

(添付資料)

資料3-4-1

## 精巣の組織学的変化と繁殖パラメータとの相関性に関する検討

### 1. 背景と目的

メダカを卵から成熟初期までエストロゲン作用を有する物質に暴露した場合、精巣組織中に卵母細胞(精巣卵)が出現することがエストロゲン暴露の指標となるとされてきた。しかし、卵母細胞の出現の生態毒性学的な定義は十分になされておらず、生殖腺組織の変化と繁殖パラメータ(産卵数及び受精率)との関連性も把握されていない。

かかる状況のもと、平成14年度に、 $17\beta$ -エストラジオール暴露によるメダカフルライフサイクル試験の繁殖試験を実施する段階で、産卵数および受精率に関する情報を収集するとともに、繁殖試験に用いた個体の精巣を精巣卵の発達度合いに応じて5段階(生殖腺スコア)に区分し、このスコアと受精率および産卵数との関連性について検討した。その結果、精巣卵の程度が重篤な個体で受精率と産卵数の低下が認められ、精巣卵の程度が軽微な個体ではほとんど受精率と産卵数に影響がないことが示された。しかしながら、精巣卵が中程度の変化を示した個体が少なかった上、ばらつきも大きく、精巣組織中の卵母細胞の出現の程度と受精率および産卵数との関連性について十分な評価を行うことができなかった(図1)。

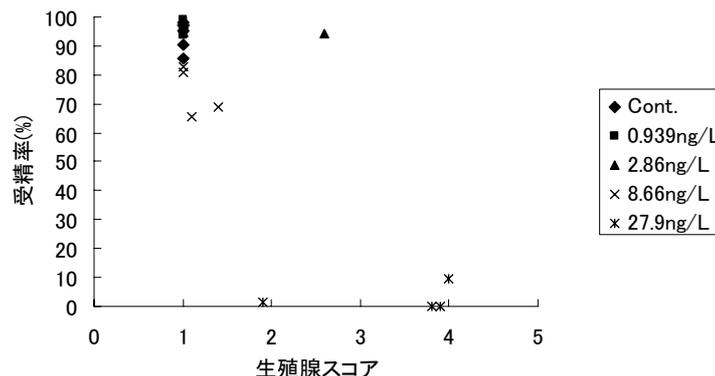


図1：生殖腺スコアと受精率の相関（平成14年度検討結果）

したがって、本検討では、エストロゲン暴露における濃度公比をさらに狭くとり、解析対象となる個体数を増やすとともに、精巣卵以外の生殖腺組織の変化(発達ステージやその他の病理学的変化)を観察し、組織学的変化と繁殖パラメータとの関連性を詳細に解析することを目的とする。

## 2. 研究概要

メダカを受精直後からふ化後 70 日までエストロジェンの基準物質である  $17\beta$ -エストラジオールに暴露し(設定濃度: 40.0、30.1、22.6、17.0、12.8 ng/L、公比: 1.33)、ふ化後 70 日の時点でペアリングを行い(20 ペア/試験区)、ふ化後約 100 日まで産卵数及び受精率を調査した。ペアリング終了時において生殖腺の組織学的観察、肝臓中ビテロジェニン(VTG)濃度、生殖腺体指数(GSI)、肝指数(HSI)、二次性徴、ステロイドホルモン濃度及びステロイドホルモン合成酵素活性を測定した。ステロイドホルモン濃度及びステロイドホルモン合成酵素活性に関しては現在測定中である。

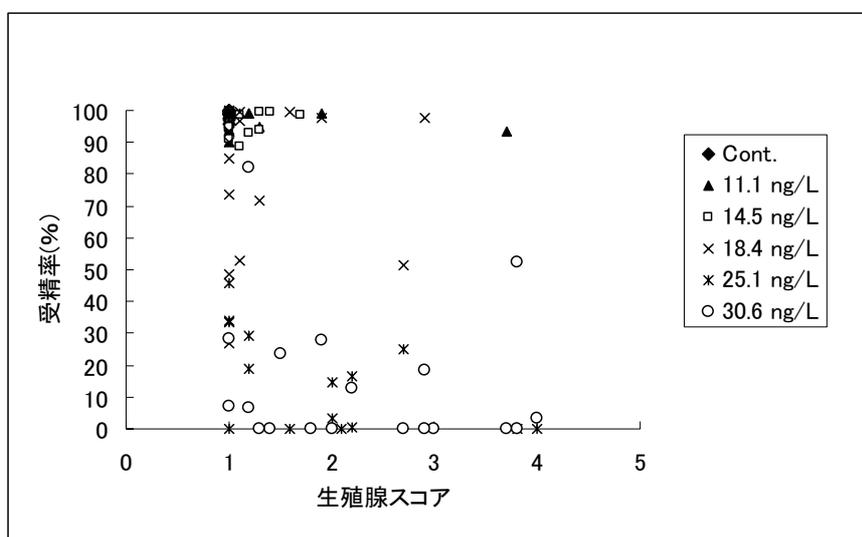
精巣の組織学的な評価については、精巣卵スコアに基づく評価に加え、OECD 生殖腺会議で示された発達ステージや、OECD Phase 1 B バリデーションで用いられる病理学的変化による評価を実施することで、どのような生殖腺組織の変化が繁殖低下に関与しているかを明らかにする。

ステロイドホルモン濃度については精子形成に関与する 11-ケトテストステロン及び卵形成に関与する  $17\beta$ -エストラジオールに着目するが、メダカの場合は血漿中のホルモン濃度の絶対定量が困難なこと、個体差が大きいことが予想されるため、11-ケトテストステロン/テストステロン比、 $17\beta$ -エストラジオール/テストステロン比を算出することで、暴露個体の生殖腺がアンドロジェン合成あるいはエストロジェン合成のどちらにシフトしているかを評価する。また、これらの合成に関与する P450 芳香化酵素及び P450 11 $\beta$ -水素化酵素の発現を生殖腺組織の免疫染色により解析し、組織学的観察所見と比較する。これらの測定を行うことで、ステロイドホルモン合成経路の中で特に精子形成を機能的な面から評価するデータを集積する。

### 3. 研究結果

#### 3-1. 平成16年度試験結果（受精率と生殖腺組織学的変化の相関性）

生殖腺スコア及び精巣の発達ステージについて受精率との相関関係を解析した。生殖腺スコアと受精率の相関を図2、精巣の発達ステージと受精率の関係を図3に示す。図2及び図3における回帰直線の決定係数(R<sup>2</sup>)はそれぞれ0.35及び0.20であり、生殖腺スコア、精巣の発達ステージ共に、受精率に対する相関性は低いことが示唆された。その他の生殖腺の病理学的変化と受精率との関連性については現在解析中である。



生殖腺スコアの分類基準

レベル	定義
1	卵母細胞が存在していない。
2	卵母細胞が組織中に 1~10 個観察される。
3	卵母細胞が組織中に 11~50 個観察される。
4	組織の約 50%までが卵母細胞によって構成される。
5	組織の約 50%~ほぼ全般が卵母細胞によって構成される。

精巣の発達ステージ

ステージ	定義
0	完全に未発達の状態であり、精子が存在しない(精原細胞から精細胞)。
1	未発達な状態であるが、精子も存在する。
2	精母細胞、精細胞、精子がほぼ等しい比率で存在する。
3	全てのステージの生殖細胞が観察されるが、精子が優占する。

### 3-2. 繁殖試験の条件と各検出指標の測定

平成16年度実施の試験では、精巣卵の程度（生殖腺スコア）が中程度の個体をより多く得られるように、平成14年度よりも試験濃度の公比を狭くとり、繁殖試験に用いるペア数も1試験区当たり20ペアとした。平成14年度の繁殖試験はフルライフサイクル試験の一部として実施しており、1試験区当たり6ペア（最高濃度区では4ペア）で実施した。したがって、これら試験における試験条件の主な相違点は、試験濃度区当たりのペア数と暴露濃度の公比である。これら試験において、受精率などの各検出指標を測定した個体の日令を表1に示す。各検出指標はほぼ同じ日令の個体をサンプリングして測定した。

表1 各検出指標を測定した個体の日令 (単位：日令)

測定項目	HSI	GSI	VTG	生殖腺スコア	産卵数	受精率
平成16年度	99	99	99	99	71~98	71~98
平成14年度	101	101	101	101	71~100	71~100

### 3-3. 対照区の各検出指標の変動について

平成16年度および平成14年度実施の繁殖試験の対照区の産卵数など検出指標の測定結果を表2に示す。これら試験の対照区の各指標の測定結果は平均値の範囲\*内であった。

表2：平成16度(■)および平成14年度実施の繁殖試験での対照区の測定結果

濃度 (ng/L)	産卵数	受精率(%)	♂HSI(%)	♂GSI(%)	♂VTG (ng/mg liver)	死亡率(%)
対照区1	356~923 (733)	85.5~98.0 (93.9)	1.19~1.73 (1.38)	0.748~1.63 (0.997)	0.23~45.61 (18.5)	0~13.3 (5.0)
対照区2	374~920 (563)	95.8~100 (99.1)	1.16~2.79 (1.76)	0.489~1.77 (1.04)	0.500~12.00 (1.44)	0~13.3 (5.0)
平均値の 範囲*	199~1,100	92~98.9	1.3~3.2	0.78~1.03	1.0~36	1.7~14

脚注) 括弧内( )の数値は平均値を示す。

\* 平均値の範囲：これまで実施したフルライフサイクル試験の対照区の各検出指標の測定値の平均値の範囲を示す。

### 3-4. 試験結果のまとめ

平成 16 年度および平成 14 年度実施の繁殖試験結果の概要を表 3 に示す。  
生殖腺指数 (GSI および死亡率を除くその他の検出指標で試験濃度依存的な変化が認められた。

8.66 ng/L 以上の濃度区でピテロジェニン (VTG) 濃度の有意な上昇が認められた。  
また、25.1ng/L 以上の濃度区で HSI (♂) および生殖腺スコアの有意な上昇が認められた。

受精率については、8.66 ng/L 以上の濃度区で有意な低下が認められた。また、  
産卵数については、18.4 ng/L 以上の濃度において有意な低下が認められた。

表 3 : 平成 16 年度 (■) および 14 年度実施の 17β-エストラジオールに暴露による  
メダカ繁殖試験の概要

濃度 (ng/L)	産卵数	受精率	HSI (♂)	GSI (♂)	VTG (♂)	死亡率	生殖腺 スコア
対照区							
0.939	—	—	—	—	—	—	—
2.86	—	—	—	—	—	—	—
8.66	—	↓	—	—	↑	—	—
11.1	—	↓	—	—	↑	—	—
14.5	—	↓	—	—	↑	—	—
18.4	↓	↓	—	—	↑	—	—
25.1	↓	↓	↑	—	↑	—	↑
27.9	↓	↓	↑	↓	↑	—	↑
30.6	↓	↓	↑	—	↑	—	↑

脚注)

↑ : 対照区と比較し統計学的に有意に増加 (太字は  $p < 0.01$ 、細字は  $p < 0.05$ )

↓ : 対照区と比較し統計学的に有意に減少 (太字は  $p < 0.01$ 、細字は  $p < 0.05$ )

— : 対照区と比較し統計学的な有意差が認められなかった。

表 3' : 平成 14 年度実施の繁殖試験の測定結果

濃度 (ng/L)	産卵数	受精率 (%)	♂HIS (%)	♂GSI (%)	♂VTG (ng/mg liver)	死亡率 (%)	生殖腺 スコア
対照区	733 ± 219	94 ± 4.9	1.4 ± 0.2	1.00 ± 0.3	15 ± 20	5.0 ± 6.4	1
0.939	659 ± 230	96 ± 2.6	1.3 ± 0.6	1.01 ± 0.3	27 ± 33	25 ± 6.6	1
2.86	790 ± 220	97 ± 1.8	1.5 ± 0.3	0.84 ± 0.2	12 ± 18	22 ± 15	1.3 ± 0.65
8.66	561 ± 133	81 ± 13*	1.8 ± 0.3	1.23 ± 0.2	160 ± 230*	22 ± 8.4	1.1 ± 0.16
27.9	58 ± 75**	3.8 ± 5.2**	2.1 ± 0.2*	0.33 ± 0.2**	3,600 ± 1,200**	15 ± 18	3.4 ± 1.0**

表 3'' : 平成 16 年度実施の繁殖試験の測定結果

濃度 (ng/L)	産卵数	受精率 (%)	♂ HSI (%)	♂ GSI (%)	♂VTG (ng/mg liver)	死亡率 (%)	生殖腺 スコア
対照区	560±120	99±1.1	1.8±0.44	1.0±0.32	1.4±2.7	5.0±6.4	1
11.1	470±150	97±2.5**	1.6±0.43	1.0±0.19	30±52**	6.7±5.4	1.2 ± 0.62
14.5	550±100	97±3.1**	1.5±0.35	1.1±0.29	58±81**	5.0±6.4	1.1 ± 0.19
18.4	330±170**	83±22**	1.9±0.47	1.2±0.36	140±120**	1.7±3.3	1.3 ± 0.57
25.1	110±150**	20±26**	2.3±0.60	0.86±0.36	560±410**	5.1±3.4	1.9 ± 0.97**
30.6	100±130**	14±22**	2.4±0.54**	0.84±0.34	660±450**	5.4±3.6	2.3± 1.0**

脚注) \*\*は  $p < 0.01$ 、\*は  $p < 0.05$  で対照区と比較し統計学的な有意差が認められたことを示す。

統計処理：受精率及び死亡率のデータは検定を行う前に逆正弦変換により分散の安定化を行った。VTG 濃度及び生殖腺スコアを除くすべての影響指標の検定は、等分散性の検定 (Levene's test) を行い、等分散性が認められた場合は一元配置分散分析 (one-way ANOVA) を行った。一元配置分散分析において有意差が認められた場合は多重検定 (Dunnett's test) により有意差を検定した。等分散性が認められなかった場合は Kruskal-Wallis の順位和検定を行い、有意差が認められた場合は Bonferroni Adjustment をもって MannWhitney の U 検定を行った。VTG 濃度及び生殖腺スコアは Kruskal-Wallis の順位和検定及び Bonferroni Adjustment をもって MannWhitney の U 検定を行った。VTG 濃度において定量下限値以下のデータに関しては定量下限の半数値を代入した。すべての統計処理は SPSS Base 10.0J (SPSS) を用いて実施し、 $p < 0.05$  を有意とみなした。

#### 4. 考察

本研究において、生殖腺スコア及び精巢の発達ステージと受精率との相関性を解析した結果、両者共に受精率との相関性は低いことが示唆される。

平成 14 年度及び平成 16 年度の繁殖試験結果をまとめた結果、死亡率の有意な低下が認められない暴露濃度におけるエストロジェン様作用を検出する指標としては VTG 濃度の感度が高いことが示唆される。また、エストロジェン暴露による魚類への影響（有害性）を評価できる指標としては受精率の感度が高いことが示唆される。受精率低下の要因に関しては、生殖腺スコアに有意な変化が認められない濃度区においても受精率の有意な低下が認められると共に、メス個体の産卵数の低下も認められたことから、精巢卵以外の精巢組織の変化やオスにおける生殖腺組織の変化以外の要因も受精率の低下に関わっていた可能性が示唆される。

本研究においては、エストロジェン暴露したオスおよびメス個体を繁殖試験に用いたが、今後は正常メス個体と暴露オス個体及び正常オス個体と暴露メス個体での繁殖試験を実施し、受精率や産卵数に関わる情報を収集する必要がある。また、受精率はエストロジェン様作用による魚類への有害性を評価する上で有用な指標と考えられるため、評価における精度を高めるために必要な背景データの収集や繁殖試験の至適条件等についての検討も必要である。