

平成30年 5月25日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H02825

研究課題名(和文)ベクターコントロールが及ぼす希少野生動物への影響評価と新規感受性評価法の開発

研究課題名(英文) Risk assessment of vector control chemicals to wild animals and development of novel method to determine the chemical sensitivity

研究代表者

池中 良徳 (Ikenaka, Yoshinori)

北海道大学・獣医学研究院・准教授

研究者番号：40543509

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 11,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、アフリカのベクターコントロール地域である南アフリカの KwaZulu-Natal州に注目し、その汚染状況の調査および生息する生物に対する毒性影響評価を実施した。家禽に着目した調査の結果、肝臓中DDT濃度は中央値として920 ng/g ww、最大濃度で14,400 ng/g wwと非常に高い値を示した。リアルタイムRT-PCR法により遺伝子発現解析を実施した結果、脂質代謝や合成や性ステロイドホルモン合成に関与する遺伝子群に影響を与えている事が明らかになった。本研究結果は、DDTが生体に一定の影響を与えている事を示しており、今後より適切なベクターコントロールを実施する必要性を示唆する。

研究成果の概要(英文)：In this study, attention was paid to the KwaZulu-Natal state in South Africa, a vector control area in Africa, and its threat situation was investigated and toxicity impact assessment was conducted on living organisms. As a result of investigation focusing on poultry, the DDT concentration in the liver showed a very high value of 920 ng / g ww in the median and 14,400 ng / g ww in the maximum value. As a result of gene expression analysis by real-time RT-PCR method, it became clear that it affected genetic group involved in lipid metabolism, synthesis and sex steroid hormone synthesis. The results of this study suggest that DDT gives certain effects to the living body, suggesting the need to implement more appropriate Vector control in the future.

研究分野：環境毒性学

キーワード：DDT・IRS ベクターコントロール マラリア 誘導性肝臓様細胞

1. 研究開始当初の背景

研究の学術的背景: Vector Control のための薬剤散布の risk-benefit を考える。

■ 病原体媒介生物のコントロール (Vector Control) のための薬剤散布は感染症制圧のために必要であり、例えば我が国においても Dengue 熱の制圧のため、多量のピレスロイド系の殺虫剤が散布されたのは記憶に新しい。Vector Control のために、環境基準や野生動物への影響を度外視した薬剤散布が時として行われている。

■ とりわけ途上国地域では、感染症制圧は依然として緊急性の高い課題であり、我が国からも精力的にその研究・支援が行われている。マラリアは年間 130 万人以上の死者を出しており、その制圧のための Vector Control も支援の一環であり、そのための予算は、国際基金として年間 20 億ドルに達している。

■ 2006 年、WHO と USAID (U.S. Agency for International Development) は Vector Control のため、DDT (dichloro - diphenyl - trichloroethane) の屋内限定散布 (IRS) を推奨した。また、2013 年 5 月に開催された COP6 においても、DDT は伝染病防止のために引き続き使用する必要があると議論された。即ち、現在の Vector Control において、DDT に代替する薬剤は限られており、その年間散布量は、アジア・アフリカ地域を中心に 5,000 トンに達していると報告されている (Henk van den Berg 2009)。

■ その結果、マラリアによる死亡率は、2000 年に比べ、世界で 25%、アフリカでは 33% 減少し、一定の benefit が得られたことが報告された (World Malaria Report 2012)。その一方で、IRS は屋内に薬剤を直接散布するため、そのヒト健康影響が懸念されているが、その影響は不明な点が多い。すなわち、Vector Control が及ぼす環境影響について、より詳細な risk-benefit 解析を散布が推奨されてから 8 年が経過した今こそ行う必要がある。

2. 研究の目的

■ 本研究では、マラリアコントロール地域であるエチオピア・リフトバレー及び南アフリカ・クワズルナタールで希少野生動物に対する先行調査を行った結果、野生鳥類や魚類、両生類

から 1,000 ppm (脂肪当量) を超える極めて高濃度の DDTs が蓄積している事を明らかにした (Yared, Ikenaka et al. 2013 他)。DDT・IRS は、環境負荷が小さいと考えられ推奨されてきたが、本調査結果はその根底を揺らがすものであった。マラリアコントロールに一定の benefit がある DDT であるが、強い残留性・生物蓄積性・長距離移動性があることは周知の事実であり、日本近海の海産物の一部からは、現在でも 5 ppm (脂肪当量) を超える蓄積が報告されている (Hisamichi et al. 2012)。

■ 通常、Vector control には、DDT のみでなく、同時に様々なピレスロイド系農薬が使用されるが、この共散布が希少生態系にどのような影響を与えるのか、未だ報告はほとんど無い。更に、genome 情報が乏しく、*in vivo* 実験が困難な希少野生動物にこれら薬剤がどのような影響を与えるか、それを評価するための方法も未だ確立されていない。

以上の背景の基、本研究の目的は、「Vector control で使用される薬剤のヒトおよび希少野生動物への毒性評価法を開発し、中・長期使用時の曝露 risk を予測する」ことである。よって当該研究は、実際に DDT やピレスロイドの散布が行われている南アフリカ共和国でカウンターパートと共同でサーベイランスを実施する。また、これら薬剤の毒性影響を明らかにするための評価手法を確立する。

3. 研究の方法

本研究では、Vector Control 地域であり、年間数 10 ~ 数 100 トンの DDT やピレスロイドが散布されている南アフリカ・リンボポ州とクワズルナタール州およびエチオピア・リフトバレーに注目したフィールドトキシコロジーを実施すると共に、特に希少野生動物の化学物質感受性評価を行うための評価手法の確立を目指す。

■ DDTs・IRS 実施地域において、野生動物・家畜、家禽への化学物質曝露量を明らかにする: アフリカでは、爬虫類や両生類、鳥類を中心に野生動物の大量変死が報告されている。南アフリカでも 2009 年に国立公園内のクロコダイルが数百頭におよび多量死したことが報告されたが、その原因は未だ明らかでない。本研究では、土壌や底質、水質の化学物質濃度を調査すると共に、希少野生動物 (特にトッ

プレデター)や家畜・家禽に注目し、フィールドサーベイランスにより蓄積する化学物質濃度とその影響を明らかにする。

■希少野生動物に対する感受性評価法の開発:化学物質感受性の差は種により、数千倍に及ぶことがあり、実験動物を用いた *in vivo* レベルの毒性試験の結果を野生動物にそのまま外挿することは難しい。更に、希少野生動物、特にトッププレデターの場合、影響を直接観察できる *in vivo* 実験は困難であるため、*in vitro* や *in silico* による評価方法を構築する必要がある。当該研究では、薬物動態解析である“ADME”、特に感受性に直接寄与する Metabolism に注目し、各パラメーターを *in vitro* および *in silico* 解析により算出することで、予測が困難であった野生動物の化学物質感受性を評価することを試みる。

> **極新鮮肝 Bank の構築と代謝酵素画分を用いたカイネティック解析による感受性評価法の開発 (Metabolism の評価):**

化学物質感受性を決定するうえで大きく寄与する“Metabolism”を肝臓の代謝酵素画分を用いて評価を行う。その評価には、極新鮮肝(死亡直後の個体から肝臓を採材し、液体窒素で瞬間凍結後、-80 で保存した肝臓)を用いたファーマコカイネティクスによる解析が必要であるが、申請者らは、ライオン等の大型食肉目 15 種以上、猛禽類 20 種以上、両生類や爬虫類 20 種以上の極新鮮肝を既に所有し保存している。また当該研究においても、現地カウンターパートとの連携の基、極新鮮肝の採取を行い“極新鮮肝 Bank”の構築も目指す。

> **誘導性肝臓様細胞 (iHep) を用いた感受性評価法の開発 (Metabolism の評価):**

極新鮮肝による解析は野生動物の感受性評価の上で有効であるが、試料採集が極めて侵襲的であり、多種多様の野生動物から採取することは現段階では困難である。そこで、当該研究では、**皮膚線維芽細胞から iPS 技術を用いた誘導性肝臓様細胞 (iHep) の構築**を行う。野生動物の皮膚は検査捕獲時等に入手可能であり、申請者らは既にハイエナやアザラシ、トド、クマの皮膚線維芽細胞の初代培養に成功している。構築した iHep を用い、極新鮮肝同様、ファーマコカイネティック解析を行う。

4. 研究成果

DDTs・IRS 実施地域において、野生動物・家畜・家禽への化学物質曝露量と毒性評価

> **野性鳥類の卵に蓄積する DDT およびその代謝産物について:**野鳥の卵として、コシベニペリカン(*pelecanus rufescens*) (n = 6)、クロスキハシコウ(*Anastomus lamelligerus*) (n = 5)、およびコサギ(*Egretta garzetta*) (n = 7)の卵を巣から採取した。

本調査の結果、全てのサンプルで DDTs が検出された。コシベニペリカンでは p,p'-DDT, p,p'-DDE, p,p'-DDD および o,p'-DDT でそれぞれ 18.5 ± 20.6 (平均 ± SD), 396.6 ± 239.0, 117.1 ± 78.2, 26.1 ± 4.5 ng/g wet、クロスキハシコウでは p,p'-DDT, p,p'-DDE, p,p'-DDD および o,p'-DDT でそれぞれ 13.9 ± 13.1, 232.2 ± 99.0, 12.3 ± 8.5, 21.9 ± 6.8 ng/g wet、コサギでは p,p'-DDT, p,p'-DDE, p,p'-DDD および o,p'-DDT でそれぞれ 30.9 ± 15.9, 518.6 ± 358.6, 8.2 ± 9.2, 28.7 ± 15.6 ng/g wet であった。

ここで、カシヨクペリカンにおける DDT の最大無作用量(NOEL)は 0.5 µg/g egg wet wt (Cooper, 1991)、繁殖成功に対する臨界値は 3 µg/g egg wet wt であると報告されている(USDol, 1998)。また、1 µg/g egg wet wt の濃度で 5-10%卵殻の薄化が認められている(Blus et al., 1974)。このカシヨクペリカンと同属であるコシベニペリカンの DDTs 濃度を比較すると、6 サンプル中 2 サンプルにおいて、NOEL を超えており、そのうち 1 サンプルでは 1.18 ug/g wet wt を示した。これは卵殻の薄化の基準値である 1 ug/g wet wt を超過していた。よって、本研究で得られたコシベニペリカンでは、繁殖成功率への影響は少ないと考えられるが、卵殻の薄化の可能性は示唆された。今回の調査では、卵殻厚の測定は行っていないため、今後の研究が求められる。

次にアマサギでは、p,p'-DDE の濃度が上昇するほど卵殻菲薄化が認められることが報告されており、10 ng/g wet では卵殻の厚さは約 0.24 mm であるのに対し、100 ng/g wet では卵殻の厚さは約 0.19 mm と薄くなっていた(Bouwman et al., 2013)。本研究の結果、アマサギと同じ科に分類されるコサギの p,p'-DDE 濃度は最小濃度でも 214.5 ng/g wet wt (平均 ± SD; 518.6 ± 358.6 ng/g wet wt)であり、全ての卵で 100 ng/g wet を超えていた。この結果より、種差を考慮してもコサギでも十分に卵殻の薄化が生じていると考えられる。また、コサギと同属であるユキコサギに関して、DDE の濃度が 5 µg/g wet wt である場合、腹卵数および生殖力が減少し、卵の崩壊が確認されている

(Henry et al., 1985)。しかし、本研究のコサギでは DDE の濃度は最大で 1.17 $\mu\text{g/g}$ wet wt であり、5 $\mu\text{g/g}$ wet wt より低値であった。そのため、ユキコサギで確認されているような生殖力の減少等の影響は少ないかもしれない。今後、コサギおよびユキコサギに対する NOAEL 等を算出していく必要がある。

最後にクロスキハシコウに関しては、同じ属や科に属する種を対象とした先行研究が無かったため、本研究では水鳥のなかで同様の食性であるホオジロガモと比較した。ホオジロガモでは、DDE は 520 ng/g wet wt の濃度で、卵の崩壊や卵殻の 15.4% の菲薄化が確認されている(Zicus et al., 1988)。本研究におけるクロスキハシコウの卵中の DDE 濃度は 82.2-304.2 ng/g wet wt であったため、クロスキハシコウの卵の濃度は毒性影響のある濃度より低値であると考えられる。ただし、野生鳥類の化学物質感受性には大きな種差がある事が報告されているため、各鳥類種の DDT 感受性を明らかにし、種ごとの毒性影響評価を行うことが求められる。

(野性鳥類に関する業績は、その試料採集の困難さから研究課題番号 26304043 と共同で実施した。そのため、報告内容に一部重複する点がある。)

> 家禽に蓄積する DDT およびその代謝産物と遺伝子発現量解析:

ニワトリ試料は 2014 年 10 月に Kwazulu-Natal 州 Ndumo 地域で、軒先で飼育してされている個体を 48 羽採取した。ニワトリは、安楽死後、肝臓を採取し、DDT の化学分析用の試料と 遺伝子発現用の試料に分けて採取した。ニワトリの肝臓中の DDT 濃度は中央値として 919 ng/g wet weight (ww) (最大濃度 14,398 ng/g ww) であった。

DDT の組成として、*p,p'*-DDE が最も高く、75% を占めていた。一方、遺伝子発現解析の結果、免疫関連遺伝子 (AvBD1、2、6、7) と DDT 濃度には負の相関が確認された。

一方、脂質代謝や合成に関与する IGFBP1、ELOVL2 および SQLE またステロイド代謝に関与する CYP17A1 と DDT 濃度には有意な正の相関が確認された。特に、CYP17A1 と DDT 濃度の相関係数は $R^2=0.86$ と特に強い正の相関があり、ステロイドホルモン合成が攪乱されている可能性が示唆された。CYP17A1 はアンドロゲンホルモンの合性に関与しており、鳥類において性分化に関与している遺伝子である。

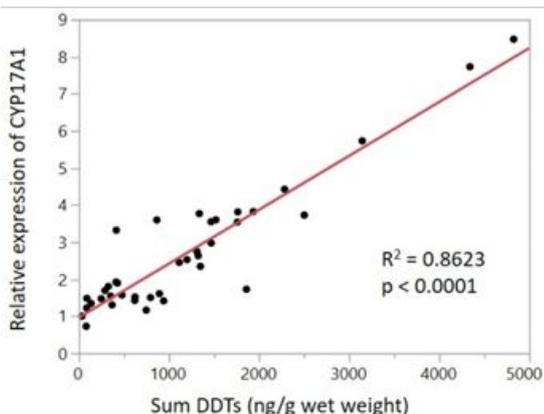
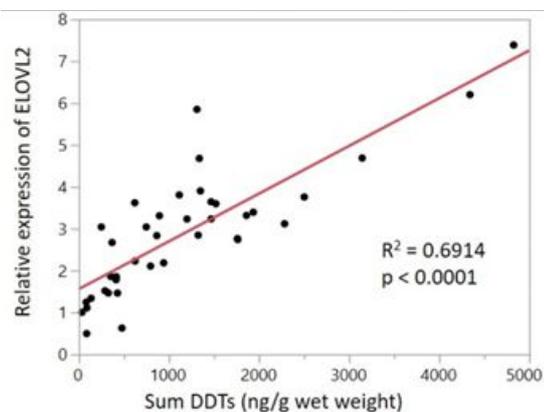
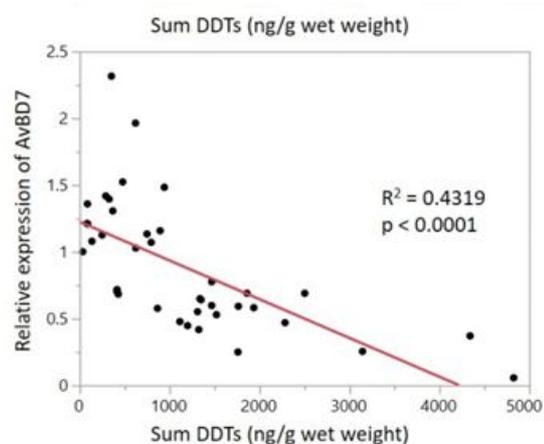


図 1: 肝臓中 DDT 濃度と遺伝子発現量との相関

当該研究で得られた結果は、マalariaコントロールのために散布している DDT がニワトリにおける遺伝子発現を攪乱している可能性を世界に先駆け示す結果であった。

誘導性肝臓様細胞 (iHep) を用いた感受性評価法の開発 (Metabolism の評価)

> iHep 細胞への誘導の試み: 当該研究では、食肉目として、ハイエナに注目した。ハイエナの皮膚線維芽細胞に鈴木因子である Hnf4

と Foxa (Foxa1, Foxa2, Foxa3 のいずれか一つ)を導入した。その結果、肝臓マーカーであるアルブミンや E-cadherin の顕著な増加を確認できた(下図)。しかし、誘導効率が低い事や cytochrome P450 や UGT 等、異物代謝に関与する酵素群の発現量が低い事などが改めて浮き彫りとなった。

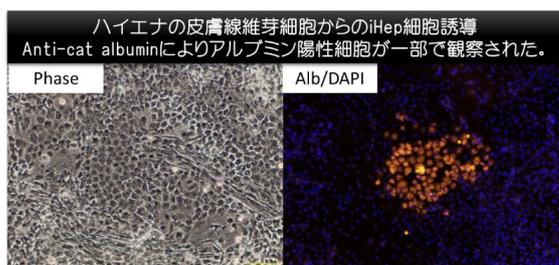


図 2: ハイエナの皮膚線維芽細胞から誘導された iHep 細胞

線維芽細胞から肝細胞への誘導に、今回は鈴木因子を用いた。一方、最近の報告では HNF や Foxa 以外にも、肝臓の初期発生にはいくつかの重要な Key factor が報告され始めている(右図)。また、これらの因子には種差があり、例えば、マウスの肝臓への分化誘導には HNF4 が重要であるが、ヒトでは HNF1 が重要であると言った知見である。

今後、種を超えた iHep 細胞への誘導を考慮すると、発生学的に各種でどのような因子が重要であるのか、明らかにしていく必要がある。また、これら遺伝的因子に依存しない誘導法の確立も重要になる。Chemical を用いた誘導法もその一つであり、今後はこれらの組み合わせにより“種共通”の分化因子を探索していく予定である。

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 57 件)

Thompson L. A., Ikenaka Y., Yohannes Y. B., Ichise T., Ito G., Bortey-Sam N., van Vuren J. J., Wepener V., Smit N. J., Darwish W. S., Nakayama S. M. M., Mizukawa H., Ishizuka M. Human Health Risk from Consumption of Marine Fish Contaminated with DDT and Its Metabolites in Maputo Bay, Mozambique, Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 査読有, 2018, pp 672-676, DOI:

10.1007/s00128-018-2323-7

R. Gerber, N.J. Smit, Johan H.J. van Vuren, Y. Ikenaka, Victor Wepener Biomarkers in tigerfish (*Hydrocynus vittatus*) as indicators of metal and organic pollution in ecologically sensitive subtropical rivers, 査読有, 2018, pp 307-317,

DOI:<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.03.091>

Pheiffer Wihan, Wolmarans Nico J., Gerber Ruan, Yohannes Yared B., Ikenaka Yoshinori, Ishizuka Mayumi, Smit Nico J., Wepener Victor, Pieters Rialet, Fish consumption from urban impoundments: What are the health risks associated with DDTs and other organochlorine pesticides in fish to township residents of a major inland city, Science of the Total Environment, 査読有, 2018, pp 517-527, DOI:

<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.02.075>

Bortey-Sam Nesta, Ikenaka Yoshinori, Akoto Osei, Nakayama Shouta M. M., Asante Kwadwo A., Baidoo Elvis, Obirikorang Christian, Mizukawa Hazuki, Ishizuka Mayumi, Environmental Pollution, 査読有, 2018, pp 163-170, DOI: 10.1016/j.envpol.2017.12.005

Kondo Takamitsu, Ikenaka Yoshinori, Nakayama Shouta M. M., Kawai Yusuke K., Mizukawa Hazuki, Mitani Yoko, Nomiyama Kei, Tanabe Shinsuke, Ishizuka Mayumi, Uridine Diphosphate-Glucuronosyltransferase (UGT) 2B Subfamily Interspecies Differences in Carnivores, Toxicological Sciences, 査読有, 2018, Vol. 158, pp 90-100, DOI: 10.1093/toxsci/kfx072

Yohannes Yared Beyene, Ikenaka Yoshinori, Ito Gengo, Nakayama Shouta M. M., Mizukawa Hazuki, Wepener Victor, Smit Nico J., Van Vuren Johan H. J., Ishizuka Mayumi, Assessment of DDT contamination in house rat as a possible bioindicator in DDT-sprayed areas from Ethiopia and South Africa, Environmental Science and Pollution Research, 査読有, 2017, Vol. 24, pp 23763-23770, DOI: 10.1007/s11356-017-9911-7

Thompson L. A., Ikenaka Y., Yohannes Y. B., van Vuren J. J., Wepener V., Smit N. J., Darwish W.S., Nakayama S. M. M., Mizukawa H., Ishizuka M., Concentrations and human health risk assessment of DDT and its metabolites in free-range and commercial chicken products from KwaZulu-Natal, South Africa, Food Additives and Contaminants: Part A, 査読有, 2017, Vol. 34, pp 1959-1969, DOI: <https://doi.org/10.1080/19440049.2017.1357209>

Les A Thompson, Wageh Sobhy Darwish, Yoshinori Ikenaka, Shouta MM Nakayama, Hazuki Mizukawa and Mayumi Ishizuka, Organochlorine pesticide contamination of foods in Africa: incidence and public health significance, JVMS, 査読有, 2017, in press, DOI: 10.1292/jvms.16-0214

Yohannes YB, Ikenaka Y., Nakayama SMM, Mizukawa H., Ishizuka M., Trace Element Contamination in Tissues of Four Bird Species from the Rift Valley Region, Ethiopia, BECT, 査読有, Vol. 98, 2017, pp 172-177, DOI: 10.1007/s00128-016-2011-4

他 48 件

[学会発表] (計 180 件)

Les A. Thompson, Yoshinori Ikenaka, Victor Wepener, Mayumi Ishizuka, Comparison of Food Products Contaminated by DDTs in South Africa and Mozambique, 19th International Conference on One Health, 25-26 May 2017, Holiday Inn, Wembley, London, UK (Oral)

Les THOMPSON, Yoshinori IKENAKA, Yared YOHANNES, Atnafu ASSEFA, Johan VAN VUREN, Victor WEPENER, Nico SMIT, Wynand VLOK, Wageh Sobhy DARWISH, Shouta NAKAYAMA, Hazuki MIZUKAWA and Mayumi ISHIZUKA, “First, do no harm” ? balancing the benefits of malaria control against the toxic effects of DDT use, The 5th Sapporo Summer Seminar for One Health (SaSSOH), 20-21 September 2017, Hokkaido University, Sapporo, Japan (Oral)

Les Thompson, Yoshinori Ikenaka, Yared Yohannes, Johan van Vuren, Victor Wepener, Nico Smit, Atnafu Assefa, Wageh Sobhy Darwish, Shouta Nakayama, Hazuki Mizukawa, Mayumi Ishizuka. Effect of DDTs on gallinacins in the avian immune system, The 10th International Meeting of the Asian Society of Conservation Medicine (ASCM), “One Health in Asia Pacific”, 20-23 October 2017, Kuching, Sarawak, Malaysia (Oral)

Emmanuel Temiotan Ogbomida, Alex Ajeh Enuneku, Yoshinori Ikenaka, Yared Beyene Yohannes, Wageh Sobhy Darwish, Shouta M.M. Nakayama, Hazuki Mizukawa, Mayumi Ishizuka, Evaluation of indoor residual spraying DDT for mosquito control: Tissue distribution and gene expression profiling in rat tissues, 環境ホルモン学会第 20 回研究発表会、2017 年 12 月 11 日 ~ 12 日、神戸大学、神戸市、兵庫県 (ポスター)

他 176 件

[その他]

ホームページ等

毒性学教室 HP

<http://tox.vetmed.hokudai.ac.jp/>

CHCA HP

<http://aa.vetmed.hokudai.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

池中 良徳 (IKENAKA, Yoshinori)

北海道大学大学院獣医学研究院・准教授
研究者番号: 40543509

(2) 研究分担者

石塚 真由美 (ISHIZUKA, Mayumi)

北海道大学大学院獣医学研究院・教授
研究者番号: 50332474

中山 翔太 (NAKAYAMA, Shouta)

北海道大学大学院獣医学研究院・助教
研究者番号: 90647629

水川 葉月 (MIZUKAWA, Hazuki)

北海道大学大学院獣医学研究院・助教
研究者番号: 60612661