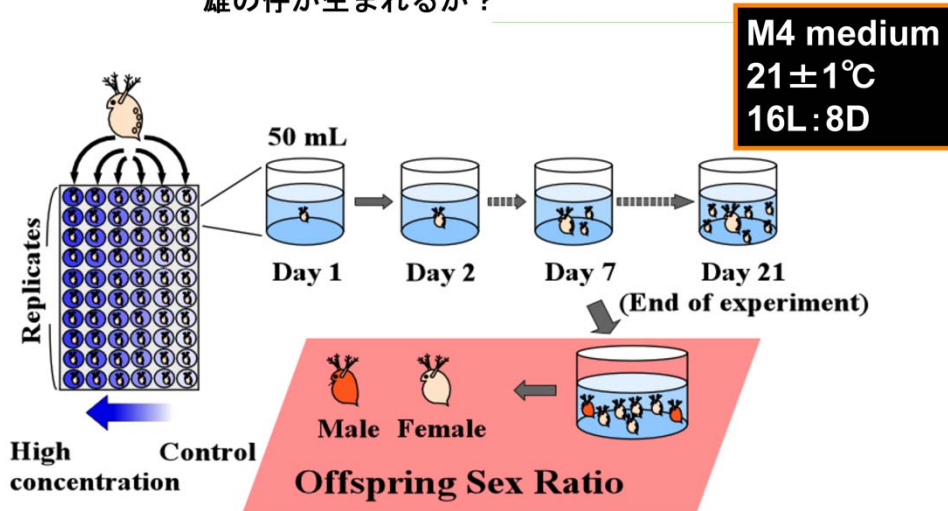


## OECD TG211 オオミジンコ生殖試験

生後24時間以内から**21日間**の産仔数  
雄の子が生まれるか？



オオミジンコのTG211という生殖試験は、生まれて24時間以内の仔を50mlの水に入れて、3週間で産む仔の数を数えて、化学物質影響を見る試験です。私たちは、この試験法を用いて、2003年に、幼若ホルモンをばく露すると単為生殖でメスしか産まないオオミジンコがオスの仔を産むことを見つけていました。そこで、化学物質のばく露により、オスが生まれれば、その化学物質に幼若ホルモン作用が有ると考えられますので、産まれた仔の性比を見ることをOECDに提案しました。

# 雄が生まれるかを 1 週間で判定する方法の開発

Research Article

Journal of  
Applied Toxicology

Received: 15 November 2013, Revised: 17 December 2013, Accepted: 17 December 2013, Published online in Wiley Online Library: 30 January 2014

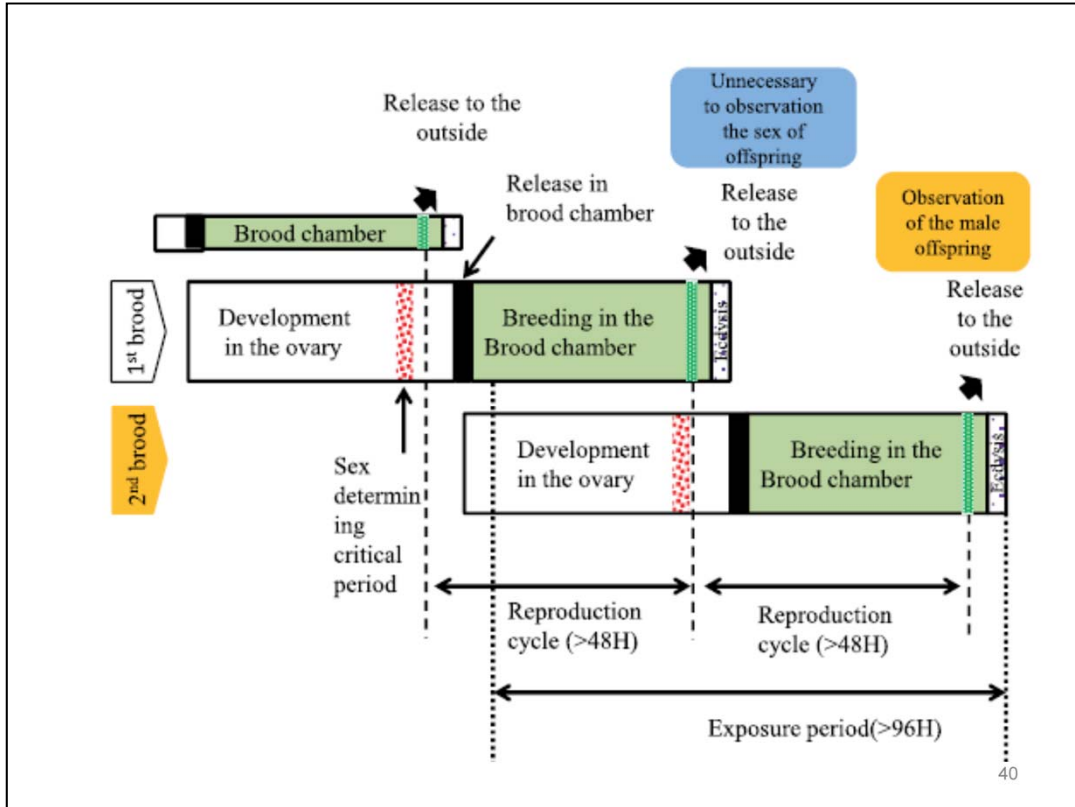
(wileyonlinelibrary.com) DOI 10.1002/jat.2989 Abe et al., J. Appl. Toxicol., 35, 75-82, 2015.

## Establishment of a short-term, *in vivo* screening method for detecting chemicals with juvenile hormone activity using adult *Daphnia magna*

Ryoko Abe<sup>a</sup>, Haruna Watanabe<sup>b</sup>, Masumi Yamamuro<sup>a</sup>, Taisen Iguchi<sup>c</sup> and Norihisa Tatarazako<sup>a,b,\*</sup>

**ABSTRACT:** Juvenile hormone (JH) and JH agonists have been shown to induce male offspring production in various daphnids, including *Daphnia magna* using OECD TG211. The critical period (about 1h) for JH action on ova in the parent's ovary to induce male offspring is existing at 7-8h later from ovulation. Therefore, we considered that adult *D. magna* could be used to produce a short-term screening method for detecting JH analogs. Using this method, we successfully demonstrated male offspring induction in the second broods after exposure to JH or JH agonists. After investigating the exposure time, the number of repetitions and the exposure concentration, we established a short-term, *in vivo* screening method for detecting JH analogs using adult *D. magna*. We examined positive and negative control chemicals using a previously developed method and verified the validity of our new testing method. Copyright © 2014 John Wiley & Sons, Ltd.

オスを産むか否かを見るだけに、3週間の試験は長すぎるので、1週間で試験が終わる方法を鑑迫先生のグループと開発しました。生後24時間以内の幼生を用いるのを、成体からの化学物質ばく露に変え、ばく露から2度目の産仔した仔の性比を見る方法が適当であることが分かりました。



(前スライドと同様)

先ほどの説明を時間スケールで表した模式図です。

### 3. 第2段階生物試験の開発

- エストロゲン、抗エストロゲン、アンドロゲン、抗アンドロゲン活性  
メダカ拡張1世代生殖試験 (MEOGRT) (OECDに提出)
- 甲状腺ホルモン活性、抗甲状腺ホルモン活性  
両生類変態アッセイ (TG231) or  
幼生期両生類成長・発達試験 (LAGDA) (OECDに提出)
- 幼若ホルモン活性  
オオミジンコ生殖試験 (OECD TG211) ANNEX 7  
ミジンコ多世代試験 (開発中)
- 脱皮ホルモン活性  
ミジンコ多世代試験 (開発中)

41

ここまでのところで、第一段階試験のレポーターアッセイと短期の動物試験についてお話ししました。

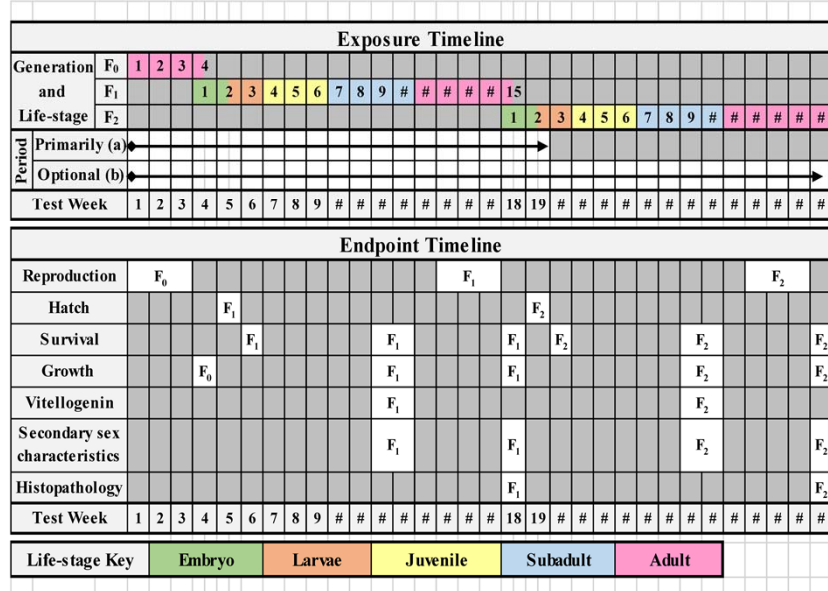
ここから第2段階の確定試験についての紹介です。エストロゲンやアンドロゲン作用については、メダカの拡張1世代生殖試験を行います。それまではメダカ多世代試験と呼ばれていました。この試験法は、われわれ日本のグループとアメリカの環境保護庁 (US EPA) の研究所のグループで開発したもので、現在はOECDの上位の委員会 (WNT) で審査してもらっています。うまく通れば2015年4月にはテストガイドラインとして認められることになります。

カエルの方は、幼生期の両生類成長試験、これはLAGDAと称していますが、これもUS EPAと一緒に開発して、これも12月にVMG-ecoというところでは通っていますので、さらに上のWNTというところが今評価をしています。うまくいけば2015年の4月にテストガイドラインとして認められる予定です。

ミジンコの多世代試験の開発は、国立環境研で行われています。

## 第2段階生物試験(確定試験) メダカ Office of Water in USEPAより相談

### Medaka Multi-generation Test (当初の計画) Exposure and measurement endpoint timelines for the MMT



42

メダカの拡張1世代試験については、Primaryとある欄を右にたどっていただければ分かりますが、親にばく露して、産まれた卵から育てた仔を交配し、産まれた卵を育てて1週間ぐらいまで観察することになります。当初は、多世代試験として、Optionalと書いた欄を右にたどっていただければ分かるように、より長期の試験を計画しておりました。これは経費がかかりすぎることや、今までの結果、親ばく露によって子どもの反応性があがるような例が見出せていないということから、2世代目は短くてよいとの意見が多く、短期の試験となります。EPAのOffice of Waterから、こういった確定試験にはどういう魚を使ったらいいかと相談を受けまして、メダカがよいと宣伝して、それが採用されたものですから、私にも責任がありますので、完成してよかったと安心しています。

## メダカ拡張1世代生殖試験 (MEOGRT) 曝露計画およびエンドポイント

MEOGRT Exposure and Endpoint Timeline																						
F0	1	2	3	4																		
F1				1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16			
週	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19			
成長段階				胚 (Embryo)			幼魚 (Larvae)				稚魚 (Juvenile)			準成魚 (Subadult)		成魚 (Adult)						
エンドポイント(観察・測定項目)																						
産卵	F <sub>0</sub>															F <sub>1</sub>			<ul style="list-style-type: none"> <li>• 実験デザイン 7群</li> <li>• 処理群 5濃度</li> <li>• 対照群 2 (溶媒使用の場合には4群)</li> <li>• <b>Within-group design</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>◦ 12 replicates for reproduction, adult pathology and SSC (Wks 10 thru 18)</li> <li>◦ 6 replicates for hatch, survival Vtg; and - subadult SSC and growth (Wks 1 thru 9)</li> </ul> </li> </ul> <p>SSC: secondary sex characters; Wks: weeks; Vtg: vitellogenin</p>			
受精	F <sub>0</sub>															F <sub>1</sub>						
孵化				F <sub>0</sub>																F <sub>1</sub>		
生存							F <sub>1</sub>								F <sub>1</sub>							
成長				F <sub>0</sub>																F <sub>1</sub>		
ピテロゲン																F <sub>1</sub>						
2次性徴																F <sub>1</sub>						
病理組織																F <sub>1</sub>						
週	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18		19		

メダカ拡張1世代試験は、19週にわたる短い試験になっています。F0にばく露して、ずっとばく露は続けます。その過程で、図の右下の欄にも書き込んでいますが、いろんなエンドポイントを評価することになります。

Nakamura et al., J. Appl. Toxicol., 35, 11-23, 2015.

## Fish multigeneration test with preliminary short-term reproduction assay for estrone using Japanese medaka (*Oryzias latipes*)

Ataru Nakamura<sup>a,b</sup>, Ikumi Tamura<sup>b</sup>, Hitomi Takanobu<sup>b</sup>,  
Masumi Yamamuro<sup>a</sup>, Taisen Iguchi<sup>c</sup> and Norihisa Tatarazako<sup>a,b,\*</sup>

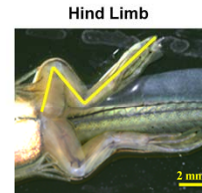
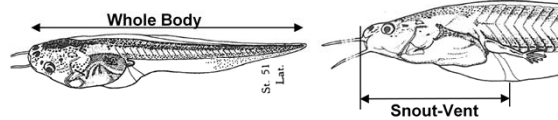
**ABSTRACT:** The most potent chemicals potentially causing adverse effects on fish species are estrogens in human waste. Sewage is a source of these estrogens and it is difficult to reduce. In particular, although the bioactivity of estrone is estimated to be about half of that of estradiol, multiple studies report that more than 100 ng l<sup>-1</sup> of estrone can be detected in urban rivers, including discharges from sewage treatment works; approximately two times as high as estradiol. Few studies have been conducted to investigate the long-term effects of estrone on wildlife; therefore, we conducted fish multigeneration test using Japanese medaka (*Oryzias latipes*). Medaka were exposed to estrone for 27 weeks across three generations in environmentally relevant concentrations, being 5.74, 11.4, 24.0, 47.1 and 91.4 ng l<sup>-1</sup>. No effects on reproduction were observed in the first generation; however, a decline in egg production and fertility was observed in the second generation exposed to 91.4 ng l<sup>-1</sup> estrone, which is lower than some known environmental concentrations in urban environments. Furthermore, histopathological abnormalities were observed in the third generation exposed to both 47.1 and 91.4 ng l<sup>-1</sup>, suggesting that estrone possibly exerts severe effects on the third or later generations. However, appearances of testis-ova were observed in the second and third generation they were not consistent with actual effects on reproduction, notwithstanding the testis-ova is regarded as the key evidence for endocrine disruption. Accordingly, we consider that qualitative measurement of abnormalities using histopathological observations is required for appropriate evaluation of endocrine disruption. Copyright © 2014 John Wiley & Sons, Ltd.

メダカ拡張1世代試験を作成する時に行った実験結果をまとめた論文です。エストロンを試験物質として用いました。これは鑑迫先生を中心に、にばく露試験をして得られた結果です。

## 両生類変態アッセイ (OECD TG231)

- アフリカツメガエル(*Xenopus laevis*)のオタマジャクシ(発生段階51から66まで) 21日間曝露
- 試験グループ6連 (20 tadpoles)
- 流水式曝露
- エンドポイント

後肢長

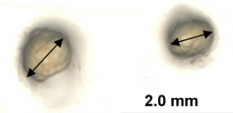


□体重、体長

□変態までの時間、発生段階



□甲状腺病理組織、長径



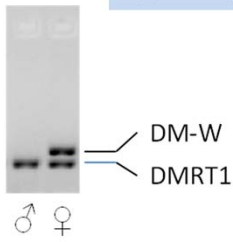
45

両生類の変態試験ではOECD TG231ができています。

正常発生では、オタマジャクシの尾は短くなって手足が伸びて、カエルに変態しますので、この試験では、幼生期のアフリカツメガエルに甲状腺ホルモンの作用を邪魔する物質をばく露して、変態への影響を調べて、抗甲状腺ホルモン作用を見ようとする、両生類変態試験です。



## 幼生期両生類成長・発達試験 (LAGDA)



### 試験デザイン

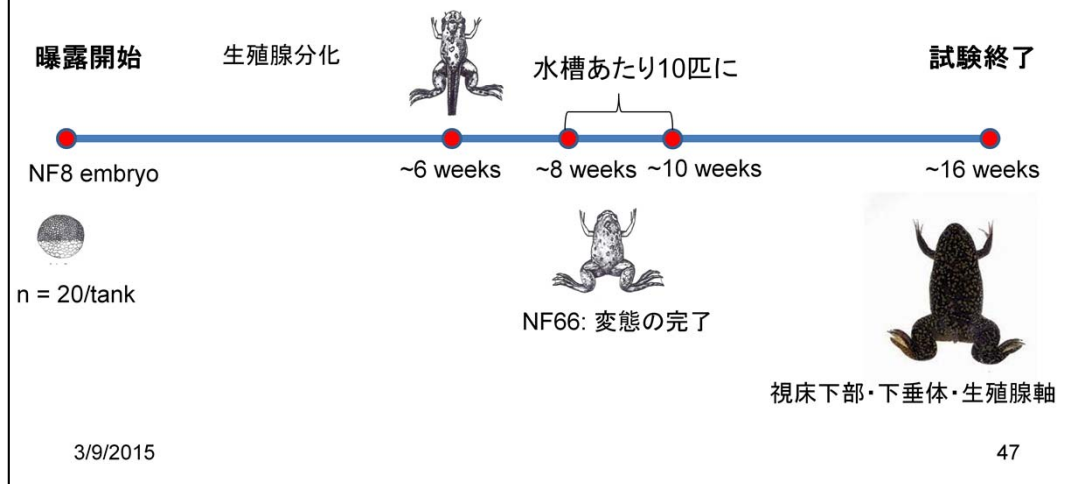
- 試験動物: アフリカツメガエル (*Xenopus laevis*)
- 試験期間: ~16-20 週間
- 発生段階NF8 の胚から 10 週間、対照では post-NF62
- 曝露濃度区: 4 濃度および対照
- 繰り返し実験: 対照8群および各濃度4群
  - 水槽総数: 24

46

当初は、8ヶ月で成体になるニシツメガエルを用いて、世代試験を行うことを考えていたのですが、2年以上の歳月をかけると、費用も膨大になることから、幼生期両生類成長・発達試験に落ち着きました。Larval Amphibian Growth and Development Test (LAGDA) と呼ばれています。性の遺伝子マーカーが確立しているアフリカツメガエルを用いて、発生段階NF8の幼生から16週間程度かかる試験です。試験物質の濃度は4群使います。

# Test Timeline

NF62 で一部サンプルを採取  
・視床下部・下垂体・生殖腺軸への影響評価  
・n = 5 (randomized block)  
・1 of every 4 that reach NF62



LAGDAの試験を時間の流れに沿ってまとめたものです。試験終了までに16週程度かかります。

<b>観察・測定項目 エンドポイント</b>			
観察するエンドポイント	毎日	発生段階 62	試験終了後
死亡	x		
病気あるいは毒性影響	x		
成長(体重・体長)		x	x
肝重量・体重インデックス (LSI)			x
肝臓病理組織			x
腎臓病理組織			x
<b>甲状腺(視床下部・下垂体・甲状腺) エンドポイント</b>			
エンドポイント	毎日	発生段階 62	試験終了後
発生段階 NF stage 62までの日数		x	
甲状腺病理組織		x	
<b>生殖腺(視床下部・下垂体・生殖腺) エンドポイント</b>			
エンドポイント	毎日	発生段階 62	試験終了後
遺伝的な性・組織学的な性			x
生殖腺病理組織			x
生殖輸管系の病理組織			x
血清中のT4, 卵黄タンパク量、母指降起はエンドポイントから削除			48

発生段階、変態時、実験終了時にどのような項目を調査するのか、エンドポイントをまとめた図です。

## 研究室間の確認試験

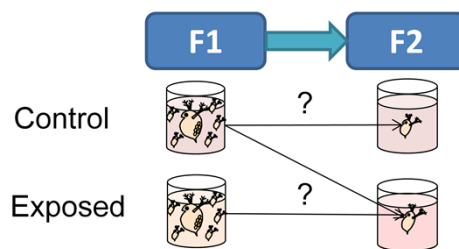
- **Prochloraz** (アロマターゼ阻害剤、抗アンドロゲン)  
– 4 labs (EPA/MED + 3 other U.S. labs)
- **4-tert-octylphenol** (エストロゲン作用)  
– 3 labs (EPA/MED + 2 other U.S. labs)
- **17 $\beta$ -trenbolone** (アンドロゲン作用)  
– 1 lab (EPA/MED)
- **Benzophenone-2** (エストロゲン作用; TPO inhibitor)  
– 1 lab (Japan)

49

これまでに、図に記載してある物質を用いたLAGDA試験を行っています。

## ミジンコの多世代試験に向けての取り組み

- 通常の繁殖試験をつなげる？
  - 多くの多世代試験が通常の繁殖試験(OECD TG211)を繰り返すことで実施されている (Sánchez et al., 2004; Brennan et al, 2006; Péry et al., 2008).
- 第2世代試験に供する仔虫をどのように確保するか？
- 第1世代および第2世代の試験結果をどのように比較するか？
  - 第1世代と第2世代における供試生物のバラツキも考慮に入れる必要があるか？



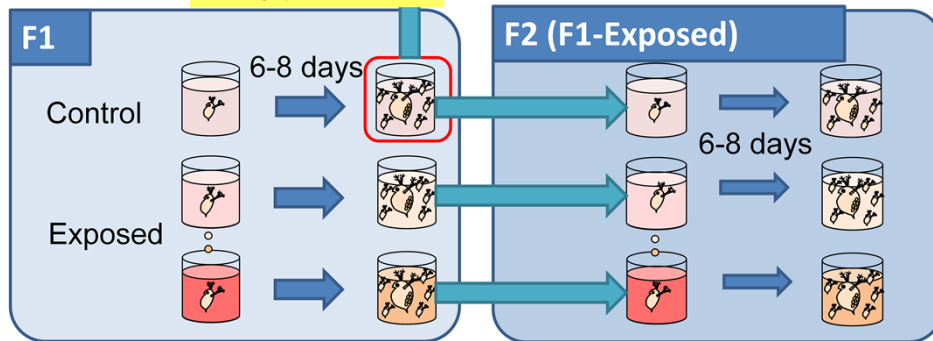
50

ミジンコの多世代試験については、詳細に話す時間がないので、図を読んでいただければ、おおよそ理解していただければと思います。

## Ceriodaphnia dubiaを用いた多世代試験

- 通常繁殖試験をつなげる
- F2(F1-Unexposed) : F1-controlの仔虫をF2において各濃度区にばく露した区（プロクロラズのみ）
- F2(F1-Unexposed) とF2(F1-Exposed) はcontrol共通.

Neonates from 2<sup>nd</sup> or 3<sup>rd</sup> brood (test end +2 days)

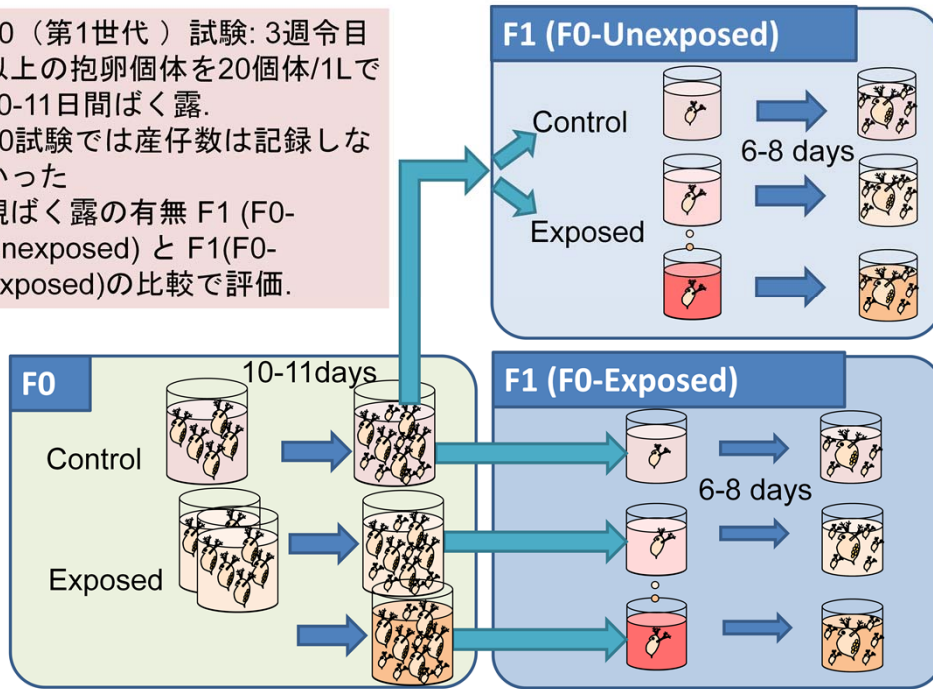


(発表では説明を省略)

生殖期間の短いニセネコゼミジンコを用いた多世代試験の例です。F2への影響を見る場合に、F1では化学物質ばく露しなかったグループを2つ準備し、そのひとつに化学物質をばく露することにより、F1, F2と連続で化学物質をばく露したグループで見られる影響と比べることができます。

## Daphnia magnaを用いた多世代試験

- F0（第1世代）試験: 3週令目以上の抱卵個体を20個体/1Lで10-11日間ばく露.
- F0試験では産仔数は記録しなかった
- 親ばく露の有無 F1 (F0-Unexposed) と F1(F0-Exposed)の比較で評価.



オオミジンコでも同様に、鑪迫先生のところでは、コントロールをF2でそのまま飼って行って、これを分けて、さらにコントロールとして飼っていくものと、F2から化学物質をばく露する群を作ります。右下のようにF1で親にばく露して生まれた子どもに、さらにF2でも同じ濃度でばく露を続けたらどうなるかをしらべています。右側の図の上下のデータを比較することにより、親ばく露の仔の方が低濃度で悪影響が出てくるかどうかということで、世代を超えた影響が判断できるという考え方です。

## まとめ

- 水生生物に対して内分泌かく乱作用が疑われる物質の2段階の試験および評価の枠組みおよび試験法を開発
  - メダカ、ツメガエルおよびミジンコの受容体遺伝子を組み込んだ細胞を用いた試験管内試験（レポーター遺伝子アッセイ）を作成
  - メダカ短期繁殖試験 (OECD TG229) を確立
  - メダカ拡張1世代生殖試験(MEOGRT)および幼若期両生類成長・発達試験(LAGDA)の最終提案をOECDに提出（アメリカ環境保護庁と協力）
  - 短期（抗）アンドロゲン作用生物試験系開発
  - トランスジェニックメダカを用いた(抗) アンドロゲン作用短期試験開発
  - トランスジェニックアフリカツメガエルを用いた(抗)甲状腺ホルモン作用短期試験の開発・リングテスト
  
- 試験・評価のための物質選定数 総計 328

-10報以上の報告があり文献評価を行った物質数	114
-文献の信頼性評価終了物質数	79
試験対象となる物質数	51
-第1段階試験管内試験	40 (18)
-第1段階短期生物試に進む物質数	10 (6)

53

ということで、以上、環境省のEXTEND2010の中の評価系で使おうとしている各種の試験を御紹介しました。



## 残されている課題および継続課題

- 2段階試験の継続
  - 第1段階試験管内試験（メダカ、ツメガエル、ミジンコ）
  - 第1段階生物試験（メダカ、ツメガエル、ミジンコ）
  - 第2段階生物試験に進む物質の選定のための第1段階生物試験を進め、第2段階生物試験の実行及び評価
- SPEED'98で評価した物質をEXTEND2010の枠組みで再評価  
Nonylphenol, octylphenol and bisphenol-A
- 新たな物質選定(日米二国間協力・日英共同研究)
  - ハイスループットスクリーニング手法の活用
- 基礎研究の推進(日英共同研究)
  - OECDのAdverse Outcome Pathways (AOP)プロジェクト
- 試験及び評価の促進
- 行政的には内分泌かく乱物質のリスク管理

54

今後は、第2段階試験にはどういう物質を使って試験するのかという重要な課題も残されています。

簡単ですが、これで試験法の概要のお話を終わりたいと思います。