

## 魚類、両生類及び無脊椎動物に係る試験法開発について

EXTEND2010 では、化学物質の内分泌かく乱作用が環境中の生物に及ぼす影響を評価するため、引き続き魚類、両生類及び無脊椎動物を対象とする試験法の開発を進めている。また、開発した試験法については、関係各国と協力しながら、OECD のテストガイドラインとして採用するよう積極的に提案していく予定である。

これらの試験法の概要、22 年度の開発の状況及び 23 年度の検討内容は、以下のとおりである。

### I. 魚類の試験法開発について

#### 1. 魚類短期繁殖試験 (TG229)

##### (1) 試験法の概要

本試験法は、魚類 21 日間スクリーニング試験 (TG230) のエンドポイントに産卵数を付加し、化学物質の (抗) エストロゲン作用、アンドロゲン作用及び視床下部—下垂体—生殖腺軸への影響をスクリーニングできる 21 日間の試験であり、平成 21 年 (2009 年) に OECD の TG229 として採択された。ビテロゲニンや二次性徴に加えて内分泌かく乱化学物質による繁殖行動や卵質及び精子形成への影響も検出できる。

本試験法はファットヘッドミノーを主たる試験魚として米国により提案されたものであり、これをメダカに適用するため試験条件の適正化に向けた検討を進める必要がある。

##### (2) 22 年度の検討結果

メダカを試験生物として魚類短期繁殖試験を実施する場合の試験条件の適正化を行うため、データの収集・整理を実施した。試験は、施設間のバリデーション試験として、国立環境研究所及びいであ株式会社で実施した。

抗エストロゲン物質については、雌での肝臓ビテロゲニン濃度や産卵数の低下、弱エストロゲン物質については、雄での肝臓ビテロゲニン濃度の増加など、期待された結果を得ることができ、本試験法の有効性が確認された。抗アンドロゲン物質については、本試験法のエンドポイントでは異常を検出できないことが認識された。

##### (3) 23 年度の検討事項

平成 22 年度の結果を踏まえ、メダカ短期繁殖試験の改善による抗アンドロゲン様作用の検出可能性について検討を進める。また本試験の適正化に向けて、さらにいくつ

かの物質についてデータを取得し、試験適用範囲の確認と結果の妥当性の検証を進める。

## 2. 魚類性発達試験 (FSDT)

受精卵初期発生時からばく露を開始し、二次性徴が認められる（孵化後 60 日(受精後 70 日)まで観察することにより、化学物質の(抗)エストロゲン作用、(抗)アンドロゲン作用及びアロマトラーゼ阻害作用による影響をスクリーニングできるとされる試験である。ビテロゲニン濃度、生殖腺組織、二次性徴及び性比の偏りをエンドポイントとする。なお、繁殖に関するエンドポイント(卵質、精子、交尾行動等)はない。

OECD においてテストガイドライン化に向けた検討が進められ、わが国は平成 21 年(2009 年)に OECD のリングテストにメダカを用いて参加し、他の参加国におけるゼブラフィッシュ及びファットヘッドミノールを用いた試験結果と比較・検証を行った。

本試験法は、本年 4 月の OECD WNT 会合において、新テストガイドラインとして合意された。

## 3. メダカ多世代繁殖試験

### (1) 試験法の概要

化学物質の母体から卵への影響、次世代目の影響及び次世代から次々世代まで影響を観察する試験法である。世代毎にビテロゲニン濃度、生殖腺組織、二次性徴、性比の偏り、繁殖等をエンドポイントとし、メダカ生涯を通じたいずれかのステージにおける化学物質の(抗)エストロゲン作用、(抗)アンドロゲン作用及びアロマトラーゼ阻害作用等の影響を検出できる。ばく露期間は約 25 週間を要する。

SPEED'98 で用いたフルライフサイクル試験(日本提案)と二世世代繁殖試験(米国提案)をもとに、平成 20 年度に「メダカを用いたフルライフサイクル試験/多世代試験」に関する提案書を日米共同で OECD に提出し、その後日米間でデータの補強を行い、試験法試案の検証を行っている。

### (2) 22 年度の検討結果

第 6 回日米実務者会議（平成 22 年 1 月）における合意に基づき、適正化した魚類の繁殖・生殖(生産性)への影響を評価する試験法「Medaka multi-generation test」のプロトコル案作成のため、メダカを試験魚とした改良型 2 世代試験(多世代試験)を実施し、データの収集を行った。

抗エストロゲン物質の試験の結果、F1 において産卵数、受精卵数、受精率の減少が確認され、F2 雄の乳頭状小突起の数が減少した。また肝臓ビテロゲニン濃度は、雌での減少、雄での増加が認められるなど、試験法の妥当性が確認された。ただし、試験に使用する個体数及び観察時期等について、更なる最適化の必要性が認識された。

### (3) 23 年度の検討事項

22 年度の結果を踏まえ、動物愛護と統計的な強度を考慮した上での適切な試験生物数の選択や、ばく露期間及びエンドポイント等についてさらに検証を行い、最終的な

改訂プロトコール(案)を作成する。

## II. 両生類の試験法開発について

### 1. 両生類ライフサイクル試験

#### (1) 試験法の概要

両生類の発達、成長及び繁殖試験 (Amphibian Development, Growth and Reproduction Assay(ADGRA)) は、ニシツメガエル *Xenopus (Silurana) tropicalis* を用いて受精 48 時間後の幼生から性成熟期(~42 週間)までばく露を行い、変態完了期 (N.F. stage 66)及び成熟期(ばく露終了時)に種々のエンドポイント(体重、頭胴長、血中ビテロゲン濃度、性比、GSI、精子数など)を調べることにより、両生類の発生、成長及び生殖に対する化学物質の慢性影響を評価することを目的とする試験である。

OECD 第 4 回両生類専門家会合 (平成 20 年 5 月) 及び日米二国間協力事業における第 5 回実務者会議 (平成 20 年 12 月) において、両生類ライフサイクルテストの開発を検討することが確認された。これを受けて、平成 21 年 3 月の OECD WNT 会合に、日米共同で本試験法開発の提案書(SPSF)を提出し、承認された。平成 21 年 7 月の OECD 両生類専門家会合(電話会議)において、米国より ADGRA の試験プロトコルが提案され、日米を軸に試験プロトコルの検証試験(リングテスト)を実施することが了承された。

また、平成 22 年 4 月に米国より、ADGRA 一部を修正した幼若期両生類の成長・発達試験 (Larval Amphibian Growth and Development Assay(LAGDA)) の試験プロトコル案が提案された。ここでは、試験生物種にアフリカツメガエル *Xenopus laevis* が追加されたこと、ばく露期間が受精 1 日以内の胚(N.F. stage 8-10)から変態完了 10 週間後までに短縮されたこと、変態完了期(N.F. stage 66)は主に変態(甲状腺)に対する影響を調べるためのエンドポイントとすることなどが ADGRA から変更されている。LAGDA の試験プロトコルについて、日米共同で技術的課題の検討や妥当性等について検証を進める必要がある。

#### (2) 22 年度の検討結果

ADGRA について、第 6 回日米実務者会議において米国(US-EPA)との協議により決定した試験プロトコルに従いエチニルエストラジオール(EE2)を用いた検証試験を実施した。

試験の結果については、米国(USEPA)が実施した EE2 の試験結果とほぼ同様の傾向を示しており、ADGRA の試験プロトコルの妥当性及び再現性が示唆された。また、本検証試験では、幼若期と成熟期でほぼ同様の影響が検出できたことから、米国より ADGRA の修正案として提案されている LAGDA における試験期間の妥当性も示唆された。なお、本検証試験の結果と米国が実施した試験結果との比較検証等のとりまとめについては、日米二国間協力の下で米国が実施している。

### (3) 23年度の検討事項

第7回日米実務者会議（平成23年2月）において米国との協議により合意したLAGDAの試験プロトコルに従い、検証試験を実施する。なお、検証試験の対象物質については、米国が検証試験で用いる物質等も踏まえて選定する。

## Ⅲ. 無脊椎動物の試験法開発について

### 1. ミジンコ多世代試験

#### (1) 試験法の概要

多世代試験法の開発が様々な生物について進められている中で、ミジンコにおける必要性の有無及びその適切な手法について、平成19年度から検討を行っている。母体中で化学物質の影響を受けたミジンコの次世代での産仔能力をエンドポイントとし、生物群の存続を考慮する試験である。

平成19～20年度はオオミジンコ *Daphnia magna* の親へのばく露が次世代に影響を及ぼすかどうかについての検討を行った。平成21年度には、短期間で試験が終了するニセネコゼミジンコ *Ceriodaphnia dubia* を新たな試験生物種として用い、カナダ環境省によるミジンコ亜急性毒性試験 “Test of Reproduction and Survival Using the Cladoceran *Ceriodaphnia dubia*” (Environment Canada, 2007) を参考にしながら、試験期間の短縮、労力の軽減なども含めたミジンコ多世代繁殖試験の手法の検討を行った。

#### (2) 22年度の検討結果

現行の課題を整理し、無脊椎動物への多世代試験の妥当性を検証するため、第6回日米実務者会議で提案された物質(プロクロラズ)を用いてニセネコゼミジンコとオオミジンコを用いて多世代試験を実施し、両種の比較を行った。

ニセネコゼミジンコでは、F2世代の産仔数は、F1世代でばく露を経験したグループとばく露を経験しないグループとでは、ほとんど差が認められなかった。オオミジンコでは、F1世代の産仔数はF0世代でばく露を経験していないグループでは有意に低下したが、F0世代でばく露を経験したグループでは産仔数は低下しなかった。この結果には再現性が認められた。

#### (3) 23年度の検討事項

本年度は内分泌かく乱(特に幼若ホルモン様)化学物質について多世代試験を行い、一世代の繁殖のみならず、性比を含めて子孫への影響も考慮した生物群集の存続を評価することにより、プロトコール(案)の適正化及び検証を行う。

### 2. ミジンコ簡易スクリーニング試験法

#### (1) 試験法の概要

EXTEND2010における生態影響評価のための試験法として、TG211 ANNEX7は試験期間が長く試験難度が高いため、幼若ホルモン様作用物質のスクリーニングのための簡便な試験法として開発中である。すでにオオミジンコでは、卵発生の特定の時期に短期間ばく露することによってオス仔虫生産誘導することが判明しており、短期ばく露（48時間程度を予定）後の2～3腹目の仔虫性比をエンドポイントとする。

(2) 23年度の検討事項

簡易スクリーニング試験法として、短期ばく露(48時間程度を予定)後の2～3腹目の仔虫性比を観察し、雄仔虫の有無を調べるという手法を検証する。