

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 カ年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、日英両国間の協議により、さらに 5 年間の延長が決定され、第 2 期目（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。また、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式が行われた。また、この第 3 期（2009～2014 年）の日英共同研究について、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. 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

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・知見及び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°C 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。また、日英の研究者が連携してコア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

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

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

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

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 期日英共同研究での新たな研究へ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。

(3) 平成 23 年度（2011 年）以降に取り組む研究テーマの考え方について（案）

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）の下で、本年 7 月に策定された EXTEND2010 に基づき、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。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。

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）

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）を解析及び評価するためには、これら物質の環境中（河川中）の濃度及び分解あるい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ばく露状況をできるだけ正確に把握又は推定することが重要である。

第 3 期の日英共同研究では、それらの推定手法（モデル化）の確立並びに環境リスクの解析及び評価への適用、管理対策への貢献を目的として以下のような研究テーマが考えられる。

(研究テーマの例)

- ・下水流入水及び放流水中の新たに注目されている汚染物質（エストロゲン及びその他の化学物質等）濃度等の調査、下水処理過程での分解及び副生成物等の挙動の解明並びにそれらの有効な除去方法及び除去機構等に関する研究
- ・下水放流水及び河川水（環境水）中の新たに注目されている汚染物質（エストロゲン及びその他の化学物質等）の濃度推定に適用可能な環境中での生物分解や光分解等を考慮した運命予測モデルの研究
- ・レポータージーンアッセイ (*in vitro* 試験) やメダカなどを用いたばく露試験 (*in vivo* 試験) 等の生物応答を利用した下水放流水又は河川水中の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 又は 3 との連携による研究）。

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）

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。

第 3 期の日英共同研究では、環境中の内分泌かく乱作用等を持つ化学物質等が野生生物に及ぼす又は及ぼす可能性がある悪影響について、その作用機構等の理解も含めて、評価手法の確立を目的とした以下のような研究テーマが考えられる。

(研究テーマの例)

- ・日本及び英国でばく露試験等に用いられる水生生物種（メダカ、ミジンコ等）をモデル動物とした化学物質の内分泌かく乱作用がそれらの生物種に及ぼす個体群レベルの影響を評価するためのエンドポイント及び試験手法等の研究。
- ・日本及び英国で開発された魚類試験法に用いる生物種における（抗）エストロゲン作用、（抗）アンドロゲン作用等の性分化、生殖機構及び繁殖行動等に及ぼす影響及びそれらの作用機構等に関する研究。
- ・日本又は英国の環境で野生生物への影響が問題となる可能性がある新たに注目されている汚染物質に関する研究（コアプロジェクト-1 又は 3 との連携による研究）。

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）

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の把握し、その原因あるいは影響を解析あるいは評価するためには、環境要因との

関連性等も含めて作用機序や作用機構の理解が不可欠である。

第 3 期の日英共同研究では、環境中の内分泌かく乱作用等を持つ化学物質等が野生生物に及ぼす又は及ぼす可能性がある悪影響について、遺伝子レベルでの作用機構等の理解及び新たな評価手法の確立を目的として以下のような研究テーマが考えられる。

(研究テーマの例)

- ・各種ホルモン受容体の生物種間差及びリガンド依存性等のメカニズム及び受容体を介する（抗）エストロゲン作用と（抗）アンドロゲン作用の相互関係等の研究
- ・生物試験（*in vivo* 試験）又は野生生物で観察される影響や変化の遺伝子レベルでの解析及び作用機構等に関する研究（コアプロジェクト-2 又は 4 との連携による研究）
- ・副腎皮質ホルモン受容体等のレポータージーンアッセイ系等の新たな評価系（*in vitro* 試験系）確立のための研究

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)

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あるいは評価するためには、野生生物において影響を疑われる事象の有無を含めてその実態を把握することが不可欠である。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）との比較検証等も必要である。

第 3 期の日英共同研究では、日本の野生生物における環境リスクに関連する知見の集積及び環境リスクの解析に向けて以下のような研究テーマが考えられる。

(研究テーマの例)

- ・野生両生類（トノサマガエル等）における精巣卵の発現状況等と個体群レベルでの影響の解析に資する調査研究
- ・野生魚類（淡水種又は海産種）における雄でのビテロゲニン及び精巣卵等の発現状況等の個体群レベルでの影響の解析に資する調査研究
- ・野生生物における個体群レベルでの影響把握のためのエンドポイント及び評価手法等の開発並びに環境因子との関連性等の影響発現のメカニズムに関する研究（コアプロジェクト-2 又は 3 との連携による研究）。
- ・環境リスクの解析及び評価へのモデル適用に関する研究