

ExTEND2005における魚類試験法開発について

【これまでの取組】

内分泌攪乱化学物質問題への環境庁の対応方針について－環境ホルモン戦略計画 SPEED' 98－の表3－1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、ビ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。

36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と *o,p'*-DDT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化学物質の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。

さらに、化学物質の内分泌かく乱作用に関する環境省の今後の対応方針について－ExTEND2005－における魚類試験法開発では、有害性の指標である受精率及び産卵数が低い個体から発生した次世代の再生産能力の把握、魚類スクリーニングアッセイのテストガイドライン化に係る経済協力開発機構(OECD)などへの国際貢献が課題として挙げられている。

【検討事項及び結果等】

これまで実施した魚類試験結果より得られた試験の評価項目に関する成果としては、①エストロゲン様物質のばく露の指標としては、雄の肝臓中ビテロジェニンの高値が有効であること、②有害性の指標としては、受精率の低値が有効であること、③精巣卵などの雄魚生殖腺の組織学的検査結果と受精率の低値とは明確な相関は認められなかったことが得られた。

また、アンドロゲン様物質のばく露の指標としては、二次性徴(尻鰭

の乳頭状小突起の形成)、生殖腺組織、生殖腺指数、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様作用をスクリーニングでき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、アンドロジェン様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。

これらの成果を踏まえ、これまで実施してきたスクリーニング試験(ビテロジェニンアッセイとパーシャルライフサイクル試験)及び有害性評価のためのフルライフサイクル試験の体系を見直すために、これまでの試験結果を比較・検討して合理化を行う予定である。

なお、試験結果の比較・検討を行うなかで、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て検討を行う必要と、フルライフサイクル試験の繁殖試験で受精率の低かった世代の再生産能力の把握に関する検討を行う必要が認められた。これらのことより、平成18年度は以下の課題を実施した。

(1) 魚類試験体系の合理化についての検討

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の検討

SPEED'98で検討したビテロジェニン産生試験は、エストロジェン様作用をスクリーニングすることを目的としており、雄魚への21日間の短期ばく露試験である。そのため、現行のビテロジェニン産生試験は、アンドロジェン様作用及びアロマターゼ阻害作用を有する化学物質をスクリーニングすることができない。平成18年度は、アンドロジェン様作用及びアロマターゼ阻害作用をスクリーニングする試験を検討した。そのため、トレンボロン(アンドロジェン様作用)及びプロクロラズ(アロマターゼ阻害作用)を雌魚にばく露する短期ばく露試験を実施した。

その結果、トレンボロンのばく露により、雌のビテロジェニン産生が抑制されること、雄の二次性徴である尻鰭の乳頭状小突起が雌の尻鰭に形成されることが明らかとなった。また、プロクロラズのばく露により、雌のビテロジェニンの産生が抑制されることが明らかとなった。しかしながら、プロクロラズのばく露では、雄の二次性徴である乳頭状小突起の形成は認められなかった。雌のビテロジェニン産生の抑制と乳頭状小突起の形成を指標とすることにより、アンドロジェン様作用及びアロマターゼ阻害作用をスクリーニングできることが成果として得られた。

② 試験体系の合理化についての検討

強エストロジェンばく露により受精率の低かった世代の再生産能力について把握するため、強エストロジェン(17β-エストラジオール)をばく露したフルライフサイクル試験を実施し、繁殖試験段階で受精率の低値(50%

以下)が認められた第1世代個体より発生した第2世代個体の生産及び再生産への影響を検討した。17β-エストラジオールにばく露した第1世代個体より発生した第2世代受精卵を水道水を活性炭処理した水*で飼育して孵化率、孵化日数及び受精率、産卵数を測定した。

その結果、第2世代の孵化率、孵化日数は対照区と比べて統計学的な有意な差は認められなかった。また、再生産能力に関する受精率、産卵数も対照区と比べて統計学的な有意な差は認められなかった。第1世代において受精率の低値を示した個体より発生した第2世代個体は、継続して強エストロジェンをばく露しない場合、第2世代の再生産能力は低下しないことが明らかとなった。これまで実施してきたフルライフサイクル試験では第1世代及び第2世代において、強エストロジェンを第2世代が成熟する孵化後60日令までばく露している。今後、ここで得られた成果とこれまでの試験結果をさらに検討することにより、フルライフサイクル試験の試験期間短縮などの効率化検討を進める予定である。

*水道水を活性炭処理した水：(財)化学物質評価研究機構において年に2回、水生生物を用いる試験での水質監視に記載されている基準「OECD Guidelines for Testing of Chemicals」“Fish, Early-life Stage Toxicity Test(Guideline 210, July 17, 1992)”あるいは水道法に基づく水質基準(2003年(平成15年)5月30日改正 厚生労働省令第101号)などに基づいて項目を測定して管理している。

(2)OECD関連事業

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行ってきた。2003年にはPhase 1Aとして強エストロジェン(17β-エストラジオール)及びアンドロジェン(17β-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。環境省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、ビ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ト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。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(WNT)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。

平成19年1月にスペインで開催された第5回生態影響試験法のためのマネージメントグループ(VMG-eco)会議において、環境省より、テストガイドライン化のためのピアレビューパネル設置とスケジュールを提案し承認されている。7月より、フランス、ドイツ、英国、米国及び日本より6名のレビューアーを選考し、ピアレビューパネルを開始している。現在、レビューアーからのコメントを整理、対応しているところである。今後は、これらをまとめてピアレビュー報告書を作成してOECDへ提出する。

さらに、OECDは、レベル5に位置付けているフルライフサイクル試験及び2世代繁殖試験について検討を行っている。平成18年11月に開催された第3回日米実務者会議では、魚類繁殖試験に関する技術的課題について共同で検討することが合意されている。現在、(独)国立環境研究所及び(財)化学物質評価研究機構において強エストロジェン作用と弱エストロジェン様作用を有する化学物質をメダカにばく露して、米国が作成した試験プロトコルの検証作業を実施しているところである。今後は、米国が提案するメダカ二世代試験の最適化、標準化に関わる情報を収集するとともに、ここで得られた結果と環境省が実施したフルライフサイクル試験結果とを比較、検討してOECDに報告する予定である。

＜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 ・ 3段階の試験体系 (Tiered testing approach) 提案	日本の取組を紹介 ・ SPEED' 98の概要説明 ・ 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 ・ Tier 1～3における試験法の結果報告	日本の取組を紹介 ・ メダカ繁殖試験 ・ sr-R メダカを用いた性転換アッセイ ・ 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 ・ 5段階の試験体系 (Conceptual framework) 提案	試験体系のスキームを提案 日本の取組を紹介 ・ 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 ・ 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 ・ 魚類生殖腺組織学の切片作製法 ・ 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ばく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 ・ Fish Screening Assay for the Detection of Endocrine Active Substances Phase 1 検証作業の承認 ・ Phase 1A 検証作業の開始	Phase 1A 検証作業の実施 参加機関(日本) ・ 財団法人化学物質評価研究機構(リードラボ)、 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 ・ Phase 1A 検証作業の進捗確認 ・ 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 日本の取組を紹介 ・ 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 ・ 生殖腺評価の標準化 FDG (Fish Drafting Group) 会議 ・ Phase 1B 検証作業に向けた取組の提案/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 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 参加機関(日本) ・ 財団法人化学物質評価研究機構(リードラボ)、 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 ・ 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 ・ 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組の整理 ・ 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 ・ Phase 2 検証作業に向けた取組の提案/承認	Phase 2 検証作業における物質選定のため <i>in vitro</i> 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 参加機関(日本) ・ 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 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 ・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組の整理 ・Fish Sexual Development Test のプロトコルの提案 ・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"> Phase 2 検証作業の結果をドラフトレポートにして報告 受精率と生殖腺の組織変化の関連性の結果報告 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
2006年2月	FDG 電話会議 ・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 ・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組の提案/承認 ・魚類試験管内試験に関する DRP(Detailed Review Paper)作成 ・Fish Sexual Development Test の Phase 1 検証作業の開始	<ul style="list-style-type: none"> 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 魚類試験管内試験に関する DRP の SPSF(Standard Project Submission Form)を提出
2006年5月	WNT ・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 ・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
2007年1月	第5回 VMG-eco ・魚類スクリーニング試験のテストガイドライン化のための取組とスケジュール提案/承認 ・Fish sexual development test (FSDT) 検証作業への提案	<ul style="list-style-type: none"> テストガイドライン化のためのレビューパネル設置の概要とスケジュールの提案 FSDT 検証作業においてメダカによる試験を行う必要があることを提言 日米二国間会議における魚類長期毒性試験の取組状況を報告
2007年7月	・魚類スクリーニング試験のテストガイドライン化のためのピアレビューパネルを設置、レビューアからのコメント収集を開始	<ul style="list-style-type: none"> フランス、ドイツ、英国、米国、日本より6名のレビューアを選考 ピアレビューマネージャーは日本
2008年1月	第6回 VMG-eco 開催予定	

ExTEND2005における魚類試験法開発について

平成19第1回 ExTEND2005作用・影響評価検討部会
平成19年11月6日

“環境省” 魚類試験法開発と有害性評価

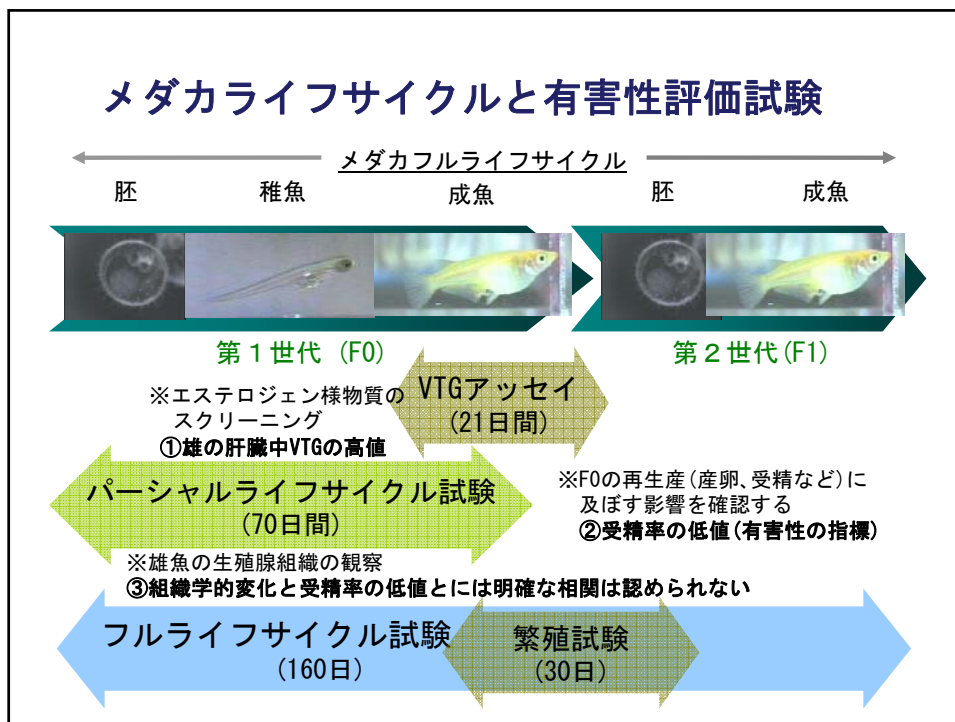
内分泌かく乱作用に関する文献及びin vitro試験に関する
文献検索収集と信頼性評価に基づいた物質選定

スクリーニング

- ・ ビテロジェニンアッセイ
- ・ パーシャルライフサイクル試験

- ・ フルライフサイクル試験

メダカライフサイクルと有害性評価試験



The OECD Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disruptors as agreed at EDTA6

<p>Level 1 Sorting & prioritization based upon existing information</p>	<ul style="list-style-type: none"> - physical & chemical properties, e.g., MW, reactivity, volatility, biodegradability. - human & environmental exposure, e.g., production volume, release, use patterns - hazard, e.g., available toxicological data
<p>Level 2 <i>In vitro</i> assays providing mechanistic data</p>	<ul style="list-style-type: none"> - ER, AR, TR receptor binding affinity - Transcriptional activation - Aromatase and steroidogenesis <i>in vitro</i> - Aryl hydrocarbon receptor recognition/binding - QSARs - High Through Put Prescreens - Thyroid function - Fish hepatocyte VTG assay - Others (as appropriate)
<p>Level 3 <i>In vivo</i> assays providing data about single endocrine mechanisms</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Uterotrophic assay (estrogenic related) - Hershberger assay (androgenic related) - Non-receptor mediated hormone function - Others (e.g. thyroid) - Fish VTG (vitellogenin) assay (estrogenic related)
<p>Level 4 <i>In vivo</i> assays providing data about multiple endocrine mechanisms</p>	<ul style="list-style-type: none"> - enhanced OECD 407 (endpoints based on endocrine mechanisms) - male and female pubertal assays - adult intact male assay - Non-spawning fish s.c assay (VTG, GSI, gonad histology) - Fish sexual development assay - Frog Metamorphosis Assay
<p>Level 5 <i>In vivo</i> assays providing adverse effects data from endocrine & other mechanisms for RA</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 1-generation assay (TG415 enhanced)¹ - 2-generation assay (TG416 enhanced)¹ - reproductive screening test (TG421 enhanced)¹ - combined 28 day/reproduction screening test (TG 422 enhanced)¹ - Partial and full life cycle assays in fish, birds, amphibians & invertebrates (developmental and reproduction) - Full life cycle & 2 generations assay <p><small>1 Potential enhancements will be considered by VMG mamm</small></p>

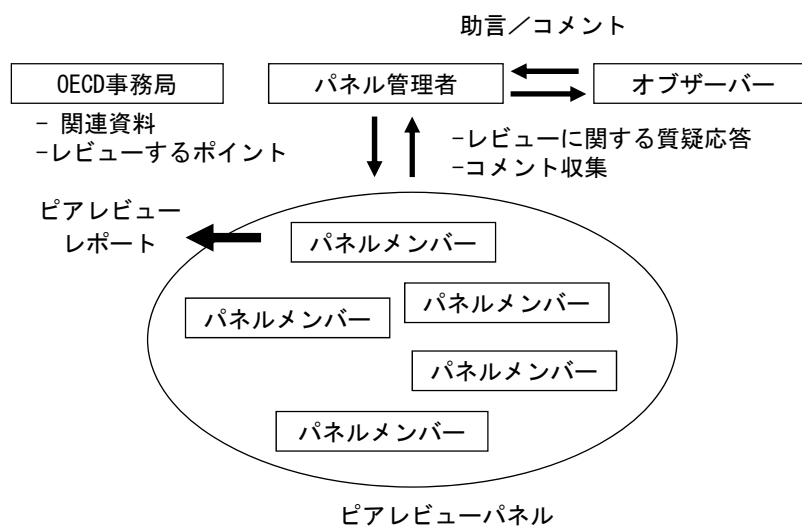
TG化ピアレビューパネルメンバー

パネル管理者: 第3者機関 (日本)

パネルメンバー: OECD加盟国政府より推薦された、
大学、公的研究機関の研究者6名

- 企業 研究者 (ドイツ)
- 公的研究所 研究者 (アメリカ)
- 公的研究所 研究者 (フランス)
- 公的研究所 研究者 (スウェーデン)
- 大学教授 (アメリカ)
- 大学教授 (日本)

TG化ピアレビューパネル構成



RG化ピアレビューパネルの流れ

- 2007年5月：パネルメンバー候補者に自己申告書を送付
- 2007年6月：パネルメンバーの選定
- 2007年7月：パネル設立
- 2007年9月末：パネル終了予定
- 2007年10月：パネルメンバー全員から、レビューコメントを収集
- 2007年11月～12月：ピアレビューレポート草案作成
- 2007年12月末：ピアレビューレポート草案完成
- 2008年1月：VMG-ecoに報告
- 2008年4月：EDTAに報告

国際的取組と環境省魚類試験法開発取組

