

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23710038

研究課題名：アフリカにおける環境毒性研究と異物代謝系の種差に注目したリスク評価

研究課題名（英文）：Toxicological Research in Africa; The risk assessment that paid attention to drug metabolism species specificity

研究代表者

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

研究成果の概要（和文）：当該研究では希少な生態系が成り立つアフリカを中心に、野生動物と環境試料の採集を行い、環境毒性研究を展開した。まず、野生動物に対する異物代謝系の種差を主に第 II 相抱合反応に注目し明らかにした。11 種の哺乳類の尿を用いたスクリーニングでは、現在まで硫酸抱合活性が低いと考えられてきたブタで硫酸抱合化 Pyrene が検出された。また、カイネティックス解析の結果、ブタの酵素効率にはラットよりも高いことが明らかになった。一方、アフリカで行った調査では、両生類、哺乳類、鳥類の尿及び臓器を採取した。これらの試料について、重金属類や農薬類を中心に化学分析を行った結果、一部の地域からきわめて高濃度の化学物質が検出され、特に鳥類において他の生物種に比べ高い濃度で化学物質を蓄積している傾向が観察された。

研究成果の概要（英文）：We paid attention to a drug metabolism phase II conjugation reaction and determined species specificity of pro-drug metabolism for the wild animal. Sulfate conjugation of pyrene was detected in the pigs which had been thought to have low sulfate conjugation activity by the screening using 11 kinds of mammalian urine. Also, as a result of kinetics analysis, it was found that the enzyme efficiency of the pig was higher than a rat. Whereas, in the investigation carried out in Africa, we obtained amphibians, mammals, avian urine and an organ. As a result of having performed chemical analysis mainly on heavy metal and pesticides, an extremely highly-concentrated chemical was detected in some areas, and the tendency that accumulated a chemical at the level that was higher than other organism species in birds particularly was observed.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,500,000	750,000	3,250,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境学・環境影響評価・環境政策

キーワード：生態系影響評価・異物代謝系

## 1. 研究開始当初の背景

環境化学物質は、日常的な曝露レベルであっても、長期曝露により、ヒトや野生動物に様々な病態を引き起こす。化学物質曝露が原因と考えられる感染症の疾患率の増加は、1980年代後半から海棲哺乳類を中心に報告されている(Hall et al. EHP 2006、Fisk et al. Sci Total Environ 2005 他)。実験動物を用いた数々の試験により、環境汚染物質が生体のホメオスタシスをかく乱し、感染症疾患率や発ガン率を上昇させることが明らかになってきた(Guengerich and Mason. Mol Pharm 1979、Mayot and Palmiter. JBC 1981)。一方、実験動物を用いた曝露試験の結果は、化学物質の作用機序を解明する上で有効であるが、主にフィールドで行われている個体数ベースの疫学調査による影響評価に直接回帰することは現状困難である。これは、広範囲の野生動物、特に中・高次生物を対象にしたフィールドレベルの調査・研究が世界的にも限られており、その実態についてはほとんど把握されていないためである。一方、野生動物の疾患原因を解明し、そのリスク評価をフィールドレベルで行うためには、各野生動物の化学物質曝露量とバイオマーカー遺伝子のモニタリングに加え、化学物質に対する感受性の種差を解明する必要がある。

化学物質に対する最も基本的な生体防御機構は異物代謝系であるが、実験動物を除くと殆どの生物種で、化学物質の感受性を決定する異物代謝系でさえ十分に解明されていない。第 I 相異物代謝酵素であるシトクロム P450 (CYP) は環境化学物質の解毒や異物のクリアランスに関わる重要な生体防御機構を担っている。しかし、P450 酵素系のうち CYP1A サブファミリーによる異物の代謝中間体は、時として親化合物より毒性の高いものがあ

り、この中間代謝物を速やかに第 II 相抱合酵素等によって解毒する必要がある。一方、この第 II 相抱合反応には第 I 相反応同様、大きな種差が存在し、化学物質感受性にも影響を与える事が示唆されている(Wageh et al. JVMS 2010)。しかし、第 II 相抱合反応の種差に関する知見は十分とは言い難い。

そこで申請者は、各生物が持つ第 II 相抱合体の種差を解明するため、蛍光標識と質量分析計を併用したスクリーニング手法を開発した(Ikenaka et al. Aquat Tox 2006)。実験動物を用い第 I 相抱合体のスクリーニングを行った結果、抱合体の生成パターンは各動物種により特徴があり、更にその構造解析の結果、代表的な実験動物においてさえ、現在まで報告の無い数種の抱合体を生成していたことを明らかにした(Ikenaka et al. BBRC 2007)。本研究結果は高く評価されており、日本トキシコロジー学会から優秀研究発表賞を受賞している。抱合体は、その種類により Multidrug resistance associated protein (MRP) や Breast cancer resistance protein (BCRP) 等のトランスポーター活性化能が異なる事が発現メンブレンベシクルを用いた実験で示されている(Jorg et al. BBA 1999)。各動物が環境化学物質に対し、どのような抱合体をどのような割合で生成するのかを明らかにし、化学物質蓄積レベルやバイオマーカー遺伝子・タンパク質の発現量と併せて解析することにより、環境化学物質に対し、高感受性動物種の特定が可能となると考えられる。更に、高レベル汚染地域に高感受性動物種が生息するケミカルハザード地域の予測が可能となることから、今後のリスク評価、環境保全対策に有益なデータが提供可能となる。

残留性汚染物質 (POPs) や金属類による汚

染・公害は、先進国ではストックホルム条約等の国際法の設置もあり、約半世紀もの年月をかけようやく減少傾向にある。しかし、とりわけアフリカ地域は実質 GDP 成長率平均が 5.5%と極めて高く、その大規模開発による環境汚染が急速に進行している事が明らかになって来ている。我々がアフリカで行ったフィールドレベルの先行研究により、一部の野生動物に環境化学物質が高濃度に蓄積しているのに加え、その曝露が原因と考えられる酸化ストレスマーカーや免疫制御因子の変動が観察された (Ikenaka *et al.* AJET in press、Nakayama *et al.* EnPoll in press、Nakayama *et al.* AECT 2010)。しかし、その独特で希少な生態系にどのような影響が出ているのか、またヒトにどのような被害が出ているのか未だ明らかでない。事実、2010年6月にナイジェリア北部ザンファラ州において、鉱山開発に伴う鉛中毒が発生し、5歳未満の子供400人以上の中毒死を含む、住人約3万人の中毒被害が報告された。途上国で急激に進行している汚染は、ヒトや野生動物に予想をしない被害を与える。悲惨な事故をこれ以上起こさないためにも、早急な調査とその環境保全方法の確立が求められている。そこで、本研究では希少な生態系、特に中・高次捕食者に富むアフリカについて、環境汚染実態の把握と、野生動物に対する影響の調査を行う。

## 2. 研究の目的

本研究ではアフリカにおいて環境毒性研究を展開すると共に、異物代謝系の種差に注目した新たな評価手法を開発し、野生動物におけるリスク評価を行うことを目的とした。

## 3. 研究の方法

本研究では希少な生態系が成り立つアフリ

カを中心に、野生動物と環境試料の採集を行い、環境毒性研究を展開した。まず、野生動物に対する異物代謝系の種差を主に第 II 相抱合反応に注目し明らかにする。各動物の抱合体は Pyrene 蛍光標識法を用いる事でスクリーニングを行うと共に、新規抱合体の探索とその構造解析を行う。一方、抱合体はその種類によりトランスポーターの活性化能が異なるため、MRP や BCRP 発現メンブレンベシクルを用い、新規抱合体を含めたトランスポーター活性化能の比較を行う。更に、各種異物代謝酵素群のクローニングから、各種動物の異物代謝系の系統分類を行う。一方、異物代謝系の解析と同時に、各動物に蓄積する汚染物質濃度の化学分析、環境汚染バイオマーカーの測定を行う。これらのデータを基に①環境汚染物質に起因する疾患について、高感受性動物種を推定し、②GIS と多変量解析を用いたケミカルハザード地域の予測とその保全に向けたインフォマティクスの構築を行う。更に、構築したインフォマティクスから、今正に環境汚染が拡大しているアフリカにおける野生動物のリスク評価を行った。

## 4. 研究成果

化学物質に対する最も基本的な生体防御機構は異物代謝系である。一方、これら異物代謝系の動物種差が、各動物の化学物質に対する感受性に強く寄与することが知られている。例えば、異物代謝・第 II 相抱合反応において、ネコではグルクロン酸抱合、イヌではアセチル抱合およびブタでは硫酸抱合活性が低いことが獣医学領域の研究から明らかになっており、投薬時に注意を要する。しかし、これら異物代謝系の動物種差に関する知見は、一部の実験動物を除くとほとんどの生物種で十分に解明されていない。そこで本研究では、異物代謝系の中でも重要な第 II

相抱合反応に注目し、Pyrene を用い新たに開発した抱合体スクリーニング手法を用いることで各動物種の異物代謝系の Characterization を行った。

11 種の哺乳類の尿を用いたスクリーニングでは、各動物に特徴的な異物代謝系が明確に存在することが明らかになった(図 1)。

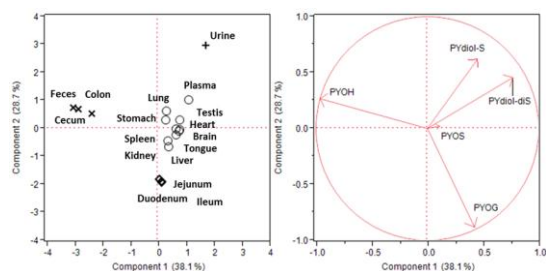


図 1 : PCA 解析による哺乳類の異物代謝系の分類

また、現在まで硫酸抱合活性が低いと考えられてきたブタの尿中から硫酸抱合代謝物が検出された。本事象を検証するため、ブタの肝サイトソルを用いて、カイネティックス分析を行った結果、興味深いことに、ブタの硫酸抱合転移酵素 (SULT) の  $V_{max}$  は比較対象として用いたラットに比べ低かったが、酵素効率を示す  $V_{max}/K_m$  はラットよりも高いことが明らかになった。ミニブタを中心に、近年ますます実験動物化が進むブタについて、本研究は薬物代謝の特徴を明らかにすることが出来た。

一方、アフリカで行った調査では、両生類、哺乳類、鳥類の尿及び臓器を採取した。これらの試料について、重金属類や農薬類を中心に化学分析を行った結果、一部の地域からきわめて高濃度の化学物質が検出され、特に鳥類において他の生物種に比べ高い濃度で化学物質を蓄積している傾向が観察された。一方、種々の鳥類においてゲノム情報は極めて乏しく、蓄積濃度と異物代謝系との関係を解

析する事は未だに困難であった。今後、次世代シーケンサーによる解析を加えることにより、より詳細な生態リスク評価を行うことが可能であると考えられた。

## 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 30 件)

1. Yohannes YB, Ikenaka Y, Saengtienchai A, Watanabe KP, Nakayama SMM, Ishizuka M. Occurrence, distribution and ecological risk assessment of DDTs and heavy metals in surface sediments from Lake Awassa - Ethiopian Rift Valley Lake. Environ Sci Pollut Res (in press) 査読有
2. Yared BY, Ikenaka Y, Nakayama SMM, Saengtienchai A, Watanabe K, Ishizuka M, Organochlorine pesticides and heavy metals in fish from Lake Awassa; Ethiopia: Insights from stable isotope analysis. Chemosphere 91:857-863 (2013) 査読有
3. Nakayama SMM, Ikenaka Y, Hamada K, Muzandu K, Choongo K, Yabe J, Umemura T, Ishizuka M. Accumulation and biological effects of metals in wild rats in mining areas of Zambia. Environmental Monitoring and Assessment 185:4907-4918 (2013) 査読有
4. Yabe J, Nakayama SMM, Ikenaka Y, Muzandu K, Choongo K, Mainda G, Kabeta N, Ishizuka M, Umemura T. Metal distribution in tissues of free-range chickens near a lead-zinc mine in Kabwe,

- Zambia. Environ Toxicol Chem. 2013 Jan;32(1):189-92. 査読有
5. Shouta M.M. Nakayama\*, Yoshinori Ikenaka\*, Kaampwe Muzandu, Kennedy Choongo, John Yabe, Taro Muroya, Shigeho Ijiri, Masao Minagawa, Takashi Umemura, Mayumi Ishizuka. GIS-based source estimation of Cu pollution in Lake Itzhi-tezhi and metal accumulation profiles in *Oreochromis spp.* from both field and laboratory studies. Arch Environ Contam Toxicol. 2013 Jan;64(1):119-29. 査読有
  6. Dominic MUREITHI, Wageh Sobhy DARWISH, Yoshinori IKENAKA, Laetitia KANJA, Mayumi ISHIZUKA. Cytochrome P450 3A mRNA expression along goat and rat gastrointestinal tracts. Jpn. J. Vet. Res. 2012 Nov;60(4):205-10. 査読有
  7. Yabe J, Nakayama SMM, Ikenaka Y, Muzandu K, Ishizuka M, Umemura T. Accumulation of metals in the liver and kidneys of cattle from agricultural areas in Lusaka, Zambia. J Vet Med Sci. 2012 Oct;74(10):1345-7. 査読有
  8. M' kandawire E, Syakalima M, Muzandu K, Pandey G, Simuunza M, Nakayama SM, Kawai YK, Ikenaka Y, Ishizuka M. The nucleotide sequence of metallothioneins (MT) in liver of the Kafue lechwe (*Kobus leche kafuensis*) and their potential as biomarkers of heavy metal pollution of the Kafue River. Gene. 2012 Sep 15;506(2):310-6. 査読有
  9. Ikenaka Y, Nakayama SMM, Muroya T, Yabe J, Konnai S, Darwish WS, Muzandu K, Choongo K, Mainda G, Teraoka H, Umemura T, Ishizuka M. Effects of environmental lead contamination on cattle in a lead/zinc mining area: changes in cattle immune systems on exposure to lead in vivo and in vitro. Environ Toxicol Chem. 2012 Oct;31(10):2300-5. 査読有
  10. Okagawa T, Konnai S, Mekata H, Githaka N, Suzuki S, Kariuki E, Gakuya F, Kanduma E, Shirai T, Ikebuchi R, Ikenaka Y, Ishizuka M, Murata S, Ohashi K. Transcriptional profiling of inflammatory cytokine genes in African buffaloes (*Syncerus caffer*) infected with *Theileria parva*. Vet Immunol Immunopathol. 2012 Aug 15;148(3-4):373-9. 査読有
  11. Nakayama SM, Ikenaka Y, Muzandu K, Choongo K, M' kandawire E, Yasuda J, Ishizuka M. Metal and metalloid levels and bio-accumulation characteristics in soil, sediment, land plants and hippopotami (*Hippopotamus amphibius* L) from the South Luangwa National Park, Zambia. Ecotoxicol Environ Saf. 2012 Jun;80:333-8. 査読有
  12. Suzuki S, Konnai S, Okagawa T, Githaka NW, Kariuki E, Gakuya F, Kanduma E, Shirai T, Ikebuchi R, Ikenaka Y, Ishizuka M, Murata S, Ohashi K. Molecular cloning and characterization of Th1 and Th2 cytokines of African buffalo (*Syncerus caffer*). Int J Immunogenet. 2012 Apr;39(2):170-82 査読有

13. 池中良徳、石塚真由美. 野生動物の化学物質感受性と生体防御機構. 安全工学 2011 50(2): 80 査読有
14. Ueda H, Ikenaka Y, Nakayama SM, Tanaka-Ueno T, Ishizuka M. Phase-II conjugation ability for PAH metabolism in amphibians: Characteristics and inter-species differences. Aquat Toxicol. 2011 Jul 8 ;105(3-4):337-343. 査読有
15. Yabe J, Nakayama SM, Ikenaka Y, Muzandu K, Ishizuka M, Umemura T. Uptake of lead, cadmium, and other metals in the liver and kidneys of cattle near a lead-zinc mine in Kabwe, Zambia. Environ Toxicol Chem. 2011 Aug;30(8):1892-7. 査読有
16. Nakayama SMM, Ikenaka Y, Hamada K, Muzandu K, Choongo K, Teraoka H, Mizuno N, Ishizuka M. Metal and metalloid contamination in roadside soil and wild rats around a Pb-Zn mine in Kabwe, Zambia. Environmental Pollution 159 (2011) 175-18. 査読有

[学会発表] (計 25 件)

- 1: Yoshinori Ikenaka, Effect of mining activity on wild and domestic animals: Case study of lead - zink mining area, Kabwe, Zambia, 日本学術会議北海道地区会議主催学術講演会、2013 年 3 月 1 日、北海道大学学術交流会館小講堂
- 2: 池中良徳、両生類の異物代謝機構の特徴と種差、第 21 回環境化学討論会、2012 年 7 月 11-13 日、愛媛県民文化会館 (ひめぎんホール)
- 3: 池中良徳、鳥類における薬物代謝の特徴: ピレンをモデル化合物として、第 21 回環

境化学討論会、2012 年 7 月 11-13 日、愛媛県民文化会館 (ひめぎんホール)

- 4: 池中良徳、薬物代謝第 II 相抱合反応の種差: 多環芳香族炭化水素の抱合反応と哺乳動物で観察された種差、第 21 回環境化学討論会、2012 年 7 月 11-13 日、愛媛県民文化会館 (ひめぎんホール)

[図書] (計 1 件)

村田浩一 坪田敏男、獣医学・応用動物科学系学生のための野生動物学、2013 年 2 月 1 日、第 8 章 野生動物と環境汚染 p191~202

[産業財産権]

- 出願状況 (計 0 件)  
○取得状況 (計 0 件)

[その他]

- 1: 北海道大学アフリカ研究会  
<http://aa.vetmed.hokudai.ac.jp/africa/>
- 2: 北海道大学大学院獣医学研究科毒性学教室  
<http://tox.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・大学院獣医学研究科・講師  
研究者番号: 40543509