

飼料を通じた畜産物の安全性

(国研) 農研機構 動物衛生研究部門
山中典子

飼料の安全性

- 健全な家畜の飼養、健全な畜産物の生産
 > 高品質な畜産物、人間の健康
- 阻害する要因
 - 感染症
 - 気温、湿度、日照などの環境要因
 - 飼料の栄養成分と組成
 - 飼料を汚染する有害物質
 - 有毒植物などの有害物質
 - 飼料原料への汚染物質の混入 (ダイオキシン類、かび毒等)
 - 人畜共通伝染病の病原体

飼料の安全性の確保及び品質の改善に関する法律 (飼料安全法)

- 1953年 飼料の品質改善に関する法律
 異物混入の防止や成分量の保証
- 1975年 飼料の安全性の確保及び品質の改善に関する法律
 (上記法律の改正により公布)
 - <1960年 七面鳥のX病 (アフラトキシン中毒)
 - <1968年 鶏ダーク油事件、カネミ油症
 (PCB-ダイオキシン中毒)
 - <1970年代 有機リン剤など急性毒性、慢性毒性のある
 多くの農薬の失効

新規飼料中の有害物質による家畜の中毒

- アンモニア過剰処理牧草による子牛の中毒
- 牛海綿状脳症 (BSE)
- 一年生ライグラス中毒
- エンドファイト中毒

牛海綿状脳症

Bovine Spongiform Encephalopathy (BSE)

- 1986年、英国で報告された異常プリオンによる中枢神経障害を呈する牛の感染症。牛に牛由来肉骨粉を飼料として給与したことが原因。ヒトの変異型CJDはBSEプリオンに起因するものであり、対策が急がれた。
- 世界での発生は1992年がピークで37,000頭を越えたが、2004年に年1000頭以下、2009年に100頭を下回り、2020年には3頭と、現時点での発生は制御されている。
- 日本では2001年9月が初発であったが、10月には飼料の規制（牛に肉骨粉を給与しない）が行われ、その後散発したが、規制開始直後2002年1月生まれの子牛を最後に発生をみていない。
- 中枢神経系に空胞変性が生じることから、牛は神経症状を表し、歩様異常や後肢麻痺、起立不能を呈する。

一年生ライグラス中毒

- オーストラリアで1950年代に報告された牧野の雑草による中毒
- 一年生ライグラス (*Lolium rigidum*) はイネ科の雑草
- 一年生ライグラスには土壌線虫 (*Anguina funesta*) が種子に寄生する
- *A. funesta*は、*Rathayibacter toxicus*という細菌を媒介し、細菌が産生するコリネトキシンが種子に蓄積する
- コリネトキシンは神経毒性があり、羊や牛が起立不能、痙攣を呈する中毒症状を表す
- 1996年、オーストラリアから輸入したオーツヘイに雑草の一年生ライグラスが混入（10%以上）、羊と牛が中毒した
- 給与種子からコリネトキシンが検出され、確定診断
- オーストラリアでは検査を厳格化し、汚染した牧草が輸入されることはなくなった

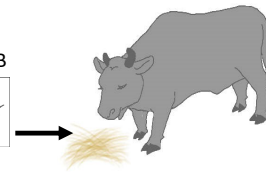
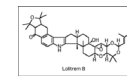
エンドファイト中毒

- 1997年以来、米国オレゴン州から輸入される牧草のストロー（わら）で神経症状を起こす牛が続発（主に黒毛和種の繁殖雌牛、育成牛）
- ストローは芝草用品種の牧草（ペレニアルライグラス、トールフェスク）で、種子用の圃場で種子を採取した残りで、蛋白、β-カロテンの含量が低く、栄養価が稲わらに類似→黒毛和種の繁殖雌牛、育成牛に飽食させている例がある
- 芝草用品種の上記牧草には内生菌のエンドファイトが感染させてある。エンドファイトは植物の成長制御、虫害耐性、病害耐性などに働く生理活性物質を産生するが、一部の物質は家畜に有害なものがあり、中毒の可能性がある
- 米国でアンガスなどの現地の牛のADIは調べられている（1800-2000ppb）
- 濃度の証明書も付いているが日本では中毒例が出た→黒毛和種の感受性？畜産物へは？
- 黒毛和種への給与試験の必要性

黒毛和種への給与試験

ライグラススタグラーの家畜衛生、公衆衛生上のリスク：家畜の中毒、食肉の汚染

ロリトレムB



リスク評価すべき項目

- 黒毛和種へのADIの設定
- 筋肉、脂肪、内臓への移行と消失のTime course (ADME)
- ヒトでの毒性発現の可能性

実際の検討事項

- 育成牛へのロリトレムB汚染飼料の給与
 - 無毒性量、最小毒性量からのADIの設定
 - ヒトの曝露量の算定
 - 変異原性、発癌性の可能性の検索（構造活性予測解析）


先端技術を活用した農林水産研究高度化事業「エンドファイト毒素の牛への影響および畜産物残留性の解明」平成17-19年度 Shimada, N. et al. (2013) Toxicological evaluation and bioaccumulation potential of lolitrem B, endophyte mycotoxin in Japanese black steers. Food Addit. Contam. 30, 1402-1406

それまで知られていなかった危害要因 に関する安全性評価

- ダイオキシン類
- 有機フッ素化合物 (PFAS)
- 遺伝子組換え飼料
- ナノテクノロジーを用いた飼料・食品

ダイオキシン類


- ダイオキシン類は、ポリ塩化ジベンゾ-パラジオキシン(PCDD)、ポリ塩化ジベンゾフラン(PCDF)、コプラナーPCB (Co-PCB)の総称で、分解しにくく、環境と生体に残留しやすい残留性有機汚染物質 (POPs)。生体内では脂肪に蓄積し、急性には消耗性症候群による死、慢性的には発癌性のほか生殖発生毒性も報告されている。
- 1999年ベルギーで、工業用PCBを含んだ油が回収所に違法投棄され、動物用飼料原料として使用されてしまった。給与された鶏の産卵率の低下と死亡率の増加により調査したところ、高濃度のダイオキシンが飼料および鶏脂肪から検出され、同様に給与された豚とともに流通を停止された。
- 除草剤のPCPは1975年に、CNPは1992年に登録失効しているが、不純物としてダイオキシン類を含んでいたため、水田の土壌に残留が認められる。(その後イネなどはダイオキシン類を根から吸収しないことがわかった)
- POPsの性質として、燃焼や土壌汚染由来のダイオキシン類は水系を介して海へ流入し、生物濃縮により魚介類や海棲哺乳類に蓄積する。

家畜の飼料 (牧草、穀物、 稲わら、魚粉) の実態解明の必要性
(魚油で高濃度、給与される鶏で生物濃縮)

Guruge, KS. Et al. (2005) Polychlorinated dibenzo-p-dioxins, -dibenzofurans, and biphenyls in domestic animal feed stuff and their fat. Chemosphere. 58, 883-889

有機フッ素化合物PFAS


- PFAS : Poly- and Perfluoroalkyl substances
 - ペルフルオロオクタンスルホン酸 (PFOS)、ペルフルオロオクタノ酸 (PFOA) など
- 難燃剤、撥水剤などとして1950年代から製造
- 2000年、製造工場の従業員の血中に高濃度に検出されたことから、3M社では製造を取りやめた (この時点で毒性は不明)
- 2009年、ストックホルム条約にてPOPsとして世界的な製造・輸出入・使用の規制等の決定
- 脂質に高度に蓄積される従来のPOPsとは物性が異なり、体内動態や毒性に不明な部分が多かった


齧歯類、鶏、マイクロミニピッグで動態、毒性を検証

Guruge, KS. et al. (2006) Gene expression profile in rat liver treated with perfluorooctanoic acid (PFOA). Journal of Environ. Monit. 7, 371-377.
Yeung, LWY. et al. (2007) Differential expression of chicken hepatic genes responsive to PFOA and PFOS. Toxicology. 237, 111-125
Yoo, H. et al. (2009) Depuration kinetics and tissue disposition of PFOA and PFOS in white leghorn chickens (Gallus gallus) administered by subcutaneous implantation. Ecotoxicol. Environ. Safety. 72, 26-36.
Guruge, KS. et al. (2009) Effect of perfluorooctane sulfonate (PFOS) on influenza A. J. Toxicol. Sci. 34, 687-691
Sakuma, A. et al. (2019) Changes in hepato-renal gene expression in microminipigs following a single exposure to a mixture of perfluoroalkyl acids. Plos One. doi.org/10.1371/journal.pone.0210110

遺伝子組み換え飼料

- 1980年代から、外来遺伝子を導入することにより、除草剤耐性、害虫抵抗性などの性質をもつ農産物の育種が始まる
- 外注抵抗性の付与では、細菌 *Bacillus thuringiensis* の産生するタンパクを発現させることで食害した害虫を殺す
- 1996年、遺伝子組換えコーン、スターリンクが飼料用輸入トウモロコシに混入していることが判明
- 食品、飼料への影響について消費者の懸念
- 農林省プロジェクト「飼料由来消化管内生産物の家畜に対する影響と動態解明」(2000-2002年度)


Cry1Ab遺伝子を導入されたトウモロコシのF1育成牛への給与試験
牛に有害な影響なく、殺虫成分の哺乳類細胞への結合性も低いことが判明

Chowdhury, EH, et al. (2004) Fate of maize intrinsic and recombinant genes in calves fed genetically modified maize Bt11. J. Food Prot. 67, 365-370.
Chowdhury, EH, et al. (2003) Detection of Cry1Ab protein in gastrointestinal contents but not visceral organs of genetically modified Bt11-fed calves. Vet. Hum. Toxicol. 45, 72-75.
Shimada, N, et al. (2006) Effects of Feeding Calves Genetically Modified Corn Bt11: A Clinico-Biochemical Study. J. Vet. Med. Sci. 68, 1113-1115.

ナノテクノロジーを用いた食品・飼料

- カーボンナノファイバーなどの登場で、ナノスケール化により、新しい機能性をもつ材料の開発が期待されるようになった
- 固体の微細繊維化、微粉末化、液体での微細エマルジョンなど、原料によって物性の物性と異能性の変化の内容は異なる
- カーボンナノファイバーにおいて、アスベストとの類似性が指摘され、新しい機能性をもつ材料の開発には新しいリスクの可能性を考慮する必要があることが提唱された
- 農研機構では、ソバや小麦粉の微細粉末化、カロテンの微細エマルジョン化などの食品の開発が進められていたが、開発プロジェクトの中で、リスク評価を合わせて行うこととなった



リスク評価、リスクコミュニケーションの手法の検討
元々の物質のもつ危害要因の増強がなく、処理による新しい危害要因が生じないか調べる

山中典子、(2009) フードナノテクノロジー 第7章ナノスケール食品素材のリスク評価 シーエムシー出版 217-225.

そのほかの家畜の中毒

- 硝酸塩中毒
- 傷害サツマイモ中毒
- 牛のドングリ中毒
- 子牛の銅中毒
- 豚の亜鉛中毒

硝酸塩中毒

- 1970年代までは自給飼料の施肥失宜が原因となることが多かった
- 1990年代後半から、粗飼料の輸入量が増え、スーダン乾草など、硝酸態窒素含有量の多い飼料による事故が出るようになった。購入飼料なので、1農家にとどまらない被害が出る場合がある (2007年長野県)
- 2000年代後半からは、野菜を牛の飼料に転用する例で、急性中毒や繁殖障害を起こす例が出てきた。
- 最近では自給飼料の施肥問題が再燃。家畜排せつ物法対策として、自家消費する例が増えた。
- 生草の硝酸態窒素定量のためには、採取後すぐ乾燥するか、冷凍する必要がある。貯蔵中に硝酸還元細菌などの作用で、硝酸イオンが亜硝酸イオンに変化する。抽出後の試料も10時間ほど置いておくと亜硝酸生成が起こる。

傷害サツマイモ中毒

腐敗甘薯中毒と言われていた
サツマイモが作るファイトアレキシンによる牛の中毒

ipomeamarone (肝毒性)

4-ipomeanol (間質性肺炎)

サツマイモ黒斑病 *Ceratocystis fimbriata*, や *fusarium solani* の感染
アリモドキゾウムシによる食害、物理的損傷

1970年代以降あまり起こっていなかった



感染症、バラコート等との鑑別

2006年京都、2010、2016年鹿児島で発生

2007年9月には英国で6頭の肉用牛が死亡2011年1月には米国で300頭規模の中毒

石井沢彦ら (2012) 腐敗甘薯中毒事例におけるサツマイモからのイポメアモロンを検出. 日獣会誌. 65, 355-359.
中村誠ら (2020) 黒毛和種繁殖牛で発生した傷害サツマイモ中毒. 日獣会誌. 73, 253-258.

ドングリ中毒

- ブナ科コナラ属植物 *Quercus spp.* (ミズナラ、カシワなど)の種実
- タンニン (ポリフェノール) を多く含む
- タンニン酸 (高分子)、ピロガロール (低分子) などが考えられるが、毒性物質単体は特定されていない
- 総ポリフェノールとして約5%以上のものを大量に食べると危険
- 2014年北海道
下牧寸前で牧草が乏しい牧場で大風の吹いた後、放牧されていた黒毛和牛が食欲不振、元気消失、血便を呈して死亡する例が続発。
BUNの上昇を認めた腎臓 (特徴的)、消化管、筋肉、皮下、その他臓器漿膜に出血。
胃内容物は特に第四胃で血様
- 少しずつ摂取すれば馴化する

子牛の銅中毒

- 銅は必須微量元素であり、酵素の構成成分や補酵素などとして抗酸化や免疫など多くの生理活性を発揮するが、子牛では安全域が狭く、育成牛や成牛の配合飼料を誤って与えることで発症することもある
- 過剰量の銅は血中でセルロプラスミンなどに結合しない遊離イオンは、ラジカルとして働く
 - 肝障害、溶血、黄疸、血色素尿
- 子牛に吸収のよいペプチド銅を含む添加剤など複数与えた例
- 肺炎などが遷延し、全身状態が悪く肝障害がすでにあつて銅の処理ができず、銅が蓄積する例

松尾加代子ら (2020) 離乳期に散発した黒毛和種子牛の銅中毒. 日獣会誌. 73, 305-309.

豚の亜鉛中毒

- 亜鉛はDNAポリメラーゼ、RNAポリメラーゼ、アルコール脱水素酵素、炭酸脱水酵素、アルカリフォスファターゼなど多くの酵素の構成成分である必須微量元素
- 豚では飼料中の要求量が出生時の100 mg/kg DMから出荷時の40 mg/kg DMまでに対し中毒水準が2000 - 4000 mg/kg DMと耐容性が高く、安全性は高い
- 一般に添加剤は硫酸亜鉛やペプチド亜鉛
- 豚の浮腫病対策として離乳直後に短期的に多量 (2000 mg/kg DM) の酸化亜鉛を給与する例がある
- この給与を漫然と続け、またさらに高用量を給与したために膵臓萎縮、成長阻害が起こった例がある

Komatsu, et al. (2020) Chronic pancreatitis farmed pigs fed excessive zinc oxide. J. Vet. Diag. Invest. Doi:10.1177/1040638720944368
小松徹也ら (2020) 豚の亜鉛中毒の病態と診断—愛知県における中毒事例の紹介— 豚病会報 76, 24-31

新しい評価手法の開発

- 動物給与試験の手法の改良
 - 遺伝子組み換え飼料の給与
 - ダイオキシン類、PFASsなどPOPsの給与
 - 墨黒穂病菌、罹病玄米の給与
- 動物試験代替法としての家畜肝細胞由来細胞の利用
 - 肝実質細胞の初代培養
 - 肝由来細胞の不死化

動物給与試験の手法の改良

- 最初期の毒性試験では、毒性の出現する量まで被験物質を給与していた

急性毒性試験では、現在では2g/kg体重以上では急性毒性なしとして被験物質の給与量には上限がある

毒性試験の結果、サッカリンは雄ラットに膀胱癌を誘発すると言われたが、のちに異常な高用量の給与により膀胱内で析出が起こり（雄では尿量が少なく顕著）、物理的刺激によって腫瘍が発現していたことが明らかになった。

飼料原料の有害物質汚染などではそれだけを給与すると栄養成分の欠乏、過剰による問題も起こる



食品、飼料としてどの程度の量まで摂取することがありうるのか考える必要がある

動物実験代替法としての家畜肝臓由来細胞の利用

毒性評価手法

- 動物実験
- 初代培養細胞による実験
- 株化細胞による実験

生体内の事象を反映しているか

費用対効果

操作、解析が容易か

アニマルウェルフェア

動物実験代替法

- 初代培養細胞は特異機能を維持しており、1頭からの細胞で多くの結果が得られるが、一度に1頭の犠牲が必要
- 株化細胞では樹立後の犠牲はないが、不死亡により機能性を減弱していることが多い。継代により性質が変化することもある
- なるべく機能を維持した株化細胞を用い、共培養などの手法でさらに底上げを図る

- Yamanaka, N. et al. (1997) Serum-free culture of adult chicken hepatocytes; morphological and biochemical characterization. Res. Vet. Sci. 62, 233-237.
- Hasagawa, J. et al. (2007) Determination of PCDD/Fs and dioxin-like PCBs in fish oils for feed ingredients by congener-specific chemical analysis and CALUX bioassay. Chemosphere. 69, 1188-1194.
- Guruge, KS et al. (2009) Differential induction of cytochrome P450 1A1 and 1B1 mRNA in primary cultured bovine hepatocytes treated with TCDD, PBDD/Fs and feed ingredients. Toxicol. lett. 185, 193-196
- Kitani, H. et al. (2010) A novel isolation method for macrophage-like cells from mixed primary cultures of adult rat liver cells. J. Immunol. Method. 360,47-55
- Takeuchi, T. et al. (2010) Reversible conversion of epithelial and mesenchymal phenotypes in SV40 large T antigen-immortalized rat liver cell lines. Cell Biol. Int. 17(1):1-7.
- Yohshioka, M. et al. (2016) Establishment of SV40 large T antigen-immortalized bovine liver sinusoidal cell lines and their immunological responses to deoxynivalenol and lipopolysaccharide. Cell Biology Int. 40,1372-1379
- Yohshioka, M. et al. (2020) Synergistic induction of drug-metabolizing enzymes in co-cultures of bovine hepatocytic and sinusoidal cell lines. In Vitro Cellular & Developmental Biology – Animal. 56, 2-9.