

EXTEND2016における 試験管内試験及び両生類試験の開発及び検証

いであ株式会社
大西 悠太

それでは、「EXTEND2016における試験管内試験及び両生類試験の開発及び検証」
についてお話しさせていただきます。

レポーター遺伝子試験 (第1段階試験管内試験)

- ✓ メダカエストロゲン受容体 α (ER α)レポーター遺伝子試験
- ✓ メダカアンドロゲン受容体 β (AR β)レポーター遺伝子試験
- ✓ ニシツメガエル甲状腺ホルモン受容体 β (TR β)レポーター遺伝子試験
- ✓ ミジンコ脱皮ホルモン受容体(EcR)レポーター遺伝子試験
- ✓ ミジンコ幼若ホルモン受容体(JhR)レポーター遺伝子試験

2

まず初めに、第1段階の試験管内試験についてお話しします。

第1段階の試験管内試験としては、ここに記載しています5種類のレポーター遺伝子試験法が開発されています。

EXTEND2016で実施する試験管内試験の開発状況

- ✓ EXTEND2016における内分泌かく乱作用の有害性評価の枠組みでは、**第1段階の試験管内試験**として、受容体を介した遺伝子発現を定量化できる**レポーター遺伝子試験**を実施。
- ✓ 各内分泌かく乱作用に関して、生物試験と同じ生物のホルモン受容体を用いる試験法。
- ✓ すべての作用に関して、**令和元年までに試験法は開発済み**。
- ✓ 試験対象物質での試験は、平成22年度より実施（幼若ホルモン作用については未実施）。

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	②メダカエストロゲン受容体 レポーター遺伝子試験	②メダカでの魚類短期繁殖試験(OECD TG229) ③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。	②メダカ胚盤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	②メダカアンドロゲン受容体 レポーター遺伝子試験	②メダカでの短期繁殖試験(OECD TG229) ③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。	②メダカ胚盤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	②メダカアンドロゲン受容体 レポーター遺伝子試験	②幼若メダカ抗アンドロゲン作用検出試験	②メダカ胚盤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	②ニシメガエル甲状腺ホル モン受容体レポータージ ーン試験	③両生類変態試験(OECD TG231, AMA) 検証中	③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	②①②ミジンコ幼若ホルモ ン受容体レポータージ ーン試験	②ミジンコ幼若ホルモン作用短期検出試験	③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	②ミジンコ脱皮ホルモン受 容体レポータージ ーン試験	△①②ミジンコ脱皮ホルモン作用検出試験	③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：②開発済み、③開発中（完成間近）、△開発中、▽未採用

※令和2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

ここに示しました表は、昨年11月の化学物質の内分泌かく乱作用に関する検討会の資料です。先ほど山崎分析官等も御説明されていますが、この中の赤枠でたところが、第1段階の試験管内試験として実施、あるいはこれから実施を予定している試験法になります。

内分泌かく乱作用に関して、EXTENDでは生物試験と同じ生物のホルモン受容体を用いたレポーター遺伝子試験を実施することにしています。そのようなスキームの中で、それぞれの試験法が令和元年までに開発されています。実際の試験対象物質での試験については、この後川嶋先生からお話があると思いますが、平成22年より実施されています。

レポーター遺伝子試験法の開発

✓ EXTEND2016で実施しているレポーター遺伝子試験は、主にSPEED'98~EXTEND2016のもとで実施された日英共同研究、基盤的研究などの取組のなかで開発。

➤ Gen Comp Endocrinol. 2010 Sep 1;168(2):220-30. doi: 10.1016/j.ygcen.2010.01.002. Epub 2010 Jan 11.

Molecular cloning and characterization of ligand- and species-specificity of amphibian estrogen receptors

Yoshinao Katsu¹, Ena Taniguchi, Hiroshi Urushitani, Shinichi Miyagawa, Minoru Takase, Kaoru Kubokawa, Osamu Tooi, Tomohiro Oka, Noriaki Santo, Jan Mytburgh, Akira Matsuno, Taisen Iguchi

➤ J Endocrinol. 2007 Apr;193(1):183-94. doi: 10.1577/JDE-06-0226.

Cloning and characterization of the ecdysone receptor and ultraspiracle protein from the water flea *Daphnia magna*

Yasuhiko Kato¹, Kaoru Kobayashi, Shigeto Oda, Norihisa Tatarazako, Hajime Watanabe, Taisen Iguchi

➤ Mol Biol Evol. 2016 Jan;33(1):228-44. doi: 10.1093/molbev/mvv216. Epub 2015 Oct 27.

Neofunctionalization of Androgen Receptor by Gain-of-Function Mutations in Teleost Fish Lineage

Yukiko Ogino¹, Shigehiro Kuraku², Hiroshi Ishibashi³, Hitoshi Miyakawa⁴, Eri Sumiya¹, Shinichi Miyagawa⁵, Hajime Matsubara⁶, Gen Yamada⁶, Michael E Baker⁷, Taisen Iguchi⁸

➤ J Appl Toxicol. 2019 Feb;39(2):241-246. doi: 10.1002/jat.3713. Epub 2018 Sep 11.

Establishment of a high-sensitivity reporter system in mammalian cells for detecting juvenoids using juvenile hormone receptors of *Daphnia pulex*

Takahiro Tanaka¹, Taisen Iguchi², Hitoshi Miyakawa³

➤ Environ Sci Technol. 2014 May 6;48(5):5254-63. doi: 10.1021/es5002659. Epub 2014 Apr 14.

Differing species responsiveness of estrogenic contaminants in fish is conferred by the ligand binding domain of the estrogen receptor

Shinichi Miyagawa¹, Anke Lange, Ikumi Hirakawa, Saki Tohyama, Yukiko Ogino, Takeshi Mizutani, Yoshihiro Kagami, Teruhiko Kusano, Masaru Ihara, Hiroaki Tanaka, Norihisa Tatarazako, Yasuhiko Ohta, Yoshinao Katsu, Charles R Tyler, Taisen Iguchi

➤ J Appl Toxicol. 2013 Sep;33(9):991-1000. doi: 10.1002/jat.2825. Epub 2012 Oct 30.

Establishment of transactivation assay systems using fish, amphibian, reptilian and human thyroid hormone receptors

Tomohiro Oka¹, Naoko Mitsui-Watanabe, Norihisa Tatarazako, Yuta Onishi, Yoshinao Katsu, Shinichi Miyagawa, Yukiko Ogino, Ryohei Yatsu, Satomi Kohno, Minoru Takase, Yukio Kawashima, Yasuhiko Ohta, Yasunobu Aoki, Louis J Guillette Jr, Taisen Iguchi

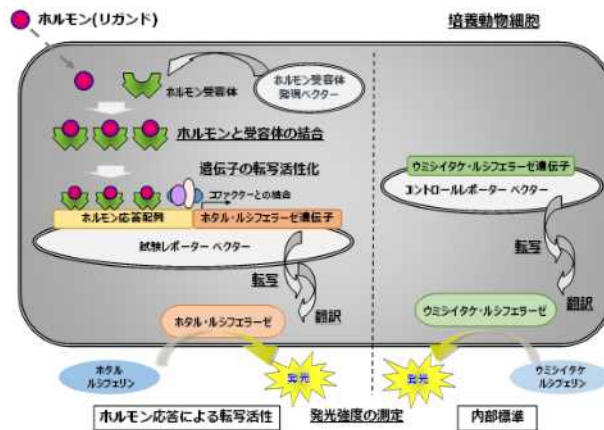
4

次に、レポーター遺伝子試験の開発の経緯について若干御説明させていただきます。現在実施しているレポーター遺伝子試験についてはSPEED'98~EXTEND2016のもとで実施された日英共同研究ですとか基盤的研究などの取組の中の成果として開発されてきています。

ここには一部ですが、その中で先生方が研究されて発表された論文を掲載しています。

レポータージーン試験法の概要①

- ✓ 試験法は、デュアルルシフェラーゼレポーターアッセイ法をベースに開発。
- ✓ 培養動物細胞にホルモン受容体遺伝子、試験レポーター遺伝子（ホタルルシフェラーゼを発現）、コントロールレポーター遺伝子（ウミシイタケルシフェラーゼを発現）を導入。
- ✓ 各レポーター遺伝子の発現量をホタルルシフェリンとウミシイタケルシフェリンの発光強度として測定。
- ✓ 細胞内で恒常的に発現するコントロールレポーター遺伝子の発現量（ウミシイタケルシフェリンの発光強度）を基に試験レポーター遺伝子の発現量を標準化（様々な要因で生じるばらつきを排除）。



ホタルルシフェリンの発光は、
 ホルモン受容体と結合し、
 レポーター遺伝子の転写を活性化させた
 ホルモン量（作用の強さ）に依存して増大。

5

次に、レポータージーン試験について簡単に試験法を御説明します。

EXTENDの中で使っているレポータージーン試験については、いずれもデュアル・ルシフェラーゼアッセイという手法を基に開発されたものです。レポータージーン試験では、培養細胞の中にホルモンの受容体を発現する遺伝子を導入します。それにホルモンが結合した後さらに反応することによって、別の遺伝子が発現して何かのたんぱく質をつくります。ここでは、ホタルのルシフェラーゼという酵素を作る遺伝子が組み込まれています。このようにいくつかの遺伝子を動物細胞の中に人為的に入れ込んで、そこに化学物質をばく露させるというような試験法です。

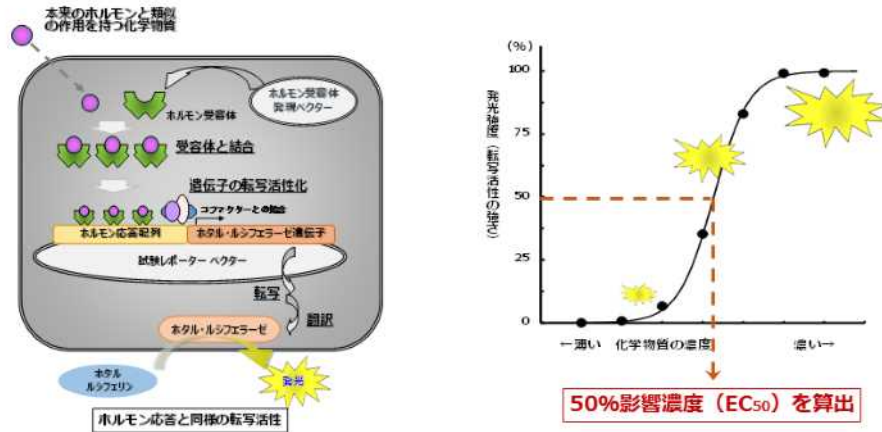
そして、反応物として生成されたルシフェラーゼの量をホタルのルシフェリンの発光として計測するという方法になっています。

デュアル・ルシフェラーゼ法というものは、もう一つコントロールレポーターというものを細胞の中に入れ込むことによって、ホルモンの働きとは関係なく細胞の活性を評価し、それを基に標準化することができることになっています。

レポーター遺伝子試験法の概要②

化学物質のホルモン類似作用（アゴニスト作用）を調べるレポーター遺伝子試験

- ✓ 本来のホルモンの代わりに試験物質（化学物質）で暴露し、本来のホルモンと類似する作用（アゴニスト作用）の強さを評価する。
- ✓ 化学物質がホルモンと同様に作用すると、化学物質の濃度に依存して、ホタル・ルシフェラーゼ遺伝子の転写活性化に比例する発光強度が増加。
- ✓ 指標として、化学物質濃度と発光強度の関係にシグモイド曲線（非線形回帰モデル）を当てはめて、最大値の50%相当の影響を及ぼす化学物質濃度（EC₅₀）を算出。



6

もう少し詳しく説明しますと、レポーター遺伝子試験については2種類の試験方法がございます。

1つが、ここに書いていますアゴニスト作用を調べる試験法で、いわゆるホルモンと類似した作用が化学物質にあるかどうかを調べるための試験法となります。

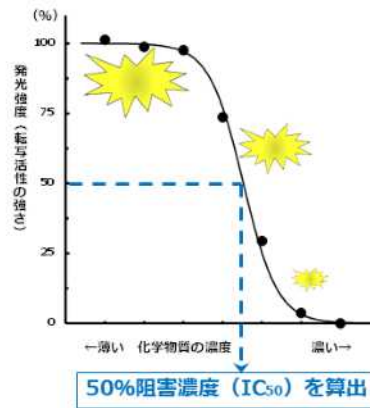
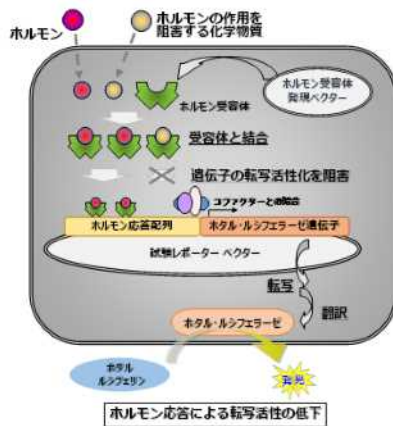
例えば化学物質が、先ほど御説明しましたようなホルモン受容体などを発現するように仕組んだ細胞の中に入ってきて、ホルモンと同じような作用をしますと、受容体と結合して最終的にはホタルルシフェリンの発光が強くなるということになります。

その場合、右のように化学物質の濃度に応じて発光の強さが高くなりますので、試験としては発光の強さが最大の強さの半分程度になるような濃度、50%影響濃度、EC₅₀と言っていますが、こういうものを算出しようとしています。

レポータージーン試験法の概要③

化学物質の抗ホルモン作用（アンタゴニスト作用）を調べるレポータージーン試験

- ✓ 本来のホルモンと一緒に試験物質に暴露し（例えば、抗エストロゲン作用の試験では、一定濃度の17β-エストラジオールと一緒に試験物質に暴露）、試験物質の本来のホルモンの作用を阻害する作用（アンタゴニスト作用）の強さを評価する。
- ✓ 化学物質が受容体に結合しても遺伝子の転写活性を促進しないと、化学物質の濃度に依存して、（一緒に添加したホルモンの遺伝子の転写活性化による）発光強度が低下。
- ✓ 指標として、ホルモンの作用を50%阻害する濃度（IC₅₀）を算出。



試験法としては、もう一つございます。例えばエストロゲン作用を阻害するような作用、抗エストロゲン作用というようなものを調べるような作用の試験。つまり、本来のホルモンの作用を阻害するような化学物質があった場合、その作用の強さを調べるための試験です。

試験では、化学物質と一緒に本来のホルモンと一緒に投与します。そのホルモンが本来ですと先ほどのように濃度に応じて光るわけですがけれども、ホルモンの作用を阻害する作用が化学物質にあると、受容体と結合してもその先の遺伝子発現、遺伝子の転写活性化を起こせなくなります。その結果として、本来の発光の強さがだんだん化学物質の濃度によって低下していくという現象が見られます。

この試験では、指標として本来の発光の強さを半分程度に阻害する濃度、50%阻害濃度IC₅₀を算出します。

レポータージーン試験の概要④

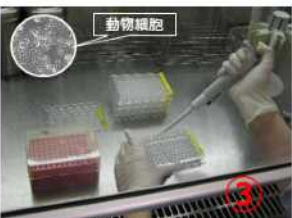


ホタルシフェリン
由来の発光強度

ウミシイタケシフェリン
由来の発光強度

⑤

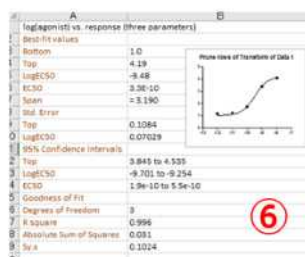
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
101	3038	3038	3038	3038	3038	3038	3038	3038	3038	3038
102	3038	3038	3038	3038	3038	3038	3038	3038	3038	3038
103	3038	3038	3038	3038	3038	3038	3038	3038	3038	3038
104	3038	3038	3038	3038	3038	3038	3038	3038	3038	3038
105	3038	3038	3038	3038	3038	3038	3038	3038	3038	3038
106	3038	3038	3038	3038	3038	3038	3038	3038	3038	3038
107	3038	3038	3038	3038	3038	3038	3038	3038	3038	3038
108	3038	3038	3038	3038	3038	3038	3038	3038	3038	3038
109	3038	3038	3038	3038	3038	3038	3038	3038	3038	3038
110	3038	3038	3038	3038	3038	3038	3038	3038	3038	3038
111	3038	3038	3038	3038	3038	3038	3038	3038	3038	3038



動物細胞

レポータージーン試験の流れ

- ① 試験容器（96穴マイクロプレート）へ動物細胞の播種～定着
- ② 細胞へのベクターの導入
- ③ 化学物質（試験物質）の添加
- ④ 培養（試験物質への暴露）
- ⑤ 細胞溶解液をサンプルとして、ホタルシフェリン、ウミシイタケシフェリンの発光強度をルミノメーターで測定
- ⑥ データ解析（影響濃度の算出）



8

実際に、どのようにレポータージーン試験を実施しているかを簡単に御説明します。

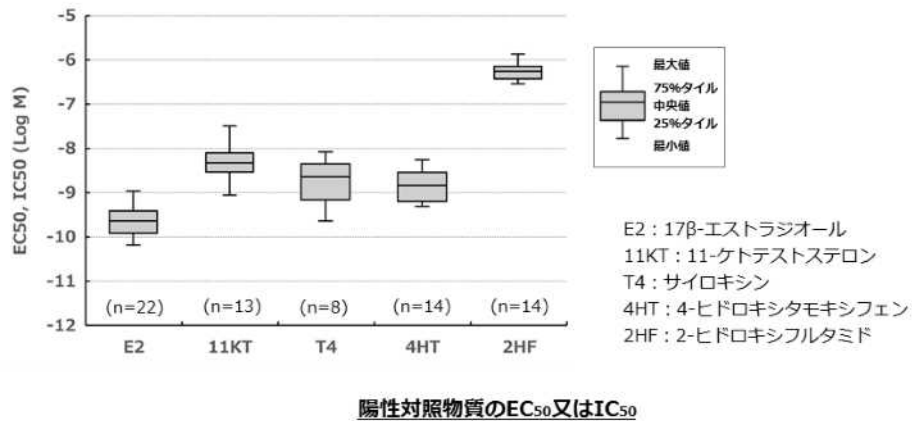
試験管内試験と言われているので、試験管を使って試験を行うようなものもございますが、現在EXTENDの中で実施している試験では、①の写真にあるような96穴のマイクロプレートというものを使って行っています。96個の穴があります。その容器の中に先ほどの細胞を入れて、培養液を入れて、そこへ化学物質も入れてばく露を行います。細胞を左側の写真の真ん中にあるようなインキュベーターの中で、最適な条件下で培養します。

培養後に、細胞を溶かしてそれをサンプルとして、ルミノメーターというもので、ホタルシフェリンの発光の強さを、あるいはウミシイタケシフェリンの発光の強さを測ります。

データはこのように数値として出てきますので、それらを解析して、右側の⑥にあるような解析を行って、EC50あるいはIC50を計算するという行っています。

レポータージーン試験法の検証①

- ✓ 各作用のレポータージーン試験に関して陽性対照物質を設定、試験対象物質の試験と並行して陽性対照物質での試験を行い、試験系（レポーター遺伝子を導入した動物細胞）が適正に機能していることを確認。
- ✓ アゴニスト作用試験では、17 β -エストラジオール（エストロゲン作用）、11-ケトテストステロン（アンドロゲン作用）、サイロキシシン（甲状腺ホルモン作用）、20ヒドロキシエクジソン（脱皮ホルモン作用）を陽性対照物質として使用（幼若ホルモン作用の陽性対照は検討中）。
- ✓ アンタゴニスト作用試験では、4-ヒドロキシタモキシフェン（抗エストロゲン作用）、2-ヒドロキシフルタミド（抗アンドロゲン作用）を陽性対照として使用（抗甲状腺ホルモン作用は未設定）。



9

次に、レポータージーン試験について、妥当性などを検証したデータについて御説明します。

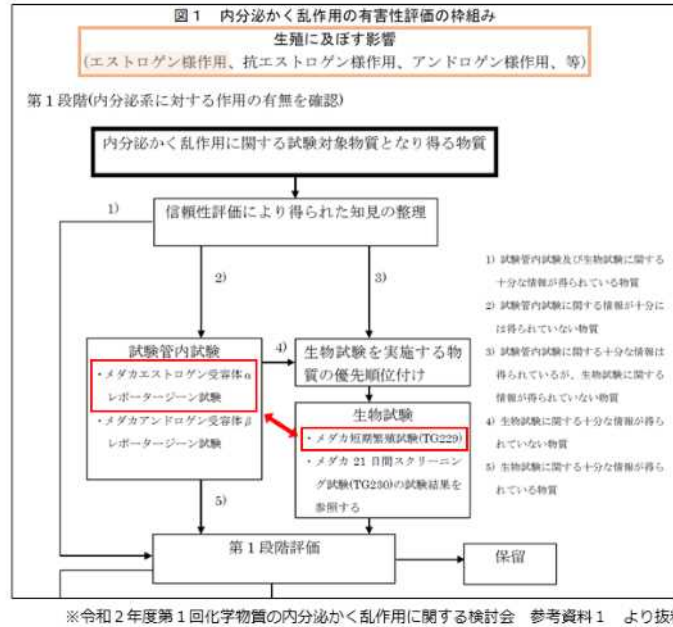
各作用のレポータージーン試験では、実際にその試験がうまく動いているかどうかということを確認するために、陽性対照物質、つまりその作用を起こすことが分かっている化学物質を使って試験を行い、試験系が適正に動いているかなどを判断しています。

例えば、アゴニストの作用、抗エストロゲン作用であれば、魚のエストロゲンである17 β -エストラジオールを使って試験を行っています。そのほかの作用についても、ここに記載していますような化学物質を使って、陽性対照としての試験を行っています。

下のグラフについては、それぞれの物質について平成22年から行ってきた試験で、どの程度のEC₅₀あるいはIC₅₀値だったかというものを図化したものです。おおむね平均値 \pm 3~5倍ぐらいの範囲に収まっています。一定の感度で試験が実施されていたということがわかります。

レポータージーン試験法の検証②

- ✓ メダカエストロゲン受容体αレポータージーン試験（エストロゲン作用）の検証事例（魚類短期繁殖試験の結果との比較による）。



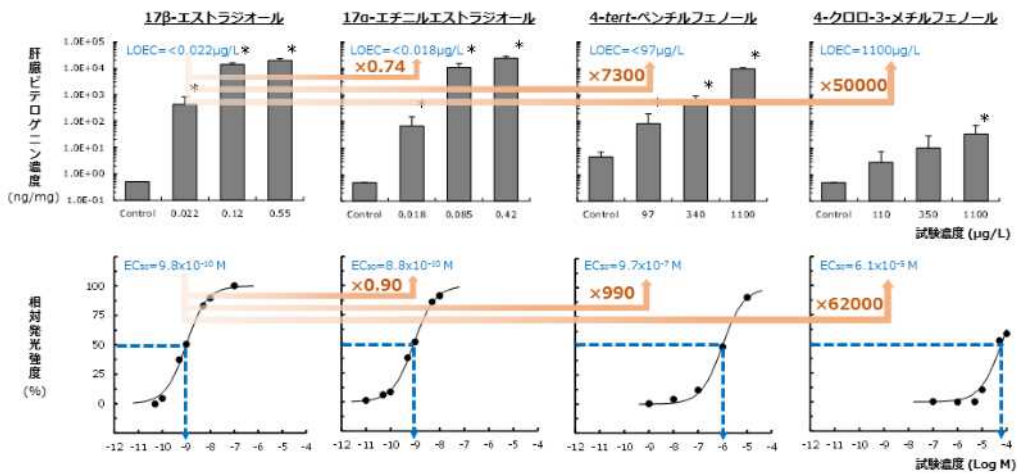
10

次に検証の事例としてレポータージーン試験と生物試験のデータを比較した事例を3つほど御紹介します。

この表は、先ほど山本先生も説明されましたものです。例えばEXTENDの中の内分泌かく乱作用の有害作用の枠組みで、生殖に及ぼす影響のエストロゲン様作用については、第1段階の試験管内試験としてメダカのエストロゲン受容体αレポータージーン試験を実施します。その後同じく第1段階の生物試験であるメダカ短期繁殖試験TG229というものを実施します。ここでは、この両者の結果を比較した事例を御紹介します。

レポータージーン試験法の検証②

- ✓ メダカエストロゲン受容体 α レポータージーン試験 (mER α -RGA) について、エストロゲン作用の陽性物質として魚類短期繁殖試験 (FSTRA) の検証に用いられた化学物質のEC₅₀を算出。
- ✓ FSTRAでエストロゲン作用の指標とされている雄(メダカ)の肝臓ビテロゲニン濃度 (VTG) に有意な増加がみられた最小試験濃度 (LOEC) と比較。
- ✓ 試験物質間の相対的關係は両指標で概ね一致。



FSTRAでの雄メダカVTGに対するLOEC (上図) とmER α -RGAでのエストロゲン作用のEC₅₀ (下図)

11

下段に、レポータージーンアッセイの結果、上段に魚類短期繁殖試験TG229で行ったメダカの肝臓のビテロゲニンの測定結果を示しています。それぞれエストラジオール、エチニルエストラジオール、4-tert-ペンチルフェノール、4-クロロ-3-メチルフェノールの結果です。

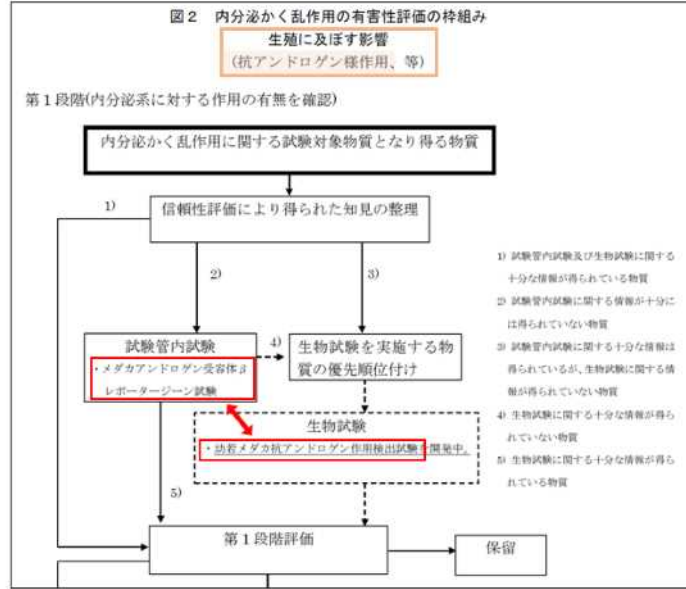
御覧頂きますように、エストラジオールですとEC₅₀の値が小さくなり、4-クロロ-3-メチルフェノールでは大きい、グラフが右側に寄っていることが分かります。

それぞれの比を出してみますと、このようになります。

1つ訂正がございます。環境省のホームページに掲載した資料では、これ一番右の4-クロロ-3-メチルフェノールが6,000倍程度になっているのですが、ここで書いてある5万倍と6万2,000倍というのが正しい値ですが、いずれにしても全体をみると、それぞれの相対関係が一致しているということで、メダカのレポータージーンアッセイと生物試験が同様の傾向を示していることが分かります。

レポータージーン試験法の検証③

✓ メダカアンドロゲン受容体βレポータージーン試験（抗アンドロゲン作用）の検証事例（幼若メダカ抗アンドロゲン作用検出試験の結果との比較による）。



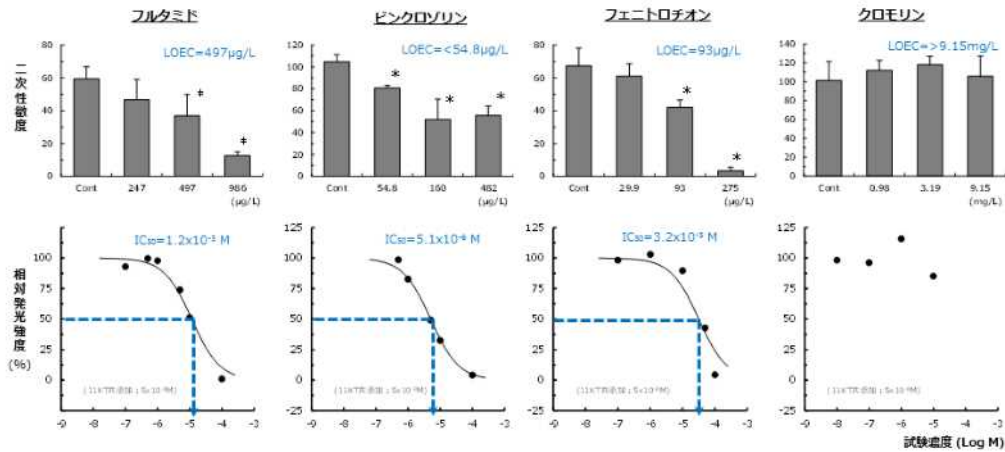
※令和2年度第1回化学物質の内分泌かく乱作用に関する検討会 参考資料1 より抜粋

12

次に、もう一つの事例として、抗アンドロゲン作用に関して、メダカアンドロゲン受容体レポータージーン試験の結果と、先ほど山本先生から御説明がありましたJMASAの結果を比較した事例を御紹介します。

レポータージーン試験法の検証③

- ✓ メダカアンドロゲン受容体βレポータージーン試験 (mARβ-RGA) について、抗アンドロゲン作用の陽性物質と陰性物質として幼若メダカ抗アンドロゲン作用検出試験 (JMASA) の検証に用いられた化学物質の IC50 を算出 (試験系には、11-ケトテストステロンを $5 \times 10^{-8} \text{M}$ 添加)。
- ✓ JMASA で二次性徴の発現に有意な低下が認められた化学物質では、mARβ-RGA でも、試験系に添加した 11-ケトテストステロンによる遺伝子の転写活性化 (アンドロゲン作用) に有意な低下がみられた一歩で、陰性物質 (クロモリン) では転写活性化の阻害はみられなかった。



JMASAでの雄メダカの二次性徴に対するLOEC (上図) とmARβ-RGAでの抗アンドロゲン作用のIC50 (下図)

13

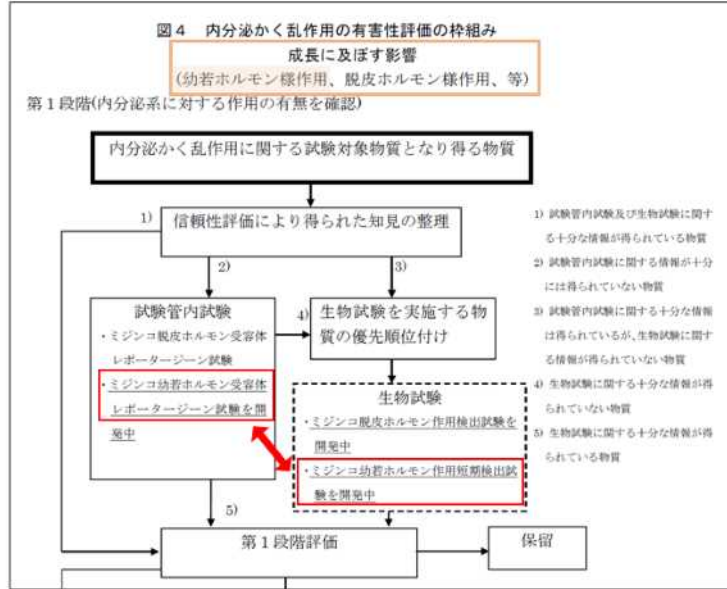
同様に、下がレポータージーンアッセイの結果、上段の図が二次性徴、つまり尻びれの乳頭状小突起の計測したデータとなっています。

左側の3つ、フルタミド、ビクロゾリン、フェニトロチオンについては先ほど山本先生からも御説明がありましたが、抗アンドロゲン作用が考えられる物質として生物試験を実施したものです。一番右のクロモリンは、抗アンドロゲン作用がない陰性物質として試験が実施されたものです。レポータージーン試験の結果を御覧頂きますとおり、陽性であるフルタミド、ビクロゾリン、フェニトロチオンについては、それぞれIC50が出ていますが、クロモリンについては転写活性に対する阻害作用は見られていません。

このように、ここでもレポータージーンアッセイの結果と生物試験の結果に一致が見られていることが確認できています。

レポータージーン試験法の検証③

✓ ミジンコ幼若ホルモン受容体レポータージーン試験（幼若ホルモン作用）の検証事例（ミジンコ幼若ホルモン作用検出試験の結果との比較による）。



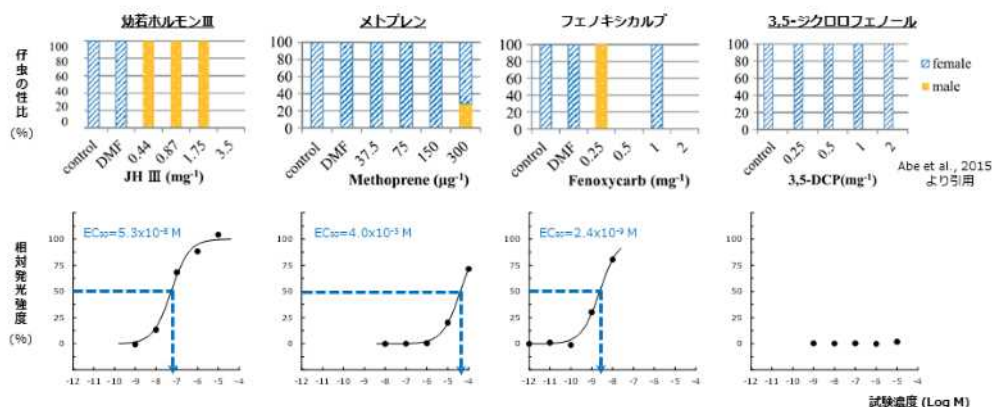
※令和2年度第1回化学物質の内分泌かく乱作用に関する検討会 参考資料1 より抜粋

14

次に、幼若ホルモン作用に関して、レポータージーン試験と生物試験の結果を比較した事例を御紹介します。

レポータージーン試験法の検証④

- ✓ ミジンコ幼若ホルモン受容体レポータージーン試験 (dJhR-RGA) について、既存文献でオオミジンコ短期スクリーニング試験 (雄仔虫の産出をエンドポイント) の検証に用いられた化学物質で試験を実施。
- ✓ 雄仔虫の産出がみられた幼若ホルモンⅢ、メトプレン及びフェノキシカルブでは、レポータージーン試験でも発光強度の増加 (遺伝子の転写活性化) がみられ、EC50が算出された一方で、雄仔虫の産出がみられなかった3,5-ジクロロフェノールでは発光強度の増加はみられず、試験法の妥当性を確認。



ミジンコ短期宿里任く試験における仔虫の性比 (上図) とdJhR-RGAでのEC50 (下図)

※ Abe R, Watanabe H, Yamamuro M, Iguchi T, Tatarazako N. (2015) Establishment of a short-term, *in vivo* screening method for detecting chemicals with juvenile hormone activity using adult *Daphnia magna*. Journal of Applied Toxicology, 35, 75–82.

15

同様に、下にレポータージーン試験の結果、上段に生物試験の結果を示しています。生物試験の結果については、先ほど山本先生はOECDのリングテストの結果を御説明されていましたが、ここでは国立環境研究所のAbeさんらの論文に記載された結果を引用しています。

左側の3つ、幼若ホルモンⅢ、メトプレン、フェノキシカルブについては、上段の生物試験の結果では、オレンジで表された濃度で、生まれた子どもの中に雄の仔虫がいたとされています。この3物質については、下段の幼若ホルモン作用に関するレポータージーン試験の結果でも陽性の反応が見られ、EC50が算出されています。

一方、一番右の3,5-ジクロロフェノールは陰性対照物質として使われた物質ですが、レポータージーン試験では有意な反応が見られていないという結果がえられ、生物試験の結果と一致しています。

これらのことから、試験法の妥当性が確認されています。

両生類試験
(甲状腺に及ぼす影響の第1段階及び第2段階生物試験)

- ✓ 両生類変態試験
Amphibian Metamorphosis Assay (AMA)
- ✓ 幼生期両生類成長発達試験
Larval Amphibian Growth and Development Assay (LAGDA)

16

では次に、両生類の試験法について御説明します。

両生類の試験については、EXTENDの中では甲状腺に及ぼす影響の第1段階の生物試験及び第2段階の生物試験となっています。

EXTEND2016で実施する両生類試験の開発状況

- ✓ EXTEND2016における内分泌かく乱作用の有害性評価の枠組みでは、甲状腺に及ぼす影響を評価（作用の有無及び有害性の確認）する第1段階及び第2段階の生物試験として、**両生類変態試験（AMA）**及び**幼生期両生類成長発達試験（LAGDA）**を採用。
- ✓ AMA及びLAGDAは、いずれもOECDで**テストガイドライン（TG）**として採択済み。
- ✓ EXTEND2016の枠組みでの実施に向けた検証及び知見収集を目的に、甲状腺系に対する作用が報告されている化学物質（陽性物質）での試験を実施。

検出可能な作用	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		③メダカエストロゲン受容体 αレポータージーン試験	③メダカでの魚類短期繁殖試験(OECD TG229) ③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。	③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		③メダカアンドロゲン受容体 βレポータージーン試験	③メダカでの短期繁殖試験(OECD TG229) ③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。	③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		③メダカアンドロゲン受容体 βレポータージーン試験	○幼若メダカ抗アンドロゲン作用検出試験	③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		③ニッ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	③両生類変態試験(OECD TG231, AMA) 検証中	③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		○①②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作用短期検出試験	③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		③ミジンコ脱皮ホルモン受 容体レポータージーン試験	△①②ミジンコ脱皮ホルモン作用検出試験	③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：③開発済み、○開発中（完成間近）、△開発中、▽不採用

※令和2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

17

先ほどと同じ表ですが、ここでは下から3つ目、甲状腺ホルモン様作用、抗甲状腺ホルモン様作用の第1段階の生物試験として、両生類変態試験、通称AMAと呼んでいる試験が採用されています。そして第2段階の試験として、幼生期両生類成長発達試験、LAGDAと呼ばれる試験が採用されています。この両者は、いずれもOECDでは既にテストガイドラインとして採択された試験法です。

両生類試験法の開発①

- ✓ 両生類変態試験（AMA）は、SPEED'98～EXTEND2005における取組において開発された試験法。
- ✓ 日本、ドイツ、米国が主導して、試験法のTG化をOECDへ提案。
- ✓ 試験法の検証のために、2001年（平成13年）～2007年（平成19年）に、OECD主導で国際的なリングテスト（Phase 1、2、3の3回）を実施。
- ✓ 2009年（平成21年）9月にTG No.231として採択。

> *Environ Toxicol Chem*. 2005 Mar;24(3):653-64. doi: 10.1081/094-2746.1.

Description and initial evaluation of a *Xenopus* metamorphosis assay for detection of thyroid system-disrupting activities of environmental compounds

Robert Oehlitz ¹, Thomas Braunbeck, Christian Bögi, Daniel B. Fickford, Gerrit Nentwig, Jörg Oehlmann, Ootamu Tobi, Rika Lutz, Werner Kläber

> *Toxicol Pathol*. 2009 Jun;37(1):415-24. doi: 10.1177/0101022309335063. Epub 2009 Apr 22.

Thyroid histopathology assessments for the amphibian metamorphosis assay to detect thyroid-active substances

Christiana Grün ¹, Marilyn Wolf, Lee Touart, Douglas C Wolf, Joe T.

OECD/OCDE

231
Adopted:
7 September 2009

OECD GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS

The Amphibian Metamorphosis Assay

INTRODUCTION

1. The need to develop and validate an assay capable of detecting substances active in the thyroid system of vertebrate species originates from concerns that environmental levels of chemicals may cause adverse effects in both humans and wildlife. In 1998, the OECD initiated a high-priority activity to revise

ENV/JM/MONO(2007)42
21-Aug-2007
English - Or. English

ENVIRONMENTAL
COOPERATION
DEPARTMENT

ASSAY FOR
IONS OF THE

18

まず初めに、これらの試験法の開発の経緯について簡単に御説明します。

両生類変態試験（AMA）については、SPEED'98～EXTEND2005の中の取組、すなわち試験法開発の取組として開発が進められた試験法です。日本とドイツとアメリカが主導して、試験法のテストガイドライン化をOECDへ提案し、その検証のために、リングテストが2001年～2007年に実施されています。

それらの結果を踏まえて、2009年にOECDにおいてテストガイドラインが採択されて、テストガイドライン231として現在OECDのホームページ等で公表されています。

両生類試験法の開発②

- ✓ 幼生期両生類成長発達試験（LAGDA）は、EXTEND2005～EXTEND2016で実施している日米二国間協力のもとで開発された試験法。
- ✓ 日米両国がそれぞれ検証試験を実施し、日米二国間会議を通じて試験法を検討及び精緻化。
- ✓ 2009年（平成21年）に日米共同でOECDへTG化を提案。
- ✓ 2015年（平成27年）7月にTG No.241として採択。

The collage contains the following documents:

- Top Left:** "Development of the Larval Amphibian Growth and Development Assay: Effects of benzophenone-2 exposure in *Xenopus laevis* from embryo to juvenile". Authors: Jonathan T Haselman, Maki Saito, Rieko Hatanabe, Youshi Goto, Futa Otsuki, Yuki Ito, Yu Onoda, Patricia A Kocian, Joseph J Korke, Rodney D Johnson, Tetsu Iguchi, Sigmund J Degitz.
- Top Right:** "Validation of the Larval Amphibian Growth and Development Assay: Integrated Summary Report". U.S. Environmental Protection Agency, Endocrine Disruptor Screening Program, Washington, D.C.
- Bottom Left:** "Development of the Larval Amphibian Growth and Development Assay: effects of chronic 4-tert-octylphenol or 17β-trenbolone exposure in *Xenopus laevis* from embryo to juvenile". Authors: Jonathan T Haselman, Patricia A Kocian, Joseph J Korke, Rodney D Johnson, Sigmund J Degitz.
- Bottom Center:** "OECD/OCDE 241 Adopted: 28 July 2015". "OECD GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS". "The Larval Amphibian Growth and Development Assay (LAGDA)".

19

次に、第2段階の生物試験であるLAGDAについて御説明します。

LAGDAは、AMAのテストガイドライン化が終わったEXTEND2005～2016の中で、日米二国間協力の下で開発された試験法です。

具体的には、日米両国がそれぞれ検証試験を実施して、定期的に行っています日米二国間会議を通じてそれらの結果を共有しつつ、試験法の検討あるいは精緻化をしていき、2009年にそれらの状況を踏まえて、日米共同でOECDへテストガイドライン化の提案をしています。さらに日米両国で様々な検証試験を行って、それらの検証試験を取りまとめた結果を踏まえて、テストガイドライン案を提案し、2015年にテストガイドラインの241番として採択されています。

両生類試験の概要①／両生類変態試験

- ✓ 両生類変態試験（AMA）は、視床下部-下垂体-甲状腺系に対する作用を持つ可能性がある化学物質のスクリーニングを目的とする、OECDの「内分泌かく乱物質の試験と評価に関する概念的フレームワーク」でレベル3（複数の内分泌機構/経路のデータを提供する*in vivo*試験）に位置づけられている試験法。
- ✓ 試験では、NF stage 51の発達段階にあるアフリカツメガエル幼生を試験生物として、21日間にわたり試験物質に暴露し、暴露7日後と21日後にエンドポイント測定を行う。
- ✓ エンドポイントのうち、発達段階及び後肢長は、試験物質の甲状腺系に対する作用の指標であるが、これらの遅延は必ずしも甲状腺系に対する阻害の指標にはならないとされている。甲状腺系に対する阻害は、主に甲状腺組織の診断結果で判断される。頭胴長及び体重は、成長に関連するエンドポイント。



次に、それぞれの試験法について簡単に御説明します。

AMAは、視床下部から脳下垂体、それから甲状腺に対する、いわゆる甲状腺系に対する作用を持っている化学物質のスクリーニングを目的とするという試験法で、OECDが決めています「内分泌かく乱物質の試験と評価に関する概念的フレームワーク」というものの中で、レベル3(複数の内分泌機構／経路のデータを提供する*in vivo*試験)というものに位置づけられています。

試験では、アフリカツメガエルのNF stage 51に相当するオタマジャクシ(幼生)を試験生物として、21日間にわたってばく露を行います。

ばく露期間中の7日目と暴露終了時の21日後に、ここに記載していますようなエンドポイントを測定します。エンドポイントのうち、発達段階の指標であるNF stageと後肢長が試験物質の甲状腺系に対する使用の指標となります。また、ばく露終了時には甲状腺の組織を観察することになっています。

両生類試験の概要② / 幼生期両生類成長発達試験

- ✓ 幼生期両生類成長発達試験 (LAGDA) は、視床下部-下垂体-甲状腺系と視床下部-下垂体-生殖腺系に対する影響に加えて、化学物質の毒性による致死や成長に対する影響 (有害性) を評価できる、OECDの「内分泌かく乱物質の試験と評価に関する概念的フレームワーク」でレベル4 (内分泌関連エンドポイントへの有害作用のデータを提供する *in vivo* 試験) に位置づけられている試験法。
- ✓ 試験では、受精直後のNF stage 8-10のアフリカツメガエル胚からNF stage 62到達の10週間後まで約16週間にわたり試験物質に暴露し、NF stage 62到達時及び暴露終了時にエンドポイント測定を行う。
- ✓ 主に幼生期のエンドポイントから甲状腺系、幼若期のエンドポイントから生殖腺系に対する試験物質の影響を評価するほか、頭胴長及び体重から成長等に対する影響を評価する。



EXTEND2016では、幼生期のエンドポイント測定までを試験期間とすることを想定

21

次に、LAGDAについて御説明します。

LAGDAは、甲状腺系に対する作用に加えて、生殖腺系に対する影響、作用も検出できる試験法として開発されました。

さらに加えて、致死や成長に対する影響も評価できるということで、OECDのフレームワークの中では、レベル4(内分泌かく乱化学物質に関するエンドポイントへの有害性の作用のデータを提供できる *in vivo* 試験) に位置づけられている試験法です。

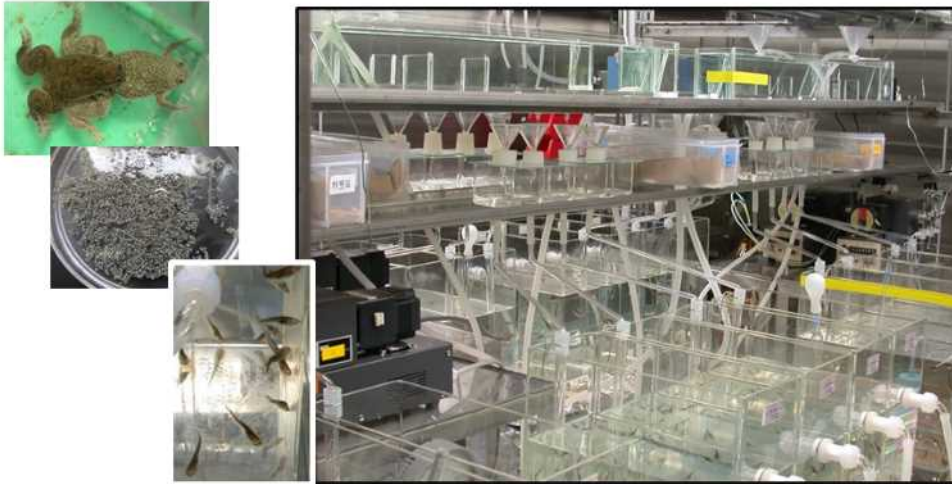
試験では受精直後、産卵された直後のアフリカツメガエルの胚、卵ですけれども、これを試験生物として、カエルになるまでの期間、正確にいうと、NF stage 62から10週間後まで、トータル約16週間にわたって化学物質でばく露する試験です。

この試験期間の間に、前半では幼生期のエンドポイントとして特に甲状腺系に対する影響について記載しているエンドポイントを調べます。試験終了時には主に生殖腺系に対する影響を調べることとなります。

ただ、EXTEND2016の中では、LAGDAは甲状腺に及ぼす影響に対する第2段階の生物試験として採用していますので、EXTENDの中では試験の途中の幼生期のエンドポイント測定までを試験期間とするということが想定されます。

両生類試験の概要③

- ✓ アフリカツメガエルの成体（親ガエル）にホルモンを注射して産卵を誘発。
- ✓ LAGDAでは、産卵直後の受精卵（胚）を供試、AMAではNF stage 51まで飼育し、異常がみられない個体を供試する。
- ✓ 通常、流水式の暴露装置を用いて化学物質（化学物質）への暴露を行う。
- ✓ 暴露試験中は、定期的に水温、溶存酸素などの環境条件、飼育水中の試験物質濃度を測定する。



22

これが実際に試験をしているような状況ですが、試験ではアフリカツメガエルの成体、つまり成熟した雌雄のカエルにホルモンを注射して産卵を誘発します。

LAGDAでは、産卵直後の受精卵を供与しますので、産卵された卵をそのまま試験に用います。AMAでは卵をNF stage 51まで飼育し、異常がない個体を試験に用います。

試験は、先ほど山本先生のMEOGRTので御説明と同様に、流水式のばく露装置を用いて行います。

ばく露期間中は定期的に水温ですとか溶存酸素、あるいはその他の環境条件を測定して、異常がないことを確認します。

両生類試験法の検証

- ✓ **AMA**に関して、**OECDによるリングテスト**では、甲状腺に対する作用が報告されている化学物質（サイロキシン、プロピルチオウラシル、過塩素酸ナトリウム、イオパノ酸、ベンゾフェノン-2）を用いて、複数機関が試験を行い、**試験法の妥当性、有効性、欠点（課題）などを検証**。
- ✓ **LAGDA**についても、AMAと同じ化学物質を用いて検証試験を行い、試験法の妥当性、有効性などの検証と合わせて、**両生類に対する内分泌かく乱作用の影響評価における基礎的知見を蓄積**。

AMAの検証（OECDリングテスト）に用いた化学物質

試験物質	主な作用
サイロキシン	甲状腺ホルモンの一種 (甲状腺ホルモン作用)
プロピルチオウラシル	甲状腺ホルモンの合成阻害 (ヨウ化物ペルオキシダーゼを阻害)
過塩素酸ナトリウム	甲状腺ホルモンの合成阻害 (ヨウ素の甲状腺への取り込みを阻害)
ベンゾフェノン-2	甲状腺ホルモンの合成阻害 (甲状腺ペルオキシターゼを阻害)
イオパノ酸	甲状腺ホルモンの代謝阻害 (脱ヨード化酵素を阻害)

23

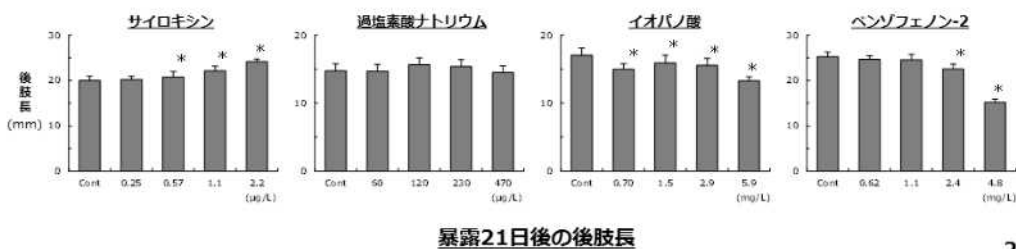
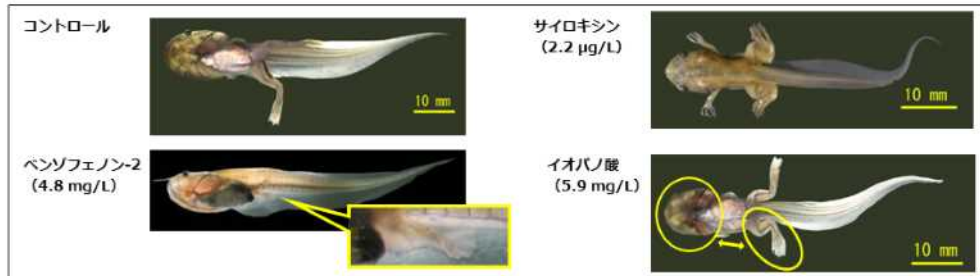
次に、両生類試験法の検証の事例についてお話しします。

両生類変態試験、AMAについては、先ほど御説明しましたように、OECDによるリングテストが実施されています。リングテストの中では、主にここに記載した5つの物質を使って試験が行われました。サイロキシンは甲状腺ホルモンの一種で、甲状腺ホルモン作用の陽性物質として使われます。プロピルチオウラシル、過塩素酸ナトリウム、ベンゾフェノン-2については、甲状腺ホルモンの合成を阻害する作用を持つことが知られており、甲状腺系に対する抗甲状腺ホルモン系の化学物質として試験に用いられました。イオパノ酸については、甲状腺ホルモンの体内での代謝阻害を及ぼすことが知られており、そのような作用の検証に用いられています。

LAGDAについても、この同じ物質を用いて試験を行って、試験法の妥当性あるいは有効性などの検証を行っています。

両生類変態試験法の検証①

- ✓ **AMAの検証試験**では、甲状腺系に対する作用の指標となるエンドポイントのうち、発達段階は感受度が低いことが示唆されたが、後肢長については、試験物質の作用に応じた変化がみられ、過塩素酸ナトリウムを除く試験物質に関して、対照区（コントロール）との間に統計学的な有意差を検出できた。
- ✓ イオパノ酸の試験では、頭部と後肢で発達が異なる非同調的発達個体の有意な増加が検出された。



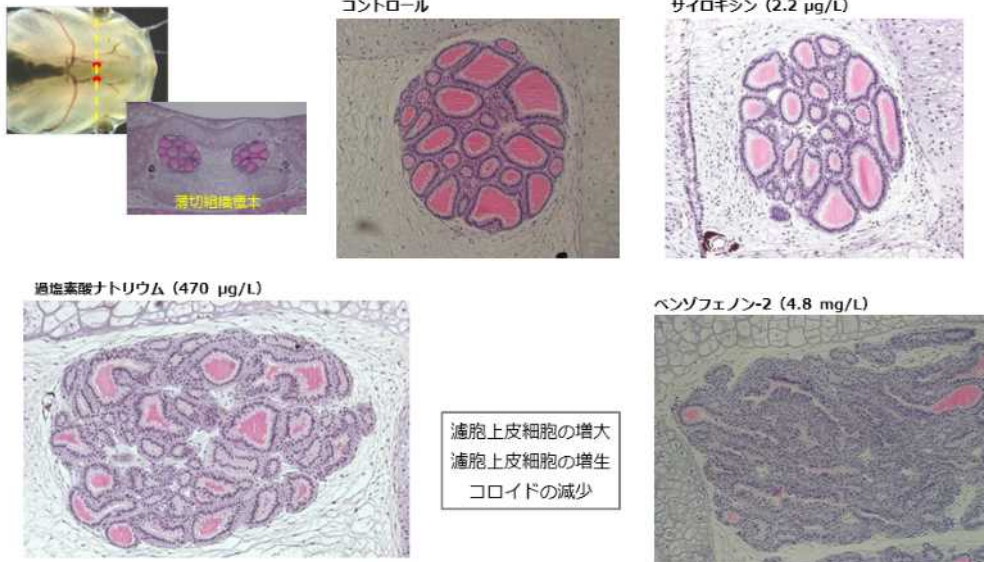
初めにAMAの検証試験の結果を簡単に御説明します。上段にばく露21日後のオタマジャクシの写真を掲載しています。左上がコントロール、すなわち化学物質で処理をしてない場合の典型的なオタマジャクシです。右上のサイロキシンでばく露されたオタマジャクシを見ていただきますと、後ろ足が非常に大きく、いわゆるカエルの形に近いことが分かります。すなわちサイロキシンで21日間ばく露されたことによって、変態が促進されたということが分かります。

一方左下のベンゾフェノン-2を見ていただきますと、後ろ足がほとんど見えないぐらい小さい状態です。すなわち、ベンゾフェノン-2にばく露された個体では、変態あるいは発達が阻害されたということが分かります。

暴露21日後の後肢長の長さをグラフ化したものを下に掲載しています。試験を実施した中で、真ん中、左2番目の過塩素酸ナトリウムについては、日本の試験機関が実施した試験の結果としては、統計学的に有意な変化が後肢長に見られていませんでした。

両生類変態試験法の検証②

✓ **AMAの検証試験**では、発達段階と後肢長に統計学的な有意差を検出できなかった過塩素酸ナトリウムを含むすべての試験物質に関して、暴露21日後の**甲状腺組織に有意な変化が確認**された。



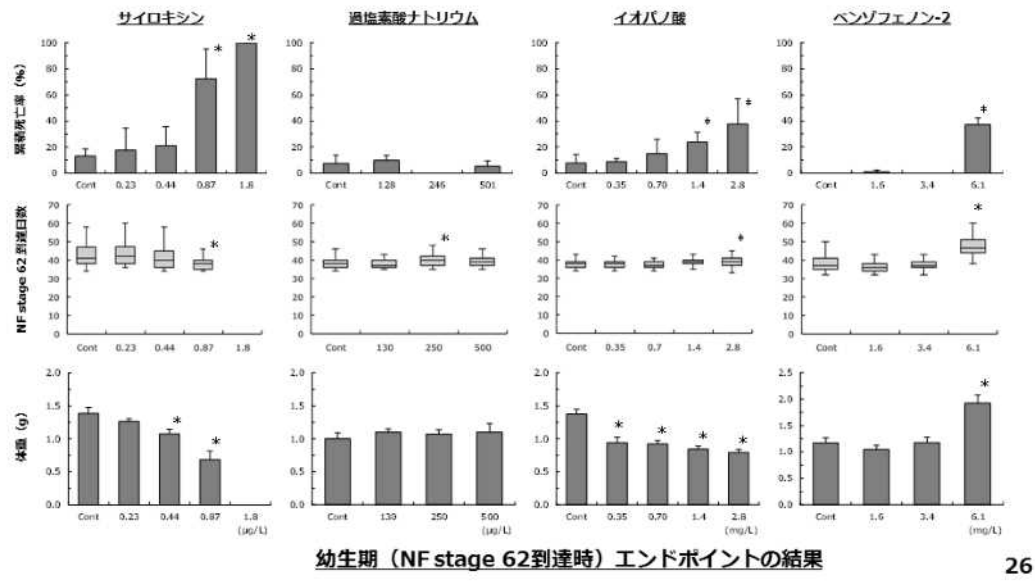
暴露21日後の甲状腺組織

25

ただし、21日後の甲状腺の組織を観察すると、いろいろな有意な変化が起きたことが確認されています。甲状腺というのは、カエルの頭の両目の間にある小さな器官です。ここを薄い輪切りにした組織標本を使って、細胞などを観察します。中央に示したコントロールの甲状腺を見ていただきますと、ピンク色で染まった部分が分かると思います。ここは甲状腺ホルモンの材料となる物質が蓄えられている部分です。その周りの青い小さい粒が、甲状腺ホルモンを作る細胞です。右下のベンゾフェノン-2を見ていただきますと、合成阻害がされた結果、甲状腺ホルモンの材料となるような物質がほとんどなく、それを産生するための細胞が増大あるいは増生していることが分かります。過塩素酸ナトリウムについては、足の長さには有意な変化がみられなかったと申し上げましたが、甲状腺を見ると同様の変化が見られており、甲状腺組織が有力なエンドポイントになるということが示されています。

幼生期両生類成長発達試験の検証①

✓ LAGDAの検証試験では、サイロキシシンやイオパノ酸に関して、強い致死影響（死亡率の増加）や成長への影響（体重の低下）がみられた。は、総体的にAMAより低い暴露濃度で認められ、有害性を評価する試験法としての有用性が確認された。



次に、同じ物質を使ってLAGDAの検証試験を実施した結果をまとめて記載しています。

一番上がばく露期間中の累積死亡率。2番目がNF stage 62という段階に到達するまでにかかった時間。一番下がそのNF stage 62の段階の体重を示しています。

特徴的なものとしては、累積死亡率について、サイロキシシンですとかイオパノ酸、ベンゾフェノン-2で有意な上昇が見られています。LAGDAと先ほどのAMAは同じ濃度で試験を行っていますが、AMAでは死亡はほとんど見られていませんでした。したがって、LAGDAでは、より死亡に対して感度が高いということが分かりました。同様に、成長に対する影響も大きく検出できるということが分かりました。

幼生期両生類成長発達試験の検証②

✓ **LAGDAとAMAを比較すると、LAGDAで致死影響（死亡率の増加）や成長への影響（体重の影響）が相対的に低濃度で認められ、有害性を評価する試験法としての有用性が確認された。**

サイロキシン

エンドポイント		LOEC (µg/L)		
		AMA (D 7)	AMA (D 21)	LAGDA
致死	死亡率	na	NE (>2.2)	↑ 0.87
発達 (変態)	NF 62到達日数	na	na	↓ 0.87
	発達段階	↑ 1.1	↑ 2.2	na
	後肢長	↑ 0.25	↑ 0.57	na
	非同調的発達	na	na	na
成長	頭胴長	NE (>2.2)	↓ 2.2	↓ 0.23
	体重	NE (>2.2)	↓ 2.2	↓ 0.44
甲状腺組織		na	1.1	↑ 0.23

過塩素酸ナトリウム

エンドポイント		LOEC (µg/L)		
		AMA (D 7)	AMA (D 21)	LAGDA
致死	死亡率	na	NE (>474)	NE (>501)
発達 (変態)	NF 62到達日数	na	na	↑ 246
	発達段階	NE (>474)	NE (>474)	na
	後肢長	NE (>474)	NE (>474)	na
	非同調的発達	na	na	na
成長	頭胴長	NE (>474)	↑ 60	↑ 128
	体重	NE (>474)	↑ 60	NE (>501)
甲状腺組織		na	↑ 60	↑ 128

イオバノ酸

エンドポイント		LOEC (µg/L)		
		AMA (D 7)	AMA (D 21)	LAGDA
致死	死亡率	na	NE (>5.9)	↑ 1.4
発達 (変態)	NF 62到達日数	na	na	↑ 2.8
	発達段階	NE (>5.9)	NE (>5.9)	na
	後肢長	NE (>5.9)	↓ 0.70	na
	非同調的発達	na	↑ 0.70	↑ 0.35
成長	頭胴長	↓ 5.9	↓ 0.70	↓ 0.35
	体重	NE (>5.9)	↓ 0.70	↓ 0.35
甲状腺組織		na	↑ 0.70	NE (>2.8)

ベンゾフェノン-2

エンドポイント		LOEC (µg/L)		
		AMA (D 7)	AMA (D 21)	LAGDA
致死	死亡率	na	NE (>4.8)	↑ 6.1
発達 (変態)	NF 62到達日数	na	na	↑ 6.1
	発達段階	NE (>4.8)	NE (>4.8)	na
	後肢長	↓ 4.8	↓ 2.4	na
	非同調的発達	na	na	na
成長	頭胴長	↑ (0.62)	↑ 4.8	↑ 6.1
	体重	NE (>4.8)	↑ 4.8	↑ 6.1
甲状腺組織		na	↑ 2.4	↑ 1.6

AMAとLAGDAの各エンドポイントに対するLOECの比較

27

AMAとLAGDAにおいて、それぞれのエンドポイントで有意差が見られた、いわゆるLOECをまとめたのがこの表になります。この表の中で、薄い黄色でハッチングしている部分が、その同じ項目の中で、よりLOECが低かったところを表しています。

全体的に見ると、成長ですとか死亡率、あるいは一部では発達など有害性に関わる指標がLAGDAで低い濃度で影響が見られたことが分かります。したがって、LAGDAは第二段階の生物試験として、有害性を評価する試験法として有用である可能性が高いということが確認されています。

幼生期両生類成長発達試験の検証③

✓ ベンゾフェノン-2を用いた検証試験（日米二国間協力事業で実施）では、幼生期のエンドポイントから視床下部-下垂体-甲状腺系に対する影響(変態の遅延)、幼若期のエンドポイントから視床下部-下垂体-生殖腺系に対する影響（遺伝的オスのメスへの性転換）を検出。

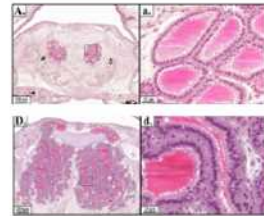
Research article
 Journal of Applied Toxicology
 Received 10 November 2015, Revised 22 March 2016, Accepted 22 March 2016, Published online in Wiley Online Library
 wileyonlinelibrary.com | DOI: 10.1002/jat.3336

Development of the Larval Amphibian Growth and Development Assay: Effects of benzophenone-2 exposure in *Xenopus laevis* from embryo to juvenile

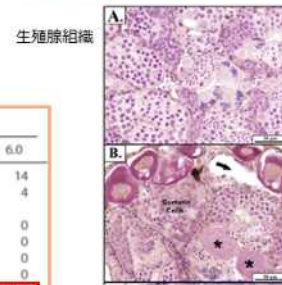
Jonathan T. Haselman^a, Maki Sakurai^b, Naoko Watanabe^b, Yasushi Goto^b, Yuta Onishi^b, Yuki Ito^b, Yu Onoda^b, Patricia A. Kosian^a, Joseph J. Korte^a, Rodney D. Johnson^a, Taisen Iguchi^a and Sigmund J. Degitz^a

ABSTRACT: The Larval Amphibian Growth and Development Assay (LAGDA) is a globally harmonized chemical testing guideline developed by the U.S. Environmental Protection Agency in collaboration with Japan's Ministry of Environment to support risk assessment. The assay is employed as a higher tiered approach to evaluate effects of chronic chemical exposure throughout multiple life stages in a model amphibian species, *Xenopus laevis*. To evaluate the utility of the initial LAGDA design, the assay was performed using a mixed mode of action endocrine disrupting chemical, benzophenone-2 (BP-2). *X. laevis* embryos were exposed in flow-through conditions to 0, 1.5, 3.0 or 6.0 mg l⁻¹ BP-2 until 2 months post-metamorphosis. Overt toxicity was evident throughout the exposure period in the 6.0 mg l⁻¹ treatment due to decreased mortality rates and observed liver and kidney pathology. Concentration-dependent increases in severity of thyroid nodules indicating BP-2-induced impacts on the thyroid axis were observed in gonadal phenotypes of gonadal phenotypes showing both testis and ovary tissues (1.5 mg l⁻¹ treatment) and complete male-to-female sex reversal, C-gonads with associated accumulations of protein in the endogenous responsive path proteins. This is the first study that chemical in an amphibian species and demonstrates the validity of the assay.

BP-2 conc. (mg l ⁻¹)	Genetic male			
	0	1.5	3.0	6.0
Total n	20	19	12	14
Replicate tanks	4	4	4	4
Gonad phenotype				
1 (Testis)	100	37	0	0
2	0	(32)	0	0
3	0	0	0	0
4	0	0	0	0
5 (Ovary)	0	(32)	(100)	(100)



甲状腺組織



生殖腺組織

雄から雌に性転換した割合

先ほど申しましたようにEXTEND2016の中ではLAGDAは生殖腺に対する影響ではなく、甲状腺に及ぼす影響を見るための第二段階の生物試験として使うことを想定していますが、ベンゾフェノン-2を用いた試験では、NF stage 62から10週間後まで暴露を行い、生殖腺への影響も確認しています。ここではベンゾフェノン-2が甲状腺に影響を及ぼし、発達を遅延させる一方で、遺伝的な雄の精巣を雌の卵巣に転換させるというような影響が見られています。このように、本来の両方見るという役割もうまく検出できるという、生殖腺と甲状腺への影響両方が検出できる事例も日米二国間協力の中で明らかとなっています。

まとめ・今後の課題

- ▶ EXTEND2016の内分泌かく乱作用に関する有害性評価の枠組みで第1段階の試験管内試験として実施するレポータージーン試験については、評価対象とする作用の試験法はすべて開発済みの状況にある。
- ▶ 各レポータージーン試験については、生物試験の結果等との比較により、妥当性や有用性を検証している。
- ▶ EXTEND2016の内分泌かく乱作用に関する有害性評価の枠組みで、化学物質の甲状腺に及ぼす影響に関して、作用の有無及び有害性を評価するための第1段階及び第2段階の生物試験として、両生類変態試験及び幼生期両生類成長発達試験が開発され、OECDでテストガイドライン化されている。
- ▶ 両生類変態試験及び幼生期両生類成長発達試験については、陽性物質等を用いた試験を実施し、エンドポイントの反応性等を含めて、試験法の妥当性、有用性及び評価における課題等を検証している。
- ▶ 両生類試験については、メダカなど魚類に比較して既存知見が相対的に少ないことから、EXTEND2016の取組を通して知見の蓄積を図りつつ、それらを踏まえて化学物質（試験対象物質）の評価を実施していくことが必要である。

ご静聴ありがとうございました。

29

最後に、簡単にまとめて、今後の課題についてお話しします。

EXTEND2016の内分泌かく乱作用に関する有害性評価の枠組みで、第1段階の試験管内試験として実施するレポータージーン試験については、評価対象とする試験法は全て開発がされた状況にあります。

各レポータージーン試験については、先ほどお示しましたように、生物試験の結果等と比較することによって、妥当性や有用性の検証が進められています。

また、同じくEXTENDの枠組みの中で、化学物質の甲状腺に及ぼす影響に関して作用の有無及び有害性を評価するための第1段階、第2段階の生物試験として、両生類変態試験(AMA)と、幼生期両生類成長発達試験(LAGDA)が開発され、それぞれ日本も協力してOECDでテストガイドライン化されています。

これらの試験については、同様に陽性物質等を用いた試験を実施してエンドポイントの反応性を含めて試験法の妥当性、有用性、あるいは今後の評価における課題等の検証を進めています。

ただし、両生類の試験については、メダカなどの魚類と比較して既存の知見が相対的に少ないことが課題として挙げられます。したがって、今後EXTEND2016の取組を通して知見の蓄積を図りつつ、それらを踏まえて化学物質、すなわちEXTENDの中で選定された試験対象物質の評価を実施していくことが必要になってくると考えます。

私の発表は以上で終わります。御清聴ありがとうございました。