

化学物質の内分泌かく乱作用に関する第一段階生物試験
(幼若メダカ抗アンドロゲン作用検出試験、酢酸クロルマジノン)
の結果について(案)

いであ株式会社

1. 実施概要

酢酸クロルマジノンについて、OECD ガイダンスドキュメント No.379 (GD379) Guidance Document on a Juvenile Medaka anti-androgen screening assay (JMASA) (2023 年 7 月 24 日採択) に準拠して、幼若メダカ抗アンドロゲン作用検出試験を実施した。

JMASA は、図1に示すように、受精後 35～42 日齢の二次性徴(尻びれの乳頭状小突起)が発現前の幼若期にあるミナミメダカ (*Oryzias latipes*) を試験生物とする。試験では、各水槽に 7 個体を収容し、28 日間(4 週間)にわたり試験物質(化学物質)に暴露する。暴露終了時に、二次性徴に関するエンドポイントとして、乳頭状小突起を発現している尻びれ鰭条の節板数を測定する。また、全個体について、性決定遺伝子(DMY 遺伝子)の有無から遺伝型(XY 又は XX)を判別し、遺伝型 XY 個体における二次性徴の変化(抑制)から、試験物質の試験生物に対する抗アンドロゲン作用の有無を評価(スクリーニング)する。

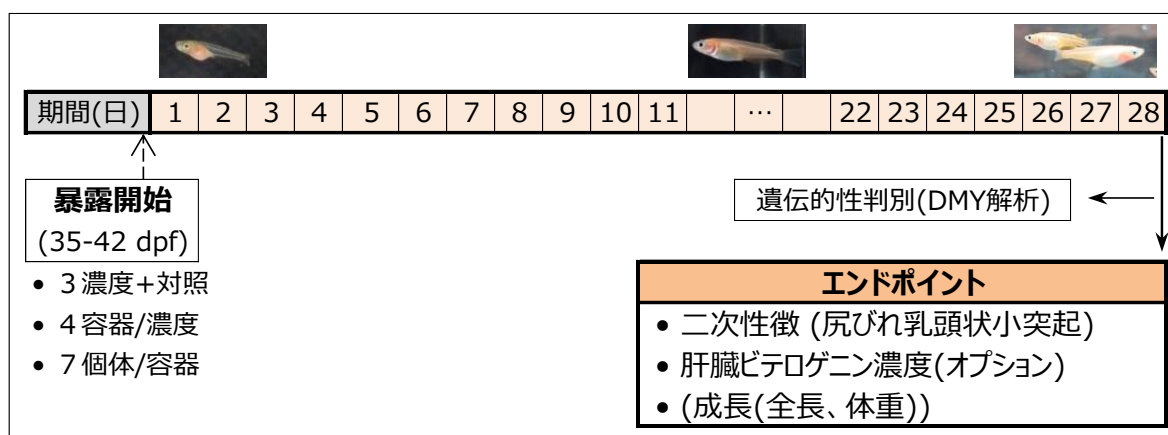


図 1 幼若メダカ抗アンドロゲン作用検出試験(JMASA)の概要

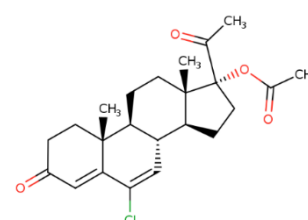
2. 材料及び方法

2-1. 試験物質

試験物質の識別及び物理化学的性状等の情報⁽¹⁾

一般名: 酢酸クロルマジノン (Chlormadinone acetate)

CAS RN: 302-22-7



分子式: $C_{23}H_{29}ClO_4$
分子量: 404.93
融点: $213^{\circ}C$ (Experimental value)
沸点: 389 to $513^{\circ}C$ (Predicted range)
水溶解度: 3.95×10^{-7} mol/L (Experimental value)
蒸気圧: 1.28×10^{-7} to 1.50×10^{-7} mm Hg (Predicted range)
Log Kow: 3.14 to 3.72 (Experimental range)

試験に供した試薬

供給者: LKT Laboratories, Inc.
ロット: 23924503
純度: 98.7% (UHPLC)

2-2. 試験濃度(設定濃度)

OECD GD379 では、試験濃度について、(1) 試験物質の最大耐用濃度(試験生物に対する毒性)、(2) 試験物質の水溶解度(又は試験液を調製可能な最高濃度)、(3) 10 mg/L、のうち、最も低い濃度を試験最高濃度に設定する、としている。

酢酸クロルマジノンの水溶解度については、実験値が 0.16 mg/L (3.95×10^{-7} mol/L)、モデルによる推定値が 2.2~25.0 mg/L (5.35×10^{-6} ~ 6.17×10^{-5} mol/L)、との既存知見が得られた。また、試験施設で実施した検討では、脱塩素水道水(試験用水)に過剰量の試験物質を添加し、48 時間かく拌後に遠心処理した試料中の酢酸クロルマジノン濃度は 0.93 ± 0.07 mg/L (N=3) であった。これらの結果から、酢酸クロルマジノンの水溶解度は、(3) 10 mg/L より低いと判断し、本試験では、(1) 試験物質の最大耐用濃度、又は(2) 試験液を調製可能な最高濃度、を最高濃度とすることにした。

酢酸クロルマジノンの最大耐用濃度に関して、試験生物(ミナミメダカ)を含む魚類に対する急性又は慢性毒性値等の既存知見は得られなかったため、試験施設において、ミナミメダカを用いた急性毒性試験を実施した。暴露濃度(設定濃度)は、160、320、640 及び 1,280 μ g/L の 5 濃度、試験液を 24 時間ごとに全量交換する半止水方式により、試験生物(7 個体/濃度)を 96 時間暴露した。試験液は、助剤としてアセトニトリルを用いて調製し、酢酸クロルマジノン濃度は、液体クロマトグラフ質量分析計(LC-MS/MS)により、調製直後及び 24 時間経過後に採取した試料(n=2)で測定した。その結果、測定濃度の設定濃度に対する割合(回収率)は、調製直後の試験液で 51~80%、24 時間経過後の試験液で 43~70%であり、設定濃度が高い試験液で相対的に低い傾向にあり、助剤に溶解させて添加した試験物質の一部が添加後に試験液中に析出し、そのまま溶解しなかった可能性が示唆された。なお、調製直後及び 24 時間経過後の測定濃度から算出した平均測定濃度(時間加重平均)は、113、225、394 及び 657 μ g/L であった(以下では、平均測定濃度に基づいて急性毒性試験の結果を示す)。

急性毒性試験の結果、暴露 96 時間後の累積死亡率は、113 及び 225 μ g/L が 0%、394 μ g/L が 57%、657 μ g/L が 71%であり、それらを基に算出した 96 時間半数致死濃度(96h-LC₅₀)は 446 μ g/L となった。657 μ g/L では、暴露開始の 1 時間後から過活発な遊

泳など行動異常が観察され、8 時間後には全個体が横転(浮力喪失)し、24 時間後に最初の死亡(1 個体)が確認された。また、394 $\mu\text{g/L}$ でも、暴露開始の 2 時間後から過活発な遊泳など行動異常が観察され、24 時間後には全個体でバランス喪失など重篤な毒性症状が観察された。この濃度では、暴露開始から 56 時間後に最初の死亡(2 個体)が確認された。225 $\mu\text{g/L}$ では、暴露期間を通して重篤な毒性症状は観察されなかったが、遊泳中に体軀を”くの字状”に屈曲させる行動が観察された。この体軀の屈曲こ行動については、394 $\mu\text{g/L}$ 及び 657 $\mu\text{g/L}$ でも頻繁に観察されたことから、酢酸クロルマジノンの毒性によると考えられた。これらの結果から、酢酸クロルマジノンは、(2) 試験液を調製可能な最高濃度、より低い濃度で試験生物に毒性影響を及ぼす、と判断し、本試験の最高濃度は、以下のとおり、(1) 魚類に対する毒性を考慮して設定した。

試験物質の最大耐用濃度について、OECD GD379 では、暴露による急性の死亡率が 10%を超えない最高濃度と定義し、一般的には、 LC_{50} の 1/10 又は 1/3 に近い濃度が想定されるとしている。また、試験物質の一般毒性による成長抑制が、JMASA で重要な尻びれ鰭条における乳頭状小突起の発達を著しく遅延させる可能性があるとしている。本試験の最高濃度について、試験施設で実施した急性毒性試験における 96h- LC_{50} (446 $\mu\text{g/L}$) を考慮すると、その 1/3 相当の 149 $\mu\text{g/L}$ 又は 1/10 相当の 45 $\mu\text{g/L}$ が目安となる。また、急性毒性試験では、225 $\mu\text{g/L}$ で酢酸クロルマジノンの毒性による行動異常が観察されたことから、暴露期間が 28 日間の JMASA では、96h- LC_{50} の 1/3 に近い濃度(149 $\mu\text{g/L}$) でも試験生物の成長が低下する可能性が高く、96h- LC_{50} の 1/10 に近い濃度(45 $\mu\text{g/L}$)を試験最高濃度とすることが妥当と判断した。

本試験では、以上を勘案して、50 $\mu\text{g/L}$ を最高濃度、公比を 3.2($\sqrt{10}$)とする以下の 3 濃度を試験濃度とした。

試験濃度(設定濃度): 5.00、16.0、50.0 $\mu\text{g/L}$

2-3. 試験生物

試験には、試験施設で 20 年間以上にわたり累代飼育しているミナミメダカ (*Oryzias latipes*、NIES-R 系と同履歴のヒメダカ系群)を使用した。本試験には、親魚から採卵した受精卵を培養し、ふ化後、試験と同じ環境及び希釈水で飼育し、試験環境に順化させた受精後 41 日齢の個体(稚魚)を供した。供試した稚魚に関して、供試前 7 間の死亡率は 0%であり、供試時の全長及び体重(平均 $\pm$ 標準偏差)は、16.6 $\pm$ 0.8 mm 及び 48.3 $\pm$ 9.2 mg であった(サブサンプル 12 個体で測定)。また、このサブサンプルについて、二次性徴を観察した結果、全個体で尻びれに乳頭状小突起の発現はみられなかった。

2-4. 試験液の調製

事前検討の結果から、酢酸クロルマジノンは水溶解度が低く、助剤を使用しても機械的かく拌など一般的な手法では、試験原液として必要な飽和に近い濃度の水溶液を調製することは難しいと判断し、本試験では、サチュレーターを用いて脱塩素水道水(希釈水)に酢酸クロルマジノンを継続的に溶解させることにより得られる飽和濃度に近い水溶液を試験原液とした(試験原液中の酢酸クロルマジノン濃度は 1,100 $\mu\text{g/L}$ を想定)。

試験では、上記の試験原液を用いて、試験装置のミニダイリ्यूーターにより各設定濃度の試験液を連続的に調製し、所定の流量で試験水槽に供給した。試験原液は、毎日、新たにサチュレーターから分取したものを試験装置に供給した。

2-5. 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試験装置を用い、OECD GD379 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:	ミナミメダカ (<i>Oryzias latipes</i>)、受精後 41 日齢
試験期間:	28 日間
試験濃度:	5.00、16.0、50.0 µg/L 及び対照区
連数:	4 連(容器)/濃度
供試生物数:	7 個体/容器
試験水槽:	3 L 容硬質ガラス製水槽
試験水量:	2 L
試験液流量:	11.2 mL/min(換水率:8 回/日)
希釈水:	活性炭を通した水道水(脱塩素水道水)
試験水温:	25±1℃
光周期:	16 h-L/8 h-D
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

2-6. 試験物質濃度の測定

暴露開始日、暴露 7 日後、14 日後、21 日後及び 28 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、液体クロマトグラフ質量分析計(LC-MS/MS)により酢酸クロルマジノン濃度を定量した(定量下限:0.044 µg/L)。

2-7. エンドポイント等の測定

暴露終了時に、対照区及び酢酸クロルマジノンの各濃度について、生存する全個体を取り上げ、全長、体重及び二次性徴を測定した。また、エンドポイントの測定に供した個体については、性決定遺伝子(DMY 遺伝子)に基づいて遺伝型(XY、XX)を判別した。

全長及び体重の測定

試験容器から取り上げた個体を麻酔後、電子ノギス及び電子天秤を用いて全長及び体重を測定した。

二次性徴

実体顕微鏡下で尻びれを上げた状態で撮影し、後日、画像上で乳頭状小突起が発現(形成)している尻びれ鰭条の節板数を計数した。

遺伝型判別

遺伝型判別用に採取した尾びれ組織片から抽出した DNA を試料として、PG17.5 及び PG17.6 のプライマーセットを用いて PCR を行い、増幅した標的遺伝領域をアガロースゲルで電気泳動した。電気泳動像で 2 本のバンド (*dmy* 及び *dmrt1* の DNA 領域) が確認できた個体を遺伝型 XY、1 本のみ (*dmrt1* の DNA 領域) の個体を遺伝型 XX と判別した。また、上記の判別で遺伝型 XX と判断された個体の中に、オスの表現型 (尻びれ鰭条の乳頭状突起の発現、精巣様の生殖腺) を持つ個体がみられたため、これらの個体については、異なるプライマーセット (*Dmy/Dmrt1-ex2f* 及び *Dmy/Dmrt1-ex2r*) ⁽²⁾ を用いた PCR を行い、遺伝型が最初の判別結果と一致することを確認した。

2-7. 統計解析

二次性徴並びに全長及び体重の測定結果について、OECD GD379 ANNEX 6 に示されたフローを参考に、以下の手順により、各濃度区と対照区の間有意差が認められるかを統計学的に解析 (検定) した。検定は、遺伝型ごとに行い、有意水準 (*p*) は 0.05 とした。

二次性徴については、単調性は認められるが、等分散性が認められなかったため、容器中央値を用いて、step-down Jonckheere-Terpstra test により検定した。全長及び体重については、容器平均値に等分散性が認められたため、容器平均値を用いて Dunnett test により検定した。

2-8. 試験の許容基準 (Validity of the Test)

- the mean mortality in the water controls and, where relevant, in the solvent controls, should not exceed 10 per cent at the end of the exposure period;
- the concentrations of the test chemical in each test vessel is satisfactorily maintained within $\pm 20\%$ of the mean measured value in the treatment group;
- the dissolved oxygen concentration should be at least 60 % of the air saturation value (ASV) in each test vessel throughout the exposure period;
- the water temperature should not differ by more than ± 1 °C between test vessels at any one time during the exposure period and should be maintained within the temperature range specified;
- the number of males per tank should be at least one in at least three out of four replicates;

3. 結果

3-1. 試験濃度

暴露期間中の試験液の酢酸クロルマジノン濃度の測定結果を表 3-1 に示す。

試験液の酢酸クロルマジノンの平均測定濃度は、設定濃度の 105～123%であった。平均測定濃度は、最低濃度 (5.00 µg/L) で設定の±20%を外れたが、暴露期間中の測定濃度は、最低濃度を含む全濃度に関して平均測定濃度±20%の範囲にあった。

表 3-1 試験液の酢酸クロルマジノン濃度の測定結果

設定濃度 (µg/L)	測定濃度 (µg/L)						
	0日後	7日後	14日後	21日後	28日後	平均	標準偏差
対照区	ND	ND	ND	ND	ND	-	-
5.00	6.56 (131) 〈107〉	7.27 (145) 〈119〉	6.38 (128) 〈104〉	5.05 (101) 〈82〉	5.41 (108) 〈88〉	6.14 (123)	0.9 [14.7]
16.0	19.8 (124) 〈105〉	21.1 (132) 〈112〉	20.0 (125) 〈106〉	17.1 (107) 〈91〉	16.1 (100) 〈85〉	18.8 (118)	2.1 [11.3]
50.0	51.1 (102) 〈97〉	56.0 (112) 〈107〉	55.7 (111) 〈106〉	49.1 (98) 〈94〉	50.7 (101) 〈97〉	52.5 (105)	3.1 [6.0]

注) ND は定量下限未満、()内及び〈 〉の数値は設定濃度及び平均測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 に示す。

試験液の水温は、暴露期間を通して 24.5～25.3℃、同一日における水槽間差は 0.5℃以下であった。また、試験液の溶存酸素は 6.8～8.5 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。

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)

測定濃度 (µg/L)	水温 (℃)	溶存酸素 (mg/L)	pH
対照区	24.5 - 25.3	7.0 - 8.4	7.7 - 7.8
6.14	24.4 - 25.2	7.1 - 8.5	7.6 - 7.8
18.8	24.4 - 25.1	7.3 - 8.5	7.6 - 7.8
52.5	24.5 - 25.3	6.8 - 8.5	7.6 - 7.8

注) データは、暴露期間中の範囲(最低－最高)を示す。

3-3. 死亡率及び一般症状

対照区及び酢酸クロルマジノンの各濃度における累積死亡率を表 3-3 に示す。

暴露終了時の累積死亡率は、対照区、酢酸クロルマジノンの 6.14 及び 18.8 µg/L で 0%、52.5 µg/L で 3.6% (暴露開始 26 日後に 1 個体死亡) であった。対照区及び酢酸クロルマジノンの全濃度において、暴露期間中に行動及び外見に明らかな異常が認められる個体は観察されなかった。したがって、本試験では、酢酸クロルマジノンの全濃度に関して、酢酸クロルマジノンの一般毒性によると推察される影響は認められなかった。

3-4. エンドポイント等の測定結果

暴露終了時に生存した個体の遺伝型は、対照区及び酢酸クロルマジノンの全濃度の合計でみると、XY:XX=61:50 (1.0:0.82) であり (表 3-3)、全ての試験容器に関して、遺伝型 XY が 2~6 個体含まれていた。

遺伝型 XX と判別された個体については、表現型 (尻びれにおける乳頭状小突起の発現及び生殖腺の形状) を調べた結果、対照区の 2 個体、酢酸クロルマジノンの 18.8 及び 52.5 µg/L の各 1 個体は明らかなオスの表現型を有していた。この 4 個体については、ミナメダカで既知の発生初期に生じた水温等の環境依存的な性転換個体と判断し、以下の二次性徴、全長及び体重の測定結果の解析 (検定) には用いなかった。

二次性徴

暴露終了時の生存個体における二次性徴の測定結果を表 3-4 及び図 3-4 に示す。

遺伝型 XY 個体の二次性徴 (乳頭状小突起を発現している尻びれ鰭条の節板数) には、酢酸クロルマジノン濃度に依存する明確な低下 (減少) がみられた。検定の結果、18.8µg/L 及び 52.5 µg/L に関して、対照区と比較して統計学的な有意差 (有意な低値) が認められた。酢酸クロルマジノンの 52.5 µg/L では、遺伝型 XY の 15 個体のうち 10 個体で乳頭状小突起が全く発現していなかった。遺伝型 XX 個体については、二次性徴が発現している個体はみられなかった (環境依存的に性転換したと判断した個体は除く)。

全長及び体重

暴露終了時の生存個体における全長及び体重の測定結果を表 3-5 及び図 3-5 に示す。遺伝型 XY 個体では、全長及び体重に関して、酢酸クロルマジノン濃度に依存して増加する傾向がみられた。検定の結果、全長では 52.5 µg/L、体重では 18.8µg/L 及び 52.5 µg/L に関して、対照区との間に有意差 (有意な高値) が認められた。遺伝型 XX 個体では、全長及び体重に関して、酢酸クロルマジノンの全濃度と対照区の間には統計学的な有意差は認められなかった。

表 3-3 暴露終了時の累積死亡率及び生存個体の遺伝型

測定濃度 ($\mu\text{g/L}$)	供試 個体数	累積死亡 個体数	累積死亡率 (%)	遺伝型 XY : XX
対照区	28	0	0	16 : 12
6.14	28	0	0	17 : 11
18.8	28	0	0	13 : 15
52.5	28	1	3.6	15 : 12

表 3-4 暴露終了時の生存個体における二次性徴

測定濃度 ($\mu\text{g/L}$)	二次性徴（乳頭状突起が発現する節板数）	
	遺伝型XY	遺伝型XX
対照区	117 $\pm$ 8.8	0 $\pm$ 0
6.14	113 $\pm$ 6.9	0 $\pm$ 0
18.8	75 $\pm$ 23 (*)	0 $\pm$ 0
52.5	3.5 $\pm$ 4.4 (*)	0 $\pm$ 0

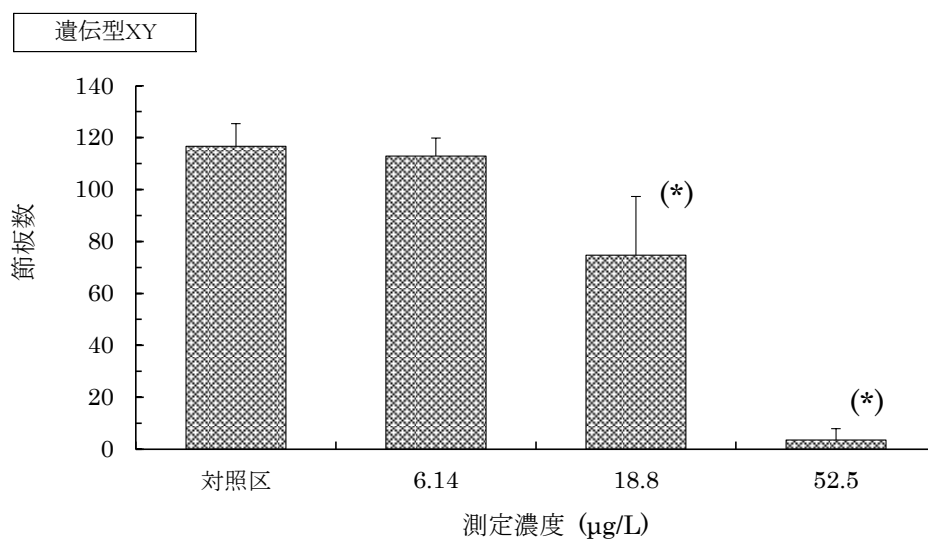


図 3-4 暴露終了時の生存個体(遺伝型 XY)における二次性徴

注) 表及び図中のデータは容器平均 $\pm$ 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。

表 3-5 暴露終了時の全長及び体重

測定濃度 ($\mu\text{g/L}$)	全長 (mm)		体重 (mg)	
	遺伝型XY	遺伝型XX	遺伝型XY	遺伝型XX
対照区	29.9 ± 0.4	31.1 ± 0.2	277 ± 10	377 ± 17
6.14	30.2 ± 0.7	31.2 ± 0.9	287 ± 16	384 ± 18
18.8	30.8 ± 0.4	30.8 ± 0.5	306 ± 18 (*)	361 ± 10
52.5	31.0 ± 0.3 (*)	31.1 ± 0.8	326 ± 6.6 (*)	366 ± 23

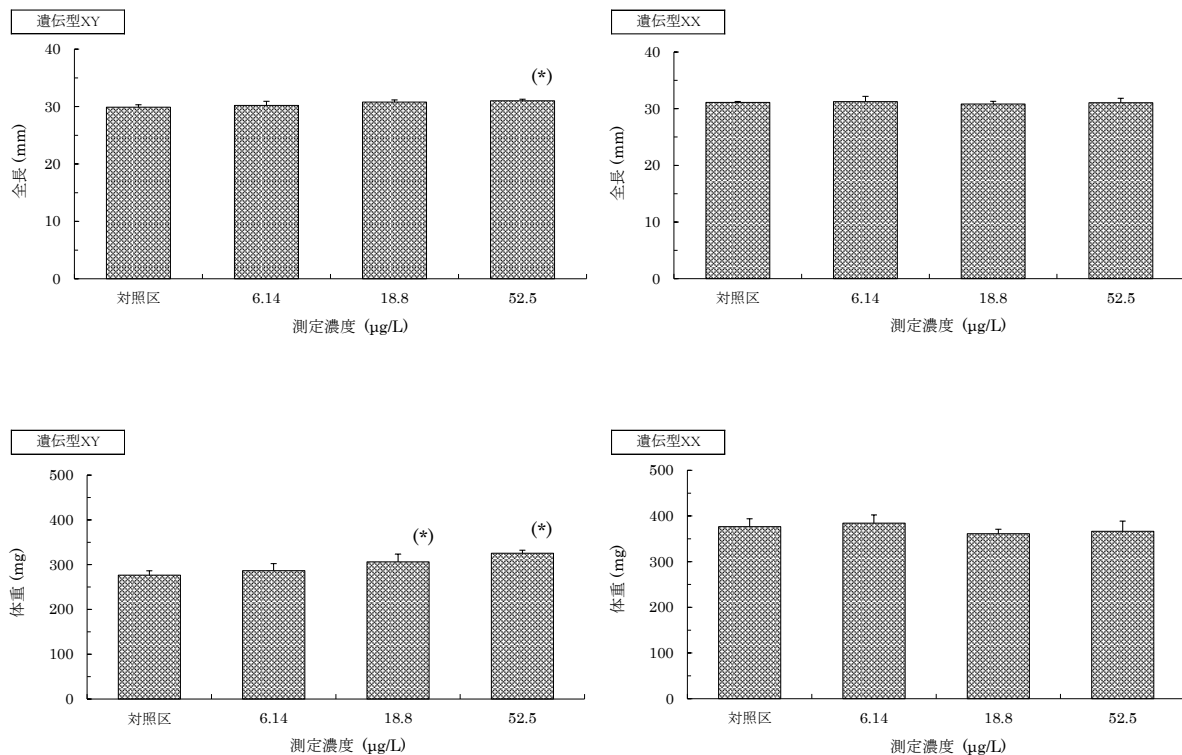


図 3-5 暴露終了時の全長(上図)及び体重(下図)

注) グラフは、容器平均を基に算出した各測定濃度における平均と標準偏差、「*」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

4-1. 試験物質の試験生物に対す抗アンドロゲン作用

対照区及び酢酸クロルマジノンの各濃度における遺伝型 XY 個体の全長と二次性徴の関係を図 4-1 に示す。

OECD GD379 では、試験物質の毒性による成長への影響(成長低下)が明らかな場合には、二次性徴の測定結果の解釈にあたり、その影響を考慮する必要があるとしている。本試験では、酢酸クロルマジノンの各濃度に関して、遺伝型 XY 個体の全長と二次性徴の間に一定の傾向はみられなかった。また、酢酸クロルマジノンの前濃度に関して、暴露終了時の全長及び体重に有意な低下は認められなかった。したがって、酢酸クロルマジノンの 18.8 μ g/L 及び 52.5 μ g/L で認められた二次性徴の統計学的に有意な低下については、酢酸クロルマジノンの毒性の影響ではなく、抗アンドロゲン作用によると考えられる。

以上のとおり、本試験の結果から、酢酸クロルマジノンは、幼若期のミナミメダカに対して抗アンドロゲン作用を有することが示唆された。

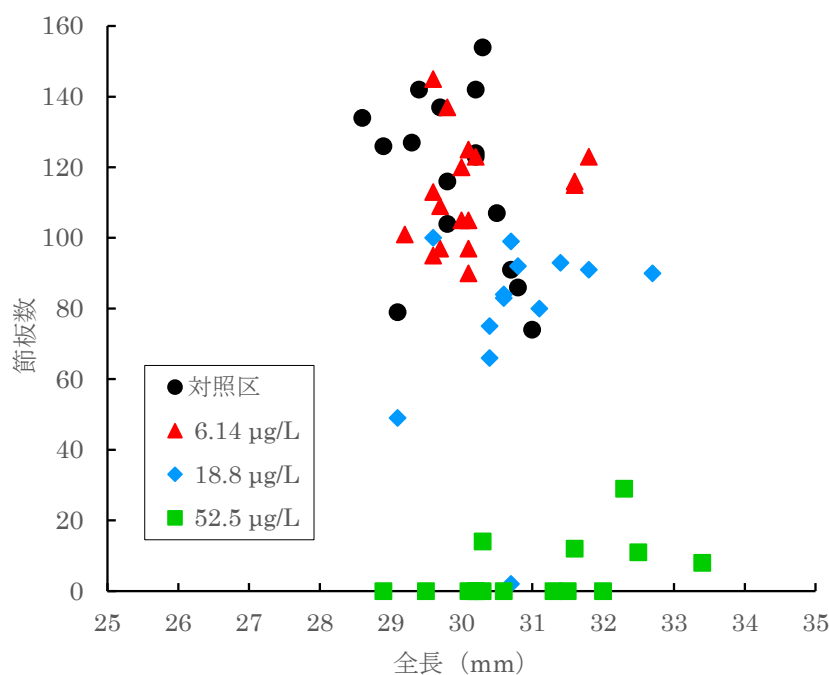


図 4-1 遺伝型 XY 個体における全長と二次性徴の関係

4-2. 最小影響濃度(LOEC)及び最大無影響濃度(NOEC)

本試験から得られた酢酸クロルマジノンの試験生物(幼若期のミナミメダカ)に対する最小影響濃度(LOEC)及び最大無影響濃度(NOEC)を表 4-2 に示す。

本試験の結果から得られた酢酸クロルマジノンの幼若期のミナミメダカの二次性徴に対する LOEC 及び NOEC は、遺伝的 XY 個体では、18.8 μ g/L 及び 6.14 μ g/L であった。また、遺伝的 XX 個体では、LOEC は得られず、LOEC が 52.5 μ g/L であった。

表 4-2 JMASA から得られた酢酸クロルマジノンの
幼若期のミナミメダカに対する LOEC 及び NOEC

エンドポイント		LOEC (µg/L)		NOEC (µg/L)
死亡		—	ND	52.5
二次性徴	遺伝型XY	↓	18.8	6.14
	遺伝型XX	—	ND	52.5
全長	遺伝型XY	↑	52.5	18.8
	遺伝型XX	—	ND	52.5
体重	遺伝型XY	↑	18.8	6.14
	遺伝型XX	—	ND	52.5
測定濃度 (µg/L)		6.14、18.8、52.5		

注) 「↑」、「↓」は統計学的に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。

参考資料

- (1) United States Environmental Protection Agency, CompTox Chemicals Dashboard v2.7.0, Chlormadinone acetate
<https://comptox.epa.gov/dashboard/chemical/details/DTXSID6020274>
- (2) Myosho T., Sato T., Nishiyama H., Watanabe A., Yamamoto J., Okamura T., Onishi Y., Fujimaki R., Hamaguchi S., Sakaizumi M., Kobayashi T. (2019): Inter- and intra-specific variation in sex hormone-induced sex-reversal in medaka, *Oryzias latipes* and *Oryzias sakaizumii*, *Zoological Science*, 36, 425-431.