

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

1. 評価体制

「内分泌攪乱化学物質問題検討会」のもとに設置された「内分泌攪乱作用が疑われる物質のリスク評価検討会」のなかに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担当グループを更に設置)、物質ごとのプロトコル及びそのプロトコ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た。

2. 有害性評価の対象とした化学物質

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、わが国において開発した方法(メダカの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・フルライフサイクル試験・レセプターバインディングアッセイ・レポータージーンアッセイ)を用いて、有害性評価を進めた。対象とした化学物質は、平成 12 年度に選定した 12 物質¹⁾、平成 13 年度に選定した 8 物質²⁾、平成 14 年度に選定した 8 物質³⁾及び平成 15 年度に選定した 8 物質⁴⁾である。

- 1)トリブチルスズ、4-オクチルフェノール、ノニルフェノール、フタル酸ジ-n-ブチル、フタル酸ジシクロヘキシル、フタル酸ジ-2-エチルヘキシル、オクタクロロスチレン、ベンゾフェノン、トリフェニルスズ、フタル酸ジエチル、フタル酸ブチルベンジル及びアジピン酸ジ-2-エチルヘキシル
- 2)ペンタクロロフェノール、アミトロール、ビスフェノールA、2,4-ジクロロフェノール、4-ニトロトルエン、フタル酸ジペンチル、フタル酸ジヘキシル及びフタル酸ジプロピル
- 3)ヘキサクロロベンゼン、ヘキサクロロシクロヘキサン、クロルデン、オキシクロルデン、trans-ノナクロル、DDT、DDE及びDDD
- 4)アルドリン、エンドリン、ディルドリン、ヘプタクロル、マイレックス、ケルセン、マラチオン及びペルメトリン

3. 魚類

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した。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*)試験を実施した。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、日本がリーダーボ（取りまとめ試験機関）として結果を取りまとめている。

（1）スクリーニング試験

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・程度を把握した。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群設定した。本アッセイについては、28物質⁵⁾について試験を実施した。

5)ヘキサクロロベンゼン、ヘキサクロロシクロヘキサン、cis-クロルデン、trans-ノナクロル、p,p'-DDT、o,p'-DDT、p,p'-DDE、p,p'-DDD、トリブチルスズ、4-オクチルフェノール、ノニルフェノール、フタル酸ジ-n-ブチル、フタル酸ジシクロヘキシル、フタル酸ジ-2-エチルヘキシル、オクタクロロスチレン、ベンゾフェノン、トリフェニルスズ、フタル酸ジエチル、フタル酸ブチルベンジル、アジピン酸ジ-2-エチルヘキシル、ペンタクロロフェノール、アミトロール、ビスフェノールA、2,4-ジクロロフェノール、4-ニトロトルエン、フタル酸ジペンチル、フタル酸ジヘキシル及びフタル酸ジプロピル

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した。曝露濃度は、原則としてビテロジェニンアッセイの結果を参考に、5群設定した。本試験については、28物質⁵⁾について試験を実施した。

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した。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群設定した。本試験については、4物質⁶⁾及び陽性対照物質(17 β -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)について試験を実施した。

6)4-オクチルフェノール、ノニルフェノール、フタル酸ジ-n-ブチル及びビスフェノールA

(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 α 及びER β)への結合能力を測定するアッセイを開発し、28物質⁵⁾について試験を実施した。

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がん由来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 α 及びER β)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、28物質⁵⁾について試験を実施した。

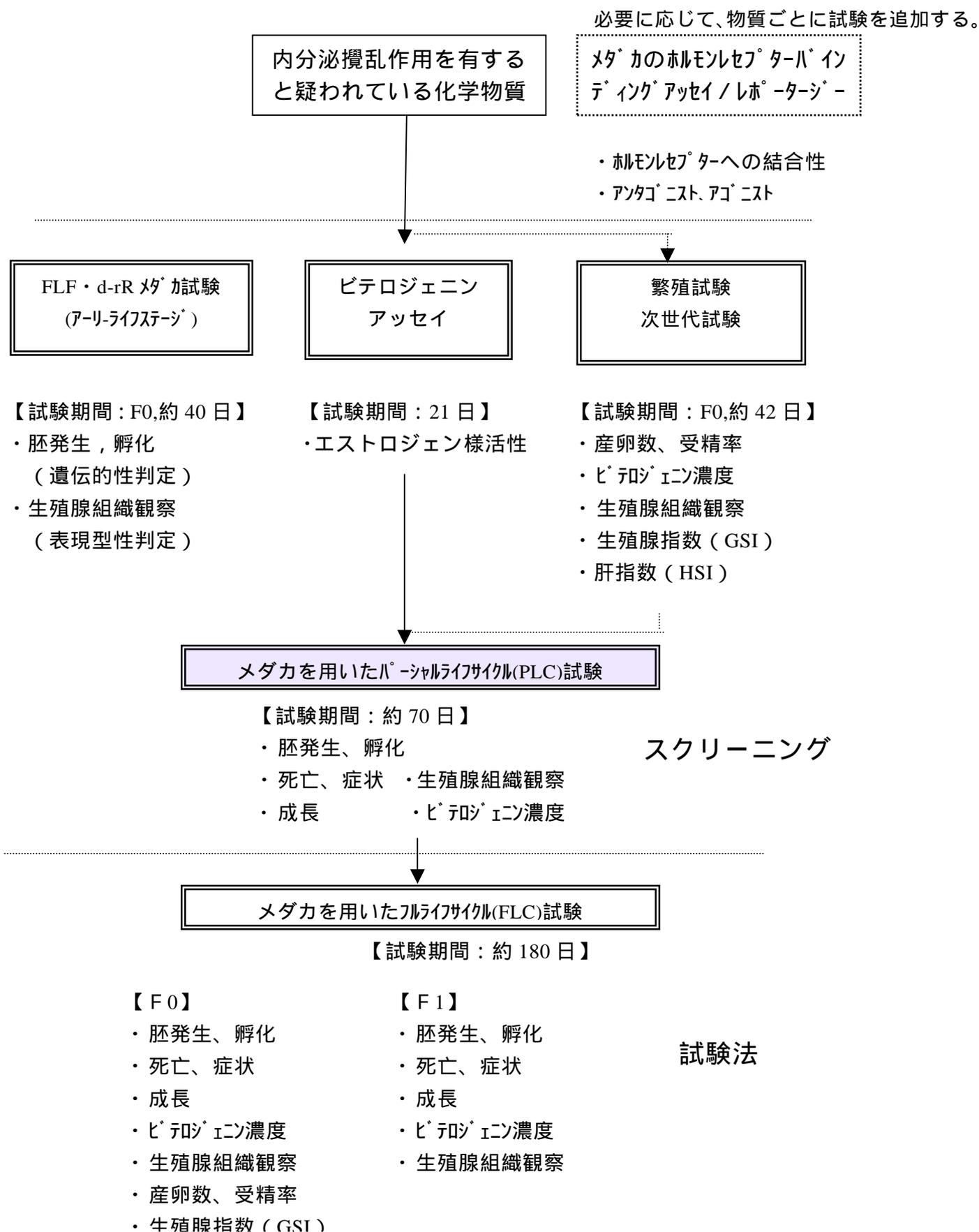
(4) メダカの標準データベース作成

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、パーソナ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した。この標準データベースについては、非曝露の対照群のデータ及び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とあわせて、(独)国立環境研究所ホームページ上で公開している。(<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、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、性分化に関わる遺伝子群を用いたDNAチップを作成した。さらにDNAチップを改良し、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収集した。

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



内分泌かく乱作用に関する魚類スクリーニング・試験法開発 平成 16 年度実施事項

環境安全課

1) 生態系への影響評価のための魚類を用いた試験の実施 (p.65 以降を参照)

2) OECD バリデーション試験への参加

OECD が提案している魚類スクリーニング試験の検証を目的とし、メダカ、ファットヘッドミノー及びゼブラフィッシュの 3 魚種を用いて、弱エストロゲンである 4-tert-ペンチルフェノール、アロマターゼ阻害剤であるプロクロラズ及び抗アンドロゲンであるフルタミドについて試験を実施した。

その結果、本試験法は弱エストロゲン及びアロマターゼ阻害剤の影響を検出することが可能であるが、抗アンドロゲンに対する適用性は低いことが示された。なお、今年度中に、Phase 1B レポートの最終化作業が終了する予定である。

今後の課題として、産卵をエンドポイントとして採用するための基礎データの収集、抗アンドロゲン作用の検出、統計処理上の n 数の取り方などが挙げられている。

これまで、OECD 等の国際貢献において、国内関係者の情報の共有化が不十分であった。今後、適切な情報発信とそれに係る体制整備に、取り組むことが必要である。

3) メダカ AR ホルモン受容体への結合性試験系の確立

これまでに、メダカエストロゲン受容体への結合性及び遺伝子転写活性、メダカアンドロゲン受容体への遺伝子転写活性を測定する試験系を確立している。本年度は、メダカアンドロゲン受容体結合試験系を確立するとともに確立した試験系の検証を行なった。具体的には、大腸菌を用いたメダカアンドロゲン受容体発現産物による結合試験系の開発を行なうとともに、受容体発現プラスミドを導入した培養細胞 (CV-1 及び HeLa 細胞) を用いた競争結合試験系も開発した。

現在、大腸菌を用いた結合試験系の開発については、発現誘導を解析中である。また、培養細胞を用いた競争結合試験系の開発について、種々の試験条件 (細胞種、播種細胞数、リガンド濃度) の検討を行った。その結果、HeLa 細胞は親化合物、CV-1 細胞は代謝産物の結合性評価に適していることがわかった。HeLa 細胞と CV-1 細胞ではダイナミックレンジに大きな差があったが、洗浄時における CV-1 細胞のプレートからの剥離が原因として考えられた。

今後、さらに詳細な試験条件の検討を行うとともに、細胞のハンドリングと試験系の位置付けの観点より、CV-1 細胞と同様に代謝能を有している COS 細胞も検討する必要があると考えられる。

4) 精巣卵の出現と繁殖影響との相関に関わる研究

これまで、メダカを卵から成熟初期までエストロゲン基準物質に暴露した場

合、精巣組織中に卵母細胞（精巣卵）が濃度依存的に出現することから、精巣卵の出現等の精巣の組織学的観察はエストロゲン様物質の検出において有効なエンドポイントになりうることを示されている。しかし、精巣卵の出現等の生殖腺組織学の変化と繁殖パラメータ（産卵数及び受精率）との関連性が十分明らかでない等の観点から、パーシャルライフサイクル試験及びフルライフサイクル試験において観察される生殖腺組織学の変化をリスク評価の際の影響指標として適用することについて慎重な意見が出されている。

そこで、17 β -エストラジオール(E2)によるメダカライフサイクル試験での繁殖検討^{*1}に用いた雄個体の生殖腺組織を5段階にスコア化し(下表参照)、受精率との相関性について検討した。17 β -エストラジオールによるメダカフルライフサイクル試験で繁殖検討に用いた雄個体の生殖腺の切片を1個体当たり10枚作成し、メダカ精巣の分類基準(案)に基づいてスコア化を行なった。各個体10枚の切片についてそれぞれスコアを求めた。

なお、繁殖検討においてペアリングした雌個体についても生殖腺の組織学的観察を行った。

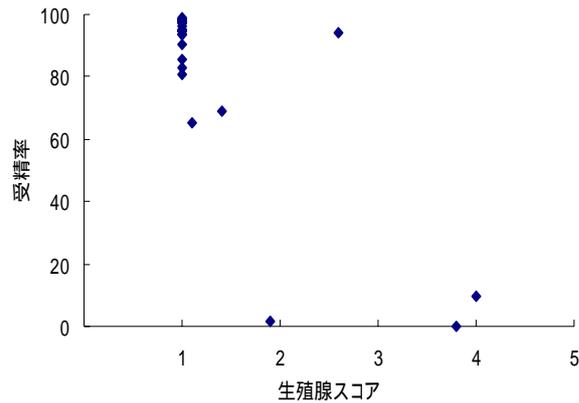
*1) 繁殖検討：フルライフサイクル試験のふ化後70日令の時点で各試験濃度（区）の生存個体の雌雄を外観の形態から判別しペアリングを行ない、ペア毎にふ化後100日令まで、毎日、産卵数及び受精率を観察

表 今回目安としたメダカ精巣のスコア化案

スコア	定義
1	成熟した雄にみられる精巣構造を有する。組織中には精原細胞、精母細胞及び精細胞といった種々の発達段階の生殖細胞が観察され、活発な精子形成が認められる。卵母細胞は発現していない。
2	全体に精巣の構造であり、精子形成も観察される。しかし、組織中に卵母細胞の発現が認められる。このレベルでの精巣卵の程度は低く、卵母細胞は組織中に散在した状態で1~10細胞が観察されるに過ぎない。
3	レベル2よりも卵母細胞の発現率が高く、組織中に10~50細胞が観察される。卵母細胞の一部は塊として観察される場合もある。しかしながら、全体としてはレベル1及び2と同様に精巣構造を呈しており、精子形成も観察される。
4	さらに精巣卵が発達し、組織の約50%までを卵母細胞によって構成される。精子形成は観察されるが、レベル1~3と比較すると精子形成に関与する生殖細胞が占めている部分が小さい。
5	組織の約50%~ほぼ全般を卵母細胞によって構成され、精原細胞、精母細胞等はわずかに散在する程度である。活発な精子形成は観察されていない。また、結合組織の異常な発達が認められる場合もある。

下図にスコア化した所見の平均値と受精率^{*2}との相関を示す。

*2) 受精率：繁殖試験期間中に雌が産卵した卵数に対する受精卵数の比率の平均（%）



この手法を利用し、測定例を増やすことにより組織所見と受精率の関係を明らかにすることが出来るのではないかと推測される。このため、今後、試験例数を増やし、生殖腺スコアと受精率との関係について、詳細な検討を実施する必要がある。

5) 性分化とステロイドホルモンの作用機序の解明と内分泌かく乱作用のメカニズム解明のための DNA マイクロアレイの開発

内分泌かく乱物質の作用メカニズムの解明には、生殖腺や脳における性分化や性的可塑性の保持メカニズムを明らかにする必要がある。本年度は、メダカの性決定遺伝子 DMY の機能の一つが精原細胞の分裂抑制であることを示すとともに、DMY の下流に働く遺伝子の一つとして新しく Sox9 をクローニングした。さらに、稚魚期のみならず、成熟個体の生殖腺や性行動についても性的可塑性が強く保持されていることを脊椎動物ではじめてみつけた。また、この性的可塑性保持の基本的要因と考えられる芳香化酵素遺伝子の発現制御領域を解析した。

DNA マイクロアレイに関しては、生殖腺由来の遺伝子を集中的に探索することができる系を確立するとともに、この系を用いて性ホルモン（アンドロゲンとエストロゲン）処理後のメダカ雌雄成熟生殖腺での遺伝子発現パターンを明らかにした。さらに同様なマイクロアレイ系を脳についても開発するために、メダカ雌雄脳の EST クローン（22,000）解析と特異的遺伝子の単離を行った。

今後の課題として、上記の研究成果を論文として公表すること、および性的可塑性を解析するために用いる性ホルモン処理濃度の問題、等について議論がなされた。

6) 内分泌かく乱作用の魚類への影響評価のための試験体系についての検討

これまで、内分泌かく乱作用の魚類への影響評価については、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を実施し、必要に応じてフルライフサイクル試験を実施するという試験体系で行ってきた。

しかし、重複をさけ効率化を図るという観点、試験期間短縮という観点から、この試験体系を見直すことも必要だと考えられる。そこで、平成 16 年度第 1 回魚類検討会において、このテーマで議論を行ったが、結論はえられなかった。

なお、OECD においても 2005 年 1 月に開催された EDTA8 において、各試験の位置づけ（各試験をスクリーニング、確定試験としてどのように位置づけるのか）に

ついて、魚類試験を例とした議論が展開されたところである。

どのような試験体系が最も科学的に妥当かつ高率的かについては今後も議論を継続すべきであり、この議論は、平成 17 年度以降の「化学物質の内分泌かく乱作用に関する環境省の今後の対応方針」に基づく新たな検討会体系のもとで、しかるべき評価検討会においてなされるべきである。

【これまでの取組概要】

SPEED '98 のリストに基づいて、鳥類を評価するにあたり、ニホン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した。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調査研究を行った。調査研究結果を改良型1世代繁殖毒性試験(Enhanced one-generation Reproduction Test)の具体的データとしてOECDにおける1世代試験改訂及び2世代試験策定のための会議において発表した。あわせて、レセプターバインディングアッセイを実施した。

・ スクリーニング試験

ビテロジェニンアッセイ

雄ニホン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・程度を把握した。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、20物質について試験を実施した。4-ノニルフェノール、*p-t*-オクチルフェノールに血清中ビテロジェニン濃度の上昇が認められた。

クロアカ試験

ニホン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した。さらに、陽性対象物質(17 β -エストラジオール、メチルテストステロン)及びノニルフェノール、ビスフェノールAによるパイロット試験を実施した。

・ 確定試験

改良型1世代繁殖毒性試験

ニホン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陽性対照物質(17 β -エストラジオール)を用いて実施した。

・ 試験管内(*in vitro*試験)

レセプターバインディングアッセイ

化学物質のニホンウズラのエストロジェンレセプター(ER₁及びER₂)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、20物質について試験を実施した。ER₁及びER₂に関しては、ビスフェノールAが結合活性を有していた。

【今後の取組方針】

日本が実施している改良型1世代試験については、試験の結果と評価は重要な知見として、その一部はすでにOECDに報告している。

1) OECD内の議論においても、1世代試験/2世代試験についての方向性が不明瞭である。今後はまず、米国(EPA)での2世代試験の開発の動きをフォローする必要がある。日本が実施してきた1世代試験に関しては、現在は試験を実施する段

階ではなく、今後 OECD と米国（EPA）の動向についての情報収集を継続し、1 世代試験の必要性が国際的に幅広く認知された時点で再検討することとする。

2) 次に重要な課題として、1 世代試験/2 世代試験に共通の課題であるエンドポイント検討が挙げられる。

既に試験法として活用されているバイオマーカーのビテロジェニンについては、今後一層知見を集積していく必要がある。また、ビテロジェニン以外の、高感度かつ特異性の高いバイオマーカーを探索することも必要である。

たとえば、哺乳類等に認められない知見として、陽性対象物質（17 β -エストラジオール）にて腎臓の障害が認められており、鳥類特有の感受性の高いエンドポイントとも成りうる可能性がある。

今後、これまでの事業により蓄積された研究成果をふまえ、エンドポイントに関する学術的情報（生殖器、甲状腺、下垂体等の内分泌系への影響、内分泌系を介した免疫系や神経系の影響、生態影響等の影響が認められたとする情報）を収集・整理していく。

内分泌かく乱作用に関する両生類のスクリーニング・試験法開発

環境安全課

【これまでの取組概要】

内分泌かく乱作用を持つと疑われる物質の両生類への影響を評価するにあたり、アフリカツメガエル等を試験動物とし、変態アッセイ、性転換試験、ビ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してきた。また、変態アッセイ、性転換試験に際し、正常な個体の成長、発生を定義するため、アフリカツメガエルの標準データベース、および人為的に作出したZZ(雌)*と、ZZ(雄)とを交配することにより得られたF₁(全雄)*による性転換試験標準データベースを作製した。あわせて、試験管内試験として、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レセプターバインディングアッセイを開発した。これらの取組に関しては、これまで開催された3回のOECD(経済協力開発機構)両生類専門家会合の中で、日本の取組成果として全て公表してきた。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年より開始され、これにフェーズIから参加してきた。

*野生型アフリカツメガエルの染色体型はZWである。

【平成16年度事業】

変態アッセイ：OECDリングテストフェーズIIへの参加

平成16年度は、平成16年6月のOECD第2回両生類専門家会合で提案され、12月の第3回VMG-ecoで承認されたフェーズIIのプロトコルに基づき、試験対象物質として選定された3物質(Ipanic acid(IOP)、T₄、Perchlorate (PER))のうち、1物質(IOP)を用いた試験を実施している。

ニシツメガエル標準データベース作成

ニシツメガエルは、アフリカツメガエルと比較して成熟期間が短く、生殖試験および世代試験の試験動物として、その重要性が世界的にも認知されつつあり、OECD第2回両生類専門家会合においても、ニシツメガエルの情報整備が重要であることが確認された。平成16年度は、OECDの変態試験リングテストフェーズIIのプロトコルに準じて、ニシツメガエルを変態完了まで飼育し、定期的に全長、尾長、発生段階、生殖腺および甲状腺の発達、ビテロジェニンの合成について、測定、観察、記録を行い、既に作成した、アフリカツメガエルの標準データベースフォーマットにしたがって、ニシツメガエルの標準データベースを作成している。

【今後の取り組み方針】

国際的な取り組みである OECD への協調を継続する。具体的には、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に引き続き参加し、平成 17 年度はフェーズ II において試験対象物質として選定された 3 物質 (Iopanic acid (IOP)、T₄、Perchlorate (PER)) のうち、残る 2 物質 (T₄、PER) を用いた試験を実施する。

今後の検討課題としては以下のような事項が挙げられる。

- ・ニシツメガエルの試験動物としての有効性を明らかにするために、ニシツメガエルに対し陽性対象物質を用いた曝露試験を実施し、成長、発生段階、生殖腺の発達、ビテロジェニン合成等について観察、記録を行って、基礎的データを収集する必要がある。

- ・昨年度まで取り組みを行った性転換試験の標準化をはかるために、アフリカツメガエル幼生 (全雄) に対して、ニシツメガエルと同様に、基礎的データを収集する必要がある。

- ・アフリカツメガエルやニシツメガエル等のモデル動物のほか、ツチガエル (*Rana rugosa*) 等の日本在来種に対する試験法の適用性を明らかにすることも重要な課題である。

- ・化学物質の作用機序を明確にし、野生型を用いた試験法を補完する観点から、化学物質の作用と遺伝子ならびにタンパク質の動態を関連づけるとともに、この関連付けに基づいて特定の遺伝子等を導入したモデル動物の利用に関する研究も必要と考えられる。

**内分泌かく乱作用に関する無脊椎動物のスクリーニング・試験法開発
および
ミジンコを用いた甲殻類の内分泌かく乱作用メカニズムの解明**

環境安全課

【平成 16 年度事業】

1) OECD への Enhanced TG 211 提案

平成 16 年 4 月に OECD へ提案した Enhanced TG 211 は、5 月に開かれた OECD の WNT 会合において、オオミジンコ (*Daphnia magna*) を用いた無脊椎動物における内分泌かく乱化学物質の試験法提案として正式に認められた。

提案後バリデーション前の予備的実験として種差についての検討を行ったところ、オスの出現というエンドポイントの感受性において種差があることが明らかとなった。

そこで、平成 16 年 12 月に開催された第 3 回 VMG-eco において、OECD 加盟各国からオオミジンコのさまざまな遺伝系統を手に入れて、バリデーション実施前にあらかじめ国立環境研究所にて予備的試験 (プレ・バリデーション) を実施することを提案し、承認をうけた。その後現在までに 8 カ所の研究所と連絡をとり、うち 5 カ所からミジンコが送付され、プレ・バリデーションの準備を進めている。試験結果は、平成 17 年中に開催予定の OECD 第 2 回無脊椎専門家会合で報告する予定である。

2) LC-MS/MS を用いた幼若ホルモン結合タンパク質のアミノ酸シーケンス解析

ミジンコの幼若ホルモンに結合するタンパク質のアミノ酸解析を行っている。具体的には、幼若ホルモン様物質の一種フェノキシカルブをリガンドとしてアフィニティーカラムクロマトグラフィーを行い、リガンドに結合したタンパク質を回収し、解析を進めている。

3) 組織学的観察によるミジンコの幼若ホルモンの作用ステージの解明

幼若ホルモン様物質曝露によるミジンコオス仔虫の誘導は、卵が卵巣内に存在するある特定の時期にのみ引き起こされることが明らかになっている。本研究では、卵巣の組織学的観察を行うことによって幼若ホルモン物質が作用しオス仔虫が誘導される卵巣内の卵のステージを決定することを目的とし、予備的検討を行った。その結果、ミジンコの組織標本の作製、染色、観察は一通り可能となった。

4) ミジンコの脱皮ホルモンレセプターのクローニングと *in-vitro* 試験系の開発

ミジンコの脱皮ホルモンレセプターのクローニングを行い、エクジソンレセプターバインディングアッセイ系を構築した。コントロールに対してエクジソンが約 200 倍結合する系を開発できたが、コントロールでのバックグラウンド値を下げるなどの改良の余地が残された。

【今後の方針】

1) OECD への協調

- ・海外 5ヶ所から送られてきたミジンコの系統維持および飼育順化
- ・陽性対照物質によるプレ・バリデーション試験の実施及び結果のとりまとめ
- ・OECD 無脊椎第 2 回専門家会合（開催時平成 17 年中に開催予定）への参加と結果の発表
- ・成果の情報発信（論文化）

2) 生態影響評価法としての Enhanced TG 211 の位置づけに関する研究

実環境中における、仔虫性比がオスに偏ることに伴う個体群レベルへの影響を、モデル実験系を構築して評価する。

- ・ミジンコ個体群の維持方法の検討
- ・個体群ダイナミクスの把握
- ・ミジンコ個体群への影響評価用実験系の確立

3) 基礎的研究

3・1 幼若ホルモンの生体内標的分子の同定

・幼若ホルモン様化学物質のターゲットとなっている生体側の標的分子を同定する。従来までの解析から、リガンドを固定化した担体に生体分子が結合することが、確認されたため、今年度は、結合条件、溶出条件等、標的分子の精製に重要なパラメーターの検討を行い、標的分子の同定を目指す。幼若ホルモンの標的分子は、未だいかなる生物でも確認されておらず、標的分子の同定とクローニングにより、化学物質の幼若ホルモン様活性の評価、影響の解析が可能となる。

・ミジンコの発生において幼若ホルモンに対して感受性の高い期間を同定する。組織学的観察による卵の成熟段階を指標として感受性の高い期間（臨界期）を決定する。これにより、幼若ホルモンの本来の作用の解明につながるのみならず、曝露期間の特定が可能となり効率的な試験系の確立につながる。

3・2 脱皮ホルモン様活性の試験管内評価系の構築

・試験管内のアッセイ系として構築しているエクジソンレセプターレポーターアッセイ系の開発を引き続き行なう。使用する細胞やベクターについての検討を行い、安定した再現性の高いアッセイ系の構築を目指す。

3・3 遺伝子発現パターンによる化学物質影響評価系の構築と作用機序の解明

・すでに構築したミジンコ cDNA ライブラリーを基に、簡便なマイクロアレイを製作し、毒性発現および内分泌攪乱に関して応答する遺伝情報を収集する。これにより、化学物質の毒性作用メカニズムの解明につながるのみならず、より感度の高い評価系やバイオマーカーの発見が期待できる。

OECD における内分泌かく乱作用に関するテストガイドライン策定作業状況
——— 環境省の取組と関連して ———

2005 年 3 月 8 日
環境安全課

魚類

2003 年 3 月より開始された、魚類のビテロジェニン産生試験 (21-day Fish Assay for the Detection of Endocrine Active Substances) の標準化を目的としたリングテストは、2003 年 10 月 phase1A が終了し、2004 年 3 月より phase1B (試験物質は弱エストロゲンである 4-tert-ペンチルフェノール、アロマトラーゼ阻害剤であるプロクロラズ、抗アンドロゲンであるフルタミド) に進んだ。このバリデーション作業に日本はリードラボとして参加しており (化学物質評価研究機構・国立環境研究所・国土環境) phase1B 結果のとりまとめを行い 2004 年 12 月の第 3 回 VMG-eco (Validation Management Group for Ecotoxicity Testing) において報告した。現在 phase1B 結果をふまえ、各エンドポイント (ビテロジェニン濃度・二次性徴・産卵数・生殖腺組織) の有効性、抗アンドロゲン作用をもつ化学物質への適用の妥当性、統計処理上の n 数のとりかた (各個体を n=1 とするか、各水槽を n=1 とするか) 等に関して、検討が行われている。

両生類

2004 年 1 月より開始された両生類変態アッセイ (Amphibian Metamorphosis Assay) のリングテスト phase1 に参加した。phase1 の結果は 2004 年 6 月に開催された第 2 回両生類専門家会合に報告され、2004 年 12 月の第 3 回 VMG-eco において phase2 のプロトコールが承認された。これに基づき現在、phase2 の試験物質 3 物質 (iopanoic acid (IOP)・sodium perchlorate (PER)・thyroxine (T4)) のうち、IOP について実験を実施している。魚類と同様に両生類においても統計処理上の n 数についての検討が行われている。

無脊椎動物

2004 年 5 月の第 16 回 WNT (Meeting of the National Co-ordinators of the Test Guideline Program) において、従来のエンドポイントに仔虫の性比を新たなエンドポイントとして追加することを enhanced Test Guideline 211 として提案した。さらに、オスの出現というエンドポイントの感受性には種差があることを、2004 年 12 月の第 3 回 VMG-eco において発表した。現在 OECD 加盟各国より送付された 5 種類のミジンコについて、プレ・バリデーション試験としてオスの出現を確認する暴露実験を実施している。

鳥類

ニホンウズラを試験動物とし、OECD の 1 世代繁殖毒性試験 (Test Guideline 206) 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改良型 1 世代繁殖毒性試験について、17 β -エストラジオールを用いたパイロット試験を実施し、その結果を 2004 年 11 月の第 4 回鳥類専門家会合において発表した。

生態系への内分泌攪乱作用による影響に関する魚類を用いた試験結果まとめ表

14. *cis*-クロルデンのメダカによる試験結果

1. ビテロジェニン産生試験 (試験機関: 国土環境(株))

表 1: 試験結果

平均濃度 ($\mu\text{g/L}$)	死亡率 (%)	肝指数 (%)		ビテロジェニン濃度(ng/mg liver)	
		14 日	21 日	14 日	21 日
対照区	0	1.7 \pm 0.22	1.7 \pm 0.30	ND	ND
助剤対照区	0	1.8 \pm 0.43	1.6 \pm 0.20	ND	ND
0.81	0	1.5 \pm 0.35*	1.6 \pm 0.48	ND	ND
1.73	0	1.6 \pm 0.30	1.8 \pm 0.32	ND	ND
3.97	3.3	1.5 \pm 0.29*	1.5 \pm 0.25	ND	ND
7.60	27	1.5 \pm 0.26	1.5 \pm 0.42	ND	ND
20.0 ^{a)}	100	-	-	-	-

各測定値データの値は、平均 \pm 標準偏差、*は $p < 0.05$ で有意であることを示す。ビテロジェニンの ND は、平均値が定量下限未満($< 1 \text{ ng/mg liver}$)を示す。なお、ビテロジェニンの平均値及び標準偏差の算出に際し、定量下限未満の個体は定量下限値の半数値(0.5 ng/mg liver)を用いた。

a) 20.0 $\mu\text{g/L}$ 区は、曝露 10 日後までに全個体が死亡。

2. パーシャルライフサイクル試験 (試験機関: (財) 化学物質評価研究機構)

表 2 - A: 試験結果

平均濃度 ($\mu\text{g/L}$)	孵化率 (%)	孵化日数 (日)	死亡率 (%)	全長 (mm)	体重 (mg)
対照区	98 \pm 3.3	9.0 \pm 0.038	1.7 \pm 3.3	31 \pm 1.4	290 \pm 49
助剤対照区	100	9.0	8.3 \pm 6.4	30 \pm 1.9	290 \pm 54
0.228	98 \pm 3.3	9.0	3.3 \pm 3.8	31 \pm 1.7	300 \pm 50
0.451	98 \pm 3.3	9.0 \pm 0.033	1.7 \pm 3.3	31 \pm 2.0	290 \pm 55
0.968	100	9.0 \pm 0.033	5.0 \pm 6.4	31 \pm 1.4	290 \pm 41
1.67	100	9.0 \pm 0.067	8.3 \pm 13	31 \pm 1.7	290 \pm 47
3.43	100	9.0	85 \pm 3.3**	30 \pm 1.1	280 \pm 42**

表 2 - B: (続き)

平均濃度 ($\mu\text{g/L}$)	尾数	生殖腺指数 (%)		精巣卵出現率 (%)	肝指数 (%)		ビテロジェニン濃度 (ng/mg liver)	
		尾	数	(精巣卵/(精巣+精巣卵))	1	2	1	2
対照区	20	0.95 \pm 0.36	7.4 \pm 2.1	0 (0/10)	1.6 \pm 0.24	3.3 \pm 0.72	1.1 \pm 1.1	1,800 \pm 660
助剤対照区	20	0.99 \pm 0.30	7.0 \pm 1.4	0 (0/10)	1.7 \pm 0.23	3.4 \pm 0.68	1.0 \pm 1.5	1,800 \pm 320
0.228	20	0.90 \pm 0.30	8.0 \pm 0.91	0 (0/8)	2.1 \pm 0.34	3.4 \pm 0.62	1.8 \pm 1.4	2,100 \pm 510
0.451	20	1.1 \pm 0.17	7.6 \pm 2.5	0 (0/10)	1.6 \pm 0.21	3.5 \pm 0.77	ND	2,000 \pm 1,300
0.968	20	0.74 \pm 0.28	6.7 \pm 2.3	0 (0/13)	2.0 \pm 0.71	3.7 \pm 0.65	ND	1,800 \pm 420
1.67	20	0.90 \pm 0.38	7.7 \pm 1.1	0 (0/10)	1.9 \pm 0.54	3.5 \pm 0.76	1.2 \pm 0.81	2,300 \pm 380*
3.43	9	0.86 \pm 0.67	8.3 \pm 5.1	0 (0/3)	1.2 \pm 0.18	3.1 \pm 0.26	2.4 \pm 1.9	4,000 \pm 2,500

各測定値データの値は、平均 \pm 標準偏差、**は $p < 0.01$ 、*は $p < 0.05$ で有意であることを示す。ビテロジェニンの ND は、平均値が定量下限未満($< 1 \text{ ng/mg liver}$)を示す。なお、ビテロジェニンの平均値及び標準偏差の算出に際し、定量下限未満の個体は定量下限値の半数値(0.5 ng/mg liver)を用いた。雄のビテロジェニンの対照区の背景データは ND ~ 10 ng/mg liver 、助剤対照区の背景データは ND ~ 21 ng/mg liver 。雌の対照区の背景データは 150 ~ 2,400 ng/mg liver 、助剤対照区の背景データは 440 ~ 2,500 ng/mg liver 。

16. *trans*-ノナクロルのメダカによる試験結果

1. ビテロジェニン産生試験 (試験機関: 国土環境(株))

表1: 試験結果

平均濃度 ($\mu\text{g/L}$)	死亡率 (%)	肝指数 (%)		ビテロジェニン濃度 (ng/mg liver)	
		14日	21日	14日	21日
対照区	0	1.82±0.26	1.86±0.26	ND	ND
助剤対照区	0	1.66±0.21	1.94±0.30	ND	ND
0.79	0	1.53±0.30	1.80±0.30	ND	ND
1.88	0	1.80±0.29	1.85±0.20	ND	ND
4.28	0	1.79±0.26	1.89±0.27	ND	ND
9.69	0	1.64±0.23	2.01±0.18	ND	ND
21.6	0	1.80±0.34	2.40±0.51**	ND	3.59 ± 12.0

各測定値データの値は、平均±標準偏差、**は $p<0.01$ で有意であることを示す。ビテロジェニンのNDは、平均値が定量下限未満($<1\text{ng/mg liver}$)を示す。なお、ビテロジェニンの平均値及び標準偏差の算出に際し、定量下限未満の個体は定量下限値の半数値(0.5 ng/mg liver)を用いた。雄のビテロジェニンの対照区の背景データは14日ND~ 6.1 ng/mg liver 、21日ND~ 3.6 ng/mg liver 、助剤対照区の背景データは14日ND~ 0.55 ng/mg liver 、21日ND~ 1.85 ng/mg liver 。

2. パーシャルライフサイクル試験 (試験機関: (財) 化学物質評価研究機構)

表2・A: 試験結果

平均濃度 ($\mu\text{g/L}$)	孵化率 (%)	孵化日数 (日)	死亡率 (%)	全長 (mm)	体重 (mg)
対照区	100	9.1 ± 0.064	13 ± 9.4	30 ± 2.6	280 ± 61
助剤対照区	100	9.1 ± 0.064	1.7 ± 3.3	29 ± 2.6	280 ± 37
0.203	100	9.0 ± 0.038	0	30 ± 3.1	300 ± 71
0.380	98 ± 3.3	9.1 ± 0.064	0	31 ± 1.5**	300 ± 46
0.803	100	9.1 ± 0.064	1.7 ± 3.3	31 ± 2.3**	290 ± 58
1.53	98 ± 3.3	9.0 ± 0.033	6.9 ± 5.8	31 ± 1.9**	300 ± 49
3.05	98 ± 3.3	9.0 ± 0.033	3.3 ± 3.8	31 ± 1.7**	300 ± 51

表2・B: (続き)

平均濃度 ($\mu\text{g/L}$)	尾数	生殖腺指数 (%)		精巢卵出現率 (%) (精巢卵/(精巢+精巢卵))	肝指数 (%)		ビテロジェニン濃度 (ng/mg liver)	
		1	2		1	2	1	2
対照区	20	0.90 ± 0.099	7.6 ± 2.4	0 (0/8)	1.9 ± 0.89	3.8 ± 0.92	1.2 ± 0.80	2,700 ± 3,100
助剤対照区	20	0.91 ± 0.26	6.5 ± 2.8	0 (0/11)	1.8 ± 0.51	3.0 ± 0.85	ND	2,500 ± 1,100
0.203	20	0.85 ± 0.28	4.8 ± 3.0	0 (0/9)	1.6 ± 0.29	3.3 ± 0.37	1.3 ± 2.0	2,400 ± 3,100
0.380	20	0.88 ± 0.31	4.7 ± 3.5	0 (0/8)	1.9 ± 0.40	3.3 ± 0.93	1.0 ± 0.80	2,000 ± 1,600
0.803	20	0.97 ± 0.29	7.0 ± 3.1	0 (0/9)	1.8 ± 0.49	3.3 ± 0.59	1.4 ± 1.1	2,100 ± 1,300
1.53	20	0.87 ± 0.31	6.8 ± 2.9	0 (0/11)	2.1 ± 0.57	3.5 ± 0.75	1.2 ± 1.1	1,600 ± 940
3.05	20	1.1 ± 0.15	7.2 ± 3.8	0 (0/12)	1.9 ± 0.28	3.4 ± 0.64	1.3 ± 1.1	2,200 ± 1,100

各測定値データの値は、平均±標準偏差、**は $p<0.01$ で有意であることを示す。ビテロジェニンのNDは、平均値が定量下限未満($<1\text{ng/mg liver}$)を示す。なお、ビテロジェニンの平均値及び標準偏差の算出に際し、定量下限未満の個体は定量下限値の半数値(0.5 ng/mg liver)を用いた。雄のビテロジェニンの対照区の背景データはND~ 10 ng/mg liver 、助剤対照区の背景データはND~ 21 ng/mg liver 。雌の対照区の背景データは150~ $2,400\text{ ng/mg liver}$ 、助剤対照区の背景データは440~ $2,500\text{ ng/mg liver}$ 。

優先物質のメダカエストロジェンレセプター（、）バインディングアッセイ、レポータージーンアッセイ及び
 アンドロジェンレポータージーンアッセイの結果

	エストロジェンレセプター (%)		エストロジェンレセプター (%)		アンドロジェンレセプター (%)	
	バインディングアッセイ	レポータージーンアッセイ	バインディングアッセイ	レポータージーンアッセイ	レポータージーンアッセイ	
17 -エストラジオール	100	100	100	100	100	
ジヒドロテストステロン					100	
<i>cis</i> -クロルデン	0.31	n. d	0.022	.	.	
<i>trans</i> -ノナクロル	0.60	n. d	0.022	.	.	

バインディングアッセイでは陽性対象物質の活性を100とした際の相対結合親和性 (%) を、レポータージーンアッセイでは相対遺伝子転写活性 (%) を示した。
 . : 試験した濃度範囲で結合性及び転写活性が認められなかった。

n. d. : 活性が認められなかったがIC₅₀値は得られず、相対活性が計算できなかった。

生態系への内分泌攪乱作用による影響に関する魚類を用いた 試験結果と今後の方針（案）

・平成14年度優先物質の試験結果について

1. *cis*-クロルデン

(1) メダカを用いた試験

ビテロジェニンアッセイ

0.81、1.73、3.97、7.60、20.0 µg/L(実測値)の曝露濃度において試験を行ったところ、肝臓中ビテロジェニン濃度には統計学的に有意な変化は認められなかった。

20.0 µg/Lの曝露群において、曝露10日までに全個体が死亡した。

なお、曝露14日後の0.81 µg/L及び3.97 µg/Lの曝露群において、肝指数の統計学的に有意な低値が認められた。

パーシャルライフサイクル試験

0.228、0.451、0.968、1.67、3.43 µg/L(実測値)の曝露濃度において試験を行ったところ、孵化率、孵化日数、全長、生殖腺指数、精巣卵出現率、肝指数及び雄の肝臓中ビテロジェニン濃度に統計学的に有意な変化は認められなかった。

3.43 µg/Lの曝露群において、死亡率の統計学的に有意な高値及び体重の統計学的に有意な低値が認められた。

雌の肝臓中ビテロジェニン濃度は、1.67 µg/Lの曝露群において、統計学的に有意な高値が認められた。

(2) 試験管内(*in vitro*)試験

メダカエストロジェン受容体(ER_α及びER_β)結合競合阻害試験、メダカエストロジェン受容体(ER_α及びER_β)レポータージーン試験及びメダカアンドロジェン受容体レポータージーン試験を行った。

その結果、メダカエストロジェン受容体(ER_α及びER_β)結合競合阻害試験では、エストラジオールに対する相対結合強度は約1/320(ER_α)及び約1/4,500(ER_β)であった。メダカエストロジェン受容体(ER_α)レポータージーン試験では、ER_αに対する活性は認められたが、IC₅₀値は得られなかった。メダカエストロジェン受容体(ER_β)レポータージーン試験及びメダカアンドロジェン受容体レポータージーン試験においては、有意な反応は認められなかった。

(3) 試験結果のまとめと今後の方針

以上のとおり、*cis*-クロルデンについては、今回の試験結果において、明らかな内分泌攪乱作用は認められなかった。

本物質については、今後、生態リスク初期評価を行う際に、今回の試験結果も参照する予定である。

2. *trans*-ノナクロル

(1) メダカを用いた試験

ビテロジェニンアッセイ

0.79、1.88、4.28、9.69、21.6 µg/L(実測値)の曝露濃度において試験を行ったところ、肝臓中ビテロジェニン濃度には統計学的に有意な変化は認められなかった。

なお、曝露 21 日後の 21.61 µg/L の曝露群において、肝指数の統計学的に有意な高値が認められた。

パーシャルライフサイクル試験

0.203、0.380、0.803、1.533、3.05 µg/L(実測値)の曝露濃度で試験を行ったところ、孵化率、孵化日数、死亡率、体重、生殖腺指数、精巣卵出現率、肝指数及び肝臓中ピテロジェニン濃度に統計学的に有意な変化は認められなかった。

0.380 µg/L 以上の曝露群において、全長の統計学的に有意な高値が認められた。

(2) 試験管内(*in vitro*)試験

メダカエストロジェン受容体(ER₁ 及び ER₂)結合競合阻害試験、メダカエストロジェン受容体(ER₁ 及び ER₂)レポーター遺伝子試験及びメダカアンドロジェン受容体レポーター遺伝子試験を行った。

その結果、メダカエストロジェン受容体(ER₁ 及び ER₂)結合競合阻害試験では、エストラジオールに対する相対結合強度は約 1/170(ER₁)及び約 1/4,500(ER₂)であった。メダカエストロジェン受容体(ER₁)レポーター遺伝子試験では、ER₁ に対する活性は認められたが、IC₅₀ 値は得られなかった。メダカエストロジェン受容体(ER₂)レポーター遺伝子試験及びメダカアンドロジェン受容体レポーター遺伝子試験においては、有意な反応は認められなかった。

(3) 今後の方針

以上のとおり、*trans*-ノナクロールについては、今回の試験結果において、明らかな内分泌攪乱作用は認められなかった。

本物質については、今後、生態リスク初期評価を行う際に、今回の試験結果も参照する予定である。

・まとめ

平成 14 年度優先物質である *cis*-クロルデン及び *trans*-ノナクロールについて行った「メダカを用いた試験」及び「試験管内(*in vitro*)試験」の結果等について取りまとめを行った。

cis-クロルデン及び *trans*-ノナクロールについて、明らかな内分泌攪乱作用は認められなかった。

cis-クロルデン及び *trans*-ノナクロールについて、今後、生態リスク初期評価を行う際に、今回の試験結果も参照する予定である。