

## 試験法の開発状況について(案)

### 1. これまでの実施状況

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(第 1 段階試験管内試験及び第 1 段階生物試験)、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 及び EXTEND2016 における試験法開発の進捗状況について表 1 に示した。

### 2. 平成 28 年度の実施結果について

#### (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等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(リニュロン)、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(17β-エストラジオール)を用いて検証試験を実施した。その結果、17β-エストラジオールを用いた試験(ばく露濃度：3.54、11.0、34.8 ng/L)では、二次性徴の発達にばく露濃度に依存的な低下がみられ、34.8 ng/L において対照区との間に有意差が検出された。一方、リニュロンを用いた試験(ばく露濃度：36.2、121、315、1,224 µg/L)では、二次性徴の発達に有意な変化はみられなかった(1,224 µg/L では、リニュロンの毒性によると推察される有意な死亡率の増加がみられた)。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(ばく露濃度：247、497、986 µg/L)を実施した結果、二次性徴の発達について 497 µg/L 以上の濃度で対照区との間に有意な低下が検出され、本試験法の妥当性及び再現性が確認された。

## ②試験法のガイダンスドキュメント化に関わる作業

本試験法の OECD でのガイダンスドキュメント化に向けて、検証試験の結果を平成 28 年 10 月に開催された OECD VMG-eco 会合(生態毒性試験検証管理グループ会合)に報告するとともにガイダンスドキュメント(案)を作成した。

### (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ー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 EXTEND2016 における第 1 段階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) の結果の一部が平成 28 年 10 月の VMG-eco に報告されたが、試験濃度の分析や統計解析等が完了していないことから、引き続き、EXTEND2016 での第 1 段階生物試験への適用の検討に向けた情報収集が必要と考えられた。

### (3) 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(ばく露濃度：6.20、12.0、24.2  $\mu\text{g/L}$ ) を実施した。その結果、ばく露 21 日後の発達段階に有意な低下、体重の有意な増加等、タモキシフェンがアフリカツメガエル幼生に対して、発達の阻害(変態の遅延)や体成長の促進作用を示すことが示唆された。なお、タモキシフェンについては、抗エストロゲン作用物質とされているが、

平成 24 年度に実施した幼生期両生類成長発達試験 LADGA の検証試験において、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がタモキシフェンクエン酸塩の毒性によって死亡率が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、直接的に視床下部—下垂体—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ていた。

AMA については、視床下部—下垂体—甲状腺軸以外への作用物質を用いた検証試験は実施されていない(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)。また、タモキシフェンを用いた検証試験の結果から、視床下部—下垂体—甲状腺軸以外への作用物質が変態や成長に何らかの影響を及ぼす可能性も示唆されることから、引き続き、陰性物質等を用いた検証試験を行い、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 の枠組において試験を実施して第 1 段階生物試験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ことが必要と考えられた。

#### (4) 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(ばく露濃度：0.350、0.700、1.41、2.75 mg/L)を実施した。その結果、1.41 mg/L 以上の濃度で NF stage 62 到達に要した日数の有意な増加、0.350 mg/L 以上の濃度で非同調的発達個体の発生に有意な増加がみられるなど、イオパノ酸のような LAGDA が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)を持つ物質の作用を適切な感度で検出(評価)できる試験法であり、第 2 段階生物試験法として、変態試験法(AMA)よりも有効性及び妥当性が高い試験法であることが示唆された。

#### (5) 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(OECD 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、鑪迫ら 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。

#### (6) 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っている。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中である。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。

#### (7) 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段階生物試験として位置付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っている。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(フェナリモル、脱皮抑制)を対象としている。

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っている。

### 3. 平成29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）

化学物質の抗アンドロゲン様作用の検出を目的とする幼若メダカ試験について、「平成28年度化学物質の内分泌かく乱作用に関する試験法開発に係る業務」において作成されたプロトコル案に従い化学物質(2物質程度)を用いた検証試験を実施し、試験法の適正化に向けた試験条件等の検討を行う。試験物質は、例えば一般化学物質の毒性作用に起因して二次性徴(乳頭状小突起の形成)の遅れる可能性がある物質や、女性ホルモン様作用を有する物質が乳頭状小突起の形成に影響を与えると考えられる物質などから選定する。また、供試個体の日齢や選別、ばく露期間、また異なる系統におけるこれら試験条件の

適正化について、基礎データの取得及び既存のデータ・情報を整理する。これらの結果から、OECD ガイダンスドキュメント化に向けて、関係機関と準備を進める。

(2) 両生類変態試験(AMA)の検証試験

両生類変態試験(AMA)について、陽性対照物質等の化学物質(2物質程度)を用いて検証試験を実施する。試験は、OECD テストガイドライン No.231 に準じて実施することとし、観測するエンドポイントは甲状腺組織とする。

(3) ミジンコ簡易スクリーニング試験法の開発

ミジンコの性比に着目した化学物質の幼若ホルモン様作用のスクリーニング試験法に関して、OECD テストガイドライン化に向け、SPSF を VMG-eco に提出し、検証実験を実施してきた。本年度はプロトコル案の作成を進める。テストガイドライン(TG)にするかガイダンスドキュメント(GD)にするかについて、国内外の専門家と相談したうえで決定する。また、本試験は EXTEND2016 の評価枠組みにおいて、第1段階生物試験に位置付けられているが、幼若ホルモン作用候補物質として選定された化学物質について、新たに作成されたプロトコル案に従い、検証試験を実施する。

(4) 脱皮ホルモン作用検出試験の開発

化学物質の脱皮ホルモン様作用のスクリーニングを目的とする試験法の確立に向けて、ミジンコの試験生物としての妥当性や有用性等を検討するために既存の知見及び情報等の収集を行う。さらに他の甲殻類(例えばヨコエビ等)について、当該試験法利用の可否について情報を収集する。

(5) ミジンコ多世代試験法の開発

化学物質の無脊椎動物に対する経世代影響を考慮した生物群集の存続を評価するための多世代試験法に関して、平成 28 年度までに作成されたプロトコル案に従い、化学物質(1物質程度)を用いて検証試験を実施する。さらに、欧州等の専門家らによる多世代試験法開発の検討グループ **EVOGENERATE(Evolutionary and multi-generational effects of chemicals)**とも連絡を密にしながら生物学的及び統計学的有意性を考慮した多世代影響の判定方法について検討を行う。

これまでに得られたデータを整理して、他の甲殻類多世代試験と比較した上で、ミジンコ多世代試験法の第2段階生物試験としての有効性・必然性の検討を行う。

また、EXTEND2016 の第 2 段階生物試験として位置付けられているオオミジンコ繁殖試験(OECD TG211)の Annex 7 について、節足動物に対する内分泌かく乱作用化学物質の確定試験法として、化学物質（1 物質程度）を用いて検証試験を実施する。

表 1 EXTEND2010 及び EXTEND2016 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レポータージ ン試験	◎両生類変態試験 (AMA, OECD TG231) ▽胚期ツメガエル甲状腺シグナリング試験 (XETA) (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)	◎幼生期両生類成長発達試験 (LAGDA, OECD TG241) ◎両生類変態試験 (AMA, OECD TG231)
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	○ミジンコ幼若ホルモン簡易スクリーニング試験	◎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 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) △ミジンコ多世代試験

注：◎開発済み、○開発中 (完成間近)、△開発中、▽検討中