

ツチガエルを用いた変態試験法の開発

藤井貴章¹、柏木昭彦²、大房健¹、山藤憲明¹、戸笈修¹

¹東和科学(株)、²広島大・院理・両生類研

無尾両生類を用いた変態試験法は、化学物質の甲状腺ホルモン攪乱作用を評価するために有効な方法の一つとして、ドイツ、イギリスなど各国において開発が進められている。無尾両生類を用いた変態試験法では、実験動物として汎用されているアフリカツメガエル(*Xenopus laevis*)が多く用いられている。

しかし、アフリカツメガエルは、飼育が容易である一方で、異質四倍体であり世代時間が1.5~2年と長いという短所がある上に、実験室で飼育されていることから遺伝的多様性が減少している可能性が指摘されるため、我々は、日本における環境指標化を目指して野生種を用いた試験法の開発に着手した。

ツチガエル(*Rana rugosa*)は、日本に広く分布しており、二倍体であること、世代時間が1年と短いことから、本邦における野生種を用いた変態試験法に適した種である。変態試験法の開発には、(1) 対照物質の濃度、(2) 飼育密度、(3) 飼育温度について設定が必要である。そこで、対照物質として、甲状腺ホルモン(T₄)、およびプロピルチオウラシル(6-propyl-2-thiouracil)を選択し、T₄に関しては、0.25, 14 μg/l、プロピルチオウラシルに関しては、18.75, 75, 150mg/l について、対照物質としての効果を検証した。また、飼育密度に関しては、5, 10, 20 匹/3.3 l、飼育温度に関しては、22, 25 および 28°C について、幼生の成長を検証した。その結果、ツチガエル幼生では、(1) T₄の濃度は1 μg/l、プロピルチオウラシルの濃度は18.75mg/l が適当であること、(2) 5~20 匹/3.3 l の飼育密度が適当であること、(3) 25~28°C の飼育温度が適当であるが、水温が高いほど幼生の成長は進むことを明らかにしたので報告する。

Development of *Rana* metamorphosis assay (RAMA) using *Rana rugosa*

Takaaki Fujii¹, Akihiko Kashiwagi², Ken Oofusa¹, Noriaki Santou¹, Osamu Tooi¹

¹Towa Kagaku Co. Ltd., ²Laboratory for Amphibian Biology, Graduate School of Science, Hiroshima University

Metamorphosis assay using anurans is considered to be one of the effective methods for examining thyroid hormone disruption induced by a variety of chemical substances, and is in preparation in many countries including Great Britain and Germany. The South African clawed toad, *Xenopus laevis*, is generally used as the animal in such metamorphosis assays. Hence, *X. laevis* has few disadvantages; it has an allotetraploid genome, and it has a relatively long lifecycle ranging from 1.5 to 2 years, we have started to develop the metamorphosis assay using wildness kind. The wrinkled frog (*Rana rugosa*) with a wide distribution in Japan, has a diploid genome, a relatively short generation time of 1 year, and is therefore better suited for use in the metamorphosis assay. To the development of metamorphosis assay using *R. rugosa*, it is necessary to optimize the following conditions; (1) concentration of positive and negative control substance, (2) population density, (3) temperature. Thyroid hormone (T₄) and PTU (6-Propyl-2-thiouracil) were chosen as a positive and negative control substance, respectively. For the optimization of these conditions; (1) 0.25, 1, 4 mg/l of T₄ and 18.75, 75, 150 mg/l of PTU, (2) 5, 10, 20 animals kept in 3.3 l of tapwater, (3) 22, 25, 28°C. Among the tested conditions, 1 μg/l of T₄, 18.75 mg/l of PTU, 5 to 20 tadpoles per 3.3 l, and 25 to 28°C were suitable for the tadpoles of *R. rugosa*.