

環境研究総合推進費 終了研究成果報告書

公 募 区 分 : 革新型研究開発 (若手枠)

研究実施期間 : 令和3 (2021) 年度 ~ 令和5 (2023) 年度

課 題 番 号 : 【4RF-2102】

体系的番号 : (J P M E E R F 2 0 2 1 4 R 0 2)

研究課題名 : 「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」

Research Title : Establishment of New Basic Technology for Risk Assessment of Environmental Pollutant in Wildlife by Using Culture Cells.

研究代表者名 : 片山 雅史

研究代表機関名 : 国立研究開発法人国立環境研究所

研究分担機関名 : 国立大学法人 北海道大学
学校法人北里研究所 北里大学

研究協力機関名 : 認定NPO法人エバーラスティング・ネイチャー
環境省
一般財団法人 自然環境研究センター
イカリ消毒株式会社
千葉大学

研究領域 : 自然共生領域

キーワード : 培養細胞、殺鼠剤、ウミガメ、毒性影響、非標的種

令和6 (2024) 年5月

目次

環境研究総合推進費 終了研究成果報告書.....	1
[課題概要].....	3
1. はじめに（研究背景等）.....	6
2. 研究開発目的.....	6
3. 研究目標.....	6
4. 研究開発内容.....	8
5. 結果及び考察.....	9
6. 目標の達成状況と環境政策等への貢献.....	25
(1) 研究目標の達成状況.....	25
(2) 研究成果の学術的意義と環境政策等への貢献.....	28
7. 研究成果の発表状況.....	30
(1) 成果の件数.....	30
(2) 誌上発表.....	30
(3) 口頭発表.....	31
(4) 知的財産権.....	33
(5) 「国民との科学・技術対話」の実施.....	34
(6) マスメディア等への公表・報道等.....	34
(7) 研究成果による受賞.....	34
(8) その他の成果発表.....	35
8. 国際共同研究等の状況.....	35
9. 研究者略歴.....	35
Abstract.....	37

[課題概要]

<課題情報>

公募区分：	革新型研究開発（若手枠）
研究実施期間：	令和3（2021）年度 ～ 令和5（2023）年度
課題番号：	【4RF-2102】
研究課題：	「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」
研究代表者：	片山雅史（国立環境研究所、研究員）
重点課題（主）：	【重点課題⑬】生物多様性の保全に資する科学的知見の充実や対策手法の技術開発に向けた研究
重点課題（副）：	【重点課題⑭】生態系サービスの持続的な利用やシステム解明に関する研究・技術開発
行政要請研究テーマ（行政ニーズ）：	（４－２）絶滅危惧野生動物の生息域外保全における飼育下保護増殖戦略策定のための分野横断的研究
研究領域：	自然共生領域

<キーワード>

培養細胞
殺鼠剤
ウミガメ
毒性影響
非標的種

<研究体制>

サブテーマ1 「培養細胞を用いた環境汚染物質の細胞影響評価に関する研究」

<サブテーマ1 リーダー及び研究分担者>

機関名	部署名	役職名	氏名	参画期間
国立環境研究所	生物多様性領域	研究員	片山雅史	令和3（2021）年度 ～令和5（2023）年度

<サブテーマ1 研究協力者>

機関名	部署名	役職名	氏名
環境省	小笠原自然保護官事務所 関東事務所	-	- 令和4(2022)年度～ 令和5(2023)年度

サブテーマ2「個体レベルにおける環境汚染物質の影響評価に関する研究」

＜サブテーマ2リーダー及び研究分担者＞

機関名	部署名	役職名	氏名	参画期間
北海道大学	獣医学研究院	准教授	中山翔太	令和3（2021）年度～令和5（2023）年度
北里大学	獣医学部	講師	武田一貴	令和3（2021）年度～令和5（2023）年度

＜サブテーマ2研究協力者＞

機関名	部署名	役職名	氏名
認定NPO法人エバーラ スティング・ネイチャー		調査研究員	近藤理美（令和3（2021）年度～令和5（2023）年度）
千葉大学	予防医学センター	講師	江口哲史（令和3（2021）年度～令和5（2023）年度）
一般財団法人 自然環境 研究センター	-	-	- （令和3（2021）年度）
イカリ消毒株式会社	技術研究所	-	- （令和3（2021）年度）

＜研究経費（間接経費を含む）＞

年度	直接経費	間接経費	経費合計
2021	3,993.7千円	1,133.3千円	5,127千円
2022	3,994.7千円	1,132.3千円	5,127千円
2023	3,949千円	1,178千円	5,127千円
合計	11,937.4千円	3,443.6千円	15,381千円

＜研究の要約＞

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、正確に評価可能であるが、野生動物の個体を用いた研究は非常に難しく、代替法の開発が必要である。本研究では、培養細胞を用いた野生動物への環境汚染物質の影響評価系を構築することとした。本研究の目的は、汚染物質である殺鼠剤ダイファシノンのウミガメへの影響をモデルに培養細胞による汚染物質評価系を構築し、有用性を検証することである。サブテーマ1では、培養細胞を用いた殺鼠剤の影響評価系構築と評価を進め、サブテーマ2ではアオウミガメの殺鼠剤曝露のバイオマーカー測定法の開発とアオウミガメ、ラットとクマネズミへのダイファシノン投与試験およびその解析を実施した。

本研究では、アオウミガメと齧歯類の不活化細胞（安定して培養可能な細胞）を樹立し、不活化細胞を用いて殺鼠剤ダイファシノンの曝露実験を実施し、薬効等のパラメーターを取得した。他方、個体レ

ベルにおけるアオウミガメ、ネズミ類の薬効等のパラメータも取得した。この際に、アオウミガメの薬効評価指標の測定法が未開発であったため、本研究で開発した。細胞と個体の結果を比較すると、同じ傾向が認められた。さらに数理モデルを用いて数学的に細胞の応答が個体の応答が再現することを示した。本研究で作製した細胞による評価系は、殺鼠剤ダイファシノンの生体における応答予測において、有用性が示された。本研究では生殖毒性評価に関しても、評価系としての有用性の検証を進め、生殖毒性の主要なパラメーターの一つであるステロイドホルモンの合成・分泌に関して、細胞は生体を模倣する結果が得られた。本研究では、生殖毒性評価における一定の有用性も示唆された。その他、小笠原地域の外来ネズミの殺鼠剤耐性変異の有無の確認、数理モデルによる齧歯類間の生理学的応答性の種差の説明等、多角的に取り組み、大きな成果が得られた。本研究は、環境省や保護団体の方々とも密に連携して良好な成果が得られた。

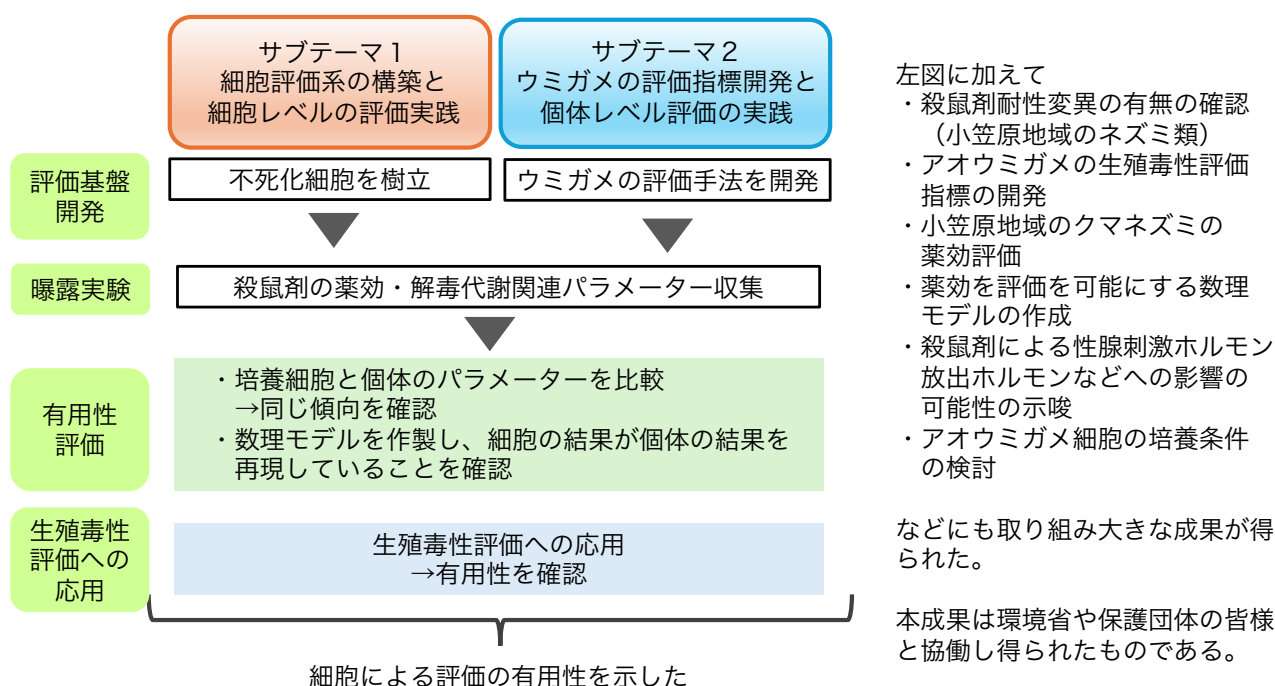


図 1 本研究概略

1. はじめに（研究背景等）

生物多様性の保全は国際的な大問題である。生物多様性条約第10回締約国会議（COP10）では、2011年から2020年の戦略計画を策定し、生物多様性保全の目標（愛知目標）を設定したが、目標達成状況は十分ではなく、更なる生物多様性保全に向けた取り組みの必要性が認識されている。IPBES（生物多様性及び生態系サービスに関する政府間科学-政策プラットフォーム）地球規模評価では、生物多様性を脅かす直接的要因として気候変動や侵略的外来種等と並んで、汚染が挙げられている。このような背景のもと、生物多様性条約第15回締約国会議（COP15）において採択された「昆明・モンテリオール生物多様性枠組」を踏まえた我が国の生物多様性国家戦略2023-2030においても、汚染対策が盛り込まれた。他方、我が国において鉛や農薬など様々な汚染物質による野生動物への影響が既に問題視されている。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、正確に評価可能であるが、野生動物の個体を用いた研究は非常に難しく、代替法の開発が必要である。個体レベルの実験が難しいヒトでは、培養細胞を用いて多様なリスク評価が進められている。分野横断的に、野生動物においても培養細胞を用いた汚染物質の評価系が構築できれば、生物多様性を脅かす要因の一つである汚染物質の実験的評価が可能になる。そこで本研究では、培養細胞を用いた野生動物への環境汚染物質の影響評価系を構築することとした。

2. 研究開発目的

本研究では、汚染物質である殺鼠剤（小笠原諸島で使用されているダイファシノン）のウミガメへの影響をモデルに、培養細胞による汚染物質評価系を構築し、有用性を検証することを目的とする。日本環境センター環境省請負業務報告書では、オガサワラノスリ、アカガシラカラスバト、アオウミガメへの殺鼠剤ダイファシノンの影響が指摘されている。本研究では、これらの中で個体を用いた実験が可能なアオウミガメを対象とする。サブテーマ1では、ラット（殺鼠剤評価対象種）、クマネズミ（駆除対象種）、ウミガメ由来の細胞を用いて殺鼠剤の試験管内曝露実験を実施し、これら3種の殺鼠剤感受性の種差を細胞レベルで解明する。この際に、通常の培養細胞は性質を安定させた長期培養が困難であるため、本研究では不死化細胞（長期間性質を一定にして培養できる細胞）を樹立して評価に利用する。サブテーマ2では、個体レベルでラット、クマネズミ、アオウミガメに対する殺鼠剤の曝露実験を行う。ウミガメに対する曝露実験は報告が皆無であるため、本研究では哺乳類、鳥類の方法を参考に評価手法を開発する。最後に、サブテーマ1とサブテーマ2の結果を比較し、培養細胞による殺鼠剤の影響評価の有用性を検証する。本研究において、培養細胞を用いた汚染物質評価系の有用性が実証できれば、今後、侵略的外来種対策として使用予定の殺鼠剤の非対象種への影響が実験的に予測可能になる。さらに将来的に、農薬や重金属など多様な汚染物質に対する野生動物の影響評価への応用も視野に入る。

3. 研究目標

全体目標	本研究目標 1. 野生動物の汚染物質影響評価における細胞評価系の構築 2. ウミガメの個体レベルでの汚染物質曝露後の評価指標の開発 3. 個体データとの比較による細胞評価系の有用性の評価 本研究では、簡便・迅速かつ非侵襲的な野生動物に対する汚染物質の影響評価を実現させるため、分野横断的な手法を用いて環境汚染物質の新規評価系構築と有用性の検証を目標とする。具体的には、本研究では生息域外保全の一環で国立環境研究所に保存されている培養細胞に着目する。培養細胞は、死亡個体から取得可能であり、個体レベルの実験が難しい野生動物において、実験可能な貴重な生物資源である。本研究は、野生動物に対する汚染物質の影響評価において「調査研究」「近縁種実験動物研究」に続く、「細胞研究」の実現と有用性の検証を目標にする。汚染物質による野生動物への毒性影響は、次の様に概念的に定義されている。[対象種
-------------	--

	への毒性影響＝感受性（の種差）×曝露量]。したがって、種ごとの汚染物質に対する感受性の解明は野生動物における毒性影響評価において重要な要因である。一方で、感受性に関しては曝露実験による評価が必要であるが、野生動物の個体を用いた曝露実験は不可能である。そこで本提案では、殺鼠剤をモデルに、非侵襲的評価である細胞実験を通じて野生動物の汚染物質に対する感受性の種差を明らかにし、細胞実験により毒性影響の評価精度が向上することを提示する。さらに、細胞実験による汚染物質に対する感受性の種差の解明が有用であることを提示できれば、新たに政策として殺鼠剤を使用する際に、事前に非対象種への影響が予測可能になる。したがって、非対象種への毒性影響が少ない殺鼠剤の選定に有益な情報を環境行政に提示できる。 本研究では、爬虫類であるウミガメ類に対する殺鼠剤の影響評価をモデルとする。殺鼠剤は、侵略的外来種対策のため、政策として使用され一定の成果があげられている。したがって、今後も外来齧歯類の対策として政策使用が計画されている。この様な背景から、殺鼠剤は環境行政への貢献を目標とする本研究において、モデルとして非常に意義がある汚染物質である。本研究において、動物モデルとするウミガメは、保護対象として国民的な関心が高いだけではなく、哺乳類や鳥類と比べて駆除対象である外来齧歯類から進化的に遠いため、汚染物質に対する生理学的応答が大きく異なる可能性がある。一方で、これまでウミガメに対する殺鼠剤の影響はほとんど評価されていない。一つの大きな理由は、個体レベルの実験が難しい点である。本研究では、汚染物質影響評価の重要性をご説明し、小笠原諸島でウミガメの保全を進めるNPO法人エバーラスティング・ネイチャー（ELNA）の全面協力を得ることに成功し、個体レベルの実験が可能になった。そこで本研究では、ウミガメをモデルに設定し、実際に小笠原諸島で使用されている抗凝血性殺鼠剤であるダイファシノン一種類に対するウミガメ、ラット、小笠原産クマネズミ（殺鼠剤耐性なし）の生体実験と細胞実験結果を比較することで、新規評価技術基盤となる細胞実験の有用性を明らかにする。一方で、ウミガメに対する汚染物質の曝露実験は報告が少なく、汚染物質の評価方法が明らかではない。そこで、本研究では、ウミガメの個体レベルでの汚染物質曝露後の評価指標の開発も目標とする。
--	---

サブテーマ 1	「培養細胞を用いた環境汚染物質の細胞影響評価に関する研究」
サブテーマ 1 実施機関	国立環境研究所
サブテーマ 1 目標	本サブテーマでは、培養細胞を用いたウミガメ類の殺鼠剤の影響評価系構築と評価を実践する。以下の4点を具体的な目標とする。 1. 試験管内曝露実験に使用するウミガメ類と比較対象であるラットとクマネズミの不死化細胞を樹立、ならびに樹立した細胞の性質の解析。 2. 試験管内における汚染物質（殺鼠剤）の曝露後の細胞毒性評価、殺鼠剤毒性の指標となる血液凝固因子産生能や、解毒代謝能の指標となる殺鼠剤代謝産物の測定。 3. サブテーマ 2 で取得した生体データとの比較による、試験管内評価系の有用性の検証。 4. 細胞における性ホルモン分泌能解析を通じた、生殖・発生毒性評価への応用可能性の検討し、汚染物質による内分泌攪乱作用の評価法としての培養細胞の有用性を明らかにする。

サブテーマ 2	「個体レベルにおける環境汚染物質の影響評価に関する研究」
サブテーマ 2 実施機関	北海道大学、北里大学

サブテーマ 2 目標	サブテーマ 1 細胞評価系の精度を評価するため、殺鼠剤の生体レベルにおける感受性情報を取得する。以下の3点を具体的な目標とする。 1. 爬虫類におけるバイオマーカー測定法の確立（ウミガメは主たる実験動物であるラット等哺乳類での測定法が適用できない可能性が高いため） 2. ウミガメ、ラット・クマネズミへ殺鼠剤（ダイファシノン）の投与試験を実施し、殺鼠剤投与後のウミガメ・ラットにおけるバイオマーカーの動態を解析する。 3. この個体レベルでのバイオマーカープロファイルと、サブテーマ 1 の細胞系で得られたパラメーターを比較し、細胞系の有用性を評価し、殺鼠剤の野生動物への毒性影響評価に細胞を用いた評価が有用であることを示す。加えて、これら2つの実験結果の数理解析を通し、細胞系の実測値から個体レベルの感受性評価の予測も試みる。
------------	---

4. 研究開発内容

＜【サブテーマ 1】「培養細胞を用いた環境汚染物質の細胞影響評価に関する研究」の研究開発内容＞

サブテーマ 1 では、培養細胞を用いたウミガメ類の殺鼠剤の影響評価系構築と評価を進めた。2021年度(初年度目)は、ウミガメ、クマネズミ、ラットの細胞の取得と、それらを用いた不死化細胞の樹立と、その性質解析を進めた。2022年度(2年度目)は前年度樹立した不死化細胞を用いた曝露実験を実施し、血液凝固因子産生に関する解析や、細胞毒性等を解析した。また、父島属島と母島における駆除対象個体群の殺鼠剤耐性変異の有無の解析を進めた。2023年度(3年度目)は、内分泌に関連するパラメータを解析するとともに、生体データとの比較を実施した(図2)。

＜【サブテーマ 2】「個体レベルにおける環境汚染物質の影響評価に関する研究」の研究開発内容＞

サブテーマ 2 ではアオウミガメの殺鼠剤曝露のバイオマーカー測定法の開発とアオウミガメ、ラットとクマネズミへのダイファシノン投与試験およびその解析を実施した。2021年度(初年度目)は、アオウミガメの抗凝血性殺鼠剤の評価において必須であるプロトロンビン時間(PT)(血液凝固時間の指標)測定方法の開発、齧歯類(小笠原諸島父島で捕獲した野生クマネズミ及び、比較対象として一般的な実験用ラット(SDラット)とイカリ消毒株式会社より譲渡されたクマネズミクロードコロニー(野生型、殺鼠剤抵抗性型)の合計4系統)のダイファシノン投与試験と、ダイファシノンPK/PD解析等を実施した。2022年度(2年度目)は、アオウミガメにおけるダイファシノン投与後の血液凝固時間測定(前年度開発したPT測定方法を利用)とダイファシノン薬物動態/薬力学的(PK/PD)解析、前年度に引き続き齧歯類のダイファシノン投与後のダイファシノンPK/PD解析を進めた。2023年度(3年度目)は、アオウミガメでの生殖毒性評価法の確立及び、殺鼠剤の与える影響を評価、ラットのデータを元にした殺鼠剤の薬効予測数理モデルの構築と、細胞の実測値から個体レベルの感受性を予測する数理モデルの構築を進めた(図2)。

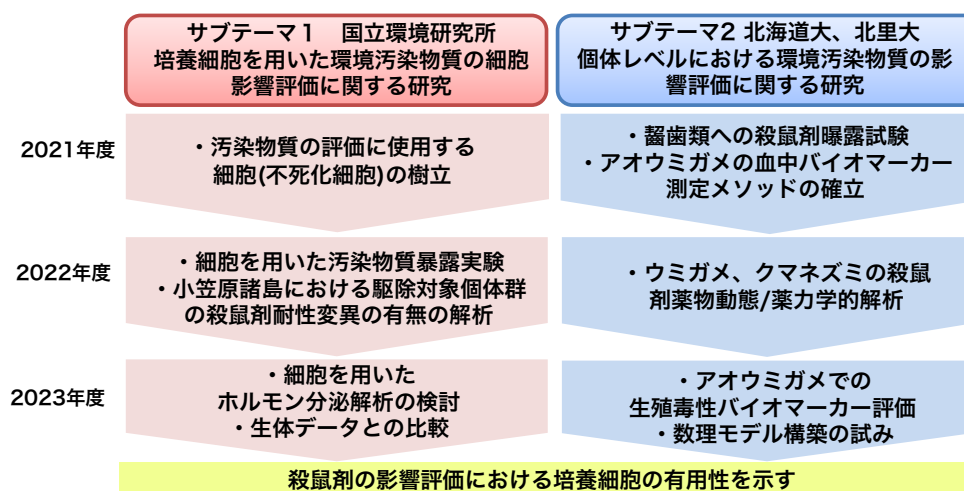


図2 研究開発内容

5. 結果及び考察

＜【サブテーマ1】「培養細胞を用いた環境汚染物質の細胞影響評価に関する研究」結果及び考察＞

5.1. ウミガメ、クマネズミ、ラットの細胞の取得

本研究では、第一にアオウミガメ、クマネズミ、ラットの体細胞の取得を試み、いずれも細胞の取得に成功した。培養条件は、クマネズミとラットに関しては、通常の哺乳類体細胞の培養条件（培地：DMEM+10%FBS、37℃、5%CO₂）で問題なく培養可能であった。一方で、アオウミガメに関しては、同条件では培養が困難であった。条件検討により、基礎培地としてRPMI1640が適していること、また温度に関しては培養温度を30℃以下にするとアオウミガメの体細胞を培養可能であることが明らかになった。また、33℃以上になると細胞生存率の低下が確認され、その原因はアポトーシスであることが明らかになった。本研究では、細胞の取得および培養条件の探索にも成功した。

5.2. 不死化細胞の樹立と、その性質解析

本研究では、細胞の条件を揃えるため、細胞培養ストレスによる細胞老化を無効化できる不死化細胞の利用を計画した。本研究では、細胞周期関連因子に着目して、不死化細胞の樹立を試みた。細胞周期は、ヒトから酵母まで広く保存されている機構である。加えて、導入予定の遺伝子のアミノ酸配列はヒトと爬虫類でも相同性が高く、アオウミガメにおいても有用であると考えられた。他方、哺乳類の不死化細胞の樹立において一般的に使用されるウイルス性がん遺伝子（SV40Tなど）は、もとの細胞の染色体が多倍体（4倍体）化し、元の細胞の性質から大きく変化することが知られている。本研究で使用した細胞周期関連因子は、主要ながん抑制遺伝子であるp53が野生型を維持可能であり、もとの細胞の性質に近い不死化細胞の樹立が可能である。この様な背景のもと、本研究では細胞周期関連因子を導入することで不死化細胞の樹立を試みた。

本研究では、アオウミガメ、クマネズミ、ラットの体細胞に遺伝子を導入して、遺伝子導入細胞を作製した。細胞増殖に関して、遺伝子導入細胞と遺伝子を導入していない初代培養細胞と比較解析を実施したところ、遺伝子導入細胞で活発かつ安定した細胞増殖が認められた。この結果は、不死化細胞が示す性質と一致する。また、遺伝子導入細胞では細胞増殖解析期間中、安定して高い細胞生存率を示し、この結果も不死化細胞の性質と一致した。体細胞は細胞老化現象により細胞の増殖が停止する。そこで、培養後期における初代培養細胞と遺伝子導入細胞を細胞老化マーカー（senescence-associated beta-galactosidase）で染色した。解析の結果、初代培養細胞では、細胞老化が確認されたが、遺伝子導入細胞では確認されなかった。この結果は、遺伝子導入細胞が細胞老化現象を回避できていることを示している。以上の結果から、本研究ではアオウミガメ、クマネズミ、ラットの不死化細胞の樹立に成功した。続いて、本研究では樹立した細胞の染色体の核型に関しても解析を実施した。本研究で樹立した不死化細胞は、染色体不安定性（多倍体化）を回避し、正常核型（アオウミガメ 2n=56, クマネズミ 2n=42, ラット 2n=42）が維持できていることが明らかになった。以上の結果から、本研究では、細胞周期関連因子を用いることで、元の細胞の性質に比較的近いアオウミガメ、クマネズミ、ラットの不死化細胞の樹立に成功した。本研究では、同細胞を曝露実験に利用する。

5.3. 細胞への殺鼠剤の曝露による血液凝固因子に関する解析

小笠原地域で使用されている抗凝血性殺鼠剤ダイファシノン（vitamin K epoxide reductase, VKOR）を阻害することで、血液凝固因子の生成が抑制される。その結果、出血しやすくなることで駆除対象種が致命に至る機構の殺鼠剤である（図3）。

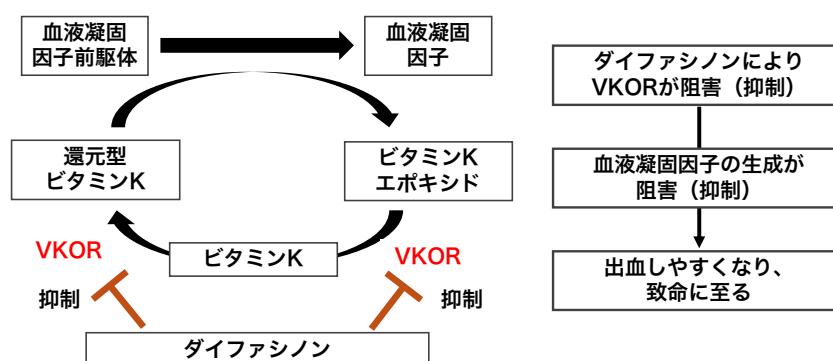


図3 ダイファシノンによるVKORの阻害と血液凝固因子産生抑制の概略図

そこで、本研究ではダイファシノンの曝露による血液凝固因子産生への影響の種差を明らかにするため、作製したアオウミガメや齧歯類の不活化細胞を用いたVKORのmRNA発現解析を通じて、ダイファシノンによるVKORの阻害効果の種差を解析した。培養細胞を用いた曝露実験の際に、血清の影響を小さくするために、血清濃度を低くする必要がある。Opti-MEMは低血清培養に対応した基礎培地であるため、本研究において基礎培地として使用した。

曝露試験の結果、ラット、クマネズミはダイファシノンの曝露量依存的に、VKORのmRNAの発現量が大幅に減少した。一方で、アオウミガメではクマネズミやラットと比較して、VKORのmRNA発現量の減少は緩やかであった。また、経時的解析を実施した結果、ラット、クマネズミでは、ダイファシノン曝露後、経時的にVKORの発現量の低下が認められたが、アオウミガメではVKORの発現が維持された。この結果は、後述するサブテーマ2で解析したアオウミガメと齧歯類の生体における血液凝固時間の経時的変化の比較に近い結果である。

5.4. 細胞への殺鼠剤の曝露後の網羅的遺伝子発現解析

次に、殺鼠剤ダイファシノンの試験管内での曝露による影響をより詳細に明らかにするために、樹立した不活化細胞へダイファシノン曝露後の網羅的遺伝子発現解析を進めた。具体的には、殺鼠剤ダイファシノン0 μ M、100 μ Mを曝露し、24時間後にRNAを抽出し、同RNAを用いて網羅的遺伝子発現解析（RNA-seq）を実施した。なお、細胞培養は、前述と同様にOpti-MEMを基礎培地とした。解析のフローは図4に記す。

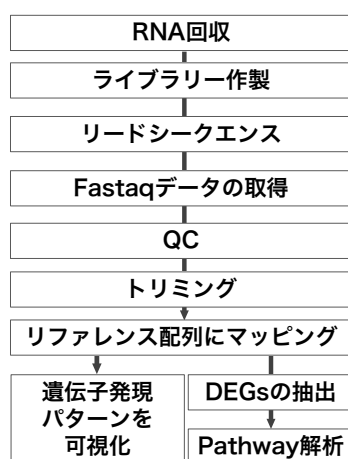


図4 RNA-seqの解析フロー

RNA-seq解析を実施した結果を用いて遺伝子発現パターンを可視化した結果、ダイファシノンの曝露前後で大きく遺伝子発現プロファイルが変動していることが明らかになった（図5）。

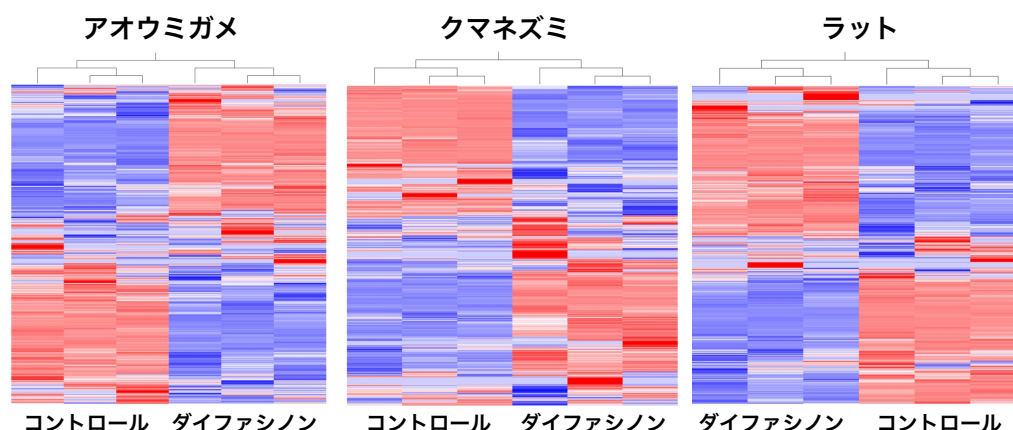


図5 ヒートマップによる全遺伝子の発現パターンの可視化

次に、殺鼠剤ダイファシノンを曝露していない細胞 ($0\mu\text{M}$; コントロール) と、曝露した細胞 ($100\mu\text{M}$ 曝露) との間で、特に変動の大きい遺伝子 (DEGs, Differentially Expressed Genes) を数学的手法により抽出した。具体的には、両群間の検定を実施し、 $\text{FDR} < 0.01$ である遺伝子を抽出した。さらにその中から、RNA-seq解析において100counts以上の遺伝子を抽出し、その中でFDR値が小さい順に1000遺伝子をDEGsとした。DEGsを解析ツールであるDAVIDを用いて、活発に変動している分子経路を洗い出した (pathway解析)。解析の結果、様々な経路が候補としてヒットしたが、アオウミガメ、ラット、クマネズミに共通して、細胞増殖関連経路と内分泌関連経路が活発に変動する候補経路としてリストされた。この結果から、殺鼠剤の曝露は、細胞増殖や内分泌関連に影響を与えている可能性があることが示唆される。

5.5. 細胞の代謝解析

次に代謝産物の測定を進めた。不死化細胞のもととなる線維芽細胞は、肝細胞のように高い代謝能力は有していないと考えられ、サブテーマ2で測定したダイファシノンの代謝物である水酸化ダイファシノンの測定は困難である。本研究では線維芽細胞でも測定可能な、NADPHとNADP+の比による代謝解析の利用を検討することとした。代謝酵素P450は、薬剤の代謝における主要な酵素であるが、代謝の際にNADPHをNADPに変化させ、薬物を代謝することが知られている。本研究では、同解析の測定値による代謝に関するパラメーターの取得を試みた。

本研究では、殺鼠剤ダイファシノンを曝露していない細胞 ($0\mu\text{M}$; コントロール) と、曝露した細胞 ($100\mu\text{M}$ 曝露) との間で比較を進めた。測定にはNADP/NADPH Assay Kit-WST (DOJINDO) を使用した。測定の結果、クマネズミとラットでは、ダイファシノンを曝露した細胞でNADPの値が高値であった。一方で、アオウミガメは、ダイファシノンの曝露後にNADPの値の上昇は確認できなかった。ダイファシノン曝露による代謝に関するパラメーターは、controlを1とした平均値ではクマネズミ、ラット、アオウミガメの順で高値を示した。この結果は、後述する生体内における水酸化ダイファシノンの生成の種差と同じ順序となった。バラツキも大きく、本研究だけで結論づけることは難しく今後検討が必要であるが、本パラメーターを代謝のパラメーターとして使用できる可能性が示唆された。

5.6. 細胞への殺鼠剤の曝露による細胞毒性評価

次に、ダイファシノン曝露後の細胞数の変化に関して解析を進めた。前述の網羅的遺伝子発現解析で、ダイファシノンの曝露により、細胞増殖に関連する経路が活発に変動していることが明らかになっており、ダイファシノンの曝露と細胞数の関係性が示唆される。解析には、CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS) (Promega) を使用した。曝露濃度ごとにダイファシノン曝露後の細胞数を解析した結果、アオウミガメでは高濃度曝露において、クマネズミ、ラットと比較して、一定の細胞数が維持された。次に、ダイファシノン ($100\mu\text{M}$) 曝露後の経時的解析の結果におい

ては、クマネズミ、ラットはダイファシノン曝露後に細胞数が減少するが、アオウミガメではダイファシノン曝露後にあまり変化しない結果が得られた。これらの結果は、2つの可能性が示唆される。一つ目は、アオウミガメは細胞レベルでダイファシノンに対して頑健である可能性、二つ目は細胞レベルで代謝が遅く速やかに細胞数へ影響が出ていない可能性である。

次に、本研究では細胞毒性に関して解析を進めた。解析には、CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay (Promega) を使用した。結果、アオウミガメにおいても、クマネズミやラットと同様の細胞毒性が確認された。これらの結果から、アオウミガメは細胞レベルにおいて代謝が遅く、細胞数の変動に速やかに影響が認められない可能性が考えられる。後述する生体レベルの解析においても、アオウミガメでは代謝が遅い結果が出ており、本結論を支持している。

細胞数の変化に関する解析は細胞を用いた評価研究の強みであると共に、比較的容易に解析可能である。本研究を通じて、化合物影響予測において、細胞数の変化をパラメーターの一つとできる可能性が示された。

5.7. 生体データとの比較

本研究で取得した薬効や代謝に関するパラメーターに関して、下表に生体と細胞での比較をまとめる(表1)。なお、生体の結果は、後述するサブテーマ2の結果である。

表1 薬効・代謝の細胞と生体データのまとめ

	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	NADPH, NADP比	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	クマネズミ>ラット >>>アオウミガメ	合致
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

本研究では、薬効・代謝の両指標において、細胞レベルの結果と後述する生体における結果が合致した。この結果は、現実的に細胞レベルで取得可能なパラメーターで、生体レベルの応答性の予測ができる可能性を示すものである。特に、殺鼠剤による非標的種への毒性評価において、薬効は致命に直結するパラメーターである。本研究では、サブテーマ2にて、数学的に薬効に関する細胞の結果(VKORのmRNA発現)と生体における応答性の関係を解析し、数学的に妥当性の検証も行った。

5.8. 細胞への殺鼠剤の曝露後のステロイドホルモン合成への影響

本研究では、網羅的遺伝子発現解析の結果、アオウミガメでは細胞でステロイド合成経路が大きく変動する結果が得られた。同経路にマッピングした7遺伝子中6遺伝子で殺鼠剤ダイファシノンの曝露により、遺伝子発現が低下する結果が得られた。後述する生体データにおいて、アオウミガメはダイファシノンの曝露により、ステロイドホルモンの合成が抑制される結果が得られている。この結果は、細胞レベルの結果を支持する結果と考えられる。この結果から、汚染物質による内分泌攪乱作用の評価法としての培養細胞は一定の有用性があると考えられ、生殖・発生毒性評価への応用も検討できると考えられる。

5.9. 細胞への殺鼠剤の曝露後の内分泌関連遺伝子発現の変動解析

前述の網羅的遺伝子発現解析において、変動の大きい遺伝子(DGEs)として抽出された遺伝子の中から、内分泌に関連する遺伝子を抽出したところ、Gnrh1(性腺刺激ホルモン放出ホルモン)とTrhde(甲状腺刺激ホルモン分解酵素)において、曝露後に大きな変動が認められた。そこで、ダイファシノン曝露後のこれらの遺伝子に関して経時的にreal-time PCRにて発現を解析した。結果、アオウミガメ、クマ

ネズミ、ラット共にGnrh1の経時的な上昇が確認された。また、同様にTrhdeに関しても解析を実施した。結果、アオウミガメとラットにおいて、経時的な減少が確認できたクマネズミに関しては、経時的な減少は確認されなかった。この原因として、元々のTrhde遺伝子の発現量がクマネズミの細胞で低いことが考えられる。ダイファシノンと同じ作用を持つワルファリンは、医薬品としてヒトの血栓塞栓症の治療および予防に使用されている。その際に、甲状腺機能亢進症、又は甲状腺機能低下症の患者には注意が必要とされている。また、同薬剤の妊娠の可能性のある女性や妊婦への使用も注意が必要とされている。これらの点は、本研究で得られた結果である、Gnrh1(性腺刺激ホルモン放出ホルモン)とTrhde(甲状腺刺激ホルモン分解酵素)の大きな変動と関係性が考えられる点である。本研究では、細胞を用いた評価を通じて、非標的種におけるこれらの内分泌機構への影響を検討する必要性を提示した。

5.10. 母島と父島属島駆除対象個体群の殺鼠剤耐性変異の有無の解析（追加内容）

新たに母島においても殺鼠剤が使用されることとなり、令和3年度に開催したアドバイザリーボード会合においてもアドバイザーから母島において殺鼠剤による駆除を検討しているネズミの殺鼠剤耐性変異に関する解析の提案を頂戴した。また、これらの地域に加えて、父島属島においても殺鼠剤が使用されているが、同地域に生息する個体に関しては確認が出来ていない。そこで、母島と父島属島における駆除耐性ネズミの殺鼠剤耐性変異の有無に関する解析を追加として実施することとなった。

父島属島におけるクマネズミの殺鼠剤抵抗性獲得の有無を明らかにするため野外個体の肝臓および尾の採材を行った。サンプリングは環境省により行われた。本研究では、先行研究において殺鼠剤抵抗性獲得のメカニズムとして報告のあるVKOR遺伝子解析を実施した。本研究で解析を進めた、4個体全てにおいてVKOR遺伝子に変異はなかった（図6）。この結果は、後述する父島におけるVKOR遺伝子解析と同様の結果であった。兄島では、殺鼠剤ダイファシノンの空中散布によるクマネズミの駆除が進められている。本研究では、殺鼠剤ダイファシノンの駆除圧がかかっているクマネズミにおいても、VKOR遺伝子における殺鼠剤耐性変異は確認されなかった。

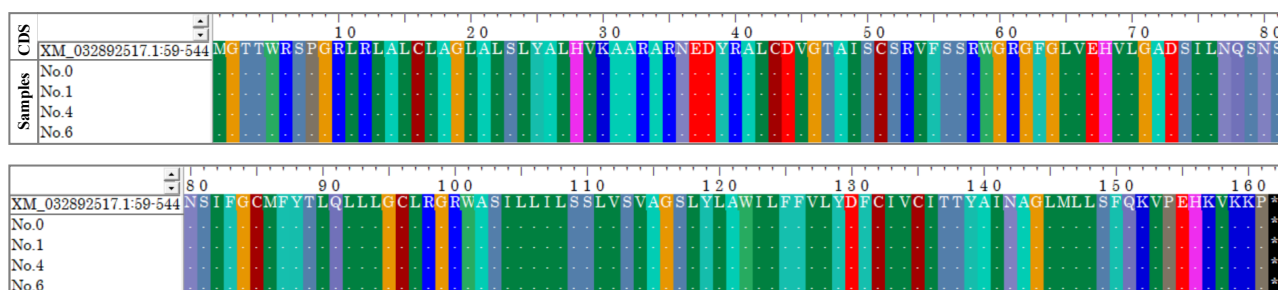


図6 VKOR遺伝子のアミノ酸レベルでの比較

次に、本研究では母島のドブネズミのVKOR遺伝子における殺鼠剤耐性変異を解析した。本研究では31個体に関して解析を実施し、全個体で殺鼠剤耐性変異は確認できなかった。母島ではドブネズミの個体数が増殖しており、今後、母島における殺鼠剤ダイファシノンを用いた外来ネズミ駆除が本格化する予定である。本研究の結果を踏まえ、母島における殺鼠剤ダイファシノンによる外来ネズミの駆除は大きな効果が得られると予想される。

兄島、母島、またサブテーマ2で実施した父島におけるVKORの変異解析に関する結果を表2にまとめる。本研究では解析した全ての個体でVKOR遺伝子における変異は認められなかった。この結果は、小笠原地域において、現状ダイファシノンによる外来ネズミ類の駆除が継続して効果が期待できることを示している。

表2 小笠原地域における殺鼠剤耐性変異解析の結果のまとめ

	解析個体数	VKOR変異個体数	VKOR変異なし個体数
父島	11	0	11
兄島	4	0	4
母島	31	0	31

＜【サブテーマ2】「個体レベルにおける環境汚染物質の影響評価に関する研究」結果及び考察＞

5.11. アオウミガメプロトロンビン時間(PT) (血液凝固時間の指標)測定方法の開発

アオウミガメの抗凝血性殺鼠剤の評価において、プロトロンビン時間 (PT) (血液凝固時間の指標) 測定は必須項目であるが、アオウミガメなどの爬虫類のPT測定方法はこれまで開発されていない。そこで本研究ではアオウミガメのPT測定方法の開発を試みた。PT測定では、トロンボプラスチン (TPL) が必要で、アオウミガメ由来のトロンボプラスチンの利用が最善である。一方で、TPLは脳から抽出するが、新鮮なアオウミガメの脳の取得は簡単ではない。そこで予備試験として、入手が容易なヒト用市販試薬 (トロンボプラスチン：TPL) のカメ類への適用の可能性を健康なスッポン (雄、成体) の血漿を用いて検証した。結果、スッポン血漿は、ヒトコントロール血漿のPT標準値 (10～15秒) と比較して10倍近い高値 (103.4 ± 16.0 秒) を示した。この結果は、カメ類における正確なPTの測定にはヒト用試薬は不適であることを示している。

次にアオウミガメの近縁種で入手が現実的であるスッポンの脳由来の新鮮なTPLの利用を検討した。本研究では、スッポンから脳を採材し、そこからTPLを精製してPT測定に用いた。TPL精製に用いた動物の体重、脳重量及びTPL収量を以下に示した (表3、表4)。スッポン脳由来のTPLを用いてスッポン血漿のPTを測定した結果、ヒト用試薬では100秒を超えていたPTが、 10.8 ± 0.8 秒まで短縮し、測定感度が大幅に改善した (図7)。さらに、スッポン血漿とアオウミガメ血漿のPTを新鮮なスッポンTPLまたは輸送の関係で新鮮ではないアオウミガメTPLの使用による比較も実施した。スッポン血漿PTは、スッポン脳由来TPLでは 13.5 ± 0.7 秒であったのに対し、アオウミガメ脳由来TPLで測定すると 72.7 ± 50.4 秒となりTPLの違いにより大きな変化が認められた。一方で、アオウミガメの血漿は、スッポン脳由来のTPLでは 14.6 ± 0.8 秒、アオウミガメ脳由来のTPLでは 23.3 ± 2.6 秒となり、どちらのTPLを用いても大きな差は見られなかった (図8)。本研究では、入手が極めて困難なアオウミガメ由来の新鮮なTPLの代替として、現実的に入手可能なスッポンのTPLを用いることで、アオウミガメPT測定方法の開発に成功した。本研究では、この方法を用いて、血液凝固時間の解析を進めた。

表3 トロンボプラスチン精製のために用いたスッポンの情報

Lot	<i>Pelodiscus sinensis</i> Individual number	sex	Body weight (kg)	Brain weight (g)	Thromboplastin weight (mg)
1	9	male	0.9	0.60	185.4
	10		1.0	0.44	
	11		1.0	0.52	
	12		0.9	0.47	
	13		1.0	0.39	
	Mean		1.0	0.48	
	SD		0.1	0.08	
2	20	male ?	1.1	0.44	222.7
	21		1.1	0.56	
	22		0.9	0.50	
	23		0.9	0.39	
	24		0.9	0.42	
	25		1.0	0.58	
	26		1.0	0.47	
	27		1.0	0.33	
	Mean		1.0	0.46	
	SD		0.1	0.08	

表4 トロンボプラスチン精製のために用いたアオウミガメの情報

<i>Chelonia mydas</i> Individual Number	Sex	Head weight(kg)	Brain weight (g)	Thromboplastin weight (mg)
10	male	1.5	3.14	123.2
12	female	1.7	2.27	

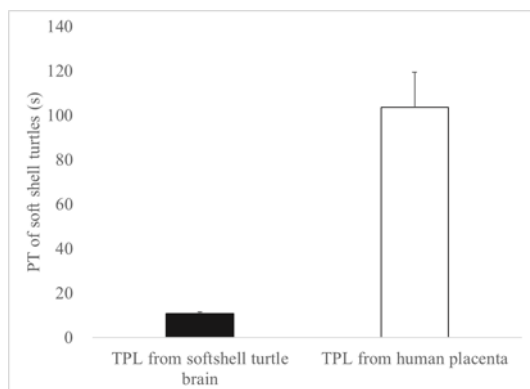


図7 スッポン脳由来及びヒト胎盤由来TPLを用いて測定したスッポン血漿PT

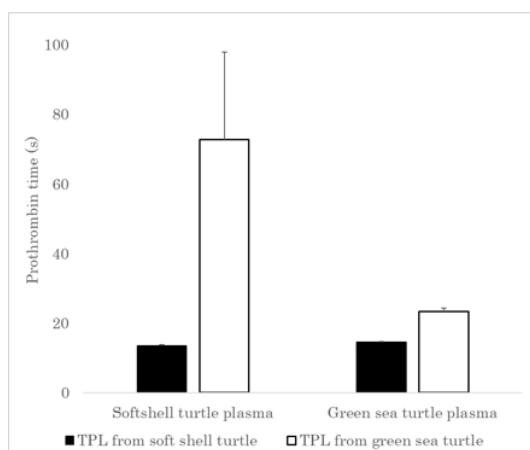


図8 スッポン脳由来及びウミガメ脳由来のTPLを用いて測定したスッポンとウミガメ血漿のPT

5. 12. アオウミガメにおけるダイファシノン投与後の血液凝固時間測定とダイファシノン薬物動態/薬力学的解析

小笠原海洋センターで飼育されているアオウミガメ（1歳齢、性別不明）を用いてダイファシノンの投与試験を実施した（冬季（2月）と夏季（7月）の2回実施）（図9）。ダイファシノンはコーンオイルに溶解させ、4 mg/kgの用量で静脈内投与した。投与後経時的に採血し（採血ポイント：0, 0.5, 1, 2, 4, 6, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 168, 216時間）、血漿をダイファシノンの濃度測定と血液凝固時間（プロトロンビン時間：PT）の測定に用いた。2月投与群においては、血中ダイファシノン濃度は投与0.5時間後にピークに達し（125.7±61.8μg/ml）、そこから投与216時間後まで緩やかな減少傾向を示した（1時間後：32.4±8.0μg/ml、216時間後：11.3±1.5μg/ml）。投与0.5時間後に一部の個体で高濃度のダイファシノンが検出された原因として、採血時の手技的な問題が考えられる。本実験においては投与と採血を共に頸静脈より行ったため、投与0.5時間後の時点ではまだダイファシノンの一部が頸静脈付近に高濃度で貯留しており、そこから採血したことにより濃度が高く出たと推測される。一方7月投与群においては、血中ダイファシノン濃度は投与1時間後まで上昇し（0.5時間後：34.3±7.9μg/ml、1時間後：63.7±26.4μg/ml）、そこから2時間後にかけて急激に減少し（2時間後：17.5±3.5μg/ml）、その後投与216時間後まで徐々に減少した（4時間後：18.7±3.7μg/ml、216時間後：8.0±1.6μg/ml）。2月

投与群と7月投与群の間で最も異なる実験条件は水温である。気象庁が公開する海水温データによると、実験実施月の小笠原付近の水温は2月で約21℃、7月で約28℃であった。ウミガメは外温性動物であり、その深部体温は周囲の温度と比べて僅かに1℃前後高いだけであることが知られている。したがって2月投与群と7月投与群における体温の差は約7℃であると推測される。外温性動物のADMEは温度の影響を強く受ける。例えばスッポンの肝ミクロソームを用いた実験において、P450によるワルファリンの代謝能は5℃から30℃の間で温度依存性に上昇したという報告がある（Yamamura et al., 2021）。また魚類においても、抗菌薬の吸収と排泄速度が水温に応じて高まったという先行研究が存在する（Björklund and Bylund, 1990）。反対に温度の低下によって活性が増す酵素もあり、ワニにおいて cytochrome *c* oxidase と lactate dehydrogenase 活性が低温により代償性に活性化したという報告がある（Seebacher et al., 2003）。本研究においては、最終採血点（投与216時間後）でのダイファシノンの残存率（ピーク時に対する割合）に2月投与群と7月投与群で大きな差は見られなかった（2月投与群：9.0%、7月投与群：12.5%）。したがってダイファシノンの代謝と排泄に関しては、ウミガメは冬と夏の間の温度変化の影響を大きく受けることはないと考えられる。

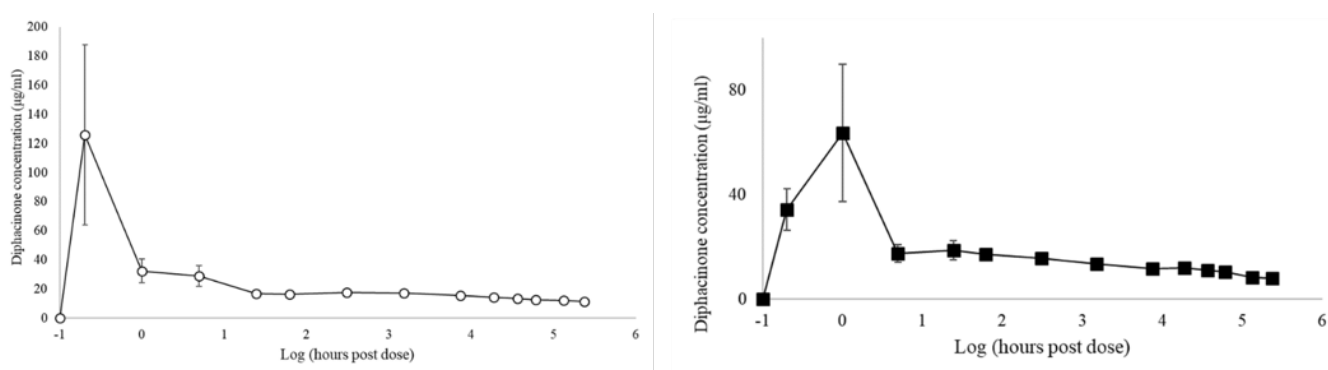


図9 ウミガメの血中におけるダイファシノン濃度の変動
(2月投与群、n=3、図左、7月投与群、n=3、図右)

ダイファシノンを投与したアオウミガメのPT値の変動は、2月投与群では実験期間を通してPTの大きな変化は認められず、統計学的にもコントロール（投与前：0時間）と比較して有意差は見られなかった（0時間後：21.2±5.9秒、216時間後：16.2±1.6秒）。一方で7月投与群では、経時的にPT値が増大し、216時間後には投与前の2倍近くまで延長し、統計学的にも有意であった（0時間：17.0 ±1.5秒、216時間：32.4 ± 2.1秒、Steel`s test, $p < 0.05$ ）（図10）。これらの結果から、少なくとも夏季期間中においては、ウミガメは摂取したダイファシノンによる血液凝固不全を呈する可能性が高いと考えられる。一般的に爬虫類は、体温が30℃前後の状態でも運動性が高くなることが知られている。活発な運動は外傷による出血のリスクを高め、その結果血液凝固因子の消費量が低体温時と比べて多くなる状況が考えられる。本研究における7月投与時の水温は約28℃であったため、実験に用いたウミガメにおいて上記のような理由から血液凝固因子が多く消費されていたことも、PTの延長を検出できた一因となった可能性がある。また2月投与群においては、今回の最終採血ポイントである216時間後より長い時間をかけてビタミンK依存性血液凝固因子が減少し、PTの延長として検出される可能性も否定できない。

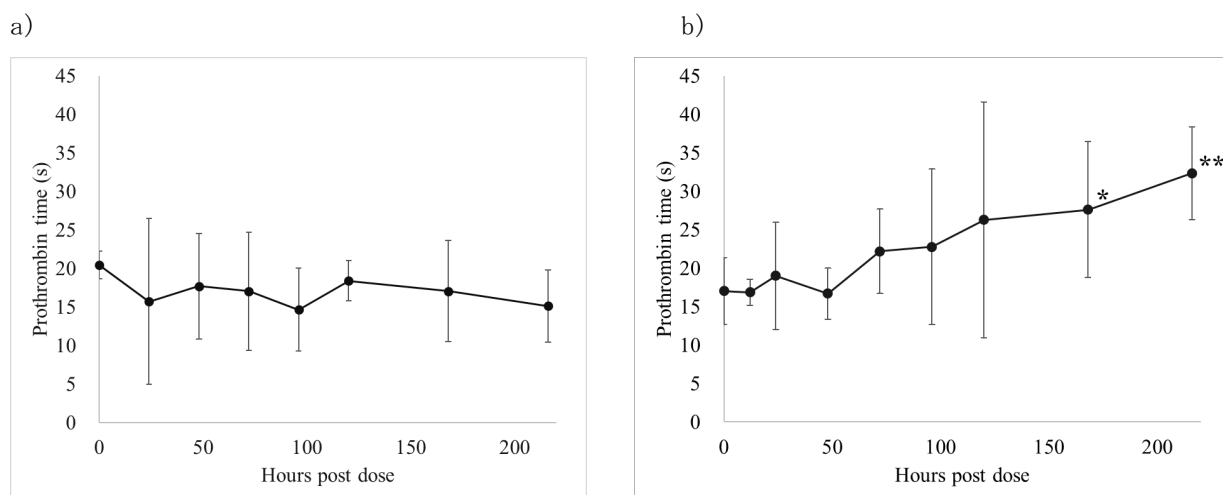


図10 ダイファシノン投与アオウミガメにおけるPTの変動 a) 2月投与群 (n=3) b) 7月投与群 (n=8)
データはノンパラメトリックなDunnett 検定で解析した。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ で有意差あり

アオウミガメの肝臓におけるダイファシノンの代謝能（水酸化能）を評価するため、ダイファシノンを基質として肝ミクロソームを用いた *in vitro* 代謝活性試験を実施した。比較対照として、SDラットの肝臓を使用して同様の実験を行った。その結果、アオウミガメの肝臓におけるダイファシノンの代謝能は、SDラットと比べて極めて低いことが示唆された（図11）。この結果は *in vivo* の投与試験においてウミガメ血中からのダイファシノンの減退と代謝物の出現速度が緩慢であった事実を支持している。

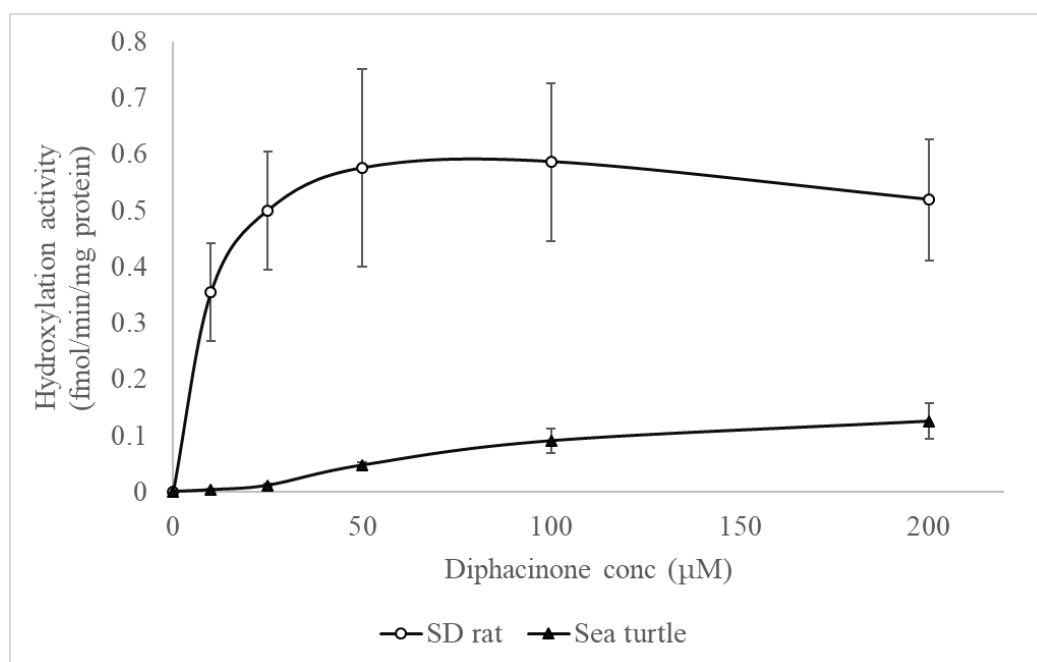


図11 アオウミガメとSDラットの肝ミクロソームにおけるダイファシノンの代謝能（水酸化能）

5.13. 殺鼠剤ダイファシノンによるアオウミガメの生殖毒性評価

ウミガメに対する殺鼠剤曝露による生殖毒性を評価するために、ダイファシノン投与前および投与後の血漿メタボローム・リピドーム解析および血漿ステロイドホルモン濃度解析を実施した。ダイファシノン投与後に変動する物質として6種類のメタボロームおよび4種類のリピドームが同定され、ダイファシノンのウミガメに対するアミノ酸、脂質代謝への影響を示唆した（表5）。

表5 血漿メタボローム・リピドーム解析・血漿ステロイドホルモン濃度解析

Compound name	Category	<i>p</i> (corr)	Up/down	KEGG/HMDB
1,5-Pentanediamine (cadaverine)	Metabolome	0.81	posi	C01672
L-Isoleucine	Metabolome	0.55	posi	C00407
2-Amino-1-phenylethanol (Phenylethanolamine)	Metabolome	0.19	posi	C02735
1-Methyl-L-histidine	Metabolome	0.07	posi	C01152
Methionine sulfoxide	Metabolome	0.03	posi	HMDB0002005
L-Phenylalanine	Metabolome	0.01	posi	C00079
Sterols	Lipidome	-0.83	nega	C00187
Ceramides	Lipidome	-0.44	nega	HMDB0004953
Cholesteryl ester	Lipidome	-0.05	nega	HMDB0000918
Triacylglycerol	Lipidome	0.03	posi	M00089

本研究では、ステロイドホルモン濃度解析においては、ストレス応答の指標として哺乳類で広く利用されるCortisolとCortisoneはウミガメでは全く検出できなかった。一方、Tetrahydrocortisone (THE) はダイファシノン投与後に明瞭な時間依存性の濃度低下が認められた (図12)。先行研究のdi-2-ethylhexyl phthalate (DEHP) を投与した雌マウスにおいてはCortisolとTHEの変動というストレス反応が観察され、上記のホルモンとその受容体の全体的な変化は、DEHPがホルモンのホメオスタシスを破壊し、その結果として泌乳能力が損なわれたことを示している (Hou et al. Sci Total Environ; 2022, 155813)。本研究で新たに明らかにしたTetrahydrocortisone (THE)の変動は、ダイファシノンが爬虫類における生殖毒性を引き起こす可能性を示すとともに、Tetrahydrocortisone (THE)は爬虫類の生殖毒性を検討する際の特異的な新規バイオマーカーとしての有用性が期待される。

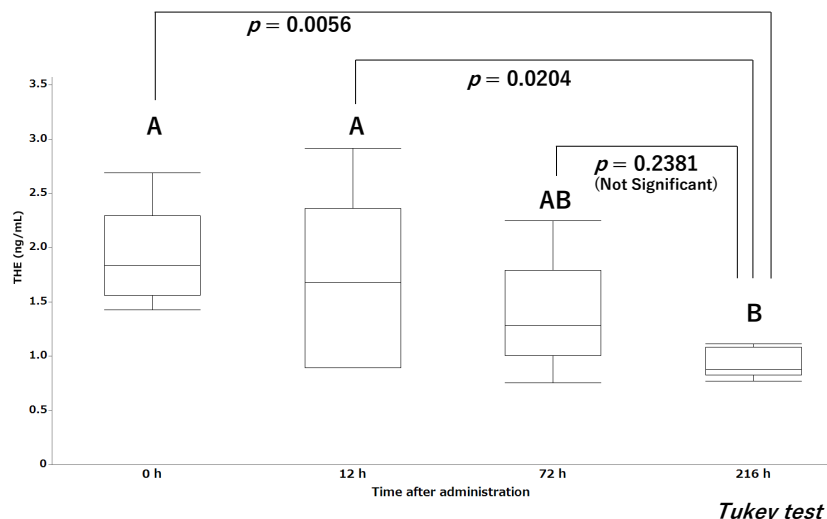


図12 ダイファシノン投与後のアオウミガメ血漿におけるTetrahydrocortisone (THE)濃度の経時変化

5.14. 野生のウミガメ個体の殺鼠剤モニタリング

AD会合でアドバイザーより提案頂いた野生のウミガメ個体の殺鼠剤モニタリングに関しては、2021年5月に食用捕殺された12個体の肝臓における殺鼠剤の濃度測定を実施した。濃度測定の結果、ダイファシノン、ワルファリン、第2世代抗凝固系殺鼠剤のいずれも定量下限未満 (< LOQ: Limit of Quantification) であった (表6)。

表6 ウミガメの肝臓における殺鼠剤濃度

個体番号	肝臓量(dw)	Warfarin	4'-OH Warfarin	6-OH Warfarin	7-OH Warfarin	8-OH Warfarin	10-OH Warfarin	Diphacinone	Brodifacoum	Bromadiolone	Coumatetralyl	Difenacoum	LOQ(抽出液中, ppb)	LOQ(乾燥肝臓中, ppb)
2021 CC 030	0.1 g	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	0.1	40
2021 CC 031	0.11 g	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	0.1	36.36
2021 CC 032	0.1 g	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	0.1	40
2021 CC 034	0.1 g	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	0.1	40
2021 CC 035	0.1 g	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	0.1	40
2021 CC 036	0.1 g	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	0.1	40
2021 CC 037	0.1 g	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	0.1	40
2021 CC 038	0.1 g	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	0.1	40
2021 CC 039	0.11 g	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	0.1	36.36
2021 CC 041	0.1 g	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	0.1	40
2021 CC 042	0.11 g	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	0.1	36.36
2021 CC 043	0.1 g	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	0.1	40

5. 15. 齧歯類のダイファシノン経口投与試験とダイファシノンPK/PD解析

齧歯類での殺鼠剤感受性評価に際し、バイオマーカーとしてビタミンK依存性血液凝固因子である血液凝固第IX因子（FIX）の抗体反応（ELISA）を用いた簡便な測定法を樹立した（図13）。図28-Aに示したFIXのタンパク質標準品を用いた検量線では、本法で定量した標準品希釈系列は0.1 ng/mLオーダーまで検出可能かつ高い直線性を示した。また、図28-Bでは近年国際的に汎用される培養細胞に殺鼠剤標的分子ビタミンKエポキシド還元酵素（VKOR）を発現させての殺鼠剤（ワルファリン）阻害試験の結果を示した。既法（凝固活性測定）とほぼ同質な阻害曲線を描画し、本法は凝固測定機器を用いない簡便法ながら既報と同様に培養細胞でのFIX測定に使用可能であることを示した（研究成果番号: 1, R. Sato & K. Watanabe et al., 2022）。

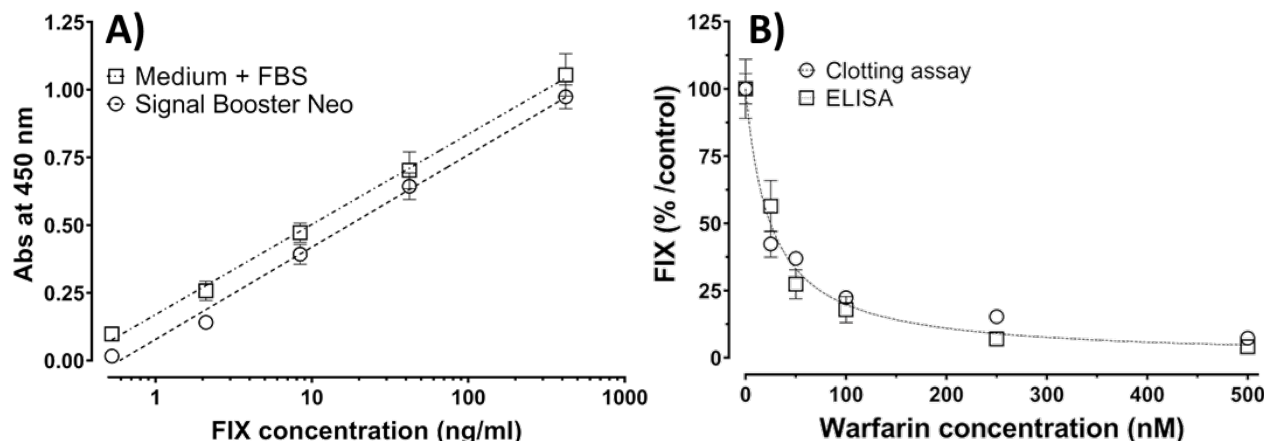


図13 ELISA法による血液凝固第IX因子(FIX)の測定。A) FIX標準品を用いた検量線。本法で定量した標準品希釈系列は $R^2 > 0.95$ 以上の高い直線性を示した。B) 培養細胞発現法による殺鼠剤（ワルファリン）阻害試験。

本研究では、父島で捕獲した野生クマネズミ、比較対象としてSDラット（N=6, ♂）、イカリ消毒株式会社技術研究所から譲渡された飼育クマネズミ（N=5, ♂）、殺鼠剤標的分子VKORに1アミノ酸変異（Lue76Pro）を有する殺鼠剤抵抗性クマネズミ（N=5, ♂）を用いてダイファシノン経口投与後の薬物動態・薬力学的（PK/PD）解析を実施した。ダイファシノンは5%アセトン含有PEG400に溶解し0.5 mg/kgで単回経口投与を実施した。野生クマネズミは、2022年の2月に小笠原諸島父島にて、かご罠を用いて捕獲した。合計11匹を捕獲し、うち8匹（♂6, ♀2）を投与試験に供試した。なお、残り3匹を無処置のまま吸入麻酔により安楽死し培養細胞用の体細胞採取に用いた。種判別については目視観察で形態学的に判断した結果、全てクマネズミであった。父島で捕獲したクマネズミの殺鼠剤耐性変異を確認するた

め、肝臓からRNAを抽出し、殺鼠剤標的分子VKORの遺伝子シーケンス解析を実施した。その結果、アミノ酸配列に影響を及ぼす変異は全個体で確認されずNCBI上の野生型配列と同一のアミノ酸配列を示し、殺鼠剤耐性変異が生じていないことを確認した（合計11匹）。クマネズミの週齢は水晶体の乾燥重量から推定した。イカリ消毒株式会社飼育クマネズミは 16.7 ± 5.1 週齢、抵抗性群は 10.7 ± 1.1 週齢、小笠原野生クマネズミは 10.6 ± 3.8 週齢であった。また、実験用SDラットは8週齢で購入し、2週間の馴化期間を経て10週齢で実験に供試した。

ダイファシノン投与後の一定時間後に尾静脈から採血し血液凝固時間（プロトロンビン時間：PT）をポータブル測定器コアグチェックXSで測定、残りを血漿を分離し血漿中ダイファシノン濃度を質量分析計で定量した。図14には投与後のダイファシノン投与後の薬効（PT）の経時的変化を示した。小笠原野生クマネズミ群（■）でも投与後に顕著な凝固時間の遅延が観察された一方で、SDラット（○）より飼育クマネズミ（▲）の方が、また飼育クマネズミ群よりは小笠原野生群の方が、血液凝固が遅延しづらい傾向を示した。この結果は、VKORの遺伝子変異が無い小笠原野生群において、抵抗性ネズミよりは薬効が強く発現するものの、飼育クマネズミよりも薬効が発現しづらい可能性を示すものである。この動態を定量的に比較しつつ統計解析における多重性の問題を最小化するために、時間-薬効曲線下面積（AUC）を算出しTukey検定を実施した（図14右）。小笠原野生群は、SDラットや飼育クマネズミの双方よりも有意に低いAUCを示した。この結果は、小笠原野生群は、SDラットや飼育クマネズミと比較してダイファシノンが効きにくいことを示唆している。

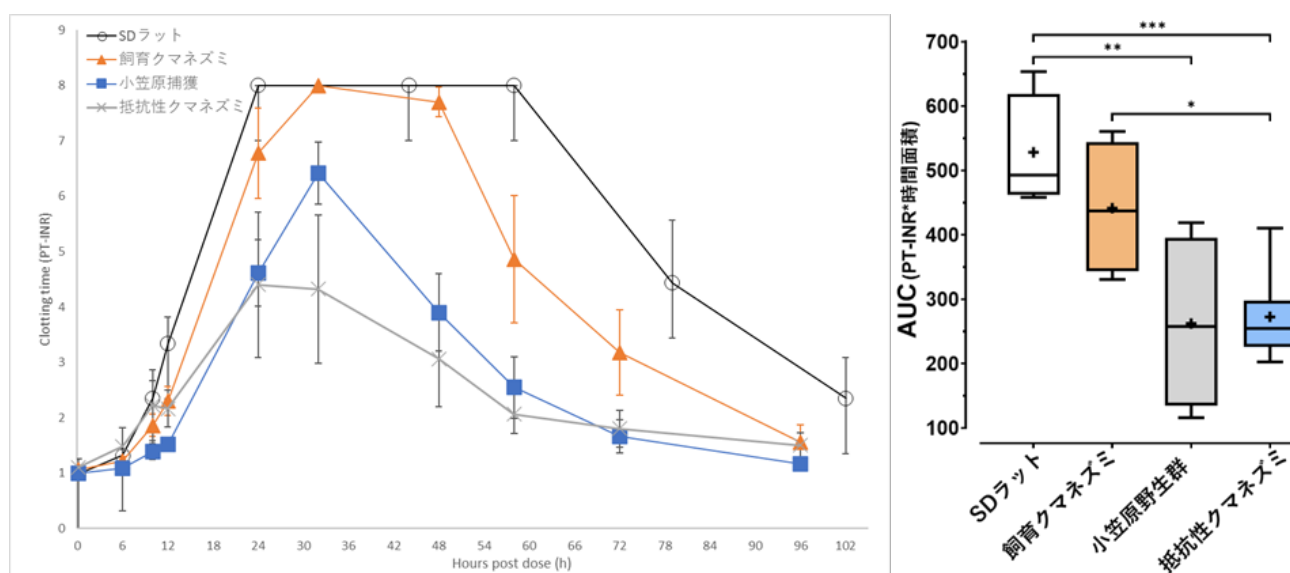


図14 齧歯類におけるダイファシノン投与後のPTの変動

ダイファシノン投与後の血漿中濃度推移は図17に示した。各群ともにダイファシノンの吸収は比較的穏やかであり、経口投与後6～10時間程度で最高濃度に達し、実験終了時の96時間後までにほぼ血中から消失した（図15）。

ダイファシノンの血漿中濃度-時間プロファイルを用い各個体ごとに薬物動態学的解析（ノンコーパントメント解析）を実施し薬物動態学的パラメーターを取得した（表7）。最高濃度及び血中存在量（AUC）は小笠原野生群及び飼育クマネズミ群で高値を示した。殺鼠剤抵抗性齧歯類の一部は殺鼠剤の高排泄能を示すことが知られているが、排泄能の指標となるC1やMRTといったパラメーターは小笠原野生群が一番低く、前述の凝固時間解析と相関しない結果となった。

他方、ダイファシノンは薬物代謝酵素シトクロムP450により水酸化され代謝される。そこで、図16に示すダイファシノンの代謝産物である水酸化ダイファシノンについても血漿中濃度を測定した。測定の結果、水酸化ダイファシノンの存在量（AUC（ $\mu\text{g}/\text{mL} \cdot \text{h}$ ））を算出するとSDラットで 45.2 ± 3.3 、飼育クマネズミで 60.0 ± 6.9 、小笠原野生群で 85.2 ± 13.3 、抵抗性群で 33.0 ± 2.6 であり小笠原野生群が高い傾向

を示した。また、クマネズミ3群は全体的にSDラットよりも代謝物の濃度上昇が早く、その中でも小笠原野生群が一番代謝物の上昇が早急であった。これらの結果から、迅速なダイファシノンの水酸化反応により、小笠原野生群において殺鼠剤ダイファシノンの薬効が低下している可能性が示唆される。

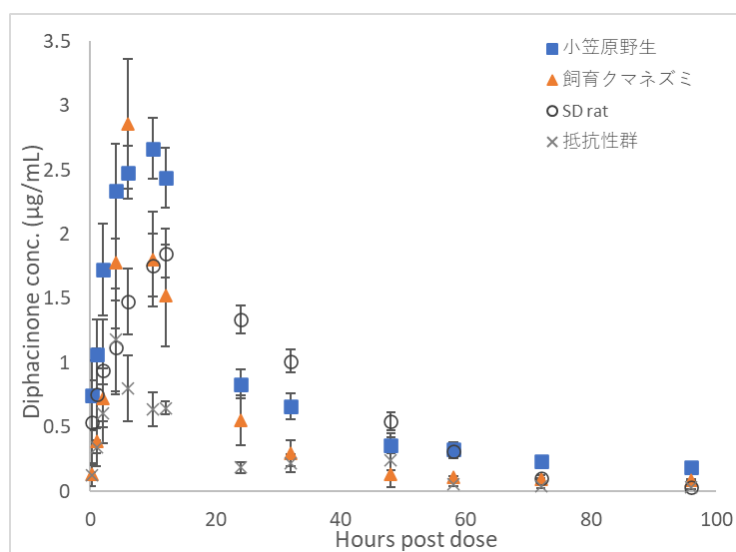


図15 齧歯類におけるダイファシノン投与後の薬物動態解析（血漿中ダイファシノン濃度-時間推移）。ここから算出した薬物動態学的パラメーターは表7に示した。

表7：ノンコーパントメント解析に基づくダイファシノン薬物動態パラメーター

Parameter	unit	SD rat	飼育クマネズミ	小笠原野生
Tmax（最高濃度到達時間）	h	10.8	6.0	8.0
Cmax（最高濃度）	µg/mL	1.7	2.9	3.0
AUC（濃度-時間曲線下面積）	µg/ml*h	54.0	42.5	72.7
MRT（平均滞留時間）	h	26.2	15.7	24.6
Vz/F（分布容積）	mL/kg	0.206	0.234	0.213
Cl/F（クリアランス）	mL/kg/h	0.010	0.015	0.007

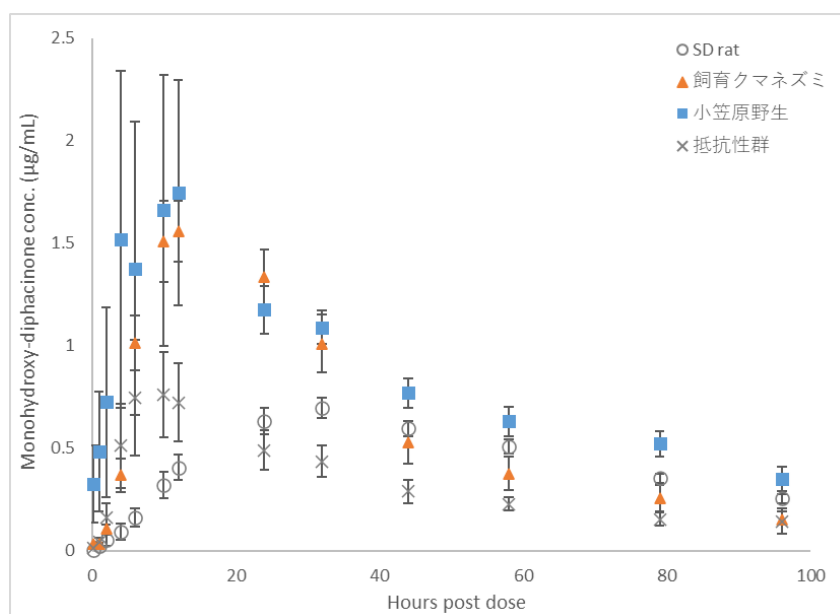


図16水酸化ダイファシノンの血漿中濃度推移。

殺鼠剤薬効のバイオマーカーであるFIXの活性を同様にダイファシノン曝露後の血漿を用い測定した（図17）。各群共に投与直後から血漿中FIX活性が減少した。PTの遅延が投与後10時間ほどから確認されたのと比較すると早期に変動しており、より鋭敏なバイオマーカーとして機能していると示唆される。また、群間で動態を比較すると、SDラットでは投与後24時間以降の活性は検出限界付近であり、実験終了時にわずかに上昇傾向を示し、ほぼ完全に活性が阻害されていた。一方、飼育クマネズミ群・小笠原野生群では活性阻害の程度はSDラットより軽度であり、投与後58時間以降から活性の回復傾向を示した。SDラットよりも飼育・野生クマネズミの方が阻害の程度が軽度であった傾向は凝固時間の変動（図17）とも同様のトレンドであり、本FIX測定がバイオマーカーとして有効であることが示唆される。

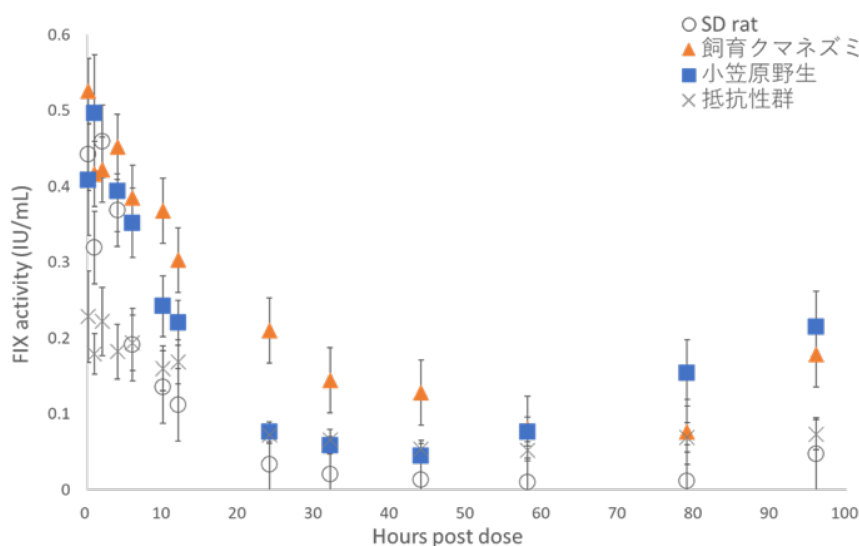


図17 ダイファシノン投与後の血漿中FIX活性推移。

ダイファシノンの標的分子VKORと代謝酵素P450は両方とも肝臓に局在するため、その毒性影響の評価には肝臓中濃度の推定が必要である。そこで、SDラットに上記PK/PD解析と同様にダイファシノン投与し、10分、6時間、24時間、48時間後に安楽死・肝臓を採取しその肝臓中濃度を測定した（図18）。

概ね血漿中濃度推移と一致した動態が得られたため、後述のPBPKモデリングの参照データとして用いた。また、濃度依存性の反応の変化を解析するため、上記投与群の半量（0.25 mg/kg）投与もSDラット6匹で実施済みである。

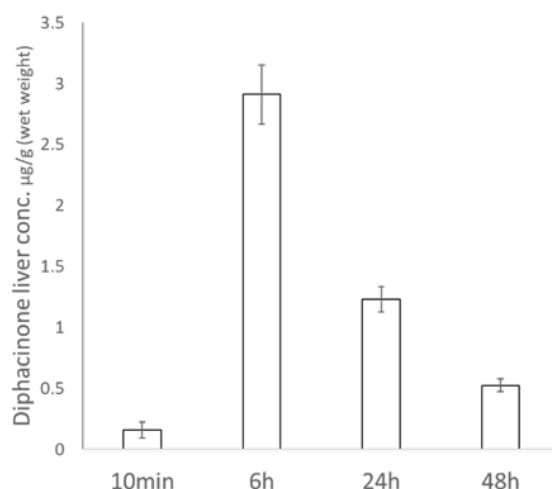


図18 SDラットにおける肝臓中ダイファシノン濃度の推移（N = 3）。

5. 16. 齧歯類におけるダイファシノンの薬物動態（PBPK）モデリング

本研究で比較した齧歯類4群のダイファシノン感受性系統差の生理学的な説明を試みるために、前述の実測データを用いた生理学的薬物動態（PBPK）モデリングをGastroPlusを用い実施した。ダイファシノンの物性値はGastroPlus内のモジュールADMET Predictor™のデフォルト条件で算出し、ダイファシノンの肝代謝活性値は図11の実測値を参考値とした。モデリングはコンパートメントモデルの設定で行い、Vc及びClはSDラット及び感受性群の実測値を使用した。その他生理学的パラメーターはGastroPlus®内蔵の実験用ラットの基準値を採用した。SDラットについてはソフトウェア内臓のデフォルト値のみでは排泄層のカーブは類似したが最高濃度のピークは実測値より大きく前倒しになった（緑破線、Initial）（図19-A）。胃通過時間をデフォルト値の0.25時間から5時間へと延長したところ実測値とほぼ完全に一致した（実線、Optimized）ため、この設定をクマネズミ群でも用いた。胃通過時間が長い理由として、麻酔下での投与に際し溶媒・潤滑剤として用いたPEG400の吸収遅延作用が考えられる。

次にこの設定を用いた感受性クマネズミのフィッティングを実施したが、これも実測値と乖離した。SDラットの分布容積(Vc)を下げ、クリアランスを上げてそれぞれ感受性クマネズミでの実測値に変更し、胃通過時間を5時間から4.5時間へ短縮したところ最良のフィッティングが得られた(図19-B)。胃通過時間の短縮・Vcの低下は、SDラット（ドブネズミ）とクマネズミの体格差による臓器の大きさの違いが原因と考えられる。この結果から、感受性群での高Cmaxは消化器官の大きさによる吸収速度の差が原因だと考えられる。また、排泄相のフィッティングにクリアランス値を上昇させたことからクマネズミの方がドブネズミよりも排泄能が高いことが支持される。抵抗性群でのモデリングでは、感受性クマネズミのパラメーターから肝代謝活性値の上昇（Vmaxを4倍、Kmを0.65倍）させ、腸管での初回通過効果を0%から5%へと変更した際に最良のフィッティングが得られた(図19-C)。以上から抵抗性群のPK動態は他群と大きく異なる動態を示したが、その原因は肝CYPによる高排泄能及び腸管での代謝の可能性が示唆された。実際にこの抵抗性コロニーを用いたワルファリン肝灌流試験でも抵抗性群は感受性群よりも大幅に高い肝代謝能を示しており、本知見とも一致する。

クマネズミ小笠原野生群のモデリングでは、代謝酵素の活性値の変更はフィッティングの向上に寄与しなかったが、体重1 gあたりのクリアランスを感受性クマネズミの値から0.03下げ、胃通過時間を4.5時間から5.5時間へ変更したところ、比較的良好な結果が得られた(図19-D)。以上から小笠原野生群はダイファシノン代謝能が低く、全身クリアランスが低下していると考えられる。また、野生群での

T_{max}再現に際し感受性群より胃通過時間を1時間延ばしているが、この原因として感受性クマネズミが粉餌を摂取しているのに対し、野生群は捕獲前に繊維質の多い植物性の食餌を摂っているために消化管内に繊維質が残っており、吸収が遅延した可能性が考えられる他、食餌内容への適応のために腸管が長くなっている可能性も考えられる。以上から、野生群のPK動態は緩徐な吸収と感受性群よりもやや低い排泄能で特徴付けられると言える。(研究成果番号:3, K. Takeda et al., 2024)

本研究では、培養細胞のデータを用いた生体データの予測プログラムの構築にも取り組んだ。

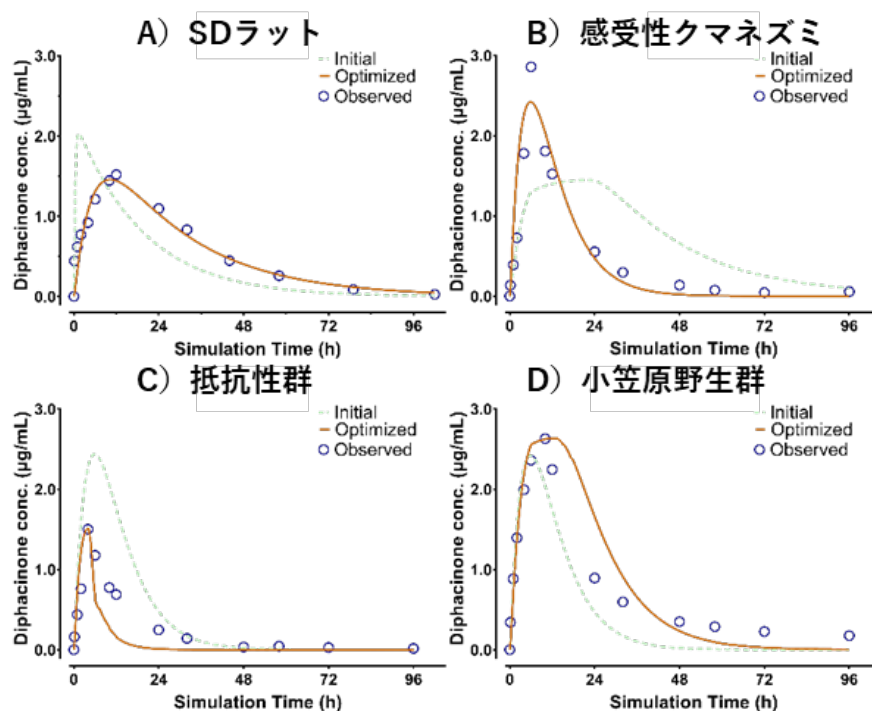


図19 PBPKモデリング。○は実測値 (Observed)、緑の破線はデフォルト値を用いたモデリング結果 (Initial)、青の実線はパラメーター最適化を施したモデリング結果 (Optimized) を示す。図はK. Takeda et al., Sensitivity Assessment of Diphacinone by Pharmacokinetic Analysis in Invasive Black Rats in the Bonin (Ogasawara) Archipelago, Japan. SSRNプレプリント公開版より一部改変の上引用 <https://ssrn.com/abstract=4557913> or <http://dx.doi.org/10.2139/ssrn.4557913>

6. 目標の達成状況と環境政策等への貢献

(1) 研究目標の達成状況

＜全体の達成状況＞・・・・・・・・・・・・・・・・ 1. 目標を大きく上回る成果をあげた

「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」

全体目標	全体の達成状況
1. 野生動物の汚染物質影響評価における細胞評価系の構築 2. ウミガメの個体レベルでの汚染物質曝露後の評価指標の開発 3. 個体データとの比較による細胞評価系の有用性の評価 本研究では、簡便・迅速かつ非侵襲的な野生動物に対する汚染物質の影響評価を実現させるため、分野横断的な手法を用いて環境汚染物質の新規評価系構築と有用性の検証を目標とする。具体的には、本研究では生息域外保全の一環で国立環境研究所に保存されている培養細胞に着目する。培養細胞は、死亡個体から取得可能であり、個体レベルの実験が難しい野生動物において、実験可能な貴重な生物資源である。本研究は、野生動物に対する汚染物質の影響評価において「調査研究」「近縁種実験動物研究」に続く、「細胞研究」の実現と有用性の検証を目標にする。汚染物質による野生動物への毒性影響は、次の様に概念的に定義されている。[対象種への毒性影響＝感受性（の種差）×曝露量]。したがって、種ごとの汚染物質に対する感受性の解明は野生動物における毒性影響評価において重要な要因である。一方で、感受性に関しては曝露実験による評価が必要であるが、野生動物の個体を用いた曝露実験は不可能である。そこで本提案では、殺鼠剤をモデルに、非侵襲的評価である細胞実験を通じて野生動物の汚染物質に対する感受性の種差を明らかにし、細胞実験により毒性影響の評価精度が向上することを提示する。さらに、細胞実験による汚染物質に対する感受性の種差の解明が有用であることを提示できれば、新たに政策として殺鼠剤を使用する際に、事前に非対象種への影響が予測可能になる。したがって、非対象種への毒性影響が少ない殺鼠剤の選定に有益な情報を環境行政に提示	（全体の達成状況と具体的な理由・根拠） 全体目標として掲げた3点に関して達成したと考えている。 1. に関しては、本研究ではアオウミガメ等の細胞に遺伝子を導入し、安定培養可能な不死化細胞の作製に成功した(サブテーマ1目標1)。また、アオウミガメの培養条件に関しても培養温度を低温とすることで最適化し、安定して長期間アオウミガメの細胞が利用することを可能にした(サブテーマ1目標1)。樹立した不死化細胞は、殺鼠剤の評価のみならず、他の汚染物質の評価への応用が期待される。 2. に関しては、アオウミガメにおける抗凝血性殺鼠剤の薬効評価指標であるプロトロンビン時間（PT）（血液凝固時間の指標）の測定法の開発に成功した(サブテーマ2目標1)。また、爬虫類における生殖毒性マーカーとして、Tetrahydrocortisone (THE)が有用である可能性も示した(サブテーマ2目標1)。今後、爬虫類の生殖毒性を検討する際の特異的なバイオマーカーとして、THEの利用が期待でき、爬虫類における生殖毒性研究に貢献できるマーカーが開発できたと考えている。 3. に関しては、細胞レベルと個体レベルでデータを取得し(サブテーマ1目標2、サブテーマ2目標2)、細胞レベルで取得したデータの多くが生体レベルを模倣する結果が得られた。また、今回比較した3種（アオウミガメ、クマネズミ、ラット）間の応答性の順番は概ね、細胞と個体で同じであった(サブテーマ1目標3)。さらに、数理モデルを使うことで、数学的に細胞の殺鼠剤に対する応答性は、生体における応答性を模倣していることが示された(サブテーマ2目標3)。したがって、数学的論拠を持って、培養細胞を用いた生体レベルの殺鼠剤影響予測が一定の有用性があることが示された。なお、計画書では数理モデルは試みとしていたが、実際に解析をすると極めて良好な結果を得ることができた。加えて、本研究でSDラットを通じて開発した殺鼠剤影響予測プログラムは、多種へ応用することも可能であると考えている。 その他、小笠原地域の外来ネズミ類における殺鼠剤耐性変異の有無に関する解析(図6、表2)、小笠原地域のアオウミガメにおける殺鼠剤の蓄積に関

できる。

本研究では、爬虫類であるウミガメ類に対する殺鼠剤の影響評価をモデルとする。殺鼠剤は、侵略的外来種対策のため、政策として使用され一定の成果があげられている。したがって、今後も外来齧歯類の対策として政策使用が計画されている。このような背景から、殺鼠剤は環境行政への貢献を目標とする本研究において、モデルとして非常に意義がある汚染物質である。本研究において、動物モデルとするウミガメは、保護対象として国民的な関心が高いだけではなく、哺乳類や鳥類と比べて駆除対象である外来齧歯類から進化的に遠いため、汚染物質に対する生理学的応答が大きく異なる可能性がある。一方で、これまでウミガメに対する殺鼠剤の影響はほとんど評価されていない。一つの大きな理由は、個体レベルの実験が難しい点である。本研究では、汚染物質影響評価の重要性をご説明し、小笠原諸島でウミガメの保全を進めるNPO法人エバーラスティング・ネイチャー（ELNA）の全面協力を得ることに成功し、個体レベルの実験が可能になった。そこで本研究では、ウミガメをモデルに設定し、実際に小笠原諸島で使用されている抗凝血性殺鼠剤であるダイファシノン一種類に対するウミガメ、ラット、小笠原産クマネズミ（殺鼠剤耐性なし）の生体実験と細胞実験結果を比較することで、新規評価技術基盤となる細胞実験の有用性を明らかにする。一方で、ウミガメに対する汚染物質の曝露実験は報告が少なく、汚染物質の評価方法が明らかではない。そこで、本研究では、ウミガメの個体レベルでの汚染物質曝露後の評価指標の開発も目標とする。

する解析(表6)などにも取り組んだ。

これらの結果を踏まえて、目標を大きく上回る成果が得られたと考えている。

本研究を進めるにあたり、高頻度でweb meetingを開催し、逐次データや問題点の共有を行った。この点は、円滑に研究を進めるにあたって有用であったと考えている。また、環境省や、保護団体の方々とも密に連携して本研究を進めることができた点も、全体目標の達成において大きな点であったと考えている。

加えて、一般向けの公開シンポジウムを開催した他、日本毒性学会でのシンポジウムも開催した。また、本研究の一部成果は、学生さんの受賞にもつながった。



一般向け公開シンポジウムのポスター

本研究は、チャレンジングな内容から、政策遂行に直結する内容まで幅広い内容であったが、若手らしく全方向に精力的に取り組むことができたと考えている。

<【サブテーマ1】達成状況>・・・・・・・・

1. 目標を大きく上回る成果をあげた

「培養細胞を用いた環境汚染物質の細胞影響評価に関する研究」

サブテーマ1 目標	サブテーマ1 の達成状況
本サブテーマでは、培養細胞を用いたウミガメ類の殺鼠剤の影響評価系構築と評価を実践する。以下の4点を具体的な目標とする。 1. 試験管内曝露実験に使用するウミガメ類と比較対象であるラットとクマネズミの不死化細胞を樹立、ならびに樹立した細胞の性質の解析。 2. 試験管内における汚染物質(殺鼠剤)の曝露後の	左記の目標に関して、下記の通りの達成状況と考えている。 1. 本研究では、アオウミガメとクマネズミ、ラット由来の不死化細胞の樹立に成功した。さらに、性質も解析し不死化細胞であることを示した。また、アオウミガメの培養条件の最適化も実施した。

細胞毒性評価、殺鼠剤毒性の指標となる血液凝固因子産生能や、解毒代謝能の指標となる殺鼠剤代謝産物の測定。 3. サブテーマ2で取得した生体データとの比較による、試験管内評価系の有用性の検証。 4. 細胞における性ホルモン分泌能解析を通じた、生殖・発生毒性評価への応用可能性の検討し、汚染物質による内分泌攪乱作用の評価法としての培養細胞の有用性を明らかにする。	2. 樹立した不死化細胞を使用して殺鼠剤の曝露実験を行い、細胞毒性、血液凝固因子、代謝などのパラメーターを取得した。 3. 生体データと比較した結果、概ね細胞で取得したデータは生体を模倣した結果であった（表1）。 4. 本研究では、性ホルモンの分泌能を解析するために、関連遺伝子の発現解析を進めた。特に、ステロイドホルモンに関する内容については、細胞、生体共に殺鼠剤曝露による影響が確認できた。この結果から、細胞を用いることで、一定の生殖・発生毒性評価ができる可能性が示された。さらに本研究では、性腺刺激ホルモン放出ホルモンなどへの影響も示唆される結果が得られた。この結果から、非標的種への今後の殺鼠剤影響を考える際の検討事項を挙げることもできた。 これらの結果に加えて、殺鼠剤耐性変異の解析も追加項目として実施した。本研究では耐性変異が確認されず、今後の政策として小笠原地域での殺鼠剤の使用が継続可能であることを示した（図6、表2）。 以上を持って、目標を大きく上回る成果を挙げたと自己評価している。
---	--

< 【サブテーマ2】 達成状況 > 1. 目標を大きく上回る成果をあげた

「個体レベルにおける環境汚染物質の影響評価に関する研究」

サブテーマ2 目標	サブテーマ2 の達成状況
サブテーマ1 細胞評価系の精度を評価するため、殺鼠剤の生体レベルにおける感受性情報を取得する。以下の3点を具体的な目標とする。 1. 爬虫類におけるバイオマーカー測定法の確立（ウミガメは主たる実験動物であるラット等哺乳類での測定法が適用できない可能性が高いため） 2. ウミガメ、ラット・クマネズミへ殺鼠剤（ダイファシノン）の投与試験を実施し、殺鼠剤投与後のウミガメ・ラットにおけるバイオマーカーの動態を解析する。 3. この個体レベルでのバイオマーカープロファイルと、サブテーマ1の細胞系で得られたパラメーターを比較し、細胞系の有用性を評価し、殺鼠剤の野生動物への毒性影響評価に細胞を用いた評価が有用であることを示す。 加えて、これら2つの実験結果の数理解析を通し、細胞系の実測値から個体レベルの感受性評価の予測も試みる。	左記の目標に関して、下記の通りの達成状況と考えている。 1. 爬虫類におけるバイオマーカー測定法を確立することができた。具体的には、抗凝血性殺鼠剤の薬効評価指標であるプロトロンビン時間（PT）（血液凝固時間の指標）の測定法（表3, 4, 図7, 8）、爬虫類における生殖毒性マーカーの測定法を開発した（表5, 図12）。 2. ウミガメ、ラット・クマネズミへ殺鼠剤（ダイファシノン）の投与試験を実施し、殺鼠剤投与後のウミガメ・ラットにおけるバイオマーカーの動態を解析した（図9-11, 13-18, 表7）。 また、小笠原に生息するアオウミガメにおける殺鼠剤の蓄積状況に関しても解析した（表6）。 加えて、これまで明らかではなかった、小笠原野生クマネズミにおける殺鼠剤の薬効の低下に関しても明らかにした（図14-17）。 3. 培養細胞試験のVKOR発現量変化から生体試験の血液凝固遅延を再現することができた。特に本研究では、殺鼠剤の標的臓器肝臓とは異なる筋肉由来の線維芽細胞から樹立した不死化細胞である。本研究では、現実的に取得可能な細胞を由来としても、殺鼠剤の薬効を予測できることを数学的に示した。 加えて、数学的に小笠原野生クマネズミの殺鼠剤の薬効低下の理由の重みづけにも成功した（図

19)。 これらの結果を持って目標を大きく上回る結果が得られたと自己評価している。
--

(2) 研究成果の学術的意義と環境政策等への貢献

＜得られた研究成果の学術的意義＞

・革新性

サブテーマ1では、死亡した個体からでも比較的容易に取得可能な体細胞（筋肉由来の線維芽細胞）を用いて汚染物質の評価に挑戦した。筋肉由来の体細胞であっても、細胞の特性を本質的に理解して有効に利用することで、本研究では汚染物質の影響の評価・予測が可能であることを示した。本結果は、これまでは、近縁種や調査研究が中心であった野生動物の汚染物質の影響評価研究において、新しい評価を追加するものであり、これまでの野生動物の汚染物質の影響評価の方向性を革新できる可能性がある成果が得られたと考えている。

サブテーマ2では、アオウミガメにおける殺鼠剤影響評価の際の有用なバイオマーカー（薬効の指標であるプロトンピン時間測定法や生殖毒性評価法）の開発に成功した。特に、生殖毒性評価法に関しては、哺乳類でストレス応答の指標として広く利用されているCortisolとCortisoneがアオウミガメでは利用できない一方で、これらが生体内で変化して生成されるTetrahydrocortisone (THE)が利用可能であることを見出した。THEは爬虫類の生殖毒性を検討する際の特異的な新規バイオマーカーとしての有用性が期待されると考えられ、これまでの考え方を革新する結果が得られたと考えている。

・独創性

サブテーマ1では、アオウミガメ等の不死化細胞を樹立し、試験管内における曝露試験を進めた。不死化細胞は、初代培養細胞が抱える細胞老化現象（細胞が増えなくなる現象）を乗り越えて、性質を安定させた培養が可能な細胞である。一方で、これまで不死化細胞技術の野生動物、特に爬虫類への応用はあまり報告されていなかった。さらに、不死化細胞を野生動物の環境影響評価に応用させた報告は、皆無であった。本研究では、不死化細胞技術を野生動物の環境影響評価に応用させた点において、独創性が高いと考えている。

サブテーマ2では、独自発想により、既に政策として殺鼠剤の散布が進められ殺鼠剤による圧が加わっている小笠原野生クマネズミと、これらの圧がかかっていないクマネズミの殺鼠剤の応答性を個体レベルで比較し、小笠原の野生クマネズミにおける殺鼠剤の薬効の低下を確認した。さらに、解析の結果、小笠原野生クマネズミは、殺鼠剤の代謝能と全身クリアランスが低下している結果が示された。離島に生息する個体群において、殺鼠剤圧により殺鼠剤の薬効の低下の可能性に着目し解析し、さらに低下のメカニズムを明らかにした報告は皆無であり、学術的にも貴重な成果を挙げられたと考えている。

・先導性

動物実験が難しい野生動物において、個体を用いない代替法による評価系の構築の必要性が強く提唱されている。他方、実験動物分野においては、動物福祉の観点から代替法を用いた研究が推奨され、一つの代替法として、培養細胞を用いた研究が推奨されている。実験動物同様に、野生動物においても培養細胞を用いることで代替法となる可能性が考えられる。本研究において、サブテーマ1、2を通じて、培養細胞を用いることで殺鼠剤の影響評価・予測が可能であることが示された。この研究成果は、個体を用いた曝露実験のハードルが高い野生動物における評価研究における新展開となる可能性があるものである。

本研究では、数理モデルを有効に使用することで、細胞における殺鼠剤の評価結果を用いて個体レベルの殺鼠剤の影響の一定の予測ができることを示した。また、同じく数学的手法を用いることで、ネズミ類の種・個体群間における殺鼠剤による薬効の差を説明した。本研究で進めた、細胞・個体・汚染物質の影響評価と数理モデルの融合研究は皆無である。本研究で進めたような融合研究は、学術研究において多方面から有用性が提唱されている。本研究では細胞・個体・汚染物質の影響評価・数理モデルというユニークな組み合わせによる先進的な融合領域研究を進めたと考えている。

・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。

＜環境政策等への貢献に関する成果＞

- ・本研究では、アオウミガメやクマネズミなどの不死化細胞を樹立した。樹立した不死化細胞は殺鼠剤のみならず、他の汚染物質（農薬や重金属等）の評価にも利用可能である。汚染物質は、生物多様性に影響を与える要因の一つであるため、生物多様性に関連する環境政策への貢献が見込まれる。
- ・不死化細胞を用いることで、殺鼠剤の影響評価が可能であることを示した。個体を用いた曝露実験が容易ではない野生動物において、個体レベルの曝露実験の代替法として不死化細胞を利用することで、科学的論拠を持った政策遂行に有用な情報を取得することが可能である。具体的には、科学的論拠を持った保全の優先種の選定等につながると考えており、効率的な政策遂行に貢献できる可能性がある。
- ・本研究では、性腺刺激ホルモン放出ホルモンなどへの影響も示唆される結果が得られた。本研究では、細胞を用いた評価を通じて、非標的種への殺鼠剤影響を考える際の新たな検討事項の提案につながった。
- ・本プロジェクトでは、環境省もと協力し父島群島ならびに母島における殺鼠剤による駆除対象ネズミの殺鼠剤耐性変異の解析を実施した。本研究では、駆除対象ネズミの殺鼠剤耐性変異は確認されなかった。この結果は、小笠原地域における抗凝血性殺鼠剤の政策利用の継続が可能であることを示し、政策遂行において有用な情報を提供したと考えている。
- ・アオウミガメのプロトロンビン時間（PT）（血液凝固時間の指標）測定方法を開発した。今後も抗凝血性殺鼠剤は政策として小笠原地域で継続的に利用される予定である。小笠原地域に生息するアオウミガメへの影響は、小笠原の住民の関心の高い項目でもあり、科学的論拠をもった政策の遂行ならびに、住民への説明のための価値ある情報の取得が可能になった。
- ・本研究では、野生のウミガメ個体の殺鼠剤モニタリングを実施し、現状、殺鼠剤は定量下限未満であることが示された。この結果は、現状アオウミガメへの蓄積の可能性は非常に低いことを示している。前項でも記述したが、小笠原地域に生息するアオウミガメへの影響は、小笠原の住民の関心の高い項目であり、科学的論拠をもった政策の遂行ならびに、住民への説明のための価値ある情報を取得することができた。
- ・本研究では、小笠原諸島父島で捕獲した野生クマネズミ、比較対象である一般的な実験用ラット（SDラット）、クローズドコロニーのクマネズミクローズドコロニー（野生型、殺鼠剤抵抗型）の合計4系統のダイファシノンに対する影響を解析した。本データは、科学的論拠を持って殺鼠剤抵抗型のクマネズミと比較して、父島の野生クマネズミにおいて、ダイファシノンが薬効を発揮することを示し、小笠原におけるダイファシノンによる外来ネズミの駆除効果を裏付ける科学的論拠と考えられる。一方で、小笠原の外来ネズミで薬効が発現しにくい可能性も示されており、継続的なモニタリングの必要性が考えられる。
- ・本研究では、培養細胞試験の結果から生体試験データの予測微分方程式モデルを構築した。本研究で開発した数理モデルを用いることで、培養細胞によるアオウミガメ、クマネズミ、ラット（ドブネズミ）の生体レベルの殺鼠剤の影響予測も可能になった。本研究内容は、理論的に多種や他の汚染物質にも応用可能であり、新たな手法による影響予測の扉を開いたと考えている。

7. 研究成果の発表状況

(1) 成果の件数

成果の種別	件数
査読付き論文：	3
査読付き論文に準ずる成果発表（人文・社会科学分野）：	0
その他誌上発表（査読なし）：	0
口頭発表（国際学会等・査読付き）：	8
口頭発表（学会等・査読なし）：	23
知的財産権：	0
「国民との科学・技術対話」の実施：	2
マスコミ等への公表・報道等：	1
研究成果による受賞：	2
その他の成果発表：	1

(2) 誌上発表

<査読付き論文>

成果 番号	【サブテーマ1】の査読付き論文
	特に記載すべき事項はない。

成果 番号	【サブテーマ2】の査読付き論文
1	R. Sato & K. Watanabe, R. Kamata, and K. Takeda. (2022) Development of a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) to quantify γ -glutamyl-carboxylated clotting factor IX and assess redox susceptibility of anticoagulant chemicals J. Vet. Med. Sci. (84, 6), 804-808
2	Khidkhan K., Yasuhira F., Saengtienchai A., Kasorndorkbua C., Sitdhibutr R., Ogasawara K., et al. (2024). Evaluation of anticoagulant rodenticide sensitivity by examining in vivo and in vitro responses in avian species, focusing on raptors. Environ. Pollut., 341, 122837.

3	Takeda K, Shimizu K, Sato M, Katayama M, Nakayama SMM, Tanaka K, et al. (2024). Sensitivity assessment of diphacinone by pharmacokinetic analysis in invasive black rats in the Bonin (Ogasawara) Archipelago, Japan. Pestic Biochem Physiol., 199, 105767.
---	---

<査読付き論文に準ずる成果発表（人文・社会科学分野）>

成果 番号	【サブテーマ 1】の査読付き論文に準ずる成果発表（人文・社会科学分野）
	特に記載すべき事項はない。

成果 番号	【サブテーマ 2】の査読付き論文に準ずる成果発表（人文・社会科学分野）
	特に記載すべき事項はない。

<その他誌上発表（査読なし）>

成果 番号	【サブテーマ 1】のその他誌上発表（査読なし）
	特に記載すべき事項はない。

成果 番号	【サブテーマ 2】のその他誌上発表（査読なし）
	特に記載すべき事項はない。

（3） 口頭発表

<口頭発表（国際学会等・査読付き）>

成果 番号	【サブテーマ 1】の口頭発表（国際学会等・査読付き）
4	片山雅史、福田智一、大沼学、武田一貴、近藤理美、中山翔太、アオウミガメの汚染物質の影響評価を可能にするリソース開発、Japan Geoscience Union Meeting 2022、ハイブリット、May 22 - 27, 2022
5	片山雅史、福田智一、武田一貴、近藤理美、清野透、中山翔太、アオウミガメから取得した培養細胞の抗凝血性殺鼠剤評価への応用の試み、Japan Geoscience Union Meeting 2023, May 21 - 26, 2023

成果 番号	【サブテーマ 2】の口頭発表（国際学会等・査読付き）
6	Kazuki Takeda, Shouta Nakayama, Kosuke Manago, Yoshiya Yamamura, Yusuke Kawai, Yoshinori Ikenaka, Noriyuki Komatsu, Chiyo Kitayama, Satomi Kondo, Takuma Hashimoto, Ryuichi Minato, Yusuke Oyamada, Kazuo Horikoshi, Mayumi Ishizuka, Anticoagulant rodenticide in Bonin Islands, Japan "Galápagos of the Orient"-investigation of rodenticide-susceptibility of endemic species by toxicokinetic analysis Pacificchem 2021 (The 2021 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies), 16-21, December 2021 (招待講演)

7	Kazuki Takeda, Nobuaki Yasuo, Kanami Watanabe, Ryo Sato, Ryo Kamata, Masakazu Sekijima, Estimating susceptibility of rodenticide by molecular dynamics & machine learning using 3D structures of vitamin k epoxide reductase, The Pure and Applied Chemistry International Conference 2022, 30 June - 1 July 2022 (招待講演)
8	Shouta MM Nakayama, Yoshiya Yamamura, Satomi Kondo, Chiyo Kitayama, Takahiro Ichise, Yoshinori Ikenaka, Mayumi Ishizuka. Sensitivity and toxicity evaluation of anticoagulant rodenticides, warfarin and diphacinone in green sea turtles (Chelonia mydas). 15th International Conference of Asian Society of Conservation Medicine. Chiang Mai University, Thailand. 25-28 Oct 2022
9	Shouta M.M. Nakayama, Yoshiya Yamamura, Satomi Kondo, Chiyo Kitayama, Takahiro Ichise, Yoshinori Ikenaka, Mayumi Ishizuka. Evaluation of anticoagulant rodenticides, warfarin and diphacinone sensitivity in sea turtles. SETAC North America 43rd Annual Meeting. David L. Lawrence Convention Center, Pittsburgh, PA, USA (+Hybrid). 13 - 17 November, 2022
10	Masashi Koide, Yusuke K. Kawai, Mitsuki Kondo, Takahiro Ichise, Yoshiya Odaya, Kazuo Horikoshi, Hajime Suzuki, Yoshinori Ikenaka, Mayumi Ishizuka, Shouta M.M. Nakayama, Assessment of susceptibility to anticoagulant rodenticides in endangered species endemic to the Bonin Islands, 6th International Chemical Hazard Symposium & 6th Symposium of Japan Society for Environmental Chemistry, Hokkaido-Tohoku Branch, Hokkaido University (Hybrid)、2023年1月12日～13日
11	Masashi Koide, Yusuke Kawai, Mitsuki Kondo, Yoshiya Odaya, Kazuo Horikoshi, Hajime Suzuki, Yoshinori Ikenaka, Mayumi Ishizuka, Shouta M.M. Nakayama. Assessment of susceptibility to Anticoagulant Rodenticides in endangered species endemic to the Bonin Islands . -International Symposium- Impact of Chemical and Biological Hazards on the Environment, Animals and Human Health and its Countermeasure. Alte Brücke Holiday Resort and Conference Center, Swakopmund, Namibia. 10th -11th October 2023

<口頭発表（学会等・査読なし）>

成果 番号	【サブテーマ1】の口頭発表（学会等・査読なし）
12	片山雅史、少数遺伝子を用いた野生動物の毒性評価細胞の作製、第49回日本毒性学会学術年会、札幌コンベンションセンター、29 June-2 July 2022

成果 番号	【サブテーマ2】の口頭発表（学会等・査読なし）
13	武田一貴、安尾信明、渡邊可菜実、佐藤玲、鎌田亮、関嶋政和、分子動力学シミュレーションと機械学習によるビタミン K エポキシド還元酵素遺伝子多型からの殺鼠剤感受性の評価法の確立、第29回環境化学討論会、2021年6月1日-4日 大阪府千里ライフサイエンスセンター (Hybrid)
14	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)
15	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
16	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）
17	渡邊可菜実、佐藤玲、鎌田亮、武田一貴、培養細胞発現系と AI による構造推定を用いた血液凝固 第 IX 因子スプライシングバリエント 2 の機能解析 第5回環境化学討論会 北海道東北地区部会・中国四国地区部会 合同シンポジウム、2022年2月3日
18	渡邊可菜実、佐藤玲、鎌田亮、武田一貴、血液凝固第IX因子 スプライシングバリエント2の機能解析、第4回日本比較薬理学・毒性学会春季研究会 2022年2月5日

19	中山翔太、山村快哉、近藤理美、北山知代、武田一貴、一瀬貴大、池中良徳、石塚真由美、ウミガメにおける抗凝血殺鼠剤の感受性評価、環境化学物質3学会合同大会、富山国際会議場 (Hybrid)、2022年6月13日～16日
20	小出将士、安平芙由、一瀬貴大、小田谷嘉弥、鈴木創、堀越和夫、池中良徳、石塚真由美、中山翔太、小笠原諸島固有種における抗凝固系殺鼠剤に対する感受性試験、環境化学物質3学会合同大会、富山国際会議場 (Hybrid)、2022年6月13日～16日
21	山村快哉、近藤理美、北山知代、武田一貴、一瀬貴大、池中良徳、石塚真由美、中山翔太、水圏から見る抗凝血殺鼠剤散布～ウミガメにおける毒性評価の試み～、第49回日本毒性学会学術年会、札幌コンベンションセンター、29 June-2 July 2022
22	小出将士、安平芙由、一瀬貴大、小田谷嘉弥、鈴木創、堀越和夫、池中良徳、石塚真由美、中山翔太、小笠原諸島固有種における抗凝固系殺鼠剤に対する感受性試験、第49回日本毒性学会学術年会、札幌コンベンションセンター、29 June-2 July 2022
23	渡邊可菜実、佐藤玲、鎌田亮、武田一貴、培養細胞法とAlphaFold2による血液凝固第IX因子スプライシングバリエーションの機能解析、第49回日本毒性学会学術年会、札幌コンベンションセンター、29 June-2 July 2022
24	武田一貴、安尾信明、関嶋政和、分子シミュレーションを用いたヒトの一塩基多型から化学物質感受性の動物種差を予測する手法の構築、第49回日本毒性学会学術年会、札幌コンベンションセンター、29 June-2 July 2022
25	伊藤愛真、近藤充希、池中良徳、田中亜紀、下鶴倫人、佐鹿万里子、柳川洋二郎、笠松雅彦、角川雅俊、中山翔太、石塚真由美、ステロイドホルモンおよびその抱合体化物の血中組成における動物種差、第165回日本獣医学会学術集会、オンライン、2022年9月6日～8日（口頭（動画収録）、質疑応答のみリアルタイム）
26	清水 敬太、佐藤 美侑、片山 雅史、中山 翔太、池中 良徳、一瀬貴大、石塚 真由美、鎌田 亮、小山田 佑輔、港 隆一、橋本 琢磨、武田 一貴、小笠原諸島の外来クマネズミに対する抗血液凝固系殺鼠剤ダイファシノンの薬物動態・薬力学(PK/PD)解析による感受性評価、第165回日本獣医学会学術集会、オンライン、2022年9月6日～8日（口頭（動画収録）、質疑応答のみリアルタイム）【受賞1】
27	清水 敬太、佐藤 美侑、片山 雅史、中山 翔太、池中 良徳、一瀬貴大、石塚 真由美、鎌田 亮、小山田 佑輔、港 隆一、橋本 琢磨、田中 和之、谷川 力、武田 一貴、2022 年に捕獲した小笠原諸島父島の外来クマネズミにおける殺鼠剤ダイファシノンの薬物動態・薬力学(PK/PD)解析による感受性評価、第28回日本野生動物医学会大会、つくば国際会議場、2022年9月22日～24日【受賞2】
28	近藤充希、池中良徳、中山翔太、石塚真由美、解毒酵素の適応種差と進化、第50回日本毒性学会学術年会：シンポジウム「解毒の種差を探る」、パシフィコ横浜、2023年6月19日～21日（招待講演）
29	宮前萌優、長岡慧、山本早苗、鎌田亮、武田一貴、抗血液凝固系殺鼠剤cis-trans異性体間の体内動態差に寄与する生体内因子の探索、パシフィコ横浜、2023年6月19日～21日
30	中川晋太郎、新屋惣、Yared Beyene Yohannes、小出将士、羽鳥聖七、山口翔、乗本裕明、池中良徳、中山翔太、石塚真由美、奄美大島の野生ハブ (Protobothrops flavoviridis) における抗凝固系殺鼠剤曝露状況の評価および爬虫類における殺鼠剤感受性試験、第29回日本野生動物医学会大会、鹿児島大学、2023年9月22日～24日
31	中山翔太、小笠原の外来種対策における殺鼠剤散布と野生動物の感受性評価、第29回日本野生動物医学会大会「自由集会：野生動物の健康と化学物質汚染」、鹿児島大学、2023年9月22日～24日（招待講演）
32	中山翔太、殺鼠剤感受性の動物種差、GastroPlus (R) Users Meeting 2023、オンライン、2023年10月19日（招待講演）
33	武田 一貴、ワルファリン系殺鼠剤ダイファシノンのネズミ4系統におけるPK/PD解析とPBPKモデリングによる系統差の評価、GastroPlus (R) Users Meeting 2023、オンライン、2023年10月19日（招待講演）
34	宮前萌優、長岡慧、山本早苗、鎌田亮、武田一貴、ワルファリン系殺鼠剤cis-trans異性体間薬効差の原因分子の探索、第6回日本獣医薬理学・毒性学会春季研究会、北里大学、2024年3月16日

(4) 知的財産権

成果 番号	発明者	出願者	名称	出願以降 の番号	出願 年月日
	特に記載すべき事項はない。				

(5) 「国民との科学・技術対話」の実施

成果 番号	実施 年度	【サブテーマ1】の実施状況
35	2022	一般公開シンポジウム「こちら、ウミガメ研究チーム ～細胞×毒性×AI ラボから救え！小笠原の希少種」（主催：北海道大学 CoSTEP、国立環境研究所 生物多様性領域、北海道大学大学院 獣医学研究院 毒性学教室、北里大学獣医学部 毒性学研究室、認定NPO法人エバーラスティング・ネイチャー（ELNA）、後援：日本野生動物医学会）2022年8月7日、オンライン開催
36	2022	上記公開シンポジウムのYou tubeでの配信 https://www.youtube.com/watch?v=Y6WDHnUAcBE

成果 番号	実施 年度	【サブテーマ2】の実施状況
		特に記載すべき事項はない。

(6) マスメディア等への公表・報道等

成果 番号	【サブテーマ1】のメディア報道等
	特に記載すべき事項はない。

成果 番号	【サブテーマ2】のメディア報道等
37	someone vol.65（2023年冬号）パラケラスの未来旅行記pp8-9「殺さず評価・予測する新技術」

(7) 研究成果による受賞

成果 番号	【サブテーマ1】の研究成果による受賞
	特に記載すべき事項はない。

成果 番号	【サブテーマ2】の研究成果による受賞
38	2022年、第165回日本獣医学会学術集会、優秀学生賞（薬理毒性分科会）清水敬太

39	2022年、第28回日本野生動物医学学会大会、最優秀賞（口頭発表部門）清水敬太
----	---

(8) その他の成果発表

成果 番号	【サブテーマ1】のその他の成果発表
	特に記載すべき事項はない。

成果 番号	【サブテーマ2】のその他の成果発表
40	第28回日本野生動物学会大会最優秀賞(成果番号39)について、JVM NEWSに写真付きで掲載 (https://buneido-shuppan.com/jvmnews/article/jvm20220928-001)

8. 国際共同研究等の状況

<国際共同研究等の概要>

特に記載すべき事項はない。

<相手機関・国・地域名>

機関名	国・地域名（本部所在地等）

9. 研究者略歴

<研究代表者略歴>

代表者氏名	略歴（学歴、学位、経歴、現職、研究テーマ等）
片山雅史	東北大学大学院農学研究科修了 博士（農学） 国立環境研究所特別研究員を経て、 現在、国立環境研究所生物多様性領域研究員 専門は分子生物学、生物多様性保全に関して研究を進めている

<研究分担者（サブテーマリーダー）略歴>

分担者氏名	略歴（学歴、学位、現職、研究テーマ等）	参画期間
1) 中山翔太	北海道大学大学院獣医学研究科修了 博士（獣医学） 北海道大学大学院獣医学研究院助教を経て、	令和3（2021）年度 ～ 令和5（2023） 年度

	現在、北海道大学大学院獣医学研究院准教授 主に野生動物における化学物質感受性の種差とそのメカニ ズムについて研究を実施	
--	---	--

Abstract

[Research Title]

Establishment of New Basic Technology for Risk Assessment of Environmental Pollutant in Wildlife by Using Culture Cells.

Project Period (FY) :	2021-2023
Principal Investigator :	Masafumi KATAYAMA
(PI ORCID) :	https://orcid.org/0000-0001-8197-3338
Principal Institution :	National Institute for Environmental Studies Onogawa 16-2, Tsukuba City, JAPAN Tel: +81-29-850-2474 E-mail: katayama.masafumi@nies.go.jp
Cooperated by :	Hokkaido University, and Kitasato University
Keywords :	Cultured cell, Green sea turtle, Diphacinone, Sensitivity assessment, non-target species

[Abstract]

Compared to studies evaluating the effects of pollutants on experimental animals, studies assessing the impacts of pollutants on wildlife are difficult to perform. Therefore, in this study, we aimed to use cultured cells to determine the effects of pollutants on wildlife. Cultured cells exhibit great potential as bioresources for wildlife and can be obtained from dead animals. Generally, somatic cells obtained from dead wildlife are limited to skin- or muscle-derived fibroblasts owing to their better maintenance in vitro compared to other organ-derived cells. Here, we examined the effects of pollutants on fibroblasts. Rodenticides are among the major environmental pollutants in Japan. They are used to eradicate rodents; however, their effects on non-target species remain unclear. This study focused on the green sea turtle, *Chelonia mydas*. Rodenticides are widely used in the Ogasawara Islands, the natural habitat of green sea turtles, for rat eradication. Hence, green sea turtles are listed as high-risk animals for rodenticide exposure in the Ogasawara Islands. Here, we established an immortalized cell line of green sea turtles and compared the effects of rodenticides on this cell line in vitro to the in vivo results. Notably, the in vitro and in vivo results were consistent. Overall, our findings highlight cultured cells as useful tools for the risk assessment of pollutants in wildlife.

[References]

R. Sato & K. Watanabe, R. Kamata, and K. Takeda. (2022) Development of a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) to quantify γ -glutamyl-carboxylated clotting factor IX and assess redox susceptibility of anticoagulant chemicals J. Vet. Med. Sci.(84, 6), 804-808
Takeda K, Shimizu K, Sato M, Katayama M, Nakayama SMM, Tanaka K, et al.(2024). Sensitivity assessment of diphacinone by pharmacokinetic analysis in invasive black rats in the Bonin (Ogasawara) Archipelago, Japan. Pestic Biochem Physiol., 199,105767.

This research was funded by the Environment Research and Technology Development Fund (ERTDF).

