

サイレージのマイコトキシン汚染が黒毛和種子牛の 発育と疾病に与える影響

小形芳美^{1)†} 和田賢二¹⁾ 藤倉尚士¹⁾ 高橋浩吉¹⁾ 大塚浩通²⁾
永幡 肇³⁾ 小岩政照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 (〒069-0836 江別市文京台緑町582)

(2006年9月4日受付・2007年3月12日受理)

要 約

黒毛和種牛繁殖農場34戸で、自給粗飼料のマイコトキシン汚染と子牛の発育および疾病発生との関連が調査された。アフラトキシン (AF) B₁汚染が、コーンサイレージ22検体中5検体、ラッピング調製グラスサイレージ11検体中2検体で検出され、母牛の乳汁へのAFM₁汚染をもたらした。デオキシニバレノール汚染は、コーンサイレージ1検体で検出された。汚染サイレージが給与された農場では、子牛の日増体量の低下 ($P < 0.05$)、下痢症の増加 ($P < 0.01$) および流早産の増加 ($P < 0.05$) が見い出され、下痢発症例では血清ASTが上昇し ($P < 0.05$)、MHC⁺CD14⁺単球数が減少していた ($P < 0.01$)。以上の結果から、マイコトキシン汚染飼料と子牛の発育低下および下痢発生は、免疫応答能の低下を介して関連することが示唆された。——キーワード：子牛、下痢、黒毛和種、マイコトキシン、サイレージ。

日獣会誌 60, 785~790 (2007)

マイコトキシン (Mt) は、穀類をはじめ種々の飼料中で、それぞれ特異的なカビから産生され [1, 2]、人や家畜に対してさまざまな毒性を示す [2-4]。Mt研究の歴史は古く、食品や飼料に関するものをはじめ数多くの報告があるが、近年自給飼料のサイレージとしての利用が拡大しつつあるなかで、その調製や保存との関係から改めて注目されつつある。流通飼料では飼料安全法で定められた厳密な規制基準 (基準値) [1, 2] が設けられているが、和牛繁殖農場では自給粗飼料を中心に飼養されている事例が多く、汚染実態や疾病発生との関わりはほとんど明らかにされていない。今回、サイレージを中心に自給粗飼料中の主要なMt濃度を測定し、下痢症など出生子牛における疾病発生との関係を疫学的に検討した。

材料および方法

調査は2004年10月から2005年6月にかけて、山形県置賜管内の黒毛和種牛繁殖農場34戸 (繁殖牛飼養頭数：4~42頭) を対象に行われ、調製保存方法について聞き取りした後に採食状況を確認のうえ、各農場にお

いてほぼ通年で給与中の自給粗飼料が採材された。調査飼料は、バンカーまたはタワー調製のコーンサイレージ (corn silage : CS) 22検体、ラッピングで調製されたグラスサイレージ (grass silage : GS) 11検体、同じくラッピングで調製されたイネホールクロップサイレージ (whole crop rice silage : WCRS) 7検体および自家産の稲ワラ10検体で、計50検体が対象となった。それぞれの飼料は1検体につき10カ所より約20gずつ採取され集合された計200g前後がそれぞれ試料にされた。各試料は、インキュベーターで70℃、72時間乾燥させ水分除去後に粉碎し、アフラトキシン (AF) B₁は70%メタノールで、デオキシニバレノール (DON) とゼアラレノン (ZEN) はPBS (pH7.4) で抽出後濾過し、それぞれ市販キット (Veratox Aflatoxin, DON5/5, Zearalenon Quantitative Test Kit, NEOGEN CORPORATION, U.S.A.) を用いてマイクロプレート式ELISA法 [5] により測定された。またAFM₁は、調査農場において授乳中の母牛39頭を対象に、滅菌スピッツ管に搾乳した乳汁を2,000rpm、10℃、15分で遠心した脱脂乳を試料として、同法 (RIDASCREEN AFM₁, r-Bipharm,

† 連絡責任者：小形芳美 (山形県農業共済組合連合会中央家畜診療所)

〒990-2171 山形市大字七浦字北川原286-1 ☎023-684-5531 FAX 023-684-5538 E-mail: ogata_y@yynosai.or.jp

マイコトキシンが黒毛和種子牛の発育と疾病に与える影響

表1 農場群の区分と自給飼料中のマイコトキシン濃度

農場群	調査飼料	検体数	測定年月	DON (ppm)	AFB ₁ (ppb)	ZEN (ppb)
汚染群 (8戸)	CS	6	05/1~05/3	1.94±1.46	24.0±7.2	314.9±243.8
	GS	2	04/11~04/12	1.76	36.1	89.8
	WCRS	1	05/3	0.38	13.3	20.9
	ワラ	2	05/1~05/3	0.19	3.8	147.1
平均値		11		1.44±1.33	21.5±13.4	216.7±219.4
軽度汚染群 (7戸)	CS	5	04/10~05/6	0.71±0.43	6.7±8.4	61.1±60.3
	GS	2	05/1	0.33	15.1	13.3
	WCRS	1	05/1	0.26	14.7	0
	ワラ	4	05/1~05/3	0.34±0.20	3.0±2.4	0
平均値		12		0.49±0.35	7.5±7.3	27.7±47.4
対照群 (19戸)	CS	11	05/1~05/3	0.49±0.24	3.9±3.0	53.7±75.0
	GS	7	04/10~05/6	0.30±0.19	2.8±2.7	0
	WCRS	5	05/1~05/3	0.27±0.24	4.1±3.9	29.1±65.2
	ワラ	4	05/1	0.21±0.05	3.6±2.4	0
平均値		27		0.36±0.23	3.6±2.9	27.3±58.5
法による許容基準				4.0	20.0	1,000
子牛(3カ月未満)基準				1.0	10.0	1,000

各群の平均値±標準偏差を示す(検体数2の飼料は平均値のみ)

CS: デントコーンサイレージ, GS: ラッピング調製のグラスサイレージ

WCRS: ラッピング調製のイネホールクロップサイレージ

Germany) で定量された。

各Mtの成牛における基準値を飼料安全法で定められているAF 20ppb, DON 4.0ppmおよびZEN 1,000ppb, 3カ月未満の子牛の基準値をAF 10ppb, DON 1.0ppmおよびZEN 1,000ppbとして, 34戸の調査農場のうち, 給与粗飼料のいずれかのMt濃度が成牛の基準濃度を越えた農場は汚染群(8戸), 子牛の基準濃度を越えた飼料があった農場は軽度汚染群(7戸)およびすべての飼料が子牛の基準に満たない農場は対照群(19戸)となる3群に区分された。

各農場で生産された子牛については, 出生時体重を30kgに仮定し, 調査飼料を育成時期に摂取していたと推察される子牛の市場出荷時体重より1日あたり増体量(daily gain: DG)を算出するとともに, 調査飼料給与期間における下痢症および早産, 虚弱などの新生子異常を中心に, 疾病発生状況が調査された。下痢症の治療費は, 家畜共済の病傷記録簿から算出された。さらに, 調査農場で飼育されている200日齢未満の子牛のうち, 下痢発症子牛36頭(汚染群12頭, 対照群24頭)と臨床的に健康な子牛15頭(対照群のみ), 計51頭の頸静脈よりプレーン試験管とEDTA-2K加試験管に採血した。前者は, 血清を分離後に総コレステロール(T-cho), アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ(AST)および血中尿素窒素(BUN)が自動分析器(AU-640, オリンパス株, 東京)により測定された。後者は抗ウシCD3抗体(総Tリンパ球), 抗ウシCD4抗体(ヘルパーTリンパ球), 抗ウシCD8抗体(サブプレッサー/キラーTリ

ンパ球), 抗ヒトCD14抗体(単球), 抗ウシWC1抗体($\gamma\delta$ T型細胞)および抗ウシMHC class II抗体(単球・Bリンパ球)を用いて白血球表面抗原が解析された。抗マウスFITC標識抗体を反応させた各表面抗原陽性細胞はフローサイトメーター(FACScan, Becton Dickinson, U.S.A.)により解析された[6]。採血と同時に直腸より採取された便を試料として, ロタ(A, B, C群)およびコロナウイルスを対象にRT-PCR法でウイルス核酸検出, 大腸菌(定量培養)やサルモネラ(増菌培養)などの細菌分離培養, クリプトスポリジウムおよびコクシジウムなどの原虫をショ糖浮遊法による顕微鏡観察下でオオシストの検出がそれぞれ行われた。

検査成績の平均値はウェルチのt検定により, 疫学的調査における疾病発生数は χ^2 検定を用いて有意差の有無が調べられた。

成 績

調査農場におけるそれぞれの飼料, 調査月およびMt濃度を群ごとに表1に示した。調査飼料中, Mtの成牛基準値を上回った飼料はCSで最も多く, 22検体中6検体(27.3%: AF5, DON1)を占めた。GSは11検体中2検体(18.2%)でAF汚染があったが, WCRSおよび稲ワラでは基準値に達した検体はなく, ZENはすべての飼料で基準値を下回った。調査農場では, 対照群の2戸でCS調製の際にプロピオン酸が添加されていたが, その他の農場では調製時防黴剤などを添加している農場はなく, 飼料給与時にMt吸着剤が給与されている農場

表2 自給飼料中のマイコトキシン濃度と疾病発生状況

農場群	戸	子牛出生数 (頭)	流早産 (頭)	新生子異常 (頭)	下痢症			
					発症数	死亡数	治療回数	1件の治療費(点)
汚染群	8	128	7 ^a	13	77 ^a	4	12.8±8.7 ^a	3,358±2,331 ^a
軽度汚染群	7	67	1	6	41 ^a	3	6.8±4.3 ^b	2,196±1,562 ^b
対照群	19	117	1 ^c	4	43 ^b	4	7.2±6.0 ^b	2,155±1,799 ^b

治療回数, 治療費は平均値±標準偏差
a-b: P<0.01, a-c: P<0.05

表3 下痢発症子牛の糞便中微生物および血液生化学検査成績

農場群	便性状	n (頭)	日齢 (日)	糞便微生物検出数(頭)				血液生化学検査成績		
				ロ ウイルス	タ コクシ ジウム	線虫	(-)	T-cho (mg/dl)	AST (IU/l)	BUN (mg/dl)
汚染群	下痢	12	24~132	1	5	1	7	127.7±61.0	93.3±54.8 ^a	11.4±3.7
対照群	下痢	24	8~197	2	4	1	18	116.7±52.0	56.2±17.6 ^b	12.6±4.9
対照群	健康	15	32~194	0	3	0	12	144.1±49.6	56.3±11.7 ^b	9.9±3.7

下痢発症子牛は1~4診目に採血および採便
血液生化学検査成績は平均値±標準偏差を示す
a-b: P<0.05

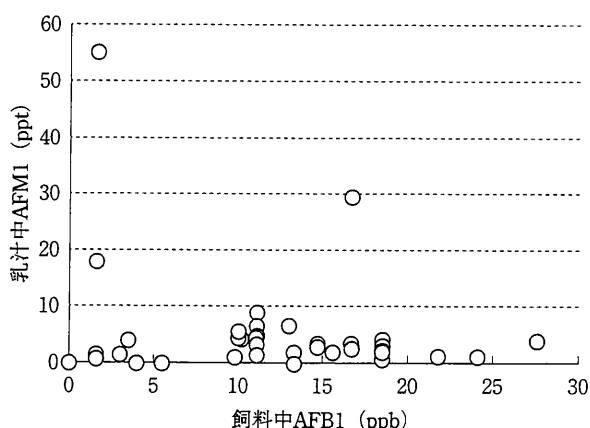


図1 飼料中AFB1と乳汁中AFM1の関係

もなかった。汚染群の農場では, Mt汚染飼料は二次発酵が強く, 特に3月に採材した検体が顕著であった。また, それらの汚染飼料は粗飼料として単独で給与されている農場が多く, ワラやWCRSが併給されている農場でも, 濃厚飼料などを合わせた全給与飼料中のMt濃度は基準値を上回っていた。汚染飼料は残飼量が多く, 給与された牛は成牛子牛を問わず牛群全体が軟便傾向であった。

子牛の発育を評価したところ, 汚染群の子牛81頭のDGは0.80±0.13kg(平均値±標準偏差)であり, 軽度汚染群59頭および対照群99頭それぞれのDG(0.87±0.13, 0.85±0.13kg)に比べ低かった(P<0.05)。また, 出生子牛の疾病発生数をみたら, 汚染群では対照群に比べ流早産(P<0.05)および下痢症(P<0.01)の発生が多く, うち下痢症では治療回数と治療費が他の2群と比較して明らかに多く, 長期の治療

を要した。また, 汚染群では虚弱などの新生子異常の発生が対照群に比べ多い傾向にあり, 軽度汚染群でも対照群に比べて下痢の発生が有意に多かった(P<0.01)(表2)。

乳汁中のAFM₁濃度は, 検体によって検出限界以下から最高値54.9pptまで分布し, 摂取飼料中のAFB₁濃度との間に明らかな相関関係はなかった。対照群のなかで, 発情期にあった繁殖牛2頭(18.0, 54.9ppt)および子牛が出生2日目と3日目に突然死亡し, 剖検により大腸菌症と診断された症例の母牛2頭(軽度汚染群, 対照群各1頭: 29.4, 5.6ppt)の乳汁中AFM₁濃度は, 他の個体に比べ高値であった(図1)。

下痢発症子牛の便から検出されたウイルスおよびその他の病原微生物の種類, 数および検出日齢などは, 汚染群と対照群の間で明らかな相違はなかったが, 汚染群子牛のAST活性が対照群に比べ高かった(P<0.05, 表3)。また, 白血球表面抗原の解析成績では, ナイープT細胞(CD3⁺CD45R⁺)数は対照群の4.7±3.1×10²/μlに対し汚染群下痢子牛では7.3±2.3×10²/μlと多く, 同様にヘルパーT細胞(CD4⁺CD45R⁺)数も対照群の1.1±0.5×10²/μlに対して1.5±0.4×10²/μlと多かった(P<0.05)。逆に顆粒球数(37.5±16.5および50.4±31.2×10²/μl)とMHC class II⁺CD14⁺単球数(2.9±1.1および5.4±3.3×10²/μl)については, 汚染群が対照群と比べ有意に少なかった(P<0.01)(図2)。

考 察

今回の調査により, 管内の和牛繁殖農場で日常的に給与されているサイレージで, AFをはじめとするMt汚染

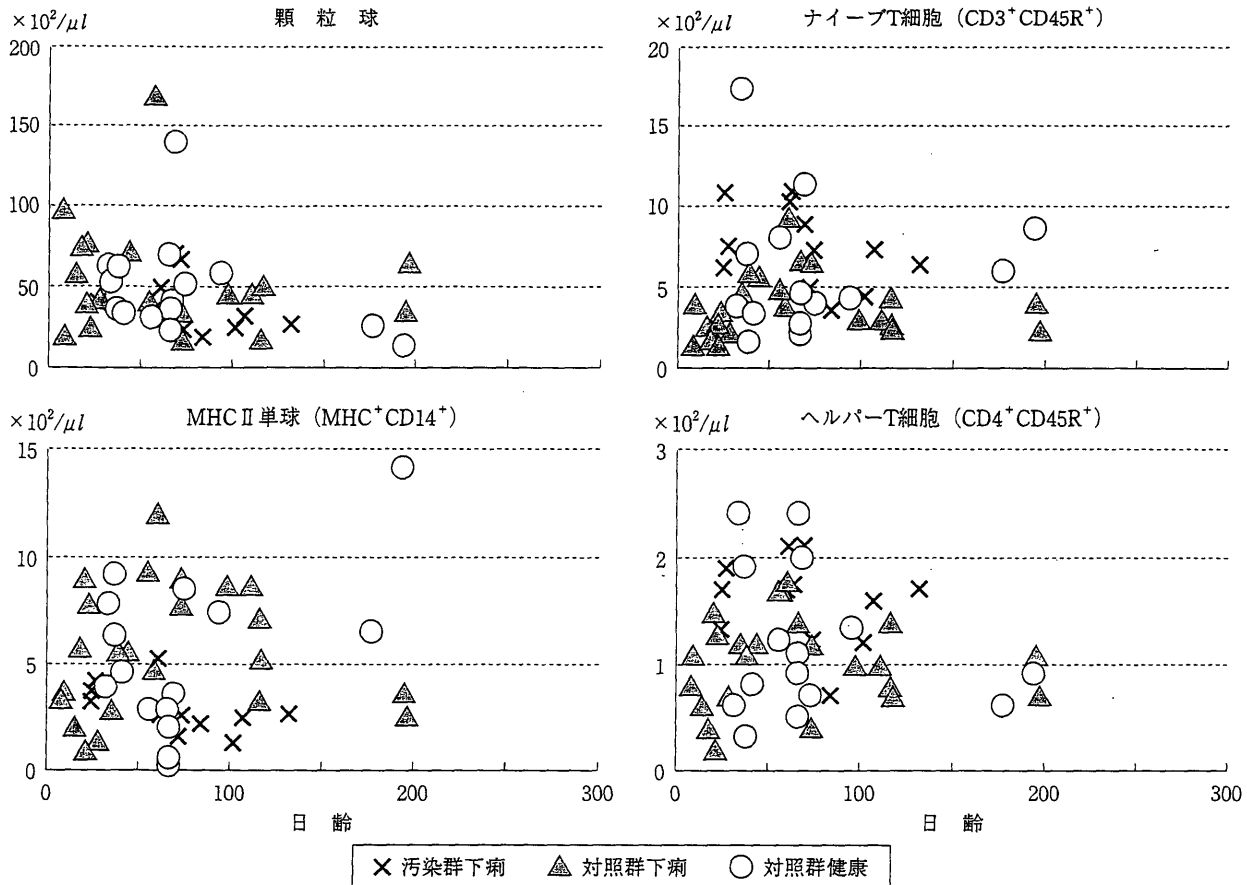


図2 汚染群と対照群における白血球サブポピュレーションの比較

が確認された。パッキングや保存などの際に厳密な調製をしなかったサイレージは品質が劣化することも多いとされる [7, 8] が、特にカビが産生しやすい春季には汚染の程度がより重度なものになることが示された。汚染飼料は嗜好性が低く、子牛の発育不良や疾病数の増加などにも影響を及ぼしていることが示されたことから、自給粗飼料の調製や保存方法に一定の推奨基準を設けることは重要な課題と考えられる。

Mt 汚染飼料の牛への影響は、乳牛を中心とした報告が主であり、抗病性の低下 [1, 9]、繁殖成績の不振 [4, 10] および乳汁移行を介しての人への健康被害 [2, 11, 12] などが問題視されている。しかし、肉牛や繁殖牛における調査・研究成績はほとんど報告されておらず、子牛がMtを摂取した場合の影響についても明らかにされていない。今回の調査によって、汚染農場では繁殖牛に早流産の増加が示されたが、エストロジェンと類似する作用を示すとされるZEN [13] の濃度は他の群に比べて高値であったにも関わらず、すべて基準値未満であった。飼料摂取量の減少にともなう低栄養の影響と並行して基準値を超えるAFの並存が妊娠維持を障害した可能性もあり、ZENの繁殖牛に及ぼす影響濃度とあわせ、複数のMtが与える相乗作用についてもさらに検討していく必要がある。

下痢発症子牛の検査成績からは、Mt 汚染農場とその他において便中から検出された病原微生物の種類には明らかな差がなかったが、対照群でロタウイルスの検出個体がいずれも14日齢以下であったのに対し、Mt 汚染農場では84日齢の個体で検出されており、コクシジウム症も日齢に関係なく発生していることから、Mt 汚染による子牛の抗病性の低下を介在して、病原微生物の易感染状態にあったことが推察できた。また、Mt 汚染群の子牛ではAST値の上昇によって明らかな肝機能の低下が示された。一般に母牛と同居している哺乳子牛は、粗飼料の摂食行動も比較的早期に始まる [14] ことから、強力な肝臓毒としてのAF 汚染 [1, 2] 飼料が子牛の肝機能に障害を与え、ひいては治療期間の延長などに与えている影響も少なくないものと推察された。

乳汁中のAFM₁濃度と飼料中のAFB₁濃度とに明らかな関係はなく、乳牛の乳汁中規制濃度 (50ppt) を超えた検体は1検体のみであった。乳牛におけるAFの乳汁移行率はおよそ1.7%と報告されている [15] が、黒毛和種繁殖牛では一般的な飼料給与量と泌乳量 [16] から推計される移行率は、乳牛と比較して低いものと考えられた。これは濃厚飼料の給与量が少ないことをはじめ、種々の要因によるものと考えられる。しかし、子牛対象のMt基準で区分した軽度汚染群においても、下痢の発

生は対照群に比べ多く、ホルスタイン種や成牛に比較して抗病性が劣る黒毛和種の子牛 [6, 17] では、連続的なMt摂取を考慮した許容基準についても慎重な検討が必要と思われた。

今回実施した白血球サブポピュレーションの成績から、汚染群では持続的なMtの摂取により、ナイーブT細胞とヘルパーT細胞はむしろ増加しているものの、骨髓系の細胞に分化すべき顆粒球やマクロファージへ成長していく活性単球 [6] 数は日齢に関わらず少ないことが示された。有害な毒性物質が摂取され、ナイーブT細胞などの免疫担当細胞は生体を防衛する反応として増加していたが、いっぽうで病原微生物の除去などを担う貪食細胞が明らかに減少していたことなどから、Mtは子牛の免疫応答能に密接に関与している可能性が示唆された。

今後は、和牛繁殖農場における自給飼料の積極的なモニタリングと吸着剤給与を含めた現実的な対策などを検討していくことが重要な課題であると考えられた。

最後に、糞便中の微生物検索を実施いただいた動物衛生研究所七戸研究施設の勝田 賢先生に深謝する。

引用文献

- [1] Whitlow LW, Hagler Jr WM : マイコトキシンと乳牛の生産性、健康状態、繁殖性能との関連、および推奨される防御方法、対策 (1)、畜産の研究、服部貴次訳、54、1204-1210 (2000)
- [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] 三好正一、田口 清、青木 創、虻川孝秀、岡田洋之、吉野知雄 : 耳介壊死、皮膚炎および肢端壊死を呈した乳牛の1例、日獣会誌、57、575-578 (2004)
- [4] Schazmayr G : マイコトキシンの種類と特性とその対策—飼料のカビ毒による家畜の被害とその予防—、畜産の研究、鈴木 章訳、58、1087-1092 (2004)
- [5] Sassahara M, Pontes Netto D, Yanaka EK : Aflatoxin occurrence in foodstuff supplied to dairy cattle and aflatoxinM1 in raw milk in the North of Parana state, Food Chem Toxicol, 43, 981-984 (2005)
- [6] 大塚浩通、小松勝一、今内 寛、福田茂夫、菊 佳男、吉野知男、小岩政照、川村清市 : 黒毛和種とホルスタイン種の子牛における末梢白血球の比較、日獣会誌、55、789-795 (2002)
- [7] 蔡 義民 : サイレージ調製における微生物研究利用、畜産の研究、60、369-375 (2006)
- [8] McDonald P : サイレージ調製に伴う損失、サイレージの生化学、安宅一夫他訳、内田仙二監修、2版、279-294、デーリィジャパン社、東京 (1995)
- [9] Takayama H, Shimada N, Mikami O, Murata H : Suppressive effect of deoxynivalenol, a Fusarium mycotoxin, on bovine and porcine neutrophil chemiluminescence : An in vitro study, J Vet Med Sci, 67, 531-533 (2005)
- [10] 和田賢二、遠藤 洋、小形芳美、大塚浩通、小岩政照、永幡 肇 : 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、日獣会誌、60、425-429 (2007)
- [11] Galvano F, Piva A, Ritieni A, Galvano G : Dietary strategies to counteract the effects of mycotoxins : A review, J Food Protect, 64, 120-131 (2001)
- [12] Diaz DE, Hagler Jr WM, Blackwelder JT, Eve JA, Hopkins BA, Anderson KL, Jones FT, Whitlow LW : Reduction of aflatoxin M1 in milk by sequestering agents of cows consuming aflatoxin in feed, Mycopathologia, Aflatoxin Binders II 157, 233-241 (2004)
- [13] Coppock RW, Mostrom MS, Sparling B, Jacobsen and ross SC : Apparent zearalenone intoxication in a dairy herd from feeding spoiled acid-treated corn : Vet. Hum. Toxicol. 32, 246 (1990)
- [14] 関根純二郎、H. E. M. カメル、金海、細川みえ、大浦良三、菱沼 貢 : 黒毛和種子牛の哺乳期における摂食量の推移、日畜会報、68、1039-1044 (1997)
- [15] Van Egmond HP : Mycotoxin in dairy Products, 66-102, Elsevier Science Pub Co, Ltd Newyork (1989)
- [16] 島田和宏、居在家義昭、鈴木 修、小杉山基昭 : 肉用牛における母牛の乳量と子牛の吸乳行動の関係、日畜会報、60、1071-1075 (1989)
- [17] 小形芳美、高橋浩吉、阿部浩之、三澤 隆、漆山芳郎、加藤敏英、酒井淳一 : 黒毛和種虚弱子牛の血液性状および母牛との関係、日獣会誌、50、253-257 (1997)