

令和 6 年 6 月 5 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05920

研究課題名(和文) 飼養環境下の牛群における多種類カビ毒同時浸潤動態の解明とその防除法の検証

研究課題名(英文) Simultaneous contamination dynamics of multiple mycotoxins in cattle herds in a field environment and validation of control methods.

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) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：家畜に給与する飼料を汚染するカビ毒の防除対策は世界的な克服課題である。本研究では、市販のELISA測定キットを用いた尿中ゼアラレノン(ZEN)濃度に加えて、尿中デオキシニバレノール(DON)濃度測定系を確立して、簡便な多種類カビ毒汚染牛群モニタリング系を確立した。牛群のカビ毒浸潤動態が牛生体内代謝や繁殖性に与える影響に関する検証では、尿中ZEN及びDON濃度と血中抗ミュラー管ホルモン(AMH)濃度及び血清アミロイドA(SAA)濃度測定とも負の相関を確認した。さらに、牛群のDON及びZEN汚染は繁殖性や乳房炎などの発生に大きく影響を与え、カビ毒防除対策により改善可能であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々が報告している牛群の尿中カビ毒濃度測定系は、経口摂取されたカビ毒の生体内浸潤レベルを個体あるいは牛群レベルで継続してモニターすることが可能であり、他に類を見ない測定系である。牛飼養環境下でのカビ毒浸潤動態やその影響に関する報告は世界的に乏しく、飼養環境下の汚染牛群をモデル牛群として用いた研究は我々の報告を含めて極めて少数である。特に世界的に問題となっている、飼料中多種類カビ毒汚染に関する問題に対して、その検出法、対応後の効果判定とその後の長期的な牛群の健康状態や繁殖性に関する情報は皆無であり、食品としての乳肉の衛生面からも家畜飼養環境下のカビ毒浸潤動態は極めて重要で斬新なデータである。

研究成果の概要(英文)：In livestock production, control measures against mycotoxins that contaminate feed fed to livestock are a worldwide challenge to overcome. In this study, we established a simple system for monitoring herds contaminated with multiple types of mycotoxins by establishing a system for measuring urinary deoxynivalenol (DON) concentration in addition to urinary zearalenone (ZEN) concentration using a commercially available ELISA kit. In the verification of the effects of herd mycotoxin contamination dynamics on bovine metabolism and fertility, negative correlations were observed between urinary DON and ZEN concentrations and blood anti-Mullerian hormone (AMH) and serum amyloid A (SAA) concentrations. Furthermore, DON and ZEN contamination in herds had a significant impact on reproductive performance and mastitis, which could be ameliorated by mycotoxin control measures.

研究分野：獣医臨床繁殖学

キーワード：牛 多種類カビ毒 繁殖性 飼料 カビ毒防除

## 1. 研究開始当初の背景

近年、畜産現場においてカビ毒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世界的に報告され、乳肉等の食品中へのカビ毒残留の危険性も指摘されている。一方、乳肉生産現場においては、「食品の安全性」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いる。近年の気候変動、温暖化の影響も相まって、保管飼料中のカビ毒浸潤動態の把握及びその防除は極めて重要な社会的課題である。我々はこれまでに、*Fusarium* 属真菌由来カビ毒で、エストロゲン類似作用を持つことから内分泌攪乱物質として知られるゼアラレノン（ZEN）と、*Aspergillus* 属真菌由来カビ毒で、強い毒性や発ガン性を持つアフラトキシン B1（AFB1）生合成過程の中間物質の1つとして知られているステリグマトシスチン（STC）に着目して、実際に腸管から吸収された生体内カビ毒浸潤レベルを反映するELISA法（スクリーニング用）と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（代謝物を含む）およびSTC濃度測定系を構築した。汚染牛群（稲ワラ）の摘発、生体内代謝と繁殖性に与える影響の解明を行うとともに、本測定系はカビ毒吸着剤添加効果の客観的評価法としても極めて有用であることを初めて報告した。一方で近年、機器分析法の発展に伴った飼料中カビ毒同時測定系による多種類カビ毒同時汚染事例摘発が世界的に相次いで報告されているが、牛群における尿中多種類カビ毒同時測定系（UMMAS）に関する報告は皆無である。以上を背景とした本研究課題の第一の学術的「問い」は、「我が国の牛群における生体内多種類カビ毒同時浸潤レベルはどの程度なのか、そして多種類カビ毒同時浸潤は生体内代謝や繁殖性にどのような影響を与えるのか」、である。

飼料へのカビ毒吸着剤(MA)添加は、家畜生産現場において実践可能な唯一のカビ毒防除法とされているが、その効果はカビ毒の種類や汚染レベル、MAの添加方法などにより大きく影響を受ける事を我々は既に報告しており、実際の添加効果は未だ不明である。客観的な臨床データに裏打ちされた、実際の臨床現場で直ちに応用可能で有効な新規カビ毒防除法の導入が世界の畜産現場レベルで求められている。最近、我々は実験動物で消化管上皮細胞への炎症低減効果によるタイトジャンクション（TJ）の「消化管バリア」機能修復によるカビ毒吸収阻害効果が報告されたフラクトオリゴ糖(FOS)製剤（Difructose anhydride III）を牛群飼料に添加し、尿中ZENおよびSTC濃度測定系データからカビ毒吸収低減効果を初めて確認した。以上を背景とした本研究課題の第二の学術的「問い」は、「本申請課題により新規確立されるUMMASデータはカビ毒防除を目的とする飼料添加剤の客観的評価法として有用なのか、そして臨床現場で直ちに応用可能で多種類カビ毒同時汚染飼料にも有効なカビ毒防除法は何か」、である。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は以下の通りである。

- ① 尿中多種類カビ毒同時測定系の新規確立と我が国牛群のカビ毒浸潤データベース拡充
- ② カビ毒同時浸潤が牛生体内代謝と繁殖性に与える影響、関連性の詳細な検証
- ③ 新規測定系データを指標としたカビ毒防除法の有用性検証、新規防除法の検証と確立

以下の4カビ毒（AFB1, デオキシニバレノール、ZEN、フモニシン）濃度については、飼料安全法により飼料中の許容基準が定められており、輸入飼料を対象にした輸入段階でのカビ毒監視体制が確立されているものの、各牛群レベルにおける飼料中カビ毒浸潤動態は不明である。本研究にて確立を目指すUMMASは、我々の研究グループで既に独自開発し稼働している尿中ZENおよびSTC濃度測定系を基盤に、許容基準が設定されている上記4種カビ毒を含む、実際に経口摂取が予想されるその他の主要カビ毒とそれらの代謝物の生体内浸潤レベルがモニター可能となるもので、世界で他に類を見ない測定系である。さらに、モデル牛群においてUMMASデータを長期間モニターすることで、家畜生産現場におけるカビ毒低濃度長期間暴露モデルとしての影響調査が可能となる。具体的には、牛群の血液生化学検査結果から、カビ毒浸潤が生体内代謝系や炎症誘発に与える影響や、特に雌牛では受胎性の他、卵巣の胞状卵胞数を反映する血中抗ミュラー管ホルモン(AMH)濃度測定を行うことで、これまでに報告例がない牛生体内代謝や繁殖性に関する新規データベースを創成することができる。これらの点が本研究の独自性、創造性である。さらに、オリゴ糖製剤は、Prebiotics製剤として既に世界中の家畜生産現場において使用されているが、牛腸管TJのバリア機能に着目したカビ毒吸収低減効果は我々が世界で初めて報告した知見である。本研究課題は、牛群における多種類カビ毒同時汚染防除の可否を検証するこ

とを目的として行う初めての試みであり、得られる成果はその効果判定の指標として尿中カビ毒濃度を客観的にモニターした世界初の臨床データとなる。この点も本研究の優れた独自性、創造性である。

### 3. 研究の方法

#### 研究課題1：LC/MS/MS法を用いた牛尿中多種類カビ毒同時測定系（UMMAS）の確立

これまでに報告例の無いLC/MS/MS法を用いたUMMASの確立を図る。我々が既に尿中ZEN、STC濃度測定で確立している手順を基本に、以下の一連の実験を行う。なお、本研究では、牛飼料中に検出報告があり、LC/MS/MS測定系のpositive modeおよびnegative modeで検出可能なカビ毒とその代謝物を各5～10種選定して順次加えていく予定である。

1) 尿サンプルの調整：経口摂取された各カビ毒が肝臓でどの程度グルクロン酸抱合されているのかを調べる目的で、尿サンプルの前培養時のβ-Glucuronidase/arylsulfatase添加有無によるLC/MS/MS測定を行う。

2) 添加回収実験：既に稼働している我々のLC/MS/MSの条件設定が、UMMASに対する適応の可否を検証するために添加回収実験を行う。試験用尿サンプルに各濃度の標準液を添加して、C-18カラムで固相抽出後に、調整済み条件によるLC/MS/MS測定を行って各カビ毒回収率を検討する。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する。

1)、2)で得られた結果から、最終的に測定感度、妥当性の検証を行い、UMMASを確立する。

#### 研究課題2：異なる地域、飼養環境下の牛群におけるUMMASデータベース作成と臨床的評価

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、UMMASデータに基づくカビ毒浸潤動態の把握、および血清生化学検査結果から、様々なレベルでの多種類カビ毒同時浸潤が牛生体内代謝、炎症レベルや繁殖性に与える影響を検証する。

1) 尿サンプル測定：わが国の飼養環境下の牛群における飼料中多種類カビ毒同時浸潤に関するデータベースを構築する。

2) 血清生化学検査：特に肝機能や肝代謝を反映する各種パラメーターのデータベースを作成する。さらに生体内炎症レベルモニターのための血清アミロイドA蛋白(SAA)濃度測定、および卵巣内胞状卵胞数モニターのための抗ミュラー管ホルモン(AMH)濃度を測定する。

本結果から、我が国牛群の新規多種類カビ毒浸潤動態と牛生体に与える影響を明らかにする。

#### 研究課題3：UMMASデータを用いたカビ毒防除法評価と新規防除法の確立

研究課題2で得られる各モデル牛群のUMMASデータベースを参考に試験牛群を選定する。本研究では、尿中ZEN、STC濃度測定系を用いた報告実績のある市販MAとFOS製剤、および我々の子牛への添加試験から、下痢罹患率の低下および便中乳酸菌数の増加が観察された乳酸菌死菌製剤を用い、単独あるいは混合添加による添加効果を検証する。

1) 試験牛群：飼養環境が異なる複数の雌牛群を選定し、各試験牛群において①無処置コントロール群10頭、②添加群10頭、計20頭使用、添加剤は既報を参考に推奨量を添加する。

2) 添加試験：我々の過去の添加試験を参照して添加期間2週間とし、添加前後で尿および血液を採取して、研究課題2に準じてUMMASと血清生化学検査を行う。

本結果から、各添加剤のカビ毒防除法の有効性と牛生体に与える影響を明らかにする。

以上の研究を順次展開し、我々がこれまで積み上げてきた牛群におけるカビ毒浸潤動態に関するデータベースをさらに拡充させる。さらに世界で必要とされている、客観的な評価に基づいた効果的かつ現実的な新規カビ毒防除法開発を目指す。

### 4. 研究成果

本申請課題の目的の1つである、尿中多種類カビ毒同時測定系の新規確立に関しては、これまでに確立しているゼアラレノン(ZEN)とステリグマトシスチン(STC)に加えて、デオキシニバレノール(DON)とフモニシンのLC/MS/MSによる測定系の確立を終え、現在市販のELISA測定キットを用いた簡便な尿中DON測定系確立の可能性を見出した。牛群におけるカビ毒浸潤動態が牛生体内代謝や繁殖性に与える影響に関する検証では、尿中ZEN濃度と牛卵巣内胞状卵胞数モニターのバイオマーカーであ

る血中抗ミュラー管ホルモン(AMH)濃度との間に負の相関関係があることを明らかにするとともに、炎症性マーカーである血清アミロイドA (SAA)濃度測定とも負の相関を確認した。さらに、我々のフィールド調査から新規摘発したDON汚染乳用牛群をモデル牛群として、DON汚染が牛群の繁殖性(受胎率)や乳房炎などの疾病罹患率に大きく影響を与えることを確認するとともに、汚染飼料摘発後の有効な対応策を実証することができた。新規カビ毒防除法確立の一環として継続している、飼料への「オリゴ糖製剤」や「熱処理乳酸菌死菌体製剤」の添加による、尿中カビ毒濃度低減効果の検証に関しては、様々な発育ステージにおける牛群において添加試験を実施し、これまでに給与飼料へのオリゴ糖製剤(DFAIII)添加による尿中STC濃度低減効果を初めて報告するとともに、DFA III 添加群と無添加群との間の血中低級脂肪酸濃度(腸管内におけるDFAIII発酵状況の確認)を比較検討して、DFA III 添加による腸管内発酵状況の変化を牛において初めて確認した。さらに、黒毛和種哺乳期子牛、及び離乳前子牛を用いた代用乳への熱処理乳酸菌死菌体製剤添加試験を実施し、添加群において疾病罹患率の低下や離乳日齢の短縮効果を確認して臨床的な有用性を明らかにした。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 5件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Oky Setyo Widodo, Dhidhi Pambudi, Makoto Etoh, Emiko Kokushi, Seiichi Uno, Osamu Yamato, Masayasu Taniguchi, Mirni Lamid and Mitsuhiro Takagi	4. 巻 15
2. 論文標題 Practical Application of a Urinary Zearalenone Monitoring System for Feed Hygiene Management of a Japanese Black Cattle Breeding Herd Relevance to Anti-Mullerian Hormone and Serum Amyloid A Clarified from a Two-Year Survey	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Toxins	6. 最初と最後の頁 317
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/toxins15050317	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Yousef Mohamed S., Rezk Walaa R., El-Naby Al-shimaa Al-H.H., Mahmoud Karima Gh.M., Takagi Mitsuhiro, Miyamoto Akio, Megahed Gaber A.	4. 巻 23
2. 論文標題 In vitro effect of zearalenone on sperm parameters, oocyte maturation and embryonic development in buffalo	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Reproductive Biology	6. 最初と最後の頁 100732 ~ 100732
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.j.repbio.2023.100732	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Widodo Oky Setyo, Nishihara Saeki, Pambudi Dhidhi, Kusakabe Ken Takeshi, Taura Yasuho, Nishi Yasunobu, Yamato Osamu, Taniguchi Masayasu, Takagi Mitsuhiro	4. 巻 9
2. 論文標題 Relationship Between Ovary Size and Anti-Mullerian Hormone Levels in Holstein?Friesian Cows	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Veterinary Science	6. 最初と最後の頁 828123
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fvets.2022.828123	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Shinya Urara, Iwamura Yuka, Yamato Osamu, Pambudi Dhidhi, Widodo Oky Setyo, Taniguchi Masayasu, Takagi Mitsuhiro	4. 巻 9
2. 論文標題 Serum Amyloid A Concentrations of Healthy and Clinically Diseased Japanese Black Breeding Cattle?Preliminary Measurements for Determining the Cut-Off Concentrations	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Veterinary Sciences	6. 最初と最後の頁 198 ~ 198
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/vetsci9050198	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Widodo Oky Setyo, Etoh Makoto, Kokushi Emiko, Uno Seiichi, Yamato Osamu, Pambudi Dhidhi, Okawa Hiroaki, Taniguchi Masayasu, Lamid Mirni, Takagi Mitsuhiro	4. 巻 14
2. 論文標題 Practical Application of Urinary Zearalenone Monitoring System for Feed Hygiene Management of a Japanese Black Cattle Breeding Herd: The Relationship between Monthly Anti-Mullerian Hormone and Serum Amyloid A Concentrations	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Toxins	6. 最初と最後の頁 143 ~ 143
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/toxins14020143	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	宇野 誠一 (Uno Seiichi) (50381140)	鹿児島大学・農水産獣医学域水産学系・教授  (17701)	
研究分担者	大和 修 (Yamato Osamu) (80261337)	鹿児島大学・農水産獣医学域獣医学系・教授  (17701)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
インドネシア	Airlangga University	Sebelas Maret University	Gaja Mada University