

化学物質の内分泌かく乱作用に関する日英共同研究について(案)

1. 経緯

平成 11 年 3 月の G8 環境大臣会合において、内分泌かく乱化学物質について日英両国間で共同研究を実施することが合意され、5 カ年の日英共同研究事業が開始された。平成 16 年度(2004 年)には、日英両国間の協議により、さらに 5 年間の延長を決定し、第 2 期(~2009 年)の日英共同研究として、4 つのテーマを設定して研究を推進した。さらに、平成 20 年 10 月の第 10 回日英共同研究ワークショップにおいて日英共同研究を延長することの合意を受けて、第 11 回ワークショップにおいて、2009 年から 5 カ年の継続についての合意文書への調印を行い、平成 22 年度から第 3 期目の日英共同研究を実施してきた。

平成 26 年 11 月の第 16 回ワークショップにおいて、日英共同研究を 2015 年からさらに 5 年間継続することに合意し、平成 27 年 4 月に、本事業の継続に関する合意文書に調印した。

2. 第 4 期日英共同研究について

第 4 期の日英共同研究では、第 16 回日英共同ワークショップにおける日英の研究者による議論等を踏まえて、新たに設定した 4 つのコアプロジェクトのもとで調査や研究を推進している。

コアプロジェクト-1

処理排水中及び環境中の主要な内分泌かく乱作用を有すると疑われる化学物質及び新たな化学物質の挙動を推定するための研究並びにそれら化学物質の環境中への排出を低減するための研究

コアプロジェクト-2

内分泌かく乱化学物質のスクリーニングのための各種メカニズムに対応する様々な分子メカニズムの解析並びに試験管内スクリーニングシステムや遺伝子組換え魚類の開発等に関する研究

コアプロジェクト-3

水生生物等に対する生殖や発達に対する影響を理解するための化学物質試験における

エンドポイントの評価等に関する研究

コアプロジェクト-4

内分泌かく乱化学物質と疑われる物質が個体群に及ぼす影響のシミュレーション並びに英国及び日本における野生生物への環境リスクの解析に関する研究

3. 平成 30 年度の成果について

平成 30 年度は、第 19 回日英共同研究ワークショップでの検討結果等を踏まえて、各コアプロジェクトにおいて、以下に示す内容について調査・研究を実施した（詳細は別添 1 のとおり）。

また、第 20 回化学物質の内分泌かく乱作用に関する日英共同研究ワークショップを平成 30 年 11 月 8 日、9 日に英国ケンブリッジ(Howard Building-Downing College)で開催し、日英両国の研究担当者による研究成果の発表及び意見交換並びに行政担当者による情報交換等を行った（別添 2 参照）。

コアプロジェクト-1

環境中での医薬品類等の挙動を推定するため数理モデルについて、実河川への適応等に関する検討を行う。また、下水処理過程及び河川内等における医薬品類等の挙動及びレポータージーンアッセイ法等を用いて医薬品由来の生理活性に関する検討を行う。

コアプロジェクト-2

遺伝子改変メダカ等の開発及びそれらを用いた分子、細胞、組織レベルでの内分泌かく乱作用の発現メカニズム等の検討を行う。

コアプロジェクト-3

化学物質の内分泌かく乱作用の試験に用いるメダカ等の試験生物について、試験に用いる場合の課題等の検討を行う。

コアプロジェクト-4

野生のカエルや沿岸海産魚等における精巣卵発現等の知見の蓄積及びそれらの化学物質との関連性についての検討を行う。

4. 平成 31 年度の実施内容について(案)

平成 31 年度は、第 20 回日英共同研究ワークショップでの検討結果等を踏まえて、各コアプロジェクトにおいて、平成 30 年度に引き続き、以下に示す内容について調査・研究を

実施する。

また、日本にて開催予定の第21回化学物質の内分泌かく乱作用に関する日英共同研究ワークショップ(期日及び場所は未定)において、日英両国の研究担当者による研究成果の発表及び意見交換並びに行政担当者による情報交換等を行う。

コアプロジェクト-1

環境中での医薬品類等の挙動を推定するための数理モデルについて、実河川への適応等に関する検討を行う。また、下水処理過程及び河川内等における医薬品類等の挙動及びレポータージーンアッセイ法等を用いた医薬品由来の生理活性に関する検討を行う。

コアプロジェクト-2

遺伝子改変メダカ等の開発及びそれらを用いた分子、細胞、組織レベルでの内分泌かく乱作用の発現メカニズム等の検討を行う。

コアプロジェクト-3

化学物質の内分泌かく乱作用の試験に用いるメダカ等の試験生物について、試験に用いる場合の課題等の検討を行う。

コアプロジェクト-4

野生のカエルや沿岸海産魚等における精巣卵発現等の知見の蓄積及びそれらの化学物質との関連性についての検討を行う。

平成 30 年度日英共同研究の成果について

コアプロジェクト-1

コアプロジェクト-1 では、内分泌かく乱作用が疑われる化学物質及び医薬品類等の下水処理過程及び環境中での挙動等に関する検討（調査研究）を行い、以下の成果を得た。

- 本年度は、医薬品アジスロマイシン AZM の底質収着の予測可能性評価を目的に研究を実施した。河川底質 8 種において、線形の収着等温線の傾き (K_d) と陽イオン交換容量 (CEC) には有意な相関があったが ($R^2=0.58$, $p<0.05$)、CEC の鉱物と腐植の内訳 (CEC_{mnl} と CEC_{om}) を説明変数とした K_d の重回帰式には高い適合性が確認され ($R^2=0.90$, $p<0.01$)、 CEC_{mnl} と CEC_{om} を別個に考慮することで AZM の K_d の予測精度が向上することが示された。鉱物と腐植の収着試験で得られた K_{cec} (=単位負電荷当たりの K_d) に基づいた底質 K_d の予測値は、実測値の 1.7~7.2 倍 (平均値で 3.4 倍) となり、予測精度は良好であった。鉱物 4 種の K_{cec} のばらつきも小さかったことから、本研究で測定した鉱物と腐植の K_{cec} を用いることで、構成成分が異なる底質に対しても、AZM の K_d が予測可能であることが示唆された。
- 世界で初めて、魚類のセロトニントランスポーター SERT が抗うつ薬によって阻害を受けること、しかもヒト SERT よりも強い阻害を受けることを示した。少なくとも分子レベル(抗うつ薬とトランスポーターの相互作用)では、抗うつ薬はヒト SERT よりもメダカ SERT やゼブラフィッシュ SERT を 10~100 倍強く阻害する。下水処理場放流水から、ヒト SERT だけでなくメダカ SERT 及びゼブラフィッシュ SERT に対する抗うつ薬の薬理活性が検出された。特に、Sertraline 当量値換算の結果から、ヒト SERT よりもメダカ SERT やゼブラフィッシュ SERT は 20~50 倍強く阻害される結果が得られた。

コアプロジェクト-2

コアプロジェクト-2 では、化学物質の内分泌かく乱作用を把握するための分子生物学的アプローチによる影響評価について以下のように検討・調査研究を行った。

- 生体内での各エストロゲン受容体サブタイプの機能を明らかにするために、ゲノム編集により各 *Esr* 遺伝子をノックアウト (KO) し、表現型解析を行った。*Esr2a* KO メダカが、卵管の閉塞により不妊であることを見いだした。

- メダカの各 *esr* 遺伝子の発現を解析し、各 *Esr* サブタイプによる複雑な遺伝子発現制御メカニズムの一端を明らかにした。
- カエルのアンドロゲン受容体をクローニングし、カエルのアンドロゲンに対する内分泌かく乱研究に必要なリソースとして整備した。

コアプロジェクト-3

コアプロジェクト-3 では、化学物質の内分泌かく乱作用を推定、評価するための試験法に関する検討（調査研究）を行い、以下の成果を得た。

- ミナミメダカ及びキタノメダカの2種メダカの表現的オスに対して、 17β -エストラジオール **E2** を種々の濃度で1週間暴露し、肝臓ビテロゲニン **VTG** 濃度の変化を比較した。以前に実施した同様の暴露試験と同様に、両種のエストロゲン応答性に大きな違いは認められなかった。
- 両種メダカの表現的メスに、種々の濃度で 17α -メチルテストステロン **MT** を1週間又は2週間暴露し、尻ビレ軟条上の乳頭状小突起数を比較した。暴露2週間において、ミナミメダカの乳頭状小突起数は、キタノメダカの2倍以上を示した。個体差が大きく、統計学的有意差は認められなかったが、アンドロゲン応答性に関しては、ミナミメダカが優る可能性が示された。その一方、両種の通常成熟オスで形成される乳頭状小突起数の把握といった、基礎的知見の集積も、厳密な比較において必要であることも浮き彫りにされた。
- 数種のプライマーを両種に適用し、*Dmy* 及び *Dmrt1* 遺伝子の増幅による性判別を行ったところ、ミナミメダカにおいては全て良好な結果が得られたが、キタノメダカにおいては不適であった。同時に、異なる抽出法を用いて得られた **DNA** を用いた場合も、上記結果と同様であった。他系統のキタノメダカでは、これら方法による遺伝的性判別が実施可能であることから、当該環境で飼育しているこの系統特有の現象である可能性が考えられた。

コアプロジェクト-4

コアプロジェクト-4（その1）では、野生生物における個体群レベルでの影響等に関する検討（調査研究）を行い、野生のカエルを対象とする調査研究及び非侵襲的生態影響指標の確立のための研究として以下の成果を得た。

- 野生のトノサマガエルを対象とした精巣卵の発現状況等に関して調査した。新潟県北部地域の個体群から採取した個体における精巣卵を有する個体の頻度等は最近8年間の調査結果とほぼ同様であった。野生調査域で採集した卵塊から発生した個体の性比、

卵精巢を持つ成熟オス個体の存在から、少数ではあるが、性転換したオス個体（XXオス）及び水域におけるエストロゲン様活性の存在する可能性が示唆された。

- 野生両生類の生態影響評価のための非侵襲的方法として検討している雄性徴の一つである前肢第一指に形成される「指たこ (nuptial pad)」の外形定量が評価指標となるかを検討した結果、指たこ形成領域に対する肥厚部の相対面積及び乳頭状突起数は、指たこの発達の有効な外形的指標となることが示された。
- 個体群生息水域における内分泌かく乱作用能の定量分析のために必要な個体群サイズを非侵襲的に評価するために環境 DNA を用いた測定手法を検討した結果、実験室内水槽におけるメダカ、複数の無尾両生類種を用いた検討から、定量可能であることが分かった。さらに野外実験水槽においても環境 DNA を精製することで、同様に測定可能であることが示された。

コアプロジェクト-4（その2）では、野生生物における個体群レベルでの影響等に関する検討（調査研究）を行い、海産魚類を対象とする調査研究として以下の成果を得た。

- ボラの卵膜構成タンパク質の一つである ZPC5 及び ZPB 遺伝子の解析を進め、測定系を確立し、これをバイオマーカーとした環境エストロゲン汚染の実態調査を試みた。その結果、VTG 遺伝子の発現は下水処理排水の影響を受ける博多港で高いものの、ZP 遺伝子は、生殖腺の形態変化との関連性が高く、メス化に向かう過程で増加する可能性が示唆された。卵巣における *zpb* と *zpc5* の発現を比較した結果、*zpc5* よりも *zpb* において、エストロゲンの影響に起因する形態異常との相関が高いことを見いだした。
- 九州各地で捕獲したボラの生殖腺を組織学的に観察した結果、特に福岡市中央区荒津の下水処理施設排水口周辺で捕獲したオスのボラの生殖腺に、精巣卵、体細胞の増殖と生殖細胞の減少などの異常が観察された。ほかの水域についても、個体数は少ないものの、体細胞の増殖や、生殖細胞の減少は確認されており、より詳細な観察と解析を進める必要がある。

第 20 回日英共同研究ワークショップの結果について

1. 開催概要

第 20 回化学物質の内分泌かく乱作用に関する日英共同ワークショップ(The 20th UK-Japan annual scientific workshop on research into environmental endocrine disrupting chemicals) は、下記のとおり開催された。

日時： 平成 30 年 11 月 8 日(木)、9 日(金)

場所： 英国ケンブリッジ(Howard Building-Downing College)

出席者： 日本ー井口泰泉(研究統括者、横浜市立大学)、田中宏明(京都大学)、征矢野清(長崎大学)、山崎邦彦(環境省)、他(計 17 名)
英国ーチャールズ・タイラー(エクセター大学)、イオアナ・カチアダキ(環境・漁業・水産養殖科学センター)、アンドリュー・ジョンソン(生態水文センター)、ケイ・ウィリアムズ(環境・食料・農村地域省)、他(計 25 名)

2. 結果概要

第 20 回化学物質の内分泌かく乱作用に関する日英共同ワークショップでの報告及び協議事項等は下記のとおりであった。

(1) 日英共同研究における研究成果及び今後の計画について

両国の研究担当者より、各コアプロジェクトに関する研究成果についての発表が行われた。また、それらを踏まえて、今後の研究の方向性についての議論が行われた。

(2) 日英両国の研究者及び行政担当者等による情報交換等について

内分泌かく乱作用を含む化学物質の生態影響等に関する取組状況について、日本及び英国の参加者による報告及び意見交換等が行われた。また、今後も引き続き緊密に情報共有を行うことが確認された。

(3) 日英共同研究ワークショップについて

第 21 回日英共同研究ワークショップは、平成 31 年に日本で開催することが合意された。