

化学物質の内分泌かく乱作用に関する 試験法の開発状況

国立環境研究所

環境リスク・健康領域

山本 裕史

Email: yamamoto.hiroshi@nies.go.jp

免責事項：本発表は演者の
意見を示すものであり、所
属機関・環境省の見解を示
すものではありません



簡単な自己紹介

National
Institute for
Environmental
Studies, Japan

2

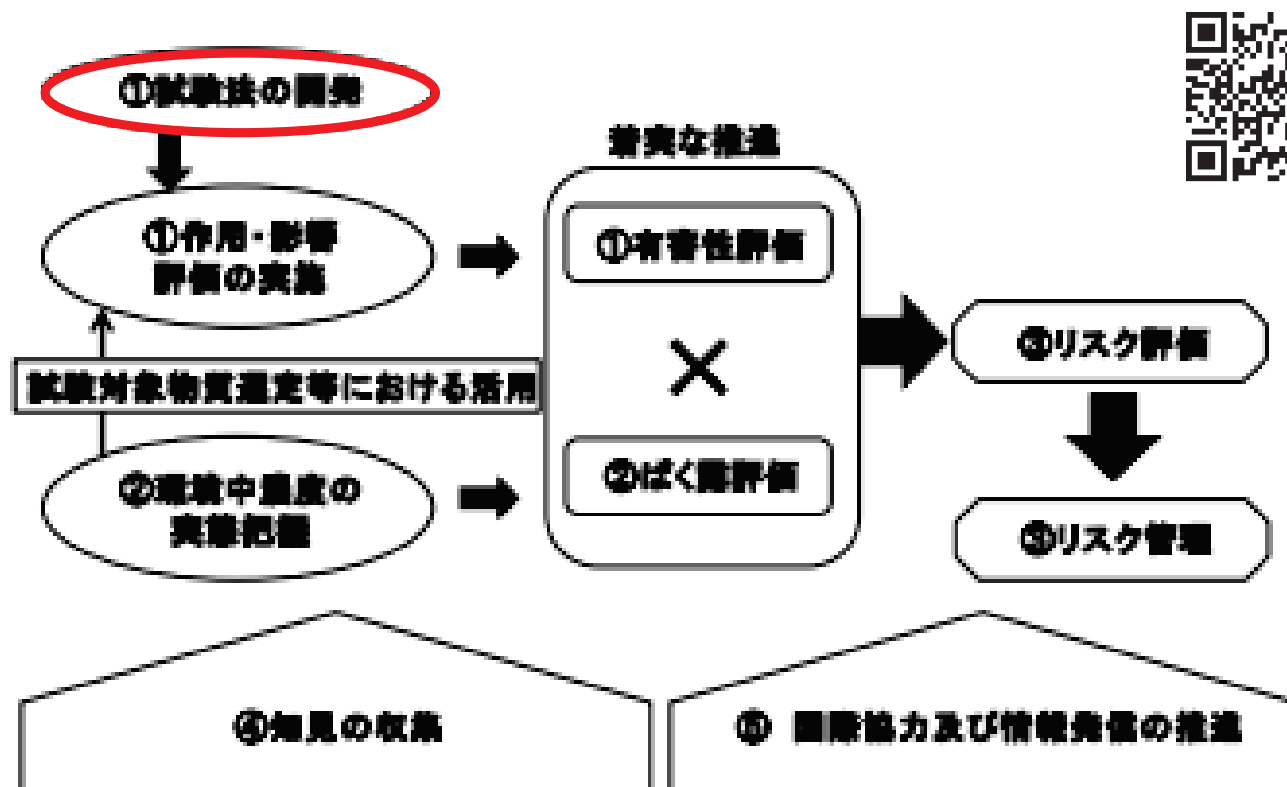
- 専門は生態毒性学、環境化学、環境工学
- 現職は国立環境研究所、環境リスク・健康領域領域長・生態毒性研究室長、生態影響評価研究室長
(<http://www.nies.go.jp/index-j.html>)
- 東京大学大学院新領域創成科学研究科自然環境学専攻客員教授
- 環境省の化審法、農取法、内分泌かく乱、医薬品による環境汚染、土壌汚染、海洋プラスチックごみ等の約30の委員を担当



1. メダカ拡張 1 世代繁殖毒性試験(MEOGRT: OECD TG240)の改訂
2. 幼若メダカ抗アンドロゲン作用検出試験 (JMASA: OECD GD379)の開発と検証
3. ミジンコ幼若ホルモン検出試験法(JHASA: OECD TG253)の開発と検証
4. 魚類胚を用いた試験法 (RADAR: OECD TG251, REACTIV: OECD TG252)の検証
5. NAMsについて

1. メダカ拡張 1 世代繁殖毒性試験(MEOGRT: OECD TG240)の改訂
2. 幼若メダカ抗アンドロゲン作用検出試験 (JMASA: OECD GD379)の開発と検証
3. ミジンコ幼若ホルモン検出試験法(JHASA: OECD TG253)の開発と検証
4. 魚類胚を用いた試験法 (RADAR: OECD TG251, REACTIV: OECD TG252)の検証
5. NAMsについて

図8 EXTEND2022における取組みの概念図



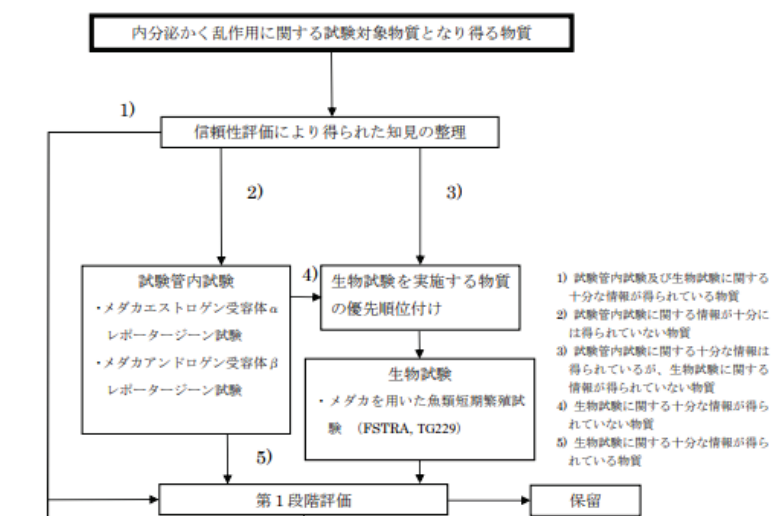
環境省「化学物質の内分泌かく乱作用に関する今後の対応— EXTEND 2022 —」より

EXTEND2022の枠組み(2)

図4 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

(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)

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）

生物試験
・メダカ拡張1世代繁殖試験 (MEOGRT, TG240)

メダカ拡張1世代繁殖試験(MEOGRT: OECD TG240)の開発・実施

有害性評価

保留

リスク評価の枠組みへ進む

環境省「化学物質の内分泌かく乱作用に関する今後の対応— EXTEND 2022 —」より



統計解析部分ほか、いくつかの文言を米国などと協議しながら修正: 2023年6月に公開



Section 2 Effects on Biotic Systems

Test Guideline No. 240 Medaka Extended One Generation Reproduction Test (MEOGRT)

4 July 2023

OECD Guidelines for the
Testing of Chemicals



OECD

Topics Countries & regions Publications Data News & Events About English

OECD Publications Test No. 240: Medaka Extended One Generation Reproduction Test (MEOGRT)

Test No. 240: Medaka Extended One Generation Reproduction Test (MEOGRT)

Record

Testing of Chemicals, Section 2 • 4 July 2023

materials

français

Download PDF

Cite this publication

This Test Guideline describes the Medaka Extended One Generation Test (MEOGRT), which exposes fish over multiple generations to give data relevant to ecological hazard and risk assessment of chemicals, including suspected endocrine disrupting chemicals (EDCs). Exposure in the MEOGRT starts with spawning fish (P or F0 generation) and continues until hatching (until two weeks post fertilization, wpf) in the second (F2) generation. This Test Guideline measures several biological endpoints. Primary emphasis is given to potential adverse effects on population relevant parameters including survival, gross development, growth and reproduction (fecundity). Secondly, in order to provide mechanistic information and provide linkage between results from other kinds of field and laboratory studies, where there is *a posteriori* evidence for a chemical having potential endocrine disrupter activity (e.g. androgenic or



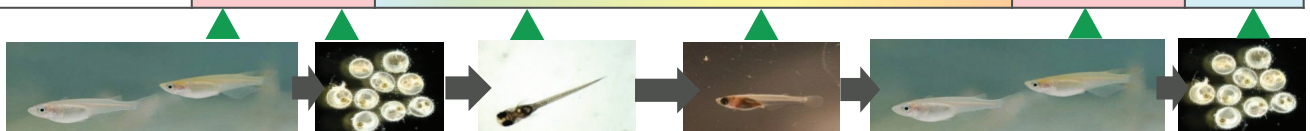
OECD TG240 HPより

MEOGRT試験のタイムライン

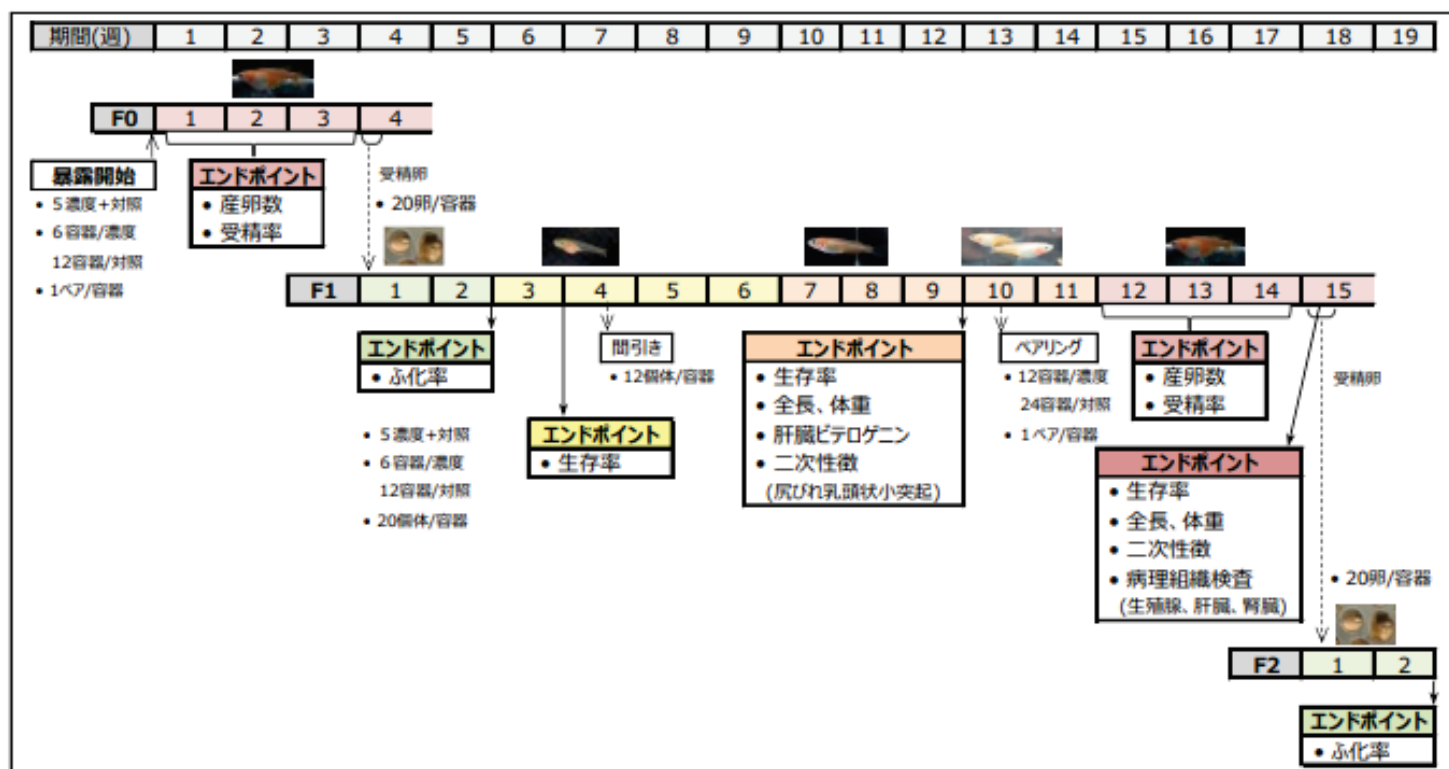
Life stage Embryo Larvae Juvenile Sub-adult Adult

Exposure duration & condition																			
Test Week	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
F0	1	2	3	4															
F1				1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
F2																		1	2
No. of fish/tank	2 (1 pair)			20		12							2 (1 pair)				20		
No. of replicates (treatment/control)	6/12			6/12							12/24				6/12				
Test chamber	2 L			2 L							5 L		2 L				2 L		
Endpoints Timeline																			
Hatch					F1														F2
Survival				F0	F1	F1						F1						F1	F2
Fecundity	F0													F1 ^b	F1				
Fertility	F0														F1				
Growth				F0								F1						F1	
Vitellogenin				(F0)								F1						(F1)	
Sexual development ^a				(F0)								F1						F1	
Histopathology																		F1	

Component	TG229	TG234										TG229	TG236
-----------	-------	-------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	-------	-------

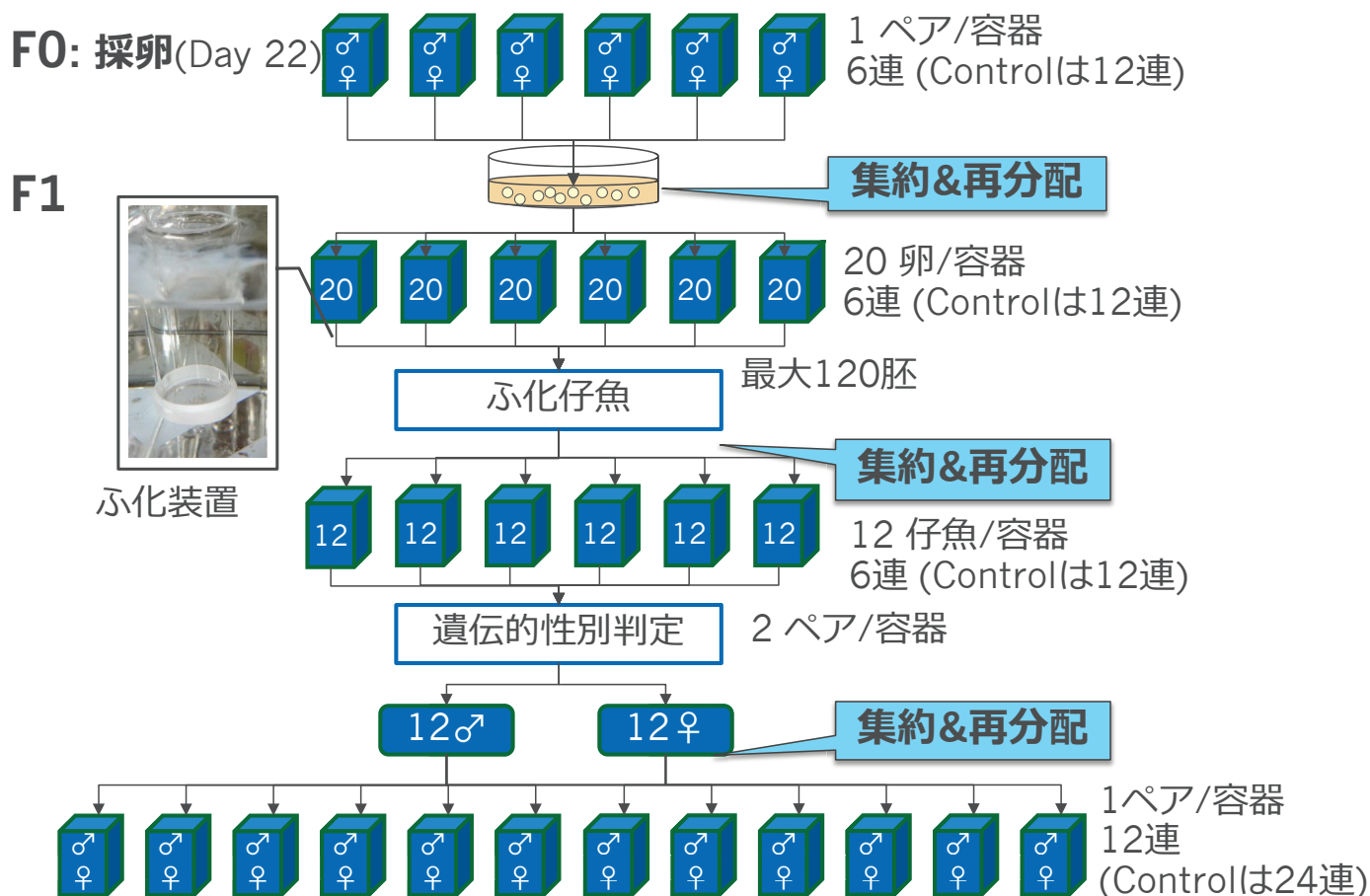


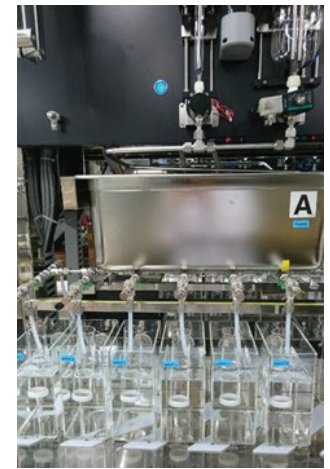
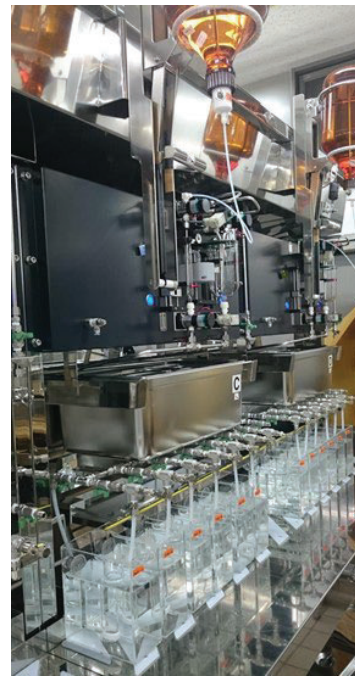
a: 表現型・生殖腺・二次性徴（オスの尻びれの乳頭状小突起）の確認, b 最初の産卵まで。カッコ内はOECD TG240 では義務付けられていないものの本試験で実施したもの。



環境省「化学物質の内分泌かく乱作用に関する今後の対応— EXTEND 2022 —」より

各連の集約と再分配





- 容器サイズ:
幼若体まで: 2 L
亜成体: 5 L
繁殖期: 2 L
- 換水率: 5 換水/日
- 水温: 25°C±2°C
- 溶存酸素: >60 %
- 光周期: 16 h 明/8 h 暗
- 給餌: ブラインシュリンプ (1日2回)

MEOGRT試験の結果

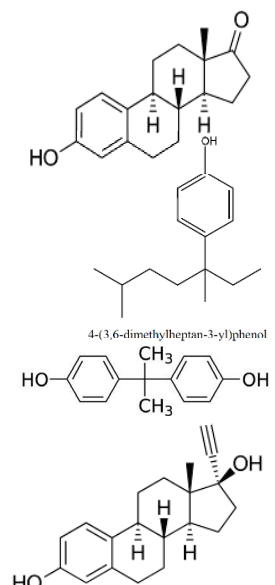
付表 2 - 3 第 2 段階生物試験 (MEOGRT, OECD TG240) の結果概要

物質名 NIESで実施 した試験	確認 (示唆) された作用				
	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	繁殖等に関する有害作用 最小影響濃度 LOEC 無影響濃度 NOEC
エストロン	○	ND	ND	ND	LOEC: 89.1 ng/L NOEC: 28.5 ng/L
4-ノニルフェ ノール (分岐型)	○	ND	ND	ND	LOEC: 1.27 µg/L NOEC: 得られなかった
ビスフェノール A	○	ND	ND	ND	LOEC: 1,000 µg/L NOEC: 330 µg/L
17α-エチニルエ ストラジオール	○	ND	ND	ND	LOEC: 7.48 ng/L NOEC: 2.36 ng/L
4-tert-オクチル フェノール	○	ND	ND	ND	LOEC: 9.91 µg/L NOEC: 3.21 µg/L
りん酸トリフェ ニル※	ND	△	ND	ND	LOEC: 48.4 µg/L NOEC: 15.2 µg/L

○: 作用が確認された、△: 試験管内試験の結果とは異なる作用が確認された、ND: 作用が確認されなかった

※りん酸トリフェニルについては、ステロイド合成阻

環境省「化学物質の内分泌かく乱作用に関する
今後の対応— EXTEND 2022 —」より



Guidance Document on a Juvenile Medaka anti-androgen screening assay (JMASA)

Series on Testing and Assessment
No. 379

新たなガイダンス文書OECD GD379
(検証レポートはGD380)として
2023年6月に公開



JT03523609

Validation of the Juvenile Medaka anti-androgen screening assay (JMASA)

Series on Testing and Assessment
No. 380



環境省との同時報道発表

ユーザー別ナビ | 一般の方 | 研究関係者の方 | 環境問題に関心のある方

トップページ > 広報活動 > 新着情報 > 2023年度 > 日本がリードする、メダカを用いた内分泌かく乱化学物質の検出手法の国際標準化 —日本が取りまとめたOECD文書が採択・公表されました—

国立研究開発法人
国立環境研究所
National Institute for Environmental Studies

2023年9月14日

日本がリードする、メダカを用いた内分泌かく乱化学物質の検出手法の国際標準化 —日本が取りまとめたOECD文書が採択・公表されました—

(筑波研究学園都市記者会)



2023年9月14日 (木)
国立研究開発法人国立環境研究所
環境リスク・健康領域

広報活動

- > 研究所紹介動画/パンフレット
- > 報道発表
- > イベント情報
- > 見学について
- > 国立環境研究所一般公開
- > 国立環境研究所公開シンポジウム



環境省
Ministry of the Environment

本文へ > English キーワード検索 🔍 ヘルプ

ホーム | 環境省について | 政策 | 法令 | 報道・広報 | 白書・統計 | 申請・手続き

報道発表資料

ホーム > 報道・広報 > 報道発表一覧

> 内分泌かく乱作用に関するOECD試験法の策定及び改定について (国際的な標準試験法の開発に対するわが国の貢献)

この記事を印刷

2023年09月14日 保護対象

内分泌かく乱作用に関するOECD試験法の策定及び改定について (国際的な標準試験法の開発に対するわが国の貢献)

国立環境研究所環境リスク・健康領域では、環境省プログラム「化学物質の内分泌かく乱作用に関する今後の対応—EXTEND2022—」の一環として、メダカを用いた化学物質の内分泌かく乱作用を検出する手法の国際標準化を進めています。このたび、日本が中心になって取りまとめた2つの検出手法に関する提案書が、2023年4月の経済協力開発機構（以下「OECD」という。）の会議で採択され、同年7月に公表されました。

1つは国立環境研究所と米国環境保護庁が共同で開発した、メダカに対する内分泌かく乱物質の影響を3世代にわたって調べる「メダカ拡張1世代繁殖試験（OECD化学品テストガイドラインNo. 240）の一部を改善した試験法です。

もう1つは、国立環境研究所が開発した、4週間にわたってメダカに化学物質をばく露し、

1. 化学物質の内分泌かく乱作用に関する環境省のプログラム（現在は「EXTEND2022」）の下で開発・検討が進められ、OECDにおいて、わが国主導で議論が行われた次の2つの魚類試験法が、OECDの国際標準試験法として採択され、本年7月に公開されました。

- ・メダカ拡張1世代繁殖試験（MEOGRT）（OECDテストガイドラインNo. 240）改定
- ・幼若メダカ抗アンドロゲン作用検出試験（JMASA）（OECDガイダンス文書）策定

2. 環境省では、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明らかにするため、EXTEND2022の下でこれらの試験法も活用しつつ、更に試験・評価を進めます。併せて未完了の試験法の開発を進め、OECDによる標準試験法の確立に貢献します。

1. 試験法開発の背景

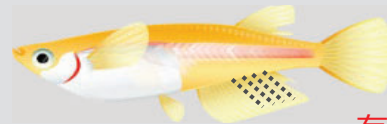
(EXTEND2022に至る環境省のプログラム)

JMASA



幼若体

- 二次性徴前
- 乳頭状小突起なし



有意差あり



形成阻害 (発現せず)

OECD TG 229 (短期繁殖毒性試験)



成魚

- 二次性徴後
- 乳頭状小突起あり



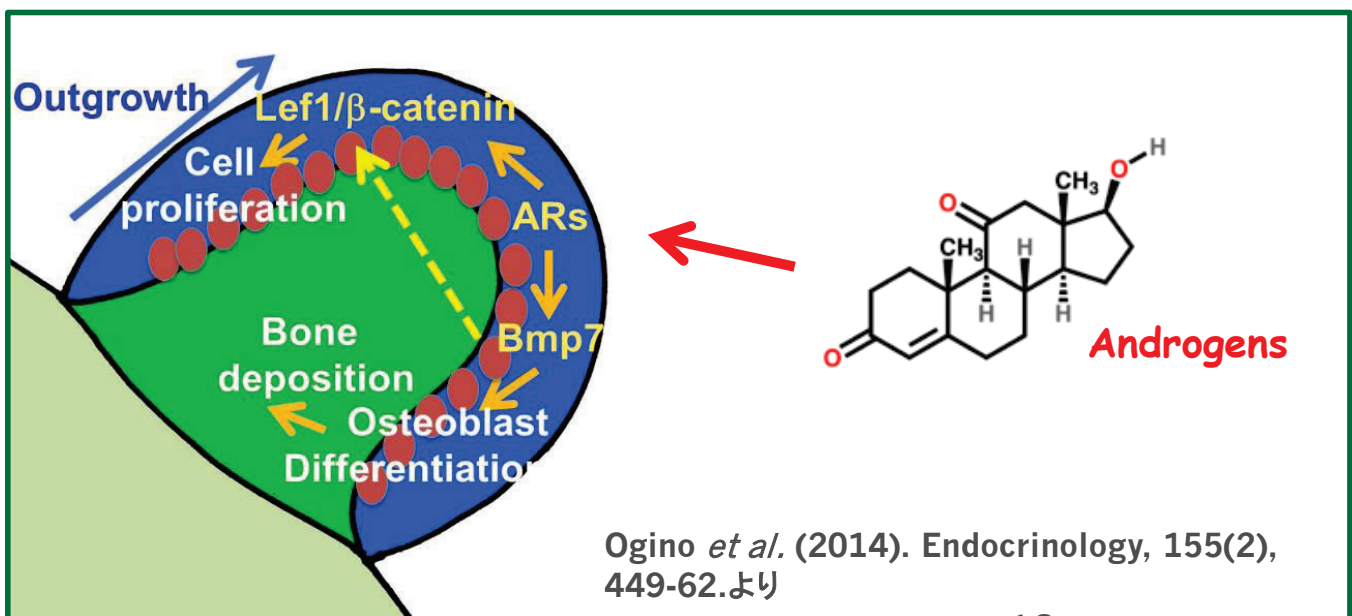
有意差なし



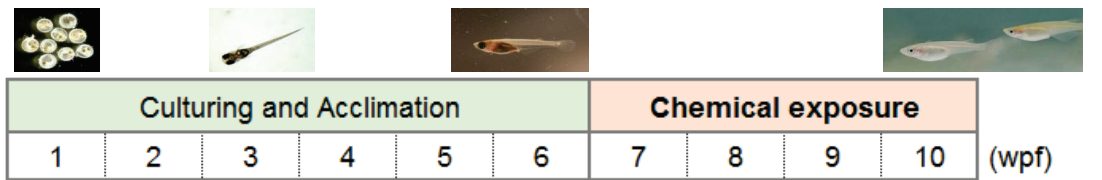
違いなし

オスのメダカ尻びれ上の乳頭状小突起の形成

- アンドロゲンが *Lef1*/ β -catenin シグナルを活性化し、骨結節を周辺の間葉系細胞の増殖に作用。
- アンドロゲンは *Bmp7* 発現を誘導し、骨形成を誘導。



Ogino *et al.* (2014). *Endocrinology*, 155(2), 449-62.より



* Fish should be acclimated for 2 weeks prior to the assay under test conditions.

Initiation of assay

juveniles at 6 wpf
(42 ± 2 dpf)

Completion of assay

Determination of
genotypic sex (*dmy* gene)

試験条件

曝露形式:	流水式(>5 換水/日)
供試生物:	メダカ(<i>Oryzias latipes</i>) (受精後6週の幼若体)
濃度区数	3 (処理区) + control
繰り返し数	4 容器/濃度区
個体数	7 頭/容器 (28頭/容器)
容器サイズ	最小1.8 L
水温	25 ± 2°C
給餌	ブラインシュリンプ, 2-3 回/day
曝露期間	28 日

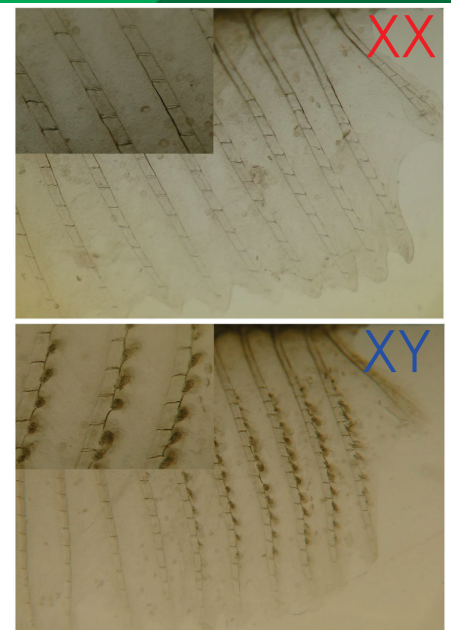
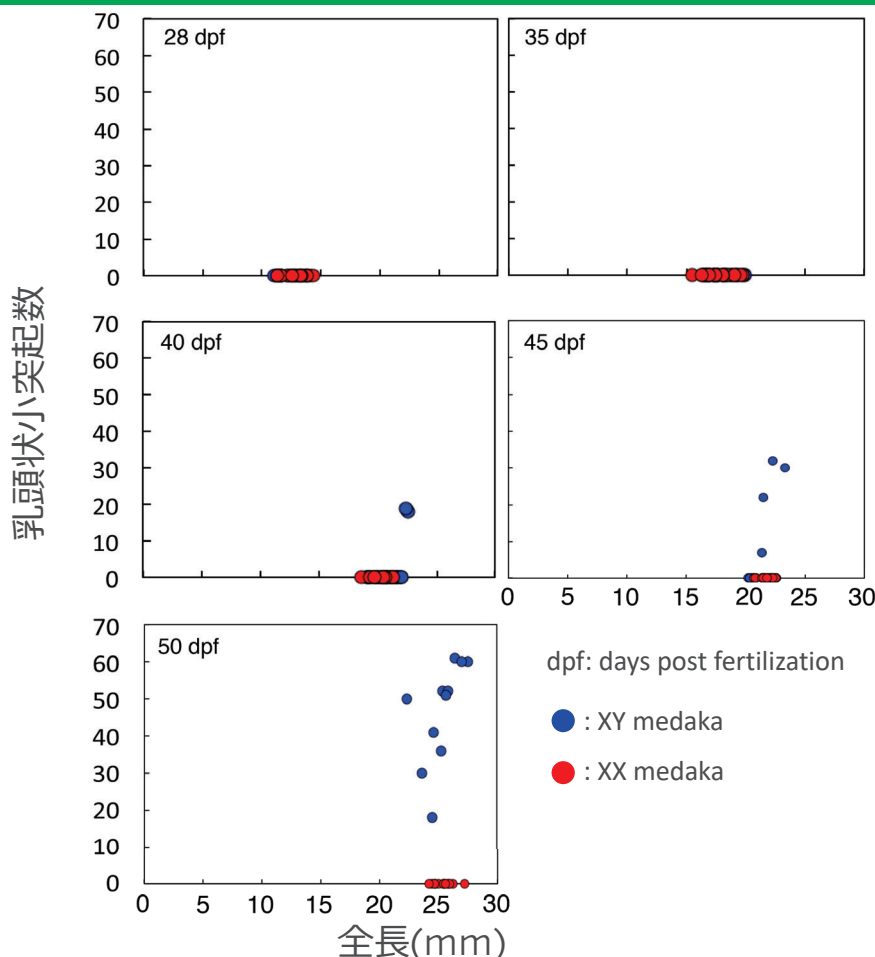
Endpoints assessment

- No. of palte with papillary process
- Vitellogenin (option)
- (growth: body length & weight)

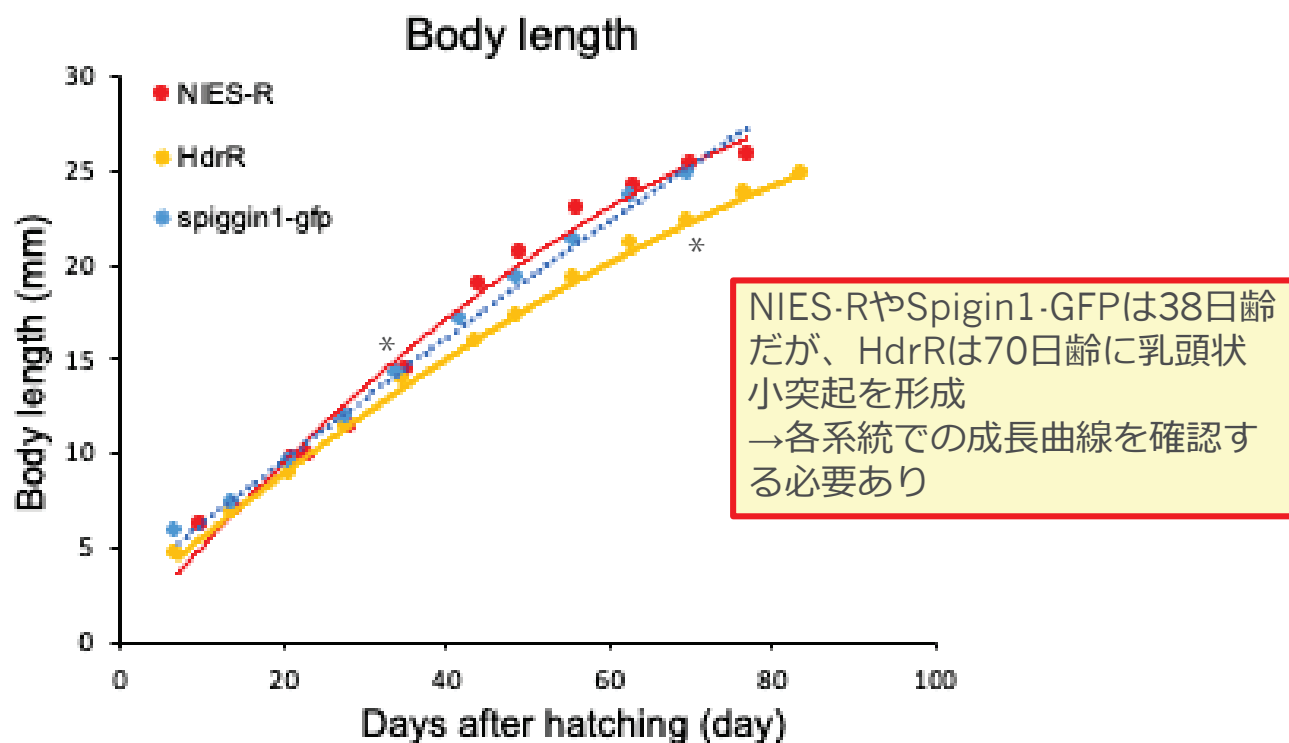
* The measurements of each endpoint are analysed based on genotypic sex.

19

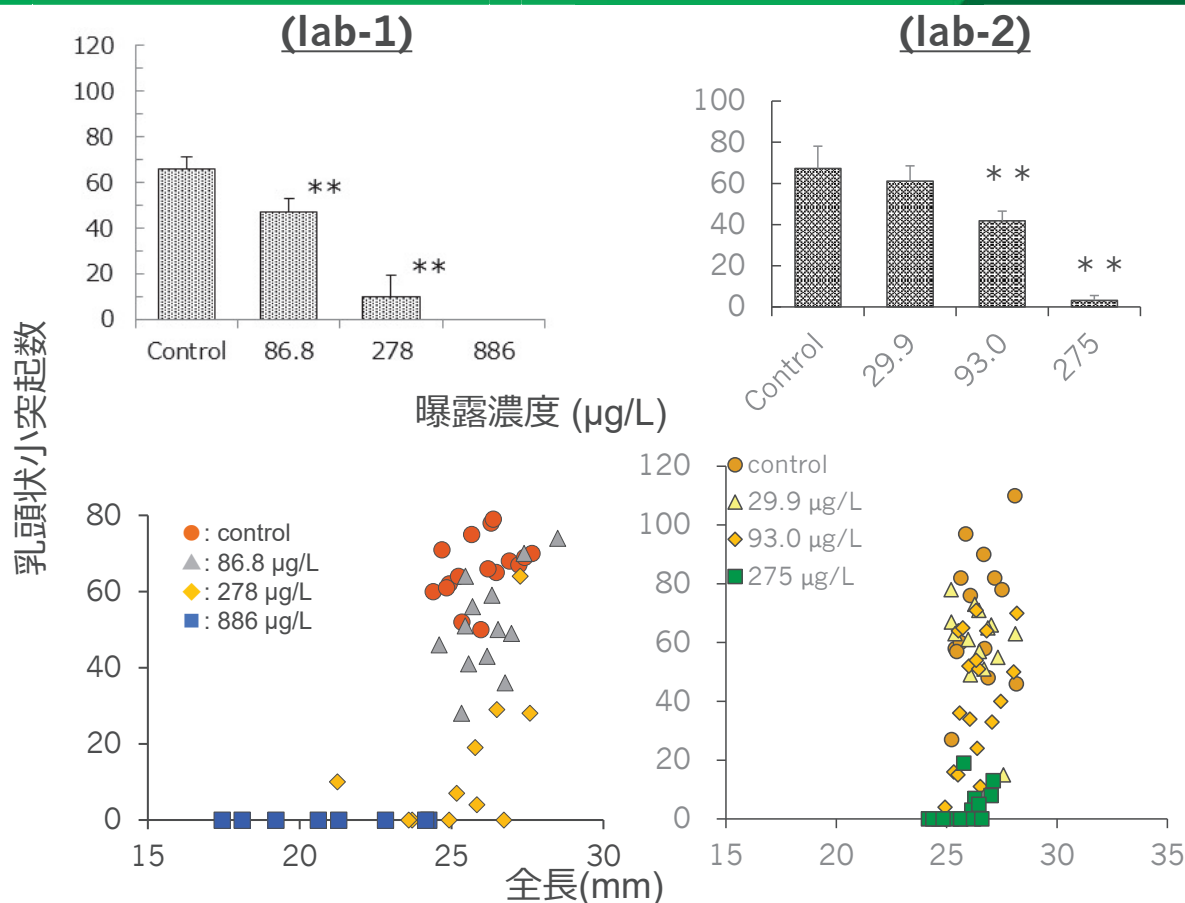
乳頭状小突起の形成過程



オスの乳頭状小突起形成
は40-45 dpf (全長21-
23 mm) から始まる



検証試験結果例 (Fenitrothion)



*In fenitrothion study (lab-1), toxicity with >30% mortality and decrease of growth was observed at 886 μg/L.

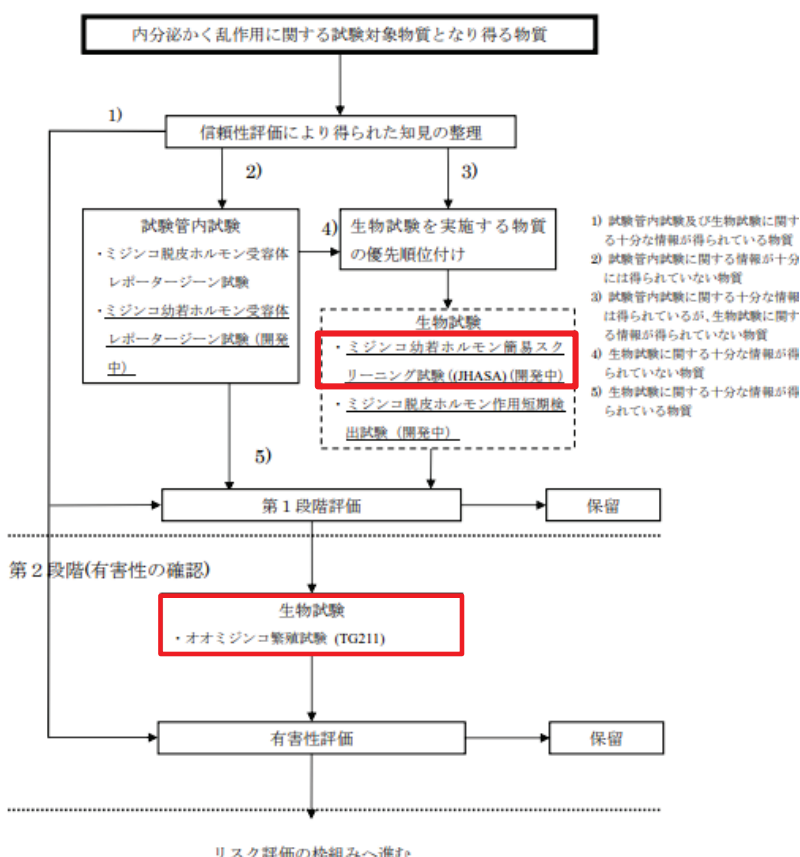
1. メダカ拡張 1 世代繁殖毒性試験(MEOGRT: OECD TG240)の改訂
2. 幼若メダカ抗アンドロゲン作用検出試験 (JMASA: OECD GD379)の開発と検証
3. ミジンコ幼若ホルモン検出試験法(JHASA: OECD TG253)の開発と検証
4. 魚類胚を用いた試験法 (RADAR: OECD TG251, REACTIV: OECD TG252)の検証
5. NAMsについて

EXTEND2022の枠組み(4)

図7 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

(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)



ミジンコ幼若ホルモン簡易スクリーニング試験 (JHASA: OECD TG253)の開発、検証

フランス、ノルウェーほか国内試験機関の協力を得て、2024年7月に公開

Test No. 253: Short-term Juvenile Hormone Activity Screening Assay using *Daphnia magna* (JHASA)

Report

: for the Testing of Chemicals, Section 2 25 June 2024

Support materials

English français

Download PDF

Cite this publication

This Test Guideline (TG) describes a short-term juvenile hormone (JH) activity screening assay using *Daphnia magna* to detect the potential of chemicals with JH activity. The JHASA was designed as a screen assay which evaluates male offspring production in the parthenogenetic daphnid.



OECD TG253 HPより

環境省との同時報道発表

トップページ > 広報活動 > 新着情報 > 2024年度 > 世界初の無脊椎動物（ミジンコ）を用いた内分泌かく乱作用検出のための国際標準化試験法－日本が取りまとめたOECDテストガイドラインが採択・公表されました－

国立研究開発法人
国立環境研究所
National Institute for Environmental Studies

2025年1月24日

世界初の無脊椎動物（ミジンコ）を用いた内分泌かく乱作用検出のための国際標準化試験法 －日本が取りまとめたOECDテストガイドラインが採択・公表されました－

(筑波研究学園都市記者会配布)



2025年1月24日（金）
国立研究開発法人国立環境研

環境省
Ministry of the Environment

本文へ >

English

キーワード検索

検索

ヘルプ

ホーム

環境省について

政策

法令

報道・広報

白書・統計

申請・手続き

報道発表資料

ホーム > 報道・広報 > 報道発表一覧 > 内分泌かく乱作用に関するOECD試験法の策定について（国際的な標準試験法の開発に対するわが国の貢献）

この記事を印刷

2025年1月24日

保護対象

内分泌かく乱作用に関するOECD試験法の策定について（国際的な標準試験法の開発に対するわが国の貢献）

To English

1. 化学物質の内分泌かく乱作用に関する環境省のプログラム（現在は「EXTEND2022」）の下で開発・検討が進められ、OECDにおいて、わが国主導で議論が行われた次の試験法が、OECDの国際標準試験法として採択されました。

・オオミジンコ幼若ホルモン作用短期スクリーニング試験（JHASA）（OECDテストガイドラインNo. 253）

2. わが国では、国立研究開発法人国立環境研究所が化学物質の生物影響に係る試験・評価手法の開発において中核的な役割を担っており、この試験法も同研究所が開発を進め、OECDにおける検討を主導してきました。

3. 環境省では、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明らかにするため、EXTEND2022の下でこれらの試験法も活用しつつ、更に試験・評価を進めます。併せて未完了の試験法の開発を進め、OECDによる標準試験法の確立に貢献します。

1. 試験法開発の背景

OECD/OCDE

253

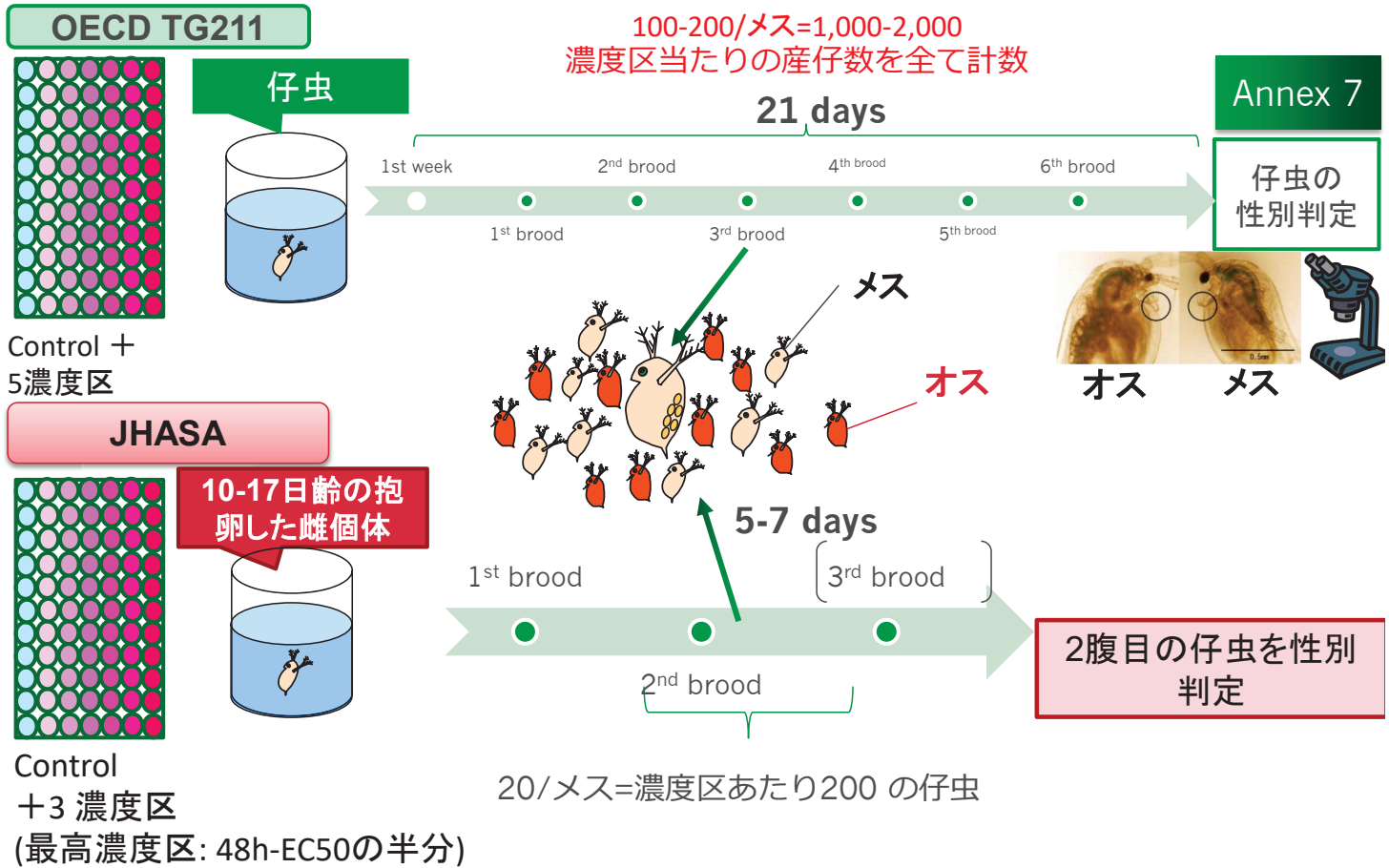
Adopted:
25 June 2024

OECD事務局の誤植修正対応により発表が遅れる

OECD GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS

Note: As of 15 January 2025, the title of Test Guideline No. 253, "Test No. 253: Short-term juvenile hormone (JH) activity screening assay in *Daphnia magna*" has been updated to "Test No. 253: Short-term Juvenile Hormone Activity Screening Assay using *Daphnia magna* (JHASA)".

Short-term Juvenile Hormone Activity Screening Assay using *Daphnia magna* (JHASA)



JHASAの検証の過程で

- JHASA 試験の検証の中では、*Daphnia magna*の2系統 (NIES-R, Clone A)が温度、硬度といったノンケミカルストレスはオスの産生などの影響を及ぼさないことがわかった。
- 一方、高密度、光周期(暗所24hなど)はオス産生を誘導することがあることを確認済

Watanabe et al. (2024) J Appl Toxicol, 44, 1914-1923.

Received: 28 June 2024 | Revised: 12 July 2024 | Accepted: 15 July 2024
DOI: 10.1002/jat.4678

RESEARCH ARTICLE

Journal of Applied Toxicology WILEY

Non-chemical stresses do not strongly induce male offspring in *Daphnia magna* ascertained using the short-term juvenile hormone activity screening assay

Haruna Watanabe¹ | Ryoko Abe¹ | Norihisa Tatarazako² | Hiroshi Yamamoto¹

¹Health and Environmental Risk Division, National Institute for Environmental Studies, Tsukuba, Ibaraki, Japan

²Department of Science and Technology for Biological Resources and Environment, Graduate School of Agriculture, Ehime

Abstract

Juvenile hormone (JH), together with ecdysone, regulates molting, metamorphosis, growth, and reproduction in arthropods. The effects of its analogs used as insecticides on nontarget species are of concern. Since JH and JH analogs (JHAs) induce male offspring in daphnids, which generally reproduce by parthenogenesis, short-term JH activity screening assay (JHASA) using the male offspring ratio as an endpoint has been developed as a detection method for JHA. However, the production of male offspring is also induced by environmental stresses such as temperature, short-day length, overcrowding, and food limitation. Thus, it is vital to prevent non-chemical stresses from inducing male offspring during the test to detect chemicals with potential JH activity accurately. Therefore, we investigated the effects of temperature (low and high), hardness, high density with low feeding, and day length on male production utilizing JHASA. Male offspring were not strongly induced by any stresses in JHASA, although the male ratio of 4.42% was observed in the

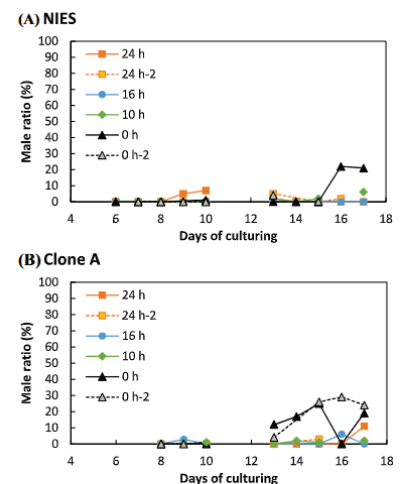


FIGURE 2 Male ratio (%) of offspring from the cultures of (a) NIES and (b) Clone A strains on each day under different photoperiods (0, 10, 16, and 24 h light). The days without plots after the 8th day indicate those without observations. The experiments of cultures under 0 and 24 h of light were conducted twice.

表 1 EXTEND2010 及び EXTEND2016 における試験法開発の進捗状況

区分 検出可能な作用	第 1 段階試験管内試験 (スクリーニング試験)	第 1 段階生物試験 (スクリーニング試験)	第 2 段階生物試験 (確定試験)
エストロゲン様作用 抗エストロゲン様作用	◎メダカエストロゲン受容体 α レポーター遺伝子試験	◎メダカを用いた魚類短期繁殖試験 (OECD TG229)	◎メダカ拡張 1 世代繁殖試験 (OECD TG240, MEOGRT)
アンドロゲン様作用	◎メダカアンドロゲン受容体 β レポーター遺伝子試験	◎メダカを用いた魚類短期繁殖試験 (OECD TG229)	◎メダカ拡張 1 世代繁殖試験 (OECD TG240, MEOGRT)
抗アンドロゲン様作用	◎メダカアンドロゲン受容体 β レポーター遺伝子試験	○幼若メダカ抗アンドロゲン作用検出試験 JMASA (OECD GD379)	◎メダカ拡張 1 世代繁殖試験 (OECD TG240, MEOGRT)
甲状腺ホルモン様作用 抗甲状腺ホルモン様作用	◎ニシツメガエル甲状腺ホルモン受容体 β レポーター遺伝子試験	◎両生類変態試験 (OECD TG231, AMA)	◎幼生期両生類成長発達試験 (OECD TG241, LAGDA)
幼若ホルモン様作用 抗幼若ホルモン様作用	◎ミジンコ幼若ホルモン受容体レポーター遺伝子試験	○ミジンコ幼若ホルモン簡易スクリーニング試験 JHASA (OECD TG253)	◎オオミジンコ繁殖試験 (OECD TG211 ANNEX7) ▽ミジンコ多世代試験
脱皮ホルモン様作用 抗脱皮ホルモン様作用	◎ミジンコ脱皮ホルモン受容体レポーター遺伝子試験	△ミジンコ脱皮ホルモン作用検出試験	◎オオミジンコ繁殖試験 (OECD TG211) 検証中 ▽ミジンコ多世代試験

注：◎開発済み、○開発中（完成間近）、△開発中、▽不採用

概要

1. メダカ拡張 1 世代繁殖毒性試験(MEOGRT: OECD TG240)の改訂

2. 幼若メダカ抗アンドロゲン作用検出試験 (JMASA: OECD GD379)の開発と検証

3. ミジンコ幼若ホルモン検出試験法(JHASA: OECD TG253)の開発と検証

4. 魚類胚を用いた試験法 (RADAR: OECD TG251, REACTIV: OECD TG252)の検証

5. NAMsについて

- 欧州を中心にした動物福祉(Animal Welfare)の広がり、化粧品の動物実験の禁止にとどまらず、欧米では魚類もその対象となっている。
- 魚類急性毒性試験(OECD TG203)の代替としての魚類胚毒性試験(FET: OECD TG236) の提案・承認と、OECD TG203への瀕死症状(Moribundity)の概念が導入された。
- ニジマスエラ細胞(RTGillW1: OECD TG249)が採択され、TG203の代替に向けた議論が進む。
- 内分泌かく乱作用についても、動物福祉の概念にそって遺伝子導入した魚類胚を用いた試験の検証が進み、魚類胚を用いた3試験法（**特にメダカを用いた2試験法**）が**OECDで採択**された。

形質転換魚類胚を用いた試験の位置づけ

OECDの内分泌かく乱評価の
Level 3試験として、EASZY
(TG250)、**RADAR (TG251)**、
REACTIV (TG252) などの
アッセイ系が採択



OECD Series on Testing and Assessment



**Revised Guidance
Document 150 on Standardised
Test Guidelines for Evaluating
Chemicals for Endocrine
Disruption**



Level 3（特異的な 内分泌かく乱作用の 検出試験）

Level 4（内分泌か く乱作用に関連する 複数のエンドポイン トに基づく有害影響 データを提供する試 験）

Level 5（生物のラ イフサイクルの全体 を網羅した有害影響 に関するより包括的 なデータを提供する 試験）

JMASA, JHASA

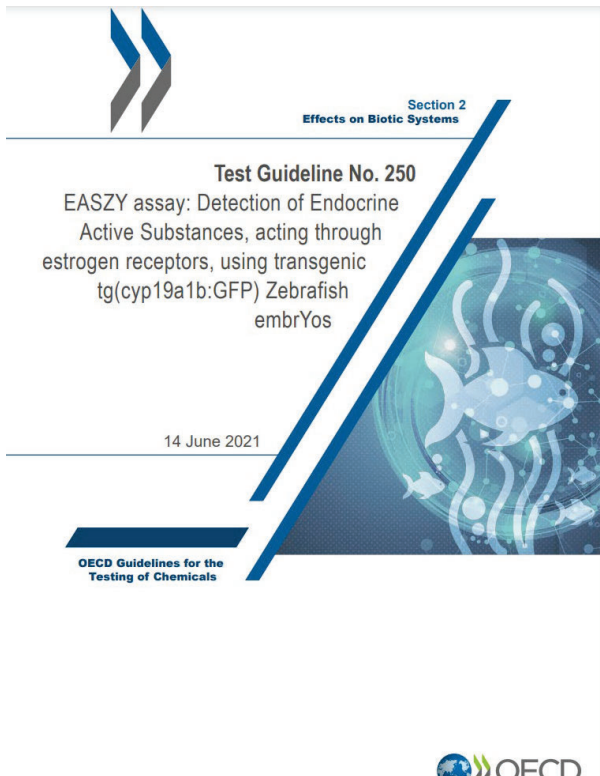
Non Mammalian Toxicology

- Amphibian metamorphosis assay (OECD [TG 231](#)).
- Fish short-term reproduction assay (FSTRA) (OECD [TG 229](#)).
- 21-day fish assay (OECD [TG 230](#)).
- Androgenized female stickleback screen (AFSS) (OECD [GD 148](#)).
- EASZY Assay: Detection of Substances Acting through Estrogen Receptors using Transgenic cyp19a1b GFP Zebrafish Embryos (draft OECD TG).
- Xenopus embryonic thyroid signalling assay (XETA) (draft OECD TG).
- Juvenile medaka anti-androgen screening assay (JMASA) (draft OECD GD).
- Short-term juvenile hormone activity screening assay using Daphnia magna (draft OECD TG).
- Rapid androgen disruption adverse outcome reporter (RADAR) assay (draft OECD TG).
- Fish sexual development test (FSDT) (OECD [TG 234](#)).
- Larval Amphibian Growth & Development Assay (LAGDA) (OECD [TG 241](#)).
- Avian Reproduction Assay (OECD [TG 206](#)).
- Fish early life stage (FELS) toxicity test (OECD [TG 210](#)).
- New guidance document on harpacticoid copepod development and reproduction test with Amphiscus (OECD [GD 201](#)).
- Potamopyrgus antipodarum reproduction test (OECD [TG 242](#)).
- Lymnaea stagnalis reproduction test (OECD [TG 243](#)).
- Chironomid Toxicity Test ([TG 218](#) & [TG 219](#)).
- Daphnia Magna reproduction test (with male induction) (OECD [TG 211](#)).
- Earthworm Reproduction Test (OECD [TG 222](#)).
- Enchytraeid Reproduction Test (OECD [TG 220](#)).
- Sediment Water Lumbriculus Toxicity Test Using Spiked Sediment (OECD [TG 225](#)).
- Predatory mite reproduction test in soil (OECD [TG 226](#)).
- Collembolan Reproduction Test in Soil (OECD [TG 232](#)).

TG211

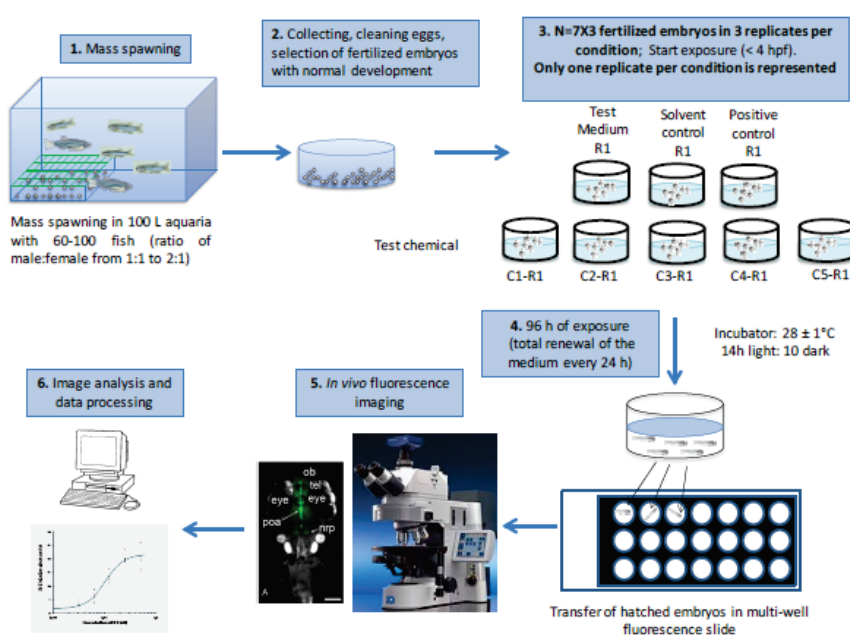
- Fish Life Cycle Toxicity Test (FLCTT) (US EPA TG OPPTS 850.1500).
- Medaka Extended One-Generation Reproduction Test (MEOGRT) (OECD [TG 240](#)).
- Avian two-generation toxicity test in the Japanese quail (ATGT) (US EPA TG OCSP 890.2100/740-C-15-003).
- Sediment Water Chironomid Life Cycle Toxicity Test (OECD [TG 233](#)).
- Daphnia Multigeneration test for assessment of EDCs (draft OECD TG).
- Zebrafish extended one-generation reproduction test (ZEOGRT) (draft OECD TG).

MEOGRT



- EASZY (detection of Endocrine Active Substances, acting through estrogen receptors, using transgenic cyp19a1b-GFP Zebrafish embryos) アッセイ
- 2021年に採択
- 硬骨魚類の脳や生殖腺において主要なエストロゲン合成酵素である cyp19a1b (アロマターゼB) プロモーターによって、GFP (緑色蛍光タンパク) が発現するトランスジェニックゼブラフィッシュを利用する手法

OECD TG 250 (2)



- フランスのINERIS (国立産業環境・リスク研究所) のBrionらによって提案された手法
- エストロゲン様作用を有する化学物質を胚に5日間曝露することで、脳の放射状グリア細胞に発色
- 受精後4時間以内の胚を使い、n = 20個で96時間の曝露、結晶皿上で毎日換水し、試験後には蛍光顕微鏡で画像解析
- 96時間曝露、24時間おきに換水 (FETとほぼ同様)



Section 2 Effects on Biotic Systems

Test Guideline No. 251
Rapid Androgen Disruption Activity
Reporter (RADAR) assay

30 June 2022

OECD Guidelines for the
Testing of Chemicals



- Rapid Androgen Activity Reporter (RADAR) Assay
- (抗) 男性ホルモン作用物質の検出に利用



OECD TG 251 (2)

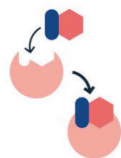
フランス (WatchFrog社) の提案 (井口先生らと共同開発)

Key event

Modes of actions

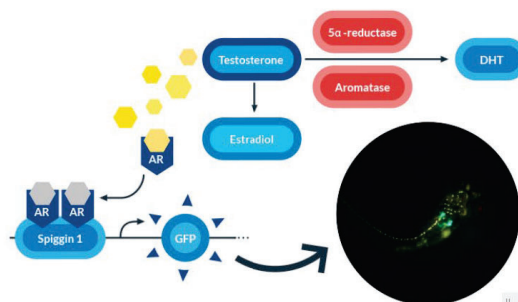


OECD physiological criterion: Spiggin production in the Three Spined Stickleback



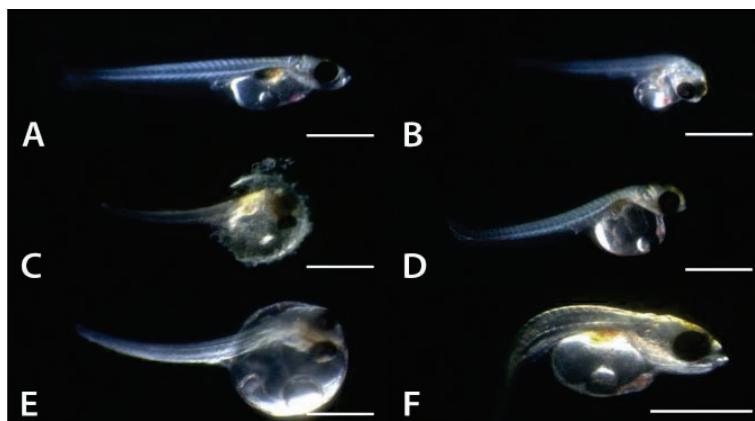
Provide additional information to authorities to assess MOA

イトヨのオス特有のスピギンタンパクと蛍光タンパクの遺伝子(spg1-gfp)を導入したメダカ胚仔魚の試験



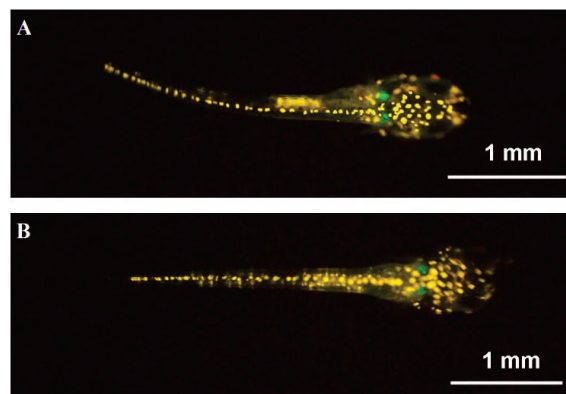
Watchfrog社HPより
(https://www.watchfrog.fr/en/test_androgenique.php)





孵化後1日以内の卵黄が残った胚
仔魚 (eleutheroembryo)に6穴プ
レート上で72時間曝露

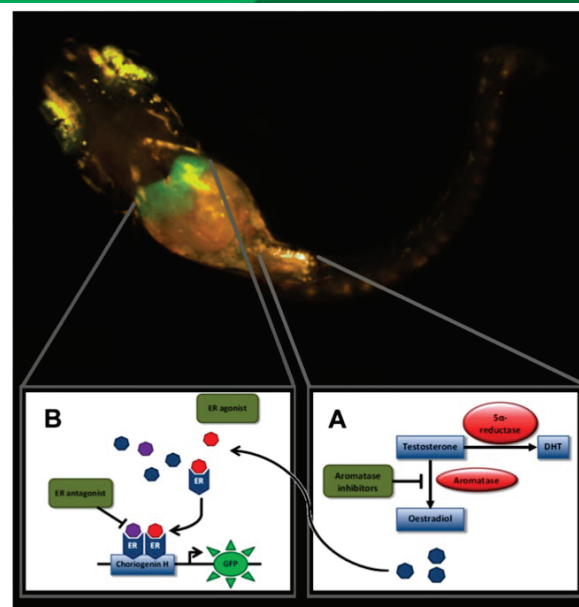
Dorsal view (背側) からの撮影で、
蛍光顕微鏡+画像解析を実施



OECD TG252 (1)

The rapid estrogen activity In Vivo
(REACTIV) assay for detecting estrogen
axis active chemicals

コリオジェニン・蛍光タンパク *chgh-gfp*
を導入したメダカの胚・仔魚の蛍光顕
微鏡を用いた画像解析によって (抗)
エストロゲン活性を有する物質やアロ
マターゼ阻害物質などを検出する手法



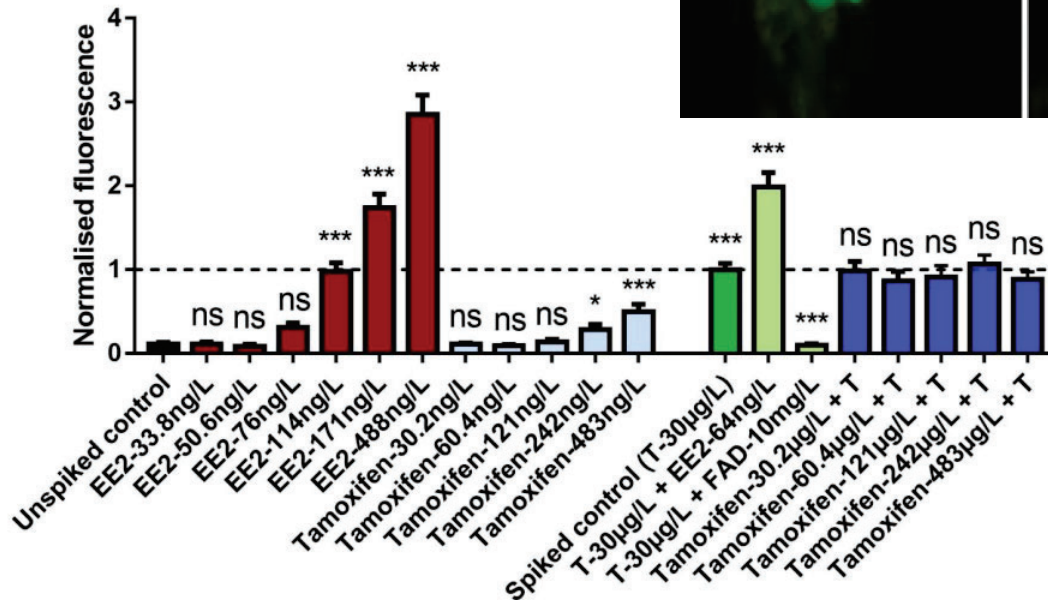
Section 2
Effects on Biotic Systems

Test Guideline No. 252 Rapid
Estrogen Activity *In Vivo*
(REACTIV) assay

25 June 2024

フランスからの提案で、主要なリングテストパートナーとして日本も国立環境研究所で検証試験を実施し、その結果を報告。多数のコメントがあったが、無事、2024年に修正・採択された

Tamoxifen



概要

1. メダカ拡張 1 世代繁殖毒性試験(MEOGRT: OECD TG240)の改訂
2. 幼若メダカ抗アンドロゲン作用検出試験 (JMASA: OECD GD379)の開発と検証
3. ミジンコ幼若ホルモン検出試験法(JHASA: OECD TG253)の開発と検証
4. 魚類胚を用いた試験法 (RADAR: OECD TG251, REACTIV: OECD TG252)の検証
5. NAMsについて

おわりに

本方針は、令和4年度から令和12年度（2030年度）に及ぶ期間を念頭に置いて、化学物質の内分泌かく乱作用に関する環境省としての対応の方向性をまとめたものである。

新たなプログラムである EXTEND2022 では、先行した EXTEND2010 及び EXTEND2016 の基本的理念を踏襲した上で、用いるべき試験法を完成させ、確立された新しい試験法を用いた試験・評価に乗り出すことも含め試験・評価の加速化を図る点は、これまでのアプローチの延長上に位置付けられる。その上で、検討対象物質として農薬、医薬品をはじめとする PPCPs 等を積極的に取り上げること、欧米で研究が進む新たな評価手法（NAMs）の活用方策を検討すること、リスク管理に係る制度下の評価体系における活用を念頭に置いた内分泌かく乱作用に関する評価の方策の提案を目指すことなど、新たな課題に取り組むこととした。これらを本プログラムにおいて達成すべく対応を進めていきたい。

New Approach Methodologies (NAMs)とは？

The definition of NAMs has evolved over time. Currently, it is broadly descriptive reference to any **non Vertebrate Animals technology, methodology, approach, or combination thereof that can be used to provide information on chemical hazard and risk assessment**. NAMs are functionally equivalent to “alternatives” to mammal testing.

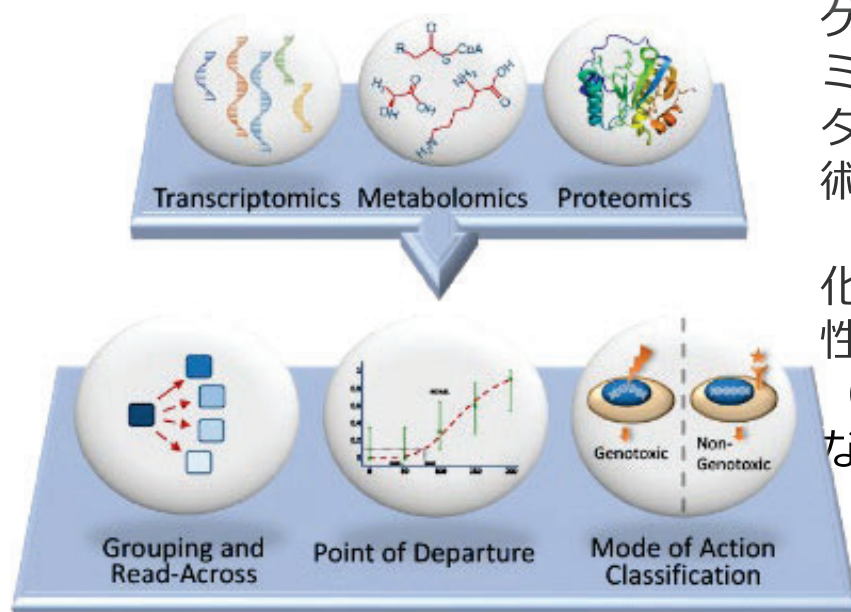
NAMsの定義は時間とともに進化
現時点では、化学物質の有害性やリスク
評価に提供することができる情報のうち、
「脊椎動物を使わないあらゆる技術、手
法、アプローチ、ないしその組合せ」を
指す

各種OMICsからin vitro試験、in silico解
析(QSARやリードアクロスなど) まで



USEPA NAMsウェブサイトより





ゲノミクス、トランスクリプトミクス、プロテオミクス、メタボロミクスなどのOMICs技術は、

化学物質のグルーピングや毒性の基準となる定量的出発点 (PoD)、作用機序(MoA)分類などへの利用が進んでいる

OECD ESCA



OECDでは、これまでAOP作成などを実施してきたEAGMSTを改組

Omicなど各種NAMsの試験法ガイドラインなど標準化に基づく有害性評価を検討するためのESCA (Emerging Science in Chemicals Assessment) Advisory Groupが2024年に発足

Transcriptomeの標準化など各種プロジェクトが検討開始
(2025年3月31日に開催予定)

1. メダカ拡張 1 世代繁殖毒性試験(MEOGRT: OECD TG240)の改訂
2. 幼若メダカ抗アンドロゲン作用検出試験 (JMASA: OECD GD379)の開発と検証
3. ミジンコ幼若ホルモン検出試験法(JHASA: OECD TG253)の開発と検証
4. 魚類胚を用いた試験法 (RADAR: OECD TG251, REACTIV: OECD TG252)の検証
5. NAMsについて

謝辞

多くの成果は環境省請負業務「化学物質の内分泌かく乱作用に関する試験法の開発」の業務の一環で実施されました。

国内外のリングテストにご参加いただいた各機関に感謝申し上げます。

井口先生、鑪迫先生ほか、国立環境研究所環境リスク・健康領域生態毒性研究室（渡部春奈主任研究員ほか）、環境リスク科学研究推進室生態毒性標準チーム（山岸隆博主任研究員ほか）にも深く感謝申し上げます。