

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、開発した方法を用いて、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、ビ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、OECD において、魚類のビ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ることとなっているが、引き続きこうした国際協調への取組も進める。

鳥類については、日本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するとともに、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ことを目標とした調査研究等を進める。

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、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。

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（試験法の有用性や妥当性等を検証する目的で、同一試験を複数の機関により実施するテスト）が平成 15 年 10 月より開始されたが、引き続きこうした国際協調への取組も進める。

無脊椎動物については、オオミジンコを試験動物とし、スクリーニング・試験法の開発として、オオミジンコを用いた OECD の繁殖毒性試験（TG211）にエンドポイントを追加した試験法を OECD に提案し、承認された。今後、正式採択されるまで追加作業を継続して行う予定。

1. 魚類

有害性評価結果のうち、平成 12 年度選定の優先 12 物質については、平成 14 年 6 月に、平成 13 年度選定の優先 8 物質については、平成 15 年 6 月に公表。なお、ビスフェノール A については、フルライフサイクル試験を実施する。

ビスフェノール A のフルライフサイクル試験及び平成 14 年選定の優先 8 物質のうち、4 物質の試験結果については、資料 5 - 1、5 - 2 を参照。

(1) スクリーニング

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。

ビ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、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。

本アッセイについては、現在、優先 24 物質について試験を実施・終了。

なお、平成 15 年 3 月より OECD において、魚類のビテロジェニンアッセイの標準化を目的としたリングテストが開始され、日本がリードラボとして結果を取りまとめることとなっている。

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、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 24 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、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、優先物質であるノニルフェノール、4-オクチルフェノール、フタル酸ジ-n-ブチル及びビスフェノール A について既に試験を終了し、ノニルフェノールについては平成 13 年 8 月に、4-オクチルフェノール及びフタル酸ジ-n-ブチルについては平成 14 年 7 月に結果を公表。ビスフェノール A については資料 5 - 1、5 - 2 を参照。なお、陽性対照物質のうち 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、フルタミドの4物質についても試験を実施。

(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

化学物質のメダカ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 24 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 及び ER) 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 24 物質について試験を実施・終了。

(4) 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。

さらに、非曝露の対照群のデータを取得し、標準データベースの原案を作成すると共に、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についても例示し、平成 14 年度から (独) 国立環境研究所ホームページ上で公開。
(<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の取組を行っており、平成 13 年には、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、世界的科学雑誌である Nature 誌に発表するなどの成果をあげた。

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、平成 15 年度には、性分化に関わる遺伝子群を用いた DNA チップを作成した。

今後、DNA チップをさらに改良し、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取得する予定。

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。

平成 14 年度まで、本アッセイの確立に向けたパイロット試験を実施したが、十分な感度が得られないため平成 15 年度以降は継続しないこととした。

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 F₁ 卵に化学物質を投与し、孵化前に F₁ 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、陽性対照物質等によるパイロット試験を実施している。

（2）確定試験

1 世代繁殖毒性試験

平成 14 年度及び平成 15 年度は、日本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実施した。

平成 16 年度は、陽性対照物質の結果を基に優先物質等を用いた検討を実施し、エンドポイントの選定と評価を実施する予定。

（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のエストロジェンレセプター（ER 及び ER_α）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、優先 20 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、後肢長などをエンドポイントとする。

平成 14 年度は、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、国際的なリングテストに結果を提供した。また、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。

平成 15 年度は、アフリカツメガエルを試験動物として、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（試験法の有用性や妥当性等を検証する目的で、同一試験を複数の機関により実施するテスト）に参加し、本年 3 月には、日本（広島）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。

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・程度を把握する。

平成 14 年度は、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作成した。

性転換試験

人為的に作出した ZZ（雌）*と、ZZ（雄）とを交配することにより得られた F₁（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する。

平成 14 年度は、陽性対照物質(17 β -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。

平成 15 年度は、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 F₁(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。

* 野生型アフリカツメガエルの染色体型は ZW である。

(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。

平成 15 年度は、優先 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_d 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) 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、標準データベースを作成する。

平成 14 年度は、非曝露の対照群のデータを取得し、標準データベースを作成し、(独) 国立環境研究所ホームページ上で公開した。

(<http://w-edcdb.nies.go.jp/AMPH/atlas/index.html>)

4. 無脊椎動物

無脊椎動物のスクリーニング・試験法開発は、平成 14 年度から開始。

無性生殖を行うため通常雌しか存在しないオオミジンコが、幼若ホルモンの存在下では雄が発生するという現象を用いて、OECD の急性毒性試験 (TG211) にエンドポイントとして仔虫の性比等を追加することを目標とした調査研究を進めた。

平成 14 年度は、陽性対照物質である幼若ホルモンを用いた曝露試験を実施し、本試験が有効であることを確認した。

平成 15 年度は、オオミジンコの脱皮ホルモンレセプターのクローニング及び *in vitro* 評価系の構築のために必要な基礎的な知見の収集を行った。また、幼若ホルモンのスクリーニング試験として、OECD(TG211)を改良した enhanced TG211 を OECD に提案し WNT 会議で提案が承認された。

平成 16 年度は、引き続き脱皮ホルモンの *in vitro* 評価系の構築、幼若ホルモンの雄仔虫発生の機構解明及び enhanced TG211 が OECD に正式採択されるまで追加作業を継続して行う予定。

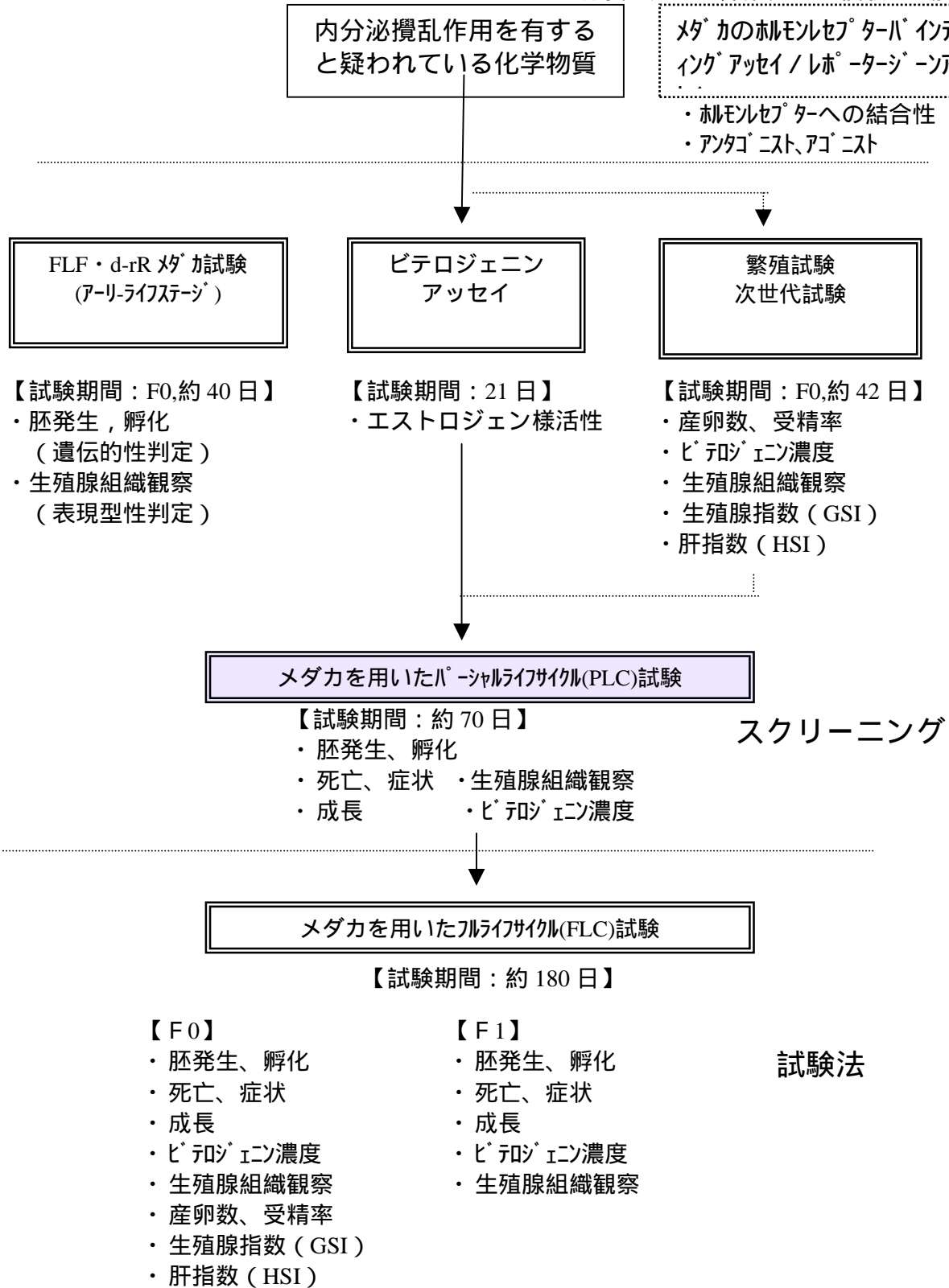
5. 評価体制

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

