

## Abstract of Doctoral Thesis

Name OKY SETYO WIDODO

Title: On-farm application of urinary mycotoxin monitoring systems for feed hygiene management to enhance cattle breeding herd productivity

(飼料衛生管理による生産性向上を目的とした尿中マイコトキシン濃度測定系の繁殖牛群における適用)

---

### Abstract of thesis:

In the first series of experiments, we address an advantageous application of a urinary zearalenone (ZEN) monitoring system not only for surveillance of ZEN exposure at the production site of breeding cows but also for follow-up monitoring after improvement of feeds provided to the herd. As biomarkers of effect, serum levels of the anti-Müllerian hormone (AMH) and serum amyloid A (SAA) concentrations were used. Based on the results of urinary ZEN measurement, two cows from one herd had urinary ZEN concentrations which were two orders of magnitude higher (ZEN: 1.34 mg/kg, sterigmatocystin (STC): 0.08 mg/kg in roughages) than the levels of all cows from three other herds (ZEN: not detected, STC: not detected in roughages). For the follow-up monitoring of the herd with positive ZEN and STC exposure, urine, blood, and roughage samples were collected from five cows monthly for one year. A monitoring series in the breeding cattle herd indicated that feed concentrations were not necessarily reflected in urinary concentrations; urinary monitoring assay by ELISA may be a simple and accurate method that reflects the exposure/absorption of ZEN. Additionally, although the ZEN exposure level appeared not to be critical compared with the Japanese ZEN limitation in dietary feeds, a negative regression trend between the ZEN and AMH concentrations was observed, indicating that only at extremely universal mycotoxin exposure levels, ZEN exposure may affect the number of antral follicles in cattle. A negative regression trend between the ZEN and SAA concentrations could also be demonstrated, possibly indicating the innate immune suppression caused by low-level chronic ZEN exposure. Finally, significant differences ( $p = 0.0487$ ) in calving intervals between pre-ZEN monitoring (mean  $\pm$  SEM:  $439.0 \pm 41.2$ ) and post-ZEN monitoring ( $349.9 \pm 6.9$ ) periods were observed in the monitored five cows. These preliminary results indicate that the urinary ZEN monitoring system may be a useful practical tool not only for detecting contaminated herds under field conditions but also provides an initial look at the effects of long-term chronic ZEN/STC (or other co-existing mycotoxins) exposure on herd productivity and fertility.

The second series of experiments, a herd of Japanese Black (JB) breeding cattle with sporadic reproductive disorders was continuously monitored for an additional year to assess the effects of the urinary ZEN concentration and changes in parameters (AMH and SAA) with time-lag variables and herd fertility (reproductive performance). This herd had high (exceeded the Japanese dietary feed regulations) urinary ZEN and rice straw ZEN concentrations (1.34 mg/kg). Long-term data of the herd with positive ZEN

(About 800 words in English)

exposure revealed a decreasing ZEN concentration in urine and a gradual decrease in the AMH level with age. The AMH level was significantly affected by the ZEN value 2-months earlier and the AMH level in the previous month. The changes in ZEN and SAA values were significantly affected by the ZEN and SAA values in the previous month. Additionally, calving interval data between pre-monitoring and post-monitoring showed a significantly different pattern. Furthermore, the calving interval became significantly shorter between the time of contamination (2019) and the end of the monitoring period (2022). In conclusion, the urinary ZEN monitoring system may be a valuable practical tool for screening and detecting herd contamination in the field, and acute and/or chronic ZEN contamination in dietary feeds may affect herd productivity and the fertility of breeding cows.

The third series of experiments, widespread presence of *Fusarium* mycotoxins in animal feed is a global issue, not only for the health of livestock but also for ensure the safety of food as an end product. High concentrations of ZEN and deoxynivalenol (DON) have been detected in the diets of JB and Holstein Friesian (HF) breeding herds. Consequently, we monitored serum biochemical parameters over a long time in both herds, focusing on AMH levels and acute-phase inflammation. Additionally, urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) and progesterone levels were measured in the HF herd. The JB herd, a ZEN-dominant model with low DON contamination, demonstrated ZEN levels that exceeded the Japanese limit in the purchased total mixed rations (TMR). Conversely, the HF herd, which primary consumes DON-dominant feed with low ZEN contamination, had high DON levels in the dent corn silage. Specifically, the JB herd's TMR contained 1.79 mg/kg ZEN and 0.58 mg/kg DON, whereas the HF herd's silage had 15.3 mg/kg DON (dried sample) and 0.1 mg/kg ZEN. Enzyme-linked immunoassay were used to measure urinary ZEN-DON levels following confirmation through liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Urinary ZEN-DON levels measured were significantly correlated ( $p < 0.05$ ,  $r > 0.6$ ) in both herds. In the HF herd, AMH levels increased ( $p = 0.01$ ) and serum amyloid A (SAA) levels decreased ( $p = 0.02$ ) when contaminated and at the end of the monitoring period. Additionally, urinary ZEN and DON levels were significantly correlated with SAA levels (ZEN:  $p = 0.00$ ,  $r = 0.46$ ; DON:  $p = 0.03$ ,  $r = 0.33$ ), with an increase in ZEN and DON levels resulting in higher SAA levels. The JB herd showed no significant differences. Additionally, in the HF herd, 8-OHdG/Cre levels increased significantly during major contamination periods ( $p < 0.05$ ). Clinical data from the HF herd indicated an increase in mastitis cases and treatment rates during periods of major contamination. Abortion rates in the HF herd decreased from 22.9% (before monitoring) to 8.9% (during the high contamination period) and finally to 1% (at the end of the monitoring period), with corresponding increases in progesterone levels. ZEN-DON contamination adversely affects breeding cattle's productivity, reproductive performance, and health. Therefore, monitoring urinary ZEN-DON is valuable for detecting contaminants and ensuring the safety of food products.

In conclusion, ZEN-DON contamination can adversely affect the productivity, reproductive efficacy, and health of breeding cattle. We examined the correlation of contamination measurements by ELISA and LC/MS-MS methods. The parallel urinary ZEN and DON contamination monitoring system we developed is effective for screening and detecting acute and/or chronic contamination of cow breeding herds on farms, hence ensuring the safety of food products.

## 学位論文審査の結果の要旨

氏 名	Okky Setyo Widodo
審 査 委 員	主 査： 山口大学 教授 高木 光博
	副 査： 山口大学 教授 日下部 健
	副 査： 山口大学 教授 佐藤 宏
	副 査： 鹿児島大学 教授 大和 修
	副 査： 山口大学 准教授 谷口 雅康
題 目	<p>On-farm application of urinary mycotoxin monitoring systems for feed hygiene management to enhance cattle breeding herd productivity</p> <p>(飼料衛生管理による生産性向上を目的とした尿中マイコトキシン濃度測定系の繁殖牛群における適用)</p>
<p>審査結果の要旨：</p> <p>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マイコトキシン（カビ毒）は飼料を汚染する。本論文では、共に <i>Fusarium</i> 属真菌由来カビ毒で、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ゼアラレノン(ZEN)と、免疫機能に影響を及ぼす他、下痢などの消化器症状を引き起こすことが報告されているデオキシニバレノール(DON)に着目し、それらカビ毒の尿中濃度測定系[ELISA 法及び液体クロマトグラフィー質量分析法(LC/MS/MS 法)]を用いた継続的なモニタリングが、牛群の生産性に与える影響を検証した研究である。</p> <p>第1章では、黒毛和種繁殖牛群における飼料中ZEN汚染状況のモニタリングを目的として、尿中ZEN濃度測定を実施したところ、1 牛群において飼料中ZEN汚染（1 ppm以上）を摘発するとともに、摘発牛群における 5 頭について飼料変更後のフォローアップ測定（1 回/月）を 1 年間継続した。あわせて、ZEN汚染が生体に与える影響をモニターするためのバイオマーカーとして、卵巣の胞状卵胞数の指標である血中抗ミュラー管ホルモン(AMH)濃度と急性相タンパク質である血清アミロイドA(SAA)濃度を測定した。本牛群における一連のモニタリングから、尿中ZEN濃度測定系は、牛群における飼料由来ZEN暴露を反映し、汚染牛群摘発のための簡便な方法であることが示された。さらに、ZEN濃度とAMH濃度の間に負の相関関係が観察されたことから、ZEN 曝露は繁殖雌牛の卵巣内胞状卵胞数に影響を及ぼすことが示された。</p> <p>第 2 章では、上述の ZEN 摘発 JB1 牛群（同一の 5 頭）をさらに 1 年間継続的にモニターし、尿中 ZEN 濃度と血中パラメータ（AMH および SAA）との関連性、および牛群の繁殖成績への影響を 2 年間に渡って評価した。毎月の尿中 ZEN 濃度測定結果に基づく管理者への注意喚起、飼養</p>	

管理を行うことで、季節的な変動は見られるものの、当該牛群の尿中 ZEN 濃度は汚染レベルよりも低く推移した。AMH 濃度は 2 ヶ月前の尿中 ZEN 濃度に有意な影響を受けた。さらに、牛の AMH 濃度は年齢とともに徐々に低下する可能性が示された。一方、尿中 ZEN 濃度と SAA 濃度では、前月の尿中 ZEN 濃度と SAA 濃度との間に有意な関連性が示された。さらに、当該牛群の本モニタリング前後の繁殖成績の推移では、汚染時（2019 年：平均 472 日）からモニタリング期間終了時（2022 年：平均 368 日）にかけて、牛群分娩間隔が有意に短縮された。以上より本尿中 ZEN モニタリングシステムは、牛群の ZEN 汚染をスクリーニング・検出するための実用的ツールであると考えられ、急性、あるいは低濃度かつ長期的な飼料の ZEN 汚染は、繁殖牛群の胞状卵胞数や炎症状態に影響を与えるとともに、最終的に牛群の繁殖性に影響を及ぼすことが示された。

第 3 章では、尿中 ZEN 測定系に加え、ELISA 法と LC/MS/MS 法による尿中 DON 測定系を新規に確立し、尿中 ZEN と DON 測定により新たに ZEN 優位黒毛和種（JB）及び DON 優位ホルスタイン・フリージアン（HF）牛群を摘発するとともに、同 2 牛群において尿中 ZEN 及び DON、血中 AMH 及び SAA 濃度の継続的なモニタリングを行なった。HF 牛群では酸化障害の指標として尿中 8-ヒドロキシ-2'-デオキシグアノシン(8-OHdG)、黄体機能の指標としてプロゲステロン(P4)濃度を測定した。HF 牛群では、カビ毒汚染飼料の変更後とモニタリング期間終了時に AMH 値が上昇し( $p = 0.01$ )、血清アミロイド A (SAA) 値が低下した( $p = 0.02$ )。さらに、尿中 ZEN および DON レベルは SAA レベルと有意な相関があり (ZEN :  $p = 0.00$ ,  $r = 0.46$ , DON :  $p = 0.03$ ,  $r = 0.33$ )、ZEN および DON レベルが上昇すると SAA レベルも上昇した。一方、JB 牛群では有意差は認められなかった。さらに、HF 牛群では、8-OHdG/Cre レベルが DON 汚染期間中に有意に上昇した ( $p < 0.05$ )。HF 牛群の臨床記録より、DON 汚染期間中に乳房炎症例と治療率が増加した。HF 牛群の流産率は 22.9% (DON 汚染摘発前) から 8.9% (高濃度汚染期間中) へ、そして最終的には 1% (モニタリング期間終了時) へ減少し、それに伴い P4 レベルも上昇した。以上より、飼料中 DON-ZEN 汚染は繁殖牛の健康や繁殖性に悪影響を及ぼし、牛群の生産性を低下させることが改めて示された。我々が開発した尿中 ZEN および DON 濃度同時測定系は、農場における繁殖牛群の急性および慢性汚染のスクリーニングおよび検出に有効であり、食品の安全性確保のための有用なツールとなることが示された。

飼養環境下の牛群において、尿中 ZEN と DON のモニタリングを基盤とした一連の研究により、牛群における ZEA と DON との共浸潤が確認されたことは、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である。さらに、カビ毒汚染と卵巣内の胞状卵胞数を反映する AMH、及び炎症の指標である SAA との関連性が明らかにされたことは、繁殖領域における新たな情報を提供するものと思われる。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。