

## イネ墨黒穂病罹病もみの生体影響評価

山中典子<sup>1)\*</sup>, 生澤充隆<sup>1)</sup>, 谷村信彦<sup>1)</sup>, 荒井治喜<sup>2)</sup>, 芦澤武人<sup>2)</sup>, 石川浩司<sup>3)</sup>

(平成 25 年 8 月 5 日 受付)

### Risk Assessment of Rice Grain Infected with Kernel Smut of Rice

Noriko YAMANAKA<sup>1)\*</sup>, Mitsutaka IKEZAWA<sup>1)</sup>, Nobuhiko TANIMURA<sup>1)</sup>, Yoshiki ARAI<sup>2)</sup>,  
Taketo ASHIZAWA<sup>2)</sup> & Kouji ISHIKAWA<sup>3)</sup>

イネ墨黒穂病は、イネの病害として長く知られてきたが、罹病した植物による生体影響についてはこれまでほとんど情報がなかった。そこで、イネ墨黒穂病の罹病もみを 28 日間にわたって雌雄の ICR マウスに給与し、生体に与える影響を検討した。

28 日間の給与中、飼料摂取量と体重の推移を記録し、給与終了後マウスを解剖し、臓器重量、血液生化学的性状、病理組織学的変化について解析した。また、28 日間の投与では明らかにならない長期的な影響の有無を推定するため、マウス肝臓の遺伝子発現の変動を、マウスゲノムに対する DNA チップを用いて網羅的に解析した。

これらの解析結果を総合すると、罹病もみの投与による長期的な生体影響はごく小さいものと考えられた。

イネ墨黒穂病は、糸状菌の一種である *Neovossia horida* (Takahashi) Padwick & Kahn によるイネの病害<sup>2)</sup>で、出穂後のもみに発生する。典型的な罹病もみでは、内外穎の合わせ目から黒色の舌状突起物が飛び出し、黒粉状の厚壁胞子が飛散してもみの表面を汚すとともに、周辺の健全もみも汚染してしまう。また、内部が胞子に満たされていても裂開することなく、外観的に識別困難な被

害もみもある。さらに、罹病もみが降雨に遭遇すると黒い胞子が流れ出して墨汁のように見えることから墨黒穂病の名がある。本病は国内に広く分布しており、しばしば局地的に多発生して問題となっている。罹病もみが混入すると脱穀調製時に玄米を汚損し等級低下につながることから、経済的被害が著しい。この病害自体は古くから知られてきたが、罹病したもみによる生体影響についてはこれまでほとんど調べられてこなかった。

墨黒穂病に罹病したイネでは、脱穀、風選の過程で罹病もみの多くが選別、廃棄される。また、もみすり調製過程まで混入してしまい、厚壁胞子の付着による汚損粒が発生した場合には、米穀検査により発見されることから、人に対する直接的な安全性という点ではそれほど危惧の対象にはならない。しかし、飼料としては、家きんに対してもみのまま飼料米として用いられる場合、乳・肉牛に対してホールクロップサイレージや飼料稲圃場への放牧により全草として給餌された場合には罹病部位を摂取してしまう可能性があり、動物に対する毒性について検討する必要がある。また、家畜に対する毒性が検出されれば、畜産物を介して人への安全性の懸念ともなる。本病と同様に、飼料イネや飼料米利用の際に問題となる

- 1) 農研機構 動物衛生研究所 病態研究領域  
〒 305-0856 茨城県つくば市観音台 3-1-5
- 2) 農研機構 中央農業総合研究センター  
〒 305-0856 茨城県つくば市観音台 3-1-1
- 3) 新潟県農業総合研究所  
〒 940-0826 新潟県長岡市長倉町 857

- 1) Pathology and Pathophysiology Research Division, National Institute of Animal Health, NARO
- 2) NARO Agricultural Research Center
- 3) Niigata Agricultural Research Institute

\* Corresponding author: Noriko YAMANAKA,  
Pathology and Pathophysiology Research Division, National  
Institute of Animal Health, NARO, JAPAN  
3-1-5, Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305-0856, JAPAN  
Tel: 029-838-7823  
Fax: 029-838-7825  
E-mail: yamamaya@affrc.go.jp

イネ稲こうじ病については、罹病した植物の給与対象動物である牛および鶏に対する給与試験を行い、安全性が調べられている<sup>5) 3)</sup>が、イネ墨黒穂病に関しては毒性の有無を含め、一切の情報がないのが現状である。

そこで我々は、イネ墨黒穂病菌および罹病もみをマウスに給与することで、生体影響を検討することとした。

墨黒穂病では、罹病程度が重度であっても、穂に占める罹病もみの割合は1%内外と比較的少なく、菌および宿主植物の産生する物質などの中に有害な物質があったとしても、罹病植物の動物への単回給与ではその急性の影響を発見することは難しい。そこでまず予備的に、重度の罹病イネから得られた厚壁胞子と、液体培養により得られる菌体を含む培養液を単回給与し、有害事象を見出すことを試みた。

さらに、罹病イネを摂取し続けた場合の影響を調べるために、罹病もみを28日間にわたって雌雄のマウスに給与し、生体に与える影響を検討した。また、より長期的な影響の有無を推定するため、肝臓組織について網羅的遺伝子発現解析を行った。病原菌の寄生した植物によって健康被害が起こるとすれば、菌体および胞子の成分だけでなく、寄生された植物体が生産するファイトアレキシン等による可能性も考えられるので、給与試験では罹病もみ自体を給与することとした。

## 材料および方法

### 動物

SPFの5週齢の雌雄のICRマウス（日本クレア）を1週間の馴致飼育の後、一群6頭の4群に分け、給与試験に供した。採材に際しては、ペントバルビタールナトリウムを腹腔内投与して深麻酔下で全採血により致死させ、試料を採取した。動物実験は動物衛生研究所実験動物計画に従って行った。

### 墨黒穂病菌厚壁胞子および培養菌液の単回給与（動物衛生研究所実験動物計画 No.10-049）

厚壁胞子については、一晚絶食の後、0.5%のメチルセルロースを含む精製水で0.1 g/mlとした厚壁胞子溶液を体重10 gあたり100  $\mu$ lとなるよう経口ゾンデを用いて単回給与した。対照群には同用量の0.5%メチルセルロース溶液を投与した。

培養菌液については、ポテトデキストロース培地を用いて *N. horida* (Tb-11株) を液体培養し、十分に増殖した時点で菌体ごとホモジナイズし、同じく絶食後の動物に体重10 gあたり100  $\mu$ lとなるよう経口ゾンデを用いて

単回給与した。対照群には同用量のポテトデキストロース培地を投与した。

いずれも1週間の経過観察の後、血液および主要臓器を採取し、臓器重量、血液生化学的検索、病理組織学的検索を行った。

血液生化学的検索では、抗凝固剤としてヘパリンナトリウムを用いて採取した血清について、血液自動分析装置7020（日立ハイテクノロジー）を用いて表4に示す項目を測定した。結果については雌雄それぞれの投与群と対照群についてStudentのt-検定を行った。一部等分散でないものについてはMann-Whitney検定を行った。

病理組織学的検索では、採材した臓器を10%中性リン酸緩衝ホルマリンにて固定後、定法に従いパラフィン切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色後鏡検を実施した。

### 28日間反復給与試験（動物衛生研究所実験動物計画 No.11-070）

AIN93M精製飼料<sup>6)</sup>の飼料成分を参考に、飼料計算上これと同等の組成となり、かつ罹病もみを最大を含む粉末飼料を設計した（表1）。罹病もみは、新潟県農業総合センターにおいて平成23年に収穫されたもち米品種「わたぼうし」で、罹病もみ率が0.6%の多発生圃場産のものを用いた。対照としては、イネ墨黒穂病を含む病害や害虫等の防除が徹底された条件で栽培された同品種の収穫もみを用い、罹病もみ飼料と同様に設計した。また、罹病もみの玄米と対照の玄米について栄養成分分析を行い（表2）、罹病することにより米自体の栄養成分が大きく変化していないことを確認した。飼料成分分析および栄養成分分析は財団法人日本食品分析センターに依頼した。

表1. 給与飼料の組成

AIN93M	%	試験飼料	%
カゼイン	14.0	カゼイン	14.0
L-システイン	0.180	L-システイン	0.180
コーンスターチ	46.5692	コーンスターチ	2.0692
$\alpha$ 化コーンスターチ	15.5	ショ糖	10.0
ショ糖	10.0	大豆油	4.0
大豆油	4.0	AIN93M	3.5
セルロースパウダー	5.0	ミネラル混合	
AIN93M	3.5	AIN93M	1.0
ミネラル混合		ビタミン混合	
AIN93M	1.0	重酒石酸	0.25
ビタミン混合		コリン	
重酒石酸コリン	0.25	第三ブチルヒドロキノン	0.0008
第三ブチルヒドロキノン	0.0008	罹病もみ	65.0

表2. 罹病玄米および対照玄米の栄養成分

		g/100g	
分析試験項目		罹病玄米	対照玄米
栄養成分	水分	15.2	11.4
	蛋白質	6.7	6.5
	脂質	2.9	3.1
	灰分	1.4	1.4
	炭水化物	73.8	77.6
	エネルギー	352kcal	368kcal
アミノ酸組成	アルギニン	0.56	0.54
	リジン	0.27	0.27
	ヒスチジン	0.19	0.19
	フェニルアラニン	0.35	0.33
	チロシン	0.26	0.25
	ロイシン	0.52	0.50
	イソロイシン	0.25	0.24
	メチオニン	0.17	0.16
	バリン	0.37	0.36
	アラニン	0.37	0.36
	グリシン	0.33	0.32
	プロリン	0.31	0.30
	グルタミン酸	1.09	1.04
	セリン	0.33	0.32
	スレオニン	0.24	0.24
	アスパラギン酸	0.64	0.62
	トリプトファン	0.09	0.09
	シスチン	0.17	0.16

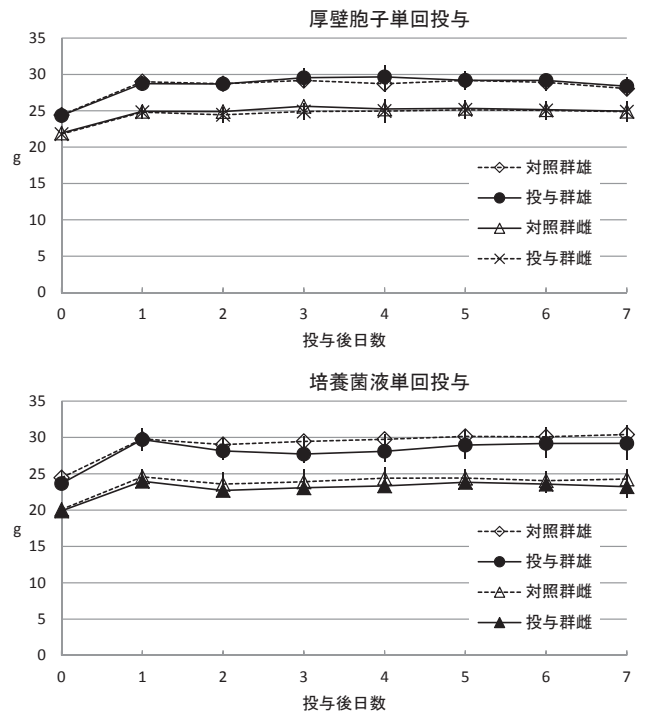


図1. 単回投与時の体重の推移

試験飼料を毎日給与し、残飼量を測定して摂取飼料量を算定した。週2回体重を測定した。28日間の給与後、ペントバルビタールナトリウム腹腔内投与による深麻酔下で全採血し、臓器重量を測定するとともに病理組織検索の材料を採取した。単回投与時と同様に血液生化学的、病理組織学的検索を行った。肝臓組織の網羅的遺伝子発現解析に供する mRNA を得るため、一部を液体窒素で急速冷凍して遺伝子抽出まで -80℃ で保存した。遺伝子自動抽出装置 QuickGene810 (富士フイルム株式会社) を用いて肝臓から mRNA を抽出し、マウスゲノムに対する DNA マイクロアレイ (Whole Mouse Genome 4x44K ver.2 アジレントテクノロジー株式会社) による網羅的遺伝子発現解析を行った。

結果

墨黒穂病菌厚壁孢子および培養菌液の単回投与

1週間の観察中、投与群と対照群との間で、体重の推移に有意な差はなかった(図1)。解剖時の臓器重量測定でもいずれの臓器も給与による変動はみられなかった(表3)。血液生化学的検索の結果として、孢子投与においてはいずれのパラメータにも有意な差はなかったが、菌液投与においては、中性脂肪濃度が投与群の雌において有意に低く、雄においてもこの項目は低い傾向がみられた(表4)。組織病理学的には、投与群において肝臓中のグリコーゲンの枯渇がみられた。

表3. 単回投与時の臓器重量

厚壁孢子投与	♂		♀	
	投与群	対照群	投与群	対照群
肝	1.51 ± 0.12	1.48 ± 0.09	1.11 ± 0.53	1.23 ± 0.09
腎(左)	0.22 ± 0.02	0.22 ± 0.02	0.14 ± 0.01	0.16 ± 0.02
腎(右)	0.23 ± 0.04	0.22 ± 0.02	0.15 ± 0.01	0.15 ± 0.01
脾	0.082 ± 0.013	0.086 ± 0.007	0.087 ± 0.012	0.084 ± 0.018
胸腺	0.0051 ± 0.0140	0.065 ± 0.005	0.091 ± 0.017	0.076 ± 0.011
肺	0.18 ± 0.02	0.20 ± 0.03	0.17 ± 0.02	0.16 ± 0.02
心	0.13 ± 0.01	0.12 ± 0.01	0.11 ± 0.01	0.11 ± 0.01
脳	0.46 ± 0.02	0.47 ± 0.02	0.43 ± 0.02	0.40 ± 0.04
精巣(左)	0.14 ± 0.03	0.13 ± 0.03		
精巣(右)	0.13 ± 0.02	0.13 ± 0.02		
子宮卵巣			0.24 ± 0.09	0.22 ± 0.07

培養菌液投与

培養菌液投与	♂		♀	
	投与群	対照群	投与群	対照群
肝	1.46 ± 0.20	1.60 ± 0.10	1.16 ± 0.16	1.24 ± 0.12
腎(左)	0.23 ± 0.03	0.25 ± 0.04	0.14 ± 0.02	0.14 ± 0.03
腎(右)	0.23 ± 0.03	0.28 ± 0.07	0.15 ± 0.02	0.16 ± 0.02
脾	0.071 ± 0.022	0.081 ± 0.026	0.083 ± 0.025	0.088 ± 0.025
胸腺	0.053 ± 0.011	0.057 ± 0.005	0.066 ± 0.008	0.082 ± 0.023
肺	0.17 ± 0.04	0.19 ± 0.03	0.16 ± 0.03	0.17 ± 0.04
心	0.12 ± 0.02	0.13 ± 0.004	0.1 ± 0.02	0.10 ± 0.02
脳	0.42 ± 0.02	0.41 ± 0.08	0.40 ± 0.02	0.40 ± 0.03
精巣(左)	0.11 ± 0.02	0.12 ± 0.03		
精巣(右)	0.12 ± 0.02	0.13 ± 0.03		
子宮卵巣			0.15 ± 0.06	0.21 ± 0.10

\* 値は臓器重量 g ± SD

表 4. 単回投与時の血液生化学的性状

		♂		♀	
		投与群	対照群	投与群	対照群
LDH	IU/l	361.2 ± 130.0	497.7 ± 264.3	721 ± 509.73	591.3 ± 249.1
AST(GOT)	IU/l	64.0 ± 17.3	92.3 ± 66.6	74.0 ± 20.3	136.8 ± 97.0
ALT(GPT)	IU/l	48.3 ± 16.71	69.8 ± 53.07	46.8 ± 11.58	91.5 ± 67.19
ALP	IU/l	362.7 ± 128.6	377.8 ± 132.5	380.0 ± 54.4	385.7 ± 41.8
CPK	IU/l	170.8 ± 53.6	292.0 ± 155.5	337.2 ± 241.8	258.5 ± 81.6
TP	g/dl	4.8 ± 0.1	4.8 ± 0.2	4.5 ± 0.3	4.8 ± 0.1
Alb	g/dl	3.3 ± 0.1	3.2 ± 0.2	3.3 ± 0.2	3.4 ± 0.1
BUN	mg/dl	28.1 ± 4.7	27.3 ± 2.9	26.6 ± 9.1	25.5 ± 4.3
Cre	mg/dl	0.12 ± 0.02	0.12 ± 0.02	0.13 ± 0.01	0.13 ± 0.03
T-Cho	mg/dl	125.2 ± 11.2	124 ± 16.9	81.2 ± 12.1	94.7 ± 20.0
TG	mg/dl	36.2 ± 20.3	52.5 ± 27.4	36.7 ± 22.3	40.0 ± 14.9
T-Bil	mg/dl	0.043 ± 0.042	0.048 ± 0.015	0.013 ± 0.023	0.015 ± 0.020
Glu	mg/dl	214.0 ± 45.4	219.7 ± 10.6	175.7 ± 36.7	235.5 ± 75.8
UA	mg/dl	1.3 ± 0.6	1.5 ± 0.6	2.1 ± 1.4	2.2 ± 1.2
Ca	mg/dl	9.2 ± 0.3	9.4 ± 0.3	9.3 ± 0.5	9.4 ± 0.3
IP	mg/dl	7.2 ± 0.9	7.5 ± 1.0	8.4 ± 1.4	7.5 ± 0.9
Mg	mg/dl	2.0 ± 0.2	2.0 ± 0.2	2.3 ± 0.3	2.4 ± 0.5

## 培養菌液投与

		♂		♀	
		投与群	対照群	投与群	対照群
LDH	IU/l	476.5 ± 483.6	290.7 ± 53.3	397.7 ± 85.8	298.5 ± 114.5
AST(GOT)	IU/l	186.5 ± 254.1	68.8 ± 35.7	92.2 ± 29.6	77.2 ± 26.8
ALT(GPT)	IU/l	71.7 ± 36.1	48.5 ± 25.8	58.5 ± 17.8	52.8 ± 21.7
ALP	IU/l	419.8 ± 118.3	414.7 ± 97.3	368.0 ± 128.5	411.3 ± 79.3
CPK	IU/l	1719.8 ± 3750.4	190.8 ± 47.5	256.7 ± 140.4	207.3 ± 56.7
TP	g/dl	4.8 ± 0.3	4.8 ± 0.3	4.7 ± 0.4	4.7 ± 0.3
Alb	g/dl	3.3 ± 0.3	3.2 ± 0.2	3.2 ± 0.2	3.2 ± 0.1
BUN	mg/dl	23.5 ± 3.9	26.9 ± 2.6	23.1 ± 4.3	22.4 ± 5.0
Cre	mg/dl	0.13 ± 0.03	0.13 ± 0.01	0.13 ± 0.01	0.12 ± 0.02
T-Cho	mg/dl	118.8 ± 15.1	129.7 ± 10.6	98.8 ± 32.6	97.2 ± 10.8
TG	mg/dl	30.7 ± 21.5	50.0 ± 29.2	27.0 ± 18.7 *	48.3 ± 10.1
T-Bil	mg/dl	0.098 ± 0.031	0.050 ± 0.015	0.030 ± 0.035	0.037 ± 0.001
Glu	mg/dl	235.2 ± 31.7	233.7 ± 12.7	207.7 ± 44.2	229.7 ± 44.0
UA	mg/dl	1.8 ± 1.0	1.2 ± 0.4	1.5 ± 0.7	1.6 ± 0.5
Ca	mg/dl	9.9 ± 0.4	9.9 ± 0.4	9.7 ± 0.4	9.6 ± 0.5
IP	mg/dl	10.0 ± 3.9	8.5 ± 0.8	8.7 ± 1.5	8.8 ± 0.9
Mg	mg/dl	2.4 ± 0.6	2.2 ± 0.1	2.4 ± 0.2	2.3 ± 0.3

\* p &lt; 0.05

## 28 日間反復投与試験

雌では投与後期に投与群で摂餌量が多くなったが、体重に有意な差はなかった。雄ではいずれも差がなかった(図2)。

臓器重量は雌雄とも差がなかった(表5)。血液生化学的検索でも有意な差はなく、また生化学的に異常な値はみられなかった(表6)。病理組織学的検索では、いくつかの組織で細胞浸潤などの軽微な変化がみられたが、変化の程度をスコア化した結果、投与群と対照群に差はみられなかった(表7)。

図3に肝臓の遺伝子発現を網羅的に解析したスクアッタープロット解析像を示した。雌では57個、雄では46個の遺伝子で2倍以上、雌で66個、雄では35個の遺伝子で2分の1以下の発現差が観察されたが、細胞周期、代謝や免疫などに関連して、共通して変動している遺伝子のグループは観察されなかった。

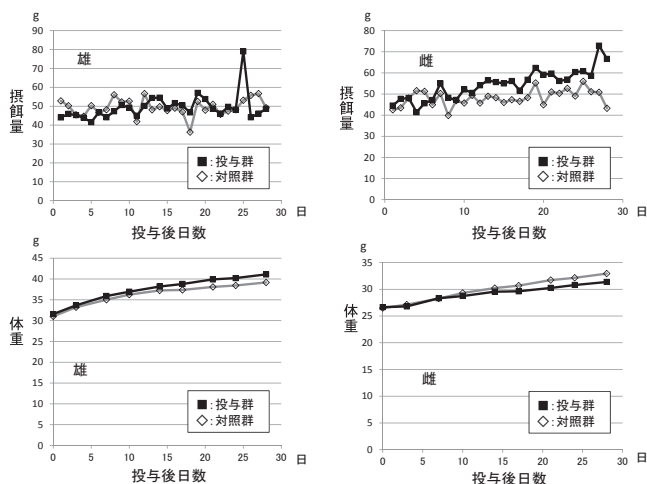


図 2. 摂餌量と体重の変化

表 5. 反復投与時の臓器重量

	♂		♀	
	投与群	対照群	投与群	対照群
肝臓	1.93 ± 0.17	1.96 ± 0.28	1.26 ± 0.14	1.46 ± 0.24
腎臓				
左	0.31 ± 0.02	0.32 ± 0.03	0.19 ± 0.02	0.20 ± 0.03
右	0.33 ± 0.03	0.35 ± 0.04	0.22 ± 0.03	0.20 ± 0.03
脾臓	0.12 ± 0.02	0.14 ± 0.08	0.13 ± 0.05	0.13 ± 0.05
胸腺	0.064 ± 0.010	0.068 ± 0.010	0.093 ± 0.021	0.086 ± 0.013
肺	0.23 ± 0.02	0.22 ± 0.01	0.20 ± 0.03	0.21 ± 0.01
心臓	0.21 ± 0.01	0.19 ± 0.01	0.16 ± 0.02	0.15 ± 0.01
脳	0.46 ± 0.03	0.47 ± 0.02	0.45 ± 0.04	0.47 ± 0.01
精巣				
左	0.15 ± 0.01	0.15 ± 0.02		
右	0.16 ± 0.02	0.14 ± 0.02		
卵巣-子宮			0.17 ± 0.05	0.20 ± 0.06
大腿骨	0.13 ± 0.03	0.15 ± 0.03	0.12 ± 0.01	0.13 ± 0.04
腓腹筋	0.20 ± 0.01	0.19 ± 0.02	0.15 ± 0.02	0.14 ± 0.01

値は平均値 g ± SD

表 6. 反復投与時の血液生化学的所見

		投与♂		対照♂		投与♀		対照♀	
		投与群	対照群	投与群	対照群	投与群	対照群	投与群	対照群
LDH	IU/l	198.6 ± 47.9	188.8 ± 49.9	205 ± 57.7	179.6 ± 17.7				
AST(GOT)	IU/l	87.2 ± 36.8	71.6 ± 21.3	82.6 ± 17.8	74.4 ± 14.1				
ALT(GPT)	IU/l	32.0 ± 13.9	21.6 ± 2.5	23.4 ± 7.3	19.4 ± 4.3				
ALP	IU/l	289.6 ± 68.7	259.0 ± 78.0	336.4 ± 38.6	300.2 ± 96.1				
CPK	IU/l	52.8 ± 17.6	57.6 ± 8.7	42.8 ± 9.8	41.8 ± 15.6				
TP	g/dl	5.24 ± 0.27	4.94 ± 0.17	4.90 ± 0.43	5.14 ± 0.05				
Alb	g/dl	3.19 ± 0.17	3.02 ± 0.06	3.46 ± 0.3	3.56 ± 0.04				
Globulin	g/dl	2.05 ± 0.18	1.92 ± 0.21	1.44 ± 0.19	1.58 ± 0.09				
A/G		1.56 ± 0.16	1.59 ± 0.19	2.43 ± 0.26	2.26 ± 0.15				
BUN	mg/dl	22.5 ± 6.1	27.3 ± 4.5	19.0 ± 5.1	20.2 ± 1.3				
Cre	mg/dl	0.17 ± 0.04	0.12 ± 0.02	0.14 ± 0.02	0.13 ± 0.01				
T-Cho	mg/dl	185.4 ± 44.8	166.0 ± 16.1	102.2 ± 15.4	113.4 ± 9.0				
TG	mg/dl	93.2 ± 28.1	73.2 ± 32.3	40.6 ± 21.8	70.8 ± 35.9				
T-Bil	mg/dl	0.238 ± 0.044	0.210 ± 0.048	0.164 ± 0.030	0.142 ± 0.052				
Glu	mg/dl	298.6 ± 31.2	281.8 ± 23.2	278.6 ± 40.0	244.0 ± 27.8				
UA	mg/dl	0.98 ± 0.30	1.04 ± 0.13	1.66 ± 0.43	1.34 ± 0.17				
Ca	mg/dl	8.48 ± 0.28	8.50 ± 0.35	8.30 ± 0.32	8.64 ± 0.25				
IP	mg/dl	6.42 ± 1.21	7.24 ± 1.07	6.14 ± 0.54	6.58 ± 0.90				
Mg	mg/dl	1.86 ± 0.31	1.82 ± 0.18	1.80 ± 0.19	1.86 ± 0.15				

表 7. 病理組織学的所見

臓器・組織	組織所見	性別 試験群 供試動物数 病変スコア	雄										雌														
			投与群					対照群					投与群					対照群									
			5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5										
心臓	…		5	0	0	0	0	5	0	0	0	0	5	0	0	0	0	5	0	0	0	0	5	0	0	0	0
肺	気管支周囲リンパ組織		5	0	0	0	0	3	2	0	0	0	5	0	0	0	0	3	2	0	0	0	5	0	0	0	0
	細胞浸潤, 血管周囲性		5	0	0	0	0	5	0	0	0	0	5	0	0	0	0	4	0	1	0	0	5	0	0	0	0
肝臓	肝細胞グリコーゲン蓄積		2	2	1	0	0	3	2	0	0	0	1	3	1	0	0	1	2	2	0	0	5	0	0	0	0
	髓外造血亢進		4	1	0	0	0	5	0	0	0	0	5	0	0	0	0	5	0	0	0	0	5	0	0	0	0
	細胞質内小空胞, 小葉中心性		3	2	0	0	0	2	3	0	0	0	5	0	0	0	0	5	0	0	0	0	5	0	0	0	0
胆嚢	…		5	0	0	0	0	5	0	0	0	0	5	0	0	0	0	5	0	0	0	0	5	0	0	0	0
脾臓	リンパ濾胞の発達		3	2	0	0	0	5	0	0	0	0	4	1	0	0	0	5	0	0	0	0	5	0	0	0	0
	髓外造血		5	0	0	0	0	4	1	0	0	0	5	0	0	0	0	4	1	0	0	0	5	0	0	0	0
腎臓	好塩基性尿細管, 限局性		4	1	0	0	0	5	0	0	0	0	5	0	0	0	0	5	0	0	0	0	5	0	0	0	0
	細胞浸潤, 限局性		2	3	0	0	0	3	2	0	0	0	3	2	0	0	0	3	2	0	0	0	3	2	0	0	0
	間質線維化, 限局性		4	1	0	0	0	5	0	0	0	0	5	0	0	0	0	5	0	0	0	0	5	0	0	0	0
胸腺	…		5	0	0	0	0	5	0	0	0	0	5	0	0	0	0	5	0	0	0	0	5	0	0	0	0
胃(食道部)	…		5	0	0	0	0	5	0	0	0	0	5	0	0	0	0	5	0	0	0	0	5	0	0	0	0
胃(無腺部)	細胞浸潤, 限局性		5	0	0	0	0	5	0	0	0	0	5	0	0	0	0	4	1	0	0	0	5	0	0	0	0
十二指腸	…		5	0	0	0	0	5	0	0	0	0	5	0	0	0	0	5	0	0	0	0	5	0	0	0	0
空腸	…		5	0	0	0	0	5	0	0	0	0	5	0	0	0	0	5	0	0	0	0	5	0	0	0	0
回腸	…		5	0	0	0	0	5	0	0	0	0	5	0	0	0	0	5	0	0	0	0	5	0	0	0	0
盲腸	…		5	0	0	0	0	5	0	0	0	0	5	0	0	0	0	5	0	0	0	0	5	0	0	0	0
結腸	…		5	0	0	0	0	5	0	0	0	0	5	0	0	0	0	5	0	0	0	0	5	0	0	0	0
精巣	…		5	0	0	0	0	5	0	0	0	0															
卵巣	…												5	0	0	0	0	5	0	0	0	0	5	0	0	0	0
子宮	…												5	0	0	0	0	5	0	0	0	0	5	0	0	0	0
大脳	…		5	0	0	0	0	5	0	0	0	0	5	0	0	0	0	5	0	0	0	0	5	0	0	0	0
小脳	…		5	0	0	0	0	5	0	0	0	0	5	0	0	0	0	5	0	0	0	0	5	0	0	0	0
脳幹部	…		5	0	0	0	0	5	0	0	0	0	5	0	0	0	0	5	0	0	0	0	5	0	0	0	0
腓腹筋	筋変性, 限局性		5	0	0	0	0	5	0	0	0	0	4	1	0	0	0	5	0	0	0	0	5	0	0	0	0
	細胞浸潤, 限局性		5	0	0	0	0	5	0	0	0	0	4	1	0	0	0	5	0	0	0	0	5	0	0	0	0
大腿骨骨髓	…		5	0	0	0	0	5	0	0	0	0	5	0	0	0	0	5	0	0	0	0	5	0	0	0	0

病変スコア 0: なし, 1: 極軽度, 2: 軽度, 3: 中等度, 4: 重度 …: 著変なし

雄

雌

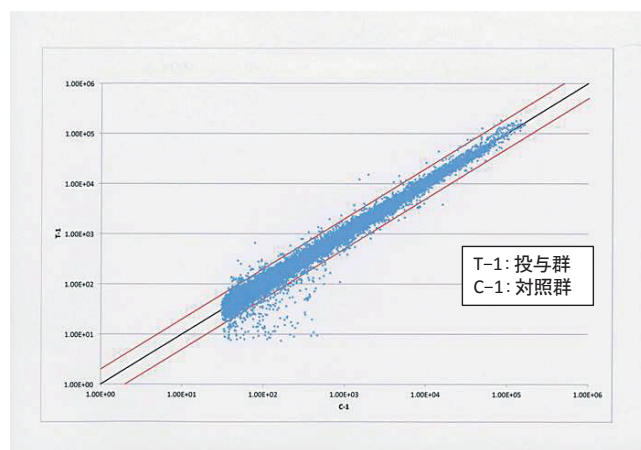
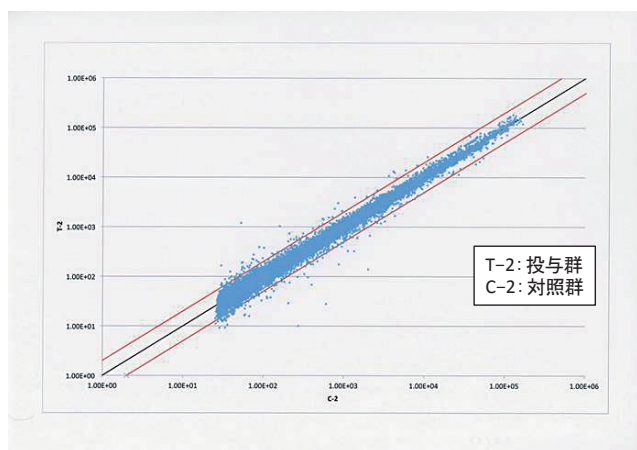


図 3. 肝臓の遺伝子発現のスキッタープロット解析

## 考 察

イネ墨黒穂病に罹病した植物については、経験的に人や家畜に対する影響はないと考えられているが、科学的な検証はされていない。同様に古くからの病害であるイネ稲こうじ病については、ウスチロキシンという毒性物質が報告されており、この物質の濃度を参考として設計した飼料を用いて牛や鶏に対する給与試験が行われている<sup>5) 3)</sup>。イネ墨黒穂病については、特段の有害成分の報告もなく、反復給与試験における飼料の量的設計が難しい。ここでは、遺伝子組換え飼料の動物に対する影響の検討<sup>1)</sup>や昆虫に対する防除効果を持ったリョクトウのほ乳類に対する安全性の検討<sup>4)</sup>の場合のような、有害影響があるとしても全く予想がつかない例に倣い、栄養学的に試験用精製飼料 AIN93M と同等で、被験物質を最大限に含む飼料を設計した。AIN93M は米国国立栄養研究所が設計した、成分の変動する天然穀物等を原料とせず、成分が明確に規定されている飼料である<sup>6)</sup>。

イネ墨黒穂病では、穂に占める罹病もみの割合が比較的少なく、急性影響を引き起こす要因が罹病植物に含まれるとしても、単回給与での発見は難しい。そこで予備的に、多発生圃場産のもみから集めた厚壁孢子と、液体培養により得られる菌体を単回給与することにより、有害事象を見い出すことを試みた。一般的な急性毒性の確認のためではなく、極端な多量摂取であっても有害事象が確認されれば、慢性影響を検討する際の検討項目の目安とすることができると考えたためである。

孢子については、精製水中に分散してもすぐに分離、沈降してしまうため、メチルセルロース水溶液に懸濁することにより定量的に給与を行った。また、今回の実験において孢子の給与量は体重 kg あたり 1 g に相当し、この用量で急性毒性作用が認められなかったことから、用量依存性検証のための 3 用量試験は必要でない。

培養菌液については、培養液自体はジャガイモ煎汁とショ糖からなるポテトデキストロース培地であり、毒性はないと考えられるが、菌体の他に、菌が培地中に生理活性のある物質を分泌している可能性を考え、培地と菌体をホモジナイズしたものを給与した。

厚壁孢子および培養液を単回給与した結果、マウスに対して急性の有害事象は観察されなかった。培養菌液を給与された動物に観察された中性脂肪の低下や肝臓中グリコーゲン貯蔵量の低下は、におい、味などが通常の飼料と全く異なるものを強制給与されたストレスによる食欲低下によるものと考えられる。ただし、食欲低下は対照群でも観察され、その影響は体重や臓器重量に差が出

るほど重度なものではなかった。

長期にわたり飼料として給与する際、罹病によって栄養成分が大きく増減していれば、栄養障害による有害影響が現れる可能性があるため、試験に先立って、罹病もみの栄養成分を解析し、同時に飼料設計のために飼料成分も定量した。もみ全体を粉末にして飼料原料としたのは、玄米、精米を原料とする場合、孢子が充満したもみを脱穀すると、孢子は散逸して飼料中に残らなくなるためと、飼料としてイネが用いられる際、もみごと給与される可能性があるためである。この結果を元に、これを最大量摂取しうる飼料を設計した。最終的に罹病もみを 65% 含む飼料を作製することとなり、野外で家畜が給与される可能性のある量として十分なものと考えられた。

28 日間の給与によって、臓器重量、血液生化学的性状、病理組織学的性状について、対照群と給与群の間に有意な差はなかった。また、肝臓の遺伝子発現を網羅的に検索した結果、発現量が 2 倍以上または 2 分の 1 以下になっている遺伝子は、雄、雌とも 50 前後と非常に少なく、ほとんどは低発現領域での差であり、わずかの変動で 2 倍以上の差となったものと考えられた。また細胞周期、薬物代謝、免疫など、特定の生体作用を制御する複数の遺伝子がアップレギュレーションまたはダウンレギュレーションされているというような事象は観察されなかった。これらのことから、さらに長期の給与が続いたとしても、大きな影響が現れる可能性は少ないと考えられた。

これらの解析結果を総合すると、罹病もみの給与による生体影響は長期的にもごく小さいものと考えられ、これまで家畜や人の健康被害報告がないという事実と合致する結果となった。

## 謝 辞

本研究は独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構による平成 22 年度交付金プロジェクト「イネの穂に発生するかび毒産生病原菌の発生抑制技術の開発」および後継交付金課題として実施した。

動物実験の遂行にあたり、動物の飼育管理および採材にあたって多大の助力をいただいた鳥根県食料安全推進課病性鑑定室松尾治彦氏、茨城県県北家畜保健衛生所矢口裕司氏、佐賀県中部家畜保健衛生所松尾研太氏、株式会社アニマルケア田口葉子氏および沢畑景一氏に深謝する。

## 引用文献

- 1) Chowdhury, E.H., Shimada, N., Murata, H., et al.: Detection of Cry1Ab protein in gastrointestinal contents but not visceral organs of genetically modified Bt11-fed calves. *Vet. Hum. Toxicol.* 45, 72-75 (2003).
- 2) 兼平 勉, 土佐佳史, 篠原正行: イネ墨黒穂病とその病原菌. *植物防疫.* 42, 9-12 (1988).
- 3) 久保博文, 蓮沼哉俊, 草別行夫, 他: 稲こうじ病罹病穂の給与による採卵鶏への影響. *富山県農林水産総合研究センター畜産研究所研究報告.* 3, 31-35 (2013).
- 4) Miura, K., Ishimoto, M., Yamanaka, N., et al.: Effects of bruchid-resistant mungbean meal on growth and blood-biochemical values in mice. *JIRCAS J.* 3, 23-31 (1996).
- 5) 森本和秀, 吉村知子, 新出昭吾, 他: 稲こうじ病罹病もみの給与が乳用種育成雌牛の生育に及ぼす影響. *関西畜産学会報.* 166, 19-25 (2010).
- 6) Reeves, P.G., Nielsen, F.H. & Fahey Jr., G.: AIN-93 purified diets for laboratory rodents: Final report of the American Institute of Nutrition Adhoc Writing Committee on reformulation of the AIN-76A rodents diet. *J. Nutr.* 123, 1939-1951 (1993).

## Summary

**Risk Assessment of Rice Grain Infected with Kernel Smut of Rice**

Noriko YAMANAKA <sup>1)\*</sup>, Mitsutaka IKEZAWA <sup>1)</sup>, Nobuhiko TANIMURA <sup>1)</sup>, Yoshiaki ARAI <sup>2)</sup>,  
Taketo ASHIZAWA <sup>2)</sup> & Kouji ISHIKAWA <sup>3)</sup>

There are few information of biological effect by plants infected with kernel smut of rice, although it has been realized as one of important rice crop disease for long time.

Effect of rice grain infected with kernel smut of rice was evaluated on 28-days repeated administered ICR mice. No significant difference was observed in body gain between administered group and control group. Tissue weights, blood biochemical and histopathological observation revealed there were no adverse effect caused by the infected grain feeding. DNA array analysis of liver gene expression showed little expression change. Our results suggest that the effect of rice grain infected with kernel smut of rice was very small.

KEY WORDS: Kernel smut of rice, mouse, repeated administration, DNA microarray analysis