

甲状腺ホルモン攪乱作用と 両生類変態アッセイにおける 病理組織学的検査

住友化学株式会社

生物環境科学研究所

宮田 かおり

於勢 佳子

Thyroidal Hormone Disrupting Effects and Histopathological Examination in an Amphibian Metamorphosis Assay

Sumitomo Chemical Co., Ltd.

Environmental Health Science Laboratory

Kaori MIYATA

Keiko OSE

The interference of a chemical with the thyroidal hormone system, that is the normal function of the hypothalamic-pituitary-thyroid (HPT) axis, is considered as an endocrine disrupting effect. The amphibian metamorphosis assay (AMA), which is an OECD and EPA guideline study, represents a generalized vertebrate model to evaluate such a chemical action not only on wildlife but also mammals. This review deals with the state-of-the-art of frog metamorphosis processes and thyroid hormone regulation, and introduces our attempts, especially the histopathological examination, for more precise evaluation of AMA.

はじめに

化学物質による内分泌攪乱問題では、ヒト健康影響のみならず、野生生物に対する影響についても広範な研究が進められており、数多くの化学物質が脊椎動物の甲状腺ホルモン系（視床下部-下垂体-甲状腺軸：HPT軸）に作用する可能性が報告されていることから、リスクアセスメントを行なう為の適切な脊椎動物モデルの確立が喫緊の課題であった。水中で生活するカエル（両生類）の幼生である「おたまじゃくし」は、鰓を介した化学物質の曝露や餌を介した経口曝露に加えて、成体と異なり皮膚が薄く透過性が高いことから経皮曝露も想定される。さらに、おたまじゃくしは変態の過程で幼生組織から成体組織へと構造および機能を新生、退縮、再構築してカエルとなるが、この過程は主に甲状腺ホルモンにより制御されており、おたまじゃくしは甲状腺ホルモンに影響する化学物質に対して極めて高感受性と考えられる。おたまじゃくしの変態における形態的および機能的な変動は劇的であり、変態過程での異常は甲状腺ホルモン系攪乱を反映するパラメータとして有効な情報となり得る。以上の観点から、経済協力開発機構（OECD）と米国環境保護庁（EPA）は甲状腺毒性に焦点をあて、アフリカツメガエル（*Xenopus laevis*、Fig. 1）の変態過程を精査するガイド

ラインを策定した^{1),2)}。毒性試験において病理組織検査の対象となるおたまじゃくし頭部に存在する甲状腺は、両眼を結ぶ線上にあり（Fig. 2）、変態開始時には非常に小さな組織であること、変態が進むにつれて頭部の形状が変わり、それとともに甲状腺の位置が変動することなどから、通常の哺乳動物とは異なり、病理検査のノウハウの蓄積が正確な毒性評価に必須であることが分かった。

以上の観点から、最新の欧米規制動向を考慮し、環境生物を含めた化学物質の内分泌攪乱作用に対するより精緻な安全性評価の一環として、当研究所においてカエルの変態や甲状腺ホルモン制御機構について調査



Fig. 1 A larva and a froglet of African clawed frogs (*Xenopus laevis*)



Fig. 2 Arrows indicate thyroid glands in Stage 51

し、おたまじゃくしを用いた甲状腺ホルモン系に対する化学物質の精緻な評価系を確立した。

甲状腺ホルモンと関連因子

甲状腺ホルモンにはサイロキシン (T4) とトリヨードサイロニン (T3) がある (Fig. 3)。甲状腺では主にT4が合成分泌されるが、末梢組織で脱ヨード化されて生理活性のより高いT3が生成される。甲状腺ホルモンは血液中では輸送蛋白トランスサイレチン (TTR) と結合した形で輸送され、肝臓にて抱合化をうけて胆汁中へ排泄される。ほ乳類についての甲状腺ホルモンとその制御や毒性影響についてはよく知られているが³⁾、脊椎動物の甲状腺ホルモンの構造は完全に保存されており、合成および分泌様式も両生類とほ乳類は基本的に同じである。

甲状腺ホルモンはHPT軸でコントロールされており、その制御機構と影響要因をFig. 4に示している。甲状腺でのヨード取り込み阻害や甲状腺ペルオキシダーゼの抑制は甲状腺ホルモンの合成を攪乱する。また、末梢組織での脱ヨード化酵素の抑制は、T4からT3の生成を抑制する。肝臓薬物代謝酵素の誘導はT4およびT3の胆汁排泄を促進させる。また、化学物質が甲状腺ホルモン輸送蛋白と結合し、甲状腺ホルモンと競合拮抗する場合は、血中の甲状腺ホルモンレベルを減少させる。

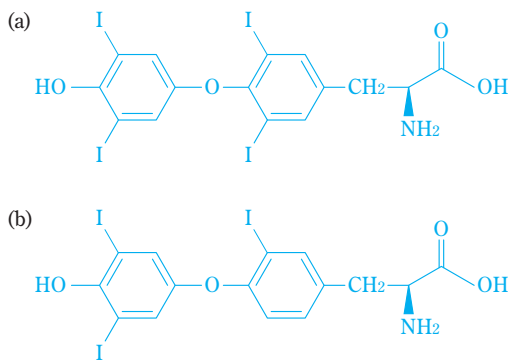


Fig. 3 Thyroxine: T4 (a), and 3,3',5'-triiodothyronine: T3 (b)

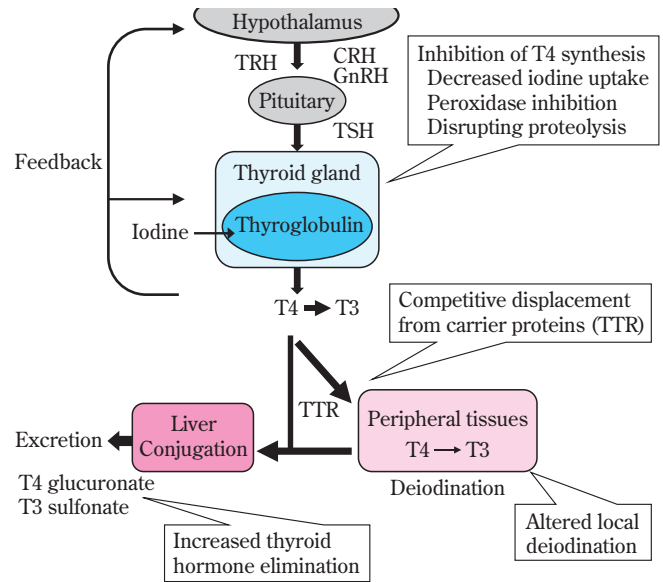


Fig. 4 Overview of the thyroid hormone pathway and regulation

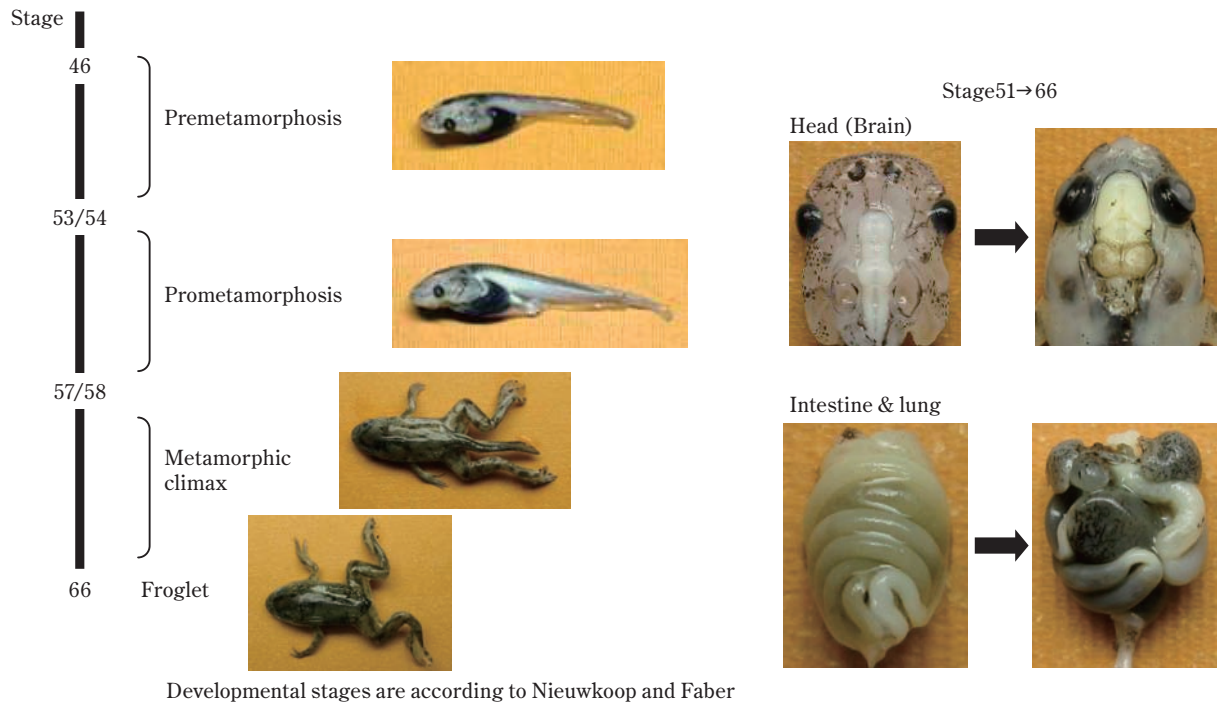
このように、Fig. 4に示したいずれのポイントも甲状腺ホルモンを変動させる要因として、環境中の汚染物質の標的となり得る。

おたまじゃくしでは、脱ヨード化酵素の変動に伴いT3:T4の活性比が発生・変態過程で変動することが知られている^{4),5)}。甲状腺ホルモンは主に肝臓で硫酸抱合されて排泄されるが、いくつかの化合物で硫酸抱合を抑制するとの報告もある⁶⁾。また、おたまじゃくしでは、グルクロン酸抱合についての情報が乏しく、ほ乳類と比較して付加的な代謝経路として特徴付けられているが、本経路の主要酵素群であるグルクロニダーゼはほ乳類と同じく胆汁排泄を通して循環血中の甲状腺ホルモンを減少させると考えられる。その他、ほ乳類と同様にベントバルビタールにより肝ミクロソーム酵素チトクロムP450 2B1が誘導されることが、ある種のカエルで報告されている⁷⁾。

カエルで特徴的な点は、ほ乳類と異なりTTRの親和性がT4よりもT3で高いことである^{6),8)}。TTRとの結合は血清中の遊離型ホルモン濃度に影響し、細胞の取り込みや生物学的反応性、血中甲状腺ホルモンのレベル維持に影響する。数種の化合物⁹⁾⁻¹²⁾はTTRとの親和性が高く、甲状腺ホルモンの攪乱を引き起こす可能性があるとして報告されている。

変態とそれに関わるホルモン

カエルの変態は大きく3つのステージに分かれ、前変態期 (premetamorphosis)、変態始動期 (prometamorphosis) そして変態クライマックス (metamorphic climax) と呼ばれる (Fig. 5)。後肢が現れるまでの甲



Developmental stages are according to Nieuwkoop and Faber

Fig. 5 The stage of metamorphosis. The premetamorphosis is the period until the appearance of the hind limbs, and the prometamorphosis is from their appearance to that of the forelimbs. During the period of metamorphic climax, resorption of the tail and gills and development of lungs occur.

腺ホルモンによらず到達できる段階までを前変態期、それ以降、前肢が出現するまでを変態始動期、その後、尾と鰓が吸収消失し、肺が出来上がって成体となるまでを変態クライマックスとして分類される。変態の過程で食性が草食から肉食へと変化し、それに伴い腸管は細長いものから太く短くなる。変態始動期以降は甲状腺ホルモンによって変態過程が全身的に制御され、甲状腺ホルモンレセプター拮抗剤に曝露させると変態が阻害されて完全なカエルにならず¹³⁾、逆に甲状腺作用物質に曝露させると変態が誘発される¹⁴⁾。甲状腺ホルモンに対する感受性は変態ステージにより変動し、その上位にある甲状腺ホルモン刺激ホルモン (TSH) の分泌量は変態始動期の後半から変態クライマックスにかけて上昇し、その後減少する¹⁵⁾。

カエルにおいては副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン (corticotrophin-releasing hormone : CRH) と性腺刺激ホルモン放出ホルモン (gonadotropin-releasing hormone : GnRH) が甲状腺刺激ホルモン放出ホルモン (TRH) と同様にTSH放出を促進することが知られている¹⁶⁾⁻¹⁸⁾。また、ほ乳類の黄体ホルモン刺激ホルモン (luteinizing hormone-releasing hormone : LHRH)、男性ホルモンであるアンドロゲン、プロラクチン (PRL)、さらに副腎皮質ホルモンであるコルチコステロイドおよびアルドステロンが変態期の甲状腺ホルモンレベル、あるいは、変態過程に影響しており、おたまじゃくしの変態期には、これらホルモンが複雑に影響している^{17), 19)-21)}。

化学物質の影響

カエルを用いた甲状腺ホルモン攪乱作用の検出は、いろいろな外因性物質による変態への影響の有無を評価することで、過去十数年前から試みられている²²⁾⁻²⁵⁾。変態ステージの遅延あるいは促進、後肢長への影響、甲状腺組織の形態変化や下垂体組織中のTSH遺伝子の発現亢進などが報告されている。環境汚染化学物質では、Perchlorate類^{26), 27)}、polychlorinated biphenyls (PCB)²⁸⁾、bisphenol A (BPA)²⁹⁾、polybrominated diphenyl ethers (BDE47) および pentabromodiphenyl ether混合物 (DE-71)³⁰⁾、methoxychlor^{31), 32)}などによる抗甲状腺作用が報告されており、一方、除草剤のacetochlorでは前肢の出現と変態クライマックス期開始の早期化という変態促進作用、すなわち、甲状腺ホルモン様作用が報告されている³³⁾。環境汚染物質による曝露を考えた場合、自治体等から流出される排水中には様々な物質が混在していることから、カエルの変態に影響を与え得ることが指摘されている³⁴⁾。実際、カナダのアルバータ州北部にあるAthabasca Oil Sands地域でのフィールド試験では、原産種のカエルに変態遅延が報告されている³⁵⁾。このように、多くの環境汚染物質が甲状腺ホルモン系に影響するとの報告があるが、これらの多くは自然環境でカエルが曝露する濃度に比べ、はるかに高濃度での実験結果であり、実環境中に存在し得る濃度でも同様に起こり得るかどうかについては、更なる研究調査が必要である。

一方、陰性結果の報告もある。4-methylbenzylidene camphor (4-MBC) および3-benzylidene camphor (3-BC) といったUVフィルターは環境曝露濃度で、甲状腺ホルモン様作用も抗甲状腺ホルモン様作用も有さず³⁶⁾、除草剤であるatrazineもカエルの変態過程になんら影響しないとの報告がある³⁷⁾。

殺菌剤Triclosanは、その構造が甲状腺ホルモンに類似していることから、環境中への流出や両生類変態への影響に関して注目され、Veldhoenらが後肢の伸長への影響を報告³⁸⁾している一方、FortらはGLPガイドライン試験を立ち上げて環境曝露濃度で変態への影響がないと反論³⁹⁾しており、この論争はまだ決着していない^{40)–44)}。

両生類変態アッセイ、特に病理組織学的検査に対する取り組み

前述した種々のメカニズム、そして種々の化合物は、血中甲状腺ホルモンレベルを変化させ、甲状腺ホルモンが減少した場合には、HPT軸の正のフィードバックが働き、下垂体でのTSH分泌が増加する。カエルのHPT軸を介する機構は、げっ歯類⁴⁵⁾と同様にコントロールされていることから、両生類変態アッセイ (amphibian metamorphosis assay : AMA) はヒトを含む脊椎動物全般におけるHPT軸の機能に基づいた評価試験と言える。TSH分泌増加により甲状腺は大きくなり、濾胞上皮細胞の肥大や過形成を引き起こす。O'Connorらはげっ歯類における甲状腺毒性物質による影響の中で、甲状腺組織像が最も有益な情報であると報告しているが⁴⁶⁾、カエルでも同様に甲状腺組織検査が最も鋭敏な指標であることがこれまでの研究で証明されている⁴⁷⁾。

AMAの試験実施概要をTable 1および2に示した。アフリカツメガエルの成長はNieuwkoopとFaberによる、その形態的特長をもとにしたステージ分類⁴⁸⁾が用いられる。AMAでは後肢がちょうど米粒の形態となるステージ51の時期に曝露が開始される。曝露期間は21日間であり、主要エンドポイントと観察のタイミングは毎日の観察 (死亡率)、曝露7および21日の成長ステージ、後肢長、鼻-排泄口長と体重、曝露21日での甲状腺組織検査である。成長ステージの形態学的指標となる最も特徴的な形態変化は後肢の発達であり、成長ステージと (抗) 甲状腺ホルモン様作用には正の相関があることが報告されている⁴⁹⁾、⁵⁰⁾。

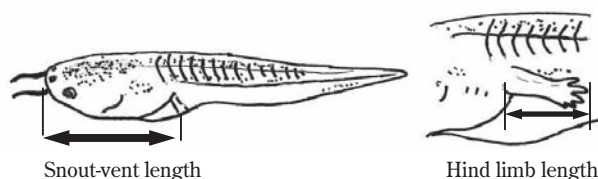
甲状腺組織学的検査では、Table 3に示すようにコアクライテリアに付加的な量的クライテリアを加味して適切にグレード化する必要がある。カエルの甲状腺組織は非常に小さく、肉眼では判別できない。また変態に伴い頭部形状が変化し、甲状腺の位置も微妙にずれていく。

Table 1 Protocol of the AMA

Initial larval stage	Nieuwkoop and Faber stage 51
Exposure period	21 days
Larvae selection criteria	Developmental stage and total length (optional)
Test concentrations	Minimum of 3 concentrations spanning approximately one order of magnitude
Exposure regime	Flow-through (preferred) and/or static-renewal
Test system flow rate	25 mL/min
Larval density	20 larvae/test vessel (5 larvae/L)
Test solution/test vessel	4–10 L (10–15 cm minimum water)/ glass or stainless steel test vessel (e.g., 22.5 cm × 14 cm × 16.5 cm)
Replication	4 replicate test vessels/ test concentration and control
Acceptable mortality rate in controls	≤ 10% per replicate test vessel
Water temperature	22 ± 1°C
Lighting	12 h Light : 12 h dark, 600 to 2000 lux
Thyroid fixation	Davidson's fixative
pH	6.5 – 8.5
Dissolved oxygen concentration	> 3.5mg/L (> 40% air saturation)

Table 2 Observation time points for primary endpoints in the AMA

Apical Endpoints	Observation time points
Mortality	Daily
Developmental stage	Day 7 and 21, comply with N&F Stage
Hind limb length	Day 7 and 21
Snout-vent length	Day 7 and 21
Wet body weight	Day 7 and 21
Thyroid gland histology	Day 21, comply with guidance for histopathology



それゆえ甲状腺組織観察に先立って、甲状腺を含む頭部を何枚も連続して薄切した病理標本の中から観察に最適な切片標本を選び出す手間が入ってくる (Fig. 6)。また、おたまじゃくしの変態過程では、成長ステージにより甲状腺の形態が異なり、前変態期は非常に小さい組織であるが、変態始動期から徐々に大きくなり、変態クライマックス後半で最大となり、濾胞上皮細胞の丈も最高となる。このように、おたまじゃくしの甲状腺組織学的検査の実施には、特有の技術および知識が必要とされることから、AMAでの標本作製技術ある

Table 3 Diagnostic criteria, severity and grading for histopathology in AMA

Core criteria (severity graded)
<ul style="list-style-type: none"> • Thyroid gland hypertrophy/atrophy • Follicular cell hypertrophy • Follicular cell hyperplasia
Additional criteria (severity graded and/or qualitatively described)
<ul style="list-style-type: none"> • Follicular lumen area: reduced or increased • Colloid quality: homogeneous, heterogeneous, lacy or granular • Follicular cell height/shape: squamous, cuboidal, low/high columnar
Grading (For multifocal or diffusely-distributed alteration, the percentage of tissue area involved should be considered.)
<ul style="list-style-type: none"> • Grade 0 (not remarkable to minimal, less than 20%) • Grade 1 (mild, 30-50%) • Grade 2 (moderate, 60-80%) • Grade 3 (severe, over 80%)

いは診断法についてのガイダンス^{51), 52)}や、AMAガイドラインをサポートするための甲状腺の組織学・組織病理学の標準法ドキュメントが、変態過程をカバーする時期の正常組織アトラスとともに公表されている⁵³⁾。

当研究所ではAMA試験の評価技術確立を目的に、甲状腺作用物質および抗甲状腺作用物質を用いた所内AMA試験を構築し、病理組織学的検査を実施した。甲状腺ホルモンのT4および代表的な抗甲状腺作用物質のPropylthiouracil (PTU) に曝露したアフリカツメガエルの甲状腺組織像をFig. 7に示す。PTUは甲状腺ペルオキシダーゼ阻害のみならず脱ヨード化阻害を介してT4およびT3の枯渇を引き起こし、フィードバック機構を介して下垂体からのTSH分泌を増加させる。甲状腺では上位からの持続刺激を受け、T4合成分泌は阻害されているものの、ホルモン合成途中までが亢進し、

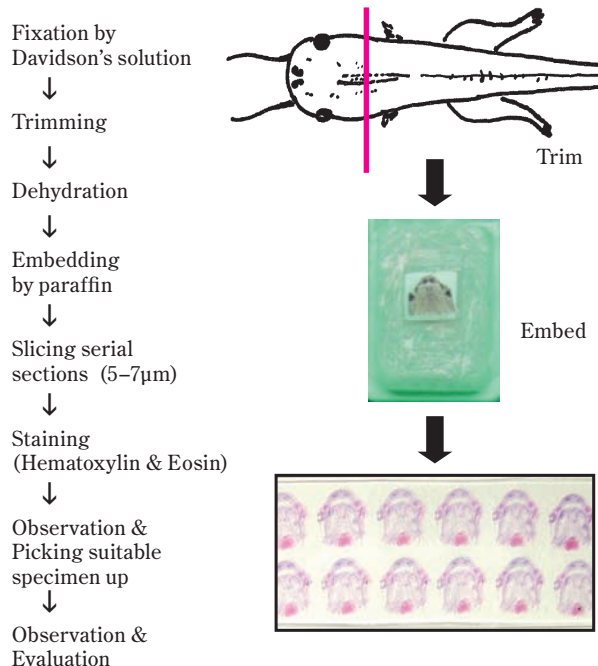
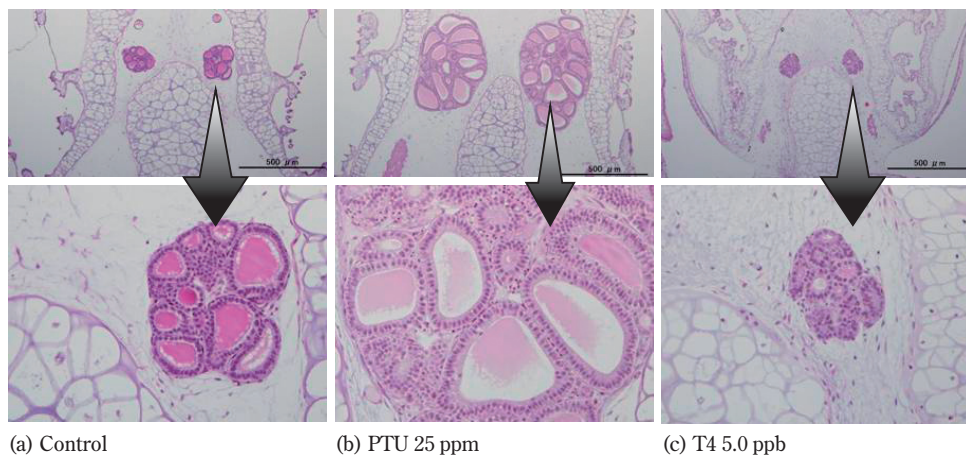


Fig. 6 Histology procedure

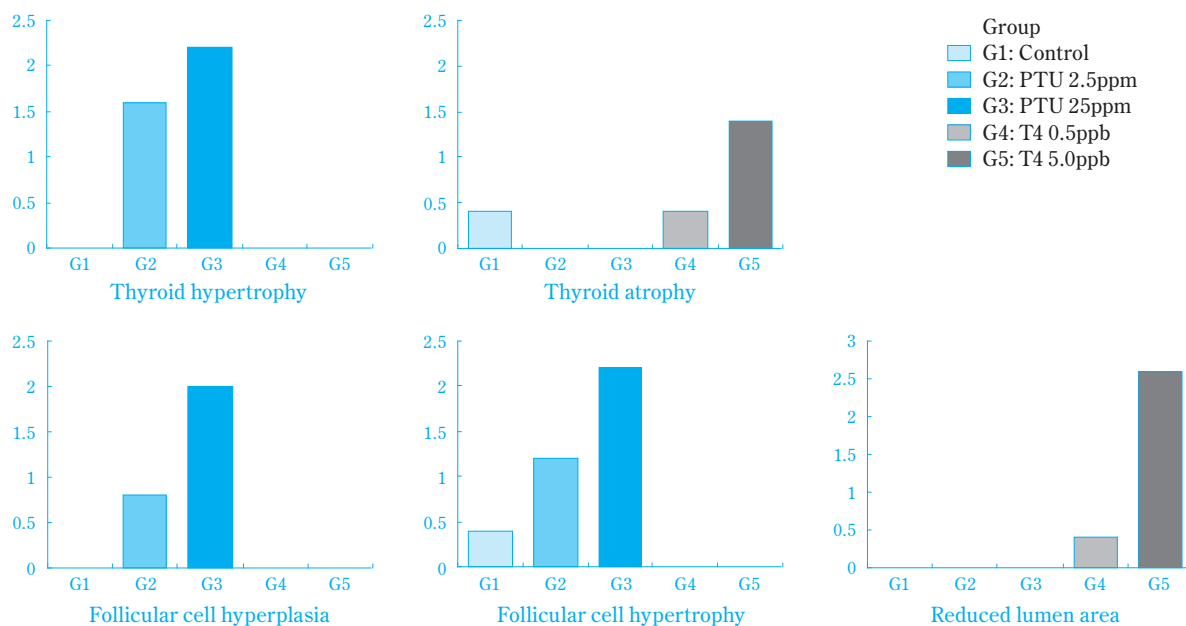
結果として甲状腺組織全体は大きくなり、濾胞上皮細胞の肥大・過形成を示す。濾胞上皮に囲まれた領域に貯蔵しているコロイドはその量や濃度が減少するため染色性が低下し、不均一な像を呈する、一方、T4は甲状腺ホルモンそのものであり、体内に過剰量の甲状腺ホルモンが存在することとなり、負のフィードバック機構が働きTSHを減少させる。結果として甲状腺は活動を停止し、甲状腺組織の萎縮および濾胞上皮細胞の萎縮を来す。コロイドを貯める必要もなくなることから、コロイド領域も小型を示す。Fig. 8はスコア化した病理組織学的検査結果を示す。甲状腺ホルモン様作用および抗甲状腺ホルモン様作用とも、曝露濃度に相関した反応を示し、病理組織学的によく捉えられて



(a) Control (b) PTU 25 ppm (c) T4 5.0 ppb

PTU induces thyroid hypertrophy, follicular cell hyperplasia and altered colloid quality. T4 causes follicular atrophy.

Fig. 7 Effect on thyroid histopathology



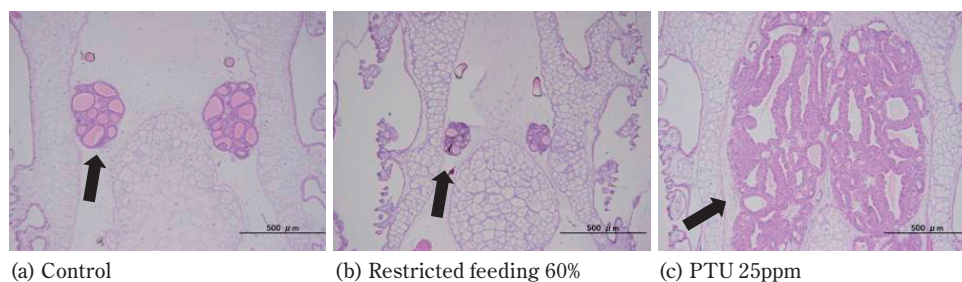
The scores show the mean of grade. Grade: 0~3

Fig. 8 Result of histopathological examination

いることがわかる。成長ステージと後肢長もまた抗甲状腺作用物質の影響に関して重要なエンドポイントであるが、成長ステージの遅延は、成長抑制など二次的な影響も受けることから、これだけで抗甲状腺作用の判断基準にはなり得ず、病理組織学的評価が必須の要素とされる。

カエルの変態過程の甲状腺の病理組織学的検査は非常に複雑である。正常な変態過程のクライマックス時には、下垂体でのTSH合成と分泌、さらに、甲状腺によるT4の合成と分泌が最大レベルとなり、甲状腺の濾胞コロイドの減少と濾胞上皮細胞の丈の増加が生じる⁵³⁾。それゆえ、このような甲状腺組織像が認められた場合、HPT軸への影響を介した変化か、あるいは、単におたまじゃくしの成長を反映したものかを見分ける困難さが付きまとう。我々はストレスや体重抑制に関連した二次的影響についての知見を得るために摂餌制限下での化合物曝露を検討した。Fig. 9の (b) は化学物質の曝

露なしに、単に餌を60%にまで制限した際の甲状腺組織を示しているが、摂餌制限は甲状腺組織の萎縮を引き起こすことが明らかであった。この変化は甲状腺作用物質曝露時の変化と同一であり、摂餌量の低下が認められた場合には、組織学的変化が化合物による甲状腺影響か、あるいは二次的な影響を介したものかの鑑別が必要となる。さらに、化合物曝露の影響に対して再現性を確認しているが、個体差やロット差も大きいことが判明した。Fig. 9の (c) の像はPTUに曝露した個体の甲状腺であるが、Fig. 7に示した像と比較すると、高度に肥大・過形成を起こしている。Triclosanの論争では甲状腺組織の軽微な肥大、濾胞上皮の変化の有無、そして個体の身体の大きさが甲状腺ホルモンへの作用性の解釈を困難にしている^{41), 42)}。個体差の観点からもAMA試験の甲状腺病理組織検査に供試する個体の選択は非常に重要で、ガイドラインにも記載されているように、曝露区の正確な影響評価には、成長ステージを



Restricted feeding induced thyroid atrophy (b). There is considerable morphological differences among individuals affected (c).

Fig. 9 Effect of food intake and individual difference

あわせた対照区と比較することが肝要である。さらに、化合物曝露がおたまじゃくしの成長に影響する可能性も考慮し、各曝露区の成長における個体差も考慮する必要がある。

おわりに

内分泌攪乱の一つの事象として、化学物質の甲状腺ホルモン系 (HPT軸) への作用はヒト健康および環境生物に対する重要な毒性として認識されている。両生類変態アッセイ (AMA) はカエルだけではなく、ヒトを含めた脊椎動物全般におけるHPT軸の機能に基づく評価試験である。当研究所では、より精緻な化学物質の安全性評価に向けて、カエルの変態過程や甲状腺ホルモン制御機構について調査し、精度の高い評価系の確立に向けて取り組んできた。

カエルの変態過程において、甲状腺の組織像は絶え間なく、また、劇的に変化することから、標本を観察、評価する毒性病理学者は、変態に伴う生理的变化に精通している必要がある。化学物質評価に対し、甲状腺の生理や甲状腺に影響する要因、甲状腺作用物質に対する反応についての知識は勿論のこと、評価の解釈を困難にする個体変動の範囲、成長・餌・ストレスといった二次的影響による変化を熟知している必要がある。以上の取り組みで得られた情報および技術を、今後の化学物質の安全性評価に活かしていきたい。

引用文献

- 1) OECD, "OECD Guideline for the Testing of Chemicals: The Amphibian Metamorphosis Assay. OECD231", (2009).
- 2) U.S.E.P. Agency, "Endocrine Disruptor Screening Program Test Guidelines OPPTS 890.1100: Amphibian Metamorphosis (Frog)", (2009).
- 3) "Casarett and Doull's Toxicology-The Basic Science of Poisons (7th Edition)", C. D. Klaassen (Ed.), McGraw-Hill (2008), Toxic responses of the endocrine system.
- 4) L. Cai and D.D. Brown, *Dev. Biol.*, **266** (1), 87 (2004).
- 5) H. Huang, L. Cai, B.F. Remo and D.D. Brown, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **98** (13), 7348 (2001).
- 6) F.B. Rahman and K. Yamauchi, *Gen. Comp. Endocrinol.*, **166** (2), 396 (2010).
- 7) M.A. Khan, S.Y. Qadri, S. Tomar, D. Fish, L. Gururajan and M.S. Poria, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **244** (3), 737 (1998).
- 8) P. Prapunpoj, K. Yamauchi, N. Nishiyama, S.J. Richardson and G. Schreiber, *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, **279** (6), R2026 (2000).
- 9) K. Yamauchi, P. Prapunpoj and S.J. Richardson, *Gen. Comp. Endocrinol.*, **119** (3), 329 (2000).
- 10) A. Ishihara, S. Sawatsubashi and K. Yamauchi, *Mol. Cell. Endocrinol.*, **199** (1-2), 105 (2003).
- 11) Y. Kudo and K. Yamauchi, *Toxicol. Sci.*, **84** (1), 29 (2005).
- 12) Y. Kudo, K. Yamauchi, H. Fukazawa and Y. Terao, *Toxicol. Sci.*, **92** (1), 87 (2006).
- 13) W. Lim, N.H. Nguyen, H.Y. Yang, T.S. Scanlan and J.D. Furlow, *J. Biol. Chem.*, **277** (38), 35664 (2002).
- 14) J.D. Furlow, H.Y. Yang, M. Hsu, W. Lim, D.J. Ermio, G. Chiellini and T.S. Scanlan, *J. Biol. Chem.*, **279** (25), 26555 (2004).
- 15) M. Kaneko, H. Fujisawa, R. Okada, K. Yamamoto, M. Nakamura and S. Kikuyama, *Gen. Comp. Endocrinol.*, **144** (2), 122 (2005).
- 16) R.J. Denver, *Gen. Comp. Endocrinol.*, **72** (3), 383 (1988).
- 17) G.F. Jacobs, M.P. Goyvaerts, G. Vandorpe, A.M. Quaghebeur and E.R. Kuhn, *Gen. Comp. Endocrinol.*, **70** (2), 274 (1988).
- 18) G.F. Jacobs and E.R. Kuhn, *Gen. Comp. Endocrinol.*, **88** (3), 415 (1992).
- 19) R.C. Jaffe, *Gen. Comp. Endocrinol.*, **44** (3), 314 (1981).
- 20) G. Jolivet Jaudet and J. Leloup Hatey, *Gen. Comp. Endocrinol.*, **56** (1), 59 (1984).
- 21) S. Kikuyama, M.R. Suzuki and S. Iwamuro, *Gen. Comp. Endocrinol.*, **63** (2), 186 (1986).
- 22) G. Carlsson and L. Norrgren, *Aquat. Toxicol.*, **82** (1), 55 (2007).
- 23) R. Opitz, T. Braunbeck, C. Bogi, D.B. Pickford, G. Nentwig, J. Oehlmann, O. Tooi, I. Lutz and W. Kloas, *Environ. Toxicol. Chem.*, **24** (3), 653 (2005).
- 24) R. Opitz, S. Hartmann, T. Blank, T. Braunbeck, I. Lutz and W. Kloas, *Toxicol. Sci.*, **90** (2), 337 (2006).
- 25) S.J. Degitz, G.W. Holcombe, K.M. Flynn, P.A. Kosian, J.J. Korte and J.E. Tietge, *Toxicol. Sci.*, **87** (2), 353 (2005).
- 26) W.L. Goleman, J.A. Carr and T.A. Anderson, *Environ. Toxicol. Chem.*, **21** (3), 590 (2002).
- 27) W.L. Goleman, L.J. Urquidi, T.A. Anderson, E.E. Smith, R.J. Kendall and J.A. Carr, *Environ. Toxicol. Chem.*, **21** (2), 424 (2002).
- 28) A.C. Gutleb, J. Appelman, M. Bronkhorst, J.H. van den Berg and A.J. Murk, *Sci. Total Environ.*, **262** (1-2), 147 (2000).

- 29) S. Iwamuro, M. Sakakibara, M. Terao, A. Ozawa, C. Kurobe, T. Shigeura, M. Kato and S. Kikuyama, *Gen. Comp. Endocrinol.*, **133** (2), 189 (2003).
- 30) G.C. Balch, L.A. Velez-Espino, C. Sweet, M. Alae and C.D. Metcalfe, *Chemosphere*, **64** (2), 328 (2006).
- 31) D.J. Fort, P.D. Guiney, J.A. Weeks, J.H. Thomas, R.L. Rogers, A.M. Noll and C.D. Spaulding, *Toxicol. Sci.*, **81** (2), 454 (2004).
- 32) D.J. Fort, J.H. Thomas, R.L. Rogers, A. Noll, C.D. Spaulding, P.D. Guiney and J.A. Weeks, *Toxicol. Sci.*, **81** (2), 443 (2004).
- 33) A.O. Cheek, C.F. Ide, J.E. Bollinger, C.V. Rider and J.A. McLachlan Arch, *Environ. Contam. Toxicol.*, **37** (1), 70 (1999).
- 34) A.D. Sowers, M.A. Mills and S.J. Klaine, *Aquat. Toxicol.*, **94** (2), 145 (2009).
- 35) B.D. Hersikorn and J.E. Smits, *Environ. Pollut.*, **159** (2), 596 (2011).
- 36) P.Y. Kunz, H.F. Galicia and K. Fent, *Mar. Environ. Res.*, **58** (2-5), 431 (2004).
- 37) J.A. Carr, A. Gentles, E.E. Smith, W.L. Goleman, L.J. Urquidi, K. Thuett, R.J. Kendall, J.P. Giesy, T.S. Gross, K.R. Solomon and G. Van Der Kraak, *Environ. Toxicol. Chem.*, **22** (2), 396 (2003).
- 38) N. Veldhoen, R.C. Skirrow, H. Osachoff, H. Wigmore, D.J. Clapson, M.P. Gunderson, G. Van Aggelen and C.C. Helbing, *Aquat. Toxicol.*, **80** (3), 217 (2006).
- 39) D.J. Fort, R.L. Rogers, J.W. Gorsuch, L.T. Navarro, R. Peter and J.R. Plautz, *Toxicol. Sci.*, **113** (2), 392 (2010).
- 40) D.J. Fort, M. Mathis and S. Pawlowski, *Environ. Sci. Technol.*, **45** (17), 7602 (2011).
- 41) D.J. Fort, M.B. Mathis, W. Hanson, C.E. Fort, L.T. Navarro, R. Peter, C. Buche, S. Unger, S. Pawlowski and J.R. Plautz, *Toxicol. Sci.*, **121** (2), 292 (2011).
- 42) D.J. Fort and S. Pawlowski, *Toxicol. Sci.*, **123** (2), 603 (2011).
- 43) C. Helbing, J. Wulff, C.M. Bromba, A. Hinther and N. Veldhoen, *Environ. Sci. Technol.*, **45** (17), 7600 (2011).
- 44) C.C. Helbing, G. van Aggelen and N. Veldhoen, *Toxicol. Sci.*, **119** (2), 417 (2011).
- 45) C.C. Capen, *Toxicol. Pathol.*, **25** (1), 39 (1997).
- 46) J.C. O'Connor, S.R. Frame, L.G. Davis and J.C. Cook, *Toxicol. Sci.*, **51** (1), 54 (1999).
- 47) J.E. Tietge, G.W. Holcombe, K.M. Flynn, P.A. Kosian, J.J. Korte, L.E. Anderson, D.C. Wolf and S.J. Degitz, *Environ. Toxicol. Chem.*, **24** (4), 926 (2005).
- 48) P.D. Nieuwkoop and J. Faber, "Normal Table of *Xenopus laevis* (Daudin)", Garland Publishing, Inc. (1994).
- 49) OECD, "Final Report of the Validation of the Amphibian Metamorphosis Assay for the Detection of Thyroid Active Substances: Phase 1-Optimisation of the Test Protocol", (2007).
- 50) OECD, "Final Report of the Validation of the Amphibian Metamorphosis Assay: Phase 2-Multi-Chemical Interlaboratory Study", (2007).
- 51) OECD, "Guidance Document on Amphibian Thyroid Histology Part 1: Technical guidance for morphologic sampling and histological preparation", (2007).
- 52) OECD, "Guidance Document on Amphibian Thyroid Histology Part 2: Approach to reading studies, diagnostic criteria, severity grading, and atlas", (2007).
- 53) K.C. Grim, M. Wolfe, T. Braunbeck, T. Iguchi, Y. Ohta, O. Tooi, L. Touart, D.C. Wolf and J. Tietge, *Toxicol. Pathol.*, **37** (4), 415 (2009).

PROFILE



宮田 かつり
Kaori MIYATA
住友化学株式会社
生物環境科学研究所
主席研究員 薬学博士



於勢 佳子
Keiko OSE
住友化学株式会社
生物環境科学研究所
主席研究員