

参考資料 4

平成 22 年度第 1 回化学物質の内分泌かく乱作用に関する検討会 (EXTEND2010)

10.11.19

資料 3-2-1

EXTEND2010 における内分泌かく乱作用に係る試験及び評価の枠組の検討状況について

1. これまでの検討状況

化学物質の内分泌かく乱作用に関連する報告の信頼性評価において「内分泌かく乱作用に関する試験対象となり得る物質」とされた物質について、生態影響評価のための動物試験法について、試験全体の枠組み（フレームワーク）及び個別の物質について実施する試験法の選定について検討を行うため、平成 21 年度より、作用・影響評価検討部会のもとに、「生態影響評価のための動物試験法検討作業班（以下、作業班とする。作業班設置要綱を別添に示した。）」を設置し、検討を進めてきた。

この作業班における検討状況については、平成 22 年度第 1 回 EXTEND2010 作用・影響評価検討部会（平成 22 年 10 月 27 日開催、公開）に報告が行われ、同検討部会において、更に検討を行った上で、

- ・「EXTEND2010 における内分泌かく乱作用に係る試験及び評価の考え方について（案）」（資料 3-2-2）
- ・「EXTEND2010 における内分泌かく乱作用の生態影響に係る試験及び評価の枠組みについて（案）」（資料 3-2-3）

を取りまとめた。

2. 今後の進め方（案）

試験及び評価の考え方及び枠組みについて、本検討会でご了承をいただいた上で、今後整理すべきとされた部分について更に検討を進めつつ、その考え方及び枠組みに従い、第 1 段階試験管内試験について試行的に実施する。

(別添)

平成 22 年度生態影響評価のための動物試験法検討作業班 設置要綱

1. 目的

平成 22 年 7 月に公表した「化学物質の内分泌かく乱作用に関する今後の対応 -EXTEND 2010-」に基づき、環境省が実施する作用・影響評価事業においては試験方法の検討作業を行うこととしている。その際、客観性が担保できる専門家により検討を行うため「生態影響評価のための動物試験法検討作業班」（以下「作業班」という。）を設置する。

2. 検討内容

信頼性評価の結果、「内分泌かく乱作用に関する試験対象となり得る物質」とされた物質を対象とする生態影響評価のための動物試験法について、OECD 等における試験法開発の進捗状況を踏まえた試験全体のフレームワーク及び個別の物質について実施する試験法の選定について検討・取りまとめを行い、検討結果を「作用・影響評価検討部会」に報告する。

3. 組織等

- (1) 作業班は、化学物質の内分泌かく乱作用に関する知見を有する学識経験者で、別表に掲げる委員及び事務局をもって構成する。
- (2) 作業班に委員の互選による座長を 1 名置く。
- (3) 作業班に座長が委員の中からあらかじめ指名する座長代行を 1 名置く。
- (4) 座長代行は、作業班の座長に事故がある場合には、その職務を代行する。
- (5) 作業班会議において特別な事項を検討する必要がある場合には、必要に応じて学識経験者等、検討事項に関連ある者を参考人として出席させることができる。
- (6) 作業班の事務は、環境省環境保健部環境安全課及び日本エヌ・ユー・エス株式会社において処理する。

4. 期間

承諾日から平成 23 年 3 月 31 日までとする。

(別表)

生態影響評価のための動物試験法検討作業班委員名簿

氏名	所属・役職
白石寛明	(独)国立環境研究所 環境リスク研究センター長
有菌幸司	熊本県立大学 環境共生学部 食健康科学科 教授
井口泰泉	自然科学研究機構 岡崎統合バイオサイエンスセンター 生命環境研究領域 教授
江藤千純	いであ(株) 企画本部 研究開発部長 兼 環境創造研究所 研究開発部長
小山次朗	鹿児島大学 水産学部 海洋資源環境教育研究センター 教授
鑪迫典久	(独)国立環境研究所 環境リスク研究センター 環境曝露計測研究室 主任研究員

EXTEND2010における内分泌かく乱作用に係る試験及び評価の考え方について（案）

1. EXTEND2010では、環境行政の中で化学物質の内分泌かく乱作用に伴う環境リスクを適切に評価し、必要に応じて管理していくことを目標として、化学物質の内分泌かく乱作用の評価手法の確立と評価の実施を加速化することに力点を置いている。

このため、評価手法の構築を進めつつ、環境リスク管理の必要性の判断に向けた環境リスク評価を効率的に進める。

(1) 現時点では、化学物質の内分泌かく乱作用に伴う環境リスクの評価の手法が十分に確立されていないので、このような評価手法の確立を行いつつ、環境行政上対応が必要となる物質を効率的かつ効果的に抽出する必要がある。

(2) このため、画一的にデータを取得して網羅的な評価を行うよりも、既存知見を活用しつつ効率的に評価を進めることが適当ではないかと考えられる。

2. 現時点で評価を行うことが可能な対象について、試験及び評価を開始する。

(1) 生態影響に関する試験及び評価から着手することとし、人の健康に対する影響の試験及び評価については、別途検討する。

(2) OECDテストガイドラインなど、試験・評価手法が既に確立している生物種、影響等を対象とする。

① OECDにおいてテストガイドラインが確立している水生生物（魚類、両生類及び無脊椎動物）を、当面は対象とする。鳥類については試験・評価手法等に関する情報収集を行うこととし、ほ乳類については別途検討する。

② 内分泌かく乱作用に伴う以下の項目を対象とする

- ・生殖に及ぼす影響－エストロゲン様作用、抗エストロゲン様作用、アンドロゲン様作用及び抗アンドロゲン様作用
- ・発達（変態等）に及ぼす影響－甲状腺ホルモン様作用及び抗甲状腺ホルモン様作用
- ・成長に及ぼす影響－幼若ホルモン様作用及び脱皮ホルモン様作用

(3) 内分泌かく乱化学物質（内分泌系に影響を及ぼすことにより、生体に障害や有害な影響を引き起こす外因性の化学物質）の生態リスク評価に向け、

- ・内分泌系に対する作用の有無の確認
- ・生体の障害や有害な影響の有無及び程度の確認

を行うこととし、これに向けて生態影響試験の実施の枠組みを構築する。

(4) 試験に使用する動物数を減らしつつ効率的に評価を進めるため、既存の知見を活用するとともに、まず試験管内試験 (*in vitro*) を実施し、その結果等を踏まえて生物試験 (*in vivo*) を優先的に実施すべき物質を抽出する。

3. 環境リスクを生ずる可能性が考えられる物質を抽出し、これを試験及び評価の対象とする。

(1) 環境リスク評価を行う観点から、化学物質のばく露と有害性の双方に着目して、優先的に検討すべき物質を抽出する。

(2) 環境中に存在し、環境リスクを及ぼす可能性がある物質を評価対象とする。化学物質の環境実態調査等の環境調査における検出物質、環境排出量が多い物質等を対象とする。

(3) 既存の知見を整理した上で、内分泌かく乱作用との関連性が認められる（作用が認められる）と判断された物質を、試験及び評価の対象とする。

4. 今後検討すべき課題として、以下の事項が挙げられる。

(1) 検討対象物質の選定の方法

化学物質の環境実態調査結果に加え、PRTRによる排出量等の情報を活用して、より効率的に検討対象物質を選定する方法を検討する。

(2) 人の健康に及ぼす影響等に関するリスク評価の手法

環境中に存在する化学物質の内分泌かく乱作用が人の健康に及ぼす影響に関するリスク評価の手法について検討する。併せて、野生のほ乳類に対する影響についても検討する。

(3) 環境ホルモン戦略計画（SPEED'98）で試験が行われた物質の取扱い

SPEED'98において試験が行われた物質について、新たな枠組みの下で試験及び評価を行う必要性の有無を検討する。

EXTEND2010 における内分泌かく乱作用の生態影響に係る試験及び評価の 枠組みについて

H22.11.19 版

1. 基本的考え方

- (1) 内分泌かく乱化学物質（内分泌系に影響を及ぼすことにより、生体に障害や有害な影響を引き起こす外因性の化学物質）の生態リスク評価に向け、
 - ① 内分泌系に対する作用の有無の確認
 - ② 生体の障害や有害な影響の有無及び程度の確認を行うため、生態影響試験の実施の枠組みを構築する。
- (2) 環境リスク管理の必要性の判断に向けた環境リスク評価を進めるため、化学物質の内分泌かく乱作用に伴う環境リスクの評価手法の確立を行いつつ、環境行政上対応が必要となる物質を効果的に抽出する必要がある。このため、画一的にデータを取得して網羅的な評価を行うよりも、既存知見を活用しつつ効率的に評価を進めることが適当ではないかと考えられる。

2. 生態影響評価のための基本的枠組み

EXTEND2010 における生態影響評価は、次の 2 段階で評価を行う（図 1）。

- (1) 第 1 段階
 - ・化学物質の内分泌系に対する作用の有無を確認するため、試験管内試験と、比較的簡易かつ短期間で実施可能な生物試験により、第 1 段階試験群を構成する。
 - ・「化学物質の内分泌かく乱作用に関連する報告の信頼性評価」（以下、信頼性評価）において、試験対象物質となり得るとされた物質を対象とする。
 - ・既存の知見及び第 1 段階試験群の結果より、第 1 段階評価を実施する。
 - (2) 第 2 段階
 - ・内分泌かく乱作用による有害性を確認するため、長期間のばく露による生物試験により、第 2 段階試験群を構成する。
 - ・第 1 段階評価において「内分泌系に対する作用がある」と認められた物質について、第 2 段階試験群を実施する候補とする。（具体的な実施方法は今後検討）
- ※ 第 1 段階評価で「内分泌系に対する作用がある」と認められなかった物質については、内分泌系に対する作用を必ずしも否定することはできないが、効率的かつ効果的に評価を進める観点から、現時点では「保留」とする。

3. 試験法の選定

(1) 試験法選定の考え方

- ① OECDにおいてテストガイドライン化された試験法を優先して採用する。また、可能な限り既存の試験法の組み合わせで試験群を構築することを前提とし、新たに開発が必要な試験法がある場合は、今後検討する。

OECDにおいてテストガイドライン化された試験法及び環境省事業（SPEED'98及びExTEND2005）において開発した試験法と、それらにより検出可能な作用を表1.1～1.3に示した。

- ② 第1段階及び第2段階の評価については、一貫した評価を実施するため、主として、同一の生物種を用いて試験を実施する。試験動物は、当面、魚類（メダカ）、無脊椎動物類（オオミジンコ）及び両生類（アフリカツメガエル又はニシツメガエル）とする。
- ③ 試験管内試験としては、受容体結合のみならず、その後の転写活性化を確認できるレポータージーン試験を採用する。

(2) 具体的な試験法

第1段階試験群として採用する試験は、以下の通りとする（表2）。

① 試験管内試験

- ・エストロゲン様作用及び抗エストロゲン様作用

第2段階試験（開発中のメダカ多世代試験を想定）で用いるメダカの受容体を使用するメダカエストロゲン受容体 α 、 $\beta 1$ 、 $\beta 2$ レポータージーン試験（試験実施対象は α 、 $\beta 1$ 、 $\beta 2$ から1種類を選択）

- ・アンドロゲン様作用及び抗アンドロゲン様作用

第2段階試験（開発中のメダカ多世代試験を想定）で用いるメダカの受容体を使用するメダカアンドロゲン受容体 α 、 β レポータージーン試験（試験実施対象は α 、 β から1種類を選択）

- ・甲状腺ホルモン様作用及び抗甲状腺ホルモン様作用

第2段階試験（アフリカツメガエル変態アッセイ(TG231)を想定）で用いるカエル類の受容体を使用するニシツメガエル甲状腺ホルモン受容体 α 、 β レポータージーン試験（試験実施対象は α 、 β から1種類を選択）

- ・脱皮ホルモン様作用

第2段階試験（オオミジンコ繁殖毒性試験(TG211 ANNEX7))で用いるオオミジンコの受容体を使用するミジンコ脱皮ホルモン受容体レポータージーン試験

② 生物試験

- ・エストロゲン様作用、抗エストロゲン様作用、アンドロゲン様作用等

テストガイドライン化されており、第2段階試験（開発中のメダカ多世代試験を想定）で用いるメダカを使用し、幅広い作用について評価可能な魚類短期間繁殖試

験 (TG229) (但し、既存知見によっては、検出できる作用が少ないがやや簡易に実施できる魚類 21 日間スクリーニング試験(TG230)を用いることを検討する)

4. 試験及び評価の実施手順

(1) 第 1 段階における試験及び評価の実施手順

画一的にデータを取得して網羅的な評価を行うのではなく、既存知見を活用しつつ効率的に評価を進めるため、別途実施している信頼性評価によって得られた既存知見を活用しながら、以下の手順で試験及び評価を実施する。

① 信頼性評価において確認された既存知見を以下の観点から整理し、第 1 段階評価を実施するに当たり、必要な情報がどの程度すでに得られているのかを確認する。

○内分泌かく乱作用の可能性が疑われている内分泌系の項目は何か

- ・生殖に及ぼす影響－エストロゲン様作用、抗エストロゲン様作用、アンドロゲン様作用、抗アンドロゲン様作用、等
- ・発達（変態等）に及ぼす影響－甲状腺ホルモン様作用、抗甲状腺ホルモン様作用、等
- ・成長に及ぼす影響－幼若ホルモン様作用、脱皮ホルモン様作用、等

○第 1 段階で採用する試験管内試験に相当する情報はるか

○第 1 段階で採用する生物試験に相当する情報はるか

② 上記の既存知見の整理結果に基づき、次のように試験を行う。

(i) 評価すべき内分泌系の項目を選定

(ii) 選定された項目について、十分な試験管内試験の情報が得られていない物質については、試験管内試験を実施

(iii) 選定された項目について、十分な生物試験の情報が得られていない物質については、既存の知見、試験管内試験の結果、環境中での検出状況等の情報を勘案し、優先順位が高いと考えられる物質から生物試験を実施

③ 必要な試験管内試験及び生物試験の情報が得られた物質について、第 1 段階評価を実施する。

(参考) 内分泌系に対する作用の網羅的な確認の実施について

化学物質の内分泌かく乱作用による生態影響評価の枠組みを構築するに当たっては、既存の試験法で評価可能なすべての内分泌系の項目について、網羅的に評価を実施すべきであり、既存知見がない項目についても評価を行うという考え方も想定される。しかし、既存の知見から考えられる項目以外のものも含むすべての項目について試験を行うことは、効率的に評価を進めるという観点から、適切でないと考えられる。

既存知見から評価を行うべき内分泌系の項目を選定した場合と、網羅的に評価を行う場合の関係の具体例について、以下に示す。「●」は、実施手順に従って評価を行う場合に評価を行う項目、「▲」は、網羅的に評価を行う場合に追加して評価を行う項目を表す。

網羅的に評価を行った場合には、実施すべき試験項目がかなり多くなり、限られた予算の中で実施するには、現実的でないと考えられる。

	既存知見の例			評価を行う項目						
	雄メダカで 肝臓中ビテ ロゲニン濃 度高値	カエル類 の変態異 常	無脊椎動 物類の脱 皮異常	エスト ロゲン	抗エス トロゲ ン	アンド ロゲン	抗アン ドロゲ ン	甲状腺 ホルモ ン	抗甲状 腺ホル モン	脱皮ホ ルモン
物質 A	○			●	▲	▲	▲	▲	▲	▲
物質 B		○		▲	▲	▲	▲	●	●	▲
物質 C			○	▲	▲	▲	▲	▲	▲	●

(2) 第 2 段階における試験及び評価の実施手順

有害性確認試験として位置付けられる試験法の開発の状況を踏まえ、第 2 段階における試験の実施の手順について具体的に検討する。

なお、現時点において、有害性確認試験として位置付けられる試験法を表 3 に示す。

(3) 今後整理すべき事項

- ・生物試験を実施するに当たっての、物質の優先順位付けの基準等の考え方
- ・試験結果の評価を実施するに当たっての、評価基準等の考え方
- ・第 1 段階生物試験が開発されていない発達（変態等）や成長に及ぼす影響の評価の考え方

実施手順を内分泌系の項目毎に整理すると図 2.1～2.3 の通りとなる。生殖系以外の項目については、第 1 段階に該当する生物試験が開発されておらず、今後の試験法開発を含め検討が必要である。

- ・信頼性評価の実施方法の再検討

これまでの信頼性評価は、内分泌かく乱作用との関連性が認められると判断されるものを幅広く拾い上げることを目的として行ったものであり、必ずしも本実施手順の中でそのまま利用できるものではないので、これまでの知見の再整理及び今後の整理方法の見直しが必要である。

図1 内分泌かく乱作用の有害性評価の枠組み（案）

第1段階（内分泌系に対する作用の有無を確認）

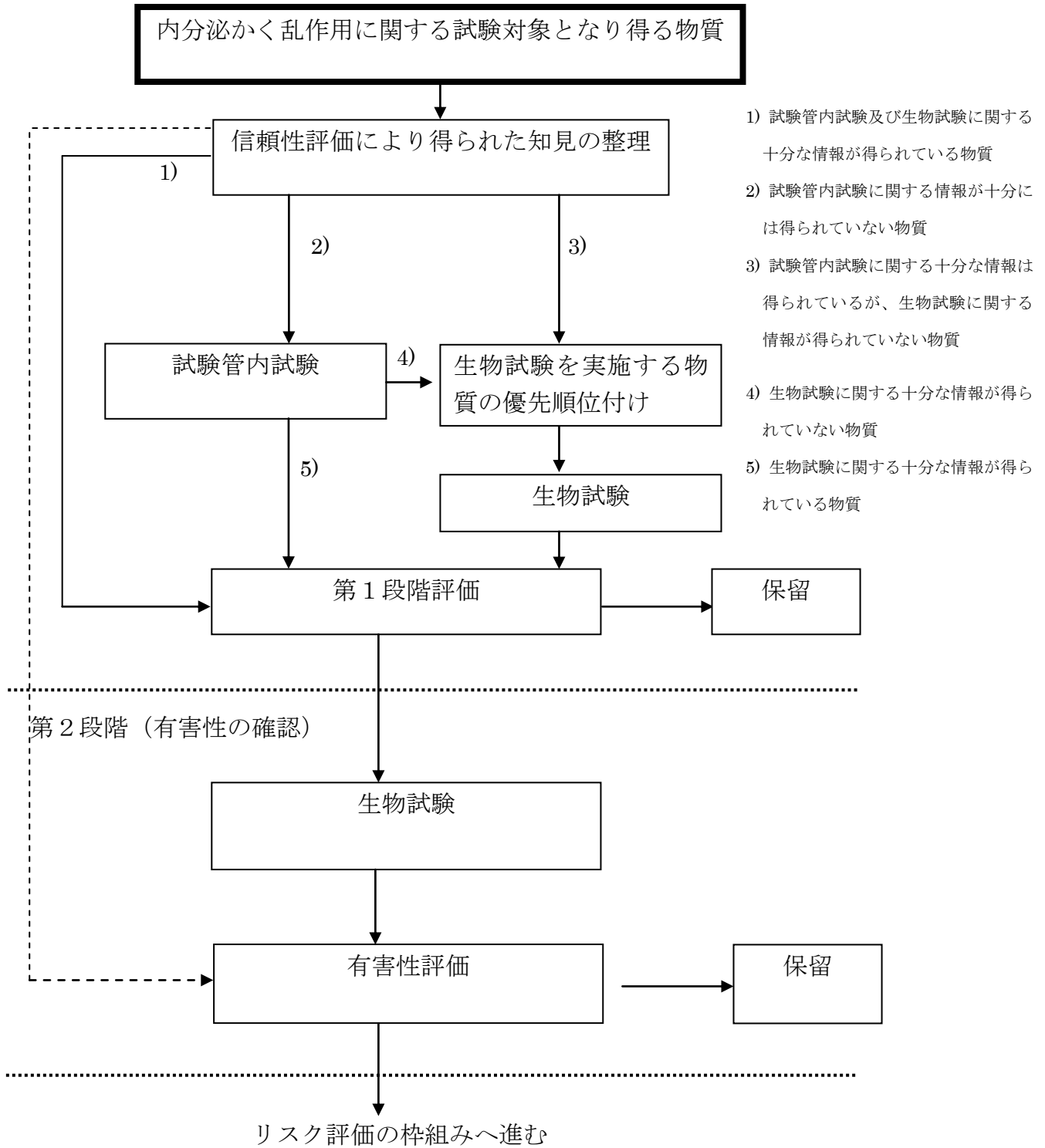


表 1.1 OECD でテストガイドライン化された試験法及び環境省事業で開発した試験法において検出可能な作用（試験管内試験：（抗）エストロゲン様作用、（抗）アンドロゲン様作用）

	エストロゲン	抗エストロゲン	アンドロゲン	抗アンドロゲン
メダカエストロゲン受容体 α 、 β 結合試験	■			
ヒトエストロゲン受容体 α 、 β 結合競合阻害試験	■			
アフリカツメガエルエストロゲン受容体 α 結合試験	■			
ニホンウズラエストロゲン受容体 α 、 β 結合試験	■			
メダカエストロゲン受容体 α 、 β 転写活性化試験 (HeLa 細胞使用)	■	■		
ヒトエストロゲン受容体 α 転写活性化試験 (TG455)	■	■		
メダカエストロゲン受容体 α 、 β 1、 β 2 レポーター遺伝子試験 (HEK293 細胞使用)	■	■		
ニシツメガエルエストロゲン受容体 α 、 β レポーター遺伝子試験 (開発中)	■	■		
ヒト乳がん細胞 E-screen 試験	■			
ラットアンドロゲン受容体結合阻害試験			■	
ニホンウズラアンドロゲン受容体結合試験			■	
メダカアンドロゲン受容体転写活性化試験 (HeLa 細胞使用)			■	■
メダカアンドロゲン受容体 α 、 β レポーター遺伝子試験			■	■
イトヨアンドロゲン受容体 α 、 β レポーター遺伝子試験			■	■
ヒト乳がん細胞アンドロゲン受容体レポーター遺伝子試験			■	■

■：検出可能な作用

表 1.2 OECD でテストガイドライン化された試験法及び環境省事業で開発した試験法において
検出可能な作用（試験管内試験：（抗）甲状腺ホルモン、幼若ホルモン、脱皮ホルモン）

	甲状腺ホルモン	抗甲状腺ホルモン	幼若ホルモン	脱皮ホルモン
ニシツメガエル甲状腺ホルモン受容体 α 、 β レポーター遺伝子試験	■	■		
ヒト甲状腺ホルモン受容体 α 、 β 酵母試験	■	■		
ヒト甲状腺ホルモン受容体 α 、 β レポーター遺伝子試験	■	■		
ミジンコ脱皮ホルモン受容体レポーター遺伝子試験				■

■：検出可能な作用

表 1.3 OECD でテストガイドライン化された試験法及び環境省事業で開発した試験法において
検出可能な作用（生物試験）

	検出可能な作用							
	エストロゲン	抗エストロゲン	アンドロゲン	抗アンドロゲン	甲状腺ホルモン	抗甲状腺ホルモン	視床下部 ／下垂体 ／生殖腺	視床下部 ／下垂体 ／甲状腺
メダカピテロジェニンアッセイ	■							
メダカパーシャルライフサイクル試験	■	■	■	■			■	
魚類 21 日間スクリーニング試験 (TG230)	■	■	■					
魚類短期間繁殖試験(TG229)	■	■	■				■	
魚類性発達試験(開発中)	■	■	■	■			■	
イトヨスピギンアッセイ(開発中)			■	■				
両生類パーシャルライフサイクル試験(開発中)	■	■	■	■	■	■	■	■

■：検出可能な作用

表2 第1段階試験群として採用する試験(案)

	検出可能な作用									
	エスト ロゲン	抗エス トロゲ ン	アンド ロゲン	抗アン ドロゲ ン	甲状腺 ホルモ ン	抗甲状 腺ホル モン	視床下部 ／下垂体 ／生殖腺	視床下部 ／下垂体 ／甲状腺	幼若ホ ルモン	脱皮ホ ルモン
試験管内試験										
メダカエストロゲン受容体 α 、 β 1、 β 2 レポーター遺伝子試験	■	■								
メダカアンドロゲン受容体 α 、 β レポーター遺伝子試験			■	■						
ニシツメガエル甲状腺ホルモ ン受容体 α 、 β レポータージ ーン試験					■	■				
ミジンコ脱皮ホルモン受容体 レポーター遺伝子試験										■
生物試験										
魚類短期間繁殖試験(TG229)	■	■	■				■			
魚類 21 日間スクリーニング試 験 (TG230)	■	■	■							

■：検出可能な作用

表3 第2段階試験群の候補

	エスト ロゲン	抗エスト ロゲン	アンド ロゲン	抗アン ドロゲ ン	甲状腺 ホルモ ン	抗甲状 腺ホル モン	視床下部 ／下垂体 ／生殖腺	視床下部 ／下垂体 ／甲状腺	幼若ホ ルモン	脱皮ホ ルモン
メダカ多世代試験(開発 中)	■	■	■	■			■			
アフリカツメガエル変態 アッセイ(TG231)					■	■		■		
オオミジンコ繁殖毒性試 験(TG211 ANNEX7)									■	
甲殻類多世代試験(開 発中)									■	■

■ : 検出可能な作用

図 2.1 内分泌かく乱作用の有害性評価の枠組み
生殖に及ぼす影響（案）

（エストロゲン様作用、抗エストロゲン様作用、
アンドロゲン様作用、抗アンドロゲン様作用、等）

第 1 段階（内分泌系に対する作用の有無を確認）

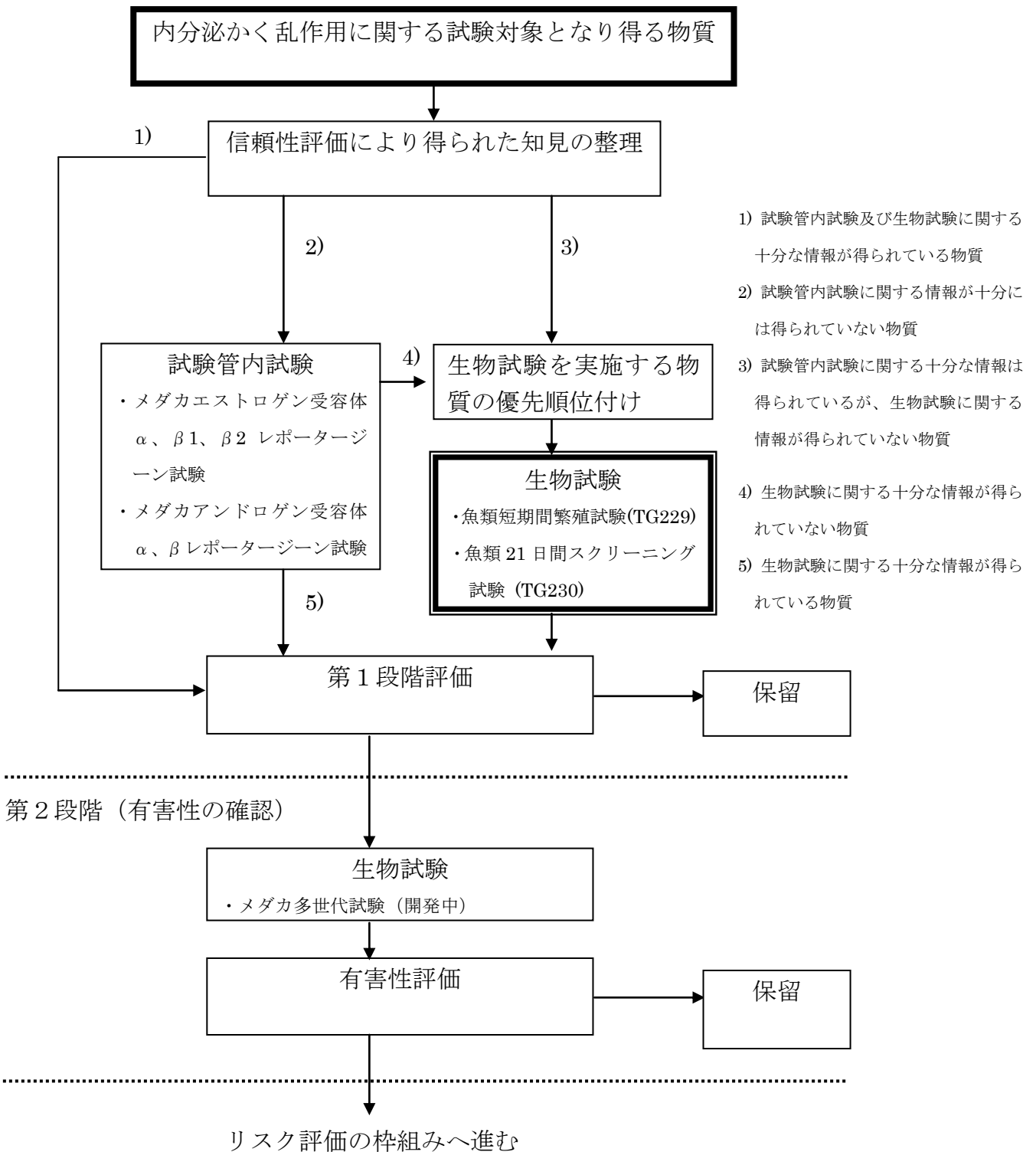
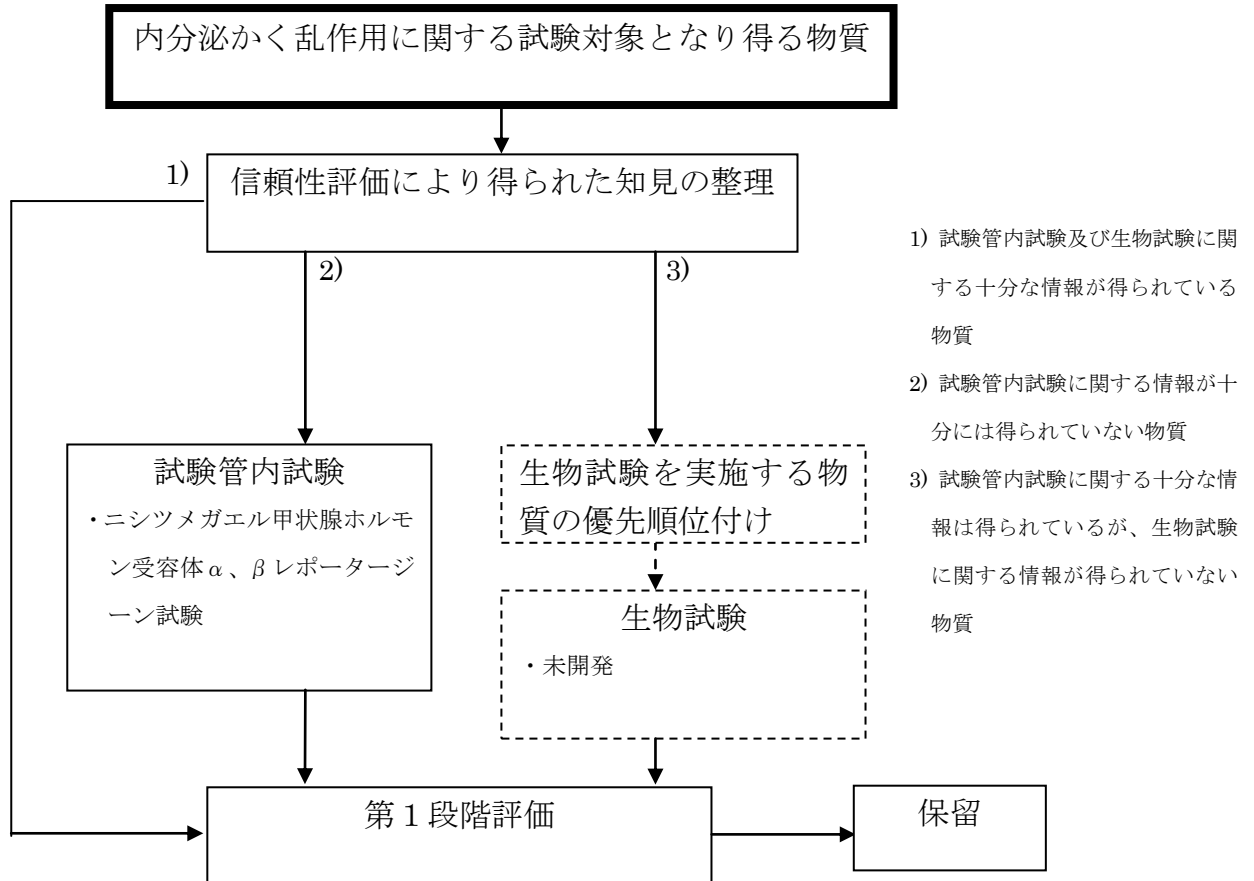


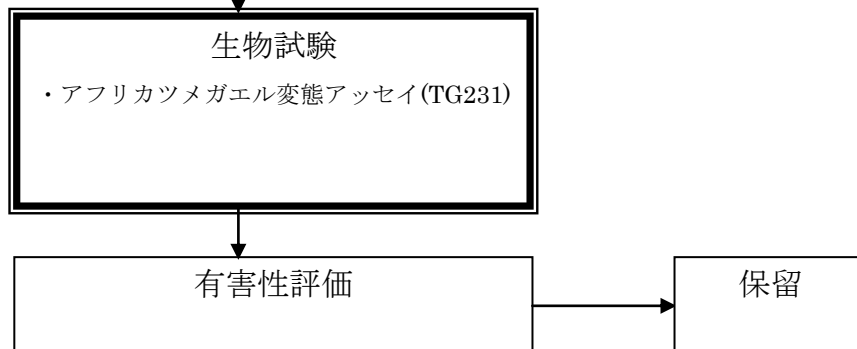
図 2.2 内分泌かく乱作用の有害性評価の枠組み
甲状腺に及ぼす影響（素案）

（甲状腺ホルモン様作用、抗甲状腺ホルモン様作用、等）

第 1 段階（内分泌系に対する作用の有無を確認）



第 2 段階（有害性の確認）



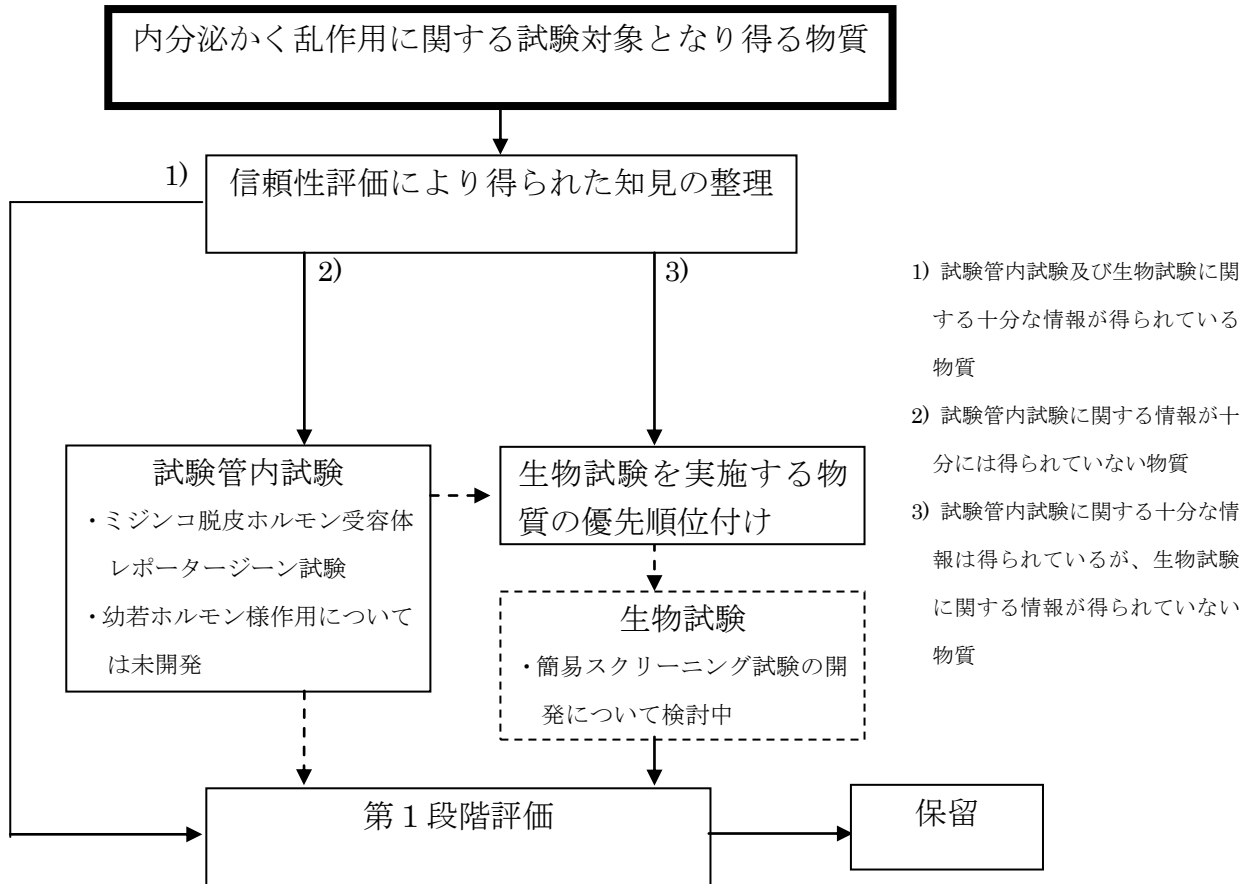
リスク評価の枠組みへ進む

図 2.3 内分泌かく乱作用の有害性評価の枠組み

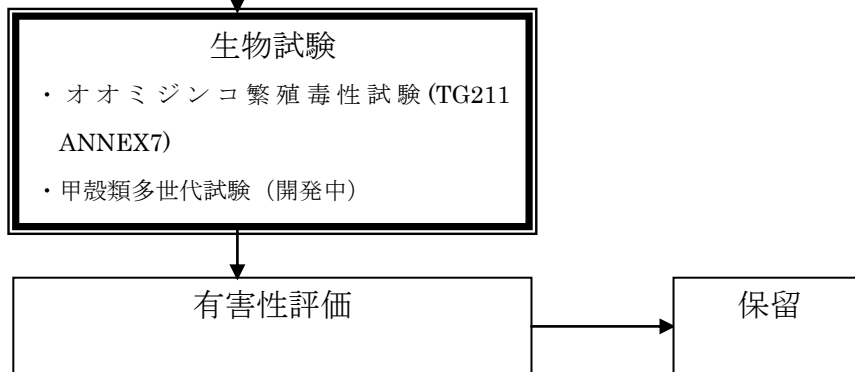
成長に及ぼす影響（素案）

（幼若ホルモン様作用、脱皮ホルモン様作用、等）

第1段階（内分泌系に対する作用の有無を確認）

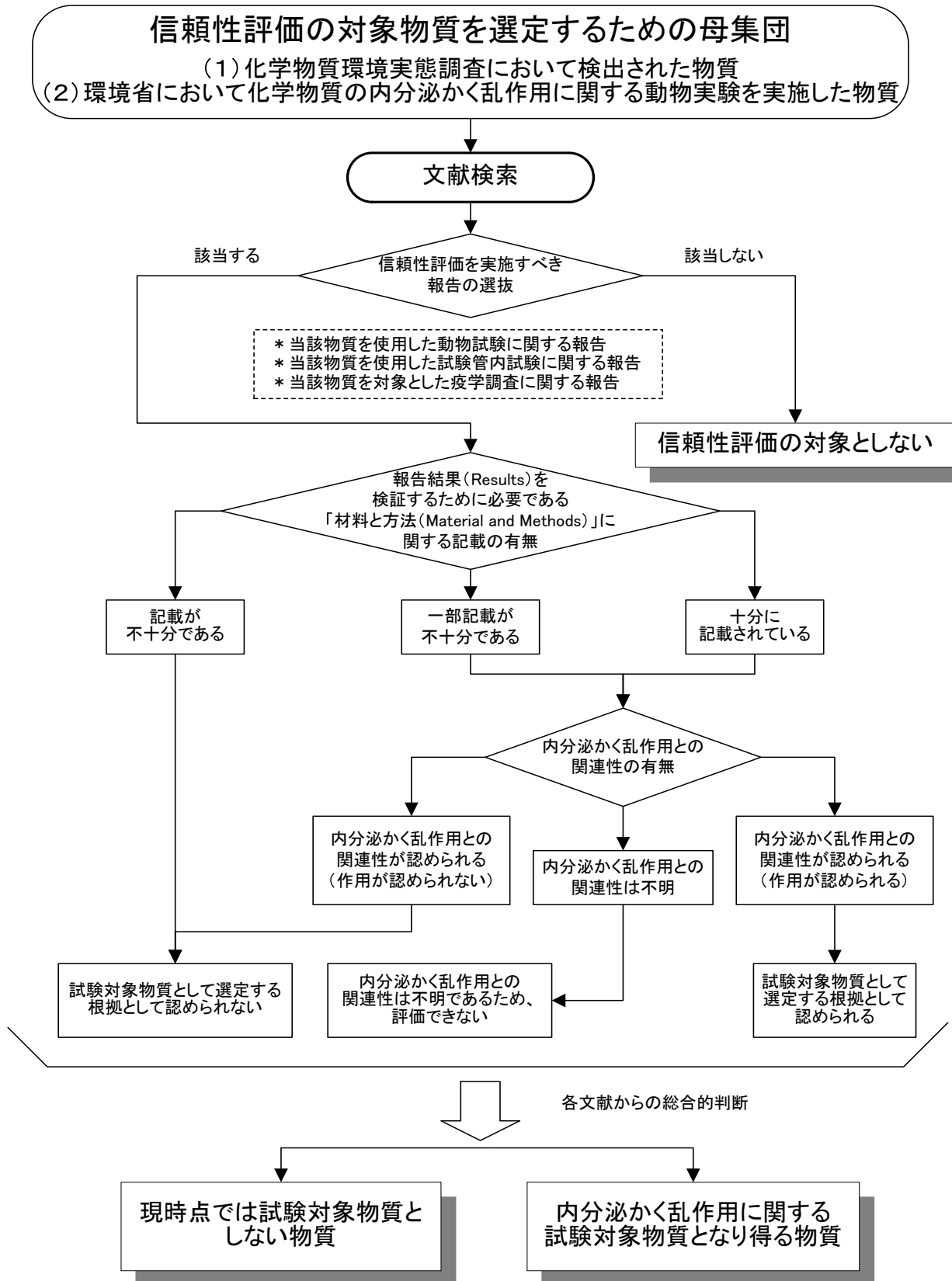


第2段階（有害性の確認）



リスク評価の枠組みへ進む

(参考1) 化学物質の内分泌かく乱作用に関連する報告の信頼性評価のこれまでの実施方法



(参考2) これまでの取組及び国際的な状況

1. SPEED'98 における試験実施の枠組み

- ・ スクリーニング及び確定試験の生物試験による2段階方式が採用され、試験管内試験結果はメカニズムの確認として利用された。
- ・ メダカを対象とした①ビテロジェニンアッセイ及び②パーシャルライフサイクル試験をスクリーニングとして実施し、有害性確認試験として③フルライフサイクル試験を実施した。また、メカニズムの確認として試験管内試験を実施した。内分泌かく乱作用を有すると推察した根拠としては、雄メダカの肝臓中ビテロジェニン濃度の高値、精巣卵の出現、産卵数・受精率の低値、孵化日数の遅延を採用し、「①内分泌系に対する作用影響の有無の確認及び②生体の障害や有害な影響の有無及び程度の確認」の指標とした。

2. 米国における試験実施の枠組み

USEPA においては、試験管内試験及び短期間の生物試験を含む Tier1 スクリーニングと長期間の生物試験である Tier2 テストの2段階方式が採用されている。

Tier 1 スクリーニングは、生物の内分泌系に対する化学物質の作用の検出を目的とした試験であり、5種類の試験管内試験（ラットエストロゲン受容体結合試験、ヒト HeLa 細胞エストロゲン受容体転写活性化試験、ラットアンドロゲン受容体結合試験、ヒトステロイド産生試験及びヒトアロマトラーゼ試験）及び6種類の動物試験（ラット子宮肥大試験、ラットハーシュバーガー試験、ラット雌思春期試験 (Pubertal female)、ラット雄思春期試験 (Pubertal male)、両生類変態試験及び魚類短期間繁殖試験）より構成される。

Tier 2 テストは、化学物質の生物に対する有害な影響を確認するための試験である。その妥当性検証は現在実施中であり、2011年（平成23年）末までに完了して、採用する試験法が決定される見込みである。

3. OECD におけるテストガイドライン化の検討状況

現時点では、OECD において無脊椎動物類 (TG211 ANNEX7)、魚類 (TG229、TG230) 及び両生類 (TG231) を対象とした試験法がテストガイドライン化されている。

この他、魚類性発達試験、メダカ多世代試験、甲殻類多世代試験などがテストガイドライン化に向けて開発中である。

魚類・両生類・無脊椎動物試験法の開発状況について

平成 17 年 3 月に策定された ExTEND2005 に基づき、平成 17 年度より魚類、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きた。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されるよう積極的に提案してきた。

本年 7 月に策定された EXTEND2010 では、引き続き環境中の生物に対する影響評価のための試験法を中心に開発を進めることとし、環境行政として行うべき生態リスク評価における活用を念頭に置いて、これに必要な試験法の開発に注力する旨記述している。

これまで開発を進めてきた試験法の目的、これまでの開発の状況及び本年度の検討内容は、以下のとおりである。

1. 魚類試験法開発について

SPEED'98 において魚類に対する内分泌かく乱作用を検討する際に用いたビテロゲニンアッセイ、パーシャルライフサイクル試験（以上スクリーニング試験）及びフルライフサイクル試験（確定試験）について、国際的な標準化を目指して OECD テストガイドライン化を提案し、専門者会合で検討を行うとともに、OECD 加盟国間のリングテスト等による検証作業を行ってきた。

(1) 魚類 21 日間スクリーニング試験 (TG230)

ビテロゲニン濃度及び短期の性転換を指標として化学物質の（抗）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をスクリーニングする 21 日間の試験である。SPEED'98 で用いられたビテロゲニンアッセイにほぼ相当する。エンドポイントは、雌雄ともに肝臓（または血液）中ビテロゲニン量及び二次性徴の変化である。

本試験法はメダカ、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、平成 21 年（2009 年）に OECD の TG230 として採択された。

(2) 魚類短期間繁殖試験(TG229)

当試験法は、上記 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下垂体～生殖腺軸への影響をスクリーニングできる 21～28 日間の試験である。ビテロゲニンの増減に加え、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に対する影響も検出できる。検出範囲が広いため重要なスクリーニング法として期待される。

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、平成 21 年（2009 年）に OECD の TG229 として採択されているが、ExTEND2005 の事業を通じて、昨年までにエストロゲン様物質及びアンドロゲン様物質について、メダカを用いた TG229 の有用性が確認されている。

本年度は、メダカに対する本試験の適正化に向け、さらにメダカにおけるデータの補強を行い、必要に応じて一部試験条件の修正（繰り返し連数、試験魚数など）を検討する。

（3）魚類性発達試験

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タ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。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ており、わが国は平成 21 年（2009 年）より 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を用いた試験結果と比較・検証を行っている。

（4）メダカ多世代繁殖試験

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タ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、その後日米間でプロトコルの統一について検討を行ってきた。

本年度は、この統一プロトコルの試案に基づきデータの補強を行い、試験法試案の検証を行う。

2. 両生類試験法開発について

OECD において、両生類については、甲状腺ホルモンによって制御されているカエルの変態に着目した「変態アッセイ」の開発が優先的に進められ、併せて生殖影響を評価する試験法（ライフサイクル試験）の検討が進められている。

(1) 両生類変態アッセイ(TG231)

両生類を用いて甲状腺ホルモン作用のかく乱化学物質を検出するための 21 日間のスクリーニング試験法である。甲状腺ホルモンによって制御されているカエルの“変態”に着目し、オタマジャクシの尾の退縮や肢の形成等に代表される形態変化の異常をエンドポイントとする。

ドイツ、日本及び米国の試験機関において、甲状腺ホルモン様物質及び抗甲状腺ホルモン様物質について数回のプロトコルの検証試験（リングテスト）が実施され、平成 21 年（2009 年）に OECD の TG231 として採択された。

(2) 両生類ライフサイクル試験

トロピカリス (*Xenopus (Silurana) tropicalis*: ニシツメガエル) の孵化後 48 時間経過した幼生を、性成熟までの長期間（40 週間）化学物質にばく露し、主として甲状腺ホルモンかく乱による両生類の発生、成長、生殖への影響について調べる試験である。

平成 20 年（2008 年）日米間で両生類のライフサイクル試験の開発に共同で取り組むことが合意され、翌年日米が Amphibian Development, Growth, and Reproduction Assay (ADGRA) を OECD に提案し承認された。その後米国から ADGRA のドラフトガイドラインが示され、日米英の専門家により検討された。

本年度は、米国から試験期間の短縮等を含むガイドラインの変更案 (Larval Amphibian Growth and Development Assay) が提案されたため、日米両国の試験データ等を比較・検証し、変更案の妥当性について検討を行う。

3. 無脊椎動物試験法開発について

無脊椎動物として、生態影響試験で広く用いられているミジンコを対象として、内分泌かく乱作用に関する試験法の開発を進めている。

(1) オオミジンコ繁殖試験 (TG211 ANNEX7)

ミジンコが幼若ホルモン様物質によってオス仔虫を産する現象を利用して、無脊椎動物の内分泌かく乱化学物質（特に幼若ホルモン様作用物質）を検出するための 21 日間の試験法である。産仔数及び仔虫性比をエンドポイントとする。

平成 15 年から開発が進められ、OECD 加盟各国による数回のリングテストを経て、平成 20 年（2008 年）に OECD の TG211 ANNEX7 として採用された。

(2) ミジンコ簡易スクリーニング試験法

TG211 ANNEX7 は試験に要する期間が長いため、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として開発中である。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。

本年度は陽性対照物質を用いて、ばく露方法、ばく露期間、試験個体数等、試験手法としての適正化を行う。

(3) ミジンコ多世代試験

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ばく露を受けたミジンコの仔虫の産仔能力をエンドポイントとする。

平成 19 年度から OECD のミジンコ繁殖試験 (TG211) に F0 世代の親ばく露を追加した繁殖試験などを行い、F0 世代におけるばく露が次世代に影響を及ぼすか否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。

本年度は、米国で行われている他の甲殻類 (アミ、コペポッド) を用いた多世代試験との結果の比較を行うことを目的として、共通の物質をばく露し、本試験法の検証を行う。

4. 受容体結合試験等の *in vitro* 試験

OECD では、受容体結合試験などの *in vitro* 試験を用いた内分泌かく乱作用物質スクリーニング法について、非動物試験法検証グループ (VMG-non animal) が検討を行っている。環境省では、平成 18 年に英国、スウェーデンとともに、魚類等の *in vitro* 試験を用いた内分泌かく乱物質のスクリーニング法について検討し、平成 20 年 (2008 年) に開催された第 6 回 VMG-non animal 会合にて、「魚類を用いた *in vitro* 試験に関する詳細レビュー報告書」を作成、提案した。

本年 12 月に開催される第 8 回 VMG-non animal 会合において、詳細レビュー報告書の見直し、*in vitro* 試験を用いた内分泌かく乱化学物質スクリーニング法等に関する検討が行われる見込みである。