3 酪農場における自給飼料のマイコトキシン汚染とその対策

和田賢二^{1)†} 遠藤 洋¹⁾ 小形芳美¹⁾ 大塚浩通²⁾
小岩政照³⁾ 永幡 肇³⁾

1) 山形県農業共済組合連合会置賜家畜診療所 (〒992-0002 米沢市窪田町矢野目 3668-3)

2) 北里大学獣医畜産学部 (〒034-8628 十和田市東 23 番町 35-1)

3) 酪農学園大学獣医学部 (〒069-8501 江別市文京台緑町 582)

(2006 年 5 月 26 日受付・2006 年 10 月 18 日受理)

要 約

成績不振の酪農場 (A, B, C 農場) において自給粗飼料中のアフラトキシン B₁ (AFB₁)、デオキシニバレノール (DON) およびゼアラレノン (ZEN) 濃度を測定とともに疾病発生状況を調査した。A および B 農場は突然死を含む死亡率が 10% 以上であり、ラップサイレージの AFB₁ がそれぞれ 30.7ppb, 37.8ppb であった。繁殖成績が不振で、早産を伴う周産期病が多い C 農場では稲ワラの ZEN が 491.6ppb であった。対策としてマイコトキシン吸着剤の飼料添加により、A および B 農場では T 細胞を主とする免疫細胞が増加し、突然死の発生はみられなくなった。C 農場では繁殖成績が改善し、周産期病が減少した。よって自給粗飼料のマイコトキシン汚染は乳牛の疾病発生に関与しており、吸着剤はその影響を低減させる効果が期待できると考えられた。

——キーワード：自給粗飼料，乳牛，疾病，マイコトキシン，マイコトキシン吸着剤。

----- 日獣会誌 60, 425～429 (2007)

マイコトキシンは人や動物に対しさまざまな影響をもたらすとされており、アフラトキシン B₁ (AFB₁) は発癌性、肝毒性、免疫抑制などの強い毒性作用を有し、デオキシニバレノール (DON) は免疫抑制や飼料の嗜好性を低下させ、ゼアラレノン (ZEN) はエストロゲン様作用による繁殖障害や流産を招来することが知られている [1, 2]。乳用牛の給与飼料中には、現在国の飼料安全法による指導基準として AFB₁ は 10ppb 未満 (配合飼料)、DON は 4.0ppm 未満 (飼料中)、そして ZEN は 1.0ppm 未満 (飼料中) の含有であることが定められており、基準値以上を含有する飼料についてはその流通や販売が禁止されている。しかしサイレージや稲ワラなどの自給粗飼料のマイコトキシン汚染実態については不明な点が多く、その被害についての報告もほとんどみあたらない。大動物臨床の分野では栄養および飼養管理などを継続的に指導しながらも毎年 10% を超える死亡率と各種疾病の長期化がみられる酪農場が散見されるが、そのような農場では概して自給粗飼料を主体に給与していることが多い。本調査では、そのような農場で給与される自給粗飼料のマイコトキシン汚染の可能性に着目し、

飼料の汚染状況と疾病発生との因果関係ならびにその対策について検討した。

材 料 お よ び 方 法

調査対象農場：2004 年次の死亡率が 10% を超え、通年で自給粗飼料を給与している 3 戸の酪農場 (搾乳頭数：A 農場 35 頭, B 農場 28 頭, C 農場 23 頭) を調査対象とした。自給粗飼料として A 農場はラップサイレージ, B および C 農場はラップサイレージと稲ワラを給与していた。

自給粗飼料の汚染調査 (2004 年 11～12 月)：各農場で給与されている自給粗飼料を 10～15 カ所から 10g 程度ずつ採取し、その混合物を検体とした (表 1)。各検体をインキュベーターで 70℃, 72 時間乾燥させた後、粉碎機で 2,500rpm, 1 分間粉碎した。5g の粉碎飼料から 70% メタノールで抽出した液を AFB₁ 測定に、またリン酸緩衝生理食塩水 (PBS, pH7.4) で抽出した液を DON および ZEN 測定に供した。測定は市販キット (Veratox Quantitative Test Kit, NEOGEN CORPORATION, U.S.A.) を用いて測定した。

† 連絡責任者：和田賢二 (山形県農業共済組合連合会置賜家畜診療所)

〒992-0002 米沢市窪田町矢野目 3668-3 ☎0238-37-6286 FAX 0238-37-6049 E-mail: wada_k@yynosai.or.jp

3 酪農場における自給飼料のマイコトキシン汚染とその対策

表1 自給粗飼料中のマイコトキシン濃度 (2004年11～12月)

検体	AFB ₁ (ppb)	DON (ppm)	ZEN (ppb)
A農場			
WS	30.7	0.03	0.0
WS残滓	50.0	0.43	52.5
B農場			
WS	37.8	0.31	12.6
稲ワラ	4.3	0.34	0.0
C農場			
WS	5.5	0.15	0.0
稲ワラ	2.8	0.72	491.6

WS：ラップサイレージ

基準値 (乳牛)：

AFB₁ (アフラトキシンB₁) <10.0ppb (配合飼料)

DON (デオキシニバレノール) <4.00ppm (飼料中)

ZEN (ゼアラレノン) <1,000ppb (飼料中)

乳汁中AFM₁濃度の測定 (2005年1～4月)：各農場から泌乳前期 (分娩後150日未満) と泌乳後期 (分娩後150日以上) の各5頭計30頭を無作為に抽出した。各個体の4分房から5mlずつ乳汁を採取し、その合乳を冷却遠心 (2,000rpm, 10℃, 15分) し、脱脂した後の乳清を検体とした。測定は市販キット (RIDASCREEN AFM₁, r-Bipharm, Germany) を用いて測定した。

白血球サブポピュレーションの解析 (2005年1～4月)：乳汁の採材と平行して尾静脈より採血を行いCD3, CD4, CD8, CD14, CD45R, TcR, MHCclass-II抗体を用いて間接蛍光抗体法で染色し、フローサイトメーター (FACScan, Becton Dickinson, U.S.A.) で白血球表面抗原を測定した。乳汁中AFM₁濃度の測定および白血球サブポピュレーションの解析はマイコトキシン吸着剤添加前 (2005年1月) と添加3カ月後 (2005年4月) に実施し、各群の比較はWelch-t検定を用いてP<0.05を有意とした。データは平均値±標準偏差で表した。

疫学的調査：死亡事故は2004年次と2005年次を比較した。繁殖成績は2004年7月～2005年6月までの平均受胎日数、初回受胎率そして平均授精回数を調査した。

マイコトキシン対策 (2005年1月～12月)：マイコトキシン吸着剤は鉍物・酵母系吸着剤 (Microbond, CENZONE TECH, INC, U.S.A.) を用い、各農場で1頭あたり15g飼料添加した。

成 績

自給粗飼料の汚染状況：AおよびB農場のラップサイレージではAFB₁がそれぞれ30.7ppbと37.8ppbであり、特にA農場の飼槽に残っていたサイレージの残滓では50.0ppbと高濃度であった。C農場では稲ワラ中のZENが491.6ppbであった (表1)。

乳汁中AFM₁濃度：全農場の吸着剤添加前における泌

表2 マイコトキシン吸着剤添加前後における白血球サブポピュレーション (cells/ μ l) の変化

A農場	添加前	添加後
分娩後日数	148.4±94.8	168.0±118.4
PBMC	2563±1298 ^a	4180±1080 ^b
CD3+TcR-	493.1±229.2 ^a	807.8±356.7 ^c
CD4+CD45R-	171.6±97.9 ^a	361.8±137.2 ^b
CD8+CD45R-	44.2±21.9 ^a	151.4±123.6 ^c
CD8+CD45R+	35.3±29.6 ^a	106.0±97.1 ^c
MHC+CD14+	333.9±274.2 ^a	887.1±236.0 ^b
B農場	添加前	添加後
分娩後日数	137.1±106.4	148.4±91.5
PBMC	3103±1705	4005±677
CD3+TcR-	436.4±367.7 ^a	800.5±319.5 ^c
CD4+CD45R-	185.8±74.5 ^a	366.1±189.8 ^c
CD8+CD45R-	83.7±87.6	141.9±90.4
CD8+CD45R+	51.8±35.0 ^a	90.9±39.2 ^c
MHC+CD14+	430.4±233.8	928.7±791.5
C農場	添加前	添加後
分娩後日数	167.8±114.5	140.8±93.3
PBMC	3890±1282	3490±450
CD3+TcR-	691.0±214.3	686.9±148.1
CD4+CD45R-	199.0±70.9	255.7±97.6
CD8+CD45R-	99.2±103.1	125.5±75.2
CD8+CD45R+	33.4±13.0 ^a	132.0±90.2 ^b
MHC+CD14+	564.0±360.8	539.0±251.6

異記号間に有意差あり：a-b P<0.01, a-c P<0.05

乳前期群の乳汁では2.3±1.6pptと泌乳後期群のそれでは6.8±4.2pptであり前者に比較して有意に高値であった (P<0.01)。吸着剤の添加により乳汁中AFM₁濃度は泌乳後期群で2.8±1.8pptと添加前より有意に低下した (P<0.01)。また農場別ではAおよびB農場において泌乳後期群が前期群に比べ高値であり、両農場とも泌乳後期群は吸着剤添加後有意に低下した (図1)。

白血球サブポピュレーション：A農場で単核球数, CD3+TcR-T細胞, CD4+CD45R-T細胞, CD8+CD45R-T細胞, CD8+CD45R+T細胞, MHC+CD14+T細胞が吸着剤添加前に比較して添加後増加した。B農場ではCD3+TcR-T細胞, CD4+CD45R-T細胞, CD8+CD45R+T細胞が増加した。C農場ではCD8+CD45R+T細胞が増加した (表2)。

疫学的調査：吸着剤添加前 (2004年次) における死亡率はA農場で14.3% (循環器病4頭, 外傷不慮1頭) であり, B農場では10.7% (周産期病2頭, 循環器病1頭) であった。C農場の死亡率は26.1% (周産期病4頭, 泌乳器病2頭) であり, 特に周産期病では3頭が早産を伴っていた。吸着剤添加後 (2005年次) における死亡率はA農場で7.7% (外傷不慮2頭, 泌乳器病1頭), B農場で10.7% (消化器病2頭, 周産期病1頭), C農

図1 各農場の吸着剤添加前後における乳汁中AFM₁濃度
異記号間に有意差あり：a-b, c-d $P < 0.05$

場で4.3%（消化器病1頭）であり，AおよびB農場における循環器病による突然死の発生はみられなくなった．繁殖成績では吸着剤添加後の平均受胎日数はすべての農場で短縮する傾向が認められた．初回受胎率はAおよびB農場でやや上昇し，C農場では著明な上昇が認められた．平均授精回数はAおよびB農場では明らかな変化は見られなかったものの，C農場では著明な減少が認められた（図2）．

考 察

食品および飼料中におけるマイコトキシンの定性および定量にはその測定対象によって酵素免疫測定（ELISA法），高速液体クロマトグラフィー（HPLC），薄層クロマトグラフィー（TLC），ガスクロマトグラフィー（GC）などが用いられており，検討がなされている [2]．本研究ではELISA法を用いて分析した結果，2農場のラップサイレージでAFB₁が，また1農場の稲ワラでZENが高濃度に検出された．日本における土壌試料の調査ではAFB₁の産生能をもつ *Aspergillus* 属の分布は年平均気温16℃の地域（九州地方）が北限であるとされている [3]．しかし今回の調査ならびに小岩 [4] の報告にもあるように，寒冷な地域でも自給粗飼料は管理保管状況によってはAFB₁に高濃度に汚染されている危険性が示唆された．

摂取されたAFB₁は牛の体内で代謝され，一定の割合でAFM₁として乳汁中に排出される [5, 6]．今回の調査で乳汁中のAFM₁濃度は泌乳前期群に対し，泌乳後期群の濃度が高値であることが示された．これは泌乳後期における乳量の低下に伴うAFM₁の濃縮によるものと思われる．すなわち，各泌乳ステージで給与量に変化する穀類ではなく，ほぼ一律に給与される自給粗飼料がAFB₁に汚染されていたことを示すものと考えられた．

一般にマイコトキシンの吸着剤は動物の消化管内で摂取されたマイコトキシンを吸着し，糞中に排泄させる作用を持つとされている．活性炭，ベントナイト，HSCAS，エステル化グルコマンナンなどのAFB₁吸着効果は *in*

図2 マイコトキシン吸着剤添加による繁殖成績の変化
◆ A農場 □ B農場 ▲ C農場

*vitro*において報告があり [7, 8]，またDiazら [6] およびHarveyら [9] は *in vivo*における乳汁中AFM₁濃度の低下作用を述べている．今回試験に供した吸着剤は鉱物系のクリノプチオライトと酵母細胞壁由来のエステル化グルコマンナンを主成分とし，AFB₁を中心に多種類のマイコトキシンを吸着するとされている．今回の調査においても吸着剤添加後，乳汁中AFM₁濃度が泌乳後期群で低下したことから *in vivo*におけるAFB₁の吸着効果をあらわしているものと考えられた．

飼料中AFB₁が高値であったAおよびB農場においてマイコトキシン吸着剤添加後に乳汁中AFM₁濃度が有意に低下し，T細胞を主とする多種の免疫細胞が一定のレベルに増加した．また，AFB₁が低値であったC農場ではAFM₁濃度の変化に有意性は認められず，免疫細胞は一部でのみ増加が認められた．AFB₁の細胞性免疫に対

する影響についてはさまざまな報告 [10-12] がなされていることから、これらの農場では AFB₁ による免疫機能の低下が疾病発生と関係していた可能性が考えられた。いっぽう ZEN が比較的高かった C 農場では吸着剤添加後、繁殖成績の改善と周産期病の減少がみられたことから、ZEN のエストロゲン様作用が繁殖性と疾病発生に影響を与えていたものと思われた。

今回調査した粗飼料のマイコトキシン濃度は指導基準に示されているように濃厚飼料中 (AFB₁) あるいは全飼料中 (DON, ZEN) の基準濃度ではないことからただちに中毒症状を示すには至らなかったものと推察された。しかし、自然界でマイコトキシンは通常複数種で存在し、それぞれが低レベルの汚染であっても相乗作用により生体に影響を及ぼす危険性があるといわれており、今回の調査においても 6 種類すべての粗飼料から複数のマイコトキシンが検出された。反芻動物ではルーメン内原虫によってマイコトキシンはある程度分解されるとされているが [1, 13]、近年高泌乳化に伴う濃厚飼料の多給によってルーメンのマイコトキシン分解能が低下している可能性があり、飼養環境や分娩によるストレスなどが感受性を増幅していることも考えられる。したがって、今後広範囲な飼料汚染調査を続けるとともに対策としての吸着剤の飼料添加、さらには生体側の要因を含めたマイコトキシン対策が必要であると思われた。

引用文献

- [1] 宮崎 茂 : Mycotoxin contamination of feeds and Mycotoxicosis of livestock, 家畜診療, 50, 175-188 (2003)
- [2] 宇田川俊一, 田端節子, 中里光男, 細貝祐太郎, 松本昌雄 : マイコトキシン各論, マイコトキシン (食品安全性セミナー 5), 74-147, 中央法規出版, 東京 (2002)
- [3] 宇田川俊一, 田端節子, 中里光男, 細貝祐太郎, 松本昌雄 : マイコトキシン産生菌の生態と分布, マイコトキシン (食品安全性セミナー 5), 20-22, 中央法規出版, 東京 (2002)
- [4] 小岩政昭 : マイコトキシン中毒が疑われる乳牛の発生状況, 臨床獣医, 22, 4, 14-17 (2004)
- [5] Allcroft R, Robert BA, Lloyd MK : Excretion of aflatoxin in a lacting cow, Food Cosmet Toxicol, 6, 619-625 (1968)
- [6] Diaz ED, Hagler WM Jr, Blackwelder JT, Eve JA, Hopkins BA, Anderson AL, Jones FT, Whitlow LW : Aflatoxin Binders II : Reduction of aflatoxin M₁ in milk by sequestering agents of cows consuming aflatoxin in feed, Mycopathologia, 157, 233-241 (2004)
- [7] Diaz ED, Hagler WM Jr, Hopkins BA, Whitlow LW : Aflatoxin Binders I : *In vitro* binding assay for aflatoxin B₁ by several potential sequestering agents, Mycopathologia, 156, 223-226 (2002)
- [8] Spotti M, Fracchiolla ML, Arioli F, Caloni F, Pompa G : Aflatoxin B₁ binding to sorbents in bovine ruminal fluid, Vet Res Commun, 29, 507-515 (2005)
- [9] Harvey RB, Phillips TD, Eliss JA, Kubena LF, Huff WE, Petersen HD : Effects on aflatoxin M₁ residues in milk by addition of hydrated sodium calcium aluminosilicate to aflatoxin contaminated diets of dairy cows, Am J Vet Res, 52, 1556-1559 (1991)
- [10] Bodine AB, Fisher SF, Gangjee S : Effect of aflatoxin B₁ and major metabolites on phytohemagglutinin-stimulated lymphoblastogenesis of bovin lymphocytes, J Dairy Sci, 67, 110-114 (1984)
- [11] Fernandez A, Hernandez M, Verde MT, Sanz MC : Effect of aflatoxin on performance, hematology, and clinical immunology in lambs, Can J Vet Res, 64, 53-58 (2000)
- [12] More T, Ramalinga Reddy G, Kumar S : An evaluation of the metabolic basis of aflatoxin B₁ toxicity by using buffalo granulocytes and agranulocytes *in vitro*, Altern Lab Anim, 33, 387-390 (2005)
- [13] Kiessling KH, Pettersson H, Sandholm K, Olsen M : Metabolism of Aflatoxin Ochratoxin, Zearalenone, and three trichothecenes by intact rumen fluid, rumen protozoa, and rumen bacteria, Appl Environ Microbiol, 47, 1070-1073 (1984)

Mycotoxins Contamination of Forage Crops on a Farm and Attenuation of its Harmful Influence at Three Dairies

Kenji WADA^{*†}, Hiroshi ENDO, Yoshimi OGATA, Hiromichi OHTSUKA,
Masateru KOIWA and Hajime NAGAHATA

** Okitama Food Animal Clinic, Yamagata Prefecture Federation of Agricultural Mutual Aid Association, 3668-3, Yanome, Kubota-cho, Yonezawa-shi, 992-0002*

SUMMARY

AflatoxinB₁ (AFB₁), deoxynivalenol (DON), zearalenone (ZEN) present in six crops used as feed at three dairies (A-, B- and C-farms) with low productivity were investigated. The AFB₁ concentration of forage was 30.7ppb (A-farm) and 37.8ppb (B-farm). Both farms were experiencing a high mortality risk, including sudden death. At C-farm, which was experiencing low fertility and many transient cow diseases with abortion, the ZEN concentration of rice straw was 491.6ppb. After the addition of mycotoxin binder in feed, the presence of T-cells in particular has significantly increased in the lymphocytes subpopulation, and no sudden death has occurred at A-farm or B-farm. At C-farm, reproduction has remarkably improved, and no transient cow disease has occurred. It is therefore concluded that mycotoxin contamination in crops has a strong correlation with the incidence of disease in dairy cows, and also that mycotoxin binder can be expected to reduce its harmful influences in the field. — Key words : crops, dairy cow, disease, mycotoxin, mycotoxin binder.

† Correspondence to : Kenji WADA (Okitama Food Animal Clinic, Yamagata Prefecture Federation of Agricultural Mutual Aid Association)

3668-3, Yanome, Kubota-cho, Yonezawa-shi, 992-0002

TEL 0238-37-6286 FAX 0238-37-6049 E-mail : wada_k@yynosai.or.jp

J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 60, 425 ~ 429 (2007)

動物適正飼養教本シリーズ I・II

犬のしつけテキスト, 猫のテキスト有料頒布のご案内

日本動物保護管理協会では、平成7年度から国の動物適正飼養推進事業を受託し、犬と猫の適正飼養に関する講習会を全国各地で開催してきましたが、その講習会のテキストとして使用してきた動物適正飼養教本を入手したいとの声が多く寄せられたことから有料頒布することとしました。

犬や猫の適正飼養普及の一環として、保健所・市町村等行政窓口での配布や動物病院にお越しになる飼い主さんへの配布ならびに各種イベントでの適正飼養普及啓発資料等として是非ご利用下さいませようご案内申し上げます。

ご購入希望の方は、日本動物保護管理協会事務局までお申し込み下さい。

犬のしつけテキスト

一冊 100 円 (消費税, 送料別)

犬のしつけテキストの主な内容

- I. よいしつけをするため
- II. 日常に必要な犬のしつけ
- III. 用語解説

猫のテキスト

一冊 100 円 (消費税, 送料別)

猫のテキストの主な内容

- I. 猫とはどんな動物か
- II. 猫を飼うにあたって
- III. 猫の健康管理
- IV. 人と猫の共生を図るために
- V. Q & A

購入申込および問合せ先

社団法人 日本動物保護管理協会事務局

〒107-0062 東京都港区南青山1-1-1 新青山ビル西館23階 TEL 03-3475-1695 FAX 03-3475-1697