

### 3 影響調査

#### 3-1 影響調査の概要

ダイオキシン類に急性かつ大量の暴露があった場合の強い毒性については良く知られている。しかし通常の生活の中で、主に食餌を通して少しずつ体内に取り込まれ、食物連鎖によって生物濃縮され、蓄積されたダイオキシン類の影響については、まだ不明の点が多い。実験的に、あるいは過去の事故などによる暴露経験から知られている影響には、生殖機能、甲状腺機能、免疫機能、中枢神経機能などへの影響がある。体内のダイオキシン類の蓄積量とこれらの影響との関連性、作用機序はまだ十分には明らかになっておらず、これらの影響の有無、あるいはその程度を知るためには、影響の指標（バイオマーカー）が必要である。

ダイオキシン類は体内に入ると Ah 受容体（aryl hydrocarbon receptor）に結合し、薬物代謝酵素を誘導することが明らかになっている。これが生体に対する影響の最初の段階と考えられ、薬物代謝酵素活性の測定はダイオキシン類の影響の指標として広く用いられている。こうした作用には種差、個体差があると考えられ、遺伝学的手法でダイオキシン類の影響への感受性の指標も研究されている。また、ダイオキシン類の影響の作用機序は Ah 受容体を介するものばかりではないことも分かってきている。

機能への影響は生理学的指標の変化で測ることができる。たとえば内分泌腺の機能変化は分泌されるホルモンの量を指標として判断できる。免疫機能の変化は血球数やその内容の検査、免疫グロブリンの測定、リンパ球機能試験などで判断できるが、免疫機能は複雑で複数の検査を総合的に判断する必要がある。野生動物においては検査法の確立、正常値の把握などが遅れている分野である。また中枢神経機能に関しては行動変化などの指標が検討されているが、確立されていない。

生体への影響でわかりやすいものは奇形などの形態学的変化であるが、これは影響がかなり進んだ状態と考えられる。肉眼的に変化が認められなくても生殖腺や甲状腺、免疫組織などの中で変化が起きていることもあり、こうした変化は病理組織学的検査で調べることができる。

野外でこれらの指標の示すものはダイオキシン類特定の影響ではなく、その他の化学物質などの影響を合わせた複合的な影響の結果と考えられる。物質や異性体毎に特定の影響を知るためには実験が必要だが、野生生物を用いて厳密に条件を管理した実験はかなり困難と考えられる。近年は生体を用いるよりも培養細胞などを用いた実験が主流となってきており、野生生物でも応用が期待される。

## 3-2 薬物代謝酵素の測定

田辺信介・久保田彰・岩田久人

### (1) 検査の意義

有機汚染物質の暴露によって生じる生化学反応の一つとして、薬物代謝酵素の誘導があげられる。例えばダイオキシン類や芳香族炭化水素は、生体内に取り込まれると、Ah 受容体(Aryl hydrocarbon receptor)を介してチトクローム P450(CYP)1A サブファミリーを含む複数遺伝子の転写活性化を促し、さまざまな毒性影響(催奇形性、免疫抑制、発癌、細胞内シグナル阻害、細胞成長の阻害)を惹起する(Whitlock et al. 1996、Okino and Whitlock 2000、Safe 2001)。従ってCYPの発現量をモニターすることは、有機汚染物質の暴露や毒性を検証する有望な手法と考えられている。

有害物質の環境汚染や生態毒性を検知する手法として、従来は個々の化学物質を分析機器等で測定する分析化学的手法が用いられてきた。このような分析化学的手法では、残留濃度から影響を間接的に推定できるが、その毒性の総体を理解することは難しい。CYP依存酵素活性(AROD活性; alkoxyresorufin *O*-dealkylase 活性)の測定は、個々の化学物質量をCYP誘導能の総量として簡便迅速に評価できるため、分析化学的手法を補足する手段として、近年環境調査に利用されるようになってきた。

### (2) 試料と測定方法

薬物代謝酵素活性の測定には、生物を捕殺後すみやかに組織を取り出し、液体窒素で急速凍結したものをを用いる。凍結した組織は、分析時まで-80以下の超冷凍庫で保管する。凍結組織はホモジナイズ後、遠心分離によってミクロソーム画分を調製する。まずミクロソーム画分のタンパク濃度を測定し、タンパク濃度当たりのCYP活性を測定する。ここでは、CYP活性として4種のAROD活性、すなわちEROD(Ethoxyresorufin *O*-deethylase; エトキシレゾルフィン *O*-脱エチル化)活性、MROD(Methoxyresorufin *O*-demethylase; メトキシレゾルフィン *O*-脱メチル化)活性、PROD(Pentoxyresorufin *O*-depenethylase; ペントキシレゾルフィン *O*-脱ペンチル化)活性、BROD(Benzyloxyresorufin *O*-debenzylase; ベンジロキシレゾルフィン *O*-脱ベンジル化)活性の測定方法について説明する。

#### ミクロソームの調製

ミクロソームの調製は超遠心法(Guengerich 1982)で行う。組織の試料数グラム

を pH 7.4 に調整したホモジネーション緩衝液 (50 mM Tris HCl、0.15 M KCl) に加え、テフロンホモジナイザーにて細胞を破壊する。これを遠心管に移し、750 g・4 で 10 分間遠心分離する。得られた上清を 12000 g・4 で 10 分間遠心分離し、さらにその上清を 100000 g・4 で 90 分間遠心分離する。沈殿層から最下層のグリコーゲンを取り除いたものをマイクロソーム画分とし、pH 7.4 に調整した TEDG バッファー (50 mM Tris HCl、1 mM EDTA、1 mM DTT、20 % (v/v) glycerol) で適度に懸濁し、液体窒素で急冷後 -80 で保存する。以下の項では、すべてこのマイクロソーム画分を用いる。

#### タンパク濃度の測定

タンパク濃度の測定は、BCA 法 (Smith et al. 1985) で行う。測定には BCA キット (Pierce 社) およびマイクロプレートリーダー (TECAN 社; SPECTRAFluoroPlus) を使用する。48 穴マイクロプレートのウェルに蒸留水で希釈したマイクロソーム溶液を 25  $\mu$ l 加え、BCA キットの A 液・B 液の混合 (50 : 1) 溶液 500  $\mu$ l を各ウェルにすみやかに添加する。37 で 1 時間インキュベーション後、560 nm の吸光度を測定する。同プレート上でスタンダードおよびバッファーブランクの吸光度を測定し、検量線からタンパク濃度を算出する。スタンダードには Bovine serum albumin (牛血清アルブミン) を用いる。

#### CYP 活性 (AROD 活性)

AROD 活性の測定は Kennedy et al (1995) の方法に準拠し、マイクロプレートリーダーを使用して行う。Ethoxyresorufin (ER)、Methoxyresorufin (MR)、Pentoxoresorufin (PR) のメタノール飽和溶液を調製する。Benzyloxyresorufin (BR) は、DMSO 飽和溶液を調製する。これら飽和溶液を pH 7.8 に調整したアッセイバッファー (50 mM Tris HCl、100 mM NaCl) に溶解し、基質バッファー溶液とする。各基質バッファー (ER、MR、PR、BR) の最終濃度は、それぞれ 2  $\mu$ M、5  $\mu$ M、2  $\mu$ M、2  $\mu$ M とする。すべての基質バッファー溶液はアルミホイルで遮光する。

基質バッファー溶液 150  $\mu$ l とサンプルのマイクロソーム溶液 10  $\mu$ l をマイクロプレートの各ウェルに加えた後、すみやかに NADPH 溶液 (6.68 mM) 40  $\mu$ l を添加し、励起波長 535 nm、測定波長 595 nm にて 1 分間隔で 5 回蛍光度を測定する。スタンダードには 1  $\mu$ M レゾルフィン/メタノール溶液を用い、その検量線の傾きとサンプルの測定によって得られた近似直線の傾きから、以下の式を用いて活性値を算出する。検量線からはずれるサンプルについては、適当に基質バッファー溶液とマイクロソーム溶液の量を変え同様の方法で測定する。基質バッファーは、冷蔵庫で一週間程度保存可能である。

異物代謝酵素活性 (pmol/min/mg protein)

$$= (\text{Sample Slope}/\text{STD Slope}) \times \text{マイクロソーム希釈倍率}/(\text{タンパク濃度} \times \text{マイクロソーム Vol.})$$

### (3) 測定データの解釈

ダイオキシン類や芳香族炭化水素による毒性影響評価に関する研究は、これまで実験動物や一部の野生動物を用いて行われ、肝臓の CYP1A 発現量や活性はこれら物質の投与(暴露)によって上昇することが報告されている(Safe *et al.*, 1985; Guruge and Tanabe, 1997)。すなわち、ダイオキシン類や芳香族炭化水素の高濃度暴露により、CYP1A サブファミリーが誘導されることが示唆されている。一方、ダイオキシン類など外来異物の侵入のほかに、外的要因として食事(餌)、内的要因として種差や系統差、性差、年齢差、栄養状態、病態、遺伝的要因に基づく個体差などが薬物代謝酵素活性の変動をもたらすことも知られている(加藤ら, 1995)。野生動物は実験動物のように一定の条件下で飼育されているわけではないので、これらのうちいくつかの要因が複合して薬物代謝酵素の活性に影響を与えている可能性もある。しかしながら、一般にこれらの要因による CYP1A の発現量や活性の変動は、一般環境に存在するレベルのダイオキシン類等の暴露を受けたことによる変動よりも小さい。したがって、野生動物における CYP1A は有用なバイオマーカーとして適用できる。

#### 参考文献

- Guengerich, F. P. 1982. Microsomal enzymes involved in toxicology- analysis and separation. Principles and Methods of Toxicology (Hayes, A. W. ed.), Raven Press, New York, 609-634.
- Guruge, K. S. and Tanabe, S. 1997. Congener specific accumulation and toxic assessment of polychlorinated biphenyls in common cormorants, *Phalacrocorax carbo*, from lake Biwa, Japan. Environmental Pollution, 96, 425-433.
- 加藤隆一・鎌滝哲也. 1995. 7章 病態や栄養による薬物代謝の変動、8章 薬物代謝の個体差、遺伝的多型、年齢差、性差、人種差および種差、薬物代謝学 医療薬学・毒性学の基礎として、東京化学同人、149-176.
- Kennedy, S. W., Jones, S. P. and Bastien, L. J. 1995. Efficient analysis of cytochrome P4501A catalytic activity, porphyrins, and total proteins in chicken embryo hepatocyte cultures with a fluorescence plate reader. Analytical Biochemistry, 226, 362-370.
- Okino, S. T. and Whitlock, J. P. Jr. 2000. The aromatic hydrocarbon receptor, transcription, and endocrine aspects of dioxin action. Vitamins and hormones, 59, 241-264.
- Safe, S. 2001. Molecular biology of the Ah receptor and its role in carcinogenesis.

Toxicology Letters, 120, 1-7.

- Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J. and Klenk, D. C. 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry*, 150, 76-85.
- Safe, S., Bandiera, S., Sawyer, T., Robertson, L., Safe, L., Parkinson, A., Thomas, P. E., Ryan, D. E., Reik, L. M., Levin, W., Denomme, M. A. and Fujita, T. 1985. PCBs: Structure-function relationships and mechanism of action. *Environmental Health Perspectives*, 60, 47-56.
- Whitlock, J. P. Jr., Okino, S. T., Dong, L., Ko, H. P., Clarke-Katzenberg, R., Ma, Q. and Li, H. (1996) Induction of cytochrome P4501A1: a model for analyzing mammalian gene transcription. *FASEB Journal*, 10, 809-818.

### 3-3 内分泌学的検査

#### (1) 検査の意義

視床下部 - 下垂体 - 甲状腺系と視床下部 - 下垂体 - 生殖腺系の内分泌器官に化学物質が影響を与えることが疑われている。これらの内分泌機能は体内を循環している血液中のホルモンの量で知ることが可能で、ダイオキシン類などの影響指標の一つとしてホルモン濃度測定が利用されている。

しかし視床下部や下垂体から分泌されるホルモンは種毎に測定系を確立しなければならず、さまざまな野生動物での利用は困難である。一方、甲状腺から分泌される甲状腺ホルモンや生殖腺から分泌される性ホルモンは、種差に関わらず同一方法で測定が可能で、野生動物においても比較的容易に利用可能である。ここでは主に哺乳類と鳥類の甲状腺ホルモンと性ホルモンについて測定結果の解釈と注意点などについて解説する。

また、鳥類以下の卵生脊椎動物でエストロゲン作用の有無の指標と考えられているピテロジェニンについても、ホルモンではないが、ここで触れることとした。

#### (2) 試料と測定方法

##### 1) 試料

ホルモンの測定には血液（血清または血漿）を用いる。採血後、なるべく早く血清または血漿に遠心分離し、冷凍保存すれば長期保存が可能である。ピテロジェニンは血液の他、産成部位の肝臓中の濃度を測ることもある。

心臓停止後の採血は困難であるが、解剖時に採取した血液（重度に溶血していることが多い）でもホルモン測定は可能な場合が多い。種や個体の状態などにもよるが、全血で1mlあれば1～2項目の測定は可能で、10ml以上採取できればここで扱うホルモンをすべて測定することが可能である。

血液を試料とする場合は、同一個体（生体）から経時的に繰り返し採取することが可能で、死体を利用する薬物代謝酵素測定や病理検査では得られない変化を観察できる可能性がある。しかし血液中のダイオキシン類の測定には、現時点では50ml程度の血液が必要で、大型動物でなければ血液のみでダイオキシン類濃度とホルモン濃度などを同時に測定することはできない。

またホルモンの測定値は、測定に用いる抗体の特性などにより、同一試料でも複数

回測るとかなり差があることがある。このため、二重または三重測定を行い、数値を比較する試料は同一時にまとめて測定する、精度管理のためにコントロールを同時に測定する、などの注意が必要である。

なお、尿や糞を試料として排出されたホルモンの代謝物を測定する方法も考えられるが、代謝物は種によって異なるため、これらを試料とする場合は代謝物の種類と測定法を確認する必要がある。

## 2) 測定方法

### 甲状腺ホルモンおよび性ホルモン

測定は抗原抗体反応を利用するイムノアッセイ法で行う。測定キットは各種市販されており、近年は自動化装置での測定も多い。甲状腺ホルモンや性ホルモンは脊椎動物では同一物質であり、動物の血清でも医療検査機関に依頼して測定することが可能であるが、動物ではヒトよりも濃度が低く測定できない項目もある。

ラジオイムノアッセイ (RIA) は感度が高く、長く利用されている測定法であるが、抗体の標識に放射性同位元素を用いるため、その使用ができる設備が必要である。近年は、放射性同位元素ではなく酵素や発光物質を標識に用いる、エンザイムイムノアッセイ (EIA) や化学発光イムノアッセイ法 (CLIA)、酵素増強化学発光イムノアッセイ (CLEIA) なども利用されている。

なお性ホルモンの測定では、従来は類似構造のステロイドによる交差反応を防ぐために有機溶媒による抽出などの前処理が必要であったが、近年は抗体の特異性の向上により直接測定する方法も多くなっている。

### ビテロジェニン

測定法には免疫拡散法、ラジオイムノアッセイ (RIA)、酵素免疫法 (ELISA) などがあり、極めて敏感な測定である。上記ホルモンと同様、ラジオイムノアッセイに代わり化学発光イムノアッセイなども開発されてきている。

種毎に種特異的抗体を作る必要があり、現在までにコイ、メダカ、ウグイ、マハゼ、マミチョグ、マダイなどの抗体が市販されている。また、測定キットとして市販されているのは ELISA 法によるコイ用キットである。

なお、アフリカツメガエルなど魚類以外のビテロジェニン測定系も開発中で、ウズラの測定キットも環境省の「平成 13 年度鳥類を用いた内分泌攪乱化学物質のスクリーニング手法の確立および新規試験法の研究開発」業務で完成した。

### (3) 測定データの解釈

#### 1) 甲状腺ホルモン

##### 種類

甲状腺で生成されるホルモンにはサイロキシン (thyroxine または tetraiodothyronine; T4) トリヨードサイロニン (triiodothyronine; T3) の2種類がある。哺乳類ではカルシトニン (カルシウム濃度を下げる作用がある) も甲状腺で生成されるが、他の脊椎動物では外側甲状腺 (ultimobranchial bodies) で作られている。通常、T3 と T4 を甲状腺ホルモンと呼ぶ。

##### 役割

甲状腺ホルモンの主な役割は代謝機能維持で、細胞の酸素消費刺激による熱生産、発生、成長・成熟、両生類の変態、爬虫類の脱皮、鳥類の換羽、光周性、乳汁分泌亢進、魚類の淡水・海水間の移動の衝動などに関与している。なお、両生類の変態、成長に甲状腺ホルモンが重要な役割を果たすことを利用して、化学物質が甲状腺ホルモンに影響を与えるかどうかのスクリーニングにカエル類を用いた試験法が開発されている。

##### 代謝

甲状腺はすべての脊椎動物に存在し、コロイドを含む胞から形成されている。甲状腺ホルモンは胞でアミノ酸のチロシンにヨードが結合して合成される。血液中に分泌されると、その大半は血漿中のアルブミンなどのタンパク質と結合して血中を運ばれる。結合しなかった部分は遊離 T4 (FT4) や遊離 T3 (FT3) と呼ばれ、ホルモン作用を示すのはこの部分である。T4、T3 は肝臓や腎臓、その他多くの器官で分解され、また T4 の一部は酵素によりヨードが取れて T3 となる。分解された T4、T3 は抱合体となって肝臓から胆汁経由で、あるいは血液から直接腸内へ移行し、排泄される。

T3、T4 の血中濃度は脳下垂体前葉から分泌される TSH (thyroid-stimulating hormone, thyrotropin) で調節される。さらに TSH は視床下部から分泌される TRH (thyrotropin-releasing hormone) で調節される。甲状腺ホルモンの血中濃度が上がると TSH、TRH は抑制されて濃度調節が行われる。こうした調節によりホルモン濃度は通常、一定範囲に保たれている。

甲状腺ホルモンは細胞に入り、核内受容体 (TR: thyroid receptors) と結合する。

この結合物が遺伝子に作用することによってホルモン作用が発現する。ヒトでは TR<sub>1</sub>、TR<sub>2</sub> の2種類の遺伝子があり、受容体蛋白はそれぞれ2種類以上あると考えられている。受容体との結合は T3の方が T4よりも活発であるが、T3は TR<sub>2</sub>とは結合しない。

通常、哺乳類では T3は T4より速く、強く効果を現すが、鳥類では T3と T4の強さは同等かむしろ T4の方が強い。また T4に対する FT4の割合は鳥類は哺乳類よりも多く、T3、T4の半減期は鳥類の方が哺乳類よりも短く、値の変動も大きい。

### 正常値

正常値は表 3-3-1 のように動物種によって異なる。T4の鳥類の正常値はヒトよりも低く、哺乳類でも正常値がヒトより低い種が多い。このためヒトの濃度に合わせて分析を行っている医療検査機関等で測定すると測定下限以下となることがある。

表 3-3-1 甲状腺ホルモン血漿中濃度の正常値

	単位	ヒト	イヌ	ラット	ニワトリ	オウム類	ニジマス
T4	µg/dl	8	0.94-3.9	平均 5.53	1.6	0.1-1.4	4.5
FT4	ng/dl	2	3.4	平均 2.2	5.5		44.3
T3	ng/dl	150	45-150	平均 89	150-250	75-145	
FT3	pg/ml	3		平均 2.1			

( Ganong 1999、Jacobs et al. 1992、Loeb et al. 1989、Lothrop et al. 1986、田名部 1977 などより作成 )

### 濃度に影響を与える因子

ヨードは甲状腺ホルモンの原料の一つであり、ヨード欠乏は甲状腺ホルモン濃度を下げる。通常は餌から摂取されられて不足することはないが、山間部などで土壤中のヨードが欠乏し植物や水などのヨードが欠乏している地域では、地域的に多くの生物種で欠乏がみられることがある。

気温が低いと TSH が増加して甲状腺ホルモンも増加する。ヒトやイヌでは季節変動が報告されているが、地域差があり、日照時間の変化による影響などもあるようである。ヒトやラットでは日内変動も知られているが変動幅は小さい。鳥類では換羽中でも甲状腺ホルモンの血中濃度に変化はないと言われている。雌雄差はないとされるが、哺乳類では妊娠中は蛋白との結合の変化のため T4が増加する。また年令については、T4は哺乳類で乳児期に成獣の正常値の2~5倍に増加し、徐々に成獣の正常値に戻っていくことが知られている。鳥類でも早成性の種では孵化の時期に、晩成性の種では孵化後4ヶ月令頃(カモの例)に T4値がピークとなり、その後、成鳥の正常値に戻る。

血中の甲状腺ホルモン濃度は、血液中の結合蛋白の濃度、T4 を T3 に変える酵素の濃度などにより一時的に変化する。性ホルモンのエストロゲンや鎮静剤の投与では結合蛋白濃度が上がるため T4 や T3 濃度が上がり、逆にアンドロゲンやグルココルチコイドなどの投与で下がることもある。またヒトでは、T4 を変換する酵素を抑制し T3 濃度が下がる要因としてセレンウム欠乏、火傷、外傷、進行した癌、肝硬変、腎不全、心筋梗塞、発熱などが知られている。

### ダイオキシン類による影響

ダイオキシン類による甲状腺ホルモンへの影響は Brouwer (1998) や Rolland (2000) によりまとめられている。実験動物(ラット、マウス、マーマセットなど)で TCDD (2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin) やコプラナーPCB の投与で T4 濃度や T3 濃度が減少することが報告されており、PCB 類の子宮内投与でも生まれた仔の T4 が減少する。ダイオキシン類以外の芳香族炭水化物(ヘキサクロロベンゼン、クロロフェノールなど)にも T4 を減少させる作用があることが知られている。

ラットでは PCB や TCDD は Ah 受容体を介して T4 を抱合化する酵素を誘導し、T4 の排泄を促進して血中濃度低下を起こす。しかし PCB では異性体や量により作用が異なり、PCB-153 単独では T4 濃度を増加させるとされる。また、PCB の水酸化代謝物は T4 やレチノール(ビタミンA)と結合する血中蛋白質の一つ(transthyretin)に競合的に結合するため、T4 やレチノールの血中濃度を低下させる。なおレチノール濃度も PCB などへの暴露の指標として利用されるが、野生動物の場合は食餌からの摂取量を管理できない点に留意する必要がある。

野生動物においては、ゼニガタアザラシで PCB などの有機塩素系物質濃度の高い魚の投与実験で甲状腺ホルモン濃度の減少が確認されており、野生のハイイロアザラシの幼獣で、T4 濃度と FT4 濃度の比率と血清中の PCB 濃度との間に負の相関が見られている。鳥類ではカワウやケワタガモでダイオキシン類やコプラナーPCB の蓄積濃度と甲状腺ホルモン濃度との間に負の相関が認められている他、アジサシではコプラナーPCB の濃度が高い地域で FT4 濃度が低い傾向が見られている。この他に PCB による甲状腺ホルモンの低下はオオカモメ、ハト、ウズラなどでも報告されている。しかしニワトリ、ハト、オオアオサギの卵への TCDD 投与で孵化したヒナの甲状腺ホルモン濃度には変化がなかったという報告もある。魚類ではサケ類で PCB の投与によって甲状腺ホルモン濃度の低下が報告されている。

## 2) 性ホルモン

### 種類

生殖腺から分泌されるステロイドホルモンには、大きく分けて雄性ホルモン(アン

ドロジェン)と卵胞ホルモン(エストロジェン)、黄体ホルモン(ジェスタージェンまたはプロジェスチン)の3種類がある。

雄性ホルモンは主に精巣の間質細胞(ライディッヒ細胞)から分泌されるが、メスでも卵巣または副腎から分泌されている。代表的な雄性ホルモンはテストステロンであるが、魚類では11-ケトテストステロンが中心的役割を果たしている。

卵胞ホルモンは主に卵巣中の卵胞から分泌されるが、オスでも少量が精巣や副腎から分泌されている。代表的な卵胞ホルモンは17 エストラジオール、エストロン、エストリオールなどである。

黄体ホルモンは哺乳類では卵巣中の黄体から主に分泌されるが、卵胞や胎盤からも少量が分泌される。黄体は卵胞が成熟し、排卵した後に形成される組織であるが、妊娠に関与した機能を持ち、鳥類以下の脊椎動物では黄体は形成されない。しかし黄体ホルモンは鳥類などでも卵巣で分泌されている。オスでも精巣や副腎から少量が分泌されている。代表的な黄体ホルモンはプロジェステロンである。

## 役割

雄性ホルモンはオスとしての発生や二次性徴、性行動を起こし、精子形成を維持する他、蛋白同化や成長促進作用がある。

卵胞ホルモンは発情ホルモンとも呼ばれ、哺乳類では発情行動を誘起したり乳腺の発育を促進したりする。卵の発達を促し、メスの二次性徴を発現する。ヒトでは骨端閉鎖促進作用も知られている。鳥類以下の卵生脊椎動物では、卵胞ホルモンが肝臓に作用してビテロジェニン(卵黄前駆蛋白)を産生させ、それが血流にのって卵巣へ行き、蓄積されて卵黄となる。鳥類では、卵胞ホルモンには卵管肥大、卵白分泌、血中カルシウム濃度増加などの作用もある。

哺乳類では排卵の時には卵胞ホルモンが高濃度となり、黄体ホルモンは低濃度である。しかし鳥類では排卵に関係するのは卵胞ホルモンではなく黄体ホルモンで、排卵の時には黄体ホルモンが高濃度となる。

黄体ホルモンは哺乳類では受精卵着床、妊娠維持作用を持つ。熱生産作用もある。鳥類では卵胞ホルモンと共に働いて、卵管からの卵白分泌促進作用などがある。

## 代謝

ステロイドホルモンはコレステロールから生成され、その過程はどの動物でも同様である。しかし肝臓で代謝された後、尿、糞へ排出される代謝産物は動物種によって異なっている。

いずれのホルモンも血漿中では大部分(ヒトで98%)はグロブリン、アルブミンなどの蛋白と結合している。性ホルモンの血中濃度は、甲状腺ホルモンと同様に、視床下部や下垂体前葉から分泌されるホルモンによって調整されていて、性周期や季節変

化を示しながら一定範囲に保たれている。下垂体前葉から分泌されるホルモンには卵胞刺激ホルモン（FSH）と黄体形成ホルモン（LH）があり、性ホルモンを調節する他、卵の成熟や排卵を誘発する作用もある。

性ホルモンは細胞内の受容体と結合して遺伝子に働きかけ、ホルモン作用を発現する。エストロゲンには2つの受容体（ER<sub>α</sub>、ER<sub>β</sub>）があり、それぞれ別の機能を持っていることが分かっている。

### 正常値

性ホルモン濃度は性成熟するまでは低く、性成熟後は性周期、季節によって変動する。哺乳類の成獣では雄性ホルモン濃度はオスがメスよりも高いが、鳥類ではメスでも産成が多く、成熟度や生殖状況によってメスの方がオスよりもテストステロン濃度が高いことも多い。

表 3-3-2 性ホルモン血漿中濃度の正常値

	単位	成人男子	成人女子 (非妊婦)	イヌ	ニワトリ	ウズラ	オウム類
テストステロン	pg/ml	3,000-10,000	300-700	780-15,600 (♂)	840-7,830 (♂) 500-1,000 (産卵メス)	100-1,200 (♂) 300-1,300 (産卵メス)	10-900
エストロジオール	pg/ml	20-50	10-250	2-150 (メス)	100-300 (産卵メス)	86-166 (産卵メス)	
プロラクチン	ng/ml	0.3	0.9-18	-0.7 (メス)	1-5 (産卵メス)		2-4

( Ganong 1999、Jacobs et al. 1992、Loeb et al. 1989、Millam 1997、稲野他 1977 などより作成 )

### 濃度に影響を与える因子

ヒトや実験動物のラットやマウスのメスの性周期は、卵胞期 排卵 黄体期の繰り返しである。卵胞期に卵胞ホルモンが増加し、LH の大量分泌が起きると排卵が起きる。黄体期には黄体ホルモンが増加するが、妊娠しなければ減少し、卵胞の発育が始まる。

野生動物では繁殖季節があるものではホルモン濃度に季節変化が見られる。また基本的に繁殖（妊娠、孵卵、育児育雛）するため周期は長くなる。繁殖季節がなくても

育児育雛期間中は性ホルモン濃度は低くなり、オスも育児育雛に携わる間は雄性ホルモンの濃度が低く抑えられる種がある。

このように性ホルモンは正常個体でも変動が大きく、個体差もあり、個別の測定値の絶対値だけで機能が障害されているかどうかを判断することは困難な場合が多い。

#### ダイオキシン類による影響

実験動物では TCDD ( 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin ) はエストラジオールやプロジェステロンの合成を抑制し、血中濃度を下げることが知られている。一方 PCB については、異性体と作用時間などにより性ホルモン分泌への影響が異なり、全く逆の結果が出ることもあることが *in vitro* の実験や発生期への暴露実験などで明らかにされている。

野生動物については、ダイオキシン類などに汚染された川のオスガメで対照地のものよりもエストラジオールが高くテストステロンが低かったという報告( Shelby et al. 2001 ) などがあるが、ダイオキシン類の影響を明確に示す報告は少なく、ニワトリ、ハト、オオアオサギの卵内に TCDD を投与してヒナの性ホルモン濃度への影響を見た例ではエストラジオール、テストステロン濃度には変化がなかったと報告されている ( Janz et al. 1996 )。

### 3) ビテロジェニン

#### 種類

ビテロジェニンは卵生脊椎動物 ( 鳥類、爬虫類、両生類、魚類 ) で見られる卵黄前駆蛋白質で種差がある。通常は成熟メスのみに認められるが、卵胞ホルモンの作用でオスや未成熟メスでも分泌が起きるため、エストロゲン作用の指標と考えられている。無脊椎動物でもビテロジェニンの合成が認められるものがあり、線虫などで実験への応用が研究されている。

#### 役割

ビテロジェニンは卵巣で卵母細胞の中に蓄積され、卵黄の元になる。自然に存在する血清蛋白質であり、オスで異常に増加しても、ビテロジェニンの存在だけによる障害はないと考えられている。

#### 代謝

下垂体から分泌された GTH の刺激で卵巣の顆粒細胞でエストラジオールが産成され、これが肝臓に作用してビテロジェニン合成を誘起する。ビテロジェニンは血液中被運ばれて卵巣へ行き、受容体と結合して卵母細胞内に取り込まれる。その後、酵素の働きで分解して数種類の卵黄蛋白となる。卵黄蛋白は蓄積して、卵母細胞は大きくなり、卵黄となる。鳥類では FSH の作用によりビテロジェニンの取り込みが促進される。

#### 正常値

原則的にメスでのみ合成される物質と考えられているが、オスでも血中や肝臓中に全く存在しないわけではない。正常値は種や測定系の感度によって異なるが、コイのオスでは 1 µg/ml 以上を異常値の目安と考える場合が多い。メスの正常値には幅があるが 1 ~ 5mg/ml 程度と考えられている。

#### 濃度に影響を与える因子

卵胞ホルモンの他に影響を与える因子は知られていない。メスでは産卵期に高くなる。オスで血中または肝臓中にビテロジェニンが一定量以上検出された場合は、環境水や餌から外因性のエストロゲン作用物質に曝されたこと、または、オスの体内でメス化の異常変化が起こり、卵胞ホルモンを産成・分泌していることを意味する。

#### ダイオキシン類による影響

TCDD (2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin) は抗エストロゲン作用があり、ビテロジェニン合成を抑制する。一方、PCB はかつて使われていた製品類はエストロゲン作用がありビテロジェニン濃度の上昇をもたらす。しかし異性体によりエストロゲン作用のあるものと抗エストロゲン作用のあるものがあり、異性体によりビテロジェニン合成が起きたり抑制されたりする。

#### 参考文献

- Brouwer, A., Morse, D. C., Lans, M. C. Schuur, A. G., Murk, A. J., Klasson-Wehler, E., Bergman, A. and Visser, T. J. 1998. Interactions of persistent environmental organohalogenes and the thyroid hormone system: Mechanisms and possible consequences for animal and human health. *Toxicol. Ind. Health*, 14: 59-84
- Ganong W. F. 1999. *Review of Medical Physiology* 19<sup>th</sup> ed. Appleton & Lange

- 稲野宏志・中村孝雄・鈴木桂子・玉置文一. 1977 4 ステロイドホルモンの生成、ホルモンの生産と分泌、日本比較内分泌学会編、学会出版センター p.95-137
- Jacobs, R. M., Lumsden, J. H. and Vernau, W. 1992. Canine and feline reference values. In Current veterinary therapy ed. by Kirk R.W. p1250-1277 W.B. Saunders Company
- Janz, D. M. and Bellward, G. D. 1996. In Ovo 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p -dioxin Exposure in Three Avian Species: 2. Effects on Estrogen Receptor and Plasma Sex Steroid Hormones during the Perinatal Period. Toxicology and Applied Pharmacology, 139: 292-300
- 金井泉・金井正光. 1998. 臨床検査法提要 金原出版
- 小林牧人・朴民根. 1998. 1 脊椎動物の生殖内分泌現象、生殖とホルモン、日本比較内分泌学会編、学会出版センター, p.1-18
- Loeb, W. F. and Quimby, F. W. 1989. The Clinical Chemistry of Laboratory Animals. Pergamon Press, Inc.
- Lothrop Jr., C.D. and Harrison, G. J. 1986. Miscellaneous Diagnostic Tests. In Clinical Avian Medicine and Surgery ed. by Harrison and Harrison p293-297 W. B. Saunders Company
- May, J. D. 1989. The Role of the Thyroid in Avian Species. Critical Reviews In Poultry Biology 2(2): 171-186
- Millam, J. R. 1997. Reproductive Physiology. In Avian Medicine and Surgery ed. by Altman et al. p12-26 W.B. Saunders Company
- Rolland, R. M. 2000. A review of chemically-induced alterations in thyroid and vitamin A status from field studies of wildlife and fish. J. Wildl. Dis., 36(4): 615-635
- Shelby, J. A. and Mendonca, M. T. 2001. Comparison of reproductive parameters in male yellow-blotched map turtles (*Graptemys flavimaculata*) from a historically contaminated and a reference site. Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol., 129(3): 233-242
- 田名部雄一. 1977. 6 甲状腺ホルモンの輸送蛋白質、ホルモンの生産と分泌、日本比較内分泌学会編、学会出版センター, p.163-185
- 田中克英・本間運隆. 1992. 3 家禽の生殖、ホルモンと生殖(III)、日本比較内分泌学会編、学会出版センター, p.67-89

### 3-4 病理形態学的検査

羽山伸一

#### (1) 検査の意義

化学物質による毒性影響では、多くの場合、形態学的変化を伴うことが知られている。そのため、実験動物を用いた毒性検査では、病理形態学的な検査を実施するのが一般的である。

したがって、野生動物を対象とした化学物質の影響評価のためには、病理形態学的な調査研究が欠かせないと考えられる。しかし、こうした調査研究の実施例は、後述するようにきわめて少なく、また対象となる野生動物種によっては健常な個体の形態学的知見すら乏しいのが現状である。

ここでは、こうした現状をふまえ、調査対象種について病理形態学的なデータを得るための基本的技術を紹介し、野生動物に対する化学物質の影響評価手法の確立を促したい。

#### (2) 試料と検査方法

本項では、病理学的検査の手順について、肉眼解剖学的検査および組織学的検査に分けて解説する。野生動物の病理学的検査は、検体が重大な感染症に罹患している恐れもあることから、しかるべき施設内で獣医師などによって実施されることが望ましい。

##### 1) 肉眼解剖学的検査

哺乳類の解剖手技は、国内でも多数出版されている家畜等に関する成書が参考になる。しかし、野生鳥類では、分類群によって臓器などの形態に大きな違いがあるために、解剖学手技については一般化して整理することが難しく、さらに成書が少ない。したがって、本稿ではおもに野生鳥類を対象に、病理学的な検査に関わる主要な注意点を絞って解説する。

なお、詳細に関しては、「野生動物救護ハンドブック」(1996、文永堂出版)ならびに「野生動物の研究と管理技術」(2002、文永堂出版)を参照されたい。また、クジラ類の病理解剖および材料の採取については「内分泌攪乱化学物質による野生生物影響実態調査マニュアル」(1999、自然環境研究センター)に詳述されている。

## 外貌検査

検査対象の個体は、必ず体重や各部位の計測、年齢などの確認の後に、肉眼解剖学的検査に供する。冷凍保存後の個体では、この後の組織学的検査に大きな支障が生じるため、可能な限り捕獲後は冷凍せず、すみやかに肉眼解剖学的検査を実施して、組織学的検査試料を採取するように努める。死亡後、速やかに解剖ができない場合や輸送が必要な場合には、冷蔵保存が望ましい。

一般状態、外傷、奇形、天然孔からの出血や吐出物、付着物、などを記録する。ハトなどでは直腸便より *Cryptococcus neoformans* が検出されないかどうかを確認する（墨汁標本などにより）。本真菌は人畜共通感染症として重要であるため、検出された際には剖検者の安全の確保を最優先にすべきである。

## 胸腹腔の観察

アスペルギルス感染症の確認を最優先するために、剥皮よりも胸腹腔の観察を先に行う方が望ましい。

動物を仰臥位にし、胸骨竜骨突起を触診で確認する。この突起に沿って横 2 mm くらいにメスを入れ、皮膚および胸筋を切開する。羽毛がじゃまをして切開しにくいことがあるが、羽毛を水でぬらすと皮膚の露出が容易である。環境ホルモン用の標本採取に当たっては、この際にアルコール綿などの有機溶媒は決して使用しない。

メスを竜骨突起に沿って胸骨に至るまで深く入れることで、胸筋は容易に剥離することが可能である。胸筋を先に摘出すると、腋下動脈などを傷つけることがあるので、胸骨から剥離するだけにとどめておいた方が無難である。竜骨突起が露出したら、これを持ち上げながら腹直筋を正中切開することで腹部気囊の観察が可能となる。

次に、胸骨をはずす。骨格標本が不要な場合は、骨鋏で鎖骨、烏口骨、肋骨を切断するが、気囊や心囊を傷つけないように注意する。もし、希少鳥類などで骨格標本が必要な場合は、肋骨脊椎部と胸骨部および胸骨・烏口骨関節にメスを入れ胸骨をはずす。

胸骨をはずす際に、気管胸骨筋を引きちぎらないようにすると、甲状腺の発見が容易である。

万一、気囊にアスペルギルス感染症が疑われる病変を発見した場合は、直ちに剖検を中止し、剖検者の安全を優先する。この際、孢子（分生子）の拡散防止に努める。

胸骨をはずした状態で、胸腹腔の諸臓器の肉眼的観察を行う。

## 甲状腺の摘出

鳥類の甲状腺は、左右 1 対で米粒大から小豆大の黄色から赤褐色の臓器である。摘出には、頸部の皮膚を正中切開し、気管を鈍性剥離で露出させ、気管胸骨筋を見いだ

す。この筋肉の筋腹を切断すると、直下の頸動脈に沿って甲状腺が見える(写真 3-4-1)。栄養状態の良い個体ではこの部分に脂肪が多く蓄積するため、発見しにくいことがある。

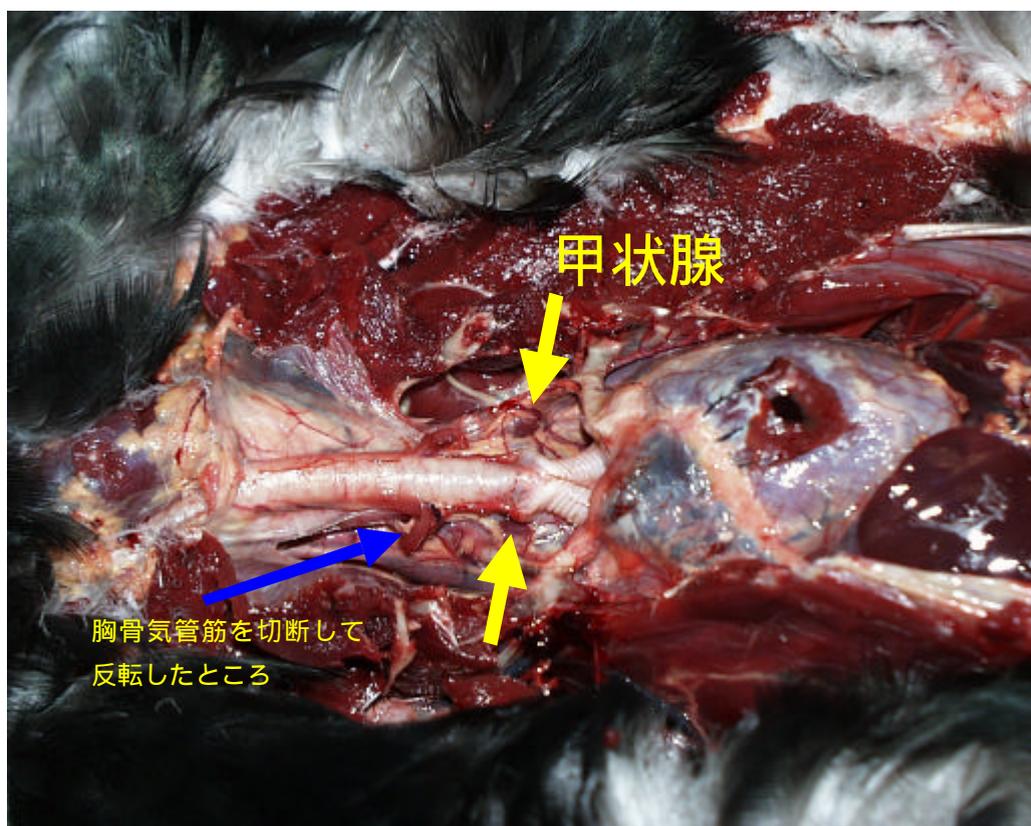


写真 3-4-1 鳥類の甲状腺

#### 生殖腺の摘出

鳥類の生殖腺は、季節や年齢によって極端に大きさや色などが変化するために、注意が必要である。また、非繁殖期には腎臓に張り付いているため、摘出時に腎臓を傷つけないように注意する。

精巣は、非繁殖季節には萎縮しているため、他の臓器の摘出前に観察しておいた方が無難である。通常、左側が大きい。

卵巣は、通常、左側のみで発達するが、環境ホルモンなどの影響で両側に発達することもあると言われるので、十分観察する。繁殖季節には卵管がよく発達するが、それ以外の季節ではほとんど識別できないことが多い。卵管も両側で発達する場合は報告されているので、十分観察する。卵管を摘出した場合、可能な限り厚手の濾紙など

に貼付けてホルマリン固定をする。

#### 化学分析標本の採取

環境ホルモンを分析するための標本は、目的に応じた容器で - 20 度以下で冷凍保存する。保存臓器は以下の通りであるが、同一個体でも臓器別に容器を分ける。

##### a . 肝臓

肝臓は観察が終わり次第、病理組織用の標本を採取し、残りはすべて冷凍する。

##### b . 脂肪組織

鳥類では脂肪組織の多くが胸腹腔の下腹部に塊状に蓄積する。これらは消化管や腸管膜を包んでいるので、注意深くはぎ取り、なるべく多く冷凍する。

##### c . 筋肉

左右の胸筋を摘出し、すべて冷凍保存する。筋間や皮下に脂肪組織が見られれば、できる限りそれらを含めて保存する。

#### 主要臓器の標本採取

肉眼的な観察の後、組織学的検査用の標本を採取する。肉眼的に異常と判断された臓器および部分は必ずホルマリン液で固定する。それ以外の臓器として、少なくとも、心臓、肺、肝臓、消化管（胃、小腸、大腸）、膵臓、脾臓、腎臓、副腎は、標本を採取する。消化管以外は、可能な限り臓器全体を固定しておく、固定液が臓器に浸透しやすいように割を入れておく。

### 標本採取にあたって西ナイルウイルスへの注意点

西ナイルウイルス（フラビウイルス属）は蚊が媒介することによって主に鳥類に感染し、ときにヒトを含む哺乳類でも感染することが知られている。アフリカ、欧州南部、中東、西アジアに広く分布していたが、北米大陸では 1999 年に米国ニューヨーク市で初めて流行が確認され、7 人が死亡した。その後、流行地域が拡大し、わずか 3 年で西海岸地域にまで達した。

こうした状況から、日本にも西ナイルウイルスが侵入する恐れがあるため、厚生労働省、外務省、農林水産省、国土交通省、環境省の五省庁は、対策強化のための関係省庁連絡会議を設置した（2002 年 10 月 4 日）。同会議では、国内のカラスに同ウイルスが感染していないかどうかを調査することとなった。

これは西ナイルウイルスが鳥の体内で増殖し、米国ではヒトでの流行の先行指標として野生鳥類とくにカラス類の死亡個体の調査が行われていることによる。カラス類は同ウイルスに感受性が極めて高いと考えられ、これまでに数千羽の死亡個体が確認されている。実験的にはカラス間での感染も起こりうることが示唆されているが、これまでに鳥類からヒトへの直接感染の証拠はない。また、実際に同ウイルスの拡大がどのように起こっているのかは未だ明らかではなく、米国での調査によると、これまで 138 種の鳥類が同ウイルスで死亡が確認されている。

ダイオキシン類調査を目的として野生動物の標本採取を行う場合には、西ナイルウイルスに限らず実施者への感染症の防御には十分な注意が必要であり、適切な施設で獣医師が解剖を行うべきである。

米国 CDC（Centers for Disease Control and Prevention）では、野鳥を取り扱う際には、必ず手術用手袋などで防御し、決して素手で取り扱わないように求めている（Epidemic/ Epizootic West Nile Virus in the United States: Revised Guidelines for Surveillance, Prevention, and Control. CDC, 2001）。

## 2) 組織学的検査

固定された臓器の標本は、定法にしたがって組織検査用の標本を作製し組織学的な観察を行う。

### (3) 測定データの解釈

野生動物におけるダイオキシン類の影響に関して、病理組織学的な研究が少ないために、観察すべきポイントが明確ではない。ここでは、これまでダイオキシン類による影響と考えられる病理学的な変化について、報告されたものを列記しておく。

#### 1) ダイオキシン類による影響

##### 実験動物への投与実験で報告された病理学的変化

Kociba ら (1978、1979) は、SD ラットに 2,3,7,8-TCDD を投与して、肝細胞の変性壊死あるいは炎症性変化を確認した。その後、さまざまな実験動物を用いたダイオキシン類の投与実験では、用いられたすべての実験動物種で、肝細胞の過形成および肥大が報告されている。

Toth ら (1979) は、スイス系マウスに 2,3,7,8-TCDD を投与して、アミロイドーシスおよび皮膚炎を確認した。胸腺の萎縮、心筋障害などの報告例もあるが、動物種による反応の違いがあるようだ。また、Sewall ら (1995) は、ラットに 2,3,7,8-TCDD を投与して、甲状腺の過形成が誘発されることを報告した。

ダイオキシン類の発がん性試験は、多くの研究例がある。マウスおよびラットを用いた発がん性試験では、肝、肺、口唇、舌、鼻甲介、甲状腺での発がんが報告されている。

なお、詳細なデータは、「ダイオキシンのリスク評価」(1997、環境庁ダイオキシンリスク評価研究会)ならびに、「内分泌攪乱作用が疑われる化学物質の生態影響データ集」(1999、東京都衛生研究所毒性部)を参照されたい。

##### 野生動物で報告された事例

野生動物におけるダイオキシン類の病理組織学的な研究はほとんど見当たらない。PCB 類に関しては、研究例は少ないが、野生動物を対象に飼育下での投与実験が行われている。Hoffman ら (1996) は、チョウゲンボウへの投与試験で、脾臓のリンパ球減少と甲状腺における濾胞の縮小およびコロイド減少を報告した。また、Fowles ら (1997) は、マガモに PCB を投与して、甲状腺重量の有意な増加と、高濃度投与における甲状腺濾胞の空胞化およびわずかな拡張を報告している。

Martineau ら (1988) は、1983 年から 1986 年にかけてカナダのセントローレンス側周辺で座礁したシロイルカ 13 頭を病理学的に検査して、皮膚潰瘍、肺脂肪種、脾臓繊維種、乳腺の過形成などを報告している。また、その後の研究では甲状腺腫も見つかっている。これらの個体はいずれも、PCB や DDT などを高濃度に蓄積しており、因果関係が指摘されている。

ダイオキシン類や PCB 類が甲状腺ホルモンと構造的に類似し、実験動物での投与試験で甲状腺の形態異常が誘発されることが明らかなため、野生個体群における甲状腺の形態学的調査がいくつかの野生動物で実施されている。Moccia ら (1986) は、米国五大湖に生息するオオセグロカモメを調査し、有機塩素系化学物質の汚染状況が甲状腺の過形成の発生率と因果関係にあることを示唆した。また、1988 年から 1989 年にかけてヨーロッパ北海バルト海で大量死が起こったゼニガタアザラシを調査から、Shumacher ら (1993) は、死亡したアザラシの甲状腺で濾胞の縮小、コロイドの消失、間質の線維化が起こっていることを報告している。これらの病変は、有機塩素系化学物質の蓄積が少ない北大西洋の同種ではほとんど見出せないことから、これらの化学物質との関係を示唆している。

#### 参考文献

- 野生動物救護ハンドブック編集委員会編著. 1996. 野生動物救護ハンドブック  
文永堂出版、326pp
- 日本野生動物医学会・野生生物保護学会監修. 2001. 野生動物の研究と管理技術 (原典 : Research and Management Techniques for Wildlife and Habitat、Bokkhout,T.A. ed. The Wildlife Society ) 文永堂出版、898pp
- Kociba,R.J., et al. 1978. Results of a two-year chronic toxicity and oncogenicity study of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxine (TCDD) in rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 46:279-303.
- Toth,K., et al. 1979. Carcinogenicity testing of herbicide 2,4,5-trichlorophenoxy ethanol containing dioxin and of pure dioxin in Swiss mice. *Nature*, 278:548-549.
- Sewall,C.H. and G.W.Lucier. 1995. Receptor-mediated events and the evaluation of the Environmental Protection Agency of dioxin risks. *Mutant. Res.*, 333:111-122.
- 環境庁ダイオキシンリスク評価研究. 1997. ダイオキシンのリスク評価 中央法規出版、196pp
- 東京都衛生研究所毒性部. 1999. 内分泌攪乱作用が疑われる化学物質の生態影響データ集. 東京都
- Hoffman, D.J. et al. 1996. Development toxicity of PCB126 in nesting American Ketrrels. *Fundamental and Applied Toxicology*, 34:188-200.
- Fowles,J.R. et al. 1997. Effects of Aroclor1254 on the thyroid gland, immune function, and hepatic cytochrom P450 activity in Mallards. *Envirn. Res.*,

75:119-129.

Martineau, D. et al. 1988. Pathology of Stranded Beluga whales from the St. Lawrence estuary, Quebec, Canada. *J. Com. Path.*, 98:287-311.

Moccia, R.D. et al. 1986. A quantitative assessment of thyroid histopathology of Herring Gulls from the Great Lakes and hypothesis on the causal role of environmental contaminants. *J. Wildl. Disease*, 22:60-70.

Shumacher, U. et al. 1993. Histological investigations on the thyroid glands of marine mammals and the possible implications of marine pollution. *J. Wildl. Disease*, 29:103-108.