

魚類への有害性評価のための試験体系

横田 弘文

財団法人化学物質評価研究機構

(スライド-1)

化学物質評価研究機構の横田です。私どもは、環境省の取り組みの一つとして、内分泌攪乱作用が疑われている化学物質の魚類への有害性を評価するための試験を実施しております。そこで、本日は「魚類への有害性評価のための試験体系」というタイトルで、実施しております一連の試験の概要についてご説明いたします。

(スライド-2)

先程ご説明がありましたように、現在環境省では SPEED'98 の中でリストアップした物質の中から、優先して評価を行う必要のある物質を選定しています。そして、優先順位の高い物質については、有害性を評価する試験を実施している段階です。現在、評価作業が進行中のものは、魚類への影響評価と人健康影響評価であります。

(スライド-3)

これは、魚類への影響評価を行うための試験体系です。国際的な内分泌攪乱物質の評価体系は、OECD を中心に検討されていますが、ここで示した体系も基本的には OECD の評価体系にならったものです。試験体系は大きく「スクリーニング」と「試験」の項目に分かれており、「スクリーニング」とは候補物質が魚類に対して内分泌攪乱作用を有するか否かを迅速に判定するものです。このスクリーニングにおいて、内分泌攪乱作用を及ぼす疑いがあると判断されたものについては、次の「試験」に進みます。一方、「試験」では非常に長期間の曝露を行い、どの位の濃度で内分泌攪乱作用が現れるかを最終的に明らかにするものです。また、内分泌攪乱作用のメカニズムを確認すると共に、これら魚を用いた試験結果を補完する目的で、ホルモンの受容体を用いた結合アッセイも行っています。

(スライド-4)

先ほどの一連試験は、すべてメダカを用いて実施しています。メダカは我が国において従来の生態毒性試験に広く使われてきた実績があり、また、OECD で開発が進められている内分泌攪乱物質のテストガイドラインの検討魚種にも挙げられています。そして、メダカを用いる大きな利点は、自然の状態では性転換や雌雄同体が起こらないこと、そして、ふ化後 6 から 8 週で成熟し、生活環が短いところです。これらの特性は、雌雄同体といった性分化異常が観察された場合、化学物質の曝露による影響と判定することが可能でありますし、また生涯を通した曝露でも約 6 ヶ月間と他魚種に比べて短期間で実施可能です。

(スライド-5)

それでは、各試験につきまして順にご説明していきます。まずは、ビテロゲニン産生アッセイです。

(スライド-6)

ご存知のように、ビテロゲニンは卵黄のもとになる前駆タンパク質 (precursor protein) で、通常は成熟したメスでのみ産生され、オスでは極微量にしか存在しません。ビテロゲニンは、肝臓の細胞にあるホルモンの受容体に雌性ホルモンがちょうどカギと鍵穴のように結合し、そして、遺伝子の転写が起こりタンパク質として産生されます。産生されたビテロゲニンは血中に放出され、卵巣に運ばれます。オスの個体にもこの受容体は存在しているため、受容体と結合するようなホルモン様物質に曝露されると、同様にビテロゲニンが高濃度に産生されます。

(スライド-7)

アッセイは、成熟したメダカをこのような曝露装置に設けた水槽に入れ、化学物質を溶かした水を連続して流すことにより曝露します。曝露期間は最大 21 日間で、終了時に肝臓を摘出し、ビテロゲニン濃度を測定します。

(スライド-8)

これは、オスのメダカに合成エストロゲンでありますエチニルエストラジオールを曝露した結果です。横軸はエチニルエストラジオールの濃度、縦軸は肝臓中のビテロゲニン濃度を示しています。このように曝露濃度が高くなるにつれて、ビテロゲニン濃度も高くなっており、本アッセイはメダカに対するエストロゲン作用を検出可能であります。現在、このアッセイにより多くの候補物質について調査しております。

(スライド-9)

続きましては、パーシャルライフサイクル試験です。

(スライド-10)

この試験は受精卵から曝露を開始して、生殖腺の分化、発達期を経て、成熟初期まで曝露を行います。そして、曝露終了時には、ひれの形からオスかメスカを判定し、また、生殖腺については顕微鏡を用いて組織学的な検査を行います。そして、主として性分化に及ぼす内分泌攪乱作用を評価することを目的としています。

(スライド-11)

これは、優先物質の1つでありますノニルフェノールを用いた試験結果で、生殖腺を組織学的に観察した写真です。上の左側の写真は正常なオスの精巣で、周囲には精子となる細胞(testicular germ cell)が、また中心部には精子が密集しています。左側の写真は正常なメスの卵巣で、この丸い細胞1つ1つが卵のもとになる細胞(oocyte)です。下の写真はノニルフェノールに曝露されたオスの精巣の写真です。精子が密集しているとなりに卵のもとになる細胞が観察され、精巣卵(testis-ova)の状態になっています。このように、ノニルフェノールはメダカの生殖腺の分化に影響を及ぼし、雌雄同体の生殖腺(intersex gonad)を形成させることがわかりました。

(スライド-12)

続きましては、フルライフサイクル試験です。

(スライド-13)

フルライフサイクル試験では 2 世代にわたる曝露を行い、その間各成長段階でこのように多くの項目について調査します。具体的には受精卵から曝露を開始し、胚の発生状態、ふ化への影響を観察します。ふ化後は、死亡、症状を毎日観察すると共に、ふ化後約 60 日令の時点で成長と性分化への影響を調査します。さらに、ふ化後約 70 日令から 100 日令までは、毎日産卵した卵の数とその受精率(fertility)を調査し、繁殖に対する影響を評価します。また、曝露された親メダカから得られた受精卵についても曝露を継続し、1 世代目と同様の観察を行います。こうして全生涯に及ぼす内分泌攪乱作用を評価し、候補物質がどれ位の低い濃度で影響を及ぼすかという「最小作用濃度(Lowest-observed-effect concentration)」を求めます。

(スライド-14)

それでは最後にホルモン受容体結合アッセイについてご説明いたします。

(スライド-15)

これまでご紹介したアッセイ法及び試験法は、いずれも生きたメダカを使ったものでした。しかし、このホルモン受容体結合アッセイは、大腸菌によってタンパク質として作り出されたメダカのホルモン受容体を用い

るアッセイです。その原理をここに示しておりますが、大腸菌が作り出したメダカホルモン受容体は鍵と鍵穴の関係で、このようにホルモンと結合します。ここにホルモンと同様に受容体と結合する化学物質を混ぜますと、一部の受容体はホルモンそのものでなく、この化学物質と結合します。こうして、候補物質がホルモン受容体と結合する特性を持っているか否かを調べるアッセイ法です。

(スライド-16)

これはメダカのエストロゲン受容体とヒトの受容体それぞれに対するアルキルフェノールの結合性をまとめた表です。エストラジオールに対する結合強度(binding affinity)を 100%とした場合、メダカの受容体のノンニルフェノール及びオクチルフェノールに対する結合強度は、それぞれ 8.1%及び 16%でした。一方、ヒトの受容体に対する結合強度はわずか 0.061%及び 0.032%しかありませんでした。このことから、メダカのエストロゲン受容体は、アルキルフェノール類に対してヒトの受容体よりも強い結合性を有することが示唆されました。

(スライド-17)

このように、私どもは種々のアッセイ法及び試験法を用いて魚類に対する有害性の評価作業を進めています。そして、現在これら 10 種類の物質に対して試験を実施しているところであります。

以上で発表を終わります。ご清聴有難うございました。