

生物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。

EXTEND2010 及び 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. 平成 29 年度の実施結果について

(1) メダカ抗アンドロゲン作用検出試験(仮称)

平成 29 年度は、試験法の妥当性及び有用性等の検証を目的として、魚類の内分泌系に対する作用を持たないと推定される陰性物質(ドデシル硫酸ナトリウム、塩化亜鉛)、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) を用いて検証試験を実施した。また、試験結果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(ビクロゾリン) を用いた検証試験を実施した。

また、本試験法の OECD でのガイダンスドキュメント化に向けて、これまでに実施された検証試験の結果等を平成 29 年 10 月に開催された OECD VMG-eco 会合(生態毒性試験検証管理グループ会合) に報告するとともに、それらを取りまとめたサマリーレポート(草案) の作成を行った。

(2) 胚期ツメガエル甲状腺シグナリング試験(XETA) について

ゼノパス胚期甲状腺シグナリング試験(*Xenopus Embryonic Thyroid signaling Assay*, XETA) は、甲状腺ホルモン応答遺伝子と GFP 遺伝子を導入した遺伝子改変アフリカツメガエルの胚(摂餌開始前)を試験生物として用い、

ばく露後の GFP の蛍光強度から甲状腺系に作用する化学物質をスクリーニングする短期の *in vivo* 試験法である。本試験法については、平成 23 年に、フランスより、テストガイドライン化に関する提案書(SPSF) が提出され、OECD において試験法のテストガイドライン化に向けた取組みが進められている。平成 25 年度には、フランス、米国及び日本が参加して、試験法及び統計解析法の適正化を目的にリングテスト(フェーズ 1) が実施され、その結果が平成 26 年 12 月の OECD VMG-eco 会合で報告された。これを受けて、平成 27 年度に、一部改変した試験プロトコルに基づくリングテスト(フェーズ 2) が実施された。バリデーション(フェーズ 2)の結果は、平成 29 年 10 月の VMG-eco に報告され、サマリーレポートの作成が進められている。

XETA の EXTEND2016 における第 1 段階生物試験への適用性については、両生類変態試験(AMA) と比較してコスト面で若干、優位性が高いと考えられるものの、スクリーニング試験法として、検出できる作用が限定される可能性があり、感度面でも AMA に劣る点で優位性は低い。したがって、総体的にみると、XETA よりも AMA の適用性が高いと考えられた。ただし、AMA については、甲状腺の組織学的観察に掛かるコストや時間が比較的大きく、同検査を必須としないことも検討する必要がある。

(3) 両生類変態試験(AMA) の検証試験

平成 29 年度は、第 1 段階生物試験としての妥当性等を確認するために、両生類の内分泌系に対する作用を持たないと推定される陰性物質(ドデシル硫酸ナトリウム)を用いた検証試験を実施した。また、平成 28 年度に実施した検証試験において、有意な発達阻害(変態遅延)及び体長の増加が認められたクエン酸タモキシフェンについて、ばく露個体の甲状腺組織の観察(OECD のガイダンスドキュメントに規定されている典型症例に関する診断等)を実施した。

(4) ミジンコ簡易スクリーニング試験法の開発

オオミジンコ繁殖毒性試験(OECD TG211) において仔虫の性別判定を行う ANNEX7 は無脊椎動物の内分泌かく乱化学物質(幼若ホルモン様作用物質)をスクリーニングするために開発されたが、試験期間が長く試験難度が高いため、新たに簡易スクリーニング試験法として、抱卵個体の短期ばく露を行い、2~3 腹目の仔虫性比を観察する試験法の開発を進めている。平成 29 年度は、試験法の妥当性及び有用性等を確認するために、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、トランスアネトール及びサフロールを用いた検証試験を実施した。

また、本試験法の OECD でのテストガイドライン化に向けて、検証試験の結

果等を平成 29 年 10 月に開催された OECD VMG-eco 会合に報告するとともに、リングテストの実施に向けて試験プロトコル(案)を作成した。

(5) ミジンコ多世代試験法の開発

ミジンコ多世代試験は、母体内(親ミジンコの体内)で受けた化学物質の影響を次世代のミジンコの産仔能力をエンドポイントとして、継世代影響(生物群の存続に対する影響)の評価を目的とする試験である。過年度までに、日米二国間会議等で検討された化学物質等を用いて検証を進めてきたが、明確な継世代影響が認められた物質はない。平成 29 年度は、試験法の妥当性及び有用性等を検証するために、既存文献において、ニセネコゼミジンコを用いた 4 世代繁殖試験で経世代影響が報告されているデキサメタゾン(合成糖質コルチコイド)を用いて検証試験を実施した。

また、本試験法については、OECD でのテストガイドライン化に関するプロジェクト提案も検討されていたことから、日本における試験法開発の状況等を平成 29 年 10 月に開催された OECD VMG-eco 会合で報告した。

(6) オオミジンコ繁殖試験(OECD TG211 Annex 7) の検証試験

EXTEND2016 の評価枠組みにおいて、成長への影響に関する第 2 段階生物試験として位置付けられているオオミジンコ繁殖試験(OECD TG211 の Annex 7 の方法)について、試験法の妥当性及び有用性等を検証するために、脱皮ホルモン作用を持つ化学物質(20-ヒドロキシエクジソン)を用いて検証試験を実施した。

3. 平成 30 年度の実施予定について

(1) メダカ抗アンドロゲン作用検出試験(仮称)

平成 30 年度は、平成 29 年度に引き続き、抗アンドロゲン作用の陽性物質、陰性物質あるいはその他の作用を有する化学物質を用いた検証試験を実施し、試験法の妥当性、有用性及び再現性等の検証を行う。また、本試験法の OECD でのガイダンスドキュメント化に向けて、既存の試験データ等の整理とりまとめを行うとともに、必要な作業(リングテストに関する関係機関との調整等)を進める。

(2) 幼生期両生類成長発達試験(LAGDA) の検証試験

幼生期両生類成長発達試験(LAGDA) は、EXTEND2016 の評価枠組みにおいて、甲状腺への影響に関する第 2 段階生物試験に位置付けられている試験法で

ある。本試験では、アフリカツメガエル *Xenopus laevis* を試験生物として、受精後数時間の胚から約 16 週間にわたって試験物質でのばく露を行い、幼生期 (NF stage 62) 及び幼若期(ばく露終了時) にエンドポイント測定を行い、両生類の発生、成長、変態及び生殖腺発達に対する影響を評価する。平成 30 年度は、両生類の内分泌系に対する作用を持たないと推定される陰性物質を用いて検証試験を実施し、試験法の妥当性等の検証を行う (EXTEND2016 の評価枠組みでは、LAGDA では、主に甲状腺(変態) への影響を評価するため、検証試験は変態に関わるエンドポイントの測定を行う幼生期までとする)。

(3) ミジンコ簡易スクリーニング試験法の開発

平成 30 年度は、平成 29 年度に引き続き、幼若ホルモン様作用を有することが疑われる化学物質等を用いて検証試験を実施し、試験法の妥当性及び有用性等の検証を行う。また、本試験法の OECD でのテストガイドライン化に向けて必要な作業(リングテストに関する関係機関との調整等)を進める。

(4) ミジンコ多世代試験法の開発

本年度までに実施した検証試験では、明確な継世代影響が認められる化学物質がなかったことから、平成 30 年度は、これまでに得られたデータや知見を整理して、本試験法の第 2 段階の生物試験法としての有効性及び開発の必要性等を再検討する

(5) オオミジンコ繁殖試験(OECD TG211 Annex 7) の検証試験

平成 30 年度は、平成 29 年度に引き続き、脱皮ホルモン作用を持つ化学物質等を用いて検証試験を実施し、試験法の妥当性及び有用性等の検証及び基礎的な知見等の収集を行う。

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	◎メダカ短期繁殖試験 (OECD TG229) ◎21 日間魚類スクリーニング試験 (OECD TG230)	◎メダカ拡張 1 世代繁殖試験 (MEOGRT, OECD TG240)
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	◎メダカ短期繁殖試験 (OECD TG229) ◎21 日間魚類スクリーニング試験 (OECD TG230)	◎メダカ拡張 1 世代繁殖試験 (MEOGRT, OECD TG240)
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	○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 (MEOGRT, OECD TG240)
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 ン試験	◎両生類変態試験 (AMA, OECD TG231) ▽胚期ツメガエル甲状腺シグナリング試験 (XETA) (抗甲状腺ホルモン様作用が検出できないため、別途 試験法を検討中)	◎幼生期両生類成長発達試験 (LAGDA, OECD TG241)
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簡易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 (スクリーニング) 試験	◎オオミジンコ繁殖試験 (OECD TG211) △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