

学 位 論 文 要 旨

氏名 戸田 克樹

題 目 : Metabolite Profiling of Japanese Black Cattle Naturally Contaminated with Mycotoxin, and Clinical Evaluation of Fructo-Oligosaccharide (DFA III) Feed Supplementation for Mitigation of Zearalenone Exposure in Cattle by a Urinary Zearalenone Monitoring System
(カビ毒汚染牛群における代謝プロファイル評価および尿中濃度を指標とした Fructo-Oligosaccharide (DFA III)添加によるゼアラレノン浸潤低減効果)

論文要旨 :

The objective of the first series of experiment was to evaluate the metabolic profile of cattle fed with or without zearalenone (ZEN) and sterigmatocystin (STC)-contaminated diets using a gas chromatography-mass spectrometry metabolomics approach. Urinary samples were collected from individual animals (n = 6 per herd) from fattening female Japanese Black (JB) cattle herds (23 months old, 550–600 kg). Herd 1 had persistently high urinary ZEN and STC concentrations due to the presence of contaminated rice straw. Herd 2, the second female JB fattening herd (23 months old, 550–600 kg), received the same dietary feed as Herd 1, with non-contaminated rice straw. Urine samples were collected from Herd 1, two weeks after the contaminated rice straw was replaced with uncontaminated rice straw (Herd 1N). Identified metabolites were subjected to principal component analysis (PCA) and ANOVA. The PCA revealed that the effects on cattle metabolites depended on ZEN and STC concentrations. The contamination of cattle feed with multiple mycotoxins may alter systemic metabolic processes, including metabolites associated with ATP generation, amino acids, glycine-conjugates, organic acids, and purine bases. The results obtained from Herd 1N indicate that a two-week remedy period was not sufficient to improve the levels of urinary metabolites, suggesting that chronic contamination with mycotoxins may have long-term harmful effects on the systemic metabolism of cattle.

In the second experimental series, the potential effect of difructose anhydride III (DFA III) supplementation in cattle feed was evaluated using a previously developed urinary-zearalenone (ZEN) monitoring system. Japanese Black cattle from two beef herds aged 9–10 months were used. DFA III was supplemented for two weeks. ZEN concentrations in feed were similar in both herds (0.27 and 0.22 mg/kg in roughage and concentrates, respectively), and below the maximum allowance in Japan. ZEN, a zearalenol (α -ZOL), and β -ZOL concentrations in urine were measured using LC/MS/MS the day before DFA III administration, 9 and 14 days thereafter, and 9 days after supplementation ceased. Significant differences in ZEN, α -ZOL, β -ZOL, and total ZEN were recorded on different sampling dates. The concentration of inorganic phosphate in DFA III-supplemented animals was significantly higher than in controls on day 23 (8.4 vs. 7.7 mg/dL), suggesting a possible role of DFA III in tight junction of intestinal

(別紙様式第 3 号)

epithelial cells. This is the first evidence that DFA III reduces mycotoxin levels reaching the systemic circulation and excreted in urine. This preventive effect may involve an improved tight junction-dependent intestinal barrier function. Additionally, our practical approach confirmed that monitoring of urinary mycotoxin is useful for evaluating the effects of dietary supplements to prevent mycotoxin adsorption.

In conclusion, the results of these field trials confirm that the contamination of cattle feed with multiple mycotoxins may alter systemic metabolic processes, and suggesting that chronic contamination with mycotoxins may have long-term harmful effects on the systemic metabolism of cattle. Additionally, by applying the urinary monitoring system, it was evidenced that DFA III reduces mycotoxin levels reaching the systemic circulation which may involve an improved tight junction-dependent intestinal barrier function.

(和文 2,000 字又は英文 800 語程度)

学位論文審査の結果の要旨

氏 名	戸田 克樹
審査委員	主 査：山口大学 教授 高木 光博
	副 査：山口大学 教授 西垣 一男
	副 査：鹿児島大学 教授 大和 修
	副 査：農業・食品産業技術総合研究機構 生物機能利用研究部門 ユニット長 菊地 和弘
	副 査：山口大学 准教授 谷口 雅康
題 目	Metabolite Profiling of Japanese Black Cattle Naturally Contaminated with Mycotoxin, and Clinical Evaluation of Fructo-Oligosaccharide (DFAIII) Feed Supplementation for Mitigation of Zearalenone Exposure in Cattle by a Urinary Zearalenone Monitoring System (カビ毒汚染牛群における代謝プロファイル評価および尿中濃度を指標とした Fructo-Oligosaccharide (DFAIII) 添加によるゼアラレノン浸潤低減効果)
審査結果の要旨： 家畜に給与される飼料中に常在する真菌によって産生されたカビ毒は飼料を汚染する。本論文では、エストロゲン類似作用を持ち、家畜に繁殖障害を引き起こす可能性が示唆される <i>Fusarium</i> 属真菌由来カビ毒のゼアラレノン (ZEN) と、アフラトキシン B1 生合成過程の中間物質である <i>Aspergillus</i> 属真菌由来のステリグマトシスチン (STC) に着目し、それらに汚染された飼料の給与が牛の代謝に与える影響を評価するとともに、新規カビ毒防除法としての飼料へのフラクトオリゴ糖添加効果の検証を行うことを目的とした。 第1章では、カビ毒汚染が牛の代謝系に及ぼす影響を検証するため、先行研究により ZEN と STC の自然汚染が確認された稲ワラを給与された黒毛和種肥育牛群を試験牛群として、汚染稲ワラ給与時の尿サンプル (高濃度群：n=6) と汚染稲ワラ除去後14日目に採取した尿サンプル (非汚染群：n=6) 、および非汚染稲ワラ給与下の黒毛和種肥育牛群由来尿サンプル (対照群：n=6) を用いて、ガスクロマトグラフィー質量分析法による尿中代謝物のメタボロミクス解析を行った。Principal component analysis (PCA) 解析の結果、高濃度群および非汚染群と対照群との間には代謝系における顕著な差異が存在したが、高濃度群と非汚染群との間には違いは見られなかった。また、エネルギー代謝やアミノ酸代謝などにおいても、試験牛群と対照群との間に有意な差が確認された。以上の結果から、カビ毒汚染飼料の摂取により一般的な血液生化学検査では検知できない代謝系の変化が生じていることが明らかとなり、高濃度汚染飼料の牛生	

代謝系への影響は、汚染飼料の除去後も長期間に及ぶ可能性が示唆された。今後は飼料中低濃度カビ毒の長期間浸潤が家畜の健康や繁殖性に与える影響の解明が求められた。

第 2 章では、近年実験動物で報告された、飼料へのオリゴ糖添加による消化管上皮細胞タイトジャンクション(TJ)の消化管バリア機能調整作用によるカビ毒吸収阻害効果の有無を、牛群において初めて客観的に評価することを目的とした。給与飼料中の ZEN 濃度が同値であることを確認した黒毛和種肥育雌の 2 牛群から、オリゴ糖 (DFAIII) 添加群 15 頭、無処置対照群 15 頭の計 30 頭を本試験に供した。DFAIII 添加は朝夕の給餌時に飼料に添加し、添加期間を 2 週間として添加試験開始時 (Day 0) と添加開始 9 日目 (Day 9)、14 日目 (Day 14)、および添加休止後 9 日目 (Day 23) に尿および血液のサンプリングを行った。尿サンプルはクロマトグラフィー質量分析法により尿中 ZEN 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) 濃度の測定を行った。併せて、DFAIII 添加による腸管 TJ 機能をモニターするために、血清カルシウム (Ca)、マグネシウム (Mg)、無機リン (iP) の濃度測定を行った。その結果、尿中濃度は ZEN、 α -ZOL、 β -ZOL、及びそれらの総計濃度のいずれにおいても DFAIII 添加群が対照群よりも有意に低くなり ($P < 0.05$)、それらは腸管からの ZEN 吸収量の差を反映するものと推測された。一方、血清生化学検査については Ca、Mg における 2 群間の差はなかったが、iP においては有意差が認められ、Day 23 において DFAIII 添加群が対照群よりも有意に高い濃度 ($P < 0.05$) となり、これは DFAIII 添加が消化管上皮の TJ 機能に影響を与えた結果を反映するものと思われた。以上の結果、飼料への DFAIII 添加により、腸管からの ZEN 吸収が低下する可能性が示唆された。今後は試験牛群数を増やして、DFAIII 添加効果の機序解明に向けた詳細な検証を行うとともに、臨床応用に向けての添加量や添加方法なども検討する必要がある。

飼養環境下の牛群において、カビ毒汚染が生体内代謝系に与える影響の一端を初めて明らかにするとともに、その影響が長期間に及ぶ可能性を示したことは、カビ毒汚染の慢性的な影響の解明に向けた足かかりとなるものである。さらにカビ毒吸着剤に替わる防除法としての DFAIII 添加効果の客観的評価がなされたことは、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。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。