

1. 魚類

有害性評価結果のうち、平成 12 年度選定の優先 12 物質については、平成 14 年 6 月に公表。

平成 12 年及び平成 13 年選定の優先物質についての試験結果については、資料 2-2-6 を参照。

(1) スクリーニング

曝露濃度は、環境実態調査結果により得られた魚類の推定曝露濃度を参考に、被験物質の水溶解度、一般毒性値、内分泌攪乱作用を示すと疑われた試験結果（信頼性評価済み）及び水中での検出限界値等を考慮して、5 群設定。

① ビテロジェニンアッセイ

雄メダカを化学物質に 21 日間曝露し、ビテロジェニン産生能力を測定することにより、化学物質のエストロジェン様作用の有無・程度を把握する。

本アッセイについては、現在、優先 20 物質について試験を実施・終了。

なお、本年 3 月より OECD において、魚類のビテロジェニンアッセイの標準化を目的としたリングテストが開始され、日本がリードラボとして結果を取りまとめることとなっている。

※ ビテロジェニン：肝臓で合成される卵黄タンパク前駆体。

繁殖期の雌成魚で特に産生される。エストロジェン様物質に曝露された雄の肝臓でも産生される。

② パーシャルライフサイクル試験

化学物質をメダカに受精卵から成熟期を通して約 70 日間曝露することにより、主に性分化への影響を把握する試験であり、孵化、孵化後の生存、成長、二次性徴、生殖腺組織、ビテロジェニン産生等をエンドポイントとする。

本アッセイについては、既に優先 20 物質について試験を実施・終了。

③ FLF・d-rR メダカ試験

胚の白色色素の有無により遺伝的な性別が判別できる FLF メダカや体色により遺伝的な性別が判別できる d-rR メダカなどの試験生物の開発を進めており、これらを用いたアーリーライフステージ試験法を開発中。

(2) 確定試験

○ フルライフサイクル試験

化学物質をメダカに少なくとも 2 世代（約 180 日間）にわたり曝露することにより、発達、成熟、繁殖期を含む全生涯を通しての影響を把握する試験であり、孵化、孵化後の生存、成長、二次性徴、生殖腺組織、ビテロジェニン産生、産卵数、受精率等をエンドポイントとする。

曝露濃度は、パーシャルライフサイクル試験結果を参考に、原則として 5 群設定。

本アッセイについては、優先物質であるノニルフェノール、4-オクチルフェノール及びフタル酸ジ-n-ブチルについて既に試験を終了し、ノニルフェノールについては平成 13 年 8 月に、4-オクチルフェノール及びフタル酸ジ-n-ブチルについては平成 14 年 6 月に結果を公表。なお、陽性対照物質のうち 17β-エストラジオール、エチニルエストラジオール、メチルテストステロン、フルタミドの 4 物質についても試験を実施。

(3) 試験管内 (*in vitro*) 試験

①レセプターバインディングアッセイ

化学物質のメダカエストロジェンレセプター (ER α 及び ER β) への結合能力を測定するアッセイを開発し、優先 20 物質について試験を実施・終了。また、メダカ甲状腺レセプター (TR α) への結合性を測定するアッセイ系の開発に成功。

②レポータージーンアッセイ

レセプター遺伝子及びレポータージーンを導入したヒト子宮頸ガン由来 HeLa 細胞を用いることにより、化学物質のメダカエストロジェンレセプター (ER α 及び ER β) 及びアンドロジェンレセプター (AR) への結合後の転写活性能力を測定するアッセイを開発し、優先 20 物質について試験を実施・終了。

(4) 標準データベース作成

各種試験に際し正常な個体の成長や生殖腺の発達状況を把握するため、パーシャルライフサイクル試験の飼育方法に準じ、定期的に体重及び生殖腺の発達などについて、測定、観察、記録を行い、標準データベースを作成。

平成 14 年度は、非曝露の対照群のデータを取得し、標準データベースの原案を作成すると共に、過去に実施した試験において得られた曝露個体の生殖腺分化異常についても例示し、(独) 国立環境研究所ホームページ上で公開。

(<http://w-edcdb.nies.go.jp/SHf/index.html>)

(5) その他

遺伝子技術を用いて、内分泌攪乱化学物質によるメダカの性分化に及ぼす影響とその作用メカニズムを明らかにするための取組を行っており、平成 13 年には、魚類の性決定遺伝子として、メダカ性決定遺伝子 (DMY) を発見・同定し、世界的科学雑誌である Nature 誌に発表するなどの成果をあげた。

また、メダカの性分化制御に関わる遺伝子群の一部のクローニングを終了し、メダカの性分化制御に関わる遺伝子群及び魚類の性決定遺伝子のうちメダカの性分化時における各種遺伝子の発現パターンを調査した。

今後、引き続き、性分化の時期に発現している遺伝子を収集し、性分化に関わる遺伝子群を用いた DNA チップを作成するための研究を行う予定。

2. 鳥類

(1) スクリーニング

①ビテロジェニンアッセイ

雄日本ウズラの腹腔内に化学物質を 7 日間投与し、血清中ビテロジェニンを測定することにより、化学物質のエストロジェン様作用の有無・程度を把握する。

本アッセイについては、感度を上げるとともに、ビテロジェニン測定用キットの開発に成功し、優先 20 物質について試験を実施・終了。

②クロアカ試験

日本ウズラを試験生物として男性ホルモンの標的組織である総排泄隆起 (クロアカ腺) の大きさをエンドポイントとして、化学物質のアンドロジェン様作用又は抗アンドロジェン様作用の有無・程度を把握する。

平成 14 年度まで、本アッセイの確立に向けたパイロット試験を実施したが、十分な感度が得られないため平成 15 年度以降は継続しないこととした。

③性転換試験

WE系（正常羽装）とAWE系（羽装により遺伝的性が判別可）のF₁卵に化学物質を投与し、孵化前にF₁の遺伝的性を確認し、その個体の生殖腺への影響を評価する。

現在、本アッセイについては、陽性対照物質等によるパイロット試験を実施している。

(2) 確定試験

○1世代繁殖毒性試験

平成14年度は、日本ウズラを試験動物とし、OECDの1世代繁殖毒性試験（TG206）に、ビテロジェニン測定や生殖腺組織（精巣卵の発生等）等をエンドポイントとして追加することを目標としたパイロット試験を実施した。

(3) 試験管内（*in vitro*）試験

○レセプターバインディングアッセイ

化学物質の日本ウズラのエストロジェンレセプター（ER α 及びER β ）及びアンドロジェンレセプター（AR）への結合能力を測定するアッセイを開発し、優先20物質について試験を実施・終了。

3. 両生類

(1) スクリーニング

①変態アッセイ

無尾両生類の幼生の変態過程において化学物質に4～6週間曝露することにより、甲状腺ホルモン様作用を検出する試験であり、尾の退縮などをエンドポイントとする。

平成14年度は、アフリカツメガエルを試験動物として陽性対照物質（T4、PTU）による試験を行い、国際的なリングテストに結果を提供した。

また、在来種であるツチガエルを試験動物とした予備実験を行い、陽性対照物質の濃度、温度及び飼育密度について適切な試験条件を確認した。

②ビテロジェニンアッセイ

雄アフリカツメガエルを化学物質に曝露し、ビテロジェニン産生能力を測定することにより、化学物質のエストロジェン様作用の有無・程度を把握する。

平成14年度は、魚類と同程度の感度を有するアフリカツメガエル・ビテロジェニン測定用キットを作成した。

③性転換試験

人為的に作出したZZ（雌）*と、ZZ（雄）とを交配することにより得られたF₁（全雄）に対し、化学物質を曝露した個体の生殖腺における卵巣構造の発達を確認することにより、その個体の生殖腺への影響を評価する。

平成14年度は、陽性対照物質（17 β -エストラジオール）による予備実験を行い、その有効性を確認。

*野生型アフリカツメガエルの染色体型はZWである。

(2) 試験管内（*in vitro*）試験

○レセプターバインディングアッセイ

アフリカツメガエル・エストロジェンレセプター（ER α ）への結合能力を測定す

るアッセイを開発。

(3) 標準データベース作成

変態試験に際し正常な個体の成長、発生を定義するため、標準プロトコール (XEMA) に準じてアフリカツメガエルを飼育し、定期的に全長、尾長、発生段階及び生殖腺・甲状腺の発達について、測定、観察、記録を行い、標準データベースを作成する。

平成 14 年度は、非曝露の対照群のデータを取得し、標準データベースを作成し、(独) 国立環境研究所ホームページ上で公開。

(<http://w-edcdb.nies.go.jp/AMPH/atlas/index.html>)

4. 無脊椎動物

無脊椎動物のスクリーニング・試験法開発は、平成 14 年度から開始。

無性生殖を行うため通常雌しか存在しないオオミジンコが、幼若ホルモンの存在下では雄が発生するという現象を用いて、OECD の急性毒性試験 (TG211) にエンドポイントとして仔虫の性比等を追加することを目標とした調査研究を進めた。

平成 14 年度は、陽性対照物質である幼若ホルモンを用いた曝露試験を実施し、本試験が有効であることを確認した。

5. 評価体制

生態系の専門家からなる「内分泌攪乱化学物質の生態影響に関する試験法開発検討会」を設置し (鳥類、両生類、無脊椎動物についてはそれぞれサブグループを更に設置)、①物質ごとのプロトコール及び②そのプロトコールに則った実施状況や試験結果について助言評価を行っている。

(別添)

内分泌攪乱化学物質の魚類への影響評価のための試験体系について

※必要に応じて、物質ごとに試験を追加する。

