

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

1. 経緯

平成 11 年 3 月の 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。平成 16 年度 (2004 年) には、日英両国間の協議により、さらに 5 年間の延長を決定し、第 2 期 (~2009 年) の日英共同研究として、4 つのテーマを設定して研究を推進した。また、平成 20 年 10 月の第 10 回日英共同ワークショップにおいて日英共同研究を延長することの合意を受けて、第 11 回ワークショップにおいて、2009 年から 5 カ年の継続についての合意文書への調印を行い、平成 22 年度から第 3 期の日英共同研究を実施しているところである。

2. これまでの成果の概要

(1) 第 1 期日英共同研究の成果概要

主に魚類や無脊椎動物に対する化学物質の内分泌かく乱作用の検出・評価手法の開発及び作用メカニズムの解明など 19 テーマ (毎年、ワークショップを開催して、日英の研究者による協議を行い 4~6 テーマを設定) について研究を実施した。また、日英両国間での研究者の相互派遣、現地での共同研究、情報・知見及び技術の交換なども行った。

(2) 第 2 期日英共同研究の成果概要

「排水由来エストロゲン作用の削減効果の評価に関する研究」、「イトヨによる内分泌かく乱作用の評価手法の研究」、「魚類エストロゲン受容体の種特異性の調査」及び「両生類の生態影響評価手法の研究」の 4 つのテーマ (コアプロジェクト-1~4) を設定し、日英両国の研究者による研究を実施した。この第 2 期の共同研究では、下水処理過程及び環境中でのエストロゲン類の挙動等の把握・解明、イトヨにおけるアンドロゲン受容体 (α 及び β) の機能やばく露試験条件等の確立、メダカでの精巣卵発現のメカニズムの解明、6 種の魚類でのエストロゲン受容体 (α 及び β) のレポータージーン試験系の確立、ニシツメガエルでのエチニルエストラジオールばく露による生殖腺影響及び甲状腺ホルモン受容体遺伝子 (α 及び β) のレポータージーン試験系の確立等の研究成果が得られている。

3. 第 3 期日英共同研究について

平成 21 年 11 月の第 11 回日英共同ワークショップにおいて、日英の研究者によって第 3 期の日英共同研究についての議論を行い、新たに以下の 4 つの枠組み (コアプロジェクト

-1~4)のもとで研究を推進することとした。また、第3期の日英共同研究では、日英の研究者が連携してコアプロジェクト横断的に研究も推進することとしている。

- 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（コアプロジェクト-1）
- 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（コアプロジェクト-2）
- 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（コアプロジェクト-3）
- 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（コアプロジェクト-4）

4. 平成22年度の成果概要

(1) 平成22年度に実施した調査研究及び成果概要

平成22年度は、新たに設定された枠組み（コアプロジェクト-1~4）のもとで、以下の調査研究を実施した。

コアプロジェクト-1

エストロゲンや新規汚染物質として注目される PPCPs の下水処理場での存在実態や挙動を明らかにし、これまでに実施されていなかった河川流域における PPCPs の存在実態や挙動について、特に光分解に着目した検討を行った。また、河川流域内のエストロゲン濃度を推定するためのモデルを構築し、日本の河川流域への応用について検討した。さらに、河川水中のエストロゲン削減のための対策効果についてモデルによる推定を行った。

コアプロジェクト-2

スピギンをバイオマーカーとして化学物質の(抗)アンドロゲン作用を調べるためのイトヨを用いる試験法^{*}に関して、ばく露における至適条件の検討を行った。ばく露日数及び試験魚の体サイズのスピギン mRNA 発現に対する効果を明らかにし、過年度までの成果と併せて、至適ばく露条件をほぼ全て確定できた。また、実験室内でのイトヨの自家繁殖法（成熟した雌雄ペアを用いた 10~50L 程度の水槽内での自然産卵による繁殖）を検討し、試験に用いる個体群を継代的に維持しておくことが可能となった。

※ イトヨを用いる試験法については、第23回 OECD WNT 会合（平成23年4月、パリにて開催）において、英国より、21-Day Androgenised Female Stickleback Screening Assay (AFSSA) としてガイダンスドキュメント案が提案されている。

コアプロジェクト-3

魚類のエストロゲン受容体に関して、種々の化学物質によるレポーター遺伝子試験を行い、魚種による感受性の違いを明らかにした。また、メダカのアンドロゲン受容体、副腎皮質ホルモン受容体及び甲状腺ホルモン受容体、ニシツメガエルの甲状腺ホルモン受容体のレポーター遺伝子試験系を構築し、それらの化学物質に対する反応性を検討し、メダカの $AR\alpha$ と $AR\beta$ はアンドロゲンや化学物質に対して同等の反応を示すこと、一方で、副腎皮質ホルモン系に関しては、 $GR1$ と $GR2(\alpha, \beta)$ 、さらに MR がそれぞれ特有のレポーター活性を示すことなどの知見が得られた。

コアプロジェクト-4

生活史が明らかで精巣卵について多くの知見があるトノサマガエルを対象として、新潟県北部地域において精巣卵の出現状況等に関する調査を行った。その結果、トノサマガエルの精巣卵が第一次精原細胞あるいは初期の第二次精原細胞から由来すること、性成熟期の精子形成開始に伴ってその形成が起こることなど、これまで両生類では不明であった精巣卵の起源に関する知見が得られた。また、これまで報告例がなかったトノサマガエルの亜成体における精巣卵の知見が得られた。

(2) 第 12 回日英共同研究ワークショップの開催

英国において第 12 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開催し、第 3 期の日英共同研究の 4 つの枠組み（コアプロジェクト-1~4）毎に、日英両国の研究担当者による研究成果の発表を行うとともに、研究担当者及び行政官等による意見交換並びに今後の研究についての検討を行った（詳細は別添のとおり）。

5. 平成 23 年度の実施内容について

(1) 各コアプロジェクトの平成 23 年度の研究課題（案）

第 3 期の日英共同研究は、新たに設定された枠組みのもとで調査研究を実施しているところであるが、平成 22 年 7 月に策定された **EXTEND2010** も踏まえて、内分泌かく乱作用を持つ化学物質等の野生生物に及ぼす悪影響や個体群レベルでの影響（環境リスク）の解析・評価に繋がるテーマを中心に調査研究を実施する。

平成 23 年度については、平成 22 年度に得られた成果及び課題等並びに第 12 回ワークショップでの日英両国の研究担当者による議論の結果等を踏まえて、各コアプロジェクトにおいて以下の調査研究を実施する予定である。

コアプロジェクト-1

生活排水由来のエストロゲン及び **PPCPs** 等に関して、下水処理の過程及び放流先の水域での濃度把握のための調査により、下水処理法と除去の関係、環境中での動態（環境中

運命)について検討する。また、これら物質の数理モデルによる環境中(河川流域内)の濃度予測手法の確立に向けて、室内実験等により環境中での分解性(光分解等)、モデル予測値と実測値の比較等の検討を行う。さらに環境試料中の内分泌かく乱作用の包括的な評価手法として、生物応答を利用した *in vitro* 試験(レポータージーン試験等)の下水処理水や河川水等への適用性について検討する。

コアプロジェクト-2

抗アンドロゲン作用を持つ化学物質の魚類に対する影響及び作用機構等を把握するために、メダカを抗アンドロゲン物質にばく露し、その影響や作用機構等を生物学的(ホルモンレベルの変化等)及び分子生物学的(遺伝子発現の変化等)に調査し、抗アンドロゲン物質に対する感受性の種差、メダカを用いる化学物質の抗アンドロゲン作用を検出するための簡易な *in vivo* 試験法等について検討する。また、両生類に対する化学物質のエストロゲン作用の影響(特に精巣卵の発現等)を把握するために、エストロゲン物質(エチニルエストラジオール)にばく露したニシツメガエルでの精巣卵の発現状況等を組織学的に調査することにより、両生類と魚類(メダカ)の精巣卵発現の種差等について検討する。

コアプロジェクト-3

魚類に対する化学物質の(抗)エストロゲン及び(抗)アンドロゲン作用に関して、受容体を介した転写活性の種間差(メダカとローチ等)のメカニズムや受容体のサブタイプ($ER\alpha$ 、 $ER\beta 1$ 、 $ER\beta 2$ 、 $AR\alpha$ 、 $AR\beta$ 等)の生体内での機能(内在的機能)について調査する。また、魚類(メダカ)のエストロゲン受容体及び副腎皮質ホルモン受容体のレポータージーン試験系を利用して、化学物質の複合的なばく露の影響(エストロゲン受容体に対するエストロゲン作用と抗アンドロゲン作用を持つ化学物質の複合作用、副腎皮質ホルモン受容体に対するプロゲステロン等の性ホルモン様物質の副腎皮質ホルモンとの複合的な作用等)や作用機構等について検討する。さらにアフリカツメガエルのエストロゲン及び甲状腺ホルモン受容体を用いた *in vitro* 試験系の構築し、これらを利用してニシツメガエルやメダカ等の他の試験生物種との感受性の種差等について検討する。

コアプロジェクト-4

平成22年度に引き続き、野生のトノサマガエルを対象とした個体群レベルでの影響(精巣卵の発現等)について調査を行う。また、新たに海産魚類(マハゼ、ボラ等)を対象として、個体群レベルでの影響(精巣卵等の発現、血中ビテロゲニン濃度等の状況)を把握するための調査を実施する。

(2) 第13回日英共同研究ワークショップの開催

平成23年度は、第13回日英共同ワークショップを日本において開催する予定である(平成23年12月頃、長崎にて開催予定)。

(別添)

第 12 回日英共同研究ワークショップについて

平成 22 年度は、下記のとおり、英国において第 12 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開催し、第 11 回ワークショップにおいて合意された研究テーマについての 4 つの枠組み（コアプロジェクト）毎に、日英両国の研究担当者による研究成果の発表及び意見交換並びに今後の研究についての検討を行った。

1. ワークショップの概要

期日： 平成 22 年 11 月 3 日（水）～11 月 4 日（木）

場所： マトフェンホール（英国 ノーザンバーランド）

出席者： 日本－井口泰泉（研究統括者、自然科学研究機構）、鑑迫典久（国立環境研究所）、山崎邦彦（環境省）、他（13 名）

英国－トム ハッチンソン（研究統括者、環境水産科学研究所）、チャールズ
タイラー（エクセター大学）、マイク ロバーツ（環境・食料・農村地域省）、
他（18 名）

2. 成果発表の概要

第 3 期日英共同研究において研究を推進している 4 つの枠組み（コアプロジェクト-1～4）毎に、日英両国の研究担当者より、これまでの研究成果について発表がなされた。日本の研究成果の概要は以下のとおり。

コアプロジェクト-1

下水処理過程から環境中におけるエストロゲン類（女性ホルモン様物質）及び医薬品類等の挙動に関する調査研究を行った。その結果、流入下水中のエストロゲン類は、処理過程で平均 90%が除去されるが、E1、E2 及びそれらの硫酸包合体の除去率は相対的に低いこと、これらエストロゲン類の除去には、活性汚泥処理での汚泥滞留時間の延長やオゾン処理が有効なことなどが明らかとなった。また、下水処理放流水について、残留する医薬品類を調べた結果、分析対象とした 76 物質の医薬品類のうち 68 物質が検出されたことから、今後、これらの物質についても下水処理過程から環境中での挙動等の知見収集の必要性が示唆された。

コアプロジェクト-2

英国で開発された（抗）アンドロゲン様作用の評価試験法に用いられるイトヨ（冷水性淡水魚）について、アンドロゲン受容体（AR）の機能解明のための研究を行った。その結果、メチルテストステロン（アンドロゲン様化学物質）にばく露したイトヨでは、腎臓での AR α の mRNA 発現量は雌雄とも一定又は僅かに減少する程度であるが AR β の mRNA 発現

量は著しく低下すること、スピギン遺伝子及びAR α のmRNAがともに腎細管細胞で発現していることが明らかとなり、アンドロゲンばく露に伴うスピギン合成には主にAR α が介在していることが示唆された。

コアプロジェクト-3

これまでに開発されたレポータージーン試験法を用いて、6種の魚類でのエストロゲン受容体(ER α)の感受性の魚差やリガンド特異性の解明に向けた研究を行った。その結果、化学物質に対するER α の転写活性(感受性)は、相対的にメダカ及びゼブラフィッシュが高く、コイが低いことが見出され、この感受性の種差にはER α のリガンド結合ドメインが関与していることが示唆された。また、*in vivo*ばく露(6魚種を同じ水槽内で10ng/LのEE2にばく露)した魚のビテロゲニン遺伝子発現を調べた結果、コイでは有意な増加が認められなかったことから、EE2に対する感受性に種差が存在することが明らかとなった。この他、新たな評価手法として両生類のニシツメガエルの甲状腺ホルモン受容体を用いたレポータージーン試験法を確立した。

コアプロジェクト-4

野生の個体群において雄に精巣卵が見られることが報告されているトノサマガエルを対象として、精巣卵の発現状況等の実態把握、野生個体における精巣卵発現の要因及びメカニズム等の解明に向けた調査研究を開始した。

3. 今後の研究についての検討結果の概要

日英両国の研究者及び行政官により議論を行い、昨年度の第11回ワークショップで合意された4つの枠組みの中で2015年まで以下の方向性で具体的研究に取り組むことを確認した。

第3期の日英共同研究では、新たに設定された枠組み(コアプロジェクト)の基で、内分泌かく乱作用を持つ化学物質等の野生生物に及ぼす悪影響や個体群レベルでの影響(環境リスク)の解析・評価に繋がるテーマを中心に調査研究を実施する。また、日英共同ワークショップ(年1回開催予定)において、日英の研究者による協議を行い、研究成果の共有及び相互利用などコアプロジェクト間の連携も図りながら、各研究テーマの工程表に基づいて効率的・効果的な推進を図る。

4. 次回ワークショップについて

次回の第13回日英共同ワークショップは、平成23年に日本で開催することが合意された。