

平成30年度化学物質の内分泌かく乱作用  
に関する公開セミナー@東京国際交流館  
(平成30年1月15日)

# 魚類・甲殻類に対する 化学物質の内分泌かく乱作用の 試験法開発

国立環境研究所  
環境リスク・健康研究センター  
山本 裕史

御紹介ありがとうございます。

国立環境研究所の山本がお話をさせていただきます。次にお話しいただきますコルテンカンプ先生や先ほどお話しいただいた井口先生に比べて、私自身はどちらかというと、生態毒性分野で10年ぐらい仕事をしていますが新参者であるところもありますので、少し簡単な自己紹介から始めさせていただければと思います。

まず最初に、言い忘れましたが、今回お招きいただきました環境省ほか事務局に感謝いたします。



# 簡単な自己紹介(1)

- 専門は生態毒性学、環境化学、環境工学
- 現職は国立環境研究所、環境リスク・健康研究センター・生態毒性研究室長(平成28年4月より)  
(<http://www.nies.go.jp/index-j.html>)

生態毒性標準拠点長：  
鑑迫先生(現愛媛大)の異動による  
(平成29年9月より)

副センター長  
(平成30年4月より)



簡単な自己紹介です。先ほどもありましたが、現在専門として生態毒性研究室というところを主宰しております。その関係で生態毒性学ですが、私自身バックグラウンドは環境工学系の人間で、先ほど御紹介ありましたが、徳島大学に以前いましたが、そのときは化学系のところにおりまして、その中で化学物質の動態と生態毒性に関する研究をしてまいりました。現職に異動したのは実は2年半前でして、平成28年4月より環境リスク・健康研究センターで生態毒性研究室長を務めております。その後、現在愛媛大学に移られました鑑迫先生が異動されることに伴いまして、こちらの生態毒性標準拠点長を併任させていただきました。その関係で内分泌かく乱化学物質の試験法開発に携わっております。それから本年より副センター長を拝命しております。

# 国立環境研究所とは(1)

1974年に設立（国立公害研究所として）

200名の研究職員、700名程度の事務職員・契約職員



国立環境研究所



国際交流館



環境省

Ministry of the Environment  
Government of Japan

国立環境研究所は、皆さん御存じかもしれませんが、環境省関係の研究所として1974年に、当時環境庁が開設された後、茨城県のつくば市に設立されました。現在、研究職員が200名程度、契約職員、事務職員等が700人程度、合計で1,000人弱ぐらいの研究所になります。つくばなので、今つくばエクスプレスという電車ができましたが、大体1時間から1時間半ぐらいで東京都内に行くことができます。見ていただいたら分かりますが、緑に囲まれた研究所として、隣に経産省系の産業技術総合研究所があります。茨城県つくば市のつくば駅からやや南の方に位置している自然に囲まれた非常にいいところです。



# 国立環境研究所とは(2)

## 研究組織

- 地球環境研究センター  
気候変動をはじめとした地球環境問題解決に貢献
- 資源循環・廃棄物研究センター  
資源の持続可能な利用と、資源利用に伴う廃棄物等の環境負荷の低減に貢献
- 環境リスク・健康研究センター**  
環境リスクの評価・管理により、人の健康および生態系に与えるリスクの低減に貢献
- 地域環境研究センター  
国内やアジアにおける地域環境問題の解決に貢献
- 生物・生態系環境研究センター  
生物多様性の保全と、生態系サービスの持続可能な利用の実現に貢献
- 社会環境システム研究センター  
環境と経済が調和する持続可能な社会への転換に貢献
- 環境計測研究センター  
環境計測技術等の革新的進展、計測データの信頼性の保証や管理の充実に貢献
- 福島支部
- 琵琶湖分室

生態毒性研究室において、分子レベル、細胞・組織レベル、個体・個体群レベルで化学物質の環境生物への影響を評価

生態毒性標準拠点において、生態毒性試験の開発や国内外の標準化、セミナーでの啓発などを実施



国立環境研究所は、現在、7つのセンターと福島支部、琵琶湖分室で成り立っています。その中の環境リスク・健康研究センターに私は所属しておりまして、その中でも、先ほど山崎様から御紹介ありましたように、生態毒性研究室というところで研究に携わっております。この中で、後で御紹介しますが、分子レベルから個体群レベルでの化学物質の環境生物への影響を評価しておりますし、先ほど言いました生態毒性標準拠点の方では生態毒性試験の試験法開発あるいは国内外の標準化、セミナー等の開催などを行っております。



# 簡単な自己紹介(2)

- 東京大学大学院新領域創成科学研究科自然環境学専攻客員准教授・徳島大学理工学部客員教授
- 環境省の化審法、農薬、排水評価、水生生物保全のための環境基準策定、内分泌かく乱、医薬品による環境汚染等の20以上の委員を担当



現在、ほかにも大学の教員をしていたり、これも先ほど山崎様から御紹介ありましたが、環境省の化審法や一般工業化学物質のリスクの評価・管理、それから農薬、水環境課の関係では排水評価であったり、水生生物のための環境基準策定であったり、本事業に関わる内分泌かく乱であったり、医薬品による環境汚染等、各種委員を現在担当させていただいております。



# 生態毒性試験の高度化(1)



国立環境研究所,  
環境リスク・健康研究  
センター 生態毒性研  
究室・生態毒性標準拠  
点で鋭意遂行中

- 生態毒性試験や試験生物種の多様化（OECDテストガイドラインは247まで）への対応が必要

平成29年に

OECD TG No.244（活性汚泥中の原生生物阻害試験）

OECD TG No.245（ミツバチ慢性経口毒性）

OECD TG No.246（マルハナバチ急性接触毒性）

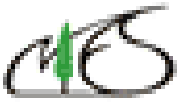
OECD TG No.247（マルハナバチ急性経口毒性） が承認，公開

**EXTEND2016**への協力: 内分泌かく乱作用に関わる試験法開発

6

我々生態毒性研究室で何をやっているかということですが、現在、生態毒性試験といわれている環境生物を用いた試験も多種多様な生物試験が出てきています。その背景として、化学物質自体が多種多様になっているということもありますし、いろんな生物種を使って試験を試みようということがありまして、OECDテストガイドライン、先ほど井口先生から御紹介ありましたが、OECDで試験法の開発あるいは承認をしているのですが、その中で今、環境生物を用いた試験法、247番ということなので、既に47の試験、一部なくなっているのがあるので本当は違うのですが、承認・公開されています。

また、先ほどありましたように、EXTEND2016という内分泌かく乱作用に関する試験法開発をその中で携わっておりまして、その外、日米や日英の二国間の内分泌かく乱に関する会議にも参画させていただいております。



## 生態毒性試験の高度化(2)

### ワンボックス多媒体モデル

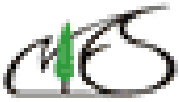


国立環境研究所HP「環境儀No.50」より

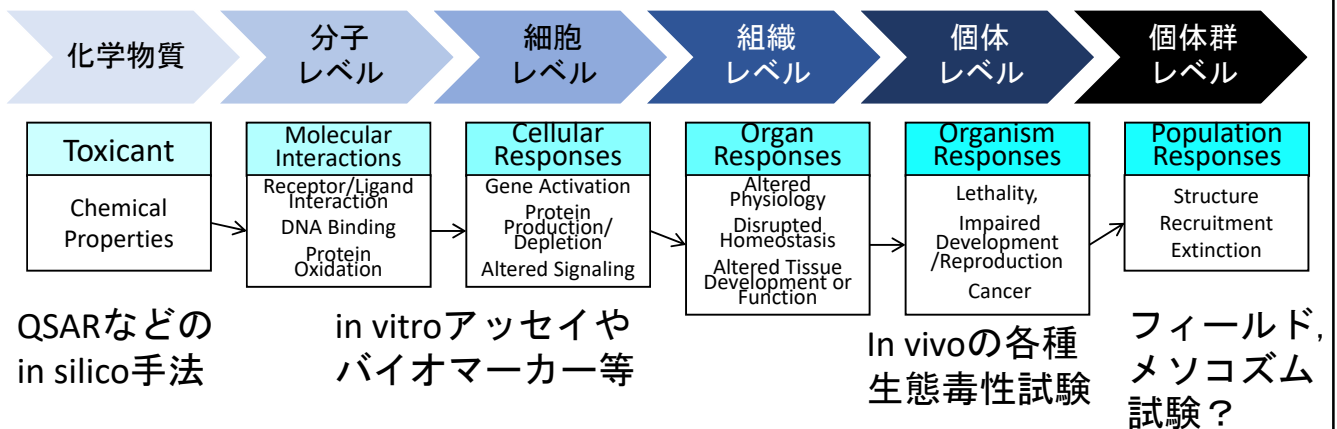
物性などにより、土壌や底質に蓄積しやすい疎水性物質については底生・土壌生物の試験、揮発性物質は陸上植物・昆虫等の試験が必要！？

→水生生物を用いた生態毒性試験に偏った評価からの考え方の変更が必要

生態毒性試験は多様化、高度化が必要だという背景として、現在使われている化学物質の性質が多種多様になってきています。昨今マイクロプラスチックの問題がいろいろ話題になっていますが、その中でもいろいろ触れられていますように、化学物質の性質がいろいろ変わるので、必ずしも水の中で試験だけしておけばいいというわけではなくて、一部については底質の方に吸着してそこに蓄積される、あるいは土壌の方に吸着する、あるいは揮発性で陸上の植物あるいは昆虫に影響する、そういった観点から様々な試験法ができてきているという現状があります。



# AOPやIATAの活用



- 生態毒性でAOPが提案されているケースは内分泌かく乱などわずかにとどまる
- 生態毒性では多くのケースでin silico手法の活用+専門家判断による効率的な試験指示が現実的

AOP: Adverse Outcome Pathway  
IATA: Integrated Approaches to Testing and Assessment

8

また、昨今、分子レベルでの研究、特に遺伝子関係の研究が広く進んできました、化学物質の分子レベルから最終的な個体群あるいは個体レベルでの影響をつないで考えていくというAdverse Outcome Pathway (AOP)といわれていますが、それぞれの分子レベル、細胞レベル、組織レベルでの関係をそれぞれキーイベントで結んでいって評価していくべきであろうというような考え方が今広く世界中で使われております。そういった観点から、我々の研究室ではQSARなどin silicoの手法も使っている研究者もおりますし、in vitroアッセイやバイオマーカーを使った研究をやっていたり、あるいは当然のことながらin vivoといわれている実際の生物、メダカの話が先ほど井口先生から御紹介ありましたが、メダカやミジンコ等を使って生物試験を実施しているグループもありますし、それをプラスして、さらに生態、生物間の相互作用を考えたようなモデルを立てている研究者もいるという形で、入り口から最終的な影響までのところをつないでいくような研究を我々の研究室ではやっているということになります。

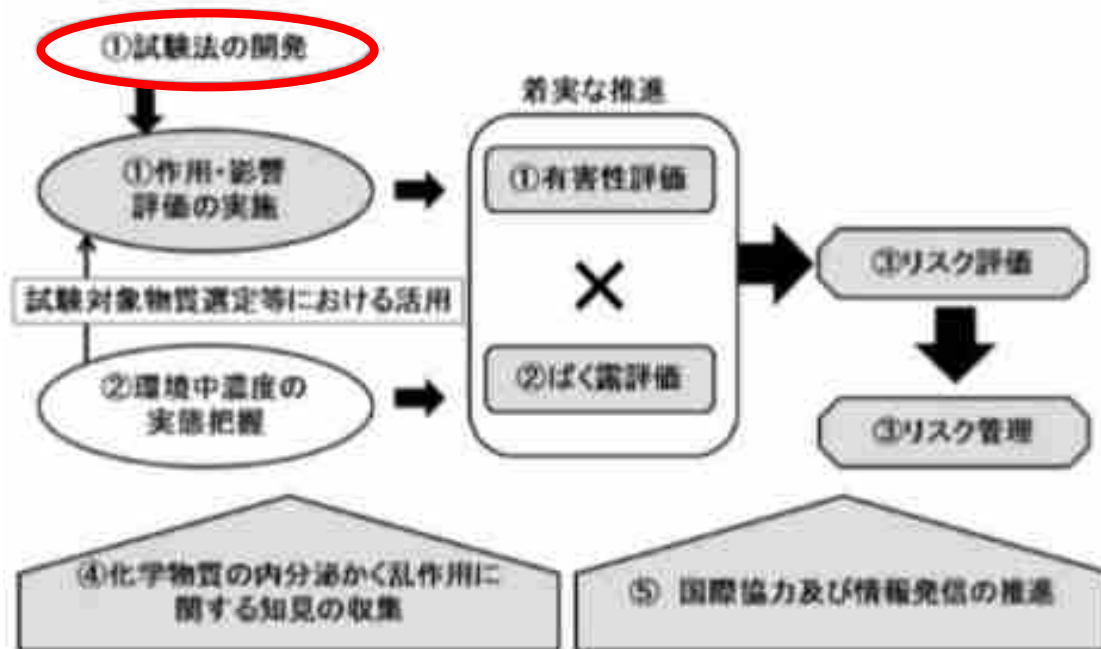
また、AOPという考え方については、生態毒性で、今のところ最終的な生物影響というのがエンドポイントとして死ぬ、死なない、あるいは成長する、しない、あるいは繁殖であったりとか、それぞれ化学物質の作用機作がはっきりわからないようなエンドポイントが使われることが多い関係もありまして、内分泌かく乱については一部逆に進んでいるところがあるのですが、それ以外のところではなかなかAOPの提案がまだまだ十分進んでいないところもあるというのが現状ではないかと思えます。それから、先ほどもありましたが、生態毒性の部分では、ある程度in silicoの手法ができます。逆にいうとin vitroの手法があまり使えません。そのまま生物で試験してしまった方が早いという場合もありますので、そういった場合については、in silicoの手法、コンピュータを使って化学物質の構造でもって毒性を予測するようなQSARといわれている手法などもある程度使えるということで、そういった試験をするべきか、しないべきかといったところを化学構造であったり、in vitro試験とか、こういうものを交えながら効率的にやっという考え方、IATAと呼ばれていますが、そういったような考え方も今後は広く使われていくのではないかと思いますし、そちらにも現在は関与しているということになります。



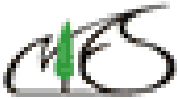


# EXTEND2016の枠組み(1)

EXTEND2016における取組みの概念図



今日は内分泌の話をしなないといけないということですので、内分泌の話をしていただきます。現在、EXTEND2016については、おそらく後で環境省の中村補佐から詳細をお話しただけかと思いますが、現時点での内分泌かく乱に関する評価に関しては、EXTEND2016の枠組みのもとでやることになっております。その中で試験法の開発というのが1つ重要なところでありまして、そちらに我々国立環境研究所が深く関わっておりますので、そのあたりのところを今日はお話していきたいと思っております。

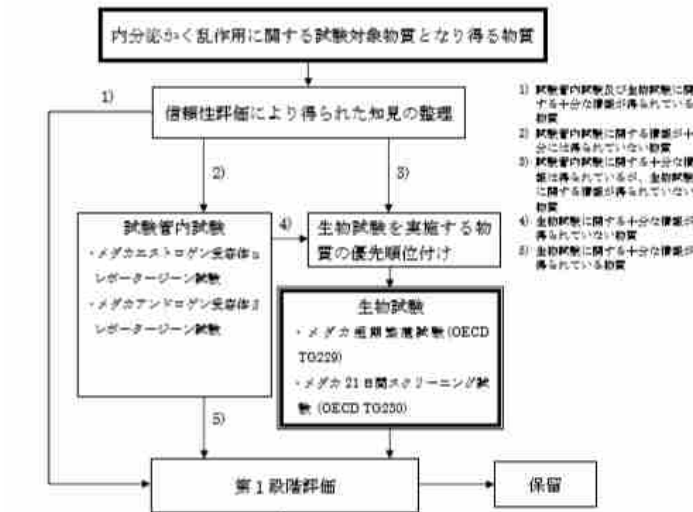


# EXTEND2016の枠組み(2)

内分泌かく乱作用の有害性評価の枠組み  
生殖に及ぼす影響

(エストロゲン様作用、抗エストロゲン様作用、アンドロゲン様作用、等)

第1段階 (内分泌系に対する作用の有無を確認)



第2段階 (有害性の確認)

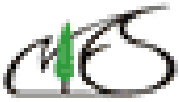


メダカ多世代試験(MMT)から  
メダカ延長一世代試験  
(MEOGRT)の開発・実施

リスク評価の枠組みへ進む

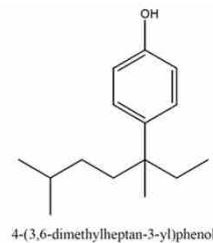
幾つか我々の方で試験法の開発を既にしたものもありますし、現在開発中のものもありますし、そのあたりについてお話をさせていただきたいと思えます。

これがEXTEND2016での内分泌かく乱作用の有害性評価の枠組みになりますが、そのうちでエストロゲン作用、先ほど井口先生からお話がありましたが、女性ホルモン様作用あるいは抗エストロゲン作用、女性ホルモン作用を妨げる作用、それからアンドロゲンといわれている男性ホルモン作用、こういったものを評価するときの最終的な確認の試験を作らないといけないということで、これは既に井口先生の方から御紹介いただいたのですが、メダカを使った試験法が既にアメリカの環境保護庁と共同で開発されておりまして、もともとは多世代試験だったのですが、現在はメダカ延長一世代試験(MEOGRT)という、メダカがたった唯一の試験法ということで承認されておりまして、開発は、私がこちらの方に異動してきたときにはもう終わっていたのですが、そのころ出来上がった試験法を使って、ノニルフェノールという女性ホルモン様物質としてよく知られている物質について試験を実施した結果の一部について御紹介させていただきたいと思えます。



# ノニルフェノールについてのMEOGRT 試験結果

～2017年10月のOECD専門家会合での  
愛媛大学鑑迫典久教授の発表スライドより



最初にお断りしておきますが、私自身が国立環境研究所に着任する前にやられた試験結果でありますので、一部私自身がすべて把握していないところがありますが、そこはお許しただければと思います。



# MEOGRT試験のタイムライン

Life stage	Embryo	Larvae	Juvenile	Sub-adult	Adult
------------	--------	--------	----------	-----------	-------

Exposure duration & condition																			
Test Week	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
F0	1	2	3	4															
F1				1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
F2																		1	2
No. of fish/tank	2 (1 pair)			20	12								2 (1 pair)				20		
No. of replicates (treatment/control)	6/12			6/12								12/24				6/12			
Test chamber	2 L			2 L								5 L	2 L				2 L		
Endpoints Timeline																			
Hatch					F1														F2
Survival				F0	F1	F1							F1					F1	F2
Fecundity	F0												F1 <sup>b</sup>	F1					
Fertility	F0													F1					
Growth				F0									F1					F1	
Vitellogenin				(F0)									F1						(F1)
Sexual development <sup>a</sup>				(F0)									F1						F1
Histopathology																			F1
Component	TG229			TG234								TG229				TG236			



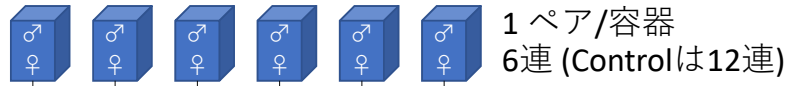
a:表現型・生殖腺・二次性徴（オスの尻びれの乳頭状小突起）の確認, b 最初の産卵まで. カッコ内はOECD TG240 では義務付けられていないものの本試験で実施したもの.

MEOGRT試験は、メダカ延長一世代試験ということで、これが全体のタイムラインで、全体のスケジュールになります。まず最初、F0という親の世代に3週間～4週間、3週間の間ずっと卵の数を数えます。親にばく露することによって親から胚に、母体から子どもに移行する。マターナル・トランスファーをここで考えて胚を回収する。その回収した胚をずっと育て、最終的にまたここで性成熟して卵を産むようになったら、また卵を回収して、その卵が孵化するところまでということなので、多世代試験ということもできますし、一世代のところの手前の、親にばく露すると最終的な孵化のところをみるということで、延長一世代試験ということもできるという試験です。これは多世代に渡っているということで、メダカのライフサイクルは比較的短いのですが、とはいえ、1週から19週間の試験、試験だけで19週間かかるというものになります。なので、準備期間等を含めると半年以上かかる試験になりまして、この後少し御紹介しますが、ペアをたくさん用意して、それぞれの産卵数を毎日数えたり、あるいは成長を見たり、バイオマーカーであるビテロゲニンという卵黄前駆タンパクを測ったりというようなことをやるということがこの試験では求められています。



# 各連の集約と再分配

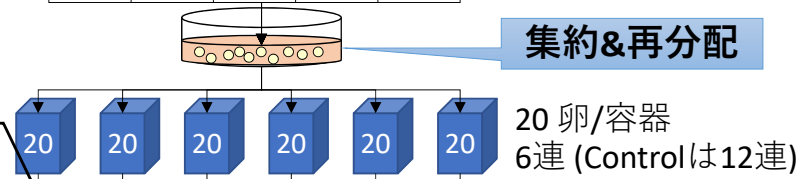
F0: 採卵(Day 22)



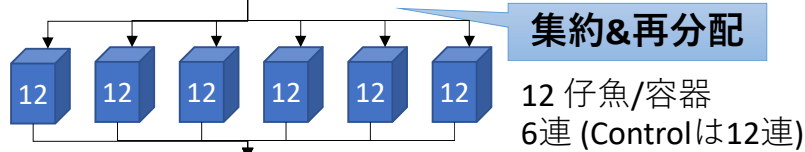
F1



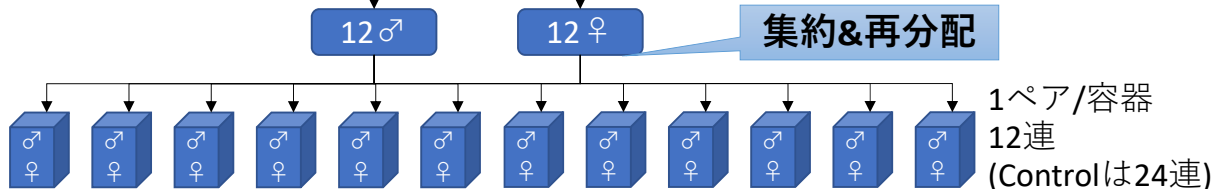
ふ化装置



ふ化仔魚 最大120胚



遺伝的性別判定 2 ペア/容器



13

先ほどお話しましたが、最初にF0という親の世代の卵を回収します。通常は1ペアを6連用意して、この中での卵を回収します。大体3週間行って、その後、その卵を再分配して二次性徴が起こるまで育てることになります。その際に、先ほど井口先生から御紹介があったと思いますが、メダカの特徴として、メダカについては、鰭を切って遺伝的な性別判定ができるということなので、それによって遺伝的雄・雌がはっきりわかるという特徴がありますので、それを利用して遺伝的な雄・雌をしっかりと見極めてから再度再分配して12ペアを作って、それぞれの卵を数えるような試験になっています。





# 流水式ばく露装置



- 容器サイズ:  
幼若体まで: 2 L  
亜成体: 5 L  
繁殖期: 2 L
- 換水率: 5 換水/日
- 水温: 26.9~27.2°C
- 溶存酸素: >60 %
- 光周期: 16 h 明/8 h 暗
- 給餌: ブラインシュリンプ (1日2回)

14

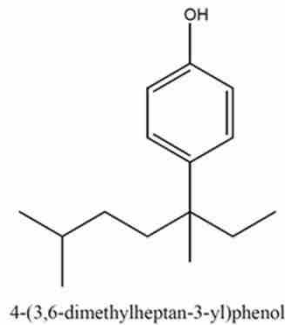
それを実施したのが我々国立環境研究所にあります流水式のばく露装置になります。これはもともとは、これも先ほど井口先生から御紹介ありましたが、環境ホルモン問題が出てきた2001年ぐらいに国立環境研究所の中で、環境ホルモン、ダイオキシン研究プロジェクトというのが立てられまして、環境ホルモン棟というのが建ち、その際に環境ホルモンの検出装置として作製されたもので、ステンレスとガラス、テフロン、フッ素樹脂などで作られていて、環境ホルモンの疑いがあるような化学物質の使用が極力控えられてつくられた装置になります。この装置を使いまして約半年間の試験を実施したということになります。この装置については、水の製造も国立環境研究所の、我々は今、環境リスク棟と呼んでいます。環境ホルモン棟の機械室で特別に作製いたしまして、もともとの水道水を脱塩素した水についてこちらに送り込んできて、連続的にここで薬液と混ぜてばく露するというような装置になっています。

# 被験物質: 4-Nonylphenol

## 4-Nonylphenol (分岐鎖同族体の混合物)

- CAS number: 84852-15-3
- 分子量: 220.35
- 分子式:  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_8\text{C}_6\text{H}_4\text{OH}$

- 化学構造 (あくまでも参考) :



## 被験物質

- 製造元: 関東化学社製
- 製造番号: 28640-96
- 純度: 99.7%

15

被験物質のノニルフェノールですが、これはあくまでも化学構造は参考ですが、分岐鎖同族体の混合物として知られている、いわゆる女性ホルモン作用を持っているといわれている物質として広く知られている物質です。この物質について先ほどのMEOGRT試験を実施したということになります。

# Watanabe et al. (2017), Environmental Toxicology and Chemistry



Environmental Toxicology and Chemistry, Vol. 9999, No. 9999, pp. 1–13, 2017  
© 2017 SETAC  
Printed in the USA

## *Environmental Toxicology*

### MEDAKA EXTENDED ONE-GENERATION REPRODUCTION TEST EVALUATING 4-NONYLPHENOL

HARUNA WATANABE,<sup>a,\*</sup> YOSHIFUMI HORIE,<sup>a</sup> HITOMI TAKANOBU,<sup>a</sup> MASAOKI KOSHIO,<sup>a</sup> KEVIN FLYNN,<sup>b</sup> TAISEN IGUCHI,<sup>c</sup>  
and NORIHISA TATARAZAKO<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Center for Health and Environmental Risk Research, National Institute for Environmental Studies, Tsukuba, Ibaraki, Japan

<sup>b</sup>US Environmental Protection Agency, Mid-Continent Ecology Division, Duluth, MN, USA

<sup>c</sup>Nanobioscience, Yokohama City University, Yokohama, Japan

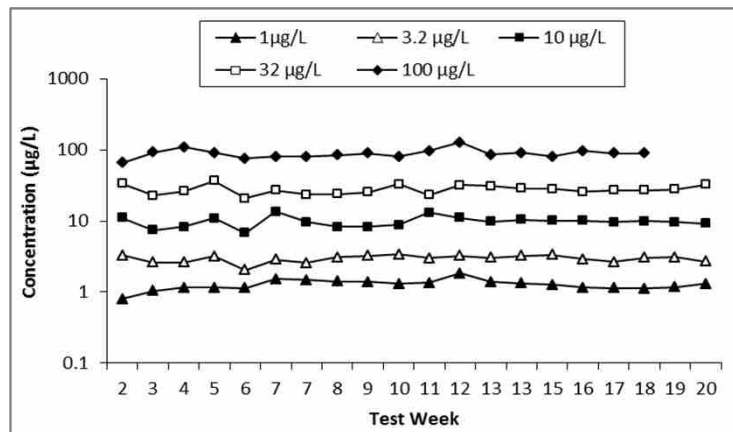
(Submitted 30 January 2017; Returned for Revision 5 March 2017; Accepted 17 June 2017)

**Abstract:** The medaka extended one-generation test (MEOGRT) was developed as a multigenerational toxicity test for chemicals, particularly endocrine-disrupting chemicals. Briefly, 3 generations of Japanese medaka (*Oryzias latipes*) are exposed to a chemical over a 20-wk period: 3 wk in the parental generation (F0), 15 wk in the first generation (F1), and 2 wk in the second generation (F2). The present study reports the first MEOGRT results concerning branched isomer mixtures of 4-nonylphenol (NP). Adult F0 medaka exposed to NP at 5 actual concentrations (1.27, 2.95, 9.81, 27.8, 89.4  $\mu\text{g/L}$ ) were unaffected in terms of reproduction, although vitellogenin in the male liver was increased dose-dependently at concentration of 2.95  $\mu\text{g/L}$  and higher. In F1, in contrast, total egg (fecundity), fertile egg, and fertility decreased as NP increased; lowest-observed-effect concentrations (LOECs) for total egg, fertile egg, and fertility were 1.27, 1.27, 27.8  $\mu\text{g/L}$ , respectively. In F1, but not in F0, secondary sex characteristics (i.e., anal fin papillae in males) were suppressed at 27.8  $\mu\text{g/L}$  NP. Vitellogenin induction in adult male fish was slightly weaker in F1 than it was in F0, however. Gonadal sex abnormality and sex reversal occurred at 27.8 and 89.4  $\mu\text{g/L}$  NP in F1 subadults. At 89.4  $\mu\text{g/L}$  NP, all genotypic F1 males in breeding pairs had female phenotype, and some even demonstrated spawning. Concentrations of NP lower than 89.4  $\mu\text{g/L}$  did not affect F2 survival or hatching.

この結果については既に「Environmental Toxicology and Chemistry」という雑誌に投稿されて既に掲載されています。実は私の名前はここには入ってなくて、私が来る前の仕事なので、現在私の部下である渡部主任研究員と鑑迫先生、井口先生の名前は入っていますが、そういったことなので、すべてについて私は熟知しているわけではないですが、我々の試験機関でやらせていただいた結果なので、今日は御紹介したいと思います。

# 測定濃度

Nominal concentration (μg/L)	<i>n</i>	Measured mean concentration (μg/L)	Coefficient of variance (%)	Measured/nominal value (%)
Control	20	ND	—	—
1	20	1.27	17	127
3.2	20	2.95	11	92.7
10	20	9.81	18	98.4
32	20	27.8	15	86.1
100	20	89.4	15	89.4



17

まず測定濃度ですが、それぞれ設定濃度が低い方から1、3.2、10、32、100 μg/Lに設定して、それぞれの濃度の測定を行って、実際の測定濃度はこちらになっています。若干変動はありますが、ほぼ80%、90%といった濃度が検出されています。先ほど井口先生からも御紹介ありましたが、環境中でのノニルフェノールの最高濃度については、若干減りつつありますけれども、1 μg/Lに近い濃度が検出されているということになります。

# ノニルフェノールの試験結果（致死率）

## F1 幼若体および亜成体

Measured concentration (μg/L)	4wpf (21 dpf)	9 wpf (59 dpf)	10 wpf (65 dpf)
Control	99 ± 2	96 ± 6	95
1.27	100 ± 0	96 ± 7	96
2.95	99 ± 3	99 ± 3	97
9.81	100 ± 0	93 ± 6	85
27.8	100 ± 0	97 ± 7	96
89.4	89 ± 10 *	82 ± 17	76 *

## F1 成体(繁殖期)

Measured concentration(μg/L)	Male			Female		
	Total	Dead	Mortality	Total	Dead	Mortality
Control	24	0	0.0%	24	1	4%
1.27	12	1	8.3%	12	0	0%
2.95	12	0	0.0%	12	0	0%
9.81	12	0	0.0%	12	4	33%*
27.8	12	0	0.0%	12	3	25%*
89.4	12	4	33%*	12	3	25%*

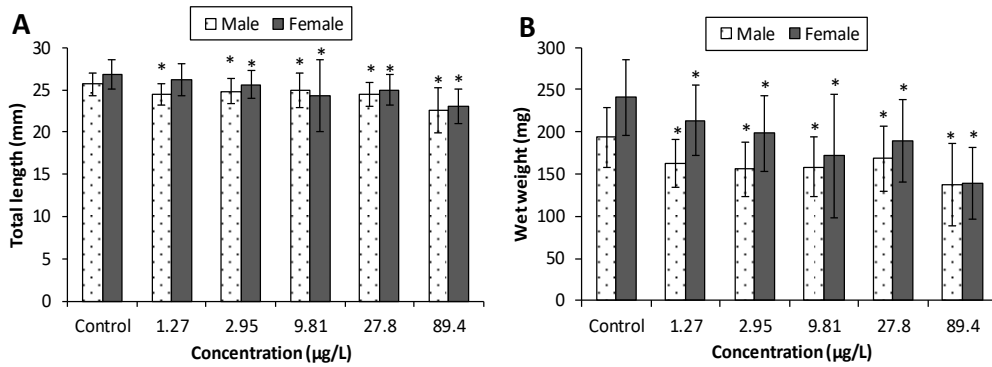
18

ノニルフェノールの試験結果です。これは致死率と書いてありますが、上側は生存率です。それぞれの濃度区での4週間後、9週間後、10週間後の生存率。下側が致死率になっていますが、それぞれのF1での成体の致死率についてこちらに書かれています。先ほどの結果も言い忘れましたが、少し高濃度側になると若干雌で死亡が出てくるということで、ノニルフェノール自体は内分泌かく乱作用もありますが、一般毒性の作用もある程度あるという物質なので、そのあたりの評価がなかなか難しいところですが、そのあたりがどうなったのか、これから御紹介したいと思います。

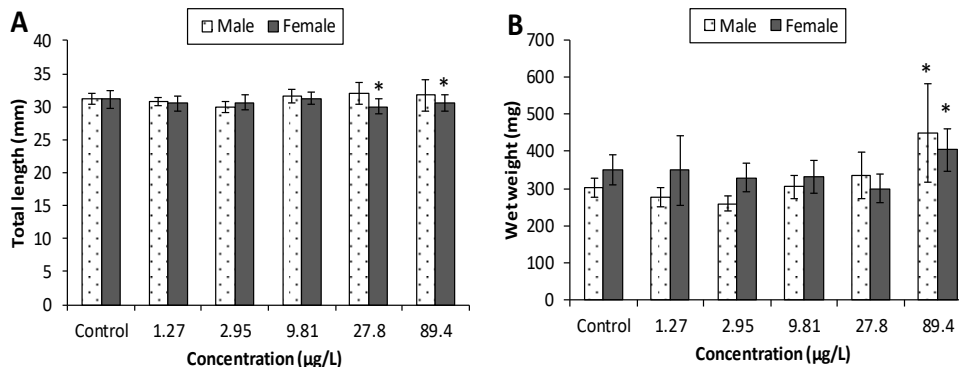


# ノニルフェノールの試験結果（成長）

F1亜成体



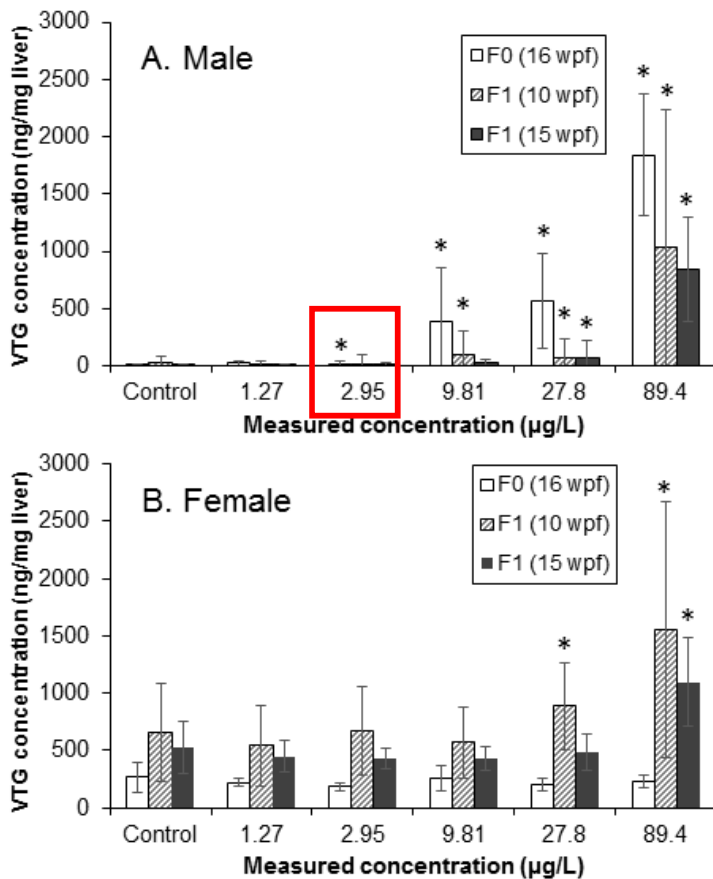
F1成体



19

これはF1の亜成体と成体の成長の様子です。若干高濃度側で成長が促進されるような効果も出ていますが、基本的にはそれほど大きな影響は出ていません。亜成体については若干出ていますが、これはその手前で成体ではそれほど大きな影響となっていないので、MEOGRTではそこまで重要なエンドポイントではありません。

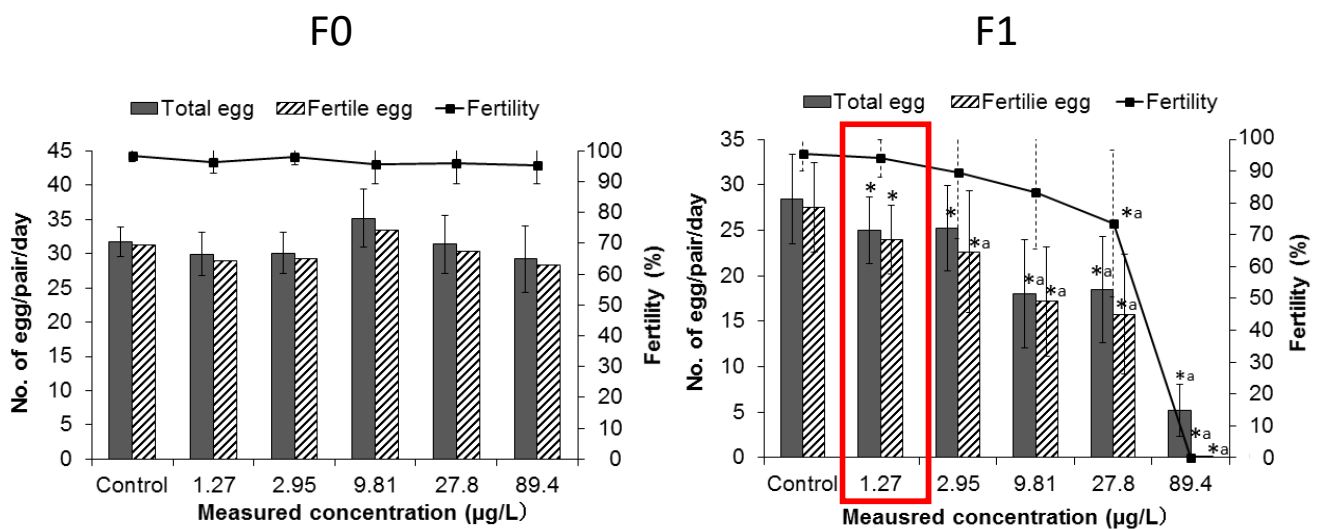
# ノニルフェノールの試験結果 (VTG)



Watanabe et al. (2017)

次は卵黄前駆タンパクのビテロゲニンの濃度ですが、亜成体のところを中心に雄のビテロゲニンの産生が2.95 µg/Lという濃度で検出されていますので、これよりも、このところで少なくとも女性ホルモン作用があるのではないかと疑われるということがわかってきたということです。これについては既に発表している論文のところから取ってきたものです。

# ノニルフェノールの試験結果（繁殖）



Watanabe et al. (2017)

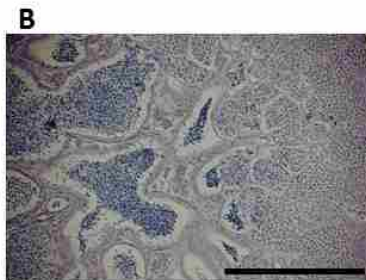
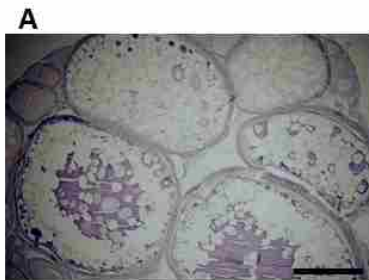
21

一番重要な繁殖というところですが、次世代を残せるかどうかということなので、これは一般の化学物質の評価でも有害性の指標としてよく使われている、繁殖のところは実は先ほどのピテロゲニンの上昇よりも低い濃度で起こることがわかってきたのがこの論文の特徴かと思います。特にF0という親世代はその前はばく露していないので、ここはあまり効かないのですが、マターナル・トランスファーを終えたF1の世代の一番低い濃度でもコントロール区、何もばく露していない対照区と比べて若干の産卵数の減少が認められたといったところがこの調査研究の成果ということになります。これについては、統計の仕方によって若干有意差がつく、つかないというのが変わってくるという問題はありますが、現時点でのOECDのテストガイドライン240に沿って、アメリカの環境保護庁の方で開発されたソフトウェアを使ってチェックしたところ、低濃度での影響については問題がない、間違いないということがわかっています。

# ノニルフェノールの試験結果（組織切片）

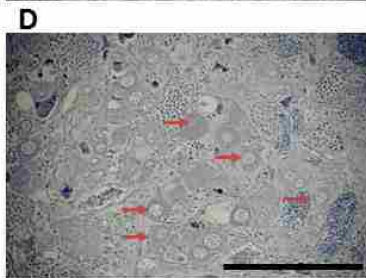
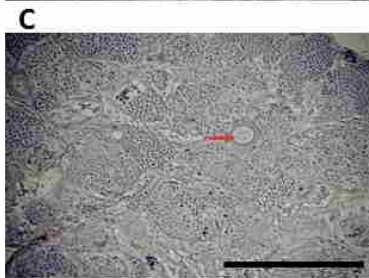


Control female



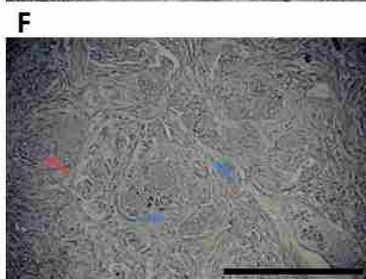
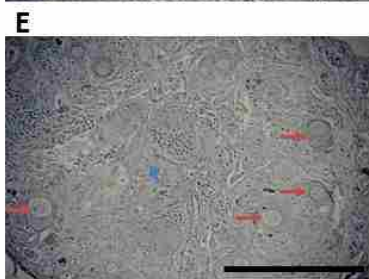
Control male

Male  
(9.81  $\mu\text{g/L}$ )



Male  
(27.8  $\mu\text{g/L}$ )

Male  
(89.4  $\mu\text{g/L}$ )



Male  
(89.4  $\mu\text{g/L}$ )

22

また、これも先ほど井口先生から御紹介がありました組織切片をとると、9.81  $\mu\text{g/L}$ というところから雄のところに精巣卵が認められるということになりました。このようにノニルフェノールについては明らかにエストロゲン様作用が確認されるということです。

# ノニルフェノールの試験結果まとめ

Endpoint		F0	F1		F2
		Adult	Embryo-Sub-adult	Adult	Embryo
ふ化率		/	↓ 89.4	/	>27.8
ふ化日数			>89.4		↑ 27.8
生存率 (2 wpf)			↓ 89.4		>27.8
生存率 (4 wpf)			↓ 89.4		
Age		13-16 wpf	10 wpf	12-15 wpf	
生存率	オス	>89.4	↓ 89.4	↓ 89.4	/
	メス	>89.4		↓ 9.81	
総産卵数		>89.4	/	↓ 1.27	
受精卵数		>89.4		↓ 1.27	
受精率		>89.4		↓ 27.8	
全長	オス	>89.4		↓ 1.27	
	メス	>89.4	↓ 2.95	↓ 27.8	
湿重量	オス	>89.4	↓ 1.27	↑ 89.4	
	メス	>89.4	↓ 1.27	↑ 89.4	
HSI	オス	>89.4	>89.4	↑ 9.81	
	メス	>89.4	↓ 9.81	↑ 27.8	
GSI	オス	↑ 2.95	↑ 9.81	↑ 27.8	
	メス	>89.4	↑ 27.8	↑ 89.4	
VTG	オス	>89.4	↓ 2.95	↓ 27.8	
	メス	NA	NA	NA	
二次性徴	オス	>89.4	↑ 27.8	↑ 89.4	
	メス	NA	NA	↑ 27.8	
表現型性別と生殖腺形態 <sup>1</sup>		NA	NA	↑ 27.8	

23

当然、エストロゲン作用が確認されるという雄のビテロゲニンのところ、これは減少ではなく上昇の間違いですが、総産卵数や受精卵のところについて1.27 µg/Lという一番低い濃度で影響が出たということがこの試験の結果の特徴だと言えるかと思えます。

実はこの後、F2の世代についても調べたのですが、大体同じような効果が出てきたので、そのあたりについてはまだ論文にお出ししていませんので、そこらあたりは今回御紹介するのは控えておきます。

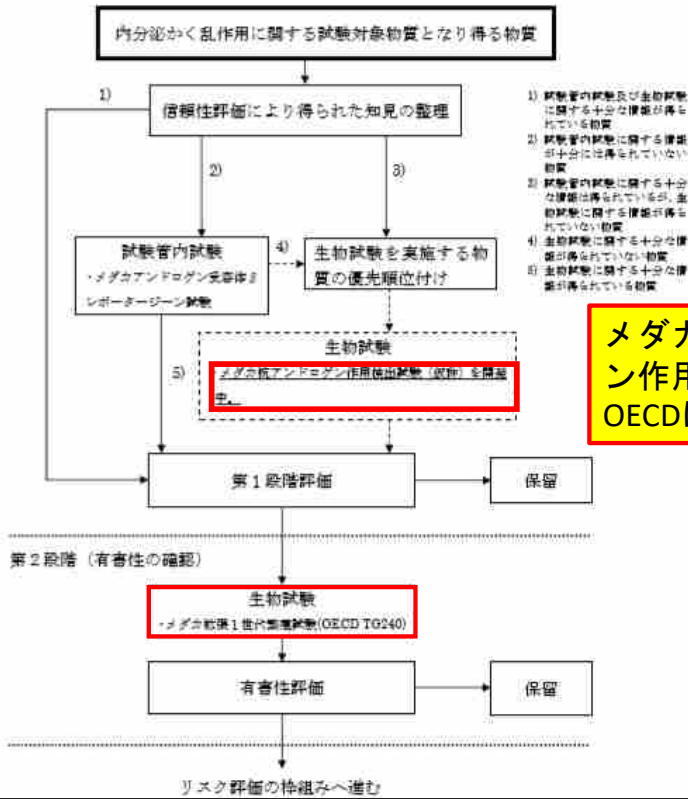




# EXTEND2016の枠組み(3)

内分泌かく乱作用の有害性評価の枠組み  
生殖に及ぼす影響  
(抗アンドロゲン様作用、等)

第1段階 (内分泌系に対する作用の有無を確認)



メダカを使った抗アンドロゲン作用検出試験法の開発：OECDに提案中

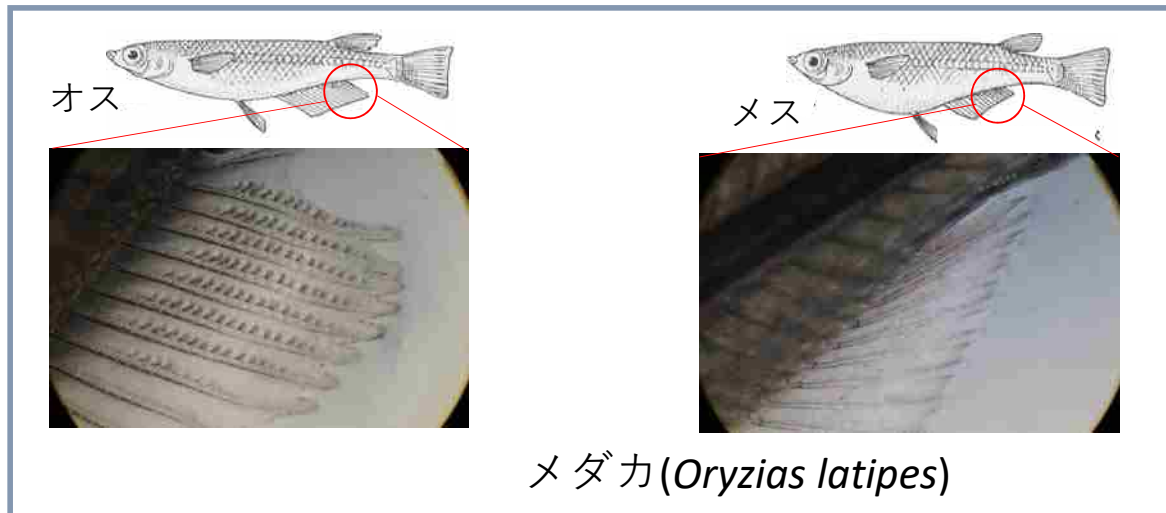
それ以外にも、この後も試験は我々の方で実施しておりますので、それについても公表できるようにになったらまた御紹介したいと思います。

もう1つ我々の方で魚を使った試験法の開発として、メダカを使った抗アンドロゲン作用の検出手法について現在OECDに提案中なので、こちらについても少し結果を御紹介したいと思います。

これも先ほど井口先生から御紹介ありましたが、農薬等を調べると、アンドロゲン、男性ホルモンの受容体にある程度作用する。けれども、それを阻害する物質が結構多いということなので、それを調べる手法について、当然先ほどのMEOGRT試験をやればいいのですが、これは半年間かかるということで非常にコストと時間がかかるので、そのスクリーニングの試験法がないのかということで開発されたのがこのメダカの抗アンドロゲン作用の検出試験です。実はこれはメダカ以外にイトヨという魚を使った試験法が開発されていて、それがスピギンという物質を出すということで使われているのですが、日本でやるということもありまして、先ほどのMEOGRTがメダカを使っているということもあるので、できればメダカを使った手法ができないかということで、メダカを使った手法を我々国立環境研究所の方で開発してまいりました。



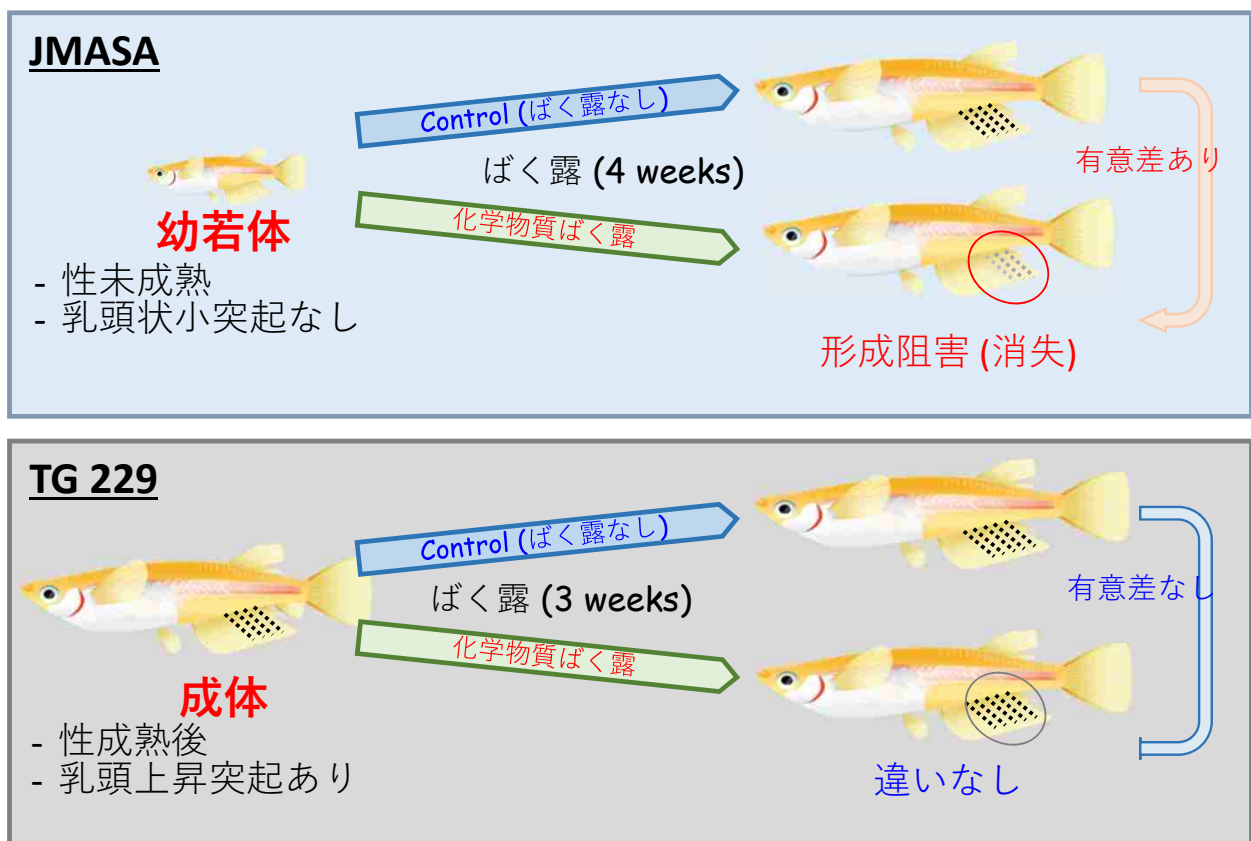
# 幼若メダカ抗アンドロゲン作用 スクリーニング試験(JMASA) 開発状況 ～2018年10月のOECD専門家会合での 愛媛大学鑑迫典久教授の発表スライドより



これも井口先生から御紹介があったのですが、メダカの特徴として雄の尻鰭のところにこういう乳頭状小突起という突起が、雌にはありませんが、雄にはできます。この突起のできる、できないというのが雄の二次性徴と関連するということで、これを利用した試験法を開発しようということでできた試験法になります。



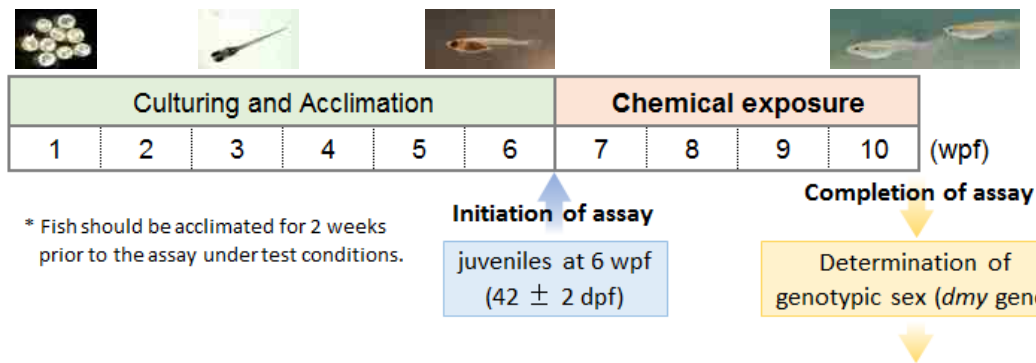
# JMASA試験の特徴



26

現在、JMASAといわれていますが、下の方が、メダカ以外も使いますが、魚の短期繁殖試験です。これ自身は3週間の産卵数あるいは乳頭状小突起もみるのですが、これはばく露期間が既に成体になってからばく露するというのもあって、乳頭状小突起の形成には直接影響しません。ですので、性成熟前の幼若メダカに4週間程度ばく露することで、雄の尻鰭の乳頭状小突起の形成が阻害されるということを見ることで、抗アンドロゲン作用、抗男性ホルモン作用をみることができるのではないかと考えてこの試験法が作られました。

# IMASA試験のタイムライン



## 試験条件

ばく露形式:	流水式(>5 換水/日)
供試生物:	メダカ ( <i>Oryzias latipes</i> ) (受精後6週の幼若体)
濃度区数	3 (処理区) + control
繰り返し数	4 容器/濃度区
個体数	7 頭/容器 (28頭/容器)
容器サイズ	最小1.8 L
水温	$25 \pm 2^\circ\text{C}$
給餌	ブラインシュリンプ, 2-3 回/day
ばく露期間	28 日

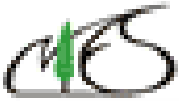
## Endpoints assessment

- No. of palte with papillary process
- Vitellogenin (option)
- (growth: body length & weight)

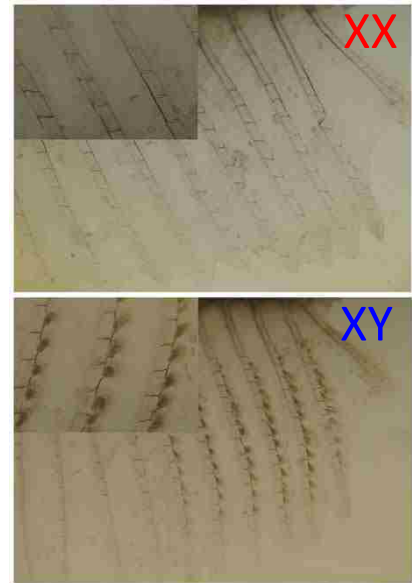
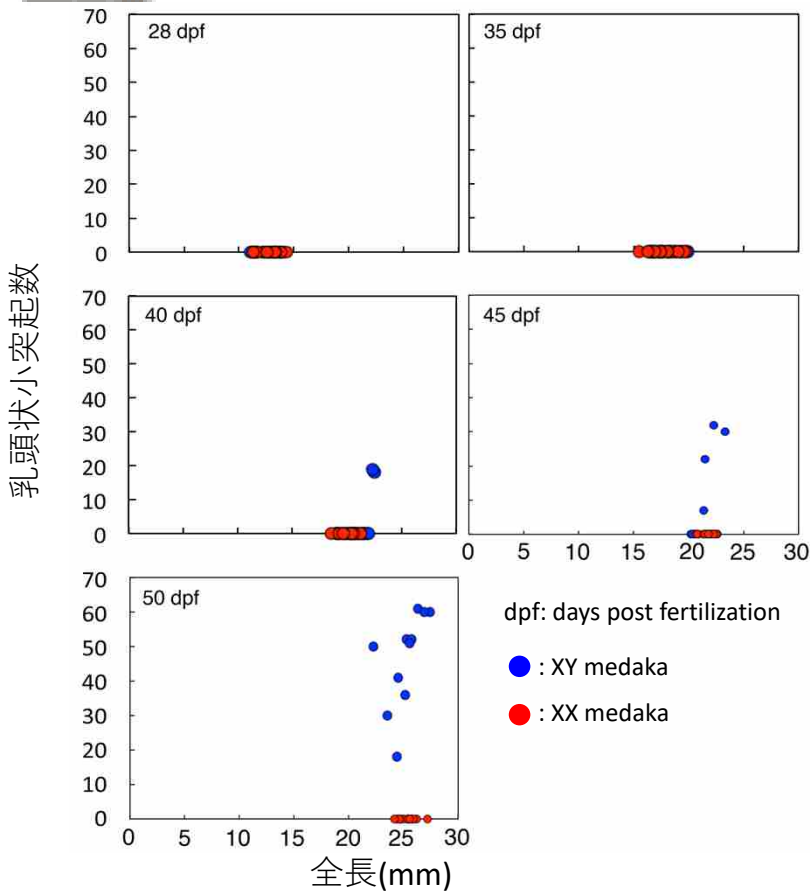
\* The measurements of each endpoint are analysed based on genotypic sex.

27

この試験は、生まれてから6週のメダカを使って4週間のばく露をするということをやります。これも先ほどの流水式ばく露装置を使いまして、大体3濃度区ないし4濃度区をばく露して試験をします。ですが、幼若期のメダカを使うので、雄雌がまだはっきりしないところもありますので、当然遺伝的な雄・雌を見ながら分けていくということになりますが、そのあたりはどうしても不完全なところがあるということなので、この時点ではまだ雄雌がはっきりしてないで、最後のところで測ります。7匹入れるのですが、7匹とも雄になったりということは基本的にはあり得ないはずなんです、そういったこともあり得ないわけではないということになります。



## 乳頭状小突起の形成過程

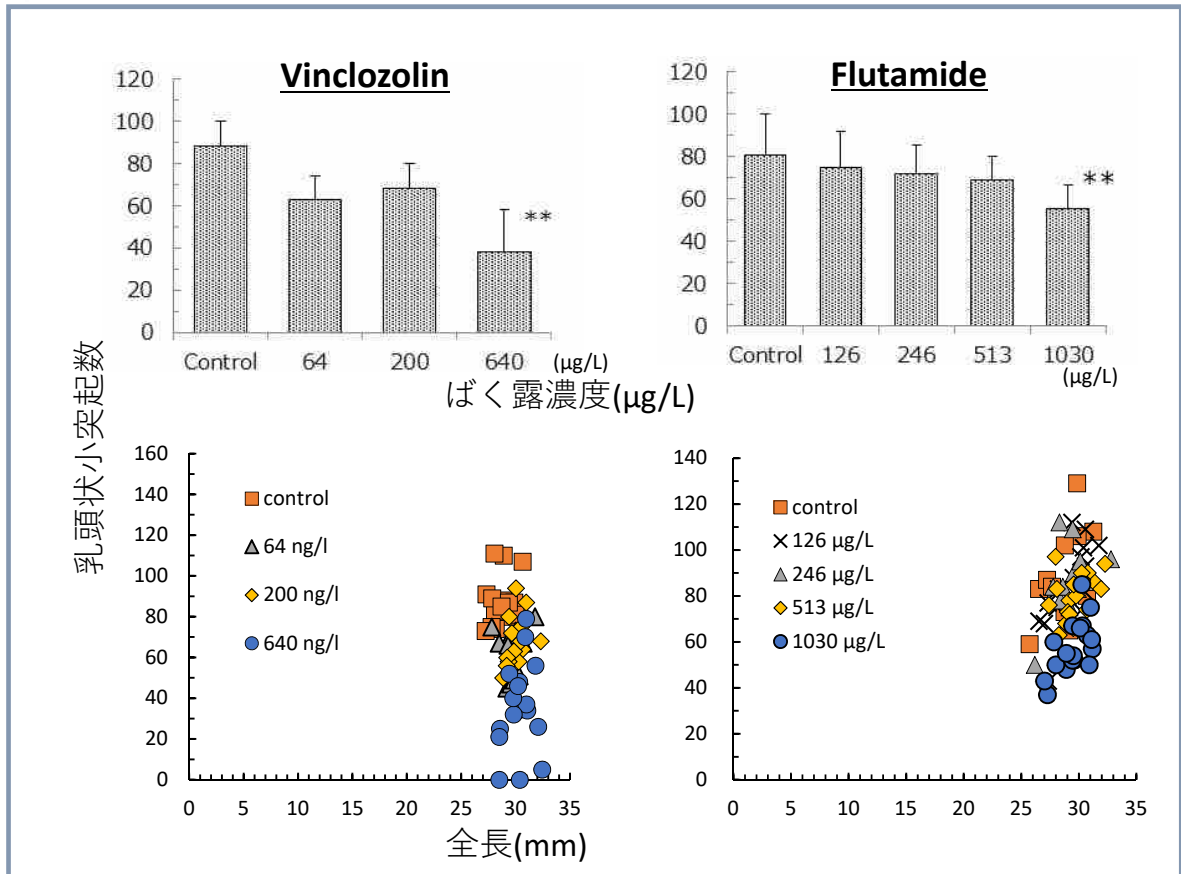


オスの乳頭状小突起形成は40-45 dpf (全長21-23 mm) から始まる

乳頭状小突起の形成なんですが、先ほど時間のスライドがありましたけれども、大体6週間、42日目ぐらいから始めますので、乳頭状小突起というのは28日ではできない。35日でもまだできていません。横軸が全長で、縦軸が乳頭状小突起数です。これを見ていただいたらわかりますが、28日、35日ではできていないのですが、40日ぐらいからちょっとずつできてきて、大体50日ぐらいだとほぼできているということになります。40日～45日ぐらいから雄の乳頭状小突起の形成が始まりますので、これを使って抗アンドロゲン作用をみるということになります。



## 試験結果 (Vinclozolin と Flutamid)

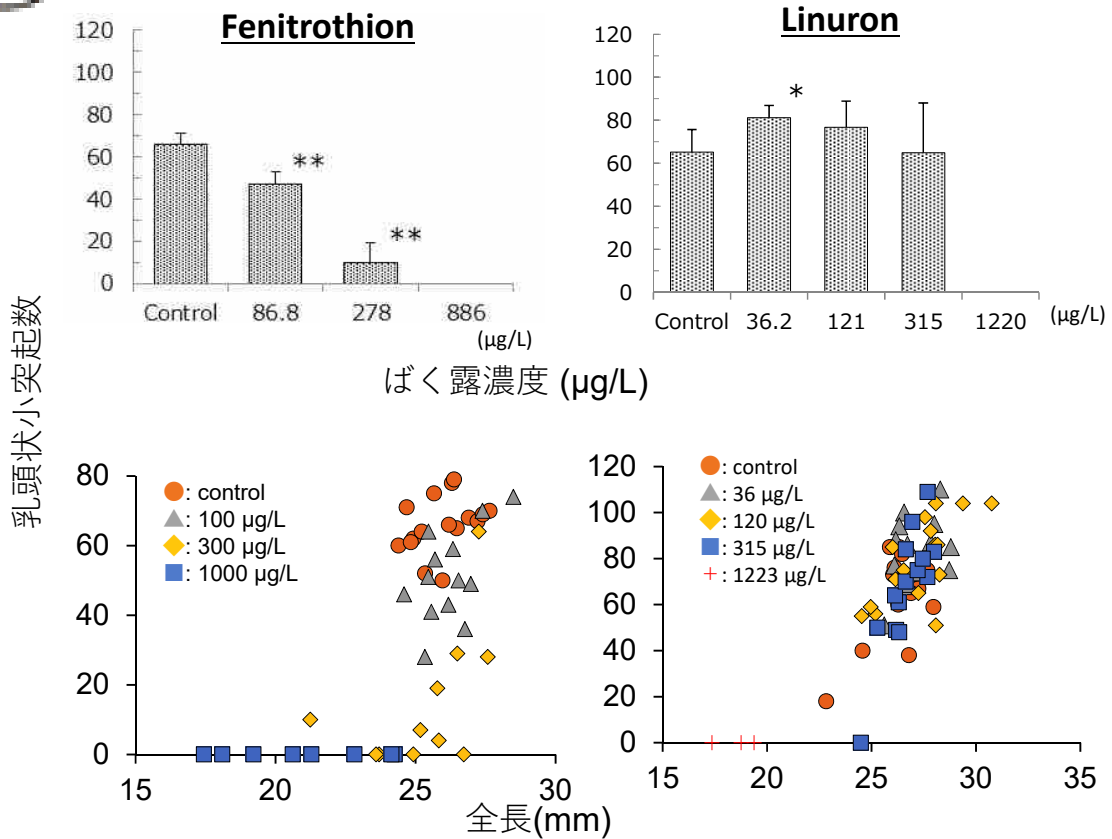


一部の結果を御紹介いたします。現在、いであ株式会社の方でも一部検証実験をやっていただいておりますが、そちらと我々と共同でやっている仕事です。ビンクロゾリンとフルタミドという物質についてやった結果ですが、やはり高濃度区になると乳頭状小突起の形成がやや抑えられているという傾向があります。同じようなことがフルタミドでも起こっていき、きちっと成長も起こっていますが、若干成長が不十分であると乳頭状小突起の形成も抑えられるということがあるので、そのあたり全長との関係をしっかりみながらやるということがポイントになります。



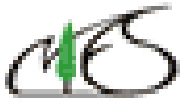


## 試験結果 (FenitrothionとLinuron)



ほかにも抗アンドロゲン作用があるといわれている物質として有機リン系殺虫剤のフェントロチオンという物質についても実施しております。この物質については、高濃度側に行くと一般毒性というか、そもそも成長自体が抑えられてしまうことによって乳頭状小突起の形成が抑えられるということもありますが、ちょうど真ん中ぐらいのところ、この濃度では成長はするのだけれども乳頭状小突起ができないということが起こりますので、それでもって抗アンドロゲン作用がここで検出されるということになります。

それに対してリニユロンという物質については、本来、こちらも同じような効果があるかと思っていたのですが、これについてはうまく見つけられなかったというところがあります。



## JMASA試験結果まとめ

- JMASA試験で抗アンドロゲン作用の検出が可能.
- 陰性物質(一般毒性物質)やエストロゲン作用物質、アンドロゲン作用物質等での検証が必要
- 現在、いであ株式会社との検証を実施中だが、他機関でのリングテストによる検証が必要

31

JMASAといわれている幼若メダカを使った抗アンドロゲンのスクリーニング試験については、現在我々の方で検証実験を引き続きやらせていただいています。今後これについては、陽性対照物質、本来抗アンドロゲン作用があるだろうと思われた物質について主に試験をしてきましたが、それに加えて陰性物質(一般の毒性物質)、エストロゲン作用やアンドロゲン作用を持つ物質は一体どうなるのかといったことを今後調べていかないといけませんし、リングテストが必要になってくると、いであ株式会社と現在検証を実施中ですが、複数のほかの機関についてもリングテストをやっていく必要があるのかなというところで現在OECDに提案中ですが、その検証をして何とか承認に持っていきたいと考えております。

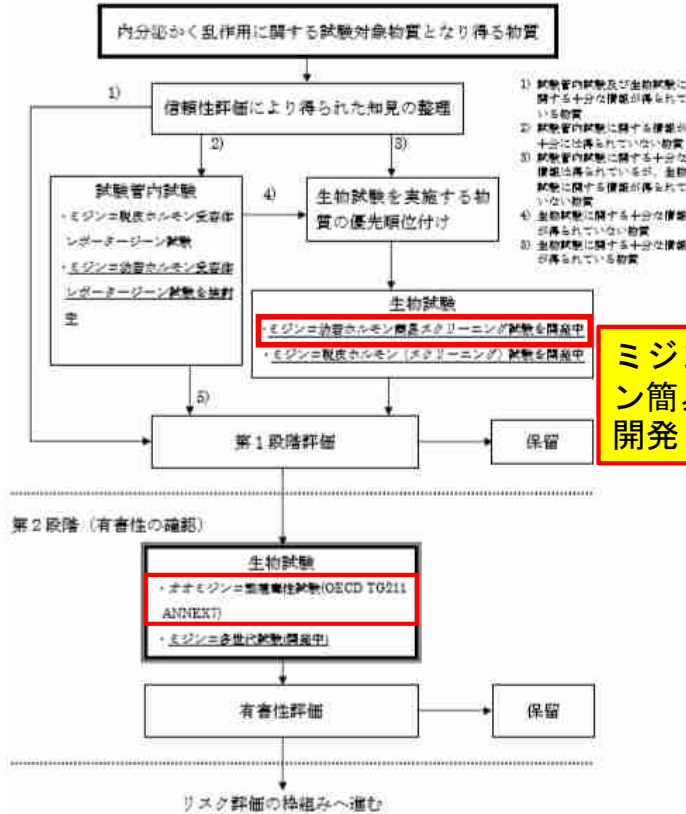


# EXTEND2016の枠組み(4)

内分泌かく乱作用の有害性評価の枠組み  
成長に及ぼす影響

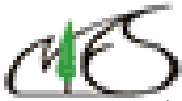
(幼若ホルモン様作用、脱皮ホルモン様作用、等)

第1段階 (内分泌系に対する作用の有無を確認)



ミジンコを使った幼若ホルモン簡易スクリーニング試験の開発：OECDに提案中

引き続きまして、これはミジンコを使った、ミジンコのホルモンに関する検出の試験です。既に確認試験の方は、OECDのテストガイドラインの211番の付録の7番、Annex 7というところに、もともと211というのはミジンコの繁殖試験で、子どもの数を数えるという試験なんです。それに加えて子どもの雄雌をしっかりと数えてやるということで、その物質が幼若ホルモン、雌が雄化するような物質かということを確認できる試験だということ、こちらの方は既に提案して承認されています。ただ、これも21日間ひたすら子どもを大体200とか産むのですが、それについて雄雌をすべて判別しないとイケないので、コスト的にも時間的にもかなりかかる。これを何とかできないかということで、スクリーニング試験として現在、幼若ホルモンのスクリーニング試験をOECDの方に提案させていただいていますので、それについて少し御紹介したいと思います。



# ミジンコ幼若ホルモンスクリーニング 試験(JHASA)開発状況

～2017年10月のOECD専門家会合での  
愛媛大学鑑迫典久教授の発表スライドより

ミジンコの生活史

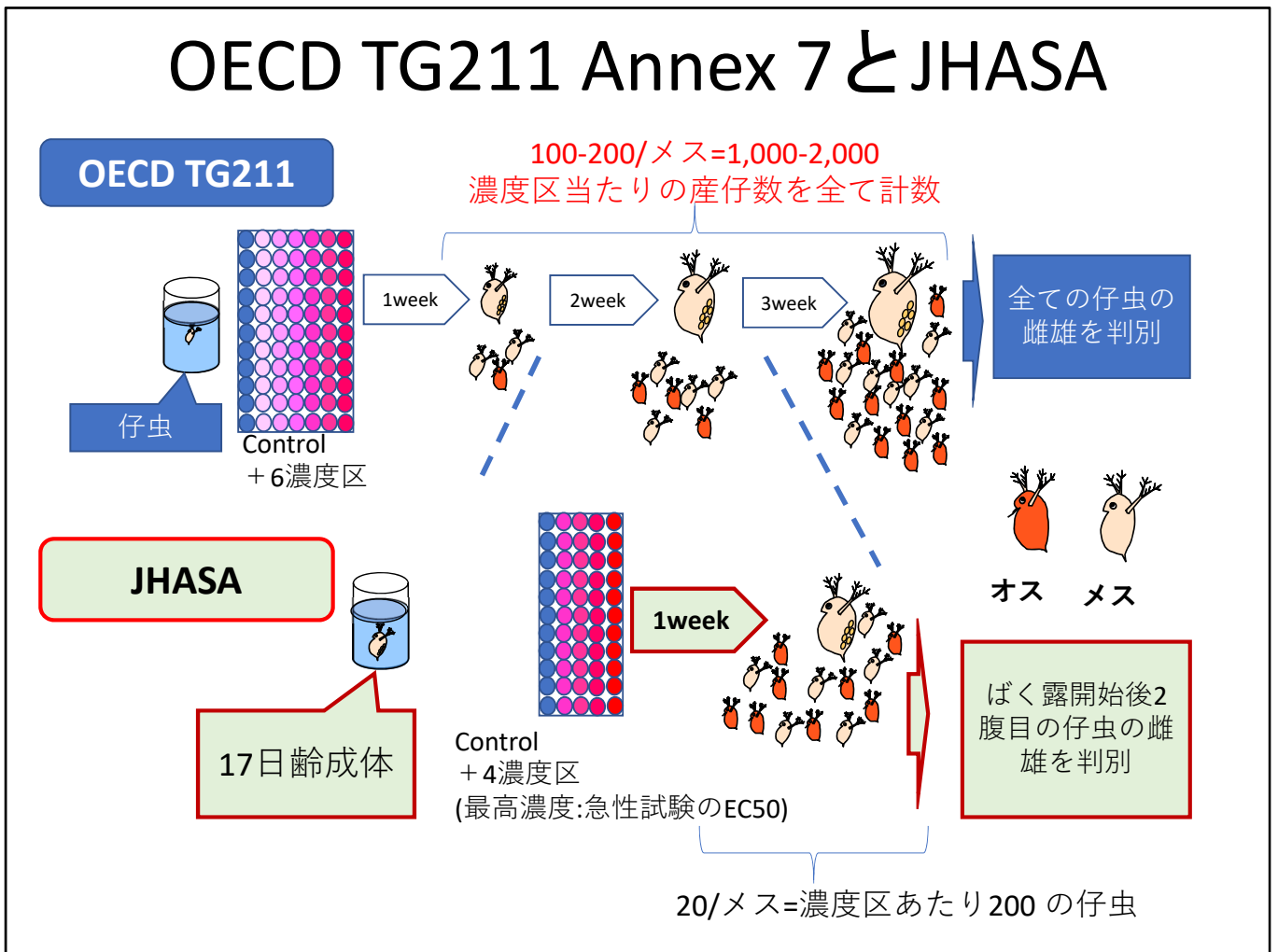


♀ 1mm ♂  
オオミジンコ (*Daphnia magna*)

先ほどもお話ししましたが、ミジンコについても皆さん大体御存じかもしれませんが、ミジンコは単為生殖です。雌が雌を産む、クローンを産む。通常は単為生殖をしています。それが環境ストレス等の働き、あるいはケミカルのストレスもあるかもしれませんが、こういったもので雄が出てきて、雄と雌とで交尾をして耐久卵が産まれて、それによって、これは当然乾燥にも非常に強い。皆さんよく御存じかもしれませんが、ミジンコは秋から田んぼに大体いると思いますが、そういったところで春になったら発生するけれども、冬になって完全に田んぼが枯れてしまうのにまた春になったら出てくるというのは、乾燥したときにも強い耐久卵というので、それでもって冬を越す、あるいは乾燥にも耐えるということをやっているということなので、この雄雌の調整のところはどうやっているかという、幼若ホルモンというホルモンが関わっているということがわかってきましたので、今回、その検出のスクリーニング手法について現在提案中なので、そちらを御紹介したいと思います。

これはミジンコの雄と雌ですが、雄は第1触覚が少し長いという特徴があって、ややオレンジっぽいという特徴があります。

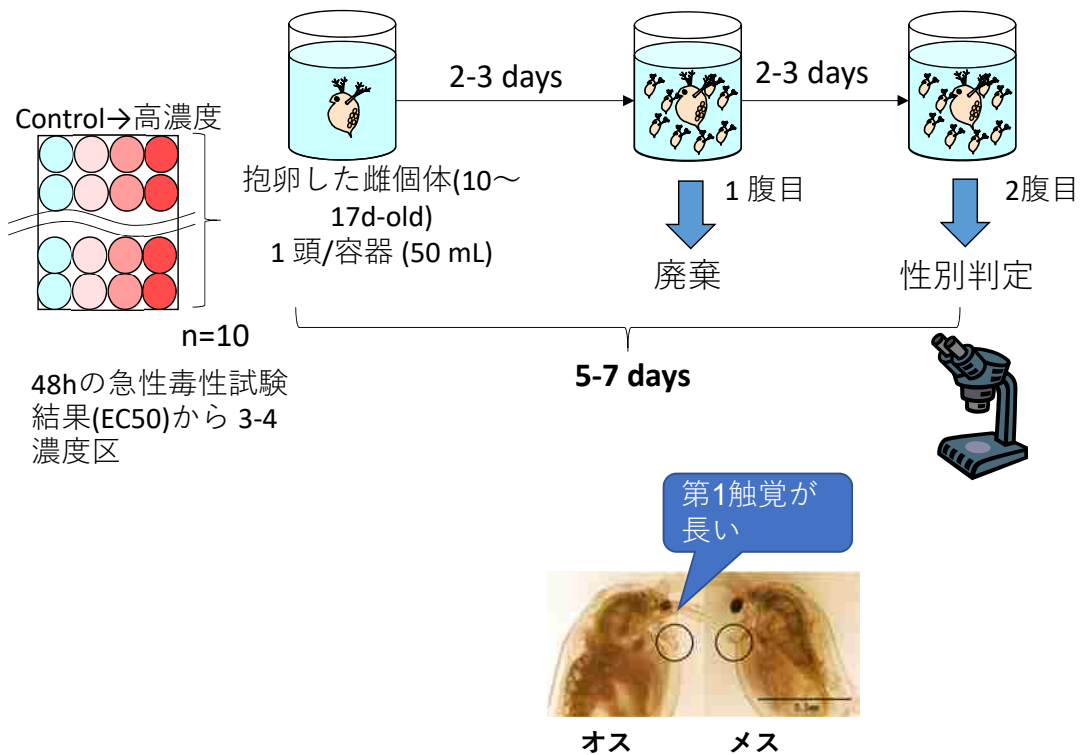
# OECD TG211 Annex 7とJHASA



これが先ほど御紹介したOECDのTG211というミジンコ繁殖試験です。これは1週間、2週間、3週間の間ひたすら子どもの数を数えて雌雄を判別するという非常に手間のかかる試験です。これは既に確認試験として承認されたのですが、それをもう少し簡単に評価できる手法ということで、JHASAといわれている幼若ホルモン活性のスクリーニング試験を現在提案中です。この場合は通常、生後24時間以内の仔虫を10個用意して、ひたすら子どもを数える。大体1週間後ぐらいから子どもを200ぐらい産みますが、1匹当たり200なので、1濃度区当たり2000とかを数えないといけないということになります。こちらの17日齢を使うと、1回目の1腹目を捨てて2腹目だけを数えるということなので、比較的簡単に調べることができる。200個ぐらい数えれば何とかこの物質が幼若ホルモンを持つか持たないかということがわかってくるということになります。



# JHASAの実験手順



現在提案中の幼若ホルモンのスクリーニング試験ですが、先ほども言いましたが、大体10～17日齢という子どもを産み始めてある程度経った成熟したミジンコを用います。これに幼若ホルモンと疑われる物質をばく露して、最初の1腹目を捨てて2腹目だけ性別判定をするということで、雄は第1触覚が長いという特徴がありますから、これを顕微鏡で観察して性別を判定するという試験になります。





# JHASA試験のポイント

- 試験生物の日齢
  - 10-17 日齢のメス (1腹目を産仔済1<sup>st</sup> brood)
- 試験濃度区
  - EC50 (TG202遊泳阻害試験) もしくは水溶解度から3-4濃度区
- 試験期間
  - 5-7 days (試験期間中の2腹目を観察)
- 繰り返し数
  - 検出力確保のためにN=10 (TG211と同じ)

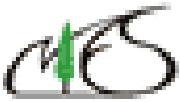
36

最初の仔虫を使うのではなくて、ある程度成長した個体を使うということがポイントなので、それでもって比較的短い期間に試験をすることができます。

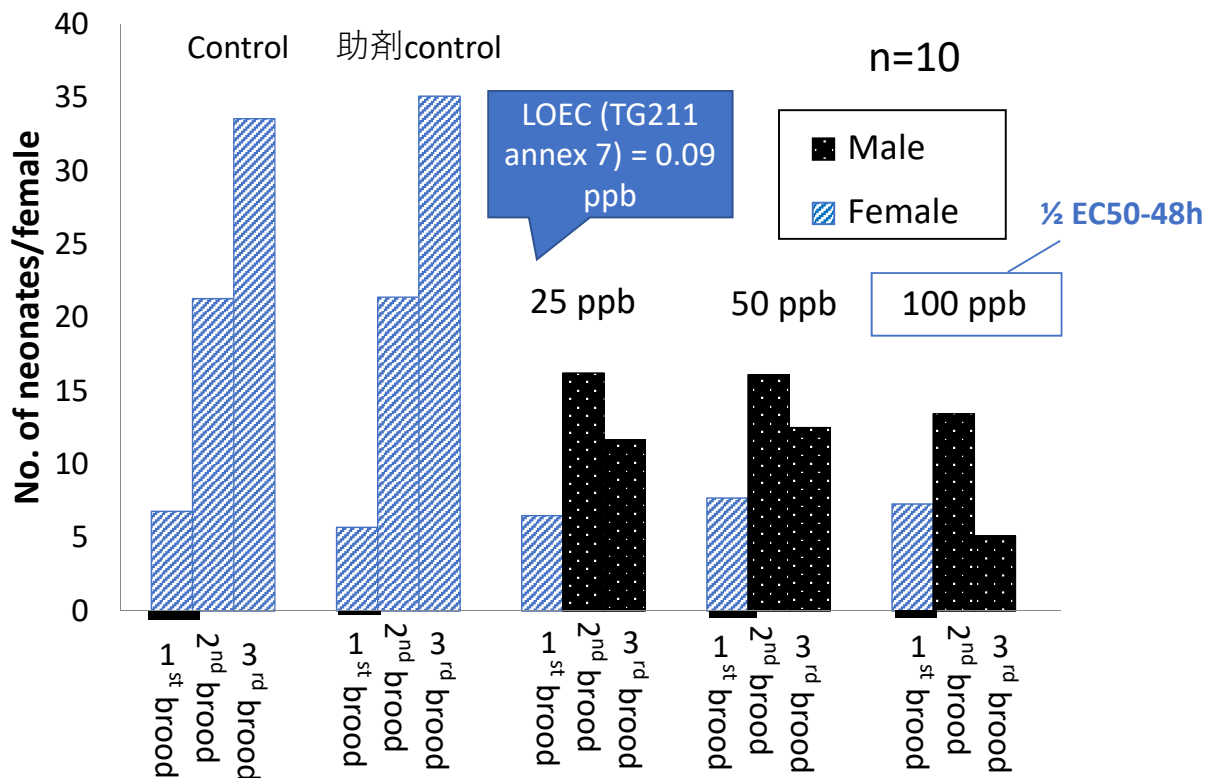
また、そもそも死ぬ、死なないという濃度よりは低い濃度から始めないと意味がないので、あと、水に溶けないと意味がありませんから、そういったところで試験を実施するというところがポイントです。

それから試験期間が短いということです。21日間フルでやらなくてもよくて、2腹目だけを観察することなのでいいということですね。

TG211と同じように繰り返し数を10個ぐらい用意しましょうということがポイントになります。



## Pyriproxyfenを用いた検証試験



37

一部結果について御紹介させていただきます。これはピリプロキシフェンという幼若ホルモン様物質として知られている物質ですが、農薬等に使われている、殺虫剤としても使われている物質です。この物質についてそれぞれコントロール、対照区と、これは助剤を使わないと溶けないので助剤コントロール、それから25、50、100ppbで試験をした結果です。縦軸が1匹の雌当たりの産仔数で、黒っぽいのが雄、グレーっぽいのが雌の子どもになります。見ていただいたらわかりますが、25ppbから雄の発生がみられるということで、これによって比較的簡単に検出することができる。ただ、TG211という試験を使うと0.09ppbですから、それに比べると感度としてはそれほどよくはないのですが、比較的簡単にできるという特徴があります。



# 幼若ホルモン様物質

## • Diofenolan:

- 昆虫成長阻害剤
- 幼若ホルモン受容体に結合
- 幼若ホルモン応答遺伝子の発現上昇

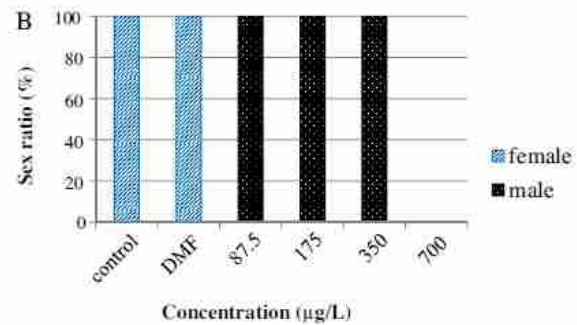
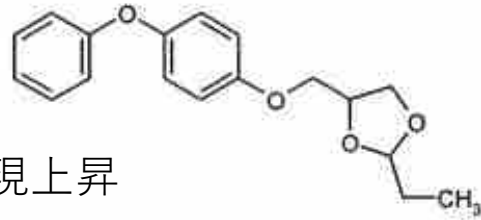


Fig. 2. Results of diofenolan with the STS assay. Mean number ( $\pm$ S.E.) of offspring in the second brood exposed to diofenolan ( $n=10$ ) (A) and sex ratio (B). Nominal test concentrations. \*\*\* Significant at  $p < 0.01$  vs solvent control.

Abe et al., 2015a Aquatic toxicology

ジオフェノランという物質についても同じようなことをやった試験結果について既に我々の方で論文発表しているので、それについても少し御紹介したいと思います。これについても低濃度区から雄がほぼ100%発生するという事なので、こういった物質についても利用できるということです。



## 急性毒性試験による感受性比較

ストレイン（系統）の違いによる  
Diofenolan EC50( $\mu\text{g/L}$ )の比較

系統	EC50	95% 信頼区間
NIES(国環研)	690	
UK(Astra)	290	140-710
Finland	710	580-840
Clone 5	430	330-530
Belgium	310	240-370

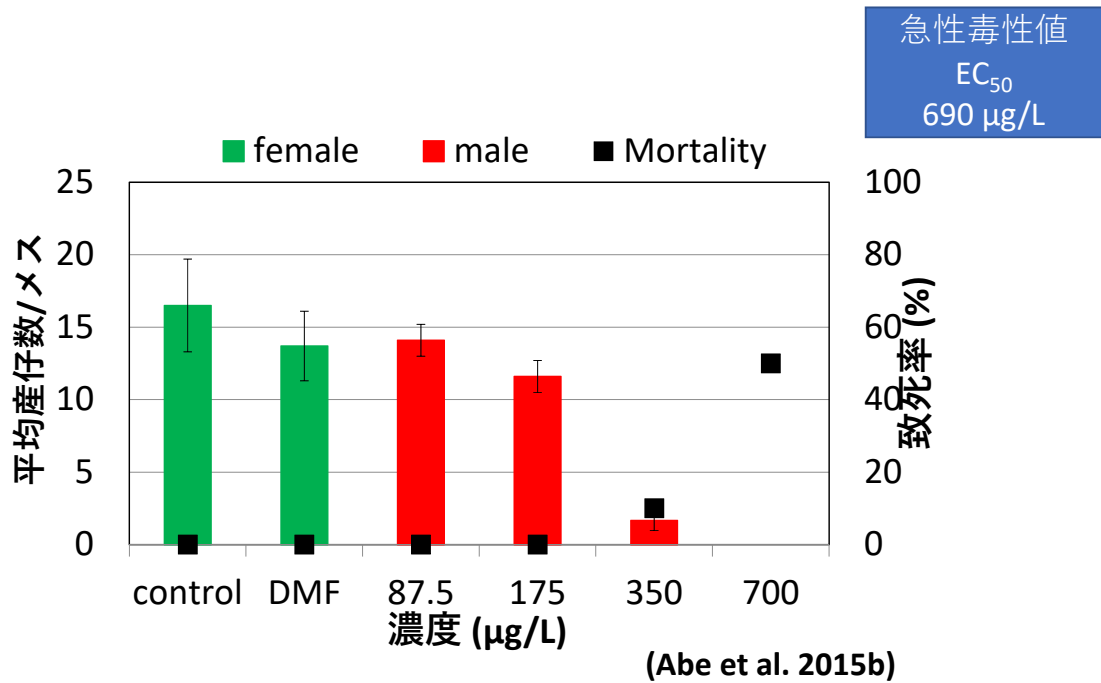
※NIES: Abe et al., 2015b

これについて特に各系統の比較をやりました。これは実はオオミジンコというミジンコを使いますが、バックグラウンドでもある程度系統の違いによって雄が発生する。我々のNIES(国環研)の系統、もともとEPAから来た系統なんですけど、これについては、バックグラウンドでほとんど雄が出ないのですが、UKやClone 5という、ヨーロッパの系統については、バックグラウンドで雄が出るという特徴があるという話だったので、そのあたりについて少し検討しようということでやった結果について御紹介したいと思います。

そもそも死ぬ、死なないというのをミジンコで調べると心臓の脈動をみないといけないので大変なので、遊泳阻害、泳げなくなるか、ならないかということを目指して、50%が遊泳阻害を起こすEC<sub>50</sub>という値を求めてやって、若干差があるということがわかってきました。

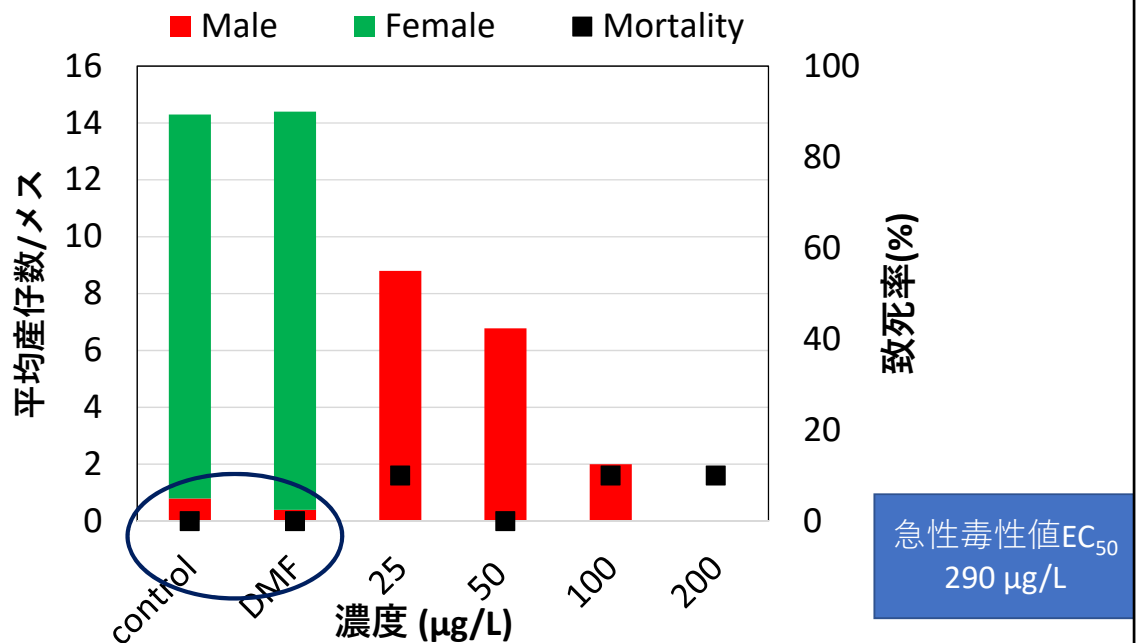


# NIES系統の結果



それから先ほどの試験に供するとどうということになるかということですが、JHASA、スクリーニング試験に供すると、先ほどの結果と同じですが、低濃度から雄が出てくることが我々の系統で明らかになりました。

# UK(アストラゼネカ)系統の結果



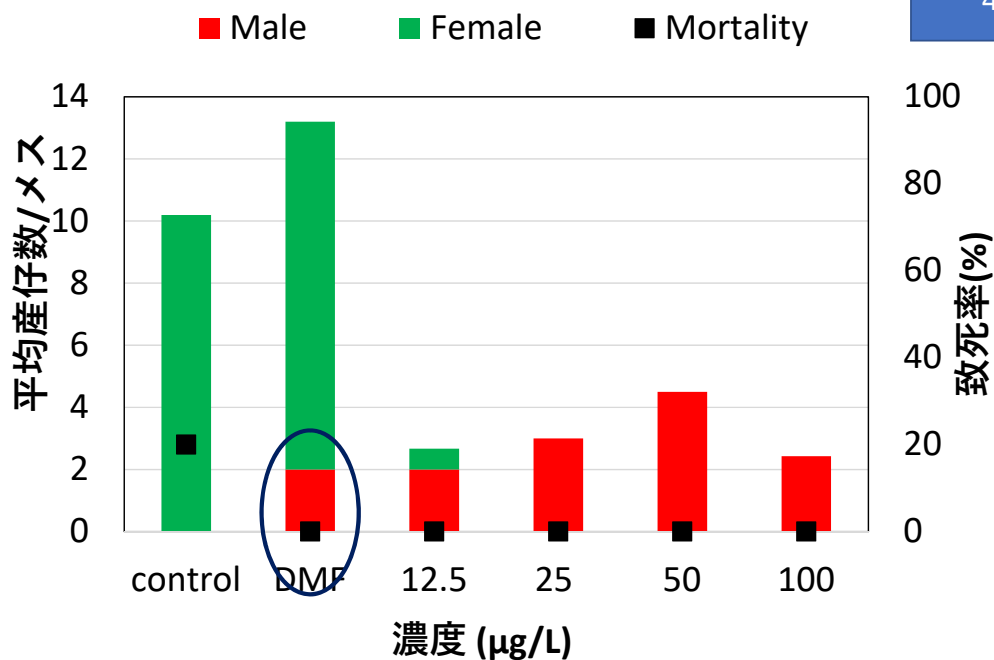
Controlおよび助剤controlでオスが発生  
NIESよりも繁殖試験結果は感受性高い

他の系統では、コントロールで先ほど我々の系統ではほとんどが雌なんですが、UKのストレインを使うと若干雄がバックグラウンドに出ることがわかってきたので、このストレインについて十分注意しないといけないかなと。



# Clone 5系統の結果

急性毒性値EC<sub>50</sub>  
430 µg/L



助剤controlでオスが発生.

NIESよりも繁殖試験・急性毒性試験結果は感受性高い

同じようなことがClone 5という系統についても認められたので、当然、遊泳阻害、急性的な影響を起こす、起こさないという点での感受性も違いますし、こういった雄の出方ということも若干系統によって変わってくるということが分かってきましたので、そのあたりに注意しながら幼若ホルモン作用のスクリーニング試験の開発をしていかなければならないということが分かってきました。

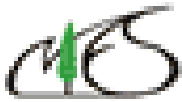


## JHASA試験まとめ

- オオミジンコを用いた幼若ホルモン作用のスクリーニング試験法が開発・OECDに提案中
- 系統によって急性毒性や繁殖などの感度が異なるほか、controlにオスが発生.
- より詳細な検討をおこなうために国際リングテストが必要

43

系統によって違うということなので、そこらあたりも注意しながら、今後、国内、国外でのリングテストをしながら何とかOECDの方で承認を得ることができればと考えております。



## 全体まとめと今後の課題

- メダカ多世代試験(延長一世代試験:MEOGRT, OECD TG240)が完成し、試験実施が進む
- 幼若メダカ抗アンドロゲンスクリーニング試験(JMASA)とミジンコ幼若ホルモンスクリーニング試験が提案中で、検証を実施中
- 魚類を用いた甲状腺ホルモン検出試験（欧州から提案中）、胚を用いた試験、甲殻類の脱皮ホルモン検出試験法の開発が課題として残る
- 内分泌かく乱化学物質は繁殖や成長、性別などに比較的低濃度で影響を及ぼす可能性があり、化学物質の生態系へのインパクトの評価には試験系整備と適切な評価・管理は重要

44

それでは最後の結果をまとめさせていただきますと、一番最初に御紹介しましたメダカの多世代試験、これは正確には延長一世代試験:MEOGRTという試験ですが、これについて試験の実施を現在進めています。試験法自体が承認されましたので、ノニルフェノール以降、被験物質について現在試験を行っているところです。

それから、幼若メダカを使った抗アンドロゲンのスクリーニング試験とミジンコの幼若ホルモンのスクリーニング試験についても現在OECDに提案中で、我々は検証を実施しているところです。

今後、これは井口先生から御紹介ありましたが、甲状腺ホルモンの検出系について、欧州から、現在カエルを使った方法が一般的なんです、魚を使った方法についてできないか、あるいは胚を使った内分泌かく乱化学物質の試験、これは欧州の方で特に動物愛護の観点から胚を使うということが最近増えていますが、こういった観点からそういった試験。それから甲殻類、ミジンコを使ったものとしては、脱皮ホルモンというのが昆虫や節足動物等、甲殻類等には特徴的なホルモンとしてありますので、こういったものの検出試験法を開発するというのがまだ課題として残っています。

また、内分泌かく乱化学物質については、繁殖、成長、性別などに比較的低濃度で影響を及ぼす可能性がありますので、化学物質の生態系へのインパクトを評価するには試験法の整備と適切な評価・管理を今後も続けていかないとはいけなかなと思います。現在のところでは通常の死ぬ、死なない、次世代を残す、残さないというところのエンドポイントはしっかりみられているのですが、内分泌かく乱というところが十分試験として調べられてないところもありますので、そういったものを環境省のプロジェクトの中でやられていかれるということで、我々としても今後協力を続けていきたいと考えております。

以上で発表を終わります。御清聴ありがとうございました。