

Environment Research and Technology Development Fund

環境研究総合推進費 終了研究成果報告書

化学物質による生態影響の新たな評価体系に関する研究
(5-1556)

平成27年度～平成29年度

The Study about a New Evaluation System of the Ecological Effect with Chemicals

〈研究代表機関〉
愛媛大学

〈研究分担機関〉
国立研究開発法人国立環境研究所

平成30年5月

目次

I. 成果の概要	4
1. はじめに（研究背景等）	
2. 研究開発目的	
3. 研究開発の方法	
4. 結果及び考察	
5. 本研究により得られた主な成果	
6. 研究成果の主な発表状況	
7. 研究者略歴	
II. 成果の詳細	
II-1 諸外国の試験法の精査/試験法のアルゴリズム (愛媛大学)	16
[要旨]	
1. はじめに	
2. 研究開発目的	
3. 研究開発方法	
4. 結果及び考察	
5. 本研究により得られた成果	
6. 国際共同研究等の状況	
7. 研究成果の発表状況	
II-2 繁殖影響試験など長期かつ多世代の影響を評価する試験法の開発（サブ1） (愛媛大学／国立研究開発法人国立環境研究所)	62
[要旨]	
1. はじめに	
2. 研究開発目的	
3. 研究開発方法	
4. 結果及び考察	
5. 本研究により得られた成果	
6. 国際共同研究等の状況	
7. 研究成果の発表状況	
8. 引用文献	
II-3 生態系を構成する主要生物を用いた試験法の研究および特殊な物性や作用を持つ物質を対象 とした評価法の研究（サブ2） (国立研究開発法人国立環境研究所)	67
[要旨]	
1. はじめに	
2. 研究開発目的	
3. 研究開発方法	
4. 結果及び考察	
5. 本研究により得られた成果	
6. 国際共同研究等の状況	
7. 研究成果の発表状況	

8. 引用文献

II-4 *in vitro*毒性試験・*in silico*解析や作用メカニズムに基づく毒性予測手法の研究（サブ3）
 （国立研究開発法人国立環境研究所） 85

[要旨]

1. はじめに
2. 研究開発目的
3. 研究開発方法
4. 結果及び考察
5. 本研究により得られた成果
6. 国際共同研究等の状況
7. 研究成果の発表状況
8. 引用文献

III. 英文Abstract 92

1. 成果の概要

課題名 5-1556 化学物質による生態影響の新たな評価体系に関する研究
 課題代表者名 鑑迫 典久（愛媛大学 教授）
 研究実施期間 平成27～29年度
 累計予算額 66,264千円（うち平成29年度：20,965千円）
 予算額は、間接経費を含む。

本研究のキーワード 生態毒性、多世代、内分泌かく乱、ネオニコチノイド、アルゴリズム、動物愛護、AOP

研究体制

- （サブ1）繁殖影響試験など長期かつ多世代の影響を評価する試験法の開発（愛媛大学H29／国立研究開発法人国立環境研究所H27～28）
- （サブ2）生態系を構成する主要生物を用いた試験法の研究および特殊な物性や作用を持つ物質を対象とした評価法の研究（国立研究開発法人国立環境研究所）
- （サブ3）*in vitro*毒性試験・*in silico*解析や作用メカニズムに基づく毒性予測手法の研究（国立研究開発法人国立環境研究所）

1. はじめに（研究背景等）

現代社会の中で使用されている化学物質はその量、種類共に年々増加しており、CAS(Cheical Abstracts Service)に登録されている化学物質は1億を超えている。わが国では化学物質による生態系への悪影響を最小化するために、化学物質審査規制法（化審法）をはじめとする化学物質管理制度においてリスク評価が実施されているが、その中で使用される生態影響試験は数種類の試験生物による限定的なものであり、持続可能な生態系と生物多様性を確保するには、十分とはいえない。諸外国では多くの生物試験法が開発、登録されており、例えばOECDのテストガイドラインでは既に47種類の*in vivo*生態毒性試験法が存在し、増加および多様化する化学物質に対応すべくほぼ毎年何らかの追加、改訂が行われている。一方、わが国の化審法には数種類の*in vivo*試験法しか存在していない。さらに、多様な生物に対する試験法、長期・多世代影響試験法、ナノマテリアルや内分泌かく乱化学物質のように、特殊な物性・作用を持つ新たな化学物質の評価手法などは世界的にも研究途上にある。動物愛護や試験期間・費用の削減の観点からは代替試験法も求められており、*in vitro*毒性試験、*in silico*解析や作用メカニズムに基づく簡便かつ迅速な毒性予測手法の開発も必要とされている。

そこでそれら諸外国の試験法を精査し、高度な試験手法、多様なエンドポイントをもち、長期間・多世代におよぶ試験法についてその特徴を明らかにするとともに、我が国での必要性および実行可能性を検討した。次に生態系の多様性を考慮し、生態系を構成する上での主要と目される生物を用いた試験法についてその特徴を明らかにするとともに、既存化学物質とは異なる特殊な物性や作用を持つ物質を対象とした試験法について我が国での必要性、実行可能性を検討した。またわが国では導入されていないが、欧米では盛んに使われている、ゼブラフィッシュの「胚期」と「仔魚期」における急性毒性試験を検討した。さらに諸外国で用いられている*in vitro*、*in silico*試験法およびAOPについて、最新の情報を得た。

我が国に上記の試験法が導入された場合に、それらを効率よく利用する体系を作る必要がある。そのため試験法選択のアルゴリズム案を考案した。諸外国の試験法の精査については、サブテーマを超えて全員で取り組んだ。また試験法のアルゴリズム作成に関しても最終年に全員で取り組んだため、冒頭に記載することにした。

2. 研究開発目的

諸外国の化学物質管理制度に用いられている生物試験法の動向を把握し、現行の化学物質審査法に補完すべき試験法の妥当性を検討し、新たな生物試験法を含めた次世代の化学物質評価体系案を提案する。まず、諸外国の試験法を精査し、その特性を明らかにした上で、我が国での必要性、実行可能性を検討し、重要度の

優先順位を付けてリストを作成し、長期かつ多世代の影響を評価する試験法、新たな生物種を用いた試験法、特殊な物性や作用を持つ物質を対象とした試験法、*in vitro*試験や*in silico*解析など作用メカニズムに基づいた毒性予測手法を対象としてそれぞれ国内への導入を検討する。

魚類拡張一世代試験と多世代毒性試験法のエンドポイントの比較を行うことにより、多世代試験の必要性について考察する。具体的には既存のメダカ拡張1世代試験(MEOGRT)の曝露期間を延長することにより魚類の多世代毒性試験とした。さらに、既存のOECDテストガイドラインの繁殖をエンドポイントとするNo. 229と2次性徴をエンドポイントとするNo. 234を続けて行い、1世代と2世代の感受性比較をすることにより、多世代試験の有効性を検証する。

化学物質の環境中動態を考慮し、陸域、土壌、底質、海域に生息する生物を用いた試験法導入の必要性が考えられた。そこで試験作成されたリストに基づき、陸生植物、土壌生物、底生生物、海産生物を用いた試験法について、実際に標準物質を用いて毒性試験を行い、我が国への適用可能性について検討する。さらに動物愛護の観点からゼブラフィッシュの「胚期」と「仔魚期」における化学物質に対する「致死・亜致死影響」について検討する。

分子レベルから個体レベルの影響に至る化学物質の作用メカニズム(AOP)に基づいて、*in vitro*毒性試験、*in silico*解析など、迅速かつ簡便で高精度な毒性予測が可能な試験法について我が国での必要性、実行可能性を検討する。ミジンコ幼若ホルモンのAOPを構築する。また、諸国ですでに規制に導入されている*in vitro*、*in silico*試験について我が国に導入可能な試験法であるかどうかの検討を行う。

上記の導入可能な試験法を効率よく使用するためのアルゴリズムを考案した。

3. 研究開発の方法

(1) 諸外国の試験法の精査/試験法のアルゴリズム

各種インビボ試験法について、我が国における導入状況および必要性・重要度の整理を行なった。既存試験法に加えて、その他の公定試験法がある試験生物についても、新規の試験法開発の必要性を評価するため、昆虫のミツバチ、土壌生物の高等植物や節足動物、環形動物もリストに加えた。我が国でまだ導入されていない試験法に対して、必要性・重要度を評価するため、①生物種、②作用、③他の試験法との関連、④諸外国での活用の4項目を設定し、それらの項目について海外での情報を調査した。また諸外国にて実際に行政で使用されている*in vivo*、*in vitro*、*in silico*の試験法について調査した。

(2) 繁殖影響試験など長期かつ多世代の影響を評価する試験法の開発(サブテーマ1)

高度な試験手法、多様なエンドポイントをもつやや複雑な試験法についてその特性を明らかにするとともに、我が国での必要性、実行可能性を検討し、重要度の優先順位を付けてリスト化し、それに基づいて実際に魚類、甲殻類などを用いて試験を試行し、その実施可能性について検討する。

(3) 生態系を構成する主要生物を用いた試験法の研究および特殊な物性や作用を持つ物質を対象とした評価法の開発(サブテーマ2)

生態系の多様性を考慮し、生態系を構成する上での主要と目される生物(海生生物、底生生物、昆虫、陸生植物)を用いた試験法についてその特徴を明らかにする。さらに、ナノマテリアルなど、化学物質としての環境動態が既存化学物質とは異なる、特殊な物性や作用を持つ物質を対象とした試験法について、我が国での試験の必要性、実行可能性を検討し、重要度の優先順位を付けてリスト化し、それに基づいて実際に試験を実施し、適用可能性について検討する。

(4) *in vitro*毒性試験、*in silico*解析や作用メカニズムに基づく毒性予測手法の研究(サブテーマ3)

*in vitro*試験法を作用機序別に、①内分泌かく乱作用を対象とした試験法、②ライフイベント時の特異的な影響を評価する試験法、③その他の特殊な作用を対象とした試験法(AOP関係)及び、④遺伝毒性、変異原性及び細胞毒性を対象とした試験法の4つに分類し、試験法の特徴、類似性及び用途についてとりまとめる。

化学物質の構造や薬物動態、遺伝子機能情報などの様々なデータを用いてコンピュータ上で作用メカニズム

や毒性を予測する*in silico*解析および作用メカニズムに基づく、迅速かつ簡便で高精度な毒性予測手法について、我が国での必要性、実行可能性を検討し、重要度の優先順位を付けてリスト化し、実際に試験や解析を実施して適用可能性について検討する。

4. 結果及び考察

(1) 諸外国の試験法の精査/試験法のアルゴリズム

1) 諸外国の試験法の精査

我が国でまだ導入されていない各種*in vivo*試験法について、必要性・重要度を評価するため、①生物種、②作用、③他の試験法との関連、④諸外国での活用の4項目を設定した。それらの項目について海外での試験を精査した結果、鳥類二世代試験とユスリカのライフサイクル試験の重要性が高かった。次に藻類とミツバチの長期・多世代試験法の必要性が挙げられたがそれらはまだ試験法が存在していない。導入に当たってはいずれもさらなる基礎データを踏まえた上で判断するのが望ましいと考えられる。底生生物のゴカイや軟体動物の巻貝は、判断材料となるデータが少なく、導入の優先順位は低い。今後の開発が期待される新規試験法としては、基本3生物種および緑藻以外の藻類についての多世代試験が挙げられる。メダカ、ミジンコを対象とした多世代試験は、現在、環境省の「化学物質の内分泌かく乱作用に関する試験法開発に係る業務」において検討されている。その中でメダカ拡張一世代繁殖試験(MEOGRT)は多世代試験ではないが、一般化学物質を対象として活用できる。ただし、長期・多世代試験を必要とする化学物質の性質は明らかになっていない。またそれらを試験法体系に組み込むための論理構築は必要である。

生死、繁殖以外のライフイベント時の特異的な影響をエンドポイントとした、急性・(亜)慢性毒性の試験は、二次性徴・性成熟に係る内分泌かく乱に関するものが該当した。一部は「化学物質の内分泌かく乱作用に関する今後対応— EXTEND2010」(環境省)に導入されている。

*in vitro*試験法を作用機序別に、①内分泌かく乱作用を対象とした試験法、②ライフイベント時の特異的な影響を評価する試験法、③その他の特殊な作用を対象とした試験法(AOP関係)及び、④遺伝毒性、変異原性及び細胞毒性を対象とした試験法の4つに分類し、試験法の特徴、類似性及び用途についてとりまとめた。内分泌かく乱作用の試験法については、調査した全ての国で何らかの試験法が開発され、しかもそれらはほぼ共通していた。日本のEXTEND2010で使用されている試験法が、試験数と対応可能なホルモン受容体の種類において、国際的に見て最も広範囲の作用に対応していた。ライフイベント時の特異的な影響の評価試験法も内分泌かく乱の*in vitro*試験法と重なる部分が多い。調査したAOPに関するデータベースで相当数の試験法が提案、開発段階にあることが確認された。AOP Wikiでは、OECD分子スクリーニングおよびトキシコゲノミクスに関する拡大アドバイザリーグループ(EAGMST)で検討中の14種のAOP、意見を受け付けている3種のAOP、開発中の106種のAOPが公開されていた。この中から生態影響の評価に係るAOP(10種)と生態影響の評価に应用可能と思われるAOP(24種)を選択し、詳細な調査対象とした。それらのほとんどのAOPは、欧州及び米国から提案されたヒト健康に関するものであり、生態毒性に関するものは、魚類のアロマターゼ阻害に関するものだけであった。遺伝毒性、変異原性及び細胞毒性を対象とした試験法は、遺伝毒性に関する試験法が11編(OECD:2、EPA:6、ISO:3)、変異原性に関するものが6編(OECD:2、EPA:3、ISO:1)、細胞毒性に関するものが2編(EPA:2)であった。調査した国や機関により試験法が異なっているが、遺伝毒性に関する試験が最も多いことが確認された。また、ISOには、*in vitro*試験法が多数存在し、ISO規格を重視する国際的な傾向もあるため、今後ISO規格のテストガイドラインが更に充実していく可能性が高い。

(Q)SARは米国環境保護庁では、潜在的な変異原性、発がん性、その他のヒト健康に及ぼすあるいは環境毒性学的な危険性を特定するため、新規や大量生産前の工業化学物質の管理と規制を行うために利用されている。米国食品医薬品局食品添加物安全事務局では食品接触物質の市場における取引前の再審査の段階、毒性試験の追加の必要性を問う場合などで(Q)SAR解析を利用している。同様にカナダ保健省およびカナダ環境省、経済協力開発機構、欧州連合でも、(Q)SARによる予測データが利用されている。しかしながら、(Q)SARの情報が利用できるかどうかは初期のスクリーニング評価か、より高次の段階の評価かにも大きく依存する。

2) アルゴリズム構築の基本原則

生物試験法を効率よく利用するために、ある法則のアルゴリズムに則ることが望ましい。アルゴリズムを考え

る上で3つの基本原則を整理し、試験方法選択アルゴリズムを考察した。

原則1：主要なRisk Pathway上のイベントについての試験が行われている必要がある

原則2：試験Aについて試験（バッテリー）Bが、感度において”ほぼ包含する”関係にあるとき、試験Aで試験Bを代替可能である

原則3：Risk Pathwayの形状は化学物質により異なるため、諸代替法の条件が成り立つ化学物質のドメイン範囲を明示的にする必要がある

a. Animal Test Reductionを目的とした試験選択アルゴリズム案

図1に上記の三原則に留意した試験選択アルゴリズム案として、Animal Test Reductionを目的とした試験選択アルゴリズムを示す。曝露レベルが参照レベルを超えた場合に、可能ならばより簡易な毒性予測手法により毒性値を算出する。毒性予測手法の適用可能性の判断は、(1)その化学物質の毒性予測手法が適用可能なドメインに属するかどうか、(2)予測に必要な情報が利用可能かどうか、に従う。これらのことは将来の化学物質の有害性評価において、(1)毒性予測手法は化学物質のドメイン範囲を意識して開発すること、(2)ドメインの識別手法自体の開発も高い重要性をもつこと、(3)予測に必要な情報の整備が重要となることを示唆する。

b. 化学物質の物性と生物試験の特徴を考慮したアルゴリズム案

化学物質の物性と生物試験の特徴を考慮したアルゴリズムを図2に示す。この特徴は最初に対象とする化学物質に予想される曝露経路（大気／陸域／水域）を基に試験法を使い分ける。上記で述べた原則におけるRisk Pathway上のイベントに対応している。それは同時に難水溶、易揮発など物質の特性に応じて適切な生物試験を選択できる。

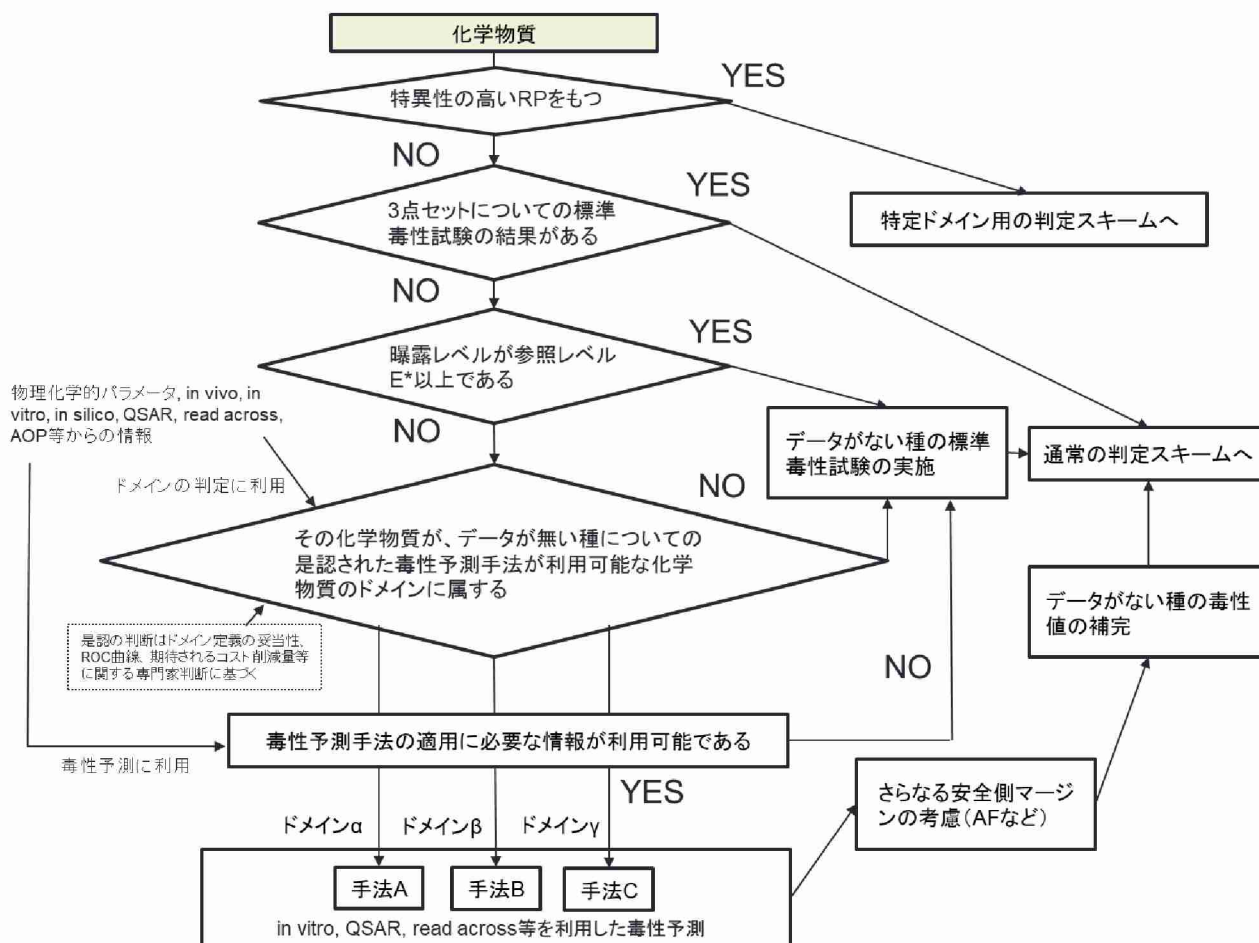


図 1 Animal Test Reductionを目的とした試験選択アルゴリズム案

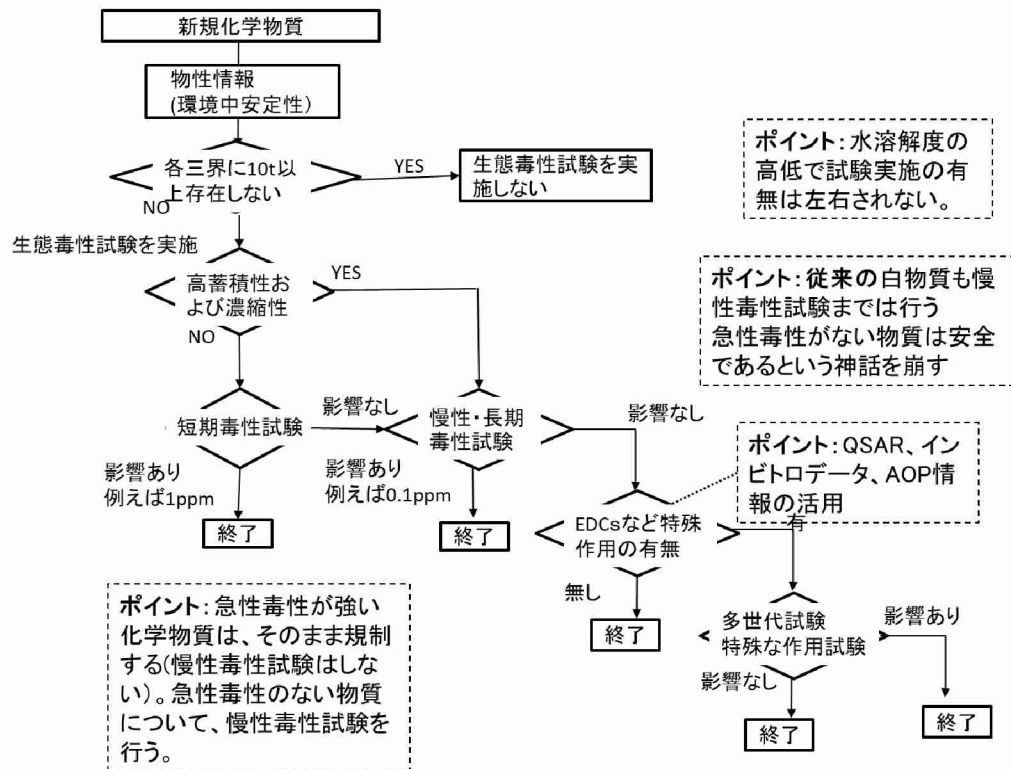


図 2 化学物質の分布を基に考えた試験法選択アルゴリズム案

また、急性毒性が検出されなかった物質についてその後に慢性毒性試験を行うことも本アルゴリズムの特徴である。これは長期・多世代影響を経由する影響評価を目的とし、急性影響では代替できないと仮定している。上記2つのアルゴリズムは案であり、現行の化学物質管理の枠組みを否定するものではない。

(2) 繁殖影響試験など長期かつ多世代の影響を評価する試験法の開発(サブテーマ1)

多世代試験法の開発するために、OECDテストガイドラインNo. 240(MEOGRT)をさらに13週間延長し、F2世代の繁殖影響までを観察するExtended MEOGRT試験を実施した。

Extended MEOGRT試験で得られた結果を図3に示す。4ノニルフェノールによってオスのシリビレ特異的に現れる乳頭状小突起の形成は抑制され、F0世代ではその影響は認められなかったが、F1世代では32 $\mu\text{g/L}$ 、F2世代では10 $\mu\text{g/L}$ 濃度区から乳頭状小突起の形成抑制が認められた。また、3世代にわたる4-NPの繁殖影響について検討した結果、F0世代ではその影響は認められなかったが、F1世代では10 $\mu\text{g/L}$ 、F2世代では32 $\mu\text{g/L}$ 濃度区から繁殖影響が認められた。以上の結果から、フルライフサイクル試験を2回繰り返すことにより、1世代目と2世代目の同じエンドポイントで比較した場合の継世代影響は2世代目の方が鋭敏に表れたが、その差は1濃度分であり、MEOGRTの倍近い曝露期間曝露していることを考えるとその差は軽微であり、多世代試験の必要性を強く示唆するものではなかった。

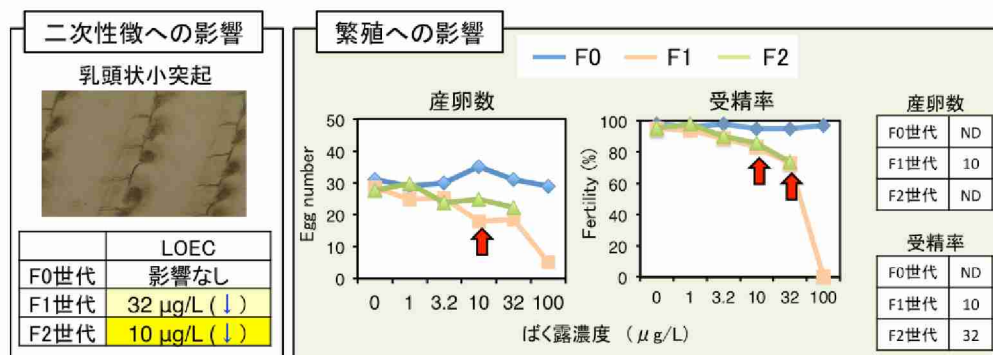


図 3 3世代における4-NPの二次性徴および繁殖影響

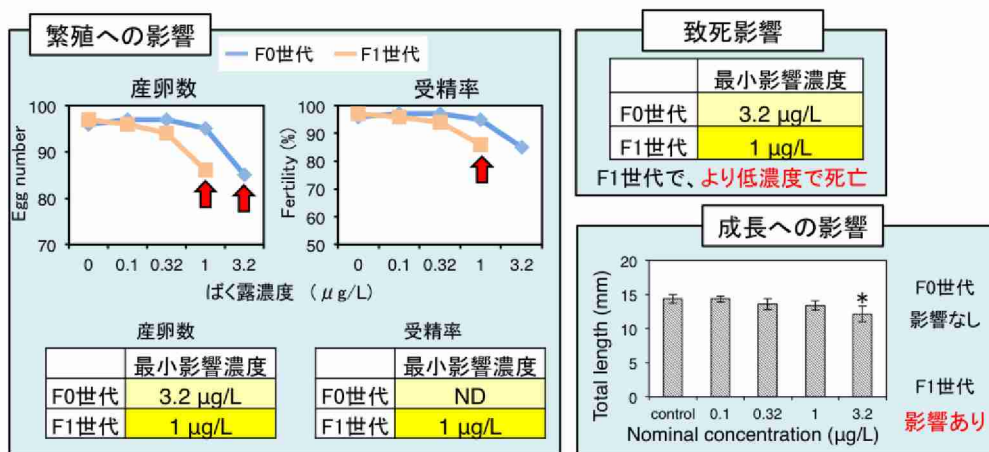


図 4 2世代におけるTPTの影響

トリフェニルスズ(TPT)を用いて、OECDテストガイドラインの魚類繁殖試験(No.229)と魚類性発達試験(No.234)を行う多世代影響試験法を提案した。結果を図4に示す。TPTの繁殖、致死、成長への影響の最小影響濃度は、F0世代と比べてF1世代の方がより低濃度で影響が認められた。本試験法は持続可能な生態系の維持に最も重要である繁殖に特化した多世代曝露の影響をMEOGRTよりも短期間で検出できた。

(3) 生態系を構成する主要生物を用いた試験法の研究および特殊な物性や作用を持つ物質を対象とした評価法の開発(サブテーマ2)

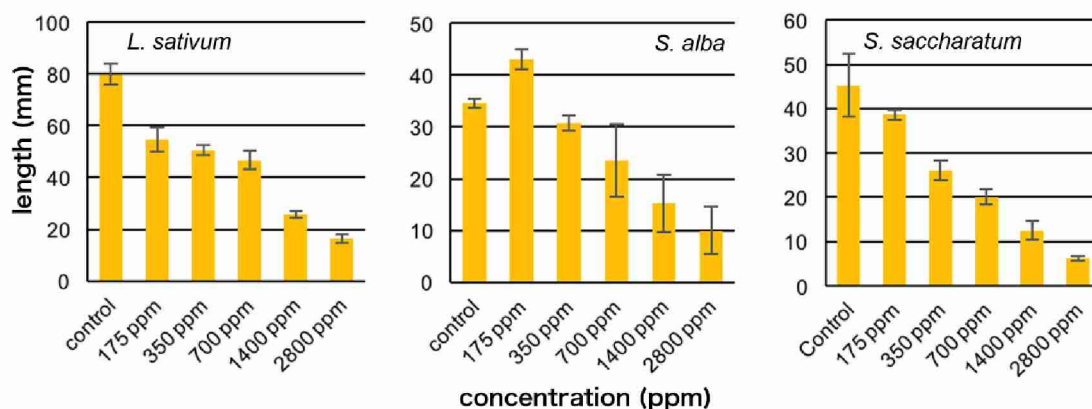
1) 生態系を構成する主要生物を用いた試験法の研究

土壌生物、底生生物、海産生物を用いた下記の試験法について、実際に毒性試験を実施してその問題点を探り、日本に導入される試験法として妥当であるか検討した。

a. 陸生植物の発芽発根試験

OECD TG208に代表される陸生植物の発芽・発根試験は、試験期間に14日～21日を要する。試験の短縮・簡略化をめざし、エンドポイントを根長およびシュート長に特化した試験法の開発を行った。試験種として、日本で入手でき、発芽・発根が特に早い、*Lepidium sativum* (コショウソウ), *Sinapis alba* (シロガラシ), *Sorghum saccharatum* (サトウモロコシ)を選定した。また、普遍的なデータの取得が困難である土壌曝露に代わる手法として、ゲル培地やグラスビーズを用いた曝露の開発を行った。試験に用いた種子は、農薬既往歴がなく高発芽率を維持するため、自主栽培により定期的に確保した。試験物質にはホウ酸を用いた。

図5に各植物・試験区の根・シュート長を示した。本試験のホウ酸714 ppmにおける根・シュート長の阻害率は、*L. sativum*が47.9%、*S. alba*が48.5%、*S. saccharatum*が27.3%で、MicroBioTest社のPhytotestkitの許容範囲にあり、本試験の適正が実証された。

図 5 *L. sativum* (左), *S. alba* (中), *S. saccharatum* (右)の根・シュート長(ホウ酸曝露)

b. ミミズを用いた毒性試験

ミミズを用いた公定試験法や諸外国の化学物質管理制度における試験実施要件について精査し、既存のミミズ毒性試験法間の違いを明らかにし、試験条件の差異を明らかにした。

シマミミズの適切な飼育方法を検討し、OECD TG207を参考に標準化学物質(クロロアセトアミド、アトラジンおよびホウ酸)について、人工土壌添加法とろ紙を用いた曝露方法による急性毒性試験を実施した。人工土壌法ではクロロアセトアミドに対する7d-LC50は40 mg/kg、14d-LC50は36 mg/kg、ホウ酸の7d-LC50は1800 mg/kg、14d-LC50は1300mg/kg、アトラジンは最高濃度1000 mg/kgでも対照区に対する死亡率0%であった。ろ紙法の3d-LC50は、クロロアセトアミド0.017 mg/cm²、ホウ酸0.21 mg/cm²、アトラジン0.0022 mg/cm²であった。ろ紙重量からmg/kgに換算すると、それぞれ130 mg/kg、16000 mg/kg、170 mg/kgとなり、人工土壌法14d-LC50の3.7倍、12倍、>0.17倍であった。既報の農薬や殺菌剤16物質の結果と合わせて、人工土壌法とろ紙法を比較すると3物質を除いて1/10～10倍の範囲内で相関した。ろ紙法は人工土壌法のスクリーニング試験として有効であることが示された。

c. ヨコエビを用いた底質毒性試験

欧州化学機関(ECHA)のリスク評価ガイドラインでは、底質リスク評価において、生息場、食餌形態、生物分類、生活段階の異なる3種の底生生物の毒性試験データを取得することを推奨しており、底生生物としてヨコエビ試験のガイドライン化が期待されている。そこで国立環境研究所より *Hyalella azteca* を入手し、安定的な飼育方法を確立した。水のみで4日間曝露する急性毒性試験で感受性確認した。カナダ環境省の標準試験法に準拠し、標準物質のCuSO₄(5水和物)、NaCl、ネオニコチノイド系農薬(アセタミプリド、イミダクロプリド、クロチアニジン、ジノテフラン、ニテンピラム、チアクロプリド、チアメトキサム)を供した。

水のみで4日間曝露する感受性試験の結果、CuとNaClは、既存文献値と同程度で、チアメトキサム、アセタミプリドは、フタバカゲロウ、*Gammarus*属のヨコエビより感受性が高かった。クロチアニジンは既存文献と比べて鈍かった。ネオニコチノイドの毒性は種差が大きいことが分かった。

d. 海産藻類を用いた生長阻害試験

新規海産藍藻類を用いた生長阻害試験を開発した。新規株の探索は、海産シアノバクテリア *Cyanobium* sp. または *Synechococcus* sp. の複数系統の中から、比較的細胞径が大きく、高増殖率を有する株をスクリーニングし、候補株とした。候補株の評価は、基準物質(3,5-dichlorophenol: 3,5-DCP, K₂Cr₂O₇, CuSO₄)および農薬系試薬(simazine: CAT, diflufenican: DFF)を用い、OECD TG 201が定める基準に従い行った。

海産シアノバクテリアは、国立環境研究所の微生物保存棟から入手した。評価試験に基づき、海産シアノバクテリア *Cyanobium* sp. (NIES-981) を(外洋環境に対応した)新規生長阻害試験法の候補株とした。

次に感受性評価試験では、基準物質(3,5-dichlorophenol: 3,5-DCP, K₂Cr₂O₇, CuSO₄)および農薬系試薬(simazine: CAT, diflufenican: DFF)の阻害率を算出し反応曲線を作成した。反応曲線からEC50値を算出し、他の試験株との感受性比較を行った(表1)。

表 1 *Cyanobium* sp.(海産藍藻類), *P. subcapitata*(淡水産緑藻類)のEC50およびNOECの比較

	<i>Cyanobium</i> sp. (NIES-981)				<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>		
	72-h EC ₅₀	72-h EC ₁₀	72-h EC ₅	NOEC	72-h EC ₅₀	72-h EC ₁₀	NOEC
3'-5-DCP (mg/L)	1.71 (1.60–1.82)	0.940 (0.934–0.947)	0.793 (0.534–0.896)	0.625	1.8–2.3 ^{1,2}	0.91 ²	0.75 ¹
CAT (μg/L)	105 (94.7–118)	26.8 (24.2–28.4)	18.2 (15.3–20.3)	12.5	100–297 ^{3,4,5}	-	10 ⁵
DFF (μg/L)	4.10 (3.70–4.62)	1.26 (1.23–1.28)	0.902 (0.733–1.25)	0.750	0.27–1.23 ^{6,7}	-	-
Cu ²⁺ (mg/L)	0.550 (0.475–0.632)	0.139 (0.0793–0.203)	0.0947 (0.045–0.135)	0.113	0.0075–0.047 ^{8,9}	0.012 ⁸	0.0018–0.01 ^{8,9}
Cr(VI) (mg/L)	4.61 (4.24–4.96)	2.19 (2.06–2.23)	1.77 (1.27–2.13)	1.76	0.30–0.488 ^{1,2}	0.092 ²	0.064 ¹

¹Comber et al. (1995); ²Mayer et al. (1998); ³Okamura et al. (2000); ⁴Pérez et al. (2011); ⁵Sbrilli et al. (2005); ⁶Katsumata et al. (2009),

⁷Weyman et al. (2012); ⁸Franklin et al. (2002); ⁹Radix et al. (2000)

NIES-981は、3,5-DCPおよびCATに対し、淡水産試験株 *Pseudokirchneriella subcapitata* と同等の感受性を有することを明らかにした。しかしながら、重金属類では、*P. subcapitata* に比較し低い感受性を示した。他の海産藻類における重金属類の試験は、これまでほとんど行われていないが、NIES-981のCu²⁺感受性は、海産藻類

の中では高いことが明らかになった(*Prorocentrum minimum*の約25倍, *Tetraselmis suecica*の約73倍, *Heterocapsa triquetra*の約13倍など)(Millán de Kuhn et al. 2006; Ebenezer and Ki 2013)。

以上より、NIES-981は、重金属類に対しては淡水産試験株と比較して低い感受性を示すものの、海産藻類の中では高い感受性を有すると考えられ海産藻類の試験株として有用であった。

e. 胚の死亡と孵化・仔魚期の致死・亜致死影響に着目した試験

生物史の1局面だけをエンドポイントとした試験魚類の生活史の中で最も化学物質に対して鋭敏な時期とされている、胚・仔魚期における化学物質の致死・亜致死性の影響を観察する試験を実施した。

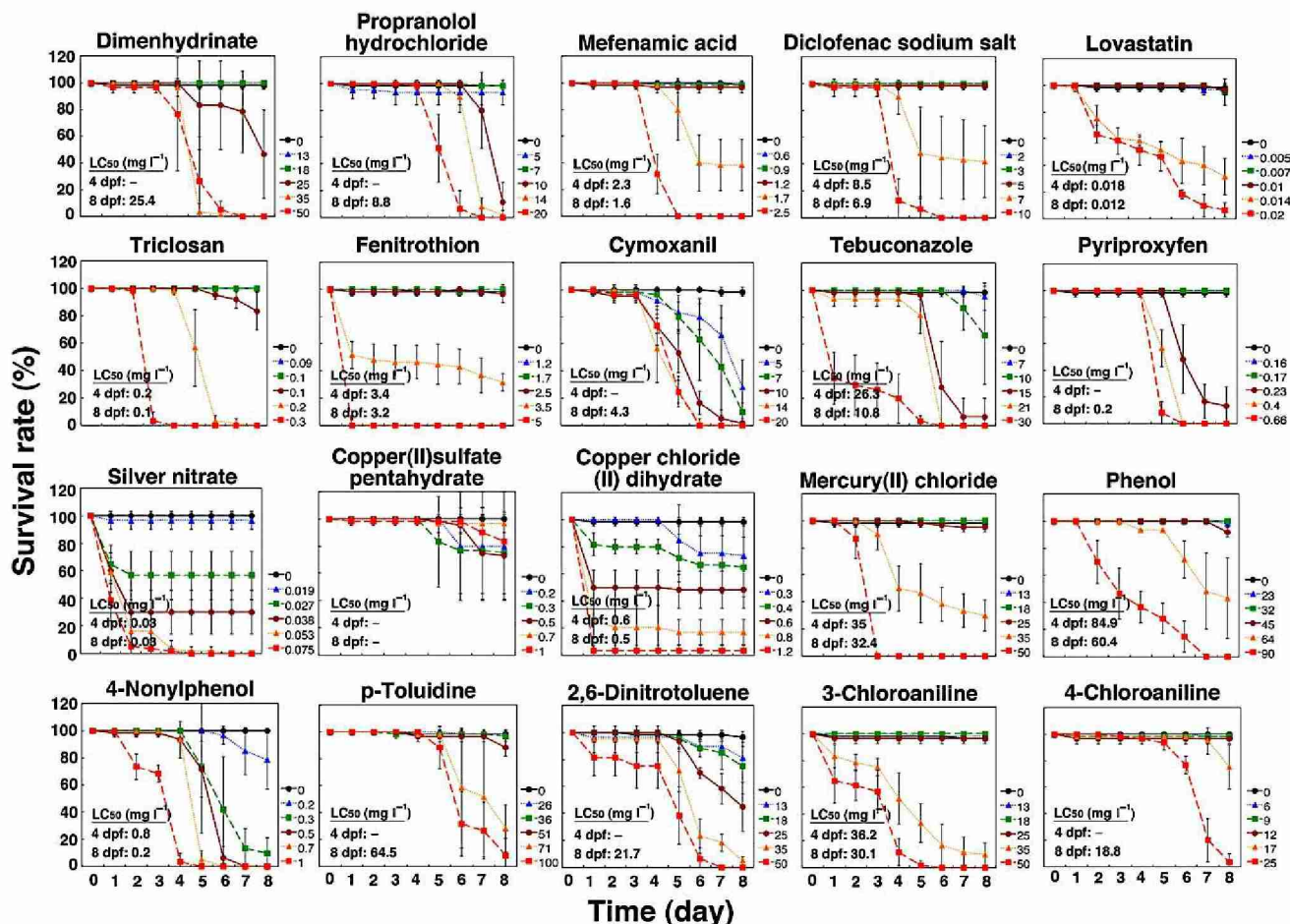


図 6 ゼブラフィッシュ胚期及び仔魚期における生残率。

値は平均±標準偏差 (n=4). -; LC₅₀が計算不可. LC₅₀: 50%致死濃度. Dpf; 受精後日数.

本試験はOECDテストガイドラインNo. 212と同等だが、特に胚の死亡と孵化・仔魚期の致死・亜致死影響に分けていくつかの物質について比較試験を行った。被験物質は、アミン類10物質を用いた。結果を図6に示す。胚期と仔魚期での致死率の変化について検討した結果、ロバスタチン、フェニトロチオン、硝酸銀、硫酸銅、塩化銅(Ⅱ)二水和物、塩化水銀(Ⅱ)、3-クロロアニリンを除く全ての物質において孵化後に死亡率が増加した。化学物質の魚類致死影響を正確に評価するためには、胚期だけでなく仔魚期も用いる必要があると考えられる。

2) 特殊な物性や作用を持つ物質を対象とした評価法の開発

ネオニコチノイド系殺虫剤は、ミジンコ類に対する感受性が低い一方で、ユスリカなど昆虫類に対する感受性が高いことが分かっている。2016年3月より農薬取締法において、ユスリカ幼虫試験成績が要求された。しかしOECDテストガイドラインNo. 235(OECD TG 235)では国外種の*Chironomus riparius*を推奨種としており、国内推奨種の*Chironomus yoshimatsui*(セスジユスリカ)に関する知見はほとんどない。

日本在来種の*C. yoshimatsui*で試験すると、一齢幼虫が容易に水面に補足されて死亡するため、試験成立の達成が困難であった。そこで様々な水面防止方策を検討した結果、テフロンシートによる被膜、床色の変更、光

条件の変化は効果を示さなかった。界面活性剤(Tweenまたはセチルアルコール)の添加またはメッシュの浸漬が効果的であった。界面活性剤は手技によらず生存率を確保できたが、試験物質との複合影響が懸念される。試験容器は表面積が小さい場合には水位が高いほど遊泳阻害率が低くなる傾向があった。よって物理的に、水面の補足を防止するメッシュ法を採用した。投入時のユスリカが極力空気に触れないように手技の習得が必要であった。また試験開始前に粉末飼料を給餌すると、棲管を形成して固着してしまい、給餌量が感受性に影響した。

(4) *in vitro*毒性試験、*in silico*解析や作用メカニズムに基づく毒性予測手法の研究(サブテーマ3)

海外における*in vitro*毒性試験、*in silico*解析や作用メカニズムに基づく毒性予測手法等の調査結果から、これらの日本への導入可能性について検討する。ミジンコ幼若ホルモン様物質に関するレポーター遺伝子試験法およびAOPを構築する。

1) 無脊椎動物の幼若ホルモン受容体を対象とする*in vitro*試験法の開発

ミジンコの幼若ホルモン受容体を用いて化学物質の幼若ホルモン様作用を検出することを目的とするレポーター遺伝子試験法を構築した。培養細胞には、比較的取扱が容易で、使用実績があるヒト由来のHEK293細胞を使用した。無脊椎動物の内在性幼若ホルモン物質に類似する5種の化学物質(Juvenile hormone III、Fenoxycarb、Pyriproxyfen、Methoprene、Hydroprene)について試験を実施したところ、Hydroprene以外は反応した。幼若ホルモン検出系として機能していた。

2) ミジンコの幼若ホルモンかく乱によるオス仔虫誘導に係るAdverse Outcome Pathwayの構築

ミジンコの幼若ホルモンかく乱に関わる論文を精査し、現時点の研究成果から6つのKey Event (KE) から構成されるAOPを構築した(図7)。

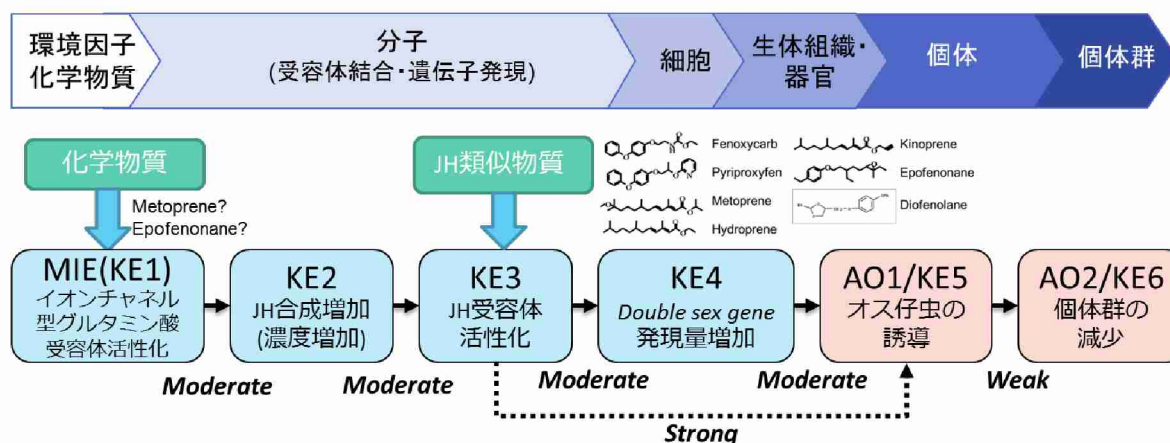


図 7 ミジンコの幼若ホルモンかく乱によるオス仔虫誘導に係るAdverse Outcome Pathway

3) 諸国で規制に導入されている*in vitro*、*in silico*試験のリストに基づく我が国における導入可能性の検討

各種結合アッセイから有害性を推定できるような単線的なリスク経路を持つ例は、内分泌かく乱などの一部化学物質群しか存在していないため、広く化学物質を管理する上で*in vitro*試験を導入することの有効性はあまり高くない。その中で内分泌かく乱化学物質に関しては幾つかのAOPも提案されており、*in vitro*試験を有効に活用できる可能性が比較的高い。

QSARの政策への利用については、毒性試験データが存在しない場合にQSARの値を代替的に用いることにより感度の増加が期待できる可能性がある。しかしそのような局面が実際にどの程度存在するかは本質的にケースごとの判断となる。

5. 本研究により得られた主な成果

(1) 科学的意義

本研究では、2種類の魚類多世代試験を実施した。今回用いたノニルフェノールでは魚類多世代試験と拡張一世代繁殖試験を比較する事によって、多世代試験の効果と意義を確認した。今回の被験物質では多世代試験の方が感受性は高かったが、拡張一世代繁殖試験との差は大きくなかったため、拡張一世代繁殖試験で十分に化学物質管理に役立てることができると判断された。化学物質の環境中動態を考慮すると、陸生、土中、底質、海域に生息する生物の試験について知見を得ておくことが望ましい。それら生物試験は国内生物種で試験を行う上で幾つかの技術的な課題を解決した。

特殊な物性・作用を持つ新興化学物質の中で、ネオニコチノイド系農薬に相応しいユスリカ試験法を検討した。内分泌かく乱化学物質は日本のEXTEND2016で使用されている*in vivo*試験と*in vitro*試験は、試験数と対応可能なホルモン受容体の種類において、国際的に見て最も広範囲の作用に対応していることが確認された。ヨーロッパ諸国では*in vitro*試験としてゼブラフィッシュの胚試験が活発に行われているが、その試験法と初期胚仔魚試験法(TG212)の感受性比較を行いTG212の優位性を確かめた。

国外では試験期間/費用の削減、動物愛護の観点等から、生物試験の削減や代替試験法の開発が進められており、QSARをはじめとする簡便かつ迅速な毒性予測手法の利用も進められていた。それらは、農薬関連の一部を除いて、まだ政策に使用するには十分な情報が揃っていないが、今後は積極的に導入していかなければならない。

ネオニコチノイド系農薬はミジンコに効かないためユスリカ幼生の急性毒性試験が農取法等で推奨されているが、国内産ユスリカを使った試験法を提案できた。

本研究で様々な試験法を開発したが、MADでそれらのデータが輸入された場合にも、それらの知見を有しているため妥当性や信頼性の評価が可能となる。

上記の生物試験の集大成として、試験を減らすことに主眼を置いた試験選択アルゴリズム案と化学物質に予想される曝露経路を基に試験法を選択するアルゴリズム案を提案した。ただし、現行の生物試験体系を否定するものではなく、将来試験数が増加した場合の参考となることを期待する。

(2) 環境政策への貢献

<行政が既に活用した成果>

- 1) ネオニコチノイドの評価系の一つである国内産ユスリカを用いた急性毒性試験は、農薬取締法の中で試験実施が決められたが、民間の試験機関内でうまく実施することが出来なかった。生態影響に関する化学物質審査規制/試験法セミナー(「国民との科学・技術対話」の実施)を通じてノウハウを伝える事により試験実施が実現した。
- 2) 環境省EXTEND2016の中で確定試験に位置づけられている、メダカ拡張一世代繁殖試験は多世代試験ではないという意見があったが、本研究の成果から、多世代試験とほぼ同等の試験であることが示された。このことは、EXTEND2016がリスク評価に充分な枠組であることが証明された。
- 3) EUで採用されているゼブラフィッシュの胚試験(FET)を日本でも急性毒性試験の代替法として採用できるかどうかの検討がされていたが、化学物質の卵膜透過性などの問題があることが本研究の初期胚仔魚試験法(TG212)の感受性比較から明らかとなり、FETの採用可否判断の材料となった。
- 4) OECDが世界に参加を呼びかけているAOP-wiki(webプラットフォームの百科事典)に、ミジンコ幼弱ホルモンのAOPを登録し、国際的な研究協力に貢献した。生態毒性試験分野では日本初である。

<行政が活用することが見込まれる成果>

生物種や試験方法によって応答する化学物質が異なるため、試験の種類が増えると様々な化学物質の影響をカバーできるようになることが予測できた。年々増加している化学物質はその種類も増加しているため、それらに対処すべく生態毒性試験を充実させていく必要が生じることが予測できる。しかしすぐに国内の管理体制の中に生物試験を増やすことは難しい。そこで化学物質管理分野での化学品安全性データの相互受理(MAD)を利用すれば、他国にて規制目的で作成された試験データを受け入れることができる。MADによって様々な試験結

果を受け入れることができる国内の素地を作ることが必要であり、本研究の成果により、日本で採用されていない試験法の結果でも十分に活用できる可能性が示されたことは意義がある。

また、持続可能な生態系を保全することが化学物質管理の一つの目標であり、そのためにまず次世代に影響が無いように生物個体群を維持することが必要であり、近年になり長期・多世代試験法が開発されているが、本研究でそれらの知見を深め、国内での実施可能性を示したことは重要である。

6. 研究成果の主な発表状況

(1) 主な誌上発表

<査読付き論文>

- 1) Horie Y, Yamagishi T, Shintaku Y, Iguchi T, Tatarazako N. Chemosphere. 203,418–425. 2018
- 2) Horie Y, Yamagishi T, Takahashi H, Shintaku Y, Iguchi T, Tatarazako N, Journal of applied toxicology : JAT, 37, 10, 1245–1253, 2017
- 3) A. Furuhashi, T. I. Hayashi, H. Yamamoto, N. Tatarazako, N. Tatarazako, SAR and QSAR in Environmental Research, 28, 765–781, 2017
- 4) Horie Y, Watanabe H, Takanobu H, Shigemoto Y, Yamagishi T, Iguchi T, Tatarazako N, Aquatic toxicology, 192, 16–23, 2017
- 5) Horie Y, Yamagishi T, Koshio M, Iguchi T, Tatarazako N, Journal of applied toxicology : JAT, 37, 7, 836–841, 2017
- 6) Watanabe H, Horie Y, Takanobu H, Koshio M, Flynn K, Iguchi T, Tatarazako N, Environmental toxicology and chemistry, 2017
- 7) Yamagishi T, Horie Y, Tatarazako N, Chemosphere, 174, 1–7, 2017
- 8) Horie Y, Watanabe H, Takanobu H, Yagi A, Yamagishi T, Iguchi T, Tatarazako N, Journal of applied toxicology : JAT, 37, 3, 339–346, 2017
- 9) Yamagishi T, Yamaguchi H, Suzuki S, Horie Y, Tatarazako N, PloS one, 12, 2, e0171259, 2017
- 10) Yamagishi T, Katsumata M, Yamaguchi H, Shimura Y, Kawachi M, Koshikawa H, Horie Y, Tatarazako N, Ecotoxicology, 25, 10, 1758, 2016
- 11) A. Furuhashi, T. I. Hayashi, N. Tatarazako, SAR and QSAR in Environmental Research, 1–18, 2016
- 12) A. Furuhashi, K. Hasunuma, T. I. Hayashi, N. Tatarazako, SAR and QSAR in Environmental Research, 27, 5, 343–362, 2016

(2) 主な口頭発表(学会等)

- 1) 多環芳香族炭化水素類(PAHs)の底質毒性~オオミジンコ(*Daphnia magna*)とヨコエビ(*Hyalella azteca*)を用いた実験的検討, 谷和音, 渡部春奈, 野口愛, 鎌迫典久, 山本裕史, 山本裕史, 環境化学討論会要旨集, 26th (2017)
- 2) ノニルフェノールの延長”メダカ拡張一世代繁殖試験”結果, 堀江好文, 渡部春奈, 山岸隆博, 井口泰泉, 鎌迫典久, 環境化学討論会要旨集, 26th (2017) .
- 3) *Pseudokirchneriella subcapitata*(ムレミカヅキモ)の増殖パターンと毒性物質(3,5-DCPおよび重クロム酸カリウム)ばく露によるそれらの変化, 山岸隆博, 鎌迫典久, 環境化学討論会要旨集, 26th(2017)
- 4) 水・底質システムにおけるオオミジンコ(*Daphnia magna*)とヨコエビ(*Hyalella azteca*)を用いた生態毒性試験の感受性比較, 谷和音, 渡部春奈, 野口愛, 鎌迫典久, 山本裕史, 日本水環境学会年会講演集, 51st(2017)
- 5) 藻類の遅延発光を用いた簡便な生物応答試験による阻害原因の推定, 勝又政和, 竹内彩乃, 幾島祐子, 佐藤由紀子, 鎌迫典久, 日本水環境学会年会講演集, 51st(2017)
- 6) 海底資源開発水域における生態毒性試験法の開発—海産藻類を用いて—, 山岸隆博, 勝又政和, 山口晴代, 志村遥平, 越川海, 河地正伸, 鎌迫典久, 海洋工学シンポジウム講演要旨集, 26th(2016)
- 7) ミジンコの幼若ホルモンかく乱によるオス仔虫誘導に係るAdverse Outcome Pathwayの構築, 渡部春奈,

阿部良子, 宮川一志, 豊田賢治, 井口泰泉, 鑪迫典久, 日本内分泌かく乱化学物質学会研究発表会要旨集, 19th(2016)

- 8) EXTEND2016における試験法開発の進捗状況について, 鑪迫典久, 日本内分泌かく乱化学物質学会研究発表会要旨集, 19th(2016)
- 9) 幼若ホルモン短期検出法(JHSST)を用いた精油成分中の昆虫ホルモン作用の検出, 阿部良子, 鑪迫典久, 日本内分泌かく乱化学物質学会研究発表会要旨集, 19th(2016)
- 10) メダカ拡張一世代繁殖試験を用いたノニルフェノールの多世代影響評価, 渡部春奈, 堀江好文, 高信ひとみ, 小塩正朗, 高橋裕子, 井口泰泉, 鑪迫典久, 環境化学討論会要旨集, 25th(2016)

7. 研究者略歴

研究代表者

鑪迫 典久

東京大学農学部卒業、農学博士、現在、愛媛大学大学院農学研究科教授

研究分担者

- 1) 渡部 春奈

東京大学工学部卒業、農学博士、現在、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主任研究員

- 2) 林 岳彦

東北大学理部卒業、理学博士、現在、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主任研究員

II. 成果の詳細

II-1 諸外国の試験法の精査/試験法のアルゴリズム

愛媛大学（平成29年度のみ）

鑑迫 典久（平成29年度に所属変更）

平成29年度予算額：12,980千円

予算額は、間接経費を含む。

[要旨]

*in vitro*試験法、*in vivo*試験法を問わずすべての生態影響試験法について、諸外国の化学物質管理制度に導入されている公定試験法ガイドラインを対象に調査した。対象国は主に欧州と米国とし、REACH（化学物質の登録、評価、認可及び制限に関する規則）やTSCA（有害物質規制法）、FIFRA（米国版農薬取締法）、EDSP（内分泌かく乱物質スクリーニングプログラム）などの化学物質管理制度で用いられているテストガイドラインを対象とした。公定試験法ガイドラインとして、OECDテストガイドライン、ISO試験法、OCSPPテストガイドライン、ASTM規格を対象とした。

分子レベルから個体レベルの影響に至る化学物質の作用メカニズム（AOP）に基づいて、迅速かつ簡便で高精度な毒性予測が可能な*in vitro*試験法も調査した。

収集した試験法について、各国の化学物質規制制度の活用状況および各国の化学物質管理に利用されている生態影響試験を文献やHPより調査した。また、生物種に着目し、各試験法のエンドポイント、試験期間、ばく露方式をまとめ、試験法の特徴・類似性・用途の整理を行った。

我が国での優先的な導入が必要な試験法を検討するため、重要度を評価する項目案を作成し、それにしたがって試験法のリスト化を行った。

既存の試験法を踏まえながら今後必要となるであろう生態毒性試験を利用できる枠組みを考え、アルゴリズムを作成した。

[キーワード]

インビボ、インビトロ、OECD、EPA、ASTM

1. はじめに

わが国では化学物質による生態系への悪影響を最小化するために、化学物質審査規制法（化審法）をはじめとする化学物質管理制度においてリスク評価が実施されているが、その中で使用される生態影響試験は数種類の試験生物による限定的なものであり、持続可能な生態系と生物多様性を確保するには、十分とはいえない。諸外国では多くの生物試験法が開発、登録されており、例えばOECDのテストガイドラインでは既に47種類の*in vivo*生態毒性試験法が存在し、増加および多様化する化学物質に対応すべくほぼ毎年何らかの追加、改訂が行われている。一方、わが国の化審法には7種類の*in vivo*試験法しか存在していない。さらに、多様な生物に対する試験法、長期・多世代影響試験法、ナノマテリアルや内分泌かく乱化学物質のように、特殊な物性・作用を持つ新たな化学物質の評価手法などは世界的にも研究途上にある。動物愛護や試験期間・費用の削減の観点からは代替試験法も求められており、*in vitro*毒性試験、*in silico*解析や作用メカニズムに基づく簡便かつ迅速な毒性予測手法の開発も必要とされる。これらの課題に対応し、わが国の今後の化学物質管理の枠組みにおいて、諸外国の生態毒性試験法の動向を把握しつつ、我が国に適した生態毒性試験および試験生物種の導入を検討し、試験法の国際標準化および多様化する化学物質の評価に関わる試験を充実させ、新たな化学物質評価体系の構築を目指す必要がある。

最初に海外で用いられている生物試験法の実態について調査を行い、次に諸外国の試験法の特徴・類

似性・用途について整理し、我が国での必要性、実行可能性の検討、重要度の評価とリスト化を行った。

諸外国の *in vitro*、*in silico* 試験法を精査し、試験法選択アルゴリズム自体の「性能」をどう評価するかの評価軸にもとづき、当該試験の「感度」「特異度」について議論し、導入可能性について検討した。試験法選択アルゴリズムを構築するためには、その望ましい性質を整理してから行った。

2. 研究開発目的

諸外国の化学物質管理制度に用いられている生物試験法の動向を把握し、現行の化学物質審査法に補完すべき試験法の導入の妥当性について検討し、さらに *in vivo* 試験だけでなく、*in silico* 解析、*in vitro* 試験など新たな生物試験法を含めた次世代の化学物質評価体系の構築案を提案する。まず、諸外国の試験法を精査し、その特性を明らかにした上で、我が国での必要性、実行可能性を検討し、重要度の優先順位を付けてリスト化する。サブテーマ①では、長期かつ多世代の影響を評価する試験法、サブテーマ②では1) 新たな生物種を用いた試験法、2) 特殊な物性や作用を持つ物質を対象とした試験法、サブテーマ③では *in vitro* 試験（試験管内試験）や *in silico* 解析など作用メカニズムに基づいた毒性予測手法を対象とする。

3. 研究開発方法

（1）対象とした *in vivo* 試験法ガイドライン

生物個体を用いた生態影響試験法について、諸外国の化学物質管理制度に導入されている公定試験法ガイドラインを対象に調査した。対象とする国は主に欧州と米国とし、REACH（化学物質の登録、評価、認可及び制限に関する規則）やTSCA（有害物質規制法）、FIFRA（米国版農薬取締法）、DSP（内分泌かく乱物質スクリーニングプログラム）などの化学物質管理制度で用いられているテストガイドラインを対象とした。

公定試験法ガイドラインとして、OECDテストガイドライン、ISO試験法、OCSP（旧OPPTS）テストガイドライン、ASTM規格を対象とした。

特に多世代試験やライフイベント時の特異的な影響を評価する試験、国内の化学物質管理制度では用いられていない試験生物による試験法、特殊な物性や作用を持つ物質（ナノマテリアル、内分泌かく乱物質等）を対象とした試験法について、開発中の試験法も含めて情報を収集した。

（2）対象とした *in vitro* 試験法ガイドライン

a. 公的ガイドラインのある *in vitro* 試験法の収集

公的ガイドラインのある *in vitro* 試験法について、諸外国の化学物質管理制度で用いられている、あるいは導入が検討されているものを対象に調査した。対象とする国は、主に欧州および米国とした。欧州については、REACH（化学物質の登録、評価、認可及び制限に関する規則）を選定し、米国については、TSCA（有害物質規制法）、FIFRA（米国版農薬取締法）およびEDSPを選定した。また、この他の公的ガイドラインとして、国際機関であるISOおよび、日本のEXTEND2010で導入されている *in vitro* 試験法についても調査を行った。調査に際しては、特に、*in vivo* 試験法の代替として、長期のライフイベント時の特異的な影響を評価する試験、特殊な物性や作用（内分泌かく乱作用、一般毒性（遺伝毒性、変異原性、細胞毒性））を対象とした試験法について、開発中の試験法も含めて情報を収集した。情報は、インターネット上で公開されているものを利用した。

b. 開発中の *in vitro* 試験法の収集

分子レベルから個体レベルの影響に至る化学物質の作用メカニズム（AOP）に基づいて、迅速かつ簡便で高精度な毒性予測が可能な *in vitro* 試験法を調査することを目的としていることから、開発中の *in vitro* 試験法に関する情報源としてAOPwikiを選択した。また、大学や民間レベルで開発された *in vitro* 試験法が数多く登録され、最近では米国EDSPで内分泌かく乱作用を持つ物質のスクリーニング評価に適用されつつあるToxCast中の試験法についても調査した。

c. 定量的構造活性相関 (QSAR) に基づく手法の調査方法

① インターネット上で公知および入手可能な情報を、GoogleやYahooなどのサーチエンジンによりキーワードを用いて検索することで入手した。

② 各国の官庁や規制当局のウェブページ内を、下記のキーワードによって検索することで有用な情報を入手した。

官庁や規制当局リスト

- American Chemistry Council (ACC) : 米国化学工業協会 (<https://www.americanchemistry.com/>)
- Council of Canadian Academies (CCA) : カナダ学術会議 (<http://scienceadvice.ca/en.aspx>)
- European Commission (EC) : 欧州委員会 (http://ec.europa.eu/index_en.htm)
- European Chemicals Agency (ECHA) : 欧州化学物質庁 (<http://www.echa.europa.eu/>)
- European Food Safety Authority (EFSA) : 欧州食品安全機関 (<http://www.efsa.europa.eu/>)
- Food and Agriculture Organization (FAO) : 国連食糧農業機関 (<http://www.fao.org/home/en/>)
- Food and Drug Administration (FDA) : 米国食品医薬品局 (<http://www.fda.gov/>)
- International Life Sciences Institute (ILSI) : 国際生命科学研究所 (<http://www.ilsilife.org/Pages/HomePage.aspx>)
- Joint Research Centre (JRC) : 欧州委員会共同研究センター (<https://ec.europa.eu/jrc/>)
- National Health and Environmental Effects Research Laboratory (NHEERL) : 米国環境保護庁国立保健環境影響研究所 (<http://www.epa.gov/aboutepa/about-national-health-and-environmental-effects-research-laboratory-nheerl>)
- National Research Council : 米国学術研究会議 (<http://www.nap.edu/>)
- Organization for Economic Co-operation and Development (OECD) : 経済協力開発機構 (<http://www.oecd.org/>)
- Office of Food Additive Safety (OFAS) : 食品添加物安全事務局 (米国食品医薬品局) (<http://www.fda.gov/AboutFDA/CentersOffices/OrganizationCharts/ucm385118.htm>)
- US EPA Office of Pesticide Programs (OPP) : 米国環境保護庁農薬プログラム部 (<http://www.epa.gov/pesticides>)
- US EPA Office of Pollution Prevention and Toxics (OPPT) : 米国環境保護庁汚染防止有害物質部 (<http://www.epa.gov/chemicals-under-tsca>)
- US EPA Office of Research and Development (ORD) : 米国環境保護庁研究開発部門 (<http://www.epa.gov/aboutepa/about-office-research-and-development-ord>)
- Pest Management Regulatory Agency (PMRA) : カナダ保健省疫病管理規制庁 (<http://hc-sc.gc.ca/ahc-asc/branch-dirgen/pmra-arla/index-eng.php>)
- World Health Organization (WHO) : 世界保健機関 (<http://www.who.int/en/>)
- United States Environmental Protection Agency (US EPA) : 米国環境保護庁 (<http://www3.epa.gov/>)

キーワードリスト

- Absorption, Distribution, Metabolism, and Elimination (ADME) : 吸収・分布・代謝・排せつ
- Adverse Outcome Pathway (AOP) : 有害転帰経路
- Bioconcentration Factor (BCF) : 生物濃縮係数
- Canadian Environmental Protection Act : カナダ環境保護法
- Code of Federal Regulations (CFR) : 米国連邦規制基準
- US EPA's Endocrine Disruptor Screening Program (EDSP) : 内分泌かく乱物質スクリーニング・プログラム
- Estrogen Receptor (ER) : エストロゲン受容体
- Food Quality Protection Act (FQPA) : 米国食品品質保護法
- US EPA's High Production Volume Chemicals Program (HPV) : 高生産量化学品プログラム
- Integrated Approaches to Testing and Assessment (IATA) : 試験と評価への統合的な取組み
- International Program on Chemical Safety (IPCS) : 国際化学物質安全性計画
- Molecular initiating event (MIE) : 分子起点となる事象
- Mode of Action (MOA) : 毒性様態
- North American Free Trade Agreement (NAFTA) : 北米自由貿易協定
- Persistent, Bioaccumulative and Toxic (PBT) : 生物濃縮性で有毒な難分解性化学物質
- Premanufacturing notification (PMN) : 製造前届出
- Quantitative structure-activity relationship (QSAR) : 定量的構造活性相関
- QSAR Model Reporting Format (QMRF) : QSARモデルレポート様式
- QSAR Prediction Reporting Format (QPRF) : QSAR予測レポート様式
- Quantitative structure-property relationship (QSPR) : 定量的構造物性相関
- Registration, Evaluation, Authorization of Chemicals legislation (REACH) : 化学品の登録・評価認可および制限に関する規則
- Structure-Activity Relationship (SAR) : 構造活性相関
- Structure Data Format (SDF) : 化学物質構造情報様式
- Toxic Substances Control Act (TSCA) : 米国有害物質規制法
- Threshold of Toxicological Concern (TTC) : 毒性学的閾値

③ PubMed (論文サーチエンジン) を利用し、上記のキーワードを入力することで (Q) SAR関連の基礎研究や技術開発について報告のある論文を検索し、アブストラクトあるいはpdf版のコピーを入手した。

d. OMICS研究や作用メカニズムに基づいた手法の調査方法

① インターネット上で公知および入手可能な情報を、GoogleやYahooなどのサーチエンジンにより検索することで入手した。

② 各国の官庁や規制当局のウェブページ内を、下記のキーワードによって検索することで有用な情報を入手した。

官庁や規制当局リスト

- European Chemicals Agency (ECHA) : 欧州化学物質庁 (<http://www.echa.europa.eu/>)
- European Food Safety Authority (EFSA) : 欧州食品安全機関 (<http://www.efsa.europa.eu/>)
- Food and Drug Administration (FDA) : 米国食品医薬品局 (<http://www.fda.gov/>)
- International Life Sciences Institute (ILSI) : 国際生命科学研究所 (<http://www.ilsilife.org/Pages/HomePage.aspx>)
- Joint Research Centre (JRC) : 欧州委員会共同研究センター (<https://ec.europa.eu/jrc/>)
- National Cancer Institute (NCI) : 米国国立がん研究所 (<http://www.cancer.gov/>)
- National Center for Biotechnology Information (NCBI) : 全米バイオテクノロジー情報センター (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)
- National Center for Toxicological Research (FDA-NCTR) : 米国国立毒性研究センター (<http://www.fda.gov/nctr/>)
- National Institute of Environmental Health Sciences (NIEHS) : 国立環境衛生科学研究所 (<http://www.niehs.nih.gov/>)
- National Health and Environmental Effects Research Laboratory (NHEERL) : 米国環境保護庁国立保健環境影響研究所 (<http://www.epa.gov/aboutepa/about-national-health-and-environmental-effects-research-laboratory-nheerl>)
- National Research Council : 米国学術研究会議 (<http://www.nap.edu/>)
- United States Environmental Protection Agency (US EPA) : 米国環境保護庁 (<http://www3.epa.gov/>)
- US EPA Office of Pesticide Programs (OPP) : 米国環境保護庁農薬プログラム部 (<http://www.epa.gov/pesticides>)
- US EPA Office of Research and Development (ORD) : 米国環境保護庁研究開発部門 (<http://www.epa.gov/aboutepa/about-office-research-and-development-ord>)

③ PubMed (論文サーチエンジン) を利用し、②と同様下記のキーワードを入力することで OMICS関連の基礎研究や技術開発について報告のある論文を検索し、アブストラクトあるいはpdf版のコピーを入手した。

キーワードリスト

- Adverse Outcome Pathway (AOP) : 有害転帰経路
- Bioinformatics : バイオインフォマティクス
- Biomarker : バイオマーカー
- Computational Biology : 計算生物学
- Endocrine Disruptor Screening Program (EDSP) : 内分泌かく乱物質スクリーニングプログラム
- Environmental Toxicogenomics : 環境毒性ゲノミクス
- Genomics : ゲノミクス
- High Throughput Screening (HTS) : ハイスループットスクリーニング
- Integrated Approaches to Testing and Assessment (IATA) : 試験と評価への統合的な取り組み
- Metabolomics : メタボロミクス
- Microarray : マイクロアレイ
- Molecular initiating event (MIE) : 分子起点となる事象
- Mode of Action (MOA) : 毒性様態
- Next-Generation Sequencing : 次世代シーケンス (DNA配列解析)
- North American Free Trade Agreement (NAFTA) : 北米自由貿易協定
- OMICS : オミクス
- Pathway analysis : パスウェイ (経路) 解析
- Persistent, Bioaccumulative and Toxic (PBT) : 生物濃縮性で有毒な難分解性化学物質
- Pharmacogenomics : 薬理ゲノミクス
- Proteomics : プロテオミクス
- Quantitative structure-activity relationship (QSAR) : 定量的構造活性相関
- QSAR Model Reporting Format (QMRF) : QSARモデルリポート様式
- QSAR Prediction Reporting Format (QPRF) : QSAR予測リポート様式
- Quantitative structure-property relationship (QSPR) : 定量的構造物性相関 (つづく)

キーワードリスト（つづき）

- ・ Registration, Evaluation, Authorization of Chemicals legislation (REACH)：化学品の登録・評価認可および制限に関する規則
- ・ Risk Assessment：リスクアセスメント
- ・ Structure-Activity Relationship (SAR)：構造活性相関
- ・ Structure Data Format (SDF)：化学物質構造情報様式
- ・ Systems biology：システム生物学
- ・ Toxicogenomics：毒性ゲノミクス
- ・ Transcriptomics：トランスクリプトミクス

（３）諸外国の*in vivo*、*in vitro*試験法の特徴・用途・類似性の整理

(1)で収集した*in vivo*試験法について、各国の化学物質規制制度の活用状況および各国の化学物質管理に利用されている生態影響試験を文献やHPより調査した。また、生物種に着目し、各試験法のエンドポイント、試験期間、ばく露方式をまとめ、試験法の特徴・類似性・用途の整理を行った。

また(1)で収集した*in vitro*試験法について、特徴・用途・類似性が比較できるように以下の調査項目を設定し、整理を行った。情報整理に際して設定した項目を表1-1～1-2に示す。

表1-1 試験法の整理に際して設定した項目

① 供試対象 (Test subject)
② 細胞 (組織) 名 (Cell (tissue) name)
③ 対象とする作用機序 (Mechanism of test)
④ 試験系 (Test system)
⑤ 測定対象 (Measurement subject)
⑥ 検出対象 (Detection target)
⑦ 試験時間 (Test duration)
⑧ 試験容器 (Test vessel)
⑨ 試験法名 (Test guideline name)
⑩ 試験法ID (Test guideline ID)
⑪ 発行機関/国 (Publishing institute/Country)
⑫ 試験目的 (Testing purpose)
⑬ 評価対象 (Test target)
⑭ 適用例 (Application)
⑮ 規制枠組み (Regulation/Program framework)
⑯ 試験法ID (Test guideline ID)
⑰ 発行年 (Publication year)
⑱ 最終更新年 (Latest modified)

表1-2 AOPの整理に際して設定した項目

① AOP name
② Molecular Initiating Event
③ Key Event
④ Adverse Outcome
⑤ OECD project No.
⑥ Latest modified year

（４）我が国での必要性、実行可能性の検討、重要度の評価とリスト化

我が国での優先的な導入が必要な試験法を検討するため、重要度を評価する項目案を作成し、それにしたがって試験法のリスト化を行った。

（５）化学物質の性質または予期される影響に応じて必要な試験を選択するアルゴリズムの草案

試験選択アルゴリズムの構築と評価において特に重要となる概念は「感度」と「特異度」である。感度は「事実として陽性であるとき、試験において陽性である確率」となる。一方、特異度は「事実として陰性のとき、試験において陰性である確率」である。

本稿では、「化学物質のもつリスク経路」と「各毒性試験が影響を検知するポイント」の組み合わせ

の関係によってどのように「感度」「特異度」が異なるかを整理することにより、試験法選択アルゴリズム自体の「性能」をどう評価するかの評価軸を明示化した。また、その評価軸にもとづき、試験選択アルゴリズムの草案を構成した。

4. 結果及び考察

(1) 繁殖影響試験など長期かつ多世代の影響を評価する試験法の開発

1) 諸外国の試験法の精査

a. 長期・多世代試験

諸外国においてフルライフまたは多世代にわたって繁殖に係る影響を評価する試験法は表1-3のものがあつた。主に内分泌かく乱物質の段階的評価体系(OECD Conceptual Framework)において、Level 5の最終確定試験として開発されている(OECD, 2010)。Level 5の試験は、試験生物のライフサイクルのより広範囲に渡って、内分泌かく乱影響を統合的に評価する*in vivo*試験である。魚類は標準試験生物であるメダカ、ファットヘッドミノー、ゼブラフィッシュのそれぞれについて多世代試験が開発されているが、メダカ拡張一世代繁殖試験(MEOGRT)は日本と米国の内分泌かく乱物質の評価枠組みにおいて最終段階の確定試験として用いられる。

表1-3 長期かつ多世代の影響を評価する試験法の概要

生物分類	試験生物	試験法名	試験法番号	試験期間	主なエンドポイント
魚類	メダカ	MEOGRT (Medaka Extended One Generation Reproduction Test)	OECD TG240	19週間 F0(成魚)→F1(卵→成魚)→F2(卵→仔魚)	繁殖、生死、成長、ビテロジェニン、二次性徴
	ファットヘッドミノー	Fish Lifecycle Toxicity Test (FLCTT)	OPPTS 850.1500	最短で次世代の同じ成長段階まで(卵から卵まで)	繁殖、生死、成長、ビテロジェニン、二次性徴
	ゼブラフィッシュ	ZEOGRT (Zebrafish Extended One Generation Reproduction Test)	OECD SPSF (開発中)	未定	繁殖、生死、成長、ビテロジェニン
鳥類	ウズラなど	Avian Two-Generation Test (ATGT)	OECD Draft TG	F1(繁殖前)→F2	繁殖、生死、成長等
両生類	アフリカツメガエル	The Larval Amphibian Growth and Development Assay (LAGDA)	OECD TG241	119日	生死、成長、外観、甲状腺・生殖腺・腎臓の病理組織学的解析、肝臓体指数、性比、ビテロジェニン
甲殻類	ミジンコ	Two-Generation Reproduction Test	リングテスト実施中	31-36日	繁殖、生死
	アミ	Life-Cycle Toxicity Tests	ASTM E1191-03a	供試個体がすべて死亡するまで	生死、成長
	カイアシ	Life-Cycle Toxicity Tests/ Copepod Reproduction and Development Test	OECD Draft guidance document	36日	繁殖、生死、成長
昆虫	ユスリカ	Sediment Water Chironomid Life Cycle Toxicity Test	OECD TG 233	44日	繁殖、生死、成長、羽化
環形動物	ゴカイ	Life-Cycle Toxicity Tests	ASTM E1562-00	10日～4週～3か月(生物種による)	繁殖、生死
軟体動物	巻貝	Mollusc Full Lifecycle Assays	OECD SPSF (開発中)	56日(暫定案)	繁殖、生死、成長

b. ライフイベント時の特異的な影響をとらえる試験

生死、繁殖以外のライフイベント時の特異的な影響をエンドポイントとした、急性・(亜)慢性毒性

の分類が難しい試験を表1-4にまとめた。二次性徴・性成熟に係る性ホルモン、甲状腺ホルモンの異常検出など、内分泌かく乱に関するものが該当した。これらの試験法は既に「化学物質の内分泌かく乱作用に関する今後対応— EXTEND2010」（環境省、2000）において検討されている化学物質の内分泌かく乱作用の生態影響評価体系に導入されている。魚類ビテロジェニンアッセイ（OECD TG230）はエストロゲン、抗エストロゲン、アンドロゲン作用を検出するための第一段階の *in vivo* 試験として、ミジンコのOECD TG211 Annex7は幼若ホルモン様作用、脱皮ホルモン様作用を検出するための第二段階の確定試験として、アフリカツメガエル変態アッセイ（OECD TG231）は（抗）甲状腺ホルモン様作用を検出するための第一段階 *in vivo* 試験として位置づけられている。さらに、抗アンドロゲン作用を検出するための第一段階 *in vivo* 試験として、幼若メダカを用いた抗アンドロゲン作用スクリーニング試験を、幼若ホルモン作用を検出するための第一段階 *in vivo* 試験として、OECD TG211 Annex7を短期・簡略化した、オオミジンコを用いた短期幼若ホルモン作用スクリーニング試験を開発し、2015年10月に環境省と共同でテストガイドダンス文書あるいはテストガイドラインとしてOECD SPSF（Standard Project Submission Form）を提出した。

表1-4 ライフイベント時の特異的な影響を評価する試験法の概要

生物分類	試験生物	試験法名	試験法番号	試験期間	主なエンドポイント
魚類	メダカ、ファットヘッドミノー、ゼブラフィッシュなど	21-day Fish Assay	OECD TG230	21日間	ビテロジェニン、二次性徴
		Fish short term reproduction test	OECD TG229	21日間	産卵数
		Fish Sexual Development Test	OECD TG234	受精卵から二次性徴まで（ふ化後60日）	生死、成長、二次性徴
		Juvenile Medaka Anti-Androgen Screening Assay	OECD Guidance 文書開発中	21日間	遺伝的オスの二次性徴
甲殻類	ミジンコ	<i>Daphnia magna</i> Reproduction Test	OECD TG211 Annex 7	21日間	仔虫の性比
		Short-term Juvenile Hormone Activity Screening Assay using <i>Daphnia magna</i>	OECD TG開発中	約7日間	仔虫の性比
両生類	アフリカツメガエル	Amphibian Metamorphosis Assay (AMA)	OECD TG231	21日間	生死、不発育、平衡喪失、奇形、発達障害、成長

2) 我が国での必要性、実行可能性の検討および重要度の評価とリスト化

表1-2及び表1-3の試験法について、我が国における導入状況および必要性・重要度のリスト化を行い、表1-4に示した。既存試験法に加えて、その他の公定試験法がある試験生物についても、新規の試験法開発の必要性を評価するため、昆虫のミツバチ、土壌生物の陸生植物や節足動物、環形動物もリストに加えた。我が国でまだ導入されていない試験法に対して、必要性・重要度を評価するため、①生物種、②作用、③他の試験法との関連、④諸外国での活用の4項目を設定した。①生物種は、既存の長期・多世代試験の試験生物と、生態・食餌形態などの異なる生物種として追加導入が必要であれば○、既存生物種との類似しており、追加導入が不要であれば×とした。②作用は、新たに評価が必要な作用を検出できる場合○、作用の類似性が不明の場合は△、既存試験と類似の作用のみを検出する場合は×とした。③他の試験法との関連は、急性・亜慢性の *in vivo* 試験が我が国で導入済みの場合○、未導入の場合は×とした。④諸外国での活用は、諸外国の法規制で既に導入活用されている場合は○、導入検討中（または詳細が不明の場合）は△、未導入は×とした。その結果、○が多かったのは鳥類二世代試験とユスリカのライフサイクル試験になった。次に藻類とミツバチは、現時点で長期・多世代試験法はないが、新規

の生物種や作用を検出する試験なので、急性・亜慢性の結果を踏まえて判断するのが望ましいと考えられる。底生生物のゴカイや軟体動物の巻貝は、生物種や作用としては既存試験と異なる情報を提供する可能性はあるが、現時点で急性・亜慢性の試験が我が国で導入されていないため、判断材料が少なく、優先順位は低いと考えられる。したがって、鳥類とユスリカの長期・多世代試験については、現行試験の実施状況を踏まえて、さらに導入の妥当性や、試験の実行可能性を検討するための情報収集を行う。新規試験法の開発としては、基本3生物種と緑藻以外の藻類について、多世代試験の研究開発状況の文献調査をさらにを行い、開発の必要性や妥当性、実行可能性を検討するための情報を収集する。

既存の長期・多世代試験は内分泌かく乱物質を対象としたものが多いが、一般化学物質についても長期・多世代にわたる影響を評価することができるので、試験法体系構築の中で、最終的な確定試験として位置づけられる。メダカ、ミジンコを対象とした多世代試験は、現在、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開発に係る業務」において検討されているが、一般化学物質を対象とした際の試験条件を検証し、必要であれば試験条件、エンドポイント等の改訂を行う。また、長期・多世代試験を実施が必要とされる条件（第一段階試験の結果等）について整理し、試験法体系に組み込むための論理構築を行う。

ライフイベント時の特異的な影響を評価する試験は、主に内分泌かく乱に関わる試験法であり、表1-4の試験法は既にEXETND 2010で化学物質の内分泌かく乱作用の評価体系において位置づけられているが、一般化学物質も含めた試験法体系においては例外的な位置づけとなる。内分泌かく乱作用以外の試験法についても研究開発レベルのものも含めて引き続き調査する。

表1-5 各試験法の我が国での導入状況、必要性・重要度のリスト化

生物分類	試験生物	試験法名	我が国での導入状況	導入の必要性・重要度			
				生物種 ^{*1}	作用 ^{*2}	他の試験法との関連 ^{*3}	諸外国での活用 ^{*4}
魚類	メダカ	Medaka Extended One Generation Reproduction Test (MEOGRT)	○EXTEND 2010				
	ファットヘッドミノ	Fish Lifecycle Toxicity Test (FLCT)	×	×	×	×	×
	ゼブラフィッシュ	Zebrafish Extended One Generation Reproduction Test (ZEOGRT)	×	×	×	×	○
	メダカ、ファットヘッドミノ、ゼブラフィッシュなど	21-day Fish Assay Fish Short term reproduction test	○EXTEND 2010				
		Fish Sexual Development Test	×	×	×↓と類似	○	△
		Juvenile Medaka Anti-Androgen Screening Assay	○EXTEND 2010(予定)				
鳥類	ウズラなど	Avian Two-Generation Test (ATGT)	×	○	○	○	△
両生類	アフリカツメガエル	The Larval Amphibian Growth and Development Assay (LAGDA)	○EXTEND 2010				
	アフリカツメガエル	Amphibian Metamorphosis Assay (AMA)	○EXTEND 2010				
甲殻類	ミジンコ	Two-Generation Reproduction Test	○EXTEND 2010				
	ミジンコ	Life-Cycle Toxicity Tests	×	×	×↑と類似	○	△
	アミ	Life-Cycle Toxicity Tests	×	△	△	×	×

	カイアシ	Life-Cycle Toxicity Tests/ Copepod Reproduction and Development Test	×	Δ	Δ	×	×
	ミジンコ	<i>Daphnia magna</i> Reproduction Test, neonate sex identification	○EXTEND 2010				
		Short-term Juvenile Hormone Activity Screening Assay using <i>Daphnia magna</i>	○EXTEND 2010				
昆虫	ユスリカ	Sediment Water Chironomid Life Cycle Toxicity Test	×	○	○	○	Δ
	ミツバチ	なし	×	○	○	○(農取 法)	×
底生	ゴカイ	Life-Cycle Toxicity Tests	×	Δ	○	×	Δ
軟体	巻貝	Mollusc Full Lifecycle Assays	×	Δ	○	×	Δ
藻類	緑藻類な ど	なし	×	○	○	○	×
土壌	陸生植物	なし	×	○	○	×	×
	節足動物	なし	×	○	○	×	×
	環形動物	なし	×	○	○	×	×

*1: 生態・食餌形態などの異なる生物種として追加導入が必要であれば○、

既存生物種との類似しており、追加導入が不要であれば×

*2: 新たに評価が必要な作用を検出できる場合○、既存試験と同じ作用のみを検出する場合は×

*3: 急性・亜慢性の*in vivo*試験が導入済みの場合○、未導入の場合は×

*4: 諸外国の法規制で導入活用されている場合は○、導入検討中はΔ、未導入は×

(2) 生態系を構成する主要生物を用いた試験法の研究および特殊な物性や作用を持つ物質を対象とした評価法の開発

1) 各公定試験法ガイドラインの概要

a. OECDテストガイドライン

OECDテストガイドラインには、魚類試験9種類、ミジンコ試験2種類、藻類試験1種類、水生植物3種類、その他水生生物2種類、底生生物5種類、微生物4種類、土壌生物5種類、陸生植物2種類、昆虫4種類、陸生生物3種類の計40種類の試験法がある。

b. ISO試験法

ISO試験法には、魚類試験4種類、ミジンコ試験3種類、その他甲殻類試験2種類、藻類試験3種類、水生植物2種類、その他水生生物4種類、底生生物2種類、微生物11種類、土壌生物8種類、陸生植物5種類の計44種類の試験法がある。

c. OCSPP (旧OPPTS) テストガイドライン

OCSPP (旧OPPTS) テストガイドラインには、魚類試験4種類、ミジンコ試験2種類、その他甲殻類試験4種類、藻類試験2種類、水生植物1種類、その他水生生物2種類、底生生物4種類、微生物2種類、土壌生物1種類、陸生植物5種類、昆虫2種類、陸生生物5種類の計34種類の試験法がある。

d. ASTM規格

ASTM規格には、魚類試験4種類、ミジンコ試験4種類、その他甲殻類試験1種類、藻類試験1種類、水生植物3種類、その他水生生物5種類、底生生物4種類、微生物2種類、土壌生物2種類、陸生植物1種類、陸生生物1種類の計29種類の試験法がある。

2) 各国の化学物質規制制度で用いられる試験法

a. 米国TSCA

米国有害物質規制法 (TSCA) では、規制対象物質の用途、目的、製造量等により要求試験が異なる。届出のための一定の試験を要求していないため、製造前届出の申請者は新規化学物質の同定、生産量、暴露及び排出量の推定の他に、健康又は環境への影響に関するデータを含む手持ちの全てのデータをEPA

へ提出する。不足している試験データについては、EPAより試験の指示がある。参照する試験ガイドラインは、OPPTSガイドラインおよびASTM規格が中心となる。

b. 米国FIFRA

米・連邦殺虫剤殺菌剤殺鼠剤法（FIFRA）においても、TSCAと同様に農薬登録のための一定の試験を要求していないため、申請者は手持ちの健康又は環境への影響に関するデータを全てEPAへ提出する。不足している試験データについては、EPAより試験の指示がある。特に、農薬等は環境中へ直接暴露することを目的としており、用途と暴露経路に応じて段階的なリスク評価が行われるため、生態毒性の最低限のデータセットは必要となる。また、高次の慢性影響試験も要求される場合がある。参照する試験ガイドラインは、OPPTSガイドラインおよびASTM規格が中心となる。

c. EU REACH

EUの化学物質規制REACH規則では、化学物質の登録に際して4段階（1-10、10-100、100-1000、1000トン超／年）のトン帯域（年間の製造量あるいは輸入量）が設けられており、量が多くなるほど要求される安全性データも増加する。試験法選択の概念は、リスクの増大とともに急性レベルの短期試験から慢性レベルの長期試験へ、水域試験から陸域試験へと要求試験が移行する。要求される生態毒性試験について表1-6に示す。参照する試験ガイドラインは、OECDガイドラインおよびISO試験法が中心となる。

d. その他の規制制度

表1-6に加えて、欧州の医薬品や農薬に関する規制、中国、韓国、台湾の一般化学物質の規制制度で利用されている生態影響試験ガイドラインの一覧を表1-7に示した。各表には該当する試験法の番号を表記した。諸外国で導入されていて、日本の化審法に導入されていない生物分類には、微生物（OECD TG209 活性汚泥呼吸阻害試験など）、土壌生物（節足動物、環形動物、陸生植物、微生物）、昆虫（OCSP 850.3020 ミツバチ急性経口試験）、海産生物（魚類、甲殻類、藻類、カキ、二枚貝）があることが分かった。

表1-6 REACHにおける生態毒性学的情報の要求要件（登録数量）

生態毒性学的情報	登録数量（トン／年）			
	1-10（未満）	10-100（未満）	100-1,000（未満）	>1,000
無脊椎動物に対する短期毒性試験（望ましくはミジンコ）	(○)	○	○	○
水生植物の成長阻害試験（望ましくは藻類）	(○)	○	○	○
魚類に対する短期毒性試験		○	○	○
無脊椎動物・魚類に対する長期毒性試験			○	○
易分解性	(○)	○	○	○
加水分解性		○	○	○
活性汚泥呼吸阻害試験		○	○	○
吸着/脱着スクリーニング		○	○	○
シミュレーション試験（表層水中での分解・土壌への吸着・底質への吸着）			○	○
環境中の運命及び挙動			○	○
陸生動物への影響（短期）			○	○
陸生動物への影響（長期）				○
底質中の生物への長期毒性				○
鳥類への長期又は生殖毒性				○

（注）：（○）については、付属書Ⅲのクライテリア（CMR物質）に適合しない物質に対しては要求されない

表1-7 各国の化学物質管理に利用されている生態影響試験ガイドライン（試験法番号記載）

分類		医薬品	農薬			一般化学物質						
規制		欧州 EMA	米国 FIFRA		EU 規制	米国 TSCA	欧州 REACH	欧州 biocide	中国 規制	韓国 化評法	台湾 化管法	日本 化審法
規制の型		段階	選択		段階・ 選択	選択	数量	選択	数量	数量	数量	段階
主な 参照TG		OECD ISO	OCSP 850.		OECD ISO	OCSP 850.	OECD ISO	OECD ISO	OECD	OECD	OECD	OECD (化審法)
水 圏	魚類	210	1075,1085, 1400,1500	1075	203, 210, 240, 215, 10229	当局判断で化学物質毎に 所有データにて判断 (必要試験データを要求)	203 210 215	xx REACH要求試験+αを要求 (選択型)	中国 210, 204 212, 215	203 210	203 210	203 210
	甲殻類	211	1010,1020, 1300	1035,1045 ,1350	202, 14371, 14380		202 211	xx	202 211	202 211	202 211	
	植物 (藻類含む)	201	4400, 4450, 4500, 4550		201, 221, 238, 239		201	xx	201	201	201	
	微生物	209 10712	3300		---		209	xx	209	209	209	---
	その他	---	1730,1850, 1900,1925	1025,1055 ,1710	---		---	xx	---	---	---	---
底生生物		218	1735,1790, 1800	1740	218, 219, 235, 233		218	xx	---	218	---	218
土 壌	大型動物	207	3100		xx		207, 222	xx	207	207	207	---
	中型動物	232	---		xx		226, 232	xx	---	---	---	---
	高等植物	208	4100, 4150, 4230, 4300, 4600, 4800		xx		208, 227	xx	208	208, 227	208	---
	微生物	216,217	4900, 3200		xx		216, 217	xx	---	---	216	---
昆虫		---	3020, 3030, 3040		xx	---	xx	---	---	---	---	

3) 試験生物ごとの特徴・類似性の整理

収集した試験法を試験生物の分類グループごとに以下のように整理した（表1-7）。

a. 魚類（急性：発育1段階）試験の概要

魚類（急性：発育1段階）試験は、OECDテストガイドラインには3種類、ISO試験法には3種類、OCSPテストガイドラインには2種類、ASTM規格には3種類あるが、化審法には1種類のみである。

b. 魚類（慢性：発育2段階以上）試験

魚類（慢性：発育2段階以上）試験は、OECDテストガイドラインには6種類、ISO試験法には2種類、OCSPテストガイドラインには2種類、ASTM規格には1種類あるが、化審法には1種類のみである。

c. ミジンコ試験の概要

ミジンコ試験は、OECDテストガイドラインには2種類、ISO試験法には3種類、OCSPテストガイドラインには2種類、ASTM規格には4種類あるが、化審法には2種類のみである。

d. その他甲殻類試験

その他甲殻類試験は、ISO試験法にはカイミジンコとホウネンエビの2種類、OCSPテストガイドラインにはヨコエビ、アミ（急性、慢性）、クルマエビの4種類、ASTM規格にはアミのライフサイクル試験があるが、化審法には該当試験はない。

e. 藻類試験の概要

藻類試験は、OECDテストガイドラインには1種類、ISO試験法には3種類、OCSPテストガイドラインには2種類、ASTM規格には1種類あるが、化審法には1種類のみである。なお、ASTM、化審法以外の試験法には緑藻類以外の藍藻や珪藻類、海産の珪藻類や紅藻類も対象となっている。

f. 水生植物試験

水生植物試験は、OECDテストガイドラインにはウキクサ、沈水植物（水添加、底質添加）の3種類、ISO試験法にはウキクサ、沈水植物の2種類、OCSPテストガイドラインにはウキクサの1種類、ASTM規格にはウキクサ、昆布（ジャイアントケルプ等）、イネの3種類が整備されているが、化審法には該当試験

はない。

g. その他水生生物試験

その他水生生物試験として、OECDテストガイドラインにはアフリカツメガエルの2種類、ISO試験法にはカイアシ類（急性、胚発生）、二枚貝、ワムシの4種類、OCSPPTテストガイドラインにはカキ、二枚貝の2種類、ASTM規格にはカキ、イシガイ、ウニ、アフリカツメガエル（急性、亜慢性）の5種類があるが、化審法には該当試験はない。

h. 底生生物試験の概要

底生生物を用いた試験には、OECDテストガイドラインにはユスリカ（亜慢性水添加試験、底質添加試験、ライフサイクル試験、幼虫急性試験）4種類、オヨギミミズ1種類の計5種類、ISO試験法にはヨコエビの急性と慢性の2種類、OCSPPTテストガイドラインにはヨコエビ、ユスリカ（急性、慢性）、オタマジャクシの4種類、ASTM規格には海産ヨコエビ、アミ、ゴカイの慢性試験、ゴカイの亜慢性試験、ヨコエビ・ユスリカ急性試験の計5種類あるが、化審法にはユスリカ亜慢性試験（OECD TG218に準拠）の1種類のみである。

i. 微生物試験の概要

微生物試験は、OECDテストガイドラインには活性汚泥、土壌微生物、嫌気性細菌を用いた4種類、ISO試験法には従属細菌、嫌気性細菌、サルモネラ菌、菌根菌、硝化細菌、活性汚泥を用いた11種類、OCSPPTテストガイドラインには微生物と活性汚泥の2種類、ASTM規格にはマイクロコズムとワムシの2種類があるが、化審法には活性汚泥の分解試験はあるものの、微生物への影響を評価する試験はない。

j. 土壌生物試験の概要

土壌生物試験は、OECDテストガイドラインにはミミズなどの環形動物3種類、ダニ、トビムシなどの昆虫類が2種類の計5種類、ISO試験法には線虫、トビムシ、コガネムシ、ミミズ、カタツムリなどを用いた計8種類、OCSPPTテストガイドラインにはミミズを用いた1種類、ASTM規格にはミミズと線虫の2種類あるが、化審法には該当試験はない。

k. 陸生植物試験の概要

陸生植物試験は、OECDテストガイドラインには単子葉・双子葉類、トマトなどを用いた2種類、ISO試験法にはムギ、エンバク、レタス、ソラマメなどを用いた5種類、OCSPPTテストガイドラインには上記以外にシロツメクサを用いた計5種類、ASTM規格にはレタスなどを用いた1種類の試験があるが、化審法には該当試験はない。

1. 昆虫試験の概要

昆虫試験は、OECDテストガイドラインにはミツバチ（成虫急性経口、接触、幼虫急性）3種類、ヒメフンバエなど1種類の計4種類、OCSPPTテストガイドラインにはミツバチを用いた2種類の試験が、ASTM規格、ISO試験、化審法には該当試験はない。

4) 特殊な物性や作用を持つ物質を対象とした評価法

a. 内分泌かく乱物質

米国EPAでは、EDSPを運用し、ヒトを含む脊椎動物に共通とされているホルモン系統と考えられているエストロゲン系、アンドロゲン系及び甲状腺ホルモン系に対して何らかの作用を及ぼす可能性を有する物質を同定し、さらに特定された作用の結果として生じる可能性がある有害影響を特定し、用量－反応関係を確立することを目的としている。*in vivo*試験としては、両生類変態試験（OECD TG 231）、魚類短期繁殖試験（OECD TG 229）、鳥類生殖試験（OECD validation program）、両生類成長生殖試験（OECD validation program）、メダカ拡張一世代試験（OECD TG240）および無脊椎動物ライフサイクル試験（OECD TG241）が位置づけられている。

一方、EU における内分泌かく乱物質対策については、1999 年に欧州委員会が「内分泌かく乱物質に対する共同体戦略」を取りまとめている。この戦略に即して、既にREACH 規則、植物保護製品規則、殺生物製品規則、化粧品規則、水枠組み指令で内分泌かく乱物質が規制対象とされている。特にREACH 規則では、「内分泌かく乱作用を有し、ヒト又は環境に対し発がん性物質等と同等の懸念をもたらす恐れ

がある」物質が高懸念物質（SVHC）の一つとして本則に規定されている。基本となる試験法リストはEDSPと同等である。

国内ではEXTEND2010において図1-1に示す評価枠組みが提案されており、作用の確認を行う第一段階Tier-1、影響レベルの確定評価を行う第二段階Tier-2としてそれぞれ下記の試験の導入が検討されている。

（抗）エストロゲン、（抗）アンドロゲン

- Tier 1：魚類短期繁殖試験（OECD TG229）
- Tier 1：魚類21日間試験（OECD TG230）
- Tier 1：幼若メダカ抗アンドロゲンスクリーニング試験（開発中、OECD SPSF提出）
- Tier 2：メダカ拡張1世代繁殖試験（OECD TG240）

（抗）甲状腺ホルモン

- Tier 1：短期クセノプス属試験（開発中）
- Tier 2：両生類変態試験AMA（OECD 231）
- Tier 2：両生類ライフサイクル試験LAGDA（OECD TG241）

幼若ホルモン・脱皮ホルモン

- Tier 1：短期幼若ホルモン検出試験（開発中、OECD SPSF提出）
- Tier 1：短期脱皮ホルモン検出試験（開発中）
- Tier 2：ミジンコ繁殖試験（OECD TG211 Annex 7）
- Tier 2：ミジンコ多世代試験（開発中）

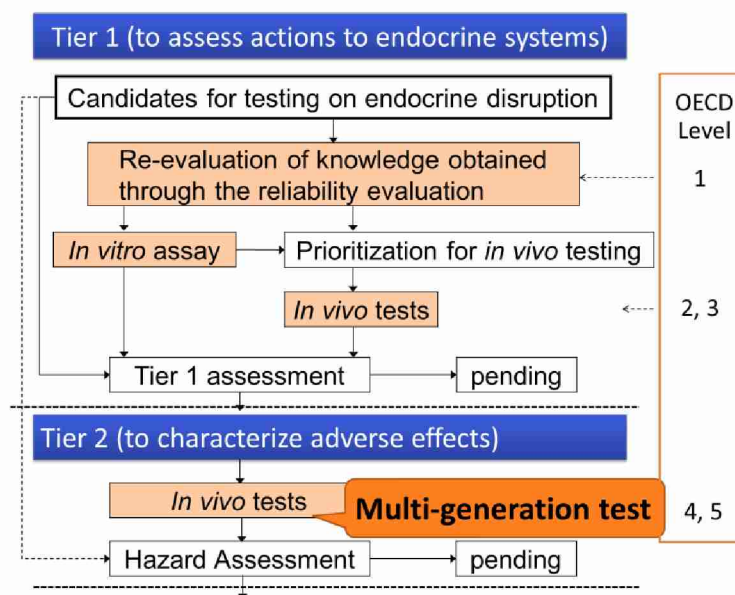


図1-1 EXTEND2010における内分泌かく乱物質評価枠組み

b. 医薬品

① アメリカ食品医薬品局（FDA）（1998）

藻類、ミジンコ、魚類を用いた急性試験がメインに利用されている。

② 欧州医薬品庁（EMA）（2006）

ミジンコ繁殖試験など慢性試験がメインに利用されている。図1-2に評価のフローチャートを示した。

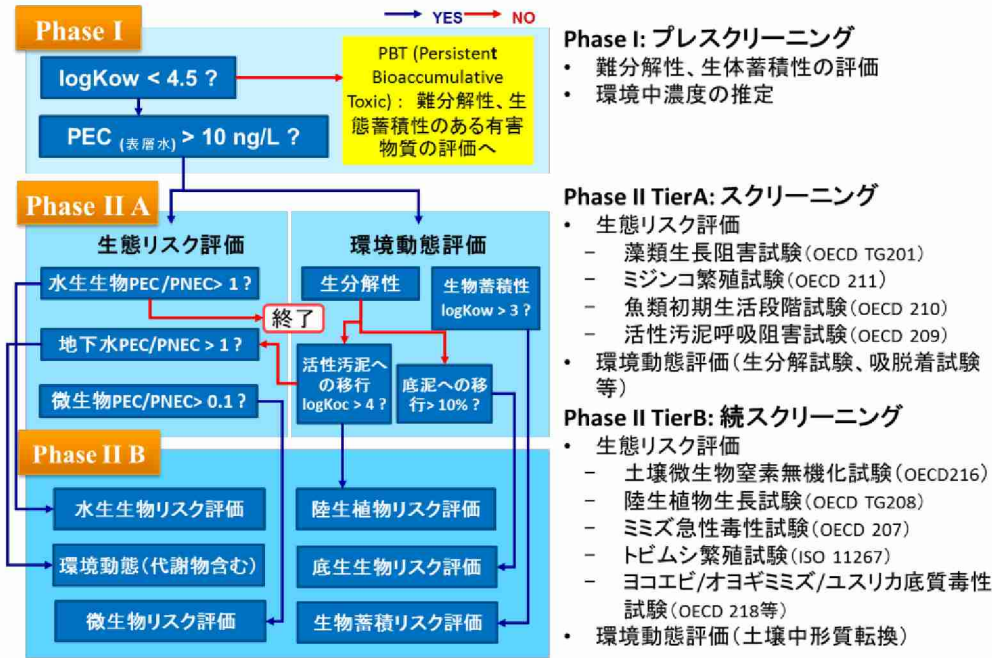


図1-2 欧州医薬品規制における生態リスク評価のフローチャート (EMEA, 2006)

③ 日本（厚生省）

厚労科研費「人用医薬品の環境影響評価ガイドラインとリスク評価等に関する研究（平成21年度～、代表：西村哲治）」において、上記法規制で用いられている試験法を参考に、より短期で慢性影響を評価できる短期慢性影響試験を検討してきた。短期慢性影響試験は、表1-8に示す藻類生長阻害試験（化審法等と同じ）、ニセネコゼミジンコを用いた繁殖試験、胚仔魚期の魚類を用いる短期毒性試験（Environment Canada, US EPA, ISO）で、国内でも生物応答を用いた排水試験法（検討案）として導入が進められている。厚生省から2015年に公表された「新医薬品開発における環境影響評価に関する考え方（案）」では「各社（製造者）において、代表的生物種3種類のスクリーニング毒性試験を実施して予測無影響濃度を求め、そのデータを将来の環境影響評価のために保有しておくこととし、承認後、国内流通量に応じて、定期的に計算した環境中予測濃度あるいは国内の代表的河川で測定された実測値が予測無影響濃度を近い将来に超えることが予想された時点で、より網羅的な試験メニューを追加実施する、といった段階的なアプローチも可能と考える。」とある。現時点で試験法の詳細については明確にされていない。

表1-8 藻類・ミジンコ・魚類を用いた短期慢性試験の概要

試験名	胚・仔魚期の魚類を用いる短期毒性試験法	ニセネコゼミジンコを用いる繁殖試験法	淡水藻類を用いる生長阻害試験法
参照試験法	ISO 12890 USEPA WET chronic test method 1001.0	ISO 20665 Environment Canada EPS 1/RM/21 USEPA WET chronic test method 1002.0	ISO 8692 Environment Canada EPS 1/RM/25 (USEPA WET chronic test method 1003.0)
生物種	ゼブラフィッシュ (<i>Danio rerio</i>) またはヒメダカ (<i>Oryzias latipes</i>) の受精卵	ニセネコゼミジンコの幼体 (<i>Ceriodaphnia dubia</i>)	対数増殖期のムレミカヅキモ (<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>)
試験期間	8～10日間（ゼブラフィッシュ）、 13～16日間（メダカ）	6～8日間	72時間
指標	胚のふ化、 胚～仔魚期の生存	繁殖（産仔数）や 親の生存	細胞濃度および 生長速度
試験濃度と評価	対照区（飼育に用いる水）＋排水の希釈列（80%、40%、20%、10%、5%）で試験 →対照区と有意な差がない排水の濃度（NOEC：最大無影響濃度）を求める。		

c. 農薬

b. で前述したとおり、米国ではFIFRA、欧州ではEU植物防疫剤規則（PPP: Plant Protection Products Regulation (EC 1107/2009) 10）やEU殺生物性製品規則（BPR: Biocidal Product Regulation）（EC 528/2012）11）において表1-8に示す魚類、ミジンコ、藻類の急性および慢性試験、水生植物、底質への移行性が示された場合、底質毒性試験も要求される。我が国では農薬取締法において魚類、ミジンコ、藻類の急性試験が必須の他、ヌマエビ・ヌカエビ、ヨコエビ、ユスリカ幼虫、ミツバチ、カイコ、天敵昆虫等、鳥類を用いた急性試験が整備されており、近年、予測無影響濃度（PNEC）の算出に、種感受性分布（SSD: species sensitivity distribution）を適用するため、珪藻や藍藻といった複数の藻類、ヌマエビ、ヌカエビ、ユスリカ幼虫、ヨコエビ、ミツバチ等を用いた試験が検討されている。

d. ナノマテリアル

OECDにおいて2006年より工業ナノマテリアル製品の安全性評価に関する作業班（Working Party on Manufactured Nanomaterials: WPMN）が発足され、産官共同で主要なナノマテリアルの物理化学的性質・環境動態・生態毒性・哺乳類毒性を評価する試験プログラムを実施している。対象とするナノマテリアルはフラーレン（C60）、単層カーボンナノチューブ、多層カーボンナノチューブ、金、銀、鉄、酸化チタン、酸化アルミニウム、酸化セシウム、酸化亜鉛、二酸化ケイ素、デンドリマー、ナノクレイで、基本的に、既存の生態毒性試験法（魚類、ミジンコ、藻類、水生植物、微生物、大型土壤動物、陸生植物、微生物、底生生物、その他）を用いて影響を評価する。ただし試料準備方法に留意が必要とされている（Preliminary Guidance Notes）。

5) 我が国での必要性、実行可能性の検討、重要度の評価とリスト化

以上の試験法について、我が国における導入状況および必要性・重要度のリスト化案を表1-9に示した。我が国でまだ導入されていない試験法に対して、必要性・重要度を評価するため、①生物種、②作用、③環境媒体、④諸外国での活用の4項目を設定した。①生物種は、生態・食餌形態などの異なる生物種として追加導入が必要であれば○、既存生物種との類似しており、追加導入が不要であれば×とした。②作用は、新たに評価が必要な特殊作用を検出できる場合○、検出できる可能性がある場合△、既存試験と同じ作用のみを検出する場合は×とした。③環境媒体は、試験生物の生息域である環境媒体について、新たなリスク評価の検討が必要な場合は○（土壌、陸、海域）、導入検討中は△（底質）、未検討（大気）または導入済み（淡水域）の場合は×とした。④諸外国での活用は、諸外国の法規制で導入活用されている場合は○、導入検討中は△、未導入は×とした。

その結果、○△が多かったのは海産魚類・アミ・二枚貝、鳥類、昆虫のミツバチ、土壤生物（植物、節足動物、環形動物）であった。鳥類はREACH等で位置づけられているが、活用状況の実態をさらに情報収集するとともに、試験の実行性（再現性、精度、コスト、労力等）についても検討が必要である。土壤生物については土壌のリスク評価のあり方や必要性についてさらなる情報収集と検討を行ったうえで、改めて試験の感受性や実行性等について検討する。

次に○△が多かったのは、両生類、底生生物のヨコエビとオヨギミミズ、巻貝、海産藻類であった。両生類と巻貝については諸外国の法規制における実際の活用状況が不明のため、導入の妥当性を検討するためにはさらなる情報収集が必要である。ヨコエビとオヨギミミズについては、平成25～27年度有害性評価困難な化学物質の試験法検討業務において導入検討調査を行い、食餌形態の違い、感受性、試験実行性）、諸外国での活用状況を踏まえ、ヨコエビを用いた底質毒性試験の検討を行い、暫定案を作成している。導入に当たっての課題として、諸外国においても底質に化学物質を適切にスパイクする方法やばく露濃度の評価、リスク評価のアプローチなど多くの課題が指摘されており、現在も学会やワークショップ等で検討が進められている。

化学物質規制では淡水生物が多く用いられているが、詳細なリスク評価を行う段階で、海産生物を用いたデータが必要とされる場合がある。海産生物種の要求要件についてはREACHやTSCAなどの活用状況について、さらに調査をした上で、試験法の実行性等を検討する必要があるだろう。

表1-9 各*in vivo*試験法の我が国での導入状況、必要性・重要度のリスト化

生物 分類	試験生物	対象 毒性	主な試験法	我が国 での導 入状況	導入の必要性・重要度			
					生物 種 ^{*1}	作用 ^{*2}	環境媒体 ^{*3}	諸外国で の活用 ^{*4}
魚類	メダカ、ニジマス、コイなど	急性/ 慢性	OECD TG203, 210	○				
		その他	OECD TG236など	△	×	△	×(淡水)	○
	シープヘッド ミノール等	急性	OECD TG203など	△	○	○	○(海域)	○
鳥類	ウズラなど	急性	OECD TG205	×	○	○	○(陸・大気)	○
		慢性	OECD TG206など	×	○	○	○(陸・大気)	○
両生 類	アフリカツメ ガエル	急性	ASTM E2591-07など	×	○	○	○(淡水・底質)	△
		慢性	OECD TG231, TG241	×	○	○	○(淡水・底質)	△
甲殻 類	ミジンコ	急性	OECD TG202など	○				
		慢性	OECD TG211など	○				
	ハウネンエビ	急性	ISO 14380	×	△↑ 類似	△↑ 類似	×(淡水)	△
	アミ	急性	OCSPP850.1035	×	○	○	○(海域)	○
		慢性	OCSPP850.1350	×	○	○	○(海域)	○
	クルマエビ	急性	OCSPP850.1045	×	△↑ 類似	△↑ 類似	○(海域)	△
昆虫	ユスリカ	急性	OECD TG235	×	○	○	△(底質)	△
	ミツバチ・ハエなど	急性	OECD TG213, 214, 228, 237	×	○	○	○(陸・大気)	○
底生 生物	ユスリカ	垂慢 性	OECD TG218, 219, OCSPP850.1735	○				
	淡水産ヨコエビ	急性/ 慢性	OCSPP850, ASTM E1705-05	×	○	○	△(底質)	○
	海産ヨコエビ	急性/ 慢性	ASTM E1361-03	×	○	○	△(底質)	○
	オヨギミミズ	慢性	OECD TG233	×	○	○	△(底質)	○
	ゴカイ	その他	ASTM E1611-00	×	△↑ 類似	△↑ 類似	△(底質)	○
	両生類*	垂慢 性	OCSPP850.1800	×	○	○	△(底質)	△
軟体	巻貝	急性/ 慢性	OECD Draft TGなど	×	○	○	○(海域)	△
	二枚貝	急性	OCSPP850.1025, 1055		○	○	○(海域)	○
藻類	淡水藻類	急性/ 慢性	OECD TG201, OCSPP850.4500, 4550	△	○	△	×(淡水)	○
	海産藻類	急性/ 慢性	ISO 10253など	×	○	△	○(海域)	○
植物	ウキクサ	慢性	OECD TG221など	×	○	△	×(淡水)	○
	沈水植物	慢性	OECD TG238など	×	○	△	×(淡水)	○
土壌	陸生植物	慢性	OECD TG208, 227など	×	○	○	○(土壌)	○
	節足動物	慢性	OECD TG226, 232	×	○	○	○(土壌)	○
	環形動物	急性/ 慢性	OECD TG207, 220, 222 など	×	○	○	○(土壌)	○

*1: 生態・食餌形態などの異なる生物種として追加導入が必要であれば○

既存生物種との類似しており、追加導入が不要であれば×

*2: 新たに評価が必要な特殊作用を検出できる場合○、検出できる可能性がある場合△

既存試験と同じ作用のみを検出する場合は×

*3: 試験生物の生息域である環境媒体について、新たなリスク評価の検討が必要な場合は○（土壌、陸、海域）

導入検討中は△（底質）、未検討（大気）または導入済み（淡水域）の場合は×

*4: 諸外国の法規制で導入活用されている場合は○、導入検討中は△、未導入は×

(3) *in vitro*毒性試験、*in silico*解析や作用メカニズムに基づく毒性予測手法の研究

1) *in vitro*試験の活用状況・開発状況・評価

a. *in vitro*試験の活用状況

① REACHにおける*in vitro*試験法の活用状況

REACHにおいて試験法として推奨されているOECDテストガイドラインを対象として活用状況について調査を実施した。OECDにおけるほとんどの*in vitro*試験法は、“OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4 Health Effects”としてまとめられているため、このSectionを調査対象とした。

“Section 4”に公開されている*in vitro*試験法は98編（2015年11月現在）あり、この中から特殊な物性や作用を対象とした内分泌かく乱作用に関する試験法と、遺伝毒性、変異原性及び細胞毒性を対象とした試験法であり、かつ入手可能なものとして以下の8編を収集した。また、生物試験ではあるが、胚を使用するため*in vitro*と同等に位置づけられる試験法として“Section 2”から1編を収集した。

また、今後導入が検討されている試験法として6編の情報（プロジェクト名）を入手した。

表1-10 OECDテストガイドラインより選択した方法

試験法ID	試験法名	検出対象
OECD TG455	Performance-Based Test Guideline for Stably Transfected Transactivation <i>in vitro</i> Assays to Detect Estrogen Receptor Agonists and Antagonists	ER agonist/antagonist
OECD TG456	H295R Steroidogenesis Assay	E2, testosterone
OECD TG457	BG1Luc Estrogen Receptor Transactivation Test Method for Identifying Estrogen Receptor Agonists and Antagonists	ER agonist/antagonist
OECD TG473	<i>in vitro</i> Mammalian Chromosomal Aberration Test	染色分体型および染色体型の異常
OECD TG476	<i>in vitro</i> Mammalian Cell Gene Mutation Tests using the Hpmt and xpmt genes	HPRT(endogeneous hypo-xanthine-guanine phosphoribosyl transferase gene), XPRT(xanthine-guanine phosphoribosyl transferase transgene)
OECD TG487	<i>in vitro</i> Mammalian Cell Micronucleus Test	小核の検出
OECD TG490	<i>in vitro</i> Mammalian Cell Gene Mutation Tests Using the Thymidine Kinase Gene	mouse lymphoma assay (MLA), thymidine kinase (TK) locus
OECD TG493	Performance-Based Test Guideline for Human Recombinant Estrogen Receptor (hrER) <i>in vitro</i> Assays to Detect Chemicals with ER Binding Affinity	ER agonist/antagonist
OECD TG236	Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test	(i)coagulation of fertilised eggs, (ii) lack of somite formation, (iii) lack of detachment of the tail-bud from the yolk sac, and (iv) lack of heartbeat

② TSCA 及び FIFRA における *in vitro* 試験法の活用状況

TSCA (Toxic Substances Control Act : 有害物質規制法) 及びFIFRA (Federal Insecticide, Fungicide and Rodenticide Act : 米国版農薬取締法) は、試験法として同じ米国EPAテストガイドライン (Test Guidelines for Pesticides and Toxic Substances) を推奨しているため、この両者については、当該テストガイドラインを対象として活用状況の調査を実施した。米国EPAテストガイドラインは、OPPTS (Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances) が管理しており、対象とする分野別に11のシリーズから構成されている。ここでは、*in vitro*試験法がまとめられている“シリーズNo. 870 Health Effects Test Guidelines”を調査対象とした。

“シリーズNo. 870”は更にグループA～Gに分かれており、ドラフトを含めて65編（2015年11月現在）の試験法があったが、ここでは、遺伝毒性、変異原性及び細胞毒性を対象とした試験法であり、かつ入手可能なものとして以下の11編（内、ドラフト3編）を収集した。

なお、内分泌かく乱作用に関する試験法は、“シリーズNo. 890 Endocrine Disruptor Screening Program

Test Guidelines”に分類されており、次項で詳述する。

表1-11 米国EPAテストガイドラインより選択した方法

試験法ID	試験法名	検出対象
OPPTS 870.5100	Bacterial Reverse Mutation Test	復帰株のコロニー数
OPPTS 870.5140	Gene Mutation in <i>Aspergillus nidulans</i>	変異株のコロニー数
OPPTS 870.5250	Gene Mutation in <i>Neurospora crassa</i>	変異株のコロニー数
OPPTS 870.5265	The <i>Salmonella typhimurium</i> Reverse Mutation Assay	復帰株のコロニー数
OPPTS 870.5300	<i>in vitro</i> Mammalian Cell Gene Mutation Test	HPRT (endogeneous hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase gene), XPRT (xanthine-guanine phosphoribosyl transferase transgene), thymidine kinase (TK) locus
OPPTS 870.5375	<i>in vitro</i> Mammalian Chromosome Aberration Test	染色体型の異常
OPPTS 870.5500	Bacterial DNA Damage or Repair Tests	DNA損傷
OPPTS 870.5550	Unscheduled DNA Synthesis in Mammalian Cells in Culture	不定期DNA合成
OPPTS 870.5575	Mitotic Gene Conversion in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	復帰株のコロニー数
OPPTS 870.5900	<i>in vitro</i> Sister Chromatid Exchange Assay	染色分体交換発生数
OPPTS 870.8800	Morphologic Transformation of Cells in Culture	形質変換した細胞数

※色つきセルはドラフトを示す

③ EDSPにおける *in vitro* 試験法の活用状況

EDSP (Endocrine Disruptor Screening Program) は、米国EPAによる内分泌かく乱物質評価のためのプログラムであり、Tier1スクリーニング試験とTier2テストの2段階から化学物質の内分泌かく乱性について評価をしている。Tier1及び2で使用される試験法は、米国EPAテストガイドラインとして登録されており、ここでは当該試験法が入っているOPPTSの“シリーズNo. 890 Endocrine Disruptor Screening Program Test Guidelines”を調査対象とした。

“シリーズNo. 890”には、14編（2015年11月現在）の試験法があり、この中で入手可能なものとして以下の5編を収集した。

表1-12 米国EDSPの試験法より選択した方法

試験法ID	試験法名	検出対象
OPPTS 890.1150	Androgen Receptor Binding (Rat Prostate Cytosol)	AR agonist/antagonist
OPPTS 890.1200	Aromatase (Human Recombinant)	the conversion of androgen to estrogen
OPPTS 890.1250	Estrogen Receptor Binding Assay Using Rat Uterine Cytosol (ER-RUC)	ER agonist/antagonist
OPPTS 890.1300	Estrogen Receptor Transcriptional Activation (Human Cell Line (HeLa-9903))	ER agonist/antagonist
OPPTS 890.1550	Steroidogenesis (Human Cell Line -H295R)	E2, testosterone

④ ISOにおける *in vitro* 試験法の活用状況

ISO (International Organization for Standardization) は、工業製品やマネジメントに関する国際規格を作成している欧州の機関であり、これまでに19,000以上の規格が公表されている。この中には、*in vitro*試験法も含まれており、調査の結果、内分泌かく乱作用を対象とした試験法はまだ公表されておらず、遺伝毒性、変異原性及び細胞毒性を対象とした試験法が8編確認された（2015年11月現在）。この内、既存の収集資料から内容が確認できた以下の4編を調査対象とした。

また、内分泌かく乱作用に関する検討中の試験法として、3編の情報（試験名）を入手した。

表1-13 ISO規格より選択した方法

試験法ID	試験法名	検出対象
ISO 11350:2012	Water quality –Determination of the genotoxicity of water and waste water – <i>Salmonella</i> /microsome fluctuation test (Ames fluctuation test)	細菌数
ISO 13829-2000	Water quality –Determination of the genotoxicity of water and waste water using the umu-test	細菌数 βガラクトシダーゼ 活性
ISO 16240:2005	Water quality –Determination of the genotoxicity of water and waste water – <i>Salmonella</i> /microsome test (Ames test)	変異株のコロニー数
ISO 21427-2-2006	Water quality –Evaluation of genotoxicity by measurement of the induction of micronuclei -- Part 2: Mixed population method using the cell line V79	小核の検出

⑤ EXTEND2010における *in vitro* 試験法の活用状況

EXTEND (Extended Tasks on Endocrine Disruption) 2010は、日本における内分泌かく乱物質評価のためのプログラムであり、第1段階と第2段階の2段階から化学物質の内分泌かく乱性について評価をしている。第1段階では試験管内試験 (*in vitro* 試験) と比較的簡易かつ短期間の生物試験を実施し、第2段階では長期間のばく露による生物試験を実施している。ここでは、*in vitro* 試験が入っている第1段階の試験群を調査対象とした。

“第1段階試験群” には、16種 (2015年11月現在、*in vitro* 試験におけるアゴニストおよびアンタゴニスト作用を別試験とする) の試験法があり、この中の *in vitro* 試験法である15種を調査対象とした。

表1-14 EXTEND2010における試験法より選択した方法

試験法名	検出対象
メダカエストロゲン受容体αレポーター遺伝子試験 (エストロゲン作用)	ER agonist
メダカエストロゲン受容体αレポーター遺伝子試験 (抗エストロゲン作用)	ER antagonist
メダカエストロゲン受容体β1レポーター遺伝子試験 (エストロゲン作用)	ER agonist
メダカエストロゲン受容体β1レポーター遺伝子試験 (抗エストロゲン作用)	ER antagonist
メダカエストロゲン受容体β2レポーター遺伝子試験 (エストロゲン作用)	ER agonist
メダカエストロゲン受容体β2レポーター遺伝子試験 (抗エストロゲン作用)	ER antagonist
メダカアンドロゲン受容体αレポーター遺伝子試験 (アンドロゲン作用)	AR agonist
メダカアンドロゲン受容体αレポーター遺伝子試験 (抗アンドロゲン作用)	AR antagonist
メダカアンドロゲン受容体βレポーター遺伝子試験 (アンドロゲン作用)	AR agonist
メダカアンドロゲン受容体βレポーター遺伝子試験 (抗アンドロゲン作用)	AR antagonist
ニシツメガエル甲状腺ホルモン受容体αレポーター遺伝子試験 (甲状腺ホルモン作用)	TR agonist
ニシツメガエル甲状腺ホルモン受容体αレポーター遺伝子試験 (抗甲状腺ホルモン作用)	TR antagonist
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 (甲状腺ホルモン作用)	TR agonist
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 (抗甲状腺ホルモン作用)	TR antagonist
オオミジンコ脱皮ホルモン受容体レポーター遺伝子試験 (脱皮ホルモン作用)	EcR agonist

b. 開発中の *in vitro* 試験

① AOPwiki

AOP Wikiは、AOP KB (AOP Knowledge Base) の最初のツールであり、OECDのガイダンス文書に基づいて作られた、AOP開発のためのバーチャル百科事典である。AOP KBとは、OECD、米国環境保護庁および欧州委員会共同研究センターによって立ち上げられたWebベースのプラットフォームであり、化学物質がどのように有害影響を引き起こすのかについての知見を集めたものである。

AOP Wikiは2014年9月に公開され、提案された種々のAOPについてWeb上で詳細な情報が閲覧できるようになっている。AOPは、関連する論文、毒性発現の原因となる分子レベルのメカニズム (MIE: Molecular Initiating Event)、有害影響 (AO) 及びそれを仲介する一連のキーイベント (KE) が書かれた表で構成され、記載されたMIE、KEs及びAOsについてはその根拠資料が示されている。

現在、AOP Wikiでは、OECD分子スクリーニングおよびトキシコゲノミクスに関する拡大アドバイザリーグループ (EAGMST: Extended Advisory Group for Molecular Screening and Toxicogenomics) で検討中の14種のAOP、意見を受け付けている3種のAOP、開発中の106種のAOPが公開されている (2016年1月現在)。この中から生態影響の評価に係るAOP (10種) と生態影響の評価に応用可能と思われるAOP (24種) を選択し、調査対象とした。調査したAOPを下表に示す。

表1-15 “AOPwiki”より選択したAOP

AOP名	主たる反応部位
Currently Under OECD EAGMST Review	
Androgen receptor agonism leading to reproductive dysfunction	Androgen receptor
Antagonist-binding causing stabilization of co-repressor (SMRT or N-CoR) to PPARalpha Ligand Binding Domain causing downstream starvation-like body-weight loss	PPARα Ligand Binding Domain
Aromatase inhibition leading to reproductive dysfunction (in fish)	Aromatase
Binding to the picrotoxin site of ionotropic GABA receptors leading to epileptic seizures	ionotropic GABA receptors
Chronic binding of antagonist to N-methyl-D-aspartate receptors (NMDARs) during brain development induces impairment of learning and memory abilities	NMDARs
Estrogen receptor antagonism leading to reproductive dysfunction	Estrogen receptor
PPARα activation in utero leading to impaired fertility in males	PPARα
PPARγ activation leading to impaired fertility in adult female	PPARγ
Open for General Comments	
Acetylcholinesterase inhibition leading to acute mortality	Acetylcholinesterase
AHR1 activation leading to developmental abnormalities and embryoletality (in birds)	AHR1
AOPs Under Development	
5-hydroxytryptamine transporter (5-HTT; SERT) inhibition leading to decreased shelter seeking and increased predation	5-HTT
AhR activation leading to embryo toxicity in fish	AhR
AhR activation leading to uroporphyrin	AhR
Binding to SH/selen-proteins can trigger neuroinflammation leading to neurodegeneration	SH/selen-proteins
Calcium-mediated neuronal ROS production and energy imbalance	neuron
Cyclooxygenase inhibition leading reproductive failure	Cyclooxygenase
Cyclooxygenase inhibition leading to reproductive dysfunction	Cyclooxygenase
Cyclooxygenase inhibition leading to reproductive dysfunction via inhibition of female spawning behavior	Cyclooxygenase
Cyclooxygenase inhibition leading to reproductive dysfunction via inhibition of pheromone release	Cyclooxygenase
Ecdysone receptor (EcR) activation leading to mortality in <i>Daphnia magna</i>	EcR
ER agonism leading to reduced survival due to renal failure	ER
ER agonism leading to skewed sex ratios due to altered sexual differentiation in males	ER
Estrogen receptor agonism leading to reproductive dysfunction	ER
Glucocorticoid Receptor (GR) Mediated Adult Leydig Cell Dysfunction Leading to Decreased Male Fertility	GR
Histamine (H2) receptor antagonism leading to reduced survival	H2 receptor
Narcosis leading to respiratory failure	Narcosis
Nicotinic acetylcholine receptor activation contributes to abnormal foraging and leads to colony loss/failure	Nicotinic acetylcholine receptor
Nicotinic acetylcholine receptor activation contributes to abnormal roll change within the worker bee caste leading to colony loss/failure	Nicotinic acetylcholine receptor
Nicotinic acetylcholine receptor activation contributes to accumulation of damaged mitochondrial DNA and leads to colony loss/failure	Nicotinic acetylcholine receptor
Nicotinic acetylcholine receptor activation contributes to impaired hive thermoregulation and leads to colony loss/failure	Nicotinic acetylcholine receptor
NR1I2 (Pregnane X Receptor, PXR) activation leading to hepatic steatosis	PXR
NR1I3 (CAR) suppression leading to hepatic steatosis	CAR
Sodium channel inhibition leading to reduced survival	Sodium channel
Unknown MIE leading to reproductive dysfunction via increased HIF-1alpha transcription	HIF-1α

※色つきセルは生態影響の評価に係るAOPを示す

② ToxCast

ToxCastは、計算機化学、生物活性のプロファイリング、トキシコゲノミクスなどのデータを用いて、ハイスループットに化学物質の毒性を予測し、さらなる毒性を検討するための優先順位をつける手法開発のプログラムであり、米国EPAにより開発されたものである。ToxCastは、2007年4月に立ち上げられ、従来のハイスループットスクリーニングと異なり、様々な細胞種、多くの濃度レベルを用いることにより毒性や用量－反応関係に関する多くの情報を一度に得ることが可能となっており、化学物質毒性スクリーニングの強力なツールとなっている。米国EPAのEDSPでは、物質のランク付けと優先付けに使われている。

現在、ToxCastには、821種のアッセイ法が登録されている（2014年10月現在）。以下に、登録されているアッセイ法の内訳を対象とする作用機序ごとに示す。

表1-16 ToxCastに登録されているアッセイ法の内訳

対象とする作用機序	検出方法	登録数
Enzyme reporter	Enzyme activity	296
Binding reporter	ELISA	149
	Radioligand binding	120
	Protein fragment complementation	14
	FRET	8
	Fluorescent polarization	1
Inducible reporter	mRNA induction	84
	Beta lactamase induction	23
	Luciferase induction	10
	Fluorescent protein induction	2
Viability reporter	ATP content	20
	Protein content	24
	DNA content	12
	Cell number	7
Morphology reporter	Cell phenotype	26
Background reporter	Artifact detection	10
Membrane potential reporter	Dye binding	7
Conformation reporter	Protein conformation	6
Growth reporter	Real-time cell-growth kinetics	2

※2014年10月現在の登録数（821種）。2015年10月現在は1192種。

本調査では、上記に示したアッセイ法の中で特殊な物性や作用を対象とした内分泌かく乱作用の検出に適用されている「Binding reporter」と「Inducible reporter」を作用機序とするアッセイ法から22種を選定し、その他生態毒性の検出に適用可能と思われるアッセイ法2種について、情報の収集整理を行った。収集したアッセイ法を表1-17に示す。

表1-17 ToxCast から収集したアッセイ法

対象とする作用機序	アッセイ名	検出対象
Binding reporter	NVS_GPCR_rTRH	thyrotropin releasing hormone receptor
	NVS_NR_hAR	androgen receptor
	NVS_NR_hER	estrogen receptor 1
	NVS_NR_hTRa_Antagonist	Thyroid hormone receptor alpha
	NVS_NR_mERa	estrogen receptor 1 (alpha)
	NVS_NR_rAR	androgen receptor

	OT_AR_ARSRC1_0480	androgen receptor
	OT_AR_ARSRC1_0960	androgen receptor
	OT_ER_ERaERa_0480	estrogen receptor 1
	OT_ER_ERaERa_1440	estrogen receptor 1
	OT_ER_ERaERb_0480	estrogen receptor 1 estrogen receptor 2 (ER beta)
	OT_ER_ERaERb_1440	estrogen receptor 1 estrogen receptor 2 (ER beta)
Inducible reporter	TOX21_AR_BLA_Agonist	androgen receptor
	TOX21_AR_BLA_Antagonist	androgen receptor
	TOX21_AR_LUC_MDAKB2_Agonist	androgen receptor
	TOX21_AR_LUC_MDAKB2_Antagonist	androgen receptor
	TOX21_ERa_BLA_Agonist	estrogen receptor 1
	TOX21_ERa_BLA_Antagonist	estrogen receptor 1
	TOX21_ERa_LUC_BG1_Agonist	estrogen receptor 1
	TOX21_ERa_LUC_BG1_Antagonist	estrogen receptor 1
	TOX21_TR_LUC_GH3_Agonist	thyroid hormone receptor beta, thyroid hormone receptor alpha
	TOX21_TR_LUC_GH3_Antagonist	thyroid hormone receptor beta, thyroid hormone receptor alpha
Others	Tanguay_ZF_120hpf	dechorionated zebrafish embryo
	NHEERL_ZF_144hpf	zebrafish embryo

※試験名はToxCast における通称名を示す

c. *in vitro*試験法の収集

公的ガイドラインのある *in vitro*試験法について、諸外国の化学物質管理制度で用いられている、あるいは導入が検討されているものを調査した。調査は、欧州REACH、米国TSCA及びFIFRA（米国版農薬取締法）、米国EDSP、ISOおよび日本のEXTEND2010を対象に実施した。調査に際しては、長期のライフイベント時の特異的な影響を評価する試験、特殊な物性や作用（内分泌かく乱作用）、一般毒性（遺伝毒性、変異原性、細胞毒性）を対象とした試験法について、開発中の試験法も含めて情報を収集した。ToxCastについては、*in vitro*試験法を組み込んだ化学物質管理体制が確立されている内分泌かく乱作用に関する試験法を主として選別した。また、以後の試験法の整理のためには、内容確認が必要であるため、インターネット上から文書が入手可能な試験法に限定した。ただし、ISO規格のテストガイドラインについては、購入した場合にのみ内容が確認できることから、委託者であるNIESと相談の上、NIESで閲覧可能なガイドラインのみを情報整理の対象とした。

調査の結果、約100編の試験法に関する情報を収集した。本調査を通じて得られた試験法を調査対象別に下表にまとめる。

表1-18 本研究で収集した試験法（まとめ）

調査対象	対象国	収集した試験法の数
REACH	欧州	9
TSCA及びFIFRA	米国	11(3)
EPA-EDSP	米国	5
ISO	欧州	4
EXTEND2010	日本	15
AOPwiki	米国	34
ToxCast	米国	24

※括弧は、ドラフトの内数

d. 諸外国の*in vitro*試験法の特徴・用途・類似性の整理

① 内分泌かく乱作用を対象とした試験法

本調査では、内分泌かく乱作用を対象とした試験法として、OECDテストガイドラインを4編、米国EPAテストガイドラインを5編、日本のEXTEND2010の試験法として15編を収集した。収集した試験法は、いずれも内分泌かく乱作用をもつ化学物質管理体制において使用されている。

OECDでは、2012年に“OECD Conceptual Framework(CF) for Testing and Assessment of Endocrine Disruptors”が公表され、内分泌かく乱物質がエストロゲン (E)、アンドロゲン (A)、甲状腺 (T) のホルモン系統 (以下、EAT 系) のシグナル伝達をかく乱する能力を検証するために、下表に示すLevel 1～Level 5 に試験方法を分けて段階的な評価を行うアプローチが示されている。

OECD CFのLevel 2には内分泌関連の特定の標的 (受容体、酵素等) と化学物質との相互作用の可能性に関する情報を提供する*in vitro*スクリーニング試験が該当する。Level 2の試験は有害性の検出、可能性のある作用機序 (MoA) の特定、adverse outcome pathway (AOP) の予測、優先順位設定、証拠の重みづけ (WoE) に基づき結論を導く判断のためのスクリーニング等に用いられる。

表1-19 OECD CFにおける試験方法のLevel

Level	特徴
Level 1	既存データ、及び試験データ以外の情報
Level 2	選択された内分泌メカニズム／経路に関するデータを与える <i>in vitro</i> 試験 (哺乳類及び非哺乳類の手法)
Level 3	選択された内分泌メカニズム／経路に関するデータを与える <i>in vivo</i> 試験
Level 4	内分泌関連のエンドポイントへの有害影響に関するデータを与える <i>in vivo</i> 試験
Level 5	生物のライフサイクルのより広範な期間の内分泌関連エンドポイントへの有害影響に関するより包括的なデータを与える <i>in vivo</i> 試験

米国EPAでは、1999年に策定されてEDSPの下で内分泌かく乱作用をもつ化学物質のスクリーニング評価が行われている。EDSP は、Tier 1スクリーニング試験とTier 2テストの2段階からなり、Tier 1ではスクリーニング試験によって、EAT系に対して何らかの作用を及ぼす可能性を有する物質を同定し、Tier 2では、Tier 1で特定された作用の結果として生じる可能性がある有害影響を特定し、用量-反応関係を確立することを目的としている。本調査で収集した試験法は、Tier 1で使用され、内分泌かく乱作用をもつ物質のスクリーニングに使われている。スクリーニング試験の結果については、証拠の重み付け (weight-of-evidence) を考慮して評価が行われ、Tier 2 テストを行うべき物質が選定される。

日本では、EXTEND2010が2010年に策定され、米国と似た2段階評価により、内分泌かく乱物質をスクリーニング評価している。具体的には、試験管内試験を主とする第1段階試験群と生物試験を主とする第2段階試験群からなり、前者で有害性と評価された物質が次の段階へ移行する。今回調査した15編の試験法は、いずれも第1段階試験群に登録されており、内分泌かく乱作用をもつ物質のスクリーニングに使われている。

この他、化学物質管理規制に使われている公的な試験法ではないが、ToxCastに登録されている約1200種類の試験法から、欧米及び日本において内分泌かく乱作用をもつ物質のスクリーニング評価に使われている作用機序 (受容体結合やレポータージーン) を有する方法を22種類選定し情報収集を行った。ToxCastは、すでに米国EDSPのTier 1の加速化のためのツールとして使われており、今後国内において注目される可能性が高いと考えられる。

本調査で収集した試験法を以下の表1-20の項目に従い、発行機関別 (ToxCastは別立て) に整理し、試験方法を比較できるようにとりまとめた。(表1-21～1-22)

また、現在化学物質の管理規制に使用されている試験法を発行機関ごとに作用機序別にとりまとめた。(表1-21)

表1-20 試験法の整理に際して設定した項目

① 供試対象 (Test subject)
② 細胞 (組織) 名 (Cell (tissue) name)
③ 対象とする作用機序 (Mechanism of test)
④ 試験系 (Test system)
⑤ 測定対象 (Measurement subject)
⑥ 検出対象 (Detection target)
⑦ 試験時間 (Test duration)
⑧ 試験容器 (Test vessel)
⑨ 試験法名 (Test guideline name)
⑩ 試験法 ID (Test guideline ID)
⑪ 発行機関/国 (Publishing institute/Country)
⑫ 試験目的 (Testing purpose)
⑬ 評価対象 (Test target)
⑭ 適用例 (Application)
⑮ 規制枠組み (Regulation/Program framework)
⑯ 試験法ID (Test guideline ID)
⑰ 発行年 (Publication year)
⑱ 最終更新年 (Latest modified)

表1- 21 作用機序別の発行機関ごとの試験法の数

作用機序	OECD	EPA	EXTEND2010
ER agonist/antagonist	3	2	6
AR agonist/antagonist	-	1	4
TR agonist/antagonist	-	-	4
EcR agonist	-	-	1
E2/testosterone	1	1	-
Aromatase	-	1	-

表1-22 作用機序別の発行機関ごとの試験法名 (EAT系)

作用機序	OECD	EPA	EXTEND2010
ER agonist/antagonist	OECD TG455	OPPTS 890.1250	メダカエストロゲン受容体 αレポーター遺伝子試験 (エストロゲン作用)
	OECD TG457	OPPTS 890.1300	メダカエストロゲン受容体 αレポーター遺伝子試験 (抗エストロゲン作用)
	OECD TG493		メダカエストロゲン受容体 β1レポーター遺伝子試験 (エストロゲン作用)
			メダカエストロゲン受容体 β1レポーター遺伝子試験 (抗エストロゲン作用)
			メダカエストロゲン受容体 β2レポーター遺伝子試験 (エストロゲン作用)
			メダカエストロゲン受容体 β2レポーター遺伝子試験 (抗エストロゲン作用)
AR agonist/antagonist		OPPTS 890.1150	メダカアンドロゲン受容体 αレポーター遺伝子試験 (アンドロゲン作用)
			メダカアンドロゲン受容体 αレポーター遺伝子試験 (抗アンドロゲン作用)
			メダカアンドロゲン受容体 βレポーター遺伝子試験 (アンドロゲン作用)
			メダカアンドロゲン受容体 βレポーター遺伝子試験 (抗アンドロゲン作用)
TR agonist/antagonist			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 (甲状腺ホル モン作用)
			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 (抗甲状腺ホル モン作用)
			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 (甲状腺ホル モン作用)
			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 (抗甲状腺ホル モン作用)
EcR agonist			オオミジンコ脱皮ホルモン 受容体レポーター遺伝子試 験 (脱皮ホルモン作用)

表1-21と表1-22より明らかなように、OECD、米国EPA及び日本のEXTEND2010の中で、日本における試験法が、試験数及び対応するホルモン受容体の種類において、最も広い範囲の内分泌かく乱作用に対応している。特に、甲状腺ホルモン作用の検出については、規制に対応した試験法があるのは日本のみとなっている。現在、OECDでは、内分泌かく乱作用に関する試験法の開発プロジェクトが複数進められたおり、今後関連する試験法が充実していくものと思われる。

② ライフイベント時の特異的な影響を評価する試験法

OECDテストガイドライン1編とToxCastに登録された2種の試験が該当した。いずれも魚類の胚を用いており、試験物質の暴露試験による死亡または形態異常を観察することで影響を評価する手法となっている。

③ その他の特殊な作用を対象とした試験法

AOPwikiを対象として、分子レベルから個体レベルの影響に至る化学物質の作用メカニズム（AOP）に基づいた、迅速かつ簡便で高精度な毒性予測が可能と思われる *in vitro* 試験法について調査した。その結果、現在WEB上で公開されているAOPの中から、まだ開発段階だが将来的に生態影響の評価に適用可能と思われる試験法を34編選定した。これら試験法は、本調査の次の段階である独自のAOP構築に際しての情報に資するため、AOPごとに毒性発現の原因となる分子レベルのメカニズム（MIE：Molecular Initiating Event）、有害影響（AO）及びそれを仲介する一連のキーイベント（KE）を整理し一覧表に示した。

④ 遺伝毒性、変異原性、細胞毒性を対象とした試験法

遺伝毒性、変異原性及び細胞毒性に関する試験法として、ヒト健康を対象としたOECDテストガイドラインを4編、米国EPAテストガイドラインを11編（内3編はドラフト）、ISOのテストガイドラインとして4編を収集した。

収集した試験法を作用機序ごとに整理すると、遺伝毒性に関する試験法が11編（OECD：2、EPA：6、ISO：3）、変異原性に関するものが6編（OECD：2、EPA：3、ISO：1）、細胞毒性に関するものが2編（EPA：2）であった。これらの作用機序に関する試験法は、国ごとに違った方法が使われる傾向にあり、ヒト健康を対象とした試験法であっても *in vitro* に分類される方法はまだ少ない現状にあることが分かった。

e. *in vitro*試験の作用機序ごとの整理

(3)-1) で調査した *in vitro* 試験法を作用機序別に、①内分泌かく乱作用を対象とした試験法、②ライフイベント時の特異的な影響を評価する試験法、③その他の特殊な作用を対象とした試験法（AOP関係）及び、④遺伝毒性、変異原性及び細胞毒性を対象とした試験法の4つに分類し、試験法の特徴、類似性及び用途について表にとりまとめた。

特に①の試験法については、化学物質管理規制において実際の使用されていることから、試験法の各発行機関（OECD、米国EPA、日本）における規制体制における使用法について別途とりまとめた。内分泌かく乱作用（ここでは、エストロゲン（E）、アンドロゲン（A）、甲状腺（T）のホルモン系統への影響を指す）については、調査した全ての国で何らかの試験法が開発されており、その検出方法はほぼ共通していることが確認された。また、現状では、日本のEXTEND2010で使用されている試験法が、試験数と対応可能なホルモン受容体の種類において、国際的に最も広い範囲の内分泌かく乱作用に対応していることが確認された。

④の試験法については、OECDが積極的にAOPの開発を推進していることから、調査したAOPに関するデータベースにおいても相当数の試験法が提案、開発段階にあることが確認された。しかしほとんどのAOPは、欧州及び米国から提案されたものであり、今後日本から独自のAOPを提案することが期待される。

⑤の試験法については、調査した国や機関により試験法が異なっており、遺伝毒性に関する試験が最も多いことが確認された。これら試験法の化学物質管理規制における適用については、今回の調査において十分な情報が得られなかったため、今後更なる調査が必要である。また、ISOについては、*in vitro* 試験法が多数確認されたが、現在国際的な流れとしてISO規格を重視する傾向にあり、この分野に限らず、内分泌かく乱作用についても今後テストガイドラインが更に充実していく可能性が高いと思われる。

今回の調査を通じて、数多くの *in vitro* 試験法について、情報を収集整理し、現状を把握することができたが、各試験法がどのような背景から成立に至ったかについては不明であり、今後、試験法の内容についてより詳細な解析をすることで、新たな試験法開発に繋がる情報を得ることが期待される。

f. 我が国での必要性、実行可能性の検討、重要度の評価とリスト化

in vitro 試験について、ToxCastやわが国のEXTEND2010などの規制に準じて扱われているのが、内分泌かく乱作用を対象とした女性、男性、甲状腺ホルモン様物質などのレセプター結合活性である。また遺伝子突然変異試験、染色体異常試験などは既にヒト健康に関する化審法の中で用いられている。規制には用いられていないが既に開発されている試験としてはPPAR γ や α のレセプター結合試験、CYPまたは

AHレセプター関連、解毒・代謝酵素関係、および魚類の胚を用いた急性毒性試験（OECDTG236）など、医薬、農薬の作用を対象にしたものが存在している。*in vitro*試験はターゲット化学物質が明確であるため、特定の作用機序に絞った化学物質のスクリーニングには有効であるが、逆に、作用の不明な化学物質に対して、どの*in vitro*試験を行うかの判断が難しい。各種結合アッセイから有害性を推定できる例は内分泌かく乱などの一部化学物質群しか存在していないため、広く化学物質を管理する上で*in vitro*試験を導入する必要性はあまり高くない。その中で内分泌かく乱化学物質に関しては幾つかのAOPも提案されており、*in vitro*試験を有効に活用できる可能性が高い。ただしEXTEND2010における*in vitro*試験系の中で、男性ホルモン、女性ホルモン、甲状腺ホルモンなどヒト健康に関する試験系は完成しているが、昆虫ホルモンの*in vitro*試験系は標準化が遅れている。よって幼若ホルモンおよび脱皮ホルモンの*in vitro*検出系の標準化の重要度が高いと考えられる（表1-23）。

表1-23 *in vitro*試験に関する分類（リスト化）

	日本	外国	重要度	優先度
内分泌かく乱	EXTEND2015 レポータージーン E/A/T	OECD EPA	EXTND2010の中で、tier1で用いられている。重要。	EXTND2010の中で、昆虫のホルモン対応が遅れている。（優先度：高）
変異原性 遺伝毒性	化審法(厚労省)	OECD EPA ISO	ヒト健康主体で、ecotoxではない。	生態毒性に、変異原性を持ち込まない。（優先度：低）
その他 農薬 医薬 ダイオキシン類	× × ×（簡易測定）	× × ×	化学物質作用の確 認に特化	新規化学物質の管理としては、使いにくい。AOPの初期段階。現時点での（優先度：中）

2) (Q)SARの活用状況・開発状況・評価

a. 諸外国におけるQSARの活用状況

① 日本国外にみられる法規制等での活用

欧州の化学品規制であるREACH規則、米国におけるTSCA等の制度では、(Q)SARやカテゴリーアプローチによる方法で得られたデータを登録や申請に使用することができる。GHS分類（Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals：化学品の危険有害性、いわゆるハザード、ごとに分類基準およびラベルや安全データシートの内容を調和させ、世界的に統一されたルールとして提供）のうち、生殖細胞変異原性や水生環境有害性等の一部の項目において、QSARを用いた予測結果によって分類に対する根拠の重み付けを行うことができる。

② 日本国外において注視すべき(Q)SARの活用状況

農薬（殺虫剤）のリスクアセスメントにおける(Q)SARの活用状況については、一般的には農薬（殺虫剤）の規制プログラムは登録時に要求される審査が広範囲に及ぶため、(Q)SARのようなリスクの予測手法に依存することは今までに無かった。しかし、数々の農薬の規制管理機関は、これまでのリスクアセスメント方法をより効率良く実施するために、(Q)SARのような代替試験方法について調査し始めている。これは、「試験およびアセスメントに向けた統合アプローチ（IATA：Integrated Approaches to Testing and Assessment）」を農薬のリスクアセスメントに対し調査・活用する特別なケースである。IATAは、農薬の物性に関する既存のデータを代替試験（例えば生化学・細胞アッセイや(Q)SAR）から得られた結果と統合できる可能性を持っており、それはこれまでの試験法の改良、簡略化、そして（あるいは）代替につながる事が予想される。以下に、農薬の規制管理機関において現在活用されているいくつかの(Q)SAR活用事例をリストアップし、それらについて簡単に解説する（North American Free Trade Agreement 2012, page 22）。

米国環境保護庁農薬プログラム部（United States Environmental Protection Agency, Office of Pesticide Programs：US EPA OPP）では、食品品質保護法（Food Quality Protection Act：FQPA）の出現によって、特に農薬代謝産物・分解副産物の毒性評価手法の精査を含めた農薬のリスクアセスメント

についての見直しが必要となっている。ヒトの食生活や環境中に存在する農薬代謝産物・分解副産物の詳細な毒性データが無いまま、それらのリスク評価を法規制の中で実施すべきか否かを決断するために、US EPA OPPでは様々な化学構造の相似から物性を評価する手法や技術について時間と労力を費やし検討してきている。近年では、OPPは農薬代謝産物および分解副産物の潜在する毒性の予測のために(Q)SARの活用に力を入れており、この取り組みによって農薬代謝産物・分解副産物のリスクアセスメントとして新たに毒性試験を追加すること、代謝・分解前後の農薬の毒性をひとまとめにした「全毒性 (total toxicity)」を定性・定量的に見積るため、あるいは逆に、代謝産物・分解副産物の毒性は試験に含める必要が無いことを実証するための科学的根拠を提示しようとしている (North American Free Trade Agreement 2012, page 23)。

カナダ保険省疫病管理規制庁 (Pest Management Regulatory Agency, Health Canada : PMRA) は、基本的には米国環境保護庁と同様の考え方の下に農薬および農薬代謝産物・分解副産物の潜在的な毒性を評価・管理する姿勢をとっている。(Q)SARの活用に関しては、ある農薬化学物質の既存の毒性データの提出が必要となる場合、PMRAは(Q)SARによる代謝産物・分解副産物の毒性予測データを、提出すべきデータ項目に加えるよう要求することができる。また、潜在的な毒性の懸念を特定することを支援するために、PMRAは (Q)SARによる毒性予測データを公開することもできる (North American Free Trade Agreement 2012, page 25)。

農薬の規制管理機関とは異なり、工業化学物質、食品添加物や他の化学物質の規制アセスメントプログラムでは、アセスメントを実施するには極めて限られた毒性データしか持ち得ていないのが通常である。したがって、これらの多くのプログラムには(Q)SAR のツールや活用方法の開発や利用の長い歴史がある。米国環境保護庁 (US EPA)、米国食品医薬品局 (US FDA)、カナダ保健省 (Health Canada)、カナダ環境省 (Environment Canada)、経済協力開発機構 (OECD) および欧州委員会 (European Commission) における(Q)SARの非農薬化学物質のリスクアセスメントへの規制としての活用事例は、以下のようにまとめられる (North American Free Trade Agreement 2012, page 25)。

米国環境保護庁汚染防止有害物質部 (US EPA, Office of Pollution Prevention and Toxics : OPPT) では、米国有害物質規制法 (Toxic Substances Control Act : TSCA) の下これまで20年以上にもわたり潜在的な変異原性、発がん性、その他のヒト健康に及ぼすあるいは環境毒性学的な危険性を特定するために、そしてまた、新規や大量生産前の工業化学物質の管理と規制を行うために(Q)SARを利用してきている。TSCAは、米国産業界における全ての工業化学物質の使用規制を司る法令である。この法令の下で、OPPTは工業化学物質の生産、加工、使用、廃棄という全てのライフサイクルの場面においてリスクアセスメントと管理を行っている機関である (OECD 2007b)。OPPTは多くの(Q)SARツールを開発し、TSCAの下で化学物質を規制・管理する目的であれば誰もがそれらのツールを利用できるようにしている。いくつかの例として、物質の物理化学的性質および環境運命要因の予測モデルや生態毒性影響を予測するためのECOSARモデルを搭載する「EPI Suite」、そして化学物質の発がん性予測のために開発された

「Oncologic」や構造アナログ化学物質を探索、同定する「AIM」などが挙げられる (North American Free Trade Agreement 2012, page 26)。

米国環境保護庁研究開発部門 (US EPA, Office of Research and Development : ORD) では、1980年代から(Q)SARモデルと(Q)SAR関連のデータベースの開発を進めてきている。その例として、ECOTOXと名付けられた生態毒性情報データベースや、現時点ではUS EPA機関内で職員のみが利用可能となっているASTERが挙げられる。ASTERは、データベースと水生生物種に特化した(Q)SARモデルの両方が組み込まれた毒性評価システムであり、それと同時に化学物質の物理化学的性質、生物濃縮、そして環境運命を予測するためのモデルも組み込まれたものである。ORDにおいて行われてきた水生生物種の受容体を介した毒性メカニズムに関する研究は、データがほぼ無いに等しい分散助剤などの不活性物質および抗細菌活性を持つ主要成分へのエストロゲン受容体の結合ポテンシャルを予測可能とする(Q)SARに基づく優れたシステムの開発につながった。このシステムは、米国EDSPにおいて、内分泌かく乱性を含めた毒性を評価するためにどの化学物質から優先的に試験を実施するべきかという順位付けのために設計されており、また、これはOECDのQSAR Toolboxソフトウェアにも取り入れられている (North American Free Trade

Agreement 2012, page 26)。

米国食品医薬品局食品添加物安全事務局 (US FDA, Office of Food Additive Safety : OFAS) では長年の間、食品接触物質の市場における取引前の再審査の段階で(Q)SAR解析を利用し続けており、近年では商業用及び一般に販売されている数種類の(Q)SARソフトウェアモデルの利用も実行に移している (Lo Piparo et al. 2011, Arvidson et al. 2010, Bailey et al. 2005)。それに加え、食品接触物質の再審査に代謝予測ソフトウェアを活用することの可否を調査している。OFASは、論文等で公開されているデータや機関に提出された試験結果と共に、評価・管理時における決断支援ツールとして(Q)SAR解析を活用している。さらに、食品接触物質の毒性データ提出前のコンサルテーションでは、毒性試験の追加の必要性を問う場合にも(Q)SARが利用されている場合もある (North American Free Trade Agreement 2012, page 27)。

カナダ保健省およびカナダ環境省 (Health Canada and Environment Canada) では、カナダ環境保護法 (Canadian Environmental Protection Act : CEPA) の下で新規化学物質を評価するために実施すべき試験の選択を(Q)SARで行えるほど、広範囲に及ぶ(Q)SARの活用経験がある。新規化学物質の物理化学的性質、難分解性、生物蓄積、ヒト健康への影響、生態毒性学的エンドポイント、そしてCEPAの下、新規化学物質通知に必須項目として他のエンドポイントを通告するために、適切に実証された(Q)SARによる予測データは新規化学物質の申請者によって提出されるか、あるいは政府の試験官によって(Q)SAR予測データが産出されることもある。また、(Q)SARは、国内物質リスト (Domestic Substance List : DSL) に掲載されている既存の化学物質の分類 (評価への優先順位付け) を目的として、保健省および環境省の両省で利用されている。カナダ環境省では、既存の化学物質の(Q)SARによる毒性影響予測を難分解性、生物蓄積、ヒト以外の生物に対する物質固有の毒性の明確な理解のために活用している。その反面、カナダ保健省は危機管理ツールの一部として既存の化学物質でエンドポイントが特定されていない物質のヒトに対する固有の毒性影響評価について、対象となる物質の優先順位を決定することに(Q)SARを利用し、さらに、ヒトの化学物質への曝露にどれほどの悪影響が潜在するかを決定付けるために化学物質の物理化学的性質を調査する目的でも(Q)SARを利用している (North American Free Trade Agreement 2012, page 27)。

経済協力開発機構 (Organization for Economic Cooperation and Development : OECD) は1990年代に、(Q)SAR技術の法規制の中での応用・利用の促進と承認を求めるために、様々な(Q)SARの手法に関する調査を始めた。このプロジェクトから得られた最も重要な成果の一つが、(Q)SARモデルの実証のための指針である (OECD 2004)。また、類似化学物質の特性比較と外挿 (read-across) や傾向解析 (trend analysis) を含むグループ分けや分類法の開発と応用についての包括的なガイダンスも作成された (OECD 2007a)。OECDでは、化学物質の構造に関わる特性、作用様態 (Mode of Action)、作用メカニズム (Mechanism of Action) などを特定することを目的に、また、類似化学物質間におけるread-acrossやtrend analysisからの体系的なグルーピングと(Q)SARによる化学物質データ間の欠落情報の補充を目的として、(Q)SARソフトウェアの開発にも積極的に取り組んできた。その結果、化学物質の危険性とリスクアセスメントに関わる情報が含まれる毒性データベースと、ハザード評価に必要な生態毒性データベース間におけるギャップを、政府機関や利害関係者らが明確にし、それを埋めていく ("gap-filling") ためのOECD QSAR Toolboxが開発され、現在ではこのソフトウェアを誰もが利用できるようになっている (OECD 2009)。また、実際には「The OECD HPV Chemicals Programme」、「The US HPV Challenge Programme」や「EU - REACH」などの化学物質リスク評価プログラムにおいて国際的にも活用されている (North American Free Trade Agreement 2012, pages 27-28)。

欧州連合 (EU) の化学品の登録、評価、認可、および制限に関する規則 (Registration, Evaluation, Authorization of Chemicals : REACH) は、欧州化学工業会の化学品製造の革新と開発における競争レベルを高く維持する一方で、ヒトの健康と環境のより良い保護のために作られた法律である。REACH法の下では、これまでの動物試験をRefine (洗練)、Reduce (削減)、Replace (代替) するために代替手法の開発と確立が強調されている。そのため、欧州委員会共同研究センター (JRC) の計算毒性学グループは、REACH法、欧州化粧品指令 (Cosmetic Directive) や食品安全性 (Food Safety) アセスメントの支援を

受けることで、化学物質の環境中移行動態、ならびにヒト健康と環境への影響に関して実証済みの計算による毒性評価手法の既存毒性試験の代替および法規制の中での活用を可能にするためのプロジェクトを推進してきている (Mostrag-Szlichtyng et al. 2010)。このグループは、無償で利用が可能な公共の(Q)SARツール (ToxfreeやDART、Toxmatchなど) の開発、規制における(Q)SARの活用と化学物質の分類手法の開発、計算機を利用したナノマテリアルの物性評価手法の開発、そしてさらには毒性評価に利用可能な分子間相互作用の解明に取り組んでいる。JRCでは、他にもOECD (Q)SARの検証指針を(Q)SARモデルに反映させることを書式化するためのテンプレートや、(Q)SARによる毒性予測の報告様式 (QSAR Prediction Reporting Format: QPRF)、そして(Q)SARモデルのデータベースを作成した実績がある (North American Free Trade Agreement 2012, page 28)。

③ 日本国内における活用

国内では、企業における化学物質の自主管理において使用されており、JIPS (Japan Initiative of Product Stewardship) では、積極的な活用が推奨されている。

b. 諸外国におけるQSAR開発の動向

① 欧州や北米の主要機関における (Q)SARの開発

(Q)SAR開発の動向は、欧州や北米の主要機関における (Q)SARの開発、妥当性、ツールの発展と今後の活用に関する予測や議論等の情報などを、以下に記載した政府機関等のWebサイトを調査することで把握することができる。

デンマーク環境保護庁のウェブページでは、主要な(Q)SARについての記載がある。デンマーク環境保護庁のホームページの多くの利用者がアクセスしている無償の(Q)SARツールおよびデータベースを、以下の一覧表に記載する。 (North American Free Trade Agreement 2012, page 122)

表1-24 (Q)SARツールおよびデータベース一覧

ツール / データベース	開発元、開発支援元	概要
AMBIT XT	化学工業会	(Q)SAR予測及びテストデータ様々なPBTアセスメントモデル (難分解性、生体内蓄積、毒性)
CAESAR	欧州連合	REACHの下での(Q)SAR利用のためのモデル：生物濃縮、皮膚アレルギー、癌、変異原性、生殖毒性
The Danish (Q)SAR Database	国立食品研究所 (NFI) デンマーク環境保護庁	データベースには70種類以上の異なる(Q)SARモデルから得られた170,000有機化合物の毒性予測データが集積されている。
The Advisory List for Self-classification	デンマーク環境保護庁	The Danish (Q)SAR Databaseによって予測されたデータが、30,000以上もの化学物質の分類に利用された。これらの分類に関連するデータや書類がリスト化されている。
EpiSUITE	米国環境保護庁	物理化学的性質、有機化合物の環境運命、生体内蓄積ポテンシャル、生分解性、加水分解効率、水生生物対象の毒性 (Ecosar) の予測モデル
LAZAR	GitHub (ソフトウェア共同開発)	ヒトおよび魚類の肝毒性、変異原性、発がん性などの予測のための(Q)SARモデル
NCI Database	米国国立がん研究センター	様々なタイプの生物学的活動における毒性の(Q)SAR予測
OECD (Q)SAR Application Toolbox	OECD	毒性影響をメカニズムレベルで理解するために化学物質の分類を(Q)SARモデルによって支援
PBT profiler	米国環境保護庁	毒性情報が限られている化学物質についてPBT (難分解性、生体内蓄積、毒性) に関するデータを予測するためのソフトウェア。EPISUITEの(Q)SAR予測を利用。
SPARC	民間企業 (ARChem LLC)	EPIWINモデルではカバーできない化学物質の物理化学的性質を予測するための無償オンラインツール
Toxtree	欧州化学局 (ECB)	化学物質の構造 (断片構造) から毒性効果を予測、化学物質を分類。
商業用のモデル (Commercial models)	民間企業	数多くの有償、無償の(Q)SARシステムが存在する。例えば、ACD/Percepta, MultiCASE, LEADSCOPE, TOPKAT, DEREK for Windows, METEOR, META-PC, Simulation Plus.

欧州委員会共同研究センター保健・消費者保護研究所（IHCP）のウェブサイトでは、(Q)SAR ツールに関する以下のような情報を提供している。（North American Free Trade Agreement 2012, pages 123-124）

- ・”non-testing methods”の背景情報
- ・QSAR報告書式に関する情報（Information on QSAR reporting formats）
- ・IHCPコンピュテーショナル毒性学関連出版物リスト
- ・JRC QSAR Model Database

また、以下（表1-25）のコンピュテーショナルツール（無償でダウンロードが可能）に関する情報もJRC IHCPのウェブページ内で提供している。

表1-25 コンピュテーショナルツールに関する情報

ツール / データベース	開発元、開発支援元	概要
Toxtree	欧州委員会共同研究センター	決定木解析ソフトウェア（decision tree analysis）：異なるタイプの毒性ハザードの予測
Toxmatch	欧州委員会共同研究センター	化学物質の構造相似指数による分類を支援するコンピュータプログラム
DART (Decision Analysis by Ranking Techniques)	欧州委員会共同研究センター	化学物質の様々な優先順位付け手法を有するコンピュータプログラム
Stat4tox (Software for the Statistical Evaluation of <i>in vitro</i> Assays)	欧州委員会共同研究センター	濃度依存性などの毒性データの統計解析ソフトウェア
METIS (Metabolic Information Input System)	欧州委員会共同研究センター	代謝および分解反応に関する情報の入力と保存を行うコンピュータプログラム
Danish (Q)SAR Database	デンマーク環境保護庁	データベースには70種類以上の異なる(Q)SARモデルから得られた170,000有機化合物の毒性予測データが集積されている。
QRF (QSAR Reporting Formats)	欧州委員会共同研究センター	QSARモデルの一覧

OECDでは、法規制中のリスクアセスメントにおいて(Q)SAR技術と毒性評価モデルを実際に活用していくことに取り組んでいる。この取り組みはこれまでに様々な前向きな結果、例えば、(Q)SARモデルの実証のための指針やQSAR Application Toolboxのような手引き書など、を生み出している。OECD (Q)SAR プロジェクトは、欧州連合の資金的な支援により運営されており、プロジェクトのウェブサイトは、以下のような書類やソフトウェアへのリンクと情報を発信している。（North American Free Trade Agreement 2012, page 124）

- ・OECD (Q)SAR プロジェクトの歴史と背景
- ・(Q)SAR プロジェクトの概要紹介
- ・化学物質の分類について
- ・(Q)SARモデルの妥当性について
- ・OECD QSAR Toolbox

オランダ国立公衆衛生・環境研究所は研究所のウェブページ上でQSARの定義、関連書籍、情報提供ウェブサイトの提供（以下のリストを参照）を行っている（表1-26）。

- ・報告書「(Q)SARs化学物質の危険性の見張り番？」
- ・文献レビュー：ヒトにおける毒性学的エンドポイントのための(Q)SARs
- ・文献レビュー：環境生態毒性学的エンドポイントのための(Q)SARs
- ・報告書「ヒトにおける有害性評価での構造活性相関解析の応用：初めの一步」
- ・報告書「難分解性、生物蓄積、毒性（PBT）のプロファイル」
- ・その他の文献や情報等は、http://www.rivm.nl/rvs/Risicobeoordeling/Modellen_voor_risicobeoordeling/QSARs

QSARsおよび以下の表を参照（North American Free Trade Agreement 2012, pages 124-125）のこと。

表1-26 QSARの定義、関連書籍、情報提供ウェブサイト

ツール / データベース	開発元、開発支援元	概要
DEREK	Lhasa Limited (英国)	化合物の構造からその毒性を予測する知識ベース (Knowledge Base)の予測ソフトウェア。日本国内の代理店はCTCライフサイエンス株式会社。生態毒性のエンドポイントはテトラヒメナのみ。
OECD QSAR Toolbox	OECD	毒性影響をメカニズムレベルで理解するために化学物質の分類を(Q)SARモデルによって支援。
QRF (QSAR Reporting Formats)	欧州委員会共同研究センター	QSARモデルの一覧
METEOR	Lhasa Limited (英国)	化合物の構造からその代謝反応および代謝産物を予測する知識ベース(Knowledge Base)の予測ソフトウェア。日本国内の代理店はCTCライフサイエンス株式会社。
TOPKAT	BIOVIA (米国)	生態毒性予測ソフトウェア：魚類と甲殻類の急性毒性のみ。
ToxTree	欧州委員会共同研究センター	決定木解析ソフトウェア：生態毒性はVerhaarとmodified Verhaar schemeが対応。
EpiSUITE	米国環境保護庁	物理化学的性質、有機化合物の環境運命、生体内蓄積ポテンシャル、生分解性、加水分解効率、水生生物対象の毒性 (Ecosar) の予測モデル

米国環境保護庁汚染防止・毒物部の持続可能な未来へのイニシアチブは、新規化学物質を安全かつより早くそしてより安く市場に流通させることを目的として、現在推進されている。このイニシアチブは、US EPAで採用・実施しているリスク・スクリーニングモデルを、新規化学物質が市場に流通する前に化学品の製造・開発者にも利用させることを目指している。これらのスクリーニングモデルは、計算によるリスク・スクリーニングが基盤になっており、企業における開発初期での候補化学物質の潜在的なリスクの的確な予測から、US EPAへの申請以前の時点でより安全な候補物質や製造工程を選択することができる。これらのコンピュータによる予測モデルおよびハザード評価ツールは、汚染防止有害物質部 (OPPT) のウェブページから無償でダウンロードすることが可能である。有害物質規正法 (TSCA) に基づき開発されたEPAの有害性評価ツールウェブサイトは以下に示すとおり<http://www.epa.gov/tsca-screening-tools/using-predictive-methods-assess-hazard-under-tsca#models> (2016年1月5日アクセス)。(North American Free Trade Agreement 2012, page 125)

US EPAで利用されている代表的なリスク・スクリーニングモデルとハザード評価ツールを、以下の表1-27に記載する。

表1-27 リスク・スクリーニングモデルとハザード評価ツール

ツール / データベース	概要
EpiSUITE (ECOSAR)	物理化学的性質、有機化合物の環境運命、生体内蓄積ポテンシャル、生分解性、加水分解効率、水生生物対象の毒性 (Ecosar) の予測モデル。Ecosarは、QSARを利用した未試験物質の構造上の類似性と主に水生生物 (魚類、無脊椎動物、水生植物) を利用した有害性データに基づく毒性予測プログラム
PBT profiler	毒性情報が限られている化学物質についてPBT (難分解性、生体内蓄積、毒性) に関するデータを予測するためのソフトウェア。EPISUITEの(Q)SAR予測を利用。
Oncologic	未試験化学物質の発がん性を、構造上の類似性からメカニズムベースの構造活性相関解析 (SAR) によって予測
NonCancer Screening Protocol	評価対象物質に関わる健康影響データの特定方法を提示し、また、対象となる健康影響と関連する化学物質グループを洞察するスクリーニングプロトコル。
Analog Identification Methodology (AIM)	構造が類似と推測される化学物質の物性および毒性データ検索ツール。read acrossとdata gap fillingに活用される。
Chemical Assessment Clustering Engine (ChemACE)	化学物質の構造に基づきクラスタリングを行う。構造上の多様性の特定。アナログ化学物質の同定。read acrossによる毒性評価の支援
E-FAST	曝露・環境運命の予測手法。
New Chemical Categories Document	化学物質の分類：物理化学的、毒性学的、生態毒性学的に類似するデータを持つ、また構造上の類似を示す化学物質のグルーピングに関する参考資料。

米国食品医薬品局食品添加物安全事務局のICSAS（インフォマティクスおよびコンピュータによる安全性解析課）は、次の業務を遂行しているユニットであり、以下の活動を行なっている。

- ・毒性学および臨床医学的なエンドポイントを集積したデータベースの開発
- ・毒性学および臨床医学的な影響を定量的に解析するためのデータ変換と変換法の規則作成
- ・構造活性相関（SAR）およびデータマイニング（発掘）ソフトウェアのICSASデータベースを利用した評価
- ・毒性学および臨床医学的な影響予測プログラムの、ソフト開発業者との共同研究開発
- ・非臨床実験研究の非実施による動物実験実施件数の削減
- ・蓄積された科学的知識の効果的な利用による毒性評価プロセス見直しの促進
- ・医薬品候補化合物の発見と開発の過程においてヒト健康に対し潜在的な悪影響を持つ化合物を特定し削除するためのツールの供給

ICSASのウェブページでは、以下のような様々なデータベースとICSASの現在の活動に関する情報提供のリンク先を紹介している。

- ・データベースプロジェクト
- ・最大推奨セラピューティック濃度（MRTD）データベース
- ・ヒト肝臓有害影響データベース
- ・遺伝毒性、繁殖および発生毒性、発がん性データベース
- ・変異原性表現法（サルモネラ菌による変異原性試験）
- ・化学物質類似構造探索
- ・コンピュータによる毒性評価プログラム
- ・ComToxコンサルテーションサービス
- ・ComTox：規制への活用
- ・臨床における有害薬物反応の評価のためのコンピュータによる毒性評価法の応用
(North American Free Trade Agreement 2012, page 126)

c. 我が国での必要性、実行可能性の検討、重要度の評価

今後非常に多くの化学物質の毒性評価を行う上で、(Q)SARの活用は必要になると考えられる。現在、既に多くの国の化学物質管理においても(Q)SARの情報が利用されてきており一定の実行可能性もある。しかしながら、もちろん(Q)SARからの情報が利用できるかどうかはそのリスク評価の文脈（例えば、初期のスクリーニング評価か、より高次の段階における評価か）にも大きく依存する。そのため、利用を期待するリスク評価の文脈に併せた(Q)SARの構築および開発が必要となるだろう。また、今後はAOPを念頭にいた(Q)SARの構築および開発が重要なテーマの一つになると考えられる。

3) 諸外国におけるOMICSの活用状況・開発状況・評価

化学物質の管理や規制のための手法としてOMICS技術が利用されたことは、残念ながらまだ無い。しかし、OMICS技術を利用した環境化学物質の毒性学的研究は、決して少なくはない。2012年6月の時点でのEnvironmental OMICS関連の研究論文数によると、Systems Biology 研究関連の論文（598報）がTranscriptomics（611報）に次いで多かった。これは、Toxicity Pathway、Biomarkers、Adverse Health Outcome という研究領域に興味を抱く環境毒性学の研究者が多いことを示している（Ge et al. 2013）。

このようなOMICSを活用した基礎研究基盤がデータ量と共に伸展し、化学物質の毒性影響を分子レベルで解明することに多大な貢献を与えるOMICS技術ではあるが、OMICSを利用した実験・試験法の標準化、データの解釈、OMICSデータによる評価モデルの形成には、さらに多くのデータ、時間、および研究資金が必要である。しかし、米国環境保護庁（US EPA）では、Next Generation Compliance（次世代のコンプライアンスというプログラムを立ち上げており（草案は2013年9月に発表）、その目標を「環境汚染物質によるヒト健康への有害性評価を迅速、安価、そしてより頑強な先端技術（OMICS技術の導入を検討中）を駆使した評価手法によって推進・改善する」としている（<https://www.epa.gov/compliance/>）

next-generation-compliance 2016年2月20日アクセス)。

a. OMICS開発の動向

① 毒性学に活用されているOMICS技術の基礎研究事例

OMICS技術・概念が基礎研究に活用された事例を記述する。トキシコゲノミクス、プロテオミクス、メタボロミクス技術を利用して毒性の分子メカニズムの解明を目的として行われた研究事例では、砒素が発がん性物質としてどのような活性を持っているか (Lau et al. 2006; Tsuchiya et al. 2005)、防カビ剤の毒性メカニズムの解明 (Ge et al. 2011a)、異なる既知/未知の活性様態 (MOA) をもつ内分泌かく乱化学物質の毒性経路の解明 (Kishi et al. 2006) などが挙げられる。また、プロテオミクス技術がナノマテリアルの毒性経路と解毒経路の解明、タンパク質の相互作用ネットワークマップの作成、生物学的応答、潜在的な毒性、二酸化チタンによる曝露を受けたBEAS-2B細胞の解毒経路を明らかにするためなどに利用された事例 (Ge et al. 2011b) もある。さらには、環境中の細菌の抗生物質への耐性に関するメカニズムをより詳細に解明するために、細菌中のプロテオーム (タンパク質総体) に現れる差異をプロテオミクスの活用によって解析した例もある (Liu et al. 2012)。発現プロファイリング研究に加え、遺伝子、タンパク質、代謝産物のそれぞれのレベルにおける「分子修飾」の同定は、環境毒性評価およびヒト健康に関わる研究の中でOMICSが一つの重要な応用技術になり得ることを示している。タンパク質のカルボニル化とリン酸化は、細胞生物学においては主要なシグナル伝達経路に属するものとして挙げられているが、これらの経路は環境汚染化学物質の毒性経路を推測するための手掛かりになるのではないかと考えられている (Ge et al. 2013)。例えば、酸化ストレス作用が毒性へとなり得る際の相関について調べるために、統合的なプロテオミクス手法によるカルボニル化されたタンパク質の同定が、プロピオコナゾールに曝露されたマウスの肝臓におけるタンパク質の酸化を体系立てて測定することに利用された (Bruno et al. 2009)。この研究は、マウスの肝細胞内のタンパク質の酸化作用によるダメージによりプロピオコナゾールが誘導し毒性のひとつの様態を示していた。更に、ある研究報告では、極低濃度のダイオキシン (TCDD: 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin) が、オスのモルモット脂肪細胞の核外分画中でタンパク質のリン酸化を短時間で増加することが観察された (Enan et al. 1994)。これらの研究成果から、統合的なOMICS技術の環境毒性学的研究における活用の有用性が高く評価されるようになり、タンパク質のカルボニル化やリン酸化については、他のタンパク質修飾よりも環境汚染物質の毒性経路の推測に役立つ可能性が比較的高いとして近年の環境毒性研究領域では注目を集めている (Ge et al. 2013)。

このようなOMICS研究では、毒性メカニズムとMOAを解明すること、曝露と毒性を指標するバイオマーカーを発見しそれらを特定すること、そして生物種間においてデータを外挿することなどが可能となるため、そこで活用されるOMICS技術は、生態およびヒト健康のリスクアセスメントのプロセス上の不確かさの軽減を支援することができる。このように統合的なOMICS研究から得られたデータは、毒性メカニズムと (あるいは) 環境化学物質のMOAに斬新な洞察を与え、化学物質のヒト健康へのリスクアセスメントに利用されることで生物種、エンドポイント、化学物質の推定のために毒性予測手法の基礎を構築している (Ge et al. 2013)。

② システム生物学、システム毒性学の活用

システム生物学およびシステム毒性学 (Systems Biology and Systems Toxicology) は、生体パーツが関連し合いながら構築するネットワークが、どのようにして生体ユニットの性質と活動を決定しているのかを学ぶための先端計算機技術を利用して、すべてのレベルの網羅的及び先進的な生物学 (ゲノミクス、プロテオミクス、メタボロミクス、およびその他のオミクスや分子機構) と毒性学から得られるデータを統合したシステムである。このシステムの目標は、細胞や多細胞機能系、また、最終的には生物個体が持つ生命機能のコンピュータモデルを創造することである。これらの *in silico* モデルは、近い将来には細胞、生態組織、生物個体の毒性応答を評価するために仮想化された試験系を提供する。言い換えれば、伝統的な毒性試験では細胞や生態組織に試験対象となる化学物質が投与され、動物実験が進行しエンドポイントが確認されていくが、システム生物学およびシステム毒性学の発展と活用は、まず

始めに計算機モデルによるシミュレーションから化学物質の毒性を予測し、その次に生物学的な試験が行われるようになるであろう (Van Aggelen et al. 2010, Sturla et al. 2014)。

1986年以来、EUは科学研究目的の実験動物の使用に関する規制を制定しようとし続け、2013年1月によりやく Directive 2010/63/EUが規制化されると同時に、化学物質の生産・使用の取締りあるいは研究目的での毒性試験に実験動物を利用することを制限した (Directive 2010/63/EU. 2014)。また、the EU Cosmetics Regulationは、動物試験の代替手法の有無にかかわらず化粧品成分となる化学物質の毒性評価のために実験動物を利用した場合には、その化学物質を含む商品の流通・販売を禁止することを2013年3月11日付で発表した (Regulation (EC) no 1223/2009. 2009)。その他の分野の化学物質の危機管理に関わる法律、例えば REACH (Registration, Evaluation, Authorization, and Restriction of Chemicals (Regulation (EC) no 1907/2006. 2006))、Plant Protection Products Regulation (Regulation (EC) no 1107/2009. 2009)、Biocides Regulation (Regulation (EC) no 528/2012. 2012) などでは、実験動物の毒性試験への利用を部分的に許可しているが、実験動物代替手法の使用を強く勧める、あるいは、もし代替手法があるのであればその利用を義務付ける法律を定めている。したがって、法規制側からも、化学物質の生産・利用側からも化学物質の有害性リスクアセスメントのために革新的な技術を開発することについて多くの要望が挙げられており、事実上それらのほとんどが動物実験を完全に、あるいは部分的に代替する *in vitro* 試験法およびコンピュータ解析に基づく毒性予測ツールの開発であるがゆえに、OMICS技術を基盤とするシステム生物学/システム毒性学の開発ならびに法規制下における活用の早急な実現が、非常に強く望まれている (Basketter et al. 2012; Sturla et al. 2014, page 316)

システム毒性学は、生体システムと関わりを持つ活性物質の毒性設計図を読み解くためにあり、これは毒性学と化学とシステム生物学が重なる部分における概念的な枠組みである。またそれは、伝統的な毒性学的な物性・毒性評価とネットワークモデル、そして複数の生体組織レベルにおける分子および機能的な変化の定量的な測定を統合している。多くの専門分野を基礎とする (Multidisciplinary) システム毒性学による化学物質の毒性評価は、化学、コンピュータ科学、工学、数学、物理学を、分子、細胞、生体組織、臓器、個体、ポピュレーションという生物学的階層から収集された高密度の実験データと統合することで、システム内に潜在する有害性と生体部位の相互作用を特徴付け、化学物質の有害性を評価することが可能となる。システム毒性学は、毒性プロセスの定量的かつ動的な理解と同様に毒性メカニズムの詳細を明らかにするためであり、結果として表面に現れる複雑な有害影響を予測し、正確にシミュレートするためのものでもある。したがって、このアプローチは *in vivo* / *in vitro* モデルで起こる影響をヒトや生態系のようなより大きなシステムに起こる影響に外挿できるポテンシャルを有しており、リスク評価における新たな枠組みの構築が期待されている。

③ 科学の新領域と法規制での利用への取組み

新たに出現した Omics、バイオインフォマティクス、コンピュータ計算毒性学関連の主な研究分野は、医薬品開発と安全性における活用と、化学物質・農薬・日用化学製品の有害性とリスクアセスメント予測のための毒性学における活用の二つである (AltTox.org web site. 2014. Emerging Science & Policy)。

米国食品医薬品局 (US FDA) のクリティカル・パス・イニシアチブ (<http://www.fda.gov/scienceresearch/specialtopics/criticalpathinitiative/ucm076689.htm> 2016年2月21日アクセス) は、FDAが規制する医薬品の開発と評価のための科学的かつ法規制的に貢献する革新技术を促進する目的で、産学官との共同開発に設立された。このイニシアチブの初期の頃の計画のひとつは「Critical Path Opportunities List (臨界経路のための新規技術導入可能性リスト)」と呼ばれ、ゲノミクス、プロテオミクス、イメージング、バイオインフォマティクスを含む生命科学分野における新たな発見が、開発対象の医薬品の安全性と薬効の予測評価試験の正確性を改良することを目的に、医薬品の開発途中で活用されることができかどうかの事例を提示する役割を持っていた。もう一つの工業界との協調は、

「International Serious Adverse Event Consortium (重大な有害事象に関する国際コンソーシアム)」と呼ばれ、これは、製薬企業7社がFDAのコンサルティング支援を受けながら共同でヒト肝毒性と医薬品の副作用を予測するトキシコゲノミクス試験法を開発するというコンソーシアムでそのプロジェクトは現在も進行中である。このコンソーシアムは、医薬品に誘導された肝毒性のように健康に有害な影響に

関連する遺伝子マーカーやヒトゲノム上のDNA塩基配列のバリエーションを特定している。そして、これらのマーカーは、患者が医薬品を服用する以前の段階で特定の健康リスクを調べるための遺伝子診断テストに利用されることができ、このような個人向けの個別の安全性試験の新規開発につながる可能性が示唆されている。また、新規技術の認識と毒性メカニズムおよび毒性経路の把握は前臨床試験段階における安全性の予測をより良いものにすることができるため、これは以下の3事項に重点的に取り組む計画となっている。

- ・患者の薬物への応答をより効果的に予測する細胞/動物モデルやアッセイの開発複数の生物学的組織レベル（遺伝子、タンパク質、生化学的経路、細胞/臓器機能など）における毒性メカニズムの理解
- ・非臨床および臨床段階での評価において、毒性、副作用、異常反応のモニタリングに適したバイオマーカーの発見および特定
- ・コンピュータ計算や、広範囲にわたる前臨床安全性試験データタイプから結果を導き出し統合する *in silico* モデルを基盤とするツールの開発と利用

FDAのNational Center for Toxicological Research（国立毒性研究センター：NCTR）は、医薬品/化学物質の安全性とリスクアセスメントのためのOMICS、バイオインフォマティクス、コンピューショナル・バイオロジー技術が活用されているプログラムを支援している。また、NCTRは毒性学的研究に有益なバイオインフォマティクスツールおよびデータベースを公開しており、更に、製薬企業と共に前臨床試験段階における医薬品の候補物質のスクリーニングに肝臓トキシコゲノミクス手法を考案する目的で共同開発に着手している。NCTRによって開発された重要なツールのひとつはArrayTrack™

（<http://www.fda.gov/ScienceResearch/BioinformaticsTools/Arraytrack/default.htm>：2016年2月21日アクセス）であるが、これは、マイクロアレイによる遺伝子発現データと薬理ゲノミクス/トキシコゲノミクス研究と関連のある実験条件項目を整理するための研究開発支援ツールである。多くの統計学のおよびデータの可視化ツールが、生物学的なデータ翻訳のための遺伝子、タンパク質、生化学的パスウェイなどの機能の提供と共にこのArrayTrack™の中で利用できるようになっている。

米国環境保護庁（US EPA）は、OMICS、バイオインフォマティクス、コンピューショナル・バイオロジーから得られたデータと、これらの技術を利用したツールの化学物質の法規制の下での活用について、開発とアセスメントを支援するプログラムを立ち上げている。Interim Policy on Genomics（ゲノミクスに関する暫定的な指針：2002年）では、毒性評価を下さねばならないプロセスにおいて追加資料としてゲノミクスデータをEPAに提出することを許可しているが、これらのデータのみによる毒性評価はできないことを明言している。Potential Implications of Genomics for Regulatory and Risk Assessment Applications at EPA（EPAにおける規制とリスクアセスメントへのゲノミクスの活用に関する潜在的な事項：2004年12月）という書類は、EPAのGenomics Task Force（ゲノミクス作業部会）によってゲノミクス技術をEPAの毒性評価に関するプログラムと指針に活用する可能性やメリット等に関し積極的に議論するために作成され、以来、多くの新規プログラムと指針がそこから生み出されている。

EPAのNational Center of Computational Toxicology（国立コンピューショナル・トキシコロジーセンター：NCCT）では、Computational Toxicology研究プログラム（CompTox）が、化学物質の安全性をより効率的に管理するために新規手法の開発を目的とした研究を開始している。CompTox研究は、先端分子生物学や先端化学、更に先端コンピュータ科学の技術を取り入れ、化学物質に阻害される重要な生物学的プロセスを特定し、そしてさらに、プロセスの阻害を引き起こす化学物質の濃度やヒトへの曝露形態を突き止める役割を担っている。その目標は、化学物質がその有害性をより深く試験されることで優先順位付けに関する適切な情報を得る方法を開発することにある。そのため、CompToxプロジェクトは以下のような内容となっている。

- ・化学物質のハイスループットスクリーニング、曝露予測モデル開発、仮想シミュレーションモデル開発に関連する研究
 - ・コンピューショナル・トキシコロジーのモデルとデータベース（ACToRやToxCastなど）の開発
 - ・Science to Achieve Results（結果に到達するための科学：STAR）プログラムを介した研究の助成
- EPAのToxCast™プログラムは、多くの *in vitro* 試験とモデル生物を利用して化学物質の潜在的な毒性

をより細かく評価し、化学物質の優先順位付けをより正確に行えるようになることを最終目標として、2007年に開始された。ToxCast™の一部には、化合物ライブラリーの生化学的かつ細胞学的なハイスループットスクリーニングによって、化学物質の毒性モデルとなり得るような重要な細胞シグナル伝達パスウェイの阻害を検知することも含まれている。EPAのToxCast™によるスクリーニングは、内分泌かく乱化学物質スクリーニング・プログラム（Endocrine Disruptor Screening Program：EDSP）やUS Toxic Substances Control Act（有害物質規正法：TSCA）による試験、およびSafe Drinking Water Act（安全な飲料水に関する法令：SDWA）の汚染物リストに挙がる候補化学物質の優先順位付けに関する情報の提供にも貢献している。

EPAは、Next Generation Compliance（次世代のコンプライアンス）の立ち上げに注力しており（草案は2013年9月に発表）、その目標を「環境汚染物質によるヒト健康への有害性評価を迅速、安価、そしてより頑強な先端技術（OMICS技術の導入を検討中）を駆使した評価手法によって推進・改善する」としている。Next Generation Complianceプログラムの目標の詳細は以下のとおりである。

- ・近年の生物学の進展によってリスクアセスメントに関するより価値のある情報が得られるという概念を実証する。
- ・特定の目的にはどのような情報が最も有益であるかを把握する（情報の価値）。
- ・新規データや技術・手法を利用したリスクアセスメントの告知の決定についての規則を明確に伝える。
- ・データ間に重要なギャップ（情報の空白）があることを明記する。

④ 日本国内における開発：Tox-0mics

2011年8月から経済産業省の事業として2016年3月までの約5年間の「ARCH-Tox」プロジェクト（石油精製物質等の新たな化学物質規制に必要な国際先導的有害性試験法の開発）が実施された。ARCH-Toxプロジェクトは、国立医薬品食品衛生研究所・安全性生物試験研究センター安全性予測評価部の主導で、*in vivo*における遺伝子発現解析等のOMICS技術に基づく試験法開発を行う「Tox-0mics」サブプロジェクト（研究開発項目①遺伝子発現変動データから各種毒性の発現可能性を取得する手法の開発）と、*in vitro*の試験法開発を行う「Tox-*in vitro*」サブプロジェクト（標的臓器毒性等の毒性やヒト代謝機能の影響を検出し得る細胞試験法（*in vitro* 試験法）の開発及び、これら試験法等の複数の細胞試験法を迅速かつ効率的に実施可能なHTSシステムの開発）で構成されており、化学物質の有害性を評価するための迅速かつ効率的な手法の開発等を行うことを目的としていた。

Tox-0micsは、2001-2006年に実施されたNEDO事業「高機能簡易型有害性評価手法の開発／遺伝子発現解析技術を用いた発がん性予測手法の開発」を基盤として、腎臓における発がん性や神経毒性等の新たなエンドポイントを加えたサブプロジェクトであり、また、Tox-*in vitro*も2006-2010年に実施されたNEDO事業である*in vitro*試験法開発のプロジェクトを引き継ぐ形で、肝毒性、腎毒性、神経毒性等が加えられたサブプロジェクトであった。

Tox-0micsの主たる目的は、単一の動物試験で得られる臓器サンプルの細胞内における遺伝子発現変動を捉えることによって、発がん性、一般毒性、神経毒性等のエンドポイントに関する情報を得る手法を開発することであった。具体的には、例えば化審法スクリーニング毒性試験やOECDテストガイドライン407のような28日間反復経口投与毒性試験のみから複数の毒性を検出する試験系を構築するために、臓器細胞内で引き起こされる遺伝子発現変動と各毒性影響との関連を捉えること進めていた。発がん性及び一般毒性については、両毒性のいずれにおいても、毒性化学物質の標的性が最も高い肝臓および腎臓をターゲット臓器とした研究が行われた。また、神経毒性については、特定の脳部位に着目した遺伝子発現解析を実施すると共に、従来の28日間反復投与毒性試験では評価が困難であった発達神経毒性についても、28日間反復投与毒性試験の枠組みで知見を得るための研究も進められた。

Tox-0micsで開発する試験系は、最大でも28日間の投与のみで発がん性や神経毒性、免疫毒性、その他の一般毒性など多岐にわたる毒性影響が、従来よりも高精度かつ短期間かつ少数の動物で評価可能となり、3R：Refine（洗練）；Reduce（削減）；Replace（代替）にも貢献できる試験法の開発が期待された。

4) 我が国での必要性、実行可能性の検討、重要度の評価

OMICSの環境毒性学における貢献度は今後高まることが期待されているものの、現時点では行政的な判断の現場において実際に利用するまでの研究段階には至っていない。現時点では行政的利用を念頭に置いた場合の実行可能性は低く、重要度も限られている。ただし、将来的な有用性を鑑みると研究レベルでの検討は継続して行う必要があると考えられる。

5) アルゴリズム構築における基本原則の整理

アルゴリズム構築における理論を3つの基本原則として整理したので以下に示す。

原則1：主要なRisk Pathway上のイベントについての試験が行われている必要がある

試験法選択アルゴリズムは、主要な媒体・生物種・作用メカニズムへの対応において漏れの無いように構築されるべきである。つまり対象とする化学物質による主要なリスク経路上のイベントを検知対象とした試験が行われている必要がある。明示化が必要であると考えられる。リスク経路が比較的単純な場合には高感度な試験バッテリーの構築が容易である。

原則2：試験Aについて試験Bが、感度において包含するとき、試験Aで試験Bを代替可能である

代替可能性の検討の際には、ROC曲線、等を用いた検討を行い、感度の包含関係とその達成レベルについて明示的な議論を行うべきであることに留意すべきである。

原則3：Risk Pathwayの形状は化学物質により異なるため、諸代替法の条件が成り立つ化学物質のドメイン範囲を明示的にする必要がある。

既存試験の代替を行う場合には、より感度の高い（安全側の）外挿とする。

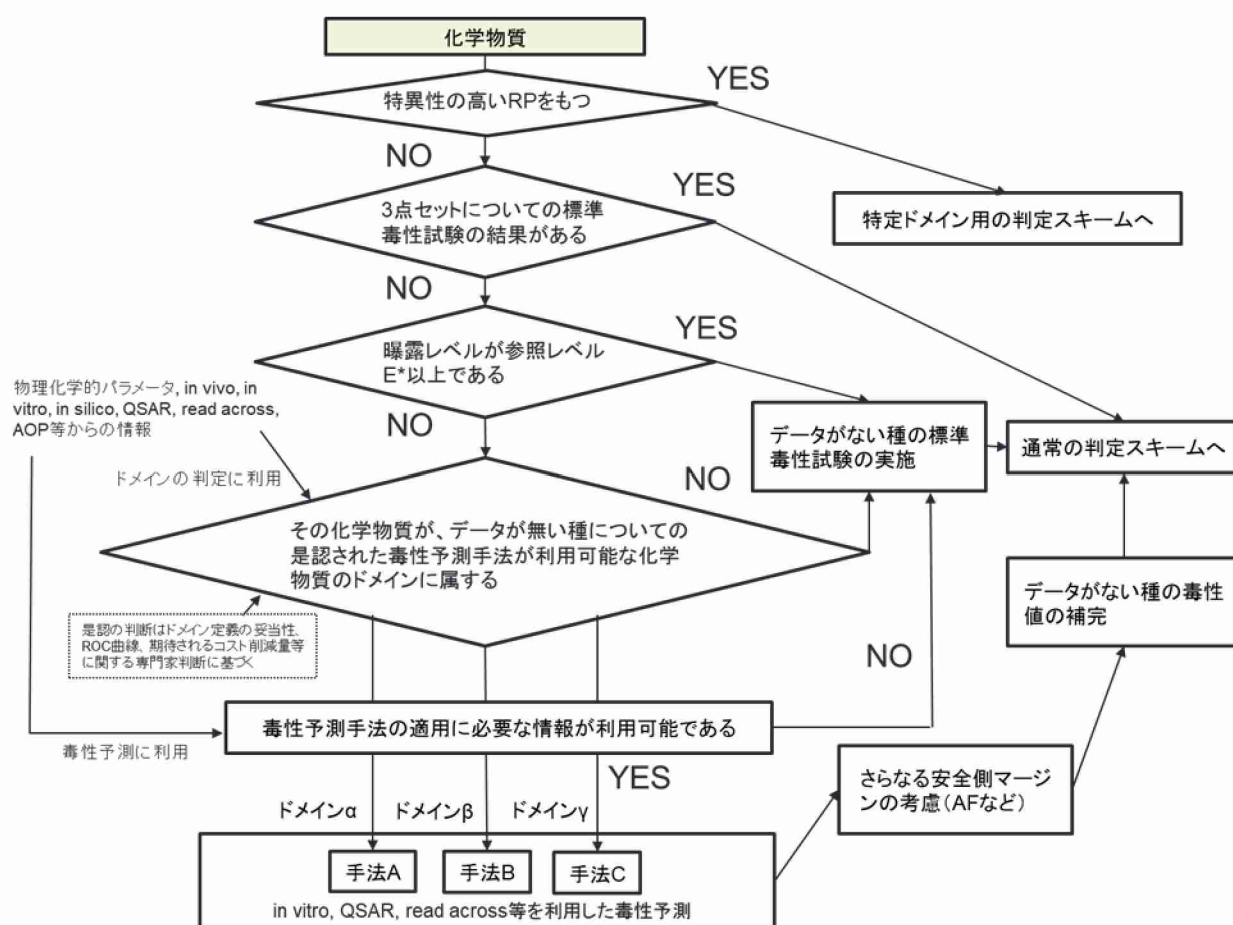


図1- 3 Animal Test Reductionを目的とした試験選択アルゴリズム案

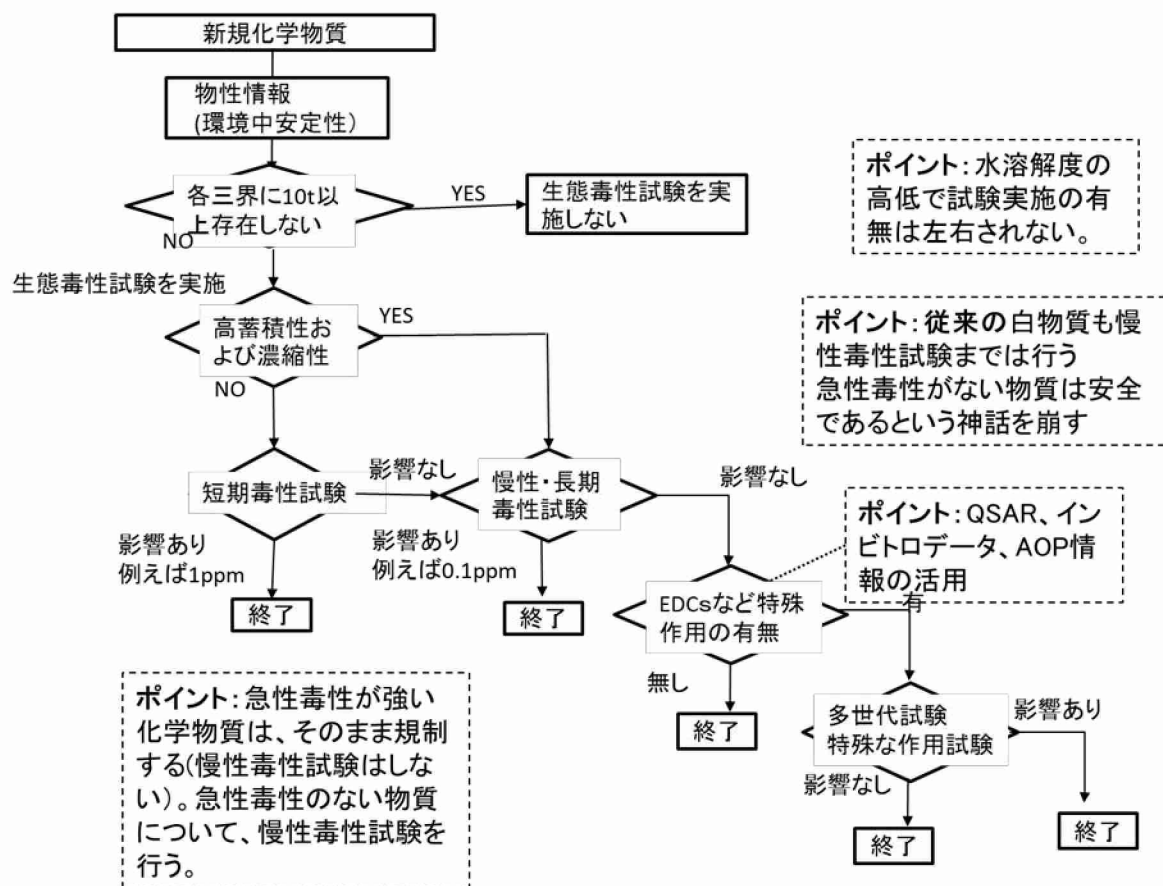


図1-4 化学物質の分布を基に考えた試験法選択アルゴリズム案

1) 具体的なアルゴリズムの草案の構築

a. Animal Test Reductionを目的とした試験選択アルゴリズム案

以下に、上記の三原則に留意した試験選択アルゴリズム案の一つとして、Animal Test Reductionを目的とした場合の試験選択アルゴリズムを図1-3に示す。この図は、曝露レベルが参照レベルを超えた場合に、可能である場合にはより簡易な手法により毒性予測手法により毒性値を算出するアルゴリズムを示している。毒性予測手法の適用可能性の判断においては、(1)その化学物質が毒性予測手法が適用可能なドメインに属するかどうか、(2)予測に必要な情報が利用可能かどうか、の判定を行う。これらのことは将来の化学物質の有害性評価において、(1)毒性予測手法は化学物質のドメイン範囲を強く意識して開発すべきであること、(2)ドメインの識別手法自体の開発も高い重要性をもつこと、(3)また予測に必要な情報の整備が重要となること、を示唆するものである。

b. 試験の確度を重要視した試験選択アルゴリズム案

具体的なアルゴリズムの草案の一つとして、試験法選択アルゴリズム案を構築した(図1-4)。このアルゴリズム案の特徴として、まずは対象とする化学物質について予想される曝露経路(大気/陸域/水域)を基に試験法を使い分けることが挙げられる。これは、上記で述べたアルゴリズムの評価軸における主要なリスク経路上の影響を検知する必要がある、に対応したものである。同時に物質の特性に準じて適切な生物試験を選択し、試験困難な物質の試験を避ける目的もある。また、急性毒性での強い感受性が検出されなかった物質について、その後に慢性毒性試験を行うことも特徴である。これは、長期・多世代影響を経由するリスクについて慢性毒性の代替として急性毒性があるという現行の考え方に寄っていない。急性影響と慢性影響の間に何らかの因果関係を認めている例は少ないことに起因する。さらに、本アルゴリズムの特徴は、長期・多世代試験の後にさらなる情報が必要とされる場合に、特殊な生物影響作用として懸念されている内分泌攪乱影響の検出を目的とした試験を行うことである。これは、内分泌かく乱化学物質など、実際には様々な作用経路が存在している可能性を考慮して、特異的な試験

を行うことにより検出の特異度を高めるといふねらいによるものである。

2) まとめ

今回は2つのアルゴリズムを提案したが、決して現行の化学物質管理の枠組みを否定するものではない。様々な価値観により考え方が多様化することを踏まえ、生物試験法を重視した視点から想像しうるアルゴリズムの例を示した。環境尾中に放出される化学物質の数・量は年々増加しており、特殊な機能を有する化学物質も生まれてきている状況下においては規制の枠組みも進化せざるを得ないが、本研究が既存の枠組みに何らかの改定が行われる折に、検討の口端にのぼることを期待する。

5. 本研究により得られた成果

(1) 科学的意義

諸外国で開発、登録されている生物試験法について網羅的に調査を行い、我が国で藻類試験、甲殻類試験、魚類試験、底生生物試験が存在しているものの、水生植物試験、微生物試験、土壌生物試験、陸生植物試験、昆虫試験、その他水生生物試験等分類群の試験については存在していないことが明らかになった。また、EUでは*in vitro*試験としてゼブラフィッシュの胚試験が活発に行われている。さらに、試験法も多様で長期・多世代影響試験法、ナノマテリアルや内分泌かく乱化学物質の様に特殊な物性・作用を持つ新興化学物質の評価手法やAOPに代表される*in vitro*毒性試験、*in silico*解析や作用メカニズムに基づく簡便かつ迅速な毒性予測手法の開発も海外で実施されていることが明らかになった。効率的化学物質管理および国際データ互換(MAD)を考慮し、我が国における生態毒性試験法の整備と標準化を進める必要がある。

(2) 環境政策への貢献

<行政が既に活用した成果>

特に記載すべき事項はない。

<行政が活用することが見込まれる成果>

海外で実際に使用されている生物試験についての調査を行い、我が国で新たに必要な生態毒性試験法の提案およびそれらを含む生態毒性試験体系の再構築を目指し、化審法を含む化学物質管理に係わる法律の中で、次世代の生態毒性試験のあり方、標準化および国際化に資する情報を提供することにより環境政策に貢献した。

6. 国際共同研究等の状況

特に記載すべき事項はない。

7. 研究成果の発表状況

(1) 誌上発表

<論文(査読あり)>

特に記載すべき事項はない。

<その他誌上発表(査読なし)>

特に記載すべき事項はない。

(2) 口頭発表(学会等)

特に記載すべき事項はない。

(3) 知的財産権

特に記載すべき事項はない。

(4) 「国民との科学・技術対話」の実施

- 1) 生態影響に関する化学物質審査規制/試験法セミナー（平成29年度）
大阪会場(70名)
- 2) 生態影響に関する化学物質審査規制/試験法セミナー（平成30年度）
大阪会場(70名)、東京会場(100名)

(5) マスコミ等への公表・報道等

特に記載すべき事項はない。

(6) その他

特に記載すべき事項はない。

8. 引用文献

3.-(1), (2) *in vivo*試験法, *in vitro*試験法ガイドライン

- 1) OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, Health Effects :
http://www.oecd-ilibrary.org/environment/oecd-guidelines-for-the-testing-of-chemicals-section-4-health-effects_20745788
- 2) OECD Work Related to Endocrine Disruptors
<http://www.oecd.org/env/ehs/testing/oecdworkrelatedtoendocrinedisrupters.htm>
- 3) Test Guidelines for Pesticides and Toxic Substances
<http://www.epa.gov/test-guidelines-pesticides-and-toxic-substances>
- 4) Master List of Test Guidelines for Pesticides and Toxic Substances
http://www.epa.gov/sites/production/files/2015-11/documents/ocsp-testguidelines_masterlist-2015-11-19.pdf
- 5) 化学物質の内分泌かく乱作用に関する情報提供サイト :
<https://www.env.go.jp/chemi/end/endocrine/4link/epa/epa3.html>
- 6) Endocrine Disruptor Screening Program (EDSP) Overview :
<http://www.epa.gov/endocrine-disruption/endocrine-disruptor-screening-program-edsp-overview>
- 7) International Organization for Standardization : <http://www.iso.org/iso/home.html>
- 8) EXTEND2010 における内分泌かく乱作用の生態影響に係る試験及び評価の枠組みについて :
http://www.env.go.jp/chemi/end/extend2010/commi_2010/com01-02/ref02_2.pdf
- 9) Adverse Outcome Pathway Wiki (AOP-Wiki) : https://aopwiki.org/wiki/index.php/Main_Page
- 10) EPA's Toxicity Forecaster (ToxCast) :
<http://www.epa.gov/chemical-research/toxicity-forecasting>
- 11) Toxicity Forecaster (ToxCast™) Data :
<http://www.epa.gov/chemical-research/toxicity-forecaster-toxcasttm-data>

4.-(1) 繁殖影響試験など長期かつ多世代の影響を評価する試験法の開発

- 12) OECD (2007) Detailed review paper for Avian Two-Generation Toxicity Test, Series on Testing and Assessment, No. 74, ENV/JM/MONO(2007)21
- 13) OECD (2010) Detailed Review Paper (DRP) on Molluscs Life-cycle Toxicity Testing, Series on Testing and Assessment No. 121, ENV/JM/MON(2010)9
- 14) OECD (2013) Draft new guidance document, Harpacticoid Copepod Development and Reproduction Test with *Amphiascus tenuiremis*
- 15) OECD (2012) Guidance Document on Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption, Series on Testing and Assessment, No. 150 ENV/JM/MONO(2012)22

16) 環境省 (2010) 化学物質の内分泌かく乱作用に関する今後の対応—EXTEND 2010—、平成22年7月
 4.-(2) 生態系を構成する主要生物を用いた試験法の研究および特殊な物性や作用を持つ物質を対象とした評価法の開発

- 17) <http://www.env.go.jp/chemi/seitai-kento/h13/03/03.pdf>, アクセス確認2016/3/1
- 18) <https://www.epa.gov/sites/production/files/2016-01/documents/data-require-guide-principle.pdf>, アクセス確認2016/3/1
- 19) 平成26年度 化学物質対策に関する試験機関の動向等調査業務報告書, 一般社団法人産業環境管理協会, 2016
- 20) http://www.meti.go.jp/meti_lib/report/2014fy/E004009.pdf, アクセス確認2016/3/1
- 21) 国立研究開発法人国立環境研究所 (2016) 平成27年度化学物質の内分泌かく乱作用に関する試験法開発に係る業務報告書
- 22) Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research. 1998. Guidance for Industry, Environmental Assessment of Human Drug and Biological Application, Rev. 1. FDA-CMC, Rockville.
- 23) EMEA (2006) Guideline on the environmental risk assessment of medicinal products for human use EMEA/CHMP/SWP/4447/00. European Medicines Agency, London
- 24) 厚生労働科学研究費補助金 (医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業) 「ヒト用医薬品の環境影響評価ガイドラインとリスク管理等に関する研究」平成25年度研究報告書
- 25) 生物応答を用いた排水試験法検討案 (2014) 排水 (環境水) 管理のバイオアッセイ技術検討分科会
- 26) European Commission HP, Legislation on Plant Protection Products (PPPs), http://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/legislation/index_en.htm, アクセス確認2016/3/31.
- 27) European Chemicals Agency HP, Biocidal Products Regulation <http://echa.europa.eu/regulations/biocidal-products-regulation>, アクセス確認2016/3/31.
- 28) 農林水産省農産園芸局長通知、平成12年11月24日付け12農産第8147号、農薬の登録申請に係る試験成績について、一部改正平成25年5月31日25消安第630号
- 29) OECD HP, Safety of manufactured nanomaterials, <http://www.oecd.org/science/nanosafety/>, アクセス確認2016/3/31.
- 30) 国立研究開発法人国立環境研究所 (2016) 平成27年度有害性評価困難な化学物質の試験法検討業務報告書

4.-(3) *in vitro*毒性試験、*in silico*解析や作用メカニズムに基づく毒性予測手法の研究

- 31) Guidance Document 150 (Annex 1.4) published in the OECD Series on Testing and Assessment “OECD Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disruptors (as revised in 2012)”
- 32) Endocrine Disruptor Screening Program (EDSP) Overview <http://www.epa.gov/endocrine-disruption/endocrine-disruptor-screening-program-edsp-overview>
- 33) EXTEND2010 における内分泌かく乱作用の生態影響に係る試験及び評価の枠組みについて http://www.env.go.jp/chemi/end/extend2010/commi_2010/com01-02/ref02_2.pdf
- 34) Toxicity Forecaster (ToxCast™) <https://www.epa.gov/sites/production/files/2013-12/documents/toxcast-fact-sheet.pdf>
- 35) Ankley, G. T., R. S. Bennett, R. J. Erickson, D. J. Hoff, M. W. Hornung, R. D. Johnson, D. R. Mount, J. W. Nichols, C. L. Russom, P. K. Schmieder, J. A. Serrano, J. E. Tietge, and D. L. Villeneuve. 2010. Adverse outcome pathway: A conceptual framework to support ecotoxicology research

- and risk assessment. *Environ. Toxicol. Chem.* 29(3):730–741.
- 36) Arvidson, K.B., R. Chanderbhan, K. Muldoon-Jacobs, J. Mayer, and A. Ogunbesan. 2010. Regulatory use of computational toxicology tools and databases at the United States Food and Drug Administration's Office of Food Additive Safety. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology* 6, 793–796.
 - 37) Bailey, A., N. Chanderbhan, N. Collazo-Braier, M. Cheeseman, and M. Twaroski. 2005. The use of structure-activity relationship analysis in the food contact notification program. *Reg. Toxicol. and Pharm.* 42:225–235.
 - 38) Benigni, R., T.I. Netzeva, E. Benfenati, C. Bossa, R. Franke, C. Helma, E. Hulzebos, C. Marchant, A. Richard, Y.-T. Woo, and C. Yang. 2007b. The expanding role of predictive toxicology: An update on the (Q)SAR models of mutagens and carcinogens. *J. Environ. Sci. Health C* 25:53–97.
 - 39) Cronin, M. 2010. Quantitative structure-activity relationships (QSARs) — applications and methodology. Chapter 10 in *Recent Advances in QSAR Studies: Methods and Applications*. Puzyn, T., J. Leszczynski, and M.T.D. Cronin (eds.). Springer, Heidelberg, Germany, pp. 3–11.
 - 40) Dearden, J.C., M.T.D. Cronin, and K.L.E. Kaiser. 2009. How not to develop a quantitative structure-activity or structure-property relationship (QSAR/QSPR). *SAR and QSAR in Environmental Research* 20:241–266.
 - 41) ENV/JM/MONO(2014)4. OECD Testing and Assessment No. 194, GUIDANCE ON GROUPING OF CHEMICALS, SECOND EDITION.
[http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono\(2014\)4&doclanguage=en](http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono(2014)4&doclanguage=en) (2016年2月20日アクセス)
 - 42) ENV/JM/MONO(2015)46. OECD Testing and Assessment No. 229, Fundamental And Guiding Principles For (Q)SAR Analysis Of Chemical Carcinogens with Mechanistic Considerations.
<http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono%282015%2946&doclanguage=en> (2016年2月20日アクセス)
 - 43) Hanway, R.H. and P.F. Evans (2000), Read-across of toxicological data in the notification of new chemicals. *Toxicology Letters*, Vol. 116, No. 1, pp. 61.
 - 44) JIPSプロダクトスチュワードシップガイダンス第2版 (一般社団法人日本化学工業協会2012年4月出版) www.nikkakyo.org/documentDownload.php?id=4826 (2016年2月19日アクセス)
 - 45) Lo Piparo, E., A. Worth, M. Manibusan, C. Yang, B. Schilter, P. Mazzatorta, M.N. Jacobs, H. Steinkellner, and L. Mohimont. 2011. Use of computational tools in the field of food safety. *Reg. Toxicol. Pharm.* 60:354–362.
 - 46) Matthews, E. J. 2007. Quantitative Structure Activity Tools Used by the U. S. FDA. OEHA-COEH Workshop: Practical Decision-Making Tools for Identifying Safer Alternatives (October 1–2, 2007) http://www.oeha.ca.gov/multimedia/green/pdf/MatthewsOct2_07.pdf (2016年2月10日アクセス)
 - 47) Mostrag-Szlichtyng, A., J.-M. Zaldívar Comenges, and A.P. Worth. 2010. Computational toxicology at the European Commission's Joint Research Centre. *Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology* 6, 785–792.
 - 48) NAFTA_TWG, 2012 North American Free Trade Agreement (NAFTA) Technical Working Group on Pesticides (TWG) (Quantitative) Structure Activity Relationship [(Q)SAR] Guidance Document <http://archive.epa.gov/pesticides/news/web/pdf/qsar-guidance.pdf> (2016年2月25日アクセス)
 - 49) National Research Council. 2007. TOXICITY TESTING IN THE 21ST CENTURY.
http://www.nap.edu/openbook.php?record_id=11970 (2016年2月25日アクセス)

- 50) OECD. 2004. OECD Principles for the validation, for regulatory purposes, of (Quantitative) Structure-Activity Relationship Models. Organization for Economic Cooperation and Development. <http://www.oecd.org/dataoecd/33/37/37849783.pdf> (2016年2月25日アクセス)
- 51) OECD. 2007a. Guidance on grouping of chemicals. OECD Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment No. 80. ENV/JM/MONO (2007)28: 99 p. [http://www.oecd.org/officialdocuments/displaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono\(2007\)28&doclanguage=en](http://www.oecd.org/officialdocuments/displaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono(2007)28&doclanguage=en) (2016年2月25日アクセス)
- 52) OECD. 2007b. Report on the regulatory uses and applications in OECD member countries of (quantitative) structure-activity relationship [(Q)SAR] models in the assessment of new and existing chemicals. OECD Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment No. 58. ENV/JM/MONO (2006)25: 79 p. <http://www.oecd.org/dataoecd/55/22/38131728.pdf> (2016年2月25日アクセス)
- 53) OECD. 2009. Guidance document for using the OECD QSAR application toolbox to develop chemical categories according to the OECD guidance on grouping of chemicals. OECD Series on Testing and Assessment No. 102. ENV/JM/MONO (2009)5: 118 p. <http://www.oecd.org/dataoecd/50/60/42294034.pdf> (2016年2月25日アクセス)
- 54) OECD. 2011. OECD Quantitative Structure-Activity Relationships Project [(Q)SARs]. http://www.oecd.org/document/23/0,2340,en_2649_34365_33957015_1_1_1_1,00.html (2016年2月25日アクセス)
- 55) Schultz, T. and B. Diderich. 2011. Adverse outcome pathways and their role in helping to formulate mechanistically relevant chemical categories. AltTox.org Non-animal Methods for Toxicity Testing. <http://alttox.org/spotlight/050.html> (2016年2月25日アクセス)
- 56) 抗菌剤のリスクを示すために要求されるデータ項目の改良の提案 (40CFR158 subpart W) <http://www.ecfr.gov/cgi-bin/text-idx?SID=8fcdcb323cbaf68166b9a717103d7d31&mc=true&node=sp40.24.158.w&rgn=div6> (2016年2月12日アクセス) AltTox.org web site. Omics, Bioinformatics, Computational Biology. Last updated: July 3, 2014. The Humane Society of the United States and Procter & Gamble. <http://alttox.org/mapp/emerging-technologies/omics-bioinformatics-computational-biology/> (2016年2月21日アクセス)
- 57) Ankley, G.T., R.S. Bennett, R.J. Erickson, D.J. Hoff, M.W. Hornung, R.D. Johnson, D.R. Mount, J.W. Nichols, C.L. Russom, P.K. Schmieder, J.A. Serrano, J.E. Tietge, and D.L. Villeneuve. 2010. Adverse outcome pathway: A conceptual framework to support ecotoxicology research and risk assessment. Environ. Toxicol. Chem. 29(3):730-741.
- 58) ArrayTrack™ Official Website <http://www.fda.gov/ScienceResearch/BioinformaticsTools/Arraytrack/default.htm> (2016年2月20日アクセス)
- 59) Basketter, D. A., Clewell, H., Kimber, I., Rossi, A., Blaauboer, B., Burrier, R., Daneshian, M., Eskes, C., Goldberg, A., Hasiwa, N., Hoffmann, S., Jaworska, J., Knudsen, T. B., Landsiedel, R., Leist, M., Locke, P., Maxwell, G., McKim, J., McVey, E. A., Ouédraogo, G., Patlewicz, G., Pelkonen, O., Roggen, E., Rovida, C., Ruhdel, I., Schwarz, M., Schepky, A., Schoeters, G., Skinner, N., Trentz, K., Turner, M., Vanparrys, P., Yager, J., Zurlo, J., and Hartung, T. (2012) A roadmap for the development of alternative (non-animal) methods for systemic toxicity testing. ALTEX 29, 3-91.
- 60) Bruno, M., Moore, T., Nesnow, S., Ge, Y. 2009. Protein carbonyl formation in response to propiconazole-induced oxidative stress. J Proteome. Res. 8:2070 - 2078.
- 61) De Wit, M., Keil, D., Remmerie, N., van der Ven, K., van den Brandhof, E. J., Knapen, D., Witters, E., De Coen, W. 2008. Molecular targets of TBBPA in zebrafish analysed through

- integration of genomic and proteomic approaches. *Chemosphere* 74: 96–105.
- 62) Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes, Official Journal of the European Union, L 276, pp 33–78.
 - 63) Enan, E. and Matsumura, F. 1994. Significance of TCDD-induced changes in protein phosphorylation in the adipocyte of male guinea pigs. *J Biochemical Toxicology*. 9:159 – 170.
 - 64) Ge, Y., Bruno, M., Foth, H. 2011a. Applications of Proteomic Technologies to Toxicology (Systems Toxicology, Proteomic Technology) John Wiley & Sons Ltd. 1:197 – 215.
 - 65) Ge, Y., Maribel, B., Wallace, K., Winnik, W., Prasad, R. Y. 2011b. Proteome profiling reveals potential toxicity and detoxification pathways following exposure of BEAS-2B cells to engineered nanoparticle titanium dioxide. *Proteomics*. 11(12):2406–22.
 - 66) Ge, Y., Wang, D.Z., Chiu, J.F., Cristobal, S., Sheehan, D., Silvestre, F., Peng, X., Li, H., Gong, Z., Lam, S.H., Wentao, H., Iwahashi, H., Liu, J., Mei, N., Shi, L., Bruno, M., Foth, H., Teichman, K. 2013. Environmental OMICS: Current Status and Future Directions. *J Integrated Omics*. 3(2):75–87.
 - 67) Kishi, K., Kitagawa, E., Onikura, N., Nakamura, A., Iwahashi, H. 2006. Expression analysis of sex-specific and 17beta-estradiol-responsive genes in the Japanese medaka, *Oryzias latipes*, using oligonucleotide microarrays. *Genomics*. 88: 241 – 251.
 - 68) Larkin, P., Folmar, L. C., Hemmer, M. J., Poston, A. J., Lee, H. S., Denslow, N. D. 2002. Array technology as a tool to monitor exposure of fish to xenoestrogens. *Mar Environ Res* 54: 395–9.
 - 69) Lau, A. T. and Chiu J. F. 2006. Proteomic and biochemical analyses of *in vitro* carcinogen-induced lung cell transformation: synergism between arsenic and benzo[a]pyrene. *Proteomics* 6:1619 – 1630.
 - 70) Liu, X.J., Kang, L.Q., Liu, Y.J., Li, H., Peng, X. 2012. Characterization of the *Edwardsiella tarda* proteome in response to different environmental stresses. *J Proteomics*. 80:320–33.
 - 71) Martyniuk, C. J., Griffitt, R. J., Denslow, N. D. 2011. Omics in Aquatic Toxicology: Not Just Another Microarray. *Environ. Toxicol. Chem.* 30(2):263–264.
 - 72) Martyniuk, C. J., Alvarez, S., McClung, S., Villeneuve, D. L., Ankley, G. T., Denslow, N. D. 2009a. Quantitative proteomic profiles of androgen receptor signaling in the liver of fathead minnows (*Pimephales promelas*). *J. Proteome Res.* 8: 2186–200.
 - 73) Martyniuk, C. J., Denslow, N. D. 2009b. Towards functional genomics in fish using quantitative proteomics. *Gen Comp Endocrinol* 164: 135–41.
 - 74) Miracle, A. L., Toth, G. P., Lattier, D. L. 2003. The path from molecular indicators of exposure to describing dynamic biological systems in an aquatic organism: microarrays and the fathead minnow. *Ecotoxicology* 12: 457–62.
 - 75) Neumann, N. F., Galvez, F. 2002. DNA microarrays and toxicogenomics: applications for ecotoxicology? *Biotechnol Adv* 20: 391–419.
 - 76) Regulation (EC) no 1223/2009 of the European Parliament and of the Council of 30 November 2009 on cosmetic products, Official Journal of the European Union, L 342, 22.12.2009, pp 59–209.
 - 77) Regulation (EC) no 1907/2006 of the European Parliament and of the Council of 18 December 2006 concerning the registration, evaluation, authorisation and restriction of chemicals (REACH), establishing a European Chemicals Agency, amending Directive 1999/ 45/EC and repealing Council Regulation (EEC) no 793/93 and Commission Regulation (EC) no 1488/94 as

- well as Council Directive 76/769/EEC and Commission Directives 91/155/EEC, 93/67/EEC, 93/105/EC and 2000/21/EC, Official Journal of the European Union, L 136, pp 3-277.
- 78) Regulation (EC) no 1107/2009 of the European Parliament and of the Council of 21 October 2009 concerning the placing of plant protection products on the market and repealing Council Directives 79/ 117/EEC and 91/414/EEC, Official Journal of the European Union, L 309, pp 1-50.
- 79) Regulation (EC) no 528/2012 of the European Parliament and of the Council of 22 May 2012 concerning the making available on the market and use of biocidal products, Official Journal of the European Union, L 167, pp 1-123.
- 80) Sturla, S. J., Boobis, A. R., FitzGerald, R.E., Hoeng, J., Kavlock, R. J., Schirmer, K., Whelan, M., Wilks, M. F., Peitsch, M.C. 2014. Systems Toxicology: from basic research to risk assessment. *Chem Res Toxicol.* 27(3):314-29.
- 81) Tox21. 2004 National Toxicology Program (National Institute of Environmental Health Sciences) http://ntp.niehs.nih.gov/ntp/about_ntp/ntpvision/ntproadmap_508.pdf (2016年2月21日アクセス)
- 82) Tox-Omics. 平成26年1月 産業構造審議会産業技術環境分科会研究開発・評価小委員会評価ワーキンググループ「石油精製物質等の新たな化学物質規制に必要な国際先導的有害性試験法の開発」中間評価報告書www.meti.go.jp/policy/tech_evaluation/e00/03/h25/479.pdf (2016年2月10日アクセス)
- 83) Tsuchiya, T., Tanaka-Kagawa, T., Jinno, H., Tokunaga, H., Sakimoto, K., Ando, M., Umeda, M. *Toxicol Sci.* 2005. Inorganic arsenic compounds and methylated metabolites induce morphological transformation in two-stage BALB/c 3T3 cell assay and inhibit metabolic cooperation in V79 cell assay. *Toxicol Sci.* 84(2):344-51.
- 84) US EPA Next Generation Compliance web
(<https://www.epa.gov/compliance/next-generation-compliance>、2016年2月20日アクセス)
- 85) US FDA and US EPA 規制に向けた科学的取り組み
(<http://alttox.org/mapp/emerging-technologies/omics-bioinformatics-computational-biology/emerging-science-and-policy/> - 2016年2月19日アクセス)
- 86) Van Aggelen, G., Ankley, G. T., Baldwin, W. S., Bearden, D. W., Benson, W. H., Chipman, J. K., Collette, T. W., Craft, J. A., Denslow, N. D., Embry, M. R., Falciani, F., George, S. G., Helbing, C. C., Hoekstra, P. F., Iguchi, T., Kagami, Y., Katsiadaki, I., Kille, P., Liu, L., Lord, P. G., McIntyre, T., O'Neill, A., Osachoff, H., Perkins, E. J., Santos, E. M., Skirrow, R. C., Snape, J. R., Tyler, C. R., Versteeg, D., Viant, M. R., Volz, D. C., Williams, T. D., Yu, L. 2010. Integrating omic technologies into aquatic ecological risk assessment and environmental monitoring: hurdles, achievements, and future outlook. *Environ Health Perspect* 118: 1-5.

Ⅱ－２ 繁殖影響試験など長期かつ多世代の影響を評価する試験法の開発（サブ１）

元国立研究開発法人国立環境研究所（現愛媛大学）
国立研究開発法人国立環境研究所

鎌迫 典久（平成29年度に所属変更）
青木 康展（平成27, 28年度）

平成27～28年度累計予算額：26,028千円（うち平成29年度：0千円）

予算額は、間接経費を含む。

〔要旨〕

諸外国の試験法を精査し、高度な試験手法、多様なエンドポイントをもつ長期、多世代試験法についてその特性を明らかにすることを目的とした。まず2種類のメダカを用いた多世代試験を行い、1世代試験と比較することにより、多世代試験の我が国での必要性、実行可能性などを検討した。

〔キーワード〕

多世代試験、繁殖、産卵数、メダカ拡張1世代試験、内分泌かく乱

1. はじめに

諸外国の試験法を精査し、高度な試験手法、多様なエンドポイントをもち、長期間におよぶ複雑な試験法についてその特性を明らかにするとともに、我が国での必要性、実行可能性を検討し、実際に導入される可能性の高い試験法については、その導入準備を進めた。魚類または甲殻類を用いた多世代毒性試験法の国内への導入可否を検討したところ、わが国では環境省のEXTEND2016用いられているメダカ拡張1世代試験（OECDテストガイドラインNo. 240；MEOGRT）が最も曝露期間が長い試験であるが、海外で存在している多世代毒性試験方法がないことからその必要性を検討することにした。また、生物史の1局面に着目（特に繁殖に関係する、産卵、交尾、行動をエンドポイントとする試験）し、既存試験を組み合わせた新たな多世代試験法の日本での導入可能性を検討した。

2. 研究開発目的

魚類を用いた多世代毒性試験法の国内への導入可否を検討するため、典型的な物質で多世代試験を行い、拡張一世代試験とエンドポイントの比較を行うことにより、必要性について考察する。具体的には既存のメダカ拡張1世代試験（MEOGRT）の曝露期間を延長することにより魚類多世代毒性試験方法を行うこととした。さらに、既存のOECDテストガイドラインの中で、繁殖をエンドポイントとするNo. 229と2次性徴の有無をエンドポイントとするNo. 234を続けて行い、1世代目と2世代目の感受性比較をすることにより、多世代試験の有効性を検証する。

3. 研究開発方法

作成されたリストに基づき魚類多世代毒性試験方法を検討した。

（１）メダカ拡張1世代試験の延長（Extended MEOGRT）試験の実施

既に公開されているOECDテストガイドラインNo. 240（MEOGRT）をさらに延長し、F2世代の繁殖影響までを観察するExtended MEOGRT試験を実施した（図2-1）。開発のための被験物質は、4-NP（分岐型含む：図は直鎖型）を用いた（図2-2）。

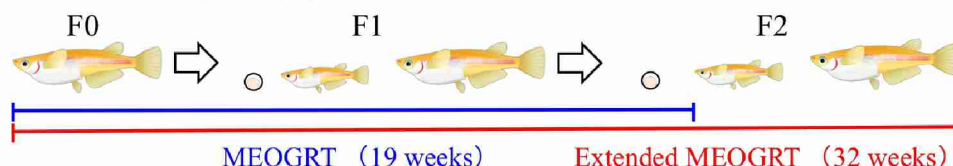


図2-1 Extended MEOGRT試験法の概要

- 4-Nonylphenol (mixture of branched chain isomers)
- CAS No; 84852-15-3
- Purity; >99.7%
- Molecular Formula; $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_8\text{C}_6\text{H}_4\text{OH}$

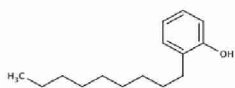


図2-2 4-NPの特徴

(2) 繁殖能力の違いを観察する新たな多世代試験の実施

既に公開されているOECDテストガイドラインNo. 229と234を続けて行い、1世代目と2世代目の繁殖能力の違いを観察する新たな多世代試験を実施した(図2-3)。開発のための被験物質は、生物高濃縮性のあるTPTを用いた(図2-4)。

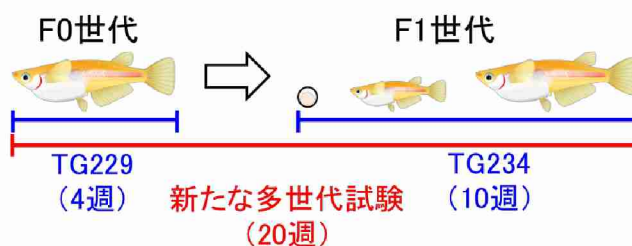


図2-3 新たな多世代試験法の概要

- Triphenyltin chloride
- CAS No; 639-58-7
- Purity; >98.0%
- Molecular Formula; $\text{C}_{18}\text{H}_{15}\text{ClSn}$

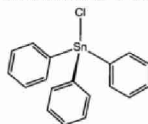


図2-4 被験物質 ; TPTの特徴

4. 結果及び考察

(1) メダカ拡張1世代試験の延長 (Extended MEOGRT) 試験の結果

Extended MEOGRT試験で得られた結果の一部を図2-5に、各世代におけるエンドポイントのLOECを表2-1に示す。エストロゲン作用によってオスのシリビレ特異的に現れる乳頭状小突起の形成は抑制され、F0世代ではその影響は認められなかったが、F1世代では32 $\mu\text{g/L}$ 、F2世代では10 $\mu\text{g/L}$ 濃度区から乳頭状小突起の形成抑制が認められた。また、3世代にわたる4-NPの繁殖影響について検討した結果、F0世代で

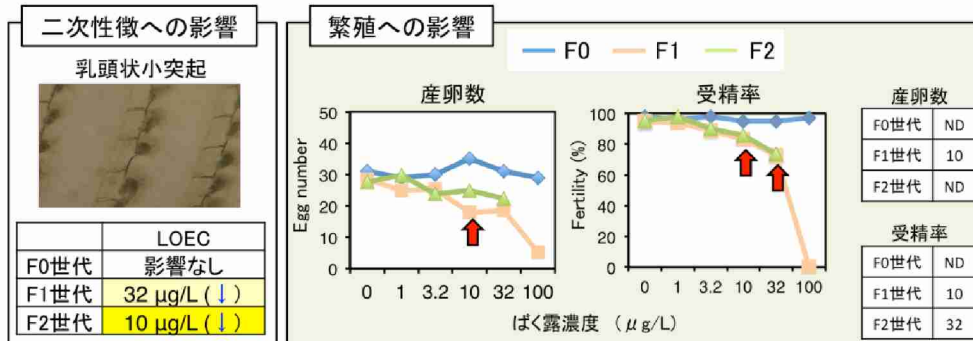


図2-5 3世代における4-NPの二次性徴および繁殖影響

はその影響は認められなかったが、F1世代では10 μ g/L、F2世代では32 μ g/L濃度区から繁殖影響が認められた。以上の結果から、フルライフサイクル試験を2回繰り返すことにより、1世代目と2世代目の同じエンドポイントで比較した場合の継世代影響を検出することができ、より理想に近い多世代試験と考えられた。

表2-1 3世代における各エンドポイントのLOEC (μ g/L)

Stage	wpf	Endpoint		LOEC (μ g/L)		
				F0	F1	F2
Embryo	2	Hatching rate			↓ 100	>32
		Hatching day			>100	↑ 32
Larvae	4	Survival rate after hatching			↓ 100	-
		Survival rate after hatching			↓ 100	-
Sub-adult	10	Total length	XY		↓ 1	>32
			XX		↓ 3.2	>32
		Wet body weight	XY		↓ 1	>32
			XX		↓ 1	>32
		HSI	XY		↑ 3.2	↓ 1
			XX		↓ 100	↓ 3.2
		GSI	XY		>100	>32
			XX		↓ 10	>32
		Secondary sex characteristic	XY		↓ 3.2	↓ 32
			XX		-	-
		VTG	XY		↑ 10	↑ 10
			XX		↑ 32	>32
		testis-ovary	XY		-	-
			XX		-	-
Adult	12~15	Mortality	XY	>100	↑ 100	>32
			XX	>100	↑ 10	>32
		Total egg number		>100	↓ 10	>32
		Fertilized egg number		>100	↓ 3.2	↓ 32
		Fertility		>100	↓ 10	↓ 32
		Fertility		>100	↓ 10	↑ 10
	15	Total length	XY	>100	>100	↑ 32
			XX	>100	↓ 32	>32
		Wet body weight	XY	>100	↑ 100	↑ 10
			XX	>100	↑ 100	>32
		HSI	XY	↑ 10	↑ 32	↑ 32
			XX	↑ 3.2	>100	↓ 10
		GSI	XY	>100	↑ 10	↓ 32
			XX	>100	↑ 32	>32
		Secondary sex characteristic	XY	>100	↓ 32	↓ 10
			XX	-	-	-
		VTG	XY	↑ 10	↑ 32	↑ 10
			XX	>100	↑ 100	>32
		testis-ovary	XY	-	↑ 10	-
			XX	-	-	-

(2) 繁殖能力の違いを観察する新たな多世代試験の実施

TPTを用いて、多世代影響を観察する試験法を提案した。本試験で得られた結果を図2-6に示す。その結果、TPTの繁殖、致死、成長への影響の最小影響濃度は、F0世代と比べてF1世代の方がより低濃度で影響が認められた。本試験法はより短期での多世代試験を目指し、持続可能な生態系の維持に最も重要である繁殖に特化した多世代曝露の影響を検出する。また、生物高濃縮性の化学物質が生態に与える影響の検出に有効であると考えられた。

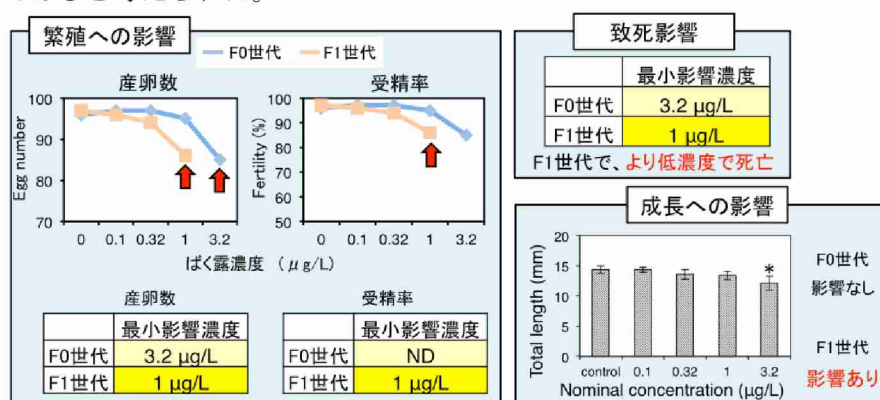


図2-6 2世代におけるTPTの影響

5. 本研究により得られた成果

(1) 科学的意義

環境省の内分泌かく乱化学物質のプロジェクトであるEXTEND2016で採用されており、既に公開されているOECDテストガイドラインNo. 240 (MEOGRT) をさらに延長し、F2世代の繁殖影響までを観察するExtended MEOGRT試験を実施した。多世代試験と1世代拡張繁殖試験を比較する事によって、多世代試験の意義を明らかにした。

(2) 環境政策への貢献

<行政が既に活用した成果>

環境省EXTEND2016の中で確定試験に位置づけられている、メダカ拡張一世代繁殖試験は多世代試験ではないという意見があったが、本研究の成果から、多世代試験とほぼ同等の試験であることが示された。このことは、EXTEND2016がリスク評価に十分な枠組であることが証明された。

<行政が活用することが見込まれる成果>

EXTEND2016の時期プログラムの改定までに、環境省で推薦しているMEGRTの延長試験を行い、多世代試験の必要性について確認した。はほぼ2世代試験と同等でありEXTEND2016で採用している魚類確定試験の妥当性が確認できたことは有用である。

6. 国際共同研究等の状況

特に記載すべき事項はない。

7. 研究成果の発表状況

(1) 誌上発表

<論文（査読あり）>

- 1) Horie Y, Yamagishi T, Shintaku Y, Iguchi T, Tatarazako N. Chemosphere. 203, 418-425. 2018
- 2) Horie Y, Watanabe H, Takanobu H, Shigemoto Y, Yamagishi T, Iguchi T, Tatarazako N, Aquatic toxicology, 192, 16-23, 2017
- 3) Watanabe H, Horie Y, Takanobu H, Koshio M, Flynn K, Iguchi T, Tatarazako N, Environmental toxicology and chemistry, 2017

<その他誌上発表（査読なし）>

特に記載すべき事項はない。

(2) 口頭発表（学会等）

- 1) ノニルフェノールの延長”メダカ拡張一世代繁殖試験”結果，堀江好文，渡部春奈，山岸隆博，井口泰泉，鎌迫典久，環境化学討論会要旨集、26th (2017) .

(3) 出願特許

特に記載すべき事項はない。

(4) 「国民との科学・技術対話」の実施

- 1) 生態影響に関する化学物質審査規制/試験法セミナー（平成29年度）
大阪会場(70名)
- 2) 生態影響に関する化学物質審査規制/試験法セミナー（平成30年度）
大阪会場(70名)、東京会場(100名)

(5) マスコミ等への公表・報道等

特に記載すべき事項はない。

(6) その他

特に記載すべき事項はない。

8. 引用文献

3.-(1)

- 1) Flynn K, Lothenbach D, Whiteman F, Hammermeister D, Touart LW, Swintek J, Tatarazako N, Onishi Y, Iguchi T, Johnson R. Summary of the development the USEnvironmental Protection Agency's Medaka Extended One Generation Reproduction Test (MEOGRT) using data from 9 multigenerational medaka tests. Environ Toxicol Chem. 2017 Dec;36(12):3387-3403.
- 2) Flynn K, Swintek J, Johnson R. The influence of control group reproduction on the statistical power of the Environmental Protection Agency's Medaka Extended One Generation Reproduction Test (MEOGRT). Ecotoxicol Environ Saf. 2017 Feb;136:8-13.
- 3) Test No. 240: Medaka Extended One Generation Reproduction Test (MEOGRT), OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2
https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-240-medaka-extended-one-generation-reproduction-test-meogrt_9789264242258-en

Ⅱ－３ 生態系を構成する主要生物を用いた試験法の研究および特殊な物性や作用を持つ物質を対象とした評価法の研究（サブ２）

国立研究開発法人国立環境研究所

環境リスク・健康研究センター

渡部 春奈

阿部 良子

青木 康展（平成29年度のみ）

平成27～29年度累計予算額：18,652千円（うち平成29年度：5,470千円）

予算額は、間接経費を含む。

【要旨】

諸外国の試験法を精査し、生態系の多様性を考慮し、生態系を構成する上での主要と目される生物を用いた試験法についてその特徴を明らかにするとともに、既存化学物質とは異なる特殊な物性や作用を持つ物質を対象とした試験法について我が国での必要性、実行可能性新たな試験法について検討した。実際に標準物質の毒性試験を行い、その問題点を探り、この試験が日本で使われる試験法として妥当であるか検討した。具体的にはa. 陸生植物の発芽発根試験、b. ミミズを用いた毒性試験、c. ヨコエビを用いた底質毒性試験、d. 海産藻類を用いた生長阻害試験、e. 胚の死亡と孵化・仔魚期の致死・亜致死影響に着目した試験、f. ネオニコチノイド系殺虫剤を対象としたユスリカ幼虫試験法、などの試験条件を精緻化し、技術的な課題を解決することにより政策に貢献することを目指した。

【キーワード】

多世代試験、内分泌かく乱、ネオニコチノイド、国内種、海産藻類

1. はじめに

諸外国の試験法を精査し、生態系の多様性を考慮し、生態系を構成する上での主要と目される生物を用いた試験法についてその特徴を明らかにするとともに、既存化学物質とは異なる特殊な物性や作用を持つ物質を対象とした試験法について我が国での必要性、実行可能性についてリスト化した。その中で、陸生植物、土壌生物、底生生物、海産生物を用いた下記の試験法について、実際に標準物質の毒性試験を行い、その問題点を探り、この試験が日本で使われる試験法として妥当であるか検討した。またわが国では導入されていないが、欧米では盛んに用いられている試験法である、ゼブラフィッシュの「胚期」と「仔魚期」における化学物質に対する「致死・亜致死影響」を調べる試験について検討した。

2. 研究開発目的

化学物質の環境中動態を考慮し、陸域、土壌、底質、海域に生息する生物を用いた試験法導入の必要性が考えられた。そこで試験作成されたリストに基づき、陸生植物、土壌生物、底生生物、海産生物を用いた試験法について、実際に標準物質を用いて毒性試験を行い、我が国への適用可能性について検討する。化学物質の環境中動態を考えた場合、最近のOECDの国際会議では、供試魚数の制限や実験動物の取り扱い方に関する議題など、動物愛護に関する議題が多く扱われている。また、ヨーロッパでは、魚類の「胚期」は生物ではなく、胚期を用いた試験は*in vitro*試験として定義されていることから、OECDの国際会議においても動物愛護の観点から魚類の「胚期」のみを用いた試験が強く推奨され始めている。そこで、OECDでは2013年にゼブラフィッシュの「胚期」のみを用いて化学物質の致死影響を評価できる魚類胚期急性毒性試験（OECD TG 236）を確立した。しかし、魚類の「胚期」だけで化学物質の致死影響を正確に評価できるかについては不明である。そこで、本研究ではゼブラフィッシュの「胚期」と「仔魚期」における化学物質に対する「致死・亜致死影響」について検討した。

3. 研究開発方法

(1) 生態系を構成する主要生物を用いた試験法の研究

作成されたリストに基づき、陸生植物、土壌生物、底生生物、海産生物を用いた下記の試験法について、実際に標準物質の毒性試験を行い、その問題点を探り、この試験が日本で使われる試験法として妥当であるか検討した。

a. 陸生植物の発芽発根試験

OECD TG208に代表される陸生植物の発芽・発根試験は、試験期間に14日～21日を要する。試験の短縮・簡略化をめざし、エンドポインを根長およびシュート長に特化した試験法の開発を行った。試験種には、発芽・発根が特に早い、*Lepidium sativum*(コショウソウ)、*Sinapis alba*(シロガラシ)、*Sorghum saccharatum*(サトウモロコシ)を選定した。また、普遍的なデータの取得が困難である土壌曝露に代わる手法として、ゲル培地やグラスビーズを用いた曝露の開発を行った。

試験に用いる*Lepidium sativum*(コショウソウ)、*Sinapis alba*(シロガラシ)、*Sorghum saccharatum*(サトウモロコシ)の種子は、高発芽率を維持するため、自主栽培により定期的に確保した(図3-1)。種子は、試験物質を含む0.2%ゲランガム(1/2MS培地)(図3-2)に撒種し、26℃、暗所下で3日間培養後、発芽率および根長・シュート長を計測した。試験物質にはホウ酸を用い、試験は5濃度区(175, 350, 700, 1400, 2800 ppm)(n=3)で行った。



図3-1 *Lepidium sativum* (コショウソウ) と *Sinapis alba* (シロガラシ) の自主栽培



図3-2 0.2%ゲランガムを用いた発芽・発根試験

b. ミミズを用いた毒性試験

ミミズを用いた公定試験法や諸外国の化学物質管理制度における試験実施要件について精査し、他の土壌生物試験法と比較してミミズを用いた生態毒性試験の意義・位置を整理した。また既存のミミズ毒性試験法間の違い(目的、特徴など)を明らかにし、試験条件(試験期間、曝露方法、エンドポイントなど)の差異を整理した。対象としたミミズ毒性試験法はOECD テストガイドライン(OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2, Effects on Biotic Systems, No. 207, 220, 222)、ISO試験法(ISO/TC 190 -Soil quality)、OCSPPテストガイドライン(US EPA, Ecological Effects Test Guidelines, 850. 3100)、ASTM規格(ASTM Volume 11.06, Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology,

E1676-12) を対象に調査した。

次に試験推奨種（主にヒメミミズおよびシマミミズ）に関する情報（生態、入手の仕方、飼育方法など）を収集し、シマミミズの適切で安定的な飼育方法について検討した。ミミズの生態については、土壤生態学入門（金子，2007）、土の中の生き物（青木と渡辺，1995）、生態影響試験ハンドブック（日本環境毒性学会，2003）、OECD TG207（OECD，1984）を基に、実際にシマミミズを入手して飼育を実施した。そしてシマミミズを用い、OECD TG207を参考に、人工土壌添加法による標準化学物質（クロロアセトアミド（東京化成）、除草剤のアトラジン（東京化成）および殺菌剤のホウ酸（関東化学））の急性毒性試験を実施し、試験実施の留意点を明らかにした。また、OECD TG207に示されている簡易（スクリーニング）法である、ろ紙を用いた曝露方法の有用性を検討した。



図3-3 シマミミズ (*Eisenia fetida*)

c. ヨコエビを用いた底質毒性試験

底生生物を用いた公定試験法や諸外国の化学物質管理制度における試験実施要件について精査し、底生生物としてのヨコエビを用いた生態毒性試験の意義・位置を整理した。また既存のヨコエビ毒性試験法間の違い（目的、特徴など）を明らかにし、試験条件（試験期間、曝露方法、エンドポイントなど）の差異を整理した。

次に試験推奨種 (*Hyalella azteca*) に関する情報（生態、入手の仕方、飼育方法など）を収集し、国立環境研究所水環境実験施設より *H. azteca* を入手し、適切で安定的な飼育方法を確立した(図3-4)。そして水のみで標準物質等を4日間曝露する急性毒性試験によって感受性確認を行った。試験条件は Environment Canadaの標準物質を用いた試験に準拠し、300 mLのトールビーカーに試験溶液200 mL、基質としてナイロンメッシュ（目開き500 μm 、2.5 cm^2 ）を入れ、生後7日未満の仔虫を2日間給餌（YCT）して順化した個体を1容器当たり10個体曝露した。連数2、3～5濃度区＋対照区で曝露し、24時間毎に生死を観察、96時間後にLC50を算出した。試験物質として標準物質の CuSO_4 （5水和物）と NaCl に加えて、ネオニコチノイド系農薬（アセタミプリド、イミダクロプリド、クロチアニジン、ジノテフラン、ニテンピラム、チアクロプリド、チアメトキサム、和光純薬工業(株)より入手）を供した。



図3-4 ヨコエビの飼育の様子

d. 海産藻類を用いた生長阻害試験

海産藻類を用いた公定試験法について精査し、現時点で海産藍藻類を用いた国際標準法がないことから、OECDテストガイドライン（TG 201）等を元に、新規海産藍藻類を用いた生長阻害試験の開発に着手

した。

新規株の探索は、海産シアノバクテリア *Cyanobium sp.* または *Synechococcus sp.* の複数系統の中から、比較的細胞径が大きく、高増殖率を有する株をスクリーニングし、候補株とした。候補株の評価は、基準物質（3,5-dichlorophenol: 3,5-DCP, $K_2Cr_2O_7$, $CuSO_4$ ）および農薬系試薬（simazine: CAT, diflufenican: DFF）を用い、OECD TG 201が定める基準に従った。

海産シアノバクテリアは、国立環境研究所の微生物保存棟から入手し、試験まで、 $23 \pm 1^\circ C$ 、連続光条件下（ $60-80 \mu E \cdot m^{-2} s^{-1}$ ）で、人工海水（ASW-SN）（表2-2）を用いて振盪培養（100 rpm）した。

5つの試験物質はすべて和光純薬工業株式会社から購入した：3,5-dichlorophenol（an inhibitor of respiration, 3,5-DCP: Lot SDK3769, >98.0%）、simazine（an herbicide that specifically inhibits electron transport from PSII to PSI, CAT: Lot RWN9047, >99.0%）、diflufenican（carotenoid biosynthesis inhibitor, DFF: Lot DCF1628, >99.0%）、 $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ （Lot PKH3685, >99.5%）、potassium dichromate（ $K_2Cr_2O_7$: Lot HWP7907, >99.5%）。試験物質は、蒸留水かN,N-dimethylformamide（DMF）を用いてASW-SNに溶解した。DMFは、OECD TG 201に従い、最終濃度 $100 \mu l/L$ 以下とした。生長阻害試験は基本的にOECD TG201に従って行った。試験開始の3日以上前から藻体の前培養を開始し、本試験までに対数増殖期を維持した。培養容器には、乾熱滅菌済み（ $180^\circ C$ 、3時間）300 mlフラスコおよびアルミ製フタを用いた。継代は、クリーンベンチ内で100mlのASW-SN培地をみたした滅菌済み300 mlフラスコに、あらかじめ分光光度計U-2000（Hitachi, Tokyo, Japan）を用いて細胞数を算出した元株から、細胞濃度が 10^6 cells/mLになるように適量播種することでおこなった。

本試験も同様に、クリーンベンチ内で試験物質を含む100mlのASW-SN培地をみたした滅菌済み300 mlフラスコに、あらかじめ分光光度計U-2000（Hitachi）を用いて細胞数を算出した元株から、細胞濃度が 10^6 cells/mLになるように適量播種することで開始した。

表3-1 人工海水（ASW-SN）の組成

Component	g / L	* Component	mg
NaCl	25.0	$Na_2EDTA \cdot 2(H_2O)$	580
$MgCl_2 \cdot 6(H_2O)$	2.0	$FeCl_3 \cdot 6(H_2O)$	422
KCl	0.5	$ZnSO_4 \cdot 7(H_2O)$	2.93
$NaNO_3$	0.75	$CoCl_2 \cdot 6(H_2O)$	1.33
$K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$	0.03	$MnCl_2 \cdot 4(H_2O)$	24.0
$CaCl_2 \cdot 2(H_2O)$	0.5	Na_2SeO_3	2.30
$MgSO_4 \cdot 7(H_2O)$	3.5	$Na_2MoO_4 \cdot 2(H_2O)$	839
Tris	1.1	$NiCl_2 \cdot 6(H_2O)$	0.37
Trace metal*	100 μl	Distilled water	100 mL
pH	8.1		

e. 胚の死亡と孵化・仔魚期の致死・亜致死影響に着目した試験

生物史の1局面だけをエンドポイントとした試験魚類の生活史の中で最も化学物質に対して鋭敏な時期とされている、胚・仔魚期における化学物質の致死・亜致死性の影響を観察する試験を実施した（図3-5）。既にOECDテストガイドラインNo. 212として上記の試験法は存在しているが、特に胚の死亡と孵化・仔魚期の致死・亜致死影響に分けていくつかの物質について比較試験を行った。被験物質は、アミン類10物質を用いた。

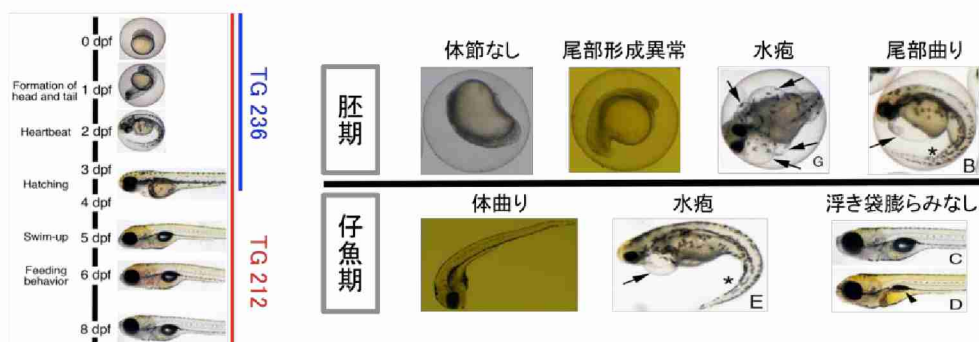


図3-5 TG236 (FET)とTG212の比較の模式図・亜致死影響のエンドポイント

試験に用いたゼブラフィッシュ (*Danio rerio*) は国立環境研究所において10年以上累代飼育している個体(NIES-R系統)を使用した。本試験では医薬品有効成分5物質、農薬5物質、重金属4物質、芳香族化合物4物質、アニリン様物質2物質を用いて、OECD TG No. 212 with minor modification (OECD, 1998)に基づいて行った。本試験のエンドポイントは「致死影響」、「胚発生異常」とした。胚発生異常は、浮腫、体曲がり、浮き袋膨らみなしとした(図3-6)。

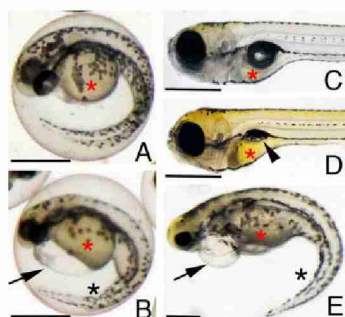


図3-6

(A, B) 受精後3日での胚発生異常. (A) ノーマル個体, (B) 胚発生異常を有した個体.

(C-E) 受精後8日(孵化後5日)でも発生異常. (C) ノーマル個体, (D) 浮き袋膨らみなしの個体, (E) 発生異常を有した個体.

矢印; 浮腫, 矢頭; 浮き袋膨らみなし, 黒色アスタリクス; 体曲がり, 赤色アスタリクス; ヨークサック, スケールバー; 0.5 mm

(2) 特殊な物性や作用を持つ物質を対象とした評価法の開発

特殊な物性や作用をもつ物質のうち、ネオニコチノイド系殺虫剤は、ミジンコ類に対する感受性が低い一方で、ユスリカなど昆虫類に対する感受性が高いことが分かっている。そのため、2016年3月より農薬取締法において、①今後我が国において新たに登録を受けようとする殺虫剤、及び②既に登録されているニコチン性アセチルコリン受容体又はGABA 受容体に作用する殺虫剤(ネライストキシシン系殺虫剤を除く。)についてユスリカ幼虫試験成績を要求することとされた。試験法はOECDテストガイドラインNo. 235 (OECD TG 235) に準拠するが、外来種の *Chironomus riparius* を推奨種としており、国内で推奨種とされている *Chironomus yoshimatsui* に関する知見はほとんどない。そこで *C. yoshimatsui* を用いた際の問題点を探り、導入の妥当性を検討した。

国立環境研究所水環境実験施設において飼育されている *C. yoshimatsui* から産出後1-2日以内の卵塊を入手し(図3-7)、活性炭ろ過清澄水道水(飼育とほぼ同質)約20 mLの入ったガラスシャーレ(直径7cm)にて、ふ化まで $23 \pm 1^\circ\text{C}$ 、16時間明8時間暗条件で培養した。産卵後約2日でふ化した後、1卵塊あたり粉末飼料(クランブル)を約1mgまたはYCT(リーセンテック社)を0.4 mL与えた。ふ化後約3日で2齢幼虫になることから、ふ化後24時間以内に曝露を開始した。試験条件はTG 235に準拠し、1齢幼虫を5個体/容器×4容器/試験区の計20個体ずつ試験溶液に48時間曝露し、24時間毎に遊泳阻害を観察した。*C. yoshimatsui* の1齢幼虫は表面張力によって表面トラップされやすいため、TG 235の試験成立条件(対照区における遊泳阻害率が15%以下)を満たすために、様々な試験条件の検討を行った。検討した条件を表3-2に示す。次に、試験成立条件を満たしたいいくつかの試験条件を用いて、基準物質(KCl, 3,5-ジクロロフェノール、和光純薬製試薬特級)を用いた試験法の検証(感受性確認)を行った。

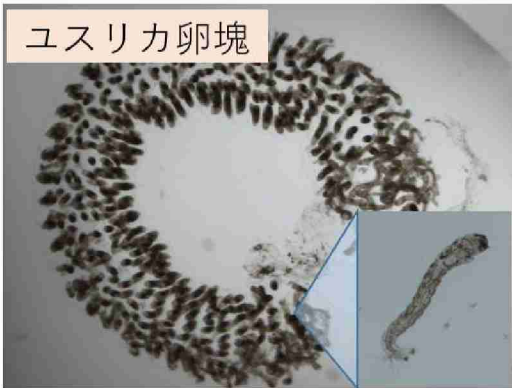


図3-7 ユスリカの卵塊とふ化後24時間以内の1齢幼虫

表 3-2 ユスリカ遊泳阻害試験において水面トラップ防止のために検討した試験条件

項目	条件
Tween 80（界面活性剤）	2μL/L
セチルアルコール	1容器あたり約0.5-1mgを粉末状にして水面に分散させる
ナイロンメッシュ（孔径100 μm）	1容器あたり3cm ² を浸漬
ナフロンテープ（ニチアス株式会社、TOMBO 9001）	容器の水面を覆うように円形にカットし、被膜する
水位（水量）	12～38 mm（20～70 mL）
試験容器のサイズ	スナップカップNo.30, 40, 50（20, 40, 60 mL）
床色の変更	白/黒
光条件	長日（16L明、8h暗）、24h暗所
給餌（ふ化後～試験前）	魚類用粉末飼料（クランブル）、YCT（Yeast, Cerophyll and Trout Chow、リーセンテック社）、量を変化

4. 結果及び考察

（1）生態系を構成する主要生物を用いた試験法の研究

a. 陸生植物の発芽発根試験

図3-8に各植物・試験区の根・シュート長を、図3-9にその阻害率の濃度反応曲線を示した。図3-9より推定すると、本試験のホウ酸714 ppmにおける根・シュート長の阻害率は、*L. sativum*が47.9%, *S. alba*が48.5%, *S. saccharatum*が27.3%であった。MicroBioTest社のPhytotestkitでは、ホウ酸714 ppmにおける平均根伸長阻害率の許容範囲が*L. sativum*で28-62%, *S. alba*で22-65%, *S. saccharatum*で9-52%であり、本試験の適正が実証された。

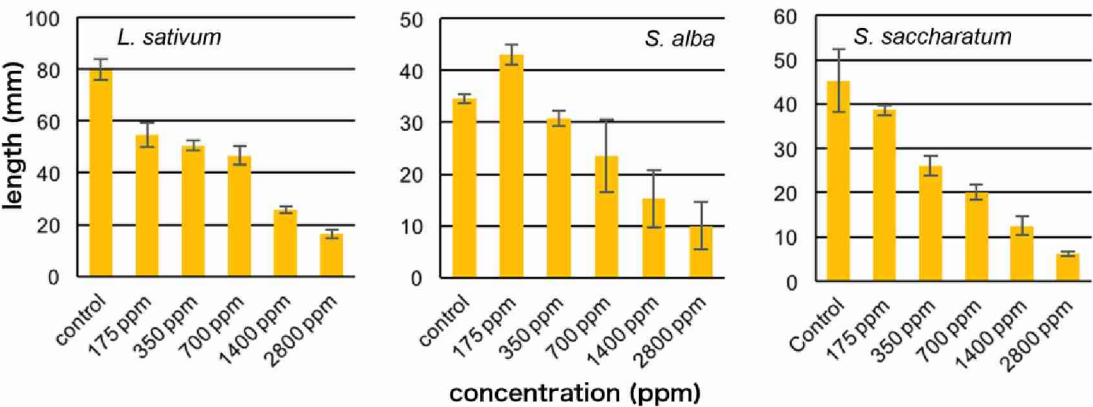


図3-8 *L. sativum* (左), *S. alba* (真ん中), *S. saccharatum* (右)の根・シュート長 (ホウ酸曝露)

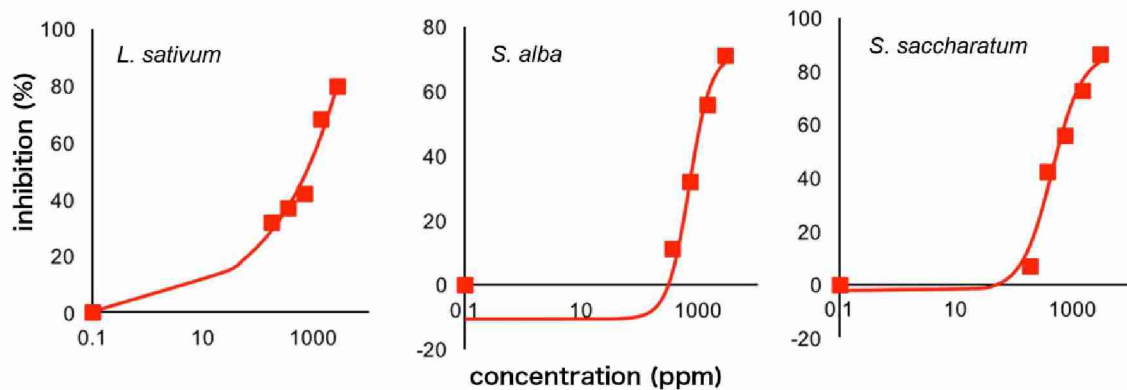


図3-9 *L. sativum* (左), *S. alba* (真ん中), *S. saccharatum* (右)の
根・シュート長阻害率の濃度反応曲線 (ホウ酸曝露)

b. ミミズを用いた毒性試験

表3-3にミミズを用いた諸外国の公定試験法の概要をまとめた。2日～14日間の生存をエンドポイントとした急性毒性試験、28日間の生存・体重をみる亜慢性試験、28日間以上で繁殖をみる慢性毒性試験がある。REACHでは生産量に応じて、年間100トン以上で急性試験、1000トン以上で慢性試験が要求される。まずはOECD TG 207に準拠した急性毒性試験の確立を目指す。

表3-3 ミミズを用いた諸外国の公定試験法の概要

区分	試験法	試験期間	生物種	曝露方法	エンドポイント
急性	OECD TG207	14日	<i>E. foetida</i> (シマミミズ)	土壌添加	致死
	ISO 11268-1	14日	<i>E. foetida</i>	土壌添加	致死
	ISO 17512-1	2日	<i>E. foetida</i>	土壌添加	土壌中生息能
亜慢	OCSPP.850.3100	28日間	<i>E. foetida</i>	土壌添加	致死, 体重減少
慢性	OECD TG220	42日	<i>E. albidus</i> (ヒメミミズ)	土壌添加	繁殖
	OECD TG222	8週間	<i>E. foetida</i>	土壌添加	繁殖
	ASTM E1676-12	28日間	<i>E. foetida</i>	土壌添加	生死, 繁殖等
	ISO 16387	42日	<i>E. albidus</i>	土壌添加	繁殖



図3-10 シマミミズの飼育容器



(直径8.5cm×深さ15cm
深型ガラスシャーレ)

図3-11 人工土壌法の試験容器



(直径3.4cm×長さ9cm
スクリーバイアル50ml)

図3-12 ろ紙法の試験容器

急性試験に用いられているシマミミズ *Eisenia fetida* (Michaelson) は、ツリミミズ科に属し、有機物の豊富な土壌に生息する。日本では主に北海道に生息しているが、北海道以南においても釣り餌として飼育・販売されており、試験用シマミミズは有限会社相模浄化サービス（神奈川県伊勢原市）などから購入できる。諸外国の公定法には、いずれも飼育についての記載があり、供試ミミズは卵包から飼育し、生育段階を合わせることを推奨している。シマミミズの一般的な飼育方法について相模浄化サービスより聞き取り調査を行い、図3-10に示すポリプロピレン容器に飼育用土壌、餌の完熟堆肥、乾燥防止の新聞紙を用いた飼育方法を確立した。

次にOECD TG207に準拠し、人工土壌法とろ紙法の比較を行った。試験物質としてクロロアセトアミド、ホウ酸、アトラジンを用いた。人工土壌法では石英砂(70%)、カオリン(20%)、ピートモス(10%) からなる人工土壌に水分含量約35-40%になるように超純水または試験溶液（クロロアセトアミド、ホウ酸）を加えた。pHは炭酸カルシウムを加えて6.0±0.5に調製した。難水溶性のアトラジンはアセトン溶液を石英砂に添加し、窒素を吹き付けてアセトンを除去した後、超純水で人工土壌を調製した（図3-11）。ろ紙法では試験容器（50 mLバイアル）の内側にろ紙を貼り付け（図3-12）、クロロアセトアミド、ホウ酸は超純水に溶解させた試験溶液1 mLをろ紙に添加した。アトラジンはアセトン溶液1 mLを添加後、窒素を吹き付けてアセトンを除去した後、超純水を1 mL添加した。

供試個体は300～600 mg/個体のものを飼育容器から取り出して洗浄し、非汚染の人工土壌に移して24時間、ろ紙の入った容器に移して3時間、それぞれ馴化した後、試験に供した。人工土壌法では10個体／容器×2連、試験期間は14日間（7日後と14日後に生死を確認）、ろ紙法では1個体／容器×5連、試験期間3日間とし、それぞれ暗所、20±2℃、無給餌で行った。

人工土壌法ではクロロアセトアミドに対する7d-LC50は40 mg/kg、14d-LC50は36 mg/kg、ホウ酸の7d-LC50は1800 mg/kg、14d-LC50は1300 mg/kg、アトラジンは最高濃度1000 mg/kgでも対照区に対する死亡率0%であった。一方、ろ紙法の3d-LC50は、クロロアセトアミド0.017 mg/cm²、ホウ酸0.21 mg/cm²、アトラジン0.0022 mg/cm²であった（表3-4、図3-13）。ろ紙重量からmg/kgに換算すると、それぞれ130 mg/kg、16000 mg/kg、170 mg/kgとなり、人工土壌法14d-LC50の3.7倍、12倍、>0.17倍であった（表3-4）。

表3-4 シマミミズを用いた人工土壌法とろ紙法によるLC50の比較

化学物質	人工土壌LC50 mg/kg	暴露時間 day	ろ紙LC50 mg/cm ² (mg/kg)	暴露時間 hour	ろ紙 /土壌	参照
アトラジン	>1000	7	>0.030 (>2300)	48	2.3	1
	>1000	14	0.0022 (170)	72	0.17	1
	381	28	-	-	-	2
	-	-	0.00290	96	-	3
	200	14d	0.00625	48	-	4
クロロアセトアミド	40	7	0.0055 (340)	48	8.5	1
	36	14	0.0017 (130)	72	3.7	1
ホウ酸	1800	7	0.32 (24000)	48	13	1
	1300	14	0.21 (16000)	72	12	1
イベルメクチン	56.3	14	0.00440	48	-	5
シベルメトリン	1270	14	0.0106	48	-	5
カルボスルファン	130	14	0.0758	48	-	5
クロルピリフォス	385	14	0.0142	48	-	5
アセタミピリド	1.52	14	0.0000088	48	-	5

1: 本検討により決定された値、2: Moslehら(2003)により報告された値、3: Lydyら(2003)により報告された値、4: Chenら(2014)により報告された値、5: Wang,ら(2012)により報告された値
ろ紙/土壌: 本検討で使用したろ紙の単位面積当たりの重量より、ろ紙接触試験の毒性値を単位mg/kgに換算することで、ろ紙接触試験と人工土壌試験の毒性値を比較

既報の農薬や殺菌剤16物質の結果と合わせて、人工土壌法の14d-LC50 (mg/kg) とろ紙法の3d-LC50 (mg/cm²) の相関図を作成すると (図3-14)、ろ紙法の結果は人工土壌法の結果の1/1000でおおよそ相関しており、3物質を除いて1/10~10倍の範囲内であった。従って両試験には相関性があり、ろ紙法は人工土壌法のスクリーニング試験として有効であることが示された。ただし、今回試験した難水溶性物質のアトラジンは、人工土壌法では1000 mg/kgでも毒性を示さず、既報やろ紙法との相関分布からも異なる結果であったことから、難水溶性物質の曝露方法については更なる検討が必要である。

また、試験法の課題として、人工土壌法において試験成立条件 (対照区での死亡率10%以下) を達成することが困難であることが挙げられた (図3-13左)。これは水分量を35%から40%に増加させることで改善できることが分かった。さらに、ろ紙法での試験溶液の添加を均一にするため、色素溶液を用いた検討を行った結果、1.0 mLから1.5 mLに増量して複数回に分けて添加することでより均一になり、1 mLのときと同様な試験結果が得られた (図3-13右)。

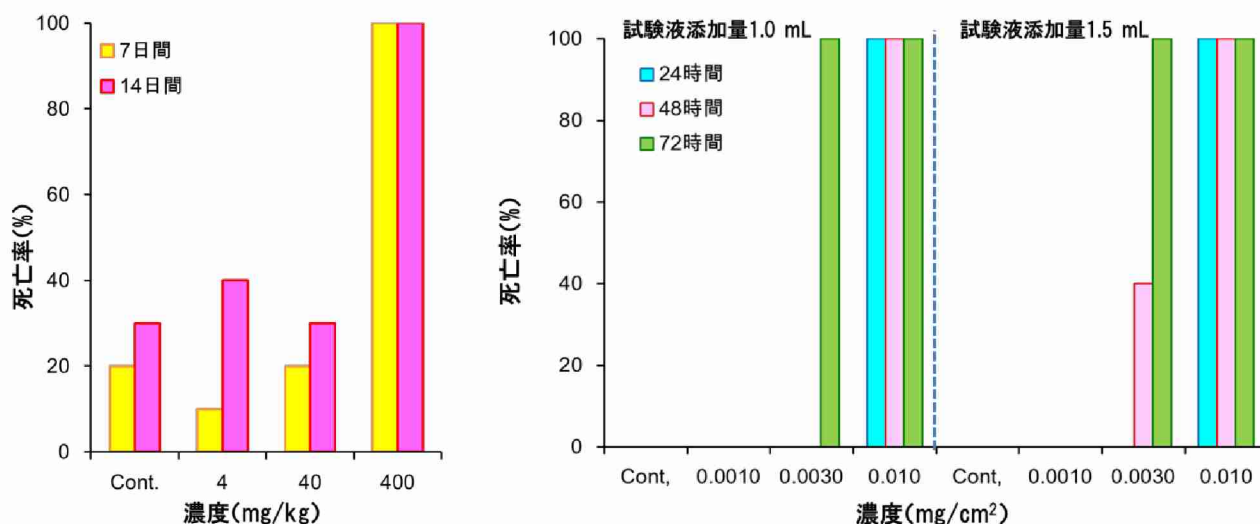


図3-13 クロロアセトアミドに対するシマミミズの死亡率 (左) 人工土壌法、(右)ろ紙法

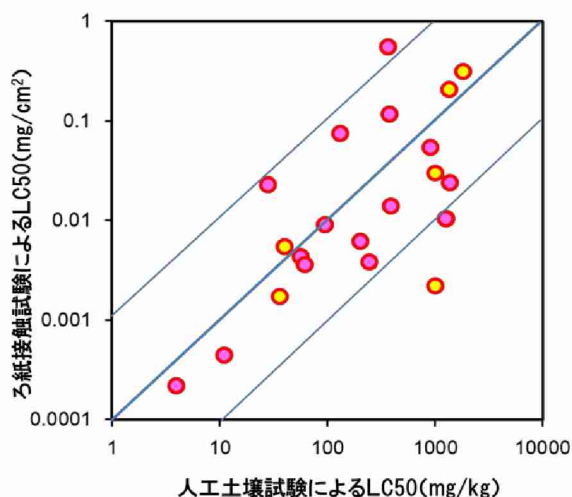


図3-14 本検討の3物質 (黄色) と既報の16物質 (赤色) に対する人工土壌法 (7dまたは14d-LC50 [mg/kg]) とろ紙法 (2dまたは3d-LC50 [mg/cm²]) の感受性比較

c. ヨコエビを用いた底質毒性試験

底生生物としてのヨコエビを用いた生態毒性試験の意義・位置づけを表3-5に整理した。欧州化学機関 (ECHA: European Chemical Agency) のリスク評価ガイドラインでは、底質リスク評価において、生息場、食餌形態、生物分類、生活段階の異なる3種の底生生物の毒性試験データ (長期毒性データを優先)

を取得することを推奨している。試験法としてOECDテストガイドラインやISO、ASTMなど様々な公定法が認められているが、試験生物としてOECDテストガイドラインのあるユスリカ、オヨギミミズの2種に加えて、第三種としてヨコエビが想定されている。加えてヨコエビの*Hyalomma azteca*はISO試験に承認されていること、他の底生生物と比べて比較的感受性が高い（ヨコエビ≧ユスリカ>>オヨギミミズの順）こと、化審法で用いられているセスジユスリカと異なり棲管を作らず、デトリタス食者であること等から、ヨコエビを用いた底質毒性試験法の開発に着手した。

表3-5 ヨコエビ（特に*Hyalomma azteca*）を用いた底質毒性試験の評価

項目	評価
試験法の科学的検証	米国、カナダにおいて開発。試験機関間試験を実施済み
国際標準化	ISO試験に承認（OECDテストガイドラインは未提案）
試験実績	REACHやTSCAなど諸外国の化学物質管理枠組みで試験実績がある
感受性	底生生物（ユスリカ、オヨギミミズ、ヨコエビ、カイミジンコ等）の中で比較的感受性が高い
飼育のしやすさ	底泥なしでも実験室で飼育・繁殖可能
生息形態	川底などの落ち葉の裏側に生息。Epibenthic*で底泥表層に潜掘する。底泥の物理化学的性質（粒径分布、有機物量など）に耐性がある。
食餌形式	デトリタス食者（動植物の破片を食べる） バクテリアや藻類を選択的に摂食するとの報告あり（US EPA, 2000）
生息分布	主に北米に生息。日本には生息してない。

* 底泥表層の基質の上または下で生息していることを指す。狭義では底泥表層を這って生息していること。

表3-6 ヨコエビを用いた公定試験法の概要

区分	試験法	試験期間	供試験	曝露方法	エンドポイント
急性	OCSPP.850.1735 EPA 600/R-99/064 ASTM E1706-05	4日	7-14日齢	水のみ (≥100 mL), 止水式	致死
	ISO 16303, Environment Canada ¹	4日	2-9日齢	水のみ (200 mL), 止水式	致死
亜慢性	OCSPP.850.1735 EPA 600/R-99/064 ASTM E1706-05	10日	7-14日齢	底泥添加 (底質100mL+水175 mL), 半止水/流水式	致死, 成長
	ISO 16303	14/28日	2-9日齢	底泥添加 (底質100mL+水175 mL), 止水/半止水式	致死, 成長
	Environment Canada	14日	2-9日齢	底泥添加 (底質55/100mL+水220/175 mL), 止水/半止水式	致死, 成長
慢性	EPA 600/R-99/064 ASTM E1706-05 Annex A6	42日	7-8日齢	底泥添加 (Day0-28: 底質100mL+水175 mL)→水のみ (Day28-42:175-275 mL), 半止水式/流水式	致死, 成長, 繁殖

¹ Environment Canada (2014) EPS1/RM/33

次に淡水産ヨコエビを用いた公定法の概要を表3-6にまとめた。4日間水のみで曝露する急性試験は感受性確認試験として位置づけられている。US EPAでは7-14日齢を用いた10日間の試験を亜慢性試験としている。繁殖をエンドポイントとした慢性試験は42日間と長期を要することから、まずは亜慢性試験の導入を行う。同類試験のISOおよびEnvironment Canadaの試験法では2-9日齢を用いて14日間曝露してい

る。一部の化学物質で供試齢7日未満の方が高い感受性を示したデータがあることから（US EPA 2002）、ISO/Environment Canadaの2-9日齢・14日間試験に準拠して今後の検討を行う。

水のみで4日間曝露する感受性試験の結果（表3-7）、標準物質のCuとNaClのLC50は、既存文献（Cooyardら、1994；Suedelら、1996；その他ECOTOXデータベース）の結果と同程度であり、十分な感受性を示したと言える。ネオニコチノイド農薬は*H. azteca*のデータが限られているため、他のヨコエビ（*Gammarus pulex*）または最も感受性が高い種（淡水産）の急性毒性値EC50（農環研、2016）と比較すると、チアメトキサム、アセタミプリドのLC50は、フタバカゲロウ、*Gammarus*属のヨコエビのEC50に比べて低く、感受性が高かった。クロチアニジンは既存の*H. azteca*のデータと同程度である一方、チアクロプリドとイミダクロプリドは既存文献と比べてLC50が1桁高かったため、再現性と曝露濃度の確認が必要である。このように構造が類似したネオニコチノイド内でも感受性に差があることが分かった。

表3-7 標準物質およびネオニコチノイド農薬のLC50（水のみ曝露）

Unit: ppb	<i>Hyaella azteca</i>		既存文献（その他の甲殻類）	
	96h-LC50	95% CI	LC50/EC50	Test species
Cu (CuSO ₄)	68.2	38.4-97.9	35-66	<i>H. azteca</i> (96h-LC50) ^{1,2}
NaCl	3.52 g/L	-1.77-8.80	1.4-5.8	<i>H. azteca</i> (96h-LC50) ³
チアメトキサム	1.1	0.77-1.5	14	<i>Cloeon</i> sp. ⁴
アセタミプリド	4.8	-54.7-64.3	50	<i>Gammarus pulex</i> (96h-LC50) ⁵
クロチアニジン	9.1	-3.09-21.4	12.52	<i>H. azteca</i> (96h-LC50) ⁶
ジノテフラン	89.3	71-107	10.4	<i>Cheumatopsyche brevilineata</i> ⁴
ニテンピラム	127	103-151	45	<i>Cheumatopsyche brevilineata</i> ⁴
チアクロプリド	245	165-324	37	<i>H. azteca</i> (96h-LC50) ⁷
イミダクロプリド	560	348-771	65.4	<i>H. azteca</i> (96h-LC50) ⁸

Cloeon sp.: フタバカゲロウ、*Gammarus pulex*: ヨコエビ、*Cheumatopsyche brevilineata*Baetis: コガタシマトビケラ

¹ Cooyardら(1994), ² Suedelら (1996), ³ US EPA, ECOTOX, ⁴ 国立研究開発法人農業環境技術研究所(2016), ⁵ Beketov MA. & Liess M (2008), ⁶ De Perre Cら(2015), ⁷ US EPA (1992), ⁸ Stoughton SJら(2008)

d. 海産藻類を用いた生長阻害試験

評価試験に基づき、海産シアノバクテリア *Cyanobium* sp. (NIES-981) を（外洋環境に対応した）新規生長阻害試験法の候補株とした。NIES-981は、新規に開発した人工海水培地を用いた、23℃、連続光（60-80 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ）条件下において、OECD TG 201が定める試験基準値を十分満たすことが分かった（対象区の増殖率：約40倍、日間生長速度の平均変動係数：約11%、繰り返し間の生長速度の変動係数：約2%）（図3-15）。

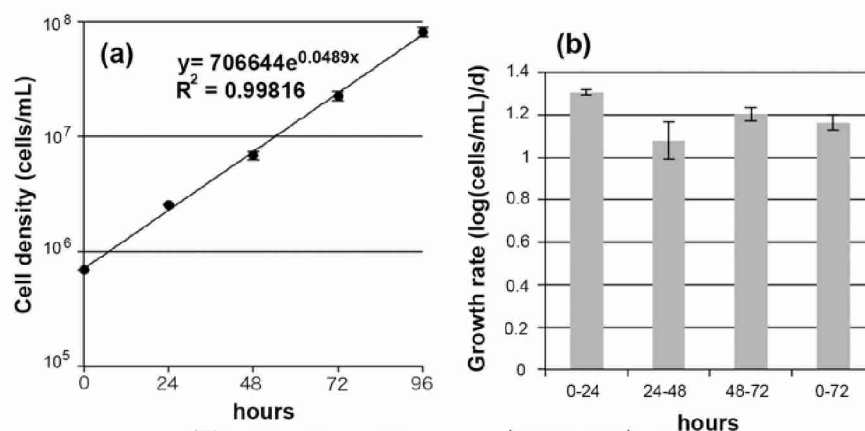


図3-15 *Cyanobium* sp. (NIES-981) の

培養96時間後の生長量 (a) と区間生長量 (b) エラーバーは標準偏差 (n=6)

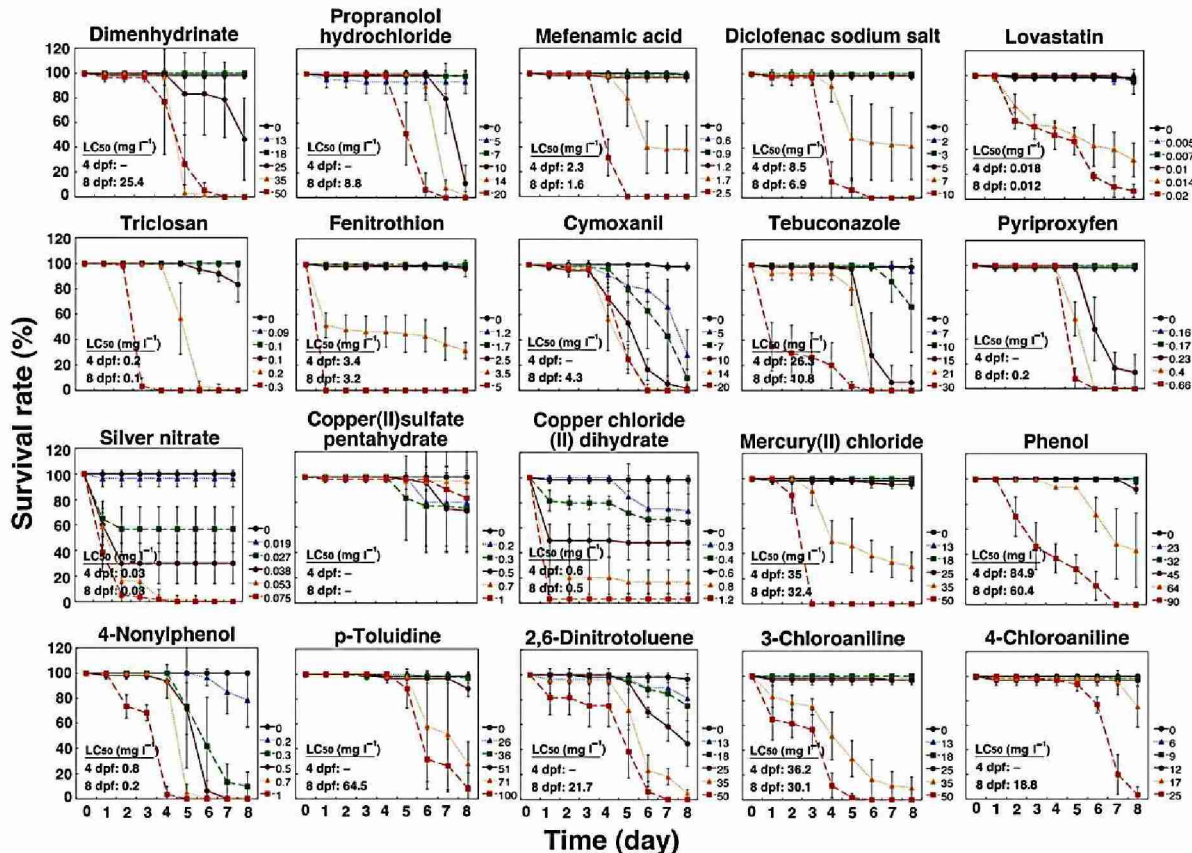


図3-16 ゼブラフィッシュ胚期及び仔魚期における生残率。

値は平均±標準偏差 (n=4). - ; LC₅₀が計算不可. LC₅₀; 50%致死濃度. Dpf ; 受精後日数.

表3-8 試験化学物質ばく露によって得られた各エンドポイントのEC₅₀及びLC₅₀値

Chemical type	Chemical	LC ₅₀ (mg L ⁻¹)		EC ₅₀ (edema) (mg L ⁻¹)		EC ₅₀ (body curvature) (mg L ⁻¹)		EC ₅₀ (absence of swim-bladder inflation) (mg L ⁻¹)
		4 dpf	8 dpf	4 dpf	8 dpf	4 dpf	8 dpf	8 dpf
Active pharmaceutical ingredients	Dimenhydrinate	>50	25.41 (22.78 < * < 28.26)	>50	30.48 (26.45 < * < 39.39)	41.55 (39.02 < * < 44.72)	45.58 (31.84 < * < 84.61)	16.35 (15.61 < * < 17.04)
	Propranolol hydrochloride	>20	8.81 (8.38 < * < 9.25)	>20	10.92 (9.6 < * < 12.90)	>20	24.58 (12.81 < * < 71.29)	5.33 (4.82 < * < 5.99)
	Mefenamic acid	2.33 (2.21 < * < 2.48)	1.69 (1.61 < * < 1.76)	1.7 (1.63 < * < 1.76)	>1.78	2.57 (2.40 < * < 2.85)	>1.78	1.71 (1.61 < * < 1.84)
	Diclofenac sodium salt	8.5 (8.12 < * < 8.91)	6.95 (6.68 < * < 7.19)	7.8 (7.15 < * < 8.86)	>7.14	9.52 (8.33 < * < 11.93)	>7.14	7.86 (6.82 < * < 10.01)
	Lovastatin	0.018 (0.016 < * < 0.02)	0.012 (0.012 < * < 0.013)	0.008 (0.007 < * < 0.012)	0.008 (0.005 < * < 0.012)	<0.019	0.008 (0.008 < * < 0.009)	0.006 (0.006 < * < 0.0067)
	Triclosan	0.27 (0.26 < * < 0.30)	0.18 (0.18 < * < 0.21)	>0.25	>0.18	>0.25	>0.18	0.14 (0.13 < * < 0.14)
Pesticide	Fenitrothion	3.42 (3.27 < * < 3.58)	3.24 (3.10 < * < 3.39)	3.2	3.52 (3.23 < * < 4.00)	3.65 (3.24 < * < 4.23)	3.4 (3.03 < * < 3.760)	2.25 (2.14 < * < 2.37)
	Cymoxanil	>20	4.31 (3.47 < * < 4.88)	1.57 (1.14 < * < 1.97)	<5.2	>20	<7.2	<5.2
	Tebuconazole	2634 (25.07 < * < 27.68)	10.87 (10.35 < * < 11.49)	19.49 (18.32 < * < 20.94)	10.14 (9.60 < * < 11.07)	27.6 (24.17 < * < 34.23)	>10	11.03 (10.30 < * < 12.76)
	Pyriproxyfen	>0.66	0.22 (0.2 < * < 0.22)	>0.66	>0.23	>0.66	>0.23	>0.23
	Phenol	84.93 (80.94 < * < 89.41)	60.43 (57.34 < * < 63.65)	59.55 (56.52 < * < 62.89)	55.38 (52.26 < * < 59.36)	63.91 (58.85 < * < 70.86)	51.75 (48.79 < * < 55.88)	33.03 (31.93 < * < 34.44)
Metal	4-Nonylphenol	0.81 (0.77 < * < 0.85)	0.29 (0.27 < * < 0.30)	>1	>1	0.22 (0.14 < * < 0.26)	0.28 (0.13 < * < 0.63)	0.23 (0.18 < * < 0.27)
	p-Toluidine	>100	64.55 (60.83 < * < 68.59)	>100	53.42 (49.39 < * < 59.14)	99.53 (87.46 < * < 120.54)	81.45 (70.44 < * < 102.94)	39.93 (37.78 < * < 42.36)
	2,6-Dinitrotoluene	>50	21.75 (20.16 < * < 23.40)	15.65 (14.40 < * < 16.80)	23.43 (19.98 < * < 32.90)	>50	21.66 (19.54 < * < 25.34)	12.13 (10.27 < * < 12.86)
	3-Chloroaniline	36.26 (34.41 < * < 38.29)	30.19 (28.86 < * < 31.53)	29.74 (28.31 < * < 31.48)	29.97 (27.66 < * < 32.48)	40.49 (36.03 < * < 48.52)	29.97 (27.66 < * < 32.48)	17.67 (16.50 < * < 18.95)
	4-Chloroaniline	>25	18.85 (17.89 < * < 19.94)	>25	>17.28	>25	>17.28	9.88 (9.30 < * < 10.49)

< * > shows 95% confidence limit.

次に感受性評価試験では、基準物質 (3,5-dichlorophenol: 3,5-DCP, K₂Cr₂O₇, CuSO₄) および農薬系

試薬 (simazine: CAT, diflufenican: DFF) を任意の濃度で曝露後、阻害率を算出し反応曲線を作成した (図3-16)。反応曲線からEC₅₀値を算出し、他の試験株との感受性比較を行った (表3-8)。NIES-981は、3,5-DCPおよびCATに対し、淡水産試験株*Pseudokirchneriella subcapitata*と同等の感受性を有することを明らかにした。しかしながら、重金属類では、*P. subcapitata*に比較し低い感受性を示した。他の海産藻類における重金属類の試験は、これまでほとんど行われていないが、NIES-981のCu²⁺感受性は、海産藻類の中では高いことが明らかになった (*Prorocentrum minimum*の約25倍, *Tetraselmis suecica*の約73倍, *Heterocapsa triquetra*の約13倍など) (Millán de Kuhn et al. 2006; Ebenezer and Ki 2013)。

以上のことから、NIES-981は、重金属類に対しては淡水産試験株と比較して低い感受性を示すものの、海産藻類の中では高い感受性を有すると考えられた。したがって、他の薬剤・重金属類を用いた追加試験は必要であるものの、NIES-981は海産藻類の試験株として有用であると結論した。

e. 胚の死亡と孵化・仔魚期の致死・亜致死影響に着目した試験

化学物質に対する致死影響の結果を図3-17に示す。全ての試験で対照区の致死率は2%未満であった。さらに、致死率は濃度依存的に増加していた。次に胚期と仔魚期での致死率の変化について検討した結果、ロバスタチン、フェニトロチオン、硝酸銀、硫酸銅、塩化銅 (Ⅱ) 二水和物、塩化水銀 (Ⅱ)、3-クロロアニリンを除く全ての物質のばく露区において孵化後に死亡率が増加していた。Di Paolo et al (2015) は、dioxin-like pollutant PCB-126をゼブラフィッシュにばく露した場合でも同様の報告をしている。さらに、化学物質に対する急性毒性影響が孵化前と孵化後で異なること (Mu et al, 2013; Yang et al; 2016)、卵殻は銀ナノ粒子の卵内への輸送を妨げることが報告されている (Kim and Tanguay, 2014)。これらの結果から、化学物質の魚類に対する致死影響を正確に評価するためには、胚期だけでなく仔魚期も用いて行う必要があると考えられる。

次に、胚期 (4dpf) と仔魚期 (8dpf) における各発生異常のEC₅₀の結果を表3-9に示す。全ての試験で対照区の発生異常率は2%未満であった。硝酸銀、硫酸銅、塩化銅 (Ⅱ) 二水和物を除く全ての化学物質ばく露区で浮腫と体曲りを有した個体が観察された。浮く袋の膨らみは受精後5日目 (孵化後2日目) で認められた。そのため、浮き袋膨らみなしについては胚期ではその影響を検出できなかった。硝酸銀を除く全ての化学物質ばく露によって浮き袋の膨らみに影響が認められ、そのEC₅₀は浮腫や体曲りのEC₅₀やLC₅₀より低い傾向にあった。「スイムアップ」行動は浮き袋を膨らませるために必要な行動であり、浮き袋の膨らみは魚の遊泳能力に必要不可欠な要素である (Lindsey et al, 2010)。本研究ではOECD TG No. 212を用いて、受精後8日目で化学物質が浮き袋の膨らみに影響を与えるか否かを評価することが可能であった。そのため、化学物質の亜致死影響を正確に評価するため場合においても、胚期だけでなく仔魚期も用いて行う必要があると考えられる。

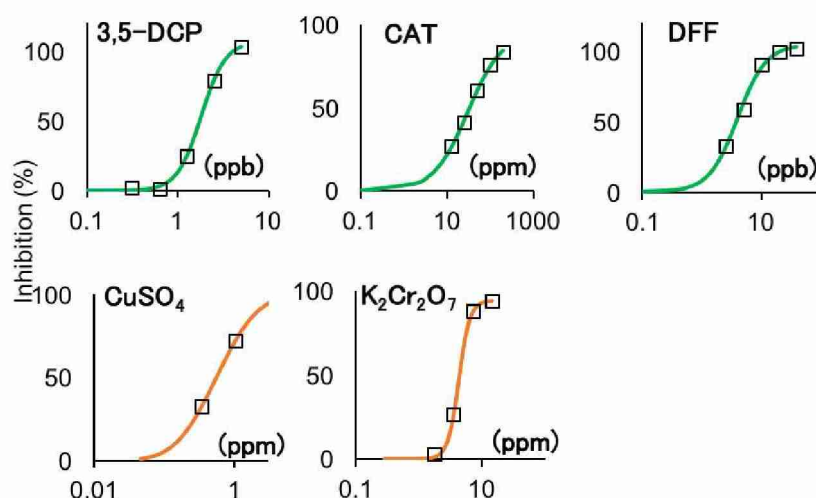


図3-17 基準物質と農薬系物質の反応曲線

表3-9 *Cyanobium* sp. (海産藍藻類) と *Pseudokirchneriella subcapitata* (淡水産緑藻類) とのEC₅₀ およびNOECとの比較

	<i>Cyanobium</i> sp. (NIES-981)				<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>		
	72-h EC ₅₀	72-h EC ₁₀	72-h EC ₅	NOEC	72-h EC ₅₀	72-h EC ₁₀	NOEC
3'5-DCP (mg/L)	1.71 (1.60-1.82)	0.940 (0.934-0.947)	0.793 (0.534-0.896)	0.625	1.8-2.3 ^{1,2}	0.91 ²	0.75 ¹
CAT (μg/L)	105 (94.7-118)	26.8 (24.2-28.4)	18.2 (15.3-20.3)	12.5	100-297 ^{3,4,5}	-	10 ⁵
DFF (μg/L)	4.10 (3.70-4.62)	1.26 (1.23-1.28)	0.902 (0.733-1.25)	0.750	0.27-1.23 ^{6,7}	-	-
Cu ²⁺ (mg/L)	0.550 (0.475-0.632)	0.139 (0.0793-0.203)	0.0947 (0.045-0.135)	0.113	0.0075-0.047 ^{8,9}	0.012 ⁸	0.0018-0.01 ^{8,9}
Cr(VI) (mg/L)	4.61 (4.24-4.96)	2.19 (2.06-2.23)	1.77 (1.27-2.13)	1.76	0.30-0.488 ^{1,2}	0.092 ²	0.064 ¹

¹Comber et al. (1995); ²Mayer et al. (1998); ³Okamura et al. (2000); ⁴Pérez et al. (2011); ⁵Sbrilli et al. (2005); ⁶Katsumata et al. (2009),

⁷Weyman et al. (2012); ⁸Franklin et al. (2002); ⁹Radix et al. (2000)

(2) 特殊な物性や作用を持つ物質を対象とした評価法の開発

ユスリカ幼虫遊泳阻害試験 (OECD TG235) について、日本在来種のセスジユスリカ *C. yoshimatsui* を用いる場合、一齢幼虫は容易に水面にトラップ・死亡してしまい、試験成立条件 (対照区の遊泳阻害率 15%以下) の達成が困難であることが分かった。対照区における生存率を向上させるため、様々な水面防止方法を検討した結果、界面活性剤 (Tweenまたはセチルアルコール) の添加とメッシュの浸漬が効果的であることが分かった (図3-18)。ナフロンシートによる被膜、床色の変更、光条件の変化は効果を示さなかった。試験容器および試験溶液量は、同水位では表面積が大きいほど遊泳阻害率が低くなるが、表面積が小さい場合には水位が高いほど遊泳阻害率が低くなる傾向があった。界面活性剤は手技によらず生存率を確保できる可能性が高いが、界面活性剤と試験物質との複合影響が懸念される。よって物理的手法の方が望ましいが、投入時にユスリカが極力空気に触れないよう、手技の習得が必要である。試験開始前の給餌は、粉末飼料の場合、棲管を形成して固着してしまうことが分かった。一方YCTの場合はD0の低下によって生存率が低下した。いずれにしても給餌量が多すぎると試験中に2齢幼虫になる場合があり、感受性の変化に注意が必要である。

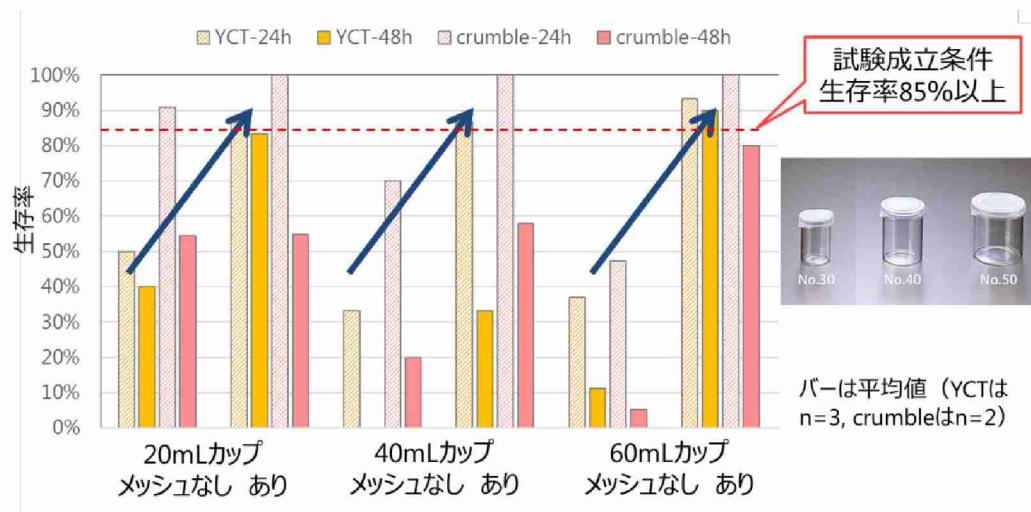


図3-18 メッシュの有無・試験容器・給餌種類による生存率の比較 (水量は20mLで共通)

5. 本研究により得られた成果

(1) 科学的意義

生物試験法についての網羅的な調査結果から、我が国で今後必要とされるであろう、陸生植物、土壤生物、底生生物などの生物試験方法について、その国内への導入可能性を図った。国内の環境条件や国内種の適用などの検討を行い導入に向けて良好な結果が得られた。また、EUではインビトロ試験としてゼブラフィッシュの胚試験が活発に行われているが、その試験法と我々が推奨している試験法 (TG212)

の感受性比較を行った。さらに、メダカまたはミジンコを用いた長期・多世代影響試験法についての詳細な検討を行い、実行可能性を示すことができた。昆虫の内分泌かく乱化学物質の様に特殊な物性・作用を持つ新興化学物質の評価手法の *in vitro* 毒性試験の開発導入を行った。効率的化学物質管理および国際データ互換 (MAD) を考慮し、我が国における生態毒性試験法の整備と国際標準化に向けて着実な成果を上げた。

(2) 環境政策への貢献

<行政が既に活用した成果>

- 1) ネオニコチノイドの評価系の一つである国内産ユスリカを用いた急性毒性試験は、農薬取締法の中で試験実施が決められたが、民間の試験機関内でうまく実施することが出来なかった。生態影響に関する化学物質審査規制/試験法セミナー (「国民との科学・技術対話」の実施) を通じてノウハウを伝える事により試験実施が実現した。
- 2) EUで採用されているゼブラフィッシュの胚試験 (FET) を日本でも急性毒性試験の代替法として採用できるかどうかの検討がされていたが、化学物質の卵膜透過性などの問題があることが本研究の初期胚仔魚試験法 (TG212) の感受性比較から明らかとなり、FETの採用可否判断の材料となった。

<行政が活用することが見込まれる成果>

海外で実際に使用されている生物試験についての調査を行い、我が国で新たに必要な生態毒性試験法の提案およびそれらを含む生態毒性試験体系の再構築を目指し、化審法を含む化学物質管理に係わる法律の中で、次世代の生態毒性試験のあり方、標準化および国際化に資する情報を提供することにより環境政策に貢献した。

6. 国際共同研究等の状況

特に記載すべき事項はない。

7. 研究成果の発表状況

(1) 誌上発表

<論文 (査読あり)>

- 1) Horie Y, Yamagishi T, Takahashi H, Shintaku Y, Iguchi T, Tatarazako N, Journal of applied toxicology : JAT, 37, 10, 1245-1253, 2017
- 2) Horie Y, Yamagishi T, Koshio M, Iguchi T, Tatarazako N, Journal of applied toxicology : JAT, 37, 7, 836-841, 2017
- 3) Yamagishi T, Horie Y, Tatarazako N, Chemosphere, 174, 1-7, 2017
- 4) Horie Y, Watanabe H, Takanobu H, Yagi A, Yamagishi T, Iguchi T, Tatarazako N, Journal of applied toxicology : JAT, 37, 3, 339-346, 2017
- 5) Yamagishi T, Yamaguchi H, Suzuki S, Horie Y, Tatarazako N, PloS one, 12, 2, e0171259, 2017
- 6) Yamagishi T, Katsumata M, Yamaguchi H, Shimura Y, Kawachi M, Koshikawa H, Horie Y, Tatarazako N, Ecotoxicology, 25, 10, 1758, 2016

<その他誌上発表 (査読なし)>

特に記載すべき事項はない。

(2) 口頭発表 (学会等)

- 1) 多環芳香族炭化水素類 (PAHs) の底質毒性~オオミジンコ (*Daphnia magna*) とヨコエビ (*Hyalella azteca*) を用いた実験的検討, 谷和音, 渡部春奈, 野口愛, 鎌迫典久, 山本裕史, 山本裕史, 環境化学討論会要旨集, 26th (2017)
- 2) *Pseudokirchneriella subcapitata* (ムレミカヅキモ) の増殖パターンと毒性物質 (3,5 - DCPおよび重クロム酸カリウム) ばく露によるそれらの変化, 山岸隆博, 鎌迫典久, 環境化学討論会要旨集,

26th(2017)

- 3) 水・底質システムにおけるオオミジンコ (*Daphnia magna*) とヨコエビ (*Hyalella azteca*) を用いた生態毒性試験の感受性比較, 谷和音, 渡部春奈, 野口愛, 鎌迫典久, 山本裕史, 日本水環境学会年会講演集, 51st(2017)
- 4) 藻類の遅延発光を用いた簡便な生物応答試験による阻害原因の推定, 勝又政和, 竹内彩乃, 幾島祐子, 佐藤由紀子, 鎌迫典久, 日本水環境学会年会講演集, 51st(2017)
- 5) 海底資源開発水域における生態毒性試験法の開発—海産藻類を用いて—, 山岸隆博, 勝又政和, 山口晴代, 志村遥平, 越川海, 河地正伸, 鎌迫典久, 海洋工学シンポジウム講演要旨集, 26th(2016)
- 6) ミジンコの幼若ホルモンかく乱によるオス仔虫誘導に係るAdverse Outcome Pathwayの構築, 渡部春奈, 阿部良子, 宮川一志, 豊田賢治, 井口泰泉, 鎌迫典久, 日本内分泌かく乱化学物質学会研究発表会要旨集, 19th(2016)
- 7) EXTEND2016における試験法開発の進捗状況について, 鎌迫典久, 日本内分泌かく乱化学物質学会研究発表会要旨集, 19th(2016)
- 8) 幼若ホルモン短期検出法(JHSST)を用いた精油成分中の昆虫ホルモン作用の検出, 阿部良子, 鎌迫典久, 日本内分泌かく乱化学物質学会研究発表会要旨集, 19th(2016)
- 9) メダカ拡張一世代繁殖試験を用いたノニルフェノールの多世代影響評価, 渡部春奈, 堀江好文, 高信ひとみ, 小塩正朗, 高橋裕子, 井口泰泉, 鎌迫典久, 環境化学討論会要旨集, 25th(2016)

(3) 出願特許

特に記載すべき事項はない。

(4) 「国民との科学・技術対話」の実施

- 1) 生態影響に関する化学物質審査規制/試験法セミナー (平成29年度)
大阪会場(70名)
- 2) 生態影響に関する化学物質審査規制/試験法セミナー (平成30年度)
大阪会場(70名)、東京会場(100名)

(5) マスコミ等への公表・報道等

特に記載すべき事項はない。

(6) その他

特に記載すべき事項はない。

8. 引用文献

3.-(1)

【ミミズ】

- 1) ASTM E1676-12 (2012). American Society for Testing and Materials. Standard Guide for Conducting Laboratory Soil Toxicity or Bioaccumulation Tests with the Lumbricid Earthworm *Eisenia Fetida* and the Enchytraeid Potworm *Enchytraeus albidus*.
- 2) ISO 11268-1 (2012). ISO Standards. Soil quality - Effects of pollutants on earthworms - Part 1: Determination of acute toxicity to *Eisenia fetida*/*Eisenia andrei*.
- 3) ISO 11268-2 (2012). ISO Standards. Soil quality - Effects of pollutants on earthworms - Part 2: Determination of effects on reproduction of *Eisenia fetida*/*Eisenia andrei*.
- 4) ISO 16387 (2014). ISO Standards. Soil quality - Effects of contaminants on Enchytraeidae (*Enchytraeus* sp.) - Determination of effects on reproduction.

- 5) ISO 17512-1 (2008). ISO Standards. Soil quality – Avoidance test for determining the quality of soils and effects of chemicals on behaviour – Part 1: Test with earthworms (*Eisenia fetida* and *Eisenia andrei*).
- 6) OCSPP 850.3100 (2012). Ecological Effects Test Guidelines. Earthworm Subchronic Toxicity Test.
- 7) OECD TG207 (1984). OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Earthworm, Acute Toxicity Tests.
- 8) OECD TG220 (2004). OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Enchytraeid Reproduction Test.
- 9) OECD TG222 (2004). OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Earthworm Reproduction Test (*Eisenia fetida*/ *Eisenia andrei*).
- 10) 青木淳一, 渡辺弘之, 1995. 土の中の生き物 : 観察と飼育のしかた. 183pp, 築地書館.
- 11) 金子信博, 2007. 土壌生態学入門. 199 pp, 東海大学出版会.
- 12) 日本環境毒性学会, 2003. 生態影響試験ハンドブックー化学物質の環境リスク評価ー. 349pp., 朝倉書店.
- 13) Chen, C., Wang, Y., Zhao, X., Qian, Y., Wang, Q., 2014. Combined toxicity of butachlor, atrazine and λ -cyhalothrin on the earthworm *Eisenia fetida* by combination index (CI)-isobologram method. *Chemosphere* 112, 393-401.
- 14) Lydy, M. J., Linck, S. L., 2003. Assessing the impact of triazine herbicides on organophosphate insecticide toxicity to the earthworm *Eisenia fetida*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 45, 343-349.
- 15) Mosleh, Y. Y., S. M. M. Ismail, M. T. Ahmed and Y. M. Ahmed, 2003. Comparative toxicity and biochemical responses of certain pesticides to the mature earthworm, *Aporrectodea caliginosa* under laboratory conditions. *Environmental Toxicology*, 18, 338-46.
- 16) Wang, Y., Cang, T., Zhao, X., Yu, R., Chen, L., Wu, C., Wang, Q., 2012. Comparative acute toxicity of twenty-four insecticides to earthworm *Eisenia fetida*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 79, 122-128.
- 17) 畠山成久, 小神野豊, 菅谷芳雄, 2009. ミミズ急性毒性試験法 (OECD ガイドライン 207) の検討、特に材料と方法に関して. *環境毒性学会誌*, 12 (2), 135- 143.

【ヨコエビ】

- 18) ASTM (2010) Standard Test Method for Measuring the Toxicity of Sediment-Associated Contaminants with Freshwater Invertebrates, E 1706-05.
- 19) Beketov, M. A., and M. Liess (2008) Potential of 11 Pesticides to Initiate Downstream Drift of Stream Macroinvertebrates, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 55:247-253.
- 20) Collyard S. A., Ankley G. T., Hoke R. A., Goldenstein T. (1994) Influence of Age on the Relative Sensitivity of *Hyalella azteca* to Diazinon, Alkylphenol Ethoxylates, Copper, Cadmium, and Zinc, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 26, 110-113.
- 21) De Perre, C., T. M. Murphy, and M. J. Lydy (2015) Fate and Effects of Clothianidin in Fields Using Conservation Practices, *Environ. Toxicol. Chem.* 34(2): 258-265.
- 22) Environment Canada (2013) Biological Test Method: Test for Survival and Growth in Sediment and Water Using the Freshwater Amphipod *Hyalella Azteca*, Second edition, EPS1/RM/33
- 23) ISO (2013) Water quality - Determination of the toxicity of fresh water sediments using *Hyalella Azteca*, ISO 16303.
- 24) Stoughton, S. J., K. Liber, J. Culp, and A. Cessna (2008) Acute and Chronic Toxicity of Imidacloprid to the Aquatic Invertebrates *Chironomus tentans* and *Hyalella azteca* Under Constant- and Pulse-Exposure Conditions, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 54(4): 662-673.

- 25) Suedel, B.C, Deaver, E. J. H., Rodgers, Jr. (1996) Experimental Factors That May Affect Toxicity of Aqueous and Sediment-Bound Copper to Freshwater Organisms, Arch. Environ. Contam. Toxicol. 30, 40-46.
- 26) U.S. EPA (2000) Methods for Measuring the Toxicity and Bioaccumulation of Sediment-associated Contaminants with Freshwater Invertebrates Second Edition, EPA 600/R-99/064.
- 27) U.S. EPA (1992) Pesticide Ecotoxicity Database (Formerly: Environmental Effects Database (EEDB)) Environmental Fate and Effects Division, U.S.EPA, Washington, D.C.
- 28) US EPA, ECOTOX Database, <https://cfpub.epa.gov/ecotox/> (2016/3/29 確認)
- 29) 国立研究開発法人農業環境技術研究所 (2016) 【技術資料】農薬の生態リスク評価のための種の感受性分布解析 Ver. 1.0 (2016 年 3 月)

【海産藻類】

- 30) Comber MHI, Smyth DV, Thompson RS (1995) Assessment of the toxicity to algae of colored substances. Bull Environ Contam Toxicol 55:922-928
- 31) Ebenezer V, Ki J (2013) Quantification of the sub-toxicity of metals and endocrine-disrupting chemicals to the marine green microalga *Tetraselmis suecica*. Fish Aquat Sci 16:187-194
- 32) Franklin NM, Stauber JL, Apte SC, Lim RP (2002) Effect of initial cell density of the bioavailability and toxicity of copper in microalgal bioassays. Environ Toxicol Chem 21:742-751
- 33) Katsumata M, Koike T, Kazumura K, Takeuchi A, Sugaya Y (2009) Utility of delayed fluorescence as endpoint for rapid estimation of effect concentration on the green alga *Pseudokirchneriella subcapitata*. Bull Environ Contam Toxicol 83:484-487
- 34) Mayer P, Frickmann J, Christensen ER, Nyholm N (1998) Influence of growth conditions on the results obtained in algal toxicity tests. Environ Toxicol Chem 1091-1098.
- 35) Millán de Kuhn R, Streb C, Breiter R, Richter P, Neeße T, Häber DP (2006) Screening for unicellular algae as possible bioassay organisms for monitoring marine water samples. Water Res 40:2695-2703
- 36) Okamura H, Aoyama I, Liu D, Maguire RJ, Pacepavicius GJ, Lau YL (2000) Fate and ecotoxicity of the new antifouling compound irgarol 1051 in the aquatic environment. 34:3523-3530
- 37) Pérez J, Domingues I, Soares AMVM, Loureiro S (2011) Growth rate of *Pseudokirchneriella subcapitata* exposed to herbicides found in surface waters in the alqueva reservoir (Portugal): a bottom-up approach using binary mixtures. Ecotoxicology 20:1167-1175
- 38) Radix P, Léonard M, Papantoniou C, Roman G, Saouter E, Gallotti-Schmitt S, Thébaud H, Vasseur P (2000) Comparison of four chronic toxicity tests using algae, bacteria, and invertebrates assessed with sixteen chemicals. Ecotoxicol Environ Safety 47:186-194
- 39) Sbrilli G, Bimbi B, Cioni F, Pagliai L, Luchi F, Lanciotti E (2005) Surface and ground waters characterization in Tuscany (Italy) by using algal bioassay and pesticide determinations: comparative evaluation of the results and hazard assessment of the pesticides impact on primary productivity. Chemosphere 58:571-578
- 40) Weyman GS, Rufli H, Eltje L, Salinas ER, Hamitou M (2012) Aquatic toxicity tests with substances that are poorly soluble in water and consequences for environmental risk assessment. Environ Toxicol Chem 31:1662-1669

3.-(2)

【ユスリカ】

- 41) OECD (2011) OECD guidelines for the testing of chemicals No. 235, *Chironomus* sp., Acute Immobilisation Test

Ⅱ－４ *in vitro*毒性試験・*in silico*解析や作用メカニズムに基づく毒性予測手法の研究（サブ３）

国立研究開発法人国立環境研究所
環境リスク・健康研究センター

林 岳彦

平成27～29年度累計予算額： 8,604千円（うち平成29年度：2,515千円）

予算額は、間接経費を含む。

【要旨】

作用メカニズムが比較的解明されている適切な化学物質をモデルとした毒性予測（AOP）の構築を検討する。補完すべきデータは他のサブテーマと連携し、また、諸国ですでに規制に導入されている *in vitro*、*in silico*試験のリストについて我が国に導入可能な試験法であるかどうかを検討しようとしたが、生態毒性に関する試験数が少なかった。

【キーワード】

アルゴリズム、動物愛護、OMICS、QSAR、AOP

1. はじめに

生きている生物を用いずに化学物質管理に資することのできる *in vitro*試験法、*in silico*試験などの方法は、*in vivo*試験の代替試験法としてばかりではなく、作用メカニズムを明らかにすることにより良い化学物質管理システムの構築に役立てられる可能性がある。それらの試験は、時間、コストの大幅な節約になり、動物愛護の点からも優れているので、これから益々期待される分野の研究である。しかし、*in vitro*毒性試験、*in silico*解析や作用メカニズムに基づく毒性予測手法は現在はまだヒト健康に関するものがほとんどで、生態影響に関するものは少ない。ここでは、我々のグループにおいてミジンコの幼若ホルモンに関する知見が豊富であることを踏まえ、その *in vitro*試験の活用とAOPの構築について検討した。また、*in vitro*試験とAOPの化学物質管理への導入可能性について検討した。

2. 研究開発目的

海外における *in vitro*毒性試験、*in silico*解析や作用メカニズムに基づく毒性予測手法等の調査結果から、それらの日本への導入可能性について検討する。ミジンコ幼若ホルモン様物質に関する *in vitro*試験およびAOPを構築する。

3. 研究開発方法

（１）無脊椎動物の幼若ホルモン受容体を対象とする *in vitro*試験法の開発

無脊椎動物の幼若ホルモン受容体を用いて化学物質の幼若ホルモン様作用を検出するレポーター遺伝子試験法を開発する。宮川ら(2013)によって開発された、ミジンコのMethoprene-tolerant (Met) と Steroid receptor coactivator (SRC) を用い、レポーター遺伝子試験法を構築する。

（２）ミジンコの幼若ホルモンかく乱によるオス仔虫誘導に係るAdverse Outcome Pathwayの構築

ミジンコの幼若ホルモンかく乱に関わる論文が多く出版されているため、それらの研究成果を有機的に組み合わせて、6つのKey Event (KE) を抽出し、AOPを構築する。

（３）諸国で規制に導入されている *in vitro*、*in silico*試験のリストに基づく我が国における導入可能性の検討

a. *in vitro*試験についての検討

論文等の調査により *in vitro*試験が実用的に用いられているのは、内分泌かく乱を対象とした女性、

男性、甲状腺ホルモン様物質などのレセプター結合活性が多かった。（平成27年度の本推進費の委託業務報告書）。また遺伝子突然変異試験、染色体異常試験などは既にヒト健康に関する化審法の中で用いられている。それらを踏まえ、*in vitro*試験の現状について精査する。

b. (Q) SAR試験についての検討

現在、既に多くの国の化学物質管理において(Q) SARの情報が利用されてきており一定の成果を挙げている（平成27年度の本推進費の委託業務報告書）。既存の試験法の結果と組み合わせることにより、現状よりも高い感受性をもつ試験選択アルゴリズムを構成することは可能である。それらを踏まえて、(Q) SAR試験の実用化に向けた検討を行う。

4. 結果及び考察

(1) 無脊椎動物の幼若ホルモン受容体を対象とする*in vitro*試験法の開発

無脊椎動物（ミジンコ類を想定）の幼若ホルモン受容体を用いて化学物質の幼若ホルモン様作用を検出することを目的とする*in vitro*試験法について、国内外における試験法の開発の動向等を調査した結果、日本の環境省EXTEND2010における内分泌かく乱作用に係る試験法開発において検討が進められているレポータージーン試験法に着目した。宮川ら(2013)によって既に開発されている、ミジンコのMethoprene-tolerant (Met) とSteroid receptor coactivator (SRC) を用い、レポータージーン試験法を構築した。本試験法の原理を図4-1に示す。

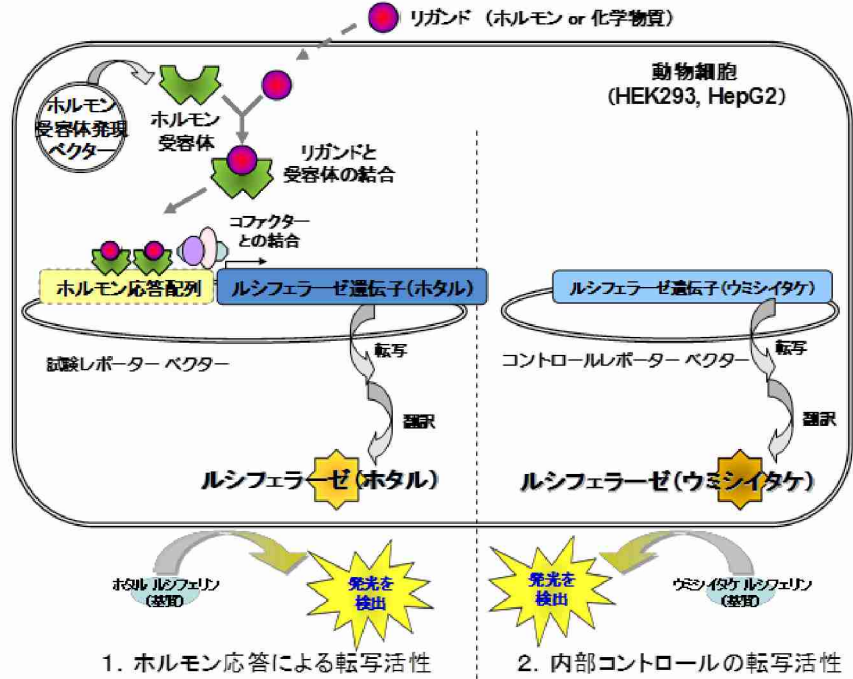


図4-1 レポータージーン試験法の原理

表4-1 レポータージーン試験の条件

動物細胞株	HEK293 (ヒト胎児腎由来)	CHO (チャイニーズハムスター卵巣由来)
試験培地	DMEM (2mL-glutamine, 10%FCS 含有)	DMEM/F12 (2mL-glutamine, 10%FCS 含有)
試験液量	0.2 mL/well	
細胞播種数	1.4×10 ⁴ cells/well	
受容体発現ベクター1	pcDNA-Met, 40ng/well	
受容体発現ベクター2	pcDNA-SRC, 40ng/well	
試験レポーターベクター	pTcJHRE-Luc, 80ng/well	
コントロールレポーターベクター	pRL-tK-RLuc, 20ng/well	
培養環境及び時間	37℃, 5%CO ₂ , 40時間	
助剤及び終濃度	DMSO 0.1%	

試験の汎用化を目的として試験条件の検討を行った。培養細胞には、比較的取扱が容易で、使用実績があるヒト由来のHEK293細胞を使用した。また、少ない試料で効率的に試験を行う観点から試験容器を96穴プレートに変更した。検討時の試験条件を表4-1に示す。試験は、表4-2に示す手順に従い実施した。また、試験法の汎用性を判定するため、ミジンコの内在性幼若ホルモンであるMethyl farnesoateを陽性対照とした。

表4-2 レポーター遺伝子試験の実施手順

試験細胞系の培養(暴露)	発光強度の測定
培地(マイクロプレート)へ細胞播種	培地の除去
↓	↓
培養(5%CO ₂ 、37°C、24時間)	細胞溶解液の添加
↓	↓
ベクターの細胞導入(トランスフェクション)	(細胞溶解)
↓	↓
培養(5%CO ₂ 、37°C、4時間)	ホタルルシフェリン(発光基質)添加
↓	↓
被験物質(及び陽生物質)の添加	ホタルルシフェリン発光強度の測定
↓	↓
培養(5%CO ₂ 、37°C、40時間)	ウミシイタケルシフェリン(発光基質)添加
↓	↓
(発光強度の測定)	ウミシイタケルシフェリン発光強度の測定

HEK293細胞を用いた検討の結果、濃度依存的なFold activation (ホタルルシフェラーゼの発現量を示す指標)の増加が見られなかった(図4-2(A))ため、宮川ら(2013)が用いたチャイニーズハムスター由来のCHO細胞を用いて、同じ試験条件で再検討した。その結果、CHO細胞を用いた系では、濃度依存的な発現量の増加が認められた(図4-2(B))。Fold activationは 10^{-4} Mで2.7倍となり、宮川らがMethyl farnesoateを用いて 4×10^{-5} Mで報告した値(約3倍)とほぼ同等であったことから、宮川らの試験法を96穴プレートにおいて再現できたものと判断した。また、今回の結果から、本試験法には培養細胞に対する高い依存性があることが確認された。

以後の検討にはCHO細胞を使用することとし、本試験手法の適用性について検討するため、無脊椎動物の内在性幼若ホルモン物質に類似する5種の化学物質(Juvenile hormone III、Fenoxycarb、Pyriproxyfen、Methoprene、Hydroprene)について試験を実施した(図4-3)。Juvenile hormone III、Fenoxycarb、Pyriproxyfenの3種類については濃度依存的なFold activationの増加が認められた。一方で、Methopreneについては、弱いながら濃度依存的なFold activationの増加が認められたが、Hydropreneについては顕著な増加は認められなかった。すなわち、幼若ホルモン様物質間でも濃度依存的なFold activationの増加傾向が異なることが確認された。

以上のことから、本研究で検討した手法を化学物質のミジンコに対する幼若作用の検出に適用することは十分可能であると考える。今後は、試験系の感度を更にあげるため、試験条件について詳細に検討する予定である。

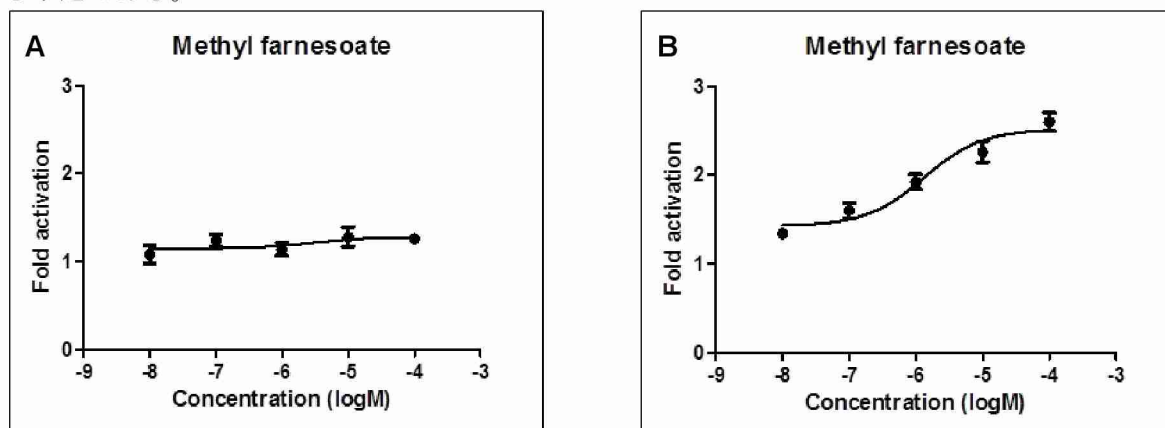


図4-2 (A) HEK293細胞および (B) CHO細胞を用いたMethyl farnesoateの試験結果

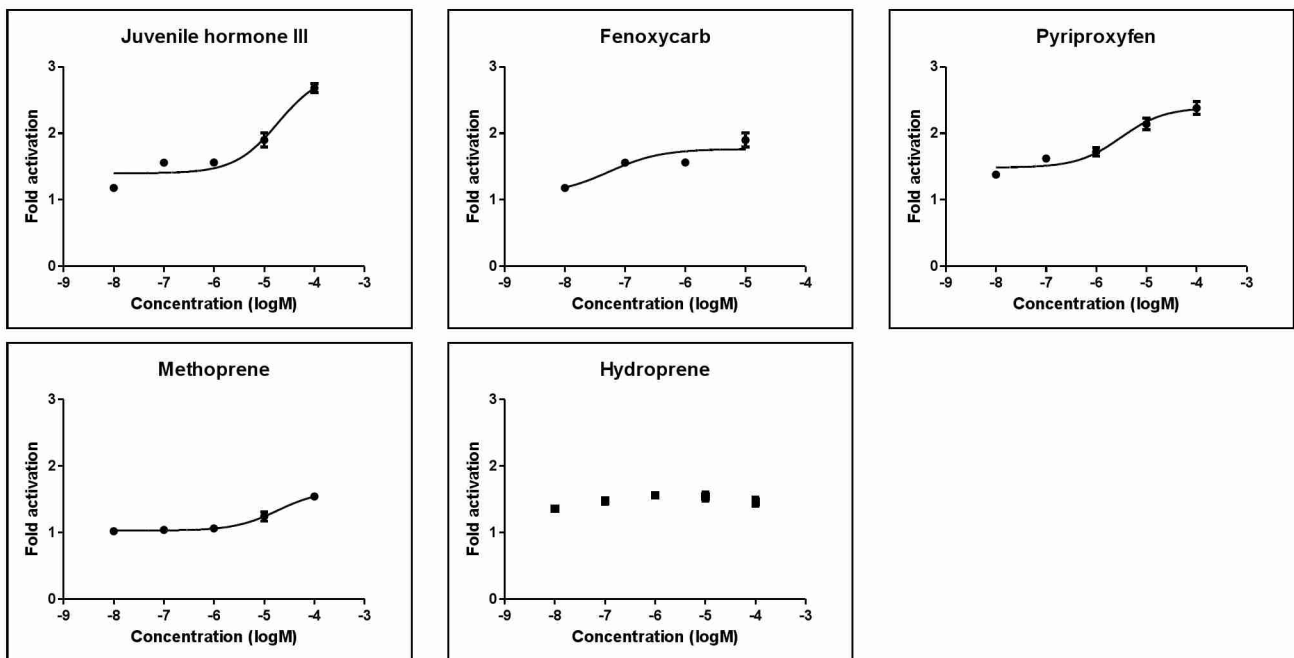


図4-3 本研究で検討した試験条件に基づく5種の幼若ホルモン様物質の試験結果

(2) ミジンコの幼若ホルモンかく乱によるオス仔虫誘導に係るAdverse Outcome Pathwayの構築

ミジンコの幼若ホルモンかく乱に関わる論文を精査し、現時点の研究成果から6つのKey Event (KE) から構成されるAOPを構築した(図4-4)。分子レベルの最初のKE、Molecular initiating event (MIE) として、ミジンコの幼若ホルモン(JH)であるMethyl farnesoateの合成経路に関わる、NMDA型グルタミン酸受容体との反応が推定されている。その後、KE2: JH合成増加、KE3: JH受容体活性化、KE4: 性決定遺伝子の発現が生じ、有害影響(AO)であるKE4: オス仔虫誘導とKE6: 個体群の減少が起きると考えられている。各KEおよびKEを繋ぐKey event relationship (KER) の確かさを「上流KEの重要性Essentiality」「KERの生物学的妥当性Biological Plausibility」「濃度・時間・頻度、不一致性・不確実性等の実証データEmpirical Support」の3つの指標からWeight of Evidenceに基づいて評価すると、MIE (KE1) からAO1/KE5までは、生物学的妥当性や重要性はStrongでも、その他の実証データの不足からModerateと判定された(表4-3)。このAOPの「確かさ」を上げるためには、濃度・時間・頻度に関するデータやDaphnia magna以外の生物のデータを追加するとともに、AO1/KE5→AO2/KE6に関する実験データを集積する必要があることが分かった。

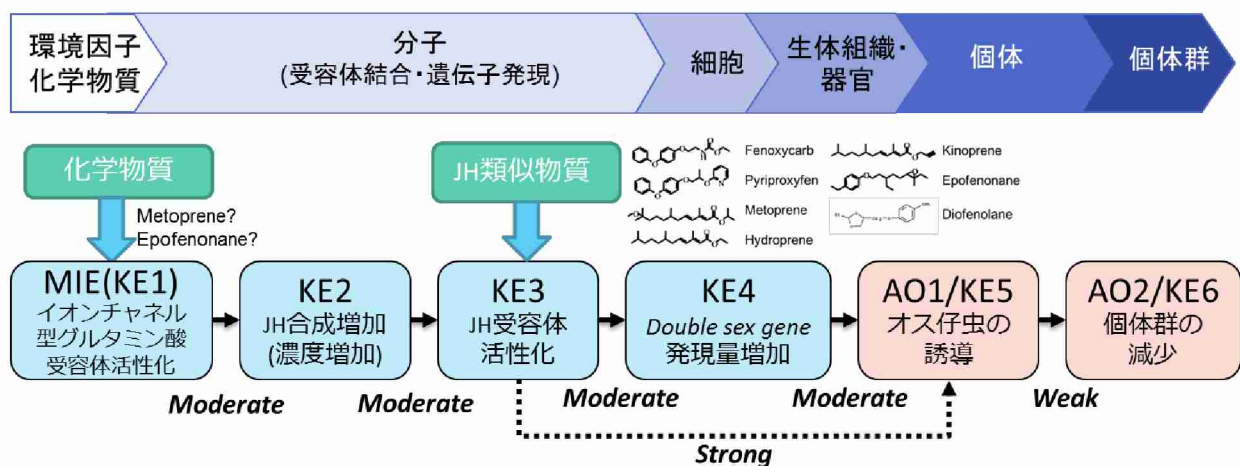


図4-4 ミジンコの幼若ホルモンかく乱によるオス仔虫誘導に係るAdverse Outcome Pathway

表4-3 ミジンコの幼若ホルモンかく乱によるオス仔虫誘導に係るAOPのWoEに基づく評価

KERs	Essentiality (KEの重要性)	Support for Biological Plausibility of KERs (生物学的妥当性)	Empirical Support for KERs (濃度・ 時間・頻度、不一致性・不確実性 等の実証データ)	Overall WoE
KER1: KE1 ↓ KE2	KE1 iGluRs活 性化: <i>Strong</i>	<i>Moderate?</i> 既存の生物学的知見より類推され るがメカニズムの科学的理解は不 十分	<i>Weak</i> 濃度: 不明 時間: 不明 発生頻度: 不明 不一致: <i>D. pulex</i> WTN6系統のみ	<i>Moderate</i>
KER2: KE2 ↓ KE3	KE2 JH合成増 加: <i>Strong</i>	<i>Moderate?</i> 既存の生物学的知見より類推され るがメカニズムの科学的理解は不 十分	<i>Weak</i> 濃度: 不明 時間: 不明 発生頻度: 不明 不一致: <i>D. pulex</i> WTN6系統のみ	<i>Moderate</i>
KE3: KE3 ↓ KE4	KE3受容体活 性化: <i>Strong</i>	<i>Strong? Moderate?</i> JH受容体の活性化によってdsxを 含めた様々な遺伝子発現が誘導さ れていると考えられるが、直接的 な証拠はなし	<i>Weak</i> 濃度: KE3はKE5より低濃度で発 生、KE4の発現に必要な最低濃度は 不明 時間: データはないが自明? 発生頻度: 不明 不一致: <i>D. pulex</i> と <i>D. magna</i> ではな し	<i>Moderate</i>
KER4: KE4 ↓ KE5	KE4性決定遺 伝子発現: <i>Strong</i>	<i>Moderate</i> dsx遺伝子発現後からオス仔虫の 誘導に至るまでの、細胞・生体組 織レベルのKEは不明	<i>Weak</i> 濃度: 直接的な証拠はないが、KE3 はKE5より低濃度で生じる 時間: KE4はKE5より早期に発生 (Kato et al., 2011). 発生頻度: 不明 不一致: <i>D. pulex</i> と <i>D. magna</i> ではな し	<i>Moderate</i>
KER5: KE5 ↓ KE6	KE5オス仔虫 の誘導: <i>Moderate</i>	<i>Weak</i> 個体群モデルによる推定のみ	<i>Weak</i> 個体群モデルによる推定のみ	<i>Weak</i>

(3) 諸国で規制に導入されている *in vitro*、*in silico*試験のリストに基づく我が国における導入可能性の検討

a. *in vitro*試験についての検討

*in vitro*試験について、ToxCastやわが国のEXTEND2010などの規制に準じて扱われているのが、内分泌かく乱作用を対象とした女性、男性、甲状腺ホルモン様物質などのレセプター結合活性である（平成27年度の本推進費の委託業務報告書参照）。また遺伝子突然変異試験、染色体異常試験などは既にヒト健康に関する化審法の中で用いられている。

まず、一般論として、作用の不明な化学物質に対しては、少なくとも単一の *in vitro*試験によって高い感度を持つ試験選択アルゴリズムを構成することは期待できない。複数の *in vitro*試験や、*in vitro*試験と既往の毒性試験からの結果を組み合わせで判断する場合には、既往の試験法選択アルゴリズムよりも感度の高い試験選択アルゴリズムを構成できる可能性はある。そのような可能性が実際にどの程度存在するかは本質的にケースごとに個別の判断となるため、文脈を特定せずに個々の試験法を取り出して可能性を議論することは難しい。*in vitro*試験等の結果の組み合わせによる判断の「感度」「特異度」を議論した例としてはなどがある。

一方、特定の作用機序に絞った単線的なリスク経路をもつ化学物質のスクリーニングにおいては、*in vitro*試験が高い感度と特異度を持つ場合がありうる。そのような場合には、試験選択アルゴリズムの中に導入することに一定の有効性がありうると考えられる。各種結合アッセイから有害性を推定できるよ

うな単線的なリスク経路を持つ例は内分泌かく乱などの一部化学物質群しか存在していないため、広く化学物質を管理する上で *in vitro* 試験を導入することの有効性はあまり高くない。その中で内分泌かく乱化学物質に関しては幾つかのAOPも提案されており、*in vitro* 試験を有効に活用できる可能性が比較的高い。

b. (Q) SAR試験についての検討

平成27年度の委託業務報告書で示した通り、現在、既に多くの国の化学物質管理においても(Q) SARかの情報が利用されてきており一定の実行可能性もある(平成27年度の本推進費の委託業務報告書参照)。一般に単独の(Q) SARからの結果がスクリーニング評価において高い感受性を持つことは期待できないが、既存の試験法からの結果と組み合わせることにより、現状よりも高い感受性をもつ試験選択アルゴリズムを構成することは可能である(例えば、「もっとも高い毒性を示すデータを採用する」というルールのもとでは、毒性試験データが存在しない場合にQSARの値を代替的に用いることにより感度の増加が期待できる)。そのような可能性が実際にどの程度存在するかは本質的にケースごとに個別の判断となる。また、十分に大きなアセスメント係数を使うこと等により、試験法選択アルゴリズムにおいて実質的に一定の感度を担保することも原理的には可能である(その際、どの程度の感度が担保されるべきかは政策的判断の領域となる)。

5. 本研究により得られた成果

(1) 科学的意義

現在、既に多くの国の化学物質管理においても(Q) SARの情報が利用されてきており一定の実行可能性もある。一般に単独の(Q) SARからの結果がスクリーニング評価において高い感受性を持つことは期待できないが、既存の試験法からの結果と組み合わせることにより、現状よりも高い感受性をもつ試験選択アルゴリズムを構成することは可能である。また、十分に大きなアセスメント係数を使うこと等により、試験法選択アルゴリズムにおいて実質的に一定の感度を担保することも原理的には可能である。ミジンコ幼若ホルモン様物質の影響を明らかにする *in vitro* 試験、*silico* 解析や作用メカニズムに基づく簡便かつ迅速な毒性予測手法の開発を行い、AOPを作成した。

(2) 環境政策への貢献

<行政が既に活用した成果>

OECDが世界に参加を呼びかけているAOP-wiki (webプラットフォームの百科事典) に、ミジンコ幼若ホルモンのAOPを登録し、国際的な研究協力に貢献した。生態毒性試験分野では日本初である。

<行政が活用することが見込まれる成果>

in vitro 試験、*silico* 解析や(Q) SARの開発は、現在はまだ途上でありその問題点も明らかとなった。今後多様化する化学物質に対して、これらの活用について慎重になるべき部分の情報が示された。

6. 国際共同研究等の状況

特に記載すべき事項はない。

7. 研究成果の発表状況

(1) 誌上発表

<論文(査読あり)>

- 1) Furuham, T. I. Hayashi, H. Yamamoto, N. Tatarazako, N. Tatarazako, SAR and QSAR in Environmental Research, 28, 765-781, 2017
- 2) Furuham, T. I. Hayashi, N. Tatarazako, SAR and QSAR in Environmental Research, 1-18, 2016
- 3) Furuham, K. Hasunuma, T. I. Hayashi, N. Tatarazako, SAR and QSAR in Environmental Research, 27, 5, 343-362, 2016

<その他誌上発表(査読なし)>

特に記載すべき事項はない。

(2) 口頭発表 (学会等)

特に記載すべき事項はない。

(3) 出願特許

特に記載すべき事項はない。

(4) 「国民との科学・技術対話」の実施

- 1) 生態影響に関する化学物質審査規制/試験法セミナー (平成29年度)
大阪会場(70名)
- 2) 生態影響に関する化学物質審査規制/試験法セミナー (平成30年度)
大阪会場(70名)、東京会場(100名)

(5) マスコミ等への公表・報道等

特に記載すべき事項はない。

(6) その他

特に記載すべき事項はない。

8. 引用文献

3., 4.

- 1) Miyakawa, H., Toyota, K., Hirakawa, I., Ogino, Y., Miyagawa, S., Oda, S., Tatarazako, N., Miura, T., Colbourne, J.K., Iguchi, T., 2013. A mutation in the methoprene tolerant alters juvenile hormone response in insects and crustaceans. Nat. Commun. 4, 1856.

III. 英文Abstract

The Study about a New Evaluation System of the Ecological Effect with Chemicals

Principal Investigator: Norihisa TATARAZAKO

Institution: National University Cooperation Ehime University
 3-5-7 Tarumi, Matsuyama, Ehime 790-8566, JAPAN
 Tel/ Fax: + 81-89-946-9902
 E-mail: tatarazako.norihisa.wn@ehime-u.ac.jp

Cooperated by: National Institute for Environmental Studies (NIES)

[Abstract]

Key Words: Ecotoxicity, Multi-generation, Endocrine disruptor, Neonicotinoid, Algorithm, Animal welfare, AOP

To minimize the adverse effects of chemical substances on the ecosystem, risk assessments are conducted in the chemical management system such as the Chemical Substances Control Law in Japan. Only a limited number of test organisms are used in the ecotoxicity tests and it is not enough to protect the sustainable ecosystem and biological diversity. On the other hand, numerous ecotoxicity test methods have recently been developed and registered in the foreign countries. This study aims to introduce ecotoxicity test methods and test organisms suitable for our country based on the trend in the other countries and the requirements for the alternative test methods, and to propose a new chemical management system for the next-generation.

We devised two kinds of new multi-generation test methods using Medaka and compared the result with the single generation test method. The effects on the second generation was more significant than those on the first generation but the difference of no observed effect concentration (NOEC) between these two generations was not so large. This means that the necessity of the risk assessment using multi-generation test should carefully considered to meet the cost-benefit. For those substances suspected to cause multi-generation impact, however, these multi-generation tests should be applied.

We examined available foreign test methods using various organisms (marine organisms, benthic organisms, insects and terrestrial plants) which are known as key constituents of the ecosystem considering biodiversity, and the applicability of these organisms to the test methods in our country was confirmed in this study. Furthermore, a test method using the midge was examined used for the risk assessment of neonicotinoids which are new and have unique function. As the result of the optimization of the additional pretreatment and adjustment, the domestic midge species became applicable to be used in the standardized protocol.

To contribute to the simple, quick and cost beneficial next-generation system of chemical management by compiling the results of the other two subtopics, two algorithms for the integrated assessment and ecotoxicity testing were designed to efficiently use *in vivo* toxicity test, *in vitro* toxicity test and *in silico* analysis. The first algorithm was designed from the viewpoint of reducing *in vivo* tests for animal welfare perspective. The second algorithm considers the environmental fate of the chemical substances to select the test method.