

## 試験法の開発について(案)

### 1. 生態影響評価のための基本的枠組み

令和4年10月に公表されたEXTEND2022では、基本的にEXTEND2016の考え方を踏襲して、「内分泌かく乱作用に関する試験対象物質となり得る物質」として選定された化学物質の生態影響について、以下の2段階で試験及び評価を進めていくとしている。

#### 第1段階(内分泌系に対する作用の有無の確認)

- 化学物質の内分泌系に対する作用の有無を確認するため、試験管内試験と比較的簡易かつ短期間で実施可能な生物試験により、第1段階試験群を構成する。
- 化学物質の内分泌かく乱作用に関連する報告の信頼性評価において、「内分泌かく乱作用に関する試験対象物質となり得る」とされた物質を試験対象の候補とする。
- 既存の知見及び第1段階試験群の結果より、第1段階評価を実施する。

#### 第2段階(有害性の確認)

- 内分泌かく乱作用による有害性を確認するため、長期間の暴露による生物試験により、第2段階試験群を構成する。
- 第1段階評価において「内分泌系に対する作用がある」と認められた物質を、第2段階試験群を実施する候補とする。

※ 第1段階評価で「内分泌系に対する作用がある」と認められなかった物質については、内分泌系に対する作用を必ずしも否定することはできないが、効率的かつ効果的に評価を進める観点から、現時点では「保留」とする。

### 2. 生態影響評価のための試験法について

EXTEND2022の内分泌かく乱作用の有害性評価の枠組みでは、生殖、甲状腺及び成長に及ぼす影響(作用)を対象として試験並びに評価を行う。第1段階の試験は、試験管内試験と簡易(短期)な生物試験で構成される。第2段階の試験は長期の確定試験である。第1段階と第2段階で一貫した評価を行うため、各影響に関して同一生物種(魚類:メダカ、両生類:ツメガエル)、無脊椎動物:ミジンコ)を用いることを基本としている。試験法については、可能な限り既存の試験法を組み合わせる試験群を構築することを前提として、OECDでテストガイドライン化されている試験法を優先し、別途、新たに開発が必要な試験法に関する検討を進めている。

- 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)
- 生殖に及ぼす影響(抗アンドロゲン様作用)
- 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)
- 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)

### 3. 試験法の概要及び開発／確立の状況について

EXTEND2016 における試験法の開発状況は表1のとおりであり、引き続き EXTEND2022 においても主に以下の試験法に関して開発を進めている。

- 抗アンドロゲン様作用： 幼若メダカ抗アンドロゲン作用検出試験
- (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短期スクリーニング試験
- (抗)脱皮ホルモン様作用： ミジンコ脱皮ホルモン作用検出試験

### 4. 令和4年度の検討内容

令和4年度は、試験法の確立に向けて、以下に示す試験法に関する検討を実施した(各試験法の概要は別添1に示す)。

#### (1) 魚類試験

##### ① 幼若メダカ抗アンドロゲン作用検出試験

OECD での試験法のガイダンスドキュメント化に向けて、HdrR 系統について日齢と体サイズ関係及び体サイズと二次性徴の形成時期との関連性についてのデータを取得するとともに、HdrR 系統を用いた JMASA 実施可能性及び最適暴露開始時期について検討した。また、JMASA 暴露開始時期における雌雄判定法について検証した。

##### ② メダカ拡張1世代繁殖試験(MEOGRT)の改訂に関する検討

OECDWNT に出席して SPSF の承認に努め、統計解析手法について専門家にヒアリングして適宜修正した。また、DNA の抽出方法について情報を収集した。

##### ③ Rapid Estrogen ACTivity In Vivo (REACTIV) assay

提案国であるフランス及び Watchfrog 社の依頼に応じて、試験実施した際に保存した試料について、化学分析のために発送した。また、昨年度実施した検証試験結果を確認するとともに、今年度の VMG-Eco(11月7、8日)で得られた専門家の意見、国内専門家の意見も踏まえて、必要に応じて追加の実験的検証を行い、提案国に情報を提供した。

##### ④ ゼブラフィッシュ拡張1世代繁殖試験(ZEOGRT)の検証

環境省請負業務「平成22年度化学物質の内分泌かく乱作用に関する試験法開発に係る業務」においてメダカ多世代試験が実施されたタモキシフェンクエン酸塩を試験物質として、検証試験(リングテスト)を実施した。

#### (2) 両生類試験

##### ① 幼生期両生類成長発達試験(LAGDA)の検証

両生類変態試験について、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、EXTEND2016 の枠組みで第1段階の試験管内試験として実施しているニシツメガエル甲状腺ホルモン受容体  $\beta$ (TR $\beta$ )レポータージーン試験で甲状腺ホルモン受容体に対するアンタゴニス

ト作用が示唆されている 2,4,6-トリブロモフェノールを用いて検証試験を実施した。

## ② 両生類変態試験法 (AMA) の検証

過年度に実施した AMA の検証試験において、試験生物の変態遅延について被験物質の影響による摂餌量の低下が原因である可能性が示唆されたが、摂餌量の変化が両生類の変態に与える影響はいまだ明らかにされていない。今後 EXTEND2022 の枠組みの下で第1段階の生物試験として実施する試験の評価等において参考とするため、給餌量の低下が各エンドポイントに与える影響についての知見を収集することを目的として4つの異なる給餌量で AMA を実施した。

## ③ 両生類変態試験法の統計手法の検証

OECD TG231 で推奨されている統計手法はひとつに確定されたものではなく、また用いる手法によっては解析結果に偽陰性が含まれる可能性がある。今後の EXTEND2022 の枠組みにおける AMA の実施に向けて、過年度に実施された検証試験の結果を踏まえて、試験結果の解釈や評価における課題等について整理した。

# (3) 無脊椎動物試験

## ① ミジンコ幼若ホルモン短期スクリーニング試験

専門家から意見があった殺虫剤などの農薬を含めた候補物質について、*in silico* 解析や *in vitro* の試験結果との関係性を考慮して検証試験を実施した。これらの結果について、過年度の検証結果も含めた検証レポートを作成して OECD の専門家会議に提出した。

## ② ミジンコ脱皮ホルモン作用検出試験法

ノルウェー水研究所 (NIVA) のグループの *in silico* スクリーニングによってアゴニストと同定された 34 物質 (表 3) より、Diacylhydrazine 構造を持つ物質から低血圧治療剤のミドドリン塩酸塩、Methylene- $\gamma$ -lactom 構造を持つ物質から殺ダニ剤のヘキシチアゾクス、Tetrahydro-quinoline 構造を持つ物質から抗がん剤のバタラニブニ塩酸塩を用いて検証試験を実施した。また、昨年度の試験物質 (クロラムフェニコール、メキシフェノジド、アミノピリン) をミジンコ脱皮ホルモン受容体レポータージーンアッセイに供して受容体転写活性を測定し、短期検出試験結果と合わせて脱皮ホルモン作用を評価した。

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

区分	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)	◎メダカ拡張1世代繁殖試験(OECD TG240, MEOGRT)
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) ◎メダカを用いた魚類21日間スクリーニング試験(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)
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	◎メダカ拡張1世代繁殖試験(OECD TG240, MEOGRT)
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)	◎幼生期両生類成長発達試験(OECD TG241, LAGDA)
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、▽不採用

(令和4年度第1回化学物質の内分泌かく乱作用に関する検討会 資料1-5より抜粋)

OECD TG211: Daphnia magna Reproduction Test

OECD TG229: Fish Short Term Reproduction Assay (FSTRA)

OECD TG230: 21-day Fish Assay: A Short-Term Screening for Oestrogenic and Androgenic Activity, and Aromatase Inhibition

OECD TG231: The Amphibian Metamorphosis Assay (AMA)

OECD TG240: Medaka Extended One Generation Reproduction Test (MEOGRT)

OECD TG241: The Larval Amphibian Growth and Development Assay (LAGDA)

## EXTEND2022 における内分泌かく乱作用に関する試験法の概要

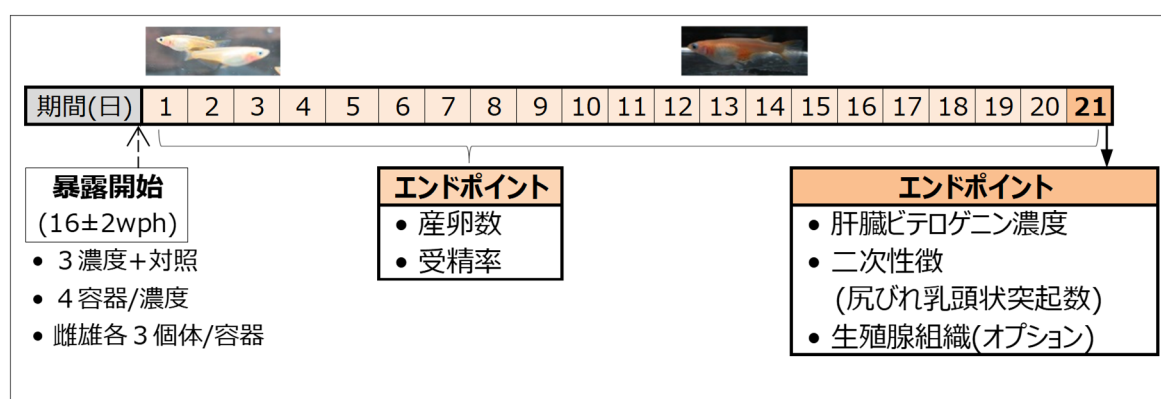
## (1) 生殖に及ぼす影響に関する試験(魚類試験)

魚類短期繁殖試験(OECD TG229: Fish Short Term Reproduction Assay, FSTRA)

FSTRA は、性的に成熟し繁殖可能な状態にある雌雄の成魚を試験生物とする。試験では、試験水槽にメス及びオス各 3 個体を収容し、21 日間にわたり試験物質(化学物質)による暴露を行う。暴露期間中、メスが産んだ卵を回収して産卵数及び受精率を調べる。また、暴露終了時に生存する個体について肝臓ビテロゲン濃度及び二次性徴(乳頭状突起を発現する尻びれの節板数)を測定する。本試験法については、化学物質のエストロゲン作用、抗エストロゲン作用、アンドロゲン作用、アロマトラーゼ阻害作用(ステロイド合成阻害作用)のほか、視床下部-下垂体-生殖腺系(HPG 軸)に対する作用も検出可能とされている。

FSTRA のテストガイドライン(TG229)は、2009 年(平成 21 年)に公表されているが、その後、日本より提案したメダカを試験生物とする場合の試験条件等が変更された改訂版が 2012 年(平成 24 年)に公表されている。FSTRA については、平成 22 年度より、日米二国間協力の下で試験法の妥当性及び有効性の検証、OECD への TG の修正提案に向けた検討が進められ、以降、平成 28 年度までに、EXTEND2010 の枠組み(第1段階評価)で参考とする知見の収集等を目的として、生殖に及ぼす影響に関わる内分泌かく乱作用(作用モード)の陽性物質(魚類等に対する作用が既知の物質)及び陰性物質を用いた検証試験が実施されている。

米国(US.EPA)の内分泌かく乱化学物質スクリーニング計画(EDSP)では、FSTRA をエストロゲン系(Estrogen pathway)及びアンドロゲン系(Androgen pathway)に関する Tier 1(スクリーニング)試験法として採用している。ただし、EDSP に適用される TG(OPPTS 890.1350)では、試験生物をファットヘッドミノー(4.5-6 か月齢)に限定し、エンドポイントには GSI 及び生殖腺組織を必須、血漿中性ステロイドホルモン濃度をオプションのエンドポイントとする点で OECD TG229 と異なる。

21 日間魚類試験(OECD TG230: 21-day Fish Assay: A Short-Term Screening for Oestrogenic and Androgenic Activity, and Aromatase Inhibition, 21D-FA)

21D-FA は、エンドポイントに繁殖に関わるエンドポイント(産卵数、受精率等)を含まないこと以外、FSTRA とほぼ同様の試験法である。21D-FA のテストガイドライン(TG 230)は、FSTRA と同様に、2009 年(平成 21 年)に公表されている。21D-FA については、TG 化の過程で、エストロゲン、

アンドロゲン、抗アンドロゲン及びアロマトーゼ阻害作用の陽性物質及び陰性物質を用いた検証試験(リングテスト)が実施されているが、EXTENDの枠組みで検証試験は実施していない。

### 幼若メダカ抗アンドロゲン作用検出試験 (Juvenile Medaka Anti-Androgen Screening Assay, JMASA) (開発中: OECD へ GD 化のプロジェクトを提案)

JMASAは、受精後42日齢(6週齢)前後の二次性徴(尻びれの乳頭状小突起)が発現前の幼若期メダカを試験生物とする。試験では、各水槽に7個体を収容し、28日間(4週間)にわたり試験物質(化学物質)による暴露を行う。暴露終了時に、エンドポイントとして二次性徴の発現状況(乳頭状小突起を発現している節板数)を調べる。エンドポイントの解析は、性決定遺伝子(dmy遺伝子)に基づき決定する遺伝的雌雄ごとに行う。化学物質の抗アンドロゲン作用については、遺伝的オスにおける二次性徴発現の低下から評価する。遺伝的メスにおける二次性徴の発現から試験物質のアンドロゲン作用も検出できる。また、必須のエンドポイントではないが、肝臓中のピテロゲニン濃度を測定した場合には、試験物質のエストロゲン作用、抗エストロゲン作用及びアロマトーゼ阻害作用を検出することも可能である。

JMASAについては、2016年(平成28年)に、日本よりOECDへGD化に関するプロジェクトを提案し、承認されている。TG化に向けて試験法の検証及び精緻化を目的として抗アンドロゲン作用の陽性物質、エストロゲン作用の陽性物質、陰性物質等を用いて検証試験を実施している。



### メダカ拡張一世代繁殖試験 (OECD TG240: Medaka Extended One Generation Reproduction Test (MEOGRT))

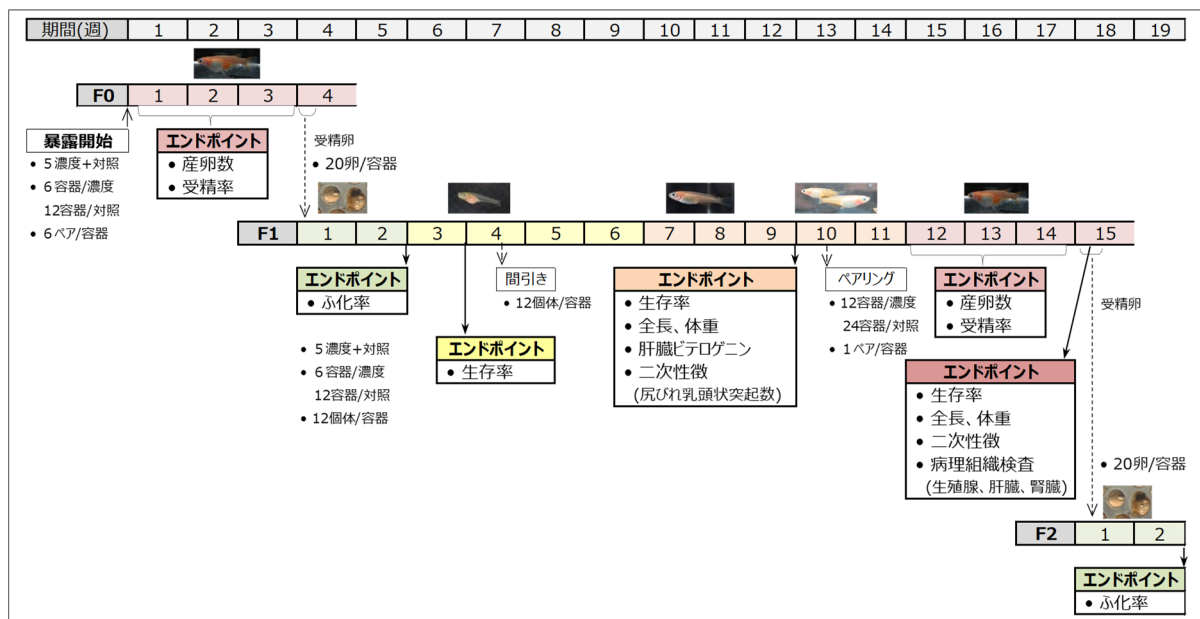
MEOGRTは、メダカを試験生物種とする19週間の試験である。試験では、性的に成熟し繁殖可能な状態にある雌雄の成魚を試験生物(F0世代)として試験物質(化学物質)による暴露を開始する。F0世代のエンドポイントは産卵状況のみである。F0世代の暴露で得られた受精卵でF1世代(子世代)の暴露を開始する。F1世代では、エンドポイントとして、受精卵のふ化率、受精4週間までの生存率、受精後9~10週目(未成魚期)における生残率、成長(全長及び体重)、ピテロゲニン(mRNA又は蛋白発現量)、二次性徴(尻びれの乳頭状突起)及び外見上の性比、初回産卵までの時間、受精12~14週目における産卵状況(産卵数及び受精率)及び受精15週後(繁殖ステージ終了後)の生存個体における生残率、成長、二次性徴及び病理組織学的所見(生殖腺、肝臓、腎臓)を調べる。これらの個体については性決定遺伝子(dmy遺伝子)に基づき遺伝的性を確認し、遺伝的雌雄ごとにエンドポイントの解析を行う。また、F1世代の繁殖ステージで得られた受精卵でF2世代(孫世代)の暴露を行う。F2世代については、エンドポイントとしてふ化率のみ測定する。これらのエンドポイントに対する影響から、化学物質の内分泌かく乱作用のほか、致



死、成長及び繁殖に対する母体を通じた化学物質の経代影響を評価できると考えられる。

MEOGRT のテストガイドライン(TG240)は、2015 年(平成 27 年)に公表されている。MEOGRT については、2009 年(平成 21 年)に、日米両国が共同で OECD へメダカ多世代試験法(MMT)の TG 化に関するプロジェクトを提案し、日米二国間協力の下で開発が進められた。MMT については、平成 24 年度までに、日米両国により、エストロゲン、抗エストロゲン、アンドロゲン、抗アンドロゲン及びステロイド合成阻害作用の陽性物質を用いた検証試験が実施されている。MEOGRT に関して、OECD TG240 に準拠して実施された試験は、EXTEND2016 の枠組みで試験対象とされた物質(4-ノニルフェノール、ビスフェノール A、4-*t*-オクチルフェノール、エストロン)のみである。

米国 EDSP では、エストロゲン系及びアンドロゲン系の Tier 2 試験として MEOGRT を採用している。EDSP では、独自の TG(OCSP 890.2200)が適用されるが、この TG の規定は基本的に OECD TG240 と同じである。



## (2) 甲状腺に及ぼす影響に関する試験(両生類試験)

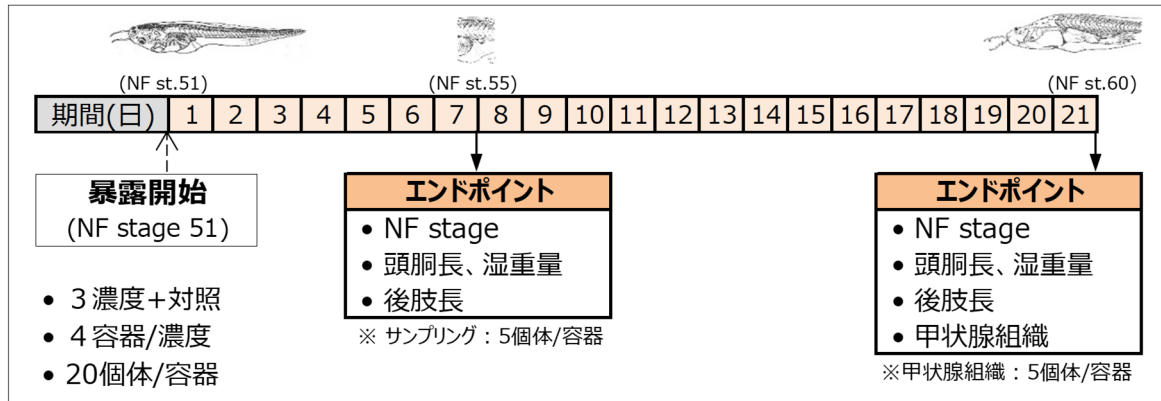
### 両生類変態試験(OECD TG231: The Amphibian Metamorphosis Assay, AMA)

AMA は、アフリカツメガエルの Nieuwkoop and Faber(NF) stage 51 の幼生を試験生物として、21 日間にわたる化学物質による暴露を行う。暴露開始から 7 日後に、一部の個体を取り上げて、発達段階(NF stage)の確認、頭胴長、後肢長及び体重の測定を行う。また、暴露終了時に生存する個体について、暴露 7 日後と同様のエンドポイントを調べるほか、一部の個体(5 個体/水槽)を対象に甲状腺組織を検査し、異常の有無及び重症度を調べる。本試験では、これらのエンドポイントの測定結果を基に、化学物質の甲状腺受容体を介した作用のほか、甲状腺ホルモンの生合成系、視床下部-下垂体-甲状腺系(HPT 軸)に対する作用を検出できるとされている。

AMA のテストガイドライン(TG231)は、2009 年(平成 21 年)に公表されている。AMA については、OECD による TG 化のためのリングテスト(Phase 1、2 及び 3 Validation)において、甲状腺ホルモン作用の陽性物質及び甲状腺系(甲状腺ホルモンの合成・代謝系)に対する阻害作用を持つ化学物質等を用いた試験が実施されている。また、EXTEND2010/2016 の枠組みでの適用性及び有効性の検証、第1段階評価で参考とする知見の収集等を目的として、平成 27 年度から甲状

腺に及ぼす影響に関わる内分泌かく乱作用の陽性物質及び陰性物質を用いた検証試験が実施されている。

米国 EDSP では、AMA を甲状腺系に対する Tier 1 のスクリーニング試験法として採用しており、適用される TG (OCSP 890.2200) の規定は、基本的に OECD TG231 と同じである。



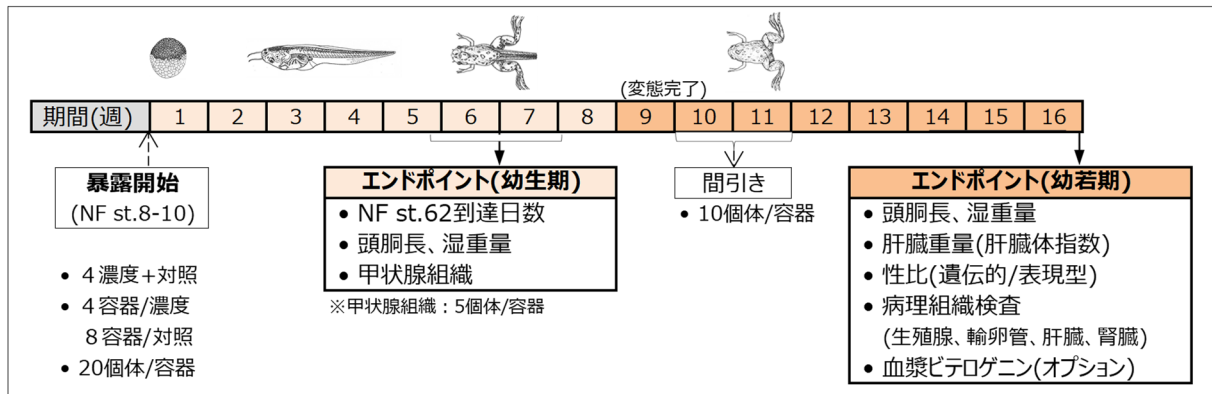
### 幼生期両生類成長発達試験 (OECD TG241: The Larval Amphibian Growth and Development Assay (LAGDA))

LAGDA は、アフリカツメガエルの NF stage 8~10 の幼生 (胚体) を試験生物として、約 16 週間にわたる化学物質 (試験物質) による暴露を行う。暴露期間中に、甲状腺に対する影響を調べるための幼生期のエンドポイントとして、各個体が NF stage 62 到達に要した日数を調べ、一部の個体について NF stage 62 における頭胴長及び体重の測定並びに甲状腺組織の検査を行う。すべての個体が NF stage 66 に達して変態を完了した時点で水槽内の個体数の調整 (間引き) を行い、以降、対照区における NF stage 62 到達日 (平均日数) から 10 週後まで暴露を継続する。また、暴露終了時に、幼若期のエンドポイントとして、成長 (頭胴長、体重)、肝臓体指数、性比 (遺伝的性比と表現型性比のギャップ) 及び主要な臓器 (生殖腺、輸卵管、腎臓、肝臓) を対象として病理組織学的検査を行う。これら幼若期のエンドポイントについては、遺伝的雌雄ごとに解析する。遺伝的性は、性決定遺伝子 DMW に基づいて判別する。LAGDA では、これらのエンドポイントから、甲状腺 (変態) に対する影響のほか、致死、成長及び生殖腺の発達に対する化学物質の影響を評価できると考えられる。ただし、EXTEND2010 の枠組みで LAGDA を使用する場合には、変態 (甲状腺系) に対する影響に関するエンドポイント測定までを試験期間とする。

LAGDA は、2015 年 (平成 27 年) にテストガイドライン (TG241) が公表されている。LAGDA については、日米二国間協力の下で、2009 年 (平成 21 年) に共同で OECD へ提出した SPSF に基づいて、ADGRA (Amphibian Development, Growth and Reproduction Assay) として開発が進められたが、2010 年に、日米間の合意を踏まえて SPSF が修正され、以降、LAGDA として開発が進められた。平成 24 年度までに日米両国で、LAGDA のプロトコルに基づいて、主にエストロゲン、アンドロゲン及び抗エストロゲン作用の陽性物質を用いて検証試験が実施されている。また、平成 25 年度以降、試験法の妥当性や有効性、EXTEND2010 の枠組みでの適用性の検討及び参考とする知見の収集等を目的として、甲状腺ホルモン作用の陽性物質及び甲状腺系 (甲状腺ホルモンの合成・代謝系) に対する阻害作用を持つ化学物質等を用いた検証試験が実施されている。

米国の EDSP では、甲状腺系の Tier 2 試験として LAGDA を採用しており、適用される US.EPA のテストガイドライン (OCSP 890.2300) の規定は基本的に OECD TG241 と同じである。





### ゼノパス自由胚甲状腺試験 (Xenopus Eleutheroembryo Thyroid Assay, XETA)

XETA は、甲状腺ホルモン応答遺伝子と GFP 遺伝子を導入(トランスジェニック)したアフリカツメガエルの幼生(NF stage 45-46)を試験生物とする。試験では、化学物質(試験物質)に 72 時間暴露し、暴露後に GFP の蛍光強度を測定し、甲状腺ホルモン受容体を介した作用を調べる。甲状腺ホルモン作用(アゴニスト作用)については試験物質のみで暴露する系、抗甲状腺ホルモン作用(アンタゴニスト作用)については、試験物質とトリヨードサイロニン(T3)に混合で暴露する系から得られた結果から評価するプロトコルが検討されている。リングテスト(Phase 1 及び 2)の結果から、甲状腺ホルモン作用は検出できるものの、甲状腺系(甲状腺ホルモンの合成・代謝系)に対する阻害作用を持つ化学物質に対する感度が低いことが指摘されている。

XETA については、2019 年(令和元年)にテストガイドライン(TG248)が公表されている。

### (3) 成長に及ぼす影響に関する試験(無脊椎動物試験)

#### オオミジンコ繁殖試験/アネックス 7: 仔虫の性別決定に関するガイダンス(OECD TG211: Daphnia magna Reproduction Test/ANNEX 7: Guidance for the identification of neonate sex)

オオミジンコ繁殖試験は、主に産仔数をエンドポイントとして化学物質の甲殻類(無脊椎動物)の繁殖に対する影響を調べる試験法であるが、産仔された幼体(仔虫)の性比(オスの発生)をエンドポイントとすることで、幼若ホルモン様作用を持つ化学物質の影響を評価できる。オオミジンコ繁殖試験のテストガイドライン(TG211)は、1998 年(平成 10 年)に公表され、2008 年に、日本提案の仔虫の性別決定に関するガイダンス(ANNEX 7)を追加した改訂版が公表されている。

#### ミジンコ幼若ホルモン簡易スクリーニング試験(Short-term Juvenile Hormone Activity Screening Assay using Daphnia magna, JHASA)(開発中: OECD へ TG 化プロジェクトを提案)

JHASA は、オオミジンコの抱卵個体を試験生物として、約 1 週間にわたり化学物質に暴露する。暴露後に生まれた仔虫について性比を観察し、オスの出現率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検出(スクリーニング)する。JHASA については、2016 年(平成 28 年)に日本より TG 化に関するプロジェクト提案(SPSF)を OECD に行い承認されている。

JHASA については、平成 23 年度から、試験法の有効性及び再現性等の検証を目的に、農薬や精油成分等でミジンコに対する幼若ホルモン作用が疑われる化学物質を用いた検証試験を実施している。また、OECD での TG 化に向けた検証の一環として国内及び国際的なリングテストを実施している。

### ミジンコ脱皮ホルモン作用検出試験(開発中)

EXTEND2010/2016 の枠組みで、成長に対する影響の第1段階生物試験に適用できる試験法が必要であることから、平成 26 年度より、試験法の検討に着手し、ミジンコの脱皮回数をエンドポイントとする評価法等が検討されたが、令和元年度までに試験デザインは確定していない。

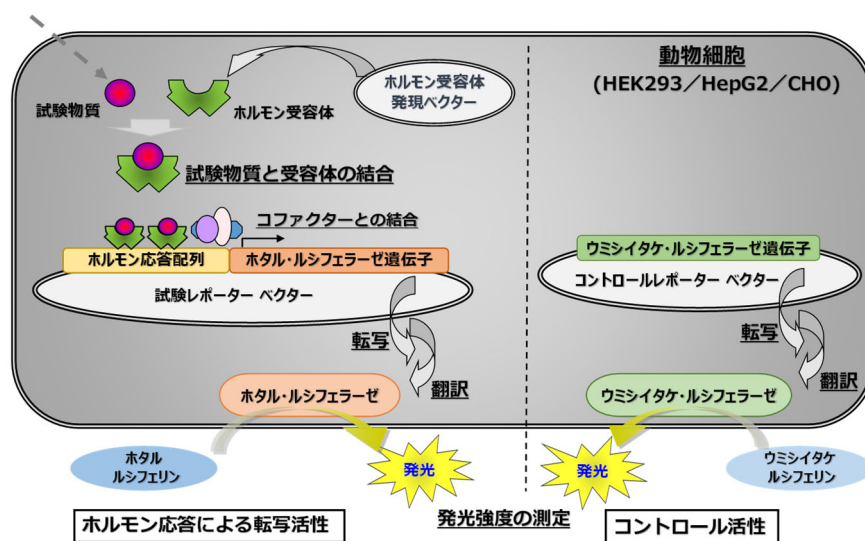
### ミジンコ多世代試験(Daphnids multi-generation test)(不採用)

ミジンコ多世代試験は、平成 22 年度から平成 25 年度まで、日米二国間協力の下で、欧米を中心に OECD で TG 化が検討されていたカイアシ類(コペポッド)を用いたフルライフサイクル試験及びアミ(ミシッド)を用いた二世代繁殖試験との比較検証を行いつつ試験デザインの検討を進めてきた。その後は、OECD への TG 化の提案も視野に試験法の開発を進めてきたが、平成 29 年度までに実施した検証試験の結果、ミジンコ類に対して多世代(経世代)影響を示す化学物質が見つからなかったことから、試験法開発については保留(中断)することとされた。

### (4) 生殖に及ぼす影響に関する試験管内試験

#### メダカのエストロゲン受容体及びアンドロゲン受容体を用いるレポータージーン試験

生殖に及ぼす影響に関する試験管内試験としては、動物細胞にホルモン受容体発現ベクター、試験レポーターベクター及びコントロールベクター等を一過的に導入する一過性発現細胞系のデュアル・ルシフェラーゼ・レポーターアッセイ法を基本原理とするメダカのエストロゲン受容体  $\alpha$  (ER $\alpha$ ) 及びアンドロゲン受容体  $\beta$  (AR $\beta$ ) を用いるレポータージーン試験法が開発されている。メダカ ER $\alpha$  及び AR $\beta$  を用いるレポータージーン試験は、第 2 期日英共同研究の成果を基に開発された試験法であり、それぞれ動物細胞として、HEK293(ヒト胎児腎細胞株)又は HepG2(ヒト肝癌由来細胞株)を用いる。エストロゲン作用あるいはアンドロゲン作用を調べるアゴニスト系試験では、メダカ ER $\alpha$  又は AR $\beta$  に対する転写活性化能を指標として試験物質の EC<sub>50</sub> を算出する。また、抗エストロゲン作用あるいは抗アンドロゲン作用を調べるアンタゴニスト検出系試験では、それぞれ試験系に陽性物質として 17 $\beta$  エストラジオール又は 11-ケトテストステロンを共添加し、陽性物質の転写活性に対する阻害作用として試験物質の IC<sub>50</sub> を算出する。メダカ ER $\alpha$  及び AR $\beta$  を用いるレポータージーン試験については、基礎的な知見の蓄積を目的として、平成 29 年度より、FSTRA 及び JMASA の検証に用いた陽性物質等について試験を実施している。



## (5) 甲状腺に及ぼす影響に関する試験管内試験

### ニシツメガエルの甲状腺ホルモン受容体を用いるレポーター遺伝子試験

甲状腺に及ぼす影響に関する試験管内試験としては、生殖に関する試験管内試験と同様に、一過性発現細胞系のデュアル・ルシフェラーゼ・レポーターアッセイ法を基本原理とするニシツメガエルの甲状腺ホルモン受容体  $\beta$  (TR $\beta$ ) を用いるレポーター遺伝子試験法が開発されている。ニシツメガエル TR $\beta$  レポーター遺伝子試験は、第 3 期日英共同研究の成果を基に開発された試験法であり、動物細胞として HepG2 を用いる。甲状腺ホルモン作用を調べるアゴニスト系試験では、ニシツメガエル TR $\beta$  に対する転写活性化能を指標として試験物質の EC<sub>50</sub> を算出し、抗甲状腺ホルモン作用を調べるアンタゴニスト検出系試験では、試験系に陽性物質として供添加するトリオードサイロニンの転写活性能に対する阻害作用として試験物質の IC<sub>50</sub> を算出する。ニシツメガエル TR $\beta$  レポーター遺伝子試験については、基礎的な知見の蓄積を目的として、平成 29 年度より、AMA 及び LAGDA の検証に用いた陽性物質等について試験を実施している。

## (6) 成長に及ぼす影響に関する試験管内試験

### ミジンコ脱皮ホルモン受容体レポーター遺伝子試験

成長に及ぼす影響に関する試験管内試験としては、生殖あるいは甲状腺に関する試験管内試験と同様に、一過性発現細胞系のデュアル・ルシフェラーゼ・レポーターアッセイ法を基本原理とするミジンコの脱皮ホルモン受容体 (EcR) を用いるレポーター遺伝子試験が開発されている。ミジンコ EcR レポーター遺伝子試験は、EXTEND2010 の基盤的研究の成果を基に開発された試験法であり、動物細胞として CHO (チャイニーズハムスター卵巣由来細胞株) を用いる。脱皮ホルモン作用を調べるアゴニスト系試験では、ミジンコ EcR に対する転写活性化能を指標として試験物質の EC<sub>50</sub> を算出する。抗脱皮ホルモン作用を調べるアンタゴニスト検出系試験については、理論的に実施可能であるが、これまで検証試験も含めて実施されていない。EXTEND2010 の下、平成 25 年度よりアゴニスト検出系試験を実施している。

### 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受容体レポーター遺伝子試験は、ミジンコ脱皮ホルモン受容体レポーター遺伝子試験と同様に、CHO を用いる一過性発現細胞系のデュアル・ルシフェラーゼ・レポーターアッセイ法を基本原理とする試験法である。ミジンコの幼若ホルモン受容体 (JhR) を用いる試験管内試験については、EXTEND2010 の基盤的研究の成果として、平成 25 年度までに、ミジンコの JhR 遺伝子 (Methoprene-tolerant) と Steroid receptor coactivator の部分配列を用いるツーハイブリッドルシフェラーゼアッセイ法 (THLA) が開発されたが、下流の遺伝子の試験物質による転写活性化を定量的に評価できないことから、幼若ホルモン応答配列を介した転写活性化を定量できるレポーター遺伝子試験法の開発が進められている。ミジンコ JhR レポーター遺伝子試験については、平成 28 年度に基本的なプロトコルが確立されたが、Fold Activation の最大値が低いことから、平成 29 年度に試験系に使用する幼若ホルモン受容体エレメントを改良し、改良された試験プロトコルについて、JHASA の結果を参考に幼若ホルモン作用の陽性物質を用いて検証試験を実施している。