

## 綿実粕あるいはカポック粕添加飼料で生ずる ニワトリおよびウズラの異常卵黄の化学組成

福永隆生・古賀克也・藤井 信・小倉博代

(畜産化学研究室)

平成元年8月10日 受理

### Chemical Compositions of Abnormal Egg Yolks from Chicken and Quail Fed on Ration Containing Cotton Seed or Kapok Seed Meals.

Takao FUKUNAGA, Katsuya KOGA, Makoto FUJII

and Hiroyo OGURA

(Laboratory of Animal Biochemistry)

#### 緒 言

西日本地区で1970年末に採卵養鶏家から集められた卵の中に卵黄が褐変したものや卵黄硬化卵(完熟卵黄が弾性があり, 指頭間で圧しても崩れないもの), 俗称スポンジ卵が見出され, 製菓原料として購入した工場からの返品が起る事態が発生した。これは飼料中の油脂に基因すると推定された。山口県種鶏場ではその産卵鶏の赤血球数, ヘマトクリット値, 白血球数などが正常鶏に比べ少ない傾向はあるが有意差は認められないと報告した<sup>20)</sup>。

また異常卵黄を産むニワトリを飼料を変えて飼育すれば正常卵産卵へ回復することを認めている。これより前, 国松ら<sup>12)</sup>はカポック粕添加飼料で飼育したニワトリが硬化卵を産卵し, その卵黄脂質の沃素価の低下を認め, このニワトリを肝油添加飼料に変換すると約1週間で正常卵を産むようになることを報告している。

千葉ら<sup>3)</sup>は綿実粕給与のニワトリが卵黄硬化卵を産むこと, 産卵率や受精率の低下をきたすことを認めている。

Evans ら<sup>4)</sup>は綿実油, コーン油, オリーブ油, タローなどの脂肪酸組成既知の油脂を添加した飼料で飼育したニワトリの卵黄について脂肪酸組成を調べている。Brown ら<sup>2)</sup>は綿実粕を与えた牛の乳脂肪を分析しC<sub>6</sub>~C<sub>14</sub>の脂肪酸の減少, C<sub>18</sub>脂肪酸の増加を認めた。

Shone<sup>15)</sup>によれば綿実油およびカポック油に含ま

れるシクロプロペノイド化合物は *Sterculia* 属(アオギリ科植物)の種子に多く含まれる。これに比べれば, 綿実やカポック種子中のその含量はかなり少ない。しかし綿実油にはシクロプロペノイドの他にアルデヒド基を有するポリフェノール化合物であるゴシポールが含まれ, これは反応性に富み, 褐変要因になることやタンパク質と反応することも知られている。Lyman ら<sup>13)</sup>は血漿アルブミンや綿実タンパク質とゴシポールとの結合物はペプシン, トリプシンによる消化が悪くなることを示し, その結合部位はε-NH<sub>2</sub>であることを見出した。Wong ら<sup>19)</sup>はゴシポールがペプシノーゲンと結合するとペプシンへの活性化が阻害されることを示している。また綿実油に鉄を加えるとゴシポールと結合し, 不溶性化合物を形成するためゴシポールの害が軽減される<sup>21)</sup>。

一方綿実粕はメチオニン含量が比較的多くタンパク質供給源として有効であるとの報告がある<sup>14)</sup>。しかし現在では, 綿実粕はゴシポール含有のためニワトリの飼料としては, ほとんど使用されず, 豚には含量の少ないものを利用し, 飼料の10%以下にとどめ, 同時に大豆粕や魚粉の給与が奨められている<sup>14)</sup>。ニワトリでは卵黄硬化卵が発生しても正常飼料に変換することにより復元することが知られており, 著者らも本研究でそのことを確認した。その場合の卵黄脂質の脂肪酸組成の変化に関する研究は見当たらない。したがって著者らは, 硬化卵黄の脂肪酸組成並びに復元過程におけるその組成変化を明らかにした。

さらに硬化卵黄脂質中のゴシポール, シクロプロ

ペノイド化合物の検出, 硬化卵黄タンパク質のアミノ酸組成および化過程中的のウズラの胚リパーゼ活性に対する硬化卵黄脂質の影響について調べた。

### 材料および方法

#### 1. 実験材料

##### 1) 異常卵発生のための飼料

(1) 基礎飼料として次記組成の市販完全配合飼料を用いた。

成鶏産卵用 (三井印完全配合飼料, ニューレイヤーNo 2)

粗タンパク質 (15.0%以上), 粗脂肪 (2.5%以上), 粗セシイ (6.0%以下), 粗灰分 (12.5%以下), 本飼料100gに添加した薬剤の量はピリメタミン (0.1mg), スルファジメトキシシ (1.0mg)

ウズラ産卵用 (三井印完全配合飼料)

粗タンパク質 (21.0%以上), 粗脂肪 (2.5%以上), 粗セシイ (4.0%以下), 粗灰分 (12.5%以下), 炭酸カルシウム (6.6%), リン酸カルシウム (0.7%), アルファルファミール (3.0%)

(2) カボック粕は鹿児島くみあい飼料より分譲をうけたもので, 上記完全配合飼料に10%添加して, 約1.5ヶ月ニワトリとウズラを飼育し, 異常卵黄生成の検査を行った。

(3) 綿実粕 綿実を三光飼料株式会社より分譲をうけ, これを70%硫酸に浸漬し, コットンリントーを溶解除去した。その後, 十分に水洗し, 水中に沈む綿実を集め乾燥した。これを圧搾機を用いて400~500気圧で搾油した。得られた綿実粕を粉碎機で粉末として用いた。前記の完全配合飼料に10%添加混合し, 試験飼料とした。

##### 2) 供試家禽

産卵用家禽としてはニワトリ (*Gallus gallus domesticus*) と日本ウズラ (*Coturnix coturnix japonica*) を用いた。

ニワトリは本学農学部附属農場より白色レグホンの雌を3羽入手し, 1羽毎のケージ飼いとした。まず基礎飼料で飼育し1~2日に1個の割合で産卵することを確認した。

つぎに日本ウズラの雌を予備試験により, カボック粕添加の飼料で飼育し, 異常卵の産卵を確認した。それを再び正常飼料で2ヶ月間飼育し, 正常卵を産卵することを確認したのを用いた。

##### 3) 異常卵の発生状況

(1) カボック粕添加飼料で飼育開始10日目より異

Table 1. Feeding conditions for chicken and quail

	Feedstuff	Number	Laying-day of abnormal egg
Chicken	Containing kapok seed meal (10%), restricted feeding	3	after 10 days
	Containing cotton seed meal (10%), restricted feeding	3	after 7 days
Quail	Containing cotton seed meal, (10%) restricted feeding	6	after 7 days

Ration amount: 100 g /Chicken, 20 g /Quail  
Basal feedstuff

Chicken : Mitsui formula feed for layer  
Quail : Mitsui formula feed for layer

常卵と思われる卵が産卵され, 3週間後には卵黄の硬化現象が確認された。

(2) 綿実粕添加飼料で飼育開始7日目頃より異常卵と思われる卵が産卵され, 3週間後完全に異常卵となった。(Table 1)

約6ヶ月間添加飼料で飼育後, 無添加の正常飼料に変換したところ, 約1週間後, 粘性はやや異常であるが, 卵黄色はほとんど正常とかわらない卵を産卵し, 20日後には生でも加熱完熟後も正常卵と同様に復元していることが認められた。

以上附属農場から入手したニワトリの正常卵と, 綿実粕, カボック粕給与後の完全異常卵および綿実粕給与後, 正常飼料に切換え後の1ヶ月間の復元過程の卵を実験材料として用いた。

### 2. 実験方法

#### 1) 卵黄脂質の抽出

試料卵を割卵し, 卵白を除去し, さらに蒸留水で卵黄を洗淨後, 濾紙で水分を吸収除去して, 卵黄膜を破り卵黄内容物のみをシャーレに移し, 凍結乾燥を行った。

正常卵黄, 異常卵黄の粉末を8~9g採取し, 常法により Soxhlet 脂肪抽出装置を用いて30時間抽出を行った。脱脂卵黄粉末はデシケーター中に保存し, 脂質の抽出物はエーテルを吸引蒸発させた後, N<sub>2</sub>ガスを導入して-20℃下で保存した。

#### 2) 卵黄脂質の硅胶カラムクロマトグラフィー

卵黄脂質の分画は Hornstein ら<sup>9)</sup>の硅胶カラムクロマトグラフィー法により行った。

溶媒として使用するクロロホルムおよびメタノールにはあらかじめ無水硫酸ソーダを加え, よく振り

まず1日放置後、蒸留したものを使用した。

硅胶 (Mallinckrodt AR 100 mesh) を131°Cで1晩加熱により活性化させ、デシケーター中で放冷後、クロロホルムを加えゲル状にして吸引脱気を行い、2.5×40cmカラムに3 kg/cm<sup>2</sup>のN<sub>2</sub>ガス圧をかけながら充填した。最後に硅胶層の上に無水硫酸ナトリウムを約2.5cmつめた。つぎにクロロホルム300mlを流し、カラムを洗った。クロマトグラフィーの展開、溶出ともに3 kg/cm<sup>2</sup>のN<sub>2</sub>ガスの圧力のもとで行った。その流速は3~5 ml/minであった。

試料はそれぞれ4 g前後を正確に秤り、CHCl<sub>3</sub>-MeOH 混液 (20:1) 15mlを加えて試料液とした。これをカラムに流し込み吸着させた後、前記の溶媒でカラム壁を洗い、つづいて、つぎの溶媒の順序で展開溶出した。

溶媒 I, CHCl<sub>3</sub>-MeOH 混液 (20:1) 300ml

溶媒 II, CHCl<sub>3</sub>-MeOH 混液 (1:1) 300ml

溶媒 III, 無水 MeOH 300ml

溶媒 IV, 5% H<sub>2</sub>O を含む MeOH 300ml

それぞれの溶出画分を Fract. I, Fract. II, Fract. III, Fract. IV とした。

分画物はロータリーエバポレーターで30~40°Cで減圧濃縮し、完全に乾燥後、重量を測定した。

### 3) 卵黄脂質の鹼化価および沃素価の測定

鹼化価は常法にしたがって測定した。また沃素価は常法にしたがい Wijs の方法で求めた。

### 4) ガスクロマトグラフィー

前記脂質の各画分について前処理としてメチル化を行った。メチル化は Stoffel ら<sup>16)</sup>の方法を参考にして行い、石油エーテルで抽出後、Shimadzu GC-4B ガスクロマトグラフで分析を行った。メチル化に用いた HCl-MeOH 溶液は濃塩酸と濃硫酸で塩化水素ガスを発生させ、濃硫酸、塩化カルシウムで乾燥した塩化水素ガスを飽和になるまでメタノールに溶解させることにより調製した。用いたメタノールは生石灰を入れ乾燥後蒸留したものである。

すなわち、メチル化においては文献<sup>11,17)</sup>を参照して各画分1~10mgの脂肪酸に相当する量を採取し、有機溶媒を蒸発させ、ベンゼン1mlと HCl-MeOH 液8mlを加え、80~100°Cの湯浴中で還流冷却器をつけ2~3時間反応させた。その後水3.5mlを加え石油エーテル20mlで3回抽出を行った。抽出液は減圧濃縮後、石油エーテルで一定量に希釈して無水硫酸ナトリウム：炭酸ナトリウム (4:1) を加え、

Table 2. Conditions for fatty acid estimation with the gas-chromatograph

Gas-chromatographic apparatus	: Shimadzu GC-4B
Column adsorbent	: Chromosorb W, DEGS H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> 5~1%, 60~80 mesh
Column size	: 3φ×3m
Column temp	: 175°C
Carrier gas	: N <sub>2</sub> gas
Flow rate	: 30ml/min
Detector	: FID

1晩脱水中和後濾過して、ガスクロマトグラフィー用の試料とした。ガスクロマトグラフィーは Table 2 の条件で行った。

ピークの同定は保持時間と、標品を添加してガスクロマトグラフィーを行った時の標品との重なりによって同定した。さらに不飽和脂肪酸についてはメチル化後有機溶媒を除き、少量の水を加えあたためつつ  $\frac{M}{50}$  KMnO<sub>4</sub> を色が消えなくなるまで加えて酸化し、その後石油エーテルで抽出、脱水処理してガスクロマトグラフィーを行い、ピークの消失により確認した。同定のための標準脂肪酸としてはカプリル酸、ラウリル酸、ミリスチン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、オレイン酸、リノール酸、アラキドン酸を用いた。

各脂肪酸の濃度はパルミチン酸を用いて、その量とクロマトグラム面積との関係式  $y=0.1745X$  から算出した。ここで  $y$  は面積 (半値巾法で求めた)、 $X$  は濃度 (10<sup>-2</sup>%) である。

### 5) 異常卵黄脂質の Millian 反応と Halphen 反応

Millian 反応は綿実油に含まれるアルデヒド物質により硝酸銀が還元されることに基づくものであり暗色となる<sup>10)</sup>。卵黄のエーテル抽出脂質2gを95%エタノール15mlにとかし、30% Ag NO<sub>3</sub> 水溶液2mlを加え、約4分間煮沸し呈色度を観察した。硝酸銀無添加のものを盲検とした。

Halphen 反応はシクロプロペノイド化合物を含む綿実油が他の油に1%混在するさいにも検出できる鋭敏な反応である<sup>10)</sup>。綿実油存在のさいは赤色~橙色を呈する。卵黄エーテル抽出脂質2g、アミルアルコール2ml、1%硫黄含有二硫化炭素溶液2mlを試験管にとり油浴中に入れ、110°Cで15分間加熱して発色度を観察した。

### 6) 卵黄タンパク質のアミノ酸分析

加水分解用試験管に脱脂卵黄タンパク質40mgと6N HCl 10mlを入れ、脱気後、N<sub>2</sub>ガス置換、さらに吸

引して封管し、110℃で24時間および48時間加水分解を行った。加水分解後減圧濃縮し、一定量に希釈して、柳本 LC-5S 型アミノ酸自動分析機を用いて分析した。

7) 異常卵黄脂質のウズラ胚リパーゼ活性に対する阻害の検討

リパーゼ活性の測定は前報<sup>7)</sup>に準じローダミン 6 G 比色法により行った。

粗酵素液はウズラの受精卵のふ卵10日目の卵黄 3 g に buffer 5 ml を加え、ホモゲナイズして濾過したものをを用いた。

基質としては10%トリブチリンの1% tween 60 溶液 (pH 8.0) を用い、緩衝液としては0.1 M Tris-HCl buffer, pH 8.0を用いた。

Dole 抽出液としては n-ヘプタン: イソプロパノール: 1 N 硫酸 (10: 4: 1) を用いた。

Rhodamine 6 G 試薬の調製は次記のように行った。Tris-HCl buffer (pH 9.5) 5 ml にとかし、ベンゼン100mlを加え、ベンゼン層を Rhodamine 6 G 試薬とした。これに NaOH 粒を加えて褐色ビンに入れ暗所に保存した<sup>1)</sup>。

正常卵黄および異常卵黄のエーテル抽出物についてそれぞれエーテルを蒸発除去後、抽出物が20%となるように1% tween 60 溶液にとかした。

測定法は上記抽出物溶液 0.2ml を試験管に採り、基質0.2ml, buffer 0.4ml および 5% albumin 水溶液0.2mlを加えた。ついで37℃ 5分間インキュベート後、粗酵素液0.2mlを加えた。60分間反応させた後、Dole 抽出液 3 ml を加え振盪した。つぎに水 2 ml, ヘプタン 3 ml を加え振盪して静置する。ヘプタン層から0.05mlをとり、ヘキサン1.95mlを加えた。これに Rhodamine 6 G 試薬 1 ml 加え島津ボシロムスペクトロニック 20 で 515 nm における吸光

度を測定した。

### 結果および考察

雌のニワトリおよびウズラを綿実粕あるいはカボック粕添加飼料で飼育した場合いづれにおいても7~10日目頃に産卵された卵の卵黄に淡褐色化の異常が認められ、20日目頃からの卵では卵黄硬化現象(完熟卵黄が指頭間で圧してもくずれなくなる現象)が確認された。これらの現象は山田ら<sup>20)</sup>の報告でも認められている。そこで完全な異常卵および別の個体から産卵された正常卵の卵黄について、硅胶カラムクロマトグラフィーによる各脂質の分画を行った。この方法は Hornstein ら<sup>9)</sup>が牛肉、豚肉中の脂質について行ったものを参考にした。その結果を Table 3 に示した。

この結果 Fract. I が81~85%と最も多く、ついで Fract. II, III, IV の順であった。Hornstein ら<sup>9)</sup>によれば Fract. I はトリアシルグリセロールであり、Fract. II, III はそれぞれリン脂質である。Fract. II はおもにケファリンであり、Fract. III は微量のケファリンを含み、おもにレシチンとスフィンゴミエリンである。Fract. I は黄色を呈し、Fract. II はかすかに黄色をおびていた。正常卵と異常卵との間には各フラクションの割合の差は認められなかった。

つぎに各画分について、常法により鹸化価を求めた。その結果は Table 4 の通りである。

抽出脂質の鹸化価についてみると綿実粕区のものやや大きく、分画物 Fract. I と II では正常卵と異常卵との差は認められないが Fract. III では異常卵がやや大きい傾向がある。

綿実粕、カボック粕給与により卵黄硬化卵を産卵するので、卵黄脂質の沃素価を測定した。その結果

Table 3. Relative amounts of each fraction of the chicken and the quail yolk lipids obtained by silicic acid column chromatography

	Chicken			Quail	
	Normal	Kapok seed	Cotton seed	Normal	Cotton seed
Fract. I	82.3%	84.7%	83.0%	83.4%	81.4%
Fract. II	11.9	6.8	9.2	7.1	13.5
Fract. III	6.3	6.3	4.9	8.6	3.9
Fract. IV	0.4	0.4	0.3	0.5	0.5
Total	100	100	100	100	100

Following solvents were used, according to the report of Hornstein et al<sup>9)</sup>.

Fract. I : CHCl<sub>3</sub>-MeOH (20:1) 300ml, Fract. II : CHCl<sub>3</sub>-MeOH (1:1) 300ml. Fract. III : Anhydrous MeOH 300ml, Fract. VI : 5% H<sub>2</sub>O in MeOH 300ml.

Column size : 2.5×40cm, Pressure with N<sub>2</sub>-gas : 3kg/cm<sup>2</sup>

Table 4. Saponification values of each lipid fraction from the chicken and quail yolk lipids

	Chicken			Quail	
	Normal	Kapok seed	Cotton seed	Normal	Cotton seed
Ether extract.	176.5	174.1	191.4	196.8	202.2
Fract. I	176.9	167.9	178.2	188.7	187.4
Fract. II	228.1	223.4	225.4	232.2	210.2
Fract. III	197.8	189.0	202.8	189.2	202.0

Table 5. Iodine values of ether extracts from various egg yolks

Normal	Chicken		Quail	
	Kapok seed	Cotton seed	Normal	Cotton seed
72	59	65	68	65

Table 6. Fatty acid constitution of ether extracts from various egg yolks

	Chicken			Quail	
	Normal	Kapok seed	Cotton seed	Normal	Cotton seed
Palmitic	27.97%	28.39%	26.34%	28.22%	30.36%
Palmitoleic	4.07	1.49	2.06	6.11	3.91
Stearic	9.83	23.27	17.97	8.96	13.46
Oleic	47.97	33.08	41.43	48.58	40.69
Linoleic	10.17	13.77	12.21	8.14	11.58
Total	100	100	100	100	100
Saturated fatty acid	37.80%	51.66%	44.31%	37.18%	43.82%
Unsaturated fatty acid	62.21	48.34	55.70	62.83	56.18

Preparation of fatty acid methylesters in the yolk lipids by interesterification and the analyses of the esters were carried out by Shimadzu GC-4B gas-chromatograph, according to the previous report<sup>11)</sup>.

は Table 5 の通りであり、異常卵黄脂質の沃素価は正常卵黄脂質のものより小さい傾向が認められ、国松ら<sup>12)</sup>の結果と同様であった。Schneider らはシクロプロペノイド含有油を添加した飼料で飼育されたラットの睾丸脂質の沃素価の低下を認めている (Shone<sup>15)</sup>より引用)。これらの結果は異常卵黄の脂質の不飽和度の低下、すなわち不飽和脂肪酸の減少を示唆している。

このことを確認するために、まず正常、異常卵黄のエーテル抽出物について、ガスクロマトグラフィーにより脂肪酸組成を調べた。その結果を Table 6 に示した。すべての試料において、パルミチン酸、パルミトレイン酸、ステアリン酸、オレイン酸、リノール酸の存在が認められた。この中最も多いのはオレイン酸で、つぎにパルミチン酸、ステアリン酸、

リノール酸の順であった。なお、パルミトレイン酸の認定は藤野の報告<sup>8)</sup>に基づいた。

異常卵黄を正常卵黄と比べればニワトリ、ウズラともにステアリン酸が著しく増加し、オレイン酸が減少していた。しかしリノール酸はやや多い。

飽和脂肪酸総量と不飽和脂肪酸総量について比較すると前者は異常卵黄で増加し、後者は逆に減少していることが認められた。このことは前記した沃素価の低下とよく一致している。Evans ら<sup>4)</sup>はステアリン酸含量の比較的少ない綿実油添加飼料区の鶏卵黄脂質にステアリン酸の増加を認め、その酸の含量が多いタロー添加飼料区のものとは変化がないことを認めている。これは卵黄の脂肪酸組成が飼料油脂の脂肪酸組成に支配されていないことを示唆する。さらに彼ら<sup>5,6)</sup>は綿実油添加

Table 7. Fatty acid constitutions of fraction I and fraction II (% of total fatty acids)

Fract. I	Chicken			Quail	
	Normal	Kapok seed	Cotton seed	Normal	Cotton seed
Myristic	trace	trace	trace	trace	trace
Palmitic	25.99	28.23	26.38	27.13	29.66
Palmitoleic	4.52	trace	2.45	6.56	4.05
Stearic	6.33	24.67	18.35	7.37	13.61
Oleic	47.58	33.93	41.75	51.38	41.77
Linoleic	15.57	13.16	11.07	7.56	10.90
Total	100	100	100	100	100
Saturated fatty A.	32.32	52.90	44.73	34.50	43.27
Unsaturated fatty A.	67.67	47.09	55.27	65.50	56.72

  

Fract. II	Chicken			Quail	
	Normal	Kapok seed	Cotton seed	Normal	Cotton seed
Palmitic	25.35	25.47	27.61	24.14	28.32
Palmitoleic	trace	trace	trace	1.98	trace
Stearic	23.04	28.12	27.27	25.67	24.76
Oleic	26.02	22.63	22.06	28.06	24.50
Linoleic	16.48	17.54	11.86	9.72	14.52
Arachidonic	9.09	6.25	11.20	10.43	7.89
Total	100	100	100	100	100
Saturated fatty A.	48.39	53.59	54.88	49.81	53.08
Unsaturated fatty A.	51.59	46.42	45.12	50.19	46.91

Table 8. Fatty acid constitutions of fraction III and IV (% of total fatty acids)

Fract. III	Chicken			Quail	
	Normal	Kapok seed	Cotton seed	Normal	Cotton seed
Palmitic	36.67	39.13	39.87	28.56	35.47
Palmitoleic	trace	trace	trace	2.32	trace
Stearic	11.11	12.57	13.04	13.98	14.45
Oleic	35.54	30.10	31.33	31.26	28.07
Linoleic	16.67	18.20	12.94	11.45	14.45
Linolenic	—	—	—	9.53	4.67
Arachidonic	trace	trace	2.81	2.90	2.89
Total	100	100	100	100	100
Saturated fatty A.	47.78	51.70	52.91	42.54	49.92
Unsaturated fatty A.	52.21	48.30	47.08	57.46	50.08

  

Fract. IV	Chicken			Quail	
	Normal	Kapok seed	Cotton seed	Normal	Cotton seed
Palmitic	49.53	44.36	45.50	42.00	43.27
Palmitoleic	trace	trace	trace	2.76	trace
Stearic	11.13	19.92	24.31	21.46	26.29
Oleic	20.11	23.29	22.53	26.35	20.10
Linoleic	8.11	12.43	7.66	7.42	10.34
Linolenic	3.90	—	trace	—	—
Arachidonic	7.23	—	trace	trace	trace
Total	100	100	100	100	100
Saturated fatty A.	60.66	64.28	69.81	63.46	69.56
Unsaturated fatty A.	39.35	35.72	30.19	36.53	30.44

飼料で飼育したニワトリの体組織、卵黄の脂肪酸の変化を調べ、血液プラズマ、肝臓、卵巣、卵黄におけるステアリン酸の増加とオレイン酸の減少を認めている。Shone<sup>15)</sup>はシクロプロペノイド含有飼料で飼育されたラットの体脂肪におけるステアリン酸の増加とオレイン酸の減少がおこること、さらにこの異常現象はオレイン酸添加飼料の給与で正常化すると述べている。

そこで硅胶カラムで分画した各脂質画分について、脂肪酸組成を調べ Table 7, Table 8 に示した。エーテル抽出物中に認められた脂肪酸以外にもピークを認めた。これは藤野の報告<sup>8)</sup>を参考にしてリノレン酸と認定した。まず卵黄脂質中80%以上を占める Fract. I をみると、正常卵黄ではオレイン酸が最も多く、ついでパルミチン酸、リノール酸、ステアリン酸、パルミトレイン酸で、ミリスチン酸は痕跡であり、藤野の報告<sup>8)</sup>と一致した。異常卵黄では

オレイン酸が最も多く、ついでパルミチン酸であり、これにステアリン酸、リノール酸がつづき、リノール酸とステアリン酸の含量が逆転していた。

Fract. II, III および IV の各脂肪酸の割合の順序は多少異なっている。また正常卵黄、異常卵黄については変動がみられるが顕著なものではなく、異常卵黄でステアリン酸の増加と、オレイン酸の減少の傾向を示した。

すべての脂肪酸画分について、飽和脂肪酸総量と不飽和脂肪酸総量を比べると異常卵黄の飽和脂肪酸は正常卵黄よりそれぞれ増加し、不飽和脂肪酸は減少していた。中でも Fract. I すなわちトリアシルグリセロール画分ではその増加が顕著であった。

硅胶カラムクロマトグラフィーにより分画したさいに、溶出液の変質を防止する目的で N<sub>2</sub> ガスを導入し、-20℃で保存したところ、不溶化物が析出した。とくに Fract. I については析出物が著しく多

Table 9. Fatty acid constitutions of solid- and soluble-parts separated from fraction I in CHCl<sub>3</sub>-MeOH solution kept at -20°C

		Chicken						Quail			
		Normal		Kapok seed		Cotton seed		Normal		Cotton seed	
		Solid	Liquid	Solid	Liquid	Solid	Liquid	Solid	Liquid	Solid	Liquid
Satd. fatty A.	Palmitic	24.8%	25.6%	31.8%	26.6%	29.9%	26.9%	28.8%	26.3%	38.1%	30.4%
	Stearic	6.9	8.4	31.3	24.1	26.6	16.5	8.8	6.8	26.0	12.4
	Total	31.7	34.0	63.1	50.7	56.5	43.4	37.6	33.1	64.1	42.8
Unsatd. fatty A.	Palmitoleic	5.1	5.2	trace	trace	trace	trace	6.7	6.2	trace	4.6
	Oleic	47.9	45.7	33.3	35.6	35.0	45.4	48.3	46.9	29.0	42.2
	Linoleic	15.2	15.1	12.2	13.9	8.5	11.2	7.4	13.8	6.8	10.5
	Total	68.2	66.0	45.5	49.5	43.5	56.6	62.4	66.9	35.8	57.3

Table 10. Ratios of the increment and decrement of fatty acid in abnormal yolk to the fatty acid in normal yolk

		Chicken		Quail
		Kapok seed	Cotton seed	Cotton seed
Fract. I	Saturated fatty A.	+63.7%	+38.4%	+25.4%
	Unsaturated fatty A.	-25.4	-15.4	-10.6
Fract. II	Saturated fatty A.	+10.8	+13.4	+6.6
	Unsaturated fatty A.	-10.0	-12.5	-6.5
Fract. III	Saturated fatty A.	+8.2	+10.7	+17.4
	Unsaturated fatty A.	-7.5	-9.8	-0.4
Fract. IV	Saturated fatty A.	+6.0	+15.1	+9.6
	Unsaturated fatty A.	+0.8	-14.8	-9.9

+ : increment, - : decrement.

いため、Fract. Iを一晩、 $-20^{\circ}\text{C}$ に保持後素早く濾過し、析出部と濾液部に分離した。これらを別々にメチル化を行い、ガスクロマトグラフィーで分析を行った。その結果を Table 9 に示した。

これより正常卵黄の析出グリセライド部と溶存グリセライド部の間にパルミチン酸、ステアリン酸、パルミトレイン酸、オレイン酸、リノール酸いずれも大きな差は見られないが、異常卵黄では、綿実粕、カポック粕区いずれのものにおいても飽和脂肪酸のパルミチン酸とステアリン酸が析出部に多く、不飽和脂肪酸のオレイン酸、リノール酸が少ない。以上の結果は飽和脂肪酸とくにステアリン酸のトリアシルグリセロール中の偏在を示唆している。

正常卵黄では析出部、溶存部ともに不飽和脂肪酸が多く、異常卵黄では逆に飽和脂肪酸が多い傾向を示し、とくに析出部に多いことが認められた。したがって飽和脂肪酸含量の多い溶解性の低いトリアシルグリセロールが異常卵黄に多く含まれており、このことが卵黄の硬化現象に対する大きな要因である

と推定される。

正常卵黄に対する異常卵黄の各脂肪酸画分中の飽和、不飽和脂肪酸の増減率を Table 7, 8 から求めた結果が Table 10 である。

表から明らかな様に異常卵黄の飽和脂肪酸の増加率は不飽和脂肪酸の減少率よりかなり高く、とくに Fract. I 画分で著しく、なかでもステアリン酸の増加率が著しく高いことが認められた (Table 7)。Fract. II, III, IV においても飽和脂肪酸の増加、不飽和脂肪酸の減少が認められたが、顕著ではなかった。

以上のことを総合すると卵黄の硬化現象はおもにトリアシルグリセロール中の飽和脂肪酸の増加に基因することは確実である。

異常卵を産卵するニワトリに正常な飼料を与えることと回復することを山田ら<sup>20)</sup>は認めており、さらに、国松ら<sup>12)</sup>によれば肝油、または不飽和脂肪酸を多く含む魚粉などを添加すると硬化の程度が回復する。著者らも異常卵を産卵するニワトリおよびウズラに

Table 11. Change of fatty acid constitutions in chicken yolk lipids during the restoration from the abnormal state to the normal

		Abnormal	B*	C	D	E	Normal
Satd. fatty A.	Palmitic	26.3	26.6	25.8	26.4	26.3	28.0
	Stearic	18.0	11.9	9.6	11.0	9.1	9.8
	Total	44.3	38.5	35.4	37.4	35.4	37.8
Unsatd. fatty A.	Palmitoleic	2.1	2.8	3.5	2.9	3.5	4.1
	Oleic	41.4	48.2	51.5	49.5	49.0	48.0
	Linoleic	12.2	10.5	9.6	10.2	12.1	10.1
	Total	55.7	61.5	64.6	62.6	64.6	62.2

\* B : 7-days passage C : 11-days passage  
D : 15-days passage E : 24-days passage

Table 12. Change of fatty acid constitutions in quail yolk lipids during the restoration from the abnormal state to the normal

		Abnormal	B*	C	D	E	Normal
Satd. fatty A.	Palmitic	30.3	29.4	28.1	27.7	27.8	28.2
	Stearic	13.5	9.7	8.7	8.0	9.3	9.0
	Total	43.8	39.1	36.8	35.7	37.1	37.2
Unsatd. fatty A.	Palmitoleic	3.9	6.0	5.6	5.3	5.4	6.1
	Oleic	40.7	47.2	49.1	49.1	49.0	48.6
	Linoleic	11.6	7.7	8.5	9.9	8.5	8.1
	Total	56.2	60.9	63.2	64.3	62.9	62.8

\* B : 7-days passage C : 11-days passage  
D : 15-days passage E : 24-days passage

正常飼料を与えると20日経過後、正常卵に復元することを認めた。そこで綿実粕添加飼料給与区の卵黄について異常卵黄から正常卵黄となるまでの過程を6段階に分けて、各階段における卵黄エーテル抽出物の脂肪酸組成をガスクロマトグラフィーにより分析した。その結果を鶏卵黄については Table 11 に、ウズラ卵黄については Table 12 に示した。

いづれにおいても正常飼料給与による復元過程中、卵黄の脂肪酸組成においてはかなり短期日の間に飽和脂肪酸含量が減少し、不飽和脂肪酸含量は増加することが認められた。とくにステアリン酸の急速な減少、オレイン酸の増加が顕著である。またパルミトリン酸は異常卵黄に比し、正常卵黄では1.5~2倍になっている。したがって復元は飽和脂肪酸の減少と不飽和脂肪酸の増加が除々に進行するのではなく、少なくとも10日前後までに急速に起こることを示している。

これは硬化卵黄を作る原因物質（綿実粕、カボック粕に残留する油溶性のシクロプロペノイドと推定される）が体内に摂取された場合、脂質代謝系に異常をおこし、脂肪酸組成に変化を来し、正常飼料に変換すると、体外にすみやかに排泄され、正常化してゆくものと思われる。

不完全搾油の綿実粕やカボック粕には脂溶性のシクロプロペノイド化合物やゴシポールが含まれるので、異常卵黄エーテル抽出脂質につき、定性的に前者を検出する Halphen 反応<sup>10)</sup>および後者を検出する Millian 反応<sup>10)</sup>を行った。その結果 Table 13, Table 14 に示すごとく、異常卵黄脂質は程度の差はあるものの両反応ともに陽性であった。この結果はシクロプロペノイド化合物およびゴシポールの卵黄への移行を示唆する。さらに他の研究者が指摘するごとく卵黄の褐変にはゴシポールが、硬化にはシクロプロペノイド化合物が関与していると推定された。著者らが本研究でえたステアリン酸の増加とオレイン酸の減少およびパルミチン酸の増加とパルミトリン酸の減少から、Shone<sup>15)</sup>が推定する C<sub>18:0</sub>酸から C<sub>18:1</sub>酸への脱水素反応の損傷を支持する。著者らはシクロプロペノイド化合物が C<sub>18:0</sub>→C<sub>18:1</sub>および C<sub>16:0</sub>→C<sub>16:1</sub>への反応に関与する dehydrogenase 活性を阻害すると考えている。

ゴシポールは卵黄の褐変現象のほか、生体成分との反応に関する報告もみられる。すなわちタンパク質とくに血漿アルブミンとの反応において ε-NH<sub>2</sub>との結合が証明され<sup>13)</sup>、リジンの減少が明らかにされている。さらにペプシノーゲンとの反応によりペプ

Table 13. Millian reaction for egg yolk lipid

	Test	Blank
Normal yolk lipid	Chicken Yellowish brown	Yellow
	Quail Light yellowish brown	Yellow
Abnormal yolk lipid (fed cotton seed meal)	Chicken Deep brown	Light yellowish brown
	Quail Brown	Yellow
Abnormal yolk lipid (fed kapok seed meal)	Chicken Light brown	Yellow
Cotton seed oil	Very deep brown	Light yellow

Blank: No addition of silver nitrate.

Table 14. Halphen reaction for egg yolk lipid

	Chicken	Quail
Normal yolk lipid	Yellowish brown	Yellow
Abnormal yolk lipid (fed cotton seed meal)	Reddish brown	Deep brownish yellow
Abnormal yolk lipid (fed kapok seed meal)	Light reddish yellow	—
Rape seed oil	Yellow	
Oleic acid	Yellow	

シンへの活性化を阻害する<sup>19)</sup>。そこでこれら化合物と卵黄タンパク質との相互作用を窺知するため、正常卵黄と異常卵黄の脱脂タンパク質についてアミノ酸組成を調べた。加水分解は110°で24時間、48時間行ったが両者に差が見られなかったため48時間加水分解の結果を Table 15 に示した。正常卵と異常卵において大きな差は見られないが、異常卵においてリジンが少なく、ゴシポールによる  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub>の修飾が示唆された。プロリン、チロシンもやや少ない傾向を示し、バリンは明らかに多く、アラニン、グリシン、イソロイシンはやや多い傾向を示した。これらアミノ酸の増減については卵黄タンパク質がゴシポールと結合し、加水分解によってもとのアミノ酸に還元せず、別のピークに出現することも考えられ

るので今後検討する必要がある。

綿実粕給与ニワトリが産卵した卵のふ化率の低下、およびタンパク質とゴシポールとの結合が明らかにされているので、卵黄脂質の代謝に関係するリパーゼの活性に対する阻害を調べた。本研究を行っているとき、当研究室でウズラ卵黄リパーゼの研究も行っていたので、ふ化過程中のウズラ卵の胚部から抽出した粗リパーゼ液の活性におよぼす異常卵黄抽出物の影響について調べた。3回実験を繰返し OD<sub>515nm</sub>値 (活性を示す) を測定し、Table 16 に示した。

この結果は異常卵黄エーテル抽出物の酵素反応系への添加による胚リパーゼ活性の低下の傾向を示している。したがって綿実やカボック種子中の油溶性

Table 15. Amino acid constitutions of proteins from the normal and abnormal egg yolks (% of total amino acids)

	Chicken			Quail	
	Normal	Kapok seed	Cotton seed	Normal	Cotton seed
Lys	7.5	7.0	6.9	8.7	7.2
His	2.6	2.7	2.5	3.0	2.9
Arg	8.0	7.7	7.4	6.9	7.2
Asp	9.9	10.0	9.7	9.2	9.9
Thr	5.2	5.1	4.9	5.3	5.3
Ser	7.4	7.4	7.2	7.3	8.3
Glu	13.1	12.7	13.1	13.2	13.8
Pro	4.3	3.6	3.8	4.0	3.8
Gly	2.9	2.9	3.5	2.5	3.2
Ala	4.7	4.9	5.0	4.4	4.8
Cys/2	1.2	1.7	1.8	1.5	0.9
Val	6.0	6.7	7.0	5.3	6.6
Met	2.9	2.8	3.1	2.7	2.2
Ile	5.3	6.1	5.6	4.9	5.6
Leu	9.0	8.9	9.0	10.6	9.2
Tyr	5.2	4.7	4.9	4.9	4.4
Phe	4.9	5.1	4.8	5.5	4.8
Total	100	100	100	100	100

Hydrolysis was performed for 24 hr and 48 hr at 110°C, in the sealed tube substituting the air by nitrogen gas. These results were almost the same.

Table 16. Effect of the abnormal yolk lipids (ether extracts) upon the quail embryo lipase (Absorbance values at 515 nm)

	Chicken			Quail	
	Normal	Kapok seed	Cotton seed	Normal	Cotton seed
No. 1	0.480	0.360	0.440	0.300	0.300
No. 2	0.360	0.310	0.330	0.370	0.350
No. 3	0.470	0.340	0.400	0.350	0.350

Crude lipase activity from the quail embryo at the 10 th day of incubation was assayed according to the colorimetric method with Rhodamine 6 G<sup>21)</sup>.

物質が卵黄脂質集積への代謝を阻害することが推測される。

異常卵のふ化過程において死にいたるもの<sup>3)</sup>や、生育不良のものも報告されている<sup>18)</sup>ので今後は種々の酵素とくにふ化過程に分泌される酵素に対する綿実油中成分の影響の研究が必要であろう。

## 要 約

ニワトリおよびウズラに綿実粕あるいはカボック粕添加飼料を給餌すると7日目あるいは10日目から卵黄色に異常(淡褐変)がある卵が産卵され、約3週間後に褐色を帯びた卵黄硬化卵が産卵されることを認めた。これらの飼料を正常飼料に変換すると約20日後に正常卵に復元することが認められた。異常卵黄と正常卵黄の脂質の分画や、それらの画分の脂肪酸組成および復元過程の脂肪酸組成の変動を調べた。さらに異常および正常卵黄のタンパク質のアミノ酸組成および、これらの卵黄のエーテル抽出物のウズラの胚リパーゼ活性に対する作用を調べた。

1. 卵黄脂質を硅胶カラムクロマトグラフィーで分画したところ、トリアシルグリセロール画分(81~85%)が最も多く、つづいてケファリン画分、レシチンとスフィンゴミエリン画分であり、異常卵黄と正常卵黄間には量的差異は認められなかった。

2. 卵黄のエーテル抽出脂質の沃素価は、正常卵黄に比べ異常卵黄が小さく、構成脂肪酸をみると異常卵黄はステアリン酸が著しく多く、オレイン酸が少い。リノール酸はやや多かった。このステアリン酸とオレイン酸の顕著な増減はトリアシルグリセロール画分についても認められた。さらに、異常卵黄の脂質およびその分画画分が正常卵黄のものより飽和脂肪酸総量が著しく多く、不飽和脂肪酸総量は少なかった。その増減率はトリアシルグリセロール画分が最も大である。

3. 硅胶カラムクロマトグラフィーにおけるトリアシルグリセロール溶出液を-20℃で保存するとき生成する不溶化析出物と溶存物質の脂肪酸組成は、正常卵黄では差はないが、異常卵黄ではパルミチン酸とステアリン酸が析出物に多く、オレイン酸とリノール酸は逆に少なかった。

4. ニワトリ、ウズラともに異常卵黄から正常卵黄への復元過程における脂肪酸組成の変化をみると、正常飼料給与後の短期間で飽和脂肪酸総量の減少と不飽和脂肪酸総量の増加が認められた。11日目には正常卵黄とほぼ同じレベルに到達した。

5. 異常卵黄凍結乾燥粉末のエーテル抽出物はMillian反応、Halphen反応ともに陽性であった。

6. 脱脂卵黄タンパク質のアミノ酸組成をみると、ニワトリ、ウズラともに異常卵のリジンとチロシン含量が正常卵より少なく、逆にバリン含量は多かった。

7. ウズラの受精卵胚部からのリパーゼ粗抽出物の酵素活性は異常卵黄エーテル抽出物の添加により阻害された。

## 文 献

- Anderson, M. M. and McCarty, R. E.: Rapid and sensitive assay for free fatty acids using rhodamine 6 G. *Anal. Biochem.*, **45**, 260-270 (1972)
- Brown, W. H., Stull, J. W. and Stott, G. H.: Fatty acid composition of milk. 1. Effect of roughage and dietary fat. *J. Dairy Sci.*, **45**, 191-196 (1962)
- 千葉胤孝, 石田 明, 加葉真一: 卵黄の硬化について。一特にカボック粕との関係—畜産の研究, **14**, 467-468 (1960)
- Evans, R. J., Davidson, J. A., LaRue, J. N. and Bandemer, S. L.: Interference in fatty acid metabolism of laying hens caused by cottonseed oil feeding. *Poultry Sci.*, **42**, 875-881 (1963)
- Evans, R. J., Davidson, J. A. and Bandemer, S. L.: Fatty acid and lipid distribution in egg yolks from hens fed cottonseed oil or *Sterculia foetida* seeds. *J. Nutrition*, **73**, 282-290 (1961)
- Evans, R. J., Bandemer, S. L., Anderson, M. and Davidson, J. A.: Fatty acid distribution in tissues from hens fed cottonseed oil or *Sterculia foetida* seeds. *J. Nutrition*, **76**, 314-319 (1962)
- 藤井 信, 古賀克也, 浜口隆博: ウズラ卵黄のリパーゼに関する研究。鹿大農学術報告, **No. 27**, 155-163 (1971)
- 藤野安彦: 卵黄脂質の化学。栄養と食糧, **24**, 317-324 (1971)
- Hornstein, I., Crowe, P. F. and Heimberg, M. J.: Fatty acid composition of meat tissue lipids. *J. Food Sci.*, **26**, 581-586 (1961)
- 改訂 実験農芸化学(別巻), 235-236 (1967) 朝倉書店
- Koga, K., Fukunaga, T. and Ogura, H.: The fatty acid composition of egg yolk lipids from the sea-turtle. *Mem. Fac. Agr. Kagoshima Univ.*, **XIV**, 117-122 (1978)
- 国松 豊, 川勝 剛: 低温時に硬化する卵黄についての研究(予報)京都府立大学術報告(農学), **11号**, 81-85 (1959)
- Lyman, C. M., Baliga, B. P. and Slay, M. W.: Reactions of proteins with gossypol. *Arch. Biochem. Biophys.*, **84**, 486-497 (1959)
- 内藤元男監修: 畜産大事典, 498-498 (1978) 養賢堂
- Shone, G. G.: Adverse effects of cyclopropanoid fatty acids. *Proc. Nutrition Soc.*, **25**, 37-44 (1966)
- Stoffel, W., Chu, F. and Ahrens, E. H. Jr.: Analysis of long-chain fatty acids by gas-liquid chromatography. *Anal. Chem.*, **31**, 307-308 (1959)
- 高橋善彌太, 田中 圭, 深沢俊男: ガスクロマトグラフィー 別冊 蛋白質・核酸・酵素。生物化学実験法Ⅶ。一脂質実験法一, 30-58 (1969)
- Thomasson, H. J.: The biological value of oils and fats.

1. Growth and food intake on feeding with natural oil and fats. *J. Nutrition*, **56**, 455-468 (1955)
- 19) Wong, R. C., Nakagawa, Y. and Perlmann G. E.: Studies on the nature of the inhibition by gossypol of the transformation of pepsinogen to pepsin. *J. Biol. Chem.*, **247**, 1625-1631 (1972)
- 20) 山田忠信, 田中秀雄, 山本 滋: イエローグリスに起因すると思われる卵黄硬化卵の発生と消失について. 山口県種鶏場試験研究報告, **12号**, 27-35 (1971)
- 21) 吉田 実: 綿実油ソーブストックのゴシポールに対する飼料中の鉄の効果. 科学飼料, **17**, 232-233 (1972)

### Summary

Hens and quails fed on a ration containing the insufficiently oil-expressed cotton seed meal or kapok seed meal, laid eggs with light brown yolk on the 7th day, and two weeks thereafter they laid eggs with brown yolk which are elastic after being boiled. However, changing of these feedstuffs to the commercial formula-feed led to laying of normal eggs, after about twenty days. Fractionations of both the abnormal and the normal egg-yolk-lipids, the fatty acid composition of each fraction and the variation of the composition during the restoration of egg-yolk, were studied, respectively. Moreover, the amino acid analyses of proteins in the abnormal and the normal yolks, and the qualitative inspections of gossypol and cyclopropenoid substance in those yolk-lipids were performed. The effect of the abnormal yolk-lipids on the activity of the quail's embryo-lipase was estimated, too.

1. Chromatographical fractionation of the yolk-lipid on the silicic acid column showed that the triacylglycerol fraction content was largest (81~85%), followed by the cephalin fraction content (7~14%) and the lecithin, sphingomyelin fraction (4~9%), accompanied with no difference between the abnormal and the normal yolk-lipids.

2. Iodine number of the abnormal yolk-lipid was smaller than that of the normal yolk lipid. The stearic acid content in the abnormal yolk-lipid was remarkably larger than in the normal, the oleic acid content was the opposite and the linoleic acid was slightly larger in the abnormal yolk than in the normal. These relationships were especially observed in the triacylglycerol fraction. Moreover, total amount of the saturated fatty acid in the abnormal yolk was much larger than that in the normal and that of the unsaturated fatty acid was the opposite. Both the increasing and the decreasing rates of these fatty acids were observed to be largest in the triacylglycerol fraction.

3. In the normal yolk-lipid, no differences were observed between the fatty acid compositions of the solid lipid and the soluble lipid separated when the triacylglycerol effluent ( $\text{CHCl}_3$ -MeOH 20:1 soln.) from the silicic acid column was kept at  $-20^\circ\text{C}$ , overnight.

However, in the abnormal yolk-lipid, the content of the saturated fatty acid in the solid lipid was more than that in the soluble lipid and the content of the unsaturated fatty acid was the opposite.

4. Changing of experimental feeds to the commercial formula-feed led to the decreasing of total amount of the saturated fatty acids and to the increasing of that of the unsaturated fatty acids in the abnormal yolk-lipid after 7 days and it led to reaching the level of fatty acid in the normal yolk, after 11 days.

5. The lipid extracted from the lyophilized abnormal egg-yolk-powder with ether, was positive to the Millian and the Halphen reactions.

6. In both the chicken and the quail, the contents of lysine and tyrosine in the abnormal yolk-protein were less than those in the normal yolk-protein, while the valine content in the former was more than that in the latter.

7. The activity of quail's embryo-lipase was inhibited by an addition of abnormal yolk-lipid extracted with ether, to the assay system.