



広島大学



ツメガエル変態アッセイを用いた甲状腺ホルモン かく乱化学物質のスクリーニングシステム開発

研究代表者: 柏木昭彦

広島大学大学院理学研究科附属両生類研究施設

今日は、先ほど御紹介いただいたのですが、ツメガエル変態アッセイを用いた甲状腺ホルモンかく乱化学物質のスクリーニングシステムの開発、これをフィージビリティスタディとして援助いただきまして、やらせていただきました。

研究目的・背景

ツメガエルの変態現象を用いて、甲状腺ホルモンかく乱化学物質を生体(*in vivo*)で試験評価する方法を開発する

問題点

- ・膨大な数に上る環境化学物質
- ・甲状腺軸への影響に対する懸念が増大



生体で試験評価を行う必要性



モデル動物ツメガエルの利点



X. laevis



X. tropicalis

- ・THIに対して高感受性
- ・トランスジェニック技術
- ・ゲノム・遺伝子データ
- ・飼育が容易
- ・多産

両生類の変態



甲状腺ホルモン
依存性

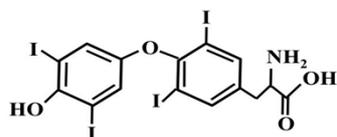
まず研究目的ですが、これはツメガエルといいましても、我々はアフリカツメガエルとネッタイツメガエルの両方を用いております。これは後で出てまいります。特に甲状腺に照準を絞って、かく乱化学物質を、生体を用いてどういうふうな影響が出るか、それをもって開発につなげていきたいと思っております。

問題点としては、膨大な数に上る環境化学物質が自然界にあるということと、その中には甲状腺軸への影響に対するものもありますから、どうしても化学物質が多くなればなるほどその懸念が増大してまいります。

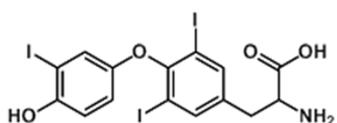
そこで、生体を使って試験系を評価できるようなものが必要になってまいります。

ここでモデル動物と書きましたが、ツメガエルの利点としては、以下のようなものがあります。特に甲状腺ホルモンに対して高感受性があります。それから、カエルといいますと、オタマジャクシからカエルになる間に変態という現象ですが、こういうふうに体も変わっていきます。しっぽがある段階はまだオタマジャクシと私どもは言っております。もう少しするとしっぽが完全になくなります。日本のカエルですと陸に上がるのですが、ネッタイツメガエルとかアフリカツメガエルは一生、成体になっても水の中で生活します。ただ、内部の機能というものは、陸上に上がるカエルとほとんど同じです。あとは尿素を持っているか、あるいは尿酸あるいはアンモニアを排出するか、それだけの違いです。

甲状腺ホルモン(TH)



Thyroxine (T₄)



Triiodothyronine (T₃)

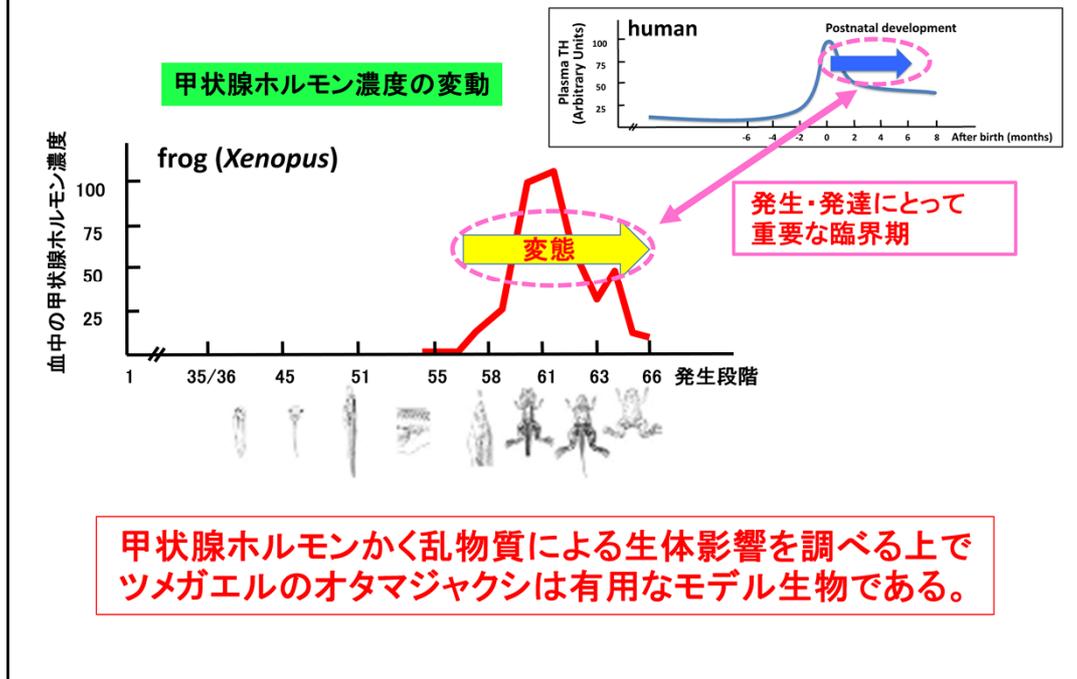
- (1) THは動物の発生や成長を制御、代謝の恒常性を維持する
- (2) 両生類の変態はTHによって制御される
- (3) 汚染物質によって誘起されるTHかく乱は両生類変態アッセイによって最もよく検出・評価される

甲状腺ホルモンといいますと、御承知のように、動物の発生とか成長をコントロールしておりますし、我々の生活に必要な代謝の恒常性を維持しております。

両生類の変態というのは甲状腺ホルモンによって制御されております。

したがって、汚染物質で誘起される甲状腺ホルモンのかく乱ですが、これは両生類の変態をみればかなりクリアに分かってまいります。

研究目的・背景



これは両生類の甲状腺の血中濃度ですが、特に変態時にこういうふうにピークがあります。この発生段階は変態最盛期というところですが、このピークを過ぎるとカエルになっていくのです。それまではオタマジャクシです。これは人間の場合ですが、誕生時に血中濃度のピークがありますね。そうした共通点を考えますと、甲状腺ホルモンのかく乱物質による生体影響を調べる上でツメガエルのオタマジャクシは有用なモデル生物になり得るということです。

二つのツメガエル: アフリカツメガエルとネッタイツメガエル



Xenopus laevis
アフリカツメガエル

	<i>laevis</i>	<i>tropicalis</i>
Ploidy	allo-tetraploid	diploid
Chromosome	36 (n=9)	20 (n=10)
Genome size (Gb)	3.1	1.7
Temperature (°C)	18-22	25-28
Life cycle (years)	1.5~2	0.5~0.8
Living environment	aquatic	aquatic
Habitat	African	Nigeria
Egg production	2000-3000	3000-8000
Egg size (diameter, mm)	1-1.3	0.7-0.8



Xenopus (Silurana) tropicalis
ネッタイツメガエル

我々は、アフリカツメガエルとネッタイツメガエルの2種のツメガエルを使っておりますが、この違いを述べさせていただきます。

アフリカツメガエルというのは、サハラ砂漠以南に広範囲に分布しております。

ところがネッタイツメガエルは、近縁ではありますが、かなり狭い部分、西アフリカの低地の熱帯雨林の中で生息しています。ナイジェリアとかセネガル、ああいうところのごく限られた、赤道直下に近い場所で生育しています。したがって、部屋の中で飼う温度も25~28°Cぐらい。いい卵を採ろうと思ったら25°Cにコントロールしておく必要があります。

ネッタイツメガエルの場合は、遺伝学やゲノムの研究を非常に単純化してくれます。というのは、ゲノムサイズの小さい二倍体であるということ、それから発生が非常に早い。それから次世代が両生類の中では珍しく短期間にとれます。雄では5カ月、雌では8カ月です。

それに対してアフリカツメガエルの場合は、アフリカツメガエルといいますと、過去、現在も含めてですが、半世紀以上にわたって生物医学の多くの研究に使われてまいりました。アフリカツメガエルを使ってiPSのアイディアもここから生まれたのです。ガードンさんが腸管の中に万能細胞核があるというのを1960年の後半にアフリカツメガエルを使って見つめられたのです。それが万能細胞につながって、2012年に山中先生とノーベル賞を同時受賞されています。非常に有名なカエルなのですが、最新の研究を行おうとすると、いくつかの欠点が見えてくるのです。使用される頻度もだんだん減ってきております。特に偽四倍体です。はっきりとした四倍体ではないのです。あとは成熟に1年半から2年を要する。そういう欠点を持っています。

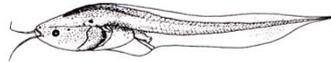
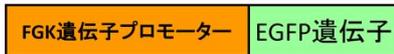
もう一つ、ネッタイツメガエルに関しては、ゲノムのシーケンス、配列が2010年にわかっております、それは哺乳類のゲノムシーケンスと非常によく似ているということで、今、アメリカを中心にして、ネッタイツメガエルを使って病的モデルをどんどんつくっていくというふうに、そっちの方に勢いが向かっております。

FGK promoter/EGFPトランスジェニックツメガエル幼生を用いたTHかく乱化学物質の*in vivo*評価

まず手始めに、これはケラチンの幼生型のプロモーターですが、そのプロモーターとEGFPをつないでトランスジェニックガエルをつくった。その幼生を用いて甲状腺ホルモンかく乱化学物質の*in vivo*の評価をやりました。

ケラチン遺伝子プロモーターの遺伝子組換えガエルを用いた評価

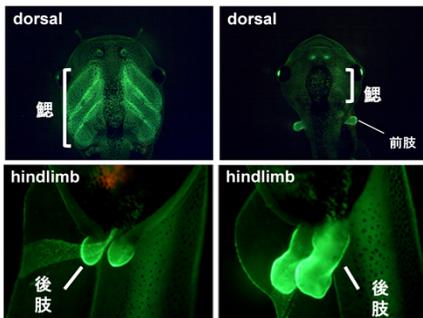
暴露実験



トランスジェニック幼生
(アフリカツメガエル)

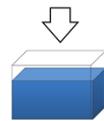
FGK遺伝子: アフリカツメガエル幼生の鰓や四肢で強く発現する遺伝子。甲状腺ホルモンにより制御され、ビスフェノールAによりその誘導が抑制される遺伝子でもある (Heimeier *et al.*, 2004)。

control 5nM T3



Suzuki *et al.*, 2012

T3: 3,3',5-Triiodothyronine
T4: 3,3',5,5'-Tetraiodothyronine
Triac: 3,5,3'-triiodothyroacetic acid



5~6日間暴露
(10^{-7} ~ 10^{-9}) N=10

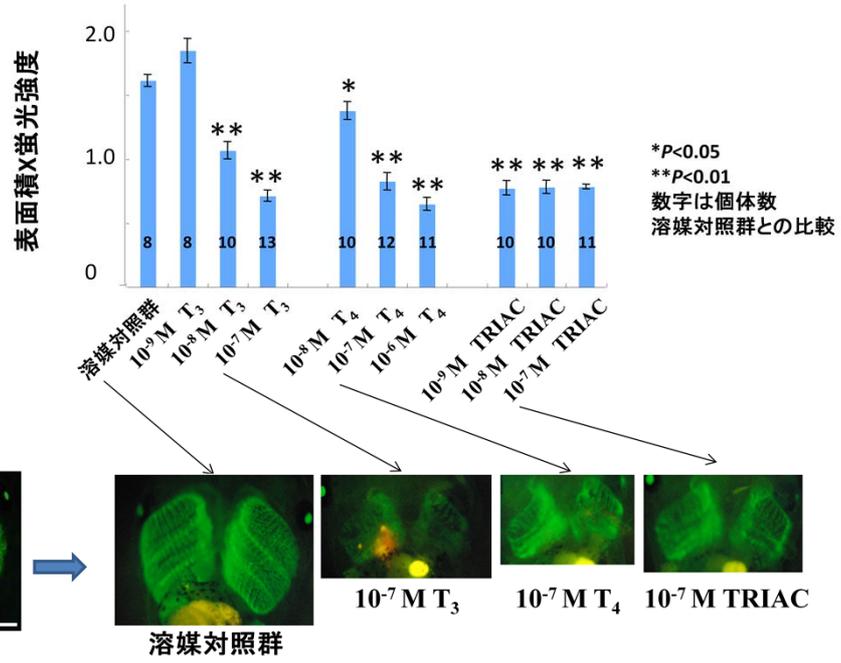
エンドポイント:
後肢と鰓

鰓(減少)と後肢(増加)でTHに対する反応が異なるため、二つのエンドポイントで評価が可能。

これがそのオタマジャクシですが、まず試験系の甲状腺ホルモン、T3に対してどんな反応をするか調べました。大体5nMのT3の中で育てますと、急速に鰓が縮んでまいります。EGFPの活性も早急に失われてまいります。ところが後肢はどんどん伸びてまいります。したがって、EGFPの活性も強化される。こういうはっきりとした結果が出ております。

ケラチン遺伝子プロモーターの遺伝子組換えガエルを用いた評価

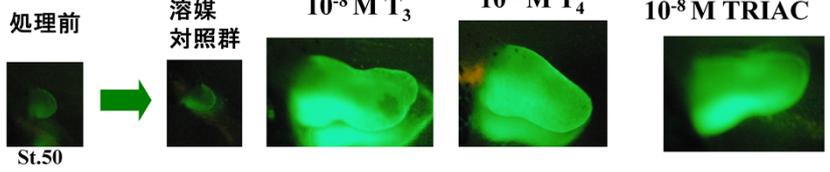
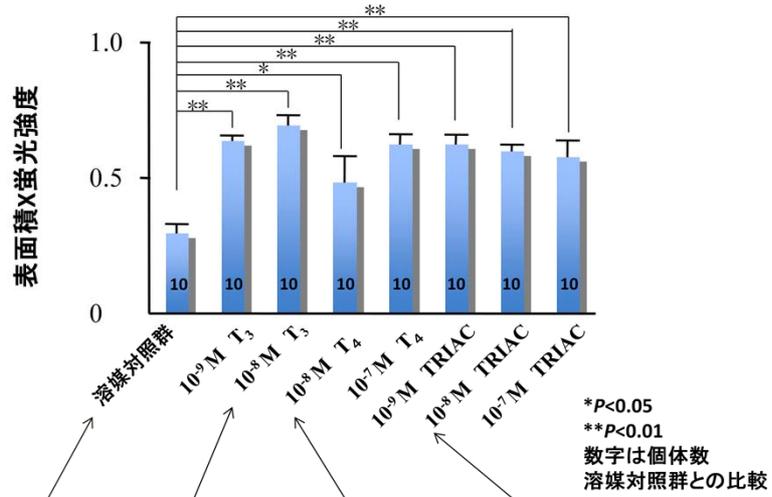
「鰓」



さらに詳しく、これは各濃度をとって調べたものですが、鰓を甲状腺ホルモンとかTRIACが早急に短縮する方向に誘導してまいります。

ケラチン遺伝子プロモーターの遺伝子組換えガエルを用いた評価

「後肢」



後肢の場合は、こういうふうにどんどん伸びて拡大してまいります。

**THアンタゴニスト作用を持つ化学物質の*in vivo*評価：
アミオダロン(AMD)**

次は、甲状腺ホルモンのアンタゴニスト作用を持つ化学物質の*in vivo*評価で、これの題材としてアミオダロンを使ってみました。

AMDの特徴

- (1) 頻脈性不整脈の治療に広く使われる
- (2) ベンゼン環をもっているために脂溶性が高く、器官・組織に蓄積する
- (3) スイスの総合病院により危険性の高い物質とみなされている(Escher et al., 2011)
- (4) 甲状腺機能障害の副作用があって、甲状腺機能低下症もしくは甲状腺中毒症を起こす
- (5) いろんな経路を経て環境中へ放出されるが、野生生物への影響についてはほとんどわかっていない

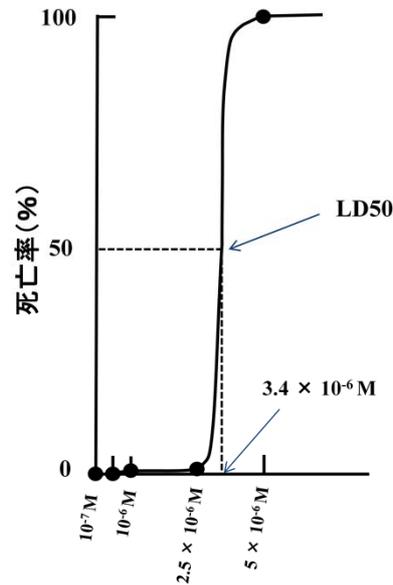
アミオダロンというのは、頻脈性不整脈の治療に非常によく使われております。ベンゼン環を持っておりまして、脂溶性が非常に高い。したがって、生物濃縮が起こりやすい物質です。

2011年にスイスの総合病院によって、危険性の非常に高い物質の一つとみなされております。

また、甲状腺機能障害という副作用もあります。甲状腺機能低下症とか甲状腺中毒症を引き起こします。

AMDはいろんな経路を経て環境中に放出されていますが、意外にも野生生物に対する影響はよくわかっておりません。

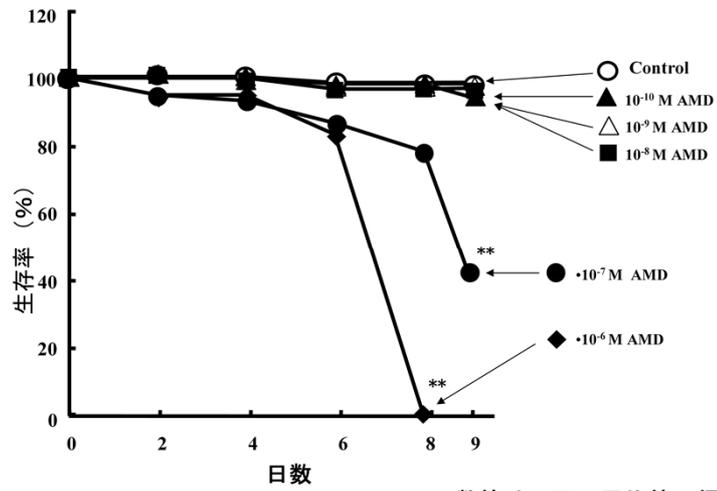
幼生期(St. 42; Nieukoop and Faber, 1956)ネットイツメガエルオタマジヤクシ
の死亡率に対するAMDの影響(2日間曝露)



48時間の半数致死濃度
(LD50)値は 3.4×10^{-6} M

まず、少し単純化して調べてみようということで、AMDの半致死濃度がどのくらいか。これは短時間、48時間で、ステージ42、非常に若いオタマジヤクシ、これはネットイツメガエルのオタマジヤクシを使って調べました。そうすると、48時間のLD50が 3.4×10^{-6} でした。縦軸には死亡率をとっております。

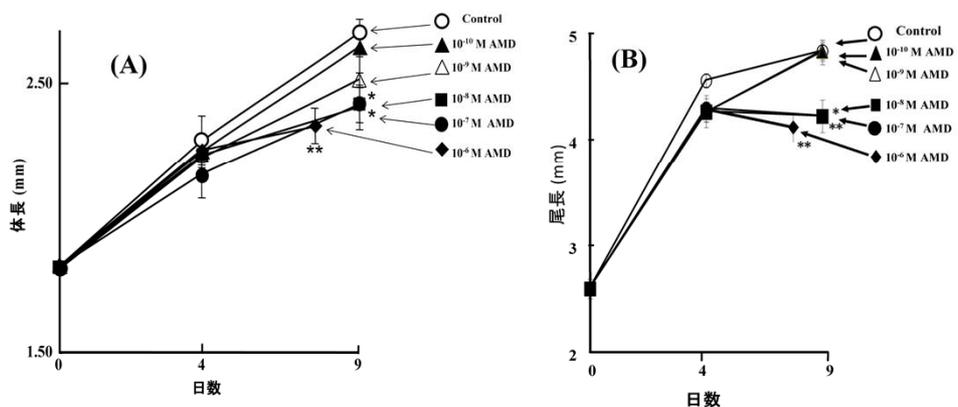
ネットイツメガエルオタマジャクシ(St. 42)の生存に対するAMDの影響
(9日間曝露)



数値は60匹の平均値±標準誤差を示す。**対照群値よりも有意に小さい(カイ2乗検定; $P < 0.01$)

今度は、同じステージ42、若いオタマジャクシを使って9日間処理して、生存率をとりました。そうすると、当然のことながら濃度が濃いものは死亡率が高まってまいります。

ネットイツメガエルオタマジャクシ(St. 42)における体長(A)および尾長(B)のAMDによる抑制(9日間曝露)



数値は60匹の平均値±標準誤差を示す。*対照群値よりも有意に小さい(スチューデントt 検定; $P < 0.05$)。**対照群値よりも有意に小さい(スチューデントt 検定; $P < 0.01$)

今度は体長とか尾長に対する影響もみてみました。そうすると、そういうものを抑制する働きがあります。それには先ほどの死亡率を含めて濃度依存性がございませう。

**10⁻⁶ ~ 10⁻¹⁰ M AMD に9日間曝露されたネツタイツメガエル
オタマジヤクシ(St. 42)の生存と成長**

濃度	個体数	生存率 (%)	体長 (mm)	尾長 (mm)
対照群	60	98.3	2.7 ± 0.05	4.7 ± 0.11
10 ⁻¹⁰ M	60	95.0	2.6 ± 0.09	4.8 ± 0.11
10 ⁻⁹ M ^c	60	98.3	2.5 ± 0.09	4.9 ± 0.09
10 ⁻⁸ M ^b	60	96.7	*2.4 ± 0.08 ^a	*4.5 ± 0.15
10 ⁻⁷ M	60	**41.7 ^a	*2.4 ± 0.07 ^a	**4.4 ± 0.09
10 ⁻⁶ M	60	0	**2.3 ± 0.07 ^a	**4.1 ± 0.13 ^a

^a対照群値よりも有意に小さい(スチューデントt 検定; *P<0.05, ** P<0.01)

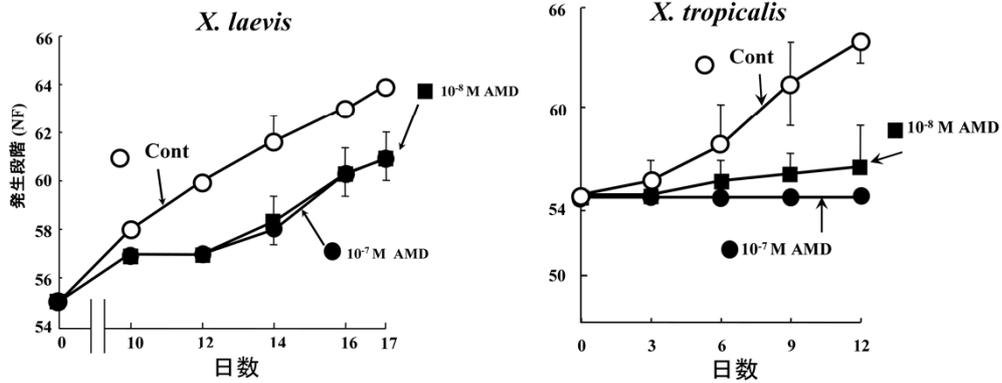
^b最低有害影響濃度量 (LOAEL)

^c無毒性量 (NOAEL)

先ほどの3つのデータを一つの表にまとめてみました。そうしますと、10⁻⁸~10⁻⁶で強い影響を及ぼすことがわかりました。それも濃度依存的にその影響は強まってまいります。

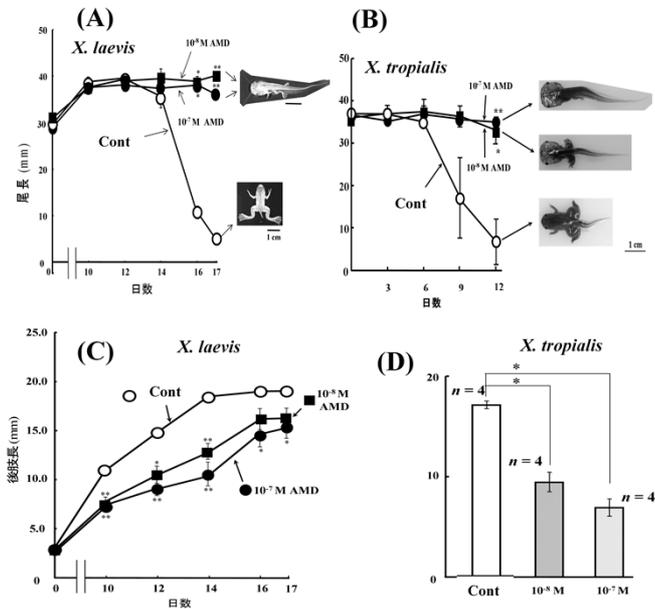
そこで、アミオダロンの最低有害影響量はどのくらいか。これをLOAELというのですが、10⁻⁸であると。これは9日間で処理した場合の影響ですが、10⁻⁹になりますと影響はない。無毒性量 (NOAEL) と呼ばれているものです。

**変態開始期(St. 57)アフリカツメガエルおよびネツタイツメガエルオタマジャクシ
における自然変態のAMDによる抑制**



それからもう少し発生の進んだオタマジャクシを使ってアミオダロンの影響を調べました。これはアフリカツメガエル(*X. laevis*)とネツタイツメガエル(*X. tropicalis*)の両方のオタマジャクシを使って調べたのですが、やはり発生に影響を及ぼす。発生を抑えてしまうのです。

アフリカツメガエルとネッタイツメガエルの尾部短縮(A, B)および後肢伸長(C, D)に対するAMDの影響

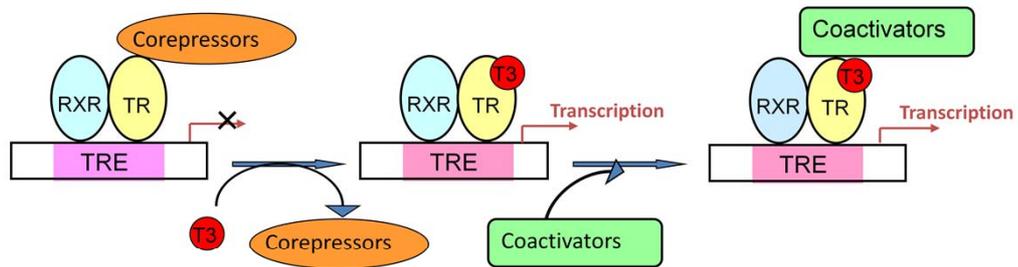


n=4, Student's *t*-test (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)

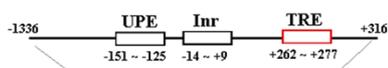
両種を使って、体長とか尾長とか、そういうものも調べてみました。そうしますと、やはり抑制する働きがございます。こういう点で見ますと、アミオダロンというのは、甲状腺ホルモンに対するアンタゴニストであるということがこの生体影響から言えます。

甲状腺ホルモン応答配列とレポーターを用いたTH作用評価の説明

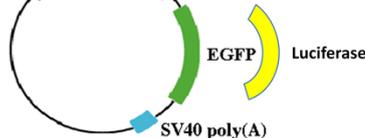
甲状腺ホルモン受容体を介した転写調節機構



X. laevis thyroid hormone receptor beta A1 promoter



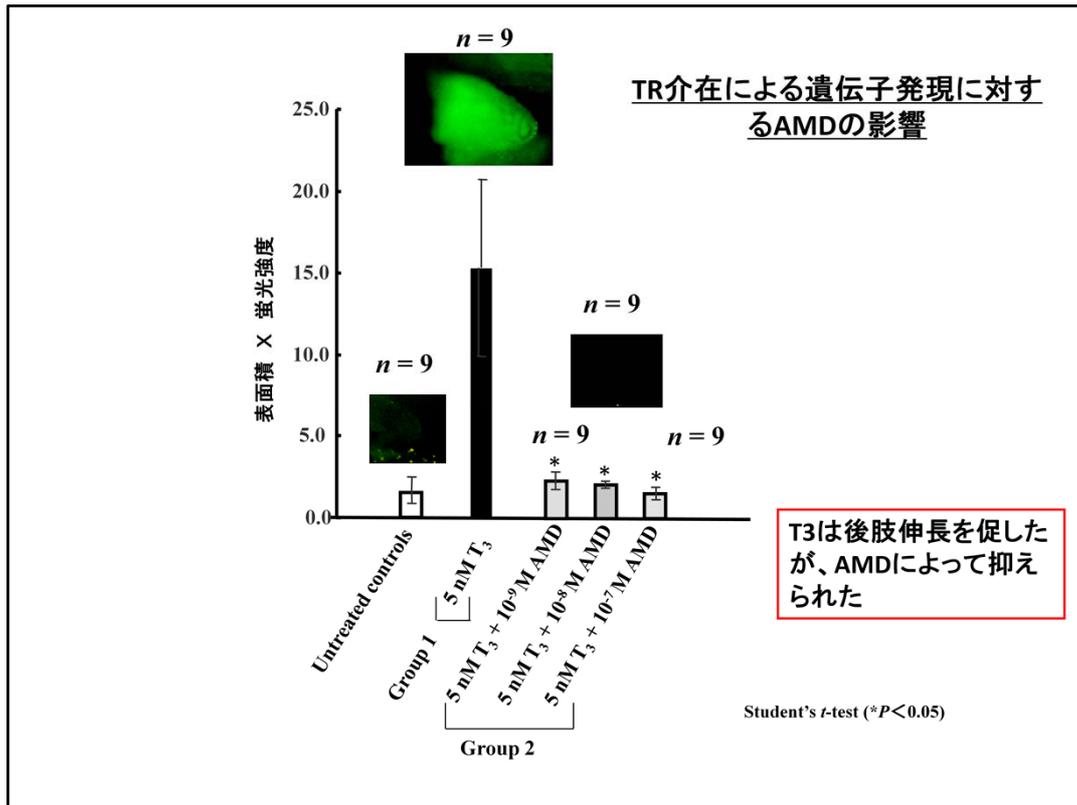
機能的なTREを持つアフリカツメガエルTRbetaA1遺伝子のプロモーター領域を用いたレポーターベクター



in vivo レポーター評価 (Tg 幼生)
in vitro レポーター評価 (A6 培養細胞)

次は、遺伝子、トランスジェニックとか、腎臓の細胞に少し足を踏み入れてみます。先ほど井口先生からも概略的な中でこういうふうなものが出てまいりましたが、甲状腺ホルモン受容体を介した転写調節機構遺伝子のTRとRXR（レチノイドXの受容体）がヘテロダイマーをつくって、標的遺伝子のTREと結合します。こういう体制ができた後、TRにT3がくっつく。そうすると遺伝子の転写が起こるようになるわけです。

我々はこういうふうなベクターをつくって、これは全部つくっているのですが、これはTRE、これはTRbetaA1遺伝子ですが、そのTRE、それから5ダッシュ上流域にあるプロモーター領域、それにEGFPもしくはルシフェラーゼ、そういうものをくっつけてこういうベクターをつくる。これを*in vivo*のレポーター系、トランスジェニックですが、こういうものを入れてこういうふうな評価系をつくる。もう一つは*in vitro*のレポーター系ですが、これはA6細胞、これはゼノパスの腎臓の細胞です。こういうものに入れてやる。そうすると、両方のアッセイ系は、甲状腺ホルモンのかく乱作用を持つ物質が、TRを介した遺伝子の発現あるいは転写にどういうふうな影響を与えるかというのがつぶさに分かるのです。そういう系をつくって調べます。



トランスジェニックの生体ですが、その一例として、甲状腺ホルモンをトランスジェニックの個体に作用させますと、変態が進む。後肢がどんどん伸びていくのです。一方で、アミオダロンを加えてやりますと、この作用が抑えられてしまいます。同時にEGFPの発現もほとんど消えてしまう。発現しないという状態になります。

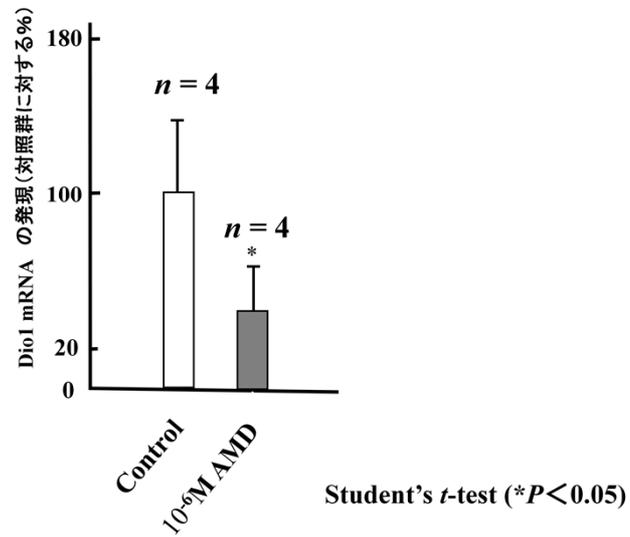
異なった生活時期のネツタイツメガエル肝臓におけるAMDの生物蓄積

	Solution concentration	Number of individuals	Days of exposure	Bioaccumulation ($\times 10^{-6}$ M)
St. 57 tadpole	Control	16	5	N.D. ^a
	10^{-9} M	18	5	0.562
	10^{-8} M	18	5	5.862
	10^{-7} M	15	5	121.29
	10^{-6} M	11	5	1248.12
7-month-old frog	Control	12	6	N.D. ^a
	10^{-9} M	12	6	N.D.
	10^{-8} M	12	6	0.147
	10^{-7} M	12	6	5.480
	10^{-6} M	12	6	135.520
3-year-old frog	Control	8	2	N.D. ^a
	10^{-8} M	4	2	N.D.
	10^{-7} M	4	2	0.071
	10^{-6} M	8	1	1.477

^a N.D. = not detected

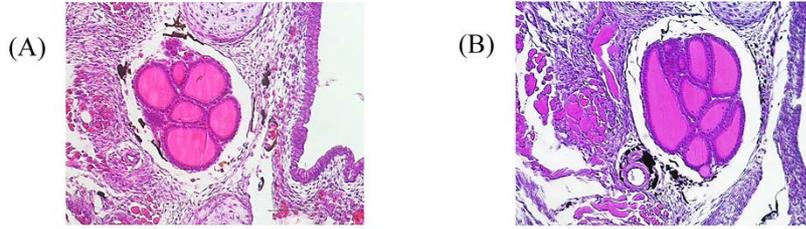
次はアミオダロンの生物濃縮ですが、ネツタイツメガエルのオタマジヤクシ、若いカエル、成熟ガエルを使って、肝臓中にアミオダロンがどれだけ蓄積されたかを調べます。オタマジヤクシの場合は、非常に濃縮度が高い。桁違いに高いのです。ところが、7カ月のカエルではそれほど高くなる。一方、成体を使った場合には、これはどういうわけかわかりませんが、アミオダロンに対する感受性が桁違いに高いのです。オタマジヤクシや幼若ガエルの方は5日とか6日では死亡個体は出ないのですが、成体の場合は処理を始めて1日か2日で全部死んでしまいます。

AMDに曝露された成熟ネツタイツメガエル肝臓におけるAMDによる1型脱ヨウ素化酵素(Dio 1)のmRNA発現量

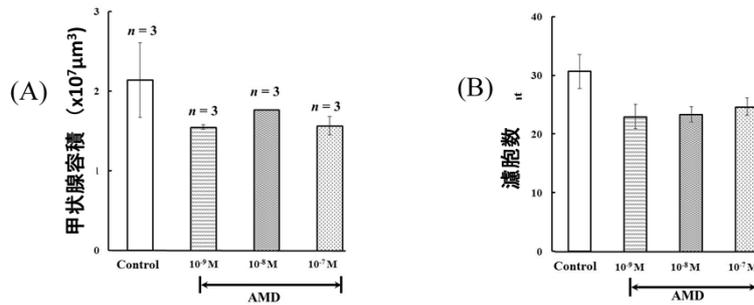


これはディオディナーゼ、T4からT3の産生を促す酵素ですが、そのmRNAの程度を測りました。そうすると、これはアミオダロンで抑えられる。

St.57ネツタイツメガエルオタマジャクシの甲状腺切片の顕微鏡写真
(A)未処理対照群 (B) 10^{-7} M AMD (曝露後5日目)



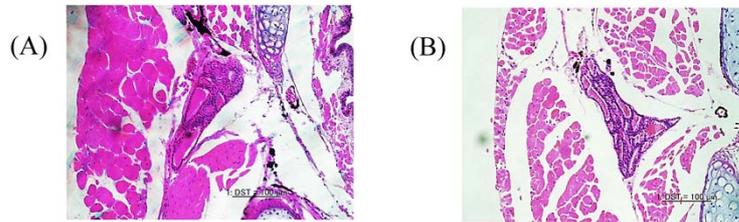
曝露されたSt.57オタマジャクシの甲状腺容積(A)と濾胞数(B)



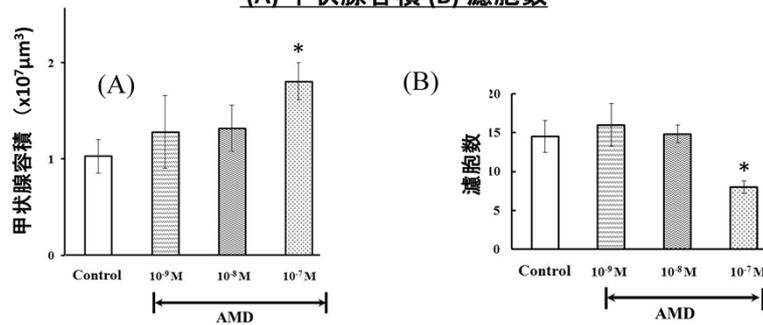
対照群と曝露オタマジャクシの間には違いは見られなかった

今度は甲状腺そのものに対する影響を調べてみました。これは若いステージ57のオタマジャクシですが、こういうふうに見た目にも、切片像を見ても、これは異常がないということが一目瞭然わかるのですが、実際に甲状腺の容量、濾胞数を全部計算します。そうすると、対照群と実験群の間には何ら差がございませんでした。

7ヶ月齢ネツタイツメガエルの甲状腺切片の顕微鏡写真 (A)未処理対照群 (B)
 10^{-7} M AMD (曝露後6日目); 組織が異常になっている



曝露された7ヶ月齢のカエルの甲状腺
 (A) 甲状腺容積 (B) 濾胞数



対照群と曝露されたカエルの間に統計的な違いが見られた

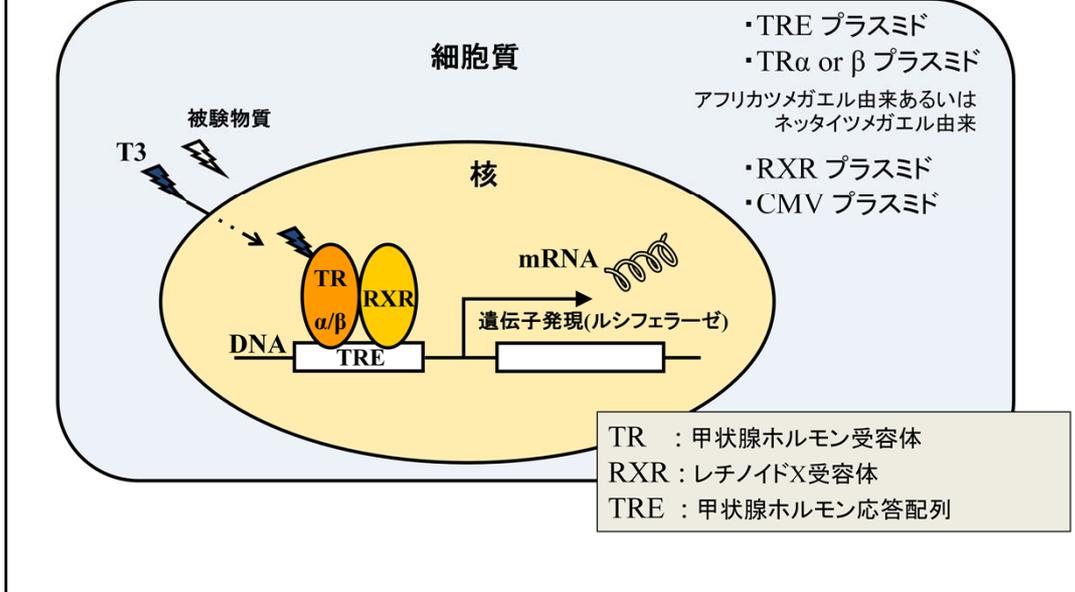
Student's *t*-test (* $P < 0.05$).

ところが、7ヶ月齢のネツタイツメガエルをみますと、切片像に既に異常が出ています。それから実際に甲状腺の大きさ、濾胞数を計算しましても、大きさはコントロールよりもだいぶ大きくなっています。ところが濾胞数は減っています。そうした結果が出ています。したがって、対照群とばく露されたカエルの間には統計的な違いがみられました。

甲状腺ホルモンレポーターアッセイ

一時的な遺伝子導入

(アフリカツメガエル腎由来株化細胞)

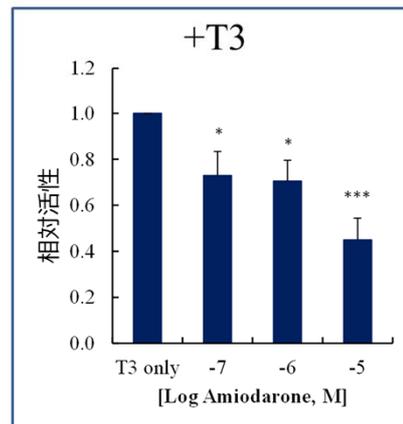
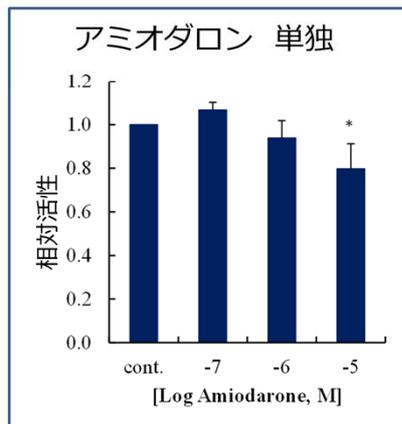
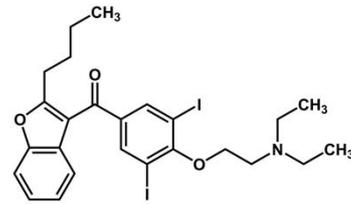


*in vitro*のレポーターアッセイ系ですが、この場合は、すでに申し述べたように、アフリカツメガエルの腎由来の細胞を使って、先ほどのベクターを入れ込みます。そしてTR α とか β でトランスフェクトしてやるのです。これも非常にいい系であるということは、いろいろな実験をやってみてわかりました。

アミオダロンの甲状腺ホルモン様活性

アミオダロン

- ・臨床で使用される抗不整脈薬
- ・副作用に甲状腺機能障害がある
- ・病院排水中に含まれる生態に対して毒性が強いと考えられる医薬品



* $p < 0.05$ and *** $p < 0.001$ vs. cont. (analyzed by Tukey's test)

その一例としてアミオダロンですが、単独の場合よりもT3を加えた場合にはどんと落ちるのですが、アミオダロンを加えた場合にはやや抑え気味になります。いずれにしても、甲状腺ホルモンに対してアンタゴニスト的な効果があります。

結論

- (1) 48時間の半数致死濃度(LD50)値は 3.4×10^{-6} Mであることが幼生期のオタマジャクシを用いて決定された。処理9日後の幼生の発生と成長に対する有意な有害影響(LOAEL)が 10^{-8} Mで見られたが、 10^{-9} Mでは無毒 (NOAEL)であった
- (2) AMDは内在性THによって制御されるアフリカツメガエルとネツタイツメガエルの自然変態を阻害したが、これはAMDがTHアンタゴニストであることを示している
- (3) トランスジェニックアフリカツメガエルにおいて、 T_3 は後肢に強いEGFP発現を誘起したが、AMDを加えるとその発現は抑えられた。このことからAMDは T_3 とTRの結合を妨げるように作用、TR介在型の遺伝子発現を阻害することが示唆された
- (4) AMDの生物濃縮は変態開始期のオタマジャクシの肝臓で高く、発生が進み若いカエルになると急速に減った。この違いについては更なる研究が必要である
- (5) 甲状腺の組織学的観察でAMDが濾胞数および大きさに変化を引き起こすことがわかった

結論として、アミオダロンに関する実験で、この物質の48時間半数致死濃度がわかった。それから、どの濃度までは影響がないか、どの濃度から影響があるかということもわかりました。

それから、アミオダロンは甲状腺ホルモンアンタゴニストとして働くことも明らかになりました。

それから、トランスジェニックガエルを使った実験結果から、AMDはTRと T_3 との結合を妨げるように作用することもわかりました。

生物濃縮についてもわかり、オタマジャクシの場合は、肝臓内で非常に高い濃縮が起こっていることもわかりました。

甲状腺の組織学的な観察から、甲状腺内の濾胞数、甲状腺自体の大きさに影響を及ぼすこともわかりました。

以上、本研究で用いた*in vivo*、*in vitro*の系はいずれも医薬品の甲状腺ホルモンかく乱影響を調べるのに有用であることが明らかになりました。

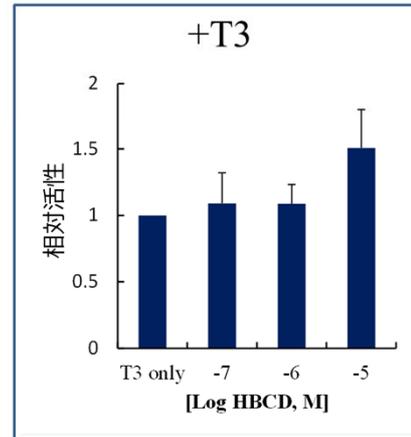
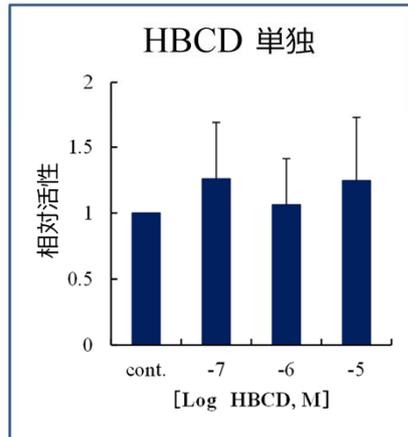
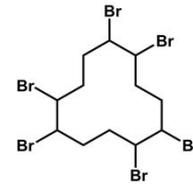
**THかく乱作用を持つ化学物質の*in vivo*評価：
ヘキサブロモシクロドデカン(HBCD)**

次にもう一つ、ヘキサブロモシクロドデカン（HBCD）についての影響も、途中経過ですが、調べております。

HBCDの甲状腺ホルモン様活性

ヘキサブロモシクロデカン (HBCD)

- ・一般用品や産業用品に使用されている難燃剤
- ・甲状腺ホルモンかく乱作用が懸念されている



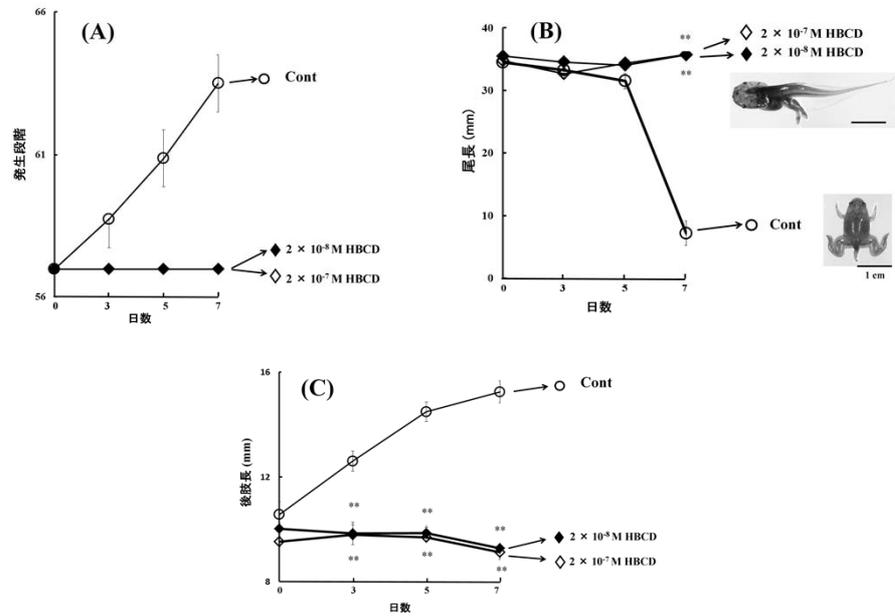
HBCDは*in vitro*レポーター系においてTRアンタゴニスト活性を示さない

これは難燃剤であるということと、一般的に甲状腺かく乱作用があるのではないかとことも懸念されています。

構造式はこんな形になっています。

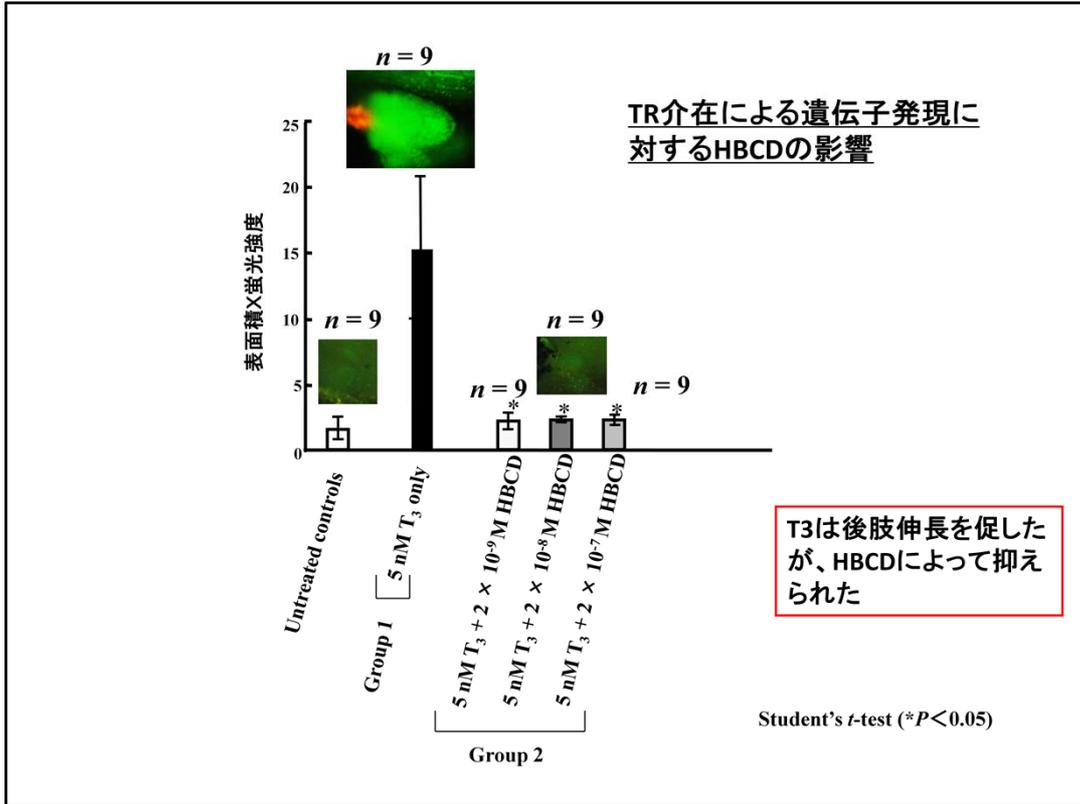
ところが、これにT3を加えても、*in vitro*系ではっきりしたデータは出ません。はっきりしたアゴニストでもないし、アンタゴニストでもない。どっちかというところ、アゴニスト様の働きがあるのかなという結果が得られました。

HBCDによるネツタイツメガエルオタマジャクシ(St.57)の自然変態(A),尾部短縮(B)および後肢伸長の抑制



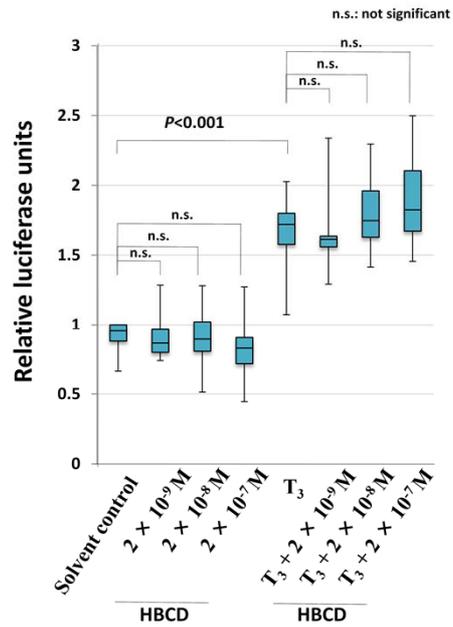
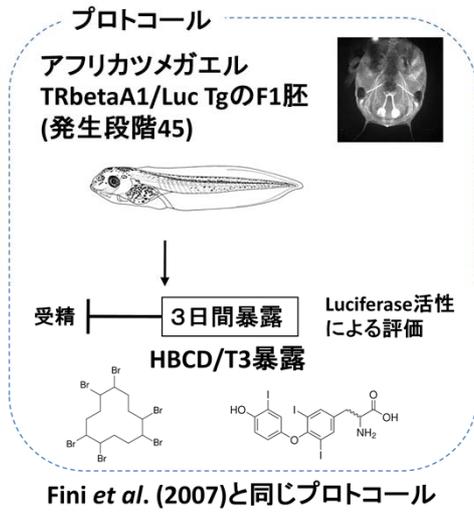
n=10, Student's *t*-test (***P*<0.01).

ところが、*in vivo*、つまり生体ではどうかといいますと、オタマジャクシを使って調べてみますと、発生に対する影響、それから尾長、後肢長、こういうものに対して非常に強い効果がある。アンタゴニスト的な効果があることがわかりました。



トランスジェニックを使っても、やはりアンタゴニスト的な効果があることも判明いたしました。

TRbetaA1/Luciferase Tg胚を用いたHBCDの*in vivo*評価:初期胚



TRbeta/Luc Tg胚を用いた*in vivo*レポーターアッセイでは、HBCDのアゴニスト及びアンタゴニスト活性は確認されなかった(A6細胞を使った*in vitro*レポーターアッセイでも同じ結果)。

もう一つ、このオタマジャクシは、TRbetaA1とルシフェラーゼをつないでつくったトランスジェニックですが、これはオタマジャクシですが、胚を使って実際にT3に対する反応があるかといったら、これはありませんでした。当然のことながらHBCDに対する反応も何らありませんでした。

結論

- (1) HBCDがネッタイツメガエルの自然変態を抑制したことはHBCDがTHアンタゴニストとして作用することを示す
- (2) HBCDはトランスジェニックT3処理個体後肢のEGFP発現を阻害した
- (3) これに対して、HBCDはアフリカツメガエル腎臓由来のA6細胞レポーターアッセイにおいてアゴニスト様の影響を示した。このような *in vivo* と *in vitro* アッセイの違いは、一部 T₃ と HBCDの構造上の違いを反映しているものと思われる

最後ですが、HBCDがネッタイツメガエルのオタマジャクシの自然変態を抑制した。だから甲状腺ホルモンに対するアンタゴニストとしての作用があることがわかりました。

それからトランスジェニックを使った場合、EGFPの発現が後肢で出ました。

これに対して、*in vitro*の系ではこういうような結果は出ていません。これはおそらくT3とHBCDの構造式が違うというところを一部反映しているのではないかと思います。

以上です。