

魚類、両生類及び無脊椎動物に係る試験法開発及び国際協力について(案)

EXTEND2010では、化学物質の内分泌かく乱作用が環境中の生物に及ぼす影響を評価するため、引き続き魚類、両生類及び無脊椎動物を対象とする試験法の開発を進めている。また、開発した試験法については、関係各国と協力しながら、OECDにおいてテストガイドライン(TG)として採用するよう積極的に提案していく予定である。

これらの試験法の概要、平成25年度の検討結果及び平成26年度の検討内容(案)は、以下のとおりである。

I. 試験法開発について(参考資料3-1参照)**1. 魚類の試験法開発について****(1)魚類短期繁殖試験(OECD TG229)**

本試験は、化学物質のエストロゲン、アンドロゲン、抗エストロゲン様作用及びアロマターゼ阻害作用に加えて、視床下部—下垂体—生殖腺軸への影響を検出できるほか、化学物質の内分泌かく乱作用による繁殖行動、卵質や精子形成への影響等の検出も期待できるものである。

平成24年度に日本の提案に基づき、メダカを試験生物として用いる場合の試験条件を含む改訂版が採択されており、それを受けて平成25年度は、過年度までに検証試験が実施されていない陰性物質(ドデシル硫酸ナトリウム)及びプロゲステロン(黄体ホルモン)を用いた検証試験を実施した。

平成26年度は、これまでにメダカを用いた長期確定試験が実施されている各種作用(エストロゲン作用、アンドロゲン作用及びアロマターゼ阻害作用物質等)の陽性対照物質等を用いて検証試験を実施し、知見の収集並びに本試験法の内分泌かく乱作用の有害性評価への適用性及び有効性等に関する検討を進める。

(2)メダカ抗アンドロゲン作用検出試験(仮称)

メダカ抗アンドロゲン作用検出試験(仮称)は、オスの二次性徴として臀びれに形成される乳頭状突起を主要なエンドポイントとして開発中の、試験物質のメダカに対する抗アンドロゲン作用の有無等を調べる試験法である。

平成25年度は、抗アンドロゲン作用の陽性対照物質(フルタミド)を試験物質として、検証試験を実施し、試験法の妥当性及び課題の整理並びに試験条件等の検討を行った。

平成26年度は、平成25年度に引き続き、検証試験を実施し、試験法の標準化に向け

た試験条件等(供試生物数、試験期間、供試メダカの週齢など)の検討を行う。

(3)メダカ多世代試験(Medaka Multi-generation Test, MMT)

本試験は、化学物質の母体から卵への移行等に伴う次世代あるいは次世代から次々世代への影響を調べることを目的として、メダカを複数の世代にわたり長期間、化学物質へのばく露を行う試験である。メダカの生活史の各ステージ(発育段階)における内分泌かく乱作用(エストロゲン、抗エストロゲン、アンドロゲン、抗アンドロゲン様作用、アロマターゼ阻害作用及び視床下部-下垂体-生殖腺軸への影響等)を含む化学物質の有害性(個体又は個体群レベルの影響)等を評価する。

本試験は、EXTEND2010 の第2段階試験として用いることを想定して米国との協力の下で開発を進めており、平成25年度は、過年度までに実施した検証試験の結果等を踏まえ、本試験法のテストガイドライン化に向けて、試験の方法及び条件に関わる課題(試験生物数、エンドポイント及びばく露期間等)についての検討を行った。

平成26年度は、試験プロトコルの詳細について日米間で合意し、OECD(WNT 会合)への提出に向けて、本試験法のテストガイドライン化に向けた検討を進める。

2. 両生類の試験法開発について

(1)両生類ライフサイクル試験(Larval Amphibian Growth and Development Assay, LAGDA)

本試験は、アフリカツメガエル *Xenopus laevis* を主たる試験生物として、両生類の変態(視床下部-下垂体-甲状腺軸)、生殖及び成長等への影響を評価する試験である。

本試験は日米二国間実務者会議での協議等により日米間で協力して開発を進めており、平成25年度は合意した試験プロトコルに従い、検証試験を実施した。

平成26年度は、平成25年度に引き続き、検証試験を実施するとともに、試験プロトコルの詳細について日米間で合意し、OECD(WNT 会合)への提出に向けて、本試験法のテストガイドライン化に向けた検討を進める。

(2)アフリカツメガエル幼生を用いる甲状腺シグナルアッセイ(Xenopus Embryonic Thyroid signaling Assay, XETA)

アフリカツメガエル幼生を用いる化学物質の甲状腺ホルモン様作用及び抗甲状腺ホルモン作用の簡易スクリーニング試験法である。本試験は、フランスからOECDにテストガイドライン化のためのプロジェクト提案書(SPSF)が提出され、現在、検証作業(リングテスト)が進められている。

平成25年度は、OECDが実施したリングテスト(フェーズ1)に参加し、本試験法の検証を行い、本試験法の有用性及び問題点等、知見の収集を行った。これらの結果も踏まえ、OECDにおいてリングテスト(フェーズ1)の報告書の作成が進められている。

平成 26 年度は、リングテストのフェーズ 2 が予定されていることから、これに参加することにより、平成 25 年度に引き続き、本試験法の有用性等についての検証を進める。

3. 無脊椎動物の試験法開発について

(1) ミジンコ多世代試験

ミジンコ多世代試験は、化学物質の影響を母体中(親ミジンコの体内)で受けた次世代のミジンコの産仔能力をエンドポイントとして、無脊椎動物での生物群の存続を考慮する試験である。

平成 25 年度は、検証試験を実施しており、平成 26 年度も引き続き検証試験を実施し、試験法の有効性等について検討する。

(2) ミジンコ簡易スクリーニング試験法

ミジンコ簡易スクリーニング試験は、オオミジンコの抱卵個体を試験生物として、幼若ホルモン様作用の有無を検出する試験である。

平成 25 年度は、検証試験を実施し、本試験法の簡易スクリーニング法としての妥当性及び有効性等を検証するとともに、基礎的なデータ及び知見の収集を行った。

平成 26 年度も引き続き、検証試験を実施し、本試験法の妥当性及び有効性等を検証する。

II. 国際協力について

1. 化学物質の内分泌かく乱作用に関する日米二国間協力について(参考資料 3-2 参照)

化学物質の内分泌かく乱作用に関する試験法が OECD においてテストガイドラインとして承認されるためには、各国共同で試験法の方法論や客観性、再現性を評価する必要がある。そのため日米二国間協力では、毎年、日米両国の実務者による会議(日米二国間実務者会議)を開催し、主に魚類、両生類及び無脊椎動物の生殖・繁殖影響を評価する試験について、試験法や試験条件等の技術的課題について検討を行い、さらに日米共同で研究や検証試験等を実施することにより、知見や情報等の共有を図りつつ、これら試験法の OECD でのテストガイドライン化に向けた取組みを進めている。

(1) 魚類の試験

魚類の試験については、メダカ多世代試験(MMT)についてテストガイドライン化に向けて試験法の開発を進めている。

(2) 両生類の試験

両生類の試験については、両生類ライフサイクル試験(LAGDA)の検証及びテストガイドライン化に向けた標準化を日米共同で進めている。

(3) 無脊椎動物の試験

無脊椎動物の試験については、日本ではミジンコを用いた多世代試験法、米国ではケンミジンコ及びアミを用いたフルライフサイクル試験/二世代繁殖試験の開発を進めていることから、日米共同でこれらの試験法及び試験結果の比較検証を進めている。

(4) 平成 26 年度の実施内容について(案)

平成 26 年度は、第 10 回日米二国間実務者会議(平成 26 年 9 月 9 日、10 日、米国ワシントン D.C.)を開催し、魚類の試験法(MMT)及び両生類の試験法(LAGDA)について、OECD への提出に向けたテストガイドライン案に関する協議等を行い、最終案を作成した。合意したテストガイドライン案を近日中に OECD に提出し、本年 12 月に予定されている OECD 生態毒性試験バリデーション管理会合に日米共同で対応する。

2. 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(参考資料 3-3 参照)

平成 11 年 3 月の G8 環境大臣会合における日英両国間の合意に基づき、日英共同研究事業が開始された。現在は、2009 年の合意に基づき平成 22 年度より開始された第 3 期日英共同研究として、4 つのコアプロジェクトを設定し、実施している。

(1) 平成 25 年度の成果及び平成 26 年度の実施内容(案)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。

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。

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

平成 25 年度は、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を行った。

平成 26 年度は、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を行う。

コアプロジェクト-2

平成 25 年度は、化学物質の抗アンドロゲン様作用を検出するための尻びれ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行った。

平成 26 年度は、メダカでのひれ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を行う。

コアプロジェクト-3

平成 25 年度は、各種魚類でのエストロゲン受容体のサブタイプごと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行った。

平成 26 年度は、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を行う。

コアプロジェクト-4

平成 25 年度は、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を行った。

平成 26 年度は、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を行う。

(2)今後の日英共同研究について(案)

本年度は第 3 期日英共同研究の最終年度に当たる。本事業については、試験法開発等に活用できる有用な知見の収集、欧州における動向を行政担当者から直接情報収集できる等、有効な成果をあげていることから、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において、平成 27 年度からの 5 年間を対象として、引き続き第 4 期日英共同研究を実施する方向で英国との間で必要な協議、手続きを進める。

魚類、両生類及び無脊椎動物に係る試験法開発の詳細

I. 魚類の試験法開発について

1. 魚類短期繁殖試験 (OECD TG229)

(1) 試験法の概要

魚類短期繁殖試験は、魚類 21 日間スクリーニング試験 (OECD TG230) のエンドポイント (ビテロゲン濃度及び二次性徴) に産卵数を付加し、化学物質のエストロゲン、アンドロゲン及び抗エストロゲン様作用、アロマターゼ阻害作用に加えて、視床下部—下垂体—生殖腺軸への影響を検出できるほか、化学物質の内分泌かく乱作用による繁殖行動、卵質や精子形成への影響等の検出も期待できる。

本試験法については、平成 21 年 (2009 年) に OECD TG229 として採択されたが、ファットヘッドミノーを主たる試験魚として米国により提案されたものであったことから、日本よりメダカを用いた試験条件等についての修正提案を行い、平成 24 年 (2012 年) にメダカを試験生物として用いる場合の試験条件を含む改訂版が採択されている。

(2) 平成 25 年度の検討結果

本試験法については、メダカを試験生物として、作用モードが既知の物質 (陽性対照物質) 等を用いた検証試験を実施し、基礎的なデータ及び知見等の蓄積を図るとともに、内分泌かく乱作用の有害性評価への適用性及び有効性の検討等を行っている。

平成 25 年度は、過年度までに検証試験が実施されていない陰性物質 (既存知見等から魚類に内分泌かく乱作用を示さないと想定される物質) のドデシル硫酸ナトリウム及びプロゲステロン (黄体ホルモン) を用いて検証試験を実施した。ドデシル硫酸ナトリウムについては、肝臓ビテロゲン濃度、二次性徴に有意な変化はみられなかったが、受精率において有意な低下がみられた。また、プロゲステロンについては、肝臓ビテロゲン濃度に有意な変化はみられなかったが、雌において尻びれに乳頭状突起 (雄の二次性徴) の発現及び濃度依存的な増加がみられたほか、産卵数及び受精率にも有意な低下がみられ、プロゲステロン作用を持つ物質がメダカの繁殖に有意な影響を示す可能性があることなど有用な知見を得ることができた。

(3) 平成 26 年度の検討内容

平成 26 年度は、これまでにメダカを用いた長期確定試験が実施されている化学物質 (エストロゲン及びアンドロゲン作用等の陽性物質等) を用いて検証試験を実施し、知見の収集並びに本試験法の内分泌かく乱作用の有害性評価への適用性及び有効性等に関する検討を進める。

2. メダカ抗アンドロゲン作用検出試験（仮称）

（1）試験法の概要

化学物質の抗アンドロゲン作用については、OECD の TG229 や TG230 では作用を検出できないと考えられている。メダカでは、アンドロゲンの作用によって、オスの二次性徴として尻びれに乳頭状突起が形成されることから、これを主要なエンドポイントとして化学物質の抗アンドロゲン作用を検出（スクリーニング）できる試験法の開発及び検証を進めている。

メダカ抗アンドロゲン作用検出試験（仮称）は、OECD TG229 と TG230 を参考とする試験デザインであり、二次性徴の発現前の幼若期にあるメダカを供試魚として、28 日間程度の期間、化学物質によるばく露を行い、ばく露終了時の遺伝的雄個体における尻びれの乳頭状小突起数の低下を指標として試験物質のメダカに対する抗アンドロゲン作用の有無等を調べる試験法である。

（2）平成 25 年度の検討結果

本試験法については、平成 23 年度から抗アンドロゲン作用の陽性物質（フルタミド、ビクロゾリン）を用いて検証試験を実施し、試験法の妥当性及び有効性並びに試験条件等について検討を行っている。

平成 25 年度は、フルタミドを試験物質として、魚類性発達試験（OECD TG234）に準じて、受精卵から性分化期までばく露を行う検証試験を実施し、得られた結果と過年度に実施したメダカ抗アンドロゲン作用検出試験の結果との比較等により、試験法の妥当性及び課題の整理並びに試験条件等の検討を行った。

（3）平成 26 年度の検討内容

平成 26 年度は、平成 25 年度に引き続き、これまでに実施した検証試験の結果等を踏まえて、試験法に関わる課題の整理及び検討を進めるとともに、既存文献等において魚類に対する抗アンドロゲン作用を示すことが示唆されている化学物質を用いた検証試験を実施し、試験法の標準化に向けた試験条件等（供試生物数、試験期間、供試メダカの週齢など）の検討を行う。

3. メダカ多世代試験

（1）試験法の概要

メダカ多世代試験は、化学物質の母体から卵への移行等に伴う次世代あるいは次世代から次々世代への影響を調べることを目的として、メダカを複数の世代にわたる長期間、化学物質へのばく露を行う試験である。本試験では、各世代において、ビテロゲニン濃度、生殖腺組織、二次性徴、性比の偏り（遺伝的性と表現型のギャップ）、繁殖（産卵数及び受精率等）及び成長等のエンドポイントを調べ、メダカ的生活史の各ステージ（発育段階）における内分泌かく乱作用（エストロゲン、抗エストロゲン、アンドロゲン及

び抗アンドロゲン様作用、アロマターゼ阻害作用及び視床下部一下垂体—生殖腺軸への影響等)を含む化学物質の有害性(個体又は個体群レベルの影響)等々を評価する。

本試験法については、SPEED'98 で用いたフルライフサイクル試験(日本提案)と二世代繁殖試験(米国提案)をもとに、日米間で各種作用物質を用いた検証試験等々を実施してデータ及び知見の蓄積を図るとともに、試験法の適正化に向けた検討を行っている。なお、本試験法については、平成 20 年度に「メダカを用いたフルライフサイクル試験/多世代試験」に関する提案書を日米共同で OECD に提出し、日米共同で OECD でのテストガイドライン化に向けた取組みを進めている。

(2) 平成 25 年度の検討結果

平成 25 年度は、過年度までに実施した検証試験の結果等々を踏まえ、本試験法のテストガイドライン化に向けて、試験の方法及び条件に関わる課題(試験生物数、エンドポイント及びばく露期間等)についての検討を行った。

(3) 平成 26 年度の検討内容

平成 26 年度は、OECD (WNT 会合) への提出に向けて、本試験法のテストガイドライン(案)の作成を行う。

II. 両生類の試験法開発について

1. 両生類ライフサイクル試験

(1) 試験法の概要

両生類のライフサイクル試験については、当初、米国から提案されたニシツメガエル *Xenopus (Silurana) tropicalis* を試験生物として、受精 48 時間後の幼生から性成熟期まで約 10 か月間にわたりばく露を行い、変態完了期及び性成熟期に、エンドポイントとして、体重、頭胴長、血中ビテロゲン濃度、性比、GSI 及び精子数等を測定することにより、両生類の発達、成長及び繁殖への影響を調べる試験法 (Amphibian Development, Growth and Reproduction Assay: ADGRA) の開発及び検証を進めてきた。しかし、ADGRA については試験期間が非常に長く多大なコストを要することなどから、試験期間の短縮及びエンドポイントの変更を図った代替の試験法として幼若期両生類の成長・発達試験 (Larval Amphibian Growth and Development Assay: LAGDA) のプロトコル案が米国より提案された。

LAGDA は、アフリカツメガエル *X. laevis* を主たる試験生物として、受精 1 日以内の胚 (N.F. stage 8~10) から変態完了 10 週間後までの期間、化学物質へのばく露を行い、変態完了の直前(幼生期)において N.F. stage 62 に達するまでに要した日数、頭胴長及び体重等、ばく露終了時(幼若期)において性比(遺伝的及び表現型)、生殖腺や輸精管等の組織、頭胴長及び体重等のエンドポイントを調べることにより、両生類の変態(視

床下部—下垂体—甲状腺軸)、生殖及び成長等への影響を評価する試験である。

(2) 平成 25 年度の検討結果

LAGDA については、平成 23 年度から、種々の作用モードの陽性物質を用いて検証試験を実施し、試験法の妥当性及び課題並びに試験条件等の検討を進めている。平成 25 年度は、日米二国間実務者会議での協議等により日米間で合意した試験プロトコルに従い、両生類の甲状腺軸に対して影響(変態阻害作用)を示すとされる過塩素酸塩(パークロレート)を用いて、両生類変態試験(OECD TG231)との比較検証を目的に、ばく露期間を幼生期までとする検証試験を実施した。その結果、甲状腺組織の変化とあわせて、N.F. stage 62 への到達日数の有意な増加(変態遅延)が検出できたことから、両生類の変態(甲状腺軸)への影響の評価における本試験法の有効性が確認された。

(3) 平成 26 年度の検討内容(案)

平成 26 年度は、平成 25 年度に引き続き、日米間で合意した LAGDA の試験プロトコルに従い、両生類に対して変態阻害作用を示すことが知られているプロピルチオウラシルを用いて、ばく露期間を幼生期までとする検証試験を実施し、両生類変態試験(OECD TG231)との比較等により、両生類の変態(視床下部—下垂体—甲状腺軸)の評価における本試験法の有用性等について検討する。

また、OECD(WNT 会合)への提出に向けて、本試験法のテストガイドライン(案)の作成を行う。

Ⅲ. 無脊椎動物の試験法開発について

1. ミジンコ多世代試験

(1) 試験法の概要

ミジンコ多世代試験は、化学物質の影響を母体中(親ミジンコの体内)で受けた次世代のミジンコの産仔能力をエンドポイントとして、無脊椎動物での生物群の存続を考慮する試験である。本試験法については、平成 19 年度から試験法の開発及び検証を行っている。当初(平成 19 年度及び 20 年度)は、試験生物とすることを想定しているオオミジンコ *Daphnia magna* を用いて検証試験を実施し、親ミジンコへのばく露の次世代への影響等についての検討等を行ったが、平成 21 年度以降は、世代期間が短く、短期間で試験を実施できるニセネコゼミジンコ *Ceriodaphnia dubia* も加えて、カナダ環境省によるミジンコ亜急性毒性試験法(Test of Reproduction and Survival Using the Cladoceran *Ceriodaphnia dubia*)を参考に、試験期間の短縮、労力の軽減なども勘案しつつ、試験法の妥当性及び有用性並びに適切な試験条件や試験手法の検討等を進めている。

(2) 平成 25 年度の検討結果

平成 25 年度は、過年度に検討したオオミジンコを試験生物とする多世代試験のプロトコルに準じて、フィプロニル及びペルフルオロオクタンスルホン酸塩を用いて検証試験を実施した。その結果、両物質とも、経世代影響（子世代における産仔数の低下等）はみられなかったが、子世代（第二世代）において親世代（第一世代）で化学物質にばく露した系とばく露していない系の比較によって経世代影響を検証することの有効性が示唆された。

(3) 平成 26 年度の検討内容

過年度までに実施したオオミジンコを用いた検証試験の結果等を取りまとめて、欧米で試験法の開発が進められているアミヤコペポッドとの感受性等の比較検証を行うとともに、過年度までに検討した試験プロトコルに準じてニセネコゼミジンコを用いた検証試験を実施し、平成 25 年度に引き続き、試験法の有効性等について検討する。

2. ミジンコ簡易スクリーニング試験法

(1) 試験法の概要

化学物質の幼若ホルモン様作用については、仔虫の性別をエンドポイントに評価する試験法がオオミジンコ繁殖毒性試験（OECD TG211）の ANNEX7 としてテストガイドライン化されている。しかし、オオミジンコ繁殖毒性試験は試験期間が長く、仔虫の性別判別など試験操作の難度も高い。オオミジンコでは、卵発生の特定の時期に短期間、幼若ホルモン様作用を持つ物質にばく露されることによってオス仔虫の生産が誘導されることが判明したことから、この研究成果を利用して、より短期間で化学物質の幼若ホルモン様作用を検出できる試験法の開発を進めている。

ミジンコ簡易スクリーニング試験は、オオミジンコの抱卵個体を試験生物として化学物質にばく露し、ばく露後に産出された 2 腹目の仔虫における性比（オス仔虫の出現）をエンドポイントとして幼若ホルモン様作用の有無を検出する最長で 1 週間程度の試験である。

(2) 平成 25 年度の検討結果

平成 25 年度は、過年度に取りまとめた試験プロトコルに準じて、ミジンコに対して幼若ホルモン作用を示す可能性が考えられる化学物質（マクロライドラクトン系殺虫剤）を用いて検証試験を実施し、本試験法の簡易スクリーニング法としての妥当性及び有効性等を検証するとともに、基礎的なデータ及び知見の収集を行った。検証試験の結果、アベルメクチン、ミルベクチン、イベルメクチンでオス仔虫の産生誘導が検出され、本試験法の有効性が確認できた。

(3) 平成 26 年度の検討内容

平成 26 年度は、平成 25 年度に引き続き、ミジンコに対して幼若ホルモン作用を示す可能性が考えられる化学物質（系殺虫剤等）を用いた検証試験を実施し、本試験法の妥当性及び有効性等を検証するとともに、基礎的なデータ及び知見の蓄積を図る。

化学物質の内分泌かく乱作用に関する日米二国間協力の詳細

1. 経緯

平成 16 年 1 月に開催された第 12 回日米合同企画調整委員会において、化学物質の内分泌かく乱作用問題に関して日米二国間の協力を進めることが合意され、この合意に基づき、化学物質の内分泌かく乱作用に関する日米二国間実務者会議（以下、日米会議）が開催されることとなった。平成 16 年度及び平成 17 年度には、化学物質の内分泌かく乱作用による生態影響評価に関する情報交換を目的として、それぞれ第 1 回（平成 16 年 9 月、東京）及び第 2 回（平成 17 年 6 月、ハワイ）の日米会議を開催した。平成 18 年度以降は、化学物質の内分泌かく乱作用に関する生態影響評価に関する情報交換に加え、日米両国が協力して、魚類等を用いて繁殖影響を評価する試験法について、技術的な課題等を明らかにして開発を進めることを目的としている。

2. 日米二国間協力における取り組み

化学物質の内分泌かく乱作用に関する試験法が OECD においてテストガイドラインとして承認されるためには、各国共同で試験法の方法論や客観性、再現性を評価する必要がある。そのため日米二国間協力では、毎年、両国の実務者による日米会議を開催し、主に魚類、両生類及び無脊椎動物の生殖・繁殖影響を評価する試験について、試験法や試験条件等の技術的課題について検討を行い、さらに日米共同で研究や検証試験等を実施することにより、知見や情報等の共有を図りつつ、これら試験法の OECD でのテストガイドライン化に向けた取り組みを進めている。各試験法に関する平成 25 年度までの取組みの成果は以下のとおりである。

(1) 魚類の試験

魚類の試験については、OECD の内分泌かく乱化学物質の試験及び評価の概念的枠組み（OECD Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disrupters）において Level 5 に位置づけられているメダカのフルライフサイクル試験法（SPEED'98 において 6 物質について確定試験として実施した試験）とメダカ二世代繁殖試験法（米国提案の試験法）の比較検証を行い、その結果等を踏まえて、メダカ多世代試験についてテストガイドライン化に向けて試験法の開発を進めている。なお、平成 21 年 4 月に、日米共同で Medaka Life Cycle (MLC)/Multi-generation Test (MMT) のテストガイドライン化のための新たなプロジェクトの提案書（SPSF）を OECD に提案、了承されており、これらの試験法開発については OECD テストガイドラインプログラムのもとで進めている。具体的には、平成 23 年度までに実施した強エストロゲン、弱エストロゲン、抗エストロゲン、

アンドロゲン様物質及びアロマトーゼ阻害作用物質を用いた検証試験の結果を基に、試験手法や試験条件に関わる課題等を整理するとともに、繁殖に関わるエンドポイント（産卵数及び受精率）に着目した統計学的検出力の解析など、試験法の標準化に向けた試験条件や技術的課題等についての検討を行っている。また、平成 24 年度には、第 8 回日米会議（平成 24 年 2 月、米国ワシントン D.C.）において日米間で合意したメダカ多世代試験法のプロトコル案に基づいて、エストロゲン様作用物質（エストロン）を用いた検証試験を実施し、その結果及び別途米国で実施した検証試験の結果等を踏まえて、平成 25 年度に開催した第 9 回日米会議（平成 25 年 10 月、米国ワシントン D.C.）において、テストガイドライン化に向けて試験法及び試験条件等の詳細についての検討を行った。なお、第 9 回日米会議に際して、米国より二世代目のばく露期間を短縮した新たな試験法（Medaka Reproduction Test: MRT）の提案がなされたが、日米間の協議により、この試験法と従来より検討している多世代試験（MMT）を合わせた"Medaka Extended One-generation Reproduction Test: MEOGRT"（メダカ拡張一世代繁殖試験）について、日米共同でテストガイドライン案の作成を進めることに合意した。

また、平成 21 年 9 月に OECD においてテストガイドラインとして採択された魚類短期繁殖試験（OECD TG229）について、米国で実施されたファットヘッドミノーでの検証試験等を参考に、平成 22 年度から、メダカを用いた検証試験を実施し、日米会議等において、試験結果の妥当性、試験条件や技術的課題等についての検討を行い、それらを踏まえて、平成 24 年 4 月の OECD WNT 会合において、メダカを試験生物とする場合の試験条件等について修正提案を行った。TG229 については、日本から提案を含む修正がなされた改訂版が平成 24 年 10 月に採択されている。

（2）両生類の試験

両生類の試験については、日米で進められてきたニシツメガエル等を用いた研究において、変態完了時(ステージ 66)までのエストロゲン物質へのばく露により、生殖腺の変化や雄でのピテロゲニン誘導等が見出されており、これらをエンドポイントとするライフサイクル試験法（プロトコル）の検証及びテストガイドライン化に向けた標準化を日米共同で進めている。平成 21 年 3 月には、ニシツメガエルを用いる両生類の発達、成長及び生殖への影響を評価するライフサイクル試験法である"Amphibian Development, Growth and Reproduction Assay: ADGRA"（両生類の発達・成長・繁殖試験）の開発についての提案書（SPSF）を日米共同で OECD に提出し、承認されている。これを受けて平成 21 年 7 月に ADGRA の試験プロトコル案が作成され、以降、日米共同で検証試験を実施し、試験条件や試験法に関わる技術的課題や妥当性等に関する検証を行っている。なお、平成 22 年 4 月には、ADGRA を一部修正した"Larval Amphibian Growth and Development Assay: LAGDA"（幼若期両生類の成長・発達試験）の試験プロトコル案が米国から提案、日米間で同試験法に変更することに合意したことを受けて、OECD に提出した SPSF についても LAGDA のガイドライン化に変更され、以降、日米が共同で LAGDA の検証試験を実施するとともに、テストガイドライン化に向けて技術的な課題等の整理及び試験法の標準化の

ための検討を行っている。平成 24 年度には、第 7 回日米会議（平成 23 年 2 月、東京）において日米間で合意した試験プロトコル案に従い、抗エストロゲン様作用物質（タモキシフェンクエン酸塩）を用いて検証試験を実施し、その結果等を踏まえて平成 25 年度に開催した第 9 回日米会議（平成 25 年 10 月、米国ワシントン D.C.）において、LAGDA のテストガイドライン化に向けて試験法及び試験条件等の詳細についての検討を日米共同で進めることに合意した。

（3）無脊椎動物の試験

無脊椎動物の試験については、日本ではミジンコを用いた多世代試験法、米国ではケンミジンコ及びアミを用いたフルライフサイクル試験/二世世代繁殖試験の開発を進めていることから、日米共同でこれらの試験法及び試験結果の比較検証を進めている。具体的には、有機フッ素系界面活性剤、除草剤、殺虫剤等を用いてミジンコ多世代繁殖試験法の検証試験を実施し、米国での同一物質を用いたケンミジンコ及びアミでの試験結果との感受性の比較等を行うとともに、試験条件や試験法に関わる技術的課題等についての検討を進めている。平成 24 年度には、これまでに検討したニセネコゼミジンコ又はオオミジンコを用いた多世代試験の試験法プロトコルに従い、米国で実施されたケンミジンコ及びアミでの試験結果との比較等を目的に日米会議で合意した物質（アトラジン、ケトコナゾール、ピリプロキシフェン）を用いて試験を実施し、それらの結果等を平成 25 年度に開催した第 9 回日米会議（平成 25 年 10 月、米国ワシントン D.C.）において報告するとともに、引き続き、無脊椎動物の試験について感受性の比較など、日米間で情報交換を行いつつ、試験法の標準化に向けた検討を進めることに合意した。

3. 平成 26 年度の実施内容

第 10 回日米会議を平成 26 年 9 月 9～10 日に米国ワシントン D.C.において開催し、主に魚類の試験法及び両生類の試験法について、OECD への提出に向けたテストガイドライン案に関する協議等を行った。会議の結果（成果及び日米間の合意事項等）は以下のとおりである。

（1）魚類の試験

メダカ多世代試験法については、第 9 回日米会議において名称を MEOGRT に変更することに合意したが、OECD へ提出するガイドライン案の名称は、日米共同で OECD に提案した SPSF に記載の試験名である Medaka Multigeneration Test (MMT) とすることに合意した。また、今回の日米会議において、これまでの日米共同で実施した検証試験の結果等を踏まえて、MMT のガイドライン案（最終案）を作成した。なお、MMT ガイドライン案については、近日中に OECD 事務局へ提出予定である。

今後、OECD において MMT ガイドライン案に対するコメンティングラウンド（ピアレビュー）が実施される予定であり、日米共同で OECD 加盟国等からのコメント等へ対応する予定である。

(2) 両生類の試験

今回の日米会議において、これまでの日米共同で実施した検証試験の結果等を踏まえて、LAGDA のガイドライン案（最終案）を作成した。なお、LAGDA ガイドライン案については、日米会議後、米国において若干の追加修正（ANNEX の追加）を行い、近日中に OECD 事務局へ提出予定である。

今後、OECD において LAGDA ガイドライン案に対するコメンティングラウンド（ピアレビュー）が実施される予定であり、日米共同で OECD 加盟国等からのコメント等へ対応する予定である。

(3) その他

化学物質の内分泌かく乱作用に関する試験法の開発等に関して、OECD へのテストガイドラインの提案も視野に情報交換を行っていくことに合意した。また、日米共同で優先的に調査する物質の選定や化学物質の内分泌かく乱作用に関するスクリーニングやリスク評価の取組み等について、引き続き日米間で情報交換等を行っていくことに合意した。

化学物質の内分泌かく乱作用に関する日英共同研究の詳細

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 か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 か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. 第3期日英共同研究での実施内容及び成果について

第3期の日英共同研究では、各コアプロジェクトにおいて、平成22年度から25年度までの4か年に、以下の課題に関わる調査・研究を実施した（第3期の4か年に得られた研究成果の概要は別添1のとおり）。

コアプロジェクト-1

- ・生活排水由来のエストロゲン類及びその他の化学物質（医薬品類等）の河川（放流先水域）における濃度及び挙動等の実態把握（平成22～24年度）
- ・生活排水由来のエストロゲン類及びその他の化学物質（医薬品類等）の下水処理過程における濃度等の挙動及び除去プロセス等の把握（平成22～24年度）
- ・生活排水由来の化学物質（エストロゲン類、医薬品類等）の数理モデルによる環境中濃度の予測手法の検討（平成22～25年度）
- ・メダカのエストロゲン受容体等を用いるレポータージーン試験法の環境試料（河川水等）への適用性の検討（平成23～25年度）
- ・生活排水に含まれる(抗)エストロゲン作用を示す可能性がある化学物質の特定（平成24年度）

コアプロジェクト-2

- ・イトヨを用いる抗アンドロゲン作用の検出試験法の適用性及び指摘条件等の検討（平成22年度）
- ・試験に用いる魚類での抗アンドロゲン物質に対する感受性や種差等の検討（平成23～24年度）
- ・魚類と両生類のエストロゲン物質に対する感受性や精巣卵形成等の種間差の検討（平成23年度）
- ・化学物質の抗アンドロゲン作用を検出するためのメダカを用いる試験法に関わる試験条件及びエンドポイント等の検討（平成24～25年度）

コアプロジェクト-3

- ・魚類におけるエストロゲン受容体を介した転写活性の種間差及びそのメカニズム等の検討（平成22～24年度）
- ・メダカの各種ホルモン受容体（アンドロゲン、甲状腺ホルモン、副腎皮質ホルモン）を用いるレポータージーン試験系の検討（平成22～25年度）
- ・両生類（ニシツメガエル等）の甲状腺ホルモン受容体を用いるレポータージーン試験系の検討（平成22年度）
- ・ホルモン受容体に対する化学物質の複合ばく露の影響及び作用機構等の検討（平成24～25年度）
- ・魚類におけるエストロゲン受容体のサブタイプの機能及びそれらに対する化学物質の作用機構等の検討（平成24～25年度）

コアプロジェクト-4

- ・野生の両生類（トノサマガエル）を対象とした個体群レベルでの精巣卵の発現状況等の実態把握（平成 22～25 年度）
- ・室内実験等に基づくトノサマガエルでの精巣卵発現とエストロゲン物質によるばく露との関連性等の検討（平成 24～25 年度）
- ・過去に実施された調査サンプルとの比較等による野生のトノサマガエルにおける精巣卵形成に関わる要因の検討（平成 23～25 年度）
- ・野生の海産魚類(ボラ、マハゼ等)を対象とした個体群レベルでの精巣卵の発現状況、血中ビテロゲニン濃度等の実態把握（平成 23～25 年度）
- ・野生の海産魚類及び貝類を対象とした化学物質の内分泌かく乱作用等の調査に適用するための新たなバイオマーカー等の検討（平成 24～25 年度）

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・評価につながる調査研究を実施した（詳細は別添 2 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 3 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様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腎びれ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ごと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

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様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

メダカでのひれ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様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

第 3 期日英共同研究での平成 22～25 年度の成果（概要）について

日英共同研究の第 3 期では、4 つのコアプロジェクトにおいて、日英両国の研究者が共同で調査・研究を実施している。平成 22 年度から 25 年度までの 4 か年に得られた成果（概要）は以下のとおりである。

コアプロジェクト-1

- ・生活排水（下水）由来のエストロゲン類に関して、下水処理場での除去率、河川での分解速度等の知見を蓄積するとともに、環境中濃度を推定するモデルを構築した。
- ・下水中の医薬品類に関して、16 処理場で 92 物質を対象とした調査を行った結果、流入下水から 86 物質、放流水から 85 物質が検出された。このうち検出濃度が物質を対象に汚泥処理装置を用いた実験を行い、活性汚泥処理過程における挙動実態及び除去率などの知見を得た。また、光分解性や吸着性の高い医薬品類について、環境実態を把握し、太陽光強度の時間変動に対応した確率論的モデル（光分解モデル）を構築した。
- ・ヒト及び各種魚類のエストロゲン受容体 α ($ER\alpha$) を用いるレポータージーンアッセイの環境試料への適用を検討した。魚類では、メダカ $ER\alpha$ が環境試料の評価に鋭敏であることがわかった。また、下水試料中には、ヒトやメダカの $ER\alpha$ に対して抗エストロゲン作用を示す物質が存在し、エストロゲン様作用を抑制している可能性を見出した。

コアプロジェクト-2

- ・イトヨを用いる抗アンドロゲン作用検出試験に関して、至適な試験条件や試験に供する個体群の継代維持など、実際に試験を実施する際に必要な知見を蓄積した。
- ・ニシツメガエルに関して、エストロゲン物質でのばく露による精巣卵形成はメダカと同程度の感受性があり、清水で飼育しても精巣卵は性成熟後まで消失しないことがわかった。
- ・メダカに関して、新たな試験法の開発に資するため、アンドロゲンにより尻びれに形成される乳頭状小突起（二次性徴）について基礎的知見を収集した。メダカの乳頭状小突起の形成は、イトヨにおけるスピギン mRNA の発現と、アンドロゲンに対する応答性についてはほぼ同等であるが、個体間のばらつきが小さいことから化学物質の抗アンドロゲン作用の検出精度が高いことが明らかとなった。また、尻びれの伸長にもアンドロゲンが不可欠であり、これらの形質が新たなエンドポイントとなる可能性を見出した。

コアプロジェクト-3

- ・レポータージーンアッセイなどによる解析結果から、メダカの $ER\alpha$ は、コイ科のローチやコイの $ER\alpha$ よりもエストロゲン様作用を持つ化学物質に対する感受性が高く、これら魚類での ER を介した化学物質に対する転写活性の種間差にはリガンド結合ドメイ

ンの寄与が大きいことが明らかとなった。また、アンドロゲン様又は抗アンドロゲン様作用物質は、エストロゲン様作用物質を持つ化学物質と複合的にばく露しても、ER α に対する化学物質のエストロゲン様活性にほとんど影響を与えないことがわかった。

- メダカに関して、アンドロゲン受容体 (AR)、グルココルチコイド受容体 (GR)、ミネラルコルチコイド受容体 (MR)、甲状腺ホルモン受容体 (TR)、黄体形成ホルモン (LH) 受容体、卵胞刺激ホルモン (FSH) 受容体のレポーター遺伝子アッセイ系を構築した。また、ニシツメガエル及びアフリカツメガエルに関して、甲状腺ホルモン受容体のレポーター遺伝子アッセイ系を構築した。
- メダカの尻びれの乳頭状小突起形成に関して、機能的な遺伝子 (Bmp7 及び Lef1) を発見し、これら遺伝子の発現変化が化学物質のアンドロゲン及び抗アンドロゲン作用に対する高感度なマーカー遺伝子となり得る可能性を見出した。

コアプロジェクト-4

- 野生のトノサマガエルを対象とした調査を行い、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に由来し、性成熟期の精子形成開始に伴い形成が起こること、形成された精巣卵が成熟後も残存することなどが明らかとなった。また、1970年代に採集されたサンプルとの比較から、野生のカエルを対象とする調査では、1 個体あたりの精巣卵発現数やそれらサイズなども重要な指標となることを見出した。
- トノサマガエルの幼生を用いたばく露実験から、トノサマガエルでは、0.03 nM (8.9 ng/L) の低濃度のエチニルエストラジオールへのばく露においても、肥大卵母細胞 (精巣卵) が形成された間性生殖腺を有する個体を生じることがわかった。
- 海産魚のボラを対象とした調査を行い、下水処理施設の周辺で採集した個体では血中ビテロゲニン濃度は低いものの、精巣卵が形成された個体の比率が高く、性分化期に長期にわたりエストロゲン様作用を持つ物質の影響を受けている可能性を見出した。また、過去の調査結果との比較により、近年は相対的に血中ビテロゲニン濃度の減少がみられ、エストロゲン様物質の影響が低減している可能性があることなどがわかった。
- 貝類を用いる調査手法の開発に資するため、ムラサキイガイに関して、組織標本に基づく生体内構造や生殖腺の発達過程などの知見、エストロゲン物質でばく露した個体での生殖関連遺伝子の発現などの知見を取集した。

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、年間を通じ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様作用の大きさはエストロゲン様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腎ひれ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ばく露実験を行い、臀びれ鱭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、鱭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、フルタミドのばく露により、オス臀びれ乳頭状小突起ととも鱭条の節板総数も減少したことから、臀びれ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ごと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) 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ばく露し、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－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－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－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様作用の評価に向けたレポータージーン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(抗男性ホルモン様作用)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びれの乳頭状突起(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様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びれ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様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。