

第 1 段階生物試験の実施について（案）

1. 第 1 段階生物試験の選定について

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については、第 1 段階生物試験として、魚類短期繁殖試験 (TG229) または魚類 21 日間スクリーニング試験 (TG230) を実施することとしている (図 1)。

一方、抗アンドロゲン様作用、甲状腺ホルモン様作用及び抗甲状腺ホルモン様作用、幼若ホルモン様作用については、第 1 段階生物試験に該当する試験法が確立していない。

(1) 抗アンドロゲン様作用に関する第 1 段階生物試験の取扱い

OECD において、アンドロゲン様作用及び抗アンドロゲン様作用を検出するためのイトヨスピギンアッセイ (Androgenised Female Stickleback Screen) に関するガイダンス文書が合意されたところであるので、今後その活用状況を踏まえながら、対応を検討していくこととする (図 2)。

(2) 甲状腺ホルモン様作用及び抗甲状腺ホルモン様作用に関する第 1 段階生物試験の取扱い

第 1 段階では生物試験を実施せずに評価を行った上で、第 2 段階で「両生類変態アッセイ (TG231)」を実施する (図 3)。

(3) 幼若ホルモン様作用に関する第 1 段階生物試験の取扱い

幼若ホルモン様作用については、試験法開発事業において比較的簡易かつ短期間で実施可能な「ミジンコ簡易スクリーニング試験法」の開発を進める (図 4)。

(4) 今後の対応

(1) ~ (3) の検討結果を踏まえ、抗アンドロゲン様作用、幼若ホルモン様作用の第 1 段階生物試験については、さらに検討を進めることとし、当面は試験法が確立している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について、第 1 段階生物試験を実施する。

2. 第 1 段階生物試験の実施について

(1) 実施に当たっての考え方

第 1 段階生物試験の候補物質について、既存知見から想定された作用に関して、第

1 段階生物試験を実施する。

なお、第 1 段階生物試験又はそれと類似の生物試験の既存知見が得られた場合は、第 1 段階生物試験は実施しない。

(2) 対象物質の優先順位付けの基本的な考え方 (案)

信頼性評価第 1 回において対象とした 2 物質及び信頼性評価第 2 回において対象とした 11 物質についての試験管内試験を実施した。

既存知見及び実施した試験管内試験の結果を取りまとめ、第 1 段階生物試験を実施するための対象物質の優先順位付け案を提案する。

優先順位付けに当たっては、信頼性評価によって得られている既存知見の結果及び今回実施した試験管内試験結果を勘案し、1～3 の優先順位を設定した。

表 1 に優先順位付けの考え方を示し、表 2 にまとめた。

○優先順位 1：今回実施した試験管内試験結果が「作用が認められた」であった物質。

○優先順位 2：既存知見の動物試験及び疫学的調査等の結果が、「作用が認められた」又は「作用が認められた及び作用が認められなかった」であり、今回実施した試験管内試験結果が「作用が認められなかった」であった物質。

○優先順位 3：既存知見の動物試験及び疫学的調査等の結果が、「作用が認められなかった」又は「得られなかった」であり、今回実施した試験管内試験結果が「作用が認められなかった」であった物質。

表1 第1段階生物試験実施の基本的な考え方（作用ごとの優先順位付け）（案）

既存知見		第1段階試験管内試験の結果	第1段階生物試験優先順位	
試験管内試験の結果	動物試験及び疫学的調査等の結果			
P	P	P	1	
		N	2	
		P	1	
		N	2	
	P及びN	P及びN	P	1
			N	3
		N	P	1
			N	3
得られなかった		P	1	
得られなかった		N	3	
P及びN	P	P	1	
		N	2	
		P	1	
		N	2	
	P及びN	P及びN	P	1
			N	3
		N	P	1
			N	3
得られなかった		P	1	
得られなかった		N	3	
N	P	P	1	
		N	2	
		P	1	
	P及びN	P及びN	N	2
			実施対象としていない	
		N	実施対象としていない	
得られなかった		P	1	
得られなかった		N	2	
得られなかった	P	P	1	
		N	2	
	P及びN	P	1	
		N	2	
	得られなかった		実施対象としていない	—
得られなかった		実施対象としていない	—	

P：作用が認められた

N：作用が認められなかった

表2 第1段階生物試験実施の基本的な考え方（作用ごとの優先順位付け）の集約（案）

既存知見		第1段階試験管内試験の結果	第1段階生物試験優先順位
試験管内試験の結果	動物試験及び疫学的調査等の結果		
P/P及びN/N/得られなかった	P/P及びN	P	1
		N	2
	N/得られなかった	P	1
		N	3

P：作用が認められた

N：作用が認められなかった

(3) 試験の実施について（案）

表3に試験管内試験結果を示し、表4に第1段階試験群として実施する生物試験の優先順位案を示した。

優先順位1（今回実施した試験管内試験結果が「作用が認められた」であった物質）とした物質のうち、「1. 第1段階生物試験の選定について」の「(4) 今後の対応」に基づき、当面は、試験法が確立している作用（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）の以下の4物質について、第1段階生物試験を実施する。

○エストロゲン様作用の有無について確認するためにメダカ短期繁殖試験(TG229)を実施する物質：エストロン及びダイアジノン

○抗エストロゲン様作用の有無について確認するためにメダカ短期繁殖試験(TG229)を実施する物質：シアナジン及びフェニトイン

(参考)

メダカを用いた魚類短期繁殖試験法

魚類短期繁殖試験 (OECD TG229) は、成熟したメダカを雌雄混合で試験物質に 21 日間ばく露し、ばく露期間中の産卵状況並びにばく露終了時の生存個体の肝臓中ビテロゲン濃度及び二次性徴を調べる試験法である。

馴化							試験物質による暴露(日)																				
6	5	6	4	3	2	1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
産卵状態の確認							産卵数(受精卵数、未受精卵数)の計数 死亡・一般症状																				

↑
暴露開始

↑
暴露終了(暴露個体の測定・分析)



エンドポイント

- ・産卵状態(産卵数、受精率、受精卵数)
- ・肝臓中ビテロジェニン濃度
- ・二次性徴
- ・生殖腺組織(オプション:実施せず)

- ・全長、体重
- ・肝臓、生殖腺重量(HSI、GSI)
- ・肝臓中ビテロジェニン濃度
- ・二次性徴(尻鰭乳頭状突起)

表3 第1段階試験群として実施した試験管内試験結果

	検出可能な作用						
	メダカエストロゲン受容体 α レポーター遺伝子試験		メダカアンドロゲン受容体 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 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
	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
信頼性評価第1回							
エストロン	P	—	—	—	—	—	—
2,4,6-トリプロモフェノール	■N	N	—	—	—	—	—
2,4-トルエンジアミン	N	—	—	N	—	—	—
p-ジクロロベンゼン	N	N	—	N	—	—	—
N,N-ジメチルホルムアミド	N	—	—	N	—	—	—
ヒドラジン	N	N	N	N	—	—	—
フェンチオン	—	N	N	N	—	—	—
信頼性評価第2回							
カルバリル	N	N	—	P	■N	N	—
カルボフラン	N	—	—	P	—	—	—
シアナジン	—	P	—	—	—	—	—
ジウロン	■N	N	—	P	—	■N	—
ジクロロボス	■N	—	■N	N	—	—	—
ジクロロプロモメタン	N	N	N	P	—	—	—
ダイアジノン	P	N	N	P	—	—	—
フェニトイン	—	P	N	—	—	P	—
フェニトロチオン	—	—	N	P	—	—	—
ペルフルオロオクタン酸	N	N	N	P	—	N	—

P：作用が認められた

N：作用が認められなかった

■：既存知見（試験管内試験）で十分であるため、試験管内試験を実施しない（N：作用が認められなかった）。

—：現時点では試験管内試験を実施しない。

表3 第1段階試験群として実施する生物試験の優先順位（案）

	検出可能な作用						
	メダカエストロゲン受容体 α レポーター遺伝子試験		メダカアンドロゲン受容体 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 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
	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
信頼性評価第1回							
<u>エストロン</u>	1	—	—	—	—	—	—
2,4,6-トリプロモフェノール	—	3	—	—	—	—	—
2,4-トルエンジアミン	2	—	—	2	—	—	—
<u>p</u> -ジクロロベンゼン	2	2	—	2	—	—	—
<i>N,N</i> -ジメチルホルムアミド	2	—	—	2	—	—	—
ヒドラジン	2	2	2	2	—	—	—
フェンチオン	—	2	2	2	—	—	—
信頼性評価第2回							
カルバリル	2	3	—	1	—	3	—
カルボフラン	2	—	—	1	—	—	—
<u>シアナジン</u>	—	1	—	—	—	—	—
ジウロン	—	3	—	1	—	—	—
ジクロルボス	—	—	—	2	—	—	—
ジクロロプロモメタン	2	2	2	1	—	—	—
<u>ダイアジノン</u>	1	2	2	1	—	—	—
<u>フェニトイン</u>	—	1	3	—	—	1	—
フェニトロチオン	—	—	3	1	—	—	—
ペルフルオロオクタン酸	2	2	2	1	—	2	—

—：現時点では試験管内試験を実施しない。

図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

(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)

第1段階 (内分泌系に対する作用の有無を確認)

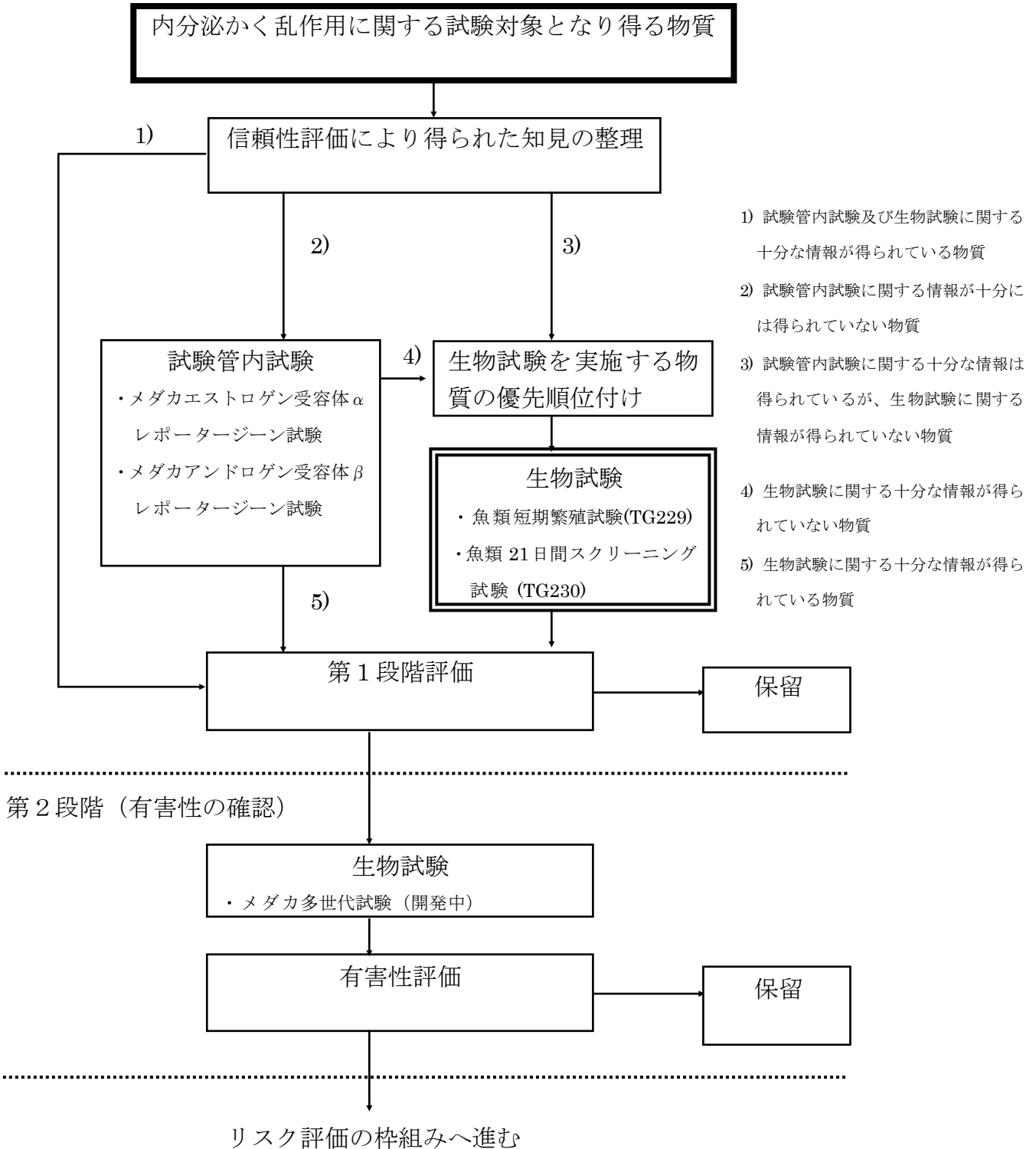
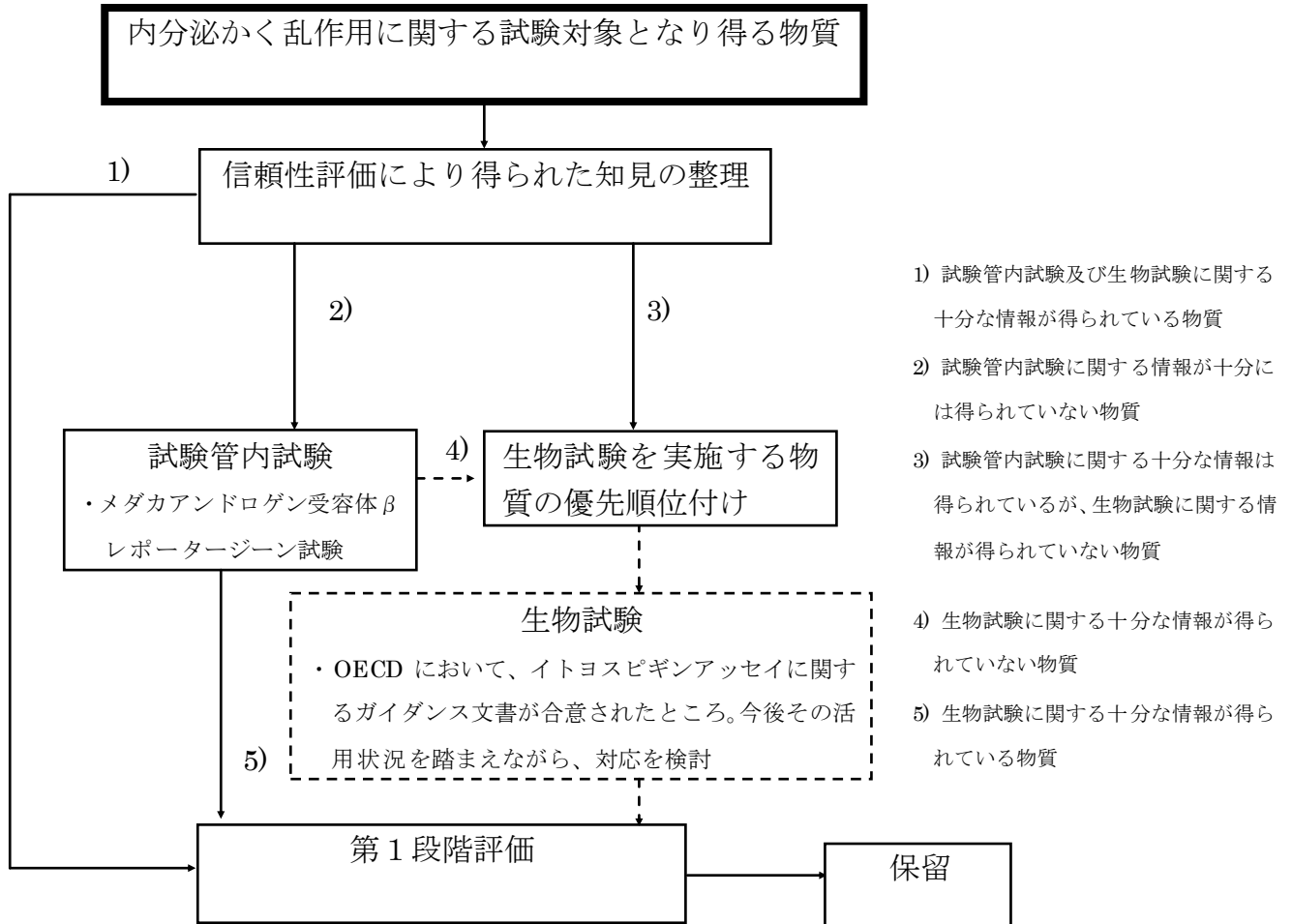
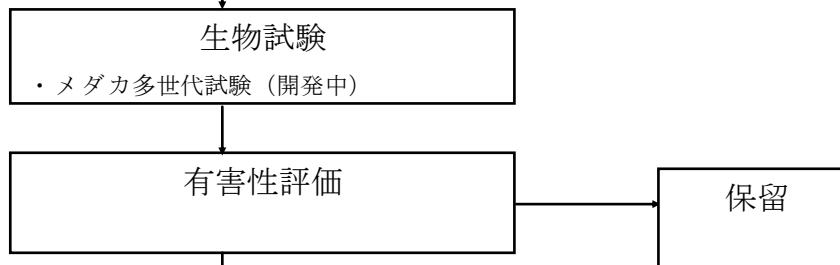


図2 内分泌かく乱作用の有害性評価の枠組み
 生殖に及ぼす影響
 (抗アンドロゲン様作用、等)

第1段階 (内分泌系に対する作用の有無を確認)



第2段階 (有害性の確認)

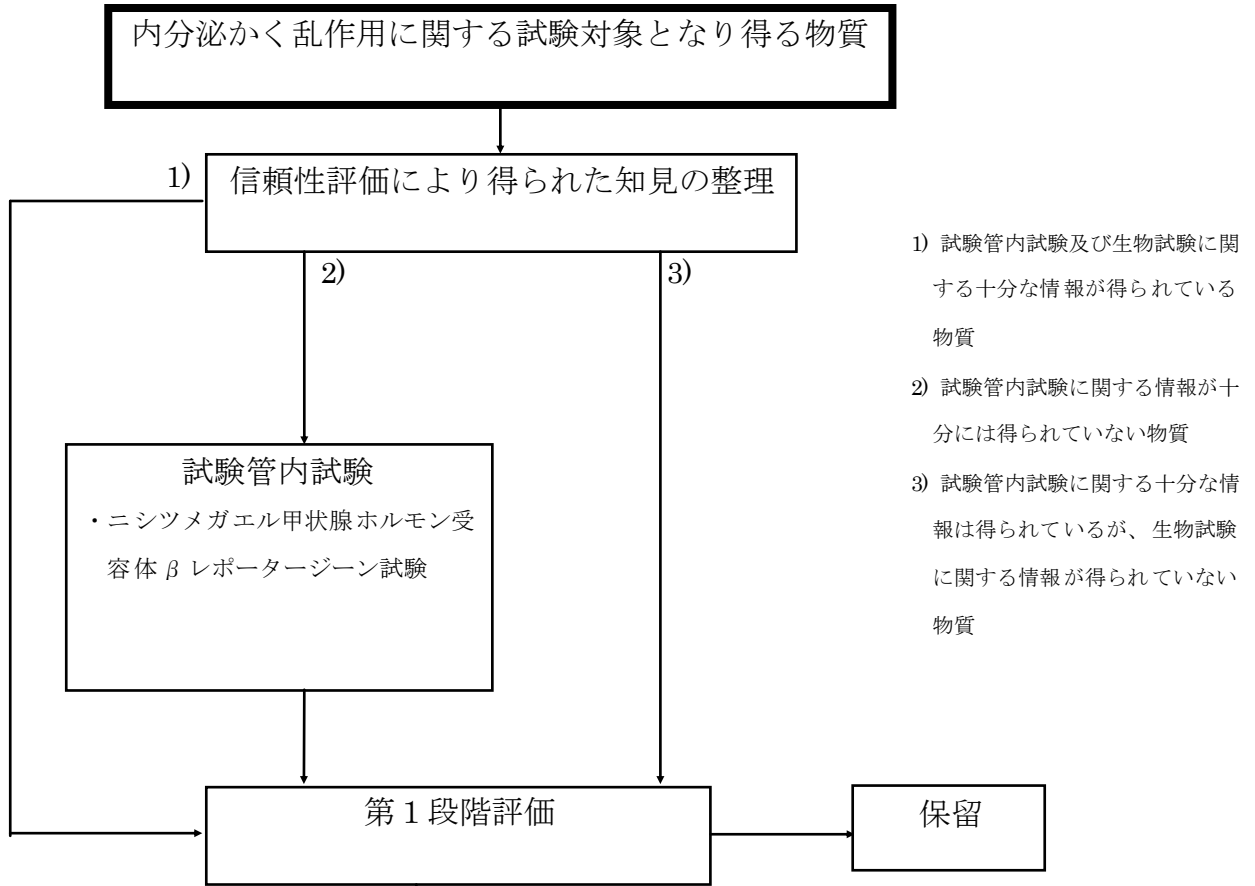


リスク評価の枠組みへ進む

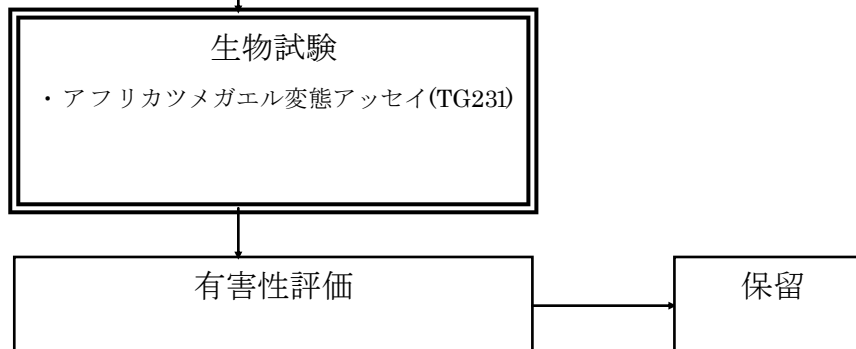
図3 内分泌かく乱作用の有害性評価の枠組み
甲状腺に及ぼす影響

(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)

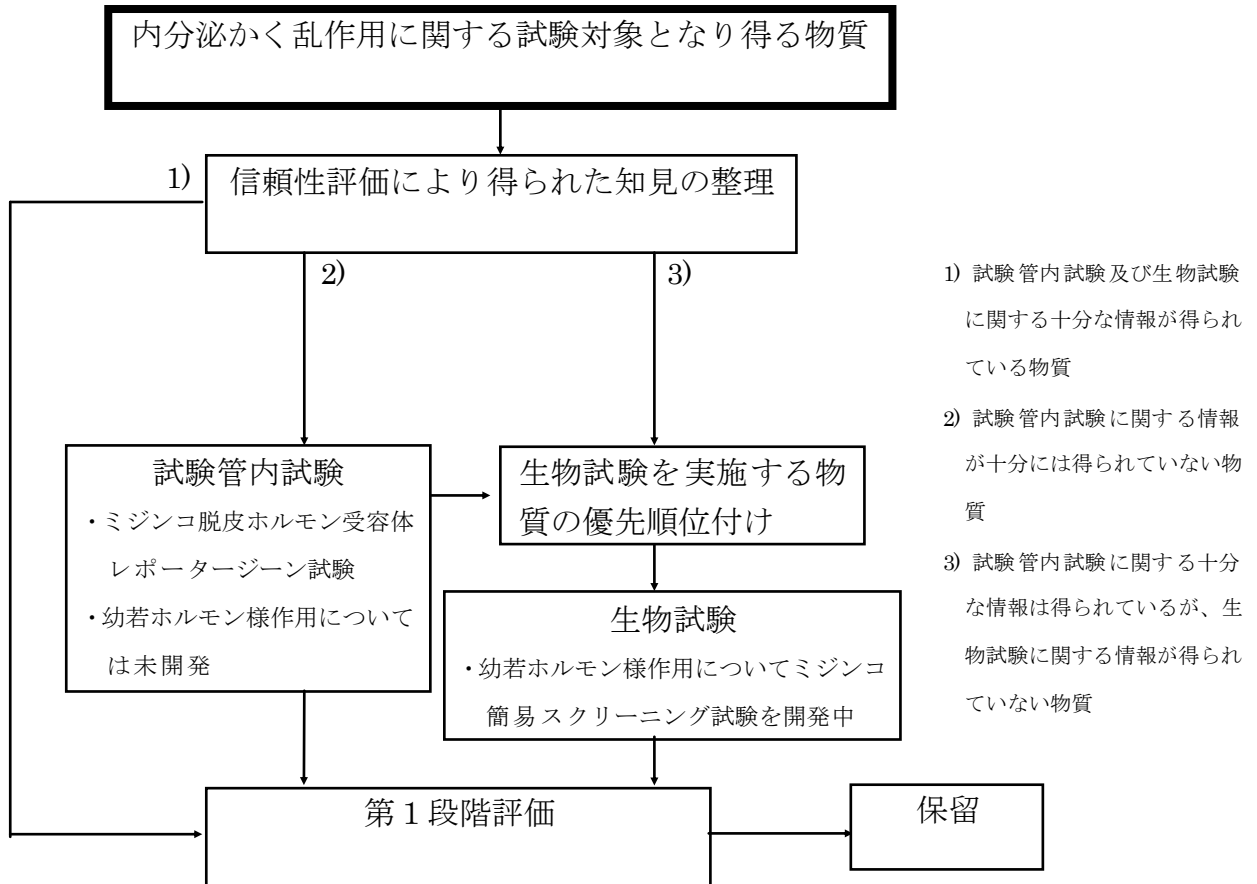


リスク評価の枠組みへ進む

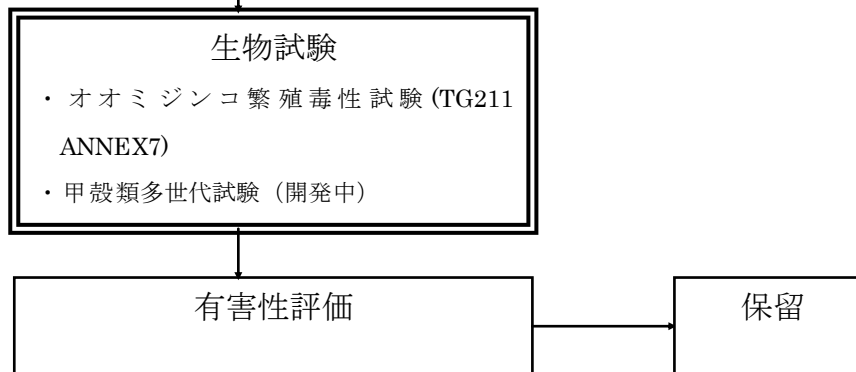
図4 内分泌かく乱作用の有害性評価の枠組み
成長に及ぼす影響

(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)



リスク評価の枠組みへ進む