

2015年1月15日

# 内分泌かく乱作用に関する試験法の開発状況

1. 内分泌かく乱作用の評価体系
2. 第1段階試験(スクリーニング)に用いる試験法とその開発状況
3. 第2段階試験(確定試験)に用いる試験法とその開発状況
4. 今後について

井口泰泉

自然科学研究機構・基礎生物学研究所・  
岡崎統合バイオサイエンスセンター

1

今日は、環境省のリスク評価に使う試験法がどれくらい開発されているかという話を中心にします。内分泌かく乱作用の評価体系は、加藤さんがもうお話しになりましたので、個々の試験法についてお話していきたいと思います。

## 1. 内分泌かく乱作用の評価体系

SPEED '98 (1998-2005), ExTEND2005 (2005-2010), EXTEND2010 (2010-2015)

内分泌かく乱作用を持つと疑われる物質が環境リスクを持つか否かを評価するために

評価の枠組みと評価手法の確立が必要

OECD Conceptual Framework for Testing and Assessment of EDCs

EXTEND2010の評価の枠組みと試験法について

### 謝辞

ご紹介する試験法は、国立環境研究所、WatchFrog、いであ（株）、JANUSとの共同研究のもとに、環境省基盤研究、LRI、日英共同研究、日米二国間協力などにより開発されたものです。

生物を使った試験は、国立環境研の鑑迫先生が中心になって開発されていますし、いであ株式会社は化学物質の影響評価を、日本エヌ・ユー・エス株式会社は文献調査と試験体系の確立を中心に行っています。

WatchFrogはフランスのベンチャー企業です。この会社から私たちの研究室に、トランスジェニックの動物の作成を行いに来まして、共同研究を行っています。

加藤さんの話にありましたが、私は、環境省の基盤研究で、ミジンコの試験法開発をずっと続けております。LRIからもミジンコの性分化遺伝子探索について研究支援をいただき、ダブルセックス遺伝子を見つけました。

OECDの内分泌かく乱物質試験及び評価に関する試験法体系		
	哺乳動物毒性試験	哺乳動物以外の毒性試験
Level 1 既存の毒性データおよび 化学物質情報	化学物質の物性、野生動物毒性試験のデータ、化学物質分類、構造活性相関、コンピューターを用いたシミュレーション、吸収(Absorption)、分布(Distribution)、代謝(Metabolism)、排泄(Excretion)情報	
Level 2 ホルモン作用のメカニズムに 基づいた試験管内試験	エストロゲン及びアンドロゲン受容体への結合、エストロゲン受容体、アンドロゲン受容体、甲状腺ホルモン受容体を用いた転写活性化試験、ステロイドホルモン合成系を用いた試験(OECD TG455-TG457)、転写活性化試験(OECD TG456)	
Level 3 ホルモン作用のメカニズムに 基づいた生物試験	子宮重量増加試験 (OECD TG 440) 前立腺重量増加試験 (OECD TG 441)	両生類変態アッセイ (OECD TG 231) 幼若期ゼノパス甲状腺シグナルアッセイ (XETA) メダカ短期繁殖試験 (OECD TG 229) 21日間魚類試験 (OECD TG 230) アンドロゲン投与雌のトゲウオ試験 (GD 140)
Level 4 ホルモン作用のメカニズムに 基づいて悪影響を調べる生 物試験	OECD TG407, 408, 415, 414, 451, 426 etc.	魚類性発達試験 (OECD TG234) 幼生期両生類成長・発達試験 (LAGDA) オオミジンコ生殖試験 (雄産仔を指標とする) (OECD TG 211) ユスリカ毒性試験、巻貝毒性試験、巻貝短期ライフサイクル試験、ミズ生殖試験、鳥類生殖試験 (OECD TG 206)
Level 5 ホルモンに関連した悪影響を 調べる多世代などの包括的 生物試験	拡張1世代繁殖毒性試験 (OECD TG 443) 2世代繁殖毒性試験 (OECD TG 416)	メダカ拡張1世代生殖試験 ミジンコ多世代試験、鳥類2世代生息毒性試験 ミシッドライフサイクル毒性試験 コペポッド生殖発達試験 巻貝類ライフサイクル試験

3

TG: Test Guideline, GD: Guidance Document

OECDでは、Conceptual Frameworkを作り、色々な試験法がリスク評価のどのレベルに位置付けられるかを示しています。Level 1～5まであり、Level 4と5の試験が有害性評価の試験とされています。

Level 1は、文献調査と、どれぐらいばく露しているかという既存の情報の整理です。

Level 2は、化学物質の受容体結合試験や、培養細胞の中に受容体遺伝子を導入し、細胞内で発現した受容体の活性化の程度を調べる試験です。

Level 3は、短期間の動物試験を行い、化学物質に作用があるかを確認する試験です。Level 2は、受容体タンパクやその、培養細胞を使って作用を確認をする試験ですので、実際の動物を使う試験がLevel 3になります。

表の中にありますように、いろいろな試験法が提案・開発されています。

## EXTEND2010における試験法開発の進捗状況

	OECD Level 2	Level 3	Level 4, 5
検出可能な作用	第1段階試験管内試験 スクリーニング試験	第1段階生物試験 スクリーニング試験	第2段階生物試験 確定試験
エストロゲン様作用 抗エストロゲン様作用	メダカエストロゲン受容体 $\alpha$ レポーター遺伝子試験	メダカ短期繁殖試験(OECD TG229) 21日間魚類試験(OECD TG230)	○メダカ拡張1世代試験
アンドロゲン様作用	メダカアンドロゲン受容体 $\beta$ レポーター遺伝子試験	メダカ短期繁殖試験(OECD TG229) 21日間魚類試験(OECD TG230)	○メダカ拡張1世代試験
抗アンドロゲン様作用	メダカアンドロゲン受容体 $\beta$ レポーター遺伝子試験	○幼若期メダカ抗アンドロゲン試験	○メダカ拡張1世代試験
甲状腺ホルモン様作用 抗甲状腺ホルモン様作用	<i>Xenopus tropicalis</i> 甲状腺 ホルモン受容体 $\beta$ レポ ーター遺伝子試験	△幼生期アフリカツメガエル甲 状腺ホルモン試験(XETA)	両生類変態アッセイ (TG231) ○幼若期両生類成長・ 発達試験(LAGDA)
幼若ホルモン様作用	△ミジンコ幼若ホルモン 受容体レポーター遺伝 子試験 ○ツォーハイブリッド試験	○ミジンコ幼若ホルモン簡易スク リーニング試験	オオミジンコ繁殖毒性 試験(TG211, Annex 7) ○オオミジンコ多世代 試験
脱皮ホルモン様作用	○ミジンコ脱皮ホルモン 受容体レポーター遺伝 子試験	△ミジンコ脱皮ホルモン簡易スク リーニング試験	○ミジンコ多世代試験

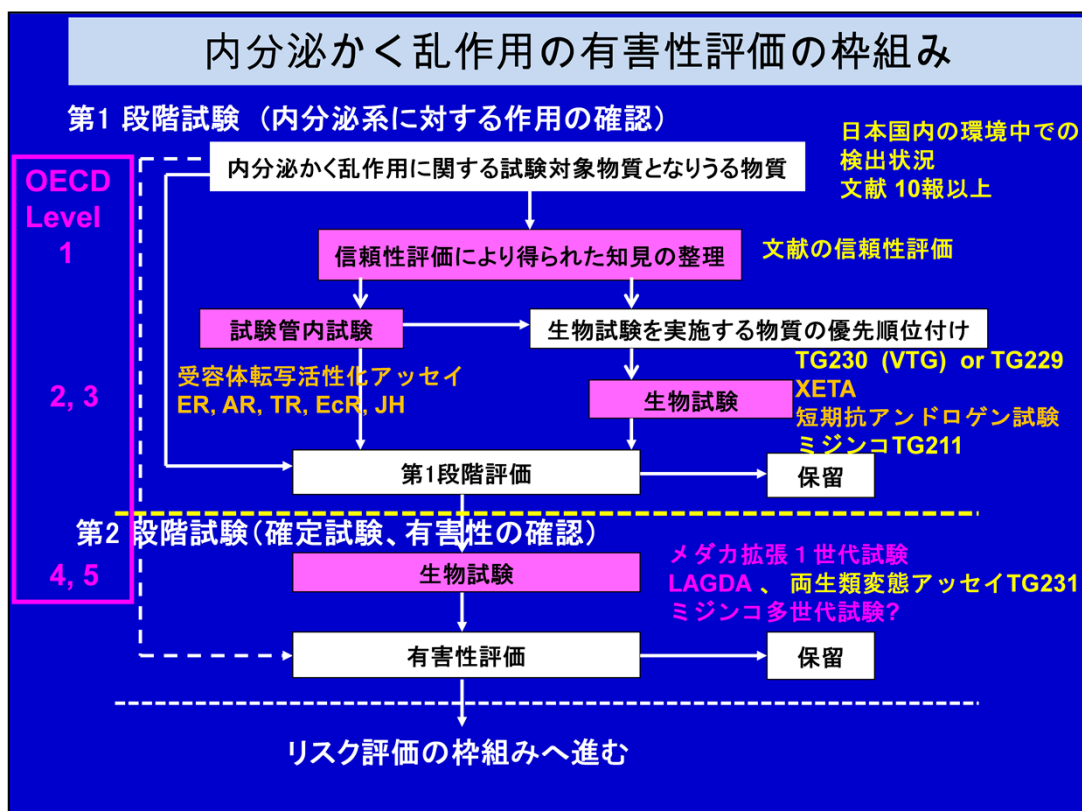
4

OECD のConceptual Frameworkを元に、日本が使っている試験法を当てはめてみました。

Level 2にはたくさんのレポーター遺伝子アッセイがあります。女性ホルモン作用、男性ホルモン作用、甲状腺ホルモン作用、脱皮ホルモン作用および幼若ホルモン作用を、培養細胞にそれぞれの受容体遺伝子導入して使用しています。

Level 3は短期の生物試験です。

Level 4、5が確定試験になります。メダカを使った拡張1世代生殖試験や、発生中のアフリカツメガエルを使った、LAGDA試験を準備しながらリスク評価の体系を作っています。



それぞれの試験法を、有害性評価の枠組みに当てはめたのがこの図です。

最初に文献調査等が入っています。次に、日本の環境中で見つかった物質に対して、その物質を使った研究成果として発表された論文数を調べ、10報以上論文が出ている場合は、有害性評価の枠組みに取り上げて、進めることとなります。

文献の信頼性を評価して、その文献は本当にきちんと実験されているか、情報は十分に記入されているか、などを、十数人の先生方に論文を読んでもらって評価をしています。その結果、論文の信頼性があり、化学物質の影響が確かであると認められた場合には、試験管内試験と短期生物試験を行うこととなります。現在、レポーターアッセイ（試験管内試験）がだいぶ進んできました。生物試験については、脱皮ホルモン作用や幼若ホルモン作用をみるミジンコ試験、甲状腺ホルモン作用を調べるカエルの試験、女性ホルモン作用や男性ホルモン作用を調べるメダカの試験では、それぞれ、OECDのテストガイドラインのどれを使うかという議論を行っています。化学物質の作用を短期生物試験で確認するところまでが第1段階評価となります。第1段階試験では、化学物質の作用(影響)の有無を調べる試験なので、試験濃度を高く設定しています。

第1段階試験で、影響が確認でき、日本の環境中の濃度が比較的高い場合には、第2段階試験を行うこととなります。今までは、第2段階試験の有害性評価をする試験がありませんでした。日米共同で、メダカを用いた、多世代試験を開発してきました。また、両生類の幼生を使った試験も日米で共同開発してきました。ミジンコは現在、多世代試験を開発しています。最終的には第2段階試験を行って、有害性の評価を行うこととなります。

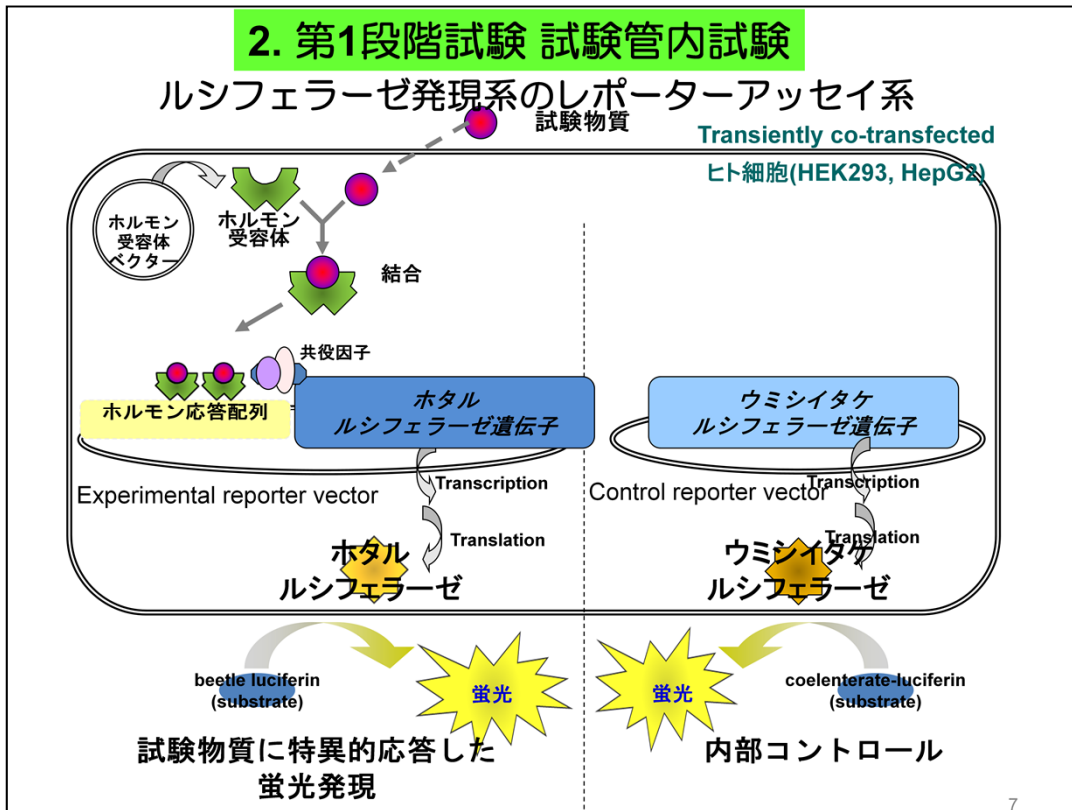
## 2段階評価試験

- 第1段階
  - 内分泌系への作用の有無を明らかにする.
  - “**内分泌かく乱作用を調べるべき物質**” の選定に、信頼性評価を行った既存知見を用いる.
  - 第1段階試験: **試験管内試験と短期生物試験.**
  - 第1段階評価: 既存知見と試験結果にもとづく.
- 第2段階
  - 内分泌かく乱作用による有害性影響の有無を明らかにする.
  - 第1段階評価により内分泌系への影響をもつことが判明した物質は第2段階生物試験を行う.
  - 生態系へのリスク評価を行う.

6

まとめますと、第1段階では、化学物質にホルモン作用があるかないかを受容体遺伝子を組み込んだ培養細胞や受容体タンパクを使う、試験管内試験と、短期の動物試験を行います。

第2段階は、確定試験で、長期間の試験なので、非常にお金がかかりますので、環境省もたくさんの物質を一度に評価することはできません。



第一段階試験に用いるレポーターアッセイの模式図です。

試験したい動物（ミジンコ、メダカ、アフリカツメガエル）の試験に用いたいホルモン受容体遺伝子（エストロゲン、アンドロゲン、甲状腺ホルモン、脱皮ホルモン）を細胞に導入します。導入された細胞内で発現したホルモン受容体に化学物質が結合して、活性化すると蛍光を発するようにしておきます。さらに、細胞がちゃんと生きているかどうか、細胞の生存を確認する仕掛けとしてウミシイタケのルシフェラーゼ遺伝子も組み込んでおき、蛍光発色の強さで、ホルモン作用の強さを調べる方法です。

## 第1段階短期生物試験

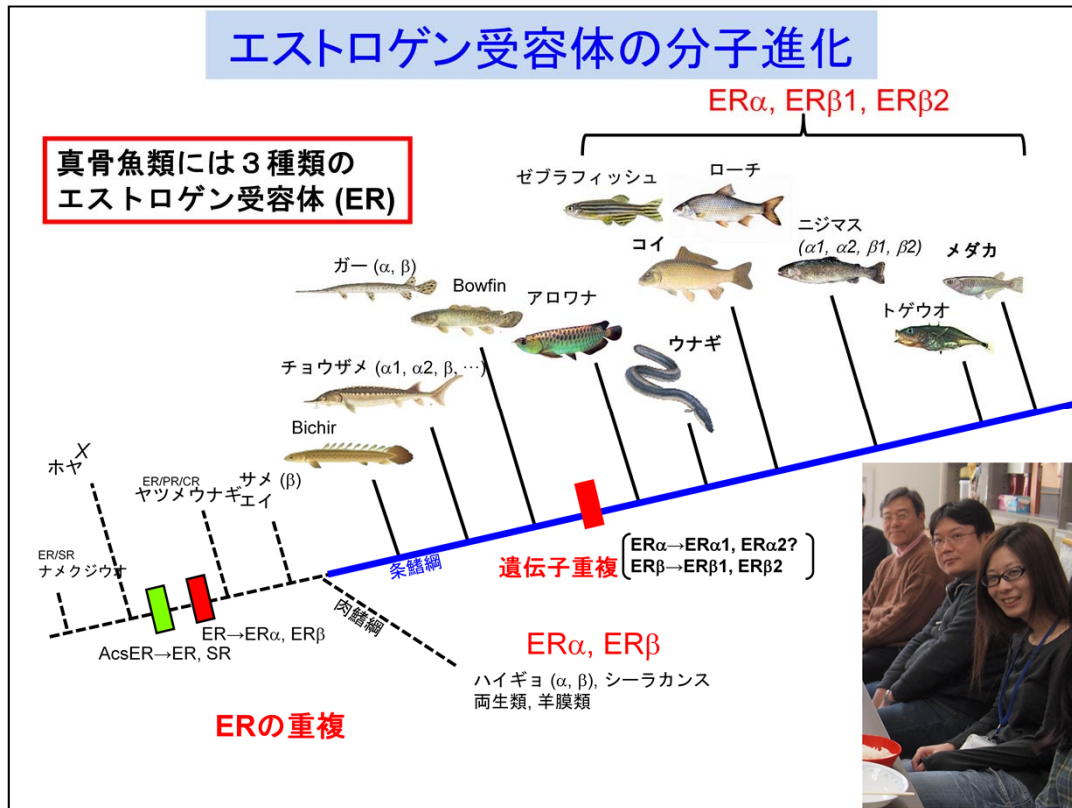
### 第1段階短期生物試験法の開発

- エストロゲンおよび抗エストロゲン活性  
メダカ (*Oryzias latipes*) エストロゲン受容体 $\alpha$  (ER $\alpha$ ) レポーター遺伝子アッセイ
- アンドロゲンおよび抗アンドロゲン活性  
メダカ アンドロゲン受容体 $\beta$  (AR $\beta$ ) レポーター遺伝子アッセイ  
(Validity for detection of anti-androgen activity should be examined.)
- 甲状腺ホルモンおよび抗甲状腺ホルモン活性  
ゼノパストロピカリス (*Xenopus tropicalis*) 甲状腺ホルモン受容体 $\beta$  (TR $\beta$ ) レポーター遺伝子アッセイ
- 幼若ホルモン活性  
オオミジンコ (*Daphna magna*) 幼若ホルモン受容体 (JHR) レポーター遺伝子アッセイ (開発中) ツーハイブリッドアッセイ (完成)
- 脱皮ホルモン活性  
オオミジンコ (*Daphnia magna*) 脱皮ホルモン受容体 (EcR) レポーター遺伝子アッセイ

環境省では3種類の生物、すなわち、メダカ、アフリカツメガエル、オオミジンコだけしか使いません。メダカでは、エストロゲンの受容体、アンドロゲンの受容体、カエルは甲状腺ホルモンの受容体、ミジンコは、幼若ホルモンと脱皮ホルモンの二つのホルモンの受容体を使います。

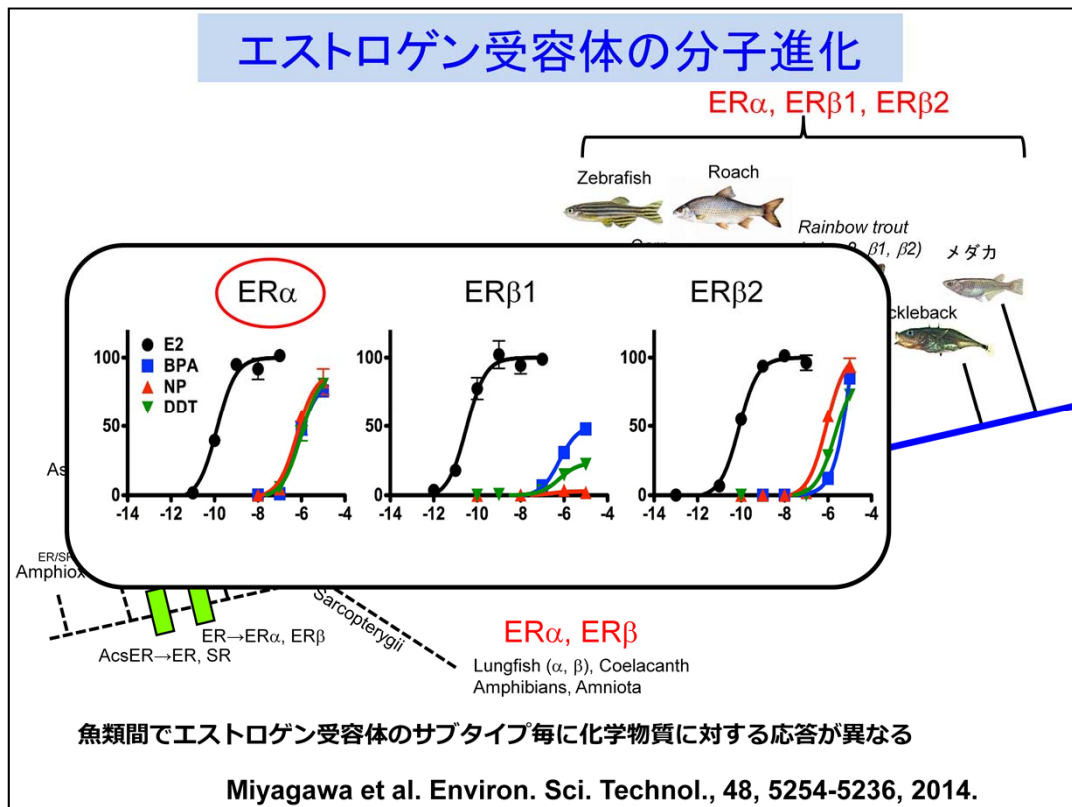


## エストロゲン受容体の分子進化



脊椎動物の祖先と考えられているナメクジウオには、無脊椎動物ですが、女性ホルモン受容体に似たステロイド受容体があります。真骨魚類の女性ホルモン受容体（エストロゲン受容体、ER）は、進化の過程で遺伝子重複が2回起こり、ERは3～4種類（ER $\alpha$ , ER $\beta$ 1, ER $\beta$ 2）があります。哺乳動物には2種類（ER $\alpha$ , ER $\beta$ ）しかありません。哺乳動物の場合には、主にER $\alpha$ が生殖に必要であることがわかっていますが、魚類の場合はそれぞれのERの機能は分かっていません。

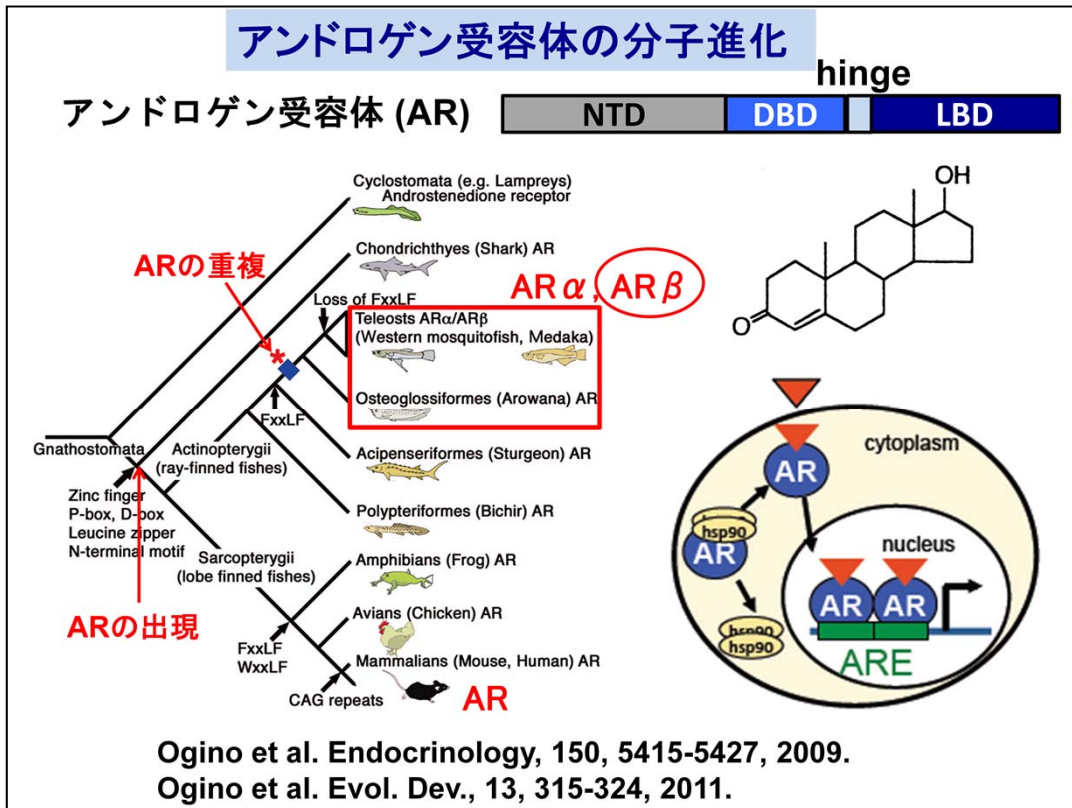
どの魚種がエストロゲンに対して反応性が高いかということも調べています。コイはエストロゲン作用を示す物質に対する反応が低く、メダカやゼブラフィッシュは反応が高いことが分かっています。



例えば、メダカの女性ホルモン受容体 $\alpha$  (ER $\alpha$ ) は、女性ホルモンに対して、低濃度できれいに反応します。ビスフェノールA、ノニルフェノール及びop'-DDTにも、女性ホルモン作用がありますが、高濃度が必要です。

ER $\beta$ 1は、化学物質に対しての反応が非常に低く。特にノニルフェノールに反応しません。ER $\beta$ 2はER $\alpha$ と同じように反応します。

雄メダカの飼育水に女性ホルモンが入ると、ビテロジェニン（卵黄タンパク）を作りますが。それはどのERを介して卵黄タンパクが発現するのかすらわかっていないのです。



一方、男性ホルモン受容体（アンドロゲンの受容体、AR）は人間を含む哺乳類には1種類しかありません。ところが、メダカは遺伝子重複により、ARαとARβの2種類があります。どちらが本当にアンドロゲンの機能を仲介しているかよくわかっていないのですが、ARβという名前が付いた方が哺乳類のARによく似ているので、環境省ではARβをレポーターアッセイに使っています。

## 第1段階 試験管内試験 (レポータージーンアッセイ)

- 2012年の既存知見の信頼性評価をもとに
- ホルモン作用の有無のまとめ
- 2013年に、7物質について第1段階試験管内試験を行い、ホルモン作用の有無の確認
  
- 試験結果:
  - エストロゲン活性の確認:メチルパラベン
  - 抗アンドロゲン活性の確認:アトラジン、デカプロモジフェニルエーテル、フェノール
  - 抗アンドロゲン活性を確認するためのレポーターアッセイは再確認が必要

12

第1段階のレポータージーンアッセイの結果、メチルパラベンにはエストロゲン活性があることを確認し、アトラジン、デカプロモジフェニルエーテル、フェノールには抗アンドロゲン活性があることが確認できています。

## オオミジンコ



1. 飼育が容易(生後5日から3日毎に産仔)
2. 単為生殖で雌が雌を産む(親子はクローン)
3. 体が透明で、体の内部が見える
4. 育房から取り出した卵はシャーレで発生するので観察しやすい
5. 遺伝子情報、ゲノム情報が使える
6. RNA干渉法、ゲノム編集手法(TALEN)を確立
7. 脱皮ホルモン受容体、幼若ホルモン受容体をクローニング

OECD TG211

21日間生殖試験  
(産仔数)

急性毒性試験

水質の検査、化学物質の毒性評価

オオミジンコは化学物質の安全性試験に、世界中で用いられています。ミジンコは藻類を食べ、魚の餌にもなるので、食物連鎖の真ん中に位置しており、水系の生態系に重要な位置を占めています。単為生殖でメスがメスを産んで、3日に30匹ほどを産みますので、ミジンコ算で増えます。

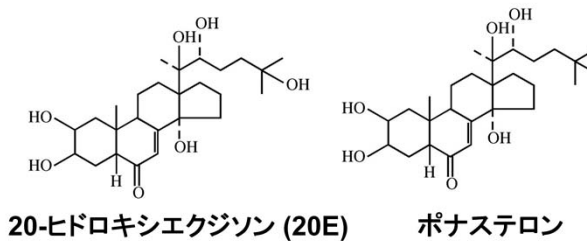
体が透明なので、体の内部が外から見えますし、育房に産んだ卵を取り出して、シャーレで発生させることもできますので、研究にも便利な点があります。

ミジンコの内分泌かく乱のメカニズムに関しては、環境省の基盤研究のサポートにより、ミジンコの遺伝子の整理、特定の遺伝子の発現を低下させる、RNA干渉法(RNAi)の確立、ゲノム編集法(TALEN)を利用した、特定の遺伝子の発現阻害(ノックアウト)の確立も行いました。ミジンコを使った遺伝子改変ができるようになったので、遺伝子のノックアウトとかノックインとか、トランスジェニックミジンコができる体制もできてきました。その他、ミジンコのホルモンである脱皮ホルモンや幼若ホルモンの、それぞれの受容体もクローニングしました。

## オオミジンコ脱皮ホルモン受容体 (EcR)

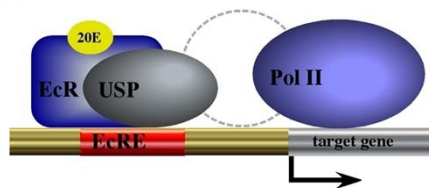
### ・主要なホルモン

- ・成長
- ・脱皮
- ・変態
- ・生殖



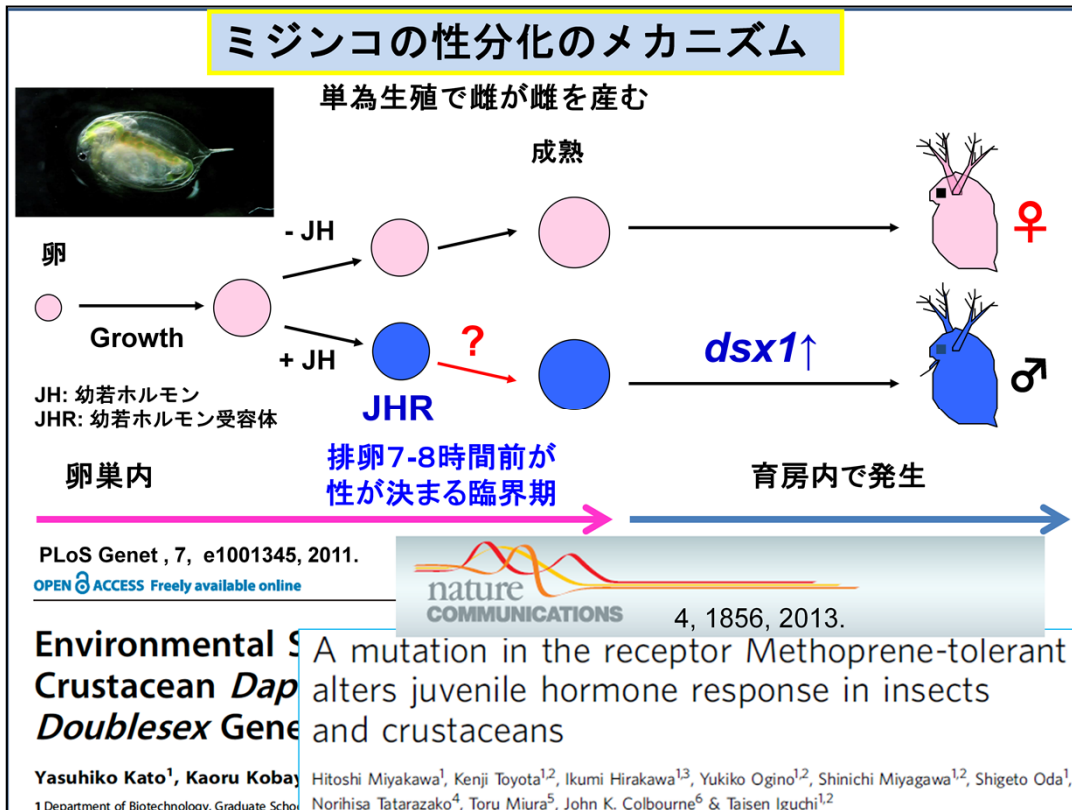
### ・脱皮ホルモン受容体(EcR)を介して作用

- ・核内受容体スーパーファミリー
- ・ウルトラスピラクル(USP)とヘテロダイマーを形成 ← リガンド依存性遺伝子発現に必須

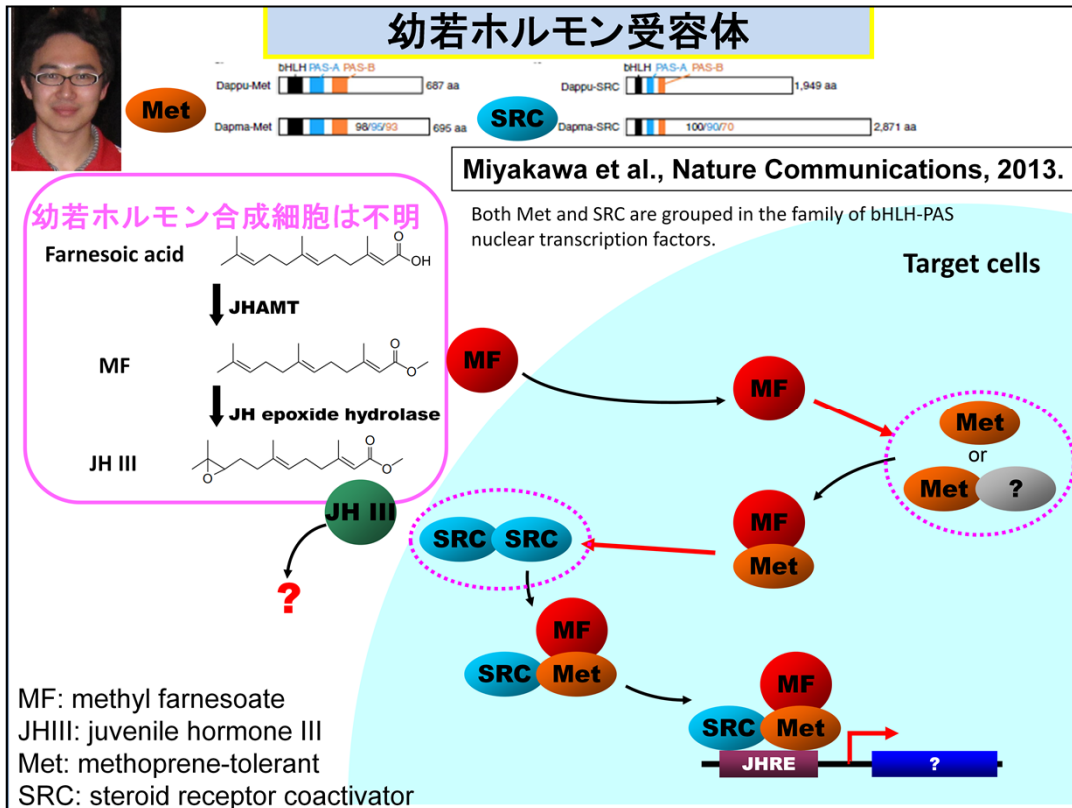


Kato et al., J. Endocrinol., 193, 183-194, 2007.

私たちは、2007年に、オオミジンコから脱皮ホルモンの受容体をクローニングして、脱皮ホルモン受容体を用いたレポーターアッセイ系を確立しています。脱皮ホルモン受容体は、脱皮ホルモン受容体(EcR)とウルトラスピラクル(USP)と呼ばれるタンパク質のヘテロダイマーでできています。EcRに脱皮ホルモンが結合します。



ミジンコは環境がよければ、単為生殖によってメスだけを産みますが、環境が悪くなるとオスを産み、交尾して乾燥にも耐えられ耐久卵（休眠卵）を産みます。耐久卵の鞘のなかには2個の卵が入っており、水が入ると2匹のメスが発生します。私たちは、幼若ホルモンを飼育水に入れると、母親はオスを産むことを2003年に見つけました。環境が悪くなると母親の体内で幼若ホルモンが作られ、それが卵巣にある排卵前の卵に作用すると、その卵の初期発生の際にダブルセックス1という遺伝子が発現して、オスに発生することを2011年に見つけています。2013年に幼若ホルモンの受容体も明らかにしましたので、今後、オスを産む仕組みを明らかにしたいと思います。



ミジンコの幼若ホルモン受容体は、メチルファーネゾエート (Met) というタンパク質が幼若ホルモンあるいはその類似物質を受け取ります。幼若ホルモンあるいは幼若ホルモン類似物質がMetに結合すると、Steroid receptor coactivator (SRC) という別のタンパク質をリクルートして、ヘテロダイマーとなって遺伝子に結合して、ここから下流の遺伝子を動かすことがわかってきています。すなわち、ミジンコの幼若ホルモン受容体はMetとSRCの複合体で、幼若ホルモンはMetに結合します。現在、ミジンコの幼若ホルモン受容体を用いた、幼若ホルモン活性を持つ物質をスクリーニングする方法の確立に向けて研究を進めています。