

学位論文題名

日本におけるスーパーラットーワルファリン抵抗性クマ
ネズミ(*Rattus rattus*)ーの分布と抵抗性獲得機構の解明

学位論文内容の要旨

ワルファリン抵抗性クマネズミ(*Rattus rattus*)はスーパーラットと呼ばれ、日本では、1980年代以来東京都で報告されてきた。このスーパーラットが駆除されることなく生息数が増加すると、公衆衛生上の問題だけでなく、人獣共通感染症の病原体の媒介生物としても問題である。抵抗性個体は駆除から免れるので、都市のインフラストラクチャーに障害を与える可能性もあり、その影響は非常に大きい。本研究では、日本におけるスーパーラットの分布とこれらの持つVKORを調べて、その変異パターンと性状について比較した。

本研究を総括すると、第I章において、日本のクマネズミに関してVKORC1遺伝子のシーケンス解析を行ったところ、9種類の変異パターンが確認され、そのうち4パターンはワルファリンに抵抗性を持つものであった。本研究で確認されたクマネズミにおける変異パターンは日本独特のもので、またドブネズミにおいても報告がないものだった。AFLPフラグメント解析を用いた、系統地理的解析においては、Ala41Valの変異個体に関してVKORC1遺伝子の変異の獲得の起源は複数存在していることを示唆する結果を得た。

第II章においてはVKOR酵素の変異に伴う機能的変化について検討したところ、抵抗性個体と感受性個体の生理的条件下での血液凝固時間には有意な差は見られなかったが、ワルファリン投与後の血液凝固時間は、ワルファリン感受性個体は、投与後24時間及び48時間後に血液凝固時間の延長が見られたのに対し、抵抗性個体はワルファリン投与後の変化が認められなかった。このことから、ワルファリン抵抗性個体は、ワルファリンの投与とは無関係にビタミンK依存性血液凝固因子を生産することができることを明らかにした。

また、VKOR酵素活性のカイネティックパラメーターに関しても、抵抗性個体のVKOR酵素の酵素効率は、ワルファリン非存在下の条件で感受性個体よりも有意に低いことから、抵抗性個体のVKOR酵素は、生理的濃度レベルの非常に低い基質濃度で非常に低い酵素活性しか持たないことが示され、ビタミンKサイクルによるビタミンKの再利用より、外界からのビタミンK摂取量を増加させている可能性が考えられた。また東京由来のワルファリン抵抗性個体のVKOR酵素はワルファリンによる活性阻害がかかりにくいことを明らかにした。これらの機能的変化は、ワルファリンに対する抵抗性を獲得する要因であった。

第III章において、VKOR酵素の変異に伴う構造的変化について検討するために、ドッキングシミュレーションを行った。その結果VKOR酵素とワルファリンの間の分子の距離は、抵抗性個体の方が感受性個体よりも長いことを明らかにした。特に東京由来抵抗性クマネズミにおいては、その酸化還元反応における電子伝達率は、抵抗性クマネズミの電子伝達率が、

感受性個体のものと比較して2.7%から5.2%にしかすぎず、この構造的変化がワルファリン抵抗性個体におけるVKOR酵素のワルファリン感受性が弱めていると考えられた。

ワルファリン感受性ドブネズミは0.005%という低濃度のワルファリン含有餌の摂取によりわずか3~4日で致死に至るのに対し、ワルファリン感受性クマネズミは0.025%ワルファリン含有餌を用いても致死までに約1週間を必要とした。クマネズミにおけるワルファリン感受性はドブネズミと比較して弱いため、クマネズミの駆除にはワルファリンではなくプロマジオロンをはじめとするワルファリンよりも強力な殺鼠剤を使用すべきだとする考えがある。しかし、野生型のVKOR酵素を持つクマネズミも確かにワルファリンに感受性を示すため、実際の現場においてはクマネズミの駆除においてもワルファリンはしばしば使用されている。プロマジオロンに代表される、より強力な血液凝固阻害作用を持つ第2世代殺鼠剤や、クロロファシノンに代表されるインダンジオン系殺鼠剤に関しては、本研究ではワルファリン以外の薬剤を使用していないので、確かなことを述べることはできない。しかし、Tyr139Pheの変異を有するワルファリン抵抗性個体は、プロマジオロンに対しても抵抗性を持つという報告や、インダンジオン系殺鼠剤の一つであるクロロファシノンに対してもLeu120Gln、Tyr139Cys、Tyr139Pheを持つ抵抗性個体は感受性個体よりも長く生存するという報告もあり、本研究で取り扱ったワルファリン抵抗性個体も、他の血液凝固阻害作用の持つ殺鼠剤に対して抵抗性を持ちうるということは十分に想定される。一方で、Tyr139Cysの変異を持つドイツ由来の抵抗性個体は第二世代殺鼠剤に分類されるジフェナクームには抵抗性を示すが、同じ第二世代殺鼠剤に分類されるプロジファクームには感受性を示すという報告もあるので、VKORC1の変異パターンのみで殺鼠剤に対する抵抗性の有無を判定することは難しい。近年、第二世代殺鼠剤によるRattus属の駆除が世界各地で実施されているが、非標的動物である鳥類にも被害を与えてしまうこともあり、薬剤を用いたRattus属の駆除方法は将来的に他の種や環境も考慮に入れて検討する必要がある。

ワルファリン以外の血液凝固阻害剤も含め、VKOR酵素との関係をはじめとして抵抗性獲得のメカニズムにはまだ不明な点が存在する。デンマークにおいて、VKORC1遺伝子に変異がないにもかかわらず、プロマジオロンに抵抗性をもつドブネズミ個体が確認された。また本研究で検討したワルファリン抵抗性クマネズミは、非常に低いVKOR酵素活性しか持たないにもかかわらず、十分量のビタミンK依存性血液凝固因子を作り出し感受性クマネズミと同じ血液凝固時間で生存していることがわかった。このような個体がどのようなメカニズムで血液凝固系を維持し、生存し続けるのかといった新たな疑問点も生じた。

このような個体のプロトロンビン活性化機構として考えられるのは、まず1)ビタミンKサイクルとは独立したγカルボキシル化のシステムが存在すること、2)VKOR酵素と異なる電子伝達経路が発達しており、それがビタミンK代謝を司っていること、3)ビタミンKエポキシドからビタミンKヒドロキノンの反応はVKOR以外にも複数の酵素が関与しており、これらがプロトロンビンの活性化に必要なビタミンKを供給している、4)ビタミンKの摂取量や腸内細菌によるビタミンK産生能が高く、ビタミンKサイクルは破綻していてもγカルボキシル化に必要なビタミンKが絶えず供給されていることなどが考えられる。これらを明らかにするために、さらなる研究が求められる。

学位論文審査の要旨

主査	教授	石塚	真由美
副査	教授	伊藤	茂男
副査	准教授	乙黒	兼一
副査	講師	池中	良徳

学位論文題名

日本におけるスーパーラットーワルファリン抵抗性クマ ネズミ (*Rattus rattus*) の分布と抵抗性獲得機構の解明

ワルファリン抵抗性クマネズミ (*Rattus rattus*) はスーパーラットと呼ばれ、日本では、1980年代以来東京都で報告されてきた。本研究では、日本におけるスーパーラットの分布とこれらの持つビタミンKエポキシド還元酵素VKORの変異パターンと性状について比較した。

国内に棲息するクマネズミ275個体に関してVKOR遺伝子のシーケンス解析を行ったところ、9種類の変異パターンが確認され、そのうち4パターンはワルファリンに抵抗性を示す個体が有していた。本研究で確認されたクマネズミにおける変異パターンは日本独特のもので、またドブネズミにおいても報告がないものだった。AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) 解析を用いた系統地理的解析においては、Ala41Valの変異個体に関してVKORC1遺伝子の変異の獲得の起源は複数存在していることを示唆する結果を得た。

そこで、VKOR酵素の変異に伴う機能的変化について検討したところ、東京由来のワルファリン抵抗性個体のVKOR酵素はワルファリンによる活性阻害がかかりにくいことが明らかになった。これらの機能的変化は、ワルファリンに対する抵抗性を獲得する要因であった。

さらにVKOR酵素の変異に伴う構造的変化について検討するために、ドッキングシミュレーションを行った。その結果VKOR酵素とワルファリンの間の分子の距離は、抵抗性個体の方が感受性個体よりも長いことを明らかにした。特に東京由来抵抗性クマネズミにおいては、その酸化還元反応における電子伝達率は、抵抗性クマネズミの電子伝達率が、感受性個体のもものと比較して2.7%から5.2%にしかすぎなかった。この構造的変化がワルファリン抵抗性個体におけるVKOR酵素のワルファリン感受性を弱めている可能性が示された。

以上の結果から、田中和之氏は、殺鼠剤に抵抗性を持つ*Rattus*属の国内分布やVKOR遺伝子の変異パターンを明らかにし、またこの変異がVKOR分子の機能や構造にもたらす変化を明らかにした。これは殺鼠剤抵抗性の新たな機構を明らかにするものであり、審査員一同は、上記学位論文提出者田中和之氏の博士論文は、北海道大学大学院獣医学研究科規程第6条による本研究科の行う博士論文の審査等に合格と認めた。