

# 鳥類におけるスクリーニング法の開発の現状と今後の展望

和田 勝

東京医科歯科大学

紹介いただきましてありがとうございます。東京医科歯科大学の和田です。

今、最初の演者であるハーマンさんの話にありましたが、彼の話を受けて、鳥ではスクリーニングとテストがどういう状況にあるか、それから我が国はどのような取り組みをしているかについてお話ししたいと思います。日本語と英語のタイトルがちょっと違うのですが。

私は、鳥を使った内分泌学 (Avian Endocrinology) をしていますが、少し個人的な話から始めますと、最初に内分泌攪乱化学物質の仕事に取りかかるきっかけとなったのは、1999 年の 5 月にライブチヒで行われた第 1 回の鳥のリプロダクションエキスパートグループに参加をしたことでした。これはそのときの会場を外から撮ったものです。

そのときの会議の目的は、先程、最初の演者であるハーマンさんのお話にありましたように、テストガイドライン 206 の改訂が一つの目的でした。今まで使っていたウズラ、コリンウズラ、それからマガモを使ったガイドラインから、マガモを落として、コリンウズラとウズラを使ったものに改訂するに際して、コリンウズラを選ぶか、それともウズラ (ニホンウズラ) を選ぶか、どちらにするかという議論から始まりました。

そのときにエンドポイントをどうするか、実験のデザインをどうするか、統計処理をどうするかといったいろいろな話がなされ、実際にはそのときに決着がついたわけではなく、バリデーション・テストを行う必要があるのではないかという話になりました。

会議の最後の方になって、やはり内分泌攪乱化学物質に対するガイドラインが必要なのではないかということになり、この話は継続をすることにしました。

次に第 2 回は 2000 年 11 月にナッシュビルで行われた会議ですが、これはナッシュビルのコンベンションセンター内の一室で行ったものです。第 2 回の場合は少し名前が変わって、Endocrine Disruptors という言葉が前に出てきて、内分泌攪乱化学物質に対するガイドラインをどうするかという話になりました。

そのときにはすでに二世世代試験を目指すこと、しかも鳥としてはウズラ (Japanese Quail) を使うことに決まっていて、ドラフトが作られ、それを事前に配布して、それについて議論をすることにして、ここではだいぶ長い間議論が行われました。壁にかかっているのは、その議論の流れをブレインストーミング的に書いたものです。

そのときの目的は、1999 年 12 月に配られたドラフトをリバイズし、レビューして、新しくガイドラインを作ろうというものでした。二世世代試験にはどういう問題があって、どういうスケジュールが必要かということが話し合われました。さらに実際に研究を行い、プロポーザルを作ろうという話になりました。

ただ、問題になったのは、現行の 206 はある意味で一世世代試験ですから、それとこの二世世代試験の関係をどうするかという点です。その後、プレバリデーションのテストを行うという話にはなりましたが、あまり進展はなくて、現在ではバリデーション・テストをとにかく分担して行おうということが決まっており、ではそれを具体的にどうするかというところで一応止まっています。

それから、実際 206 の改訂に関しても、先程言ったコリンウズラ (Bobwhite) を使うかウズラを使うかという、比較の実験をしなければいけないという話になっていますが、それも、では具体的にどうするかというのは今、止まっている状態です。

そのような状況のもと、ライブチヒの会議に参加をして、この問題には取り組まなければならないと感じて日本に帰ってきたわけです。なぜ鳥が必要かというのは、今まで魚と両生類での研究がありましたが、基本的には生態学あるいは生態に関する影響を見るには、鳥というのは非常にいい動物だからです。Avian Endocrinologist としての宣伝を少しスライドでお見せしていますが、鳥は非常に重要であるということです。

その理由の第一は、鳥が扱いやすいということで、閉鎖卵という閉じた系の卵を生むため、ほ乳類に比べたら卵を非常に扱いやすいということです。これはウズラの卵ですが、完全に閉じた系として生み出されます。

発生をしてヒナになるわけですが、つまりそのための栄養や必要な素材は、すべて最初に卵の中に埋め込まれているというか、投資されているわけです。

栄養素として卵黄の中には、ホスビチンとリポビテリンというタンパク質があります。これはすでにもう魚のところでお話がありましたが、ビテロゲニンという前駆体タンパク質として肝臓で作られて、卵胞に送り込まれているものです。

もう一つは栄養素、エネルギー源として、トリグリセイドが非常に重要で、これがやはりたくさん卵黄の中に蓄えられています。こちらビテロゲニンの場合と同じように、エストロゲンの働きによって、肝臓でリポタンパク質の中に埋め込まれるわけです。特にそのリポタンパク質の中では、超低密度リポタンパク質 (Very Low Density Lipoprotein: 以降 VLDL と略) の中に包まれるようなかたちで、実際アポタンパク質 B に包まれるようなかたちで作られて、送り込まれます。

このスライドは、もう成熟した雄と雌の生殖腺と生殖輸管ですが、雌がこちらで雄とは全然違います。雌の場合はゴナドトロピンの働きによって肝臓にエストロゲンが働いて、肝臓から今のようにビテロゲニンと VLDL が血中を運ばれ、卵巣の中に蓄えられることになるわけです。雄の場合は、同じようにゴナドトロピンが出て、もちろんアンドロゲンがそれに応じて分泌されますが、アンドロゲンが肝臓に働いて、ビテロゲニンを作らせることはありません。VLDL はやや少ない量ではありますが生産されています。したがって、雄では非常に少量の VLDL が血中を流れていることになります。

今のような背景があって、我々は日本で鳥を使って内分泌攪乱化学物質にどう対応するかというので、二つの面からプロジェクトを立てることにしました。幸いなことに環境省の補助を受け、一つは側面を補助するようなリサーチ・プロジェクトで、これは名古屋大学の島田清司教授、それから広島大学の吉村幸則教授などを中心として現在も行われております。もう一つは、スクリーニング法をとりあえず鳥でも確立しようということで、スクリーニング法を確立するための努力を始めました。

今お話ししたように、魚の場合と同じように鳥の場合でも、ビテロゲニンが非常に有効な雌のエストロゲン様物質曝露の指標となりますので、ビテロゲニンを何とかアッセイできる測定法の開発に取り組みました。鳥の場合、ビテロゲニンには分子量の異なる3つの分画 (I~III) がありますが、IIIはほとんどトレース程度の少量で、主なものはこのビテロゲニンIIです。これがIとIIの分子で、先程述べたように、分子の中にリポビテリンとホスビチンと、もう一つリポビテリンがあり、卵黄の中では分断されて蓄えられていくわけで、こういう構造をしています。こちらがメジャーのビテロゲニンIIです。基本的には同じような構造で、分子量が少しビテロゲニンIIの方が少し小さいのです。

ビテロゲニンを抗原にしてもよかったのですが、抗原にするには大量に得られて扱いやすい卵黄のリポビテリンの方がいいということで、リポビテリンIの部分をウズラの卵黄から分離し、それをさらにゲルろ過をしてきれいにしました。これがその途中の結果です。これは雄の血清、こちらが雌の血清で、ここにビテロゲニンがありますが、それをリポビテリンにしたものがこれです。これが大体、分子量140だったかのリポビテリンの分画です。これはウサギによって抗体を作って、IgGフラクションだけを選んで、さらに吸着をしてきれいにして得られた抗体を使ったものです。これはダイリューション・テストで薄めていくと下がってきます。

これは雄の血清と雌の血清に対する抗体の反応性で、雌の血清には確かに抗体に反応する分子があり、雄には全然ないことを示しています。

このスライドでは、さらに抗体のキャラクタライゼーションをしたもので、こちらが SDS-PAGE で見たものです。これがビテロゲニンのもので、このところにあるものがそうです。それをウエスタン・ブロッティングで、こちらが今回得られた抗体で染めたもので、こちらがこれと同じもので雌の血清で、こちらがビテロゲニンの標品、血清中のビテロゲニンです。このところに染まっていて、確かに抗体が認識しています。こちらは北海道大学の原彰彦教授から供与してもらったウミネコの抗体を使ったものです。やはり同じように、このところに認識しているというので、これで使えることになりました。

そして、これを使って ELISA を作ったのがこれです。こちらはスタンダードカーブで、2000ng/ml からここまで、一応スタンダードがちゃんと書けています。それから平行性を見たものがこれで、雌の血清も確かに平行しているということで、確かにこの系を使うと、血清中のビテロゲニンを測ることができるということがわかりました。

もう一方の VLDL ですが、こちらの方は HPLC を使って測定をしています。これはその測定の概要を示したのですが、簡単に言いますと、HPLC を使って粒子径によって分画にわけ、それを二つに分けて、さらに酵素を使って各フラクションに含まれているトリグリセリドとコレステロールを反応させて、それをこの検出器で検出しているというやり方です。そしてデータを取り込んで処理しています。粒子径の大きなトリグリセリドを含む分画が VLDL とみなすことができます。

これは非常にプレリミナリーな仕事ですが、ヒメウズラの雄 4 羽と雌 4 羽で測定した結果です。緑で示したものが血中の HDL、白で示したものが VLDL です。雌の、しかも産卵中の雌だけに VLDL が高くなって、確かに産卵に伴ってトリグリセリドを運ぶために VLDL が増加していることがわかります。

これは同じヒメウズラを使って、光刺激によって、短日においておいて生殖腺が全然、発達していない状況から、発達させるような状況に移したときに、VLDL が雌では増えていくけれども、雄では全然増えていかないことを示したものです。

今度は雄にエストロゲンを、少し量は多い (1 mg) ののですが投与したときに、VLDL が確かに増えていくことを示したものです。

この二つのツールを使ってスクリーニングをするということで、性的に成熟した、しかも長日においておいたウズラを使って、そこに被験物質を 7 日間投与しました。いずれも腹腔内 (intraperitoneal) の注射を打って投与しました。いくつかおこなっているのですが、今回は、エストラジオールとジェチルスチルベストロールだけの結果をお見せします。

VLDL とビテロゲニンの、縦軸が濃度で、横軸が用量になっています。少し濃度が濃いのですが、最初の実験なので、確実に結果を得るためにわりあい濃いところから始めましたが、ドース・レスポンス (用量反応性) があることはわかると思います。

これは、こちら側に VLDL、こちら側のビテロゲニンを打ったときの相関を見たものですが、低いところではやや VLDL の反応が悪いので、ちょっと濃度の低いところで立ちあがっているのですが、相関があることがわかると思います。

これは、ジェチルスチルベストロールですが、ジェチルスチルベストロールの場合は少し高い濃度のところではもう頭打ちになっているのですが、そこまでのところでは用量反応性があることがわかると思います。

これは、縦軸がビテロゲニン、横軸が VLDL で、両者の相関を見たものです。やはり先程と同じように、低いところの VLDL はちょっと出が悪いので立っていますが、統計的に有意な相関はあります。

このような方法を使っておこなっているのですが、ELISA に関してはもう少し感度を上げる必要があると考えています。いま示した実験の結果は、ポリクローナルの抗体を使って得た結果ですが、それをモノクローナル抗体に変えて、さらに各パーツの見直しをして感度を上げるようなことをおこなっています。それから VLDL の方も、分離を少し細かくおこなうようなことをして、感度を上げる努力をしています。

こういった方法を使ってスクリーニングを行っていて、実際に先程、昨日来からお話があります SPEED'98 でリストアップされたいくつかの物質に関して、実際にスクリーニングの仕事をおこなっています。その中には、ノニルフェノールやオクチルフェノール、トリブチルスズなどが含まれています。そのほかにもあるのですが、いくつかのものについては現在も行っているところです。

最初の方のスライドでお話ししました研究、つまり実際に二世世代試験に向けて、広島大学の方では、親に打ったときに子どもにどういう影響が出るかを調べています。そういった結果とスクリーニングの結果の、おそらく両者の結果を合わせて、現在、次のステップとしては、最初の演者のハーマンさんのお話にあった、OECD が目指している二世世代試験 (Two-generation Test) にどのような寄与ができるか、どのようにそれを具体化できるかを、これから考えていかなければならないと考えています。

今のはエストロゲニックの効果を見ているわけですが、そのほかにアンドロゲンの効果を見る方法を新しく開発する必要があるというので、これにも取り組んでいます。

現在、OECD の鳥の内分泌攪乱化学物質のガイドラインの策定に関してはどういう状況にあって、日本がそれに対してどのようなことを寄与できるか、具体的にどういうことをしているかという話をしました。実際のこれらの仕事は医科歯科大学とトランスジェニック株式会社との共同の研究で行っているものです。

以上で終わります。

## 質疑応答

クーター：鳥類の素晴らしい研究概要についてお話しいただきありがとうございました。何かご質問はありますか。はい、どうぞ。

質問：どうもありがとうございます。少し位置づけについてお伺いしたいのです。今、先生の方でやっていただいているようなアッセイが、OECD の 206 の中にエンドポイントとして組み込まれていく。そのようなお仕事と位置づけて、されていると理解してよろしいですか。

和田：206 の方では、必ずしもビテロゲニンが入ってはこないかもしれませんが。今までの、要するにリプロダクティブ・トキシコロジーのことですから、卵殻の厚さや孵化能力 (hatch ability) といったことになるかもしれませんが、二世世代試験の方ではビテロゲニンは必ず入ってくると思います。そのようなお話で方向は進んでいます。

質問：今、OECD の方で、二世世代試験により、鳥類のバリデーションも進みつつあるように最初、お話しいただいたように思うのですが、それについては今のところ、特にこちらから二世世代試験のバリデーションに参画するとか、日本としてそういう動きはまだないと考えてよろしいですか。

和田：先程ハーマンさんのお話にありましたが、鳥の場合はエキスパートグループは、エコ・トキシコロジストが多くて、先程の話にありましたが議論、議論、議論で、なかなかうまくシェアするというようにはいかないのです。本当はそういくべきだと思いますが、なるべくそういう方向に持っていこうとは思っていますが。

質問：ありがとうございました。

クーター：他に質問はありませんか？なければ、和田先生、発表いただき有難うございました。