

参考資料 3

4-ヒドロキシ安息香酸プロピルでの第1段階生物試験の結果について

いであ株式会社

4-ヒドロキシ安息香酸プロピルについて、OECD Guideline for the testing of chemicals No.229: Fish Short Term Reproduction Assay (Adopted: 2 October 2012) に準拠して、以下のとおり、メダカを試験生物とする魚類短期繁殖試験を実施した。



メダカを試験生物とする魚類短期繁殖試験の概要

1. 材料及び方法

1-1. 試験物質

試験に供した 4-ヒドロキシ安息香酸プロピル試薬(東京化成工業株式会社、Lot. G8M6D)の純度は99.9%であった。

1-2. 試験濃度(設定濃度)

試験濃度(設定濃度)は、試験物質のメダカに対する毒性を考慮して設定した。

試験濃度の設定にあたり、メダカ(成魚)を用いて96時間急性毒性試験を2回実施した(1回目:1.5、6.25、12.5、25、100 mg/L、2回目4.0、5.0、7.5、10、15 mg/L)。

1回目の試験では、96時間後の死亡率は12.5 mg/L以上で100%、6.25 mg/L以下では0%であったが、6.25 mg/Lで遊泳異常を示す個体がみられた(LC50は8.8 mg/L)。

2回目の試験では、96時間後の死亡率は、15 mg/Lで100%、5.0 mg/L以下で0%であったが、5 mg/Lでは遊泳異常を示す個体がみられた。また、7.5 mg/L及び10 mg/Lの死亡率は14%及び29%であり、LC50値は10.4 mg/Lであった。

なお、既存知見としては、ふ化後24時間未満のファッドヘッドミノーの48時間LC50が9.7 mg/L、7日間の成長に対するLOEC、幼若期のニジマス(*Oncorhynchus mykiss*)

では、12 日間暴露において 0.25 mg/L で血漿ビテロゲニン濃度が有意に増加したことなどの報告がある。

以上を踏まえて、最高濃度を 96 時間 LC50 の 1/3 程度で公比を 3.2 とする 3 濃度 (0.320、1.00、3.20 mg/L) を設定濃度とした。

1-3. 試験生物

試験には、性的に成熟した 16 週齢(暴露開始時)のメダカ (*Oryzias latipes*) を供した (試験実施施設で 18 年間累代飼育している NIES 系と同履歴の系群)。

供試するメダカは、暴露開始の 2 週間前から試験と同条件(雌雄各 3 個体/水槽)で飼育し、産卵状況を確認した(暴露開始前 7 日間の平均産卵数は 22.0 ~ 30.3 eggs/day/female)。

1-4. 試験条件

暴露方式:	流水式
希釈水:	活性炭を通した水道水
試験水温:	25±1℃
光周期:	16 hr-L/8 hr-D
試験水槽:	3 L 容硬質ガラス製水槽
試験水量:	2 L
換水率:	約 12 回/日(16 mL/min)
供試生物数:	6 個体(オス 3 個体、メス 3 個体)/容器
試験濃度数:	3 濃度及び対照区
連数:	4 連(容器)/濃度
給餌:	ブラインシュリンプふ化幼生を 3 回/日、飽食量給餌
通気:	なし

1-5. 試験物質濃度の測定

暴露開始日、暴露 7 日後、14 日後及び 21 日後に、試験水槽の中央部(中層)から必要量の試料(試験液)を採取し、LC-MS/MS により 4-ヒドロキシ安息香酸プロピル濃度を定量した(定量下限:0.0008 mg/L)。

1-6. エンドポイント測定

エンドポイントとして、暴露期間中の産卵状態(メス 1 個体・1 日当たりの産卵数及び受精卵数並び受精率)、暴露終了時の生存個体における肝臓ビテロゲニン濃度及び二次性徴を測定した。

また、テストガイドラインでは、エンドポイントに含まれていないが、試験物質の毒性影響等を検討するための参考データとして、暴露終了時の生存個体について肝臓体指数(HSI)及び生殖腺体指数(GSI)を測定した。

ビテロゲニンについては、肝臓抽出液(肝臓 1 mg あたり 50 µL の Buffer を添加、ホモジナイズ後の上澄み)を試料として、Medaka Vitellogenin ELISA System(藤倉化

成株式会社)で定量分析した(定量下限:1 ng/mg 肝重)。

二次性徴(乳頭状突起が発現している尻びれ鰭条の節板数)については、解剖時に尻びれを拡げた状態で撮影し、後日、それらの画像上で計数した。

1-7. 統計解析

各エンドポイント(HSI、GSIを含む)の統計解析には、測定値の容器平均値を用いた。

はじめに Bartlett's test により等分散性を検定し、等分散性が認められた場合は、一元配置分散分析法(ANOVA)及び Dunnet test により、等分散性が認められなかった場合は、Kruskal-Wallis test 及び Bonferroni-Holm の有意水準補正を適用した Mann-Whitney test により、対照区と各濃度区間の有意差検定を行った(有意水準(p):0.05)。

2. 結果

2-1. 試験濃度

試験液の 4-ヒドロキシ安息香酸プロピル濃度は、全濃度区において設定濃度±20%の範囲にあった。対照区では、暴露期間を通して定量下限未満(ND)であった。

表 2-1 試験液中の 4-ヒドロキシ安息香酸プロピル濃度の測定結果

設定濃度 (mg/L)	測定濃度 (mg/L)					
	0日後	7日後	14日後	21日後	平均	標準偏差
対照区	ND	ND	ND	ND	-	-
0.320	0.319 (100)	0.295 (92)	0.318 (99)	0.311 (97)	0.311 (97)	0.011 (3.6)
1.00	0.937 (94)	0.887 (89)	1.01 (101)	0.87 (87)	0.926 (93)	0.063 (6.8)
3.20	2.96 (93)	2.77 (87)	3.10 (97)	2.91 (91)	2.94 (92)	0.136 (4.6)

注) カッコ内は、平均欄では設定濃度に対する割合(%)、標準偏差欄では変動係数(%)

2-2. 試験環境

試験液の水温は、暴露期間を通して 24.6~25.2℃の範囲にあり、同一日における試験水槽間の水温差も 0.4℃以下であった。

また、溶存酸素は 5.9~8.2 mg/L の範囲にあり、暴露期間を通して飽和の 60%以上を維持していた。pH は 7.3~7.6 の範囲にあった。

試験環境は、テストガイドラインに規定される TEST ACCEPTANCE CRITERIA を満たしていた。

表 2-2 暴露期間中の試験環境(試験液の水温、溶存酸素及び pH)

測定濃度 (mg/L)	水温 (°C)	溶存酸素 (mg/L)	pH
対照区	24.7 - 25.2	6.1 - 8.1	7.3 - 7.6
0.311	24.6 - 25.1	6.2 - 8.2	7.3 - 7.6
0.926	24.6 - 25.0	6.0 - 8.2	7.3 - 7.6
2.94	24.7 - 25.1	5.9 - 8.2	7.3 - 7.6

注) データは、暴露期間中の範囲(最低－最高)

2-3. 死亡率及び一般症状

暴露終了時の死亡率(累積死亡率)は、対照区で 4.2%(メスが(12 個体中)1 個体死亡)、4-ヒドロキシ安息香酸プロピルの各濃度では 0%であった。

ただし、4-ヒドロキシ安息香酸プロピルの 2.94 mg/L では、暴露開始日に、各水槽において狂奔又は平衡喪失等の行動異常が 2～3 個体で認められ、暴露 2 日目以降は、行動又は外見に異常が認められる個体は減少したものの、底層での長時間停滞、水面での長時間浮遊、刺激に対する過敏反応あるいは体色明化等の試験物質に起因すると推察される行動あるいは外見の異常(毒性症状)を示す個体が暴露終了まで全試験水槽を通して 1～2 個体観察された。

2-4. エンドポイントに関する測定結果

各エンドポイントの測定結果は、まとめて表 2-4 に示した。

ビテロゲニン

肝臓中ビテロゲニン濃度に関して、オスでは、4-ヒドロキシ安息香酸プロピル濃度に依存的な増加がみられ、すべての濃度について対照区と有意差(有意な増加)が認められた。

なお、対照区のオスについては、すべての個体で肝臓中ビテロゲニン濃度は定量下限未満であった。

メスでも、4-ヒドロキシ安息香酸プロピル濃度に依存的な増加傾向がみられ、2.94 mg/L について対照区と有意差(有意な増加)が認められた。

二次性徴

オス及びメスともに、4-ヒドロキシ安息香酸プロピルのすべての濃度に関して、対照区と有意差は認められなかった(メスでは、対照区及び 4-ヒドロキシ安息香酸プロピルのすべての濃度において、二次性徴の発現がみられなかった)。

産卵状況

暴露期間中の産卵数には、4-ヒドロキシ安息香酸プロピル濃度に依存的な低下傾向が

みられ、2.94 mg/L に関して対照区と有意差(有意な低下)が認められた。

2.94 mg/L の産卵数は、対照区の 39%であった。

受精卵数にも、4-ヒドロキシ安息香酸プロピル濃度に依存的な低下がみられ、0.926 mg/L 及び 2.94 mg/L に関して対照区と有意差(有意な低下)が認められた。

0.926 mg/L 及び 2.94 mg/L の受精卵数は、対照区の 87%及び 20%であった。

受精率については、4-ヒドロキシ安息香酸プロピルの 9.75 mg/L に顕著な低下がみられ、対照区との間に有意差が認められた。

4-ヒドロキシ安息香酸プロピルの 2.94 mg/L では、産卵数は暴露開始の翌日(暴露 1 日後)に顕著に低下したが、暴露期間の後半には漸増(回復)する傾向にあった(図 2-4)。

生殖腺体指数(GSI)及び肝臓体指数(HSI)

GSI 及び HSI については、オス及びメスともに、4-ヒドロキシ安息香酸プロピルの濃度に関して、対照区と有意差は認められなかった。

表 2-4 魚類短期繁殖試験結果のまとめ(4-ヒドロキシ安息香酸プロピル)

暴露濃度 (mg/L)	供試個体数		死亡個体数(死亡率)	
	オス	メス	オス	メス
Control	12	12	0 (0.0%)	1 (8.3%)
0.311	12	12	0 (0.0%)	0 (0.0%)
0.926	12	12	0 (0.0%)	0 (0.0%)
2.94	12	12	0 (0.0%)	0 (0.0%)
暴露濃度 (mg/L)	全長 (mm)		体重 (mg)	
	オス	メス	オス	メス
Control	36.8 ± 0.6	36.1 ± 0.7	536 ± 33	520 ± 19
0.311	36.4 ± 1.3	36.1 ± 0.2	525 ± 13	525 ± 27
0.926	37.1 ± 1.7	36.8 ± 0.8	515 ± 49	539 ± 21
2.94	36.5 ± 0.9	36.5 ± 1.5	490 ± 26	549 ± 83
暴露濃度 (mg/L)	肝臓体指数 (%)		生殖腺体指数 (%)	
	オス	メス	オス	メス
Control	2.1 ± 0.26	5.0 ± 0.43	0.79 ± 0.076	9.7 ± 1.2
0.311	2.7 ± 0.98	5.4 ± 0.75	0.74 ± 0.14	10 ± 0.16
0.926	2.7 ± 0.23	5.1 ± 0.20	0.78 ± 0.053	9.9 ± 1.1
2.94	2.3 ± 0.14	4.3 ± 0.77	0.81 ± 0.21	10 ± 1.1
暴露濃度 (mg/L)	ビテロゲニン (ng/mg liver)		二次性徴(乳頭状突起を有する節板数)	
	オス	メス	オス	メス
Control	0.5 ± 0.0	1,170 ± 71.6	125 ± 7.8	0 ± 0
0.311	23.7 ± 9.0 *	1,190 ± 238	125 ± 3.8	0 ± 0
0.926	42.2 ± 36.8 *	1,590 ± 271	127 ± 15	0 ± 0
2.94	4170 ± 513 *	3,540 ± 1080 *	125 ± 8.0	0 ± 0
暴露濃度 (mg/L)	産卵数 (eggs/day/female)			
	21日間平均	(1-7日後)	(8-14日後)	(15-21日後)
Control	26.1 ± 1.0	24.9 ± 2.0	27.2 ± 0.9	26.3 ± 1.3
0.311	28.3 ± 1.6	26.8 ± 2.8	29.7 ± 0.9	28.4 ± 2.3 *
0.926	23.4 ± 2.0	20.5 ± 2.1	23.5 ± 3.7	26.3 ± 2.2
2.94	10.3 ± 4.7 *	6.74 ± 3.5 *	10.4 ± 5.8 *	13.6 ± 5.6 *
暴露濃度 (mg/L)	受精卵数 (eggs/day/female)			
	21日間平均	(1-7日後)	(8-14日後)	(15-21日後)
Control	25.1 ± 0.7	24.3 ± 2.2	25.8 ± 0.9	25.2 ± 1.4
0.311	26.3 ± 0.8	25.1 ± 2.0	28.2 ± 0.3 *	25.6 ± 0.8
0.926	21.8 ± 1.6 *	19.6 ± 1.7 *	22.0 ± 3.3	23.9 ± 2.2
2.94	4.9 ± 4.1 *	2.3 ± 2.6 *	6.5 ± 5.8 *	5.8 ± 4.6 *
暴露濃度 (mg/L)	受精率 (%)			
	21日間平均	(1-7日後)	(8-14日後)	(15-21日後)
Control	96.0 ± 1.0	97.4 ± 1.1	94.7 ± 3.8	95.9 ± 1.6
0.311	93.0 ± 3.1	93.7 ± 2.9	94.8 ± 2.3	90.7 ± 6.1
0.926	93.5 ± 3.7	95.8 ± 1.6	94.0 ± 3.6	91.3 ± 6.4
2.94	40.8 ± 23 *	30.7 ± 22 *	52.8 ± 26 *	35.5 ± 24 *

注) データは、容器平均値を基に算出した各測定濃度における平均±標準偏差を示す。

「*」は統計学的に対照区と有意差(p<0.05)が認められたことを示す。

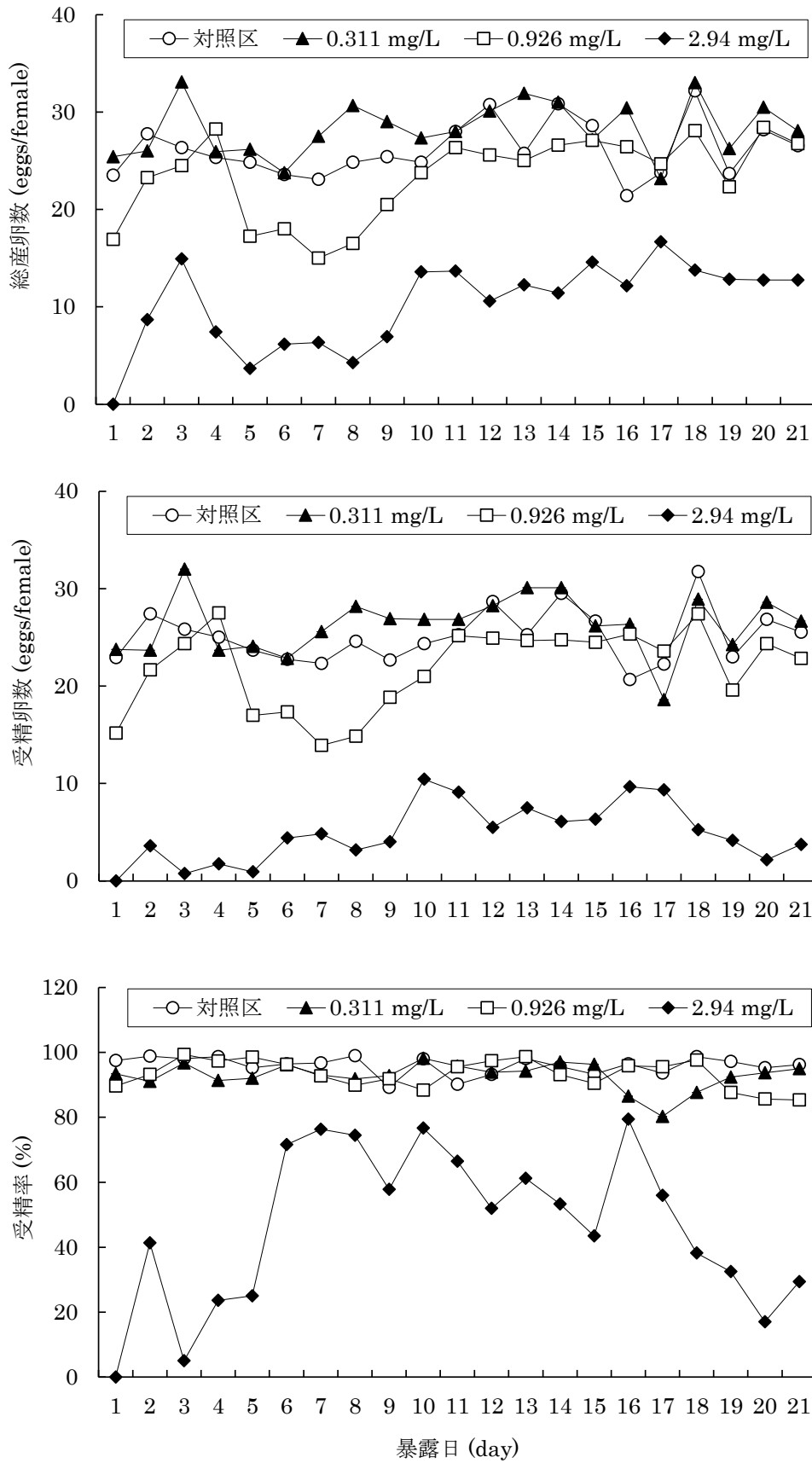


図 2-4 暴露期間中の産卵数(上)、受精卵数(中)、数受精率(下)

3. まとめ及び考察

本試験から得られた 4-ヒドロキシ安息香酸プロピルのメダカに対する最小影響濃度 (LOEC) は、有害性の指標となる産卵に関わるエンドポイントに関して 0.926 mg/L (受精卵数に対する影響)、肝臓ビテロゲニン濃度に関して 0.311 mg/L であった。

二次性徴については、試験濃度範囲において有意な影響はみられず、LOEC は得られなかった。

本試験の結果、オスにおいて、肝臓中ビテロゲニン濃度に 4-ヒドロキシ安息香酸プロピルの暴露濃度に依存的かつ統計学的に有意な増加がみられたことから、4-ヒドロキシ安息香酸プロピルがメダカに対してエストロゲン様作用を示すことが示唆された。

また、暴露期間中の産卵に関わるエンドポイント(産卵数、受精卵数、受精率)についても、4-ヒドロキシ安息香酸プロピルの 2.94 mg/L 又は 0.926 mg/L で有意な低下が認められた。

とくに産卵数(及び受精卵数)では、暴露開始の翌日に急激な低下が観察されたが、このような現象はエストロゲン作用による影響とは考えにくく、4-ヒドロキシ安息香酸プロピルが(メスのメダカに対して)エストロゲン様作用以外の作用(ステロイド合成阻害等の HPG 軸に対する作用)を示した可能性も示唆される。

表 3 魚類短期繁殖試験から得られた
4-ヒドロキシ安息香酸プロピルのメダカに対する LOEC 及び NOEC

エンドポイント			LOEC (mg/L)	NOEC (mg/L)
ビテロゲニン	オス	↑	0.311	ND
	メス	↑	2.94	0.926
二次性徴	オス	—	ND	2.94
	メス	—	ND	2.94
産卵状況	総産卵数	↓	2.94	0.926
	受精卵数	↓	0.926	0.311
	受精率	↓	2.94	0.926
試験濃度 (mg/L)			0.311, 0.926, 2.94	

注) 「↑」、「↓」は濃度依存的増加又は低下がみられたことを示す。

「—」は統計学的に有意な反応がみられなかったことを示す。

「ND」は、LOEC 又は NOEC が得られなかったことを示す。