

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

国立大学法人 愛媛大学

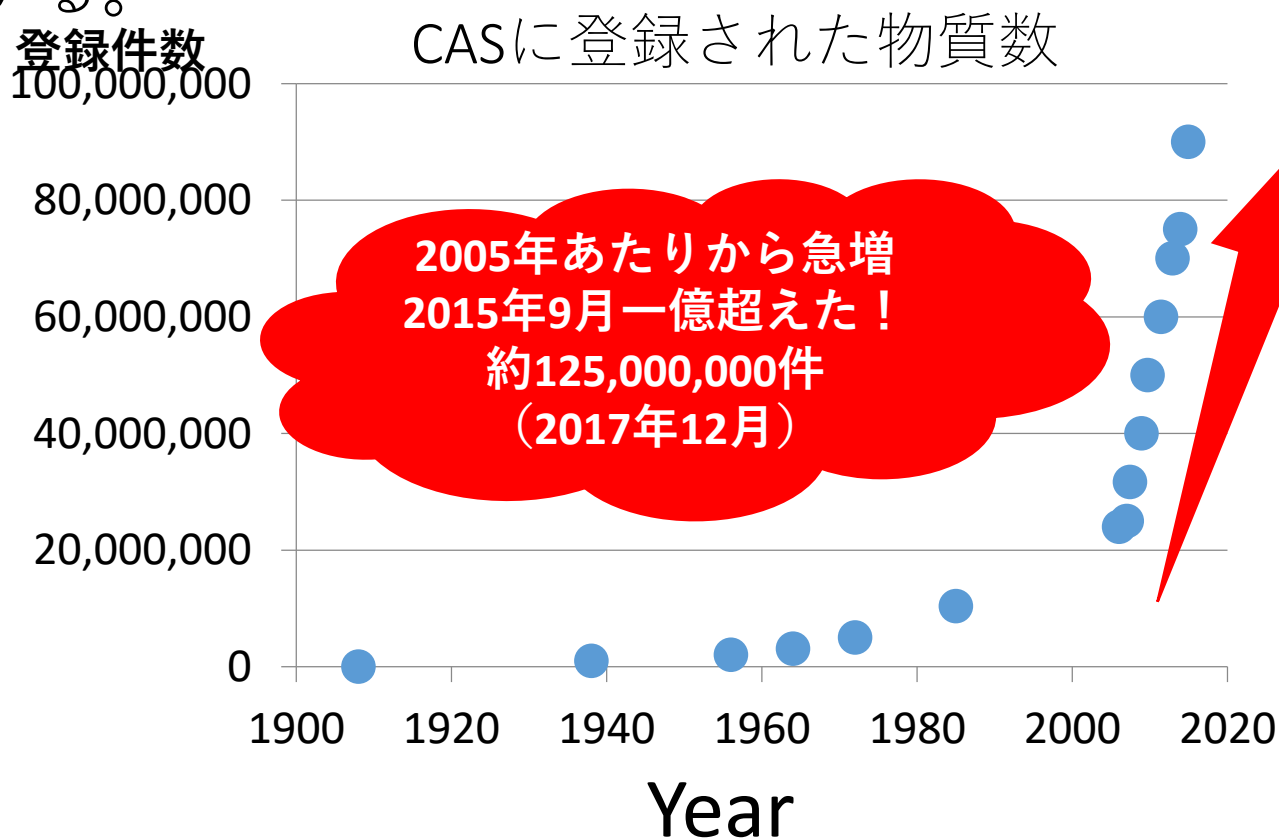
研究代表者 鑑迫典久

(元 国立環境研究所 環境リスク・健康研究センター)

平成27~29年度
予算 66,264千円

背景：化審法で使用する生態影響試験法で見落とされている点

化学物質は数・量の増加に伴い、多様性も増加
ナノマテリアル、内分泌かく乱化学物質、医薬品、農薬など新規機能、新作用、新動態を持つ化学物質が増えている。



各サブテーマ の構成図

試験結果などを*in silico* 解析する統合型

*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（AOP）など
NIES 林岳彦

適切な生態毒性試験
選択のアルゴリズムを
作成（必要な試験）
全員

繁殖・多世代影響など 複雑試験系

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
愛媛大、NIES 鑑迫典久
（NIES 青木康展）

生態系主要生物など 多様試験系

多様性を考慮し、生態
系を構成する上での主
要生物（海生生物、底
生生物、昆虫、陸生植
物、沈水植物等）
NIES 渡部春奈

ナノマテリアルや内分泌かく乱 物質など特殊試験系

特殊な物性や作用を持つ物質を対象
とした試験法 NIES 渡部春奈



サブテーマ1: 高度（繁殖・多世代）試験の開発

（１）多世代影響（母体への影響、精原細胞・卵母細胞への影響、遺伝的蓄積（メチル化）、化学物質の蓄積）

（２）生物のライフイベント時の特異的な影響を捉える

H27年度は、我が国における今後の化学物質管理での使用を見据えて：

- 公定法のある試験法の特徴・期間・世代数・用途の整理
- 諸外国の化学物質管理制度における活用状況の調査

➡ 我が国での必要性・実行可能性・重要性を評価した

調査方法（＊詳細については本資料末の補遺スライドを参照）

調査対象

公定試験法

- OECDテストガイドライン
- ISO規格
- USEPA公定試験法
- ASTM規格

対象となる化学物質

- 一般化学物質
- 内分泌かく乱物質
- エピジェネティック誘導物質
- 高蓄積性・生物高濃縮性物質

繁殖・多世代・特殊
試験法の整理

- 試験生物
- 対象物質
- 試験期間
- エンドポイント

諸外国の化学物質管理
制度における活用
状況

我が国での必要性・重要性の評価

評価指標

試験の目的

何を検出する試験なのか

対象物質

内分泌かく乱物質、エピジェノミクス

他の試験との位置関係

確定試験か？

諸外国での活用状況

どのような規制要件に入っているか？

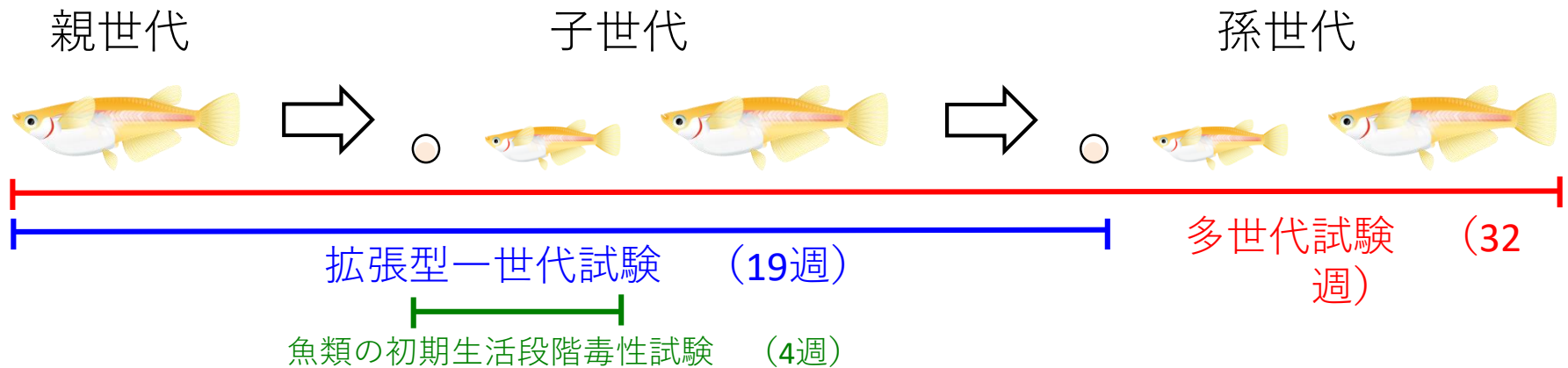
➡ リスト化（詳細は補遺）

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	カイアシ	Life-Cycle Toxicity Tests/ Copepod Reproduction and Development Test	OECD Draft guidance document	36日	繁殖、生死、成長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

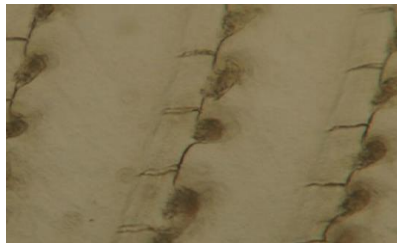
結果 1 : 長期・多世代試験法の開発

拡張型一世代試験 (MEOGRT) から多世代試験の提案 (4-NP)



二次性徴への影響

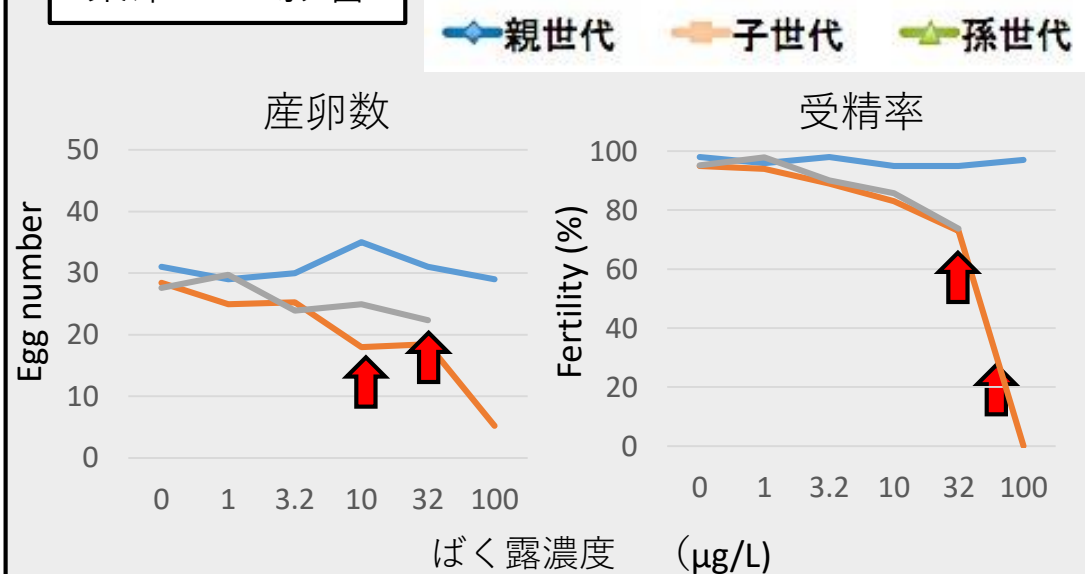
乳頭状小突起



最小影響濃度

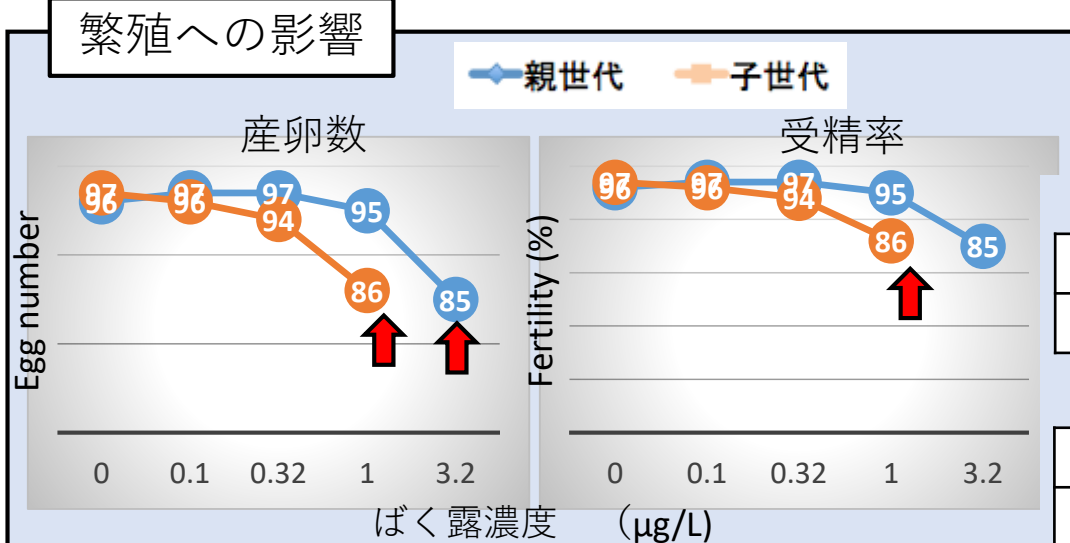
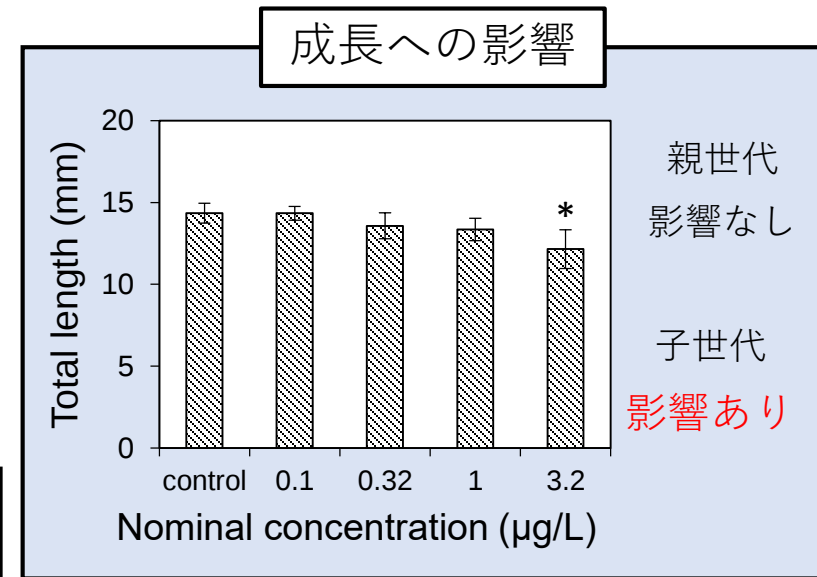
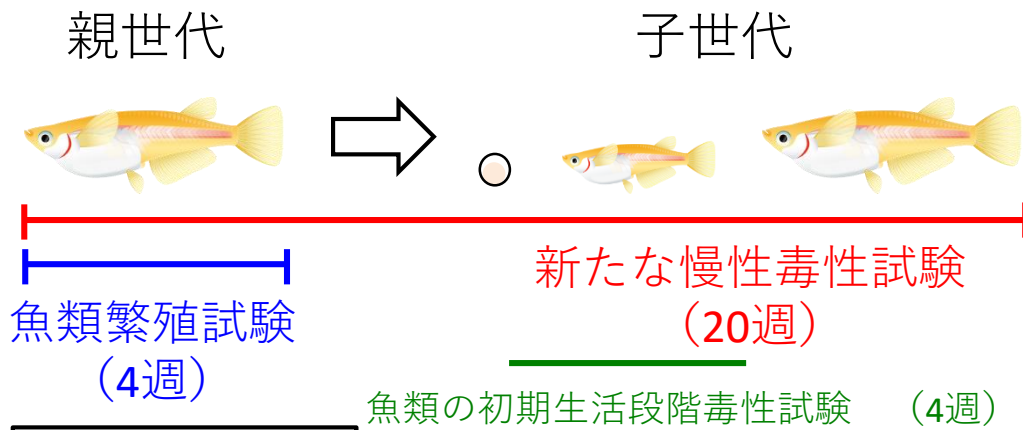
親世代	影響なし
子世代	32 $\mu\text{g/L}$ (↓)
孫世代	10 $\mu\text{g/L}$ (↓)

繁殖への影響



結果2：特殊なエンドポイントを検出する 試験法の開発

母体からの影響を調べる試験の提案（TPT；トリフェニルスズ）



産卵数	
親世代	3.2
子世代	1

受精率	
親世代	ND
子世代	1

致死影響	
	最小影響濃度
親世代	3.2 µg/L
子世代	1 µg/L

子世代で、より低濃度で死亡

サブテーマ 2: *in vivo*試験の充実化

- (1) 生態系を構成する主要生物を用いた試験法の研究
- (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

H27年度は、我が国における今後の化学物質管理での使用を見据えて：

- 公定法のある試験法の特徴・類似性・用途の整理
- 諸外国の化学物質管理制度における活用状況の調査

➡ 我が国での必要性・実行可能性・重要性を評価した

調査方法 (* 詳細については本資料末の補遺スライドを参照)

調査対象

公定試験法

- OECDテストガイドライン
- ISO規格
- USEPA公定試験法
- ASTM規格

化学物質管理制度

- 一般化学物質
 - REACH (欧州)
 - TSCA (米国)
 - 中国、韓国、台湾
- 農薬 (欧州、米国)
- 医薬品
- 内分泌かく乱物質
- ナノマテリアル

試験法の特徴・類似性・用途の整理

- 試験生物
- 対象物質
- エンドポイント

諸外国の化学物質管理制度における活用状況

- 試験法の選択
- 試験実施要件

我が国での必要性・重要性の評価

評価指標

生物種

[現行] 藻類、ミジンコ、魚類に追加すべきものは？

作用 (対象物質)

[現行] 急性メイン→特殊なエンドポイント

環境媒体

環境中存在形態：水域・大気・土壌・底質

諸外国での活用状況

どのような規制要件に入っているか？

➡ ○・△・×で評価しリスト化 (詳細は補遺)

サブ2結果： *in vivo*試験の現状の整理と我が国での重要度の評価

評価指標

生物種

[現行] 淡水藻類・ミジンコ・魚類
→異なる生態（生理活性、食餌形態、生息場）、進化系統の生物は？

作用（対象物質）

新たに評価したい作用（対象物質）が検出可能か？
→難溶性物質、医薬品、農薬、ナノマテリアル、内分泌かく乱作用など

環境媒体

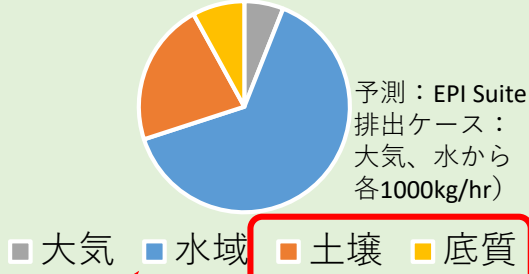
環境中でどこに存在するか？

- 土壌や底質にも多く存在→**水域だけではなく、土壌と底質中の生態リスク評価が必要。**
- 淡水域<海水域→**海産生物を用いた試験が必要。**

諸外国での活用状況

多くの規制制度で利用されているのは？

優先評価化学物質315種の環境中分布予測の内訳



試験の必要性、重要度のリスト例（詳細は補遺）

生物分類	試験生物	対象毒性	試験法	国内導入状況	導入の必要性・重要度			
					生物種	作用	環境媒体	諸外国での活用
土壌生物	陸生植物	慢性	OECD TG208, 227等	×	○	○	○土壌	○
	節足動物トビムシ	慢性	OECD TG226, 232	×	○	○	○土壌	△
	環形動物ミミズ	急性/慢性	OECD TG207, 220, 222等	×	○	○	○土壌	○

海域

わが国での実行可能性について検討する

土壌生物

底生生物

海産生物

サブ2結果：土壌生物を用いたin vivo試験の開発

(1) 高等植物の発芽発根試験

試験生物種・試験法の選択

Sinapis alba

Lepidium sativum

Sorghum saccharatum

- 発芽・発根試験 (OECD TG208など)
- 植物活力試験 (OECD TG227など)

種の入手・発芽率の確保



自主栽培により高発芽種子を確保

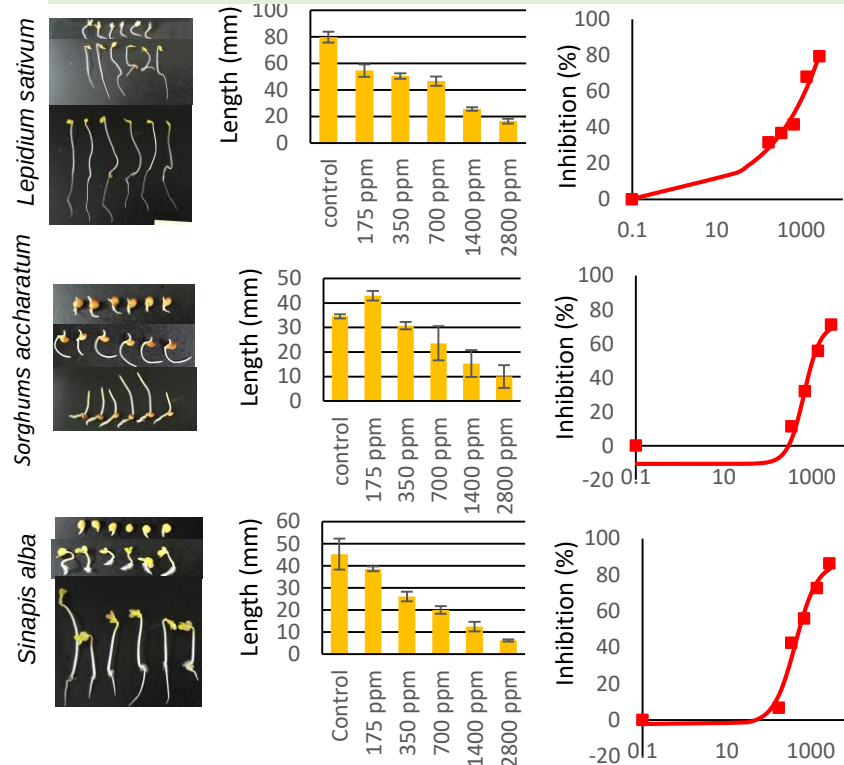
ばく露方法

- 人工土壌
- ゲル培地



試験物質を含む0.2%ゲランガム上に撒種し、27°C、暗所下で3日間培養後、発芽率およびroot & shoot長を計測する。

基準物質(bolic acid)による本試験法の評価



(2) ミミズを用いた毒性試験

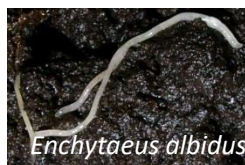
- 急性毒性試験 (生存) OECD TG207など
- 慢性毒性試験 (繁殖) OECD TG110, 220など

➡ まず急性毒性試験から検討

検証事項



Eisenia foetida



Enchytraeus albidus

- 試験生物種の選択 (ヒメミミズ、シマミミズ)
- 試験実施要件の整理
- 飼育方法、取り扱いの留意点
- ばく露方法の比較法：①人工土壌、②ろ紙接触法

サブ2結果：底生生物を用いた*in vivo*試験の開発

(3) ヨコエビを用いた底質毒性試験

*ECHA Guidance R.7B, section R.7.8.12.2

- 欧州ECHAリスク評価ガイドライン*：異なる生息場、食餌形態、分類、生活段階の底生生物の慢性毒性値を優先的に用いる
 - 入手可能な慢性毒性値の数によって不確定係数を選択
 - OECDテストガイドライン：ユスリカ (TG218, 233)、オヨギミミズ (TG225) の2種（沈水植物も底質毒性試験として近年追加）
 - 第3種としてヨコエビを想定
- 感受性：ヨコエビ > ユスリカ >> オヨギミミズ



オヨギミミズ
www.discoverlife.org



ホザキノフサモ
(沈水植物)



ヨコエビを選択

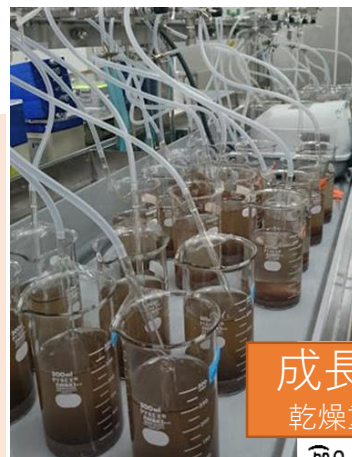
Hyalella Azteca

- 表層底泥、落ち葉の下に生息
- デトリタス、腐食植物、表層沈殿物を摂食
- 4/10/14/42日急性～慢性試験 (Environment Canada、ISO、ASTM)

⇒10日間試験法案の作成→検証中

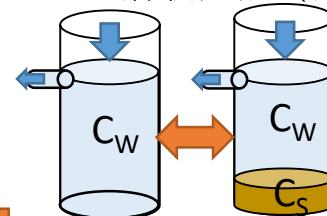
検証事項

- 新規人工底泥
- ばく露装置（半止水式／流水式）
- ばく露方法（スパイク方法、平衡時間）
- エンドポイント（成長量の計測）
- 感受性

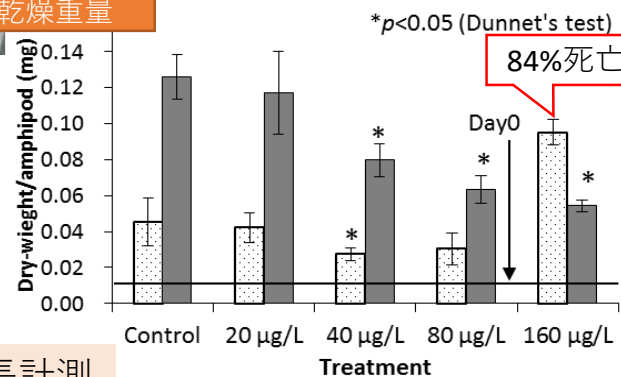


底質からのばく露寄与はどのくらい？

Cu溶液供給（流水式）



成長量
乾燥重量



画像解析による体長計測

(4) 海産藻類の生長阻害試験

試験生物種の選択

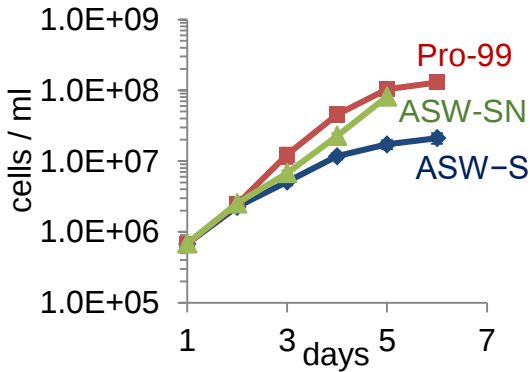


Cyanobium sp. (藍藻)

株番号: NIES-981
学名: Cyanobium sp.
産地: 沖縄県、西表島
生育環境: 海域
株の状態: 無菌、単藻、クローン

海産藍藻の中で特に高い増殖性を示した。

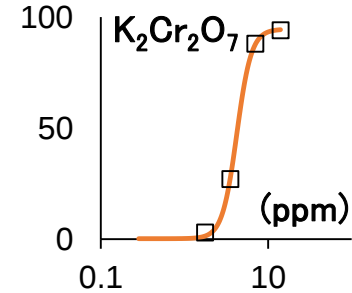
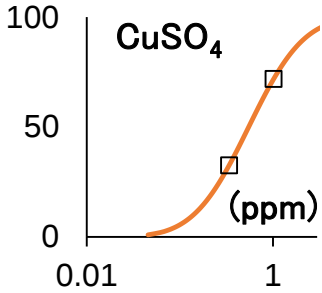
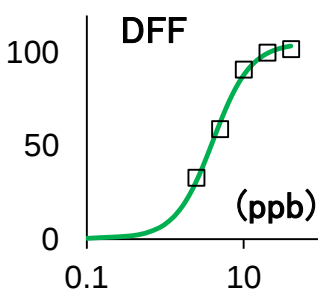
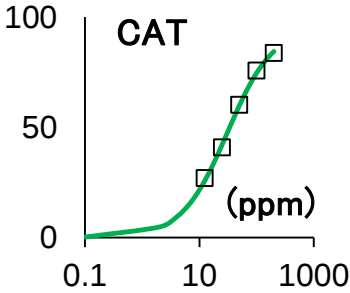
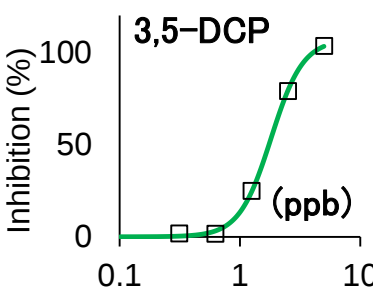
培地の選択
生長率の確保



- 対照区の増殖率: 40倍 (TG201基準: > 16倍)
- 日間生長速度の平均変動係数: 11% (TG201基準: < 35%)
- 繰り返し間の生長速度の変動係数: 2% (TG201基準: < 7%)

ASW-SN培地で最も安定した生長率を示した。

感受性の確認



	シアノビウム EC50	ムレミカツキモ EC50
CAT	122.4 µg/L	100-200 µg/L
3'5-DCP	1.74 mg/L	2 mg/L
DFF	3.83 µg/L	1.2 µg/L
CuSO ₄	1.53 mg/L	0.163 mg/L
K ₂ Cr ₂ O ₇	12.2 mg/L	1.0 mg/L

海産藻類	CuSO ₄ EC50 (mg/L)
NIES-981 シアノビウム	1.53
Prorocentrum minimum	13.5
Tetraselmis suecica	40
Dunaliella salina	220
Heterocapsa triquetra	7

重金属に対する感受性はムレミカツキモと比較すると劣るが、海産種の中では高い。

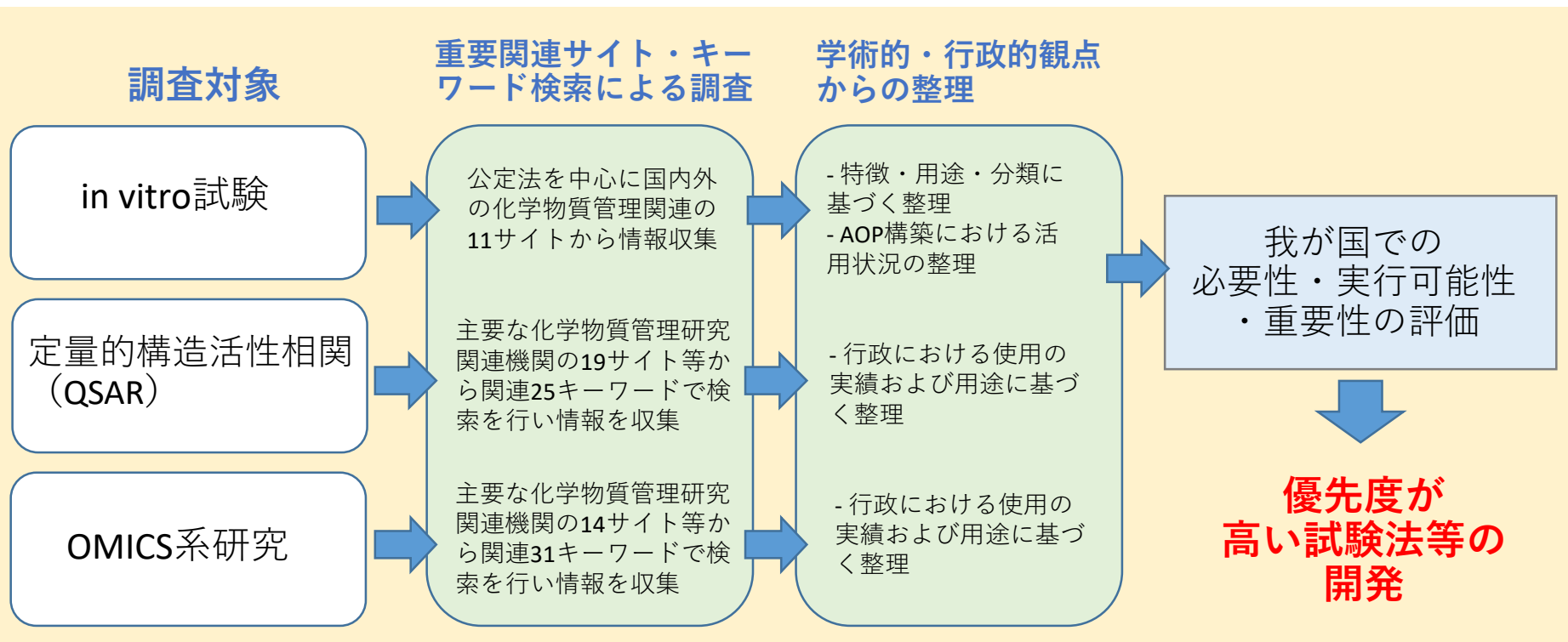
サブ3: in vitro毒性試験・in silico解析や作用メカニズムに基づく毒性予測手法の研究

H27年度は、我が国における今後の化学物質管理での使用を見据えて：

- 既存手法等の特徴・類似性・用途の整理
- 諸外国での活用状況の調査

➡ 我が国での必要性・実行可能性・重要性を評価した

調査方法（＊詳細については本資料末の補遺スライドを参照）



サブ3結果：in vitro試験の現状の整理と我が国での重要度の評価

国内外で用いられているin vitro試験法の数と分類（要約）

管理制度	対象国	遺伝毒性・変異原性・細胞毒性	内分泌かく乱	その他
REACH	欧州	5	9	4
TSCAおよびFIFRA	米国	11	---	---
EDSP	米国	---	5	---
EXTEND 2010	日本	---	15	---
環境影響評価等	欧州	8	3	---
ToxCast	---	---	22	---

遺伝毒性・変異原性に関するin vitro試験法はヒト健康を念頭に置いたものが多い

生態毒性の観点からは必ずしも優先度は高くはないと考えられる

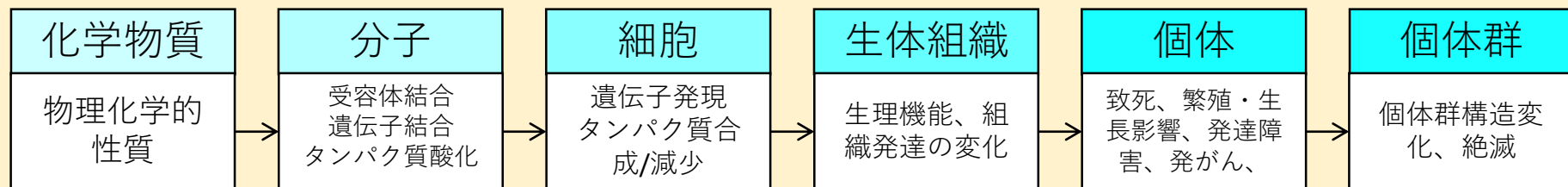
生態毒性評価で使用されているin vitro試験法は内分泌かく乱作用に対応したものが主であった

サブ3結果：in vitro試験の現状の整理と我が国での重要度の評価

作用メカニズム（AOP）の観点からの整理と重要度の評価

Adverse Outcome Pathway (AOP)とは？

化学物質の分子レベルにおける応答（遺伝子・受容体結合など、**Molecular Initiating event**）から、細胞・生体組織・個体レベルの応答（**Key Event**）、さらにリスク評価に用いる個体・個体群レベルにおける有害影響（**Adverse outcome**: 致死・繁殖・生長）までをつなぐ生体内反応経路（**Key Events Relationships**）を整理・構築したもの



- AOPが確立されている場合、当該AOPの有害影響を調べるin vivo試験の代替として、AOP内の鍵となる応答を調べるin vitro試験を使用することの科学的妥当性は高い
- OECD, US EPA, ECなどがAOP研究を後押しし、AOPの構築に関する情報を整理・集約している（AOPwiki）

➡ H27年度の調査からは、現在のところAOP Wikiにおいても内分泌かく乱作用に関わるAOPが中心となり構築が進んでいることが示された

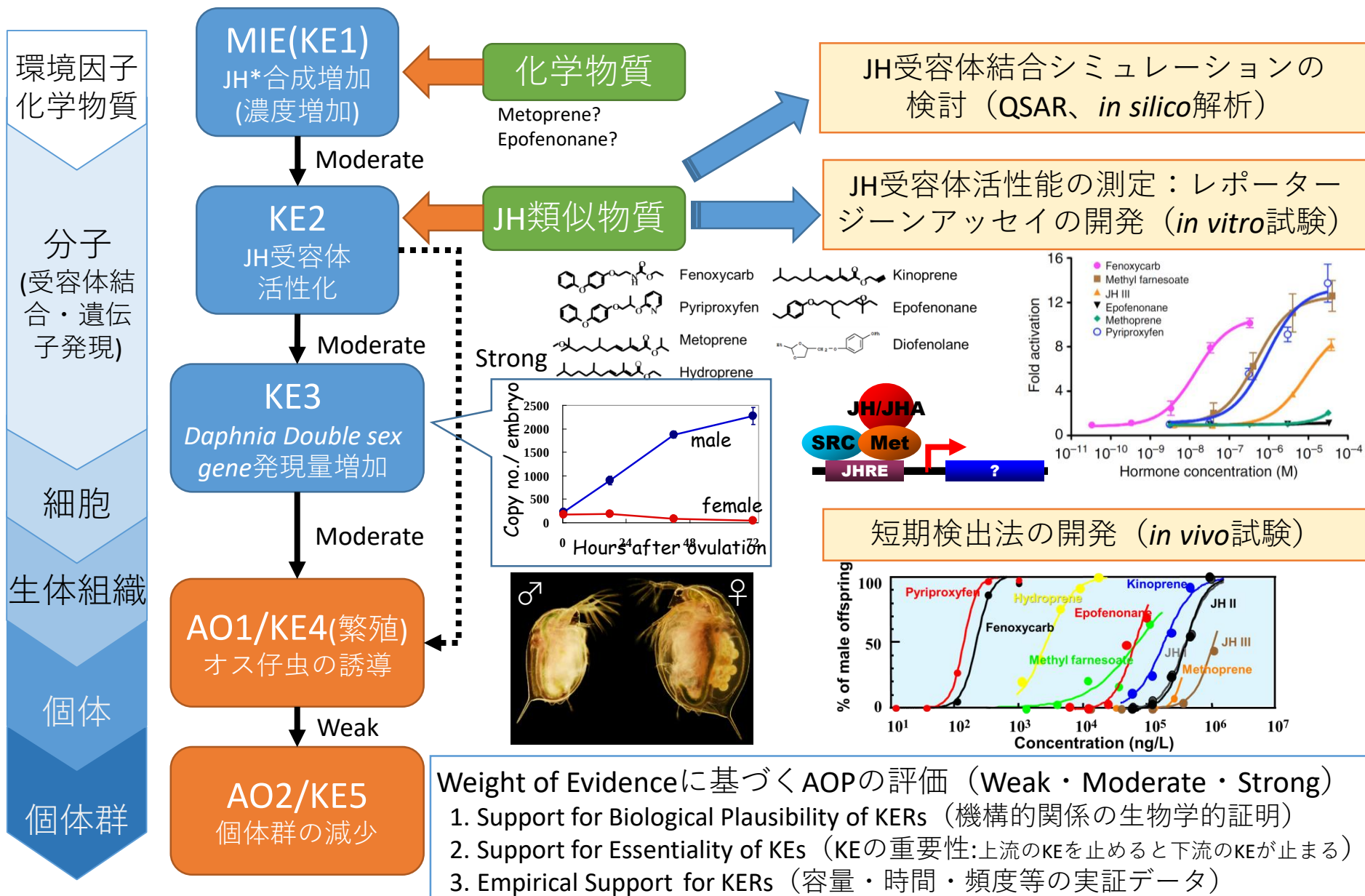
我が国での重要度／優先度の評価

AOPの構築が進んでいる内分泌かく乱作用に関するin vitro試験法は行政による毒性評価における利用が有望である

その他の毒性作用に関しては、各in vitro試験法がAOP上での鍵となる応答と明確に対応する場合には化学物質管理での使用が有望となると考えられる。そのため、該当するAOPの構築が先立つ課題となる

サブ3結果：AOPの構築と評価

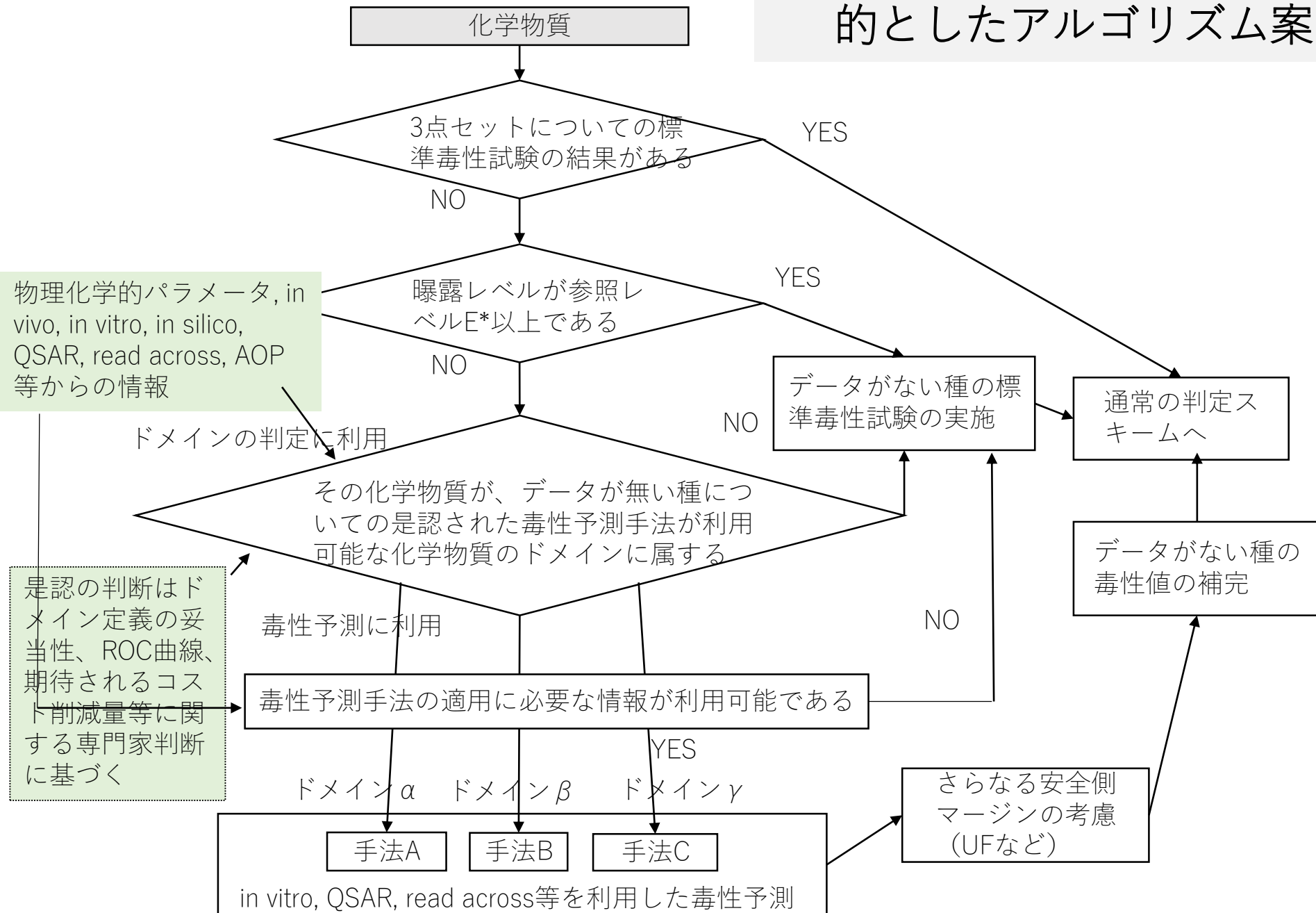
ミジンコにおける幼若ホルモン（JH: Juvenile hormone）のAOP



生態毒性試験選択のアルゴリズム例

- サブテーマ1～3で得られた知見を活かし、化学物質管理に使われる生態毒性試験について、導入の可能性を検討した。
1. インビボ生物試験を減らす方策を目的としたアルゴリズム
 2. 様々な生態毒性試験と化学物質の存在場を考慮したアルゴリズム

Animal Test Reductionを目的としたアルゴリズム案



化学物質の分布（物性・用途）

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

大気

生態毒性試験は弱い
鳥類、昆虫、高等植物
肺、気孔からの吸入
曝露

土壌

土壌試験

- 植物
- 昆虫（トビムシなど）
- ミミズ

水域

淡水生物試験

- 藻類
- 甲殻類
- 魚類

追加試験

追加試験

海域

海産生物の追加試験要求

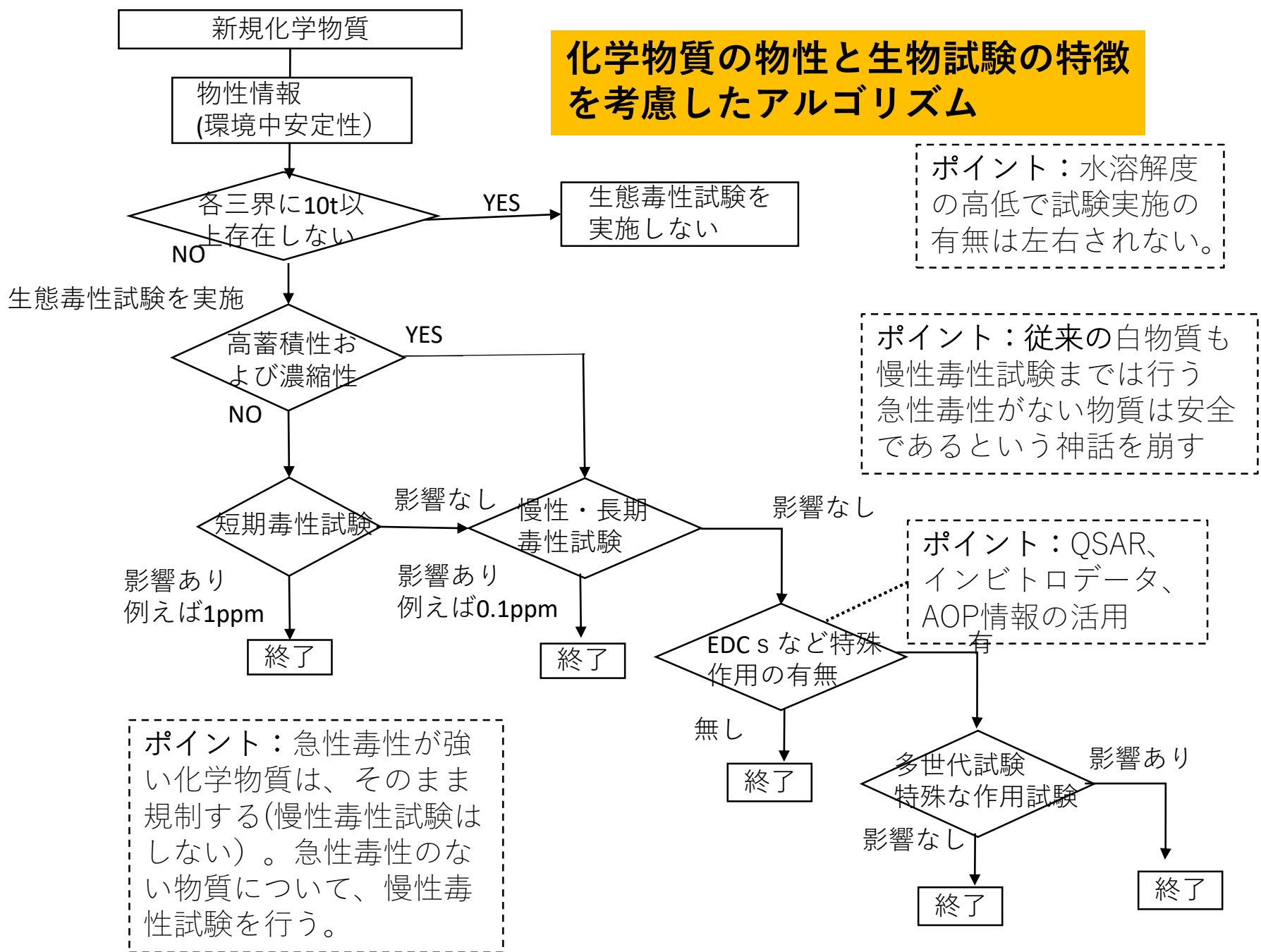
- 沿岸域で使用・排出している物質（用途別）
- 海産生物

底質

底生生物の追加試験要求

- **Log Kow >3**
- 上記以外の底質蓄積性にかかわる要素
- 既存物質：汚泥・浚渫底泥中から検出される物質

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



まとめ

- 増加・多様化する化学物質に対して必ずしも現行の試験法ではその有害性を十分に評価できていない。
- 理想的には試験法も多様化・複雑化する必要がある。技術的には実施可能であり、良い結果も得られる。
- ただし、スピードとコストを考慮する必要がある。
- 代替法・簡易法の使用は十分注意を要する。
- AOP、IATAなどは引き続き注目する必要がある
- 動物愛護は世界的動向であり無視できない。

「国民との科学・技術対話」の実施

- **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)
- **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)

口頭発表

- 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(*Hyaella azteca*)を用いた実験的検討, 谷和音, 渡部春奈, 野口愛, 鑑迫典久, 鑑迫典久, 山本裕史, 山本裕史, 環境化学討論会要旨集, 26th
- 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, 鑑迫典久, 環境化学討論会要旨集, 26th
- 水・底質システムにおけるオオミジンコ(*Daphnia magna*)とヨコエビ(*Hyaella 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, 鑑迫典久, 山本裕史, 日本水環境学会年会講演集, 51st
- 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, 鑑迫典久, 日本水環境学会年会講演集, 51st
- 海底資源開発水域における生態毒性試験法の開発ー海産藻類を用いてー, 山岸隆博, 勝又政和, 山口晴代, 志村遥平, 越川海, 河地正伸, 鑑迫典久, 海洋工学シンポジウム講演要旨集, 26th
- 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, 鑑迫典久, 日本内分泌かく乱化学物質学会研究発表会要旨集, 19th
- EXTEND2016における試験法開発の進捗状況について, 鑑迫典久, 日本内分泌かく乱化学物質学会研究発表会要旨集, 19th
- 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, 鑑迫典久, 日本内分泌かく乱化学物質学会研究発表会要旨集, 19th
- 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, 鑑迫典久, 環境化学討論会要旨集, 25th
- Watanabe H, Tamura I, Abe R, Takanobu H, Nakamura A, Suzuki T, Hirose A, Nishimura T, Tatarazako N, Environmental toxicology and chemistry / SETAC, 35, 4, 1006, 2016
- Hayashi TI, Imaizumi Y, Yokomizo H, Tatarazako N, Suzuki N, Environmental toxicology and chemistry / SETAC, 35, 1, 240, 2016

投稿論文

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

ご清聴ありがとうございました