

## OECD における試験法開発・検証の取組

### 1. ExTEND2005における魚類試験法開発について

#### 【これまでの取組】

内分泌攪乱化学物質問題への環境庁の対応方針について—環境ホルモン戦略計画 SPEED' 98—の表 3-1 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、ビ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。

36 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 と *o,p'*-DDT 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化学物質の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。

さらに、化学物質の内分泌かく乱作用に関する環境省の今後の対応方針について—ExTEND2005—における魚類試験法開発では、有害性の指標である受精率及び産卵数が低い個体から発生した次世代の再生産能力の把握、魚類スクリーニングアッセイのテストガイドライン化に係る経済協力開発機構(OECD)などへの国際貢献が課題として挙げられている。

#### 【検討事項及び結果等】

これまで実施した魚類試験結果より得られた試験の評価項目に関する成果としては、①エストロゲン様物質の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、②有害性の指標としては、受精率の低値が有効であること、③精巣卵などの雄魚生殖腺の組織学的検査結果

と受精率の低値とには明確な相関は認められなかったことが得られた。

また、アンドロジェン様物質のばく露の指標としては、二次性徴(尻鰭の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ジェン様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、エストロジェン様物質と同様に、アンドロジェン様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。

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・検討して合理化を行う予定である。

なお、試験結果の比較・検討を行うなかで、エストロジェン様作用以外の内分泌かく乱作用に着目して検討を行う必要と、フルライフサイクル試験の繁殖試験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。これらのことより、平成18年度は以下の課題を実施した。

#### (1) 魚類試験体系の合理化についての検討

##### ① エストロジェン様作用以外の内分泌かく乱作用に着目した試験の検討

SPEED'98で検討したビテロジェニン産生試験は、エストロジェン様作用をスクリーニングすることを目的としており、雄魚への21日間の短期ばく露試験である。そのため、現行のビテロジェニン産生試験は、アンドロジェン様作用及びアロマターゼ阻害作用を有する化学物質をスクリーニングすることができない。平成18年度は、アンドロジェン様作用及びアロマターゼ阻害作用をスクリーニングする試験を検討した。そのため、トレンボロン(アンドロジェン様作用)及びプロクロラズ(アロマターゼ阻害作用)を雌魚にばく露する短期ばく露試験を実施した。

その結果、トレンボロンのばく露により、雌のビテロジェニン産生が抑制されること、雄の二次性徴である尻鰭の乳頭状小突起が雌の尻鰭に形成されることが明らかとなった。また、プロクロラズのばく露により、雌のビテロジェニンの産生が抑制されることが明らかとなった。しかしながら、プロクロラズのばく露では、雄の二次性徴である乳頭状小突起の形成は認められなかった。雌のビテロジェニン産生の抑制と乳頭状小突起の形成を指標とすることにより、アンドロジェン様作用及びアロマターゼ阻害作用をスクリーニングできることが成果として得られた。

##### ② 試験体系の合理化についての検討

強エストロジェンばく露により受精率の低かった世代の再生産能力に

ついて把握するため、強エストロジェン(17β-エストラジオール)をばく露したフルライフサイクル試験を実施し、繁殖試験段階で受精率の低値(50%以下)が認められた第1世代個体より発生した第2世代個体の生産及び再生産への影響を検討した。17β-エストラジオールにばく露した第1世代個体より発生した第2世代受精卵を水道水を活性炭処理した水\*で飼育して孵化率、孵化日数及び受精率、産卵数を測定した。

その結果、第2世代の孵化率、孵化日数は対照区と比べて統計学的な有意な差は認められなかった。また、再生産能力に関する受精率、産卵数も対照区と比べて統計学的な有意な差は認められなかった。第1世代において受精率の低値を示した個体より発生した第2世代個体は、継続して強エストロジェンをばく露しない場合、第2世代の再生産能力は低下しないことが明らかとなった。これまで実施してきたフルライフサイクル試験では第1世代及び第2世代において、強エストロジェンを第2世代が成熟する孵化後60日令までばく露している。今後、ここで得られた成果とこれまでの試験結果をさらに検討することにより、フルライフサイクル試験の試験期間短縮などの効率化検討を進める予定である。

\*水道水を活性炭処理した水：(財)化学物質評価研究機構において年に2回、水生生物を用いる試験での水質監視に記載されている基準「OECD Guidelines for Testing of Chemicals」“Fish, Early-life Stage Toxicity Test(Guideline 210, July 17, 1992)”あるいは水道法に基づく水質基準(2003年(平成15年)5月30日改正 厚生労働省令第101号)などに基づいて項目を測定して管理している。

## (2)OECD関連事業

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行ってきている。2003年にはPhase 1Aとして強エストロジェン(17β-エストラジオール)及びアンドロジェン(17β-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。環境省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、ビ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。

平成19年1月にスペインで開催された第5回生態影響試験法のためのマネジメントグループ(VMG-eco)会議において、環境省より、テストガイドライン化のためのピアレビューパネル設置とスケジュールを提案し承認されている。7月より、フランス、ドイツ、英国、米国及び日本より6名のレビュアーを選考し、ピアレビューパネルを開始している。現在、レビュアーからのコメントを整理、対応しているところである。今後は、これらをまとめてピアレビュー報告書を作成してOECDへ提出する。

さらに、OECDは、レベル5に位置付けているフルライフサイクル試験及び2世代繁殖試験について検討を行っている。平成18年11月に開催された第3回日米実務者会議では、魚類繁殖試験に関する技術的課題について共同で検討することが合意されている。現在、(独)国立環境研究所及び(財)化学物質評価研究機構において強エストロジェン作用と弱エストロジェン様作用を有する化学物質をメダカにばく露して、米国が作成した試験プロトコルの検証作業を実施しているところである。今後は、米国が提案するメダカ二世代試験の最適化、標準化に関わる情報を収集するとともに、ここで得られた結果と環境省が実施したフルライフサイクル試験結果とを比較、検討してOECDに報告する予定である。

＜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組の提案/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帯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組の整理 ・ 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組の提案/承認	Phase 2 検証作業における物質選定のため <i>in vitro</i> 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組の整理 ・Fish Sexual Development Test のプロトコルの提案 ・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"> <li>Phase 2 検証作業の結果をドラフトレポートにして報告</li> <li>受精率と生殖腺の組織変化の関連性の結果報告</li> <li>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</li> </ul>
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組の提案/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"> <li>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</li> <li>魚類試験管内試験に関する DRP の SPSF(Standard Project Submission Form)を提出</li> </ul>
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
2007年1月	第5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のための取組とスケジュール提案/承認 ・Fish sexual development test(FSDT) 検証作業への提案	<ul style="list-style-type: none"> <li>テストガイドライン化のためのレビューパネル設置の概要とスケジュールの提案</li> <li>FSDT 検証作業においてメダカによる試験を行う必要があることを提言</li> <li>日米二国間会議における魚類長期毒性試験の取組状況を報告</li> </ul>
2007年7月	・魚類スクリーニング試験のテストガイドライン化のためのピアレビューパネルを設置、レビューアからのコメント収集を開始	<ul style="list-style-type: none"> <li>フランス、ドイツ、英国、米国、日本より6名のレビューアを選考</li> <li>ピアレビューマネージャーは日本</li> </ul>
2008年1月	第6回 VMG-eco 開催予定	

## 2. 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、①変態アッセイ、②性転換試験、③ビ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、④アフリカツメガエルの標準データベースおよび⑤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 F<sub>1</sub>(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 $\alpha$ )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 3 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 ; T<sub>4</sub>、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 ; T<sub>4</sub>、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、T<sub>4</sub>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。

(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

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)	$3.1 \times 10^9$	$1.7 \times 10^9$
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(°C)	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)	500-2000	1000-3000

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18年度事業の成果】

① OECD リングテストフェーズ3への参加

平成18年度は、フェーズ3のプロトコルに沿って、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実施した。また、平成19年1月の第5回VMG-ecoにフェーズ2の結果を報告した。

② 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

T<sub>4</sub>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、作用メカニズムを理解するための、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。



③ 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、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。

【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、フェーズ3の取りまとめとともに、テストガイドラインの提案に向けた取組を推進する。また、現在はアフリカツメガエルのみを試験動物として使用しているが、平成16年度および平成18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を試験動物として含めることを提案していく。さらに、試験法開発を補完するために、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に関する研究を推進する。

＜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	ドイツが 2001 年に提唱した XEMA( <i>Xenopus</i> Metamorphosis Assay)のデータをドイツ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	<p>第1回両生類専門家会合</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>カエル変態アッセイの OECD テストガイドライン作成推進</li> </ul>	<p>日本の取組を紹介</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>ツチガエル変態試験の試験条件の設定</li> <li>トロピカリス変態試験の試験条件設定</li> <li>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</li> <li>アフリカツメガエルパーシャルライフテストの提案</li> <li>ビテロジェニン測定キットの開発</li> <li>アトラスデータベースの構築</li> <li>ZZ 雌を用いた性転換試験</li> <li>トランスジェニックカエルの作製と利用</li> <li>プロテオーム解析</li> </ul>
2003年9月	<ul style="list-style-type: none"> <li>Proposal for Phase 1 of the Validation of the Amphibian Metamorphosis Assay を受理</li> </ul>	フェーズ 1 の試験条件を取りまとめ、米・独とともに OECD に提出
2004年1月	<ul style="list-style-type: none"> <li>フェーズ 1 開始</li> </ul>	フェーズ 1 実施
2004年3月	<ul style="list-style-type: none"> <li>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</li> </ul>	<p>「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</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>フェーズ 1 結果報告</li> </ul>
2004年6月	<p>第2回両生類専門家会合</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>フェーズ 1 のデータを承認</li> <li>フェーズ 2 への移行の承認</li> </ul>	<p>フェーズ 1 の試験結果の提出</p> <p>フェーズ 2 のプロトコル案の提出</p> <p>日本の取組を紹介</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>ツチガエル変態試験の試験条件の設定</li> <li>トロピカリス変態試験の試験条件の設定</li> <li>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</li> <li>アフリカツメガエルパーシャルライフテストの提案</li> <li>ビテロジェニン測定キットの開発</li> <li>アトラスデータベースの構築</li> <li>ZZ 雌を用いた性転換試験</li> <li>トランスジェニックカエルの作製と利用</li> <li>プロテオーム解析</li> </ul>
2004年12月	<p>第3回 VMG-eco</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Draft Report of Phase 1 of the Validation of the Amphibian Metamorphosis Assay の報告</li> <li>Phase 2 of the Validation of the Amphibian Metamorphosis Assay の承認</li> </ul>	
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"> <li>Draft Report of Phase 2 of the Validation of the Amphibian Metamorphosis Assay の進捗報告</li> </ul>	
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"> <li>Phase 2 Frog Metamorphosis Assay Histology: 1 Part 2 - Approach to reading studies, diagnostic criteria, severity grading, and atlas の改定</li> </ul>	組織評価の手順について提案

2007年1月	第5回 VMG-eco ・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	第7回両生類専門家会合電話会議 ・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 (予定)	第6回 VMG-eco ・Phase 3 of the Validation of the Amphibian Metamorphosis Assay の結果報告(予定)	

### 3. ExTEND2005 における無脊椎動物試験法開発について

#### 【これまでの取組】

平成 16 年 4 月に経済協力開発機構(OECD)へ提案した Enhanced TG 211\*は、同年 5 月の OECD の第 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)会合において、オオミジンコ(*Daphnia magna*)を用いた無脊椎動物における内分泌かく乱作用に関する試験法提案として正式に認められた。

提案後にバリデーションの予備検討を行ったところ、オスの出現というエンドポイントの感受性に系統差があることが明らかとなった。

そこで、平成 16 年 12 月に開催された第 3 回生態影響試験法のためのマネージメントグループ(VMG-eco)会議において、OECD 加盟 6 カ国からオオミジンコのさまざまな遺伝系統を手に入れて、バリデーション実施前にあらかじめ予備的試験(プレ・バリデーション)を実施することが承認され、(独)国立環境研究所において実施した。

その結果を、平成 17 年 11 月に開催された OECD 第 2 回無脊椎動物専門家会合において報告し、それを踏まえて試験物質の選定、使用系統の選択等、バリデーション・リングテストの実施条件が検討された。

平成 17 年 12 月に(独)国立環境研究所がリングテストのリード・ラボラトリーとして選定され、平成 18 年度には 6 カ国 12 研究機関の参加のもと、バリデーション・リングテストを実施した。一通りのデータ整理と統計解析を行った後、平成 19 年 1 月に開かれた OECD の第 5 回 VMG-eco 会議および平成 19 年 6 月開催の第 3 回無脊椎動物専門家会合に於いて結果報告を行った。各国からの意見を参考にして、現在リングテストの報告書(ドラフト)を作成中である。

\* 従来ミジンコでの毒性試験として使用されてきたテストガイドライン 211 に、オスの出現(仔虫の性比の変化)、脱皮回数の変化という新たなエンドポイントを追加することを Enhanced テストガイドライン(Enhanced TG 211)として提案している。

#### 【平成 19 年度検討及び実施事項】

##### ① Enhanced TG211 に関連した取組み

国際試験法提案リード国として、昨年度行われたバリデーション・リングテストの結果の取り纏め、各国から出された意見に対し、内部で今後の対策検討を行う。また OECD の無脊椎動物試験法に係る専門家会議に出席し、内部検討結果に関する問題点および今後の予定などを明らかにする。

##### ② OECD および米国環境保護庁(EPA)との研究協力におけるミジンコ多世

## 代試験の検討および実施

OECD および EPA で提案されている無脊椎動物および脊椎動物を用いた内分泌かく乱作用に関する試験法は全て多世代の影響をエンドポイントとして取り入れている。しかしミジンコを用いた試験については現行の TG211 および提案中の Enhanced TG211 とともに 1 世代のみの影響を観察している。そこでミジンコについても多世代試験を行う必要性があるのか、または行うとしたらどのような手法が適切であるかについての検討を行う。さらに、日米二国間協力実務者会議(平成 20 年 2 月開催予定)へ出席し上記試験法に関する提案を行う。

### ③OECD へ提案中の他の無脊椎動物を用いた試験法との比較のためのデータ収集

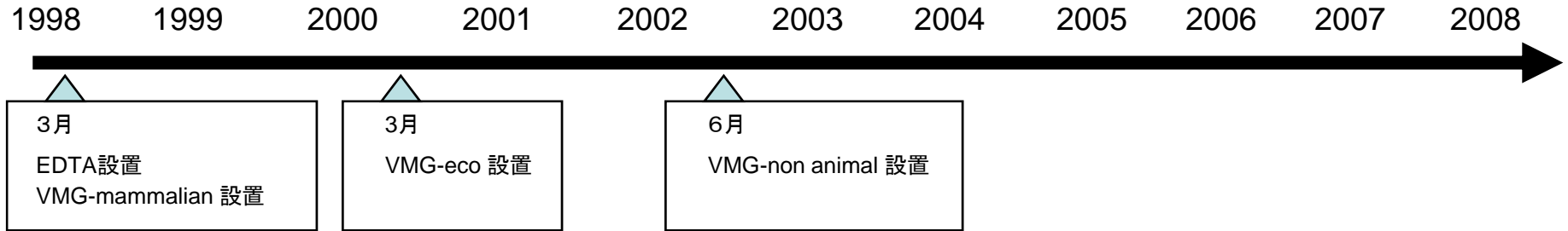
OECD へ提案中のほかの無脊椎動物(コペポッドなど)試験法ですでにデータがあるもの、あるいは今後データを集める予定の物質について、ミジンコを用いた試験法で仔虫性比、脱皮への影響が見られるかを確認する。

### <無脊椎動物試験に関する OECD の動きと日本の取組>

年月	OECD の動き	日本の取組
2003 年 10 月	第 1 回無脊椎動物専門家会合 ・提案された甲殻類における内分泌かく乱化学物質スクリーニング試験法については『Enhanced Test Guideline 211』という呼称を用いることに決定	ミジンコ科数種における、幼若ホルモン様物質によるオス仔虫生産誘導についての基礎データを報告し、甲殻類における内分泌かく乱化学物質スクリーニング試験法として提案
2004 年 5 月	第 16 回 WNT (Meeting of the National Co-ordinators of the Test Guidelines Programme) ・『Enhanced Test Guideline 211』の優先順位については medium と評価	
2004 年 12 月	第 3 回 VMG-eco ・バリデーション開始に先立ち、日本において、OECD 参加各国で使用されているミジンコ系統の感受性差を評価することを決定	試験に用いるミジンコの系統によって幼若ホルモン様物質に対する感受性が異なることを報告
2005 年 2 月		各国から送付されたミジンコを用いた系統差に関するプレ・バリデーション開始
2005 年 11 月	第 2 回無脊椎動物専門家会合	プレ・バリデーション結果報告及び、Enhanced TG 211 リングテスト実施を提案
2005 年 12 月	Invitation Letter 配布	Invitation Letter の作成
2006 年 2 月	バリデーション・リングテスト開始	参加研究機関へのプロトコル、試験物質、試験系統の配布

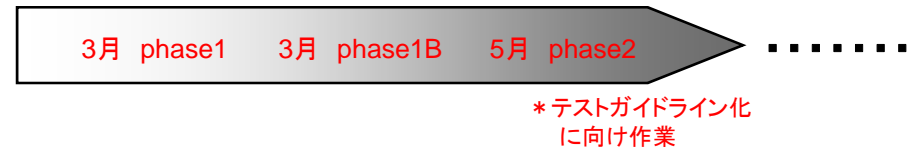
2007年1月	第5回 VMG-eco	バリデーション・リングテスト結果報告
2007年3月	第19回 WNT OECD 事務局より、現行の TG211 でも雄仔虫の出現はオプションな項目として挙げられており、本プロジェクトの成果はこの項目に関するガイダンスとして、TG211の附録にできるのではないかとの示唆あり。また BIAC より、本試験法の目的、根拠及び規制的な必要性が理解できないとの強い意見あり。	
2007年6月	第3回無脊椎動物専門家会合 TG211 に新たなエンドポイントを付加することにより対応することが決定。試験法の意義、必要性について各国の理解を得る。報告書作成、統計処理の検討について、参加国からのボランティア援助の約束。	バリデーション・リングテスト結果報告

# OECDにおける試験法開発・検証の取組



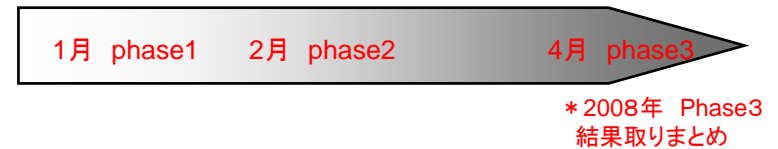
## ○魚類

魚類21日間スクリーニングアッセイ



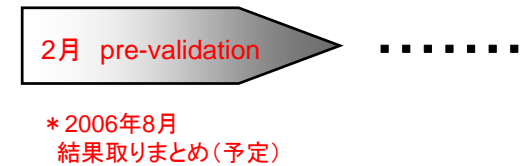
## ○両生類

両生類変態アッセイ



## ○無脊椎動物

拡張TG211 (ミジンコ繁殖試験)



## ○ほ乳類

子宮肥大試験



ハーシュバーガー試験



改訂TG407

(改良28日間反復投与毒性試験)

