

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24248056

研究課題名(和文) 化学物質汚染に対する産業動物の生体防御機構の研究基盤

研究課題名(英文) Defence mechanism against environmental chemicals in livestock animals

研究代表者

石塚 真由美 (ISHIZUKA, MAYUMI)

北海道大学・(連合)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) 34,800,000円

研究成果の概要(和文)：産業動物について、第I相反応であるシトクロムP450、第II相反応であるグルクロン酸抱合および硫酸抱合酵素について種差を明らかにした。哺乳類の尿におけるグルクロン酸抱合と硫酸抱合体比を比較し、その特徴を明らかにした。また、国内外の産業動物に蓄積する環境化学物質を分析し、ウシなどについては、重金属蓄積性が比較的高いことを見出した。鳥類について家禽を中心にトランスクリプトーム解析を行い、肝臓に発現する第I相反応酵素および第II相反応酵素の網羅的解析を行った。以上の研究により、産業動物の化学物質に対する防御機構を、異物代謝酵素を中心に明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In livestock animals, we identified the enzymatic characters of cytochrome P450 as typical phase I enzyme for xenobiotics. We also analyzed glucuronyltransferase and sulfotransferase dependent metabolites in urine samples from mammalians including livestock animals, to elucidate the ability of xenobiotic conjugating detoxification. In field surveillance at Asia and African countries, heavy metals are major accumulated environmental pollutants in cattle, and the accumulating pattern is unique in ruminants. In case of poultry species, we clarify the expressed cytochrome P450 and phase II enzymes in liver using transcriptome analyses method and in silico analyses, and we compared the structure of xenobiotic metabolizing enzymes in poultry species to those of mammals.

研究分野：境界農学

キーワード：シトクロムP450 グルクロン酸抱合 環境汚染 産業動物

1. 研究開始当初の背景

■産業動物はヒトと同じく日常的に多くの環境化学物質に曝露されており、環境化学物質による急性・慢性の中毒は世界的に継続的に観察・報告されている。曝露濃度が低いと思われてきた草食動物でも、餌飼料に含まれる汚染物質や草の表面に付着した化学物質により、予想以上に高濃度の汚染物質に曝露されていることが分かってきている。

■特に海外では家畜の化学物質汚染は深刻である。アフリカ諸国においては、産業動物の著しい化学物質汚染から、食の安全に関する各国の懸念は無視できず、WHO の勧告を上回る食肉の汚染物質の蓄積が明らかとなりつつある(Yabe J, Ishizuka M, et al. 2011, Environ Toxicol Chem)。また、有害金属の汚染、農薬などの明らかな環境化学物質の急性中毒による家畜の集団死が頻発していることも、各国との共同研究から明らかになりつつある。

■アフリカ諸国では今後地下資源だけに頼るモノ経済から農業製品輸出も含むマルチ経済への移行を目指している。輸出食肉の化学物質の安全確保は、輸出・輸入国にとって将来的に必須の問題である。

■この状況を受けて、我々は 2009 年～2011 年度に「国際トキシコロジーシンポジウム in アフリカ」をザンビア共和国・ルサカ市において緊急に開催し、10 数カ国のアフリカ各国の研究者らとケミカルハザード問題についてディスカッションを行った。各国研究者の認識でも、現在最も不足し、今後の研究調査で必要となってくるのが高次動物の毒性学的なデータであった。シンポジウムでは、動物に関する毒性学的データの欠如が各国の対策を後手に回す原因ともなっていることで意見が一致した。

■2010 年には、ナイジェリアのザムファラ州において 400 人以上の子供が鉛中毒により死亡する事件が起きている。この重大なケミカルハザードでは、ヒトにおける中毒の前に、家畜など棲息動物に先に病態が顕在化しており、産業動物のサーベイランスやモニタリングが実施できていれば十分に防ぐことのできた事件であったと言われている。

■しかし、実験動物や人と異なり、産業動物における外来化学物質の曝露が引き起こす毒性影響に関する研究は少なく、そのモニタリング手法は確立されていない。産業動物では化学物質感受性の種差・系統差が報告されており、ケミカルハザードからの動物の保護・ケアや対策、化学物質の環境への放出のリスクアセスメントを極めて困難にしている。

■また近年の分析技術の向上により、産業動物の化学物質に対する生体防御機構に関して、既存の教科書的情報にも多々誤りがあることを我々は見出している。

■このようなヒトや実験動物以外の動物種における化学物質感受性の決定因子や生体防御機構に関する情報の欠如は、動物の健康と

安全の確保だけではなく、食の安全や、ひいては健全な生態系の保全・管理をも脅かす結果となっている。これら産業動物における化学物質の曝露の現状やこれらの種の持つ生体防御機構の体系的な解析、研究基盤の構築、また非侵襲的に化学物質による病態を鋭敏に把握する為のセンシング技術の開発が求められている。

2. 研究の目的

当該研究では、産業動物において、次の点を解明または確立する。

■ 外来の化学物質代謝の主役となるシトクロム P450(特に CYP1A1、CYP2C、CYP3A を中心に)をはじめとする第 I 相反応酵素の基質特異性。

■ グルクロン酸抱合酵素、硫酸抱合酵素、グルタチオン抱合酵素をはじめとする第 II 相反応酵素の補酵素選択性と基質特異性。

■ 上記の異物酵素の組織分布とその発現分布とその機構。

■ フィールドで産業動物にどのような化学物質が蓄積しているのか、その動物種特異性。

■ ケミカルリスクをセンシングする為のバイオマーカー分子の探索を行い、非侵襲的な試料を用いたモニタリング方法を確立。

■ カロテノイドやフラボノイドなど、P450 や phase II 酵素群を高レベルに発現させる要因。

3. 研究の方法

■ 産業動物の化学物質の感受性の種差や系統差について、in vivo のみならず、異物の代謝を構成する遺伝子群(シトクロム P450 など phase I 酵素、グルクロン酸抱合酵素、硫酸抱合酵素、グルタチオン抱合酵素など phase II 酵素、トランスポーター、それらの発現調節因子)のクローニングと異種発現による in vitro、およびゲノム情報を用いた in silico による研究を行う。

■ 実際に汚染が顕著な海外フィールドで飼育される産業動物をモデルとして、蓄積する化学物質とその病態について明らかにする。特に、農薬、多環芳香族、重金属、マイコトキシンに重点を置く。

■ ウシやヤギなど歩哨動物となり得る動物を中心に、尿中の化学物質と抱合体の網羅的解析を行い、飼育環境中における環境化学物質の曝露とその由来を明らかにする。

4. 研究成果

(1) 抱合酵素における産業動物の動物種差

産業動物(ブタ、ウシ、ウマなど)およびその比較対象として計 15 種以上の哺乳類の尿

を採集し、モデル化合物としてピレンの抱合体の解析を行った。硫酸抱合およびグルクロン酸抱合酵素活性の優位な哺乳類種をそれぞれ同定した。これまで硫酸抱合酵素を書くときされてきたブタでは、ピレンに関してはグルクロン酸抱合活性が優位であるが、硫酸抱合活性も有していた。Km、Vmax 解析からは、ラットなど実験動物に比べても、高活性を有していることが明らかとなった。一方で、かっせり硫酸濃度はラットに比して低く、これが硫酸抱合活性がブタで低い一因となっている可能性が明らかとなった。

(2) 海外フィールドでの産業動物の化学物質汚染の現状

特にザンビアや南アフリカ、エチオピア、エジプト、ガーナなどのアフリカ諸国およびタイ、モンゴルなどのアジア地域から家畜類を採集し、蓄積する環境汚染物質について分析を行った。アフリカ地域の中でもエジプト、ザンビアおよびモンゴルでは、比較的高濃度の汚染物質が検出され、その主な化学物質は重金属類であった。特に、鉛およびカドミウムは高濃度を示しており、ヒトへの健康影響が懸念されるレベルであった。今後も引き続き、モニタリングが必要であり、その汚染源の同定が必要である。

一方、肝細胞に金属類を曝露したところ、シトクロム P450、グルクロン酸抱合酵素等の発現量が減少した。メカニズムとして酸化ストレスの介在が考えられたが、同時に転写調節因子の発現量も減少していた。さらに家畜類のカロテノイド濃度を反芻獣で分析したところ、種差が認められ、バッファローに比べてウシでは高濃度のカロテノイドを保有しており、これが異物代謝の発現に影響している可能性も考えられた。また、反芻獣では、特に舌など、他の動物種とは異なる部位に汚染物質の顕著な蓄積が認められた。

(3) 鳥類家禽におけるトランスクリプトーム及びゲノム in silico 解析による phase I および phase II 酵素の網羅的分析

ダチョウおよびニワトリなど家禽類について、肝臓 mRNA を用いた網羅的トランスクリプトーム解析を行った。これら鳥類では人と比べてシトクロム P450 分子種の数には大きな違いは認められなかったが、特に CYP2 ファミリーが顕著に分化しており、ニワトリとダチョウ間でも主となる P450 分子種に違いが認められた。

代表的な家禽であるニワトリは実験鳥類としても用いられているが、シトクロム P450 についてはワルファリンなどをモデル化合物とした場合に、他の鳥類種に比べて顕著に高活性を示しており、毒性学的試験としては他の鳥類種に外挿が難しいことも明らかとなった。

また、これらの家禽では、異物代謝酵素を発現調節する Aryl Hydrocarbon Receptor などの転写調節因子についても、リガンドとの結合性に種差があり、ニワトリではリガンドとの親和性が他の鳥類に比べて高いことが明らかとなった。このため、他の鳥類種に比較すると、化学物質に曝露された際の解毒のための酵素誘導など、異物代謝酵素の反応性が高いことも考えられた。

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 66 件)すべて査読有

- (1) Darwish WS, Ikenaka Y, Morshdy AE, Eldesoky KI, Nakayama SMM, Mizukawa H, Ishizuka M. β -carotene and retinol contents in the meat of herbivorous ungulates with a special reference to their public health importance. *JVMS* 78(2):351-4. (2015)
doi: 10.1292/jvms.15-0287
- (2) Bortey-Sam N*, Nakayama SMM*, Akoto O, Ikenaka Y, Fobil N.J., Baidoo E, Mizukawa H, Ishizuka M (* Equal contribution). Ecological Risk of Heavy Metals and a Metalloid in Agricultural Soils in Tarkwa, Ghana. *Int J Environ Res Public Health*. 12(9):11448-11465 (2015)
doi: 10.3390/ijerph120911448.
- (3) Bortey-Sam N*, Nakayama SMM*, Akoto O, Ikenaka Y, Fobil N.J., Baidoo E, Mizukawa H, Ishizuka M (* Equal contribution). Accumulation of heavy metals and metalloid from agricultural soils to foodstuffs around Tarkwa area in Ghana, and associated human health risks. *Int J Environ Res Public Health*. 12(8):8811-8827 (2015)
<http://hdl.handle.net/2115/60173>
- (4) Watanabe KP, Kawata M, Ikenaka Y, Nakayama SMM, Ishii C, Darwish WS, Saengtienchai A, Mizukawa H, Ishizuka M. *Environ Toxicol Chem*. 34(10):2328-2334 (2015)
doi: 10.1002/etc.3062.
- (5) Kakehi M, Ikenaka Y, Nakayama SMM, Kawai YK, Watanabe KP, Mizukawa H, Nomiyama K, Tanabe S, Ishizuka M. Uridine diphosphate-glucuronosyltransferase (UGT) xenobiotic metabolizing activity and genetic evolution in Pinniped species. *Tox Sci* (2015, in press)
doi: 10.1093/toxsci/kfv144
- (6) Bortey-Sam N*, Nakayama SMM*, Ikenaka Y, Akoto O, Baidoo E, Mizukawa H, Ishizuka M (* Equal contribution). Health risk assessment of heavy metals and metalloid in drinking water from communities near gold mines in Tarkwa,

- Ghana. *Environ Monit Assess*, 187(7):1-12 (2015)
doi: 10.1007/s10661-015-4630-3.
- (7) Darwish WS, Nakayama SMM, Itotani Y, Ohno M, Ikenaka Y, Ishizuka M. Metabolic Activation of Heterocyclic Amines and Expression of Xenobiotic-Metabolizing Enzymes in the Gastrointestinal Tract of Rats. *J Food Sci*, 80(7):T1627-T1632 (2015)
doi: 10.1111/1750-3841.12931
- (8) Darwish WS, Hussein MA, El-Desoky KI, Ikenaka Y, Nakayama SMM, Mizukawa H, Ishizuka M. Incidence and public health risk assessment of toxic metal residues (cadmium and lead) in Egyptian cattle and sheep meats. *Int Food Res J*, 22(4):1719-1726 (2015)
[http://www.ifrj.upm.edu.my/22%20\(04\)%202015/\(58\).pdf](http://www.ifrj.upm.edu.my/22%20(04)%202015/(58).pdf)
- (9) Nakata H*, Nakayama SMM*, Ikenaka Y, Mizukawa H, Ishii C, Yohannes YB, Konnai S, Darwish WS, Ishizuka M (* Equal contribution). Metal extent in blood of livestock from Dandora dumping site, Kenya: source identification of Pb exposure by stable isotope analysis. *Environ Pollut*. 205:8-15 (2015)
doi: 10.1016/j.envpol.2015.05.003.
- (10) Saengtienchai A, Ikenaka Y, Darwish WS, Nakayama SMM, Mizukawa H, Ishizuka M. Characterization and tissue distribution of conjugated metabolites of pyrene in the rat. *J Vet Med Sci*. 77(10):1261-1267 (2015)
doi: 10.1292/jvms.14-0632
- (11) Ikenaka Y, Nakayama SMM, Oguri M, Saengtienchai A, Mizukawa H, Kobayashi J, Darwish WS, Ishizuka M. Are red gourami (*Colisa labiosa*) low xenobiotic metabolizers? Elucidation of in vivo pharmacokinetics of pyrene as a model substrate. *Environ Toxicol Pharmacol*, 39:1148-1153 (2015)
doi: 10.1016/j.etap.2015.04.004.
- (12) Bortey-Sam N, Ikenaka Y, Akoto O, Nakayama M.M.S, Yared YB, Baidoo E, Mizukawa H, Ishizuka M. Levels, potential sources and human health risk of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in particulate matter (PM10) in Kumasi-Ghana. *Environ Sci Pollut Res*, Jul;22(13):9658-67 (2015)
doi: 10.1007/s11356-014-4022-
- (13) Yabe J*, Nakayama SMM*, Ikenaka Y, Yohannes YB, Bortey-Sam N, Oroszlany B, Muzandu K, Choongo K, Kabalo AN, Ntapisha J, Mweene A, Umemura T, Ishizuka M (* Equal contribution). Lead poisoning in children from townships in the vicinity of a lead-zinc mine in Kabwe, Zambia. *Chemosphere*, 119:941-947 (2015)
doi: 10.1016/j.chemosphere.2014.09.028.
- (14) Bortey-Sam N*, Nakayama SMM*, Ikenaka Y, Akoto O, Yohannes YB, Baidoo E, Mizukawa H, Ishizuka M (* Equal contribution). Human health risks from metals and metalloid via consumption of food animals near Gold Mines in Tarkwa, Ghana: Estimation of the daily intakes and target hazard quotients (THQs). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 111:160-167 (2015)
doi: 10.1016/j.ecoenv.2014.09.008.
- (15) Watanabe KP, Kawai YK, Nakayama SMM, Ikenaka Y, Mizukawa H, Takaesu N, Ito M, Ikushiro S, Sakaki T, Ishizuka M. Partial cloning of CYP2C23a genes and hepatic protein expression in eight representative avian species. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 38(2):190-195 (2015)
doi: 10.1111/jvp.12159.
- (16) Saengtienchai A, Ikenaka Y, Nakayama SMM, Mizukawa H, Kakehi M, Bortey-Sam N, Darwish W, Tsubota T, Terasaki M, Poapolathep A, Ishizuka M. Identification of inter-specific differences in phase II reactions: Determination of metabolites in the urine of 16 mammalian species exposed to environmental pyrene. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 33(9):2062-2069 (2014)
doi: 10.1002/etc.2656.
- (17) Fujisawa N, Nakayama SMM, Ikenaka Y, Ishizuka M. TCDD-induced chick cardiotoxicity is abolished by a selective cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitor NS398. *Arch. Toxicol*, 88(9):1739-1748 (2014)
<http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00204-014-1225-7>
- (18) Bortey-Sam N, Ikenaka Y, Nakayama SMM, Akoto O, Yohannes YB, Baidoo E, Mizukawa H, Ishizuka M. Occurrence, distribution, sources and toxic potential of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in surface soils from the Kumasi Metropolis, Ghana. *Sci Total Environ*, 496:471-478 (2014)
doi: 10.1016/j.scitotenv.2014.07.071
- (19) Yohannes YB, Ikenaka Y, Saengtienchai A, Watanabe KP, Nakayama SMM, Ishizuka M. Concentrations and human health risk assessment of organochlorine pesticides in edible fish species from a Rift Valley Lake – Lake Ziway, Ethiopia. *Ecotoxicol. Environ. Saf*. 106:95-101 (2014)
doi: 10.1016/j.ecoenv.2014.04.014.
- (20) Darwish WS, Ikenaka Y, Nakayama SMM, Ishizuka M. The effect of copper on the mRNA expression profile of xenobiotic-metabolizing enzymes in cultured rat H4-II-E cells. *Biol. Trace Elem. Res*. 158:243-248 (2014)

- doi: 10.1007/s12011-014-9915-9.
- (21) Watanabe KP, Kawai YK, Ikenaka Y, Kawata M, Ikushiro S, Sakaki T, Ishizuka M. Avian cytochrome P450 (CYP) 1-3 family genes: isoforms, evolutionary relationships, and mRNA expression in chicken liver. PLOS ONE e75689(2013)
doi: 10.1371/journal.pone.0075689
- (22) Fujisawa N, Kawai YK, Nakayama SMM, Ikenaka Y, Yamamoto H, Ishizuka M. Dioxin sensitivity-related two critical amino acids of arylhydrocarbon receptor may not correlate with the taxonomy or phylogeny in avian species. J Vet Med Sci 75:1577-1583 (2013)
https://www.researchgate.net/publication/255177885_Dioxin_Sensitivity-Related_Two_Critical_Amino_Acids_of_Arylhydrocarbon_Receptor_May_Not_Correlate_with_the_Taxonomy_or_Phylogeny_in_Avian_Species
- (23) Sasaki N, Matumoto T, Ikenaka Y, Nakayama SMM, Ishizuka M, Kazusaka A, Fujita S. Repeated treatment with furazolidone induces multiple cytochrome P450-related activities in chicken liver but not in rat liver. J Vet Med Sci 75:1497-1502 (2013)
https://www.jstage.jst.go.jp/article/jvms/75/11/75_12-0531/_article
- (24) Ikenaka Y, Oguri M, Saengtienchai A, Nakayama SMM, Ijiri S, Ishizuka M. Characterization of Phase-II conjugation reaction of polycyclic aromatic hydrocarbons in fish species: unique pyrene metabolism and species specificity observed in fish species. Environmental Toxicology and Pharmacology 36:567-578 (2013)
doi: 10.1016/j.etap.2013.05.018.
- (25) Kawai YK, Watanabe KP, Ishii A, Onuma A, Sawa H, Ikenaka Y, Ishizuka M. De novo sequence analysis of cytochrome P450 1-3 genes expressed in ostrich liver with highest expression of CYP2G19. Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics 8(3):201-208 (2013)
doi: 10.1016/j.cbd.2013.05.002
- (26) 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 20:8663–8671 (2013)
. doi: 10.1007/s11356-013-1821-8.
- (27) Fujisawa N, Darwish WS, Ikenaka Y, Kim E, Lee J, Iwata H, Nakayama SMM, Ishizuka M. Molecular evaluation of a new highly sensitive aryl hydrocarbon receptor in ostriches. Poultry Science 92(7):1921-1929 (2013)
doi: 10.3382/ps.2013-03090
- (28) 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)
doi: 10.1016/j.chemosphere.2013.01.047.
- (29) 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):189-192.
doi: 10.1002/etc.2029.
- (30) 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.
doi: 10.1002/etc.1951.
- 〔学会発表〕(計 150 件)
多数につき、招待講演のみ記載する。
- (1) Mayumi Ishizuka, Interspecies differences in xenobiotic metabolism, 7th International Toxicology Symposium in Africa, 31st August, 2015, Johannesburg, South Africa
- (2) 中山翔太、水川葉月、池中良徳、石塚真由美、シンポジウム「野生鳥類の化学物質汚染とその影響」鳥類で起こっているケミカルハザードとそのメカニズム、第 21 回日本野生動物医学学会大会、2015 年 7 月 30 日～8 月 2 日 (7/31、招待講演)、酪農学園大学、北海道
- (3) 石塚真由美、中山翔太、水川葉月、池中良徳、外来化学物質の代謝の種差、第 31 回日本毒性病理学シンポジウム「毒性病理学と獣医病理学を繋ぐ比較の生物学 - 共通性と種差を知ろう」、2015 年 1 月 29 日、タワーホール船堀、東京 (招待講演)
- (4) Yoshinori Ikenaka, Saengtienchai Aksorn, Mayu Kakehi, Shouta M.M. Nakayama, Hazuki Mizukawa, Mayumi Ishizuka, Mammalian interspecies differences in xenobiotic phase II reaction, 12th International Symposium on Cytochrome P450 Biodiversity and Biotechnology, 24th - 28th September, 2014, Conference Hall of the Kyoto International Foundation, Kyoto, Japan (招待講演)
- (5) Mayumi Ishizuka, Environmental Pollution

in African countries -Focus on metal and organochlorine pesticide-, International symposium on environmental pollution and food safety, Zagazig University, 20th August, 2014, Zagazig, Egypt (招聘講演)

- (6) 石塚真由美, アフリカ諸国における化学物質汚染: 金属およびメタロイド汚染を中心に, 第 59 回トキシシンポジウム, 2012 年 8 月 30 日, とかちプラザ (帯広市)

[図書] (計 0 件) 教科書を除く

[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/>

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

(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・准教授
研究者番号 : 40543509

(3) 連携研究者

坪田 敏男 (TSUBOTA, Toshio)
北海道大学・大学院獣医学研究科・教授
研究者番号 : 10207441

(3) 連携研究者

今内 覚 (KONNAI, Satoru)
北海道大学・大学院獣医学研究科・准教授
研究者番号 : 40396304