

研究課題

希少鳥類における非侵襲的化学物質感受性評価法の開発

研究代表者 久保田 彰 (帯広畜産大学グローバルアグロメディシン研究センター)

共同研究者 川合 佑典 (帯広畜産大学グローバルアグロメディシン研究センター)

丸山 青葉 (帯広畜産大学畜産学部共同獣医学課程 6 年)

野見山 桂 (愛媛大学沿岸環境科学研究センター)

田上 瑠美 (愛媛大学沿岸環境科学研究センター)

研究背景と目的

絶滅危惧種を含む野生動物の獣医療でしばしば問題となるのが、薬物の用法・用量である。これは、薬物に対する感受性・反応に種差が存在し、他動物種で得られた知見を単純に外挿することが難しいためである。さらに、複数の薬物を併用したときの薬物相互作用も考慮しなければならない。希少鳥類においても例外ではなく、他の鳥類で得られた知見を外挿して経験的に薬物の用法・用量を決定しており、個体によっては投薬効果が小さいばかりか副作用を否定できない症状がみられるケースすらある。こうした問題を解決するための鍵は、種固有の薬物動態に基づいた投薬プロトコルを考案することであるが、投与実験や試料入手の困難さ故に、基礎情報となる化学物質感受性を希少動物で評価することは容易ではない。

シトクロム P450 (CYP) は化学物質の代謝や相互作用に重要な役割を担うため、化学物質感受性の種差にも深く関与している。申請者らはこれまで、事故死・病死により得たタンチョウやヤンバルクイナから新鮮肝を採材し、分子生物学実験に活用可能なクオリティであることを確認した。さらにタンチョウに関しては、RNA-seq 解析により肝発現 CYP 分子種の同定と発現プロファイルの解明に成功した (Kawai et al., 2020, Comp Biochem Physiol C, 228, 108643)。

そこで申請者は、出芽酵母発現系を用いて CYP 分子種を異種発現させ、これを用いて臨床現場で頻用される薬物や環境汚染物質の代謝、ならびに

それら物質による酵素活性阻害を明らかにするとともに、種固有の CYP 分子種の遺伝情報に基づいてホモロジーモデリングにより構造推定したタンパク質と薬物・環境汚染物質の相互作用・結合状態の解析により代謝・阻害特性を予測するインシリコ手法を統合することで、実際の肝臓における異物代謝能や化学物質相互作用を推定し、化学物質感受性を予測できるのではないかと考えた。

本研究の目的は、希少野生動物の保全科学の観点から、タンチョウおよびヤンバルクイナを対象に非侵襲的化学物質感受性評価法を開発することである。本年度は、主にタンチョウの肝ミクロソームを用いた研究を実施した。

研究方法

帯広畜産大学・久保田の研究室で、道東にて野生化または釧路市動物園で収容後死亡したタンチョウの肝臓を用いて、以下の研究を実施した。肝臓よりミクロソーム画分を調製し、これを酵素源とした。肝ミクロソームの CYP 依存酵素活性は、P450-Glo Assays キット (Promega, WI) および EROD アッセイにより測定した。用いた P450-Glo Assays キットと代謝作用を示すヒト CYP を Table 1 に示す。

Table 1. Luciferin 誘導体に代謝作用を示すヒト CYP

Luciferin誘導体	代謝作用を示すCYP
1A2	<u>1A2</u>
ME	<u>1A2</u> , <u>2C8</u> , 2C9, 2J2, 4A11, 4F3B, 19
2B6	<u>2B6</u>
H	<u>2C9</u>
ME EGE	1A1, 1A2, 2B6, <u>2D6</u>
H EGE	1A1, 1A2, <u>2C19</u>
BE	<u>3A4</u> , 3A5, <u>3A7</u> , 4F12
IPA	<u>3A4</u>

P450 Glo Assays Protocol より引用。主に下線の CYP 分子種により代謝されるが、その他の CYP 分子種も代謝作用を示すことが確認されている。

次いで、久保田の研究室で調製したタンチョウ肝ミクロソームを用いて、愛媛大学沿岸環境科学研究センター・田上准教授および野見山准教授の研究室で、アゾール系抗真菌薬であるボリコナゾールの代謝試験を実施した。

研究成果

タンチョウ肝ミクロソームを用いて P450-Glo Assays の基質代謝を評価したところ、Luciferin-1A2、-2B6、-ME、-H、-ME EGE、-IPA、-BE を代謝した。P450-Glo Assays の各種代謝活性と肝臓における CYP 分子種の mRNA 発現量の相関関係を解析したところ、Luciferin-1A2 を含む複数の代謝活性値と CYP1A5 mRNA 発現量の間に関連関係がみられた。

そこで次に CYP1A 依存酵素活性（EROD 活性）を指標として、各種薬剤や農薬による肝ミクロソームの異物代謝酵素阻害を評価した（Fig. 1）。アゾール系抗真菌薬のケトコナゾール、イトラコナゾールは、CYP1A 阻害剤である α -ナフトフラボンと同様、濃度依存的に EROD 活性を阻害した（ IC_{50} はそれぞれ 1.1 μ M、1.8 μ M、0.090 μ M）が、ボリコナゾールでは明瞭な阻

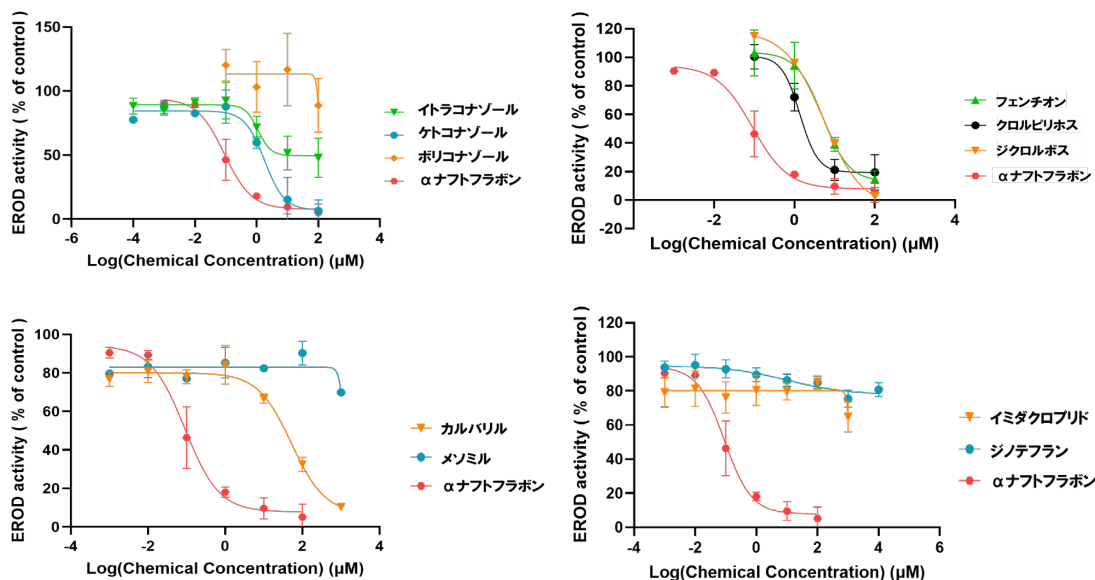


Fig. 1. 薬物および農薬によるタンチョウ肝ミクロソーム中の EROD 活性への影響

縦軸に DMSO を 100% としたときの相対 EROD 活性値 (%)、横軸に阻害物質の濃度 (μ M) を対数表示したものをプロットした。

害はみられなかった。また、有機リン系殺虫剤のクロルピリホス、フェンチオン、ジクロルボスは、いずれも EROD 活性を阻害し (IC_{50} はそれぞれ 1.4 μ M、5.2 μ M、5.4 μ M)、一部のカーバメート系殺虫剤 (カルバリル) も阻害活性を示した ($IC_{50} = 52 \mu$ M)。一方、ネオニコチノイド系殺虫剤のイミダクロプリド、ジノテフランや、ピレスロイド系殺虫剤のエトフェンプロックス、ペルメトリンでは有意な阻害は認められなかった。

鳥類の CYP1A 分子種は種々の異物代謝に関与することが知られている。したがって、ケトコナゾールやイトラコナゾールを臨床現場で他の薬物と併用する際または農薬による中毒が疑われる個体の治療の際には、薬物相互作用に注意する必要があると考えられた。

一方、ボリコナゾールでは CYP1A 活性の阻害はほとんどみられなかった。ボリコナゾールは鳥類においても有用なアゾール系抗真菌薬である。Lehner et al. (2024, *Toxicol Mech Methods*, 34, 654-668) は、カラスを対象とした *in vivo* 実験において、ボリコナゾールは単独処置では速やかに代謝され血中濃度が低下したのに対し、シプロフロキサシン (CYP3A4、CYP1A2 阻害剤) との共処置によりボリコナゾールの代謝が抑制され血中治療濃度域が維持されたことを報告している。本研究で得られたボリコナゾールの結果は、肝ミクロソーム中 CYP による代謝と関連すると推察されたため、CYP 阻害剤によりボリコナゾールの代謝は抑制されると仮説を立てた。そこで次に、タンチョウの肝ミクロソームを用いて、愛媛大学 CMES・田上准教授、野見山准教授の研究室でボリコナゾールの代謝試験を行い、 α -ナフトフラボン (CYP1A 阻害剤) の有無によるボリコナゾール代謝への影響を評価した。

代謝試験 (n=2) の結果を Fig. 2 に示す。インキュベーション時間が 60 分を超えると代謝速度が減衰していたことから、0~60 分と 0~120 分に分けて消失速度定数を算出した。0~60 分までの消失速度定数は、ボリコナゾール単独 (100 nM) で 0.0083 mL/min/mg-protein、 α -ナフトフラボン (100 nM) との共処置で 0.0060 mL/min/mg-protein であった。したがって、 α -ナフトフラボンによってボリコナゾールの代謝が 27%阻害されたと考えられた。

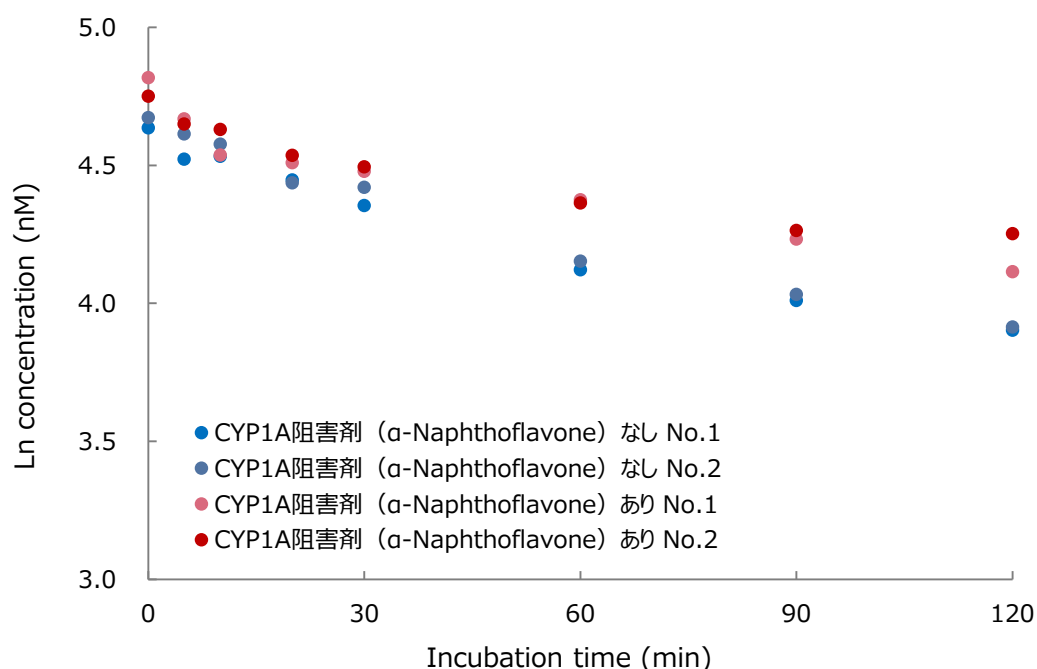


Fig. 2. タンチョウ肝ミクロソームを用いたポリコナゾール代謝試験でのポリコナゾール濃度の経時変化（阻害剤の有無で各 n=2）

今後の課題

タンチョウには CYP1A4、CYP1A5 の 2 つの分子種が存在する。今後はまず、これら CYP1A 分子種のタンパク質を酵母発現系により *in vitro* で合成し、上記で検討した薬剤や環境汚染物質の酵素活性阻害特性を評価する。また、ポリコナゾールやイトラコナゾールなど、臨床現場で使用される抗真菌薬の代謝や阻害、エンロフロキサシン等 CYP1A 阻害能をもつ抗生物質との共処置による抗真菌薬の代謝抑制を肝ミクロソームおよび CYP1A 発現酵母ミクロソームで評価する。また、ヤンバルクイナについて、現時点で肝発現 CYP 分子種の同定のために必要な数の試料が入手できたことから、タンチョウと同様のアプローチで研究を進める予定である。得られた研究成果は、投与実験による血中動態の評価が難しい希少動物において、薬物代謝や薬物相互作用に関する基礎情報を提供するものと期待される。本研究の成果は学会等で発表するとともに、国際学術誌に英文として投稿する予定である。