

生態系への影響評価のための魚類を用いた内分泌攪乱作用に関する

試験結果について(案)

・平成 14 年度優先物質の試験結果について

1. *p,p'*-DDD

(1) メダカを用いた試験

ビテロジェニンアッセイ

1.28、2.55、5.40、10.2、21.3 $\mu\text{g/L}$ (実測値)の曝露濃度において試験を行ったところ、肝臓中ビテロジェニン濃度には統計学的に有意な変化は認められなかった。

なお、曝露 21 日後の 5.40 $\mu\text{g/L}$ 及び 21.3 $\mu\text{g/L}$ の曝露群において、肝指数の統計学的に有意な低値が認められた。

パーシャルライフサイクル試験

0.213、0.637、1.86、6.39、18.7 $\mu\text{g/L}$ (実測値)の曝露濃度において試験を行ったところ、孵化率、孵化日数、全長、体重、雌の生殖腺指数、肝指数及び肝臓中ビテロジェニン濃度に統計学的に有意な変化は認められなかった。

18.7 $\mu\text{g/L}$ の曝露群において、死亡率の統計学的に有意な高値が認められた。

0.213 $\mu\text{g/L}$ 及び 18.7 $\mu\text{g/L}$ の曝露群の雄において、生殖腺指数の統計学的に有意な高値が認められた。

生殖腺の組織学的検査では、対照区、助剤対照区、0.213 $\mu\text{g/L}$ の曝露群及び 18.7 $\mu\text{g/L}$ の曝露群において、精巣卵の個体が僅かに認められたが、助剤対照区、0.213 $\mu\text{g/L}$ 及び 18.7 $\mu\text{g/L}$ の曝露群においては、精巣卵出現率に統計学的な有意差は認められなかった。

(2) 試験管内(*in vitro*)試験

メダカエストロジェン受容体(ER α 及び ER β)結合競合阻害試験、メダカエストロジェン受容体(ER α 及び ER β)レポーター遺伝子試験及びメダカアンドロジェン受容体レポーター遺伝子試験を行った。

その結果、メダカエストロジェン受容体(ER α 及び ER β)結合競合阻害試験では、エストラジオールに対する相対結合強度は 1/2,500(ER α)及び約 1/2,000(ER β)であった。メダカエストロジェン受容体(ER α)レポーター遺伝子試験では、ER α に対する活性は認められたが、IC₅₀ 値は得られなかった。メダカエストロジェン受容体(ER β)レポーター遺伝子試験及びメダカアンドロジェン受容体レポーター遺伝子試験においては、有意な反応は認められなかった。

(3) 試験結果のまとめと今後の方針

以上のとおり、 p,p' -DDDについては、用量相関性もなく、低頻度で統計学的な有意差は認められない精巣卵(曝露群ごとの精巣卵が認められた個体のみ)の生殖腺スコアの平均値2.0及び1.6)がみられた。平成14年度に行った追加試験の結果(別添1参照)を踏まえると、受精率に悪影響を与えとは考えられず、今回の試験結果において、明らかな内分泌攪乱作用は認められなかった。なお、生殖腺スコアと受精率との関係については、試験例数を増やし、詳細な検討を実施中である。

本物質については、今後、生態リスク初期評価を行う際に、今回の試験結果も参照する予定である。

2. p,p' -DDE

(1) メダカを用いた試験

ビテロジェニンアッセイ

7.44、16.5、28.0、53.6、115 $\mu\text{g/L}$ (実測値)の曝露濃度において試験を行ったところ、肝指数には統計学的に有意な変化は認められなかったが、肝臓中ビテロジェニン濃度は53.6 $\mu\text{g/L}$ 以上の曝露群において、曝露濃度の上昇と共に増加し、統計学的に有意な高値が認められた。

パーシャルライフサイクル試験

1.05、3.48、11.1、32.4、111 $\mu\text{g/L}$ (実測値)の曝露濃度で試験を行ったところ、孵化率、全長、体重及び生殖腺指数に統計学的に有意な変化は認められなかった。

生殖腺の組織学的検査では、助剤対照区及び11.1 $\mu\text{g/L}$ 以上の曝露群において精巣卵の個体がみられ、曝露濃度の上昇と共に増加した精巣卵出現率に32.4 $\mu\text{g/L}$ 以上の曝露群において、統計学的に有意な高値が認められた。111 $\mu\text{g/L}$ の曝露群において観察を行った雄9個体(性決定遺伝子により雌雄を判定した)のうち、1個体は卵巣を有する性転換個体であった。

雄の肝臓中ビテロジェニン濃度は曝露濃度の上昇と共に増加し、32.4 $\mu\text{g/L}$ 以上の曝露群において、統計学的に有意な高値が認められた。

雌の肝臓中ビテロジェニン濃度は、111 $\mu\text{g/L}$ の曝露群において、統計学的に有意な高値が認められた。

1.05 $\mu\text{g/L}$ 及び32.4 $\mu\text{g/L}$ 以上の曝露群において、孵化日数の統計学的に有意な高値(遅延)が認められた。

32.4 $\mu\text{g/L}$ 以上の曝露群において、死亡率の統計学的に有意な高値が認められた。

32.4 $\mu\text{g/L}$ の曝露群の雄において、肝指数の統計学的に有意な低値が認められ、111 $\mu\text{g/L}$ の曝露群の雄において、肝指数の統計学的に有意な高値が認めら

れた。

1.05 µg/L、3.48 µg/L、11.1 µg/L 及び 111 µg/L、の曝露群の雌において、肝指数の統計学的に有意な低値が認められた。

(2) 試験管内 (*in vitro*) 試験

メダカエストロジェン受容体(ER α 及び ER β) 結合競合阻害試験、メダカエストロジェン受容体(ER α 及び ER β) レポータージーン試験及びメダカアンドロジェン受容体レポータージーン試験を行った。

その結果、メダカエストロジェン受容体(ER α 及び ER β) 結合競合阻害試験では、エストラジオールに対する相対結合強度は約 1/2,900(ER α) 及び約 1/8,300(ER β) であった。メダカエストロジェン受容体(ER α 及び ER β) レポータージーン試験では、ER α 及び ER β に対する活性は認められたが、IC₅₀ 値は得られなかった。メダカアンドロジェン受容体レポータージーン試験においては、有意な反応は認められなかった。

(3) 今後の方針

以上のとおり、*p,p'*-DDE については、今回の試験結果において、弱いながらもメダカエストロジェン受容体(ER α 及び ER β) との結合性が認められるとともに、用量相関的な肝臓中ビテロジェニン濃度及び精巣卵出現率の統計学的に有意な高値が認められたため、今後、確定試験として環境中濃度を考慮したフルライフサイクル試験を実施し、その結果を踏まえて評価を行うことが必要である。

・まとめ

平成 14 年度優先物質である *p,p'*-DDD 及び *p,p'*-DDE について行った「メダカを用いた試験」及び「試験管内 (*in vitro*) 試験」の結果等について取りまとめを行った。

p,p'-DDD については、用量相関性もなく低頻度で統計学的な有意差は認められない精巣卵が認められたものの、受精率に悪影響を与えるとは考えられず、明らかな内分泌攪乱作用は認められなかった。

p,p'-DDD については、今後、生態リスク初期評価を行う際に、今回の試験結果も参照する予定である。

p,p'-DDE については、弱いながらもメダカエストロジェン受容体(ER α 及び ER β) との結合性が認められるとともに、用量相関的な肝臓中ビテロジェニン濃度及び精巣卵出現率の統計学的に有意な高値が認められたため、今後、確定試験として環境中濃度を考慮したフルライフサイクル試験を実施し、その結果を踏まえて評価を行うことが必要である。

メダカを用いた 17 β -エストラジオール曝露による 精巢卵の程度と受精率に関する検討

1. 経緯

現在までの魚類内分泌攪乱試験法開発において、精巢組織中における卵母細胞(精巢卵)の出現はエストロゲン作用を示すパラメータであると考えられており、最も高感度なエンドポイントの一つとなりうることを示されている。しかし、精巢卵出現の生態毒性学的な定義は十分なされておらず、繁殖パラメータ(産卵数及び受精率)との関連性も十分議論されているとはいえない。そこで、17 β -エストラジオール(E2)によるメダカライフサイクル試験での繁殖検討*¹に用いた雄個体の生殖腺組織を5段階にスコアリングし(下表参照)、受精率との相関性について検討した。

*¹ 繁殖検討：フルライフサイクル試験のふ化後70日令の時点で各試験濃度(区)の生存個体の雌雄を外観の形態から判別しペアリングを行ない、ペア毎にふ化後100日令まで、毎日、産卵数及び受精率を観察

表 メダカ精巢の分類基準(案)

スコア	定義
1	成熟した雄にみられる精巢構造を有する。組織中には精原細胞、精母細胞及び精細胞といった種々の発達段階の生殖細胞が観察され、活発な精子形成が認められる。卵母細胞は発現していない。
2	全体に精巢の構造であり、精子形成も観察される。しかし、組織中に卵母細胞の発現が認められる。このレベルでの精巢卵の程度は低く、卵母細胞は組織中に散在した状態で1~10細胞が観察されるに過ぎない。
3	レベル2よりも卵母細胞の発現率が高く、組織中に10~50細胞が観察される。卵母細胞の一部は塊として観察される場合もある。しかしながら、全体としてはレベル1及び2と同様に精巢構造を呈しており、精子形成も観察される。
4	さらに精巢卵が発達し、組織の約50%までを卵母細胞によって構成される。精子形成は観察されるが、レベル1~3と比較すると精子形成に関与する生殖細胞が占めている部分が小さい。
5	組織の約50%~ほぼ全般を卵母細胞によって構成され、精原細胞、精母細胞等はわずかに散在する程度である。活発な精子形成は観察されていない。また、結合組織の異常な発達が認められる場合もある。

2. 方法

17 エストラジオールによるメダカフルライフサイクル試験で繁殖検討に用いた雄個体の生殖腺の切片を1個体当たり10枚作成し、メダカ精巢の分類基準(案)に基づいてスコアリングを行なった。各個体10枚の切片についてそれぞれスコアを求め、その平均値を各個体の生殖腺スコアとした。

なお、繁殖検討においてペアリングした雌個体についても生殖腺の組織学的観察を行った。

3. 結果

下図に生殖腺スコアと受精率^{*2}との相関を示す。

生殖腺スコアと受精率の関係は、生殖腺スコアが約 4 の個体で受精率の顕著な低下が観察された。生殖腺スコアが 2~3 の個体では、個体により反応の違いが認められた。生殖腺スコアが 1.9 未満においては、受精率の顕著な低下は認められなかった。

* 2) 受精率：繁殖試験期間中に雌が産卵した卵数に対する受精卵数の比率の平均 (%)

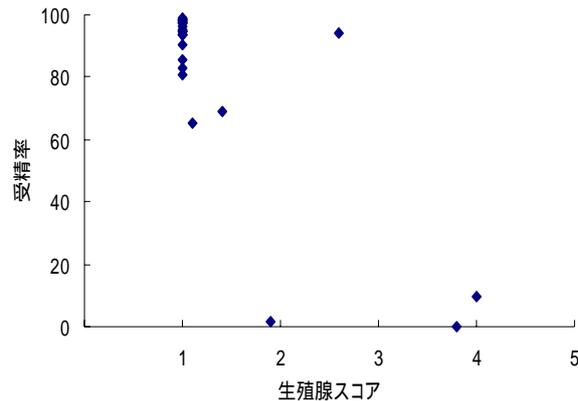


図 生殖腺スコアと受精率(%)との関係

4. 考察

今回の検討においては、雌の卵巣に何ら異常が認められなかったことから、本試験における受精率の低下は雄に起因したものであることが推測された。

生殖腺スコアが 1.9 の個体(31.3 ng/L 区)は、受精率の低下が認められたが、生殖腺スコアが 2.6 の個体では受精率の低下は認められなかった。生殖腺組織観察では、生殖腺スコア 1.9 及び 2.6 の個体ともに組織全般にわたる精子形成が観察された。受精率が低下したスコア 1.9 の個体においては生殖腺指数 GSI の顕著な低下(対照区の約 1/3)が認められ、精子形成の量的障害が推測された。また、この個体では肝臓中ビテロジェニンの誘導及び乳頭状小突起数の低下も認められた。一方、受精率が低下しなかったスコア 2.6 の個体においては、GSI 及びその他の項目において変化は認められなかった。

なお、今後、試験例数を増やし、生殖腺スコアと受精率との関係について、詳細な検討を実施する予定である。

ジメチルスルホキシドのパーシャルライフサイクル試験結果

1. 方法

ジメチルスルホキシド(DMSO)のメダカに及ぼす内分泌攪乱作用を評価するために、メダカ(*Oryzias latipes*)を段階的な濃度(100、320 及び 1,000 mg/L ; 設定濃度)の試験液に受精卵からふ化後 60 日令まで流水条件下で曝露した。

曝露方法については、通常のパーシャルライフサイクル試験と同様の方法で実施した。ふ化後 60 日の時点で、外観的二次性徴から判別して雌雄それぞれ 10 尾ずつを取り上げ、生殖腺組織学及び肝臓中ビテロジェニン濃度の測定を実施した。摘出した生殖腺はブアン液に固定後、常法に従い、雄個体については連続切片を、雌個体については 1 検体当たり 5 切片のパラフィン切片を作成し、組織学的観察を行った。

2. 結果

生殖腺組織学において雌雄共に異常は認められなかった。また、肝臓中ビテロジェニン濃度においては、雌雄共に統計学的な有意差及び濃度依存的な反応は認められなかった(下表参照)。

これらの結果から DMSO は本試験濃度範囲においてメダカの性分化及びビテロジェニン産生に影響を及ぼさないことが示された。

表 各試験濃度区における雌雄の肝臓中ビテロジェニン濃度

DMSO 濃度 mg/L	肝臓中ビテロジェニン濃度(ng/mg liver)	
	雄	雌
対照区	ND	1,700 ± 560
100	1.8 ± 1.9	1,800 ± 1,800
320	1.4 ± 2.1	1,400 ± 570
1,000	ND	2,100 ± 500

メダカを用いた 17 β -エストラジオール曝露による 肝臓中ビテロジェニン濃度と受精率の関係に関する検討

1. 経緯

現在までの内分泌攪乱化学物質の魚類に関する試験法開発において、雄個体におけるビテロジェニン誘導はエストロゲン作用を示す直接的なパラメータであり、性分化異常と並び最も高感度なエンドポイントの一つとなりうることを示されている。しかし、ビテロジェニン誘導の生態毒性学的な定義は十分なされておらず、繁殖パラメータ(産卵数及び受精率)との関連性も十分議論されているとはいえない。そこで、17 β -エストラジオール(E2)によるメダカフルライフサイクル試験を実施し、繁殖検討^{*1}に用いた雄個体の肝臓中ビテロジェニン濃度を測定し、受精率との相関性について検討した。

*1) 繁殖検討：フルライフサイクル試験のふ化後 70 日令の時点で各試験濃度(区)の生存個体の雌雄を外観的形態から判別しペアリングを行ない、ペア毎にふ化後 100 日令まで、毎日、産卵数及び受精率を観察

2. 方法

17 β -エストラジオールによるメダカフルライフサイクル試験において、繁殖検討に用いた雄個体の肝臓中ビテロジェニン濃度を測定した。

3. 結果

下図に肝臓中ビテロジェニン濃度(対数值)と受精率^{*2}との相関を示す。

ビテロジェニン濃度が 1,000ng/mg liver 以上の雄個体では受精率の顕著な低下が認められた。ビテロジェニン濃度が 10 ~ 1,000 ng/mg liver の雄個体では受精率の低下を示す個体が認められた。ビテロジェニン濃度が 10 ng/mg liver 未満の雄個体においては受精率の顕著な低下は認められなかった。

*2) 受精率：繁殖試験期間中に雌が産卵した卵数に対する受精卵数の比率の平均(%)

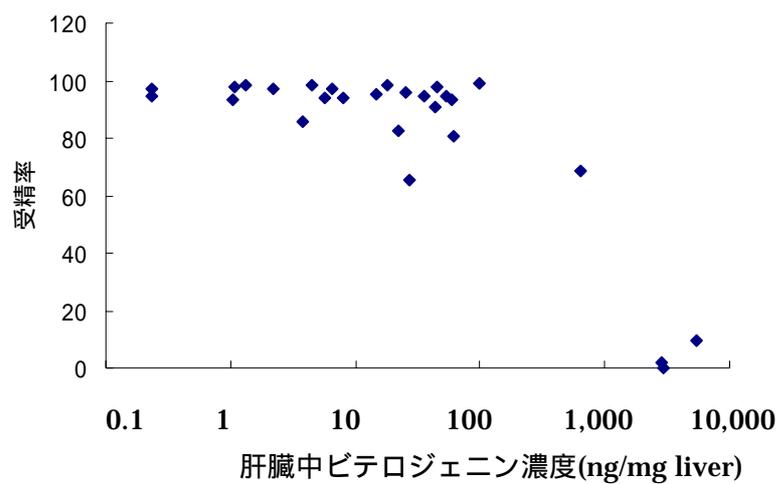


図 肝臓中ピテロジェニン濃度と受精率(%)との関係

4. 考察

雄のピテロジェニン濃度の増加と受精率低下のメカニズムについては不明であるが、ピテロジェニン濃度が増加している個体は同時に生殖腺の雌化が進んでおり、その結果、受精率低下が生じている可能性が推測される。