

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 1 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450429

研究課題名(和文) 飼養環境下の牛群における複数のマイコトキシンによる共浸潤動態とその影響の解明

研究課題名(英文) Monitoring for multiple contamination of mycotoxins in feeding environment of cattle herds

研究代表者

高木 光博 (Takagi, Mitsuhiro)

山口大学・共同獣医学部・教授

研究者番号：40271746

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：繁殖雌牛群における尿中ZEN濃度と繁殖成績との関連性を検証するとともに、血清中抗ミュラー管ホルモン (AMH) 濃度の測定を行い、ZENの内分泌攪乱作用の有無を調べた。その結果、尿中ZEN濃度が有意に高い牛群において、AMH濃度は有意に低い結果となり、ZEN浸潤動態と血清中AMH濃度との関連性が示唆された。さらに、LC/MS/MS法による尿中STC濃度測定法を確立して、ZEN汚染牛群由来尿サンプルの測定を行った。その結果、飼料中STCは経口摂取後にその大部分が肝臓でグルクロン酸結合されること、及びZEN汚染牛群における飼料中ZENとSTCの共汚染の存在が初めて明らかにされた。

研究成果の概要(英文)：We investigated the effects of exposure to zearalenone levels on the anti-Mullerian hormone (AMH) endocrine levels of cattle. Urinary zearalenone and its metabolites concentrations were measured by chromatography-tandem mass spectrometry (LC/MS/MS), and serum AMH concentrations were determined. The results indicate that zearalenone intake from dietary feed, even when below the threshold zearalenone contamination level permitted in Japan, may affect the ovarian antral follicle populations of postpartum cows. Additionally, we determine the levels of the fungal toxin sterigmatocystin (STC) in the urine of cattle using LC/MS/MS. The results indicate that STC is extensively conjugated in the liver, presumably to glucuronic acid, and confirmed co-existing contamination of both ZEN and STC in the dietary feeds of cattle. Overall, mycotoxins in urine samples are useful biological markers for monitoring the systemic exposure of cattle to multiple mycotoxins.

研究分野：獣医繁殖学、産業動物獣医学

キーワード：ウシ ゼアラレノン ステリグマトシスチン 尿 繁殖性

1. 研究開始当初の背景

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 MT (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毒性や発ガン性の可能性が有る) が飼料を汚染する。近年、MT 汚染飼料の摂取が疑われる家畜の消化器疾患や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。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、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る ZEN に着目し、(1) 尿中 ZEN 濃度を指標とした飼養環境下の牛群における MT モニタリングシステムの構築とその有用性 (Takagi *et al.*, *J Anim Sci*, 2011)、(2) モニタリング結果から我が国の暫定基準値を超える ZEN 汚染牛群の初摘発とその汚染源として国産稲ワラの特定 (Hasunuma *et al.*, *J Anim Sci*, 2012)、および (3) 尿中 ZEN 濃度を指標とした MT 吸着剤添加効果の客観的評価法の確立 (Takagi *et al.*, 世界牛病学会口頭発表, リスボン, 2012) などを報告し、バイオマーカーを用いた MT モニタリング研究を世界的にリードするとともに、飼養環境下の牛群における ZEN 浸潤動態の検証を進めている。さらに、ウシとブタの体外培養系を用いた ZEN 添加試験より、(4) 卵子成熟および胚発生能への ZEN およびその代謝物の影響 (Takagi, *et al.*, *Reprod Toxicol*, 2008; Sambuu *et al.*, *J Reprod Dev*, 2011)、(5) 液状保存液中ブタ精子への ZEN 長期暴露の精子生存率への影響 (Sambuu *et al.*, *Anim Sci J*, 2013) などを報告し、ZEN とその代謝物の影響について、特に配偶子と受精卵側からの検証を行い、急性および長期間暴露の詳細な影響についての新知見を明らかにしている。

一方、ステリグマトシスチン (STC) は *Aspergillus versicolor* やその他の *Aspergillus* 属真菌などにより産生される MT であり、動物やヒトに対して強い毒性を持つアフラトキシン B1 (AFB1) 生合成の中間物質の 1 つとして知られているが、STC そのものの長期曝露による毒性は不明であるために、わが国では飼料、食品ともに現時点で規制値は設定されていない。A. *Versicolor* などの STC 産生真菌は世界中に分布し、日本各地の土壌や穀類、特にコメを汚染することは広く知られているが、これまでに稲ワラを含む粗飼料が給与される牛群の LC/MS/MS 測定法によるバイオマーカー濃度に基づく STC 浸潤動態についての報告は世界レベル

で皆無である。さらに、研究協力者である宮本らは、配偶子の成熟や輸送、受精や初期胚発育などに重要な役割をもつ卵管の微細環境調節機構を生殖免疫学的に検証するためのウシ卵管上皮細胞の体外培養系モデルを確立し、性ステロイドホルモンやエンドトキシン添加による自然免疫関連遺伝子群の発現動態に関する新知見を報告している (Kowsar *et al.*, *J Reprod Dev*, 59: 470-478, 2013)。

2. 研究の目的

(1) 牛群における複数のマイコトキシン (MT) による共浸潤動態解明のため、液体クロマトグラフィー質量分析 (LC/MS/MS) 法による尿中ステリグマトシスチン (STC) 測定法を確立し、申請者らの尿中ゼアラレノン (ZEN) 濃度のデータベースを基に、ZEN と STC との共浸潤動態を初めて明らかにして、我が国の飼養環境下における MT 共浸潤動態検証の足掛かりとする。

(2) ZEN 暴露が生殖能に与える影響を、免疫調節攪乱作用の観点から検証するために、新たにウシ卵管上皮細胞 (BOEC) の体外培養系をモデルとした ZEN 添加試験を行い、ZEN 暴露による BOEC の生存性や自然免疫調節関連遺伝子の発現動態に対する影響を初めて明らかにする。

3. 研究の方法

申請者らが既に確立している LC/MS/MS 法による尿中 ZEN 濃度モニタリング法をベースに、尿中 STC 濃度測定法の確立を目指すとともに、試験牛群数を増やしてデータベースの拡充を計り、飼養環境下の牛群における尿中 STC モニタリングシステムの有用性を検証する。さらに、申請者らが初めて摘発した ZEN 自然汚染稲ワラ (8 ppm 以上) が給与されていた牛群を含む保存尿サンプルを用いて STC 測定を行い、我が国の飼養環境下における ZEN と STC との共浸潤動態を検証する。一方、ZEN が繁殖性に与える影響を詳細に検証するために、ウシ卵管上皮細胞の体外培養系を用いた ZEN 添加による生存率、PGE2 分泌能および自然免疫関連遺伝子群の発現動態への影響を明らかにする。具体的な研究計画および方法は以下の通りである。

(1) LC/MS/MS 法を用いたウシ尿中 STC 濃度測定法の確立と臨床的有用性の実証試験-測定のための条件設定、妥当性確認と MT 共浸潤動態の検証

尿サンプルの前培養条件と STC の最適な抽出法の検討

経口摂取された STC の肝臓でのグルクロン酸結合の有無を調べる目的で、尿サンプルの抽出操作を行う前段階時の β -Glucuronidase 添加の有無による LC/MS/MS 測定を行う。 β -Glucuronidase の添加が必要で、かつ抽出効率に影響が無く

れば、尿サンプル測定時に ZEN と STC の同時抽出が可能となる。

STC 添加回収実験

ZEN 濃度測定用の LC/MS/MS 条件設定が、STC 測定に適用出来るか否かを検証するために、STC 添加回収実験を行う。試験用尿サンプルに各濃度の STC 標準液を添加して、C-18 カラムで固相抽出後に、先ず既報を参考にした条件による LC/MS/MS 測定を行って、STC の回収率を検討する。得られた結果をもとに、溶媒濃度や流速などの最適条件を設定し、尿をサンプルとした場合の STC 測定系を確立する

ZEN 汚染牛群を含む保存尿サンプルの LC/MS/MS 法による尿中 STC 測定

これまでに報告の無い飼養環境下の牛群における ZEN および STC の共浸潤動態の有無を検証するために、申請者が採取した尿中 ZEN 濃度既知の尿サンプルを用いて、上記及び で確立した LC/MS/MS 法を用いて尿中 STC 濃度測定を行う。

(2) 内分泌攪乱物質としての ZEN が家畜の繁殖性に与える影響

ZEN、およびその代謝物である -および -ゼアラレノール(-ZOL および -ZOL) がウシ BOEC の生存率、分泌能および自然免疫関連の遺伝子群発現動態に与える影響

ZEN 暴露が家畜の繁殖性に与える影響をさらに詳細に検討するために、従来の配偶子および受精卵の体外培養系に加えて、ウシ卵管上皮細胞培養系モデルを用いた ZEN とその代謝物の添加試験を行う。BOEC 体外培養液中に Estradiol (E2)、Pregesterone (P4) および Luteinizing hormone (LH) を添加および無添加の2条件下で種々の濃度の ZEN、 -ZOL および -ZOL をそれぞれ培養液に加えて培養し、以下の測定を行う。

体外培養終了後の Trypan Blue 染色による BOEC 生存性の確認

ELISA 法による培養液中 PGE2 濃度測定(ZEN 暴露による BOEC 分泌能への影響)

回収 BOEC 由来 cDNA をサンプルとした Real time PCR 法による BOEC 発現遺伝子群 (Toll-like receptor-4, Tumor necrosis factor , Interleukin 1 , interleukin 10) の発現動態解析

以上の結果から、ZEN の母体生殖関連細胞への免疫システムの攪乱作用を解明する。

(3) 異なる飼養環境下の牛群における STC 浸潤動態に関するデータベース作成

各地域(九州、本州と北海道を予定)の異なる飼養管理モデル牛群において尿、給与飼料および血液のサンプリングを行い、飼養環境下の牛群における ZEN と STC の共汚染に関するデータベースの拡充を継続するとともに、家畜の STC 浸潤(ZEN との共浸潤も含めた)に関する影響を明らか

にするための基礎的なデータベースの作成にも着手する。

尿および飼料サンプル測定: H26年度の結果を基盤に、我が国の飼養環境下の牛群の飼料への浸潤を含めた STC と ZEN との共汚染に関する詳細なデータベースを作成する。

血清生化学検査: AFB1 合成の中間物質として知られる STC のウシに対する影響をモニターするための予備データとして、特に肝機能や肝代謝を反映する各種パラメーターの測定を行い、そのデータベースを作成する。

4. 研究成果

ZEN 汚染稲ワラ給与が原因で尿中高 ZEN 濃度を呈した ZEN 汚染牛群と、稲ワラ以外は汚染群と同一の飼料が給与されたコントロール牛群を用いて、飼料への MA 添加が液体クロマトグラフィー質量分析(LC/MS/MS)法による尿中 ZEN 濃度に与える影響を検証するとともに、血清生化学検査も併せて行い、ZEN 暴露による生体への影響を検証した。その結果、MA 添加(16日間)により、尿中 ZEN とその代謝物である -ZOL および -ZOL 濃度の低下が認められ、腸管からの MA 吸収阻害作用が尿サンプルを用いた客観的手法により初めて確認された。血清生化学検査結果では、GGT、AST や BUN 濃度に MA 添加の顕著な影響は認められず、肝臓、腎機能などに与える影響は少ないことが示唆された。さらに、予備試験として行った血清中抗ミュラー管ホルモン (AMH) 濃度測定においては、ZEA 汚染牛群において AMH 濃度が低くなる傾向が認められた。

次に、黒毛和種繁殖雌牛群における尿中 ZEN 濃度と繁殖成績との関連性を検証するとともに、血清中 AMH 濃度の測定を行って、ZEN 浸潤による内分泌攪乱作用の有無、および牛群の繁殖性に与える影響の一端を明らかにすることを目的とした。黒毛和種繁殖牛群 2 群を選定し、分娩後 30 日に尿および血液のサンプリングを行うとともに、超音波診断装置を用いた生殖器の詳細な観察を行った。尿サンプルは LC/MS/MS 法により尿中 ZEN、 -ZOL および -ZOL 濃度の測定を行った。さらに血中 AMH 濃度を測定し、2 群間での比較検討を行った。その結果、尿中 ZEN 濃度が有意に高い牛群において、AMH 濃度は有意に低い結果となり、ZEN 浸潤動態と血清中 AMH 濃度との関連性が示唆された。一方、繁殖成績では ZEN 濃度が高い牛群において分娩後空胎日数が有意に短い結果となり、低レベル ZEN 浸潤は繁殖性に直接的な影響を及ぼすものではないことが示唆された。

さらに、LC/MS/MS 法による尿中 STC 濃度測定法を確立して、上記で用いた ZEN

汚染牛群由来保存尿サンプルの測定を行い、STC との共汚染の有無を確認するとともに MA 添加が尿中 STC 濃度に与える影響の検証を目的とした。尿サンプル前処理時の β -Glucuronidase/ arylsulfatase 添加の有無による LC/MS/MS 測定、STC 添加回収実験、溶媒濃度や流速などの最適条件を設定し、LC/MS/MS による尿中 STC 濃度測定系の確立を行った。その結果、経口摂取された飼料中 STC はその大部分が肝臓でグルクロン酸抱合されていることが初めて明らかとなった。また、飼料中 STC 濃度測定結果との比較から、LC/MS/MS 法による尿中 STC 濃度測定は飼料中 STC 濃度を極めて良好に反映することが判明した。さらに、ZEN 汚染牛群における飼料中 ZEN と STC の共汚染の存在が初めて明らかにされ、一方で MA 添加による STC の腸管からの吸収阻害作用は認められないことが明らかとなった。以上の結果より、継続的な MT 浸潤動態の検証と牛の健康に対するリスクファクターの詳細な評価を行う必要があることが示された。

飼養環境下の牛群において、尿中 ZEN とその代謝物のモニタリングを基盤とした一連の研究により、MT 対策のための吸着剤添加効果の客観的評価法の確立がなされたことは、安全な畜産物の生産が求められる今日、乳肉生産現場における新たな生産性向上のための一助となるものと思われる。さらに、牛群における ZEN と STC との共浸潤を確認するとともに、卵巣内の胞状卵胞数を反映する AMH 濃度との関連性を示唆したことは、繁殖領域における新たな情報を提供することができた。

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 3 件)

Fushimi Y., Takagi M., Monniaux D., Uno S., Kokushi E., Shinya U., Kawashima C., Otoi T., Deguchi E., Fink-Gremmels J. Effects of dietary contamination by zearalenone and its metabolites on serum anti-Müllerian hormone: impact on the reproductive performance of breeding cows. *Reprod. Dom. Anim.* 50. 834-839, 2015. 査読有

Fushimi Y., Takagi M., Uno S., Kokushi E., Nakamura M., Hasunuma H., Shinya U., Deguchi E., Fink-Gremmels J. Measurement of sterigmatocystin concentrations in urine for monitoring the contamination of cattle feed. *Toxins* 6. 3117-3128, 2014. 査読有

Fushimi Y., Takagi M., Hasunuma H., Uno S., Kokushi E., Watanabe U., Liu J., Marey

MA., Miyamoto A., Otoi T., Deguchi E., Fink-Gremmels J. Application of mycotoxin adsorbent to cattle feed naturally contaminated with zearalenone: Urinary zearalenone excretion and association with anti-Müllerian hormone. *World Mycotoxin J.* 7, 367-378, 2014. 査読有

[学会発表](計 3 件)

XXV World Buiatrics Congress 2016. Takagi M., Uno S., Kokushi E., Wijayagunawardane M. P. B., Fink-Gremmels J. Monitoring natural feed contamination of mycotoxins in cattle: metabolite profiling using gas chromatography-mass spectrometry. Dublin Convention Centre (Dublin, Ireland), 3-8 July, 2016.

XXVIII World Buiatrics Congress 2014. Takagi M., Fushimi Y., Uno S., Nakamura M., Hasunuma H., Watanabe U., Deguchi E., Fink-Gremmels J. Measurement of sterigmatocystin concentrations in urine to monitor natural feed contamination in cattle herds: Co-occurrence with zearalenone contamination. Cairns Convention Centre (Cairns, Australia) 26 July-2 August, 2014.

9 th International Symposium on Reproduction in Domestic Ruminants 2014. Takagi M., Fushimi Y., Uno S., Kokushi E., Watanabe U., Liu J., Marey M., Miyamoto A., Otoi T., Deguchi E., and Fink-Gremmels J. Application of mycotoxin adsorbent to cattle feed naturally contaminated with zearalenone: impact on ovarian function and serum anti-Müllerian hormone. Hotel Nikko Northland Obihiro (Obihiro, Hokkaido), 25-29, August, 2014.

[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)

山口大学・共同獣医学部・教授

研究者番号: 4 0 2 7 1 7 4 6

(2) 研究分担者

宇野 誠一 (UNO, SEIICHI)
鹿児島大学・農水産獣医学域水産学系・准
教授
研究者番号： 50381140

音井 威重 (OTOI, TAKESHIGE)
徳島大学・生物資源産業学研究部・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 (KOKUSHI, EMIKO)
鹿児島大学・水産学部・助教

中村 正幸 (NAKAMURA, MASAYUKI)
鹿児島大学・農学部・准教授

宮本 明夫 (MIYAMOTO, AKIO)
帯広畜産大学・畜産学研究科・教授

出口 栄三郎 (DEGUCHI, EISABURO)
鹿児島大学・共同獣医学部・教授

蓮沼 浩 (HASUNUMA, HIROSHI)
(有)シェパード中央家畜診療所

伏見 康生 (FUSHIMI, YASUO)
(有)シェパード中央家畜診療所