

ミニレビュー

化学物質の安全性試験と生態系への影響評価

茂 岡 忠 義

(株)三菱化学安全科学研究所 横浜研究所

Testing Methods and Evaluation of Ecotoxicological Effects of Chemicals

Tadayoshi SHIGEOKA

Mitsubishi Chemical Safety Institute, Ltd, 1000 Kamoshida-cho, Aoba-ku, Yokohama 227-0033, Japan

次世代にかけがえの無い自然環境を残すためには、農薬を含めた化学物質についてもその環境生態系に対する安全性の評価が重要であることは言うまでもない。では環境生態系へのリスクをどのように評価し、リスクの削減を図るか？ 欧米諸国に比較して対応の遅れが指摘されていた農薬の生態系に対する影響評価も、農林水産省、環境庁の努力で、評価体系の検討、試験法のガイドライン化、GLP化等体制の整備が図られつつある。今回、農薬を主に化学物質の生態系に対する影響評価の現状について述べる。

化学物質も一般化学品（中間体を含む工業薬品、一般消費者用の洗剤等）、農薬、医薬品、動物薬等さまざまであり、その用途等によって環境への流入の仕方が異なるため、化学物質の特性や使用・廃棄の方法に応じた評価が必要である。また、ヒトへの有害性評価と異なって、一口に生態系といっても対象が一種の生物だけでは無いため、保護すべき生態系をどう捉えるかも問題である。全ての生物種に対する毒性を評価することは現実には不可能である以上、試験生物種をどのように選択するか、また、負担できる費用にも限界があるため、スクリーニングレベルの試験法から、膨大な費用がかかるマイクロズム、野外試験までをどう組み合わせるのが合理的であるか？ 得られた試験結果をどのように評価するのか？ また、リスク評価に際して、生物が暴露されるであろう化学物質の環境中濃度の予測或いは実測（暴露評価）が必須である。

結果の評価に関して、従来からの生態影響評価方法は用量-反応性が成立するとした評価法である。すなわち、投与量（暴露濃度）を増加させればそれに応じて毒性影響が強く発現するという関係が成り立つとしている。ヒトへの毒性リスク評価（哺乳類試験）は勿論、生態影響のリスク評価も従来からこの方法で行われている。また、費用の点から急性毒性の値を使用して、慢性的な影響を安全サイドで

推測することが一般的に行われるが、その際に使用するアセスメント係数（不確実係数）をどう設定するか、また、その根拠は充分であるかも議論のあるところである。最近問題となっている内分泌攪乱化学物質（いわゆる環境ホルモン）は従来の用量-反応関係が成り立たないのではないかと疑いが出ており、これが真実とすればリスクアセスメントの方法論が根本的に揺るがされることになる。

今回、米国及び OECD, EU 等の生態影響評価システムを紹介するとともに、生態影響研究分野における最近のトピックス及び内分泌攪乱化学物質の野生生物への影響についてもふれたい。

なお、今回はページ数の関係から図・表は省略したが、ご興味のある場合は第5回レギュラトリーサイエンス研究会のプロシーディングを参照されたい。

1. 生態系へのリスク評価

2.1 生態系に対する影響評価の考え方

化学物質の中で農薬は一般の工業化学品とは異なり、生物への作用を期待して意図的に環境に投入するものであり、したがって農薬を使用する限り、生態系に対する影響評価は必ず問題として取り上げられなければならない。散布された農薬は通常、最終的に水系に入ることが多く、したがって生態系の中で特に水生生態系に対する影響評価が重要である。ここでも水生生態系に対する影響を中心に述べる。

良く知られたことであるが、水生生態系は生産者→消費者→分解者→生産者のサイクルとして構成される。生産者は藻類等の植物であり、炭酸同化作用（光合成）により無機物から有機物を生産する。これが水生生態系を支える根幹となる。これを消費するミジンコ等の小動物が発生し（一次消費者）さらに小動物を餌とする魚類など大型の生物が

二次消費者として存在する。そしてこれらの生物が“死”を迎えたとき、分解して無機物に還元する微生物等の分解者が存在する。この食物連鎖が、散布された農薬等の流入により切断され回復不能な影響を受けてはならない。

1.2 生態系リスクアセスメントの手法

生態系への影響を評価する安全性試験についてもその複雑さに応じ、各種のレベルがある。スクリーニングレベルの *in vitro* 的手法から、個体生物を用いる *in vivo* 試験、集団レベルの試験、フィールドでの試験までであるが、現在のところ最も多用されるのは、比較的簡便に行える、魚類等の個体を用いる *in vivo* の短期試験(急性毒性試験)である。

これらの試験の結果を用いて生態系へのリスクを評価する。散布された農薬が環境中でどのくらいの濃度で存在することになるのか、その存在濃度で水生生態系の生物にどのような悪影響が予想されるのか、いわゆる暴露評価と影響評価を行って両者を比較しリスク判定を行う。環境中濃度は実際に分析的にモニタリングして知るのは大変手間がかかることであり、最近では数学的なモデルを用いて農薬の環境運命を予測し予測環境濃度を算出することが一般に行われる。他方、環境生物への有害性評価は試験生物での毒性試験結果を用いて行う。この際、データの質によってアセスメント係数(不確実係数)を10から1000の範囲で選定する。通常しばしば用いられる急性毒性データの場合、1000が用いられる。OECDの生態影響評価指針¹⁾では生物分類学的に異なる3種の毒性値が揃っている場合には最も毒性の強い値に対し100を用いてよいこととなっている。これから予測無影響濃度(Predicted No Effect Concentration, PNEC)を算出し、予測環境中濃度(Predicted Environmental Concentration, PEC)と比較してリスク判定を行うのが現在最も一般的に行われる方法である。

1.3 OECD 評価指針によるリスクアセスメントの実例

主に有機合成の中間体として用いられる2,4-ジクロロアニリンについて、1.2で述べたOECDの生態影響評価指針を用い、生態リスク評価を行った。OECDではNOECの代わりに、行政的判断から“許容できる”というニュアンスを含ませた最大許容濃度 Maximum Tolerable Concentration (MTC) という用語を用いている。この物質は急性、慢性の毒性値は測定済であるので、アセスメント係数の妥当性の検証ができる。急性毒性データである $L(E)C_{50}$ 値が3種揃っているので最小値に対してアセスメント係数は100を採用でき、その結果、水中でのMTC値は0.042 mg/lである。一方、慢性毒性データであるNOEC値も3種揃っているので最小値に対してアセスメント係数は10を採用でき、MTC値は0.0016 mg/lとなり、急性毒性値からのMTC値と大きく異なる。これはミジンコの慢性毒性に対するNOEC値が0.016 mg/lと、他の種に比較して極端に毒性が強いことに起因する。アセスメント係数を安全係

数的に捉えるならば、本来急性毒性の値を用いた場合の方がMTC値としては小さく出なくてはならない。急性毒性値が3種揃った場合はアセスメント係数として100を用いてよいというのは適切とは思えない。

2. 環境庁生態影響評価事業

2.1 環境庁生態影響評価事業の対象物質、試験項目および事業の意義

環境庁(環境リスク評価室)では平成7年度から10か年計画で、高生産量物質、環境汚染物質、水質規制対象物質、環境ホルモン物質など、何らかの形で生態系への影響が懸念される各種物質について、システムチェックに生態影響データを取得する事業を開始している²⁾。この事業の最終的な目標は生態系に対するリスク評価である。リスク評価には前述したように環境中の濃度と生態毒性に関する無影響濃度の双方の値が必要であるが、濃度に関して環境庁は既に20年前から問題となる物質の環境モニタリングを大掛かりに行っており、膨大なデータが集積されていると言える。

試験方法は藻類、ミジンコ、魚類を用い急性毒性試験、慢性毒性試験あわせて5試験であり、OECDガイドラインの方法で実施する。このうち、魚類延長毒性試験は当初、慢性毒性試験の位置付けで採用されたが、慢性毒性試験の範疇には入れがたいということで現在は実施されておらず、それに代わる慢性毒性試験として初期生育段階試験の採用が検討されている。

各種化学物質の生態毒性データについてはこれまでに膨大なデータが集積されている。しかし、そのデータの大半は学術雑誌に論文として掲載されたものであり、手法の開発など研究目的が中心であるため、同一の方法でのデータは少なく、比較がしにくい。構造活性相関などの基礎データとしては案外使えない。今回は同一のプロトコールでGLP下でデータが蓄積されるので、相互に比較可能なデータベースとしての価値が高い。試験種相互の感受性比較、アセスメント係数の検証など、多方面からのデータ解析が可能となり、地道ではあるが国際的にも貢献度の高い事業である。

2.2 結果の解析

—試験種相互の感受性比較、アセスメント係数の妥当性の確認—

これまでに当方で試験した41物質のデータを用いて試験種相互の感受性を比較した。その結果、急性毒性、慢性毒性ともに一般的にも言われていることではあるが、ミジンコの感受性が最も高いことが確認された。

現在、OECD等で用いられているアセスメント係数の妥当性確認のため、41物質のうち、水難溶性で試験溶液調製がしばしば困難な場合によくある、数値が〇〇以上と不等

号で表されたような場合を除いて、ミジンコおよび魚類(ヒメダカ)での急性毒性値 $L(E)C50$ と慢性毒性値 $NOEC$ の比を算出した(今回データの詳細は省略した)。

ミジンコの場合、急性毒性 48hr- $EC50$ 値と慢性毒性 21d- $NOEC$ 値の比を算出した。その結果、 $EC50/NOEC=40.9 \pm 58.2$ と、ばらつきは大きい。安全サイドで見ると 100 を見込めはほぼ十分といえることがわかった。これは OECD で 3 種揃った場合には慢性毒性のアセスメント係数が 10、急性毒性のそれは 100 でよいことになっており、比率としては $100/10=10$ であるが、これでは不十分であることが示唆される。実際、比が 10 以下の物質は少ない。さきに OECD の指針にしたがって 2,4-ジクロロアニリンの評価を行ったときにも同様なことが起こっていることから、その不適切さが裏付けられる。

同様に魚類(ヒメダカ)での急性毒性 96hr- $LC50$ 値と延長毒性 14d- $NOEC$ 値との比を算出した。 $LC50/NOEC=14.7 \pm 12.5$ とミジンコの場合と比較して小さい。先に述べたが延長毒性は OECD では慢性毒性とは位置付けておられず、脂溶性が高く生体に徐々に蓄積して急性毒性の発現に時間がかかる物質を対象としたものであり、急性毒性を延長して試験を行うものである。この比率からも慢性毒性とは位置付け難いことがわかる。

3. 新しい試験手法の開発—魚類鰓細胞への毒性—

3.1 未来環境創造型基礎研究プロジェクト

現在、次々に新しい化学物質が開発され製造・上市されている。既存の化学物質の生態影響評価も充分には行えていないのに、次々に新規の化学物質が出現しては評価が追いつかない。また、身の回りの環境汚染を調べ、例えば河川、湖沼等の環境水の有害性が懸念されるものかどうかを知るのに、いちいち分析しては追いつかない。このような目的から、河川水等の環境媒体が有害かどうか、まずトータルにいわゆるバイオアッセイの手法で把握し、問題であれば精査することが効率的に環境汚染を調べる一つの方法であろう。このような考え方で九大の内海教授を研究代表者として、20 余の大学等の研究機関が参加して環境庁未来環境創造型基礎研究プロジェクトが平成 9 年から発足している。参加した機関のアッセイ法の多くはヒトに対する毒性評価を目的としたものであるが、安科研の分担は水生生物に有害な環境汚染を鋭敏に検出できる方法を開発し、確立した方法を用いて多数の問題となっている物質について試験することである。

3.2 魚類鰓細胞を用いた細胞毒性測定法の開発—鰓機能阻害を指標とする意義—

今回われわれは水生生物特有の影響評価ということで魚類の鰓に着目した。よく知られているように魚類の鰓は哺乳類でいえば肺に相当し、ガス交換を行う呼吸器官である

と同時にイオン取り込み、排泄・浸透圧調節も行い、さらに外界からの異物も除去するきわめて重要な器官であるので、鰓に何らかの障害があれば生存にかかわる。しかも常に水中で化学物質の暴露を受けるので、化学物質の取り込みにおいてももっとも重要な器官である。

3.3 コイ鰓細胞に対する毒性

この考え方で鰓の機能に障害を引き起こす物質あるいは環境媒体に対して簡便に毒性をアッセイする方法を確立するため、コイの鰓細胞(鰓薄板由来)を用いることとし、組織培養後その株化を試み、成功した。倍加時間 5 日の上皮細胞である。

毒性評価法はよく知られた MTT 法の改良法である MTS-PES 試薬で呼吸にかかわる細胞内デヒドロゲナーゼ活性を測定する方法である。まだ、一部の結果を示すにとどまるがトリブチルスズはヒメダカ、ミジンコよりは感受性が低いものの、細胞毒性が $24hr-EC50=0.52 \text{ mg/l}$ と強い毒性を示した。簡便に大量の試料を処理することができるので、データを蓄積し解析すれば有用な方法となる可能性がある。

4. 内分泌攪乱化学物質(環境ホルモン物質)の野生生物への影響

4.1 野生生物への影響を考える上での考慮すべきポイント

最近問題となっている、内分泌攪乱作用があるのではないかと疑われている化学物質の中に、既存の農薬もかなりの数が含まれている。内分泌攪乱化学物質とは性ホルモン、甲状腺ホルモン様等の作用を有する物質のことであるが、一口に内分泌攪乱化学物質といっても問題は複雑であり、これまでに見出された野生生物の異常が、化学物質による影響と断定できるものは少ない。

問題とされ始めた最初の頃、魚類のメス化現象が大きく取り上げられたが、特に人口が密集した都市周辺の水系環境では人工の化学物質による影響を議論する前に、ヒト由来の天然女性ホルモンの流入による影響を、評価する必要があることが明らかとなりつつある。また、魚類等野生生物の性分化は水温や棲息密度などの環境条件にも依存する。これらの要因も判断しなくてはならない。

4.2 英国の河川および多摩川での事例

野生生物のメス化ということで大きな波紋を引き起こした英国の河川での雌雄同体魚の存在や雌魚に特有の卵黄たん白ビテロゲニンの雄性魚での検出、多摩川での雄コイの雌化も、河川水中の天然女性ホルモンおよび化学物質の分析により、現在ではノニルフェノールの影響とはいいがたく、女性ホルモン存在濃度との関連が疑われている。英国環境庁の報告では問題となった河川に流入する下水処理場の放流水中の天然由来女性ホルモン濃度はエストラジオー

ルが平均 11.0 ng/l, エストロンが平均 17.3 ng/l 以上であり, 雄のニジマスにビテロゲニンを産生するエストラジオール濃度が 10 ng/l 以上であるので, この検出濃度は天然女性ホルモンによる可能性を示唆するとしている^{3,4)}。

多摩川での事例も詳細は省略するが建設省が測定したエストラジオールとノニルフェノール濃度の結果⁵⁾から, 女性の尿由来のホルモンに起因する可能性が示唆された。このことから環境ホルモンの問題も十分バックグラウンドを確認して議論する必要がある。

4.3 環境生物を用いたアッセイ法

内分泌攪乱作用の検出手法として種々の *in vitro*, *in vivo* の手法が, 特にヒトに対する作用の評価を目的に提案され, また既に行われている。しかし, 環境生物に対する影響評価手法については, 実際のところ検討・確立された方法は少ない。女性ホルモン様物質に暴露された場合, 雄の魚に雌特有のたん白質であるビテロゲニンが生成し検出されるので, ビテロゲニンを簡便にアッセイする方法の開発が注目されている。また, メダカを用いてホルモン作用を検出する方法も検討されている。

さらに米国 EPA ではその EDSTAC (内分泌攪乱化学物質のスクリーニングと検査の方法に関する諮問委員会) の報告書⁶⁾でティア1スクリーニング (TIS) の方法として 1) カエルの変態アッセイおよび 2) 魚類の性腺復帰アッセイが提案されているが, 方法としての確立は未だ充分でなく, これからの検討が必要である。

5. 今後のトレンド

生態系に対する影響評価に関して, 従来のように個別の生物種に対する急性毒性中心で評価する方法には限界があることが明らかとなってきた。しかし, 慢性的影響を評価する手法は一般に大変な手間がかかり, 例えば既に OECD ガイドラインに定められているミジンコの繁殖阻害試験もとても気軽に行える方法ではない。また, 最近問題となっている生態系の生物に対する内分泌攪乱作用の有無を簡便に調べる方法も検討が始まったばかりである。また, 環境管理という視点でみた場合, 膨大な数に及ぶ化学物質を一物質毎にあるいは一農薬毎にその存在量を分析し

毒性を評価するより, 環境水トータルで毒性が懸念されるかどうか調べるほうが適切である。各種の毒性を簡便に, 高感受性で検出できることが究極の目標である。このような観点から, 1) *in vitro* で機能特化し, また高感受性で, これらの生物活性をスクリーニングする手法いわゆるバイオアッセイ法の研究 2) 従来ほとんど研究されていなかった新しい種類の毒性を検出する方法 (内分泌攪乱作用検出法, 免疫毒性検出法等) 3) 高感受性遺伝子改変生物の開発 (例えばノックアウトメダカ, 遺伝子導入魚の開発) 等が生態影響評価研究の分野で今後大きなウエイトを占めることになる。

引用文献

- 1) OECD: OECD Environmental Monographs No.92, Guidance Document for Aquatic Effects Assessment (1995)
- 2) 日本環境毒性学会: 生態影響と評価に関するセミナー'98 講演要旨集 p.24 (1998年7月30日, 東京)
- 3) U. K. Environmental Agency: R & D Technical Summary, p.38, November 1996
- 4) 西川洋三: アロマティックス 50, 348 (1998)
- 5) 建設省: 水環境における内分泌攪乱化学物質に関する実態調査結果 (前期調査), 1998年10月16日
- 6) EDSTAC: Report: July 16, 1998

略歴

茂岡忠義

生年月日: 昭和17年6月22日

略歴: 九州大学大学院理学研究科化学専攻修了

昭和43年 三菱化成工業株式会社入社中央研究所勤務

昭和52年 株式会社三菱化成安全科学研究所 (現 三菱化学安全科学研究所) 農薬, 一般化学品の環境安全性試験・研究に従事

現在 同社横浜研究所所長, 横浜国立大学客員教授兼任

学位 薬学博士

研究テーマと抱負: 化学物質の環境安全性評価, 特に生態系に対する影響評価および新試験法の開発。

今後は毒性データをどう使うか, 科学的・客観的なリスク評価にも力を入れたい。