

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、変態アッセイ、性転換試験、ピ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、アフリカツメガエルの標準データベース及び人為的に作出した 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・エストロジェンレセプター(ER)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 4 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。

平成 18 年度には、平成 19 年 1 月の第 5 回 VMG-eco にフェーズ 2 の結果を報告するとともに、同 VMG-eco にて承認されたフェーズ 3 について、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、平成 19 年度にかけて実施した。また、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の理解に向け、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、作用メカニズムの理解に向けた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。さらに、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。

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()	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)	500-2,000	1,000-3,000

(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19年度事業の成果】

OECD 変態アッセイテストガイドライン作成への参加

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)を用いたフェーズ3のばく露試験の結果について、平成20年1月の第6回VMG-ecoにおいて報告した。また、変態アッセイのテストガイドライン作成について、平成20年3月のテストガイドライン作業グループ(WNT)会議において承認されたのを受け、テストガイドライン案の作成に参加した。

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

PTU にばく露した幼生における遺伝子発現変化をプロファイリングした。さらに、甲状腺ホルモンかく乱作用応答モデルとしてのトランスジェニックカエルの作製方法を設定した。

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、後肢長について形態学的な測定を、生殖腺について遺伝子発現解析を行い、データベースを作成した。また、全雄集団を作出するための性転換個体の作製を開始した。

【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、変態アッセイのテストガイドライン策定に向けた取組を推進する。また、試験法を補完するために、視床下部 下垂体 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の理解に向けた研究を推進する。さらに、平成16年度及び平成19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により、ライフサイクルテストの提案に向けた取組を推進する。

< 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	独国が 2001 年に提唱した XEMA(<i>Xenopus</i> Metamorphosis Assay) のデータを独国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	第 1 回両生類専門家会合 ・カエル変態アッセイの OECD テストガイドライン作成推進	日本の取組を紹介 ・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 ・ピ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	・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、米国・独国とともに OECD に提出
2004 年 1 月	・フェーズ 1 開始	フェーズ 1 実施
2004 年 3 月	・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	「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 ・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 フェーズ2のプロトコル案の提出 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 ・ピ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	<p>OECD 両生類変態アッセイ病理組織会議</p> <ul style="list-style-type: none"> ・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	<p>第5回 VMG-eco</p> <ul style="list-style-type: none"> ・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	<p>第7回両生類専門家会合電話会議</p> <ul style="list-style-type: none"> ・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	<p>第6回 VMG-eco</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ Revised Draft Report of Phase 3 of the Validation of the Amphibian Metamorphosis Assay の結果報告 	
2008年3月	<p>WNT</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ 変態アッセイのテストガイドライン化を承認 	
2008年5月	<p>第4回両生類専門家会合</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ Draft OECD Guideline For the Testing of Chemicals “The Amphibian Metamorphosis Assay” (テストガイドライン案) を作成 ・ 各国の取組を紹介 ・ ライフサイクルテストの OECD テストガイドライン作成の推進を確認 	<p>変態アッセイのテストガイドライン策定に向けた参加国との協議及びガイドライン案の作成</p> <p>日本の取組を紹介</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ トロピカリス標準データベース ・ トロピカリス全雄集団の作製 ・ 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
2008年6月	<ul style="list-style-type: none"> ・ WNT に対しガイドライン案 (The Amphibian Metamorphosis Assay) のレビュー及びコメント要請 (9月15日まで) 	