

化学物質の内分泌かく乱に関するテストガイドライン開発

環境創造研究所 大西 悠太

内分泌かく乱作用を持つ化学物質(いわゆる環境ホルモン)の生物・生態系に対する影響の解明に向けた取り組みが国際的に進められています。日米共同で開発を進めている魚類や両生類に対する悪影響を評価するための生物試験法について紹介します。

※本報告は、環境省から委託を受けた業務の成果をもとに作成しました。

はじめに

ある種の化学物質が生物の内分泌系に悪影響を及ぼすこと(いわゆる環境ホルモン問題)は、1990年代後半に顕在化しましたが、未だに科学的に解明されていないことも多く、国際的に解明に向けた取り組みが進められています。ここでは、日本が米国と共同で取り組んでいる魚類や両生類に対する影響評価のためのライフサイクル試験法のガイドライン開発について紹介します。

OECDにおける生態毒性試験法ガイドラインの開発

OECD(経済協力開発機構)では、化学物質の生物影響を調べる試験(生態毒性試験)に関して、加盟国が相互に試験データを利用・承認できるように、国際的に調和のとれた方法を示したガイドラインを整備しています。このテストガイドライン(以下、TG)の開発は、加盟国の提案に基づいて進められますが、国際的なリングテスト(検証試験)に基づく試験法の検証評価(ピアレビュー)の実施等が求められ、提案から承認までには通常5年以上の期間を要します(図1)。

内分泌かく乱に関するTGの開発は1996年に着手されました。魚類および両生類については、これまでに4種類のスクリーニング試験(主に作用の有無を調べることを目的とする短期の試験)のTGが承認されています。

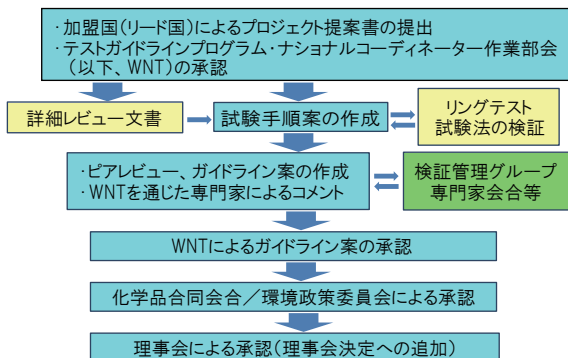


図1 OECDにおけるテストガイドライン開発

日米二国間協力によるテストガイドライン開発

内分泌かく乱物質(以下、EDCs)の生物影響としては、

生殖機能に対する有害性(生殖腺の発達不全、繁殖力低下等)が最も懸念されます。魚類や両生類に対する影響を適切に把握するには、生殖腺の発達が始まる前の卵や稚仔の時期から、発達が完了する成体期を通して化学物質(試験物質)に曝露するライフサイクル試験法による評価が必要です。

日本と米国は、2004年からEDCsに関わる取り組みで協力していたことから、2009年に共同でOECD WNTへ魚類および両生類を用いるライフサイクル試験のTG開発プロジェクトの提案を行い、承認を受けました。以降、日米両国は、共同でベースとなる試験手順を作成し、各種の陽性物質(生物に対する作用が既知の物質)を用いた試験等に基づく検証を実施しました。また、両国の試験担当者や行政官が参加する会議を毎年開催し(写真1)、検証試験の結果報告や意見交換を行う等、新たな知見や情報の共有を図りつつ、試験手順や条件等試験法に関わる課題について継続的に協議してきました。



写真1 日米会議(米国環境保護庁にて開催)

当社は、この日米二国間協力において、日本側事務局として会議の運営に携わるとともに、主に両生類の試験に関して、検証試験の実施から、試験法に関わる実務者レベルでの米国側との協議等を担当しました。

魚類の試験(メダカ拡張一世代繁殖試験)

魚類については、試験生物としてメダカを用い、成熟した成魚(親世代)から、次世代(子)を経て、次々世代(孫)まで、継続的に化学物質(試験物質)で曝露を行う多世代試験をベースに試験法に関わる技術や条件等が検討

されました。特に魚類の試験では、EDCsの繁殖能力に対する影響を高感度で再現性よく評価できることが重要です。そこで、繁殖能力を反映する評価項目(エンドポイント)である産卵数に着目して統計学的検出力の観点から解析を行い、適切な繰り返し数(濃度あたりの水槽数)等の条件検討を行いました。そのほかにも、水温は25℃と26℃のどちらが妥当か、評価項目測定に適したサンプリング時期は8週目か9週目か等、標準化に向けた試験法の細部について日米会議で検討協議が行われました。

日米両国が実施した検証試験の結果やピアレビューを踏まえ、「親世代から子世代が産んだ卵(孫世代)の孵化まで」を試験期間とする「メダカ拡張一世代繁殖試験」(Medaka Extended One-Generation Reproduction Test: 以下、MEOGRT)としてガイドライン化することがOECDの専門家会合で合意されました。

MEOGRTでは、評価項目として主に子世代で内分泌かく乱に関わる項目(ビテロゲニン、二次性徴、生殖腺組織による性比等)、繁殖に関わる項目(産卵数、受精率)とともに、卵のふ化率、成魚の全長・体重を調べるため、生殖機能に対する内分泌かく乱作用とあわせて、ライフサイクルを通じた魚類に対する化学物質の有害性(生存、成長、繁殖に対する悪影響)を評価できます(図2)。

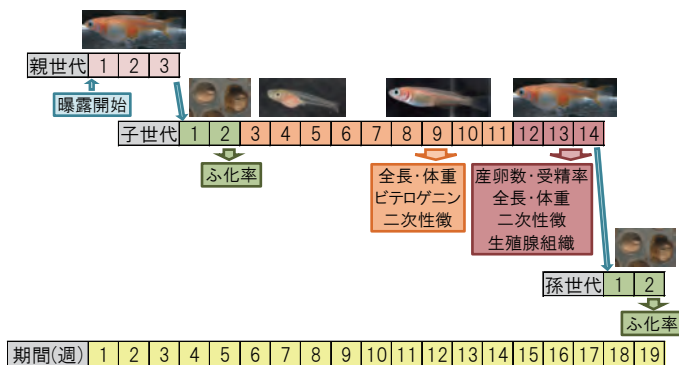


図2 メダカ拡張一世代繁殖試験

両生類の試験(幼若両生類発達・成長試験)

両生類の試験法については、当初、42週間と長期の試験法を検証しましたが、試験に要するコストを勘案し、「NF stage 8-10(ふ化後10時間以内の胚)から、NF stage 62(尾部がほぼ消失した状態)の10週間後まで」を試験期間とする「幼若両生類発達・成長試験」(Larval Amphibian Growth and Development Assay: 以下、LAGDA)がTG化されました。LAGDAには、変態後も水中で生活するアフリカツメガエルを用います(写真2)。LAGDAについても、日米会議では、試験に供する胚の時期や餌料の種類等、試験法の細部について検討協議が行われました。



写真2 アフリカツメガエル(左)とLAGDAの実施風景(右)

カエル類(無尾両生類)では、幼生期(オタマジャクシ)から成体(カエル)へ成長する際に、尾部の消失と四肢の発達という劇的な形態変化がみられます。この過程を変態といいます。変態は、甲状腺ホルモンにより調節されていることから、LAGDAでは生殖機能に対する評価に加えて、変態に関わる項目(NF stage 62到達に要した日数、甲状腺組織)を調べることで、化学物質の甲状腺機能に対する有害性も評価できます(図3)。



図3 幼若両生類発達・成長試験

当社で実施したベンゾフェノン-2(以下、BP2)という化学物質を用いた検証試験では、濃度6mg/LのBP2で曝露した個体は無処理の対照と比較して変態に有意な遅延がみられ、甲状腺組織にも肥大や細胞の増加等の異常が確認されました(写真3)。また、遺伝的オス個体の生殖腺(精巣)を調べた結果、内部に卵母細胞がみられる個体や卵巣を持つ性転換した個体が確認され、LAGDAが化学物質の生殖腺と甲状腺に対する内分泌かく乱作用を同時に評価できる有用な試験法であることが示唆されました。

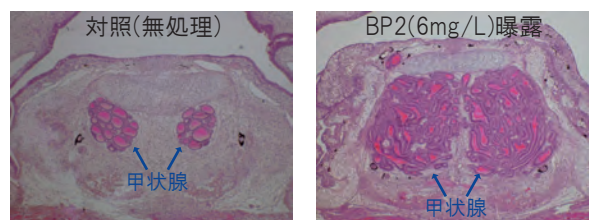


写真3 BP2の曝露により肥大した甲状腺組織

おわりに

MEOGRTおよびLAGDAは2015年4月のWNT会合でTG案が承認されました。最終的な承認を受けた後、TGが公表されます。

化学物質の内分泌かく乱作用については、未解明な点も多く残されています。当社では、今後も当社の技術力や設備を駆使して、新たな試験法の開発、内分泌かく乱を含む化学物質の生態影響の評価等に取り組んでまいります。