

生態影響評価のための第 1 段階試験について（案）

1. 試験法の開発状況について

1. 1. これまでの実施状況

EXTEND2010 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について参考資料 1 に示した。

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は、内分泌系に対する作用の有無を確認することを目的とした第 1 段階試験群、その試験結果を踏まえて有害性を確認することを目的とした第 2 段階へ進む候補物質を選定する第 1 段階評価、第 2 段階生物試験及び第 2 段階有害性評価から構成されている。

EXTEND2010 における試験法開発の進捗状況について表 1 に示した。

1. 2. 胚期ツメガエル甲状腺シグナリング試験 (XETA) について

ゼノパス胚期甲状腺シグナリング試験 (Xenopus Embryonic Thyroid signaling Assay, XETA) は、甲状腺ホルモン応答遺伝子と GFP 遺伝子を導入した遺伝子改変アフリカツメガエルの胚 (摂餌開始前) を試験生物として用い、ばく露後の GFP の蛍光強度から甲状腺系に作用する化学物質をスクリーニングする短期の *in vivo* 試験法である。本試験法については、平成 23 年に、フランスより、テストガイドライン化に関する提案書 (SPSF) が提出され、OECD において試験法のテストガイドライン化に向けた取組みが進められている。平成 25 年度には、フランス、米国及び日本が参加して、試験法及び統計解析法の適正化を目的にリングテスト (フェーズ 1) が実施され、その結果が平成 26 年 12 月の OECD VMG-eco 会合で報告された。平成 27 年度は、リングテスト (フェーズ 1) の結果を受けて、一部改変した試験プロトコルに基づいてリングテスト (フェーズ 2) が開始された。

XETA の第 1 段階の生物試験への適用性については、両生類変態試験 (AMA) と比較してコスト面で若干、優位性が高いと考えられるものの、スクリーニング試験法として、検出できる作用が限定される可能性があり、感度面でも AMA に劣る点で優位性は低い。したがって、総合的にみると、XETA よりも AMA の適用性が高いと考えられた。ただし、AMA については、甲状腺の組織学的観察

に掛かるコストや時間が比較的大きく、同検査を必須としないことも検討する必要がある。

なお、XETA については、日本以外の試験機関で実施されたバリデーション(フェーズ 2)の結果が 10 月に OECD で開催されるバリデーション管理グループ(VMG-eco)に報告される予定であることから、その結果も踏まえて、EXTEND2016 での第 1 段階の生物試験への適用について検討することが必要と考えられる。

1. 3. 平成 28 年度の実施予定について

(1) メダカ抗アンドロゲン作用検出試験(仮称)

① 検証試験の実施

平成 28 年度は、試験法の妥当性及び有用性当の検証を目的として、魚類に対する抗アンドロゲン作用が疑われる物質(リニューロンを検討)、抗アンドロゲン作用以外でオスの二次性徴の発達に影響を及ぼすことが考えられるエストロゲン作用物質(17 β エストラジオール)を用いて検証試験を実施する。

また、試験結果の再現性の検証を目的として、フルタミドを用いた検証試験を実施する。

② 試験法のガイダンスドキュメント化に関わる作業

OECD でのガイダンスドキュメント化に向けて、本試験法に関するラボ間検証(リングテスト)への対応案(試験物質の検討、プロトコルの作成等)の検討、ガイダンスドキュメント(案)の作成等を行う。

(2) 両生類変態試験(AMA)の検証試験

平成 28 年度は、タモキシフェンクエン酸塩を用いた検証試験を実施する。タモキシフェンは、抗エストロゲン作用物質とされているが、平成 24 年度に実施した LADGA の検証試験では、タモキシフェンクエン酸塩での暴露により、NF stage 62 到達に要した日数の延長(変態の遅延)、NF stage 62 における頭胴長及び湿重量に有意な増加が認められた。一方で、甲状腺組織に有意な変化は認められず、変態の遅延等の影響については、例えば、タモキシフェンクエン酸塩の毒性によって死亡率の増加したため試験水槽内の密度が低下したことによる成長の増大など、直接的に甲状腺軸に対して作用した結果ではない可能性が考えられた。

AMA については、陰性物質あるいは甲状腺軸以外のへの作用物質を用いた検証試験は実施されていないことから(ただし、OECD のバリデーションでは、ドイツがエストラジオールを用いた試験を実施)、LAGDA で甲状腺への影響に関して擬陽性を示した可能性が高いタモキシフェンクエン酸塩を用いて検証試

験を行い、AMAの第1段階生物試験としての妥当性及び有用性等の検証を行うとともに、今後、EXTEND2016の枠組みにおいて試験を実施して第1段階及び有害性評価を実施する際の参考となる知見を収集する。

(3) 幼生期両生類成長発達試験(LAGDA)の検証試験

平成28年度は、イオパノ酸を用いた検証試験を実施する。イオパノ酸は、甲状腺ホルモンの代謝阻害作用(脱ヨード化酵素阻害作用)を持つ物質であり、AMAのOECDバリデーション(リングテスト)に用いられた物質である。

(4) ミジンコ簡易スクリーニング試験法の開発

オオミジンコ繁殖毒性試験(TG211)において仔虫の性別判定を行うANNEX7は無脊椎動物の内分泌かく乱化学物質(幼若ホルモン様作用物質)をスクリーニングするために開発されたが、試験期間が長く試験難度が高いため、スクリーニングのための新たな簡易試験法が望まれている。そこで簡易スクリーニング試験法として、抱卵個体の短期ばく露を行い、2~3腹目の仔虫性比を観察するという手法が提案されている(Olmstead & LeBlanc 2002, 鑓迫ら2004)。これらの知見を利用して、ミジンコ簡易スクリーニング試験法(案)を確立させ、EXTEND2016の内分泌かく乱作用評価枠組みの有害性評価において、生物の成長に及ぼす影響として、化学物質の幼若ホルモン様作用の有無を確認するための第1段階生物試験として利用する。

(5) ミジンコ抗幼若ホルモン、抗脱皮ホルモン、幼若ホルモン軸等試験法の開発

近年になって昆虫の幼若ホルモン受容体が明らかになり、ミジンコの幼若ホルモン受容体の発見にも繋がった(Miyakawa *et al.* 2013)。このように無脊椎動物の幼若ホルモンや脱皮ホルモンの知見は揃ってきたが、抗幼若ホルモンや抗脱皮ホルモンに関する知見はまだ少ない。そこで幼若ホルモン及び脱皮ホルモンについて、それらの抗ホルモン作用の存在の確認及びそれらの検出法について検討を行う。また幼若ホルモン軸に関する作用について、考え方の整理とその検出法について検討する。試験法を確立させ化学物質の抗ホルモン作用の有無を確認するための試験として利用する。

(6) ミジンコ多世代試験法の開発

これまで日米共同研究において提案のあった物質を中心に検証を進めてきたが、改訂した試験法による再試も含めると、明確な継世代影響を示した物質はない。本試験は幼若ホルモン及び脱皮ホルモン様物質の第2段階確定試験とし

て位置づけられていることから、平成 28 年度はこれらの物質を用いて、特異的なエンドポイント（仔虫性比、脱皮回数）に着目しながら検証試験を行う。幼若ホルモンについてはピリプロキシフェンについてすでに試験を実施していることから、脱皮ホルモン（候補物質：フェナリモル、脱皮抑制）を想定している。

OECD テストガイドライン化に向けては、共同提案国のフランス及びスペインの研究者と情報交換を行い、試験法案のメリット・デメリットを勘案して試験法のすりあわせを行う。

2. 第 1 段階生物試験の実施状況について（平成 28 年 3 月まで）

生態影響評価のための第 1 段階試験に係るこれまでの検討状況と平成 28 年度の予定について以下に示した。

(1) これまでの実施状況

これまでに、46 物質について 130 の第 1 段階試験管内試験を実施した（再試験を含まず）。その結果として、19 物質について陽性の結果が、27 物質について陰性の結果が得られた。

また、12 物質について第 1 段階生物試験としてメダカを用いた魚類短期繁殖試験(修正 TG229)を実施した。その結果として、6 物質についてエストロゲン様作用を有することが想定され、9 物質についてメダカの生殖に対する有害性を示すことが示唆された。

なお、メダカを用いた魚類短期繁殖試験(修正 TG229)を開発するに当たり、以下の物質について TG229 が実施されている。

その結果として、抗アンドロゲン様作用を除いた各作用については、検出可能であることが認められた。

*エストロゲン様作用：4-*t*ペンチルフェノール、エチニルエストラジオール、4-クロロ-3-メチルフェノール、17 β -エストラジオール

*抗エストロゲン様作用：タモキシフェンクエン酸塩、ラロキシフェン塩酸塩

*アンドロゲン様作用：メチルテストステロン、17 β -トレンボロン、5 α -ヒドロキシテストステロン

*抗アンドロゲン様作用：フルタミド、ビクロゾリン

*ステロイド合成阻害作用：プロクロラズ、ケトコナゾール

*プロゲステロン様作用：プロゲステロン、レヴォノルゲステレル

*陰性対照：ドデシル硫酸ナトリウム

(2) 平成 27 年度の実施状況について（参考資料 2 参照）

これまでに実施した抗アンドロゲン作用を検出するためのメダカアンドロゲン受容体 β レポータージーン試験について、偽陽性の結果が疑われたため、検証試験を実施した（資料3-2参照）。

信頼性評価の結果として作用メカニズムが推定できた6物質（トリクロサン、フタル酸ジイソブチル、ベノミル、カルベンダジム、トリクロロ酢酸、フィプロニル）について、第1段階試験管内試験を実施した（資料3-3参照）。

また、昨年度実施した第1段階試験管内試験並びに既存知見に基づき、2物質（ダイアジノン及びフェンバレレート）についてメダカ短期繁殖試験(TG229)を実施した（資料3-4参照）。

なお、OECDで承認されたMEOGRTに準じた検証試験（4-ノニルフェノール(分岐型)）を実施し、第2段階生物試験としての適用に向けて知見の収集を行った（試験結果について総合的に検討中）。

(3)平成28年度の実施予定について

信頼性評価の結果として作用メカニズムが推定できた20物質（アクリロニトリル、ジブロモクロロメタン、テブコナゾール、テブフェノジド、ブタクロール、フルオランテン、プロシミドン、2-ブロモプロパン、1-ブロモプロパン、ペルフルオロドデカン酸、メチル-*t*ブチルエーテル、メトラクロール、スチレン、4-ヒドロキシ安息香酸プロピル、*t*ブチルアルコール、プロピコナゾール、酢酸クロルマジノン、チオ尿素、クロロタロニル及びジラム）について、第1段階試験管内試験を実施する候補とする（合計47試験）。

また、抗アンドロゲン作用を検出するメダカアンドロゲン受容体 β レポータージーン試験について試験結果の安定性に関する検証が終了し、妥当な試験結果が得られることとなったため、これまで実施していなかった12物質（二硫化炭素、フェンバレレート、グリホサート、ニトロベンゼン、トリクロサン、フタル酸ジイソブチル、ベノミル、トリクロロ酢酸、フィプロニル、4-ノニルフェノール(分岐型)、4-*t*オクチルフェノール及びビスフェノールA）について第1段階試験管内試験(抗アンドロゲン作用)を実施する候補とする(合計12試験)。

また、昨年度実施した第1段階試験管内試験並びに既存知見に基づき、2物質（トリクロサン及びフタル酸イソブチル）についてメダカ短期繁殖試験(TG229)を実施する。

なお、平成28年度は、OECDで承認されたMEOGRTに準じた検証試験（ビスフェノールA）を実施し、第2段階生物試験としての適用に向けて知見の収集を行う。

表 1 EXTEND2010 における試験法開発の進捗状況

区分 検出可能な作用	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 抗エストロゲン様作用	◎メダカエストロゲン受容体 α レポーター遺伝子試験	◎メダカ短期繁殖試験 (OECD TG229) ◎21 日間魚類スクリーニング試験 (OECD TG230)	◎メダカ拡張 1 世代繁殖試験 (MEOGRT, OECD TG240)
アンドロゲン様作用	◎メダカアンドロゲン受容体 β レポーター遺伝子試験	◎メダカ短期繁殖試験 (OECD TG229) ◎21 日間魚類スクリーニング試験 (OECD TG230)	◎メダカ拡張 1 世代繁殖試験 (MEOGRT, OECD TG240)
抗アンドロゲン様作用	◎メダカアンドロゲン受容体 β レポーター遺伝子試験	○メダカ抗アンドロゲン作用検出試験 (仮称)	◎メダカ拡張 1 世代繁殖試験 (MEOGRT, OECD TG240)
甲状腺ホルモン様作用 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 レポーター遺伝子試験	▽ <u>胚期ツメガエル甲状腺シグナリング試験 (XETA)</u> (抗甲状腺ホルモン様作用が検出できないため、別途試験法を検討中)	◎ <u>両生類変態試験 (OECD TG231)</u> ◎ <u>幼生期両生類成長発達試験 (LAGDA, OECD TG241)</u>
幼若ホルモン様作用 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遺伝子試験	○ <u>ミジンコ幼若ホルモン簡易スクリーニング試験</u>	◎オオミジンコ繁殖試験 (OECD TG211 ANNEX7) △ <u>ミジンコ多世代試験</u>
脱皮ホルモン様作用 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遺伝子試験	△ミジンコ脱皮ホルモン (スクリーニング) 試験	◎オオミジンコ繁殖試験 (OECD TG211) △ <u>ミジンコ多世代試験</u>

注：◎開発済み、○開発中 (完成間近)、△開発中、▽検討中