

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 30 年度の実施結果及び平成 31 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)

(1)平成 30 年度の実施結果

平成 30 年度は、試験法の妥当性、有効性、適用性及び再現性等の検証を目的として、抗アンドロゲン作用の陽性物質（フェニトロチオン、リニュロン）、抗アンドロゲン作用以外の作用物質（ケトコナゾール、17 β トレンボロン）を用いて検証試験を実施した。

なお、リニュロンについてはイトヨ（トゲウオ）を用いた試験（Androgenised Female Stickleback Screen）では抗アンドロゲン作用が検出されたと報告されているが、これまでにメダカを用いた JMASA では抗アンドロゲン作用は検出されていない。

その結果、フェニトロチオンを用いた試験(ばく露濃度：29.9、93.0、275 μ g/L)では、雄の二次性徴(尻びれの乳頭状小突起)の発達にばく露濃度に依存的な低下がみられ、93.0 μ g/L 以上の濃度において対照区との間に有意差が検出された。

リニュロンを用いた試験(設定ばく露濃度：47.7、151、497 μ g/L)では、全濃度において雄の二次性徴の発達について対照区との間に有意差は検出されなかった。

また、ケトコナゾールを用いた試験(ばく露濃度：87.7、159、413、881 μ g/L)

では、雄の二次性徴(尻びれの乳頭状小突起)の発達にばく露濃度に依存的な低下がみられ、159 μ g/L 及び 413 μ g/L の濃度において対照区との間に有意差が検出された。

一方、17 β -トレンボロンを用いた試験(ばく露濃度:7.87、37.3、125、346ng/L)では、雄の二次性徴の発達には有意な差が認められなかったが、雌の尻びれに乳頭状小突起がばく露濃度に依存的な増加がみられ、37.3ng/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。

フェニトロチオ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。

(2) 平成 31 年度の実施予定

抗アンドロゲン作用の陽性物質による検証については、フルタミド、ビンクロゾリン、フェニトロチオン及びリニューロンでの検証試験を 2 機関で実施したことから、新たな物質による試験は必要ないと考えられる。一方で、OECD VMG-eco では、できれば 3 機関(可能であれば 1 機関は日本以外)で検証試験(リングテスト)を実施するべきである、との指摘もあることから、上記 4 物質のうち 2 物質程度(例えば、フルタミドとフェニトロチオン)について、第 3 の機関による検証試験の実施を検討する必要がある。

2. 2. 幼生期両生類成長発達試験(OECD TG241、LAGDA)

(1)平成 30 年度の実施結果

平成 30 年度は、試験法の妥当性、有効性及び適用性等の検証を目的として、ドデシル硫酸ナトリウム(陰性物質を想定)を用いた検証試験を実施した。

その結果、甲状腺組織に関する各典型症例(甲状腺の肥大又は萎縮、濾胞上皮細胞の肥大及び過形成)について、試験物質濃度に依存的な増加や低下はなく、有意差は認められなかった。

(2) 平成 31 年度の実施予定

EXTEND2016 の枠組みで実施する両生類を用いる試験法(AMA、LAGDA)については、今年度までに、甲状腺ホルモン作用の陽性物質、甲状腺ホルモンの合成・代謝に対する阻害作用物質を用いた検証試験が実施されているが、抗甲状腺ホルモン作用(甲状腺ホルモン受容体のアンタゴニスト)での試験は実施していない。

以上を踏まえて、平成 31 年度は、抗甲状腺ホルモン作用の陽性物質での AMA を実施する。

2. 3. ミジンコ幼若ホルモン受容体レポーター遺伝子試験

(1)平成 30 年度の実施結果(概要)

平成 30 年度は、試験法の確立に向けた妥当性及び有用性等の検証を目的として、ミジンコ幼若ホルモン簡易スクリーニング試験で陽性の結果が得られた化学物質での試験を実施した。

(2) 平成 31 年度の実施予定

ミジンコ幼若ホルモン受容体レポーター遺伝子試験について、ミジンコ幼若ホルモン短期スクリーニング試験で陰性の結果が得られている化学物質も含めて試験を実施し、試験プロトコルを精緻化する。

2. 4. ミジンコ幼若ホルモン作用短期検出試験(JHASA)

(1)平成 30 年度の実施結果

平成 30 年度は、OECD での TG 化に向けて、試験法の妥当性、有効性及び再現性等の検証を目的として、国内の 5 試験機関を対象にリングテストを実施した。また、試験法の適用性等を検証するために6種のフェニルプロペン類を用いた実証試験を実施した。

リングテストの結果として、すべての試験機関において、陽性対照物質のジオフェノランでオスの誘導が確認でき、陰性対照物質の 3,5-ジクロロフェノールではオスの誘導が確認されなかったことから、JHASA は幼若ホルモン作用の検出に有効であることが確認された。ただし、試験機関によって対照区及び助剤対照区の産仔数にばらつきがみられたため、検出力を確保するためには、何頭以上の産仔があることが望ましいなど、今後留意する必要があることが分かった。

実証試験の結果として、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、ホオノキの成分であるマグノロールではオスの誘導が確認できなかった。一方、4-アリルピロカテコール、香料やリラックスサプリメントとして使用されているホノキオール、タバコ香料に使用されているプロペニルグアエトールの 3 種類でオスの誘導が確認された。マグノロールと同じくホオノキの成分であり構造が類似しているホノキオールではオスの誘導があった。

(2) 平成 31 年度の実施予定

平成 31 年度は、海外から参加表明のあった 2 機関（フランス、ノルウェー）についても、最終的な参加の意向が確認でき次第、試験物質を配付し、同様の

試験を行う予定である。そして、すべての試験結果をとりまとめ、OECD の VMG-eco において国内外のリングテストについて結果を報告する。

フェニルプロペン類がオスを誘導する可能性が示唆されたが、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になった。今後は引き続き入手可能なフェニルプロペンでの検討を進め、構造による共通点を見出していけるよう情報を収集する。また、VMG-eco の専門家から、温度、全硬度の違いなどによるノンケミカルストレスによってオス仔虫が誘導されないか指摘があったことから、これについて検証していく。

2. 5. ミジンコ脱皮ホルモン作用検出試験

(1)平成 30 年度の実施結果

平成 30 年度は、化学物質の脱皮ホルモン作用を評価する試験法の確立に向けて、既存のミジンコ繁殖試験 (OECD TG211 Annex 7) について、脱皮ホルモン作用試験法として適用性等を検討するために、ジフルベンズロン (キチン合成阻害剤) を用いた試験を実施した。

その結果として、オス仔虫は誘導されなかった。脱皮回数に対する NOEC や IC_x は、繁殖 (産仔数) に対する値より高く、感受性が低いことが分かった。

したがって、脱皮ホルモン様物質の第 2 段階試験としては Annex 7 を除いた TG211 が妥当であると考えられた。

(2) 平成 31 年度の実施予定

文献収集結果に基づき、第 1 段階試験法開発に向けた実験的な検討を行う必要がある。過年度業務で実施した、オス仔虫を用いて脱皮回数をエンドポイントとした試験では、試験の簡易性と検出力に課題があったことから、脱皮作用に特異的な遺伝子や酵素などのバイオマーカーを活用した検出試験についても検討する。

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 α 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 レポーター遺伝子試験 | ○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