

## 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. 各試験の平成 29 年度の実施結果及び平成 30 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(仮称)

##### (1)平成 29 年度の実施結果

平成 29 年度は、試験法の妥当性及び再現性等の検証を目的として、魚類に対する抗アンドロゲン作用が疑われる物質(ビクロゾリン)、抗アンドロゲン作用以外でオスの二次性徴の発達に影響を及ぼすことが考えられるエストロゲン作用物質(エストロン) 及び抗アンドロゲン作用を示さないと推察される陰性物質(ドデシル硫酸ナトリウム、塩化亜鉛)を用いて検証試験を実施した。

その結果、ビクロゾリンを用いた試験(ばく露濃度：64.0、200、640 $\mu$ g/L)では、二次性徴の発達にばく露濃度に依存的な低下がみられ、64.0 $\mu$ g/L 以上の全濃度において対照区との間に有意差が検出された。

エストロンを用いた試験(設定ばく露濃度：100、320、1,000、3,200ng/L)では、100ng/L 以上の全濃度においてオス個体に二次性徴(尻びれの乳頭状小突起)の発現がみられなかった。

また、ドデシル硫酸ナトリウムを用いた試験(ばく露濃度：1.00、3.16、10.0mg/L)では、10.0mg/L において対照区と比較して二次性徴の発達に有意な低下がみられたが、ドデシル硫酸ナトリウムの毒性によって成長が低下(遅延)した結果、二次性徴の発達が低下(遅延)した可能性が示唆された。

一方、塩化亜鉛を用いた試験(ばく露濃度：60.0、120、240、480 $\mu$ g/L)では、二次性徴の発達にばく露濃度に依存的な低下がみられ、240 $\mu$ g/L以上で対照区との間に有意差(有意な増加)が検出されたが、その原因は不明であった。

ビクロゾリンあるいはエストロンでの試験結果から、本試験法の妥当性及び再現性が確認された。

一方で、ドデシル硫酸ナトリウムでの試験では、試験物質の毒性による成長の遅延に伴い二次性徴の発達遅延(低下)がみられる可能性が示唆され、試験結果の解釈(成長遅延の影響)あるいは成長のばらつきを抑える試験条件の検討等が必要と考えられた。

## (2) 平成 30 年度の実施予定

平成 30 年度は、平成 29 年度に引き続き、OECD でのガイダンスドキュメント化を進めるために、試験法の妥当性及び再現性等に関する検証を行うことを目的として、魚類に対する抗アンドロゲン作用が疑われる物質(フェニトロチオン、リニューロン)及び抗アンドロゲン作用以外の作用物質(ケトコナゾール、17 $\beta$ トレンボロン(検討中))を用いて検証試験を実施する。

## 2. 2. 両生類変態試験(OECD TG231、AMA)

### (1)平成 29 年度の実施結果

平成 29 年度は、ドデシル硫酸ナトリウムを用いた検証試験(ばく露濃度:1.0、3.2、10mg/L)を実施した。

その結果、10mg/Lにおいて、ばく露 21 日後の体重及び後肢長に対照区と比較して有意な増加がみられた。

一方で、10mg/Lについては、ばく露 21 日後の個体の甲状腺組織に有意な変化はみられなかった。

したがって、体重及び後肢長の増加については、試験物質の視床下部一下垂体—甲状腺軸(HPT軸)に対する作用でないと考えられた。

### (2) 平成 30 年度の実施予定

実施しない。

## 2. 3. 幼生期両生類成長発達試験(OECD TG241、LAGDA)

### (1)平成 29 年度の実施結果

実施していない。

## (2) 平成 30 年度の実施予定

EXTEND2016 における評価の枠組みにおいて、化学物質の甲状腺に対する影響に関する第 2 段階生物試験として採用されている幼生期両生類成長発達試験について、試験法の妥当性の検証及び知見の収集を目的として、平成 29 年度に両生類変態試験(AMA)の検証試験を実施したドデシル硫酸ナトリウムを用いて検証試験を実施する。

なお、幼生期両生類成長発達試験については、テストガイドライン(OECD TG231) では生殖腺が発達する時期(NF stage 62 到達から 10 週間後) までを試験期間としているが、EXTEND2016 では、甲状腺に対する影響の評価を目的に実施することから、上記の検証試験の試験期間は、甲状腺に関わるエンドポイント測定までとする。

## 2. 4. ミジンコ幼若ホルモン受容体レポータージーン試験

### (1)平成 29 年度の実施結果(概要)

主に試験法の開発及び検証を目的としてミジンコに対して幼若ホルモン様作用を示すと推察される農薬等の化学物質を用いた試験を実施した。

## (2) 平成 30 年度の実施予定

幼若ホルモン様物質及び幼若ホルモン類似物質等(ファネルソン酸(E,E)-メチル、幼若ホルモンⅢ、フェノキシカルブ、ピリプロキシフェン、メトプレン、ヒドロプレン)を用いて試験を実施する。

## 2. 5. ミジンコ幼若ホルモン短期スクリーニング試験

### (1)平成 29 年度の実施結果

化学物質の無脊椎動物に対する内分泌かく乱作用(幼若ホルモン様作用) を調べる試験法として、既存のオオミジンコ繁殖試験(OECD TG211) において仔虫の性別判定を追加して行う方法が開発され、テストガイドライン(OECD TG211) の ANNEX 7 として公表されているが、同手法は試験期間が長く試験難度が高いため、スクリーニングのための新たな簡易試験法を開発を進めている。

ミジンコ幼若ホルモン簡易スクリーニング試験法は、抱卵個体の短期ばく露を行い、2~3 腹目の仔虫性比に基づいて、試験物質の幼若ホルモン様作用をスクリーニングする手法である。

平成 29 年度は、試験法の妥当性等の検討及び知見の収集を目的に、オス仔虫

を誘導する可能性が考えられるフェニルプロペン類(イソオイゲノール、アセチルオイゲノール、ジヒドロオイゲノール、エストラゴール、*trans*-アネトール、サフロール)を用いて検証試験を実施した。

その結果、エストラゴール、*trans*-アネトール及びサフロールの3物質に関して、オス仔虫の誘導がみられ、フェニルプロペン類がミジンコでオスを誘導する可能性が示唆されたが、一方で、すべてのフェニルプロペンがオスを誘導するわけではないことが明らかとなった。

## (2) 平成30年度の実施予定

平成30年度は、平成29年度に引き続き、試験法の妥当性等の検討及び知見の収集を目的に、フェニルプロペン類(4-アリルピロカテコール、ジエネストロールジアセタート、*trans*-ベンジルイソオイゲノール、マグノール、プロペニルグアエトール、ホノキオール)を用いて検証試験を実施する。

## 2. 6. ミジンコ脱皮ホルモン作用検出試験

### (1) 平成29年度の実施結果

実施していない。

### (2) 平成30年度の実施予定

化学物質の脱皮ホルモン様作用のスクリーニングを目的とする試験法の確立に向けて、ミジンコの試験生物としての妥当性や有用性等を検討するために既存の知見及び情報等の収集を行う。

さらに他の甲殻類(例えばヨコエビ等)について、当該試験法利用の可否について情報を収集する。

## 2. 7. オオミジンコ繁殖試験(OECD TG211 ANNEX7)

### (1) 平成29年度の実施結果

EXTEND2016における評価の枠組みでは、化学物質の無脊椎動物の成長に対する影響を調べる第2段階の生物試験法としてオオミジンコ繁殖試験(OECD TG211 ANNEX 7)を採用している。

本試験法については、オス仔虫の誘導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評価できる試験法であるが、化学物質の脱皮ホルモン様作用の評価への適用性については検証されていない。

そこで、平成29年度は、節足動物における脱皮ホルモンの一つである20-ヒ

ドロキシエクジソンを用いて検証試験を実施した。

その結果、20-ヒドロキシエクジソン(ばく露濃度:10、32、100、320、1,000 $\mu\text{g/L}$ )に関して、繁殖影響(産仔数の低下)が生じるばく露濃度と脱皮に対する影響(脱皮回数の低下)が生じるばく露濃度は同程度であり、オス仔虫の誘導はみられなかったことから、脱皮ホルモン様作用の評価では、繁殖に対する有害性のためにTG211は有用であるものの、ANNEX 7の適用は必ずしも必要でないことが示唆された。

## (2) 平成 30 年度の実施予定

平成 30 年度は、平成 29 年度に引き続き、ミジンコの脱皮に影響を及ぼす懸念がある化学物質に対する本試験法の有効性等を検証するために、昆虫に対するキチン合成阻害作用が知られている化学物質(ジフルベンズロンを検討中)を用いて検証試験を実施する。

## 2. 8. ミジンコ多世代試験

### (1)平成 29 年度の実施結果

ミジンコ多世代試験については、主に日米二国間協力の下で合意した化学物質を用いて試験法の開発及び検証を進めてきたが、これまでにミジンコ類(オオミジンコあるいはニセネコゼミジンコ)に対して明確な継世代影響を示した物質はなかった。

平成 29 年度は、既存文献においてニセネコゼミジンコを用いた 4 世代繁殖試験で継世代影響が報告されているデキサメタゾンを用いて検証試験を実施した(試験生物にはニセネコゼミジンコを使用)。

試験結果に関して、種々の方法(二元配置分散分析、対数ロジスティック回帰曲線の比較(有意差検定)、IC<sub>x</sub>の比の比較)による判定方法の検証を行った結果、デキサメタゾンについては、親ミジンコがばく露された場合に産仔数が低下することが示唆された。

ただし、過年度の検討では、1 回の試験で継世代影響が示唆されても、その後の追試験で再現性が得られなかった化学物質も多く、デキサメタゾンについても再現性の確認が必要と考えられた。

### (2) 平成 30 年度の実施予定

実施しない。

表 1 EXTEND2010 及び EXTEND2016 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 $\alpha$ レポーター遺伝子試験	◎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、その試験結果を利用する。	◎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 $\beta$ レポーター遺伝子試験	◎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、その試験結果を利用する。	◎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 $\beta$ レポーター遺伝子試験	○幼若メダカ抗アンドロゲン作用検出試験(仮称)	◎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 $\beta$ レポーター遺伝子 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 レポーター遺伝子試験	○ミジンコ幼若ホルモン短期スクリーニング試験	◎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 レポーター遺伝子試験	△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、▽検討中