

生態影響に関する化学物質審査規制／試験法セミナー  
2016年2月26日・29日

## OECDテストガイドライン改訂の動向について

(国)国立環境研究所  
環境リスク研究推進室  
鑑迫典久

# 今日の話題

- VMG-eco11の概要
- TG203の改定提案
  - 体サイズについて
  - 未成熟
  - モリバンドに関する対策
- メダカの別種問題

Species <sup>1</sup>	Temperature (°C)	Salinity (‰)	pH	Hardness (mg/L CaCO <sub>3</sub> )	Photoperiod (hours)	Total length <sup>3</sup> (cm)**
<b>Freshwater:</b>						
<u>Danio rerio</u> Zebrafish	26±1.5	0	6.0- 8.1	>100-250	12-16	2.0 ± 1.0
<u>Pimephales promelas</u> Fathead minnow	25±1.5	0	6.0- 8.5	10-250	16	2.0 ± 1.0
<u>Cyprinus carpio</u> Carp	22±1.5	0	6.0- 8.5	10-250	12-16	3.0 ± 1.0
<u>Oryzias latipes</u> Japanese Medaka	25±1.5	0	6.0- 8.5	10-250	12-16	2.0 ± 1.0 (juveniles) <sup>4</sup>
<u>Poecilia reticulata</u> Guppy	23±1.5	0	6.0- 8.5	10-250	12-16	2.0 ± 1.0 (juveniles) <sup>4</sup>
<u>Lepomis macrochirus</u> Bluegill	23±1.5	0	6.0- 8.5	10-250	12-16	2.0 ± 1.0
<u>Oncorhynchus mykiss</u> Rainbow trout	10±1.5	0	6.0- 8.5	10-250	12-16	5.0 ± 1.0
<u>Gasterosteus aculeatus</u> Three-spined stickleback	18±1.5	0-35	6.0- 8.5	10-250	12-16	3.0 ± 1.0 3
<b>Estuarine and Marine:</b>						

# Oryzias latipes (Japanese Medaka)

	水温(°C)	pH	硬度	明暗周期(h)	全長(cm)
<u>新TG203</u>	25 ± 1.5	6.0-8.5	10-250	12-16	2.0 ± 1.0 (juveniles) <sup>4</sup>
<u>現TG203</u> (17 July 1992)	21-25			12-16	2.0 ± 1.0

参考; TG210 (26 July 2013) では、水温; 25 ± 2°C、明暗周期; 12-16h、試験期間; 孵化後30日、試験終了時の平均全長の最小値; 17 mm、孵化率; 最低80%、孵化後生残率; 最低80%

# 魚類急性毒性試験等における 毒性症状の記載について

モリバンドの取り扱い

# 背景

- 化審法試験法通知及び環境省の実施する生態毒性試験の仕様書において、魚類の毒性症状についての記載が求められている。
- 毒性症状の定義および記載方法については試験施設の判断に依存している。
- 魚類急性毒性試験において、重篤な毒性症状は、生態毒性に関する重要な知見である。
- 毒性症状の記載を今後化学物質の安全性評価判断に用いるかどうかは未定であるが、将来的に有効な共通財産となるように整備したい。
- よって症状の定義を明確にし、記載法を統一することが望ましいと考えられる。

# 現行魚類の毒性症状についての記載(1)

## 化審法試験法通知(平成15年11月)

- 暴露開始後少なくとも24、48、72、96時間後に魚の様子を観察する。
- 観察可能な動き(例えば、鰓蓋の動きなど)がなく、尾柄部に触れて反応がない場合には魚は死亡しているとみなす。
- 観察時に死亡魚を取り除き死亡率を記録する。
- 暴露開始後、3時間と6時間後にも観察することが望ましい。
- 平衡、遊泳行動、呼吸機能、体色などに異常が観察された場合は記録しておく。

## 現行魚類の毒性症状についての記載(2)

### 藻類、ミジンコ及び魚類の急性毒性に対する試験手順例(平成15年11月版、国立環境研究所)

(一部分略)

- 観察可能な動き(例えば、鰓蓋の動きなど)がなく、尾柄部に触れて反応がない場合には魚は死亡しているとみなす。
- 平衡、遊泳行動、呼吸機能、体色などに異常が観察された場合や、亜致死的な影響が観察された場合は具体的に記録する。死亡の他にも、行動や外見の異常が見られた場合には記録する。その他特異的症例(背曲がり、出血、体色変化、粘液の分泌、平衡失調、立鱗等)が観察された場合には別途具体的にその旨を記載する。
- 異常呼吸: 対照区の魚と比較して鰓蓋の動きが異なるもの。
- 異常遊泳: 明らかに対照区の魚と異なる遊泳をしたもの。動作の緩慢、過敏、痙攣、反転、鼻上げ等。
- 遊泳不能: 底部または水面で動いてはいるものの、水中を遊泳することが不可能なもの。横転、仮死を含む。

# EPAの表記法(参考)

term	Definition
<b>General behavior</b>	<b>Observable responses of the test fish, individually or in groups, to their environment.</b>
Quiescent	Marked by a state of inactivity or abnormally low activity; motionless or nearly so.
Hyperexcitable	Reacting to stimuli with substantially greater intensity than control fish.
Irritated	Exhibiting more or less continuous hyperactivity.
Surfacing	Rising and remaining unusually long at the surface.
Sounding	Diving suddenly straight to the bottom; remaining unusually long at the bottom.
Twitching	Moving the body or parts of the body with sudden jerky movements.
Tetanus	In a state of tetany; marked by intermittent tonic spasms of the voluntary muscles.
Flaccid	Lacking tone, resilience or firmness; weak and enfeebled; flabby.
Normal	Unaffected by or not exposed to a particular experimental treatment; conforming to the usual behavioral characteristics of the species.
<b>Pigmentation</b>	<b>Color or skin due to deposition or distribution of pigment.</b>
Light discolored	Color appearance lighter than usual for the species.
Dark discolored	Color appearance darker than usual for the species.
Varidisclored	Color appearance abnormally varied; mottled.
<b>Integument</b>	<b>The skin</b>
Mucus shedding	Observably losing mucous skin coating to an abnormal degree.
Mucus coagulation	Showing observable clumping or clotting of the mucous skin coating, especially at the gills
Hemorrhagic	Visibly bleeding as from gills, eyes, anal opening

用語
行動一般
無活動
過剰反応
過敏
浮上
潜行
ひきつり
筋緊張性痙攣
弾性低下
正常
色彩
明色化
暗色化
変色
外皮
粘膜剥離
粘膜硬化
出血

# つづき

<b>Swimming</b>	<b>Progressive self-propulsion in water by coordinated movement of tail, body, fins.</b>
Ceased	Broken off or tapered off to a stop.
Erratic	Characterized by lack of consistency, regularity, or uniformity; fluctuating, uneven; eccentric.
Gyrating	Revolving around a central point; moving spirally about an axis.
Skittering	Skimming hurriedly along the surface with rapid body movements.
Inverted	Turned upside down, or approximately so.
On side	Turned 90° laterally, more or less, from the normal body orientation.
<b>Respiration</b>	<b>Physical action of pumping water into mouth and out through gills, so as to absorb oxygen</b>
Rapid	Observably faster than normal to a significant degree
Slow	Observably slower than normal to a significant degree
Irregular	Failing to occur at regular or normal intervals
Ceased	Broken off or tapered off to a stop
Gulping air	Swimming at surface with mouth open and laboriously pumping surface water and air through gills.
Labored	Performed with apparent abnormally great difficulty and effort

<b>遊泳</b>
停止
不安定
旋回
アメンボ行 動
逆さ遊泳
傾泳
<b>呼吸</b>
速い
遅い
不規則
停止
空気飲み (鼻上げ)
疲弊

# 各試験施設のアンケート結果の記載例 (抜粋)

- 行動が停止した場合
  - 遊泳不能、不活発、横転、反転、遊泳行動異常、着底、異常遊泳、無活動、活動(度)低下、うつぶせ、完全平衡喪失、嗜眠状態、仮死
- 行動が異常の場合
  - 旋回、スパイラル遊泳、コークスクリュウ遊泳、回転、狂奔、平衡失調、方向不定遊泳、異常遊泳、興奮、過敏
- 体色が変化した場合
  - 明色化、暗色化、体色の変化、体色黒化、体色淡化、白化、暗化、変色、該当無し

# 語句の統一の考え方

- 症状を細かく規定すると、判断に差が生じ、統一が難しい
- 化審法では死因まで言及するわけではなく、細かな症状の違いを必要としていない。また詳細な症例のデータ利用を考えていない。
- 生データ(実験ノート等)への詳細な症状の記載は推奨するが、報告書には簡素化した記載にする。
- 重篤であるか否かが重要
- 96時間目における重篤の目安として120～144時間後には死に至ると思われる状態としてはどうだろうか。

## 魚類の毒性症状について、A:死亡・重篤、B:異常、C:正常 の3つに分類し、それぞれの定義(案)を示す

分類		記載事項	症状の定義(案)
A	死亡・重篤	死亡	観察可能な動き（例えば鰓蓋の動きなど）がなく、尾柄部に触れて反応がない状態。
		遊泳不能	鰓蓋のみが動いているが、遊泳等の運動が停止、または極度の異常を示している状態。これまでの仮死、横臥、横転等が相当する。
B	異常	遊泳異常	<p>正常ではない遊泳行動を示す状態。以下の症状が含まれる。</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・ 表層遊泳（表層で遊泳。鼻上げ等を含む。）</li> <li>・ 平衡失調（平衡感覚が失われており、背泳、スパイラル遊泳（鉛直方向）、コークスクリュウ遊泳（水平方向）等をしている）</li> <li>・ 方向不定遊泳（方向感覚がなく遊泳方向が定まらない。）</li> <li>・ 過活発（活動量が増加している、興奮、狂奔等）</li> <li>・ 不活発（活動量が低下している）      ・ 痙攣</li> </ul>
		外見異常	正常ではない外見を示す状態。①表面に関する異常と②形態に関する異常の2つに分類する。
		①表面異常	<ul style="list-style-type: none"> <li>・ 体色変化（明化・暗化）      ・ 出血（内出血を含む）</li> <li>・ びらん（ただれる）      ・ 鰭腐れ</li> <li>・ 立鱗（鱗が逆立つ）      ・ 脱鱗</li> <li>・ 粘液異常（粘液過剰分泌、粘液凝固等）</li> </ul>
		②形態異常	<ul style="list-style-type: none"> <li>・ 背曲がり      ・ 骨折      ・ 眼球異常（眼球突出等）</li> </ul>
		呼吸異常	正常ではない、鰓蓋の動きを示す状態。増加または減少がある。
C	正常	なし	遊泳行動及び外見に異常がみられない状態。

# 最終報告書の記載方法(案)

- 少なくとも、「死亡、遊泳不能、遊泳異常、外見異常(①表面異常、②形態異常)、呼吸異常、正常」のいずれかを記載し、全生存個体中のそれぞれの個体数がわかるように記載する。
- 症状が重複して観察される場合には、より重篤な分類(A>B)を優先する。
- 分類Bの症状が重複して観察される場合には、併記する。
- ただし一つの個体が呈している症状がわかるように記載する。

# 最終報告書の記載方法(例)

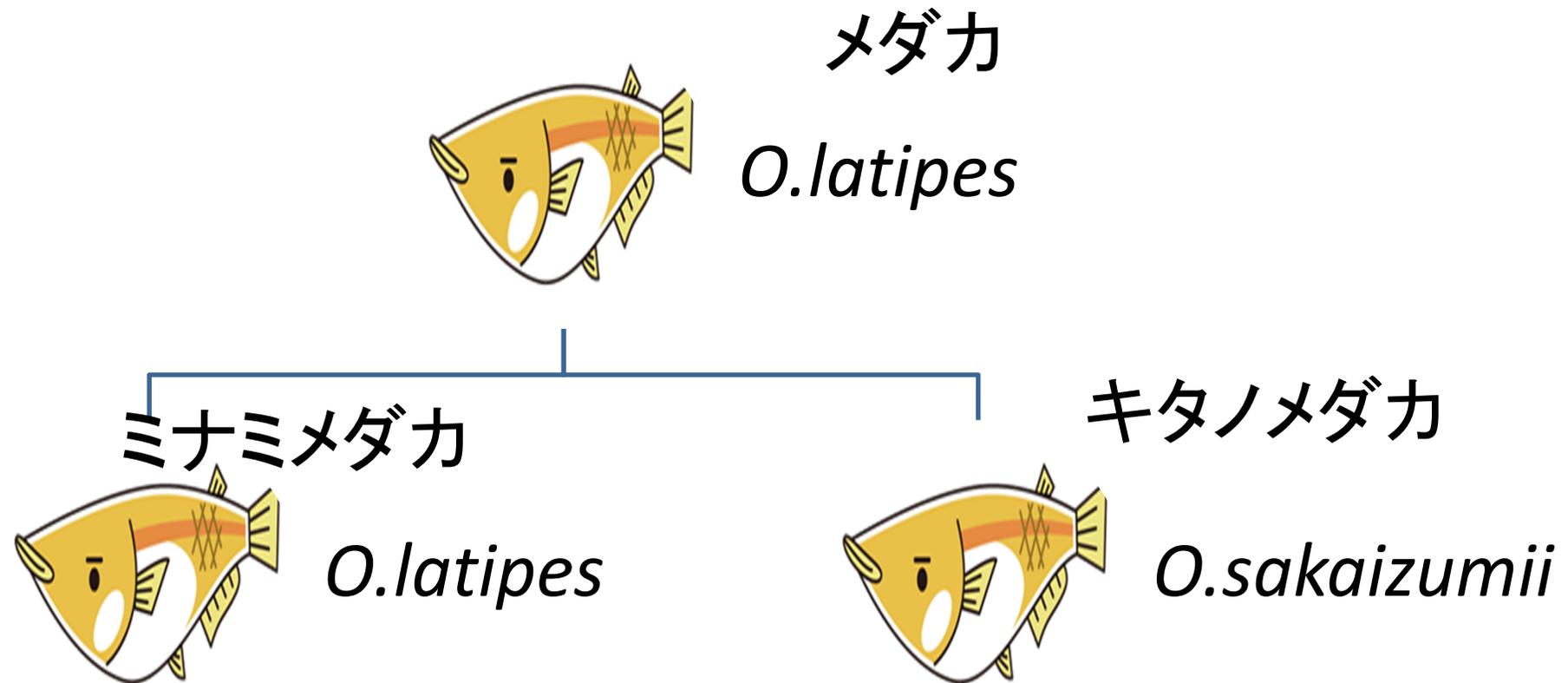
濃度区	症状等の区分	X h	Y h	
A mg/L	死亡	1/8	3/7	
	遊泳不能	2/8	2/7	
	遊泳異常	3/8	1/7	以下の*は全て同一個体
	外見異常			
	①表面	1/8	1個体は+遊泳異常	1/7 *
	②形態	0/8		1/7 *
	呼吸異常	2/8	1個体は+遊泳異常	1/7
正常	1/8		0/7	

# 今後の予定

- 症状の表記および記載法の統一について、関係各機関の意見を参考にしながら進めていく。
- 英語表記、OECDとの整合性についても考慮する。
- モリバンド（瀕死）の定義が決まったらお知らせする。

メダカは、分類学上2種類に分けられた。

日本からメダカが消えた!?



# 遺伝的多様性

ニホンメダカは、種内の地理的変異が非常に多様である

- 各クレードの分岐年代：推定200～800万年前

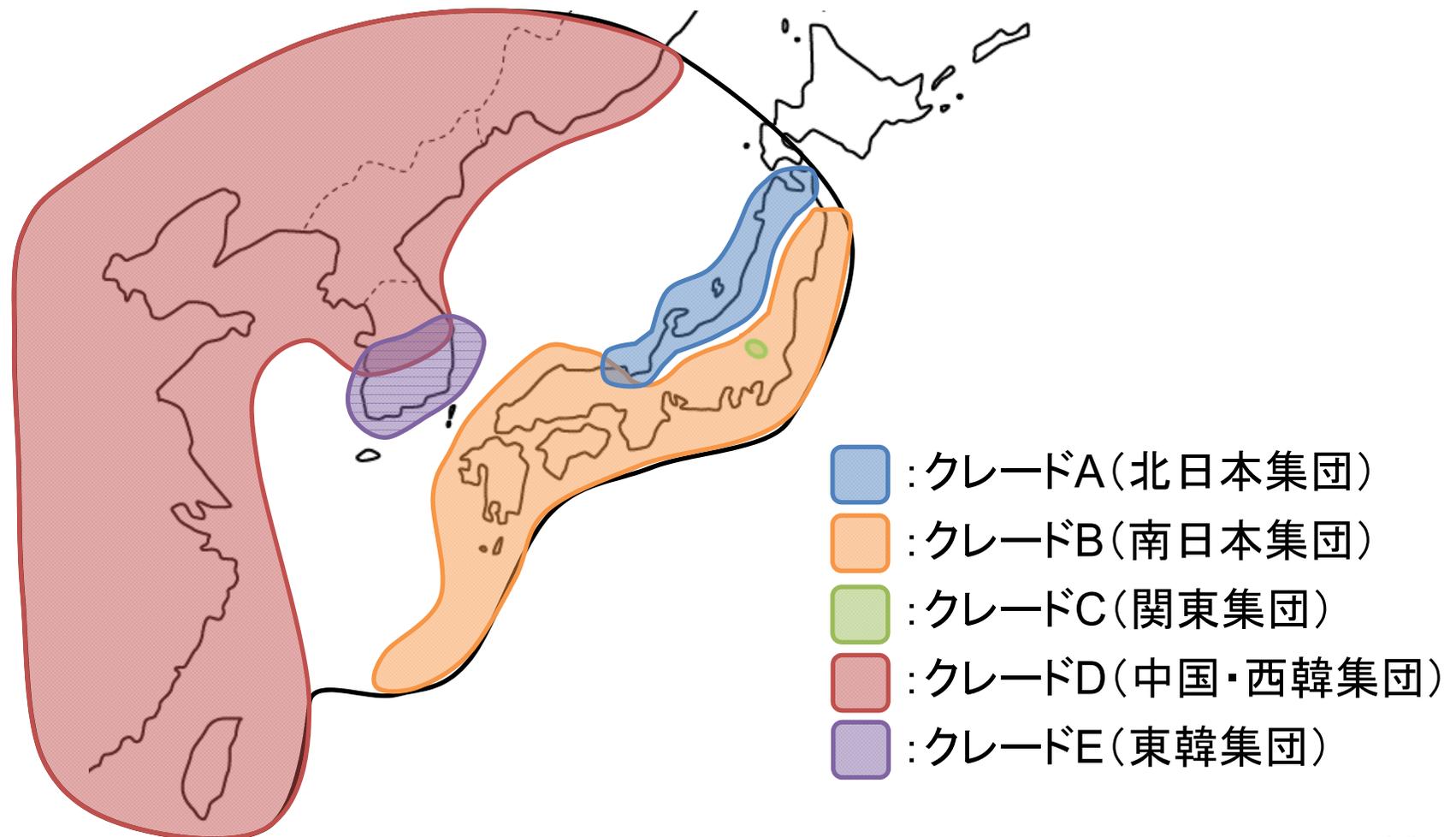


Fig. ニホンメダカにおける各クレードとその地理的分布(概略図)

# 遺伝的多様性

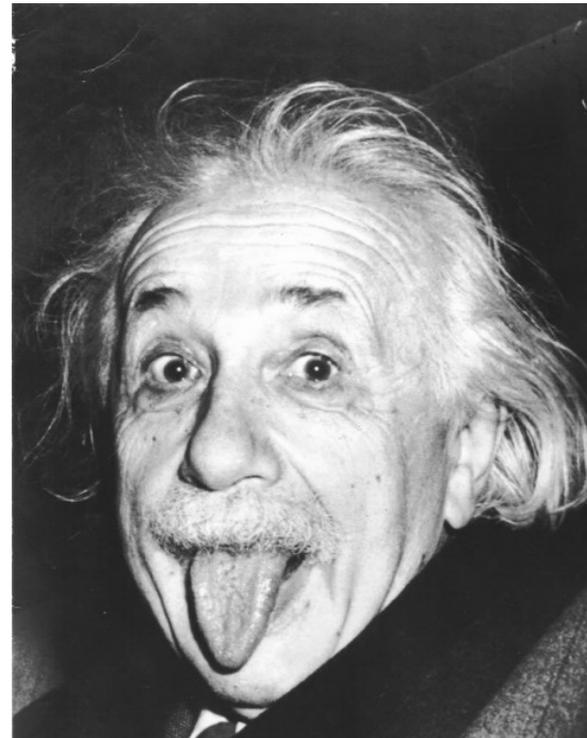
ニホンメダカは、種内の地理的変異が非常に多様である

- 各クレードの分岐年代: 200~800万年前

[参考] チンパンジーとヒトの場合: 400~700万年前



チンパンジー (*Pan troglodytes*)



ヒト (*Homo sapiens*)

# 遺伝的多様性

ニホンメダカは、種内の地理的変異が非常に多様である

- 各クレードの分岐年代: 200~800万年前

[参考] オオカミとイヌの場合: 1~10万年前



オオカミ (*Canis lupus*)



イヌ (*Canis lupus familiaris*)

# 遺伝的多様性

ニホンメダカは、種内の地理的変異が非常に多様である

- 各クレードの分岐年代・200～800万年前



南日本集団

photograph from T. Sato and K. Yoshida



photograph from T. Sato and K. Yoshida

南日本集団



photograph from T. Sato and K. Yoshida

北日本集団

しかし、形態的差異は極めて僅かである

# 遺伝的多様性

主な形態的差異: Asai *et al.* (2012)による

	黒色 網目模様	黒色 染み状斑紋	銀色鱗数	背びれ欠刻
キタノメダカ	ある	ある	0~9枚	浅い (軟条の 半分以下)
ミナミメダカ	ない	ない	10~23枚	深い (軟条の 半分以上)



南日本集団



北日本集団

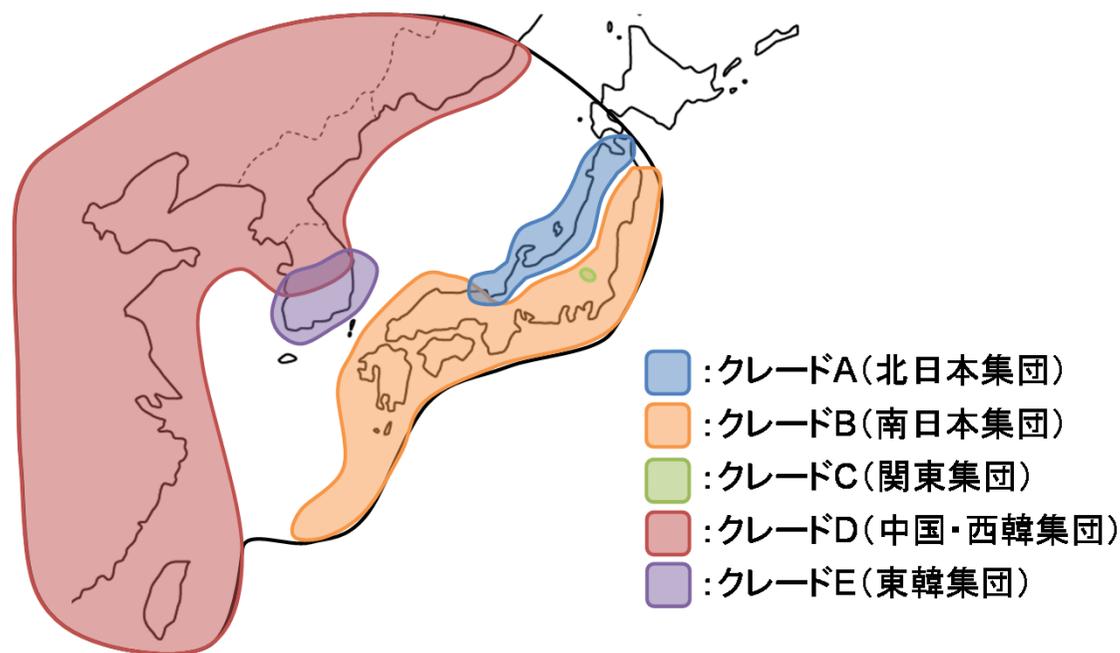
しかし、例外が非常に多く、判断材料としては不十分である

# ニホンメダカの遺伝的多様性に関する経緯

- 1950年代(江上ら)
  - 臀鰭軟条数の違いを報告
- 1980年代(酒泉ら)
  - 核DNAの多型を調査
  - 南日本集団と北日本集団に大別されることを報告
  - 加えて, 中国・台湾・朝鮮半島のニホンメダカについても調査
- 2000年代(Matsuda et al., Takehana et al.など)
  - 核DNA・mtDNA
  - 5つのクレード(前述)に分かれている事を報告

# ニホンメダカの遺伝的多様性に関する経緯

- Asai et al. (2012)により, 下記が提唱
  - クレードA: *Oryzias sakaizumii* (キタノメダカ)
  - クレードB: *Oryzias latipes* (ミナミメダカ)
  - クレードD: *Oryzias sinensis* (チュウゴクメダカ)



⇒ 上記に従う場合, 何がどうなるか?

# ニホンメダカ新種記載の影響

- 分類学
  - 分類の妥当性を巡り, 議論がされている
- 分子生物学
  - 「キタノメダカ」と「ミナミメダカ」の意図的な交雑によりゲノム解読や遺伝子組み換えを効率化させている
  - ⇒ 異なる2種を交配させたことになってしまう
- 毒性学
  - 多くの試験法で, 推奨魚種を下記としている  
「Japanese medaka (*Oryzias latipes*)」
  - ⇒ キタノメダカを使ったデータは無効?
  - ⇒ 「メダカ」を買ったらまず遺伝子を調べないといけない?

# medakaが試験魚のOECDテストガイドライン

**No.203: Fish, Acute Toxicity Test**

**No 204: Fish, Prolonged Toxicity Test: 14-Day Study**

**No 210: Fish, Early-life Stage Toxicity Test**

**No 212: Fish, Short-term Toxicity Test on Embryo and Sac-Fry Stages**

**No 215: Fish, Juvenile Growth Test**

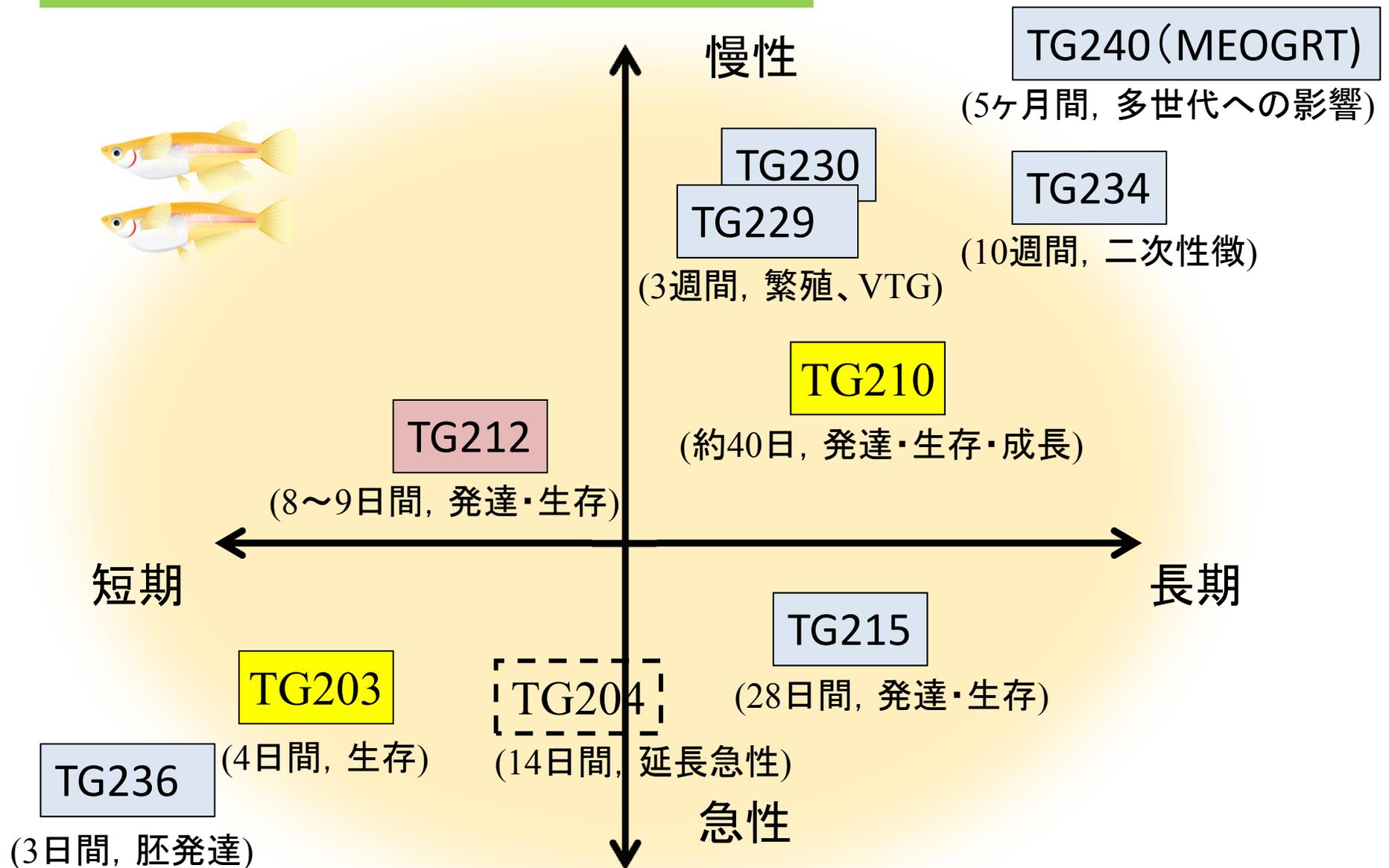
**No 229: Fish Short Term Reproduction Assay**

**No 230: 21-day Fish Assay**

**No 234: Fish Sexual Development Test**

**No 240: Medaka Extended One Generation Reproduction Test (MEOGRT)**

# OECD試験法の種類(魚類の例)



魚類を用いた生態影響試験の分類(概念)

## OECD TG240 のメダカに関する記載(原文)

The test species is Japanese medaka *Oryzias latipes* because of its short life-cycle and the possibility to determine genetic sex. Although other small fish species may be adapted to a similar test protocol, the specific methods and observational endpoints detailed in this guideline are applicable to Japanese medaka alone. The medaka is readily induced to breed in captivity; published methods exist for its culture, and data are available from short-term lethality, early life-stage and full life-cycle tests.

短いライフサイクルと遺伝子の性決定が可能なので、試験生物は日本メダカ*Oryzias latipes*を用いる。他の小型試験魚も用いることができるが、このガイドラインに詳述される特定の方法と観察のエンドポイントは日本メダカのみ適用できる。メダカは水槽中で繁殖し、飼育方法が公開されており、短期長期の毒性試験データが利用可能である。

## さらにメダカに求められる条件

- 若魚を容易に入手（購入）できる（TG203）
- 数百の均質な卵が集められる（TG210、234他）
- 胚発生、孵化、仔魚の死亡率が低い（TG210）
- 外見上で性が判別できる（TG234、240他）
- 遺伝的性(*dmy*) が判別できる（TG229、240他）
- 1ペアで繁殖できる（TG229、240他）
- ビテロジェニンが測定できる（TG229、230他）
- 成熟が早く次世代試験ができる（TG240）
- 急性・慢性のバックグラウンドデータがある

# OECD TGにsakaizumiiを入れるとしたら・・・

別種としてOECDに申請するため、、、

## まず基礎データを得る

- キタノメダカの至的温度は？（OECDは25-26度）
- 産卵数、孵化率、死亡率、成長速度、乳頭状小突起数等の基礎データを揃える
- 化学物質について急性・慢性毒性値等バックグラウンドデータの取得
- ビテロジェニンのELISA反応の確認(絶対値比)
- 内分泌かく乱化学物質の感受性差の知見
- ハイブリットを排除するか否か。見分け方。

以上の情報を揃えてから、OECD専門者会合を経てWNT（全体会議）での承認を受ける。

# 生態毒性試験上の問題

- コンタクトラボから良く受ける質問

化審法の**過去のデータ**は、キタとミナミのどちらですか。

キタノメダカとミナミメダカで、メダカとして**データの互換性**はあるのですか(感受性差)

**将来***O. sakaizumii*または**ハイブリッド**は化審法他の試験で使われるのですか。

- 余談 *O. sinensis*は使われていない。外見的に判別できる。*O. latipes*と妊性が**無い**。あった！

# 化審法の過去のデータは、キタとミナミのどちらですか。

- 高橋ら(環境省)の調査から、環境省GLPラボは南日本に偏っていて、自家生産しているラボのメダカのマイトタイプはミナミである。
- 化審法ではヒメダカを推奨しており、魚を購入しているラボの仕入れ先養殖業者(大和郡山市が有名)の遺伝子型はミナミである。(小山ら、魚類学雑誌・短報56(2): 153-157)
- 上記から環境省GLPから出されたデータはミナミの可能性が高いが、今までミナミかキタかを区別して使用されていない。

# キタノメダカとミナミメダカで、データの 互換性はあるか(感受性差)

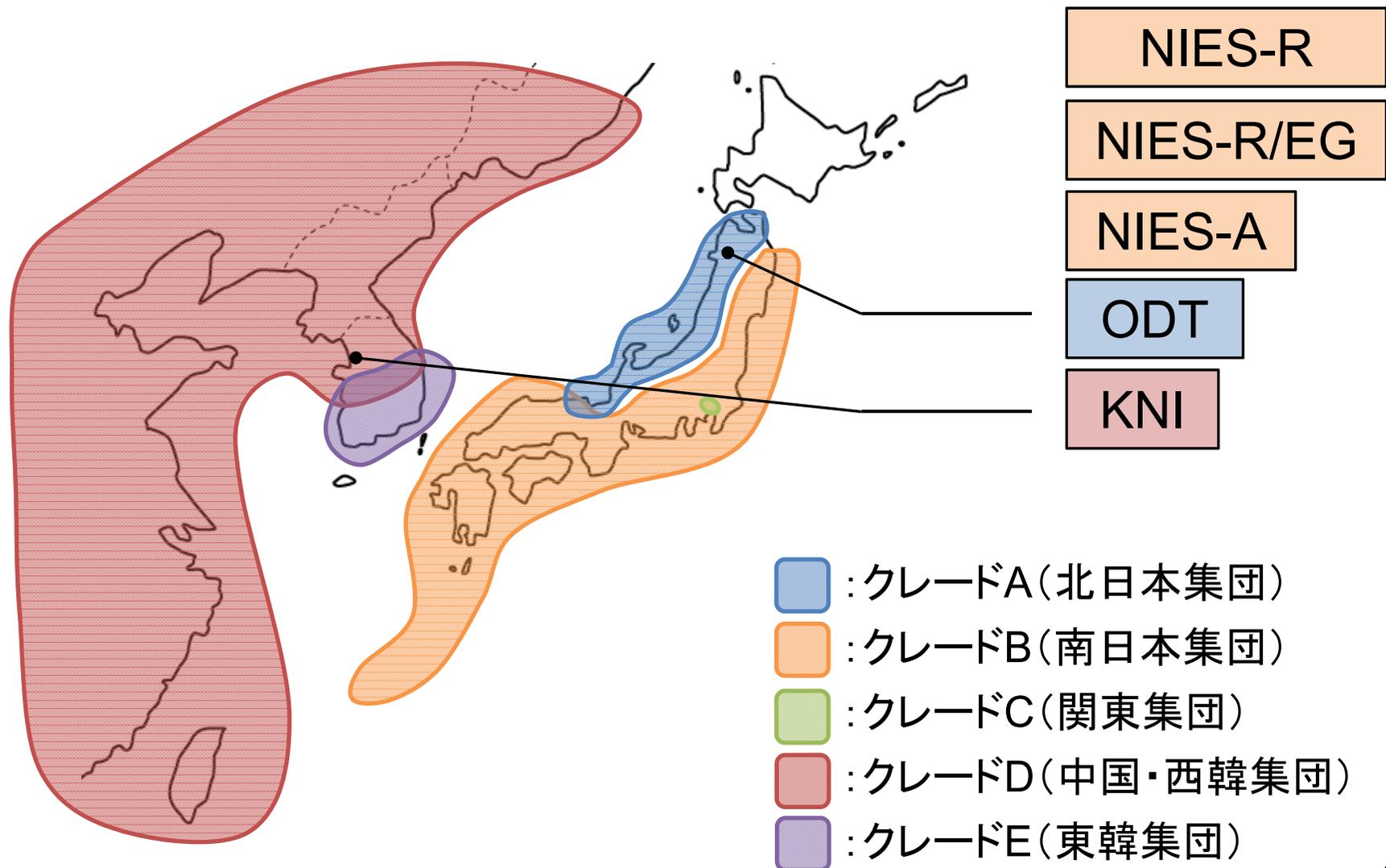
- 東洋大柏田教授らの発表では、キタとミナミの毒性値にほぼ差は無い。
- 我々のラボデータ(急性毒性値)でも差が無い。
- TG210等の慢性毒性試験の公式の*sakaizumii*データは存在しない。
- 内分泌に関する感受性は異なる(小林ら、A journal of integrative Biology, 2015)
- 遺伝的差異が存在するのに、感受性が同じであるとは言い切れない。

# 将来 *O.sakaizumii* またはハイブリッドは化 審法他の試験で使えるか

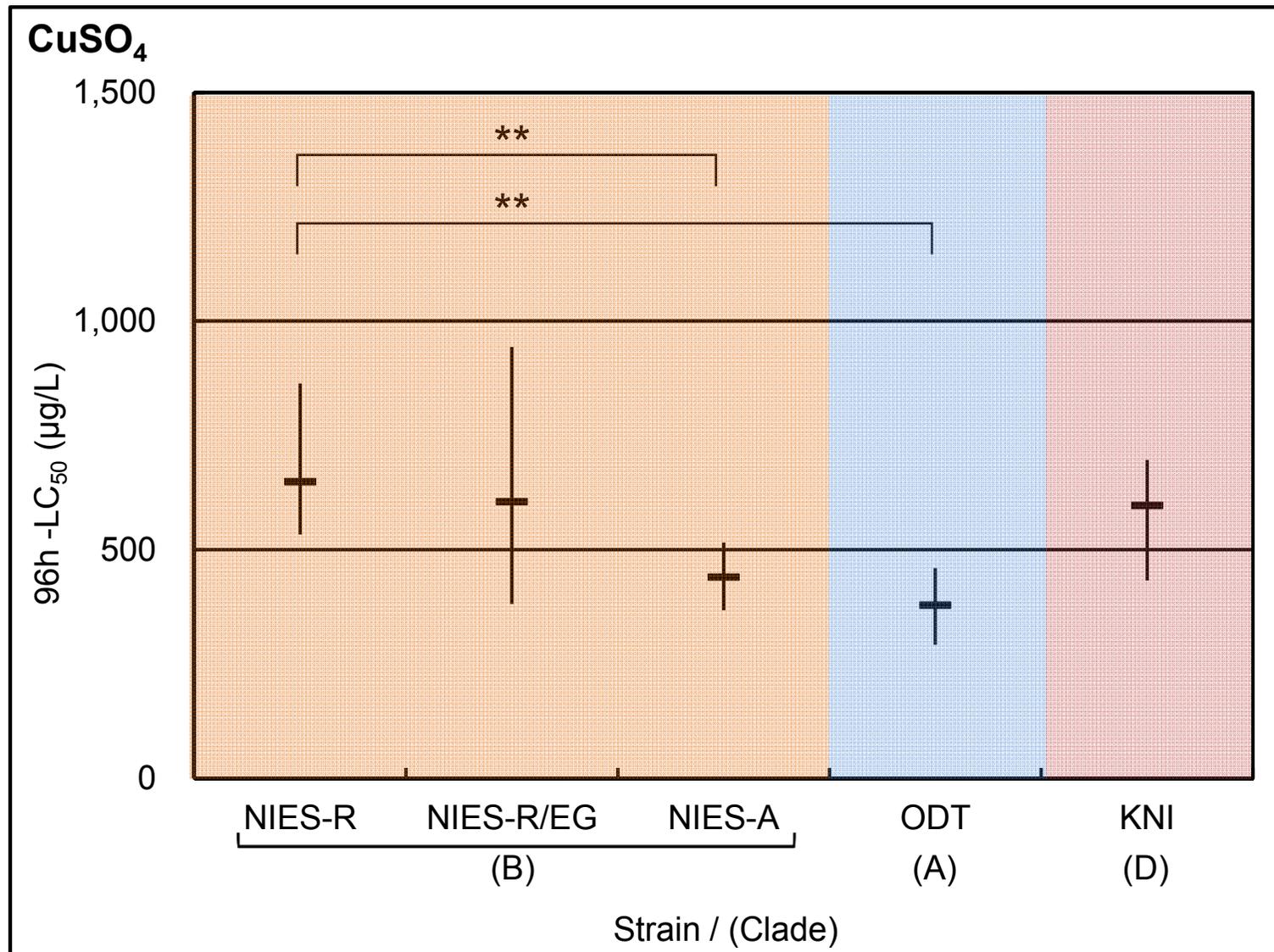
- *O.sakaizumii*の基礎データが揃い、OECDの推奨試験魚欄に名前が載れば、使える。
- ただし *latipes* と同等の感受性、検出範囲を持っているのなら、あえて *sakaizumii* を用いる必要性が不明。間違えて用いられた時の危険回避的意味合い。
- もし、*latipes* と感受性、検出範囲が異なるなら、*sakaizumii* を用いる価値がある。その価値とOECDの推奨試験魚にするための努力のバランスが取ればの話である。
- おそらくハイブリッドは用いない(種として定義できない)。ハイブリッドを検出する方法が分からない。(ミトコンドリアによるマイトタイプではわからない)

# 被験生物

系統の異なる5種のニホンメダカを供試



# 試験結果: CuSO<sub>4</sub>



**Fig.** ニホンメダカ個体群におけるふ化仔魚の半数致死量 (LC<sub>50</sub>) : CuSO<sub>4</sub>, \*\**p*<0.01, Bar: 95% C.I.

# 試験結果：2,4-DCP

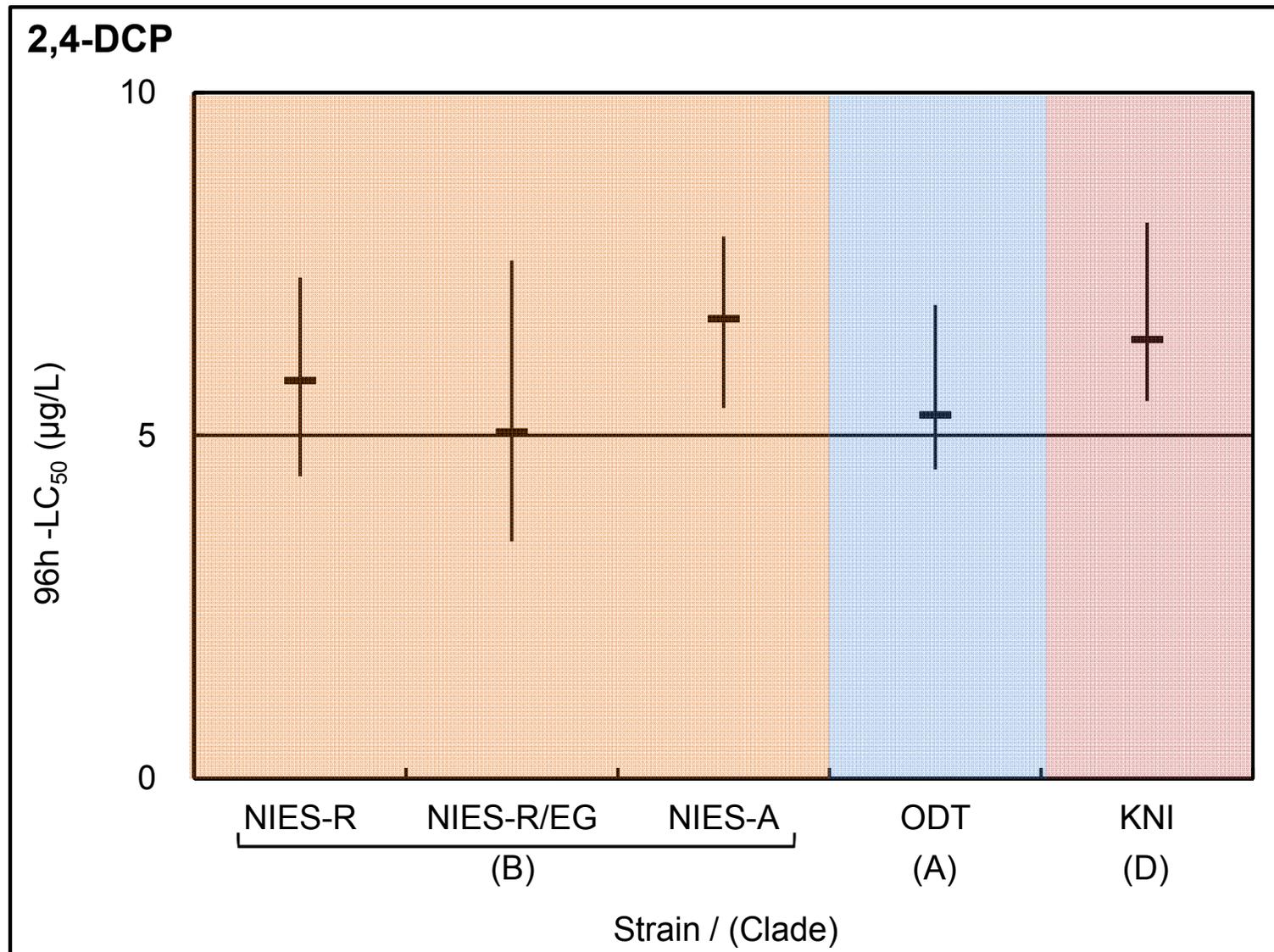


Fig. ニホンメダカ個体群におけるふ化仔魚の半数致死量 (LC<sub>50</sub>) : 2,4-DCP, Bar: 95% C.I.

# 試験結果：3,4-DCA

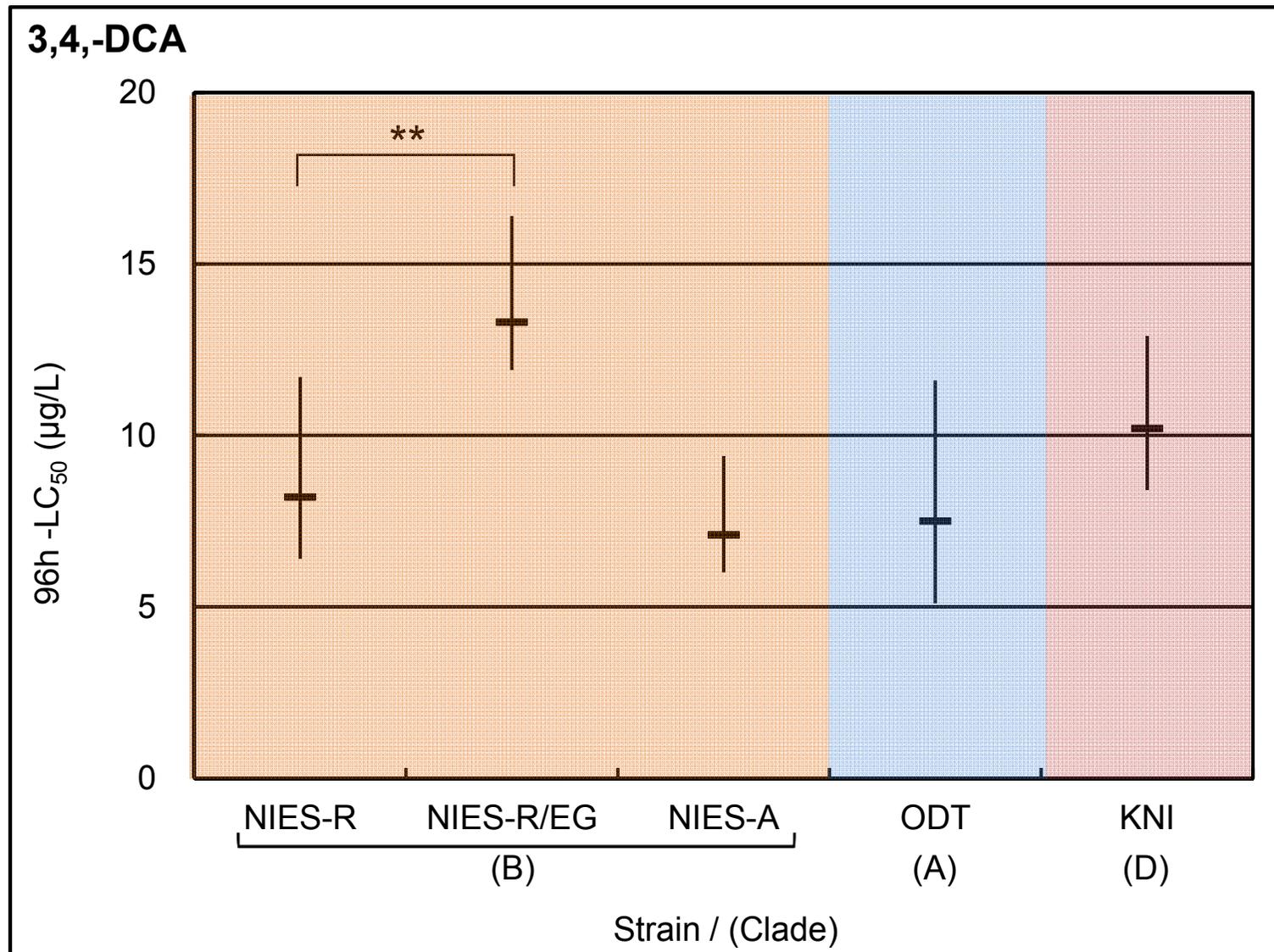


Fig. ニホンメダカ個体群におけるふ化仔魚の半数致死量 (LC<sub>50</sub>) : 3,4-DCA, \*\* $p < 0.01$ , Bar: 95% C.I.

# まとめ

- TG203の改定は検討中
- モリバンドについては、協力をお願いします。
- キタノメダカは当面使わない。
- ミナミメダカを試験魚とする。

**ご清聴ありがとうございました。**