

EXTEND2010 における内分泌かく乱作用の生態影響に係る試験及び評価の 枠組みについて (案)

H22.11.19 版

1. 基本的考え方

- (1) 内分泌かく乱化学物質 (内分泌系に影響を及ぼすことにより、生体に障害や有害な影響を引き起こす外因性の化学物質) の生態リスク評価に向け、
 - ① 内分泌系に対する作用の有無の確認
 - ② 生体の障害や有害な影響の有無及び程度の確認を行うため、生態影響試験の実施の枠組みを構築する。
- (2) 環境リスク管理の必要性の判断に向けた環境リスク評価を進めるため、化学物質の内分泌かく乱作用に伴う環境リスクの評価手法の確立を行いつつ、環境行政上対応が必要となる物質を効果的に抽出する必要がある。このため、画一的にデータを取得して網羅的な評価を行うよりも、既存知見を活用しつつ効率的に評価を進めることが適当ではないかと考えられる。

2. 生態影響評価のための基本的枠組み

EXTEND2010 における生態影響評価は、次の 2 段階で評価を行う (図 1)。

- (1) 第 1 段階
 - ・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」(以下、信頼性評価)において、試験対象物質となり得るとされた物質を対象とする。
 - ・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。
 - (2) 第 2 段階
 - ・内分泌かく乱作用による有害性を確認するため、長期間のばく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」と認められた物質について、第 2 段階試験群を実施する候補とする。(具体的な実施方法は今後検討)
- ※ 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。

3. 試験法の選定

(1) 試験法選定の考え方

- ① OECDにおいてテストガイドライン化された試験法を優先して採用する。また、可能な限り既存の試験法の組み合わせで試験群を構築することを前提とし、新たに開発が必要な試験法がある場合は、今後検討する。

OECDにおいてテストガイドライン化された試験法及び環境省事業（SPEED'98及びExTEND2005）において開発した試験法と、それらにより検出可能な作用を表1.1～1.3に示した。

- ② 第1段階及び第2段階の評価については、一貫した評価を実施するため、主として、同一の生物種を用いて試験を実施する。試験動物は、当面、魚類（メダカ）、無脊椎動物類（オオミジンコ）及び両生類（アフリカツメガエル又はニシツメガエル）とする。
- ③ 試験管内試験としては、受容体結合のみならず、その後の転写活性化を確認できるレポーター遺伝子試験を採用する。

(2) 具体的な試験法

第1段階試験群として採用する試験は、以下の通りとする（表2）。

① 試験管内試験

- ・エストロゲン様作用及び抗エストロゲン様作用

第2段階試験（開発中のメダカ多世代試験を想定）で用いるメダカの受容体を使用するメダカエストロゲン受容体 α 、 $\beta 1$ 、 $\beta 2$ レポーター遺伝子試験（試験実施対象は α 、 $\beta 1$ 、 $\beta 2$ から1種類を選択）

- ・アンドロゲン様作用及び抗アンドロゲン様作用

第2段階試験（開発中のメダカ多世代試験を想定）で用いるメダカの受容体を使用するメダカアンドロゲン受容体 α 、 β レポーター遺伝子試験（試験実施対象は α 、 β から1種類を選択）

- ・甲状腺ホルモン様作用及び抗甲状腺ホルモン様作用

第2段階試験（アフリカツメガエル変態アッセイ(TG231)を想定）で用いるカエル類の受容体を使用するニシツメガエル甲状腺ホルモン受容体 α 、 β レポーター遺伝子試験（試験実施対象は α 、 β から1種類を選択）

- ・脱皮ホルモン様作用

第2段階試験（オオミジンコ繁殖毒性試験(TG211 ANNEX7))で用いるオオミジンコの受容体を使用するミジンコ脱皮ホルモン受容体レポーター遺伝子試験

② 生物試験

- ・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

テストガイドライン化されており、第2段階試験（開発中のメダカ多世代試験を想定）で用いるメダカを使用し、幅広い作用について評価可能な魚類短期間繁殖試

験 (TG229) (但し、既存知見によっては、検出できる作用が少ないがやや簡易に実施できる魚類 21 日間スクリーニング試験(TG230)を用いることを検討する)

4. 試験及び評価の実施手順

(1) 第 1 段階における試験及び評価の実施手順

画一的にデータを取得して網羅的な評価を行うのではなく、既存知見を活用しつつ効率的に評価を進めるため、別途実施している信頼性評価によって得られた既存知見を活用しながら、以下の手順で試験及び評価を実施する。

① 信頼性評価において確認された既存知見を以下の観点から整理し、第 1 段階評価を実施するに当たり、必要な情報がどの程度すでに得られているのかを確認する。

○内分泌かく乱作用の可能性が疑われている内分泌系の項目は何か

- ・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、抗アンドロゲン様作用、等
- ・発達（変態等）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

○第 1 段階で採用する試験管内試験に相当する情報はるか

○第 1 段階で採用する生物試験に相当する情報はるか

② 上記の既存知見の整理結果に基づき、次のように試験を行う。

(i) 評価すべき内分泌系の項目を選定

(ii) 選定された項目について、十分な試験管内試験の情報が得られていない物質については、試験管内試験を実施

(iii) 選定された項目について、十分な生物試験の情報が得られていない物質については、既存の知見、試験管内試験の結果、環境中での検出状況等の情報を勘案し、優先順位が高いと考えられる物質から生物試験を実施

③ 必要な試験管内試験及び生物試験の情報が得られた物質について、第 1 段階評価を実施する。

(参考) 内分泌系に対する作用の網羅的な確認の実施について

化学物質の内分泌かく乱作用による生態影響評価の枠組みを構築するに当たっては、既存の試験法で評価可能なすべての内分泌系の項目について、網羅的に評価を実施すべきであり、既存知見がない項目についても評価を行うという考え方も想定される。しかし、既存の知見から考えられる項目以外のものも含むすべての項目について試験を行うことは、効率的に評価を進めるという観点から、適切でないと考えられる。

既存知見から評価を行うべき内分泌系の項目を選定した場合と、網羅的に評価を行う場合の関係の具体例について、以下に示す。「●」は、実施手順に従って評価を行う場合に評価を行う項目、「▲」は、網羅的に評価を行う場合に追加して評価を行う項目を表す。

網羅的に評価を行った場合には、実施すべき試験項目がかなり多くなり、限られた予算の中

で実施するには、現実的でないと考えられる。

	既存知見の例			評価を行う項目						
	雄メダカで 肝臓中ビテ ロゲニン濃 度高値	カエル類 の変態異 常	無脊椎動 物類の脱 皮異常	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	甲状腺 ホルモ ン	抗甲状 腺ホル モン	脱皮ホ ルモン
物質 A	○			●	▲	▲	▲	▲	▲	▲
物質 B		○		▲	▲	▲	▲	●	●	▲
物質 C			○	▲	▲	▲	▲	▲	▲	●

(2) 第 2 段階における試験及び評価の実施手順

有害性確認試験として位置付けられる試験法の開発の状況を踏まえ、第 2 段階における試験の実施の手順について具体的に検討する。

なお、現時点において、有害性確認試験として位置付けられる試験法を表 3 に示す。

(3) 今後整理すべき事項

- ・ 生物試験を実施するに当たっての、物質の優先順位付けの基準等の考え方
- ・ 試験結果の評価を実施するに当たっての、評価基準等の考え方
- ・ 第 1 段階生物試験が開発されていない発達（変態等）や成長に及ぼす影響の評価の考え方

実施手順を内分泌系の項目毎に整理すると図 2.1～2.3 の通りとなる。生殖系以外の項目については、第 1 段階に該当する生物試験が開発されておらず、今後の試験法開発を含め検討が必要である。

- ・ 信頼性評価の実施方法の再検討

これまでの信頼性評価は、内分泌かく乱作用との関連性が認められるものを幅広く拾い上げることを目的として行ったものであり、必ずしも本実施手順の中でそのまま利用できるものではないので、これまでの知見の再整理及び今後の整理方法の見直しが必要である。

図1 内分泌かく乱作用の有害性評価の枠組み（案）

第1段階（内分泌系に対する作用の有無を確認）

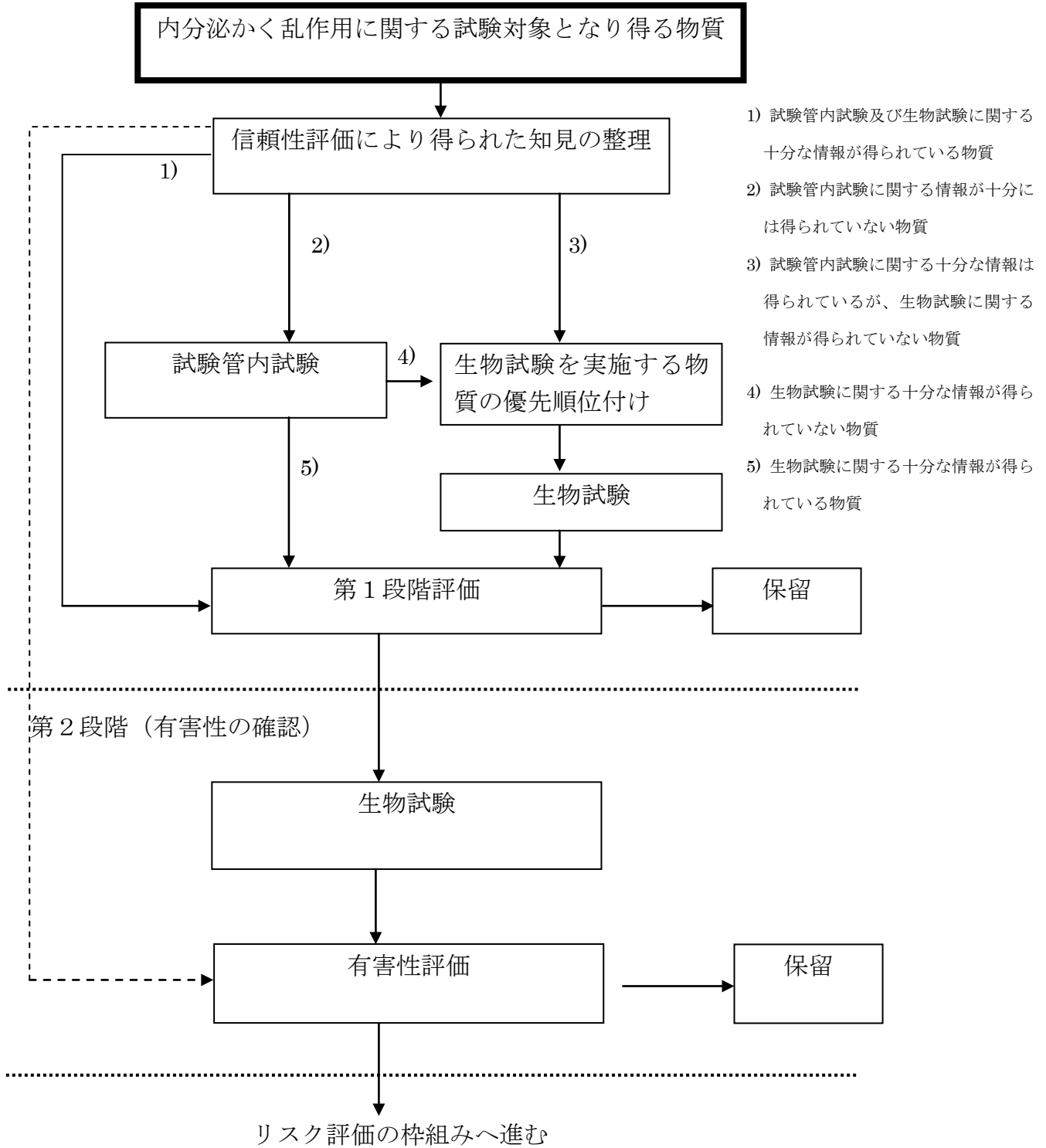


表 1.1 OECD でテストガイドライン化された試験法及び環境省事業で開発した試験法において検出可能な作用（試験管内試験：（抗）エストロゲン様作用、（抗）アンドロゲン様作用）

	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
メダカエストロゲン受容体 α 、 β 結合試験	■			
ヒトエストロゲン受容体 α 、 β 結合競合阻害試験	■			
アフリカツメガエルエストロゲン受容体 α 結合試験	■			
ニホンウズラエストロゲン受容体 α 、 β 結合試験	■			
メダカエストロゲン受容体 α 、 β 転写活性化試験 (HeLa 細胞使用)	■	■		
ヒトエストロゲン受容体 α 転写活性化試験 (TG455)	■	■		
メダカエストロゲン受容体 α 、 β 1、 β 2 レポーター遺伝子試験 (HEK293 細胞使用)	■	■		
ニシツメガエルエストロゲン受容体 α 、 β レポーター遺伝子試験 (開発中)	■	■		
ヒト乳がん細胞 E-screen 試験	■			
ラットアンドロゲン受容体結合阻害試験			■	
ニホンウズラアンドロゲン受容体結合試験			■	
メダカアンドロゲン受容体転写活性化試験 (HeLa 細胞使用)			■	■
メダカアンドロゲン受容体 α 、 β レポーター遺伝子試験			■	■
イトヨアンドロゲン受容体 α 、 β レポーター遺伝子試験			■	■
ヒト乳がん細胞アンドロゲン受容体レポーター遺伝子試験			■	■

■：検出可能な作用

表 1.2 OECD でテストガイドライン化された試験法及び環境省事業で開発した試験法において
検出可能な作用（試験管内試験：（抗）甲状腺ホルモン、幼若ホルモン、脱皮ホルモン）

	甲状腺ホルモン	抗甲状腺ホルモン	幼若ホルモン	脱皮ホルモン
ニシツメガエル甲状腺ホルモン受容体 α 、 β レポーター遺伝子試験	■	■		
ヒト甲状腺ホルモン受容体 α 、 β 酵母試験	■	■		
ヒト甲状腺ホルモン受容体 α 、 β レポーター遺伝子試験	■	■		
ミジンコ脱皮ホルモン受容体レポーター遺伝子試験				■

■：検出可能な作用

表 1.3 OECD でテストガイドライン化された試験法及び環境省事業で開発した試験法において
検出可能な作用（生物試験）

	検出可能な作用							
	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	甲状腺ホルモン	抗甲状腺ホルモン	視床下部 ／下垂体 ／生殖腺	視床下部 ／下垂体 ／甲状腺
メダカピテロジェニンアッセイ	■							
メダカパーシャルライフサイクル試験	■	■	■	■			■	
魚類 21 日間スクリーニング試験 (TG230)	■	■	■					
魚類短期間繁殖試験(TG229)	■	■	■				■	
魚類性発達試験(開発中)	■	■	■	■			■	
イトヨスピギンアッセイ(開発中)			■	■				
両生類パーシャルライフサイクル試験(開発中)	■	■	■	■	■	■	■	■

■：検出可能な作用

表2 第1段階試験群として採用する試験(案)

	検出可能な作用									
	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	甲状腺 ホルモ ン	抗甲状 腺ホル モン	視床下部 ／下垂体 ／生殖腺	視床下部 ／下垂体 ／甲状腺	幼若ホ ルモン	脱皮ホ ルモン
試験管内試験										
メダカエストロゲン受容体 α 、 β 1、 β 2 レポーター遺伝子試験	■	■								
メダカアンドロゲン受容体 α 、 β レポーター遺伝子試験			■	■						
ニシツメガエル甲状腺ホルモ ン受容体 α 、 β レポータージ ーン試験					■	■				
ミジンコ脱皮ホルモン受容体 レポーター遺伝子試験										■
生物試験										
魚類短期間繁殖試験(TG229)	■	■	■				■			
魚類 21 日間スクリーニング試 験 (TG230)	■	■	■							

■：検出可能な作用

表3 第2段階試験群の候補

	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	甲状腺 ホルモ ン	抗甲状 腺ホル モン	視床下部 ／下垂体 ／生殖腺	視床下部 ／下垂体 ／甲状腺	幼若ホ ルモン	脱皮ホ ルモン
メダカ多世代試験(開発 中)	■	■	■	■			■			
アフリカツメガエル変態 アッセイ(TG231)					■	■		■		
オオミジンコ繁殖毒性試 験(TG211 ANNEX7)									■	
甲殻類多世代試験(開 発中)									■	■

■ : 検出可能な作用

図 2.1 内分泌かく乱作用の有害性評価の枠組み
生殖に及ぼす影響（案）

（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、抗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）

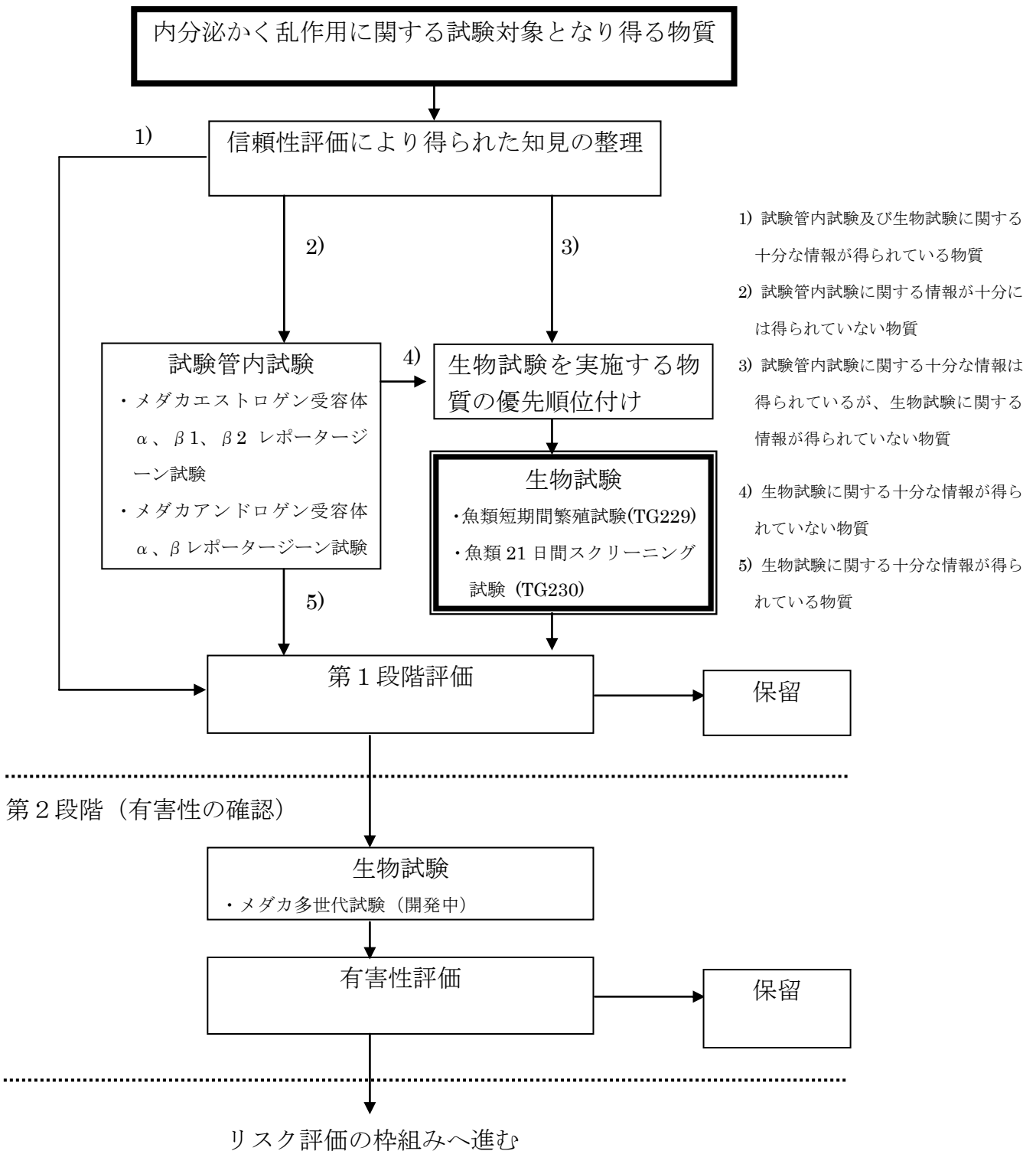
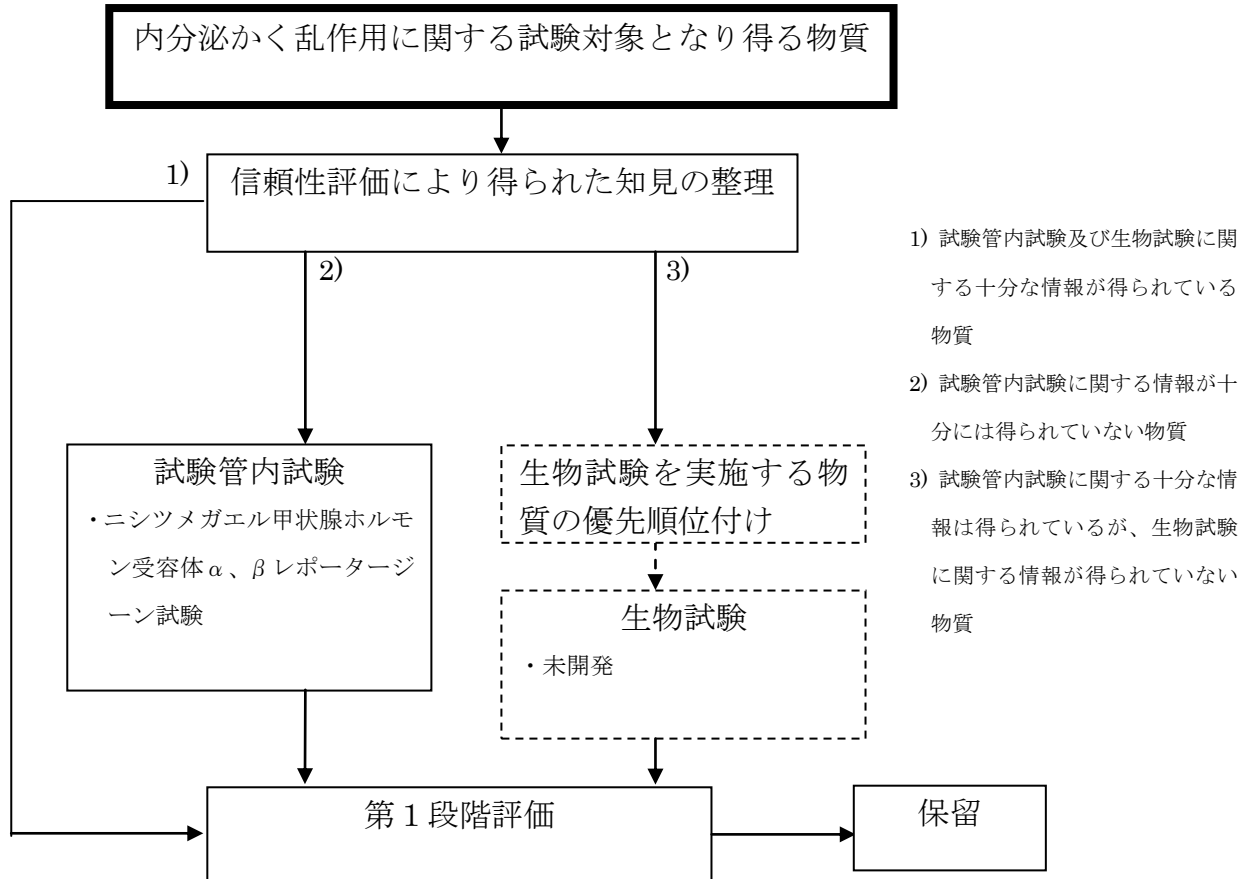


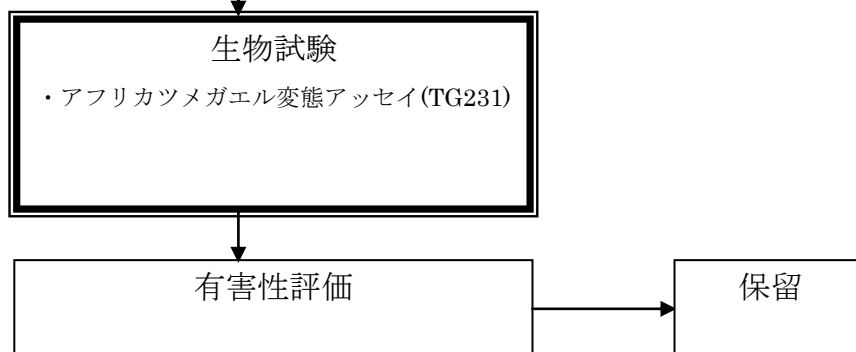
図 2.2 内分泌かく乱作用の有害性評価の枠組み
甲状腺に及ぼす影響（素案）

（甲状腺ホルモン様作用、抗甲状腺ホルモン様作用、等）

第 1 段階（内分泌系に対する作用の有無を確認）



第 2 段階（有害性の確認）



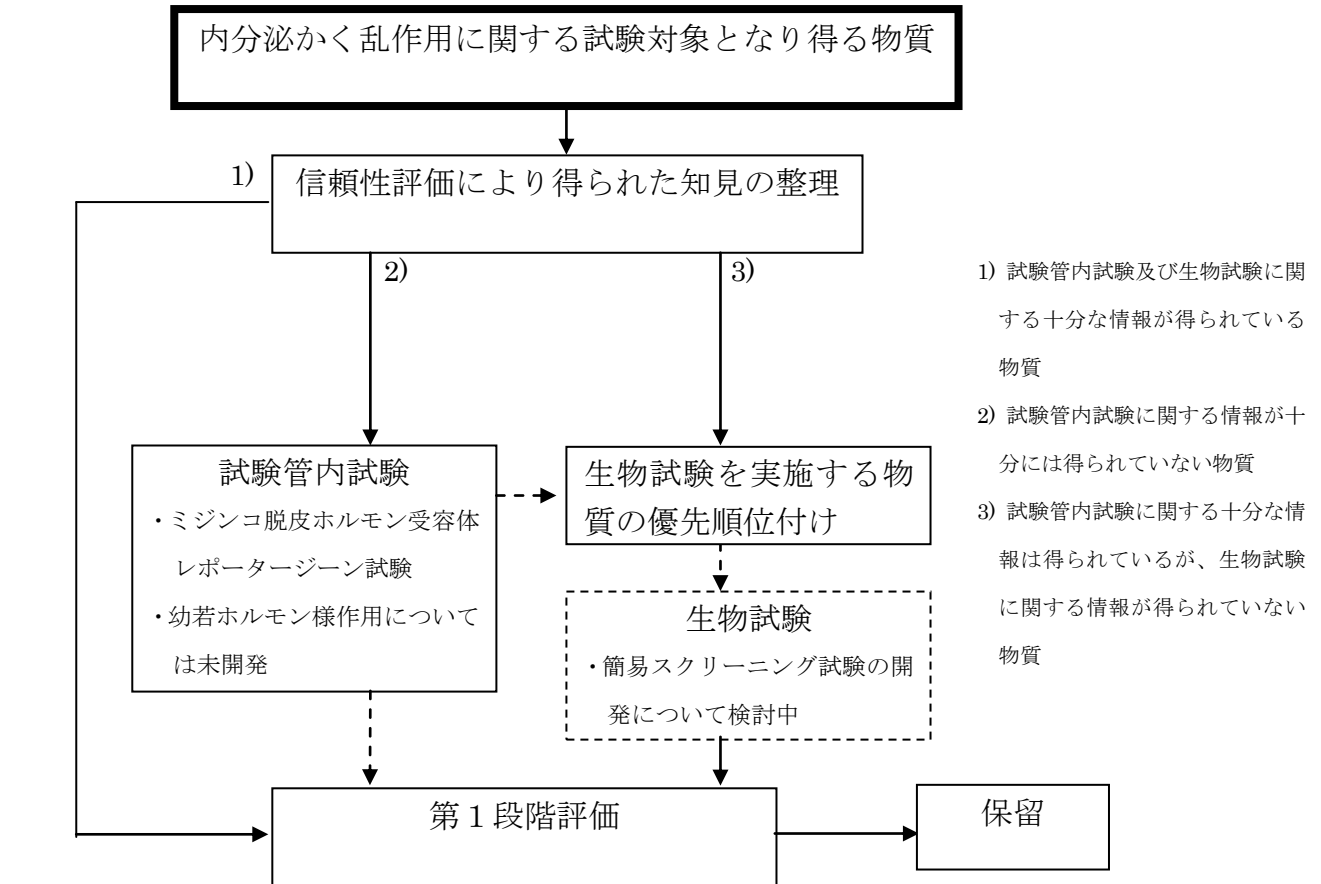
リスク評価の枠組みへ進む

図 2.3 内分泌かく乱作用の有害性評価の枠組み

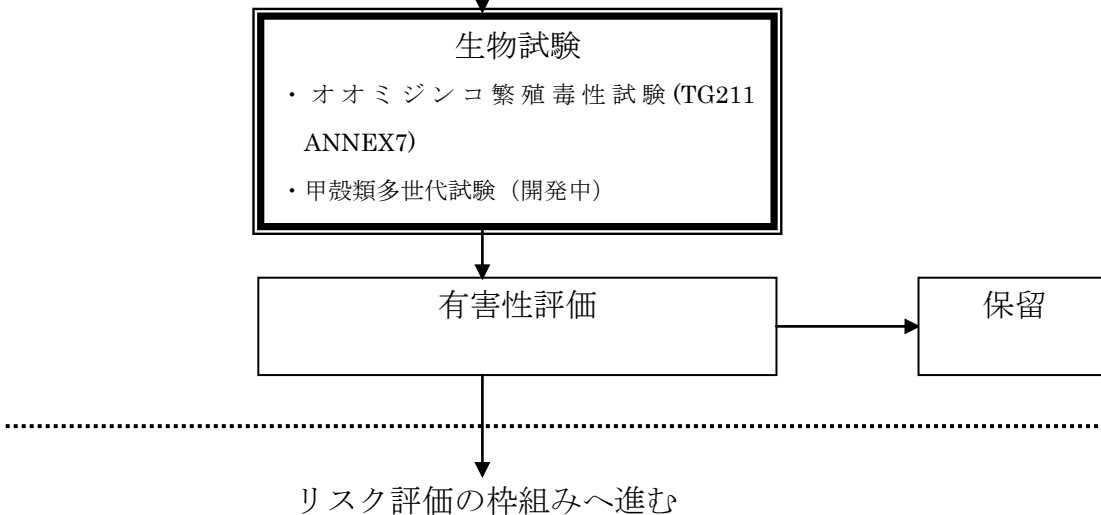
成長に及ぼす影響（素案）

（幼若ホルモン様作用、脱皮ホルモン様作用、等）

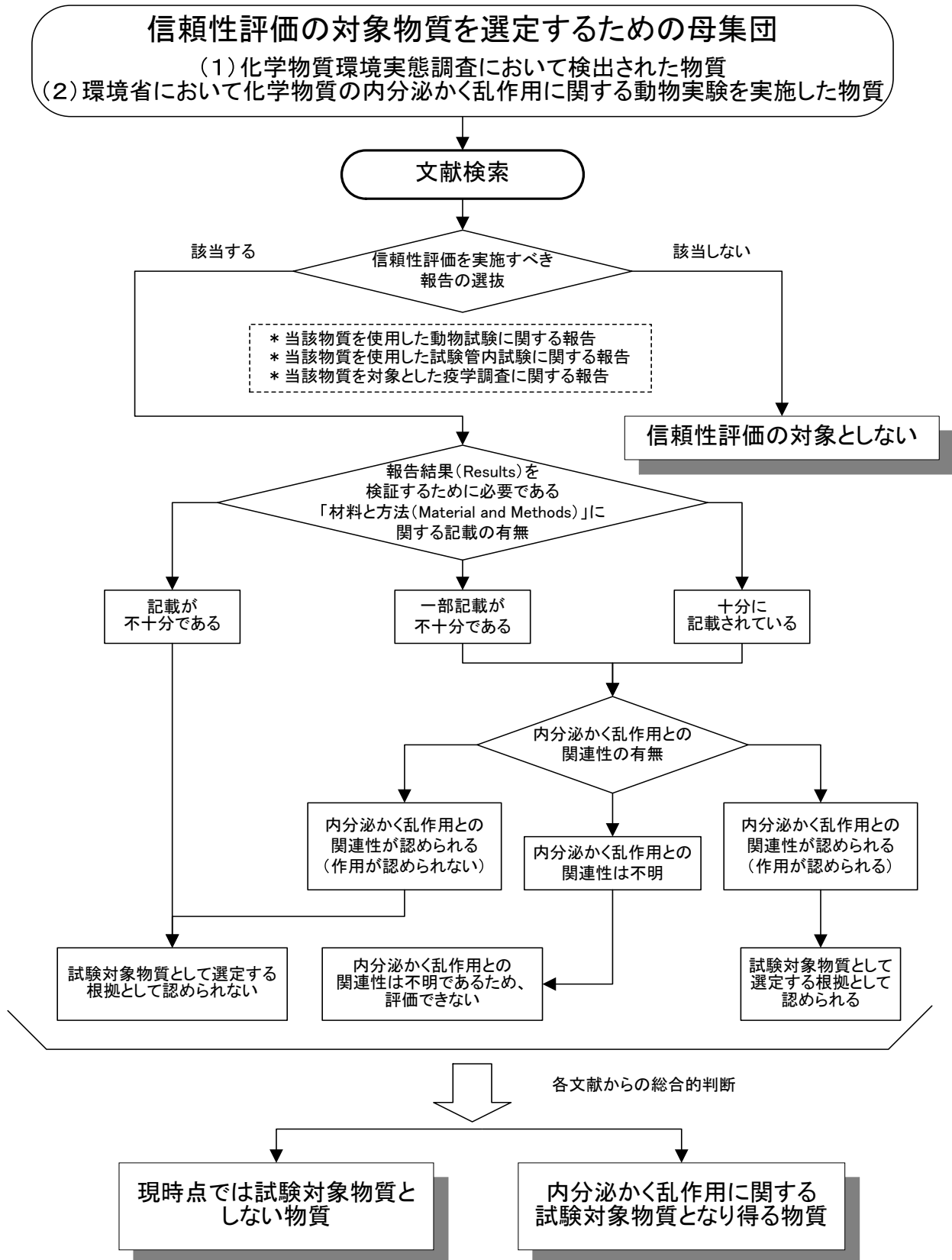
第 1 段階（内分泌系に対する作用の有無を確認）



第 2 段階（有害性の確認）



(参考1) 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のこれまでの実施方法



(参考2) これまでの取組及び国際的な状況

1. SPEED'98 における試験実施の枠組み

- ・ スクリーニング及び確定試験の生物試験による2段階方式が採用され、試験管内試験結果はメカニズムの確認として利用された。
- ・ メダカを対象とした①ビテロジェニンアッセイ及び②パーシャルライフサイクル試験をスクリーニングとして実施し、有害性確認試験として③フルライフサイクル試験を実施した。また、メカニズムの確認として試験管内試験を実施した。内分泌かく乱作用を有すると推察した根拠としては、雄メダカの肝臓中ビテロジェニン濃度の高値、精巣卵の出現、産卵数・受精率の低値、孵化日数の遅延を採用し、「①内分泌系に対する作用影響の有無の確認及び②生体の障害や有害な影響の有無及び程度の確認」の指標とした。

2. 米国における試験実施の枠組み

USEPA においては、試験管内試験及び短期間の生物試験を含む Tier1 スクリーニングと長期間の生物試験である Tier2 テストの2段階方式が採用されている。

Tier 1 スクリーニングは、生物の内分泌系に対する化学物質の作用の検出を目的とした試験であり、5種類の試験管内試験（ラットエストロゲン受容体結合試験、ヒト HeLa 細胞エストロゲン受容体転写活性化試験、ラットアンドロゲン受容体結合試験、ヒトステロイド産生試験及びヒトアロマトラーゼ試験）及び6種類の動物試験（ラット子宮肥大試験、ラットハーシュバーガー試験、ラット雌思春期試験 (Pubertal female)、ラット雄思春期試験 (Pubertal male)、両生類変態試験及び魚類短期間繁殖試験）より構成される。

Tier 2 テストは、化学物質の生物に対する有害な影響を確認するための試験である。その妥当性検証は現在実施中であり、2011年（平成23年）末までに完了して、採用する試験法が決定される見込みである。

3. OECD におけるテストガイドライン化の検討状況

現時点では、OECD において無脊椎動物類 (TG211 ANNEX7)、魚類 (TG229、TG230) 及び両生類 (TG231) を対象とした試験法がテストガイドライン化されている。

この他、魚類性発達試験、メダカ多世代試験、甲殻類多世代試験などがテストガイドライン化に向けて開発中である。