

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 17 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23580441

研究課題名(和文)飼養環境下の家畜におけるゼアラレノン浸潤動態の解明と対策法の確立

研究課題名(英文)Monitoring of naturally feed contamination of zearalenone in cattle herds and its preventive measures

研究代表者

高木 光博(Takagi, Mitsuhiro)

鹿児島大学・獣医学部・准教授

研究者番号：40271746

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：ゼアラレノン(ZEN)汚染牛群をモデル牛群として、マイコトキシン吸着剤(MA)の添加効果に関する臨床試験を行ってその有用性を検証した。その結果、MA添加による腸管からのZEN吸収阻害作用が確認されるとともに、併せて行った血清生化学検査結果から、MA添加の肝および腎機能などに対する影響は無いものと推測された。その他、雌牛群での過剰排卵処理成績は尿中ZEN濃度の違いによる影響は無いこと、1乳用牛群における年間尿中ZEN濃度には有意な季節変化が見られること、などが明らかとなった。さらに、ZENの長期間暴露によるブタ体外培養精子性状への影響は少ないことが推測された。

研究成果の概要(英文)：We investigated effects of a commercially available mycotoxin adsorbent (MA) using Zearalenone (ZEN) contaminated herd as a model herd. The results indicate that MA supplementation has beneficial effects in reducing ZEA absorption from the intestine of cattle, reversing hepatic effects. Additionally, our field trials revealed that 1) natural ZEN contamination resulting in urine levels below the threshold value does not affect embryo production in Japanese Black and Holstein cows undergoing superovulation, and 2) the monthly (seasonally) variation of urinary ZEN concentrations existing under the standard dairy farming condition. Moreover, the effects of in vitro exposure of porcine spermatozoa to ZEN were studied by evaluating several parameters of an in vitro fertilization (IVF) system. Overall, the results indicate that prolonged exposure of boar spermatozoa to ZEN up to 1000 µg/l under reduced metabolic conditions does not affect their in vitro function.

研究分野：産業動物獣医学

キーワード：ウシ ブタ ゼアラレノン 尿 マイコトキシン吸着剤 繁殖性

1. 研究開始当初の背景

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。一方、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や「動物福祉」の観点等から、環境衛生や飼養衛生(どのような飼養環境下で家畜が飼育されているのか)を意識した取り組みが必須条件となっており、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。飼料中の各種MT[アフラトキシンB1, デオキシニバレノール、ゼアラレノン(ZEN)]濃度については、飼料の安全性確保及び品質の改善に関する法律(飼料安全法)により許容基準が定められており、公的機関などにより配合飼料やその原料におけるMT浸潤モニタリングが行われている。一方、飼料中に存在するMTは、飼料中に均一に分布する訳ではなく、飼料中でスポット的に存在する可能性も報告されている。従って飼料中MT測定法は、そのサンプリング方法が測定結果に大きく影響を与える可能性が示唆されており正確性に欠ける。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濃度測定の実用性、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、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

申請者らはこれまでに、(1)飼養環境下の牛群における尿中ZEN濃度を指標としたMT浸潤動態モニタリング法の有用性、(2)ウシとブタ卵胞液中におけるZENとその代謝物の存在、および(3)卵体外成熟および受精能に及ぼす濃度依存的なZEN添加の影響を明らかにしている。本申請においては *In vivo* および *In vitro* の側面から以下の3点を明らかにして、MTが飼養環境下の家畜の健康や繁殖性に与える影響をさらに詳細に検証する。

1)申請者らのデータベース中、他群と比較して有意に高い尿中ZEN濃度(500倍以上)を示した1牛群をZEN浸潤モデル牛群として、その原因を究明するとともに対策を講じて、飼養環境下のMT浸潤牛群における尿中ZENモニタリングシステム臨床適用モデルの構築をはかる。

2)ZENが生殖機能に与える影響をさらに詳細に検証するために、卵子および精子体外培養系モデルを用いたZEN添加試験を発展的に継続するとともに、ZEN長期間暴露による卵胞発育および卵子成熟能に対する影響を初めて明らかにする。

3)家畜衛生および食品衛生的見地から、異なる地域および飼養形態をとる家畜からの被検尿サンプル数をさらに増やして、尿中MT濃度に関する他に類を見ないデータベースの拡充を図る。

3. 研究の方法

モデル牛群を用いた尿中ZENモニタリングシステムの臨床的有用性の実証試験 - 尿中高ZEN濃度を示す牛群のその原因究明と尿中ZEN濃度の経時的推移の検証

1)経口摂取される飼料および水中のZEN濃度測定:モデル牛群、およびモデル牛群と同一ロット飼料給与下のコントロール牛群(低尿中ZEN濃度)から飼料および水をサンプルとして採取し、それらのZEN濃度を比較検討することで、給与飼料あるいは水がその原因である可能性を検討する。

2)血清生化学検査をもとにした肝臓機能評価:モデルおよびコントロール牛群から採血を行い、申請者らで測定可能な血清中肝逸脱系酵素(AST,GGT など)とIGF-1濃度を測定して比較検討することで、肝臓におけるZEN代謝系の障害等がその原因である可能性を検討する。

3)LC/MS/MS法を用いたウシ尿中ZENとその代謝物濃度の測定:モデル牛群における1、2の結果を参考にした各種対策期間中の尿中ZEN、および代謝物である -および -ゼアラ

レノール(β -ZOL および α -ZOL) 濃度を経時的に測定し、尿中ZEN濃度低減の有無を基準としてその効果評価を行う。

内分泌かく乱物質としてのZENが家畜の繁殖性に与える影響

4) ブタ卵子体外培養系を用いた卵子成熟および受精へのZEN暴露の影響: ZEN暴露がブタ卵子性状に与える影響を検討するために、ブタ卵子へのZENおよび α -ZOL暴露がブタ卵子体外成熟能、および体外受精後の胚発生率に与える影響について検討する。ブタ卵子採取後、0 (コントロール)、10 および 1000 $\mu\text{g/l}$ の ZEN あるいは α -ZOL を添加した体外成熟培養液中で成熟培養を行い、その後の成熟能を観察するとともに、体外受精を行って胚盤胞への発生率を検証する。

5) ブタ精子体外培養系を用いた精子生存率および受精へのZEN暴露の影響: これまでに報告のない低濃度かつ長期間の ZEN 暴露がブタ精子性状に与える影響を検討するために、ブタ精液へのZENおよび α -ZOL暴露が液状保存後のブタ精子性状に与える影響について検討する。ブタ精液採取後、0 (コントロール)、10 および 1000 $\mu\text{g/l}$ の ZEN あるいは α -ZOL を添加した液状保存液中で、ブタ精液を5°Cにて1週間および3週間保存する。保存1週間後にブタ精子を回収して体外成熟卵子との体外受精を行い、さらに保存3週間後の精子性状の観察を行う。

6) LC/MS/MS法を用いたブタ卵胞液中ZEN、 β -ZOL および α -ZOL濃度の測定: ブタ卵胞内の卵胞液中のZENとその代謝物の存在を確認し、併せてそれらの濃度に関する基礎データの収集を目的として、LC/MS/MS法を用いた分析を行う。方法は我々がウシで確立した既報に準じて行うこととし、卵胞液の採取にあたっては、各卵胞サイズが小さいために、各卵巣に存在する複数の卵胞から採取してプールされた卵胞液を測定用サンプルとして用いる。

4. 研究成果

Fusarium 属真菌由来のマイコトキシンで、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、飼養環境下の牛群における尿中 ZEN 濃度を指標とした浸潤動態モニタリング法を確立している。これまでに、他群と比較して有意に高い尿中 ZEN 濃度(500倍以上)を示す1牛群を摘発してその原因究明を行い、給与されていた稲ワラがその原因であることを明らかにした。さらに、申請者らが摘発したZEN汚染牛群をZEN浸潤モデル牛群として、MT 吸着剤 (MA)の添加効果に関する臨床試

験を行ってその有用性を検証したところ、MA添加による尿中ZENとその代謝物濃度の低下が認められ、MA添加による腸管からのZEN吸収阻害作用が初めて確認された。併せて行った血清生化学検査では、MA添加による影響は認められず、MA添加の肝および腎機能などに対する影響は無いものと推測された。さらに、追加で行ったフィールド試験から、通常の飼養管理下にある雌牛群での過剰排卵処理成績は尿中 ZEN 濃度の違いによる影響は無いこと、1乳用牛群における年間を通じた尿中 ZEN 濃度には有意な季節変化が見られること、などが明らかとなった。一方、ブタ卵子体外培養系モデルを用いたZEN添加試験より、卵子成熟率において濃度依存的な低下が認められたものの、正常受精率および胚盤胞発生率においては、各試験濃度間に有意差は認められなかったことから、1000 $\mu\text{g/l}$ 以下レベルでの生体内ZEN暴露は、胚の初期発生段階での影響は少ない可能性を示唆した。さらに、ブタ精子体外培養系を用いたZENおよびその代謝物である β -ZOLへの曝露試験を実施し、ZENおよび β -ZOLの長期間暴露によるブタ精子性状への影響を調べた。その結果、体外受精後のブタ精子の総受精率、正常受精率、多精子受精率、胚の分割率および胚盤胞への発育率において、ZENおよび β -ZOLの両群とも各濃度間に有意な差は認められなかった。さらに、保存3週間後の精子運動性、精子生存率や精子膜正常性についても両群ともに濃度依存的な影響は認められなかった。以上の結果から、少なくとも1000 $\mu\text{g/l}$ までの濃度のZENあるいは α -ZOLのブタ精子への体外曝露は精子性状に影響を及ぼさないことが示された。

5. 主な発表論文等

(雑誌論文)(計7件)

Takagi M., Shiga S., Uno S., Kokushi E., Otoi T., Tshering C., Deguchi E., Fink-Gremmels J. Periodic alteration in urinary zearalenone excretion in a dairy cattle herd. Anim. Nut. Feed Tech. 13. 303-310, 2013.

Takagi M., Hirai T., Shiga S., Uno S., Kokushi E., Otoi T., Deguchi E., Tshering C., Fink-Gremmels J. Relationship between urinary zearalenone concentration and embryo production in superovulated cattle. Arch. Anim. Breed. 56. 360-366, 2013.

Sambuu R., Takagi M., Namula Z., Nii M., Taniguchi M., Uno S., Kokushi E., Tshering C., dos Santos RR., Fink-Gremmels J., Otoi T. Effects of long-term in vitro exposure of ejaculated boar sperm to zearalenone and α -zearalenol in sperm liquid storage medium. Anim. Sci. J. 84. 28-34, 2013.

Hasunuma H., Takagi M., Kawamura O., Taniguchi C., Nakamura M., Chuma T., Uno S., Kokushi E., Matsumoto D., Tshering C., Deguchi E., Fink-Gremmels J. Natural contamination of dietary rice straw with zearalenone and urinary zearalenone concentrations in a cattle herd. J. Anim. Sci. 90. 1610-1616, 2012.

Hasunuma H., Takagi M., Shiga S., Uno S., Kokushi E., Mukai S., Kuriyagawa T., Takagaki K., Matsumoto D., Okamoto K., Deguchi E., Fink-Gremmels J. Monitoring natural feed contamination in beef cattle by measurements of urinary zearalenone concentrations after oral administration of mycotoxin adsorbents as a top dressing. J. Appl. Anim. Res. 39. 292-295, 2011.

Sambuu R., Takagi M., Namula Z., Otoi T., Shiga S., dos Santos RR., Fink-Gremmels J. Effects of exposure to zearalenone on porcine oocytes and sperm during maturation and fertilization in vitro. J. Reprod. Dev. 57. 547-550, 2011.

Sambuu R., Takagi M., Shiga S., Uno S., Kokushi E., Namula Z., Otoi T., Miyamoto A., Deguchi E., 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. 57. 303-306, 2011.

〔学会発表〕(計4件)

平成24年度日本産業動物獣医学会(九州地区)、蓮沼浩、高木光博、宇野誠一、國師恵美子、松本大策、岡本光司、渡邊麗、出口栄三郎、「飼養環境下の牛群におけるカビ毒吸着剤の飼料添加効果」、シーガイアコンベンションセンター(宮崎県宮崎市)平成24年10月14日

XXVII World Buiatrics Congress 2012. Takagi M., Hasunuma H., Uno S., Kokushi E., Matsumoto D., Watanabe U., Okamoto K., Tshering C., Deguchi E., Fink-Gremmels J. Effects of a mycotoxin adsorbent applied with the diet to cattle being exposed to rice straw naturally contaminated with zearalenone. Lisbon Congress Centre (Lisbon, Portugal) 3-8 June, 2012.

XXVII World Buiatrics Congress 2012. Hasunuma H., Takagi M., Kawamura O., Taniguchi C., Nakamura M., Chuma T., Uno S., Kokushi E., Matsumoto D., Tshering C., Deguchi E., Fink-Gremmels J. Natural contamination of dietary rice straw with zearalenone and urinary zearalenone concentrations in a cattle herd. Lisbon Congress Centre (Lisbon, Portugal) 3-8 June, 2012.

日本マイコトキシン学会第70回学術講演会、Hasunuma H., Takagi M., Kawamura O., Taniguchi C., Nakamura M., Chuma T., Uno S., Kokushi E., Matsumoto D., Tshering C., Deguchi E., Fink-Gremmels J. Natural contamination of rice straw by zearalenone indicated by persistently high urinary zearalenone concentrations in a cattle herd. タワーホール船堀(東京都江戸川区)平成24年1月6日

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高木 光博 (TAKAGI MITSUHIRO)
鹿児島大学・共同獣医学部・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

音井 威重 (OTOI TAKESHIGE)
山口大学・共同獣医学部・教授
研究者番号：30311814

(3) 連携研究者

(4) 研究協力者

Johanna Fink-Gremmels
ユトレヒト大学・獣医学部・教授

國師 恵美子
鹿児島大学・大学院連合農学研究科

中村 正幸
鹿児島大学・農学部・准教授

宮本 明夫
帯広畜産大学・畜産学研究科・教授

出口 栄三郎
鹿児島大学・共同獣医学部・教授

川村 理
香川大学・農学部・教授

志賀 慧
鹿児島大学・農学部獣医学科

松本 大策
(有)シェパード中央家畜診療所

蓮沼 浩
鹿児島大学・大学院連合獣医学研究科

伏見 康生
鹿児島大学・大学院連合獣医学研究科

岡本 光司
鹿児島県曾於農業共済組合家畜診療所

渡邊(新屋) 麗
鹿児島県曾於農業共済組合家畜診療所