

## 内分泌攪乱化学物質の生態系影響評価のための試験体系の概況

### 1. 評価体制

「内分泌攪乱化学物質問題検討会」のもとに設置された「内分泌攪乱作用が疑われる物質のリスク評価検討会」のなかに生態系の専門家からなる「内分泌攪乱化学物質の生態影響に関する試験法開発検討会」を設置し（鳥類、両生類、無脊椎動物についてはそれぞれ担当グループを更に設置）物質ごとのプロトコール及びそのプロトコールに則った実施状況や試験結果について助言評価を行った。

### 2. 試験方法

環境省においては、わが国において開発した方法（メダカのピテロジェニンアッセイ・パーシャルライフサイクル試験・フルライフサイクル試験・レセプターバインディングアッセイ・レポータージーンアッセイ）を用いて、有害性評価を進めた。対象とした化学物質は、平成 12 年度に選定した 12 物質<sup>1)</sup>、平成 13 年度に選定した 8 物質<sup>2)</sup>、平成 14 年度に選定した 8 物質<sup>3)</sup>及び平成 15 年度に選定した 8 物質<sup>4)</sup>である。

- 1) トリブチルスズ、4-オクチルフェノール、ノニルフェノール、フタル酸ジ-n-ブチル、フタル酸ジシクロヘキシル、フタル酸ジ-2-エチルヘキシル、オクタクロロスチレン、ベンゾフェノン、トリフェニルスズ、フタル酸ジエチル、フタル酸ブチルベンジル及びアジピン酸ジ-2-エチルヘキシル
- 2) ペンタクロロフェノール、アミトロール、ビスフェノールA、2,4-ジクロロフェノール、4-ニトロトルエン、フタル酸ジペンチル、フタル酸ジヘキシル及びフタル酸ジプロピル
- 3) ヘキサクロロベンゼン、ヘキサクロロシクロヘキサン、クロルデン、オキシクロルデン、trans-ノナクロル、DDT、DDE 及び DDD
- 4) 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、マラチオン及びペルメトリン

### 3. 魚類

メダカを試験動物とし、スクリーニングの位置付けで、ピテロジェニンアッセイ、パーシャルライフサイクル試験、FLF・d-rR メダカ試験等を実施するとともに、確定試験の位置付けでフルライフサイクル試験を実施した。また、必要に応じて、物質ごとに試験を追加するとともに、これらの試験結果を補完する目的で試験管内（*in vitro*）試験を実施した。なお、試験方法及び試験結果について OECD に報告するとともに、OECD において、魚類のピテロジェニン産生試験の標準化を目的としたリングテスト（試験法の有用性や妥当性等を検証する目的で、同一試験を同一条件で複数の機関により実施するテスト）が平成 15 年 3 月より開始され、日本（化学物質評価研究機構）がリードラボ（取りまとめ試験機関）として結果を取りまとめている。

#### (1) スクリーニング試験

##### ピテロジェニンアッセイ

雄メダカを化学物質に 21 日間曝露し、ピテロジェニン産生能力を測定することにより、化学物質のエストロジェン様作用の有無・程度を把握した。曝露濃度は、環境実態調査結果により得られた魚類の推定曝露濃度を参考に、被験物質の水溶解度、一般毒性値、内分泌攪乱作用を示すと疑われた試験結果（信頼性評価済み）及び水中での検出限界値等を考慮して、5 群設定した。本アッセイについては、26 物質\* について試験を実施した。

##### パーシャルライフサイクル試験

化学物質をメダカに受精卵から成熟期を通して約 70 日間曝露することにより、主に性分化への影響を把握する試験であり、孵化、孵化後の生存、成長、二次性徴、生殖腺組織、ピテロジェニン産生等をエンドポイントとした。曝露濃度は、原則としてピテロジェニンアッセイの結果を参考に、5 群設定した。本試験については、26 物質\* について試験を実施した。

## FLF・d-rR メダカ試験

胚の白色色素の有無により遺伝的な性別が判別できる FLF メダカや体色により遺伝的な性別が判別できる d-rR メダカなどの試験生物の開発を進めており、アーリーライフステージでの影響を把握する試験へ応用できる系統を確立した。

### (2) 確定試験

#### フルライフサイクル試験

化学物質をメダカに少なくとも2世代(約180日間)にわたり曝露することにより、発達、成熟、繁殖期を含む全生涯を通しての影響を把握する試験であり、孵化、孵化後の生存、成長、二次性徴、生殖腺組織、ビテロジェニン産生、産卵数、受精率等をエンドポイントとした。曝露濃度は、パーシャルライフサイクル試験結果を参考に、原則として5群設定した。本試験については、4物質\*\*及び陽性対照物質(17-エストラジオール、エチニルエストラジオール、メチルテストステロン、フルタミド)について試験を実施した。

### (3) 試験管内(in vitro)試験

#### レセプターバインディングアッセイ

化学物質のメダカエストロジェンレセプター(ER<sub>α</sub>及びER<sub>β</sub>)への結合能力を測定するアッセイを開発し、26物質\*について試験を実施した。

#### レポーター遺伝子アッセイ

レセプター遺伝子及びレポーター遺伝子を導入したヒト子宮頸がん由来 HeLa 細胞を用いることにより、化学物質のメダカエストロジェンレセプター(ER<sub>α</sub>及びER<sub>β</sub>)及びアンドロジェンレセプター(AR)への結合後の転写活性能力を測定するアッセイを開発し、26物質\*について試験を実施した。

### (4) メダカの標準データベース作成

各種試験に際し正常な個体の成長や生殖腺の発達状況を把握するため、パーシャルライフサイクル試験の飼育方法に準じ、定期的に体重及び生殖腺の発達などについて、測定、観察、記録を行い、標準データベースを作成した。この標準データベースについては、非曝露の対照群のデータ及び過去に実施した試験において得られた曝露個体の生殖腺分化異常とあわせて、(独)国立環境研究所ホームページ上で公開している。( <http://w-edcdb.nies.go.jp/SHf/index.html> )

### (5) その他

遺伝子技術を用いて、内分泌攪乱化学物質によるメダカの性分化に及ぼす影響とその作用メカニズムを明らかにするため、魚類の性決定遺伝子として、メダカ性決定遺伝子(DMY)を発見・同定した。また、メダカの性分化制御に関わる遺伝子群の一部のクローニングを終了し、メダカの性分化制御に関わる遺伝子群及び魚類の性決定遺伝子のうちメダカの性分化時における各種遺伝子の発現パターンを調査し、性分化に関わる遺伝子群を用いたDNAチップを作成した。さらにDNAチップを改良し、性ステロイドホルモン及び内分泌攪乱化学物質の作用メカニズムを解析するためのデータを収集した。

## 4. 鳥類

ニホンウズラを試験動物とし、ビテロジェニンアッセイ、性転換試験などのスクリーニング手法を開発した。確定試験としてOECDの1世代繁殖毒性試験(TG206)にエンドポイントを追加する調査研究を行った。調査研究結果を改良型1世代繁殖毒性試験(Enhanced one-generation Reproduction Test)の具体的なデータとしてOECDにおける1世代試験改訂及び2世代試験策定のための会議において発表した。あわせて、レセプターバインディングアッセイを実施した。

### (1) スクリーニング試験

#### ビテロジェニンアッセイ

雄ニホンウズラの腹腔内に化学物質を7日間投与し、血清中ビテロジェニンを測定することにより、化学物質のエストロジェン様作用の有無・程度を把握した。本アッセイについては、感度を上げるとともに、ビテロジェニン測定用キットの開発に成功し、20物質\*\*\*について試験を実

施した。

#### クロアカ試験

ニホンウズラを試験生物として男性ホルモンの標的組織である総排泄隆起（クロアカ腺）の大きさをエンドポイントとして、化学物質のアンドロジェン様作用又は抗アンドロジェン様作用の有無・程度を把握した。

#### 性転換試験

WE系（正常羽装）とAWE系（羽装により遺伝的性が判別可）のF<sub>1</sub>卵に化学物質を投与し、孵化前にF<sub>1</sub>の遺伝的性を確認し、その個体の生殖腺への影響を評価した。さらに、陽性対照物質（17 $\beta$ -エストラジオール、メチルテストステロン）及びノニルフェノール、ビスフェノールAによるパイロット試験を実施した。

### (2) 確定試験

#### 1世代繁殖毒性試験

ニホンウズラを試験動物とし、OECDの1世代繁殖毒性試験（TG206）に、ビテロジェニン測定や生殖腺組織（精巣卵の発生等）等をエンドポイントとして追加することを目標としたパイロット試験を陽性対照物質（17 $\beta$ -エストラジオール）を用いて実施した。

### (3) 試験管内（*in vitro*）試験

#### レセプターバインディングアッセイ

化学物質のニホンウズラのエストロジェンレセプター（ER $\alpha$ 及びER $\beta$ ）及びアンドロジェンレセプター（AR）への結合能力を測定するアッセイを開発し、20物質\*\*\*について試験を実施した。

## 5. 両生類

アフリカツメガエル等を試験動物とし、変態アッセイ、ビテロジェニンアッセイ、性転換試験などのスクリーニング手法を開発した。あわせて、レセプターバインディングアッセイを実施した。なお、OECDにおいて、両生類の変態アッセイの標準化を目的としたリングテスト（リードラボ：ドイツ、ライプニッツ淡水生態及び内水面水産研究所）が平成15年10月より開始され、日本も参加している。

### (1) スクリーニング試験

#### 変態アッセイ

無尾両生類の幼生の変態過程において化学物質に2～3週間曝露することにより、甲状腺ホルモン様作用を検出する試験であり、後肢長の短縮の程度などをエンドポイントとした。アフリカツメガエルを試験動物として陽性対照物質（T4、PTU）による試験を行い、ドイツ、日本、イギリス及びスイスが共同して独自に行ったリングテストに結果を提供した。さらに、OECDにおいて開始された両生類の変態アッセイの標準化を目的としたリングテストに参加し、わが国においてフェーズ1の取りまとめ会議を開催し、フェーズ1の結果の取りまとめ及びフェーズ2用のプロトコル案の作成を行った。さらに、在来種であるツチガエルを試験動物とした予備実験を行い、陽性対照物質（T4）の濃度、温度及び飼育密度について適切な試験条件を確認した。

#### ビテロジェニンアッセイ

雄アフリカツメガエルを化学物質に曝露し、ビテロジェニン産生能力を測定することにより、化学物質のエストロジェン様作用の有無・程度を把握した。また、魚類と同程度の感度を有するアフリカツメガエル・ビテロジェニン測定用キットを開発した。

#### 性転換試験

アフリカツメガエルを用いて人為的に作出したZZ（雌：野生型アフリカツメガエル雌の染色体型はZW）と、ZZ（雄）とを交配することにより得られたF<sub>1</sub>（全雄）に対し、化学物質を曝露した個体の生殖腺における卵巣構造の発達を確認することにより、その個体の生殖腺への影響を評価した。陽性対照物質（17 $\beta$ -エストラジオール）による予備実験を行い、その有効性を確認した。

性転換試験の標準化を目指し、非曝露の個体の成長、発生を定義するため、変態アッセイの飼育方法に準じて F<sub>1</sub> (全雄) を飼育し、定期的に全長、尾長、発生段階及び生殖腺の発達について、測定、観察、記録を行い、標準データベースの原案を作成した。

(2) 試験管内 (in vitro) 試験

レセプターバインディングアッセイ

アフリカツメガエル・エストロジェンレセプター (ER) への結合能力を測定するアッセイを開発した。20 物質\*\*\* についてレセプターバインディングアッセイを実施した。さらに、放射性同位元素を用いて、ノニルフェノール、4-オクチルフェノールの K<sub>d</sub> 値を測定すると共に、ヒト、ウズラ及びメダカ受容体に対する結合性の種差の検討を行った。

(3) アフリカツメガエルの標準データベース作成

変態試験に際し正常な個体の成長、発生を定義するため、標準プロトコール (XEMA) に準じてアフリカツメガエルを飼育し、定期的に全長、尾長、発生段階及び生殖腺・甲状腺の発達について、測定、観察、記録を行い、アフリカツメガエルの標準データベースを作成した。この標準データベースについては、非曝露の対照群のデータとあわせて、(独) 国立環境研究所ホームページ上で公開している。( <http://w-edcdb.nies.go.jp/AMPH/atlas/index.html> )

6. 無脊椎動物

脊椎動物と全く異なる内分泌系を有する無脊椎動物において、化学物質による内分泌かく乱作用を初期評価するスクリーニング試験法の開発が OECD 専門家会合で求められている。数ある無脊椎動物の中でも比較的内分泌系の知見があり、試験生物として取扱の容易な枝角類のオオミジンコを用いて、スクリーニング試験法の開発に取り組んだ。オオミジンコは、単為生殖を行うため通常ほとんど雌しか存在しない。しかし、環境条件 (例えば、餌密度、日周期、個体群密度等) の変化により、雄仔虫が発生し有性生殖を行うことが知られている。しかし、これまでは化学物質がミジンコの性比に与える影響について、明確な知見は少なかった。

最近、幼若ホルモンの存在下で雄仔虫が発生するという報告があり、この現象について暴露試験や基礎的な知見の収集を行った結果、OECD の繁殖試験 (TG211) にエンドポイントとして親オオミジンコから発生する仔虫の性比を追加することにより、幼若ホルモン様物質のスクリーニングに使える可能性が示唆された。

十分な科学的知見がないながらも、幼若ホルモンのオオミジンコへの影響を評価するスクリーニング試験として TG211 の改訂となる enhancedTG211 を OECD/WNT 会議 (2004 年 5 月) に提案し、今後は EDTA 等の OECD 専門家会合において審議検討される予定である。また、必要な科学的基礎となる標準化試験 (リングテスト: リードラボは日本、国立環境研究所) も行う予定である。

【26 物質\*、4 物質\*\*、20 物質\*\*\* について】

26 物質\*

ヘキサクロロベンゼン、ヘキサクロロシクロヘキサン、p,p'-DDT、o,p'-DDT、p,p'-DDE、p,p'-DDD、トリブチルスズ、4-オクチルフェノール、ノニルフェノール、フタル酸ジ-n-ブチル、フタル酸ジシクロヘキシル、フタル酸ジ-2-エチルヘキシル、オクタクロロスチレン、ベンゾフェノン、トリフェニルスズ、フタル酸ジエチル、フタル酸ブチルベンジル、アジピン酸ジ-2-エチルヘキシル、ペンタクロロフェノール、アミトロール、ビスフェノールA、2,4-ジクロロフェノール、4-ニトロトルエン、フタル酸ジペンチル、フタル酸ジヘキシル及びフタル酸ジプロピル

4 物質\*\*

4-オクチルフェノール、ノニルフェノール、フタル酸ジ-n-ブチル及びビスフェノールA

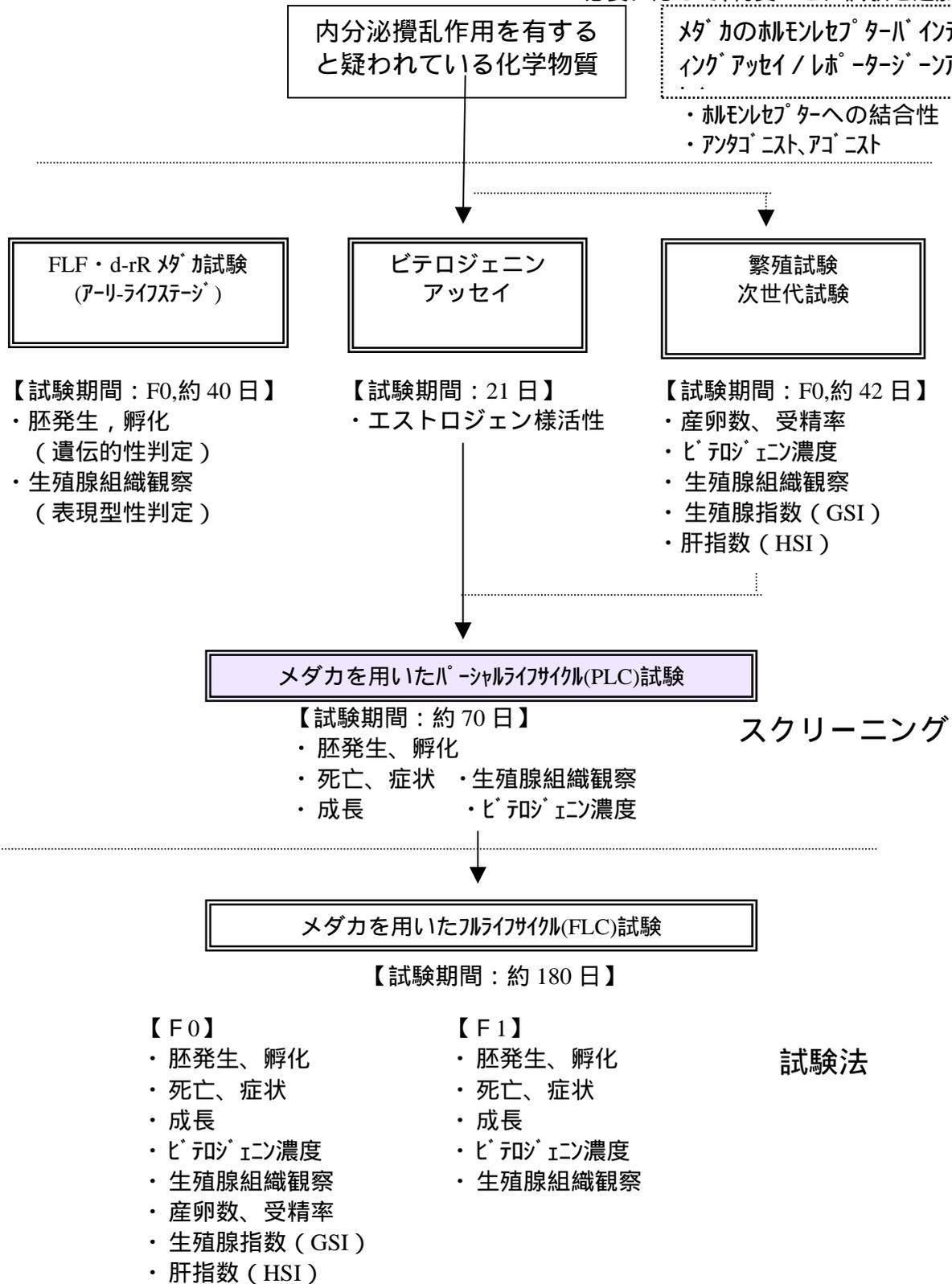
20 物質\*\*\*

トリブチルスズ、4-オクチルフェノール、ノニルフェノール、フタル酸ジ-n-ブチル、フタル酸ジシクロヘキシル、フタル酸ジ-2-エチルヘキシル、オクタクロロスチレン、ベンゾフェノン、トリフェニルスズ、フタル酸ジエチル、フタル酸ブチルベンジル、アジピン酸ジ-2-エチルヘキシル、ペンタクロロフェノール、アミトロール、ビスフェノールA、2,4-ジクロロフェノール、4-ニトロトルエン、フタル酸ジペンチル、フタル酸ジヘキシル及びフタル酸ジプロピル

(別添)

# 内分泌攪乱化学物質の魚類への影響評価のための試験体系について

必要に応じて、物質ごとに試験を追加する。



(参考)

## SPEED '98 にリストアップされている物質のリスク評価

