

## メダカを用いた 17β-エストラジオール曝露による 精巣卵の程度と受精率に関する検討

### 1. 経緯

現在までの魚類内分泌かく乱試験法開発において、精巣組織中における卵母細胞(精巣卵)の出現はエストロゲン作用を示すパラメータであると考えられており、最も高感度なエンドポイントの一つとなりうることが示されている。しかし、精巣卵出現の生態毒性学的な定義は十分なされておらず、繁殖パラメータ(産卵数及び受精率)との関連性も十分議論されているとはいえない。そこで、**17β-エストラジオール(E2)**によるメダカライフサイクル試験での繁殖検討\*1に用いた雄個体の生殖腺組織を 5 段階にスコアリングし(下表参照)、受精率との相関性について検討した。

\* 1) 繁殖検討：フルライフサイクル試験のふ化後 70 日令の時点で各試験濃度(区)の生存個体の雌雄を外観的形態から判別しペアリングを行ない、ペア毎にふ化後 100 日令まで、毎日、産卵数及び受精率を観察

表 メダカ精巣の分類基準(案)

スコア	定義
1	成熟した雄にみられる精巣構造を有する。組織中には精原細胞、精母細胞及び精細胞といった種々の発達段階の生殖細胞が観察され、活発な精子形成が認められる。卵母細胞は発現していない。
2	全体に精巣の構造であり、精子形成も観察される。しかし、組織中に卵母細胞の発現が認められる。このレベルでの精巣卵の程度は低く、卵母細胞は組織中に散在した状態で 1~10 細胞が観察されるに過ぎない。
3	レベル 2 よりも卵母細胞の発現率が高く、組織中に 10~50 細胞が観察される。卵母細胞の一部は塊として観察される場合もある。しかしながら、全体としてはレベル 1 及び 2 と同様に精巣構造を呈しており、精子形成も観察される。
4	さらに精巣卵が発達し、組織の約 50%までを卵母細胞によって構成される。精子形成は観察されるが、レベル 1~3 と比較すると精子形成に関与する生殖細胞が占めている部分が小さい。
5	組織の約 50%~ほぼ全般を卵母細胞によって構成され、精原細胞、精母細胞等はわずかに散在する程度である。活発な精子形成は観察されていない。また、結合組織の異常な発達が認められる場合もある。

### 2. 方法

17β エストラジオールによるメダカフルライフサイクル試験で繁殖検討に用いた雄個体の生殖腺の切片を 1 個体当たり 10 枚作成し、メダカ精巣の分類基準(案)に基づいてスコアリングを行なった。各個体 10 枚の切片についてそれぞれスコアを求め、その平均値を各個体の生殖腺スコアとした。

なお、繁殖検討においてペアリングした雌個体についても生殖腺の組織学的観察を行った。

### 3. 結果

下図に生殖腺スコアと受精率\*2との相関を示す。

生殖腺スコアと受精率の関係は、生殖腺スコアが約 **4** の個体で受精率の顕著な低下が観察された。生殖腺スコアが **2~3** の個体では、個体により反応の違いが認められた。生殖腺スコアが **1.9** 未満においては、受精率の顕著な低下は認められなかった。

\* 2) 受精率：繁殖試験期間中に雌が産卵した卵数に対する受精卵数の比率の平均 (%)

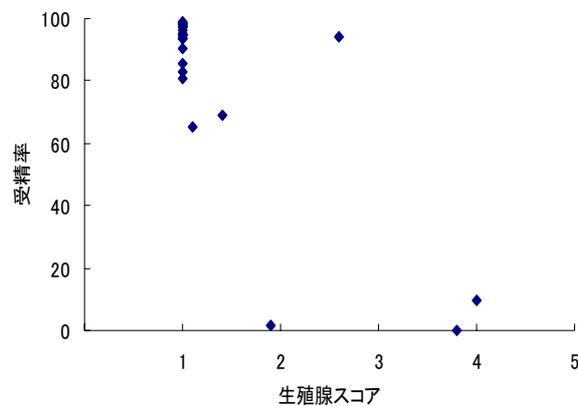


図 生殖腺スコアと受精率(%)との関係

### 4. 考察

今回の検討においては、雌の卵巣に何ら異常が認められなかったことから、本試験における受精率の低下は雄に起因したものであることが推測された。

生殖腺スコアが **1.9** の個体(**31.3 ng/L** 区)は、受精率の低下が認められたが、生殖腺スコアが **2.6** の個体では受精率の低下は認められなかった。生殖腺組織観察では、生殖腺スコア **1.9** 及び **2.6** の個体ともに組織全般にわたる精子形成が観察された。受精率が低下したスコア **1.9** の個体においては生殖腺指数 **GSI** の顕著な低下(対照区の約 **1/3**)が認められ、精子形成の量的阻害が推測された。また、この個体では肝臓中ピテロジェニンの誘導及び乳頭状小突起数の低下も認められた。一方、受精率が低下しなかったスコア **2.6** の個体においては、**GSI** 及びその他の項目において変化は認められなかった。

なお、今後、試験例数を増やし、生殖腺スコアと受精率との関係について、詳細な検討を実施する予定である。

## ジメチルスルホキシドのパーシャルライフサイクル試験結果

## 1. 方法

ジメチルスルホキシド(DMSO)のメダカに及ぼす内分泌かく乱作用を評価するために、メダカ(*Oryzias latipes*)を段階的な濃度(100、320 及び 1,000 mg/L ; 設定濃度)の試験液に受精卵からふ化後 60 日令まで流水条件下で曝露した。

曝露方法については、通常のパーシャルライフサイクル試験と同様の方法で実施した。ふ化後 60 日の時点で、外観的二次性徴から判別して雌雄それぞれ 10 尾ずつを取り上げ、生殖腺組織学及び肝臓中ビテロジェニン濃度の測定を実施した。摘出した生殖腺はブアン液に固定後、常法に従い、雄個体については連続切片を、雌個体については 1 検体当たり 5 切片のパラフィン切片を作成し、組織学的観察を行った。

## 2. 結果

生殖腺組織学において雌雄共に異常は認められなかった。また、肝臓中ビテロジェニン濃度においては、雌雄共に統計学的な有意差及び濃度依存的な反応は認められなかった(下表参照)。

これらの結果から DMSO は本試験濃度範囲においてメダカの性分化及びビテロジェニン産生に影響を及ぼさないことが示された。

表 各試験濃度区における雌雄の肝臓中ビテロジェニン濃度

DMSO 濃度 mg/L	肝臓中ビテロジェニン濃度(ng/mg liver)	
	雄	雌
対照区	ND	1,700 ± 560
100	1.8 ± 1.9	1,800 ± 1,800
320	1.4 ± 2.1	1,400 ± 570
1,000	ND	2,100 ± 500

## メダカを用いた $17\beta$ -エストラジオール曝露による 肝臓中ビテロジェニン濃度と受精率の関係に関する検討

### 1. 経緯

現在までの内分泌かく乱化学物質の魚類に関する試験法開発において、雄個体におけるビテロジェニン誘導はエストロゲン作用を示す直接的なパラメータであり、性分化異常と並び最も高感度なエンドポイントの一つとなりうることが示されている。しかし、ビテロジェニン誘導の生態毒性学的な定義は十分なされておらず、繁殖パラメータ(産卵数及び受精率)との関連性も十分議論されているとはいえない。そこで、**17 $\beta$ -エストラジオール(E2)**によるメダカフルライフサイクル試験を実施し、繁殖検討\*1に用いた雄個体の肝臓中ビテロジェニン濃度を測定し、受精率との相関性について検討した。

\* 1) 繁殖検討：フルライフサイクル試験のふ化後 70 日令の時点で各試験濃度(区)の生存個体の雌雄を外観的形態から判別しペアリングを行ない、ペア毎にふ化後 100 日令まで、毎日、産卵数及び受精率を観察

### 2. 方法

$17\beta$ -エストラジオールによるメダカフルライフサイクル試験において、繁殖検討に用いた雄個体の肝臓中ビテロジェニン濃度を測定した。

### 3. 結果

下図に肝臓中ビテロジェニン濃度(対数値)と受精率\*2との相関を示す。

ビテロジェニン濃度が **1,000ng/mg liver** 以上の雄個体では受精率の顕著な低下が認められた。ビテロジェニン濃度が **10~1,000 ng/mg liver** の雄個体では受精率の低下を示す個体が認められた。ビテロジェニン濃度が **10 ng/mg liver** 未満の雄個体においては受精率の顕著な低下は認められなかった。

\* 2) 受精率：繁殖試験期間中に雌が産卵した卵数に対する受精卵数の比率の平均 (%)

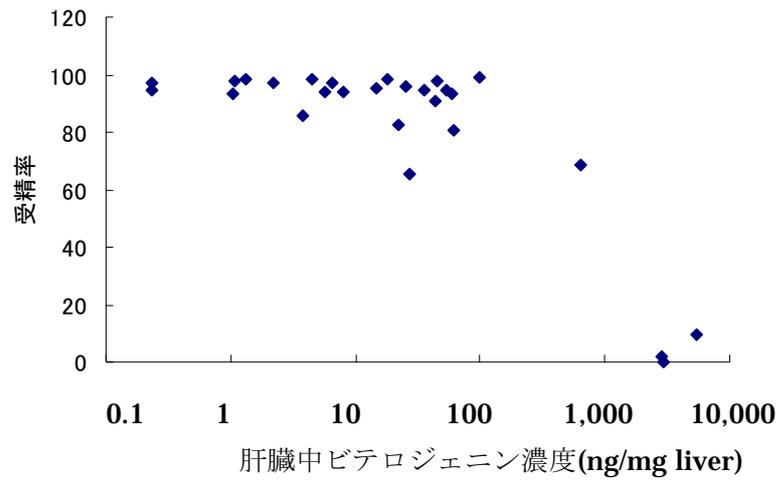


図 肝臓中ビテロジェニン濃度と受精率(%)との関係

#### 4. 考察

雄のビテロジェニン濃度の増加と受精率低下のメカニズムについては不明であるが、ビテロジェニン濃度が増加している個体は同時に精巢卵の程度も著しいため、その結果、受精率低下が生じている可能性が推測される。

## o,p'-DDT のメダカによる試験結果

### 1. ビテロジェニン産生試験（試験機関：(財) 化学物質評価研究機構）

表 1 試験結果

平均濃度 ( $\mu\text{g/L}$ )	死亡率 (%)	肝指数 (%)		ビテロジェニン濃度( $\text{ng/mg liver}$ )	
		14 日	21 日	14 日	21 日
対照区	0	2.4 ± 0.34	2.1 ± 0.56	ND	ND
助剤対照区	3.3	2.1 ± 0.59	1.9 ± 0.41	ND	ND
0.373	0	2.0 ± 0.60	2.1 ± 0.71	ND	ND
0.800	0	2.1 ± 0.58	1.9 ± 0.73	ND	ND
1.50	0	2.2 ± 0.59	1.8 ± 0.52	2.1 ± 4.8	260 ± 560**
3.20	0	2.5 ± 0.89	2.2 ± 0.40	510 ± 1,800**	1,700 ± 2,100**
6.55	0	2.7 ± 0.62	2.7 ± 0.44**	1,800 ± 2,000**	9,300 ± 9,700**

各測定値データの値は、平均±標準偏差、\*\*は  $p < 0.01$  で有意であることを示す。  
ビテロジェニンの ND は、定量下限未満 ( $< 1\text{ng/mg liver}$ ) を示す。

### 2. パーシャルライフサイクル試験（試験機関：(財) 化学物質評価研究機構）

表 2 - A 試験結果

平均濃度 ( $\mu\text{g/L}$ )	孵化率 (%)	孵化日数 (日)	死亡率 (%)	全長 (mm)	体重 (mg)
対照区	100	9.4 ± 0.21	8.3 ± 10	31 ± 2.1	290 ± 50
助剤対照区	100	9.7 ± 0.15	6.7 ± 7.7	30 ± 3.4	280 ± 70
0.195	100	9.8 ± 0.21	5.0 ± 6.4	31 ± 1.3	300 ± 41
0.366	100	10 ± 0.58	5.0 ± 6.4	31 ± 1.7	300 ± 52
0.830	100	10 ± 0.28*	12 ± 6.4	31 ± 1.6**	310 ± 59
1.69	100	9.8 ± 0.11	8.3 ± 6.4	31 ± 2.2	300 ± 58
3.36	98 ± 3.3	9.7 ± 0.091	18 ± 10	28 ± 3.5**	260 ± 81

表 2 - B 試験結果（続き）

平均濃度 ( $\mu\text{g/L}$ )	尾数	生殖腺指数 (%)		精巣卵出現率(%) (精巣卵/(精巣+精巣卵))	肝指数 (%)		ビテロジェニン濃度 ( $\text{ng/mg liver}$ )	
		♂	♀		♂	♀	♂	♀
対照区	20	0.98±0.37	7.1±2.9	0 (0/13)	1.8±0.48	3.3±1.2	1.7±3.8	1,800±770
助剤対照区	20	1.2±0.26	6.7±3.7	0 (0/11)	2.0±0.45	3.9±1.1	ND	1,700±1,000
0.195	20	1.6±1.3	6.0±3.3	18* (2 <sup>b</sup> /11)	1.9±0.46	3.7±0.75	2.1±4.8	1,700±970
0.366	20	1.2±0.39	8.1±2.6	0 (0/8)	2.0±0.40	3.4±0.50	2.5±2.6	2,300±1,200
0.830	20	1.2±0.50	5.1±3.3	50** (4 <sup>c</sup> /8)	2.0±0.55	3.9±1.1	3.4±3.1	4,200±2,400*
1.69	20	1.2±0.25	4.1±2.5*	100** (2 <sup>d</sup> /2)	2.3±0.28	4.0±0.81	29±36	7,700±4,000**
3.36	20	- <sup>a</sup>	1.9±1.6**	- <sup>a</sup> (0/0)	- <sup>a</sup>	4.5±0.90*	- <sup>a</sup>	7,500±1,200**

各測定値データの値は、平均±標準偏差、\*\*は  $p < 0.01$ 、\*は  $p < 0.05$  で有意であることを示す。  
ビテロジェニンの ND は、定量下限未満 ( $< 1\text{ng/mg liver}$ ) を示す。

<sup>a</sup>：生殖腺を観察した結果、性決定遺伝子 DMY の存在では雄と判定された個体(20 尾中 9 尾)において精巣を有する個体がなかったため、算出できなかった。<sup>b</sup>：生殖腺スコアは 1.4 であった。

<sup>c</sup>：生殖腺スコアは 1.6 であった。<sup>d</sup>：生殖腺スコアは 3.7 であった。

### 3. フルライフサイクル試験（試験機関：(財) 化学物質評価研究機構）

表3-A：1世代目（F0）試験結果

平均濃度 ( $\mu\text{g/L}$ )	孵化率 (%)	孵化日数 (日)	死亡率 (%)	全長 (mm)	体重 (mg)	尾数	精巣卵出現率(%) (精巣卵/(精巣+精巣卵))
対照区	97 $\pm$ 3.8	9.9 $\pm$ 0.060	0	30 $\pm$ 1.3	280 $\pm$ 49	20	0 (0/8)
助剤対照区	95 $\pm$ 3.3	10 $\pm$ 0.033	7.0 $\pm$ 0.24	31 $\pm$ 1.0	290 $\pm$ 43	20	0 (0/11)
0.0153	97 $\pm$ 6.7	9.9 $\pm$ 0.13	1.7 $\pm$ 3.3	31 $\pm$ 1.3	300 $\pm$ 38	20	0 (0/11)
0.0474	98 $\pm$ 3.3	9.9 $\pm$ 0.054	3.3 $\pm$ 3.8	31 $\pm$ 0.94	300 $\pm$ 26	20	0 (0/8)
0.145	100	10 $\pm$ 0.19	5.0 $\pm$ 6.4	31 $\pm$ 1.7	290 $\pm$ 49	20	0 (0/10)
0.522	98 $\pm$ 3.3	9.8 $\pm$ 0.20	5.1 $\pm$ 6.4	31 $\pm$ 1.0	300 $\pm$ 34	20	55 (6 <sup>a</sup> /11)**
1.94	95 $\pm$ 6.4	9.8 $\pm$ 0.10	7.3 $\pm$ 6.3	30 $\pm$ 1.5	290 $\pm$ 45	20	100 (2 <sup>b</sup> /2)**

表3-B：(続き)

平均濃度 ( $\mu\text{g/L}$ )	産卵数	受精率 (%)	生殖腺指数 (%)		肝指数 (%)		ビテロジェニン濃度 (ng/mg liver)	
			♂	♀	♂	♀	♂	♀
対照区	1,200 $\pm$ 130	98 $\pm$ 1.0	0.95 $\pm$ 0.25	9.9 $\pm$ 1.2	1.4 $\pm$ 0.33	4.6 $\pm$ 1.3	ND	1,200 $\pm$ 340
助剤対照区	1,100 $\pm$ 140	99 $\pm$ 0.27	1.0 $\pm$ 0.32	11 $\pm$ 2.3	1.7 $\pm$ 0.53	4.1 $\pm$ 0.83	ND	1,300 $\pm$ 250
0.0153	1,200 $\pm$ 160	98 $\pm$ 1.4	1.0 $\pm$ 0.25	10 $\pm$ 1.7	1.4 $\pm$ 0.41	3.7 $\pm$ 0.98	ND	1,300 $\pm$ 240
0.0474	1,100 $\pm$ 170	98 $\pm$ 2.5	1.0 $\pm$ 0.37	9.5 $\pm$ 1.2	1.4 $\pm$ 0.48	3.9 $\pm$ 0.88	ND	1,300 $\pm$ 350
0.145	1,000 $\pm$ 210	98 $\pm$ 0.77	1.2 $\pm$ 0.32	9.8 $\pm$ 2.0	1.5 $\pm$ 0.33	3.9 $\pm$ 1.6	1.5 $\pm$ 2.5	1,400 $\pm$ 230
0.522	1,000 $\pm$ 380	80 $\pm$ 33*	1.2 $\pm$ 0.41	10 $\pm$ 2.1	1.9 $\pm$ 0.54	4.2 $\pm$ 1.5	110 $\pm$ 220**	1,700 $\pm$ 390**
1.94	- <sup>c</sup>	- <sup>c</sup>	- <sup>c</sup>	- <sup>c</sup>	- <sup>c</sup>	- <sup>c</sup>	- <sup>c</sup>	- <sup>c</sup>

各測定値データの値は、平均 $\pm$ 標準偏差、\*\*は  $p < 0.01$ 、\*は  $p < 0.05$  で有意であることを示す。  
ビテロジェニンの ND は、定量下限未満 (<1ng/mg liver) を示す。

<sup>a</sup> 生殖腺スコアは 1.8 であった。

<sup>b</sup> 生殖腺スコアは 3.9 であった。

<sup>c</sup> オスの二次性徴を示す個体が存在しなかったため繁殖検討を実施できず、値を算出できなかった。

表3-C : 2世代目 (F1) 試験結果

平均濃度 ( $\mu\text{g/L}$ )	孵化率 (%)	孵化日数 (日)	死亡率 (%)	全長 (mm)	体重 (mg)	尾数	精巣卵出現率(%) (精巣卵/(精巣+精巣卵))
対照区	99 $\pm$ 2.4	9.7 $\pm$ 0.26	3.3 $\pm$ 3.8	29 $\pm$ 1.2	260 $\pm$ 38	20	0 (0/12)
助剤対照区	99 $\pm$ 1.4	9.5 $\pm$ 0.26	0	30 $\pm$ 1.4	260 $\pm$ 37	20	0 (0/7)
0.0153	91 $\pm$ 12	9.7 $\pm$ 0.43	3.3 $\pm$ 3.8	30 $\pm$ 1.7	260 $\pm$ 52	20	0 (0/9)
0.0474	98 $\pm$ 2.6	9.9 $\pm$ 0.27**	3.3 $\pm$ 6.7	30 $\pm$ 1.4**	270 $\pm$ 40	20	0 (0/12)
0.145	97 $\pm$ 2.9	10 $\pm$ 0.27**	0	30 $\pm$ 1.7	270 $\pm$ 35	20	0 (0/7)
0.522	96 $\pm$ 5.5	9.9 $\pm$ 0.24**	1.7 $\pm$ 3.3	30 $\pm$ 1.7	260 $\pm$ 45	20	25 (2 <sup>a</sup> /8)*
1.94	- <sup>b</sup>	- <sup>b</sup>	- <sup>b</sup>	- <sup>b</sup>	- <sup>b</sup>	- <sup>b</sup>	- <sup>b</sup>

表3-D : (続き)

平均濃度 ( $\mu\text{g/L}$ )	肝指数 (%)		ビテロジェニン濃度(ng/mg liver)	
	♂	♀	♂	♀
対照区	1.8 $\pm$ 0.40	3.2 $\pm$ 0.87	ND	1,400 $\pm$ 340
助剤対照区	1.9 $\pm$ 0.30	3.4 $\pm$ 0.70	11 $\pm$ 34	1,200 $\pm$ 590
0.0153	1.9 $\pm$ 0.51	3.3 $\pm$ 0.63	ND	1,100 $\pm$ 620
0.0474	1.4 $\pm$ 0.33**	3.0 $\pm$ 0.55	1.0 $\pm$ 1.6	1,200 $\pm$ 570
0.145	1.7 $\pm$ 0.36	2.9 $\pm$ 0.71	1.2 $\pm$ 1.2	1,800 $\pm$ 1,500
0.522	1.8 $\pm$ 0.26	3.3 $\pm$ 0.58	1.4 $\pm$ 1.9	1,900 $\pm$ 690
1.94	- <sup>b</sup>	- <sup>b</sup>	- <sup>b</sup>	- <sup>b</sup>

各測定値データの値は、平均 $\pm$ 標準偏差、\*\*は $p < 0.01$ 、\*は $p < 0.05$ で有意であることを示す。ビテロジェニンのNDは、定量下限未満 (<1ng/mg liver)を示す。

<sup>a</sup> 生殖腺スコアは1.8であった。

<sup>b</sup> 1世代目においてオスの二次性徴を示す個体が存在しなかったため、次世代を得ることができなかった。



## アルドリンのメダカによる試験結果

### 1. ビテロジェニン産生試験（試験機関：独）国立環境研究所）

表 1：試験結果

平均濃度 ( $\mu\text{g/L}$ )	死亡率 (%)	肝指数 (%)		ビテロジェニン濃度( $\text{ng/mg liver}$ )	
		14 日	21 日	14 日	21 日
対照区	0	2.0 $\pm$ 0.38	2.0 $\pm$ 0.44	1.3 $\pm$ 1.3	ND
助剤対照区	0	2.1 $\pm$ 0.59	2.2 $\pm$ 0.48	ND	ND
2.02	3.3	2.2 $\pm$ 0.36	1.9 $\pm$ 0.32	ND	ND
3.28	3.3	2.2 $\pm$ 0.53	1.9 $\pm$ 0.31	ND	ND
7.34	0	1.8 $\pm$ 0.47	2.1 $\pm$ 0.60	ND	ND
15.1	33	1.9 $\pm$ 0.62	2.4 $\pm$ 0.73 <sup>b</sup>	ND	1.8 $\pm$ 0.94 <sup>b**</sup>
28.6	93	1.9 $\pm$ 0.70 <sup>a</sup>	-	2.6 $\pm$ 3.6 <sup>a</sup>	-

各測定値データの値は、平均 $\pm$ 標準偏差、\*\*は  $p<0.01$ 、\*は  $p<0.05$  で有意であることを示す。  
ビテロジェニンの定量下限は 1 $\text{ng/mg liver}$

a: N=2, b: N=5

### 2. パーシャルライフサイクル試験（試験機関：独）国立環境研究所）

表 2 - A：試験結果

平均濃度 ( $\mu\text{g/L}$ )	孵化率 (%)	孵化日数 (日)	死亡率 (%)	全長 (mm)	体重 (mg)
対照区	83 $\pm$ 5.8	11 $\pm$ 0.092	3.9 $\pm$ 3.4	29 $\pm$ 2.1	340 $\pm$ 82
助剤対照区	82 $\pm$ 2.9	11 $\pm$ 0.59	8.2 $\pm$ 3.7	28 $\pm$ 2.1	320 $\pm$ 70
0.069	92 $\pm$ 7.6	11 $\pm$ 1.0	14 $\pm$ 5.0	30 $\pm$ 2.5	350 $\pm$ 93
0.225	87 $\pm$ 7.6	12 $\pm$ 1.4	18 $\pm$ 6.6*	30 $\pm$ 2.1*	360 $\pm$ 89
0.686	83 $\pm$ 14	13 $\pm$ 0.42*	22 $\pm$ 2.9**	30 $\pm$ 2.0	360 $\pm$ 85
2.23	77 $\pm$ 14	12 $\pm$ 0.69	18 $\pm$ 6.6*	30 $\pm$ 1.8*	360 $\pm$ 87
7.10	92 $\pm$ 2.9	10 $\pm$ 0.73	64 $\pm$ 7.0**	30 $\pm$ 1.4	360 $\pm$ 65

表 2 - B：(続き)

平均濃度 ( $\mu\text{g/L}$ )	生殖腺指数 (%)		尾数	精巣卵出現率(%) (精巣卵/(精巣+精巣卵))	肝指数 (%)		ビテロジェニン濃度 ( $\text{ng/mg liver}$ )	
	♂	♀			♂	♀	♂	♀
対照区	0.91 $\pm$ 0.11	7.9 $\pm$ 2.2	20	0(0/9)	2.2 $\pm$ 0.55	5.5 $\pm$ 0.57	ND	2,000 $\pm$ 750
助剤対照区	0.88 $\pm$ 0.27	3.7 $\pm$ 2.2 <sup>c</sup>	20	25(2/8) <sup>d</sup>	3.5 $\pm$ 0.78 <sup>c</sup>	5.1 $\pm$ 0.93	ND	1,300 $\pm$ 1,000
0.069	1.0 $\pm$ 0.20	8.9 $\pm$ 3.1**	20	0(0/11)	2.0 $\pm$ 0.41**	5.1 $\pm$ 1.1	11 $\pm$ 16**	1,700 $\pm$ 730
0.225	1.2 $\pm$ 0.13**	8.7 $\pm$ 2.0**	20	14(1/7) <sup>e</sup>	2.3 $\pm$ 0.44**	5.3 $\pm$ 1.1	3.1 $\pm$ 5.4	1,800 $\pm$ 920
0.686	1.1 $\pm$ 0.24*	6.7 $\pm$ 4.3	20	0(0/10)	2.6 $\pm$ 0.66**	4.9 $\pm$ 1.2	2.6 $\pm$ 3.7*	1,100 $\pm$ 850
2.23	0.84 $\pm$ 0.17	8.8 $\pm$ 2.3**	20	0(0/7)	2.1 $\pm$ 0.47**	5.3 $\pm$ 1.0	6.9 $\pm$ 8.6**	1,500 $\pm$ 750
7.10	0.80 $\pm$ 0.14	8.5 $\pm$ 1.4**	20	0(0/10)	2.1 $\pm$ 0.47**	4.7 $\pm$ 1.7	ND	1,800 $\pm$ 650

各測定値データの値は、平均 $\pm$ 標準偏差、\*\*は  $p<0.01$ 、\*は  $p<0.05$  で有意であることを示す。  
ビテロジェニンの定量下限は 1 $\text{ng/mg liver}$

c) 対照区と助剤対照区の間で有意差。曝露区との検定は助剤対照区に対して実施。

d) 精巣卵スコアは、1.7 $\pm$ 0.78。

e) 精巣卵個体のスコアは、1.1。

## エンドリンのメダカによる試験結果

### 1. ビテロジェニン産生試験（試験機関：独）国立環境研究所）

表 1：試験結果

平均濃度 ( $\mu\text{g/L}$ )	死亡率 (%)	肝指数 (%)		ビテロジェニン濃度( $\text{ng/mg liver}$ )	
		14 日	21 日	14 日	21 日
対照区	0	1.9 $\pm$ 0.27	1.9 $\pm$ 0.27	1.6 $\pm$ 0.85	ND
助剤対照区	0	2.0 $\pm$ 0.36	2.2 $\pm$ 0.42* <sup>a</sup>	1.9 $\pm$ 0.76	ND
0.037	10	2.0 $\pm$ 0.35	2.0 $\pm$ 0.30	2.3 $\pm$ 1.25	ND
0.075	3.3	1.8 $\pm$ 0.24	2.0 $\pm$ 0.32	1.8 $\pm$ 0.72	ND
0.144	3.3	1.8 $\pm$ 0.34	2.0 $\pm$ 0.37	1.6 $\pm$ 0.67	ND
0.309	13.3	2.0 $\pm$ 0.52	2.0 $\pm$ 0.41	2.0 $\pm$ 0.80	ND
0.648	83.3	1.8 $\pm$ 0.34	- <sup>b</sup>	2.1 $\pm$ 0.39	- <sup>b</sup>

各測定値データの値は、平均 $\pm$ 標準偏差、\*\*は  $p<0.01$ 、\*は  $p<0.05$  で有意であることを示す。  
ビテロジェニンの定量下限は 1 $\text{ng/mg liver}$ 。

a: 対照区と助剤対照区の間で有意差。曝露区との検定は助剤対照区に対して実施。

b: 14 日目に生残個体をすべて解剖したため(N=5)、サンプルはなし。

### 2. パーシャルライフサイクル試験（試験機関：独）国立環境研究所）

表 2 - A：試験結果

平均濃度 ( $\mu\text{g/L}$ )	孵化率 (%)	孵化日数 (日)	死亡率 (%)	全長 (mm)	体重 (mg)
対照区	83 $\pm$ 7.6	9.3 $\pm$ 1.2	7.8 $\pm$ 8.4	29 $\pm$ 2.6	310 $\pm$ 99
助剤対照区	72 $\pm$ 10	12 $\pm$ 2.4	15 $\pm$ 14	29 $\pm$ 2.0	300 $\pm$ 80
0.00188	88 $\pm$ 5.8	10 $\pm$ 1.0	23 $\pm$ 11	29 $\pm$ 2.2	300 $\pm$ 82
0.0058	88 $\pm$ 2.9	12 $\pm$ 2.0	17 $\pm$ 9.4	29 $\pm$ 2.3	300 $\pm$ 82
0.0178	83 $\pm$ 7.6	14 $\pm$ 3.7	24 $\pm$ 2.3	28 $\pm$ 2.6*	280 $\pm$ 87
0.0562	73 $\pm$ 7.6	12 $\pm$ 1.0	22 $\pm$ 22	29 $\pm$ 2.2	300 $\pm$ 85
0.19	80 $\pm$ 15	12 $\pm$ 2.4	28 $\pm$ 7.5	28 $\pm$ 2.9	280 $\pm$ 90

表 2 - B：(続き)

平均濃度 ( $\mu\text{g/L}$ )	生殖腺指数 (%)		尾数	精巣卵出現率(%) (精巣卵/精巣+精巣卵)	肝指数 (%)		ビテロジェニン濃度 ( $\text{ng/mg liver}$ )	
	♂	♀			♂	♀	♂	♀
対照区	0.98 $\pm$ 0.18	6.9 $\pm$ 3.2	20	0(0/11)	3.3 $\pm$ 0.46	6.1 $\pm$ 1.2	ND	3,200 $\pm$ 2,300
助剤対照区	1.0 $\pm$ 0.27	6.5 $\pm$ 4.2	20	0(0/9)	2.8 $\pm$ 0.55* <sup>c</sup>	5.8 $\pm$ 1.5	ND	3,200 $\pm$ 2,300
0.00188	0.95 $\pm$ 0.27	8.6 $\pm$ 2.8	20	0(0/13)	2.9 $\pm$ 0.86	5.5 $\pm$ 0.56	ND	2,800 $\pm$ 1,700
0.0058	0.82 $\pm$ 0.33	7.8 $\pm$ 3.1	20	0(0/10)	3.3 $\pm$ 0.69	6.4 $\pm$ 1.0	3.4 $\pm$ 5.1**	2,300 $\pm$ 1,100
0.0178	1.1 $\pm$ 0.34	5.8 $\pm$ 3.4	20	0(0/9)	2.8 $\pm$ 0.82	5.4 $\pm$ 0.76	9.1 $\pm$ 21**	2,400 $\pm$ 1,700
0.0562	1.0 $\pm$ 0.22	5.6 $\pm$ 4.0	20	0(0/13)	2.9 $\pm$ 0.57	5.8 $\pm$ 0.98	2.0 $\pm$ 0.70**	3,200 $\pm$ 2,800
0.19	0.82 $\pm$ 0.26	7.3 $\pm$ 4.2	20	0(0/12)	2.8 $\pm$ 1.0	5.1 $\pm$ 0.97	1.5 $\pm$ 0.31**	2,200 $\pm$ 1,600

各測定値データの値は、平均 $\pm$ 標準偏差、\*\*は  $p<0.01$ 、\*は  $p<0.05$  で有意であることを示す。

ビテロジェニンの定量下限は 1 $\text{ng/mg liver}$ 。

c: 対照区と助剤対照区の間で有意差。曝露区との検定は助剤対照区に対して実施。

ディルドリンのメダカによる試験結果

1. ビテロジェニン産生試験（試験機関：独）国立環境研究所）

表 1：試験結果

平均濃度 ( $\mu\text{g/L}$ )	死亡率 (%)	肝指数 (%)		ビテロジェニン濃度( $\text{ng/mg liver}$ )	
		14 日	21 日	14 日	21 日
対照区	3.3	2.0 $\pm$ 0.40	2.3 $\pm$ 0.44	1.6 $\pm$ 0.47	1.6 $\pm$ 0.80
助剤対照区	6.7	2.0 $\pm$ 0.40	2.5 $\pm$ 0.43	1.4 $\pm$ 0.65	1.8 $\pm$ 0.65
0.27	0	2.0 $\pm$ 0.47	2.2 $\pm$ 0.37	1.8 $\pm$ 0.58	3.1 $\pm$ 1.7**
0.70	3.3	2.0 $\pm$ 0.47	2.2 $\pm$ 0.40	1.7 $\pm$ 0.49	2.7 $\pm$ 1.3*
2.26	0	2.2 $\pm$ 0.36	2.2 $\pm$ 0.26	1.6 $\pm$ 0.73	2.4 $\pm$ 1.1*
7.23	16.7	2.2 $\pm$ 0.52	2.2 $\pm$ 0.33	2.0 $\pm$ 0.79*	2.6 $\pm$ 1.4
24.2	100 <sup>a</sup>	-	-	-	-

各測定値データの値は、平均 $\pm$ 標準偏差、\*\*は  $p<0.01$ 、\*は  $p<0.05$  で有意であることを示す。  
ビテロジェニンの定量下限は  $1\text{ng/mg liver}$ 。

a: 曝露開始後 9 日目までにすべて死亡。

2. パーシャルライフサイクル試験（試験機関：独）国立環境研究所）

表 2 - A：試験結果

平均濃度 ( $\mu\text{g/L}$ )	孵化率 (%)	孵化日数 (日)	死亡率 (%)	全長 (mm)	体重 (mg)
対照区	93 $\pm$ 7.6	13 $\pm$ 1.1	13 $\pm$ 3.0	29 $\pm$ 2.0	290 $\pm$ 61
助剤対照区	88 $\pm$ 16	11 $\pm$ 0.95	13 $\pm$ 4.8	29 $\pm$ 1.8	280 $\pm$ 55
0.023	93 $\pm$ 7.6	13 $\pm$ 0.77	16 $\pm$ 1.4	29 $\pm$ 2.4	300 $\pm$ 75
0.073	85 $\pm$ 5.0	16 $\pm$ 1.5**	31 $\pm$ 12**	29 $\pm$ 2.2	280 $\pm$ 69
0.230	83 $\pm$ 12	16 $\pm$ 1.9**	17 $\pm$ 10	29 $\pm$ 2.6	290 $\pm$ 82
0.754	80 $\pm$ 8.7	14 $\pm$ 1.8	4.3 $\pm$ 3.8	30 $\pm$ 2.0	300 $\pm$ 69
2.33	87 $\pm$ 7.6	14 $\pm$ 1.0	29 $\pm$ 4.6*	29 $\pm$ 1.6	290 $\pm$ 53

表 2 - B：(続き)

平均濃度 ( $\mu\text{g/L}$ )	生殖腺指数 (%)		尾数	精巣卵出現率(%) (精巣卵/(精巣+精巣卵))	肝指数 (%)		ビテロジェニン濃度 ( $\text{ng/mg liver}$ )	
	♂	♀			♂	♀	♂	♀
対照区	0.74 $\pm$ 0.23	7.7 $\pm$ 1.1	20	0(0/12)	3.0 $\pm$ 0.44	5.4 $\pm$ 0.66	ND	1,500 $\pm$ 320
助剤対照区	0.83 $\pm$ 0.22	6.4 $\pm$ 2.1	20	0(0/9)	2.9 $\pm$ 0.52	5.8 $\pm$ 0.58	ND	1,700 $\pm$ 580
0.023	0.92 $\pm$ 0.17	7.8 $\pm$ 3.3	20	13(1/8) <sup>b</sup>	2.4 $\pm$ 0.47*	5.3 $\pm$ 0.68	ND	2,000 $\pm$ 700
0.073	1.1 $\pm$ 0.32**	6.1 $\pm$ 3.8	20	7.7(1/13) <sup>c</sup>	2.6 $\pm$ 0.56	5.4 $\pm$ 0.84	1.5 $\pm$ 1.9*	1,900 $\pm$ 550
0.230	0.84 $\pm$ 0.32	6.2 $\pm$ 3.6	20	0(0/9)	3.0 $\pm$ 0.58	5.7 $\pm$ 0.68	ND	2,000 $\pm$ 1,300
0.754	0.76 $\pm$ 0.27	8.2 $\pm$ 2.7	20	0(0/11)	2.7 $\pm$ 0.56	5.8 $\pm$ 1.2	ND	2,100 $\pm$ 720*
2.33	0.80 $\pm$ 0.19	6.9 $\pm$ 3.2	20	0(0/12)	2.8 $\pm$ 0.42	5.1 $\pm$ 1.1	2.5 $\pm$ 4.0*	2,100 $\pm$ 790

各測定値データの値は、平均 $\pm$ 標準偏差、\*\*は  $p<0.01$ 、\*は  $p<0.05$  で有意であることを示す。  
ビテロジェニンの定量下限は  $1\text{ng/mg liver}$ 。

b, c: 精巣卵スコアはそれぞれ 1.1。

ヘプタクロルのメダカによる試験結果

1. ビテロジェニン産生試験 (試験機関：国土環境(株))

表1：試験結果

平均濃度 ( $\mu\text{g/L}$ )	死亡率 (%)	肝指数 (%)		ビテロジェニン濃度( $\text{ng/mg liver}$ )	
		14日	21日	14日	21日
対照区	0	1.8 $\pm$ 0.42	1.9 $\pm$ 0.39	ND	ND
助剤対照区	0	1.8 $\pm$ 0.43	1.7 $\pm$ 0.33	ND	ND
0.674	0	1.4 $\pm$ 0.28*	2.0 $\pm$ 0.39	ND	ND
1.29	0	1.8 $\pm$ 0.37	1.9 $\pm$ 0.36	ND	ND
2.52	0	1.6 $\pm$ 0.20	1.9 $\pm$ 0.40	1.5 $\pm$ 2.5	1.1 $\pm$ 2.2
5.66	0	2.0 $\pm$ 0.49	2.0 $\pm$ 0.50	ND	ND
11.4	23	1.8 $\pm$ 0.23	1.9 $\pm$ 0.35	ND	ND

各測定値データの値は、平均 $\pm$ 標準偏差、\*は $p < 0.05$ で有意であることを示す。

ビテロジェニン濃度のNDは、定量下限未満 (< 1 ng/mg liver) を示す。

2. パーシャルライフサイクル試験 (試験機関：財) 化学物質評価研究機構)

表2-A：試験結果

平均濃度 ( $\mu\text{g/L}$ )	孵化率 (%)	孵化日数 (日)	死亡率 (%)	全長 (mm)	体重 (mg)
対照区	98 $\pm$ 3.3	10 $\pm$ 0.16	1.8 $\pm$ 3.6	30 $\pm$ 1.8	290 $\pm$ 49
助剤対照区	100	9.9 $\pm$ 0.054	3.3 $\pm$ 3.8	30 $\pm$ 1.6	280 $\pm$ 46
0.0649	100	10 $\pm$ 0.11	1.7 $\pm$ 3.3	30 $\pm$ 1.3	280 $\pm$ 41
0.120	100	10 $\pm$ 0.19	1.7 $\pm$ 3.3	30 $\pm$ 1.5	280 $\pm$ 42
0.252	100	10 $\pm$ 0.11*	1.7 $\pm$ 3.3	30 $\pm$ 1.6	290 $\pm$ 45
0.538	95 $\pm$ 6.4	10 $\pm$ 0.064	3.7 $\pm$ 4.3	30 $\pm$ 3.1	290 $\pm$ 64
1.04	98 $\pm$ 3.3	10 $\pm$ 0.18	1.8 $\pm$ 3.6	30 $\pm$ 1.4	280 $\pm$ 33

表2-B：(続き)

平均濃度 ( $\mu\text{g/L}$ )	生殖腺指数 (%)		尾数	精巣卵出現率(%) (精巣卵/(精巣+精巣卵))	肝指数 (%)		ビテロジェニン濃度 ( $\text{ng/mg liver}$ )	
	♂	♀			♂	♀	♂	♀
対照区	1.0 $\pm$ 0.17	5.2 $\pm$ 3.6	20	0 (0/9)	2.0 $\pm$ 0.45	3.2 $\pm$ 0.66	ND	1,700 $\pm$ 1,100
助剤対照区	1.0 $\pm$ 0.36	6.0 $\pm$ 2.8	20	0 (0/10)	1.9 $\pm$ 0.40	4.3 $\pm$ 2.1	ND	1,800 $\pm$ 1,200
0.0649	0.91 $\pm$ 0.29	6.9 $\pm$ 3.3	20	0 (0/8)	2.0 $\pm$ 0.27	3.7 $\pm$ 1.0	ND	1,500 $\pm$ 800
0.120	1.0 $\pm$ 0.44	7.1 $\pm$ 2.4	20	0 (0/10)	1.7 $\pm$ 0.34	3.5 $\pm$ 0.72	ND	1,500 $\pm$ 770
0.252	1.0 $\pm$ 0.21	5.1 $\pm$ 3.2	20	0 (0/7)	1.9 $\pm$ 0.66	3.4 $\pm$ 0.89	2.7 $\pm$ 1.7	2,200 $\pm$ 1,000
0.538	1.2 $\pm$ 0.35	6.2 $\pm$ 3.8	20	0 (0/10)	1.9 $\pm$ 0.44	3.6 $\pm$ 0.50	1.0 $\pm$ 0.74	2,200 $\pm$ 1,400
1.04	0.87 $\pm$ 0.29	7.1 $\pm$ 3.8	20	0 (0/10)	1.6 $\pm$ 0.33	3.6 $\pm$ 0.69	ND	1,600 $\pm$ 1,000

各測定値データの値は、平均 $\pm$ 標準偏差、\*は $p < 0.05$ で有意であることを示す。

ビテロジェニンのNDは、定量下限未満 (< 1 ng/mg liver) を示す。

## マイレックスのメダカによる試験結果

### 1. ビテロジェニン産生試験 (試験機関：国土環境(株))

表 1：試験結果

平均濃度 ( $\mu\text{g/L}$ )	死亡率 (%)	肝指数 (%)		ビテロジェニン濃度( $\text{ng/mg liver}$ )	
		14 日	21 日	14 日	21 日
対照区	3.3	1.8 $\pm$ 0.41	1.9 $\pm$ 0.23	ND	ND
助剤対照区	0	1.7 $\pm$ 0.36	1.9 $\pm$ 0.28	ND	ND
1.07	0	1.7 $\pm$ 0.28	2.0 $\pm$ 0.26	ND	ND
2.99	0	1.7 $\pm$ 0.28	2.0 $\pm$ 0.27	ND	ND
8.36	0	1.8 $\pm$ 0.39	1.7 $\pm$ 0.25	ND	ND
23.8	0	1.9 $\pm$ 0.37	1.9 $\pm$ 0.30	ND	ND
65.6	0	1.7 $\pm$ 0.31	1.8 $\pm$ 0.29	ND	ND

各測定値データの値は、平均 $\pm$ 標準偏差として示した。

ビテロジェニン濃度の ND は、定量下限未満 (< 1  $\text{ng/mg liver}$ ) を示す。

### 2. パーシャルライフサイクル試験 (試験機関：(財) 化学物質評価研究機構)

表 2 - A：試験結果

平均濃度 ( $\mu\text{g/L}$ )	孵化率 (%)	孵化日数 (日)	死亡率 (%)	全長 (mm)	体重 (mg)
対照区	100	9.7 $\pm$ 0.16	0	30 $\pm$ 1.7	280 $\pm$ 48
助剤対照区	100	9.8 $\pm$ 0.14	6.7 $\pm$ 5.4	30 $\pm$ 1.2	270 $\pm$ 37
0.0809	100	9.7 $\pm$ 0.054	5.0 $\pm$ 10	30 $\pm$ 1.9	270 $\pm$ 46
0.222	98 $\pm$ 3.3	9.7 $\pm$ 0.16	3.3 $\pm$ 3.8	30 $\pm$ 1.4	280 $\pm$ 45
0.549	100	9.5 $\pm$ 0.24	5.0 $\pm$ 6.4	30 $\pm$ 1.1	270 $\pm$ 41
1.61	100	9.5 $\pm$ 0.42	3.3 $\pm$ 3.8	30 $\pm$ 1.5	270 $\pm$ 42
4.05	97 $\pm$ 3.8	9.5 $\pm$ 0.22	5.0 $\pm$ 10	30 $\pm$ 0.92	260 $\pm$ 29

表 2 - B：(続き)

平均濃度 ( $\mu\text{g/L}$ )	生殖腺指数 (%)		尾数	精巣卵出現率(%) (精巣卵/(精巣+精巣卵))	肝指数 (%)		ビテロジェニン濃度 ( $\text{ng/mg liver}$ )	
	♂	♀			♂	♀	♂	♀
対照区	0.98 $\pm$ 0.32	6.4 $\pm$ 3.3	20	0 (0/8)	1.7 $\pm$ 0.45	3.2 $\pm$ 1.1	ND	1,500 $\pm$ 740
助剤対照区	0.89 $\pm$ 0.19	6.7 $\pm$ 2.4	20	0 (0/9)	1.6 $\pm$ 0.64	4.0 $\pm$ 2.1	ND	1,900 $\pm$ 690
0.0809	1.2 $\pm$ 0.27	7.4 $\pm$ 2.2	20	0 (0/10)	1.6 $\pm$ 0.71	3.2 $\pm$ 0.56	1.3 $\pm$ 2.5	1,600 $\pm$ 620
0.222	1.0 $\pm$ 0.25	6.1 $\pm$ 3.1	20	10 (1 <sup>a</sup> /10)	1.8 $\pm$ 0.27	3.2 $\pm$ 0.63	ND	1,600 $\pm$ 870
0.549	0.99 $\pm$ 0.23	7.7 $\pm$ 1.1	20	8.3 (1 <sup>a</sup> /12)	2.1 $\pm$ 0.59	3.9 $\pm$ 1.0	ND	1,800 $\pm$ 500
1.61	1.1 $\pm$ 0.20	7.5 $\pm$ 3.0	20	0 (0/9)	1.8 $\pm$ 0.29	3.4 $\pm$ 0.85	1.3 $\pm$ 2.5	1,700 $\pm$ 430
4.05	0.76 $\pm$ 0.31	7.5 $\pm$ 2.7	20	0 (0/12)	1.7 $\pm$ 0.26	3.2 $\pm$ 0.98	ND	1,800 $\pm$ 710

各測定値データの値は、平均 $\pm$ 標準偏差として示した。

ビテロジェニンの ND は、定量下限未満 (< 1  $\text{ng/mg liver}$ ) を示す。

<sup>a</sup> 生殖腺スコアは 1.2 であった。

ケルセンのメダカによる試験結果

1. ビテロジェニン産生試験（試験機関：(財) 化学物質評価研究機構）

表 1：試験結果

平均濃度 ( $\mu\text{g/L}$ )	死亡率 (%)	肝指数 (%)		ビテロジェニン濃度( $\text{ng/mg liver}$ )	
		14 日	21 日	14 日	21 日
対照区	0	2.6 $\pm$ 0.60	2.4 $\pm$ 0.35	ND	ND
助剤対照区	0	2.2 $\pm$ 0.55	2.0 $\pm$ 0.38	ND	ND
3.03	0	2.4 $\pm$ 0.67	2.2 $\pm$ 0.53	ND	ND
4.48	0	2.3 $\pm$ 0.37	2.2 $\pm$ 0.43	ND	ND
6.68	0	2.3 $\pm$ 0.38	2.1 $\pm$ 0.41	ND	ND
10.4	0	2.3 $\pm$ 0.44	2.5 $\pm$ 0.53	ND	ND
14.6	6.7	2.0 $\pm$ 0.48	2.1 $\pm$ 0.31	ND	8.1 $\pm$ 7.7**

各測定値データの値は、平均 $\pm$ 標準偏差、\*\* は  $p < 0.01$  で有意であることを示す。

ビテロジェニン濃度の ND は、定量下限未満 ( $< 1 \text{ ng/mg liver}$ ) を示す。

2. パーシャルライフサイクル試験（試験機関：(財) 化学物質評価研究機構）

表 2 - A：試験結果

平均濃度 ( $\mu\text{g/L}$ )	孵化率 (%)	孵化日数 (日)	死亡率 (%)	全長 (mm)	体重 (mg)
対照区	93 $\pm$ 5.4	9.6 $\pm$ 0.14	11 $\pm$ 12	30 $\pm$ 1.6	270 $\pm$ 43
助剤対照区	97 $\pm$ 3.8	9.1 $\pm$ 0.10	14 $\pm$ 11	30 $\pm$ 1.4	280 $\pm$ 42
0.275	98 $\pm$ 3.3	9.3 $\pm$ 0.18	10 $\pm$ 4.1	30 $\pm$ 1.8	290 $\pm$ 58
0.550	98 $\pm$ 3.3	9.2 $\pm$ 0.12	10 $\pm$ 8.6	30 $\pm$ 1.4	280 $\pm$ 37
1.10	100	9.4 $\pm$ 0.084	6.7 $\pm$ 9.4	30 $\pm$ 1.9	280 $\pm$ 53
2.18	95 $\pm$ 6.4	9.2 $\pm$ 0.20	17 $\pm$ 6.4	30 $\pm$ 2.5	280 $\pm$ 54
4.52	97 $\pm$ 6.7	9.5 $\pm$ 0.15**	8.8 $\pm$ 4.4	30 $\pm$ 1.3	280 $\pm$ 33

表 2 - B：(続き)

平均濃度 ( $\mu\text{g/L}$ )	生殖腺指数 (%)		尾数	精巣卵出現率(%) (精巣卵/(精巣+精巣卵))	肝指数 (%)		ビテロジェニン濃度 ( $\text{ng/mg liver}$ )	
	♂	♀			♂	♀	♂	♀
対照区	0.87 $\pm$ 0.23	5.0 $\pm$ 3.0	20	0 (0/8)	1.7 $\pm$ 0.35	3.2 $\pm$ 0.77	ND	1,200 $\pm$ 660
助剤対照区	1.0 $\pm$ 0.43	7.5 $\pm$ 2.7	20	0 (0/11)	1.8 $\pm$ 0.79	4.0 $\pm$ 0.57	ND	1,400 $\pm$ 410
0.275	1.1 $\pm$ 0.34	5.4 $\pm$ 4.0	20	0 (0/10)	1.9 $\pm$ 0.50	3.7 $\pm$ 0.50	ND	1,200 $\pm$ 760
0.550	1.1 $\pm$ 0.39	3.7 $\pm$ 3.3	20	0 (0/12)	2.2 $\pm$ 0.76	3.6 $\pm$ 0.61	ND	620 $\pm$ 890
1.10	1.1 $\pm$ 0.17	5.1 $\pm$ 3.4	20	0 (0/7)	1.7 $\pm$ 0.31	3.4 $\pm$ 1.3	ND	1,100 $\pm$ 810
2.18	0.93 $\pm$ 0.36	2.8 $\pm$ 3.1	20	0 (0/12)	1.7 $\pm$ 0.80	3.2 $\pm$ 0.60	1.1 $\pm$ 1.8	570 $\pm$ 830
4.52	1.0 $\pm$ 0.54	6.5 $\pm$ 1.1	20	0 (0/12)	2.1 $\pm$ 0.58	4.0 $\pm$ 0.62	1.3 $\pm$ 1.8	1,600 $\pm$ 340

各測定値データの値は、平均 $\pm$ 標準偏差、\*\* は  $p < 0.01$  で有意であることを示す。

ビテロジェニンの ND は、定量下限未満 ( $< 1 \text{ ng/mg liver}$ ) を示す。

ペルメトリンのメダカによる試験結果

1. ビテロジェニン産生試験（試験機関：(財) 化学物質評価研究機構）

表 1：試験結果

平均濃度 <sup>a</sup> ( $\mu\text{g/L}$ )	死亡率 (%)	肝指数 (%)		ビテロジェニン濃度( $\text{ng/mg liver}$ )	
		14 日	21 日	14 日	21 日
対照区	0	2.2 ± 0.59	2.1 ± 0.40	ND	ND
助剤対照区	0	2.4 ± 0.53	2.0 ± 0.45	ND	ND
0.279	0	2.0 ± 0.52	1.9 ± 0.49	ND	ND
0.632	0	2.2 ± 0.63	2.1 ± 0.45	ND	ND
1.29	0	2.3 ± 0.52	2.2 ± 0.55	ND	ND
2.19	0	2.1 ± 0.46	2.1 ± 0.47	ND	ND
5.49	3.3	2.2 ± 0.65	2.0 ± 0.49	ND	ND

各測定値データの値は、平均±標準偏差として示した。

ビテロジェニンの ND は、定量下限未満 (< 1  $\text{ng/mg liver}$ ) を示す。

2. パーシャルライフサイクル試験（試験機関：(財) 化学物質評価研究機構）

表 2 - A：試験結果

平均濃度 <sup>a</sup> ( $\mu\text{g/L}$ )	孵化率 (%)	孵化日数 (日)	死亡率 (%)	全長 (mm)	体重 (mg)
対照区	100	9.8 ± 0.14	3.3 ± 3.8	30 ± 1.5	270 ± 41
助剤対照区	100	9.5 ± 0.15	3.3 ± 3.8	30 ± 1.4	260 ± 46
0.177	98 ± 3.3	9.5 ± 0.32	3.5 ± 4.0	30 ± 2.0	250 ± 40
0.279	98 ± 3.3	9.4 ± 0.22	1.8 ± 3.6	29 ± 1.9	260 ± 45
0.424	100	9.1 ± 0.23	5.0 ± 3.3	30 ± 1.5	270 ± 41
0.636	100	9.6 ± 0.12	1.7 ± 3.3	30 ± 1.5	270 ± 41
0.907	95 ± 6.4	9.6 ± 0.27	3.6 ± 7.1	30 ± 1.4	260 ± 43

表 2 - B：(続き)

平均濃度 <sup>a</sup> ( $\mu\text{g/L}$ )	生殖腺指数 (%)		尾 数	精巢卵出現率(%) (精巢卵/(精巢+精巢卵))	肝指数 (%)		ビテロジェニン濃度 ( $\text{ng/mg liver}$ )	
	♂	♀			♂	♀	♂	♀
対照区	0.97±0.23	7.9±1.2	20	0 (0/11)	2.2±0.43	3.5±0.76	ND	1,100±530
助剤対照区	0.90±0.30	7.6±3.3	20	0 (0/11)	2.2±0.49	3.8±1.3	ND	1,300±740
0.177	0.93±0.24	7.8±1.7	19 <sup>b</sup>	0 (0/9)	1.8±0.67	3.6±0.73	ND	1,800±930
0.279	0.98±0.19	9.6±1.5	20	9.1 (1 <sup>c</sup> /11)	2.0±0.58	3.6±0.81	ND	1,400±320
0.424	1.2±0.33 <sup>*</sup>	6.1±3.2	20	7.7 (1 <sup>c</sup> /13)	2.0±0.73	3.2±1.3	ND	1,700±660
0.636	1.2±0.22	6.2±2.4	20	0 (0/7)	1.8±0.33	3.2±1.2	ND	1,500±320
0.907	1.2±0.30	8.9±2.4	20	0 (0/10)	2.0±0.70	3.6±0.85	ND	1,700±540

各測定値データの値は、平均±標準偏差、\*は  $p < 0.05$  で有意であることを示す。

ビテロジェニンの ND は、定量下限未満 (< 1  $\text{ng/mg liver}$ ) を示す。

<sup>a</sup> 平均測定濃度は *cis* 体と *trans* 体のそれぞれの平均濃度の合計とした。

<sup>b</sup> 固定作業における操作ミスのため N=19 とした。

<sup>c</sup> 生殖腺スコアは 1.2 であった。

マラチオンのメダカによる試験結果

1. ビテロジェニン産生試験（試験機関：国土環境株式会社）

表1：試験結果

平均濃度 ( $\mu\text{g/L}$ )	死亡率 (%)	肝指数 (%)		ビテロジェニン濃度( $\text{ng/mg liver}$ )	
		14日	21日	14日	21日
対照区	0	2.1 $\pm$ 0.26	2.4 $\pm$ 0.29	ND	ND
助剤対照区	0	2.1 $\pm$ 0.33	2.3 $\pm$ 0.33	ND	ND
1.49	0	2.2 $\pm$ 0.40	2.0 $\pm$ 0.27	ND	ND
4.57	0	1.8 $\pm$ 0.31*	2.2 $\pm$ 0.39	ND	ND
15.1	0	1.9 $\pm$ 0.27*	2.2 $\pm$ 0.55	ND	ND
45.6	0	1.9 $\pm$ 0.14	2.2 $\pm$ 0.29	ND	ND
148	0	2.0 $\pm$ 0.34	2.2 $\pm$ 0.36	ND	ND

2. パーシャルライフサイクル試験（試験機関：(財)化学物質評価研究機構）

表2-A：試験結果

平均濃度 ( $\mu\text{g/L}$ )	孵化率 (%)	孵化日数 (日)	死亡率 (%)	全長 (mm)	体重 (mg)
対照区	100	9.9 $\pm$ 0.18	1.7 $\pm$ 3.3	29 $\pm$ 1.7	260 $\pm$ 43
助剤対照区	100	10 $\pm$ 0.033	0	30 $\pm$ 2.3	270 $\pm$ 63
0.375	100	9.9 $\pm$ 0.094	0	29 $\pm$ 1.6	260 $\pm$ 47
0.781	98 $\pm$ 3.3	10 $\pm$ 0.16	1.7 $\pm$ 3.3	30 $\pm$ 2.0	270 $\pm$ 52
1.62	100	10 $\pm$ 0.064	0	30 $\pm$ 1.0	270 $\pm$ 31
2.77	98 $\pm$ 3.3	10 $\pm$ 0.11	5.0 $\pm$ 6.4	30 $\pm$ 2.7	280 $\pm$ 54
6.26	100	10	3.3 $\pm$ 3.8	30 $\pm$ 1.5	270 $\pm$ 48

表2-B：(続き)

平均濃度 ( $\mu\text{g/L}$ )	生殖腺指数 (%)		尾 数	精巢卵出現率(%) (精巢卵/(精巢+精巢卵))	肝指数 (%)		ビテロジェニン濃度 ( $\text{ng/mg liver}$ )	
	♂	♀			♂	♀	♂	♀
対照区	1.0 $\pm$ 0.32	6.2 $\pm$ 3.5	20	0 (0/11)	2.3 $\pm$ 0.73	3.3 $\pm$ 0.67	ND	1,500 $\pm$ 860
助剤対照区	1.0 $\pm$ 0.23	7.2 $\pm$ 3.1	20	0 (0/9)	1.9 $\pm$ 0.54	3.7 $\pm$ 0.33	ND	1,600 $\pm$ 720
0.375	1.1 $\pm$ 0.20	8.0 $\pm$ 1.7	20	0 (0/9)	1.7 $\pm$ 0.36	3.5 $\pm$ 0.81	ND	1,800 $\pm$ 550
0.781	0.96 $\pm$ 0.25	8.5 $\pm$ 2.6	20	0 (0/9)	1.4 $\pm$ 0.56	3.8 $\pm$ 0.76	ND	1,900 $\pm$ 510
1.62	1.2 $\pm$ 0.40	9.4 $\pm$ 1.6	20	0 (0/11)	1.9 $\pm$ 0.70	3.8 $\pm$ 0.75	ND	1,400 $\pm$ 310
2.77	1.2 $\pm$ 0.30	7.4 $\pm$ 3.4	20	0 (0/11)	1.9 $\pm$ 0.42	3.9 $\pm$ 1.0	ND	1,300 $\pm$ 440
6.26	1.1 $\pm$ 0.22	8.7 $\pm$ 2.1	20	0 (0/9)	2.1 $\pm$ 0.67	3.7 $\pm$ 0.57	ND	1,100 $\pm$ 290*

各測定値データの値は、平均 $\pm$ 標準偏差、\*は  $p < 0.05$  で有意であることを示す。  
ビテロジェニンの ND は、定量下限未満 ( $< 1 \text{ ng/mg liver}$ ) を示す。



表 選定物質のメダカエストロジェン受容体 ( $\alpha$ 、 $\beta$ ) 結合競合阻害試験、  
メダカエストロジェン受容体 ( $\alpha$ 、 $\beta$ ) レポータージーン試験及び  
メダカアンドロジェン受容体レポータージーン試験の結果

	エストロジェン受容体 $\alpha$ (%)		エストロジェン受容体 $\beta$ (%)		アンドロジェン受容体 (%)
	結合競合阻害試験	レポータージーン試験	結合競合阻害試験	レポータージーン試験	レポータージーン試験
17 $\beta$ -エストラジオール ジヒドロテストステロン	100	100	100	100	100
アルドリン	0.29	—	0.025	—	—
エンドリン	0.21	—	0.019	—	—
ディルドリン	0.30	—	0.0079	—	—
ヘプタクロル	0.16	—	0.015	—	—
マイレックス	—	—	—	—	—
マラチオン	0.0044	—	0.0010	—	—
ケルセン	0.024	n. d.	0.0038	—	—
ペルメトリン	0.0090	—	0.0048	—	—
op'-DDT	0.54	n. d.	0.17	—	—

結合競合阻害試験では陽性対象物質の活性を 100 とした際の相対結合親和性 (%) を、レポータージーン試験では相対遺伝子転写活性 (%) を示した。マラチオン、ケルセン、ペルメトリンについては各試験を実施中。

—: 試験した濃度範囲で活性が認められなかった。

n. d.: 活性が認められたが IC<sub>50</sub> 値は得られず、相対活性が計算できなかった。

## SPEED'98における生態系への内分泌かく乱作用による影響に関する 魚類を用いた試験体系の概況

### 1. 評価体制

平成16年度までは、「内分泌攪乱化学物質問題検討会」のもとに設置された「内分泌攪乱作用が疑われる物質のリスク評価検討会」のなかに生態系の専門家からなる「内分泌攪乱化学物質の生態影響に関する試験法開発検討会」を設置し（鳥類、両生類、無脊椎動物についてはそれぞれ担当グループを更に設置）、①物質ごとのプロトコール及び②そのプロトコールに則った実施状況や試験結果について助言評価を行った。

平成17年度からは、「化学物質の内分泌かく乱作用に関する検討会」のもとに設置された「作用・影響評価検討会」のなかに生態系の専門家からなる「魚類試験実務者会議」を設置し（両生類、無脊椎動物についてはそれぞれ試験法開発研究班を更に設置）、①物質ごとのプロトコール及び②そのプロトコールに則った実施状況や試験結果について助言評価を行った。

### 2. 有害性評価の対象とした化学物質

環境省においては、内分泌攪乱化学物質の生態系への影響評価のため、スクリーニング・試験法について、**OECD**（経済協力開発機構）の国際的取組に協調しつつ開発を進めるとともに、わが国において開発した方法（メダカのビテロジェニンアッセイ・パーシャルライフサイクル試験・フルライフサイクル試験・レセプターバインディングアッセイ・レポータージーンアッセイ）を用いて、有害性評価を進めた。対象とした化学物質は、平成12年度に選定した12物質<sup>1)</sup>、平成13年度に選定した8物質<sup>2)</sup>、平成14年度に選定した8物質<sup>3)</sup>及び平成15年度に選定した8物質<sup>4)</sup>である。

- 1) トリブチルスズ、4-オクチルフェノール、ノニルフェノール、フタル酸ジ-n-ブチル、フタル酸ジシクロヘキシル、フタル酸ジ-2-エチルヘキシル、オクタクロロスチレン、ベンゾフェノン、トリフェニルスズ、フタル酸ジエチル、フタル酸ブチルベンジル及びアジピン酸ジ-2-エチルヘキシル
- 2) ペンタクロロフェノール、アミトロール、ビスフェノールA、2,4-ジクロロフェノール、4-ニトロトルエン、フタル酸ジペンチル、フタル酸ジヘキシル及びフタル酸ジプロピル
- 3) ヘキサクロロベンゼン、ヘキサクロロシクロヘキサン、クロルデン、オキシクロルデン、trans-ノナクロル、DDT、DDE及びDDD
- 4) アルドリン、エンドリン、ディルドリン、ヘプタクロル、マイレックス、ケルセン、マラチオン及びペルメトリン

### 3. 魚類

メダカを試験動物とし、スクリーニングの位置付けで、①ビテロジェニンアッセイ、②パーシャルライフサイクル試験、③**FLF・d-rR**メダカ試験等を実施するとともに、確定試験の位置付けでフルライフサイクル試験を実施した。また、必要に応じて、物質ごとに試験を追加するとともに、これらの試

験結果を補完する目的で試験管内 (*in vitro*) 試験を実施した。なお、OECDにおいて、魚類のビテロジェニン産生試験の標準化を目的としたリングテスト（試験法の有用性や妥当性等を検証する目的で、同一試験を同一条件で複数の機関により実施するテスト）が平成15年3月より開始され、日本がリーダーラボ（取りまとめ試験機関）として結果を取りまとめている。

## (1) スクリーニング試験

### ① ビテロジェニンアッセイ

雄メダカを化学物質に21日間曝露し、ビテロジェニン産生能力を測定することにより、化学物質のエストロジェン様作用の有無・程度を把握した。曝露濃度は、環境実態調査結果により得られた魚類の推定曝露濃度を参考に、被験物質の水溶解度、一般毒性値、内分泌攪乱作用を示すと疑われた試験結果（信頼性評価済み）及び水中での検出限界値等を考慮して、5群設定した。本アッセイについては、36物質<sup>5)</sup>について試験を実施した。

5)ヘキサクロロベンゼン、ヘキサクロロシクロヘキサン、*cis*-クロルデン、*trans*-ノナクロル、*p,p'*-DDT、*o,p'*-DDT、*p,p'*-DDE、*p,p'*-DDD、トリブチルスズ、4-オクタチルフェノール、ノニルフェノール、フタル酸ジ-*n*-ブチル、フタル酸ジシクロヘキシル、フタル酸ジ-2-エチルヘキシル、オクタクロロスチレン、ベンゾフェノン、トリフェニルスズ、フタル酸ジエチル、フタル酸ブチルベンジル、アジピン酸ジ-2-エチルヘキシル、ペンタクロロフェノール、アミトロール、ビスフェノールA、2,4-ジクロロフェノール、4-ニトロトルエン、フタル酸ジペンチル、フタル酸ジヘキシル、フタル酸ジプロピル、アルドリン、エンドリン、ディルドリン、ヘプタクロル、マイレックス、ケルセン、マラチオン及びペルメトリン

### ② パーシャルライフサイクル試験

化学物質をメダカに受精卵から成熟期を通して約70日間曝露することにより、主に性分化への影響を把握する試験であり、孵化、孵化後の生存、成長、二次性徴、生殖腺組織、ビテロジェニン産生等をエンドポイントとした。曝露濃度は、原則としてビテロジェニンアッセイの結果を参考に、5群設定した。本試験については、36物質<sup>5)</sup>について試験を実施した。

### ③ FLF・d-rR メダカ試験

胚の白色色素の有無により遺伝的な性別が判別できるFLFメダカや体色により遺伝的な性別が判別できるd-rRメダカなどの試験生物の開発を進めており、アーリーライフステージでの影響を把握する試験へ応用できる系統を確立した。

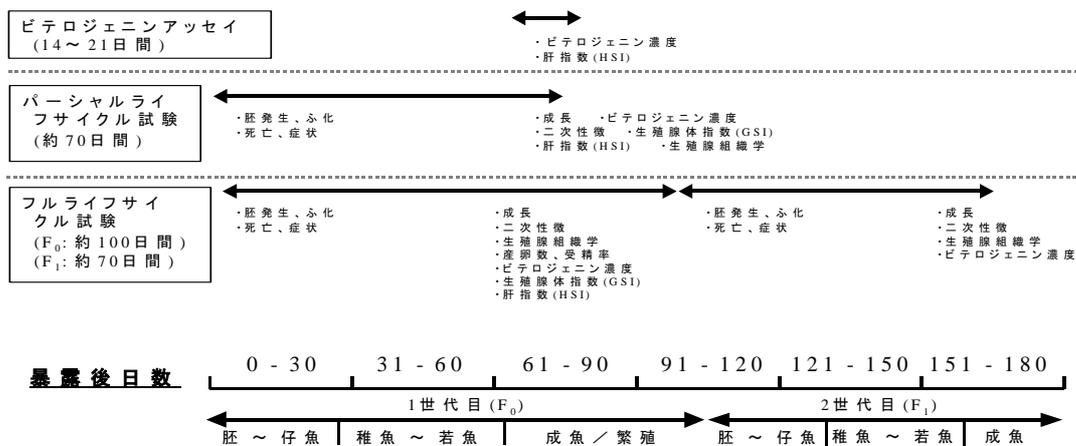
## (2) 確定試験

### ① フルライフサイクル試験

化学物質をメダカに少なくとも2世代（約180日間）にわたり曝露するこ

とにより、発達、成熟、繁殖期を含む全生涯を通しての影響を把握する試験であり、孵化、孵化後の生存、成長、二次性徴、生殖腺組織、ビテロジェニン産生、産卵数、受精率等をエンドポイントとした。曝露濃度は、パーシャルライフサイクル試験結果を参考に、原則として5群設定した。本試験については、5物質<sup>6)</sup>及び陽性対照物質（17β-エストラジオール、エチニルエストラジオール、メチルテストステロン、フルタミド）について試験を実施した。

6) 4-オクチルフェノール、ノニルフェノール、フタル酸ジ-n-ブチル、ビスフェノールA及びo,p'-DDT



ビテロジェニンアッセイでは雄メダカに21日間、パーシャルライフサイクル試験では受精卵から成熟期を通して約70日間、フルライフサイクル試験では少なくとも2世代(約180日間)にわたり試験物質を曝露する。なおメダカが孵化して産卵する期間は、約90日から120日程度である。

図1 メダカ試験の概要

### (3) 試験管内 (*in vitro*) 試験

#### ① レセプターバインディングアッセイ

化学物質のメダカエストロジェンレセプター (ER $\alpha$  及び ER $\beta$ ) への結合能力を測定するアッセイを開発し、36物質<sup>5)</sup>について試験を実施した。

#### ② レポータージーンアッセイ

レセプター遺伝子及びレポータージーンを導入したヒト子宮頸がん由来 HeLa 細胞を用いることにより、化学物質のメダカエストロジェンレセプター (ER $\alpha$  及び ER $\beta$ ) 及びアンドロジェンレセプター (AR) への結合後の転写活性能力を測定するアッセイを開発し、36物質<sup>5)</sup>について試験を実施した。

### 内分泌攪乱化学物質の魚類への影響評価のための試験体系について

※必要に応じて、物質ごとに試験を追加する。

