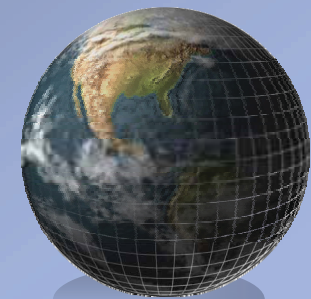


# 哺乳類を用いた毒性実験の結果に影響を 及ぼす実験動物の遺伝的要因解析



(財) 残留農薬研究所毒性部  
青山 博昭



# 様々な毒性試験に使われる実験動物



## ラット，マウス：

- 急性毒性試験，亜急性毒性試験，慢性毒性試験
- 繁殖毒性試験，催奇形性試験（発生毒性試験）
- 発がん性試験
- 神経毒性試験，発達神経毒性試験
- 遺伝毒性試験，
- 免疫毒性試験など



## ウサギ：

- 催奇形性試験（発生毒性試験）
- 目刺激性試験など



## モルモット：

- 皮膚感作性試験など



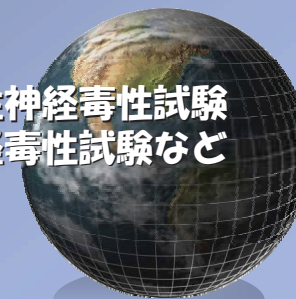
## イヌ：

- 亜急性毒性試験
- 慢性毒性試験など



## ニワトリ：

- 急性遅発性神経毒性試験
- 遅発性神経毒性試験など



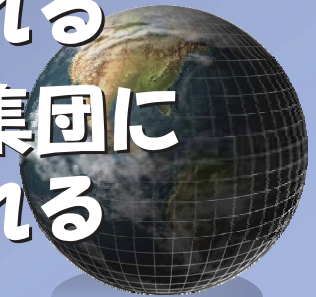
# 実験動物の遺伝学的素性

## 近交系

- ゲノム上にあるすべての遺伝子座が、ホモに固定している
- 親子兄弟の遺伝子型がすべて同じである
- 同じ用量の化合物に対し、均一な反応をすると予測される
- ヒトの集団とは明らかに異なる

## アウトブリード

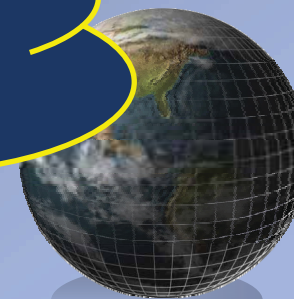
- 多くの遺伝子座に多型（バラエティー）が存在する
- 親子兄弟は似ているが、同じではない
- 化合物に対する反応に、適度な個体差があると予測される
- 比較的ヒトの集団に近いと期待される



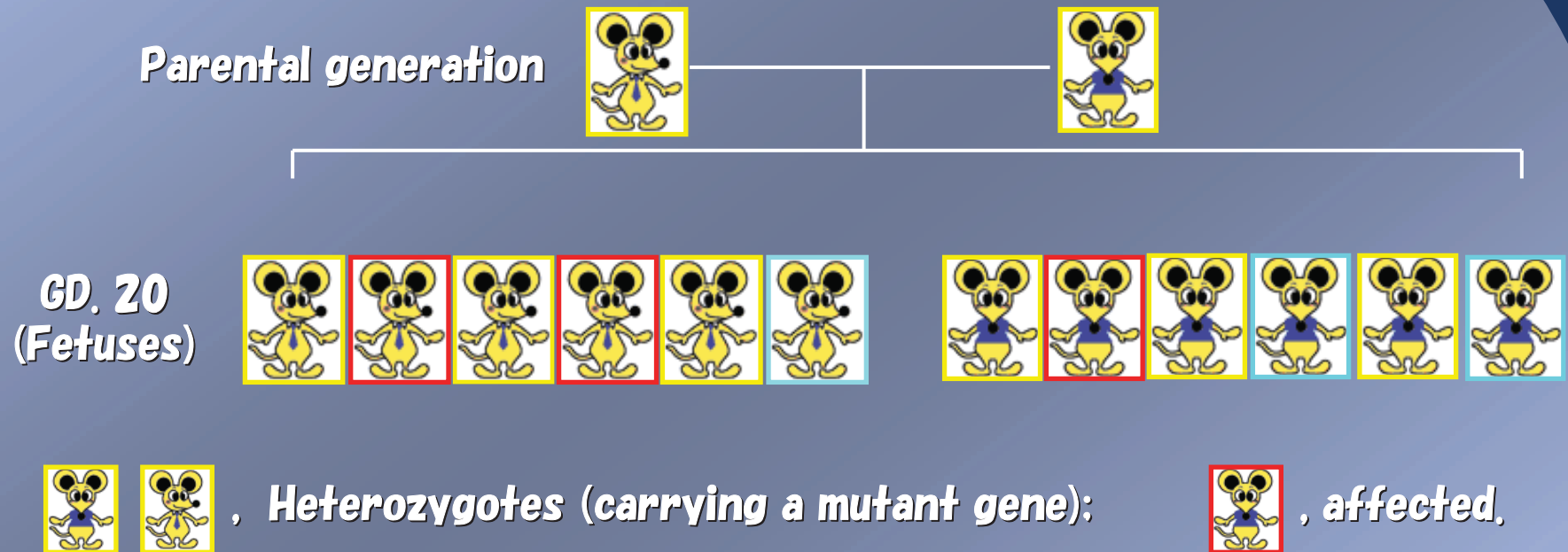
## 毒性学者が好む実験動物

- なるべくヒトの集団に近いモデルを使いたい。
- 遺伝的に均一な動物モデルでは、特定の集団に対する影響しか予測できない。
- アウトブリード系統の動物なら、程よい個体差があって、ヒトのモデルに丁度良い。

遺伝的に不均一なアウトブリード系統の動物を使った毒性試験に、弱点はないの？



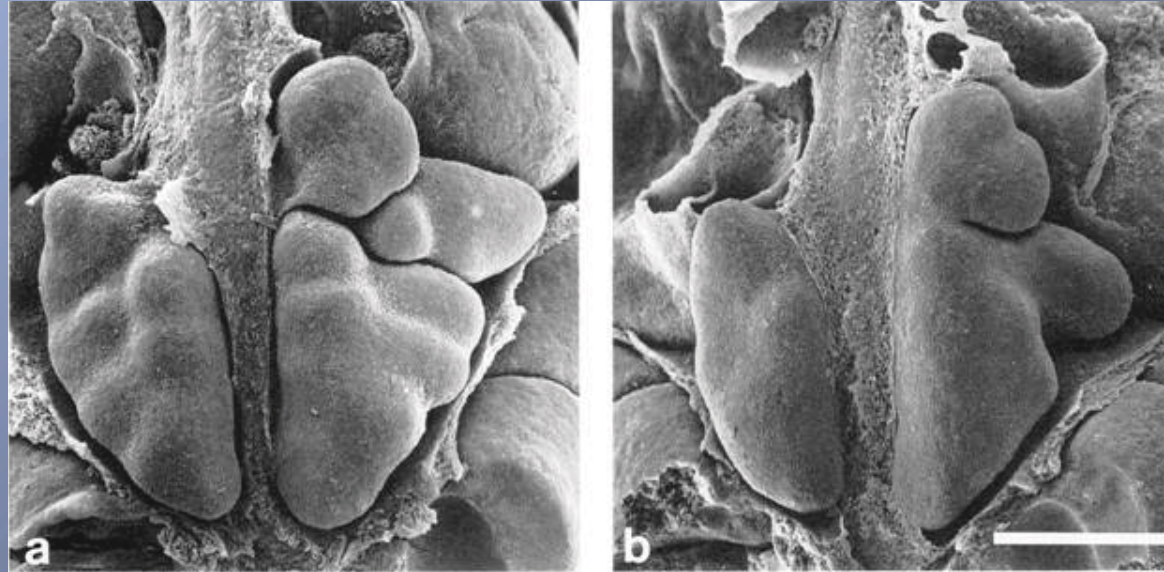
# 動物コロニーに潜む劣性突然変異遺伝子の思わぬ効果 - 外表から診断できない劣性突然変異の関与 -



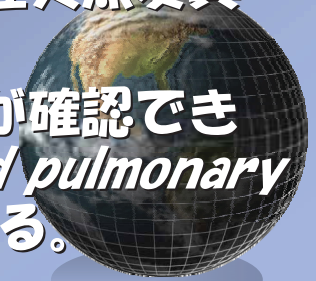
メンデルの法則が忠実に再現される



# Wistarラットに出現した *fpl* 突然変異



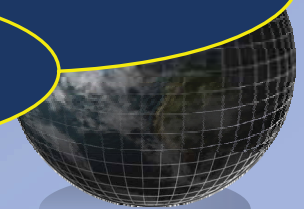
- 農薬の2世代繁殖毒性試験を実施したところ、低用量群の1腹の産児13匹中3匹に、肺の分葉異常が観察された。これらの異常個体には、喘鳴呼吸、眼瞼の異常、合指症などの合併が認められた。
- 対照群とその他の投与群の動物に同様の異常はみられなかったことから、この異常（肺の分葉異常を主とする奇形症候群）は劣性突然変異によるものと推測された。
- 交配実験によりこの異常は遺伝性の奇形症候群であることが確認できたので、この異常を引き起こす劣性突然変異遺伝子を *fused pulmonary lobes (fpl)* と命名し、異常動物を近交系として維持している。



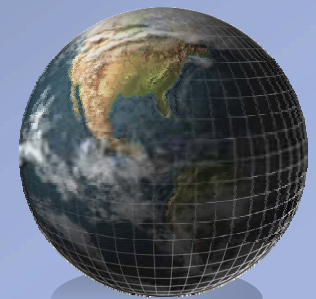
## アウトフレッドラットに由来する その他の突然変異

- PD (preaxial duplication) : 軸前性多指, 雄性不妊, Autosomal recessive
- PL (polydactyly lethal) : 軸前性多指, 致死, Autosomal recessive
- MOD (male olygodactyly) : 雄にのみ出現する欠指症, Y chromosome-linked?
- Dwarf : 甲状腺の組織学的異常を伴う矮小症 (小人症), Autosomal recessive?

アウトフレッド系統のラットを交配に使うと, 集団に潜んでいた劣性突然変異形質が露呈する!

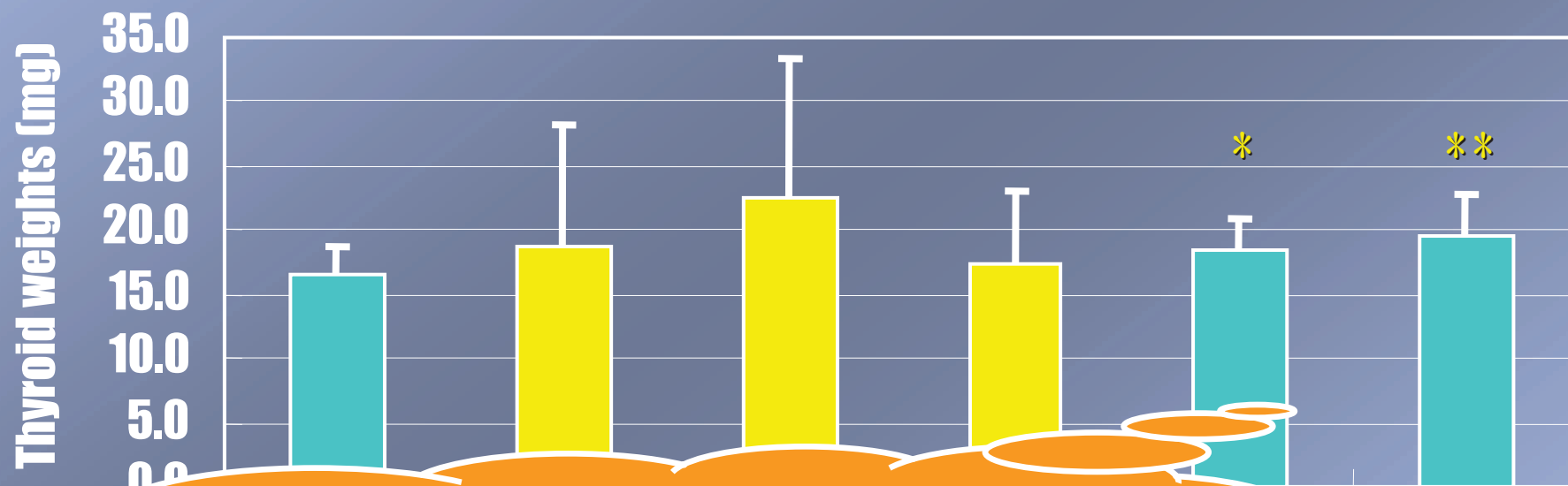


**様々な化合物の生殖・発生毒性を評価する実験  
の妨げとなる突然変異遺伝子の解析**





# 環境省プロジェクトで観察された 見かけ上の逆U字型用量反応関係の例 (Wistar Hannover GALASラット)

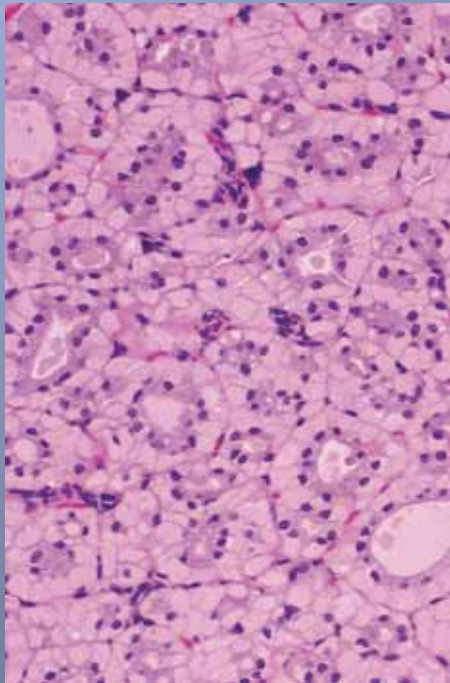


低用量影響？  
突然変異個体の影響？

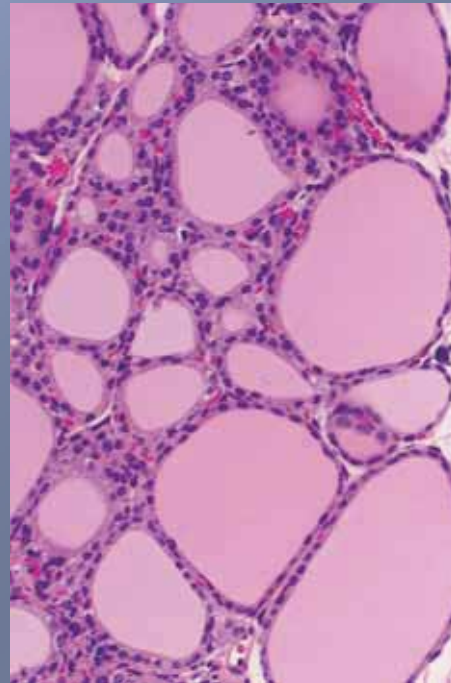
Dose level of Kelthane ( $\mu\text{g/kg/day}$ )



# Wistar Hannover GALAS ラットに観察される 甲状腺の組織学的異常と外表異常（矮小症）



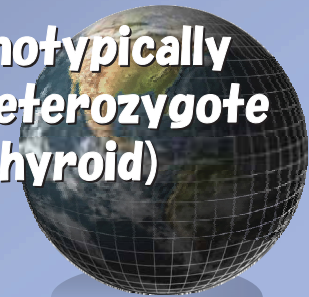
**Abnormal thyroid  
with increased  
weight**



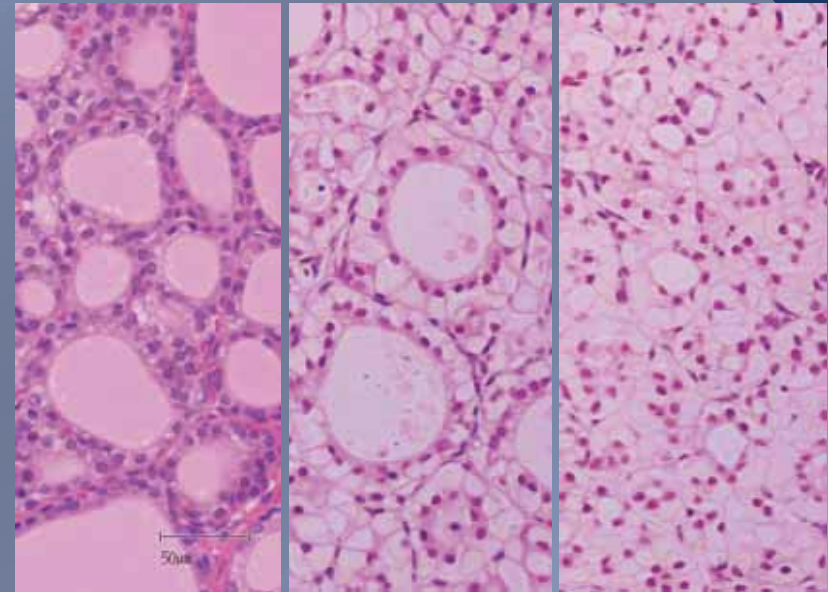
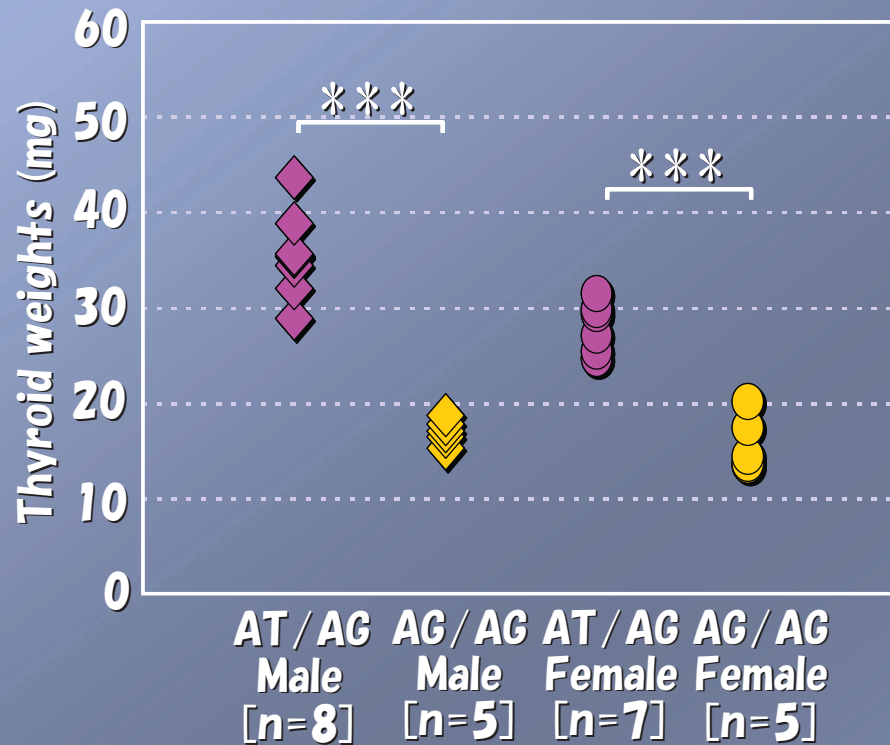
**Normal thyroid**



**Dwarf and his phenotypically  
normal littermate (heterozygote  
with abnormal thyroid)**



# Wistar Hannover GALASラットにおける *Thyroglobulin*遺伝子変異②



Wistar Hannoverラットにみられる  
自然発生甲状腺腫の病理組織像

左, 野生型ホモ(AG/AG, 正常)

中央, ヘテロ(AG/AT, 外見正常, 甲状腺腫)

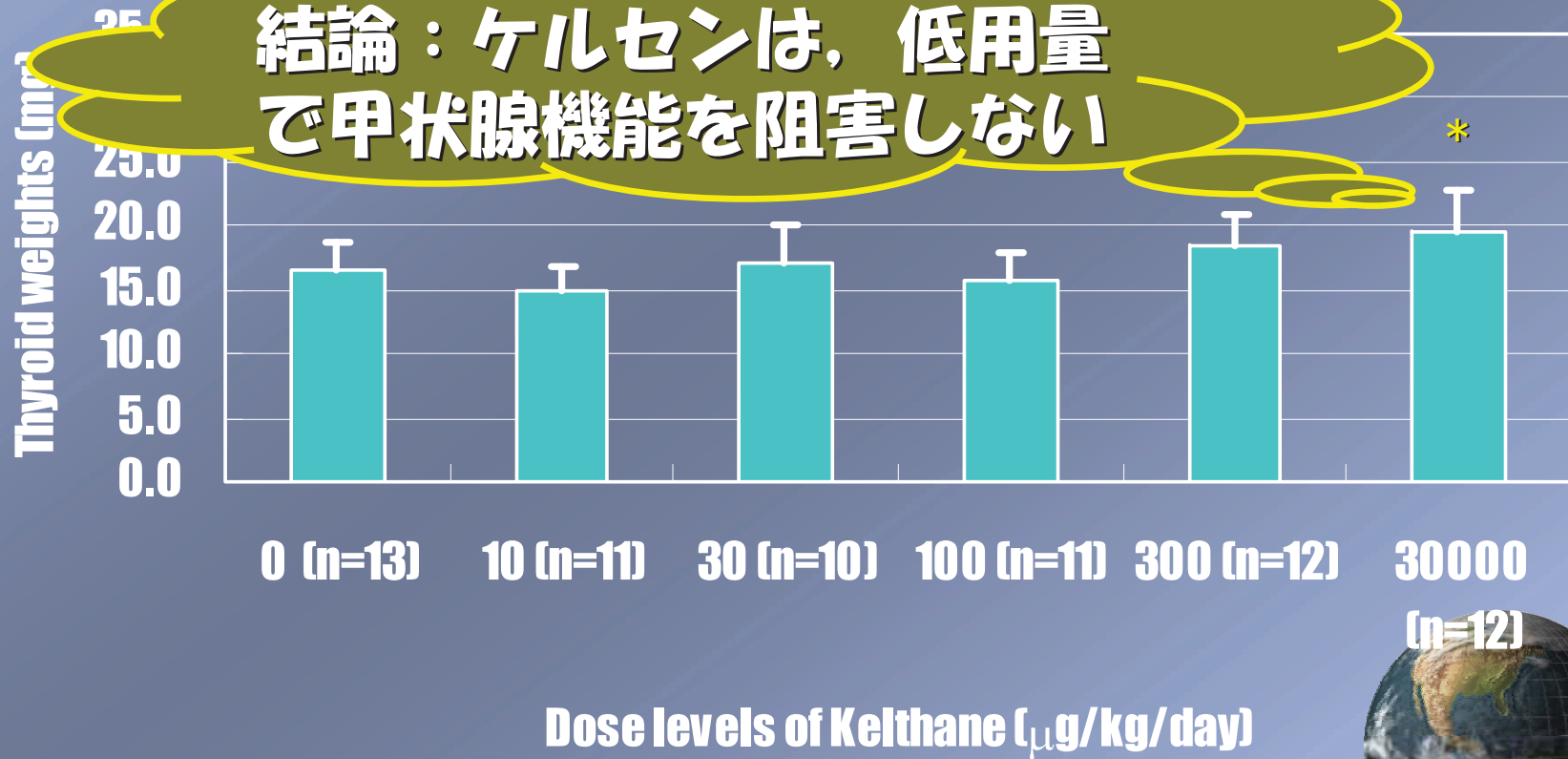
右, 変異型ホモ(AT/AT, 矮小症)

※現在は, PCR法に基づく簡便な遺伝子診断法によって,  
変異型アレルを保有する個体を直ちに診断可能となった。

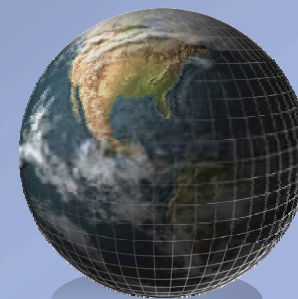


# 突然変異個体を除外後の用量反応関係 (突然変異個体を除外した後の解析)

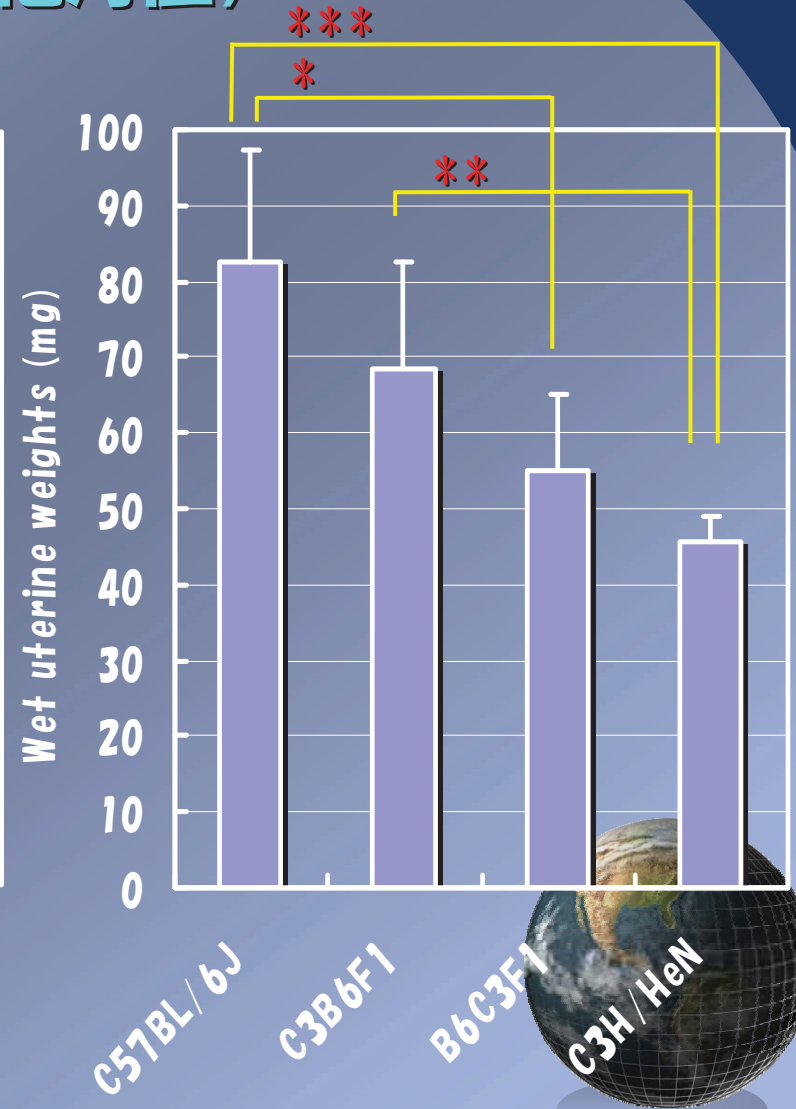
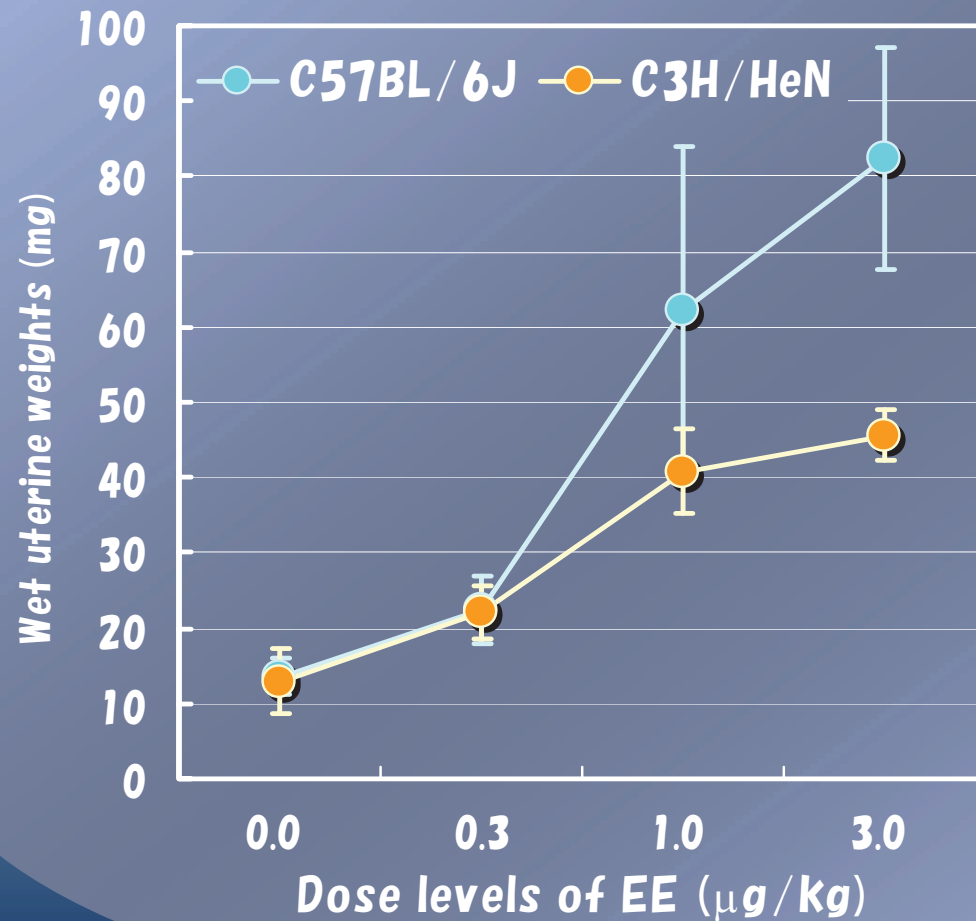
結論：ケルセンは、低用量  
で甲状腺機能を阻害しない



**様々な化合物のエストロゲン様作用を評価する  
実験（子宮肥大試験）の妨げとなる  
遺伝子多型の解析**

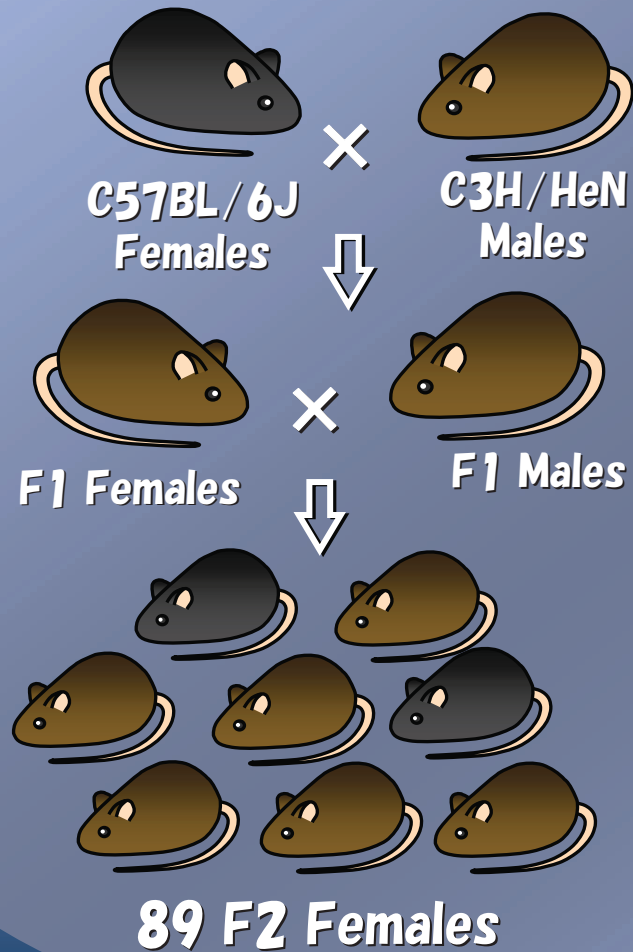


# C57BL/6JマウスとC3H/HeNマウスの間にみられた エストロゲンに対する感受性の系統差： 子宮湿重量（絶対値）



# QTL解析: B6C3F2 ♀

## 交雑群: B6C3F2

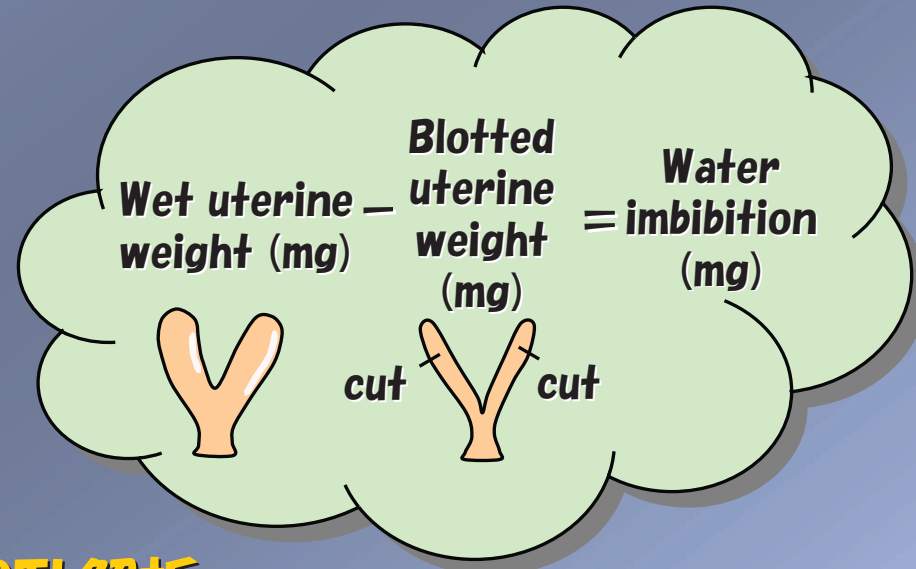


## 処置:

Ethinylestradiol (EE)

3.0  $\mu\text{g}/\text{kg}$ の用量で皮下注射

21日齢より3日間投与後、翌日に剖検



## QTL解析:

マイクロサテライトマーカー95個

F2全個体の遺伝子型を判定

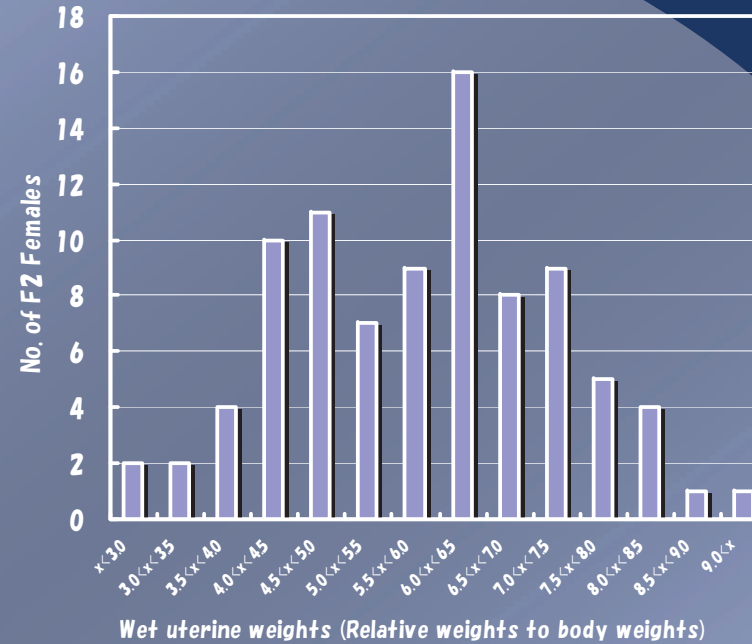
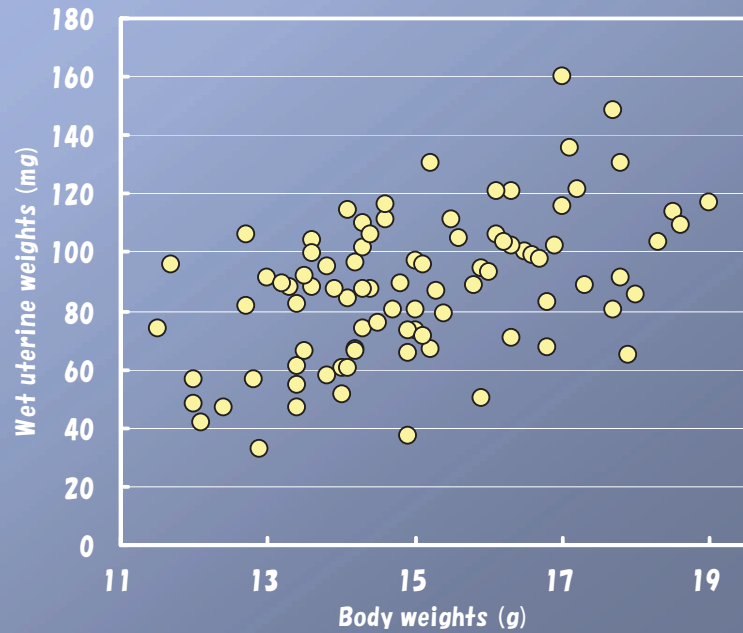
MapManager QTXb20を用いて解析



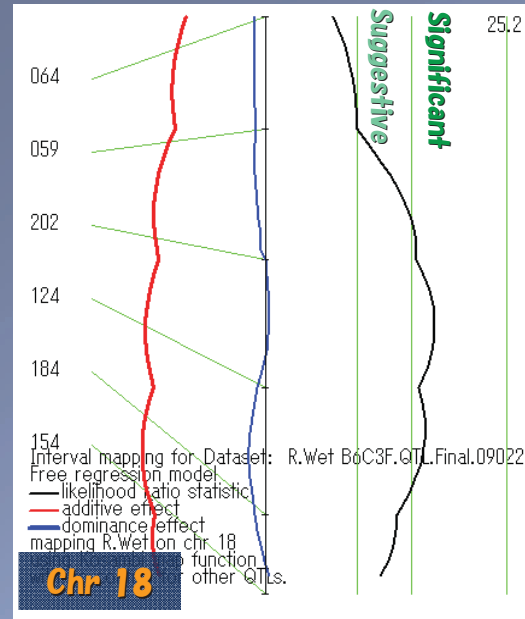
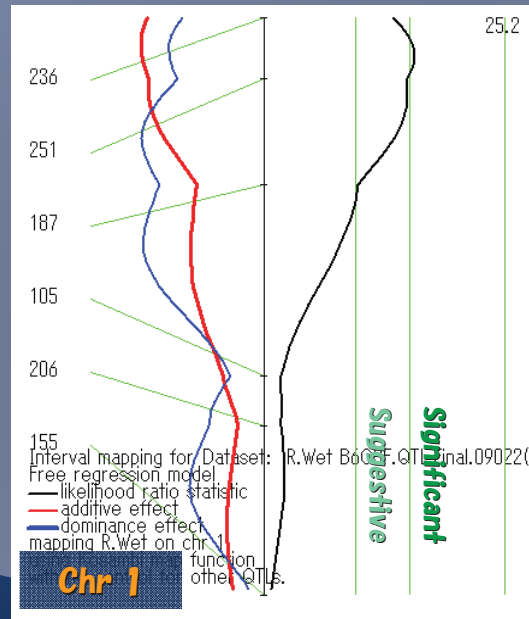




# QTL解析の結果: 子宮湿重量



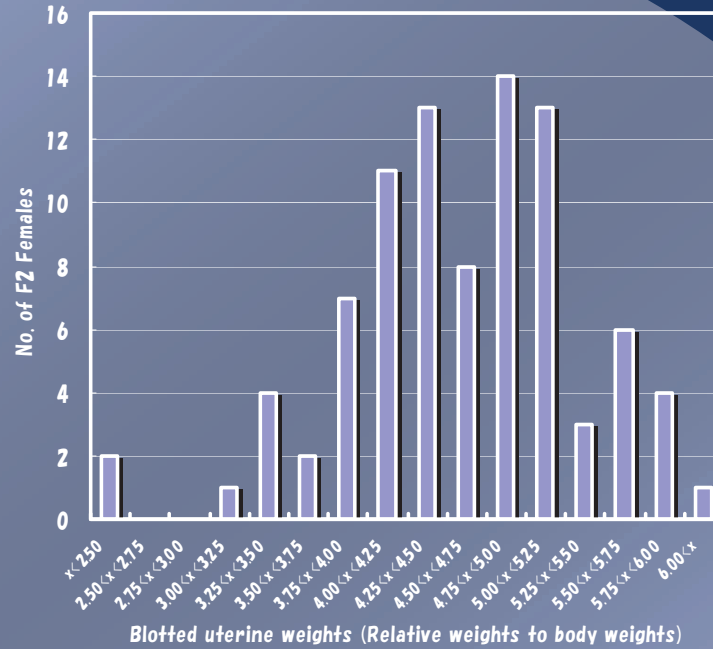
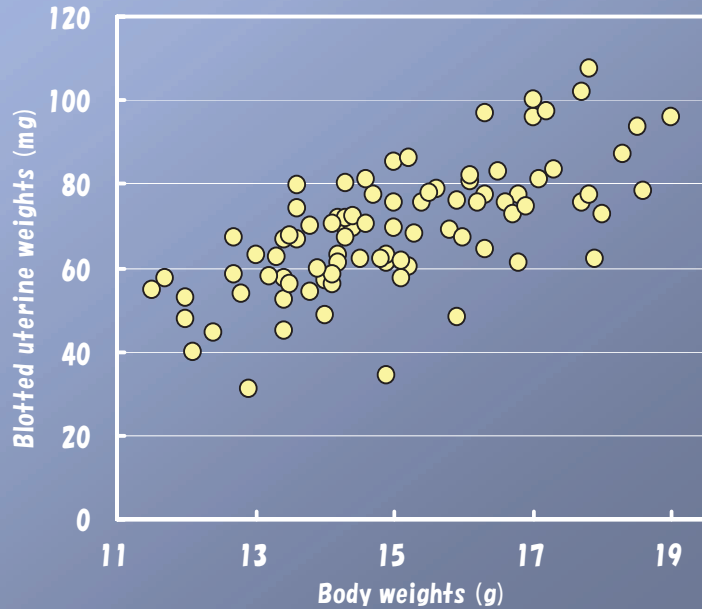
*D1Mi+236*  
~  
*D1Mi+187*



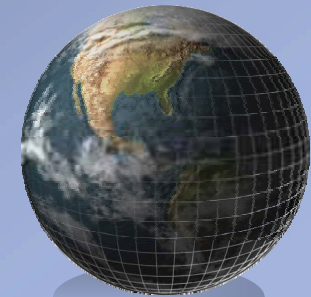
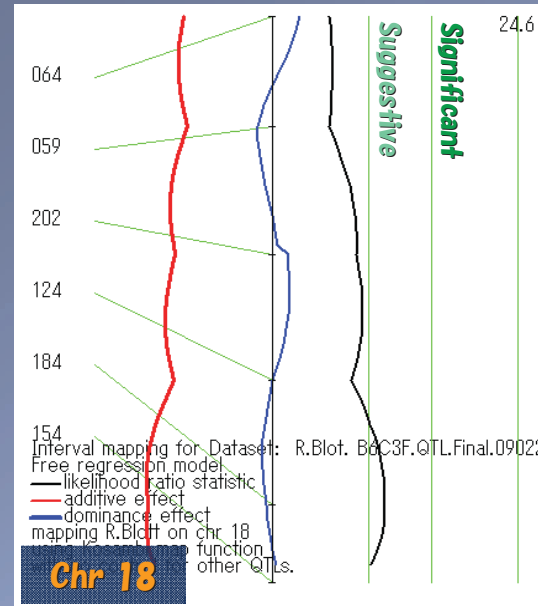
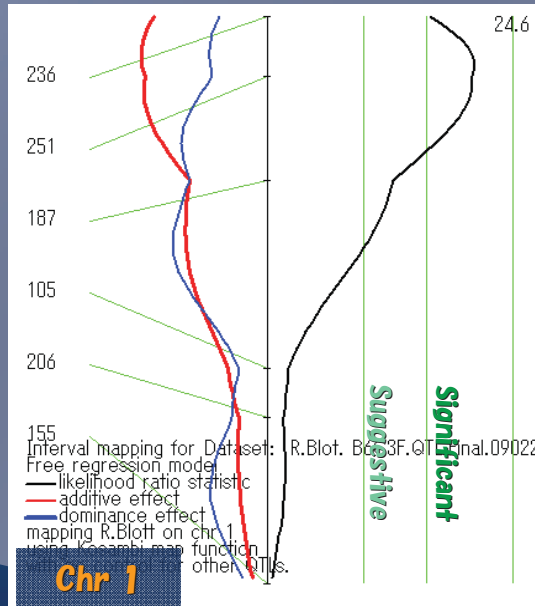
*D18Mi+59*  
~  
*D18Mi+154*



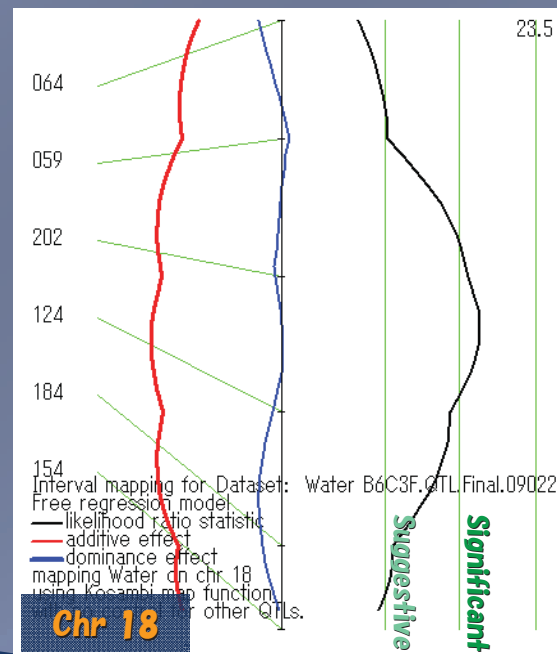
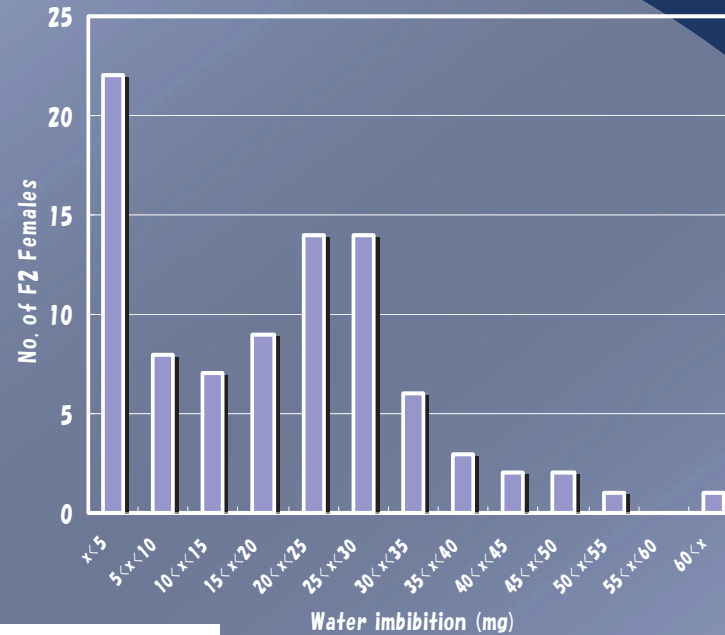
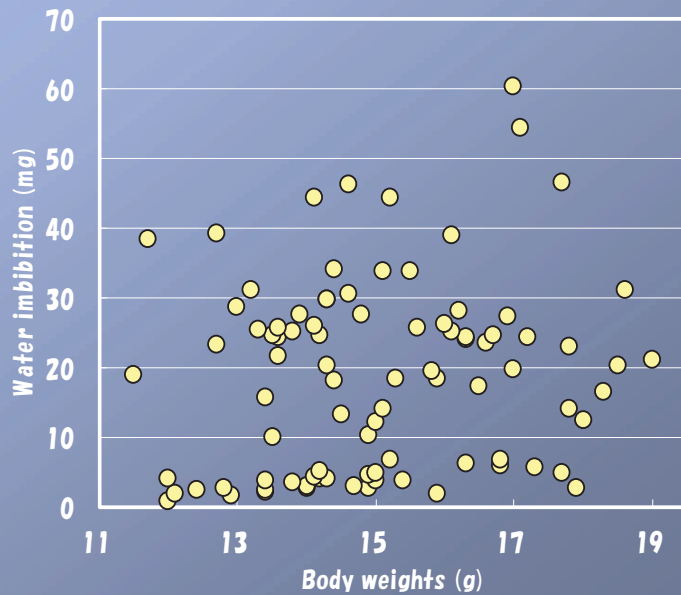
# QTL解析の結果: 子宮実質重量



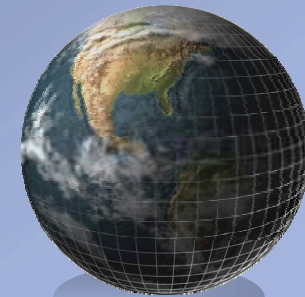
*D1Mi+236*  
~  
*D1Mi+187*



# QTL解析の結果：子宮腔内の水分貯留量



*D18Mit59*  
~  
*D18Mit184*

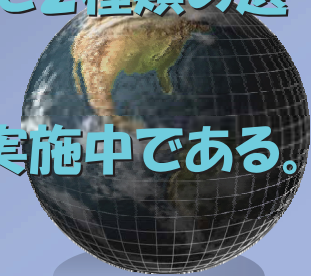


# QTL解析結果のまとめ

指標	子宮 湿重量	子宮 実質重量	水分 貯留量
染色体	<b>Chr 1</b> Chr 11 <b>Chr 18</b>	<b>Chr 1</b> Chr 11 <b>Chr 18</b>	<b>Chr 18</b>

**赤**, Significant; **黄**, Suggestive

- ① 子宮組織の重量(子宮実質重量)を修飾する遺伝子多型  
⇒第1染色体上
  - ② 子宮腔内の水分貯留量を修飾する遺伝子多型  
⇒第18染色体上
- B6系統とC3H系統にみられた子宮肥大反応の差は、主として2種類の遺伝子多型に支配されていることが強く示唆される。
  - 現在、第1染色体上の候補遺伝子同定に向け、確認実験を実施中である。

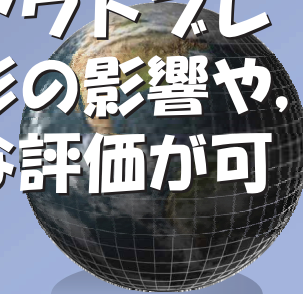


# 実験動物に関する遺伝学的研究成果の毒性試験 (内分泌かく乱作用検出実験) への還元

先天奇形誘発突然変異遺伝子や  
恒常性維持に関わるホルモン感  
受性修飾遺伝子の同定

遺伝子型診断法の確立

様々な化合物の生殖・発生毒性を検出するためにアウトブリード動物を用いて実施される研究で、自然発生奇形の影響や、感受性の個体差に基づく偶然の差を除去した正確な評価が可能となる。



# 謝辞

- 一連の1世代繁殖毒性試験は、環境省プロジェクトとして実施された。プロジェクトに参画されたラボと、試験を実施された多くの研究者に感謝する。
- Wistar Hannover GALASラットに出現した突然変異の解析とマウスを用いた基礎研究は、環境省の支援により、以下の研究者との共同研究として実施された。

✓ 理化学研究所バイオリソースセンター

吉木 淳, 目加田 和之, 阿部 訓也

✓ 農業生物資源研究所

後藤 英夫, 須藤 淳一

✓ 残留農薬研究所

佐藤 旭, 荒木 雅行, 北條 仁

