

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。さらに、平成 20 年 10 月の第 10 回日英共同研究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 期目の日英共同研究を実施している。

2. 第 3 期日英共同研究について

第 3 期の日英共同研究では、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議論を行い、新たに設定した以下の 4 つの枠組み(コアプロジェクト)のもとで研究を推進している。

コアプロジェクト-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-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-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-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. 平成 25 年度の成果について

平成 25 年度は、平成 24 年度に引き続き、各コアプロジェクトにおいて、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・評価に繋がる調査研究を実施した(詳細は別添 1 のとおり)。

また、第 15 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(平成 25 年 12 月、愛知県名古屋市)、日英両国の研究担当者による研究成果の発表、意見交換及び今後の研究計画の検討等並びに行政担当者による情報交換等を行った(詳細は別添 2 のとおり)。

コアプロジェクト-1

医薬品等の生分解や吸着などの環境中や下水処理水での挙動の解明及び河川中濃度の推定のための数理モデルの検証並びに抗エストロゲン又はエストロゲン作用を示す可能性がある排水中の物質の探索及びそれらの挙動等に関する検討

コアプロジェクト-2

化学物質の抗アンドロゲン様作用を検出するための尻鰭の乳頭状突起の形成に着目したメダカを用いる新たな試験法について、イトヨ(冷水性淡水魚)での試験法との比較等による検討

コアプロジェクト-3

各種魚類でのエストロゲン受容体のサブタイプ毎の機能の差異等の解明に向けた研究及び各種受容体を用いたレポータージーン試験法の確立に向けた検討

コアプロジェクト-4

野生のカエルについての精巣卵発現等のデータの蓄積及び化学物質との関連性についての検討、並びに海産の魚類及び貝類についての化学物質の内分泌かく乱作用を調べるためのバイオマーカーの確立に向けた妥当性の検証

4. 平成 26 年度の実施内容について(案)

平成 26 年度は、第 15 回日英共同研究ワークショップでの検討結果等を踏まえて、各コアプロジェクトにおいて、以下に示す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・評価に繋がる調査研究を実施する。また、第 16 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英国(バース市、平成 26 年 11 月頃を予定)にて開催し、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行政担当者による情報交換等を行う。

コアプロジェクト-1

環境中での光分解、生分解及び吸着メカニズムを考慮した数理モデルの検証、並びに下水処理水等に含まれるエストロゲン又は抗エストロゲン作用を示す物質の特定に向けた検討

コアプロジェクト-2

メダカでの鰭の形状による抗アンドロゲン様作用の検出など、化学物質の内分泌かく乱作用の検出に有効な新たなエンドポイント及び試験法等の検討

コアプロジェクト-3

各種魚類でのエストロゲン物質に対する感受性の差異などホルモン受容体とリガンドの相互作用の解明に向けた検討及び各種受容体を用いたレポータージーン試験法の確立等に向けた検討

コアプロジェクト-4

野生のカエルでの精巣卵発現等の知見の蓄積及びそれらの化学物質との関連性についての検討、並びに海産の魚類及び貝類での各種バイオマーカーに関する調査研究及びそれらの化学物質との関連性についての検討

平成 25 年度日英共同研究の成果について

コアプロジェクト-1

コアプロジェクト-1 では、医薬品等の生分解や吸着などの環境中での挙動の解明及び河川中濃度の推定のための数理モデルの検証、並びに抗アンドロゲン又はエストロゲン様作用を示す可能性がある排水中の物質の特定及びそれらの環境中での挙動等に関する検討を実施した。得られた成果等は以下のとおりであった。

- ・西高瀬川において、水環境中における医薬品類の光分解速度推定手法の検証を行ったところ、年間を通した太陽光の分光スペクトルの変動に対応可能であることが示唆され、水環境中における化学物質の光分解速度の推定手法の実用性が極めて高くなった。また、桂川において、底質への吸着平衡定数を用い、医薬品類の吸着性が推定できることが示唆された。
- ・英国のテムズ川流域で調査を行い、下水処理場における医薬品類の除去率について調査し、生物処理に散水路床を用いた処理場では、活性汚泥を用いた処理場よりも医薬品類の除去率が低くなる傾向を示すことが示唆された。また、Littlemore 川区間と Thames 川区間での医薬品類の流達性を調査し、大幅な減衰を示す医薬品類の存在を把握した。
- ・下水処理場における医薬品等の除去実態の調査より、オキシデーションディッチ法を用いた下水処理場では、大部分の医薬品類の除去率は 60~100% であり、標準活性汚泥法を用いた下水処理場では各物質の分配係数と除去率との間に負の相関傾向が見られ、滞留時間が医薬品等の除去率に影響していることが示唆された。また、活性汚泥処理実験装置を用いた下水処理プロセスにおける挙動把握調査より、標準活性汚泥法を用いた下水処理場での結果と同様に、各物質の分配係数と除去率との間に弱い負の相関傾向がみられ、滞留時間が長くなると除去率も高くなる傾向が確認された。
- ・下水試料を対象として、ヒトとメダカの ER α を用いたレポータージーンアッセイを行い、ヒトやメダカの ER α に対する抗エストロゲン作用を検出した。また、固相抽出段階での分画により抗エストロゲン物質を分離できたことで、下水試料中の抗エストロゲン物質の同定につながる可能性がある。さらに、下水試料中の抗エストロゲン物質によって、エストロゲン類の活性が抑制されること、レポータージーンアッセイで測定されているエストロゲン作用の大きさはエストロゲン作用と抗エストロゲン作用の差し引きから生じた作用であることなどの知見が得られた。

コアプロジェクト-2

コアプロジェクト-2 では、化学物質の抗アンドロゲン様作用を検出するための臀鰭の乳頭状突起の形成に着目したメダカを用いる新たな試験法について、イトヨ(冷水性淡水

魚)での試験法との比較等による検討を実施した。得られた成果等は以下のとおりであった。

- ・メダカを用いた抗アンドロゲン物質のフルタミドと抗エストロゲン物質のプロクロラズのとばく露実験を行い、臀鰭鰭条先端の分岐に対する性ホルモンの効果について調べた結果、プロクロラズのとばく露により先端が分岐しない個体の数が増加したことから、鰭条先端分岐においてエストロゲンが関与する可能性が示唆された。また、フルタミドのとばく露により、オス臀鰭乳頭状小突起ととも鰭条の節板総数も減少したことから、臀鰭の伸長にはアンドロゲンが不可欠であることが示唆された。

コアプロジェクト-3

コアプロジェクト-3では、各種魚類でのエストロゲン受容体のサブタイプ毎の機能の差異等の解明に向けた研究及び各種受容体を用いたレポータージーン試験法の確立に向けた検討を実施した。得られた成果等は以下のとおりであった。

- ・各種魚類のエストロゲンレセプター(ER)について、分子系統樹に対してエストロゲン及び化学物質に対する反応性(EC₅₀ 値)を解析した結果、エストロゲンに対する応答性に関して、ER β 1 の魚種間でのばらつきは ER α と同程度であった。一方、ER β 2 は魚種間でのばらつきが大きく、ER β 2 が ER の生存や生殖とは直接関係ない作用を持ち、それぞれの魚種特異的エストロゲンに対する作用を担っている可能性が示唆された。また、化学物質に対する応答性に関しては、魚種間で全て似た傾向を示すことが示唆された。
- ・ゴナドトロピン受容体(メダカ黄体形成ホルモン(LH)受容体、卵胞刺激ホルモン(FSH)受容体)を用いたレポータージーンアッセイを確立し、種々のリガンドを用い、その反応性を確認した。
- ・アンドロゲン応答マーカー遺伝子の候補として考えられる *Bmp7* 及び *Lef1* は雌メダカへのアンドロゲン投与後 18 時間で有意な遺伝子発現変化を検出でき、AR アンタゴニストであるフルタミドを用い、メチルテストステロンによって誘導される雌メダカの乳頭状小突起形成が阻害され、*Bmp7* 及び *Lef1* の遺伝子発現が抑制されることが明らかとなった。さらに、雄メダカでの *Bmp7* 及び *Lef1* の遺伝子発現の上昇、フルタミド投与による *Bmp7* 及び *Lef1* の遺伝子発現の抑制が確認でき、これらの遺伝子発現変化はアンドロゲン作用及び抗アンドロゲン作用、いずれも検出できることが示唆された。

コアプロジェクト-4

コアプロジェクト-4では、野生のカエルについての精巣卵発現等のデータの蓄積及び化学物質との関連性についての検討、並びに海産の魚類及び貝類についての化学物質の内分泌かく乱作用を調べるためのバイオマーカーの確立に向けた妥当性の検証等を実施した。得られた成果等は以下のとおりであった。

- 新潟県北部地域のトノサマガエルを対象として精巣卵発現に関する調査を実施した結果、精巣卵の1個体における発現数やトノサマガエル集団における出現頻度は過年度と同様であり、それらは1970年代のトノサマガエルに比べると少ない傾向にあったが、1970年代で多くみられた50個以上の精巣卵を有する個体が複数みられた。
- 新潟県北部地域で1970年代に採集されたトノサマガエルのサンプルを解析した結果、変態直後のカエルでは肥大卵母細胞様の精巣卵はみられず、変態後に精巣卵形成が起こること、性成熟期の精子形成に伴ってその形成が活発に起こることが明らかとなり、精巣卵サイズの動態から、性成熟過程で形成された精巣卵が成熟個体にも連続して存在することが強く示唆された。また、1970年代のサンプルと平成22～25年度の調査結果を比較すると、トノサマガエル集団内での精巣卵発現個体の頻度に大きな差異はないが、1970年代のサンプルでは1個体当たりの精巣卵数が著しく多いことなどが明らかとなり、精巣卵発現の調査において、1個体当たりの精巣卵の発現数やそれらのサイズも重要な指標となることが強く示唆された。
- トノサマガエルの幼生をエチニルエストラジオールで暴露し、変態完了時に生殖腺の組織観察を行った結果、低濃度(0.03～3 nM)のエチニルエストラジオールばく露において、組織構築は精巣構造を示すが、肥大卵母細胞が形成される間性生殖腺を有する個体がみられたことなどから、トノサマガエルでは、性転換誘導に必要なエストロゲン濃度よりも低濃度のエストロゲンへのばく露は、変態完了時点で組織構築の性に影響しないものの、生殖細胞分化のみに影響を与える可能性が強く示唆された。
- マハゼを対象とするエストロゲン様物質等の影響評価基準を作成するため、長崎の沿岸河口域で毎月マハゼを採集し、生殖腺発達に関する組織学的観察、血中性ステロイド濃度、血中ビテロゲニン濃度等に関して、基準となるデータを収集し、雌雄の生殖腺発達の周年変化とそれに伴う内因性エストロゲン及び血中ビテロゲニンの挙動についての知見を得た。
- 日本各地の沿岸域でボラを採集し、血中ビテロゲニン濃度、ビテロゲニン mRNA の測定及び組織標本による精巣卵の発現状況等の実態調査を実施し、過去のデータと比較し、血中ビテロゲニン濃度の減少及び環境エストロゲン汚染が改善されつつあることが分かった。一方、下水処理施設周辺で採集されたボラでは血中ビテロゲニン濃度は低いものの、精巣卵出現率が高く、ボラが性分化期において、長期にわたり環境エストロゲンの影響を受けていることが示唆された。
- ムラサキイガイを用いたエストロゲンのばく露実験を実施し、生殖腺の形態観察、エストロゲン受容体及びビテロゲニン遺伝子発現解析等の生殖関連遺伝子の解析を行う試料を得た。

第 15 回日英共同研究ワークショップについて

1. 開催概要

日時： 平成 25 年 12 月 9 日(月)、10 日(火)

場所： 名古屋マリオットアソシアホテル(愛知県名古屋市)

出席者(敬称略)：

日本ー井口泰泉(研究統括者、自然科学研究機構)、田中宏明(京都大学)、山崎邦彦(環境省)他(16 名)

英国ートム ハッチンソン(研究統括者、プリマス大学)、デビット・ウィリアム(環境・食料・農村地域省)、マイク・ロバーツ(同)他(15 名)

その他ー豪州の研究者(1 名)

2. 結果概要

(1)研究成果の発表

第 3 期の日英共同研究で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)について、日英両国の研究担当者がこれまでの研究成果の発表を行った。日本の研究者による成果発表の概要は以下のとおり。

コアプロジェクト-1

医薬品類等の下水処理過程での挙動及び生分解や吸着など環境中での挙動に関する調査結果、環境中濃度の推定等に向けた数理モデルの検証結果並びに環境試料中のエストロゲン及び抗エストロゲン作用の評価に向けたレポーター遺伝子アッセイの適用に関する研究成果等が報告された。

コアプロジェクト-2

化学物質の抗アンドロゲン様作用等を検出するための新たな試験法の開発に向けたメダカ及びイトヨを用いた検証実験の結果等が報告された。

コアプロジェクト-3

魚類における化学物質のエストロゲン様作用に対する種ごとの感受性の違い、種々のホルモン受容体を用いた *in vitro* アッセイシステムの構築に向けた研究成果及びメダカでのアンドロゲンによる尻鰭の乳頭状突起(二次性徴)の形成メカニズムなど分子生物学的なアプローチによる研究成果等が報告された。

コアプロジェクト-3

日本における野生のカエル類に見られる精巣卵の調査及びエストロゲン物質を用いた

検証実験の結果並びに海産魚類(マハゼ及びボラ)における雄でのビテロゲニン生成及び精巣卵発現等の実態に関する調査結果等が報告された。

(2) 来年度の研究計画について

第3期の日英共同研究で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)について、これまでの研究成果等を踏まえて、日英両国の研究担当者等により、来年度の研究計画についての議論がなされた。日本が取り組む研究課題の概要は以下のとおり。

コアプロジェクト-1

医薬品類等の環境中での光分解、生分解及び吸着メカニズムを考慮した基本的なモデルの検討、フィールドデータに基づくモデル推定値と実測値の差異等についての検証並びに下水処理水等に含まれるエストロゲン又は抗エストロゲン作用を示す物質の特定に向けた検討等を進める。

コアプロジェクト-2

化学物質の抗アンドロゲン様作用を検出するためのメダカでの尻鰭の乳頭状突起の形成に着目した試験法及び化学物質の内分泌かく乱作用の検出に有効な新たなエンドポイントの検討等を進める。

コアプロジェクト-3

各種魚類でのエストロゲン物質に対する感受性の差異などエストロゲン受容体とリガンドの相互作用の解明及び各種受容体を用いたレポータージーン試験法の確立等に向けた検討等を進める。

コアプロジェクト-4

野生のカエルについての精巣卵発現等のデータの蓄積及び化学物質との関連性についての検討、並びに海産の魚類及び貝類での各種バイオマーカーについての実態調査並びにそれらの化学物質との関連性等についての検証を進める。

(3) 行政担当者等による情報交換等について

化学物質の内分泌かく乱作用に関する取組状況について、日本及び英国の行政担当者等より説明を行い、意見交換が行われた。今後も緊密に情報共有を行うことが確認された。

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26年度に英国で開催することが合意された。