

第 1 段階生物試験の実施結果について（案）

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 p 3 参照）。

(1) 1-ナフトールの試験結果

80.0、258、857 μ g/L(実測値)のばく露濃度で試験を行ったところ、産卵数、受精卵数、雌雄の死亡率、全長、体重、二次性徴、生殖腺体指数、肝臓体指数、雄の肝臓中ビテロゲニン濃度に統計学的に有意な変化は認められなかった。

雌の肝臓中ビテロゲニン濃度は、ばく露濃度の上昇と共に増加し、857 μ g/L のばく露群において、統計学的に有意な高値が認められ、受精率の統計学的に有意な低値が認められた。また、雌の腹部膨満、総排泄腔に未受精卵の付着が観察された。

(2) 4-*tert*-ペンチルフェノールの試験結果

58.4、227、940 μ g/L(実測値)のばく露濃度で試験を行ったところ、受精率、雌雄の全長、体重、二次性徴、生殖腺体指数、雄の死亡率、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。

雄の肝臓中ビテロゲニン濃度は、ばく露濃度の上昇と共に増加し、58.4 μ g/L 以上のばく露群において、統計学的に有意な高値が認められた。

940 μ g/L のばく露群において、雌の死亡率に高値が認められ、肝臓中ビテロゲニン濃度、雄の肝臓体指数に統計学的に有意な高値が認められ、産卵数、受精卵数に統計学的に有意な低値が認められた。また、遊泳行動の異常が観察された。

(3) りん酸トリフェニルの試験結果

2.13、7.19、17.1、44.9 μ 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 μ 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

(1) 1-ナフトール

857 $\mu\text{g/L}$ のばく露群において、受精率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。

1-ナフトール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。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。

なお、有害性が示唆されたばく露濃度 857 $\mu\text{g/L}$ は、平成 20 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 0.0093 $\mu\text{g/L}$ の約 92,000 倍であった。

(2) 4-*tert*-ペンチルフェノール

940 $\mu\text{g/L}$ のばく露群において、雌の死亡率に高値が認められ、産卵数、受精卵数に統計学的に有意な低値が認められた。また、遊泳行動の異常が観察されたことから、有害性を示すことが示唆された。

4-*tert*-ペンチルフェノール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。今回の試験結果において、死亡が認められない濃度範囲において、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が認められ、エストロゲン作用を持つことが確認された。

なお、有害性が示唆されたばく露濃度 940 $\mu\text{g/L}$ は、平成 20 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 0.0011 $\mu\text{g/L}$ の約 850,000 倍であった(同調査において底質で検出されていた)。

(3) リン酸トリフェニル

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。

リン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。

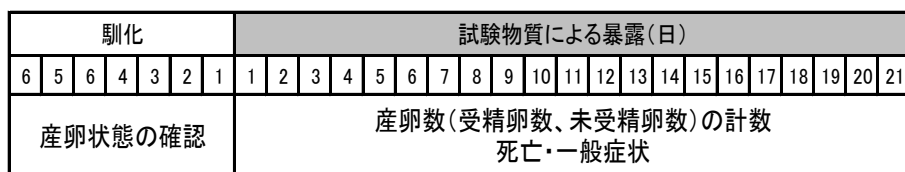
雌の肝臓中ビテロゲニン濃度の統計学的に有意な低値が認められたことから、抗エストロゲン作用の有無について、試験管内試験で確認する必要がある。

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。



↑
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)

第1段階生物試験結果(TG229)

1-ナフトール

実施機関：いであ株式会社

表 1-A 試験結果

試験濃度(μ g/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)	39.1 \pm 0.9	38.6 \pm 0.5	669 \pm 52	653 \pm 39
100	80.0	12	12	0(0)	0(0)	39.2 \pm 1.1	39.3 \pm 0.3	645 \pm 53	702 \pm 48
316	258	12	12	0(0)	0(0)	38.2 \pm 1.4	39.0 \pm 0.3	598 \pm 30	697 \pm 43
1,000	857	12	12	0(0)	0(0)	38.9 \pm 1.3	39.2 \pm 1.0	638 \pm 81	807 \pm 126

表 1-B 試験結果(続き)

試験濃度実測値 (μ g/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	25.0 \pm 6.3	23.8 \pm 6.4	94.8 \pm 2.6	0.80 \pm 0.05	11.4 \pm 0.67
80.0	26.9 \pm 10	24.1 \pm 10	88.7 \pm 4.0	0.67 \pm 0.15	11.1 \pm 0.37
258	21.3 \pm 7.9	19.4 \pm 8.3	89.6 \pm 5.2	0.81 \pm 0.18	11.0 \pm 1.7
857	17.1 \pm 3.6	11.3 \pm 4.4	64.8 \pm 14*	0.61 \pm 0.03	17.1 \pm 6.1

表 1-C 試験結果(続き)

試験濃度実測値 (μ 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	2.0 \pm 0.21	4.0 \pm 0.14	1.4 \pm 0.9	3,080 \pm 204	126 \pm 7.8	0
80.0	1.9 \pm 0.15	4.2 \pm 0.32	2.2 \pm 1.3	3,220 \pm 623	130 \pm 12	0
258	2.3 \pm 0.48	4.1 \pm 0.48	81.1 \pm 75.2	3,840 \pm 579	121 \pm 16	0
857	2.3 \pm 0.26	4.1 \pm 0.75	1.3 \pm 0.8	5,170 \pm 1,530*	115 \pm 11	0

表 1-D 試験結果(続き)

試験濃度実測値 (μ g/L)	その他の所見
対照区	特になし
80.0	特になし
258	特になし
857	雌の腹部膨満、総排泄腔に未受精卵の付着

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: Medaka vitellogenin ELISA kit (トランスジェニック株式会社製))

二次性徴: 乳頭状小突起数

4-tert-ペンチルフェノール

実施機関：いであ株式会社

表 3-A 試験結果

試験濃度 ($\mu\text{g/L}$)		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)	1(8.3)	36.4 \pm 0.6	36.2 \pm 0.4	509 \pm 21	552 \pm 32
62.5	58.4	12	12	0(0)	1(8.3)	37.8 \pm 1.2	36.0 \pm 0.5	590 \pm 39	558 \pm 48
250	227	12	12	0(0)	1(8.3)	36.2 \pm 0.6	35.5 \pm 0.7	546 \pm 23	523 \pm 48
1,000	940	12	12	0(0)	3(25)	35.6 \pm 0.8	36.1 \pm 1.6	509 \pm 47	588 \pm 130

表 3-B 試験結果(続き)

試験濃度実測値 ($\mu\text{g/L}$)	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	23.6 \pm 2.2	21.2 \pm 3.0	89.8 \pm 6.0	0.76 \pm 0.09	11 \pm 1.8
58.4	20.8 \pm 3.1	19.5 \pm 3.2	93.7 \pm 1.7	0.89 \pm 0.11	10 \pm 0.63
227	20.0 \pm 2.7	18.9 \pm 2.9	94.3 \pm 2.5	0.73 \pm 0.16	9.9 \pm 1.0
940	16.1 \pm 4.7*	12.9 \pm 3.5*	81.1 \pm 8.9	0.73 \pm 0.13	8.9 \pm 1.2

表 3-C 試験結果(続き)

試験濃度実測値 ($\mu\text{g/L}$)	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	1.8 \pm 0.14	3.9 \pm 0.59	1.8 \pm 1.7	2,310 \pm 267	116 \pm 12.3	0
58.4	2.3 \pm 0.18	4.3 \pm 0.50	970 \pm 858*	2,930 \pm 737	113 \pm 6.14	0
227	2.2 \pm 0.33	4.2 \pm 0.44	3,700 \pm 2,300*	3,070 \pm 686	103 \pm 6.28	0
940	3.6 \pm 0.50*	3.9 \pm 0.73	30,800 \pm 6,440*	8,100 \pm 3,340*	110 \pm 11.0	0

表 3-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
58.4	特になし
227	特になし
940	遊泳行動の異常 (水槽底での停滞、緩慢な遊泳)

結果は平均値 \pm 標準偏差.

有意差水準 (* p <0.05).

ビテログニン濃度の検出下限値は 1 ng/mg liver (使用したキット : Medaka vitellogenin ELISA kit (トランスジェニック株式会社製))

二次性徴 : 乳頭状小突起数

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(μ g/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 \pm 0.51	36.5 \pm 0.50	543 \pm 45	512 \pm 37
20.0	2.13	12	12	0(0)	0(0)	37.9 \pm 1.1	35.3 \pm 0.65	532 \pm 44	449 \pm 19
64.0	7.19	12	12	0(0)	0(0)	38.0 \pm 1.1	35.5 \pm 0.28	544 \pm 49	464 \pm 27
200	17.1	12	12	0(0)	0(0)	37.7 \pm 1.0	35.2 \pm 1.0	539 \pm 31	468 \pm 34
640	44.9	12	12	0(0)	1(8.3)	38.3 \pm 1.1	34.4 \pm 0.35**	583 \pm 68	432 \pm 32*

表 2-B 試験結果(続き)

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

表 2-C 試験結果(続き)

試験濃度実測値 (μ 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	1.2 \pm 0.19	2.7 \pm 0.52	9.1 \pm 5.4	764 \pm 220	88 \pm 7.5	0
2.13	1.4 \pm 0.12	3.5 \pm 0.39	6.9 \pm 4.0	542 \pm 115	83 \pm 7.4	0
7.19	1.7 \pm 0.29*	3.1 \pm 0.21	8.4 \pm 9.0	360 \pm 59.6**	84 \pm 6.9	0
17.1	1.7 \pm 0.24*	3.6 \pm 0.46	11.2 \pm 9.4	420 \pm 76.7*	83 \pm 7.2	0
44.9	1.7 \pm 0.13*	3.6 \pm 0.60	8.8 \pm 8.1	417 \pm 70.3*	90 \pm 8.0	0

表 2-D 試験結果(続き)

試験濃度実測値 (μ 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