

令和元年度及び令和2年度第2段階生物試験(りん酸トリフェニル)の試験結果について (概要版)(案)

1. 令和元年度及び令和2年度に実施した試験結果について

第2段階生物試験として、りん酸トリフェニル(CAS No.115-86-6)について、メダカ拡張1世代繁殖試験(MEOGRT:OECD TG240)を実施した。

メダカ(*Oryzias latipes*)を用い、0.501、1.62、4.54、15.2、48.4 $\mu\text{g/L}$ (実測値)のばく露濃度で試験(全ばく露期間:19週間)を行った。

テストガイドラインが規定する試験有効性基準をすべて満たしていた。

(1) F0世代(ばく露期間:4週間)

生存個体数、雄の全長、雄の体重、受精率、雄の生殖腺体指数、雌雄の肝臓体指数、雄の二次性徴、雌雄の肝臓中ビテロゲニン濃度に有意な変化は認められなかった。

0.501 $\mu\text{g/L}$ 以上のばく露群において、雌の体重に統計学的に有意な低値が認められた。

15.2 $\mu\text{g/L}$ 以上のばく露群において、雌の全長、雌の生殖腺体指数に統計学的に有意な低値が認められた。

48.4 $\mu\text{g/L}$ のばく露群において、総産卵数、受精卵数の統計学的に有意な低値が認められた。

(2) F1世代(ばく露期間:16週間)

生存率(8週齢、雌の成熟個体)、雄の全長(成熟個体)、雄の体重(10週齢)、雌雄の体重(成熟個体)、受精率、雄の肝臓中ビテロゲニン濃度(10週齢)、雄の生殖腺体指数(10週齢)、雌雄の肝臓体指数(成熟個体)、雄の二次性徴(成熟個体)に統計学的に有意な変化は認められなかった。

0.501、1.62、4.54、15.2 $\mu\text{g/L}$ のばく露群において、ふ化日数の統計学的に有意な低値が認められた。

0.501、1.62、4.54 $\mu\text{g/L}$ のばく露群において、雌の全長(成熟個体)の統計学的に有意な高値が認められ、雌の肝臓体指数(10週齢)の統計学的に有意な低値が認められた。

0.501 $\mu\text{g/L}$ 以上のばく露群において、雄の肝臓体指数(10週齢)、雌雄の肝臓中ビテロゲニン濃度(成熟個体)の統計学的に有意な低値が認められた。

4.54 $\mu\text{g/L}$ 以上のばく露群において、雌の生殖腺体指数(成熟個体)の統計学的に有意な高値が認められ、ふ化率の統計学的に有意な低値が認められた。

15.2 $\mu\text{g/L}$ 以上のばく露群において、雌の生殖腺体指数(10週齢)の統計学的に有意な高値が認められ、雄の生存率(成熟個体)の統計学的に有意な低値が認められた。

48.4 $\mu\text{g/L}$ のばく露群において、雄の生殖腺体指数(成熟個体)の統計学的に有意な高値が認められ、生存率(4週齢)、総産卵数、受精卵数の統計学的に有意な低値が認められた。

なお、10週齢で認められた0.501 $\mu\text{g/L}$ 以上のばく露群での雄の全長、雄の二次性徴、0.501、1.62、4.54 $\mu\text{g/L}$ のばく露群での雌の全長、0.501、4.54 $\mu\text{g/L}$ のばく露群での雌の体重、4.54 $\mu\text{g/L}$ 以上のばく露群での雌の肝臓中ビテロゲニン濃度の統計学的に有意な高値が認められたが、何れも対照群の成長遅延に起因する有意差と考えられた。

(3) F2世代(ばく露期間：2週間)

ふ化率に統計学的に有意な変化は認められなかった。

0.501、1.62、4.54、48.4 $\mu\text{g/L}$ のばく露群において、ふ化日数の統計学的に有意な低値が認められた

2. 試験結果のまとめ

りん酸トリフェニルについては、既存知見及び試験管内試験の結果(平成24年度に実施したメダカエストロゲン受容体 α レポータージーン試験の結果として EC_{50} 値は、 $9.7 \times 10^{-6}\text{M}$ で、17 β -エストラジオールに対する相対活性比は、0.000021であった)から、エストロゲン作用を持つことが想定された。

一方で過年度に第1段階生物試験として実施したメダカを用いた魚類短期繁殖試験(OECD TG229)では、7.19 $\mu\text{g/L}$ 以上のばく露群において雌の肝臓中ビテロゲニン濃度(成熟個体)の統計学的に有意な低値が認められたため、抗エストロゲン作用を持つことが想定された(添付資料参照)。

今回の試験結果において、死亡が認められなかった濃度範囲(4.54 $\mu\text{g/L}$ 未満)において、抗エストロゲン作用を示す雌(F1成熟個体)の肝臓中ビテロゲニン濃度の統計学的に有意な低値が認められ、抗エストロゲン作用を持つことが確認された。

また、48.4 $\mu\text{g/L}$ のばく露群において総産卵数、受精卵数、生存率(4週齢、雄の成熟個体)の統計学的に有意な低値が認められたことから、メダカの繁殖に対する有害性を示すことが認められた。

なお、過年度に第1段階生物試験として実施したメダカを用いた魚類短期繁殖試験(OECD TG229)では、44.9 $\mu\text{g/L}$ のばく露群において総産卵数、受精卵数、雌の全長と体重の統計学的に有意な低値が認められていた。

また、この試験結果等から、りん酸トリフェニルはメダカに対して抗エストロゲン作用を示すことが確認されたとともに、本物質がメダカの繁殖に及ぼす影響に関する最低影響濃度(LOEC)として、44.9 $\mu\text{g/L}$ が得られた。

メダカの繁殖に対する有害性が示唆されたばく露濃度44.9 $\mu\text{g/L}$ は、平成29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0.024 $\mu\text{g/L}$ の約1,870倍であった。

また、メダカの繁殖に対する有害性が示唆されなかったばく露濃度15.2 $\mu\text{g/L}$ は、平成29

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 0.024 μ g/L の約 630 倍であった。

(別添)

メダカ拡張1世代繁殖試験結果(MEOGRT: OECD TG240)

りん酸トリフェニル

実施機関：L S I メディエンス

1. F0世代

表 1-A 試験結果

平均濃度実測値 ($\mu\text{g/L}$)	試験個体数		生存個体数		全長(mm)		体重(mg)	
	雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌
対照区	12	12	12	11	32.7 \pm 1.5	34.2 \pm 1.0	389 \pm 56	514 \pm 55
0.501	6	6	6	6	34.0 \pm 0.6	33.3 \pm 0.5	411 \pm 33	468 \pm 17*
1.62	6	6	6	6	33.2 \pm 1.3	32.5 \pm 1.1	380 \pm 43	447 \pm 38*
4.54	6	6	6	6	33.0 \pm 1.4	34.3 \pm 0.7	379 \pm 48	451 \pm 44*
15.2	6	6	6	6	33.1 \pm 1.7	32.9 \pm 1.2*	395 \pm 49	396 \pm 24*
48.4	6	6	6	6	32.3 \pm 0.9	33.4 \pm 0.7*	355 \pm 27	434 \pm 40*

表 1-B 試験結果(続き)

平均濃度実測値 ($\mu\text{g/L}$)	総産卵数 (eggs/day/pair)	受精卵数 (eggs/day/pair)	受精率 (%)	生殖腺体指数 (%)	
				雄	雌
対照区	26.7 \pm 6.2	26.1 \pm 6.1	97.8 \pm 1.0	1.1 \pm 0.4	10.4 \pm 1.3
0.501	25.2 \pm 3.3	24.6 \pm 3.4	97.6 \pm 1.3	1.3 \pm 0.3	10.8 \pm 1.2
1.62	25.8 \pm 3.8	24.9 \pm 4.3	96.2 \pm 3.6	1.3 \pm 0.5	11.0 \pm 3.1
4.54	26.3 \pm 3.3	25.7 \pm 3.3	97.7 \pm 1.0	1.0 \pm 0.5	9.6 \pm 2.3
15.2	23.8 \pm 4.3	22.6 \pm 4.2	95.0 \pm 5.7	1.1 \pm 0.3	8.4 \pm 0.7*
48.4	22.7 \pm 2.6*	22.2 \pm 2.6*	97.4 \pm 1.2	1.0 \pm 0.3	7.9 \pm 1.4*

表 1-C 試験結果(続き)

平均濃度実測値 ($\mu\text{g/L}$)	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	2.5 \pm 0.4	5.0 \pm 1.6	0.66 \pm 0.52	928 \pm 203	94 \pm 15	0
0.501	2.0 \pm 0.5	5.2 \pm 0.5	3.79 \pm 8.29	930 \pm 155	106 \pm 20	0
1.62	2.2 \pm 0.9	5.7 \pm 0.5	4.28 \pm 8.42	925 \pm 488	94 \pm 15	0
4.54	2.5 \pm 1.2	5.0 \pm 1.0	1.39 \pm 0.96	848 \pm 84	106 \pm 8	0
15.2	2.5 \pm 0.5	5.0 \pm 1.6	1.20 \pm 1.31	900 \pm 370	101 \pm 12	0
48.4	2.4 \pm 0.8	4.9 \pm 0.5	0.67 \pm 0.31	1,160 \pm 505	100 \pm 21	0

2. 1. F1世代(胚～仔魚期)

表 2-A 試験結果

平均濃度実測値 ($\mu\text{g/L}$)	ふ化率 (%)	ふ化日数 (day)
対照区	96 \pm 5	8.7 \pm 0.4
0.501	96 \pm 4	7.6 \pm 0.1*
1.62	96 \pm 2	7.7 \pm 0.1*
4.54	77 \pm 13*	7.4 \pm 0.2*
15.2	49 \pm 20*	7.9 \pm 0.4*
48.4	73 \pm 20*	8.3 \pm 0.2

表 2-B 試験結果(続き)

平均濃度実測値 ($\mu\text{g/L}$)	生存率 (%)		全長(mm)(10週齢)		体重(mg)(10週齢)	
	(4週目)	(8週目)	雄	雌	雄	雌
対照区	100 \pm 0	99 \pm 2	21.7 \pm 0.8	22.1 \pm 0.8	118 \pm 11	125 \pm 14
0.501	100 \pm 0	100 \pm 0	23.1 \pm 0.2*	23.9 \pm 0.5*	128 \pm 5	149 \pm 9*
1.62	100 \pm 0	99 \pm 3	23.8 \pm 1.1*	23.6 \pm 1.0*	135 \pm 15	140 \pm 23
4.54	100 \pm 0	100 \pm 0	24.1 \pm 0.7*	24.5 \pm 0.8*	134 \pm 8	146 \pm 12*
15.2	100 \pm 0	100 \pm 0	23.9 \pm 0.9*	22.7 \pm 1.5	133 \pm 14	128 \pm 19
48.4	97 \pm 4*	95 \pm 7	22.7 \pm 0.9*	22.6 \pm 0.8	111 \pm 10	119 \pm 5

表 2-C 試験結果(続き)

平均濃度実測値 ($\mu\text{g/L}$)	肝臓体指数 (%)		ビテロゲン濃度 (ng/mg liver)		二次性徴	
	雄	雌	雄	雌	雄	雌
対照区	3.2 \pm 0.5	4.2 \pm 0.9	24.5 \pm 60.8	214 \pm 188	23 \pm 14	0
0.501	1.8 \pm 0.3*	3.1 \pm 0.4*	18.9 \pm 41.8	431 \pm 262	52 \pm 11*	0
1.62	2.4 \pm 0.1*	3.1 \pm 0.4*	ND	523 \pm 575	43 \pm 11*	0
4.54	2.0 \pm 0.2*	3.1 \pm 0.2*	ND	741 \pm 333*	56 \pm 10*	0
15.2	2.3 \pm 0.2*	4.0 \pm 1.0	ND	609 \pm 189*	58 \pm 3*	0
48.4	2.6 \pm 0.7*	3.9 \pm 0.5	0.35 \pm 0.27	755 \pm 280*	50 \pm 12*	0

表 2-D 試験結果(続き)

平均濃度実測値 ($\mu\text{g/L}$)	生殖腺体指数 (%)	
	雄	雌
対照区	1.0 \pm 0.8	2.6 \pm 1.4
0.501	0.8 \pm 0.3	3.8 \pm 1.6
1.62	0.7 \pm 0.2	3.0 \pm 2.5
4.54	1.0 \pm 0.4	3.5 \pm 0.9
15.2	0.9 \pm 0.2	5.2 \pm 0.7*
48.4	0.7 \pm 0.3	4.4 \pm 2.2*

2. 2. F1世代(成熟個体)

表 2-E 試験結果(続き)

平均濃度実測値 ($\mu\text{g/L}$)	生存率 (%)		全長(mm)		体重(mg)	
	雄	雌	雄	雌	雄	雌
対照区	100	100	27.8 \pm 1.8	29.0 \pm 1.5	226 \pm 51	312 \pm 47
0.501	100	100	30.7 \pm 0.9	30.6 \pm 0.5*	296 \pm 37	348 \pm 19
1.62	100	91(10/11)	30.3 \pm 1.0	30.5 \pm 0.9*	267 \pm 23	361 \pm 26
4.54	92(11/12)	100	30.3 \pm 0.9	30.7 \pm 1.3*	273 \pm 26	339 \pm 39
15.2	83(10/12) *	92(11/12)	27.9 \pm 1.4	29.5 \pm 0.9	215 \pm 37	318 \pm 30
48.4	92 (11/12) *	92(11/12)	27.8 \pm 1.2	28.6 \pm 0.8	218 \pm 33	293 \pm 32

表 2-F 試験結果(続き)

平均濃度実測値 ($\mu\text{g/L}$)	総産卵数 (eggs/day/pair)	受精卵数 (eggs/day/pair)	受精率 (%)	生殖腺体指数 (%)	
				雄	雌
対照区	20.4 \pm 1.9	19.9 \pm 1.9	97.3 \pm 1.8	1.3 \pm 0.4	11.6 \pm 1.8
0.501	21.0 \pm 1.4	20.8 \pm 1.4	98.8 \pm 1.2	1.5 \pm 0.4	12.0 \pm 1.7
1.62	20.1 \pm 3.6	19.8 \pm 3.6	98.9 \pm 0.6	1.7 \pm 0.4	12.4 \pm 1.2
4.54	21.13 \pm 1.8	20.8 \pm 1.6	98.6 \pm 1.5	1.7 \pm 0.7	13.3 \pm 1.0*
15.2	18.8 \pm 1.6	18.5 \pm 1.6	98.3 \pm 1.2	1.4 \pm 0.2	14.2 \pm 2.4*
48.4	17.4 \pm 4.2*	16.5 \pm 5.5*	89.4 \pm 28.2	1.7 \pm 0.5*	13.5 \pm 1.0*

表 2-G 試験結果(続き)

平均濃度実測値 ($\mu\text{g/L}$)	肝臓体指数 (%)		ビテロゲニン濃度 (ng/mg liver)		二次性徴	
	雄	雌	雄	雌	雄	雌
対照区	2.3 \pm 0.5	6.2 \pm 0.8	21.5 \pm 65.3	1,000 \pm 538	69 \pm 12	0
0.501	2.0 \pm 0.5	6.2 \pm 1.0	ND*	553 \pm 269*	72 \pm 11	0
1.62	1.8 \pm 0.3	5.8 \pm 1.1	ND*	654 \pm 341*	69 \pm 13	0
4.54	3.0 \pm 1.1	6.4 \pm 0.9	0.28 \pm 0.24*	344 \pm 306*	71 \pm 9	0
15.2	2.0 \pm 0.2	6.3 \pm 0.9	ND*	433 \pm 93*	74 \pm 16	0
48.4	2.3 \pm 0.5	6.5 \pm 0.9	0.25 \pm 0.17*	357 \pm 197*	67 \pm 15	0

3. F2世代(胚、仔魚期)

表 3-A 試験結果

平均濃度実測値 ($\mu\text{g/L}$)	ふ化率 (%)	ふ化日数 (day)
対照区	96 \pm 7	8.9 \pm 0.3
0.501	97 \pm 3	8.3 \pm 0.2*
1.62	99 \pm 2	8.2 \pm 0.1*
4.54	93 \pm 8	8.3 \pm 0.4*
15.2	95 \pm 6	8.9 \pm 0.3
48.4	98 \pm 4	8.0 \pm 0.2*

結果は平均値 \pm 標準偏差.

有意差水準 (* p <0.05、** p <0.01).

ビテロゲニン濃度のND は全ての個体において定量下限値未満であった (<0.4 ng/mg liver)ことを示す

NA: not available

二次性徴：乳頭状小突起を有する節板数

有効数字は測定精度を考慮して、

- ・ふ化率・ふ化後生存率・生存率は2桁（ただし1の位までとする）
- ・肝臓体指数および生殖腺体指数は、1未満は1桁、1以上は2桁
- ・それ以外のエンドポイントは3桁（ただし二次性徴は1の位まで、ビテロゲニンは小数点以下2桁までとする）
- ・標準偏差の桁数は平均値の位に合わせる

第1段階生物試験の実施結果について（抜粋）

1. 平成24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3物質(1-ナフトール、4-*tert*-ペンチルフェノール及びりん酸トリフェニル)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p2参照）。

(3) りん酸トリフェニルの試験結果

2.13、7.19、17.1、44.9 $\mu\text{g/L}$ (実測値)のばく露濃度で試験を行ったところ、受精率、雌雄の死亡率、生殖腺体指数、二次性徴、雄の全長、体重、肝臓中ビテロゲニン濃度、雌の肝臓体指数に統計学的に有意な変化は認められなかった。

7.19 $\mu\text{g/L}$ 以上のばく露群において雄の肝臓体指数の統計学的に有意な高値、雌の肝臓中ビテロゲニン濃度の統計学的に有意な低値が認められた。

44.9 $\mu\text{g/L}$ のばく露群において、産卵数、受精卵数、雌の全長、体重の統計学的に有意な低値が認められた。

2. 試験結果のまとめ

(3) りん酸トリフェニル

44.9 $\mu\text{g/L}$ のばく露群において、産卵数、受精卵数、雌の全長、体重の統計学的に有意な低値が認められたことから、有害性を示すことが示唆された。

りん酸トリフェニルについては既存知見からエストロゲン作用又は抗アンドロゲン作用を持つことが想定された。今回の試験結果においては、エストロゲン作用を示す雄の肝臓中ビテロゲニン濃度の高値は認められなかったため、エストロゲン作用を持つことは確認できなかった。本試験においては抗アンドロゲン作用については確認できない。

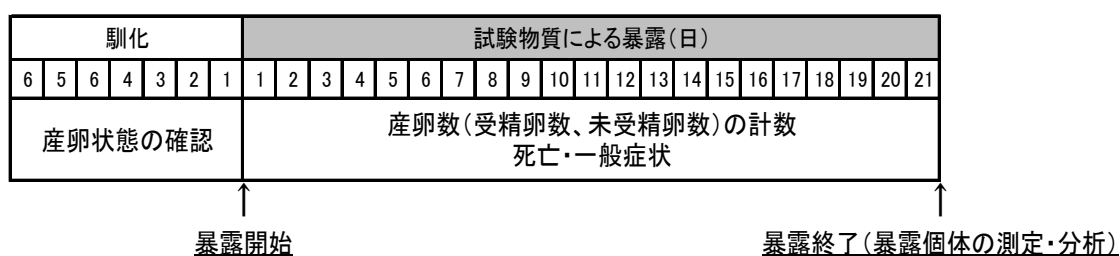
雌の肝臓中ビテロゲニン濃度の統計学的に有意な低値が認められたことから、抗エストロゲン作用の有無について、試験管内試験で確認する必要がある。

なお、有害性が示唆されたばく露濃度44.9 $\mu\text{g/L}$ は、昭和50年度に実施された化学物質環境実態調査において調査された検出下限値の最高値0.25 $\mu\text{g/L}$ の約180倍であった(平成19年度に実施された同調査において大気で検出されていた)。

(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ピテロジェニン濃度及び二次性徴を調べる試験法である。



エンドポイント

- ・産卵状態(産卵数、受精率、受精卵数)
- ・肝臓中ピテロジェニン濃度
- ・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)
- ・肝臓中ピテロジェニン濃度
- ・二次性徴(尻鰭乳頭状突起)

りん酸トリフェニル

実施機関：国立環境研究所

表 2-A 試験結果

試験濃度(μg/L)		試験個体数		死亡個体数(死亡率%)		全長(mm)		体重(mg)	
設定値	実測値	雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌
対照区		12	12	0(0)	0(0)	38.0±0.51	36.5±0.50	543±45	512±37
20.0	2.13	12	12	0(0)	0(0)	37.9±1.1	35.3±0.65	532±44	449±19
64.0	7.19	12	12	0(0)	0(0)	38.0±1.1	35.5±0.28	544±49	464±27
200	17.1	12	12	0(0)	0(0)	37.7±1.0	35.2±1.0	539±31	468±34
640	44.9	12	12	0(0)	1(8.3)	38.3±1.1	34.4±0.35**	583±68	432±32*

表 2-B 試験結果(続き)

試験濃度実測値 (μg/L)	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	23.3±3.7	21.7±4.0	93.0±5.3	0.86±0.083	8.0±0.72
2.13	20.4±2.7	18.3±3.1	89.3±4.9	0.87±0.17	7.9±0.47
7.19	18.7±3.1	17.1±3.4	90.8±3.8	0.95±0.092	8.1±0.62
17.1	20.1±2.0	18.6±1.8	92.6±2.2	0.94±0.098	7.7±0.72
44.9	16.4±3.2*	14.9±3.5*	91.0±3.9	0.80±0.067	9.4±1.3

表 2-C 試験結果(続き)

試験濃度実測値 (μg/L)	肝臓体指数 (%)		ビテロゲン濃度 (ng/mg liver)		二次性徴	
	雄	雌	雄	雌	雄	雌
対照区	1.2±0.19	2.7±0.52	9.1±5.4	764±220	88±7.5	0
2.13	1.4±0.12	3.5±0.39	6.9±4.0	542±115	83±7.4	0
7.19	1.7±0.29*	3.1±0.21	8.4±9.0	360±59.6**	84±6.9	0
17.1	1.7±0.24*	3.6±0.46	11.2±9.4	420±76.7*	83±7.2	0
44.9	1.7±0.13*	3.6±0.60	8.8±8.1	417±70.3*	90±8.0	0

表 2-D 試験結果(続き)

試験濃度実測値 ($\mu\text{g/L}$)	その他の所見
対照区	特になし
2.13	特になし
7.19	特になし
17.1	特になし
44.9	特になし

結果は平均値 \pm 標準偏差.

有意差水準 (** $p<0.01$, * $p<0.05$).

ビテロゲン濃度の検出下限値は 1 ng/mg liver (使用したキット: EnBioMedaka Vitellogenin ELISA system (株式会社エンバイオテック・ラボラトリーズ製))

二次性徴: 乳頭状小突起数