



Overview of Some Key Past and Current U.S. EPA Studies on Endocrine Disrupting Chemicals (EDCs)

Jim Lazorchak, Aquatic Ecologist/Toxicologist

U.S. Environmental Protection Agency (EPA), Office of Research and Development

On behalf of a research team of scientists from EPA, other Federal agencies, and universities

Ministry of the Environment Seminar on Disrupting Effects of Chemical Substances



Office of Research and Development
National Exposure Research Laboratory

August 20, 2015

The views expressed in this presentation are those of the author and do not necessarily reflect the views or policies of the U.S. EPA.

ありがとうございます。このセミナーでお話しできることをうれしく思っております。少し話題と視点を変えてお話をしていきたいと思えます。特に水生生物の話をしていきたいと思えます。特にEE2(エチニルエストラジオール)、つまり避妊薬に含まれているものでありますが、こちらのお話をしていきたいと思えます。

多くの科学者が検討をしているわけです。

Outline

- **Whole Lake Dosing Experiment - Collapse of a Fish Population Following Exposure to a Synthetic Estrogen (1999 – 2006)**
- **Results of a 21-Day Fathead Minnow Fecundity Study Following Exposure to 17 α -ethinylestradiol (EE2) (2015)**
- **South Platte River, Colorado Wastewater Treatment Plant (WWTP) Field Study (2012 – 2015)**
- **National Municipal Effluent Contaminants of Emerging Concern (CEC) Study Sampling (December 2010 – April 2011)**

2

では、今日の講演の内容です。

医薬品のEE2(エチニルエストラジオール)ですが、3種類の魚について全湖添加実験を行いました、ばく露後の個体群の崩壊というものについてみています。NOEC、PNEC、つまり無影響量等、ほとんど観察不能な影響濃度を検討していったわけです。

次に、EE2が実際に物質としてこういった河川に再放流されている、そして影響を及ぼしているという証拠ですね。水の中における証拠をつかもうとしても、なかなか検討が難しいということで、我々としては今回このような実験系を組むことによって、その因果関係をみようと思ったわけです。果たして排水中に混じっている共存物質としてこういったものであり、影響が魚類に対してどうあるかということを検討していきました。



Whole Lake Dosing Experiment –

Collapse of a Fish Population Following Exposure to a Synthetic Estrogen

Kidd Karen¹, Blanchfield Paul¹, Mills Ken¹, Palace Vince¹, Evans Bob¹, Lazorchak James², and Flick Robert² 2007, Proceeding National Academy of Science

¹ Fisheries and Oceans Canada, Freshwater Institute, Winnipeg Manitoba, Canada

² U.S. EPA, National Exposure Research Laboratory, Cincinnati, OH, USA

Summary

- Dose a Whole Lake for 3 years during Spring – Fall
- Collect Fathead Minnows, Pearl Dace and Lake Trout
- Measure molecular to population endpoints

3

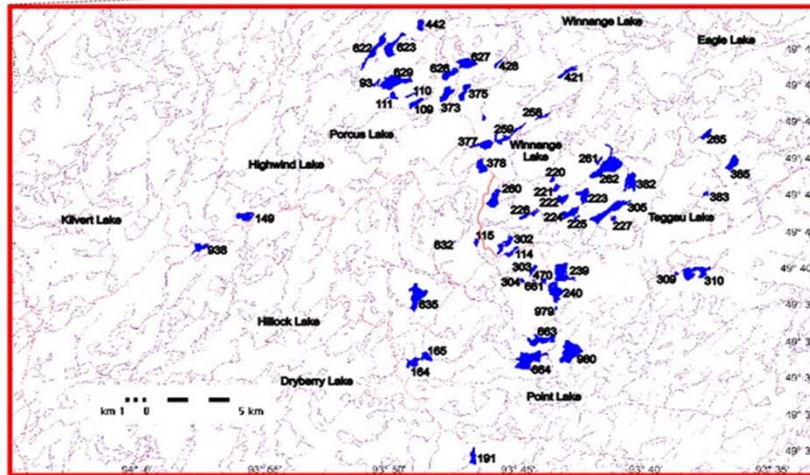
こちらがその研究です。2007年に発表済みのデータです。世界的にも認識されております。医薬品が、エストロゲンのばく露というものが、野生魚類の個体群に対して影響をもたらすということがわかったわけです。実際に個体群の崩壊があった、いなくなってしまったという事例も報告されています。これは家畜であるウシなどへのEE2投与がその背景にあるということです。

カナダにおいて3年間に渡って春季から秋季にかけて湖全体に添加して、分子レベルから個体群に至るまでのエンドポイントを計測しています。

58 Designated Research Lakes and their Watersheds Detailed Monitoring since 1969



- Located in northwestern Ontario approximately 250 km east of Winnipeg and 50 km east-southeast of Kenora



**Boreal
Shield of
northwestern
Ontario**

4

Experimental Lakes Area

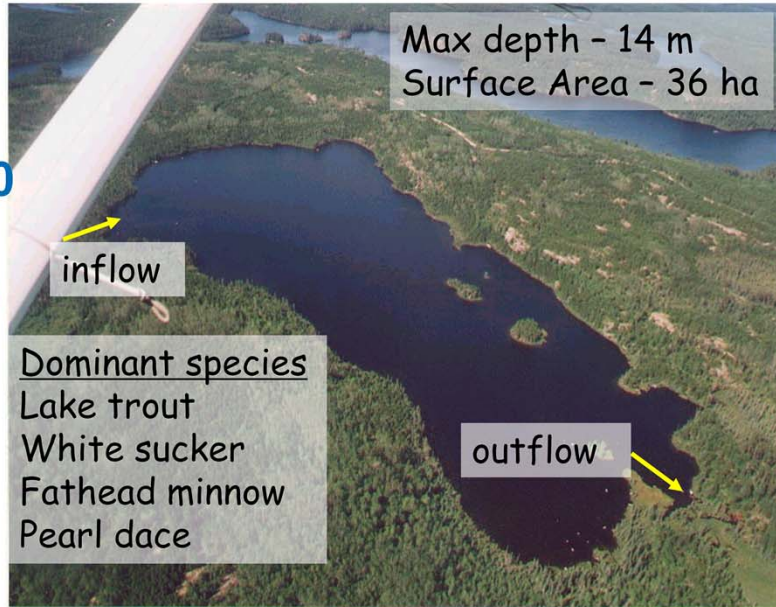
Courtesy of: K. Kidd

Designated Research Lakes shaded Blue

こちらはカナダの地図ですが、今日は米国からカナダにかけて御覧になって
いただきたいと思います。58の指定された調査湖及び水系が存在しています。

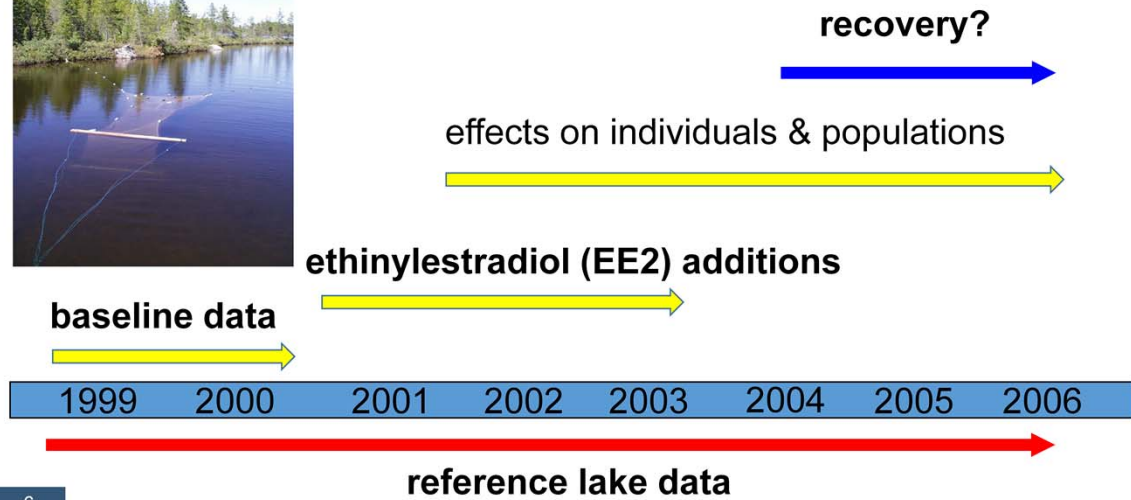
Whole Lake Dosing Experiment

Lake 260 - Estrogen Addition Lake



3年間に渡って5月末から10月末にかけて添加を行いましたが、これがエストロゲン添加湖Lake 260です。主な魚種をこちらに示しています。種類があるということです。結構狭いところが流入口となっています。

Whole Lake Dosing Experiment Study Design



6

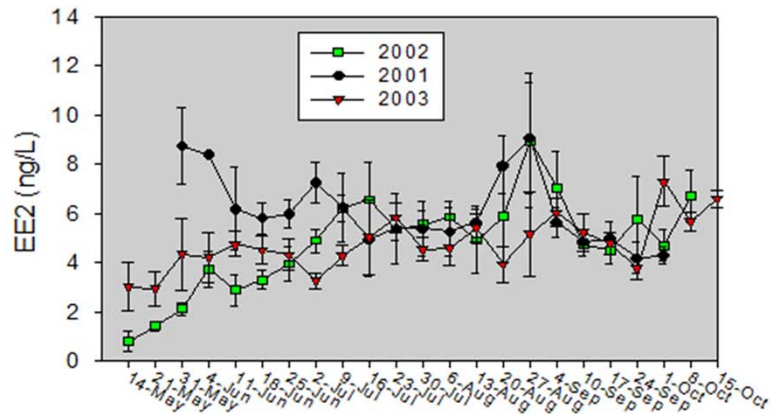
Courtesy of: K. Kidd

こちらがタイムラインです。ベースライン研究を行っています。これは添加する前ということです。

超微量の投与を開始し、そして魚類についての計測を行ったわけです。2001年から2003年、分子レベルにおいて計測を行いました。2006年まで個体及び個体群における影響をみて、回復はあるのかということも研究対象としました。

Whole Lake Dosing Experiment Additions of EE2 to Lake 260, 2001–2003

- EE2 added 3 times a week for 5 months
- 100–450 mg added/day to maintain constant concentration (4.5% loss/day)
- Season mean of 6.1 (± 2.9), 5.0 (± 1.8), and 4.8 (± 1.0) ng/L in surface waters

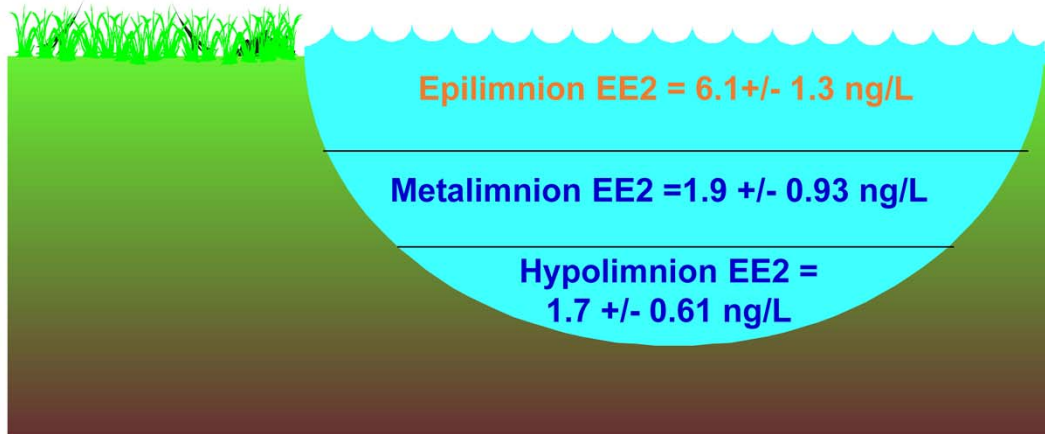


7

Courtesy of: K. Kidd

化学物質としての濃度はどうであるのか、各季節においてみています。ng/L、すなわちpptが単位であります。ppm、mg/Lではありません。ng/Lという非常に微量なわけです。3年間を通してこの平均値が5ng/Lとか、そのぐらいのところにあるわけです。環境的にはかなり高い濃度といえます。

Whole Lake Dosing Experiment Concentrations of EE2 in Stratified Lake 260



8

Courtesy of: K. Kidd

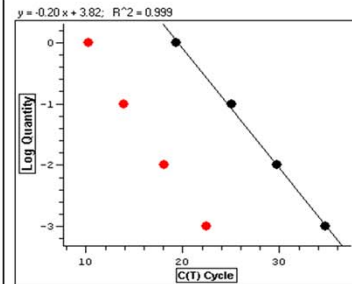
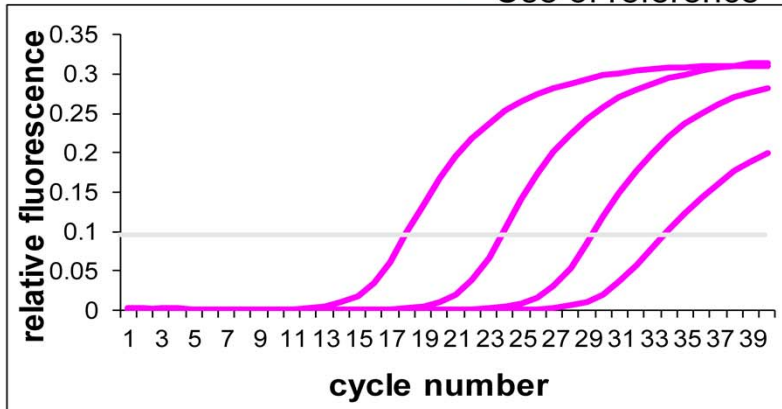
こちらにありますのは、理解を深めるために入れました。水環境へのばく露を考える際、研究対象の魚種が影響を受けることが必要になります。さきほどの添加濃度、3層でみていますが、一番上から表水層、循環層、深水層というのはDOレベルが低いということになります。ミノーというのは、表層水、循環水の部分に存在しており、この層でばく露を受けるということになるわけです。9フィートとか、それ程度の深さです。つまり、ファットヘッドミノーとそれ以外の魚種とではかなりばく露濃度が違うということになります。

Molecular Endpoint Vitellogenin Gene Expression

Analyzed by quantitative real-time polymerase chain reaction (RT-PCR)

Quantitation

- Extrapolation to standard curve
- Use of reference



9

私どものラボにおいては、遺伝子発現をリアルタイムPCRを行って定量的にみています。ビテロゲニンの遺伝子発現を分子レベルで検討しています。この遺伝子を雄が持っているということ。遺伝子自体はあるのですが、通常は転写活性化されていません。いわゆる外因性のエストロゲンにばく露されて初めて転写活性化されるのです。エストロゲンにばく露されますと、ビテロゲニンの遺伝子が発現します。つまり、この遺伝子の発現は、エストロゲンばく露を意味しています。雌の場合には、ビテロゲニン蛋白質を合成して、そしてその魚はそれを消すことができない。いわゆる雌化するということになるわけです。そして卵を産むということになります。

定量的PCRでみていますが、こちらは肝臓由来のmRNAを検討しています。例えば11というセルサイクルにおいて数値が低いですが、右のほうにずっといきますと、より高いコピー数が得られ、それを検出することが可能となっていきます。つまり、このようにビテロゲニンの遺伝子発現と蛋白質発現とは意味が違うということをまず念頭に置いて下さい。

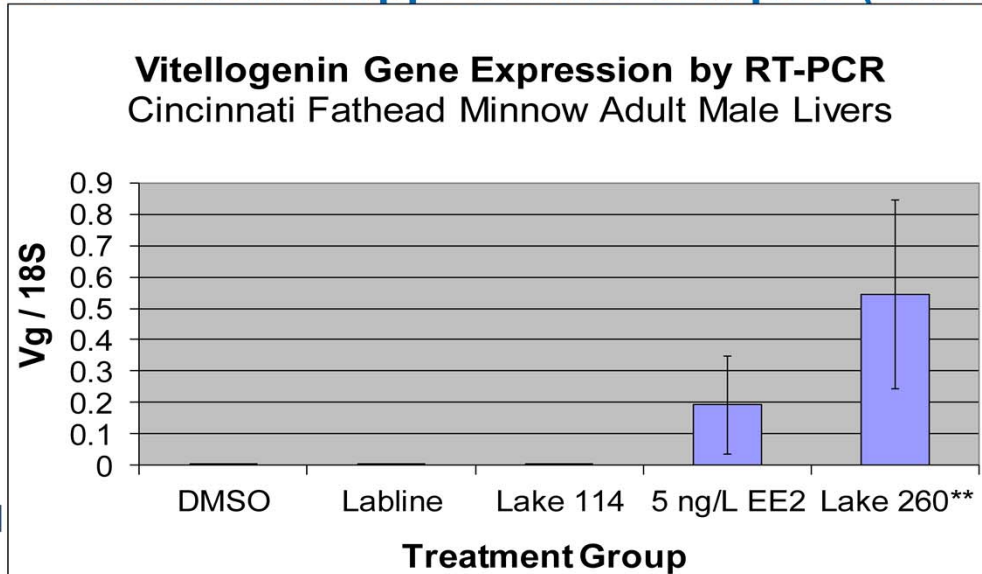
Vitellogenin Gene Expression 2001 Objectives

- Evaluate exposure of Cincinnati male fathead minnows to grab water samples from Lake 260 and Control Lake 114 and test at the U.S. EPA Aquatic Research Facility in Cincinnati, OH
- Evaluate short-term (13-day) exposure of Control Lake 114 male fathead minnows deployed in Lake 260
- Evaluate exposure of indigenous Lake 260 male fathead minnows to EE2 and compare to indigenous Control Lake 114 male fathead minnows

最初の年、添加を行いました。それから1年目、シンシナティに戻りまして、我々の魚を放流しました。EE2を添加した260の湖水に放したわけです。そして Lake 114という対照湖の水にもミノーを放流して、遺伝子発現の比較を検討しました。

カナダ人として我々がやりたかったのは、添加湖において残留EE2があって、それが交絡するのを防がなくてはいけないと考えました。残存しているEE2がありますと、それによってもビテロゲニンの遺伝子発現してしまうからです。そこで、添加湖に関して問題がないか。つまり、そこでもとからいた魚に関しても検討して、そこでEE2に最初にばく露しているかどうかということも比較検討することにいたしました。もとからいた魚と後で放流した魚で検討したわけです。

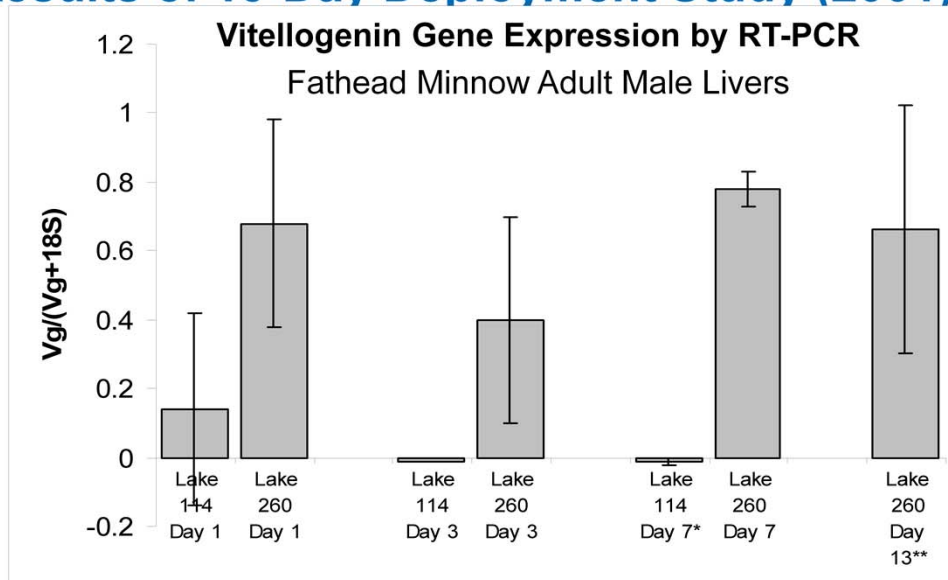
Vitellogenin Gene Expression Results from Shipped Water Samples (2001)



11

ポジティブコントロール、陽性対照というものを使ったわけですし、これが5 ng/Lということになります。それからLake 114、こちらは対照の湖、添加していないところ。それからEE2の等量関係もみえています。比率の関係でどうなるのか。5ng/L、ポジティブコントロール、魚が放流されたところと比較してどうなのかということを見ました。ここでわかるように、我々の魚にとってはLake 260区では5ng/L区と比較して明らかに高いビテロゲニン遺伝子発現を示しています。

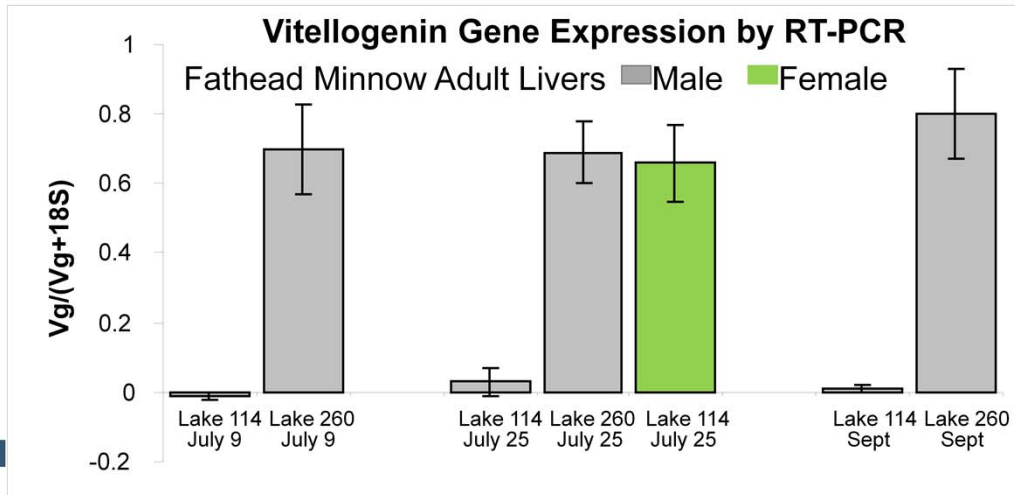
Vitellogenin Gene Expression Results of 13-Day Deployment Study (2001)



12

Lake 260に関してこのようにみえています。RT-PCRでの遺伝子発現を検討しています。Lake 260に入れる前はどうかだったのか。こちらがコントロールで1日経ったところ、既に変化がみられます。260に放流したばかり、1日目のところではビテロゲニンの遺伝子発現が顕著に増えています。さらにばく露期間が長くなりますと、有意な発現レベル亢進がみられています。

Vitellogenin Gene Expression Results of Indigenous Fathead Minnows Collected from Lakes 260 and 114 (2001)



13

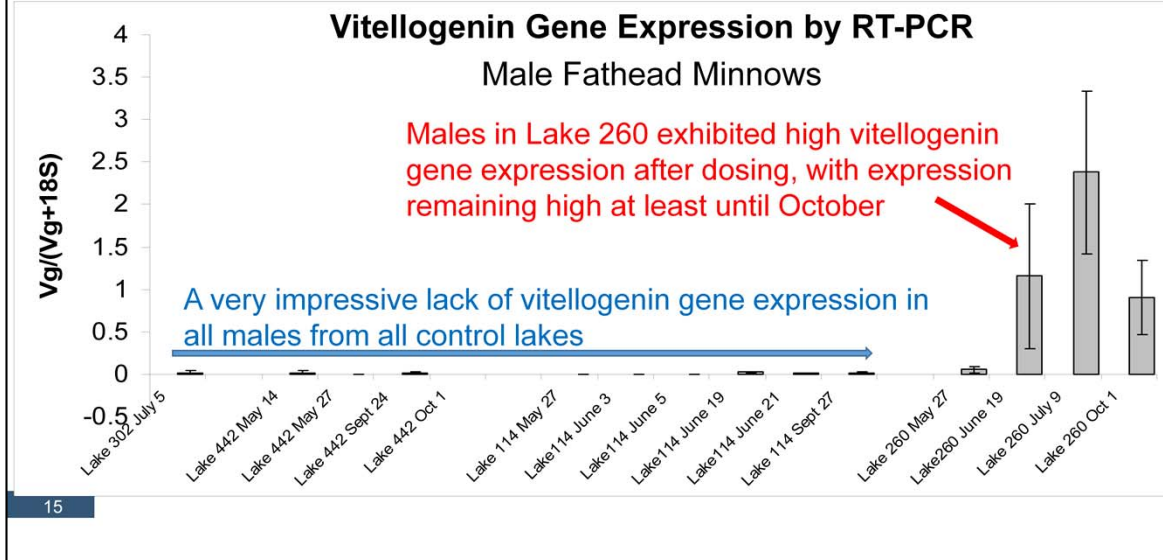
Lake 114、対照湖のほうでは変化なしということがわかります。こちらのほうですが、260にもともといた魚でありまして、添加前、これは添加する数週間前、7月の段階で検討しています。対照湖の雌についてみると、もともとのビテロゲン遺伝子発現が高い。それに対し、ばく露湖の雄では、典型的な雌よりもビテロゲン遺伝子発現が高いということがわかります。ライフスタイルとしては、産卵がおよその季節に起き、その後は水温が下がってしまうから活動が下がります。雪が降れば活動が停止するという状況であります。ただ、雄では秋になりましてもまだビテロゲン遺伝子発現は続いているということで、影響が続いていることがわかります。

Vitellogenin Gene Expression 2002 Objectives

- Evaluate exposure of indigenous Lake 260 male fathead minnows to EE2 using vitellogenin gene expression before and 3 times throughout the dosing and compare to vitellogenin gene expression in indigenous male fathead minnows collected from Control Lakes 114, 302, and 442
- Evaluate exposure of Cincinnati male fathead minnows to Lake 260 water at the U.S. EPA facility in Cincinnati, OH
- Evaluate exposure of Cincinnati fathead minnow fry to sediment from Lake 260

2002年になりまして、まず卵を採ってきて、Lake 260の底質に稚魚をばく露して影響を検討しようということにしたわけです。ただ、この実験系はうまくいきませんでした。

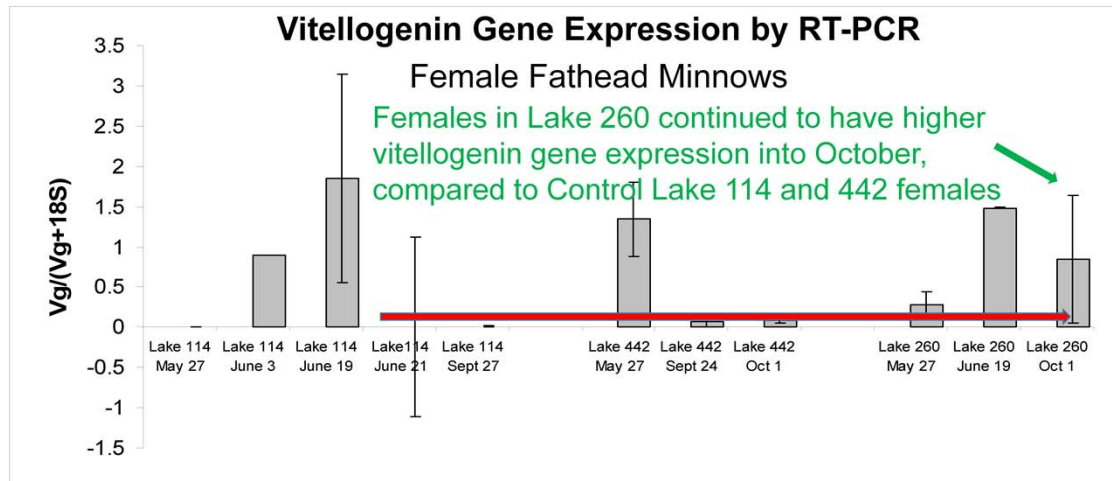
Vitellogenin Gene Expression Results from Males Collected in 2002



2002年、こちらが結果を示しています。時系列的にみていきますと、こちらが3つの対照湖についてです。魚を遺伝子発現を指標としてみていますが、対照湖のすべてにおいて採取雄魚のビテロゲニン遺伝子発現は認められないということがわかります。

もう1つの問題としては、ばく露湖の雄でのビテロゲニン誘導が産卵期を越えても続いていることです。

Vitellogenin Gene Expression Results from Females Collected in 2002



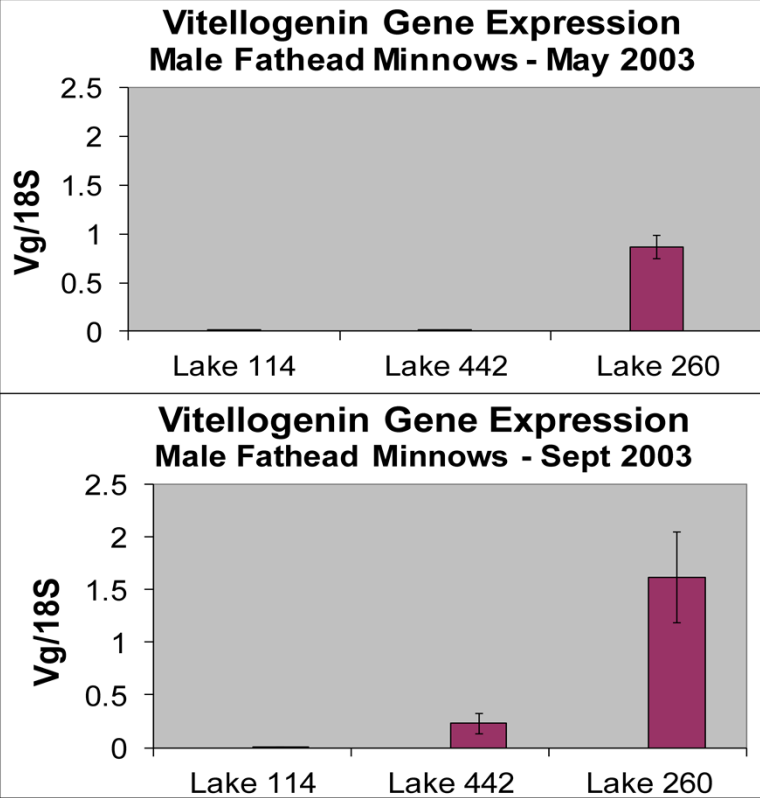
16

こちらは雌です。雌に関しては、6月ぐらいからこのような形でビテロゲニンの発現が認められます。ばく露湖では、ビテロゲニン遺伝子発現が維持されています。このペーパー、ビテロゲニンの遺伝子発現と蛋白質発現の両方のデータからも、産卵期を過ぎても雌はそれでも卵を産もうとしている。



Vitellogenin Gene Expression Results from Males Collected in 2003

17

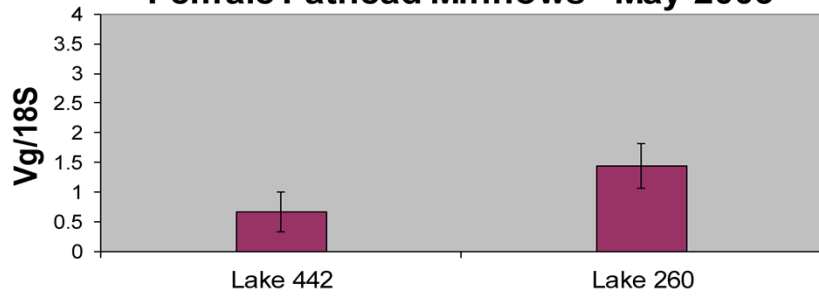


こちらは2003年の結果です。似たような結果が得られています。まだこの段階でばく露湖では雄でのビテロゲニン遺伝子発現はがかなり高い。対照湖では低いということがわかります。

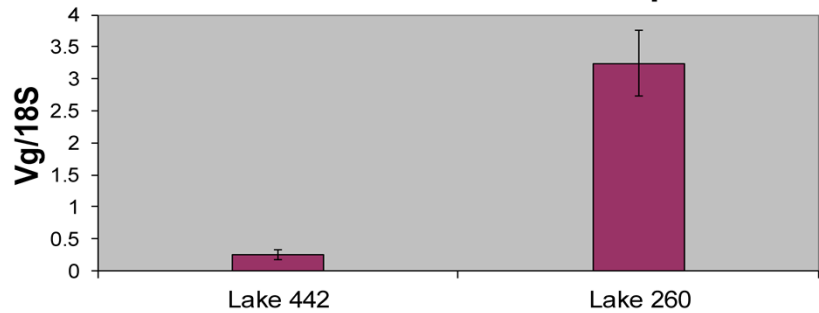
**Vitellogenin Gene
Expression
Results from
Females
Collected in
2003**

18

**Vitellogenin Gene Expression
Female Fathead Minnows - May 2003**



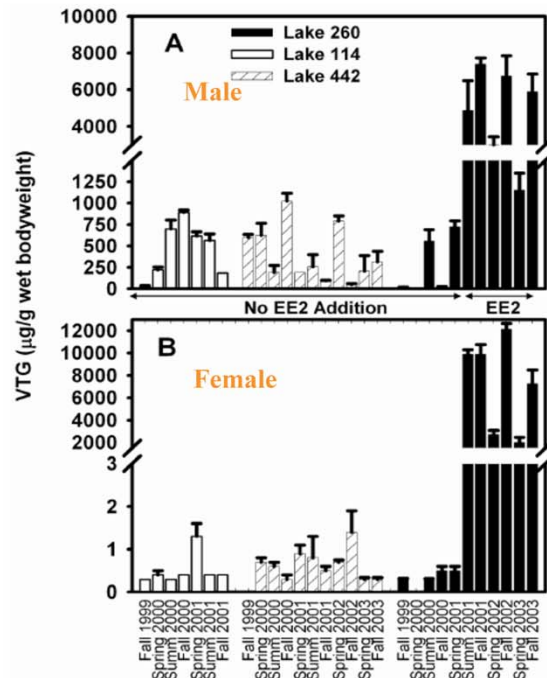
**Vitellogenin Gene Expression
Female Fathead Minnows - Sept 2003**



雌の場合ですが、やはりLake 260においてはビテロゲニンの遺伝子発現が高いということがわかります。つまり、過剰生産ということで、ビテロゲニン蛋白質の発現も高くなっているだろうということです。

Vitellogenin Protein

- Mean (\pm SE; n= 4-7) vitellogenin concentrations in whole body homogenates from fathead minnows captured in 1999–2003 from Control Lakes 114 and 442 and from Lake 260 before and during addition of 5-6 ng/L EE2
- Low catches of fish in Lake 260 in 2004 and 2005 did not allow for these analyses in the latter two years of the study.



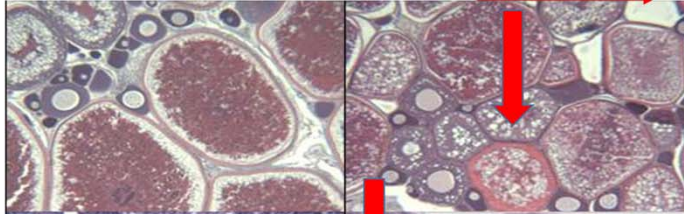
19

Courtesy of: Kidd et al.

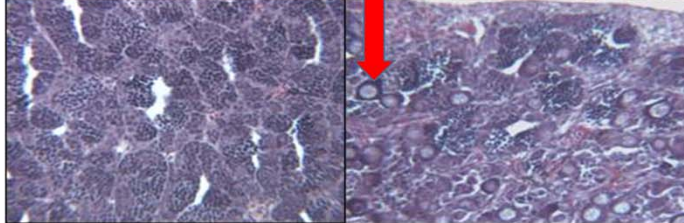
こちらは蛋白質をみています。2000年以前からみていますが、ばく露区での値は黒で示しました。雌においても雄においてもビテロゲン蛋白質の発現が高いということがわかります。調査者は、実際に魚を採取しビテロゲン蛋白質濃度を測定しています。

Gonad Histopathology Results Fathead Minnow Ovaries and Testis (2003)

A
Control Lake
442 Ovary



B
Lake 260
Ovary (EE2
Dosing)



C
Control Lake
442 Testis



D
Lake 260
Testis (EE2
Dosing)

Lake 260 Testes (**D**) demonstrating inter-sex

20

Courtesy of: Kidd et al.

また、分子レベルでは、遺伝子発現が異常になっていることがわかります。そして、ビテロゲニン蛋白質発現も影響を受けている。そのために卵巣に組織病理学的影響が生じていました。卵巣では、こちらでは正常ですが、こちらでは異常になっています。雄の場合には精巣が卵巣化しているということがわかります。つまり、雄の場合には早期の段階で間性になっているということです。

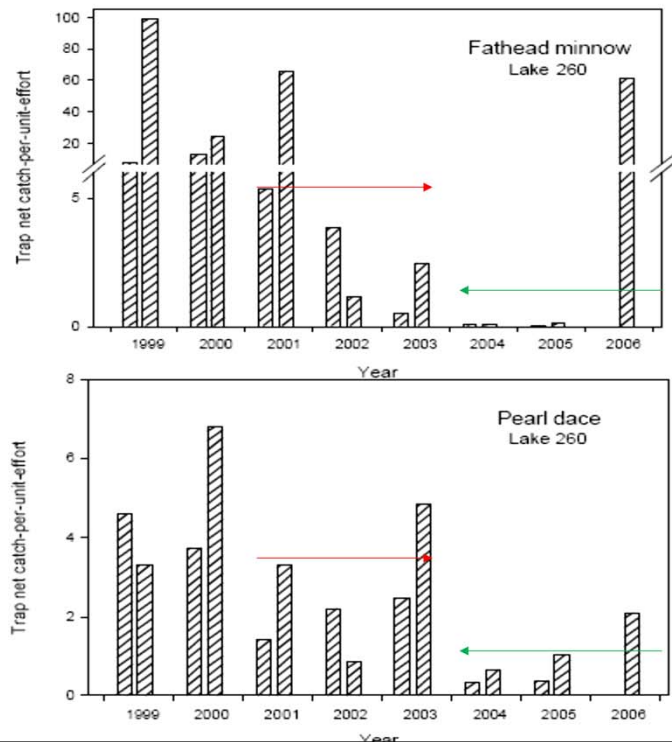
Fathead Minnow and Pearl Dace Population Size – Lake 260

Catch Results

- Pre-dose (1999)
- **During Dosing (2001-2003)**
- **Post Dosing (2004-2006)**

21

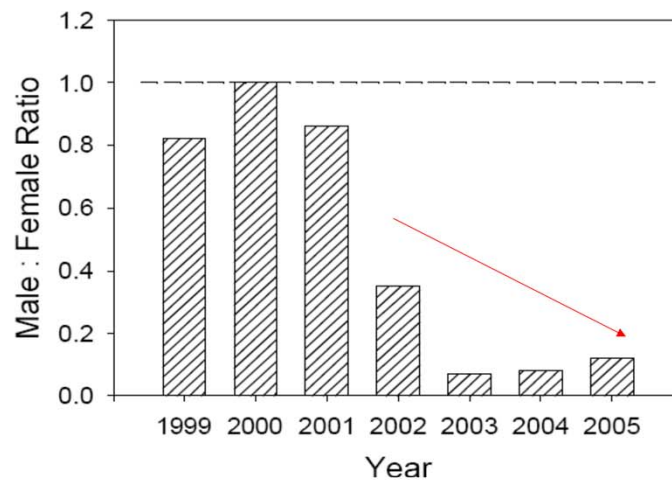
Courtesy of: K. Mills



では、個体群をみてみましょう。1999年から捕獲個体数をみています。魚がどのくらい捕れたかということですが、2年目、2001年の段階、ここで添加が始まっているのですが、徐々に個体数が下がっている。そしてほぼ採れなくなりました。2年、3年ばく露が続くと魚はほとんどみられなくなっていきます。論文にも書いたのですが、5カ月の添加によって5ng/Lですが、これだけ影響があるということです。ファットヘッドミノーですが、川のほうに行っても湖に戻ってくるというライフスタイルをこの魚は持っています。しかし、実験湖においては川に行かないという現象もみられました。

Pearl Dace Population Structure – Lake 260

Pearl Dace Sex Ratio

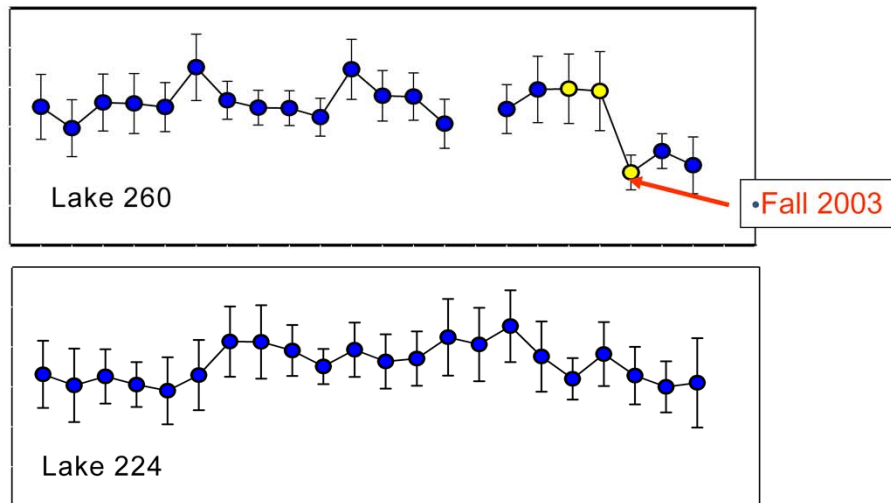


22

Courtesy of: K. Mills

こちらはパールデイスです。2002年、性比は50%を割っています。

Lake Trout Abundance – Lake 260




- a decline in lake trout in exposed Lake 260 coinciding with a decline in fathead minnow populations.

23

•Courtesy Ken Mills


レイクトラウトの漁獲数をみると、2002年ぐらいから下がり始めています。興味深いことに、この魚はEEが高濃度の上層には生息していませんので、レイクトラウトに対して直接的なばく露影響はないはずですが、これはエコロジカルカスケードが始まっているということです。つまり、EE2の影響はなかったわけですが、レイクトラウトが食べる魚種の減少による影響がみられているということです。

Whole Lake Dosing Experiment Fathead Minnow Summary

- 
- **Spring 2001** - EE2 additions began
 - Vitellogenin gene expression induction in Control Lake 114 fish **within 24 hours of deployment in Lake 260**
 - Significant vitellogenin plasma induction after 7 weeks
 - **Fall 2001 (4 months)**
 - Proteinaceous accumulation in kidney
 - Liver cell size increased

まとめてみますと、最初の添加年をみてみますと、ビテロゲニン遺伝子の発現が誘導されているということがわかりました。そして1カ月ぐらい、4カ月ぐらいをみてみますと、腎臓で蛋白質の蓄積があり、腎臓に問題が起きる。また肝臓細胞のサイズが増加している。

Whole Lake Dosing Experiment Fathead Minnow Summary

- 
- **Spring 2002 (12 months)**
 - Disorganized testes, immature ovaries
 - Decreased spawning aggression, fewer and less-developed eggs
 - Reduction in 2^o sex characteristics
 - No fish population impacts observed
 - **Fall 2002 (17 months)** - Reproductive failure, few age 0 fish
 - **Spring 2003 (2 years)** - Only age 2 fish remaining
 - One male found, females with large ovipositors
 - **2006 (3 years post EE2 addition)** – Fathead minnow population recovered

25

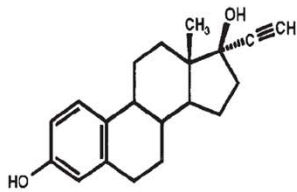
また、精巣が卵巣化している。そして卵巣に異常がみられたということです。
また、ヒトと違って化学物質が行動異常に及ぼす影響をみるのはなかなか難しいのですが、典型的な雄のファットヘッドミノーというのは、他の雄を押しつけるような、かなりアグレッシブな活動がみられるわけですが、それがなくなっていたということ。

2006年にはファットヘッドミノーの個体数は回復しました。

Whole Lake Dosing Experiment Pearl Dace and Lake Trout Summary – Lake 260

- Fall 2002 (17 months) - Pearl dace male/female ratios <40%
- 2004 – 2006 (2-4 years post EE2 addition) - Pearl dace catch per unit effort (CPUE) and Lake trout abundance lower

以降、この湖には戻っていないので、その後どうなったかわからないのですが、パールデイス、レイクトラウトの影響はこのような状態です。17カ月、その後2年、3年、こういった影響がみられました。



21-Day Fathead Minnow Fecundity Study Following Exposure to Ethinylestradiol (EE2)

Armstrong B¹, Lazorchak JM², Jensen KM³, Haring HJ⁴, Smith ME⁴, Flick RW², Bencic DC², Biales AD²

¹ Department of Fisheries and Wildlife, Michigan State University, East Lansing, MI, USA

² U.S. EPA, National Exposure Research Laboratory, Cincinnati, OH, USA

³ U.S. EPA, National Health and Environmental Effects Research Laboratory, Duluth, MN, USA

⁴ The McConnell Group c/o U.S. EPA, Cincinnati, OH, USA

27

ということで、EE2を一定量添加することによって、環境中のファットヘッドミノーへの影響がみられたということです。

さらに対照試験を行いました。2000年の早期に行ったものですが、21日間のEE2のばく露試験です。

Summary

21-Day Fathead Minnow Fecundity Study

Endpoints Following Exposure to EE2 (0.5,

1.5, and 4.5 ng/L)

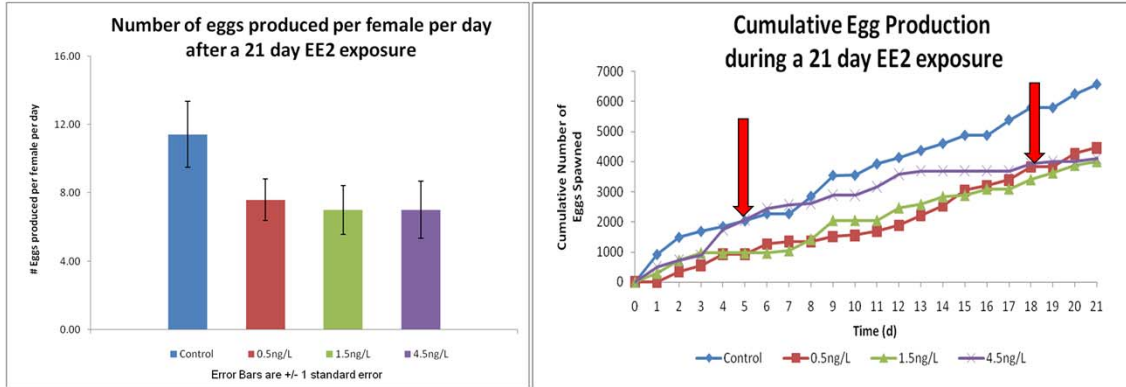
- Fecundity
- Fertility
- Mortality
- Vitellogenin Expression
 - Liver and Plasma
- Metabolonomics - Urine
- Tissue Weights Relative to Body Weight
 - Fatpad Index
 - Tubercle Counts
 - Gonadosomatic Index
 - Hepatosomatic Index

Ankley GT, Jensen KJ, Kahl MD, Korte JJ, and Makynen EA (2001). Environ Toxicol Chem 20: 1276-1290.



こちらですが、3年間の平均が5ng/Lだったわけですが、こちらは非常に高い濃度です。どのくらい産卵数があったか、受精卵数があったかという繁殖能をエンドポイントとして試しています。また、死亡数、ビテロゲニンの発現、メタボロミクス、代謝物の違い、尿中における代謝物の違いなどもみましました。それから組織の体重当たりの相対重量ということで、特に肝臓体指数や生殖腺体指数などを試しています。21日間のばく露試験ということで、この文献の著者らと実施しました。

21-Day Fathead Minnow Fecundity Study

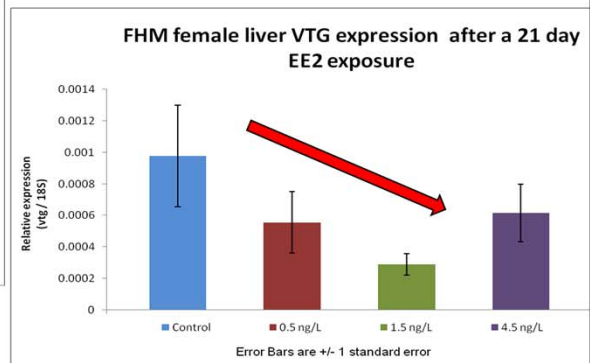
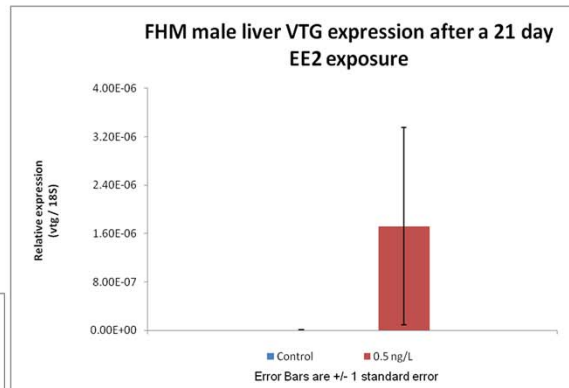
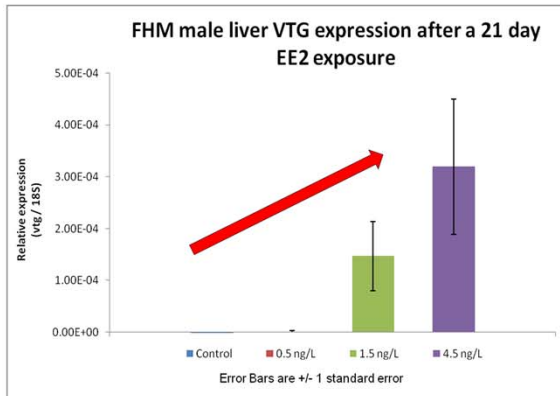


- Immediate decline in egg production compared to control in 0.5 and 1.5 ng/L EE2 treatments
- Initial increase then cessation of egg production at 4.5 ng/L EE2.

29

2001年に結果が出ています。21日間のばく露結果です。まず21日をみてみますと、雌1個体当たりの1日の産卵数は下がってきているということがわかります。濃度はpptでみています。そして、産卵数を徐々にみているのですが、4.5ng/Lが一番濃度が高いわけですが、1週間後ではむしろ対照区と変わらなかったという結果が出ました。対して、2つの低用量区では産卵数に影響がすみやかにあらわれました。このパターンをみてみますと、21日後の数値をみてみますと、おそらくおよそすべての濃度区で産卵数に影響があるということです。

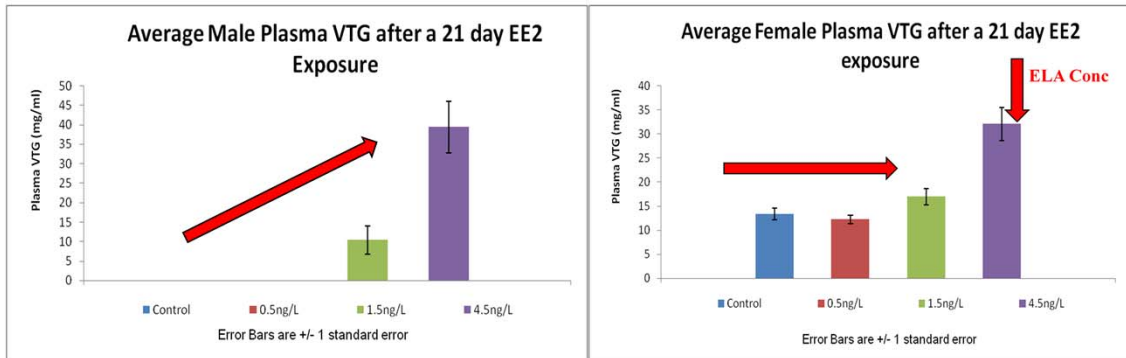
21-Day Fathead Minnow Fecundity (FHM) Study



30

さらに、ファットヘッドミノーの肝臓中のビテロゲニンの発現をみてみました。遺伝子発現なんですが、0.5ng/Lでは影響がないように見えるのですが、1.5、4.5ng/LではVTG発現はアップレギュレーションされていることがわかります。これはカナダでの全湖試験で添加した付近の濃度です。そうしますと、雄のビテロゲニン発現は上がっていったわけです。しかし、雌でのビテロゲニン発現はこの試験においては下がっているということがわかります。

21-Day Fathead Minnow Fecundity Study Plasma-Level Vitellogenin Expression



- Plasma vitellogenin concentration elevated in male AND female minnows exposed to 1.5 and 4.5 ng/L EE2

31

Courtesy of: K. Jensen

こちらが血漿中のビテロゲニン蛋白質です。雄ではかなり高い蛋白質の上昇がみられました。こちらは4.5ng/Lということで、カナダの実験に近い濃度です。

Summary

Endpoint	LOEC ng EE2/L	NOEC ng EE2/L	PNEC*, NOEC** ng EE2/L
Fecundity	0.47 (0.19-0.76)	<0.47 (0.19-0.76)	0.35*-0.96**
Egg Fertilization	> 3.9	> 3.9	<0.32**
Aver Egg/Female/Day	0.47	<0.47	
Plasma Vg Male	1.55	0.47	
Plasma Vg Female	3.9	<3.9	
Vg Expression Male	1.55	0.47	
Vg Expression Females	1.55	<1.55	
GSI	>3.9	>3.9	
Urine Metabolites	Urinary metabolite profiling of	males shows potential	for assessing exposures to estrogens

こちらがまとめです。こちらで見たいのは、まず基準をNOEC、つまり最大無影響濃度をみるということ。それから環境中の予想無影響濃度をみていくということです。これを比較してみますと、NOEC、PNECは0.47ppt以下であったということがわかります。

この化学物質の検出濃度にはばらつきがあることがわかります。LOECとして検出されたEE2濃度というのは非常に低い。0.19ng/L以下であったということです。