

1. 多くの野生生物が生物学的に影響を持つ可能性のある濃度の有害化学物質に曝されていると免疫機能の攪乱が起きる可能性があることが推察される。
2. 実験室レベルにおいても生態系においても、有害化学物質が環境生物の免疫機能におよぼす影響に関わる知見が（特に、哺乳類以外の生物において）きわめて少ないことが明らかになった。
3. 未知の部分が多く実験手法の開発を含め今後の研究の進展が望まれるが、現存の手法を用いることでも多くの知見が得られることが明らかになった。
4. 種々の野生生物における免疫機能の異常が生態系におよぼす影響については多くの因子が含まれていることから複雑な因果関係で影響にいたることが推察されるが、この点においても解析の基礎となる環境有害化学物質による免疫機能への影響の研究を推進する必要がある。
5. 国際的にも米国、EU諸国は連携を謀りながらこれらの点についての検討を推進しており、我が国においても早急にプロジェクトを立ち上げ基礎データを得つつこれらの諸国との連携を強化する必要がある。

Fig.28 結論

8. 鳥類の内分泌攪乱化学物質影響調査

研究者 和田 勝（東京医科歯科大学教養部教授）

研究要旨

鳥類を用いた内分泌攪乱化学物質の研究をわが国において推進するために、有力な鳥類内分泌学者を糾合し、強力な研究グループを組織した。今後、研究を進められる体制を整える必要がある。一方、鳥類における内分泌攪乱化学物質の評価法を確立するために、ビテロゲニンのかわりに血中 VLDL 量を機器分析し、エストロゲンの肝臓に対する作用を推定する方法を試した。血中 VLDL 量は、雌では高く雄では低かった。雄にエストラジオールを投与すると、雄は雌と同じように血中 VLDL 濃度が著しく上昇した。この方法は評価法のひとつとして有効であると考えられる。

研究者協力者

服部 淳彦（東京医科歯科大学教養部教授）
岡崎 三代（東京医科歯科大学教養部教授）
園田 豊（日本大学生物資源科学部講師）

A. 研究目的

ヒトが作った化学合成物質が、環境に排出された後に生体にとりこまれて内分泌攪乱化学物質としてはたらき、野生動物に深刻な影響を与え、ヒトへの影響も見逃されない状況に立ち至っている。多くの内分泌攪乱物質はエストロジェニックな作用を持ち、生体の内分泌系、特に生殖にかかわる内分泌系を攪乱していると考えられているが、その詳細なメカニズムは不明な点が多い。野生生物への影響についても、散発的な報告が見られるだけである。食物連鎖の頂点にいるヒトへの影響を考えたとき、同じような地位にいる鳥類に関する情報が重要である。

現在、OECD において鳥類内分泌毒性試験ガイドラインの改訂がおこなわれ、さらに二世世代試験を含む内分泌攪乱化学物質試験法の策定が進められている。環境行政上、これらに対応するためにも、鳥類の研究が

不可欠となってきた。

そこで、この研究では鳥類への内分泌攪乱物質の影響を調査し、今後の OECD の動向に対応するため「鳥類における内分泌攪乱物質の影響と評価法の確立」のための研究グループを組織することを目的とした。また、魚類では、卵黄タンパク前駆物質であるビテロゲニンをバイオマーカーとして、内分泌攪乱物質の影響を評価しようとしているが、鳥類では現在までのところ、よい評価方法がない。そこで、実験動物である、ウズラ、ヒメウズラを使い、ビテロゲニンあるいはその関連物質をバイオマーカーに使うためにはどのような方法があるかを検討し、評価方法を確立するための予備的な実験をおこなった。

B. 研究方法

1) 鳥類を使った研究の必要性和研究グループの立ち上げ

1999 年 5 月 23 日（日）～24 日（月）にドイツ国ライプチヒ大学で開かれた Meeting of the Avian Reproduction Expert Group on OECD Test Guideline for Avian

Reproduction Toxicity Testing に参加して、鳥類に対する化学科学物質の生殖毒性検査のガイドライン策定に関与するようになった。参加者はアメリカ、カナダ、ドイツ、英国、オランダ、日本であった。現在までのところ、生殖毒性の最終ガイドラインの策定を行っており、これが終わったら内分泌攪乱物質の評価と検査のガイドライン策定に向かうことになった。内分泌攪乱物質に関しても若干討議したが、二世代テストを行うという点では参加者の一致を見たが、エンドポイントをどうするかという議論では、議論の入り口に立ったところである。このように、鳥類において内分泌攪乱化学物質が本当にどのように影響を与えているかに関する研究はまだ少ないのが現状である。今後、このガイドラインを策定するに当たって、どのようなエンドポイントを設定するか、どのくらいの検査期間を置くかという点が重要なポイントになってくるだろう。そこでまず、鳥類における内分泌攪乱物質による影響を文献調査し、国内外の研究者と情報交換を行い、十分な情報を収集し、OECD Test Guideline for Avian Reproduction Toxicity Testing に対応するためにわが国の研究者を集めて研究グループを組織することを試みた。

今後、この研究グループが十分な成果をあげられるような環境を整える必要がある。

2) 評価法確立のための予備的実験

鳥類における内分泌攪乱物質の影響を評価するバイオマーカーを探索した。魚類ですでおこなわれているように、ビテロゲニンはエストロゲンの効果を調べる有効なバイオマーカーである。鳥類でもエストロゲンの作用により、ビテロゲニンが肝臓で生成され、卵巣に送り込まれるが、ビテロゲニンの有効な測定系はまだ開発されていない。血清中のリポタンパク質である超低

密度リポタンパク質 (VLDL) はビテロゲニンと関連があり、肝臓でつくられた多量の中性脂肪を卵巣に運搬する。そのため、ビテロゲニンと同様に、産卵に連動して増加する。VLDL を指標とすれば各種内分泌攪乱物質の鳥類に対するエストロジェニック作用を簡便に測定することができると考えた。そこで、以下のような実験をおこなった。

- (1) 雌雄で VLDL の血中濃度に差があるかどうかを確認するために、ヒメウズラ (*Coturnix chinensis*) の雌 4 羽雄 4 羽の血中 VLDL 量を、東ソーリポタンパク質測定システムで測定した。この装置は、カラム 2 本を備えた HPLC を通して粒子の大きさで分けたフラクションのコレステロールとトリグリセリド量を抗体法によって検出して、これらを運ぶ HDL、LDL、VLDL 量を測定する装置である。

雌 4 羽のうち 2 羽は産卵を続けている個体であったが、2 羽は長日下であったにもかかわらず産卵していない個体であった。

翼静脈 (尺骨静脈) を注射針によって破り出血させ、これをヘマトクリット毛細管で吸引して採血した。採血した血液を遠心し、血漿を分離してサンプルとした。

- (2) 次に、短日下で飼育して性的に成熟していない、雌 8 羽雄 8 羽のヒメウズラを長日 (16L8D) に移して視床下部-脳下垂体-生殖腺を刺激し、雄の精子形成、雄の卵成熟ならびに産卵を誘導した。短日から長日に移した日を Day0 とし、これ以降、Day5、Day10、Day14、Day20、Day25、Day30 に採血した。血中エストラジオールの濃度をラジオイムノアッ

セイ法で測定した。同じサンプル中の VLDL 量を上記の方法で測定した。

(3) エストラジオールをごま油に溶かし、1羽あたり 1mg/100g BW の用量で雄 8羽に腹腔内投与をおこなった。投与前に採血をおこない、この日を Day0 とし、これ以降、毎日投与した。投与後、Day2、Day4、Day7、Day10、Day14 にも注射をおこない、投与前に採血した。これらのサンプルの VLDL 量を測定し、タイムコースを確定した。

(4) 各群 3羽の雄に、エストラジオールの用量を変えて 7日間、投与した。7日目に断頭で殺し、採血をおこない、開腹して精巣、肝臓重量を摘出し、重さを測定した。投与開始前にも採血をおこなった。用量は、0.064、0.32、1.6、8、40、200、1000 μ g/100gBW とした。

得られた Day0 と Day7 のサンプルから血中エストラジオール濃度と VLDL 量を測定した。

(5) ウズラ (*Coturnix japonica*) を使って雄と雌の血中 VLDL 量の違い、用量反応性を調べた。

雄ウズラ各群 3羽に、エストラジオールと dienestrol (DES の誘導体) をそれぞれ投与した。投与法は胸筋への筋注で、用量はいずれも 1、10、100 μ g/個体とした。

対照群として雄 3羽にごま油のみを投与し、比較のために雌 1羽から採血した。

C. 研究結果

1) 鳥類を使った研究の必要性和研究グループの立ち上げ
ライプチヒ大学での会議の後、この分

野での研究の必要性を痛感し、鳥類内分泌学研究者に呼びかけ、研究グループを立ち上げることとした。神戸でおこなわれた第 2 回国際内分泌攪乱化学物質シンポジウムなどで、内外の研究者と話し合い、どのような研究グループをつくるかを議論した。2000 年 1 月に各研究単位の責任者が環境庁で最終的な話し合いをおこない、次のような組織を作った。

○総括責任者

和田 勝

○鳥類における内分泌攪乱物質の影響評価および指標に関する研究

和田 勝、服部 淳彦、園田 豊、岡崎 三代

○鳥類の性分化および生殖腺発達に及ぼす内分泌攪乱物質の影響

島田清司、森 誠、齋藤 昇、赤染 康久

○鳥類の受精機能に及ぼす内分泌攪乱物質の影響

吉村幸則、前田照夫、仲田 正、古沢修一、藤田正範、小櫃剛人

○鳥類の発生に及ぼす内分泌攪乱物質の影響

小野珠乙、鏡味 裕、小林哲也、服部淳彦

○鳥類の中枢神経機能および行動に及ぼす内分泌攪乱物質の影響

竹内浩昭、山内清志、松島俊也、大村百合、後藤麻木、筒井和義

○オブザーバー

井口泰泉、原 彰彦

今後この組織が十分な成果をあげられるような研究環境を整える必要がある。これらの研究グループが所期の成果をあげれば、OECD に十分対応でき、わが国の環境行政に資することになると考える。

2) 評価法確立のための予備実験

(1) ヒメウズラ血中 VLDL 量は、雄では低く雌では高かったという。特に産卵している雌では高く、産卵雌では低かった (図 1)。コレステロールを運ぶ高密度リポタンパク質は雌雄で血中濃度に差がないこともわかった。そこでこれ以降は、血中 VLDL 量にのみ注目することとした。

(2) そこで、冬季、屋外で飼育され生殖腺が完全に退化している雌雄のヒメウズラを実験室の 16L8D 下に移し、時間を追って採血した。その結果、雄では成熟して calling が始まったが、まったく血中 VLDL 量の変化が見られなかった。一方、雌では長日刺激によってエストラジオールが上昇して産卵が始まり、これに対応して、血中 VLDL 量が増加した (図 2、3)。

(3) 雄にエストラジオール 1mg/100 g BW を投与したところ、2 日目にすでに雌の血中濃度を越え、14 日には雌の血中濃度の 12 倍を超えた (図 4)。

体重もエスとロジェン投与によって増加し、Day0 の体重 (51.41 ± 1.14 g) から Day14 の体重 (60.20 ± 1.09 g) は有意な増加だった。

(4) エストラジオールの用量を変えて 7 日間投与したときの、体重増加率と肝臓重量を図 5 と図 6 に示した。各群 3 羽ずつなので、バラツキが大きい。8 μ g/100gBW までの低い用量では増加が見られないが、この濃度以降では用量と反応の間に関係があるように見える。

Day0 と Day7 の血中エストラジオールの濃度を図 7 に示した。図 7 から明らかのように、投与前にはおよそ 0.5ng/ml

だったエストラジオールの血中濃度は、高濃度用量群 (8~1000 μ g/100 g BW) では増加している。投与量と血中濃度の間には両対数表示で直線関係がある (図 8)。

これを反映して、血中 VLDL 濃度においても投与前の 0.5mg/ml の値が、7 日間のエストラジオールの投与で高濃度群では増加している (図 9)。投与量と VLDL 血中濃度の間には両対数表示で直線関係がある (図 10)。

(5) ウズラでも 1 μ g/個体では血中 VLDL 量を増加させなかったが、10 および 100 μ g/個体の投与で VLDL 濃度は増加した。また dinestrol (DES の誘導体) ではエストラジオールよりも効果は顕著ではなかったが増加が見られた (図 11)。

D. 考察

環境行政上、OECD への対応は必要であるためにはそれなりの研究の蓄積が必要であろう。これまで、鳥類における研究は哺乳類、魚類に比べて遅れていた。今回、この研究組織を動かして所期の成果をあげられれば、これまでの遅れを一挙に取り戻すことができると考える。実際に動き出せるよう、各方面のご支援をお願いする次第である。

文献調査をした結果、鳥類のビテログゲニンを測定した論文は見つからなかった。両生類のビテログゲニンを測定するラジオイムノアッセイ系が、ニワトリのビテログゲニンと交差をするという論文があったが、その抗体の所在は不明であった。そこで、ビテログゲニンの代わりに、VLDL を測定する事を考えた。VLDL は肝臓で作られた中性脂肪を卵黄に運搬するリポタンパク質であり、エストロゲンによってその血中量が支配されている。リポタンパク質の定量は、これ

まで煩雑であったが、東ソーのシステムを使うと、比較的簡単に多量の試料を測定することができる。このシステムでは VLDL 量は粒子の大きさで分けて中性脂肪量を測定して推定している。

この測定方法を用いてヒメウズラの雌雄の血中 VLDL 量を測定したところ、生理的状态とよく一致していた。また、長日条件にして脳下垂体-生殖腺系を刺激したところ、雌でのみ血中 VLDL 量が増加した。雄にエストラジオールを投与した場合には、本来ほとんどないはずの VLDL が著しく増加した。これらの結果は、この方法が感度のよいエストロゲン様物質の評価法として有望であることを示している。今後、この方法がビスフェノール A などの内分泌攪乱物質として疑われる物質を評価するために使えるかどうかを調べて行く必要がある。

今回の一連の実験ではヒメウズラを使った。これはこの鳥が体重 50 から 60 g でウズラの 100 g から 120 g に比べて小型であること、さらに自然条件下で繁殖期が長く、屋外のフライングケージで雌雄を同居させて自由に交配させ有性卵が長期にわたって得やすいこと、孵卵設備が小規模ですむこと、などの理由である。二世世代試験法を開発するときには適していると考えたが、OECD での議論や外国での実験などを考えると、ウズラが主な試験動物となっていくと思われる。

ウズラでも雄にエストラジオールを投与すると血中 VLDL 濃度は増加し、その反応性はヒメウズラと本質的な差はない。また、ウズラでは dienesol に反応して血中 VLDL が増加することが示されている。今後は、ヒメウズラをウズラに変えて、さらに評価法を検討し、内分泌攪乱化学物質の評価をおこなう方向でこの研究を進めたい。

E. 研究発表

この研究に関する研究発表は現在までのところない。

F. 参考文献

- 1) Barron, L. G., Walzem, R. L. and Hansen, R. J. Plasma lipoprotein changes in hen (*Gallus domesticus*) during an induced molt. *Comp. Biochem. Biophys. Part B.* **123**, 9-16 (1999).
- 2) Korach, K. S., Metzler, M. and McLachlan, J. A. Estrogenic activity in vivo and in vitro of some diethylstilbestrol metabolites and analogs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75** (1): 468-471 (1978).
- 3) 岡崎三代。「リポ蛋白」 臨床検査 **40** (12): 1281-1292. 1996).
- 4) Walzem, R. L. Lipoproteins and the laying hen: Form follows function. *Poultry Avian Biol. Rev.* **7**(1), 31-64 (1996).

Organization of a Japanese Research Group on Endocrine Disruption in Birds and a Preliminary Study on Testing of Estrogenic Substances by Measuring Circulating Very Low Density Lipoprotein (VLDL)

Masaru Wada (College of Liberal Arts and Sciences, Tokyo Medical and Dental University, Professor)

Keywords: Endocrine disruption in birds, Research group, VLDL, Assay method

Abstract:

After attending the Meeting of the Avian Reproduction Expert Group on OECD Test Guideline for Avian Reproduction Toxicity Testing held in Leipzig during May 23 through 24, 1999, the author took an attempt to organize a research group gathering Japanese avian endocrinologists to promote studies of endocrine disruption in birds to meet the demand of OECD EDTF guideline scheme decision. Fortunately, many researchers agreed to have such a research group after a meeting held in January, 2000 and 23 members were included in the group. We have made a proposal which waits for approval from authority.

Vitellogenin is established as a good endpoint to assess estrogenic substances in fish. However, in avian species, vitellogenin assay system has not established so far. To get a good testing method to assess estrogenic substance, we took notice of Very Low Density Lipoprotein (VLDL). VLDL is a carrier of neutral lipids from the liver to the ovary. In egg-laying hens, circulating VLDL increases. Amount of circulating VLDL is estimated by Tosoh Lipoprotein Assay System with relatively simple procedures. With this assay system we measured circulating VLDL in male and female Asia blue quails. The level of VLDL in females was very high compared with those in male; especially laying females had high values. Photostimulation induced increase in circulating VLDL only in female birds. Furthermore, injection of estradiol (1 mg/100g BW) into males induced tremendous increase in circulating VLDL. These results indicate that this assay method is valid to assess estrogenic substances in male birds. Further validation is required using actual endocrine disruptors.

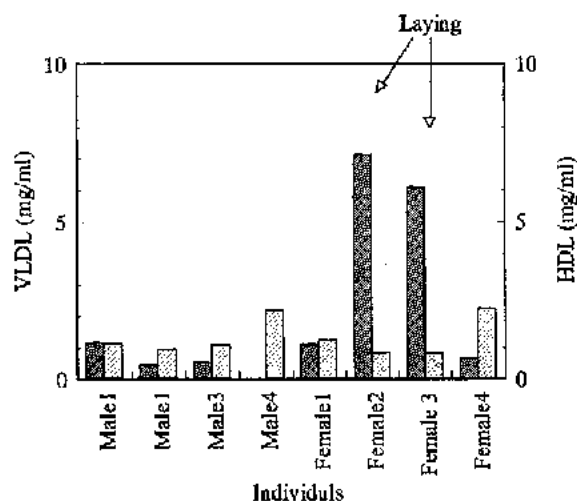


図1 成熟ヒメウスラ雄4個体と雌4個体の血中 VLDL 濃度。雌では個体番号2と3が産卵中で1と4は産卵していなかった。

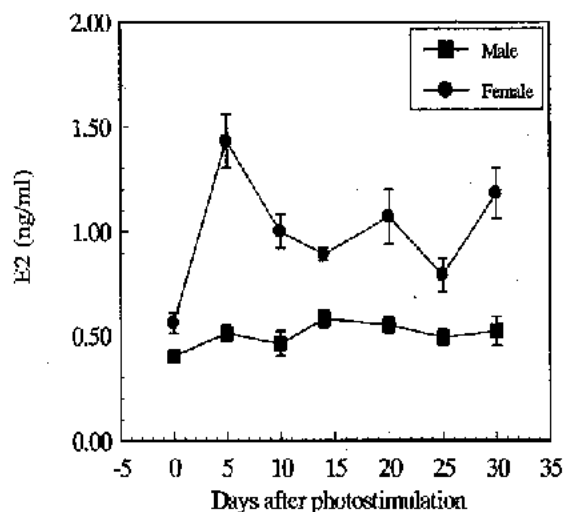


図2 成熟ヒメウスラ雄8個体と雌8個体を短日から長日に移した後の血中エストラジオール濃度の変動

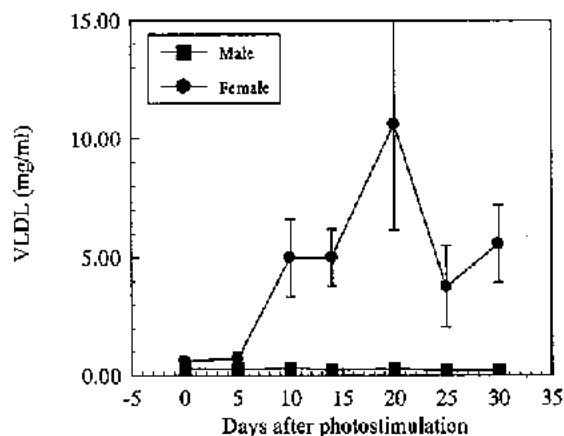


図3 成熟ヒメウスラ雄8個体と雌8個体を短日から長日に移した後の血中 VLDL 濃度の変動

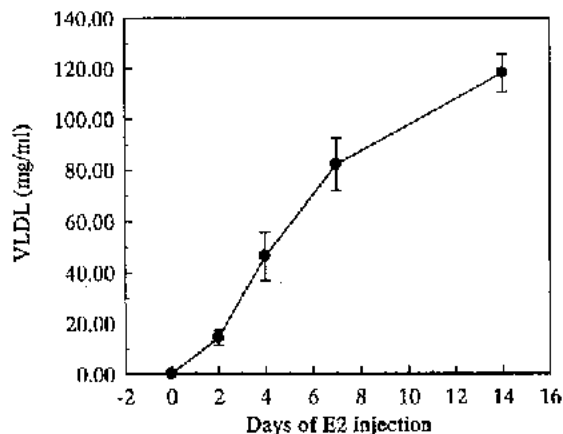


図4 成熟ヒメウスラ雄にエストラジオールを 1mg/100gBW 投与したときの血中 VLDL 濃度の増加 (n=8)。2日目以降、Day0 に比べて有意の増加である。

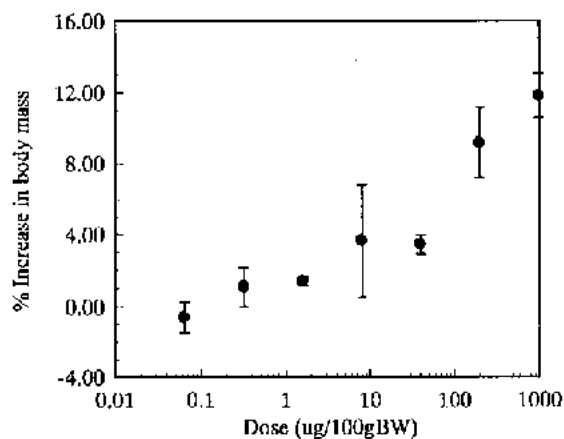


図5 投与したエストラジオールの用量に対する体重増加の割合

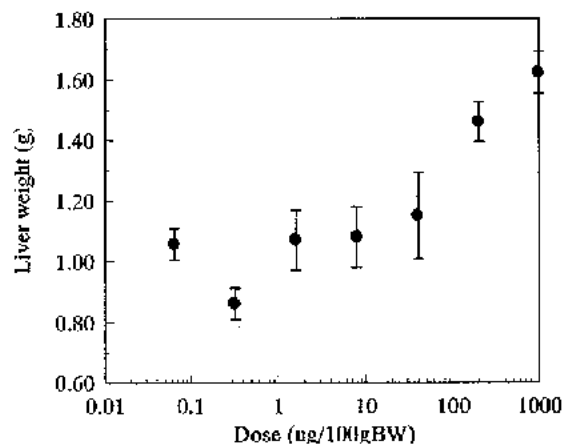


図6 投与したエストラジオールの用量に対する Day7 の肝臓重量

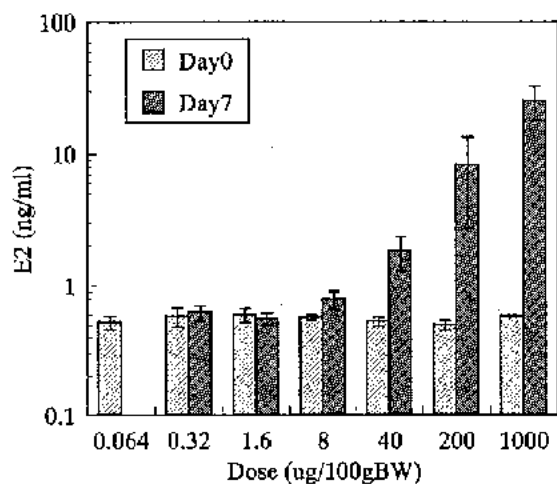


図 7 成熟雄に投与したエストラジオールの用量と血中エストラジオール濃度の関係

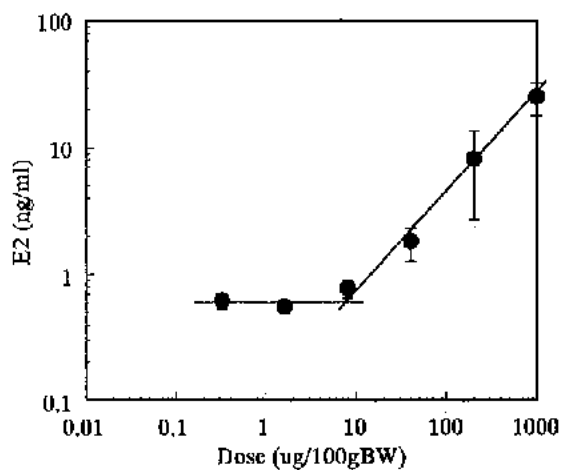


図 8 成熟雄に投与したエストラジオールの用量と血中エストラジオール濃度の関係

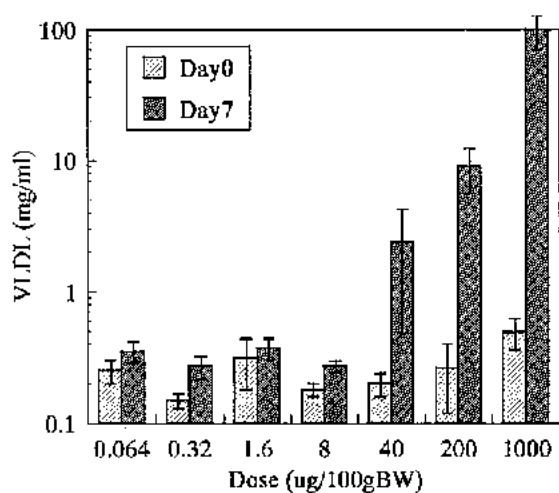


図 9 成熟雄に投与したエストラジオールの用量と血中 VLDL 濃度の関係

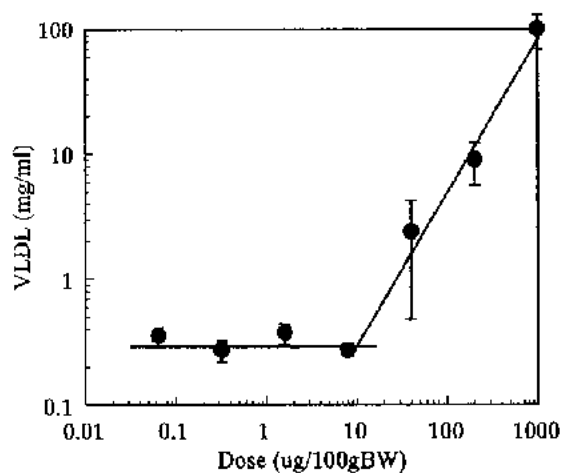


図 10 成熟雄に投与したエストラジオールの用量と血中 VLDL 濃度の用量反応関係

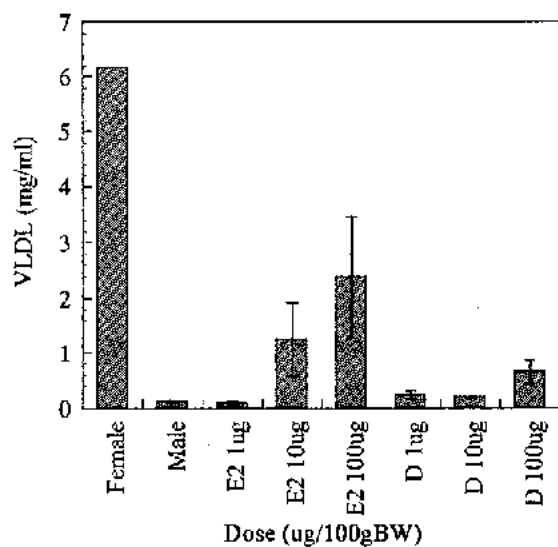


図 11 ウズラ雌雄の血中 VLDL 濃度、および雄にエストラジオールあるいは dienestrol (D) を投与したときの血中 VLDL 濃度