

## 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。

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、以下のことが得られている。

#### (1) エストロジェン様物質のばく露の指標

①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いこと、が明らかとなっている。

(2) アンドロジェン様物質のばく露の指標

①雌の肝臓中ビテロジェニンの低値(抑制)が有効であること、②二次性徴(尻鰭の乳頭状小突起の形成)の変化が有効であること、③有害性の指標として、受精率と産卵数の低値が有効であること、が明らかとなっている。

(3) アロマターターゼ阻害物質のばく露の指標

①雌の肝臓中ビテロジェニンの低値(抑制)が有効であること、②アンドロジェン様物質のばく露の指標として有効である二次性徴(尻鰭の乳頭状小突起の形成)はアロマターゼ阻害物質のばく露では変化が認められなかったこと、③雌のビテロジェニン産生の低値(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、が明らかとなっている。

(4) 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

17β-エストラジオールにばく露した第一世代個体より発生した第二世代受精卵を水道水を活性炭処理した水\*で飼育し、孵化率、孵化日数及び受精率、産卵数を測定した結果、以下のことが明らかとなっている。

①第二世代の孵化率、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こと、②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こと、③第一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二世代個体は、継続して強エストロジェンをばく露しない場合、再生産能力は低下しないこと。

\*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。

**【平成19年度の事業の成果】**

平成19年度は、これらの成果を踏まえ、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以下の課題を実施した。

試験の体系の合理化についての検討では、メダカ二世世代繁殖試験とフルライフサイクル試験との比較を行った。OECDでは、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二世世代繁殖試験について検討を行っている。また、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。(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4-t-オクチルフェノール及び17β-エストラジオールをメダカにばく露して、米国が作成し

た二世代繁殖試験プロトコルの検証作業を実施するとともに、既に得られているフルライフサイクル試験結果との比較、検討を行っている。これまでの比較、検討の結果、初期生活段階のふ化率、死亡率及び成魚の繁殖期の受精率、産卵数への影響では二世代繁殖試験とフルライフサイクル試験で得られた結果の間に違いは認められなかった。

#### 【今後の取組方針】

今後は、既にフルライフサイクル試験を実施している物質より二世代繁殖試験を実施する物質を選び試験を実施、結果を比較することにより、それぞれの試験の有効な評価項目を明確にするとともに、試験期間の短縮化、試験条件等の適正化を行う予定である。

#### 【OECD等の国際貢献に関わる課題】

OECD等の国際貢献に関わる課題では、性比に関わる情報収集と魚類性発達試験（FSDA: Fish Sexual Development Assay）の検証試験、魚類スクリーニングアッセイ（FSA: Fish Screening Assay）のテストガイドライン化及び日米実務者会議に関わる課題を実施した。

##### （１）性比に関わる情報収集と魚類性発達試験（FSDA）の検証試験

OECDでは、平成18年（2006年）より、デンマークをリード国として基準物質を用いたFSDAの検証作業を行っている。この試験は性比をエンドポイントとする初期生活段階試験（試験期間60日）である。メダカは雌雄を決定する性決定遺伝子（DMY）を有し、外観的な雌雄と遺伝的な雌雄を区別ができることから、性比をエンドポイントとしたFSDAの有効なモデルである。今後は、平成19年度に実施した4-*t*-オクチルフェノールの試験結果や条件をもとに、ゼブラフィッシュやファットヘッドミノールを用いたフェーズ2検証作業が実施される予定である。

##### （２）魚類スクリーニングアッセイ（FSA）のテストガイドライン化

OECDでは、内分泌かく乱作用のスクリーニングを目的としたFSAを提案し、平成15年（2003年）から基準物質による検証試験を行ってきた。本アッセイは、ビテロジェニン濃度及び二次性徴を指標として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ラーゼ阻害作用の影響をスクリーニングする方法である。これまでに、Phase 1A（2003年）、Phase 1B（2004年）及びPhase 2（2005年）検証試験が行われている。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。

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）において検証結果が報告され、テストガイドライン化へ向けた作業を進めることが承認されている。さらに、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ージメントグル

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おり、平成19年7月より、ピアレビューパネルが開始されている。ピアレビュー報告書は平成20年4月にパリで開催された第20回WNTに提出されており、平成20年6月に、OECDより、FSAのテストガイドライン案に対するコメント要請がアナウンスされている。今後、コメントへの対応が行われ、さらにテストガイドライン化の取組が進められる予定である。

### (3) 日米実務者会議に関わる課題

平成20年2月、サンフランシスコにて第4回日米実務者会議が開催された。魚類では、4-t-ペンチルフェノールを用いた日米の二世世代繁殖試験の結果の比較、検討を行うとともに、広範囲にデータを収集してプロトコルを簡略化することなどが合意されている。また、平成20年度に二世世代試験を実施する候補物質についても検討が行われた。第5回会議は平成20年12月に東京で開催の予定である。

＜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<br>・ 3段階の試験体系 (Tiered testing approach)<br>提案   | 日本の取組を紹介<br>・ SPEED' 98の概要説明<br>・ 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<br>・ Tier 1～3における試験法の結果報告   | 日本の取組を紹介<br>・ メダカ繁殖試験<br>・ sr-R メダカを用いた性転換アッセイ<br>・ 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<br>・ 5段階の試験体系 (Conceptual framework)<br>提案   | 試験体系のスキームを提案<br>日本の取組を紹介<br>・ 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<br>・ 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<br>・ 魚類生殖腺組織学の切片作製法<br>・ 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<br>・ Fish Screening Assay for the Detection of Endocrine Active Substances Phase 1 検証作業の承認<br>・ Phase 1A 検証作業の開始 | Phase 1A 検証作業の実施<br>参加機関 (日本)<br>・ 財団法人化学物質評価研究機構 (リードラボ)、<br>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<br>・ Phase 1A 検証作業の進捗確認<br>・ 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<br>日本の取組を紹介<br>・ 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<br>・ 生殖腺評価の標準化<br><br>FDG (Fish Drafting Group) 会議<br>・ 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<br>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<br>参加機関 (日本)<br>・ 財団法人化学物質評価研究機構 (リードラボ)、<br>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<br>・ 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<br>・ 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<br>・ 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<br>・ 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 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<br>参加機関 (日本)<br>・ 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<br>Phase 2 検証作業の進捗   | Phase 2 検証作業の結果報告  |

|          |  |  |
|----------|--|--|
| 2005年12月 | <p>第4回 VMG-eco</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・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</li> <li>・Fish Sexual Development Test のプロトコルの提案</li> <li>・フルライフサイクル試験と二世世代試験の比較</li> </ul>                               | <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  | <p>FDG 電話会議</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・魚類スクリーニング試験の検証作業の論文文化</li> </ul>   | 魚類スクリーニング試験の検証作業の論文文化の実施   |
| 2006年4月  | <p>第9回 EDTA</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・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</li> <li>・魚類試験管内試験に関する DRP (Detailed Review Paper) 作成</li> <li>・Fish Sexual Development Test の Phase 1 検証作業の開始</li> </ul> | <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  | <p>WNT</p> <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承認/開始</li> <li>・魚類試験管内試験に関する DRP 作成プロジェクトの開始</li> </ul>   | 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  | <p>第5回 VMG-eco</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・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</li> <li>・Fish sexual development test (FSDT) 検証作業への提案</li> </ul>  | <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  | <ul style="list-style-type: none"> <li>・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</li> </ul>  | <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  | <p>第6回 VMG-eco</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・ピアレビュー報告書を WNT に提出 (決定)</li> <li>・FDG を設置して技術課題について協議開始</li> <li>・繁殖試験 DRP が提示される (米国)</li> </ul>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>・ピアレビュー報告書を提出し TG 化に向けた技術課題について検討を要請</li> <li>・FSDT 結果報告及び検証作業への参加表明</li> <li>・日米二国間会議について報告</li> </ul>                             |
| 2008年3月  | <p>FDG 電話会議 (27<sup>th</sup>)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・ピアレビュー指摘事項の検討 (魚類試験結果の up-date、試験成立の基準設定など)</li> </ul>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>・VTG レベルについて対照区データを整理</li> <li>・Phase1~3 以外の物質に対する試験結果の追加</li> </ul>  |
| 2008年4月  | <p>第11回 EDTA</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・ピアレビュー報告書案提出</li> <li>・米国が孵化率、生殖腺病理をエンドポイント EP に加えることを提案</li> <li>・魚類短期繁殖試験の新規プロジェクト提案</li> </ul>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>・米国提案の追加 EP については VMG-eco (FDG 電話会議) で検討</li> <li>・魚類短期繁殖試験に関しては WNT の表明待ち</li> </ul>   |
| 2008年4月  | <p>FDG 電話会議 (27<sup>th</sup>)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・ピアレビュー指摘事項の検討 (VTG 基準設定など)</li> <li>・孵化率、生殖腺病理を EP として追加することを検討</li> </ul>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>・対照区のメダカ VTG レベルを報告</li> </ul>  |

## 2. ExtTEND2005 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及び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 4 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ージメントグループ (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。

平成 18 年度には、平成 19 年 1 月の第 5 回 VMG-eco にフェーズ 2 の結果を報告するとともに、同 VMG-eco にて承認されたフェーズ 3 について、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、平成 19 年度にかけて実施した。また、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の理解に向け、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、作用メカニズムの理

解に向けた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。さらに、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。

（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。

| 種          | アフリカツメガエル<br>( <i>Xenopus laevis</i> ) | ニシツメガエル<br>( <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)     | 500-2,000                              | 1,000-3,000                               |



## 【平成19年度事業の成果】

### ① OECD 変態アッセイテストガイドライン作成への参加

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）を用いたフェーズ3のばく露試験の結果について、平成20年1月の第6回 VMG-eco において報告した。また、変態アッセイのテストガイドライン作成について、平成20年3月のテストガイドライン作業グループ（WNT）会議において承認されたのを受け、テストガイドライン案の作成に参加した。

### 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

PTU にばく露した幼生における遺伝子発現変化をプロファイリングした。さらに、甲状腺ホルモンかく乱作用応答モデルとしてのトランスジェニックカエルの作製方法を設定した。

### 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、後肢長について形態学的な測定を、生殖腺について遺伝子発現解析を行い、データベースを作成した。また、全雄集団を作出するための性転換個体の作製を開始した。

## 【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、変態アッセイのテストガイドライン策定に向けた取組を推進する。また、試験法を補完するために、視床下部—下垂体—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の理解に向けた研究を推進する。さらに、平成16年度及び平成19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により、ライフサイクルテストの提案に向けた取組を推進する。

＜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<br>・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<br>・両生類の変態に関する研究<br>・トランスジェニックカエルの研究<br>・ホルモン測定法の研究<br>・在来種の組織学及び形態学的データ蓄積<br>・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 | 独国が 2001 年に提唱した XEMA (Xenopus Metamorphosis Assay) のデータを独国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<br>・アフリカツメガエル培養肝細胞を用いた VTG アッセイ<br>・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<br>・XEMA Ringtest の報告<br>・米国 Draft DRP について議論   | 日本の取組を紹介<br>・在来種 (ツチガエル) を用いた変態試験の開発<br>・VTG 試験法の開発  |
| 2003 年 6 月  | 第 1 回両生類専門家会合<br>・カエル変態アッセイの OECD テストガイドライン作成推進   | 日本の取組を紹介<br>・ツチガエル変態試験の試験条件の設定<br>・トロピカリス変態試験の試験条件設定<br>・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<br>・アフリカツメガエルパーシャルライフテストの提案<br>・ビテロジェニン測定キットの開発<br>・アトラスデータベースの構築<br>・ZZ 雌を用いた性転換試験<br>・トランスジェニックカエルの作製と利用<br>・プロテオーム解析  |
| 2003 年 9 月  | ・Proposal for Phase 1 of the Validation of the Amphibian Metamorphosis Assay を受理                                    | フェーズ 1 の試験条件を取りまとめ、米国・独国とともに OECD に提出  |
| 2004 年 1 月  | ・フェーズ 1 開始  | フェーズ 1 実施  |
| 2004 年 3 月  | ・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   | 「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<br>・フェーズ 1 結果報告   |
| 2004 年 6 月  | 第 2 回両生類専門家会合<br>・フェーズ 1 のデータを承認<br>・フェーズ 2 への移行の承認   | フェーズ 1 の試験結果の提出<br>フェーズ 2 のプロトコル案の提出<br>日本の取組を紹介<br>・ツチガエル変態試験の試験条件の設定<br>・トロピカリス変態試験の試験条件の設定<br>・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<br>・アフリカツメガエルパーシャルライフテストの提案<br>・ビテロジェニン測定キットの開発<br>・アトラスデータベースの構築<br>・ZZ 雌を用いた性転換試験<br>・トランスジェニックカエルの作製と利用<br>・プロテオーム解析 |

|          |  |  |
|----------|--|--|
| 2004年12月 | 第3回 VMG-eco<br>・Draft Report of Phase 1 of the Validation of the Amphibian Metamorphosis Assay の報告<br>・Phase 2 of the Validation of the Amphibian Metamorphosis Assay の承認  |  |
| 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 | 第4回 VMG-eco<br>・Draft Report of Phase 2 of the Validation of the Amphibian Metamorphosis Assay の進捗報告   |  |
| 2006年1月  | OECD 両生類変態アッセイ病理組織会議<br>・Phase 2 Frog Metamorphosis Assay Histology: 1 Part 2 - Approach to reading studies, diagnostic criteria, severity grading, and atlas の改定          | 組織評価の手順について提案  |
| 2007年1月  | 第5回 VMG-eco<br>・Draft Report of Phase 2 of the Validation of the Amphibian Metamorphosis Assay の報告<br>・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<br>・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  | 第6回 VMG-eco<br>・Revised Draft Report of Phase 3 of the Validation of the Amphibian Metamorphosis Assay の結果報告   |  |
| 2008年3月  | WNT<br>・変態アッセイのテストガイドライン化を承認   |  |
| 2008年5月  | 第4回両生類専門家会合<br>・Draft OECD Guideline For the Testing of Chemicals “The Amphibian Metamorphosis Assay” (テストガイドライン案) を作成<br>・各国の取組を紹介<br>・ライフサイクルテストの OECD テストガイドライン作成の推進を確認 | 変態アッセイのテストガイドライン策定に向けた参加国との協議及びガイドライン案の作成<br><br>日本の取組を紹介<br>・トロピカリス標準データベース<br>・トロピカリス全雄集団の作製<br>・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 |
| 2008年6月  | ・WNT に対しガイドライン案 (The Amphibian Metamorphosis Assay) のレビュー及びコメント要請 (9月15日まで)  |  |

### 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 OECD へ提案した Enhanced TG 211\*は、同年 5 月の OECD の 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 VMG-eco 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 及び平成 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。

\* 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 年度事業の成果】

各国からの意見を参考にして、リングテスト報告書案 (Draft Validation Report) を作成し、Draft Enhanced TG211 とともに、平成 20 年 1 月に開催された OECD の第 6 回 VMG-eco に提出した。会議の結果、TG211 の改訂を行うのではなく、Annex として仔虫性比を付け加えることによって、必要に応じて使えるようにするという位置付けとなった。

#### 【今後の取組方針】

平成 20 年 4 月の第 20 回 WNT では、Draft Validation Report は提案通り承認された。また TG211 に関しては、仔虫の雌雄判別を従来の TG に Annex の形で付け加えることとなっていたため、大幅な改訂の必要がないことが合意された。

① OECD に提案した Enhanced TG211 試験のバリデーション・リングテストの結果取りまとめ及び各国で出された意見に対する対応等

国際試験法提案リード国として、各国から出された修正意見等に対し、対処すべき事項においては国立環境研究所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者会議に出席し、内部検討結果に係る

問題点及び今後の予定などを明らかにする。

### ②OECD 及び EPA（米国環境保護庁）との研究協力におけるミジンコ多世代試験の検討及び実施

OECD 及び EPA で提案されている無脊椎動物及び脊椎動物を用いた化学物質の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 及び提案中の 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昨年度に引き続き行う。

アミ類やカイアシ類を用いた多世代試験を米国、ドイツなどでは提案しているが、ミジンコについてはそれらの試験間の比較ができるように、各国共通の化学物質を用いた試験を実施することが必要とされている。さらに、日米二国間協力実務者会議へ出席し、化学物質の内分泌かく乱作用に関する日米二国間協力業務において報告する無脊椎動物に係る試験法開発進捗状況の説明を行い、試験法に関する提案を行う。

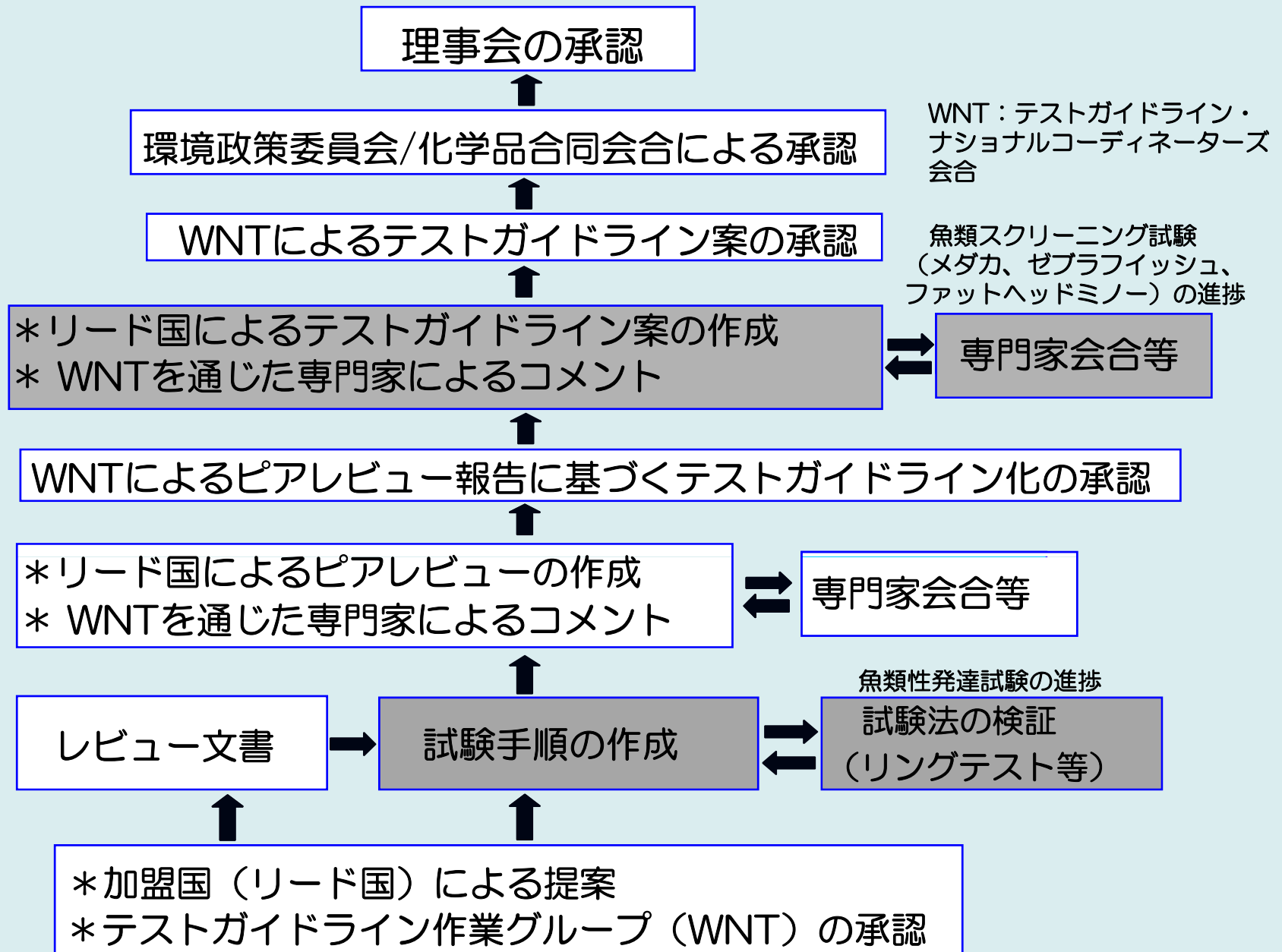
### ③ミジンコの性比に影響を及ぼす化学物質の情報収集及びスクリーニング試験

文献及び学会等における最新の情報を収集し、米国、OECD 等の他国で行われているミジンコ以外の甲殻類試験で用いられている被験物質の中から、ミジンコの仔虫性比及び繁殖に影響を与える物質を選定する。また、選定した物質について、作用・影響評価検討部会に報告する。さらに、作用・影響評価検討部会の意見を踏まえてミジンコを用いたスクリーニング試験を行う。

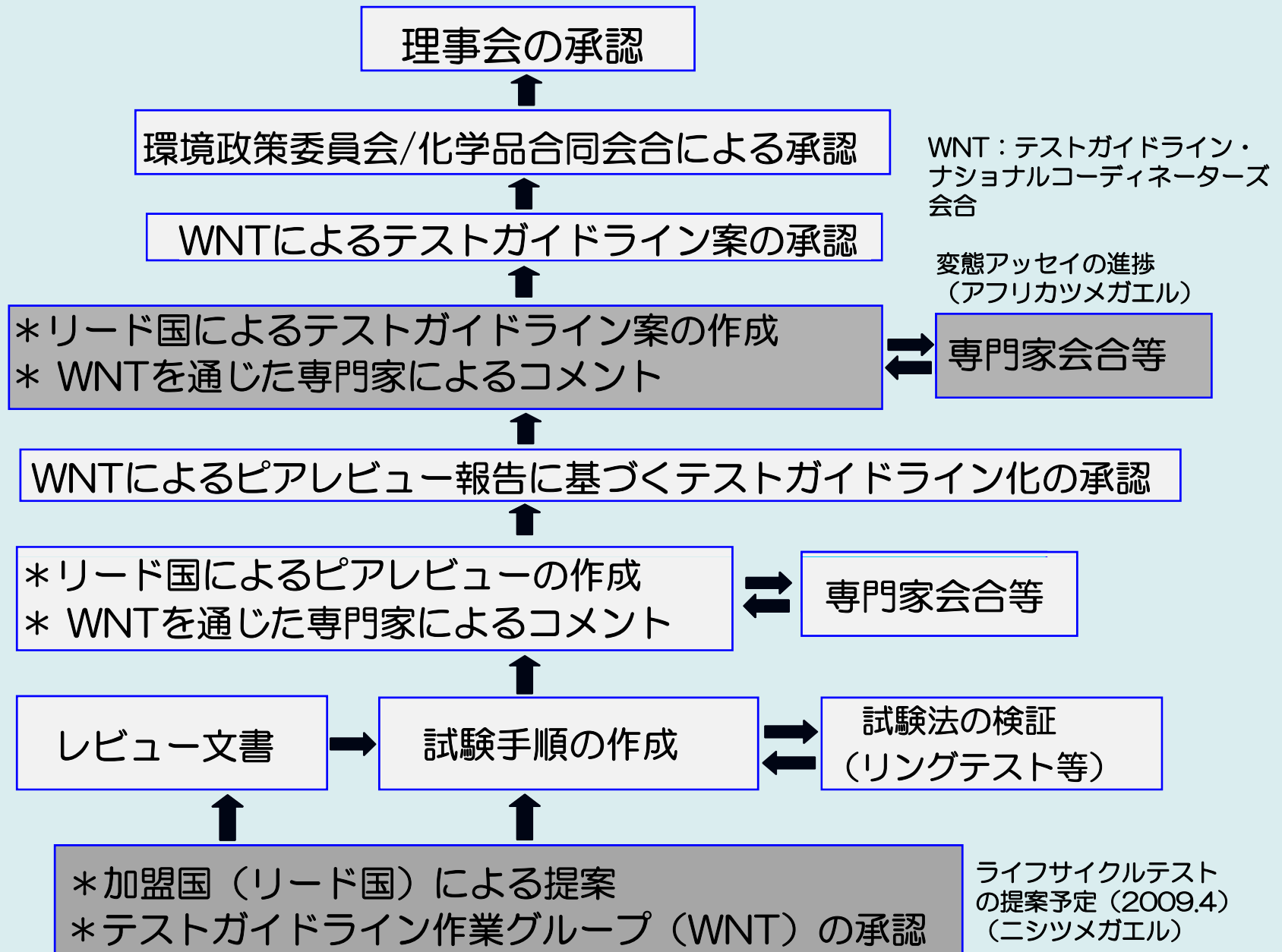
＜無脊椎動物試験に関する OECD の動きと日本の取組＞

| 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<br>・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、甲殻類における化学物質の内分泌かく乱作用のスクリーニング試験法として提案                                    |
| 2004 年 5 月  | 第 16 回 WNT<br>(Meeting of the National Co-ordinators of the Test Guidelines Programme)<br>・『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<br>・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ール、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<br>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 ANNEX (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<br>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。<br>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   |
| 2008 年 1 月  | 第 6 回 VMG-eco<br>TG211 の改訂ではなく、Annex として仔虫性比を付け加えることによって、必要に応じて使えるようにするという位置付け。   | BIAC からのコメント、John Green 氏による統計解析結果などを受けて、Finland の Jukka Ahtiainen 氏の協力を得ながら Draft Validation Report を第 20 回 WNT までに準備 |
| 2008 年 4 月  | 第 20 回 WNT<br>Draft Validation Report は提案通り承認された。また、TG211 に関しては、従来の TG にオプションの観察事項として産出された仔虫の雌雄を観察するとの記述があったため、大幅な改訂の必要がないことが合意された。関連する部分については提案の通り承認すべきとされた。                 | Draft Validation Report に対する日本化学工業協会からのコメントを BIAC として OECD へ提出   |

# OECDテストガイドラインに向けた開発段階(魚類)



# OECDテストガイドラインに向けた開発段階(両生類)





# OECDテストガイドラインに向けた開発段階(無脊椎)

