

平成 26 年度第 1 段階生物試験の実施について(案)

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

信頼性評価第 3 回から第 5 回において対象とした 7 物質について第 1 段階試験管内試験を実施した。

既存知見及び実施した第 1 段階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第 1 段階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：今回実施した第 1 段階試験管内試験結果において「作用が認められた」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において「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、今回実施した第 1 段階試験管内試験結果が「作用が認められなかった」物質。

○優先順位 3：動物試験及び疫学的調査等の知見が「得られなかった」物質、又は既存知見の動物試験及び疫学的調査等の結果において「作用が認められなかった」であり、今回実施した第 1 段階試験管内試験結果が「作用が認められなかった」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)

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	動物試験及び疫学的調査等		
結果 P	結果 P	P	1
		N	2
	結果 P 及び N	P	1
		N	2
	結果 N	P	1
		N	3
	知見が得られなかった	P	1
		N	3
結果 P 及び N	結果 P	P	1
		N	2
	結果 P 及び N	P	1
		N	2
	結果 N	P	1
		N	3
	知見が得られなかった	P	1
		N	3
結果 N	結果 P	P	1
		N	2
	結果 P 及び N	P	1
		N	2
	結果 N	実施対象としていない	—
	知見が得られなかった	実施対象としていない	—
知見が得られ なかった	結果 P	P	1
		N	2
	結果 P 及び N	P	1
		N	2
	結果 N	実施対象としていない	—
	知見が得られなかった	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

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	動物試験及び疫学的調査等		
結果 P/結果 P 及び N/結果 N/知見が得られなかった	結果 P/結果 P 及び N	P	1
		N	2
	結果 N/知見が得られなかった	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

(1)表 3 に第 1 段階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 (今回実施した第 1 段階試験管内試験結果が「作用が認められた」物質)とした物質のうち、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)について反応が認められた 2 物質(4-ヒドロキシ安息香酸メチル及びダイアジノン)のうち、EC₅₀ 値が得られている 4-ヒドロキシ安息香酸メチルについて、第 1 段階生物試験を実施する候補とする。

優先順位1であった物質のメダカ ER α レポータージーンアッセイの結果

	ダイアジノン		4-ヒドロキシ安息香酸メチル	
	PC ₁₀ 値(M)	RP (%)	EC ₅₀ 値(M)	RP (%)
H23	1.0×10^{-5}	0.00021	—	—
H25	—	—	7.0×10^{-5}	0.00038

RP: 17 β エストラジオールに対する相対比活性

(2)第 1 段階試験管内試験として採用したメダカ ER α レポータージーンアッセイを開発する際に SPEED'98 における検討の結果として「メダカに対し内分泌かく乱作用を有すると推察された」3 物質(4-ノニルフェノール(分岐型):NP、4-*t*-オクチルフェノール:OP 及びビスフェノール A:BPA)について平成 20 年度から平成 22 年度において同アッセイ

を実施した。その結果として、比較的低い EC_{50} 値において比較的高い相対比活性が得られていた。これらの物質についても第 1 段階生物試験を実施する候補とする。

メダカ ER α レポータージーンアッセイの結果(平成 20～22 年度日英共同研究での検討結果)

	17 β エストラジオール(陽性対照)		ビスフェノール A		4-ノニルフェノール(分岐型)		4- <i>t</i> -オクチルフェノール	
	EC_{50} 値(M)	RP (%)	EC_{50} 値(M)	RP (%)	EC_{50} 値(M)	RP (%)	EC_{50} 値(M)	RP (%)
H20	1.766×10^{-10}	100	2.2×10^{-7}	0.080	3.6×10^{-8}	0.49	3.5×10^{-8}	0.50
H21	1.8×10^{-10}	100	6.0×10^{-7}	0.030	5.6×10^{-8}	0.32	—	—
H22	3.3×10^{-10}	100	4.9×10^{-7}	0.067	—	—	—	—

RP: 17 β エストラジオールに対する相対比活性

H20 の BPA、NP、OP については、報告書記載の RP (%) から EC_{50} 値を算出した。

(3) メダカ短期繁殖試験(TG229)を実施する物質の候補：4-ヒドロキシ安息香酸メチル、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

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3回							
りん酸トリフェニル	P	N	—	N	—	—	—
信頼性評価第4回							
アトラジン	N	N	N	P	N	N	N
シマジン	■N	N	—	—	—	—	—
デカブロモジフェニルエーテル	N	N	—	P	N	N	—
信頼性評価第5回							
2,4-ジニトロフェノール	—	—	—	—	—	N	—
4-ヒドロキシ安息香酸メチル	P	N	—	—	—	—	—
フェノール	—	N	—	P	—	—	—

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、第1段階試験管内試験を実施しない(N：作用が認められなかった)。—：対象外

表 4 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							
エストロン	1 済	—	—	—	—	—	—
2, 4, 6-トリブロモフェノール	—	3	—	—	—	1	—
2, 4-トルエンジアミン	2	—	—	2	—	—	—
p-ジクロロベンゼン	2	2	—	2	—	—	—
N, N'-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	—	—	—
シアナジン	—	1 済	—	—	—	—	—
ジウロン	—	3	—	1	—	—	—
ジクロロボス	—	—	—	2	—	—	—
ジクロロプロモメタン	2	2	2	1	—	—	—
ダイアジノン	1	2	2	1	—	—	—
フェニトイン	—	1 済	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	—
フェノバルビタール	2	2	2	2	2	2	—

済：第 1 段階生物試験について実施済み

—：対象外

	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3回							
アクリルアミド	—	—	2	2	—	—	—
アラクロール	2	■N	—	2	2	2	—
2,4-ジクロロフェノキシ酢酸(2,4-D)	3	■N	2	—	—	2	—
テトラブロモビスフェノールA	2	3	■N	2	2	2	—
ナフタレン	■N	■N	2	—	—	—	—
モリネート	—	2	2	2	—	—	—
りん酸トリフェニル	1 済	3	—	2	—	—	—
信頼性評価第4回							
2,6-ジ- <i>tert</i> -ブチル-4-メチルフェノール(BHT)	3	■N	—	3	—	—	—
1-ナフトール	1 済	—	—	2	■N	3	—
4- <i>tert</i> -ペンチルフェノール	1 済	■N	—	1	—	—	—
メソミル	3	3	—	2	—	—	—
アトラジン	2	2	2	1	2	2	2
シマジン	■N	3	—	—	—	—	—
デカブロモジフェニルエーテル	2	2	—	1	2	2	—

済：第1段階生物試験について実施済み

—：対象外

	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5回							
2,4-ジニトロフェノール	—	—	—	—	—	3	—
4-ヒドロキシ安息香酸メチル	1	3	—	—	—	—	—
フェノール	—	3	—	1	—	—	—

済：第1段階生物試験について実施済み

—：対象外

*抗アンドロゲン作用を検出するための第1段階試験管内試験については、試験結果の再現性について再検証中である。

*抗甲状腺ホルモン様作用を検出するための第1段階生物試験については、現在開発中である。

(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ジェニン濃度及び二次性徴を調べる試験法である。

