

## ExTEND2005における魚類及び哺乳類試験実施・試験法開発について

## 1. 基本的な考え方

- 1) ExTEND2005 (4) 影響評価 ②試験の実施においては、「これまで、メダカを用いた試験は、ビテロジェニンアッセイ及びパーシャルライフサイクル試験、必要に応じてフルライフサイクル試験を追加する試験体系のもとで実施してきたが、今後の試験では、試験結果から得られる情報と必要な試験期間を勘案し、効率化を念頭に置いた試験体系について改めて検討する」としている (ExTEND2005 P26)。個々の試験法の簡便化とともに、試験体系全体のスリム化が必要である。
- 2) 同じく、ExTEND2005 (4) 影響評価 ②試験の実施において、「これまで、ラットを用いた試験における試験用量の設定にあたっては、ヒトが暴露する可能性がある用量領域に特化していた。今後は各種の毒性評価の手法も参考とし、ヒトが暴露する可能性がある用量から何らかの有害影響が既に報告されている用量までを包含することによって、限られた群設定のなかでも有害性評価に資する知見が得られるような用量設定を原則とすべきである」としており (ExTEND2005 P26)、今後の哺乳類試験実施にあたっては、用量設定の見直しを行う。
- 3) また、ExTEND2005 (3) 基盤的研究の推進 ②個体レベルのアプローチの項目では「化学物質の内分泌かく乱作用の評価では、甲状腺、下垂体等、生殖系以外の内分泌系における標的臓器の機能への影響や、また内分泌系・生殖系への影響のみならず、神経系や免疫系への影響も視野に入れ、統合的な生物学の理解に立つ基礎的な知見を収集する」と記されている (ExTEND2005 P21)。

SPEED' 98の下での魚類試験実施にあたっては、内分泌かく乱作用の中でも特にエストロゲン様作用に着目してきたが、ExTEND2005に基づく取組では、エストロゲン様作用以外の作用にも着目して、試験体系を見直すことも必要である。
- 4) さらに、ExTEND2005 (3) 基盤的研究の推進 ④試験法開発に資する基礎的研究においては、「実験動物ごとの内分泌調節についての生物学的知見が必要である。各生物種の内分泌系に関する基礎的知見を蓄積することにより、個体差・種差・生育条件による変動を把握した上で、結果を評価する必要がある。正常な状態についての知識なくしては、何が異常なのか、という判断をすることは不可能である。」 (ExTEND2005 P23) という理由により、試験動物の基礎的データの整備の必要性が強調されている。

## 2. 化学物質の内分泌かく乱作用に関する魚類試験について

### 【これまでの取組】(ExTEND2005 P5 より抜粋)

SPEED' 98 のリストに基づいて、化学物質ごとに水生生物及び野生生物に対する内分泌かく乱作用に関連する文献及び試験管内試験(*in vitro* 試験)に関する文献の検索・収集を行い、専門家による文献の信頼性評価を実施した。その結果をもって試験対象物質を選定し、メダカを用いて、ビテロジェニンアッセイ、パーシャルライフサイクル試験を実施し、必要に応じてフルライフサイクル試験を追加した。試験濃度の設定にあたっては、試験対象物質の環境中の濃度、既存の毒性情報、物性情報を参考とした。

28 物質で試験を実施した結果、環境中の濃度を考慮した濃度で 4-ノニルフェノール(分岐型)と 4-t-オクチルフェノールでメダカに対し内分泌かく乱作用を有することが強く推察され、またビスフェノール A でもメダカに対し内分泌かく乱作用を有することが推察された。

メダカを用いた上記の一連の試験結果をもって内分泌かく乱作用に関連する評価を実施してきたが、実験動物として基礎的知見の集積が進んでいるメダカにおいても、さらに結果を評価するための関連知見の収集が必要であることや、試験期間の短縮等の効率化を図ること等が課題として挙げられた。

### 【平成 17 年度検討及び実施事項】

#### 1) 試験体系のスリム化についての検討

##### ①試験法簡便化

ビテロジェニン(VTG)の肝臓中濃度ではなく mRNA 発現量を指標としたスクリーニング試験法の検討を行う(mRNA 発現量と肝臓中または血中ビテロジェニン濃度との時間的、量的相関についての検討等)。

##### ②スクリーニング試験

選定された試験対象物質に関する情報に応じて、実施すべきスクリーニング試験を決定し、必要ならば複数の試験を組み合わせて実施する。

##### ③確定試験

スクリーニング試験後の確定試験としては、ライフサイクル試験を実施する。

#### 2) エストロゲン様作用以外の内分泌かく乱作用に着目した試験体系の検討

##### ①アンドロゲン様作用についての検討

アンドロゲン様作用評価のためのバイオマーカーやエンドポイント

トについて検討する。メスのビテロジェニン産生低下、乳頭状小突起のような二次性徴の変化、生殖腺組織の変化、繁殖への影響といった項目が候補して挙げられる。具体的には、トレンボロン（アンドロジェン作用物質）を用いてライフサイクル試験を実施し、評価指標の検討を行う。

②弱エストロジェン様作用/アロマターゼ阻害作用/甲状腺ホルモン様作用についての検討

エストロジェン様作用以外の内分泌かく乱作用に関する試験法について情報収集を行う。

3) 試験魚（メダカ）に関する基礎的知見の収集・整理

①メダカアトラスの作成

これまでの取組において、正常個体における基礎データ（生殖腺組織と成長、二次性徴、肝臓中ビテロジェニン濃度等）及び暴露個体における生殖腺組織のデータを収集し、メダカデータベースとしてホームページで公開してきた。しかしながら、暴露個体における生殖腺組織の画像については、精巣卵以外の精巣や卵巣の変化についての画像が極めて少なく、エストロジェン以外の化学物質による暴露個体の画像も僅かである。よって、今後は、これまでに実施した暴露試験における保存サンプルを活用して、様々な化学物質暴露における、様々な臓器（生殖線以外の臓器を含む）の変化について、アトラスを作成する。

②試験のエンドポイントについての情報整備

試験におけるエンドポイントとなる、全長、体重、産卵数、受精率、孵化日数といった事項に関して、そのコントロール群（被験物質無投与群）でのばらつき、また飼育条件等によるばらつきの変化等について情報を整備する（表1参照）。

③エンドポイントの生物学的意義についての検討

エストロジェン様作用物質に暴露した際、精巣組織中に卵母細胞が出現する精巣卵という事象は、濃度依存的な現象であり、重要なエンドポイントとされている。しかし、この精巣卵という現象と繁殖パラメータ（産卵数や受精率）との関連性は十分明らかにされておらず、精巣卵というエンドポイントの有害性についてはまだ明確な結論は得られていない。このことから、平成16年度より、17-βエストラジオールを用いた暴露試験を行い、精巣卵の程度と受精率との関連性について検討した（添付資料参照）。

#### 4) 平成17年度試験対象物質について

今年度は、魚類試験体系そのものの検討を行うため、平成17年度試験対象物質として選定された物質に関しては、受容体結合性等の評価及び情報収集のみを行う。

#### 5) OECD関連事業について

経済協力開発機構(OECD)は、内分泌かく乱作用のスクリーニングを目的とした魚類スクリーニングアッセイ(FSA:Fish Screening Assay)を提案し、2003年(平成15年)から基準物質による検証作業を進めている。2003年にはPhase 1Aとして強エストロジェン(17 $\beta$ -エストラジオール)及びアンドロジェン(17 $\beta$ -トレンボロン)による検証作業が、2004年にはPhase 1Bとして弱エストロジェン(ペンチルフェノール)、アロマターゼ阻害剤(プロクロラズ)及び抗アンドロジェン(フルタミド)による検証作業が行われてきた。我が国は本検証作業に参加すると共に、リードラボとして全データのとりまとめ及び報告を行ってきた。

その結果、強弱エストロジェンによる暴露では、3魚種共にビテロジェニンの濃度依存的な誘導が認められた。また、アンドロジェンによる暴露では、メダカ及びファットヘッドミノーのメス個体において二次性徴のオス化が観察されると共に、3魚種共にメス個体におけるビテロジェニン濃度の低下が認められた。アロマターゼ阻害剤による暴露では、3魚種共にメス個体におけるビテロジェニン濃度の低下が認められた。抗アンドロジェンによる暴露では明瞭な影響は認められなかった。影響指標の中で産卵と生殖腺組織学に関しては再現性が十分でなく、さらなる標準化が必要であることが示唆された。以上の結果から、本アッセイにおいて、ビテロジェニン濃度及び二次性徴を測定することで化学物質のエストロジェン様作用、アンドロジェン様作用及びアロマターゼ阻害作用の影響を検出することが可能であることが示唆された。

さらに、平成17年度より陰性対照物質を用いた魚類スクリーニングアッセイのPhase 2検証作業が開始された。陰性対照物質の選定にあたっては、1-ヘキサノール、3,4ジクロロアニリン、2,4-ジニトロフェノール、ペンタクロロフェノール及び過マンガン酸カリウムについて試験管内試験を実施し、専門家による協議をへた後、過マンガン酸カリウム及び1-オクタノールの2物質を陰性対照物質とすることが決定された。今年度、我が国においても、過マンガン酸カリウム及び1-オクタノールを用いた暴露試験を実施する。なお、このPhase2についても、これまでに引き続き日本がリードラボとしてとりまとめを行うこととなっている。

<魚類試験に関するOECDの動きと日本の取組>

年月	OECDの動き	日本の取組
1998年10月	第1回魚類 Expert Consultation ・3段階の試験体系 (Tiered testing approach) 提案	日本の取組を紹介 ・SPEED' 98の概要説明 ・d-rRメダカを用いた性転換試験の結果
2000年11月	第2回魚類 Expert Consultation ・Tier 1~3における試験法の結果報告	日本の取組を紹介 ・メダカ繁殖試験 ・sr-Rメダカを用いた性転換アッセイ ・メダカフルライフサイクル試験を用いた試験結果
2002年6月	第6回 EDTA (Endocrine Disrupter Testing and Assessment) 会議 ・5段階の試験体系 (Conceptual framework) 提案	試験体系のスキームを提案 日本の取組を紹介 ・ノニルフェノール及びトリブチルスズについてのリスク 評価結果を提出し加盟国の専門家の意見を聴取していることを発表
2002年9月	第1回魚類生殖腺組織学に関するテクニカルワークショップ ・魚類内分泌かく乱評価において生殖腺組織学がエンドポイントになりうるとの共通認識確認	日本における取組を紹介 ・魚類生殖腺組織学の切片作製法 ・メダカ正常発生における生殖腺組織学基礎データ及び内分泌攪乱化学物質に暴露されたメダカ生殖腺病理組織学
2003年3月	VMG-eco (Validation Management group for ecotoxicity testing) 電話会議 ・Fish Screening Assay for the Detection of Endocrine Active Substances Phase 1 検証作業の承認 ・Phase 1A 検証作業の開始	Phase 1A 検証作業の実施 参加機関(日本) ・財団法人化学物質評価研究機構 (リードラボ)、 独立行政法人国立環境研究所、国土環境株式会社
2003年5月	第2回 VMG-eco ・Phase 1A 検証作業の進捗確認 ・高次試験法についての議論	魚類スクリーニング試験の Phase 1A 検証作業における初期結果報告 日本の取組を紹介 ・パーシャルライフサイクル試験及びフルライフサイクル試験開発状況
2003年10月	第1回魚類生殖腺会議 ・生殖腺評価の標準化  FDG (Fish Drafting Group) 会議 ・Phase 1B 検証作業に向けた取り組みの提案/承認	魚類スクリーニング試験の Phase 1A 検証作業の結果報告 フルライフサイクル試験と二世代試験の比較に関する文献調査の進捗状況報告
2004年3月	・Phase 1B の検証作業の開始	Phase 1B 検証作業の実施 参加機関(日本) ・財団法人化学物質評価研究機構 (リードラボ)、 独立行政法人国立環境研究所、国土環境株式会社
2004年11月	第2回魚類生殖腺会議 ・魚類生殖腺評価の標準化と重要な測定項目のリストアップ	魚類スクリーニング試験の Phase 1B 検証作業のうち生殖腺関連の結果報告
2004年12月	第3回 VMG-eco ・魚類スクリーニング試験 Phase 1B 検証作業のまとめと今後の取り組みの整理 ・高次試験法についての議論	魚類スクリーニング試験の Phase 1B 検証作業の結果報告
2005年5月	FDG 電話会議 ・Phase 2 検証作業に向けた取り組みの提案/承認	Phase 2 検証作業における物質選定のため in vitro 試験の結果報告
2005年7月	・Phase 2 の検証作業の開始	Phase 2 検証作業の実施 参加機関(日本) ・財団法人化学物質評価研究機構 (リードラボ)

表1：これまでに検討会等で指摘を受けた試験条件等

資料 3-4-1

指摘事項	要因と試験結果への影響等	試験方法への反映(合意時期)及び現状
1. PLCT における試験魚の体重、体長(全長)が実施機関で異なる(対照区) <ul style="list-style-type: none"> <li>全長 30mm 程度と体長 21mm 程度</li> <li>体重 250mg 程度と 160mg前後</li> <li>雌のVTG産生 1,500 ng/mg liver と 550 ng/mg liver</li> </ul>	<p>&lt;要因&gt;</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>水槽の大きさと給餌方法が成長に影響を与える</li> </ul> <p>&lt;影響等&gt;</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>VTG 産生濃度が低い場合があり、メスの性成熟が達成されていない可能性が考えられる</li> <li>ふ化後 60 日令でのメダカ成長の相違は、エンドポイントである二次性徴、生殖腺組織や VTG 産生、GSI 等に試験結果に影響する可能性がある</li> <li>FLCT では繁殖試験は 60 日の曝露の後、70 日令でヘアリングを行ない開始するので、70 日令で十分な性成熟が達成されていない場合、繁殖試験結果に反映する可能性が考えられる</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>給餌方法等について NIES が検討すること(H15)</li> <li>現時点で性成熟の遅れ等がどの程度試験結果に反映して来ているのかは明らかでないが、プロトコルに準拠して試験を実施する。実施が困難な場合には、充分、要因を議論すること(H15)</li> </ul> <p><b>【現状】</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>体重、全長については概ね改善</li> <li>試験によっては異なる場合がある</li> <li>水槽の大きさについては統一されていない</li> </ul>
2. エストロゲン作用により、二次性徴等から性の判別が困難な場合、雌雄の定義と検定方法を明確にして、実施機関で統一すべきである <ul style="list-style-type: none"> <li>二次性徴による性比の求め方、取上げ方も検討すべき</li> </ul>	<p>&lt;要因&gt;</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>CERI ではランダムに 20 尾、取り上げているが NIES では外観で雌雄を確認して 10 尾づつ取り上げている</li> <li>NIES では雌は泌尿生殖隆起をみている</li> </ul> <p>&lt;影響等&gt;</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>OECD に提出したプロトコルでは、ランダムに取り上げることになっている</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>影響の個体差を考慮してランダムに取り上げる(H15)</li> <li>精巣卵が検出された個体に対しては DMY による性判別を行なう(H14)</li> <li>VTG、肝指数、生殖腺指数は外観による観察を優先させる(H16)</li> <li>性比の偏りについては、OECD の Fish development test のプロトコル作成で、有効性基準における対照区の性比の偏りをどうするかという問題も発生</li> </ul>
3. 生殖腺組織観察において輸精管と精子の状況に関わる事項等も評価基準として検討した方が良い	<p>&lt;要因&gt;</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>他魚種では、エストロゲンによる生殖腺発達の影響として、輸卵管形成が感度の高い指標として上げられているが、メダカについてはこれまで十分な検討がなされていない</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>生殖細胞の分化に着目しているが、輸精管・輸卵管の発達が異常であれば当然繁殖に影響が生じるので、検討課題とする(H15)</li> </ul> <p><b>【現状】</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>OECD では生殖腺組織観察として、その他の観察項目も検討されているところである</li> <li>作用・影響評価研究では生殖腺以外の組織観察のデータベースを構築することも計画している</li> </ul>
4. 試験結果の表記方法の違い <ol style="list-style-type: none"> <li>ふ化率、体重等の有効数字</li> <li>HSI,GSI,VTG の有効数字</li> <li>生殖腺性比の表記方法</li> <li>VTG の統計処理</li> <li>定量限界の数値</li> </ol>	<p>&lt;要因&gt;</p> <p>数値の表記については有効数字が決められていない</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>整数と少数表示</li> <li>有効数字2桁と3桁 <ul style="list-style-type: none"> <li>VTG は数値が丸められるものと実数を記入</li> </ul> </li> <li>精巣:精巣卵・卵巣と精巣・卵巣・精巣卵</li> <li>CERI は標準偏差、環境研は標準誤差</li> <li>CERI は 1ng/mg liver、NIES は 0.5ng/mg liver</li> </ol>	<p>表記する有効数字を決める</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>有効数字 2 桁(裏面図参考)(H15)</li> <li>有効数字 2 桁(裏面図参考)(H15)</li> <li>精巣卵が発生した個体については雄個体である事を明記できる表記方法とする[s1](H16)</li> <li>標準偏差で統一する(H14)</li> <li>1ng/mg liver で統一(H15)</li> </ol>
5. 試験条件などについて <ul style="list-style-type: none"> <li>試験の連数</li> <li>試験水槽のサイズ</li> <li>繁殖試験における試験温度</li> </ul>	<p>&lt;要因&gt;</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>試験連数の考え方(OECD に提出した PLCT、FLCT プロトコルでは水槽を 4 連にすることになっている)即ち、CERI では、試験魚 60 尾を 15 尾づつ、4 水槽に別けて曝露している(NIES では水槽サイズが CERI と異なるので 60 尾を 20 尾づつ 3 水槽で曝露している)・・・1 との関連あり</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>OECD において検討されている、統計処理を個体毎に行うか、水槽毎に行うかといった問題がある</li> <li>フルライフサイクル試験の濃度幅を十分にとり、無影響量等が出せるようにする[s2](H17)</li> </ul>

\* CERI:化学物質評価研究機構 NIES:国立環境研究所

○改訂後の表記方法（案）

測定濃度	ふ化率 (%)	ふ化日数 (日)	死亡率 (%)	全長 (mm)	体重 (mg)	GSI (%) ♂ ♀	二次性徴による性比 (♂:♀)
有効数字 3 桁	全て有効数字 2 桁 体重は 2 桁以下を丸める (四捨五入)						
測定濃度	生殖腺性比 (精巣:精巣卵:卵巣)		HSI (%) ♂ ♀		VTG (ng/mg liver) ♂ ♀		
有効数字 3 桁	精巣卵が出現した個体はDMY を測定して雌雄判別する		2 桁		2 桁 (以下は丸める)		

### 3. 化学物質の内分泌かく乱作用に関する哺乳類試験について

#### 【これまでの取組】（ExTEND2005 P8より抜粋）

ラットを用いた改良1世代試験を開発し、SPEED'98のリストに基づいて、対象とした化学物質ごとには哺乳類に対する内分泌かく乱作用に関連する文献及び試験管内試験に関する文献の検索・収集を行い、専門家による文献の信頼性評価を実施した。その結果から選定した試験対象物質を用いて試験を実施した。試験にあたっては試験対象物質の環境中の濃度、ヒトの推定暴露量、既存の毒性情報、物性情報をもとに試験用量及び観察項目の設定を行った。試験用量の設定にあたっては、ヒトが暴露する可能性のある用量レベルにおいて何らかの反応や非用量相関的な反応があった場合に検出することをめざして、敢えて従来型のリスク評価を目的とはせず、ヒト推定暴露量を考慮した用量に原則4群、何らかの有害影響が既に報告されている用量に原則1群を設定した。経済産業省で進められている子宮肥大試験、ハーシュバナー試験、改良28日間反復投与毒性試験の試験結果も参照し、結果の評価を行った。

28物質でラットを用いた試験を実施し、いずれの物質でもヒト推定暴露量を考慮した用量では明らかな内分泌かく乱作用は認められないと判断した。

動物試験であるからには、飼料から完全に除去することができず定量に制御することもできない物質（たとえば植物由来のエストロゲン様作用を持つ物質やフタル酸エステル類など）が存在する中での試験であり、現実的には作用物質の暴露量ゼロであるような対照群を設定することはできない中で、ヒト推定暴露量を考慮した用量のレベルにおいてこれ以上精密に変化を捉えることには限界があることが明らかとなった。今後は、ヒトが暴露する可能性がある用量だけでなく、各種の毒性評価の手法も参考とした用量設定の検討が必要である。

#### 【平成17年度検討及び実施事項】

##### 1) 試験対象物質についての暴露試験実施

平成17年度試験対象物質のうち、ブチルフェノールに関しては、ラットにおける影響の報告があることから、ラットを用いた改良1世代試験を実施する。試験用量については、NOELが算定できるような暴露濃度群の設定を行う。

##### 2) 基盤的研究（案）：哺乳類において観察される変化についての研究

これまでに実施した内分泌かく乱作用が疑われる化学物質の改良型世代試験において、実験動物生産業者から購入した動物（一定頻度で遺伝的多型性を保持するクローズドコロニーラット）の中に自然発生的な遺伝性の突然変異とおぼしき変化を示す事例が紛れ込んでおり、投与群



で低頻度にそのような変化が出現した場合、誘発性の変化なのか自然発生性の変化なのか判断が難しい局面に多々遭遇した。背景的な出現頻度や異常の種類を把握しているだけでは、この問題は基本的には解決せず、遺伝性あるいはエピジェネティックな変化であることを証明することが本質的な問題解決として最も簡明であると考えられた。そのためには、そのような自然発生性の異常の発見、遺伝的固定、様々な遺伝実験や病態の解明と共に、原因遺伝子を探索確立し、診断用プローブを作製することが必要である。

\* 註：OECDにおいては子宮肥大試験、ハーシュバーガー試験等のラットを用いたスクリーニング試験について検証作業が進められている。



(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)。

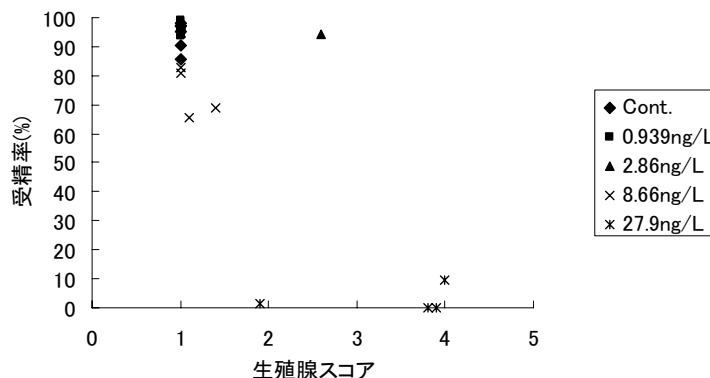


図1：生殖腺スコアと受精率の相関（平成14年度検討結果）

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。

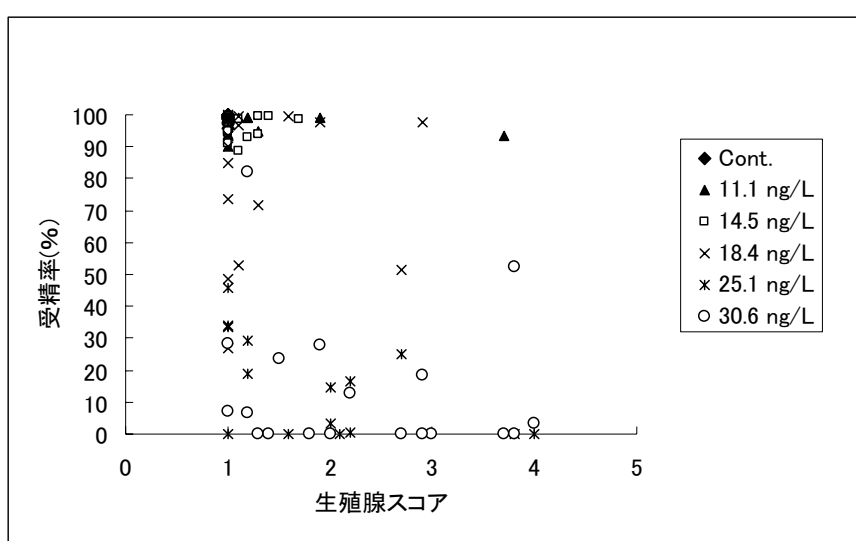


図2. 生殖腺スコアと受精率との相関

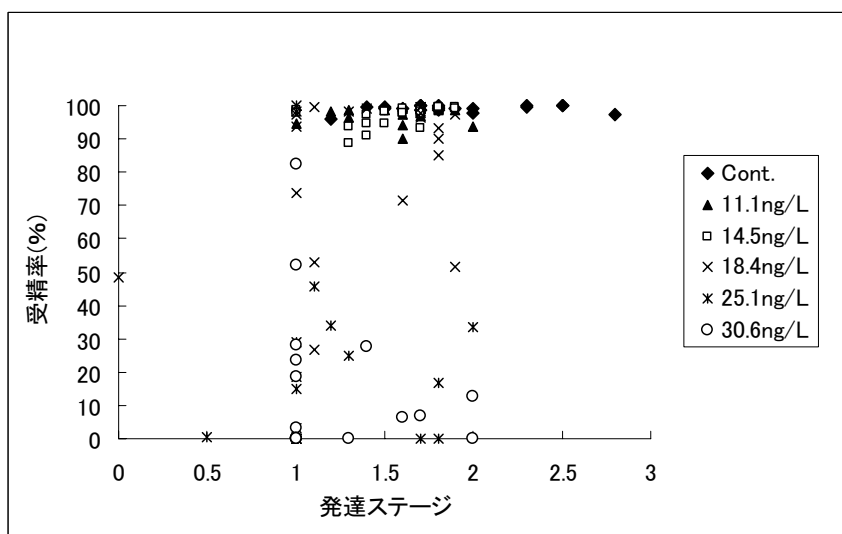


図3. 精巣の発達ステージと受精率との相関

### 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。