

# 化学物質の内分泌かく乱作用の 生態影響に関する試験法

国立環境研究所  
鑪迫典久

御紹介ありがとうございました。国立環境研究所の鑪迫です。

今日は、内分泌かく乱の試験法についての説明をしてくださいと言われてここに立っているわけですが、もうピーター先生とか、次に話される井口先生とかがかなり詳しいスライドを作っているから、私の身の置き場がないということで、違う方向で話をしようと思っていたのですが、それも先ほど御質問のあった先生の、新規化学物質についてはどうかということとか、既存とか新規化学物質に内分泌かく乱の試験法は使えるかという話もあるので、実はその話をしようと思って持ってきたので、そういう話からさせていただきたいと思います。

## 内分泌かく乱化学物質のために 新たな試験法を開発する理由

既存の試験法はなぜ使えないのか

ENV/JM/MONO(2002)8

OECD Series on Testing and Assessment No. 21

Appraisal of Test Methods for Sex Hormone  
Disrupting Chemicals

“内分泌かく乱化学物質のための試験方法の評価“

実は皆さん、SPEED'98からEXTEND2005、EXTEND2010、EXTEND2016と移行していますが、なぜ新しい試験法を開発する必要があるのかと疑問に思ったことがあるのではないかと思います。時間とお金と労力をかけて新しい試験法を作らなければいけなかったのはなぜかと疑問に思ったことがあるのではないかと思います。私も自分でやりながら疑問に思っ  
てはおかしいかもしれませんが、私も思っていました。だけど、過去において、既存のテストガイドラインは内分泌かく乱の化学物質の評価にはふさわしくないという議論があったんですね。それでさかのぼって調べてみたところ、やっと見つけたのですが、これはピーター先生がよく知っているかもしれませんが、OECDのTesting and AssessmentのNo.21という番号のドキュメントがあって、この中に、既存の試験法では内分泌かく乱化学物質は評価できないので、新しい試験法を開発しなさいということが書いてありました。もちろんその前からWHOの方でもちゃんと既存の試験法は使えないと書いていたのですが、一番古くて一番最初に言い出したのがこれぐらいかなとなっています。

余談ですが、新興化学物質(Emerging Chemicals)の中で代表的なのが、内分泌かく乱と工業的ナノマテリアルとファーマシューティカルと言われているのですが、内分泌かく乱は「新しい試験法を使わないと評価できない化学物質」に分類されていて、工業的ナノマテリアルは「既存の試験法は使える」となっていました。その代わりプレパレーションというか、物質の分散とか、ばく露方法とか、そういうところはナノマテリアルに関しては、新しいことを考えなければいけないと。あとナノマテリアルの分析というのは、粒子のサイズなのか、重さなのか、数なのか。例えば電荷なのか、表面積なのか。あと形状、そういうことを考えなければいけないので、プレパレーションのところは考えなければいけないが、試験法はOECDのガイドラインを使えると。ファーマシューティカルの方は、「既存の試験法は使える」になっていたのですが、「結果の解釈のところ難しい」となっていて、リスク・ベネフィットでいくと、どうしても医薬品とかはベネフィットの方が高いので、生態リスクについてどう考えるか今後の問題になってくる。余談ですが、そういうことで内分泌かく乱は新しい試験法を作る必要があったんです。

## 2002年時点でのOECD試験法

- 202 Daphnia species: acute immobilisation test and reproduction test (02/04/84)
- 203 Fish, acute toxicity test (Updated Guideline) (17/07/92)
- 204 Fish, prolonged toxicity test: 14-day study (04/04/84)
- 205 Avian dietary toxicity test (04/04/84)
- 206 Avian reproduction test (04/04/84)
- 207 Earthworm, acute toxicity test (04/04/84)
- 210 Fish early life stage toxicity test (17/07/92)
  
- 211,212,215は開発中

2002年以降のドキュメントが出ていて、2002年の段階でどのような生態毒性試験法がOECDに存在していたか調べてみると、200番台は生態毒性試験の番号なのですが、202番から210番まで存在していました。211番、212番、215番は、この年にはまだ開発中になっていました。

## MOAの違いによるエンドポイントの違い

- 化審法、農取法の試験法:

生死、成長(魚類)、生死、繁殖(甲殻類)、増殖(藻類)

- 内分泌かく乱試験法:

性発達(成熟)、性分化、繁殖、発生、変態、脱皮

その内容を詳しく見る前に、なぜ内分泌かく乱物質だけ新しい試験法が必要なのかといいますと、この段階(スライド3)で既に存在していた試験法の中で、魚の試験は203番と204番と210番なのですが、繰り返しのなってしまうのですが、203番は急性毒性試験です。210番が日本の化審法という慢性毒性試験なのですが、エンドポイントが成長なんです。成長量を見ているだけなんです。そうすると、内分泌かく乱化学物質の評価には使えないのではないかという話になっていました。

なぜかといいますと、つまり化審法、農取法の試験法でわかるのは、生きてるか死んでいるかと、成長するかどうかです。甲殻類は慢性試験があるのでリプロダクションをみている。生きてるか死ぬかという試験もあります。藻類は増殖だけです。

内分泌かく乱のエンドポイントとして必要なのは、WHOの方の定義でもありますように、性成熟とか性分化も入れて、メインは繁殖(reproduction)が重要。あと発生(development)も必要ですし、甲状腺ホルモンですが、morphology、変態とか、あとは昆虫とかecdysis、脱皮みたいなところも内分泌が関与しているので、このようなエンドポイントが、つまり2002年までのOECDのテストガイドラインになかったので、この試験、新しい化学物質の評価は難しいのではないかとされたという経緯があるみたいです。そこで試験法を開発する必要があったわけですね。

## Avian reproductive function (OECD 206)(2002年当時)

- 鳥に少なくとも20週間化学物質を投与して、光周期で産卵させ、孵化後、14日間雛を観察する。
- 性ホルモンかく乱のエンドポイントを有している。
- 改良するとしたら、雛の生殖腺重量と組織観察を加える。

だけど、2002年、先ほどのドキュメントの中で、よく読んでみると、内分泌かく乱の評価に使えるかもしれないという試験法も実はあって、206番の鳥の試験、Avianの試験は、20週間化学物質をばく露して、孵化後、14日間観察するので、これはひょっとしたら、証拠は書いていないのですが、「使えるかもしれない」という記載はありました。性ホルモンかく乱のエンドポイントを有しているから、使えと。

改良するとしたら、雛の生殖腺重量などを入れたらどうか。それはネズミのハーシュバーガー試験を念頭に置いて考えたと思うのですが、そういうふうに一応書いてありました。

## Fish early life stage (OECD 210) (2002年当時)

- 魚類初期生活段階試験。
- 未成熟魚の生長をエンドポイントとする試験。
- この試験法に大幅な改良をしても、成熟(性発達、性ホルモンなど)に対する影響を見ることは難しい。

あとは、先ほどのドキュメントの中に書いてあったのが、Fish early life stage、210番ですね。日本の化審法でいう慢性毒性試験は使えるかどうかということで、これは使えないと。大幅な改良をしても、成熟(性発達、性ホルモンなど)に対する影響を見ることは難しいのでだめですとちゃんと明記されています。ですから、先ほど化審法に入れる、入れないという話が山崎さんの話でもありましたが、この段階では確かに無理な話だったんだなという気が私もします。

## Daphnid acute and reproductive function (OECD 202) (2002年当時)

- 少なくとも2週間以上の化学物質の曝露が行われている。
- 繁殖を見ているので、何らかのホルモンの影響を検出している可能性があるが、その作用機構は分かっていない。

これはミジンコのリプロダクションの試験。実は2002年のときにはOECDのテストガイドラインの202番の中に急性と慢性が一緒になっていたのですが、この翌年ぐらいに202が202と211に分かれて急性と慢性になって、今の化審法では両方とも採用されているのですが、旧202番の慢性の方の試験は、繁殖を見ているので、何らかのホルモンの影響を検出している可能性があるから、使えるかもしれないと書いてありました。ただし、その作用機序というか作用メカニズムがわかっていないので、その辺は今後の研究課題だというふうに記載されていまして、これが後で私としては面白いことが起こるのですが、先ほどのアカトンボの話もそうですが、脊椎動物と節足動物、甲殻類では、ホルモンが違うので、ホルモンの種類が違くと作用メカニズムも違うから、作用メカニズムがわかっていないものを使うときには注意しなさいよということが記載されていたかと思います。

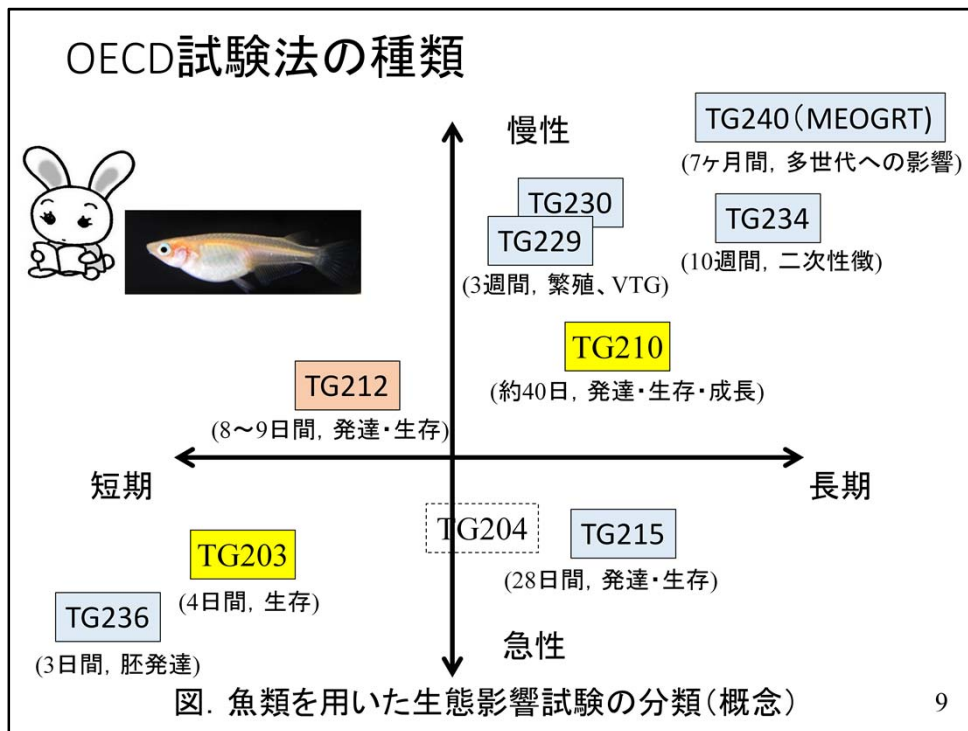
## 2002年以降のEDCs関連のOECD 試験法

- No. 242: Potamopyrgus antipodarum Reproduction Test (29 July 2016)
- No. 243: Lymnaea stagnalis Reproduction Test (29 July 2016)
- No. 240: Medaka Extended One Generation Reproduction Test (MEOGRT) (28 July 2015)
- No. 241: The Larval Amphibian Growth and Development Assay (LAGDA) (28 July 2015)
- No. 211: Daphnia magna Reproduction Test (02 Oct 2012)
- No. 229: Fish Short Term Reproduction Assay (02 Oct 2012)
- No. 234: Fish Sexual Development Test (28 July 2011)
- No. 230: 21-day Fish Assay (08 Sep 2009)
- No. 231: Amphibian Metamorphosis Assay (08 Sep 2009)

2002年から15年ぐらい経ちまして試験法が増えました。というのは、新しい内分泌かく乱に関する試験法を作らなければいけないというふうに世界中で思って、日本もそれに協力して、環境省さんと井口先生とかピーター先生が頑張って新しい試験を作って、現在、内分泌かく乱を表す、検出できると思われるOECDのテストガイドラインを集めるとこのようになっていました。2002年以降です。

231番、番号が順番に並んでなかったのですが、230番、231番、234番とかずっと並んでいて、一番下はAmphibianのAMAですが、カエルの試験と魚の試験とDaphniaの試験で、今年、2016年に2つ新しい試験法が入ったのですが、マキガイの試験が内分泌かく乱関係のOECDのテストガイドラインというふうに位置付けられています。



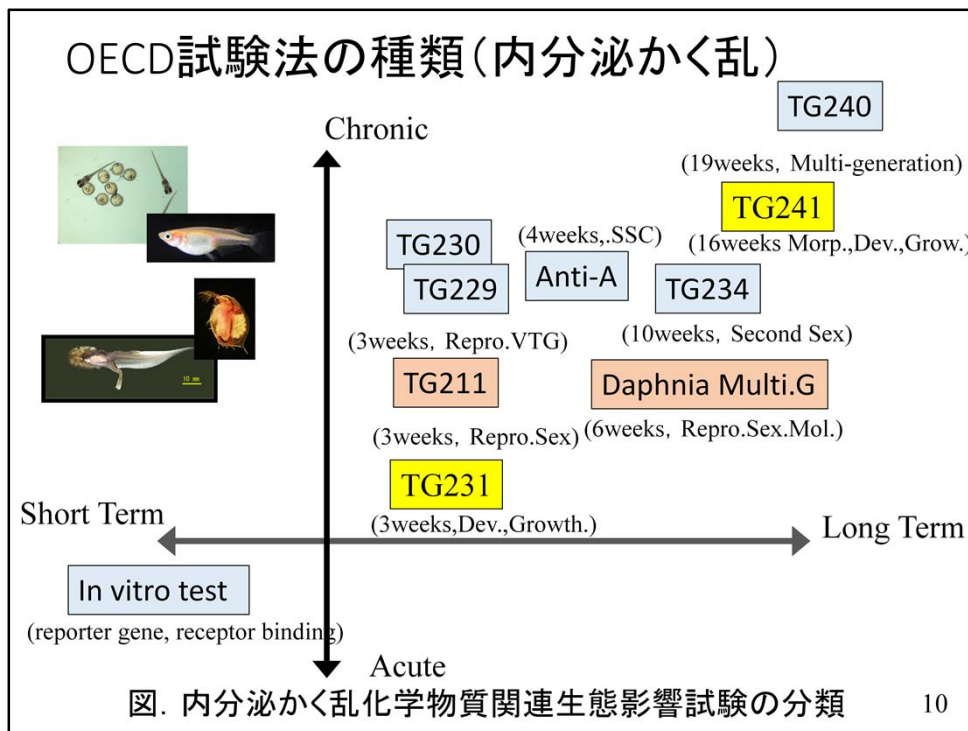


これは私が作ったチャートなんですけど、これは魚だけに特化しています。たくさん試験法があるので、今、OECDのテストガイドラインの200番台、生態毒性試験の魚に関するものだけをピックアップして並べてみたのですが、まず黄色で目立つ203番と210番というのが、いわゆる化審法で使われている急性毒性、慢性毒性で、210番が慢性毒性で、203番は急性毒性で、急性毒性は4日間の試験、慢性毒性は約1カ月の試験をやる。化審法を作ったときには210番が慢性毒性と位置付けられていたんですね。ところが、内分泌かく乱というのは、死にはしないし、見た目は何も変わらないけれども、実は成熟してないとか、繁殖能力がないという、先ほど言いましたように、見えにくい毒性を持っているものなので、新しい試験法が必要だったので、このような慢性毒性の210番よりも更に難しいというか期間を長くしたり、エンドポイントも増やした試験が必要で、青に書かれている229番、230番、234番、あとMEOGRTとありますが240番、この4つの魚の試験が内分泌かく乱に使われる試験となっています。だから、いわゆる化審法でいっている慢性毒性よりもやや難しい試験を行っているということになります。

急性の方は、これも余談ですが、203番という急性毒性試験が、魚をむやみやたらに殺すので、動物愛護のところではひっかかるのではないかと話で、236番というゼブラフィッシュの卵の孵化前までの試験に置き換えようという動きが世界中で起きて、OECDの方で起きていますけれども、それはいろいろあって、今のところまだ日本はペンディングです。ヨーロッパのREACHなどは236番でやろうというふうに進んでおります。

204番は消えましたね。

212番は、慢性でも急性でもない試験なんですけど、手頃な試験で感受性の高い試験なので、212番という試験は有用だな、残してほしいなと思っていて、実は、皆さんあまり興味ないかもしれませんが、工場排水のWETの試験などで使っているのが212番で、こういう位置付けになっております。



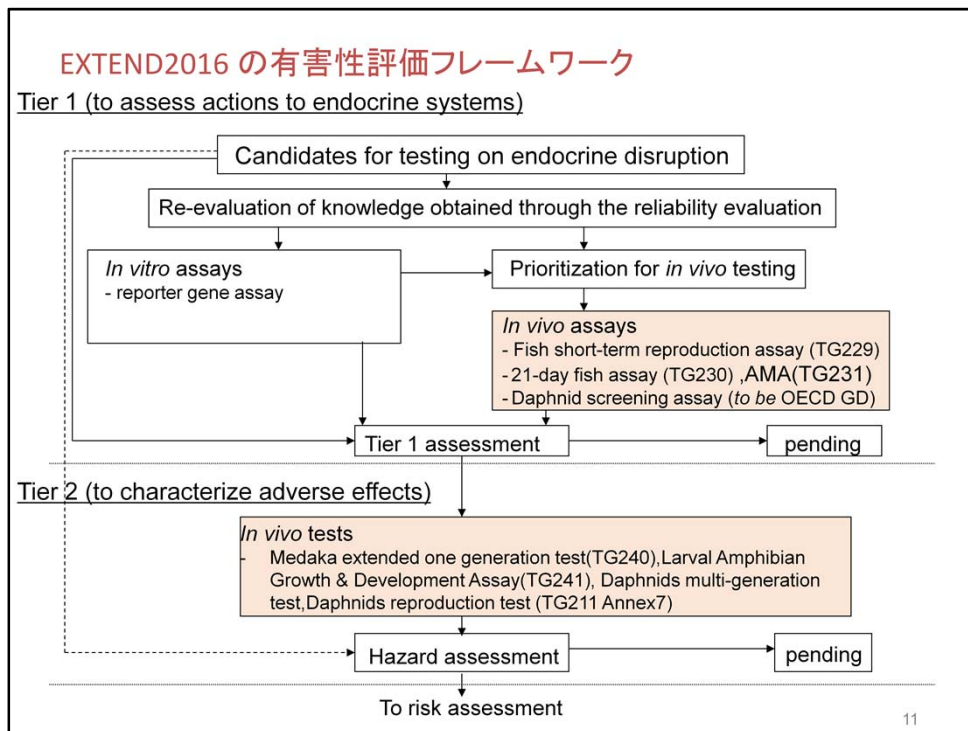
先ほど除きましたが、魚以外のカエルとミジンコの試験もここに載せてみると、ここは慢性毒性試験のエリアですが、ほとんど慢性毒性でないと内分泌かく乱は検出できないということで、期間の長い試験になっております。

まず黄色、TG231が、先ほど山崎さんのスライドにありましたが、EXTEND2010と2016のフレームワークの中で書いてあるTier1で使われるのではないかと、そこら辺は微妙な感じなんですけど、使われるのではないかとされているのがTG231で、確定試験、Tier2で使われるのではないかとされている試験がTG241というカエルの試験です。カエルの試験という言い方をしていると、カエルだけという感じがしますが、実はmode of action的には甲状腺ホルモンをメインに見る試験になっております。成長を見るので、甲状腺ホルモン以外のホルモンも見られなくもないのですが、実はカエルの特徴としては、カエルの変態というのは甲状腺ホルモンがつかさどっているもので、逆にいうと、メダカとか他の生き物で甲状腺ホルモンを検出しようと思ったら難しいのです。そこで、カエルを使うと楽に甲状腺ホルモンの検出ができるということで、カエルの試験が使われているという次第です。だから、特にカエルをやりたいというよりは、甲状腺ホルモンを検出したいということですね。

オレンジのTG211がミジンコの試験で、ミジンコの試験も、先ほどのピーター先生の御講演にもありましたが、多世代試験とかmaternal effectみたいなものが内分泌かく乱のときには化学物質の影響と考えなければいけないので、ミジンコの多世代試験を今OECDの方に提案しようかなというか、提案するつもりでいるというところで準備しているのがこの多世代試験です。TG211というのは、化審法で使っているミジンコのリプロダクションテストなんですけど、そのAnnex7という追加の試験というところで、実は観察ポイントにミジンコの性比を入れています。

話せば長くなってしまいますが、ミジンコのホルモンというのは、昆虫のホルモンと非常に似通ってしまっていて、昆虫のホルモンはほとんどペプチドホルモンでできているのですが、唯一、化学物質、ペプチドも化学物質なんですけど、ペプチドは複雑な構造をとっているんで、一般化学物質でミミックされることは難しいと考えられているのですが、比較的単純な構造で、一般化学物質で置き換えられるというか、ミミックされるようなホルモンがあるとすれば、たぶん幼若ホルモンと脱皮ホルモンが内分泌、つまりアカトンボも含めて昆虫の内分泌がかく乱される可能性があるホルモンであると考えられます。幼若ホルモンの方は、セスキテルペンとかテルペノイドが主たる骨格となっております。脱皮ホルモンはステロイド骨格を持っているのですが、ミジンコの性比が幼若ホルモンによってある程度制御されていることがわかりましたので、ミジンコのTG211、普通の化審法の慢性毒性試験にプラスしてミジンコの性比、生まれてくる子どもの性比を数えることによって、幼若ホルモンの影響を見るというか、その化学物質が幼若ホルモン活性を持っているか持っていないかの検出ができるのではないかと提案をした試験がここに入っております。正確にいうとTG211のAnnex7です。

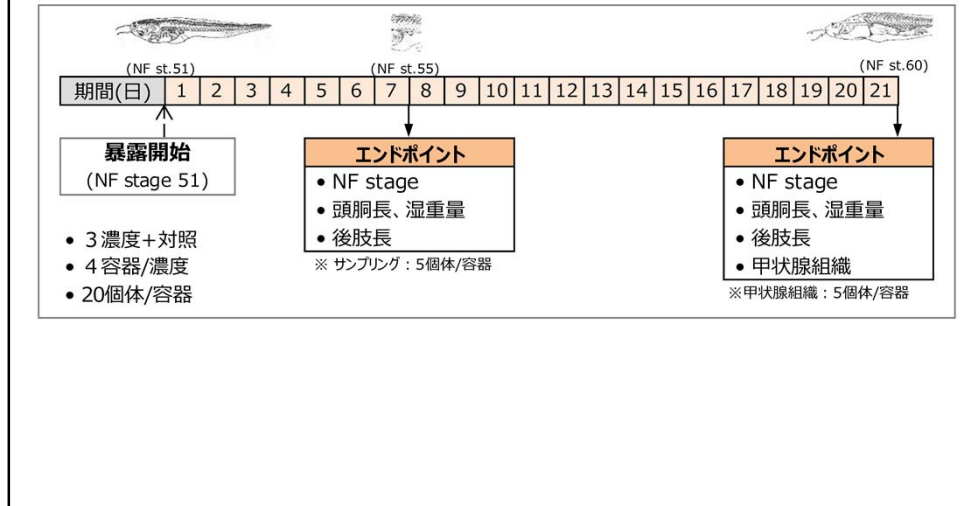
内分泌かく乱で一番左下の方にあるのがin vitro試験となっていて、短期で内分泌系を見たら、レセプターバインディング、レセプタージーンアッセイとか、in vitroの試験を入れていくしかないなということに一応なっていて、EXTENDのフレームワークの中でもTier1のところに入っております。



このフレームワークは先ほど山崎さんの方であったので省略しますが、私が説明したのが、色が着いているTier1のこの部分とTier 2の部分で、上がスクリーニング試験で比較的短期の試験、短期といっても1カ月以上はかかる試験。Tier 2の方は数カ月かかる試験ですが、確定試験で、違いは、Tier 1の試験は、比較的高濃度でばく露して、化学物質のポテンシャル、だからリスクベースでどんな影響があるかを見るのがTier 1と考えてもいいと思います。だから、溶けるまで溶かしてやるとか、死ぬ直前までやるとか、むちゃくちゃな高濃度やって、ポテンシャルを見て、実はTier 2の方では濃度を下げて行って、環境中の濃度で近いところを含みつつとか、またはどこまで薄めたら無影響濃度に達するかということで、なるべく濃度の低い方に焦点を当ててやる試験というのがTier 2の試験になっています。

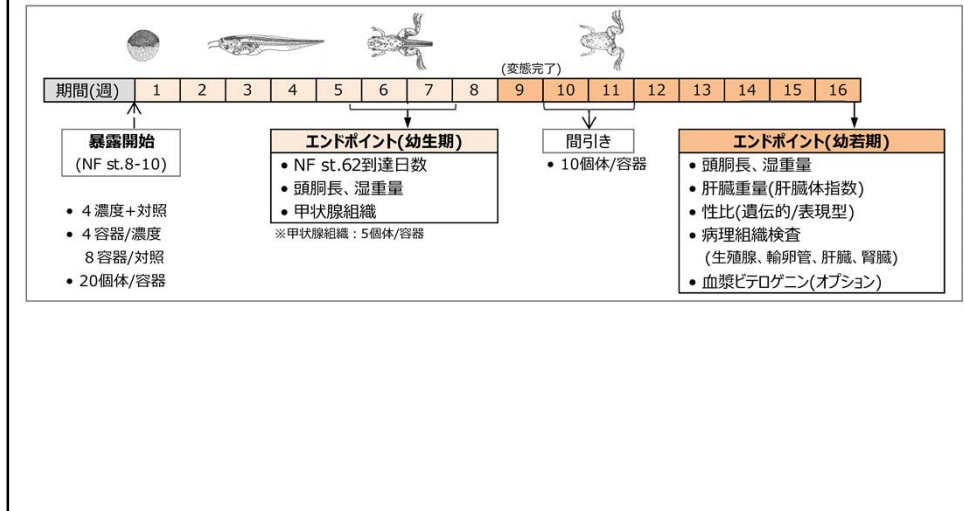
見てわかるように、*in vitro*の試験と*in vivo*の試験は、*in vitro*の試験が決してスクリーニングになっていないところが面白いところというか私の好きなところなんです、あくまで*in vitro*と*in vivo*が並列に扱われていて、*in vitro*でスクリーニングかけてやろうという、昔、1998年かEDSTACの方で始まって結局ポシャったのは、レセプターにバインディングするとか、しないとかだけでエンドクリンを分けていくと間違えてしまう。つまり、もっと複雑だとWHOの方でも言っていますが、もっと複雑な作用がたくさんあって、生殖腺軸とか甲状腺軸のところとか、いろいろな複合影響を考えると、*in vitro*だけでは見落としてしまうので、*in vitro*と*in vivo*を並列で扱おうというのがこのフレームワークのコンセプトで、私は非常に面白いと思っています。

# 両生類変態試験 (TG231)



これを一つずつ説明していくと時間がかかるので、皆さんのお手元のものは、後で家に帰ってつらつらながめて、「なんだ」というぐらいで、参考資料と考えていただきたいと思っていますのでお付けしましたが、特に一々説明しません。この中で本当に試験をやる人はいなくて、知識として必要だと思うので、細かい説明はしませんが、簡単に言いますと――

# 幼生期両生類成長発達試験 (TG241)



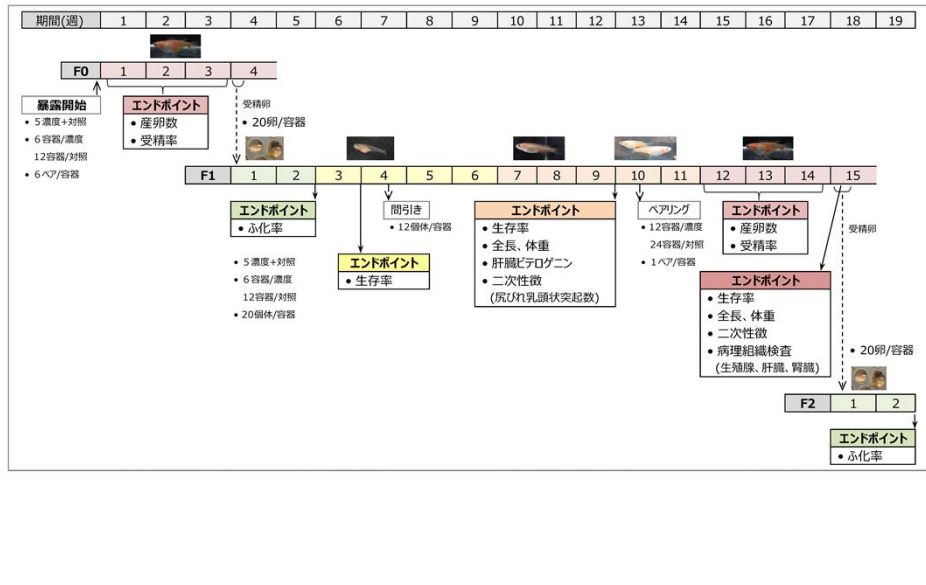
TG241というのは、さっき言ったカエルのTier 1で使われている試験です。

## 魚類短期繁殖試験 (TG229)



TG229というのは、魚類のTier 1で使われている試験で、繁殖を見る試験です。

# メダカ拡張一世代繁殖試験 (TG240)



メダカの拡張一世代繁殖試験、これが先ほど山崎さんからもありましたが、昨年の7月にOECDで認められたメダカの確定試験です。2世代、本当いうと3世代まで見る試験で、5カ月ぐらいかかって大変な試験なんです。失敗したら本当に大変な思いをして、この間、失敗して今大変な思いをしている最中ですが、全部一からやり直して、5カ月棒に振るという恐ろしいものですが、これを確定試験としてやられています。

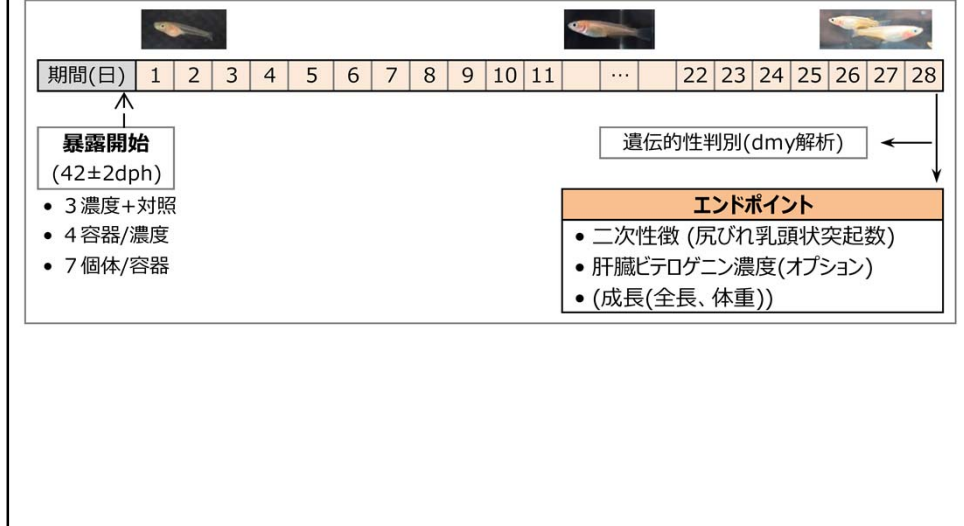
# ミジンコ繁殖阻害試験 (TG211) ANNEX7



ミジンコの繁殖阻害試験は、さっき言った211のものエンドポイントのところ、普通の化審法の慢性毒性試験のエンドポイントのところ、雄雌の性比を見るというのを入れたために、2倍以上労力がかかるという非常に大変な試験なんです、それを内分泌かく乱試験でやっております。

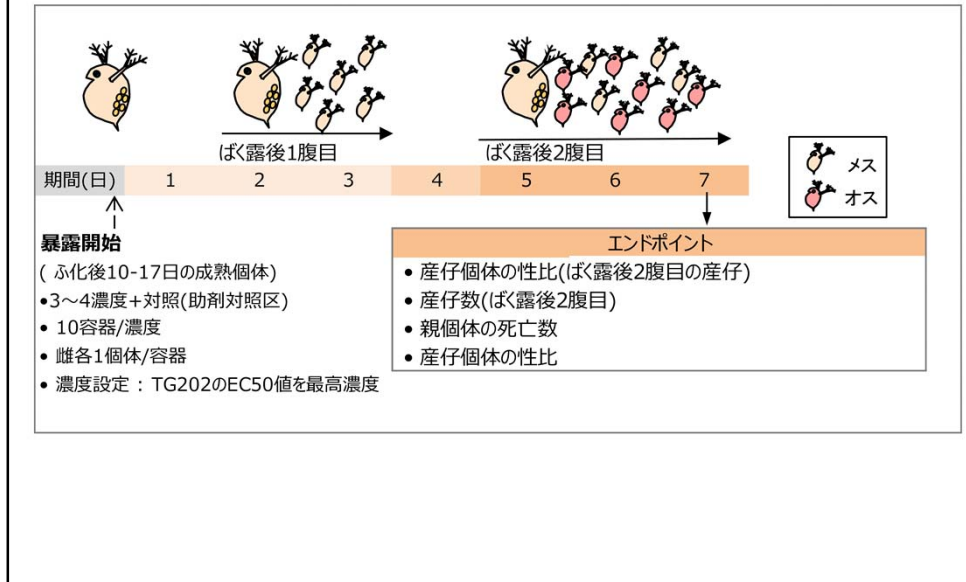


## 幼若メダカ坑アンドロゲン作用検出試験 (案)



この試験法の詳しい内容は後で井口先生の方からあるので、さわりだけ言っておきますと、先ほど229番というメダカを使った繁殖毒性試験はTier1で使いたいという提案をしていたのですが、そこではエストロゲン作用とアンチエストロゲン作用とアンドロゲン作用までは見られるんですね。甲状腺ホルモンはカエルにお任せして、あと全部魚で引き受けようと思ったのに、実はアンチアンドロゲンは見ることができないということがわかったんですね。詳しい話は、時間があと4分ぐらいしかないので言えませんが、では、アンチアンドロゲンはどうやって見ればいいのかということで、簡単に言うと、メダカの尻鰭のところに雄だけ二次性徴で、乳頭状小突起といっているのですが、鰭にポツポツができていて、そのポツポツの数を数えようと、つまり簡単に言うと、男性のひげみたいなものだと思うのですが、青年というか大人になったのにまだひげが生えてこないのは、アンチアンドロゲン、つまり抗男性ホルモン、男性ホルモン不足ではないのかというコンセプトで作られた試験です。その試験は今開発中で、これを今年の4月にWNTに提案したので、ピーター先生とか座長で協力していただきまして、これはこれから検討に入って、いろいろな国での評価の対象になる、バリデーションの対象になるということになっています。

## ミジンコ短期検出法(案)



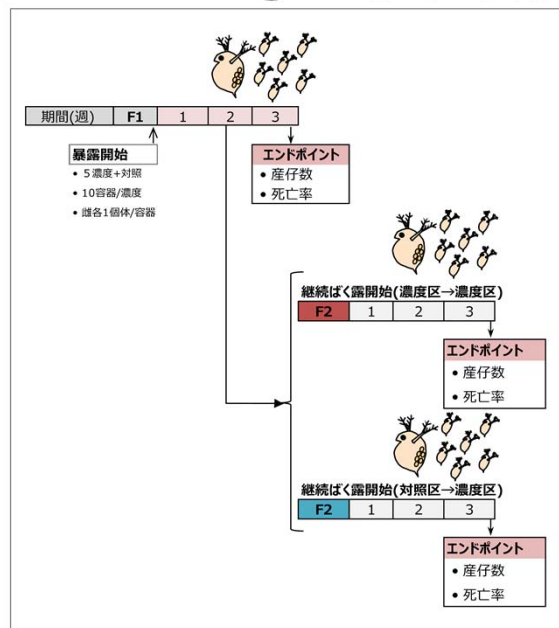
ミジンコの短期検出法、これも今年の4月のWNTが開発が承認された試験で、今開発中で、世界中の国とリングテストをやろうと準備している最中のもので、先ほど言ったTG211の雄雌の比を見ると簡単に言いましたけれども、とても大変な試験なんです。それが3週間かかっていたので、1週間でできないかと考案したのがこの試験です。これはTier1で使ってもらいたいと考えているところです。

## ミジンコ脱皮ホルモン検出法(案)



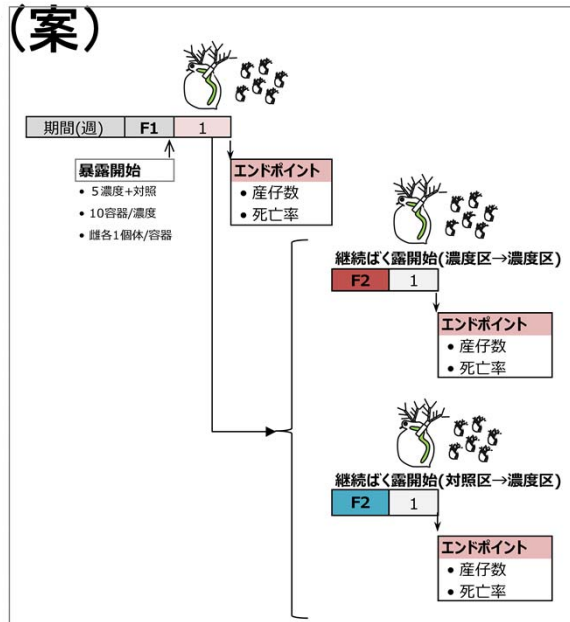
脱皮ホルモンというのは、先ほど言いましたように、昆虫とか甲殻類は脱皮するのですが、内分泌かく乱されるとしたら、幼若ホルモンと脱皮ホルモンの2種類がかく乱される可能性があるホルモンなんですけど、幼若ホルモンの方はミジンコの雄雌の比率でいいのですが、脱皮ホルモンが抜け落ちていました。脱皮ホルモンを何とか見られないかと今開発中なんですけど、これもなかなか難しいです。簡単に言うと、ミジンコの脱皮の回数を数えるという試験で、「なんだ」と言うかもしれませんが、化学物質を与えると、一般毒性はいいけれども、脱皮が減ったりするんですね。だから、なかなか検出は難しいので、かなり厳密な条件でやらなければいけないということがわかってきて、今開発途中となっています。

# オオミジンコD. magna 多世代試験 (案)



ミジンコの多世代試験です。maternal effectとか、maternal transferとか、多世代影響を見ておかなければいけないということで、ミジンコは単為生殖という厄介であり、かつ便利な生殖形態を持っていますので、それを利用して多世代をやろうと考えています。

# ニセネコゼミジンコ (*C. dubia*) 多世代試験(案)



これは*C. dubia*と*D. magna*の2種類で考えています。

## まとめ

- 現在OECDに抗アンドロゲン検出の試験と、ミジンコのスクリーニング試験が提案されている。
- ミジンコを使った脱皮ホルモン試験と多世代試験は今後OECDへの提案を検討中である。
- 上記の試験が完成すれば、試験方法がほとんど準備される。

上記の今までの試験が全部完成すれば、試験法がほとんど準備されるので、あとは *in vitro* の試験と *in vivo* の試験を組み合わせ、効率よく化学物質のスクリーニングをやっていきたいと考えております。

以上です。