

# 水生環境における内分泌攪乱現象の試験戦略

ダニエル・B. ピックフォード

英国 アストラゼネカ社

座長の先生、ありがとうございます。冒頭に、ちょっと訂正を申し上げます。私は魚類の試験の専門家ではありません。どちらかというと両生類の試験の専門家です。本日の講演では、この両方の話題に触れていきたいと思っています。

最初に明確にしておかなければいけない点は、我々の作業は、1996年にウェイブリッジで設定された内分泌攪乱化学物質の一般定義である「天然状態の生物体に有害作用を引き起こす物質」に基づいている、ということです。前の2つの講演でも盛んに取り上げられていましたように、我々の研究は *in vivo* 試験に重点を置いています。

しかし同時に、*in vitro* のデータから得られたメカニズム情報に裏付けられる必要があります。これらの仕事は優先順位付けにも利用できます。そうした過程については、すでにすばらしい説明がされました。

結局のところ、我々が実施する試験はその種類に応じて、対象が野生生物になることもあれば哺乳動物になることもあり、含めるエンドポイントも、生殖関係、発生関係、行動関係などを利用して、内分泌攪乱化学物質を検出していくことになります。

水生脊椎動物の生態学的リスク評価に関する戦略の概要をお話するにあたって、なぜ哺乳類以外にもそうした試験が必要なのか、その理由を簡単にご説明した方がよいかもかもしれません。

魚類は、水に棲むネズミではありません。脊椎動物の内分泌系は進化の過程で連続していることは確かですが、ホルモンの働きと制御の相互作用は異なっています。例えばプロラクチンは、哺乳類において主に乳汁分泌に関わっていますが、魚類においては浸透圧調節に働き、両生類においては変態の中心的制御因子になっています。

さらに、両生類を例にとりますと、制御の相互作用がいろいろです。無尾類(カエルやヒキガエル)では、甲状腺ホルモン系と性ステロイド類との間に相互作用があります。これは、両生類試験におけるエストロゲンのバイオマーカーとしてビテロゲニンが有用であるということに関連していると言えるでしょう。両生類の幼生は、変態期の頂点に達するまでは、エストロゲンで刺激してもビテロゲニン合成の反応を示しません。変態期を過ぎると、甲状腺ホルモン受容体とエストロゲン受容体との間にクロストークが成立します。

そのうえ、哺乳類の代謝と水生下等無脊椎動物の代謝は異なっている場合があります。そのことは全身毒性と内分泌毒性の重要性の比率に影響を及ぼします。その例としては、今しがたお話にありましたメトキシクロルが挙げられます。*In vivo* でのメトキシクロルのエストロゲン様作用は、そのヒドロキシル化代謝産物によるものですが、魚類では、この代謝産物を分解する能力に限界があるらしく、哺乳類では毒性が現われない濃度でも魚類では全身毒性が現われ、エストロゲン様反応の発現は断ち切られたような形になります。

また、哺乳類における経口曝露と魚類における経皮ないし経鰓曝露とでは、曝露経路および、曝露経路による影響に違いがあり、それが内分泌攪乱性が疑われる化学物質のバイオアベイラビリティに影響する可能性があります。このことは、初回通過代謝によってさらに複雑になる可能性があります。

決定的なのは、生体異物に対するステロイド受容体の親和性には種差があることです。そのよい例がビンクログリンの代謝産物で、アンドロゲン受容体への親和性が魚類とラットで違うようです。

では、生態系リスクの評価を進める中での内分泌攪乱化学物質試験に我々がどのように携わっているかについて、産業界の立場から簡単に概略をお話いたします。これはあくまでも私の個人的な解釈でして、絶対に正しいというわけではありません。この作業は「欧州化学物質生態毒性・毒性センター (European Center for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals: ECETOC)」からの要請を請けたものであり、昨年、トム・ハッチンソンらによって公表されました。

このプログラムの考え方は、すでに話しにありましたように、構造活性相関のデータと *in vitro* のデータを用いて優先順位付けを行おうというものです。これからお話しする水生動物においても、すでに蓄積された哺乳

乳類の情報を組み込むことになるでしょう。当然のことながら、物質への曝露の実際の可能性を判断するためには、物質の利用パターンの情報と動態データの情報を組み合わせます。

次に、*in vivo* 試験の段階的試験システムに入ります。魚類条件を用いるために ECETOC が実際に推進しているものを例にすると、3 段階の試験システムになっています。これは米国の方法やおそらくは OECD の手法とも若干異なる部分がありますが、相互に交換可能であると言えるでしょう。クーター博士がすでに述べていましたように、我々が採用した第 1 段階の試験は、タイプを篩い分けする短期間試験であり、これによって内分泌活性のメカニズムに特化した情報を実際に得られます。

さて、ある化学物質は魚類においてエストロゲン様なのでしょうか、それともアンドロゲン様なのでしょうか？そのことがこのスクリーニング試験で確認できたならば、続いて第 2 段階および第 3 段階の試験、すなわち、最終的(アピカル)なエンドポイントを用いて作用特性の詳細をだんだんと絞り込んでいく段階に進みます。そして最後に、曝露データに我々が得た危険性データを組み合わせることで、生態学的リスク評価を行うことができます。

魚類で用いられることになるべき手法については、すでに序論が紹介されています。幼若魚類スクリーニングアッセイの目的の一つは、エストロゲン類の検出です。エストロゲン類の試験では偽陰性を減らすために、哺乳動物の他にも卵生の下等脊椎動物モデルが必要になるだろうと我々は考えています。

その候補となる試験の一つが、ニジマスアッセイです。この試験に関しては、ブリクサム研究所の我々の同僚であるカレン・ソープが携わっています。この試験は、既存の OECD 試験ガイドラインに適合しており、15°C の水中曝露を 14 日間行います。エンドポイントは、すでに話しにありましたように、生存率、成長度、肝量指数、エストロゲン様バイオマーカーとしての血漿ビテロゲニン濃度です。すでに話しに出ましたように、この考えを我々が OECD 試験のその他の種にも適用することができました。

この試験方法の有効性を検証したカレンのデータの一部をお見せします。これが幼若ニジマスのエストラジオール、ノニルフェノール、メトキシクロルへの曝露量です。ご覧になって分かるように、それら化学物質の作用の強さの違いを反映して X 軸の目盛り幅は異なっていますが、図の様子はどれも同じです。

このようにきれいな濃度反応関係がありますが、アッセイ期間を 14 日以上に拡大しても、感度に大きな増加は得られません。ご覧のように、第 14 日と第 21 日の反応はまったく同じです。最初に簡単に申し上げた項目の最後が、この魚類モデルにおける全身毒性与内分泌毒性の作用比率の問題です。このように、ニジマスにおいては、先ほど申し上げたようにメトキシクロルの全身毒性のために、エストロゲン様反応が断ち切られています。

第 2 段階に進みましょう。我々はパーシャルライフサイクル試験をいくつか行っていますが、そのうちの 2 つが優れているようです。その 1 つが、胎児 - 幼生発生試験です。これもまた OECD の既存ガイドラインを拡張したものです。この試験に含まれるエンドポイントとしては、成長、最終的(アピカル)な発達、全身のビテロゲニン濃度、さらに性腺組織への作用の有無が含まれます。

生殖試験：いくつかある候補の中で、我々はその 1 つをブリクサムで扱っています。グレース・パンターとカレン・ソープが、ファットヘッド・ミノウ(コイ科のハヤ)を用いて、42 日間のつがい繁殖アッセイを研究しています。このアッセイでは 3 週間の前順応期間をおいてから 3 週間の曝露を行います。調べる項目は、肉眼的形態学、雄のファットヘッド・ミノウの脂肪球(おそらくアンドロゲン感受性)などの二次性徴、血漿ビテロゲニン、生殖力と生殖細胞の質があります。

こうした第 2 段階の試験は、できるだけ短期間の試験にすれば、時間も費用もかかるフルライフサイクル試験を行わなくてもある程度の作用特性の解明が可能です。当然のことながら、内分泌攪乱化学物質の生態学的リスク評価においてはフルライフサイクル試験がゴールデンスタンダードであり、ライフサイクルに関しては優れたガイドラインがすでに確立されています。

しかし、血漿ビテロゲニンなどの関連したエンドポイントをおさえたり、場合によっては別の種を使ったり、アンドロゲン様作用のバイオマーカーであるスピギンや性腺の組織学を用いることで、この試験法を内分泌攪乱化学物質に最適化することが可能です。

この種の試験においては、生殖などの最終的(アピカル)なデータをより特異性の高いバイオマーカーと比較することができるのでは、と期待されています。そうすれば、各バイオマーカーの予測因子としての価値を高

めることができるでしょう。そして、有効性が検証されたバイオマーカーを利用し、それを室内研究と野外研究とを結びつけるツールにすることで、室内と野外との重ね合わせが可能になることが期待されています。

次に、両生類を対象とした試験について、簡単に述べます。この分野の活動は、最近 2 年間でとても増えました。その種の活動の中で注目されるのは、今年の 4 月に OECD 委員会によってパリで開催された、両生類における内分泌攪乱化学物質試験に関する最初の専門協議会です。

この分野は、2 つの部分で構成されていると言ってもいいでしょう。その第 1 が、甲状腺ホルモン様活性のスクリーニングの開発です。このことについて、少しお話しします。そして第 2 は、ずっと将来のことになるでしょうが、魚類で行われているのと同じ種類の高次段階の試験の開発です。

この考えは実際には、「内分泌攪乱化学物質スクリーニングおよび試験諮問委員会 (EDSTAC)」の作業過程で第 1 段階のスクリーニングにおける甲状腺ホルモン様活性の尾吸収アッセイを推奨した米国から出てきたものですが、それに対して、ドイツで我々が開発したツメガエル (*Xenopus*) 変態アッセイ (XEMA) があります。これも甲状腺ホルモン様活性を調べるものです。XEMA 試験を開発されたベルリン大学のクロアス博士がここに来ておられますが、現在はドイツ環境省 (UBA) の出資によるリング試験段階にあります。ブリクサム私たちの研究室も、この作業に参加しています。

両生類のライフサイクルにおけるこれら有望な両生類試験の位置付けを考えてみますと、典型的には両生類無尾類 (カエルとヒキガエル) は 2 相性のライフサイクルを持っています。すなわち、卵が発生して胚になり、孵化して完全な水生である幼生になります。続いて変態を経て若成体になります。一般的には、この成体期の若い段階はより陸生に適応しています。やがて成体期において性腺が成熟して、生殖細胞の産生が始まり、新しいライフサイクルが始まります。

この文脈において、ライフサイクルの中でもっとも重要な点は、カエルとヒキガエルの変態の誘発において甲状腺ホルモンが中心的な役割を果していることです。したがって、私たちは変態アッセイを使えるので、カエルの変態は甲状腺ホルモン様活性のスクリーニングとしてきわめて有用となる可能性が出てきます。

より高次の試験段階では、生殖-発生試験を行うことがありますが、これは部分的生殖試験になるかもしれません。おそらく最初は、成体を曝露させ、その生殖細胞を変態に至るまで追跡することになるでしょう。しかし適切な種においては、これをライフサイクル試験にまで拡張することが可能です。ただしそれには、利用する種について十分に考察しておくことが必要です。このことはまた後で簡単に触れます。

これらの試験を試みて、私が先ほど述べた 3 段階の魚類試験の中に組み込むためには、両生類の変態アッセイはどの位置に据えればいいのでしょうか？理想的にはそれは、1 つの段階での甲状腺ホルモン活性のための 1 スクリーニング法であるべきです。私はこれを、2 つの段階の中間に仮置きしてみました。というのは、現状ではこの試験の特異性の問題に対処する必要があるからです。すなわち、この試験は本当に、甲状腺ホルモン様活性そのものを検出できる特異的な試験なののでしょうか？また、複数の作用特性を見ているのでしょうか？その点について説明してみたいと思います。

クーター博士が指摘されたように、この試験には *Xenopus* がもっとも適した選択肢でしょう。系統がきちんと確立されていますし、幼生発生の特徴もよく分かっています。曝露臨界期については、生存率や試験の感度および変動を左右する可能性がありますので、考察しておく必要があります。

その例として、EDSTAC の作業過程における尾吸収アッセイの推奨があります。両生類幼生の発生を見てみると、この図は大ざっぱなグラフですけれども、オタマジャクシが成長して発生段階が進むことは、尾の長さが増加することで示されます。その後、変態期の頂点において尾が吸収されます。これが尾吸収アッセイの基礎です。

しかし、内因性の甲状腺ホルモンの濃度が非常に高い場合には、アゴニストもしくはアンタゴニストの作用が現われにくくなるために、臨界期の感度がそれほど高くないものになる可能性があります。ですので、幼生が甲状腺ホルモンへの感受性を獲得するよりも前の段階に曝露時期をずらすのがよいかもかもしれませんが、甲状腺ホルモン自体の分泌量が多くない可能性があります。これがドイツ式プロトコールの基礎です。

この仕事における一つのツールにしようことを簡単に述べておきます。それは、変態試験のエンドポイントとして成長と発生を調べる場合には考慮しておかなければならないこと、すなわちアピカルなエンドポイントです。これらエンドポイントは、甲状腺ホルモン系に複数の影響を統合したものになり得ます。

両生類の内分泌においてエストロゲンが幼生の発生に影響を及ぼしうることは、かなり以前から知られていました。我々はブリクサムの研究室で、*Xenopus laevis* の2種の幼生発生に対して  $17\alpha$ -エチニルエストラジオールが及ぼす影響について調べてみました。 $17\alpha$ -エチニルエストラジオールを10から1000 ng/リットルで曝露させたところ、幼生が完全に変態を完了するまでにかかる日数で表わされる発生時間が濃度依存性に増加することが分かりました。また、16 ng/リットルでその遅延は有意になりました。

一方、同じ濃度範囲と同じ曝露システムを用いて固有種である *Rana temporaria* を調べてみました。この場合に用いたエンドポイントは前肢の萌出です。これは明瞭な発生エンドポイントです。この実験の場合もやはり、高濃度において発生抑制が見られました。しかし、16 ng/リットル程度の低濃度においては、むしろ発生促進が出現しました。ただし、これは溶媒の作用による交絡の可能性があります。これは蒸留水コントロールで、こちらは溶媒コントロールで促進があります。以上のデータは、*Xenopus* から固有種に外挿する際には注意を必要とするかもしれないことを示しています。

両生類変態アッセイに関するいくつかの問題を総括するためには、エストロゲン類や全身毒性物質などの甲状腺以外から来る影響による偽陽性の可能性について考察しておく必要があります。また、甲状腺ホルモン系が攪乱される可能性のあるポイントは複数存在することも考慮しなければなりません。我々がやっているのは、標的部位における生合成、輸送、排泄、作用の攪乱なのかもしれません。

ですので、生化学的および分子的バイオマーカーを追加して調べる必要があるでしょう。そうすれば、いずれのアピカルな作用の基礎となっているメカニズムを確定することができます。そうなれば、これが発生に影響しているのだと述べるのが可能になり、バイオマーカーを根拠にして、それは甲状腺ホルモン様作用による影響であり、他の何ものでもないことが分るようになります。

そういうわけで、これらバイオマーカーが存在していない時は、それがスクリーニングなのか試験なのかを議論する必要があります。なんだか語義論のようですが、ちゃんと考えておく必要があります。また、この試験の有効性についても検討し、哺乳類アッセイにおいて有望な甲状腺ホルモンエンドポイントの開発を睨んで、化学物質を共有させておく必要があります。

両生類の生殖-発生試験についての考察を簡単に試み、結論を出してみたいと思います。今回の場合も、パーソナルライフサイクルかフルライフサイクルによって、ECETOC が推進している段階試験のいずれになるかが変わってきますので、中間に置いておきます。

これはあくまでも思考実験です。用いられる曝露期とエンドポイントについては、より低次段階で得られる情報および、変態における作用を見るのか、それとも別のエストロゲン様活性試験における作用を見るのかによって、変わってくるでしょう。

種の選択においては、1世代の長さについて考慮する必要があります。その長さによって、試験の日数や経費が変わるかもしれないからです。

指摘したように、曝露経路については、多くの両生類は成体期は陸生であるので、ライフサイクルを調べる場合には、幼生期から成体期までで曝露をどのくらい持続するかが考慮されなければなりません。それについては研究が必要です。

OECD の会議で私が同意したように、*Xenopus* は高次段階の試験での試験動物種としては、世界の多くの地域についての生態学的代表にはならないだろう、という点は、おそらく皆からの同意が得られると思います。南アフリカならば当然、生態学的代表になりますが、この種を他の固有種の代替種として用いることができるかどうかについては、調べる必要があります。先ほどお見せしたデータに基づけば、議論の必要があると思います。そのために、適切なモデルの有効性検討を行わなければなりません。

時間に限りがありますので、このスライドは飛ばします。どちらにしてもあまり正確なものではありませんので。要するに、カエルと無脊椎動物は、その他の動物種からずっと立ち遅れている、ということです。

まとめです。私が指摘しておきたいのは次のことです。野生の水生生物を対象にした環境毒性学の多段階試験アプローチでは、低次段階の試験は特定のバイオマーカーを用いてメカニズム関連の情報を提供し、高次段階の試験はアピカルなエンドポイントを用いてアピカルなデータを提供します。その両方をうまく組み合わせることで、個体群レベルでの作用に及ぼす影響を予測することが可能になるかもしれません。

最後に、魚類の仕事を行ったトム・ハッチンソン、カレン・ソープ、グレース・パンター、あらゆる面で助けてもらったネイジーン・パウンズの各共同研究者にお礼を申し上げます。また、このとても重要な会議を主催し、私を日本に招いて話す機会をくださった環境省と主催者の皆さんにもお礼申し上げます。ありがとうございました。