

第 1 段階生物試験の実施結果について(案)

1. 平成 27 年度に実施した試験結果について

試験管内試験の結果等から第 1 段階生物試験を実施する優先順位が高いと考えられた 1 物質 (ビスフェノール A) について、メダカを用いた魚類短期繁殖試験(修正 TG229)を実施した (試験法の概要については p 2 参照)。

(1) ビスフェノール A の試験結果

0.155、0.826、4.67 mg/L(実測値)のばく露濃度で試験を行ったところ、雄では、全長、体重、生殖腺体指数及び二次性徴には有意な変化は認められなかった。また、4.67 mg/L のばく露群では、肝臓体指数、肝臓中ビテロゲニン濃度が統計学的に有意な高値を示した。

また雌では、0.155 及び 0.826 mg/L のばく露群では、全長、体重、生殖腺体指数、肝臓体指数、肝臓中ビテロゲニン濃度には、有意な変化が認められなかった。一方、4.67 mg/L のばく露群では、総産卵数と受精率の統計学的に有意な低値が認められた。しかし、生存個体が 1 水槽のみとなったため死亡率の統計学的検定はできなかった。残った個体については、全長、体重、生殖腺体指数は低値傾向、肝臓体指数と肝臓中ビテロゲニン濃度は高値傾向が認められた。

2. 試験結果のまとめ

(1) ビスフェノール A

ビスフェノール A については既存知見からエストロゲン作用を持つことが想定された。

ばく露濃度 4.67 mg/L は、平成 26 年度に実施された化学物質環境実態調査において測定された最高濃度 280 ng/L の約 16,700 倍であった。この濃度でばく露を受けた雄では肝臓中ビテロゲニン濃度の上昇が確認できた。この濃度のばく露を受けた雌では、総産卵数、受精率の統計学的に有意な低値が認められたことから、メダカの生殖に対する有害性を有する可能性はあるが、死亡率が高値であるため、本結果のみから結論を得ることはできなかった。

(参考)

メダカを用いた魚類短期繁殖試験法

魚類短期繁殖試験（OECD TG229）は、成熟したメダカを雌雄混合で試験対象物質に21日間ばく露し、ばく露期間中の産卵状況並びにばく露終了時の生存個体の肝臓中ビテロジェニン濃度及び二次性徴を調べる試験法である。

馴化							試験物質による暴露(日)																				
6	5	6	4	3	2	1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
産卵状態の確認							産卵数(受精卵数、未受精卵数)の計数																				
							死亡・一般症状																				

↑
暴露開始

↑
暴露終了(暴露個体の測定・分析)



エンドポイント

- ・産卵状態(産卵数、受精率、受精卵数)
- ・肝臓中ビテロジェニン濃度
- ・二次性徴
- ・生殖腺組織(オプション:実施せず)

- ・全長、体重
- ・肝臓、生殖腺重量(HSI、GSI)
- ・肝臓中ビテロジェニン濃度
- ・二次性徴(尻鰭乳頭状突起)

第 1 段階生物試験結果(TG229)

ビスフェノールA

実施機関：(一財)化学物質評価研究機構

表 1-A 試験結果

平均濃度実測値 (mg/L)	試験個体数 ¹⁾		死亡率 (%) 雌雄(雄, 雌)	全長 (mm)		体重 (mg)	
	雄	雌		雄	雌	雄	雌
対照区	12	12	0(0, 0)	33.0 ± 0.3	32.0 ± 0.9	325 ± 17	318 ± 25
0.155	12	12	16.7(25.0, 8.3)	33.2 ± 0.9	31.7 ± 0.9	290 ± 23	313 ± 23
0.826	12	12	8.3(8.3, 8.3)	32.5 ± 0.9	32.0 ± 0.9	310 ± 10	342 ± 20
4.67	12	12	70.8*(58.3, 83.3)	33.6 ± 1.9	30.6	370 ± 72	281

表 1-B 試験結果(続き)

平均濃度実測値 (mg/L)	総産卵数 (eggs/female/day)	受精卵数 (eggs/female/day)	受精率 (%)	生殖腺体指数 (%)	
				雄	雌
対照区	13.7 ± 2.1	-	97.2 ± 0.4	0.93 ± 0.33	6.50 ± 1.53
0.155	14.4 ± 1.8	-	96.1 ± 2.1	0.91 ± 0.13	6.77 ± 0.50
0.826	13.6 ± 1.6	-	94.2 ± 1.9	0.80 ± 0.23	6.00 ± 1.00
4.67	1.47 ± 1.2 **	-	59.2 ± 25 *	0.77 ± 0.23	2.25

表 1-C 試験結果(続き)

平均濃度実測値 (mg/L)	肝臓体指数 (%)		ビテログニン濃度 (ng/mg liver)		二次性徴	
	雄	雌	雄	雌	雄	雌
対照区	2.04 ± 0.46	3.51 ± 0.33	ND	438 ± 60.3	67.8 ± 10.7	0
0.155	2.10 ± 0.40	3.36 ± 0.46	ND	435 ± 65.3	74.0 ± 3.6	0
0.826	2.30 ± 0.45	3.34 ± 0.75	ND	768 ± 297	71.3 ± 4.2	0
4.67	3.44 ± 1.15*	4.81	2,804 ± 811 *	3,456	76.0 ± 5.7	0

表 1-D 試験結果(続き)

平均濃度実測値 (mg/L)	その他の所見					
対照区	-					
0.155	-					
0.826	-					
4.67	-					

結果は平均値±標準偏差。

有意差水準 (** $p<0.01$ 、* $p<0.05$)。

ND は未検出 (< 1 ng/mg liver)。

(-)は、未測定

二次性徴：乳頭状突起を有する節板数

1) 1水槽に雄3尾、雌3尾を収容し、同じ濃度区に4水槽（4連）を用いた。

2) 試験結果の統計処理方法：濃度群ごとに、まず、水槽ごとの平均値を算出し、その平均値を用いて結果の統計処理を行った(平均値+/-標準誤差)。

・濃度設定：LC50=13mg/L (Yokota *et al.* 2000) より1/3濃度の最高濃度4 mg/Lを初案とした。しかし、繁殖試験で設定濃度4 mg/Lで産卵数に有意な増減なし (Kang *et al.* 2002) であったことから、産卵数への影響をより重視した5 mg/Lを採用した。

・試薬（被験物質）

被験物質：2,2-Bis(4-hydroxyphenyl)propane (Bisphenol A)

メーカー：東京化成工業株式会社

等級：EP

ロット : KL28J
純度 : 99.9% (GC%、試験成績書より)
購入日 : 2015年6月29日

・VTGキット

キット名 : EnBio Medaka Vitellogenin ELISA system
メーカー : 藤倉化成株式会社
ロット : SBI25
購入日 : 2015年10月2日納品
使用期限 : 2016年6月

平成 27 年度化学物質の内分泌かく乱作用に関する第一段階生物試験 (ビスフェノール A:BPA) 実施業務

(一財) 化学物質評価研究機構

1. 背景及び目的

本業務は、環境省が取りまとめた「化学物質の内分泌かく乱作用に関する今後の対応—EXTEND2010—」に基づき、化学物質の内分泌かく乱作用についての評価手法の確立と評価の実施を加速化して進めることを目的とし、内分泌かく乱作用に関する評価等に必要なデータを集積するため、環境省が実施する試験管内試験の結果において第一段階生物試験を実施する優先順位が高いと考えられる物質について、第一段階生物試験である魚類短期繁殖試験を実施するものである。本業務では対象物質をビスフェノール A (BPA) とし、OECD テストガイドライン No.229 に従い、メダカ (*Oryzias latipes*) の内分泌かく乱に関わるエンドポイントへの作用・影響の有無及び NOEC または LOEC 等のデータ収集を行った。

2. 試験条件

被験物質	ビスフェノール A (BPA)
試験濃度	5.00、1.00、0.200 mg/L (公比 5.0) 及び対照区
試験液量	約 1.8 L (2.7 L 容器)
換水率	14 回/day (流量 17.5 mL/min)
供試魚	24 尾/試験区 (雄 3 尾、雌 3 尾/1 連、4 連)
供試魚週齢	18 週齢
暴露期間 (プレ暴露)	21 日間 (14 日間)
給餌	2 回/日、飽食量、アルテミアふ化幼生

3. BPA による魚類短期繁殖試験の試験結果

表 1: 測定濃度

設定濃度 (mg/L)	測定濃度(対設定濃度%)				平均 測定濃度
	0 day	7 day	14 day	21 day	
対照区	ND	ND	ND	ND	ND
0.200	0.185 (92.3)	0.129 (64.5)	0.166 (83.0)	0.138 (69.2)	0.155 (77.3)
1.00	0.975 (97.5)	0.801 (80.1)	0.838 (83.8)	0.689 (68.9)	0.826 (82.6)
5.00	5.28 (106)	4.75 (95.0)	4.65 (93.0)	4.01 (80.2)	4.67 (93.5)

表 2: 試験結果 (死亡率/繁殖)

測定濃度 (mg/L)	死亡数 (尾)		死亡率計 (%)	産卵数 (eggs/female/day)	受精率 (%)
	♂	♀			
対照区	0	0	0	13.7 ± 2.1	97.2 ± 0.4
0.155	3	1	16.7	14.4 ± 1.8	96.1 ± 2.1
0.826	1	1	8.3	13.6 ± 1.6	94.2 ± 1.9
4.67	7	10	70.8 *	1.47 ± 1.2 **	59.2 ± 25 *

**は $p < 0.01$ 、*は $p < 0.05$ で有意であることを示す。
産卵数、受精率の値は、容器平均±標準偏差で示す。

表 3：試験結果（全長/体重/二次性徴）

測定濃度 (mg/L)	全長 (cm)		体重 (mg)		二次性徴(乳頭状小突起)	
	♂	♀	♂	♀	♂	♀
対照区	3.30 ± 0.03	3.20 ± 0.09	325 ± 17	318 ± 25	67.8 ± 10.7	0
0.155	3.22 ± 0.09	3.17 ± 0.09	290 ± 23	313 ± 23	74.0 ± 3.6	0
0.826	3.25 ± 0.09	3.20 ± 0.09	310 ± 10	342 ± 20	71.3 ± 4.2	0
4.67	3.36 ± 0.19	3.06	370 ± 72	281	76.0 ± 5.7	0

各測定値データの値は、容器平均±標準偏差で示す。4.67 mg/L 区の雌については 1 容器にしか生存個体がいなかったため、標準偏差は示さなかった。

表 4：試験結果（HSI/GSI/VTG）

測定濃度 (mg/L)	肝臓体指数 (%)		生殖腺体指数 (%)		ビテロジェニン (ng/mg liver)	
	♂	♀	♂	♀	♂	♀
対照区	2.04 ± 0.46	3.51 ± 0.33	0.93 ± 0.33	6.50 ± 1.53	ND	438 ± 60.3
0.155	2.10 ± 0.40	3.36 ± 0.46	0.91 ± 0.13	6.77 ± 0.50	ND	435 ± 65.3
0.826	2.30 ± 0.45	3.34 ± 0.75	0.80 ± 0.23	6.00 ± 1.00	ND	768 ± 297
4.67	3.44 ± 1.15 *	4.81	0.77 ± 0.23	2.25	2804 ± 811*	3456

*は $p < 0.05$ で有意であることを示す。

各測定値データの値は、容器平均±標準偏差で示す。4.67 mg/L 区の雌については 1 容器にしか生存個体がいなかったため、標準偏差は示さなかった。

表 5：まとめ

エンドポイント	NOEC (mg/L)	LOEC (mg/L)
死亡	0.826	4.67 ↓
産卵数	0.826	4.67 ↓
受精率	0.826	4.67 ↓
肝臓体指数	0.826	4.67 ↑
ビテロジェニン	0.826	4.67 ↑

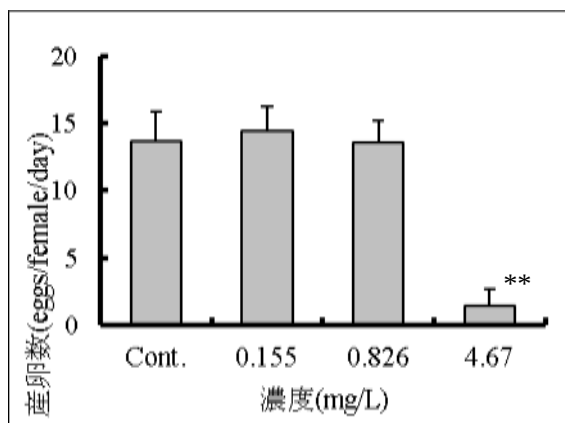


図 1：暴露期間中の平均産卵数 (/female/day)

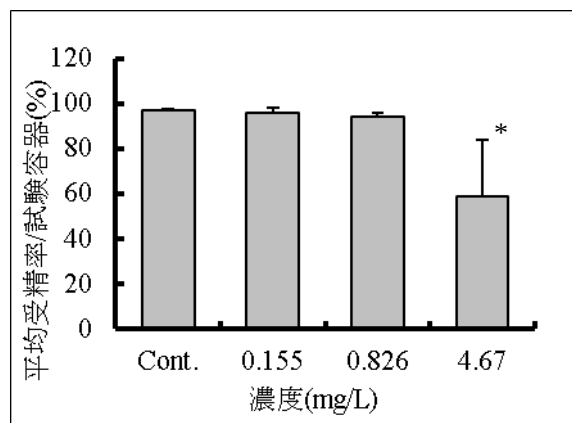


図 2：暴露期間中の平均受精率 (/試験容器)

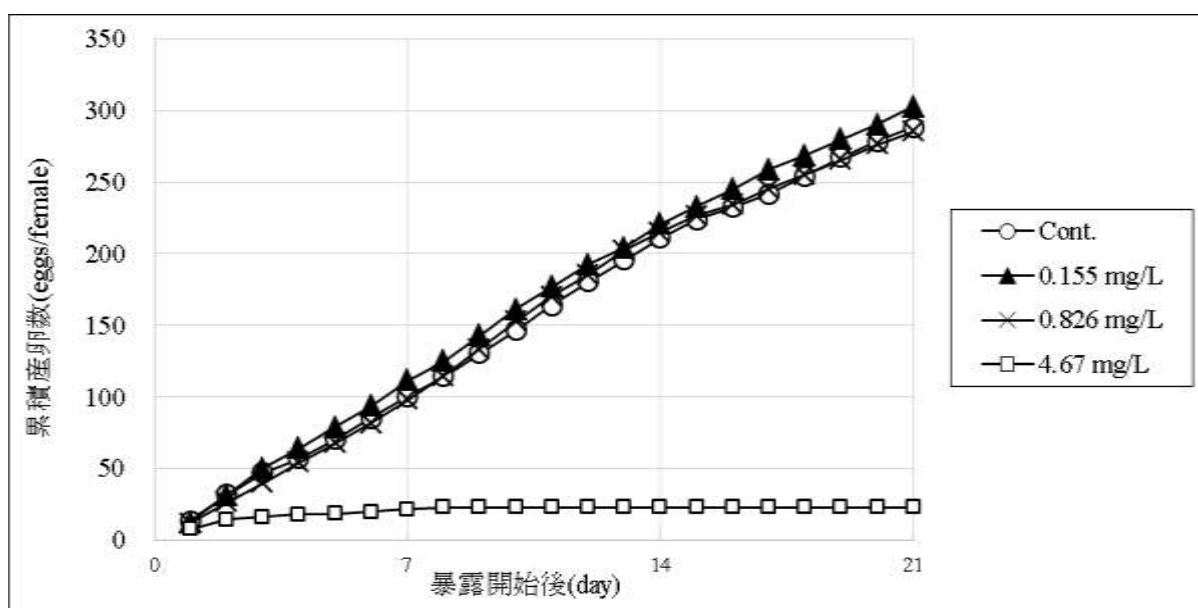


図 3：暴露期間中の累積産卵数 (/female)

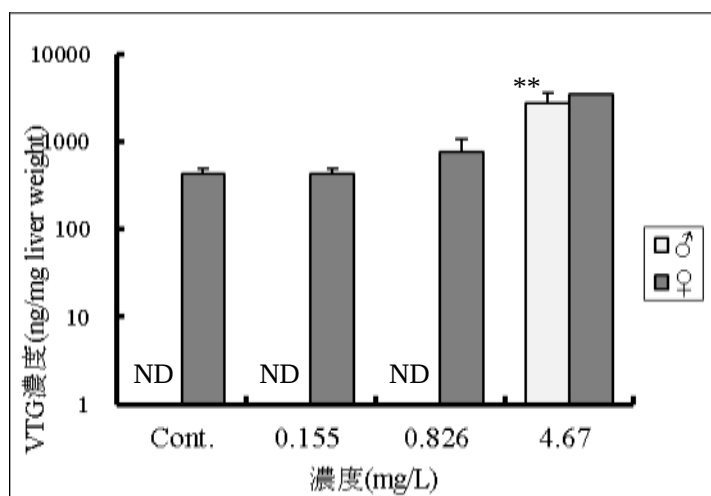


図 4：肝臓中のビテロジェニン濃度 (ng/mg liver weight)