

今カエルの試験法は3種類あります。私のここでの任務は、皆さんに細かい試験法のレクチャーをすることではないと思っています。というのは、この中でカエルの試験をやる方は1人か2人か、ひょっとしたらゼロじゃないかと思うので、私とか環境省が何かカエルの試験法と言ったときにイメージがぱっと浮かばいいぐらいに思っているのですが、そうしたときにたぶんキーワードとしては、ADGDAとか、LAGDAとか、AMAという言葉が時々出てくるので、それぐらい覚えておいて、大体どんなことをやっているかなと思っていただければいいと思います。

ここで一番重要なのは、一番下に書いたAMAなんです。AMAとは何かといいますと、こういう試験です。

Amphibian Metamorphosis Assay (AMA) TG231

Xenopus laevis



試験動物	アフリカツメガエル		
試験期間	発生段階51から21日間*		
試験物質及びばく露濃度	Iopanoic acid (IOP)	0.75, 1.5, 3.0, 6.0 mg/L	
	Thyroxine (T ₄)	0.25, 0.5, 1.0, 2.0 µg/L	
	Percholate (PER)	65, 125, 250, 500 µg/L	
エンドポイント・計測日	発生段階	0日目、7日目*、21日目	
	体長	頭胴長	7日目*、21日目
		完全長	7日目*、21日目
	後肢長	7日目*、21日目	
	湿重量	7日目*、21日目	
	死亡率	毎日	
	甲状腺(組織)	7日目*、21日目	

* (7日目に各水槽から5匹ずつサンプリング)

21

Amphibian Metamorphosis Assayを略してAMAというのです。これは先ほどお見せしたOECDのテストガイドラインの231に相当します。つまり、国際的なバリデーションが終わって試験法として確立している試験です。この試験法を環境省のEXTEND2010でも甲状腺ホルモンの検出系として用いることになっています。

ここに細かいエンドポイントというか、観察点とか、いつ何を見るか出ていますが、甲状腺ホルモンとか甲状腺ホルモン阻害剤または促進剤を与えるとどうなるかといいますと、甲状腺という臓器の組織が変化するということが1つの観察眼として知られます。

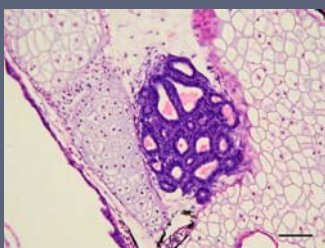
試験結果(甲状腺)



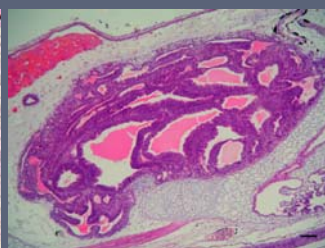
Control



IOP (6.0 mg/L)



T₄ (2.0 μg/L)



PER (500 μg/L)

スケール: 100 μm

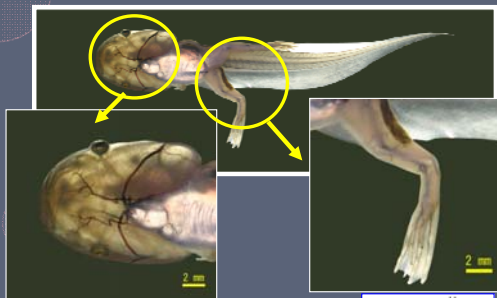
22

これは解剖して切片を切って、標本を作って観察しなきゃいけないのですが、コントロールではこういう形をしていたのが、阻害剤または促進剤を与えると、こういうふうに異常なものを示す。T4だと、多量に与えてしまうとこういうふうな形になります。

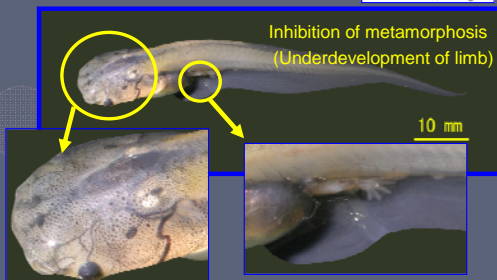
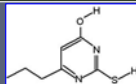
甲状腺ホルモンかく乱による変態異常

Morphological changes with disruption to the thyroid system

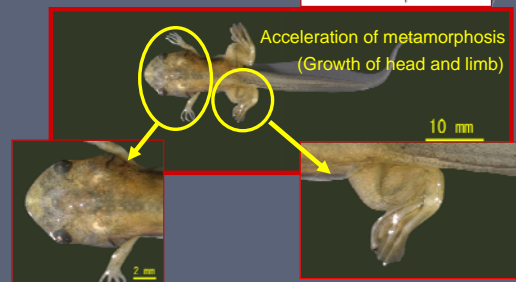
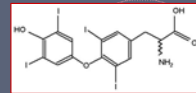
Control



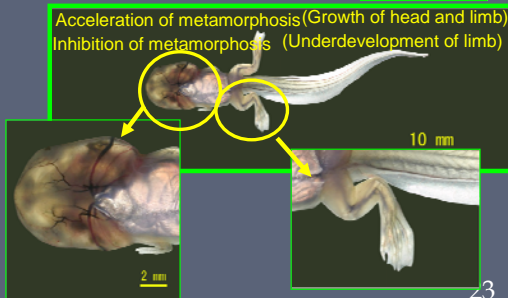
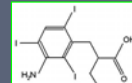
PTU $C_7H_{10}N_2OS$



T4 $C_{15}H_{11}I_4NO_4$



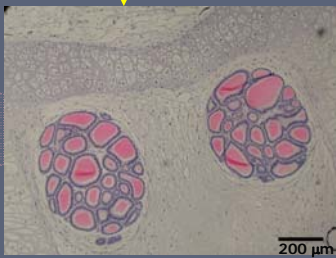
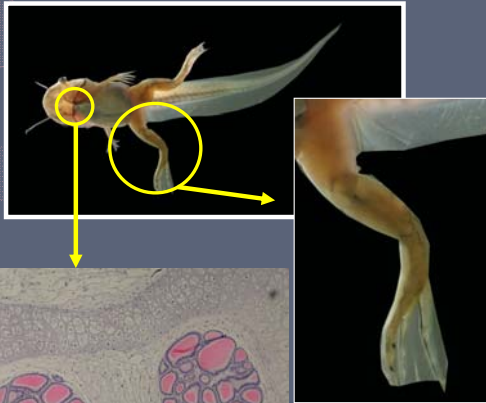
IOP $C_{11}H_{12}I_3NO_2$



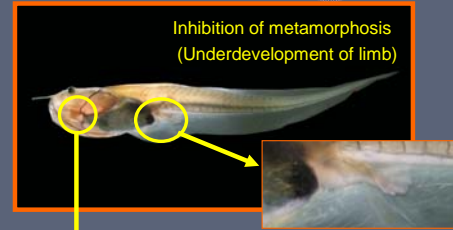
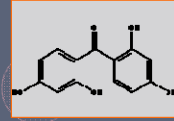
あとは、甲状腺ホルモン以外に何を見るかという、後肢が出てくるタイミングとか、前肢が出てくるタイミングが変わる。それはいろんなこういう化学物質によって、これがノーマルだとすると、ノーマルはまだ前肢が出ていないのですが、前肢が出てきたりしますね。逆に、ノーマルは後肢が出てくるのに、ここでは出てないとか、こちらは両方とも頭の形が変になっているということが起きています。大体奇形が起きることですね。

Results of Metamorphosis Assay (Phase 3)

Control



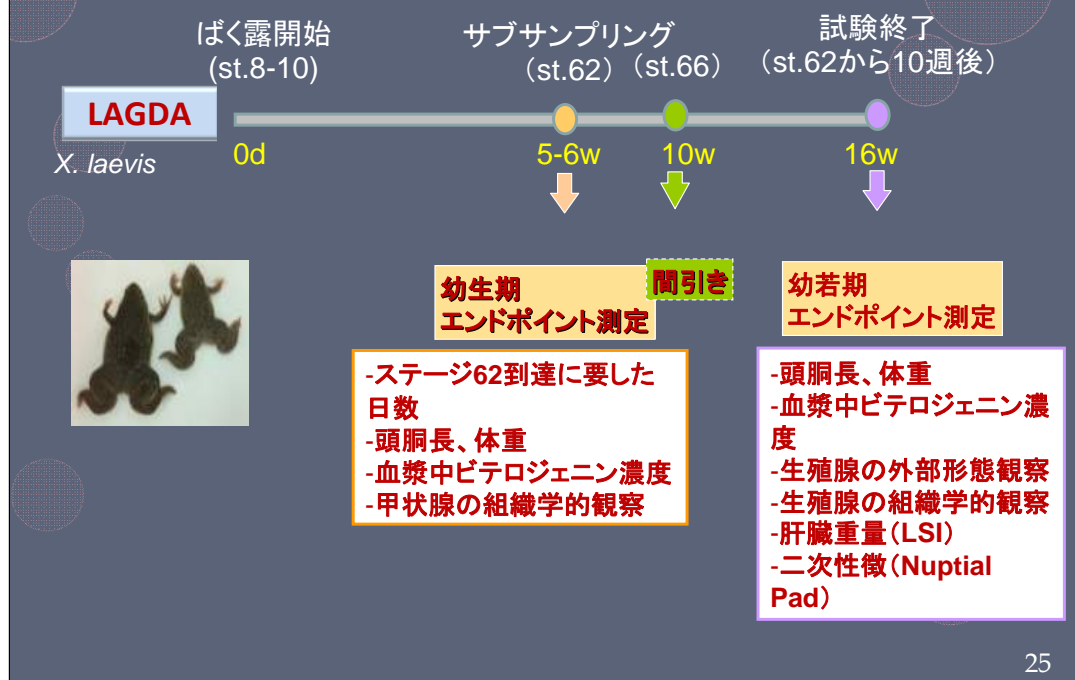
BP-2 $C_{13}H_{10}O_5$



24

次にカエルの方です。

長期試験（第2段階試験？検討中）



もう1つ試験法として、Tier1とTier2に分かれていて、今お見せしたのは、今の段階ではTier2の方で使う予定なんですけど、ひょっとしたら、今日の午前中の会議でも、こっちの方をTier2にした方がいいのではないかという意見が出て、まだ決まっていないのですが、LAGDAという試験があります。ADGDAはたぶん忘れていいのかもしれませんが、LAGDAとAMAの2つは、今後環境省の報告とかに出てくる可能性がありますので、覚えておいてください。

これはアフリカツメガエルを使って16週間見て、生殖腺の異常とかも見るし、肝臓の重量とかを見るし、もちろん甲状腺ホルモンの影響を見るというちょっと長期の試験です。さっきのAMAが3週間なので、こちらの方はちょっと長期の試験でもっと詳しく調べると試験になっています。

メダカの試験のキーワードは

性

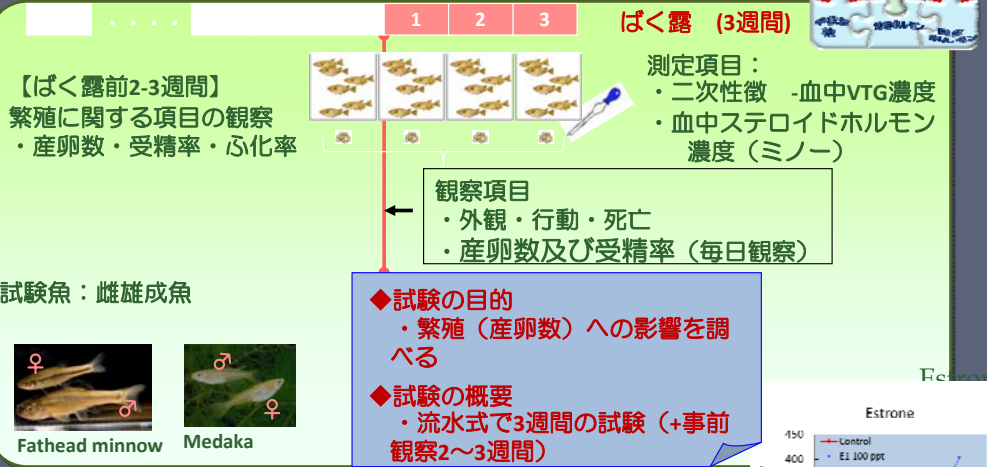
sex



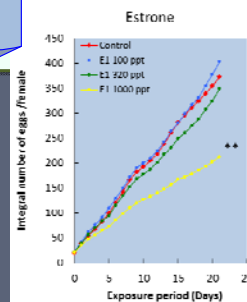
26

メダカの試験のキーワードは「性」なんです。これがメダカのエンドポイントで、守備範囲は赤で囲まれたところです。

魚類短期繁殖試験 (TG229)



- ★スクリーニング試験
- ★ビテロゲニンに加え、産卵数 (生物群存続に関する有害影響) がエンドポイント
- ★米国により提案され、2009年にOECDのTG229として採択され2012年に改訂された。



メダカの試験法で今環境省で取り上げられているのは、テストガイドラインの229番または230番でもいいのですが、229番がメインで取り上げられています。これはどういう試験か簡単に言いますと、雄と雌の成熟したメダカを1つのメダカに入れておくと、卵を産みます。その産んだ卵の数を毎日数えて、化学物質によって卵の生まれる数が減るか増えるかということをはたすら数える。他にもエンドポイントはありますが、これは非常に手間のかかる試験なんです、毎日数えることをやるのです。これはアメリカで開発して、それをメダカに移植した感じの試験法です。ファットヘッドミノーのデータがたくさんですが、今メダカの試験のデータが少ないので、環境省が今、メダカを使った試験をたくさんとろうとしています。

魚類繁殖試験(TG229)の適用

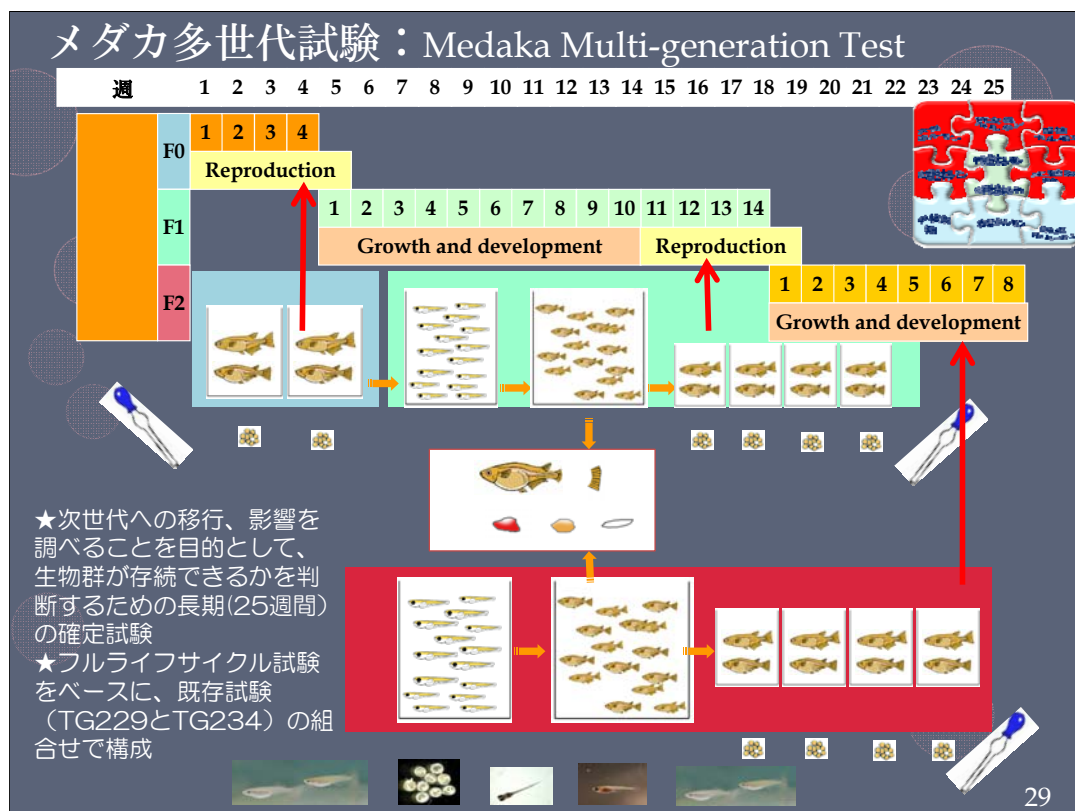


エンドポイント	女性ホルモン		抗女性ホルモン		男性ホルモン		抗男性ホルモン		生殖腺軸	
	オス	メス	オス	メス	オス	メス	オス	メス	オス	メス
生死	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ビテロジェニン	↑	↑	↑	↓	-	↓	-	-	?	?
2次性徴	-	-	-	-	-	↑	?	-	?	?
産卵数	↓	↓	↓	↓	↓	↓	-	-	?	?
受精率	↓	↓	↓	↓	↓	↓	?	-	?	?
詳細	オスのメス化		女性ホルモンが働かない		メスのオス化 乳頭状小突起		男性ホルモンが働かない?		化学物質によって作用が異なる	

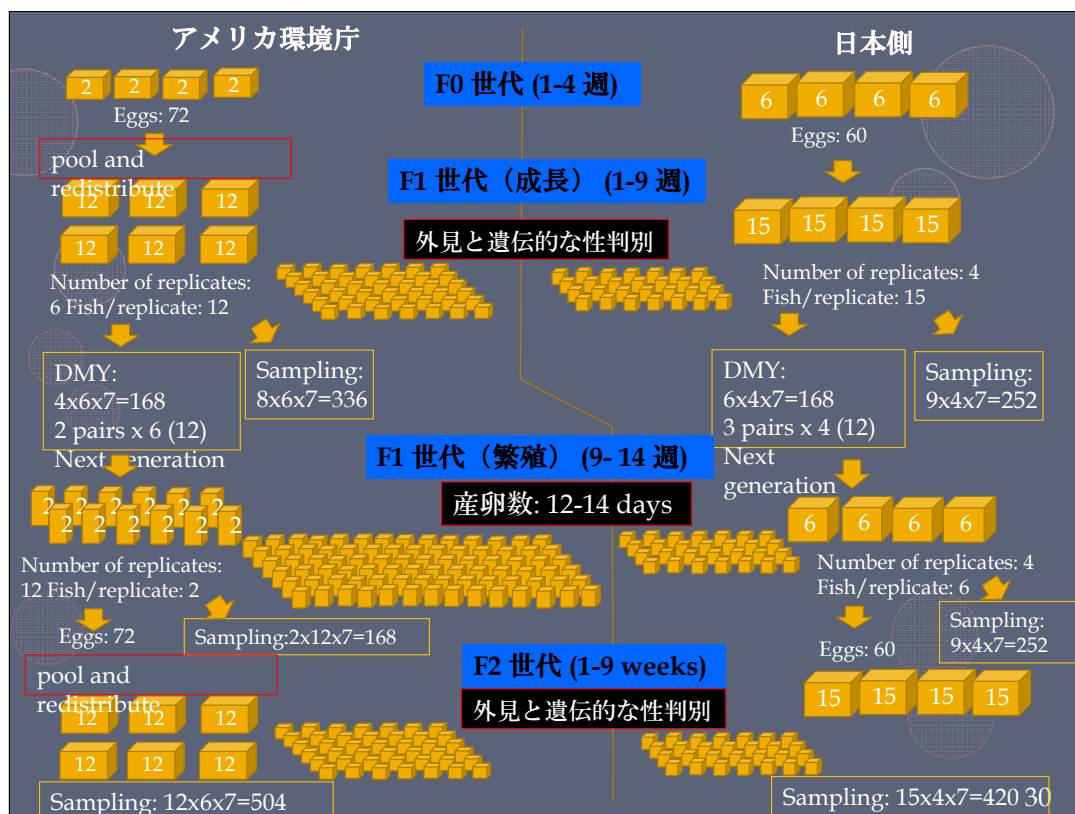
これは、先ほどパズルでお見せしたいろんなホルモンに対して、TG229を使うとどのようになるか。これを説明するとたぶん時間がなくなるので省略します。ただ、女性ホルモン様物質を与えたときにどうなるかというと、ビテロジェニンという、雌化すると増えるタンパクがあるのですが、ビテロジェニンが雄も雌も上がります。女性ホルモンで雄も雌化されるし、雌はさらに雌になるので上がります。

ビテロジェニンという雌化が上がるのに産卵数とか受精率が減るのはなぜかというと、それは雄が雄らしくなくなってしまうからです。雄が精子を出したり、雌を追いかけていたりということをしなくなるので、ここは下がる。例えば抗女性ホルモンを与えたらどうなるかというと、実は雄のビテロジェニンが上がるのです。抗女性ホルモンというのは、女性ホルモンの反対の作用をする、そういう働きをするはずなんです。反対の作用の仕方にはいろんなパターンがあって、この場合、大体多いのが競争阻害なんです。そうすると、弱いエストロゲンが実は女性ホルモンに対しては、レセプターに蓋をして全体の女性ホルモンの活性を下げることになるのですが、雄にとっては女性ホルモンは女性ホルモンなので、弱いながらも上がるときがあります。雌の方は、本来の女性ホルモンが働かないようにブロックされてしまうので下がるのです。産卵数とか受精率も下がります。それは女性の方がやる気をなくすので、たぶん産まなくなってしまうと考えられます。

ここで問題は後半の2つ、抗男性ホルモンと生殖腺軸なんです。生殖腺軸というのは、いろんなことが複雑に絡み合うので難しいのですが、これは、今までの化学物質を見てみると、合成経路とか見て、つまりホルモンの合成系とか作用メカニズムみたいなものはまだ納得できるところがあるのですが、抗男性ホルモンについては、TG229ではわからないということがわかっていて、今、緊急的に抗男性ホルモンのTG229に代わる試験法がないかと思って、新しい試験を開発中であります。つまり、この部分が、229番が欠けちゃうのです。



もう1つ試験法を開発しているのは、メダカの多世代試験というのをやっています。これは、おばあちゃんの影響が孫に出るかまで見る試験法です。これは確定試験で、環境中で検出される低濃度付近で試験をやることになっています。手順としては、親にばく露して、親が産んだ卵を育てて、卵が大人になるまで見て、大人になった娘がたくさん卵を産むか、娘が産んだ卵がちゃんと孵化するかというところまで見る試験なんです。全体で25週間かかります。26週になるかもしれませんが、かかります。これを人間でやると70年から80年かかる試験を25週でやるので、大変な試験なんです、これは魚を使った確定試験ということになっております。



今、アメリカ側と日本側でこの試験をめぐる競争中というか、お互いの意見をぶつけ合っているのですが、何が一番違うかというと、統計的な力がどっちが強いとか、信頼性をやっているのですが、アメリカ側の主張だと、これだけの水槽の数が必要なんです、日本側は若干少ないようにデザインしていて、これも日米の会議でどちらの試験法がいいかということ进行讨论している最中です。

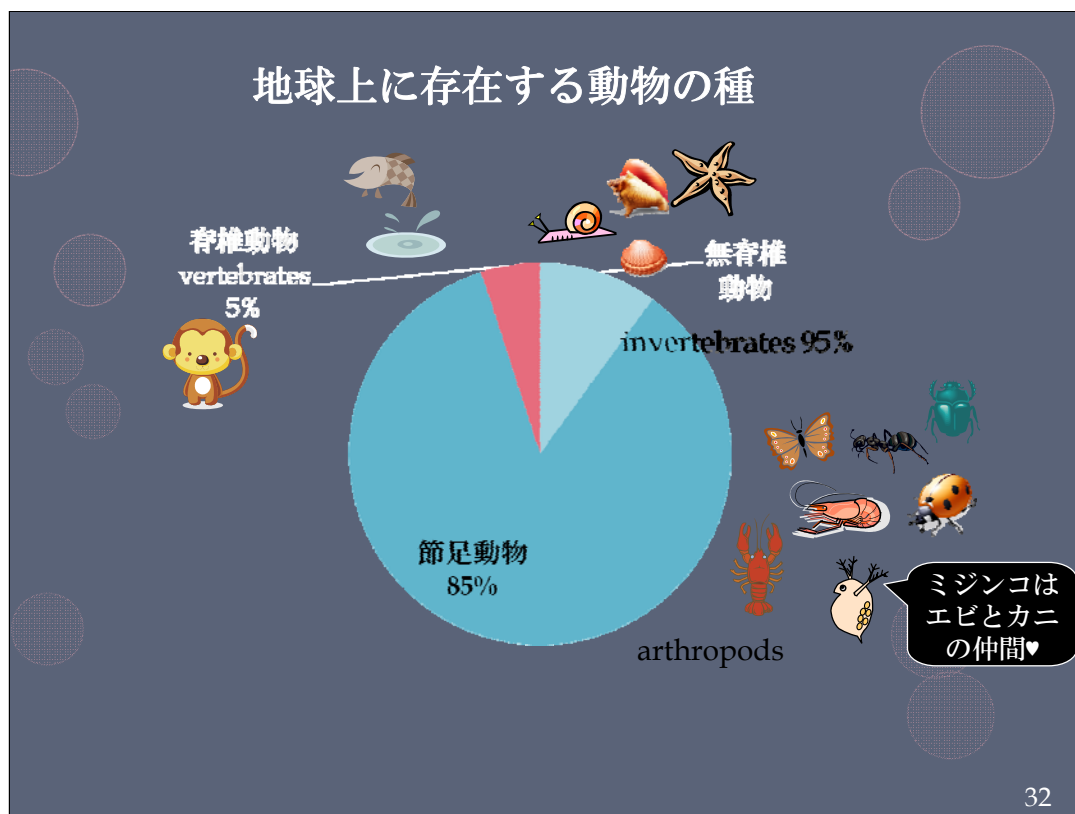
ミジンコの試験のキーワードは

変態と性

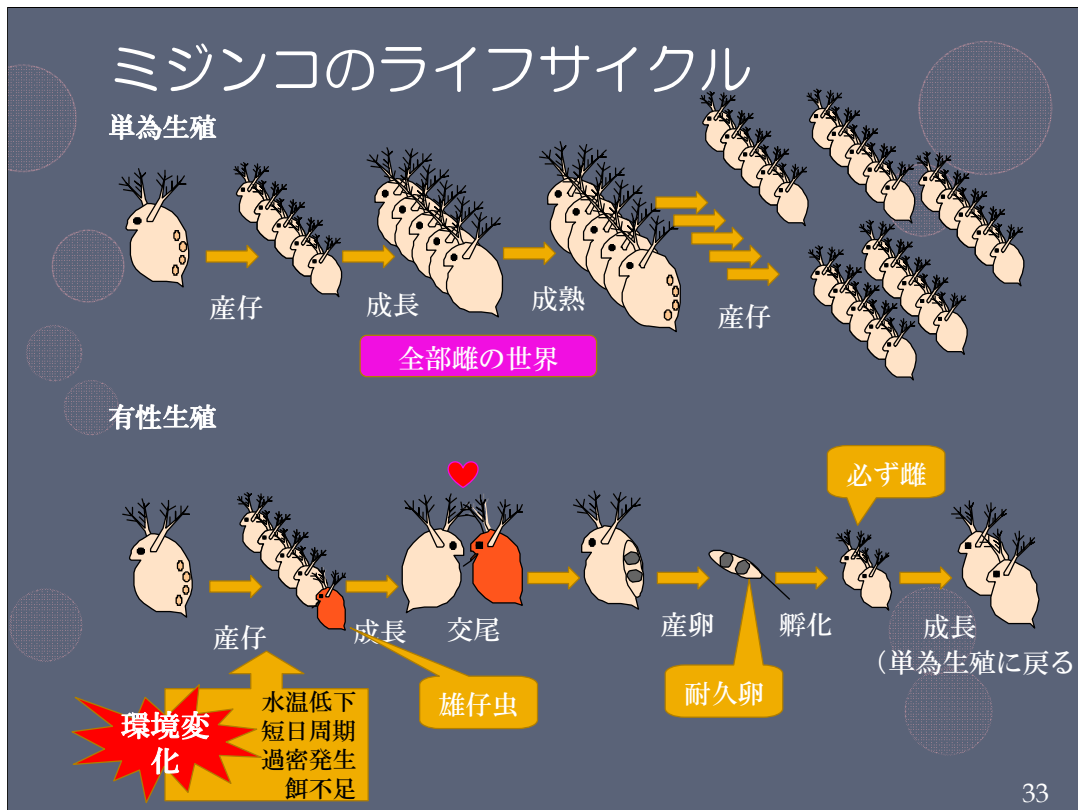
transformation & sex



次に、ミジンコの試験のキーワードは変態と性なんですが、変態といっても、transformationではないかと私は思っているのですが、それとsexです。守備範囲はここになります。



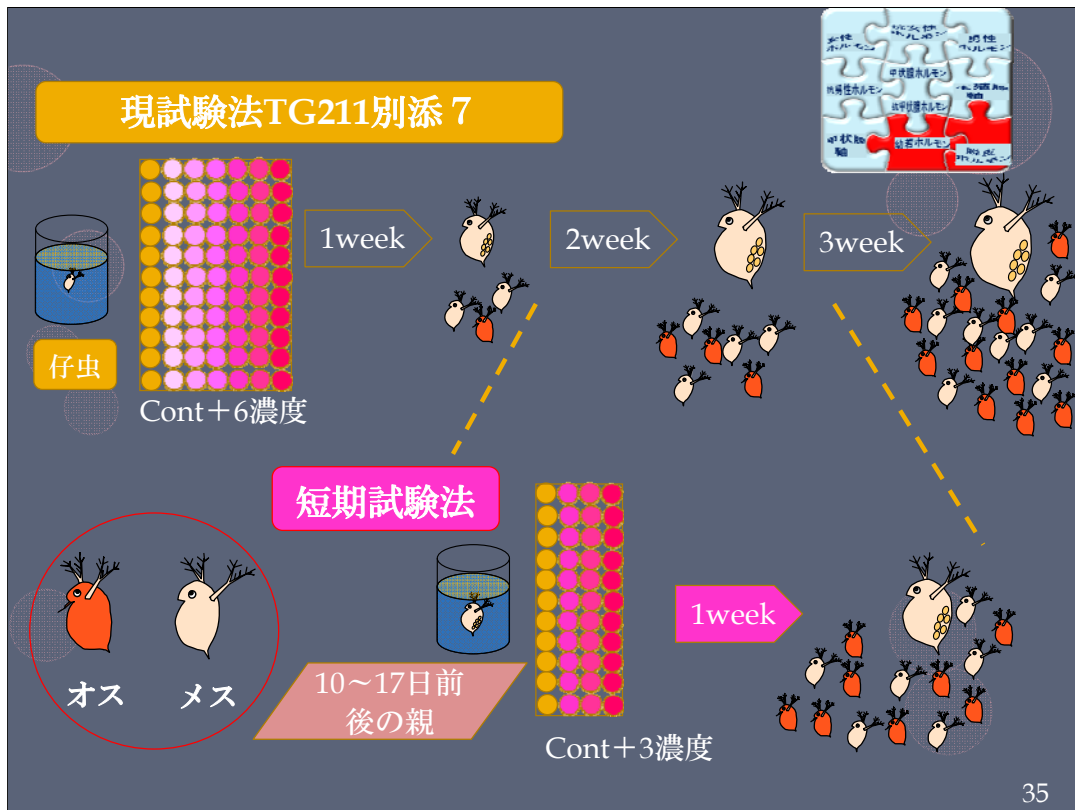
地球上に存在する生き物のほとんどは無脊椎動物なんです。我々脊椎動物は種類でいくと5%しかなくて、無脊椎動物の軟体動物が10%ぐらいいますので、節足動物は85%ぐらい。節足動物というと、エビとかカニ、昆虫などもここに入ります。ミジンコはこのところに入っています。エビとカニの仲間なんです。だから、ミジンコを使えば、大体ここら辺のグループの代表とまではいかないですが、内分泌かく乱の様子がわかるだろうということで、ミジンコを採用しています。



ミジンコのライフサイクルの説明は時間がないので飛ばしますが、ミジンコは単為生殖で、雄と雌が交尾しないでどんどんふえていくのです。つまり、産まれるとこどもを産んで、成長してまたすぐ成熟してこどもを産んでということ、ネズミ算式よりもすごい勢いでふえていきます。時々水温が変わったり、短日周期になったり、過密になったり、餌不足になると、雄が生まれてきて、交尾をして耐久卵をつくって、耐久卵から必ず雌が出てくるのです。必ず雌が出てくると、単為生殖にいくということになります。耐久卵というのは、冬を越したり、砂漠だと乾燥に耐えたり、とにかく地球上で何万年か何億年か知らないですが、生きてきたときにこれは最も重要なタイムカプセルみたいな感じで存在しているものなんですね。



これは向かい合って交尾しているように見えますが、実はミジンコは後ろから交尾するので、これは貴重な写真なんです。こっちが雌で、こっちが雄なんです。雄は斜め後ろから雌のどこかに何かを入れて交尾している最中の写真を撮ったんです。立体的に撮るのが結構大変だったのですが、こういう写真もあります。

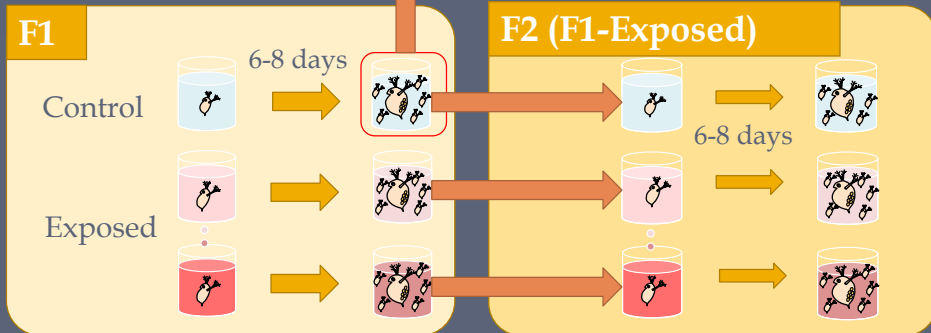


35

TG221の別添7というのは何をやったかという、幼若ホルモン様の物質を与えると、雄が産まれてくるということがわかったのです。今までは環境変化、日照時間を短くするとか、餌がなくなるとか、過密になると雄が産まれてくることはわかったのですが、化学物質によって雄が出てくるのがわかったのです。この試験は3週間かかるので、大変だということもありまして、今、短期の1週間の試験を開発しています。

ミジンコを用いた2世代試験法の開発

- 2世代目で、1世代目のばく露あり・なしで世代効果を評価する
- ニセネコゼミジンコを用いて試験条件の検討や内分泌かく乱物質の評価を実施
- オオミジンコ *Daphnia magna* を用いた試験法ガイドラインを作成し、OECDに提案



36

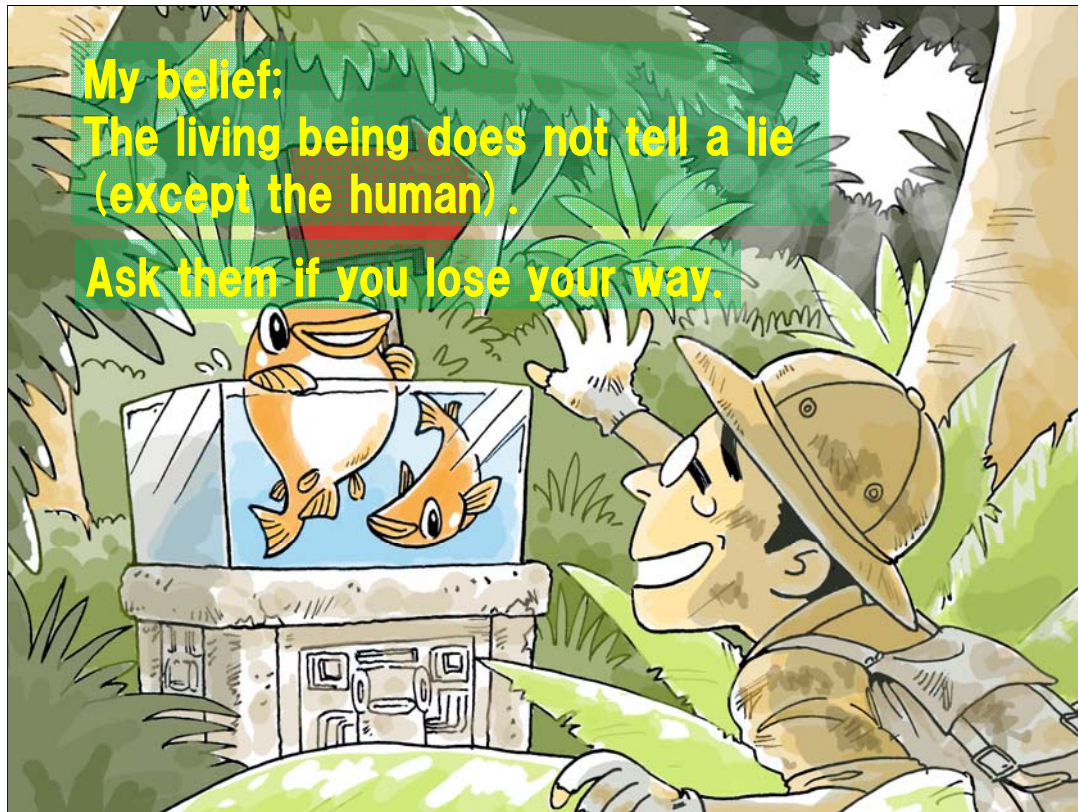
同様に、ミジンコを用いた2世代試験、TG221よりもっと長い試験も開発中です。これは説明すると長くなるのですが、メダカのおばあちゃんの影響が孫に出るまでと同じような試験を、ミジンコを使ってもやりましょうということでやっています。

今後の課題

- カエル試験法の開発
- めだか多世代試験法の開発
- めだか抗男性ホルモン作用検出法の開発
- ミジンコ短期試験法の開発
- ミジンコ多世代試験の開発

37

今後の課題としては、まだまだ作らなきゃいけない試験法がこれだけ残されています。



最後に、これは私の信念なんですが、生き物は嘘をつかない。人間を除いてですが、ですから、私の信念は、もしもわからないことがあったら、生き物に聞け。何か試験を間違えたら、生き物が悪いのではなくて、たぶん人間の方が悪いし、ヒトは嘘をつくけれども、生き物が死ぬ、生きる、ふえる、ふえないということは、何万年も変わってないはずなので、それをもとに基準値を決めていくのはまず間違いないでしょうと思っています。

ご清聴ありがとう
ございました



Title: The little Cyclops Came from Moon.

39

長くなりましたが、以上です。
ご清聴ありがとうございました。