

第一段階生物試験(魚類短期繁殖試験:2-ナフトール) の結果について(案)

いであ株式会社

1. 実施概要

2-ナフトールについて、OECD Guideline for the testing of chemicals No.229: Fish Short Term Reproduction Assay (Adopted: 2 October 2012) (OECD TG229) に準拠して、ミナミメダカ (*Oryzias latipes*) を試験生物とする魚類短期繁殖試験 (FSTRA) を実施した。

FSTRA は、図1に示すように、性的に成熟し繁殖可能な状態にある雌雄の成魚を試験生物とする。試験では、試験水槽にメス及びオス各3個体を収容し、21 日間にわたり試験物質(化学物質)による暴露を行う。暴露期間中、メスが産んだ卵を回収して産卵数及び受精率を調べる。また、暴露終了時に生存する個体について肝臓中ビテログニン濃度及び二次性徴(乳頭状小突起を発現する尻びれの節板数(メダカを試験生物に用いる場合))を測定する。本試験法については、化学物質のエストロゲン様作用、抗エストロゲン様作用、アンドロゲン様作用、アロマターゼ阻害作用(ステロイド合成阻害作用)のほか、視床下部-下垂体-生殖腺軸系 (HPG 軸) に対する作用も検出可能とされている。

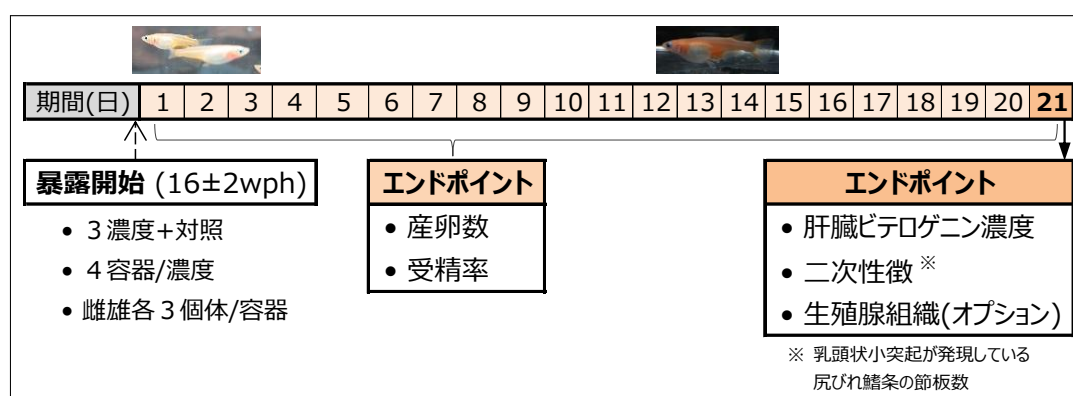


図 1 メダカを試験生物とする魚類短期繁殖試験の概要

2. 材料及び方法

2-1. 試験物質

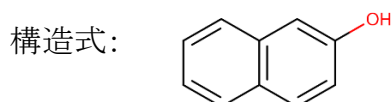
試験物質の識別及び物理化学的性状等の情報 ※

一般名: 2-ナフトール (2-Naphthol)

CAS No.: 135-19-3

分子式: $C_{10}H_8O$

分子量: 144.173



水溶解度: $5.24 \cdot 10^{-3}$ to $6.93 \cdot 10^{-3}$ mol/L (Experimental range)

蒸気圧: $3.20 \cdot 10^{-4}$ mm Hg (Experimental range)

Log Pow: 2.70 (Experimental range)

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

<https://comptox.epa.gov/dashboard/chemical/details/DTXSID5027061>

試験に供した試薬

供給者: 富士フイルム和光純薬株式会社

Lot No.: PAK0249

純度: 99.8%

2-2. 試験濃度(設定濃度)

OECD TG229 では、試験濃度について、(1)死亡率が結果的に 10%を超えない最高濃度と定義する試験物質の最大許容濃度(maximum tolerated concentration)、(2) 10 mg/L、(3) 試験物質の水溶解度、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。

2-ナフトールのメダカに対する毒性に関して、96 時間の急性毒性試験における半数致死濃度(96h-LC₅₀)が 3970 µg/L(設定濃度)との既存知見がある(環境省(2005):平成 16 年度生態影響試験)。また、試験施設において、18 週齢のミナミメダカ(全長 30 mm 前後)を用いて、1.0、2.0、4.0 及び 8.0 mg/L の濃度設定で、半止水式(24 時間ごとに試験液の全量を交換)による 96 時間急性毒性試験を実施した結果、96h-LC₅₀ は 3.6 mg/L であった。この試験では 96 時間後の死亡率は、8.0 mg/L が 100%、4.0 mg/L が 71%であり、2.0 及び 1.0 mg/L では 0%であったが、2.0 mg/L では、72 時間後以降は全個体が水槽底で停滞(着底)し、1.0 mg/L でも、96 時間後に水槽底で断続的に停滞する個体が観察された。以上の知見より、2-ナフトールについては、10 mg/L 及び水溶解度よりも毒性に対する最大許容濃度が相対的に低いと考えられることから、本試験の試験濃度は、2-ナフトールのミナミメダカに対する毒性を考慮して設定した。

試験物質の毒性に基づく濃度設定に関して、2008 年 10 月の OECD Fish Drafting Group meeting では、試験最高濃度について LC₅₀ の 1/3 と 1/10 のどちらを目安にするべきかが議論され、会議参加の専門家より、試験最高濃度の設定は難しいが、経験から LC₅₀ の 1/10 がより適切であるように思われる、との意見が出されている。この考え方に基くと、2-ナフトールのミナミメダカに対する 96h-LC₅₀ は 3.6 mg/L であり、その 1/10~1/3 に相当する 0.36~1.2 mg/L が FSTRA で設定する試験最高濃度の目安となる。しかし、試験実施施設で実施した急性毒性試験では、1.0 mg/L でも、軽微ではあるものの 2-ナフトールの毒性によると推

察される影響(水槽底での停滞)が観察されていることから、FSTRA では、これより低い濃度での実施が妥当と考えられた。一方で、FSTRA は第1段階試験(スクリーニング試験)として実施することから、試験最高濃度については、試験物質の毒性影響がみられない範囲で高い濃度を設定することが望ましい。

以上を勘案して、FSTRA の試験濃度(2-ナフトール濃度)は、18 週齢のミナミメダカを用いた 96 時間の急性毒性試験で軽微な毒性影響が確認された濃度の 1/2(500 µg/L)を最高濃度、公比を 3.2($\sqrt{10}$)とする以下の 3 濃度とした。

試験濃度(設定濃度): 50.0、158、500 µg/L

2-3. 試験生物

試験には、性的に成熟したミナミメダカ(*Oryzias latipes*)の成魚(試験実施施設で 22 年間累代飼育している入手源が NIES-R 系と同じ系群)を用いた。暴露開始時における試験生物の週齢は 16 週齢であった。試験生物は、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。試験では、この順化期間の終わり 7 日間の平均受精卵数を基に、試験濃度間に偏りが生じないように試験生物(水槽)を割り当てた。暴露開始前 7 日間の平均受精卵数は 23.5~29.4 eggs/day/female 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:	ミナミメダカ(<i>Oryzias latipes</i>)、16 週齢
試験期間:	21 日間
試験濃度:	50.0、158、500 µg/L 及び対照区
連数:	4 連(容器)/濃度
供試生物数:	6 個体(オス 3 個体、メス 3 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:	21 mL/min(換水率:15 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

2-5. 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 2-ナフトール濃度を定量した(定量下限:0.57 µg/L)。

2-6. エンドポイント測定

エンドポイントとして、暴露期間中に産卵状況(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)、暴露終了時に生存個体を対象にビテロゲニン(肝臓中濃度)及び二次性徴(乳頭状突起を有する尻びれ鰭条の節板数)を測定した。また、OECD TG229 が規定するエンドポイントには含まれないが、試験物質の影響を検討する参考データとして、暴露終了時の生存個体について肝臓体指数及び生殖腺体指数を測定した。

ビテロゲニンは、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-liver)。二次性徴は、解剖時に尻びれを上げた状態で撮影し、後日、それらの画像上で乳頭状小突起が発現している節板を計数した。

2-7. 統計解析

各エンドポイント(肝臓体指数及び生殖腺体指数を含む)の統計解析(検定)には、測定値の容器平均値を用いた。ビテロゲニンに関して、定量下限未満であった個体は、定量下限の半数値(0.5 ng/mg)を容器平均の算出に用いた。検定では、はじめに対照区及び各濃度区のデータについて、等分散性を Bartlett's test により検定した。等分散性が認められたデータ(エンドポイント)については Dunnett test により、等分散性が認められなかったデータについては、Steel's test により、対照区と各試験濃度間における有意差の有無を検定した。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 2-ナフトール濃度の測定結果を表 3-1 に示した。

試験液の 2-ナフトールの平均測定濃度は、設定濃度の 100～107%であった。測定濃度は、暴露期間を通して設定±20%の範囲にあったが、最低設定濃度(50 µg/L)では、7 日後の測定濃度が平均測定濃度の 80%を下回った(試験原液添加量の一時的な低下が原因と推定)。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 2-ナフトール濃度の測定結果

設定濃度 (µg/L)	測定濃度 (µg/L)					
	0日後	7日後	14日後	21日後	平均	標準偏差
対照区	ND	ND	ND	ND	-	-
50.0	53.4 (107) 〈102〉	40.6 (81) 〈77〉	58.5 (117) 〈111〉	58.0 (116) 〈110〉	52.6 (105)	8.3 [15.9]
158	173 (109) 〈102〉	150 (95) 〈89〉	179 (113) 〈106〉	172 (109) 〈102〉	169 (107)	12.7 [7.5]
500	520 (104) 〈104〉	462 (92) 〈92〉	492 (98) 〈98〉	535 (107) 〈107〉	502 (100)	32.2 [6.4]

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 に示した。

試験液の水温は、暴露期間を通して 24.5～25.4℃、同一日における水槽間差は 0.3℃以下であった。また、試験液の溶存酸素は 5.6～7.9 mg/L の範囲にあり、暴露期間を通して飽和の 60%以上を維持しており、いずれも OECD TG229 で規定された基準を満たしていた。

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)

測定濃度 (µg/L)	水温 (°C)	溶存酸素 (mg/L)	pH
対照区	24.6 - 25.4	5.6 - 7.9	7.3 - 7.8
52.6	24.5 - 25.3	5.6 - 7.9	7.4 - 7.8
169	24.5 - 25.3	5.7 - 7.9	7.4 - 7.8
502	24.5 - 25.3	5.7 - 7.9	7.5 - 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

暴露 21 日間の累積死亡率は、対照区及び 2-ナフトールの全試験濃度において 0%であった。また、全試験濃度において、暴露期間を通して、2-ナフトールの毒性によると推察される外見又は行動の異常も観察されなかった。

3-4. エンドポイントの測定結果

エンドポイントの測定結果を含む 2-ナフトールでの試験結果を表 3-3 に示した。また、エンドポイントの測定結果を図 3-1、暴露期間中の産卵状況を図 3-2 に示した。

ビテロゲニン

オスでは、明瞭ではないものの 2-ナフトール濃度に依存的な増加傾向がみられ、検定の結果、全試験濃度に関して、対照区との間に統計学的な有意差が認められた。メスでも、明瞭ではないものの 2-ナフトール濃度に依存的な増加傾向がみられ、検定の結果、502 µg/L に関して、対照区との間に統計学的な有意差が認められた。

二次性徴

オスでは、明瞭ではないものの 2-ナフトール濃度に依存的な減少傾向がみられ、検定の結果、全試験濃度に関して、対照区との間に統計学的な有意差が認められた。メスでは、対照区及び 2-ナフトールの全試験濃度において、全個体で二次性徴(尻びれ鰭条の乳頭状突起)はみられなかった(全試験濃度について、統計学的に対照区と有意差は認められなかった)。

産卵状況

暴露期間中の産卵数は、2-ナフトールの 169 及び 502 µg/L でやや少なかったが、検定の結果、全試験濃度に関して、対照区との間に統計学的な有意差は認められなかった。受精卵数も、2-ナフトールの 169 及び 502 µg/L でやや少なかったが、検定の結果、全試験濃度に関して、対照区との間に統計学的な有意差は認められなかった。受精率は、2-ナフトール濃度に依存的な減少傾向がみられ、検定の結果、502 µg/L に関して対照区との間に統計学的な有意差が認められた。502 µg/L では、暴露期間の中頃(11 日目頃)から暴露終了まで、受精卵数及び受精率が徐々に減少(低下)していた。

肝臓体指数及び生殖腺体指数

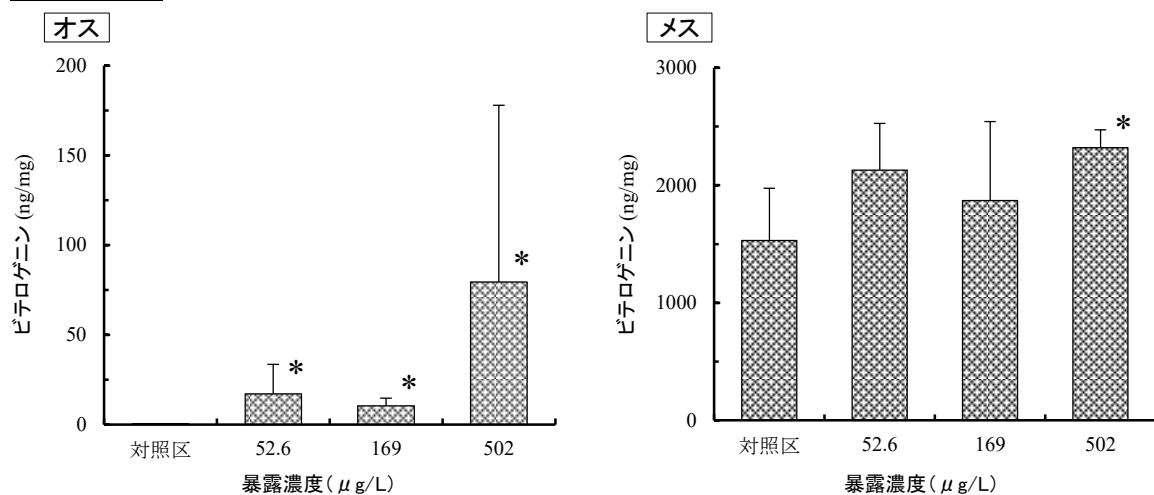
肝臓体指数は、オスでは、2-ナフトールの全試験濃度に関して、検定の結果、対照区との間に統計学的な有意差は認められなかった。メスでは、明瞭ではないものの 2-ナフトール濃度に依存的な増加傾向がみられ、検定の結果、52.6 及び 502 µg/L に関して、対照区との間に統計学的な有意差が認められた。生殖腺体指数は、オス及びメスともに、2-ナフトールの全試験濃度に関して、検定の結果、対照区との間に統計学的な有意差は認められなかった。

表 3-3 魚類短期繁殖試験結果のまとめ(2-ナフトール)

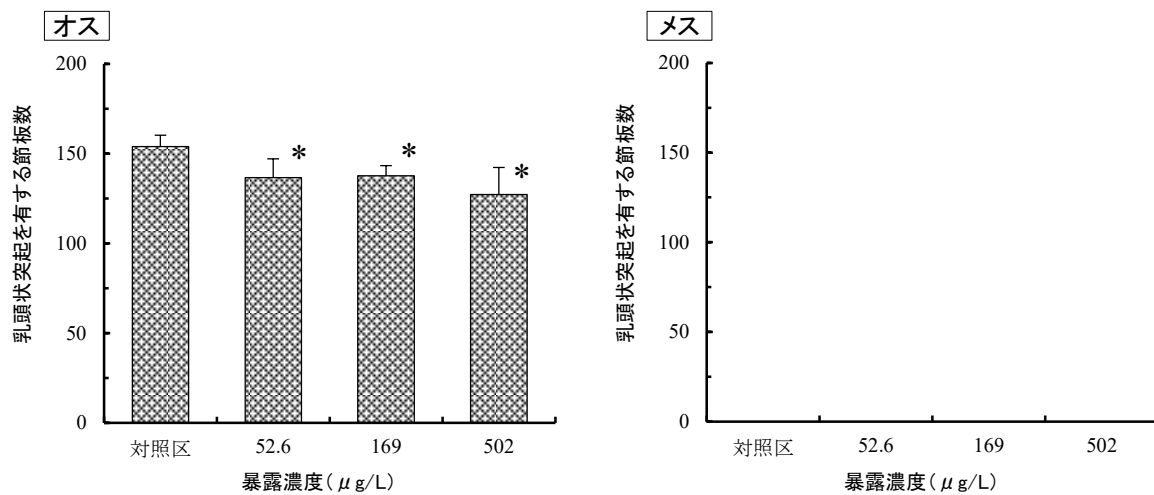
暴露濃度 ($\mu\text{g/L}$)	供試個体数		死亡個体数(死亡率)	
	オス	メス	オス	メス
対照区	12	12	0 (0.0 %)	0 (0.0 %)
52.6	12	12	0 (0.0 %)	0 (0.0 %)
169	12	12	0 (0.0 %)	0 (0.0 %)
502	12	12	0 (0.0 %)	0 (0.0 %)
暴露濃度 ($\mu\text{g/L}$)	全長 (mm)		体重 (mg)	
	オス	メス	オス	メス
対照区	39.3 $\pm$ 0.7	39.9 $\pm$ 0.5	690 $\pm$ 58	697 $\pm$ 23
52.6	38.2 $\pm$ 0.8	39.2 $\pm$ 1.1	634 $\pm$ 16	719 $\pm$ 56
169	39.0 $\pm$ 0.4	37.9 $\pm$ 1.0	678 $\pm$ 20	673 $\pm$ 48
502	38.4 $\pm$ 0.4	38.9 $\pm$ 0.7	663 $\pm$ 23	690 $\pm$ 37
暴露濃度 ($\mu\text{g/L}$)	肝臓体指数 (%)		生殖腺体指数 (%)	
	オス	メス	オス	メス
対照区	2.5 $\pm$ 0.31	4.4 $\pm$ 0.43	0.67 $\pm$ 0.06	9.7 $\pm$ 0.46
52.6	2.3 $\pm$ 0.20	5.3 $\pm$ 0.49 *	0.72 $\pm$ 0.08	9.6 $\pm$ 0.55
169	2.5 $\pm$ 0.24	5.0 $\pm$ 0.33	0.70 $\pm$ 0.12	10.9 $\pm$ 1.5
502	2.9 $\pm$ 0.27	6.0 $\pm$ 0.64 *	0.64 $\pm$ 0.08	10.4 $\pm$ 0.7
暴露濃度 ($\mu\text{g/L}$)	ビテロゲニン (ng/mg liver)		二次性徴	
	オス	メス	オス	メス
対照区	ND	1,530 $\pm$ 446	154 $\pm$ 6.4	0 $\pm$ 0
52.6	17.0 $\pm$ 16.5 *	2,130 $\pm$ 396	137 $\pm$ 10 *	0 $\pm$ 0
169	10.4 $\pm$ 4.2 *	1,870 $\pm$ 673	138 $\pm$ 5.8 *	0 $\pm$ 0
502	79.5 $\pm$ 98.5 *	2,320 $\pm$ 152 *	127 $\pm$ 15 *	0 $\pm$ 0
暴露濃度 ($\mu\text{g/L}$)	産卵数 (eggs/day/female)			
	21日間平均	(1-7日後)	(8-14日後)	(15-21日後)
対照区	32.1 $\pm$ 1.6	29.3 $\pm$ 1.7	34.1 $\pm$ 2.2	32.9 $\pm$ 2.3
52.6	33.6 $\pm$ 3.8	31.5 $\pm$ 3.1	34.5 $\pm$ 4.5	35.0 $\pm$ 5.5
169	31.8 $\pm$ 4.2	29.3 $\pm$ 3.5	33.8 $\pm$ 3.6	32.2 $\pm$ 5.9
502	31.0 $\pm$ 3.9	28.8 $\pm$ 3.8	32.8 $\pm$ 3.1	31.5 $\pm$ 5.6
暴露濃度 ($\mu\text{g/L}$)	受精卵数 (eggs/day/female)			
	21日間平均	(1-7日後)	(8-14日後)	(15-21日後)
対照区	31.4 $\pm$ 1.4	28.6 $\pm$ 1.6	33.3 $\pm$ 2.2	32.5 $\pm$ 1.9
52.6	31.7 $\pm$ 3.8	29.8 $\pm$ 2.9	32.9 $\pm$ 4.0	32.2 $\pm$ 5.6
169	29.8 $\pm$ 5.3	28.2 $\pm$ 4.2	31.3 $\pm$ 5.9	29.9 $\pm$ 6.1
502	27.9 $\pm$ 3.6	27.5 $\pm$ 3.9	29.9 $\pm$ 2.8	26.4 $\pm$ 6.3
暴露濃度 ($\mu\text{g/L}$)	受精率 (%)			
	21日間平均	(1-7日後)	(8-14日後)	(15-21日後)
対照区	98.0 $\pm$ 0.8	97.8 $\pm$ 1.2	97.6 $\pm$ 0.7	98.6 $\pm$ 1.5
52.6	94.1 $\pm$ 2.3	94.9 $\pm$ 2.7	95.7 $\pm$ 2.3	91.8 $\pm$ 3.0
169	93.4 $\pm$ 4.9	96.0 $\pm$ 4.1	92.1 $\pm$ 9.0	92.5 $\pm$ 2.3
502	90.0 $\pm$ 2.1 *	95.5 $\pm$ 4.1	91.0 $\pm$ 1.6 *	83.3 $\pm$ 8.0 *

注) データは容器平均を基に算出した平均 $\pm$ 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、ビテロゲニンの「ND」は全個体が定量下限未満であったことを示す。

ピテロゲン



二次性徴



肝臓体指数

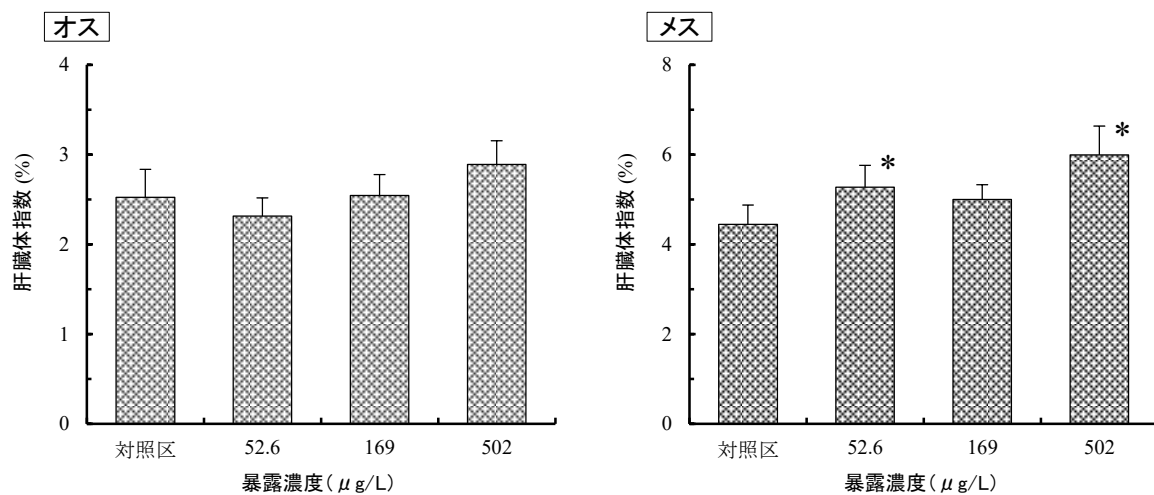
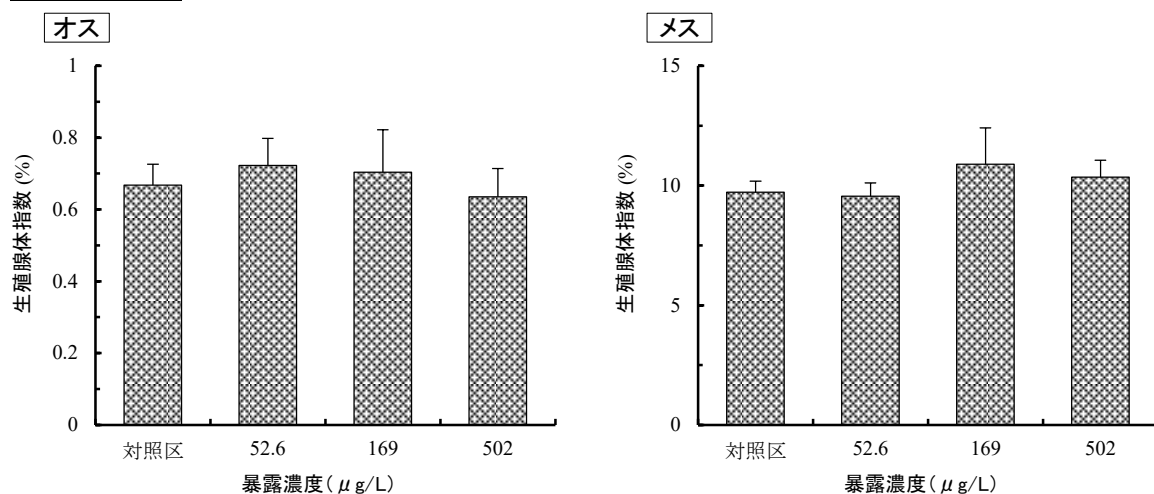


図 3-1 エンドポイントの測定結果(2-ナフトール)

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。

生殖腺体指数



産卵状況(21日間平均)

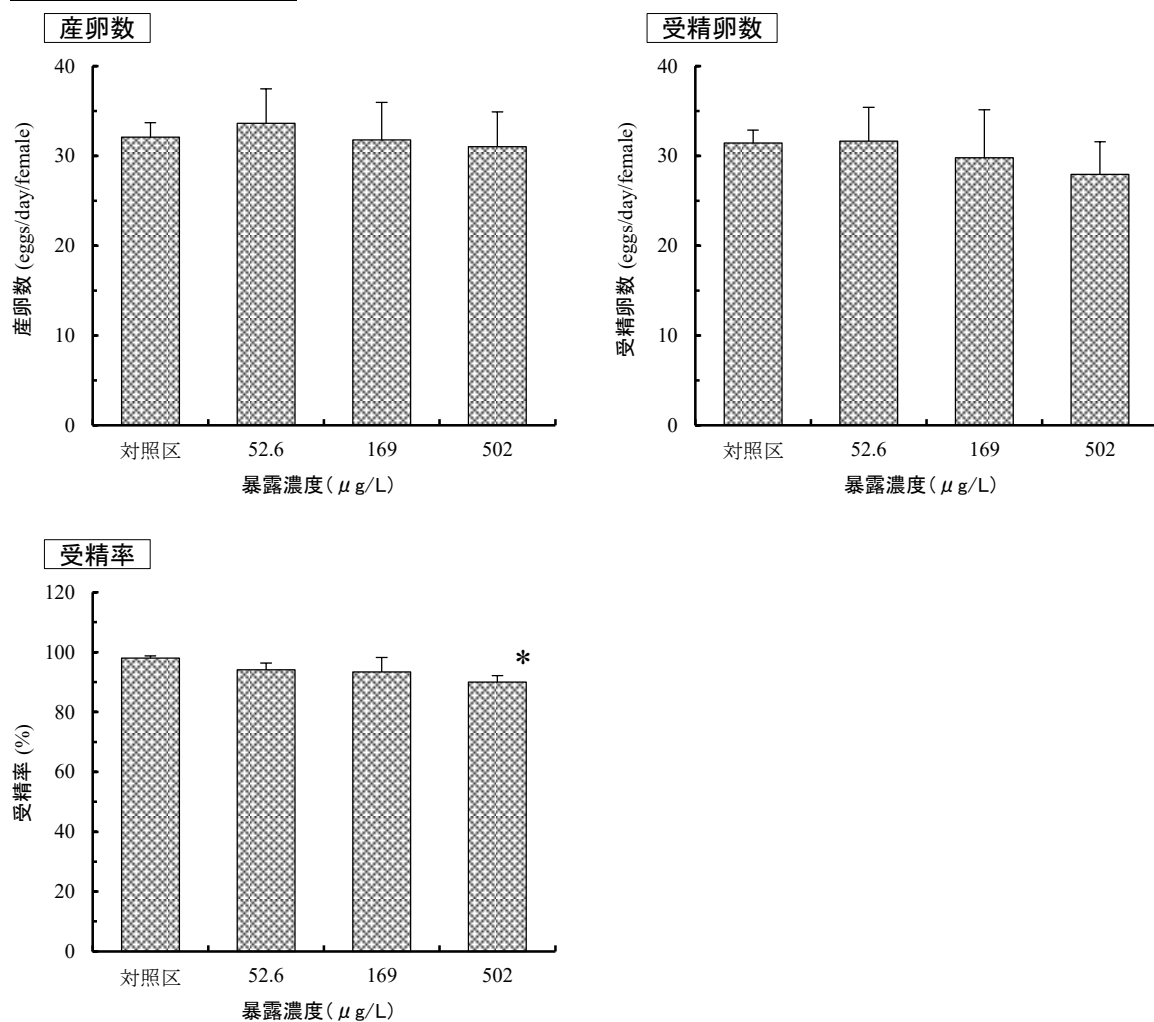


図 3-1 (つづき)

注) グラフは容器平均を基に算出した平均及び標準偏差、「*」は対照区との間に統計学的な有意差(p<0.05)が認められたことを示す。

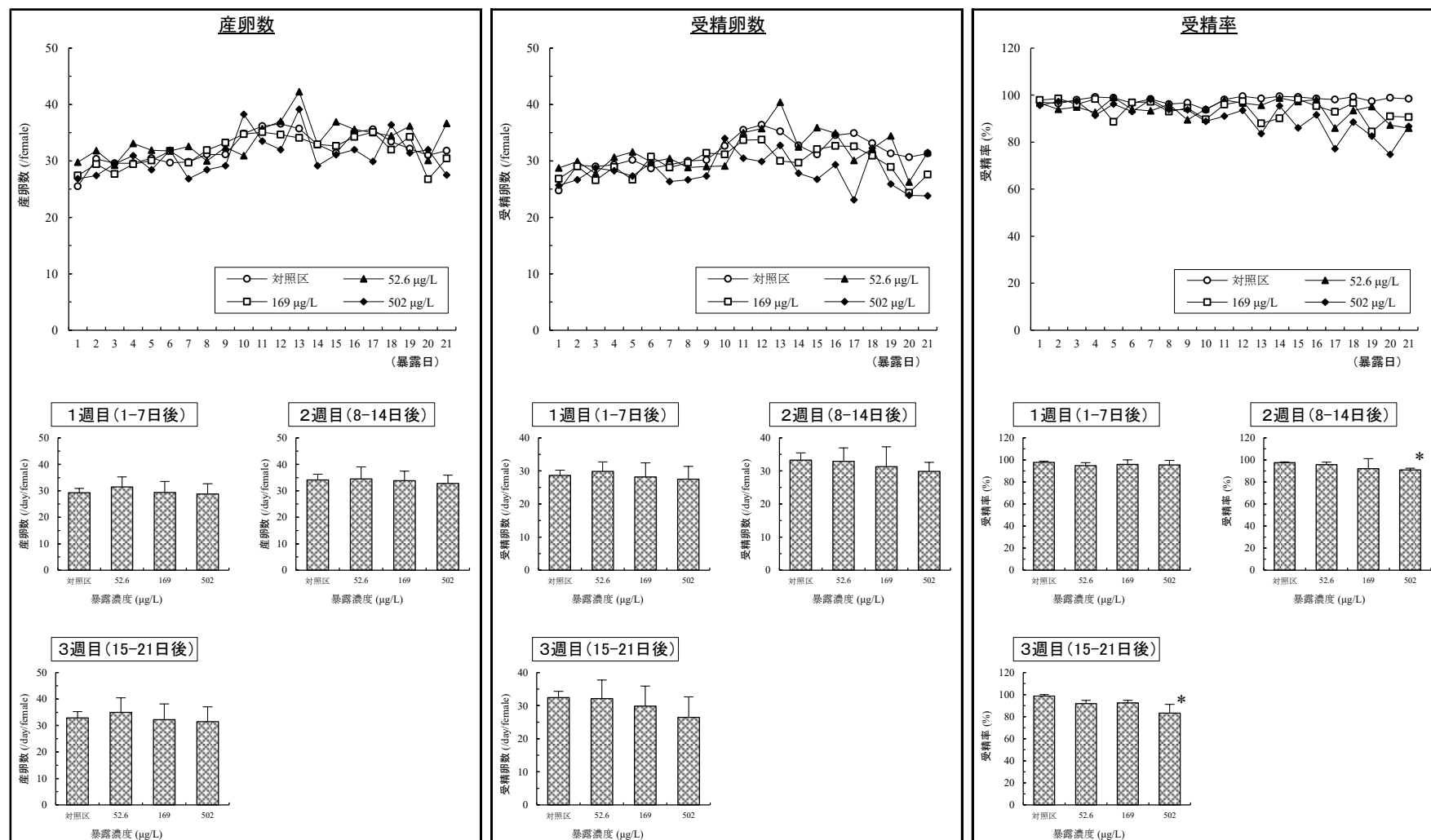


図 3-2 暴露期間中の産卵状況

注) グラフは容器平均を基に算出した平均及び標準偏差、「*」は対照区との間に統計学的な有意差($p < 0.05$)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 2-ナフトール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。

本試験の結果、オスにおいて、暴露 21 日後の肝臓ビテロゲニン濃度に明瞭ではないものの 2-ナフトール濃度に依存的な増加傾向がみられ、全ての試験濃度に関して対照区と比較して統計学的にも有意差 (有意な高値) が認められたことから、2-ナフトールが試験生物 (ミナミメダカ) に対してエストロゲン様作用を示したと考えられる。また、暴露期間中の産卵状況に関して、産卵数及び受精卵数に有意な変化は確認されなかったが、受精率では、2-ナフトール濃度に依存的な低下傾向がみられ、502 µg/L の試験濃度に関して対照区との間に計学的な有意差 (有意な低値) が認められた。暴露期間中の 502 µg/L における平均受精率には、暴露期間の中頃から終了時にかけて漸減する傾向がみられたが、これは 17β-エストラジオールやエチニルジオールでの FSTRA の結果と類似しており、2-ナフトールのエストロゲン様作用による影響と考えられる。

以上のとおり、本試験の結果から、2-ナフトールについて、ミナミメダカの成魚に対して、エストロゲン様作用を示し、繁殖に影響を及ぼすことが示唆された。

表 4 FSTRA から得られた 2-ナフトール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)
ビテロゲニン	オス	↑	52.6	ND
	メス	↑	502	169
二次性徴	オス	↓	52.6	ND
	メス	—	ND	169
産卵状況	産卵数	—	ND	502
	受精卵数	—	ND	502
	受精率	↓	502	169
試験濃度 (µg/L)		52.6、169、502		

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。