

OECD 試験法に係る最近の動向について

国立環境研究所 環境リスク・健康領域

山本 裕史

化審法セミナー@Web
(令和5年2月27日)



National
Institute for
Environmental
Studies, Japan

簡単な自己紹介

- 専門は生態毒性学、環境化学、環境工学
- 現職は国立環境研究所、環境リスク・健康領域副領域長・生態毒性研究室長
(<http://www.nies.go.jp/index-j.html>)
- 東京大学大学院新領域創成科学研究科自然環境学専攻客員教授・徳島大学環境防災センター客員教授
- 環境省の化審法、農取法、内分泌かく乱、海洋プラスチックごみ等の約30の委員を担当



- 2021年度まではOECDの試験法関係の会議も軒並みWeb (Zoom等) での開催だったが、2022年度からは現地＋オンラインのハイブリッドに
- 欧州での10-17時程度の開催が多く、米国では早朝、日本では深夜

WNT: Working Group of National Co-ordinators of the TGs programme

- 化学品の試験のためのOECDテストガイドライン
（テストガイドラインの開発ならびに試験方法
の検証の円滑化及び調和化を含む）
- 試験の諸問題に関するガイダンス文書
- 特定の有害性領域の先端科学に関する詳細レ
ビュー文書

に関する作業の指揮・監督をおこなう。

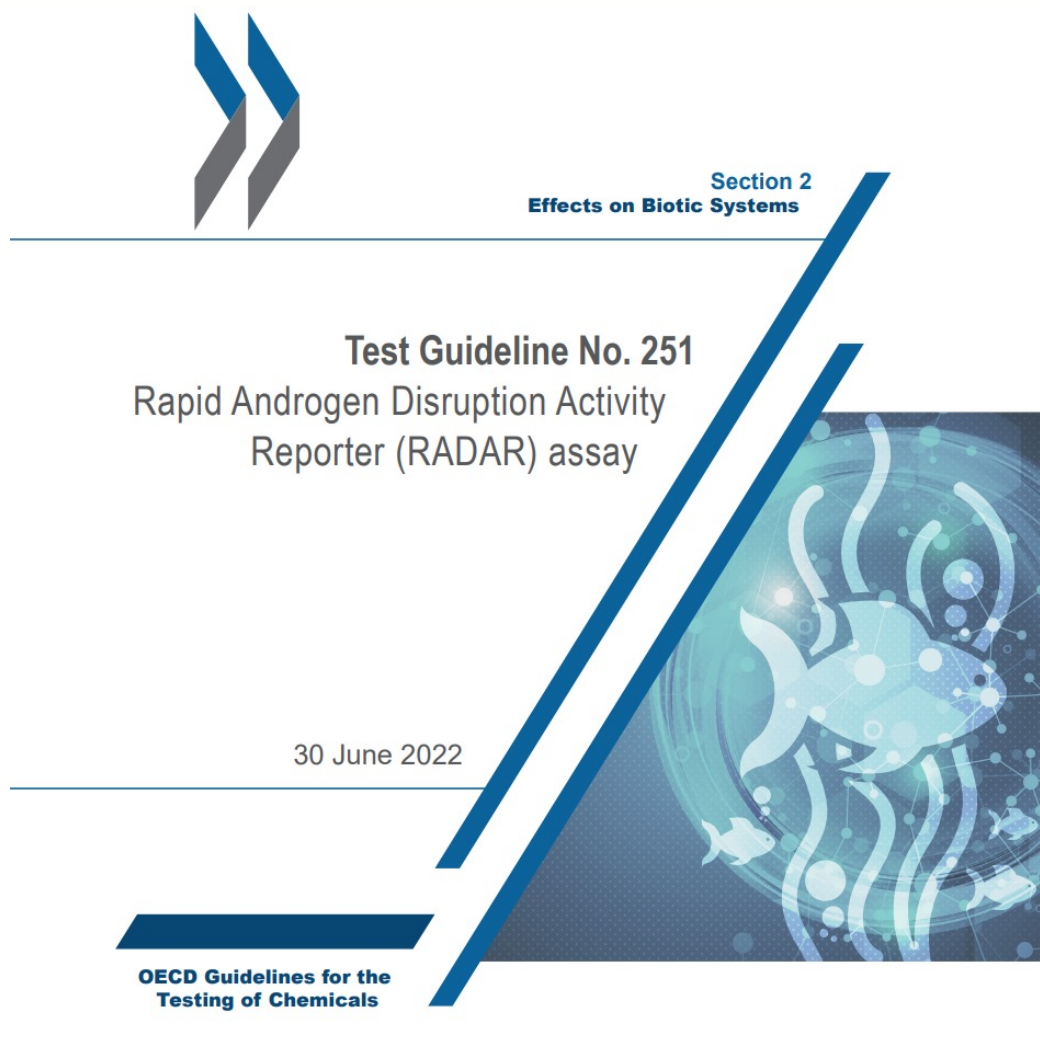
WNT-34は2021年4月26～29日に開催
TG No.251 (RADAR assay) ほかの承認作業を実施

新規試験法や試験法改訂の提案書（SPSF）の承認

各国のSPSFの採否を審議

日本から提案した、新規提案のヨコエビを用いた底質試験法、MEOGRT（メダカ拡張一世代繁殖毒性試験: TG240)の改訂プロジェクト案が承認された

OECD TG 251の承認



- Rapid Androgen Activity Reporter (RADAR) Assay
- （抗）男性ホルモン作用物質の検出に利用

フランス（WatchFrog社）の提案によるもの

Key event

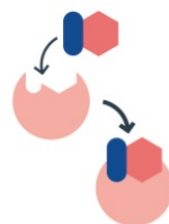


OECD physiological criterion: Spiggin production in the Three Spined Stickleback

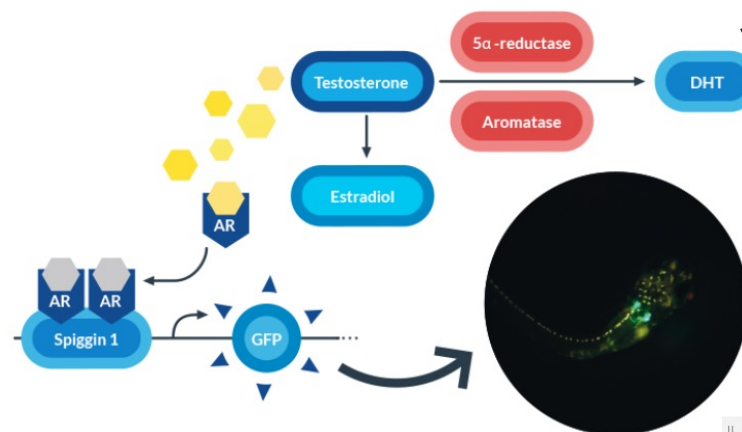


Watchfrog社HPより
(https://www.watchfrog.fr/en/test_androgenique.php)

Modes of actions

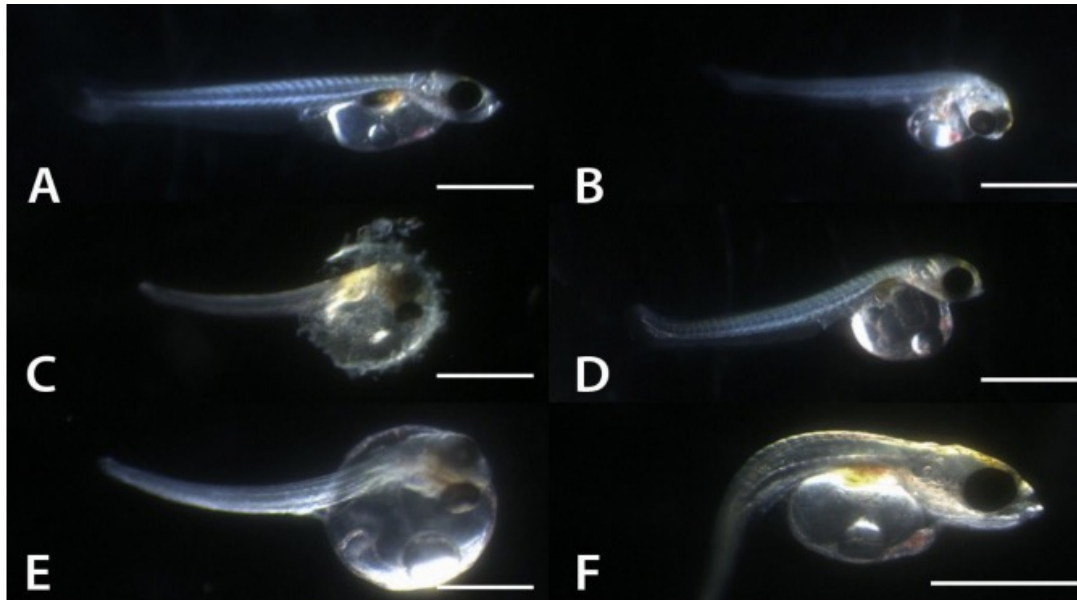


Provide additional information to authorities to assess MOA



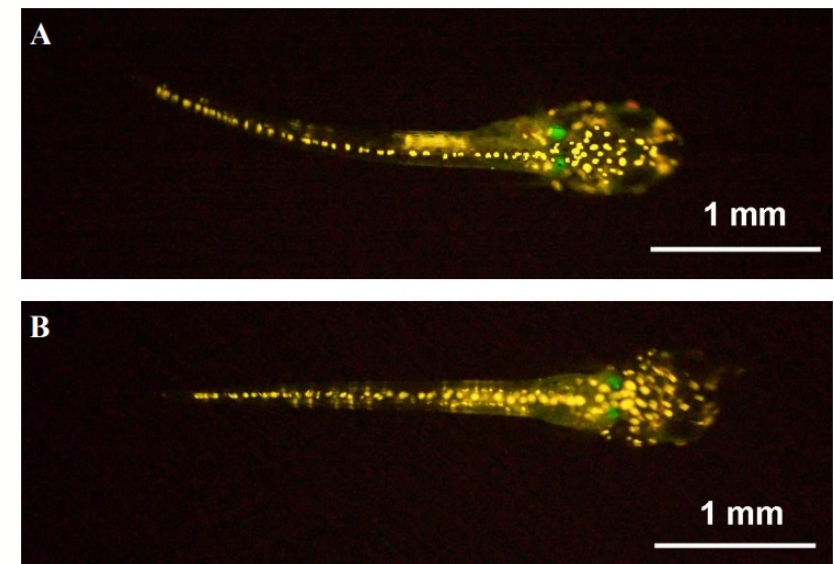
イトヨのオス特有のス
ピギンタンパクと蛍光
タンパクの遺伝子
(*spg1-gfp*)を導入した
メダカ胚仔魚の試験

OECD TG251の試験の概要

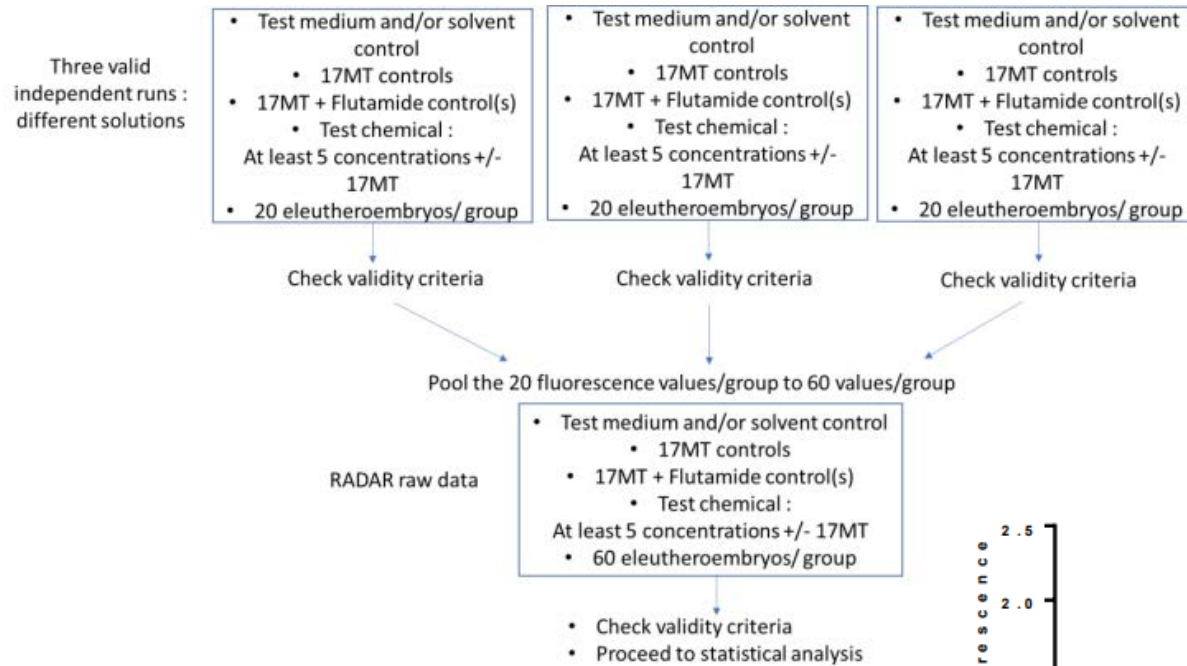


孵化後1日以内の卵黄が残った胚仔魚 (eleutheroembryo) に6穴プレート上で72時間曝露

Dorsal view (背側) からの撮影で、
蛍光顕微鏡 + 画像解析を実施

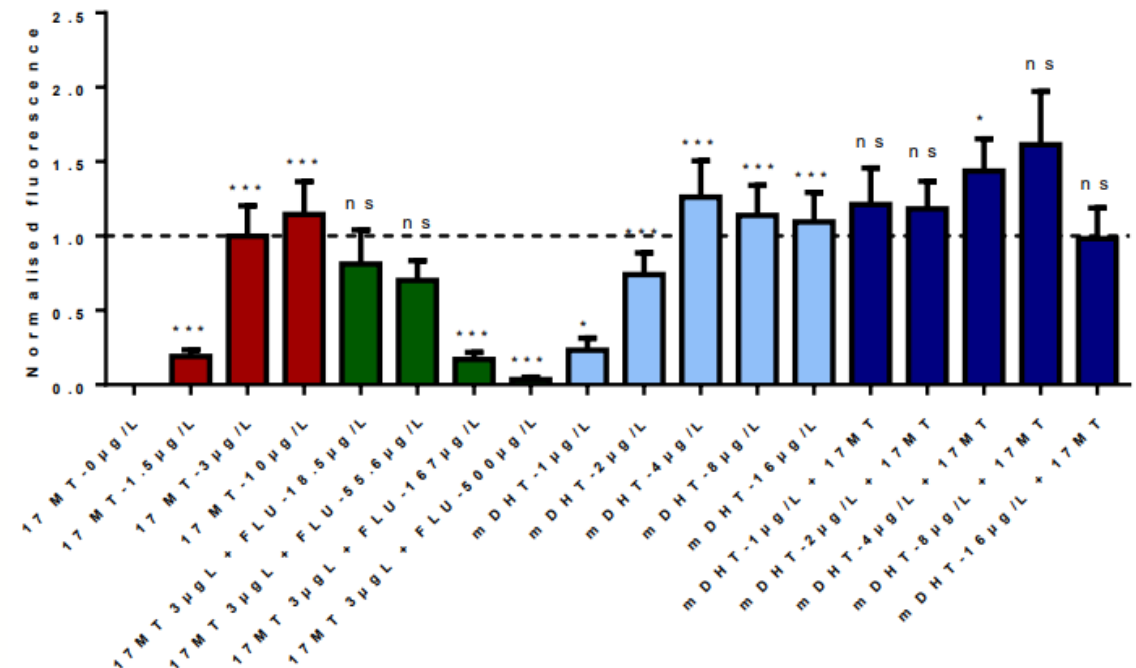


OECD WNT34の主要議題(5)



5濃度区に加え、17MTとの共ばく露なども用意

各濃度区20卵×繰り返し3回となり、合計840以上の胚が必要



OECD TG250として承認



Section 2
Effects on Biotic Systems

Test Guideline No. 250

EASZY assay: Detection of Endocrine
Active Substances, acting through
estrogen receptors, using transgenic
tg(cyp19a1b:GFP) Zebrafish
embrYos

14 June 2021

OECD Guidelines for the
Testing of Chemicals



内分泌かく乱化学物質の検出試験法として、利用される
→ほかにも、遺伝子導入メダカを用いた
RADAR（抗アンドロゲン作用）、
REACTIV（エストロゲン・アンドロゲン
作用）も提案中

- VMG-eco（生態毒性試験バリデーション管理グループ）において、200シリーズ関連の専門家会合を開催し、バリデーションを実施
- ほかにVMG-NA（非動物試験バリデーション管理グループ）など

17th VMG-ecoは2022年11月7～8日にパリで開催、日本からは内分泌かく乱関係の試験法のバリデーション結果ほか、①鳥類卵内投与試験の進捗報告、②ヨコエビ試験法提案の進捗報告、③TG201の改訂に向けた提案の進捗報告等の情報提供を発表

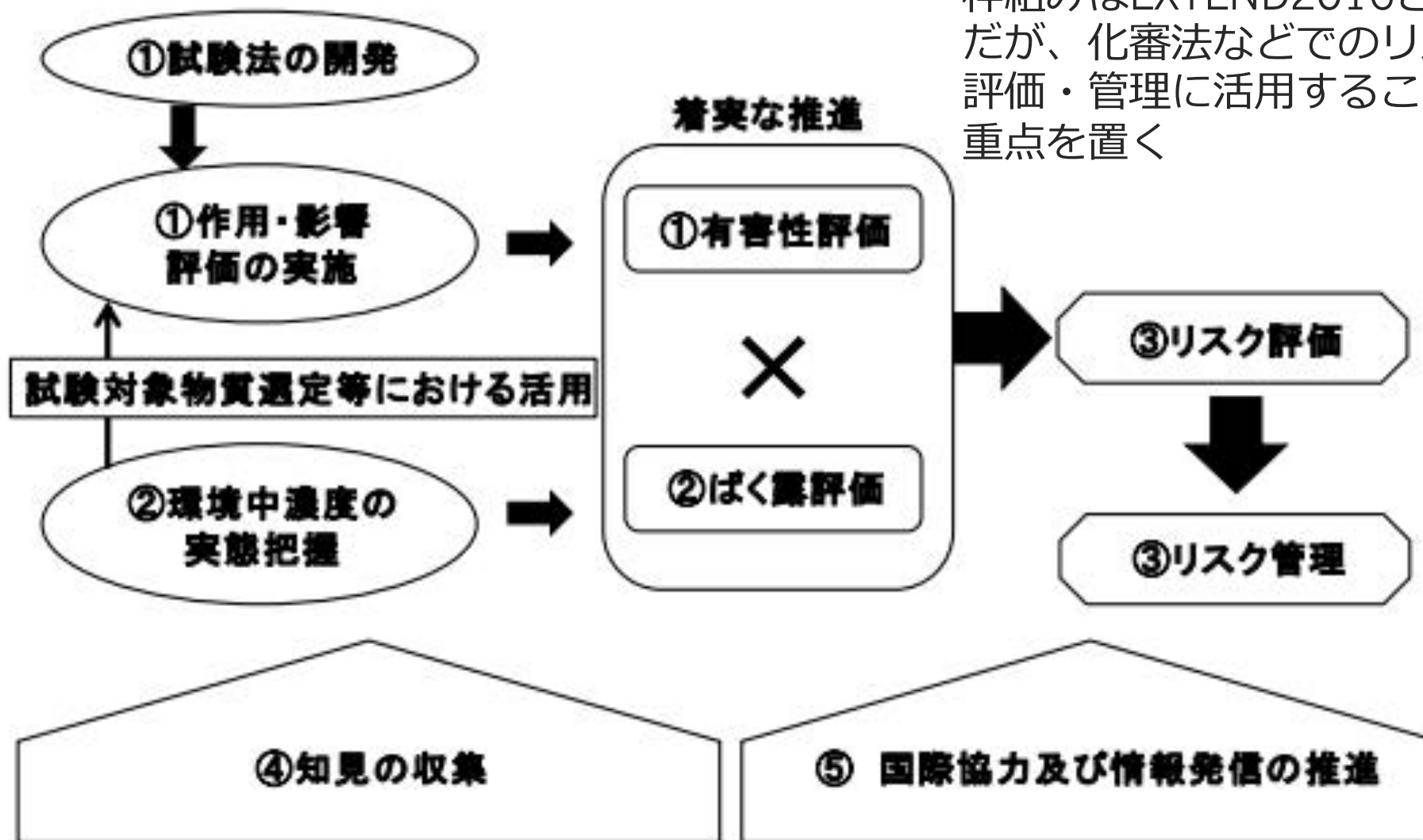
VMG-ecoの概要(1)

Item 1のアジェンダ案の承認、
Item 2の事務局からの連絡事項の後、
Item 3では日本の内分泌かく乱化学物質の評価プログラムのEXTEND2022の紹介（環境省 山崎様より）

ほか、FET (OECD TG236)とEASZYアッセイ(OECD TG250)を組合せた試験法開発に関する報告

EXTEND2022の概要(1)

図8 EXTEND2022における取組みの概念図

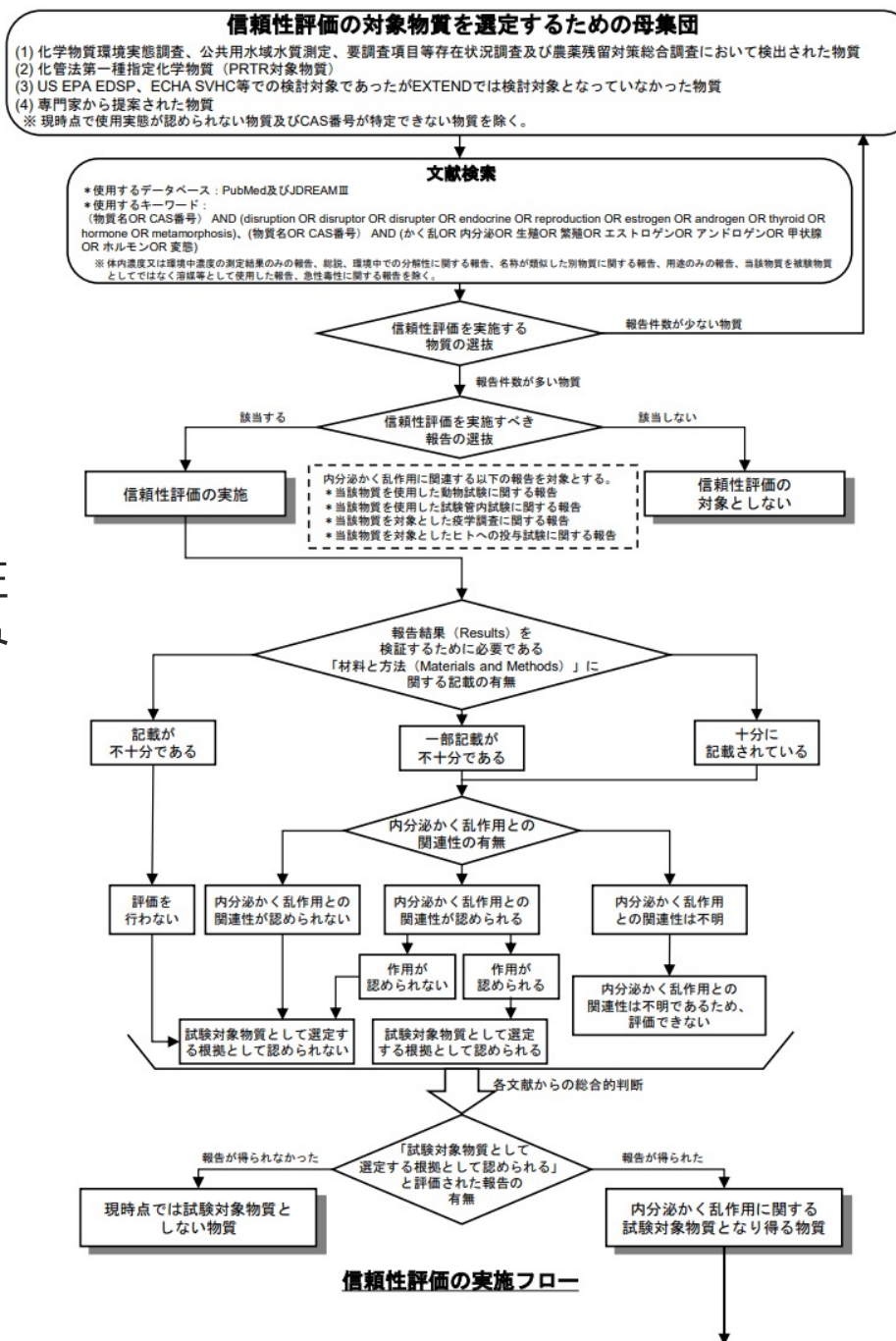


枠組みはEXTEND2016と同様だが、化審法などでのリスク評価・管理に活用することに重点を置く

EXTEND2022の概要(2)

図3 EXTEND2016における内分泌かく乱作用に関する試験及び評価の基本的な流れ
(<https://www.env.go.jp/content/000114063.pdf>)

EXTEND 2016の基本的な流れを踏襲して、文献調査・信頼性評価により対象物質を絞り込み



EXTEND2022の概要(3)

(エストロゲン様作用、抗エストロゲン様作用、アンドロゲン様作用、等)

第1段階（内分泌系に対する作用の有無を確認）

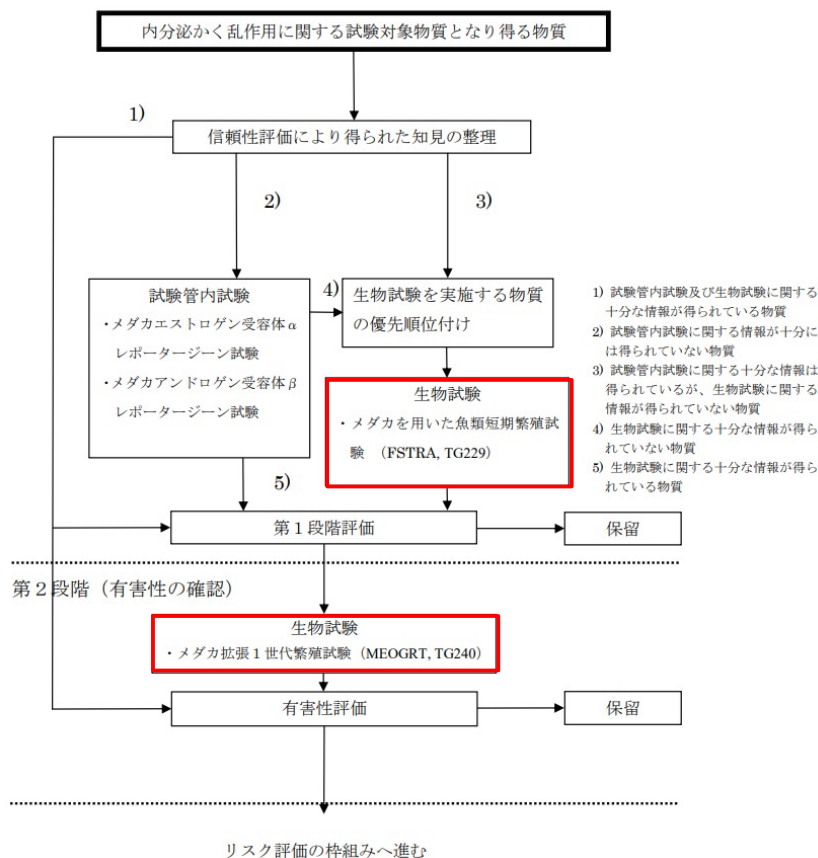


表1 EXTEND2010 及び EXTEND2016 における試験法開発の進捗状況

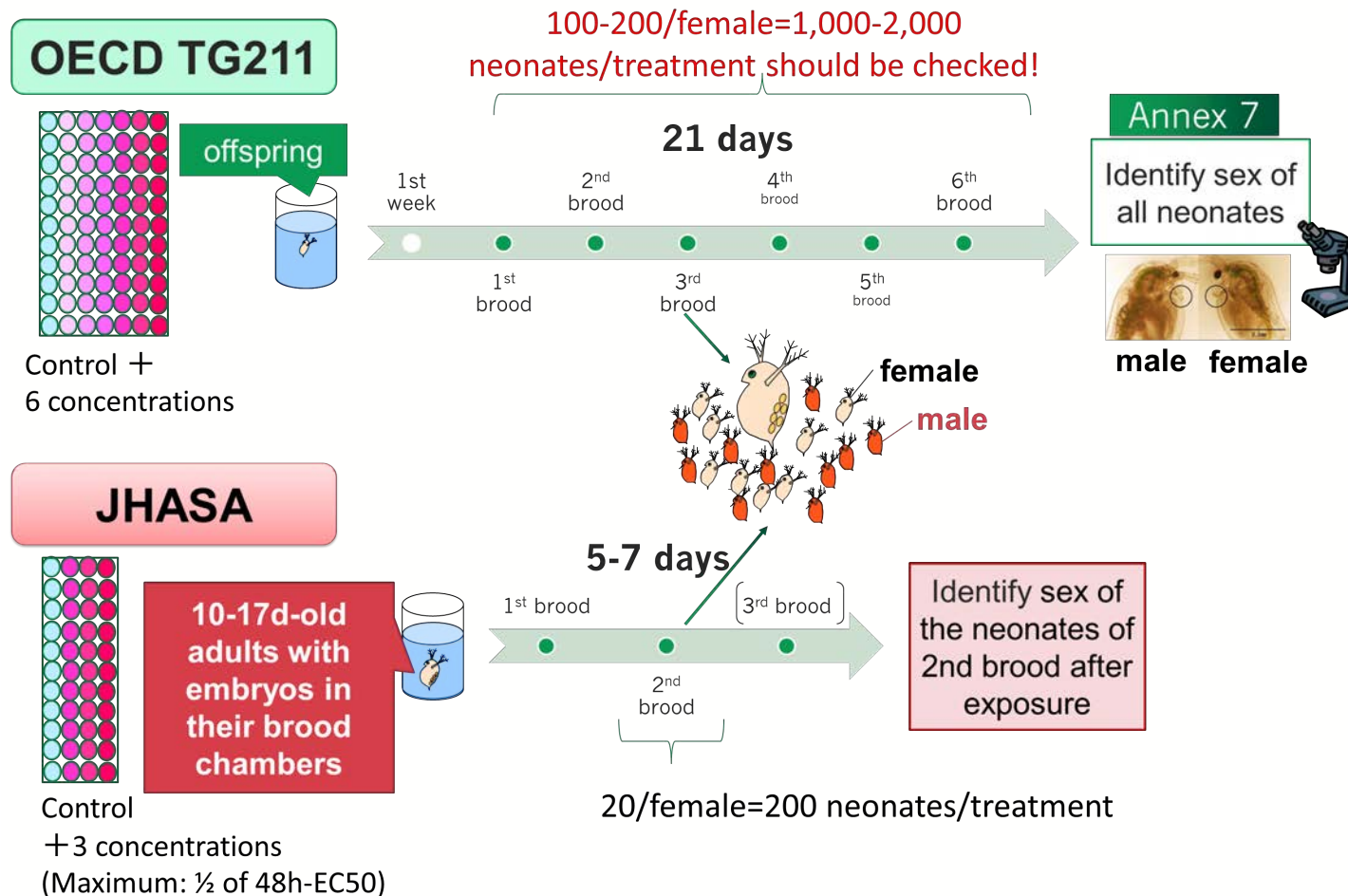
区分	第1段階試験管内試験 (スクリーニング試験)	第1段階生物試験 (スクリーニング試験)	第2段階生物試験 (確定試験)
エストロゲン様作用	◎メダカエストロゲン受容体 α レポータージーン試験	◎メダカを用いた魚類短期繁殖試験（OECD TG229）	◎メダカ拡張1世代繁殖試験（OECD TG240, MEOGRT）
抗エストロゲン様作用	◎メダカエストロゲン受容体 α レポータージーン試験	◎メダカを用いた魚類短期繁殖試験（OECD TG229）	◎メダカ拡張1世代繁殖試験（OECD TG240, MEOGRT）
アンドロゲン様作用	◎メダカアンドロゲン受容体 β レポータージーン試験	◎メダカを用いた魚類短期繁殖試験（OECD TG229）	◎メダカ拡張1世代繁殖試験（OECD TG240, MEOGRT）
抗アンドロゲン様作用	◎メダカアンドロゲン受容体 β レポータージーン試験	○幼若メダカ抗アンドロゲン作用検出試験 JMSA	◎メダカ拡張1世代繁殖試験（OECD TG240, MEOGRT）
甲状腺ホルモン様作用	◎ニシツメガエル甲状腺ホルモン受容体 β レポータージーン試験	◎両生類変態試験（OECD TG231, AMA）	◎幼生期両生類成長発達試験（OECD TG241, LAGDA）
抗甲状腺ホルモン様作用	◎ニシツメガエル甲状腺ホルモン受容体 β レポータージーン試験	◎両生類変態試験（OECD TG231, AMA）	◎幼生期両生類成長発達試験（OECD TG241, LAGDA）
幼若ホルモン様作用	◎ミジンコ幼若ホルモン受容体レポータージーン試験	○ミジンコ幼若ホルモン簡易スクリーニング試験 JHASA	◎オオミジンコ繁殖試験（OECD TG211 ANNEX7） ▽ミジンコ多世代試験
抗幼若ホルモン様作用	◎ミジンコ幼若ホルモン受容体レポータージーン試験	○ミジンコ幼若ホルモン簡易スクリーニング試験 JHASA	◎オオミジンコ繁殖試験（OECD TG211 ANNEX7） ▽ミジンコ多世代試験
脱皮ホルモン様作用	◎ミジンコ脱皮ホルモン受容体レポータージーン試験	△ミジンコ脱皮ホルモン作用検出試験	◎オオミジンコ繁殖試験（OECD TG211）検証中 ▽ミジンコ多世代試験
抗脱皮ホルモン様作用	◎ミジンコ脱皮ホルモン受容体レポータージーン試験	△ミジンコ脱皮ホルモン作用検出試験	◎オオミジンコ繁殖試験（OECD TG211）検証中 ▽ミジンコ多世代試験

注：◎開発済み、○開発中（完成間近）、△開発中、▽不採用

VMG-ecoの概要(2)

Item 4: 最初は国立環境研究所から、オオミジンコを用いた幼若ホルモン検出試験 (JHASA)の進捗報告 (渡部主任研究員)

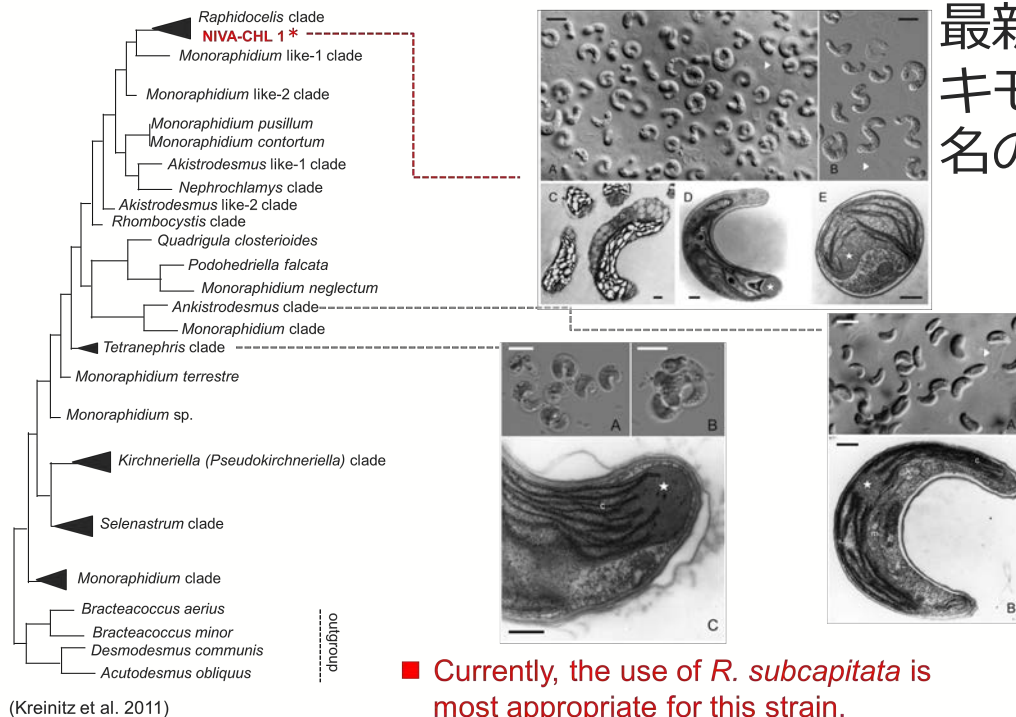
OECD TG211: ミジンコ繁殖毒性試験



Tatarazako et al. (2003)に基づき、昆虫や甲殻類に特有な幼若ホルモンをミジンコのオス仔虫出現で評価する手法を提案し、2015年のOECD TG211 Annex7に掲載

簡易なミジンコ幼若ホルモン活性スクリーニング試験法(JHASA)を現在提案・検証中 + AOP (Adverse Outcome Pathway)の修正案を提案

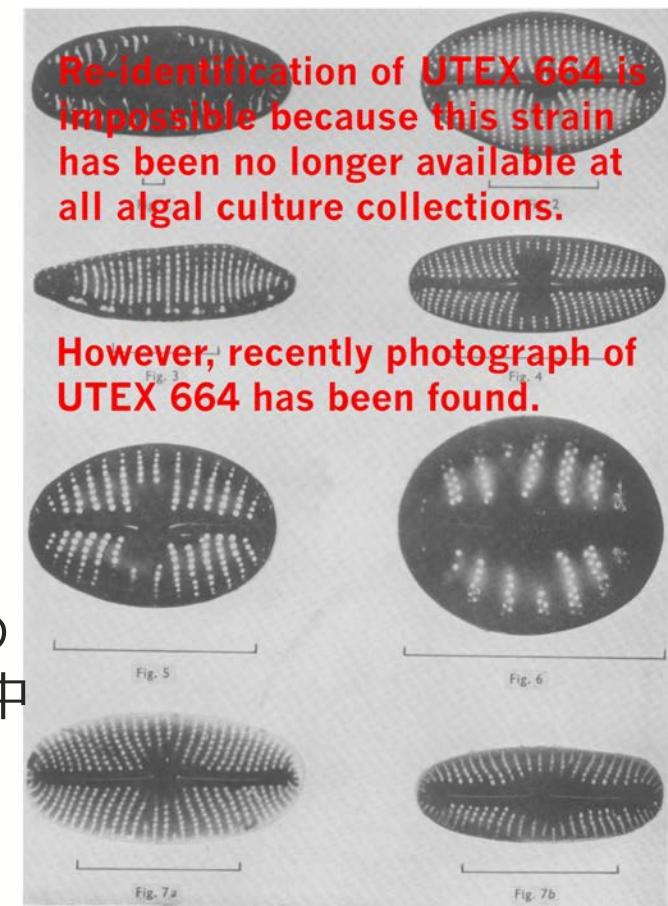
Item 5: 藻類生長阻害試験(OECD TG201)の改訂提案プロジェクトの進捗報告 (山岸主任研究員)



最新の科学的知見に基づいたムレミカツキモ(*Raphidocelis subcapitata*)などの学名の修正

■ Currently, the use of *R. subcapitata* is most appropriate for this strain.

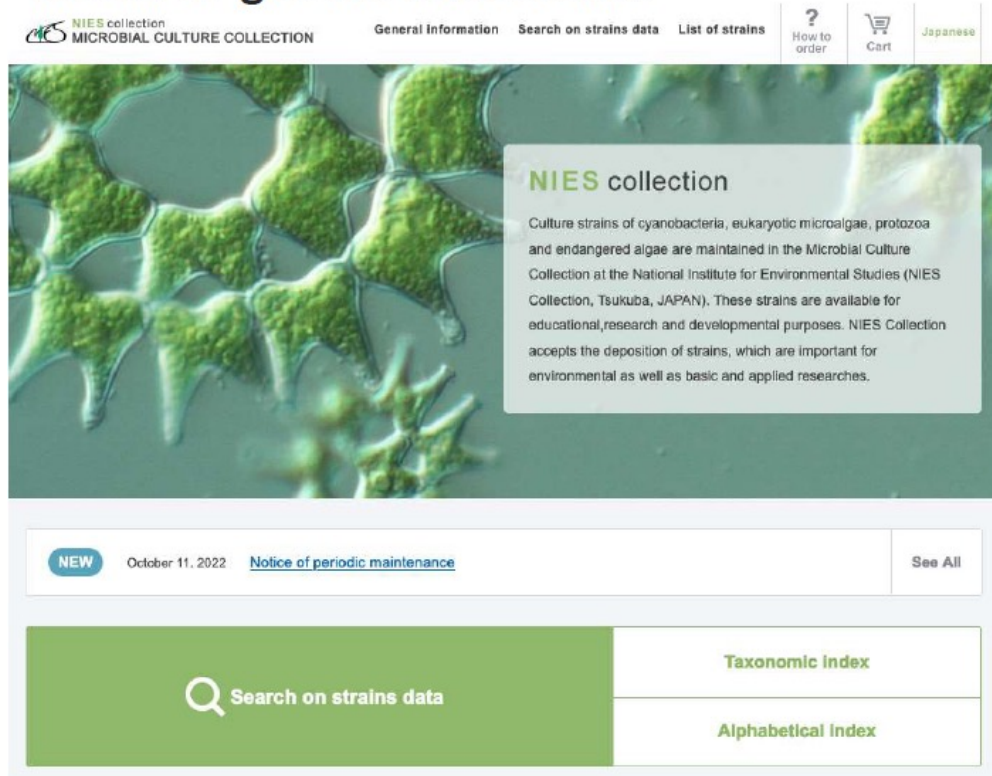
損失している珪藻*Navicula perliculosa*のUTEX664株の代替株の提案などを実施中



TG201のリングテスト提案

UTEX664の代替株を用いたバリデーション試験の概要

1. How to get the test strains



- NIES-2724 is available on NIES culture collection (https://mcc.nies.go.jp/index_en.html).
- NIES-4280 is available on NIES culture collection and UTEX culture collection (<https://utex.org/>).

2. Test chemicals

- Test chemicals (3,5-DCP and Potassium dichromate) will be supplied from NIES.

3. Chemical analysis

- 3,5-DCP is shipped to NIES after solid phase extraction .
- Cr(VI) is shipped to NIES after adding nitric acid.

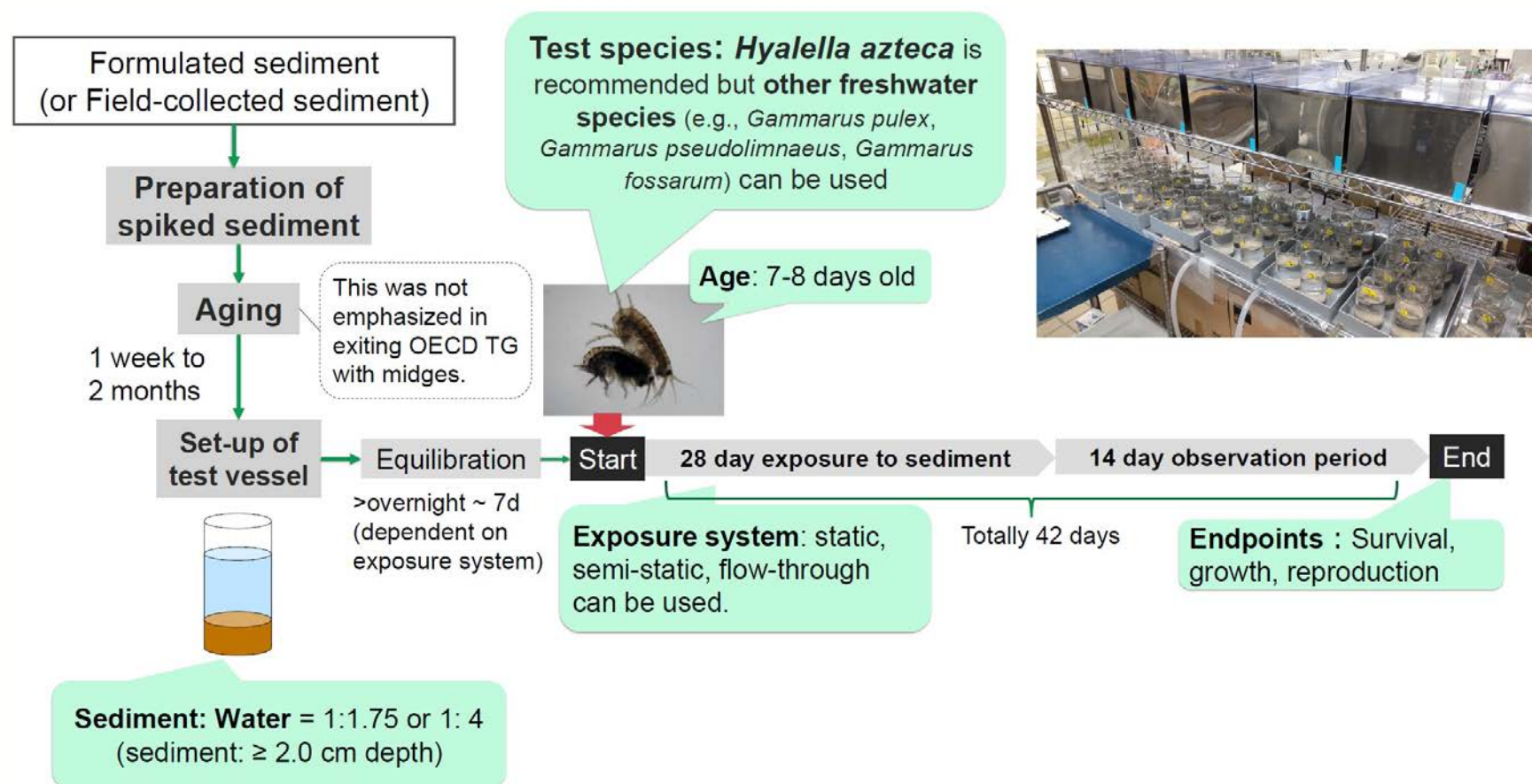
4. Testing laboratory

1. Chemicals Evaluation and research institute (CERI), Japan.
2. National Institute for Industrial Environment and Risks (INERIS), France.

**国内外の機関からの参加
を歓迎します！**

Item 6:ヨコエビを用いた底質添加試験の提案プロジェクトの進捗報告（日置主任研究員）

欧米で底質リスク評価にユスリカなどとならんで広く用いられているヨコエビ(*Hyalella azteca*)を用いた底質毒性試験をフランスと共同で提案中
(2021年に提案書を提出、2022年4月のWNTで検証プロジェクトが承認)



ヨコエビ底質試験法(1)

亜慢性(10日) と慢性(42日) の試験法を提案中

Draft protocol basically follows the method by ASTM (2020) but is partially modified to harmonize with other standardized methods (Environ Climate Change Canada, 2017; ISO, 2013).

	Part I Sub-chronic	Part II Chronic
Test period	10 days	42 days
Endpoint	Survival, growth	Survival, growth, reproduction
Exposure to sediment	10 days	28 days (after 28 days amphipods are transferred to clean water)
Species	<i>Hyalella azteca</i> is recommended but other freshwater species (e.g., <i>Gammarus pulex</i> , <i>G. pseudolimnaeus</i> , <i>G. fossarum</i>) can be used	
Sediment	Formulated sediment is preferred but field-collected sediment can be used.	
Food	YCT + fish flake food or Diatom + fish flake food For strongly adsorbing substances (e.g., $\log K_{OW} > 5$), food may be mixed with spiked-sediment before exposure.	
Sediment: water volume	1:1.75 to 1:4	
Amphipod age	7 to 8 days old	
Temperature	$23 \pm 3^{\circ}\text{C}$ (daily average: $23 \pm 1^{\circ}\text{C}$)	

できる限り、米国・カナダ、ISOなどで実施された検証結果を活用

US and Canada conducted several ring tests using *H. azteca* (the Table below). We'd like to utilize the results of the ring tests for OECD TG development.

Table. List of existing ring tests using *H. azteca*

Test protocol	Period	Test substance	No. of lab	Source
USEPA, 1994	10-day	Field-collected sed.	9	Burton et al., 1996, <i>ET&C</i>
ECC Canada	14-day	Field-collected sed.	5	Milani et al. 1996, Report. (partially reported in ISO, 2013)
	28-day	Field-collected sed.	3–7	
USEPA, 2000 ASTM, 2002	10-day	Cd (only 3 conc.) ^a Field-collected sed.	17	Norberg-King et al., 2006, <i>ET&C</i>
	28-day	Field-collected sed.	8–12	
	42-day	Field-collected sed.	7–9	
ASTM, 2020 ^b	10-, 28- & 42-day	Only control condition	24	Ivey et al., 2016, <i>ET&C</i>

a: Formulated sediment containing alpha cellulose was used.

b: The proposed OECD draft test guideline basically follows ASTM (2020).

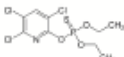
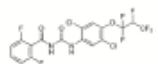
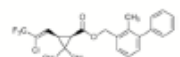
There is no spiked-sediment data for 42-day test. We need to perform ring test.

42日間の繁殖試験の検証のためのリングテスト参加機関を募集中

Inter-laboratory **42-day** ring tests using $\geq$ two organic chemicals

Test chemicals and peat (as sediment organics) will be provided from our laboratory.
Analysis of chemicals in water and sediment may also be performed by our lab.

Table. List of candidate test chemicals in future ring tests

		log K_{OW}	Category	Sediment toxicity data using <i>H. azteca</i>
Pyrene		4.88	Aromatic hydrocarbon	Tani et al. (2021) 96 hour Our lab 14-day
Chlorpyrifos		4.96	Organophosphate insecticide	Many 10-day data
Lufenuron		5.12	Chitin-synthesis inhibiting insecticide	Brock et al. (2018, Aquat. Toxicol.) 28-day
Bifenthrin		6.00	Pyrethroid insecticide	Anderson et al. (2015 IEAM) 28-day

Laboratories that have expressed interest in ring test

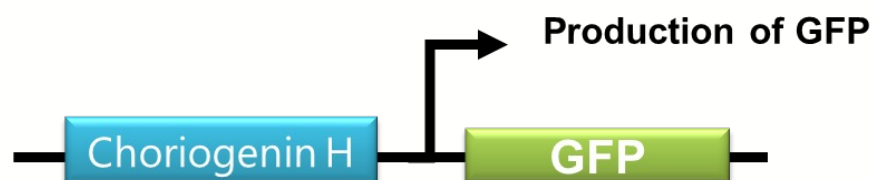
- ✓ IDEA Consultants (Japan)
- ✓ National Institute for Environmental Studies (Japan)
- ✓ Fraunhofer Institute for Molecular Biology and Applied Ecology (Germany)

Join ring tests!

Item 7: 遺伝子導入メダカ胚を用いた（抗）エストロゲン作用物質の迅速検出試験(REACTIV)の進捗報告

The rapid estrogen activity In Vivo (REACTIV) assay for detecting estrogen axis active chemicals

コリオジェニン・蛍光タンパク *chgh-gfp* を導入したメダカの胚・仔魚の蛍光顕微鏡を用いた画像解析によって（抗）エストロゲン活性を有する物質やアロマターゼ阻害物質などを検出する手法



日本も、主要なリングテストパートナーとして協力、国立環境研究所でリングテストを実施し、その結果は報告済

削除
(REACTIV assay模式図)

Item 8: TG210やTG234における助剤対照区と対照区
の比較による魚体数削減プロジェクト

→日本からもメダカのDMFデータも提供したが、デー
タ数が少ないことから、データが多いFHMを優先的に
解析中

Item 9: TG218と219のユスリカ底質試験の改訂に関す
るプロジェクト

→化学分析を推奨から必須、エンドポイントに関する
記述、マスバランス、統計手法のアップデートなどが
提案されている

Item 10: 日米共同でのMEOGRT (メダカ拡張一世代繁殖毒性試験、OECD TG240) の改訂提案 (渡部主任研究員)

Objectives

- Update the **statistics section (ANNEX 10)** in response to the update of USEPA OCSPP test guideline 890.2000.
- Add a few additional sentences/phrases **to clarify the protocol** based on the validation studies after approval of TG240 (OECD, 2015).

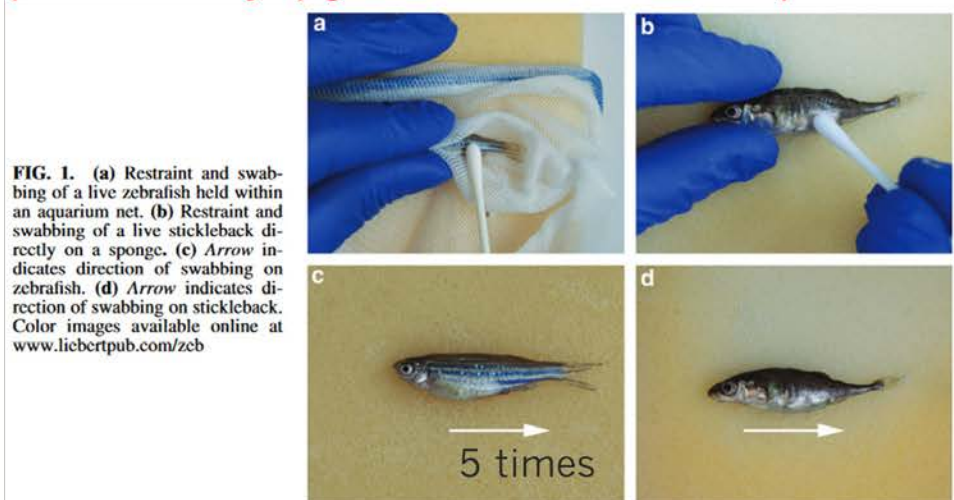
Revision points

- Statistical analysis (ANNEX 10)
- Endpoints (Table 1. fertile eggs, time to first spawn, etc.)
- Strains (ANNEX 11)
- Typos

遺伝的雌雄判別のためのDNAサンプリングについて

Success in zebrafish and stickleback

- The swabbing method consistently generated **sufficient DNA for successful PCR**.
- Swabbing fish of different **sizes** (20 and 30 mm SL) produced comparable results to the largest fish (55 mm SL); however, **we do not recommend the technique for fish smaller than 20 mm due to handling difficulty and the potential for injury given the size of the swab tip**.



Breacker C. et al. (2016) Zebrafish, 14(1), 35-41.

Applicable to medaka?

- Díaz et al (2019)(Fraunhofer, Germany) successfully conducted **DMY analysis** by skin swab method on 52 wks old (3-3.5 cm) and **10 wks old (1.25-2.5 cm)** medaka by comparison to fin clipping method.

Swab method is really a none-invasive DNA technique?

- Possible **bacterial/fungal infection and stress** by removal of mucus from the body surface.
- Does swabbing cause **any damage on survival, growth, reproduction, other endpoints?**
- Fin clipping can be conducted more quickly than swabbing?

The other DNA sampling method

- Collection of a scale (Masumoto et al. (2000))

Item 11: ゼブラフィッシュ拡大一世代繁殖毒性試験
(ZEOGRT)の検証への協力

**削除
(ZEOGRT試験法ドラフト)**

ZEOGRTの検証



国立環境研究所では、この
ZEOGRTのリングテストに参加

MEOGRTの経験はあったものの、
採卵、仔魚の飼育、採血などで苦
心した

Item 12: FET (OECD TG236)と魚類急性毒性試験(TG203)を利用したIATA (Integrated Approach to Testing and Assessment: 試験と評価の統合的アプローチ)



OECD TG203の改訂 (2019)

1. 魚体数の削減
2. 海産・汽水産魚の追加
3. **診断症状**をオプションとして観察し、**”瀕死 (Moribund)”** を死に代わるエンドポイントとして想定 (安楽死を実施)

TG203の改訂後の対応

Annex 4の症状

Loss of equilibrium

Abnormal
swimming behavior

Abnormal
ventilatory function

Abnormal skin
pigmentation

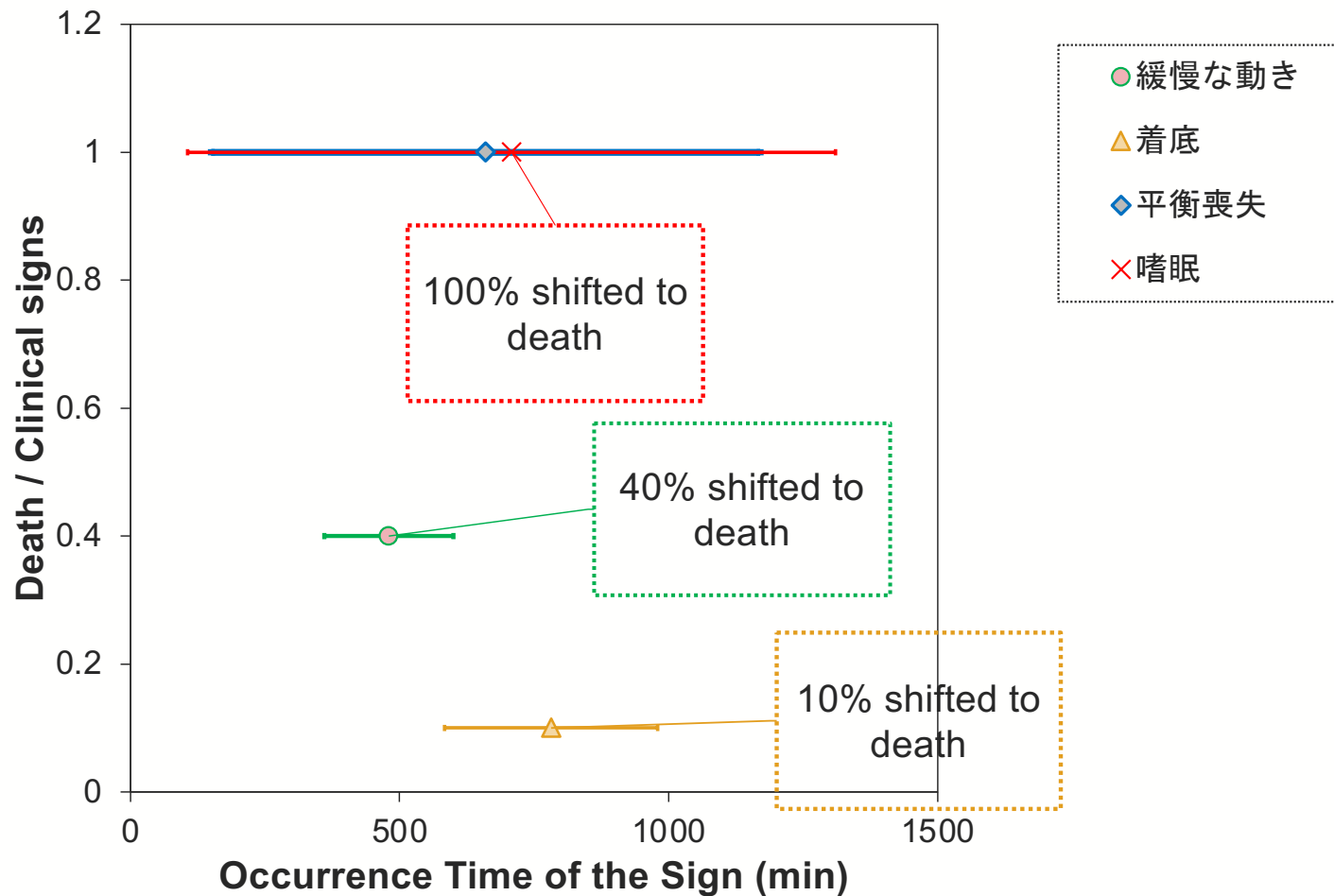
Clinical sign	Definition	Synonyms
LOSS OF EQUILIBRIUM (sub-categories below)		
Abnormal horizontal orientation	Loss of balance displaying as abnormal horizontal orientation/posture in water column	Keeling, lost righting reflex
Abnormal vertical orientation	Head-up or head-down posture	
Loss of buoyancy control	Floating at surface or sinking to the bottom	
ABNORMAL SWIMMING BEHAVIOUR (sub-categories below)		
Hypoactivity	Decrease in spontaneous activity	Torpid, apathy, lethargy, weak, immobility, inactivity, ceased swimming, quiescent
Hyperactivity	Increase in spontaneous activity	Erratic swimming, skittering
Corkscrew swimming	Rotation around long axis; erratic movements, often in bursts	Rolling, spiralling, spiral swimming, tumbling, circling movements
Convulsions	Abnormal involuntary and uncontrolled contraction of muscles	Seizures, twitching, muscle spasms, shaking, shuddering, vibration
Tetany	Rigid body musculature (intermittent or permanent)	Paralysis
Irritated skin behaviours		Flashing, scraping, rubbing
Abnormal surface distribution/behaviour	Abnormal depth selection, close to water/air interface	Jumping, surfacing; on/at/near/just below surface/top
Abnormal bottom distribution/behaviour	Abnormal depth selection, close to base of tank	Diving, sounding; Lying on/ orientation to / collecting at / near / just above bottom
Over-reactive to stimulus	Flight (startle) or avoidance response to: visual (hand passing over top of tank, light beam), tactile (touch) or vibration (tank rapped lightly) stimulus	Hyperexcitability; hyperactivity after stimulus/threat
Under-reactive to stimulus		Not responsive to external stimulation; inactivity after stimulus/threat
Loss of schooling / shoaling behaviour	Individual fish show loss of aggregating and social interactions	Isolation, social isolation
Dense schooling / shoaling behaviour	Increase in clumped association of fish	Crowding
ABNORMAL VENTILATORY (RESPIRATORY) FUNCTION (sub-categories below)		
Hyperventilation	Increased frequency of opercular ventilatory movements, with possible open mouth and extended operculae	Rapid/strong respiratory rate/ function. Heavy gill movements, strong ventilation, strongly extended gills, abnormal opercular activity, operculae spread apart, mouth open
Hypoventilation	Decreased frequency of (and possibly shallow) opercular ventilatory movements	Reduced/laboured/weak/slow respiration/respiratory action/ventilation
Irregular ventilation	Irregular opercular ventilatory movements	Sporadic / spasmodic respiration / gill movement
Coughing	Fast reflex expansion of mouth and operculae not at water surface - assumed to clear ventilatory channels	Gasping, abnormal opercular activity, yawn
Gulping	Mouth (and opercular) movements at water surface, resulting in intake of water and air	Piping
Head shaking	Rapid lateral head movements	
ABNORMAL SKIN PIGMENTATION (sub-categories below)		
Darkened		Changed / increased / dark(ened) colour / pigmentation / melanistic markings
Lightened		Pallor, pale/changed/weak pigmentation
Mottled		Discoloured patches
OTHER VISIBLE (APPEARANCE & BEHAVIOUR) ABNORMALITIES (sub-categories below)		
Exophthalmia	Swelling within orbital socket(s) resulting in bulging of one or both eyes	Exophthalmos, exophthalmus, popeye, protruding eyeball
Oedema	Abdominal swelling due to accumulation of fluid. May cause protruding scales and/or fissure in abdominal wall	Distended/swollen/bloated abdomen/gut area; dropsy
Haemorrhage	Petechias (pinhead sized spots) and/or haematoma (area of blood) due to intradermal or sub-mucus bleeding	
Mucus secretion	Excess mucus production	Mucus build-up (pay close attention to eyes); increased secretion (mucus on skin or in water); mucus loss
Faecal (anal) casts	String of faeces hanging from anus or on tank floor	
Aggression and/or cannibalism		Aggression, direct attack, domination of choice tank locations, pick at or eat bodies of dead fish

Clinical signについての
観察はオプション

メダカについての情報が
ない

メダカ症状の分類

診断症状を重篤さに基づき分類



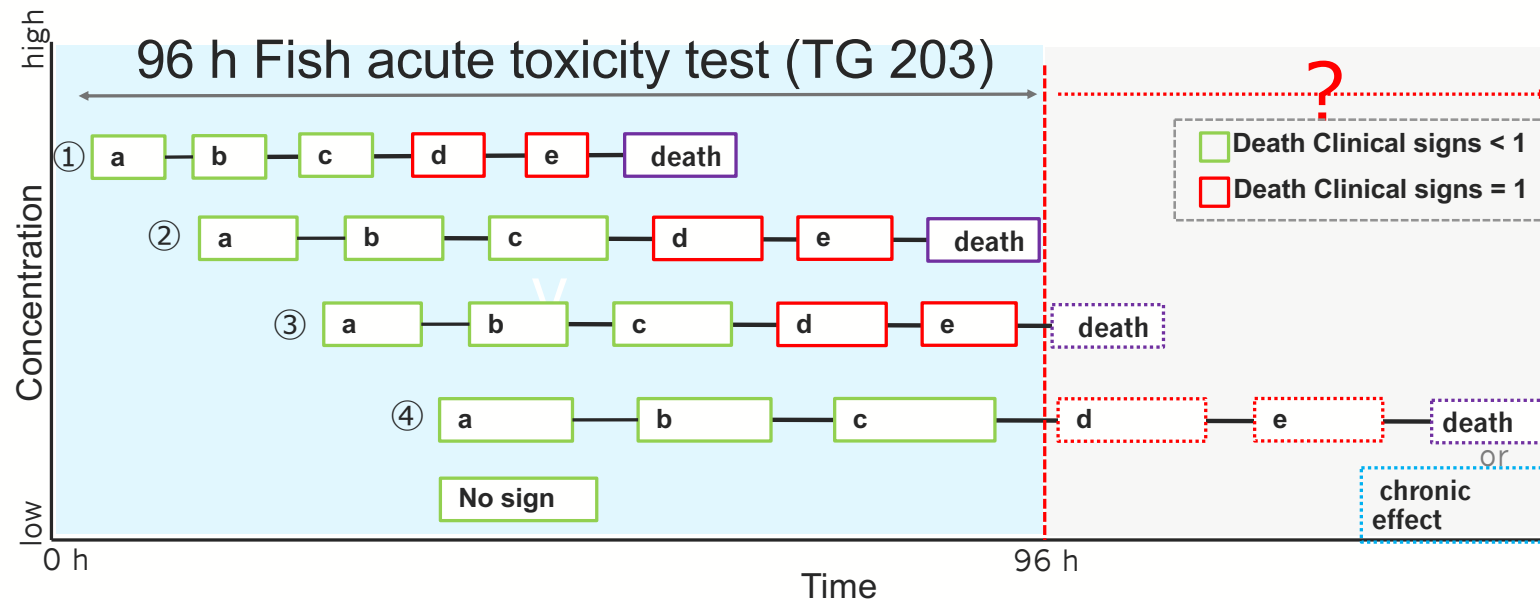
メダカ症状の分類(2)

Category	Clinical sign	Definition	Death/Clinical sign Ratio	Severity
Abnormal Swimming Behavior	Grounding	No swimming and attaching stomach on the bottom (fins are still moving)	0.67*	Moderate
	Hyperactivity	Skittering toward undefined directions	0.82*	Moderate
	Tumbling	- Equilibrium function is lost and backstroke and spiral movement (vertical direction), and corkscrewing (horizontal direction) - Backstroke, spiral and corkscrew swimming were observed simultaneously in many cases.	0.88*	Moderate
	Loss of buoyancy	Lying on side with motion of gills and fins, but momentary rapid swimming after stimulation or abnormal swimming at bottom of tank with loss of buoyancy.	0.88*	Moderate
	Lethargy	- Lying on the bottom of the tank - No movement in gills and fins - By stimulus such as tank rapped lightly, swims slowly but eventually ceases to sink on the bottom	1*	Severe
Immobilization	Recumbency	- Lying on the bottom of the tank - Gills are moving but fins are not	1*	Severe
	Floating at surface	- Gulping - Gills are moving but fins are not	1*	Severe

*Arithmetic mean of eight chemicals

Clinical Signsの観察の客観化（＋他の魚種）が課題

メダカ症状の分類(3)



- Our current interest is the link between the clinical signs and chronic effects (impacts on growth/reproduction)
- We are currently working on the link between the low Death/Clinical signs ratio signs and the early life stage test (TG210) results.

96時間より先は？？？慢性影響との関連性？？？

生態影響試験実習セミナー

国立環境研究所では、2022年7月6～8日に第15回生態影響試験実習セミナーを実施

第15回生態影響試験実習セミナー 受講者募集のご案内

国立環境研究所環境リスク・健康領域環境リスク科学研究推進室では、生態影響試験に関する標準機関として、幅広い機関への試験の普及を図るため、平成23年度より「生態影響試験実習セミナー」を開催しております。

環境リスク科学研究推進室は、この2年間、新型コロナウイルス感染拡大の影響でやむなく生態影響試験実習セミナーの開催を自粛しておりました。未だ感染者数は警戒すべき域を脱していない状況ではありますが、国の新型コロナ規制緩和措置とセミナー開催への強い要望があることを鑑み、本年度は、対面実習の規模を縮小する等の十分な感染防止対策を講じた上で、座学や講演等をWeb配信するハイブリッド形式での開催を決定いたしました。節目となる15回目の今回は、魚類急性毒性試験の改訂に伴うメダカの症状診断と魚類胚期急性毒性（FET）試験の導入及びそれらの技術向上を目指したい方を対象に、令和4年7月6日(水)～8日(金)の3日間の日程で開催します。皆様のご参加をお待ちしております。

日程	令和4年7月6日(水)～8日(金) 6日：10:30～17:45、7日：09:00～17:15、8日：09:30～12:30
場所	国立環境研究所 環境リスク研究棟 〒305-8506 茨城県つくば市小野川16-2
対象	魚類急性毒性試験におけるメダカの症状診断と 魚類胚期急性毒性（FET）試験の導入及び 技術向上を目指したい方※
定員	現地参加10～12名（各機関1名まで）、 オンライン参加（座学・講演等のWeb配信の受講） は制限なし 定員超過の場合、生態影響試験の 経験等を考慮し参加者決定
参加費	なし （昼食費必要に応じて実費となります。 懇親会は新型コロナウイルス感染拡大防止の観点から、実施しません。）



メダカ診断症状の観察とFET

第16回（12月）は藻類＋ウキクサ試験

第17回は2023年6月（ミジンコ？）を予定！

※初心者から中級者向けの基本的な概要・操作説明及び実習を予定しております。

FET (OECD TG236)の概要

Annex 3

NORMAL ZEBRAFISH DEVELOPMENT AT 26°C

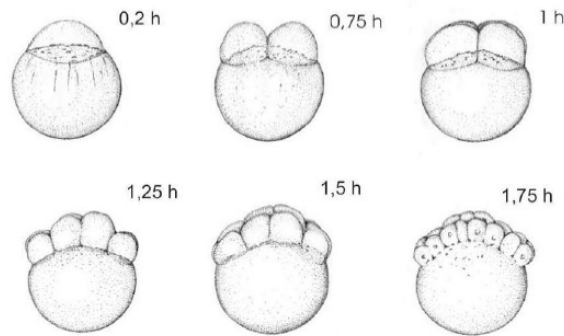
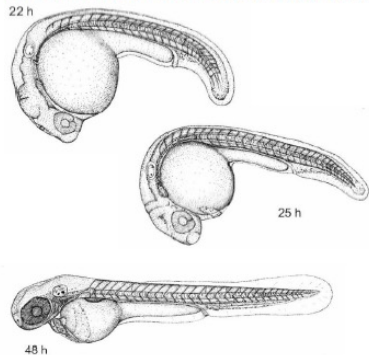


Fig. 1: Selected stages of early zebrafish (*Danio rerio*) development: 0.2 – 1.75 hrs post-fertilisation (from Kimmel *et al.*, 1995). The time sequence of normal development may be taken to diagnose both fertilisation and viability of eggs (see paragraph 26: Selection of fertilised eggs).



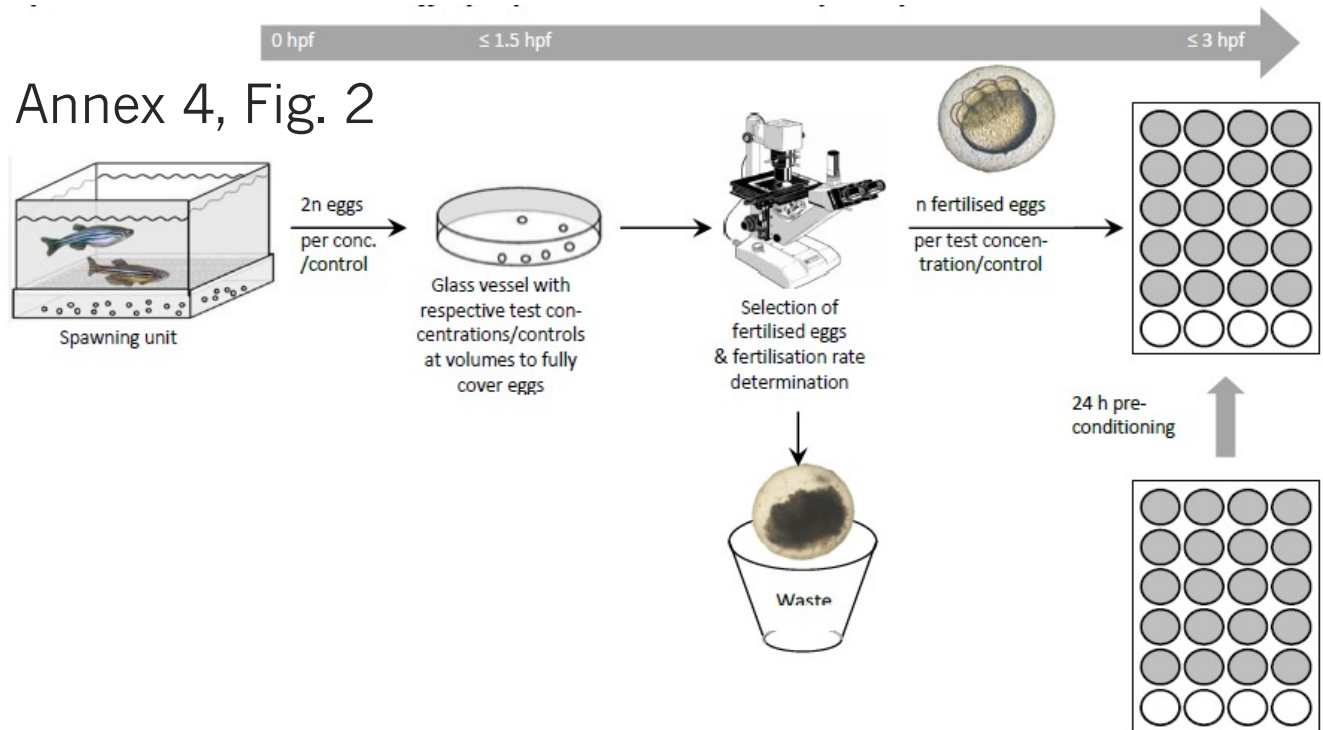
© OECD, (2013)

16

Fig. 2: Selected stages of late zebrafish (*Danio rerio*) development (de-chorionated embryo to optimise visibility): 22 - 48 hrs after fertilisation (from Kimmel *et al.*, 1995 (35)).

© OECD, (2013)

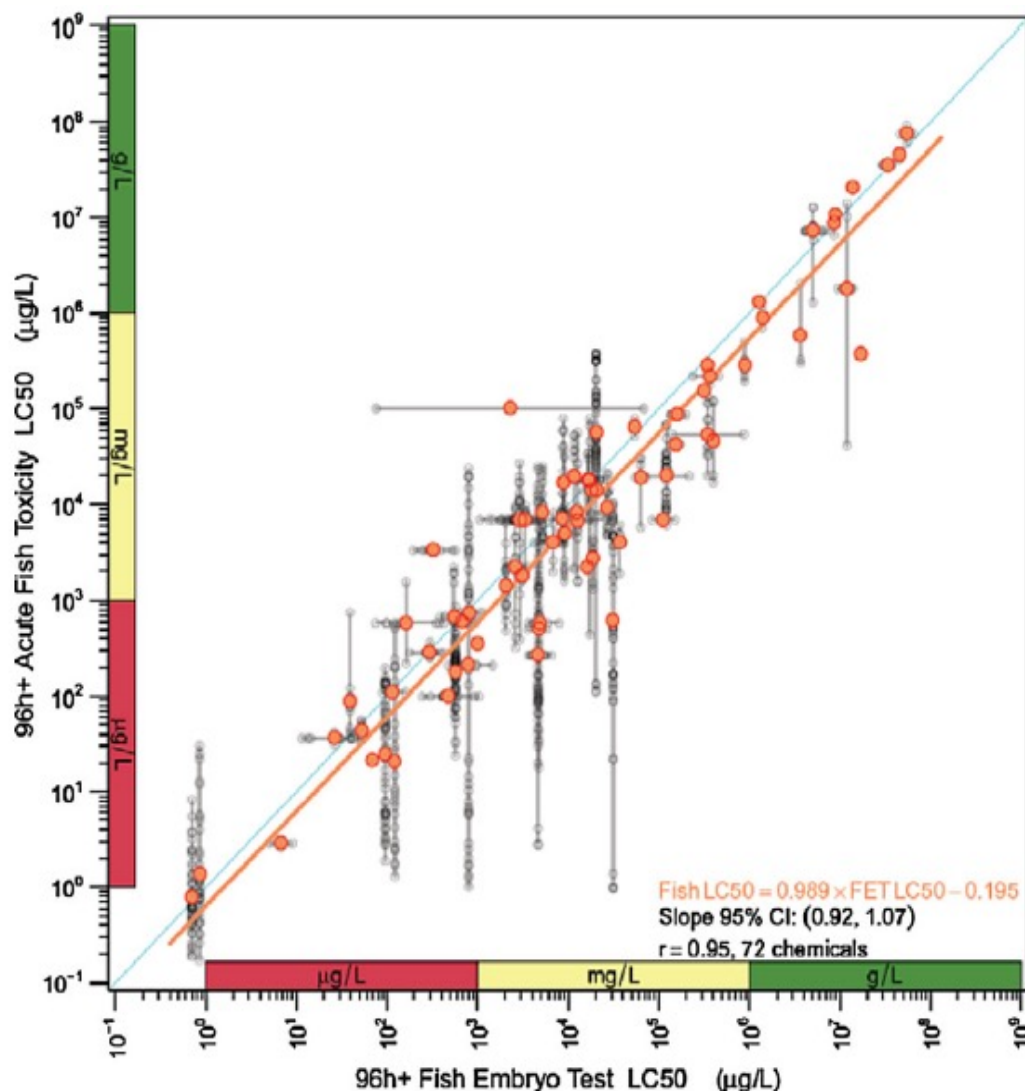
Annex 4, Fig. 2



19

- 20 eggs per concentration using 24-well microplates
- 96 h exposure (hatching at 48-72 hpf @26°C)

FETとTG203の比較



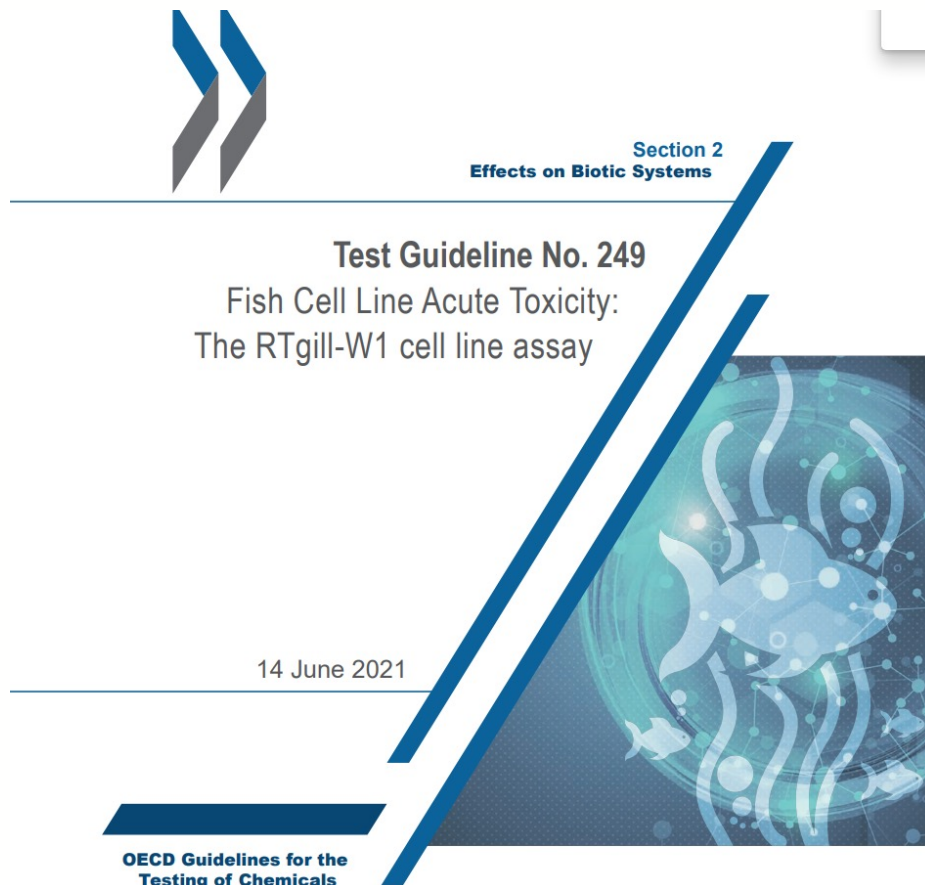
Relatively good correlation was observed for 72 chemicals compared between FET and TG203 (all species included) results

This may not be true for some pharmaceuticals metabolized in liver

TG249 (RT-Gill-W1 assay)

ノルウェーとスイスの提案によるニジマス
エラ細胞株を用いたRTgill-W1アッセイ

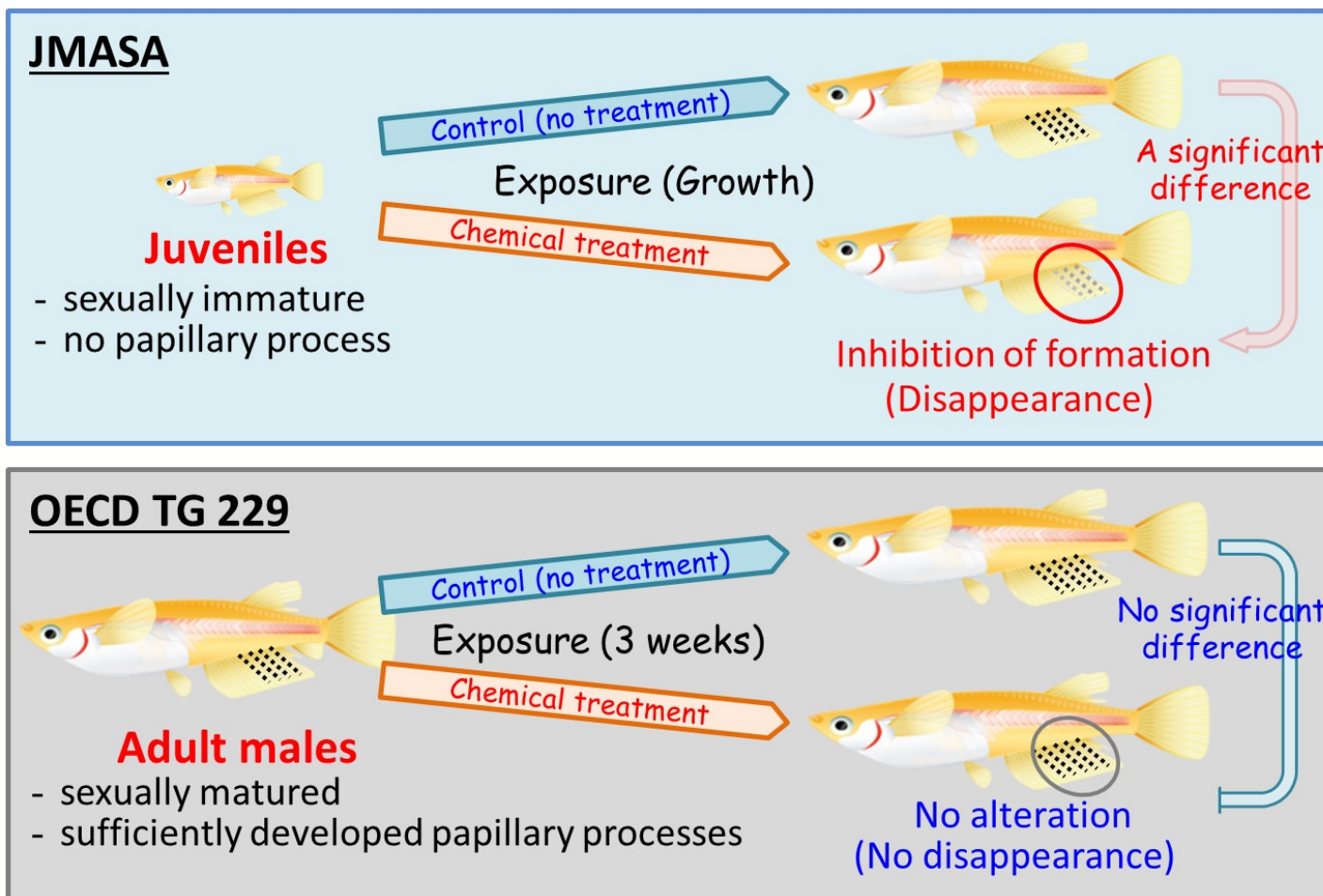
スイス連邦水科学技術研究所
(Eawag)のKristin Schirmer教授ら
が開発した手法



**削除
(試験系模式図)**

VMG-ecoの概要(10)

Item 13の幼若メダカ抗アンドロゲン検出試験(JMASA)の進捗報告 (山本より)



雄の幼若メダカの尻びれの乳頭状小突起の形成を利用した抗男性ホルモンの検出試験法 (JMASA) の検証はほぼ終了

→ バリデーションレポートが回覧中で、ガイダンスドキュメントとして、WNTで承認される前の最終段階

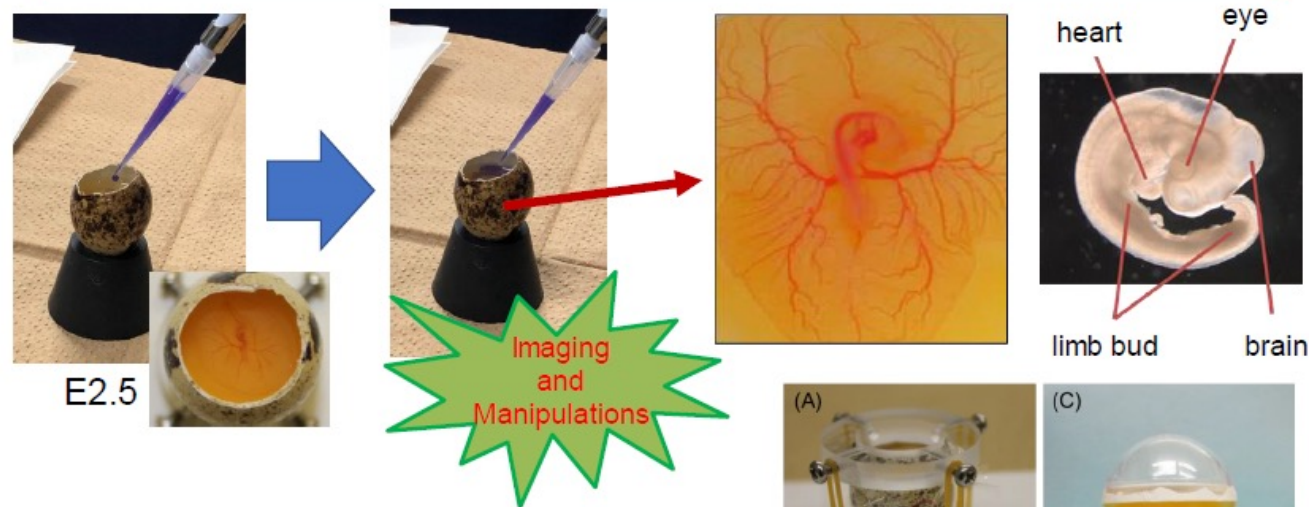
Item 14: OECD魚類試験法に甲状腺ホルモンエンドポイントを入れるためのAOP開発との共同プロジェクト

削除
(見込まれるバイオマーカー/エンドポイントの図)

OECD TG229/234を組み合わせた試験法提案

Item 15の各国の活動（この先TGに提案されそうな内容）の紹介部分で、日本の活動として、ウズラを用いた鳥類卵内試験の進捗状況を国立環境研究所（川嶋主幹研究員）から紹介

ex ovo assay (Japanese Quail)



The avian surrogate eggshell culture method can be applied as a new method of administration due to more flexibility in setting the dose of test substances.

We are also developing a method for culturing quail embryos in artificial vessel.

削除 (Pepperの概念図)

フランスのNPOである
PEPPERでも、鳥類（ニワトリ）を用いた卵内投与試験法を検討中であり、共同提案を模索中

2023年4月24-28日にOECD WNT-35が開催
(現地参加) 予定

鳥類卵内投与スクリーニング試験(AIOSA)の
SPSFの承認に努める

JMASAのガイダンス文書の承認に努める

研究内容（組織・サブテーマ）

National
Institute for
Environmental
Studies, Japan

環境研究総合推進費(5-2205)「研究課題名：作用・構造や曝露プロファイルの類似性に基づく複数化学物質の生態リスク評価手法の開発」

R4～R6年度

サブテーマ1 有機化学物質



サブテーマ2 金属類



作用・構造が類似した有機汚染化学物質の複合影響評価手法の開発

代表：○山本裕史

- 3グループの選定：
- ・フタル酸エステル
 - ・トリアジン系除草剤
 - ・第四級アンモニウム

金属の曝露プロファイルに基づく複合影響評価手法の開発

代表：○内藤航

水生生物へのリスクが比較的高い亜鉛(Zn)、銅(Cu)、カドミウム(Cd)、ニッケル(Ni)の4金属

環境動態・曝露評価

複合曝露シナリオ

有害性評価

個別・複合曝露試験

リスク判定手法の比較・検証

有機汚染物質と金属 の複合影響評価

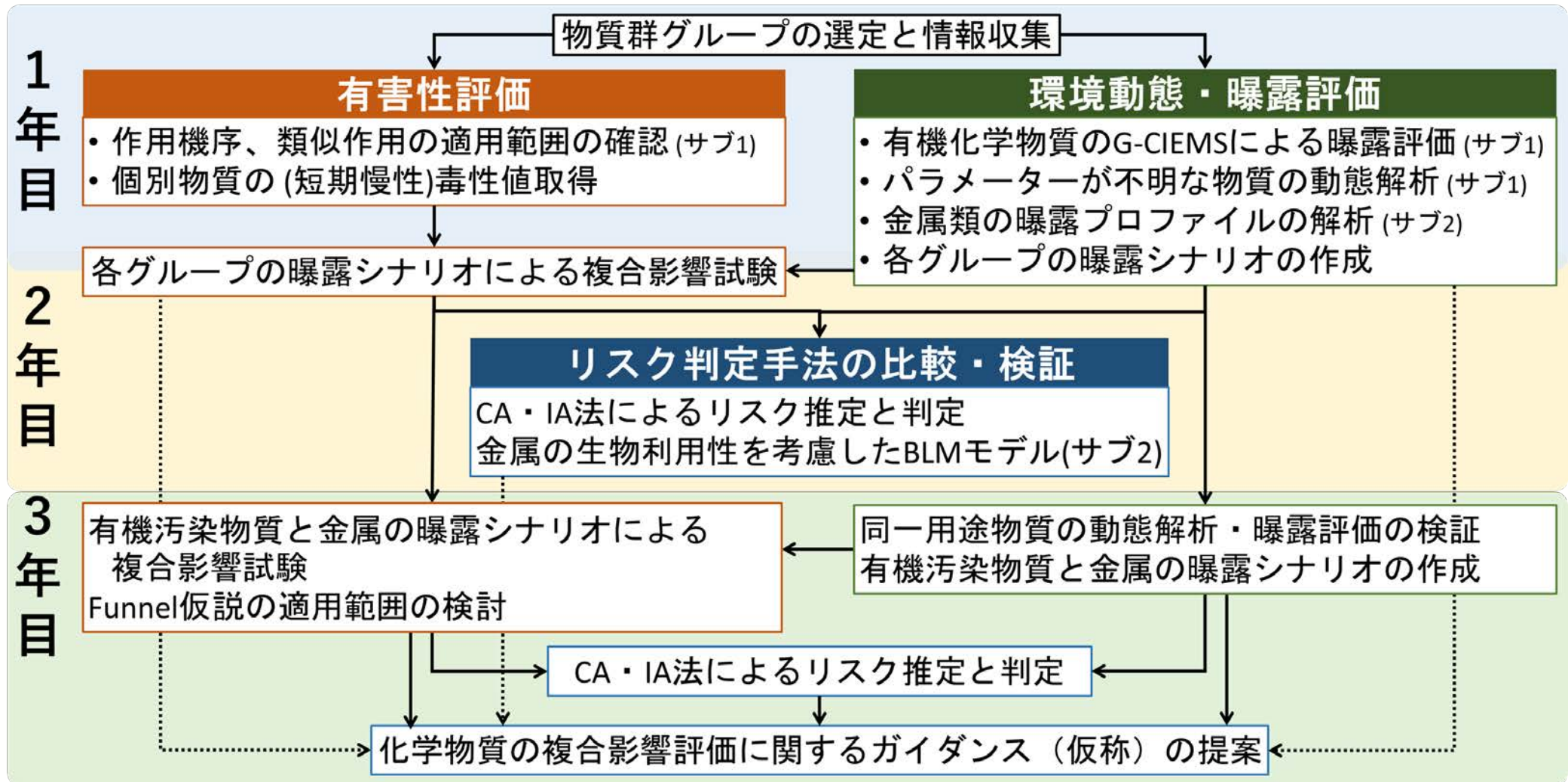
化学物質の複合影響評価に関するガイダンス
(仮称)の提案

複合影響モデルによる
予測影響との比較検証
Funnel仮説の適用範囲
の検証

研究計画

研究計画

サブが明記していないものは
両サブ共通（協働しながら実施）



化審法対象の試験生物種の販売

実験水生生物の有償分譲の対象種・系統

①	セスジスリカ	<i>Chironomus yoshimatsui</i>
②	ヨコエビ	<i>Hyalella azteca</i>
③	オオミジンコ	<i>Daphnia magna</i>
④	タマミジンコ	<i>Moina macrocopa</i>
⑤	ニセネコゼミジンコ	<i>Ceriodaphnia dubia</i>
⑥	ヌカエビ	<i>Paratya compressa improvisa</i>
⑦	ヒメダカ	<i>Orizias latipes</i>
⑧	ゼブラ	<i>Danio rerio</i>
⑨	ファッドヘッドミノ	<i>Pimephales promelas</i>
⑩	アカルチア	<i>Acartia tonsa</i>
⑪	アミ	<i>Americamysis bahia</i>
⑫	コウキクサ	<i>Lemna minor</i>

