

EXTEND2022の内分泌かく乱作用の生態影響に係る試験法について(案)

1. 生態影響評価のための基本的枠組み

令和4年10月に公表されたEXTEND2022では、基本的にEXTEND2016の考え方を踏襲して、「内分泌かく乱作用に関する試験対象物質となり得る物質」として選定された化学物質の生態影響について、以下の2段階で試験及び評価を進めていくとしている。

第1段階(内分泌系に対する作用の有無の確認)

- 化学物質の内分泌系に対する作用の有無を確認するため、試験管内試験と比較的簡易かつ短期間で実施可能な生物試験により、第1段階試験群を構成する。
- 化学物質の内分泌かく乱作用に関連する報告の信頼性評価において、「内分泌かく乱作用に関する試験対象物質となり得る」とされた物質を試験対象の候補とする。
- 第1段階試験管内試験結果が陽性であった物質について第1段階生物試験を実施する優先順位付けの対象物質とする。
- 既存の知見及び第1段階試験群の結果より、第1段階評価を実施する。

第2段階(有害性の確認)

- 内分泌かく乱作用による有害性を確認するため、長期間の暴露による生物試験により、第2段階試験群を構成する。
- 第1段階評価において「内分泌系に対する作用がある」と認められた物質を、第2段階試験群を実施する候補とする。

※ 第1段階評価で「内分泌系に対する作用がある」と認められなかった物質については、内分泌系に対する作用を必ずしも否定することはできないが、効率的かつ効果的に評価を進める観点から、現時点では「保留」とする。

2. 生態影響評価のための試験法について

EXTEND2022の内分泌かく乱作用の有害性評価の枠組みでは、生殖、甲状腺及び成長に及ぼす影響(作用)を対象として試験並びに評価を行う。第1段階の試験は、試験管内試験と簡易(短期)な生物試験で構成される。第2段階の試験は長期の確定試験である。第1段階と第2段階で一貫した評価を行うため、各影響に関して同一生物種(魚類:メダカ、両生類:アフリカツメガエル又はニシツメガエル)、無脊椎動物:オオミジンコ)を用いることを基本としている。試験法については、可能な限り既存の試験法を組み合わせる試験群を構築することを前提として、OECDでテストガイドライン化されている試験法を優先し、別途、新たに開発が必要な試験法に関する検討を進めている。

- 生殖に及ぼす影響(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)

- 生殖に及ぼす影響(抗アンドロゲン様作用)
- 甲状腺に及ぼす影響(甲状腺ホルモン様作用、抗甲状腺ホルモン様作用等)
- 成長に及ぼす影響(幼若ホルモン様作用、脱皮ホルモン様作用等)

3. 試験法の概要及び開発／確立の状況について

EXTEND における試験法の開発状況(令和5年3月時点)を表1に示した。以下の試験法に関して、プロトコルの検討又は OECD でのテストガイドライン化やガイダンスドキュメント化に向けた検討が進められている。

- 抗アンドロゲン様作用: 幼若メダカ抗アンドロゲン作用検出試験
- (抗)幼若ホルモン様作用: ミジンコ幼若ホルモン簡易スクリーニング試験
- (抗)脱皮ホルモン様作用: ミジンコ脱皮ホルモン作用検出試験

4. 令和5年度の検討内容(実施計画の概要)

令和5年度は、魚類試験、両生類試験、無脊椎動物試験に関して、試験プロトコルの検討、試験法の妥当性及び有効性等の検証を目的に以下を実施する。

(1) 魚類試験

① 幼若メダカ抗アンドロゲン作用検出試験(JMASA)

これまでの検証試験の結果を受けて、ガイダンスドキュメントの精緻化を図る。必要に応じて、試験法の妥当性、有効性及び適用性等の検証を目的とした検証試験を実施する。

なお、過年度までの検証試験結果及び有識者からの追加コメント対応を加えた試験プロトコルを OECD WNT に昨年度提出し、2023年4月の WNT においてガイダンスドキュメントとして採択され、同7月に OECD GD379 として公開された。

② 魚類胚を用いた内分泌かく乱化学物質検出試験法の検討について

RADAR アッセイ、REACTIV アッセイについては、New Approach Methodologies (NAMs)の一つとして、*in vitro* 試験の代替又は *in vivo* の第一段階試験との間の試験として、また Weight of Evidence (WoE: 証拠の重み付け)の1つとして参照するなど、一定の利用可能性が考えられることから、今年度は RADAR アッセイについて、選定した2物質を用いた試験を実施することで、EXTEND の枠組みにおける RADAR アッセイの利用可能性について検証する。

(2) 両生類試験

両生類変態試験(AMA)の検証として、給餌量が異なる条件で AMA と同じ 21 日間飼育した試験生物の甲状腺組織を評価し、AMA において試験生物の摂餌量の低下が主要なエンドポイントに及ぼす影響や化学物質での試験から得られた結果の解釈や評価において留意する点などを整理する。また、試験法の妥当性、有効性及び適用性等の検証を目的に検証試験を実施する。

(3) 無脊椎動物試験

① ミジンコ幼若ホルモン及び抗幼若ホルモン簡易スクリーニング試験

OECD でのテストガイドライン化に向けて、これまでに実施したリングテスト及び検証試験の結果を取りまとめる。また、幼若ホルモンの生合成阻害作用及び幼若ホルモン受容体阻害作用を検出するための試験プロトコルを検討する。

② ミジンコ脱皮ホルモン作用検出試験法

過年度に検討したミジンコ脱皮ホルモン作用検出試験のプロトコル案について、ノルウェー水研究所 (NIVA) のグループによる *in silico* スクリーニングでアゴニストと同定された化学物質を用いて試験を実施し、妥当性及び有効性等を検証する。

(4) 試験管内試験

抗甲状腺ホルモン作用については、適切な化学物質(トリヨードサイロニンによるニシツメガエル TR β の転写活性を阻害する化学物質)が入手できなかったことから、陽性対照物質での試験は実施されていない。ゼノパス自由胚甲状腺試験 (Xenopus Eleutheroembryo Thyroid Assay, XETA) の OECD バリデーションで使用された、甲状腺ホルモン受容体に対するアンタゴニスト作用を有する NH3 の試薬が市販されたことから、ニシツメガエル TR β を用いるレポータージーン試験に関して、同化学物質を用いた試験を実施し、抗甲状腺ホルモン作用の陽性対照物質としての妥当性(日間再現性等)を検証する。

表 1 EXTEND2010、EXTEND2016 及び EXTEND2022 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 ータージーン試験	◎メダカを用いた魚類短期繁殖試験 (OECD TG229, FSTRA)	◎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, FSTRA)	◎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 (OECD GD379, JMASA)	◎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 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 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 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

OECD TG211: *Daphnia magna* Reproduction Test, OECD TG229: Fish Short Term Reproduction Assay (FSTRA), OECD TG240: Medaka Extended One Generation Reproduction Test (MEOGRT), OECD TG231: The Amphibian Metamorphosis Assay (AMA), OECD TG241: The Larval Amphibian Growth and Development Assay (LAGDA), OECD GD379: Juvenile Medaka Anti-Androgen Screening Assay (JMASA)

EXTEND2022 における内分泌かく乱作用に関する試験法の概要

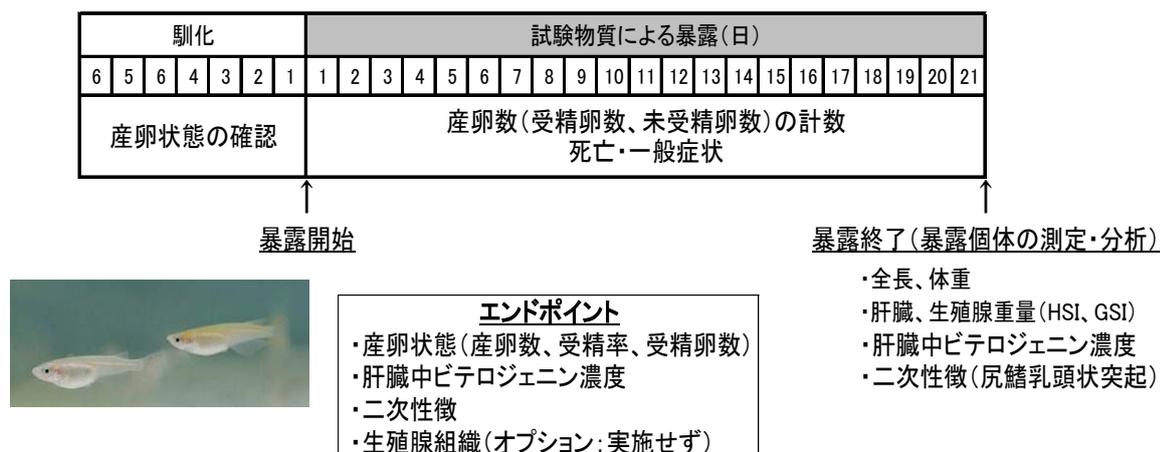
(1) 生殖に及ぼす影響に関する試験(魚類試験)

魚類短期繁殖試験(OECD TG229: Fish Short Term Reproduction Assay, FSTRA)

FSTRA は、性的に成熟し繁殖可能な状態にある雌雄の成魚を試験生物とする。試験では、試験水槽にメス及びオス各 3 個体を収容し、21 日間にわたり試験物質(化学物質)による暴露を行う。暴露期間中、メスが産んだ卵を回収して産卵数及び受精率を調べる。また、暴露終了時に生存する個体について肝臓ビテロゲン濃度及び二次性徴(乳頭状小突起を発現する尻びれの節板数)を測定する。本試験法については、化学物質のエストロゲン作用、抗エストロゲン作用、アンドロゲン作用、アロマターゼ阻害作用(ステロイド合成阻害作用)のほか、視床下部-下垂体-生殖腺系(HPG 軸)に対する作用も検出可能とされている。

FSTRA のテストガイドライン(TG229)は、2009 年(平成 21 年)に公表されているが、その後、日本より提案したメダカを試験生物とする場合の試験条件等が変更された改訂版が 2012 年(平成 24 年)に公表されている。FSTRA については、平成 22 年度より、日米二国間協力の下で試験法の妥当性及び有効性の検証、OECD への TG の修正提案に向けた検討が進められ、以降、平成 28 年度までに、EXTEND2010 の枠組み(第1段階評価)で参考とする知見の収集等を目的として、生殖に及ぼす影響に関わる内分泌かく乱作用(作用モード)の陽性物質(魚類等に対する作用が既知の物質)及び陰性物質を用いた検証試験が実施されている。

米国(US.EPA)の内分泌かく乱化学物質スクリーニング計画(EDSP)では、FSTRA をエストロゲン系(Estrogen pathway)及びアンドロゲン系(Androgen pathway)に関する Tier 1(スクリーニング)試験法として採用している。ただし、EDSP に適用される TG(OPPTS 890.1350)では、試験生物をファットヘッドミノー(4.5-6 か月齢)に限定し、エンドポイントには GSI 及び生殖腺組織を必須、血漿中性ステロイドホルモン濃度をオプションのエンドポイントとする点で OECD TG229 と異なる。

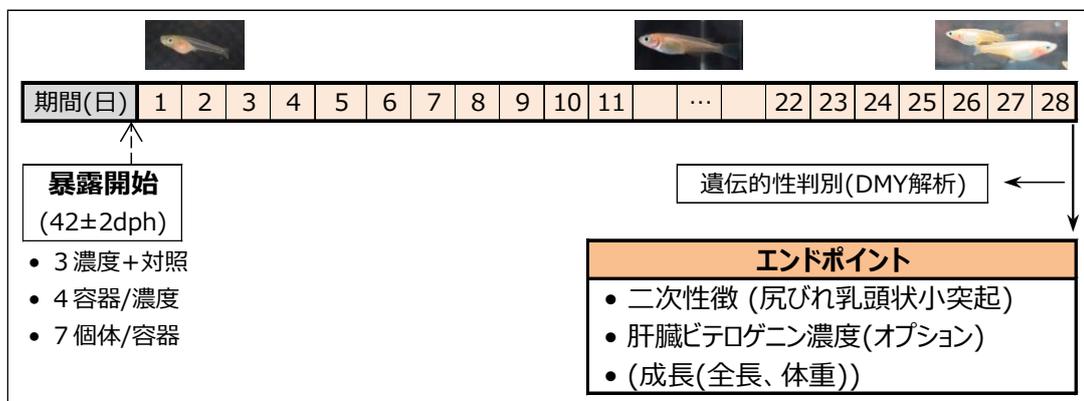


21 日間魚類試験 (OECD TG230: 21-day Fish Assay: A Short-Term Screening for Oestrogenic and Androgenic Activity, and Aromatase Inhibition, 21D-FA)

21D-FA は、エンドポイントに繁殖に関わるエンドポイント(産卵数、受精率等)を含まないこと以外、FSTRA とほぼ同様の試験法である。21D-FA のテストガイドライン(TG 230)は、FSTRA と同様に、2009 年(平成 21 年)に公表されている。21D-FA については、TG 化の過程で、エストロゲン、アンドロゲン、抗アンドロゲン及びアロマトラーゼ阻害作用の陽性物質及び陰性物質を用いた検証試験(リングテスト)が実施されているが、EXTEND の枠組みで検証試験は実施していない。

幼若メダカ抗アンドロゲン作用検出試験 (OECD GD379: Juvenile Medaka Anti-Androgen Screening Assay, JMASA)

JMASA は、受精後 42 日齢(6 週齢)前後の二次性徴(尻びれの乳頭状小突起)が発現前の幼若期メダカを試験生物とする。試験では、各水槽に 7 個体を収容し、28 日間(4 週間)にわたり試験物質(化学物質)による暴露を行う。暴露終了時に、エンドポイントとして二次性徴の発現状況(乳頭状小突起を発現している節板数)を調べる。エンドポイントの解析は、性決定遺伝子(dmy 遺伝子)に基づき決定する遺伝的雌雄ごとに行う。化学物質の抗アンドロゲン作用については、遺伝的オスにおける二次性徴発現の低下から評価する。遺伝的メスにおける二次性徴の発現から試験物質のアンドロゲン作用も検出できる。また、必須のエンドポイントではないが、肝臓中のピテロゲニン濃度を測定した場合には、試験物質のエストロゲン作用、抗エストロゲン作用及びアロマトラーゼ阻害作用を検出することも可能である。



メダカ拡張一世代繁殖試験 (OECD TG240: Medaka Extended One Generation Reproduction Test (MEOGRT))

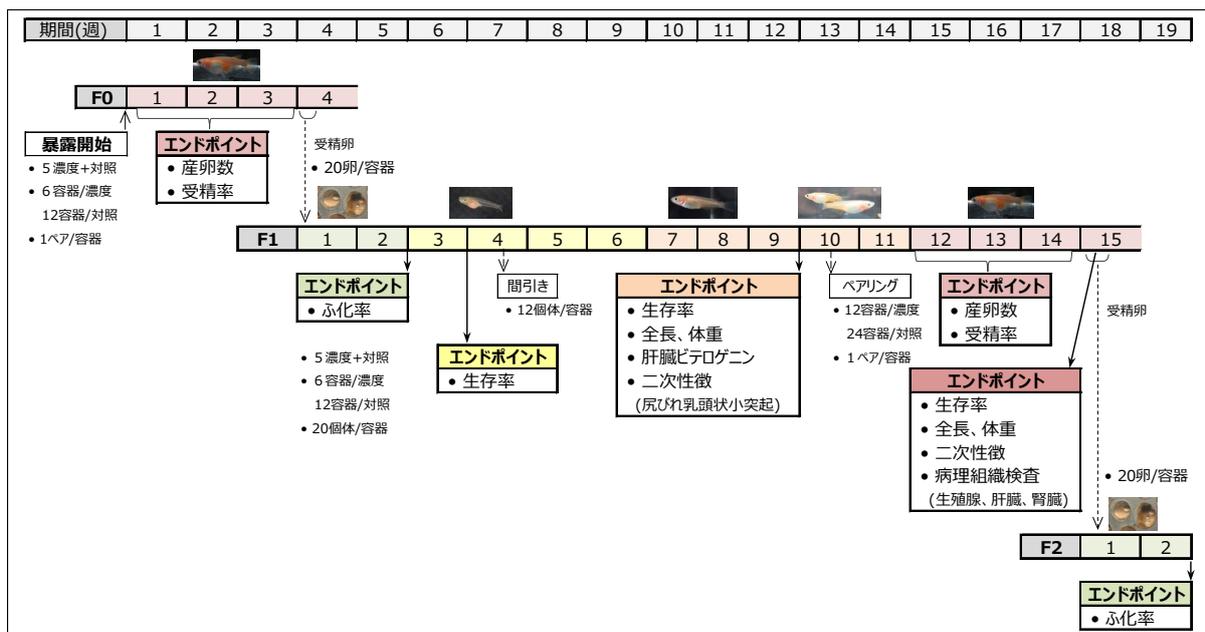
MEOGRT は、メダカを試験生物種とする 19 週間の試験である。試験では、性的に成熟し繁殖可能な状態にある雌雄の成魚を試験生物(F0 世代)として試験物質(化学物質)による暴露を開始する。F0 世代のエンドポイントは産卵状況のみである。F0 世代の暴露で得られた受精卵で F1 世代(子世代)の暴露を開始する。F1 世代では、エンドポイントとして、受精卵のふ化率、受精 4 週間までの生存率、受精後 9~10 週目(未成魚期)における生残率、成長(全長及び体重)、ピテロゲニン(mRNA 又は蛋白発現量)、二次性徴(尻びれの乳頭状小突起)及び外見上の性比、初回産卵までの時間、受精 12~14 週目における産卵状況(産卵数及び受精率)及び受精 15 週後(繁殖ステージ終了後)の生存個体における生残率、成長、二次性徴及び病理組織学的所見(生

殖腺、肝臓、腎臓)を調べる。これらの個体については性決定遺伝子(dmy 遺伝子)に基づき遺伝的性を確認し、遺伝的雌雄ごとにエンドポイントの解析を行う。また、F1 世代の繁殖ステージで得られた受精卵で F2 世代(孫世代)の暴露を行う。F2 世代については、エンドポイントとしてふ化率のみ測定する。これらのエンドポイントに対する影響から、化学物質の内分泌かく乱作用のほか、致死、成長及び繁殖に対する母体を通じた化学物質の経代影響を評価できると考えられる。

MEOGRT については、2009 年(平成 21 年)に、日米両国が共同で OECD ヘメダカ多世代試験法(MMT)の TG 化に関するプロジェクトを提案し、日米二国間協力の下で開発が進められ、2015 年(平成 27 年)に OECD においてテストガイドライン(TG240)が公表された。米国 EDSP では、エストロゲン系及びアンドロゲン系の Tier 2 試験として MEOGRT を採用している。EDSP では、独自の TG (OCSPP 890.2200)が適用されるが、この TG の規定は基本的に OECD TG240 と同じである。

MEOGRT については、平成 24 年度までに日米両国によって実施されたエストロゲン、抗エストロゲン、アンドロゲン、抗アンドロゲン及びステロイド合成阻害作用の陽性物質を用いたメダカ多世代試験(MMT)の結果に基づいて試験法の検証が実施されている。また、EXTEND2016 の枠組みでは、令和 2 年度までに第 1 段階試験でエストロゲン作用又は抗エストロゲン作用を有することが示唆された 6 物質を対象に OECD TG240 に準拠した試験が実施されている。

なお、統計処理の方法について改定が進められている。



(2) 甲状腺に及ぼす影響に関する試験(両生類試験)

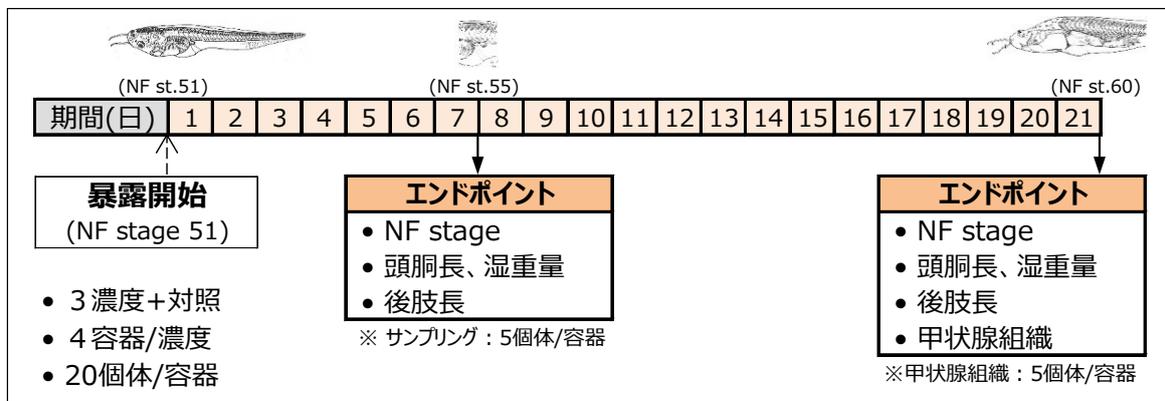
両生類変態試験(OECD TG231: The Amphibian Metamorphosis Assay, AMA)

AMA は、アフリカツメガエルの Nieuwkoop and Faber(NF) stage 51 の幼生を試験生物として、21 日間にわたる化学物質による暴露を行う。暴露開始から 7 日後に、一部の個体を取り上げて、発達段階(NF stage)の確認、頭胴長、後肢長及び体重の測定を行う。また、暴露終了時に生存する個体について、暴露 7 日後と同様のエンドポイントを調べるほか、一部の個体(5 個体/水槽)

を対象に甲状腺組織を検査し、異常の有無及び重症度を調べる。本試験では、これらのエンドポイントの測定結果を基に、化学物質の甲状腺受容体を介した作用のほかに、甲状腺ホルモンの生合成系、視床下部-下垂体-甲状腺系(HPT軸)に対する作用を検出できるとされている。

AMA のテストガイドライン(TG231)は、2009年(平成21年)に公表されている。AMA については、OECD による TG 化のためのリングテスト(Phase 1、2 及び 3 Validation)において、甲状腺ホルモン作用の陽性物質及び甲状腺系(甲状腺ホルモンの合成・代謝系)に対する阻害作用を持つ化学物質等を用いた試験が実施されている。また、EXTEND2010/2016 の枠組みでの適用性及び有効性の検証、第1段階評価で参考とする知見の収集等を目的として、平成27年度から甲状腺に及ぼす影響に関わる内分泌かく乱作用の陽性物質及び陰性物質を用いた検証試験が実施されている。

米国 EDSP では、AMA を甲状腺系に対する Tier 1 のスクリーニング試験法として採用しており、適用される TG (OCSPP 890.2200) の規定は、基本的に OECD TG231 と同じである。



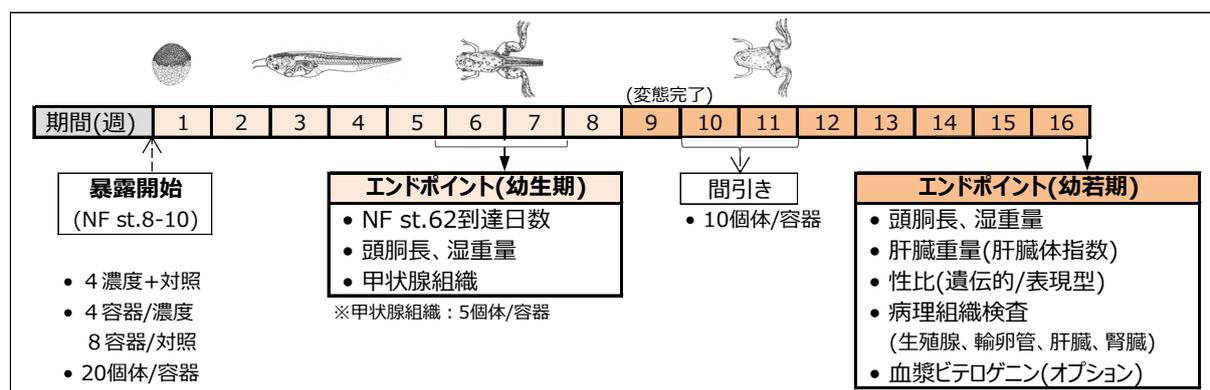
幼生期両生類成長発達試験 (OECD TG241: The Larval Amphibian Growth and Development Assay (LAGDA))

LAGDA は、アフリカツメガエルの NF stage 8~10 の幼生(胚体)を試験生物として、約 16 週間にわたる化学物質(試験物質)による暴露を行う。暴露期間中に、甲状腺に対する影響を調べるための幼生期のエンドポイントとして、各個体が NF stage 62 到達に要した日数を調べ、一部の個体について NF stage 62 における頭胴長及び体重の測定並びに甲状腺組織の検査を行う。すべての個体が NF stage 66 に達して変態を完了した時点で水槽内の個体数の調整(間引き)を行い、以降、対照区における NF stage 62 到達日(平均日数)から 10 週間まで暴露を継続する。また、暴露終了時に、幼若期のエンドポイントとして、成長(頭胴長、体重)、肝臓体指数、性比(遺伝的性比と表現型性比のギャップ)及び主要な臓器(生殖腺、輸卵管、腎臓、肝臓)を対象として病理組織学的検査を行う。これら幼若期のエンドポイントについては、遺伝的雌雄ごとに解析する。遺伝的性は、性決定遺伝子 DMW に基づいて判別する。LAGDA では、これらのエンドポイントから、甲状腺(変態)に対する影響のほか、致死、成長及び生殖腺の発達に対する化学物質の影響を評価できると考えられる。ただし、EXTEND2010 の枠組みで LAGDA を使用する場合には、変態(甲状腺系)に対する影響に関するエンドポイント測定までを試験期間とする。

LAGDA は、2015年(平成27年)にテストガイドライン(TG241)が公表されている。LAGDA については、日米二国間協力の下で、2009年(平成21年)に共同で OECD へ提出した SPSF に基づ

いて、ADGRA (Amphibian Development, Growth and Reproduction Assay) として開発が進められたが、2010 年に、日米間の合意を踏まえて SPSF が修正され、以降、LAGDA として開発が進められた。平成 24 年度までに日米両国で、LAGDA のプロトコルに基づいて、主にエストロゲン、アンドロゲン及び抗エストロゲン作用の陽性物質を用いて検証試験が実施されている。また、平成 25 年度以降、試験法の妥当性や有効性、EXTEND2010 の枠組みでの適用性の検討及び参考とする知見の収集等を目的として、甲状腺ホルモン作用の陽性物質及び甲状腺系 (甲状腺ホルモンの合成・代謝系) に対する阻害作用を持つ化学物質等を用いた検証試験が実施されている。

米国の EDSP では、甲状腺系の Tier 2 試験として LAGDA を採用しており、適用される US.EPA のテストガイドライン (OCSPP 890.2300) の規定は基本的に OECD TG241 と同じである。



(3) 成長に及ぼす影響に関する試験 (無脊椎動物試験)

オオミジンコ繁殖試験 / アネックス 7: 仔虫の性別決定に関するガイダンス (OECD TG211: Daphnia magna Reproduction Test / ANNEX 7: Guidance for the identification of neonate sex)

オオミジンコ繁殖試験は、主に産仔数をエンドポイントとして化学物質の甲殻類 (無脊椎動物) の繁殖に対する影響を調べる試験法であるが、産仔された幼体 (仔虫) の性比 (オスの発生) をエンドポイントとすることで、幼若ホルモン様作用を持つ化学物質の影響を評価できる。オオミジンコ繁殖試験のテストガイドライン (TG211) は、1998 年 (平成 10 年) に公表され、2008 年に、日本提案の仔虫の性別決定に関するガイダンス (ANNEX 7) を追加した改訂版が公表されている。

ミジンコ幼若ホルモン簡易スクリーニング試験 (Short-term Juvenile Hormone Activity Screening Assay using Daphnia magna, JHASA) (開発中: OECD へ TG 化プロジェクトを提案)

JHASA は、オオミジンコの抱卵個体を試験生物として、約 1 週間にわたり化学物質に暴露する。暴露後に生まれた仔虫について性比を観察し、オスの出現率をエンドポイントとして化学物質の幼若ホルモン様作用を検出 (スクリーニング) する。JHASA については、2016 年 (平成 28 年) に日本より TG 化に関するプロジェクト提案 (SPSF) を OECD に行い承認されている。

JHASA については、平成 23 年度から、試験法の有効性及び再現性等の検証を目的に、農薬や精油成分等でミジンコに対する幼若ホルモン作用が疑われる化学物質を用いた検証試験を実施している。また、OECD での TG 化に向けた検証の一環として国内及び国際的なリングテストを実施している。

ミジンコ脱皮ホルモン作用検出試験(開発中)

EXTEND2010/2016 の枠組みで、成長に対する影響の第1段階生物試験に適用できる試験法が必要であることから、平成 26 年度より、試験法の検討に着手し、ミジンコの脱皮回数をエンドポイントとする評価法等が検討されたが、令和 4 年度までに試験デザインは確定していない。

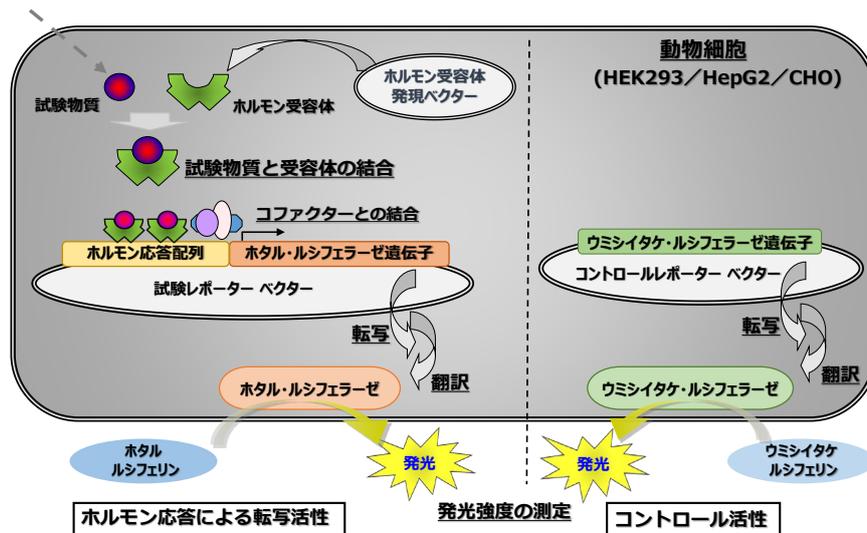
ミジンコ多世代試験(Daphnids multi-generation test)(不採用)

ミジンコ多世代試験は、平成 22 年度から平成 25 年度まで、日米二国間協力の下で、欧米を中心に OECD で TG 化が検討されていたカイアシ類(コペポッド)を用いたフルライフサイクル試験及びアミ(ミシッド)を用いた二世世代繁殖試験との比較検証を行いつつ試験デザインの検討を進めてきた。その後は、OECD への TG 化の提案も視野に試験法の開発を進めてきたが、平成 29 年度までに実施した検証試験の結果、ミジンコ類に対して多世代(経世代)影響を示す化学物質が見つからなかったことから、試験法開発については保留(中断)することとされた。

(4) 生殖に及ぼす影響に関する試験管内試験

メダカのエストロゲン受容体及びアンドロゲン受容体を用いるレポーター遺伝子試験

生殖に及ぼす影響に関する試験管内試験としては、動物細胞にホルモン受容体発現ベクター、試験レポーターベクター及びコントロールベクター等を一過的に導入する一過性発現細胞系のデュアル・ルシフェラーゼ・レポーターアッセイ法を基本原理とするメダカのエストロゲン受容体 α (ER α)及びアンドロゲン受容体 β (AR β)を用いるレポーター遺伝子試験法が開発されている。メダカ ER α 及び AR β を用いるレポーター遺伝子試験は、第 2 期日英共同研究の成果を基に開発された試験法であり、それぞれ動物細胞として、HEK293(ヒト胎児腎細胞株)又は HepG2(ヒト肝癌由来細胞株)を用いる。エストロゲン作用あるいはアンドロゲン作用を調べるアゴニスト系試験では、メダカ ER α 又は AR β に対する転写活性化能を指標として試験物質の EC₅₀ を算出する。また、抗エストロゲン作用あるいは抗アンドロゲン作用を調べるアンタゴニスト検出系試験では、それぞれ試験系に陽性物質として 17 β エストラジオール又は 11-ケトテストステロンを共添加し、陽性物質の転写活性能に対する阻害作用として試験物質の IC₅₀ を算出する。メダカ ER α 及び AR β を用いるレポーター遺伝子試験については、基礎的な知見の蓄積を目的として、平成 29 年度より、FSTRA 及び JMASA の検証に用いた陽性物質等について試験を実施している。



(5) 甲状腺に及ぼす影響に関する試験管内試験

ニシツメガエルの甲状腺ホルモン受容体を用いるレポーター遺伝子試験

甲状腺に及ぼす影響に関する試験管内試験としては、生殖に関する試験管内試験と同様に、一過性発現細胞系のデュアル・ルシフェラーゼ・レポーターアッセイ法を基本原理とするニシツメガエルの甲状腺ホルモン受容体 β (TR β)を用いるレポーター遺伝子試験法が開発されている。ニシツメガエル TR β レポーター遺伝子試験は、第3期日英共同研究の成果を基に開発された試験法であり、動物細胞として HepG2 を用いる。甲状腺ホルモン作用を調べるアゴニスト系試験では、ニシツメガエル TR β に対する転写活性化能を指標として試験物質の EC₅₀ を算出し、抗甲状腺ホルモン作用を調べるアンタゴニスト検出系試験では、試験系に陽性物質として供添加するトリヨードサイロニンの転写活性能に対する阻害作用として試験物質の IC₅₀ を算出する。ニシツメガエル TR β レポーター遺伝子試験については、基礎的な知見の蓄積を目的として、平成29年度より、AMA 及び LAGDA の検証に用いた陽性物質等について試験を実施している。

(6) 成長に及ぼす影響に関する試験管内試験

ミジンコ脱皮ホルモン受容体レポーター遺伝子試験

成長に及ぼす影響に関する試験管内試験としては、生殖あるいは甲状腺に関する試験管内試験と同様に、一過性発現細胞系のデュアル・ルシフェラーゼ・レポーターアッセイ法を基本原理とするミジンコの脱皮ホルモン受容体 (EcR) を用いるレポーター遺伝子試験が開発されている。ミジンコ EcR レポーター遺伝子試験は、EXTEND2010 の基盤的研究の成果を基に開発された試験法であり、動物細胞として CHO (チャイニーズハムスター卵巣由来細胞株) を用いる。脱皮ホルモン作用を調べるアゴニスト系試験では、ミジンコ EcR に対する転写活性化能を指標として試験物質の EC₅₀ を算出する。抗脱皮ホルモン作用を調べるアンタゴニスト検出系試験については、理論的に実施可能であるが、これまで検証試験も含めて実施されていない。EXTEND2016 の下、令和2年度にアゴニスト検出系試験として、クロルピリホスの試験を実施している。

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受容体レポーター遺伝子試験は、ミジンコ脱皮ホルモン受容体レポーター遺伝子試験と同様に、CHOを用いる一過性発現細胞系のデュアル・ルシフェラーゼ・レポーターアッセイ法を基本原理とする試験法である。ミジンコの幼若ホルモン受容体(JhR)を用いる試験管内試験については、EXTEND2010の基盤的研究の成果として、平成25年度までに、ミジンコのJhR遺伝子(Methoprene-tolerant)とSteroid receptor coactivatorの部分配列を用いるツーハイブリッドルシフェラーゼアッセイ法(THLA)が開発されたが、下流の遺伝子の試験物質による転写活性化を定量的に評価できないことから、幼若ホルモン応答配列を介した転写活性化を定量できるレポーター遺伝子試験法の開発が進められている。ミジンコJhRレポーター遺伝子試験については、平成28年度に基本的なプロトコルが確立されたが、Fold Activationの最大値が低いことから、平成29年度に試験系に使用する幼若ホルモン受容体エレメントを改良し、改良された試験プロトコルについて、JHASAの結果を参考に幼若ホルモン作用の陽性物質を用いて検証試験を実施している。令和元年度にプレートデザインの検討を経て、ミジンコJhRレポーター遺伝子試験のプロトコル案(試験の手順及び条件)を作成している。