

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008 ~ 2010

課題番号：20580355

研究課題名(和文) 飼養環境下の牛群におけるゼアラレノン浸潤動態の解明 -特に繁殖性との関連性の検証

研究課題名(英文) Monitoring of natural zearalenone contamination in feeds of cattle herds, with special focus on the effect on reproductive efficacy.

研究代表者

高木 光博 (TAKAGI MITSUHIRO)

鹿児島大学・農学部・准教授

研究者番号：40271746

研究成果の概要(和文)：

ゼアラレノン(ZEN)は *Fusarium* 属真菌により産生されるエストロゲン類似作用を持つマイコトキシン(MT)の1種であり、ZENに汚染された飼料を家畜が摂取すると、消化管から吸収されて一部が代謝された後、その代謝物とともに尿中に排出される。これまでに、尿中ZEN濃度をモニターすることで、牛群における給与飼料からのZEN摂取状況の把握が可能となり、ウシ生産現場における比較的簡易な日常のモニタリング法として有用であることを初めて実証するとともに、肥育牛群で特に高い尿中ZEN濃度を示す群が存在したことから、生産現場においては、今後飼料中MT濃度を含めた継続的なMTのモニタリングが必要であることを報告した。また、尿中ZEN濃度をモニターすることで、飼料へのMT吸着剤添加効果の客観的評価が可能となること、およびMT吸着剤の添加方法がその効果に影響を与える可能性を示唆した。さらに、ウシおよびブタ卵胞液からZENおよびその代謝物を検出し、経口摂取後腸管から吸収されたZENが血流を介して卵胞液中へ侵入することを初めて確認し、卵胞発育や卵子成熟への影響も起こりうる可能性を示した。また血中エストロゲン濃度と同等レベルのZENを含む卵胞液サンプルも存在したことから、内分泌攪乱物質として繁殖性に影響を与える可能性も示唆した。

研究成果の概要(英文)：

The aims of the first study were (1) to investigate the efficacy of measuring bovine urinary zearalenone (ZEN) concentrations by using a commercially available ELISA method in cattle kept under different feeding conditions to monitor the natural contamination of feeds at the farm level, and (2) to investigate the effects of supplementation of a mycotoxin adsorbent (MA) product in the feed based on urinary ZEN concentration. The findings indicate the usefulness of measuring concentrations of urinary ZEN and its metabolites not only for monitoring the natural ZEN contamination of cattle feed at the farm level but also for *in vivo* evaluation of MA function after supplementing feeds with MA.

Zearalenone (ZEN) and its metabolites are important nonsteroidal estrogenic mycotoxins that cause reproductive disorders in domestic animals, especially pigs. The aim of the second study were to simultaneously detect ZEN and its metabolites  $\alpha$ -zearalenol ( $\alpha$ -ZOL) and  $\beta$ -zearalenol ( $\beta$ -ZOL) in porcine follicular fluid (FF) by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. ZEN and  $\alpha$ -ZOL, but not  $\beta$ -ZOL, were detected in all pooled FF samples collected from coexisting follicles (diameter  $\geq 6$  mm) within 10 ovaries. Furthermore, ZEN and  $\alpha$ -ZOL were detected in samples pretreated with  $\beta$ -glucuronidase/arylsulfatase, but not in those left untreated, suggesting that the FF samples contained glucuronide-conjugated forms of the mycotoxins that may be less harmful to porcine oocytes due to glucuronidation affecting the receptor binding. Nonetheless, the effects of the glucuronide-conjugated forms should be studied, both *in vitro* and *in vivo*. Additionally, the influence of acute exposure to zearalenone (ZEN) on porcine oocyte maturation, fertilization, or sperm penetration ability during both *in vitro* maturation and fertilization was evaluated. First, oocytes were cultured in ZEN-containing (0–1000  $\mu$ g/l) maturation medium and then fertilized. Second, oocytes maturing *in vitro* without ZEN were fertilized in ZEN-containing fertilization medium. The maturation rates of oocytes and penetration

ability of sperm decreased significantly in the presence of 1000  $\mu\text{g/l}$  of ZEN. However, neither increases in the rates of degeneration and DNA fragmentation of oocytes nor reductions in normal and polyspermic fertilization were observed. ZEN did not affect the sperm penetration rates, however, 1000  $\mu\text{g/l}$  ZEN had positive effects on normal and polyspermic fertilization rates. Therefore, it can be suggested that an acute exposure of porcine oocytes during maturation, and oocytes and sperm during fertilization to ZEN up to 1000  $\mu\text{g/l}$  may not affect the fertility of the oocytes.

交付決定額

(金額単位：円)

|        | 直接経費      | 間接経費      | 合計        |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2006年度 |           |           |           |
| 2007年度 |           |           |           |
| 2008年度 | 2,000,000 | 600,000   | 2,600,000 |
| 2009年度 | 800,000   | 240,000   | 1,040,000 |
| 2010年度 | 900,000   | 270,000   | 1,170,000 |
| 総計     | 3,700,000 | 1,110,000 | 4,810,000 |

研究分野：産業動物獣医学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学 臨床獣医学

キーワード：ウシ、ブタ、マイコトキシン、ゼアラレノン、尿、卵胞液

1. 研究開始当初の背景

近年、乳肉生産現場においては、「食品の安全性」に対する消費者意識の高揚と「動物福祉」の観点から、環境衛生や飼養衛生を意識した取り組みが必須条件となっている。一般的に、家畜に給与されている貯蔵飼料中には真菌が常在し、貯蔵環境の変化等により繁殖条件が整えば、増殖した真菌によって産生されたマイコトキシン（真菌が産生する二次代謝産物で、ヒトを含む動物に対して強い毒性や発ガン性をもつ：MT）が飼料を汚染することが知られている。近年、MT 汚染飼料の摂取が疑われる家畜の食欲廃絶、突発性の下痢、疝痛や肝機能障害などの消化器疾患、あるいは繁殖障害等の中毒症状が我が国を含めて世界的に報告されている。我が国においては北海道内でサンプリングされたコーンサイレージの80%、グラスサイレージの43%からMTが検出されたという報告もある。家畜飼養環境下におけるMT浸潤動態のモニタリングは、家畜衛生面のみならず、最終生産物である食品としての乳肉衛生面からも極めて重要である。

申請者らは、これまでにウシ飼養環境下のMT浸潤動態をモニタリングする目的で、*Fusarium*属真菌由来MTで、尿中に排出され、エストロゲン類似作用を持つことから家畜に繁殖障害などを引き起こす可能性が示唆されているゼアラレノン（ZEN）に着目し、  
（1）簡便なMT浸潤動態モニタリング法の1つとして、ウシ尿中ZEN濃度測定の有用性、

（2）規定値以下ながら、ウシ飼養環境下における貯蔵飼料中ZENの自然汚染の存在、および（3）飼料へのMT吸着剤添加による尿中ZEN濃度低減効果、を確認して、飼養環境の違いがウシ尿中ZEN濃度に影響を与えるという新知見を報告している。さらに、ZENの繁殖性に与える影響に関しては、科学研究費補助金の交付を受けて、これまでにウシ卵子の体外培養系モデルを用いた成熟培養液中へのZEN添加実験を行い、卵子成熟能、および体外受精後の胚盤胞への発生能を検証した結果から、添加ZEN濃度依存的な成熟能（第二成熟分裂終了）の有意な低下が観察されるものの、体外受精後の胚盤胞への発生率には影響しないという極めて興味深い現象を初めて報告している。

2. 研究の目的

本申請では、これまでの申請者らの研究成果である、（1）我が国における貯蔵飼料給与下の牛群において、その給与飼料中および生体内ZEN汚染の存在が確認された事実、および（2）ウシ卵子体外成熟能に及ぼす濃度依存的なZEN添加の影響の2点をさらに詳細に検証するために、以下の2点を目的とする。

①家畜衛生および食品衛生学的見地から、異なる地域および飼養形態をとる牛群からの被検尿サンプル数をさらに増やしてデータベースを蓄積し、尿中ZEN濃度を指標とした家畜飼養環境下におけるMT浸潤動態モニタリングシステムの有用性

の検証を行う。

②内分泌かく乱物質としてのZENがウシ生殖機能に与える影響をさらに詳細に検証するために、ウシ卵子体外培養系モデルを用いた培養液中ZEN添加試験を発展的に継続するとともに、液体クロマトグラフ質量分析法(LC/MS/MS)を用いて卵胞液および胎盤組織中ZEN、およびその代謝物濃度の測定系を確立して、ウシ生殖器官へのZEN浸潤動態を明らかにする。

### 3. 研究の方法

(1) 尿中ZEN濃度を指標とした、異なる地域および飼養環境下の牛群におけるZEN浸潤動態に関するデータベース作成 — 飼料中ZEN汚染との関連性の検討

① ウシ尿中および飼料中ZEN濃度測定：

各地域の異なる飼養管理モデル牛群（放牧、品種、MT吸着剤投与の有無などにより区分した各5牛群以上）において尿、給与飼料および血液のサンプリングを行う。さらに、特定したモデル牛群においては、同一牛群の定期的なサンプリングを行い、尿中および飼料中ZEN濃度の季節性の有無を検証する。採取したサンプルは各項目測定時まで保存する。

尿サンプル：我々が既に報告しているELISA法により尿中ZEN濃度の測定を行い、区分した各牛群におけるZEN浸潤動態に関するデータベースの拡充をはかる。

飼料サンプル：各牛群における粗飼料および配合飼料をサンプルとして、乾燥、粉碎後にELISA法あるいは飼料分析基準に基づいたHPLC法による飼料中ZEN濃度の測定を行い、各モデル牛群における給与飼料中ZEN汚染動態の評価とデータベースの拡充をはかる。

血液サンプル：一般血液性状、血液生化学性状をモニターすることにより、客観的データに基づいた飼養管理状況の把握とデータベースの拡充をはかる

(2) 内分泌かく乱物質としてのZENがウシの繁殖性に与える影響の実験的検証

② ZENが卵子細胞質の成熟に与える影響：

ZENがウシ卵子成熟に与える影響をさらに詳細に検討するために、体外成熟培養法を用いて、卵子細胞質における成熟能の指標である卵子内グルタチオン(GSH)濃度の測定を行う。種々の濃度のZENを培養液に添加して卵子の体外培養を行い、培養終了後Cell Tracker (Molecular probe社) を10 $\mu$ M含む培養液中で30分追加培養し、洗浄後に蛍光顕微鏡にて

励起された輝度を測定する。各ZEN濃度群における輝度を客観的に比較して、ZEN添加が卵子細胞質成熟能に与える影響を明らかにする。

③ LC/MS/MS法による卵胞液中ZEN濃度検出系の確立：

これまでに報告のないウシ卵胞液中ZEN、およびその代謝物である $\alpha$ -および $\beta$ -ゼアラレノール( $\alpha$ -Zol および $\beta$ -Zol)の存在の有無を検証するために、LC/MS/MS法を用いた検出系の確立をはかる。まず、固相抽出にもちいるカラムの検討と添加回収実験を行う。食肉センター由来卵巣から卵胞液を採取し、C-18カラム、ZENイムノアフィニティカラム(IAC)の単独、およびそれらを併用して抽出操作を行った場合の添加回収実験を行い、LC/MS/MS法の溶媒の濃度や流速などの最適条件を設定し、卵胞液をサンプルとした場合の測定系を確立する。

④ 着床前の胚発生に与える影響：

ZENが着床前の初期胚発育に与える影響を検討するために、体外培養系を用いたウシ胚の培養実験を行う。常法に従ってウシ卵子の体外成熟培養後に体外受精を行って胚を作出する。その後の体外発生培養時に、種々の濃度のZENを無血清培地に添加してその後の胚盤胞までの発生率を指標として、ウシ胚に対するZEN暴露の影響を検証する。

⑤ LC/MS/MS法を用いたウシ卵胞液中ZENと代謝物濃度の測定：

③において確立したLC/MS/MS法を用いて、ウシ卵胞液中のZEN、 $\alpha$ -Zol および $\beta$ -Zol濃度の測定を行う。卵胞液サンプルは食肉センター由来卵巣の嚢腫様卵胞を含む様々なサイズの卵胞から採取後、凍結保存したものをを用いる。併せて、卵胞液中プロゲステロン(P4)およびエストラジオール17 $\beta$ (E2)濃度の測定を行い、P4/E2値に基づいた卵胞機能別のZEN、 $\alpha$ -Zol および $\beta$ -Zol濃度の比較検討

⑥ LC/MS/MS法を用いたウシ胎盤組織中ZENと代謝物濃度の測定：

申請者がこれまでに胎盤停滞関連実験にて採取し、凍結保存しているウシ母体および胎子胎盤組織を本実験に用いる。サンプルは食肉センター由来、および生体由来の分娩後に採取した胎盤組織である。サンプルをホモジナイズ後に抽出操作を行い、③

において確立した LC/MS/MS 法を用いてウシ胎盤組織中 ZEN、 $\alpha$ -Zol および  $\beta$ -Zol 濃度の測定を行う。

#### 4. 研究成果

尿中 ZEN 濃度をモニターすることで、牛群における給与飼料からの ZEN 摂取状況の把握が可能となり、ウシ生産現場における比較的簡易な日常のモニタリング法として有用であることを初めて実証するとともに、肥育牛群で特に高い尿中 ZEN 濃度を示す群が存在したことから、生産現場においては、今後飼料中 MT 濃度を含めた継続的な MT のモニタリングが必要であることを報告した。また、尿中 ZEN 濃度をモニターすることで、飼料への MT 吸着剤添加効果の客観的評価が可能となること、および MT 吸着剤の添加方法がその効果に影響を与える可能性を示唆した。さらに、ウシおよびブタ卵胞液中から ZEN およびその代謝物を検出し、経口摂取後腸管から吸収された ZEN が血流を介して卵胞液中へ侵入することを初めて確認し、卵胞発育や卵子成熟への影響も起こりうる可能性を示した。また血中エストロゲン濃度と同等レベルの ZEN を含む卵胞液サンプルも存在したことから、内分泌攪乱物質として繁殖性に影響を与える可能性も示唆した。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 16 件)

(1) Takagi M., Uno S., Kokushi E., Shiga S., Mukai S., Kuriyagawa T., Takagaki K., Hasunuma H., Matsumoto D., Okamoto K., Shahada F., Chenga T., Deguchi E., and Fink-Gremmels J. Measurement of urinary zearalenone concentrations for monitoring natural feed contamination in cattle herds – on farm trials. *J. Anim. Sci.* 89. 287-296, 2011. (査読有)

(2) Sambuu R., Takagi M., Shiga S., Uno S., Kokushi E., Namula Z., Otoi T., Miyamoto A., Deguchi E. and Fink-Gremmels J. Detection of zearalenone and its metabolites in naturally contaminated porcine follicular fluid by using liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J. Reprod. Dev.* (In press) (査読有)

(3) Sambuu R., Takagi M., Namula Z., Otoi T., Shiga S., Rodrigues dos Santos, R. and Fink-Gremmels J. Effects of exposure to zearalenone on porcine oocytes and sperm during maturation and fertilization In vitro. *J. Reprod.*

Dev. (In press). (査読有)

(4) Takagi M., Mukai S., Kuriyagawa T., Takagaki K., Uno S., Kokushi E., Otoi T., Budiyanto A., Shirasuna K., Miyamoto A., Kawamura O., Okamoto K., and Deguchi E. Detection of zearalenone and its metabolites in naturally contaminated follicular fluids by using LC/MS/MS and in vitro effects of zearalenone on oocyte maturation in cattle. *Reprod Toxicol.* 26, 164-169, 2008. (査読有)

[学会発表] (計 10 件)

(1) 平成 21 年度日本獣医師会学会年次大会(宮崎) 志賀慧、高木光博、宇野誠一、蓮沼浩、岡本光司、出口栄三郎、「牛尿中ゼアラレノン濃度を指標とした給与飼料中ゼアラレノン浸潤動態モニター法の確立」、ワールドコンベンションセンターサミット、2010 年 1 月 29 日

(2) 日本産業動物獣医学会(九州)、志賀慧、高木光博、宇野誠一、國師恵美子、蓮沼浩、松本大策、岡本光司、出口栄三郎、「牛尿中ゼアラレノン濃度を指標とした給与飼料中ゼアラレノン浸潤動態モニター法の確率」、福岡国際会議場 平成 21 年 10 月 18 日

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

高木 光博 (TAKAGI MITSUHIRO)  
鹿児島大学・農学部・准教授  
研究者番号：40271746

##### (2) 研究分担者

宇野 誠一 (UNO SEIICHI)  
鹿児島大学・水産学部・准教授  
研究者番号：50381140

##### (3) 連携研究者

音井 威重 (OTOI TAKESHIGE)  
山口大学・農学部・教授  
研究者番号：30311814

宮本 明夫 (MIYAMOTO AKIO)  
帯広畜産大学・畜産学研究科・教授  
研究者番号：10192767

##### (4) 研究協力者

Johanna Fink-Gremmels  
ユトレヒト大学・獣医学部・教授

川村 理  
香川大学・農学部・教授

國師恵美子  
鹿児島大学・大学院連合農学研究科

志賀 慧  
鹿児島大学・農学部獣医学科

蓮沼 浩  
山口大学大学院連合獣医学研究科

松本 大策  
シェパード中央家畜診療所

岡本 光司  
鹿児島県曾於農業共済組合家畜診療所