

EXTEND2022 の内分泌かく乱作用の生態影響に係る試験法について

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。
- 既存知見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物質」とされた物質を、第1段階試験管内試験の対象候補物質とする。
- 第1段階試験管内試験結果が陽性であった物質について第1段階生物試験を実施する優先順位付けの対象物質とする。
- 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:アフリカツメガエル又はニシツメガエル、無脊椎動物:オオミジンコ)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、抗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

EXTEND における試験法の開発状況(令和 5 年 10 月時点)を表1に示した。以下の試験法に関して、プロトコルの検討又は OECD でのテストガイドライン化やガイダンスドキュメント化に向けた検討が進められている。ミジンコ幼若ホルモン短期スクリーニング試験(Short-term Juvenile Hormone Activity Screening Assay using *Daphnia magna* (JHASA))については、2024 年 4 月に開催された WNT (Working Group of National Coordinators of the Test Guidelines programme)会合において承認された(OECD TG253)。

- 抗幼若ホルモン様作用: ミジンコ幼若ホルモン短期スクリーニング試験(抗幼若ホルモン様作用検出系を開発中)
- (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 6 年度の検討内容

令和 6 年度は、魚類試験、両生類試験、無脊椎動物試験に関する検討を実施する(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

EXTEND2022 の枠組みのもとで実施している化学物質の甲状腺に及ぼす影響の評価に参考となる知見等を収集するため、RADAR アッセイ(OECD TG251)に供試する形質転換メダカ(*Spg1-gfp*)について、抗アンドロゲン幼生対照物質であるフルタミドを用いた検証試験を実施して NIES-R との感受性を比較することにより、*Spg1-gfp* メダカの幼若メダカ試験への適用可能性を検証する。

② 魚類胚を用いた内分泌かく乱化学物質検出試験法の検討

試験法の合理化及び動物福祉の観点から、生体ではなく胚を用いた試験法の開発が進められており、内分泌かく乱化学物質の検出試験法についても、形質転換胚を用いた簡易検出法が開発されている。New Approach Methodologies (NAMs)の一つとして、*in vitro* 試験の代替、又は *in vivo* の第 1 段階試験との間の試験として、また Weight of Evidence (WoE: 証拠の重み付け)の 1 つとして参照するなど、一定の利用可能性が考えられることから、第 1 段階試験管内試験で抗アンドロゲン作用が認められた物質であるプロシミドン及び酢酸クロルマジノンを用いた RADAR アッセイ(OECD TG251:Rapid Androgen Disruption Activity Reporter (RADAR) assay)を実施する。さらに、魚類短期繁殖試験(OECD TG229: Fish Short-Term Reproduction Assay (FSTRA))においてエストロゲン作用(候補:4-ノニルフェノール、ビスフェノール A)または抗エストロゲン作用が確認された物質を用いて、REACTIV アッセイ(OECD TG252: Rapid

Estrogen ACTivity *In Vivo* (REACTIV) assay)を実施し、EXTEND の枠組みにおける RADAR アッセイや REACTIV アッセイの利用可能性について検証する。

(2) 両生類試験

Larval Amphibian Toxicity Test (LATT)の検証

EXTEND2022 の枠組みのもとで実施している化学物質の甲状腺に及ぼす影響の評価に参考となる知見等を収集するため、Larval Amphibian Toxicity Test (LATT)の検証試験を実施し、各エンドポイントの感受性及び技術的課題等について検証する。

LATT は、AMA と同じく Nieuwkoop and Faber (NF) stage 51 の幼生を用いる試験である。試験終了は、変態が完了する NF stage 66 までの約 40 日間化学物質(試験物質)に暴露する試験法(暴露終了時の発生段階を固定する Fixed-stage design)であり、US. EPA が OECD のテストガイドライン化を計画している試験法である。

今年度は、米国が先行して LATT を実施しているイオパノ酸を試験物質として検証試験を実施し、米国と共同で各エンドポイントの感受性及び技術的課題等について検証する。

(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

今年度の OECD WNT 会合で JHASA の OECD テストガイドラインが承認されたことから、OECD ガイダンスドキュメント No. 150 における既存知見と JHASA の試験結果を合わせた解釈のシナリオについての整理を進める。また、EXTEND2022 での試験候補物質の選定方法について、*in silico* のドッキングシミュレーションの活用なども含めて検討する。

抗幼若ホルモン様作用スクリーニング試験については、JH 受容体アンタゴニスト候補物質を用いて、JH 受容体に対する転写活性の低下を確認し、オス仔虫誘導抑制の検証及び JH 生合成阻害剤の検出試験法案として、オス仔虫誘導が JH 生合成阻害剤候補物質により抑制されるかどうかを検証する。

② ミジンコ脱皮ホルモン作用検出試験法

ミジンコ脱皮ホルモン作用検出試験法案の妥当性と有効性を検証するため、脱皮ホルモン生合成阻害剤、幼若ホルモン受容体アゴニストを用いた検証試験を実施する。また、ミジンコ脱皮ホルモン受容体レポーター遺伝子アッセイにより、バタラニブ塩酸塩、ヘキシチアゾクス、ミドドリン塩酸塩の受容体活性を確認する。さらに、これまでの検証試験結果を用いて、有効な試験期間やエンドポイントについて検証する。

表1 EXTEND2010、EXTEND2016 及び EXTEND2022 における試験法開発の進捗状況
(令和5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3より引用し、赤を追記した)

表1 EXTEND2010、EXTEND2016 及び EXTEND2022 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 ータージーン試験	◎メダカを用いた魚類短期繁殖試験 (OECD TG229, FSTRA)	◎メダカ拡張1世代繁殖試験 (OECD TG240, MEOGRT)
アンドロゲン様作用 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	◎メダカを用いた魚類短期繁殖試験 (OECD TG229, FSTRA)	◎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 β レポータージーン試 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 ポータージーン試験	○ミジンコ幼若ホルモン簡易スクリーニング試験 (HASA) ◎OECD TG253	◎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

OECD TG211: *Daphnia magna* Reproduction Test, OECD TG229: Fish Short Term Reproduction Assay (FSTRA), OECD TG240: Medaka Extended One Generation Reproduction Test (MEOGRT), OECD TG231: The Amphibian Metamorphosis Assay (AMA), OECD TG241: The Larval Amphibian Growth and Development Assay (LAGDA), OECD GD379: Juvenile Medaka Anti-Androgen Screening Assay (JMASA)

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グニ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 へのテストガイドライン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 に適用されるテストガイドライン(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、エンドポイントとしては、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、テストガイドライン化の過程で、エストロゲン、アンドロゲン、抗アンドロゲン及びアロマタ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(OECD GD379: Juvenile Medaka anti-androgen screening assay (JMASA))

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、肝臓中のビ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ターゼ阻害作用を検出することも可能である。

JMASA は、2016 年(平成 28 年)に日本より OECD へガイダンスドキュメント化に関するプロジェクトを提案し、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、陰性物質等を用いた検証試験を実施して試験法を精緻化し、2023 年 4 月の WNT においてガイダンスドキュメントとして採択された。同年 7 月に OECD GD379 として試験法、GD380 でバリデーション結果が公開された。



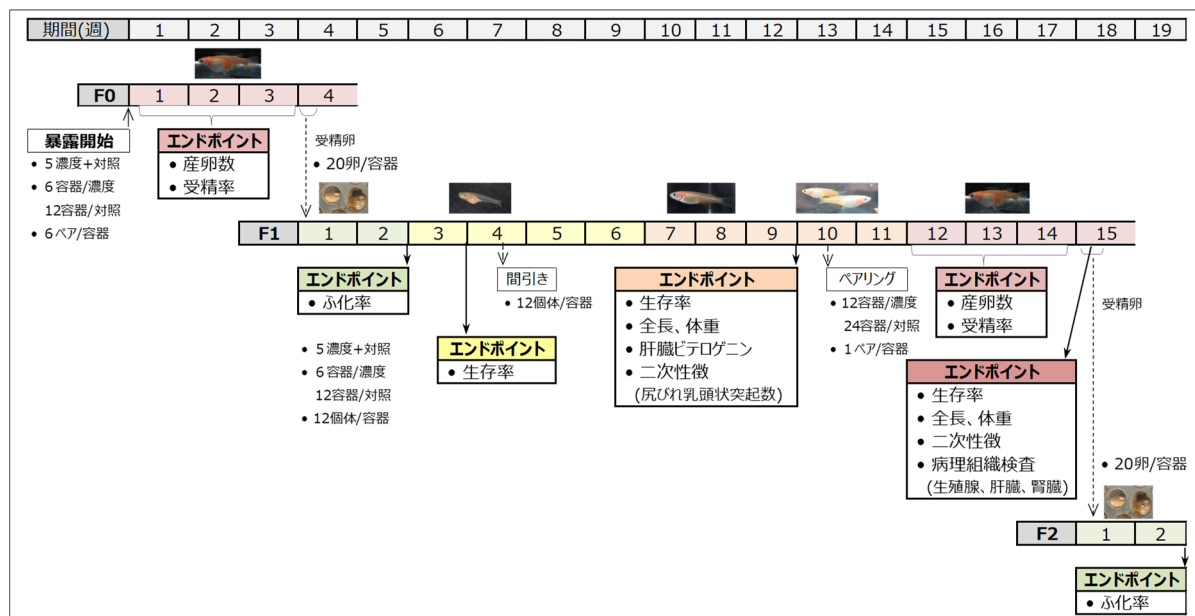
メダカ拡張一世代繁殖試験(OECD TG240: Medaka Extended One Generation Reproduction Test (MEOGRT))

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)、ビテロゲニン(mRNA 又はたんぱく質発現量)、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、受精後 12～14 週目における産卵状況(産卵数及び受精率)及び受精後 15 週目(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 ヘメダカ多世代試験法(MMT)のテストガイドライン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-tert-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、独自のテストガイドライン(OCSP 890.2200)が適用されるが、このテストガイドラインの規定は基本的に 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)

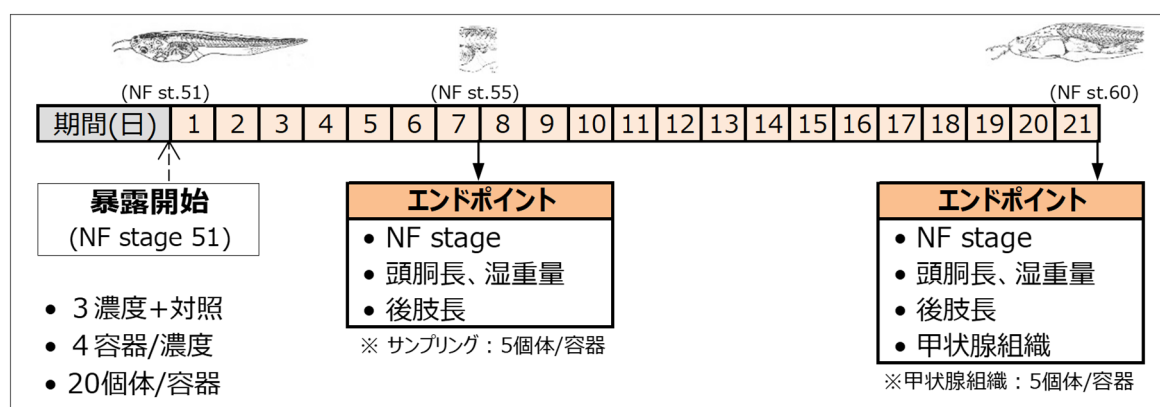
両生類変態試験(OECD TG231: The Amphibian Metamorphosis Assay (AMA))

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、発生段階(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に、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によるテストガイドライン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、EXTEND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Tier1のスクリーニング試験法として採用しており、適用されるテストガイドライン(OCSP 890.2200)の規定は、基本的にOECD TG231と同じである。



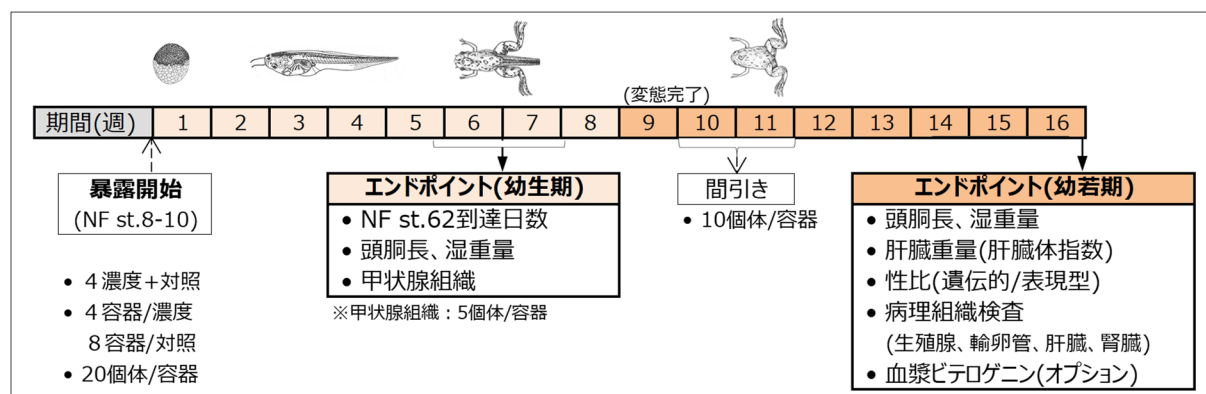
幼生期両生類成長発達試験(OECD TG241:The Larval Amphibian Growth and Development Assay (LAGDA))

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週間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、EXTEND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、EXTEND 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(OECD TG248: 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。

(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(OECD TG 253: Short-term Juvenile Hormone Activity Screening Assay using *Daphnia magna* (JHASA))

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。暴露後に産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)に日本よりテストガイドライン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 でのテストガイドライン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。2023 年(令和 5 年)、これまでの検討結果を取りまとめた検証レポートを OECD 事務局に提出し、VMG-Eco 専門家からのコメントに対応したテストガイドライン案及び検証レポートを再度 OECD 事務局に提出(2024 年 2 月)し、2024 年(令和 6 年)4 月の WNT 会合で承認された。

抗幼若ホルモン様作用については、これまで開発した幼若ホルモン簡易スクリーニング試験などを参考にして検出系の開発を進めている。

ミジンコ脱皮ホルモン作用検出試験(開発中)

EXTEND2022 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ている。令和元年度に試験法案(試験条件の案)を作成して検証試験を進めるとともに、有効な試験期間やエンドポイントについて検討している。

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

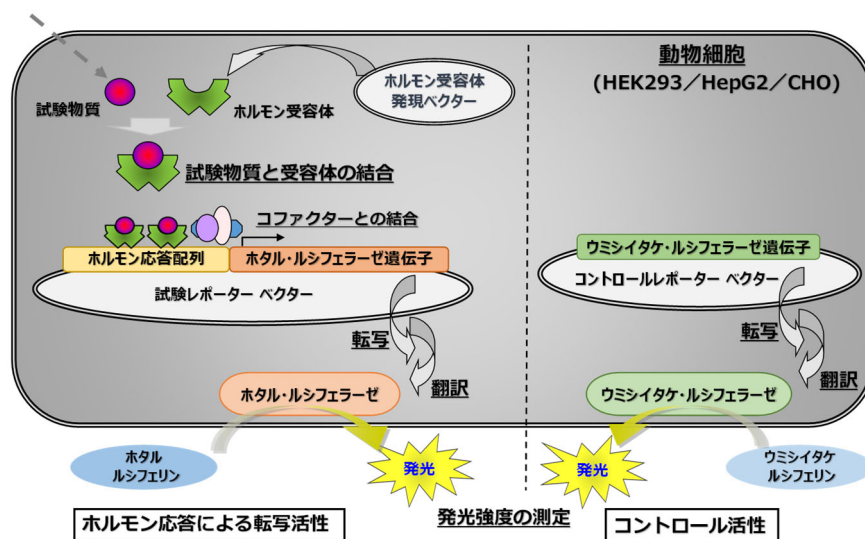
ミジンコ多世代試験は、平成 22 年度から平成 25 年度まで、日米二国間協力の下で、欧米を中心に OECD でテストガイドライン化が検討されていたカイアシ類(コペポッド)を用いたフルライフサイクル試験及びアミ(ミシッド)を用いた二世世代繁殖試験との比較検証を行いつつ試験デザインの検討を進めてきた。その後は、OECD へのテストガイドライン化の提案も視野に試験法の開発を進めてきたが、平成 29 年度までに実施した検証試験の結果、ミジンコ類に対して多世代(経世代)影響を示す化学物質が見つからなかったことから、試験法開発については保留(中断)にすることとされた。

(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遺伝子試験

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 α (ER α) 及びアンドロゲン受容体 β (AR β) を用いるレポーター遺伝子試験法が開発されている。メダカ ER α 及び AR β を用いるレポーター遺伝子試験は、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_{50} 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 17β -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能に対する阻害作用として試験物質の IC_{50} 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 JMSA の検証に用いた陽性物質等について試験を実施した。



(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ジーン試験

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 β ($TR\beta$) を用いるレポータージーン試験法が開発されている。ニシツメガエル $TR\beta$ レポータージーン試験は、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_{50} 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ヨ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_{50} を算出する。抗甲状腺ホルモンの影響を検出するについては、ニシツメガエル $TR\beta$ 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、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た。令和 5 年度より、抗甲状腺ホルモン物質である NH-3 を入手し、アンタゴニスト検出系試験における抗甲状腺ホルモン作用の陽性対照物質としての妥当性等の検証をした。

(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ジーン試験

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ジーン試験が開発されている。ミジンコ EcR レポータージーン試験は、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 EC₅₀ 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。EXTEND の下、平成 25 年度よりアゴニスト検出系試験を実施した。

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受容体レポータージーン試験は、ミジンコ脱皮ホルモン受容体レポータージーン試験と同様に、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、EXTEND 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ジーン試験法の開発が進められている。ミジンコ JhR レポータージーン試験については、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た。