

EXTEND公開セミナー  
2012年12月17日 浜離宮朝日ホール

# かえる、メダカ、ミジンコで 内分泌かく乱を測る！？

鑑迫 典久

国立環境研究所 環境リスク研究センター

1

今日お話しするのは、カエル、メダカ、ミジンコで生物試験についての話ですが、環境省さんの方から、やさしく平易に、みんなにわかりやすく伝えてほしいと言われて、こういうタイトルにしたのですが、名簿を見ますと、専門家が多いので、ちょっと物足りないかもしれません。

後半はちょっと難しくなりますが、前半は一般的な話をしたいと思います。

## テーマ



### 測るということ

- 生き物を使う理由
- 内分泌かく乱の測定は難しい
- 生物測定上の問題

### 何を測るのか

- いままでの測定方法
- EXTEND2010
- 内分泌かく乱の種類



### どうやって測るのか

- かえる
- メダカ
- ミジンコ

2

今日話すテーマは、大きく3つに分けて、測るということと、何を測るのかということと、どうやって測るのかについて説明したいと思います。

測るということ

生き物を使う理由

内分泌かく乱の測定は難しい

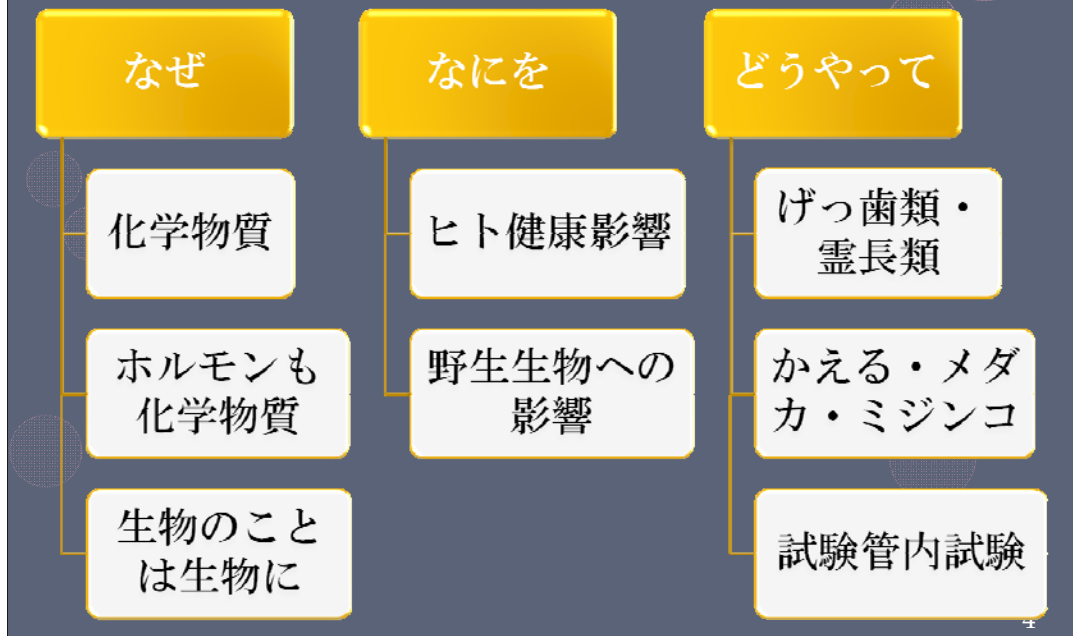
生物測定上の問題

3

まず、私は生き物を使って測るということを専門としているのですが、それについて、緑のところなのですが、生き物を使う理由、なぜ生き物を使うのか、あと、内分泌かく乱の測定というのは非常に難しい。なぜ難しいのかという説明をちょっとします。

あと、生物測定上の問題というのは、内分泌かく乱に限らず、一般的な問題点について説明したいと思います。

## 生き物を使う理由



まず、生き物を使う理由ですが、化学物質の重さを測定するのはたぶんガスマスやLC/MSの方が正確に測定できると思います。生き物を使う理由としては、一番下に書いてあるのですが、生物のことは生物に聞けというか、生き物の反応のことは生き物に聞くしかないんです。内分泌かく乱というのは、効果と影響で定義されているので、ガスマスやLC/MSを使ったら、重さはわかりますけれども、生物への影響はわからない。だから、生物影響を見るためには生物試験を使わざるを得ないというのが1つの理由です。

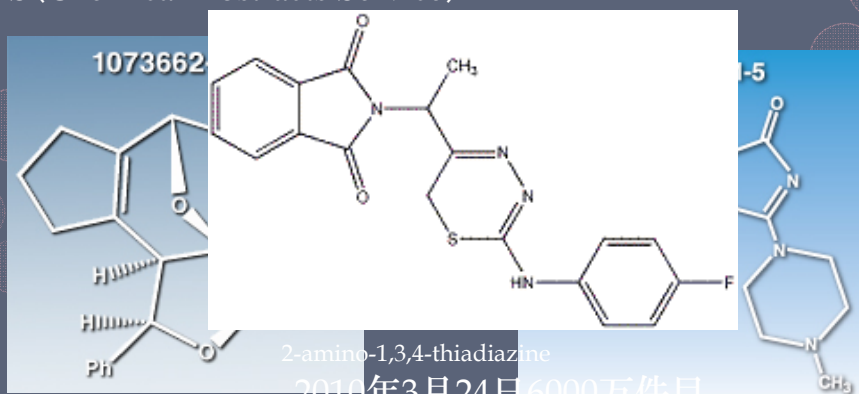
何を測るか。大きく分けて内分泌かく乱は2つあると思います。

ヒトへの影響と野生生物への影響。逃げるわけではないですが、私が今日お話しするのは、野生生物への影響についてのみです。ヒトへの影響を調べるならば、げっ歯類とか霊長類を使って試験をしないと本当のことはわからないかもしれない。これを使ったからといって、本当にヒトへの影響がわかるかは微妙なんです、少なくともミジンコを使ってヒト影響はわからない。ですから、そこはちゃんと分けないといけないのです。ただ、メダカやカエルは若干ヒトと同じような体の酵素とかホルモンを持っていますので、カエル、メダカはヒト影響をある程度外挿できますが、ミジンコは絶対できません。

また、今日お話しするのはここだけなんです、他の生物試験としては、試験管内試験(ビトロの試験)がありまして、EXTEND2010にしても試験管内試験とこういう試験を組み合わせて構成されております。

# 世の中に化学物質は幾つあるか？

CAS (Chemical Abstracts Service)



1073662  
*rel*-(1*R*,2*aR*,5*aR*,7*S*,10*bR*,10*cR*)-  
1,2*a*,3,4,5,5*a*,6,7,8,9,10,10*b*-dodecahydro-1-  
phenyl-7,10*c*-epoxy-10*cH*-azuleno[4,5,6-  
*cd*]benzofuran

2-amino-1,3,4-thiadiazine

2010年3月24日6000万件目

(5*Z*)-5-[(5-Fluoro-2-hydroxyphenyl)methylene]-2-  
(4-methyl-1-piperazinyl)-4(5*H*)-thiazolone

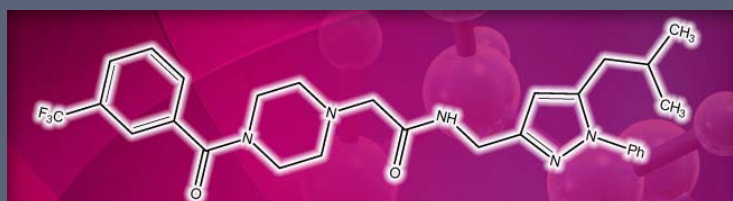
2008年11月21日4000万件目

2009年9月7日5000万件目

5

内分泌かく乱と一時離れるのですが、世の中に化学物質は幾つかあるのか、いつも悩むのですが、よりどころとなるのがCASぐらいしかなくて、趣味で時々Webで調べるのですが、2008年11月に4千万件、1年後の2009年に大体5千万件となって、1年間で1千万件化学物質の登録数が増えているのですね。

皆さんもWebで調べるとわかると思うのですが、楽しいですよ。どんどん数字が変わっていくので。



2012年12月6日7000万件

6

2010年3月に6千万件に達したのです。ずっと見ていて、いつ7千万件かなと思ったら、つい最近の12月6日に7千万件に達したのです。

つまり、それだけの化学物質が少なくとも発見なり作られたり合成されたりしているわけですね。使われているわけではないです。

## 内分泌かく乱の測定は難しい



### ホルモンの種類はたくさんある

- 女性ホルモンだけではない



### 従来のバイオアッセイが使えない

- 死なないことが前提。
- 何を観察すればよいのか(end point)



### 生来のホルモンメカニズムは多様

- 性差
- 種差
- 年齢差



### 新たな試験法は妥当性の確認が必要

- Relevancy
- Reliability
- Reproducibility



### かく乱は、細胞、組織や個体レベル

- *In vitro test* は作用機序の一面 (レセプター結合性など)

7

次に、内分泌かく乱の測定は難しい。私は逃げているわけではないのですが、本当に難しいのです。何が難しいかというと、一つには、ホルモンの種類がたくさんある。つまり、SPEED'98の時代は女性ホルモンにわりと特化して調べていたので、話は簡単だったのですが、女性ホルモンだけではなく、男性ホルモンもあれば、甲状腺ホルモンもあるし、その逆の働き、または阻害する働きも考えられるのです。そうすると、ホルモンがたくさんあるということになります。

あと、生来のホルモンのメカニズムが多様だ。いろんなホルモンが同じ働きだけするのではなくて、いろんな働きをします。その局面は、性差によって、男と女で効き方が違ったりしますし、種差、いろんな生物、いろんな種がいますから、種によって違いますし、年齢差によってもホルモンは違います。そこら辺でメカニズムが非常に複雑だということ。

かく乱は、細胞内の内分泌かく乱というものもありませんが、主には個体レベルで見なければいけない。組織や個体レベルでホルモンのかく乱が起こります。それはホルモンのもとの原理からいって、あるところからの命令が、あるところに伝達する物質がホルモンなのでそうなんです。そうすると、*in vitro*のテストだけで複雑な作用のメカニズムを明らかにするのは難しい。だから、一般的に使われている試験管内試験で、レセプターにくっつか、くっつかないかだけ見ていたら、たぶんホルモンの一面は見ているのですが、全体を見ていることにはならない。そこが難しいところです。ですから、一番最初に部長もおっしゃいましたように、ピボの試験とビトロの試験と両方やらなければいけないというのは、そういうところにあります。

もう一つは、従来のバイオアッセイが使えないというのが難点です。従来のバイオアッセイというと失礼ですが、化審法で使っている試験がホルモンの評価に使えるかといえ、使えないのです。基本的に化審法では、死ぬ、生きるというのが一つの重要なエンドポイントになっていますけれども、内分泌かく乱は、死んでしまったらもうかく乱される内分泌はないので、死ぬ前の段階で見なきゃいけない。そうなってくると、だんだん従来のバイオアッセイでは使えないものが多い。

あと、エンドポイントという言い方をしていますが、何を観察するか。死ぬ、生きるだったらはっきりわかるのですが、どこかがむずかゆいとか、どこかが痛いとかというのは、なかなか見つけにくいのです。ホルモンの場合には、どこに、どういう形で影響が現れるかというのがなかなかわからない。だから、性だけ見ればよいというものではないのです。それは後で説明しますが、そこら辺が難しい。

あと、新たな試験法を開発したときには、その妥当性の確認が必要というのは、実は内分泌かく乱の試験法に限らず、全ての試験法に言えるのですが、つまり従来のバイオアッセイが使えないとなったら、新しい試験法を作らなきゃいけないのです。先ほど最初にご質問されたモリタさんがおっしゃったように、グローバルに使えない試験法だと逆にだめなんです。新たな試験法を開発して、自分だけで得意になって試験法を使っていたら全然意味がないんです。世界中で同じような試験法でやらなきゃいけないし、その試験法は妥当でなきゃいけない。その妥当性の確認というのが非常に難しいのです。

Reliabilityとか、これはリサイクルの3Rと違う3Rを私が勝手に作っているのですが、これについては後で説明します。

## 生物測定上の問題点

内分泌かく乱物質を調  
べる試験法は**未確定**

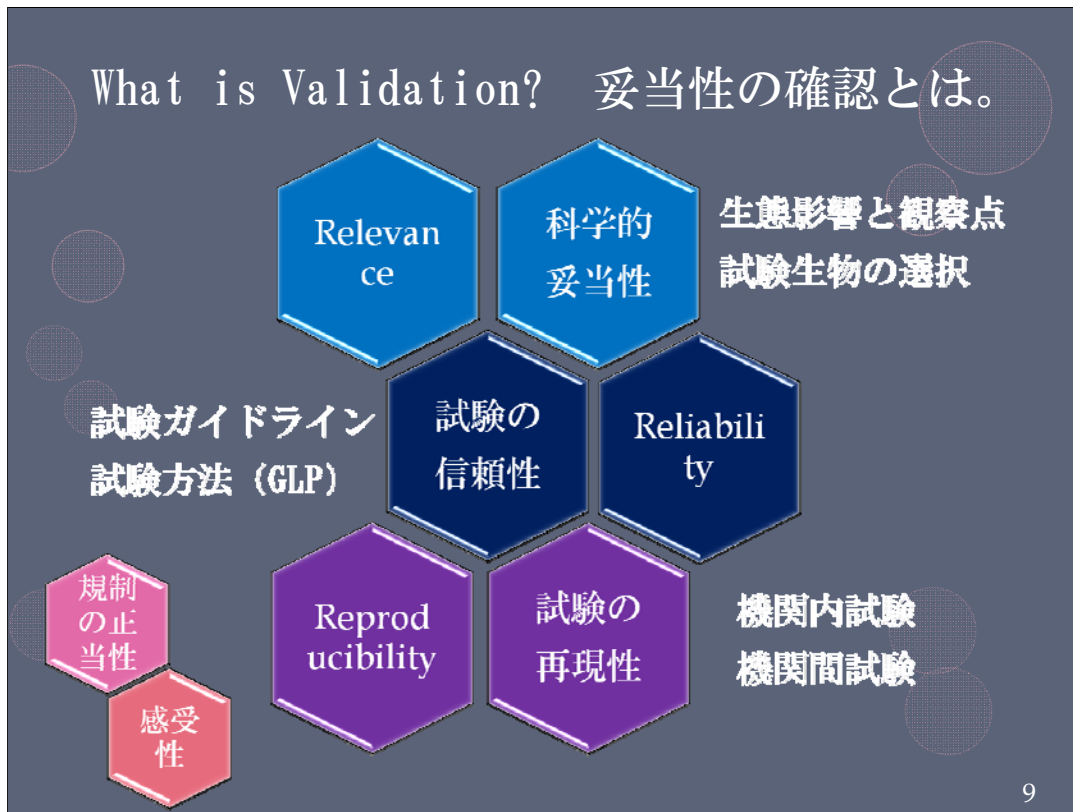
**新たな試験法**の開発  
が必要

新試験法は**妥当性の  
確認**が必要

繰り返してみたいになりますが、内分泌かく乱の試験法というのは、既存の試験法が使えない。一部確定しているところもあるのですが、まだ未確定の部分があります。

そうすると、新しい試験法を開発しなくてはいけない。試験法の妥当性についての確認が必要というところが今、生物測定上の問題点になると思います。





3Rといったものの説明をしますと、妥当性の確認とは何かといいますと、これは内分泌かく乱の試験法だけではなくて全ての試験法に関わっているのですが、まずはRelevanceがあるか、つまり科学的妥当性があるかどうかということを確認しなきゃいけない。余り引き合いに出すと敵を作っちゃうからあれなんです、ある試験法を開発したときに、それが本当に科学的に正しいのかどうかを検証するのは非常に大変なんです。例えば大気汚染のひどいところに住んでいる人は鼻毛の伸びるのが早いと誰か言い出したとして、それが正しいかどうか確認するのは非常に難しいわけです。逆に言うと、確認できない試験法は使ってはいけないのです。そこでいろいろ試験法のセレクションがかかるのです。なんでもかんでも試験法を作ればよいというものではないということなんです。

何が必要かという、生物の影響と観察点と書きましたが、エンドポイントのことですが、生物としてどんな影響が出て、どんなところを見ればその影響がわかって、その原因は何で、ということがある程度道筋を立てなきゃだめだということですね。あと試験生物の選択があります。先ほど昆虫の話の質問をされた方もいらっしゃいましたが、なぜその生物を使うのか、その生物を使うためには何か理由があって使えばいいのですが、好きだからとか、かわいいから使っているというのではだめなんです。何かしらの理由があってその生物試験を選択しなきゃいけない。それは飼いやすいとか、感度が高いとか、いろいろ理由はあると思いますが、そういういろんな理由があって、実は試験生物を選ばなきゃいけないのです。

もう一つ、試験の信頼性ですが、これはまた非常に難しく、まずガイドラインのない試験は使わない。そんなことを言うと、またいろいろ言う人がいるかもしれませんが、独創的な試験法を否定するつもりはないのですが、先ほどおっしゃったように、グローバルスタンダードというか、インターナショナルにデータを共有するとなったら、ある程度決まりがない試験法はだめなんです。試験ガイドラインに沿うということが非常に重要なことなんです。だから、勝手に試験ガイドラインの中身を変えてはいけないのです。温度を変えたり、餌の量を変えたりすると、結果が変わってしまうので、ガイドラインを決めて、ガイドラインに従ってやるということが、1つのみんなが共有できるデータを持つということが重要なことなんです。

あと試験方法というのは、今言った餌の量とか、水の量とか、匹数とか全部守らなきゃいけない。つまり、GLP(Good Laboratory Practice)といっていますが、海外ではGLPを取得しているラボが出したデータは信用できるということになっていて、それは厳密な管理が行われているラボがやったということなんです。だから、試験の信頼性というのは、データの信頼性ですね。信頼性におけるデータが出せるかということが重要なことです。

もう一つは、Reproducibilityと書いていますが、これは試験の再現性です。誰々さんしかできない試験というのはあり得ないのです。それは、そこに仕事を集中するという意味ではなくて、それは信用できなくなるのです。真理というものは不変だと私は思っていて、そうすると、誰がやっても同じような数値が出てくれない試験法というのは、どこかおかしいのです。ですから、新しい試験法を開発すると、機関内試験と機関間試験をやるのですが、つまり1つのラボで繰り返し試験をやってみて同じ数値が出るかというのと、1つの試験法で違うA、B、C、Dのラボでやってみて同じ数値が出るかということを確認してからでないと、新しい試験法は使えないのです。

そういういろんな試験法のハードルを越えて出来上がった試験で内分泌かく乱の試験をやらないと、勝手に自分の思い込みで試験したデータで話を進められてしまうと、それは規制にも使えないし、リスク評価にも使えないのです。このところが非常に難しい。内分泌かく乱に限らないのですが、この3つは、試験法を開発する上で我々がすごく気にしているということをいつか言いたいなと思っていたので、この場を借りて言えてよかったです。

あと、皆さん重要だと思っているのが、この他には、規制の正当性というのがありますが、これはどの数字だとレギュレーションをかけて、どの数字だと下にするか、これは国ごとに違うのです。だから、ある化学物質が、Aという国では規制がかかるけれども、Bという国ではかからないというのは、たぶんその国の都合ですね。リスク評価のときの使用状況、環境中の検出量によっても決まりますけれども、これは国で決めるのでしょくない。

あと感受性ですが、皆さん、感受性が高い方がいいと思っているかもしれませんが、感受性が高くて、実はReproducibilityが下がったり、Reliabilityが下がるようでは意味がないのです。大体感受性が高い生き物というのは、再現性が悪かったり、同じ数値が出なかつたりするのです。だから、そこら辺の微妙なバランスが必要なんです、感受性は、第一義には普通に上げられないのです。つまり、試験法決定の最重要項目にはなってはいけません。もちろん感受性が低いものは試験法としてはだめですが、感受性がある程度ついていれば、あとは規制の正当性とかで数値を決めればよいので、そんなに求めなくてもいいということになってい



これは1つの例ですが、環境省の委託を受けて、ミジンコを使った内分泌かく乱の試験法を開発したことがあります。それはどんなステップで1つの試験法が妥当性評価を受けてなったかという歴史なんですが、昔、OECDのテストガイドラインの211番にミジンコの試験を提案して、それは日本が提案国として一国だけで提案した初めての例ではないかと思うのですが、それでどれだけ手間がかかったかということなんです。まず2003年に提案したのです。提案は比較的スムーズに承認されまして、第1回の専門者会議でいいよと簡単に言われたのですが、その後で、検証試験をやってくれと。このときには、私のラボで、いろんな国から8種類のミジンコを集めてきて、いろんな国の使っているミジンコで全部同じ結果が出るかやってみたら、どのミジンコを使っても同じ結果が出たのです。ということは、この試験は、国によって使っている生き物によって差が出ないということを確認したのです。

その次に、いろんな会議を経て、予備検証試験をして、レポートを提出して、次にやったのが検証試験なんです。これは、日本で使っている、私たちが使っているミジンコをいろんな国に配って、13ラボか、14カ国か、ドイツとかフランスとかイタリアとかにミジンコを渡して、そこで同じメソッドで、同じ化学物質で試験をしたのです。これをリングテストというのですが、その結果を集めて、検証試験のレポートを提出したのが2007年。ここまで4年かかっているのです。そのときに下手な国と上手な国があって、日本はわりと上手な国だったのですが、下手な国はコントロールでむちゃくちゃなデータが出たりして、データ処理が大変だったのです。だけど、下手だということは下手な人はちゃんと認めてくれて、2008年に、当初の開発予定は「Enhanced TG221」という名前だったのですが、今はOECDのテストガイドラインの別添7というところに試験法として承認されました。ですから、約5年かかってやっと1つの試験法の別添が1つ付いただけなんです。それぐらいの勢いで開発されています。これが無脊椎動物の内分泌かく乱の試験法の1つとして今使われています。

何を測るのか

---

既存の測定方法（OECD）

---

EXTEND2010

---

内分泌かく乱の種類

---

11

次に、何を測るのかですが、先ほど話に出ましたけれども、まずOECDの試験法について既存の方法を皆さんにご紹介します。

## 生態毒性に関するOECDテストガイドライン

TG No.	TG名	改正年月	TG No.	TG名	改正年月
201	藻類成長阻害試験	Jul-11	219	水中ユスリカ毒性試験	Nov-04
202	ミジンコ急性遊泳阻害試験	Nov-04	220	ヒメミズ繁殖試験	Nov-04
203	魚類急性毒性試験	Jul-92	221	ウキクサ成長阻害試験	Jul-06
204	魚類延長毒性試験（14日試験）	Apr-84	222	ミミズ繁殖毒性試験	Nov-04
205	鳥類摂餌毒性試験	Apr-84	223	鳥類急性経口毒性試験	Jul-10
206	鳥類繁殖毒性試験	Apr-84	224	嫌気性微生物活性試験	Jan-07
207	ミミズ急性毒性試験	Apr-84	225	底質-水でのミミズ毒性試験	Oct-07
208	陸生植物成長試験	Aug-06	226	土中の摂食ダニ生殖試験	Oct-08
209	活性汚泥呼吸阻害試験	Jul-10	227	陸生植物活性試験	Aug-06
210	魚類初期生活段階毒性試験	Jul-92	228	双翅類フンバエ科の発達毒性測定	Oct-08
211	オオミジンコ繁殖阻害試験	Oct-12	229	魚類短期繁殖試験	Oct-12
212	魚類胚・仔魚短期毒性試験	Sep-98	230	21日間魚類試験	Sep-09
213	ミツバチ急性経口毒性試験	Sep-98	231	両生類変態試験	Sep-09
214	ミツバチ急性接触毒性試験	Sep-98	232	土中のトビムシ繁殖試験	Sep-09
215	魚類稚魚成長毒性試験	Jun-00	233	底質-水ユスリカ生活環毒性試験	Jul-10
216	土壌微生物窒素無機化試験	Jun-00	234	魚類性発達試験	Jul-11
217	土壌微生物炭素無機化試験	Jun-00	235	ユスリカ属急性運動阻害試験	Jul-11
218	底質中ユスリカ毒性試験	Nov-04			

12

これは字が小さいので、お手元の資料を後でじっくり見ていただければいいのですが、OECDのテストガイドラインの200番台の試験というのは生物試験なんです。201から、今235まで存在しています。右側には最新の改訂年月日を入れてあります。

この試験法があるのですが、これは内分泌かく乱の試験法ではありません。この中で内分泌かく乱に使える試験法としてどれがあるかといいますと――

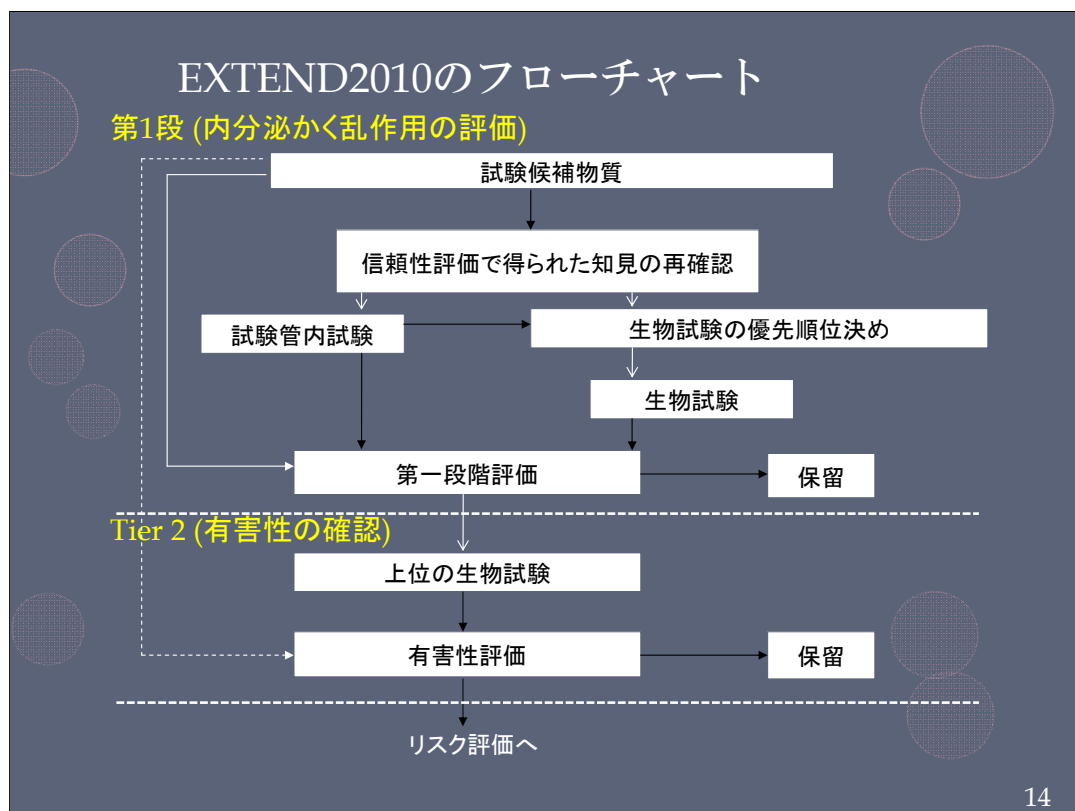
## 内分泌かく乱に関するOECDテストガイドライン

TG No.	TG名	改正年月	TG No.	TG名	改正年月
211	オオミジンコ繁殖阻害試験	Oct-12	229	魚類短期繁殖試験	Oct-12
			230	21日間魚類試験	Sep-09
			231	両生類変態試験	Sep-09
			234	魚類性発達試験	Jul-11

13

これだけなんです。オオミジンコの繁殖阻害試験、これはさっき私が言った、5年もかかってやっとOECDのガイドラインの別添7になったというものが211番のannex7。あと、229番、230番、これはメダカを使ったビテロジェニンアッセイ試験、短期繁殖試験といひまして、環境省のEXTEND2010でも第1段階試験として用いられているものです。231番というのは、後で説明しますが、カエルの試験。234番というのは、魚の性発達試験といひまして、環境省のEXTEND2010では使いませんが、SPEED'98のときには「パーシャルライフサイクルテスト」という名前で使っていたものです。

先ほど内分泌かく乱の試験がないと言っていたら、あるじゃないかと言いますが、こちら辺は全部、年代を見ていただければわかると思いますけれども、EXTEND2005以降にやっとながが昔の財産をもとに、後で説明される井口先生と一緒にOECDに通って、何とか世間に認めてもらったというか、いろんな国で使ってもらえるようにグローバルスタンダード化した試験法なんです。この試験は、どこの国でやっても同じような試験法になっていますし、ちゃんとしたGLPを持っているラボがやれば同じような数値が出てくるはずの試験法なんです。逆にいうと、今のところまだこれだけしかないのです。日本では234は使わないので、日本で使うとしたら、この4つ。

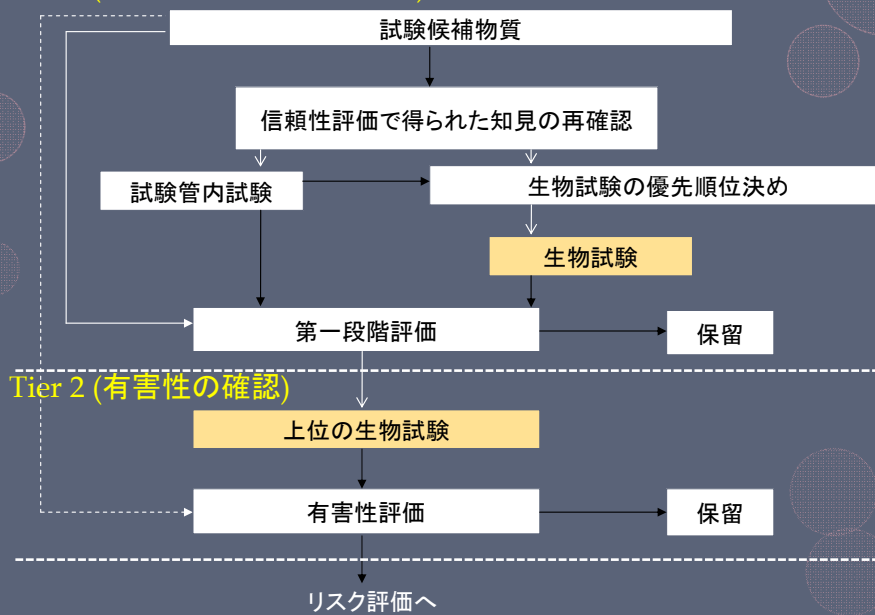


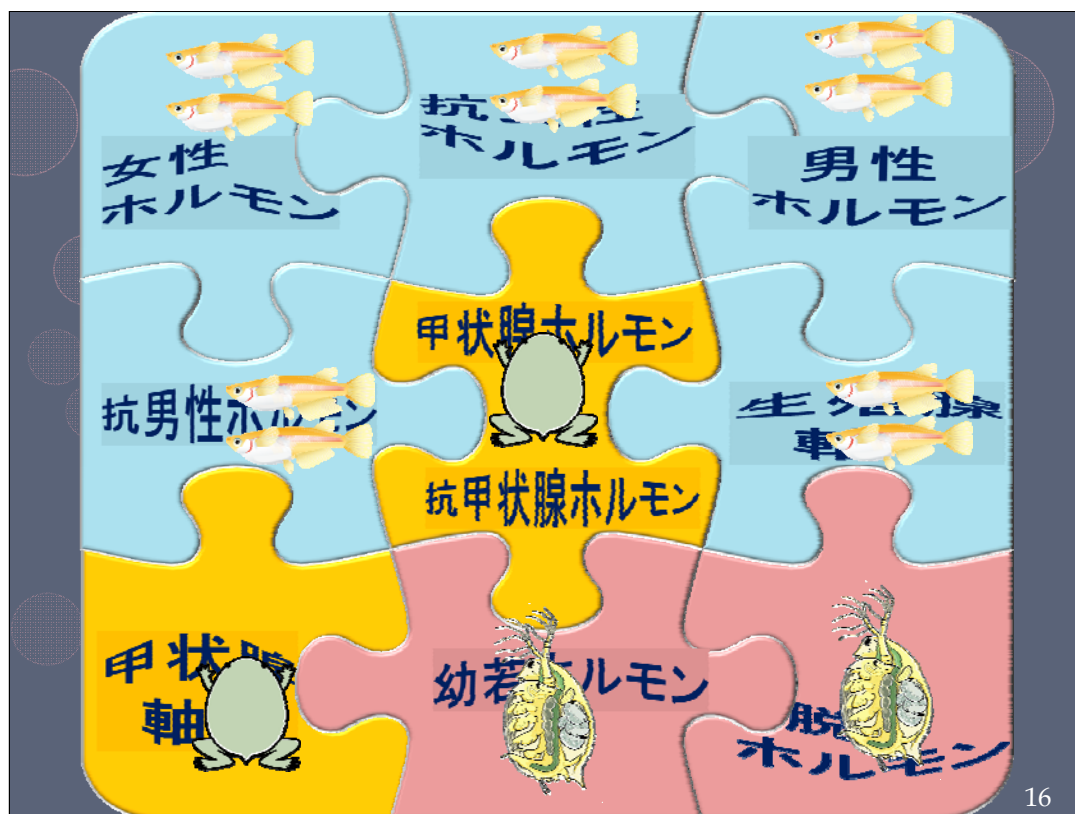
(P14とP15に対する説明)

これは先ほど上田課長の図にもありましたが、EXTEND2010のフローチャートですが、生物試験は2カ所に入っていて、Tier1のところとTier2のところに入っています。Tier1の方が急性毒性試験で、Tier2の方が慢性毒性試験だと思っている方がいますけれども、それは違います。急性、慢性の分け方ではないのです。Tier1の方は、なるべく高濃度でばく露して、その化学物質が内分泌かく乱性を持つかどうかのポテンシャルを見ることを主眼に置いた試験法です。Tier2の方は、なるべく低濃度でばく露して、どこまで薄めたら影響がなくなるかを見て、環境中濃度と影響がなくなる濃度の乖離を見る。もしも環境中濃度で影響が見られるようだったら、リスクは高くなりますね。だから、これはポテンシャルだけではなくて、リスク評価に使うための試験法。こちらは化学物質のポテンシャルを見る試験法なんです。違う試験法を持ってこないで見られないのですね。それは統計上の使っている生物の数とか、設定の仕方とか、見る項目とか、ばく露期間とっているのですが、試験の期間なども微妙に違ってきます。そこについて簡単に次に説明します。

# EXTEND2010のフローチャート

## 第1段 (内分泌かく乱作用の評価)





その前に、どんなホルモンが内分泌かく乱の対象になるかですが、内分泌かく乱というのは、確かに複雑だと言いましたけれども、今、環境省で整理しているのがこのパターン。これがパズルのように埋まって、網羅的とまで言えるかどうか分かりませんが、これだけ押さえていけば、内分泌かく乱の作用がわかるだろうと考えているところです。女性ホルモン、抗女性ホルモン、男性ホルモン、抗男性ホルモン、甲状腺ホルモンと抗甲状腺ホルモン、生殖腺軸、甲状腺軸、幼若ホルモン、脱皮ホルモンです。最後の2つは、昆虫とかエビとかカニの節足動物のホルモンです。

分担がありまして、このように分かれています。青で書いたのが、簡単に言うとメダカ担当で、黄色がカエル担当、赤い幼若ホルモンと脱皮ホルモンはミジンコ担当になっています。



どうやって測るのか

かえる



メダカ



ミジンコ



17

ちょっと話が長くなりましたが、これからやっと本題で、どうやって測るのか、にいきたい  
と思います。この順番でカエルからいきます。

かえるの試験のキーワードは

変態

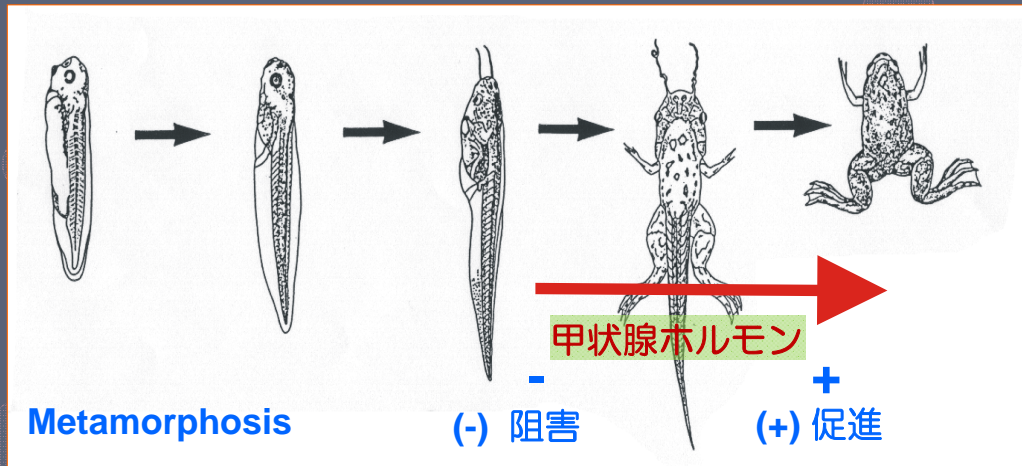
metamorphosis



18

カエルのキーワードは「変態」です。変態というと、誤解される方がいるので、英語で書いておいたのですが、metamorphosisの変態です。ここに小さな縮図を書いています、このピースとこのピースがカエルの担当となります。

# Development of *Xenopus*



19

なぜキーワードとして変態を見るかという、実は甲状腺ホルモンがカエルの変態に重要な役割を果たしています。つまり、オタマジャクシが、後肢が生えて、前肢が出てきてカエルになるまで、そのときに実は甲状腺ホルモンがたくさん分泌されてきっかけになるのです。その量が多かったり少なかったり、出るタイミングがずれたりすると、奇形になってしまうのです。

同じようなことは他の生き物でできないか。カエル以外でもできるのではないかとおっしゃるかもしれませんが、実は人間で甲状腺ホルモンの試験をやると、もっと大変。人間は無理ですよね。ネズミとかではできなくはないのですが、影響を見るのが大変。メダカなんかでも甲状腺ホルモンを与えても何も外見的变化はないです。ただ、ヒラメとかカレイなどの平たい魚は、稚魚の頃には縦に泳いでいて、それが横になるときに、目が右に寄ったり左に寄ったりするときに甲状腺ホルモンが関係してくるので、ヒラメとかを使うと甲状腺ホルモンの検出系はできるかもしれませんが、今のところ、そういう試験系が確立されていないので、一番確立されているのはカエルということで、カエルを使った試験系をOECDの方でも提案されています。