

## ExTEND2005における魚類試験法開発について

### 1. 化学物質の内分泌かく乱作用に関する魚類試験について

#### 【これまでの取組】(ExTEND2005 P5 より抜粋)

SPEED '98 のリストに基づいて、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、ピ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。

28 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 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。

#### 【平成 17 年度検討事項及び結果等】

##### (1) エストロジェン様作用以外の内分泌かく乱作用に着目した試験体系の検討

###### アンドロジェン様作用についての検討

トレンボロン(アンドロジェン作用物質)を用いてライフサイクル試験を実施し、VTG 誘導や二次性徴等の評価指標の有用性について検討を行った。その結果、生殖腺組織、二次性徴、GSI、受精率及び産卵数において有意な影響が認められた。特に、二次性徴の変化はアンドロジェン作用をスクリーニングで切る簡便かつ高感度な指標となると考えられる。また、受精率及び産卵数に関しては、繁殖低下を直接的に示すことから、エストロジェン様物質と同様に、アンドロジェン作用による有害性を評価できる指標であると考えられた。

###### 弱エストロジェン様作用/アロマターゼ阻害作用/甲状腺ホルモン様作用についての検討

メダカ甲状腺ホルモン受容体を用いた結合試験を行った。その結果、トリブチルスズ、トリフェニルスズ、4-オクチルフェノール、アルドリン、

クロルデン、ヘプタクロールなどに弱い結合性が認められた。

メダカ甲状腺ホルモン受容体を用いた結合試験結果

| 試験物質                    | IC50(M)               | RBA(%)   |
|-------------------------|-----------------------|----------|
| 3,3',5-トリヨードチロニン        | $2.20 \times 10^{-9}$ | 100      |
| トリブチルスズ                 | $1.17 \times 10^{-5}$ | 0.0301   |
| トリフェニルスズ                | $1.76 \times 10^{-5}$ | 0.0200   |
| 4-オクチルフェノール             | $3.48 \times 10^{-4}$ | 0.00101  |
| アルドリン                   | $2.55 \times 10^{-4}$ | 0.000862 |
| クロルデン                   | $2.78 \times 10^{-4}$ | 0.000792 |
| ヘプタクロール                 | $3.06 \times 10^{-4}$ | 0.000719 |
| ノニルフェノール                | N.D.                  | N.D.     |
| マラチオン                   | N.D.                  | N.D.     |
| アジピン酸ジ-2-エチルヘキシル        |                       |          |
| アミトロール                  |                       |          |
| エンドリン                   |                       |          |
| オクタクロロスチレン              |                       |          |
| ケルセン                    |                       |          |
| 2,4-ジクロロフェノール           |                       |          |
| ディルドリン                  |                       |          |
| 4-ニトロトルエン               |                       |          |
| trans-ノナクロル             |                       |          |
| ノニルフェノキシ酢酸              |                       |          |
| ノニルフェノールモノエトキシレート       |                       |          |
| ノニルフェノールジエトキシレート        |                       |          |
| ビスフェノール A               |                       |          |
| フタル酸ジエチル                |                       |          |
| フタル酸ジ-2-エチルヘキシル         |                       |          |
| フタル酸ジシクロヘキシル            |                       |          |
| フタル酸ジ-n-ブチル             |                       |          |
| フタル酸ジプロピル               |                       |          |
| フタル酸ジヘキシル               |                       |          |
| フタル酸ジペンチル               |                       |          |
| フタル酸ブチルベンジル             |                       |          |
| 4-t-ブチルフェノール            |                       |          |
| $\gamma$ -ヘキサクロロシクロヘキサン |                       |          |
| ヘキサクロロシクロヘキサン           |                       |          |
| ペルメトリン混合物               |                       |          |
| ベンゾフェノン                 |                       |          |

| 試験物質        | IC50(M) | RBA(%) |
|-------------|---------|--------|
| ペンタクロロフェノール |         |        |
| マイレックス      |         |        |
| p,p'-DDD    |         |        |
| p,p'-DDE    |         |        |
| p,p'-DDT    |         |        |
| o,p'-DDT    |         |        |

RBA：相対結合親和性（％）

N.D.：活性が認められたが IC<sub>50</sub> 値は得られず、相対活性が計算できなかった。

：試験した濃度範囲で結合性が認められなかった。

## （２）試験魚（メダカ）に関する基礎的知見の収集・整理

### メダカアトラスの作成

これまでの取組において、正常個体における基礎データ(生殖腺組織と成長、二次性徴、肝臓中ビテロジェニン濃度等)及び暴露個体における生殖腺組織のデータを収集し、メダカデータベースとしてホームページ\*で公開してきている。しかしながら、エストロジェン以外の化学物質による暴露個体の画像が僅かであることから、平成 17 年度はトレンボロンを暴露した個体における生殖腺組織変化のデータを収集し、メダカデータベースを整備した。

\* [http://endocrine.eic.or.jp/siryou\\_medaka/index.html](http://endocrine.eic.or.jp/siryou_medaka/index.html)

### 試験のエンドポイントについての情報整備

試験におけるエンドポイントとなる、全長、体重、産卵数、受精率、孵化日数といった事項に関して、そのコントロール群(被験物質無投与群)でのばらつき、また飼育条件等によるばらつきの変化等について情報を整備した。

## （３）OECD関連事業について

経済協力開発機構(OECD)は、内分泌かく乱作用のスクリーニングを目的とした魚類スクリーニングアッセイ(FSA:Fish Screening Assay)を提案し、2003年(平成15年)から基準物質による検証作業を進めている。2003年には Phase 1Aとして強エストロジェン(17 $\beta$ -エストラジオール)及びアンドロジェン(17 $\beta$ -トレンボロン)による検証作業が、2004年には Phase 1Bとして弱エストロジェン(ペンチルフェノール)、アロマトターゼ阻害剤(プロクロラズ)及び抗アンドロジェン(フルタミド)による検証作業が行われてきた。また、2005年には、陰性対照物質として過マンガン酸カリウム及び1-オクタノールの2物質を用いてPhase 2検証作業が行われた。我が国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。

その結果、本アッセイにおいて、ピテロジェニン濃度及び二次性徴を測定することで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ターゼ阻害作用の影響を検出することが可能であることが示唆された。そして、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において、本アッセイのテストガイドライン化へ向けての作業を引き続き行うこととされた。

< 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暴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り組みの提案/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り組みの整理<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り組みの提案/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 | 第4回 VMG-eco<br>・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り組みの整理<br>・Fish Sexual Development Test のプロトコールの提案<br>・フルライフサイクル試験と二世世代試験の比較                                 | <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  | FDG 電話会議<br>・ 魚類スクリーニング試験の検証作業の論文化  | 魚類スクリーニング試験の検証作業の論文化の実施  |
| 2006年4月  | 第9回 EDTA<br>・ 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り組みの提案/承認<br>・ 魚類試験管内試験に関する DRP (Detailed Review Paper) 作成<br>・ Fish Sexual Development Test の Phase 1 検証作業の開始 | <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  | WNT<br>・ 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<br>・ 魚類試験管内試験に関する DRP 作成プロジェクトの開始  | 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   |