

魚類を用いた生態系への内分泌攪乱作用に関する

試験結果について（案）

．平成 12 年度優先物質の試験結果について

1．試験結果の評価を保留した項目と対応

平成 12 年度優先物質の試験結果については平成 14 年度第 1 回内分泌攪乱化学物質問題検討会(平成 14 年 6 月 14 日開催)において、下記の 3 項目に関し、別途実施する追加試験の結果を踏まえて評価を行うこととしていた。

フタル酸ジ-n-ブチル、フタル酸ジ-2-エチルヘキシル、フタル酸ジシクロヘキシル、アジピン酸ジ-2-エチルヘキシル及びベンゾフェノンの 5 物質に用量相関性もなく低頻度でみられた精巢卵(追加試験)

アジピン酸ジ-2-エチルヘキシルの助剤区(ジメチルスルホキシド:DMSO を使用した)に低頻度でみられた精巢卵(追加試験)

フタル酸ジ-n-ブチル及びベンゾフェノンに認められた雄の肝臓中ビテロジェニン濃度の有意な高値(追加試験)

今般、これらの追加試験の結果を踏まえて、平成 12 年度優先物質の試験結果の評価を行った。

2．追加試験の結果

(1)追加試験 (用量相関性もなく低頻度でみられた精巢卵について)

今回の追加試験 においては、メダカを用いた 17 -エストラジオール曝露による精巢卵の程度と受精率の関係に関する検討を行った。

その結果として、生殖腺スコアが約 2 未満では受精率に明確な低下をもたらさず、約 4 以上では受精率に明確な低下をもたらすとの結果が得られた(別添 1 参照)。

この結果を踏まえると、5 物質にみられた用量相関性もなく低頻度の精巢卵^{注)}については、受精率に悪影響を与えとは考えられなかった。

^{注)} 曝露群ごとの精巢卵が認められた個体のみの生殖腺スコアの平均値は、フタル酸ジ-n-ブチル 1.1 以下、フタル酸ジ-2-エチルヘキシル 1.4 以下、フタル酸ジシクロヘキシル 1.3 以下、アジピン酸ジ-2-エチルヘキシル 1.8 以下及びベンゾフェノン 1.3 以下であった。

また、試験結果を既に公表したノニルフェノール(以下、NP と略)及び 4-t-オクチルフェノール(以下、4-OP と略)についてフルライフサイクル試験の結果を溯って検討したところ、4-OP(82.3 µg/L 曝露群)については、曝露群の全個体

ロジェニン濃度の有意な高値(9.1ng/mg liver 以下)については、受精率に悪影響を与えるとは考えられなかった。また、ベンゾフェノンで認められた雄の肝臓中ビテロジェニン濃度の有意な高値(5,400ng/mg liver 以下)については、環境中濃度(環境実態調査結果の水質調査における最高値 0.84 μ g/L)と比較してはるかに高濃度(1,380 μ g/L 以上)においてのみ 1,000ng/mg liver 以上であるとともに、環境中濃度を考慮したパーシャルライフサイクル試験(5.06 ~ 435 μ g/L の5濃度で実施)では有意な変化は認められなかったことから、現時点では、より低濃度での確定試験としてのフルライフサイクル試験を実施する必要はないと考えられた。

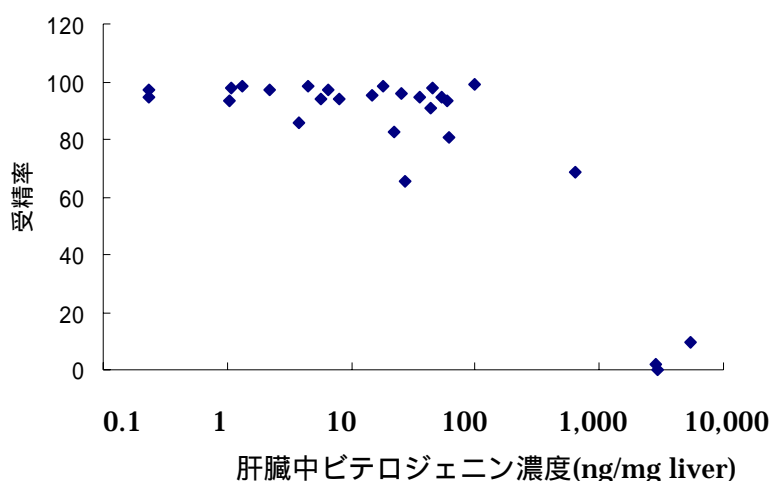


図 肝臓中ビテロジェニン濃度と受精率(%)との関係(追加試験の結果より)

3. 追加試験結果のまとめと評価

以上の結果を踏まえると、フタル酸ジ-2-エチルヘキシル、フタル酸ジシクロヘキシル及びアジピン酸ジ-2-エチルヘキシルの3物質については、用量相関性もなく低頻度で精巣卵がみられたものの、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。

フタル酸ジ-n-ブチルについては、用量相関性もなく低頻度の精巣卵及び雄の肝臓中ビテロジェニン濃度の統計学的に有意な高値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。

ベンゾフェノンについては、用量相関性もなく低頻度で精巣卵がみられたものの、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。また、用量相関的な雄の肝臓中ビテロジェニン濃度の統計学

的に有意な高値が認められたものの、現時点では、より低濃度での確定試験としてのフルライフサイクル試験を実施する必要はないと考えられた。

．平成13年度優先物質の試験結果について

1．ペンタクロロフェノール

(1)メダカを用いた試験

ビテロジェニンアッセイ

1.2、2.5、10.1、28.6、95 µg/L(実測値)の曝露濃度において肝臓中ビテロジェニン濃度及び肝指数には統計学的に有意な変化は認められなかった。

パーシャルライフサイクル試験

0.13、0.34、1.00、3.40、10.92 µg/L(実測値)の曝露濃度で試験を行ったところ、孵化率、孵化日数、死亡率、全長、体重、生殖腺指数、生殖腺の組織学的検査、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。

(2)試験管内(*in vitro*)試験

メダカエストロジェン受容体(ER)結合競合阻害試験、メダカエストロジェン受容体(ER 及び ER)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、いずれの試験においても統計学的に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、ペンタクロロフェノールについては、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。

本物質については、「化学物質の環境リスク評価 第1巻」の中で行われた生態リスク初期評価において、「現時点では生態リスクの判定はできない」と評価されているが、今回の試験結果においても明確な影響は認められなかったことから、この評価結果に変更を及ぼすものではないと考えられた。

2．アミトロール

(1)メダカを用いた試験

ビテロジェニンアッセイ

84、315、949、3,141、9,495 µg/L(実測値)の曝露濃度において肝臓中ビテロジェニン濃度及び肝指数には統計学的に有意な変化は認められなかった。

パーシャルライフサイクル試験

7.6、28.9、100、323、1,027 µg/L(実測値)の曝露濃度で試験を行ったところ、孵化率、孵化日数、死亡率、体長、体重、生殖腺指数、生殖腺の組織学的

検査、肝指数及び雌の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が、323 µg/L 以上の曝露群の雄において、肝臓中ビテロジェニン濃度の統計学的に有意な高値が認められた。

(2) 試験管内 (*in vitro*) 試験

メダカエストロジェン受容体(ER)結合競合阻害試験、メダカエストロジェン受容体(ER 及び ER)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、いずれの試験においても統計学的に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、アミトロールについては、用量相関性がみられない雄の肝臓中ビテロジェニン濃度の統計学的に有意な高値(12ng/mg liver 以下)が認められたが、追加試験の結果(別添 3 参照)を踏まえると、受精率に悪影響を与えるとは考えられず、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。

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。

3. ビスフェノールA

(1) メダカを用いた試験

ビテロジェニンアッセイ

58.5、141、334、772、1,740 µg/L(実測値)の曝露濃度において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、曝露 14 日後の 772 µg/L 以上の曝露群及び曝露 21 日後の 334 µg/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。

なお、曝露 14 日後の 1,740 µg/L の曝露群及び曝露 21 日後の 334、1,740 µg/L の曝露群において肝指数の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

220、470、890、2,120、4,410 µg/L(実測値)の曝露濃度で試験を行ったところ、孵化率、死亡率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。

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、470 µg/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曝露濃度の上昇と共に増加し、2,120 µg/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。

生殖腺の組織学的検査では、890 µg/L 以上の曝露群において雄の精巢中に卵母細胞が出現する精巢卵の個体が見られ、曝露濃度の上昇と共に増加した精巢

卵出現率に統計学的に有意な高値が認められた。

220、470 $\mu\text{g/L}$ 曝露群において、体重の統計学的に有意な高値が認められた。

470、890 $\mu\text{g/L}$ 曝露群において、体長の統計学的に有意な高値が認められた。

2,120 $\mu\text{g/L}$ 以上の曝露群の雌及び 4,410 $\mu\text{g/L}$ 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。

4,410 $\mu\text{g/L}$ 曝露群において、体重の統計学的に有意な低値及び孵化日数の統計学的に有意な高値(遅延)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 1/210(ER α) 及び約 1/320 (ER β) であった。メダカエストロジェン受容体(ER α) レポータージーン試験では、エストラジオールに対する相対遺伝子転写活性は約 1/1,300 であった。メダカエストロジェン受容体(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においては、統計学的に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、ビスフェノールA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、孵化日数の統計学的に有意な高値(遅延)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とする。

4. 2,4-ジクロロフェノール

(1) メダカを用いた試験

ビテロジェニンアッセイ

33.5、105.3、323.7、945.9、3,281.2 $\mu\text{g/L}$ (実測値)の曝露濃度において肝指数には統計学的に有意な変化は認められなかった。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、曝露 14 日後の 945.9 $\mu\text{g/L}$ 以上の曝露群及び曝露 21 日後の 323.7 $\mu\text{g/L}$ 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。

パーシャルライフサイクル試験

0.24、0.76、2.84、8.92、27.25 $\mu\text{g/L}$ (実測値)の曝露濃度で試験を行ったと

ころ、孵化率、孵化日数、死亡率、体長、体重、生殖腺の組織学的検査、肝指数及び雌の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が、0.24 µg/L 以上の曝露群の雄において、肝臓中ビテロジェニン濃度の統計学的に有意な高値が認められた。

27.25 µg/L 曝露群の雄において生殖腺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 1/27,000(ER α) 及び約 1/48,000(ER β) であった。メダカエストロジェン受容体(ER α) レポータージーン試験では、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においては、統計学的に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、2,4-ジクロロフェノールについては、ビテロジェニンアッセイにおいて用量相関的な雄の肝臓中ビテロジェニン濃度の統計学的に有意な高値(180ng/mg liver 以下)が認められるとともにパーシャルライフサイクル試験において雄の肝臓中ビテロジェニン濃度の統計学的に有意な高値(27ng/mg liver 以下)が認められたが、追加試験の結果(別添 3 参照)を踏まえると、受精率に明らかな悪影響を与えるとは考えられず、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。

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。

5. 4-ニトロトルエン

(1) メダカを用いた試験

ビテロジェニンアッセイ

19.5、58.4、182、600、1,920 µg/L(実測値)の曝露濃度において肝臓中ビテロジェニン濃度及び肝指数には統計学的に有意な変化は認められなかった。

パーシャルライフサイクル試験

0.99、3.01、9.22、26.6、87.5 µg/L(実測値)の曝露濃度で試験を行ったところ、孵化率、孵化日数、死亡率、体長、体重、雌の生殖腺指数、雄の肝指数

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が、0.99、3.01 µg/L 曝露群の雄において、生殖腺指数の統計学的に有意な低値が認められた。

3.01、26.6 µg/L 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。

生殖腺の組織学的検査では、9.22 µg/L 曝露群において精巣卵の個体が僅かに認められた。

(2) 試験管内 (*in vitro*) 試験

メダカエストロジェン受容体(ER)結合競合阻害試験、メダカエストロジェン受容体(ER 及び ER)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、いずれの試験においても統計学的に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、4-ニトロトルエンについては、用量相関性もなく、低頻度で精巣卵(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1.4以下)がみられたが、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るとは考えられず、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。

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。

6. フタル酸ジベンチル

(1) メダカを用いた試験

ビテロジェニンアッセイ

4.78、14.2、50.6、161、583 µg/L(実測値)の曝露濃度において肝臓中ビテロジェニン濃度及び肝指数には統計学的に有意な変化は認められなかった。

パーシャルライフサイクル試験

0.814、2.39、8.15、23.1、80.6 µg/L(実測値)の曝露濃度で試験を行ったところ、孵化率、孵化日数、死亡率、生殖腺指数、生殖腺の組織学的検査、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が、80.6 µg/L 曝露群において、全長の統計学的に有意な低値が認められた。

23.1 µg/L 曝露群において、体重の統計学的に有意な高値が認められた。

(2) 試験管内 (*in vitro*) 試験

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

エ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約 1/2,900(ER α)及び 1/10,000(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、統計学的に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、フタル酸ジペンチルについては、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。

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。

7. フタル酸ジヘキシル

(1)メダカを用いた試験

ビテロジェニンアッセイ

1.5、4.06、15.6、58.1、143 $\mu\text{g/L}$ (実測値)の曝露濃度において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 15.6 $\mu\text{g/L}$ 曝露群において肝指数の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

0.693、2.25、6.83、23.7、71.5 $\mu\text{g/L}$ (実測値)の曝露濃度で試験を行ったところ、孵化率、孵化日数、死亡率、全長、体重、生殖腺指数、生殖腺の組織学的検査、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。

(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約 1/4,300(ER α)及び約 1/7,700(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、統計学的に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、フタル酸ジヘキシルについては、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。

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。

8. フタル酸ジプロピル

(1) メダカを用いた試験

ビテロジェニンアッセイ

12.7、43.4、158、572、1,690 µg/L(実測値)の曝露濃度において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 14 日後の 572 µg/L 曝露群及び曝露 21 日後の 1,690 µg/L 曝露群において肝指数の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

0.869、2.57、8.34、24.7、74.8 µg/L(実測値)の曝露濃度で試験を行ったところ、孵化率、死亡率、体重、生殖腺指数、生殖腺の組織学的検査、雄の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が、0.869、2.57 µg/L 曝露群において、全長及び雌の肝指数の統計学的に有意な低値が認められた。

0.869、2.57、74.8 µg/L 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。

(2) 試験管内(*in vitro*)試験

メダカエストロジェン受容体(ER α)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約 1/4,200(ER α)及び約 1/56,000(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、統計学的に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、フタル酸ジプロピルについては、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。

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。

. まとめ

平成 12 年度優先物質であるフタル酸ジ-n-ブチル、フタル酸ジ-2-エチルヘキ

シル、フタル酸ジシクロヘキシル、アジピン酸ジ-2-エチルヘキシルの4物質については、用量相関性もなく低頻度でみられた精巣卵または雄の肝臓中ビテロジェニン濃度の統計学的に有意な高値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。

ベンゾフェノンについては、用量相関性もなく低頻度で精巣卵がみられたものの、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。また、用量相関的な雄の肝臓中ビテロジェニン濃度の統計学的に有意な高値が認められたものの、現時点では、より低濃度での確定試験としてのフルライフサイクル試験を実施する必要はないと考えられた。

平成13年度優先8物質について行った「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。

その結果として、ビスフェノールAについては、弱いながらもメダカエストロゲン受容体(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に統計学的に有意な高値、孵化日数の統計学的に有意な高値(遅延)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とする。

ペンタクロロフェノール、アミトロール、2,4-ジクロロフェノール、4-ニトロトルエン、フタル酸ジペンチル、フタル酸ジヘキシル及びフタル酸ジプロピルについては、明らかな内分泌攪乱作用は認められなかった。

アミトロール、2,4-ジクロロフェノール、4-ニトロトルエン、フタル酸ジペンチル、フタル酸ジヘキシル、フタル酸ジプロピルについては、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。

ペンタクロロフェノールについては、「化学物質の環境リスク評価 第1巻」の中で行われた生態リスク初期評価において、「現時点では生態リスクの判定はできない」と評価されているが、今回の試験結果においても明確な影響は認められなかったことから、この評価結果に変更を及ぼすものではないと考えられた。

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の関係に関する検討

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 (%)

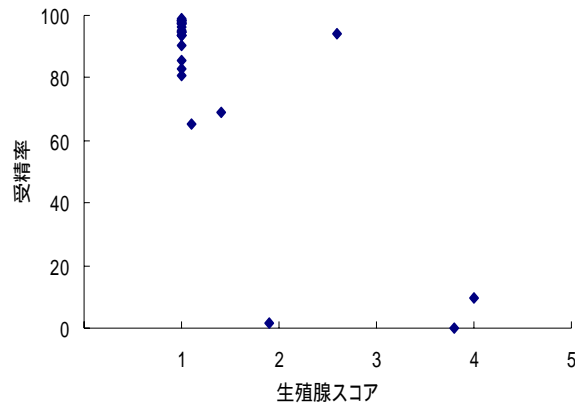


図 生殖腺スコアと受精率(%)との関係

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。

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 -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(%)

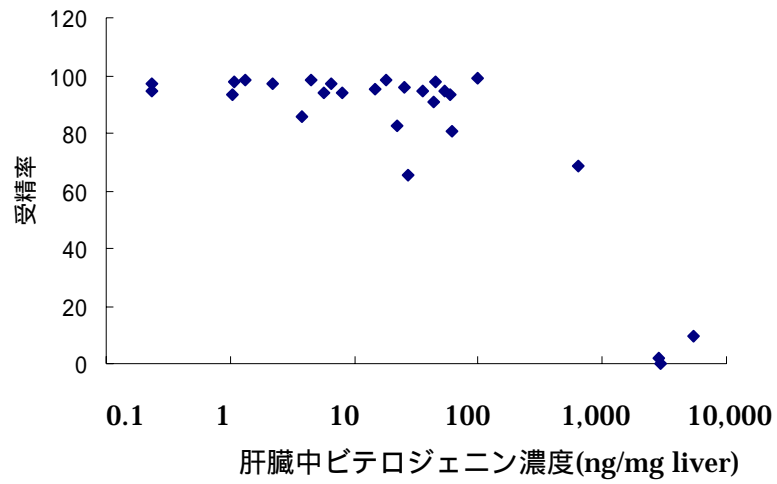


図 肝臓中ピテロジェニン濃度と受精率(%)との関係

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。