

## 魚類、両生類及び無脊椎動物に係る試験法開発及び国際協力について(案)

EXTEND2010では、化学物質の内分泌かく乱作用が環境中の生物に及ぼす影響を評価するため、引き続き魚類、両生類及び無脊椎動物を対象とする試験法の開発を進めている。また、開発した試験法については、関係各国と協力しながら、OECDにおいてテストガイドライン(TG)として採用されるよう積極的に提案しているところである。

これらの試験法の概要、平成26年度の検討結果及び平成27年度の検討内容(案)は、以下のとおりである。

### I. 試験法開発について

#### I. 魚類の試験法開発について

##### (1)魚類短期繁殖試験(OECD TG229)

本試験は、化学物質のエストロゲン、アンドロゲン、抗エストロゲン様作用及びアロマターゼ阻害作用に加えて、視床下部-下垂体-生殖腺軸への影響を検出できるほか、化学物質の内分泌かく乱作用による繁殖行動、卵質や精子形成への影響等の検出も期待できるものである。

平成26年度は、これまでにメダカを用いた長期試験(多世代試験、フルライフサイクル試験)が実施されているが、本試験は実施されていない3物質(17 $\beta$ -エストラジオール(エストロゲン作用の陽性対照物質)、17 $\beta$ -トレンボロン(アンドロゲン作用の陽性対照物質)及びプロクロラズ(アロマターゼ阻害作用の陽性対照物質))について検証試験を実施した。

平成27年度は、現時点で得られている知見が少ないプロゲステロン作用、抗エストロゲン作用について、陽性物質を用いた検証試験を実施し、第1段階評価に向けた知見の収集並びに本試験法の内分泌かく乱作用の有害性評価への適用性及び有効性等に関する検討を進める。

##### (2)メダカ抗アンドロゲン作用検出試験(仮称)

メダカ抗アンドロゲン作用検出試験(仮称)は、オスの二次性徴として形成される臀びれに乳頭状突起を主要なエンドポイントとして開発中の試験物質のメダカに対する抗アンドロゲン作用の有無等を調べる試験法である。

平成26年度は、これまでに実施した検証試験の結果等を踏まえて、試験法に関わる課題を整理し、試験法の標準化に向けて供試生物数、試験期間、供試するメダカの週齢などの試験条件についての検討を行った。

平成 27 年度は、既存文献等において魚類に対して抗アンドロゲン作用を示すことが資されている物質を用いて検証試験を実施し、本試験法の妥当性や有効性等を検証するとともに、試験法の確立に向けて試験条件の検討等を進める。

### (3)メダカ拡張一世代繁殖試験 (OECD TG240) (旧名称：メダカ多世代試験)

本試験は、化学物質の母体から卵への移行等に伴う次世代あるいは次世代から次々世代への影響を調べることを目的として、メダカを複数の世代にわたり長期間、化学物質へのばく露を行う試験である。メダカの生活史の各ステージ(発育段階)における内分泌かく乱作用(エストロゲン、抗エストロゲン、アンドロゲン、抗アンドロゲン様作用、アロマターゼ阻害作用及び視床下部一下垂体—生殖腺軸への影響等)を含む化学物質の有害性(個体又は個体群レベルの影響)等を評価する。

本試験は、EXTEND2010 の第二段階試験として用いるために米国との協力の下で開発を進め、平成 26 年度の日米二国間協力会議において、本試験法のテストガイドライン(案)をとりまとめ、同年 9 月に日米共同で OECD 事務局へ提出した。

その後、OECD の生態毒性試験バリデーション管理会合 (VMG-eco 会合) における審議及び 2 回の意見照会 (コメンティングラウンド) を経て所要の修正がなされ、平成 27 年 4 月に開催された OECD のナショナルコーディネーター会合 (WNT 会合) において承認された。本ガイドラインは本年 7 月 28 日より公開されている。

平成 27 年度は、OECD で承認された MEOGRT に準じた検証試験 (4-ノニルフェノール (分岐型)) を実施し、第 2 段階生物試験としての適用に向けて知見の収集を行う。

## 2. 両生類の試験法開発について

### (1) 幼若期両生類の成長・発達試験 (OECD TG241)

幼若期両生類の成長・発達試験 (Larval Amphibian Growth and Development Assay: LAGDA) は、アフリカツメガエル *Xenopus laevis* を主たる試験生物として、両生類の変態(視床下部一下垂体—甲状腺軸)、生殖及び成長等への影響を評価する試験である。

本試験は日米間で協力して開発が進められており、平成 26 年度の日米二国間協力会議でテストガイドライン(案)がとりまとめられ、平成 26 年 9 月に日米共同で OECD 事務局へ提出した。

その後、OECD の生態毒性試験バリデーション管理会合 (VMG-eco 会合) での審議及び 2 回の意見照会 (コメンティングラウンド) を経て所要の修正がなされ、平成 27 年 4 月に開催された OECD のナショナルコーディネーター会合 (WNT 会合) において承認された。本ガイドラインは本年 7 月 28 日より公開されている。

また、抗甲状腺ホルモン作用の陽性物質であるプロピルチオウラシルを用いて検証試験を実施し、本試験法の甲状腺に対する影響の評価への適用性及び有効性等に関する検討を行った。

平成 27 年度は、甲状腺ホルモン作用の陽性物質を用いて検証試験を実施し、過年度に

引き続き、甲状腺に対する影響評価における本試験法の妥当性や有効性等について検討する。

### 3. 無脊椎動物の試験法開発について

#### (1) ミジンコ多世代試験

本試験は、化学物質の影響を母体中(親ミジンコの体内)で受けた次世代のミジンコの産仔能力をエンドポイントとして、無脊椎動物での生物群の存続を考慮する試験である。

平成 26 年度は、フィプロニル (フェニルピラゾール系の殺虫剤) を用いて、ニセネコゼミジンコでの多世代試験を実施し、試験法の有効性等について検討した。

平成 27 年度は、既存文献等で無脊椎動物に対する経世代影響が示唆される化学物質等を用いて検証試験を実施し、試験法の妥当性や有効性、多世代影響の判定方法に関する検討等を行う。

#### (2) ミジンコ簡易スクリーニング試験法

本試験は、オオミジンコの抱卵個体を試験生物として、幼若ホルモン様作用の有無を検出する試験である。

平成 26 年度は、ミジンコでオスを誘導することが報告されている精油の成分を用いて、過年度までに開発した方法での検証試験を実施し、試験法の妥当性及び有効性等を検証するとともに、基礎的なデータ及び知見の蓄積を図った。

平成 27 年度は、平成 26 年度に引き続き、ミジンコでオスを誘導する可能性がある化学物質 (天然由来の化合物やその代謝産物等) を用いて検証試験を実施し、試験法の妥当性や有効性等を検証するとともに、試験法の標準化に向けた検討を行う。

#### (3) ミジンコ脱皮ホルモン (スクリーニング) 試験法

本試験については、基本的な試験デザイン (試験期間、試験生物、エンドポイントなど) の検討を始めた段階である。ミジンコは昆虫同様に脱皮を繰り返して成長することから、一定期間における脱皮回数をエンドポイントとして、化学物質の脱皮ホルモン (様) 作用を検出する方法を検討している。

平成 26 年度は、脱皮促進または抑制効果があると報告されている化学物質を用いて検討している方法による検証試験を実施し、試験デザインの妥当性や有効性、試験条件等について検討した。

平成 27 年度は、平成 26 年度に引き続き、脱皮促進または抑制効果があると報告されている化学物質等を用いて試験法の検証を行うとともに、ミジンコ以外の生物種を用いる試験法についても検討する。

## II. 国際協力について

### 1. 化学物質の内分泌かく乱作用に関する日米二国間協力について

化学物質の内分泌かく乱作用に関する試験法が OECD においてテストガイドラインとして承認されるためには、各国共同で試験法の方法論や客観性、再現性を評価する必要がある。そのため日米二国間協力では、毎年、日米両国の実務者による会議(日米二国間実務者会議)を開催し、主に魚類、両生類及び無脊椎動物の生殖・繁殖影響を評価する試験について、試験法や試験条件等の技術的課題について検討を行い、さらに日米共同で研究や検証試験等を実施することにより、知見や情報等の共有を図りつつ、これら試験法の OECD でのテストガイドライン化に向けた取り組みを進めている。

#### (1) 魚類及び両生類の試験

魚類及び両生類の試験については、平成 21 年 4 月に日米共同で OECD にテストガイドライン化のための新たなプロジェクトの提案書 (SPSF) を提案したメダカ多世代試験 Medaka multigeneration test 及び幼若期両生類成長・発達試験 Larval Amphibian Growth and Development Assay について、テストガイドライン化に向けた検討を進めてきた。

#### (2) 無脊椎動物の試験

無脊椎動物の試験については、日本ではミジンコを用いた多世代試験法、米国ではケンミジンコ及びアミを用いたフルライフサイクル試験/二世代繁殖試験の開発を進めていることから、日米共同でこれらの試験法及び試験結果の比較等を行いつつ、試験法のテストガイドライン化に向けた検討を進めている。

#### (3) 平成 26 年度の成果及び平成 27 年度の実施内容について(案)

平成 26 年度は、第 10 回日米二国間会議(平成 26 年 9 月 9 日～10 日、米国ワシントン D.C.) を開催し、これまでの日米間での協議結果等を踏まえて協議を行い、魚類及び両生類の試験法について、テストガイドラインの日米合意案をとりまとめた。これらのテストガイドライン案は、日米共同で OECD 事務局へ提出した。

第 11 回日米二国間会議(平成 27 年 9 月頃、米国ワシントン D.C.及びミネソタ州ダルースを予定) を開催し、今後、日米二国間協力の下で進めるべき検討事項に関する協議を行うほか、化学物質の内分泌かく乱作用の評価に関する日米の取り組み状況について情報交換を行う。

### 2. 化学物質の内分泌かく乱作用に関する日英共同研究について

平成 11 年 3 月の G8 環境大臣会合における日英両国間の合意に基づき、日英共同研究事業が開始された。現在は、2009 年の合意に基づき平成 22 年度より開始された第 3 期日英共同研究として、4 つのコアプロジェクトを設定し、実施している。

## (1)平成 26 年度の成果及び平成 27 年度の実施内容(案)について

平成 26 年度は、下記のとおり、各コアプロジェクトにおいて、内分泌かく乱作用を持つ化学物質等の野生生物に及ぼす悪影響や個体群レベルでの影響(環境リスク)の解析・評価に繋がる調査研究を実施した(詳細は別添 1 のとおり)。

また、第 16 回化学物質の内分泌かく乱作用に関する日英共同研究ワークショップを開催し(平成 26 年 11 月、英国バース市)、日英両国の研究担当者による研究成果の発表、意見交換及び今後の研究計画の検討等並びに行政担当者による情報交換等を行った(詳細は別添 2 のとおり)。

平成 27 年度は、各コアプロジェクトにおいて、以下に示す内分泌かく乱作用を持つ化学物質等の野生生物に及ぼす悪影響や個体群レベルでの影響(環境リスク)の解析・評価に繋がる調査研究を実施する。

また、第 17 回化学物質の内分泌かく乱作用に関する日英共同研究ワークショップ(平成 27 年 11 月頃、札幌市を予定)を開催し、日英両国の研究担当者による研究成果の発表及び意見交換並びに行政担当者による情報交換等を行う。

### コアプロジェクト-1

平成 26 年度は、環境中での光分解、生分解及び吸着メカニズムを考慮した数理モデルの検証、並びに下水処理水等に含まれるエストロゲン又は抗エストロゲン様作用を示す物質の特定に向けた検討を行った。

平成 27 年度は、内分泌かく乱作用が疑われる化学物質及び医薬品類等の下水処理過程及び環境中での挙動等に関する検討を行う。

### コアプロジェクト-2

平成 26 年度は、各種魚類でのエストロゲン様物質に対する感受性の差異などホルモン受容体とリガンドの相互作用の解明に向けた検討及び各種受容体を用いたレポーター遺伝子試験法の確立等に向けた検討を行った。

平成 27 年度は、化学物質の内分泌かく乱作用を把握するための分子生物学的アプローチによる影響評価(ホルモン受容体の機能やそれらを介した化学物質の内分泌かく乱作用(悪影響)の発現メカニズム等)に関する検討を行う。

### コアプロジェクト-3

平成 26 年度は、メダカでの鰭の形状による抗アンドロゲン様作用の検出など、化学物質の内分泌かく乱作用の検出に有効な新たなエンドポイント及び試験法等の検討を行った。

平成 27 年度は、化学物質の内分泌かく乱作用(抗アンドロゲン作用等)を評価・推定するためのメダカを用いる試験法に関する検討を行う。

### コアプロジェクト-4

平成 26 年度は、野生のカエルでの精巣卵発現等の知見の蓄積及びそれらの化学物質との関連性についての検討、並びに海産の魚類及び貝類での各種バイオマーカーに関する調査研究及びそれらの化学物質との関連性についての検討を行った。

平成 27 年度は、野生生物における個体群レベルでの影響等（野生のカエルでの精巣卵発現や海産魚類でのビテロゲニン等のバイオマーカーと化学物質との関連性等）に関する検討を行う。

## 魚類、両生類及び無脊椎動物に係る試験法開発の詳細

### I. 魚類の試験法開発について

#### 1. 魚類短期繁殖試験 (OECD TG229)

##### (1) 試験法の概要

魚類短期繁殖試験は、魚類 21 日間スクリーニング試験 (OECD TG230) のエンドポイント (ビテロゲン濃度及び二次性徴) に産卵数を付加し、化学物質のエストロゲン、アンドロゲン及び抗エストロゲン様作用、アロマトターゼ阻害作用に加えて、視床下部—下垂体—生殖腺軸への影響を検出できるほか、化学物質の内分泌かく乱作用による繁殖行動、卵質や精子形成への影響等の検出も期待できる。

本試験法については、平成 21 年 (2009 年) に OECD TG229 として採択されたが、ファットヘッドミノーを主たる試験魚として米国により提案されたものであったことから、日本よりメダカを用いた試験条件等についての修正提案を行い、平成 24 年 (2012 年) にメダカを試験生物として用いる場合の試験条件を含む改訂版が採択されている。

##### (2) 平成 26 年度の検討結果

本試験法については、メダカを試験生物として、作用モードが既知の物質 (陽性対照物質) 等を用いた検証試験を実施し、基礎的なデータ及び知見等の蓄積を図るとともに、内分泌かく乱作用の有害性評価への適用性及び有効性の検討等を行っている。

平成 26 年度は、これまでにメダカを用いた長期確定試験 (多世代試験、フルライフサイクル試験) が実施されている物質のうち、メダカを用いた魚類短期繁殖試験が実施されていない  $17\beta$ -エストラジオール (エストロゲン作用の陽性対照物質)、 $17\beta$ -トレンボロン (アンドロゲン作用の陽性対照物質として使用される物質) 及びプロクロラズ (アロマトターゼ阻害作用の陽性対照物質として使用される物質) を用いて検証試験を実施した。

##### (3) 平成 27 年度の検討内容 (案)

平成 27 年度は、知見が少ない作用モード (プロゲステロン作用、抗エストロゲン作用等) の陽性物質を用いて検証試験を実施し、第 1 段階評価に向けた知見の収集並びに本試験法の内分泌かく乱作用の有害性評価への適用性及び有効性等に関する検討を進める。

#### 2. メダカ抗アンドロゲン作用検出試験 (仮称)

##### (1) 試験法の概要

化学物質の抗アンドロゲン作用については、OECD の TG229 や TG230 では作用を

検出できないと考えられている。メダカでは、アンドロゲンの作用によって、オスの二次性徴として臀びれに乳頭状突起が形成されることから、これを主要なエンドポイントとして化学物質の抗アンドロゲン作用を検出（スクリーニング）できる試験法の開発及び検証を行っている。本試験法については、OECD へのテストガイドライン（もしくはガイダンス文書）の提案も視野に開発を進めている。

メダカ抗アンドロゲン作用検出試験（仮称）は、OECD TG229 と TG230 を参考とする試験デザインであり、二次性徴の発現前の幼若期にあるメダカを供試魚として、28 日間程度の期間、化学物質によるばく露を行い、ばく露終了時の遺伝的雄個体における臀びれの乳頭状小突起数の低下を指標として試験物質のメダカに対する抗アンドロゲン作用の有無等を調べる試験法である。

## （2）平成 26 年度の検討結果

これまでに実施した検証試験の結果等を踏まえて、試験法に関わる課題を整理し、試験法の標準化に向けて供試生物数、試験期間、供試するメダカの週齢などの試験条件についての検討を行った。

## （3）平成 27 年度の検討内容（案）

平成 27 年度は、既存文献等において魚類に対して抗アンドロゲン作用を示すことが資されている物質を用いて検証試験を実施し、本試験法の妥当性や有効性等を検証するとともに、試験法の確立に向けて試験条件の検討等を進める。

# 3. メダカ多世代試験（メダカ拡張一世代繁殖試験）

## （1）試験法の概要

メダカ多世代試験は、化学物質の母体から卵への移行等に伴う次世代あるいは次世代から次々世代への影響を調べることを目的として、メダカを複数の世代にわたる長期間、化学物質へのばく露を行う試験である。本試験では、各世代において、ビテロゲニン濃度、生殖腺組織、二次性徴、性比の偏り（遺伝的性と表現型のギャップ）、繁殖（産卵数及び受精率等）及び成長等のエンドポイントを調べ、メダカの生活史の各ステージ（発育段階）における内分泌かく乱作用（エストロゲン、抗エストロゲン、アンドロゲン及び抗アンドロゲン様作用、アロマターゼ阻害作用及び視床下部一下垂体—生殖腺軸への影響等）を含む化学物質の有害性（個体又は個体群レベルの影響）等を評価する。

本試験法については、SPEED'98 で用いたフルライフサイクル試験（日本提案）と二世世代繁殖試験（米国提案）をもとに、日米間で各種作用物質を用いた検証試験等を実施してデータ及び知見の蓄積を図るとともに、試験法の適正化に向けた検討を行った。また、本試験法については、平成 20 年度に「メダカを用いたフルライフサイクル試験/多世代試験」に関する提案書を日米共同で OECD に提出し、日米共同で OECD でのテストガイドライン化に向けた取り組みを進めてきた。



## (2) 平成 26 年度の検討結果

日米二国間協力会議において本試験法のテストガイドライン（案）をとりまとめ、平成 26 年 9 月に日米共同で OECD 事務局へ提出した。テストガイドライン（案）については、OECD の生態毒性試験バリデーション管理会合（VMG-eco 会合）における審議及び 2 回の意見照会（コメンティングラウンド）を経て、それらの結果を踏まえて所要の修正がなされた。なお、これら OECD での一連の審議において、試験期間を F0（親世）から F1 世代が産卵した受精卵が孵化するまでとする試験デザインに変更すること、試験名をメダカ拡張一世代繁殖試験（Medaka Extended One-generation Reproduction Test (MEOGRT)）とすることが合意された。

以上のとおり修正された MEOGRT のテストガイドライン案は、平成 27 年 4 月に開催された OECD のナショナルコーディネーター会合(WNT 会合)において承認された。

## (3) 平成 27 年度の検討内容（案）

平成 27 年度は、OECD で承認された MEOGRT に準じた検証試験を実施し、第 2 段階生物試験としての適用に向けて知見の収集を行う。

## II. 両生類の試験法開発について

### 1. 両生類ライフサイクル試験

#### (1) 試験法の概要

両生類のライフサイクル試験については、当初、米国から提案されたニシツメガエル *Xenopus (Silurana) tropicalis* を試験生物として、受精 48 時間後の幼生から性成熟期まで約 10 か月間にわたりばく露を行い、変態完了期及び性成熟期に、エンドポイントとして、体重、頭胴長、血中ビテロゲン濃度、性比、GSI 及び精子数等を測定することにより、両生類の発達、成長及び繁殖への影響を調べる試験法（Amphibian Development, Growth and Reproduction Assay: ADGRA）の開発及び検証を進めてきた。しかし、ADGRA については試験期間が非常に長く多大なコストを要することなどから、試験期間の短縮及びエンドポイントの変更を図った代替の試験法として幼若期両生類の成長・発達試験（Larval Amphibian Growth and Development Assay: LAGDA）のプロトコル案が米国より提案された。

LAGDA は、アフリカツメガエル *X. laevis* を主たる試験生物として、受精 1 日以内の胚 (N.F. stage 8~10) から変態完了 10 週間後までの期間、化学物質へのばく露を行い、変態完了の直前（幼生期）において N.F. stage 62 に達するまでに要した日数、頭胴長及び体重等、ばく露終了時（幼若期）において性比（遺伝的及び表現型）、生殖腺や輸精管等の組織、頭胴長及び体重等のエンドポイントを調べることにより、両生類の変態（視床下部—下垂体—甲状腺軸）、生殖及び成長等への影響を評価する試験である。

## (2) 平成 26 年度の検討結果

日米二国間協力会議において LAGDA のテストガイドライン（案）をとりまとめ、平成 26 年 9 月に日米共同で OECD 事務局へ提出した。テストガイドライン（案）については、OECD の生態毒性試験バリデーション管理会合（VMG-eco 会合）での審議及び 2 回の意見照会（コメンティングラウンド）を経て、それらの結果を踏まえて所要の修正がなされた。

また、平成 26 年度には、抗甲状腺ホルモン作用の陽性物質であるプロピルチオウラシルを用いて検証試験を実施し、本試験法の甲状腺に対する影響の評価への適用性及び有効性等に関する検討を行った。

LAGDA のテストガイドライン案は、平成 27 年 4 月に開催された OECD のナショナルコーディネーター会合（WNT 会合）において承認された。

## (3) 平成 27 年度の検討内容（案）

平成 27 年度は、甲状腺ホルモン作用の陽性物質を用いて検証試験を実施し、過年度に引き続き、甲状腺に対する影響評価における本試験法の妥当性及び有効性等について検討する。

# Ⅲ. 無脊椎動物の試験法開発について

## 1. ミジンコ多世代試験

### (1) 試験法の概要

ミジンコ多世代試験は、化学物質の影響を母体中（親ミジンコの体内）で受けた次世代のミジンコの産仔能力をエンドポイントとして、無脊椎動物での生物群の存続を考慮する試験である。本試験法については、平成 19 年度から試験法の開発及び検証を行っている。当初（平成 19 年度及び 20 年度）は、試験生物とすることを想定しているオオミジンコ *Daphnia magna* を用いて検証試験を実施し、親ミジンコへのばく露の次世代への影響等についての検討等を行ったが、平成 21 年度以降は、世代期間が短く、短期間で試験を実施できるニセネコゼミジンコ *Ceriodaphnia dubia* も加えて、カナダ環境省によるミジンコ亜急性毒性試験法（Test of Reproduction and Survival Using the Cladoceran *Ceriodaphnia dubia*）を参考に、試験期間の短縮、労力の軽減なども勘案しつつ、試験法の妥当性及び有用性並びに適切な試験条件や試験手法の検討等を進めている。

### (2) 平成 26 年度の検討結果

フィプロニル（フェニルピラゾール系の殺虫剤）を用いて、ニセネコゼミジンコでの多世代試験を実施し、試験法の有効性等について検討した。

### (3) 平成 27 年度の検討内容（案）

平成 27 年度は、既存文献等が無脊椎動物に対する経世代影響が示唆される化学物質等を用いて検証試験を実施し、試験法の妥当性や有効性、多世代影響の判定方法に関する検討等を行う。

## 2. ミジンコ簡易スクリーニング試験法

### (1) 試験法の概要

化学物質の幼若ホルモン様作用については、仔虫の性別をエンドポイントに評価する試験法がオオミジンコ繁殖毒性試験（OECD TG211）の ANNEX7 としてテストガイドライン化されている。しかし、オオミジンコ繁殖毒性試験は試験期間が長く、仔虫の性別判別など試験操作の難度も高い。オオミジンコでは、卵発生の特定の時期に短期間、幼若ホルモン様作用を持つ物質にばく露されることによってオス仔虫の生産が誘導されることが判明したことから、この研究成果を利用して、より短期間で化学物質の幼若ホルモン様作用を検出できる試験法の開発を進めている。

ミジンコ簡易スクリーニング試験は、オオミジンコの抱卵個体を試験生物として化学物質にばく露し、ばく露後に産出された 2 腹目の仔虫における性比（オス仔虫の出現）をエンドポイントとして幼若ホルモン様作用の有無を検出する最長で 1 週間程度の試験である。

### (2) 平成 26 年度の検討結果

ミジンコでオスを誘導することが報告されている精油の成分を用いて、過年度までに開発した方法での検証試験を実施し、試験法の妥当性及び有効性等を検証するとともに、基礎的なデータ及び知見の蓄積を図った。

### (3) 平成 27 年度の検討内容（案）

平成 27 年度は、平成 26 年度に引き続き、ミジンコでオスを誘導する可能性がある化学物質（天然由来の化合物やその代謝産物等）を用いて検証試験を実施し、試験法の妥当性や有効性等を検証するとともに、試験法の標準化に向けた検討を行う。

## 3. ミジンコ脱皮ホルモン（スクリーニング）試験法

### (1) 試験法の概要

本試験については、基本的な試験デザイン（試験期間、試験生物、エンドポイントなど）の検討を始めた段階である。ミジンコは昆虫同様に脱皮を繰り返して成長することから、一定期間における脱皮回数をエンドポイントとして、化学物質の脱皮ホルモン（様）

作用を検出する方法を検討している。

## **(2) 平成 26 年度の検討結果**

脱皮促進または抑制効果があると報告されている化学物質を用いて検討している方法による検証試験を実施し、試験デザインの妥当性や有効性、試験条件等について検討した。

## **(3) 平成 27 年度の検討内容（案）**

平成 27 年度は、平成 26 年度に引き続き、脱皮促進または抑制効果があると報告されている化学物質等を用いて試験法の検証を行うとともに、ミジンコ以外の生物種を用いる試験法についても検討する。

## 化学物質の内分泌かく乱作用に関する日米二国間協力の詳細

### 1. 経緯

平成 16 年 1 月に開催された第 12 回日米合同企画調整委員会において、化学物質の内分泌かく乱作用問題に関して日米二国間の協力を進めることが合意され、この合意に基づき、化学物質の内分泌かく乱作用に関する日米二国間実務者会議(以下、日米会議)が開催されることとなった。平成 16 年度及び平成 17 年度には、化学物質の内分泌かく乱作用による生態影響評価に関する情報交換を目的として、それぞれ第 1 回(平成 16 年 9 月、東京)及び第 2 回(平成 17 年 6 月、ハワイ)の日米会議を開催した。平成 18 年度以降は、化学物質の内分泌かく乱作用に関する生態影響評価に関する情報交換に加え、魚類、両生類及び無脊椎動物を用いて繁殖影響等を評価する試験法について、日米両国が協力して技術的な課題等を明らかにして開発を進めることを目的としている。

### 2. 日米二国間協力における取り組み

化学物質の内分泌かく乱作用に関する試験法が OECD においてテストガイドラインとして承認されるためには、各国共同で試験法の方法論や客観性、再現性を評価する必要がある。そのため日米二国間協力では、毎年、日米両国の実務者による会議(日米二国間会議)を開催し、主に魚類、両生類及び無脊椎動物の生殖や繁殖に対する影響を評価するための試験について、試験法や試験条件等の技術的課題について検討を行い、さらに日米共同で研究や検証試験等を実施することにより、知見や情報等の共有を図りつつ、これら試験法の OECD でのテストガイドライン化に向けた取り組みを進めている。

#### (1) 魚類の試験

魚類の試験については、平成 21 年 4 月に日米共同で OECD にテストガイドライン化のための新たなプロジェクトの提案書 (SPSF) を提案したメダカ多世代試験 *Medaka multigeneration test* について、テストガイドライン化に向けた検討を進めてきた(試験法の詳細等は、別途、試験法開発に関する資料に記載のとおり)。

#### (2) 両生類の試験

魚類の試験については、平成 21 年 4 月に日米共同で OECD にテストガイドライン化のための新たなプロジェクトの提案書 (SPSF) を提案した幼若期両生類成長・発達試験 *Larval Amphibian Growth and Development Assay* について、テストガイドライン化に向けた検討を進めてきた(試験法の詳細等は、別途、試験法開発に関する資料に記載のとおり)。

### (3) 無脊椎動物の試験

無脊椎動物の試験については、日本ではミジンコを用いた多世代試験法、米国ではケンミジンコ及びアミを用いたフルライフサイクル試験/二世世代繁殖試験の開発を進めていることから、日米共同でこれらの試験法及び試験結果の比較等を行いつつ、試験法のテストガイドライン化に向けた検討を進めている。

### 3. 平成 26 年度の成果について

平成 26 年度は、第 10 回日米二国間会議（平成 26 年 9 月 9 日～10 日、米国ワシントン D.C.）を開催し、これまでの日米間での協議結果等を踏まえて協議を行い、魚類及び両生類の試験法について、テストガイドラインの日米合意案をとりまとめた。これらのテストガイドライン案は、日米共同で OECD 事務局へ提出した（以降のテストガイドライン案に関する検討状況等は、試験法開発に関する資料に記載のとおり）。

### 4. 平成 27 年度の実施内容について(案)

第 11 回日米二国間会議（平成 27 年 9 月頃、米国ワシントン D.C.及びミネソタ州ダルーを予定）を開催し、今後、日米二国間協力の下で進めるべき検討事項に関する協議を行うほか、化学物質の内分泌かく乱作用の評価に関する日米の取り組み状況について情報交換を行う。

## 化学物質の内分泌かく乱作用に関する日英共同研究の詳細

## 1. 経緯

平成 11 年 3 月の G8 環境大臣会合において、内分泌かく乱化学物質について日英両国間で共同研究を実施することが合意され、5 カ年の日英共同研究事業が開始された。平成 16 年度(2004 年)には、日英両国間の協議により、さらに 5 年間の延長を決定し、第 2 期(～2009 年)の日英共同研究として、4 つのテーマを設定して研究を推進した。さらに、平成 20 年 10 月の第 10 回日英共同研究ワークショップにおいて日英共同研究を延長することの合意を受けて、第 11 回ワークショップにおいて、2009 年から 5 カ年の継続についての合意文書への調印を行い、平成 22 年度から第 3 期目の日英共同研究を実施してきた。

平成 26 年 11 月の第 16 回ワークショップにおいて、日英共同研究を 2015 年からさらに 5 年間継続することに合意し、平成 27 年 4 月に、本事業の継続に関する合意文書に調印した。

## 2. 第 3 期日英共同研究について

第 3 期の日英共同研究では、第 11 回日英共同ワークショップにおいて、日英の研究者によって議論を行い、新たに設定した以下の 4 つの枠組み(コアプロジェクト)のもとで研究を推進している。

## コアプロジェクト-1

処理排水中及び環境中の主要な内分泌かく乱作用を有すると疑われる化学物質及び新たな化学物質の挙動を推定するための研究、並びにそれら化学物質の環境中への排出を低減するための研究

## コアプロジェクト-2

内分泌かく乱化学物質が起こしうる環境リスクを評価するための野生生物への悪影響を推定する方法(試験法)の開発

## コアプロジェクト-3

水生生物及びその他の生物の生殖及び成長への影響を把握するための化学物質試験法における様々なエンドポイントの評価(遺伝子レベルや分子生物学的なアプローチ)に関する研究

## コアプロジェクト-4

英国及び日本における野生生物への環境リスク(個体群レベルでの影響等)の解析

### 3. 平成 26 年度の成果について

平成 26 年度は、平成 24 年度に開催した第 15 回日英共同研究ワークショップでの検討結果等を踏まえて、下記のとおり、各コアプロジェクトにおいて、内分泌かく乱作用を持つ化学物質等の野生生物に及ぼす悪影響や個体群レベルでの影響(環境リスク)の解析・評価に繋がる調査研究を実施した(詳細は別添 1 のとおり)。

また、第 16 回化学物質の内分泌かく乱作用に関する日英共同研究ワークショップを開催し(平成 26 年 11 月、英国バース市)、日英両国の研究担当者による研究成果の発表、意見交換及び今後の研究計画の検討等並びに行政担当者による情報交換等を行った(詳細は別添 2 のとおり)。

#### コアプロジェクト-1

環境中での光分解、生分解及び吸着メカニズムを考慮した数理モデルの検証、並びに下水処理水等に含まれるエストロゲン又は抗エストロゲン様作用を示す物質の特定に向けた検討

#### コアプロジェクト-2

各種魚類でのエストロゲン様物質に対する感受性の差異などホルモン受容体とリガンドの相互作用の解明に向けた検討及び各種受容体を用いたレポータージーン試験法の確立等に向けた検討

#### コアプロジェクト-3

メダカでの鰭の形状による抗アンドロゲン様作用の検出など、化学物質の内分泌かく乱作用の検出に有効な新たなエンドポイント及び試験法等の検討

#### コアプロジェクト-4

野生のカエルでの精巣卵発現等の知見の蓄積及びそれらの化学物質との関連性についての検討、並びに海産の魚類及び貝類での各種バイオマーカーに関する調査研究及びそれらの化学物質との関連性についての検討

### 4. 平成 27 年度の実施内容について(案)

平成 27 年度は、第 16 回日英共同研究ワークショップでの検討結果等を踏まえて、各コアプロジェクトにおいて、以下に示す内分泌かく乱作用を持つ化学物質等の野生生物に及ぼす悪影響や個体群レベルでの影響(環境リスク)の解析・評価に繋がる調査研究を実施する。

また、第 17 回化学物質の内分泌かく乱作用に関する日英共同研究ワークショップ(平成 27 年 11 月頃、札幌市を予定)を開催し、日英両国の研究担当者による研究成果の発表及



び意見交換並びに行政担当者による情報交換等を行う。

**コアプロジェクト-1**

内分泌かく乱作用が疑われる化学物質及び医薬品類等の下水処理過程及び環境中での挙動等に関する検討

**コアプロジェクト-2**

化学物質の内分泌かく乱作用を把握するための分子生物学的アプローチによる影響評価（ホルモン受容体の機能やそれらを介した化学物質の内分泌かく乱作用（悪影響）の発現メカニズム等）に関する検討

**コアプロジェクト-3**

化学物質の内分泌かく乱作用（抗アンドロゲン作用等）を評価・推定するためのメダカを用いる試験法に関する検討

**コアプロジェクト-4**

野生生物における個体群レベルでの影響等（野生のカエルでの精巣卵発現や海産魚類でのビテロゲニン等のバイオマーカーと化学物質との関連性等）に関する検討

## 平成 26 年度日英共同研究の成果について

### コアプロジェクト-1

コアプロジェクト-1に関する調査研究では、環境中での光分解、生分解及び吸着メカニズムを考慮した数理モデルの検証、並びに下水処理水等に含まれるエストロゲン又は抗エストロゲン様作用を示す物質の特定に向けた検討を行い、以下に示す成果を得た。

- 河川の底質に含有される医薬品類の分析手法を構築した。実河川での調査を行い、医薬品類 27 物質について河川水と底質の分配比を検討した。
- 英国テムズ川流域の河川と下水処理場を対象とした調査を行った。医薬品類 53 物質について、河川の流域における存在、流下過程での減衰及び下水処理場での除去性の実態を検討した。
- 市場流通量が多く、下水中からの検出濃度が高い医薬品類のうち水生生物に対する高い生態リスクの可能性が指摘されている物質を対象として、活性汚泥処理実験装置を用いて試験を実施し、下水処理過程での挙動や固液分配係数などの物質特性との関連性を検討した。
- 高度処理による下水中のエストロゲン様作用及び抗エストロゲン作用の除去特性、G protein coupled receptor (GPCR)に作用する医薬品の生理活性を検出できる Transforming growth factor- $\alpha$  (TGF $\alpha$ ) shedding assay の下水試料への適用性を検討した。

### コアプロジェクト-2

コアプロジェクト-2に関する調査研究では、メダカのひれの形状による抗アンドロゲン様作用の検出など、化学物質の内分泌かく乱作用の検出に有効な新たなエンドポイント及び試験法等に関する検討を行い、以下に示す成果を得た。

- 雌のメダカにおける尻びれ鰭条先端の分岐と体サイズとの関連を検討した。先端分岐は全長が 23~24mm を超えると発生すること、先端分岐は主に第 8~11 節板において主に発生すること、先端分岐は尻びれ後方から前方にかけて順に発生していくことが明らかとなった。
- 雄のメダカの二次性徴形質である乳頭状小突起形成と体サイズの関連を検討した。乳頭状小突起の形成は全長が 20~21mm を超える個体で認められ、体サイズの伸長（精巣発達）との強い相関性が示唆された。

### コアプロジェクト-3

コアプロジェクト-3に関する調査研究では、各種魚類でのエストロゲン様物質に対する感受

性の差異などホルモン受容体とリガンドの相互作用の解明に向けた検討及び各種受容体を用いたレポータージーン試験法の確立等に向けた検討を行い、以下に示す成果を得た。

- 魚類のエストロゲン受容体について、化学物質に対する転写活性のサブタイプ間で差異が生じるメカニズムをメダカのエストロゲン受容体（ESR1、ESR2a、ESR2b）をモデルとして、*in silico* 及び *in vitro* の実験系を用いて検討した。化学物質応答性は、ESR1 ではリガンド結合ドメインに依存し、ESR2a、ESR2b では、リガンド結合ドメインだけでなく、他の領域も転写活性化に影響することが示唆された。
- 哺乳類細胞で魚類エストロゲン受容体の応答性を評価するレポータージーンアッセイ系の妥当性を検討した。魚類 ESR1 では化学物質に対する応答性がリガンド結合ドメインに依存するため、哺乳類培養細胞を用いたアッセイ系でも得られた結果は信頼できることが示唆された。
- ポリプテルス、アロワナ、ウナギの各魚類からエストロゲン受容体を単離同定し、これらが E2 に応答する機能的なエストロゲン受容体であることを確認した。

#### コアプロジェクト-4

コアプロジェクト-4に関する調査研究では、野生のカエルでの精巣卵発現等の知見の蓄積及びそれらの化学物質との関連性についての検討、並びに海産の魚介類の各種バイオマーカーに関する調査研究及びそれらの化学物質との関連性についての検討を行い、以下に示す成果を得た。

- これまでに精巣卵を有する個体が高率で見られることが報告されている野生のトノサマガエル集団について調査した。精巣卵を有する個体の出現頻度は、2010～2013年度と同様であったが、これまでに報告がない雌雄同体のカエルが見つかった。
- 1970年代に採集された野生のトノサマガエル集団について、精巣組織の発達、精子形成の進行、精巣卵の形成を調べ、2010～2014年度に採集された個体と比較検討した。両年代では、トノサマガエルの幼生期における環境要因の影響の質が異なる可能性が示唆された。
- 性成熟過程にあるトノサマガエルに種々の濃度の estradiol-17 $\beta$  を投与し、精巣組織及び配偶子形成への影響を検討した。エストロゲン投与は、精子形成開始期のカエルでは精巣卵の形成を誘導できるが、精母細胞移行期になると明瞭な効果を示さないことが示唆された。
- 野生のトノサマガエル集団に関する調査を行った地域における農薬の使用状況について文献調査を行った。使用報告がある農薬に明確なエストロゲン活性を示すものはなかった。
- 沿岸海域の下水処理場周辺で捕獲したボラを対象として血中 VTG 濃度、VTG mRNA 発現量及び精巣卵の有無を調査した。環境中のエストロゲン物質の影響は認められるものの、その程度は減少する傾向にあることが示唆された。

- 下水処理場の放流原水で飼育した雄のマハゼの血中 VTG 濃度及び VTG mRNA から、下水処理場の放流原水に VTG を誘導できる程度のエストロゲン物質が含まれていることが示唆された。
- ムラサキイガイを用いてエストラジオールによる暴露試験を実施した。ムラサキイガイはエストラジオールを速やかに取り込み、エストラジオールに対する ER mRNA の発現応答は ER1 では認められるが ER2 では認められなかった。

## 第16回日英共同研究ワークショップについて

### 1. 開催概要

第16回化学物質の内分泌かく乱作用に関する日英共同ワークショップ (The 16th UK-Japan annual scientific workshop on research into environmental endocrine disrupting chemicals) は、下記のとおり開催された。

日時： 平成26年11月27日(木)、28日(金)

場所： 英国バース市 Macdonald Bath Spa Hotel

出席者： 日本一井口泰泉(研究統括者、自然科学研究機構)、田中宏明(京都大学)、山崎邦彦(環境省)ほか(16名)

英国ートム ハッチンソン(研究統括者、プリマス大学)、デビット・ウィリアム(環境・食料・農村地域省)、マイク・ロバーツ(同)ほか(24名)

### 2. 結果概要

第16回化学物質の内分泌かく乱作用に関する日英共同ワークショップでの報告及び協議事項等は下記のとおりであった。

- 日英両国の研究統括責任者より、日英共同研究の背景と取組の趣旨等についての説明がなされ、共同研究の枠組みについて総括的な意見交換が行われた。
- 共同研究の4つの枠組み(コアプロジェクト1～4)について、日英両国の研究担当者より、これまでの研究成果等についての報告が行われた。
- 化学物質の内分泌かく乱作用に関連する日本及び英国の取組状況、豪州における関連研究の動向等が紹介された。
- 本共同研究を2015年から5年間延長することについて、日英の行政担当者間で合意した。
- 今後の研究計画について、日英両国の研究担当者による議論(グループ討議)が行われ、コアプロジェクトごとに報告がなされた。また、全参加者による質疑応答及び意見交換が行われた。
- 次回のワークショップは、平成27年に日本で開催されることが合意された。