

平成22年度 化学物質の内分泌かく乱作用に関する公開セミナー

生物の試験法開発に関するこれまでの 成果と今後の課題

鑑迫 典久(国立環境研究所)

内分泌かく乱化学物質に対する各国の取り組み

アメリカの取り組み (US EPA)

- ・1999年にEDSP(内分泌かく乱物質スクリーニング計画)策定
- ・Tier 1(スクリーニング), Tier 2(多世代試験)の試験法についての妥当性を検証
- ・2010年にTier 1の対象物質(ヒト曝露の可能性のある物質)を選定し、生産者(販売業者)への試験結果のデータの提出を要求する。
- ・遺伝子発現やタンパク質発現などを評価手法とする新たな試験法についても開発

欧州の取り組み(欧州委員会)


- ・1999年に内分泌かく乱化学物質に対する戦略を採択
- ・優先物質のリストを作成し物質を絞り込む
- ・2008年に規制登録が開始されたREACHのもとで物質に対する対応を報告

経済開発協力機構(OECD)


- ・1996年にEDTA(内分泌かく乱化学物質の試験及び評価)に関する検討を開始
- ・魚類、両生類、無脊椎等の試験法を策定(VMG-eco)
- ・2010年から内分泌かく乱物質の評価に関するガイダンス文書作成のための検討開始

内分泌かく乱化学物質に対する国内の取り組み

SPEED'98

- 
- ① 化学物質の環境実態調査及び野生生物の影響実態調査
 - ② 生態系への影響評価のための魚類を用いた試験
 - ③ ヒトの健康への影響評価のためのほ乳類を用いた試験
 - ④ 国際的な協力(日英、日米、日韓、OECD, WHO)

ExtEND 2005

- 
- ① 野生生物の観察
 - ② 環境中濃度の実態把握及びばく露の測定
 - ③ 基盤的研究の推進
 - ④ 影響評価(試験法開発、国際協力(日英、日米、OECD)、物質選定と評価事業)
 - ⑤ リスク評価及びリスク管理
 - ⑥ 情報提供とリスクコミュニケーション等の推進

EXTEND 2010

- ① 野生生物の生物学的知見研究及び基盤的研究の推進
- ② 試験法の開発及び評価の枠組みの確立(OECD貢献等)
- ③ 環境中濃度の実態把握及びばく露の評価
- ④ 作用・影響評価の実施
- ⑤ リスク評価及びリスク管理
- ⑥ 情報提供等の推進
- ⑦ 国際協力の推進(OECD, 日英, 日米, アジア地域)

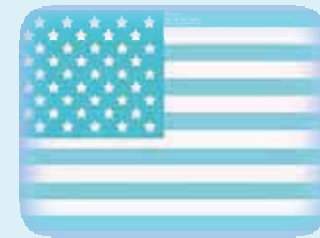
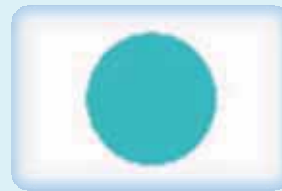
OECD生態毒性試験法の開発(標準化)への国際貢献

新しい試験法の開発および標準化への取り組み

- ・魚類短期間繁殖試験(日本協力)▶ TG229 (2009年)
- ・魚類21日間魚類試験(日本基本案)▶ TG230 (2009年)
- ・ミジンコ繁殖試験(日本主導提案)▶ TG211改定 (2008年)
- ・両生類変態アッセイ(日米独共同提案)▶ TG231 (2009年)



OECDテストガイドラインとして承認された



- ・魚類多世代繁殖試験
- ・無脊椎動物試験法(多世代試験)
- ・両生類パーシャルライフサイクル試験
- ・魚類2次性徴発達試験(FSDT)
- ・in vitro試験法開発

環境省
米国EPA
英国DEFRA

OECDテストガイドライン化
試験法の共有・標準化



内分泌かく乱物質の世界共通の試験法を開発するため、
国際的な枠組みの中で検証作業を実施



国内のリスク管理・国際協調、国際貢献

OECDテストガイドラインプログラムにおける試験法承認までの流れ

ステップ 1

OECD事務局への新規プログラムの提案

加盟国、工業界、学会、OECD事務局から新規プログラムの提案
参加国の中からリード国を決定する

ステップ 2

SPSFの作成とWNTへの提案

試験 (TG) が必要な背景を、Guide34に基づいて提案
新規プログラムに関わる試験データも提出

WNTによる新規プログラムの承認

WNTにて優先順位 (H/M/L) が検討される
OECD-TGPでの新規プログラムの活動が承認

ステップ 3

ad hoc専門者会合 (VMG, FDG...) の開催

動物愛護の観点から試験プロトコルを検討、試験物質などを選定する
検証試験の実施、試験結果の解析、実証試験報告書の作成
検証試験は複数回実施される場合がある
ドラフトガイドライン (DTG) の作成・修正

ステップ 4

ピュアレビューパネルの設置とDTGのレビュー

加盟国専門家によるピュアレビューパネルを設置、DTGへのコメントをGuide34に基づいて要請
ピュアレビュー報告書を作成して化学品合同会議 (WNT) へ提出する

ステップ 5

WNTによるTGの承認/採択

DGTの再検討/修正等をad hoc専門者会合に要請

理事会の承認/採択

魚類試験法開発

OECD魚類生態毒性試験法の開発(標準化)状況

開発済みの試験(SPEED'98~EXTEND 2005)

(1) 魚類21日間試験(TG230)

★メダカ、ファットヘッドミノー及びゼブラフィッシュを試験魚として、ビテロゲニン量及び短期の性転換を指標とする21日間のスクリーニング試験

★SPEED'98 で用いられたビテロゲニンアッセイに相当

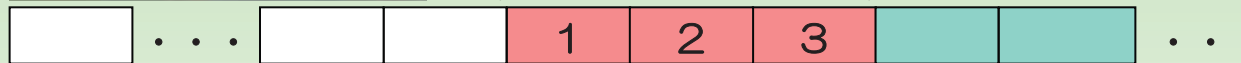
★2009年にOECDのTG230として採択

- ・エンドポイント： 肝臓(または血液)中ビテロゲニン量及び二次性徴の変化
- ・検出可能な作用： (抗)エストロゲン作用、アンドロゲン作用、アロマターゼ阻害作用

試験魚種： メダカ、ファットヘッドミノウ、ゼブラフィッシュ



試験生物： 繁殖可能な成熟した雌雄個体
(ふ化後2~4ヶ月令)



順化 (ばく露前) ばく露期間 (3W) 測定・観察

試験条件

- ・試験方法： 流水式試験装置
- ・試験濃度： 3濃度区+対照区
- ・試験魚数： 雌雄10個体/試験濃度
- ・繰返し数： 2 (雌雄各5個体/試験濃度)
- ・観察項目： 試験水pH、DO、水温 (24±1℃)、試験水濃度
- ・給餌： アルテミア (飽食量)

◆試験の目的

- ・化学物質のエストロゲン作用、アンドロゲン作用、及びアロマターゼ阻害作用による影響について調べる。

◆試験の概要

- ・流水式での21日間の試験
- ・個体の生存・症状、二次性徴、肝臓VTG濃度 (ELISA) を指標とする。

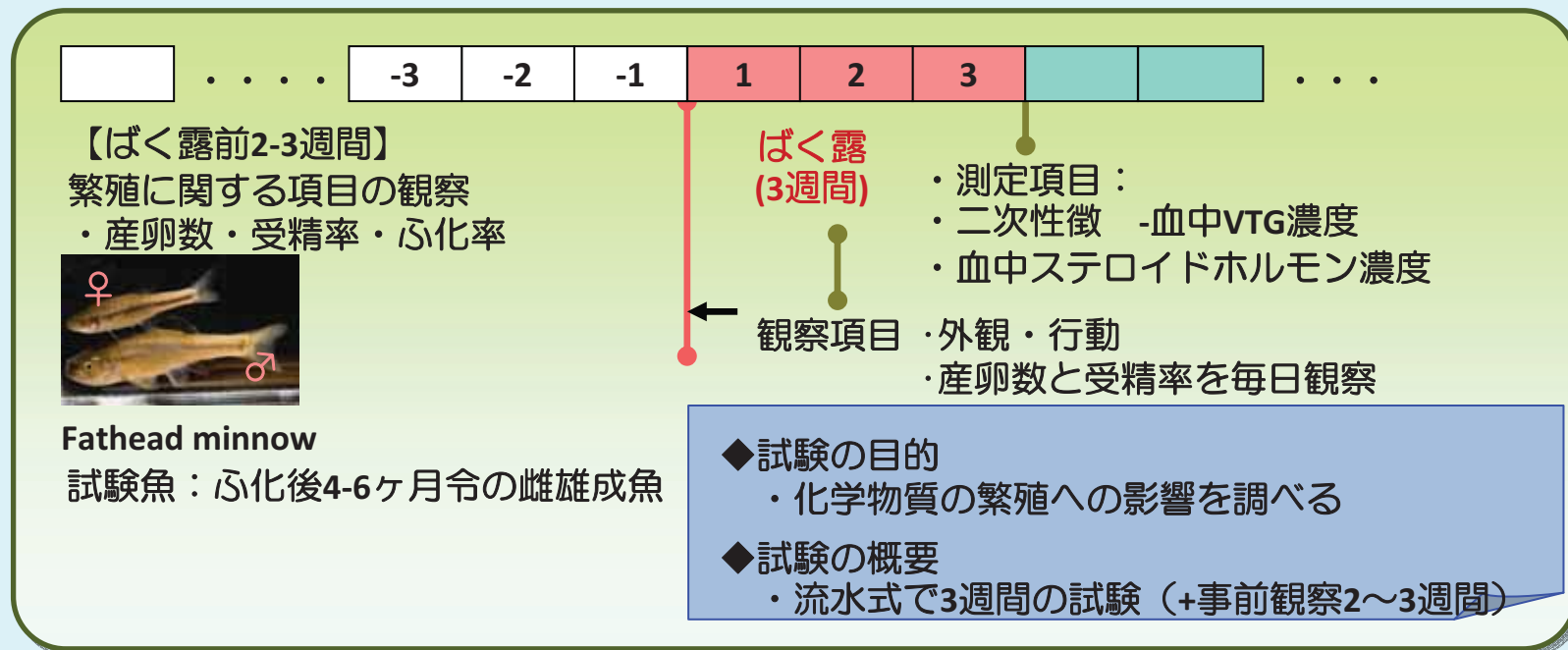
(2) 魚類短期繁殖試験 (TG229)

★ファットヘッドミノーを主たる試験魚とした21~28日間のスクリーニング試験

★ビテロゲニンに加え、生物群存続に関するハザード(繁殖率)をエンドポイントに持ち、母親から次世代への影響(マターナルエフェクト)を検出できる。

★米国により提案され、2009年にOECDのTG229として採択されたが、メダカを試験魚とした本試験の適正化に向け、一部の試験条件を再検討中

- ・エンドポイント: 肝臓(または血液)中ビテロゲニン量、二次性徴、産卵数の変化
- ・検出可能な作用: (抗)エストロゲン作用、アンドロゲン作用、アロマターゼ阻害作用、下垂体~生殖腺軸への影響



メダカを試験魚とする短期繁殖試験の適正化のため、試験条件の再検討に向けた取組みを推進している

OECD魚類生態毒性試験法の開発(標準化)状況

開発中の試験 (EXTEND 2005~EXTEND 2010)

(1) 魚類性発達試験(FSDT)

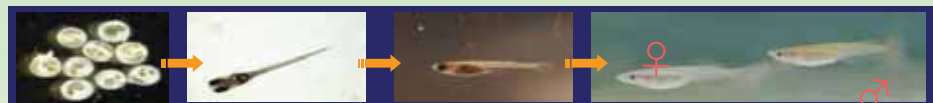
- ★受精卵から二次性徴が認められるまで(60日間)曝露するスクリーニング試験
- ★SPEED' 98で開発されたパーシャルライフサイクル試験に相当
- ★2009年よりリングテストにメダカを用いて参加し、他の試験魚の結果と比較・検証を実施

- ・エンドポイント: ビテロゲン量、生殖腺(組織・二次性徴・性比)の変化
(繁殖に関するエンドポイントはない)
- ・検出可能な作用: (抗)エストロゲン作用、(抗)アンドロゲン作用、アロマトラーゼ阻害作用、下垂体~生殖腺軸への影響

試験魚種: メダカ、ファットヘッドミノー、ゼブラフィッシュ

試験生物受精後数時間経過した受精卵

ばく露期間(60日)



測定・観察

試験条件

- ・試験方法: 流水式試験装置
- ・試験濃度: 3濃度区+対照区
- ・試験魚数: 45個体/試験濃度
- ・繰返し数: 2 (雌雄各5個体/試験濃度)
- ・観察項目: 試験水pH、DO、水温
(25±2°C)
- ・給餌: アルテミア (飽食量)

◆試験の目的

- ・化学物質の生殖腺への影響を調べる

◆試験の概要

- ・流水式での60日間の試験である。
- ・心化率、心化日数、個体の生存・症状、体長・体重、生殖腺組織、性比(DMY)、肝臓VTG濃度(ELISA)を指標

閑話休題：試験法開発にあたって重要なこと

- 科学的妥当性 (relevancy)
 - 方法・エンドポイントの科学的根拠
 - どうして内分泌かく乱の試験法は必要なのか
- 繰り返し再現性 (repeatability/reproducibility)
 - いつも同じ結果を出せるか (ラボ内再現性)
 - 誰がやっても同じ結果になるか (ラボ間再現性)
- 結果の信頼性 (reliability)
 - 試験条件をすべて満たした試験が遂行されている
 - 客観的に判断して正しい

(2) 魚類(メダカ)多世代繁殖試験

★次世代への移行、影響を調べることを目的として、化学物質の影響によって生物群が存続できるかを判断するための長期(25週間)の確定試験

★フルライフサイクル試験をベースに、既存試験(TG229、TG210、FSDT)の組合せで構成

★メダカ多世代試験として、2009年より日米で共同でテストガイドライン化に向け検討中

- ・エンドポイント： ビテロゲニン量、生殖腺(組織・二次性徴・性比)、繁殖(産卵数等)
- ・検出可能な作用： (抗)エストロゲン作用、(抗)アンドロゲン作用、アロマターゼ阻害作用、下垂体～生殖腺軸への影響

メダカ多世代試験(multi-generation test): 確定試験

期間(週)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25
-------	---	---	---	---	---	---	---	---	---	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----

