

# 環境化学物質が野生動物に引き起こす毒性と適応

石塚真由美（北海道大学・大学院獣医学研究科）

ishizum@vetmed.hokudai.ac.jp

野生動物にどのような残留性有機汚染物質が蓄積し、また、それに対応して野生動物の肝臓における P450 依存の外来異物の代謝活性がどのように変化しているのかを報告する。一方で、野生動物における個体間の P450 の発現レベルの違いは、汚染物質への曝露による一過性な酵素変動だけではなく、P450 の遺伝的な「多型」が野生哺乳類にも存在することも分かってきた。

## シトクロム P450 と化学物質への生体防御

医薬品、環境化学物質や食品添加物など、外来性の化学物質の代謝による解毒は、第 I 相反応と第 II 相反応から成り立っている。外来性の化学物質は、第 I 相反応で水酸化などの修飾を受け、第 II 相反応で補酵素の抱合を受け、水溶性を増し、体外に排泄されやすくなる(図 1)。中でも、異物代謝酵素であるシトクロム P450(CYP)は、第 I 相反応において特に重要な生体防御機構を担っている。ヒトでは、P450 は医薬品の代謝的活性化・排泄などに関与する主要な酵素である。P450 の代謝活性

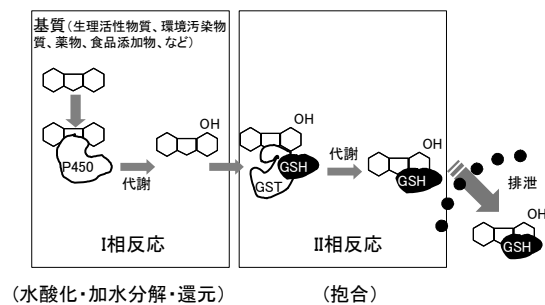


図1 化学物質に対する生体防御機構

が低く、薬が効きすぎてしまうヒトを poor metabolizer、逆に代謝能力が高く薬が効きにくいヒトを extensive metabolizer と呼ぶが、P450 について、その代謝能力を調べるための試薬が、欧米では事前診断薬として認可されている。このように、P450 は医薬品の動態を決定付ける重要なファクターであるため、ヒトや実験動物においては、P450 の分子種や基質特異性などについて詳細な報告がある。

また、P450 による代謝は解毒にばかり寄与しているわけではない。P450 酵素系による異物の代謝中間体は、時として親化合物より活性（毒性）の高いものがあり、この中間代謝物を速やかに解毒しないと生体に害を及ぼすことになる。通常では、この中間代謝物を更に代謝する第 II 相の抱合系の酵素の活性は、代謝的活性化に関与するシトクロム P450 などの第 I 相の酵素の反応速度より遥かに速く、活性中間代謝物は生成されるそばから速やかに代謝され解毒される。しかし、異物の生体への侵入が大量だったり、多種であったりすると、第 II 相酵素のキャパシティーを超えてしまったり、必要なコファクターの供給が追いつかなかったりして、活性中間代謝物の解毒が速やかに行われず、中間代謝物による悪影響が生体に及んでしまう。

このように、P450 をキーとして、化学物質の曝露量と酵素の毒化/解毒活性の正常なバランスが日常的に曝露される化学物質の解毒・毒性化機構を決定する大きなファクターとなっている。

## 野生動物のシトクロム P450

ヒトや実験動物では P450 について詳細な報告がなされ、そのファミリーについても体系的に研究が進められている。しかし、その一方で、野生動物における P450 の解析は非常に立ち遅れている。シトクロム P450 は、その発現や代謝の標的である基質の特異性に関して、大きな動物種差を有している

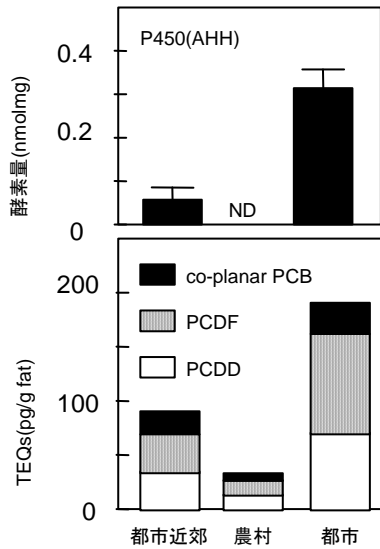


図2 モクズガニの中腸線に蓄積するダイオキシン類のTEQ(ダイオキシン類毒性等価量)値とP450依存の活性の関係。

にもかかわらず、哺乳類に関しては、ヒト、実験動物、家畜のみで P450 の分子進化が系統立てられており、特に野生哺乳類に関しては、まずは、これらの情報を蓄積していく必要がある。しかし、野生動物の P450 の活性測定やクローニング、精製のための試料入手は、野生動物自身の稀少性や生態系の保護といった観点から考えると難しく、野生生物において P450 の基質特異性や年齢、性差による発現パターンなどの情報は乏しい。

脊椎動物の野生生物種で、環境汚染物質と P450 の研究が最も進んでいるのは魚類である[2]。しかし、その一方で、野生の両棲類、爬虫類、鳥類、そして哺乳類における P450 分子種の解析の報告は非常に少ない。P450 は、PCB や農薬など、多くの環境汚染物質を代謝するため、野生動物の環境汚染に対する適応能を知るためにも、それらの有する異物代謝能を知ることが重要である。

それでは、実際に環境汚染にさらされている野生生物では、P450 をはじめとする生体防御機構はどうなっているのでしょうか？

### 野生動物におけるシトクロム P450 と環境汚染

野生生物の中でも、多くの魚類に加え、カエル、トカゲ、ワニ、アザラシ、ミンクなどでは、実験飼育室における環境汚染物質の投与実験から、肝臓などで CYP が発現誘導を受けることが報告されている。また、室内実験だけではなく、我々はこれまでの研究で、野生動物においても、棲息環境の汚染に適応して、肝臓における P450 依存の外来異物の代謝活性が誘導させることを報告してきた(図2)。環境化学物質への曝露による P450 の誘導は、CYP1 あるいは CYP3 などの分子種を中心に、甲殻類や魚類、両生類、哺乳類まで広範囲の生物種で実際の環境中で、普遍的に起こっており、野生動物の異物に対する生体防御機構に P450 が重要であることが我々の研究から明らかになっている。また、実際に野外から海棲哺乳類を採集し、蓄積する co-planar PCB 量と肝臓における CYP 量を比較したところ、TEQ (ダイオキシン等価) 値と CYP1A サブファミリー発現レベルは比例関係にあり、これらダイオキシン類が、CYP1A サブファミリーの誘導を引き起こしていることが分かった[3]。

また、前述の通り、P450 は多くの化学物質の代謝的活性化も行っている。ヒトの発癌の 80% は環境、特に化学物質によるとの報告もあるが、このような化学物質によるリスクはヒトに限ったことではない。これまでの我々の研究で、環境汚染の亢進している地域の棲息している野生哺乳類では、CYP1A1 の発現誘導と同時に、第 II 相結合酵素の抑制が見られ、環境汚染の亢進した地域では、P450 が汚染物質を代謝・解毒しているだけではなく、日常的に曝露されている環境化学物質を毒性化している可能性も考えられた。

ダイオキシン類が結合し、CYP1A1 の発現を調節する AhR (arylhydrocarbon receptor) は現在のところ、魚類以上の生物種で発見・クローニングされている。ショウジョウバエでは、AhR に近い受容体は同定されているが、その受容体にはダイオキシンなど化学物質との結合性は無いことが報告されている。しかし、これまでの研究から、AhR は同定されていないが、甲殻類に蓄積するダイオキシン類の TEQ 値と中腸腺に発現する P450 量が比例しており、脊椎動物から無脊椎動物まで、様々な野生生物

種において、環境汚染物質曝露による生体防御機構が活性化されていることが示唆される。

以上の報告から分かるように、野生生物においても P450 と環境汚染物質は、ある一定の汚染濃度範囲では比例関係にある。環境汚染物質の化学分析だけではなく、生態系をも考慮した解析のために、この P450 を環境汚染の指標、すなわちバイオマーカーとして用いることもある[4-6]。

### 野生動物における P450 の遺伝的多型

さらに、我々は、P450 の発現の一過性な酵素変動だけではなく、CYP2D サブファミリーなど、ヒトや実験動物で報告されている薬物代謝酵素の多型の存在を野生動物で初めて報告した。野生のエゾヤチネズミに薬剤の poor metabolizer と extensive metabolizer が存在することを報告したのである。

最近では、野生のクマネズミにおいて、殺鼠剤の代謝に高活性の P450 代謝酵素系をもつクマネズミが出現し、殺鼠剤の抵抗性の獲得の一因となることも明らかにした(図 3)[7]。ヒドロキシクマリン系の殺鼠剤は比較的ヒトにとって安全で、扱いやすいため、世界中で使用されている殺鼠剤である。ヒドロキシクマリン系殺鼠剤に抵抗性を持つネズミ（ドブネズミ、クマネズミ、ハツカネズミ）は世界中の都市部で報告されているが、日本国内では関東近郊に抵抗性のクマネズミが棲息している。最近では、青森県内において、わが国で初めてのヒドロキシクマリン系殺鼠剤の抵抗性ドブネズミが報告された。ヒドロキシクマリン系の殺鼠剤は、ビタミンKエポキシド還元酵素(VKOR)の活性を阻害することで、ビタミンK依存の血液凝固因子の生成をストップしてしまう。これにより、標的となるネズミは出血死する。抵抗性個体の出現の原因として、これまでに、ネズミの VKOR に変異が入ることで、ヒドロキシクマリンの阻害を受けなくなり、この殺鼠剤に抵抗性を持つことが報告されている。我々は、VKOR の変異に加えて、さらに P450 による新たな殺鼠剤の耐性機構を見出したが、これは明らかに殺鼠剤の使用によるラットの生き残りのための適応（適者生存の結果）と考えられる。このような耐性クマネズミの出現は殺鼠剤使用の頻繁な都市部での現象である。農薬の散布によって昆虫の薬物代謝酵素の遺伝子の“セレクション”が起こることは既に周知の事実であるが、この P450 薬物代謝酵素系を介した「環境への適応」がゲノムレベルで野生の哺乳類でもおこっていることを初めて明らかにしたものである。

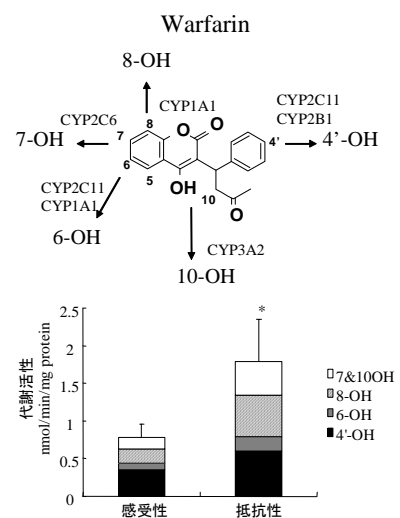


図3 ヒドロキシクマリン系殺鼠剤ワルファリンの代謝経路とクマネズミの肝臓における代謝活性の系統差

### 最後に

このように、野生動物における環境化学物質への感受性は、種差だけではなく、同一種間でも遺伝的多型により異なっているが、実際には、これに関する研究は少ない。野生動物の環境汚染物質に対する感受性およびその毒性リスクを明らかにするためには、前述のシトクロム P450 や第 II 相抱合酵素、その発現調節因子、異物のトランスポーター、そして生体に取り込まれた異物の標的分子の動物種間・系統間の感受性などについて明らかにする必要がある。今後、ヒトや実験動物だけではなく、野生動物におけるこれらの毒性発現機序の分子レベルの解明が期待される。

## 謝辞

この度、受賞につながった研究は、主に北海道大学・大学院獣医学研究科の毒性学教室で行われました。これらの研究成果は、もちろん、私一人の力によるものではありません。これまで、当研究室に在籍した学生さんやスタッフの先生方、そして共同研究の先生方のご協力・ご助言があつて、はじめて研究を推進することができました。特に、北海道大学・大学院獣医学研究科の藤田正一教授には、本研究に関し、終始一貫して、多方面にわたりご指導いただきました。

また、本研究にご理解を頂き、農学進歩賞にご推薦いただいた日本獣医学会および関係の先生方に改めて御礼申し上げます。

最後になりましたが、本研究をご評価頂いた審査の先生方に、心から深謝を申し上げます。

## 引用文献

1. Sakamoto KQ, Kunisue T, Watanabe M, Masuda Y, Iwata H, Tanabe S, Akahori F, Ishizuka M, Kazusaka A, Fujita S. Accumulation patterns of polychlorinated biphenyl congeners and organochlorine pesticides in Steller's sea eagles and white-tailed sea eagles, threatened species, in Hokkaido, Japan. *Environ Toxicol Chem.* 21(4):842-7 (2002)
2. 板倉隆夫、石塚真由美、藤田正一: P450 の分子生物学、大村恒雄、石村巽、藤井義明編、第 1 版、167-182、講談社サイエンティフィク、東京 (2003)
3. Chiba I, Sakakibara A, Goto Y, Isono T, Yamamoto Y, Iwata H, Tanabe S, Shimazaki K, Akahori F, Kazusaka A, Fujita S: *Environ Toxicol Chem.* 20,1092-7(2001)
4. Ishizuka M, Hoshi H, Minamoto N, Masuda M, Kazusaka A, Fujita S : Alterations of cytochrome P450 dependent monooxygenase activities in *Eriocheir japonicus* in response to water pollution. : *Environmental Health Perspectives* 104: 774-778 (1996)
5. Ishizuka M, Yoshino S, Yamamoto Y, Yamamoto H, Imaoka S, Funae Y, Masuda M, Iwata H, Kazusaka A, Fujita S Isozyme selective alterations of the expression of cytochrome P450 during regeneration of male rat liver following partial hepatectomy. *Xenobiotica* 27(9): 923-931(1997)
6. Fujita S, Chiba I, Ishizuka M, Hoshi H, Iwata H, Sakakibara A, Tanabe S, Kazusaka A, Masuda M, Masuda Y, Nakagawa H. P450 in wild animals as biomarker of environmental impact. *Biomarkers* 6(1):13-25 (2001)
7. Ishizuka M, Okajima F, Tanikawa T, Min H, Tanaka KD, Sakamoto KQ, Fujita S: *Drug Metab Dispos.* 35, 62-6 (2007)

### **Environmental impact of toxic substances on wildlife**

Mayumi Ishizuka (Graduate School of Veterinary Medicine, Hokkaido University)

ishizum@vetmed.hokudai.ac.jp