

魚類、両生類及び無脊椎動物に係る試験法開発について

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く予定である。

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。

・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 - エストラジオール (エストロゲン作用の陽性対照物質)、17 - 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、メダカ的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、アロマトーゼ阻害作用及び視床下部 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。

．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、血中ビテロゲニン濃度、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や有効性等について検討する。

・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、試験法の妥当性及び有効性、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。