

巻頭言

KHVへの不覚

「No way! We can't visit Koi farm.」友人のA. Hurvitz氏は即座にこう答えた。'99（平成11）年3月、技術指導でイスラエルを訪問していた時のことである。私が「錦ゴイの養殖場を見たい」と希望したので、それに対する返答であった。「なぜか？」と問うと、彼は「昨年から新しいウイルス病が出ているからだ。状況は大変悪い、輸出ができなくなっている」と言う。「SVC（コイの春ウイルス病）か？」と聞くと「違う、新病だ」とも答えた。イスラエルは、歴史は浅いが、錦ゴイを欧州各国へ輸出する国として知られている。ともあれ、魚病学者でもある彼の言に従って見学を断念したが、当時の私は、不覚にも、この新しいウイルス病は遠く離れた異国の病気であると思ってしまった。その後、'02年4月、北京で開催されたWorld Aquaculture 2002に参加した時、イスラエルのDr.Ariavの発表を聴いて初めて、あの新ウイルス病こそ、イスラエルの食用ゴイと錦ゴイ産業に大打撃を与えたコイヘルペスウイルス病であり、かつまた、日本にいつ侵入しても不思議ではない状況にあったKHV病そのものであることを知った。不思議ではないと言うのも、この頃は既に、KHVは欧米だけでなく、アジアでも拡がりつつあった。'01年に香港でのKHV病の発生が報じられたのをはじめ、中国本土や台湾でも発生したらしいと言われるようになっていた。また、'02年インドネシアのジャワ島でも感染コイの大量死が発生するに至って、日本へのKHVの侵入がにわかに現実味を帯びていた。国は'03年6月末に、国内防疫法である「持続的養殖生産確保法」の「特定疾病」にKHV病を追加指定したが、

福岡県水産海洋技術センター 内水面研究所
所長 稲田 善和



その僅か4ヶ月後の11月2日、水産庁は「霞ヶ浦の養殖ゴイにKHV病が発生した」と発表した。そして一冬を越して、'04年の今や、予想を上回る広さと早さで、KHV病は日本各地でアウトブレイクし、私自身も職務上、防疫と蔓延防止対策に忙殺される羽目となってしまった。

KHVは、幸いと言うべきか？イスラエルや欧米諸国といった先発国の事例や研究があり、日本においても、生残コイに免疫を付与し、大量死が長く続くことはないであろう。ただ、私自身は、淡水魚の病気にも携わった一研究者として、不明を恥じる部分も少なくない。たまたまとは言え、多分日本人の魚病関係者の誰よりも先に発生直後の国を訪問しながら、なぜ関心を持って発生や被害の状況を詳しく聞かなかったのか？また、「日本にいつ侵入してもおかしくない」と関係者に多少の警告はしたものの、自分自身が半ば「未だ先のことか」とも思っていた。さらに、'03年11月に侵入が確定しても「魚の処分や消毒を徹底すれば、感染の拡大は防げるのでは？」と観念的に考えていた。今年1月、業界の招きでKHVの講師として来日し、福岡に立ち寄ったイスラエルのMHaimi氏に「日本でKHVは蔓延すると思うか？」と尋ねたところ、彼は躊躇なく「Matter of time.」と答えた。そして、その後の事態は彼の言うとおりととなった。自問してみれば、私は、物事を客観的にみて論理的に判断する、科学者としての厳しい眼を忘れていたのかも知れない・・・不覚、反省である。

CONTENTS

●巻頭言

「KHVへの不覚」

福岡県水産海洋技術センター 内水面研究所 所長 稲田善和

●本機構の活動から

- ・評議員会および理事会開催
- ・第9回化学物質評価研究機構研究発表会開催

●特集1（化学物質安全部門Ⅰ）久留米事業所

1. 改正化審法の試験法
2. 既存化学物質安全性点検事業の加速化について－Ⅲ
3. 魚類を用いた内分泌かく乱作用の評価法開発状況について
4. 生態毒性関連のテストガイドライン作成・改訂の最近の動きについて
5. 医薬品安定性試験の品質保証体制について
6. コイヘルペスウイルス（KHV）について

●お知らせ

- ・無料クロマトセミナー

●編集後記

本機構の活動から

評議員会および理事会開催

平成16年6月23日に理事会が開催され、20名の評議員が選任されました。引き続いて、評議員会が開催され、15名の理事が選任されました。

I. 評議員（任期：平成16年8月1日から平成18年7月31日まで）

安部 明廣	東京工芸大学教授、東京工業大学名誉教授、日本学術会議会員
井上 達	厚生労働省国立医薬品食品衛生研究所安全性生物試験研究センター長
今井 秀孝	独立行政法人産業技術総合研究所計量標準研究部門研究顧問、独立行政法人製品評価技術基盤機構技術顧問
小倉 正敏	社団法人日本化学工業協会常務理事・化学品管理部長
小野 宏	財団法人食品薬品安全センター常務理事・秦野研究所長
辛島 英二	日本産業ガス協会特殊ガス専門委員会委員長
小林 邦男	九州大学名誉教授
櫻井 治彦	中央労働災害防止協会労働衛生調査分析センター所長、慶応義塾大学名誉教授
田村 昌三	東京大学名誉教授
柘植 新	名古屋大学名誉教授、愛知工業大学客員教授
十川 照延	株式会社十川ゴム代表取締役社長
中杉 修身	横浜国立大学共同研究推進センター客員教授、前独立行政法人国立環境研究所化学物質環境リスクセンター長
中村 洋	東京理科大学薬学部教授
野澤 俊太郎	社団法人日本試薬協会名誉会長、関東化学株式会社代表取締役社長
平石 次郎	元独立行政法人産業技術総合研究所副理事長
古川 睦久	長崎大学大学院教授
前川 昭彦	財団法人佐々木研究所長
山口 政俊	福岡大学薬学部教授
湯川 れい子	音楽評論家
吉田 淑則	合成ゴム工業会副会長

II. 理事・監事（任期：理事 平成16年7月1日から平成18年6月30日まで

任期：監事 平成15年7月1日から平成17年6月30日まで）

○理 事 長	近藤 雅臣（医学博士、大阪大学名誉教授）
○専務理事	細川 幹夫
○常務理事	山本 武人
○常務理事	荏澤 孝二（総務部長）
○常務理事	阿南 忠明（東京事業所長）
○理 事	高月 峰夫（理学博士、安全性評価技術研究所長）
○理 事	田所 博（農学博士、化学物質安全センター所長、久留米事業所長）
○理 事	矢可部 芳州（理学博士、企画部長、安全性評価技術研究所副所長）
○理 事	大武 義人（工学博士、高分子技術センター所長、東京事業所高分子技術部長）
理 事	池田 正之（医学博士、京都大学名誉教授、財団法人京都工場保健会理事）
理 事	山本 明夫（工学博士、東京工業大学名誉教授、早稲田大学理工学総合研究センター顧問研究員）
理 事	松本 和子（理学博士、早稲田大学理工学部教授）
理 事	西原 力（薬学博士、大阪大学大学院薬学研究科教授）
理 事	保母 敏行（工学博士、東京都立大学名誉教授）
理 事	堀江 一之（工学博士、東京大学名誉教授）
監 事	松中 宏至（日本ゴム協会理事）
監 事	北野 大（工学博士、淑徳大学国際コミュニケーション学部教授）

（○印者は常勤）

第9回化学物質評価研究機構研究発表会開催

本機構は7月23日、経団連会館において第9回化学物質評価研究機構研究発表会を経済産業省のご後援により開催しました。発表会には300名弱の方々にご参加いただき、無事終了いたしました。

発表会は本機構理事長 近藤 雅臣の挨拶ではじまり、基調講演を経済産業省製造産業局化学物質安全室 辻 信一室長に「化学物質管理の最近の動向と課題」という演題で、特別講演を日本学術会議 黒川 清会長に「科学と社会：21世紀の日本の課題」という演題でご講演いただきました。

お二人のご講演の間に、本機構職員が研究の一端として「トキシコゲノミクス-バイオインフォマティクス技術を用いた発がん性予測法の開発」、「トキシコプロテオミクス-タンパク質の網羅的解析に基づく毒性評価」の発表2題と各事業部門の技術報告5題を紹介いたしました。

発表会は定刻に終了し、引き続き懇親会が行われ、発表会の限られた時間で討議できなかった課題について、発表者と聴講者の間で熱心に議論が交わされていました。

皆様にとりまして有意義な公開研究発表会にしたいと考えておりますので、今後ともよろしくお願いいたします。

<機構の職員による発表の概要>

発表1 トキシコゲノミクス-バイオインフォマティクス技術を用いた発がん性予測法の開発



安全性評価技術研究所
松本 博士

さまざまなバイオインフォマティクス手法を駆使して、発がん性既知物質を投与したラット肝臓の遺伝子発現データから、発がん性に特徴的な遺伝子発現パターンを抽出し、高精度な発がん性予測法を開発している。今回、その研究成果と今後の課題について紹介した。

発表2 トキシコプロテオミクス-タンパク質の網羅的解析に基づく毒性評価



安全性評価技術研究所
山中 秀徳

2D-DIGE法とマイクロLC-MS/MS法を組み合わせたタンパク質の網羅的定量比較解析から高感度たんぱく質同定まで一連のプロテオミクス解析システムを利用した研究例として、化学物質の発がん性予測および創薬への応用として抗がん剤の分子ターゲット探索を行った例を紹介した。

技術報告1 Non-RI Local lymph node assay相対比較法による化学物質の感作性強度の推定

化学物質安全部門 武吉 正博

我々はLocal lymph node assay (LLNA) に既知のヒト感作性物質を比較対照として用いることにより、被験化学物質の感作性強度を正確に推定する方法を開発した。本法は化学物質の感作性を迅速かつ効率的に分類、評価する方法として有用であることが示された。

技術報告2 特殊溶媒を用いた高分子の分子量分布評価方法開発

高分子技術部門 寶崎 達也

N-メチルピロリドン、HCFC225溶媒等GPC測定において汎用的に用いられていない溶媒を用い、ポリアミド、ポリアミドイミド等の分子量分布測定方法およびその測定結果について報告した。

技術報告3 製品中の有害化学物質の含有量分析

環境技術部門 本橋 勝紀

RoHS指令の対象物質6物質を含めた有害な特定化学物質について、原料、素材や製品中の分析方法を検討し、これらの含有量分析の体制を整備した。一部の物質については検討中であるが、ほとんどの物質が対応可能となっている。

技術報告4 技能試験用試料の調製

化学標準部門 四角目 和広

ISO/IEC 17025における技術的な要求事項として、技能試験等による技術能力の確認が必要となってきた。そこで、これら技術能力の確認のための精確な濃度と不確かさが付けられた試験用試料（特に、低濃度無機溶液）の調製を行うことが可能となった。

技術報告5 高速液体クロマトグラフ用カラム L-column ODS (3 μm) の開発

クロマト技術部門 坂牧 寛

今回開発したL-column ODS (3 μm) は、基材シリカゲルの微粒子化と高温気相反応による不活性化処理の相乗効果で酸性から塩基性、配位性化合物まであらゆる化合物において最適な分離を得ることができる。

特集 1 (化学物質安全部門 I) 久留米事業所

1. 改正化審法の試験法

平成15年11月21日「新規化学物質等に係る試験及び指定化学物質に係る有害性の調査の項目等を定める省令の一部を改正する省令」が出されました。これにより、新たな試験が導入されるとともに一部の試験では改訂が行われましたのでその内容をご紹介します。

1) 動植物への影響試験の導入

「化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律（化審法）」は人の健康を損なう恐れのある物質による環境汚染を防止する目的で昭和48年に世界に先駆けて制定されました。その後、欧米先進諸国では同様の法律が制定され、その中では、人への健康影響と同様に環境中の動植物への影響についても着目し、環境汚染防止が考慮されてきました。このような国際的な状況も考慮し、化審法においても平成15年の改正により、難分解性、高濃縮性、人への長期毒性に加えて、動植物への影響可能性を有する化学物質の監視制度の導入、生活環境に係る動植物への被害防止のための規制措置の導入がなされました。その結果、改正化審法では従来4通りのカテゴリーが次の6通りに変更されました。

- ① 第1種特定化学物質（難分解性、高濃縮性、人への長期毒性又は生態毒性あり）
- ② 第2種特定化学物質（難分解性、高濃縮性でない、人への長期毒性又は生態毒性あり）
- ③ 第1種監視化学物質（難分解性、高濃縮性、人への長期毒性又は生態毒性不明）
- ④ 第2種監視化学物質（難分解性、高濃縮性でない、人への長期毒性疑いあり）
- ⑤ 第3種監視化学物質（難分解性、高濃縮性でない、生態毒性あり）
- ⑥ 新規化学物質（「白」公示物質）

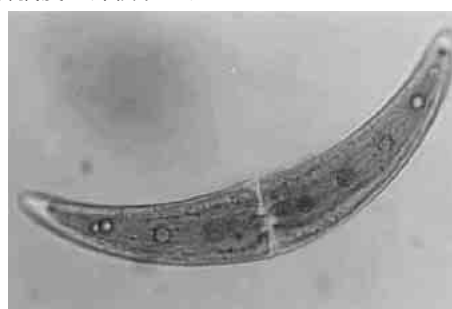
導入された試験は「藻類生長阻害試験」、「ミジンコ急性遊泳阻害試験」、「魚類急性毒性試験」の三項目です。生態系の生物構成を表す生態ピラミッドの最下位である生産者に属する藻類、一次捕食者であるミジンコ、高次捕食者である魚類が試験生物として選択されています。これらは、生物分類的にも植物、無脊椎動物（甲殻類）、脊椎動物（魚類）と広い範囲からの代表種となっています。また、環境汚染の際に水は主要な媒介となることなどから、いずれの生物も水生生物が選択されています。当機構ではこれらの三生物種はもとより、多種の環境生物を用いた影響試験を20年以上にわたって実施してきた経験と実績があります。また、化審法制定時からの分解度および濃縮度試験の実施実績に基づく微量分析や分析困難物質に関する分析

知識・技術を有しています。生態毒性試験の実施時に必要な濃度維持および水中濃度分析においてこれらのノウハウが活用されています。

ここで、生態毒性の各試験法について概略を紹介します。

「藻類生長阻害試験」

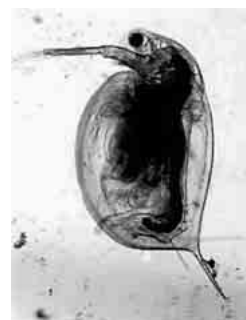
水生生態系における生産者である単細胞緑藻類（推奨種：*Pseudokirchneriella subcapitata*）に対する化学物質の影響を72時間暴露により発現する生長阻害を指標として50%生長阻害濃度を評価する。



緑藻（*Pseudokirchneriella subcapitata*）

「ミジンコ急性遊泳阻害試験」

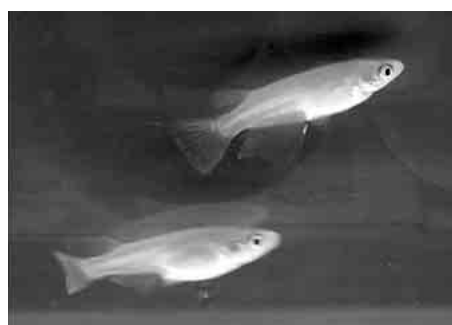
水生生態系における一次捕食者であるミジンコ（推奨種：*Daphnia magna*）に対する化学物質の影響を48時間暴露により発現する遊泳阻害を指標として50%遊泳阻害濃度を評価する。



オオミジンコ（*Daphnia magna*）

「魚類急性毒性試験」

水生生態系における高次捕食者である魚（推奨種：メダカ）に対する化学物質の影響を96時間暴露により発現する死亡を指標として50%致死濃度を評価する。



メダカ（*Oryzias latipes*）

また、これら生態影響試験はGLP基準に従って実施することが義務付けられています。当機構の生態部門では農薬GLP制定後、農薬GLP適合試験を年間100件以上実施

しており、化審法GLPにおいても平成16年の施行後、直ちにGLP適合施設としての確認申請を行い、適合試験施設として認定されています。(久留米・末田)

2) 分解度試験法の改正

分解度試験の改正の要点を記載します。

改正後（平成16年4月1日から実施）	改正前
4 活性汚泥の接種 3-2、3-3 及び 3-4 の試験容器に JISK0102-1998 の 14.1 で定められた懸濁物質濃度が 30mg/L になるように活性汚泥を接種する。<u>ただし、3-2 については必要な場合には接種の前に溶液の pH を 7.0 に調整する。なお、活性汚泥は合成下水を添加してから 18～24 時間後のものを使用する。</u>	4 活性汚泥の接種 3-1、3-2 及び 3-4 の試験容器に JIS K0102 の 10.2.3 で定められた懸濁物質濃度が 30ppm (W/V) になるように活性汚泥を接種する。
5 分解度試験の実施 <u>遮光した条件のもとで</u> 25±1℃で十分かきまぜながら一定期間^(注2) 培養し、酸素消費量の変化を経時的に測定する。一定期間培養した後、<u>残留する被験物質と変化物を分析に供し、その量を測定する。</u>被験物質が水に溶解する場合は、溶存有機炭素の残存量も測定する。 (注2) <u>通常は 28 日間とする。</u>	5 分解度試験の実施 25±1℃で十分かきまぜながら一定期間^(注2) 培養し、酸素消費量の変化を経時的に測定する。一定期間培養した後、残留する供試物質を分析に供し、その量を測定する。供試物質が水に溶解する場合は、全有機炭素の残存量も測定する。 (注2) 原則として 14 日間とする。
6-1 試験条件の確認 <u>試験終了時の被験物質の分解度の最大値と最小値の差が 20%未満であり、酸素消費量から求めたⅣの 3-3 のアニリンの分解度が 14 日後に 60%以上の場合は、この試験は有効とする。</u>	6-1 試験条件の確認 酸素消費量から求めたⅣ-3 の 4 のアニリンの分解度が 7 日後に 40%を超えない場合は、この試験は無効とする。
6-3 直接定量^(注3) から分解度 (%) を算出する方法 ① 全有機炭素分析計を用いる場合 試験容器から試験液を適当量分取し、これを 3000G で 5 分間遠心分離<u>又はろ過 (0.45 μm)</u> し、その上澄液又はろ液から適当量を分取して全有機炭素分析計により残存する溶存有機炭素を定量する。	6-3 直接定量^(注3) から分解度 (%) を算出する方法 ① 全有機炭素分析計を用いる場合 試験容器から反応液を 10ml 採取し、これを 3000 g で 5 分間遠心分離し、その上澄液から適当量を採取して全有機炭素分析計により残留する全有機炭素を定量する。
<u>Ⅴ 結果のまとめ</u> <u>試験の結果を様式 1 によりまとめ、最終報告書を添付するものとする。</u>	無し

4 項において（被験物質＋活性汚泥）系の必要に応じた pH 調整と、活性汚泥に合成下水を添加してから試験に供するまでの時間が規定されました。

5 項において変化物の分析が盛り込まれるとともに、通常の試験期間が 28 日間と示されました。

6-1 項において試験の有効性の基準が変更されています。

6-3 項において全有機炭素分析計を用いた測定を行う場合の前処理方法に「ろ過」が加えられています。

Ⅴ 項で試験結果の様式作成が盛り込まれました。

また、分解変化物の分析（定性分析、定量分析等）は GLP で実施するように求められています（パブリックコメントに対する回答による）。

(久留米・辻)

3) 濃縮度試験および分配係数試験

分解度試験と同様に濃縮度試験も化審法の改正にあわせて試験方法の一部見直しが行われました。主な改正点は、試験濃度について被験物質の水溶解度以上の濃度は使用しないほうがよいとの規定が追加されたことです。新規物質では、ほとんどの場合、水溶解度のデータを入手できませ

ん。そこで対応としては、従来と同様に可能な限り低濃度で試験を実施し、濃縮性が認められた場合には、濃縮倍率の暴露濃度依存性の有無について注視していくことになります。

分配係数試験については、試験方法の変更はありません。
(久留米・屋形)

2. 既存化学物質安全性点検事業の加速化について－Ⅲ

経済産業省は、化学物質のリスクを極小化し、適切に管理する社会システムの構築を目的として平成13年度に「化学物質総合評価管理プログラム」を立ち上げました。このプログラムの1つのプロジェクトとして「既存化学物質の安全性点検事業の加速化」があります。本プロジェクトでは、平成18年度までに、早急に対応すべきリスク管理の必要性の高い物質の試験を実施するとともにデータの体系化、集大成による知的基盤整備を図り、構造活性相関手法の開発と活用により、既存化学物質の安全性点検を加速化して行うことを目的としています。平成15年度までにPRTR指定化学物質で安全性点検が終了していない物質を中心に水への溶解度などの物理化学性状基本項目、分解性および蓄積性のデータを取得しました。また化学物質特性予測システム構築に必要なデータベースを整備するとともに現行の分解性予測システムの精度検証および改良と構造活性相関解析に不足するデータを補うための簡易分解度試験を実施しました。蓄積性の予測システムに関しては濃縮倍率(BCF)と分配係数(logPow)の相関を解析しました。

1) 安全性データの取得

PRTR指定化学物質等早急な安全性点検が必要と考えられる物質および予測システム開発に必要と考えられる物質について独立行政法人 新エネルギー・産業技術総合開発機構(NEDO)から試験実施の指示を受け国内のGLP機関^{*1}のご協力をいただき試験を実施しました。また、これまで分解度試験の分解生成物が構造不明等の理由で濃縮度試験が困難であった物質についてはラジオアイソトープ(RI)ラベル化法を取り入れ、試験実施を加速化しました。

^{*1}: 広栄テクノサービス株式会社、株式会社日本医学臨床検査研究所、保土谷コントラクトラボ株式会社、株式会社三菱化学安全科学研究所

表1に平成15年度までに安全性点検試験を実施した物質数を示します。

なお、試験結果は順次、経済産業省化学物質審議会審査部会で審査され、審査結果は経済産業省広報により発表されています。

表1 安全性点検試験の実施状況

年度	分解度試験 (良分解)	濃縮度試験 (Pow 測定)
平成12年度	91 (28)	49 (9)
平成13年度	34 (12)	18 (4)
平成14年度	42 (9)	42 (23)
平成15年度	23 (2)	31 (21)
計	190 (51)	140 (57)

2) 化学物質特性予測システムの構築

(1) 分解性予測システムの構築

分解性予測システムの構築では市販の生分解性予測ソフト(BIOWIN、TOPKAT等)と現在、当機構のホームページで公開中のシステム(CERIシステム)(URL = <http://www.cerij.or.jp/>「公開情報DATA」)の検証結果を考慮してCERIシステムを既存点検用に改良することとしました。CERIシステムは化学物質の骨格構造や置換基の組合せから生分解性を予測する経験則フローと部分構造情報を元に統計解析を行うSAR予測式で生分解性の予測を行っています(図1)。CERIシステムの改良では現在のシステムで予測失敗している物質の構造解析による経験則フローの見直しとSAR式の再解析やシステム開発時以降に得られた生分解性のデータや簡易分解度試験結果から得られた生分解性に関する知見等を加えて解析しています。さらに、独立行政法人製品評価技術基盤機構に再委託し、新規化学物質のデータによる予測システムの検証および改良を行っています。予測システム改良の結果、図2に示すように予測的中率の向上が見られました。ただし、これらは予測システム開発に使用した物質群に対する的中率の向上であるので実際に予測を行うときにはシステム開発に使用した物質群と予測対象となっている物質群の類似性や予測システムの適用範囲等を十分考慮する必要があります。また、生分解性予測では一部分解して安定な中間体を生成する場合についての予測方法を検討しています。現在、今までに実施した既存点検において中間体を生じた物質のデータ整理とそれらの物質に共通な部分構造の解析を行っています(図3)。

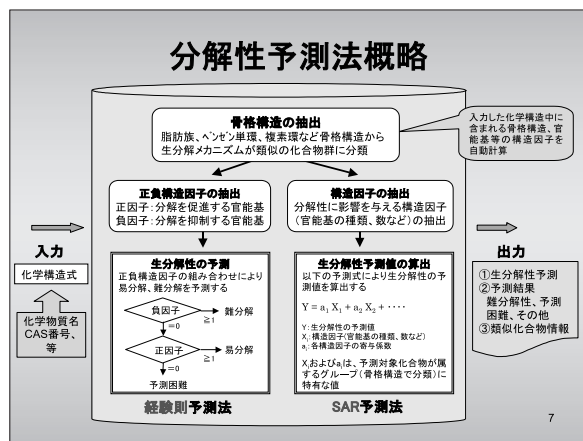


図1 分解性予測法の概略

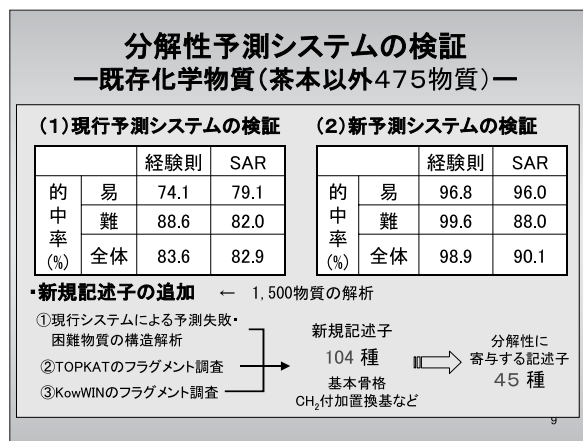


図2 分解性予測システムの検証結果

安定な難分解性物質
＜BOD分解度が10%未満の難分解性物質＞

調査物質		1229	
無効データ		重複、BOD信頼性低、参考試験など9物質	
検証用データ		BODデータのばらつきが大きい23物質	
有効データ		1197	
易分解 BOD ≥ 60%	375	変化物なし	299
		変化物確認	76
			水系 58 汚泥系 13 水/汚泥 5
中分解 BOD 10~60%	99	変化物なし	32
		変化物確認	67
			水系 8 汚泥系 31 水/汚泥 28
難分解 BOD < 10%	723	変化物なし	608
		変化物確認	115
			水系 2 汚泥系 36 水/汚泥 77

安定な難分解性物質

図3 残留中間体調査結果

(2) 蓄積性予測システム

一般に魚類へのBCFは化学物質の水-オクタノール分配係数と相関があることが知られています。平成15年度までに既存化学物質で骨格構造ごとのlogP(実測値および計算値)とBCFとの相関関係を解析し最終的に3種類の相関式を開発しました(図4)。ただし、解離性等によりBCFと計算logPとの相関が低い物質も数多く存在するためlogP以外のパラメータ、例えば特定の部分構造やその組合せなどを用いた予測手法の開発も検討して予測の適用範囲の拡大を図っています。

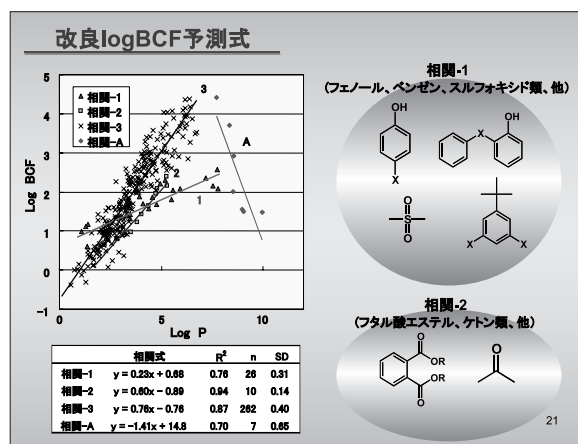


図4 logPとBCFの関係

(3) 今後の検討

分解性予測システムでは安定な中間体の予測として経験則による部分構造分類を活用した予測方法を検討しています。分解性・蓄積性ともに予測を実施する上で予測式の適用範囲内での使用や既存データとの類似構造情報の比較を行う手法の開発を検討中です。また、新しい予測システムは平成16年度中にインターネットで公開する予定です。

(久留米・廣松)

3. 魚類を用いた内分泌かく乱作用の評価法開発状況について

1990年代、環境中に存在する化学物質が生体内に取り込まれた後に正常なホルモン作用に影響し、野生生物の性分化や繁殖に影響を及ぼすのではないかと危惧されるようになりました。1996年に米国のシーア・コルボーンらが刊行した「Our Stolen Future (邦題：奪われし未来)」はこのような危惧を指摘し、世界的な反響を呼び起こすことになりました。久留米事業所においては、30年以上にわたる濃縮度試験や生態毒性試験の実施による多くの試験技術の蓄積を生かし、魚類を用いた内分泌かく乱化学物質の

評価試験法開発に取り組んできました。これまでに、環境省が公表した「環境ホルモン戦略計画SPEED'98」の一環として魚類を用いた試験法の開発を進め、成果は順次、学会誌、国際シンポジウム等で公表しています。また、試験結果の評価に必要な正常なメダカの成長や生殖腺の発達に関する基礎データを集積してホームページ上で公開し、国内外の研究者に広く提供しています (<http://w-edcdb.nies.go.jp/SHf/index.html>)。これまで開発中の試験法を表-1に示していますが、これら試験法は基本的な試験デザイン

の検討、陽性対照物質による検証がほぼ終わり、現在は、内分泌かく乱作用が疑われている化学物質の中で優先的に試験すべき物質のデータの取得を進めています。これらの物質の中で、アルキルフェノールである4-ノニルフェノールと4-tert-オクチルフェノールについては、オスメダカの肝臓中ビテロジェニン濃度の増加（ビテロジェニン：卵黄前駆タンパク質）、生殖腺組織への影響、繁殖への影響等が認められました。図1はノニルフェノールの暴露により生じたオスメダカにおける精巣の異常組織を示しています。

経済協力開発機構（OECD）では、1997年に内分泌かく乱化学物質の試験および評価のための作業部会を発足させ、1998年には魚類の試験法開発に関する最初の専門家会議（魚類専門家会議）が開催されました。その後、電話による会議も含め22回の魚類専門家会議が行われていますが、本機構からは毎回専門家が出席し、OECDの試験法開発に貢献をしています。また、OECDは魚類生殖腺組織の評価に関する取り組みも開始し、2002年と2003年に専門家による国際会議が開催されました。本機構はこれらの会議に参加すると共に、メダカにおける病理組織学的検査結果を報告し、生殖腺組織における評価の標準化に向けた取り組みにも貢献しています。2003年には、魚類専門家会議において提案された魚類スクリーニング試験（成熟した雌雄のメダカやファットヘッドミノー等を用いた21日間の試験）に対する基準物質を用いた国際的な検証活動が始まりました。ここでは強エストロゲン物質とアンドロゲン物質に対する有効性の検証試験（Phase 1A）が行われました。これらの結果はパリで開催された魚類専門家

会議で本機構により報告されると共に、レポートとしてOECDに提出されました。久留米事業所は、Phase 1Aの検証試験に参画すると同時に、全ての参加ラボラトリーに対する技術的な支援を行い、全結果の取りまとめと報告を行うリードラボラトリーとしての役割を担いました。現在、弱エストロゲン物質、抗アンドロゲン物質、アロマターゼ阻害剤（ステロイド合成酵素の一種であるアロマターゼを阻害する化学物質）に対する有効性の検証試験（Phase 1B）を行っています。Phase 1Bの結果は今年の10月にOECDの会議で報告され、その後は次段階の検証試験（Phase 2）に進むことが想定されています。本機構は、今後も引き続きOECDの試験法開発に積極的に参加し、国際的に大きな役割を果たしていきたいと考えています。

投稿論文一覧（魚類内分泌かく乱試験法開発）

Yokota H. *et al.* 2000. *Environ Toxicol Chem* 19:1925_1930.

Yokota H. *et al.* 2001. *Environ Toxicol Chem* 20:2552_2560.

Yokota H. *et al.* 2001. *Jpn J Environ Toxicol* 4:87_98.

Kang IJ. *et al.* 2002. *Chemosphere* 47:71_80.

Kang IJ. *et al.* 2002. *Environ Toxicol Chem* 21:2394_2400.

Seki M. *et al.* 2002. *Environ Toxicol Chem* 21, 1692_1698.

Seki M. *et al.* 2003. *Environ Toxicol Chem* 22:1487_1496.

Seki M. *et al.* 2003. *Environ Toxicol Chem* 22:1507_1516.

Kang IJ. *et al.* 2003. *Environ Toxicol Chem* 22:2438_2445.

Nozaka T. *et al.* 2004. *Environmental Sciences* 11, 99_121.

Seki M. *et al.* 2004. *Environ Toxicol Chem* 23:774_781.

（久留米・関）

表1 メダカを用いた内分泌かく乱化学物質の試験方法

試験法	概要	特徴
ビテロジェニンアッセイ	成熟したオスメダカを用いて最大 21 日間化学物質に暴露し、卵黄前駆タンパク質であるビテロジェニンの産生を調べる。	エストロゲン様物質に対するスクリーニング試験としての位置付け。
繁殖試験	成熟した雌雄のメダカを用いて 21 日間化学物質に暴露し、産卵数、受精率、二次性徴、生殖腺組織、ビテロジェニンの産生等を調べると共に、次世代への影響も測定可能。	繁殖への影響に着目したスクリーニング試験としての位置付け。
パーシャルライフサイクル試験	受精卵から成熟初期まで約2ヶ月間化学物質に暴露し、ふ化、ふ化後の生存・成長、二次性徴、生殖腺組織、ビテロジェニンの産生等を調べる。	内分泌かく乱化学物質に対し最も感受性が高いと考えられている初期生活段階を利用した、フルライフサイクル試験のスクリーニング試験としての位置付け。
フルライフサイクル試験	受精卵から次世代の成熟初期まで連続して約6ヶ月間化学物質に暴露し、1世代目及び次世代において、上記パーシャルライフサイクル試験と同様の測定項目を調べる。また、1世代目の成熟期に繁殖への影響（産卵数、受精率）を調べる。	次世代への影響も含め、魚類全生涯にわたる暴露を行うことで、影響の時期、内容、強さなどの全てを把握できる確定的な評価法の位置付け。リスク評価に必要な予測無影響濃度の算定に最も有効なデータが得られる。

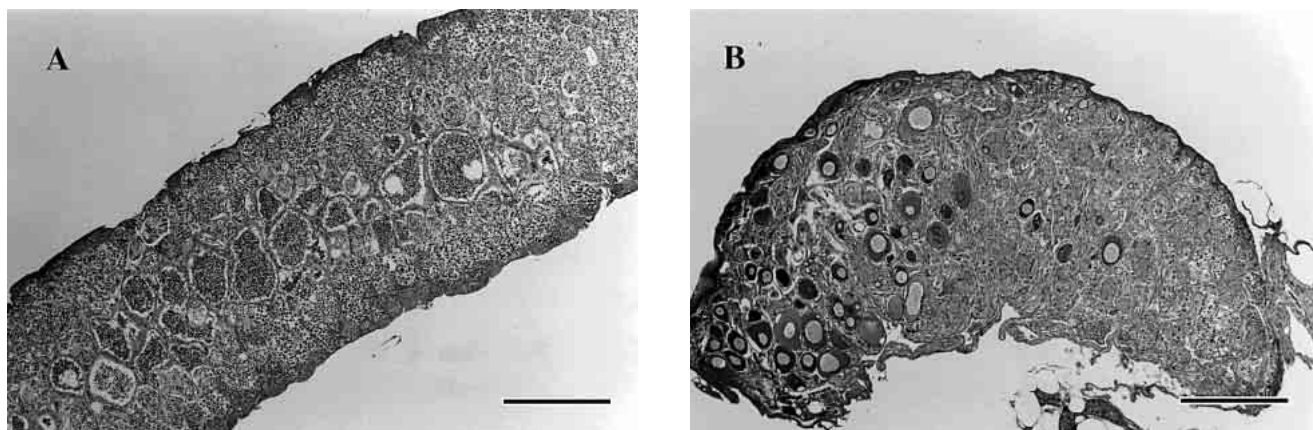


図1.ノニルフェノールに卵からふ化後60日まで暴露されたオス個体の生殖腺組織像（H&E染色） Aは対照区の生殖腺で、正常な精子形成が観察される。Bは44.7 $\mu\text{g/L}$ 区の生殖腺で、精巣組織中に多数の卵母細胞が観察される。図中のバーは400 μm を示す。

4. 生態毒性関連のテストガイドライン作成・改訂の最近の動きについて

1) 新および改訂テストガイドライン

(1) 承認されたテストガイドライン

2003年11月に行われたOECD第36回合同会合にて以下の4つの新テストガイドライン（以下TGと略）および1つのテストガイドラインの改訂が承認されています。これらのTGは環境政策会議および理事会承認を経て、近々第15回増補版として発行される予定となっています。

承認された新テストガイドライン

- ・ TG218 : Sediment - Water Chironomid Toxicity using Spiked Sediment
- ・ TG219 : Sediment - Water Chironomid Toxicity using Spiked Water
- ・ TG220 : Enchytraeidae Reproduction Test
- ・ TG222 : Earthworm Reproduction Test

承認された改訂テストガイドライン

- ・ TG202 : *Daphnia* sp. : Acute Immobilisation test

(2) 検討中のテストガイドライン

2004年5月26～28日に開催された第16回TG会合（16th Meeting of the Working group of National Coordinators of the Test Guidelines, Programme）において以下のTG及びガイダンスが議論されています。

TG改訂について

- ・ TG201 : Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test
- ・ TG208 : Seedling Emergence and Seedling Growth Test

新規TG作成について

- ・ TG221 : *Lemna* sp. Growth Inhibition Test
- ・ TG227 : Vegetative Vigour Test

ガイダンスについて

- ・ Guidance Document on Statistical Analysis of Ecotoxicity Data

この会議において、TG201及び221については最終的な合意（承認）がなされており、その後合同会合等を経て、第16回増補版として発行されることになります。TG208およびTG227については作業継続ということで、今回は承認されていません。ガイダンス（Guidance Document on Statistical Analysis of Ecotoxicity Data）については大筋合意がなされました。

また、現在その他の水生生物試験としての検討案件には以下の2つがあります。

・ Aquatic Field Studies

これは実環境における影響を推定するための方法を示したのですが、いわゆるガイドラインではなく、強制力のないガイダンスになりそうです。今年の2nd quarterに草案の改訂版が回覧される予定となっています。

・ Aquatic Invertebrate Tests

具体的にはCopepod reproduction and development testです。Swedenがリード国になり、harpacticoidaとcalanoida種についてプレバリデーションを実施しています。内分泌かく乱評価法としての位置づけも考えているようです。

陸上生物（terrestrial）では以下の検討案件があります。

- ・ Avian toxicity Testing
- ・ Terrestrial Plant Tests
- ・ Terrestrial Effects Assessment
- ・ Dung Organisms

2) 国内試験法の開発活動との関係

生態毒性試験として今後注目され、重要視されるであろう3つのTG（TG218, 219, 221）および国内試験法に重要な影響を及ぼすと考えられるTG201について化学物質評価研究機構の関わりやTGについての若干の説明をします。

(1) ユスリカ試験

次の2試験法があります。

- ・TG218：Sediment - Water Chironomid Toxicity using Spiked Sediment
- ・TG219：Sediment - Water Chironomid Toxicity using Spiked Water

試験方法としては、ユスリカ幼虫を水相と底質相を含む試験系に投入し、羽化への影響を調べます。TG218では底質相、TG219では水相に被験物質を添加する点で異なりますが、実環境中での被験物質の挙動（底質由来あるいは水由来）を配慮し試験法を選択する必要があります。一般に難水溶性物質では試験液調製が困難であり、十分な影響評価が出来ない場合があるが、ユスリカ試験では不溶成分は底質相に吸着・残留するため、底質中に生息するユスリカ幼虫により影響評価が可能です。この試験法は土壤吸着性や残留性の高い難水溶性物質には特に有効な試験と考えられています。

国内では国立環境研究所主導のもと、TG218の実用性の確認を目的としたリングテスト（2003年）が行われましたが、当機構もそれに参加し試験実施上の問題点についてコメントを行っています。ユスリカ試験は化審法で第三種監視化学物質に認定された物質の場合、試験実施を要求される可能性があり、現在、当機構では試験の実施体制の整備を行っています。

(2) ウキクサ試験

次の試験法が検討されています。

- ・TG221：Lemna sp. Growth Inhibition Test

試験方法としては、高等水生植物（ウキクサ）を用いての生長阻害試験です。藻類試験の場合と同様にバイオマス（葉数）を経時的に測定し、その結果を基に計算された平

均生長速度および最終バイオマス量を比較してEC50およびNOECを算出、評価します。

この試験の注目すべきところは①藻類生長試験では現実的に実施できなかった換水式及び流水式での試験が可能であり、試験液中の化学物質濃度を安定的に維持できること、②試験する液の濁度（光透過率）に試験結果が左右されないことです。当機構ではこのガイドライン作成に先立って行われたリングテスト（1998年）に国立環境研究所とともに参加し、結果を報告しました。全体の結果はイギリスが報告書としてまとめています*。

Environment Agency, U.K. (1999) The OECD *Lemna* growth inhibition test: Development and ring-testing of draft OECD test Guideline. Research and Development, Technical report EMA 003.

(3) 藻類試験法

従来の試験法にシアノバクテリアを試験生物として加え、次のガイドライン名として、改訂が検討されています。

- ・TG201：Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test

1997年の第8回ナショナルコーディネータ会合で改訂実施が承認されて以来、度々議論がなされてきています。論点はエンドポイントの取り扱い（選択）です。エンドポイントには①平均生長速度、②生長曲線下面積、③最終的バイオマスの3つがありますが、2004年5月に配布された最新のドラフト版ではエンドポイントとしては平均生長速度、付加的な結果として最終的バイオマスが選択されています。しかしながらこのドラフト版もかなりの箇所が変更されて合意に至ったようであり、最終的な合意内容については現在ところ公表されていません。（久留米・前田）

5. 医薬品安定性試験の品質保証体制について

医薬品の承認申請のための安定性試験は、温度、湿度、光等の様々な環境要因の影響の下での品質の経時的变化を評価し、原薬のリテスト期間（製剤の製造に使用できる期間）、製剤の有効期間および医薬品の貯蔵条件の設定に必要な情報を得るために行う試験です。

久留米事業所では昭和63年から約300本の安定性試験を実施してきました。ここでは安定性試験の試験データの品質保証のための取り組みを紹介させていただきます。

1) 医薬品GLP基準

久留米事業所では医薬品GLP基準の適用となるTK測定試験を実施しており、平成9年から医薬品GLP適合施設として確認を受けています。GLP基準では①組織および職員②試験施設および機器③試験施設内における操作④被

験物質等の取り扱い⑤試験計画書および試験の実施⑥報告および保存の各項目について試験実施施設の基準が定められています。私どもは安定性試験についても、基準に従った体制を整備し遂行することにより試験データの信頼性を高めています。

2) 「申請資料の信頼性の基準」

（薬事法施行規則 第18条の4の3）

「申請資料の信頼性の基準」で申請資料（最終報告書）の作成の際に要求されている留意事項と対応状況を示します。

①データの正確性：申請資料は、これを作成することを目的として行われた調査または試験において得られた結果に基づき、正確に作成されたものであること。久留米事業所ではチェック体制を整備して実行し、最終報告書

が正確に生データを反映していることを確認しています。試験課で確認が終了したものについてもQA部門が調査を行います。

- ②データの完全性：申請に係る医薬品について品質、有効性または安全性を有することを疑わせる調査結果、試験成績等が得られた場合には、当該調査結果、試験成績等についても検討および評価が行われ、その結果は当該資料に記載されていること。再測定に関しては採用、不採用にかかわらず発生したデータはすべて生データとして取り扱います。これらの全記録についてQA部門が調査を行います。
- ③データの保存：資料は、承認を与えるまたは与えない旨の処分の日まで保存すること。資料は試験委託者の要求する期間、試資料管理部門で保存を行います。

3) cGMP (current GMP) への対応による 海外申請対策

国際的な規制緩和および製薬メーカーのグローバル化により、医薬品の海外申請が増加傾向にあります。海外申請

をするためには米国FDA (Food and Drug Administration) のcGMPへの対応が不可欠とされています。GMPではかなりの部分がGLPと重複しますが、もっとも頭を悩ませるのは電子記録・電子署名に関する規則 21CFR Part11で、この規則には電子記録・電子署名を紙の記録・手書き署名と同等とみなすための要件が記載されています。現在対応を進めている段階であり逐次対応する予定です。

- ①コンピューターシステムバリデーション：使用するコンピューターが期待される結果を満たしているかを確認し記録を残す。
- ②アクセスコントロール：権限を持ったユーザーのみシステムにアクセスできその権限にレベルをつけて管理する。パスワードの字数制限、短期間での更新などが求められる。
- ③オーディットトレイル：システムへのログイン・ログアウト、内容の変更・削除等を行った際にその日時、担当者、操作の履歴をコンピューターが自動的に作成するシステムであること。
(久留米・古川)

6. コイヘルペスウイルス (KHV) について

1) KHVの発生状況

昨年10月から茨城県の霞ヶ浦で養殖ゴイの大量へい死が報告され、その後の調査で日本におけるコイヘルペスウイルス (KHV) 病の発生が確認されました。本年5月末までに27都道府県に感染が拡大しています。九州では長崎県を除く6県で本病の発生報告があり、福岡県でも5月末以降、筑後川流域を中心に32ヶ所で感染が確認され、現在も増加している状況にあります。

2) KHVの特徴について

報道等により世間の注目を集めたKHVという病気は以下のようなものです。

- ・KHVは宿主特異性が非常に高く、マゴイおよびニシキゴイ以外の魚や人への感染はない。
- ・本病の感染には水温の影響が大きく、KHVの適水温は18～25℃で30℃以上ではウイルスは増殖しない。
- ・本病の潜伏期間は2～3週間で、発病すると2日程度で死亡する。
- ・病魚との接触や水 (KHVで汚染された水) を介して感染する。
- ・KHVの診断には培養細胞によるウイルス検査およびPCR (ポリマー連鎖反応) による遺伝子診断の2種類の方法により実施されている。

3) KHV病の対策について

現在のところKHV病に有効な治療薬はなく、コイを用

いて濃縮度試験等を実施している当機構にとってKHVの防疫対策は最も重要な課題です。以下に当機構の対応を簡単に説明します。

- ・コイの入手は養殖業者からの購入と自家生産の二本立てで実施している。
- ・外部よりコイを入手する場合は、その魚が汚染水域由来のコイとの接点がないことを確認する。
- ・入手先で購入予定のコイを隔離して2～3週間飼育し、コイの一部を魚病診断 (PCR検査) 試料として、水産試験場等で検査してもらい、病原体検査証明書を発行してもらう。
- ・当機構はKHV陰性と判定された、同一のロットを購入する。
- ・入手後は蓄養施設で2～3週間隔離飼育し、状態観察により発病の有無を判断する。
- ・使用した水槽および網などの器具類は必ず消毒する。
- ・飼育施設への管理担当者以外の入室を禁止とする。
- ・飼育施設への入室時には消毒を徹底する。

以上の対応策により、当機構では濃縮度試験および生態毒性試験に用いるコイの安定供給を図っており、今後も試験を安心してご依頼いただける体制となっています。

(久留米・川島)

無料クロマトセミナー

平成16年度クロマトセミナーを次の通り開催いたします。皆さまのご参加をお待ちしております。
なお、参加料は無料です。

☆セミナー内容☆

テーマ：「HPLC理論を実践に生かす」

「クロマトグラフィーのトライアングルと分離」

講師：京都大学大学院理学研究科
理学博士 山本 文子 先生

選択したクロマトグラフィーの条件が、移動相、固定相、そして試料成分からなるトライアングルに、どのような影響を与えるかについて解説。

「逆相カラムの上手な使い方」 「HPLCの基礎と実践」

講師：本機構職員

HPLCにおいて最も多く使用されている逆相系カラムについて使用上の留意点、ノウハウ、トラブル対策など実践的な方法を解説。

☆開催日程☆

●開場は12:30となります。

※大阪会場のみ開場13:00となります。

	日 時	会 場	募集人数
58回 (大阪)	平成16年8月20日(金) 13:30～17:00(終了予定)	大阪科学技術センター 8階	300名
59回 (東京)	平成16年9月16日(木) 13:00～16:30(終了予定)	北とぴあ つつじホール	300名
60回 (横浜)	平成16年10月29日(金) 13:00～16:30(終了予定)	横浜市市民文化会館 関内ホール	200名

※各会場共、定員になり次第受付を締め切らせて頂きますので、お早目にお申込下さい。
定員を超えた場合に限りご連絡致します。

セミナー参加ご希望者は、参加ご希望日、お名前、お勤め先およびお勤め先住所、
お電話番号、FAX番号をご記載の上、FAXまたはお葉書にて下記宛にお申し込み下さい。
また、本機構ホームページ (<http://www.cerij.or.jp>) から
お申し込みができますのでどうぞご利用ください。

財団法人化学物質評価研究機構 東京事業所クロマト技術部セミナー係
〒345-0043 埼玉県北葛飾郡杉戸町下高野1600番
TEL 0480-37-2601 FAX 0480-37-2521

編集後記

第46号夏季号をお届けいたします。

残暑お見舞い申し上げます。

巻頭言は、「KHVへの不覚」について福岡県水産海洋技術センター内水面研究所長稲田善和様から頂戴しました。誠にありがとうございました。

今回の特集は、化学物質安全部門・久留米事業所について掲載させていただきました。

また、本号には7月23日開催の本機構第9回公開研究発表会発表概要を掲載させていただきました。併せてご高覧ください。

(企画部・吉岡)

化学物質評価研究機構
ホームページ

<http://www.cerij.or.jp>

CERI NEWS 第46号 夏季号 発行日 平成16年8月

編集発行 財団法人化学物質評価研究機構 企画部

〒112-0004 東京都文京区後楽1-4-25 日教販ビル7F

Tel:03-5804-6132 Fax:03-5804-6139 mail to:cerinews@ceri.jp

古紙配合率100%再生紙を使用しています 