

環境省による野生生物を用いた試験のまとめ と今後の展望

The summary of the examination for EDCs
using wildlife by Ministry of the Environment
and the future prospects

鑓迫 典久(国立環境研究所)

Norihisa Tatarazako

(National Institute for Environmental Studies)

Summary

- 化審法で用いられている試験法には、生物群集の存続を調べる試験法は無い。

By the method of testing used in “Chemical Substances Control Law”, the continuation of the biology group is not examined.

- 内分泌かく乱化学物質は生物群の存続に影響を及ぼす。

The endocrine disruptor has bad influence on continuation of the biological community.

- 化審法では内分泌かく乱化学物質を検出・規制できない。

Endocrine disruptor cannot be detected/regulated in the Chemical Substances Control Law.

- 環境省の取組と今後の展望

The action of Ministry of the Environment and the future prospects.

内分泌かく乱化学物質の試験法構築が難しい理由！

The reason why it is difficult to build method of testing for the endocrine disruptor.

- 内分泌かく乱性は作用メカニズムによって定義されている。

The “EDCs” are defined by mode of action.

- ところがメカニズムの解明は難しい。
- Estradiolと同じ働きをする物質のスクリーニングが目的ではない。
- レセプターが直接関与しない場合もある。



- 生来のホルモンメカニズムが複雑なため、かく乱のされ方も複雑

Because the hormone of the creature is a complex, the way of appearing in disrupting is complicated.

- 生き物の性別、種差、成長過程によってホルモンの働きが違う
- 強弱、正反作用を調べる必要がある



- ホルモンのかく乱は、細胞内ではなく、組織や生物個体レベルでの反応

The disturbance appears at tissue or a bion level not intracellular level.

- *in vitro* test では作用機構の一側面(レセプター結合性など)しか検出できない

内分泌かく乱化学物質の試験法構築が難しい理由 II

The reason why it is difficult to build method of testing for the endocrine disruptor.

- 従来のin vivoバイオアッセイ(特に急性毒性試験)では評価できない。

EDCs cannot be evaluated by the conventional in vivo bioassay (an acute toxicity test in particular).

- 死なないことが前提。死んでしまっではかく乱されない……
- 次世代への影響を評価する試験系が存在しない。
(現行の試験法では、せいぜい受精卵から開始)



- たとえ、新たな試験法を開発しても、妥当性の検討が難しい。
Investigation of the propriety is difficult even if new method of testing was developed.

- エンドポイントが内分泌かく乱の結果を反映しているか
(何を観察すればよいのか(end point))
- 個体レベルはかく乱と並行して色々なことが起こる
(内分泌かく乱作用だけを抽出できるか。毒性と分離できない。)
- 試験結果の妥当性、普遍性の判断(誰、どうやって)

現行の試験法で欠けているエンドポイント (次世代に子孫を繋げる課程)

Insufficient points in the current method of testing
(Impact to the next-generation)

- 性別の不一致
- 求愛、性行動
- 性成熟度、成熟期の一致
- 卵成熟、精子数、放卵・放精
- 初期発生・分化

母体からの移行
母体中での暴露
卵発生時の異常
精子形成異常
受精異常
胚発生時の異常

繁殖(reproduction) = 産卵数 × 孵化率 × 幼生生残数

内分泌かく乱だけの影響とは限らないが、野生生物にとっては最も重要なファクター

生態毒性に関するOECD-TGプロジェクト

PJ No.	PJ名	リード国
2.1	EDs:カイアシ類繁殖・発生試験	SWE
2.3	鳥類回避試験	UK
2.4	鳥類2世代毒性試験	US
2.7	魚類胚毒性試験	GER
2.8	EDs:オオミジンコ改良繁殖試験	JPN
2.9	トビムシ類繁殖試験	DK
2.12	EDs:魚類ライフサイクル試験開発とバリデーション	US/GER JPN
2.13	EDs:アミ類毒性試験	US
2.14	EDs:魚類性成熟試験	DK
2.16	EDs:魚類(長期試験)ガイダンス文書	US
2.17	鳥類急性毒性試験	UK
2.18	EDs:魚類21日スクリーニング試験の開発とバリデーション	OECD JPN

PJ No.	PJ名	リード国
2.19	EDs:両生類試験の開発とバリデーション	US/GER JPN
2.20	ハエ類毒性試験の開発とバリデーション	EC
2.22	ダニ類繁殖試験	NL
2.23	魚類限度試験のためのステップダウン試験のガイダンス文書	EC
2.24	TG209:活性汚泥呼吸阻害試験の改定	UK
2.25	EDs:イカ類ライフサイクル試験	UK/GER
2.26	EDs:魚類(雌スティックルバック)21日EDクリーニング試験	UK
2.27	EDs:魚類短期繁殖試験	US
2.28	EDs:ユスリカライフサイクル試験	GER
2.29	甲虫類試験のガイダンス文書	EC
2.30	魚類試験のフレームワーク	US

EDs: 内分泌かく乱作用に関わる "The OECD Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disruptors as agreed at EDTA6" に基づく試験法開発

内分泌かく乱によってさまざまな現象が起こる。
それを調べる試験法はいろいろ考えられる。

しかし重要なことは

持続可能な生態系の維持

(Preservation of sustainable ecosystem)

野生生物の場合、世代交代が出来るかどうかが重要

個体レベルでの生死＝現行の規制
（瀕死でも長生きしたほうが良い？）



個体群レベルでの存続＝持続可能な生態系
（子孫を残し繁殖できるレベルへ）

内分泌かく乱化学物質が教えてくれたこと

魚類試験法開発

メダカフルライフサイクル試験

Medaka full life cycle test-FLCT

メダカ(*Oryzias Latipes*)のライフサイクルステージ



eggs : within several hours after fertilized

F0 .. 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 ..

Exposure beginning 初期段階

観察項目:ふ化率、ふ化日数

観察項目【ふ化後60日】死亡率、体長、体重、
性比、生殖腺組織観察

繁殖段階

【ふ化後70-100日】

6ペア/濃度区

測定項目

【ふ化後101日】

VTG濃度
生殖腺指数

F1 .. 1 2 3 4 5 6 7 8 9 .. **F1受精卵** 【96-98日採取】

Exposure beginning 初期段階 測定項目【ふ化後60日】

- ・肝臓中ビテロジェニン(VTG) by ELISA -性比(DMY)
- ・生殖腺組織観察、生殖腺指数(GSI)

※測定、観察項目は統計処理により対照区との有差を検定する



FLCT と二世代繁殖試験(two-generation test)

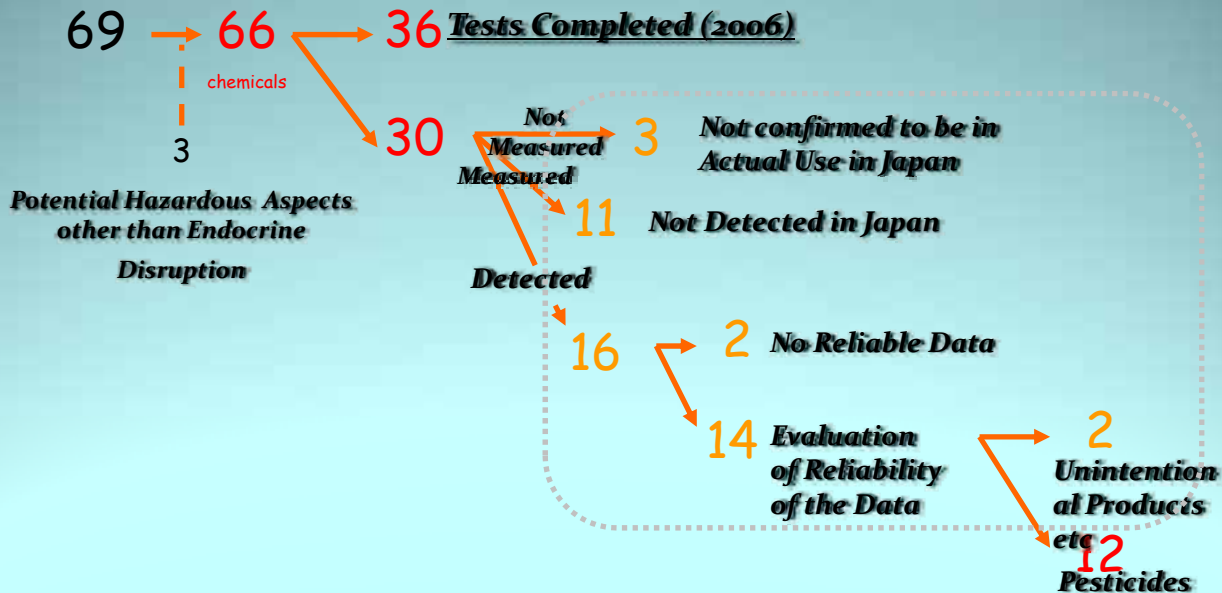


期間(週)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26
-------	---	---	---	---	---	---	---	---	---	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----

SPEED'98 < May 1998 ~ >

Strategic Programs on Environmental Endocrine Disruptors

Evaluation of 69 Chemicals in the list Under the Framework of SPEED'98



Evaluated chemicals In SPEED'98

Material	VTG	PLCT	FLCT	Results	Notes	
Tributyltin	CERI	CERI				before 2001
Octyl phenol	CERI	CERI	CERI	Testis-ova		2001
Nonyl phenol	CERI	CERI	CERI	Testis-ova		2002
Di-n-butyl phthalate	CERI	CERI	CERI	Testis-ova		2003
Octachlorostyrene	METO	CERI				2004
Benzophenone	METO	CERI				
Dicyclohexyl phthalate	METO	CERI				
Di-(2-ethylhexyl)phthalate	METO	CERI				
Triphenyltin	NIES	NIES				
Butyl benzyl phthalate	NIES	NIES				
Diethyl phthalate	NIES	NIES				
Diethylhexyl adipate	NIES	CERI				
Pentyl phenol	CERI	CERI	CERI			
Pentachlorophenol	NIES	NIES				
Amitrole	NIES	NIES				
Bisphenol A	METO	NIES	NIES	Testis-ova		
2,4-Dichlorophenol	NIES	NIES				
4-Nitrotoluene	METO	CERI				
Dipentyl phthalate	METO	CERI				
Diethyl phthalate	METO	CERI				
Dipropyl phthalate	METO	CERI				
Hexachlorobenzene (HCB)	CERI	CERI			POP _s	
Hexachlorocyclohexane	METO	CERI				
Chlordane	METO	CERI			POP _s	
trans-Nonachlor	METO	CERI				
o,p-DDT	CERI	CERI			POP _s	
p,p-DDT	NIES	NIES			POP _s	
p,p-DDE	NIES	NIES				
p,p-DDD	NIES	NIES				
Aldrin	NIES	NIES			POP _s	
Endrin	NIES	NIES			POP _s	
Dieldrin	NIES	NIES			POP _s	
Heptachlor	METO	CERI			POP _s	
Mirex	METO	CERI			POP _s	
Kelthane	CERI	CERI				
Malathion	METO	CERI				
Permethrin	CERI	CERI				
17β-Estradiol		NIES	CERI	Testis-ova		
17α-Ethinyl Estradiol	CERI	NIES&CERI	NIES	Testis-ova		
Metyl testosterone	CERI		CERI			
Fultamide	CERI		CERI			

メダカ試験の結果

ヘキサクロロベンゼン	所見・関連所見あり、 低頻度精巣癌	7α,8α-ジクロロベンジル	所見あり
ベンタクロロフェノール	影響なし	7α,8α-ジクロロ- <i>n</i> -7α,8α-ジクロロ (VTG, PLC, FLC)	関連所見あり 低頻度精巣癌
アミトロール	所見あり	7α,8α-ジクロロヘキシル	所見・関連所見あり 低頻度精巣癌
β-ヘキサクロロシクロヘキサン	所見・関連所見あり、 低頻度精巣癌	7α,8α-ジエチル	所見あり
p,p'-DDT	毒性所見	2,4-ジクロロフェノール	所見・関連所見あり
o,p'-DDT	VTG↑、精巣癌・・・FLCへ	アジピン酸ジ-2-エチルヘキシル	所見・関連所見あり
p,p'-DDD	試験せず	ベンゾフェノン	所見・関連所見あり 低頻度精巣癌
増化トリフチルスス	毒性所見	4-ニトロトルエン	所見・関連所見あり 低頻度精巣癌
増化トリフェニルスス	毒性所見	オクタクロロスチレン	影響なし
4-ノニルフェノール (分岐型) (VTG, PLC, FLC)	強いER結合、VTG↑、精巣癌、 変性率低下	7α,8α-ジベンジル	所見あり
4-tert-オクチルフェノール (VTG, PLC, FLC)	強いER結合、VTG↑、精巣癌、 変性率低下	7α,8α-ジヘキシル	所見あり
ビスフェノールA (VTG, PLC, FLC)	強いER結合、VTG↑、精巣癌、 変性の増加	7α,8α-ジプロピル	所見あり
7α,8α-ジ-2-エチルヘキシル	関連所見あり、低頻度精巣癌	http://www.env.go.jp/chemi/end/speed98/speed98-20.pdf	

VTG, ビテロジェニン産生試験; PLC, パーシャルライフサイクル試験; FLC, フルライフサイクル試験