

令和2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3年2月25日）

# 魚類、無脊椎動物を用いた内分泌かく乱作用の試験法開発状況と 主な試験結果について

国立環境研究所  
環境リスク・健康研究センター

山本 裕史



国立環境研究所の山本です。過分な御紹介ありがとうございます。

「魚類、無脊椎動物を用いた内分泌かく乱作用の試験法開発状況と主な試験結果について」ということでお話をさせていただきます。

# 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・健康研究センター・生態毒性研究室長、生態毒性標準拠点長、副センター長 (<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



現在、国立環境研究所で研究しております。

# 概要

1. メダカ拡張一世代繁殖毒性試験(MEOGRT)の試験結果
2. 幼若メダカ抗アンドロゲン作用検出試験(JMASA)の開発と検証
3. ミジンコ幼若ホルモン検出試験法(JHASA)の開発と検証
4. 魚類胚を用いた試験法の検証

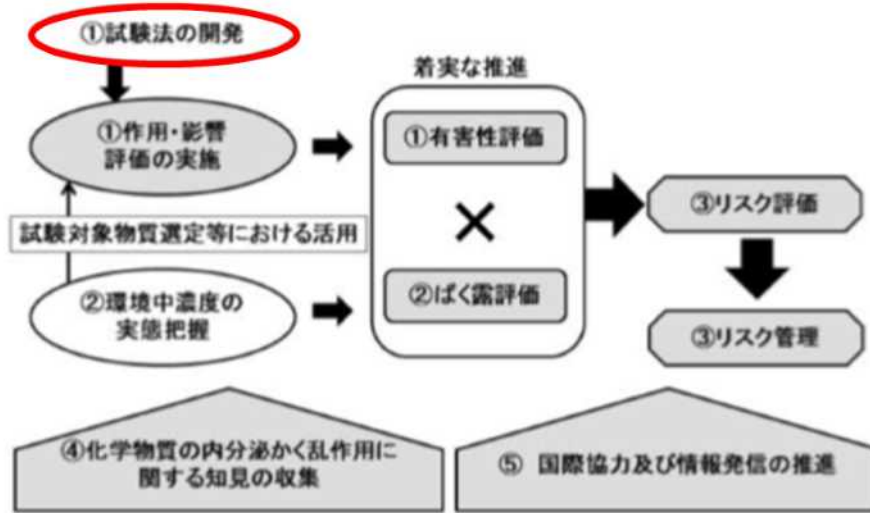
本日はすけれども、4つ程度の内容についてお話をさせていただく予定になっています。

これが概要になっておりますが、1つ目がメダカ拡張一世代繁殖毒性試験(MEOGRT)についての試験結果が出てきておりますので、それについての御報告。2つ目が、幼若メダカを用いた抗アンドロゲン、抗男性ホルモン作用の検出試験の開発事業とその検証状況についてお話しをする。3番目ですが、ミジンコの幼若ホルモンの検出試験法、これも開発途上ですけれども、これについてほぼ検証試験等も終わってききましたので、その状況についてお話しし、最後に新たに最近魚類胚を用いた試験法についての検証が行われておりまして、そういったものが提案されておりますので、その状況について簡単に説明をしたいと考えております。

1. メダカ拡張一世代繁殖毒性試験(MEOGRT)の試験結果
2. 幼若メダカ抗アンドロゲン作用検出試験(JMASA)の開発と検証
3. ミジンコ幼若ホルモン検出試験法(JHASA)の開発と検証
4. 魚類胚を用いた試験法の検証

それでは、最初に1番目の話ですが。

EXTEND2016における取組みの概念図



その前に、先ほど山崎様のほうからお話がありましたけれども、EXTEND2016の枠組みの中では、試験法の開発というのが重要な概念の一つとなっております、その開発した試験法を用いて影響を評価し、有害性を評価してリスク評価まで持っていくということになっておりますので、試験法の開発というのが要になっております。

# EXTEND2016の枠組み(2)

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)



- 1) 試験管内試験及び生物試験に関する十分なデータが得られている物質
- 2) 試験管内試験に関する十分なデータが得られている物質
- 3) 試験管内試験に関する十分なデータが得られているが、生物試験に関するデータが得られていない物質
- 4) 生物試験に関する十分なデータが得られている物質
- 5) 生物試験に関する十分なデータが得られていない物質

第2段階 (有害性の確認)



メダカ延長一代試験(MEOGRT)の開発・実施


リスク評価の枠組みへ進む

実際EXTEND2016の2段階のリスク評価、有害性評価の枠組みですけれども、その際に試験法がキーとなっております、これも先ほど山崎様のほうから少しお話がありましたけれども、第1段階試験の生物試験に加えて、第2段階の有害性の確認試験というのが重要になってきています。

その中で、エストロゲン作用、それから抗エストロゲン様作用とアンドロゲン作用については、メダカ拡張1世代繁殖試験、いわゆるMEOGRT試験というものの開発が進められてきてまして、これは米国とともに開発をしてきましたが、これについてはすでに承認されまして、その試験が実施をされています。

# MEOGRT試験のタイムライン

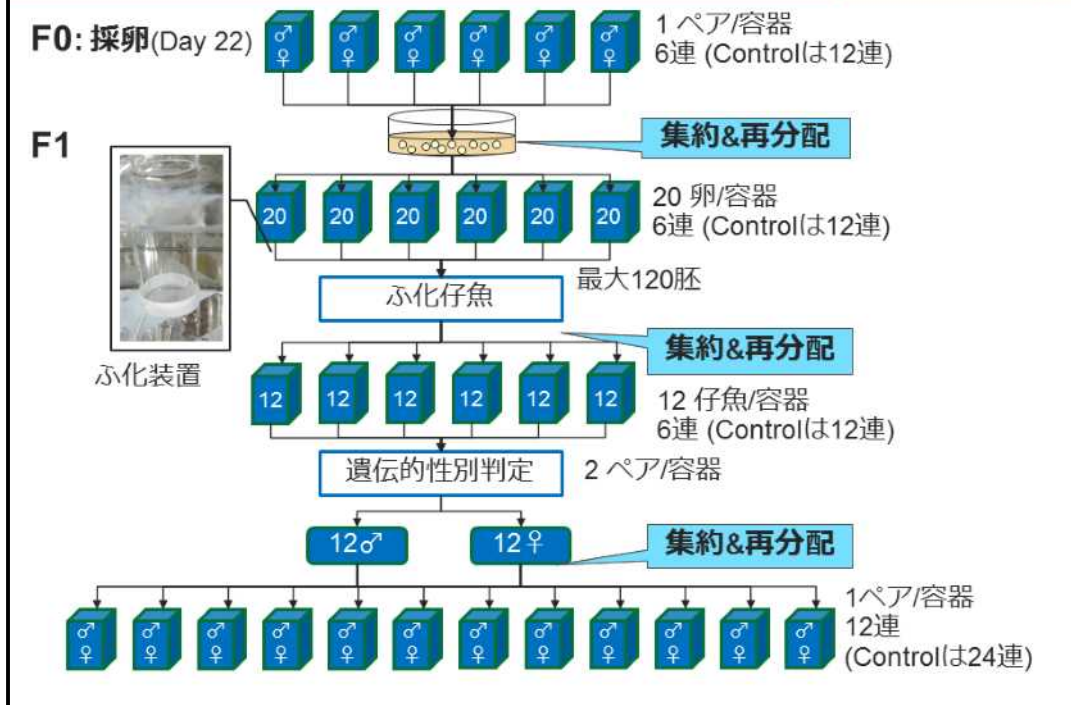
	Life stage		Embryo	Larvae	Juvenile	Sub-adult	Adult													
Exposure duration & condition																				
Test Week	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	
F0	1	2	3	4																
F1				1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	
F2																		1	2	
No. of fish/tank	2 (1 pair)		20		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 <sup>b</sup>		F1				
Fertility			F0												F1					
Growth				F0								F1							F1	
Vitellogenin				(F0)								F1							(F1)	
Sexual development <sup>a</sup>				(F0)								F1							F1	
Histopathology																			F1	
Component	TG229		TG234						TG229		TG236									



<sup>a</sup>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、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本試験で実施したもの。

これはMEOGRT試験の全体のタイムラインですけれども、非常に長い試験になっておりまして、親のメダカに対して、まずは産卵個体に対してばく露する。そこで卵を回収しまして、その卵が孵化し育てていく過程でばく露を継続する。その後そのF1世代と言われていますが、その子どもの世代が最終的にまた産卵をする。その卵の数を数えると、ここの繁殖のところが一番効いてくるエンドポイントなのですが、それからそこから回収した胚についての孵化まで見るというような、合計で19週という非常に長い試験になっております。

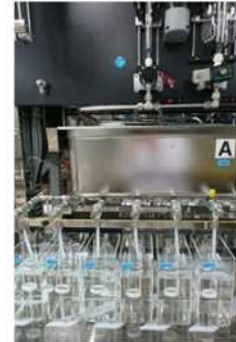
# 各連の集約と再分配



まず、これも先ほど説明しましたがけれども、F0世代、親の世代で卵を回収します。その卵を集約、再分配して孵化後の仔魚を集める。それから、遺伝的な性別を確認し、子ども世代、F1世代の卵を数えるといったことをやります。これが全体的な流れとなっております。



# 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)

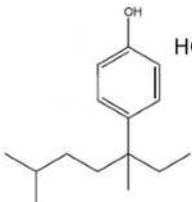
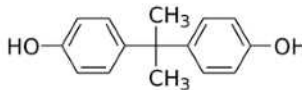
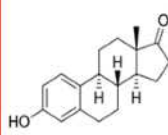
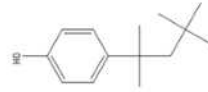
これが実施した試験機関、これは我々の国立環境研究所にある流水曝露装置になっておりますが、連続的にここにストック溶液という濃い溶液がありますが、それと飼育水とを混ぜて連続的に水を送るシステムになっております。

容器のサイズ等もそれぞれ成長段階に応じて大きさが変わる形になっておりまして、1日5換水ということになっています。

御質問頂いていますが、5換水というのは1日に水槽が5回入れ替わるということなのですが、5回一遍に入れ替わるのではなくて、連続的に水が出て入ってというように、大体5換水なので4時間～5時間ぐらいで入れ替わるような水の流れになっています。

こういった水温、溶存酸素を保ちながら、長日周期で給餌をしながら実施します。こちらがこの装置の様子になっております。

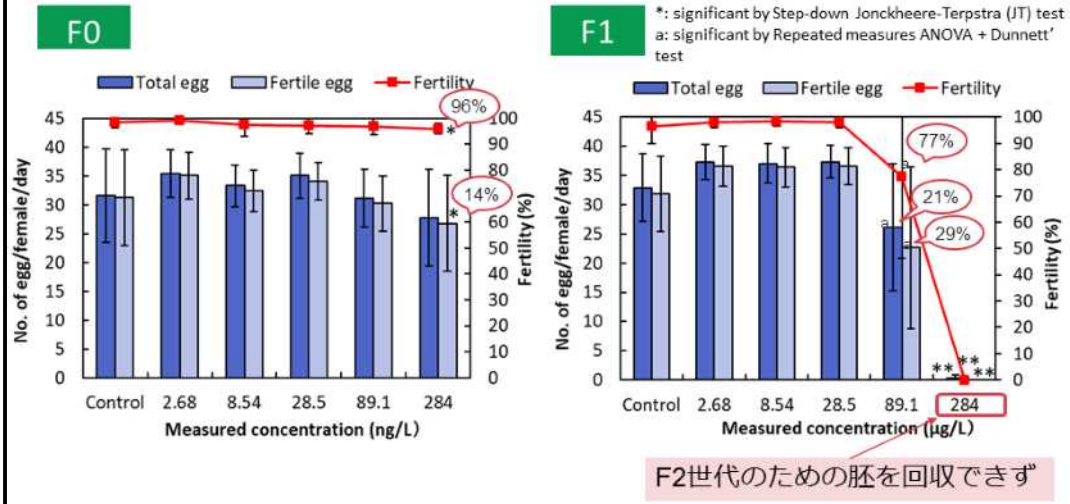
# 実施対象物質

	4-ノニルフェノール (4-NP)	ビスフェノール A (BPA)	エストロン (E1)	4-tert-オクチルフェノール (4-t-OP)
CAS No.	84852-15-3	80-05-07	53-16-7	140-66-9
化学式	$C_{19}H_{26}O$	$C_{15}H_{16}O_2$	$C_{18}H_{22}O_2$	$C_{14}H_{22}O$
	 4-(3,6-dimethylheptan-3-yl)phenol			
実測濃度	1.27, 2.95, 9.81, 27.8, 89.4 $\mu\text{g/L}$	28, 93, 330, 1000, 3700 $\mu\text{g/L}$	2.68, 8.54, 28.5, 89.1, 284 $\text{ng/L}$	0.926, 3.21, 9.91, 31.1, 99.2 $\mu\text{g/L}$
実施機関	NIES (平成27年度)	NIES (平成28年度)	NIES (平成29-30年度)	別機関 (平成29-30年度)

実施対象物質ですが、平成27年、28年にかけて、ノニルフェノールとビスフェノールAについて試験を実施しましたが、29年度～30年度(2017年から2018年度)にかけて天然の女性ホルモンのエストロンと、4-tert-オクチルフェノールの2物質について、これは別機関で実施されたのですが、試験が実施されましたので、この結果について私から報告をさせていただきます。

# E1の結果（繁殖）

- F0: 総産卵数LOEC = >284 ng/L, 受精卵数・受精率LOEC = 284 ng/L.
- F1: 総産卵数・受精卵数・受精率LOEC = 284 (JT)/89.4 (RMANOVA) ng/L. JT とRMANOVA+ Dunnettでは異なる結果.
- 89.4 µg/Lでの繁殖阻害(受精卵数)はF0 (3.2%)から F1 (29%)で増加.



まず、エストロンの結果ですが、エストロンの左側がF0、親の世代の産卵の結果です。この結果、産卵数は、一番上の濃度、284というところで若干下がる。14%というわずかな低下ですが、ほぼ、ほかの濃度については影響はないということが分かってきました。これは受精卵数とそれから受精率の若干の低下が見られるというレベルです。

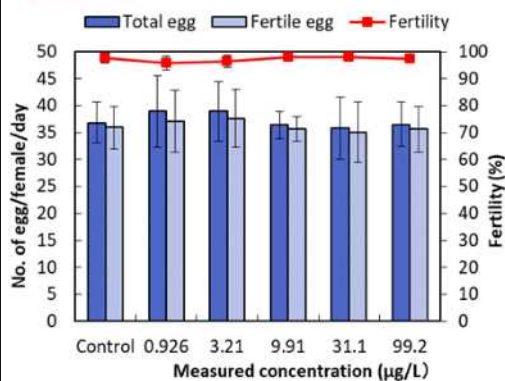
それに対して、F1世代については、一番上の濃度はほぼもう採卵ができなかったという状態で、2番目の89.1ng/Lという濃度でかなり産卵数が低下しましたが、これは統計の解析方法によって有意差がついたりつかなかったりといったような結果になりました。

これを文字どおり解析すると、284というところが一番最高の濃度、ここのところが有意差がつくLOECになって、2番目のところがNOECになるのですが、別の解析手法を使うともう30%程度低下しておりますので、この辺りが生物学的に有意な差がつくところかなとは考えておりますが、この辺については少し専門家の判断を今お願いしているところです。

## 4-t-OPの結果（繁殖）

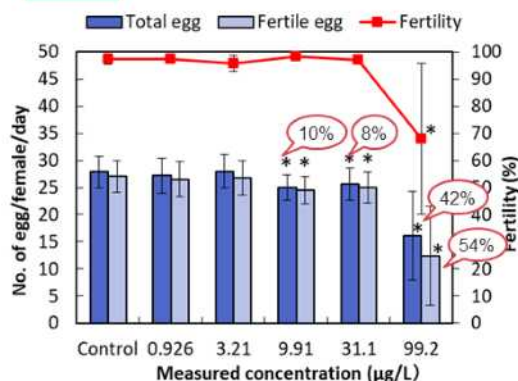
- F0: 総産卵数・受精卵数・受精率 LOEC = 99.2 µg/L.
- F1: 総産卵数・受精卵数 LOEC = 9.91 µg/L, 受精率 LOEC = 99.2 µg/L.
- F1 LOEC (9.91 µg/L) での繁殖阻害率は10%.

F0



F1

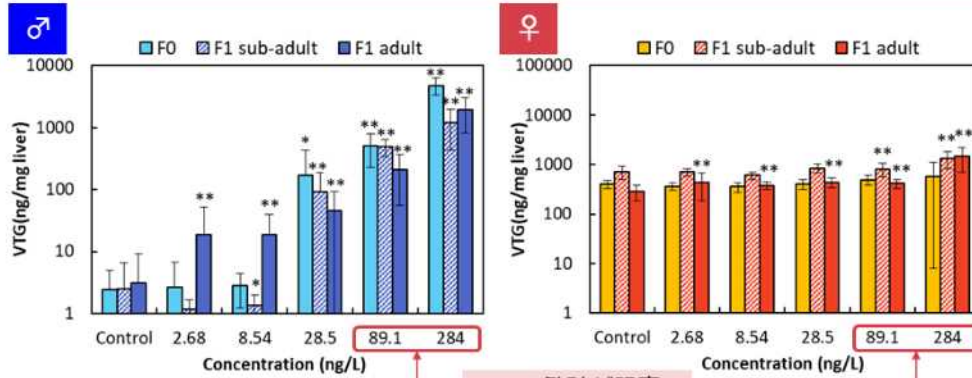
\*: significant by Step-down Jonckheere-Terpstra test



それから次ですが、オクチルフェノールの結果なのですが、こちらはF0では有意な低下は認められませんでした。F1世代において最高濃度から次の濃度、その次の濃度まで若干ですが産卵数、総産卵数、受精卵数に低下が見られました。受精率については一番最高濃度だけが低下が見られたということが確認できました。

# E1の結果 (Vitellogenin : VTG)

Age	F0 adult 17 wpf	F1 subadult 10 wpf	F1 adult 15 wpf
LOEC (♂)	28.5 ng/L	8.54 ng/L	2.68 ng/L
LOEC (♀)	>284 ng/L	89.1 ng/L	2.68 ng/L

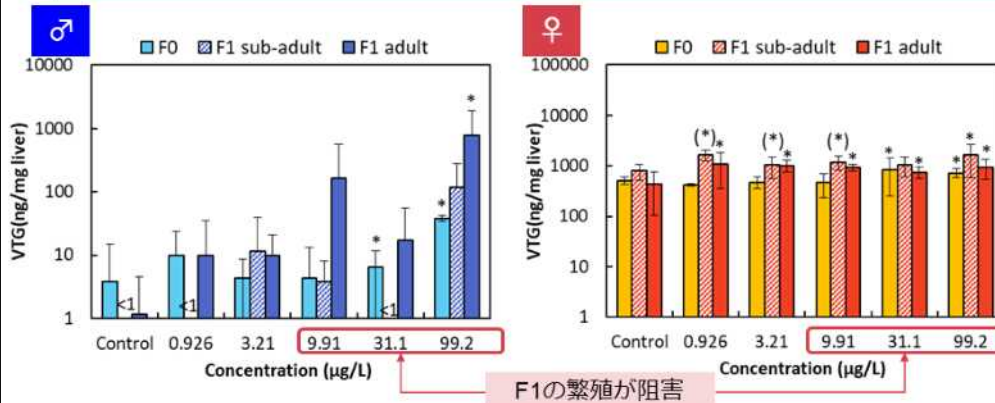


- オス・メスともにVTG誘導はF1の方がF0よりも顕著に認められた。
- オスのVTG誘導は繁殖阻害よりも低い濃度で認められた

これはビテロゲニンという卵黄前駆たんぱくの左側が雄の濃度と、右側が雌の濃度です。これですが、見ていただいたら分かりますけれども、F1世代のほうが阻害が大きいということが分かってきましたが、基本的には雄のところについては結構繁殖に影響が出るよりも低い濃度からビテロゲニンの誘導が見られるということが分かってきました。特にそれがF0世代よりもF1世代が大きいということが分かってきました。

# 4-t-OPの結果 (Vitellogenin)

Age	F0 adult 17 wpf	F1 subadult 10 wpf	F1 adult 15 wpf
LOEC (♂)	31.1 µg/L	>99.2 µg/L	99.2 µg/L
LOEC (♀)	31.1 µg/L	99.2 µg/L	0.926 µg/L



- オス・メスともにVTG誘導はF1の方がF0よりも顕著に認められた.
- オスのVTG誘導は繁殖阻害よりも低い濃度で認められた.

続いてオクチルフェノールのほうですが、雄の結果が左側、雌の結果が右側なのですが、雄、雌ともにF1世代のほうがやはり顕著な影響が認められるということと、先ほどと同様なのですが、9.91µg/Lというところで有意な差が出てくる。ただ産卵ではそれほど大きな差は出てこなかったのですが、ビテロゲニンの誘導については明らかに9.91というところで影響が認められるということが分かってきました。

# E1の結果まとめ

Unit: µg/L

エンドポイント	F0		F1		F2
	Adult	Embryo-subadult	adult	Embryo	
ふ化率		>284		>284	
ふ化日数		>284		>284	
生存 (2 wpf)		>284		>284	
生存 (4 wpf)		>284		>284	
Age	17 wpf	10 wpf	15 wpf		
生存	オス	>284	>284	>284	
	メス	>284	>284	>284	
総産卵数	>284		↓ 284 (89.1*)		
受精卵数	↓ 284		↓ 284 (89.1*)		
受精率	↓ 284		↓ 284 (89.1*)		
体長	オス	>284	↑ 28.5	↑ 8.54	
	メス	>284	>284	↓ 284	
湿重量	オス	↑ 89.1	↑ 284	↑ 89.1	
	メス	>284	>284	↓ 284	
HSI	オス	↑ 284	↑ 89.1	↓ 284	
	メス	>284	>284	↓ 284	
GSI	オス	>284	↑ 8.54	↑ 284	
	メス	>284	>284	>284	
VTG	オス	↑ 28.5	↑ 8.54	↑ 2.68	
	メス	>284	↑ 89.1	↑ 2.68	
二次性徴	オス	>284	↓ 284	↓ 89.1	
	メス	NA	NA	NA	
間性と性転換(表現型)	>284	↑ 89.1 <sup>2</sup>	↑ 284 <sup>2</sup>		

環境中濃度レベル: <0.046~4.1 ng/L (検出頻度10/15) (環境省, 2016)

HSI: hepatosomatic index, GSI: gonadosomatic index, VTG: vitellogenin, SSCs: secondary sex characteristics, NA: Not available.  
<sup>1</sup> Inconsistency of phenotypic and genotypic sex, and gonad phenotype was observed.  
<sup>2</sup> Genotypic male had female phenotype and ovary.  
 \*Figure in parentheses was calculated by repeated measures ANOVA followed by Dunnett's test.

これがエストロン、E1の結果にまとめになっております。少し複雑な表になっておりますが、それぞれF0、F1、F2の世代での各エンドポイントのLOEC、最小の影響濃度が記載されています。

見ていただいたら分かりますけれども、これは先ほどの繰り返しになりますが、総産卵数、受精卵数、受精率ともにF1世代では284という最高濃度で統計的な有意差が確認されましたが、別の手法を使うと89.1というところでも有意差がつく。また、30%程度の低下が見られたということが確認されました。

ほか、体長、湿重量ほか、エンドポイントについてもそれぞれ確認がされてきて、ビデロゲンについてはやや低い濃度の8.54あるいは2.68というところで有意差が確認されたということが分かってきました。

# 4-t-OPの結果まとめ

Unit: µg/L

エンドポイント	F0		F1		F2
	Adult	Embryo-subadult	adult	Embryo	
ふ化率		>284		↓ 99.2	
ふ化日数		>284		↓ 0.926	
生存 (4 wpf)		→284			
Age	15 wpf	10 wpf	15 wpf		
生存	オス	>99.2	↓ 31.1	>99.2	
	メス	>99.2		>99.2	
総産卵数	>99.2		↓ 9.91		
受精卵数	>99.2		↓ 9.91		
受精率	>99.2		↓ 99.2		
体長	オス	>99.2	>99.2	↑ 99.2	
	メス	>99.2	↓ 99.2	↓ 31.1	
湿重量	オス	>99.2	>99.2	↑ 99.2	
	メス	>99.2	↓ 99.2	↓ 31.1	
HSI	オス	>99.2	>99.2	↑ 99.2	
	メス	↓ 99.2	↓ 0.926	↓ 0.926	
GSI	オス	↑ 9.91	>99.2	↓ 99.2	
	メス	↑ 31.1	↓ 31.1	>99.2	
VTG	オス	↑ 31.1	>99.2	↑ 99.2	
	メス	↑ 31.1	↑ 99.2	↑ 0.926	
二次性徴	オス	>99.2	↓ 31.1	↓ 9.91	
	メス	NA	NA	NA	
間性と性転換(表現型)	>99.2	>99.2	>99.2		

MEOGRTの結果、4-t-OPのエストロゲン活性 (VTG↑, SSCs↓)が確認され、繁殖のLOECはF1で (LOEC=9.91 ng/L) であり、F1でF0よりも強い繁殖阻害が認められた。

環境中濃度レベル:  
0.00039~0.031 ng/L (検出頻度 19/24) (環境省, 2012)

HSE: hepatosomatic index, GSI: gonadosomatic index, VTG: vitellogenin, SSCs: secondary sex characteristics, NA: Not available.  
<sup>1</sup> Inconsistency of phenotypic and genotypic sex, and gonad phenotype was observed.  
<sup>2</sup> Genotypic male had female phenotype and ovary.  
 \*Figure in parentheses was calculated by repeated measures ANOVA followed by Dunnett's test.

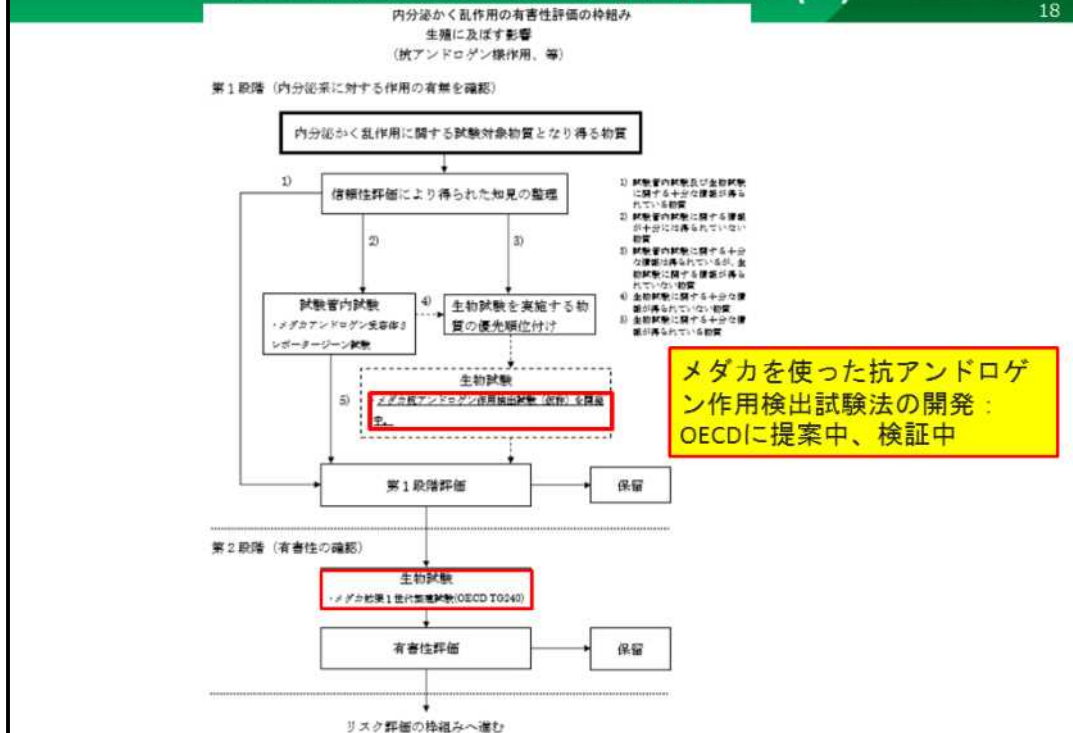
続いてオクチルフェノールですけれども、オクチルフェノールについては、これも先ほどお話ししたとおりですけれども、F1世代の繁殖のところでは9.91というのがLOECになりました。F0世代よりも低いところで繁殖への阻害というのが明らかになってきましたし、ビデロゲニンについても若干それに近いものが得られましたが、ちょっとこのところ有意差のつく、つかないといったところで、若干LOECの値が変わってきているといったところがあります。



1. メダカ拡張一世代繁殖毒性試験(MEOGRT)の試験結果
2. 幼若メダカ抗アンドロゲン作用検出試験(JMASA)の開発と検証
3. ミジンコ幼若ホルモン検出試験法(JHASA)の開発と検証
4. 魚類胚を用いた試験法の検証

続いてJMASA、幼若メダカの抗男性ホルモン作用の検出試験の開発状況について御説明をさせていただきます。

# EXTEND2016の枠組み(3)



こちらは、先ほどの2段階に分かれた段階的な有害性評価の枠組みの中での抗アンドロゲン様作用についてです。最終的な確認の試験はTG240、MEOGRT試験で実施するということなのですが、この検出用の試験、スクリーニング用の生物試験というものが開発されていなかったということもあり、メダカを使った試験法についてOECDに提案し、それについて専門家会議の中で指摘された部分について特に検証を実施してきました。

# 幼若メダカ抗アンドロゲン作用検出試験 (JMASA)



## JMASA



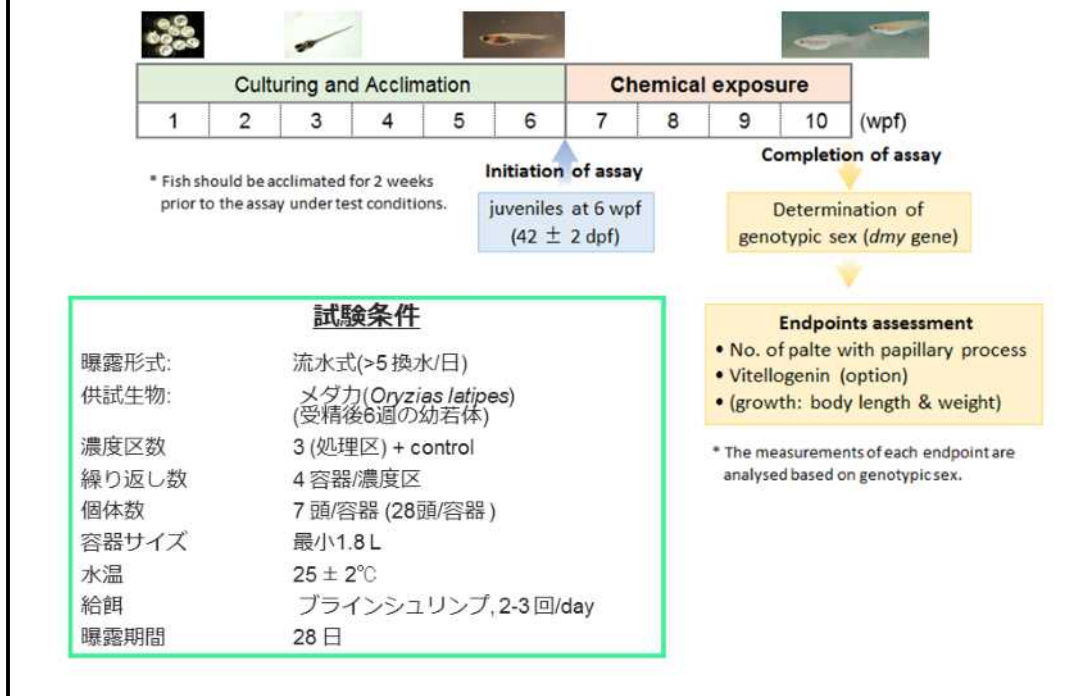
## OECD TG 229 (短期繁殖毒性試験)



JMASA試験、幼若メダカの抗アンドロゲン作用の検出試験の概要ですが、メダカの幼若体、性的に未成熟な幼若体に4週間ばく露することによって、そのばく露後の雄の尻びれの乳頭状小突起を確認することで、抗アンドロゲン作用を確認する試験です。

下側は、OECD TG229の短期繁殖毒性試験なのですが、こちらは成魚からばく露するために、既に乳頭状小突起が出現し、性成熟をした後ですので、化学物質をばく露したとしても、尻びれの乳頭状小突起の消失ということは起こりません。ですので、やや成魚ではなく幼若体を用いることで、尻びれの乳頭状小突起の出現というのをエンドポイントにして、抗アンドロゲン作用を確認するというような試験法になっています。

# JMASA試験のタイムライン



JMASA試験のタイムラインなのですが、42日齢、6週齢の魚を使って4週間ばく露する試験になっております。ただ、ここでは性別が明らかに分かっておりませんので、雄、雌というのは見た目では何となく分かるのですが、まだ分かっていない個体が結構多いですので、7匹導入して4連で実施します。

濃度区は3程度でということになってはいますが、これはあくまでもスクリーニング試験という位置づけですので、そういったような連数、濃度区になっております。

最終的に、尻びれ上の乳頭状小突起やビデロゲン、成長等を確認するというような試験系になっております。

- 検証試験を2016年から実施。
  - ✓ 陽性対照物質(抗アンドロゲン様物質)  
Flutamide, Vinclozolin, Fenitrothion, Linuron, ...
  - ✓ 陽性候補物質: Maneb (実施中)
  - ✓ 他の作用物質(女性ホルモンと男性ホルモン)  
17 $\beta$ -estradiol, estrone, trenbolone, ketoconazole, fluconazole
  - ✓ 陰性物質(成長阻害物質)  
SDS, 塩化亜鉛, クロモリン酸ナトリウム
- JMASAのプロトコル案は専門家会議に2016年提出
- 2018年に検証レポートを報告したが、3か所以上での検証試験が必要であるとの指摘があり、現在進行中。
- ガイダンス文書の素案は2021年専門家会議に提出後、2022年の試験法承認会議に提案予定。

これまでの経緯を御説明させていただきますが、検証試験については2016年からOECDに試験法を提案し、その後継続的に実施してまいりました。抗アンドロゲン様作用を持つとされる陽性対照物質として、フルタミドやビンクロゾリン、それからフェニトロチオンやリニューロンについて試験を実施してきました。

また、これは第1段階の試験管内試験において陽性であるという候補のマンネブについても、昨年度から実施をしております、これについても報告ができるのではないかと考えております。今日はこの結果については、まだ解析途中なので御発表できません。

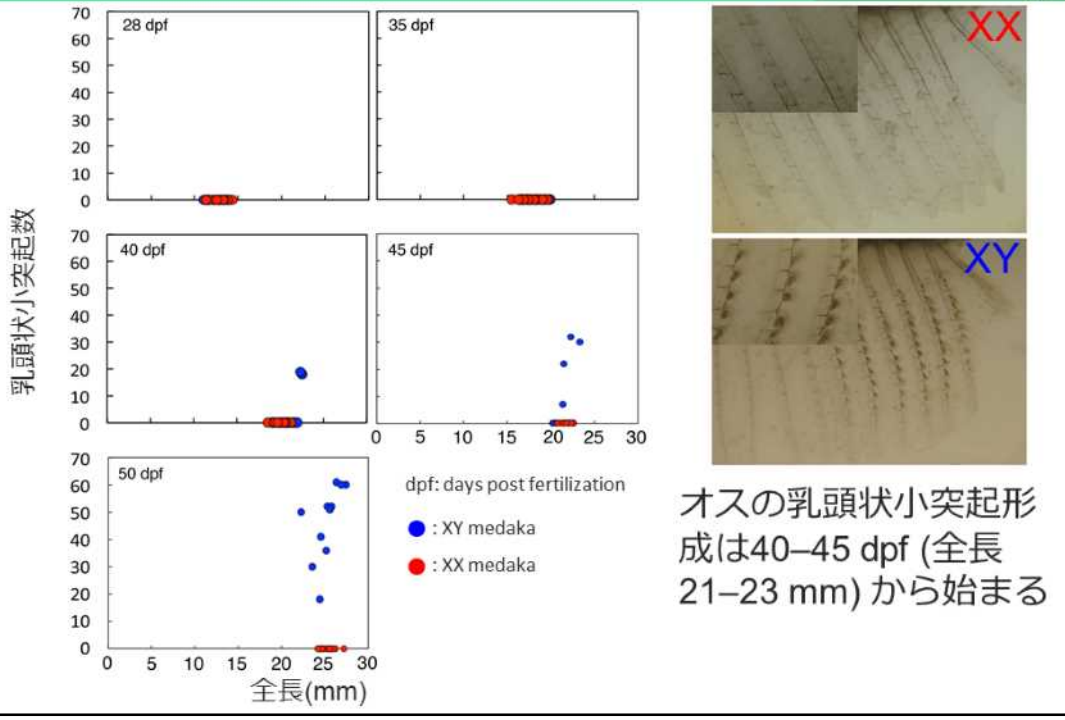
ほかの作用として、女性ホルモン作用であったり男性ホルモン作用そのものについても試験を実施しましたので、それについて。

それから、陰性物質としてクロモリン酸、SDS等がありますので、そういった物質についても試験を実施してきました。

プロトコル案自体は2016年に提出されまして、2018年のOECDの専門家会議において検証レポートを報告いたしましたが、試験の実施のリングテストを3か所以上の試験機関で実施すべきであるといったことの指摘を受けましたので、現在3か所目の試験機関の御協力を頂きながら実施をしているところです。

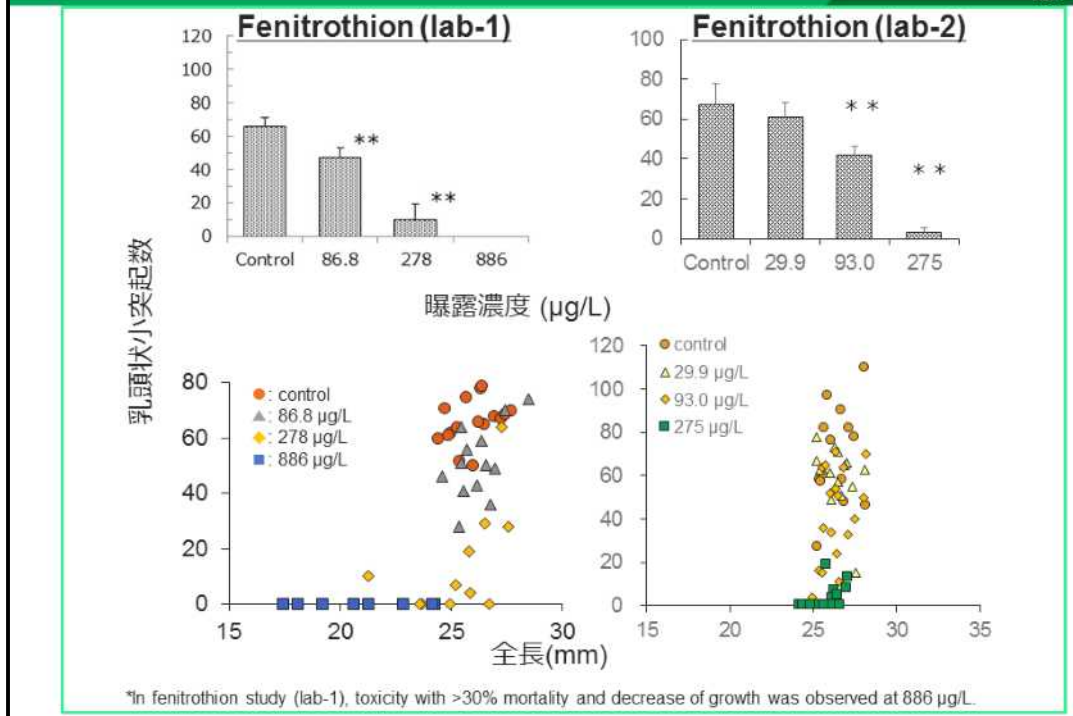
ガイダンス文書を最終的に作成する予定ですが、その素案については2021年10月に開催される予定の専門家会議に提出し、2022年、来年の試験法の承認会議で提案し、承認がされればなと考えております。

# 乳頭状小突起の形成過程



乳頭状小突起の形成過程については、御存じの方は御存じだと思いますが、横軸に全長、それから縦軸に乳頭状小突起数を表しています。それぞれの日齢をここに示していますが、日齢が増えていくに従って性成熟が進んでいき、大体40日～45日後ぐらいから乳頭状小突起が出現してきます。なので、この35日、ここらあたりから試験を実施するというような形で、最終的に乳頭状小突起の出現を確認するといったことになっております。

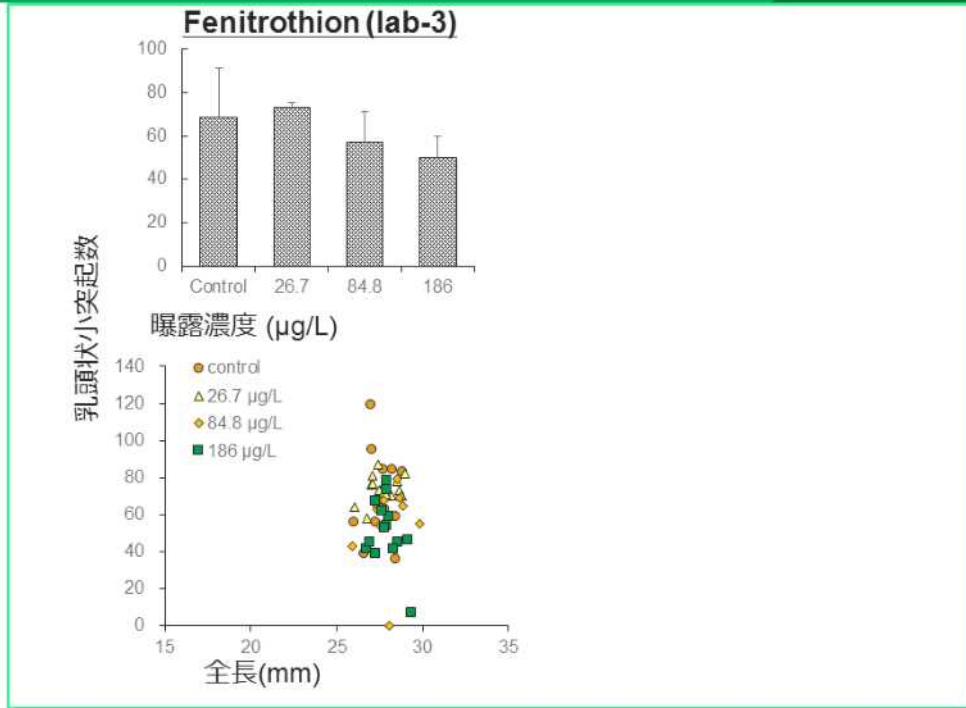
# 検証試験結果 (Fenitrothion)



これは検証試験の結果なのですが、これはそれぞれの試験機関、lab-1とlab-2での結果ですが、フェニトロチオンという陽性と考えられる物質についての試験結果ですが、それぞれlab-1、lab-2とも乳头状小突起の出現数が減少しているといったことが、濃度が上がるに従って減少するということが分かってきました。

ただ、高濃度になってくると、成長自体が抑えられてくるといって成長阻害も起きてきますので、そこをきちんと区別するような濃度を見つけることが、この試験のポイントになってくるかなと考えます。

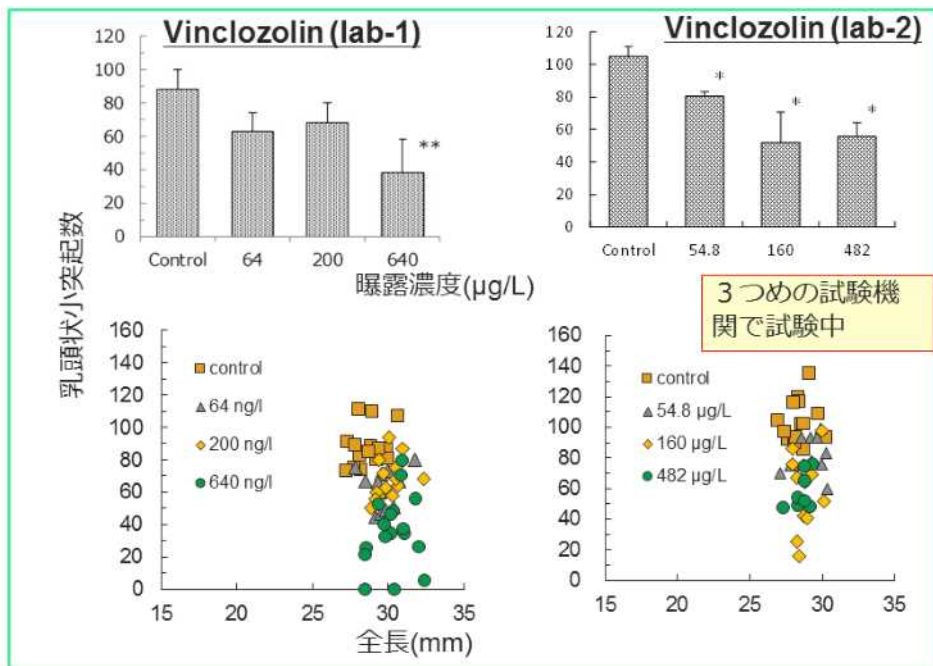
# 検証試験結果(Fenitrothion)



同じように3つ目のlabについても試験を実施していただきました。最高濃度での有意差がつかなかったのですが、若干乳頭状小突起の低下が見られましたので、さらにほかの物質についても現在試験を実施していただきまして、検証を進めているところです。



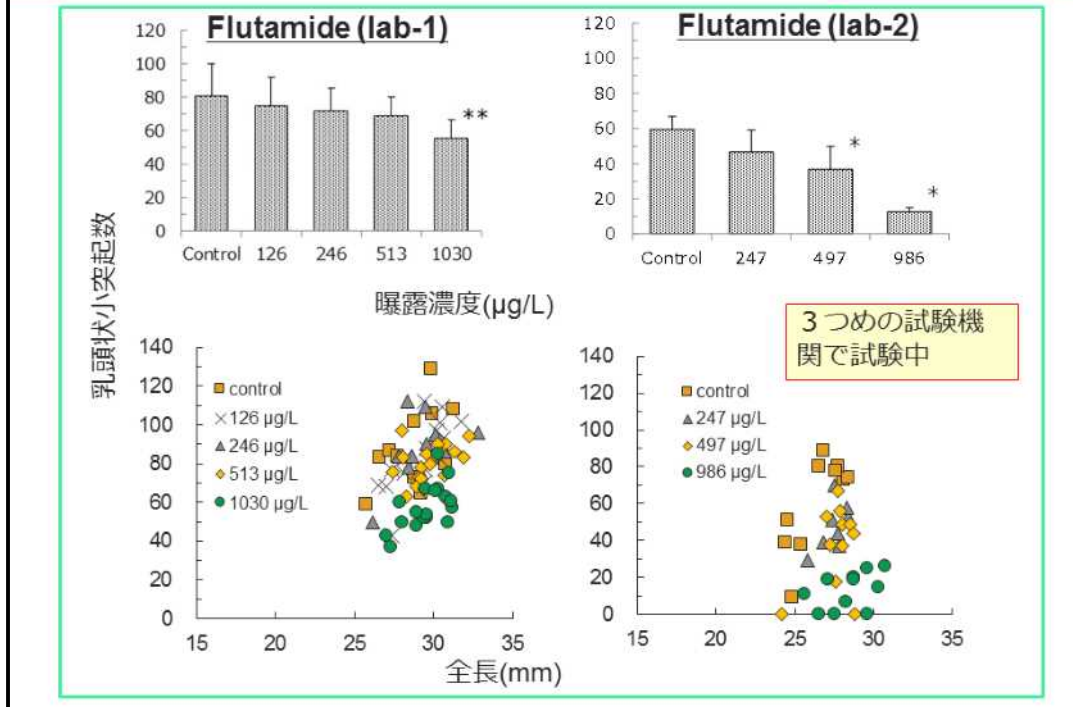
# 検証試験結果(Vinclozolin)



続いてビンクロゾリン、これも抗アンドロゲン作用を持つと考えられる物質ですが、これについても最高濃度区で乳頭状小突起の低下が見られました。1つ目のlabもそうですが、2つ目のlabについては若干低いところでの乳頭状小突起の出現数が低下しましたが、大体傾向としては同程度であるといったことが分かってきましたので、この物質について同じような結果が出るかどうかを3つ目の試験機関で実施しております。

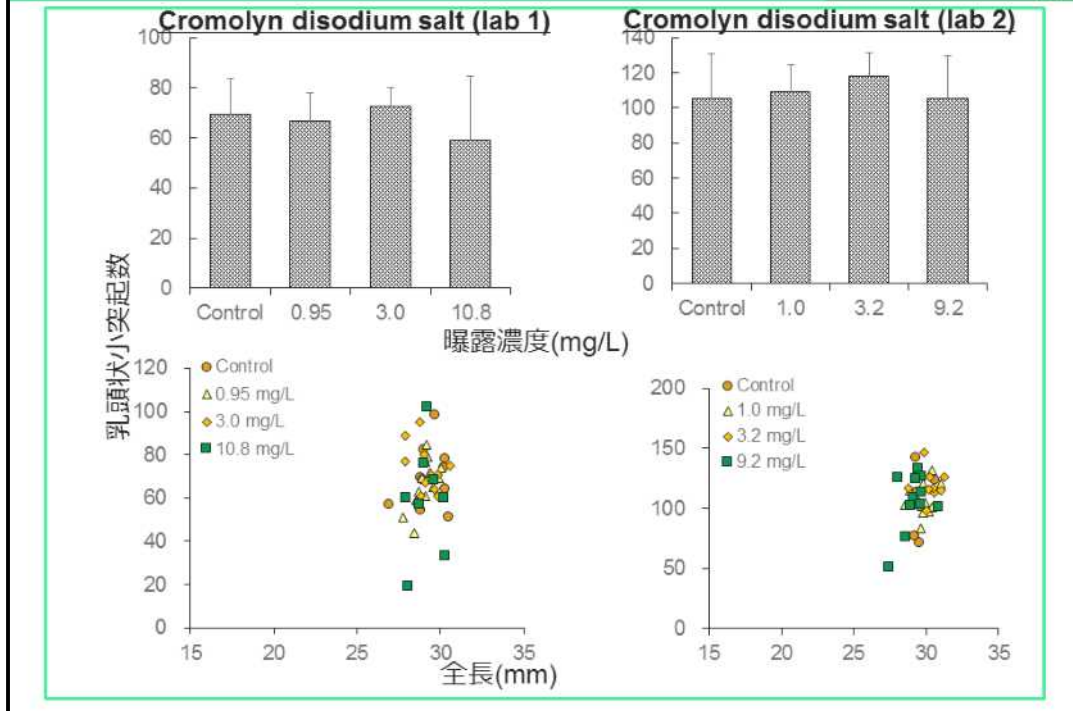
結果としては受け取っておりますが、大体同じような結果が出ておりますので、その結果について、OECDの試験法検証会議に報告できればと考えております。

# 検証試験結果(Flutamide)



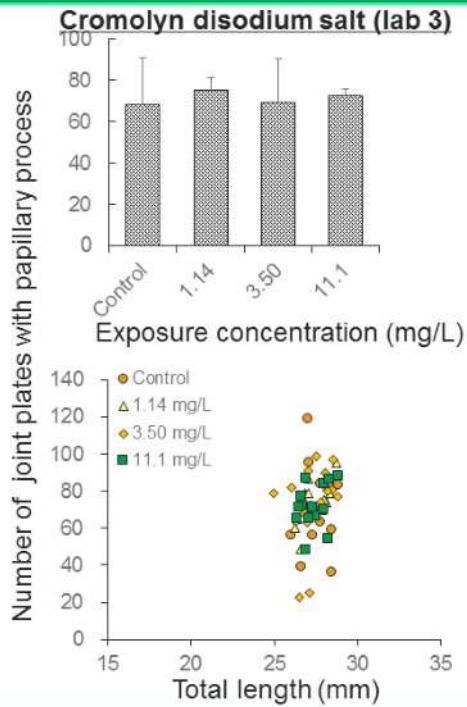
同じように、抗アンドロゲン作用を持つフルタミドについても、最高濃度区で影響が出ています。同じように、lab-2のほうでも影響が出ていますが、若干有意差がつく濃度のところが少し違いますが、いずれにせよそれぞれのこのフルタミドの抗アンドロゲン作用を乳頭状小突起の出現数で確認することができるということが分かっています。3つ目のlabについても、現在結果を取りまとめているところです。

# 検証試験結果（陰性物質）



陰性対照物質としては、クロモリン（クロモグリク酸）という物質が、これはRADARアッセイという胚を使った抗アンドロゲン作用の確認試験でも使われている陰性対照物質なのですが、これを使ってlab-1と、lab-2で実施されまして、これについては同等に乳頭状小突起の減少は認められなかったといった結果になりました。

## 検証試験結果（陰性物質）



これは3つ目のlabについても、結果が出ておまして、同じように乳頭状小突起の減少については見られないといったことが分かっております。

- JMASAの検証結果の結果、この手法によって抗アンドロゲン作用を複数の物質について複数の試験機関で検出することができた。
- この手法は、抗アンドロゲン作用物質の検出だけでなく、エストロゲンやアンドロゲン、ステロイド合成阻害剤の影響も検出できる可能性がある。
- この試験法のキーは、一般毒性による成長阻害と抗アンドロゲン作用をいかにして区別するかである。
- 3つめの試験機関での検証試験は現在進行中である (vinclozolin and flutamide)
- 試験機関での結果を取りまとめ、検証レポートを作成し、OECD 専門家会議で報告予定である。

以上、検証結果の結果をまとめさせていただきますと、この結果として抗アンドロゲン作用を複数の物質について複数の試験機関で検出することができました。この手法については、一部抗アンドロゲン作用でなくてエストロゲン、アンドロゲン、ステロイド合成阻害剤の試験を実施しましたが、それについても同じように乳頭状小突起の出現が低下したり、あるいはビデロゲニンの上昇が確認されたりといったような形で、そういった形でも一部利用できますが、ただエストロゲン作用と抗アンドロゲン作用をどういふふうに区別するかというような問題も少しありますので、そこについては可能性がありますが、まだ十分な検証はできていないと考えています。

この試験法のキーなのですけれども、これ先ほども申し上げましたが、一般毒性による成長阻害という問題もありますので、成長阻害によって乳頭状小突起が出現しないという可能性もありますので、全長、体長に対して影響が出ない、かつ抗アンドロゲン作用が確認できる濃度の設定といったところがポイントになってくるかなと思います。

またもう一つのキーというのが実は体長でして、どこのとこめで始めるかというのが、今日齢で区切られています。やはり成長度合いをきちんとそろえない限りは、若干結果とした違うことになるということもありますので、それも含めて体長との関係について3つの試験機関で実施した結果について検証を実施する予定です。

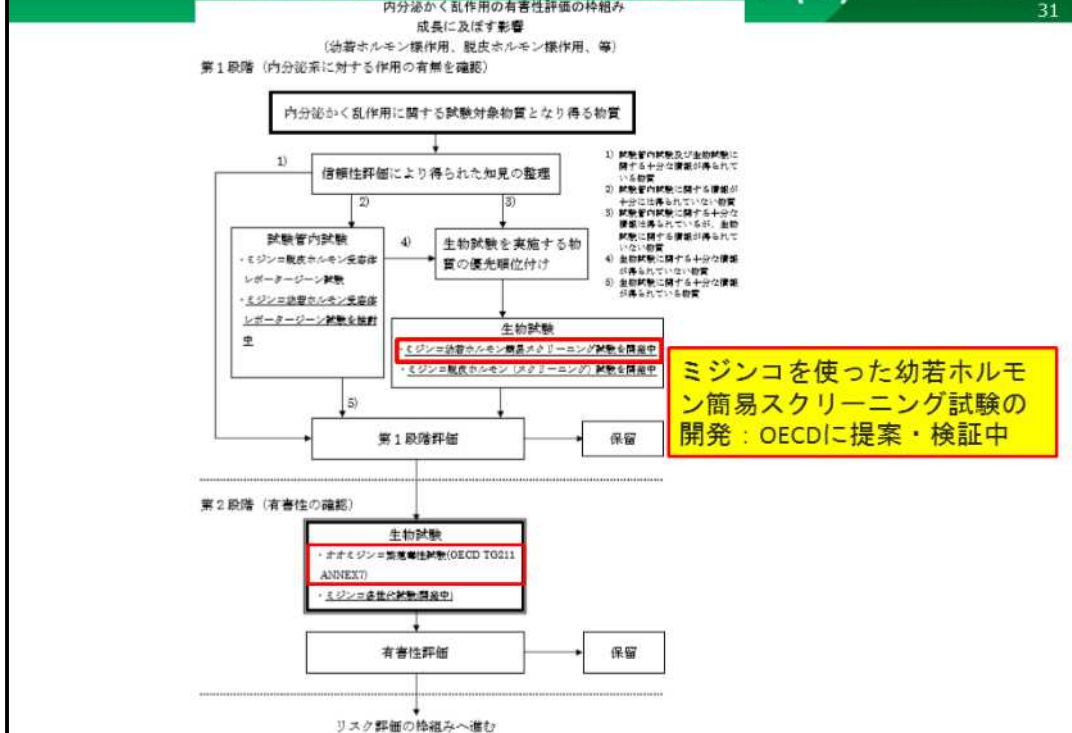
この結果については取りまとめさせていただきます。先ほどお話ししましたよう検証レポートをOECDの専門家会議に提供、報告し、コメントを頂き、最終的にはガイダンス文書として承認されるといったことを期待しております。

# 概要

1. メダカ拡張一世代繁殖毒性試験(MEOGRT)の試験結果
2. 幼若メダカ抗アンドロゲン作用検出試験(JMASA)の開発と検証
3. ミジンコ幼若ホルモン検出試験法(JHASA)の開発と検証
4. 魚類胚を用いた試験法の検証

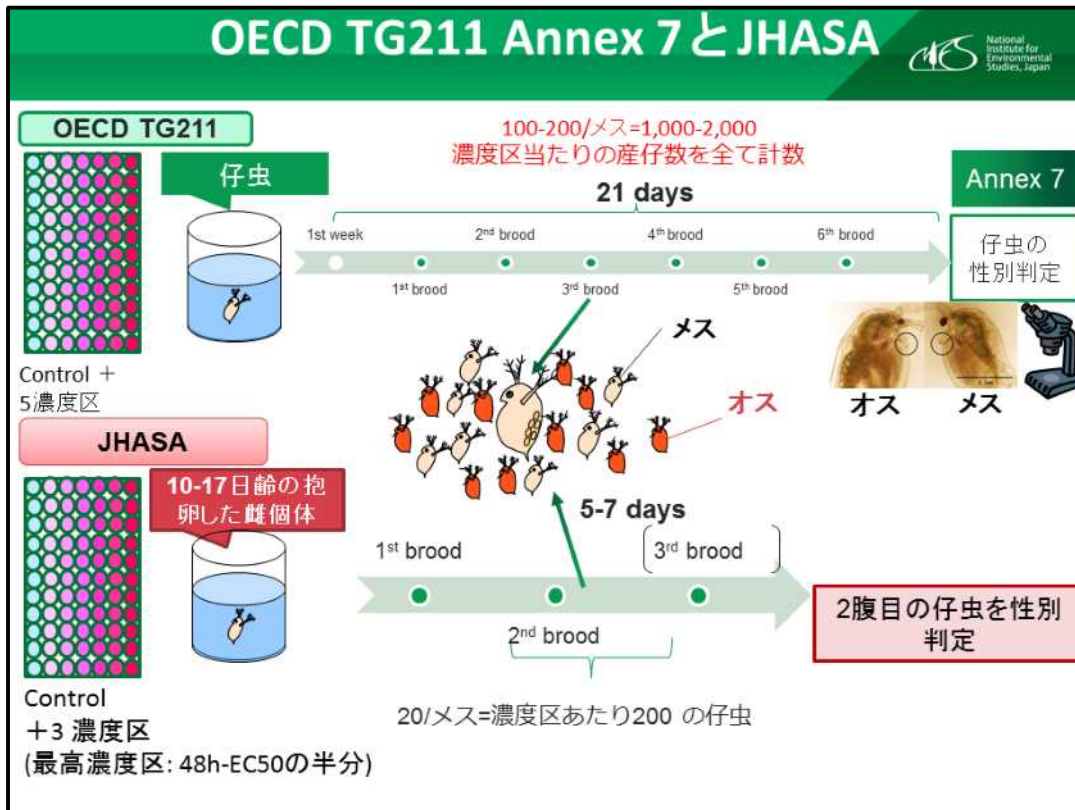
続いて3つ目、ミジンコの幼若ホルモン検出試験法、JHASAと言いますが、この試験法の開発と検証の状況について御報告をします。

# EXTEND2016の枠組み(4)



これは、同じくまたEXTENDの枠組みの中で、幼若ホルモン、あるいは脱皮ホルモン等の検出それから有害性の確認の枠組みになっておりますが、既に第2段階の確認試験としてオオミジンコの繁殖毒性試験、OECD TG211にAnnex 7という雌雄を確認する手法が追加されております。これについては、我々の国立環境研究所で承認、検証し、提案、承認されたものです。

それに対して、検出のスクリーニングの試験というのが十分に整備されていなかったということもありまして、このTG211のAnnex 7というのは21日間ずっとやるということで非常に時間がかかる。1,000匹ぐらい、非常に多くの雌雄を確認しないとイケないということもあって、検出試験が重要だと言われておりましたので、これについて試験法の開発を実施してきました。これについてお話をします。



先ほどもお話ししましたが、21日間、7日目ぐらいから子どもを産みますが、それを合計1匹当たり大体100~200ぐらいの産仔があります。ですので、10回の繰り返いをやると1,000~2,000という非常に多くの個体の雌雄を確認しないといけないということで、非常に今煩雑な試験になっているので、それを一部2腹目のところを切り取って、かなり成長してきて、ある程度産仔が安定してきたというところで、10日~17日齢の雌個体を使って雌雄を判定するというスクリーニング試験法について提案をさせていただいております、この検証の状況についてお話をします。



### 提案書の提出 (2015~2016)

- 2015年にOECD 専門家会議に提案書(SPSF)を提出
- メンバー国からのコメント聴取
- コメントへの回答と修正提案書を提出.

### リングテストの準備(2016~2017)

- リングテストのためのプロトコル案の作成.
- コメントへの対応のための検証試験の実施(系統差、ノンケミカルストレス).
- 陽性対照と陰性対照物質の予備試験の実施.

### リングテスト (2018~)

- 国内試験機関(GLP機関3か所,メーカー, および国環研) が試験法のさらなる改良のための検証試験を実施.
- 2019年からは海外(ノルウェーとフランス)がリングテストに参加.

提案書については、既に2015年に提案して、それぞれ提案後プロジェクトとして認められております。

その後リングテストするためのプロトコル案を作成し、その際に専門家からは検証試験を実施するべきだ、系統差はどうか、あるいはノンケミカルストレスと言われているような温度や密度、硬度等の影響について調べるべきだということで、予備試験を実施しまして、2018年から国内、国外の試験機関に御協力頂きまして、リングテストを実施してきました。

### 温度

- 飼育とJHASA: 20°C, 28°C, 30°C
- 飼育 ( 30°C ) → JHASA ( 20°C )
- 飼育 ( 10°C ) → JHASA ( 20°C )

### 硬度

250, 500, 1000 mg CaCO<sub>3</sub> /L

### 密度

35, 70, 105 頭/L (給餌量は比例して増加)

### 栄養状態

35, 70, 105 頭/L (給餌量はそのまま)

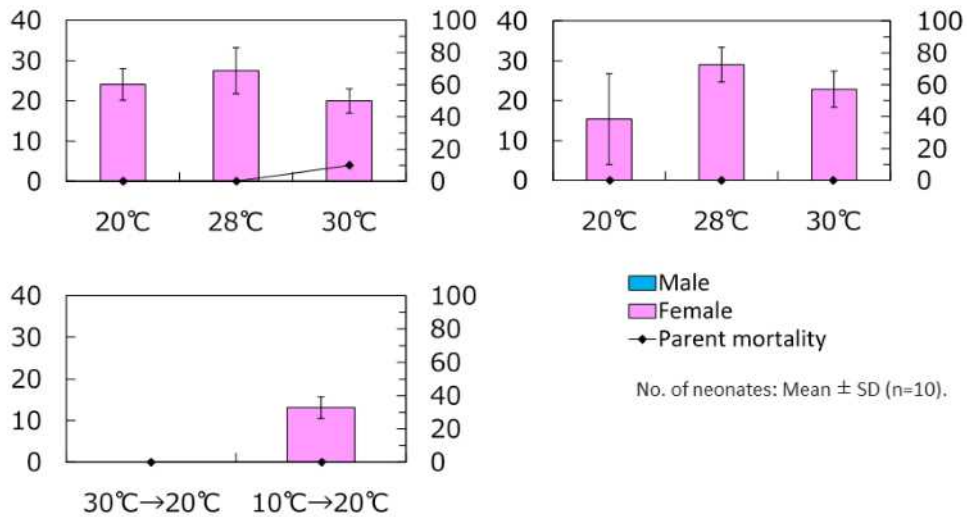
その結果についてもう既に御報告しているところですが、本日はノンケミカルストレスの話の少し御紹介したいと思います。

ノンケミカルストレスというのは、先ほども少しお話ししました温度や硬度、密度、栄養状態が変わることによって、ミジンコの雄が出現するのではないかというような話です。

これについて十分な知見がなく、その影響がかなりあるのではないかということを確認するべきだという専門家の御意見に従って検証を実施してきました。

## 温度の影響

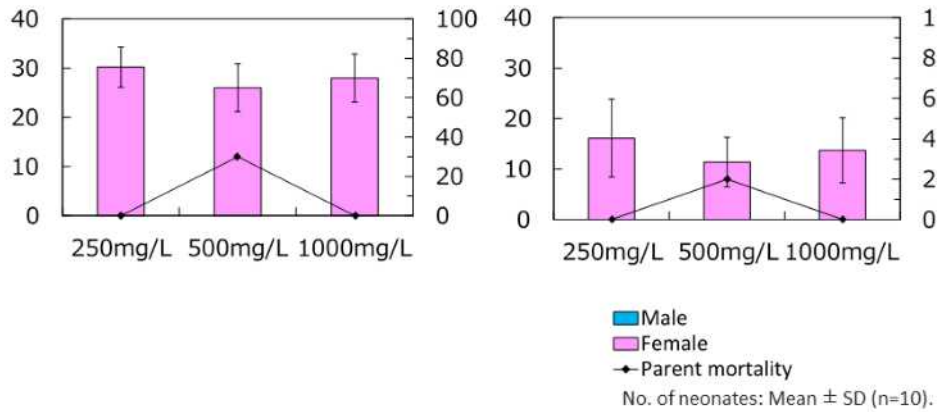
- すべての試験区でオスの産生は確認されなかった
- 30℃では、繁殖は減少傾向を示した.
- 30℃で飼育後にJHASAを20℃で実施した際は産仔が認められなかった.



例えば温度なのですが、20℃、28℃、30℃と高温になるとその傾向があるのかなということだったのですが、実際、雄の産生というのは確認されませんでした。ただ30℃になってくると、繁殖自体が低下するといったような問題があるということも分かってきましたし、30℃で飼育後20℃にしても産仔が見られないといったことも分かってきました。

## 硬度の影響

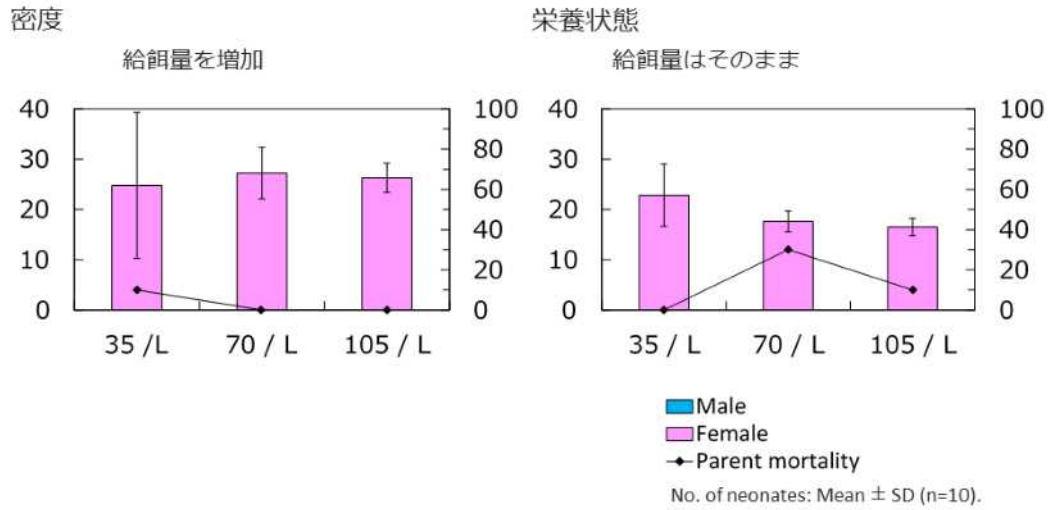
- すべての試験区でオスの産生は確認されなかった
- 硬度を高くしても、産仔数には影響が認められなかった。



続いて硬度ですけれども、高硬度になるとこれも同じように産仔に影響があるかということ、あるいは雄の出現があるかということをお調べしたのですが、これについては影響がないといったことが分かってきました。

# 密度と栄養状態

- すべての試験区でオスの産生は確認されなかった
- 高密度でも給餌量を増やした際は産仔数は減少しなかった。
- 高密度で給餌量を増やさない場合は産仔数が減少した。



密度について、給餌量を増加して密度を増やす、あるいは給餌量をそのまま密度を増やすという条件でやりましたが、これについても影響が確認はされませんでした。

## JHASA試験のまとめ

- JHASA試験の7機関でのリングテストにより、幼若ホルモン作用の検出に利用可能であることが改めて示された。
- JHASA はOECD TG211 Annex7に比べて、幼若ホルモン作用物質の検出の際に大きく時間と労力を削減することができる。
- リングテストはOECD専門家会議に報告済。
- OECDテストガイドラインに加えるには、統計解析を導入する必要がある。
- JHASA 試験には、温度、硬度、密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。
- 光周期(暗所、明期10h, 24hなど)の影響について調査予定。

ということで、JHASAについては既に7機関でのリングテストが終了しておりまして、陽性対照物質、陰性対照物質、1物質ずつの結果を報告しております。これについては、それぞれ若干の差がありますが、ほぼ同等の結果が起っています。

ですが、ノンケミカルストレスについては検討が十分でなかったということで、今回検討させていただきましたが、特に重要な影響を及ぼすということはありませんでした。

ただ、光周期のところについてまだ十分終わっておりませんので、これについては今結果を取りまとめているところですが、それについて併せて報告をする予定です。

リングテストの結果は、既に昨年OECDの試験法の専門家会議のところで御報告をしているところです。

1. メダカ拡張一世代繁殖毒性試験(MEOGRT)の試験結果
2. 幼若メダカ抗アンドロゲン作用検出試験(JMASA)の開発と検証
3. ミジンコ幼若ホルモン検出試験法(JHASA)の開発と検証
4. 魚類胚を用いた試験法の検証

最後に、魚類胚を用いた試験について御紹介をします。

- 欧州を中心にした動物福祉(Animal Welfare)の広がり  
は、化粧品の動物実験の禁止にとどまらず、魚類試験  
にもその波がやってきている。
- 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)の概念の導入など。
- 内分泌かく乱作用も、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討が進む
- 魚類胚を用いた3試験法がOECDに提案中

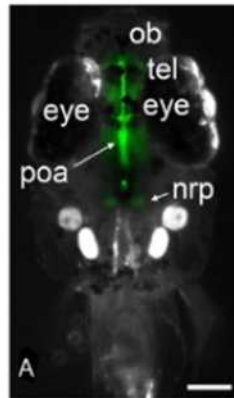
魚類胚を用いた意見というのは、欧州を中心に動物福祉の概念が広がっておりますので、その概念が脊椎動物ということで、哺乳類、げっ歯類だけではなくて、魚類試験にも来ているというところがあります。

そういった観点で、急性毒性試験、OECDのTG203ですが、これがなかなか使用できない、あるいはその中に瀕死症状というのを入れましょう、あるいは魚類胚を用いた試験にしましょうといったことになって変わってきています。

その一環もありまして、内分泌かく乱作用の確認についても、魚類胚を用いた試験が使えないのかといったようなことで、トランスジェニックな魚を使って、魚類の胚を使った試験法が幾つか提案されておりますので、それについて御紹介します。



- セブラフィッシュの胚を用いたEASZYアッセイ  
（cyp19a1b-GFP遺伝子導入ゼブラフィッシュ胚を用いたエストロゲン受容体を介する内分泌かく乱物質の検出試験）が2013年にフランスからOECDに提案
- 検証試験が進められている



cyp19a1b-GFPトランスジェニックゼブラフィッシュにエストロゲンをばく露した際の仔魚の背面図 <sup>1)</sup>

(tel: telencephalon; 終脳、poa: preoptic area; 視索前野、nrp: nucleus recessus posterioris; 核後陥凹)

1) Brion, et al. (2012), PLoS ONE 7(5): e36069.

1つ目が、EASZYアッセイと言われる方法ですが、ゼブラフィッシュの胚を用いた方法で、これはアロマターゼのプロモーターを導入したのですが、ゼブラフィッシュの胚を用いたエストロゲン受容体を介する内分泌かく乱物質の検出試験になっていますが、これについては現在検証を進められているところで、いずれこれは承認されると考えられています。

# RADARアッセイ

- RADARアッセイ（イトヨのスピギン-GFPタンパク遺伝子を導入したメダカ胚を用いた迅速男性ホルモンかく乱有害性レポーター試験）は、英国のKatsiadakiら<sup>2)</sup>が開発・提案したイトヨのオス特異的なスピギンタンパクを用いた抗アンドロゲン作用検出試験法を元にしたものでOECDに提案中。
- Watch frog社<sup>3)</sup>では、日本の基礎生物学研究所（井口先生ら）のグループとともに、spg1-GFPを導入したメダカ胚を用いた簡易試験法を開発



2) Katsiadaki et al. (2006) Environ Health Persp, 114 Suppl 1, 115–121.

3) Laboratoire Watchfrog Website, Androgen Test ([https://www.watchfrog.fr/test\\_androgenique.php](https://www.watchfrog.fr/test_androgenique.php)).

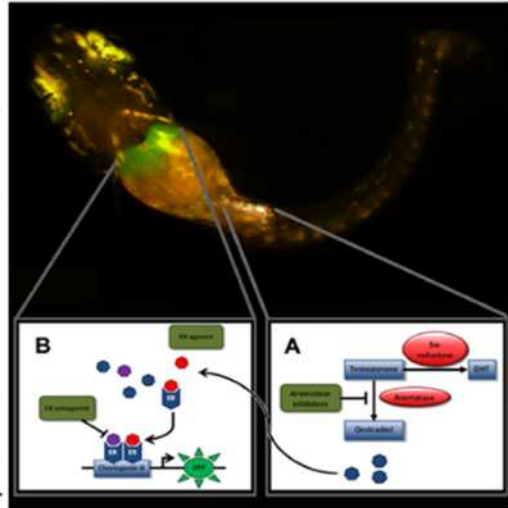
続いてRADARアッセイという試験法ですが、これはメダカの胚にイトヨのスピギンたんぱくと言われている男性ホルモンを発現することで産生するようなたんぱくを導入した試験法です。

これについては、抗アンドロゲン作用を確認するために、アンドロゲンと共ばく露することによってできるのではないかとといったようなことで、提案をされています。

既にこれについてはかなり検証が進んできておりまして、もしかしたら一部、後で大西さんのほうから御紹介頂くかもしれません。Watch frog社というフランスの会社で作成されて、井口先生らのグループと共に開発された試験法です。

# REACTIVアッセイ

- Watchfrog社および基礎生物学研究所・横浜市立大学（井口先生ら）のグループは、卵膜前駆タンパクのコリオジェニンHプロモーターとGFGタンパクを導入したメダカを開発し、女性ホルモン軸（エストロゲン受容体アゴニストとアンタゴニスト）およびステロイド合成軸などへの影響を迅速に検出するアッセイを新たに提案<sup>4)</sup>。
- このトランスジェニックメダカの胚を用いて、REACTIV（Rapid Estrogen ACTivity Tests In Vivo: 迅速な*in vivo*によるエストロゲン活性検出試験）と呼ばれる試験法が、2020年4月のOECDに提案され、その検証試験に協力している。



4) Spirhanzlova, et al. (2016). Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol Pharmacol, 179, 64–71.

5) Laboratoire Watchfrog Website, Estrogen Test ([https://www.watchfrog.fr/test\\_estrogenique.php](https://www.watchfrog.fr/test_estrogenique.php)).

同じフランスのWatch frog社と井口先生らのグループで開発された方法としては、REACTIVという、今度はメダカを使ったエストロゲン作用の検出の試験法というのが提案されています。

これについては、我々も現在検証実験について協力を実施しているところです。少し先ほどと違うのは、コリオゲニンのプロモーターなどを導入しているといったところが、EASZYアッセイはゼブラフィッシュですので、少し違うところかなと思いますので、メダカを使って一貫して評価ができるという意味では、我々がEXTENDでやっている枠組みにも一部利用できる可能性があるのではないかと考えております。

1. メダカ拡張一世代繁殖毒性試験(MEOGRT)の試験結果
2. 幼若メダカ抗アンドロゲン作用検出試験(JMASA)の開発と検証
3. ミジンコ幼若ホルモン検出試験法(JHASA)の開発と検証
4. 魚類胚を用いた試験法の検証

ということで、本日4つの案件について御紹介をさせていただきました。

## Sponsors:

Ministry of the Environment, JAPAN  
Environmental Restoration and Conservation  
Agency (ERCA)

We appreciate the efforts of all the collaborators,  
especially the volunteers for the ring tests.

最後、今回こういった機会を与えていただきまして、環境省環境保健部安全課と事務局に感謝をいたします。

以上です。