

ディスカッション 「カエル・哺乳類/甲状腺ホルモン」

座長	吉里 勝利 (広島大学) 井口 泰泉 (岡崎国立共同研究機構)
パネリスト	ユンボ シ (米国 国立衛生研究所) バーバラ デメニーク (フランス 国立自然史博物館) ロバート J. デンバー (米国 ミシガン大学) ミンジャー ツァイ (米国 ベイラー医科大学) ジャック サマリユ (フランス 国立高等師範学校リヨン校) シューヤン チェン (米国 国立がん研究所)

吉里: 本日午後のミーティングの最終セッションによるこそお越しくございました。本日は既に 2 つのセッションを聞きました。一つは両生類のプレゼンテーションで、もう一つは哺乳類です。3 つ目は、ご紹介しました通り、両生類と哺乳動物のグループのジョイントミーティングです。

このスライドを注意してご覧ください。アブストラクト集に記されています通り、このセッションの題名は「ディスカッション カエル・甲状腺」です。しかし、私はタイトルを「カエルと哺乳類に関するディスカッション」に変更したいと思います。前の 2 つのセッションを考えると、皆さんはこの変更を（私が行いたい理由を）ご理解いただけると思います。

甲状腺ホルモンの応答については、哺乳類と両生類の間にいくつかの軽微な差がありますが、甲状腺ホルモンに影響を受けるプロセスの大部分はこれら 2 つの種の間で非常に共通性があると思います。従って、私はディスカッションのタイトルを「カエル・甲状腺」に代えて、「カエルと哺乳類」にしたいと思います。

初めに、いくつかのスライドを使って、このセッションをあらかじめ紹介したいと思います。私たちは、このセッションのためのプランを準備しましたが、中断やフリートークを歓迎します。

このセッションの始めに、私は両生類の変態プロセスに対するビスフェノール A の影響についてお話しします。そして、シ博士は、哺乳類、特にヒトとの関連で、両生類を観察する方法、および、内分泌攪乱において甲状腺ホルモンがどれほど著しく変態するかという 2 つの問題をお話しされます。

3 人目のプレゼンター、サマリユ博士は、シ博

士のディスカッションにコメントします。デメニーク博士は、内分泌攪乱作用の試験に関する OECD の提案および推奨すべき試験について我々が何らかの意見の一致が得られるかについてお話しされます。デメニーク博士のディスカッションに対してはヨーロッパのエキスパートがコメントします。最後に、井口博士が結論を提示されます。

この午後のミーティングの最初のセッションでは、私は、甲状腺軸に影響を及ぼす化学物質のアフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) 遺伝子導入を利用した検出に関するいくつかの最近のデータをお見せすると申し上げました。皆さんはこれらの TR β A1 プロモーター配列は良くご存知だと思います。

このスライドから、甲状腺ホルモン（トリヨードチロニン、T₃）とビスフェノール A (BPA) にはいくつかの類似性があることをお分かりいただけると思います。BPA は、様々な種類のプラスチックを調製したり作成したりするための化学物質です。これは、人工プラスチックを作るために非常に広く使用されている単量体の化学物質です。T₃のこの基本構造と比べると、この化合物はこの部分が欠けていますが、ビスフェノールは共通しています。BPA はヨウ素原子がなく、その代わりにメチルがあります。従って、構造には若干の差があります。

我々は、両生類の変態における代表的な現象の 1 つであり T₃により誘発されるオタマジヤクシの尾の後退を、このビスフェノール A が抑制することを発見しました。我々は、この濃度の T₃でこれらアカガエル (*Rana*) オタマジヤクシを処理しました。これは実験を観察するときの対照です。縮小または尾の吸収は黄色の線で示しています。T₃

に応答した良好な尾の後退が見られます。

しかし、 T_3 だけでなく、この濃度の BPA でオタマジャクシを処理すると、抑制には顕著な差がありません。濃度は非常に高く、このレベルで持続しますが、濃度に著しい差はありません。しかしとにか、BPA はオタマジャクシの尾の後退に対する T_3 の作用を著しく抑制します。

次に、最初のセッションでお話した方法を用いて我々は遺伝子導入オタマジャクシを作成しました。アフリカツメガエル (*Xenopus*) 甲状腺ホルモン受容体 $\beta A1$ 遺伝子およびリポーター遺伝子として EGFP を含むこのベクターを使用して、アフリカツメガエル (*Xenopus*) を用いた生殖細胞遺伝子導入を行いました。

これは T_3 です。そしてこれは潜在的な甲状腺ホルモン T_4 と TRIAC と TETRAC です。これらの化学物質は、この動物の甲状腺ホルモン様応答を誘発させる非常に高い効力があります。これらの化学物質は甲状腺ホルモンの研究で非常に一般的に用いられています。これらのグループとこれらのグループには差があることがご覧頂けます。

まず、これは一種の陽性対照実験です。我々は遺伝子導入オタマジャクシを 0.1nM から 1.0 nM までの濃度で T_3 と T_4 に暴露させました。使用した濃度の差にご注意ください。これは非常に高い濃度です。恐らく、この濃度 10 nM の T_4 では若干の EGFP 応答を見ることができます。また、ここでは T_3 に対する若干の応答も確認できますが、 T_4 に比べると、ずっと低い濃度です。

TRIAC のこれらの濃度と TETRAC のこの濃度にオタマジャクシを暴露させる方法で同じ実験を実施しました。リポーター遺伝子を発現させることによって、遺伝子導入オタマジャクシが TRIAC と TETRAC に対して非常に顕著に応答したことに注目してください。この用量反応曲線は、これらの甲状腺ホルモン様化学物質に誘発された EGFP 蛍光発光の強度の範囲を示しています。

1.0 nM の T_3 に対してはこの応答が見られ、 T_4 に対しては若干少ない応答が見られます。これは非常に理由が明らかで予測通りです。また、他の実験から予測した通り、天然の甲状腺ホルモンと比較すると TRIAC と TETRAC はオタマジャクシから強い応答を誘発させました。

一方、ビスフェノール A は遺伝子導入オタマジャクシの EGFP 蛍光発光に影響を及ぼしません。我々はこれらの様々な濃度の BPA を試験しまし

た。これは対照で、 T_3 で誘発された応答ですが、この濃度の BPA では EGFP 蛍光発光を発現させる応答はありません。これは、TRIAC と TETRAC による応答とは非常に異なります。

しかし、このグラフを見ると非常に面白い点があります。ビスフェノール A は、 T_3 で誘発される EGFP 蛍光発光を抑制している点です。これは T_3 のみです。これは 20 時間後で、後ろ足に若干の応答が見られます。この応答は、ビスフェノール A により用量依存的に抑制されます。これは 1.0 nM で、これは BPA の等モル濃度です。BPA の 1,000 倍高い濃度では完全に EGFP を発現する応答を消去します。

これは前の写真の結果を定量的に示したものです。これは T_3 に対する応答です。このとき同時に BPA を投与すると、用量依存的に T_3 による応答を低下させます。

これは、ビスフェノール A による T_3 作用の抑制の機序に関する我々の現在の考え方です。ご存知の通り、受容体によりこの受容体は下流遺伝子を活性化します。BPA の存在下では、恐らく、BPA が T_3 と競合するか、または恐らく BPA の存在が T_3 による活性化反応のプロセスを阻害します。ここに共同研究者を紹介いたします。ご清聴ありがとうございます。

パネリストの皆さん、ステージの方へお越しくださいませんか。予定にしたがって、まず、シ博士に 2 つの問題についてお話し頂きます。シ博士、どうぞお願いします。

シ: 話をするのではなく、皆さんがコメントできるように問題提起をしたいと思います。なぜなら、両生類を専門に取り組んでいる研究者として、実際のところアフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) に取り組んでいますが、内分泌攪乱に関して根本的に 2 つの疑問があるからです。

1 つ目は、我々は本日の講演から知りましたが、甲状腺ホルモンに依存する変態が、多くの非内分泌攪乱化学物質により影響を受けることです。しかし、疑問なのは、逆の質問をするとしたら、自然界には両生類発生の異常や欠陥がたくさんありますが、そのうちのどれが、内分泌攪乱の可能性のある化学物質に起因しているのか、また、ヒトの健康を害するという観点からの政策決定が実際に重要なのかということです。

すなわち、変態に関しては、内分泌攪乱の可能

性のある化学物質の検出または発見におけるモデルとして、発見用ツールとして、どれほど重要なのでしょうか。それが、聴衆の皆さんの誰かまたはパネリストのうちの誰かに答えていただきたい1つ目の質問です。

2つ目の質問は、私は両生類を専門に研究していますが、私が知りたいのは、内分泌攪乱が哺乳類やヒトに関係があることを世界の他の人々に納得してもらうためには、両生類生物学者として我々は実際に何をしなければならないかということです。

すなわち、我々が何かを発見したときに、人々を納得させるためには、何を示すことが必要でしょうか。また、薬品や疑わしい化学物質の継続的使用を許可または禁止する政策の決定に、それはどれくらい重要でしょうか。それについて皆さんを納得させるには、両生類研究からはどのような証拠が必要でしょうか。それが私の質問です。そして私にはその答えがありません。

吉里：分かりました。恐らく、サマリユ博士がこれについていくつかコメントがあるのではないのでしょうか。

サマリユ：シ ユンボ博士の2つ目の質問にコメントできるかもしれません。私が感じているのは、内分泌攪乱が疑われる化学物質のスクリーニングを両生類だけで行ってはならないと言うことです。いくつかの哺乳動物モデルでもスクリーニングを行う必要があると思います。これには2つの理由があると思います。

第一の理由は、いくつかのプレゼンテーションでも示されましたが、若干異なる結合親和性があることです。例えば、担体タンパクに対するPCB類の結合親和性はカエルと哺乳類では異なります。もう1つの理由は、これらの化合物のいくつかは哺乳類と両生類では代謝が異なることです。

そして3つ目の理由があります。それも恐らく非常に重要です。すなわち、アイソフォームが数多くあると言う意味で、哺乳類では両生類よりも受容体の多様性が幅広いことです。例えば、私は良く分かりませんが、 $\beta 2$ とか $\beta 3$ 、少なくとも $\beta 3$...恐らく $\beta 2$ 。両生類に $\beta 2$ はありますか。

シ：まったく同じではありません。

サマリユ：また、 α のアイソフォームはどうかと言うと、明らかに両生類には $\alpha 2$ はありません。なぜなら $\alpha 2$ は哺乳類に非常に特異的だからです。また、短縮型アイソフォーム、いわゆるデルタ α も哺乳類に非常に特異的です。そして非常に最近ですが、ATAのミーティングでこれらの短いアイソフォームが T_4 とリバース T_3 に特異的に結合するが、 T_3 には結合しないことが提唱されています。

明らかにこれらすべての遺伝子によってコード化されるタンパク質に関してはいくつかの大きな差があります。このことは、内分泌攪乱が疑われる化学物質を試験する際に、念頭においておく必要があると思います。

吉里：受容体の多様性については、あなたの講演でダブルノックアウト α/β マウスが延命することを聞いて非常に驚きました。恐らく、いくつかの未知の機序についての考えをお持ちではありませんか。

サマリユ：明らかに $TR\gamma$ はありません。我々はヒトゲノムのスクリーニングを行いました。甲状腺ホルモンに対し3番目の核受容体のように見えるものは何もありませんでした。Karolinska研究所のBjorn Vennstromは、ダブルノックアウトミュータントで T_3 結合をいくつか行っていますが、特異的な結合を示す証拠は得られていません。従って、 $TR\alpha$ と $TR\beta$ と同様の親和性を持つ3番目の受容体はありません。

申し上げておきたいのは、ダブルノックアウトミュータントが生きてはいますが、非常に注意深く制御された実験室環境にあるということです。そして、これらの動物は例えばB細胞の生産に著しい異常が見られることが分かっています。私は、これらの動物は自然環境の攻撃性への耐性はないと思います。従って、我々は注意することが必要です。私はこれらの動物が、とにかく、正常ではないことは分かっています。

吉里：聴衆の皆さんから甲状腺ホルモン受容体の多様性についてのコメントや質問を受けたいと思います。質問はございませんか。はいどうぞ。

質問：コメントしてよろしいですか。サマリユ博士への質問です。質問は、甲状腺ホルモンの非核作用についてです。ご存知の通り、ステロイドホ

ルモンが膜受容体を介して作用する可能性を示す証拠が増えています。それは甲状腺ホルモン作用と発生に対してはどれぐらい重要ですか。

サマリユ：甲状腺ホルモンのいくつかの非ゲノム作用については何年も議論が続いています。今のところ、私にはその答えがありません。しかし、我々が現在所有しているダブルノックアウト動物から、この質問に答えてみましょう。我々はその分野ではまだ何もしていません。

しかし、ATAのミーティングで提出されたいくつかの最近のデータを見ると、先ほど言及したこれらDNAを結合しない短縮型アイソフォームは、細胞質にだけ配置されています。そして、アメリカのグループにより、それらがT₄またはリバースT₃に結合でき、それが結合を開くと、これらのタンパク質が細胞におけるアクチンのネットワーク再編成を変化させることが示されています。従って、まだ明確な証明はなされていませんが、これらのアイソフォームが甲状腺ホルモンのこの非ゲノム作用の媒介体であるかもしれません。

チェン：私も非ゲノム作用について一言付け加えたいと思います。サマリユ博士が今お話された細胞質ゾルに存在している可能性があるタンパク質に加え、いくつかの膜作用を介していると考えられる非常に急速に生じる作用がいくつかあります。従って、それは、甲状腺ホルモンの非ゲノム作用であると見なすべきもう1つの側面です。

ツァイ：私もサマリユ博士が述べられた注意点に一言付け加えたいと思います。マウスとヒトにおける薬剤の代謝は非常に異なります。また、カエルと哺乳類とはさらに異なるに違いないと確信しています。マウスとヒトの生体異物受容体CARの特異性は、恐らく両者の食物に起因して、非常に異なっているため、それらは完全に異なる必要条件があります。

従って、この攪乱物質の代謝も非常に異なるに違いないと思います。しかし、私はこのために環境中の攪乱物質の試験へのカエルの使用をやめることはできないと思います。カエルは発がん物質や他の攪乱物質の試験に簡単かつ安価に利用できるからです。初回試験ではバクテリアを用いたエームズ試験が行われていますが、その結果が完全に人間に適用されることを意味してはいません。

しかし、少なくともこれは、初回試験として用いるべきです。その後、最終的に、ヒトにおける試験に戻る必要があります。

シ：私は1点付け加えたいと思います。ツァイ博士は両生類を使用すべきだと述べたと思います。しかし、実際、内分泌攪乱化学物質についての私の限られた知識によると、内分泌攪乱化学物質であることが最初に発見されるのは、非常に多くの場合、野生の両生類に影響を与えたことによります。

実際、最近の1つの例は、恐らく議論の余地がありますが、確かに多くの関心を惹きつけているアトラジンです。アトラジンは両生類に影響を及ぼすことが確認されていますが、問題は、その知識をいつになったら解釈したり、受け入れたり、あるいは他の動物種や哺乳類で証明したり、検証したりできるのかということです。なぜなら、この化学物質が哺乳動物に影響を及ぼしていることが示され納得されるまでは、政策立案は行われなからです。

従って、問題は、どのようにしてものごと迅速に対処したら良いかということです。なぜなら、両生類における発見から実際の政策の変更には何年もかかりますが、この時間を短縮するために利用可能な既存の知識やツールを活用することにより、我々ができる方法が、両生類を始めとして存在するからです。

デメニーク：私は吉里博士が賛成されるかどうか分かりませんが、これは、OECDの試験に関する提案についての考えに取り入れるべきことではないでしょうか。

吉里：そのとおりです。

デメニーク：ある論文が最近発表されており、それによると、最初に両生類を使用すべきであること、両生類のみに限定するものではありませんが、使用されるべきであるとしています。ここにいる大部分の方はそれに賛成すると思います。しかし、それらは試験の第一のレベルとして使用されると言うことです。そして、試験は哺乳類でも行われなければなりません。

我々が両生類を使用するのならば、問題となるのは、どのような種類のテストを行うべきかとい

うことです。28日間変態アッセイに多くの努力が注がれており、非常に興味深いアッセイですが、それが28日間を要するアッセイであり、そこでは28日間にわたり動物を監視し、次に組織検査を行わなければならないという欠点があります。

問題提起しなければならないのは、ゲノミクスや生殖細胞遺伝子導入、体細胞遺伝子導入における大きな進歩を、変態アッセイによる試験と組み合わせることが可能な短期間の試験の開発に活用できないかということ、また、使用すべきアッセイをどれくらい迅速に作成することができるかということ、また、どの動物種にアッセイを適用すべきかということ、また、どれくらい迅速に社会全体で試験を実施することができるかということです。

これらは、内分泌攪乱の可能性を試験することが必要な数多くの分子を評価するための優れたモデルを獲得しようと考えているならば、大変重要な問題です。

吉里：バーバラ、OECDの最近の活動を簡単に概説して頂けますか。恐らく聴衆の大部分の皆さんはOECDの活動についてあまり分かっていないと思います。

デメニーク：この数ヶ月間に、多くの国の専門家に非常に広範囲にわたる文書を見直すよう要請しました。それら文書とは、試験の種類、動物の種類、実験動物であれば *tropicalis* と *laevis* のどちらか、試験に野生動物を含めるべきかどうか、28日間変態アッセイの他に別の試験を使用するとすれば、DNAアレイを導入すべきか、また、試験が適切な期限内に準備できるかどうかといった問題を取り扱っている文書です。

ここにいらっしゃる方の多くが、米国環境保護庁が作成したこの草案をご覧になっていると想像します。とにかく、米国の何らかの機関が作成したことは間違いありません。

吉里：あとで、聴衆の皆さんからコメントを頂きたいとおもいますが、その前に、OECDは、カエル、つまり両生類を環境中の攪乱物質を検出する目的で利用する可能性を現在検討しているのですか。

デメニーク：はい、検討しており、両生類委員会

があります。

吉里：この場合、どの両生類種が標準とされるのでしょうか。これは非常に重要な問題です。

デメニーク：はい、これは非常に重要な点だと思います。これが、私が手短かにそれを取り上げた理由です。なぜなら、我々が実験動物を使用する場合、*Xenopus*であれば、*laevis*にするか、*tropicalis*にするかを決定しなければなりません。このことについては、ほとんどの方が同意されると思います。どの動物を使用すべきか、どのような種類の試験が適正かつ最も効果的にそれらの動物に適用できるかについては、我々は何らかの意見の一致に達する必要があります。

井口：私は聴衆の中の2人の科学者、ドイツのWerner Kloas博士と米国のJoseph Tietge博士をお招きしたいと思います。マイクのほうへ来て頂けますか。我々は、この国際的な会合の前にサテライトミーティングを開きましたが、そこでお二人は非常に興味深いデータを示されました。お二人が行っておられることとOECDの目的について要約して頂けますか。

Tietge：私は米国環境保護庁で働いており、我々は14日間を要する略式のアッセイに取り組んでいます。このアッセイでは *Xenopus laevis* を使用し、前変態相を使用しています。

いずれにしても、その14日間のプロトコルで非常に良好な感受性を得ています。典型的な合成抑制剤であるメチマゾール、過塩素酸塩、6-PTUを使用し、8日以内に相当な組織学的変化が得られますが、それは我々にとって重要です。なぜなら、我々の見解では、発生の遅延は甲状腺に特異的な作用とは区別するか突き止めることが必要であり、少なくとも甲状腺の組織学的データは甲状腺に特異的な作用が継続していることを示すとしているからです。

このアッセイは拡張することもできます。また、いくつかの分子生物学的手法もあり、我々はそれを現在使用しています。それについてはここでは詳しく取り上げませんが、我々は遺伝子アレイを使用しており、これはアフリカツメガエルの甲状腺経路に特異的なアレイで、関連性がある遺伝子または我々が関連性が高いと判断した遺伝子の配

列を明らかにし、いくつかの生化学的測定を行うために使用しています。しかし、基本とするアッセイは、前変態相を用いた 14 日間アッセイです。

ここにいる Werner にマイクを譲る前に、少しだけコメントしたいと思います。我々は数年前に受容体に着目することから始めました。その後、デンバー博士が指摘したように、甲状腺作用に関する作用の大部分が受容体を介しておらず、大部分に代謝による甲状腺ホルモンの取込みと合成が関与していることを知りました。それで、私は、受容体作用があることを示した証拠はあまりないことを忘れてはならないと考えました。

シ博士、あなたの質問にお答えするとすれば、生命体に保存されている多種多様なプロセスを両生類や哺乳類とその他の種との間で厳密に比較することが両生類の研究者に課せられていると思います。それにより、どのようなプロトコルが採用されるとしても、どのような点でそのプロトコルに強さがあり、どのような点で観察した作用を他の種に外挿できるかを理解することができます。

Kloas : 我々はリング試験を行いました、残念ながら、それは私がドイツに戻って 14 日後でなければ発表の用意が整いません。バーバラが述べたように、その試験は 28 日間試験系に基づいており、我々もステージ 48 から 50 の前変態期のオタマジャクシで試験を開始しました。

理論的には、あなたが既に言われたように、甲状腺ホルモンのポジティブな作用を模倣するいくつかの物質が環境中に存在する可能性があります。前変態のステージから開始する場合は、より良い検出感受性が得られます。また、エンドポイントとする発達段階を定めていれば、ポジティブな作用を検出する感受性がさらに向上します。

しかし、我々は我々のデータとリソースが互いに実際に一致していることを確認しています。従って、確実なところでは、これはそのような試験系の大きな推定ですが、非常に単純な試験であり、発達段階を観察する場合は、4 週間、つまり 28 日間にわたり観察するような場合、確実な方法としては、変態の際に変化するものすべてを含めることになるでしょう。例えば、結合タンパク質、あるいは酵素誘導や酵素の分泌なども含めることになるかもしれません。

従って、我々は 48 から 50 で開始します。標準的なコントロールの平均的最終段階はステージ

59 から 60 となります。これで恐らくすべてをカバーすると思います。さらに、バイオマーカーを得るための遺伝子発現に関していくつかの試験を行いました。TR β の発現を観察する場合は、1 日間だけ動物を暴露させると、TR β の mRNA の発現の 8 倍から 10 倍の著しい増大が非常に初期のステージで得られます。従って、ステージ 50 を使用する場合は、迅速に結果を得るためには良いステージですが、ポジティブな作用に限定されます。

これらすべてを考慮すると、つまり、シンプルで実際的な理由を確立し、生態毒性試験に関心を持つ世界中のすべての研究室が実施できる試験を開発するとすれば、形態学的エンドポイントが非常に良いのではないかと思います。もちろん、何か他の方法を加えることによって我々がこれを実証できるとしたら、それはそれで異論はありません。素晴らしいことだと思います。以上です。

吉里 : 今お話しいただいたヨーロッパの科学者お二人に対するコメントはありませんか。

ツァイ : カエルをヒトのようにするというものについて言及されました。完全にそうすることはできませんが、カエルの人間化は 1 つの方法であると思います。

人間化されたマウスを得るためには、2 つのものを変化させる必要があると思います。1 つは TR で、もう 1 つは生体異物代謝を司る CAR です。私は、カエルの CAR をヒトの CAR に、また、カエルの TR をヒトの TR に代えることができると思います。それを行えば、このカエルは少なくともある程度はヒトに類似してきて、従って環境中の攪乱物質のスクリーニングに使用することができると思います。

吉里 : 優れた提案です。

チェン : 私は、ある種のアッセイがあるのではないかと考えていました。つまり、非常に特異的な代謝産物が存在し、その代謝産物は、限られたある条件下で周囲に分泌され、比色分析で測定可能であり、そしてこの代謝産物は甲状腺ホルモンに特異的な代謝産物であるというものです。このような代謝産物があれば、アッセイを単純にすることができるだろうと思いました。

ちょっと質問ですが、ユンボ、発生の特定のス

ページで両生類により分泌されるこのような代謝産物で、利用可能であり、酵素作用から生じるある種の代謝産物を知りませんか。これは質問ですが、それがあれば、分析を単純化できると思います。

例えば、ヒトでは尿中の代謝産物を測定します。変態のあるステージでオタマジャクシまたはカエルにより分泌されるある種の代謝産物があるのではないかと考えています。そして、容易かつ便利にある種の比色分析または蛍光法で測定できるならば、その代謝産物を使用することができると思います。これは質問ですが、可能性があるのではと思っています。

コメント：コメントしてよろしいですか。ありがとうございます。ちょっとフォローしておきたいと思います。なぜなら哺乳類のことについての質問が出たからです。1つ付け加えておくと、OECDプログラムでは、甲状腺に特異的な作用をスクリーニングするためのげっ歯類を用いたスクリーニング法の開発も含んでいます。それらの作用は、発生と平行して進んでおり、カエルの変態を用いた分析法で観察されます。

実際に、6月のOECD-EDTAミーティングでKuder博士が段階的な検討プロセスの初期の段階で哺乳類においてマルチモデルタイプのスクリーニングアッセイが必要であることを講演されたときには、素晴らしいディスカッションが行えるという大きな期待がありました。我々は、そのようなタイプのアッセイの開発、標準化、および検証を進めています。ありがとうございます。

吉里：コメントをありがとうございます。

サマリユ：この哺乳類とマウスのスクリーニングについては、あなたがどんな種類のテストについて考えておられるのか分かりませんので、もう少し情報を提供していただくことができると思いますが、私の考えでは、我々が観察しなければならないのは、DNAチップを用いた遺伝子発現だと思います。これらは、様々な組織における甲状腺ホルモン応答性遺伝子の発現に関係があります。

これが最も感受性が高いアッセイであると思います。なぜなら、組織検査の変調を観察しようと思っても、または期待していても、膨大な数の化合物を使用しなければ、それらを見ることはでき

ず、意味がないからです。

デンバー：その通りです。これらのスクリーニングアッセイは、全身を用いた動物モデルを基にするとします。従って、エンドポイントである甲状腺ホルモン濃度や組織病理に焦点を置くこととなります。実際、使用する必要がある化合物の量には限度があり、もちろん、感受性と特異性の問題もあります。

しかし、実際にOECDの検証活動では、妥当性、信頼性、感受性、特異性などは、答えを発見しなければならぬ種類の問題とされています。恐らく、最終的に、哺乳動物試験系で評価する化合物として、カエル変態アッセイや他のタイプの両生類を使用するアッセイの化合物と同じタイプの一連の化合物を使用するかもしれません。

次に、特定のクラスの化学物質や今ある情報よりもっと情報が必要な化学物質にはどちらが最良のアッセイか比較して、決定することになります。あるいは、本質的に分子により重点をおいた別の研究を行うことになるかも知れません。我々は両方の試験に関してまだ初期の段階にいますが、それらは平行して進行中です。

サマリユ：私は1点付け加えておきたいと思います。我々は組換え型マウスを作成しており、それは甲状腺ホルモンのリポーターマウスです。標識したリポーターを有するこのマウスを使用して、我々は体のどこに甲状腺ホルモンがあるかを観察することができます。

このマウスは、例えば、甲状腺ホルモンの結合を阻害する化合物や甲状腺ホルモンを模倣する化合物のスクリーニングに使用できます。また、このマウスを使用して、特定の組織を分離したり、このリポーターシステムを含んでいる細胞系や特定の組織から分離した細胞系を作成したりできます。

吉里：我々は2種類の優れた動物を獲得していることが分かりました。それらは甲状腺ホルモンへの応答が優れている動物、つまり哺乳類と両生類です。私の意見では、多くの、もしかしたら両生類についてはそんなに多くはないかもしれませんが、科学者が、哺乳類と両生類における甲状腺ホルモン作用の機序に関心を持っています。

しかし、私の意見では、これらの2つのグルー

プ、2つの大小のグループは、つまり哺乳類グループは非常に大きく、両生類グループはそれほど大きくないという意味ですが。これらの2つのグループは、甲状腺ホルモンの作用機序に関する限り、たぶん同じ研究をしています。けれども、これらの2つのグループは完全に分離されており、情報交換が行われていません。これらの2つのグループがより頻繁に連絡しあって、アイデアや問題を交換する必要があると思います。

内分泌攪乱化学物質を検出するためには、我々は哺乳類と両生類に対する甲状腺ホルモンの作用を総合的に理解する必要があります。バーバラ、OECD 本部はパリにありますので、あなたはOECDの最近の活動についてご存知なのではないですか。これらの2つのグループが合流するような傾向や活動はありますか。

デメニーク：残念ながら、パリに住んでいるからと言っても、私に特別なアクセスがあるわけではありません。広島にいるのと同じだと思います。

しかし、そのうち2つの委員会の間で会合が開かれると思います。それはまったく当然だと思いますが、我々は専門家として、2つの委員会が作業をこれ以上進める前に、この考えを提案する必要があります。すなわち、これらの問題のいくつかを徹底的に議論するために共同会議を行うことが必要だと提案することが必要です。

吉里：その通りです。私が知る限り、今回は哺乳類と両生類に関するジョイントミーティングを行うことができた最初の機会です。従って、これは記憶しておくべきミーティングであると思います。

デメニーク：確かに、その通りです。それは非常に重要なポイントです。

サマリユ：私は、今回は、その分野におけるある種の国際的行動を起こすのに優れた機会であると思います。これは同時に複数の国によって支援される可能性があります。

デンバー：最後に、1つ言わせてください。これまでのところ、我々は、哺乳類とヒトのためのモデルとして、どのように両生類を使用すべきか話しました。しかし、我々は、生物学的多様性の保護を考慮することが非常に重要であるという事実

を見失うべきではないと思います。おそらくこれらの化合物がどのようにヒトに直接影響を及ぼすかのみに焦点を置くことよりも重要です。

両生類はこれまでも様々な面で指標動物種と見なされています。両生類は生息環境の悪化を検出することができます。そして、両生類が失われることは、ヒト集団にとって非常に意味をもつことです。なぜなら、ある化合物へのヒトの暴露が生じたときに何が起こるかを示してくれる指標となるからと言うよりも、生物の多様性が失われることは、我々が注意することを怠ってはならない重要な問題であるからです。

吉里：甲状腺ホルモン作用の生体異物の側面に戻りましょう。まず、デンバー博士、あなたは無尾類の発生または変態に対するPCB類の影響について優れたデータを示されました。哺乳類と両生類の間におけるPCB類の影響を比較して頂けますか。

デンバー：短く答えると、結合タンパクの競合と甲状腺ホルモン代謝の変調に関しては若干の類似性があります。私は多くの類似性があると思いますが、指摘しましたとおり、結合タンパクの特異性に関しても差があると思います。

しかし、それよりもずっと複雑なのは、両生類には哺乳類とは非常に異なる生活史があります。両生類は非常に異なる環境に住んでいます。従って、両生類が内分泌攪乱の疑われる化学物質を取り込んだり暴露したりする方法も当然異なります。

それが重要だと思います。既に言及しましたが、これらの化合物の取り込みとその代謝は、恐らく、化合物が核受容体と相互作用する可能性と同程度かそれ以上に重要です。しかし、究極的には、甲状腺ホルモンのアベイラビリティが変調されれば、受容体の活性化または受容体のリプレッサー機能が影響を受けます。

デメニーク：私はその点について強調しておきたいと思います。なぜなら、私はこれらの14日間および28日間アッセイが重要であるということを確認しますが、それらのアッセイでは全身の動物生理が考慮されることになるため、受容体に対する何らかの影響が、ある時点で存在しない限り、甲状腺ホルモンや甲状腺組織の発達に対する影響を観察することはできません。

たとえ我々がこれらの一般に信じられている非ゲノム作用を考慮したとしても、我々が現在知る限りでは、組織や発生で観察する何らかの影響は、核受容体レベルにおける影響に99%の確率で関与しているに違いありません。

デンバー: そうです。しかし、本当の問題は、甲状腺機能の攪乱であり、そしてその後に見られる表現型が甲状腺機能の攪乱の結果なのかどうかということです。なぜなら、例えばPCB類は、甲状腺機能に対する影響やホルモンに対する影響を大きく超えて、直接的神経毒性作用を及ぼすことができるからです。従って、観察される表現型が実際に甲状腺攪乱の影響であるかどうかを評価することは、非常に難しいと思います。

実際に、ビスフェノールAについて吉里博士に質問があります。それは取り込みについての質問とこれらの化合物を投与する方法についてです。これは、あらゆるアッセイを開発する上でも重要な問題です。通常は、化合物を水中に配置することで、オタマジャクシに投与します。あなたがビスフェノールAを投与している方法はこれですか。

吉里: そうです。

デンバー: ビスフェノールAが甲状腺ホルモン受容体の機能を変調せずに、T₃の取り込みを変調する可能性はありますか。すなわち、我々が設計する実験や分析法で考慮しなければならないのは投与経路です。なぜなら、オタマジャクシは環境からものを取り込み、そのことが、水にT₃を加えることにより変態が促進されるという考えのもとになっているからです。その取り込みは、恐らくこれらの工業的に生産された化合物によって変調されることがあります。

吉里: しかし、ご存知の通り、ビスフェノールAと甲状腺ホルモンの間には若干の構造上の類似性があります。

デンバー: そうです。しかし、構造上の類似性は、PCB類と甲状腺ホルモン受容体と相互作用する他の化合物のモデリングに基づいています。私は、それが実際に受容体と相互作用するかという問題の論点なのか疑問です。化合物がいくつかのトランスポーター分子、恐らく、膜トランスポーターに入

り込み、そのシステムに栓をしてしまうことがあると思います。

デメニーク: ビスフェノールAに関しては、受容体からT₃を外してしまうことを示した文献がつい最近発表されています。

コメント: 我々の以前の研究課題は、ビスフェノールAの性分化への影響と発生における性分化の観察でした。T₃とビスフェノールAとの間の作用に関して提出されたものと同じデータだと思います。あなたもエストラジオールを用いた陽性対照実験をいくつか実施されたと思います。

そこには若干の相互作用があり、あなたはエストラジオールに関する疑問に言及しなかった、また類似した投与を行っているとは言われなかったと思いますが、同時に尾の後退が減弱します。2日前にポスターセッションでもいくつかのデータが示されていたと思います。そのようなものです。私は、それがT₃の取り込みの問題だとは思いません。私は、この考えを支持します...

デンバー: ビスフェノールAではそうでしょうが、他の化合物にも適用することはできないと思います。

コメント: そうです。

吉里: オオフサ博士はいらっしゃいますか。ビスフェノールAについてコメントはありませんか。

オオフサ: 我々は、受容体リガンド結合アッセイを用いた実験を行うことを計画しています。ビスフェノールAが甲状腺ホルモンとその受容体間の相互作用を阻害するかを調査します。

吉里: これであなたの質問に十分に答えていますか。

デメニーク: 私は、約4週間前に「Endocrinology」に発表された論文があったことを指摘していたのです。その論文は、ビスフェノールAにより受容体からT₃が外されることを示していました。それが私の指摘したかったことです。

吉里: ありがとうございます。

私が最初のセッションで皆さんにご覧頂いた通り、甲状腺ホルモンは、オタマジャクシの真皮の成長と分化に大きな影響を及ぼします。サマリユ博士への私の質問ですが、あなたは TR β と α に関するダブルノックアウト遺伝子導入マウスを作成されていますが、皮膚の発生への何らかの影響に気付かれませんでしたか。

サマリユ：我々は皮膚の発生への表立った影響は見ませんでした。我々が観察したこと、そしてまだ詳しくは観察していないが何かが存在し、興味深いことは、我々はこれらの動物で若干の創傷の治癒に異常を観察したことです。

吉里：ありがとうございます。皆さん、このセッションに対する提案やコメントは他にはありませんか。また、聴衆の皆さんからはございませんか。では、次に井口博士から結論を述べて頂きたいと思います。

井口：私は結論については何も考えていません。このシンポジウムの初めに我々はサテライトミーティングを行いました。広島には非常に優れた両生類研究所があります。吉里教授はその研究所の一員です。このシンポジウムでは、我々は甲状腺ホルモンについて論じることにしていました。

我々は、人への甲状腺ホルモンの影響とカエルを用いた甲状腺ホルモン類似作用の解析の2つのセッションを予定していましたが、我々はこれをどのように運営すればよいかと思案しました。そこで、私は2つのセッションを一緒にすることを

提案しました。それが、私がここにいる理由です。皆さんが椅子に座ってくだされば、私は何もしなくてすむというわけです。

今回は非常によいディスカッションだと思います。私は、OECDの検証マネージメントを担当しています。そしてもちろん、我々はカエル、魚類、鳥類について研究しています。鳥類とはウズラです。カエルについては、ただカエルのことだけを考えていますが、このカエル試験系をヒトのために使用する場合は、バイアスが生じます。しかし、我々はカエル自体についても考える必要があります。

カエルは、変態や性分化などのためだけに存在するわけではありません。従って、この会合は非常に良い開始点だと思います。私は、我々が哺乳動物の側で独自に取り組むことができる甲状腺システムを考えています。そして、私は、両生類と哺乳類の双方がそれぞれ独自に研究することができるかどうか考えています。そして、その後ときどき集まって、進捗や相違点や整合性を論じるのが良いと思います。

私は、今回のディスカッションが、甲状腺ホルモンまたは甲状腺ホルモン受容体のこのキーワードについて考える良い開始点であると思います。しかし、我々は、哺乳類、カエルなどの両生類だけではなく他の種も含めた全ての種で構成される環境について考える必要があります。

優れたディスカッションを行ってくださったこと、このディスカッションの時間に参加して下さったことに感謝いたします。このセッションを終了したいと思います。ありがとうございました。