

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、変態アッセイ、性転換試験、ピ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、

アフリカツメガエルの標準データベース、および人為的に作出した ZZ (雌)* と、ZZ (雄) とを交配することにより得られた F₁ (全雄)* 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) 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 1 から参加してきた。

平成 16 年度より、12 月の第 3 回 VMG-eco で承認されたフェーズ 2 のプロトコルに基づき、試験対象物質として選定された 3 物質 (イオパノ酸 ; IOP、テトラヨードチロニン ; T₄、パークロレート ; PER) 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において、その情報整備の重要性が確認されたニシツメガエル** の標準データベース作成を行った。

*野生型アフリカツメガエルの染色体型は ZW である。

**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。

(参考) アフリカツメガエルとニシツメガエルとの比較

種	アフリカツメガエル (<i>Xenopus laevis</i>)	ニシツメガエル (<i>Silurana tropicalis</i>)
倍数性	異質 4 倍体 ¹⁾	2 倍体
染色体数 (2n)	36	20
ゲノムサイズ (bp)	3.1 × 10 ⁹	1.7 × 10 ⁹
世代時間 (年)	1.5 ~ 2.0	0.5 ~ 1.0
生息場所	陸水域	陸水域
至適温度 ()	16 ~ 22	25 ~ 30
体長 (mm)	80 ~ 110	40 ~ 50
卵径 (mm)	1.0-1.3	0.6-0.7
産卵数 (個)	1,000 ~ 3,000	5,000 ~ 10,000
近交系	有 ²⁾	有 ³⁾

1) Schmid, M. and C. Steinlein (1991) Chromosome banding in amphibia. XVI. High-resolution replication banding patterns in *Xenopus laevis*. Chromosoma 101: 123-132.

Tymowska, J. (1991) Polyploidy and cytogenetic variation in frogs of the genus *Xenopus*. In Green, D. M. and Sessions, S. K. (eds.), Amphibian Cytogenetics and Evolution, pp. 259-297. Academic Press, San Diego, CA.

2) 北海道大学にて 20 代以上に渡る近親交配を経て作出

3) バージニア大学に由来のクローズドコロニーより、10 代以上に渡る近親交配を経て作出. ナショナルバイオリソースプロジェクト (文部科学省所管) の中核的機関である 広島大学大学院理学研究課附属両生類研究施設より配布可能

【平成 17 年度事業の成果】

変態アッセイ：OECD リングテストフェーズ 2 への参加

平成 17 年度は、フェーズ 2 のプロトコルに沿って、試験対象物質として選定された 3 物質 (イオパノ酸 ; IOP、テトラヨードチロニン ; T₄、パークロレート ; PER) のうち、2 物質 (T₄、PER) を用いたばく露試験を実施した。また、甲状腺の組織学的検証に基づいて、OECD 両生類変態アッセイ病理組織会議において評価方法を提案した。

基盤的研究：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

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担保する上で必要不可欠な情報を整備するため、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（テトラヨードチロニン； T_4 、プロピルチオウラシル；PTU、イオパノ酸；IOP）を、変態アッセイに準じてニシツメガエル幼生にばく露し、 T_4 をばく露したニシツメガエル幼生より、継時的に得た3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発現プロファイルを整理し、抽出された221個の遺伝子の中から、特に泳動パターンの変化が明瞭に異なる80個の遺伝子を同定した。

【今後の取組方針】

国際的な取組みであるOECDへの協調を継続する。具体的には、両生類の変態アッセイ法の標準化に向け、フェーズ2の取りまとめとともに、テストガイドラインの提案に向けた取組みを推進する。また、現在はアフリカツメガエルのみを試験動物として使用しているが、平成16年度にアトラス作成等を行ったニシツメガエルを試験動物として含めることを提案していく。さらに、試験法開発を補完するために、視床下部 下垂体 甲状腺軸への作用による変態促進・阻害の作用メカニズムに関する研究を推進する。

< 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 Xenopus laevis』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取りまとめ、『Ringtest: Effects of Pesticides and Other Chemicals on Thyroid System in the Amphibian Xenopus laevis』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	第 1 回両生類専門家会合 ・カエル変態アッセイの OECD テストガイドライン作成推進	日本の取組を紹介 ・ツチガエル変態試験の試験条件の設定 ・トロピカリス変態試験の試験条件設定 ・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 ・アフリカツメガエルパーシャルライフテストの提案 ・ピテロジェニン測定キットの開発 ・アトラスデータベースの構築 ・ZZ 雌を用いた性転換試験 ・トランスジェニックカエルの作製と利用 ・プロテオーム解析
2003 年 9 月	・Proposal for Phase 1 of the Validation of the Amphibian Metamorphosis Assay を受理	フェーズ 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	・フェーズ 1 開始	フェーズ 1 実施
2004 年 3 月	・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	「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 ・フェーズ 1 結果報告

2004年6月	<p>第2回両生類専門家会合</p> <ul style="list-style-type: none"> ・フェーズ1のデータを承認 ・フェーズ2への移行の承認 	<p>フェーズ1の試験結果の提出 フェーズ2のプロトコル案の提出 日本の取組を紹介</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ツチガエル変態試験の試験条件の設定 ・トロピカリス変態試験の試験条件の設定 ・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 ・アフリカツメガエルパーシャルライフテストの提案 ・ピテロジェニン測定キットの開発 ・アトラスデータベースの構築 ・ZZ雌を用いた性転換試験 ・トランスジェニックカエルの作製と利用 ・プロテオーム解析
2004年12月	<p>第3回 VMG-eco</p> <ul style="list-style-type: none"> ・Draft Report of Phase 1 of the Validation of the Amphibian Metamorphosis Assay の報告 ・Phase 2 of the Validation of the Amphibian Metamorphosis Assay の承認 	
2005年2月		フェーズ2実施
2005年9月		フェーズ2のばく露試験終了
2006年1月	<p>OECD 両生類変態アッセイ病理組織会議</p> <ul style="list-style-type: none"> ・Phase 2 Frog Metamorphosis Assay Histology: 1 Part 2 Approach to reading studies, diagnostic criteria, severity grading, and atlas の改定 	組織評価の手順について提案

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）を実施することが承認され、予備試験を実施した。

予備試験の結果について、平成 17 年 11 月に開催された OECD 第 2 回無脊椎専門家会合において報告し、この結果をもとに試験物質の選定、使用系統の選択等、バリデーション・リングテストの実施条件が検討された。

平成 17 年 12 月には、(独)国立環境研究所がリードラボラトリーとして選定され、バリデーション・リングテストへの Invitation Letter を作成・配布し、6 カ国 12 研究機関がバリデーション・リングテストへの参加を表明した。平成 18 年 6 月現在、各参加研究機関においてバリデーション・リングテストを実施中である。

*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 TG 211）として提案している。

【平成 18 年度検討及び実施事項】

Enhanced TG211 に関連した取組み

平成 17 年度末からバリデーション・リングテスト実施へ向けての準備を進めており、すでに(独)国立環境研究所が有するオス仔虫出現が確実に観察可能な系統と、ピリプロキシフェン（陽性対照）及び 3,5 ジクロロフェノール（陰性対照）の 2 試験物質が参加研究機関へ配布されている。

今後、8 月中に参加研究機関から(独)国立環境研究所へ試験データが送られ、データ解析を行った後に結果をまとめ、OECD へ報告する予定である。

< 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ブレ・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	ブレ・バリデーション結果報告及び、Enhanced TG 211 リングテスト実施を提案
2005 年 12 月	Invitation Letter 配布	Invitation Letter の作成
2006 年 2 月	バリデーション・リングテスト開始	参加研究機関へのプロトコール、試験物質、試験系統の配布