

## 神奈川県におけるサイレージのカビ毒汚染実態調査

住吉俊亮<sup>1)†</sup> 五十嵐靖美<sup>2)</sup> 鎌木雅人<sup>2)</sup> 大野真美子<sup>3)</sup> 堀北哲也<sup>3)</sup>

- 1) 神奈川県農業共済組合 (〒259-1141 伊勢原市上粕屋 43-2)  
 2) 日本ニュートリション(株) (〒107-0062 港区南青山 1-1-1)  
 3) 日本大学生物資源科学部 (〒252-0880 藤沢市亀井野 1866)

(2017年8月24日受付・2017年12月22日受理)

## 要 約

神奈川県内で生産されたコーンサイレージ 11 検体及びグラスサイレージ 5 検体を対象に、18 種類のカビ毒について汚染実態を調査した。その結果 16 検体中 15 検体からカビ毒が検出された。しかし、検出量は全体的に低く、管理基準値が設けられているデオキシニバレノール (DON)、ゼアラレノン (ZON) 及びアフラトキシンも管理基準値以下であった。一方で、トリコテセン類とフモニシン族あるいはトリコテセン類、フモニシン族及び ZON の複合汚染が多く認められた。多くの家畜で複数のカビ毒を摂取した場合の毒性の相加作用及び相乗作用が報告されており、複合汚染による影響が危惧される。また、肉眼的に変敗、カビの発生が多く観察されたものの、カビ毒はほとんど検出されない飼料があった一方で、肉眼的には異常が認められなかった多くのサンプルからカビ毒が検出されたことから、サイレージの肉眼的な状態とカビ毒の有無は連動しないことが示唆された。

——キーワード：複合汚染、マイコトキシン、サイレージ。

-----日獣会誌 71, 245~249 (2018)

カビ毒 (マイコトキシン) とは、おもに *Fusarium* 属菌及び *Aspergillus* 属菌の一部が 2 次代謝産物として産生する毒素であり、カビ毒の種類、摂取する家畜の種類や健康状態、環境によりその作用は多岐にわたるが、摂取した家畜にさまざまな有害作用を示し、生産性を阻害することが知られている。家畜の健康に影響する主要なカビ毒と摂取時の、おもな症状を表 1 に示した [1, 2]。このようにカビ毒摂取が人や家畜に与える影響は多岐にわたるため、各国で飼料中、食品中の規制値が設けられ規制されているカビ毒も多く存在する。わが国でもアフラトキシン B<sub>1</sub>、デオキシニバレノール (DON) 及びゼアラレノン (ZON) の 3 種類について、農林水産省により指導基準及び管理基準が設定されている (表 2)。カビ毒摂取が家畜に与える影響やそれによる生産性の低下 [1-4] については、近年生産者の間でも関心が高まっており、飼料中のカビ毒あるいは飼料に発生するカビについて気にしている生産者も多くなっている。一方で、家畜に発生する疾病や異常の原因を短絡的にカビ毒に帰する傾向も見受けられる。このような飼料のカビ毒汚染

は穀類を中心に、世界的に問題となっており、自給飼料サイレージにおいても国内外で複数のカビ毒が検出されているという報告がある [5-7]。しかし、自給飼料のカビ毒汚染実態の調査はまだ十分ではない。今後カビ毒汚染のメカニズムを明らかにし、自給飼料の汚染防止、汚染リスク軽減のための対策を検討するためには、汚染実態の解明が必要であると思われる。そこで本試験では、神奈川県内で生産された自給飼料サイレージのカビ

表 1 主要なカビ毒と摂取時の主な症状

カビ毒の種類	摂取時の症状
アフラトキシン	肝機能障害, 食欲・増体率・泌乳量低下, 出血, 免疫抑制
オクラトキシン	腎毒性, 免疫抑制
フモニシン	食欲・増体率低下, 豚の肺水腫, 馬の白質脳軟化, 腎・肝毒性, 免疫抑制
トリコテセン	消化器系障害, 骨髄機能障害, 浮腫, 免疫抑制
ゼアラレノン	エストロゲン作用, 不妊症, 流産

† 連絡責任者(現所属)：住吉俊亮 (日本大学生物資源科学部獣医学科 獣医産業動物臨床学研究室)

〒252-0880 藤沢市亀井野 1866 ☎0466-84-3488 FAX 0466-84-3423

E-mail : sumiyoshi.toshiaki@nihon-u.ac.jp

神奈川県におけるサイレージのカビ毒汚染実態調査

表2 飼料中のマイコトキシンに関する農林水産省の指導基準及び管理基準

マイコトキシン	飼料	管理基準
アフラトキシン B <sub>1</sub>	配合飼料（乳用牛用）	0.01mg/kg(指導基準)
	配合飼料（牛・豚・鶏・ウズラ用）とうもろこし	0.02mg/kg
	配合飼料（哺乳期子牛・子豚用，幼すう用，プロイラー前期用）	0.01mg/kg
デオキシニバレノール	家畜等（生後3カ月以上の牛を除く）に給与される飼料	1mg/kg
	生後3カ月以上の牛に給与される飼料	4mg/kg
ゼアラレノン	家畜に給与される飼料	1mg/kg

表3 各飼料の種類，貯蔵形態，サンプリング日，刈取及び開封時期

サンプル	草種	貯蔵形態	サンプリング日	刈取時期	開封時期
1	コーン	FRPタワー	2016年10月7日	2016年7月上旬	2016年9月1日
2		鉄板サイロ	10日	7月下旬	9月下旬
3		スチールタワー	9日	2015年9月下旬	9月下旬
4		バンカー	10日	12月中旬	2月下旬
5		バンカー	11日	9月下旬	9月上旬
6		鉄板サイロ	12日	2016年8月中旬	10月上旬
7		バンカー	12日	2015年10月下旬	10月2日
8		ロールベールラップ	12月14日	8月下旬	12月14日
9		スタック	14日	8月中旬	10月上旬
10		スタック	14日	2016年9月上旬	11月下旬
11		バンカー	14日	8月上旬	10月下旬
12	イタリアンライグラス	ロールベールラップ	10月9日	4月下旬	10月9日
13			10日	5月上旬	10月7日
14			11日	4月上旬	10月11日
15			12月14日	5月中旬	12月14日
16			14日	5月上旬	12月14日

毒汚染実態について調査を行った。

材料及び方法

**供試飼料：**供試飼料は2016年4～5月に神奈川県内で生産されたグラスサイレージ5検体及び2015年9月～2016年9月に生産されたコーンサイレージ11検体を用いた。各飼料のサンプリング日，貯蔵形態，刈取り時期及び開封時期を表3に示した。

**採材：**採材は2016年10月及び2016年12月に実施した。バンカーサイロやスタックサイロの場合は，取り出し時に表層を10cm程度除去し，上中下各2カ所から等量ずつ，ロールベールの場合は周辺部2カ所，中心部1カ所，中間部2カ所より等量ずつ採取した。採取したサンプルはよく混合し，約500gをジップ付きのビニール袋に入れ，空気を抜いて密封した後，分析実施まで冷蔵保存した。

**飼料中のカビ毒分析：**飼料中のカビ毒分析は日本ニュートリション(株)が担当し，検査はローマラボで実施した。カビ毒はトリコテセン類が，DON，3アセチルデオキシニバレノール(3-ADON)，15アセチルデオキシニバレノール(15-ADON)，ニバレノール(NIV)，フザレノンX(FX)，T-2トキシン，HT-2トキシン，ジアセトキシシルペノール(DAS)，ネオソラニオー

ル(NEO)の9種類，ZON，フモニシン類がフモニシンB<sub>1</sub>(FB<sub>1</sub>)，フモニシンB<sub>2</sub>(FB<sub>2</sub>)，フモニシンB<sub>3</sub>(FB<sub>3</sub>)の3種類，アフラトキシン類がアフラトキシンB<sub>1</sub>(AFB<sub>1</sub>)，アフラトキシンB<sub>2</sub>(AFB<sub>2</sub>)，アフラトキシンG<sub>1</sub>(AFG<sub>1</sub>)，アフラトキシンG<sub>2</sub>(AFG<sub>2</sub>)の4種類及びオクラトキシン(OCT)の合計18種類について検査を実施した。分析は液体クロマトグラフィ質量分析法(LC-MS/MS)による一斉分析により実施した。

成績

カビ毒の検出状況を表4に示した。まずトリコテセン類9種類の検出状況については，16検体中9検体からDON，8検体からNIV，4検体から15-ADONが検出された。その他のトリコテセン類は検出されなかった。また，このうち1検体では3種類のトリコテセン類，6検体では2種類のトリコテセン類が同時に検出された。ZONは16検体中4検体から検出された。フモニシン族のカビ毒はほとんどの検体から検出されており，FB<sub>1</sub>は16検体中15検体，FB<sub>2</sub>は14検体，FB<sub>3</sub>は10検体から検出された。アフラトキシン及びOCTについては1検体からAFB<sub>2</sub>，AFG<sub>1</sub>及びAFG<sub>2</sub>が検出されたが，その他の検体からは検出されなかった。検出されたカビ毒は，いずれもその検出数値は低く，DON，ZON及びア

表4 各サイレージサンプルにおけるカビ毒検出状況

サンプル 番号	草種	トリコテセン類			ゼアラ レノン	フモニシン類				アフラトキシン				オクラ トキシン	
		DON	15-ADON	NIV	ZON	FB <sub>1</sub>	FB <sub>2</sub>	FB <sub>3</sub>	FUM 合計	AFB <sub>1</sub>	AFB <sub>2</sub>	AFG <sub>1</sub>	AFG <sub>2</sub>	AF 合計	OCT
1	コーン	—	—	30	—	256	88	20	364	—	—	—	—	—	—
2		35	—	28	—	83	39	39	161	—	—	—	—	—	—
3		66	—	11	14	15	16	—	31	—	—	—	—	—	—
4		—	—	—	—	10	—	—	10	—	—	—	—	—	—
5		32	—	—	29	956	397	102	1,455	—	—	—	—	—	—
6		11	41	45	18	115	26	—	141	—	—	—	—	—	—
7		13	—	18	—	424	161	39	624	—	—	—	—	—	—
8		—	58	—	—	418	66	33	517	—	—	—	—	—	—
9		—	35	—	—	102	17	11	130	—	—	—	—	—	—
10		32	—	22	—	382	61	27	470	—	—	—	—	—	—
11		62	—	25	186	1,468	302	125	1,895	—	—	—	—	—	—
12	グラス	—	—	—	—	20	16	—	36	—	—	—	—	—	—
13		—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
14		—	110	—	—	35	23	—	58	—	—	—	—	—	—
15		35	—	—	—	2,093	318	134	2,545	—	—	—	—	—	—
16		16	—	35	—	234	82	26	342	—	0.9	0.5	0.6	2.0	—

単位：ppb ー：検出限界以下

フラトキシンのいずれも管理基準値以下であった。一方で、トリコテセン類とFUMあるいはトリコテセン類、FUM及びZONの複合汚染が16検体中13検体と多くみられた。またサンプル4, 5, 13及び16は肉眼的に変敗部位及びカビの発生が多く観察された。これらのうちサンプル5及び16はカビ毒が検出されたが、サンプル4及び13からはカビ毒はほとんど検出されなかった。一方で、肉眼的には異常が認められなかったその他の11検体すべてからカビ毒が検出された。コーンサイレージとグラスサイレージでカビ毒の検出状況を比較してみると、コーンサイレージは11検体すべてから、グラスサイレージでは5検体中4検体でカビ毒が検出された。また、サンプル15のように比較的高い濃度で検出されているものもあった。各飼料のサンプリング日、刈取時期及び開封時期とカビ毒検出の間には特定の関係性を見出すことはできなかった。

## 考 察

今回、カビ毒の分析はLC-MS/MSにより実施した。LC-MS/MSは、迅速性及測定費用の面から現場で広く用いられている酵素免疫測定法(ELISA)に比べ、高い分析精度を得ることができるメリットがある。また、従来ラボ測定の主流であった高速液体クロマトグラフ(HPLC)分析がカビ毒を個別に分析する性質上、複合汚染の実態を把握することが困難であったが、LC-MS/MSによる分析により、18種類のカビ毒について一斉分析を行うことが可能となった。LC-MS/MS一斉分析法による国内自給飼料のカビ毒分析の実態はあまり報告

がない。今回、この分析法を用いて、圃場や貯蔵場所は異なるが、ほぼ同一の気候条件である神奈川県内で生産された自給飼料サイレージ16検体のカビ毒汚染状況を調べたところ、15検体からカビ毒が検出された。しかし、検出されたカビ毒の量は全体的に低く、DON、ZON及びアフラトキシンのいずれも管理基準値以下であった。このことから、県内で生産されている自給飼料サイレージの多くがカビ毒により汚染されているものの、その含有量は比較的低値であり、ただちに牛の健康に影響を与えるレベルはないと考えられた。このような自給飼料サイレージのカビ毒汚染は、当県のみならず、国内においては北海道において飼料用トウモロコシのDON汚染が深刻であることが報告されており、10ppmを上回る高濃度のDONによる汚染も報告されている[7]。また、岩手県でも39農場で生産されたコーンサイレージを調べた結果、すべてのサンプルからDONが0.3~11.7ppmの濃度の範囲で検出されたという報告がある。北海道に次ぐ畜産地帯である九州地域でも飼料用トウモロコシから検出濃度は低いもののDON、NIV及びFUMが検出されている[8]。国外においてもヨーロッパではDON、ZEN、FUMが高率に検出されており、特にDONは平均607~1,421ppb検出されている。北米においてもDON、ZEN及びFUMが高率に検出されており、DONは平均1,085~1,947ppb、FUMは平均902~1,357ppb検出されている[9, 10]。アジアではDON、FUM及びアフラトキシンが高率に検出されており、FUMの平均検出濃度は797~1,568ppbとなっている[9, 10]。検出されるカビ

毒の種類及びその濃度はさまざまであるが、このようにカビ毒汚染は国内のみならず全世界的に広く浸潤している。今回、当県で検出されたカビ毒の含有量は、これらの既報と比べて高くはなかったが、調査サンプル数が16と少ないため比較検討するためには、さらなる調査が必要であると思われる。

サイレージの種類別にみると、一般的に牧草サイレージではカビ毒の検出率は低いという報告もあるが [2, 11], グラスサイレージでも5検体中4検体でカビ毒が検出されており、一部比較的高い濃度で検出されているものもあったことから、グラスサイレージといえどもカビ毒汚染に対して油断はできないことが示唆された。

また、いずれのサイレージもマイコトキシン含有量は低値ではあったがDON, 15-ADON及びNIVの3種類あるいはこのうち2種類のトリコテセン類による複合汚染に加えて、トリコテセン類とFUMあるいはトリコテセン類, FUM及びZONの複合汚染が16検体中13検体と多くみられた。トリコテセン類では、管理基準値が設けられているDONに比べ、その類縁体である15-ADON, NIV及びFXの方が高い細胞毒性を持つという報告がある [12]。今回多くのサンプルでDONに加え、類縁体である15-ADON及びNIVも同時に検出されており、その毒性の作用について今後検討していく必要がある。また、複数のカビ毒による複合汚染ではカビ毒の悪影響が別のカビ毒の存在で増幅された場合、相乗作用を起こすことが多いという報告がある [2]。加えて2種のカビ毒に共同暴露された場合、各毒素の単独作用よりも重症化し、豚では2種類のマイコトキシン、すなわちトリコテセン類のDONを3ppm, フモニシン6ppmを含む飼料を5週間にわたり摂取した場合のワクチン抗体価の減少が報告されている [13]。牛でのカビ毒の複合汚染による影響については報告が少ないが、羊ではDASとアフラトキシンの間に相乗作用がありDASを5.0mg/kgとアフラトキシシン2.5mg/kgを同時に給与することにより、それぞれを単独で投与した場合に比べ、著しい増体減及び血清GGTの増加が認められたという報告がある [14]。また、乳牛ではZONとトリコテセン類あるいはZONとT-2トキシシンが原因で卵巣機能不全となり、生殖能力に対する相加あるいは相乗作用を示す可能性が報告されている [3, 15]。しかし乳牛において複合汚染により相加あるいは相乗作用を示す具体的なカビ毒の組み合わせや濃度については不明な点が多い。今回検出されたカビ毒は、それぞれ単体では濃度は低値であり、牛の健康状態にただちに影響を与えるレベルではないが、しかし複合汚染が認められたサンプルにはサンプル5, 11, 15のように一部フモニシン族のカビ毒が比較的高濃度に検出されているものもあった。今回、個々のマイコトキシンの検出量はおおむね低

値であったが、しかし牛が複数のカビ毒を摂取した際の影響は未だ明らかとなっていない。また、乳牛はサイレージのみならず、乾草、穀物、加工飼料等、多様な飼料に由来するカビ毒に暴露されている可能性もあり、このような複合汚染リスクを軽減していくことは必要であると考えられる。さらに今後、乳牛が複数のカビ毒を摂取した場合の相互作用について、より多くの研究が必要であると思われる。

また今回、肉眼的に変敗部位及びカビの発生が多く観察されたが、カビ毒はほとんど検出されなかったサンプルがあった一方で、肉眼的に異常が認められなかったその他のすべてのサンプルから検出量は高くないものの、カビ毒が検出された。このことから、サイレージの肉眼的な状態とカビ毒の有無は必ずしも連動しないことが示唆された。コーンサイレージから国内でも高頻度に検出されるDONでは、サイレージの発酵品質とDON濃度の間に関連性は認められないとの報告もある [7]。生産者は目に見えるカビの発生及び飼料の変敗を気にしがちであるが、今回の結果を受けて、一見カビが生えていないように見える飼料にもカビ毒が存在する可能性があることを注意喚起していく必要がある。また、たとえカビ毒が検出されなくても、肉眼的にカビの発生、変敗が認められた飼料では、嗜好性や栄養価が低下することにより飼料効率が悪くなり、家畜の健康状態に有害な影響がでる可能性がある。このため、このような飼料は給与しないよう配慮が望まれる。

今回、2回のサンプリングで計16検体のサイレージについてカビ毒の検査を行い、このうち15検体からカビ毒が検出され、さらに13検体からは2種類以上のカビ毒が検出された。このことから、今後のカビ毒対策としては、まずできるだけ酸素を除去してサイレージを密封する適切な調整、そして開封後は速やかにシートで覆い、サイレージ内への空気の流入を防ぐ適切な保管が重要である。加えてカビ毒産生菌は土壤中に存在し、カビ毒はおもに圃場において収穫前の飼料作物を汚染していることが知られている [6, 16, 17]。このため今回カビ毒が検出されたサイレージ飼料が生産された圃場では、今後も生産されるサイレージからのカビ毒検出量を継続的に検査し、給与飼料のカビ毒汚染状況を随時把握しておくとともに、圃場での飼料作物の収穫時期、品種、栽培状況についても調査し、汚染対策を進めていく必要があると考えられる。今後、カビ毒汚染対策及び汚染防止のための方策を検討していくためには、県内で生産された自給飼料サイレージのカビ毒汚染実態を今後も継続して調査し、さらに今回明らかにすることができなかったが、カビ毒が比較的多く検出された検体について、その要因を明らかにしていく必要があると思われる。

## 引用文献

- [1] Hussein HS, Brasel JM : Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals, *Toxicology*, 167, 101-134 (2001)
- [2] Speijers GJA, Speijers MHM : Combined toxic effects of mycotoxins, *Toxicol Lett*, 153, 91-98 (2004)
- [3] D'Mello JPF, Placinta CM, Macdonald AMC : *Fusarium* mycotoxins: a review of global implications for animal health, welfare and productivity, *Anim Feed Sci Tech*, 80, 183-205 (1999)
- [4] Cortinovis C, Pizzo F, Spicer LJ, Caloni F : *Fusarium* mycotoxins: effects on reproductive function in domestic animals-a review, *Theriogenology*, 80, 557-564 (2013)
- [5] 福中理恵, 平岡久明 : 高速液体クロマトグラフタンデム型質量分析計による飼料中の11種類のかび毒の一斉分析法, *Research report of animal feed*, 31, 8-30 (2006)
- [6] Mansfield MA, Kuidau GA : Microbiological and molecular determination of mycobiota in fresh and ensiled maize silage, *Mycologia*, 99, 269-278 (2007)
- [7] 湊 啓子, 飯田憲司, 出口健三郎 : 北海道におけるトウモロコシサイレージのデオキシニバレノール汚染実態とその対策, *日本草地学会誌*, 61, 97-101 (2015)
- [8] 笹谷孝英, 川上 顕, 加藤直樹, 井上博喜, 宮坂 篤, 平八重一之 : 九州地域での作付体系による飼料用トウモロコシのかび毒汚染状況, *日本草地学会誌*, 61, 102-106 (2015)
- [9] Rodrigues I, Naehrer K : Prevalence of mycotoxins in feedstuffs and feed surveyed worldwide in 2009 and 2010, *Phytopathol Mediterr*, 51, 175-192 (2012)
- [10] Rodrigues I, Naehrer K : A three-year survey on the worldwide occurrence of mycotoxins in feedstuffs and feed, *Toxins*, 4, 663-675 (2012)
- [11] 平岡久明 : 飼料用トウモロコシのフザリウムマイコトキシン汚染とその軽減対策, *日本草地学会誌*, 61, 107-114 (2015)
- [12] Alassane-Kpembé I, Puel O, Oswald IP : Toxicological interactions between the mycotoxins deoxynivalenol, nivalenol and their acetylated derivatives in intestinal epithelial cells, *Arch Toxicol*, 89, 1337-1346 (2014)
- [13] Grenier B, Loureiro-Bracarense AP, Luciola J, Pacheco GD, Cossalter AM, Moll WD, Schatzmayr G, Oswald IP : Individual and combined effects of sub-clinical doses of deoxynivalenol and fumonisins in piglets, *Mol Nutr Food Res*, 55, 761-771 (2011)
- [14] Harvey RB, Edrington TS, Kubena LF, Elissalde M, Corrier DE, Rottinghaus GE : Effect of aflatoxin and diacetoxyscirpenol in ewe lambs, *B Environ Contam Tox*, 54, 325-330 (1995)
- [15] Trucksess MW : Mycotoxins, *J AOAC Int*, 80, 119-126 (1997)
- [16] Blandino M, Reyneri A, Vanara F : Effect of sowing time on toxigenic fungal infection and mycotoxin contamination of maize kernels, *J Phytopathol*, 157, 7-14 (2009)
- [17] Yoshida M, Nakajima T : Deoxynivalenol and nivalenol accumulation in wheat infected with *Fusarium graminearum* during grain development, *Phytopathology*, 100, 763-773 (2010)

## Survey of Contamination Status of Silage in Kanagawa

Toshiaki SUMIYOSHI<sup>1)†</sup>, Yasumi IGARASHI<sup>2)</sup>, Masato KAMAKI<sup>2)</sup>,  
Mamiko ONO<sup>3)</sup> and Tetsuya HORIKITA<sup>3)</sup>

1) *Kanagawa Agricultural Mutual Aid Association, 43-2 Kamikasuya, Isehara, 259-1141, Japan*

2) *Japan Nutrition Co., Ltd, 1-1-1 Minamiaoyama, Minato, 107-0062, Japan*

3) *Nihon University College of Bioresource Sciences, 1866 Kameino, Fujisawa, 252-0880, Japan*

## SUMMARY

Eleven corn silage samples and 5 glass silage samples produced in Kanagawa were examined for contamination by 18 types of mycotoxins. As a result, mycotoxins were detected in 15 of the 16 samples. However, the levels of mycotoxins detected were low. The levels of deoxynivalenol (DON), zearalenone (ZON) and aflatoxins were lower than the established control values, but there was high combined contamination of Trichothecenes and Fumonisins or Trichothecenes, Fumonisins and ZON. Toxic additive effects and synergistic effects have been reported upon ingestion of multiple mycotoxins by domestic animals. Therefore, the influence of combined contamination is of concern. Furthermore, although deterioration and mold were observed macroscopically, there were silage samples with minimal mycotoxin contamination. On the other hand, mycotoxins were detected in many samples that exhibited no macroscopic abnormalities. From these results, the presence of mycotoxins may not be correlated with the macroscopic state of the silage.

— Key words : combined contamination, mycotoxins, silage.

† *Correspondence to (Present address) : Toshiaki SUMIYOSHI (Nihon University College of Bioresource Sciences)*

*1866 Kameino, Fujisawa, 252-0880, Japan*

*TEL 0466-84-3488 FAX 0466-84-3423 E-mail : sumiyoshi.toshiaki@nihon-u.ac.jp*

*J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 71, 245~249 (2018)*