

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 13 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 13 年度優先物質の試験結果については平成 15 年度第 1 回内分泌攪乱化学物質問題検討会(平成 15 年 6 月 12 日開催)において、ビスフェノール A について、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していた。

今般、メダカを用いた試験(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及びフルライフサイクル試験)及び試験管内(*in vitro*)試験の結果を踏まえて、ビスフェノール A の試験結果の評価を行った。

2．ビスフェノール A の試験結果

(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みられ、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 µg/L 及び 470 µg/L の曝露群において、体重の統計学的に有意な高値が認められた。

470 µg/L 及び 890 µg/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 µg/L 以上の曝露群の雌及び 4,410 µg/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 µg/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。

フルライフサイクル試験

2.00、9.30、49.7、247、1,179 µg/L(実測値)の曝露濃度で試験を行ったところ、F₀ 世代の孵化率、孵化日数、全長、体重、精巢卵出現率、産卵数、受精率、雄の生殖腺指数、雌の肝指数及び雌雄の肝臓中ビテロジェニン濃度、F₁ 世代の孵化日数、死亡率、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。

F₀ 世代の死亡率には、1,179 µg/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。

雌の生殖腺指数については、助剤対照区において統計学的に有意な低値が認められた。

49.7 µg/L 及び 1,179 µg/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。

F₁ 世代の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、1,179 µg/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。

2.00 µg/L 曝露群において、孵化率の統計学的に有意な低値が認められた。

全長及び体重では、2.00 µg/L、49.7 µg/L 及び 1,179 µg/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。

生殖腺の組織学的検査では、1,179 µg/L の曝露群において精巢卵の個体がみられ、精巢卵出現率に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_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 1/210(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)レポーター遺伝子試験では、

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)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)現時点での有害性評価と今後の方針

以上のとおり、ビスフェノールAについては、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結果において、雌雄の肝臓中ビテロジェニン濃度の上昇、雄に精巣卵の出現、孵化日数の遅延が統計学的に有意に認められていた。今回実施した環境中濃度を考慮したフルライフサイクル試験結果においては、雄の肝臓中ビテロジェニン濃度の上昇、雄に精巣卵の出現が統計学的に有意に認められ、孵化日数の遅延は認められなかった。なお、F₁世代の孵化率の統計学的に有意な低値が 2.00 µg/L 曝露群のみにおいて、認められた。

試験管内(*in vitro*)試験において、メダカエストロジェンレセプター との結合強度は 4-ノニルフェノール(分岐型)の約 1/17 程度、4-t-オクチルフェノールの約 1/33 程度、17 - エストラジオールの約 1/210(0.48%)であった(4-ノニルフェノール(分岐型)の相対結合強度は、17 - エストラジオールの約 1/12(8.1%)で、4-t-オクチルフェノールの相対結合強度は、17 - エストラジオールの約 1/6(16%))。メダカエストロジェンレセプター との結合強度は 4-ノニルフェノール(分岐型)及び 4-t-オクチルフェノールの約 1/3 程度、17 - エストラジオールの約 1/320(0.31%)であった(4-ノニルフェノール(分岐型)及び 4-t-オクチルフェノールの相対結合強度は、17 - エストラジオールの約 1/120(0.83%))。

これらの結果より、本物質が魚類に対して内分泌攪乱作用を有することが推察された。

精巣卵の出現が統計学的に有意に認められた曝露濃度は、パーシャルライフサイクル試験においては 890 µg/L 以上、フルライフサイクル試験においては 1,179 µg/L であった。

曝露群ごとの精巣卵が認められた個体みの生殖腺スコアの平均値では、パーシャルライフサイクル試験の 890 µg/L で 2.1、2,120 µg/L で 1.7、4,410 µg/L で 3.7、フルライフサイクル試験の 1,179 µg/L で 1.4 であった。

生殖腺スコア 2 以上において受精率への影響が認められた知見から(別添 1 参照)、最小作用濃度 LOEC は 890 µg/L、最大無作用濃度 NOEC はパーシャルライフサイクル試験の結果からは 470 µg/L、フルライフサイクル試験の結果からは 247 µg/L と考えられた。

本物質については、現在、各種生物を考慮に入れた環境リスク評価事業が別途進められている。

<参考> 環境中濃度と本試験結果から推定された無影響濃度との比較
環境実態調査

環境省(庁)が実施した「平成10年度環境ホルモン緊急全国一斉調査」、
「平成11年度及び平成12年度環境ホルモン全国一斉調査」、「平成13年度
及び平成14年度環境実態調査」、国土交通省(建設省)が実施した「平成10
年度、平成11年度、平成12年度、平成13年度、平成14年度水環境における
内分泌攪乱化学物質に関する実態調査」において、全国のべ3,403地点につ
いて水質、底質、土壌、大気、水生生物、野生生物の環境中濃度を測定し
た。

水質調査結果

水質調査では5年間で2,301地点中1,151地点で検出され(検出率50%)、
濃度範囲:ND(< 0.01) ~ 19 µg/Lであった。

水質調査結果の年度ごとの推移

年度毎に集計した水質調査結果では95パーセンタイル値は平成10年度
調査では0.17 µg/L、平成11年度調査では0.13 µg/L、平成12年度調査で
は0.12 µg/L、平成13年度調査では0.12 µg/L、平成14年度調査では0.29
µg/Lであった。

項目	測定年度	平成10年度	平成11年度	平成12年度	平成13年度	平成14年度
95percentile 値 (µg/L)		0.17	0.13	0.12	0.12	0.29
最大値 (µg/L)		1.7	1.81	1.7	0.56	19*
検出限界値 (µg/L)		0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
検出数		515	301	124	122	89
検体数		941	633	302	288	137

*平成14年度の最大値を示した調査点は新規に測定を実施した調査点である。

注：年度により調査点数及び調査位置は異なっている。

図 ビスフェノール A の水質調査結果

予測環境中濃度(PEC)

平成14年度調査における95パーセンタイル値0.29 µg/Lを暫定的に予測
環境中濃度PECとすることを提案する。

環境中濃度と本試験結果から推定された無影響濃度との比較

ノニルフェノールのリスク評価結果を参考とし、最大無作用濃度NOECの
1/10に当たる24.7 µg/Lまたは47 µg/Lを本試験結果から推定された無影響
濃度と想定した。

予測環境中濃度(PEC)0.29 µg/Lは、本試験結果から推定された無影響濃
度24.7 µg/Lまたは47 µg/Lを下回っており(約1/85または約1/160)、現実的
なリスクはやや低いまたは低いと考えられた。

底質調査結果

底質調査では5年間で440地点中239地点で検出され(検出率54%)、濃度範囲:ND (<0.2 ~ 35) ~ 200 µg/kgであった。

土壌調査結果

平成10年度に実施された土壌調査では101地点中2地点で検出され(検出率2%)、濃度範囲:ND (<5 ~ 15) ~ 2,700 µg/kgであった。

大気調査結果

平成14年度に実施された大気調査では20地点中2地点で検出され(検出率10%)、濃度範囲:ND (<0.1) ~ 1.0ng/m³であった。

水生生物調査結果

平成10年度に実施された水生生物調査では141地点中8地点で検出され(検出率6%)、濃度範囲はND: (<5) ~ 15 µg/kg であった。

2. まとめ

ビスフェノールA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、魚類に対して内分泌攪乱作用を有することが推察された。なお、ビスフェノールAの予測環境中濃度は、本試験結果から推定された無影響濃度を下回っており、現実的なリスクはやや低いまたは低いと考えられた。ビスフェノールAについては、現在、各種生物を考慮に入れた環境リスク評価事業が別途進められている。

・平成14年度優先物質の試験結果について

1. ヘキサクロロベンゼン

(1)メダカを用いた試験

ビテロジェニンアッセイ

1.79、4.13、7.98、16.1、35.2 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4.13 µg/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

0.309、0.615、1.29、2.86、5.75 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、全長、体重、生殖腺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、2.86 µg/L以上の曝露群に

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。

0.615 µg/L 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た。

生殖腺の組織学的検査では、助剤対照区及び 0.309 µg/L の曝露群において統計学的な有意差は認められなかったが、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、ヘキサクロロベンゼンについては、助剤対照区及び曝露群において用量相関性もなく、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 1.4)がみられたが、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、「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、「信頼できる生態毒性の知見が少なくアセスメント係数が 1,000 と大きいこと、環境中濃度が検出下限値未満の値であることから、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. -ヘキサクロロシクロヘキサン

(1) メダカを用いた試験

ビテロジェニンアッセイ

0.97、3.04、9.18、30.6、95.4 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 3.04 µg/L 及び 95.4 µg/L の曝露群並びに曝露 21 日後の 95.4 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

0.495、1.54、4.75、14.6、43.8 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、43.8 µg/L の曝露群の雌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。

生殖腺の組織学的検査では、0.495 µg/L 及び 1.54 µg/L の曝露群において用量相関性もなく、統計学的な有意差は認められない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、メダカエストロジェン受容体(ER 及び ER)結合競合阻害試験では、エストラジオールに対する相対結合強度は 1/5,000(ER)及び 1/62,500(ER)であった。メダカエストロジェン受容体(ER)レポーター遺伝子試験では、ER 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)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、 -ヘキサクロロシクロヘキサンについては、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 1.2 及び 1.4)がみられたが、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。

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. p,p'-DDT

(1) メダカを用いた試験

ビテロジェニンアッセイ

0.37、0.62、1.34、2.73、5.26 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 2.73 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

0.044、0.144、0.467、1.43、4.72 µg/L(実測値)の曝露濃度で試験を行ったところ、孵化率、孵化日数及び生殖腺の組織学的検査に統計学的に有意な変化は認められなかったが、4.72 µg/L の曝露群において、孵化後 8 日目までに全個体が死亡した。

1.43 µg/L 以下の曝露群において、生殖腺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。

1.43 µg/L の曝露群において、死亡率、全長及び体の統計学的に有意な高値が認められた。

0.467 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。

(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 1/830(ER α) 及び約 1/1,400(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、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'*-DDT 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、「予測環境中濃度(PEC)と予測無影響濃度(PNEC)との比は、淡水域では0.1未満となるため、現時点では作業は必要ないと考えられる。一方海水域のPEC/PNECについては1未満となるため、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、PNECの算出の際に用いられた毒性値0.2 µg/Lを下回る濃度において、今回の試験結果では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。

4. *o,p'*-DDT

(1) メダカを用いた試験

ビテロジェニンアッセイ

0.373、0.800、1.50、3.20、6.55 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3.20 µg/L以上の曝露群及び曝露21日後の1.50 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21日後の6.55 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

0.195、0.366、0.830、1.69、3.36 $\mu\text{g/L}$ (実測値)の曝露濃度で試験を行ったところ、孵化率、死亡率及び体重に統計学的に有意な変化は認められなかった。

3.36 $\mu\text{g/L}$ の曝露群において、生殖腺を観察した結果、全ての個体が雌化していたため、雄の生殖腺指数、精巣卵出現率、肝指数及び肝臓中ビテロジェニン濃度は測定できなかった。

1.43 $\mu\text{g/L}$ 以下の曝露群の雄において、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。

生殖腺の組織学的検査では、0.195 $\mu\text{g/L}$ 及び 0.830 $\mu\text{g/L}$ 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、0.830 $\mu\text{g/L}$ 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。

1.69 $\mu\text{g/L}$ 以上の曝露群の雌において、生殖腺指数の統計学的に有意な低値が認められた。

0.830 $\mu\text{g/L}$ 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。

0.830 $\mu\text{g/L}$ の曝露群において、全長の統計学的に有意な高値及び 3.36 $\mu\text{g/L}$ の曝露群において、全長の統計学的に有意な低値が認められた。

3.36 $\mu\text{g/L}$ の曝露群の雌において、肝指数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 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 1/190(ER α)及び約 1/590(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、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、*o,p'*-DDT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とする。

・まとめ

平成 13 年度優先物質であるビスフェノールA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、魚類に対して内分泌攪乱作用を有することが推察された。なお、ビスフェノールAの予測環境中濃度は、本試験結果から推定された無影響濃度を下回っており、現実的なリスクはやや低いまたは低いと考えられた。ビスフェノールAについては、現在、各種生物を考慮に入れた環境リスク評価事業が別途進められている。

平成 13 年度優先物質であるヘキサクロロベンゼン、 α -ヘキサクロロシクロヘキサン、*p,p'*-DDT、*o,p'*-DDT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。

ヘキサクロロベンゼン、 α -ヘキサクロロシクロヘキサンについては、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。

ヘキサクロロベンゼンについては、「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、「信頼できる生態毒性の知見が少なくアセスメント係数が 1,000 と大きいこと、環境中濃度が検出下限値未満の値であることから、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。

α -ヘキサクロロシクロヘキサンについては、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'-DDTについては明確な影響は認められなかった。

p,p'-DDT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、「予測環境中濃度(PEC)と予測無影響濃度(PNEC)との比は、淡水域では 0.1 未満となるため、現時点では作業は必要ないと考えられる。一方海水域の PEC/PNEC については 1 未満となるため、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、PNEC の算出の際に用いられた毒性値 0.2 $\mu\text{g/L}$ を下回る濃度において、今回の試験結果では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。

o,p'-DDT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 及び ER)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とする。

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 (%)

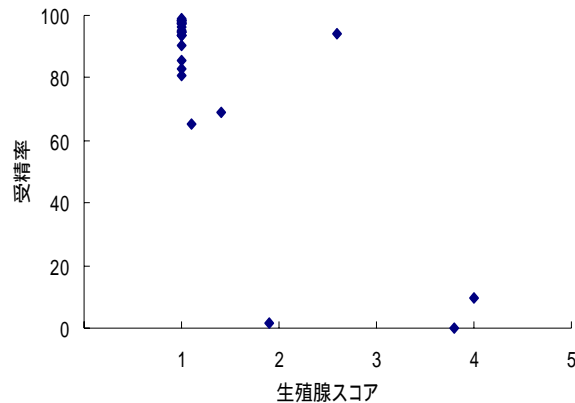


図 生殖腺スコアと受精率(%)との関係

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。

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(対数値)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(%)

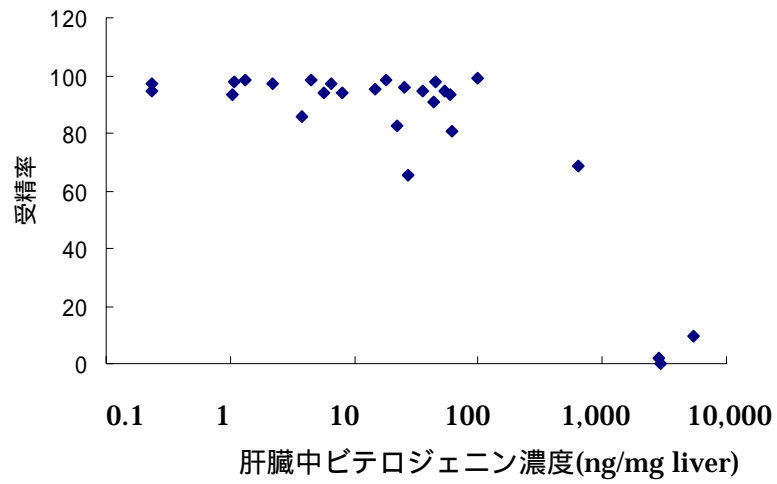


図 肝臓中ピテロジェニン濃度と受精率(%)との関係

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。