

機関番号：10101
 研究種目：基盤研究（A）
 研究期間：2007～2010
 課題番号：19208028
 研究課題名（和文）
 環境汚染と希少野生プレデターにおける化学発癌
 研究課題名（英文）
 Effects of environmental pollutants on cancer in wildlife
 研究代表者
 藤田 正一（FUJITA SHOICHI）
 北海道大学・名誉教授
 研究者番号：10143314

研究成果の概要（和文）：当該研究では、希少動物を含む生態系高次の動物について発がん物質の影響を調べるために、癌原物質を代謝的に活性化するシトクロム P450（CYP）1A1、及びその転写調節因子アリルヒドロカーボン受容体、活性代謝中間体を抱合する抱合酵素の種差を中心に調べ、その基質との親和性や分子進化について明らかにした。また、野生動物における発がん物質など環境汚染物質の蓄積とその影響について、野生げっ歯類を中心とした歩哨動物を用いて分析した。

研究成果の概要（英文）：We investigated bioaccumulation levels of environmental chemicals, e.g., carcinogens and pro-carcinogens, in wildlife and elucidated the effects of these environmental toxic compounds. We cloned cytochrome P450 1 subfamilies, arylhydrocarbon receptors and phase II enzymes, which contribute to activation or detoxification of carcinogens and procarcinogens, from bird and mammalian species including rare wildlife, and characterized these molecules. We also reported the molecular evolution of these enzymes and regulation receptors in wildlife.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
%##*	S#Z, ##Z###	&Z%#Z###	S' ZS* #Z###
%##+年度	~*Z) ##Z###	%Z%#Z###	, Z++#Z###
~%##,	, Z(##Z###	%Z+(#Z###	S%Z&(#Z###
~%#S#年度	, Z(##Z###	%Z+(#Z###	S%Z&(#Z###
総計	&*Z) ##Z###	SSZ%#Z###	' +Z* (#Z###

研究分野：薬物代謝学、毒性学

科研費の分科・細目：境界農学・環境農学

キーワード：環境汚染、野生動物、プレデター、化学発癌、シトクロム P450

1. 研究開始当初の背景

我々は、これまで、様々な階層の野生生物を採集し、生体に蓄積する環境汚染物質やその生体影響について調査・研究を行ってきた。この研究過程で、食物連鎖の頂点に立つトドやゴマフアザラシに高濃度の PCB、DDT が蓄積し、その蓄積レベルに相関して雌性ホルモンエストロゲンの代謝に預かる P450 分子種である CYP1 ファミリーの発現

量が増加していること、甲状腺ホルモン濃度が PCB 濃度と負の相関関係を持ち、PCB 曝露によって明らかな生体影響が出ていることを報告した。また、鳥類における高次捕食者オオワシ、オジロワシに蓄積する有機塩素系化合物や重金属を分析した。その異性体のプロファイルから PCB や DDT の汚染源がロシアにあることを突き止めた。これらの結果は、環境汚染物質が実際に高次捕食者の野生

動物に影響をもたらしていることを明らかにしている。

これまでの研究の過程で、我々は、ダイオキシン類や PCB など、高濃度の化学物質に曝露された野生動物では、低濃度汚染の個体に比べて、肝臓において著しく GSTP などの癌マーカーが高発現していることを野生動物で初めて明らかにした。さらに、1990 代後半より、環境化学物質の DNA アダクトの検出率の増加が鯨類で報告されている。また、ウシでは、環境化学物質とウイルスによる腫瘍の危険性が密接に関連している可能性が報告された。ヒトの発癌の約 80% は、環境中の発癌物質等環境の要因に起因することが知られているが、一方で、野生動物で報告されている癌はウイルスなどが原因であると推測されているのみで、化学物質による発ガンが野生動物の間でどの程度起きているのか、その実態の調査は行われていない。しかし、野生動物における DNA 付加体の検出は、ヒト同様、化学物質による DNA 障害が希少動物でもおこっていることを確実に示している。

2. 研究の目的

野生動物の場合、各々の動物種で実験動物とは異なる外来化学物質の代謝的活性化（毒化）経路を持っており、実験動物のみの研究結果からそのリスクを外挿することは難しいことを我々は報告した。化学物質による生態系の破壊は、最も検知しにくく、しかも不可逆的な場合が多い。化学物質による「発癌」という状況は、これまでの予備的な調査からも、野生動物の間で、少しずつであるが、確実に進行していることは明らかである。化学発癌が生態系に与える影響についてはまったく情報が無いが、その実態調査は獣医学領域における急務である。

そこで、本研究では、ヒトが生産・放出する化学物質の大型野生動物への化学発癌リスクを初めて評価し、生物保全のための研究を推進することを目的とした。

3. 研究の方法

（概要）本研究は、プレデター・大型野生動物を研究のターゲットとするが、モデル動物として、中間捕食者でありながら、プレデターも捕食し、汚染物質に高濃度に曝露されている海鳥繁殖地のドブネズミなど、比較的入手の簡易な野生動物についても分析を行う。さらに、鳥類及び哺乳類において xenobiotics を代謝的活性化するシトクロム P450 (CYP) の分子および機能の解明の為に、キーエンザイム P450 とその発現を調節する受容体間のバイオフィームネットワークを明らかにする。その為、希少動物を含む野生動物種から P450 とその発現調節因子をクロ

ーニングあるいは精製し、in silico あるいは異種細胞発現による機能解析を行う。

(1) 発がん物質の活性化および解毒/排泄に関わる酵素類、その受容体の生化学的特性の同定

大型草食獣や、広範囲の希少動物（特にプレデター）において発がんに関わる酵素類およびその発現調節因子の解析を行う。また、プレデターを含む鳥類におけるアрилハイドロカーボン受容体の解析を行う。遺伝子のクローニングの他、in silico による解析も行う。

(2) 環境汚染物質が野生動物に及ぼす影響に関するモデル動物を用いた研究

野生のラットを中心に、蓄積する環境汚染物質の（特に発がん性を示す多環芳香族類、有機塩素系化合物、有害金属を中心に）分析する。

さらに、肝臓におけるマーカーの変動や、ゲノムへの修飾について明らかにし、蓄積する環境化学物質の発癌リスクや、蓄積する化学物質が野生動物に及ぼす生化学的変化や毒性学的影響について、その可能性を明らかにする。

4. 研究成果

（概要）広範囲の動物種について、変異原物質や癌原物質を代謝的に活性化するシトクロム P450 のうち CYP1A1、及びその転写調節因子アрилハイドロカーボン受容体の種差を中心に、下記の通り明らかにした。また、フィールドにおける環境汚染物質の影響を調べるために、野生動物やヒトの歩哨動物となる野生げっ歯類を用いて、蓄積する環境化学物質とその毒性学的/生化学的影響について明らかにした。

(1) 発がん物質の活性化および解毒/排泄に関わる酵素類、その受容体の生化学的特性の同定

（概要）高次の動物種を中心に、発がん物質の代謝に関わる酵素類（シトクロム P450、ジアホラーゼ、グルクロン酸抱合酵素、硫酸抱合酵素など）やその発現調節因子（アрилハイドロカーボン受容体）の生化学的特徴について明らかにした。

①大型草食獣において発がんに関わる酵素類およびその発現調節因子の解析

変異原物質や癌原物質の代謝的活性化には CYP1A1 の関与が大きいことが知られ

ている。そこで、大型草食類における環境化学物質の代謝的活性化能について、その種差を明らかにした。

実験動物と異なり、有蹄類では CYP1A1 依存の代謝活性が大きいこと、しかし活性化された化学物質を抱合し、体外への排泄を促進する第二相抱合酵素（グルクロン酸抱合酵素、グルタチオン抱合酵素）の活性が比較的高く、化学発がんに対する生体防御能をあげていることが予測された。

また反芻類では、他の哺乳類に比較して特異的な CYP1A1 の組織発現パターンを示すことが分かった。反芻類では CYP1A1 は舌や上部消化管における発現レベルが高く、反芻によってこれらの器官が化学物質に繰り返し接触している影響も示唆された。実際、汚染が亢進している地域における野生もしくは飼育下の反芻動物を調べたところ、これらの動物種の臓器（舌など）には、他の臓器に比較して、重金属等に関しては高い濃度の汚染物質の蓄積が認められた。

CYP1A の発現を変動させるファクターには様々な化学物質が報告されている。本研究では草食性の動物に関して、植物に含まれるカロテノイド類が、CYP1A1 の発現に重要な働きをしていることを見出した。

② 広範囲の希少動物において発がんに関わる酵素類およびその発現調節因子の解析

希少動物を含む様々な動物種（食肉目、奇蹄目、鯨偶蹄目、齧歯目、霊長目、長鼻目）から CYP1A1 をクローニングし、その分子進化と淘汰圧の関係について明らかにした。

また、CYP1A1 以外にも、発がん物質の代謝的活性化に関わる CYP1 ファミリーについてクローニングを行い、その分子進化とアрилハイドロカーボン受容体との関係について報告した。

一方、第二相抱合酵素の一つで、哺乳類では環境汚染物質の解毒に非常に重要な働きをするグルクロン酸抱合酵素について、希少食肉目におけるゲノム解析を行い、これらの種でグルクロン酸抱合酵素の 1A6 が偽遺伝子化していることを見出した。従って、希少な食肉目は外来化学物質に対する感受性が他の種よりも高い可能性が考えられた。

③ 鳥類におけるアрилハイドロカーボン受容体の解析

鳥類におけるアрилハイドロカーボン受容体の性状の種差について調べた。特に鳥類の中でもトッププレデターに位置するハヤブサなど猛禽類について、アрилハイドロカーボン受容体と変異原物質との親和性について明らかにした。

また、これまで鳥類のモデル動物としてニワトリが用いられてきたが、ニワトリのアрилハイドロカーボン受容体感受性が他の鳥類と異なり、顕著に高いことを報告した。さらに、このニワトリと同等の感受性を持つ鳥類種を初めて報告した。

鳥類にはアрилハイドロカーボン受容体 1 と 2 が発現することが知られているが、アрилハイドロカーボン受容体 2 についても様々な鳥類種から遺伝子をクローニングし、その分子進化に関して報告した。

また、新たにクローニングを行った様々な鳥類種のアрилハイドロカーボン受容体 1 について、*in silico* 解析により、リガンドとの親和性に関するドッキングシミュレーションを行い、その特性を明らかにした。アрилハイドロカーボン受容体 1 とリガンドとの親和性を決定する 2 つのアミノ酸について、その変異がリガンドとの親和性にどのように影響するのかを *in silico* で解析した。

(2) モデル動物を用いた環境汚染物質が野生動物に及ぼす影響に関する研究

(概要) 野生げっ歯類をモデルとした環境汚染物質の調査とその影響について解析した。野生げっ歯類に関しては現在も採集および解析を継続しているが、日本各地から野生のドブネズミおよびクマネズミを採集し、蓄積する環境汚染物質の分析と発がんマーカー、化学物質の代謝解毒酵素の発現について解析を行った。

① 野生げっ歯類に蓄積する環境汚染物質の解析

代謝的活性化により遺伝子毒性を持つ多環芳香族類について分析を行った。野生げっ歯類では、代謝および排泄の早い多環芳香族類の蓄積は低く、検出限界以下の化合物が多かった。しかし、フルオレン、ピレン、等の多環芳香族類の他、ガソリン燃焼のマーカーとなるベンゾ[g,h,i]ペリレンも検出された。また、変異原性のあるベンゾ[k]フルオランテン、ジベンゾ[a,h]アントラセンなど、発がん性が疑われている一部の多環芳香族が低濃度で検出された。

一方で、野生げっ歯類では、特にラット属で様々な種類の有機塩素系化合物の蓄積が認められた。ダイオキシン類に関しては、国内でも一部の都市地域で高濃度のコプラナーPCB を蓄積している個体群が認められた。またヒトの活動のない離島の海鳥繁殖地より採集したドブネズミでは、日本国内では使用されていない有機塩素系殺虫剤も検出され、海鳥由来の汚染によることが考えられた。

残留性有機汚染物質であり、難燃剤に含まれるジフェニルエーテルについては都市部棲息の個体で蓄積が認められた。難燃剤は都市部より採集したドブネズミにおける蓄積が高く、大きな地域差は認められなかった。一方、離島などヒトの活動のない地域から採集したげっ歯類では、ジフェニルエーテルの蓄積濃度は、他の地域に比較して顕著に低い値を示した。

日本国内より採集した野生げっ歯類では、一部の地域から、発がん性のあるヒ素が高い濃度で蓄積している個体が検出された。また、鉛濃度が顕著に高い個体群も検出された。国内の鉛蓄積レベルは外国より採集した野生ラット個体群よりも高濃度であった。一方で、これらの重金属の野生げっ歯類における蓄積と、GIS（地理情報）解析されている棲息地域の重金属の土壤汚染との間には相関は得られなかった。特に都市部に棲息しているドブネズミやクマネズミではその傾向が強かった。モデル動物としてピックアップした野生げっ歯類のうち、クマネズミやドブネズミなどでは、ヒトの生活圏に近いため、棲息土壌の環境の汚染よりも、比較的、食物由来の汚染を反映している可能性が示唆された。

②汚染地域に棲息するげっ歯類の生化学的/毒性学的解析

国内における環境汚染の重度汚染地区では、棲息する野生ラットの肝臓等において、活性酸素種や重金属曝露のバイオマーカー、発がんマーカー遺伝子の上昇が認められ、野生動物において「環境化学物質の影響があることが明らかとなった。特に環境汚染が著しく更新している地域と、ヒトの活動が殆どなく汚染が低い地域から採集したドブネズミでは、重金属の蓄積と肝臓に発現するメタロチオネインなど金属蓄積マーカーの発現レベルとの間に相関関係が得られ、非汚染域に棲息するネズミに比較すると、汚染域に棲息するネズミではマーカー遺伝子の発現が有意に上昇していた。

また、高濃度の重金属に曝露されている野生ラットの個体群ではゲノムのメチル化レベルの低下が認められ、野生動物においても発がん性を持つ環境汚染物質がゲノムにエピジェネティックな影響を及ぼしている可能性が示唆された。

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 33 件)

- ① Sasaki N, Matsumoto T, Ikenaka Y, Kazusaka A, Ishizuka M, Fujita S. Furazolidone induces the activity of microsomal enzymes that metabolize furazolidone in chickens. *Pestic Biochem Physiol*. 2011 (in press) 査読あり
- ② Kawai YK, Ikenaka Y, Fujita S, Ishizuka M. The CYP1D subfamily of genes in mammals and other vertebrates. *Mamm Genome*. 2010. 21(5-6):320-9. 査読あり
- ③ Takiguchi M, Darwish WS, Ikenaka Y, Ohno M, Ishizuka M. Metabolic activation of heterocyclic amines and expression of CYP1A1 in the tongue. *Toxicol. Sci*. 2010. 116(1):79-91. 査読あり
- ④ Darwish WS, Ikenaka Y, Eldaly EA, Ohno M, Sakamoto QK, Fujita S, Ishizuka M. Cytochrome P450 1A dependent activities in deer, cattle, and horses. *J Vet Med Sci*. 2010. 72(5):561-6. 査読あり
- ⑤ Nakayama SMM, Tanaka-Ueno T, Sakamoto QK, Fujita S, Ishizuka M. Molecular cloning of novel cytochrome P450 1A genes from nine Japanese amphibian species. *J Vet Med Sci*. 2009. 71(10):1407-11. 査読あり
- ⑥ Sakamoto QK, Sato K, Naito Y, Habara Y, Ishizuka M, Fujita S. Morphological features and blood parameters of Weddell seal (*Leptonychotes weddellii*) mother and pup during breeding season. *J Vet Med Sci*. 2009. 71(3):341-4. 査読あり
- ⑦ Refat NA, Ibrahim ZS, Moustafa GG, Sakamoto QK, Ishizuka M, Fujita S. The induction of cytochrome P450 1A1 by sudan dyes. *J Biochem Mol Toxicol*. 2008. 22(2):77-84. 査読あり

[学会発表] (計 40 件)

- ① Ikenaka Y, Muroya T, Nakayama S, Saentienchai A, Muzaundu K, Choongo K, John Y, Ishizuka M. The Environmental Pollution in Zambia: Current status of POPs and heavy metals pollution in wildlife and domestic animals in Zambia. 31st Annual Meeting in North America of the Society of Environmental

Toxicology and Chemistry
(SETAC) (Oregon Convention Center,
Portland, Oregon, USA. 7-11 November
2010)

- ② 藤澤希望、山本秀明、川合佑典、坂本健太郎、藤田正一、石塚真由美. Arylhydrocarbon receptor (AhR) の分子生物学的解析によるハヤブサの環境汚染物質の感受性評価. 第147回日本獣医学会学術集会 (平成21年4月4日、栃木県総合文化センター、栃木県自治会館、栃木県)
- ③ Wageh Sobhy, Mayumi Ishizuka, Kentaro Q Sakamoto and Shoichi Fujita. Mutagenic activation and detoxification of Benzo[a]pyrene by liver of meat producing animals. 第146回日本獣医学会学術集会 (平成20年9月24日、ワールドコンベンション・センター、宮崎県)
- ④ Wageh Sobhy, Mayumi Ishizuka, Kentaro Q Sakamoto and Shoichi Fujita. Role of phase II metabolizing enzymes in decreasing the mutagenic activity of Ungulates microsomes. 第35回日本トキシコロジー学会学術年会 (平成20年6月27日、国立オリンピック記念青少年総合センター、東京都)
- ⑤ Wageh Sobhy, Mayumi Ishizuka, Kentaro Q Sakamoto and Shoichi Fujita. Characterization of Cytochrome P450 CYP1A in Ungulates. The First Egypt-Japan International Symposium on Science and Technology (平成20年6月8日、早稲田大学、東京都)
- ⑥ Fujita S, Sakamoto K, Ishizuka M. Environmental impact of persistent toxic substances on wildlife. 13th International Symposium on Toxicity Assessment (平成19年8月21日、富山県民会館、富山県)

[図書] (計2件)

藤田正一、他: P450の分子生物学 第2版、分担執筆 (魚類のP450酵素系)、pp195-208 (総297ページ)、講談社サイエンティフィク (2009年発行)

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称: 第二相解毒酵素誘導剤
発明者: 大和 修 外3名
権利者: 国立大学法人 鹿児島大学
種類: 特許
番号: 特許出願2006-297965
出願年月日: 2006年11月1日
国内外の別: 国内

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤田 正一 (FUJITA SHOICHI)
北海道大学・名誉教授
研究者番号: 10143314

(2) 研究分担者

池中 良徳 (IKENAKA YOSHINORI)
北海道大学・大学院獣医学研究科・講師
研究者番号: 40543509

(3) 連携研究者

石塚 真由美 (ISHIZUKA MAYUMI)
北海道大学・大学院獣医学研究科・教授
研究者番号: 50332474
(H19→H21: 研究分担者)

坂本 健太郎 (SAKAMOTO KENTARO)
北海道大学・大学院獣医学研究科・講師
研究者番号: 80374627
(H19→H21: 研究分担者)