

## 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(案)

### 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きた。

平成 26 年 11 月の第 16 回ワークショップにおいて、日英共同研究を 2015 年からさらに 5 年間継続することに合意し、平成 27 年 4 月に、本事業の継続に関する合意文書に調印した。

### 2. 第 4 期日英共同研究について

第 4 期の日英共同研究では、第 16 回日英共同ワークショップにおける日英の研究者による議論等を踏まえて、新たに設定した 4 つのコアプロジェクトのもとで調査や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のスクリーニングのための各種メカニズムに対応する様々な分子メカニズムの解析並びに試験管内スクリーニングシステムや遺伝子組換え魚類の開発等に関する研究

#### コアプロジェクト-3

水生生物等に対する生殖や発達に対する影響を理解するための化学物質試験における

エンドポイントの評価等に関する研究

**コアプロジェクト-4**

内分泌かく乱化学物質と疑われる物質が個体群に及ぼす影響のシミュレーション並びに英国及び日本における野生生物への環境リスクの解析に関する研究

### 3. 平成 29 年度の成果について

平成 29 年度は、第 18 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、以下に示す内容について調査・研究を実施した（詳細は別添 1 のとおり）。

また、第 19 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平成 29 年 11 月 28 日、29 日に横浜市(新横浜プリンスホテル)で開催し、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った。

**コアプロジェクト-1**

環境中での医薬品類等の挙動を推定するための数理モデルの実河川への適用性等並びに下水処理過程及びレポータージーンアッセイ法等を用いた河川内等における医薬品類等の挙動(消長機構、医薬品類由来の生理活性の把握等)に関する検討

**コアプロジェクト-2**

遺伝子改変メダカ等の開発及びそれらを用いた分子、細胞、組織レベルでの内分泌かく乱作用の発現メカニズム等に関する検討

**コアプロジェクト-3**

化学物質の内分泌かく乱作用の試験に用いるメダカ等の試験生物種の供試における課題等に関する検討

**コアプロジェクト-4**

野生のカエルや沿岸海産魚等における精巣卵発現等の知見の蓄積及びそれらの化学物質等との関連性に関する検討

### 4. 平成 30 年度の実施内容について(案)

平成 30 年度は、第 19 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、平成 29 年度に引き続き、以下に示す内容について調査・研究を実施する。

また、英国にて開催予定の第 20 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(期日及び場所は未定)において、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

環境中での医薬品類等の挙動を推定するための数理モデルの実河川への適用並びに下水処理過程及び河川内等における医薬品類等の挙動及びレポータージーンアッセイ法等を用いた河川内等における医薬品由来の生理活性の把握等に関する検討

#### コアプロジェクト-2

遺伝子改変メダカ等の開発及びそれらを用いた分子、細胞、組織レベルでの内分泌かく乱作用の発現メカニズム等に関する検討

#### コアプロジェクト-3

化学物質の内分泌かく乱作用の試験に用いるメダカ等の試験生物を試験に用いる場合の課題等に関する検討

#### コアプロジェクト-4

野生のカエルや沿岸海産魚等における精巣卵発現等の知見の蓄積及びそれらの化学物質等との関連性に関する検討

## 平成 29 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に関する調査研究では、内分泌かく乱作用が疑われる化学物質及び医薬品類等について下水処理過程や環境中における挙動等に関する調査研究を行い、以下に示す成果を得た。

- 桂川とテムズ川における抗生物質の減衰速度の差異とその要因について検討を行った。アジスロマイシンとスルファピリジンに関しては、桂川とテムズ川において減衰速度定数が類似していたが、クラリスロマイシンの減衰速度定数は、テムズ川が桂川を大幅に上回っていた。クラリスロマイシンの減衰速度の河川間差異は、両河川の底質が有する収着容量の差異に起因することが示唆された。
- アジスロマイシンとレボフロキサシンの河川底質への収着には、疎水性吸着や錯体形成の影響は小さく、陽イオン交換が主な収着機構であると考えられた。また、環境水中の主要な無機陽イオンとの競合性が文献値と類似していたことから、アジスロマイシンやレボフロキサシンの底質への収着平衡定数の予測には、他の有機化学物質の収着平衡定数を用いて予測する基準物質法が適用できる可能性が示された。
- 神経伝達物質のトランスポーターの蛍光基質 APP を用いた *in vitro* アッセイ(抗うつ薬アッセイ)によって 9 種類の抗うつ薬の生理活性を測定し、抗うつ薬の特性にあった生理活性を定量できることが確認された。また、抗うつ薬の複合影響を検証し、その効果が相加的であることが明らかとなり、あわせて確立した抗うつ薬アッセイが複合影響を正確に定量できることも確認された。確立した抗うつ薬のアッセイ系を下水試料へ適用し結果、下水二次処理水や放流水から SSRI 又は SNRI 型の抗うつ薬の生理活性が検出された。

### コアプロジェクト-2

コアプロジェクト-2に関する調査研究では、化学物質の内分泌かく乱作用を把握するための分子生物学的アプローチによる影響評価に関する調査研究を行い、以下に示す成果を得た。

- 生体内での各エストロゲン受容体サブタイプの機能を明らかにするために、TALEN 法によりメダカの *esr1* をノックアウト(KO)して表現型解析を行った結果、メダカでは *Esr1* がなくても性決定・性分化、生殖への影響はほとんどみられなかったが、ビ

テロゲニン(vtg) 遺伝子の最大転写活性化に **Esr1** が必要であることを見出しなど、生物種によって異なるエストロゲン受容体の機能分化の一端が明らかとなった。

- 内分泌かく乱化学物質のエストロゲン作用に対する高感度な *in vivo* 遺伝子マーカーである vtg 遺伝子の発現制御機構を解明するために、*esr1* KO メダカのオスに EE2 をばく露し、遺伝子発現解析を行った結果、**Esr1** は *esr1* 遺伝子自身とともに vtg 遺伝子の転写活性を最大化するために必要であることを見出すなど、複雑な vtg 遺伝子発現制御メカニズムの一端が明らかとなった。
- 3 種あるエストロゲン受容体のそれぞれの機能や役割分担をより詳細に解析するためのツールとして *esr2a* 及び *esr2b* KO メダカを作出した。これらを用いた検討により、*esr2a* KO メダカのメスはほとんど産卵をしない不妊であることが見出され、今後、表現型解析やエストロゲン/エストロゲン様化学物質に対する反応性等の解析が可能になると考えられた。

### コアプロジェクト-3

コアプロジェクト-3に関する調査研究では、化学物質の内分泌かく乱作用を評価あるいは推定するための試験法に関する調査研究を行い、以下に示す成果を得た。

- ミナミメダカとキタノメダカについて、 $17\alpha$ -メチルテストステロンによるばく露を行い、メス個体における尻鰭の乳頭状小突起形成数を比較した結果、両種における節板数の違いなどを考慮した補正を行った場合でも、キタノメダカのアンドロゲン応答性はミナミメダカのそれに劣ることが示唆された。
- OECD TG234 に記載されている性判別用のプライマーを両種に適用し、遺伝的性判別を行った結果、ミナミメダカでは適用性が確認されたが、キタノメダカでは不適であった。そこで、両種の *DMY* 及び *DMRT1* の塩基配列を明らかにして、遺伝的性判別のためのユニバーサルプライマーの設計を試行したが、ミナミメダカでは適用性が確認されたものの、キタノメダカでは適用性が認められず、この原因として、キタノメダカのターゲット遺伝子、特に *DMY* 遺伝子の周辺領域の構造が複雑で PCR への適合性が低いことが示唆された。

### コアプロジェクト-4

コアプロジェクト-4に関する調査研究では、野生生物における個体群レベルでの影響等に関する調査研究を行い、以下に示す成果を得た。

- 野生のトノサマガエルを対象とした精巣卵の発現状況等に関する調査した。新潟県北部地域の個体群から採取した個体における精巣卵を有する個体の頻度等は過去 8 年間

の調査結果とほぼ同様であった。野生調査域で採集した卵塊から発生した個体の性比、卵精巣を持つ成熟雄個体の存在から、少数ではあるが、性転換した雄個体(XX雄)が存在する可能性が示唆された。

- 野生のトノサマガエルでの雌雄同体(卵精巣)の成因を検討するために、農薬流通量に関する文献調査を行い、調査フィールドにおけるエストロゲン合成阻害作用を有する水稻殺菌剤の推定使用量を整理(アーカイブ化)した。雌への性比の偏り、性転換雄(XX雄)の原因としては、実験の解析及び農薬流通調査の結果から、エストロゲン機能阻害によってもたらされた可能性が示唆された。
- ボラ(沿岸性海産魚)の卵膜構成タンパク質の一つである ZPC5 及び ZPB 遺伝子の解析を進め、測定系を確立した。長崎で捕獲したボラを用いて生殖腺、肝臓、下垂体、脳、鰾、腸、頭腎臓、心臓における *zpc5* と *zpb* の発現を調査した結果、雌では全ての器官において両遺伝子の発現し、生殖腺において最も高いことが確認されたが、雄では、生殖腺のみで *zpc5* の発現が確認された。一方で、予備的実験では、環境中のエストロゲン様物質の影響を受けている可能性の高い福岡で採集した雄のボラでは、生殖腺における *zpb* の発現が高い値を示したことから、*zpc5* と *zpb* のエストロゲン応答性は異なることが示唆された。
- 九州各地で捕獲したボラの生殖腺を組織学的観察した結果、福岡市中央区荒津の下水処理施設排水口周辺で捕獲したボラ雄の生殖腺に、体細胞の増殖と生殖細胞の減少等の異常が観察され、他の水域でも詳細な観察と解析を進める必要があることが示唆された。
- 英国テムズ川で捕獲され凍結保存されていたローチの生殖腺を用いた組織観察の実施に向けて、凍結サンプルの固定方法や観察可能な組織切片を作製できるか否かを検討した結果、精巣卵の出現観察などであれば、凍結サンプルも利用可能であることが明らかとなった。

## 第 19 回日英共同研究ワークショップの結果について

### 1. 開催概要

第 19 回化学物質の内分泌かく乱作用に関する日英共同ワークショップ(The 19th UK-Japan annual scientific workshop on research into environmental endocrine disrupting chemicals) は、下記のとおり開催された。

日時： 平成 29 年 11 月 28 日(火)、29 日(水)

場所： 横浜市(新横浜プリンスホテル)

出席者： 日本ー井口泰泉(研究統括者、横浜市立大学)、田中宏明(京都大学)、征矢野清(長崎大学)、瀧口博明(環境省)、他(計 22 名)  
英国ーチャールズ・タイラー(エクセター大学)、イオアナ・カチアダキ(環境・漁業・水産養殖科学センター)、アンドリュー・ジョンソン(生態水文センター)、ケイ・ウィリアムズ(環境・食料・農村地域省)、他(計 9 名)

### 2. 結果概要

第 19 回化学物質の内分泌かく乱作用に関する日英共同ワークショップでの報告及び協議事項等は下記のとおりであった。

#### (1) 日英共同研究における研究成果及び今後の計画について

両国の研究担当者より、各コアプロジェクトに関する研究成果についての発表が行われた。また、それらを踏まえて、今後の研究の方向性についての議論が行われた。

#### (2) 日英両国の研究者及び行政担当者等による情報交換等について

内分泌かく乱作用を含む化学物質の生態影響等に関する取組状況について、日本及び英国の参加者による報告及び意見交換等が行われた。また、今後も引き続き緊密に情報共有を行うことが確認された。

#### (3) 日英共同研究ワークショップについて

第 20 回日英共同研究ワークショップは、平成 30 年に英国で開催することが合意された。