

日本における両性類の内分泌攪乱試験研究の現状

内山 実

富山大学

ご紹介有難うございます。私は両生類、特に無尾両生類の水電解質代謝とそれに関連する内分泌について研究しています。今日は、今年の夏以降漸く日本でも OECD、環境省を中心にして、無尾両生類を用いて内分泌攪乱化学物質に関するスクリーニングと試験方法の研究が開始されるようになりましたので、OECD の第 1 回両生類専門家会議の様子と日本のその後の取り組みとその進捗状況をお話いたします。

両生類は発生、変態を始め、性分化、生理など様々な研究の格好な材料になっている、我々に馴染み深い動物群です。

3 億年以上も昔に脊椎動物の中で初めて陸上に現れましたが、最近 10~20 年間で世界中で 200 種以上の両生類数が激減し、約 20 種が絶滅したのではないかとされています。激減の理由として地球環境の変化や農薬などによる汚染、致命的な病原菌の蔓延など様々な要因が挙げられています。このようなことから、両生類は地球環境汚染の警鐘を鳴らす炭鉱におけるカナリアの役目を果たしているとも言われています。

この様に地球レベルで両生類数の激減にもかかわらず、内分泌攪乱化学物質と両生類に関する調査、研究は一部の研究者によるものを除いて大変遅れておりました。1998 年の第 1 回 EDTA 調査委員会では両生類を用いての試験方法はないとしております。2000 年の第 4 回会議で両生類を用いた試験の必要性が提案され、2001 年の 4 月に OECD のパリ本部で両生類の内分泌攪乱物質の試験法に関する専門家会議が開催されました。参加国名は、デンマーク、フランス、ドイツ、イタリア、日本、スウェーデン、スイス、英国そして米国です。

この会議において、ここにお示しすることが決まりました。

両生類の多くは、幼生としてある期間を水中で過ごし、変態を経て成体になると陸上生活をするようになります。したがって、変態過程において形態学および機能的な変化が生じるわけですが、これには甲状腺ホルモンが重要な働きをしております。甲状腺ホルモンは脳下垂体から分泌される甲状腺刺激ホルモン (TSH)、さらに上位の視床下部ホルモンの甲状腺刺激ホルモン放出ホルモン (TRH) によって調節を受けています。このため、両生類を用いての内分泌攪乱試験には、特に視床下部-甲状腺軸に関するスクリーニングを行なうことが提案され、それについての各国の取り組みが求められました。

日本の取り組みとしては、ここに挙げることを行なっていく予定であることを示しました。視床下部-甲状腺軸に関する研究に加えて、両生類の性分化の問題は大変重要であると考えているからです。

ここに示しますのは、今回の専門家会議で両生類を用いて視床下部-甲状腺軸の内分泌攪乱を調べる研究で対象とする化学物質です。T₃ と T₄ はポジティブコントロール、プロピルチオ尿素はネガティブコントロールです。その他の化学物質は、文献調査により甲状腺への影響が報告されている物質です。日本は有機塩素化合物の副生成物であり、「環境ホルモン戦略計画 SPEED'98」にリストアップされ、2000 年に早急に内分泌攪乱作用を調べるのが要求されたオクタクロロスチレンについて検討することになりました。また、樹脂の原料であり性ホルモン様の作用を有することが報告されているビスフェノール A について、現在研究中の結果を報告いたします。

アフリカツメガエルオタマジャクシにおけるオクタクロロスチレンの急性毒性実験の結果をお示しします。ST48 のオタマジャクシではオクタクロロスチレン処理 72 時間後の LD50 は約 140 μ g/l でした。これは、オクタクロロスチレン処理 24 時間後の肝臓組織のヘマトキシリンエオシン染色の光学顕微鏡像です。コントロール群に比べて、100 μ g/l 処理群では肝細胞の脂肪変性が見られ、リンパ球の浸潤が見られます。1000 μ g/l 処理群では細胞索の萎縮、肝細胞の脱落、減少、脂肪変性、リンパ球の浸潤や壊死細胞が観察され、この個体は肝不全により死亡しました。これらの個体では循環不全による静脈洞の拡張が見られたものの、甲状腺など内分泌腺への影響は光学顕微鏡レベルでは明らかではありませんでした。発達ステージが進むにつれ、オクタクロロスチレン毒性に対する抵抗性が増加しました。

これは、ドイツなどのグループが提案してリングテストを行なっている XEMA (Xenopus Metamorphosis Assay 法) にしたがって、オクタクロロスチレンについてスクリーニングを行なった結果です。これは縦軸に発達段

階を Newkoup のステージ表に基づいて示します。横軸は当該溶液の処理期間を示します。処理開始時の発生段階は ST48-49、4 週間後には ST57-58 に成長します。4 週間処理までが XEMA 法ですが、我々は変態完了まで調べてみました。ドイツなどがリングテストで使用していると同一の餌と環境水 (0.025 g/1 海水) は *Xenopus laevis* を 4 週間で、ほぼ ST58 まで安定して成長させました。エチレンチオ尿素処理では ST53 のままで、他の群は発達段階の著しい群からオクタクロロスチレン 50 μ g、25 μ g、T4 1 μ g/l、コントロール、オクタクロロスチレン 10、1、5 μ g/l 群となりましたが、コントロール群との間に有意差は見られませんでした。ここに示しました T4 濃度は 1 μ g/l です。T4 濃度 8 μ g/l 処理では 1 週間目に既に ST54 まで発達し前肢の出現や頭蓋骨の変化が見られるなど体が貧弱なまま変態が進みました。

オクタクロロスチレンの影響を *Xenopus Metamorphosis Assay* により、調べた結果です。縦軸は各群のオタマジャクシを 3 日毎にデジタルカメラで撮影し、全長と尾長を測定した結果を示します。Assay 法がオクタクロロスチレン 50 μ g/l 群はコントロール群と比較して、全体長の発達が著しい傾向がありました。一方、低用量では成長が遅れ、発達が乏しい傾向がありました。

これは、ツチガエル (*Rana rugosa*) のオタマジャクシを甲状腺ホルモンの 1 種である T_3 で処理する方法を用いて、尾の退縮に対する BPA の効果を調べた結果です。まず、stage11 (T.K.) に達したツチガエルオタマジャクシを、脱塩素水道水 (untreated およびグループ 3) もしくは BPA を添加した脱塩素水道水 (グループ 1 およびグループ 2) で 7 日間飼育しました。次に、先に述べた飼育環境の下で、グループ 2 およびグループ 3 に属するオタマジャクシを、 5×10^{-8} M の T_3 で 24 時間処理しました。最後に、 T_3 処理の後、オタマジャクシを、はじめに述べた飼育環境の下で再び 4 日間飼育しました。なお、尾長の計測に当たっては、 T_3 処理の開始時を 0 日目としました。また、尾長の変化は、0 日目を 100% として相対的に示しました。このグラフから明らかのように、グループ 3 では、 T_3 処理によって、尾の退縮が観察されました。これに対し、グループ 2 では、 T_3 処理を行ったにもかかわらず、尾の退縮が観察されませんでした。以上から、BPA は、 T_3 による尾の退縮を阻害する効果を持つことが認められました。したがって、BPA は、甲状腺ホルモンの作用を阻害する効果を持つことが示唆されます。

プロテオームは、様々な生物学的プロセスやメカニズムに迫るための、有効な手段の一つです。そこで、先程示した実験の終了後、各グループの個体より尾および肝臓を採取し、タンパク質を抽出して二次元電気泳動を行いました。これは、尾より抽出したタンパク質を二次元電気泳動した結果です。ここで、オレンジ色に示したスポットは、無処理の個体の二次元電気泳動像と比較して発現量が増加したスポット、ピンク色に示したスポットは無処理の個体の二次元電気泳動像と比較して発現量が減少したスポットを示しています。

このように、タンパク質の発現は、各グループで大きく変化していることが明らかとなりました。つぎに、興味深い変化を示したスポットを示します。

このスポットは、グループ 3 (T_3 処理) の個体でのみ発現が増加します。グループ 2 の個体では、 T_3 処理を行っているにも拘わらず、このスポットに変化は認められません。したがって、このスポットは、BPA による尾の退縮の阻害に直接的、あるいは間接的に関わっていることが示唆されます。

次に、先程示した実験終了後、各グループの個体の肝臓より抽出したタンパク質を二次元電気泳動した結果を示します。先程と同様に、オレンジ色に示したスポットは、無処理の個体の二次元電気泳動像と比較して発現量が増加したスポット、ピンク色に示したスポットは無処理の個体の二次元電気泳動像と比較して発現量が減少したスポットを示しています。

このように、肝臓についても、尾の場合と同様に、タンパク質の発現が、各グループで大きく変化していることが明らかとなりました。つぎに、興味深い変化を示したスポットを示します。

99L に示したスポットは、グループ 3 の個体でのみ発現が増加します。グループ 2 の個体では、 T_3 処理を行っているにも拘わらず、このスポットに変化は認められません。したがって、このスポットは、BPA による尾の退縮の阻害に直接的、あるいは間接的に関わっている蛋白質であることが示唆されます。一方、52L に示したスポットは、グループ 2 およびグループ 3 の個体で発現が増加します。そして、このスポットは、無処理およびグループ 1 の個体では変化が認められません。つまり、 T_3 処理により特異的に発現が上昇するスポットです。したがって、このスポットは、尾の退縮に関わっているが、BPA の影響を受けない蛋白質であることが示

唆されます。プロテオーム解析により、内分泌攪乱化学物質による内分泌攪乱作用のメカニズムの解明や、内分泌攪乱作用を検出するマーカーを探索できると期待しています。

次に、トランスジェニックカエルによる内分泌攪乱化学物質のスクリーニング方法の開発について紹介します。甲状腺ホルモンは、両生類の変態を制御する分子であり、そのシグナルを伝達する核レセプター (TR α 、 β) も同定されています。TR は、RXR (Retinoid X receptor) とヘテロ二量体を形成し、甲状腺ホルモン (T $_3$) 存在下、あるいは非存在下において甲状腺ホルモン応答配列 (Thyroid hormone responsive element: TRE) と総称される DNA 配列と結合することにより遺伝子の転写を制御しています。

そこで、TRE を備えた *Xenopus* TR β A1 遺伝子の転写開始点近傍 1.6kbp (−1300~+300) の配列の下流に EGFP (Enhanced Green Fluorescent protein) 遺伝子を挿入したプラスミド (pEGFP/xTR β A1) を作製しました。そして、このプラスミドを用いて、トランスジェニックカエルを作製しました。

ここに、トランスジェニックカエルの作製手順を示します。はじめに、雄より採取した精子から精子核を調整します。次に、この精子核とプラスミドとを混合した後、雌より採取した未受精卵に精子核移植することにより、トランスジェニックカエルを作製します。

プラスミド (pEGFP/xTR β A1) を導入したトランスジェニックオタマジャクシおよびカエルについて、T $_3$ に対する応答性を評価しました。はじめに、トランスジェニック幼生について説明します。左図に示したように、NF ステージ 51 において、飼育水に、T $_3$ を 1 nM となるよう添加して、EGFP の発現を経時的に観察しました。すると、試験開始後 3 日目には蛍光の上昇が見られ、試験開始後 5 日目にはさらに強い蛍光を確認しました。また、肢芽および神経系で顕著な応答を示しました。また、右図に示したように、トランスジェニックカエルに対して、飼育水に、T $_3$ を 1 nM となるよう添加して、EGFP の発現を経時的に観察しました。その結果、幼生の試験結果と同様に、試験開始後 3 日目には蛍光の上昇が見られ、試験開始後 5 日目にはさらに強い蛍光を確認しました。したがって、化学物質を飼育水に添加し、その蛍光強度を測定することにより、TR を介したシグナル伝達系の攪乱作用を評価できることが示唆されました。

次に、すでに作製したトランスジェニックカエル個体群の性成熟を待って、これらを野生型カエルと交配することにより F $_1$ を得ました。アフリカツメガエルは、一度に数百~千個程度産卵するので、外来遺伝子の伝達を受けた第二世代 (F $_1$) を獲得できれば、トランスジェニックカエルを用いて多様な化学物質群の評価を実施することが可能となります。F $_1$ の個体をステージ 51 まで飼育した後、飼育水に T $_3$ を 1 nM となるよう添加してその応答性を確認したところ、第一世代のトランスジェニックカエルと同様に、試験開始後 3 日目には蛍光の上昇が見られ、試験開始後 5 日目にはさらに強い蛍光を確認しました。また、肢芽および神経系で顕著な応答を示しました。以上から、トランスジェニックカエルの次世代は、T $_3$ に対する応答性に関して、世代を超えて伝達されていることが明らかとなりました。トランスジェニックカエルは、TR を介したシグナル伝達系の攪乱作用を評価するための、有用なツールとなりうると考えています。

環境省が都道府県別のメッシュマップを用いて、数年おきに実施している分布調査によっても、分布や個体数の変動などは充分につかみきれていない状況です。これは、1999 年と 2000 年の日本における奇形カエルの観察された地点を赤丸で示しました。原因については、一部を除き明らかではありません。

これは、1964 年に報告されたヤマアカガエルの雌雄同体の顕微鏡写真です。この個体は右側に精巣、左側に卵巣を持ち夫々の生殖巣はよく発達していました。右側は、2000 年に各種の日本産カエルの精巣において観察された精巣卵です。カエルにおいては、盛んに精子形成を行なう精巣中に卵細胞が観察されました。自然界においてはこのような雌雄同体や精巣卵の存在することが、欧米では 1920 年代、国内でも 1950 年代頃には報告されています。しかし、この現象が無尾両生類の性分化の特色であるのかどうかについては明らかにされていません。

ここに群馬大学の花岡、三上先生が開発している *Xenopus laevis* を用いた化学物質の女性ホルモン効果試験法を紹介します。正常カエルの性染色体は雌ヘテロの ZW 型です。雄カエルを女性ホルモン処理すると遺伝的に無関係に成熟した雌に成ります。この性転換雌と雄を交配すると、次世代オタマジャクシは 100%性染色体 ZZ の雄個体です。内分泌攪乱が疑われる化学物質を含む環境水中で飼育して、変態終了後の性を形態学的に観察します。この方法により、化学物質による雄の雌化を定量化して示すことができます。

これは女性ホルモン処理による精巣卵の形成を示した光学顕微鏡写真です。

これは今回お示しした雄 *Xenopus* オタマジャクシを女性ホルモンあるいは DES を含む飼育水で変態完了まで処理した結果です。Estradiol-17 β 処理群、Diethylstilbesterol 群共に雄を雌化させることが、この方法により定量的に表すことができます。

両生類とくにカエル類は、生活史からも或る種類の内分泌攪乱化学物質研究のための良いモデル動物であるかもしれないと思われます。そこで我々は以下のように考えています。

1. 両生類における内分泌攪乱物質の影響について、スクリーニング試験を継続します。
2. XEMA に加えて、日本のカエルでスクリーニングを行ないます。
3. 両生類の野外調査と分析(分布、体内の化学物質の蓄積、ホルモンレベルなど)について、研究を継続します。

今回の発表に際して、この方々に御手伝いいただきました。この場を借りてお礼申し上げます。

質疑応答

クーター：どうもありがとうございます。質問はございませんか？はい、どうぞ。

ピックフォード：アストラゼネカ社のドン ピックフォードです。非常に興味深いお話をありがとうございます。私はビスフェノール A による尾吸収の抑制に関するデータに興味深いと思いました。我々の研究室では、*Xenopus laevis* (アフリカツメガエル) とあなたが使用された濃度に達するまでのビスフェノール A を使用して外因性の T_3 を併用することなく幼生による慢性試験を実施しましたが、我々の場合、幼生の発生への影響が見られませんでした。

この矛盾は種間差に起因するものと思われますか、それとも正常な発生とは別に外因性の T_3 刺激物質を使用したという事実に起因するものと思われますか？

内山：私は分かりません。さらに多くの他の種を試して精査すべきだと思います。また、我々はまだアフリカツメガエルについては精査していません。

ピックフォード：ありがとうございます。

クーター：ありがとうございました。他に質問はございませんか？そろそろ時間が来たようです。