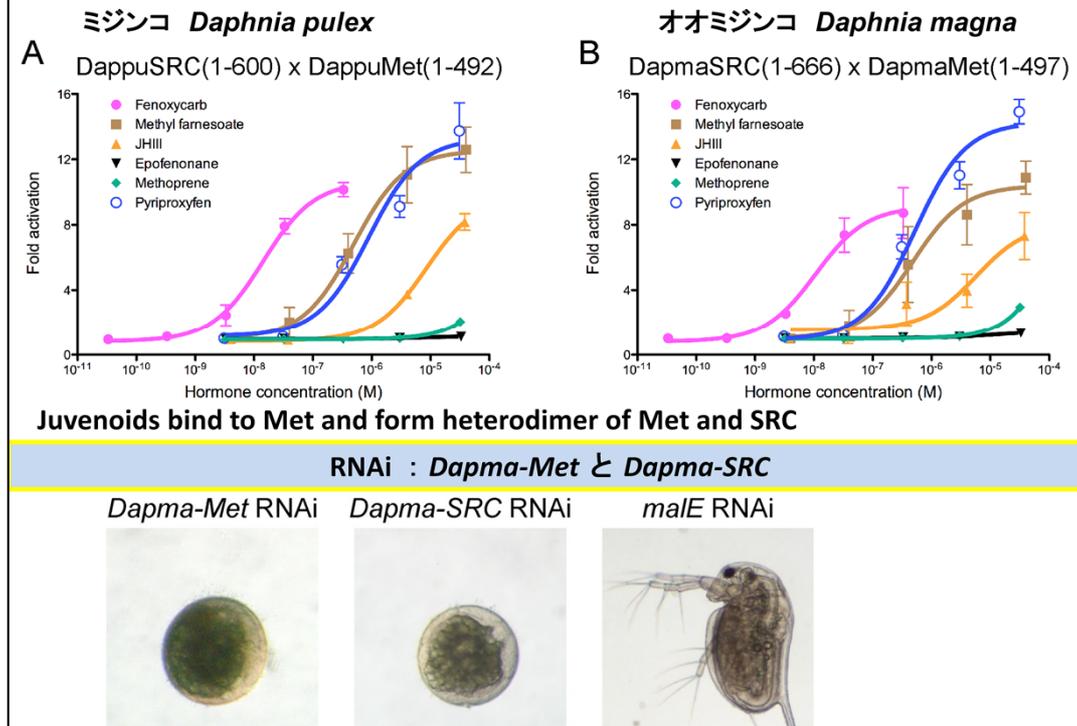


幼若ホルモン受容体 ツーハイブリッドアッセイ



ミジンコの幼若ホルモン受容体を使ったレポーターアッセイはまだできていないのですが、ツーハイブリッドアッセイというのがあります。これはメトプレントレラント (Met) というタンパク質に幼若ホルモン類似物質が結合すると、その複合体にSRCというタンパク質が結合するのを見るアッセイ法です。フェノキシカーブ (図のピンク色の線) という殺虫剤、ミジンコの幼若ホルモンと考えられているメチルファーネゾエート (茶色の線) を比べると、殺虫剤の方がはるかに低濃度で幼若ホルモン作用を示します。とりあえず、ツーハイブリッドアッセイで、幼若ホルモン作用を示す物質をスクリーニングすることが可能になっています。

オオミジンコの初期発生の際に、RNAiを用いてMetやSRCの発現を止めると、発生が止まって死ぬことから、MetやSRCは正常発生に必要であることも明らかにしています。

魚類短期生殖試験: OECD TG229

Pre-exposure							Chemical exposure period (days)																				
1	2	3	4	5	6	7	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
Checking fecundity Selection of fish							Daily observation (general endpoints, fecundity) Checking test conditions (Water temp, chemical conc., etc.)																				



Initiation of exposure

Termination of exposure
Endpoint measurements

毎日の観察

- ▶ 生存
- ▶ 異常反応 (外部形態、行動、摂餌)
- ▶ 産卵数および受精率

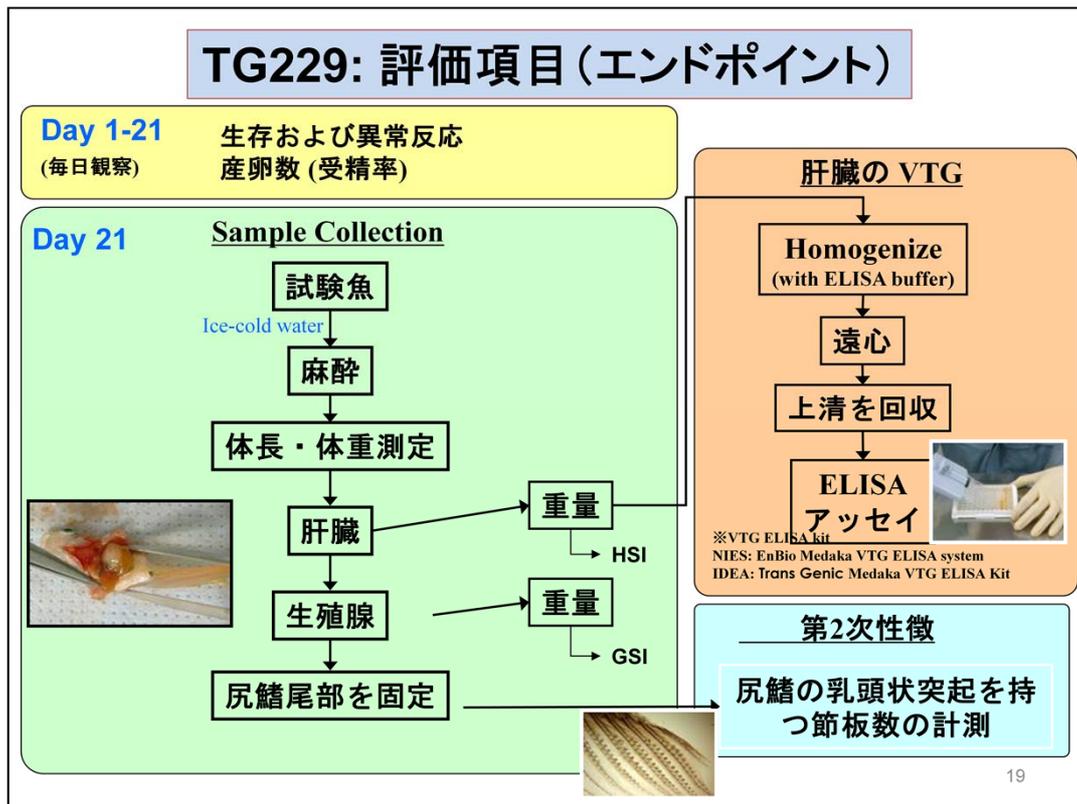
- 2014年度に試験中の物質
4-hydroxybenzoic acid,
4-nonylphenol,
4-*t*-octylphenol,
bisphenol-A

21日間曝露後の評価項目(エンドポイント)

- ▶ ビテロゲニン(卵黄タンパク)(肝臓)
- ▶ 二次性徴(尻鰭乳頭状突起)
- ▶ 生殖腺病理組織 (オプション)

18

魚類の短期の試験に使うメダカについてのお話です。メダカではOECD TG229というテストガイドラインができていまして、これは成体の雄・雌のペアを使って、3週間に産む卵の数(産卵数)を調べるとともに受精率やその他、異常行動の有無、死亡率、卵黄タンパク発現、尻鰭を利用した二次性徴なども観察項目に入っています。化学物質に女性ホルモン作用や男性ホルモン作用があるか、などを確認することができます。2014年度は、図に示すような物質を用いた試験が進行中です。

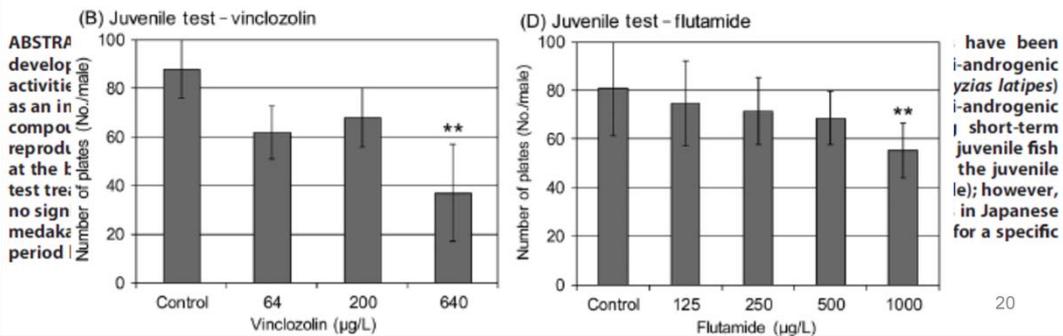


産卵数は産んだ卵の数を数えるだけですが、試験終了後には、オスの肝臓を取り出して、卵黄タンパク（ビテロジェニン）の計測により、試験物質に女性ホルモン作用があるかを確認することもできます。生殖腺組織を調べることによって、精巣や卵巣への影響も調べることができますし、メスの尻鰭の乳頭状突起の数を計測することにより、アンドロゲン作用の有無も分かります。



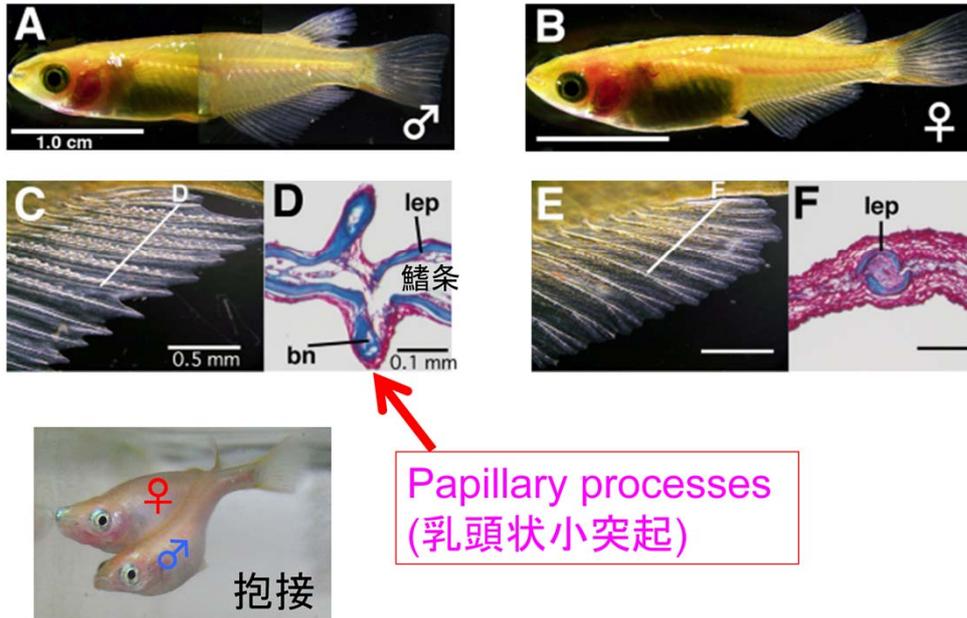
Verification of responses of Japanese medaka (*Oryzias latipes*) to anti-androgens, vinclozolin and flutamide, in short-term assays

Ataru Nakamura^{a,b}, Hitomi Takanobu^b, Ikumi Tamura^b, Masumi Yamamuro^a, Taisen Iguchi^c and Norihisa Tatarazako^{a,b*}



今までは、化学物質の抗アンドロゲン作用をメダカで調べることはできないと言われていたのですが、鑑迫先生のグループは、メダカを用いて抗アンドロゲン作用を検出する系を開発しました。メダカはオスが二次性徴（尻鰭の大きさや乳頭状突起）を示すようにならないと、外部形態では雌雄の判別ができません。成体のオスでは、尻鰭が平大きく、平行四辺形になり、また、尻鰭に乳頭状小突起と呼ばれる突起ができてきます。幼若期の遺伝的なオスを用いて、化学物質をばく露して、乳頭状突起が本来できる日からどのくらい遅れるのか、あるいは乳頭状突起の数がどれくらい少ないか、を記録します。尻鰭の大きさや乳頭状突起の数は男性ホルモン（アンドロゲン）の作用に依存していますので、発達途中で男性ホルモンの働きを邪魔すれば、この突起の出方が遅れたり、あるいはできなかつたりします。これを目安に抗アンドロゲン作用の有無を調べることができ、試験法です。

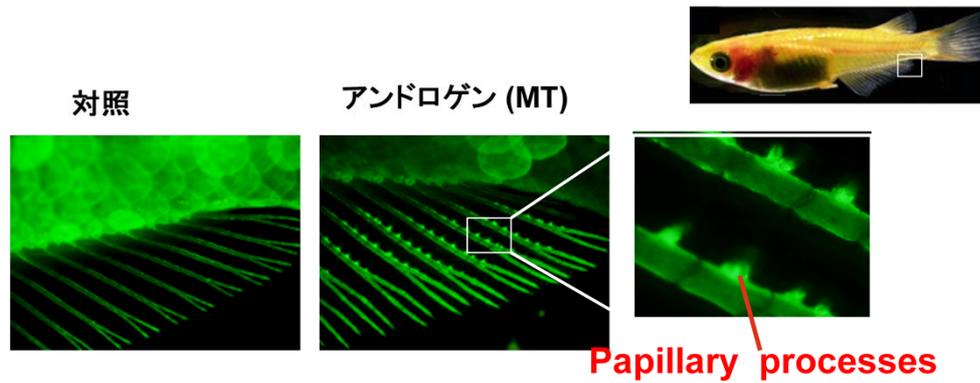
メダカ♂の尻鰭に現れる二次性徴
papillary processes (乳頭状小突起)



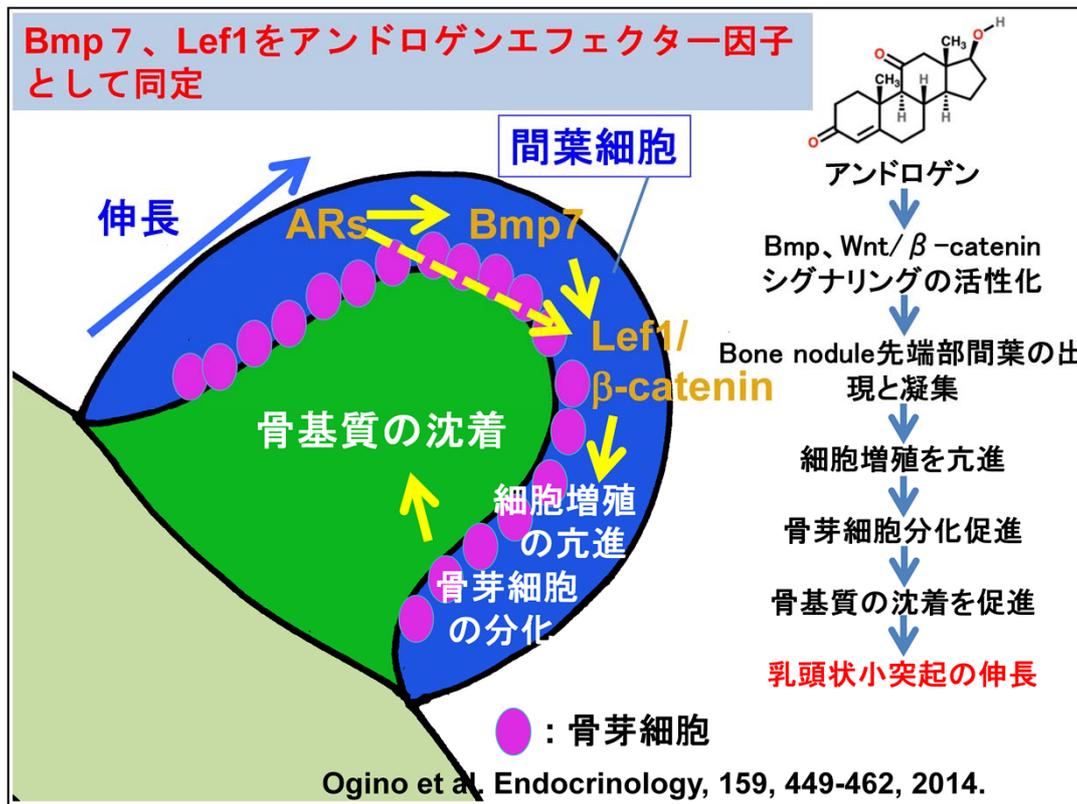
雌雄のメダカを示していますが、上図の左がオス、右がメスです。オスのほうが尻鰭が大きいことが分かります。2段目の図の左はオスの尻鰭の拡大図で、白い点々が乳頭状小突起です。メスの尻鰭には白い点々がありません。オスは尻鰭を使ってメスを抱え込んで産卵を促しているようです。

アンドロゲンによって、どのような発生制御遺伝子経路が活性化され二次性徴発現にいたるのか?

アンドロゲンは、メスにも乳頭状小突起形成を誘導する



乳頭状小突起の部分をもう少し拡大すると、右下のように突起が良く分ると思われます。メスには乳頭状小突起は無いのですが、男性ホルモン（アンドロゲン）をばく露すると、下の真ん中の図の様に、乳頭状小突起が形成されます。これをさらに拡大したのが、右下の図です。



乳頭状小突起がどのように形成されるのか、そのメカニズムを、1年かけて詳しく調べてみました。男性ホルモン（アンドロゲン）が尻鰭に作用すると、アンドロゲン受容体に結合して、突起ができる部分の間質細胞が増えます。この間質細胞が増えた後に、中心部は骨化します。細胞が増えて、骨化がおこるときには、Bmp7とLef1という二つの遺伝子の発現が起こります。二つの遺伝子の働きを邪魔すればこの乳頭状小突起は形成されません。この二つの遺伝子の発現を目安すると、アンドロゲン作用を示す物質ならば、ばく露して大体18~24時間で試験物質のアンドロゲン作用の有無がわかりますので、レポーターアッセイを使わなくても、メダカの鰭を使っても判断できます。という基礎的な研究を私たちが受け持っています。



Anthony Sébillot

アンドロゲン作用を簡便に検出する トランスジェニックメダカの開発



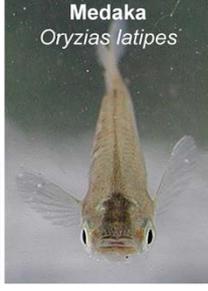
Three-spined stickleback
Gasterosteus aculeatus

トゲウオのスピギン(糊) 遺伝子を利用

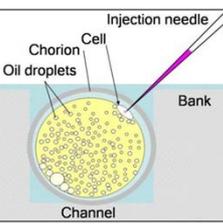


**1200 injected eggs with Spg1
300 eggs GFP positive on
mesoderm and yolk**

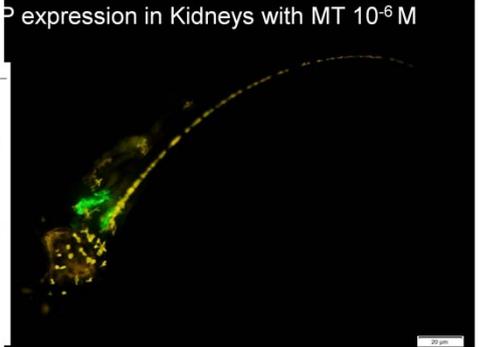
73 ALIVE FOR SCREENING



Medaka
Oryzias latipes



Injection needle
Chorion
Cell
Oil droplets
Bank
Channel



P expression in Kidneys with MT 10⁻⁶M

The Science News 平成 26 年 12 月 1 日 (金曜日) 第 3516 号 (6)

水中の男性ホルモンと阻害物質 簡単検出

新たな試験系に期待
基生研がメダカ作出

メダカは繁殖に必要とする男性ホルモン(テストステロン)の産生を抑制する阻害物質(アンドロゲン拮抗剤)の検出に、簡便な試験系を開発した。メダカは繁殖に必要とする男性ホルモン(テストステロン)の産生を抑制する阻害物質(アンドロゲン拮抗剤)の検出に、簡便な試験系を開発した。メダカは繁殖に必要とする男性ホルモン(テストステロン)の産生を抑制する阻害物質(アンドロゲン拮抗剤)の検出に、簡便な試験系を開発した。



Androgen disruptor

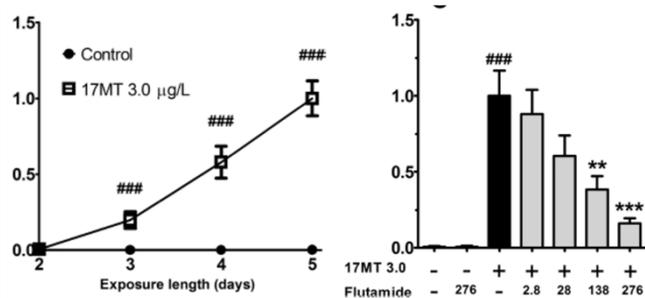
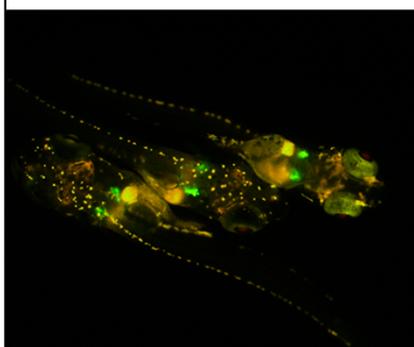
WatchFrogというフランスのベンチャー企業との共同研究のお話です。トゲウオはオスがアンドロゲン作用によって腎臓が作るスピギンと呼ばれる接着タンパクを使って、藻などを集めて巣作りをして、メスを呼び込み産卵させます。このスピギン遺伝子はアンドロゲン応答遺伝子です。ですからトゲウオのスピギン遺伝子に蛍光を発色するようにして、メダカの受精卵に打ち込んで、メダカでスピギンを発現するトランスジェニックメダカを作れば、簡便に化学物質のアンドロゲン作用を見ることができると考えました。メダカの体で、このトゲウオがつくるスピギン遺伝子を発現させることができれば、たくさんのメダカを殺すことなく、外から腎臓の蛍光を測定するだけで、試験物質のアンドロゲン作用を見ることができます。アンドロゲンを与えると4-5日の稚魚で腎臓が光ります。

欧州ではメダカといえどもたくさん実験に使うことはできません。餌を食べ出すまでは動物とみなさないという取り決めもあります。ちょっと信じられないでしょうが、受精卵でも動物だと思いますが、餌を食べるまでは動物とみなさないという便宜上の動物愛護の考え方を導入していますので、孵化して1週間くらいはおなかのところに有る卵黄から栄養を得ていて、餌を食べていませんので、この時点ではこのメダカの稚魚は動物ではありません。だから4~5日で化学物質が男性ホルモン作用をするかしないかをみるのは、動物実験をしていないということになります。

アンドロゲンと同時に試験物質をばく露すれば、試験物質の抗アンドロゲン作用も調べることができます。

Rapid Fluorescent Detection of (Anti)androgens with *spiggin-gfp* Medaka

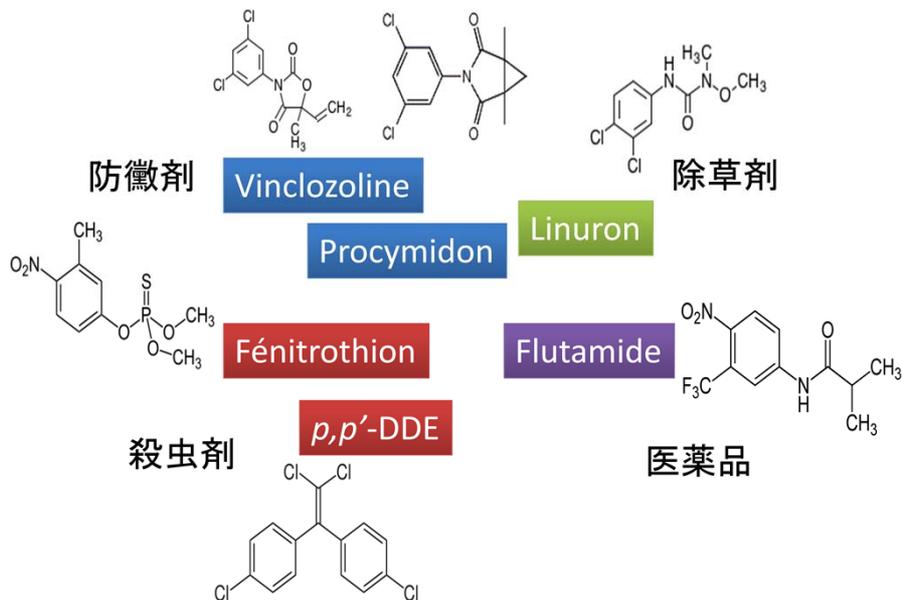
Anthony Sébillot,[†] Pauliina Dandimopoulou,^{†,||} Yukiko Ogino,[‡] Petra Spirhanzlova,^{†,§}
Shinichi Miyagawa,[‡] David Du Pasquier,[†] Nora Mouatassim,[†] Taisen Iguchi,[‡] Gregory F. Lemkine,^{*,†}
Barbara A. Demeneix,[§] and Andrew J. Tindall[†]



25

スピギン遺伝子を組み込んだメダカの孵化直後から、男性ホルモン（アンドロゲン）をばく露すると、腎臓での蛍光の発現は5日ぐらいでピークになります。また、男性ホルモンの働きを邪魔する物質（抗男性ホルモン）を、男性ホルモンと同時にばく露すると、抗男性ホルモンの濃度に依存して、蛍光が弱くなってきます。すなわち、このトランスジェニックメダカの孵化直後の幼生に化学物質を4～5日ばく露することで、男性ホルモン作用、抗男性ホルモン作用を調べることができます。

抗アンドロゲン作用を示す物質の例

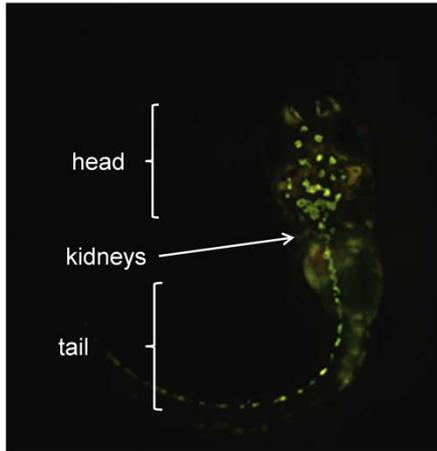


抗男性ホルモン作用を持つことが分かっている物質の例を図に示しています。防黴剤、除草剤、殺虫剤や医薬品などがあります。一般化学物質の中に抗男性ホルモン作用を示すものがあるか、などを調べるために、新しく開発したトランスジェニックメダカが利用できると思います。

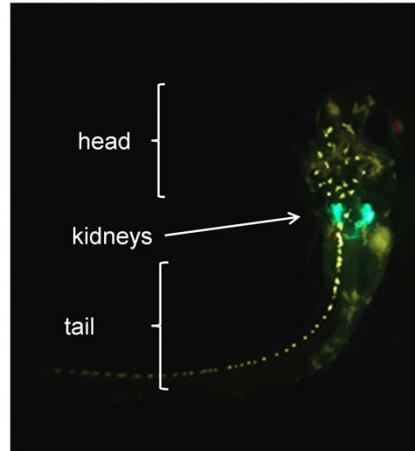
Spg1.22-gfp Transgenic Medaka



Fry exposed to Evian

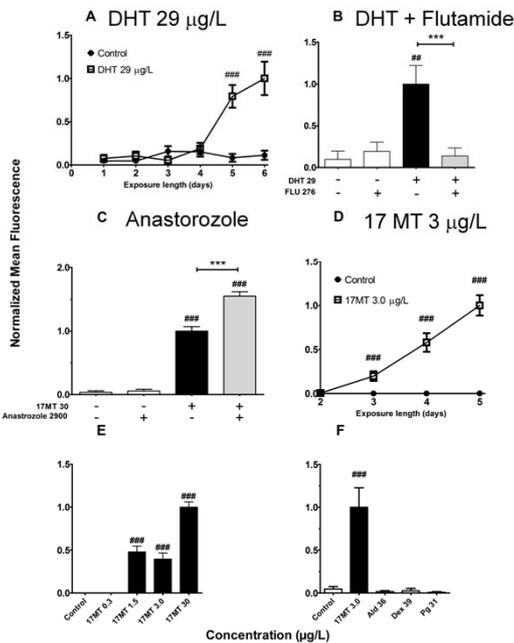


Fry exposed to
17 α -methyltestosterone

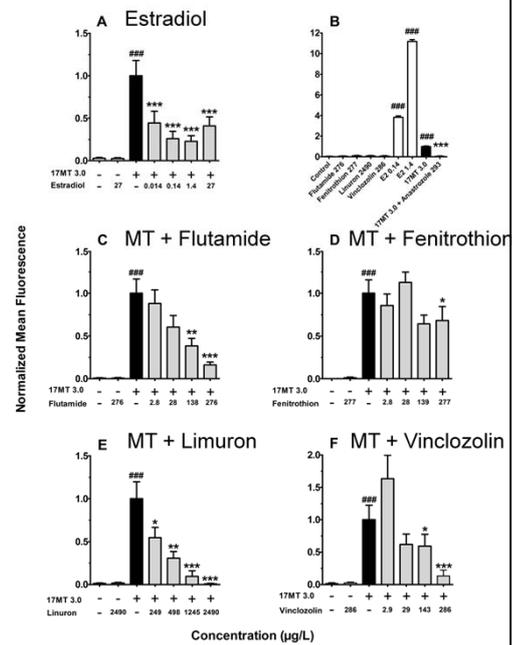


左の図は対照で、男性ホルモンをばく露しておりませんので、矢印の腎臓が光っていません。一方、右の図は合成アンドロゲンのメチルテストステロンをばく露しています。アンドロゲン作用により腎臓が緑色に蛍光を発色しています。図の上は頭部、下は尾部です。

アンドロゲン作用の検出



抗アンドロゲン作用の検出 (+MT)



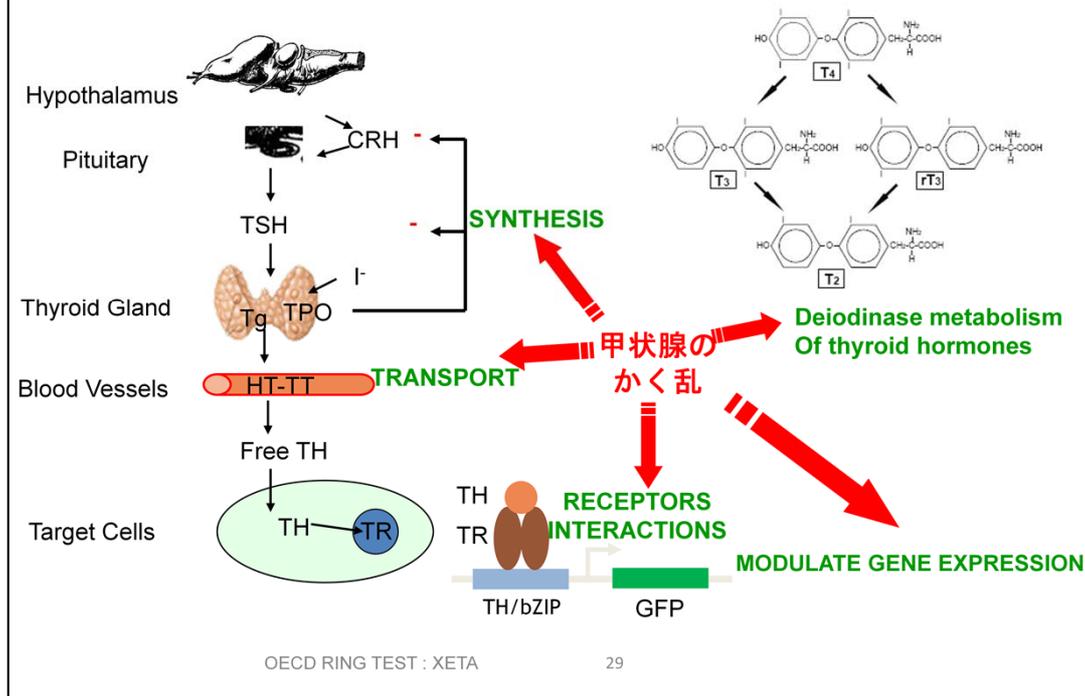
(発表では説明を省略)

図の左は男性ホルモン（アンドロゲン）のDHT（ジヒロテストステロン）、アナスロゾール、17MT（メチルテストステロン）をばく露すると蛍光が強くなります。

図の右側は、DHTとともに抗アンドロゲン（フルタミド、フェンチオン、リヌロン、ビクロゾリン）をばく露すると、濃度依存的に蛍光が弱くなります。

これらの結果から、新しく開発したトランスジェニックメダカは、アンドロゲン作用と、抗アンドロゲン作用の両方を検出できることが分かります。

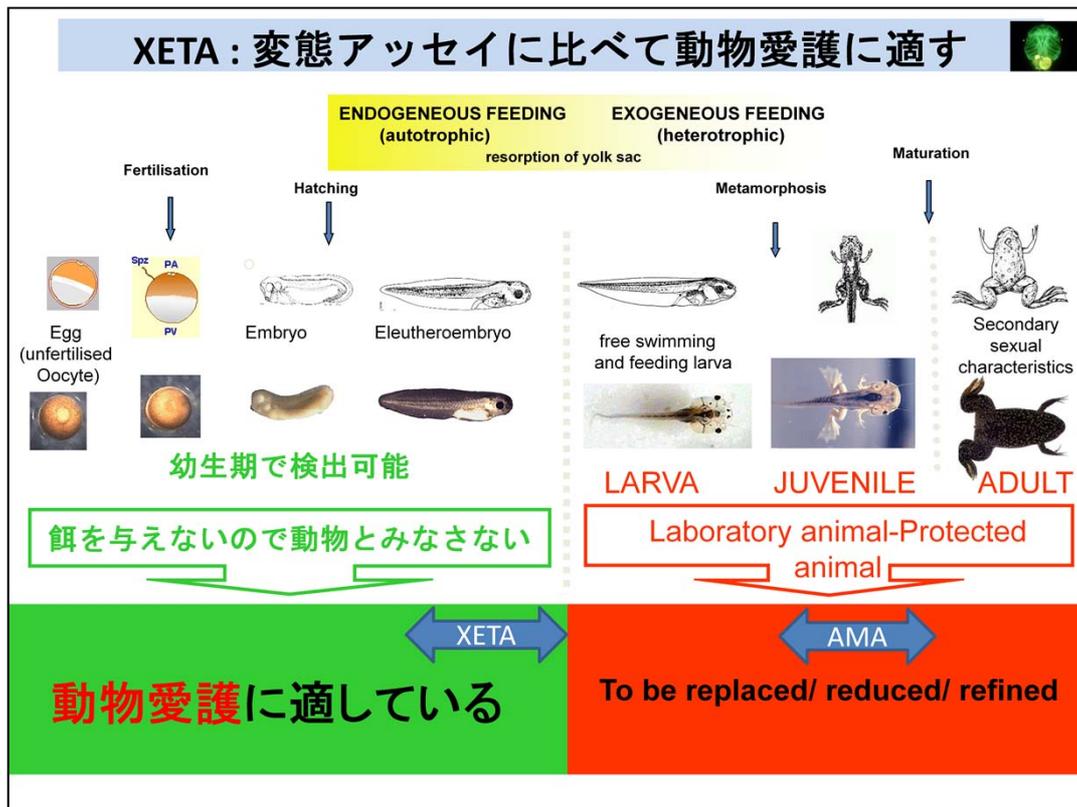
ヒトと両生類の甲状腺系



(発表では説明を省略)

私の発表の後に、広島大学の柏木先生がお話されるので省略しました。

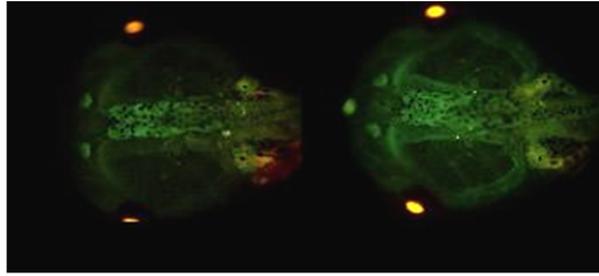
カエルも人間と同じように甲状腺があり、視床下部・下垂体からの刺激ホルモンによって、甲状腺のホルモン産生が調節されています。甲状腺で作られた甲状腺ホルモンは血中を運ばれて標的器官に作用します。カエルの場合には、オタマジャクシの尾が短くなり、カエルに変態する時に重要な働きをしています。いろいろな化学物質が、甲状腺ホルモンの合成や血液中での運搬や遺伝子発現を邪魔する可能性が考えられています。甲状腺ホルモンはヒトでは脳の発達に重要であることが知られています。



(発表では説明を省略)

左の図（幼若期ゼノパス甲状腺シグナルアッセイ、XETA）は、餌を食べるまでのカエルの幼生は動物とみなさないことになっていきますので、カエルの発生初期の幼生（オタマジャクシ）の間に化学物質の影響を調べれば、動物でない時期での試験となり、動物愛護に抵触しないこととなります。一方、右側の図（両生類変態アッセイ、AMA）はオタマジャクシから、尻尾が消えてカエルに変態する時期での化学物質を調べる試験法は、動物愛護からも問題となり得ます。

幼若期ゼノパス甲状腺シグナルアッセイ Xenopus Embryonic Thyroid Assay (XETA)

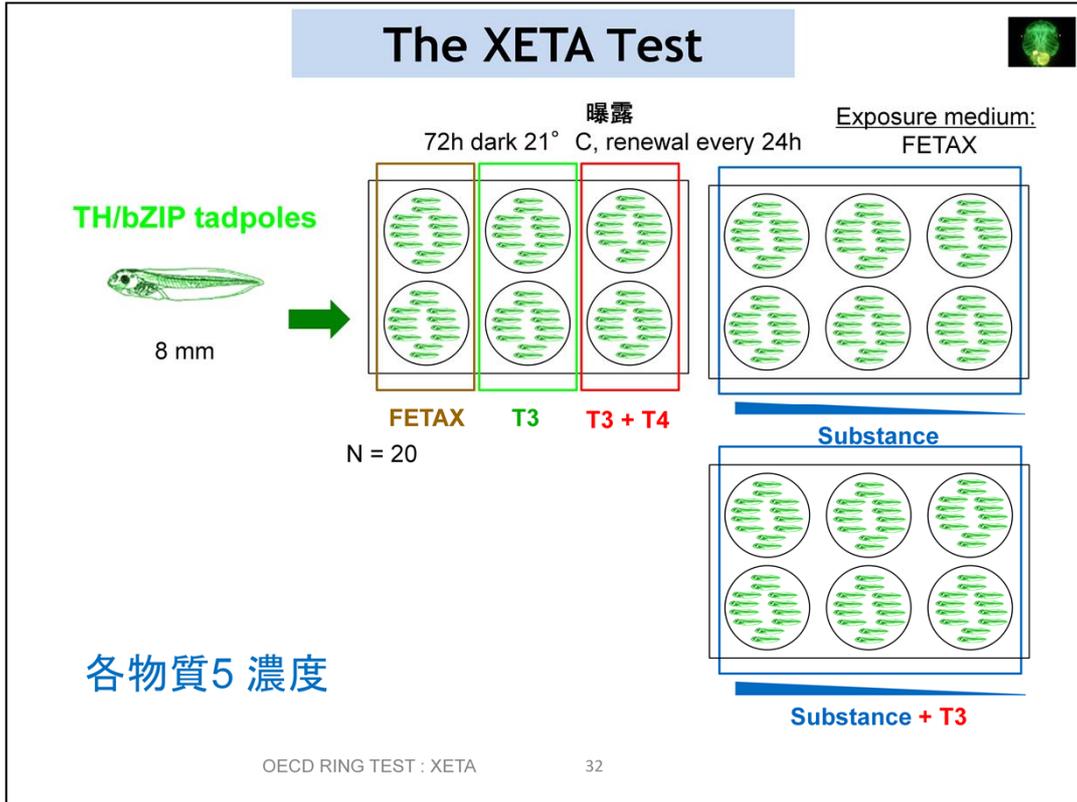


甲状腺ホルモン作用があると光る
トランスジェニックアフリカツメガエルを用いて5日程度で
甲状腺ホルモン活性、抗甲状腺ホルモン活性を検出



今度は両生類です。両生類の話は、私の後に柏木先生が詳細にお話しされると思いますので、飛ばしながら、要点だけお話しします。

両生類もWatchFrogというフランスのベンチャー企業との共同研究です。体内で甲状腺ホルモンができたり、あるいは外部から甲状腺ホルモン作用を示す物質をばく露すると蛍光で光るトランスジェニックカエルを作りました。



このトランスジェニックカエルのオタマジャクシを、シャーレの中に20匹ずつ入れ、これに甲状腺ホルモン作用を持つ物質や、甲状腺ホルモンの働きを邪魔する物質をばく露して、蛍光の発色を記録して、甲状腺ホルモン作用の強さや、抗甲状腺ホルモン作用の強さを簡単に促成することができます。

各物質、5濃度を用いています。試験物質の抗甲状腺ホルモン活性を調べるためには、甲状腺ホルモンのT3と同時にばく露します。

Xenopus Embryonic Thyroid Assay



in vivo information...
...with *in vitro* tools.

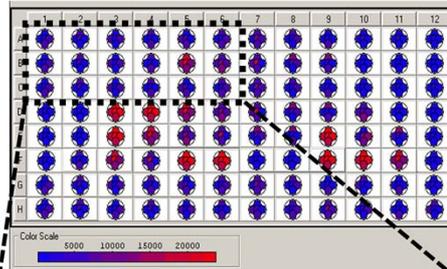
AUTOMATED READING

Robotized 96 well-plate fluorescent reader

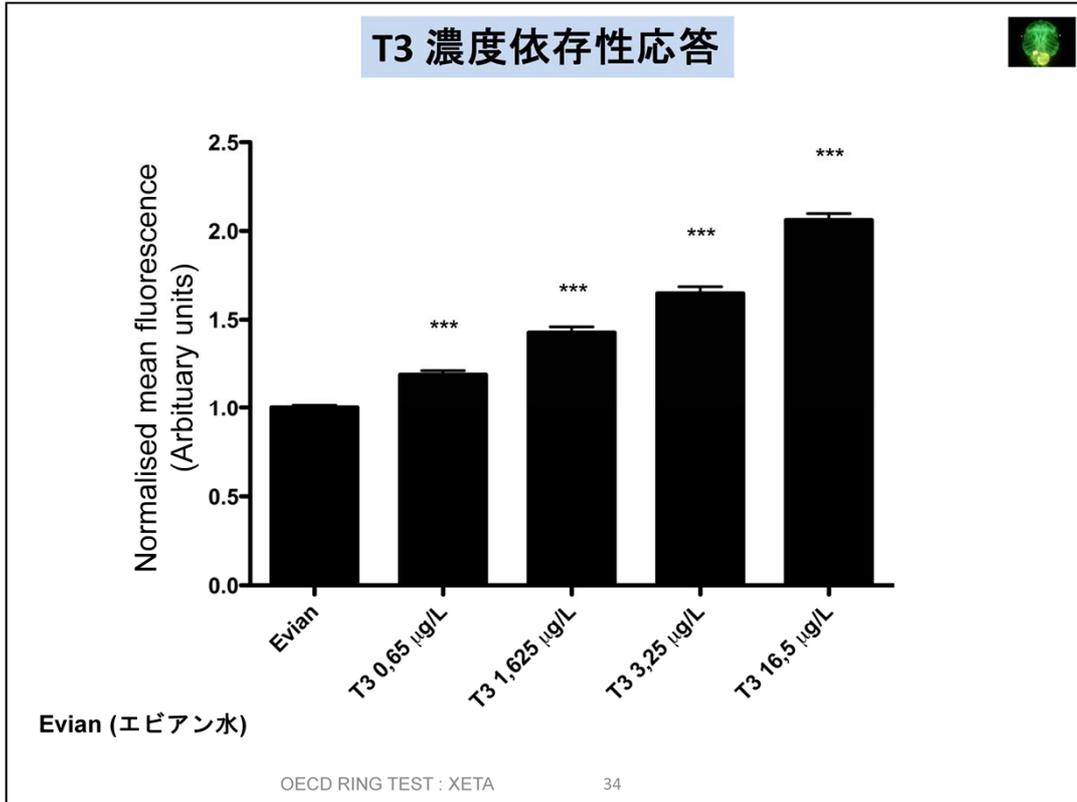


 **TECAN.**

OECD RING TEST : XETA



96穴の小さい穴が空いたプラスチックシャーレにオタマジャクシを並べて入れておいて、この機械の中に入れ、蛍光を自動的に測定します。



甲状腺ホルモンのT3をばく露すると、濃度依存的に蛍光が強くなります。もともとオタマジャクシは甲状腺ホルモンを若干出していますので、ある程度薄く光っていますが、T3により、有意差をもって蛍光強度が強くなります。ばく露5日で結果が出ます。

An OECD Ring Test for the Validation of the XETA



OECD RING TEST : XETA

35

今までお話ししました、トランスジェニックアフリカツメガエルを用いて、OECDが中心となって、フランス、アメリカ、日本の私の研究室で、同じ濃度の甲状腺ホルモン、化学物質を用いて、同じ方法でリングテストをおこなっています。

リングテスト



- フェーズ 1:
 - 3物質:
 - T4 (甲状腺ホルモン サイロキシン)
 - TRIAC (合成の甲状腺ホルモン受容体アゴニスト)
 - PTU (プロピルチオウラシル TPO and deiodinase inhibitor)
 - 甲状腺ホルモン受容体には作用しない1物質:
 - Cefuroxime (抗生物質 cephalosporin antibiotic)

 - 5 濃度 with or without T3
 - 3 連、各オタマジャクシ20匹

 - 化学分析
 - **Detailed SOPs** provided to the participating laboratories

 - **結果の統計解析**– John Green (OECD)

OECD RING TEST : XETA

36

3カ国で行っているリングテストに用いる物質、濃度、幼生の個体数などについての情報のまとめです。

結論



XETA フェーズ I

- 日本とアメリカのラボに試験法を移せた
- 3ラボともに、3物質 (PTU, TRIAC and T4) の影響は低濃度で観察できた
- ラボ内、およびラボ間のデータの再現性が確認された
- 統計解析から、試験に用いるオタマジャクシ数は、各濃度10匹でよいことが明らかとなった
- 確定的な統計解析にはより大量のデータが必要である

XETA フェーズ II

- 作用機序の異なる新たな物質、及び作用しない物質を選定する.
- 参加ラボ数を増やす
- OECD VMGeco (2014年12月) でフェーズIIが承認された

OECD RING TEST : XETA

37

(前スライドと同様)

リングテストの、現在までのまとめです。

3つの研究室ともに、再現性のあるデータが得られています。

統計は、OECDが中心となって行っています。

さらに、次のステップのリングテストを行うことになりました。