

## 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。

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、以下のことが得られている。

#### (1) エストロゲン様物質のばく露の指標

雄の肝臓中ビテロジェニンの高値が有効であること、有害性の指標としては、受精率の低値が有効であること、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いこと、が明らかとなっている。

( 2 ) アンドロジェン様物質のばく露の指標

雌の肝臓中ビテロジェニンの低値(抑制)が有効であること、二次性徴(尻鰭の乳頭状小突起の形成)の変化が有効であること、有害性の指標として、受精率と産卵数の低値が有効であること、が明らかとなっている。

( 3 ) アロマターゼ阻害物質のばく露の指標

雌の肝臓中ビテロジェニンの低値(抑制)が有効であること、アンドロジェン様物質のばく露の指標として有効である二次性徴(尻鰭の乳頭状小突起の形成)はアロマターゼ阻害物質のばく露では変化が認められなかったこと、雌のビテロジェニン産生の低値(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、が明らかとなっている。

( 4 ) 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

17 -エストラジオールにばく露した第一世代個体より発生した第二世代受精卵を水道水を活性炭処理した水\*で飼育し、孵化率、孵化日数及び受精率、産卵数を測定した結果、以下のことが明らかとなっている。

第二世代の孵化率、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こと、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こと、第一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二世代個体は、継続して強エストロジェンをばく露しない場合、再生産能力は低下しないこと。

\*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。

【平成19年度の事業の成果】

平成19年度は、これらの成果を踏まえ、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以下の課題を実施した。

試験の体系の合理化についての検討では、メダカ二世世代繁殖試験とフルライフサイクル試験との比較を行った。OECDでは、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二世世代繁殖試験について検討を行っている。また、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。(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 4-*t*-オクチルフェノール及び 17 $\beta$ -エストラジオールをメダカにばく露して、米国が作成した二世世代繁殖試験プロトコルの検証作業を実施するとともに、既に得られているフルライフサイクル試験結果との比較、検討を行っている。これまでの比較、検討の結果、初期生活段階のふ化率、死亡率及び成魚の繁殖期の受精率、産卵数への影響では二世世代繁殖試験とフルライフサイクル試験で得られた結果の間に違いは認められなかった。

#### 【今後の取組方針】

今後は、既にフルライフサイクル試験を実施している物質より二世世代繁殖試験を実施する物質を選び試験を実施、結果を比較することにより、それぞれの試験の有効な評価項目を明確にするとともに、試験期間の短縮化、試験条件等の適正化を行う予定である。

#### 【OECD等の国際貢献に関わる課題】

OECD等の国際貢献に関わる課題では、性比に関わる情報収集と魚類性発達試験（FSDA: Fish Sexual Development Assay）の検証試験、魚類スクリーニングアッセイ（FSA: Fish Screening Assay）のテストガイドライン化及び日米実務者会議に関わる課題を実施した。

##### （１）性比に関わる情報収集と魚類性発達試験（FSDA）の検証試験

OECDでは、平成18年（2006年）より、デンマークをリード国として基準物質を用いたFSDAの検証作業を行っている。この試験は性比をエンドポイントとする初期生活段階試験（試験期間60日）である。メダカは雌雄を決定する性決定遺伝子（DMY）を有し、外観的な雌雄と遺伝的な雌雄を区別ができることから、性比をエンドポイントとしたFSDAの有効なモデルである。今後は、平成19年度に実施した4-*t*-オクチルフェノールの試験結果や条件をもとに、ゼブラフィッシュやファットヘッドミノールを用いたフェーズ2検証作業が実施される予定である。

##### （２）魚類スクリーニングアッセイ（FSA）のテストガイドライン化

OECDでは、内分泌かく乱作用のスクリーニングを目的としたFSAを提案し、平成15年（2003年）から基準物質による検証試験を行っている。本アッセイは、ビテロジェニン濃度及び二次性徴を指標として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スクリーニングする方法である。これまでに、Phase 1A（2003年）、Phase 1B（2004年）及びPhase 2（2005年）検証試験が行われている。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。

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）において検証結果が報告され、テストガイドライン化へ向けた作業を進めることが承認されている。さらに、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おり、平成19年7月より、ピアレビューパネルが開始されている。ピアレビュー報告書は平成20年4月にパリで開催された第20回WNTに提出されており、平成20年6月に、OECDより、FSAのテストガイドライン案に対するコメント要請がアナウンスされている。今後、コメントへの対応が行われ、さらにテストガイドライン化の取組が進められる予定である。

### （3）日米実務者会議に関わる課題

平成20年2月、サンフランシスコにて第4回日米実務者会議が開催された。魚類では、4-*t*-ペンチルフェノールを用いた日米の二世世代繁殖試験の結果の比較、検討を行うとともに、広範囲にデータを収集してプロトコルを簡略化することなどが合意されている。また、平成20年度に二世世代試験を実施する候補物質についても検討が行われた。第5回会議は平成20年12月に東京で開催の予定である。

< 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 ・Phase1A 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	・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文化	魚類スクリーニング試験の検証作業の論文文化の実施
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	・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	・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	・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 ・ピアレビュー報告書を WNT に提出(決定) ・FDG を設置して技術課題について協議開始 ・繁殖試験 DRP が提示される(米国)	・ピアレビュー報告書を提出し TG 化に向けた技術課題について検討を要請 ・FSDT 結果報告及び検証作業への参加表明 ・日米二国間会議について報告
2008年3月	FDG 電話会議(27 <sup>th</sup> ) ・ピアレビュー指摘事項の検討(魚類試験結果の up-date、試験成立の基準設定など)	・VTG レベルについて対照区データを整理 ・Phase1~3 以外の物質に対する試験結果の追加
2008年4月	第11回 EDTA ・ピアレビュー報告書案提出 米国が孵化率、生殖腺病理をエンドポイント EP に加えることを提案 ・魚類短期繁殖試験の新規プロジェクト提案	・米国提案の追加 EP については VMG-eco( FDG 電話会議) で検討 ・魚類短期繁殖試験に関しては WNT の表明待ち
2008年4月	FDG 電話会議(27 <sup>th</sup> ) ・ピアレビュー指摘事項の検討(VTG 基準設定など) ・孵化率、生殖腺病理を EP として追加することを検討	・対照区のメダカ VTG レベルを報告