

## 魚類、両生類及び無脊椎動物に係る試験法開発について(案)

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 24 年度の開発の状況及び平成 25 年度の検討内容(案)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(ビテロゲニ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 24 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の検討及び知見の蓄積を図るため、平成 23 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。

抗エストロゲン様物質のラロキシフェン塩酸塩については、雌での肝臓ビテロゲニン濃度の低下及び受精率の低下など、既往知見等から想定された結果を得ることができた。また、4-クロロ-3-メチルフェノールについては、雄及び雌での肝臓ビテロゲニン濃度の増加がみられ、弱いエストロゲン様作用を示すことが示唆されるとともに、本試験法がエストロゲン様作用物質のスクリーニングに有効であることが確認できた。

### (3)平成 25 年度の検討事項(案)

平成 24 年度までの成果を踏まえ、適正化した試験条件で、さらに陰性物質を含む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、平成 24 年度に引き続き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 24 年度の検討結果

平成 23 年度に日米間で合意した試験プロトコルに準じて、繁殖ステージにおけるばく露を対照区 16 連及び濃度区 8 連(2 : 1 モデル)とし、エストロンを用いて検証試験を実施した。その結果、メダカ短期繁殖試験の結果を基に設定した試験濃度範囲において、F<sub>1</sub>及びF<sub>2</sub>世代での雄の肝臓ビテロゲニン濃度の増加、雄の二次性徴(臀びれの乳頭状小突起数)の低下及びF<sub>1</sub>世代における産卵数及び受精率の低下などが検出できたことから、統計学的に十分な検出力で産卵などへの影響を評価できることが示唆された。

### (3)平成 25 年度の検討事項(案)

平成 24 年度までの検討結果を踏まえ、試験生物数、エンドポイント及びばく露期間等について検討し、テストガイドライン化に向けてプロトコルの適正化を進める。

## 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 *X. 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24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、抗エストロゲン様作用物質のタモキシフェンクエン酸塩を用いた検証試験を実施した。検証試験の結果、N.F. stage 62 到達に要した日数に有意な遅延がみられたが甲状腺組織には有意な変化がみられなかったことから、発達の遅延が甲状腺軸に対する影響ではなくタモキシフェンクエン酸塩の毒性によって生じた可能性が示唆された。また、幼若期のエンドポイントについても明瞭な抗エストロゲン様作用を示す変化はみられず、本試験法は抗エストロゲン様作用については有効性が低いことが示唆された。

## (3) 平成25年度の検討事項(案)

LAGDA について、甲状腺軸に対する阻害作用(変態阻害作用)を持つ化学物質を用いて、ばく露期間を幼生期までとする検証試験を実施し、両生類変態試験(TG231)との比較等により、本試験法の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 24 年度の検討結果

平成 23 年度に引き続き、アトラジン及びケトコナゾール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、試験プロトコルの標準化に向けて試験条件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アトラジン及びケトコナゾールの多世代試験では、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、F<sub>2</sub> 世代(子世代)における産仔数の集計方法の精緻化が必要であることが示唆された。オオミジンコでのピリプロキシフェンの試験では、F<sub>1</sub> 世代のばく露を平成 23 年度に検討した集団ばく露から F<sub>2</sub> 世代と同じ個別ばく露で行った結果、F<sub>2</sub> 世代で性比の偏りが大きくなる傾向はみられなかった。

## (3)平成 25 年度の検討事項(案)

平成 24 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 24 年度の検討結果

平成 23 年度に引き続き、ピリプロキシフェン(幼若ホルモン様作用物質)を用いて検証試験を実施し、供試個体の選別法及びばく露期間(仔虫の性別判定)、繰り返し数、解析方法及び試験の有効性基準等についての検討を行った。供試生物については、育房中の次世代が卵の段階にあるものを選別すること、データ解析等を考慮すると濃度あたり 10 連が適することなどが明らかとなった。また、平成 24 年度までの検討結果に基づいて確定した試験プロトコールに基づいて、3,5-ジクロロフェノール(陰性対照物質)を用いて検証試験を実施し、陰性物質で雄の仔虫が誘導されないことを確認した。

## (3)平成 25 年度の検討事項(案)

平成 24 年度に取りまとめた試験プロトコールに基づいて、化学物質(殺虫剤等)を対象とした検証試験を実施し、本試験法の簡易スクリーニング試験法としての有効性等を検証するとともに知見の蓄積を図る。