

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 において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 25 年度の検討結果及び平成 26 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(OECD TG229)

(1)試験法の概要

魚類短期繁殖試験は、魚類 21 日間スクリーニング試験(OECD 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、抗エストロゲン様作用及びアロマターゼ阻害作用に加えて、視床下部一下垂体—生殖腺軸への影響を検出できるほか、化学物質の内分泌かく乱作用による繁殖行動、卵質や精子形成への影響等の検出も期待できる。

本試験法については、平成 21 年(2009 年)に OECD 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ったことから、日本よりメダカを用いた試験条件等についての修正提案を行い、平成 24 年(2012 年)にメダカを試験生物として用いる場合の試験条件を含む改訂版が採択されている。

(2)平成 25 年度の検討結果

本試験法については、メダカを試験生物として、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、基礎的なデータ及び知見等の蓄積を図るとともに、内分泌かく乱作用の有害性評価への適用性及び有効性の検討等を行っている。

平成 25 年度は、過年度までに検証試験が実施されていない陰性物質のドデシル硫酸ナトリウム(既存知見等から魚類に内分泌かく乱作用を示さないと想定される物質)及びプロゲステロン(黄体ホルモン)を用いて検証試験を実施した。ドデシル硫酸ナトリウムについては、肝臓ビテロゲニン濃度、二次性徴に有意な変化はみられなかったが、受精率において有意な低下がみられた。また、プロゲステロンについては、肝臓ビテロゲニン

濃度に有意な変化はみられなかったが、雌において臀びれに乳頭状突起(雄の二次性徴)の発現及び濃度依存的な増加がみられたほか、産卵数及び受精率にも有意な低下がみられ、プロゲステロン作用を持つ物質がメダカの繁殖に有意な影響を示す可能性があることなど有用な知見を得ることができた。

(3)平成 26 年度の検討内容(案)

平成 26 年度は、これまでにメダカを用いた長期確定試験が実施されている各種作用(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物質等)の陽性対照物質等を用いて検証試験を実施し、知見の収集並びに本試験法の内分泌かく乱作用の有害性評価への適用性及び有効性等に関する検討を進める。

2. メダカ抗アンドロゲン作用検出試験(仮称)

(1)試験法の概要

化学物質の抗アンドロゲン作用については、OECD の TG229 や TG230 では作用を検出できないと考えられている。メダカでは、アンドロゲンの作用によって、オスの二次性徴として臀びれに乳頭状突起が形成されることから、これを主要なエンドポイントとして化学物質の抗アンドロゲン作用を検出(スクリーニング)できる試験法の開発及び検証を進めている。

メダカ抗アンドロゲン作用検出試験(仮称)は、OECD TG229 と TG230 を参考とする試験デザインであり、二次性徴の発現前の幼若期にあるメダカを供試魚として、28 日間程度の期間、化学物質によるばく露を行い、ばく露終了時の遺伝的雄個体における臀びれの乳頭状小突起数の低下を指標として試験物質のメダカに対する抗アンドロゲン作用の有無等を調べる試験法である。

(2)平成 25 年度の検討結果

本試験法については、平成 23 年度から抗アンドロゲン作用の陽性対照物質(フルタミド及びピンクロゾリン)を用いて検証試験を実施し、試験法の妥当性及び有効性並びに試験条件等について検討を行っている。

平成 25 年度は、フルタミドを試験物質として、魚類性発達試験(OECD TG234)に準じて、受精卵から性分化期までばく露を行う検証試験を実施し、得られた結果と過年度に実施したメダカ抗アンドロゲン作用検出試験の結果との比較等により、試験法の妥当性及び課題の整理並びに試験条件等の検討を行った。

(3)平成 26 年度の検討内容(案)

平成 26 年度は、平成 25 年度に引き続き、これまでに実施した検証試験の結果等を踏まえて、試験法に関わる課題の整理及び検討を進めるとともに、既存文献等において魚類に対する抗アンドロゲン作用を示すことが示唆されている化学物質を用いた検証試験を実施し、試験法の標準化に向けた試験条件等(供試生物数、試験期間、供試メダカの週

齢など)の検討を行う。

3. メダカ多世代試験

(1)試験法の概要

メダカ多世代試験は、化学物質の母体から卵への移行等に伴う次世代あるいは次世代から次々世代への影響を調べることを目的として、メダカを複数の世代にわたり長期間、化学物質へのばく露を行う試験である。本試験では、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(遺伝的性と表現型のギャップ)、繁殖(産卵数及び受精率等)及び成長等のエンドポイントを調べ、メダカの生活史の各ステージ(発育段階)における内分泌かく乱作用(エストロゲン、抗エストロゲン、アンドロゲン、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-下垂体-生殖腺軸への影響等)を含む化学物質の有害性(個体又は個体群レベルの影響)等を評価する。

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、日米間で各種作用物質を用いた検証試験等を実施してデータ及び知見の蓄積を図るとともに、試験法の適正化に向けた検討を行っている。なお、本試験法については、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、日米共同で OECD でのテストガイドライン化に向けた取り組みを進めている。

(2)平成 25 年度の検討結果

平成 25 年度は、過年度までに実施した検証試験の結果等を踏まえ、本試験法のテストガイドライン化に向けて、試験の方法及び条件に関わる課題(試験生物数、エンドポイント及びばく露期間等)についての検討を行った。

(3)平成 26 年度の検討内容(案)

平成 26 年度は、OECD(WNT 会合)への提出に向けて、本試験法のテストガイドライン(案)の作成を行う。

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

両生類のライフサイクル試験については、当初、米国から提案されたニシツメガエル *Xenopus (Silurana) tropicalis* を試験生物として、受精 48 時間後の幼生から性成熟期まで約 10 か月間にわたりばく露を行い、変態完了期及び性成熟期に、エンドポイントとして、体重、頭胴長、血中ビテロゲニン濃度、性比、GSI 及び精子数等を測定することにより、両生類の発達、成長及び繁殖への影響を調べる試験法(Amphibian Development,

Growth and Reproduction Assay: ADGRA)の開発及び検証を進めてきた。しかし、ADGRA については試験期間が非常に長く多大なコストを要することなどから、試験期間の短縮及びエンドポイントの変更を図った代替の試験法として幼若期両生類の成長・発達試験(Larval Amphibian Growth and Development Assay: LAGDA)のプロトコル案が米国より提案された。

LAGDA は、アフリカツメガエル *X. laevis* を主たる試験生物として、受精 1 日以内の胚(N.F. stage 8~10)から変態完了 10 週間後までの期間に化学物質へのばく露を行い、変態完了の直前(幼生期)において N.F. stage 62 に達するまでに要した日数、頭胴長及び体重等、ばく露終了時(幼若期)において性比(遺伝的及び表現型)、生殖腺や輸精管等の組織、頭胴長及び体重等のエンドポイントを調べることにより、両生類の変態(視床下部—下垂体—甲状腺軸)、生殖及び成長等への影響を評価する試験である。

(2)平成 25 年度の検討結果

LAGDA については、平成 23 年度から、種々の作用モードの陽性物質を用いて検証試験を実施し、試験法の妥当性及び課題並びに試験条件等の検討を進めている。平成 25 年度は、日米二国間実務者会議での協議等により日米間で合意した試験プロトコルに従い、両生類の甲状腺軸に対して影響(変態阻害作用)を示すとされる過塩素酸塩(パークロレート)を用いて、両生類変態試験(OECD TG231)との比較検証を目的に、ばく露期間を幼生期までとする検証試験を実施した。その結果、甲状腺組織の変化とあわせて、N.F. stage 62 への到達日数の有意な増加(変態遅延)が検出できたことから、両生類の変態(甲状腺軸)への影響の評価における本試験法の有効性が確認された。

(3)平成 26 年度の検討内容(案)

平成 26 年度は、平成 25 年度に引き続き、日米間で合意した LAGDA の試験プロトコルに従い、両生類に対して変態阻害作用を示すことが知られているプロピルチオウラシルを用いて、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(OECD TG231)との比較等により、両生類の変態(視床下部—下垂体—甲状腺軸)の評価における本試験法の有用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

ミジンコ多世代試験は、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る。本試験法については、平成 19 年度から試験法の開発及び検証を行っている。当初(平成 19 年度及び 20 年度)は、試験生物とすることを想定しているオオミジン

コ *Daphnia magna* を用いて検証試験を実施し、親ミジンコへのばく露の次世代への影響等についての検討等を行ったが、平成 21 年度以降は、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* も加えて、カナダ環境省によるミジンコ亜急性毒性試験法(Test of Reproduction and Survival Using the Cladoceran *Ceriodaphnia dubia*)を参考に、試験期間の短縮、労力の軽減なども勘案しつつ、試験法の妥当性及び有用性並びに適切な試験条件や試験手法の検討等を進めている。

(2)平成 25 年度の検討結果

平成 25 年度は、過年度に検討したオオミジンコを試験生物とする多世代試験のプロトコルに準じて、フィプロニル及びペルフルオロオクタンスルホン酸塩を用いて検証試験を実施した。その結果、両物質とも、経世代影響(子世代における産仔数の低下等)はみられなかったが、子世代(第二世代)において親世代(第一世代)で化学物質にばく露した系とばく露していない系の比較によって経世代影響を検証することの有効性が示唆された。

(3)平成 26 年度の検討内容(案)

過年度までに実施したオオミジンコを用いた検証試験の結果等を取りまとめて、欧米で試験法の開発が進められているアミヤコペポッドとの感受性等の比較検証を行うとともに、過年度までに検討した試験プロトコルに準じてニセネコゼミジンコを用いた検証試験を実施し、平成 25 年度に引き続き、試験法の有効性等について検討する。

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については、仔虫の性別をエンドポイントに評価する試験法がオオミジンコ繁殖毒性試験(OECD TG211)の ANNEX7 としてテストガイドライン化されている。しかし、オオミジンコ繁殖毒性試験は試験期間が長く、仔虫の性判別など試験操作の難度も高い。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を持つ物質にばく露されることによってオス仔虫の生産が誘導されることが判明したことから、この研究成果を利用して、より短期間で化学物質の幼若ホルモン様作用を検出できる試験法の開発を進めている。

ミジンコ簡易スクリーニング試験は、オオミジンコの抱卵個体を試験生物として化学物質にばく露し、ばく露後に産出された 2 腹目の仔虫における性比(オス仔虫の出現)をエンドポイントとして幼若ホルモン様作用の有無を検出する最長で 1 週間程度の試験である。

(2)平成 25 年度の検討結果

平成 25 年度は、過年度に取りまとめた試験プロトコルに準じて、ミジンコに対して幼若ホルモン作用を示す可能性が考えられる化学物質(マクロライドラクトン系殺虫剤)を用いて検証試験を実施し、本試験法の簡易スクリーニング法としての妥当性及び有効性

等を検証するとともに、基礎的なデータ及び知見の収集を行った。検証試験の結果、アベルメクチン、ミルベクチン及びイベルメクチンでオス仔虫の産生誘導が検出され、本試験法の有効性が確認できた。

(3)平成 26 年度の検討内容(案)

平成 26 年度は、平成 25 年度に引き続き、ミジンコに対して幼若ホルモン作用を示す可能性が考えられる化学物質を用いた検証試験を実施し、本試験法の妥当性及び有効性等を検証するとともに、基礎的なデータ及び知見の蓄積を図る。