

令和6年度化学物質の内分泌かく乱作用に関する公開セミナー
@WEB（令和7年3月11日）

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



よろしくお願いいたします。皆さん、こんにちは。国立環境研究所の山本です。過分な御紹介を頂きまして、どうもありがとうございます。

簡単な自己紹介

- 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



既にもう御紹介していただいているのですが、私、昨年の4月から国立環境研究所の環境リスク・健康領域の領域長を拝命しておりまして、もともとは生態毒性研究室長ということで、主に化学物質の水生生物を用いた安全性評価に関連するような研究に従事しておりましたが、より重要な立場、化学物質管理全体を見るような立場に4月以降なっています。先ほども御紹介いただきましたが、化審法、農取法、内分泌かく乱等の環境省の化学物質管理にも深く関わらせていただいているところです。

先ほど井口先生から御紹介がありましたが、国立環境研究所では、こういった化学物質の内分泌かく乱作用の検出に関連するような試験法の開発に携わっておりまして、そういった内容について今日はお話をさせていただこうと考えております。

ただ、これは主に私の前任者であります愛媛大学に異動されました鐘迫先生が中心になってやられていたものを私自身は7年ほど前に引き継いだものですので、それ以前の大きな貢献があってこそ私たちの現在の国立環境研究所でのこういった研究、それから試験法開発業務ができていると考えておりまして、この場を借りて感謝を申し上げたいと思います。

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

今日の御紹介する内容については、既に先ほど井口先生から御紹介がありましたが、我々の国立環境研究所で実施してきた水生生物を用いた内分泌かく乱化学物質の検出試験法の開発ということで、主にメダカとオオミジンコを用いた試験法の開発状況についてお話をさせていただきます。

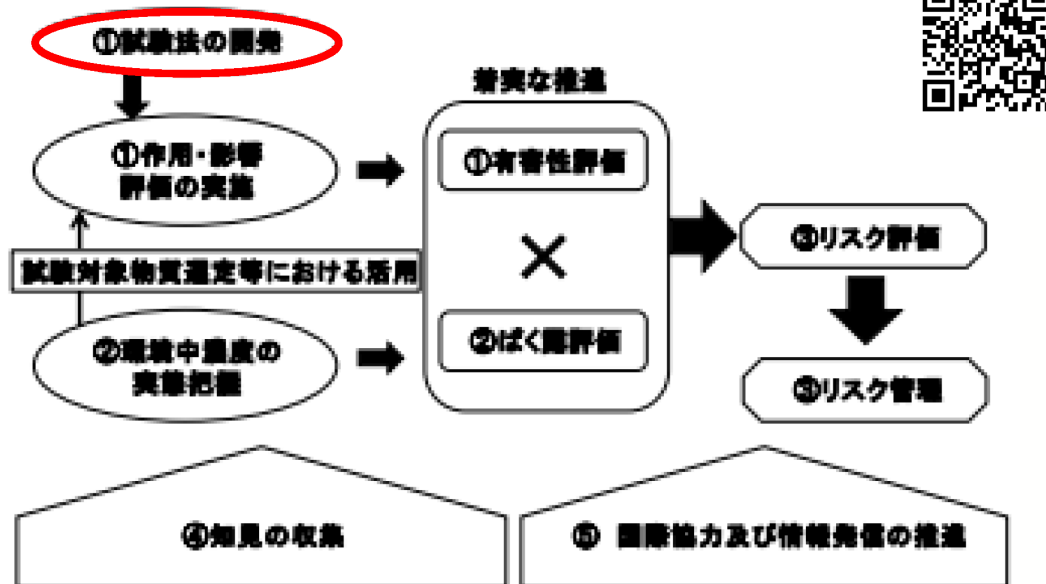
私自身は、こちらの EXTEND の講演会で 4 年ほど前に一度お話をさせていただく機会を与えていただきまして、それ以降に実施した主な内容について今回は御紹介をさせていただこうと考えております。

既に先ほど井口先生から概要についてはお話を頂きましたので、より詳細な部分について OECD の試験法開発の状況についてお話をさせていただこうと思います。

まず最初に、こちらのメダカの拡張 1 世代繁殖試験 (MEOGRT) TG240 番、2015 年にアメリカとともに開発したものが承認されていますが、その改訂作業について少し携わってききましたので、少しだけ御紹介をさせていただきます。

EXTEND2022の枠組み(1)

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

その前に、EXTEND の枠組みにつきましては、これはおそらく後で環境省の山崎様あるいは日本エヌ・ユー・エスの川嶋様からお話があるかなと思いますが、これまで EXTEND2005、2010、2016、2022 とおおむね同じような枠組みでやってきましたが、一つの重要な観点といたしまして、こういった内分泌かく乱作用を有する化学物質の検出のための試験法の開発というのがありまして、こちらは SPEED 以降国立環境研究所の鎌迫先生を中心に実施されていたところが、井口先生の御指導の下やってきたことが最終的に現在、国際的にもこの分野で世界をリードするという結果になっているのではないかなと思います。

この EXTEND の中で我々はこの試験法の開発のところを担当しておりまして、その部分について最新、ここ 3～4 年ぐらいの知見について御紹介をさせていただくということなので、最初にこのスライドを出させていただきました。

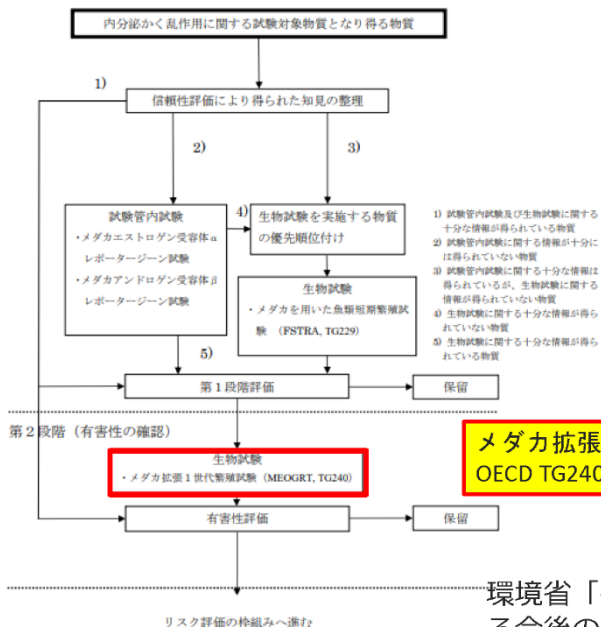
EXTEND2022の枠組み(2)

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)



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

また、枠組みについても、それぞれの作用ごとに EXTEND についてはこういったワークフローができておりまして、これについてはおそらくこの後山崎様から詳細がありますので、私としてはごく簡単にですけれども、エストロゲンとかアンドロゲン、女性ホルモン、男性ホルモン様作用、こういったような物質の検出、あるいは抗エストロゲン作用といったもの、あるいは抗アンドロゲン作用がありますが、こういったものを最終的な検出の試験法として第1段階、第2段階と段階的に評価しますが、第2段階の試験法としてこの EXTEND の中で開発されたのがこの MEOGRT (OECD TG240) ということになります。

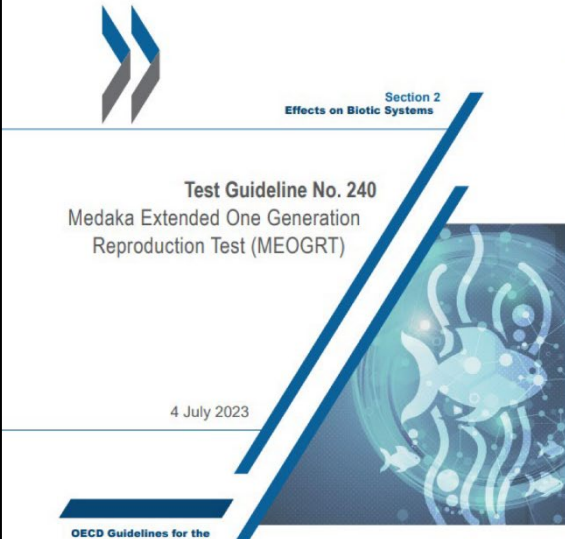
これは「メダカ拡張1世代繁殖試験」と言いますが、もともとは多世代試験、3世代にわたる試験でして、この試験法の開発というのが重要なキーであったと言えます。

このメダカを利用するということに対しての重要性については、既に井口先生からお話しいただきましたが、小型魚類の中でも性決定遺伝子が明らかになっている希少な種であるメダカを活用して、この性ホルモンをかく乱するような化学物質を検出するような試験法になっています。

OECD TG240改訂版

National Institute for
Environmental
Studies, Japan

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





このTG240はもともと2015年に採択されたとお話しさせていただきましたが、日本、アメリカの協力の下に先ほど井口先生にお話しいただいたような形で2015年にTG240が採択されていますが、その後EXTENDで利用されていく中で統計解析部分や一部間違いが見つかってきたということで、そのあたりを米国と協議しながら改訂作業を行ってきました。それについては、2023年4月のOECDの会議で承認されて、6月に公開されています。こちらについてはQRコードもありますので、もし御興味がありましたら御確認いただければと思います。

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					

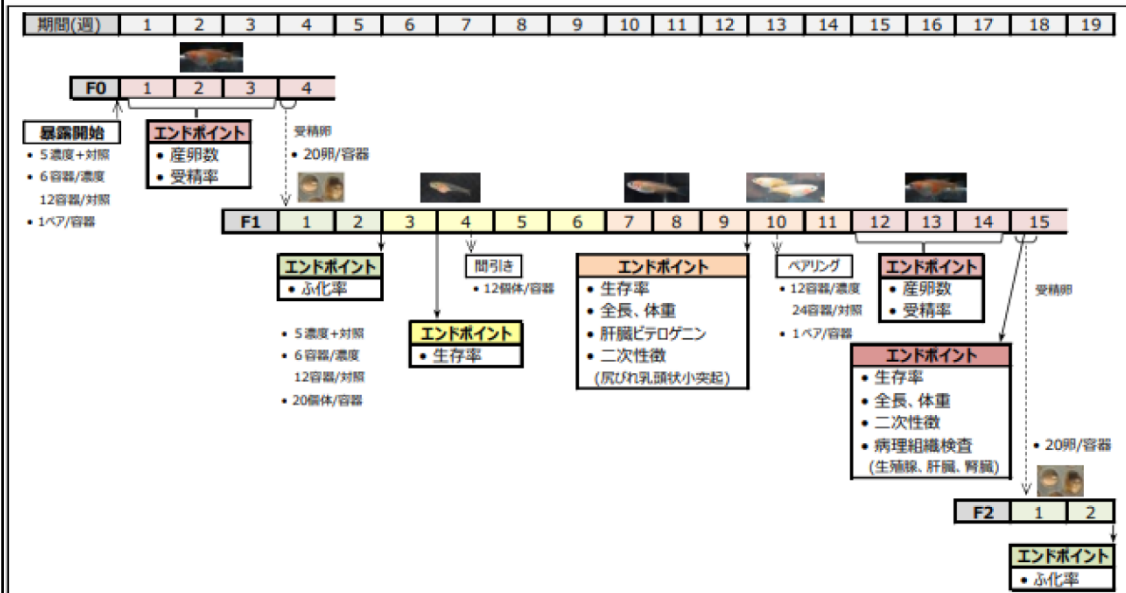
a: 表現型・生殖腺・二次性徴（オスの尻びれの乳頭状小突起）の確認、^b 最初の産卵まで。カッコ内はOECD TG240 では義務付けられていないものの本試験で実施したもの。

^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。

MEOGRT という試験自身については、もしかしたらよく御存じの方がおられるかもしれませんが、3 世代にわたる試験ということで、F0 世代の親に対して曝露しまして、その産卵をして、その産卵した卵を回収します。その卵をふ化、それから性発達をして二次性徴後また産卵をしまして、この産卵数を確認すると。ここが主要なエンドポイントになっていると。

また、その回収した胚についてのふ化のところまでを見るというような 3 世代にわたる試験ですが、1 世代のライフサイクルの試験の拡張型ということで「拡張 1 世代繁殖試験」と言われています。

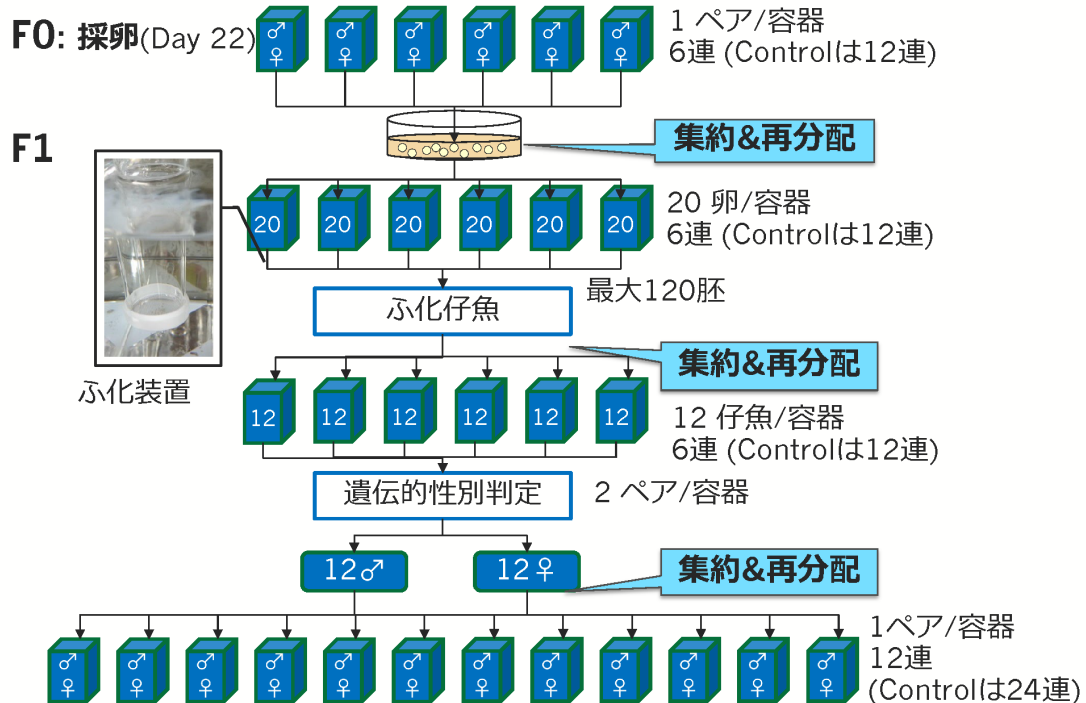
MEOGRT試験のタイムライン



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

もう少し分かりやすく書かせていただきますと、これは EXTEND のサイトのホームページにありますけれども、F0 世代の卵を取ってこの卵を回収し、ここのマターナルトランスファーと言われている母体から胚への移行について十分検討できることで高感度な試験を実現するということが分かっています。その回収した胚について産卵まで持っていって、その後、胚のふ化まで見るということですが、主要なエンドポイントはやはりここの F1 世代、2 世代目のところの産卵ということになります。

各連の集約と再分配



これは非常に複雑な試験でして、F0 世代のところでは各濃度区に対して 6 ペアを作成する、Control、対照区については 12 ペアを用意して、5 濃度区ですので合計でもかなりの量のものを実施するということになります。42 になります。

それから、それをまた回収した胚を集約して再分配した後、20 卵について分けて、同じようにふ化についても集約・再分配して、最終的にはこの F1 世代の繁殖については各濃度区 12 ペア、対照区については 24 ペアと非常に多くの産卵を見るような試験で、非常に感度の高い試験として知られています。

NIESの流水式曝露装置



- 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: $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$
- 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)



それを実現するのが、この連続の流水式曝露装置でして、これは国立環境研究所にあるものの写真ですけれども、内分泌かく乱化学物質に対応するような形で全面ガラスの水槽、それからステンレス製の容器で構成されておりまして、連続的に曝露した飼育溶液を供給するようなシステムになっております。1日5換水するような形になっています。

MEOGRT試験の結果

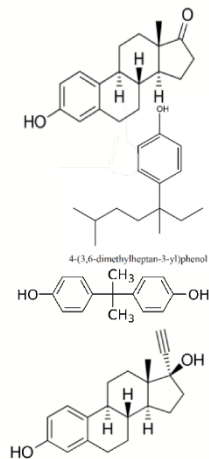
付表 2-3 第2段階生物試験 (MEOGRT, OECD TG240) の結果概要

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



既にもう試験については先ほど井口先生から御紹介がありましたが、おそらくこの後最後のところで川嶋様から御紹介があるのではないかなと思いますけれども、EXTEND の報告書の中では 6 物質、その後 2 物質で合計 8 物質の結果について出ておりまして、多くについてはもう既にその結果について公表されているということになります。このうち、4 物質について国立環境研究所で実施させていただいたということでここでは御紹介をさせていただきます。

概要

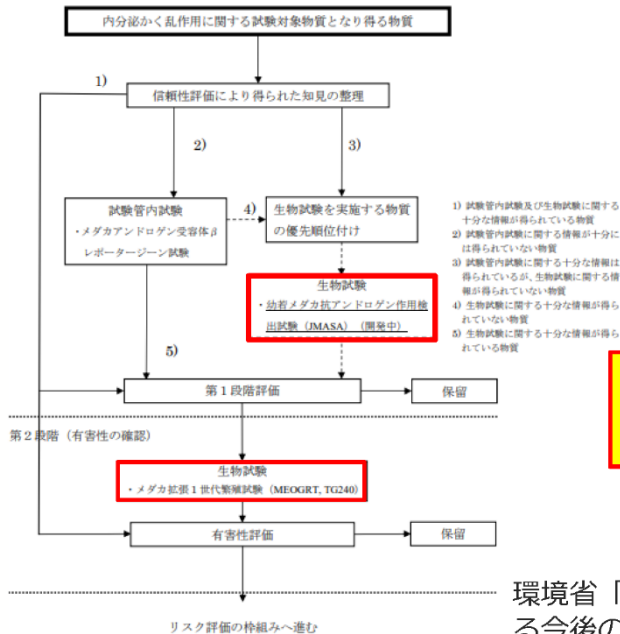
1. メダカ拡張 1 世代繁殖毒性試験(MEOGRT: OECD TG240)の改訂
2. 幼若メダカ抗アンドロゲン作用検出試験 (JMASA: OECD GD379)の開発と検証
3. ミジンコ幼若ホルモン検出試験法(JHASA: OECD TG253)の開発と検証
4. 魚類胚を用いた試験法 (RADAR: OECD TG251, REACTIV: OECD TG252)の検証
5. NAMsについて

続いてありますが幼若メダカ抗アンドロゲン作用検出試験ということになります。

EXTEND2022の枠組み(3)

図5 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
(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)



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

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

これも EXTEND の枠組みの中でエストロゲン、女性ホルモン様作用を持つ物質やアンドロゲン、男性ホルモン様作用を持つ物質、それから抗エストロゲンですね。こちらについては検出試験法が先ほどのフローで行けたのですが、こちらの抗アンドロゲン、男性ホルモンを抑えるような働きを持つ物質については、いわゆる短期の繁殖毒性試験 TG229 ではあまり評価できないということが分かってきまして、繁殖の影響だとか二次性徴の影響をちゃんと見られないと。そのための試験法を開発しようということで進めてきたものになります。

第1段階の試験ですので、これと先ほどの 229 番、短期の繁殖毒性試験とを組み合わせるような形で抗男性ホルモン様作用の物質を検出するという方法で、これは 2016 年ごろに提案をされて、その検証を我々のグループでやらせていただきました。



14

環境省との同時報道発表



16

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)



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

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

報道発表資料

ホーム

報道・広報

報道発表一覧

2023年09月14日

環境省

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）

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3つの化学試験法が、OECDの国際標準試験法として採択された。本年7月に公開されました。

・メダカ胚毒1世代繁殖試験（OECDガイドラインNo. 240）改定

・幼体メダカアンドロゲン作用繁殖試験（AMASA）（OECDガイドライン文書）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の中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。併せて未作成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. 試験法要約の巻頭

(EXTEND2022に至る環境省のプログラム)

報道発表も既に国立環境研究所、環境省とで同時に発表をさせていただいております。これについてもホームページ上にありますので、もしよろしければ御確認いただければと思います。

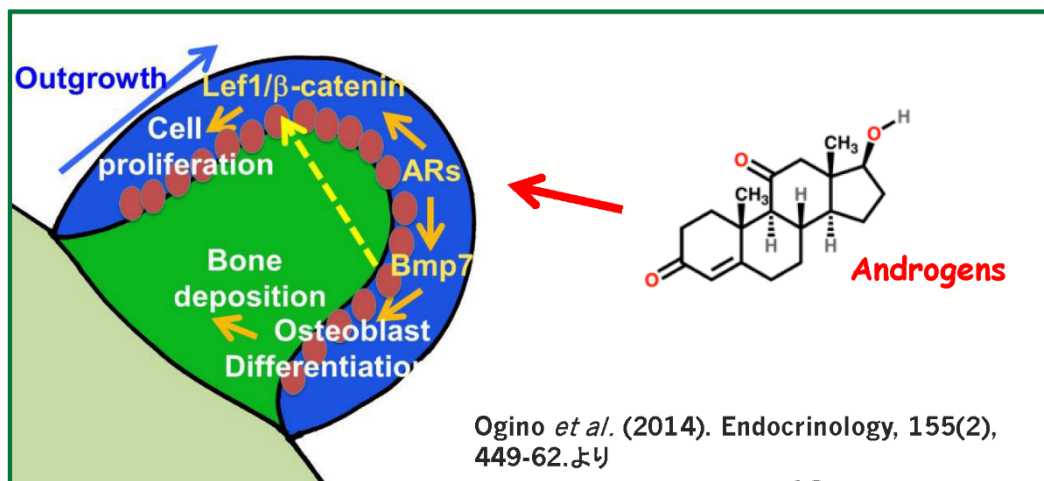
15

幼若メダカ抗アンドロゲン作用検出試験 (JMASA)



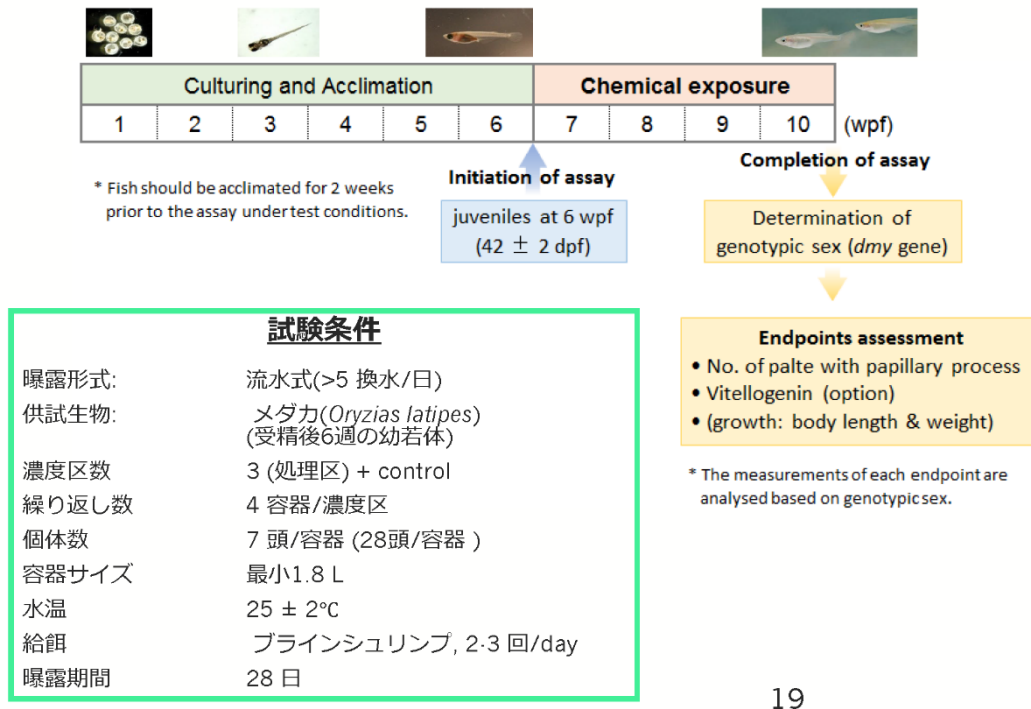
こういったざっとした話をさせていただきましたが、先ほどのお話に戻らせていただきますと、TG229 というのは短期の繁殖毒性試験で、これは第 1 段階試験としてエストロゲンやアンドロゲン様作用の物質について、その繁殖への影響があるということで確認する試験でした。ただ、抗アンドロゲン、抗男性ホルモン様作用の物質については、雄のメダカの尻びれのところにある乳頭状小突起が二次性徴で出てくるのですけれども、これに着目すればいいということが分かってきまして、TG229 というのはもう親になってから曝露しますので、この乳頭状小突起は雄に特異的なのですけれども、この形成が特に抗アンドロゲンを曝露することによっても形成に影響がないということが分かってきましたので、そうであればもう少し二次性徴前の個体で始めれば、ここの乳頭状小突起の形成のところの阻害を確認できるということでこういった試験法が提案されて検証をやってきました。

- 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.



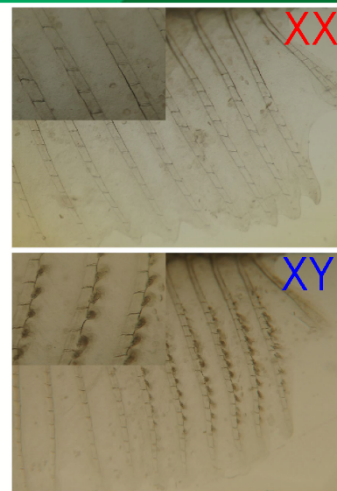
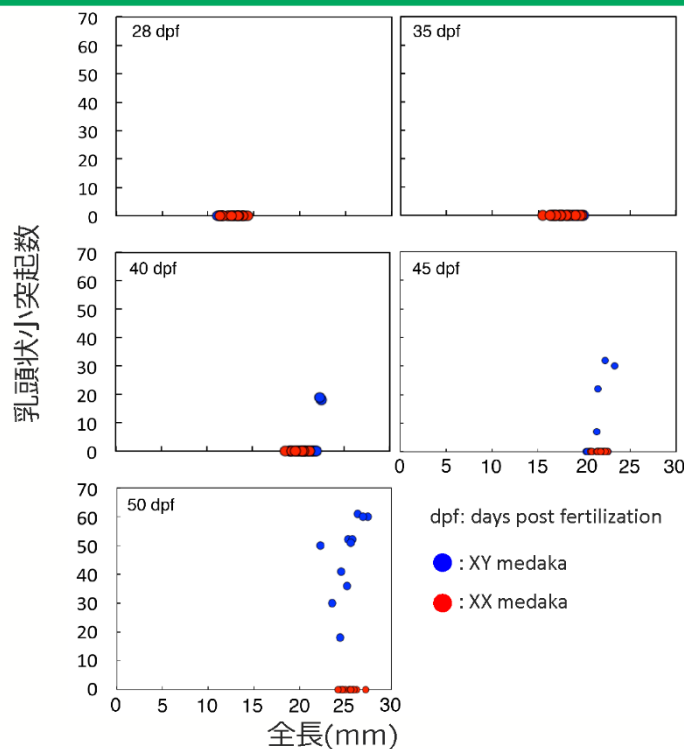
このバックグラウンドのサイエンスが非常に大事だという話を井口先生がおっしゃっていましたが、これも先ほど井口先生から御紹介がありました、井口先生のところにおられて現在九州大学におられます荻野先生の成果ですね。このアンドロゲンが乳頭状小突起の形成に効いてきているのだということが分かってきたという、こういった基礎的な知見を基に抗アンドロゲン作用を持つ物質の検出に重要であるということが分かってきました。

JMASA試験のタイムライン



これが試験法の概要なのですが、二次性徴前の大体6週齢と35～42日齢のメダカに対して4週間の曝露をしまして、その後、尻びれの乳頭状小突起の形成数を調べるというような試験法になっております。

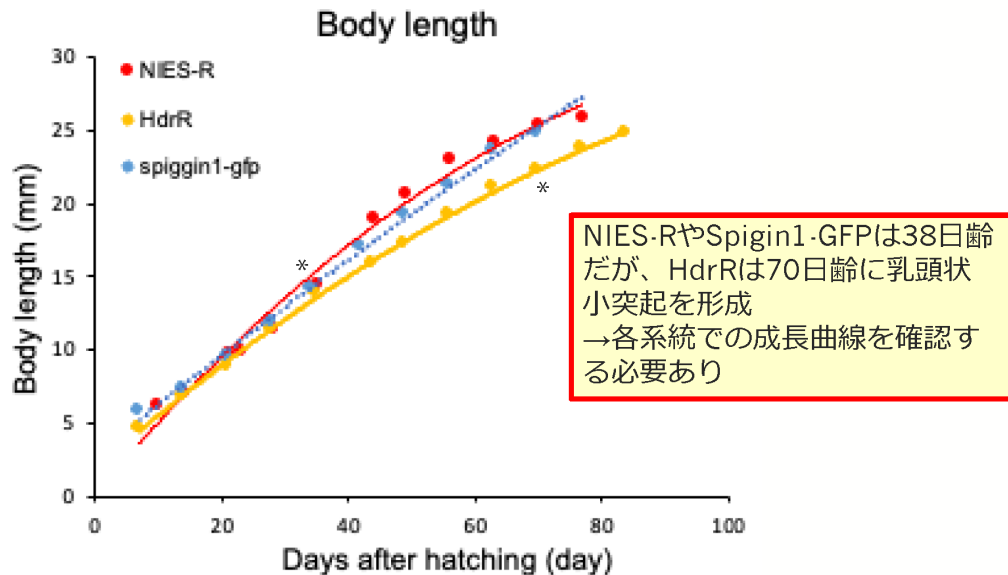
乳頭状小突起の形成過程



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

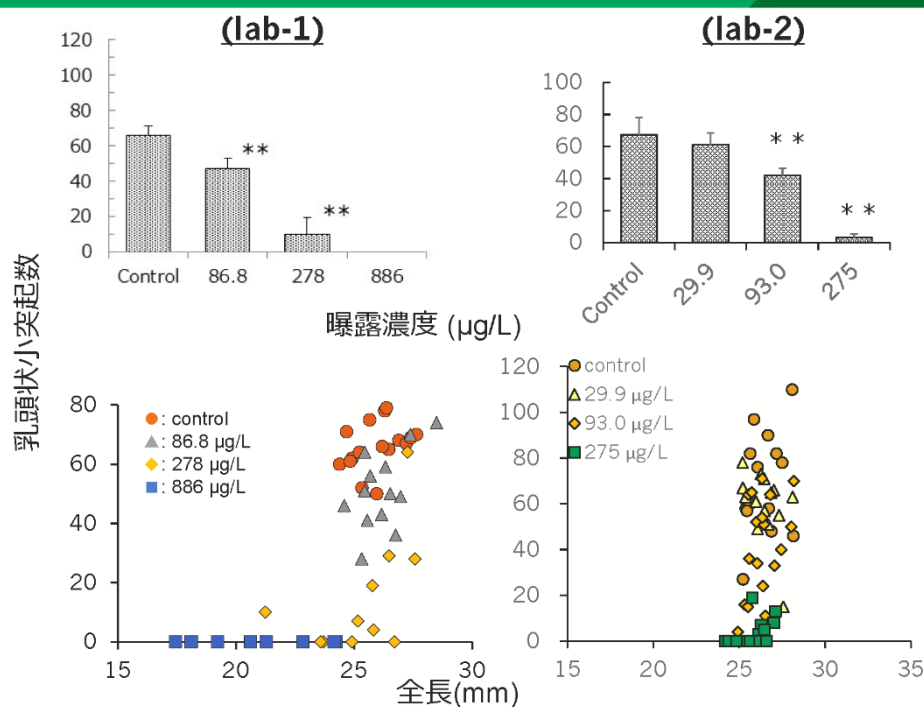
メダカの乳頭状小突起の形成については、遺伝的な雄についてはおよそ 40 日から形成が始まってくるところですので、その形成の直前から曝露を始めるということが重要なと思います。これはそれぞれ、実はメダカの系統とか飼育状況によって変わってきますので、それについて十分確認をしながら試験開始の時期を決めるというようなテストガイドラインになっております。

乳頭状小突起の形成の違い



それについて我々のグループでも確認をさせていただいておりまして、我々のグループのところで飼育すると、複数の系統においてこの試験が実施できる一方で一部の系統、これは HdrR という結構使われているメダカの系統ですが、これについては乳頭状小突起の形成自体がすごく遅いということではなかなか難しいですが、これが成長曲線を作って乳頭状小突起の形成が一体どこで行われるかということで我々の NIES-R と Spiggin1-GFP という、これは後で御紹介しますが RADAR Assay という、これも遺伝子組換えのメダカですけども、これについても同様に実施できるということが分かってきましたので、一定程度の系統については実施できますが、一部できないということは、例えば今問題になっていますミナミメダカとキタノメダカはなかなか難しいという話も長江先生が示されておりますが、そういったことで一部の系統については実施できるということを確認させていただきました。

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.

実際バリデーションするとこういう結果が出てくるわけですが、これはフェントロチオンと言われている抗アンドロゲン作用を有する物質の結果の例ですが、高濃度になってくると乳頭状小突起の形成が抑えられてくるということに加えて成長自体が遅くなるということもありますから、そのところをしっかりと区別しながら評価していくと。濃度が高過ぎるとそういうことが起こりますので、成長自体には影響がないけれども乳頭状小突起の形成には影響があるといったことが検出できるかというのがこの試験法のポイントということになってくると考えています。

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

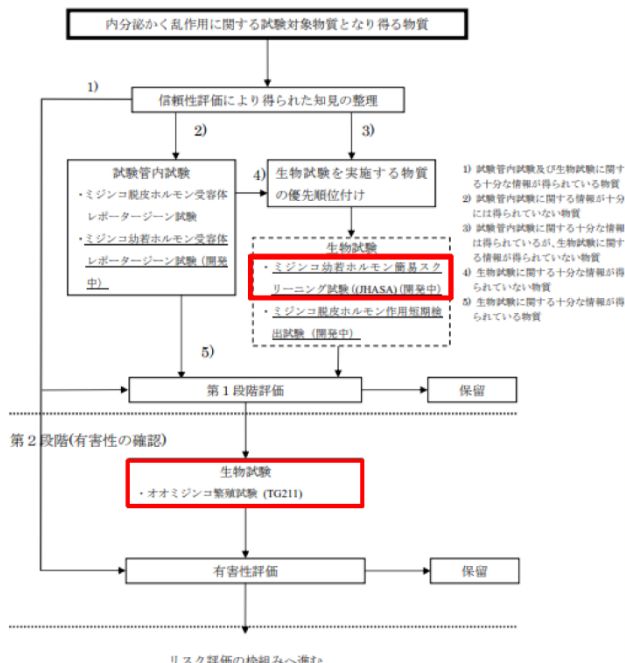
続きまして、オオミジンコを用いた試験法として、これはミジンコの幼若ホルモンの検出試験法です。

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

これは昆虫、節足動物等の特異的な幼若ホルモンや脱皮ホルモンなどがありますけれども、そのうちの成長に関連するような幼若ホルモン物質については、オオミジンコに対して雄の産生に影響があると、これは愛媛大学の鑑迫先生のグループが発見されましたということがありまして、これを利用してこの幼若ホルモンの検出をオオミジンコでできないのかと、幼若ホルモン様物質の検出ができないかということで、既に確認のためのテストガイドラインとしてTG211という、これは繁殖試験の中にAnnex7という付録をつけまして、その中で雌雄をしっかりと判別するという試験法が認められていたのですが、これが非常に大変だということで、短期の第1段階の試験としてこのミジンコ幼若ホルモン簡易スクリーニング試験 (JHASA) という試験の提案をさせていただきました、その検証を長年やらせていただきました。

昨年これについて承認されまして公開されましたので、これについても御紹介をさせていただきます。

OECD TG253

National Institute for Environmental Studies, Japan
25

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

Topics Countries & regions Publications Data News & Events About

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

25 June 2024

OECD Guidelines for the Testing of Chemicals

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](#) [View 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

これは昨年度 TG253 番として公開されたものになりますが、こういった OECD の試験法の提案・検証の際には複数の海外の国の協力が欠かせないわけですが、国内の機関はもちろんのこと、海外の機関、今回はフランスとノルウェーの御協力を頂きまして検証が無事済みまして、専門家からは何度かもう少し化学物質以外の評価なんかもやるべきだというような指摘を頂きましたが、最終的には 2024 年、昨年認められまして公開をされたということになります。

環境省との同時報道発表



26

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



本文へ >

English

キーワード検索

検索

印刷・手配

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01月24日

本報発表

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

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、メダカやミジンコ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、日本が提案した、ミジンコの一つであるオオミジンコを用いた試験法が、2024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6月に公表されました。

この試験法は国立環境研究所が開発した、オオミジンコを用いて甲殻類や昆虫などに特効若ホルモンを迅速に検出する「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）」であり、OECDテストガイドラインNo. 253として新たに公表されたもので、

オオミジンコを用いた内分泌かく乱作用を検出する世界で初めてのOECDテストガイドラインです。

OECD/OCDE

253

Adopted:

25 June 2025

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)

OECD事務局の誤植修正対応により発表が遅れる

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本試験法が、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）

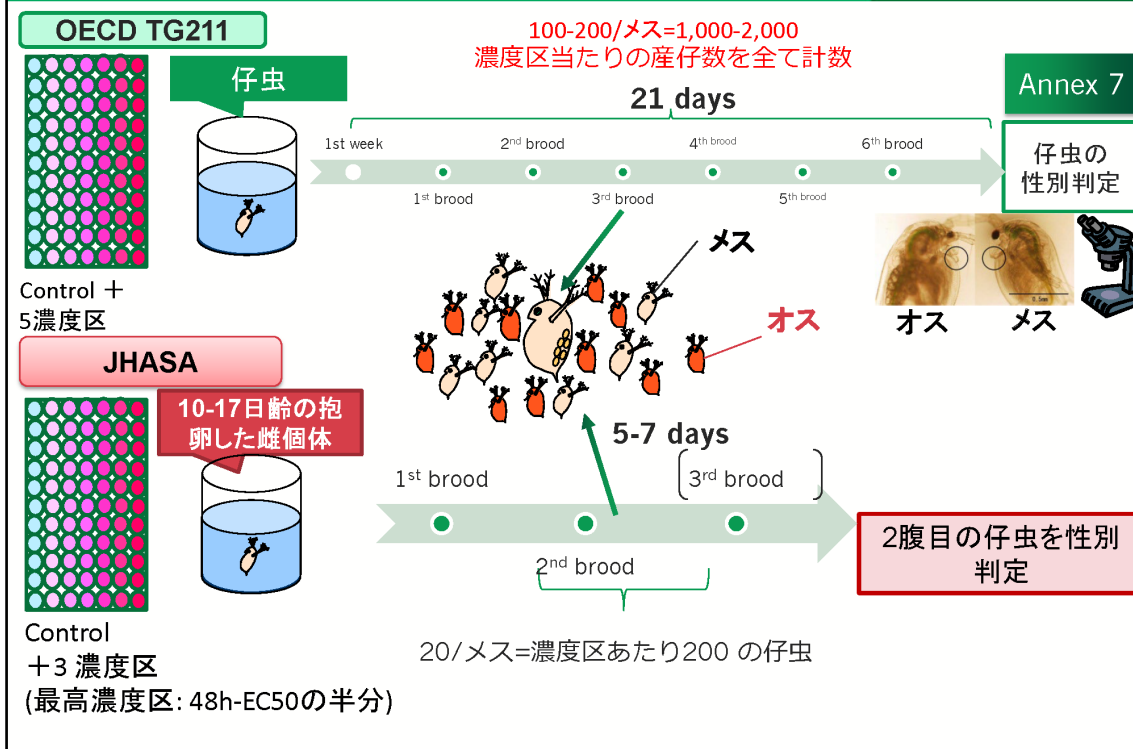
2. わが国では、国立研究開発法人国立環境研究所が化学物質の生物影響に係る試験・評価手法の開発において中核的な役割を担っており、この試験法も同研究所が開発を進め、OECDにおける検討を主導してきました。

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。併せて未発表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. 試験法開発の経緯

ただ少し誤記もありまして、試験法自体の名前の間違いもありまして、OECDの事務局と交渉いたしまして、その辺の修正が行われ、今年の初めに同時の報道発表をやらせていただきました。これも環境省と国立環境研究所でやらせていただきましたので、こちらについても御興味がありましたら御確認いただければと思います。

OECD TG211 Annex 7とJHASA



先ほどの試験法の話、ちょっと前後してしまいましたけれども、TG211 というのは繁殖の試験でして、これは各濃度区 11 匹、仔虫ですね。ミジンコは雌が雌を生む単為生殖ですが、この産仔の数をずっと調べていくということで、1 匹当たり大体 100~200 匹の仔虫を産みますので、1,000~2,000 匹の雌雄判別が必要という、これは確認するための試験で非常にいい試験ではあるのですが、やはり手間が大変ということで短期の試験を 10 日間 17 日齢の試験から 3 腹だけを見るような簡易の試験というのを提案してそれについての検証をやらせていただいたということになります。

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

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.4676

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, Tohoku
University, Sendai, Japan



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

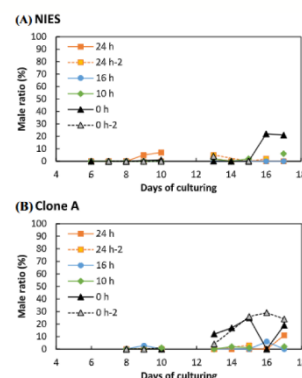


FIGURE 2 Male ratio (%) of offspring from the cultures of (a) NIES and (b) Clone A strains on each day under different photoperiods (0, 10, 16, and 24 h light). The days without plots after the 8th day indicate those without observations. The experiments of cultures under 0 and 24 h of light were conducted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

実は先ほど少し言いましたけれども、その過程で化学物質以外にもミジンコは雄になるという条件が幾つかあります。その一つがノンケミカルストレスの中で温度だとか硬度、日照時間などがありまして、それがどの程度この試験に影響があるのかということも確認するべきだと指摘がありましたので、それについては我々のグループで確認をさせていただきましたし、論文としても報告をさせていただいたということで、ここで御紹介をさせていただきます。こちら興味がありましたらアクセスになっておりますので、御確認いただければと思います。

EXTENDの試験法開発状況



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

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	◎メダカエストロゲン受容体 <i>a</i> 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)
抗エストロゲン様作用			
アンドロゲン様作用	◎メダカアンドロゲン受容体 <i>B</i> 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 <i>B</i> 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	◎ニシツメガエル甲状腺ホルモン受容体 <i>B</i> 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)
抗甲状腺ホルモン様作用			
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
抗幼若ホルモン様作用			
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
抗脱皮ホルモン様作用			

注：◎開発済み、○開発中（完成間近）、△開発中、▽不採用

これが先ほど井口先生から御紹介がありました試験法全体の図ですが、これはおそらく山崎さん、川嶋さんから詳細を御報告いただくとと思いますが、ここ 2 年、3 年の間に JMASA (OECD GD379) と JHASA (OECD TG253)、それから MEOGRT240 の改訂というのが行われたということになります。

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

最後に、胚の試験の検証について、これは日本から提案したわけではなくて、フランスやほか欧州を中心に検証が行われたものについて日本も一部参加させていただきましたので、そちらについても少しだけ御紹介します。

- 欧州を中心にした動物福祉(Animal Welfare)の広がりや、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。

これについてはよく御存じの方がおられると思いますけれども、ヨーロッパを中心に動物福祉の概念が広がっておりまして、化粧品の動物実験の禁止にとどまらず、魚類の試験自体がなかなかできなくなってきていると。その過程で魚類急性毒性試験は胚を使った試験に今置き換えられる、あるいはエラ細胞を使った試験に置き換えられるということで、そういった議論が今 OECD では盛んに行われているところです。

内分泌かく乱作用の検出についても例外にはならず、遺伝子を組み換えた魚類の胚を使って評価できないかといったようなことでヨーロッパでは高いニーズがありまして、魚類の胚を用いた 3 試験法が既に OECD でこちらについては承認されておりますので、御紹介をさせていただきます。

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)
- 10th short-term reproduction assay (10th RA) (OECD TG 229)
- 21-day fish assay (OECD TG 230)
- Androgenized female stickleback screen (AFSS) (OECD TG 238)
- CASZY Assay: Detection of Substances Acting through Androgen Receptors using (transgenic) cyprinids (Zu-P-Zu) (OECD TG 239)
- Xenopus embryonic thyroid signalling assay (XETA) (draft OECD TG)
- Juvenile invertebrate anti-androgen screening assay (JMASA) (draft OECD TG)
- Short-term juvenile hormone activity screening assay using Daphnia magna (draft OECD TG)
- Rapid androgen disruptor 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 236)
- Fish early life stage (ELS) toxicity test (OECD TG 216)
- New guidance document on haplochromis development and reproduction test with Amphileurus (OECD TG 201)
- Polychaete reproduction test (OECD TG 242)
- Lymnaea stagnalis reproduction test (OECD TG 243)
- Chironomid Toxicity Test (OECD TG 232)
- Daphnia magna reproduction test (with male induction) (OECD TG 219)
- Earthworm Reproduction Test (OECD TG 222)
- Freshwater Invertebrate Toxicity Test (OECD TG 220)
- Sediment Water Lumbriculus Toxicity Test Using Spiked Sediment (OECD TG 225)
- Prokaryotic reproduction test in soil (OECD TG 226)
- Collembola Reproduction Test in Soil (OECD TG 233)

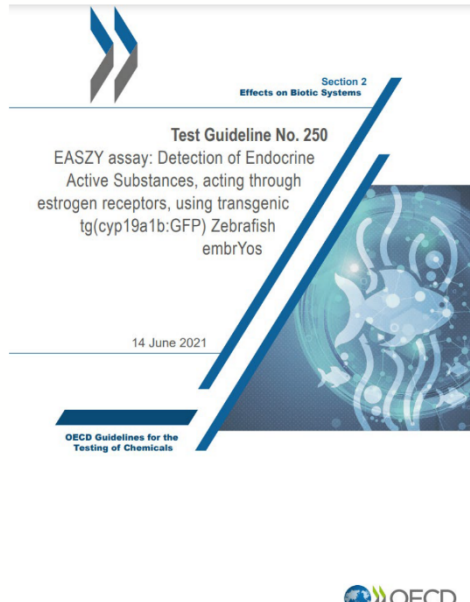
TG211

MEOGRT

OECD EDTA/GD150 HPより

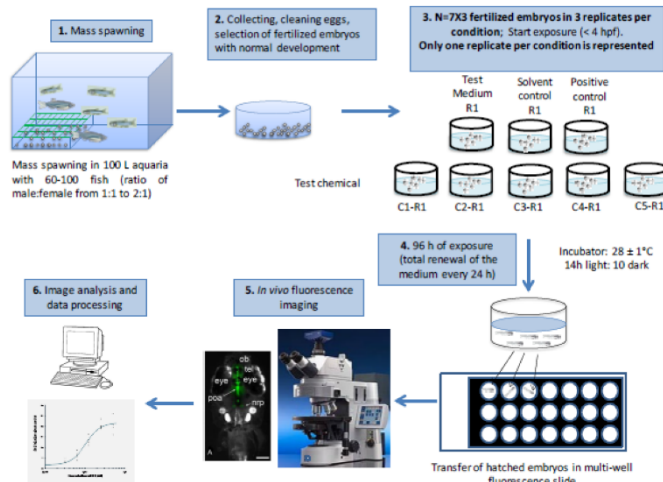
その前に、こういった魚類胚を用いた試験の位置づけということですが、これも OECD の試験法のフレームワークがありまして、Guidance Document150 というのが内分泌かく乱化学物質の試験法のフレームワーク（枠組み）を規定しているものになりますが、この中で Level3、Level4、Level5 というのがありまして、Level がスクリーニング試験、日本では第 1 段階試験に相当するもので、これが JMASA とか JHASA でして、こういった胚を用いた試験についてもこの Level3 の試験として代替可能ではないかということをお OECD では考えています。日本では、こちらの動物試験については特にそういった制限はありませんので、従来どおり JMASA、JHASA を利用していきますが、こういったものについても利用可能性があるのかということをお今後考えていくために検証について他国の国際協力の一環でやらせていただきました。

また、TG211 だとか MEOGRT なんかは Level4 とか Level5 というような試験に相当しますという話です。



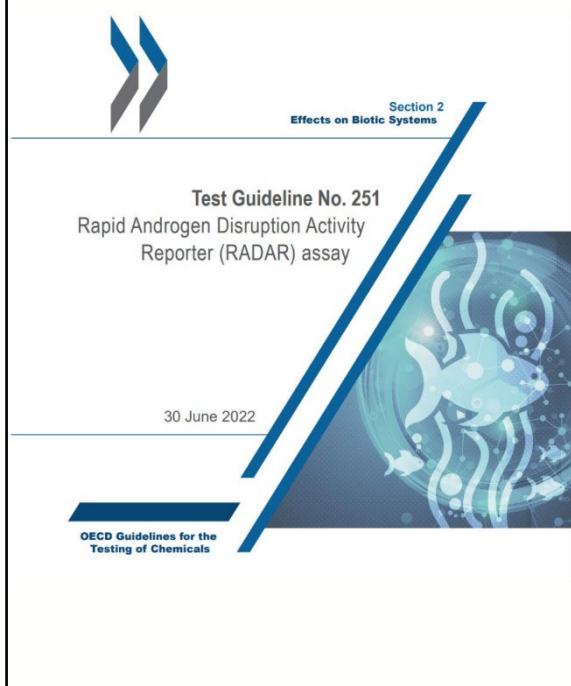
- EASZY (detection of Endocrine Active Substances, acting through estrogen receptors, using transgenic cyp19a1b-GFP Zebrafish embryos) アッセイ
- 2021年に採択
- 硬骨魚類の脳や生殖腺において主要なエストロゲン合成酵素である cyp19a1b (アロマターゼB) プロモーターによって、GFP (緑色蛍光タンパク) が発現するトランスジェニックゼブラフィッシュを利用する手法

既にこういった胚の試験というのは 3 つ試験が認められておりまして、ゼブラフィッシュを用いた EASZY という試験ですね。これはエストロゲン関係、アロマターゼと GFP を導入したトランスジェニックゼブラフィッシュを用いた試験ということです。



- 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）

これも胚に曝露をして、96 時間の曝露で胚の毒性試験と同様ですので、これについては動物福祉の観点でも問題ないということになっています。



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



同じように、遺伝子導入したメダカを使った試験法についても、これはフランスの Watch Frog 社を中心に開発を進められまして、それについて検証もやらせていただいていた、その一つが RADAR Assay、TG251 として認められたものになります。

フランス (WatchFrog社) の提案 (井口先生らと共同開発)

Key event

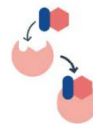


OECD physiological
criterion: Spiggin production
in the Three Spined
Stickleback



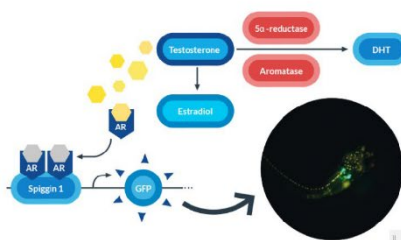
Watchfrog社HPより
(https://www.watchfrog.fr/en/test_androgenique.php)

Modes of actions



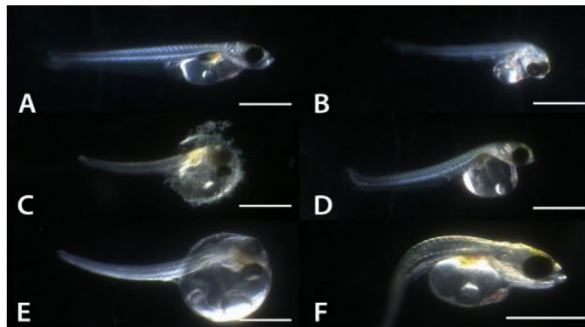
Provide additional
information to authorities
to assess MOA

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



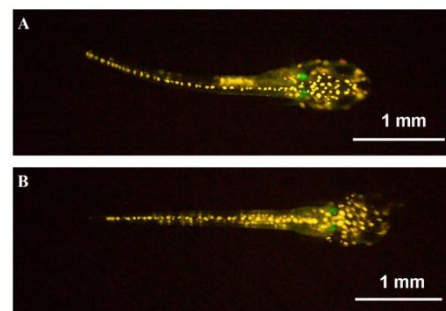
これは井口先生も検証に貢献されてきたということですが、**「イトヨ」**と言われている魚の雄に特異的なスピギン蛋白ですね。これをメダカに導入した形質転換のメダカを用いて、この胚を使って評価するというような試験法になります。

これについても検証を国内でやってきまして、我々といであ株式会社さんのほうで実施されました。我々もこの系統を持っておりまして、現在どの程度利用可能化ということと比較検証させていただいているところです。



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

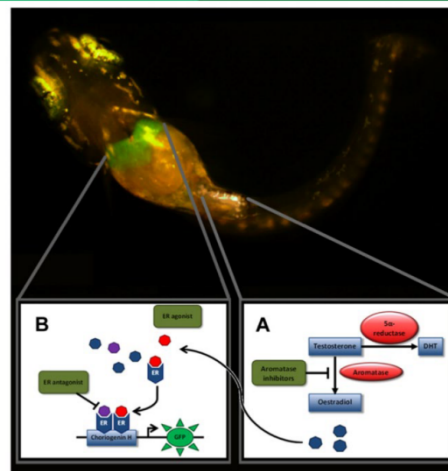
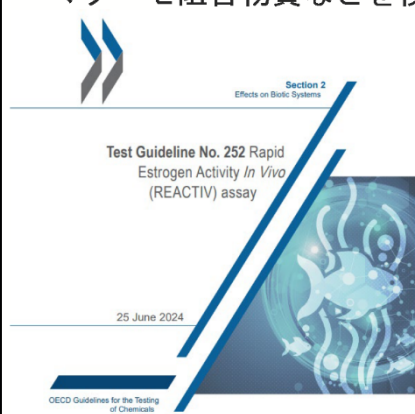


こちらは孵化後 1 日の間の卵黄を 72 時間曝露するのですが、これについて背側から撮影して蛍光顕微鏡で画像解析を行うというようなシステムになっております。これについてもテストガイドライン化しておりますので、欧州中心に進められています。ただ、短期の TG229 だとか JMASA に比べて比較的簡易だということですので、利用可能性は結構あるのかもしれないと考えております。

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トキシン阻害物質などを検出する手法

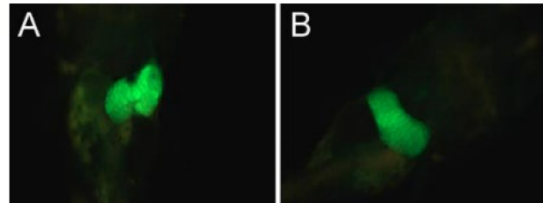
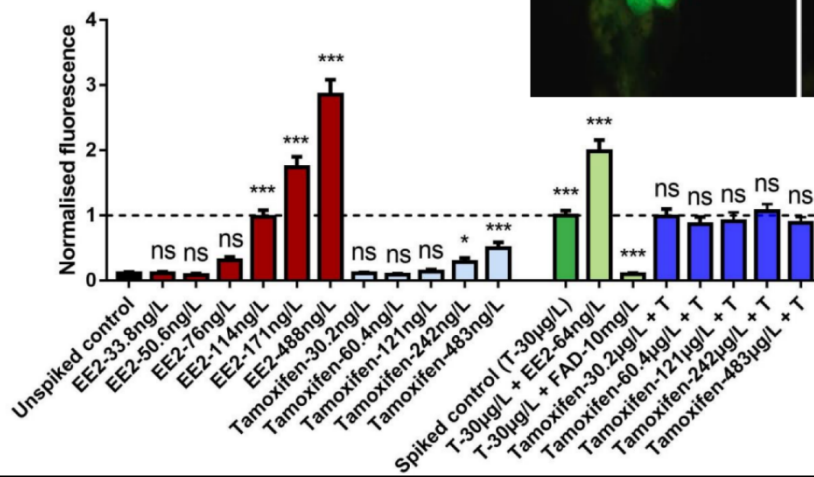


また、同じような遺伝子組み換えのメダカを利用したものとして卵膜蛋白のコリオジェニン、これと蛍光蛋白とを導入したメダカでエストロゲン活性を有するような物質を検出する試験法として REACTIV という Assay がこちらにも提案されております。これは国立環境研究所で検証に参加をさせていただきました。

OECD TG252 (2)

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



少し各試験機関の結果にばらつきがありましたけれども、一定程度これについての利用可能性というのは、やはり何ととっても簡易であるということと動物福祉の観点でも大きな問題がないということで、利用可能性は一定程度あるのではないかなと考えているところです。

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

そういった概念が出てきたところで、最近は「NAMs」という言葉が広く利用されています。

EXTEND2022の枠組み(5)



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。

NAMs についてはいろいろな考え方がありますが、EXTEND の中では欧米で研究が進むこういった NAMs の活用を考えるということで、これはおそらく後でまた山崎さんからお話があると思いますけれども、利用可能性が一定程度あるかなと思います。

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

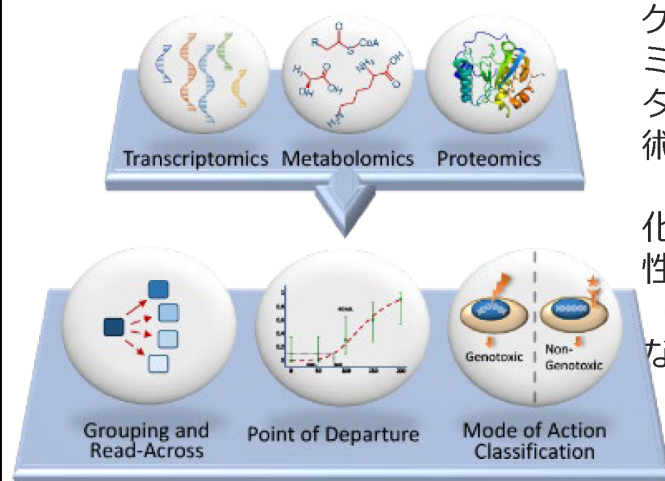


USEPA NAMsウェブサイトより



NAMs の定義は非常にいろいろな考え方がありまして、脊椎動物を使わないものはみんなNAMsだと言う人たちもいれば、もう少しOMICsだとかこういったものに特化したものだと言う人もいれば、*in vitro*、*in silico* 全て併せたものだというのですが、代替このOMICsから*in vitro*、*in silico* 全体を指すというものが大きく通常は使われています。これはヨーロッパ、アメリカそれぞれ、OECD でも少し定義の違いがありますが、大体同じようなことは言われているかなと思います。

様々なOMICs技術



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

その中で今注目されているのは、こういった OMICs ですね。ゲノミクスとかトランスクリプトミクス、プロテオミクス、メタボロミクスといろいろありますけれども、こういったものが化学物質の評価系にどれだけ使えるかということで、おそらく化学物質のグルーピングとか **Point of Departure** とも言われている作用の出発点ですね。それから作用機序自体の解析なんかには一定程度使えるということなのですが、これの標準化がやはり課題でして、研究レベルで研究論文になっているのですが、これをどういうふうに行行政利用に活用していくかということが OECD で少しずつ議論が始まっているところです。



OECDでは、これまでAOP作成などを実施してきたEAGMSTを改組

Omics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)

その議論の主戦場となっているのが、昔は「EAGMST」と言いましたが、OECD ESCA というグループでして、この NAMs とかいわゆる AOP と言われている毒性作用の経路を確認していったレギュレーションをどう使っていくのかといったもの等を整理していった標準化していくというプロジェクトが少しずつ始まりつつありますので、こういったものが数年たつと標準化したものが出てくることが考えられるかと思いますが、現在は議論が始まったところと御理解いただければと思います。

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、鑓迫先生ほか、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。

少し長くなりましたが、私の講演はこれで終わらせていただきまして、最後にこちらについては多くは環境省の業務としてやらせていただいたということと、リングテストに参加いただいた機関に改めて感謝申し上げるとともに、私たちの仕事についていろいろ評価を頂いておりますが、我々のチームの各メンバーと井口先生、鑓迫先生ほかの御指導によるものかなと考えております。

御清聴、ありがとうございました。