

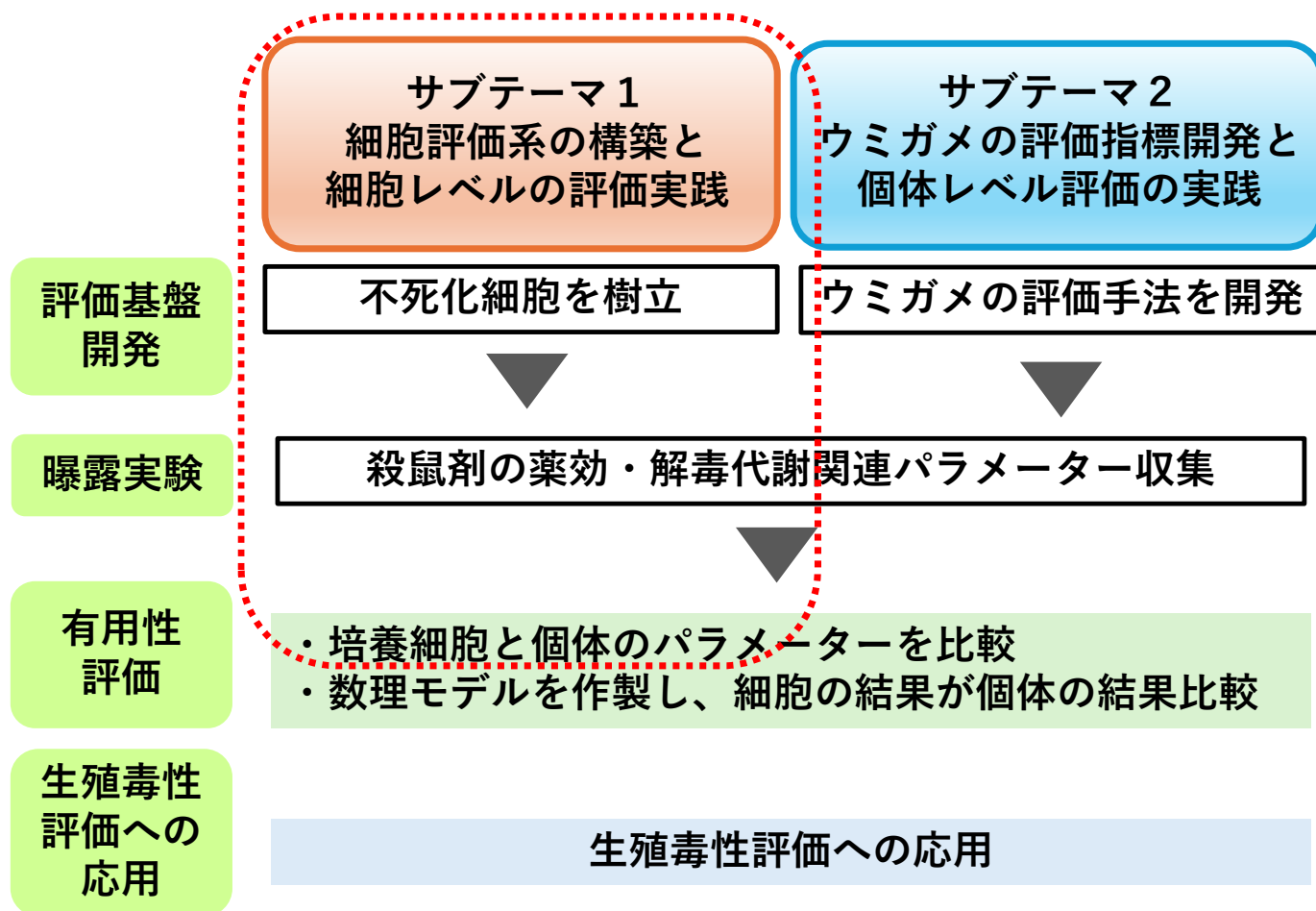
令和6年度若手研究者による研究成果発表会

2024年11月29日
(発表20分＋質疑応答10分)

【4RF-2102】
**野生動物への環境汚染物質の影響評価を実現する
培養細胞を用いた新規評価技術の構築**

国立環境研究所生物多様性領域 片山雅史

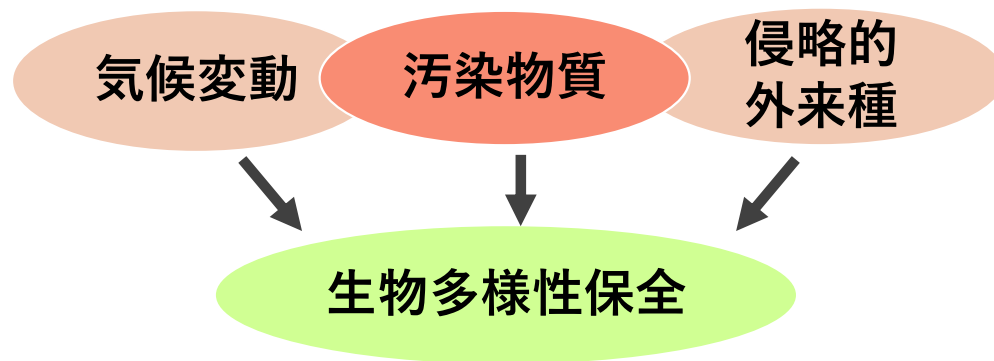
本推進費研究全体で取り組んだ内容



様々な内容に取り組んでいるが、本発表では中心内容である細胞による殺鼠剤ダイファシノンの薬効評価を中心にお話します

はじめに（研究の背景）

生物多様性保全は国際的な大問題



汚染物質は生物多様性を脅かす
主要要因の一つ

野生動物への曝露実験は事実上不可能

汚染物質



野生動物



汚染物質の野生動物への影響を解明するた
め、野生動物に曝露実験ができれば、
正確に評価可能

個体を用いた曝露実験は不可能
非侵襲的な新規評価法（代替法）の
開発が必要

はじめに（研究の背景）

本研究では、細胞に着目

個体



死亡個体から
組織の一部を採取



培養細胞



細胞は野生動物であっても、死亡個体から取得可能
この培養細胞を汚染物質の影響の評価に利用できないか？

はじめに（研究の背景）

細胞の可能性

- 細胞は、生物学的に生体を構成する最小単位
 - 応答性を有する
 - ヒト等の研究では、創薬や基礎研究に利用されている
- 野生動物由来の細胞
 - 汚染物質をばく露し、応答を解析可能
 - 感受性情報などの取得を通じて、汚染物質による影響を評価できる可能性がある



- 応答を解析
遺伝子発現
細胞毒性（細胞数を含む）
など

本研究では、死亡個体から取得した体細胞を用いた汚染物質の評価に取り組んだ

はじめに（研究の背景）

モデル事例の設定

- ・小笠原諸島では外来ネズミ大繁殖
→小笠原固有の生物に大きな影響
例）小笠原固有の陸産貝類の捕食



- ・殺鼠剤による対策（駆除）を実施している
→一定の効果が得られている
- ・非標的種への影響の検討が必要
→既に一定の検討はされている
→より詳細な影響の評価をすれば、より安心して利用可能



父島の居住地域でも
外来ネズミが生息し
ています



外来ネズミである
クマネズミ

本研究では、小笠原における殺鼠剤の非標的種への影響評価をモデルにした

はじめに（研究の背景）

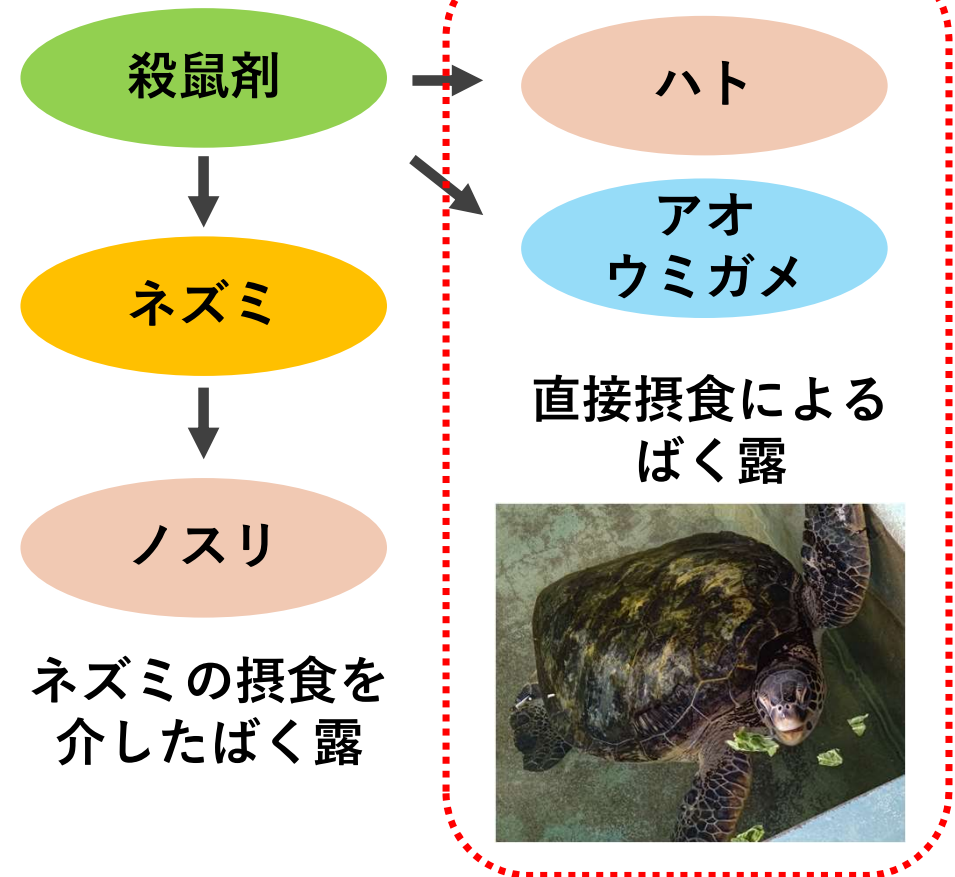
評価対象種の設定

(財)日本環境センター環境省請負業務報告書
でばく露リスクが報告されている動物

- ・オガサワラノスリ
- ・アカガシラカラスバト
- ・アオウミガメ

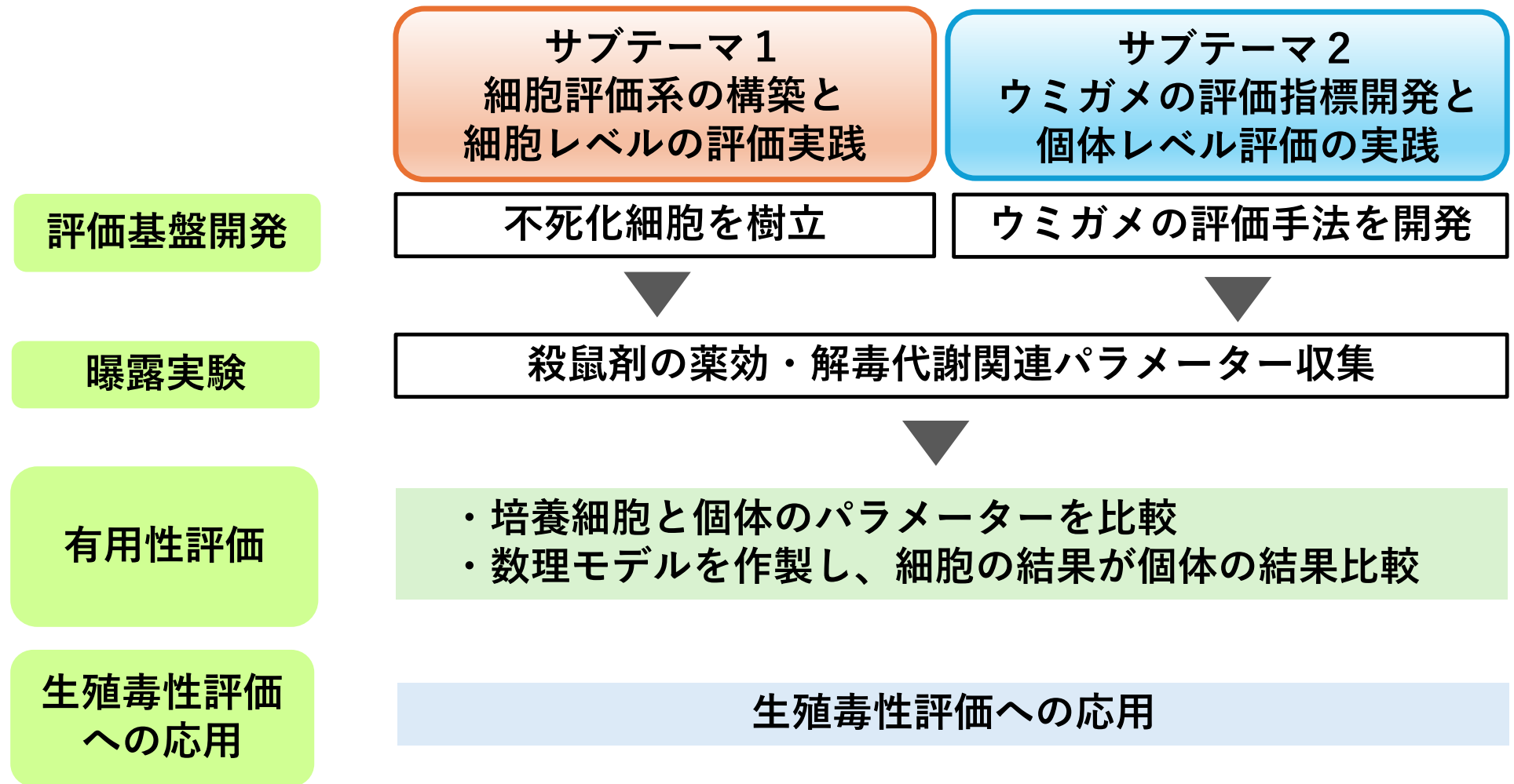


アオウミガメは個体を用いた実験が可能
先行の推進費(4RF-1802)でアオウミガメは
殺鼠剤の感受性が高い可能性が示唆



本提案では、殺鼠剤のウミガメへの影響をモデルに細胞評価系の有用性を検証

本研究の概要

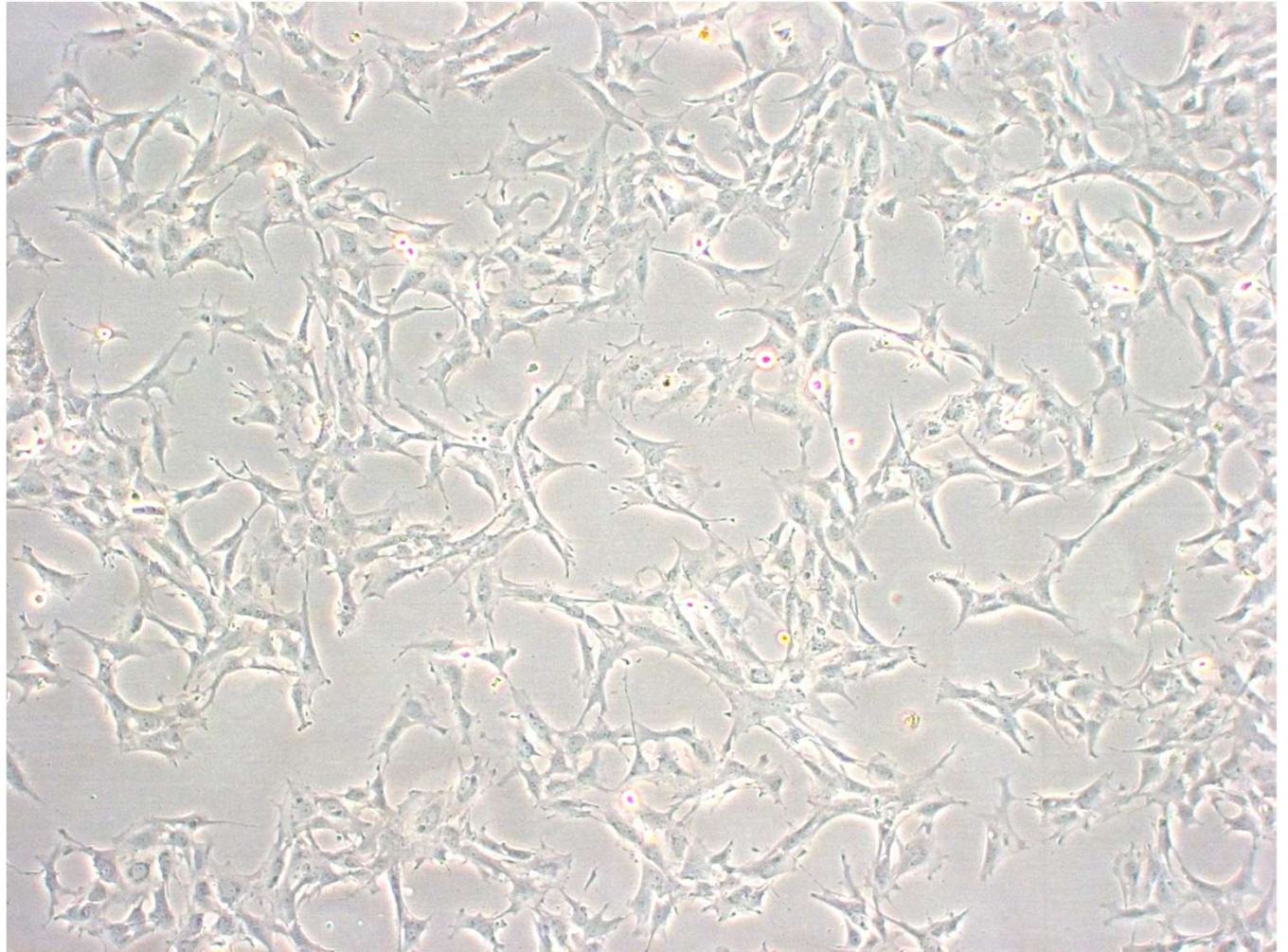


細胞による評価の有用性を検証することとした

細胞の取得



死亡個体から体細胞
取得に成功！



不死化細胞の樹立

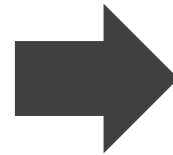
培養細胞が抱える課題

培養初期の細胞



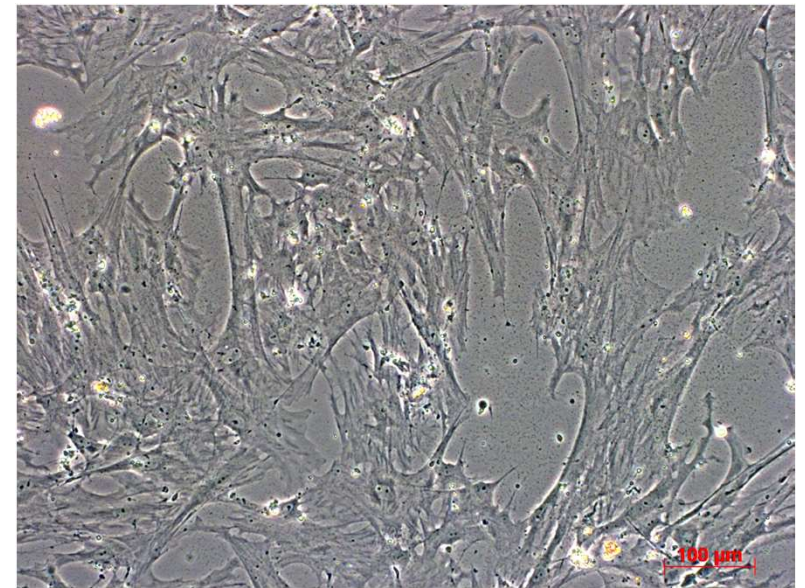
活発な細胞増殖

継代



細胞老化
現象

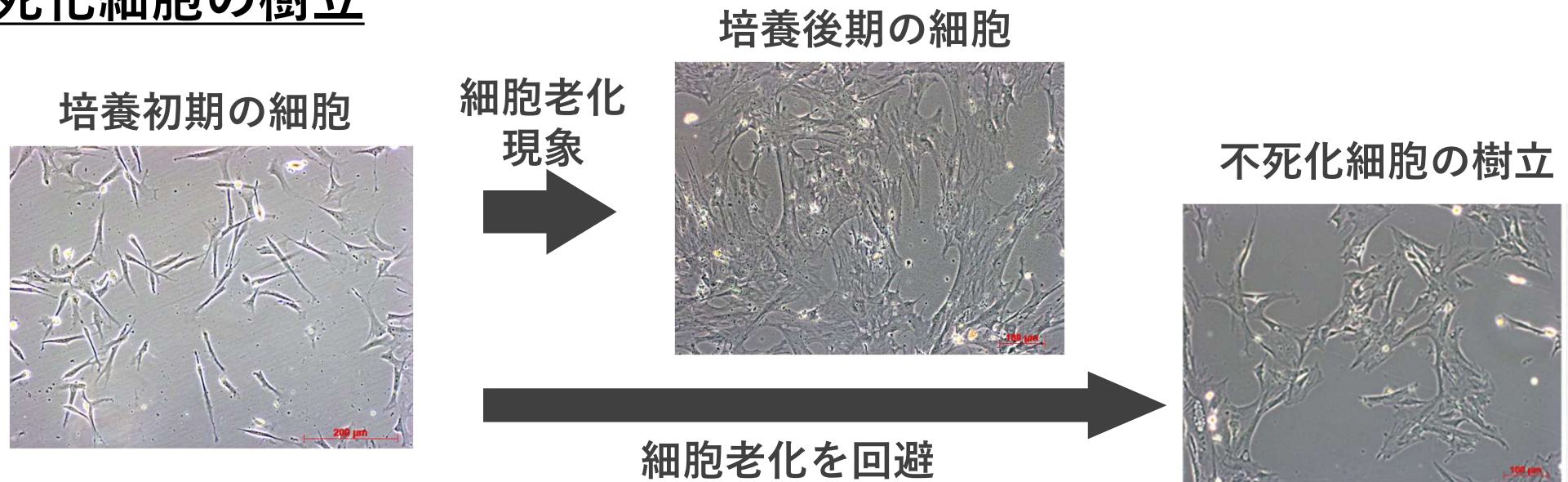
培養後期の細胞



細胞増殖がゆるやか

- ・ 培養後期では、十分な細胞が得られない場合がある
- ・ 細胞のコンディションが揃わない場合もある

不死化細胞の樹立



- ・細胞老化現象を乗り越えられれば、安定して細胞培養が可能
- ↓
- ・細胞老化は、細胞培養ストレスにより生じる
→細胞培養ストレスにより、細胞周期が停止に誘導される
- ↓
- ・本研究では、野生動物へ不死化細胞技術を応用

不死化細胞の樹立

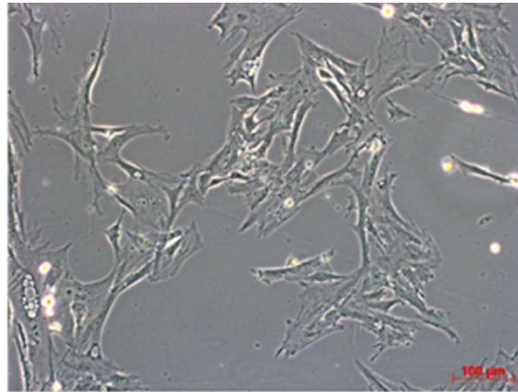
培養初期の細胞



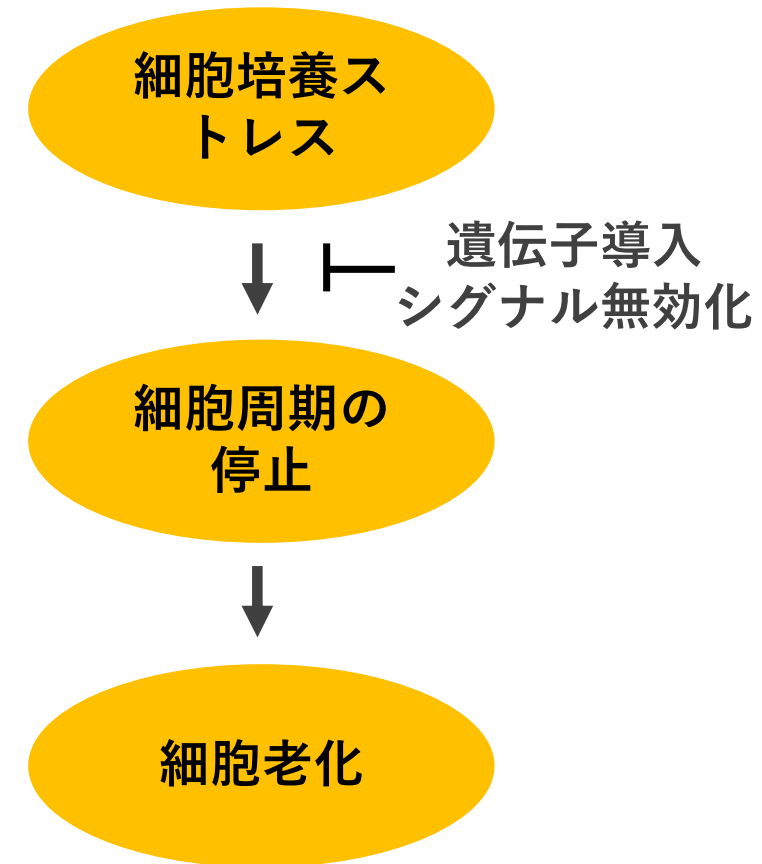
遺伝子の導入



不死化細胞の樹立

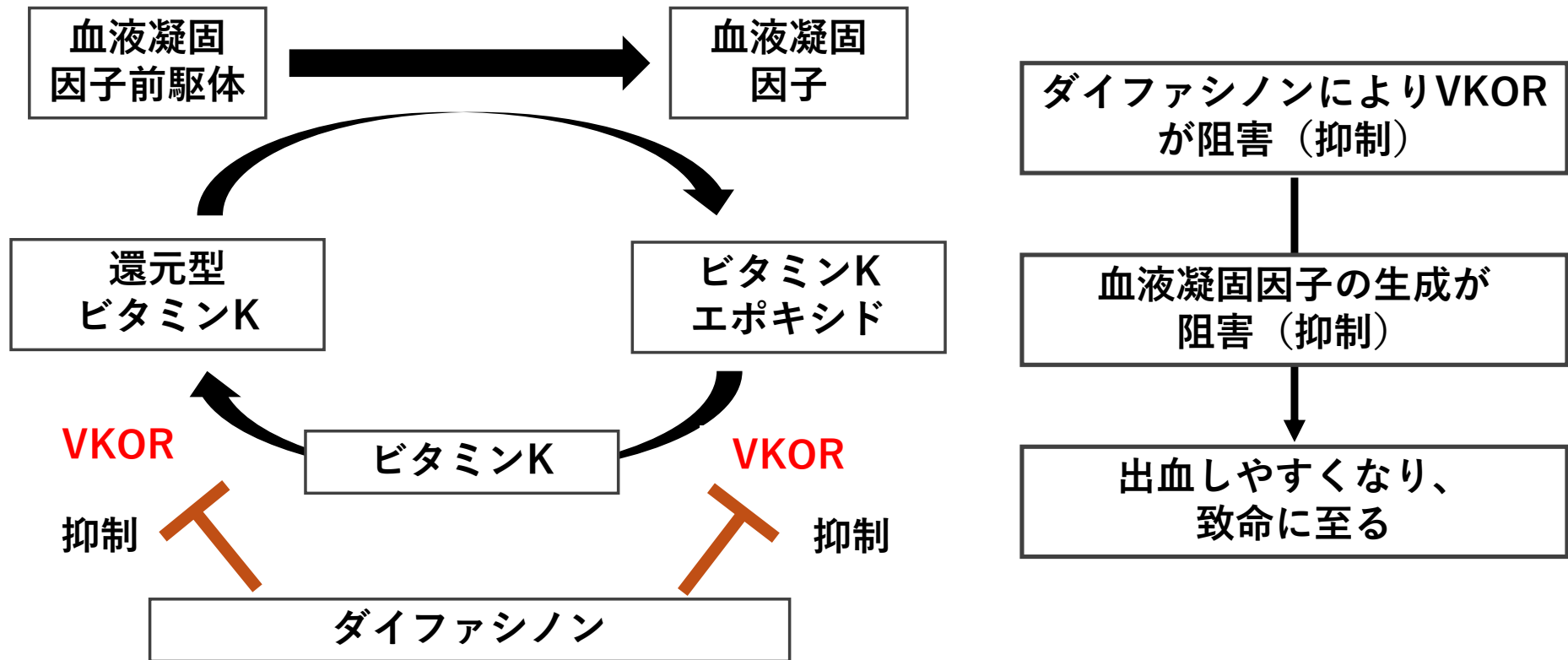


- 細胞老化は、細胞培養ストレスにより生じる
→細胞培養ストレスにより、細胞周期が停止に誘導
- 本研究では、遺伝子を導入し不死化細胞の樹立を試みた
→細胞培養ストレス由来のシグナルを無効化させる遺伝子を導入
- 結果、不死化細胞の樹立の基準とされるPopulation Doubling level100を超える細胞の樹立に成功した



殺鼠剤の評価

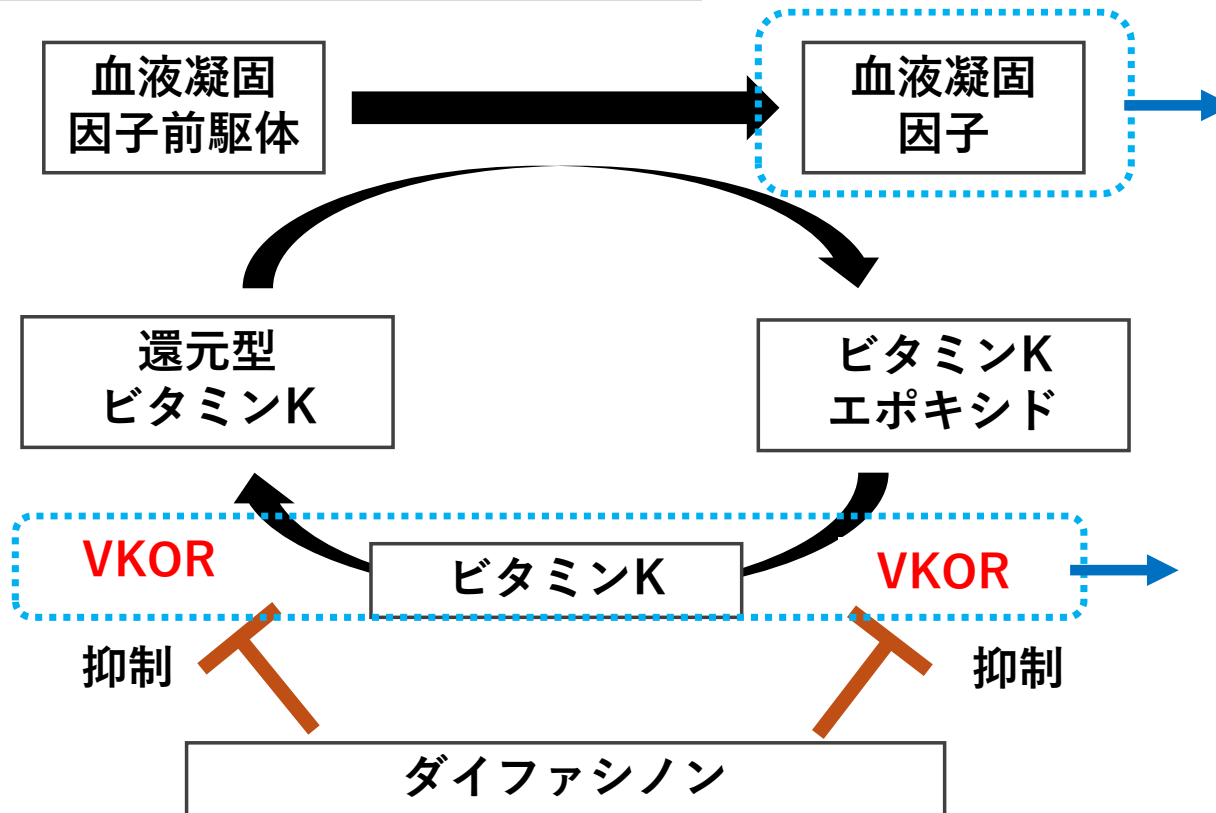
殺鼠剤ダイファシノンの作用



小笠原地域で使用されている殺鼠剤ダイファシノンは、VKORを阻害し、出血が止まらなくすることで、ネズミを駆除している

殺鼠剤の評価

細胞、個体での取得パラメータ



- ・ 生体におけるダイファシノンの作用の指標にプロトロンビン時間(血液凝固時間の指標)とする

- ・ VKORを細胞におけるダイファシノンの作用の指標とする
→ 遺伝子発現で解析

本研究では、細胞におけるVKORの発現と、
生体におけるプロトロンビン時間を比較した

殺鼠剤の評価

細胞、個体で取得したパラメータの比較

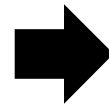
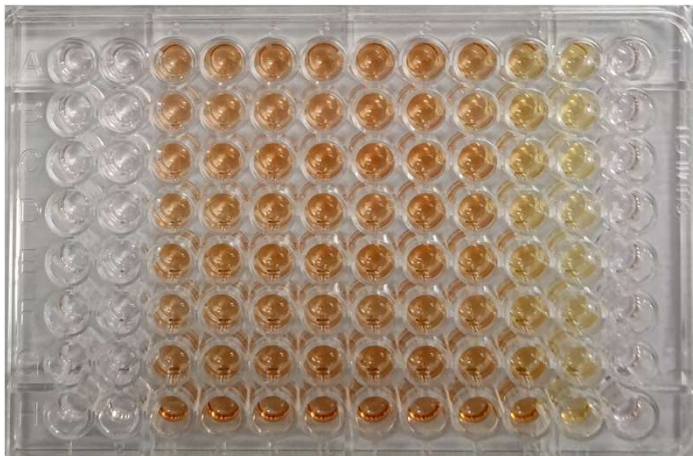
	細胞	生体	応答性（細胞）	応答性（生体）	細胞と生体データの順位
薬効	VKOR遺伝子発現	プロトロンビン時間	ラット＞クマネズミ >>>アオウミガメ	ラット＞クマネズミ >>>アオウミガメ	合致

- ・細胞レベルの結果、生体レベルの結果ともに、応答性はラットが一番高く、次にクマネズミ、最後にアオウミガメであった
→細胞による、ダイファシノンの薬効が評価できる可能性が示唆

殺鼠剤の評価

細胞数情報の評価への利用の試み

- 細胞数の解析は、細胞研究における強み
→ 試薬で反応させて、プレートリーダーで読むだけで情報が取得できる



プレートリーダーで解析
簡便に情報が得られる

評価に使用することはできないだろうか？

ボトムアップ的発想で、検討を進めた

殺鼠剤の評価

細胞、個体で取得したパラメータの比較

	細胞	生体	応答性（細胞）	応答性（生体）	細胞と生体データの順位
代謝		水酸化ダイファシノン濃度		クマネズミ＞ラット ＞＞＞アオウミガメ	
その他	細胞数		クマネズミ＞ラット ＞＞＞アオウミガメ		※代謝との関係性が示唆

※水酸化ダイファシノンは、ダイファシノンの代謝物

- 細胞数に関して、生体のダイファシノンと同じような結果が得られた
→代謝との関連性を示唆される結果であった

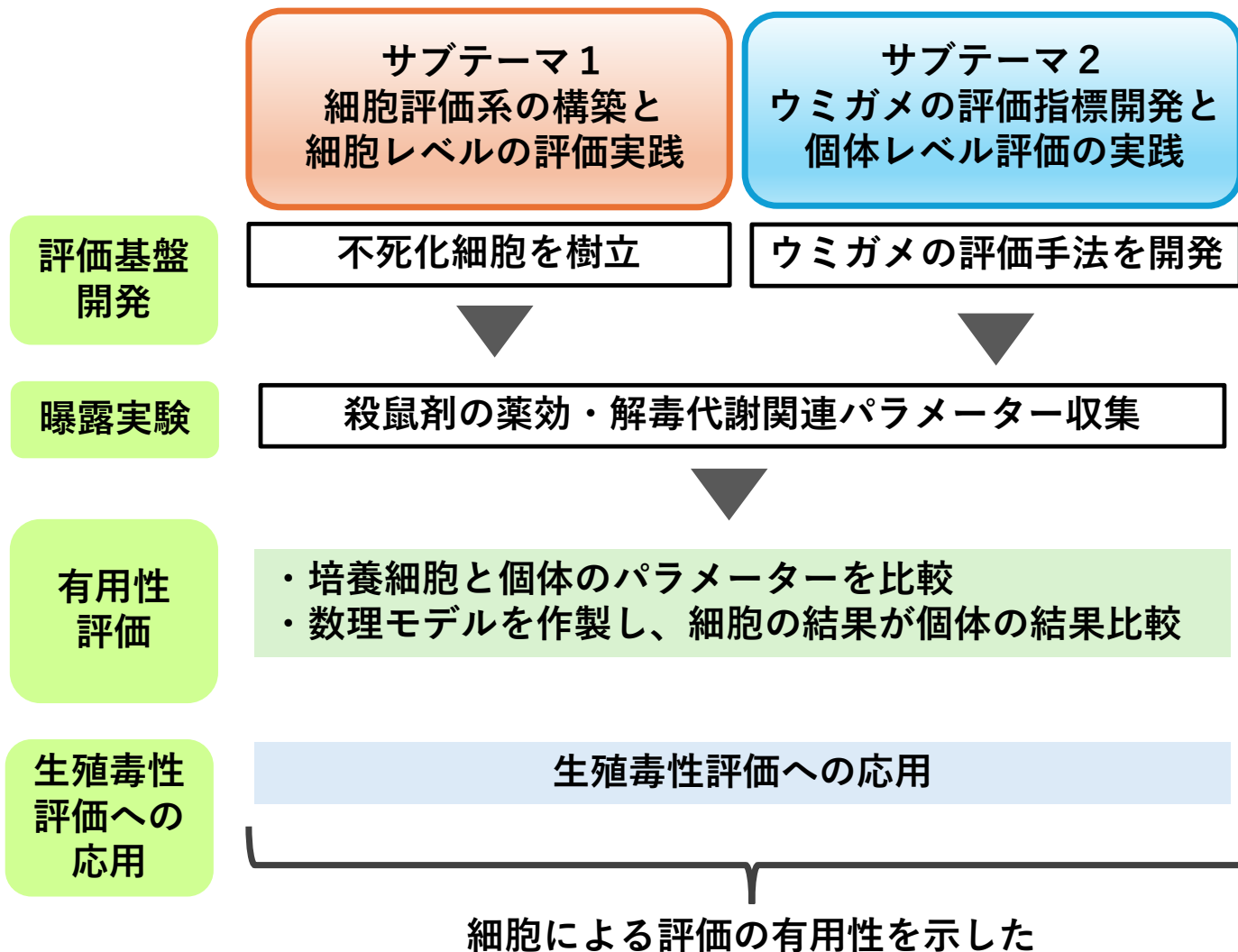
殺鼠剤の評価

細胞、個体で取得したパラメータの比較

	細胞	生体	応答性（細胞）	応答性（生体）	細胞と生体データの順位
薬効	VKOR遺伝子発現	プロトロンビン時間	ラット＞クマネズミ ＞＞＞アオウミガメ	ラット＞クマネズミ ＞＞＞アオウミガメ	合致
代謝		水酸化ダイファシノン濃度		クマネズミ＞ラット ＞＞＞アオウミガメ	
その他	細胞毒性		クマネズミ＞ラット ＞＞＞アオウミガメ		※代謝との関係性が示唆

細胞レベルを使うことで、一定の評価が可能であることが示唆された

本研究で取り組んだ内容



左図に加えて

- ・ 殺鼠剤耐性変異の有無の確認
(小笠原地域のネズミ類)
- ・ アオウミガメの生殖毒性評価
指標の開発
- ・ 小笠原地域のクマネズミの
薬効評価
- ・ 薬効を評価を可能にする数理
モデルの作成
- ・ 殺鼠剤による性腺刺激ホルモン
放出ホルモンなどへの影響の
可能性の示唆
- ・ アオウミガメ細胞の培養条件
の検討

本研究の発展性

- ・ 本研究を通じて、小笠原で使用されている殺鼠剤ダイファシノンモデルに、アオウミガメ、クマネズミ、ラット（ドブネズミ）における細胞を使った評価の有用性が示唆された。
- ・ 他種の生物や、他の汚染物質への評価の応用が今後期待できると考えている。

本研究の研究体制

研究代表者：国立環境研究所
研究分担者：北海道大学
研究分担者：北里大学

片山雅史(サブテーマリーダー)
中山翔太(サブテーマリーダー)
武田一貴

研究協力：認定NPO法人エバーラスティング・ネイチャー
研究協力：千葉大学
研究協力：環境省関東事務所小笠原自然保護官事務所
研究協力：一般財団法人 自然環境研究センター
研究協力：イカリ消毒株式会社

近藤里美
江口哲史

(敬称略)

上記の皆様を含め、ご協力をいただきました全ての方々に厚く御礼申し上げます。