

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。

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．各試験の令和元年度の成果及び令和２年度の実施予定について

２．１．幼若メダカ抗アンドロゲン作用検出試験(JMASA)

令和元年度は、試験法の妥当性の検証を目的とする抗アンドロゲン作用に関して陰性と推察される物質(クロモリン)を用いた検証試験、試験法の再現性の検証を目的とする抗アンドロゲン作用の陽性物質(フェニトロチオン)及び試験法の抗アンドロゲン作用以外の作用への適用性の検証を目的とするフルコナゾール(トリアゾール系抗真菌剤)を用いた検証試験を実施した。

また、EXTEND2016 の枠組みの下で実施する際の参考となる知見の収集等を目的として、EXTEND2016 の枠組みで実施した第１段階試験管内試験において抗アンドロゲン作用を有することが推察された物質(マンネブ)を用いた検証試験を実施した。

令和２年度は、試験法の再現性の検証を目的として、抗アンドロゲン作用の陽性物質(２物質)及び陰性物質(１物質)を用いて検証試験を実施する。

また、令和元年度に引き続き、第１段階試験管内試験の結果から抗アンドロゲン作用を有することが推察された物質(１物質)を用いた検証試験を実施する。

２．２．ミジンコ幼若ホルモン作用短期検出試験(JHASA)

令和元年度は、OECD テストガイドライン化に向けて国際リングテストを(フランス及びノルウェーの試験機関が参加)を実施した。

また、OECD (VMG-eco)において指摘を受けた水温や水の硬度等のノンケミカルストレスに対する本試験法の応答に関する情報を得るための検証試験を実施した。

令和2年度は、本試験法の OECD でのテストガイドライン化に向けて、過年度に実施したリングテスト（国内の5試験機関及び海外の2試験機関が参加）の結果等を取りまとめた報告書を OECD へ提出する。

また、本試験法の抗幼若ホルモン様作用への適用性（化学物質の抗幼若ホルモン様作用を検出する試験法の開発）について検討する。

2. 3. ミジンコ脱皮ホルモン作用検出試験

令和元年度は、既存文献等に基づいて検討した試験プロトコル（試験法の改良案）について、キチン合成阻害剤（ジフルベンズロン）及び脱皮ホルモン受容体に対する作用を持つことが知られている物質（テブフェノジド）を用いた検証試験を実施した。

令和2年度は、引き続き、脱皮ホルモン受容体に対する作用を持つ物質（脱皮ホルモン受容体のアゴニスト及びアンタゴニスト）等を用いて検証試験を実施し、試験プロトコルの妥当性の検証及び精緻化を進める。

2. 4. 両生類試験（両生類変態試験(OECD TG231、AMA)及び幼生期両生類成長発達試験(OECD TG241、LAGDA))

令和元年度は、両生類変態試験について、EXTEND2016 の枠組みの下で実施する際に参考となる知見の収集等を目的として、既存文献で抗甲状腺ホルモン様作用を有することが示唆されている物質（テトラブロモビスフェノール A）を用いた検証試験を実施した（資料1－2参照）。

令和2年度は、前年度に実施した両生類変態試験において試験生物の変態に有意な影響を及ぼすことが示唆される結果が得られたことから、EXTEND2016 の枠組みの下で実施する際に参考となる知見の収集等を目的として、テトラブロモビスフェノール A を用いて幼生期両生類成長発達試験(LAGDA)を実施する。

なお、第1段階試験管内試験の結果として抗甲状腺ホルモン作用が認められたのは以下の3物質であり、第1段階生物試験(AMA)の候補物質となり得ると考えられた。

2,4,6-トリブロモフェノール(IC_{50} 値= $4.6 \times 10^{-5}M$)、ベンゾフェノン-2(IC_{50} 値= $7.9 \times 10^{-5}M$)、フェニトイン(IC_{30} 値= $6.3 \times 10^{-5}M$)

2. 5. ミジンコ幼若ホルモン受容体レポータージーン試験

令和元年度は、ミジンコ幼若ホルモン作用短期検出試験(JHASA)の試験物質(幼若ホルモン作用の陽性物質)を用いた検証試験を実施して、過年度に検討した試験プロトコルについて妥当性及び有用性等を確認した。

また、これらの成果を踏まえて、試験プロトコルを精緻化した。

なお、令和2年度は、本試験法に関する検証試験等の実施予定はない。

2. 6. その他

(1) Rapid Androgen Disruption Adverse Outcome Reporter Assay(RADAR Assay)

令和元年度は、OECD のリングテストの一環として、本試験法のリード国(フランス及び英国)より提案されたプロトコルに準じて、アンドロゲン作用の陽性物質(キャリブレーション試験用の1物質を含めて3物質)、抗アンドロゲン作用の陽性物質(キャリブレーション試験用の1物質を含めて3物質)及びアンドロゲン系に対して不活性を推察される物質(4物質)を用いた検証試験を実施した。

なお、令和2年度は、本試験法に関する検証試験等の実施予定はない。

令和元年度に実施した検証試験については、リード国においてリングテストの結果を取りまとめてOECDへ報告する予定である。

(2) 第1段階試験管内試験

令和元年度は、令和元年度又は過年度にJMASA及びその他の魚類及び両生類試験(魚類短期繁殖試験(FSTRA)、AMA、LAGDA等)の検証試験に用いられた物質について、幅広く基礎的データや知見を収集することを目的として、既知の作用以外の作用を対象にメダカ $ER\alpha$ 、 $AR\beta$ 及びニシツメガエル $TR\beta$ を用いるレポータージーン試験を実施した。

令和2年度は、EXTEND2016の枠組みの下で実施する第1段階評価等において参考となる知見の収集等を目的として、第1段階生物試験が実施されている物質について、これまでに試験が実施されていない作用を対象としてメダカ $ER\alpha$ 及び $AR\beta$ を用いるレポータージーン試験を実施する。

(3) 検証試験結果のとりまとめ

これまでに実施した各種作用の陽性物質等を用いた検証試験の結果(FSTRA及びレポータージーン試験等)、EXTEND2016の枠組みの下で実施された第1段階試験の結果等について、論文化(公表)することも視野に取りまとめる。

表 1 EXTEND2010 及び EXTEND2016 における試験法開発の進捗状況

新たな進捗状況について下線を付した。

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	◎メダカでの魚類短期繁殖試験(OECD TG229) ◎メダカでの 21 日間魚類試験(OECD TG230) の 試験結果が既存の報告等により得られた場合には、 その試験結果を参照する。	◎メダカ拡張 1 世代繁殖試験(OECD TG240, MEOGRT) 検証試験実施中
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	◎メダカでの短期繁殖試験(OECD TG229) ◎メダカでの 21 日間魚類試験(OECD TG230) の 試験結果が既存の報告等により得られた場合には、 その試験結果を参照する。	◎メダカ拡張 1 世代繁殖試験(OECD TG240, MEOGRT) 検証試験実施中
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	◎メダカ拡張 1 世代繁殖試験(OECD TG240, MEOGRT) 検証試験実施中
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) 検証中	◎幼生期両生類成長発達試験(OECD TG241, LAGDA) 検証中
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作用短期検出試験	◎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