

EXTEND2005における魚類及び哺乳類試験法開発について

1. 化学物質の内分泌かく乱作用に関する魚類試験について

【これまでの取組】(EXTEND2005 P5 より抜粋)

SPEED '98 のリストに基づいて、化学物質ごとに水生生物及び野生生物に対する内分泌かく乱作用に関連する文献及び試験管内試験(*in vitro* 試験)に関する文献の検索・収集を行い、専門家による文献の信頼性評価を実施した。その結果をもって試験対象物質を選定し、メダカを用いて、ピテロジェニンアッセイ、パーシャルライフサイクル試験を実施し、必要に応じてフルライフサイクル試験を追加した。試験濃度の設定にあたっては、試験対象物質の環境中の濃度、既存の毒性情報、物性情報を参考とした。

28 物質で試験を実施した結果、環境中の濃度を考慮した濃度で 4-ノニルフェノール(分岐型)と 4-t-オクチルフェノールでメダカに対し内分泌かく乱作用を有することが強く推察され、またビスフェノール A でもメダカに対し内分泌かく乱作用を有することが推察された。

メダカを用いた上記の一連の試験結果をもって内分泌かく乱作用に関連する評価を実施してきたが、実験動物として基礎的知見の集積が進んでいるメダカにおいても、さらに結果を評価するための関連知見の収集が必要であることや、試験期間の短縮等の効率化を図ること等が課題として挙げられた。

【平成 17 年度検討事項及び結果等】

(1) エストロゲン様作用以外の内分泌かく乱作用に着目した試験体系の検討

アンドロゲン様作用についての検討

トレンボロン(アンドロゲン作用物質)を用いてフルライフサイクル試験を実施し、VTG 誘導や二次性徴等の評価指標の有用性について検討を行った。その結果、二次性徴(尻鰭に乳頭状小突起の形成)、生殖腺組織、生殖腺指数、受精率及び産卵数において有意な影響が認められた。特に、二次性徴の変化はアンドロゲン作用をスクリーニングできる簡便かつ高感度な指標となると考えられる。また、受精率及び産卵数に関しては、繁殖低下を直接的に示すことから、エストロゲン様物質と同様に、アンドロゲン作用による有害性を評価できる指標であると考えられた。

弱エストロゲン様作用/アロマターゼ阻害作用/甲状腺ホルモン様作用についての検討

メダカ甲状腺ホルモン受容体を用いた結合試験を行った。その結果、トリブチルスズ、トリフェニルスズ、4-オクチルフェノール、アルドリン、クロルデン、ヘプタクロールなどに弱い結合性が認められた。

メダカ甲状腺ホルモン受容体を用いた結合試験結果

試験物質	IC50(M)	RBA(%)
3,3',5-トリヨードチロニン	2.20×10^{-9}	100
トリブチルスズ	1.17×10^{-5}	0.0301
トリフェニルスズ	1.76×10^{-5}	0.0200
4-オクチルフェノール	3.48×10^{-4}	0.00101
アルドリン	2.55×10^{-4}	0.000862
クロルデン	2.78×10^{-4}	0.000792
ヘプタクロール	3.06×10^{-4}	0.000719
ノニルフェノール	N.D.	N.D.
マラチオン	N.D.	N.D.
アジピン酸ジ-2-エチルヘキシル		
アミトロール		
エンドリン		
オクタクロロスチレン		
ケルセン		
2,4-ジクロロフェノール		
ディルドリン		
4-ニトロトルエン		
trans-ノナクロル		
ノニルフェノキシ酢酸		
ノニルフェノールモノエトキシレート		
ノニルフェノールジエトキシレート		
ビスフェノール A		
フタル酸ジエチル		
フタル酸ジ-2-エチルヘキシル		
フタル酸ジシクロヘキシル		
フタル酸ジ-n-ブチル		
フタル酸ジプロピル		
フタル酸ジヘキシル		
フタル酸ジペンチル		
フタル酸ブチルベンジル		
4-t-ブチルフェノール		
γ -ヘキサクロロシクロヘキサン		
ヘキサクロロベンゼン		

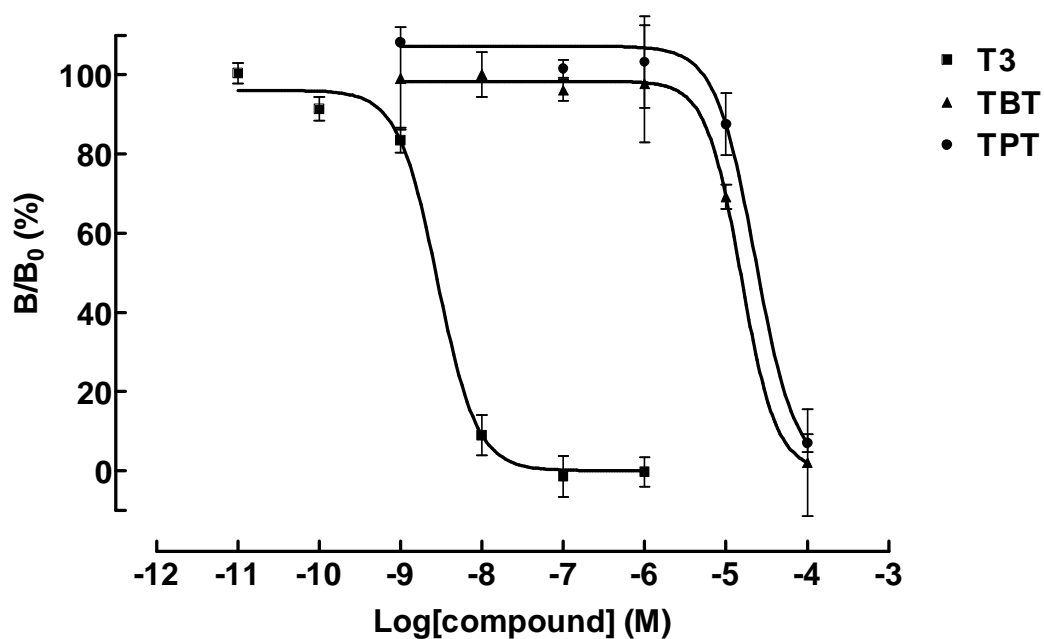
試験物質	IC50(M)	RBA(%)
ペルメトリン混合物		
ベンゾフェノン		
ペンタクロロフェノール		
マイレックス		
p,p'-DDD		
p,p'-DDE		
p,p'-DDT		
o,p'-DDT		

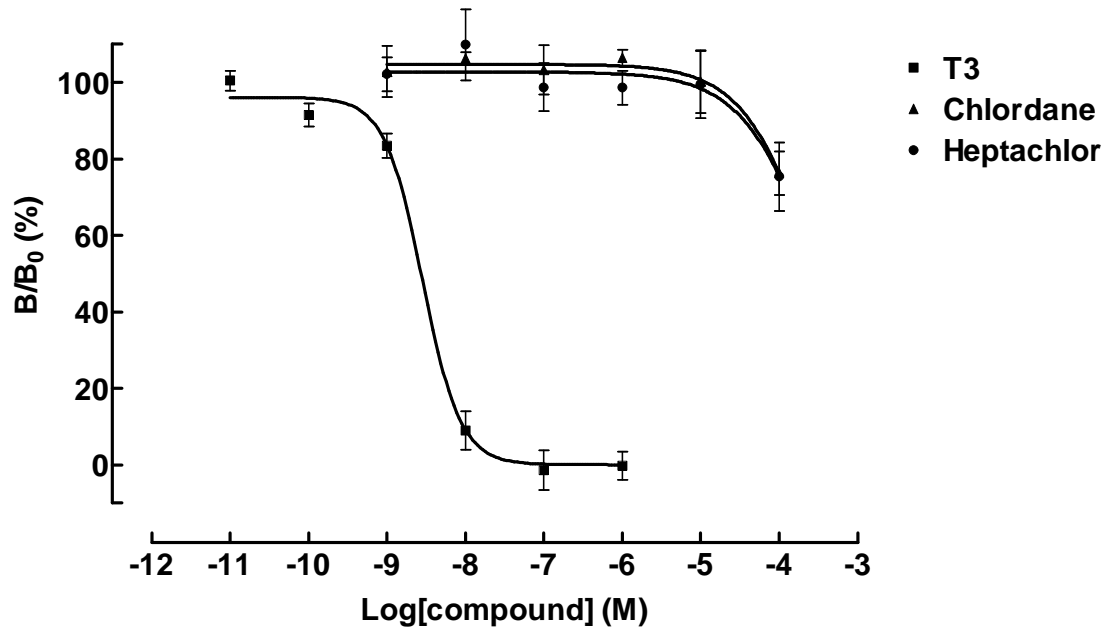
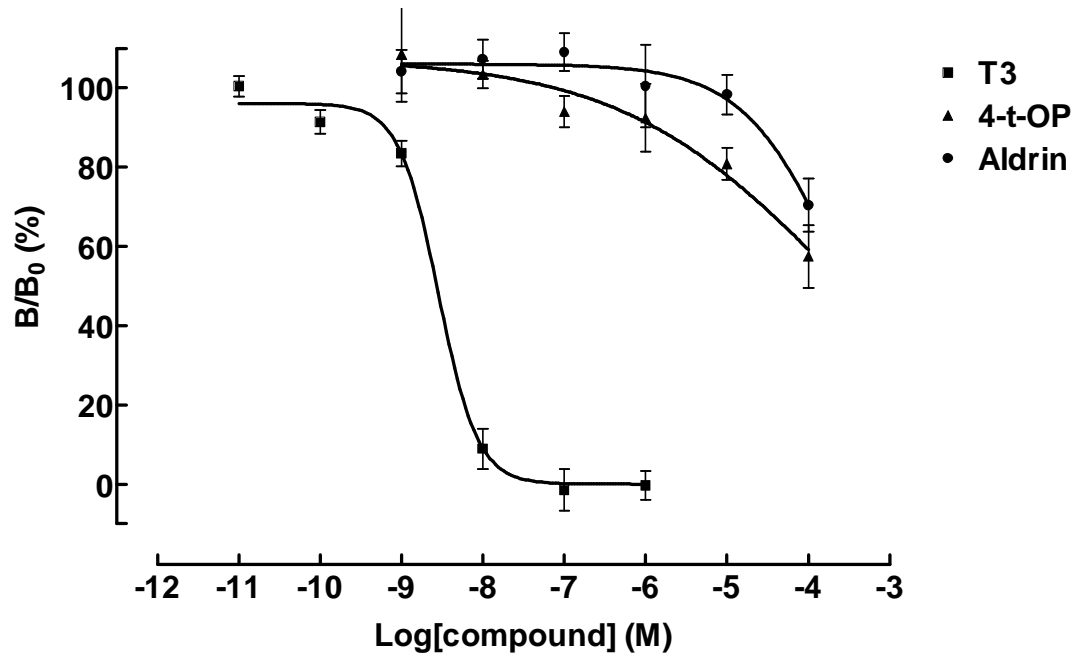
RBA：相対結合親和性（％）

N.D.：活性が認められたが IC₅₀ 値は得られず、相対活性が計算できなかった。

：試験した濃度範囲で結合性が認められなかった。

TR 結合曲線





(2) 試験魚(メダカ)に関する基礎的知見の収集・整理 メダカアトラスの作成

これまでの取組みにおいて、正常個体における基礎データ(生殖腺組織と成長、二次性徴、肝臓中ビテロジェニン濃度等)及びエストロジェンばく露個体における生殖腺組織のデータを収集し、メダカデータベースとしてホームページ*で公開してきている。エストロジェン以外の化学物質にばく露した個体の基礎データが不足していることから、平成17年度はアンドロジェン作用物質であるトレンボロンにばく露した個体における生殖腺組織変化のデータを収集し、メダカデータベースを整備した。

*http://endocrine.eic.or.jp/siryoku_medaka/index.html

試験のエンドポイントについての情報整備

試験におけるエンドポイントとなる、全長、体重、産卵数、受精率、孵化日数といった試験項目に関して、その対照群(被験物質無投与群)でのばらつき、また飼育条件等によるばらつきの変化等について情報を整備した。

(3) 魚類試験体系の合理化についての検討

ビテロジェニン(VTG)mRNA 発現量を指標としたスクリーニング試験法の検討

ビテロジェニン(VTG)mRNA 発現量を指標としたスクリーニング試験法の検討を行った。その結果、mRNA 発現量と血中ビテロジェニン濃度との間に量的相関性が認められ、ばく露期間を短縮することが可能である。しかしながら、既存の VTG 産生試験で得られる最小影響濃度の近傍では、mRNA の発現により VTG 産生を検出することは困難であることが明らかとなった。したがって、化学物質を高濃度でばく露して VTG 誘導をスクリーニングする場合、mRNA 発現量を指標にした本方法が適用できると考えられた。

試験体系の合理化の検討

試験の評価項目に関するこれまで実施した SPEED'98 における魚類試験結果より得られた成果としては、ばく露の指標としては、雄の肝臓中ビテロジェニンの高値が有効であること、有害性の指標としては、受精率の低値が有効であること、精巣卵などの生殖腺の組織学的検査結果は、受精率の低値とは明確な相関は認められなかったこと、が得られた。

これらの成果を踏まえ、これまで実施してきたスクリーニング試験(ビテロジェニンアッセイとパーシャルライフサイクル試験)及び有害性評価のためのフルライフサイクル試験の体系を見直すために、これまでの試験結果を比較・検討中である。

なお、試験結果の比較・検討を行うなかで、受精率の低かった世代の再生産能力の把握に関する検討を行う必要が認められた。

(4) OECD関連事業について

経済協力開発機構(OECD)は、内分泌かく乱作用のスクリーニングを目的とした魚類スクリーニングアッセイ(FSA:Fish Screening Assay)を提案し、2003年(平成15年)から基準物質による検証作業を進めている。2003年にはPhase 1Aとして強エストロジェン(17 β -エストラジオール)及びアンドロジェン(17 β -トレンボロン)による検証作業が、2004年にはPhase 1Bとして弱エストロジェン(ペンチルフェノール)、アロマトターゼ阻害剤(プロクロラズ)及び抗アンドロジェン(フルタミド)による検証作業が行われてきた。また、2005年には、陰性対照物質として過マンガン酸カリウム及び1-オクタノールの2物質を用いてPhase 2検証作業が行われた。我が国は本検証作業に参加すると共に、(財)化学物質評価研究機構がリードラボとして全データのとりまとめ及び報告を行ってきた。

その結果、本アッセイにおいて、ピテロジェニン濃度及び二次性徴を測定することで化学物質のエストロジェン様作用、アンドロジェン様作用及びアロマトターゼ阻害作用の影響を検出することが可能であることが示唆された。平成18年5月に開催された第18回テストガイドライン・ナショナルコーディネーターズ会合(WNT)において、本アッセイのテストガイドライン化へ向けての作業を引き続き行うこととされた。

< 魚類試験に関するOECDの動きと日本の取組 >

年月	OECD の動き	日本の取組
1998年10月	第1回魚類 Expert Consultation ・ 3段階の試験体系 (Tiered testing approach) 提案	日本の取組を紹介 ・ SPEED '98 の概要説明 ・ d-rR メダカを用いた性転換試験の結果
2000年11月	第2回魚類 Expert Consultation ・ Tier 1~3 における試験法の結果報告	日本の取組を紹介 ・ メダカ繁殖試験 ・ sr-R メダカを用いた性転換アッセイ ・ メダカフルライフサイクル試験を用いた試験結果
2002年6月	第6回 EDTA (Endocrine Disrupter Testing and Assessment) 会議 ・ 5段階の試験体系 (Conceptual framework) 提案	試験体系のスキームを提案 日本の取組を紹介 ・ ノニルフェノール及びトリブチルスズについてのリスク評価結果を提出し加盟国の専門家の意見を聴取していることを発表
2002年9月	第1回魚類生殖腺組織学に関するテクニカルワークショップ ・ 魚類内分泌かく乱評価において生殖腺組織学がエンドポイントになりうるとの共通認識確認	日本における取組を紹介 ・ 魚類生殖腺組織学の切片作製法 ・ メダカ正常発生における生殖腺組織学基礎データ及び内分泌攪乱化学物質にばく露されたメダカ生殖腺病理組織学
2003年3月	VMG-eco (Validation Management group for ecotoxicity testing) 電話会議 ・ Fish Screening Assay for the Detection of Endocrine Active Substances Phase 1 検証作業の承認 ・ Phase 1A 検証作業の開始	Phase 1A 検証作業の実施 参加機関(日本) ・ 財団法人化学物質評価研究機構(リードラボ)、 独立行政法人国立環境研究所、国土環境株式会社
2003年5月	第2回 VMG-eco ・ Phase 1A 検証作業の進捗確認 ・ 高次試験法についての議論	魚類スクリーニング試験の Phase 1A 検証作業における初期結果報告 日本の取組を紹介 ・ パーシャルライフサイクル試験及びフルライフサイクル試験開発状況
2003年10月	第1回魚類生殖腺会議 ・ 生殖腺評価の標準化 FDG (Fish Drafting Group) 会議 ・ Phase 1B 検証作業に向けた取り組みの提案/承認	魚類スクリーニング試験の Phase 1A 検証作業の結果報告 フルライフサイクル試験と二世世代試験の比較に関する文献調査の進捗状況報告
2004年3月	・ Phase 1B の検証作業の開始	Phase 1B 検証作業の実施 参加機関(日本) ・ 財団法人化学物質評価研究機構(リードラボ)、 独立行政法人国立環境研究所、国土環境株式会社
2004年11月	第2回魚類生殖腺会議 ・ 魚類生殖腺評価の標準化と重要な測定項目のリストアップ	魚類スクリーニング試験の Phase 1B 検証作業のうち生殖腺関連の結果報告
2004年12月	第3回 VMG-eco ・ 魚類スクリーニング試験 Phase 1B 検証作業のまとめと今後の取り組みの整理 ・ 高次試験法についての議論	魚類スクリーニング試験の Phase 1B 検証作業の結果報告
2005年5月	FDG 電話会議 ・ Phase 2 検証作業に向けた取り組みの提案/承認	Phase 2 検証作業における物質選定のため in vitro 試験の結果報告
2005年7月	・ Phase 2 の検証作業の開始	Phase 2 検証作業の実施 参加機関(日本) ・ 財団法人化学物質評価研究機構(リードラボ)

2005年10月	FDG 電話会議 Phase 2 検証作業の進捗	Phase 2 検証作業の結果報告
2005年12月	第4回 VMG-eco ・魚類スクリーニング試験のテストガイドライン化に向けた取り組みの整理 ・Fish Sexual Development Test のプロトコールの提案 ・フルライフサイクル試験と二世世代試験の比較	<ul style="list-style-type: none"> Phase 2 検証作業の結果をドラフトレポートにして報告 受精率と生殖腺の組織変化の関連性の結果報告 メダカのフルライフサイクル試験における指標の感受性を報告
2006年2月	FDG 電話会議 ・魚類スクリーニング試験の検証作業の論文化	魚類スクリーニング試験の検証作業の論文化の実施
2006年4月	第9回 EDTA ・魚類スクリーニング試験のテストガイドライン化に向けた取り組みの提案/承認 ・魚類試験管内試験に関する DRP (Detailed Review Paper) 作成 ・Fish Sexual Development Test の Phase 1 検証作業の開始	<ul style="list-style-type: none"> 魚類スクリーニング試験バリデーションのピアレビューの提案 魚類試験管内試験に関する DRP の SPSF(Standard Project Submission Form)を提出
2006年5月	WNT ・魚類スクリーニング試験バリデーションのピアレビューの承認/開始 ・魚類試験管内試験に関する DRP 作成プロジェクトの開始	魚類スクリーニング試験バリデーションのピアレビューの提案

2. 化学物質の内分泌かく乱作用に関する哺乳類試験について

【これまでの取組】（EXTEND2005 P8より抜粋）

ラットを用いた改良1世代試験を開発し、SPEED'98のリストに基づいて、対象とした化学物質ごとには哺乳類に対する内分泌かく乱作用に関連する文献及び試験管内試験に関する文献の検索・収集を行い、専門家による文献の信頼性評価を実施した。その結果から選定した試験対象物質を用いて試験を実施した。試験にあたっては試験対象物質の環境中の濃度、ヒトの推定ばく露量、既存の毒性情報、物性情報をもとに試験用量及び観察項目の設定を行った。試験用量の設定にあたっては、ヒトがばく露する可能性のある用量レベルにおいて何らかの反応や非用量相関的な反応があった場合に検出することをめざして、敢えて従来型のリスク評価を目的とはせず、ヒト推定ばく露量を考慮した用量に原則4群、何らかの有害影響が既に報告されている用量に原則1群を設定した。経済産業省で進められている子宮肥大試験、ハーシュバーガー試験、改良28日間反復投与毒性試験の試験結果も参照し、結果の評価を行った。

28物質でラットを用いた試験を実施し、いずれの物質でもヒト推定ばく露量を考慮した用量では明らかな内分泌かく乱作用は認められないと判断した。

動物試験であるからには、飼料から完全に除去することができず定量に制御することもできない物質(たとえば植物由来のエストロゲン様作用を持つ物質やフタル酸エステル類など)が存在する中での試験であり、現実的には作用物質のばく露量ゼロであるような対照群を設定することはできない中で、ヒト推定ばく露量を考慮した用量のレベルにおいてこれ以上精密に変化を捉えることには限界があることが明らかとなった。今後は、ヒトがばく露する可能性がある用量だけでなく、各種の毒性評価の手法も参考とした用量設定の検討が必要である。

【平成17年度検討事項及び結果等】

(1) 哺乳類試験結果の情報提供

平成18年3月までに試験が終了していた35物質の改良型一世代試験の結果について、平成18年4月に開催されたOECDのEDTA会議において発表し、報告書「Additional Data on the specificity of the uterotrophic assay」に記載された。

(2) 哺乳類試験法に関する情報収集

化学物質の内分泌かく乱作用に関する哺乳類試験法について、一生涯試験、多世代試験のような環境省が実施している改良型一世代試験と比較して長期間の飼育を要する試験法*や多種類の化学物質を同時に投与する複合影響試験法**に関する報告が得られている。

人健康影響研究における留意点や化学物質の内分泌かく乱作用に関する人健康影響研究についての特異性や課題、研究法のあり方などについて検討を行う必要がある。

* Anway, M.D., A.S. Cupp and M. Uzumcu and M.K. Skinner(2005)Epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors and male fertility. Science, Vol.308, p1466-1469 など

**Earl Gray Jr, L., V.S. Wilson, T. Stoker, C. Lambright, J. Furr, N. Noriega, K. Howdeshell, G.T. Ankley and L. Guillette (2006)Adverse effects on environmental antiandrogens and androgens on reproductive development in mammals. Int. J. Androl., Vol.29, No.1, p96-104 など

(3) 哺乳類試験体系の合理化についての検討

哺乳類試験体系については、ExtEND2005において「今後は、ヒトがばく露する可能性がある用量だけでなく、各種の毒性評価の手法も参考とした用量設定の検討が必要である。」とされている。

NOELが算定できるようばく露用量群の設定を行った動物試験を行うために、試験対象候補物質である4-t-ブチルフェノールについて、ラットを用いた改良1世代試験を実施中である。

試験内容

- * 動物の種類：ラット(クローズドコロニー；Wistar Hannover)
- * 飼料の種類：実験動物用粉末飼料(CE2、日本クア(株)、自由摂取)
- * 用量：1 µg/kg/day、60 µg/kg/day、20 mg/kg/day、60 mg/kg/day、200 mg/kg/day (環境中における最大検出濃度から推定したばく露量0.9 µg/kg/day及びOECDが実施したラットを用いた反復経口投与毒性・生殖発生毒性併合試験結果から設定した)
- * 投与経路：強制経口投与(1 µg/kg/day群及び60 µg/kg/day群)及び混餌投与(300 ppm群、1000 ppm群及び3000 ppm群、それぞれ20 mg/kg/day、60 mg/kg/day及び200 mg/kg/dayに相当)
- * 1群あたりの動物数：妊娠動物として12匹/群
- * 試験期間：馴化・交配期間を含め17週程度(約120日)
- * 投与期間：妊娠0日～哺育21日
- * 観察項目：文献調査・環境調査結果を参考に、物質ごとに検討
- * 分析：飼料、飲水、コーン油については、被験物質及び植物エストロゲン濃度を測定するとともに、被験物質の純度分析も実施。また、コーン油等に混合した実質投与量も測定。

実施状況

平成18年3月に試験を開始し、現在、離乳後F1の飼育中で、8月に終了予定。

平成18年4月1日に交配開始。

平成18年4月24日にF1児の出産開始。

平成 18 年 5 月 15 日に F1 児の離乳開始（母動物の剖検）。
平成 18 年 6 月 22 日に F1 児について 56 日齢の体重測定終了。

（参考）1 世代試験の概略図

