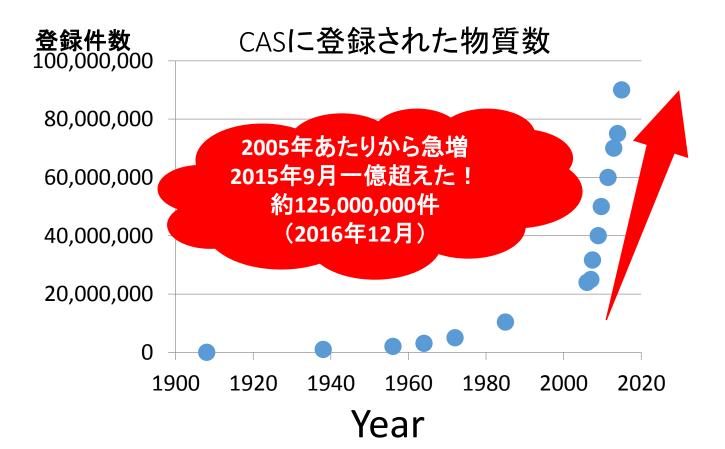
化学物質による生態影響の 新たな評価体系に関する研究 5-1556

国立環境研究所 環境リスク・健康研究センター 鑪迫典久、青木康展、林岳彦、渡部春奈 協力 山本裕史、古濱彩子

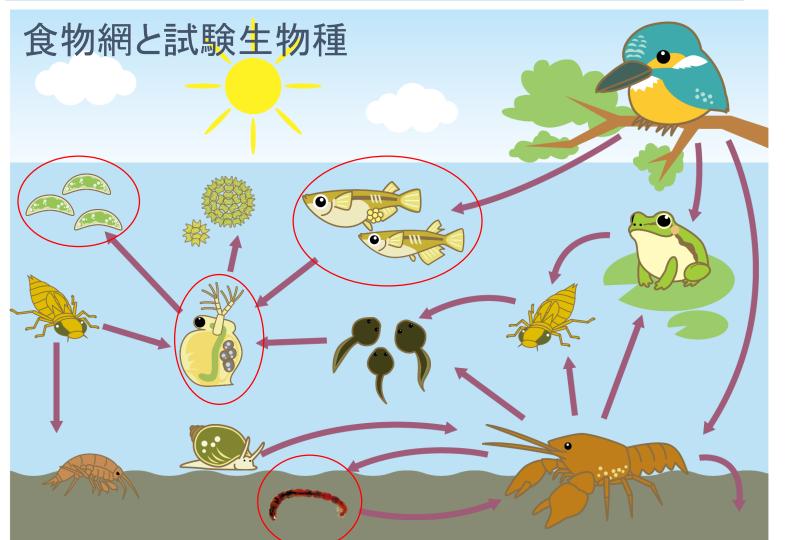
背景:化学物質管理に使用される生態影響試験法で 見落とされている点

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。



現行の化審法の生態毒性試験は

- 生態系ピラミッドから形成されている。
- 全ての試験の重みづけはほぼ同等
- 化学物質の性質による生態試験の取捨選択は無い



背景:生態影響試験法の再考視点

- 長期・多世代影響の懸念 ⇒サブテーマ1世代間移行、母体影響、遺伝蓄積、持続可能な生態系保全
- 多様な生物を用いた守備域の補完 ⇒サブテーマ2(1)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
- 特殊な物性・作用を持つ新たな化学物質⇒サブテーマ2(2)

急性毒性は無いが慢性毒性がある(摂餌・交尾行動、受精、産卵)化学物質が存在~~~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

- in vitro試験・in silico解析・AOP ⇒サブテーマ3
 効率の良い化学物質管理システム、動物愛護
- サブテーマ1~3を統合して試験体系の再構築⇒29年度全員
 迅速性、経済性、科学的な妥当性を考慮して統合アルゴリズムの提案

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 繁殖・多世代影響など 複雑試験系

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

新たな生態影響評価体系の提案

3



サブ テーマ ②-1 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)

サブ テーマ ②-2

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) ナノマテリアルや内分泌かく乱 物質など特殊試験系

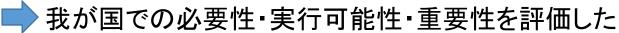
特殊な物性や作用を持つ物質を対象とした試験法

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



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

どのような規制用件に入っているか?

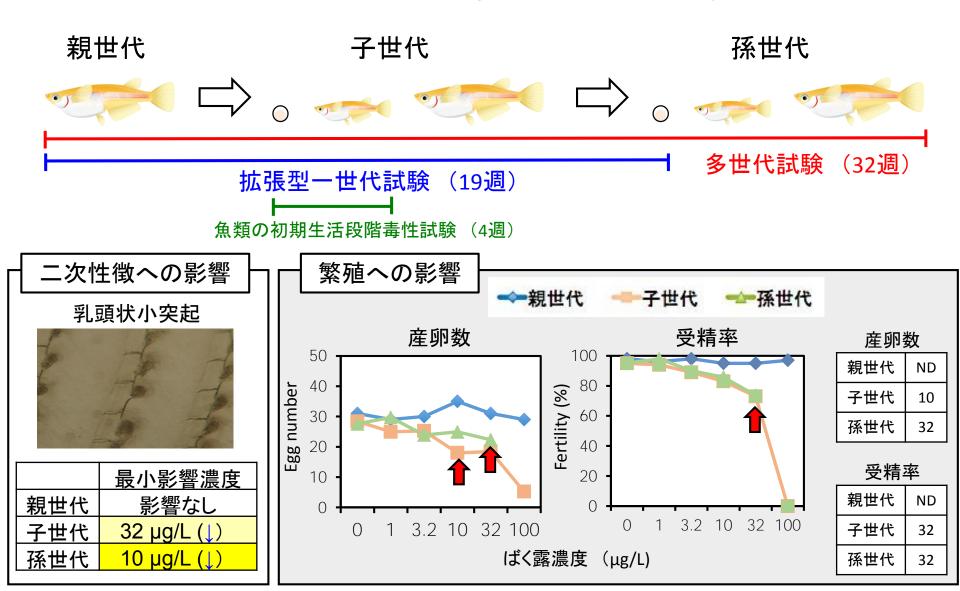
リスト化(詳細は補遺)

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
甲殼類	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

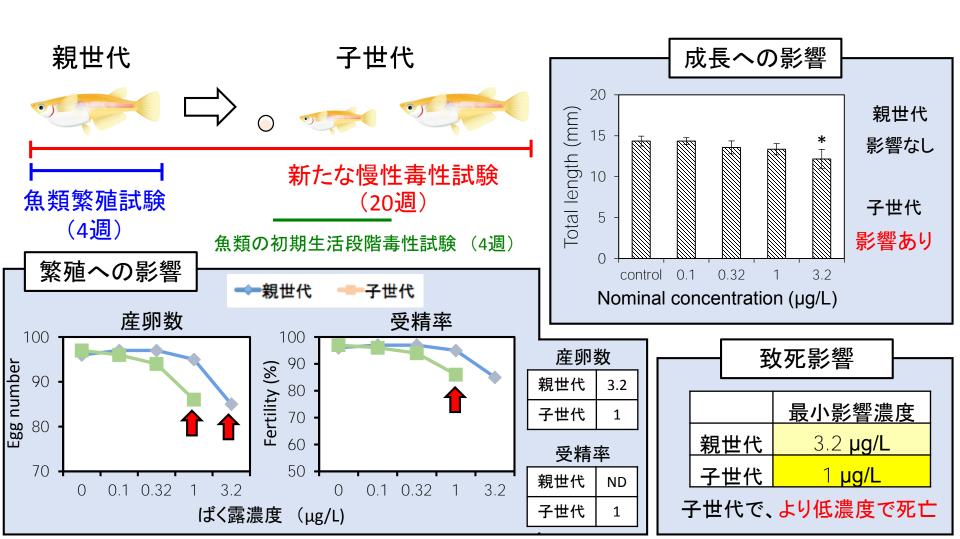
結果1:長期・多世代試験法の開発

拡張型一世代試験 (MEOGRT)から多世代試験の提案 (4-NP)



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)

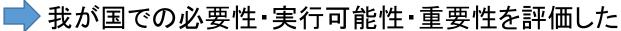


サブテーマ2: in vivo試験の充実化

- (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



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

どのような規制用件に入っているか?



○·△·×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?

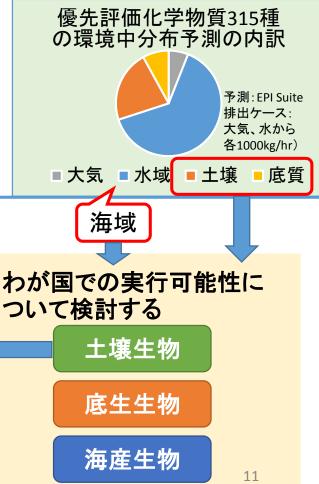
- ・土壌や底質にも多く存在→水域だけではなく、土壌と底質中の生態リスク評価が必要。
- 淡水域<海水域**>海産生物を用いた試験が必要**。

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?

試験の必要性、重要度のリスト例(詳細は補遺)

生		114		国内		人の必	要性∙፤	三要度
生物分類	試験生物	式験生物 対象 試験法 毒性 試験法		導入状況	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	×	0	0	〇 土壌	0
物	節足動物 トビムシ	慢性	OECD TG226, 232	×	0	0	O 土壌	Δ
	環形動物 ミミズ	急性/ 慢性	OECD TG207, 220, 222等	×	0	0	土壌	0



(1)高等植物の発芽発根試験

試験生物種・試験法の選択







- 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



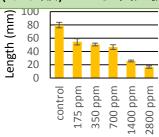


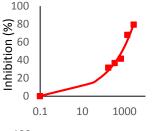


試験物質を含む0.2%ゲラン ガム上に撒種し、27℃、暗 所下で3日間培養後、発芽 率およびroot &shoot長を計 測する。

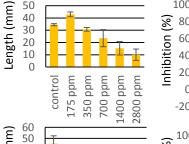
基準物質(ホウ酸)による本試験法の評価

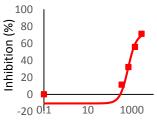




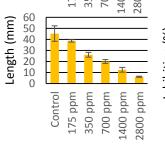


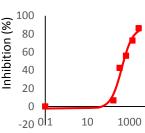












根伸長阻害率(ホウ酸 714ppm)の比較

Phytotestkit (MictoBioTest, Inc.)	平均根伸長 阻害率 (%)	許容範囲(%)
L. Sativum	45	28-62
S. alba	44	22-65
S. saccharatum	30	9-52

本試験	平均根伸長 阻害率 (%)	95% 信頼区間
L. Sativum	47.9	32.2-51.3
S. alba	48.5	40.1-58.3
S. saccharatum	27.3	20.4-37.1

(2)ミズを用いた毒性試験

諸外国における試験法の比較





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 (3日)	E. foetida (シマミミズ)	土壌添加 (簡易法有り)	致死
	ISO 11268-1	14日	E. foetida	土壌添加	致死
	ISO 17512-1	2日	E. foetida	土壌添加	土壌中生息能
亜慢性	OCSPP.850.3100	28日間	E. foetida	土壌添加	致死, 体重減少
慢性	OECD TG220	42日	E. albidus (ヒメミミズ)	土壌添加	繁殖
	OECD TG222	8週間	E. foetida	土壌添加	繁殖
	ASTM E1676-12	28日間	E. foetida	土壌添加	生死, 繁殖等
	ISO 16387	42日	E. albidus	土壌添加	繁殖

化学物質管理制度における試験実施要件



🔷 まず急性毒性試験から検討

- REACH: 数量段階に応じて要求試験変化。ミミズ試験は陸生生物への影響として≥100t/yで急性 毒性(OECD TG207等), ≥ 1000t/yで慢性毒性(OECD TG222等)がそれぞれ要求。
- 欧州医薬品:段階的なリスク評価により各種試験が要求。Phase II -Bの高次評価時に、ミミズ急性 毒性(OECD TG207)が要求される。
- TSCA: 所有データを基に化学物質の特性より化学物質毎に必要試験を要求

(2)ミズを用いた毒性試験

1) ミズを用いた生態毒性試験法の情報収集

- 1. 土壌生物としてのミミズを用いた生態毒性試験の**意義・位置を整理**する。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)の差異を整理する。
- 2. 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) を収集する。

2) 飼育方法, 試験法に関する検討事項

- 1. シマミズの適切で安定的な飼育について, OECD TG207等を参考にしつつ調査・検討する。
- 2. 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等)の急性毒性試験を実施し、試験方法を整理する。また、試験実施の留意点をまとめる。
- 3. OECD TG207に示されている簡易(スクリーニング)法(ろ紙法)の有用性を検討する。
- 4. OECD TG207を参考にしたミミズ急性毒性試験法手順書案を作成する。

3) 実験計画

項目		11月	12月	1月	2月
1)	1	調査	調査	調査・まとめ	
	2		調査	調査・まとめ	
2)	1		調査・検討	検討	
	2		計画・試験実施	試験実施	試験実施・まとめ
	3		計画・試験実施	試験実施	試験実施・まとめ
	4				手順書作成
報告	書				報告書作成



(3)ヨコエビを用いた底質毒性試験

諸外国における底生生物を用いた試験法の比較	急性	重慢性	慢性

諸外	国におり	ける底生生物を用いた試験	法の比輔
	ID	Species	Endpoint
	218	Chironomus en	Surivival arc

Surivival, growth, emergence 218 Chironomus sp.

ユスリカ

219 Chironomus sp. Surivival, growth, emergence

イトミミズ 225 Lumbriculus variegatus Biomass, reproduction **OECD**

233 Chironomus sp. 235

Hylella a:

amphipod

Polychaetous Annelids

Polychaetous Annelids

Bu

Chironomus sp.

239

1020

1735

1740

1790

1800

16191

E1367-03

E1562-00

E1611-00

OCSP

P850.

ISO

ASTM

emergence, sex ratio, reproduction Chironomus sp. (first instar)

Immobilization 沈水植物

shoot length, weight water amphipod) Survival

Myriophyllum spicatum

ヨコエビ ヨコエビ ユスリカ

Survival, growth

marine or estuarine amphipod Survival (, reburrowing capability) ユスリカ

カイミジンコ

ヨコエビ

沈水植物 Myriophyllum aquaticum Growth

marine or estuarine sediment-dwelling

14371 Heterocypris incongru 16303 Hylella azteca Survival, growth marine or estuarine sediment-dwelling 16712 Survival, reburrowing capability amphipod

おたまじゃくし

ゴカイ

ユスリカ

Survival, growth Survival, sub-lethal, growth Survival, growth

Survival, reburrowing capability

Survival, growth

Survival, growth

Survival(F0 & F1 embryo), reproduction

30d

Test

duration

28d

28d

28d

44d

2d

14d

4d

10-28d

10-28d

14d

6d 14/28d 10d

10d

10d

10d-3mon

28d

10d

static/semi-static Spiked sediment, static

For marine/estuarine

Spiked sediment, static

Spiked water+sediment.

Spiked sediment, static

Water-only, static

Water-only, static

static, static

Spiked sediment/water, static

Spiked sediment/water, semi-

Spiked sediment, static/semi-

Spiked sediment, static/semi-

Spiked sediment/water, static

Spiked sediment/water

Spiked sediment/water.

Spiked sediment, static

Field collected sediment,

Spiked sediment, semi-static

Spiked sedimenf static/semi-

Spiked sediment

Exposure type

static

staic

staic

Spiked sediment, static

static

static

(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実係数を選択
 - 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





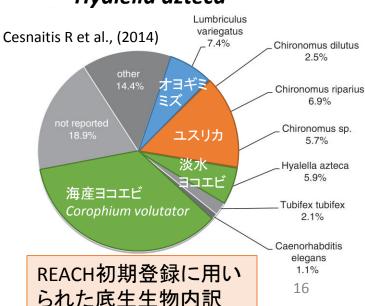
ホザキノフサモ (沈水植物)



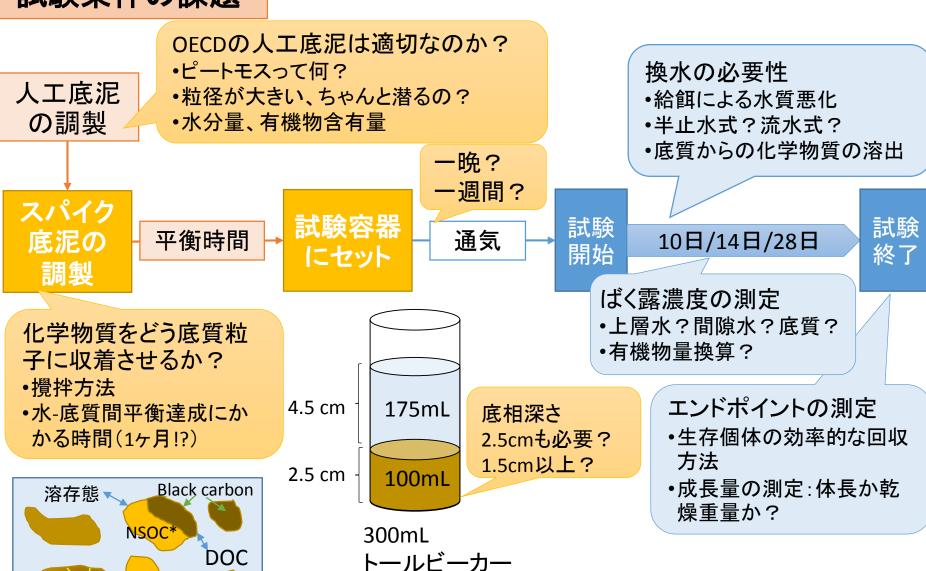
ヨコエビ (Hyalella azteca) を選択

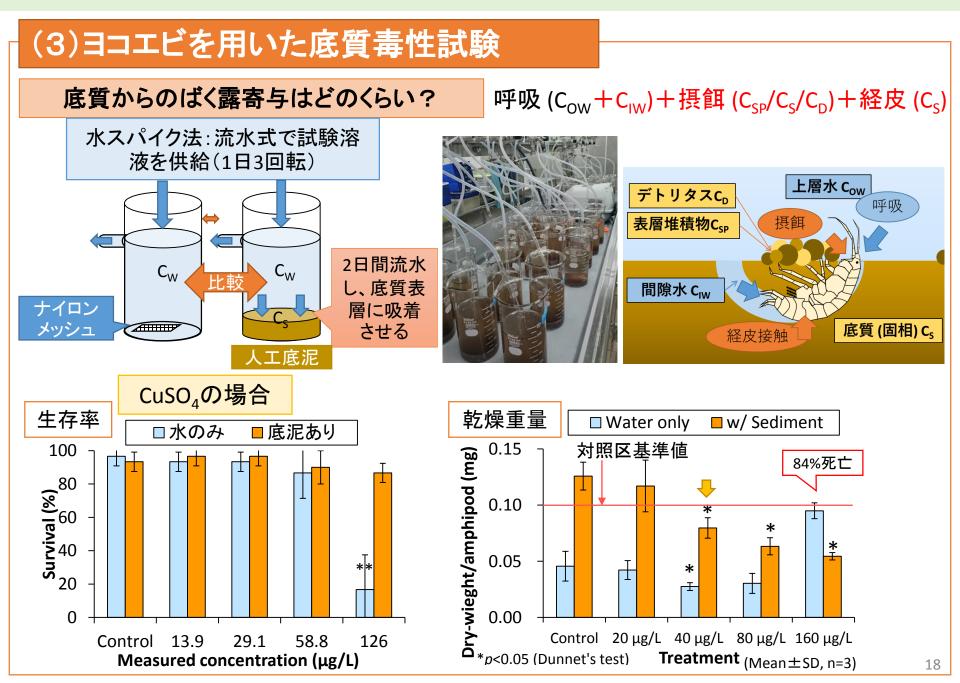
- ・ 主に北米に生息
- 生息形態:表層底泥、落ち葉の下に生息、底質の物理 化学的性質(粒径分布、有機物量など)に耐性がある
- 食餌形式: デトリタス、腐食植物、表層沈殿物を摂食
- 底泥なしでも実験室で飼育・繁殖可能
- 4/10/14/42日急性~慢性試験(Environment Canada、 ISO、ASTM)
- ⇒14日間試験法案の作成→検証中

Hyalella azteca



試験条件の課題





魚類

- OECD TG210, 212, OPPTS 850 seriesの急性 /胚仔魚/初期生活段階/フルライフ試験など
- シープスヘッドミノー(Cyprinodon varigatus), シルバーサイド(Menidia sp.)
- 水産庁(2010) 海産生物毒性指針:
 - マミチョグ(急性~慢性フルライフ)
 - マダイ、シロギス、ジャワメダカ

藻類

- 珪藻 Skeletonema costatum
 - OCSPP 850.4500, ISO 10253:2006
- 大型紅藻類 Ceramium tenuicorne
 - ISO 10710:2010
 - ✓ 藻類成長阻害試験は珪藻1種のみ
- ✓ 群体を作るため細胞数計測が困難

他の藻類を用いた試験を検討

無脊椎動物

- ASTM, OPPTS 850 series, ISOの急性/繁殖/フルライフ試験など
- 甲殻類:アミ(Mysidopsis sp.),アカルチア(Acartia tonsa),ヨコエビ(*Leptocheirus plumulosus*等)
- 貝類:カキ (Crassostrea gigas Thunberg, Crassostrea virginica Gmelin), ホンビノスガイ (Mercenaria mercenaria Linnaeu), イガイ(Mytilus edulis Linnaeus)
- ・環形動物:ゴカイ
- 水産庁(2010) 海産生物毒性指針:
 - シオダマリミジンコ(急性、繁殖)
 - エビ類(クルマエビ、アシナガエビモドキ、スジエビ)(急性)

(4)海産藻類の生長阻害試験

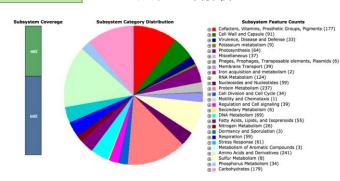
他試験法等との条件比較

	試験名	生物種	試験期間	エンドポイント	試験容器	温度	光条件	培地
本試験		藍藻: Cyanobium sp.	72時間	成長速度 EC50, LOEC, NOEC	300 ml フラスコ 容量: 100 ml	23°C±2	連続光	ASW-SN
ISO	[急]ISO 10253 Algal Growth Inhibition Test	珪藻: S. costatum, P. tricornutum	72時間	成長速度 EC50, LOEC, NOEC	300 ml フラスコ 容量: 100 ml	23°C±2	連続光	ASW
U.S.EPA	[急]850.5400 Algal Toxicity, Tiers I and II	珪藻: S. costatum	96時間	成長速度 EC50, LOEC, NOEC	容量: 125-500 ml	20°C±2	連続光	ASW
ASTM	[急]E1218-97a Static 96h Toxicity Test with Microalgae	珪藻: S. costatum	96時間	成長速度 EC50, LOEC, NOEC	容量: 100 ml	23°C±2	連続光	ASW

Cyanobium sp. のゲノム解析

パスウェイ解析

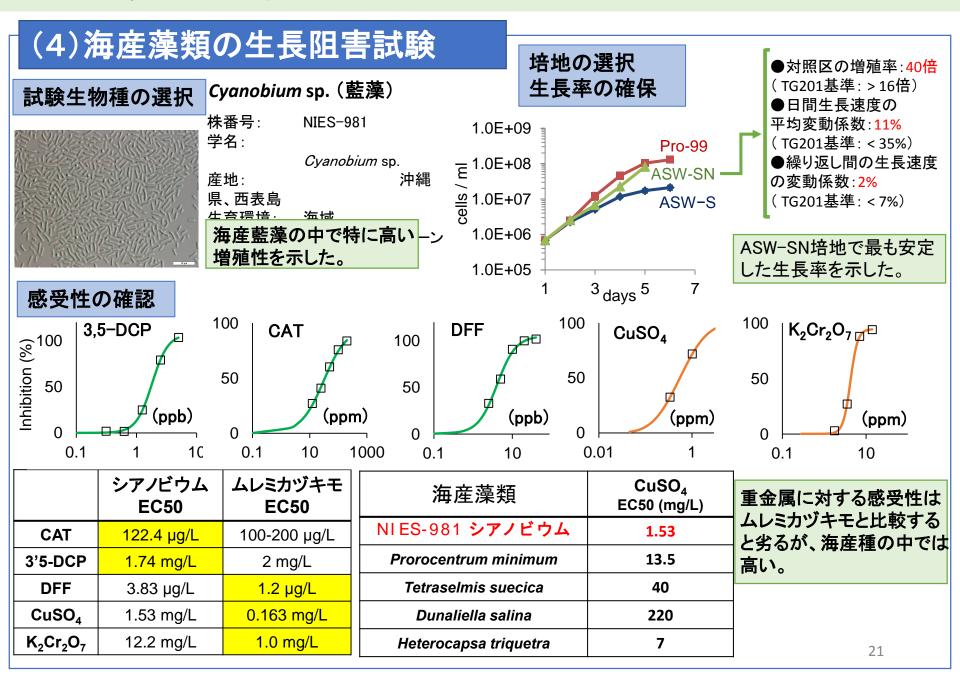
シークエンス結果 NIES-981 3,021,545 bp



ISO試験化

本試験法の意義・利点:

- ◎これまで海産藍藻を用いた試験法はない。
- ◎本種は沿岸および外洋における優占種である。
- ◎本種は抗生物質の感受性が非常に高い。
- ◎全ゲノム解読が終了している。



(4)海産藻類の生長阻害試験

抗生物質に対する淡水産藻類との感受性比較

	Cyanobium sp.			Pseudok	udokirchneriella Synechococcus			Microcystis aeruginosa				
		海点	産藍藻	subcapita	subcapitata 緑藻 le		leopoliensis 藍藻		藍藻			
	NOEC	EC50	LOEC	NOEC	EC50	LOEC	NOEC	EC50	LOEC	NOEC	EC50	LOEC
Ampicillin		0.01			>1000		0.025	0.083	0.2		0.0002	
Trimethoprim		>100		25.5	80.3			>200			>100	
Levofloxacin		0.3			7.4						0.0079	
Oxytetracycline		1.0		0.183	0.342		0.25	1.1	16	0.031	0.23	
Clarithromycin		0.1			0.002							
Chloramphenicol		0.1										
Sulfamehoxazole		0.01			0.52		0.0059	0.026				

EC50の比較

Ampicillin: M. aeruginosa > Cyanobium sp. > S. leopoliensis > P. subcapitata

Trimethoprim: P. subcapitata > Cyanobium sp., S. leopoliensis, M. aeruginosa

Levofloxacin: Cyanobium sp. > P. subcatitata

Oxytetracycline: M. aeruginosa > P. subcatitata > Cyanobium sp. > S. leopoliensis

Clarithromycin: P. subcapitata > Cyanobium sp.

Chloramphenicol:

Sulfamethoxazole: S. leopoliensis > Cyanobium sp. > P. subcapitata

サブ2結果:(2)特殊な物性や作用を持つ物質を対象とした評価法

内分泌かく乱物質

EXTEND2010で開発中

- (抗)エストロゲン、(抗)アンドロゲン作用:メダカ
- (抗)甲状腺ホルモン作用:アフリカツメガエル・ニシッメガエル
- 幼若ホルモン・脱皮ホルモン作用:ミジンコ
- 受容体結合活性の評価にin vitro試験を活用
- ・ 受容体結合性の評価にQSARも (⇒サブテーマ③)

ナノマテリアル

- ・ 新規試験方法の開発なし
- ばく露方法の工夫(分散状態の維持、濃度の 測定方法(サイズ・分散状態))
- 特殊なエンドポイントの追加?
 - 体内蓄積
 - 酸化ストレス(金属ナノ)

農薬

農水省:農取法(水産動植物への影響評価)

作用機序と試験生物の選択

- ・ 基本、藻類(緑藻)、ミジンコ、魚類の急性毒性試験 のみ
- ネオニコチノイド農薬: ユスリカ幼虫急性毒性試験 (OECD TG235)を要求

土壌への蓄積⇒高等植物やミミズなど土壌生物試験

国際標準試験との整合性? ミツバチ、ヌカエビ、ヨコエビの現行試験

医薬品

厚労省:環境影響評価関する考え方(案)

- ・代表的生物3種のスクリーニング毒性試験の実施・予測無影響濃度(PNEC)の保有
- 環境中予測濃度PEC>PNECのとき、より網羅的な試験メニューを追加実施する
- ・ Whole effluent toxicity testによる総体的な出口 評価
 - 短期慢性毒性試験の検討

サブ2結果:**特殊な農薬を対象とした評価法**

背景 ミジンコに効かないが昆虫に効く殺虫剤

- ニコチン性アセチルコリン受容体(ネオニコチノイド系)
- GABA受容体

水産動植物の被害防止に係る農薬登録保留基準値(案)(2016年)

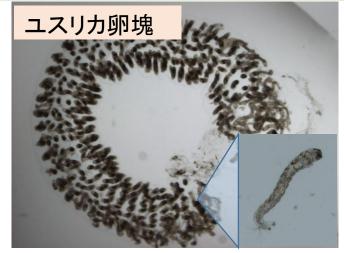
- ① 今後我が国において新たに登録を受けようとする殺虫剤、及び
- ② 既に登録されているニコチン性アセチルコリン受容体又は GABA 受容体に作用する殺虫剤(ネライストキシン系殺虫剤を除く。)

については、ユスリカを用いた畫性試験の提出を要求する

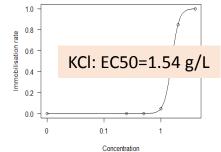
ユスリカ幼虫急性毒性試験(OECD TG235)

- 試験設計はミジンコ遊泳阻害試験に準拠
- C. ripariusを元に設計、C. dilutus、C. yoshimatsuiも may be used.

項目	条件
曝露期間	48h
供試齢	1齢 (C. yoshimatsuiではふ化後3日程度)
個体数/試験区	20頭/試験区、5頭/容器
エンドポイント	遊泳阻害
試験成立条件	対照区において致死率15%以下







検討項目

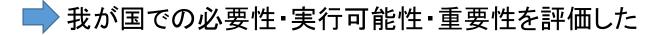
- 水面トラップの防止方法
 - C. yoshimatsuiは分散剤等なしでは水面に トラップされ易い
 - 分散剤(Tween 80)なしで試験成立条件は 満たせるか?
 - ・ 物理的な防止方法の検討
- 適切な試験溶液、容器の選択
- 試験前給餌
- 1齢の期間、サイズ(頭蓋長)
- 感受性の確認

24

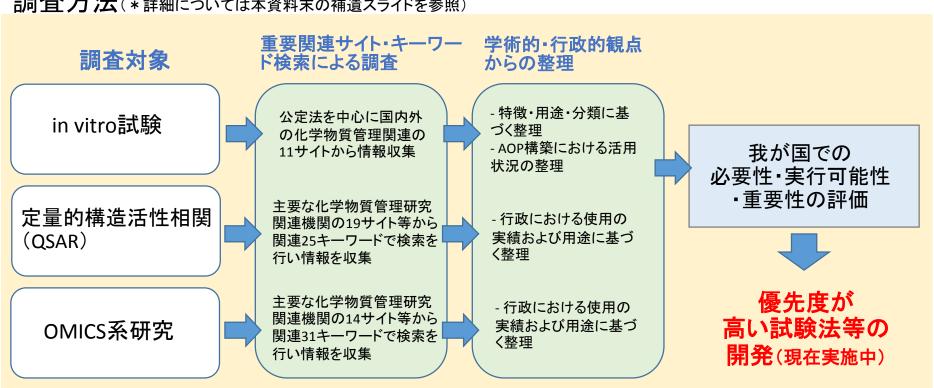
サブ3: in vitro毒性試験・in silico解析や作用メカニズムに基 づく毒性予測手法の研究

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



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	区欠州	5	9	4
TSCAおよびFIFRA	米国	11		0
EDSP	米国		5	
EXTEND 2010	日本		15	15
環境影響評価等	区欠州	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

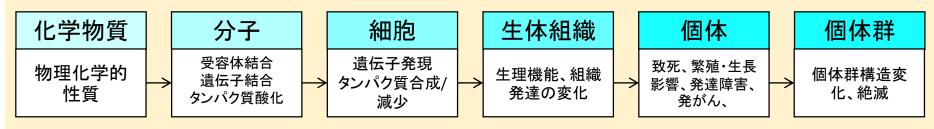
生態毒性評価で使用されているin vitro試験法は内分泌かく乱作用 に対応したものが主であった

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

環境因子 化学物質

分子 (受容体結 合•遺伝 子発現)

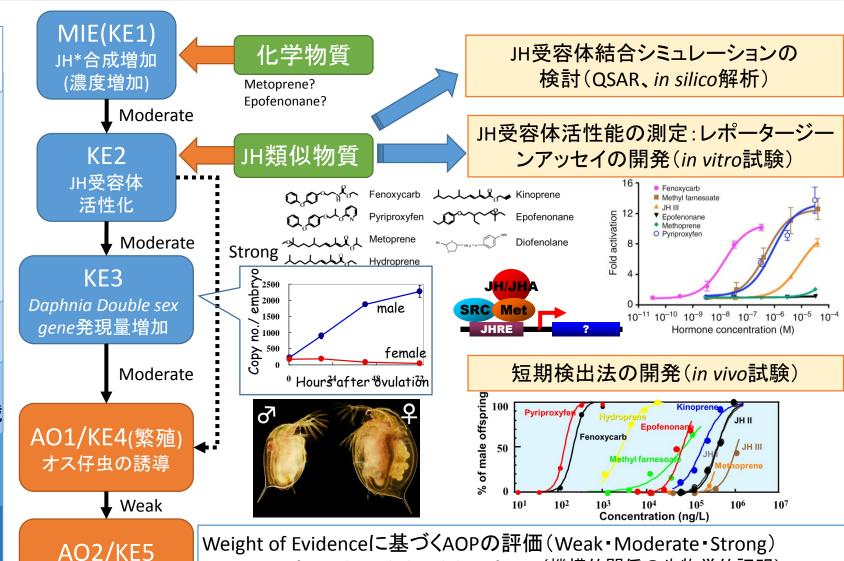
細胞

生体組織

個体

個体群

個体群の減少



Weight of Evidenceに基づくAOPの評価(Weak・Moderate・Strong)

- 1. Support for Biological Plausibility of KERs (機構的関係の生物学的証明)
- 2. Support for Essentiality of KEs (KEの重要性:上流のKEを止めると下流のKEが止まる)
- 3. Empirical Support for KERs (容量・時間・頻度等の実証データ)

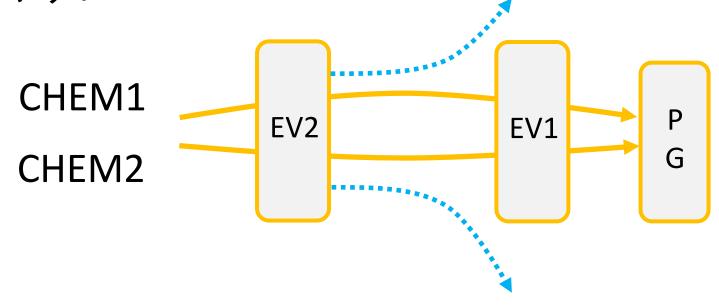
毒性試験におけるpathwayの軸の基本的な類型

- Risk Pathwayは質的に多岐な方向性を持ちうるが、考慮すべき「主軸」は(少なくとも)以下の3つ
 - ① どのような媒体を経由するか
 - ② どのような生物種を経由するか
 - ③ どのような作用メカニズムを経由するか

「感度の高い試験(もしくは試験バッテリー)」は、少なくとも主要なRisk Pathway上のeventをカバーしている必要がある

- ▶ 例えば、底質にたまる物質の場合には、底生生物試験が必要
- ▶ 例えば、昆虫類に効く場合には、昆虫類の試験が必要(例:ネオニコ)
- ▶ 例えば、性分化に影響を与える物質の場合には、性分化試験が必要

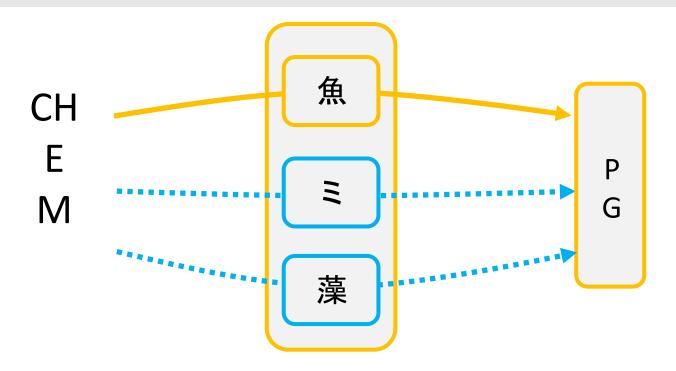
■ Protection Goalに近い試験ほど感度と特異度が両立 しやすい



- 欧州の農薬リスク評価体系などでも、higher tierほど最終的な PGに近い試験が置かれる(例: in vivo, population, mesocosme試験)
- ただし、mesocosm試験等は再現性の意味で感度が落ちやすい
- Pathwayが単線的な場合にも感度と特異度は両立しやすい³®

■ 高<u>感度</u>試験バッテリーの構築法:「または」で繋ぐ

「[魚=陽性] または [ミジンコ=陽性] または [ミジンコ=陽性]」の とき、「試験=陽性」とする



- 複数の試験を繋げることにより、広いpathwayをカバーできる
- 試験を「または」で繋げることによって、<u>感度は低下しない</u> 31

■ 事例:皮膚刺激性試験代替の「2 out of 3 rule」

Regulatory Toxicology and Pharmacology 71 (2015) 337-351



Contents lists available at ScienceDirect

Regulatory Toxicology and Pharmacology

Regulatory
Toxicology and
Pharmacology
Maintenance of the Phar

journal homepage: www.elsevier.com/locate/yrtph

Assessing skin sensitization hazard in mice and men using non-animal test methods



Daniel Urbisch^a, Annette Mehling^b, Katharina Guth^a, Tzutzuy Ramirez^a, Naveed Honarvar^a, Susanne Kolle^a, Robert Landsiedel^{a,*}, Joanna Jaworska^c, Petra S. Kern^d, Frank Gerberick^e, Andreas Natsch^f, Roger Emter^f, Takao Ashikaga^g, Masaaki Miyazawa^h, Hitoshi Sakaguchi^h

^a BASF SE, Experimental Toxicology and Ecology, Ludwigshafen, Germany

^b BASF Personal Care and Nutrition GmbH, Düsseldorf, Germany

^c Procter & Gamble NV, 100 Temselaan, 1853 Strombeek-Bever, Belgium

^d Procter & Gamble Technology (Beijing) Co., Ltd., China

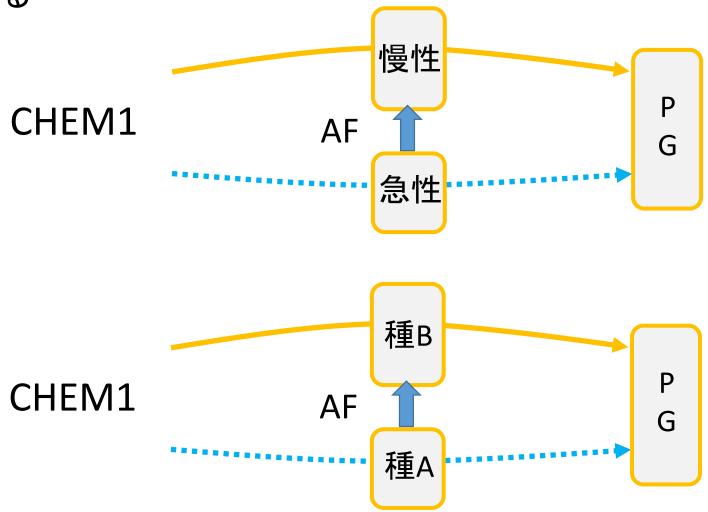
^e Procter & Gamble Company, Cincinnati, OH, USA

^f Givaudan Schweiz AG, Ueberlandstraße 138, CH-8600 Dübendorf, Switzerland

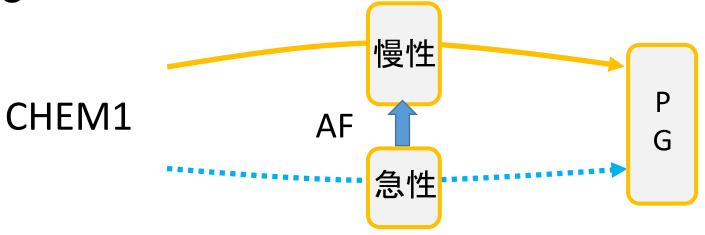
^g Shiseido Research Center, Shiseido Co., Ltd., 2-2-1 Hayabuchi, Tsuzuki-ku, Yokohama-shi, Kanagawa 224-8558, Japan

^h Safety Science Research Laboratories, Kao Corporation, 2606 Akabane, Ichikai, Haga, Tochigi 321-349, Japan

■ 外挿係数等により異なるpathway上のeventを代替する



■ 外挿係数等により異なるpathway上のeventを代替する



- 外挿係数や外挿モデルの判定設定を安全側に設定することにより、感度はある程度意図的に調整することができる
- むしろ、より簡易な試験による代替は、より感度の高い(安全側)の外挿となることが一般的な性質としては望ましい

試験選択アルゴリズム案の構築における基本原則 (案)

いままでの考察から、試験選択アルゴリズム案の構築における基本原則を以下にまとめる(あくまで"原則"であり場合や文脈による逸脱を否定するものではない)

- (1) 主要なRisk Pathway上のeventについての試験が行われている必要がある
- (実際の/あるいは我々が暗黙に想定している)主要なRisk Pathwayを(その不確実性も含めて)明示化する必要がある

既存の生態毒性試験の代替あるいは上流での「絞込み」の目的において:

- Pathwayが単純な場合(例:一本道)には、高感度なハイスルー プット試験バッテリーの構築が_比較的_容易と思われる
- Pathwayが複雑な場合には、感度・特異度が共に高い試験バッテリーの構築は困難である

試験選択アルゴリズム案の構築における基本原則(案)

いままでの考察から、試験選択アルゴリズム案の構築における基本原則を以下にまとめる(あくまで"原則"であり場合や文脈による逸脱を否定するものではない)

- (2) 上流側では感度の高さ、下流側では特異度の高さが 相対的に重要となる
- 既存の試験バッテリーに「または」で追加する限りでは感度は低下しないため、上流側での使用においては、in vitro/in chemico/in silico手法も「使いよう」があるかもしれない
- ▶「使えるとしたら満たしているべき条件」を明確化する(~**年度まで)

試験選択アルゴリズム案の構築における基本原則 (案)

いままでの考察から、試験選択アルゴリズム案の構築における基本原則を以下にまとめる(あくまで"原則"であり場合や文脈による逸脱を否定するものではない)

- (3)(より簡易な試験によって)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
- 「感度の高さ」の検討は、empirical/statisticalに行うか、pathway とeventの化学/生物学的な関係に基づいて行うことになる(ど ちらも必ずしも簡単ではない)
- (4) どの程度の感度・特異度が担保されるべきかの定量 的議論には実施コスト制約の考慮が必要

諸外国の動向の整理:背景にある潮流

IATAのイメージ図

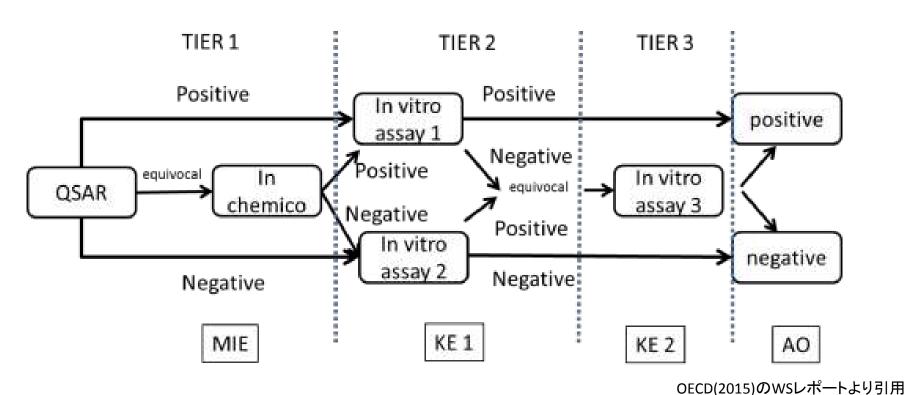


Fig 4. Use of an AOP/MoA in a testing strategy

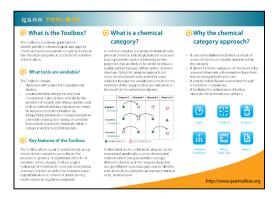
●IATA(やAOP)の構築における使用が念頭におかれつ

38

In silico 手法についての整理: QSAR

諸外国での現在における使用状況

OECD QSAR Toolbox



ハザード評価に必要な生態毒性データにおける "gap filling"を目的に構築されている

以下のケースで実際に使われている:

- The OECD HPV Chemicals Programme
- The US HPV Challenge Programme
- EU REACH

US EPA

- ・Toxic Substances Control Act (TSCA)においてhazard identificationの用途に20年以上使われている
- ・農薬のmetabolites and degradatesの評価においてその潜在的な毒性を予測するために使われている

EU

•Joint Research Center (JRC) Computational Toxicology GroupがREACH, Cosmetic DirectiveやFood Safetyにおける既存毒性試験の代替としてQSAR toolsの開発を行っている

In silico 手法についての整理: QSAR

開発の世界的な動向

- ◆ 今まで"学習データ"として使われてきた頑健な毒性試験データが入手できなくなってきている
- 一方、ハイスループットスクリー ニング手法からの情報が増加し ている

HTS assay ⇔ QSAR の時代へ

個々のQSAR単独での評価というより IATAの枠組みの中での評価へと移行

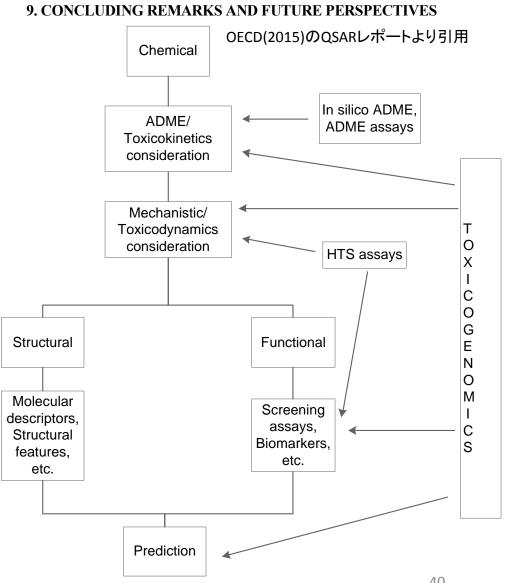


Figure 10: Integration of chemistry-based (Q)SAR and biology-based predictive assays

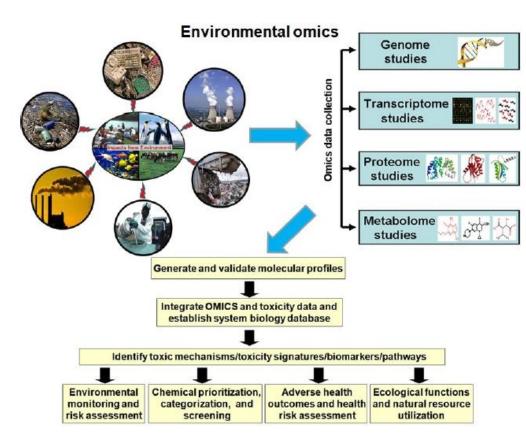
In silico 手法についての整理:計算機毒性学-OMICS

化学物質の管理や規制のための手法としてOmicsは未使用

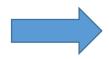
開発の世界的な動向

- Omics技術の高度化・データ 量増加
- 「網羅的プロファイリング」から 生物学的に意味のある変化 探索と機能解析へ
 - 研究方法の規格化
 - ガイドラインの制定
 - サンプル採取法の体系化
 - Omicsデータの解析手法の標準化

に向けて欧米を中心に プロジェクトが進行中



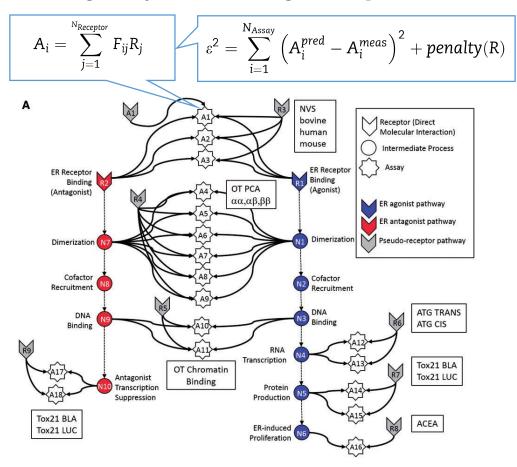
(Ge et al. 2013 Journal of Integrated Omics 84: 75-87)



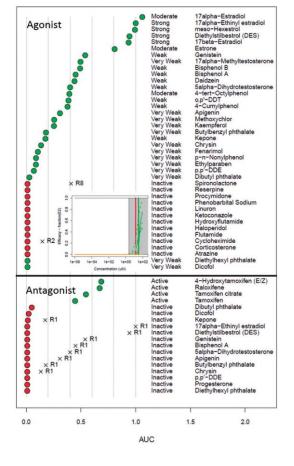
複合Omicsデータの包括的な解析と、毒性データとOmicsデータの統合による相関解析へと進んでいる

In silico 手法についての整理:その他 IATAにおける各手法の統合のための計算モデル

Integrated Model of Chemical Perturbations of a Biological Pathway Using 18 *In Vitro* High-Throughput Screening Assays for the Estrogen Receptor



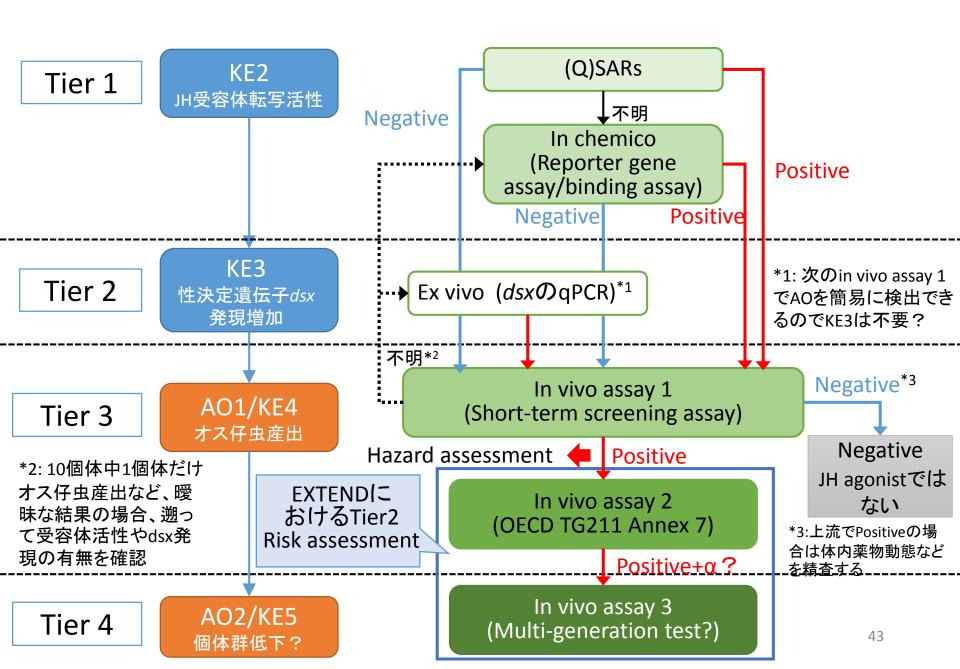
計算モデルによる予測結果



Judson et al. (2015)

TOXICOLOGICAL SCIENCES, 148(1), 2015, 137–154

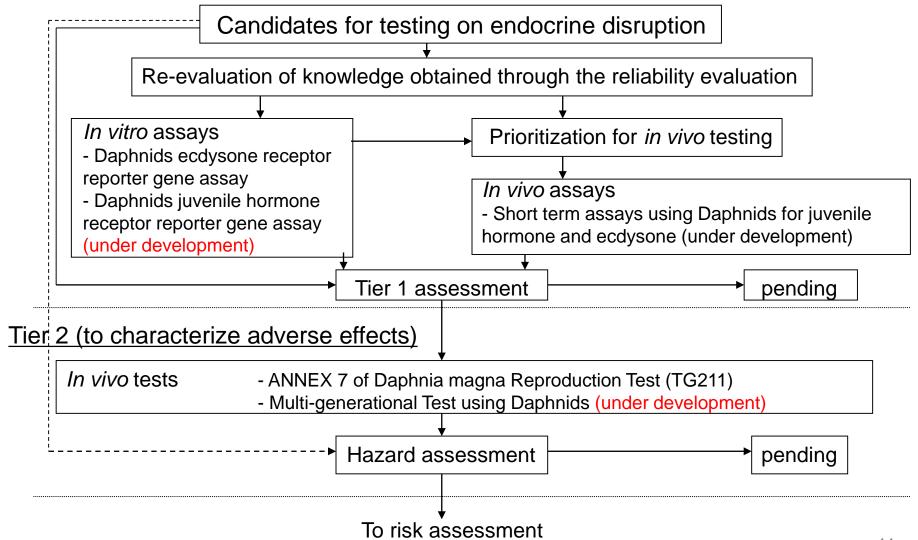
JH受容体アゴニスト検出に係わる試験フロー案



参考: EXTENDにおける試験フロー

Framework of hazard assessment of endocrine disrupting effect Effect to growth (juvenile hormone & ecdysone activities) (provisional)

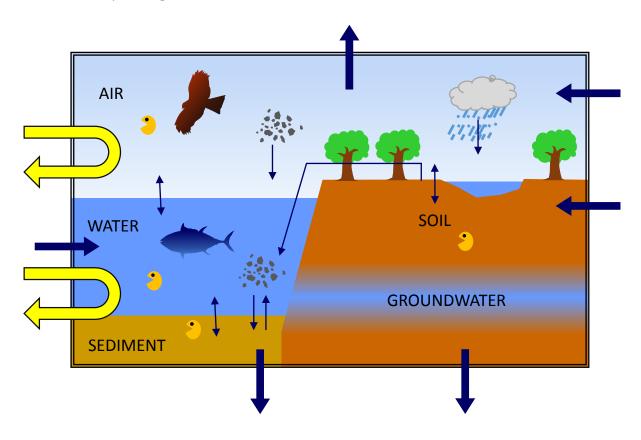
Tier 1 (to assess actions to endocrine systems)



具体的なアルゴリズム素案の構築

■ 化学物質の環境中の存在に応じた生物試験バッテリーのダイアグラム(提案)

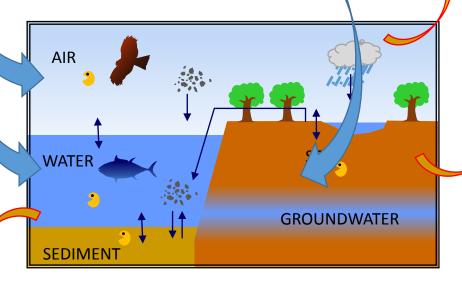
Concept of generic multimedia environment – Unit world



Pictrial representation of a multi-media model

Cowan, et al. (1995)

新規化学物質 生態毒性試験 の要求



大気

生産量×(1-大気分配係数)<10t の物質は生態毒性試験の必要なし 大気にしか行かない物質の試験はしない。

昆虫?



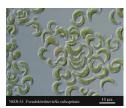
生産量×土壌分配係数>10t の物質は土壌生態毒性試験必要







水 生産量×水分配係数>10t の物質は水性生態毒性試験必要



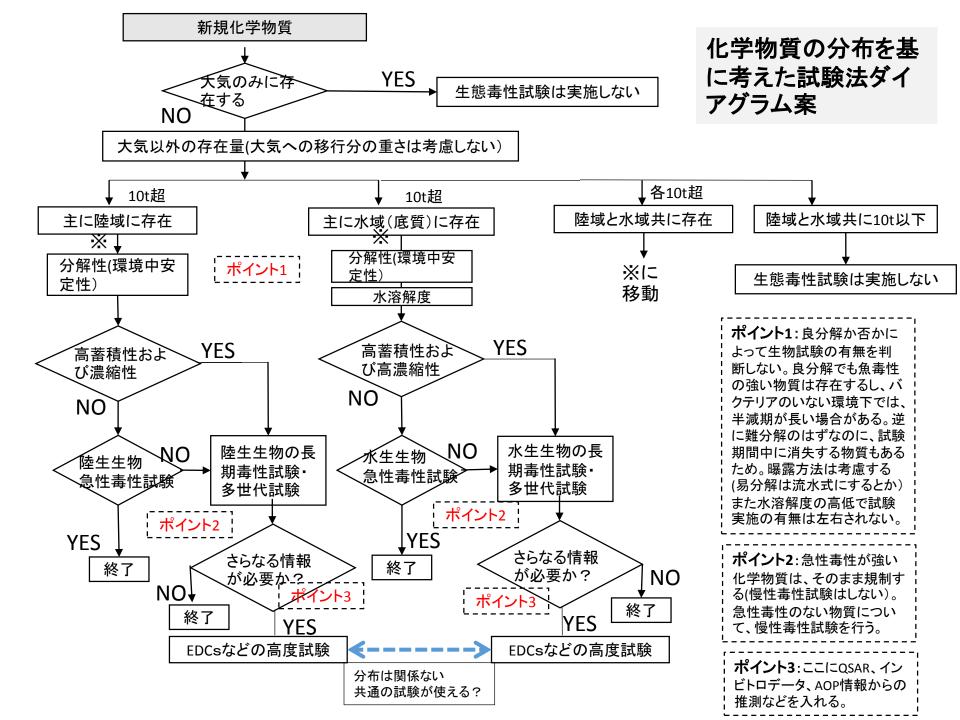




遺伝的、発生学的に離れたところにある複数の生物の試験を行う。



NOEC→PNEC(UF) NOEC→SSD



ご清聴ありがとうございました