

## ExTEND2005 作用・影響評価に関する取組の成果概要

「化学物質の内分泌かく乱作用に関する環境省の今後の対応方針について-ExTEND2005-」においては、「現時点で考え得る知見を利用して生態系への影響やヒト健康への影響を推定するための種々の試験評価手法を確立する必要がある。」(p14)、「環境省では、OECD 等で進められている試験法確立に今後も積極的に協力し、国際的な貢献を行っていくこととする。」(p14)と示されている。

また、「試験対象とすべき物質は新たな科学的知見の集積により絶えず更新し続ける必要があること、取り組むべき物質の範疇自体も変容する可能性があること、一方で、ある時点で対象とすべき物質をリストアップすることにより、あたかも内分泌かく乱作用が認められた物質であるかのような誤解を与える懸念があるとの指摘もあることから、今後は、一時点でのリストアップは行わず、試験対象として取り上げる物質を選定するための考え方、評価の流れを明確にしておくことが望ましい。」(p24)と示されている。これらを踏まえ、平成17年度より「作用・影響評価に関する取組み」を実施している。

化学物質の内分泌かく乱作用に関する試験法開発、化学物質の内分泌かく乱作用に関する国際協力関連事業及び化学物質の内分泌かく乱作用に関する試験対象物質選定と評価の成果概要を以下にまとめた。

### 1. 化学物質の内分泌かく乱作用に関する試験法開発の成果概要

平成17年度より魚類、両生類及び無脊椎動物を対象とした試験法の開発を行ってきた。後述する「国際協力関連事業」において開発された試験法を含めたExTEND2005において開発した試験法を別添1にまとめた。

#### (1) 魚類

以下の2種類の動物試験法及び試験管内試験法の開発を行った。

- 魚類 21日間スクリーニング試験：SPEED'98において36物質について実施したビテロジェニンアッセイをモデルとした試験法で、わが国がテストガイドライン化のリード国である。ビテロジェニン濃度及び二次性徴を指標として化学物質のエストロジェン様作用、アンドロジェン様作用及びアロマトーゼ阻害作用の影響をスクリーニングする試験法で、OECDにおいてテストガイドライン TG230として平成21年3月に採択された。
- 魚類性発達試験：SPEED'98において36物質について実施したパーシャルライフサイクル試験をモデルとした試験法で、デンマークがテストガイドライン化のリード国である。ビテロジェニン濃度、生殖腺組織及び二次性徴と性比を指標とするスクリーニング試験法で、OECDにおいてテストガイドライン化に向けての検証試験を実施中である。

○試験管内試験：魚類の試験管内試験について内分泌かく乱作用のスクリーニング試験法として OECD に提案中である。

## (2) 両生類

以下の2種類の動物試験法の開発を行った。

○アフリカツメガエル変態アッセイ：甲状腺ホルモンによって制御されているカエルの“変態”に着目し、尾の退縮や肢の形成等に代表される、形態変化をエンドポイントとして、甲状腺ホルモンかく乱作用を評価する試験法で、OECDにおいてテストガイドライン TG231 として平成21年3月に採択された。

○両生類パーシャルライフサイクル試験：両生類の発生・成長・繁殖への影響について調べることを目的とした試験法で、OECDに提案中である。

## (3) 無脊椎動物

以下の動物試験法の開発を行った。

○オオミジンコ繁殖毒性試験：従来ミジンコでの繁殖毒性試験として使用されてきたテストガイドライン 211 に、オスの出現(仔虫の性比の変化)、脱皮回数の変化という新たなエンドポイントを追加することで幼若ホルモンかく乱作用を検出する試験法で、OECDにおいてテストガイドライン TG211 ANNEX7 として平成20年10月に採択された。

## 2. 化学物質の内分泌かく乱作用に関する国際協力関連事業の成果概要

### (1) 化学物質の内分泌かく乱作用に関する日英共同研究

平成11年3月に開催されたG8環境大臣会合において、内分泌かく乱化学物質について日英両国間で共同研究を実施することが合意され、5カ年の日英共同研究事業が開始された。また、5年目となる平成16年度(2004年)に、日英両国間の協議により、さらに5年間の延長が決定された(第2期)。第2期(2004~2009年)の日英共同研究では、4つのテーマを設定し、日英両国の研究者によって、それぞれ研究を推進している。研究成果の概要を以下に示した。

#### ①排水由来エストロゲン様作用の評価に関する研究

エストロゲン作用が高い河川でのエストロゲンの環境中運命を予測する方法及びエストロゲン作用の削減効果の評価方法を開発することを目的とした。

遊離体及び抱合体エストロゲンの分析法の開発を行い、エストロゲン及びその抱合体に対し、これまで開発されたLC/MS/MSによる分析方法を改善し、遊離体及び抱合体エストロゲンについて高い回収率を得る有効な方法を開発した。

下水処理でのエストロゲン(E1及びE2)の挙動に関し、実態調査(窒素除去プロセスにおける挙動調査、小規模処理場対応の処理プロセスにおける挙動調査、追加的処理プロセスにおける挙動調査)を実施した。下水処理での挙動について、我国における下水のエストロゲン様活性はE1の寄与が大きいことが確認でき、好気条件の維持が水中からエストロゲン除去に大きく影響すること、二次処理した後に接触酸化法で高度処理を行うと、エストロゲン濃度が減少することが明らかとなった。

エストロゲンの環境中運命を予測する方法として、淀川水系における河川のエストロゲン類濃度のモデル化を行い、実測データと比較した結果、モデルの予測値と適合性が見られた。

#### ②イトヨを用いたアンドロゲン様作用の評価手法の研究

OECD に向けた化学物質のアンドロゲン作用を評価するための試験法開発に貢献するため、イトヨ雌を用いたアンドロゲン様物質の影響評価手法の確立を目的とした。

スピギン及びアンドロゲン受容体(AR)mRNA の定量 RT-PCR 測定系を構築し、高感度測定を可能とした。また、イトヨのばく露に際しては、水温は 15°C が好適であり、またスピギン mRNA をエンドポイントとした場合、1 週間程度のばく露で影響を評価できることを示唆した。さらに、飼育環境下でのイトヨの育成にも取り組み、人工授精及び稚仔魚の育成に成功した。

イトヨアンドロゲン受容体  $\alpha$  及び  $\beta$  の腎臓並びに精巣での発現解析を遺伝子及びタンパク質の両面から行い(精巣、成熟雄腎臓及びアンドロゲン処理雌腎臓での発現パターンを明らかにする)、その機能性を評価した。また、イトヨアンドロゲン受容体のレポータージーンアッセイを確立した。

#### ③魚類精巣卵の誘導機構に関する研究及び魚類エストロゲン受容体の種特異性の調査

OECD に向けた国際貢献に資するため、ステロイドホルモン及び化学物質による転写活性を指標としたホルモン受容体の種差を評価すること及びメダカで見られるエストロゲン誘導性精巣卵を遺伝子発現の観点から解析し、ローチ精巣卵解析の足がかりとすることを目的とした。

ローチ、メダカ、ファットヘッドミノー、ゼブラフィッシュ、イトヨ、コイ等のエストロゲン受容体アルファとベータを培養細胞で発現させ、レポータージーンアッセイ系を確立した。これにより、エストロゲン作用を発揮すると推測される化学物質(ビスフェノール A (BPA)、ノニルフェノール (NP)、オクチルフェノール (OP)) の転写活性の強さを調べた。

メダカで見られるエストロゲン誘導性精巣卵を遺伝子発現の観点から解析し、ローチ精巣卵解析の足がかりが得られた。遺伝子発現解析により、精巣卵誘起時に発現する遺伝子群を見出し、ZPA、ZPB、ZPC1、ZPC2、ZPC3 及び ZPC5 については、精巣卵誘起のためのバイオマーカーとして活用できる可能性を示した。

#### ④両生類の生態影響評価手法の研究

OECD において必要性が議論されている両生類のための生殖影響試験について、陽性対象物質(エチニルエストラジオール: EE2) に対する影響を整理・評価し、試験法の必要性について検討すると共に、その運用を検討することを目的とした。

ニシツメガエル(*Xenopus (Silurana) tropicalis*) に陽性対象物質(EE2) をばく露し、定期的に全長、後肢長、発生段階、生殖腺、甲状腺について、形態学的な測定、観察、記録を行い、これらのデータを OECD 等で広く活用できるよう、標準データベースを作成した。さらに、各種ホルモンレセプター・ビテロジェニンの発現等について測定、

観察、記録を行い、遺伝子発現に関する標準データベースを作成した。

ニシツメガエルを使い、各種ホルモン受容体遺伝子(エストロゲン受容体 $\alpha$ 及び $\beta$ 並びに甲状腺ホルモン受容体 $\alpha$ 及び $\beta$ )の単離、発生過程におけるホルモン受容体遺伝子の発現解析、エストロゲン応答遺伝子の探索及びエストロゲン受容体を用いたレポーター遺伝子アッセイ系の構築を行った。

ニシツメガエルの全雄集団を得るための性転換個体の作製を行った。

#### ○今年度の実務者会議

平成20年10月に英国で開催された第10回日英共同ワークショップにおいて、日英共同研究を2010年から引き続き5年間、延長することが合意されている。平成21年11月の第11回ワークショップにおいて、今後の研究テーマについて行政官及び研究者により議論し、日英共同研究の延長に関する調印を行った。

第11回ワークショップの成果について別添2に記載した。

## (2)化学物質の内分泌かく乱作用に関する日米二国間協力

平成16年1月に開催された第12回日米合同企画調整委員会において、化学物質の内分泌かく乱作用問題に関して日米二国間の協力を進めることが合意され、この合意に基づき、化学物質の内分泌かく乱作用に関する日米実務者会議が開催されることとなった。

第1回(東京：平成16年9月)及び第2回(ハワイ：平成17年6月)実務者会議は、化学物質の内分泌かく乱作用による生態影響評価に関する情報交換を行うことを目的として開催された。

平成18年11月に釧路市で開催した第3回実務者会議以降は、生態影響評価に関する情報交換に加え、魚類等を用いた繁殖影響を評価する試験法の開発を共同で実施することなど、内分泌かく乱作用に関する試験法開発の共通課題を明らかにし、技術的な協力を日米で進めることを目的として日米二国間協力事業を行っている。化学物質の内分泌かく乱作用に関する試験法をOECDにおける確定試験として承認されるためには各国共同で試験法の方法論や客観性、再現性を評価する必要がある。このことから、日米二国間協力で実施する共同研究は、魚類、両生類及び無脊椎動物の生殖・繁殖への影響を評価する方法論を検討し、試験法を開発することを目的として進められている。

#### ○魚類の試験

OECDにおいて確定試験と位置づけているフルライフサイクル試験(SPEED'98)において6物質について実施した試験)と二世世代試験(米国が提案した試験)の実施を日米共同で行い、これら試験プロトコルの検証と標準化を進めているところである。平成21年4月には日米共同でMedaka Life Cycle (MLC)/Multi-generation Test (MMT)のテストガイドライン化を新たなプロジェクトとして実施するようOECDに提案し、了承されている。これまでに、強エストロジェン、弱エストロジェン及びアンドロジェン様物質の試験を実施し、多世代試験プロトコルの標準化を進めている。

#### ○両生類の試験

ニシツメガエルを用いたエストロジェン様物質の生殖への影響を評価する両生類パーシャルライフサイクル試験を日米で開発してきている。これまでにニシツメガエルでは、変態完了(ステージ 66)までのばく露により、生殖腺の変化や雄にビテロジェニンが誘導されることが見出されており、これらをエンドポイントとするライフサイクル試験のプロトコルの標準化を日米共同で進めている。これまでに、ビテロジェニン測定に用いる ELISA 抗体などの標準化及び変態完了直後(ステージ 66)の生殖腺組織標本による雌雄判別に関するガイダンスドキュメントを作成することを進めている。

#### ○無脊椎動物の試験

日本はオオミジンコを用いた多世代繁殖試験の検討を行ってきており、米国が実施しているケンミジンコ及びアミを用いた多世代繁殖試験結果とミジンコ多世代繁殖試験との比較を進めている。また、これまでミジンコ及びオオミジンコを用いた多世代試験プロトコルの適正化を進めて来ている。

#### ○今年度の実務者会議

平成 22 年 1 月に米国 (ワシントン D. C.) において第 6 回日米二国間協力実務者会議が開催され、行政官、研究者により、今年度の研究成果及び行政における取組の概要が発表され、今後の研究テーマ等について話し合われた。

なお、会議の場において説明された米国環境保護庁(USEPA)による内分泌かく乱化学物質に関する取組の概要を別添 3 に示した。

### 3. 化学物質の内分泌かく乱作用に関する試験対象物質選定と評価の成果概要

平成17年度には、国内で検出され、動物試験の信頼性が認められた結果が得られた 4 物質を試験対象物質として選定した。

平成19年度からは、化学物質環境実態調査において検出された物質について内分泌かく乱作用に関連した報告の文献検索を行い、得られた報告についてその内容の信頼性評価を「化学物質の内分泌かく乱作用に関連する報告の信頼性評価作業班」において実施し、「内分泌かく乱作用に関する試験対象物質となり得る物質」を選抜した。

これまでの試験対象物質選定と評価の成果を以下に年度毎にまとめた。

#### (1)平成17年度

○ SPEED' 98において平成16年度までに実施した 9 物質(*o, p'*-DDT、アルドリン、エンドリン、ディルドリン、ヘプタクロル、マイレックス、ケルセン、ペルメトリン、マラチオンのメダカを用いた試験及びアルドリン、エンドリン、ディルドリン、ヘプタクロル、マイレックス、ケルセン、ペルメトリン、マラチオンのげっ歯類を用いた試験)の試験結果の検討を行った。その結果として、*o, p'*-DDTについて、魚類に対して内分泌かく乱作用を有することが推察された。

○ 試験対象物質として、国内で検出され、動物試験の信頼性が認められた結果が得

られた4-*t*-ブチルフェノール、ノニルフェノールジエトキシレート(NP2EO)、ノニルフェノールモノエトキシレート(NP1EO)及びノニルフェノキシ酢酸(NP1EC)を選定した。

①環境省が実施した試験において、環境中の濃度を考慮した濃度で4-ノニルフェノール(分枝型)と4-*t*-オクチルフェノールがメダカに対し内分泌かく乱作用を有することが推察されたこと、②ノニルフェノールと4-オクチルフェノール以外の国内における使用実態が認められ、環境中で検出されたアルキルフェノール類について内分泌かく乱作用を有するか否かを確認する必要があること、③ノニルフェノールとオクチルフェノールは、それらの前駆物質類が界面活性剤等として使用されており、環境中で検出された前駆物質類について内分泌かく乱作用を有するか否かを確認する必要があること、により試験対象物質の候補とした。

## (2)平成18年度

○ SPEED' 98において平成16年度までに実施した2物質(*p*, *p'*-DDEのメダカを用いた試験及びケルセンのげっ歯類を用いた試験において認められた甲状腺重量の高値)の試験結果の検討を行った。

○ 試験対象物質として前年度に選定した4-*t*-ブチルフェノール、NP2EO、NP1EO及びNP1ECについて、メダカエストロジェン受容体(ER $\alpha$ 及びER $\beta$ )結合競合阻害試験、メダカエストロジェン受容体(ER $\alpha$ 及びER $\beta$ )レポータージーン試験、メダカアンドロジェン受容体(AR)レポータージーン試験及びメダカ甲状腺ホルモン受容体結合試験(TR)を行ったところ、いずれの物質についても、メダカエストロジェン受容体(ER $\alpha$ )レポータージーン試験では、ER $\alpha$ に対する活性は認められたが、EC<sub>50</sub>値は得られず、メダカエストロジェン受容体(ER $\beta$ )レポータージーン試験、メダカアンドロジェン受容体レポータージーン試験及びメダカ甲状腺ホルモン受容体結合試験においては、有意な反応は認められなかった。

4-*t*-ブチルフェノールについては、一般環境中における検出状況に関する情報が得られているが、試験を実施する際の試験濃度の設定に必要な影響の認められた信頼性のある情報が得られておらず、現時点では、影響に関する情報の収集に努めることとした。

NP1EO、NP2EO及びNP1ECについては、影響の認められた信頼性のある情報が得られているが、一般環境中における検出状況に関する情報が不足しており、今後、環境実態調査の調査対象物質として、一般環境中における検出状況に関する情報情報の収集に努めることとした。

○ 哺乳類試験体系については、ExTEND2005において「今後は、各種の毒性評価の手法も参考とし、ヒトが暴露する可能性がある用量から何らかの有害影響が既に報告されている用量までを包含することによって、限られた群設定のなかでも有害性評価に資する知見が得られるような用量設定を原則とすべきである。」(p26)とされている。無影響量：NOELが算定できるようなばく露用量群の設定を行った動物試験

を行うために、4-*t*-ブチルフェノールについて、ラットを用いた改良1世代試験を実施した。

その結果として、児動物の体重の低値を指標とした4-*t*-ブチルフェノールの最小影響量:LOELは78 mg/kg/day、無影響量:NOELは23 mg/kg/dayと考えられた。今回得られた無影響量はこれまで報告されている無影響量を下回るものであった。今回採用した用量設定において、ヒトがばく露する可能性がある用量における変化の有無だけでなく、無影響量が算定できる動物試験が実施可能であることが確認された。

### (3)平成19年度

- 平成17年度に化学物質環境実態調査を実施した物質(群)のうち、①平成17年度化学物質環境実態調査の対象物質選定時に実施した文献調査において化学物質の内分泌かく乱作用に関する影響有りとする報告が得られた物質(群)及び②環境省において化学物質の内分泌かく乱作用に関する魚類及びほ乳類による動物試験を実施していない物質(群)に該当する物質は22物質(群)のうち、平成8～17年度に実施した化学物質環境実態調査等において、複数地点あるいは単地点から検出された15物質に影響有りとする情報に関する信頼性評価を行う物質とした。

### (4)平成20年度

- 化学物質の内分泌かく乱作用に関連する報告について客観性が担保できる専門家による信頼性評価を実施するため「化学物質の内分泌かく乱作用に関連する報告の信頼性評価作業班」を設置した。
- 平成19年度に化学物質の内分泌かく乱作用に関連する報告の信頼性評価を行うとして選定した15物質について「化学物質の内分泌かく乱作用に関連する報告の信頼性評価作業班」において文献検索及び信頼性評価のための作業を実施した。  
信頼性評価が終了した10物質のうち、7物質について内分泌かく乱作用に関する試験対象物質となり得る物質とし、3物質について現時点では試験対象物質としない物質とした。

### (5)平成21年度

- 平成20年度、化学物質の内分泌かく乱作用に関連する報告の信頼性評価が終了していない5物質のうち、2物質については平成21年度も文献検索を行い、新たに得られた報告も加えた信頼性評価を実施することとし、3物質については、使用実態が認められない物質であるため、信頼性評価を実施しないこととした。
- 平成18年度に化学物質環境実態調査が実施されたのべ112物質(群)のうち、平成8～18年度に実施した化学物質環境実態調査において検出された47物質群から、現時点で使用実態が認められない物質、対象物質が特定できない物質及びExTEND2005において平成20年度までに信頼性評価の対象とした物質を除いた35

物質を、化学物質の内分泌かく乱作用に関連する報告の文献検索を行う物質とした。検索を行った 35 物質から、検索により選抜された報告のうち、化学物質の内分泌かく乱作用に関連しない報告を除き 1 件以上の報告が残った 26 物質のうち、報告数が 10 件を超えた 15 物質を平成 21 年度において優先的に信頼性評価を行う物質とした。

○ 平成 19 年度からこれまでに選定した 30 物質についての信頼性評価の結果及び実施状況を以下にまとめた。

- ・得られた報告の信頼性評価の結果として「内分泌かく乱作用に関する試験対象物質となり得る物質」とした 7 物質  
エストロン、*p*-ジクロロベンゼン、*N,N*-ジメチルホルムアミド、2,4,6-トリブロモフェノール、2,4-トルエンジアミン、ヒドラジン及びフェンチオン
- ・得られた報告の信頼性評価の結果として「現時点では試験対象物質としない物質」とした 3 物質  
 $\sigma$ -ジクロロベンゼン、直鎖アルキルベンゼンスルホン酸及びその塩及びトリフルラリン
- ・使用実態が認められない物質であるため、得られた報告の信頼性評価を実施しないこととした 3 物質  
トキサフェン、ビクロゾリン及びメトキシクロル
- ・得られた報告の信頼性評価を実施中の 17 物質  
カルバリル(NAC)、ペルフルオロオクタン酸、アジピン酸、カルボフラン、シアナジン、ジウロン、ジクロルボス、ジクロロブロモメタン、ダイアジノン、フェナントレン、フェニトイン、フェニトロチオン、フェノバルビタール、1-ブタノール、ベンジルアルコール、メタクリル酸メチル及び EPN

○ 内分泌かく乱作用に関する試験対象物質となり得るとした物質については、「生態影響評価のための動物試験法検討作業班」において、試験全体のフレームワーク及び個別の物質について実施する試験法の選定について検討することとした。



## ExTEND2005における試験法開発(1)

<p><b>物質選定(Level 1)</b> 既存情報に基づく分類及び優先順位付け</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•物理化学的性質 分子量、揮発性等</li> <li>•人及び環境曝露 環境中濃度、生産量、用途</li> <li>•ハザード 内分泌かく乱作用に関連する報告(信頼性評価)、規制状況</li> </ul>
<p><b>メカニズム確認(Level 2)</b> メカニズムデータを提供する <i>in vitro</i> 試験</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•ヒトエストロジェン受容体結合競合阻害試験、ヒト乳がん細胞E-screen試験、ヒト乳がん細胞アンドロジェン受容体レポーター遺伝子試験、ラットアンドロジェン受容体結合阻害試験、ヒト甲状腺ホルモン受容体酵母試験(SPEED'98において実施)</li> <li>•メダカエストロジェン受容体結合試験、メダカエストロジェン受容体転写活性化試験、メダカアンドロジェン受容体転写活性化試験(SPEED'98において実施し、<b>OECDに提案中</b>)</li> <li>•イトヨアンドロジェン受容体レポーター遺伝子試験(日英共同研究で開発し、<b>OECDに提案中</b>)</li> <li>•メダカ、コイ、ローチ、ファットヘッドミノー、ゼブラフィッシュ、イトヨエストロジェン受容体レポーター遺伝子試験(日英共同研究で開発し、<b>OECDに提案中</b>)</li> <li>•アフリカツメガエルエストロジェン受容体結合試験(SPEED'98において検討)</li> <li>•ニシツメガエルエストロジェン受容体レポーター遺伝子試験(日英共同研究で開発中)</li> <li>•ニホンウズラエストロジェン受容体結合試験、ニホンウズラアンドロジェン受容体結合試験(SPEED'98において検討)</li> </ul>
<p><b>スクリーニング(Level 3)</b> 単独のメカニズム及び影響に関するデータを提供する <i>in vivo</i> 試験</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•メダカピテロジェニンアッセイ(SPEED'98において実施)</li> <li>•イトヨスピギンアッセイ(日英共同研究で開発中)</li> <li>•アフリカツメガエルピテロジェニンアッセイ(SPEED'98において検討)</li> <li>•アフリカツメガエル変態アッセイ(TG231として採択された)</li> <li>•ニシツメガエル変態アッセイ、ツチガエル変態アッセイ(SPEED'98において検討)</li> <li>•ニホンウズラピテロジェニンアッセイ、ニホンウズラクロアカ試験(SPEED'98において検討)</li> </ul>

OECDのフレームワークを利用した。

## ExtTEND2005における試験法開発(2)

<p><b>スクリーニング(Level 4)</b> 複数のメカニズム及び影響に関するデータを提供する <i>in vivo</i> 試験</p>		<ul style="list-style-type: none"><li>•メダカパーシャルライフサイクル試験(SPEED'98において実施)</li><li>•FLF・d-rRメダカ試験(SPEED'98において検討)</li><li>•<u>魚類21日間スクリーニング試験 (TG230として採択された)</u></li><li>•<u>魚類性発達試験(テストガイドライン化に向けて検証試験を実施中)</u></li><li>•アフリカツメガエル性転換試験(SPEED'98において検討)</li><li>•<u>両生類パーシャルライフサイクル試験(日米二国間協力において開発中。OECDに提案中)</u></li><li>•ニホンウズラ性転換試験(SPEED'98において検討)</li><li>•オオミジンコ繁殖毒性試験(TG211 ANNEX7として採択された)</li></ul>
<p><b>確定試験(Level 5)</b> 内分泌及びその他のメカニズムによる悪影響に関するデータを提供する <i>in vivo</i> 試験</p>	<p>•げっ歯類を用いた1世代試験(SPEED'98において実施)</p>	<ul style="list-style-type: none"><li>•<u>メダカフルライフサイクル試験(SPEED'98において実施、日米二国間協力において、2世代試験との比較を実施中)</u></li><li>•ニホンウズラ1世代繁殖毒性試験(SPEED'98において検討)</li><li>•<u>ミジンコ多世代試験(日米二国間協力において開発中。ケンミジンコ及びアミを用いた多世代繁殖試験との比較を実施中)</u></li></ul>

下線を付した項目がExtTEND2005での実施内容を示す。

(別添2)

## 第11回 化学物質の内分泌かく乱作用に関する 日英共同研究ワークショップの結果について

平成21年11月16日(月)  
環境省総合環境政策局  
環境保健部環境安全課  
直 通 03-5521-8261  
代 表 03-3581-3351  
課 長 早水 輝好(内6350)  
課長補佐 佐方 信夫(内6352)

第11回化学物質の内分泌かく乱作用に関する日英共同研究ワークショップを、11月13、14日に大阪府大阪市で開催しました(公開)。本ワークショップでは、両国の研究担当者によるこれまでの成果の発表、意見交換が行われたほか、今後の研究テーマについても議論がなされ、共同研究の今後5年間の継続に関する文書の調印式が行われました。

### 1 目的

平成11年3月に開催されたG8環境大臣会合において、化学物質の内分泌かく乱作用に関して英国と共同研究を実施することが合意され、5カ年の日英共同研究事業が開始されました。平成16年度には、5年間の延長(2005~2009年)が決定され、日英両国の研究者が共同で研究を推進してきました。

今年度のワークショップでは、両国の研究担当者によるこれまでの成果の発表、意見交換が行われたほか、昨年10月に英国で開催された第10回ワークショップにおいて日英共同研究を2010年より引き続き5年間延長することが合意されたことを受け、今後の研究テーマについての議論がなされ、日英共同研究の継続に関する文書の調印式が行われました。

2 日 時 平成21年11月13日(金)9:00~18:20  
14日(土)8:40~13:00

3 場 所 リーガロイヤルホテル大阪  
(大阪市北区中之島5-3-68)

4 出席者 日本:井口泰泉(研究統括者、自然科学研究機構)、田中宏明(京都大学)、早水輝好(環境省)、他(18名)  
英国:チャールズ タイラー(研究統括者、エクセター大学)、トム ハッチンソン(環境水産科学研究所)、イアン ダルトン(環境食料農村地域省)、マイク ロバーツ(同)、他(12名)

### 5 結果の概要

(1) 日英共同研究における研究プロジェクト(2005~2009年)について

両国の研究担当者より、5年間の第2期共同研究の成果についての発表がなされた。

概要は以下のとおり。

①排水由来エストロゲン様作用の評価に関する研究

下水処理水及び環境水中のエストロゲン様作用（女性ホルモン様作用）を持つと考えられる物質について、日英の現状及びその違い等に関する報告がなされた。

②イトヨを用いたアンドロゲン様作用の評価手法の研究

イトヨ（冷水性淡水魚）を用いた、アンドロゲン様作用（男性ホルモン様作用）の検出法、ホルモン剤の複合影響等に関する報告がなされた。

③魚類精巣卵の誘導機構に関する研究及び魚類エストロゲン受容体の種特異性の調査

メダカなど6種類の魚を用いて、女性ホルモン様物質をばく露した飼育試験及び試験管内試験を行い、その影響について、種差などを考慮した多角的な解析の結果が報告された。

④両生類の生態影響評価手法の研究

両生類（アフリカツメガエル・ニシツメガエル）を用いた、化学物質のエストロゲン様作用等の影響を調べるための遺伝子技術の開発、発達段階のデータベースの作成及び変態試験の検討、生態調査の方法の検討等の結果が報告された。

(2) 今後の日英共同研究における研究内容について

2010年以降の共同研究は、これまでの成果を踏まえ、横断的なテーマを設定して進めることとされ、以下のテーマが設定された。

①処理排水中及び環境中の主要な内分泌かく乱作用を有すると疑われる化学物質及び新たな化学物質の挙動を推定するための研究、並びにそれら化学物質の環境中への排出を低減するための研究

②内分泌かく乱化学物質が起こしうる環境リスクを評価するための野生生物への悪影響を推定する方法（試験法）の開発

③水生生物及びその他の生物の生殖及び成長への影響を把握するための化学物質試験法における様々なエンドポイントの評価（遺伝子レベルや分子生物学的なアプローチ）に関する研究

④英国及び日本における野生生物への環境リスク（個体群レベルでの影響等）の解析

(3) 次回ワークショップについて

次回ワークショップは平成22年英国にて開催されることが合意された。

6 日英共同研究の5年間の継続に関する調印

ワークショップでの検討結果を踏まえ、両国環境省代表者により5年間の継続に関する文書の調印を行った。調印内容は別添のとおり。（別添略）

※化学物質の内分泌かく乱作用に関する日英共同研究については、下記ホームページ（専門家向け 英語のみ）でも概要を御覧いただけます。

<http://www.uk-j.org>

## 米国環境保護庁(USEPA)の取組

### 1. 背景

内分泌かく乱化学物質スクリーニング及び試験法諮問委員会(EDSTAC)<sup>1)</sup>、パブリックコメント及び米国環境保護庁の科学諮問委員会と殺虫剤・殺菌剤・殺鼠剤法(FIFRA)科学諮問委員会の勧告を受け、1999年に設立された内分泌かく乱化学物質スクリーニング計画(EDSP)が取り組みの中核である<sup>2)</sup>。

<http://www.epa.gov/endo/pubs/edspoverview/background.htm> 参照。

1)内分泌かく乱化学物質スクリーニング及び試験法諮問委員会(EDSTAC)：1996年～1998年に活動した委員会。1998年に以下の提案をした。

- ①エストロジェン、アンドロジェン、甲状腺(ホルモン)を対象とする。
- ②ヒト影響及び生態影響を対象とする。
- ③膨大な種類・数の化学物質に優先順位を設定する。
- ④2段階的取り組みを行う。

- Tier1 スクリーニング：内分泌系との潜在的相互作用の検出を目的とした試験管内試験及び動物試験から構成されるスクリーニングで、試験結果により化学物質は陽性(positive)、陰性(negative)、判定不能(equivocal)のいずれかに分類される。
- Tier2 テスト：ハザード評価に向けたデータの提供を目的とした広範な生物種(げっ歯類、魚類、両生類、鳥類、甲殻類)を用いた多世代試験から構成される試験。

2)EDSPの活動の法的根拠

- ①1996年に食品品質保護法(Food Quality Protection Act)によって要請されている。
  - ヒト健康に有害な影響を及ぼすようなエストロジェン作用をもつ農薬をスクリーニングしなければならない。
  - 検証済の試験系あるいはその他の科学的関連情報を適切に用いなければならない。
  - エストロジェン作用以外の内分泌作用(例えばアンドロジェン影響、甲状腺影響、ヒト以外の生物種に対するエストロジェン影響)についても対象とするものとする。
  - 広い範囲でヒトがばく露するおそれがある化学物質も対象とする。
- ②1996年に飲料水安全法(Safe Drinking Water Act)によって要請されている。
  - 広い範囲でヒトがばく露するおそれがある飲料水中汚染化学物質のスクリーニングを行うものとする。

### 2. 内分泌かく乱化学物質スクリーニング計画(EDSP)の主な活動\*

(1) 試験法の開発と開発した試験法の妥当性検証

- ①Tier1 スクリーニング及び Tier2 テストから構成される複数の試験法の開発と試験法の妥当性検証を行っている。
- ②化学物質による生物の内分泌系への作用を確認するための Tier1 スクリーニングの妥当性検証は完了している。Tier1 スクリーニングは以下の試験法で構成されている。
- 試験管内試験
    - ・ラットエストロジェン受容体結合試験
    - ・ヒト HeLa 細胞エストロジェン受容体転写活性化試験
    - ・ラットアンドロジェン受容体結合試験
    - ・ヒトステロイド産生試験
    - ・ヒトアロマターゼ試験
  - 動物試験
    - ・ラット子宮肥大試験
    - ・ラットハーシュバーガー試験
    - ・ラット雌思春期試験(Pubertal female)
    - ・ラット雄思春期試験(Pubertal male)
    - ・両生類変態試験
    - ・魚類短期間繁殖試験
- ③化学物質に生物の有害影響を確認するための Tier2 テストの妥当性検証は実施中であり、2011 年末までに完了の予定である。

(2) Tier1 スクリーニング対象物質の選抜

- ①Tier1 スクリーニング対象物質の第 1 次リストとして農薬活性成分(PAIs)58 物質及び高生産量化学物質(HPVs)で農薬不活性成分 9 物質の合計 67 物質をヒトのばく露情報の有無を根拠として選抜した。
- ②Tier1 スクリーニング対象物質の第 2 次リストとして農薬及び飲料水において検出されている化学物質のうち少なくとも 100 物質を 2010 年 10 月末までに選抜する予定である。

(3) Tier1 スクリーニング実施に向けての準備

- ①Tier1 スクリーニングにおいて用いられる試験法に関する情報を 2009 年 10 月までに公表した。
- ②2009 年 10 月から 2010 年 2 月までに第 1 次リストの Tier1 スクリーニング対象物質の登録者、製造者及び輸入業者にスクリーニング実施の命令を行う。

(4) Tier1 スクリーニングの実施

- ①第1次リストの Tier1 スクリーニング対象物質の登録者、製造者及び輸入業者は全ての Tier1 スクリーニングを実施しなければならない。
- ②2012年までに第1次リストの Tier1 スクリーニング対象物質のスクリーニングは完了する。Tier1 スクリーニングの結果は公表される予定である。

(5) Tier1 スクリーニングの評価

- ①スクリーニング結果の解釈においては、専門家による判断、エンドポイントの選択及び複数のエンドポイントや試験において認められた影響などをもとに、証拠の重み付け(Weight-of-evidence)についてレビューする。
- ②2012年に第1次リストの Tier1 スクリーニング対象物質のスクリーニング結果の評価を行い、Tier2 テストを行うべき物質を選抜する。

\*<http://www.epa.gov/endo/pubs/assayvalidation/tier1battery.htm> 及び第6回日米二国間協力実務者会議において発表された資料を参照して作成した。