

両生類を用いた変態試験法の開発

環境創造研究所 環境リスク研究センター リスク評価グループ 戸笈 修

国際的な枠組みのもと、両生類を用いて、化学物質の内分泌かく乱作用を客観的に評価するための、標準化されたスクリーニング・試験法の確立に取り組んでいます。

はじめに

甲状腺ホルモンは、脊椎動物等において個体の成長や発達等に重要な役割を担っており、甲状腺ホルモンのかく乱による影響の有無、リスクを評価することは、世界的に重要なテーマの一つです。両生類の「変態」過程は、例えば、無尾両生類において、オタマジャクシからカエルへと劇的な変化を伴うイベントであり、これは、主に甲状腺ホルモンによって調節されていることから、無尾両生類は、甲状腺ホルモンのかく乱作用を最も明確に評価できる典型的な動物群として注目されています。

経済協力開発機構(以下、「OECD」)では、内分泌かく乱化学物質のテストガイドラインを扱うワーキンググループ(VMG: Validation Management Group)のもと、2001年4月に、両生類を用いた試験方法を検討、開発するための両生類専門家会合(以下、「専門家会合」)を発足させ、両生類を用いた、発生(変態)や生殖に対する内分泌かく乱作用を評価するための標準試験法の開発を推進しました(図1)。日本(当社)も国際貢献の一環として、試験法開発の一翼を担っています。

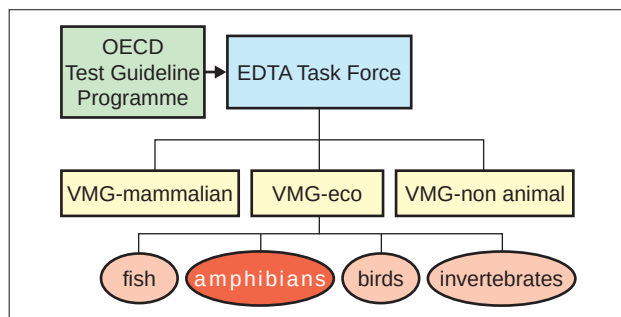


図1 OECDにおける試験法開発の体系

変態試験法開発の概況

試験法開発において決定すべき要件は多くありますが、特に①試験動物(どの種を用いるか)、②試験期間(試験動物の、どの成長段階で、どの程度の期間に渡り試験をするか)、および③エンドポイント(試験動物におけるどのパラメータを評価の規準とするか)の選定は、試験法の骨格を成す大事な要件です。

2001年4月に開催された専門家会合(フランス)においてドイツより提案された変態試験のプロトコル(XEMA: Xenopus Metamorphosis Assay)は、発生段階48/49のアフリカツメガエル幼生に対し、28日間にわたり化学物質をばく露し、全長、尾長、発生段階をエンドポイントとする試験法でした。

アフリカツメガエルはアフリカ原産であるものの、両生類の世界標準として多くの知見が集積しており、試験動物として位置付けられたのは妥当であったといえます。日本は変態試験法の開発を目指してXEMAのリングテストに各国とともに参加し、データをドイツとともに取りまとめ、OECDへ報告しました。

一方、米国から試験期間の異なる独自のプロトコルが提案され、2003年6月に開催された専門家会合(米国)では、XEMAの結果と併せ、各プロトコルについて議論されました。この議論をもとに、日独米の3カ国が主体となり、発生段階51から21日間のばく露試験と、発生段階54から14日間のばく露試験とを並行して実施し、これらを比較、評価したうえで、プロトコルを改定しました。

現在、試験動物をアフリカツメガエルとし、発生段階51から21日間のばく露により、形態(全長、後肢長、発生段階等)および組織(甲状腺)の変化をエンドポイントとする試験法としてテストガイドラインの策定に向けた取り組みが推進されています(図2)。

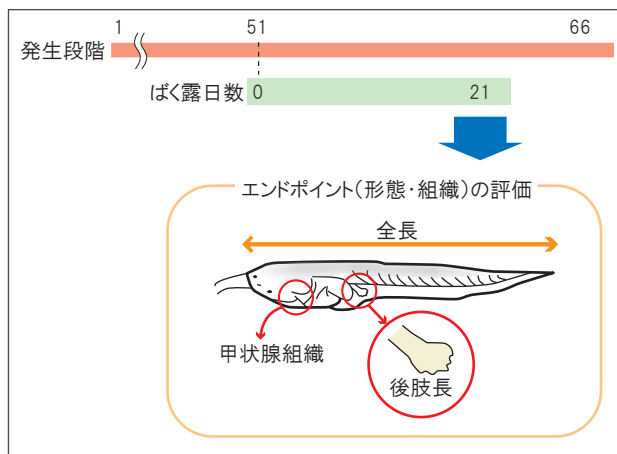


図2 変態試験法の概略

試験法の確立に向けた作用メカニズムの解明への取り組み

前述したように、OECDで開発を推進している、両生類を用いた「変態試験法」は、甲状腺ホルモンによって制御されている「変態」を利用し、形態および組織変化に基づき、化学物質の甲状腺ホルモンかく乱作用を評価することを目指しています。

一方、変態試験法における甲状腺ホルモンかく乱作用の検出力と、試験法としての妥当性を担保するためには、化学物質の作用メカニズムについて、試験法の開発と並行して整理しておく必要があります。これまでに、変態試験法の過程において、作用メカニズムに関わると推測される複数の遺伝子を取得しています。現在、これら遺伝子の機能解析のためのモデル動物として、遺伝子改変動物(トランスジェニックカエル)の作製(図3)を進めており、作用メカニズムの面から変態試験法の妥当性を担保する取り組みを推進しています。

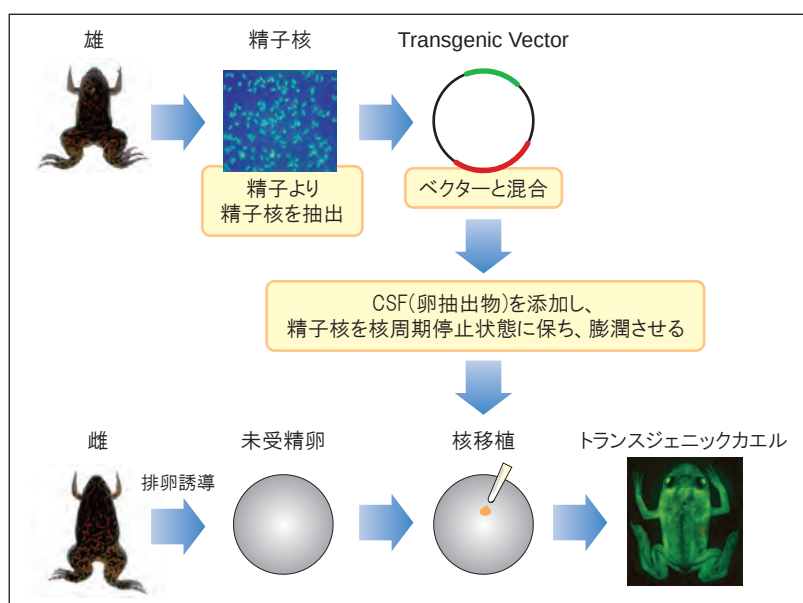


図3 トランスジェニックカエルの作製方法

今後の展開

変態試験法は両生類のための試験法としてのみならず、脊椎動物全般に貢献できる試験法として開発が推進され、ガイド

ライン策定に向けた取り組みが加速しています。

一方で、両生類の生殖に対する内分泌かく乱作用を評価するための標準試験法開発の必要性が、専門家会合において、常に議論の対象となっており、今後は、両生類を用いた生殖影響試験の確立への取り組みが進むものと思われます。

日本では、変態試験法の開発と並行して、すでに、アフリカツメガエルのビテロジェニン(卵黄タンパク質の前駆体で、化学物質のエストロジェニック作用を評価するためのバイオマーカー)を測定するためのELISAをキット化し、また、アフリカツメガエルより世

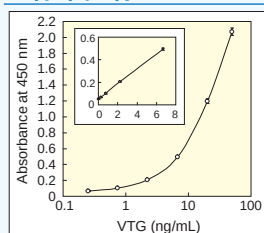
代時間の短いニシツメガエルの活用に向けた取り組みを進めており、両生類を用いた生殖影響試験の確立に向け、さらなる国際貢献が期待される状況にあります。

終わりに

両生類は、およそ3億6000万年前のデボン紀後期に出現し、地上に進出した最初の脊椎動物であり、その基本的構造は人類にも引き継がれています。近年、世界各地でその減少が報じられており、日本においては、9種の両生類がレッドデータブックに登録されています。カエルの減少や絶滅は、人類を含む生態系全体への警告とも言えます。両生類を用いた試験法開発を通じて、これからも、環境保全に貢献していきたいと考えています。



標準曲線



Xenopus Vitellogenin ELISA Kit

特長

- ▶ 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*)を用いたビテロジェニン測定キット
- ▶ 0.2~50 ng/mLのレンジで測定可能
- ▶ アッセイは約5時間で終了
- ▶ 血漿サンプルや肝細胞培養液を用いたビテロジェニン検出・測定が可能
- ▶ 実験動物として近年注目されているニシツメガエルのビテロジェニン測定も可能

お問い合わせ

東和环境科学株式会社

〒730-0841 広島県広島市中区舟入町6番5号 TEL. 082-297-6111 FAX. 082-292-8161
E-Mail: web@mail.towakagaku.co.jp ホームページ: <http://www.towakagaku.co.jp>