

Environment Research and Technology Development Fund

環境研究総合推進費 終了研究成果報告書

4RF-1802

「小笠原諸島における殺鼠剤散布が野生動物に及ぼす影響の解明」

J P M E E R F 2 0 1 8 4 R 0 2

平成30年度～令和3年度

Elucidation of the Influence of the Rodenticide Spraying on Wildlife in the Ogasawara Islands

＜研究代表機関＞

北海道大学

＜研究分担機関＞

帯広畜産大学

＜研究協力機関＞

環境省（小笠原自然保護官事務所）、小笠原自然文化研究所、自然環境研究センター、エバーラスティング・ネイチャー、札幌市円山動物園、釧路市猛禽類医学研究所、多摩動物公園、（株）イカリ消毒技術研究所、（株）シー・アイ・シー、水川葉月（平成30年度）、森田鮎子（平成30年度）、武田一貴（R2－R3年度）

○図表番号の付番方法について

「Ⅰ．成果の概要」の図表番号は「0．通し番号」としております。なお、「Ⅱ．成果の詳細」にて使用した図表を転用する場合には、転用元と同じ番号を付番しております。

「Ⅱ．成果の詳細」の図表番号は「サブテーマ番号．通し番号」としております。なお、異なるサブテーマから図表を転用する場合は、転用元と同じ図表番号としております。

令和4年5月

目次

I. 成果の概要	1
1. はじめに（研究背景等）	
2. 研究開発目的	
3. 研究目標	
4. 研究開発内容	
5. 研究成果	
5-1. 成果の概要	
5-2. 環境政策等への貢献	
5-3. 研究目標の達成状況	
6. 研究成果の発表状況	
6-1. 査読付き論文	
6-2. 知的財産権	
6-3. その他発表件数	
7. 国際共同研究等の状況	
8. 研究者略歴	
II. 成果の詳細	14
II-1 殺鼠剤に対する解毒排泄能の動物種差の解明 （北海道大学）	
要旨	
1. 研究開発目的	
2. 研究目標	
3. 研究開発内容	
4. 結果及び考察	
5. 研究目標の達成状況	
6. 引用文献	
II-2 殺鼠剤標的分子の感受性の種差の解析 （帯広畜産大学）	22
要旨	
1. 研究開発目的	
2. 研究目標	
3. 研究開発内容	
4. 結果及び考察	
5. 研究目標の達成状況	
6. 引用文献	
III. 研究成果の発表状況の詳細	31
IV. 英文Abstract	35

I. 成果の概要

課題名 4RF-1802 小笠原諸島における殺鼠剤散布が野生動物に及ぼす影響の解明

課題代表者名 中山 翔太 (北海道大学 大学院獣医学研究院 准教授)

重点課題 主：【重点課題⑫】生物多様性の保全とそれに資する科学的知見の充実に向けた研究・技術開発

副：【重点課題③】環境問題の解決に資する新たな技術シーズの発掘・活用

行政要請研究テーマ（行政ニーズ） 4-7) 生物多様性と地域の社会経済に配慮した自然保護地域の管理有効性評価と計画・管理運営手法の開発

研究実施期間 平成30年度～令和3年度

但し、新型コロナウイルスの影響のため、令和3年度まで延長

研究経費

16,755千円（合計額）

（各年度の内訳：平成30年度：5,243千円、令和元年度：5,756千円、令和2年度：4,456千円、令和3年度：1,300千円）

研究体制

（サブテーマ1）殺鼠剤に対する解毒排泄能の動物種差の解明（北海道大学）中山翔太、池中良徳

（サブテーマ2）殺鼠剤標的分子の感受性の種差の解析（帯広畜産大学）川合佑典

研究協力機関

環境省（小笠原自然保護官事務所）、小笠原自然文化研究所、自然環境研究センター、エバーラスティング・ネイチャー、札幌市円山動物園、釧路市猛禽類医学研究所、多摩動物公園、（株）イカリ消毒技術研究所、（株）シー・アイ・シー、水川葉月（平成30年度）、森田鮎子（平成30年度）、武田一貴（R2-R3年度）

本研究のキーワード： 野生動物、殺鼠剤、感受性、小笠原諸島、動物種差、固有種、希少種

1. はじめに（研究背景等）

ドブネズミやクマネズミなどの外来性小哺乳類は、公衆衛生学的理由のほか、生態系を攪乱することから、その駆除のために殺鼠剤が使用されてきた。1950年代より、ビタミンKエポキシド還元酵素（VKOR）を標的とした抗血液凝固系の殺鼠剤（ワルファリンなど）が世界的に使用されている。一方で、世界各地において殺鼠剤に抵抗性を持つげっ歯類個体が現れ、より毒性の強い第2世代殺鼠剤の開発が進み、日本を除く各国で害獣駆除に用いられている。また、近年加速する猛禽類の生息数の減少の主要因の一つとして、殺鼠剤による環境及び餌生物の汚染による中毒死が挙げられている。国内および世界各地でペストコントロールのために抗血液凝固系の殺鼠剤が使用され続け、野生げっ歯類の耐性個体群の拡散により、殺鼠剤の使用が拡大している。殺鼠剤に対する鳥類・哺乳類などの「殺鼠剤の非対象生物」の感受性は、特に鳥類ではニワトリを用いた実験から、「感受性が極めて低く鳥類は中毒が起こらない」として野生鳥類の生態を考慮せずに殺鼠剤が用いられてきた。しかし我々の研究により、鳥類種によって殺鼠剤に対する感受性が大きく異なることがわかった（Watanabe et al. 2015、他）。現状では、殺鼠剤の感受性種差について、より多様な生物を用いてその分子メカニズムを明らかにした研究はない。データ基盤が欠落したまま殺鼠剤を使用することにより、海外ではニュージーランドをはじめとして、殺鼠剤により8割の海鳥種が局所的に全滅した。

世界遺産に登録された小笠原諸島では、外来生物の駆除が勧告され、殺鼠剤の散布によってクマネズミの駆除が実施された。完全な撲滅には至っていないものの、クマネズミの棲息数の激減により、着実に生態系の回復が図られていることも報告されている。一方で、殺鼠剤の非対象生物の感受性は不明であり、殺鼠剤散布が非対象野生動物に及ぼす影響は、小笠原諸島において何も分かっていない。

【参考文献】Watanabe KP, Kawata M, Ikenaka Y, Nakayama SMM, Ishii C, Darwish WS, Saengtienchai A, Mizukawa H, Ishizuka M. Cytochrome P450-mediated warfarin metabolic ability is not a critical determinant of warfarin sensitivity in avian species: In vitro assays in several birds and in vivo assays in chicken. *Environ Toxicol Chem.* 34(10):2328-2334 (2015) DOI: 10.1002/etc.3062

2. 研究開発目的

小笠原諸島における自然再生において、外来ネズミ類対策は重要な対策であり、小笠原諸島の各地において抗凝血性殺鼠剤を用いた防除が実施されている。しかし、非標的種の抗凝血性殺鼠剤に対する感受性に関する情報は少なく、特に小笠原諸島において重要な非標的種であるアカガシラカラスバト、オガサワラノスリ、オガサワラオオコウモリ、アオウミガメ等に関する情報は皆無という状況である。本研究では、小笠原諸島に生息する野生動物のうち、特に殺鼠剤感受性評価のニーズが高いアカガシラカラスバト、オガサワラノスリ、オガサワラオオコウモリ、アオウミガメの4種を中心とした野生動物における殺鼠剤感受性の評価を行うことを目的とする。

殺鼠剤の使用自体の可否の決定、および使用を決定した際にも、その使用量・使用方法の策定は、生態系保全と地域社会における公衆衛生や環境政策などとのバランスを加味した上で決定する必要があり、非常に難しい問題となっている。本研究では、殺鼠剤の感受性に関わる酵素学的・遺伝子学的研究アプローチにより、最低必要数の個体数を用いて殺鼠剤感受性の「予測」を行うことで、小笠原諸島における殺鼠剤使用が、野生動物に対して及ぼす影響を予測し、殺鼠剤の使用に関わる政策決定のためのデータを提供する。小笠原諸島の健全な生態系保全や公衆衛生上のリスク低減は、地域環境産業の維持にも資すると考えられ、本研究が活用される点である。

3. 研究目標

全体目標	殺鼠剤のリスクが懸念されている小笠原諸島棲息のアカガシラカラスバト、オガサワラノスリ、オガサワラオオコウモリ、アオウミガメの4種を主な対象として殺鼠剤感受性の評価を行い、殺鼠剤の使用に関わる政策決定のためのデータを提供する。
サブテーマ1	殺鼠剤に対する解毒排泄能の動物種差の解明
サブテーマリーダー/所属機関	中山翔太／北海道大学
目標	新鮮肝の入手可能な生物種のマイクロソーム画分を用いて、第一世代および第二世代殺鼠剤の代謝経路を明らかにし、 K_m および V_{max} などのパラメーターを同定する。In Vivoで猛禽類などに第一世代殺鼠剤（可能であれば低濃度の第二世代殺鼠剤）を投与し、半減期やAUC（血中濃度－時間曲線下面積）の測定を行い、血中動態の種差を明らかにする。
サブテーマ2	殺鼠剤標的分子の感受性の種差の解析
サブテーマリーダー/所属機関	川合佑典／帯広畜産大学
目標	VKOR活性試験およびワルファリンなどの殺鼠剤による阻害試験から、殺鼠剤標的分子の感受性の種差を明らかにする。 サブテーマ1と共同で実施するIn Vivo投与試験より、殺鼠剤による血液凝固系への影響を明らかにする。

4. 研究開発内容

本研究ではサブテーマ1における殺鼠剤に対する解毒排泄能の動物種差の解明および、サブテーマ2における殺鼠剤標的分子の感受性の種差の解析を実施し、殺鼠剤のリスクが懸念されている小笠原諸島棲息のアカガシラカラスバト、オガサワラノスリ、オガサワラオオコウモリ、アオウミガメの4種を主な対象として殺鼠剤感受性の評価を行い、殺鼠剤の使用に関わる政策決定のためのデータを提供した。

サブテーマ1および2の両方の研究を進めるために必要なアカガシラカラスバト、オガサワラノスリ、オガサワラオオコウモリ、アオウミガメ、クマネズミなどの野生動物種における試料採取には、環境省（小笠原自然保護官事務所）、小笠原自然文化研究所、自然環境研究センター、エバーラスティング・ネイチャー、札幌市円山動物園、釧路市猛禽類医学研究所、多摩動物公園、（株）イカリ消毒技術研究所、（株）シー・アイ・シーなどの各協力機関と協同して液体窒素保管された超低温保管試料の採取方法および北海道大学への輸送体制を確立した。

サブテーマ1における目的は、アカガシラカラスバト、オガサワラノスリ、オガサワラオオコウモリ、アオウミガメおよびそれらの近縁種を用いて、殺鼠剤の代謝に関わるプロファイル、血中動態の種差を明らかにすることである。In Vitro代謝試験における、代謝能パラメーターである V_{max}/K_m 値は、ドバト（12.79）、ラット（5.47）、スッポン（1.70）、アオウミガメ（0.27）の順で高いことが明らかになった。ドバトが肝臓でワルファリンを速やかに分解し、その影響を受けにくいのに対し、アオウミガメは肝臓内におけるワルファリン代謝能が低く、ワルファリン感受性が高いことが示唆された。

オガサワラオオコウモリでのIn Vivo投与試験は不可能であるため、実験で使用可能なエジブシヤンルーセットオオコウモリを用いて、ワルファリンの投与試験を実施し、ラットに比較してコウモリでは血中のワルファリンおよびダイファシノンが速やかに減少することが分かった。In Vivo試験により、ワルファリンの代謝・排泄についてはノスリとドバトでニワトリよりも高いことが分かった。解剖・肝臓摘出が可能なドバトとニワトリで肝臓中ワルファリン濃度の比較を行ったところ、ドバトにおいてニワトリよりも有意に肝臓中ワルファリン濃度が低かった。これは血中動態の結果から予測したドバトの代謝能が高いことを強く支持した。多様な鳥類種における殺鼠剤の代謝に関わる血中動態のデータ解析に初めて多変量データ解析手法をはじめて応用し、猛禽類の中でも異なる感受性を持つ可能性をIn Vivoレベルで明らかにした。同様にアオウミガメにおけるワルファリンの血中動態を測定したところ、他の動物種とは全く動態が異なりワルファリンが長期間血中に残存することが明らかになった。これは、In Vitroにおける排泄能が非常に低い上述の結果を強く支持するIn Vivoにおける重要な成果である。本成果からアオウミガメは血中、臓器中にワルファリンが長期間残存するリスクが高い種であることが明らかになった。

サブテーマ2における目的は、殺鼠剤の標的分子における感受性の種差を明らかにすることである。殺鼠剤の対象種であるクマネズミのVKOR活性の阻害率は99.2%であるのに対して、アカガシラカラスバトのVKOR活性は60%程度の阻害率であり、ラットに比べてアカガシラカラスバトの感受性は低いことが予想された。これらの結果は、ドバトを用いたサブテーマ1におけるIn Vivo試験の結果を支持するものであった。ノスリにおけるVKOR阻害率について、IC50はおよそ0.30 μM であり、ラットの0.26 μM と同程度であった。ノスリの低IC50、低VKOR活性は殺鼠剤に対する高感受性の可能性を示唆するものである。ノスリは殺鼠剤による死亡したネズミ個体の捕食する可能性が非常に高い点と、ラットと同程度の殺鼠剤標的分子VKORの阻害のされやすさを考慮し、殺鼠剤曝露量・リスクを低減することは重要と考えられる。ラットは投与後72時間経過後も凝固時間の延長が認められ、測定機器の上限値(8.0)以上を示したのに対して、コウモリでは約30時間後から凝固時間の回復が観察された。一方で、肝臓ミクロソームを用いた阻害試験においてはVKOR阻害率のIC50がおよそ0.39 μM であり、ラットと同程度であった。以上より、コウモリはラットより低い、あるいは同程度の感受性であると予想された。ワルファリンによるVKOR活性は、アオウミガメでは殺鼠剤の対象動物であるラットと同程度に阻害されやすいことが明らかになった。さらに、アオウミガメのIn Vivo投与試験における血液凝固時間の解析により、ワルファリン投与後も長期間において血液凝固時間が延長することが明らかになった。以上のサブテーマ2における成果を、上述したサブテーマ1における殺鼠剤代謝能の結果も合わせて考察すると、環境中に曝露された殺鼠剤を摂取した場合のリスクは、アオウミガメなどのカメ類でラットやドバトより高い可能性が考えられた。本研究の成果により、小笠原諸島でダイファシノンを散布する際には、海洋への流出防止、あるいは流出したスローパックの回収を行うことが重要であると考えられた。これらの対策は環境省により実施されているが、今後も同様に実施していくことが望まれる。

5. 研究成果

5-1. 成果の概要

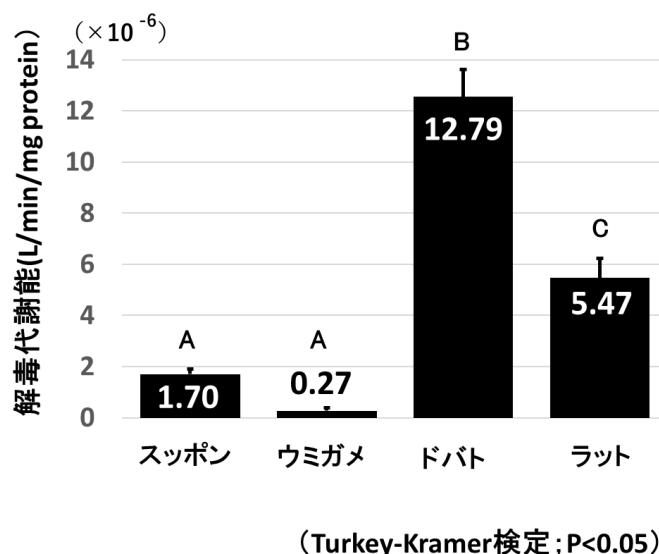
サブテーマ(1)-1: 試料採集(サブテーマ(2)と試料は共有)

環境省(小笠原自然保護官事務所)、小笠原自然文化研究所、自然環境研究センター、エバーラスティング・ネイチャー、札幌市円山動物園、釧路市猛禽類医学研究所、多摩動物公園、(株)イカリ消毒技術研究所、(株)シー・アイ・シーなどの各協力機関と協同して、アカガシラカラスバト、オガサワラノスリ、オガサワラオオコウモリ、アオウミガメ、クマネズミなどの野生動物の肝臓試料に関して、液体窒素保管された超低温保管試料の採取方法および北海道大学への輸送体制を確立した。これまで、アカガシラカラスバト(N=20)、オガサワラノスリ(N=2)、オガサワラオオコウモリ(N=2)、

アオウミガメ (N=11) 、クマネズミ (N=36) について試料を採集した。

(1) -2: 殺鼠剤代謝能の解析

図(1)-1は、ワルファリンを基質としたIn Vitro代謝試験における、代謝能パラメーターであるV_{max}/km値の種間比較を示している。V_{max}/km値(平均)は、ドバト(12.79)、ラット(5.47)、スッポン(1.70)、アオウミガメ(0.27)の順で高いことが明らかになった。ドバトが肝臓でワルファリンを速やかに分解し、その影響を受けにくいのに対し、アオウミガメは肝臓内におけるワルファリン代謝能が低く、ワルファリン感受性が高いことが示唆された。また、本試験におけるドバトの結果は、アカガシラカラスバトにおける代謝能も同様に高いことを示唆するものであった。



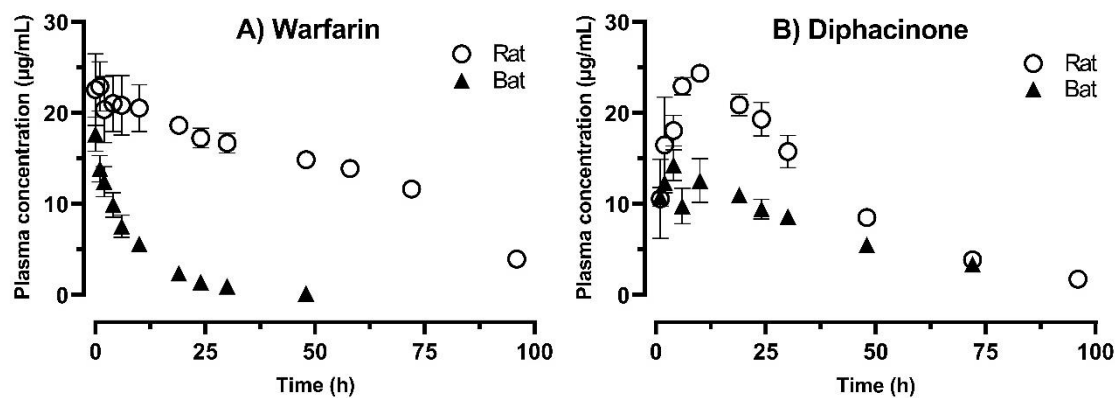
図(1)-1: ワルファリン代謝能の種間比較

(1) -3: In Vivo投与試験による殺鼠剤の動態解析 (サブテーマ (2) と共同で実施)

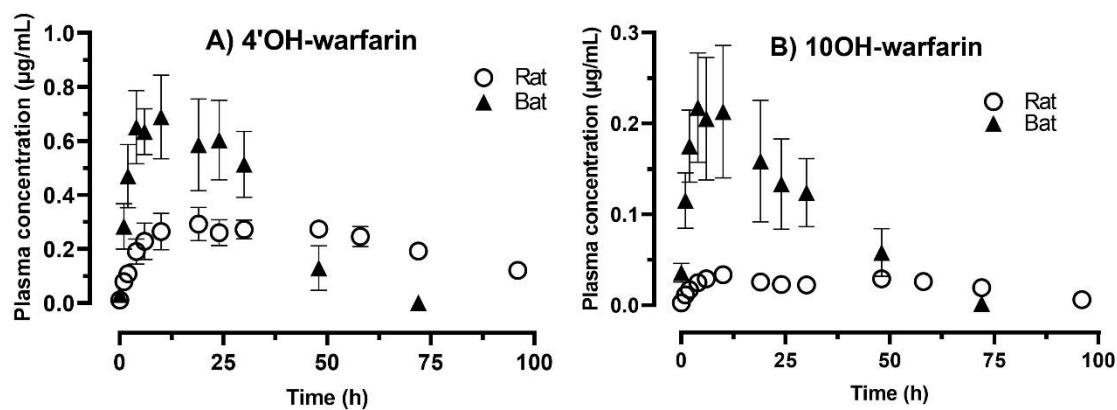
オガサワラオオコウモリでのIn Vivo投与試験は不可能であるため、実験で使用可能なエジブシヤンルーセットオオコウモリを用いて、ワルファリンの投与試験を実施した。図(1)-2は、血液中ワルファリンおよびダイファシノン濃度の時間推移をラットと比較したものである。ラットに比較してコウモリでは血中のワルファリンおよびダイファシノンが速やかに減少することが分かった。代謝物の解析が可能なワルファリンについては、4'-および6位水酸化体の動態も解析した(図(1)-3)。水酸化体の生成量についてもラットに比べてコウモリの方が多く、コウモリの排泄能が高いことが示唆された。

In Vivo試験により、ワルファリンの代謝・排泄についてはノスリとドバトでニワトリよりも高いことが分かった(図(1)-4)。

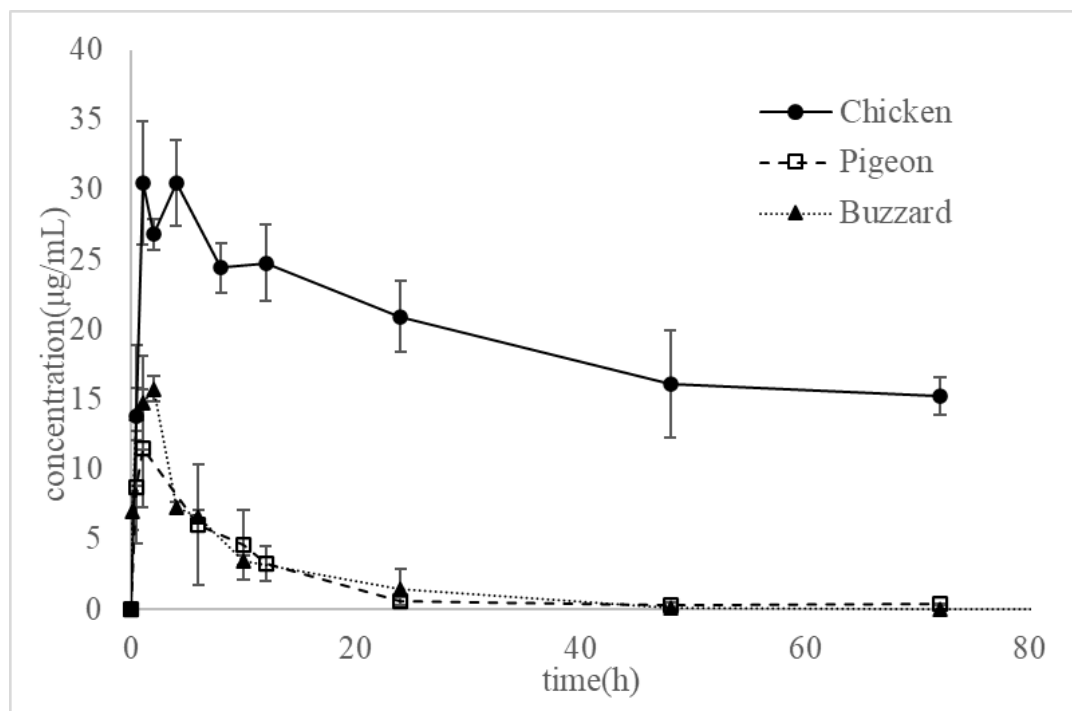
同様にアオウミガメにおけるワルファリンの血中動態を測定したところ、他の動物種とは全く動態が異なりワルファリンが長期間血中に残存することが明らかになった(図(1)-7)。これは、In Vitroにおける排泄能が非常に低い上述の結果を強く支持するIn Vivoにおける重要な成果である。本成果からアオウミガメは血中、臓器中にワルファリンが長期間残存するリスクが高い種であることが明らかになった。



図(1)-2：エジプシャンルーセットオコウモリ (▲) およびラット (○) における血中ワルファリン (A) およびダイファシノン (B) 濃度の経時変化



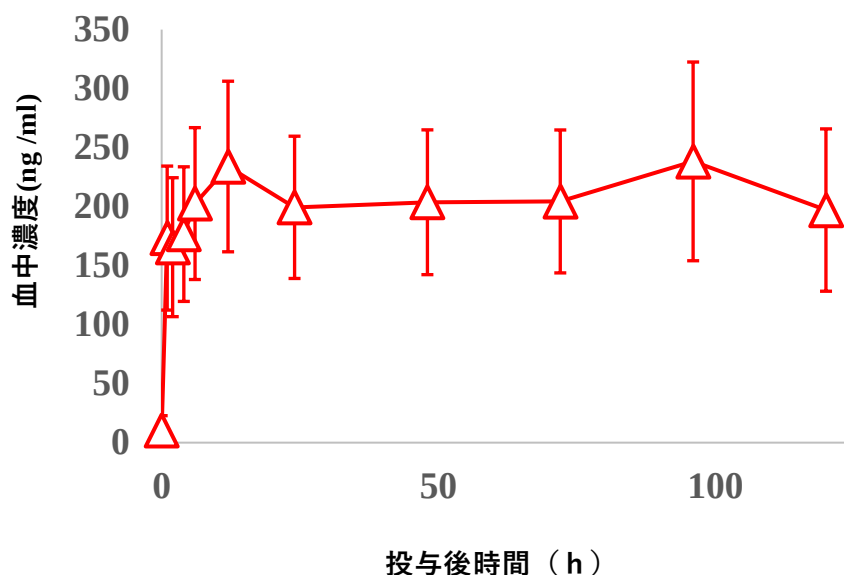
図(1)-3：エジプシャンルーセットオコウモリ (▲) およびラット (○) における血中の水酸化体ワルファリン濃度の経時変化



図(1)-4：ノスリ、ドバト、およびニワトリにおける血中ワルファリン濃度の経時変化

Species	n	Half-life (h)	本事業での実施場所
Chicken	5	97.9±24.0	北海道大学
Pigeon	5	19.9±6.6	北海道大学
Buzzard	2	8.6±0.3	猛禽類医学研究所
Himalayan Buzzard	1	18	カセサート大学
Eastern Barn Owl	1	11.1	カセサート大学
Collared Scops owl	5	17.6±10.8	カセサート大学
Crested Serpent Eagle	2	30.4±8.6	カセサート大学
Changeable hawk eagle	2	25.3±7.0	カセサート大学
Black Kite	2	21.4±3.4	カセサート大学
Brahminy Kite	4	17.5±4.6	カセサート大学
Black-winged Kite	2	16.7±1.0	カセサート大学

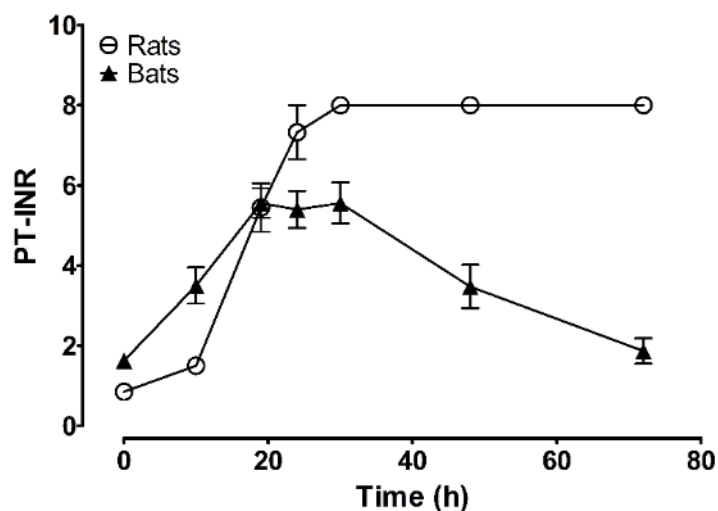
表(1)-1：ニワトリ、ハト、ノスリおよび他猛禽類種における血中ワルファリン濃度の半減期の比較



図(1)-7：アオウミガメにおける血中ワルファリン濃度の経時変化

ワルファリンを添加して活性試験を実施したところ、クマネズミではVKOR活性はほぼ検出できず、阻害率は99.2%であるのに対して、アカガシラカラスバトのVKOR活性は60%程度の阻害率であり、ラットに比べてアカガシラカラスバトの感受性は低いことが予想された（表(2)-1）。これらの結果は、ドバトを用いたサブテーマ1におけるIn Vivo試験の結果を支持するものである。ノスリにおけるVKOR阻害率について、IC50はおよそ0.30 μM であり、ラットの0.26 μM と同程度であった（図(2)-3）。ノスリ類のVKOR活性（V0）はドブネズミやカワラバト・アカガシラカラスバトと比較して低い（0.49～0.74 pmol/min/mg protein）点にも留意する必要があるが、低IC50、低VKOR活性は殺鼠剤に対する高感受性の可能性を示唆するものである。一方で、生理的なビタミンKサイクルでVKORに対する依存性が低い可能性もあることに留意が必要である。また、本研究で用いた殺鼠剤のDoseにおいては、ノスリ、およびニワトリにおける血液凝固時間の延長は両種において認められなかった（図(2)-4）もののノスリは殺鼠剤による死亡したネズミ個体の捕食する可能性が非常に高い点と、ラットと同程度の殺鼠剤標的分子VKORの阻害のされやすさを考慮し、殺鼠剤曝露量・リスクを低減することは重要と考えられる。

図(2)-5は、血液凝固時間の時間推移をエジプシャンルーセットオオコウモリとラットを比較した結果である。ラットは投与後72時間経過後も凝固時間の延長が認められ、測定機器の上限値（8.0）以上を示したのに対して、コウモリでは約30時間後から凝固時間の回復が観察された。一方で、肝臓ミクロソームを用いた阻害試験においてはVKOR阻害率のIC50がおよそ0.39 μM であり、ラットと同程度であった。以上より、コウモリはラットより低い、あるいは同程度の感受性であると予想された。さらに、アオウミガメおよびニホンスッポン、ミシシippアカミミガメ、ラットにおけるVKOR活性の阻害率を解析した（表(2)-2）。ワルファリンによるVKOR活性の阻害について、ワルファリンによるVKOR活性は、アオウミガメでは殺鼠剤の対象動物であるラットと同程度に阻害されやすいことが明らかになった。アオウミガメのIn Vivo投与試験における血液凝固時間の解析により、ワルファリン投与後も長期間において血液凝固時間が延長することが明らかになった（図(2)-6）。以上のサブテーマ2における成果を、上述したサブテーマ1における殺鼠剤代謝能の結果も合わせて考察すると、環境中に曝露された殺鼠剤を摂取した場合のリスクは、アオウミガメなどのカメ類でラットやドバトより高い可能性が考えられた。本研究の成果により、小笠原諸島でダイファシノンを散布する際には、海洋への流出防止、あるいは流出したスローパックの回収を行うことが重要であると考えられた。これらの対策は環境省により実施されているが、今後も同様に実施していくことが望まれる。



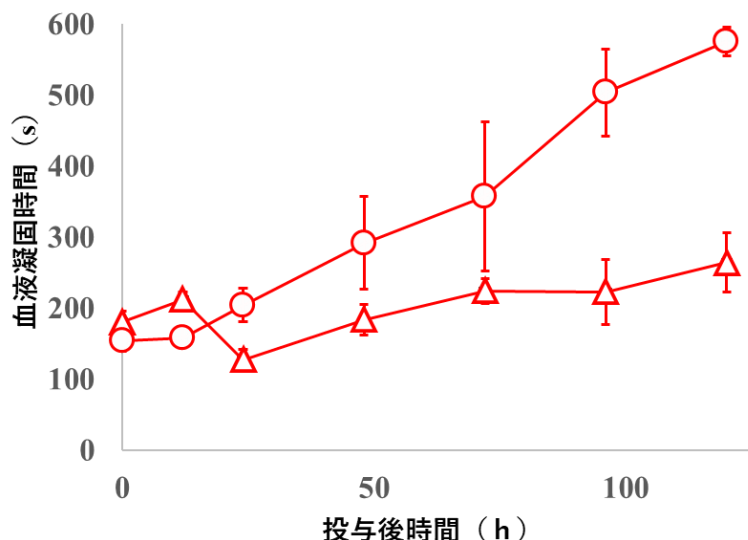
図(2)-5：エジプシャンルーセットオオコウモリ（▲）およびラット（○）における血液凝固時間の経時変化。縦軸のPT-INR (prothrombin time-international normalized ratio)：プロトロンビン時間国際標準比

	SD ラット（ド ブネズミ）	カワラバト	アカガシ ラカラス バト	アメリカ チョウゲ ンボウ	ワルファ リン(殺 鼠剤)抵 抗性クマ ネズミ
ワルファリン非存在下の活 性 pmol/min/nmol mg protein	5.9±0.5	15.4±4.2	11.4± 11.6		
IC ₅₀ :50%活性濃度 (μM)	0.26±0.19	3.2±1.8	22.7±4.5	177	5.3

表(2)-1：ラットおよび鳥類間におけるワルファリンによるVKOR活性の阻害の比較

	IC50 (μM)
SDラット	0.26±0.19
アオウミガメ	0.15±0.05
ニホンスッポン	0.063±0.06
ミシシippアカミミガメ	0.055±0.01

表(2)-2：ラットおよびカメ類におけるワルファリンによるVKOR活性の阻害の比較



図(2)-6：アオウミガメのワルファリン投与後（静注：○、経口：△）の血液凝固時間の経時変化

5－2．環境政策等への貢献

<行政等が既に活用した成果>

特に記載すべき事項はない。

<行政等が活用することが見込まれる成果>

本成果は、アカガシラカラスバトの殺鼠剤感受性が低い、オガサワラオオコウモリはラットより低い同程度の感受性、およびアオウミガメにおける感受性が高い可能性をはじめて示したものである。オガサワラノスリに関しては感受性が高い種とは判定できないものの、死亡したネズミ類を直接捕食するため曝露リスクは非常に高いことから、殺鼠剤曝露量・リスクを低減することは重要と考えられる。アオウミガメへの対策については、小笠原諸島でダイファシノン散布する際には、海洋への流出防止、あるいは流出したスローパックの回収を行うことがより重要であると考えられた。これらの対策は環境省により実施されているが、今後も同様に海洋への流出防止策を実施していくことが望まれる。さらに本研究で開発した技術は、本研究の対象種に加えて、他の生物種への技術応用も可能である。小笠原諸島に加えて、北海道のユルリ・モユルリ島のネズミ駆除、奄美大島におけるマングース（フイリマングース）駆除に殺鼠剤使用が政策決定している。ネズミやマングースなどの食害被害は甚大であり、希少種・固有種の保全のためには現状で最も効果的な防除が期待できる殺鼠剤の使用は必要である。

一方で、殺鼠剤の感受性には動物種差があることが明らかになったことから、標的動物である野生ラットと生息域が同じ希少種・固有種・絶滅危惧種に対する殺鼠剤散布の影響の事前予測が必要とされており、今後もそのような地域が増えることが予想される。このような事前予測を行うことで、政策決定者に対し殺鼠剤の環境リスクに関するより正確で幅広い知見を提供するとともに、特に殺鼠剤の感受性が高い動物種への曝露リスクを低減するなどの予防対策も講じることができ、リスクを低減した方法での殺鼠剤使用が可能になる。

上述の感受性予測のために、地域固有種や絶滅危惧種の新鮮な肝臓試料を有効活用することが重要な喫緊課題となっている。今後は事故などで死亡したこれらの個体における新鮮肝臓を採取し、液体窒素の急速冷凍およびマイナス80℃での超低温保存する「新鮮肝臓保存バンク」の体制構築が望まれる。

5－3．研究目標の達成状況

殺鼠剤のリスクが懸念されている小笠原諸島棲息のアカガシラカラスバト、オガサワラノスリ、オガサワラオオコウモリ、アオウミガメの4種を主な対象として殺鼠剤感受性の評価を行うことができ研究目標を達成できた。本成果は、アカガシラカラスバトの殺鼠剤感受性が低い、オガサワラオオコウモリはラットより低いか同程度の感受性、およびアオウミガメにおける感受性が高い可能性をはじめて示したものである。オガサワラノスリに関しては感受性が高い種とは判定できないものの、死亡したネズミ類を直接捕食するため曝露リスクは非常に高いことから、殺鼠剤曝露量・リスクを低減することは重要と考えられる。小笠原諸島でダイファシノン散布する際には、海洋への流出防止、あるいは流出したスローバックの回収を行うことがより重要であることを明らかにし、殺鼠剤の使用時に留意すべき点に関わる政策決定のためのデータを提供することができた。一部の動物種（近縁種）については、当初に予定していなかったIn Vivo投与試験を実施できたことから、当初の目標以上の成果を達成することができた。

6．研究成果の発表状況

6－1．査読付き論文

<件数>

4件

<主な査読付き論文>

- 1) Nakayama SMM, Morita A, Ikenaka Y, Kawai YK, Watanabe KP, Ishii C, Mizukawa H, Yohannes YB, Saito K, Watanabe Y, Ito M, Ohsawa N, Ishizuka M. Avian interspecific differences in VKOR activity and inhibition: insights from amino acid sequence and mRNA expression ratio of VKORC1 and VKORC1L1. *Comparative Biochemistry and Physiology* 228: 108635 (2020) DOI: 10.1016/j.cbpc.2019.108635 (IF:3.228)
- 2) Nakayama SMM, Morita A, Ikenaka Y, Mizukawa H, Ishizuka M. A review: Poisoning by anticoagulant rodenticides in non-target animals globally. *J. Vet. Med. Sci.* 2019. 81(2): 298-313. DOI: 10.1292/jvms.17-0717 (IF:1.267)
- 3) Kazuki Takeda, Ayuko Morita, Yoshinori Ikenaka, Shouta M.M.Nakayama, Mayumi Ishizuka. Comparison of two reducing agents dithiothreitol and tris(3-hydroxypropyl)phosphine for in vitro kinetic assay of vitamin K epoxide reductase. *Veterinary and Animal Science.* 9: 100095 (2020) DOI: 10.1016/j.vas.2020.100095 (IF:1.821)
- 4) Yoshiya Yamamura, Kazuki Takeda, Yusuke K. Kawai, Yoshinori Ikenaka, Chiyo Kitayama, Satomi Kondo, Chiho Kezuka, Mari Taniguchi, Mayumi Ishizuka, Shouta M.M. Nakayama (Corresponding). Sensitivity of turtles to anticoagulant rodenticides: risk assessment for green sea turtles (*Chelonia mydas*) in the Ogasawara Islands and comparison of warfarin sensitivity among turtle species. *Aquatic Toxicology.* 233: 105792 (2021) DOI: 10.1016/j.aquatox.2021.105792 (IF:4.964)

6－2．知的財産権

特に記載すべき事項はない。

6－3．その他発表件数

査読付き論文に準ずる成果発表	0 件
その他誌上発表（査読なし）	0 件
口頭発表（学会等）	1 2 件
「国民との科学・技術対話」の実施	7 件
マスコミ等への公表・報道等	0 件
本研究に関連する受賞	6 件

7．国際共同研究等の状況

- 1) タイにおける殺鼠剤感受性評価における共同研究、カウンターパート：Saengtienchai Aksorn准教授（カセサート大学、タイ）、Amnart Poapolathep教授（カセサート大学、タイ）、Kraisiri Khidkhan助教（カセサート大学、タイ）、Chaiyan Kasorndorkbua教授（カセサート大学、タイ）、Ratiwan Sitdhibutr獣医師（カセサート大学、タイ）、タイにおける多様な野生動物種における殺鼠剤感受性評価を行う国際共同研究である。本事業成果報告書においても記載しているノスリをはじめとする猛禽類における殺鼠剤感受性評価に関わる殺鼠剤の投与試験については、上記のタイ・カセサート大学との共同研究による成果である。中山翔太（研究代表者）が参画。
- 2) アフリカにおける新興・再興の環境汚染のフィールドベースの毒性メカニズム解析、文部科学省：科研費 国際共同研究加速基金（国際共同研究強化（B））、カウンターパート：John Yabe講師（ザンビア大学、ザンビア）、Victor Wepener教授（ノースウェスト大学、南アフリカ）、Osei Akoto教授（クワメ・エンクルマ科学技術大学、ガーナ）、アフリカ三カ国との国際共同研究、アフリカ（ザンビア、南アフリカ、ガーナ）において環境化学物質の高濃度ばく露群のヒトおよび動物の試料を同地域から採集し、実際のフィールドにおける毒性とメカニズムを解明し、初めてフィールドベースでその毒性影響の全体像を体系的に明らかにする。中山翔太（研究代表者）、池中良徳（研究分担者）が参画。
- 3) ザンビアにおける鉛汚染のメカニズムの解明と健康・経済リスク評価手法および予防・修復技術の開発、JST/JICA：地球規模課題対応国際科学技術協力プログラム環境・エネルギー研究分野 「地球規模の環境課題の解決に資する研究」、カウンターパート：Luke Evuta Mumba教授・ザンビア大学副総長（ザンビア大学、ザンビア）、ザンビア大学との国際共同研究、地球規模で進行している環境汚染に対して、世界で初めて健康影響および経済インパクトを定量的に明らかにし、汚染低減対策手法を開発・実施する国際共同研究プロジェクトである。中山翔太（研究代表者）が参画。
- 4) 低濃度・長期慢性暴露における鉛の毒性発現に腸内細菌叢が関係するか？、文部科学省：科研費 国際共同研究加速基金（国際共同研究強化）、カウンターパート：John Yabe講師（ザンビア大学、ザンビア）、ザンビア大学との国際共同研究、アフリカをはじめとする世界中で問題となっている環境汚染物質に対して、世界ではじめて低濃度の長期慢性暴露と腸内細菌叢攪乱との関係を明らかにする。中山翔太（研究代表者）が参画。

8. 研究者略歴

研究代表者：中山 翔太

北海道大学獣医学部卒業、獣医学博士、現在、北海道大学大学院獣医学研究院 准教授

研究分担者：

1) 池中 良徳

信州大学理学部卒業、理学博士、現在、北海道大学大学院獣医学研究院 教授

2) 川合 佑典

北海道大学獣医学部卒業、獣医学博士、現在、帯広畜産大学獣医学研究部門 助教

Ⅱ．成果の詳細

Ⅱ－１ 殺鼠剤に対する解毒排泄能の動物種差の解明

北海道大学

大学院獣医学研究院 毒性学教室 准教授
大学院獣医学研究院 動物医療センター 教授

中山 翔太
池中 良徳

〔要旨〕

サブテーマ１における目的は、アカガシラカラスバト、オガサワラノスリ、オガサワラオオコウモリ、アオウミガメおよび近縁種を用いて、殺鼠剤の代謝に関わるプロファイル、血中動態の種差を明らかにすることである。具体的な目標は、新鮮肝の入手可能な生物種のミクロソーム画分を用いて、第一世代および第二世代殺鼠剤の代謝経路を明らかにし、 K_m および V_{max} などのパラメーターを同定すること、およびIn Vivoで猛禽類などに第一世代殺鼠剤（可能であれば低濃度の第二世代殺鼠剤）を投与し、半減期やAUC（血中濃度－時間曲線下面積）の測定を行い、血中動態の種差を明らかにすることである。

ワルファリンを基質としたIn Vitro代謝試験における、代謝能パラメーターである V_{max}/K_m 値の種間比較を示している。 V_{max}/K_m 値（平均）は、ドバト（12.79）、ラット（5.47）、スッポン（1.70）、アオウミガメ（0.27）の順で高いことが明らかになった。ドバトが肝臓でワルファリンを速やかに分解し、その影響を受けにくいのに対し、アオウミガメは肝臓内におけるワルファリン代謝能が低く、ワルファリン感受性が高いことが示唆された。また、本試験におけるドバトの結果は、アカガシラカラスバトにおける代謝能も同様に高いことを示唆するものであった。オガサワラオオコウモリでのIn Vivo投与試験は不可能であるため、実験で使用可能なエジプシャンルーセットオオコウモリを用いて、ワルファリンの投与試験を実施し、ラットに比較してコウモリでは血中のワルファリンおよびダイファシノンが速やかに減少することが分かった。水酸化体の生成量についてもラットに比べてコウモリの方が多く、コウモリの排泄能が高いことが示唆された。In Vivo試験により、ワルファリンの代謝・排泄についてはノスリとドバトでニワトリよりも高いことが分かった。解剖・肝臓摘出が可能なドバトとニワトリで肝臓中ワルファリン濃度の比較を行ったところ、ドバトにおいてニワトリよりも有意に肝臓中ワルファリン濃度が低かった。これは血中動態の結果から予測したドバトの代謝能が高いことを強く支持した。多様な鳥類種における殺鼠剤の代謝に関わる血中動態のデータ解析に初めて多変量データ解析手法をはじめて応用し、猛禽類の中でも異なる感受性を持つ可能性をIn Vivoレベルで明らかにした。同様にアオウミガメにおけるワルファリンの血中動態を測定したところ、他の動物種とは全く動態が異なりワルファリンが長期間血中に残存することが明らかになった。これは、In Vitroにおける排泄能が非常に低い上述の結果を強く支持するIn Vivoにおける重要な成果である。本成果からアオウミガメは血中、臓器中にワルファリンが長期間残存するリスクが高い種であることが明らかになった。

１．研究開発目的

サブテーマ１における目的は、アカガシラカラスバト、オガサワラノスリ、オガサワラオオコウモリ、アオウミガメおよび近縁種を用いて、殺鼠剤の代謝に関わるプロファイル、血中動態の種差を明らかにすることである。

２．研究目標

新鮮肝の入手可能な生物種のミクロソーム画分を用いて、第一世代および第二世代殺鼠剤の代謝経路を明らかにし、 K_m および V_{max} などのパラメーターを同定する。

In Vivoで猛禽類などに第一世代殺鼠剤（可能であれば低濃度の第二世代殺鼠剤）を投与し、半減期や

AUC（血中濃度－時間曲線下面積）の測定を行い、血中動態の種差を明らかにする。

3. 研究開発内容

環境省（小笠原自然保護官事務所）、小笠原自然文化研究所、自然環境研究センター、エバーラスティング・ネイチャー、札幌市円山動物園、釧路市猛禽類医学研究所、多摩動物公園、（株）イカリ消毒技術研究所、（株）シー・アイ・シーなどの各協力機関と協同して、アカガシラカラスバト、オガサワラノスリ、オガサワラオオコウモリ、アオウミガメ、クマネズミなどの野生動物の肝臓試料に関して、液体窒素保管された超低温保管試料の採取方法および北海道大学への輸送体制を確立できた。

上述の試料を用いて、肝臓ミクロソーム画分を用いた殺鼠剤の代謝試験を実施し、その代謝能の動物種差を明らかにした。さらに、In Vivo投与試験による殺鼠剤の動態解析を実施した。血中の半減期やAUCを解析し、その動物種差を明らかにした。

以上のように、研究開発目標としていた、殺鼠剤の代謝プロファイルを同定することができた。In Vivoにおける猛禽類などに第一世代殺鼠剤を投与し、半減期やAUC（血中濃度－時間曲線下面積）の測定を行い、血中動態の種差を明らかにすることができた。さらに、In Vivo試験についてはドバト、コウモリおよびウミガメにおいても実施したことから、研究目標以上の成果を達成することができた。

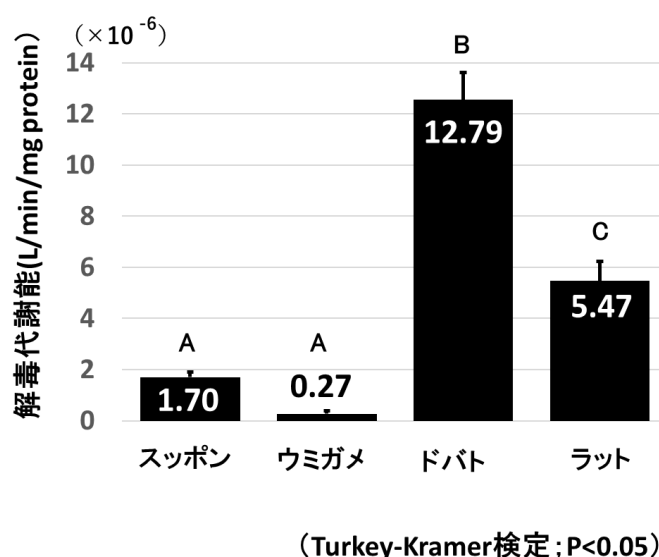
4. 結果及び考察

（1）-1：試料採集（サブテーマ（2）と試料は共有）

環境省（小笠原自然保護官事務所）、小笠原自然文化研究所、自然環境研究センター、エバーラスティング・ネイチャー、札幌市円山動物園、釧路市猛禽類医学研究所、多摩動物公園、（株）イカリ消毒技術研究所、（株）シー・アイ・シーなどの各協力機関と協同して、アカガシラカラスバト、オガサワラノスリ、オガサワラオオコウモリ、アオウミガメ、クマネズミなどの野生動物の肝臓試料に関して、液体窒素保管された超低温保管試料の採取方法および北海道大学への輸送体制を確立した。これまで、アカガシラカラスバト（N=20）、オガサワラノスリ（N=2）、オガサワラオオコウモリ（N=2）、アオウミガメ（N=11）、クマネズミ（N=36）について試料を採集した。

（1）-2：殺鼠剤代謝能の解析

図(1)-1は、ワルファリンを基質としたIn Vitro代謝試験における、代謝能パラメーターである V_{max}/K_m 値の種間比較を示している。 V_{max}/K_m 値（平均）は、ドバト（12.79）、ラット（5.47）、スッポン（1.70）、アオウミガメ（0.27）の順で高いことが明らかになった。ドバトが肝臓でワルファリンを速やかに分解し、その影響を受けにくいのに対し、アオウミガメは肝臓内におけるワルファリン代謝能が低く、ワルファリン感受性が高いことが示唆された。また、本試験におけるドバトの結果は、アカガシラカラスバトにおける代謝能も同様に高いことを示唆するものであった。



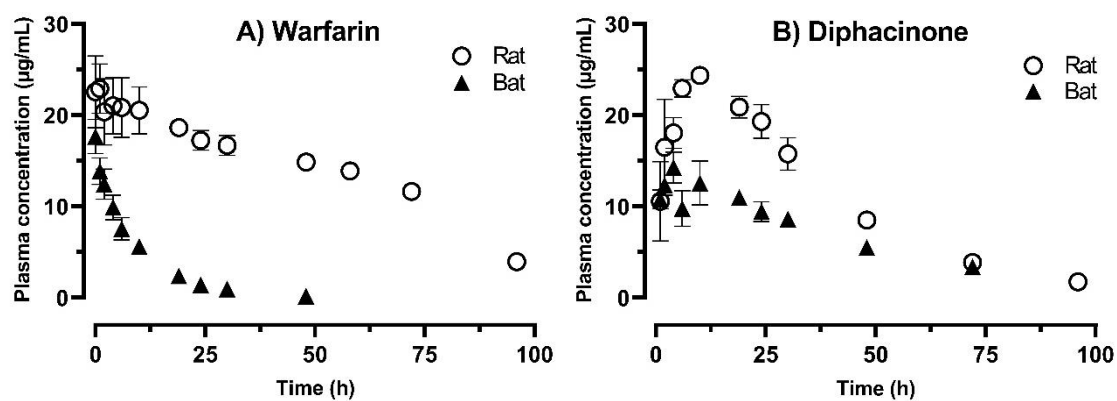
図(1)-1：ワルファリン代謝能の種間比較

(1) -3：In Vivo投与試験による殺鼠剤の動態解析（サブテーマ（2）と共同で実施）

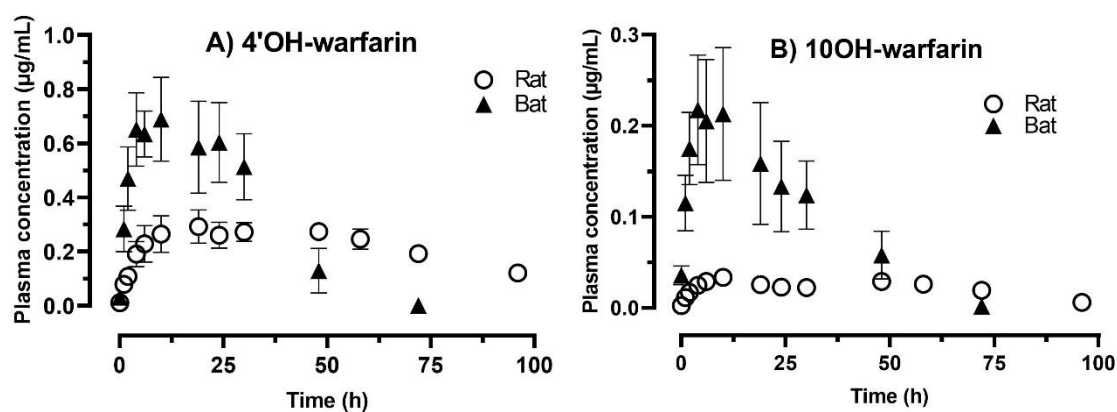
オガサワラオオコウモリでのIn Vivo投与試験は不可能であるため、実験で使用可能なエジブシヤンルーセットオオコウモリを用いて、ワルファリンの投与試験を実施した。図(1)-2は、血液中ワルファリンおよびダイファシノン濃度の時間推移をラットと比較したものである。ラットに比較してコウモリでは血中のワルファリンおよびダイファシノンが速やかに減少することが分かった。代謝物の解析が可能なワルファリンについては、4'-および6位水酸化体の動態も解析した（図(1)-3）。水酸化体の生成量についてもラットに比べてコウモリの方が多く、コウモリの排泄能が高いことが示唆された。

In Vivo試験により、ワルファリンの代謝・排泄についてはノスリとドバトでニワトリよりも高いことが分かった（図(1)-4）。解剖・肝臓摘出が可能なドバトとニワトリで肝臓中ワルファリン濃度の比較を行ったところ、ドバトにおいてニワトリよりも有意に肝臓中ワルファリン濃度が低かった（図(1)-5）。これは血中動態の結果から予測したドバトの代謝能が高いことを強く支持した。同様にノスリに加えて様々な猛禽類種を加えて動物種差を検討したところ、表(1)-1に示す半減期となった。これらの動態パラメータ値をもとに多変量解析のPrincipal Component Analysis(PCA)を行い①ドバト & ノスリ、②フクロウ、③タカ、④トビ、⑤ニワトリの5つのクラスターに大別された（図(1)-6）。多様な鳥類種における殺鼠剤の代謝に関わる血中動態のデータ解析に初めて多変量データ解析手法をはじめて応用し、猛禽類の中でも異なる感受性を持つ可能性をIn Vivoレベルで明らかにした。本研究成果により、近縁種を用いた感受性評価が極めて重要であると考えられる。

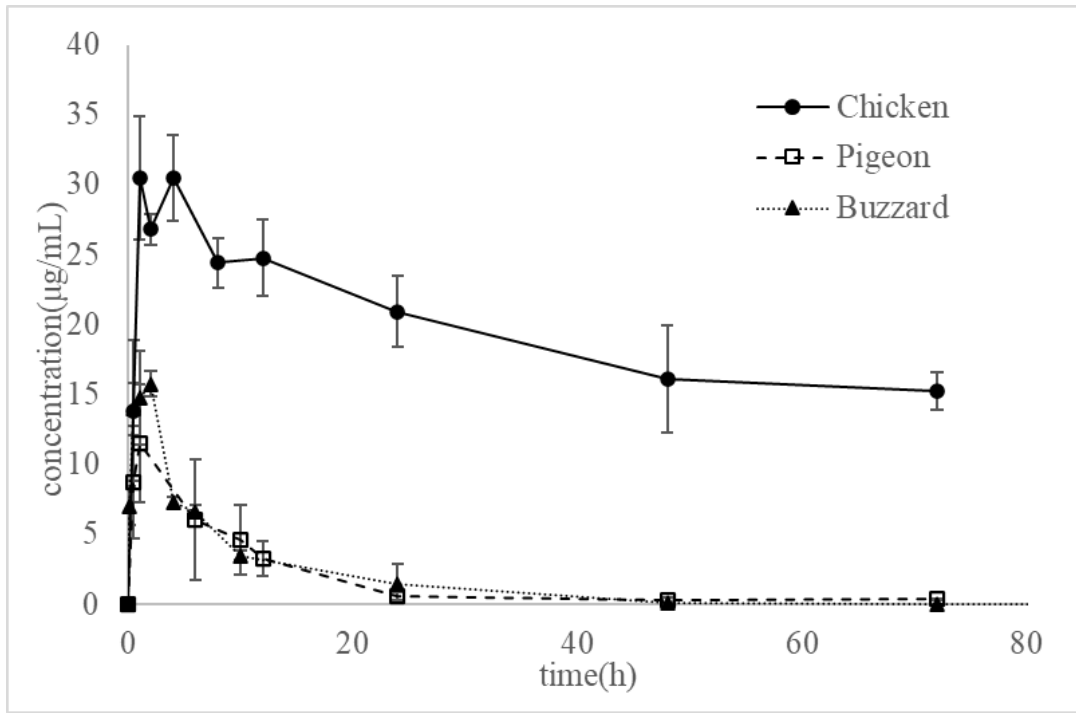
同様にアオウミガメにおけるワルファリンの血中動態を測定したところ、他の動物種とは全く動態が異なりワルファリンが長期間血中に残存することが明らかになった（図(1)-7）。これは、In Vitroにおける排泄能が非常に低い上述の結果を強く支持するIn Vivoにおける重要な成果である。本成果からアオウミガメは血中、臓器中にワルファリンが長期間残存するリスクが高い種であることが明らかになった。



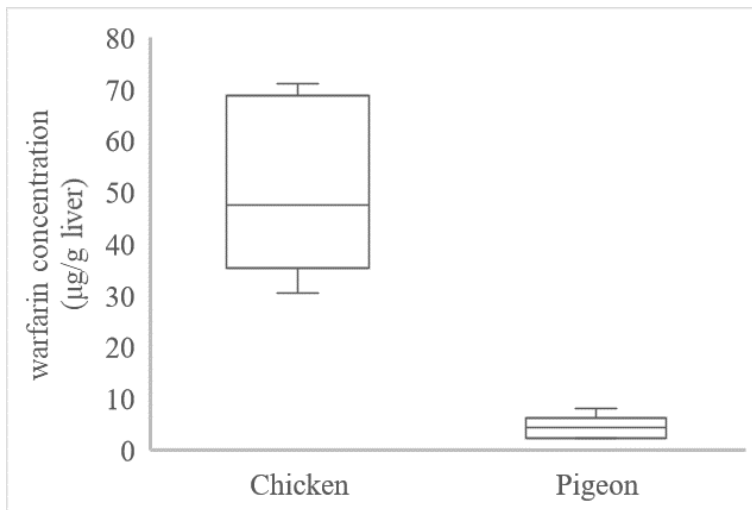
図(1)-2：エジブシャンルーセットオオコウモリ（▲）およびラット（○）における血中ワルファリン（A）およびダイファシノン（B）濃度の経時変化



図(1)-3：エジブシャンルーセットオオコウモリ（▲）およびラット（○）における血中の水酸化体ワルファリン濃度の経時変化



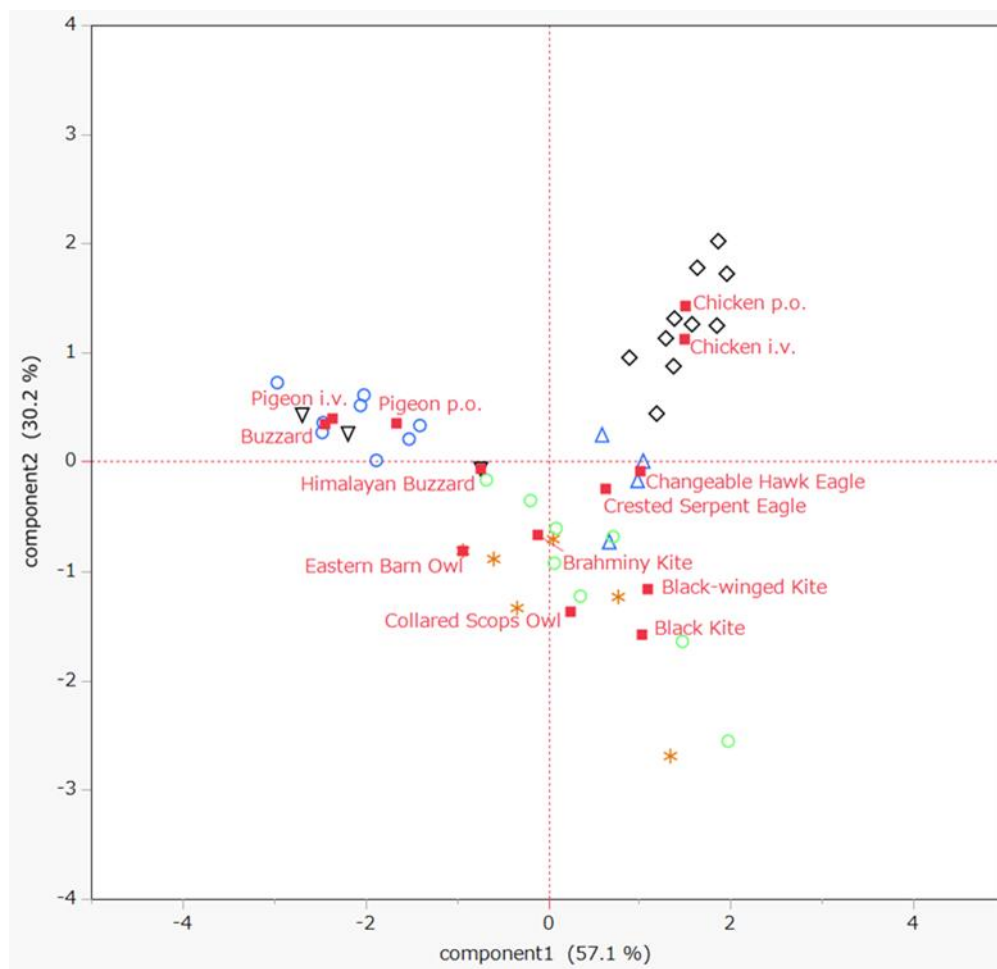
図(1)-4：ノスリ、ドバト、およびニワトリにおける血中ワルファリン濃度の経時変化



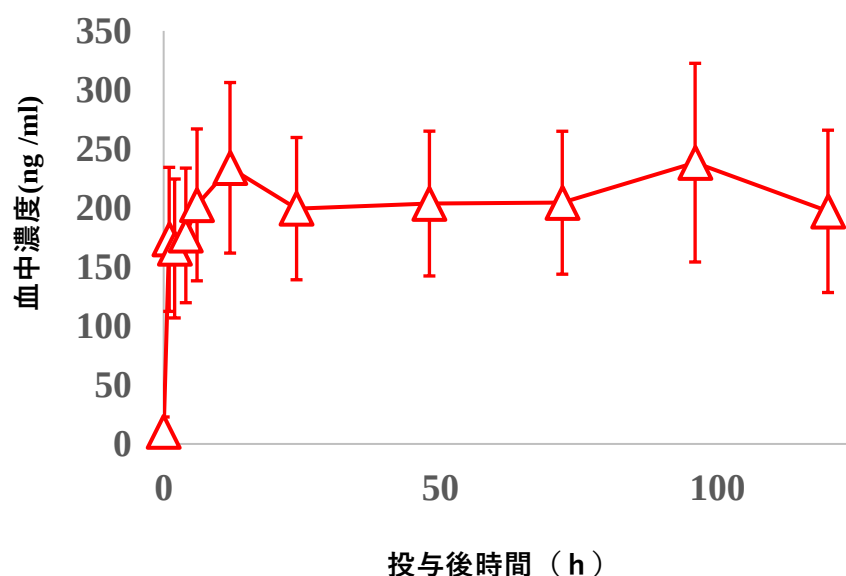
図(1)-5：ドバトおよびニワトリにおける肝臓中ワルファリン残留濃度の比較

Species	n	Half-life (h)	本事業での実施場所
Chicken	5	97.9±24.0	北海道大学
Pigeon	5	19.9±6.6	北海道大学
Buzzard	2	8.6±0.3	猛禽類医学研究所
Himalayan Buzzard	1	18	カセサート大学
Eastern Barn Owl	1	11.1	カセサート大学
Collared Scops owl	5	17.6±10.8	カセサート大学
Crested Serpent Eagle	2	30.4±8.6	カセサート大学
Changeable hawk eagle	2	25.3±7.0	カセサート大学
Black Kite	2	21.4±3.4	カセサート大学
Brahminy Kite	4	17.5±4.6	カセサート大学
Black-winged Kite	2	16.7±1.0	カセサート大学

表(1)-1：ニワトリ、ハト、ノスリおよび他猛禽類種における血中ワルファリン濃度の半減期の比較



図(1)-6：血中動態パラメータ値を基にしたPrincipal Component Analysis(PCA)



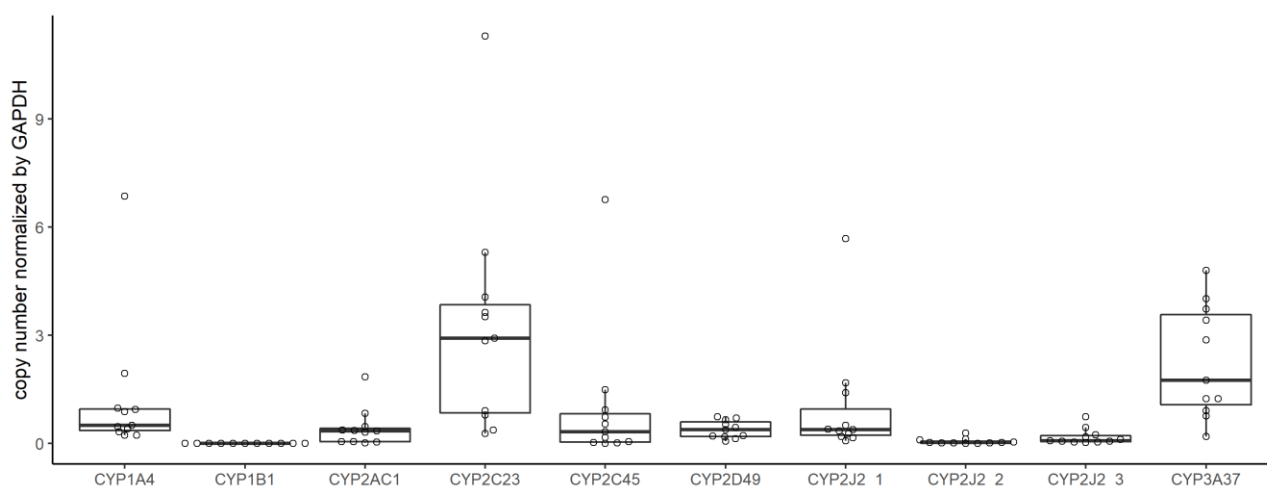
図(1)-7：アオウミガメにおける血中ワルファリン濃度の経時変化

(1) -4：高機能シーケンサー（Hiseq）による異物代謝酵素の発現量解析

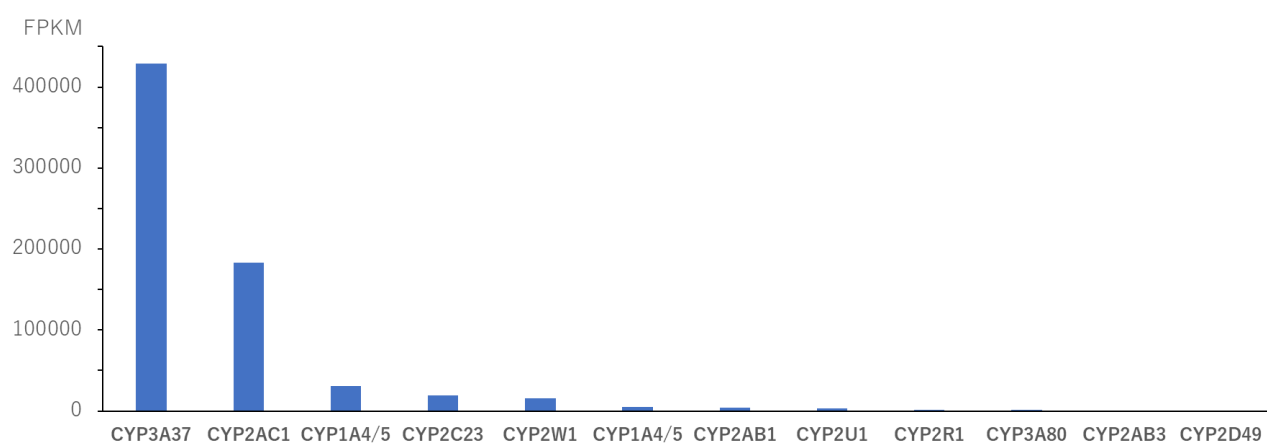
高機能シーケンス解析およびリアルタイムPCRの結果から、アカガシラカラスバトの肝臓においてCYP1-3遺伝子の発現量はCYP3A37、CYP2C23、CYP1A4が多く発現している傾向が示された（図(1)-8）。これらのCYP分子種は哺乳類や鳥類におけるワルファリンなどの殺鼠剤の代謝に重要な遺伝子として知られており、アカガシラカラスバトにおいても重要な遺伝子であることが予想された。UGT1-2遺伝子は3分子（UGT1-1、UGT1-2、UGT2）を同定し、UGT1-1遺伝子が最も多く発現し、他のUGT遺伝子の発現量は少ないことが示された。

オガサワラノスリの肝臓においては、CYP1-3遺伝子が12分子種（CYP1A4、CYP1A5、CYP2C23、CYP2D49、CYP2R1、CYP2U1、CYP2W1、CYP2AB1、CYP2AB2、CYP2AC2、CYP3A37、CYP3A80）同定された。また、アセンブリ配列へのリマップ解析の結果から、その発現量はCYP3A37が最も多く、CYP2AC1が次に多く発現している傾向が示された（図(1)-9）。UGT1-2遺伝子は4分子（UGT1-1、UGT1-2、UGT1-3、UGT2）を同定し、UGT1-1遺伝子が最も多く発現し、他のUGT遺伝子の発現量は少ないことが示された。

一般的に肝臓に多く発現するCYP分子種は薬物代謝上重要な役割を果たすことが知られており、これらの分子種の重要性が示唆された。



図(1)-8: アカガシラカラスバトの肝臓における、CYP遺伝子の発現量比較



図(1)-9: オガサワラノスリの肝臓における、CYP遺伝子の発現量比較

5. 研究目標の達成状況

新鮮肝の入手可能な生物種のマクロソーム画分を用いて、殺鼠剤の代謝プロファイルを同定することができた。In Vivoにおける猛禽類などに第一世代殺鼠剤（可能であれば低濃度の第二世代殺鼠剤）を投与し、半減期やAUC（血中濃度－時間曲線下面積）の測定を行い、血中動態の種差を明らかにすることができた。さらに、In Vivo試験についてはドバト、コウモリおよびウミガメにおいても実施したことから、研究目標以上の成果を達成することができた。

6. 引用文献

特に記載すべき事項はない。

Ⅱ－２ 殺鼠剤標的分子の感受性の種差の解析

帯広畜産大学

大学院獣医学研究院 獣医学研究部門基礎獣医学分野助教

川合 佑典

〔要旨〕

サブテーマ2における目的は、アカガシラカラスバト、オガサワラノスリ、オガサワラオオコウモリ、アオウミガメにおける殺鼠剤の標的分子における感受性の種差を明らかにすることである。具体的な研究目標は、VKOR活性試験および、ワルファリンなどの殺鼠剤による阻害試験から、殺鼠剤標的分子の感受性の種差を明らかにすること、およびサブテーマ1と共同で実施するIn Vivo投与試験より、殺鼠剤による血液凝固系への影響を明らかにすることである。

殺鼠剤の対象種であるクマネズミのVKOR活性の阻害率は99.2%であるのに対して、アカガシラカラスバトのVKOR活性は60%程度の阻害率であり、ラットに比べてアカガシラカラスバトの感受性は低いことが予想された。これらの結果は、ドバトを用いたサブテーマ1におけるIn Vivo試験の結果を支持するものであった。ノスリにおけるVKOR阻害率について、IC50はおよそ0.30 μM であり、ラットの0.26 μM と同程度であった。ノスリの低IC50、低VKOR活性は殺鼠剤に対する高感受性の可能性を示唆するものである。ノスリは殺鼠剤による死亡したネズミ個体の捕食する可能性が非常に高い点と、ラットと同程度の殺鼠剤標的分子VKORの阻害のされやすさを考慮し、殺鼠剤曝露量・リスクを低減することは重要と考えられる。ラットは投与後72時間経過後も凝固時間の延長が認められ、測定機器の上限値(8.0)以上を示したのに対して、コウモリでは約30時間後から凝固時間の回復が観察された。一方で、肝臓ミクロソームを用いた阻害試験においてはVKOR阻害率のIC50がおよそ0.39 μM であり、ラットと同程度であった。以上より、コウモリはラットより低い、あるいは同程度の感受性であると予想された。In VitroにおけるワルファリンによるVKOR活性は、アオウミガメでは殺鼠剤の対象動物であるラットと同程度に阻害されやすいことが明らかになった。さらに、アオウミガメのIn Vivo投与試験における血液凝固時間の解析により、ワルファリン投与後も長期間において血液凝固時間が延長することが明らかになった。以上のサブテーマ2における成果を、上述したサブテーマ1における殺鼠剤代謝能の結果も合わせて考察すると、環境中に曝露された殺鼠剤を摂取した場合のリスクは、アオウミガメなどのカメ類でラットやドバトより高い可能性が考えられた。本研究の成果により、小笠原諸島でダイファシノン散布する際には、海洋への流出防止、あるいは流出したスローパックの回収を行うことが重要であると考えられた。これらの対策は環境省により実施されているが、今後も同様に実施していくことが望まれる。

1. 研究開発目的

アカガシラカラスバト、オガサワラノスリ、オガサワラオオコウモリ、アオウミガメにおける殺鼠剤の標的分子における感受性の種差を明らかにする。

2. 研究目標

VKOR活性試験および、ワルファリンなどの殺鼠剤による阻害試験から、殺鼠剤標的分子の感受性の種差を明らかにする。サブテーマ1と共同で実施するIn Vivo投与試験より、殺鼠剤による血液凝固系への影響を明らかにする。

3. 研究開発内容

環境省（小笠原自然保護官事務所）、小笠原自然文化研究所、自然環境研究センター、エバーラスティング・ネイチャー、札幌市円山動物園、釧路市猛禽類医学研究所、多摩動物公園、（株）イカリ消毒技

術研究所、(株)シー・アイ・シーなどの各協力機関と協同して、アカガシラカラスバト、オガサワラノスリ、オガサワラオオコウモリ、アオウミガメ、クマネズミなどの野生動物の肝臓試料に関して、液体窒素保管された超低温保管試料の採取方法および北海道大学への輸送体制を確立できた。

4. 結果及び考察

(2)-1: 試料採集 (サブテーマ (1) と試料は共有)

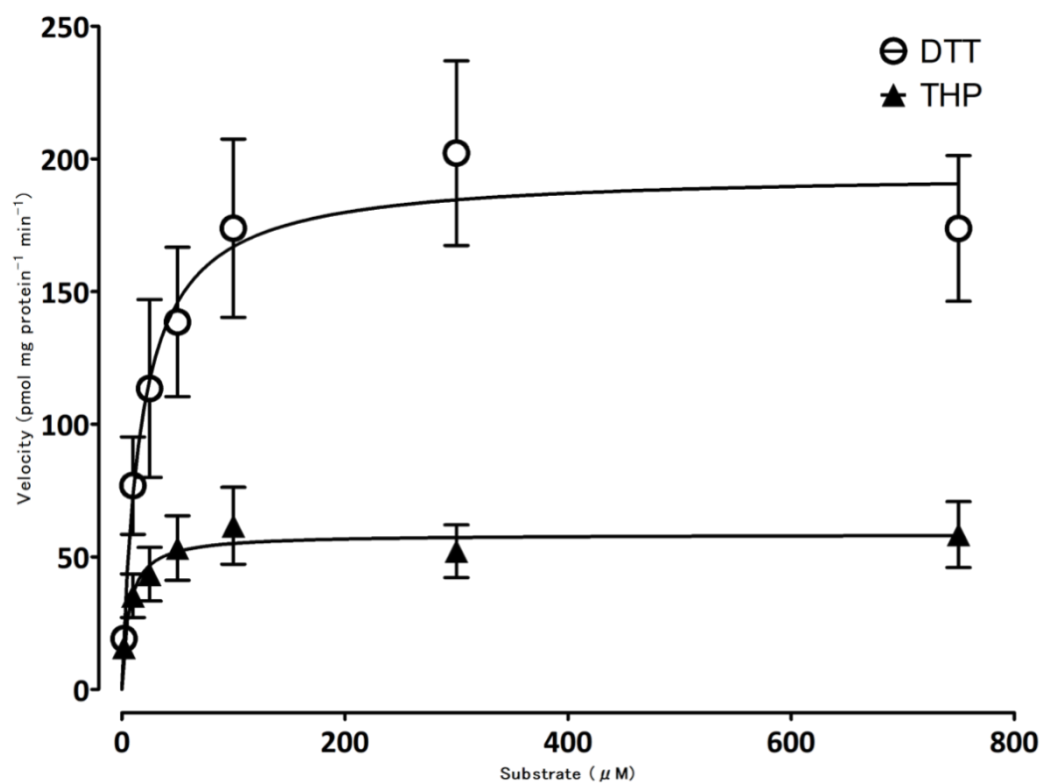
環境省 (小笠原自然保護官事務所)、小笠原自然文化研究所、自然環境研究センター、エバーラスティング・ネイチャー、札幌市円山動物園、釧路市猛禽類医学研究所、多摩動物公園、(株)イカリ消毒技術研究所、(株)シー・アイ・シーなどの各協力機関と協同して、アカガシラカラスバト、オガサワラノスリ、オガサワラオオコウモリ、アオウミガメ、クマネズミなどの野生動物の肝臓試料に関して、液体窒素保管された超低温保管試料の採取方法および北海道大学への輸送体制を確立した。これまで、アカガシラカラスバト (N=20)、オガサワラノスリ (N=2)、オガサワラオオコウモリ (N=2)、アオウミガメ (N=11)、クマネズミ (N=36) について試料を採集した。

(2)-2: 殺鼠剤標的分子 (VKOR) の活性試験および阻害試験

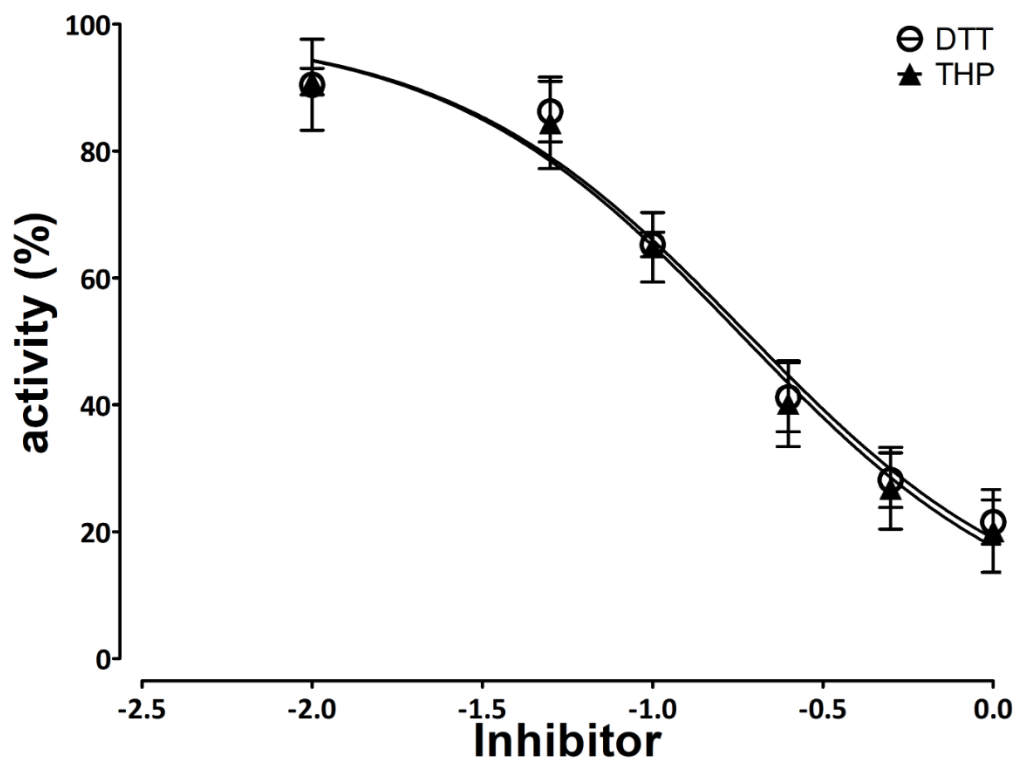
生体内でVKOR活性をより正確に評価することを目的として、新規のVKOR活性測定方法を開発した。図(2)-1は基質であるビタミンKエポキシド濃度を増加させた際の反応速度をプロットしたミカエリスメンテン描写である。THPおよびDTT双方で良好なミカエリスメンテン描写ができたが、THPはDTTに比べ有意に低い活性を示した。これはDTTによる非特異的な還元能による差である可能性がある。

図(2)-2では、50 μ MのビタミンKエポキシドに対し阻害剤であるワルファリンを添加し、ワルファリン濃度を増加させ阻害率を測定した。その結果、阻害率 (50%阻害濃度) に関しては2群間で顕著な差は認められなかった。本結果から、ワルファリンによる阻害率に関しては、先行文献におけるデータも比較として使用できると考えられた。

本成果により、殺鼠剤の標的分子であるVKORにおける生体内での正確な活性測定の技術を開発することができた。正確なVKORおよびVKOR阻害試験結果は、殺鼠剤の標的分子感受性を評価する上で重要であり、今後は本手法を用いた様々な野生動物種の感受性評価に用いられることが期待できる。



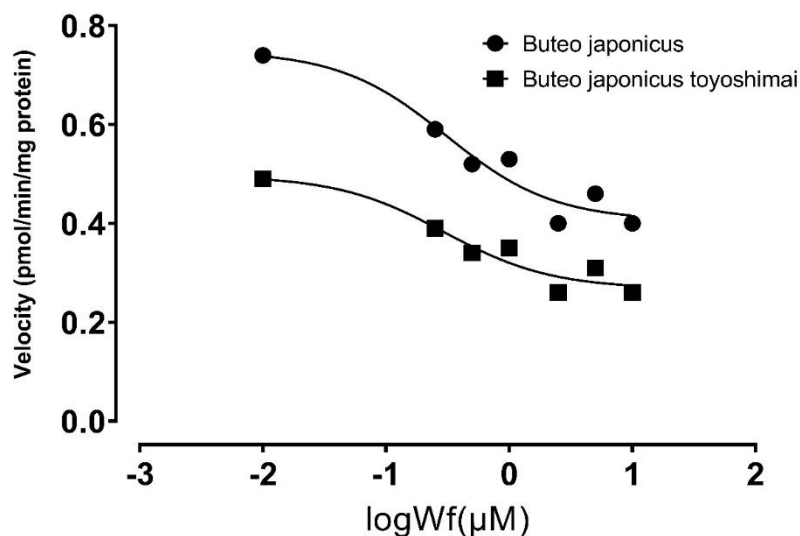
図(2)-1：従来のDTT法（▲）と新規のTHP法（○）におけるVKOR活性の比較



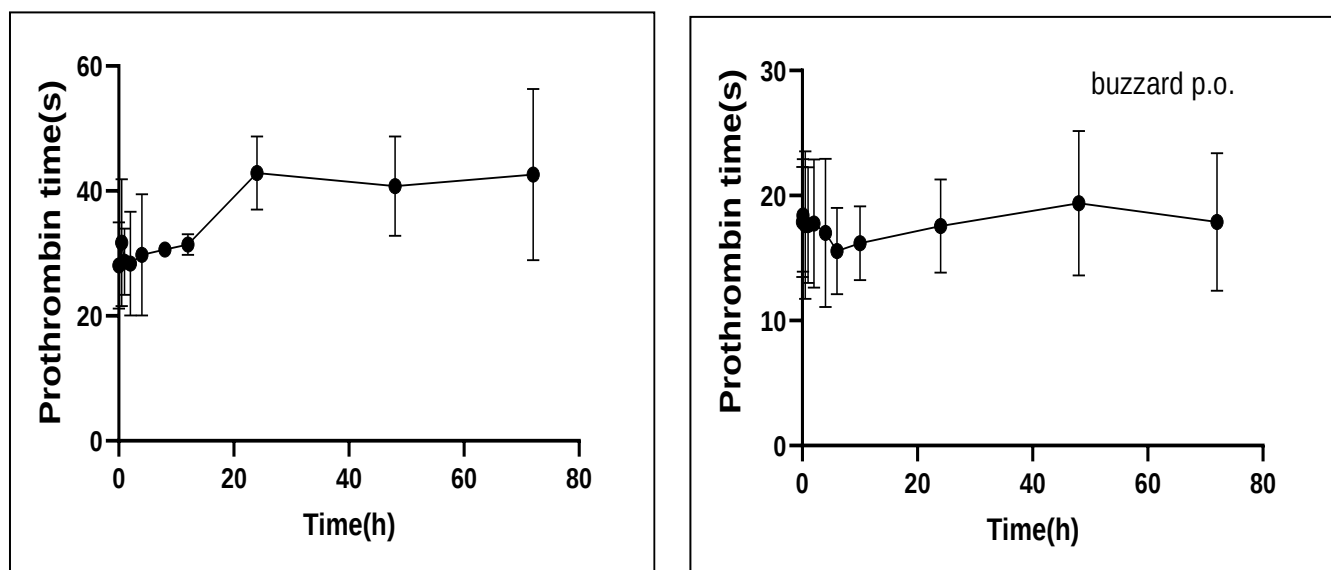
図(2)-2：ワルファリンによるVKOR活性阻害の比較（従来のDTT法（▲）と新規のTHP法（○）の比較）

上述のTHPを用いた新規評価法を用いて、VKOR活性阻害率を解析した。ワルファリンを添加して活性試験を実施したところ、クマネズミではVKOR活性はほぼ検出できず、阻害率は99.2%であるのに対して、アカガシラカラスバトのVKOR活性は60%程度の阻害率であり、ラットに比べてアカガシラカラスバトの感受性は低いことが予想された(表(2)-1)。これらの結果は、ドバトを用いたサブテーマ1におけるIn Vivo試験の結果を支持するものである。ノスリにおけるVKOR阻害率について、IC50はおおよそ0.30 μM であり、ラットの0.26 μM と同程度であった(図(2)-3)。ノスリ類のVKOR活性(V0)はドブネズミやカワラバト・アカガシラカラスバトと比較して低い(0.49~0.74 pmol/min/mg protein)点にも留意する必要があるが、低IC50、低VKOR活性は殺鼠剤に対する高感受性の可能性を示唆するものである。一方で、生理的なビタミンKサイクルでVKORに対する依存性が低い可能性もあることに留意が必要である。また、本研究で用いた殺鼠剤のDoseにおいては、ノスリ、およびニワトリにおける血液凝固時間の延長は両種において認められなかった(図(2)-4)もののノスリは殺鼠剤による死亡したネズミ個体の捕食する可能性が非常に高い点と、ラットと同程度の殺鼠剤標的分子VKORの阻害のされやすさを考慮し、殺鼠剤曝露量・リスクを低減することは重要と考えられる。

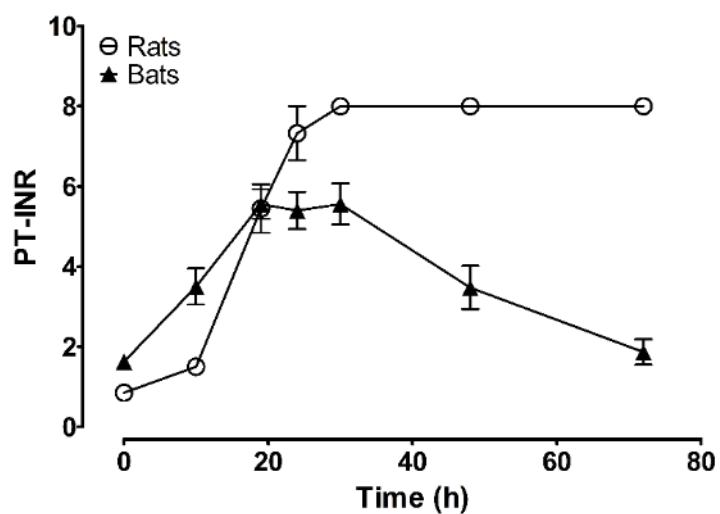
図(2)-5は、血液凝固時間の時間推移をエジプシャンルーセットオオコウモリとラットを比較した結果である。ラットは投与後72時間経過後も凝固時間の延長が認められ、測定機器の上限値(8.0)以上を示したのに対して、コウモリでは約30時間後から凝固時間の回復が観察された。以上の血中ワルファリン濃度の推移、および上述した血液凝固時間の阻害の回復時間の検討から、エジプシャンルーセットオオコウモリはラットよりもワルファリンやダイファシノンへの抵抗性があることが推測された。一方で、肝臓ミクロソームを用いた阻害試験においてはVKOR阻害率のIC50がおおよそ0.39 μM であり、ラットと同程度であった。以上より、コウモリはラットより低い、あるいは同程度の感受性であると予想された。さらに、アオウミガメおよびニホンスッポン、ミシシippアカミミガメ、ラットにおけるVKOR活性の阻害率を解析した(表(2)-2)。ワルファリンによるVKOR活性の阻害について、ワルファリンによるVKOR活性は、アオウミガメでは殺鼠剤の対象動物であるラットと同程度に阻害されやすいことが明らかになった。アオウミガメのIn Vivo投与試験における血液凝固時間の解析により、ワルファリン投与後も長期間において血液凝固時間が延長することが明らかになった(図(2)-6)。以上のサブテーマ2における成果を、上述したサブテーマ1における殺鼠剤代謝能の結果も合わせて考察すると、環境中に曝露された殺鼠剤を摂取した場合のリスクは、アオウミガメなどのカメ類でラットやドバトより高い可能性が考えられた。本研究の成果により、小笠原諸島でダイファシノンを散布する際には、海洋への流出防止、あるいは流出したスローパックの回収を行うことが重要であると考えられた。これらの対策は環境省により実施されているが、今後も同様に実施していくことが望まれる。



図(2)-3：ワルファリンによるオガサワラノスリおよびノスリのVKOR活性阻害の比較



図(2)-4：ニワトリ（左）およびノスリ（右）におけるワルファリン投与後の血液凝固時間（プロトロンビン時間）



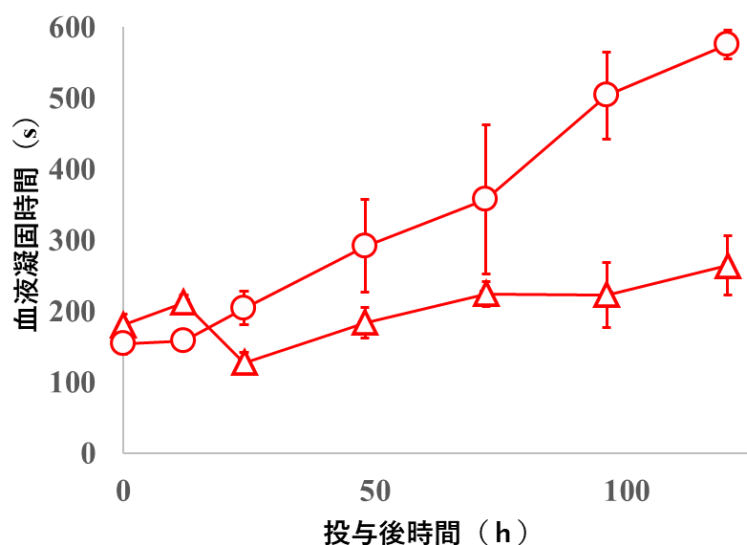
図(2)-5：エジプシャンルーセットオオコウモリ（▲）およびラット（○）における血液凝固時間の経時変化。縦軸のPT-INR（prothrombin time-international normalized ratio）：プロトロンビン時間国際標準比

	SD ラット (ド ブネズミ)	カワラバト	アカガシ ラカラス バト	アメリカ チョウゲ ンボウ	ワルファ リン(殺 鼠剤)抵 抗性クマ ネズミ
ワルファリン非存在下の活 性 pmol/min/nmol mg protein	5.9±0.5	15.4±4.2	11.4± 11.6		
IC ₅₀ :50%活性濃度 (μM)	0.26±0.19	3.2±1.8	22.7±4.5	177	5.3

表(2)-1：ラットおよび鳥類間におけるワルファリンによるVKOR活性の阻害の比較

	IC50 (μM)
SDラット	0.26±0.19
アオウミガメ	0.15±0.05
ニホンスッポン	0.063±0.06
ミシシippアカミミガメ	0.055±0.01

表(2)-2：ラットおよびカメ類におけるワルファリンによるVKOR活性の阻害の比較



図(2)-6：アオウミガメにおけるワルファリン投与後（静注：○、経口：△）の血液凝固時間の経時変化

(2) - 3 : VKORの遺伝子配列解析

アカガシラカラスバトのゲノムを対象とした高機能シーケンス解析の結果から、VKORC1L1配列が同定された。得られた配列を近縁種のカワラバトと比較したところ、アミノ酸配列がほぼ一致した(図(2)-7)。VKORC1配列については同定されなかった。ゲノムが明らかになっている近縁種のカワラバトについてもVKORC1は報告されていないことから、アカガシラカラスバトにはVKORC1が存在しない可能性も考えられる。

```

Red-headed_Wood-Pigeon_VKORC1L1  -----?SLF YRWGRGFGLL GSIFGKDSAI NQNSNVFGLV FYILQMLLG? GMTASAYAAL ILMTSSIVSV VGSLEYLAYIL
Rock-Pigeon_VKORC1L1             MLPLPYISLF YRWGRGFGLL GSIFGKDSAI NQNSNVFGLV FYILQMLL-- GMTASAYAAL ILMTSSIVSV VGSLEYLAYIL

Red-headed_Wood-Pigeon_VKORC1L1  YFVLKEFCIV CVITYLLNFI LFIINYKRLV YLNEAWKROL QPKQE*
Rock-Pigeon_VKORC1L1             YFVLKEFCIV CVITYLLNFI LFIINYKRLV YLNEAWKROL QPKQE*

```

図(2)-7 : アカガシラカラスバトとカワラバトにおけるVKORC1L1配列の比較

NCBIデータベースに登録されているヒト、ラット、ニワトリ、カエル、フグ、エジプシャンルーセットオオコウモリ (*Rousettus aegyptiacus*)、クロオオコウモリ (*Pteropus alecto*)、ジャワオオコウモリ (*Pteropus vampyrus*)、ユビナガコウモリ (*Miniopterus natalensis*)、タイワンカグラコウモリ (*Hipposideros armiger*)、キクガシラコウモリ (*Rhinolophus sinicus*)、ナミチスイコウモリ (*Desmodus rotundus*)、クビワコウモリ (*Eptesicus fuscus*)、トビイロホオヒゲコウモリおよび近縁種 (*Myotis lucifugus*, *Myotis davidii*, *Myotis brandtii*) におけるVKORの遺伝子配列を比較すると、コウモリの種間におけるアミノ酸配列の相同性は高く(図(2)-8)、上述(1) - 3におけるIn Vivo投与試験の研究結果を合わせて考察すると、オガサワラオオコウモリにおける殺鼠剤感受性は低いと予想された。

```

1
humanVKORC1      MGSTWGPSGW VRLALCLTGL VLSLYALHVK AARARDRDRY ALCDVGTAIS CSRVFSSRWG RGFGLEHVL GQDSILNQSN SIFGCIFYTL QLLGCLRTR
ratVKORC1        MGTWTRSPGR LRLALCLAGL ALSLYALHVK AARARNEDYR ALCDVGTAIS CSRVFSSRWG RGFGLEHVL GADSIILNQSN SIFGCMFYTL QLLGCLRGR
chickenVKORC1    -----MA ARAALCAVGL ALAGYALHVE RAHERDPTYR ASCDLGPSVS CTRVFASRWG RGLGLEAFV GRDSAINVFN SVIGIAFYSL QHCSAQCRAR
frogVKORC1       -MAVPGWERA VRLLLCGVGI ALSVYAHVE TSRERDANYT ALCDINPSIS CSKVFTSRWG RGFGLEQIL GRQSFLNQPN SVFGILFYGL QVLLGFSGSV
fuguVKORC1       -MAIPTWERK VRIFLCVFGI LLSVYALHVE LSRERNPDYR AMCDLGESVS CSKVFTSRWG RGFGLEQYFV DKDSPLNQPN SVLGIIFYTL QMCLGSLSLR
RousettusVKORC1  MDAILCSPRW VRLALCLAGL VLSFYAQHVK EEARARDQNYR ALCDVGTAIS CSRVFSSRWG QGFGLEHVL GPNSIFNQSN SIFGCIFYTL QLLFGCLRGR
PteropusVKORC1   MGATWGPSGW VRLALCLAGL VLSLYAMHVK EEARARDQNYR ALCDVGTAIS CSRVFSSRWG QGFGLEQVL GPNSIFNQSN SIFGCIFYTL QLLFGCLRGR
JawaVKORC1       MGATWGPSGW VRLALCLAGL VLSLYAMHVK EEARARDQNYR ALCDVGTAIS CSRVFSSRWG QGFGLEQVL GPNSIFNQSN SIFGCIFYTL QLLFGCLRGR
MiniopterusVKORC1 MGLTWGPSGA VRLALCLAGL VLSLYAMHVK EEARARDQNYR ALCDVGTAIS CSRVFSSRWG QGFGLEQVL GPNSIFNQSN SIFGCIFYTL QLLFGCLRGR
HipposiderosVKORC1 MGATWGPSGW VRLALCLAGL VLSLYALHVK AARARDQDNYR ALCDVGTAIS CSRVFSSRWG QGFGLEHVL GRDSLNFQSN SIFGCIFYTV QLLGCLRGR
RhinolophusVKORC1 MGATWRGPGW ARLALCLAGL VLSLYAMHVK AARARDKDYR ALCDVGTAIS CSRVFSSRWG QGFGLEPVL GRDSVFNQSN SIFGCIFYTL QLLSCLRAR
DesmodusVKORC1   MGATWGPSGW ARLALCLTGL VLSLYALHVK AARARDRDRY ALCDVGTAIS CSRVFSSRWG QGFGLEQVL GPDSVFNQSN SVFGCIFYTL QLLGCLRGR
EptesicusVKORC1  MGTWTRSPGR VRLALCLSGI VLSLYALHVK AARARDQDNYR ALCDVGTAIS CSRVFSSRWG RGFGLEPVL GADSVFNQSN SIFGCIFYTL QLLGCLRGR
MyotisVKORC1     MGATWGPSGW VRLALCLAGL VLSLYALHVK AARARDRDRY ALCDVGTAIS CSRVFSSRWG QGFGLEQVL GPDSVFNQSN SIFGCIFYSL QLLGCLRGR
M.davidiiVKORC1  MGTWGPSGW VRLALCLAGL VLSLYALHVK AARARDRDRY ALCDVGTAIS CSRVFSSRWG QGFGLEPVL GPDSVFNQSN SIFGCIFYTL QLLGCLRGR
M.brandtiiVKORC1 -----XPGW VRLALCLSGI VLSLYALHVK AARARDRDRY ALCDVGTAIS CSRVFSSRWG QGFGLEQVL GPDSVFNQSN SIFGCIFYSL QLLGCLWGR

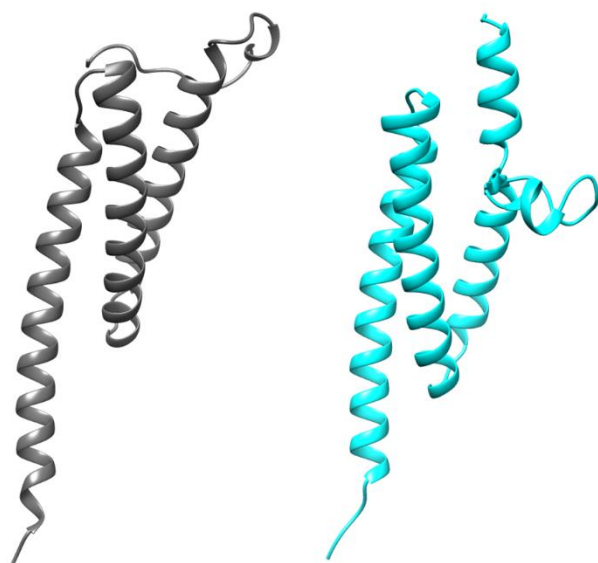
101
humanVKORC1      WASVLMMLSS LVSLAGSVYL AWILFFVLYD FCIVCITTYA INVSLMWLSF RKVQEPQGKA KRH*----- -
ratVKORC1        WASILLILSS LVSVAGSLYL AWILFFVLYD FCIVCITTYA INAGLMLLSF QKVPEHKVKK P*----- -
chickenVKORC1    ASSAALLVTS VTSVLASLYL ALVLAFLGHD LCLVCLSTYV VNAALLFLNW RRWRRCGQTA VRKRE*---- -
frogVKORC1       GAATAALLFTS LVSIAGSLYL AYILFYVLED FCIVCITTYA LNFCLLLNL KRLASLRAPP KKQNKRRKN *
fuguVKORC1       KAALFLVFTS  WVSAGSLYL ASILAFVLED FCMVCVSTYL VNFVLLFTNL KRRRAIEGLK EKS*----- -
RousettusVKORC1  WASILLVLSS LVSLIGSVYL AWILFFVLYD FCIVCLTTYA INVGLMVLNV RDVQGPQDKV KGH*----- -
PteropusVKORC1   WASILLVLSS LVSLTGSVYL AWILFFVLYD FCIVCITTYA INVGLMVLNV RDVQGPQDKV KGH*----- -
JawaVKORC1       WASILLVLSS LVSLTGSVYL AWILFFVLYD FCIVCITTYA INVGLMVLNV RDVQGPQDKV KGH*----- -
MiniopterusVKORC1 WVSILLLLSS LVSLAGSVYL AWILFFVLYD FCIVCITTYA INVGLMVLNV RDVQGPQDKV KGH*----- -
HipposiderosVKORC1 WASVILLVLSS LVSLAGSVYL AWILFFVLYD FCIVCITTYA INVGLMALS F REVSGPQSKV KGH*----- -
RhinolophusVKORC1 WASVILLVLSS LVSLAGSVYL AWILFFVLYD FCIVCITTYA INVGLMALS F REVSGPQSKV KGH*----- -
DesmodusVKORC1   WVSILLLLSS LVSLAGSVYL AWILFFVLYD FCIVCITTYA INVGLMVLNV RDVQGPQDKV KGH*----- -
EptesicusVKORC1  WVSILLLLSS LVSLAGSVYL AWILFFVLYD FCIVCITTYA INVGLMVLNV RDVQGPQDKV KGH*----- -
MyotisVKORC1     WVSALLLLSS LVSLAGSVYL AWILFFVLYD FCIVCITTYA INVGLMVLNV RDVQGPQDKV KGH*----- -
M.davidiiVKORC1  WVSILLLLSS LVSLAGSVYL AWILFFVLYD FCIVCITTYA INVGLMALS F REVRRPQSKV KGH*----- -
M.brandtiiVKORC1 WVSALLLLSS LVSLAGSVYL AWILFFVLYD FCIVCITTYA INVGLMVLNV RDVQGPQDKV KGH*----- -

```

図(2)-8 : ヒト、ラット、ニワトリ、カエル、フグおよびコウモリにおけるVKORアミノ酸配列の比較

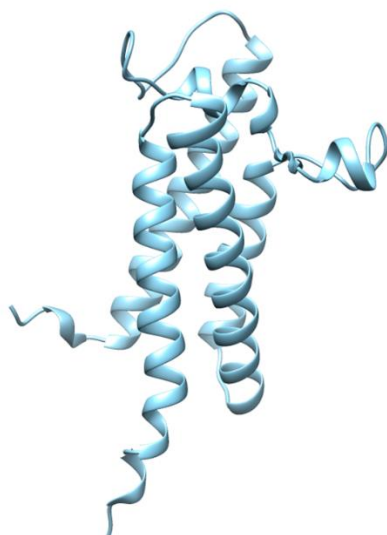
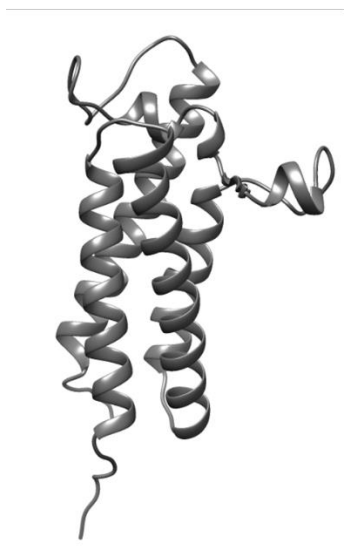
(2) - 4 :VKORの立体構造予測

RNA-seq解析の結果からアカガシラカラスバトではVKORC1が存在しないことが示唆され、類似遺伝子であるVKORC1L1遺伝子が血液凝固に関わる可能性が考えられた。アカガシラカラスバトから得られたVKORC1L1遺伝子配列を基にAlphaFold2を用い、立体構造を予測した。その結果、ワルファリンが結合すると考えられる領域周辺の構造は保存されている一方で、VKORC1が膜を4回貫通する構造であるのに対し、得られた配列からはアカガシラカラスバトのVKOC1L1はヒトなどのVKORC1L1よりも配列が短くなっており、カワラバトのVKORC1L1とともに3回膜貫通型であることが示唆された（図(2)-9）。一方でVKORC1L1の予測立体構造はカワラバトとアカガシラカラスバトで類似性が低い領域があり、シークエンスの精度を上げる必要があるとともに、殺鼠剤によるVKOR阻害試験においてカワラバトからアカガシラカラスバトへの外挿には注意が必要であると考えられた。



図(2)-9: アカガシラカラスバトVKORC1L1（左）およびカワラバトVKORC1L1（右）の予測立体構造

RNA-seq結果から得られたオガサワラオオコウモリのVKORC1配列をもとにAlphaFold2を用いて立体構造予測を行い、エジプシャンルーセットオオコウモリのVKORC1予測立体構造との比較を行った。その結果、オガサワラオオコウモリのVKORC1は4回膜貫通型の構造をとり（図(2)-10）、エジプシャンルーセットオオコウモリVKORC1と比較して163残基中145残基がアライメントされRMSDが0.152となる非常に類似した構造をとることが示唆された。このことから配列から得られる結果と同様、VKORC1の阻害試験についてエジプシャンルーセットオオコウモリの結果からオガサワラオオコウモリへの外挿は可能であると考えられた。



図(2)-10: オガサワラオオコウモリVKORC1の予測立体構造（左）、およびエジプシャンルーセットオオコウモリVKORC1の予測立体構造（右）

5. 研究目標の達成状況

VKOR活性試験および、ワルファリンなどの殺鼠剤による阻害試験から、殺鼠剤標的分子の感受性の種差を明らかにすることができた。サブテーマ1と共同で実施するIn Vivo投与試験より、殺鼠剤による血液凝固系への影響を明らかにすることができた。さらに、In Vivo試験についてはドバト、コウモリおよびウミガメにおいても実施したことから、研究目標以上の成果を達成することができた。

6. 引用文献

特に記載すべき事項はない。

Ⅲ. 研究成果の発表状況の詳細

(1) 誌上発表

<査読付き論文>

【サブテーマ1および2共通の成果発表】

- 1) Nakayama SMM, Morita A, Ikenaka Y, Kawai YK, Watanabe KP, Ishii C, Mizukawa H, Yohannes YB, Saito K, Watanabe Y, Ito M, Ohsawa N, Ishizuka M. Avian interspecific differences in VKOR activity and inhibition: insights from amino acid sequence and mRNA expression ratio of VKORC1 and VKORC1L1. *Comparative Biochemistry and Physiology* 228: 108635 (2020) DOI: 10.1016/j.cbpc.2019.108635 (IF:3.228)
- 2) Nakayama SMM, Morita A, Ikenaka Y, Mizukawa H, Ishizuka M. A review: Poisoning by anticoagulant rodenticides in non-target animals globally. *J. Vet. Med. Sci.* 2019. 81(2): 298-313. DOI: 10.1292/jvms.17-0717 (IF:1.267)
- 3) Kazuki Takeda, Ayuko Morita, Yoshinori Ikenaka, Shouta M.M.Nakayama, Mayumi Ishizuka. Comparison of two reducing agents dithiothreitol and tris(3-hydroxypropyl)phosphine for in vitro kinetic assay of vitamin K epoxide reductase. *Veterinary and Animal Science.* 9: 100095 (2020) DOI: 10.1016/j.vas.2020.100095 (IF:1.821)
- 4) Yoshiya Yamamura, Kazuki Takeda, Yusuke K. Kawai, Yoshinori Ikenaka, Chiyo Kitayama, Satomi Kondo, Chiho Kezuka, Mari Taniguchi, Mayumi Ishizuka, Shouta M.M. Nakayama (Corresponding). Sensitivity of turtles to anticoagulant rodenticides: risk assessment for green sea turtles (*Chelonia mydas*) in the Ogasawara Islands and comparison of warfarin sensitivity among turtle species. *Aquatic Toxicology.* 233: 105792 (2021) DOI: 10.1016/j.aquatox.2021.105792 (IF:4.964)

<査読付論文に準ずる成果発表>

特に記載すべき事項はない。

<その他誌上発表（査読なし）>

特に記載すべき事項はない。

(2) 口頭発表（学会等）

【サブテーマ1およびサブテーマ2共通の成果発表】

- 1) Nakayama SMM, Morita A, Ikenaka Y, Kawai Y.K, Takeda K, Mizukawa H, Ishii C, Saito K, Watanabe Y, Ito M, Ohsawa N, Ishizuka M. Avian interspecific differences in rodenticide sensitivity: amino acid sequence and mRNA expression ratio of VKORC1 and VKORC1L1、SETAC North America 39th Annual Meeting. 4th - 8th Nov 2018. Sacramento Convention Center, CA, USA
- 2) 武田一貴、池中良徳、田中和之、中山翔太、谷川力、石塚真由美、東京の殺鼠剤抵抗性ラットにおける殺鼠剤代謝能の解明、平成30年度内外環境応答・代謝酵素研究会、2018年11月23日～24日、鳥取大学、鳥取市、鳥取県（口頭）

- 3) Takeda K, Ikenaka Y, Tanaka K, Nakayama SMM, Tanikawa T, Ishizuka M. Novel Mechanism of Rodenticide (warfarin) Resistance of Wild Rats in Tokyo ~ Enhanced Pentose Phosphate Pathway Causes Rapid Metabolism of Warfarin ~, 2nd Chemical Hazard Symposium, 8th Dec 2018, Ehime University, Matsuyama, Japan (口頭)
- 4) 山村快哉、武田一貴、中山翔太、川合佑典、森田鮎子、池中良徳、小松謙之、北山知代、近藤理美、石塚真由美、環境汚染物質と淡水ガメ～環境中でのリスクアセスメント～、第6回淡水ガメ情報交換会、2019年2月23日～24日、東邦大学、習志野市、千葉県 (口頭)
- 5) Ishizuka M, Ikenaka Y, Nakayama SMM. Species differences in xenobiotic metabolism by phase I and II enzymes of companion animals and wildlife. The 2nd Joint Meeting of Veterinary Science in East Asia. 26th April 2019, Konkuk University, Seoul, Korea (招待講演)
- 6) Aksorn Saengtienchai, Yoshinori Ikenaka, Shouta M.M. Nakayama, Mayumi Ishizuka、Characterization and differentiation of xenobiotic metabolism in mammalian animals through glucuronidation and sulfation profiling、第28回環境化学討論会、2019年6月12日～6月14日、埼玉会館、埼玉県 (口頭)
- 7) 山村快哉、武田一貴、中山翔太、川合佑典、森田鮎子、小松謙之、北山知代、近藤理美、池中良徳、石塚真由美、東京都小笠原諸島における殺鼠剤散布のアオウミガメへのリスク評価、第25回日本野生動物医学会大会 (山口)、2019年8月30日～9月1日、山口大学、山口県 (口頭)
- 8) 真砂皓大、武田 一貴、中山 翔太、森田 鮎子、池中 良徳、石塚 真由美、抗凝血系殺鼠剤が小笠原諸島在来固有種に与える影響の評価、第25回 日本環境毒性学会研究発表会、2019年9月25日～9月27日、国立環境研究所 (口頭)
- 9) 石塚真由美、中山翔太、池中良徳、xenobiotics 代謝と解毒の動物種差、48th Annual meeting of Japanese Society of Toxicology、対面 (Hybrid)、07-09, July 2021 (招待講演)
- 10) Fuyu Yasuhira, Shouta M.M. Nakayama, Kraisiri Khidkhan, Kohei Ogasawara, Takahiro Ichise, Soe Nyein Chan, Aksorn Saengtienchai, Chaiyan Kasorndorkbua, Ratiwan Sitdhibutr, Yukiko Watanabe, Keisuke Saito, Yoshinori Ikenaka, Mayumi Ishizuka. Pharmacokinetics of anticoagulant rodenticide warfarin in avian species. The 14th Asian Society of Conservation Medicine. Hokkaido University/hybrid. 22-24 Sep 2021 (Oral)
- 11) 石塚真由美、池中良徳、中山翔太、薬物 / 異物代謝と毒性の種差 Species differences in drug metabolism and toxicity、日本薬物動態学会 第36回年会、Gメッセ群馬、2021年11月16日 (火)～11月19日 (金) (招待講演)
- 12) 川合佑典、池中良徳、中山翔太、久保田彰、石塚真由美、ゲノムデータベースを利用した脊椎動物がもつグルクロン酸抱合遺伝子の進化解析、第23回環境ホルモン学会研究発表会、Online、2021年9月12-13日 (Oral)

(3) 「国民との科学・技術対話」の実施

【サブテーマ1およびサブテーマ2の共同実施】

- 1) 一般公開 科学技術セミナー（主催：北海道大学大学院獣医学研究院、札幌市円山動物園、2018年5月13日、札幌市円山動物園、参加者約60名）にて成果紹介
- 2) 一般公開 第28回三省堂サイエンスカフェin札幌 CoSTEPシリーズ15（主催：北海道大学CoSTEP、2018年5月29日、三省堂書店 札幌店、参加者約30名）にて成果紹介
- 3) 一般公開 シンポジウム「小笠原諸島返還50周年記念 みんなの近くの世界遺産＜返還50周年記念講演会＞」（主催：環境省小笠原自然保護官事務所、林野庁小笠原諸島森林生態系保全センター、東京都小笠原支庁、小笠原村、2018年9月11日、小笠原世界遺産センター、参加者約100名）にて成果紹介
- 4) 北海道帯広市立緑丘小学校における特別授業「科学体験実習」（2018年10月25日、参加者約120名）にて成果紹介
- 5) 一般公開 国際シンポジウム「International CHEMICAL HAZARD Symposium 2019」（主催：One Health Frontier Graduate School of Excellence & SATREPS KAMPAI Project、2019年3月20日、北海道大学、参加者約150名）にて成果紹介
- 6) エコプロ2019（2019年12月5日～7日、東京ビッグサイト、約16万人）にて成果紹介
- 7) WEBホームページおよびフェイスブックによる研究成果の継続的な公開・発信
(<http://tox.vetmed.hokudai.ac.jp/>, <https://www.facebook.com/tox.vetmed.hokudai/>)

(4) マスコミ等への公表・報道等＞

特に記載すべき事項はない。

(5) 本研究費の研究成果による受賞

- 1) 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、スーパーラットは何が「スーパー」なのか？ ～東京の殺鼠剤抵抗性クマネズミにおける抵抗性獲得機序の探索～、第45回日本毒性学会学術年会、2018年、大阪国際会議場、大阪市、大阪府（学生ポスター発表賞）
- 2) Kondo T, Ikenaka Y, Nakayama SMM, Mizukawa H, Mitani Y, Nomiyama K, Tanabe S, Ishizuka M. Inter-species differences of phase II xenobiotics metabolism enzymes in carnivorans. The 6th Sapporo Summer Symposium for One Health (6th SaSSOH). 2018. Hokkaido University, Sapporo, Japan (Oral, Best Presentation Award)
- 3) Takeda K, Ikenaka Y, Tanikawa T, Tanaka K, Nakayama SMM, Mizukawa H, Ishizuka M, Novel Mechanism of Rodenticide (warfarin) Resistance of Wild Rats in Tokyo -Enhanced Pentose Phosphate Pathway Causes Rapid Metabolism of Warfarin -. 2018, Society of Toxicology 57th Annual Meeting and ToxExpo, USA (Comparative & Veterinary Specialty Section, Graduated Student Travel Award)
- 4) Takeda K, Ikenaka Y, Tanikawa T, Tanaka K, Nakayama SMM, Mizukawa H, Ishizuka M, Novel Mechanism of Rodenticide (warfarin) Resistance of Wild Rats in Tokyo -Enhanced Pentose Phosphate Pathway Causes Rapid Metabolism of Warfarin -. 2018. Society of Toxicology 57th Annual Meeting and ToxExpo, USA (Molecular and Systems Biology SS Graduated Student Honorable Mention)
- 5) 山村快哉、武田一貴、中山翔太、川合佑典、森田鮎子、小松謙之、北山知代、近藤理美、池中良徳、

石塚真由美、東京都小笠原諸島における殺鼠剤散布のアオウミガメへのリスク評価、第25回日本野生動物医学会大会（山口）、山口大学、山口県、2019年8月30日～9月1日（口頭発表賞、学生部門）

- 6) 真砂皓大、武田一貴、中山翔太、森田鮎子、池中良徳、石塚真由美、抗凝血系殺鼠剤が小笠原諸島在来固有種に与える影響の評価、第25回 日本環境毒性学会研究発表会、国立環境研究所、2019年9月25日～9月27日（奨励賞）

IV. 英文 Abstract

Elucidation of the Influence of the Rodenticide Spraying on Wildlife in the Ogasawara Islands

Principal Investigator: Shouta NAKAYAMA

Institution: Hokkaido University, Sapporo City, Hokkaido 060-0818, JAPAN

Tel: +81-11-706-5105 / Fax: +81-11-706-5105

E-mail: shouta-nakayama@vetmed.hokudai.ac.jp

Cooperated by: Graduate School of Veterinary Medicine, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine

[Abstract]

Key Words: Wildlife, rodenticide, susceptibility, Ogasawara Islands, animal species difference, endemic species, rare species

Although anticoagulant rodenticides (ARs) are effectively used for the control of invasive rodents, nontarget species are also frequently exposed to ARs and secondary poisonings occur widely. However, little data is available on the effects of ARs, especially on wildlife. In this study, we evaluated the anti-coagulant rodenticides sensitivity in four main species in the Ogasawara Islands: the red-faced wood pigeon, the Ogasawara Buzzard, the Bonin flying fox, and the green sea turtle, to provide data for policy decisions related to rodenticides use. In Vitro metabolism studies suggested that pigeon rapidly metabolized warfarin in the liver and are less susceptible to its effects, whereas green turtles have a lower capacity to metabolize warfarin in the liver and are more susceptible to warfarin. Compared to rats, bats showed a rapid decrease in blood warfarin and diphacinone. In Vivo studies showed that warfarin metabolism and excretion was higher in buzzard and pigeons than in chickens. In Vivo studies of warfarin in green sea turtles showed that warfarin remained in the blood for a long period of time. The inhibition rate of VKOR activity in the black rat, the target species for rodenticides, was 99.2%, whereas the inhibition rate of VKOR activity in the pigeon was about 60%, indicating that the pigeon is expected to be less sensitive to warfarin than the rat. The low IC₅₀ and low VKOR activity of buzzard suggests that they may be susceptible to rodenticides. In Vivo study using Egyptian bats suggested that bat would be more resistant to warfarin and diphacinone than rats. In Vitro VKOR activity inhibition by diphacinone showed comparable inhibition rate in bats compared to rat. These results suggest that bats are lower or comparative sensitivity with rats. In Vitro VKOR activity inhibition by warfarin suggested that sea turtles would be more sensitive to rodenticides compared to rats. Furthermore, analysis of blood coagulation time in sea turtles in In Vivo administration study revealed that blood coagulation time was prolonged even long after of warfarin administration. The risk of exposure of rodenticides from the marine environment may be higher in green turtles.