

## ExTEND2005 における両生類及び無脊椎動物試験法開発について

### 1. 化学物質の内分泌かく乱作用に関する両生類を用いた試験法開発について

#### 【これまでの取組】

化学物質の内分泌かく乱作用の両生類への影響を評価するにあたり、アフリカツメガエル等を試験動物とし、①変態アッセイ<sup>\*1</sup>、②性転換試験、③ビテロジェニンアッセイ、などのスクリーニング手法を開発してきた。また、変態アッセイ、性転換試験に際し、正常な個体の成長、発生を定義するため、④アフリカツメガエルの標準データベース、および⑤人為的に作出した ZZ（雌）<sup>\*2</sup>と、ZZ（雄）とを交配することにより得られた F<sub>1</sub>（全雄）<sup>\*2</sup>による性転換試験標準データベースを作成した。あわせて、試験管内試験として、アフリカツメガエル・エストロジェンレセプター（ER $\alpha$ ）への結合能力を測定するレセプターバインディングアッセイを開発した。

これらの取組に関しては、これまで開催された3回の OECD（経済協力開発機構）両生類専門家会合の中で、日本の取組成果として全て公表してきた。なお、OECD において、両生類の変態アッセイの標準化を目的としたリングテスト（試験法の有用性や妥当性等を検証する目的で、同一試験を同一条件で複数の機関により実施するテスト）が平成15年より開始され、これにフェーズ I から参加してきた。

平成16年度は、12月の第3回 VMG-eco で承認されたフェーズ II のプロトコールに基づき、試験対象物質として選定された3物質（Iopanoic acid(IOP)、Thyroxine(T<sub>4</sub>)、Perchlorate (PER))のうち、1物質（IOP）を用いた試験を実施した。さらに、平成16年6月の OECD 第2回両生類専門家会合等において、その情報整備の重要性が指摘されているニシツメガエル<sup>\*3</sup>の標準データベース作成を行った。

\*1 無尾両生類の幼生の変態過程において化学物質に2~3週間暴露することにより、甲状腺ホルモン様作用を検出する試験であり、後肢長の短縮の程度等をエンドポイントとしている。

\*2 野生型アフリカツメガエルの染色体型は ZW である。

\*3 ニシツメガエルは、アフリカツメガエルと比較して世代時間が短く、かつ染色体が二倍体であるという利点を有し、両生類における新たな試験動物として着目されている。

【平成 17 年度検討及び実施事項】

①変態アッセイ：OECD リングテストフェーズ II への参加

平成 17 年度は、平成 16 年度に引き続き、フェーズ II のプロトコールに沿って、試験対象物質として選定された 3 物質 (Iopanoic acid(IOP)、Thyroxine(T<sub>4</sub>)、Perchlorate (PER)) のうち、残る 2 物質 (T<sub>4</sub>、PER) を用いた暴露試験を実施している。

②基盤的研究 (案)：両生類の甲状腺軸に対する内分泌かく乱作用発現のメカニズムに関する研究 (資料 4-2 参照)

化学物質の甲状腺軸への作用メカニズムを理解し、変態アッセイの妥当性を保証する上で必要不可欠な情報を整備するため、平成 17 年度より基盤的研究を開始している。異なる作用メカニズムにより甲状腺ホルモン軸に対し内分泌かく乱作用を惹起する化学物質 (T<sub>4</sub>、Propyltiouracil(PTU)、IOP) を、変態アッセイに準じてニシツメガエル幼生に暴露し、継時的に得た各組織における遺伝子発現を、ディファレンシャル・ディスプレイ法を用いて解析し、個体レベルで生じた変化と対応させて遺伝子カスケードを整理する。

＜両生類試験に関する OECD の動きと日本の取組＞

年月	OECD の動き	日本の取組
2001 年 4 月	第 1 回両生類 Expert Consultation ・変態アッセイのテストガイドラインの作成に関する可能性の合意	日本の取組を紹介 ・両生類の変態に関する研究 ・トランスジェニックカエルの研究 ・ホルモン測定法の研究 ・在来種の組織学及び形態学的データ蓄積 ・性転換試験
2002 年 12 月	・『Ringtest: Effects of Pesticides and Other Chemicals on Thyroid System in the Amphibian <i>Xenopus laevis</i> 』を受理	ドイツが 2001 年に提唱した XEMA (Xenopus Metamorphosis Assay) のデータをドイツとともにとりまとめ、『Ringtest: Effects of Pesticides and Other Chemicals on Thyroid System in the Amphibian <i>Xenopus laevis</i> 』として、OECD に提出
2003 年 3 月	第 1 回 VMG-non animal	日本の取組を紹介 ・アフリカツメガエル培養肝細胞を用いた VTG アッセイ ・レセプターバインディングアッセイ
2003 年 5 月	第 2 回 VMG-eco ・XEMA Ringtest の報告 ・米国 Draft DRP について議論	日本の取組を紹介 ・在来種(ツチガエル)を用いた変態試験の開発 ・VTG 試験法の開発

2003年6月	<p>第1回両生類専門家会合</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>カエル変態アッセイの OECD テストガイドライン作成推進</li> </ul>	<p>日本の取組を紹介</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>ツチガエル変態試験の試験条件の設定</li> <li>トロピカリス変態試験の試験条件設定</li> <li>トロピカリス cDNA ライブラリの構築と遺伝子クローニング</li> <li>アフリカツメガエルパーシャルライフテストの提案</li> <li>ビテロジェニン測定キットの開発</li> <li>アトラスデータベースの構築</li> <li>ZZ 雌を用いた性転換試験</li> <li>トランスジェニックカエルの作製と利用</li> <li>プロテオーム解析</li> </ul>
2003年9月	<ul style="list-style-type: none"> <li>Proposal for Phase 1 of the Validation of the Amphibian Metamorphosis Assay を受理</li> </ul>	Phase 1 の試験条件を取りまとめ、米・独とともに OECD に提出
2004年1月	<ul style="list-style-type: none"> <li>Phase 1 開始</li> </ul>	Phase 1 実施
2004年3月	<ul style="list-style-type: none"> <li>右記ワークショップを、変態試験に関する両生類専門家会合として承認</li> </ul>	<p>「両生類における内分泌かく乱化学物質試験法に関する国際ワークショップ」を広島において開催</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Phase 1 結果報告</li> </ul>
2004年6月	<p>第2回両生類専門家会合</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Phase 1 のデータを承認</li> <li>Phase 2 への移行の承認</li> </ul>	<p>Phase 1 の試験結果の提出</p> <p>Phase 2 のプロトコル案の提出</p> <p>日本の取組を紹介</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>ツチガエル変態試験の試験条件の設定</li> <li>トロピカリス変態試験の試験条件の設定</li> <li>トロピカリス cDNA ライブラリの構築と遺伝子クローニング</li> <li>アフリカツメガエルパーシャルライフテストの提案</li> <li>ビテロジェニン測定キットの開発</li> <li>アトラスデータベースの構築</li> <li>ZZ 雌を用いた性転換試験</li> <li>トランスジェニックカエルの作製と利用</li> <li>プロテオーム解析</li> </ul>
2004年12月	<p>第3回 VMG-eco</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Draft Report of Phase 1 of the Validation of the Amphibian Metamorphosis Assay の報告</li> <li>Phase 2 of the Validation of the Amphibian Metamorphosis Assay の承認</li> </ul>	
2005年2月	<ul style="list-style-type: none"> <li>Phase 2 開始</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Phase 2 実施</li> </ul>

## 2. 化学物質の内分泌かく乱作用に関する無脊椎動物を用いた試験法開発について

### 【これまでの取組】

平成16年4月にOECDへ提案したEnhanced TG 211\*は、5月に開かれたOECDのWNT会合において、オオミジンコ (*Daphnia magna*) を用いた無脊椎動物における内分泌かく乱作用に関する試験法提案として正式に認められた。

提案後バリデーション前の予備的実験として系統差についての検討を行ったところ、オスの出現というエンドポイントの感受性において系統差があることが明らかとなった。

そこで、平成16年12月に開催された第3回VMG-ecoにおいて、OECD加盟各国からオオミジンコのさまざまな遺伝系統を手に入れて、バリデーション実施前にあらかじめ予備的試験(プレ・バリデーション)を実施することを提案し、承認をうけた。

\*従来ミジンコでの毒性試験として使用されてきたテストガイドライン211に、オスの出現(仔虫の性比の変化)、脱皮回数の変化という新たなエンドポイントを追加することを改訂テストガイドライン(Enhanced TG211)として提案している。

### 【平成17年度検討及び実施事項】

#### ①Enhanced TG211に関連した取組

各国の研究所と連絡をとり、うち6カ所からミジンコが送付され、プレ・バリデーションを実施した。プレ・バリデーションの結果、系統差が存在することが確認されたため、平成17年11月のOECD第2回無脊椎専門家会合においてはプレ・バリデーションの結果を報告するとともに、オスの出現が確実に観察可能な国立環境研究所が有する株を配布し、この株を用いてリングテストを実施することを提案する予定である。

#### ②基盤的研究(案): ミジンコにおける内分泌かく乱作用発現のメカニズムに関する研究 (資料4-2参照)

Enhanced TG211においてエンドポイントとなる、脱皮回数の増減や、オスの発生(仔虫の性比の変化)という個体レベルでの変化等について、その作用メカニズムを細胞・分子レベルで明らかにする必要がある。

このため、ミジンコに関する細胞・分子レベルでの情報整備を目的として、平成17年度は、ミジンコの遺伝子情報を整理し、DNAマイクロアレイを作

成する。将来的には、このマイクロアレイを用いて、毒性発現および内分泌かく乱作用発現に関して応答する遺伝情報を収集することが可能となると考えられる。

＜無脊椎動物試験に関する OECD の動きと日本の取組＞

年月	OECD の動き	日本の取組
2003 年 10 月	第 1 回無脊椎動物専門家会合 ・提案された甲殻類における内分泌かく乱化学物質スクリーニング試験法については『Enhanced Test Guideline 211』という呼称を用いることに決定	ミジンコ科数種における、幼若ホルモン様物質によるオス仔虫生産誘導についての基礎データを報告し、甲殻類における内分泌かく乱化学物質スクリーニング試験法として提案
2004 年 5 月	第 16 回 WNT (Meeting of the National Co-ordinators of the Test Guidelines Programme) ・『Enhanced Test Guideline 211』の優先順位については medium と評価	
2004 年 12 月	第 3 回 VMG-eco ・バリデーション開始に先立ち、日本において、OECD 参加各国で使用されているミジンコ系統の感受性差を評価することを決定	試験に用いるミジンコの系統によって幼若ホルモン様物質に対する感受性が異なることを報告
2005 年 2 月		各国から送付されたミジンコを用いた系統差に関するプレ・バリデーション開始
2005 年 11 月	第 2 回無脊椎動物専門家会合開催予定	プレ・バリデーション結果報告及び、Enhanced TG211 リングテスト実施を提案予定