

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月15日現在

機関番号：10101
 研究種目：若手研究（S）
 研究期間：2007～2011
 課題番号：19671001
 研究課題名（和文） 化学物質が引き起こす野生動物の病態と感受性決定機構の解析
 研究課題名（英文） Environmental impact of toxic substances on wildlife and species differences
 研究代表者
 石塚 真由美（ISHIZUKA MAYUMI）
 北海道大学・大学院獣医学研究科・教授
 研究者番号：50332474

研究成果の概要（和文）：環境化学物質の曝露が野生動物や飼育動物にどのような毒性学的影響を与えるのかを明らかにすることを目的として、国内およびアフリカ諸国のフィールドにおける調査を行った。またどのような種が化学物質に高い感受性を持つのか、ハイリスクグループの同定のために、化学物質感受性を決定する因子の種差について明らかにした。

研究成果の概要（英文）：The effects of environmental pollution on wildlife and domestic animals were investigated in Japan and African countries. In addition, the species differences in the roles of molecular factors which contribute to the chemical sensitivity in animals were clarified.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	16,000,000	4,800,000	20,800,000
2008年度	17,600,000	5,280,000	22,880,000
2009年度	18,800,000	5,640,000	24,440,000
2010年度	19,300,000	5,790,000	25,090,000
2011年度	14,900,000	4,470,000	19,370,000
総計	86,600,000	25,980,000	112,580,000

研究代表者の専門分野：毒性学

科研費の分科・細目：環境学・放射線・化学物質影響科学

キーワード：トキシコロジー

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、長期曝露によって、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みられる感染症の罹患率の増加は、1990年代より、海棲哺乳類や爬虫類で報告されている。また、両棲類では、世界的に発生している催奇形性の主要な原因のひとつに、環境化学物質への曝露が候補として挙げられている。化学物質が引き起こす毒性の中でも、顕著な病態として挙げられるのは、化学発がんである。実際、化学発がんは、ヒトの癌発生要因の80%以上を占めることが報告

されている。野生動物もヒトと同じく、常に食餌や棲息環境の汚染を通じて、環境化学物質を生体内に取り込んでいるが、1990年代以降に行われた海棲哺乳類に関する研究では、化学物質の高濃度汚染地域で腫瘍の増加やDNA付加体が検出されており、野生動物においても、ヒト同様に化学物質による発がんが起こっている可能性を示唆している。また、申請者は、寿命の短い野生げっ歯類でも、環境汚染亢進域ではGSTPなど発がんマーカーが上昇することをDNAマイクロアレイ解析により検出している。さらに、これまでの研究で、特に高濃度に残留性有機汚染物質（POPs）

を蓄積する野生の個体では、がん原物質の代謝的活性化を引き起こすことが多い第 I 相酵素の顕著な発現誘導が起こっており、かつ活性化された発がん物質を解毒する第 II 相抱合酵素の発現が抑制されているという、潜在的に化学発がんを起こしやすい状態であることを明らかにした。しかし、化学物質が具体的にどのような病態を引き起こしているのか、広範囲の野生動物、特に高次生物を対象に調査を行った研究は世界的にも極めて限られており、その実態については把握されていない。

一方で、化学物質に対する感受性は生物種間で大きく異なることが予測される。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のは第 I 相酵素シトクロム P450 である。しかし、P450 分子種の 1 つ 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が高い。この生体防御と化学物質の毒性化の両方に寄与する P450、及び化学物質を受容し P450 の発現を調節する xenobiotics 受容体の動物種差・系統差は化学物質の感受性を決定する大きな要因となっている。ヒトでは、P450 は医薬品の代謝に重要な酵素であることから、精力的にその基質特異性や遺伝子配列による分子多様性が調べられている。しかし、野生動物の P450 の情報は殆ど無く、化学物質の引き起こす病態リスク評価を難しくしている。

また、残留性汚染物質の分布に国境はなく、その汚染は地球規模で広がっている。北半球では、先進国はもとより、東南アジア地域については、すでに広範囲な地域においてこれら環境汚染の実態が把握・報告され、環境中の動態や輸送経路も明らかにされてきた。一方で、南半球における環境汚染の実態は不明であり、その動態・地球規模の循環、そして生態系への影響について、ほとんどデータはない。南半球には大型哺乳類や鳥類の多様性に富むアフリカやオセアニアが位置しており、特にアフリカでは近年における急激な開発と汚染の進行が懸念されている。

2. 研究の目的

そこで、本研究では、1) 化学物質の感受性を決定する P450 および xenobiotics 受容体の種差・系統差を解析し、恒常的な環境化学物質への曝露が引き起こしている野生動物の病態を明らかにすることを目的とする。また、2) 野生動物の環境汚染リスクについて国内における調査はもとより、高次捕食者の多様性に富むアフリカについて、初めて汚染物質の実態の把握と、野生動物に対する影響の調査を行う。そこで、下記の研究目標を設定した。

(1) フィールドにおける検証研究

フィールドにおいて野生動物で起こっている現象を明らかにするために、国内及び海外（アフリカ・ザンビアおよびエジプト中心）において、環境汚染の現状把握と野生動物の毒性学的見地からの生体影響を調べ、明らかにする。特に歩哨動物となる、野生げっ歯類や家畜、希少動物について重点的な研究を展開することとする。

(2) 化学物質感受性の種差を作り出す分子機構の解明

環境化学物質の感受性の種差の原因として、シトクロム P450 とその発現調節因子に焦点を当てて研究を展開する。特に希少動物を含む生物種横断的、また同属生物種間の種差（系統差を含む）について、比較検討を行う。

3. 研究の方法

(1) フィールドにおける検証研究

国内に棲息する野生動物の化学物質汚染と生体リスク：国内では、野生哺乳類・鳥類の生化学的な反応の調査と蓄積する環境化学物質に関する調査を行う。

また、海外はアフリカを中心に野生動物のサンプルの採集と環境汚染のリスクの解析を行う。汚染の研究・情報の無いアフリカの汚染調査を行い、環境汚染物質の MAP を完成させる。

(2) 化学物質感受性の種差を作り出す分子機構の解明

異物代謝酵素シトクロム P450 のなかでも、がん原物質活性化のキーとなる P450 分子種や抱合酵素群について、動物園飼育動物および国内外の野生動物からのクローニングを行う。

また、動物園飼育動物および国内外の野生動物について、多くのがん原物質と結合する arylhydrocarbon receptor (AhR) を中心に、P450 を調節する異物受容体のキャラクターゼーションを行い、化学物質感受性の種差・系統差を明らかにする。

4. 研究成果

(1) フィールドにおける検証研究

①国内の野生ラットに蓄積する環境汚染物質

全国より野生の Rattus 属を採集し、蓄積する汚染物質を分析した。有害金属を中心に解析を進めたところ、ヒ素やカドミウム濃度が高い汚染地域がピックアップされた。また、肝臓に蓄積する金属類とメタロチオネン等のマーカー分子の発現は比例しており、野生げっ歯類では、生体内レスポンスを起こすほどの有害金属が日常的に摂取されてい

ることが明らかとなった。

②河川による化学物質の拡散と魚類の汚染

ザンビア共和国のコッパーベルト地域における銅鉱床の採掘の影響を調べるために、この地域を通るザンビアの主要河川について上流から下流にむけて底質および棲息する魚類に蓄積する銅をはじめとする重金属の影響を調査した。鉱床地域を通過した河川では急激に銅をはじめとする重金属濃度が上昇するが、鉱床から500km先の国立公園に位置するイテジテジ湖に棲息するティラピアなど魚類にも高濃度の重金属が蓄積し、銅鉱床の採掘の影響が河川の生態系の浄化機能でもキャンセルできず、恒常的に棲息生物の魚類に影響を与えていることが明らかとなった。

ティラピアが他の魚種に比べて比較的高い銅濃度を蓄積していることが明らかとなったため、室内曝露試験を実施したところ、生理的な条件下でも他の魚種に比べて銅濃度の蓄積が高いことが明らかとなった。

またザンビア以外の国でも、河川が環境汚染物質のトランスポート経路となっていることが明らかとなった。ガーナの金鉱山周辺では水圏のヒ素の汚染が進んでおり、周辺の野生動物や家畜にも比較的高いヒ素濃度が検出された。また南アフリカでは高濃度のDDTが国立公園の河川に棲息する魚類より検出された。

③陸圏における野生げっ歯類による汚染モニタリング

ザンビア広域における陸圏の汚染を調べるために、幹線道路を中心に全土にわたる土壤汚染の調査を行ったところ、カブエ地域、コッパーベルト地域について、特に鉛、銅、コバルト、カドミウム、ヒ素などの重金属の汚染が集中していることが明らかとなった。そこで、これらの地域の詳細な重金属汚染のマッピングを行うと同時に、蓄積する汚染物質や棲息動物に与える影響を調べるために、歩哨動物として棲息する野生ラットを採集し、生体反応について解析した。カブエ地域周辺の土壌からは高濃度の鉛が検出され、その分布パターンから鉱床が汚染由来であることが明らかとなった。鉛採掘に伴って発がん性を持つヒ素やカドミウムなどの重金属も鉛とほぼ同じ分布パターンを示しており、汚染源が同一であることが明らかとなった。

鉛鉱床のあるカブエ地域ではラットにも高濃度の鉛やカドミウムの蓄積が認められ、腎臓におけるメタロチオネインの発現が有意に上昇し、この地域において野生ラットに生体反応を引き起こすほどの重金属曝露であることが明らかとなった。また、疫学的解析から鉛については、野生げっ歯類では特

に分子マーカーとともに体重増加抑制などの毒性学的影響が現れている可能性が考えられた。

④偶蹄目の化学物質汚染と生体リスク

国立公園内の偶蹄目、特にリーチェでは、バイオマーカーが高発現している群において重金属蓄積が高い傾向にあることが示された。また、カバでは水銀の生物濃縮が起きていることが明らかとなった。

②によるザンビア全域の調査で重金属の高濃度汚染を示したカブエおよびコッパーベルト州を中心にザンビアからウシ約160頭以上について重金属濃度を分析した。カブエ地域のウシでは血中および肝臓の鉛とカドミウムが他の地域に比べて有意に高く、都市部を中心に採集したザンビア全体の80%以上のウシがCodexの基準を超える濃度の鉛を蓄積していた。

また血液中の重金属濃度とメタロチオネインなどのマーカー遺伝子の発現とは正の相関が認められた。さらに、鉛蓄積個体ではインターロイキンやiNOSの発現量が増加し、インターフェロンの発現が低下する等、免疫系への影響も認められた。ウシに観察された免疫細胞への影響は同定度の濃度を用いたin vitroの曝露試験でも再現され、環境化学物質が直接的に免疫系に影響していることが示された。

(2) 化学物質感受性の種差を作り出す分子機構の解明

①CYP1Aの酵素学的特徴の動物種差

がん原物質の発がんリスクを決定するCYP1A1について、有蹄類が高活性を持ち、がん原物質の代謝的活性化能が高いことを明らかにした。これらの中間体を消去する第I相酵素についても同様に独自進化を見ていることが明らかとなった。

また、鳥類では農薬に対する解毒代謝活性に関して大きな種差が認められ、化学物質感受性の種差を起している原因の一つであることが明らかとなった。

②生物種横断的なCYP1ファミリーの分子進化

様々な生物階層におけるCYP1ファミリーの分子進化やそのキャラクタリゼーションを行った。この研究の過程でこれまで通説とされてきたCYP1ファミリーとAhRとの関係について、AhRの調節を受けないCYP1ファミリーが哺乳類にも広く分布しており、その一部は偽遺伝子化せずに機能している可能性を明らかにした。

また、ダチョウをはじめ進化上キーとなる生物種について次世代シーケンサーを用いてcDNAライブラリーに発現する薬物代

謝酵素関連をシーケンスし、その進化過程を明らかにすることができた。

③食性と CYP1A1 の種差

P450 はこれまで肝臓を中心とした解析がなされてきた。肝臓は解毒を行う第一臓器である。しかし、動物は通常環境汚染物質に曝露される際には、経口による摂取が主要な曝露経路であるため、肝臓に至るまでの臓器は常に環境汚染物質に曝露されることとなる。しかしながらこれまでにこの観点からの研究はほとんどない。特に、複胃をもつ生物では、反芻による食物由来化学物質の継続的な曝露を消化管および舌で受け、単胃生物よりも曝露リスクが高まる可能性が考えられる。そこで、各種生物における P450 などの発現様式を調べたところ、偶蹄類に特異的な CYP1A1 の発現プロファイルを得ることができ、特に舌で高濃度の発現が観察された。また、舌に発現する P450 が実際に食物に含まれる環境汚染物質を代謝的に活性化することを初めて直接的に示すことができた。

④外来化学物質の感受性を決定する P450 の動物系統差

CYP2D サブファミリーに関して新規の転写調節因子を発見し、この因子がラットの系統差を引き起こしていることを明らかにした。鳥類については CYP2 ファミリーを中心にその発現やシーケンスを解析し、鳥類の外来異物代謝に重要な分子種を同定することができた。

⑤がん原物質の感受性を決定する重要因子 AhR の動物種差

鳥類 AhR1 系統樹を作成したところ、シブリー・アールキスト鳥類分類による系統樹と酷似していた。またリガンド結合能を決定する二つのアミノ酸配列を比較した場合、これら鳥類が高感受性型、低感受性型、中間型の三種類に分類されることがわかった。AhR1 および AhR2 の発現比には種差が認められた。ヘテロ発現および遺伝子解析の研究により、AhR リガンド（多環芳香族などのがん原物質やダイオキシン類など平面構造を持つ環境化学物質）に高い感受性を持つハイリスクグループの鳥類を同定することができた。

また、鳥類・哺乳類について、CYP1A1 の発現に大きな種差があることを明らかにした。その原因の一端として、カロテノイドの摂取が特に草食性の動物において AhR を活性化し、CYP1A1 の発現の種差を作り出していることを明らかにした。一方でビタミン A は ARNT を介して AhR 機能を抑制することが分かり、AhR の新たな機能を報告することができた。

⑥第 II 相抱合酵素の種差

多環芳香族が CYP1A1 によって代謝的に活性化された後に、解毒酵素として働くグルクロン酸抱合酵素や硫酸抱合酵素の動物種差を明らかにした。両棲類、鳥類、哺乳類の広範囲の動物種を調べたところ、多環芳香族であるピレンの抱合について大きな動物種差が認められた。両棲類間や、鳥類間、哺乳類の同類間でも抱合酵素の基質の特異性には種差が認められ、発がん物質である多環芳香族に関しては、同種間でも解毒経路が異なることが明らかとなった。

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 50 件）

- ① 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. *Environ Pollut*. 2011 Jan;159(1):175-81. Doi:10.1016/j.envpol.2010.09.007
- ② Kawai YK, Ikenaka Y, Fujita S, Ishizuka M. The CYP1D subfamily of genes in mammals and other vertebrates. *Mammalian Genome*. 2010 Jun;21(5-6):320-9. Doi:10.1007/s00335-010-9263-9
- ③ Watanabe KP, Saengtienchai A, Tanaka KD, Ikenaka Y, Ishizuka M. Comparison of warfarin sensitivity between rat and bird species. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*. 2010 Jun;152(1):114-9. Doi:10.1016/j.cbpc.2010.03.006
- ④ 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 Jul;116(1):79-91. Doi: 10.1093/toxsci/kfq087

〔学会発表〕（計 68 件）

- ① 石塚真由美、池田良徳 汚染環境下の野生動物の適応と毒性 フォーラム 2011・衛生薬学環境トキシコロジーシンポジウム 2011 年 10 月 28 日 金沢エクセルホテル東急（金沢）（招待講演）
- ② Marumi Ohno, Yoshinori Ikenaka, and Mayumi Ishizuka. All-trans retinoic acid negatively regulates AHR-mediated CYP1A1 transcription in human hepatoma, HepG2. 17th

International Symposium on Cytochrome P450. 2011年6月27日 The University of Manchester, Manchester (UK)

- ③ 石塚真由美 野生生物の持つ汚染環境への適応戦資源・素材関係学協会合同秋季大会 2007年9月9日北海道大学(札幌市、北海道) (招待講演)

[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]

【受賞】：科学技術分野の文部科学大臣表彰・若手科学者賞 (2009年) 野生動物のシトクロム P450 と汚染環境適応能力解明の研究

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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