

ExTEND2005 における両生類試験法開発について

【これまでの取組】

化学物質の内分泌かく乱作用の両生類への影響を評価するにあたり、アフリカツメガエル等を試験動物とし、①変態アッセイ、②性転換試験、③ビテロジェニンアッセイなどのスクリーニング手法を開発してきた。また、変態アッセイ、性転換試験に際し、正常な個体の成長、発生を定義するため、④アフリカツメガエルの標準データベースおよび⑤人為的に作出した ZZ(雌)* と、ZZ(雄) とを交配することにより得られた F₁(全雄)* による性転換試験標準データベースを作成した。あわせて、試験管内試験として、アフリカツメガエル・エストロゲンレセプター(ER α)への結合能力を測定するレセプターバインディングアッセイを開発した。

これらの取組に関しては、これまで開催された 3 回の経済協力開発機構(OECD)両生類専門家会合の中で、日本の取組成果として全て公表してきた。なお、OECD において、両生類の変態アッセイの標準化を目的としたリングテスト(試験法の有用性や妥当性等を検証する目的で、同一試験を同一条件で複数の機関により実施するテスト)が平成 15 年より開始され、これにフェーズ 1 から参加してきた。

平成 16 年度より、12 月の第 3 回生態影響試験法のためのマネジメントグループ(VMG-eco)会議で承認されたフェーズ 2 のプロトコルに基づき、試験対象物質として選定された 3 物質(イオパノ酸 ; IOP、テトラヨードチロニン ; T₄、パークロレート ; PER)を用いた試験を、平成 17 年度まで 2 年に渡り実施した。さらに、平成 16 年 6 月の OECD 第 2 回両生類専門家会合において、その情報整備の重要性が確認されたニシツメガエル**の標準データベース作成を行った。

平成 17 年度には、化学物質の視床下部—下垂体—甲状腺軸への作用メカニズムを理解し、変態アッセイの妥当性を保証する上で必要不可欠な情報を整備するため、異なる作用メカニズムにより視床下部—下垂体—甲状腺軸に対し内分泌かく乱作用を惹起する化学物質(テトラヨードチロニン ; T₄、プロピルチオウラシル ; PTU、イオパノ酸 ; IOP)を、変態アッセイに準じてニシツメガエル幼生にばく露し、T₄ をばく露したニシツメガエル幼生における遺伝子発現を、ディファレンシャル・ディスプレイ法を用いて解析し、泳動パターンの変化が明瞭に異なる 80 個の遺伝子を同定した。

(参考)アフリカツメガエルとニシツメガエルとの比較

*野生型アフリカツメガエルの染色体型はZWである。

**ニシツメガエルは、アフリカツメガエルと比較して世代時間が短く、かつ染色体が

種	アフリカツメガエル (<i>Xenopus laevis</i>)	ニシツメガエル (<i>Silurana tropicalis</i>)
倍数性	偽4倍体	2倍体
染色体数(本)	18	10
ゲノムサイズ(bp)	3.1×10^9	1.7×10^9
世代時間(年)	1.5-2.0	0.5-1.0
生息場所	陸水域	陸水域
至適温度(°C)	16-22	25-30
体長(mm)	100	40-50
卵径(mm)	1.0-1.3	0.6-0.7
産卵数(個)	500-2000	1000-3000

二倍体であるという利点を有し、両生類における新たな試験動物として着目されている。

【平成18年度事業の成果】

① OECD リングテストフェーズ3への参加

平成18年度は、フェーズ3のプロトコルに沿って、試験対象物質として選定された1物質(ベンゾフェノン2;BP-2)を用いたばく露試験を実施した。また、平成19年1月の第5回VMG-ecoにフェーズ2の結果を報告した。

② 両生類の視床下部—下垂体—甲状腺軸に対する内分泌かく乱作用発現のメカニズムに関する研究

T₄ばく露で同定された遺伝子に対してデータベースの照合による整理を行うとともに、リアルタイムPCRによる発現パターンの再現性を確認した。さらに、作用メカニズムを理解するための、遺伝子機能解析の手段として、また、化学物質の作用点を推定するためのモデル動物として、トランスジェニックニシツメガエルの作製に向けた準備を行った。

③ 両生類の生態影響評価手法の研究

ニシツメガエルに陽性対象物質(エチニルエストラジオール；EE2)を変態完了までばく露し、定期的に発生段階、全長、頭胴長、後肢長、体重について形態学的な測定を、生殖腺、甲状腺について組織学的な観察を行い、データベースを作成した。

【今後の取組方針】

国際的な取組であるOECDへの協調を継続する。具体的には、フェーズ3の取りまとめとともに、テストガイドラインの提案に向けた取組を推進する。また、現在はアフリカツメガエルのみを試験動物として使用しているが、平成16年度および平成18年度において標準データベース作成を行ったニシツメガエルを試験動物として含めることを提案していく。さらに、試験法開発を補完するために、視床下部一下垂体一甲状腺軸への作用による変態促進・阻害の作用メカニズムに関する研究を推進する。

＜両生類試験に関する OECD の動きと日本の取組＞

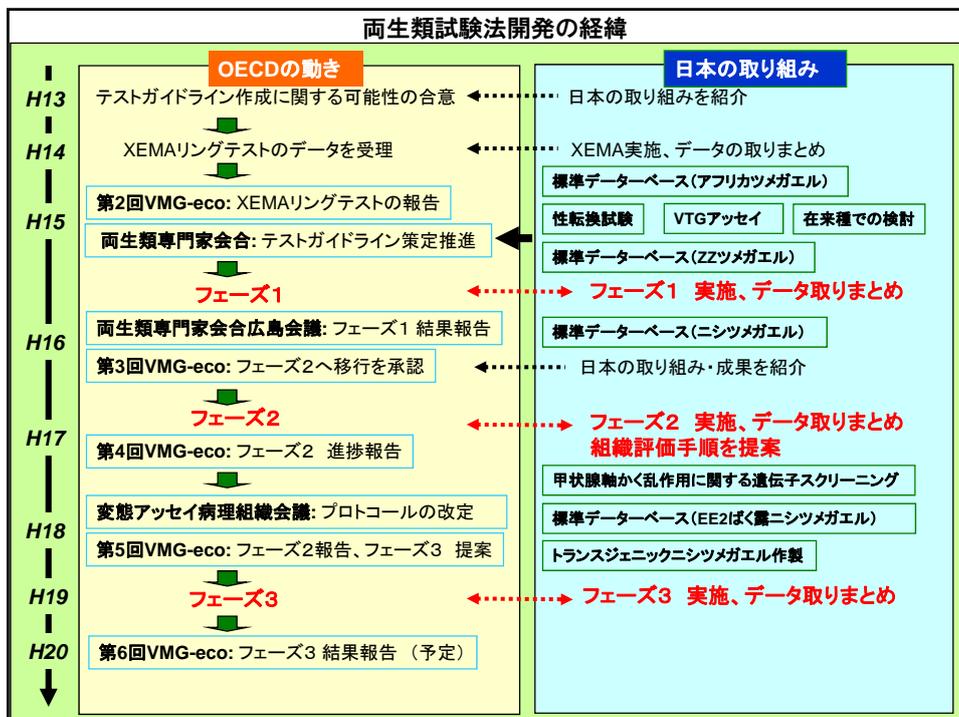
年月	OECD の動き	日本の取組
2001 年 4 月	第 1 回両生類 Expert Consultation ・変態アッセイのテストガイドラインの作成に関する可能性の合意	日本の取組を紹介 ・両生類の変態に関する研究 ・トランスジェニックカエルの研究 ・ホルモン測定法の研究 ・在来種の組織学及び形態学的データ蓄積 ・性転換試験
2002 年 12 月	・『Ringtest: Effects of Pesticides and Other Chemicals on Thyroid System in the Amphibian <i>Xenopus laevis</i> 』を受理	ドイツが 2001 年に提唱した XEMA(<i>Xenopus</i> Metamorphosis Assay)のデータをドイツとともに取りまとめ、『Ringtest: Effects of Pesticides and Other Chemicals on Thyroid System in the Amphibian <i>Xenopus laevis</i> 』として、OECD に提出
2003 年 3 月	第 1 回 VMG-non animal	日本の取組を紹介 ・アフリカツメガエル培養肝細胞を用いた VTG アッセイ ・レセプターバインディングアッセイ
2003 年 5 月	第 2 回 VMG-eco ・XEMA Ringtest の報告 ・米国 Draft DRP について議論	日本の取組を紹介 ・在来種(ツチガエル)を用いた変態試験の開発 ・VTG 試験法の開発

2003年6月	<p>第1回両生類専門家会合</p> <ul style="list-style-type: none"> カエル変態アッセイの OECD テストガイドライン作成推進 	<p>日本の取組を紹介</p> <ul style="list-style-type: none"> ツチガエル変態試験の試験条件の設定 トロピカリス変態試験の試験条件設定 トロピカリス cDNA ライブラリの構築と遺伝子クローニング アフリカツメガエルパーシャルライフテストの提案 ビテロジェニン測定キットの開発 アトラスデータベースの構築 ZZ 雌を用いた性転換試験 トランスジェニックカエルの作製と利用 プロテオーム解析
2003年9月	<ul style="list-style-type: none"> Proposal for Phase 1 of the Validation of the Amphibian Metamorphosis Assay を受理 	フェーズ 1 の試験条件を取りまとめ、米・独とともに OECD に提出
2004年1月	<ul style="list-style-type: none"> フェーズ 1 開始 	フェーズ 1 実施
2004年3月	<ul style="list-style-type: none"> 右記ワークショップを、変態試験に関する両生類専門家会合として承認 	<p>「両生類における内分泌かく乱化学物質試験法に関する国際ワークショップ」を広島において開催</p> <ul style="list-style-type: none"> フェーズ 1 結果報告
2004年6月	<p>第2回両生類専門家会合</p> <ul style="list-style-type: none"> フェーズ 1 のデータを承認 フェーズ 2 への移行の承認 	<p>フェーズ 1 の試験結果の提出</p> <p>フェーズ 2 のプロトコル案の提出</p> <p>日本の取組を紹介</p> <ul style="list-style-type: none"> ツチガエル変態試験の試験条件の設定 トロピカリス変態試験の試験条件の設定 トロピカリス cDNA ライブラリの構築と遺伝子クローニング アフリカツメガエルパーシャルライフテストの提案 ビテロジェニン測定キットの開発 アトラスデータベースの構築 ZZ 雌を用いた性転換試験 トランスジェニックカエルの作製と利用 プロテオーム解析
2004年12月	<p>第3回 VMG-eco</p> <ul style="list-style-type: none"> Draft Report of Phase 1 of the Validation of the Amphibian Metamorphosis Assay の報告 Phase 2 of the Validation of the Amphibian Metamorphosis Assay の承認 	
2005年2月		フェーズ 2 実施
2005年9月		フェーズ 2 のばく露試験終了
2005年12月	<p>第4回 VMG-eco</p> <ul style="list-style-type: none"> Draft Report of Phase 2 of the Validation of the Amphibian Metamorphosis Assay の進捗報告 	

2006年1月	OECD 両生類変態アッセイ病理組織会議 ・ Phase 2 Frog Metamorphosis Assay Histology: 1 Part 2 - Approach to reading studies, diagnostic criteria, severity grading, and atlas の改定	組織評価の手順について提案
2007年1月	第5回 VMG-eco ・ Draft Report of Phase 2 of the Validation of the Amphibian Metamorphosis Assay の報告 ・ Phase 3 of the Validation of the Amphibian Metamorphosis Assay の提案	
2007年2月	第7回両生類専門家会合電話会議 ・ Phase 3 of the Validation of the Amphibian Metamorphosis Assay の承認	
2007年3月		フェーズ2の組織学的検証終了
2007年4月		フェーズ3実施
2007年7月		フェーズ3の終了
2008年1月 (予定)	第6回 VMG-eco ・ Phase 3 of the Validation of the Amphibian Metamorphosis Assay の結果報告(予定)	

ExTEND2005における 両生類試験法開発について

いであ株式会社
環境創造研究所
戸笈 修



変態アッセイ開発の経緯

フェーズ1（平成16年1月開始）

①試験期間の比較

試験期間	ばく露開始時発生段階
14日	発生段階54
21日	発生段階51

②エンドポイントの評価

物質	プロピルチオウラシル (PTU)	甲状腺ホルモン (T4)
作用	ヨウ素の有機化を阻害 (TH合成の抑制)	甲状腺ホルモン
エンドポイント	形態学的検証	形態学的検証
	甲状腺の組織学的検証	甲状腺の組織学的検証

フェーズ2（平成17年1月開始）

○作用メカニズムの異なる物質での検出力の検証

物質	パークロレート (PER)	甲状腺ホルモン (T4)	イオパノ酸 (IOP)
作用	ヨウ素の取込を阻害 (TH合成の抑制)	甲状腺ホルモン	TH代謝の調節
エンドポイント	形態学的検証	形態学的検証	形態学的検証
	甲状腺の組織学的検証	甲状腺の組織学的検証	甲状腺の組織学的検証

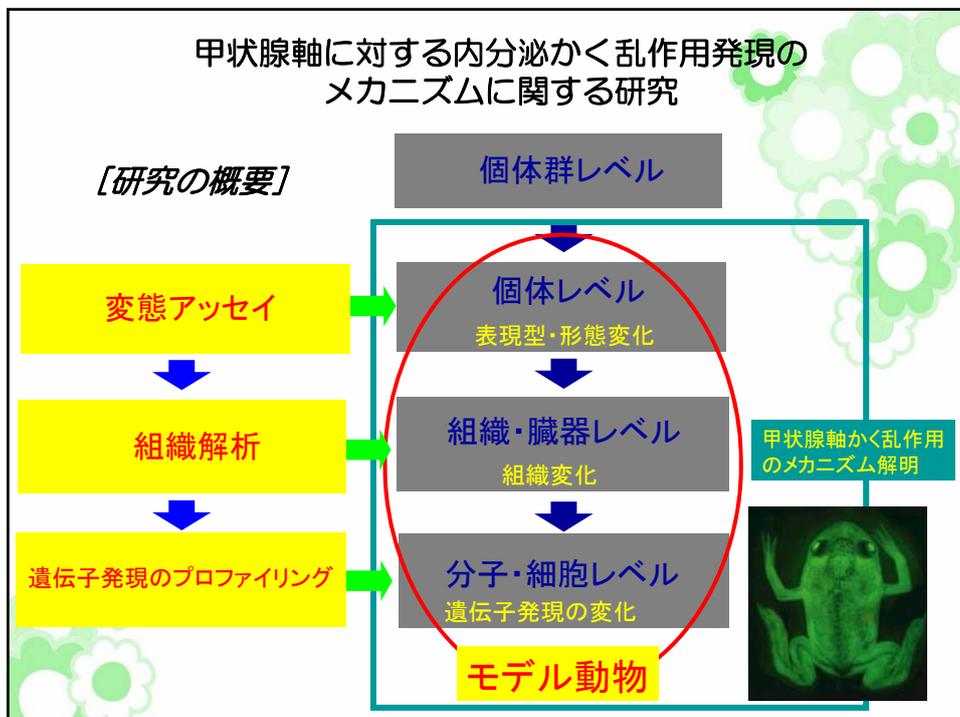
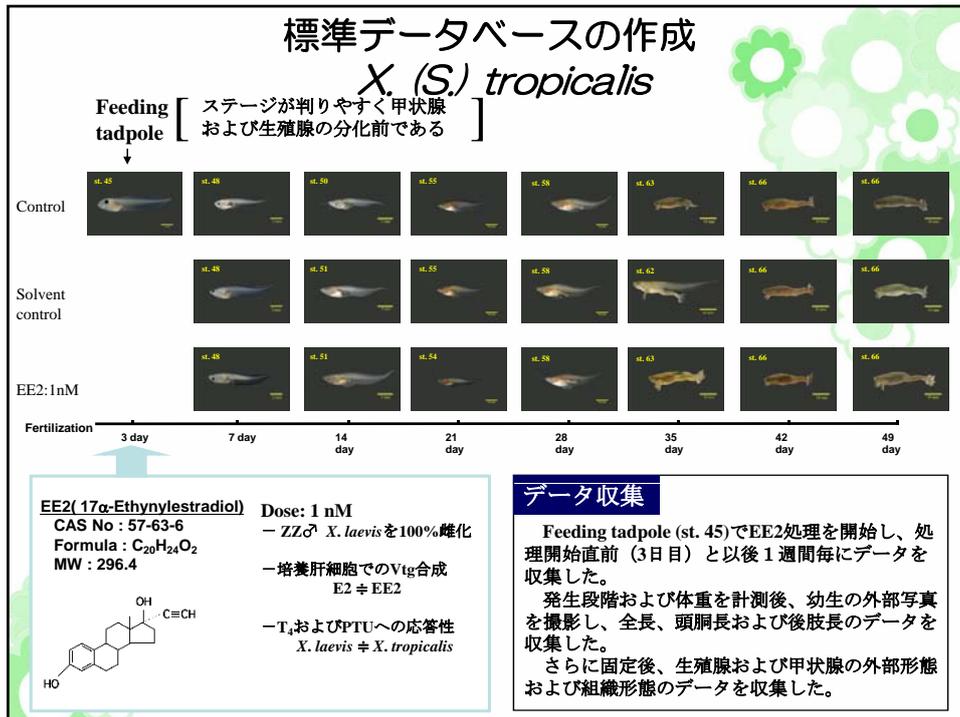
フェーズ3（平成19年4月開始）

○弱い作用物質に対する検出力の検証

物質	ベンゾフェノン2 (BP-2)
作用	甲状腺ペルオキシダーゼを阻害 (TH合成の阻害)
エンドポイント	形態学的検証
	甲状腺の組織学的検証

変態アッセイ プロトコル

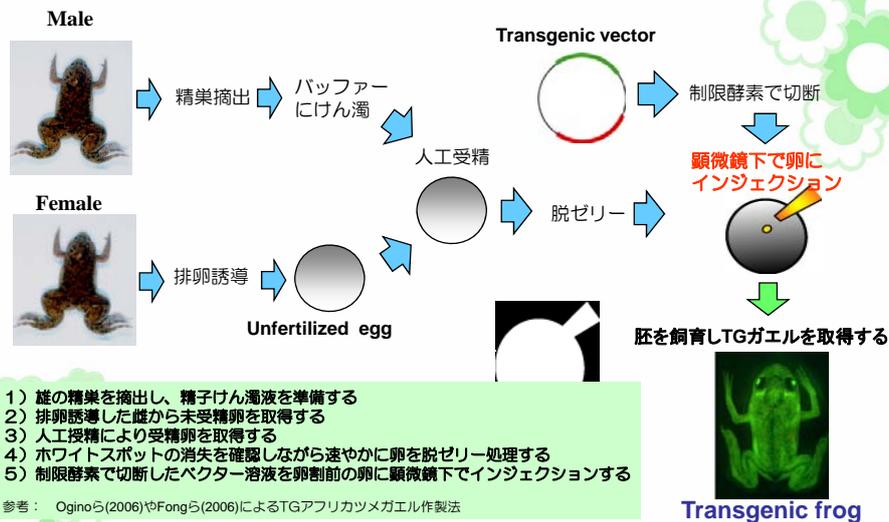
試験動物	アフリカツメガエル (<i>Xenopus laevis</i>)	
試験物質	XXX	
試験までの飼育期間	約14日 (受精より発生段階51まで)	
ばく露期間	21日 (発生段階51より21日)	
濃度設定	5	
連数	4	
水槽数	20	
飼育密度	20匹/4L/水槽	
試験個体数	400匹 (20匹/水槽 × 20水槽)	
計測個体数 (全個体)	ばく露7日目	100匹 (5匹/水槽 × 20水槽)
	ばく露21日目	300匹 (15匹/水槽 × 20水槽)
測定項目 (エンドポイント)	5点 (全長、頭胴長、後肢長、発生段階、甲状腺組織)	
甲状腺組織解析の対象数	100匹 (5匹/水槽 × 20水槽)	
濃度分析	水槽からの採集頻度	4回 (0, 7, 14, 21日目)
	水槽由来の検体数	64 (4濃度/回 × 4連/濃度 × 4回/連)
	ストック溶液の採取頻度	5回 (0, 4, 8, 13, 17日目)
	ストック溶液由来の検体数	10 (1濃度/回 × 2連/濃度 × 5回/連)
	総検体数	74



甲状腺軸に対する内分泌かく乱作用発現のメカニズムに関する研究

トランスジェニック技術のニシツメガエルへの最適化

個体レベルで生じる変化と遺伝子発現とをリアルタイムで評価できる、トランスジェニック技術を用いた甲状腺ホルモンかく乱作用応答モデルの作製準備に着手し、アフリカツメガエルに対する作製技術を、ニシツメガエルに適用するために最適化する。



今後の取組方針

国際的な取り組みであるOECDへの協調を継続する

1. テストガイドラインの策定に向けた取り組みの推進
2. 試験法を補完するための作用メカニズム解明の推進
3. 試験動物としてのニシツメガエルの評価の推進