

## 魚類・両生類・無脊椎動物試験法の開発状況について

ExTEND2005 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、魚類、両生類及び無脊椎動物を対象とする試験法の開発が進められてきた。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として採用するよう積極的に提案してきたところである。

これらの試験法の目的、これまでの開発の状況及び本年度の検討内容は、以下のとおりである。

### 1. 魚類試験法開発について

SPEED'98 において魚類に対する内分泌かく乱作用を検討する際に用いたビテロゲニンアッセイ試験、パーシャルライフサイクル試験（以上スクリーニング試験）及びフルライフサイクル試験（確定試験）について、国際的な標準化を目指して OECD テストガイドライン化を提案し、専門者会合で検討を行うとともに、OECD 加盟国間のリングテスト等による検証作業を行ってきた。

#### (1) 魚類 21 日間スクリーニング試験 (TG230)

ビテロゲニン濃度及び短期の性転換を指標として化学物質の（抗）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による影響をスクリーニングする 21 日間の試験である。SPEED'98 で用いられたビテロゲニンアッセイにほぼ相当する。エンドポイントは雌雄ともに肝臓（または血液）中ビテロゲニン量及び二次性徴の変化である。

本試験法は、平成 21 年（2009 年）に OECD の TG230 として採択された。

#### (2) 魚類短期間繁殖試験(TG229)

当試験法は、上記 TG230 のエンドポイントに産卵数を付加し、化学物質の（抗）エストロゲン作用、アンドロゲン作用及び下垂体～生殖腺軸への影響をスクリーニングできる 21～28 日間の試験である。ビテロゲニンの増減に加えて内分泌かく乱化学物質による繁殖行動や卵質及び精子形成への影響も検出できる。検出範囲が広いため重要なスクリーニング法として期待される。

本試験法は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、平成 21 年（2009 年）に OECD の TG229 として採択されているが、ExTEND2005 の事業を通じて、昨年までにエストロゲン様物質及びアンドロゲン様物質について、メダカを用いた

TG229 の有用性が確認された。

このため、本年度は、メダカに対する本試験の適正化に向け、更にメダカにおけるデータの補強を行い、必要に応じて一部試験条件の修正（繰り返し連数、試験魚数など）を検討する。

### （３） 魚類性発達試験

受精卵初期発生時からばく露を開始し、二次性徴が認められる（孵化後 60 日（受精後 70 日））まで観察することにより、化学物質の（抗）エストロゲン作用、（抗）アンドロゲン作用及びアロマトラーゼ阻害作用による影響をスクリーニングできるとされる試験である。ビテロゲニン濃度、生殖腺組織、二次性徴及び性比の偏りをエンドポイントとする。繁殖に関するエンドポイント（卵質、精子、交尾行動等）はない。

OECD においてテストガイドライン化に向けた検討が進められており、わが国は平成 21 年（2009 年）より OECD のリングテストにメダカを用いて参加し、他の参加国におけるゼブラフィッシュ及びファットヘッドミノーを用いた試験結果と比較・検証を行っている。

### （４） メダカ多世代繁殖試験

化学物質の母体から卵への影響、次世代目の影響及び次世代から次々世代まで影響を観察する試験法である。世代毎にビテロゲニン濃度、生殖腺組織、二次性徴、性比の偏り、繁殖等をエンドポイントとし、メダカ生涯を通じたいずれかのステージにおける化学物質の（抗）エストロゲン作用、（抗）アンドロゲン作用及びアロマトラーゼ阻害作用等の影響を検出できる。ばく露期間は約 25 週間を要する。

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、その後日米間でプロトコルの統一について検討を行ってきた。

本年度は、この統一プロトコルの試案に基づきデータの補強を行い、試験法試案の検証を行う。

## 2. 両生類試験法開発について

OECD において、両生類については、甲状腺ホルモンによって制御されているカエルの変態に着目した「変態アッセイ」の開発を優先的に進めることとされ、化学物質の甲状腺ホルモンに対する影響の検出に焦点を当てた開発が進められ、2004 年からドイツ、日本及び米国の試験機関でプロトコルの検証試験が実施された（TG231 として採択）。

一方で、2008 年 3 月の OECD の第 4 回両生類専門家会合において、変態アッセイのガイドライン化への取り組みが収束しつつあることから、生殖影響を評価する試験法（ライフサイクル試験）についてガイドライン策定に向けた取り組みを推進することが確認されている。

### (1) 両生類変態アッセイ

両生類変態アッセイ (TG231) は、両生類を用いて甲状腺ホルモン作用のかく乱化学物質を検出するための 21 日間のスクリーニング試験法である。甲状腺ホルモンによって制御されているカエルの“変態”に着目し、オタマジャクシの尾の退縮や肢の形成等に代表される形態変化の異常をエンドポイントとする。

ドイツ、日本及び米国の試験機関において、甲状腺ホルモン様物質及び抗甲状腺ホルモン様物質について数回のプロトコルの検証試験 (リングテスト) が実施され、平成 21 年 (2009 年) に OECD の TG231 として採択された。

### (2) 両生類ライフサイクル試験

両生類ライフサイクル試験はトロピカリス (*Xenopus (Silurana) tropicalis*: ニシツメガエル) の孵化後 48 時間経過した幼生を、性成熟までの長期間 (40 週間) 化学物質にばく露し、主として甲状腺ホルモンかく乱による両生類の発生、成長、生殖への影響について調べる試験である。

平成 20 年 (2008 年) 日米間で両生類のライフサイクル試験の開発を共同で取り組むことが合意され、翌年日米が Amphibian Development, Growth, and Reproduction Assay (ADGRA) を OECD に提案し承認された。その後米国から ADGRA のドラフトガイドラインが示され、日米英の専門家により検討された。

本年度は、米国から試験期間の短縮等を含むガイドラインの変更案 (Larval Amphibian Growth and Development Assay) が提案されたため、日米両国のエチニルエストラジオール試験データ等を比較・検証し、変更ガイドラインの妥当性について検討を行う。

## 3. 無脊椎動物試験法開発について

無脊椎動物として、生態影響試験で広く用いられているミジンコを対象として、内分泌かく乱作用に関する試験法の開発を進めている。

### (1) オオミジンコ繁殖試験 (TG211 ANNEX7)

ミジンコが幼若ホルモン様物質によってオス仔虫を産する現象を利用して、無脊椎動物の内分泌かく乱化学物質 (特に幼若ホルモン様作用物質) を検出するための 21 日間の試験法である。産仔数及び仔虫性比をエンドポイントとする。

平成 15 年から開発が進められ、OECD 加盟各国による数回のリングテストを経て、平成 20 年 (2008 年) に OECD の TG211 ANNEX7 として採用された。

### (2) ミジンコ簡易スクリーニング試験法

EXTEND2010 における生態影響評価のための試験法として、TG211 ANNEX7 は試験期間が長く試験難度が高いため、幼若ホルモン様作用物質のスクリーニングのための簡便

な試験として開発中である。すでにオオミジンコでは、卵発生の特定の時期に短期間ばく露することによってオス仔虫生産誘導することが判明しており、短期ばく露（48時間程度を予定）後の2～3腹目の仔虫性比をエンドポイントとする。

本年度は陽性対照物質を用いて、ばく露方法、ばく露期間、試験個体数等、試験手法としての適正化を行う。

### （3） ミジンコ多世代試験

多世代試験法の開発が様々な生物について進められている中で、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、平成19年度から検討を行っている。母体中で化学物質の影響を受けたミジンコの次世代での産仔能力をエンドポイントとする。

平成19年度から OECD TG211 *Daphnia magna* reproduction test に F0 世代の親ばく露を追加した繁殖試験などを行い、F0 世代におけるプレばく露が次世代に影響を及ぼすかどうかについての検討を行った。平成21年度には、短期間で試験が終了するニセネコゼミジンコを新たな試験生物種として用い、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、労力の軽減なども含めたミジンコ多世代繁殖試験の手法の検討を行った。

本年度は、米国で行われている他の甲殻類（アミ、コペポッド）を用いた多世代試験との結果の比較を行うことを目的とし、共通の物質をばく露し、試験法の検証を行う予定である。

## 4. 受容体結合試験等の *in vitro* 試験

OECD では、受容体結合試験などの *in vitro* 試験を用いた内分泌かく乱作用物質スクリーニング法について、非動物試験法検証グループ (VMG-non animal) が検討を行っている。環境省では、2006年に英国、スウェーデンとともに、魚類等の *in vitro* 試験を用いた内分泌かく乱物質のスクリーニング法について検討し、2008年に開催された第6回 VMG-non animal 会合にて、「魚類を用いた *in vitro* 試験に関する詳細レビュー報告書」を作成、提案した。

今後、2010年に開催される第8回 VMG-non animal 会合において、さらに詳細レビュー報告書の見直しや、*in vitro* 試験を用いた内分泌かく乱化学物質スクリーニング法に関する検討が行われる見込みである。