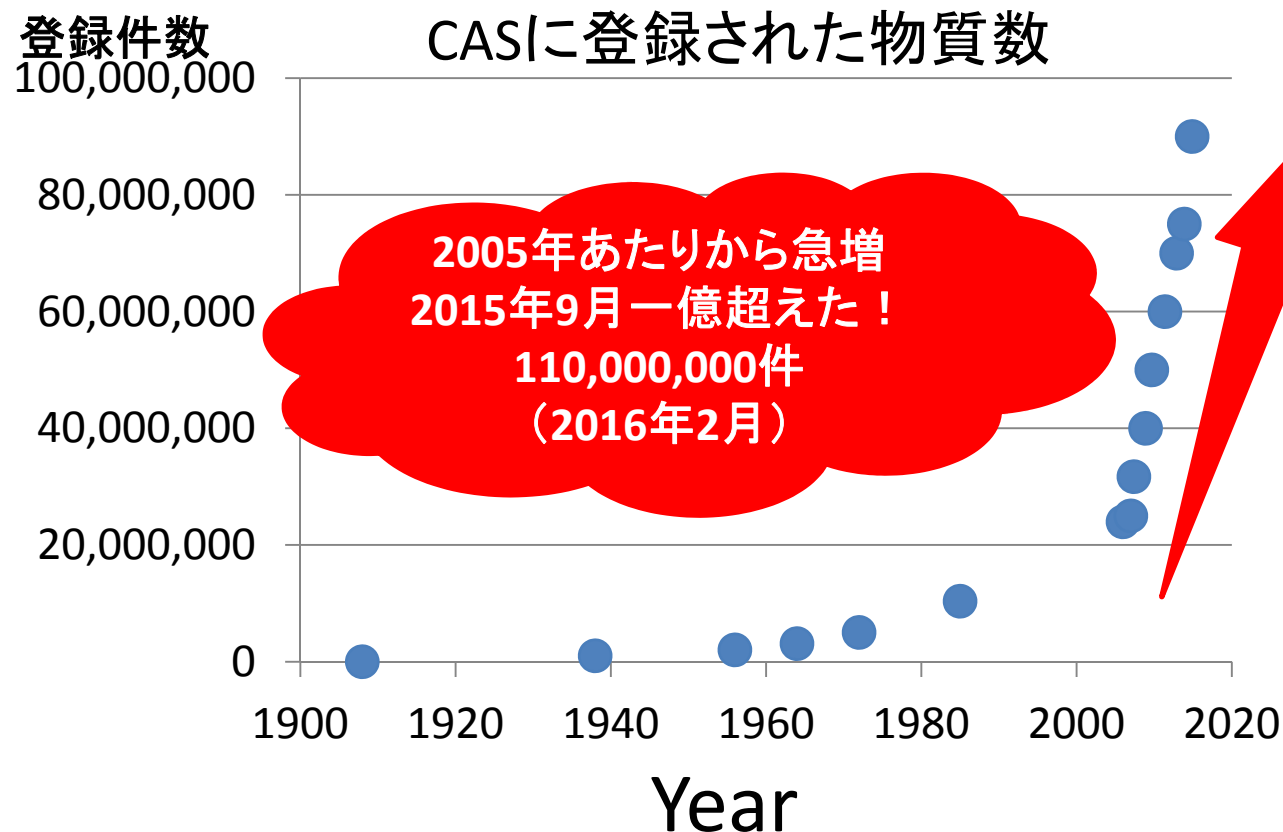


# 化学物質による生態影響の 新たな評価体系に関する研究

国立環境研究所 環境リスク研究センター  
鑪迫典久

## 背景：化学物質管理に使用され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。



## 背景：化学物質管理に使用される生態影響試験法で見落とされている点

- 化学物質の多様化に伴い、評価軸の多様化も必要
- 多様な生物による守備域の補完  
特定の生物、高感受性生物、化学物質インベントリーと棲息場所の関連
- 特殊なイベントに対する影響  
急性毒性は無いけど慢性毒性はある(摂餌・交尾行動、受精、産卵)化学物質が存在する
- 長期・多世代影響 (長期≠慢性)  
世代間移行、母体影響、遺伝蓄積等
- 特殊な物性・作用を持つ新たな化学物質の評価手法  
ナノマテリアル、内分泌かく乱化学物質、医薬品、農薬、健康食品、レアメタル

## 背景：化学物質管理に使用される生態影響試験法で見落とされている点

- 諸外国では多くの生物試験法が新規開発、登録済。
- OECDテストガイドラインでは38種類の*in vivo*生態毒性試験法(2004年以降の新登録は22件)が存在。
- 日本の化審法で採用されている生態毒性試験

メダカの急性・慢性毒性試験

オオミジンコの急性・慢性毒性試験

藻類増殖阻害試験

ユスリカ試験

日本うずら試験

7試験法、5生物種に  
過ぎない

- 国際標準化～データの国際互換性があるか

MAD (Mutual Acceptance of Data: データの相互受け入れ)

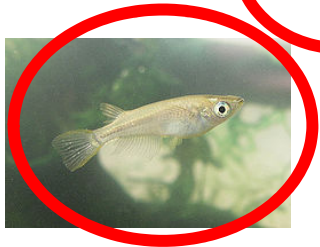
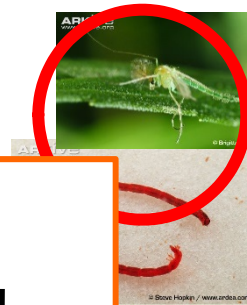
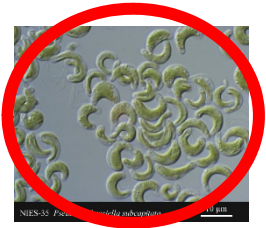


OECDテストガイドラインで  
採用されている生物  
38試験 127種

Fig. 1. *Scotophaga stercoraria autumnalis*

Fig. 2. *Moxaz*

*Eisenia fetida* & *Eisenia andrei*



日本の化審法で  
採用されている生物  
7試験、5種

## 背景：化学物質管理に使用される生態影響試験法で見落とされている点

効率化が必須～省略、簡素化、国際相互互換 MAD  
(Mutual Acceptance of Data: データの相互. 受理

### 動物愛護や代替試験法の考え方

- *in vitro*毒性試験  
試験管内で細胞などを用いて行う試験
- *in silico*解析  
様々なデータを使用し、コンピュータ上で行う実験
- 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、検討。  
AOP(Adverse Outcome Pathway)

## 背景：化学物質管理に使用される生態影響試験法で見落とされている点

化学物質管理体系が必要（実態に即しているか？）

- スクリーニング試験として急性毒性試験⇒慢性毒性実施で良いのか？
- *in vitro*試験、*in silico*解析と*in vivo*試験を組み合わせた仕組みがない
- 省力化のためには、試験法の取捨選択が必要
- 化学物質を総合的に管理するアルゴリズムが必要



試験法間の関連とその使い方を示す。



## 本研究の目的

1. 多様化する化学物質の管理に関わる個々の生態影響試験の充実
2. 試験法の国際標準化
3. 次世代に向けて新たな化学物質管理体系(アルゴリズム)の構築

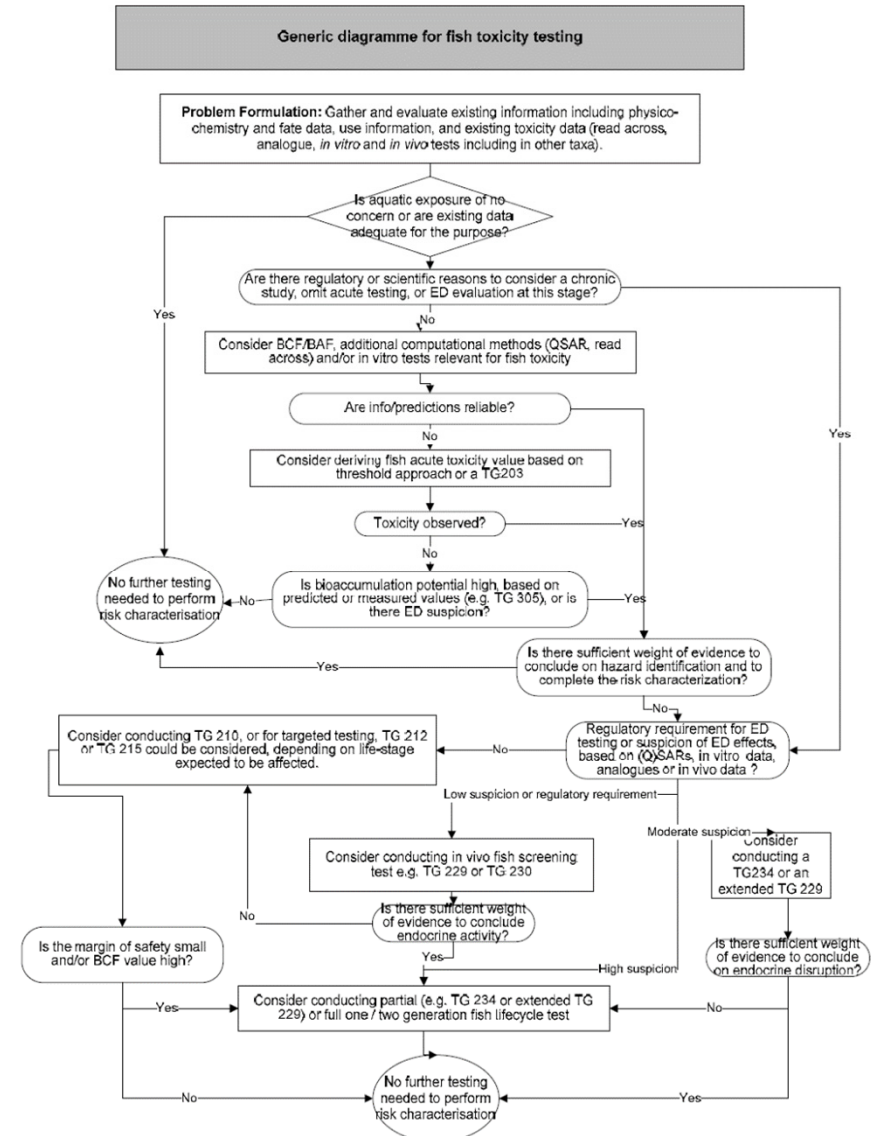


## 研究概要

- 化学物質管理に関わる生態毒性試験法の充実に資する
- OECD試験法、米国環境庁試験法、カナダ環境局試験法、ドイツ試験法、米国試験材料協会、ISOなど既存のガイドラインなどを精査（**採長補短**）
- 国際化を視野に入れつつ、日本の状況に適用できるように、試験条件や生物種の変更を検討（モディファイ）
- さらに足りない部分を補う試験法を考案（オリジナル）
- 適切な生態毒性試験選択のアルゴリズムを提案

# 最終目標

- 持続可能な生態系と生物多様性を実現するため適切な生態毒性試験選択のアルゴリズムを提案
- 有用かつ実現可能な生態毒性試験法の提案、新規開発
- 化学物質管理に関する世界共有の中長期目標(WSSD2020年目標)および2020年以降の化学物質管理を視野に入れた提案をする。
- レファレンスラボラトリー機能を利用した、試験法の周知、啓発



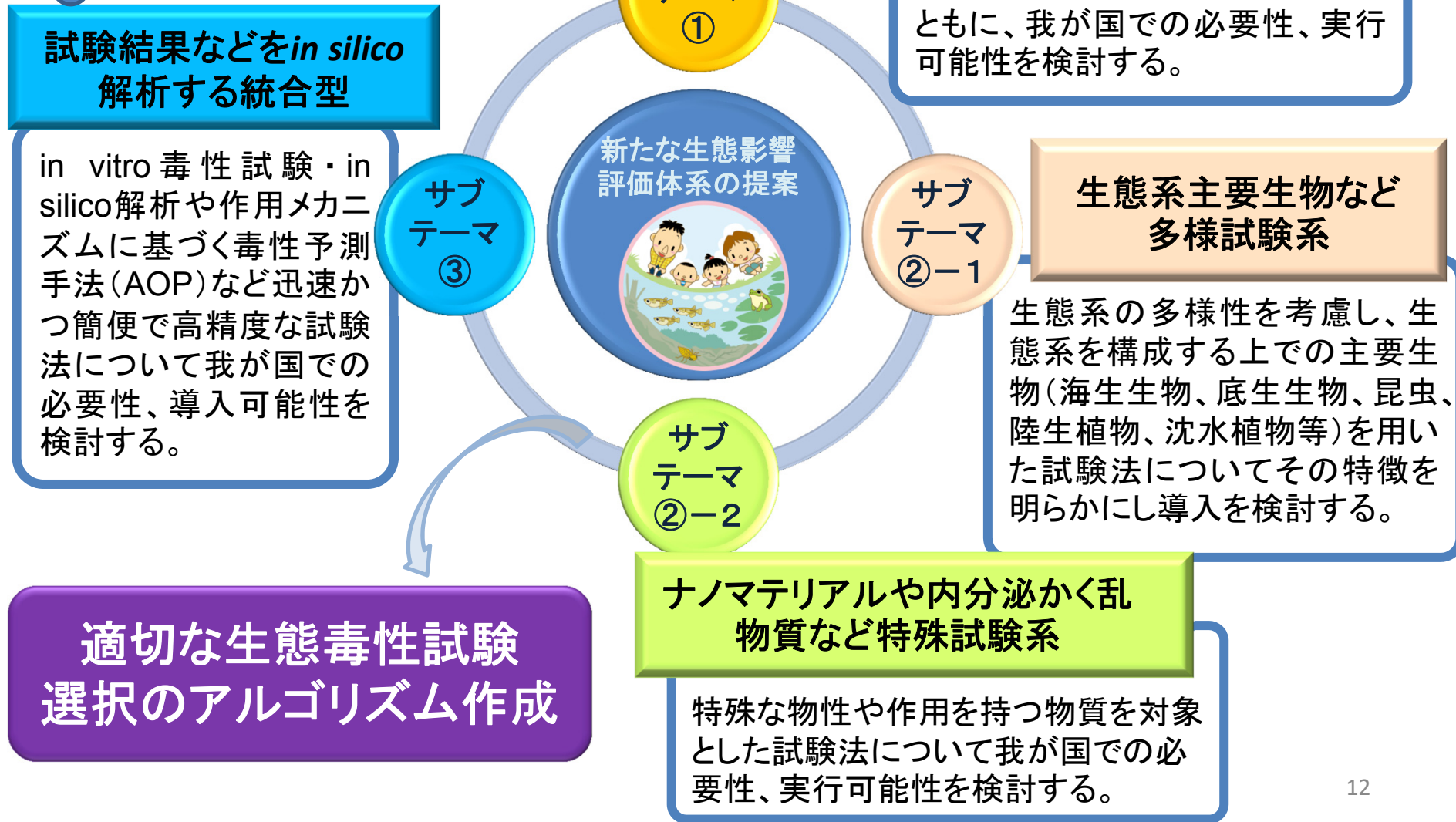
試験選択のアルゴリズムの例

ENV/JM/MONO(2010)16

FISH TOXICITY TESTING FRAMEWORK

から引用

# 各サブテーマの構成図



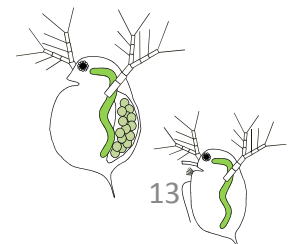
# サブテーマ①「繁殖影響試験など長期かつ多世代の影響を評価する試験法の開発」

## 複雑試験系の検討～アルゴリズムの高位に位置する

- 継世代影響（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）
- 生物のライフイベント時の特異的な影響を捉える

これに対応するためには**長期・複雑な試験**が必要。  
例えば・・・

NEOGRT、MMTなどの多世代試験  
OECD TG229、234などの繁殖・交尾行動を調べる試験  
OECD TG211 ANNEX7のミジンコ性比を調べる試験など

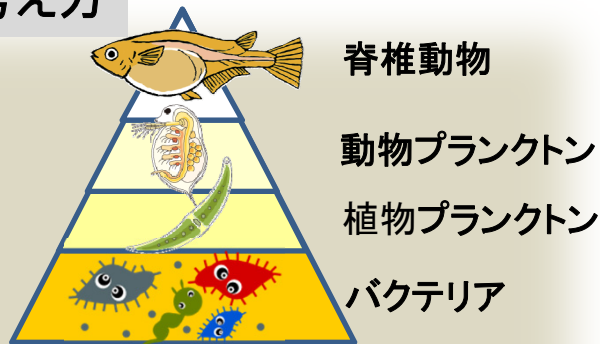


# サブテーマ②-1「生態系を構成する主要生物を用いた試験法の研究」

## 多様試験系の検討～アルゴリズムの分類・構成に位置

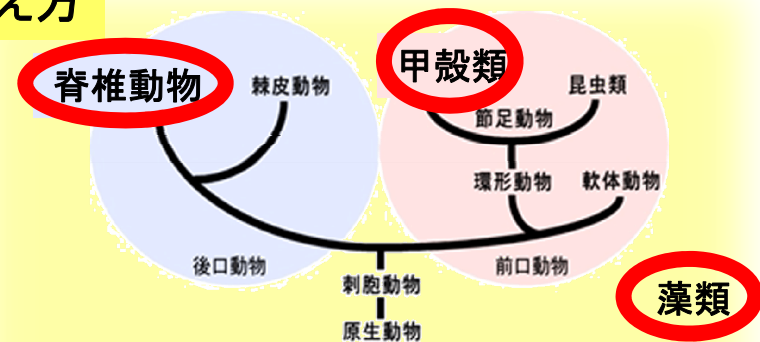
- ・日本の化審法では海産生物、昆虫、陸生植物、沈水植物などの試験が抜けている。  
化学物質の**作用の多様化**、環境中の**動態**に対応させる
- ・生物種を増やしたら生態系がわかるという訳ではない。

従来の考え方



生態系を構成する生物で試験する

今回の考え方

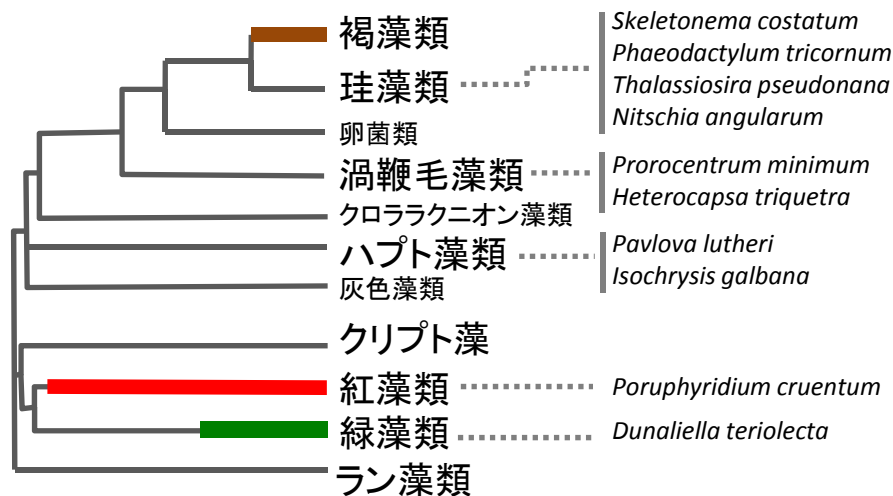


生理生化学反応が異なる(進化学的に離れている)、生息場所が異なる生物で試験する。

## ■ 海産藻類を用いた毒性試験法の現状

名称	OECD	ISO	U.S.EPA	ASTM	EU	日本国内		
	Guidelines for Testing of Chemicals	TC147 Water quality SC5 Biological methods	Ecological Effects Test Guideline OPPTS 850	ASTM Historical Standard	Reach Test Guidance	環境省水生生物の保全に関する水質環境基準	水産庁海産生物毒性試験指針	日本工業規格工場排水試験法 JIS K0102
試験法		[急]ISO 10253 Algal Growth Inhibition Test	[急]850.5400 Algal Toxicity, Tiers I and II	[急]E1218-97a Static 96h Toxicity Test with Microalgae		ISO10253に準拠した藻類生長阻害試験	[急]生長阻害試験	
試験生物		<i>Skeletonema costatum</i> , <i>Phaeodactylum tricornutum</i>	<i>Skeletonema costatum</i>	<i>Skeletonema costatum</i>		<i>Skeletonema costatum</i>	<i>Skeletonema costatum</i> とするが、複数種選択するのが望ましい	

## ■ 毒性試験に用いられているその他海産藻類の研究成果



■ 褐藻類アラメ・カジメが構成する海中林では、1平方メートルの海底あたり2-3 kg/年の生産量があり、これは陸上の森林の生産量を凌ぐ数値である。

■ 海洋性微細藻において、ラン藻類は、珪藻類や渦鞭毛藻などに加え、1次生産者として重要な地位を占めている。

## サブテーマ②-2 「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」

特殊試験系の検討～アルゴリズムの中位に位置する

内分泌かく乱物質や医薬品など特殊な作用を持つ物質、  
ナノマテリアルなど特殊な物性を持つ物質を対象とした  
試験法は世界的にも開発途上にある。参考にすべき。



必要ならば、新しい試験法の開発も  
視野に入れる。





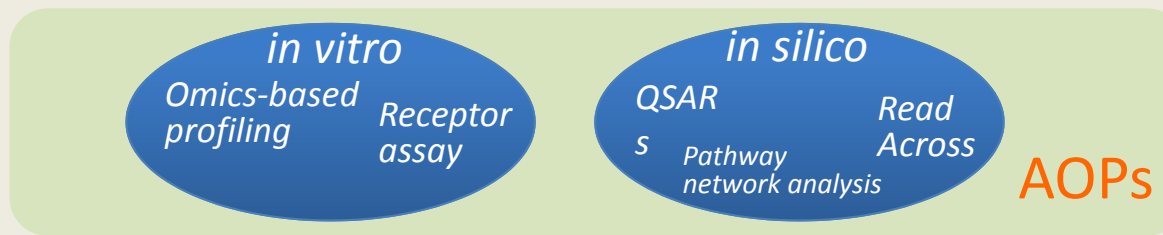
## サブテーマ③「*in vitro*毒性試験・*in silico*解析や作用メカニズムに基づく毒性予測手法の研究」

### 簡易試験系の検討～アルゴリズムの開始に位置する

- *in vitro*毒性試験、*in silico*解析の開発と位置付け
- 作用メカニズムに基づく簡便かつ迅速な、統合型毒性予測手法(AOP)の導入検討
- 上記と*in vivo*試験とを連携させて、我が国への適用可能性を検討
- 試験の簡素、迅速、省エネ、低コストと、精度との天秤を考慮

# サブテーマ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」

諸外国で使用／提案されている「簡便かつ迅速」な試験法の網羅的収集



日本における必要性はあるか？

実行可能性はあるか？

重要度の優先順位をつけてリスト化

- (1) ○○○○ Assay
- (2) ×××× model-based extrapolation
- (3) △△△△ profiling
- ⋮
- ⋮
- ⋮

リスト上位のものから

- ・ *in vitro*試験
- ・ 統計学－計算化学による *in silico*解析による検討

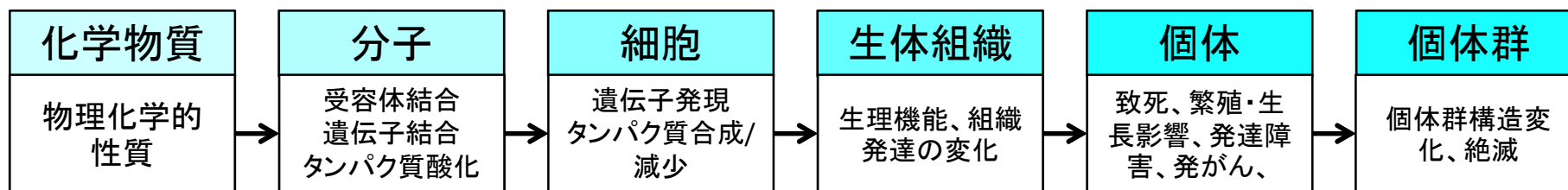
簡便・迅速な試験法の適用可能性の評価

# Adverse Outcome Pathway (AOP)

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)から、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 Relationship)を整理・構築していく。

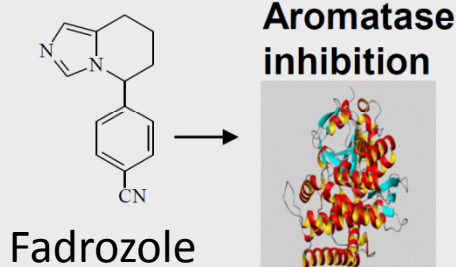


有害性評価における*in silico*, *in vitro*試験データ(QSAR, ゲノミクス, トランスクリプトミクス, メタボロミクス)の有効活用へ

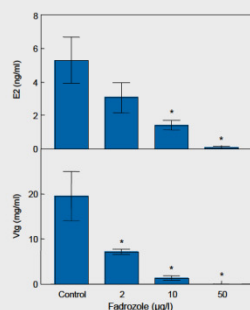


## 例: アロマトラーゼ阻害物質

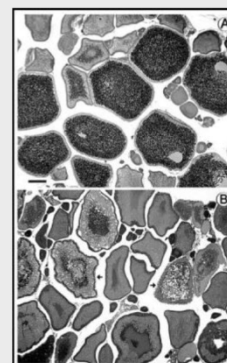
(出典: Ankley GA, 2012, 6<sup>th</sup> SETAC Europe Special Science Symposium)



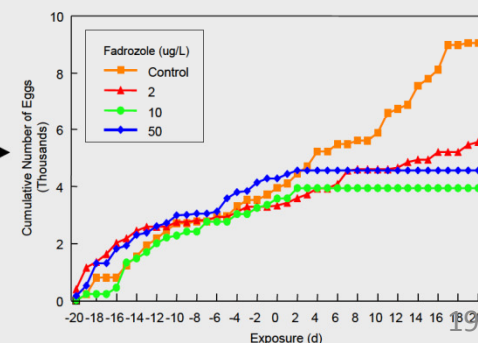
### Reduced E2, Vtg synthesis



### Impaired vitellogenesis



### Reduced fecundity

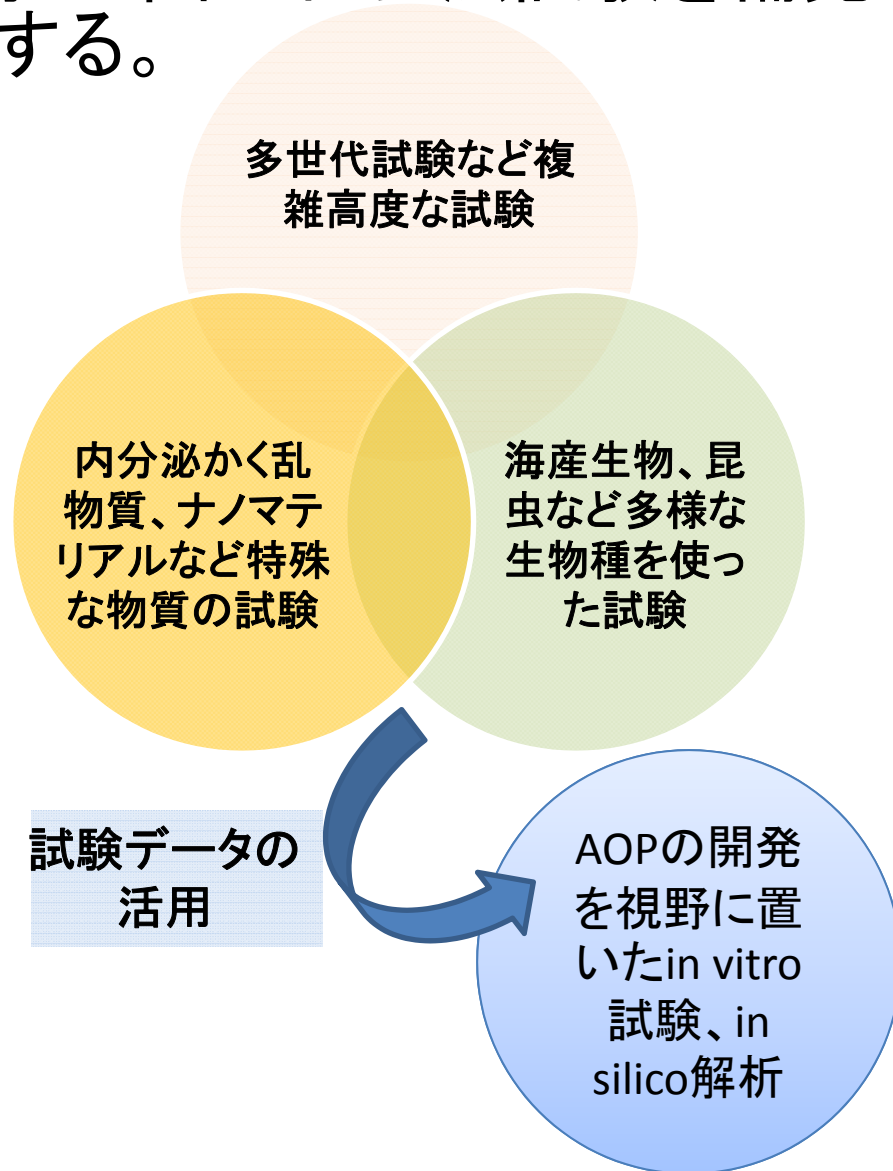


## 3年間の研究方針

1. 先行する諸外国の生態毒性試験法（OECDの試験法、米国環境庁の試験法、カナダ環境局の試験法、ドイツ試験法、米国試験材料協会、ISOなど）のガイドラインの試験法を精査し、分別と取捨選択を行い我が国の**化学物質管理を充実できる**試験法のリストを作成する。
2. 試験に必要な設備、道具や試験生物を調達し、実施可能な試験については予備的に**試験を実施し、問題点を抽出**し、日本へ適応可能か検討する。
3. 化学物質の特徴、生物試験の特徴を踏まえたうえで、生物試験法の**使い方（アルゴリズム）の提案**を行う

# 平成27年度研究方針(1年目)

我が国の化審法試験を補完できる試験法のリストを作成する。



## リスト化する項目

ガイドライン名

生物種(入手可能か、飼育可能か)

試験期間、生物のステージなど

影響指標(何のための試験法か)

試験コスト(国内で行った場合)

技術的な難易度

カバーする化学物質の物性、特徴、分布

実際の運用状況

リスク評価における位置づけ

## 優先順位づけ方法

日本に導入する必要があるか

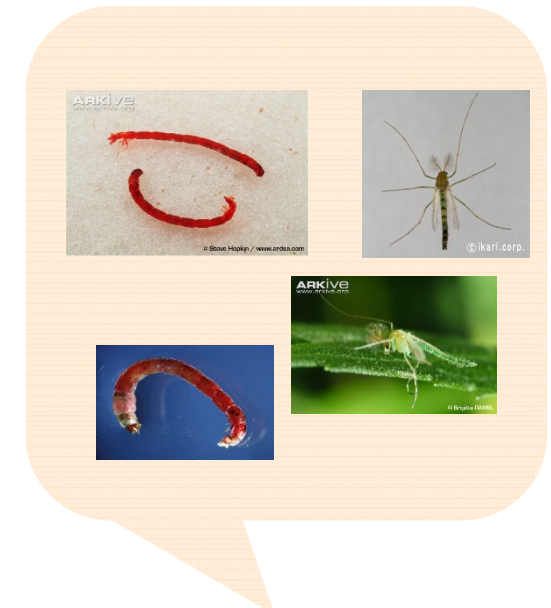
日本に導入可能か

改良、工夫は必要か

# 平成28年度研究方針(2年目)

リストの優先順位に従い実際に試験を行い、実行レベルでその問題点等を明らかにし、日本の環境に適用できるような試験法を検討、開発する。

検討項目の例(サブテーマ:2-1)	
生物入手方法	
試験の技術的難易度	
試験結果の再現性	ガイドライン上の推奨種はその国に適した種である場合が多い。また推奨種に入っても、メジャーなものでなければあまり再現性が検討されておらずうまくいかない可能性がある。
日本の環境に適合性確認	硬度、pH、温度など
その他	



日本の化審法で採用されているヨシイマツイは……

## 平成29年度研究方針(3年目)

- 実行レベルで問題点等を明らかにして日本の環境に適用できる試験法を検討する。
- 後半はサブテーマ(1)～(3)を統合し、それぞれの結果から得られた、試験法を整理し、それらを連携させた効率的な化学物質評価体系の再構築を行う。
- 再構築にあたり、米国：有害物質規制法(TSCA)、カナダ：カナダ環境保護法(CEPA)、欧州：化学物質の登録、評価、認可及び制限に関する規則(REACH規則)、中国：新化学物質環境管理弁法(弁法)、韓国：有害化学物質管理法等を参考にする

## 本研究の行政貢献

- 化学物質管理に役立つ、研究面からの新たな提案を行う。
- アルゴリズムの構築により、体系的に生物試験を捉え、国際標準に近づける。
- 増加する化学物質に対して、効率の良いリスク評価が行えるシステム作りに資する。

