

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 (TG) 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、平成 23 年度の開発の状況及び平成 24 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 (ビテロゲン濃度及び二次性徴) に産卵数を付加し、化学物質のエストロゲン、アンドロゲン及び抗エストロゲン様作用、アロマターゼ阻害作用並びに視床下部一下垂体一生殖腺軸への影響をスクリーニングできる 21 日間の試験である。化学物質の内分泌かく乱作用による繁殖行動や卵質及び精子形成への影響等の検出も期待できる。本試験法は、平成 21 年 (2009 年) に OECD の TG229 として採択されたが、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、メダカを用いた試験については、繁殖 (産卵) に関わる試験条件等の検討及び適正化が必要である。

(2) 平成 23 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適正な試験条件を検討するため、平成 22 年度に引き続き、作用モードが既知の物質 (陽性対照物質) 等を用いた検証試験を実施し、データの収集・整理を行った。

アンドロゲン様物質 (ジヒドロテストステロン及びメチルテストステロン) については、雌での乳頭状小突起数 (二次性徴) の出現・増加及び産卵数の低下、エストロゲン様物質 (エチニルエストラジオール) については、雄での肝臓ビテロゲン濃度の増加及び高濃度域での産卵数の低下など、既往知見等から想定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。一方、抗アンドロゲン様作用を有するとされている物

質（ビクロゾリン）での試験では、各エンドポイントにおいて明確な変化は認められず、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。

また、メダカを用いた場合の試験条件としては、試験水槽あたりのメダカの供試数を雌雄各 3 個体、試験濃度あたりの水槽数（繰り返し数）を 4 連（水槽）とするのが適切であることが確認された。この結果を踏まえ、平成 24 年 4 月に開催された OECD WNT 会合において、TG229 のメダカでの試験条件について修正提案を行ったところ、雌雄各 3 個体、水槽数 4 連で試験することが合意され、平成 24 年 10 月 2 日に改訂版が OECD ホームページにおいて公表された。

（3）平成 24 年度の検討事項

平成 23 年度までの成果を踏まえ、適正化した試験条件で、さらに作用モードの異なる物質について検証試験を実施してデータを取得し、試験適用範囲の確認及び結果の妥当性の検証等を進める。併せて、メダカを用いた抗アンドロゲン作用の検出手法の開発を行う。

2. 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移行等に伴う次世代及び次世代から次々世代への影響を調べることを目的とする試験法である。メダカを多世代にわたって化学物質にばく露し（約 25 週間）、各世代において、ビテロゲニン濃度、生殖腺組織、二次性徴、性比の偏り、繁殖（産卵数）、成長等のエンドポイントを調べることで、メダカ生涯のいずれかのステージ（発育段階）において化学物質の内分泌かく乱作用（エストロゲン、抗エストロゲン、アンドロゲン及び抗アンドロゲン様作用、アロマターゼ阻害作用及び視床下部一下垂体—生殖腺軸への影響等）の検出や個体群レベルの影響等を評価することができる。

本試験法については、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、日米間で検証試験等を実施してデータの補強を行い、試験法の適正化に向けた検討を行っている。

（2）平成 23 年度の検討結果

これまでにフルライフサイクル試験又は二世世代繁殖試験のプロトコル案に基づいて実施した検証試験の結果を整理し、主に産卵数など繁殖への影響を適正に評価するために必要な試験条件等について、統計学的検出力の観点から検証を行った。その結果、繁殖ステージにおけるばく露を対照区及び濃度区とも 12 連（1：1 モデル）で行う、もしくは対照区 16 連及び濃度区 8 連（2：1 モデル）で行うことで、統計学的に十分な検出力で産卵数への化学物質の影響を評価できることが示唆された。

(3) 平成 24 年度の検討事項

平成 23 年度の検討結果を踏まえ、平成 23 年度に検討したプロトコール（案）による検証試験を実施し、試験生物数、エンドポイント及び統計解析等の観点から、その妥当性等について検討する。

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、成長及び繁殖への影響を調べる試験については、当初、米国から提案されたニシツメガエル *Xenopus (Silurana) tropicalis* を用いて受精 48 時間後の幼生から性成熟期までばく露し、変態完了期及び性成熟期に体重、頭胴長、血中ビテロゲン濃度、性比、生殖腺体指数：GSI 及び精子数等のエンドポイントを測定する Amphibian Development, Growth and Reproduction Assay (ADGRA) の開発及び検証を進めてきた。しかし、この試験法は、ばく露期間が約 42 週間と長いことから、米国より代替の試験法として、ばく露期間を短縮し、エンドポイントの一部を変更した幼若期両生類の成長・発達試験 (Larval Amphibian Growth and Development Assay (LAGDA)) のプロトコル案が提案された。LAGDA については、そのほかに試験生物種としてアフリカツメガエル *Xenopus laevis* が追加されたこと、受精 1 日以内の胚 (N.F. stage 8~10) を用いること、ばく露期間を変態完了 10 週間後までとすること、変態完了直前 (N.F. stage 62) に変態 (甲状腺) に関わるエンドポイントを測定することなどが変更されており、試験法の目的等を踏まえて、試験条件やエンドポイントの妥当性等について検証を進める必要がある。

(2) 平成 23 年度の検討結果

LAGDA について、第 7 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、ベンゾフェノン 2 (BP2) を用いた検証試験を実施した。BP2 は、両生類変態アッセイ (TG231) の検証試験でも用いられた物質であり、両生類に対して弱いエストロゲン様作用と視床下部一下垂体—甲状腺軸に対する弱い阻害作用を示すことが疑われている物質である。検証試験の結果、N.F. stage 62 において発達 (変態) の遅延など BP2 の甲状腺軸に対する影響及びばく露終了時におけるビテロゲン濃度の増加及び遺伝的雄個体における性転換個体の増加など BP2 のエストロゲン様作用の影響を検出することができ、本試験法の有効性が確認された。

(3) 平成 24 年度の検討事項

LAGDA について、第 8 回日米実務者会議 (平成 24 年 2 月) での米国との協議により

選定した抗エストロゲン物質（タモキシフェンクエン酸塩）を用いて、検証試験を実施し、本試験法の抗エストロゲン様作用物質に対する有効性等について検討する。

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

化学物質の影響を母体中（親ミジンコの体内）で受けた次世代のミジンコでの産仔能力をエンドポイントとして無脊椎動物での生物群の存続を考慮する試験であり、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の検討を平成 19 年度から行っている。平成 19～20 年度には、オオミジンコ *Daphnia magna* を試験生物として用い、親ミジンコへのばく露が次世代に及ぼす影響等についての検討を行った。平成 21 年度からは、世代期間が短く短期間で試験を実施できるニセネコゼミジンコ *Ceriodaphnia dubia* も試験生物種に加えて、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、労力の軽減なども勘案しつつミジンコを用いる多世代繁殖試験法の検討を行っている。

（2）平成 23 年度の検討結果

平成 22 年度に引き続き、ビクロゾリン（抗アンドロゲン様作用物質）及びテブフェノジド（脱皮阻害作用物質）を用いてニセネコゼミジンコによる多世代試験及びピリプロキシフェン（幼若ホルモン様作用物質）を用いたオオミジンコでの多世代試験を実施し、現行の試験プロトコルの妥当性等についての検討を行った。その結果、ニセネコゼミジンコでのビクロゾリン及びテブフェノジドの多世代試験では、いずれも次世代の産仔数への明確な影響は確認できなかった。また、オオミジンコでのピリプロキシフェンの試験では、親世代（F1 世代）のばく露によって子世代（F2 世代）において幼若ホルモン様作用が増大する可能性が示唆された。

（3）平成 24 年度の検討事項

平成 23 年度に引き続き、多世代試験について幼若ホルモン様作用物質等による検証試験を実施し、性比を含めた次世代への影響も考慮してプロトコル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

化学物質の幼若ホルモン様作用を調べる試験法については、すでに TG211 ANNEX7 が OECD テストガイドライン化されているが、EXTEND2010 における生態影響評価のための試験（第一段階生物試験）として用いるには、試験期間が長く試験操作の難度も高い。これまでの研究成果により、オオミジンコでは、卵発生の特定の時期に短期間、幼若ホルモン様作用物質をばく露することによってオス仔虫生産が誘導されることが判明しており、この知見を利用して、48 時間程度の短期ばく露後の 2～3 腹目の仔虫の性比をエンドポイントとする幼若ホルモン様作用物質のスクリーニングを目的とする簡便な試験法を開発している。

（2）平成 23 年度の検討結果

ピリプロキシフェン（幼若ホルモン様作用物質）を用いて、供試個体の齢や試験濃度の設定方法等を検討するための検証試験を実施した。供試個体の週齢については、10 日齢と 17 日齢では仔虫のオス誘導（性比）に差異は見られなかった。また、試験濃度については、EC₅₀ 値の半値から公比 2 で 3 濃度程度を設定するのが適当と考えられた。

（3）平成 24 年度の検討事項

平成 23 年度の成果を踏まえて、幼若ホルモン様作用物質を用いた検証試験を実施し、知見を取集するとともに、試験プロトコルの簡易スクリーニング試験法として適切な試験条件や試験手法等の検討を行う。