

CERI NEWS

No.42 2003 July

巻頭言

「安全」と「安心」

最近、化学物質を含めた種々のリスクに関する文章や言葉のなかに、「安全」だけではなく、「安心」という言葉がよく使われる。例えば、「安全に安心して生活のできる町」などである。従来、リスクアセスメントにおいては「安全」が重視され、多くの規制や対策が考えられてきた。最たる対策はマニュアルづくりであろう。最近も、「小学校に不審者が入ってきたときのマニュアルがない」とか、「有事立法は緊急時のマニュアルの第1歩である」などといわれている。化学物質に関していうならば、化管法の施行に続き、化審法の改正案も承認され、「安全」ではかなり進展し、日本も公害先進国から少しは脱却しつつあるように感じる。

一方、「安心」という点では、少々心寂しい気がする。例えば、いくら良いマニュアルがあったとしてもそれに従わなければまったく無意味である。最近の事故や事件でこれに似たことがあったような気がする。すなわち、その化学物質の全ライフサイクルにわたる安全性に関する知識があり、そのマニュアルの重要性を認識し、自分の行為に対して常に適切な意識をもっていれば、無視・軽視・手抜きなどといったことは起こらないはずである。この知識と意識の形成にはリスクコミュニケーションが重要であり、「情報開示」と「人材育成」がその基本となる。もちろん、「情報開示」に関しては発信者が「嘘をつかない」が基本である。化学物質のリス

クに関しては、意図的ではないかもしれないが、情報の内容そのものだけではなく、その情報の有無に関しても実質的には非公開になっているケースもあるように思う。他方、受信者はこれらの情報を理解・評価・判断するための知識、特にリスクの定量的な考え方が必須である。また、発信者と受信者の間を仲介するマスメディアやいわゆる専門家の役割が重要であることは言うまでもない。「人材育成」に関してはこの仲介者を含めて教育に携わるものの責任でもある。化学物質の物化性状や毒性についての知識は当然であるが、われわれ人類は宇宙船地球号の一乗組員であり、生活においては3R(Reduce, Recycle, Reuse)を実行し、体を健康に、環境をグリーンに保つという意識をもたせることである。健康であれば自己防御機能が発揮され、各人の無影響量(NOEL)が大きくなり、グリーンな環境では微生物がその分解能力を十分に発揮し、遅滞なく環境濃度を下げるからである。これらの人材育成のための最良のテキストは開示された情報であり、「情報開示」と「人材育成」は車の両輪の様なものである。

すなわち、「安全」と「安心」には関わる人の正しい知識と適切な意識が重要であり、「安全」に関してはいうまでもなく、「安心」においても、化学物質評価研究機構が果たす役割を期待するところである。

大阪大学大学院薬学研究科 教授
財団法人化学物質評価研究機構 評議員
西原 力



CERI 財団法人 化学物質評価研究機構

CONTENTS

●巻頭言

「安全」と「安心」

大阪大学大学院薬学研究科 教授

財団法人化学物質評価研究機構 評議員 西原 力

●本機構の活動から

・第8回化学物質評価研究機構研究発表会開催

●特集1(化学物質安全部門Ⅰ) 久留米事業所

- ・既存化学物質安全性点検事業の加速化についてⅡ
- ・魚類による内分泌かく乱評価法開発について
- ・農薬GLP査察
- ・OECDガイドラインの整備状況

●化審法改正にともなうお知らせ

●技術報告 食生活の変化がコンクリートピット、ヒューム管に与える影響

●編集後記

本機構の活動から

第8回化学物質評価研究機構研究発表会開催

本機構は6月18日、経団連会館において第8回化学物質評価研究機構研究発表会を経済産業省のご後援により開催しました。発表会には400名弱の方々にご参加いただき、無事終了いたしました。

今回の発表会は「安全で安心できる社会を目指して」をサブテーマに本機構理事長近藤雅臣の挨拶ではじまりました。基調講演として、経済産業省製造産業局化学物質安全室 辻 信一室長に「化学物質管理政策の今後の展開」という演題でご講演いただきました。

特別講演は、理化学研究所ゲノム科学総合研究センタープロジェクトディレクター小長谷明彦 先生に「ポストゲノム解析におけるグリッド技術のインパクトについて」という演題でご講演いただきました。

お二人のご講演の間に、本機構職員が研究の一端として「生理活性アミン類の新規測定法の開発と *in vivo* モニタリングへの応用」、「ポリカーボネート中の微小異物とその一次構造に関する研究」、「マイクロアレイテクノロジーによる発がん性予測」の発表3題と各事業部門の技術報告5題を紹介いたしました。

発表会は定刻に終了し、引き続き懇親会が行われました。この懇親会を利用して、発表会の限られた時間で討議できなかった課題について、発表者と聴講者の間で熱心に議論が交わされていました。

今後も皆様にとりまして有意義な公開研究発表会にしたいと考えておりますので、今後ともよろしくお願いいたします。

<機構の職員による発表の概要>

発表1 生理活性アミン類の新規測定法の開発と *in vivo* モニタリングへの応用



日田事業所
一瀬 文雄

近年の高ストレス化、高齢化などの社会現象にともない、アルツハイマー病、うつ病、パーキンソン病などの精神および神経疾患が深刻な問題となっている。これらの疾患には、生理活性アミン類（インドールアミン類、カテ



コールアミン類およびヒスタミン等）が深く関与していることが知られている。さらには、花粉症、ハウスダスト、シックハウス症候群、農薬などの吸入物質にまつわるアレルギー等の健康障害にもこれらの生理活性アミン類の影響が示唆されている。

本機構では、これまでにスウェーデンのカロリンスカ研究所（吉武尚博士らのグループ）および福岡大学薬学部（山口政俊教授らのグループ）との共同研究により、新規蛍光誘導体化反応を用いる生理活性アミン類（インドールアミン類、カテコールアミン類およびヒスタミン等）の超高感度・高選択な新規HPLC測定法の開発に成功している。開発したインドールアミン類（セロトニンなど）およびカテコールアミン類（ノルエピネフリン、ドパミンなど）の新規HPLC測定法ではベンジルアミンを、ヒスタミンについてはPSE (4-(1-pyrene) butyric acid N-hydroxysuccinimide ester) を蛍光誘導体化試薬として用い、従来測定不可能とされていたサブフェムトモルレベルでの測定も可能である。さらに、脳神経領域研究における世界的権威であるカロリンスカ研究所との共同研究においては、開発した測定法と動物が生きたままの状態（*in vivo*）でのサンプリング法であるラットおよびトランスジェニックマウス等の脳微小透析法との組み合わせによりアルツハイマー病やうつ病のメカニズムの解析などの応用研究を行い、本研究の有用性が世界的にも実証されている。また、これらの脳微小透析法は、種々の薬剤の薬効評価や新薬開発および脳神経機能の解明以外に行動学（運動量等）と脳微小透析法を組み合わせることにより化学物質等の神経毒性の評価にも有用である。

これらの微小透析法は、脳以外の末梢組織（肝臓、腎臓、皮膚、血管）にも適用可能で、末梢組織での医薬、化学物質の毒性評価および動態研究にも有用と思われる。

さらに最近、環境問題などが社会的に大きく取り上げられているが、それらのほとんどは吸入暴露による生体への影響である。本機構には化学物質安全センター設立の当初から化学物質、医薬、農薬などの吸入実験（全身暴露、鼻部暴露）に取り組み、これまでに数々のデータを世に送り出してきたという背景がある。

今後は、共同研究先との連携をさらに深め、高感度・高選択な測定法、脳および末梢組織微小透析法技術および吸入実験との組み合わせにより、環境物質、化学物質、医薬、農薬などの新規な吸入物質の毒性評価およびメカニズム解明の研究への一助になることが大いに期待される。

発表2 ポリカーボネート中の微少異物とその一次構造に関する研究



東京事業所高分子技術部
寶崎 達也

コンパクトディスク（CD）に成型した際に存在するポリカーボネート（PC）中の微少異物が存在すると、CD媒体への転写性能が劣るため、微少異物がどのようなものであるかを明らかにする必要がある。CD用途に用いるPCはゴミ等不純物が混入しないよう注意

が払われており、この異物はPC自体の構造によると考えられる。この微少異物の多く存在する溶融法PCと微少異物の少ない溶液法PCの構造解析を行い、その差異を調べた。

微少異物は、成型温度で未溶融な成分である。この未溶融な成分はPC中でも分子量が高い高分子量成分あるいは架橋成分であると考えられる。

通常、サイズ排除クロマトグラフィー（SEC）では濃度を検出しているため、微量の高分子量成分が存在したとしても検出されない。さらに、SECカラムを通過する際のせん断により分子切断が起こり、高分子量成分が存在したとしても検出できない。そこで、検出されるシグナルの強度が分子量比例する光散乱検出器をSECに取り付けたSEC/光散乱法を用いた。さらにSECカラムに充填されているゲルの粒形を大きくすることで、分子切断が起こりにくい状態で、高分子量成分の検出を行った。一方PCをクロロホルムに溶解させ、その際の不溶であった成分を熱分解ガスクロマトグラフィー（PyGC）で調べることで、架橋成分の解析を行った。

その結果、溶液法PCでは微量しか検出されない高分子量成分が溶融法PCでは多く存在した。さらに、クロロホルム不溶成分は溶液法PCに比較し溶融法PCが多く存在

することがわかった。この不溶成分をPyGCで調べると、カルボキシル分岐に起因するピークが検出された。上記結果より、微少異物は高分子量成分で分岐構造を有していることから、架橋成分であると考えられる。

発表3 マイクロアレイテクノロジーによる発がん性予測

ゲノム配列決定後の生命科学における重要なテクノロジーの一つとして、数千～数万もの遺伝子についてそれらの発現レベルを網羅的に解析することを可能にするDNAマイクロアレイが注目されている。トキシコロジーの分野においてもマイクロアレイはメカニズムに基づいた毒性評価を可能にする有望なツールとして取り入れられ、トキシコゲノミクスと呼ばれる新しい領域を開こうとしている。

新エネルギー・産業技術総合開発機構（NEDO）の「高精度・簡易有害性（ハザード）評価システムの開発」プロジェクトが平成13年度に5ヵ年計画でスタートした。本プロジェクトは、化学物質の生体影響評価の中でも不可逆的な毒性事象の一つである発がん性をターゲットにDNAマイクロアレイを用いた高精度な予測モデルの確立を中心課題としている。従来、長期の動物実験を基本に発がん物質の同定が行われてきたが、膨大な化学物質について評価を行うことは不可能であるため、メカニズムに基づきしかも短期間に発がん性を予測できる手法の開発はリスク評価の精緻化に不可欠である。

現在までに標準実験プロトコルの策定とラットcDNAマイクロアレイの作製を終了し、これに基づき発がん性モデル化合物について毒性データおよび遺伝子発現データの収集を行っている。これらの実験データと遺伝子機能のアノテーション情報および化合物情報を統合したリファレンスデータベースの構築を進めている。

今回抽出を試みた発がん性予測マーカー遺伝子セットを用いて遺伝子発現データを統計解析したところ、発がん物質と非発がん物質をそれぞれ2つのグループに分類できる結果が得られた。今後さらに集積される基礎データをもとに、発がん性予測により適切な遺伝子セットを選択してだけでなく、腫瘍の発生や進展に関わる転写制御系やパスウェイを考慮して遺伝子相互のネットワークを構築したマイクロアレイを作製する予定である。このことにより、メカニズムに基づいた発がん性短期予測モデルを確立することができると考える。



安全性評価技術研究所
大塚 雅則

特集 1 (化学物質安全部門 I)

久留米事業所

1. はじめに

久留米事業所は化学物質の安全性に関する試験研究の中で、物理化学性状の測定、微生物での分解度試験、魚類での濃縮度試験、魚介類（藻類、甲殻類、魚類）での毒性試験、医薬品の生体内動態・安定性試験および環境調査を行っています。研究分野ではこれらの試験方法の開発・改良を行っています。これらの中で、ここでは、既存化学物質の安全性評価、内分泌かく乱化学物質の魚類の評価法の開発状況などを紹介します。

2. 既存化学物質安全性点検事業の加速化についてーII

平成12年度から新エネルギー・産業技術総合開発機構（以下NEDOという）の補正予算の委託事業として実施されることとなった「化学物質総合評価管理プログラム」の中の「既存化学物質安全性点検事業の加速化」も3年目が終了しました。

最終目標を「平成18年度までに、フォールスネガティブの結果がでない定量的な構造活性相関手法による分解性・蓄積性に係る化学物質特性予測システムを完成する。また、これを用いて化審法上リスク管理の必要性の高い既存化学物質（原則年間生産・輸入量100 t以上の物質[約4,000]）に関する分解性・蓄積性に係る点検を実施する。」として掲げ、これまでPRTR対象物質等、早急に対応すべき物質の安全性点検を行いつつ、既存のデータおよび新たに取得するデータの体系化、集大成による知的基盤整備を図り、分解性、蓄積性にかかる化学物質特性予測システムを構築する事業を進めてきました。今回は予測システム開発におけるシステム間の比較ならびに試験の実施状況を紹介します。

1) 化学物質特性予測システムの構築

分解性予測システムおよび蓄積性予測システムの海外での動向の調査、それらとの比較検討を行いました。

現在、分解性についてはいくつかの予測手法が開発され、一部は市販のソフトウェアとして提供されています。構造型から分解性を予測できるソフトウェアとしてはUS-EPAがホームページで無料公開しているBIOWINとaccelrys社から発売されているTOPKATがあります。最近では代謝経路を予測してBOD分解度を算出するソフトウェアとして2002年にブルガリアのProf. ZLATAROV 大学からCATABOLが発表されています。CATABOLは中間代謝産物の生成量を予測することができます。国内では（財）化学物質評価研究機構（CERI）が経験則を基に開発した構造型から分解性予測が可能なシステムを1999年からインターネット上で無料公開しています。これらについての比較を行った結果を表1に示します。

すべての既存システムの予測精度は80%程度に止まっています。しかも、フォールスネガティブを出さない（難分解性物質を良分解性と予測しない）ようにする配慮がなされていないため、安全性評価に際し重大なエラーを犯しかねない危険性ははらんでいます。また、CERI以外のシステムは、用いたデータの試験条件や試験期間の相違を考慮していないという問題点があります。

本事業においては、データの追加などによりデータベースを充実させ、このデータをもとに、手法的に予測精度が最も高いCERIの経験則フローに構造活性相関手法を取り込むことによりシステムを改良しています。また、新たにフォールスネガティブの結果を出さない仕組みを考案して、安全性点検に適用できるシステムの開発を行っています。さらに、安全性評価に必要な分解中間体情報をデータ

表1 生分解性予測システムの比較表

項 目	BIOWIN	TOPKAT	CATABOL	CERI
データソース	データ集 589	データ集 894	データ集 732	データ集 615
予測結果の出力	易または難分解性	易または難分解性	①BOD 分解度 ②中間体の生成率	易、難分解性または予測困難
予測手法	置換基寄与法	置換基寄与法	経験則	①置換基寄与法 ②経験則フロー
検証データ	425 物質	421 物質	546 物質	510 物質
予測精度	76.7%	76.9%	82.4%	83.9%
フォールスネガティブの物質	70 物質 (全体の 16%)	79 物質 (全体の 19%)	65 物質 (全体の 12%)	48 物質 (全体の 9%)

ベースに加え、この情報を用いて、分解中間体の生成を予測することも可能なシステムとする予定です。

次に、蓄積性の予測手法に関して以下にBCFWINと本事業で開発予定の予測システムとの比較結果を表2に示します。

表2 蓄積性予測手法の比較表

項 目	EPA BCFWIN	CERI
予測エンドポイント	魚類のBCF	コイのBCF
データソース データ数	化審法データ（データ集） AQUIRE, HSDB, EFDB 等文献情報 694 物質（化審法 479 物質）	化審法データ（データ集+それ以降） 約 750 物質+新たに得られるデータ
魚種 試験方法	コイ、ファットヘッドミノー、 その他魚類 種々の試験手法が混在	コイ 化審法（GLP）試験のみ
手法	$\log BCF = a \log P + b + \text{補正項}$ 単一の式	$\log BCF = a \log P + b + \text{補正項}$ 構造毎に複数の式 部分構造で $\log P$ 適応対象外を抽出 有機性値・無機性値（ $\Sigma i / \Sigma o$ ）
結果の出力	$\log BCF$ 値	$\log BCF$ 値 定性的な予測値（高濃縮・低濃縮等）
精度	予測式開発に用いた物質全体の 90% が $\log BCF$ の誤差 ± 1 以内 フォールスネガティブ等考慮なし	類似構造検索などを付加してフォー ルスネガティブ（高濃縮性の物質を 低濃縮と予測）0 を目標
$\log P$	文献値+KowWIN 計算値	実測値+文献値+KowWIN 計算値
その他問題点等	魚種、試験法が異なるデータを同一 に取り扱っているため精度が低い	

魚類への生物濃縮倍率は、脂肪／水間分配のモデル系であるオクタノール／水間の分配係数と線形あるいは放物線状の関係があることがさまざまな化学物質群について報告されており、これらの関係式を用いることにより化学物質の構造から濃縮倍率を推定できます。

水中で解離する化学物質や金属化合物、フッ素化合物などでは、上述の線形あるいは放物線状の関係式が成り立たない場合があります。解離性の化学物質については解離度を補正した関係式について検討します。金属化合物では、水中での存在形態等と濃縮倍率との関係を調べ、生物濃縮に関与している存在形態等を検討しています。フッ素化合物については分配係数の測定法等を含め、濃縮倍率を予測するパラメーターを検討しています。

2) 既存化学物質の安全性データの取得

試験は図1のフローに従い、当機構をはじめいくつかのGLP試験機関で実施しています。

平成12-14年度の試験実施数を表3に示します。
(久留米・辻)

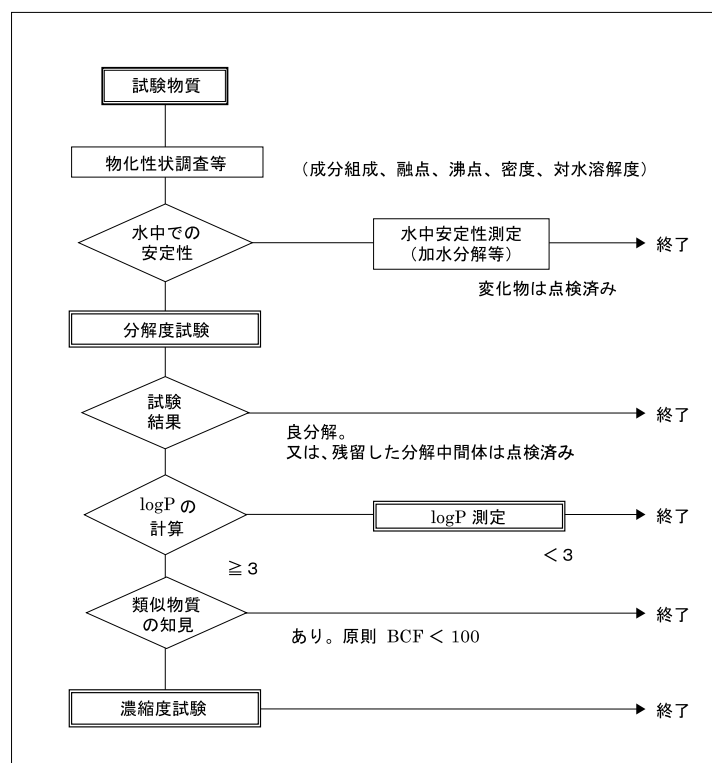


図1 試験のフロースキーム

表3 試験実施状況

年度 試験	1 2	1 3	1 4	合計
物理化学性状調査等	107	43	53	202
分解性試験	91 (3)	35 (1)	43 (2)	168 (6)
追加分解性試験	6	4	3	13
分配係数試験	9	4	23	35
蓄積性試験	39 (3)	13 (2)	18 (7)	70 (12)
蓄積性試験(RI)	1	1	1	3

注：分解性試験の（ ）内の数字は安定性試験
蓄積性試験の（ ）内の数字は部位別・排泄試験を実施した物質数を示す。

3. 魚類による内分泌かく乱評価法開発について

平成10年度よりメダカを用いた内分泌かく乱評価法の開発を進めてきました。それらの成果は順次公表するとともに、OECDでの魚類内分泌かく乱関係の会合に出席し、技術的な協力支援を進めています。今年の2月末には、環境省、岡崎国立共同研究機構を初め関係者のご協力を得て、岡崎国立共同研究機構にて国際シンポジウムを開催し、これまでの成果を発表することができました（プログラム添付）。また、関係する研究者の方々と共にメダカ小冊子を発刊しています（表紙と目次添付）。さらに、メダカの生殖腺の発達などに関して収集したデータは国立環境研究所のホームページに掲載させて頂きました（<http://w-edcdb.nies.go.jp/SHf/index.html>）。

最近OECDでは魚類を用いたスクリーニング方法としてnon-spawning screening assayという方法の検討が進められています。この方法では、成熟した雌雄の魚を化学物質に14日あるいは21日間処理し、二次性徴の変化、生殖腺異常およびビテロジェニン（卵黄蛋白前駆体）の誘導などをみることによって内分泌かく乱作用の有無を評価します。現在メダカ、ファットヘッドミノーおよびゼブラフィッシュを試験魚種として検討が行われています。この試験法のプロトコルはOECDの魚類専門家によって検討されてきましたが、プレバリデーション試験の開始に先立ち、先ほどの岡崎での国際シンポジウムの際にプロトコルの具体的な詰めなど関係者での協議も行いました。現在、プレバリデーション試験が進行中ですが、国内外からの4試験研究所が参加しています。当機構はこれらの試験の取りまとめを行うリードラボラトリーという役目を担っています。現在は、陽性対照物質（強エストロゲンと強アンドロゲン）を用いて試験を実施していますが、これらの結果を踏まえて、試験プロトコルの有効性の検討などが行われ

る予定です。今後、これらの検討が行われた後、本格的なバリデーション試験に進む予定になっていますが、その際には、どのような課題を含めてバリデーション試験を実施するかなどが検討され、より多くの試験研究所が参加して行われる予定です。

また、現在まで日本で開発してきたメダカのフルライフサイクル試験やパーシャルライフサイクル試験もOECDに提案されていますが、日本には多くの信頼性の高い公表データがあるため、国際的にも高い評価を受けています。これらの試験法も今後OECDで検討が進められていくものと考えられます。（久留米・前田）

メダカ国際シンポジウム

メダカ国際シンポジウム	
The 3 rd International Medaka Symposium, 2003	
Development of Test Methods with Medaka to Detect Endocrine Disrupting Chemicals	
February 27 and 28, 2003	
Okazaki Conference Center, Okazaki, Japan	
□ February 27, Thursday	
PROGRAM	
9:30-9:45 Opening Address	
I. Kazuhiko Adachi	Director of Environmental Health and Safety Division, Ministry of the Environment Japan
II. Taisen Iguchi	Center for Integrative Bioscience Okazaki National Research Institutes, Japan
III. Anne Gourmelon	OECD, Environmental Health and Safety Division
Session I. Each Fish's Activity of Evaluation of Endocrine Disrupting Chemicals	
(Chairperson: Anne Gourmelon)	
9:45-10:00	Medaka (Taisen Iguchi: Okazaki National Research Institutes)
10:00-10:45	Zebra fish (Thomas Braunbeck: Heidelberg University)
10:45-11:30	Fathead minnow (Karen Thorpe: University of Exeter/AstraZeneca)
Lunch 11:30-13:00	

Special Lecture. Sex Determination and Gonadal Sex Differentiation in Fish
 13:00-14:00 Yoshitaka Nagahama: *National Institute for Basic Biology*
 (*Chairperson: Taisen Iguchi*)

Session II. Endocrine Disrupting Effects and Test Methods with Medaka

Part I (Chairperson: Taisen Iguchi)

14:00-14:25 Availability of Receptor Binding Assay for Screening of Endocrine Disrupting Chemicals

Part III

16:05-16:30 **Draft Protocol of Phase 1 Test and Other Issues**
 General Discussion

16:30 **Closing**

メダカ小冊子

M E D A K A

Oryzias latipes

Development of Test Methods and Suitability of Medaka as Test Organism for Detection of Endocrine Disrupting Chemicals



February 2003

Ministry of the Environment, Japan
 Chemicals Evaluation and Research Institute, Japan

(Makoto. Nakai: CERI)
 14:25-14:55 Endocrine Disrupting Effects and Testing Methods with Medaka
 (Masanori Seki: CERI)
 14:55-15:25 Partial Life-cycle Test and Full Life-cycle Test in Medaka
 (Hirofumi Yokota: CERI)

Tea Break 15:25-15:40

Part II (Chairperson: Koji Arizono)

15:40-16:05 Relationship Between Vitellogenin and Genetic Sex in Medaka
 Partial Life-cycle Test with the Novel Sex Determining Gene, DMV
 (Tatsuo Abe: CERI)
 16:05-16:30 Transgenic See-Through Medaka for Monitoring Chemical Substances
 in Aquatic Environments
 (Yuko Wakamatsu: Nagoya University & Masato Kinoshita: Kyoto University)
 16:30-16:55 Feeding and Preparing Endocrine-Disrupting Chemicals Free Food
 (Koji. Arizono: Kumamoto Prefectural University)

16:55-17:00 Other information, medaka report (Chisumi ETO : CERI)

17:00 **Closing** Kenjiro Ozato : Emeritus Professor of Nagoya University

□ **February 28, Friday**

Technical Meeting and Strategy on Phase 1 Test

Session I. OECD' s Framework and Recent Studies with Three Fish Species
 (Chairpersons: Taisen Iguchi, Rodney D. Johnson and Anne Gourmelon)

9:30-10:00 OECD' s Framework and Validation Test on the Endocrine Disrupting Chemicals

(Anne Gourmelon: OECD)

10:00-11:40 **Report on the Results of Positive Controls, such as EE2, E2 and MT etc. with three Fish Species.**

10:00-10:30 Medaka (Masanobu Maeda: CERI)

10:30-11:00 Zebrafish (Gitte Petersen: DHI Water and Environment)

11:00-11:30 Fathead minnow (Rodney Johnson: US EPA)

11:30-11:40 Discussion

Lunch 11:40-12:40

Session II. Sensitivity and/or Variance of Parameters such as Vitellogenin and Gonad Histology for Three Fish Species

(Chairpersons: Taisen Iguchi, Rodney D. Johnson and Anne Gourmelon)

Part I

12:40-14: 10 **Vitellogenin(for methodology, antibody and standard)**

12:40-13:00 Medaka (Norihiisa Tatarazako :National Institute for Environmental Studies, Japan)

13:00-13:20 Zebrafish (Thomas Braunbeck: Heidelberg University)

13:20-13:40 Fathead minnow (Karen Thorpe; University of Exeter/AstraZeneca)

13:40-14:10 Discussion

Tea Break 14:10-14:25

Part II

14:25-16:05 **Gonadal Histology (for methodology and endpoints available for each fish including secondary sex characteristics)**

14:25-14:45 Medaka (Masanori Seki: CERI)

14:45-15:05 Zebrafish (Leif Norrgren: Swedish University of Agricultural Sciences)

15:05-15:25 Fathead minnow (Rodney Johnson; US EPA)

15:25-16:05 Discussion

Contents

Preface	1
Summary	3
Chapter 1: <i>Suitability of Medaka fish as Test Organism and New Medaka Strains</i>	7
Chapter2: <i>Receptor Binding Assay and Reporter Gene Assay of Medaka</i>	21
Chapter3: <i>Medaka Screening and Definitive Test for Endocrine Disrupting Chemicals</i> <i>Part1 : Validation with Reference Chemicals</i> <i>Part2: Hazard Assessment of 4-Nonylphenol (NP)</i>	26
Chapter4: <i>Genetic Approaches to Understanding the Basic Mechanisms of Endocrine Disruptor Actions on sex Determination/Differentiation in the Medaka, Oryzias latipes</i>	54
Further Works	75
Appendix	

4. 農薬G L P査察

平成15年3月に農薬G L Pの適合性確認の施設査察を受け、5月に農林水産省生産局長より確認書を受領しました。農薬適合性査察の状況および最近のG L Pの動向について報告します。

久留米事業所におきましては、これまで農薬申請のための安全性試験のうち、物理化学性状試験および水産動植物影響試験についてG L P試験として実施してきています。物理化学性状試験については、平成11年に試験法ガイドラインの成立および改正農薬G L Pの公表と同時にG L P適用試験として施行されました。平成12年3月に適合性確認をうけ同年5月に適合確認書をいただきました。また、水産動植物影響試験については正式にはG L P適用試験とはなっていませんでしたが、課長通知による適合性確認査察を平成12年9月にうけ、同年11月に適合性確認書をいただけてきました。このたび、水産動植物影響試験のうち懸案であったミジンコ繁殖試験の正式テストガイドライン化にともない、平成13年10月から水産動植物影響試験も正式にG L P適用試験として通知されました。

今回のG L P適合性確認査察では物理化学性状試験および水産動植物影響試験との同時申請となりました。適合性確認査察は独立行政法人農薬検査所の3名の職員により3日間実施されました。査察は試験施設のラボツアーから始まり、各試験施設では、試験系の状況、試資料の管理状況、記録等について査察と質疑応答が行われました。また、スタディーオーディットでは試験が済んでいる報告書等の書類について行われました。物理化学性状試験ではG L Pの対象試験となっているすべての試験(13種類)について、また、水産動植物試験では藻類生長阻害試験、ミジンコ急性遊泳阻害試験、魚類急性毒性試験、ミジンコ繁殖試験の4試験について査察されました。今回の査察では試験計画書、最終報告書および生データの調査はもとより、記録類とS O Pの記載との整合性まで一歩踏み込んだ内容となりました。査察後の講評をもとに改善すべき事項および改善が望ましい事項について指導を受け、現在G L P基準に従い、試験施設としてより以上の改善の検討を行っているところです。

最近のG L Pのトピックとしましては、経済産業省、厚生労働省および農林水産省による「規制改革推進3か年計画(平成13年3月30日、閣議決定)」を踏まえ、各G L P基準の確認申請手続きの簡素化について3省による協議が重ねられ、新しく「試験施設に関する基準適合確認申請書(安全性試験調査申請書)」が作成されました。平成14年8月にはパブリックコメントが求められ、平成14年12月には書式が統一されました。違ったG L P基準を乗り越えて一つに統一されたのは画期的なことといえます。しかし、実際の申請書に添付する資料については引き続き検討中で、各省ともこれまでの独自の様式が使用されています。膨大な作業となるこの添付資料についてもはやく一本化さ

れ、効率的にG L P制度が運用されることを試験施設としては願っているところです。(久留米・堀)

5. O E C Dガイドラインの整備状況

テストガイドライン作成・改定の最近の動きについて、久留米事業所の実施している試験分野である物理化学性状試験および環境運命試験分野を中心に紹介します。

平成14年5月に開催された第14回テストガイドラインナショナルコーディネーター会合(14th Meeting of the Working Group of the National Co-ordinators of the Test Guidelines Programme)で承認された分配係数H P L C法(TG117: Partition Co-efficient, HPLC method)、表層水中での好気分解シミュレーション試験法(TG309: Aerobic Mineralisation in Surface Water - Simulation Biodegradation Test)は、会議後の修正等に多少の時間を取ったため、その後の手続きが遅れており、OECD会議で承認され正式発行に至るにはもう少し時間がかかるようです。これらのガイドラインは第15回増補版として発行される予定です。

<物理化学性状試験分野>

分配係数スローステアリング法(TG123: Estimation of the partition coefficient of highly hydrophobic compounds by slow-stirring method)：各国専門家の意見を取り入れた改訂ドラフトが今年6月頃に作成される予定です。

加水分解試験法(TG111: Hydrolysis as a Function of pH)の改定：今年5月下旬にフランスで行われる第15回テストガイドラインナショナルコーディネーター会合(15th Meeting of the Working Group of the National Co-ordinators of the Test Guidelines Programme)で承認される見込みです。

またドイツより蒸気圧測定法(TG104: Vapour Pressure)に噴射法(Effusion method: Isothermal thermogravimetry)を追加することが提案されておりましたが、これも第15回テストガイドラインナショナルコーディネーター会合で承認される予定です。この新測定法により10⁻¹⁰Paレベルでの蒸気圧測定が可能になります。

<環境運命試験分野>

溶出試験法(TG312: Leaching studies)：第15回テストガイドラインナショナルコーディネーター会合で承認される見込みです。

水中での光分解試験法(Phototransformation of Chemicals in Water)：作成は若干遅れ気味ですが、今年の終わり頃までには改訂ドラフトが作成される予定です。

土壌表面中での光分解試験法(Phototransformation of Chemicals in Soil Surfaces)：今年の夏頃までに改訂ドラフトが作成されるようです。

嫌気性生分解性試験法（TG311: Anaerobic Biodegradability of Organic Compounds in Digested Sludge）：現在各国の専門家からのコメントを基に草案の改訂が行われており、今年の夏頃に改訂版が作成される見込みです。

難水溶性物質に対する本質的生分解性試験法（TG302D: Inherent Biodegradability for Poorly Water Soluble Substance）と好気性生分解性試験ヘッドスペース法（TG310: Aerobic Biodegradability-Head Space Method）の作成は若干遅れているようです。またドイツ主導のもと、土壌生物への濃縮性試験法（Accumulation in Sediment Worm）のバリデーションが現在行われています。

この他、生態毒性分野、健康影響分野においても各種のガイドラインの新規作成、改定が行われており、第15回

テストガイドラインナショナルコーディネーター会合では、土壌中ユスリカ毒性試験（TG218: Sediment-Water Chironomid Toxicity Test Using Spiked Sediment）、水中ユスリカ毒性試験（TG219: Sediment-Water Chironomid Toxicity Test Using Spiked Water）、ヒメミミズ繁殖試験（TG220: Enchytraeidae Reproduction Test）、ミミズ繁殖試験（TG222: Earthworm Reproduction Test）が承認される予定になっています。

なお、既存のガイドラインおよび現在作成中のドラフトガイドラインは以下のサイトにより閲覧が可能になっています。

<http://webdomino1.oecd.org/comnet/env/ChemComm.nsf>

（久留米・宮地）

化審法改正にともなうお知らせ

平成15年5月28日に、「化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律（通称化審法）の一部を改正する法律」が公布されました。今回の改正の目玉は次のとおりです。

1. 環境中の動植物への影響に着目した審査・規制制度の導入
2. 難分解・高蓄積性の既存化学物質に関する規制の導入
3. 環境中への放出可能性に着目した審査制度の導入
4. 事業者が入手した化学物質の有害性情報の報告の義務付け

この改正により、従来の「指定化学物質」は「第二種監視化学物質」に改められるとともに、新たに規制対象として「第一種監視化学物質」（難分解性あり、高蓄積性あり、毒性が不明な既存化学物質）および「第三種監視化学物質」（難分解性あり、高蓄積性なし、動植物の生息または生育に支障を及ぼすおそれがある化学物質）の措置が講じられ

ることになりました。

「環境中の動植物への影響」の判定は、国際的に用いられている3種の急性毒性試験、すなわち藻類生長阻害試験、ミジンコ急性遊泳阻害試験および魚類急性毒性試験によるものとの観測が有力であり、環境省の「生態影響試験実施に関する基準」適合機関として実績を積んでいる当機構は、いつでも試験のお引き合いに応じられる態勢となっております。改正後の新規化学物質届出についての試験プランニングのご相談は下記へご連絡ください。

化学物質安全センター管理部業務課 下川、野口

TEL 03-5804-6134

または機構ホームページの化学物質安全部門試験のご依頼・ご相談コーナーをご利用ください。

<http://www.cerij.or.jp>

技術報告

—食生活の変化がコンクリートピット、ヒューム管に与える影響—

微生物は、ゴムやプラスチックなどの有機材料ばかりに被害を与えるわけではない。固くて頑丈な無機材料や金属にまでその被害を及ぼすことがある。また、微生物は「馴養」という、かつてこの世に存在しなかった化学物質などの新規物質でさえも長期間接触していると分解法を学習し、少しずつ分解を生じさせる。

院内感染菌のように抗生物質が新たに開発され、病原菌を死滅しても何年か後には耐性を持ち効き目がなくなるのも、また昆虫が農薬に対し少しずつ耐えられるようになるのも、皆、馴養化されていくためである。すなわち、数ミクロンオーダーの小さな微生物でさえも、われわれ人間同様に学習し進化している。例えば、かつて分解されないと

されてきたポリエチレン（PE）でも微生物の馴養によって容易に分解される。事実、野山や畑などに散乱している農業用マルチフィルムや食品包装用パッケージは、常在菌によってボロボロに崩壊・分解されている^{1), 2)}。

また、金属の微生物腐食（Microbially Influenced Corrosion）も最近多く報告されている³⁾。例えば、ステンレス鋼は自然海水中の付着微生物によって徐々に腐食される。これは桿菌（Pseudomonas 属）が生物皮膜中にある酸化性物質を分解酵素として濃縮貯蔵しており、酸素よりも強力な酸化剤としてステンレス鋼の表面に電気化学的に反応し腐食に導く。これら一連の現象は南極や北極などの特殊な地域を除き、どこにでもいつでも起きる可能性がある。

ビル地下調整槽のコンクリート壁の崩壊

超高層ビルではなくとも、都会の大型ビルでは何軒かの食堂・レストランが入っている所が多い。これらの厨房設備のあるビルには、必ず厨房廃水の調節槽を地下ピット内に備えている（トイレで用いられる水洗用廃水とは別）。図1に厨房廃水のフローチャートおよび調整槽の概要を示す。

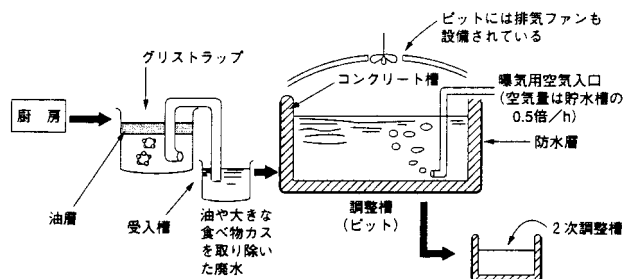


図1 厨房から調整槽（ピット）へのフローチャート

まず、厨房を出た廃水はグリストラップと呼ばれる槽に入り、廃水中に多量に含まれる食用油や廃水中に混入した残飯の薄片を比重法で取り除かれ、コンクリート製の調整槽に入る。調整槽は防水処理を施した通常の打ち放しのコンクリート製で、厨房廃水以外にも洗面所、給湯室からの生活雑廃水も流れ込んでいる。また、調整槽には曝気設備があり、調整槽の体積の1.5倍/1時間の空気をプールされた廃水に常時送り込んでいる。

このコンクリート製調整槽が破壊事故を起こした。このような現象は、食堂やホテルが入った大型ビルで最近顕著になりつつある。20年ほど前では同事故は皆無であったため、現在、ビルメンテナンス会社や建設施工会社を大いに悩ませている。

調整槽中の廃水分析と空気接触面のコンクリート分析

まず第1に調整槽の廃水を全部抜き、槽全体の外壁を観察した。外壁は常時浸っている部分はほぼ正常な状態にあり、水面近傍、さらに水面より離れた所で激しい破壊が生じ、一部大きな脱落が見られた。図2に、ダメージの程度と調整槽の深さ方向との関係について示した。これらの観察結果より、廃水中の酸性物質と腐食ガスによって浸食され破壊されていることがほぼ判明した。

BOD（生物学的酸素要求量）は、廃水採取場所にもよるが700～300mg/lと非常に高く、さらにはn-ヘキサン抽出量（油類）は400～300mg/lと通常の家計より排水される雑廃水より1桁高い数字を示した。すなわち、グリストラップが厨房より排出される所に設置されているにもかかわらず、調整槽に流れ込む廃水中には多量の油類を含む有機物が相当量で流れ込んでいることが分かった。

調整槽受入口付近はpH6.5、排出口付近はpH5.7で、廃水そのもののpHはほぼ中性に近い。このため、廃水に浸っているコンクリート部分のほとんどに破壊が進行していない理由が分かった。すなわち、酸性物質の存在下でもアルカリ性コンクリートの破壊によって中和されてしまい、

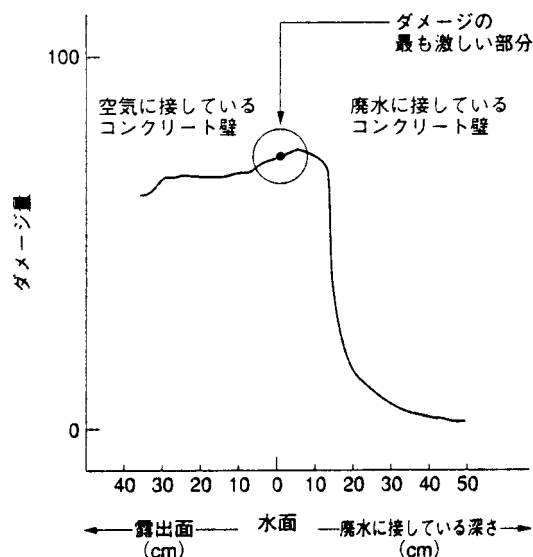


図2 コンクリート壁の深さとダメージの関係

調整槽の廃水がほぼ中性になったためである。

一方、廃水面より上の空気接触面のコンクリート表面を一部削り取り、蛍光X線分析を行ったところ、コンクリート成分のSi、CaのほかにSが検出された。このため、調整槽では硫化水素（ H_2S ）の発生が考えられた。

調整槽排気付近のガスクロ分析と硫酸還元菌の作用

しばらく排気ファンの運転を止め、真空ガラスびんに調整槽排気ファン付近の空気を採取し、ガスクロマトグラフィー（GC）にて定性定量分析を行うと、推測通り硫化水素が検出された。その濃度を表1に示す。比較のため、受入槽、2次調整槽についても行った。この結果、ほかの2つの槽と比べて、調整槽のみが硫化水素の濃度が異常に高いことが確認された。また、金曜日は月曜日に比べて、その発生量が倍以上もあり、厨房がフルに使用されているときに発生量が多く、有機物の流入が大きく影響していることが推定された。すなわち、硫化水素の根源となる「硫黄（S）」が食物中に微量に含まれ、特に肉類のたんぱく質に多く含まれることを考えると、硫黄は調整槽に存在する硫酸還元菌（多くは*Desulfavibro*属）によって乳酸などの有機化合物、あるいは H_2 を用いて $\text{SO}_4 \rightarrow \text{H}_2\text{S}$ に還元されていると考えられる。

表1 硫化水素発生量

測定日	サンプリング場所	受入槽 (ppm)	調整槽 (ppm)	2次調整槽 (ppm)
金曜日		8	124	0.8
月曜日		2.4	52	0.6

SO_4^{2-} の還元において SO_4^{2-} は、まずアデノシン-5'-ホスホスルフェート（APS）となり、その後、還元されて SO_3^{2-} とアデノシンチノホスフェート（AMP）になる。 SO_3^{2-} は亜硫酸還元酵素により、 H_2S にまで還元されることになる。硫酸還元菌は嫌気性菌であることから、酸素が十分供給されているところではほとんど存在せず、また存在

しても有機物に対し作用することはない。しかし今回のように、酸素の供給が曝気されているとはいえ不十分で、なおかつ豊富な有機化合物の存在下では活発な活動が行われ、多量の硫化水素を発生することになる。

硫酸還元菌と硫黄酸化細菌の相乗作用

コンクリートの崩壊は、硫酸還元菌の仕業ばかりではない。先述したように、硫黄還元菌の生成した H_2S はさらに酸化されて硫酸(H_2SO_4)となり、廃水を酸性に変え、直接廃水に触れているコンクリートを破壊に導く(本件の調整槽水面付近でも破壊が顕著であったのはこのためである)。また、廃水中で硫酸還元菌の活動により発生した硫化水素は上昇し、空気のあるコンクリート天井部または水面より離れたコンクリート壁まで拡散していく。天井部や壁は適度に湿っているため、すでに存在している硫黄酸化細菌(多く *Thiobacillus*)の活動により、 $\text{H}_2\text{S} \rightarrow \text{H}_2\text{SO}_4$ に酸化される。その酸化機構を図3に示す⁴⁾。

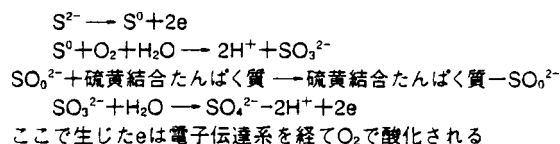


図3 *Thiobacillus novellus*による硫黄化合物の酸化機構

これらの生成した硫酸の一部はそのままコンクリートを破壊し、またほかの一部は落下して廃水を酸性に変える。しかし実際には、コンクリートの破壊と引き換えに廃水は中性化されてしまう。事実、廃水のpH実測値はpH6.5～5.7であった。そのため本件のような事故はコンクリート破壊が生ずるまでほとんど気づかないことが多い。破壊のメカニズムを図4に示した。

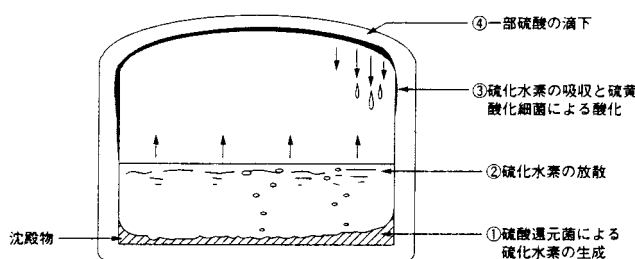


図4 コンクリート調整槽の硫酸生成メカニズム

日本人の食生活の変化がコンクリートを破壊する

しかしここで、グリストラップが厨房に設備されているにもかかわらず、大量の有機物の流入を許したのかという疑問がわく。グリストラップは、比重差を利用し浮いてきた油を水と分離するものであるが、昨今の厨房は食器洗浄時に大量の中性洗剤を使用する。この中性洗剤が油をエマルジョン化してしまい、廃液中に均一に分散し、事実上、油の分離がほとんどなされていなかったのである。さらに始末の悪いことに、小さな気泡に有機物(小さな食べ物残

渣)が付着し、ちょうど浮遊選鉱法と同じ原理で食べ物残渣もそっくり調整槽に運ばれてしまうことが分かった。

したがって、グリストラップは本来の役目をほとんど果たさず、大型固形物以外の大半の有機物は中性洗剤とともに、調整槽に流れ込んでしまっていた。このため、BODが著しく高くなり、設計初期の曝気量では不足し、自ずと嫌気性の状態になったのであろう。それでは、なぜ国内ではここ10年くらいの間に、今回同様のコンクリートの破壊事故が多発するようになったのであろうか?

硫酸を構成する「S」は、硫酸還元菌や硫黄酸化細菌の菌体より代謝されているわけではない。これらは、廃水中の有機化合物や微量含有している硫黄すなわち硫酸イオンを還元する。つまり、近年、ほかの食品に比べて硫黄を多く含む肉類の消費が多くなってきたことが、コンクリート破壊事故への増加へとつながっている。すなわち、日本人の食生活の変化がコンクリートの破壊を導くことになったとも言えよう。その証として、肉類を多く食する欧米諸国では下水道のコンクリート破壊は古くから大きな問題となっていた。日本人の食生活が欧米並みになっていること、あるいは食べ物を粗末にする現在の風潮のため、コンクリート破壊はますます深刻な問題となり、豊かになった代償として我々とはとてもない事故を招き入れることになった。

今後の対策

まず第1の対策として、コンクリート壁の表面をエポキシ樹脂でコートすることがコンクリート破壊を防ぐ最良の方法であろう。しかし廃水は、コンクリートを溶解することによって中和されるため、もしここで中和が行われなければ強酸性化した廃水は、次の2次調整槽もしくは下水管、ヒューム管を破壊してしまう恐れがある。したがって、硫化水素の発生そのものを抑えてしまうことが根本的な対策となる。さらには、硫酸還元菌は典型的な「偏性嫌気性菌」であり、酸素が有害となるため、十分な曝気をすれば硫酸還元菌は死滅してしまう。

ところで、当機構では、コンクリート保護のため多種多様のコーティング材やヒューム管に用いられるゴムパッキン等の硫酸水溶液中での劣化挙動や寿命評価等をさまざまな分析手法を駆使し行っている。是非、ご相談下さい。

参考文献

- 1) Y. OHTAKE, T. KOBAYASHI, A. ASABE, K. ONO : Submitted to Polym. Degrad. and Stab.
 - 2) 大武義人、小林智子、浅部仁志、矢部増男、村上信直、小野勝道：日本ゴム協会誌、68、808 (1995)
 - 3) 天谷 尚、幸 英昭：金属、65、11 (1995)
 - 4) 山中健生：「入門生物地球化学」、理想社 (1995)
- (東京高分子・大武)

無料クロマトセミナー

平成15年度クロマトセミナーを次のとおり開催いたします。皆さまのご参加をお待ちしております。
なお、ご参加は無料です。

☆セミナー内容☆

「HPLCにおける分離の基礎」

講師：名古屋大学名誉教授 工学博士 石井 大道先生
順相、逆相、サイズ排除、イオン交換の分離モードを中心に
にして、試料成分に対しての適切なカラムと移動相選択に
ついて。

「逆相系 HPLC カラムの取扱について」

講師：本機構職員
HPLCにおいて最も多く使用されている逆相系カラムにつ
いて使用上の留意点について解説。

☆開催日程☆

●開場は12:30となります。

	日 時	会 場	募集人数
53回 (福岡)	平成15年8月1日 (金) 13:00～16:30 (終了予定)	福岡市天神ビル 11階 第10会議室	100名
54回 (大阪)	平成15年9月26日 (金) 13:00～16:30 (終了予定)	大阪科学技術センター 8階 大ホール	300名
55回 (東京)	平成15年11月21日(金) 13:00～16:30 (終了予定)	北とぴあ つつじホール	300名
56回 (横浜)	平成15年12月5日 (金) 13:00～16:30 (終了予定)	ラジアントホール	150名

※各会場共、定員になり次第受付を締め切らせて頂きますので、お早目にお申込下さい。
定員を超えた場合に限りご連絡致します。

セミナー参加ご希望者は、参加ご希望日、お名前、お勤め先およびお勤め先住所、
お電話番号、FAX番号をご記載の上、FAXまたはお葉書にて下記宛にお申し込み下さい。
また、本機構ホームページ (<http://www.cerij.or.jp>) から
お申し込みができますのでどうぞご利用ください。

財団法人化学物質評価研究機構 東京事業所クロマト技術部セミナー係
〒345-0043 埼玉県北葛飾郡杉戸町下高野 1600 番
TEL 0480-37-2601 FAX 0480-37-2521

編集後記

第42号夏季号をお届けいたします。
暑中お見舞い申し上げます。
巻頭言は、「安全と安心」について大阪大学大学院薬
学研究科教授西原 力先生から頂戴しました。誠にあ
りがとうございました。

今回の特集は、化学物質安全部門Ⅰ・久留米事業所
について掲載させていただきました。
また、当機構では試験・分析のご依頼・ご相談をホ
ームページにて承っておりますのでどうぞ活用くだ
さい。(企画部・吉岡)

化学物質評価研究機構
ホームページ

<http://www.cerij.or.jp>

CERI NEWS 第42号 夏季号 発行日 平成15年7月

編集発行 財団法人化学物質評価研究機構 企画部

〒112-0004 東京都文京区後楽 1-4-25 日教販ビル 7F

Tel:03-5804-6132 Fax:03-5804-6139 mail to:cerinews@ceri.jp

古紙配合率100%再生紙を使用しています R100