

令和 2 年 5 月 27 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19847

研究課題名（和文）「カクテル型」コンセプトによる「猛禽類対応型」新世代殺鼠剤の開発

研究課題名（英文）Development of new "cocktail type" rodenticide

研究代表者

石塚 真由美（Ishizuka, Mayumi）

北海道大学・獣医学研究院・教授

研究者番号：50332474

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：現在、殺鼠剤による猛禽類への二次被害が頻発している。このため、殺鼠剤抵抗性ラットに有効かつ安全な駆除方策は存在しない。これは抵抗獲得機序に対する研究の不足と野生動物における感受性評価法の欠如が原因である。本研究では、殺鼠剤抵抗性の獲得の原因を明らかにし、殺鼠剤の開発や非対象生物種への保全に資するデータを得ることを目的とした。本研究により、野生齧歯類の殺鼠剤への抵抗性の原因として、ビタミンKエポキシド還元酵素の結合ポケット内外の変異が抵抗性獲得に寄与する事を実証した他、NADPH産生の向上とそれに伴うシトクロムP450による殺鼠剤代謝能の活性化という新しい抵抗性獲得機序が明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

国内で発生している野生齧歯類の殺鼠剤抵抗性について、ビタミンKエポキシド還元酵素（VKOR）と殺鼠剤との親和性の低下のほか、電子伝達系の変化によるシトクロムP450の活性上昇という新しいメカニズムを提唱した。現在、世界中で殺鼠剤の非対象生物への毒性が問題となっているが、本研究は新規殺鼠剤の新規開発にも資するものであり、また、非対象生物のリスクアセスメントのクライテリアにも貢献することができる。

研究成果の概要（英文）：Currently, secondary damage to birds of prey from rodenticides is frequently occurring. Therefore, no effective and safe control measures exist for rodenticide-resistant rats. This is due to the lack of research on resistance acquisition mechanisms and the lack of methods for assessing susceptibility in wildlife. The purpose of this study was to elucidate the causes of the acquisition of rodenticide resistance and to obtain data that will contribute to the development of rodenticides and their conservation to non-target species. This study demonstrated that mutations in the binding pocket and within the binding pocket of vitamin K epoxide reductase contribute to the acquisition of resistance in wild rodents as a cause of rodenticide resistance, and revealed a new mechanism of resistance acquisition through enhanced NADPH production and subsequent activation of rodenticide metabolism by cytochrome P450.

研究分野：環境毒性学

キーワード：殺鼠剤 シトクロムP450 ビタミンKエポキシド還元酵素 野生齧歯類 ラット

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

野生齧歯類は35種以上の人獣共通感染症を媒介する。これには現在マダガスカルで流行し100人以上が死亡したペスト等の重篤な感染症も含まれる。また、野生ラットは繁殖力の強さから離島へ生息域を広げ外来動物として生態系を攪乱する事もある。これらは絶滅危惧種の植物や鳥類の卵を食害し生息数を激減させる。イギリス領ゴフ島でのズキンミズナギドリや小笠原諸島のシマホゾキラン等国内・外で希少種の被害が報告されている。このように野生ラットは人・生態系に対し有害動物となり得るため、その駆除は不可欠である。

野生齧歯類の駆除方策としてトラップなど物理的方策は、強い繁殖力に対し効果が薄く、撲滅することはできない。天敵導入などバイオロジカルな手法は更なる生態系攪乱を生じるため禁忌である。そこで安価で高い効果を持つ殺鼠剤が用いられる。殺鼠剤としてワルファリンなど抗凝血系化学物質が比較的安全性が高いため広く利用された。一方、度重なる使用により抵抗性を持つ個体群が世界各地に出現している。その対策に欧米では致死性の高い第二世代抗凝血系殺鼠剤が用いられている。しかしながら、第二世代抗凝血系殺鼠剤は毒性が強く駆除対象外生物の二次被害が絶えない。ノスリやワシミミズクなど希少な猛禽類での被害が特に多く、Nature Newsで“Killing rats is killing birds”と報告されるなど深刻な問題である。

2. 研究の目的

そこで当該研究は、齧歯類における抵抗性獲得機序の解明とそれに応じた新規殺鼠剤の開発のための基盤データ、殺鼠剤抵抗性ラットや鳥類種における殺鼠剤感受性評価を行う in silico モデリング手法の構築を目指す。

3. 研究の方法

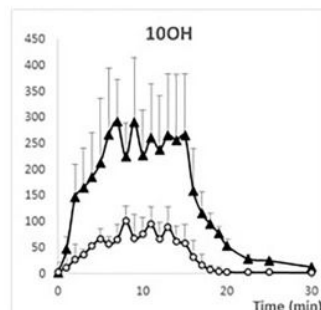
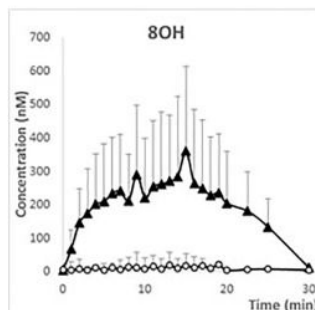
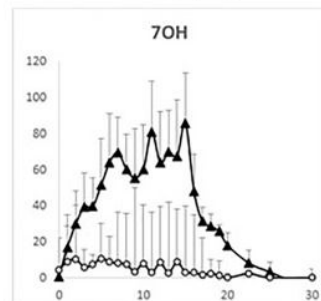
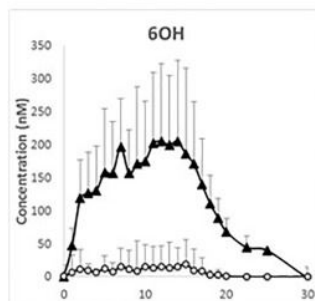
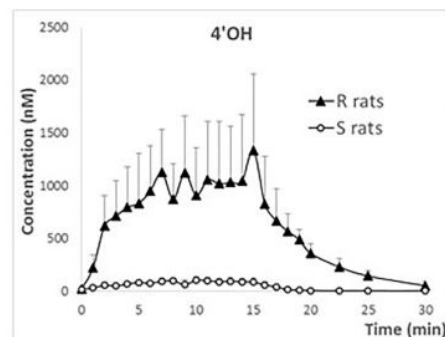
殺鼠剤など化学物質の感受性を構成する要素として以下の二点が挙げられる。

- 標的分子の遺伝子変異：
標的分子の種差・遺伝子変異が化学物質の感受性に影響する。殺鼠剤は血液凝固因子産生に必要な酵素ビタミン K エポキシド還元酵素(VKOR)を阻害し出血多量を起こし致死させる。VKOR の遺伝子変異・配列の種差により殺鼠剤の VKOR への結合性が変化する。
- 薬物体内動態の各要素 = ADME(Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion)の影響：
生体内で化学物質が作用する際、吸収・分布により標的分子へ到達、またその後代謝・排泄を受ける。これら ADME は生体内での化学物質感受性に影響を与える。特に解毒・排泄を担う「代謝」はその影響の中核を為す。また薬物代謝酵素シトクロム P450(CYPs)には幅広い種差があることも知られ、化学物質に対する種差の主要因である。

そこで、上記2点について、in vitro、in silico 解析により、明らかにする。殺鼠剤感受性固体と抵抗性固体をそれぞれ飼育繁殖させ、継代してクローンコロニーを形成させた。感受性個体、抵抗性個体について、肝灌流試験により in vivo に近い形で殺鼠剤の代謝の kinetics を分析した。また、肝臓を採集し、マイクロソーム画分および9000g上清(S9画分)を調製した。基質とおよび殺鼠剤と酵素の親和性については、in silico での結合性シミュレーションおよびドッキングシミュレーションにより解析した。

4. 研究成果

ワルファリンはビタミン K エポキシド還元酵素(VKOR)を阻害し、ビタミン K 依存性の血液凝固因子を枯渇させ出血毒性を示す。従来、世界各地の抵抗性齧歯類ではVKORの結合ポッケツ

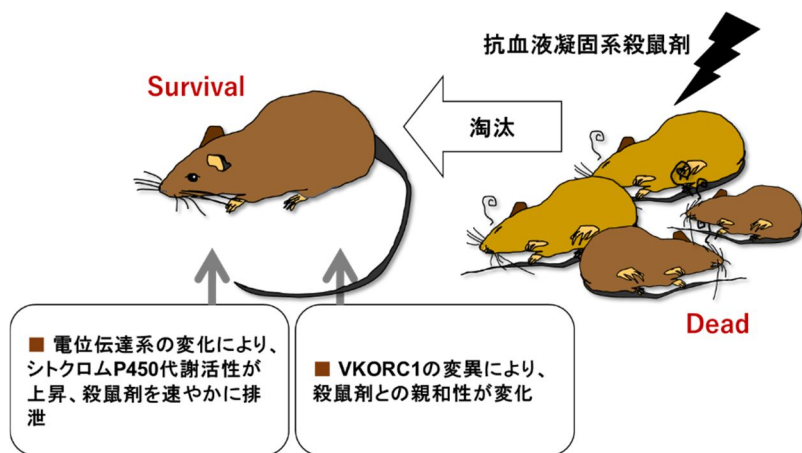


ト内にアミノ酸変異が生じると抵抗性が生じる事が示唆されている。一方、東京の抵抗性ラットで多数確認されている変異パターンである Leu76Pro 変異は結合ポケットや活性残基から離れた位置にあり、どのように抵抗性に寄与するかは不明であった。そこで、国内のクマネズミで認められている本変異が VKOR の VKO 還元活性やワルファリン感受性に与える影響を *in vitro* 酵素速度論的手法や *in silico* での結合性シミュレーションで解析した。肝臓の酵素画分を用いた代謝活性測定において、ワルファリンに対する 50%阻害濃度を比較すると Leu76Pro 変異を有する抵抗性群の VKOR では、感受性群（野生型）に比べ有意に高い値を示すことがわかった。そこで、Leu76Pro 変異 VKOR の立体構造とワルファリン/VKO の結合性をドッキングシミュレーションで評価したところ、抵抗性群はワルファリンとの結合性が低下していたが VKO とは感受性群と同等の結合性を示した。

ワルファリンは主に肝臓中で薬物代謝酵素シトクロム P450 (P450) により水酸化体に代謝される。しかし、肝臓のミクロソームや S9 画分を用いた実験では、殺鼠剤抵抗性群と感受性群とで、半数致死量 LD50 を反映させるような顕著な酵素活性の差は認められなかった。また、ワルファリン代謝を担う P450 のタンパク質発現量はウェスタンブロット法で比較すると、感受性群に比べ 1.2-1.3 倍と軽微な変化に留まった。そこで、肝代謝能を *in situ* 肝灌流試験により調べた。グラフに示しているのは、S が感受性群、R が抵抗性群における *in situ* 肝灌流試験のワルファリン代謝活性の結果である。実際に抵抗性群は 5 つ全ての水酸化ワルファリンで有意に 5-8 倍程度高い生成量を示し、ワルファリンに対して高い肝代謝能を有している事が明らかとなった。

In vitro の再構成系の代謝実験では、電子伝達系を NADPH など外部より供与している。一方で、肝灌流試験では人工的な電子伝達系の供与は行っていない。そこで、P450 の反応に不可欠なニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸 (NADPH) を介した電子伝達反応に着目した。S9 画分を用いた内因性 NADPH 産生能依存性の P450 ワルファリン代謝活性試験を行ったところ、抵抗性群は全ての水酸化体で感受性群より有意に高い代謝能を示し、高代謝能の原因が代謝を直接担う P450 自体の変異ではなく、その上流の NADPH 産生能の活性化である事が示唆された。次に、肝臓中での NADPH 産生を担う主要な経路であるペントースリン酸経路を解析した所、実際に抵抗性群が有意に高い NADPH 産生活性を示した。

本研究により、図の通り、国内における野生齧歯類の殺鼠剤への抵抗性の原因として、従来から



提唱されてきた VKOR の結合ポケット内の変異に加えて、ポケット外の変異が抵抗性獲得に寄与する事を実証した他、NADPH 産生の向上とそれに伴う P450 による殺鼠剤代謝能の活性化という新しい抵抗性獲得機序が明らかとなった。特に、酵素そのものの変化ではなく、電子伝達の差により感受性が異なる変異は初めての報告である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

| | |
|--|---------------------|
| 1. 著者名 Takeda K, Ikenaka Y, Tanikawa T, Tanaka KD, Nakayama SMM, Mizukawa H, Ishizuka M. | 4. 巻 48 |
| 2. 論文標題 Investigation of hepatic warfarin metabolism activity in rodenticide-resistant black rats (<i>Rattus rattus</i>) in Tokyo by in situ liver perfusion. | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Pestic Biochem Physiol. | 6. 最初と最後の頁 42-49 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.pestbp.2018.03.018 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|---|---------------------|
| 1. 著者名 Saengtienchai A, Ikenaka Y, Kawata M, Kawai Y, Takeda K, Kondo T, Bortey-Sam N, Nakayama S.M.M, Mizukawa H, Ishizuka M. | 4. 巻 214 |
| 2. 論文標題 Comparison of xenobiotic metabolism in phase I oxidation and phase II conjugation between rats and bird species | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 CBP | 6. 最初と最後の頁 28-35 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cbpc.2018.08.007 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|--|-----------------------|
| 1. 著者名 Nakayama SMM, Morita A, Ikenaka Y, Mizukawa H, Ishizuka M. | 4. 巻 28 |
| 2. 論文標題 Poisoning by Anticoagulant Rodenticides in Non-Target Animals Globally. | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 JVMS | 6. 最初と最後の頁 298-313 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1292/jvms.17-0717 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件／うち国際学会 1件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 武田一貴、池中良徳、田中和之、中山翔太、谷川力、水川葉月、石塚真由美 |
| 2. 発表標題 HPLC-APCI-MSを用いたビタミンKの網羅的検出とin vitroビタミンKエポキンド還元酵素活性の評価 |
| 3. 学会等名 第27回環境化学討論会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 武田 一貴、池中 良徳、田中 和之、中山 翔太、谷川 力、水川 葉月、石塚 真由美 |
| 2. 発表標題 スーパーラットは何か「スーパー」なのか？ ~東京の殺鼠剤抵抗性クマネズミにおける抵抗性獲得機序の探索~ |
| 3. 学会等名 第45回 日本毒性学会学術年会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Kazuki TAKEDA, Yoshinori IKENAKA, Kazuyuki D. TANAKA, Shouta M.M. NAKAYAMA, Tsutomu TANIKAWA, Hazuki Mizukawa, and Mayumi ISHIZUKA |
| 2. 発表標題 Assessment of vitamin K epoxide reductase by in vitro kinetic analysis & in silico docking simulation for evaluation of rodenticide sensitivity. |
| 3. 学会等名 The 6th Sapporo Summer Symposium for One Health (6th SaSSOH). (国際学会) |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 武田 一貴、池中 良徳、田中 和之、中山 翔太、谷川 力、石塚 真由美 |
| 2. 発表標題 東京の殺鼠剤抵抗性ラットにおける殺鼠剤代謝能の解明 |
| 3. 学会等名 内外環境応答・代謝酵素研究会 |
| 4. 発表年 2018年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|-------|--|---|----|
| 研究分担者 | 池中 良徳 (Ikenaka Yoshinori) (40543509) | 北海道大学・獣医学研究院・准教授 (10101) | |

6. 研究組織（つづき）

| | 氏名 (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|-------------------|--|--|----|
| 研究 分 担 者 | 中山 翔太 (Nakayama Shouta) (90647629) | 北海道大学・獣医学研究院・助教 (10101) | |