

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 年間の日英共同研究事業が開始された。この合意から 5 年目となる平成 16 年度（2004 年）には、日英両国間の協議により 5 年間の延長が決定され、第 2 期（2004～2009 年）の日英共同研究として、日英両国の研究者によって 4 つの研究テーマについてそれぞれ研究を推進した。

平成 20 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 年より引き続き延長することが合意されたことを受け、平成 21 年 11 月に大阪で開催された第 11 回ワークショップにおいて、日英共同研究の 5 カ年の継続（第 3 期日英共同研究）に関する文書の調印が行われた。第 3 期（2009～2014 年）の日英共同研究では、これまでの成果等を踏まえて新たな研究の枠組み（コアプロジェクト）が設定された。

2. 第 1 期及び第 2 期日英共同研究の成果の概要

（1）第 1 期日英共同研究の成果概要

第 1 期の日英共同研究では、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、毎年開催されるワークショップにおいて日英の研究者による協議に基づいて設定した「魚の性分化に関する分子生物学的アプローチ」、「無脊椎動物を用いた内分泌かく乱作用評価法の開発」、「ボラを用いた内分泌かく乱化学物質のフィールド調査による影響評価」、「水環境における人畜由来エストロゲン物質の寄与率に関する研究」など 19 テーマ（毎年 4～6 テーマを設定）について研究を実施した。また、日英両国が相互に研究者を派遣し、現地での共同研究、情報・知見、両国で開発された技術の交換などを行った。

（2）第 2 期日英共同研究の成果概要

第 2 期の日英共同研究では、以下の 4 つのテーマ（コアプロジェクト）を設定し、日英両国の研究者による研究を実施した。

○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（コアプロジェクト-1）

遊離体及び抱合体エストロゲン（E1 及び E2 等）について、LC/MS/MS による分析方法を改善し、高い回収率を得る有効な方法を開発した。これにより下水処理での

エストロゲンの挙動に関して、実態把握のための調査を行い、日本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、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などが明らかとなった。また、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、モデルの予測値との適合性が確認された。

○イトヨによる内分泌かく乱作用の評価手法の研究（コアプロジェクト-2）

スピギン及びアンドロゲン受容体 mRNA の定量 RT-PCR 測定系を構築し、高感度測定を可能とした。これによりイトヨのばく露試験の条件を検討し、水温は 15℃が好適であり、スピギン mRNA をエンドポイントとした場合には、約 1 週間のばく露で影響を検出できることなどが明らかとなった。また、イトヨのアンドロゲン受容体（ α 及び β ）について、腎臓及び精巣での発現を遺伝子及びタンパク質の両面から解析しその機能性を評価するとともに、レポータージーンアッセイ系を確立した。さらに、飼育環境下でのイトヨの育成法を検討し、人工授精及び自然産卵での繁殖並びに稚仔魚の育成に成功した。

○魚類エストロゲン受容体の種特異性の調査（コアプロジェクト-3）

6 種の魚類（ローチ、メダカ、ファットヘッドミノー、ゼブラフィッシュ、イトヨ及びコイ）のエストロゲン受容体（ α 及び β ）について、レポータージーンアッセイ系を確立した。これにより、エストロゲン受容体のリガンド特異性及び種特異性を調べることが可能となった。また、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、精巣卵誘起時に発現する遺伝子群を同定し、そのうち ZPA、ZPB、ZPC1、ZPC2、ZPC3 及び ZPC5 遺伝子については、化学物質による精巣卵誘起のバイオマーカーとして活用できる可能性を見出した。

○両生類の生態影響評価手法の研究（コアプロジェクト-4）

ニシツメガエル（両生類の試験動物種）を用いたエチニルエストラジオール（エストロゲンの陽性対象物質）でのばく露試験を行い、全長、後肢長、発生段階、生殖腺及び甲状腺等の形態学及び組織学的知見並びに遺伝子発現に関する知見を収集して標準データベースを作成した。また、エストロゲン及び甲状腺ホルモン受容体遺伝子（ α 及び β ）の単離及び発生段階における発現解析を行うとともに、レポータージーンアッセイ系の構築を行った。

3. 第 3 期日英共同研究について

（1）第 3 期日英共同研究のコアプロジェクト

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 期の日英共同研究で取り組むテーマ等についての議論がなされ、新たに以下の 4 つの枠組み（コアプロジェクト-1～4）が設定された。併せて、日英の研究者が連携してコ

プロジェクト横断的な研究も推進することとされた。

第3期日英共同研究のコアプロジェクト

①	Studies to simulate the behaviours of principal suspected EDCs and emerging chemicals in treated effluents and in the environment, and further to consider ways to reduce their environmental discharge	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	Development of methods for quantifying adverse effects to wildlife to assess environmental risks caused by EDCs	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	Studies to evaluate various endpoints for chemical testing to understand reproductive and developmental effects on aquatic organisms and other species	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	Analysis of environmental risks to wildlife in the United Kingdom and Japan	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

(2) 平成 22 年度の研究計画

平成 22 年度は、新たに設定された枠組みのもとで、第 2 期の日英共同研究の成果及び課題も踏まえて調査研究を実施する。

- 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 関連）

処理排水（処理放流水）に含まれるエストロゲン類の環境中での挙動については、平成 21 年度（第 2 期）までの研究により日本の河川にモデルを適用できることが示唆されたところであるが、モデルの精緻化及び検証には、さらに処理過程から環境中における挙動に関する知見の蓄積が必要である。そこで平成 22 年度は、以下の課題について調査研究を行う。

- ・ 下水処理での化学物質(エストロゲン、その他の汚染物質等)の挙動に関連する下水処理法と化学物質除去の関係の把握及び除去機構の検討。
- ・ 放流先水域での化学物質(エストロゲン、その他の汚染物質等)の実態調査及びそれらの環境中運命予測及び削減効果の評価方法のモデル化に向けた検討。
- ・ 英国で開発された化学物質の河川中運命予測モデルの導入及び日本での実用に向けた検討。

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 関連）

化学物質の(抗)アンドロゲン作用の評価法としてイトヨを用いる試験法については日英共同で研究を進め英国から OECD に提案されたところであるが、イトヨをモデル動物として(抗)アンドロゲン作用の評価を行うにあたり課題も残されている。また、OECD で生殖試験法の開発が進められているニシツメガエルについては繁殖行動に関する知見は十分ではない。そこで平成 22 年度は、平成 21 年度までの研究成果の補完及び新たな情報の収集を目的として以下の課題について調査研究を行う。

- ・OECD で検討されているイトヨを用いる試験法に関する技術情報等の収集及び実験室内でのイトヨの自家繁殖法の検討。
- ・成長段階の異なるイトヨのアンドロゲン物質に対する感受性及びばく露試験の至適条件等の検討。
- ・ニシツメガエルでの繁殖行動等の新たなエンドポイントに関する情報の収集及び適用性の検討。

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 関連）

OECD で開発が進められている試験法に用いられるメダカ等の魚類のエストロゲン受容体及びニシツメガエル（両生類）の甲状腺ホルモン受容体については、平成 21 年度（第 2 期）までの研究によりレポータージーンアッセイ法を確立したところであるが、今後のそれら実用のためにはデータの信頼性確保の観点からの検証が必要と考えられる。また、新たな生物種又は受容体を対象とした評価法の確立も必要である。そこで、平成 22 年度は以下の課題について検討する。

- ・魚類のエストロゲン受容体のレポータージーンアッセイ系の再現性等の検証及びヒトのエストロゲン受容体のレポータージーンアッセイとの比較等による感受性の種間差及び種特異性等の検討。
- ・メダカのアンドロゲン受容体、甲状腺ホルモ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アッセイ系の構築。
- ・ニシツメガエルの甲状腺ホルモン受容体のレポータージーンアッセイの再現性等の検証及びメダカの甲状腺ホルモン受容体のレポータージーンアッセイとの比較による感受性の種間差及び種特異性等の検討。

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 関連）

日本では、野生生物への影響又は影響が疑われる事例（個体群レベルでの影響）に

ついて知見は十分ではなく、研究を進めるためにはデータ及び情報の収集が必要である。そこで平成 22 年度は、第 3 期日英共同研究における新たな研究の着手に向けて以下の課題について検討する。

- ・日本国内における両生類(トノサマガエル)での個体群レベルでの影響に関わる精巣卵の発現状況等の調査。
- ・海外における野生生物の環境リスクの解析への取組み等に関する情報収集。

4. 第 12 回日英共同研究ワークショップの概要

本年度は、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、昨年度の第 11 回ワークショップにおいて合意された共同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) 開催地及び参加者等

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）

プログラム：別紙参照

(2) 成果発表

現在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がこれまでの研究成果について発表した。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

下水処理施設で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や医薬品等の処理状況や河川における残留濃度等に関する報告がなされた。

コアプロジェクト-2

イトヨ（冷水性淡水魚）でのアンドロゲン様作用（男性ホルモン様作用）等を腎臓の mRNA を用いて検出する方法等、新たな検出方法の検証結果が報告された。

コアプロジェクト-3

エストロゲン様作用について、生物種ごとの感受性の違いに関する分子生物学的なアプローチによる検証に関する報告がなされた。

コアプロジェクト-4

日本におけるカエル類に見られる精巣卵形成の実態に関する報告及び英国における女性ホルモン様作用を持つ物質が魚類の個体群に与える影響の有無に関する報告がなされた。

(3) 今後の研究についての検討結果

昨年度のワークショップで合意された 4 つの枠組みの中で進めるべき、今後の研究の方向性について、総論及び各コアプロジェクトについての議論を行い、以下のことが確認された。

総論

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。

コアプロジェクト-1

内分泌かく乱作用等を持つ化学物質等の野生生物に及ぼす影響(環境リスク)を解析・評価するため、これら物質の環境中(河川中)の濃度及び分解又は副生成等も含めた挙動(環境中運命)など、野生の水生生物への暴露状況をできるだけ正確に把握・推定するための研究を進める。

コアプロジェクト-2

化学物質の内分泌かく乱作用の検出・評価を目的とした生物試験法(in vivo 試験)については、OECD を中心に開発が進められているが、野生生物の生息環境や生態系は複雑であり、これらの生物試験法(評価法)又はエンドポイントをそのまま適用することは難しいと考えられるため、野生生物への影響について、作用機構の解明や評価手法の確立等のための研究を進める。

コアプロジェクト-3

野生生物の生息環境や生態系は複雑であり、野生生物に見られた影響を疑われる事象を把握し、その原因や影響を解析・評価するため、遺伝子レベルや分子生物学的なアプローチ等により、環境要因との関連性等も含めて作用機序の解明や評価手法の開発のための研究を進める。

コアプロジェクト-4

野生生物における内分泌かく乱作用等を持つ化学物質等の影響を解析・評価するため、実際に野生生物において個体群レベルで起きている、影響を疑われる事象の実態を把握し、また、それらの事象と実験室内での生物試験で観察される変化(エンドポイント)との比較検証等を併せて行う。

(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。

(5) 平成 23 年度以降に取り組む研究テーマの考え方について

平成 23 年度以降は、本年 7 月に策定された EXTEND2010 に基づき、第 3 期日英共同研究で新たに設定された枠組み（コアプロジェクト）の下で、今回のワークショップで確認された研究の方向性を前提として、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）の解析及び評価に繋がるテーマを中心に調査研究を実施する。

(別紙)

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

2010年 英国ノーザンバーランド

12th Annual Scientific Workshop

UK-Japan Co-operation for Research on Endocrine Disrupters in the Aquatic Environment

開催プログラム

11月3日(水)

セッション1 開会挨拶

議事及び事務連絡

トム・ハッチンソン (英国 環境水産科学研究所)

日英共同研究の学術的成果と政策への貢献

井口 泰泉 (自然科学研究機構)

セッション2 コアプロジェクト

- ・コアプロジェクトー1：家庭排水及び河川中の内分泌かく乱活性の調査

田中 宏明 (京都大学)

南山 瑞彦 (土木研究所)

アンドリュー・ジョンソン (英国 生態・水文学センター)

- ・コアプロジェクトー2：小型魚をモデルとした化学物質及び作用様式の内分泌かく乱作用の評価

長江 真樹 (長崎大学)

イオアナ・カチアダキ (英国 環境水産科学研究所)

- ・コアプロジェクトー3：淡水魚における外因性エストロゲンに対する感受性の違い及び甲状腺ホルモンに対する生物種間の応答性の違いを理解するための分子生物学的アプローチ

宮川 信一 (自然科学研究機構)

アンケ・ランゲ (英国 エクセター大学)

- ・コアプロジェクトー4：野生の水生生物 (ローチ及びトノサマガエル) における内分泌かく乱物質の個体群への影響

小林 亨 (静岡県立大学)

パトリック・ハミルトン (英国 エクセター大学)

セッション3 招待講演

- ・魚類の繁殖に及ぼす内分泌かく乱物質と水圏温暖化の複合影響
征矢野 清（静岡県立大学）
- ・魚類に対する内分泌かく乱物質及び新たな汚染物質の影響を理解するためのシステム
バイオロジーの適用
チャールズ・タイラー（英国 エクセター大学）
- ・化学物質の内分泌かく乱作用に関する今後の対応：EXTEND2010
山崎 邦彦（環境省）
- ・OECDテストガイドラインプログラムの最新情報
ピーター・マッテセン（OECD VMG-eco 座長）
- ・政策が必要とする科学的証拠の本質的役割
ディビッド・ウィリアムズ（英国 環境・食料・農村地域省）

講演後、各コアプロジェクトの課題に関する討論

11月4日（木）

セッション4 今後の日英共同研究

- ・今後の日英共同研究プロジェクト及び日本と英国に必要な新たな政策について総合討論

ワークショップ総括

トム・ハッチンソン（英国 環境水産科学研究所）
井口 泰泉（自然科学研究機構）
マイク・ロバーツ（英国 環境・食料・農村地域省）
山崎 邦彦（環境省）

閉会