

令和5年度第一段階生物試験(両生類変態試験:セルトラリン)
の結果について(案)

いであ株式会社

1. 実施概要

セルトラリンについて、OECD Guideline for the testing of chemicals No.231: Amphibian Metamorphosis Assay (Adopted: 7 September 2009) (OECD TG231) に準拠して、両生類変態試験 (AMA) を実施した。

AMA は、図1に示すように、アフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) の Nieuwkoop and Faber (NF) stage 51 の幼生を試験生物として、21 日間にわたる化学物質 (試験物質) による暴露を行う。暴露開始から7日後に、一部の個体を取り上げて、発達段階 (NF stage) の確認、頭胴長、後肢長及び体重の測定を行う。また、ばく露終了時に生存する個体について、暴露7日後と同様のエンドポイントを調べるほか、一部の個体 (5 個体/水槽) を対象に甲状腺組織を検査し、異常の有無及び重症度を調べる。本試験については、これらのエンドポイントの測定結果を基に、化学物質の甲状腺受容体を介した作用のほかに、甲状腺ホルモンの生合成系、視床下部-下垂体-甲状腺系 (HPT 軸) に対する作用を検出できるとされている。

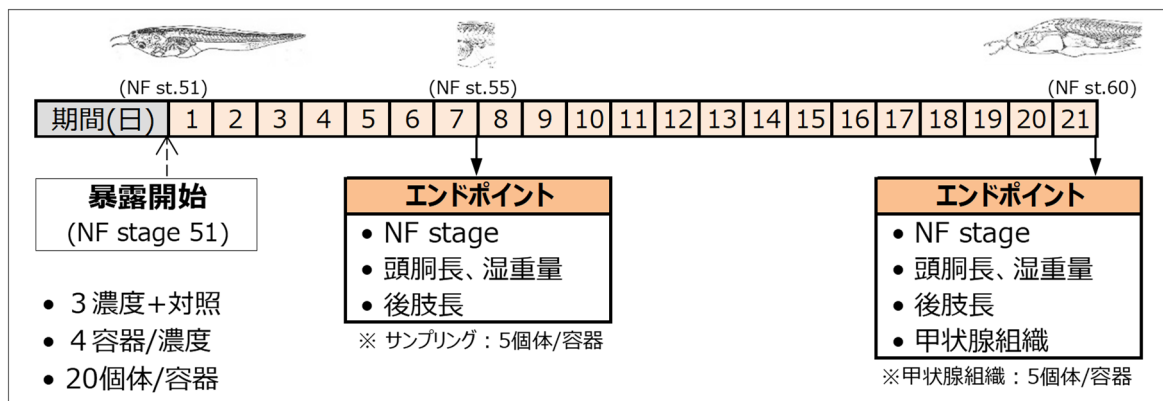


図1 両生類変態試験の概要

2. 材料及び方法

2-1. 試験物質

試験対象物質は、セルトラリン (CAS No. 79617-96-2) であるが、AMA は試薬が入手可能なセルトラリン塩酸塩を試験物質とした。

試験物質の識別及び物理化学的性状に関する情報 ※

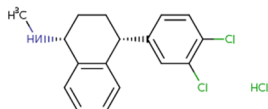
一般名： セルトラリン塩酸塩 (Sertraline hydrochloride)

CAS No.: 79559-97-0

分子式: $C_{17}H_{18}Cl_3N$

分子量: 342.69

構造式:



水溶解度: $6.97 \cdot 10^{-6}$ to $5.00 \cdot 10^{-5}$ mol/L (Predicted range)

蒸気圧: $1.89 \cdot 10^{-7}$ to $3.85 \cdot 10^{-7}$ mm Hg (Predicted range)

Log Pow: 0.820 to 5.14 (Predicted range)

pKa: 8.16 (Predicted range)

※ 米国環境保護庁 CompTox Chemicals Dashboard より引用

<https://comptox.epa.gov/dashboard/chemical/details/DTXSID1040243>

試験に供した試薬

供給者: 東京化成工業株式会社

Lot No.: U7PML

純度: 99.9%

2-2. 試験濃度(設定濃度)

OECD TG231 では、試験濃度の設定に関して、(1) 試験物質の毒性に対する試験生物の耐忍濃度 (maximum tolerated concentration (MTC))、(2) 試験物質の水溶解度、(3) 100 mg/L、のうち最も高い濃度を試験最高濃度に設定するとされている。MTC については、結果的に死亡率が 10% 未満となる最も低い濃度と定義するとされている。MTC については、試験生物に対する急性の半数致死濃度 (LC_{50}) の 1/3 が実用的な近似値になるとしており、試験生物での急性毒性データがない場合には、AMA と同じ発生段階の試験生物を用いて 96 時間の急性毒性試験を実施もしくは他の水生生物種のデータ (魚類又は試験生物種以外の両生類に対する LC_{50}) を代用としている。

セルトラリンの急性毒性に関して、試験生物及び試験生物以外の両性類の既存知見 (毒性値) は得られなかったが、魚類については、セルトラリンのファットヘッドミノール (*Pimephales promelas*)、メダカ (*Oryzias latipes*)、ゼブラフィッシュ (*Danio rerio*) 及びニジマス (*Oncorhynchus mykiss*) に対する 96 時間の LC_{50} (96h- LC_{50}) として、143、191、205 及び 340 $\mu\text{g/L}$ の既存知見がある (これらの試験では、試験物質としてセルトラリン塩酸塩を使用)。また、これらの既存毒性値も参考に、セルトラリン塩酸塩を試験物質

として、AMA と同じ発生段階 (NF stage 51) のアフリカツメガエル幼生を試験生物とする半止水式 (試験液は 24 時間ごとに全量を交換) での 96 時間急性毒性試験 (事前検討) を試験実施施設で実施した。試験濃度 (セルトラリン塩酸塩換算) は、4.10、10.2、25.6、64.0、160、400 及び 1000 µg/L の 7 濃度 (及び対照区) とし、通常の急性毒性試験と同様に無給餌とする条件に加えて AMA と同様に給餌する条件で実施した。その結果、無給餌条件では、96 時間後の死亡率は、400 µg/L 以上が 100%、160 µg/L が 10%、64.0 µg/L 以下が 0% (25.6 µg/L は 10%) であり、96-h LC₅₀ は 225 µg/L であった。一方、給餌条件では、96 時間後の死亡率は、1000 µg/L が 100%、400 µg/L が 70%、160 µg/L 以下が 0% であり、96-h LC₅₀ は 318 µg/L となり、無給餌条件よりもセルトラリンの毒性が軽減する可能性が示唆された。また、給餌条件の試験では、暴露中に試験生物の行動等に明らかな異常は観察されなかったが、160 µg/L の水槽では、24 時間ごとの試験液の交換時に水槽底に残存する餌料が明らかに対照区より多く、試験生物の摂餌量が低下していた可能性が示唆された。以上の知見より、セルトラリン塩酸塩については、OECD TG231 に示された試験濃度の設定で考慮する要件の中で MTC が最も低いと考えられることから、本試験では、以下のとおり、セルトラリン塩酸塩での事前検討 (急性毒性試験) の結果に基づいて試験濃度 (セルトラリン濃度) を設定した。

試験実施施設で実施した急性毒性試験に基づくと、OECD TG231 で MTC の実用的な近似値とされる 96-h LC₅₀ の 1/3 は、セルトラリン塩酸塩濃度として、無給餌条件では 74.9 µg/L、給餌条件では 106 µg/L となる。給餌条件では、160 µg/L に関して試験生物の摂餌量が低下したと考えられたが、暴露中の行動等に明らかな異常は観察されず、これより低濃度の 100 µg/L 程度であれば、AMA の試験期間 (21 日間) でも死亡率が 10% を超える可能性は低いと判断した。また、AMA は、EXTEND2022 の枠組みでスクリーニングに位置付けられる第 1 段階の試験として実施することから、試験物質の毒性が発現しない範囲でより高い濃度を試験最高濃度に設定することが望ましい。

以上を勘案して、AMA の試験濃度 (セルトラリン濃度) は、NF stage 51 のアフリカツメガエル幼生を用いた給餌条件での 96h LC₅₀ の 1/3 に近似する 89.4 µg/L (セルトラリン塩酸塩濃度として 100 µg/L) を最高濃度、公比を 3.2 (√10) とする以下の 3 濃度とした。

試験濃度 (設定濃度) : 8.94、28.3、89.4 µg/L

2-3. 試験生物

試験は、アフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) の NF stage 51 の幼生である。本試験には、試験実施施設でヒト絨毛性生殖腺刺激ホルモンを投与した親動物 (雌雄成体のペア) から得られた受精卵を採卵から 16 日後まで試験と同じ水温下で飼育した幼生から選別した同程度の全長の個体を供した。本試験に供した個体の全長 (供試群から無作為に取り上げた 20 個体で測定) は 27.5 ± 0.82 mm (平均 ± 標準偏差) であった。

2-4. 試験生物の暴露

試験生物の暴露は、大気循環型安定性試験室(タバイエスペック株式会社)に設置した流水式の暴露試験装置を用い、OECD TG229 に準拠する以下の方法及び条件で実施した。

暴露方式:	流水式
供試生物:	アフリカツメガエル (<i>Xenopus laevis</i>)、NF stage 51
試験期間:	21 日間
試験濃度:	8.94、28.3、89.4 µg/L 及び対照区
連数:	4 連(容器)/濃度
供試生物数:	20 個体/容器
試験水槽:	7 L 容硬質ガラス製水槽
試験水量:	5 L (水深 18cm)
試験液流量:	25 mL/min (換水率: 7.2 回/日)
希釈水:	活性炭を通した地下水(ヨウ素濃度が 1.0 µg/L となるようにヨウ化カリウム水溶液を添加)
試験水温:	22±1℃
光周期:	12 h-L/12 h-D
給餌:	Sera Micron [®] 、1 個体あたり 30 mg (Day 0-4)、40 mg (Day 5-7)、50 mg (Day 8-10)、70 mg (Day 11-14) 又は 80 mg (Day 15-20) を 2 回/日に分けて給餌
通気:	なし

2-5. 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、高速液体クロマトグラフによりセルトラリン濃度を定量した(定量下限: 0.54 µg/L)。

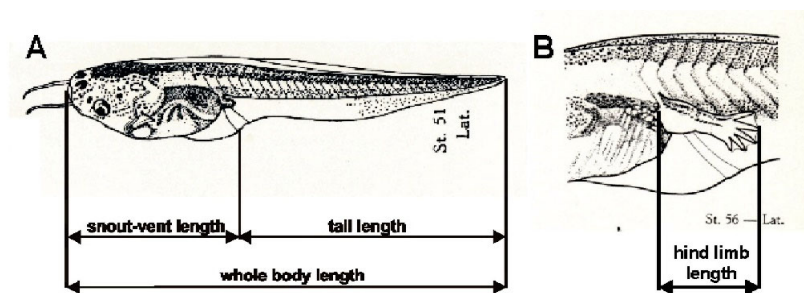
2-6. エンドポイント測定

暴露期間中に死亡個体数、暴露 7 日後及び終了時に発生段階及び形態に関わるエンドポイント(後肢長、頭胴長及び体重)、暴露終了時に甲状腺組織に関するエンドポイントの測定を行った。

発生段階及び形態に関わるエンドポイント

暴露 7 日後は、各試験水槽から無作為に 5 個体を取り上げ、pH を調整した 200 mg/L のメタンサルホン酸トリカイン水溶液中で麻酔してから、ノギスを用いて頭胴長及び後肢長、電子天秤で体重(湿重量)を測定し(図 2-1)、Nieuwkoop and Faber

(1994)の発生段階表(Normal Table)に基づいて発生段階(NF stage)を判別した。暴露終了時は、各試験水槽について生存する全個体を取り上げ、暴露 7 日後と同様に、形態に関わるエンドポイント及び発生段階の判別を行った。また、後述の甲状腺の組織学的検査に供する試料として、対照区及び試験物質の 1 濃度区について、発生段階が NF stage 60 であった個体を試験水槽あたり 5 個体ずつ無作為に抽出し、甲状腺を含む頭部を採取して Davidson 液で固定(保存)した(NF stage 60 の個体が 5 個体未満の試験容器では代替として NF stage 59 の個体を試料とした)。



(OECD TG231 より引用)

図 2-1 AMA での頭胴長(snout-vent length)及び後肢長(hind limb length)の測定

甲状腺組織に関するエンドポイント

甲状腺の組織学的検査(典型症例における各重症度に該当する個体数の測定)は、対照区及びセルトラリンの 3 濃度区のうち、暴露終了時の発生段階に対照区と比較して有意差が認められた最も低い濃度を対象に実施した。これらの試験区については、暴露終了時に、取り上げた個体のうち、発生段階が NF stage 60 の個体を試験水槽当たり 5 個体ずつ無作為に抽出し(NF stage 60 の個体が 5 個体未満の試験容器では NF stage 59 の個体を代替とした)、甲状腺を含む頭部を Davidson 液で固定した(48～96 時間後に 10% 中性緩衝ホルマリン液に移し、組織標本作製まで保存)。各試料は、適宜、トリミングしてから、常法によりパラフィン包埋し、回転式マイクロームで甲状腺の下端側(尾部側)から 6 μ m 厚で薄切した(図 2-2)。作製した連続切片から甲状腺を含む部位の切片をステップセクション法(約 50 μ m 間隔)によりスライドガラスに貼付(進展)し、常法によりヘマトキシリン-エオシン染色した。

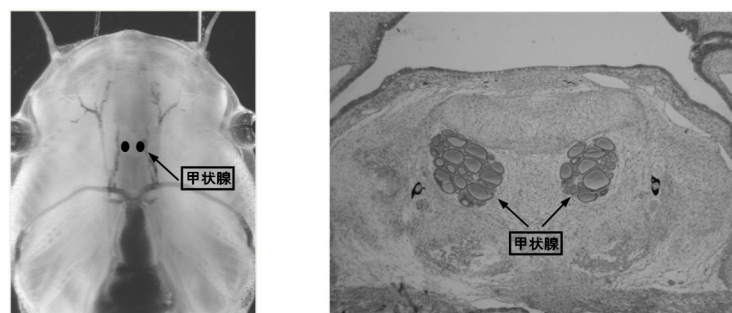


図 2-2 アフリカツメガエル幼生の甲状腺

生物顕微鏡下で甲状腺の組織標本を観察し、甲状腺中央に位置する切片を対象に、OECD Series on Testing and Assessment No.82: Guidance Document on Amphibian Histology に従い、Thyroid gland hypertrophy (甲状腺肥大)、Thyroid gland atrophy (甲状腺萎縮)、Follicular cell hypertrophy (濾胞上皮細胞の肥大) 及び Follicular cell hyperplasia (濾胞上皮細胞の過形成) の症例について、Severity grade (重症度) を 0 (Non-remarkable) ～ 3 (Severe) の 4 段階で診断した (別添-1 参照)。

2-7. 統計解析

死亡個体数を除くエンドポイントの統計解析 (検定) は、米国環境保護庁が開発及び公開している統計解析プログラム StatCharrms (ver.0.90.9 及び 0.90.96) を用いて行った。

死亡個体数は、Bonferroni-Holm adjustment による有意確率補正を適用した Fisher's exact test により、対照区と試験物質の各濃度区間の有意差を検定した。発生段階 (NF stage) は、試験容器の中央値を用いて、ステップダウン法を適用した Jonckheere-Terpstra trend test (stepdown JT test) により、対照区と試験物質の各濃度区間の有意差を検定した。外部形態に関わるエンドポイント (頭胴長、体重及び後肢長) は、初めに試験容器の中央値を用いて、Linear contrast 及び Quadratic contrast により、データの単調性 (monotonicity) を解析した。本試験では、全てのデータ (エンドポイント) について単調性が認められたため、試験容器の中央値を用いた stepdown JT test により、対照区と各濃度区間の有意差を検定した。なお、暴露終了時については、OECD TG231 の推奨に従い、NF stage 61 以上の個体を除外したデータで検定を行った。甲状腺組織は、典型症例ごとに、診断結果 (各重症度と診断された個体数) について Rao-Scott Cochran-Armitage by Slices 法により、対照区と各濃度区間の有意差を検定した。すべての検定において有意水準 (p) は 0.05 とした。

3. 結果

3-1. 試験濃度

暴露期間中の試験液のセルトラリン濃度の測定結果を表 3-1 に示した。

試験液のセルトラリンの平均測定濃度は、設定濃度の 89.0～96.3%であった。また、その変動係数は 3.8～6.6%であり、OECD TG231 に規定された Performance criteria の Acceptable limits (20%未満)を満たしていた。対照区は、暴露期間を通して定量下限未満 (ND) であった。

表 3-1 試験液のセルトラリン濃度の測定結果

設定濃度 ($\mu\text{g/L}$)	測定濃度 ($\mu\text{g/L}$)					標準偏差
	0日後	7日後	14日後	21日後	平均	
対照区	ND	ND	ND	ND	-	-
8.94	9.05 (101)	8.30 (92.8)	8.67 (97.0)	8.44 (94.4)	8.61 (96.3)	0.33 <3.8>
28.3	27.8 (98.2)	26.1 (92.2)	26.4 (93.3)	24.3 (85.9)	26.1 (92.4)	1.4 <5.5>
89.4	85.3 (95.4)	82.8 (92.6)	75.4 (84.3)	75.0 (83.8)	79.6 (89.0)	5.2 <6.6>

注) ND は定量下限未満、()内の数値は設定濃度に対する割合(%), < >内の数値は変動係数(%)を示す。

3-2. 試験環境

暴露期間中の試験液の水温、溶存酸素及びpHの測定結果を表 3-2 に示した。

試験液の水温は、暴露期間を通して 21.6～22.6℃、同一日における水槽間差は 0.4℃以内であった。試験液の溶存酸素は 5.2～9.0 mg/L の範囲にあり、暴露期間を通して飽和の 50%以上を維持していた。また、pH は、7.3～8.1 の範囲にあり、同一日における水槽間差は 0.2 以内であり、いずれも OECD TG231 に規定された Performance criteria の Acceptable limits (水温: 22±1℃かつ水槽間差 0.5℃以内、溶存酸素: 飽和の 40%以上、pH: 6.5～8.5 かつ水槽間差 0.5 以内)を満たしていた。

表 3-2 暴露期間中の試験環境 (試験液の水温、溶存酸素及び pH)

設定濃度 ($\mu\text{g/L}$)	水温 ($^{\circ}\text{C}$)	溶存酸素 (mg/L)	pH
対照区	21.6 — 22.6	5.3 — 8.9	7.3 — 8.1
8.61	21.6 — 22.5	5.2 — 9.0	7.3 — 8.0
26.1	21.7 — 22.6	5.4 — 8.6	7.3 — 8.1
79.6	21.7 — 22.6	6.6 — 8.5	7.4 — 8.0

注) データは、暴露期間中の範囲 (最低—最高)を示す。

3-3. 死亡個体数及び一般症状

対照区における暴露期間を通した死亡個体はみられず、OECD TG231 に規定された Performance criteria の Acceptable limits (全水槽で 10% 以下) を満たしていた。また、セルトラリンの各濃度区については、暴露期間を通した死亡個体数は、8.61 及び 79.6 µg/L が 0 個体、26.1 µg/L が 1 個体であり、OECD TG231 に規定された Test Validity (対照区を含む全試験区で死亡率は 10% 未満かつ全ての試験容器で死亡個体数は 3 個体未満) を満たしていた。また、検定の結果、セルトラリンの全濃度に関して、対照区との間に統計学的な有意差は認められなかった。

暴露期間中、対照区及びセルトラリンの 8.61 及び 26.1 µg/L では、暴露個体の外見や行動に明らかな異常は観察されなかった。79.6 µg/L では、暴露 1 日後に平衡喪失して着底した状態の個体 (1 個体)、暴露 9 日後から 10 日後に対照区と比較して遊泳が緩慢な状態が観察された。これらの症状は一過的であったが、暴露 3 日後から終了時まで一貫して、対照区と比較して水槽清掃時に水槽底に残留する餌料量が多く、暴露している個体の摂餌量が継続的に低下していたと考えられた。

3-4. エンドポイントの測定結果

(1) 暴露7日後の発生段階及び形態学的エンドポイント

暴露 7 日後の発生段階及び形態に関するエンドポイントの測定結果を表 3-3 に示した。また、形態に関するエンドポイントの測定結果を図 3-1 に示した。

発生段階に関して、セルトラリン濃度に依存的な低下 (遅延) 傾向がみられ、検定の結果、79.6 µg/L について、対照区との間に統計学的な有意差 (低値) が認められた。形態学的エンドポイントでは、後肢長、頭胴長及び体重に関して、セルトラリン濃度に依存する低下がみられ、検定の結果、26.1 µg/L 以上 (後肢長及び体重) 又は 8.61 µg/L 以上 (頭胴長) の濃度について、対照区との間に統計学的な有意差 (低値) が認められた。

表 3-3 暴露 7 日後の発生段階及び形態に関するエンドポイントの測定結果

測定濃度 (µg/L)	発生段階	後肢長 (mm)	頭胴長 (mm)	体重(湿重量) (mg)
対照区	54.0 (54.0 - 54.0)	2.87 ± 0.14	17.1 ± 0.29	374 ± 24.6
8.61	54.0 (54.0 - 54.0)	2.64 ± 0.22	16.0 ± 0.49 (*)	299 ± 36.1
26.1	53.5 (53.0 - 54.0)	2.50 ± 0.18 (*)	14.9 ± 0.24 (*)	258 ± 9.2 (*)
79.6	53.0 (53.0 - 53.0)(*)	1.65 ± 0.12 (*)	12.1 ± 0.31 (*)	143 ± 9.3 (*)

注) 発生段階は容器中央値に基づく4試験水槽の中央値及び(最小-最大)、後肢長、頭胴長及び体重は、容器平均値に基づく平均±標準偏差、(*)は統計学的に対照区の間有意差(p<0.05)が認められたことを示す。

(2) 暴露終了時の発生段階及び形態学的エンドポイント

暴露終了時(21 日後)の発生段階及び形態に関するエンドポイントの測定結果を表 3-4 に示した。また、形態に関するエンドポイントの測定結果を図 3-1 に示した。

発生段階に関して、セルトラリン濃度に依存的な低下(遅延)傾向がみられ、検定の結果、26.1 及び 79.6 $\mu\text{g/L}$ について、対照区との間に統計学的な有意差(低値)が認められた。形態学的エンドポイントでは、後肢長、頭胴長及び体重に関して、セルトラリン濃度に依存する低下がみられ、検定の結果、いずれも 26.1 及び 79.6 $\mu\text{g/L}$ について、対照区との間に統計学的な有意差(低値)が認められた。

表 3-4 暴露終了時の発生段階及び形態に関するエンドポイントの測定結果

測定濃度 ($\mu\text{g/L}$)	発生段階	後肢長 (mm)	頭胴長 (mm)	体重(湿重量) (mg)
対照区	60.0 (59.0 – 60.0)	17.4 $\pm$ 1.14	27.0 $\pm$ 0.27	1593 $\pm$ 70.0
8.61	59.0 (59.0 – 59.0)	16.6 $\pm$ 0.64	26.5 $\pm$ 0.46	1463 $\pm$ 40.1
26.1	58.5 (58.0 – 59.0)(*)	14.0 $\pm$ 1.01 (*)	25.5 $\pm$ 0.39 (*)	1280 $\pm$ 55.6 (*)
79.6	57.0 (56.0 – 57.0)(*)	6.70 $\pm$ 0.56 (*)	20.4 $\pm$ 0.81 (*)	636 $\pm$ 62.1 (*)

注) 発生段階は容器中央値に基づく4試験水槽の中央値及び(最小-最大)、後肢長、頭胴長及び体重は、容器平均値に基づく平均 $\pm$ 標準偏差、(*)は統計学的に対照区との間に有意差($p < 0.05$)が認められたことを示す。

(3) 暴露終了時の甲状腺組織

暴露終了時(21 日後)の対照区及び 26.1 $\mu\text{g/L}$ (暴露終了時に発生段階に関して対照区との間に有意差が認められた最低濃度)における甲状腺組織の典型症例に関する診断結果(重症度(Grade)が 0、 ≥ 1 (1 以上の合計(以下、同じ))、 ≥ 2 及び ≥ 3 と診断された個体数)を表 3-5 に示した。なお、対照区は、4つの試験水槽に関して、それぞれ発生段階が NF stage 60 であった 5 個体(計 20 個体)を検査に供したが、セルトラリンの 26.1 $\mu\text{g/L}$ では、NF stage 60 の個体が 5 個体未満であった試験水槽があったため、NF stage 60 の 10 個体に加えて NF stage 59 の 10 個体を検査に供した。

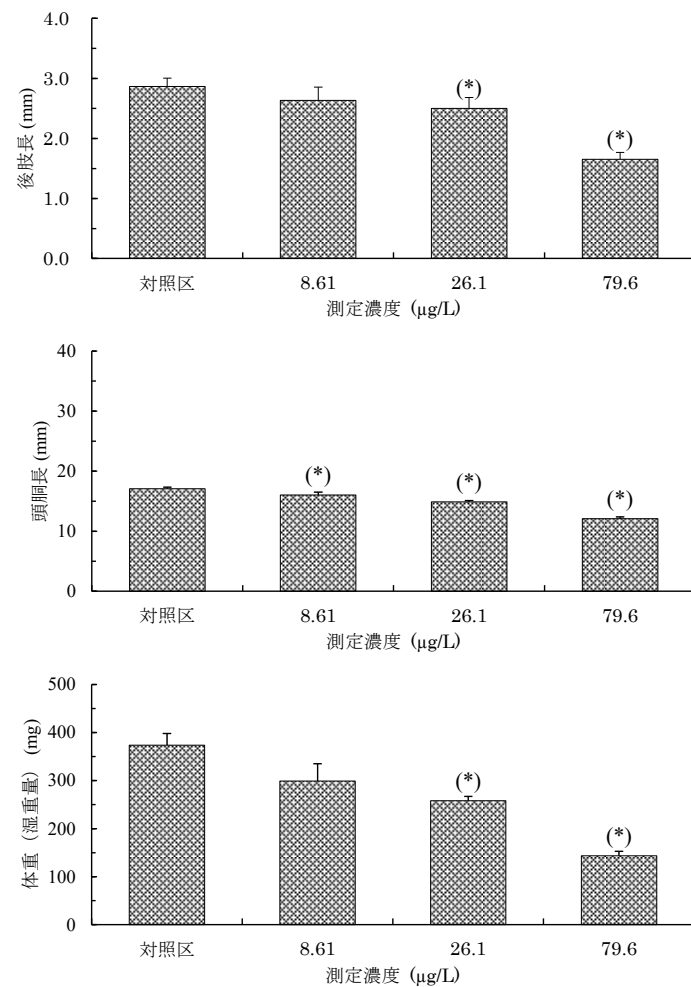
対照区では、Thyroid gland hypertrophy(甲状腺肥大)、Thyroid gland atrophy(甲状腺萎縮)、Follicular cell hypertrophy(濾胞上皮細胞の肥大)及び Follicular cell hyperplasia(濾胞上皮細胞の過形成)の全典型症例に関して、検査に供した全 20 個体で重症度(Grade)が 0 であった。セルトラリンの 26.1 $\mu\text{g/L}$ では、Thyroid gland hypertrophy 及び Follicular cell hyperplasia に関して、検査に供した全 20 個体で重症度が 0 であったが、Thyroid gland atrophy 及び Follicular cell hypertrophy に関して、それぞれ 3 個体及び 1 個体について重症度が 1 と診断された。また、検定の結果、Thyroid gland atrophy の重症度が 1(以上)と診断された個体数に関して、対照区との間に統計学的な有意差(高値)が認められた。

表 3-5 暴露終了時における甲状腺の組織学的検査の結果

測定濃度 ($\mu\text{g/L}$)	Thyroid gland hypertrophy (甲状腺肥大)			
	Grade 0	$\geq$ Grade 1	$\geq$ Grade 2	$\geq$ Grade 3
対照区	20 / 20	0 / 20	0 / 20	0 / 20
26.1	20 / 20	0 / 20 (ns)	0 / 20 (ns)	0 / 20 (ns)
測定濃度 ($\mu\text{g/L}$)	Thyroid gland atrophy (甲状腺萎縮)			
	Grade 0	$\geq$ Grade 1	$\geq$ Grade 2	$\geq$ Grade 3
対照区	20 / 20	0 / 20	0 / 20	0 / 20
26.1	17 / 20	3 / 20 (*)	0 / 20 (ns)	0 / 20 (ns)
測定濃度 ($\mu\text{g/L}$)	Follicular cell hypertrophy (濾胞上皮細胞の肥大)			
	Grade 0	$\geq$ Grade 1	$\geq$ Grade 2	$\geq$ Grade 3
対照区	20 / 20	0 / 20	0 / 20	0 / 20
26.1	19 / 20	1 / 20 (ns)	0 / 20 (ns)	0 / 20 (ns)
測定濃度 ($\mu\text{g/L}$)	Follicular cell hyperplasia (濾胞上皮細胞の過形成)			
	Grade 0	$\geq$ Grade 1	$\geq$ Grade 2	$\geq$ Grade 3
対照区	20 / 20	0 / 20	0 / 20	0 / 20
26.1	20 / 20	0 / 20 (ns)	0 / 20 (ns)	0 / 20 (ns)

注) データは検査に供した個体数(20 個体)のうち該当の重症度以上と診断された個体数、(*)は対照区との間に統計学的な有意差が認められたこと($p < 0.05$)、(ns)は統計学的な有意差が認められなかったことを示す。

暴露 7 日後



暴露終了時

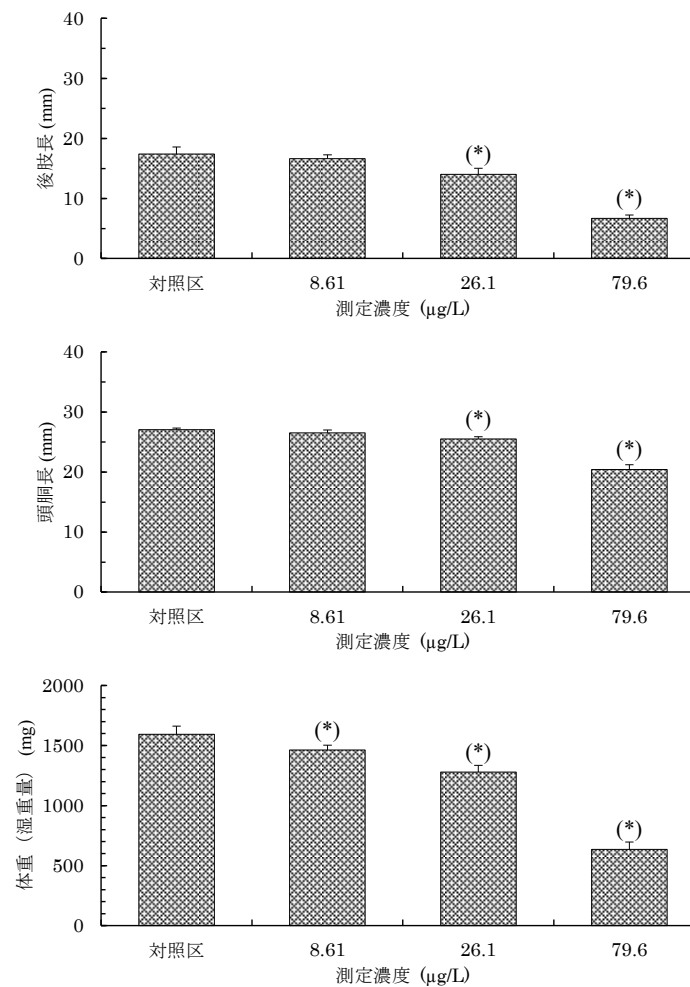


図 3-1 暴露 7 日後及び終了時(21 日後)の発生段階及び形態に関するエンドポイントの測定結果

注) グラフは容器平均を基に算出した平均と標準偏差、(*)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。

4. まとめ及び考察

本試験から得られたセルトラリンの各エンドポイントに対する最小影響濃度 (LOEC) 及び最大無影響濃度 (NOEC) を表 4 に整理した。

本試験では、試験生物の発生段階に関して、暴露 7 日後及び 21 日後 (終了時) ともに、セルトラリン濃度に依存的な低下 (発達の遅延) がみられ、暴露 21 日後における LOEC は 26.1 µg/L、NOEC は 8.61 µg/L であった。形態に関するエンドポイントについても、暴露 7 日後及び 21 日後ともに、後肢長、頭胴長及び体重に関して、セルトラリン濃度に依存的な低下 (発達の遅延) がみられ、暴露 21 日後における LOEC は、後肢長及び頭胴長では 26.1 µg/L、体重では 8.61 µg/L であった。また、暴露 21 日後における発生段階に対する LOEC である 26.1 µg/L では、甲状腺の組織学的検査の結果、Thyroid gland atrophy (甲状腺萎縮) に関して、重症度が 1 以上と診断された個体の割合に統計学的に有意な増加が認められた。以上のとおり、本試験の結果から、セルトラリンは、アフリカツメガエル幼生に対して、有意な死亡が認められない濃度範囲において、発達 (変態) を有意に遅延させることが示唆された。

OECD TG231 では、AMA から得られた結果の解釈に関する Decision logic が示されており (別添-2 参照)、これに従うと、本試験では、死亡及び行動等の異常が観察されなかった 26.1 µg/L において甲状腺組織に有意な変化 (Thyroid gland hypertrophy) が認められたことから、試験物質 (セルトラリン) は甲状腺軸に対する作用を有すると判断される。しかし一方で、79.6 µg/L では、死亡及び行動等の明らかな異常は観察されなかったが、ほぼ暴露期間を通して摂餌量が低下していたことが示唆された。セルトラリンは、選択的セロトニン再取り込み阻害薬 (Selective serotonin reuptake inhibitors) であり、既存文献*で報告されているように、本試験でもセロトニンレベルの上昇に関連して摂餌量が低下し、それに伴う成長低下の副次的な影響として発達 (変態) が遅延した可能性も考えられる。ただし、セルトラリンの抗甲状腺ホルモン作用が摂餌量の低下 (摂餌行動の抑制) に関与している可能性も否定できないことから、本試験から得られた結果とセルトラリンの両生類に対する内分泌かく乱作用の関連性 (抗甲状腺ホルモン作用の有無) は判断できなかった。

※ Connors DE, Rogers ED, Armbrust KL, Kwon JW and Black MC (2009) Growth and development of tadpoles (*Xenopus laevis*) exposed to selective serotonin reuptake inhibitors, fluoxetine and sertraline, throughout metamorphosis. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 28 (12), 2671-2676.

表 4 AMA から得られたセルトラリンのアフリカツメガエルに対する LOEC 及び NOEC

エンドポイント			LOEC (μg/L)		NOEC (μg/L)	
暴露7日後	発生段階		↓	79.6	26.1	
	形態	後肢長	↓	26.1	8.61	
		頭胴長	↓	8.61	ND	
		体重（湿重量）	↓	26.1	8.61	
暴露21日後	死亡		—	ND	79.6	
	発生段階		↓	26.1	8.61	
	形態	後肢長	↓	26.1	8.61	
		頭胴長	↓	26.1	8.61	
		体重（湿重量）	↓	8.61	ND	
	甲状腺	Thyroid gland hypertrophy	—	ND	26.1	
		Thyroid gland atrophy	↑	26.1	ND	
		Follicular cell hypertrophy	—	ND	26.1	
		Follicular cell hyperplasia	—	ND	26.1	
試験濃度 (μg/L)			8.61, 26.1, 79.6			

注) 「↑」、「↓」は濃度依存的又は有意な増加又は低下がみられたこと、「—」は統計学的に有意な反応がみられなかったこと、「ND」は LOEC 又は NOEC が得られなかったことを示す。

Table 1. Severity grading scheme for thyroid gland hypertrophy.

Grade	Descriptor	Criteria
0	Non-remarkable	Less than 20% enlargement of glands in comparison to controls.
1	Mild	Diffuse enlargement of glands that exceeds control glands size by 30-50%.
3	Moderate	Diffuse enlargement of glands that exceeds control glands size by 60-80%.
4	Severe	Diffuse enlargement of glands that exceeds control glands size by over 80%. There is contact of both glands at the midline and they exceed normal boundaries into surrounding tissue space.

Table 2. Severity grading scheme for thyroid gland atrophy.

Grade	Descriptor	Criteria
0	Non-remarkable	Less than a 20% reduction in size in comparison to controls.
1	Mild	Gland size is 30-50% reduced from the size of control glands.
2	Moderate	Gland size is 60-80% reduced from the size of control glands.
3	Severe	Gland size is over 80% reduced from the size of control glands.

Table 3. Severity grading scheme for follicular cell hypertrophy.

Grade	Descriptor	Criteria
0	Non-remarkable	Fewer than 20% of the cells exhibit hypertrophy.
1	Mild	30-50% of follicular cells exhibit hypertrophy.
2	Moderate	60-80% of follicular cells exhibit hypertrophy.
3	Severe	Over 80% of follicular cells exhibit hypertrophy.

Table 4. Severity grading scheme for follicular cell hyperplasia.

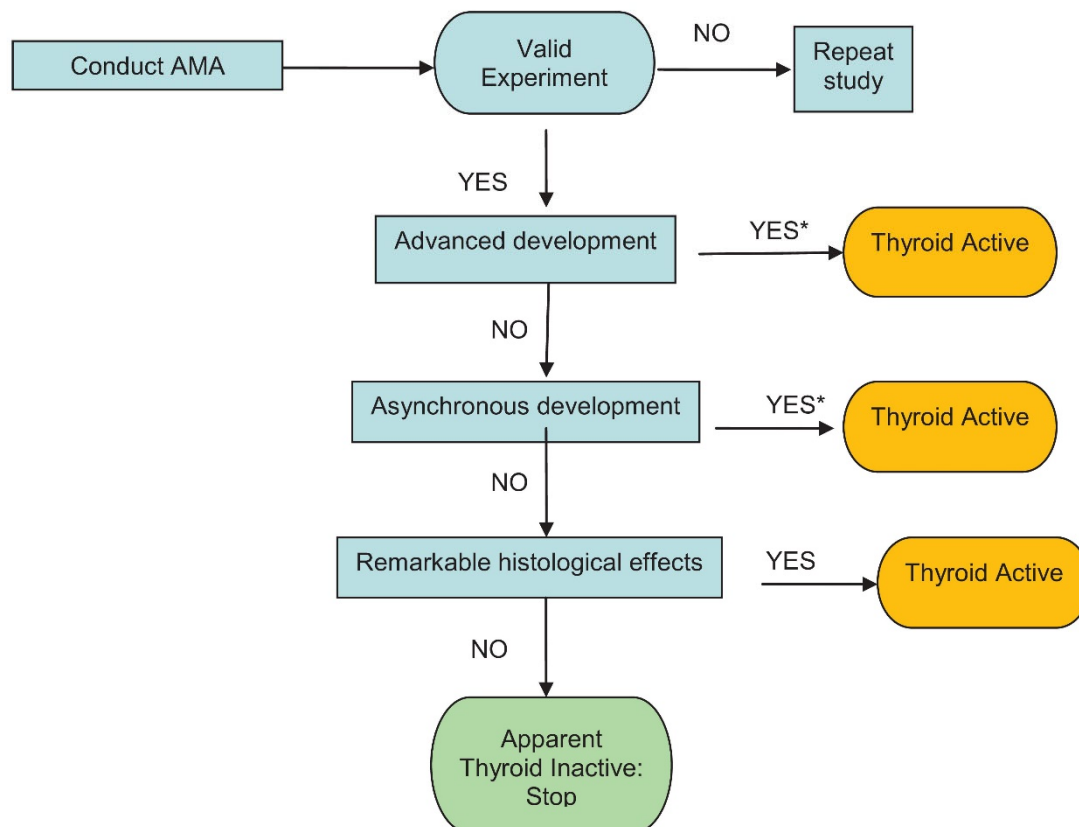
Grade	Descriptor	Criteria
0	Non-remarkable	Focal or diffuse crowding of follicular cells affecting less than 20% of the tissue.
1	Mild	Focal or diffuse crowding of follicular cells affecting 30-50% of the tissue, and/or single or multiple papillary infoldings of follicular cell layer.
2	Moderate	60-80% of the follicles exhibit focal hyperplasia characterized by pseudostratified or stratified follicular epithelium – papillary infolding may be present.
3	Severe	Over 80% of follicles exhibit extensive hyperplasia with stratification 2-3 cell layers thick – papillary infolding may be present.

注) OECD Series on Testing and Assessment No.82: Guidance Document on Amphibian Histology より引用

Decision logic for the conduct of the AMA

46. Decision logic was developed for the AMA to provide logical assistance in the conduct and interpretation of the results of the bioassay (see flow chart in [Figure 3](#)). The decision logic, in essence, weighs the endpoints in that advanced development, asynchronous development, and thyroid histopathology are weighed heavily, while delayed development, snout-vent length and wet body weight, parameters that can potentially be affected by general toxicity, are weighed less heavily.

Figure 3. Decision logic for the conduct of the AMA.



注) OECD Guideline for the testing of chemicals No.231: Amphibian Metamorphosis Assay より引用