



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Investigation of mechanisms of rodenticide-resistance using a closed colony of rodenticide-resistant black rats (<i>Rattus rattus</i>) from Tokyo [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	武田, 一貴
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(獣医学)
Dissertation Number	甲第14111号
Issue Date	2020-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/78549
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Kazuki_TAKEDA_review.pdf, 審査の要旨



学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称：博士（獣医学）

氏名：武田一貴

審査委員	主査	教授	石塚真由美
	副査	教授	乙黒兼一
	副査	准教授	池中良徳
	副査	助教	川合佑典

学位論文題名

東京由来殺鼠剤抵抗性クマネズミ (*Rattus rattus*) クローズドコロニーを用いた
殺鼠剤抵抗性獲得機序の解明

**Investigation of mechanisms of rodenticide-resistance using a closed colony of
rodenticide-resistant black rats (*Rattus rattus*) from Tokyo**

野生齧歯類は、20 種以上の人獣共通感染症を媒介し公衆衛生上の害獣であることに加え、農作物の食害等経済被害も問題となっている。さらに、外来動物として離島等の生態系を攪乱する事も報告されている。このげっ歯類の駆除、すなわちペストコントロールのために、殺鼠剤としてはワルファリン等の抗血液凝固系殺鼠剤が広く用いられている。しかしながら、これに抵抗性を示す個体群が世界各地に出現しており、国内では関東近郊のクマネズミの 80%は殺鼠剤に抵抗性を持つことも報告されている。武田氏は、東京で捕獲された殺鼠剤抵抗性クマネズミのクローズドコロニーを用い、代表的な抗血液凝固系殺鼠剤であるワルファリンへの応答を多角的に解析する事で抵抗性メカニズムの包括的な解明を試みた。

ワルファリンはビタミン K エポキシド還元酵素 (VKOR) を阻害し、ビタミン K 依存性の血液凝固因子を枯渇させ出血毒性を示す。従来、世界各地の抵抗性齧歯類では VKOR の結合ポケット内にアミノ酸変異が生じると抵抗性が生じる事が示唆されている。一方、東京の抵抗性ラットで多数確認されている変異パターンである Leu76Pro 変異は結合ポケットや活性残基から離れた位置にあり、どのように抵抗性に寄与するかは不明であった。そこで、本変異が VKOR の VKO 還元活性やワルファリン感受性に与える影響を in vitro 酵素速度論的手法や in silico での結合性シミュレーションで解析した。また、ワルファリンに対する 50%阻害濃度を比較すると Leu76Pro 変異を有する抵抗性群の VKOR では、感受性群（野生型）に比べ有意に高い値を示していた。Leu76Pro 変異 VKOR の立体構造とワルファリン/VKO の結合性をドッキングシミュレーションで評価したところ、抵抗性群はワルファリンとの結合性が低下していたが VKO とは感受性群と同等の結合性を示した。分子動力学シミュレーション

ュレーションを実施したところ、抵抗性群はワルファリンへの最も強力な結合サイトとされる Phe55 とワルファリンとの距離が遠くなり、親和性が低下していた。

次に、抵抗性群にワルファリンを単回経口/静脈内投与し、その応答を薬物動態学/薬力学的に解析した。ワルファリンの 10 mg/kg 単回投与では抵抗性群の血液凝固時間は有意に延長せず薬効が発現しにくい事が示唆された。また、薬物動態学的解析では抵抗性群では血漿中からの排泄能（クリアランス）が高くワルファリンを迅速に体外へ排泄している事が判明した。

ワルファリンは主に肝臓中で薬物代謝酵素シトクロム P450 (P450) により水酸化体に代謝される。そこで、肝代謝能を *in situ* 肝灌流試験により調べたところ、実際に抵抗性群は 5 つ全ての水酸化ワルファリンで有意に 5-8 倍程度高い生成量を示し、ワルファリンに対して高い肝代謝能を有している事が明らかとなった。一方、ワルファリン代謝を担う P450 のタンパク質発現量はウェスタンブロット法で比較すると、感受性群に比べ 1.2-1.3 倍と軽微な変化に留まった。そこで、武田氏は P450 の反応に不可欠なニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリリン酸 (NADPH) を介した電子伝達反応に着目した。S9 画分を用いた内因性 NADPH 産生能依存性の P450 ワルファリン代謝活性試験を行ったところ、抵抗性群は全ての水酸化体で感受性群より有意に高い代謝能を示し、高代謝能の原因が代謝を直接担う P450 自体の変異ではなく、その上流の NADPH 産生能の活性化である事が示唆された。次に、肝臓中での NADPH 産生を担う主要な経路であるペントースリン酸経路を解析した所、実際に抵抗性群が有意に高い NADPH 産生活性を示した。

以上、本研究により抵抗性の原因として従来から提唱されてきた VKOR の結合ポケット内の変異に加えて、ポケット外の変異が抵抗性獲得に寄与する事を実証した他、NADPH 産生の向上とそれに伴う P450 による殺鼠剤代謝能の活性化という新しい抵抗性獲得機序が明らかとなった。さらに、本研究で示された新規抵抗性獲得機序は世界各地で確認されている殺鼠剤抵抗性齧歯類のメカニズムの更なる理解や新規殺鼠剤の開発への応用に対して有用な知見だと考えられる。よって、審査委員一同は、上記学位論文提出者、武田一貴氏の学位論文は、北海道大学大学院獣医学研究科規程第 6 条の規定による本研究科の行う学位論文の審査等に合格と認めた。