

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成30年6月8日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15034

研究課題名（和文）次世代型殺鼠剤開発を目的とした殺鼠剤抵抗性ラットの抵抗性獲得機序の解明

研究課題名（英文）Investigation of hepatic warfarin metabolism activity in rodenticide-resistant black rats (*Rattus rattus*)

研究代表者

石塚 真由美 (Ishizuka, Mayumi)

北海道大学・獣医学研究科・教授

研究者番号：50332474

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,800,000円

研究成果の概要（和文）：野生齧歯類は様々な感染症を媒介するため駆除する必要がある。駆除には殺鼠剤が用いられたがこれらに抵抗性を有す個体群が出現し駆除を困難にしている。従来抵抗性群は殺鼠剤の標的分子が変異し殺鼠剤が結合しにくい形になるのが原因と考えられてきた。本研究では殺鼠剤の解毒代謝機能を評価した。その結果、抵抗性群では肝で殺鼠剤を代謝し排泄する能力が向上しており、標的分子の変異と代謝能の向上という二つの機構を併せ持つことが判明した。

研究成果の概要（英文）：Anti-blood coagulation rodenticides, such as warfarin, have been used all over the world. They inhibit vitamin K epoxide reductase (VKOR), which is necessary for producing several blood clotting factors. This inhibition by rodenticides results in lethal hemorrhage in rodents. However, heavy usage of these agents has led to the appearance of rodenticide-resistant rats. The mutation of the target enzyme of warfarin, VKOR, is considered as major cause for rodenticide resistance in wild rats. However, there have been few studies regarding the hepatic metabolism of warfarin. We investigated warfarin metabolism in resistant rats, and our results showed new mechanism for the rodenticide resistance in wild black rats in Japan.

研究分野：毒性学

キーワード：殺鼠剤 抵抗性 ラット

1. 研究開始当初の背景

野生齧歯類は腎症候性出血熱やライム病等 35 種類以上の人獣共通感染症を媒介する。このため殺鼠剤によるコントロールは不可欠である。しかしワルファリンなど抗凝血系殺鼠剤に対し抵抗性を持つ個体群が殺鼠剤使用頻度の高い世界各地の都市部に出現している。その対策として、現在欧米では致死性の高い第二世代抗凝血系殺鼠剤が主に用いられている。

しかしながら、これらは毒性が強く駆除対象外生物への二次被害が絶えない。食物連鎖による生物濃縮の結果、捕食者である猛禽類への二次被害が頻発しており、Nature News で “Killing rats is killing birds” として報告されるなど深刻な問題である (Lovett, Nature News, 2012.11.14)。また、日本では第二世代殺鼠剤の使用は規制されており、比較的安全性の高いワルファリンが主に用いられている。このため、現在抵抗性齧歯類の有効な防除策はなく、公衆衛生上危険な状態である。そこで、抵抗性獲得機序の解明とそれに則した新規防除策の提案は急務である。抗凝血系殺鼠剤は、血液凝固因子産生に必須であるビタミン K エポキシド還元酵素 (VKOR) を阻害し、出血多量によりラットを死亡させる。抵抗性の原因としてワルファリンの標的分子 VKOR に遺伝子変異が生じると、VKOR のワルファリン感受性が低下することが報告されている (Rost 2004 Nature 427: 537-41)。一方、野生ラットを用いた実験は、まず捕獲後 1 か月間のワルファリン喫食試験を行い生存したものを抵抗性ラットと見なし、さらに 1 か月以上の馴化期間が必要と困難である。このため現在殺鼠剤抵抗性齧歯類の研究は、主に VKOR の遺伝子変異に焦点を絞った *in vitro* 試験に限られている。しかしながら VKOR 変異が生体レベルでどの程度抵抗性へ寄与するかは不明な点も多く、VKOR 遺伝子変異以外の抵抗性獲得機序の存在も疑われる。

そこで VKOR 変異以外の要因を探索するため、申請者らはワルファリン抵抗性野生クマネズミのクローズドコロニーを確立し、ワルファリン抵抗性群および感受性群でのワルファリン薬物体内動態を解析した。その結果抵抗性群ではワルファリンを代謝する能力が亢進し、素早く体外へ排泄している可能性を示した。つまり、VKOR 変異以外に代謝・排泄の亢進といった複数の要因が抵抗性に関与することが判明し、抵抗性の解明には殺鼠剤に対する生体内応答を複数の視野から観察する必要があることが示唆された。

2. 研究の目的

上述の通り、現状の抵抗性齧歯類の研究は VKOR 変異など個々の要素に着目した *in vitro* 試験系が主流であるが、VKOR 変異が生体に与える影響や、高代謝能の原因は未知である。一方、申請者らは協力研究者との共

同研究により、国内で唯一の殺鼠剤抵抗性野生クマネズミ由来のクローズドコロニーを使用することが可能である。このためこれらを用いた *in vivo*, *in vitro* 試験により、殺鼠剤が生体に与える影響を実験的に複数の視野から解析することが可能である。当該研究では、同ラットをモデル動物とし、殺鼠剤抵抗性ラットにおける抵抗性獲得因子の網羅的な探索と、それを標的とした新規殺鼠剤の応用を目指した。

3. 研究の方法

(1) ワルファリン高代謝能の原因分子の探索

申請者らの先行研究から抵抗性群では迅速な代謝が抵抗性に寄与することが示唆されたが、その機序は未解明である。ワルファリンの代謝は肝臓中で薬物代謝酵素シトクロム P450 により行われる。また、P450 の活性には主に解糖系の一つ、ペントースリン酸経路で産生される NADPH による電子の供与が不可欠である。このようにワルファリン代謝に関与する因子は多岐にわたり、またこれらは複雑に調節されている。

本試験系ではワルファリン抵抗性・感受性それぞれのラットに対し、実際に環境中で暴露される量相当のワルファリンを継続的に曝露、また、それぞれについて対照として無処置群も用意する。これらの血液・標的臓器である肝臓サンプルを用い、ワルファリン投与に伴う薬物代謝酵素の遺伝子発現量や、電子供与体など生体内物質の変動を、観察する。これにより抵抗性ラットに高代謝能をもたらす原因分子：抵抗性ラット特異的な挙動を示す候補因子を探索する。特に抵抗性に寄与が期待される候補因子については、個別に遺伝子配列解析や酵素活性解析を実施し、抵抗性に与える影響を詳細に検討する。これにより VKOR 遺伝子変異以外の抵抗性獲得因子を探索する。

(2) VKOR 遺伝子変異が生体に与える影響の解明

従来の VKOR 評価法では、肝臓から抽出した VKOR を含む酵素画分を用い試験管内でビタミン K エポキシドの還元反応を行い、ワルファリン添加時の阻害率を測定している。この系では VKOR 自体の評価は可能だが、肝細胞へのワルファリンの取り込みや代謝による解毒といった複数の要素が存在する生体レベルでの VKOR 変異がもたらす影響は評価できない。そこで、本試験系では肝灌流試験を実施し、生体レベルでのワルファリン感受性を評価する。肝灌流試験では肝臓の主要な血管である門脈と後大静脈にカニューレを挿入し、ビタミン K やワルファリンを肝臓へ通液することで、生体とほぼ同条件での肝臓の応答を観察することができる。肝臓で VKOR により還元されたビタミン K や P450 により代謝されたワルファリンの代謝産物は液体

クロマトグラフィー質量分析計(HPLC-MS)で網羅的に検出・定量する。本試験系で得られた結果と in vitro での VKOR 活性試験・ワルファリン代謝試験それぞれの結果を比較することでそれぞれの因子が抵抗性に与える影響を推測する。

4. 研究成果

本研究では、殺鼠剤抵抗性クマネズミのワルファリン代謝能を解明することを目的とし、in situ での肝灌流試験により生体に近い条件でのワルファリン代謝活性を測定した。一方で、肝臓より薬物代謝酵素画分を抽出し、in vitro でのワルファリン代謝試験も実施することで代謝酵素の機能も評価した。その結果、in situ 肝灌流試験では抵抗性群において3-8 倍程度有意に高いワルファリン代謝能が確認された。一方 in vitro 代謝試験では抵抗性群は 1.2-1.3 倍程度と有意だが in situ 試験に比べ軽度の高代謝能を示した。これらの結果から上記抵抗性群は高いワルファリン代謝能を持つが、その原因は in vitro 試験で観察した薬物代謝酵素シトクロム P450 自身ではなく、in vitro 試験で観察できない、生体内での P450 の活性に必要な電子伝達系などの補因子にある事が初めて示唆された。

肝灌流試験により肝代謝能を評価した所、ワルファリンの代謝産物である5つの水酸化体全てにおいて抵抗性群が感受性群より5~10倍程度有意に高い生成量を示し、抵抗性群が高い肝ワルファリン代謝能を持つと判明した。ワルファリン代謝を担う薬物代謝酵素シトクロム P450 を評価するため肝酵素画分とワルファリンを in vitro で反応させ酵素速度論的に解析した。この際、P450 の活性に必要な電子供与体 NADPH を過剰量添加・NADPH の前駆体である NADP⁺を添加し肝酵素画分に NADPH を産生させる二群を作った。NADPH 過剰添加系では抵抗性群は感受性群より有意に高い酵素活性を示したがその差は軽微であった。一方、NADP⁺を添加するとその差は顕著になった。つまり抵抗性群の高代謝能は代謝を直接担う P450 が原因ではなく、電子供与体 NADPH の産生能向上が原因と示唆された。

また、抵抗性群における NADPH 産生能を評価すると抵抗性群では肝臓での主要な NADPH 産生源であるペントースリン酸経路による NADPH の産生速度が感受性群に対し有意に高かった。

以上の結果により、殺鼠剤抵抗性個体について、全く新しいメカニズムが提唱できた。東京の殺鼠剤抵抗性ラットではペントースリン酸経路の亢進による NADPH の供給増進が P450 によるワルファリンの代謝活性を向上させ、肝臓での高代謝能に寄与していることが判明した。現状、NADPH 産生能がワルファリン抵抗性に寄与するという報告はなく、世界的に新しい抵抗性機序であると考えられ

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3件)

Takeda K, Ikenaka Y, Tanaka KD, Nakayama SMM, Tanikawa T, Mizukawa H, Ishizuka M. Investigation of hepatic warfarin metabolism activity in rodenticide-resistant black rats (*Rattus rattus*) in Tokyo by in situ liver perfusion. *Pesticide Biochemistry and Physiology* (in press) DOI: 10.1016/j.pestbp.2018.03.018 査読有

Saengtienchai A, Ikenaka Y, Kawata M, Kawai Y, Takeda K, Kondo T, Bortey-Sam N, Nakayama SMM, Mizukawa H, Ishizuka M. Comparison of xenobiotic metabolism in phase I oxidation and phase II conjugation between rats and bird species. *Comparative Biochemistry & Physiology* (in press) <https://www.journals.elsevier.com/comparative-biochemistry-and-physiology-part-c-toxicology-and-pharmacology> 査読有

Takeda K*, Ikenaka Y*, Tanikawa T, Tanaka KD, Nakayama SMM, Mizukawa H, Ishizuka M (*Equal contribution). Novel revelation of warfarin resistant mechanism in roof rats (*Rattus rattus*) using pharmacokinetic/pharmacodynamic analysis. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 134:1-7 (2016) DOI: 10.1016/j.pestbp.2016.04.004 査読有

[学会発表](計15件)

Kazuki Takeda, Yoshinori Ikenaka, Tsutomu Tanikawa, Kazuyuki D. Tanaka, Shouta M.M. Nakayama, Hazuki Mizukawa, Mayumi Ishizuka, Novel Mechanism of Rodenticide (warfarin) Resistance of Wild Rats in Tokyo ~ Enhanced Pentose Phosphate Pathway Causes Rapid Metabolism of Warfarin ~, Society of Toxicology 's 57th Annual Meeting and ToxExpo, 11-15 March 2018, Henry B. Gonzalez Convention Center, San Antonio, Texas, USA (Poster)

武田一貴、池中良徳、田中和之、谷川力、

中山翔太、水川葉月、石塚真由美、スーパーラットは高NADPH産生能を持つ～東京の殺鼠剤抵抗性ラットにおける抵抗性獲得機序の解明～、第3回北大部局間横断シンポジウム、2018年1月26日、北海道大学医学部学友会館フラテホール、北海道（ポスター）

Kazuki Takeda, Yoshinori Ikenaka, Tsutomu Tanikawa, Kazuyuki D. Tanaka, Shouta M.M. Nakayama, Hazuki Mizukawa, Mayumi Ishizuka, 東京のワルファリン抵抗性ラットの抵抗性獲得機序の解明：ペントースリン酸経路の亢進を通じたワルファリン代謝の活性化 Investigation of mechanism of warfarin resistance of wild rats in Tokyo ~ enhanced pentose phosphate pathway causes rapid metabolism of warfarin ~、2017年度生命科学系学会合同年次大会（ConBio2017）、2017年12月6日～9日、神戸ポートアイランド、神戸市、兵庫県（口頭、ポスター）

Kazuki Takeda, Yoshinori Ikenaka, Tsutomu Tanikawa, Kazuyuki D. Tanaka, Shouta M.M. Nakayama, Hazuki Mizukawa, Mayumi Ishizuka, Nobel investigation of mechanism of rodenticide resistance ~ enhanced pentose phosphate pathway causes rapid metabolism of warfarin ~、The 5th Sapporo Summer Seminar for One Health (SaSSOH)、2017年9月20日～21日、Hokkaido University, Sapporo, Japan、（口頭発表、受賞）

武田一貴、池中良徳、田中和之、谷川力、中山翔太、水川葉月、石塚真由美、東京由来殺鼠剤抵抗性ラットを用いた新規抵抗性獲得機序の解明～ペントースリン酸経路の亢進による殺鼠剤代謝能の活性化～、第160回日本獣医学会学術年会、2017年9月12日～15日、鹿児島大学、鹿児島市、鹿児島県（口頭発表）

武田一貴、池中良徳、田中和之、谷川力、中山翔太、水川葉月、石塚真由美、肝灌流試験、in vitro 酵素活性試験による東京由来ワルファリン抵抗性クマネズミのワルファリン代謝能の解明、第44回日本毒性学会学術年会、2017年7月10日～12日、パシフィコ横浜、横浜市、神奈川県（口頭発表）

武田一貴、池中良徳、田中和之、谷川力、中山翔太、水川葉月、石塚真由美、In situ 肝灌流試験によるワルファリン抵抗性クマネズミでのワルファリン代謝能の解明、第26回環境化学討論会、2017年

6月7日～9日、静岡県コンベンションアーツセンター「グランシップ」、静岡市、静岡県（ポスター発表）

石塚真由美、中山翔太、水川葉月、池中良徳、代謝酵素の動物種差、日本薬学会第137年会シンポジウム、2017年3月24日～27日、仙台国際センター、仙台市（招待講演）

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、In situ 肝灌流モデルによる殺鼠剤抵抗性野生クマネズミにおけるワルファリン代謝能の解明、第39回日本分子生物学会年会、2016年11月30日～12月2日、パシフィコ横浜、神奈川県（ポスター発表）

石塚真由美、中山翔太、水川葉月、池中良徳、化学物質の汚染環境に生きる野生動物の適応戦略、一般社団法人日本環境化学会25周年記念講演会：「環境化学の今、そして未来へ - 環境化学からの提言 -」、2016年11月16日、発明会館地下ホール、東京都（招待講演）

石塚真由美、中山翔太、水川葉月、池中良徳、野生げっ歯類の殺鼠剤の抵抗性メカニズムと非対象動物に対する毒性メカニズム、日本哺乳類学会2016年度大会「企画シンポジウム：野生動物が関わる問題にどのように対応するか？～基礎研究を応用した解決への取り組み～」、2016年9月23日～26日、筑波大学、つくば市、茨城県（口頭発表）

Kazuki Takeda, Yoshinori Ikenaka, Tsutomu Tanikawa, Kazuyuki D. Tanaka, Shouta M.M. Nakayama, Hazuki Mizukawa, Mayumi Ishizuka, Investigation of Warfarin Metabolic Ability of Warfarin Resistant Roof Rats by in situ Liver Perfusion., The 4th Sapporo Summer Seminar for One Health (SaSSOH), 20th-21st September, 2016, Sapporo, Japan (Poster)

Kazuki Takeda, Yoshinori Ikenaka, Tsutomu Tanikawa, Kazuyuki D. Tanaka, Shouta M.M. Nakayama, Hazuki Mizukawa, Mayumi Ishizuka, Pharmacokinetic analysis of warfarin resistant roof rats (*Rattus rattus*) in Tokyo, 8th International Toxicology Symposium in Africa, 29th-31st August, 2016, Giza, Egypt (Poster)

武田一貴、池中良徳、田中和之、谷川力、中山翔太、水川葉月、石塚真由美、東京由来ワルファリン抵抗性クマネズミク

ローズドコロニーでのワルファリン体内動態の解明、第 43 回日本毒性学会学術年会、2016 年 6 月 29 日～7 月 1 日、ウインクあいち、愛知（口頭発表、ポスター発表、優秀研究発表賞）

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

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

アウトリーチ活動

・2018 年 5 月 29 日、日本学会会議主催によるサイエンスカフェ、（三省堂、札幌市）

・2018 年 5 月 13 日、円山動物園との共催によるサイエンスイベント（円山動物園、札幌市）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

池中 良徳 (Ikenaka, Yoshinori)

北海道大学・大学院獣医学研究院・准教授

研究者番号：40543509

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