

## 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

## 基本的な考え方

現在、環境省においては、内分泌攪乱化学物質の生態系への影響評価のため、スクリーニング・試験法について、OECD（経済協力開発機構）の国際的取組に協調しつつ開発を進めるとともに、確立した方法を用いて、リスク評価に取り組む優先物質について有害性評価を進めている。

魚類については、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する。

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*）試験を実施する。

なお、既にOECDに対しては、日本で進めている試験体系のスキーム図（別添）を提案するとともに、ノニルフェノール及びトリブチルスズの魚類を用いた内分泌攪乱作用のリスク評価結果を提出し、OECD加盟国の専門家の意見を聴取している。

鳥類については、日本ウズラを試験動物とし、ピテロジェニンアッセイ、クロアカ試験、性転換試験などのスクリーニング手法を開発し、確立した手法を用いて優先物質の有害性評価を行うとともに、確定試験としてOECDが提唱している「二世代繁殖毒性試験」のエンドポイントを設定するため、各種基礎的研究を実施する。

また、これらの試験結果を補完する目的で試験管内試験を実施する。

両生類については、アフリカツメガエル等を試験動物とし、変態アッセイ、ピテロジェニンアッセイなどのスクリーニング手法を開発する。

また、これらの試験結果を補完する目的で試験管内試験を実施する。

無脊椎動物を用いたスクリーニング・試験法の開発についても、平成14年度から着手する予定。

## 有害性評価の実施状況

## 1. 魚類

魚類に関する有害性評価結果(優先12物質のうち、ノニルフェノールとトリブチルスズを除く10物質)については、資料5を参照

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設定

## (1) スクリーニング

曝露濃度は、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）、全国一斉調査結果及び水中での検出限界値等を参考として、5群設定。

## 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・程度を把握する。

本アッセイについては、現在、優先 20 物質について試験を実施・終了。

ビテロジェニン：肝臓で合成される卵黄タンパク前駆体。

繁殖期の雌成魚で特に産生される。エストロジェン様物質に曝露された雄の肝臓でも産生される。

#### パーシャルライフサイクル試験

化学物質に受精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、生殖腺組織、ビテロジェニン産生等をエンドポイントとする。

本アッセイについては、既に優先 12 物質について試験を実施・終了。

#### 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、これらを用いたアーリーライフステージ試験法を開発中。

### (2) 確定試験

#### フルライフサイクル試験

少なくとも 2 世代にわたる曝露（約 170 日間）を行い、発達、成熟、繁殖期を含む全生涯を通しての影響をみる試験であり、孵化後の生存、成長、生殖腺組織、ビテロジェニン、産卵数、受精率等をエンドポイントとする。

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。

本アッセイについては、既にノニルフェノールについて試験が終了し昨年 8 月にリスク評価結果を公表するとともに、4-オクチルフェノール及びフタル酸ジ-n-ブチルについて試験を実施・終了。

### (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、優先 12 物質について試験を実施・終了。

#### レポータージーンアッセイ

レセプター遺伝子及びレポータージーンを導入したヒト子宮頸ガン由来 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、優先 12 物質について試験を実施・終了。

### (4) 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、下記の取組を進めている。

メダカの性分化制御に関わる遺伝子群 (P450<sub>scc</sub>、StAR など) の一部のクローニングを終了。

魚類の性決定遺伝子としてメダカ性決定遺伝子 (DMY) を初めて発見・同定 (参考 3 参照)。

世界的な科学雑誌である Nature 本年 5 月 30 日号に掲載。

Matsuda et al.

DMY is a Y-specific DM-domain gene required for male development in the medaka fish.  
Nature, 417: 559-563, 2002.

性分化に関わる遺伝子群を用いた DNA チップを作成するために、性分化の時期に発現している遺伝子を収集。

## 2. 鳥類

### (1) スクリーニング

#### ビテロジェニンアッセイ

雄日本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・程度を把握する。

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、優先 20 物質について試験を実施・終了。

#### クロアカ試験

日本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・程度を把握する。

現在、本アッセイの確立に向けたパイロット試験を実施している。

#### 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する。

現在、本アッセイについては、標準物質によるパイロット試験を実施している。

### (2) 確定試験

#### 二世世代繁殖毒性試験

「二世世代繁殖毒性試験」のエンドポイント、投与量・方法等を設定するため、平成 13 年度は、内分泌攪乱作用との関連性が指摘される 性分化・発達、生殖機能についての基礎的研究を実施。

### (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

化学物質の日本ウズラエストロジェンレセプター (ER 及び ER ) への結合能力を測定するアッセイを開発し、優先 12 物質について試験を実施・終了。

## 3. 両生類

### (1) スクリーニング

#### 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を 4 ~ 6 週間投与することにより、甲状腺ホルモン作用を検出する試験であり、尾の退縮などをエンドポイントとする。

平成 13 年度は、アフリカツメガエルを試験動物とした予備実験を行い、本アッセイの有効性を確認することができ、今後国際的なリングテストに参加する予定。

また、日本在来種であるツチガエルを用いた基礎的研究も進めている。

## ビテロジェニンアッセイ

雄アフリカツメガエルに化学物質を投与し、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・程度を把握する。

平成13年度は、アフリカツメガエルを試験動物とした本アッセイを確立することができ、今後ビテロジェニン測定用キットを作成する予定。

### (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

化学物質のホルモンレセプター（エストロジェンレセプターなど）への結合能力を測定するアッセイを開発する予定。

### 4. 無脊椎動物

平成14年度から無脊椎動物を用いたスクリーニング・試験法開発を進める。

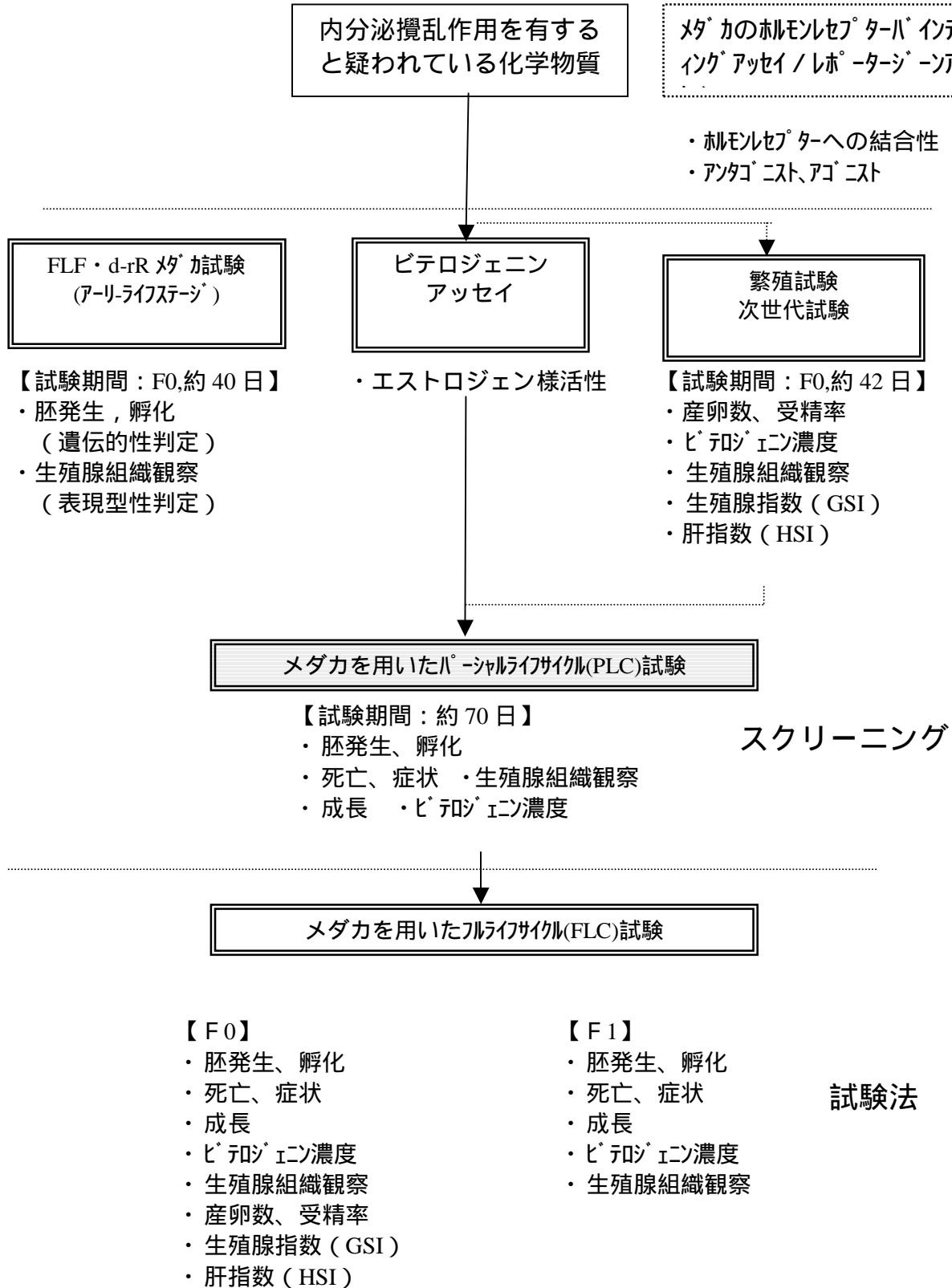
### 5. 評価体制

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サブ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ている。

(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

