じている。Gardner ら¹²⁾によれば CB-1A が失活する温度は 175°C であるという。したがつて著者らの調製した A 群の試料にはアレルギー活性が残存している可能性がある。毒性蛋白質リシンに関してはその毒性が失われたと認められた標品 A-5 および AD-5 についてアレルギーの存在およびその有害作用の有無を検討した。元来アレルギー物質は直接には毒性をもたず生体内に摂取された時、抗原となつて血液中に抗体を造らせ、約 3 週間の潜伏期間を経た後、再び抗原が与えられると同時に抗原-抗体反応を起してショック、アナフィラキシー等のアレルギー症状を呈するものである。したがつてヒマシ-アレルギーを含む飼料を雛に給与した場合、もし万一接触または消化吸収された後、なお且つ抗原となりうるものであるならば雛は当然血液中に抗体を生じ、長期にわたる給与試験期間中に必ず何らかのアレルギー症状を呈するか、或は表面にあらわれないまでも生体に悪影響をおよぼすはずである。しかしながら初生雛に 7 週間 A-5 および AD-5 を配合した飼料を給与し、上記の推察を解明しようと試みたが、その間何らのアレルギー症状も認められず、また体重増加も第 10 表に示すように対照区に比し若干の差は認められたが、有意な差はなく正常な成長を示した。このように表面には何らの症状もあらわれなかつたが、或は血液中の抗体価を上昇させている可能性も考えられたので、上記の雛に給与 8 週目に別に調製したアレルギーを静脈に注射したが、全くアレルギー症状を認めず抗体の生成は考えられなかつた。さらに精製した CB-Allergen の雛に対する抗原性を検討したところ、Spies らがモルモットで観察したようなアレルギー症状を見ることが出来なかつた。アレルギー物質は度々強い動物特異性を有すると

言われているので、ヒマシ-アレルギーは少なくとも鶏に対しては抗原性を示さないのかも知れない。この点なお今後の研究にまたねばならないが、いずれにしてもヒマシオートクレーブ処理粕は雛に経口的に与えた場合にはアレルギーに関しては何らの有害作用も与えないと認められた。

以上述べたようにヒマシ粕はオートクレーブを用い十分な水分を加え、加圧下 125°C で 5 分間加熱処理することにより毒性蛋白質に関する限り完全に無毒化することができた。しかしながら、このような無毒化ヒマシ粕を飼料に配合する場合にはヒマシ中に含まれる毒蛋白質以外の成分、例えば残留油脂成分等の動物に対する影響等も考慮検討される必要がある。また特にアミノ酸組成に関する粕の栄養化学上の問題も飼料化に関連して検討すべきであるが、これに関しては目下加熱処理に伴うアミノ酸組成の変化を検討しつつあるので後報において述べることにする。

要 約

ヒマシ粕は有用な蛋白質を多量含みながら、その強力な毒性のため飼料としては未利用のまま現在に至つていた。著者らはこのヒマシ粕に種々の処理を施して無毒化しようと試み雛を用いて、その除毒法を検討した結果 125°C、2 kg/cm² の条件下で 5 分間処理するという簡単な方法で最も能率的に、且つ完全に除毒できることを明らかにした。このような熱処理による無毒化において、処理粕の残存水溶性蛋白質量と毒性との間にかかなり密接な関係があり、水溶性蛋白質が或る限度以下になれば完全に毒性がなくなることを明らかにし、残存水溶性蛋白質量を測定することにより、間接的に毒性を判定しうることを見出した。更に水溶性蛋白質量を簡単、迅速に定量する方法を種々検討した結果、ピクリン酸を用いる比濁法が優れていることを明らかにした。ヒマシ中の蛋白質分解酵素および赤血球凝集素の失活と毒性の低下の間には直線的な関係は認められなかつた。アレルギー物質の有害作用についても検討したが、熱処理により無毒化されたヒマシ粕は雛に対し何らアレルギー症状も示さず、悪影響を与えなかつた。

後 記

本研究に使用したヒマシおよびヒマシ粕は伊藤製油株式会社より恵与されたものであり、ここに深甚の謝意を表するものである。

文 献

1. D. Breese Jones, J. Am. Oil Chem. Soc., **24**, 247 (1947).
2. Aaron M. Altschul *et al.*, "Processed Plant Protein Foodstuffs", Chapter **31**, 829 (1958) Academic Press.
3. T. B. Osborne, L. B. Mendel and J. F. Harris, Am. J. Physiol., **14**, 258 (1905).
4. P. Karrer *et al.*, Z. physiol. Chem., **135**, 129 (1924).
5. E. A. Kabat, M. Heidelberger and A. E. Bezer, J. Biol. Chem., **168**, 629 (1947).
6. M. Kunitz and M. R. McDonald, J. Gen. Physiol., **32**, 25 (1948).
7. E. LeBreton et Y. Moulè, Compt. rend., **225**, 152 (1947); Bull. soc. chim. biol., **31**, 94 (1949).
8. Y. Moulè, Arch. Sci. Physiol., **5**, 227 (1951); Bull. soc. chim. biol., **33**, 1461, 1467 (1951).
9. J. H. Barnard and J. Allergy, **1**, 473 (1930).
10. J. R. Spies and E. J. Umberger, J. Am. Chem. Soc., **64**, 1889 (1942).
11. J. R. Spies and E. J. Coulson, J. Am. Chem. Soc., **65**, 1720 (1943).
12. 船津 勝, 船津軍喜, 農化, **33**, 461 (1959).
13. 船津軍喜, 農化, **33**, 465, 520 (1959).
14. 船津軍喜, 農化, **34**, 139 (1960).
15. 船津 勝, 船津軍喜, 蛋白質, 核酸, 酵素, **5**, 451 (1960).
16. R. Kodras, C. K. Whithair and R. MacVicar, J. Am. Oil Chem. Soc., **26**, 242 (1949).
17. H. K. Gardner, E. L. Gardner, E. L. D'Aquin, S. P. Koltun, E. J. McCourtney, H. L. E. Vix and E. A. Gasterock, J. Am. Oil Chem. Soc., **37**, 142 (1960).
18. J. M. Looney and A. I. Walsh, J. Biol. Chem., **127**, 117 (1939); **130**, 635 (1939).
19. O. Folin, J. Biol. Chem., **77**, 421 (1928).
20. 萩原文二, 米谷隆, 酵素研究法 II, 237 (1956) 朝倉書店.
21. T. Takahashi, G. Funatsu and M. Funatsu, J. Biochem., (Tokyo) **51**, 288; **52**, 50 (1962).
22. I. E. Liener, E. G. Hill and J. Nutrition, **49**, 609 (1953).

Summary

Castor pomace was left unavailable until today due to its serious toxic damage to the animals, despite of its valuable protein content. Ricin which was a toxic protein in castor bean was considered responsible for the powerful toxic action of castor pomace after a regular heat-treatment in the extraction process of its oil. However, it was expected that the pomace might be completely detoxified by an additional heat-treatment. Thus, various attempts were made of treatment under different conditions of heating in order to detoxify the pomace, resulting in that the pomace could be completely detoxified by heating at 125°C in an autoclave under a pressure of 2 kg/cm². for 5 minutes, whereas heating in an open vessel was not able to completely detoxify the castor pomace even at 165°C. Furthermore, it was found that detoxification was carried out more efficiently when the pomace was autoclaved in the presence of excess water.

Through these experiments the toxicity of the pomace was assayed on chicken by intraperitoneal injection of an aqueous solution of the toxic principle which was extracted from the pomace with 10% sodium chloride solution, dialyzed against water, subsequently precipitated with saturated ammonium sulfate, and then dialyzed against water or 0.9% sodium chloride solution.

For the purpose of an indirect and rapid determination of the toxicity remained in the heat-treated pomace, an attempt was made to correlate the loss of toxicity on heating to the inactivation of the other physiologically active proteins, i.e. hemagglutinin and protease. No correlation was found between these activities. However, the amounts of water-soluble proteins remained after the heat-treatment was found to be approximately proportional to the degree of detoxification of the pomace, so that it became possible to determine the degree of detoxification indirectly by measuring the amounts of water-soluble proteins remained in the treated pomace. A turbidimetric method was employed for a rapid determination of the water-soluble protein which was extracted under a certain condition.

On the other hand, allergic symptoms observed on chicken fed pomace was examined, since allergen is usually so heat-stable that it is possible to remain intact even after the heat treatment. No allergic symptoms was observed on the chicken during 7 weeks of feeding with the heat-treated pomace. At the beginning of the 8th week a partially purified allergen which was prepared from castor bean was injected into the chicken. Any allergic symptoms did not even appear. Therefore,

it could be concluded that even if a small amount of allergen was still contained in the treated pomace, it did not give any damage to the chicken at all.

Consequently, it was found that an appropriate heat treatment could make the castor pomace free from ricin toxicity and utilizable for an animal feed.

Laboratory of Biochemistry, and
* Laboratory of Animal Breeding,
Faculty of Agriculture,
Kyushu University,
Fukuoka, Japan