

学 位 論 文 要 旨

氏名 伏見 康生

題 目 : Field Application of Urinary Zearalenone and Sterigmatocystin Measurements for Monitoring Natural Feed Contamination in Cattle Herds: Effects of Mycotoxin Adsorbent and Affect on Reproductive Functions

尿中濃度を指標とした飼養環境下の牛群におけるゼアラレノンとステリグマトシスチン浸潤動態 : マイコトキシン吸着剤の投与効果と繁殖機能への影響

論文要旨 :

The first series of experiments were conducted to investigate (1) protective effects of a commercially available mycotoxin adsorbent (MA) and (2) endocrine effects of *in vivo* exposure to zearalenone (ZEA) in cattle. The sample included a Japanese Black female cattle herd (MYT herd) that displayed persistently high urinary ZEA concentrations. A second herd (NM herd) was used as a control. Three groups from each herd were assessed: MX (n = 6; MA mixed with concentrate), TD (n = 6; MA applied as topdressing with the concentrate), and a positive control (n = 6; no MA application). Urine and blood samples were collected at the start of MA supplementation (Day 0), on the final day of supplementation (Day 16), and on the final day of the sampling period (Day 58 for MYT herd and Day 50 for NM herd). Urinary ZEA concentrations (pg/mg of creatinine) were measured by ELISA and tandem mass spectrometry (LC/MS/MS). Haematological and serum biochemical analyses were performed to monitor hepatic, renal, nutritional, and mineral intake statuses. Ovulation status was assessed by progesterone (P4) and antral follicle population by anti-Müllerian hormone (AMH) levels. The urinary concentrations of ZEA and its metabolites in the MX and TD groups were significantly lower ($P < 0.05$) at Day 16 compared with the control group when measured using LC/MS/MS. The valid ratio of AMH-positive (>0.08 ng/mL) cattle was significantly higher in NM herd than MYT herd without affecting the P4-positive (>3 ng/mL) ratio, suggesting different populations of antral follicles. Significant differences were also observed between the MX and control in aspartate aminotransferase and γ -glutamyltransferase at Day 58, suggesting the preventive effects of MA supplementation. Our field trial indicates that MA supplementation of a ZEA-contaminated diet has beneficial effects in reducing ZEA absorption from the intestine of cattle, maintaining endocrine homeostasis and reversing hepatic effects.

In the second experimental series, we investigated the effects of *in vivo* exposure to

low zearalenone levels on the anti-Müllerian hormone endocrine levels and the reproductive performance of cattle. Urine and blood samples and reproductive records were collected from two Japanese Black breeding female cattle herds with dietary zearalenone contamination below the threshold levels (< 1 ppm) at 30 d after calving. Urinary zearalenone, α -zearalenol, and β -zearalenol concentrations were measured by chromatography–tandem mass spectrometry, and serum anti-Müllerian hormone concentrations were determined along with serum biochemical parameters. Urinary concentrations of α -zearalenol were significantly higher ($p < 0.05$) in cattle in Herd 1 than in cattle in Herd 2, reflecting the different amounts of zearalenone in the diet of the two herds. Although the number of 5-mm and 10-mm follicles of the herds and their fertility after artificial insemination were similar, the serum anti-Müllerian hormone concentrations in Herds 1 and 2 were 438.9 ± 48.6 pg/mL and 618.9 ± 80.0 pg/mL, respectively, with a trend toward a significant difference ($p = 0.053$), which may indicate differences in the antral follicle populations between herds. Thus, zearalenone intake from dietary feed, even when below the threshold zearalenone contamination level permitted in Japan, may affect the ovarian antral follicle populations, but not the fertility, of postpartum cows.

The third series of experiment aimed (1) to determine the levels of the fungal toxin sterigmatocystin (STC) in the feed and urine of cattle and (2) to evaluate the effects of supplementing the feed with a mycotoxin adsorbent (MA) on STC concentrations in urine. Two herds of female Japanese Black cattle were used in this study. The cattle in each herd were fed a standard ration containing rice straw from different sources and a standard concentrate; two groups of cattle from each herd ($n = 6$ per group) received the commercial MA, mixed with the concentrate or given as top-dressing, whereas a third group received no supplement and served as control. Urine and feed samples were collected at various time points throughout the experiment. STC concentrations were measured using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. STC concentrations in straw were higher in herd 1 (range: 0.15–0.24 mg/kg DM) than in herd 2 (range: <0.01 –0.06 mg/kg DM). In Herd 1, STC concentrations in urine significantly declined 2 wks after replacing the contaminated feed, whereas MA supplementation had no effect. In conclusion, mycotoxins in urine samples are useful biological markers for monitoring the systemic exposure of cattle to multiple mycotoxins, as well as evaluating the effectiveness of interventions.

In conclusion, the results of these field trials confirm that a system for monitoring urinary ZEN and STC concentrations is a useful tool for predicting the exposure of animals at the farm level to ZEN and STC. By applying the urinary monitoring system, it allows for the objective evaluation of MA supplementation to feeds at the farm level. Moreover, dietary contamination with mycotoxins may affect the population of antral follicle in the ovary.

学位論文審査の結果の要旨

氏名	伏見 康生
審査委員	主査： 山口大学 教授 高木 光博
	副査： 山口大学 教授 山本 芳実
	副査： 山口大学 教授 田浦 保穂
	副査： 鹿児島大学 教授 出口 栄三郎
	副査： 鳥取大学 准教授 柄 武志
題目	Field Application of Urinary Zearalenone and Sterigmatocystin Measurements for Monitoring Natural Feed Contamination in Cattle Herds: Effects of Mycotoxin Adsorbent and Affect on Reproductive Functions (尿中濃度を指標とした飼養環境下の牛群におけるゼアラレノンとステリグマトシスチン浸潤動態：マイコトキシン吸着剤の投与効果と繁殖機能への影響)
審査結果の要旨：	
<p>家畜に給与される飼料中には真菌が常在し、環境の変化等により真菌によって産生されたマイコトキシン(MT)が飼料を汚染する。「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、飼養環境下におけるMT浸潤動態と影響の解明、およびその対策は、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。本論文では、<i>Fusarium</i> 属真菌由来MT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を引き起こす可能性が示唆されるゼアラレノン(ZEA)、および <i>Aspergillus</i> 属真菌由来MTで、アフラトキシン B1 (AFB1) 生合成過程の中間物質であるステリグマトシスチン (STC) に着目し、それらの尿中濃度をモニターすることで飼養環境下の牛群における ZEA と STC の共浸潤動態やマイコトキシン吸着剤 (MA) 添加効果の検証を行うことを目的とした。</p> <p>第1章では、ZEA汚染稲ワラ給与が原因で尿中高ZEA濃度を呈したZEA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ZEA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、ZEA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ZEAとその代謝物α-およびβ-ゼアラレノール(α-ZOL およびβ-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ーラー管ホルモン (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。</p>	

第 2 章では、黒毛和種繁殖雌牛群における尿中 ZEA 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、ZEA 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 ZEA、 α -ZOL および β -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 ZEA 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、ZEA 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 ZEA 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 ZEA 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。

第 3 章では、LC/MS/MS 法による尿中 STC 濃度測定法を確立するとともに、第 1 章で用いた ZEA 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、ZEA 汚染牛群における飼料中 ZEA 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 ZEA 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 ZEA 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ものである。以上により、本論文は博士（獣医学）の学位論文として十分な価値を有するものと判定した。