

環境省請負業務

平成 28 年度

化学物質の内分泌かく乱作用に関する  
第二段階生物試験（ビスフェノール A）実施業務

報告書  
(改訂版)

平成 29 年 3 月

国立研究開発法人 国立環境研究所

## はじめに

米国の動物学者シーア・コルボーンらにより 1996 年（平成 8 年）に刊行された「奪われし未来」では、化学物質が野生生物に深刻な影響を及ぼすことが取り上げられ、人の健康に対しても同様な作用があるのではないかという懸念から、大きな反響を呼び、内分泌かく乱化学物質問題について国内外の関心を集めた。一方で、この問題に対しては、当時、科学的に未解明な部分が多く、日本だけでなく、国際的にも早急な対応が求められた。このような中、経済協力開発機構（OECD）では、化学物質のテストガイドラインプログラムの一環として、内分泌かく乱化学物質の試験及び評価（Endocrine Disruptors Testing and Assessment：EDTA）に関する検討を進め、加盟国への情報提供と活動の間の調整、化学物質の内分泌かく乱作用を検出するための新規試験法の開発と既存の試験法の改定、有害性やリスク評価の手法の調和等を目的とし、この下で、内分泌かく乱化学物質の試験と評価に関する概念的フレームワークが整理され、試験及び評価に関する手法が開発されている。

我が国の内分泌かく乱化学物質問題への取り組みについては、平成10年（1998年）に環境省（当時環境庁）が、専門家の研究班による検討結果に基づき、それまでの科学的知見や今後の対応方針等をとりまとめた「内分泌攪乱化学物質問題への環境庁の対応方針について - 環境ホルモン戦略計画SPEED'98 -」を策定し、本格的に研究が推進された。この取り組みによって得られた多方面かつ科学的知見を踏まえ、環境省では、「化学物質の内分泌かく乱作用に関する環境省の今後の対応方針について - ExTEND2005-」を策定し、内分泌かく乱化学物質問題における新たな方向性が示された。ExTEND2005では、野生生物の観察、環境中濃度の実態把握及びばく露の測定、基盤的研究の推進、作用・影響評価に関する取り組み、リスク評価とリスク管理、情報提供とリスクコミュニケーション等を柱として推進すると共に、OECD等の国際協力の下で生物を用いた試験法開発を積極的に推進し、成果の一部については、OECDに提案され、テストガイドラインとして採択されている。

一方、海外では、1999年に米国環境保護庁（USEPA）において、EDSP（内分泌かく乱物質スクリーニング計画）が策定され、人の健康に有害な影響を及ぼすようなエストロゲン作用をもつ農薬及び飲料水中汚染化学物質を中心にスクリーニングすることが計画されている。Tier1（生物の内分泌系に対する化学物質の作用の検出を目的としたスクリーニング）と Tier2（化学物質の生物に対する有害な影響を確認するための試験（多世代試験））の2段階の試験体系を採用しており、2010年（平成22年）に Tier 1 の対象物質 List 1（ヒトばく露の可能性のある物質）が選定され、登録者、製造者及び輸入業者に対して試験の実施命令が出された。2012年までに試験が完了し、証拠の重み付け（Weight of Evidence）を考慮した結果の評価が行われた。2015年9月に List 1 の 52 物質について評価結果が公表され、うち 18 物質について Tier 2 の試験実施が推奨されている。

また、欧州委員会では、平成 8 年（1996 年）から内分泌かく乱化学物質に対する取り組みを進めており、内分泌かく乱化学物質に対する戦略として、短期的な取り組み（情報の集約による優先検討対象物質の選定）、中期的取組み（試験法の開発や研究の実施）及び長期的取組み（リスク評価手法及びリスク管理手法の検討）が継続して実施されている。また、平成 19 年（2007 年）に発効した REACH 規則（欧州連合における化学物質の登録・評価・認可及び制限に関する規則）においては、高懸念物質である許可対象物質となりうる要件のひとつとして、「内分泌かく乱作用を有する」物質であって、人や環境に対する深刻な影響をもたらすおそれがあるとの科学的根拠がある場合が挙げられている。

さらに OECD では、化学物質の内分泌かく乱作用に関する OECD の検討を方向付けるため、2009 年（平成 21 年）9 月に OECD 加盟国の専門家を集め、内分泌かく乱化学物質の試験、評価及び管理に関するワークショップを開催し、今後 OECD において検討を進めるべき事項や研究ニーズについての提言がされた。特に、内分泌かく乱化学物質の評価に関する検討の必要性が指摘され、平成 24 年（2012 年）に内分泌かく乱化学物質の評価に関するガイダンス文書が公表された。

環境省は、内分泌かく乱化学物質問題について、これまでの ExTEND2005 や EXTEND2010 の枠組みのうち、踏襲すべきものは引き続き採用しつつ、改善を加えた上で、新たなプログラムである「EXTEND2016」を構築し、「環境行政の中で化学物質の内分泌かく乱作用に伴う環境リスクを適切に評価し、必要に応じて管理していくことを目標として、化学物質の内分泌かく乱作用の評価手法の確立と評価の実施を加速化することに力点を置く」という EXTEND2010 の基本理念を踏襲し、これをさらに着実に推進している。今後、化学物質が環境を経由して人の健康や生態系に及ぼす影響を防止する観点から、引き続き生態系への影響について優先的に取り組み試験評価手法の確立と評価の実施を重点的に進められていくことになる。

本書は、内分泌かく乱物質に対する魚類を用いた第二段階試験（有害性の確認）として、過年度業務において米国環境保護庁などとともに開発・提案・承認されたメダカ拡張一世代繁殖試験（OECD テストガイドライン No. 240）を用いて、対象となるビスフェノール A について実施した結果について報告するものである。

平成29年3月  
国立研究開発法人 国立環境研究所

# 目次

I.	概要	1
1.	業務の目的	1
2.	業務の内容	1
II.	メダカ拡張一世代繁殖試験に係る業務	2
1.	背景と目的	2
2.	実施内容	3
3.	材料及び方法	3
3.1	被験物質	3
3.2	試験生物	4
3.3	試験環境及び条件など	4
3.4	ばく露及び観察・測定の方法	8
3.5	結果の算出	13
4.	結果	15
4.1	試験環境	15
4.2	試験液の被験物質濃度	15
4.3	F0 世代の結果	15
4.4	F1 世代胚～稚魚期の結果	21
4.5	F1 世代亜成体の結果	22
4.6	F1 世代成熟個体の結果	25
4.7	F2 世代の結果	31
4.8	結果の概要	32
4.9	考察	34
4.10	参考文献	36
参考資料	調温清浄ろ過水について	37

## I. 概要

### 1. 業務の目的

環境省では、平成22年7月に「化学物質の内分泌かく乱作用に関する今後の対応—EXTEND2010—」を取りまとめ、化学物質の内分泌かく乱作用に伴う環境リスクを適切に評価し、必要に応じ管理していくことを目標として、評価手法の確立と評価の実施を加速化することとしている。このため、まだ十分確立されていない試験法について、引き続き開発を進める必要があるとともに、OECD等で進められている試験法確立に今後も積極的に協力し、国際的な貢献を行う必要がある。

平成27年9月にOECDテストガイドラインとして認定されたメダカ拡張一世代繁殖試験（Medaka Extended One Generation Reproduction Test、以下「MEOGRT」という。）は内分泌かく乱化学物質の確定試験として重要であり、EXTEND2010の中で第二段階試験として位置づけられている。

本業務は、環境省が平成22年11月に取りまとめた化学物質の内分泌かく乱作用に関する試験及び評価の考え方や枠組みに基づき、内分泌かく乱作用に関する評価等に必要なデータを集積するため、既に実施された試験管内試験及び第一段階生物試験の結果を踏まえて優先順位が高いと考えられる物質（ビスフェノールA）について、第二段階生物試験であるMEOGRTを実施するものである。

### 2. 業務の内容

#### （1）メダカ拡張一世代繁殖試験の実施及び検討

OECDで合意されたテストガイドラインに基づいてビスフェノールAを用いてMEOGRTを実施し、試験条件の確認等を行うとともに、各エンドポイントに関するデータ等を取得した。また、得られたデータを踏まえて、試験生物数の削減等、試験の簡素化に繋がる試験条件の変更案及びその妥当性等について検討を行った。各エンドポイントの統計学的検出力を踏まえた試験物質の有害性評価の観点等から、試験生物数を削減することの妥当性等について検討した。

#### （2）試験法の確立等に関する検討班会議への報告に係る作業

本業務の結果について、環境省が開催する検討会などへの会議に報告するため、環境省担当官の指示に従い資料を作成の上、担当官に提出した。また、平成29年2月20日に航空会館にて開催された「第2回化学物質の内分泌かく乱作用に係る試験法の確立等に関する検討班会議」に出席し、資料に関する説明、質疑応答を行った。

#### （3）報告書の作成

上記（1）、（2）の結果を取りまとめた報告書（本報告書）を3部、報告書の電子データを収納した電子媒体（DVD-ROM）9式を作成した。

## II. メダカ拡張一世代繁殖試験に係る業務

### 1. 背景と目的

EXTEND2010 における内分泌かく乱作用の有害性評価の枠組み（生殖に及ぼす影響）では、化学物質の（試験対象物質）の内分泌かく乱作用による有害性を確認する第2段階生物試験（長期間のばく露による生物試験）として、メダカを用いる多世代試験法の開発を進めている。メダカ多世代試験は、化学物質の母体から卵への移行による次世代、あるいは次世代から次々世代への影響（有害性）の評価を目的として、メダカを複数世代にわたって化学物質にばく露、各世代においてビテロジェニン、生殖腺組織、二次性徴、間性又は性転換、繁殖（産卵数・受精率など）及び成長などのエンドポイントを測定し、化学物質のメダカに対する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、抗アンドロゲン様作用、アロマターゼ阻害作用及び視床下部・下垂体・生殖腺軸への影響などの評価を行う。これは、OECD の試験法・評価体系で Level 5 に位置付けられる試験法である。

メダカを用いる Level 5 の試験法については、平成 18 年当時、OECD においてガイドライン化が進んでいなかったことから、第 3 回日米二国間実務者会議（平成 18 年 12 月）において、米国提案のメダカ二世世代試験法について日米共同で検証及び標準化を進めることに合意した。以降、年 1 回開催の日米二国間実務者会議における議論及び合意などを踏まえて、日米両国において共通の試験プロトコールによる検証試験などを実施し、試験法の標準化に向けた技術的課題などの検討を行うことになった。平成 21 年 4 月に、日米共同で OECD に提出した Medaka Life Cycle (MLC) / Multi-generation Test (MMT) のガイドライン化のためのプロジェクト提案書 (SPSF) が承認され、OECD のテストガイドラインプログラムのもとでテストガイドライン化に向けた取り組みが開始された。平成 22 年（2010 年）4 月には、米国より、試験プロトコールが提案された。日本は、このガイドライン案に準じてタモキシフェンクエン酸塩を用いた検証試験を行い、その過程で試験法や条件など関わる技術的課題を整理し、再検討した。一方、米国では、これまでに日米で実施された検証試験の結果（データ）に基づいて、主に繁殖に関わるエンドポイント（産卵数等）における統計学的検出力の観点から試験条件の妥当性等についての検証を行った。第 7 回及び第 8 回日米二国間実務者会議（平成 22・23 年度）では、動物愛護及び統計学的検出力を考慮した試験生物数・繰り返し数や各世代のばく露期間等について、テストガイドライン化に向けた再検討及び改訂プロトコール案の策定が行われ、これをもとに試験法に関わる技術的課題の再検討を行う事が合意された。改定プロトコール案に準じた試験の実施は、エストロゲン作用の陽性対象物質であるエストロンを被験物質として平成 24 年度に実施され、試験法としての妥当性や技術的課題などについて検討を行った。その結果は、第 9 回日米二国間実務者会議（平成 25 年度）にて報告され、協議結果を踏まえて、MMT として 27 週で検討されていた試験期間を 19 週に短縮するメダカ拡張一世代繁殖試験（MEOGRT: the Medaka Extended One Generation Reproduction Test）がドラフトテストガイドライン案として OECD の専門家グループに提出された。

第 10 回日米二国間実務者会議（平成 26 年度）において OECD のテストガイドライン化に向けた最終プロコール案が取りまとめられた。試験期間を 19 週に短縮する米国案の MEOGRT に対し、過年度の検討結果より F2 世代の繁殖影響を確認することに重要性が示唆されることから、試験期間について 3 つのオプション、即ち 19 週・27 週・31 週の 3 種を設けて、試験目的に応じて選択するスキームを作成し、日本案として提案した。しかし、協議の結果、米国案の MEOGRT を最終プロトコールとすることで合意し、OECD に提出、平成 27 年 4 月に開催された第 27 回 OECD-WNT 会議においてドラフトテストガイドライン OECD TG240 として承認、7 月にガイドラインとして公表された<sup>1)</sup>。

平成 27 年度の環境省請負業務「化学物質の内分泌かく乱作用に関する試験法開発に係る業務」では、承認された OECD TG240 に基づいて 4-ノニルフェノールについて MEOGRT を実施し、その結果を報告した<sup>2)</sup>。

## 2. 実施内容

承認された OECD TG240 に基づいて MEOGRT を実施し、試験条件の確認等を行うとともに、各エンドポイントに関するデータ等を取得する。試験物質として、ビスフェノール A を用い、試験条件の違いや MEOGRT の妥当性について検討する。また、得られたデータを踏まえて、試験生物数の削減等、試験の簡素化に繋がる試験条件の変更案及びその妥当性等について検討を行う。各エンドポイントの統計学的検出力を踏まえた試験物質の有害性評価の観点等から、試験生物数を削減することの妥当性等について検討する。

## 3. 材料及び方法

### 3.1 被験物質

被験物質の名称、物理化学的性状等を以下に示す<sup>3, 4, 5)</sup>。試験に用いる試薬は、東京化成工業株式会社（型番：GK01、純度：99.0%）より入手した。

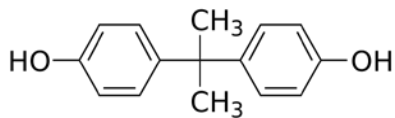
#### (1) CAS 登録番号

CAS: 80-05-7

#### (2) 一般名

和名：ビスフェノール A  
英名：Bisphenol-A (BPA)

#### (3) 構造式



#### (4) 分子式及び分子量

分子式：C<sub>15</sub>H<sub>16</sub>O<sub>2</sub>  
分子量：228.29

#### (5) 化学名

和名：4,4'-(プロパン-2,2-ジイル)ジフェノール (IUPAC 命名法)  
英名：4,4'-(propane-2,2-diyl)diphenol (IUPAC 命名法)

#### (6) 溶解性

水溶解度：120-300 mg/L

#### (7) 融点

150-155°C

#### (8) 分配係数

log K<sub>ow</sub> = 3.32

### 3.2 試験生物

#### (1) 供試生物種

生物種はヒメダカ (*Oryzias latipes*) とした。試験に用いたヒメダカは、財団法人化学物質評価研究機構より供与され、10年以上、当施設飼育馴化室において飼育繁殖している系統 (NIES 系統) を使用した。

#### (2) 飼育環境及び条件

飼育水には、当施設の淡水処理装置で製造された「調温清浄濾過水」を使用した (参考資料Ⅲ)。ヒメダカの飼育は全て飼育馴化室において、以下の条件で行った。

- ・飼育水槽：オールガラス水槽 (5 L)
- ・飼育水：調温清浄濾過水
- ・飼育方法：流水式
- ・水温・pH：25±2℃、pH 7.5±0.5
- ・光周期：明期 16 時間・暗期 8 時間
- ・エアレーション：なし
- ・飼料：ブラインシュリンプ (Aquafauna Bio-Marine 社製) のふ化後 24 時間以内の幼生を、1 日 2 回、飽食量を給餌

### 3.3 試験環境及び条件など

#### (1) 試験室

試験は全て、国立環境研究所 環境リスク研究棟 魚類・両棲類試験室で行った。

#### (2) 試験装置

流水式魚類試験装置 (SIS-24F、柴田科学株式会社製) を使用した。

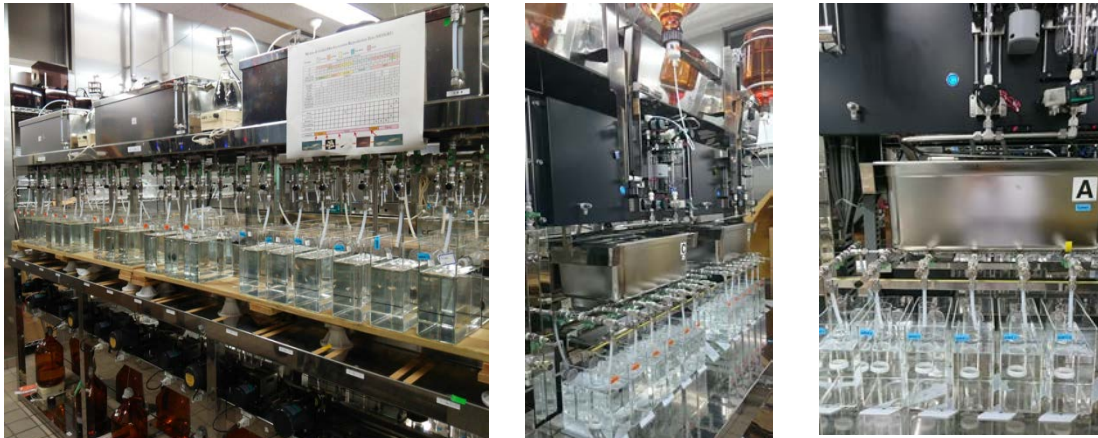


図 1 流水式装置 (左：1号機、中央：2号機、右：2号機・ふ化器をセット)

#### (3) 試験条件

ばく露は、前述の OECD TG240 に準じて、以下の条件で行った。

- ・飼育水槽：オールガラス水槽
- ・希釈水：調温清浄濾過水
- ・ばく露方式：流水式 (換水率 5 回/日以上)



### III. メダカ拡張一世代繁殖試験に係る業務

- ばく露期間：F0 世代から F2 世代のふ化までの計 19 週
  - F0 世代 : 4 週間
  - F1 世代 : 15 週間
  - F2 世代 : 対照区のふ化日の中央値の 2 倍 (約 2 週間)
- 試験液量：
  - F0 世代 : 2 L/連
  - F1 世代 (受精後 0~6 週目) : 2 L/連
  - F1 世代 (受精後 7~10 週目) : 5 L/連
  - F1 世代 (受精後 10~15 週目) : 5 L/連
- 試験区数：被験物質ばく露区 5 濃度 (32, 100, 320, 1000, 3200  $\mu\text{g/L}$ )、対照区
- 連数：
  - F0 世代 : 12 連 (対照区)、6 連 (ばく露区)
  - F1 世代 (受精後 1~10 週目) : 12 連 (対照区)、6 連 (ばく露区)
  - F1 世代 (受精後 10~15 週目) : 24 連 (対照区)、12 連 (ばく露区)
  - F2 世代 (受精後 1~2 週目) : 12 連 (対照区)、6 連 (ばく露区)
- 供試生物数：
  - F0 世代 : 2 個体 (オス 1 個体・メス 1 個体) /連
  - F1 世代 (受精後 1 週目) : 20 個体/連
  - F1 世代 (受精後 2~10 週目) : 12 個体/連
  - F1 世代 (受精後 10~15 週目) : 2 個体 (オス 1 個体・メス 1 個体) /連
  - F2 世代 (受精後 1~2 週目) : 20 個体/連
- 供試生物齢：
  - F0 世代 : 12-16 週齢 (本試験では 16 週齢 (受精後 107 日))  
オス 250 mg 以上、メス 350 mg 以上
- 継代時期：
  - F0 世代 : 試験開始 4 週目のできるだけ早い日 (+1 日)  
(本試験では試験開始 22 日目、F0 : 15 週齢目)
  - F1 世代 : 試験開始 120 日目 (+1 日) (F1 : 15 週齢目)  
(本試験では試験開始 120 日目および 121 日目)
- 水温 :  $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$
- pH :  $\text{pH } 7.5 \pm 0.5$
- 溶存酸素飽和度 : 60% 以上
- 光周期 : 明期 16 時間・暗期 8 時間
- エアレーション : なし
- 飼料 : ブラインシュリンプ (Aquafauna Bio-Marine 社製) のふ化後 24 時間以内の幼生を、OECD TG240 Annex 1 と NIES 系統の飽食量を考慮して、成長段階に応じ表 1 に示す量を 1 日 2 回給餌した。

表 1 ブラインシュリンプ (*Artemia spp. nauplii*) の給餌量 (mg dry weight/fish/day)

ふ化後週齢 (wph)	ふ化後日齢 (dph)	本試験	OECD TG240 ANNEX 5
Week 1	Day 1		0.5
	Day 2		0.5
	Day 3	1.0	0.6
	Day 4	1.0	0.7
	Day 5	1.0	0.8
	Day 6	1.0	1.0
	Day 7	1.0	1.3
Week 2	Day 8	2.0	1.7
	Day 9	2.0	2.2
	Day 10	3.0	2.8
	Day 11	3.0	3.5
	Day 12	4.0	4.2
	Day 13	4.0	4.5
	Day 14	5.0	4.8
Week 3	Day 15	5.0	5.2
	Day 16-21	6.0	5.6
Week 4	Day 22-28	8.0	7.7
Week 5	Day 29-35	16.0	9.0
Week 6	Day 36-42	24.0	11.0
Week 7	Day 43-49	40.0	13.5
Week 8	Day 50-56	48.0	22.5
Week 9	Day 57-63	(20 fish/tank) 53.3	22.5
		(2 fish/tank) 56.0	22.5
Week 10	Day 64-70	60.0	22.5
Week 11~	Day 71~	60.0	22.5

#### (4) 環境測定機器

水温、pH、溶存酸素の測定は、それぞれ以下の機器を用いて行った。

- ・水温計：CT-430WP、株式会社カスタム製
- ・pH計：D-55、株式会社堀場製作所製
- ・溶存酸素計：HQ30d、HACH社製

#### (5) 試験液の調製

被験物質 25 g を電子天秤 (AG204、Mettler Toledo 社製) によって秤量し、アセトン (残留農薬試験用 和光純薬工業株式会社製) 100 mL に溶解させ、ストックソリューション A (250 mg/mL) を作製した。次に、3.2, 10, 32, 100, 320 mg/L のストックソリューション B を作製するため、57.6, 180, 576, 1800, 5760  $\mu$ L のストックソリューション A を容量 5L のねじ口瓶に投入し、乾固させた後に飼育水 4.5 L を投入、超音波処理によって混合し、ストックソリューション B を作製した。

各ばく露区用のストックソリューション B を流水式ばく露装置にセットし、飼育水で希釈し (薬液 1 に対して飼育水 100)、設定濃度に調整した。調製直後の試験液は各水槽へ滴下した。ストックソリューション A の調整は 1 ヶ月に 1 度、ストックソリューション B の調製は 4 日に 1 度の頻度で行った。

## (6) 被験物質の濃度測定

生物試験に使用した試験水を超純水、アセトニトリルで希釈した後、フィルター濾過し、LC/MS を用いて定量した。

### 【試薬】

- ・ ビスフェノール A：東京化成工業株式会社製
- ・ アセトニトリル：残留農薬・PCB 試験用 和光純薬工業株式会社製
- ・ GLクロマトディスク 4P 0.45  $\mu\text{m}$ ：ジーエルサイエンス株式会社
- ・ ディスポーザブルシリンジ：Syringe PP/PE without needle 1 mL 用 SIGMA-ALDRICH 社
- ・ 精製水：栗田工業株式会社 PURECONTI SYSTEM と ADVANTEC 社 RFU665DA ULTRAPURE WATER SYSTEM を組み合わせた系により処理したもの。

### 【器具】

メスシリンダー、メスフラスコ、シリンジ、共栓円錐管 10mL、

### 【標準液の調整】

ビスフェノール A 10 mg を秤量し、アセトニトリルに溶解、定容して 1000 mg/L 標準液を作成した。この標準液を希釈し、20、50、100、200、500 $\mu\text{g/L}$  の標準液を作成して検量線に使用した。

### 【試験水の前処理】

試料は測定対象の濃度が 15~500 $\mu\text{g/L}$  程度、50%アセトニトリル溶液 (v/v) となるよう必要に応じて希釈し、クロマトディスクによりろ過した後、分析機器による測定に供した。

### 【分析機器】

- ・ LC  
コントローラー：島津製作所製 SCL-10A VP  
ポンプ：島津製作所 LC-10AD  
オートインジェクター：島津製作所製 SIL-10A VP  
オーブン：島津製作所製 CTO-10A VP
- ・ MS  
島津製作所製 LCMS-2010 EV

### 【測定条件】

- ・ LC  
カラム：島津製作所製 Shim-pack VP-ODS (5  $\mu\text{m}$ 、150 $\times$ 2.0 mmI.D)  
移動相：A：水、 B：アセトニトリル (1：3、v/v)  
流量：0.2 mL/min  
カラム温度：45 $^{\circ}\text{C}$   
注入量：5  $\mu\text{L}$
- ・ MS  
インターフェース電圧：1.5 kV  
CDL 電圧：-25 V  
イオン源温度：200 $^{\circ}\text{C}$   
イオン化法：ESI (-)

モニターイオン (m/z) : 定量イオン 227、確認イオン 228  
 上記分析条件下における保持時間は約 2.5 分であった。

### 3.4 ばく露及び観察・測定の方法

MEOGRT (OECD TG240) のタイムラインを図 2、試験期間中における連数の変化とプールおよび分配の手順を図 3 に示した。

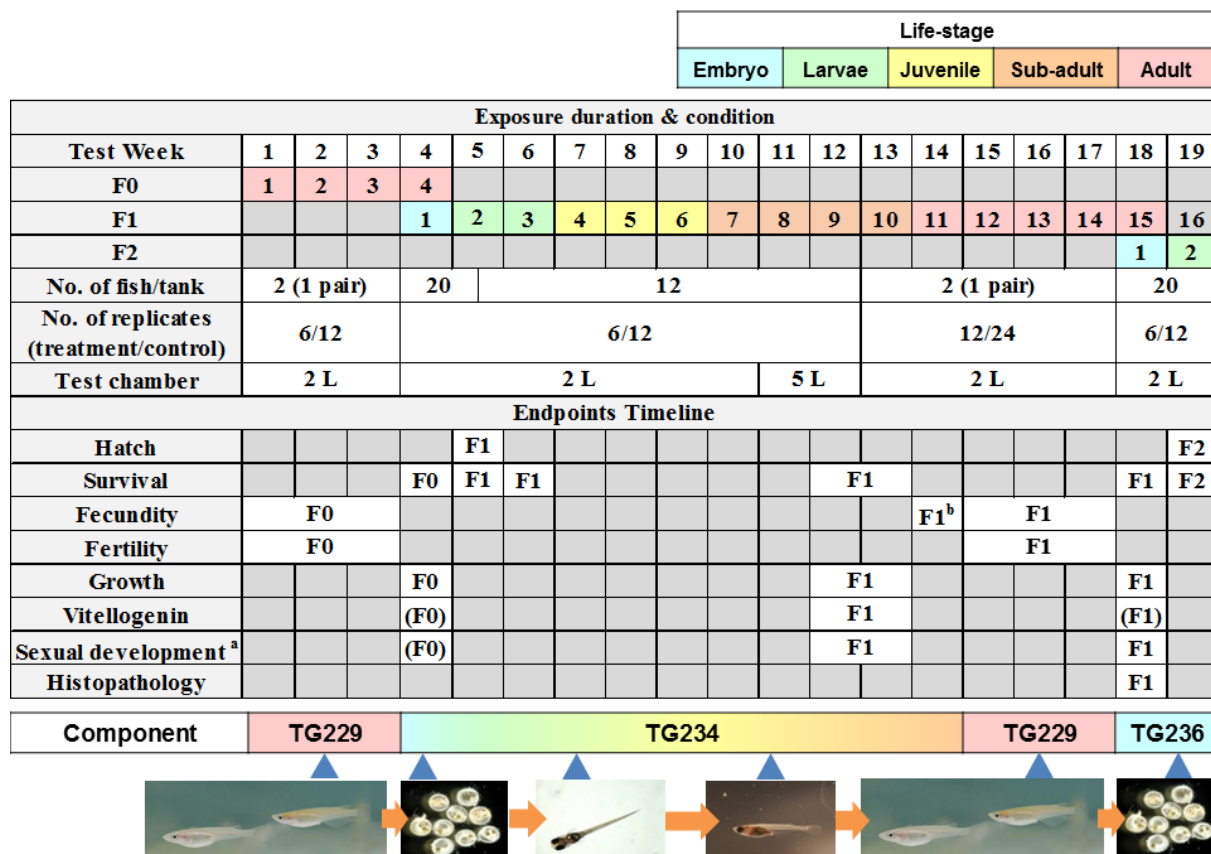


図 2 OECD TG240 メダカ拡張 1 世代繁殖試験(MEOGRT)のタイムライン

注) 括弧内はガイドラインにおいて必須ではないが、本試験で測定を行ったもの。

<sup>a</sup> オスの二次性徴 (尻鰭乳頭状小突起)、<sup>b</sup> 産仔開始日

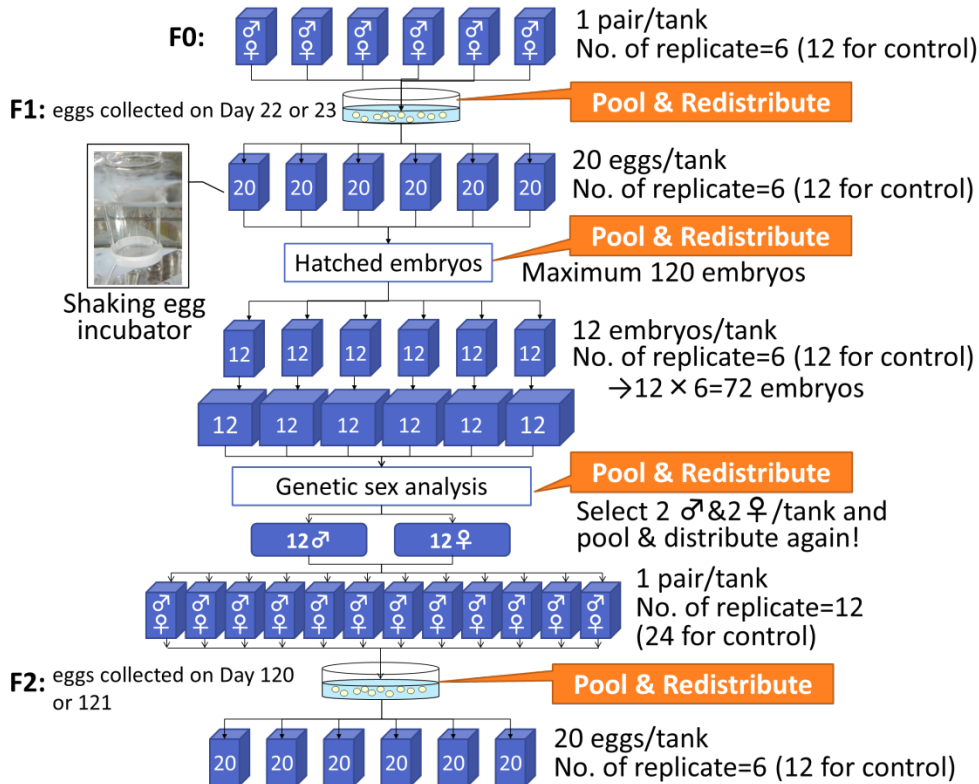


図3 MEOGRTにおける連のプールと分配の手順

注) 連数は濃度区の場合で、対照区はこの2倍数用いる。「egg」は受精卵を意味する。

### (1) F0 世代

#### [ばく露方法]

受精後 15 週齢のヒメダカを外見（尻びれの形状）から雌雄選別し、1 水槽あたりにメス 1 個体・オス 1 個体を投入して 7 日間の馴化を行った（48 ペア）。その際、外観に異常が認められた個体や極端に成長差がある個体は除去した。

馴化終了後、被験物質の濃度が適正值であることを確認してから、供試ヒメダカを各水槽（12 水槽 + 6 水槽 × 5 濃度区 = 計 42 水槽）に投入して試験開始した。週に 1 回程度、水温・pH、溶存酸素量を試験区毎に測定した。

ばく露水槽への藻類付着を防ぐため、週に 1 回程度水槽交換を行った。交換後の水槽は実験器具用自動洗浄機（G7887、Miele 社製）を用いて洗浄し乾燥の上再使用した。尚、ばく露・洗浄に用いた廃水は、環境リスク研究棟内排水処理装置に通水し、試験排水中の被験物質を吸着処理させた上で処理した。

#### [ばく露期間中の観察・計測]

ばく露期間中は水槽内の産出卵を毎日採取し、メス 1 個体あたりの産卵数、受精卵数、受精率を計測した。また、死亡個体の有無及び行動・外見の異常を、毎日目視によって観察した。死亡個体は、発見後速やかに取り除き外見上の雌雄を確認した。途中でメスまたはオスが死亡した場合、ばく露期間の半分以上の記録があれば、その日までの日平均を計算に含めた。行動・外見の異常は、下記について対照区と比較した。

- 1) 行動観察項目
  - 摂餌活動の低下、横転、平衡喪失、表層集中、活動度低下、過運動など
- 2) 外観観察項目

体幹湾曲、眼球突出、腹部膨満、体色異常、出血、粘液の異常、立鱗など

[F1 試験用受精卵の採取]

ばく露4週目の第2日、すなわち試験開始22日目（以下、Test Day 22）に各ペアの産出した受精卵をすべて、試験溶液の入ったガラスシャーレにプールし、対照区は12連、濃度区は6連分、20粒ずつ選択し、水槽に設置したふ化器に投入した。

[ばく露終了後の測定]

4週間のばく露期間終了後（本試験ではTest Day 24、133日齢）、生存した全個体を氷麻酔処理した上で解剖し、下記項目について測定した。なお、解剖前には尻びれの形状と乳頭状小突起の有無より表現型の雌雄を判別した。

1) 全長・体長及び湿重量の測定

全長・体長はノギス（CD-S10C、株式会社ミットヨ製）を用いて、湿重量は電子天秤（AG204、Mettler Toledo 社製）を用いて測定した。

2) 二次性徴指標の計測

メダカの臀鰭を切断し、4%パラホルムアルデヒド・リン酸緩衝液で固定し、臀鰭軟条上に認められる乳頭状小突起を実体顕微鏡（MZ16、Leica 社製）の下で観察し、突起を有する節板数を計測し、対照区と比較した。

3) 肝臓の測定及び肝臓中ビテロジェニン濃度の測定

解剖により肝臓を摘出し電子天秤（AG204、Mettler Toledo 社製）によって秤量した。計測した肝臓重量を基に肝臓体指数（肝臓重量/湿重量）を算出した。

また、肝臓中のビテロジェニン量を調べるため、摘出した肝臓をホモジナイズし、ELISA法で測定した。ELISAはEnBioMedaka Vitellogenin ELISA system（株式会社エンバイオテック・ラボラトリーズ製）を用い、付属のマニュアルに従い実施した。測定は以下のように行った。

- ① 肝臓を回収したテストチューブに冷却した検体希釈用バッファー200  $\mu\text{L}$  を加える。
- ② 肝臓をホモジナイズし、4°C、9000 g、10分間の遠心分離にかける。
- ③ 分離した上清を500  $\mu\text{L}$  マイクロテストチューブに回収し、直ちに氷冷し、続けてビテロジェニン測定に供することができない場合は-80°Cで保存した。

この上清をELISA（Enzyme Linked Immuno Solvent Assay）法によるビテロジェニン測定に供した。測定にはこのホモジネート上清をさらに10倍希釈したものを使用した。ホモジネート上清中に含まれるビテロジェニンの分析にはエンバイオ社製のメダカビテロジェニン測定用ELISAキットを使用した。操作は以下の通りである。

- ① Wash Buffer で洗浄した抗体固着化マイクロプレートの各wellに、測定サンプルを50  $\mu\text{L}$  添加し、室温で1時間インキュベートする。
- ② 溶液を捨て、well内をwash bufferで3回洗浄し、HRP-抗メダカビテロジェニン抗体溶液を、各wellに50  $\mu\text{L}$  ずつ添加し、室温で1時間インキュベートする。
- ③ 溶液を捨て、洗浄した後、発色液を各wellに50  $\mu\text{L}$  ずつ添加し、室温で正確に20分間反応させ、反応停止液を50  $\mu\text{L}$  ずつ添加して反応を停止させる。
- ④ マイクロプレートリーダーを用い、450 nmの吸光度を測定する。各サンプル

ルについて 2 well を使用し、デュプリケーションで測定を行った。検量線にはキットに付属のメダカビテロジェニン標準液を使用した。標準液（100 ng/mL）を希釈し、50, 20, 10, 5 ng/mL 溶液を調製し、上記と同様の手順によって測定した吸光度より検量線を作成した。検量線はマイクロプレートごとに作成した。測定サンプルの吸光度より、検量線を使用して測定試料中のビテロジェニン濃度を算出し、これに希釈率を乗じることでホモジナイズ上清中のビテロジェニン濃度を求めた。さらに、この濃度を各個体の肝臓の重量で除算することにより、肝臓重量あたりのビテロジェニン含量（ng/mg）を求めた。

4) 生殖腺の観察及び湿重量測定

解剖後、胴体から生殖腺を摘出し、湿重量を測定するとともに、卵巣と精巣を目視により区別し、判別できないものは不明とした。その後、Davidson 固定液中に浸漬し固定した。

(2) F1 世代

[ばく露方法]

F0 世代より採取した受精卵は、水槽内に設置したふ化用シリンダーに投入し F0 世代と同一条件でばく露を継続した。ふ化用シリンダーは、底面をステンレスメッシュ（No. 32）で覆った円筒状のガラス管（内径 5 cm、高さ 10 cm）であり、卵上下機構（柴田科学株式会社製）によってゆっくりと振とうさせた。

水質の測定、水槽の交換と洗浄、廃水の処理などは、F0 世代と同一である。

[ばく露期間中の観察]

ばく露期間中はふ化や死亡個体の有無及び行動・外見の異常を TG240 では目視で観察するとあるが、目視による確認が困難であったため、受精 3 日後以降、毎日ふ化器から取り出して実態顕微鏡下で観察した。卵の生死は心拍の有無によって判別した。各日にふ化した仔魚はガラス円筒を用いて水槽内で区別して維持した。対照区のふ化日の中央値の 2 倍の時点までにふ化しなかった個体は死亡とみなした。

各試験区において最も多くのふ化がみられた 2 日間（本試験では受精後 6 ~ 8 日目）分の各連の仔魚を再度プールし、12 個体ずつ対照区は 12 連、ばく露区は 6 連ずつ再分配した。

受精後 21 日目に（Test Day 43）に仔魚の生死を確認した。死亡個体は、発見後速やかに取り除き外見上の雌雄（もしくは未成熟）を確認した。行動・外見の異常は、F0 世代と同様の基準で対照区と比較した。

[受精後 9 週目の遺伝的性判別およびペアリング]

受精後 9 ~ 10 週目（Test Day 78-85）に、生存した全個体についてメダカの性決定遺伝子である DMY の保有有無を解析する事で、各個体の遺伝的な性別を判別した。方法は以下の通りである。

- ① Test Day 78 に各個体を、尾部の一部を鋭利な剃刀で切断した。これを試料として DNA 抽出液（800 mM グアニジン HCl, 30 mM Tris-HCl pH 8.0, 30 mM EDTA pH 8.0, 5% Tween-20, 0.5% Triton X-100）を用い、DNA を抽出した。
- ② PCR はプライマーとして PG17.5（CCG GGT GCC CAA GTG CTC CCG CTG）、PG17.6（GAT CGT CCC TCC ACA GAG AAG AGA）を使用した。PCR は、95°C・5 分の条件で 1 サイクル、その後、96°C・20 秒、55°C・30 秒、72°C・30 秒の条件

を 38 サイクル繰り返して行った。

- ③ この後、増幅産物を 1.5% TAE-アガロースゲルで電気泳動し、EtBr 染色によりバンド（メスは 1 本、オスは 2 本現れる）を確認して遺伝的な性別を判別した。

判別結果を基に、遺伝的なメスとオスを無作為に各連から 2 個体ずつ選別し、再度メス個体、オス個体でそれぞれプールしてから、対照区は 24 ペア、ばく露区は 12 ペアのペアリングを行った。これらを 1 ペア毎に水槽に投入し、繁殖用個体ばく露を継続した。

[亜成体（10 週齢）のばく露終了後の測定]

繁殖用に用いなかった 10 週齢の亜成体（Sub-adult）については、Test Day 86 および Test Day 87（64 日齢または 65 日齢）に氷麻酔処理した上で解剖し、下記項目について測定した。各計測・測定方法は、F0 世代とほぼ同一であるが、生殖腺の固定はブアン液によって行った。

- 1) 全長・体長及び湿重量の測定
- 2) 二次性徴指標の計測
- 3) 肝臓の測定及び肝臓中ビテロジェニン濃度の測定
- 4) 生殖腺の観察及び湿重量測定

[産出卵の計測]

各ペアについて、受精後 12～14 週の 21 日間（Test Day 99-119）、水槽内の産出卵を毎日採取し、1 ペアあたりの総産卵数、受精卵数、受精率を計測した。

[F2 試験用受精卵の採取]

ばく露 15 週目の第 1 日（Test Day 120）に各ペアの産出した受精卵を、観察・計測終了後に F2 試験に供した。このとき 30 µg/L および 100 µg/L 濃度区において必要な受精卵数（20 個×6 連=120 個）が得られなかったため、第 2 日（Test Day 121）においてもすべての試験区で F2 用の採卵を行った。各日から採取した卵をそれぞれプールし、10 個体ずつ各連に分配することで、合計 20 個体/連、対照区は 12 連、ばく露区は 6 連分、水槽に設置したふ化器に投入した。

[ばく露終了後の測定]

15 週間のばく露期間終了後（本試験では Test Day 122、100 日齢）、生存した全個体を氷麻酔処理した上で解剖し、下記項目について測定した。各計測・測定方法は、F1 世代亜成体（10 週齢）と同一のものを行った。

- 1) 全長・体長及び湿重量の測定
- 2) 二次性徴指標の計測
- 3) 肝臓の測定及び肝臓中ビテロジェニン濃度の測定
- 4) 生殖腺の観察及び湿重量測定

### (3) F2 世代

[ばく露方法]

F1 世代より採取した受精卵は、水槽内に設置したふ化用シリンダーに投入し F1 世代と同一条件でばく露を継続した。ふ化用シリンダーは、F1 世代に用いたものと同一である。

水質の測定、水槽の交換と洗浄、廃水の処理などは、F0 世代・F1 世代と同一である。



## [ばく露期間中の観察]

ばく露期間中はふ化や死亡個体の有無及び行動・外見の異常を TG240 では目視で観察するとあるが、目視による確認が困難であったため、受精 3 日後以降、毎日ふ化器から取り出して実体顕微鏡下で観察した。卵の生死は心拍の有無によって判別した。ふ化率は対照区のみふ化日の中央値の 2 倍の時点で算出し、それ以降は未ふ化で死亡とみなした。

## 3.5 結果の算出

## (1) 数値の取り扱い

分析値などの数値の処理は、JIS Z 8401:1999 参考 1 規則 B に従った。有効数字は測定精度を考慮して、ふ化率・ふ化後生存率・生存率は 2 桁（ただし 1 の位までとする）、肝臓体指数および生殖腺体指数は、1 未満は 1 桁、1 以上は 2 桁、それ以外のエンドポイントは 3 桁（ただし二次性徴は 1 の位までとする）とし、標準偏差の桁数は平均値の位に合わせた。

## (2) 統計処理

各データは、繁殖データや胚仔魚期のデータを除き、遺伝的性別ごとに平均値±標準偏差で示した。NOEC および LOEC 算出のための統計手法は OECD TG240 の Annex 10 および USEPA の Flynn K ら<sup>6)</sup>の改訂版フローチャートに基づき、各エンドポイントに対し表 2 に示す変数変換と統計手法を適用した。解析には US EPA が MEOGRT および幼若両生類発達・成長試験 (LAGDA) 用に開発した統計解析ソフトウェア StatCharrms v.09.9 (2018 年 4 月 5 日版、R cran サイトより入手) および R-3.4.3 (win 64 bit) を用いた<sup>7)</sup>。乱数のシードは set.seed(1234) で固定して解析した。検定は原則、片側検定で有意水準 5% とした。

繰り返しのない生存率およびふ化日数以外のエンドポイントは、「Other endpoints」解析において Test type で「Auto」を選択すると、まず単調性の検定 (Linear quadratic contrast: 線形二次項対比(仮訳)) が実施され、単調性がある場合 (二次項のみ有意のケース以外) は Jonckheere-Terpstra (JT) 検定、単調性がない (二次項のみ有意) 場合は、正規性検定 (Shapiro Wilks 検定) および等分散性検定 (Levene 検定) を行った後、等分散の場合は Dunnett 検定、非等分散の場合は Dunn 検定が適用される。

総産卵数と受精卵数の場合は、「Other endpoints」解析において、上記の手法に加えて、ばく露時間による影響 (Time effect) をみるため、週間毎データとして反復測定分散分析 (Repeated measures ANOVA: 時間と濃度の 2 要因) および Dunnett 検定も実施した。ただし、経日変化のグラフより、Control と明らかに時間変動が異なる濃度区は観察されなかったため、Time effect はないとして通常の解析結果を採用することとした。

繰り返しのない生存率 (垂成体、成熟個体) は step-down Cochran-Armitage 検定を適用した。

ふ化日数は「Time to Event」を選択し、各観察日の各個体のイベント (ふ化を 1、未ふ化または死亡を 0 とする) を入力し、Mixed Effects Cox Models の Dunnett により解析した。F1 は 8 日目以降、一部の連がプールされてしまったため (Control は 12→7 連、29  $\mu\text{g/L}$  は 6→1 連、94  $\mu\text{g/L}$  は 6→3 連)、Other endpoint と同様に解析した。

フローチャートに記載はないが、F0 や F1 の繁殖期における繰り返しのない生存率は Step-down Cochran-Armitage 検定を適用した。

表2 各エンドポイントの変数変換と統計手法

エンドポイント	変数変換	統計手法
総産卵数・受精卵数	平方根変換	1) 単調性の検定 →(単調性あり) Jonckheere-Terpstra 検定 →(単調性なし) 一元配置分散分析・正規性・等分散性の検定 →(正規性&等分散性あり) Dunnett 検定 →(正規性&等分散性なし) Dunn 検定 2) 反復測定分散分析→Dunnett 検定
受精率	アークサイン変換	単調性の検定 →(単調性あり) Jonckheere-Terpstra 検定 →(単調性なし) 一元配置分散分析・正規性・等分散性の検定 →(正規性&等分散性あり) Dunnett 検定 →(正規性&等分散性なし) Dunn 検定
生存率 (繰り返しなし)	アークサイン変換	Step-down Cochran-Armitage 検定
ふ化率・ふ化後生存率・生存率	アークサイン変換	単調性の検定 →(単調性あり) Jonckheere-Terpstra 検定
ふ化日数 (F1)	なし	→(単調性なし)
全長・湿重量	なし	亜成体の場合: Mixed effect ANOVA→Dunnett 検定 成体の場合: 一元配置分散分析・正規性・等分散性の検定 →(正規性&等分散性あり) Dunnett 検定 →(正規性&等分散性なし) Dunn 検定
肝臓体指数・生殖腺体指数	なし	
ビテロジェニン	対数変換	
二次性徴	平方根変換	
ふ化日数 (F2)	なし	Mixed Effects Cox Models (※F1 はふ化率等と同じ)

### 3.5.1 試験有効性基準

以下の条件が満たされたとき、この試験は有効とする。

- ・ 溶存酸素が試験期間を通じて飽和酸素濃度の 60%以上であること。
- ・ 試験期間を通じた平均水温が 24℃から 26℃の間であること。各水槽の水温の平均値からのずれは 2℃未満であること。
- ・ 各世代 (F0 および F1) の対照区における各ペアの日平均総産卵数の平均が 20 以上であること。計測期間中のすべての卵の受精率が 80%以上であること。推奨される 24 ペア中 16 ペア (>65%) において各ペア日平均総産卵数が 20 以上であること。
- ・ 各世代 (F1 および F2) の対照区におけるふ化率が 80%以上であること
- ・ F1 の対照区において、受精後 3 週目までのふ化後の生存率が平均 80%以上、および受精後 3 週目から F1 終了時(受精後 15 週目)までの生存率が平均 90%以上であること。
- ・ 試験期間中において被験物質濃度が測定平均値の±20%以内に十分維持されていることを示す証拠が得られていること。

## 4. 結果

### 4.1 試験環境

表3に水温、pH、溶存酸素の試験期間中を通じた平均値と標準偏差をまとめた。試験液の平均水温は26.5～26.7℃の範囲であり、試験有効性基準である24～26℃をわずかに超えていたものの、メダカの生殖の至適温度の範囲(26～28℃)<sup>8)</sup>であり、これは試験結果には大きく影響したとは考えていない。また、平均pHは8.11～8.15の範囲であり、6.5～8.5までという有効性基準を満たしていた。溶存酸素は7.70～8.26 mg/Lの範囲であり、飽和酸素濃度の97～105%の範囲であり、60%以上という有効性基準を満たしていた。

表3 試験期間中の平均水温、pH、溶存酸素

設定濃度 ( $\mu\text{g/L}$ )	水温( $^{\circ}\text{C}$ )	pH	溶存酸素(mg/L)
Control	26.7 $\pm$ 0.7	8.11 $\pm$ 0.42	8.26 $\pm$ 0.84
32	26.5 $\pm$ 0.9	8.11 $\pm$ 0.38	8.15 $\pm$ 0.60
100	26.5 $\pm$ 0.9	8.13 $\pm$ 0.32	7.95 $\pm$ 0.24
320	26.7 $\pm$ 0.9	8.14 $\pm$ 0.27	7.95 $\pm$ 0.25
1000	26.5 $\pm$ 0.9	8.15 $\pm$ 0.23	7.90 $\pm$ 0.26
3200	26.5 $\pm$ 0.9	8.13 $\pm$ 0.22	7.70 $\pm$ 0.33

### 4.2 試験液の被験物質濃度

試験期間中の各濃度につき計18回(3200 $\mu\text{g/L}$ 濃度区ではF2世代が取れなかったため、計15回)の測定結果を表4にまとめた。全ての濃度区において、平均測定濃度は設定濃度の80-120%の範囲内であった。また、対照区では検出限界未満であった。

表4 試験液中の被験物質濃度

設定濃度 ( $\mu\text{g/L}$ )	N	実測濃度( $\mu\text{g/L}$ )		設定濃度比 (%)	変動係数 (%)
		平均	標準偏差		
Control	18	ND		-	-
32	18	28 $\pm$	6	87	21
100	18	93 $\pm$	21	93	23
320	18	330 $\pm$	71	103	22
1000	18	1000 $\pm$	220	100	21
3200	15	3700 $\pm$	360	116	10

ND; 検出限界以下

### 4.3 F0世代の結果

#### (1) F0世代試験期間中の死亡及び行動・外観の異常

F0世代試験期間中の死亡個体数を表5に示す。対照区において11日目及び13日目にオスが各1個体、11日目にメスが1個体死亡したが、外見に異常は無く偶発的な死亡と考えられる。いずれの試験区においても、行動・外観の異常は認められなかった。

表5 F0世代試験期間中の死亡個体数

実測濃度 ( $\mu\text{g/L}$ )	オス			メス			合計 死亡率
	供試数	死亡数	死亡率	供試数	死亡数	死亡率	
Control	12	2	17%	12	1	8%	13%
28	6	0	0%	6	0	0%	0%
93	6	0	0%	6	0	0%	0%
330	6	0	0%	6	0	0%	0%
1000	6	0	0%	6	0	0%	0%
3700	6	0	0%	6	0	0%	0%

注) 統計解析は Step-down Cochran-Armitage Test を用いた。

## (2) F0世代の総産卵数・受精卵数・受精率

F0世代試験開始後21日間 (Test Day 1-21) における1ペア1日あたりの総産卵数、受精卵数、受精率の結果を表6、図4に示す。対照区ではメスの死亡がみられた水槽では、ばく露開始初期より正常な産卵が観察されていなかったため、計算から除外した。オスの死亡がみられた2水槽では死亡までのデータを計算に含めた。1000および3700  $\mu\text{g/L}$ 濃度区では、総産卵数および受精卵数に有意な低下が認められた。また、3700  $\mu\text{g/L}$ 濃度区では、受精率に有意な低下が認められた。

表6 F0世代の総産卵数・受精卵数・受精率

実測濃度 ( $\mu\text{g/L}$ )	N	総産卵数 (eggs/day/pair)							
		21日間		1週目 (Day 1-7)		2週目 (Day 8-14)		3週目 (Day 15-21)	
Control	11	28.8	$\pm$ 7.7	33.7	$\pm$ 5.1	25.0	$\pm$ 12.6	25.4	$\pm$ 10.2
28	6	33.8	$\pm$ 3.0	32.5	$\pm$ 3.4	36.3	$\pm$ 2.9	32.7	$\pm$ 3.8
93	6	29.5	$\pm$ 7.6	28.7	$\pm$ 12.7	32.6	$\pm$ 4.6	27.2	$\pm$ 6.6
330	6	26.2	$\pm$ 9.2	25.4	$\pm$ 13.1	26.5	$\pm$ 10.6	26.7	$\pm$ 6.6
1000	6	20.9	$\pm$ 9.9 *	22.3	$\pm$ 10.8 *	20.3	$\pm$ 10.1	20.0	$\pm$ 11.7
3700	6	20.1	$\pm$ 9.2 **	23.0	$\pm$ 8.7 **	21.1	$\pm$ 9.8 *	16.3	$\pm$ 10.2 **
実測濃度 ( $\mu\text{g/L}$ )	N	受精卵数 (eggs/day/pair)							
		21日間		1週目 (Day 1-7)		2週目 (Day 8-14)		3週目 (Day 15-21)	
Control	11	27.8	$\pm$ 8.2	33.3	$\pm$ 5.2	23.3	$\pm$ 13.0	24.3	$\pm$ 10.8
28	6	33.3	$\pm$ 2.8	32.3	$\pm$ 3.3	35.2	$\pm$ 2.7	32.3	$\pm$ 3.6
93	6	28.5	$\pm$ 8.4	28.4	$\pm$ 12.6	31.8	$\pm$ 4.9	25.4	$\pm$ 9.0
330	6	25.4	$\pm$ 9.5	24.6	$\pm$ 13.2	25.5	$\pm$ 10.8	26.0	$\pm$ 6.9
1000	6	20.0	$\pm$ 9.9 *	21.5	$\pm$ 10.7 **	19.4	$\pm$ 9.9	19.2	$\pm$ 12.2
3700	6	18.4	$\pm$ 8.9 **	22.5	$\pm$ 8.5 **	18.5	$\pm$ 10.1 *	14.1	$\pm$ 9.0 **
実測濃度 ( $\mu\text{g/L}$ )	N	受精率 (%)							
		21日間		1週目 (Day 1-7)		2週目 (Day 8-14)		3週目 (Day 15-21)	
Control	11	95.8	$\pm$ 6.2	98.9	$\pm$ 1.1	90.0	$\pm$ 13.2	89.9	$\pm$ 17.6
28	6	98.4	$\pm$ 2.0	99.3	$\pm$ 0.3	97.2	$\pm$ 5.3	98.9	$\pm$ 1.0
93	6	95.8	$\pm$ 6.3	99.0	$\pm$ 0.4	97.3	$\pm$ 2.0	91.1	$\pm$ 17.2
330	6	95.9	$\pm$ 3.0	85.7	$\pm$ 28.1 *	95.3	$\pm$ 4.8	96.8	$\pm$ 3.1
1000	6	96.2	$\pm$ 6.1	96.4	$\pm$ 4.3 *	96.0	$\pm$ 6.5	94.4	$\pm$ 12.5
3700	6	89.5	$\pm$ 6.6 *	97.9	$\pm$ 1.7 *	81.1	$\pm$ 18.7	85.1	$\pm$ 8.9

注) 値は連平均値を元に算出した平均値 $\pm$ 標準偏差 (対照区は1,2週目はn=11、3週目はn=9、ばく露区はn=6)を示す。(\* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$ , 総産卵数・受精卵数データはJonckheere-Terpstra Test、受精率データはDunnett Test。)

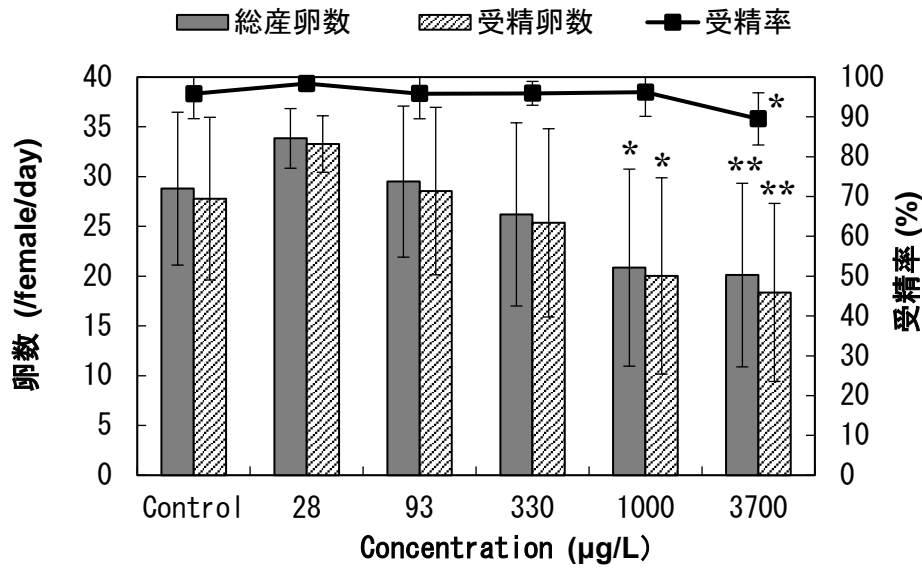
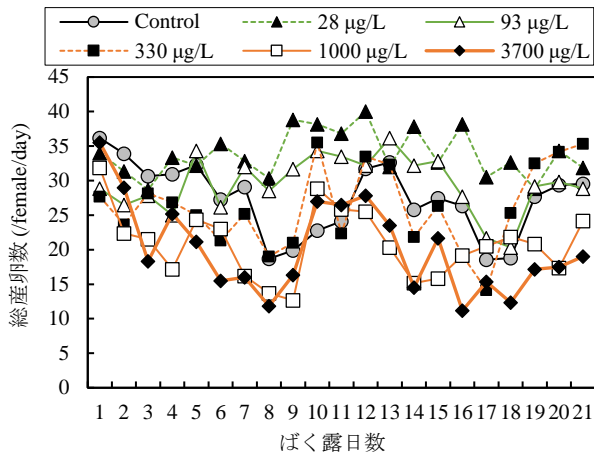


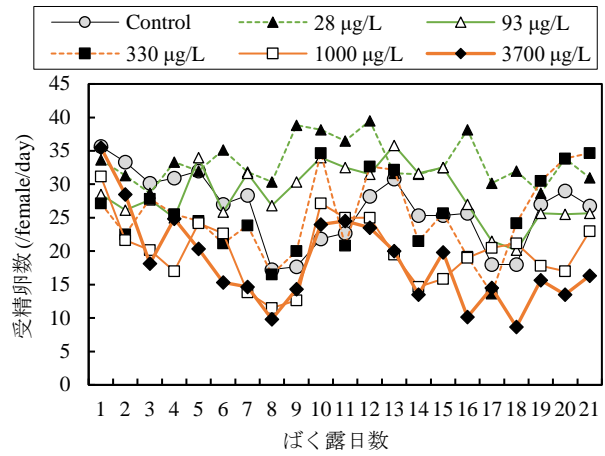
図 4 F0 世代の総産卵数、受精卵数および受精率 (各ペア・1 日あたり)

注) 値は連平均値を元に算出した平均値±標準偏差を示す。\*は対照区に比べて統計学的な有意差があることを示す (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , 総産卵数・受精卵数データは Jonckheere-Terpstra Test, 受精率データは Dunnett Test。)

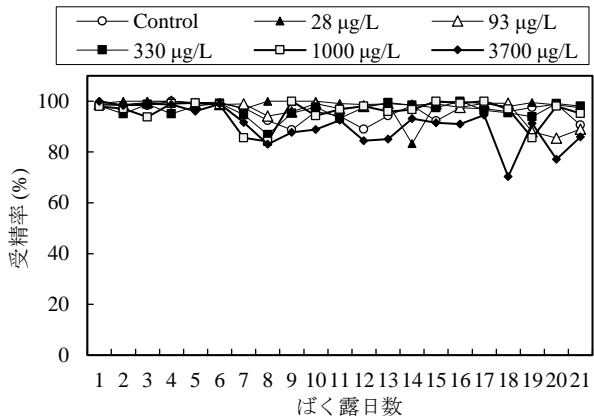
(a) 総産卵数



(b) 受精卵数



(c) 受精率



(d) 累積受精卵数

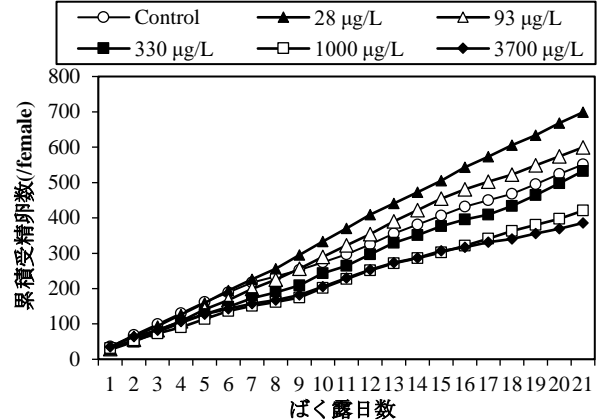


図 5 F0 世代の(a) 総産卵数 (b) 受精卵数 (c) 受精率の日変動および (d) 累積受精卵数 (値は各試験区の連平均値)

## (3) F0 世代の全長・湿重量

F0 世代の全長及び湿重量の測定結果を表 7 および図 6(a)(b) に示す。全長は、オスは 3700 µg/L 濃度区において対照区と比べて有意な低下が認められた。メスは、いずれのばく露区においても対照区と比べ統計学的な有意差は確認されなかった。

湿重量は、雌雄ともにいずれのばく露区においても対照区と比べ統計学的な有意差は確認されなかった。

表 7 F0 世代の全長および湿重量

実測濃度 (µg/L)	全長 (mm)		湿重量 (mg)	
	オス	メス	オス	メス
Control	36.0 ± 1.8	35.0 ± 1.2	413 ± 70	444 ± 39
28	35.7 ± 1.4	34.9 ± 1.3	413 ± 68	460 ± 37
93	34.6 ± 1.0	35.1 ± 0.9	373 ± 32	445 ± 39
330	35.4 ± 1.3	35.5 ± 2.0	390 ± 46	461 ± 87
1000	36.2 ± 1.7	34.4 ± 2.0	430 ± 53	449 ± 74
3700	33.9 ± 1.5 *	35.3 ± 0.9	373 ± 70	470 ± 47

注) 値は連平均値を元に算出した平均値±標準偏差 (対照区のオスは n=10、メスは n=11、ばく露区は n=6) を示す。\*は対照区に比べて統計学的な有意差があることを示す (\* $p<0.05$ 、Jonckheere-Terpstra 検定)。

## (4) F0 世代の肝臓中ビテロジェニン濃度

ELISA による F0 世代の肝臓中ビテロジェニン濃度の測定結果を表 8 および図 6(e) に示す。オスでは、28 µg/L 濃度区以上で対照区と比べて有意な増加がみられた。メスでは 3700 µg/L 濃度区で対照区と比べて有意な増加がみられた。

表 8 F0 世代の肝臓中ビテロジェニン濃度

実測濃度 (µg/L)	肝臓中ビテロジェニン濃度 (ng/mg liver)			
	オス		メス	
Control	8.17 ± 8.74	527 ± 239		
28	99.2 ± 94.9 **	550 ± 286		
93	2660 ± 3760 **	548 ± 122		
330	9990 ± 5850 **	612 ± 501		
1000	12800 ± 5420 **	703 ± 319		
3700	4950 ± 3240 **	1910 ± 1050 **		

注) 値は連平均値を元に算出した平均値±標準偏差 (対照区のオスは n=10、メスは n=11、ばく露区は n=6) を示す。\*は対照区に比べて統計学的な有意差があることを示す (\*\* $p<0.01$ 、Jonckheere-Terpstra 検定)。

## (5) F0 世代の二次性徴指標

二次性徴の指標として、F0 世代における乳頭状小突起を有する節板数の計測結果を表 9 および図 6(f) に示す。オスでは、いずれのばく露区においても対照区と比べ統計学的な有意差は確認されなかった。また、メスではすべてのばく露区で乳頭状小突起を有する個体は確認されなかった。

表9 F0世代における乳頭状小突起を有する節板数（オス1個体あたり）

実測濃度 ( $\mu\text{g/L}$ )	乳頭状小突起を有する節板数 (Plates/fish)					
	オス			メス		
Control	106	$\pm$	16	0	$\pm$	0
28	117	$\pm$	14	0	$\pm$	0
93	102	$\pm$	17	0	$\pm$	0
330	102	$\pm$	8	0	$\pm$	0
1000	121	$\pm$	12	0	$\pm$	0
3700	106	$\pm$	12	0	$\pm$	0

注) 値は連平均値を元に算出した平均値 $\pm$ 標準偏差（対照区のオスはn=10、メスはn=11、ばく露区はn=6）を示す。

### (6) F0世代の性への影響

F0世代における表現型性別・生殖腺形態は明確かつ一致していた。

### (7) F0世代の肝臓体指数および生殖腺体指数

F0世代の肝臓体指数および生殖腺体指数の測定結果を表10および図6(c)(d)に示す。肝臓体指数は、オスは3700 $\mu\text{g/L}$ 濃度区、メスは1000 $\mu\text{g/L}$ 濃度区以上で対照区に比べて有意に増加した。

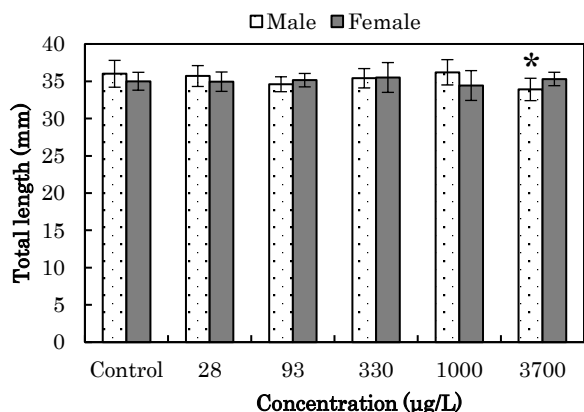
生殖腺体指数は、オスは3700 $\mu\text{g/L}$ 濃度区において対照区と比べて有意な低下が認められた。メスはいずれのばく露区においても対照区と比べ統計学的な有意差は確認されなかった。

表10 F0世代の肝臓体指数および生殖腺体指数

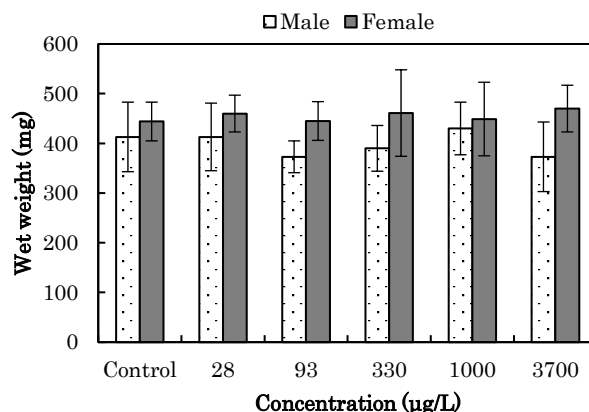
実測濃度 ( $\mu\text{g/L}$ )	肝臓体指数 (%)		生殖腺体指数 (%)	
	オス	メス	オス	メス
Control	1.8 $\pm$ 0.8	4.6 $\pm$ 1.0	1.1 $\pm$ 0.3	8.7 $\pm$ 1.8
28	2.2 $\pm$ 1.8	4.6 $\pm$ 0.9	0.9 $\pm$ 0.5	9.2 $\pm$ 1.0
93	1.8 $\pm$ 0.7	5.1 $\pm$ 0.6	1.2 $\pm$ 0.2	9.9 $\pm$ 1.0
330	1.8 $\pm$ 0.5	4.9 $\pm$ 0.7	0.9 $\pm$ 0.3	10.1 $\pm$ 1.0
1000	2.1 $\pm$ 0.5	5.7 $\pm$ 0.9	1.2 $\pm$ 0.6	10.0 $\pm$ 1.8
3700	3.9 $\pm$ 1.3	5.7 $\pm$ 1.2	0.6 $\pm$ 0.2	7.3 $\pm$ 1.3

注) 値は連平均値を元に算出した平均値 $\pm$ 標準偏差（対照区のオスはn=10、メスはn=11、ばく露区はn=6）を示す。\*は対照区に比べて統計学的な有意差があることを示す（\* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01, Jonckheere-Terpstra 検定）。

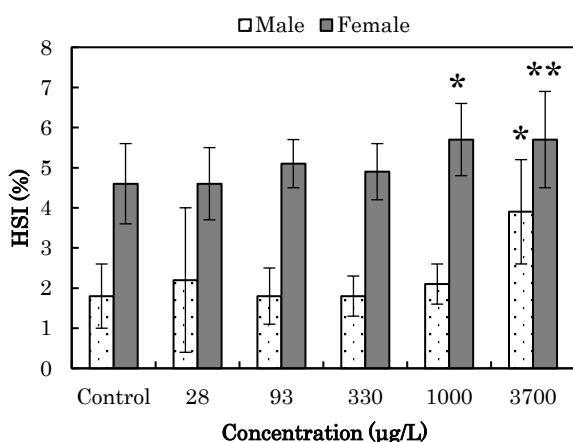
(a) 全長



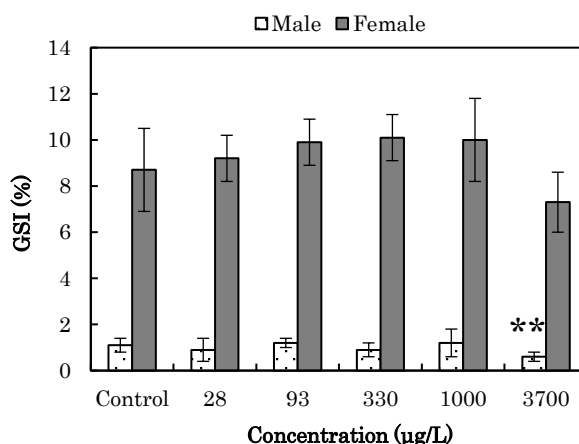
(b) 湿重量



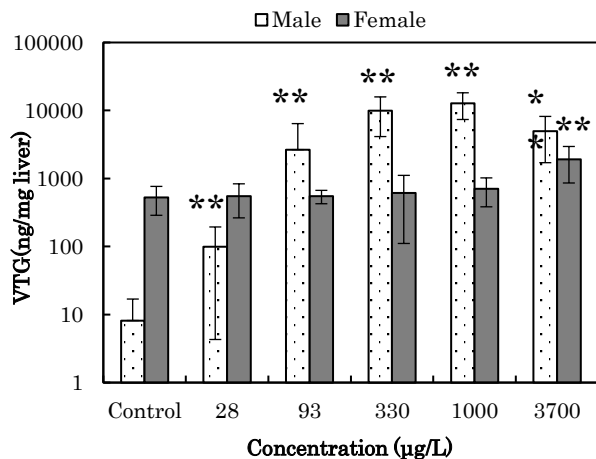
(c) 肝臓体指数 (HSI)



(d) 生殖腺体指数 (GSI)



(e) 肝臓中ピテロジェニン



(f) 乳頭状小突起を有する節板数

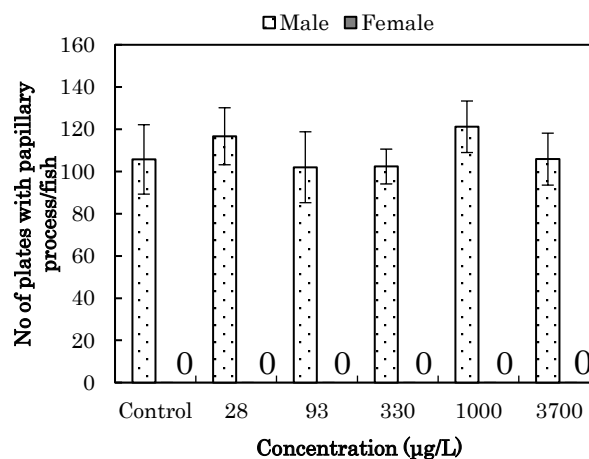


図6 F0世代の (a) 全長 (b) 湿重量 (c) 肝臓体指数 (d) 生殖腺体指数 (e) 肝臓中ピテロジェニン (f) 乳頭状小突起を有する節板数

注) 値は連平均値を元に算出した平均値±標準偏差 (対照区のオスはn=10、メスはn=11、ばく露区はn=6) を示す。\*は対照区に比べて統計学的な有意差があることを示す (\* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01、Jonckheere-Terpstra 検定)。



4.4 F1 世代胚～稚魚期の結果

(1) F1 世代胚・仔魚期のふ化率・ふ化日数・ふ化後生存率

F1 世代胚・仔魚期の受精後 12 日目のふ化率、ふ化日数、およびふ化後生存率を表 11 に、受精後 6 日目～12 日目におけるふ化個体数を図 7 に示す。対照区におけるふ化日の中央値が受精後 6 日目であったことから (図 7)、その 2 倍である 12 日目において各エンドポイントを計算した。

ふ化率は、いずれのばく露区においても対照区と比べ統計学的な有意差は確認されなかった。

ふ化日数は、330 µg/L 濃度区以上で対照区に比べて有意に大きかった。

ふ化後の生残率は、いずれのばく露区においても対照区と比べ統計学的な有意差は確認されなかった。

表 11 F1 世代胚・仔魚期のふ化率・ふ化日数・ふ化後生存率 (受精後 12 日目)

実測濃度 (µg/L)	N	ふ化率 (%)	ふ化日 (day)	ふ化後生存率 (%)
Control	7	99 ± 2	6.4 ± 0.2	100 ± 0
28	1	95 ± NA	7.1 ± NA	100 ± NA
93	6(3#)	98 ± 4	6.7 ± 0.4	100 ± 0
330	6	100 ± 0	7.2 ± 0.3 **	100 ± 0
1000	6	89 ± 4	7.2 ± 0.1 **	100 ± 0
3700	6	98 ± 3	7.6 ± 0.3 **	100 ± 0

注) 値は連平均値を元に算出した平均値±標準偏差を示す。#ふ化日数は n-3。\*は対照区に比べて統計学的な有意差があることを示す (\*\*p<0.01, Jonckheere-Terpstra 検定)。NA=Not Available

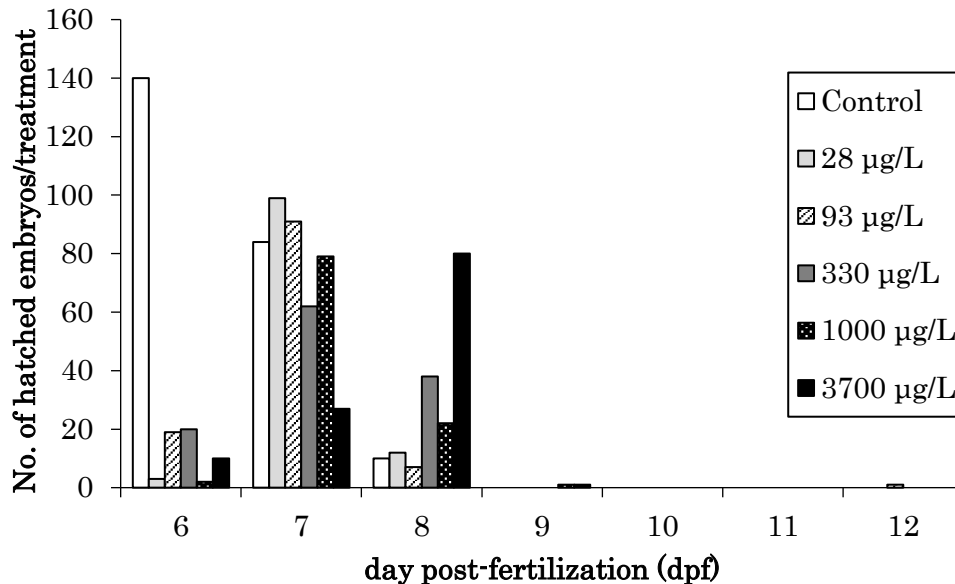


図 7 F1 の受精後 6～12 日目におけるふ化個体数 (各連の合計)

## 4.5 F1 世代亜成体の結果

## (1) F1 世代亜成体の生存率

F1 世代の受精後 4 週目、9 週目 (DMY 判定中) における生存率を表 12 に示した。受精後 4 週目における 3700 µg/L 濃度区の生存率は 97% と高い値を示していたが、対照区 (生残率 100%) と比べ統計学的な有意差が認められた。受精後 9 週目では、いずれのばく露区においても対照区と比べ統計学的な有意差は確認されなかった。

表 12 F1 世代亜成体 (受精後 4、9 週目) の生存率

実測濃度 (µg/L)	生存率(4 週目)		生存率(9 週目)	
	(%)		(%)	
Control	100	± 0	97	± 8
28	100	± 0	100	± 0
93	100	± 0	99	± 3
330	100	± 0	100	± 0
1000	100	± 0	100	± 0
3700	97	± 4*	97	± 4

注) 値は連平均値を元に算出した平均値±標準偏差 (対照区は n=12、ばく露区は n=6)。\*は対照区に比べて統計学的な有意差があることを示す (\* $p<0.05$ , Jonckheere-Terpstra 検定)

## (2) F1 世代亜成体の全長・湿重量

10 週齢の亜成体の全長及び湿重量の測定結果を表 13 および図 8 (a)(b)に示した。全長は、オスはいずれのばく露区においても対照区と比べ統計学的な有意差は確認されなかった。メスは、3700 µg/L 濃度区において対照区と比べて有意差が認められた。

湿重量は、オスはいずれのばく露区においても対照区と比べ統計学的な有意差は確認されなかった。メスは、3700 µg/L 濃度区において対照区と比べて有意差が認められた。

表 13 F1 世代亜成体の全長・湿重量

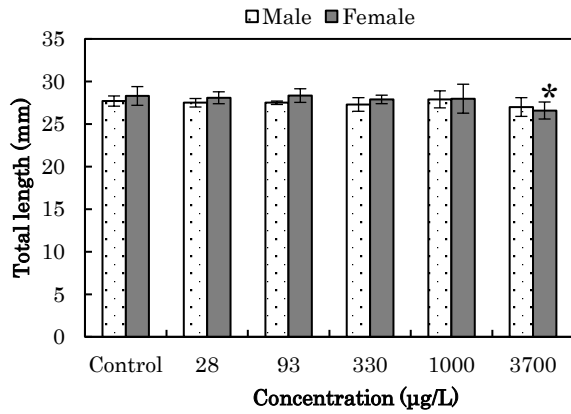
実測濃度 (µg/L)	全長 (mm)		湿重量 (mg)	
	オス	メス	オス	メス
Control	27.7 ± 0.6	28.3 ± 1.1	218 ± 17	267 ± 43
28	27.5 ± 0.5	28.1 ± 0.7	204 ± 16	254 ± 20
93	27.5 ± 0.2	28.3 ± 0.8	207 ± 13	262 ± 23
330	27.3 ± 0.8	27.9 ± 0.5	188 ± 19	241 ± 22
1000	27.9 ± 1.0	28.0 ± 1.7	207 ± 21	233 ± 45
3700	27.0 ± 1.1	26.6 ± 1.0	213 ± 29	208 ± 20

注) 値は連平均値を元に算出した平均値±標準偏差 (対照区は n=12、ばく露区は n=6)。\*は対照区に比べて統計学的な有意差があることを示す (\* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$ , Jonckheere-Terpstra 検定)

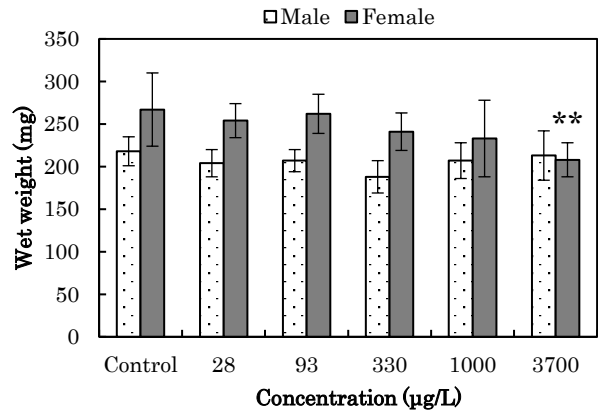
## (3) F1 世代亜成体の肝臓中ピテロジェニン濃度

ELISA による F1 世代亜成体の肝臓中ピテロジェニン濃度の測定結果を表 14 および図 8 (e)に示す。オスでは 330 µg/L 濃度区以上で、メスでは 93 µg/L 濃度区以上で、対照区と比べて有意な増加が確認された。

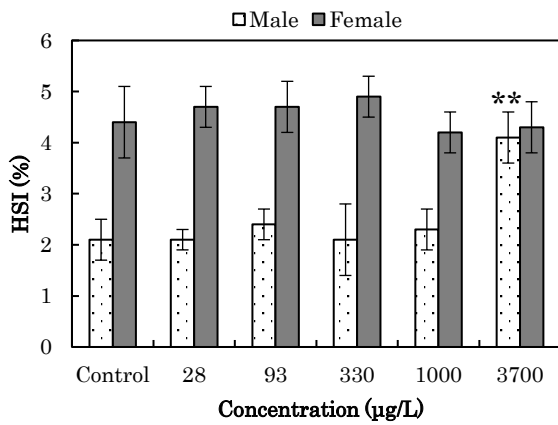
(a) 全長



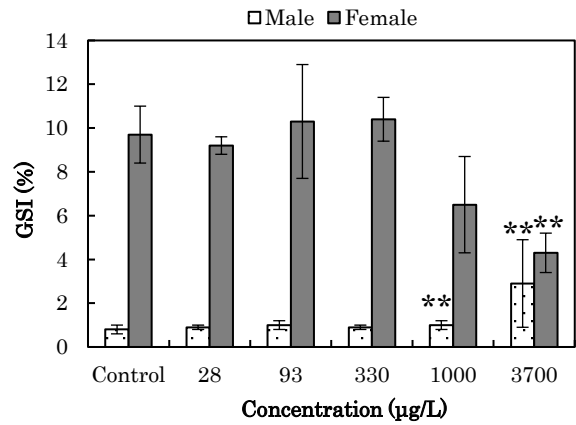
(b) 湿重量



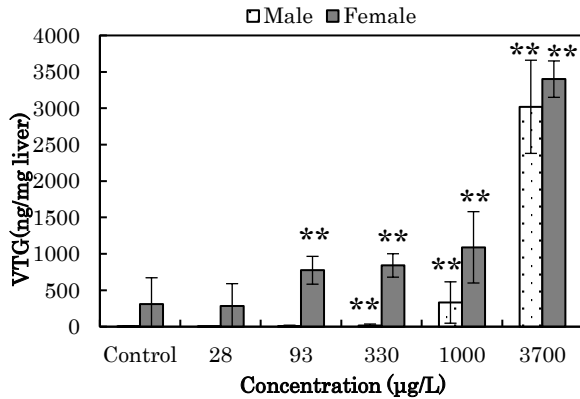
(c) 肝臓体指数 (HSI)



(d) 生殖腺体指数 (GSI)



(e) 肝臓中ビテロジェニン



(f) 乳頭状小突起を有する節板数

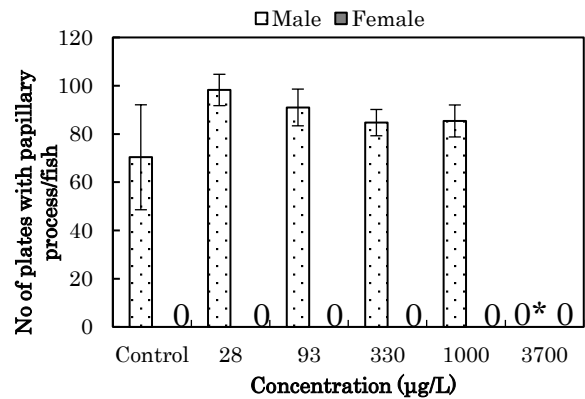


図8 F1世代亜成体の (a) 全長 (b) 湿重量 (c) 肝臓体指数 (d) 生殖腺体指数 (e) 肝臓中ビテロジェニン (f) 乳頭状小突起を有する節板数

注) 値は連平均値を元に算出した平均値±標準偏差 (対照区は n=12、ばく露区は n=6)。\*は対照区に比べて統計学的な有意差があることを示す (\* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01, Jonckheere-Terpstra 検定)。

表 14 F1 世代亜成体の肝臓中ビテロジェニン濃度

実測濃度 ( $\mu\text{g/L}$ )	肝臓中ビテロジェニン濃度 (ng/mg liver)	
	オス	メス
Control	4.37 $\pm$ 9.71	309 $\pm$ 363
28	0.83 $\pm$ 0.19	284 $\pm$ 307
93	7.84 $\pm$ 12.5	775 $\pm$ 191 **
330	17.9 $\pm$ 18.8 **	841 $\pm$ 161 **
1000	332 $\pm$ 284 **	1090 $\pm$ 490 **
3700	3020 $\pm$ 640 **	3400 $\pm$ 250 **

注) 値は連平均値を元に算出した平均値 $\pm$ 標準偏差 (対照区は n=12、ばく露区は n=6)。\*は対照区に比べて統計学的な有意差があることを示す (\*\* $p<0.01$ , Jonckheere-Terpstra 検定)。

#### (4) F1 世代亜成体の二次性徴指標

二次性徴の指標として、乳頭状小突起を有する節板数の計測結果を表 15 および図 8(f) に示す。オスでは、3700  $\mu\text{g/L}$  濃度区で乳頭状小突起を有する個体は確認されなかった。メスではいずれの試験区においても、乳頭状小突起を有する個体は確認されなかった。

表 15 F1 世代亜成体の乳頭状小突起を有する節板数

実測濃度 ( $\mu\text{g/L}$ )	乳頭状小突起を有する節板数 (Plates/fish)	
	オス	メス
Control	70 $\pm$ 22	0 $\pm$ 0
28	98 $\pm$ 6	0 $\pm$ 0
93	91 $\pm$ 8	0 $\pm$ 0
330	85 $\pm$ 5	0 $\pm$ 0
1000	85 $\pm$ 7	0 $\pm$ 0
3700	0 $\pm$ 0 *	0 $\pm$ 0

注) 値は連平均値を元に算出した平均値 $\pm$ 標準偏差 (対照区は n=12、ばく露区は n=6)。\*は対照区に比べて統計学的な有意差があることを示す (\* $p<0.05$ , Jonckheere-Terpstra 検定)。

#### (5) F1 世代亜成体の表現型性別と生殖腺形態

F1 世代亜成体の遺伝的オス個体における表現型性別および生殖腺形態の比較を表 16 に、遺伝的メス個体における表現型性別および生殖腺形態の比較を表 17 に示す。遺伝的オス個体では、3700  $\mu\text{g/L}$  濃度区で全ての個体でメスの表現型 (尻びれが小さい、背びれの切込みなし) を示し、生殖腺形態では 3700  $\mu\text{g/L}$  濃度区で 19 個体中 12 個体において卵巣が確認された。

表 16 F1 世代亜成体における遺伝的オス個体の表現型性別・生殖腺形態

実測濃度 ( $\mu\text{g/L}$ )	N	表現型			生殖腺形態		
		オス	メス	不明	精巣	卵巣	不明
Control	41	41	0	0	41	0	0
28	27	27	0	0	27	0	0
93	19	19	0	0	19	0	0
330	23	23	0	0	23	0	0
1000	22	22	0	0	22	0	0
3700	19	0	19	0	1	12	6

表 17.7 F1 世代亜成体における遺伝的メス個体の表現型性別・生殖腺形態

実測濃度 ( $\mu\text{g/L}$ )	N	表現型			生殖腺形態		
		オス	メス	不明	精巣	卵巣	不明
Control	50	1	49	0	1	49	0
28	21	0	21	0	0	21	0
93	27	1	26	0	1	26	0
330	25	0	25	0	0	25	0
1000	26	1	25	0	3	23	0
3700	27	0	27	0	1	24	2

遺伝的メス個体では対照区、93  $\mu\text{g/L}$  濃度区、1000  $\mu\text{g/L}$  濃度区において 1 個体ずつオスの表現型を示したが、いずれの個体も乳頭状小突起は認められなかった。また、対照区、93  $\mu\text{g/L}$  濃度区、1000  $\mu\text{g/L}$  濃度区、3700  $\mu\text{g/L}$  濃度区において解剖所見により精巣様の生殖腺が認められる個体が存在した。

#### (6) F1 世代亜成体の肝臓体指数・生殖腺体指数

F1 世代亜成体の肝臓体指数および生殖腺体指数の測定結果を表 18 および図 8(c)(d)に示す。オスの肝臓体指数は 3700  $\mu\text{g/L}$  濃度区で、生殖腺体指数は 1000  $\mu\text{g/L}$  濃度区以上で、対照区と比べて有意差に増加した。メスでは肝臓体指数は有意差が示されなかったが、生殖腺体指数は 3700  $\mu\text{g/L}$  濃度区で、対照区に比べて有意な低下が確認された。

表 18 F1 世代亜成体の肝臓体指数・生殖腺体指数

実測濃度 ( $\mu\text{g/L}$ )	肝臓体指数 (%)		生殖腺体指数 (%)	
	オス	メス	オス	メス
Control	2.1 $\pm$ 0.4	4.4 $\pm$ 0.7	0.8 $\pm$ 0.2	9.7 $\pm$ 1.3
28	2.1 $\pm$ 0.2	4.7 $\pm$ 0.4	0.9 $\pm$ 0.1	9.2 $\pm$ 0.4
93	2.4 $\pm$ 0.3	4.7 $\pm$ 0.5	1.0 $\pm$ 0.2	10.3 $\pm$ 2.6
330	2.1 $\pm$ 0.7	4.9 $\pm$ 0.4	0.9 $\pm$ 0.1	10.4 $\pm$ 1.0
1000	2.3 $\pm$ 0.4	4.2 $\pm$ 0.4	1.0 $\pm$ 0.2	** 6.5 $\pm$ 2.2
3700	4.1 $\pm$ 0.5	** 4.3 $\pm$ 0.5	2.9 $\pm$ 2.0	** 4.3 $\pm$ 0.9 **

注) 値は連平均値を元に算出した平均値 $\pm$ 標準偏差 (対照区は n=12、ばく露区は n=6)。\*は対照区に比べて統計学的な有意差があることを示す (\*\* $p<0.01$ , Jonckheere-Terpstra 検定)。

#### 4.6 F1 世代成熟個体の結果

##### (1) F1 世代ペアリング後の死亡及び行動・外観の異常

F1 世代ペアリング後の死亡個体数を表 19 に示す。いずれのばく露区においても対照区と比べ統計学的な有意差は確認されなかった。また、ばく露終了後に DMY の再確認をしたところ、3700  $\mu\text{g/L}$  濃度区では 2 ペア 4 個体とも遺伝子型がメスであったため、それらのペアを除いて結果を示した (n=10)。

表 19 F1 世代ペアリング後の死亡個体数

実測濃度 ( $\mu\text{g/L}$ )	オス			メス			合計 死亡率
	供試数	死亡数	死亡率	供試数	死亡数	死亡率	
Control	24	0	0%	24	0	0%	0%
28	12	0	0%	12	0	0%	0%
93	12	0	0%	12	0	0%	0%
330	12	0	0%	12	0	0%	0%
1000	12	0	0%	12	0	0%	0%
3700	10	1	10%	10	1	10%	10%

注) 統計解析は Step-down Cochran-Armitage Test を用いた。

## (2) F1 世代の総産卵数・受精卵数・受精率

F1 世代受精後 12 週目～14 週目の 21 日間の各試験区における 1 ペア 1 日あたりの総産卵数・受精卵数・受精率の結果を表 20、図 9 および 10 に示す。

1000  $\mu\text{g/L}$  および 3700  $\mu\text{g/L}$  濃度区では、総産卵数および受精卵数に对照区と比べて有意な低下が認められた。また、3700  $\mu\text{g/L}$  濃度区では、受精率に对照区と比べて有意な低下が認められた。1000  $\mu\text{g/L}$  濃度区では、受精率の低下傾向が認められたが、对照区と比べて統計学的な低下は認められなかった。

表 20 F1 世代の総産卵数・受精卵数・受精率

実測濃度 ( $\mu\text{g/L}$ )	N	総産卵数 (eggs/day/female)			
		21 日間	1 週目(Day 1-7)	2 週目(Day 8-14)	3 週目(Day 15-21)
Control	24	32.4 $\pm$ 3.6	32.4 $\pm$ 3.2	32.2 $\pm$ 3.8	32.5 $\pm$ 4.8
28	12	34.3 $\pm$ 2.7	34.4 $\pm$ 3.2	34.0 $\pm$ 3.2	34.7 $\pm$ 3.0
93	12	32.8 $\pm$ 3.1	32.4 $\pm$ 3.2	32.0 $\pm$ 3.4	34.0 $\pm$ 4.2
330	12	33.2 $\pm$ 3.8	33.2 $\pm$ 4.2	33.0 $\pm$ 4.4	33.5 $\pm$ 3.8
1000	12	27.2 $\pm$ 5.8	* 27.9 $\pm$ 4.8	* 28.0 $\pm$ 5.6	* 25.6 $\pm$ 7.8
3700	10	0.5 $\pm$ 0.8	** 0.4 $\pm$ 0.5	** 0.4 $\pm$ 0.6	** 0.6 $\pm$ 1.5
実測濃度 ( $\mu\text{g/L}$ )	N	受精卵数 (eggs/day/female)			
		21 日間	1 週目(Day 1-7)	2 週目(Day 8-14)	3 週目(Day 15-21)
Control	24	31.6 $\pm$ 3.7	31.5 $\pm$ 3.6	31.4 $\pm$ 3.7	31.9 $\pm$ 4.6
28	12	33.0 $\pm$ 3.4	33.1 $\pm$ 4.2	32.5 $\pm$ 3.4	33.2 $\pm$ 3.8
93	12	32.3 $\pm$ 2.8	31.7 $\pm$ 2.7	31.6 $\pm$ 3.3	33.5 $\pm$ 4.0
330	12	32.7 $\pm$ 3.8	32.5 $\pm$ 3.9	32.5 $\pm$ 4.5	32.9 $\pm$ 3.8
1000	12	23.5 $\pm$ 11.1	* 23.3 $\pm$ 11.1	* 24.6 $\pm$ 11.7	22.5 $\pm$ 10.9
3700	10	0.0 $\pm$ 0.0	** 0.0 $\pm$ 0.0	** 0.0 $\pm$ 0.0	** 0.0 $\pm$ 0.0
実測濃度 ( $\mu\text{g/L}$ )	N	受精率 (%)			
		21 日間	1 週目(Day 1-7)	2 週目(Day 8-14)	3 週目(Day 15-21)
Control	24	97.5 $\pm$ 2.7	96.9 $\pm$ 4.0	97.5 $\pm$ 3.3	98.1 $\pm$ 3.0
28	12	95.9 $\pm$ 5.5	96.4 $\pm$ 8.5	95.7 $\pm$ 5.1	95.7 $\pm$ 5.3
93	12	98.4 $\pm$ 1.1	97.7 $\pm$ 2.0	98.7 $\pm$ 1.2	98.6 $\pm$ 1.2
330	12	98.3 $\pm$ 0.7	98.0 $\pm$ 1.9	98.5 $\pm$ 1.4	98.4 $\pm$ 1.1
1000	12	81.2 $\pm$ 36.7	80.1 $\pm$ 36.7	82.6 $\pm$ 37.5	80.8 $\pm$ 36.3
3700	10	0.0 $\pm$ 0.0	** 0.0 $\pm$ 0.0	** 0.0 $\pm$ 0.0	** 0.0 $\pm$ 0.0

注) 値は連平均値を元に算出した平均値 $\pm$ 標準偏差 (对照区～ばく露濃度区の連数は、n=24, 12, 12, 12, 12, 10) を示す。\*は对照区に比べて統計学的な有意差があることを示す (\* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01, Jonckheere-Terpstra Test)。

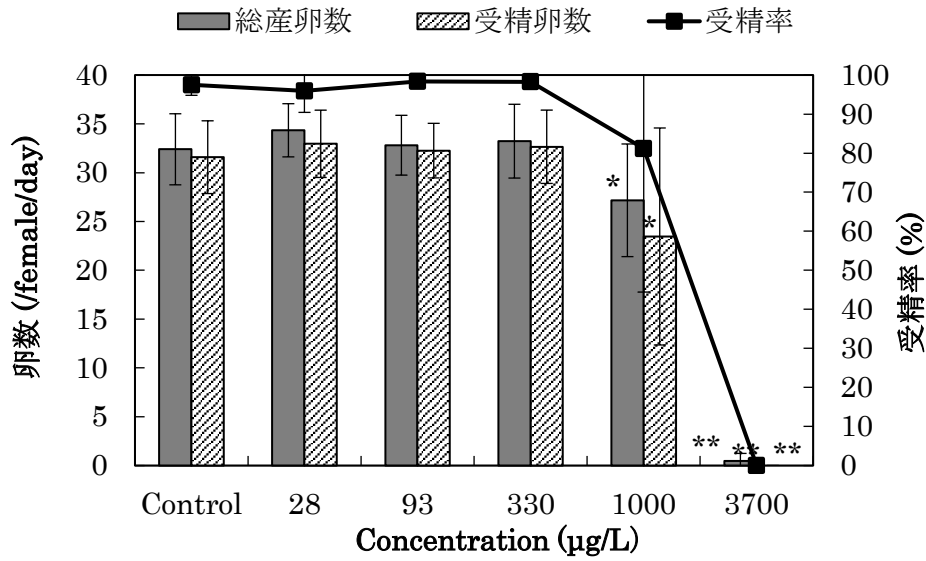
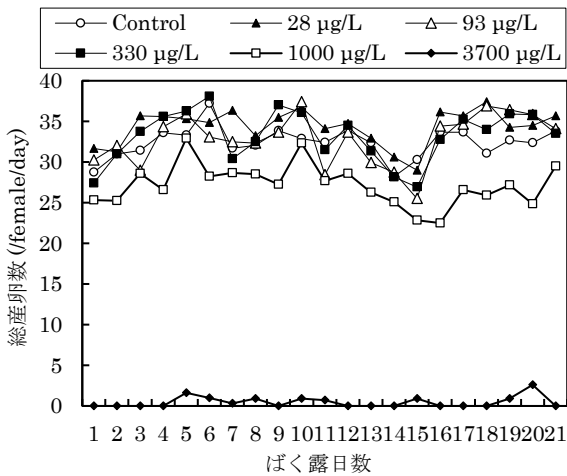


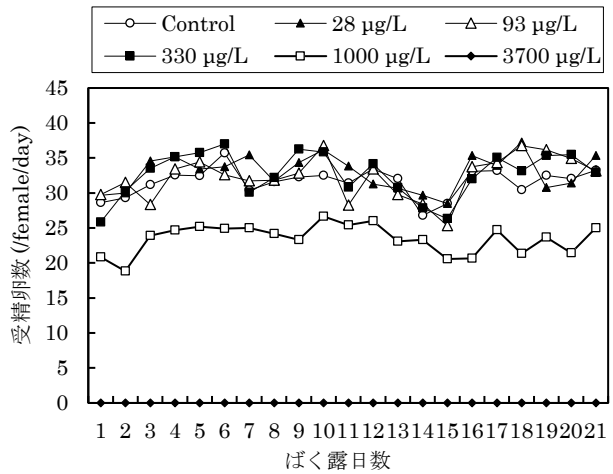
図9 F1世代の総産卵数・受精卵数・受精率(各ペア・1日あたり)

注) 値は連平均値を元に算出した平均値±標準偏差(対照区~ばく露濃度区の間は、n=24, 12, 12, 12, 12, 10)を示す。\*は対照区に比べて統計学的な有意差があることを示す(\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , Jonckheere-Terpstra Test)。

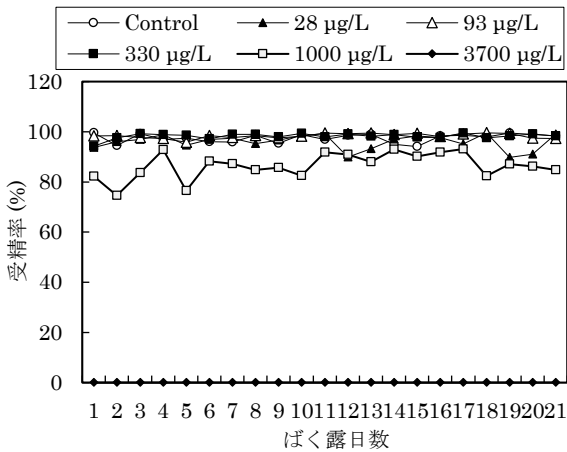
(a) 総産卵数



(b) 受精卵数



(c) 受精率



(d) 累積受精卵数

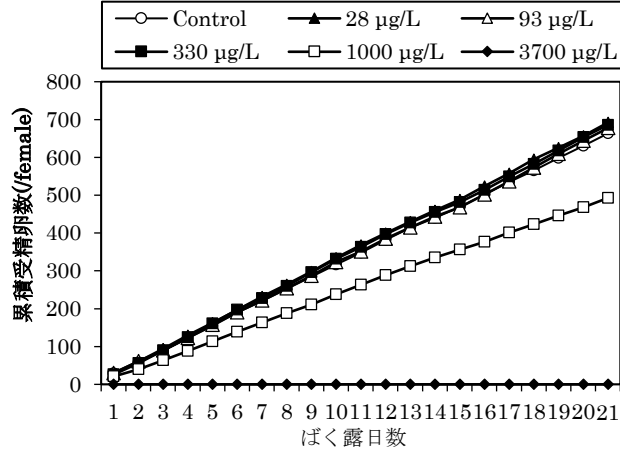


図10 F1世代の(a) 総産卵数 (b) 受精卵数 (c) 受精率の日変動および (d) 累積受精卵数 (値は各試験区の間平均値)

## (3) F1 世代成熟個体の全長・湿重量

F1 世代成熟個体の全長および湿重量の測定結果を表 21、図 11(a)(b) に示す。全長は、オスは非単調であり、28、93、1000  $\mu\text{g/L}$  濃度区において対照区と比べて有意差が認められたものの、非単調な増加であり、330 および 3700  $\mu\text{g/L}$  濃度区では有意差が認められなかったことから、NOEC は 3700  $\mu\text{g/L}$  とした。メスは、3700  $\mu\text{g/L}$  濃度区において対照区と比べて有意な減少が認められたため、NOEC は 1000  $\mu\text{g/L}$  となった。

湿重量は、オスは 1000、3700  $\mu\text{g/L}$  濃度区において対照区と比べて有意差が認められた。メスはいずれのばく露区において対照区に対する有意差は示されなかった。

表 21 F1 世代成熟個体の全長・湿重量

実測濃度 ( $\mu\text{g/L}$ )	全長 (mm)		湿重量 (mg)	
	オス	メス	オス	メス
Control	31.6 $\pm$ 1.3	32.3 $\pm$ 1.2	331 $\pm$ 42	425 $\pm$ 46
28	33.1 $\pm$ 1.5 *	32.5 $\pm$ 1.6	348 $\pm$ 42	406 $\pm$ 44
93	32.7 $\pm$ 1.5 *	31.9 $\pm$ 1.0	364 $\pm$ 47	421 $\pm$ 35
330	32.4 $\pm$ 1.2	32.2 $\pm$ 1.0	345 $\pm$ 34	417 $\pm$ 40
1000	33.8 $\pm$ 1.3 **	31.6 $\pm$ 1.1	401 $\pm$ 45	440 $\pm$ 58
3700	31.9 $\pm$ 1.3	31.4 $\pm$ 1.4 *	436 $\pm$ 41	421 $\pm$ 46

注) 値は連平均値を元に算出した平均値 $\pm$ 標準偏差 (対照区 $\sim$ ばく露濃度区の連数は、n=24, 12, 12, 12, 12, 9) を示す。\*は対照区に比べて統計学的な有意差があることを示す (\* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01, 全長オスは非単調データのため Dunnett Test, その他は Jonckheere-Terpstra Test) …

## (4) F1 世代成熟個体の肝臓体指数・生殖腺体指数

F1 世代成熟個体の肝臓体指数および生殖腺体指数の測定結果を表 22、図 11(c)(d) に示す。肝臓体指数については、オスは 3700  $\mu\text{g/L}$  濃度区で対照区と比べて有意に増加したが、メスはすべての濃度区で有意差は示されなかった。

生殖腺体指数については、オスは 3700  $\mu\text{g/L}$  濃度区で、メスは 1000、3700  $\mu\text{g/L}$  濃度区で有意に増加した。

表 22 F1 世代成熟個体の肝臓体指数・生殖腺体指数

実測濃度 ( $\mu\text{g/L}$ )	肝臓体指数 (%)		生殖腺体指数 (%)	
	オス	メス	オス	メス
Control	1.8 $\pm$ 0.3	4.7 $\pm$ 0.7	0.9 $\pm$ 0.2	9.4 $\pm$ 1.3
28	2.0 $\pm$ 1.3	5.1 $\pm$ 1.3	0.9 $\pm$ 0.2	9.6 $\pm$ 1.5
93	1.9 $\pm$ 0.4	5.4 $\pm$ 0.8	1.0 $\pm$ 0.4	10 $\pm$ 1
330	2.0 $\pm$ 0.5	5.3 $\pm$ 0.3	1.0 $\pm$ 0.3	9.2 $\pm$ 1.5
1000	1.8 $\pm$ 0.6	4.3 $\pm$ 1.3	0.9 $\pm$ 0.3	14 $\pm$ 8 **
3700	3.6 $\pm$ 1.3 **	4.1 $\pm$ 0.6	9.0 $\pm$ 5.8 **	9.7 $\pm$ 5.8 *

注) 値は連平均値を元に算出した平均値 $\pm$ 標準偏差 (対照区 $\sim$ ばく露濃度区の連数は、n=24, 12, 12, 12, 12, 9) を示す。\*は対照区に比べて統計学的な有意差があることを示す (\* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01, Jonckheere-Terpstra Test)。



## (5) F1 世代成熟個体の肝臓中ビテロジェニン濃度

ELISA による F1 世代成熟個体の肝臓中ビテロジェニン濃度の測定結果を表 23、図 11(e) に示す。オスでは、28 µg/L 濃度区以上で、メスでは 3700 µg/L 濃度区で、対照区と比べて有意な増加がみられた。

**表 23 F1 世代成熟個体の肝臓中ビテロジェニン濃度**

実測濃度 (µg/L)	肝臓中ビテロジェニン濃度 (ng/mg liver)			
	オス		メス	
Control	5.88 ± 5.98		732 ± 399	
28	187 ± 250	**	558 ± 232	
93	155 ± 200	**	526 ± 90	
330	1000 ± 474	**	568 ± 97	
1000	1100 ± 260	**	624 ± 127	
3700	5140 ± 3470	**	4680 ± 1410	**

注) 値は連平均値を元に算出した平均値±標準偏差 (対照区~ばく露濃度区の連数は、n=24, 12, 12, 12, 12, 9) を示す。\*は対照区に比べて統計学的な有意差があることを示す (\*\* $p<0.01$ , Jonckheere-TerpstraTest)

## (6) F1 世代成熟個体の二次性徴指標

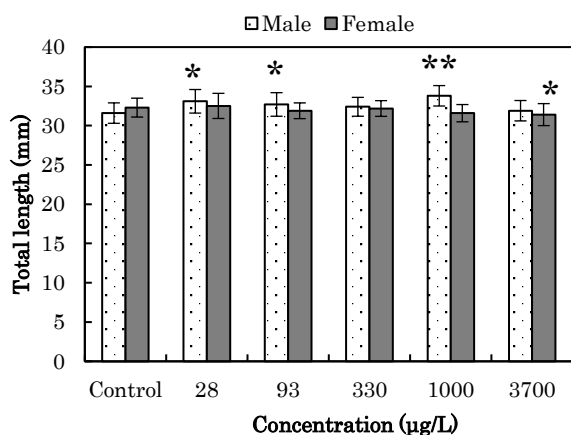
二次性徴の指標として、F1 世代成熟個体における乳頭状小突起を有する節板数の計測結果を表 24、図 11(f) に示す。オスでは、3700 µg/L 濃度区で乳頭状小突起を有する個体は確認されなかった。メスではすべての試験区で、乳頭状小突起を有する個体は確認されなかった。

**表 24 F1 世代成熟個体における乳頭状小突起を有する節板数**

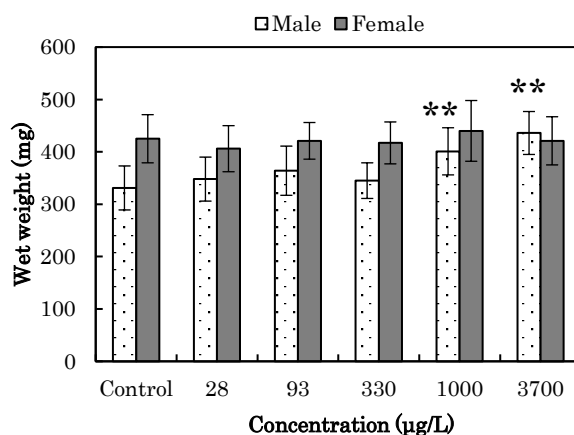
実測濃度 (µg/L)	乳頭状小突起を有する節板数 (Plates/fish)			
	オス		メス	
Control	101 ± 14		0 ± 0	
28	107 ± 18		0 ± 0	
93	96 ± 13		0 ± 0	
330	101 ± 14		0 ± 0	
1000	97 ± 15		0 ± 0	
3700	0 ± 0	**	0 ± 0	

注) 値は連平均値を元に算出した平均値±標準偏差 (対照区~ばく露濃度区の連数は、n=24, 12, 12, 12, 12, 10) を示す。\*は対照区に比べて統計学的な有意差があることを示す (\*\* $p<0.01$ , Jonckheere-TerpstraTest)

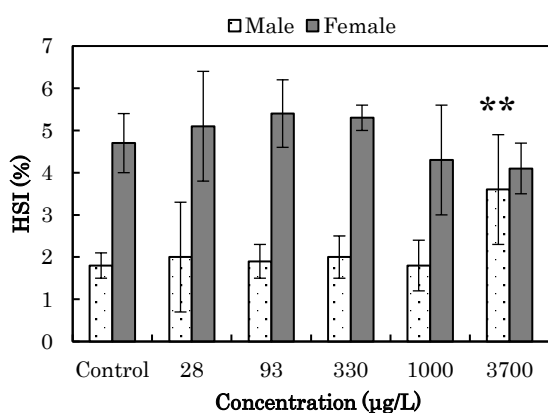
(a) 全長



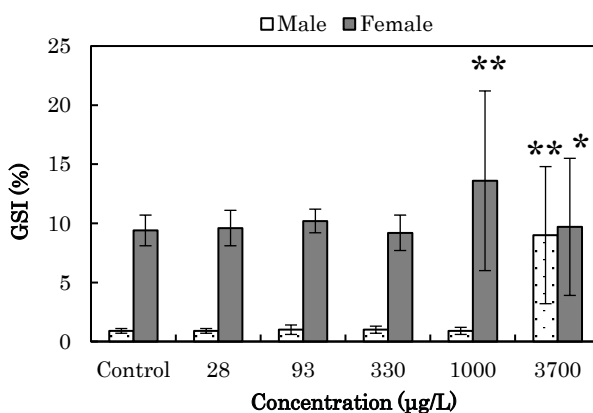
(b) 湿重量



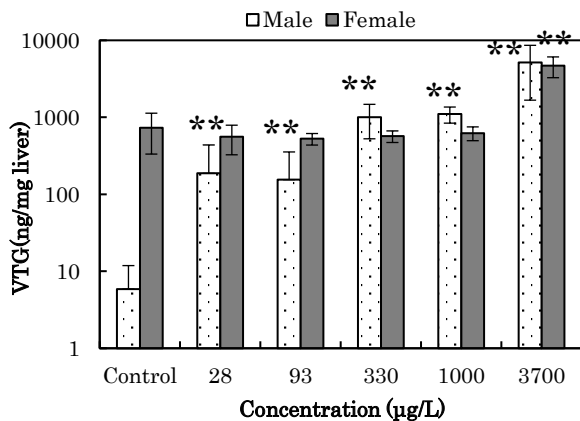
(c) 肝臓体指数 (HSI)



(d) 生殖腺体指数 (GSI)



(e) 肝臓中ビテロジェニン



(f) 乳頭状小突起を有する節板数

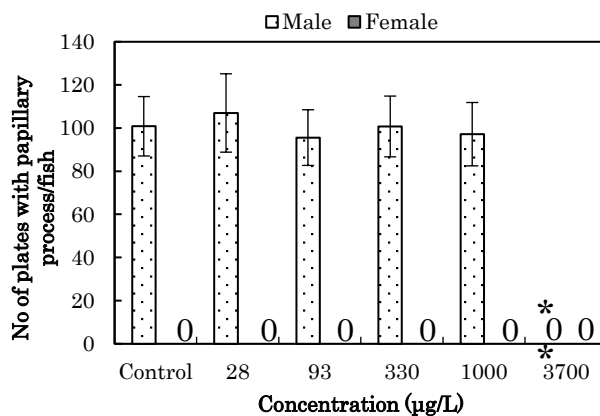


図 11 F1 世代成熟個体の (a) 全長 (b) 湿重量 (c) 肝臓体指数 (d) 生殖腺体指数 (e) 肝臓中ビテロジェニン (f) 乳頭状小突起を有する節板数

注) 値は連平均値を元に算出した平均値±標準偏差 (対照区~ばく露濃度区の間は、n=24, 12, 12, 12, 12, 9) を示す。\*は対照区に比べて統計学的な有意差があることを示す (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , 全長オスは非単調データのため Dunnett Test, その他は Jonckheere-Terpstra Test)

(7) F1 世代成熟個体の表現型性別と生殖腺形態

F1 世代成熟個体における遺伝的オス個体における生殖腺形態の比較を表 25 に、遺伝的メス個体における生殖腺形態の比較を表 26 に示す。遺伝的オス個体では、3700 µg/L 濃度区で 9 個体中 8 個体において卵巣が確認された。遺伝的メス個体では、全ての濃度区

において卵巣が確認された。

表 25 F1 世代繁殖用個体における遺伝的オス個体の生殖腺形態

実測濃度 ( $\mu\text{g/L}$ )	N	生殖腺形態		
		精巣	卵巣	不明
Control	24	24	0	0
28	12	12	0	0
93	12	12	0	0
330	12	12	0	0
1000	12	12	0	0
3700	9	0	8	1

表 26 F1 世代繁殖用個体における遺伝的メス個体の生殖腺形態

実測濃度 ( $\mu\text{g/L}$ )	N	生殖腺形態		
		精巣	卵巣	不明
Control	24	0	24	0
28	12	0	12	0
93	12	0	12	0
330	12	0	12	0
1000	12	0	12	0
3700	9	0	9	0

#### 4.7 F2 世代の結果

##### (1) F2 世代胚・仔魚期のふ化率・ふ化日数・ふ化後生存率・生存率

対照区におけるふ化日の中央値が受精後 8 日目であったことから (図 12)、その 2 倍である 16 日目において各エンドポイントを計算した (表 27)。3700  $\mu\text{g/L}$  濃度区では F2 世代に継代することができなかった。ふ化率、ふ化後生存率、生存率はすべての濃度区で対照区との有意差は認められなかった。

ふ化日数は Mixed Effects Cox Models によると 330  $\mu\text{g/L}$  濃度区において有意な増加がみられた。その差は 0.5 日であった。なお、Dunn 検定 (非単調、非等分散のため) では全ての濃度区で有意差は示されなかった。

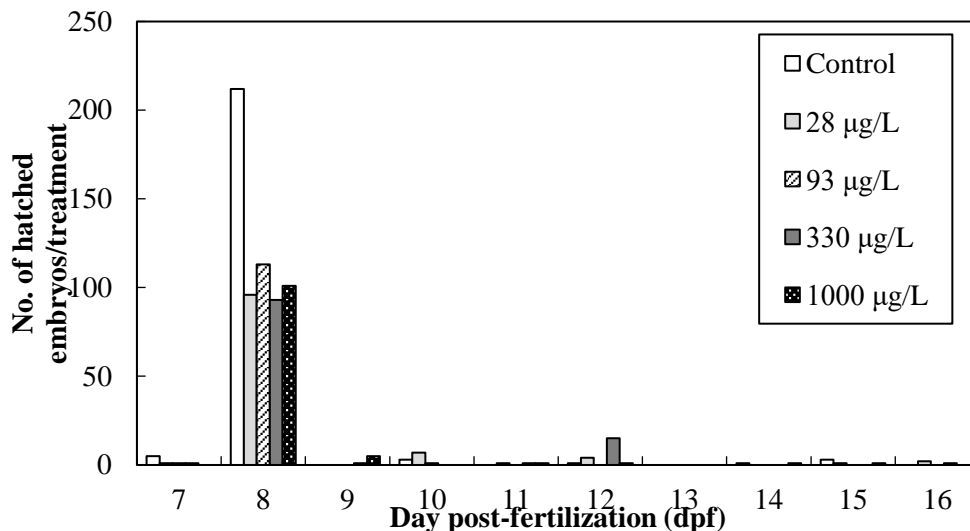


図 12 F2 の受精後 7~16 日目におけるふ化個体数 (各試験区の合計)

表 27 F2 世代胚期のふ化率・ふ化日数・ふ化後生存率・生存率（受精後 16 日目）

実測濃度 ( $\mu\text{g/L}$ )	ふ化率 (%)	ふ化日 (day)	ふ化後生存率 (%)	生存率 (%)
Control	94 $\pm$ 5	8.1 $\pm$ 0.2	100 $\pm$ 0	94 $\pm$ 5
28	93 $\pm$ 5	8.5 $\pm$ 0.4	100 $\pm$ 0	95 $\pm$ 3
93	96 $\pm$ 5	8.0 $\pm$ 0.0	100 $\pm$ 0	97 $\pm$ 4
330	93 $\pm$ 7	8.6 $\pm$ 0.5 *	100 $\pm$ 0	98 $\pm$ 3
1000	92 $\pm$ 4	8.2 $\pm$ 0.2	100 $\pm$ 0	95 $\pm$ 5
3700	NA	NA	NA	NA

注) 値は連平均値を元に算出した平均値 $\pm$ 標準偏差（対照区は n=12、ばく露区は n=6）を示す。\*は対照区に比べて統計学的な有意差があることを示す（\* $p<0.05$ , ふ化日数は Mixed Effects Cox Models, その他は Jonckheere-Terpstra 検定）。NA: Not available（継代なし）。

#### 4.8 結果の概要

各エンドポイントについて、各世代の結果の概要を以下にまとめた。

##### (1) F0 世代成熟個体の結果

- 1) 繁殖に関する指標（総産卵数・受精卵数・受精率）  
 総産卵数・受精卵数は 1000 および 3700  $\mu\text{g/L}$  濃度区で対照区と比べて有意な低下が認められた。  
 受精率は 3700  $\mu\text{g/L}$  濃度区で対照区と比べて有意な低下が認められた。
- 2) 二次性徴（乳頭状小突起を有する節板数）  
 オスではすべての濃度区において対照区との有意差は認められなかった。  
 メスではすべての試験区で観察されなかった。
- 3) 肝臓中ビテロジェニン濃度  
 オスでは 28  $\mu\text{g/L}$  濃度区以上で、メスでは 3700  $\mu\text{g/L}$  濃度区で対照区と比べて有意に上昇した。
- 4) 表現型性別と生殖腺形態  
 すべての濃度区において表現型性別・生殖腺形態は明確かつ一致していた。
- 5) その他の指標  
 全長は、3700  $\mu\text{g/L}$  濃度区のオスにおいて対照区と比べて有意に低かった。  
 肝臓体指数は、オスは 3700  $\mu\text{g/L}$  濃度区で、メスは 1000  $\mu\text{g/L}$  濃度区以上で対照区に比べて有意に増加した。  
 生殖腺体指数は、3700  $\mu\text{g/L}$  濃度区のオスにおいて対照区と比べて有意に低かった。  
 それ以外の指標については、すべての濃度区で対照区との有意差は認められなかった。

##### (2) F1 世代胚～稚魚期の結果

- 1) 胚期ふ化率・ふ化日数・生存率  
 ふ化率、生残率はすべての濃度区で対照区との有意差は認められなかった。  
 ふ化日数は、当研究所での平均的なふ化日数よりも、F1 世代の対照区のみで約 1 日

早かった。そのため、330 µg/L 濃度区以上で対照区と比べて有意に大きかったが、その差は最大で1.2日であった。

### (3) F1 世代垂成体の結果

- 1) 生存率  
受精後4週目にいて、3700 µg/L 濃度区の生存率は97%と高い値を示していたが、対照区（生残率 100%）と比べ統計学的な有意差が認められた。
- 2) 二次性徴（乳頭状小突起を有する節板数）  
オスでは 3700 µg/L 濃度区で乳頭状小突起を有する個体は確認されなかった。  
メスではすべての濃度区で観察されなかった。
- 3) 肝臓中ビテロジェニン濃度  
オスでは 330 µg/L 濃度区以上で、メスでは 93 µg/L 濃度区以上で対照区と比べて有意に上昇した。
- 4) 表現型性別と生殖腺形態  
遺伝的オス個体では、3700 µg/L 濃度区で全ての個体でメスの表現型（尻びれが小さい、背びれの切込みなし）を示し、生殖腺形態では 3700 µg/L 濃度区で 19 個体中 12 個体において卵巣が確認された。
- 5) その他の指標  
全長および湿重量は、3700 µg/L 濃度区のメスにおいて対照区と比べて有意に低かった。  
肝臓体指数は、3700 µg/L 濃度区のオスにおいて対照区と比べて有意に高かった。  
生殖腺体指数は、オスは 1000 µg/L 濃度区以上で対照区と比べて有意に増加した。  
一方、メスは 3700 µg/L 濃度区で対照区に比べて有意に低下した。

### (4) F1 世代成熟個体の結果

- 1) 生存率  
いずれの濃度区においても対照区と比べ統計学的な有意差は確認されなかった。
- 2) 繁殖に関する指標（総産卵数・受精卵数・受精率）  
総産卵数・受精卵数は 1000 および 3700 µg/L 濃度区で対照区と比べて有意な低下が認められた。  
受精率は 3700 µg/L 濃度区で対照区と比べて有意な低下が認められた。
- 3) 二次性徴（乳頭状小突起を有する節板数）  
オスでは 3700 µg/L 濃度区で乳頭状小突起を有する個体は確認されなかった。  
メスではすべての濃度区で観察されなかった。
- 4) 肝臓中ビテロジェニン濃度  
オスでは 28 µg/L 濃度区以上で、メスでは 3700 µg/L 濃度区で対照区と比べて有意に上昇した。
- 5) 表現型性別と生殖腺形態  
遺伝的オス個体では、3700 µg/L 濃度区で 9 個体中 8 個体において卵巣が確認された。

6) その他の指標

全長は、28、93、1000 µg/L 濃度区のおスにおいて対照区と比べて有意に高かった。一方、3700 µg/L 濃度区のおメスでは対照区と比べて有意に低かった。

湿重量は、1000 µg/L 濃度区以上のおスにおいて対照区と比べて有意に高かった。

肝臓体指数は、3700 µg/L 濃度区のおスにおいて対照区と比べて有意に高かった。

生殖腺体指数は、おスは 3700 µg/L 濃度区で、おメスは 1000 µg/L 濃度区以上で対照区と比べて有意に高かった。

(5) F2 世代胚・仔魚期の結果

ふ化率、ふ化後生存率、生存率はすべての濃度区で対照区との有意差は認められなかった。

ふ化日数は 330 µg/L 濃度区において有意に増加したが、その差は 0.5 日であった。

4.9 考察

本試験の各世代・各エンドポイントの LOEC 一覧を表 28 に示す。

MEOGRT 試験法を用いてビスフェノール A の多世代影響について検討した。これまでの研究から、ビスフェノール A はエストロゲン作用を持つことが想定されている<sup>3,4,5)</sup>。本試験において F1 世代の 28、93、33、1000 µg/L 濃度区では、ふ化から亜成体までの生残率・全長・湿重量に対照区との有意差は認められなかった。

F0 および F1 世代のおス・おメス共に肝臓中のビテロジェニン濃度はビスフェノール A 濃度依存的に増加した。成熟個体におけるビスフェノール A の肝臓中ビテロジェニン濃度に対する LOEC は F0 および F1 世代間で同じ値を示した。また、F1 世代において、3700 µg/L 濃度区において遺伝的おス個体から卵巣を有したおメス個体へと性転換したと考えられる個体が観察された。さらに、3700 µg/L 濃度区では乳頭状小突起を有する遺伝的おス個体は確認されなかった。これらの現象は、エストロゲン作用によって誘導される現象であり、ビスフェノール A はメダカに対してエストロゲン作用を有することが示された。

ビスフェノール A が繁殖に与える影響を検討した結果、総産卵数および受精卵数は 1000 µg/L 濃度区以上で、受精率は 3700 µg/L 濃度区で有意に低下した。さらに、各エンドポイントの LOEC は F0 および F1 世代間で同じ値を示し、経世代の影響は観察されなかった。ビスフェノール A の肝臓中ビテロジェニン濃度に対する影響および繁殖影響では経世代の影響が認められなかった。一方で、表現型性別や生殖腺形態、F0 世代では観察されなかったが F1 世代では 3700 µg/L 濃度区のおスにおいて、遺伝的おス個体のおメス表現型および卵巣を有する個体が多く観察された。

表 28 ビスフェノール A の MEOGRT 試験結果まとめ (各世代各エンドポイントの LOEC)

エンドポイント		F0	F1		F2
		成体	胚～垂成体	成体	胚
ふ化率		\	>3700	\	>1000
ふ化日数			↑ 330		>1000
生存率 (2 wpf)			>3700		>1000
生存率 (4 wpf)			↓ 3700		
齢		13-16 wpf	9 wpf	12-15 wpf	
生存率	Male	>3700	>3700	>3700	\
	Female	>3700		>3700	
総産卵数		↓ 1000	\	↓ 1000	
受精卵数		↓ 1000		↓ 1000	
受精率		↓ 3700		↓ 3700	
全長	Male	↓ 3700	>3700	>3700	
	Female	>3700	↓ 3700	↓ 3700	
湿重量	Male	>3700	>3700	↑ 1000	
	Female	>3700	↓ 3700	>3700	
肝臓体指数	Male	↑ 3700	↑ 3700	↑ 3700	
	Female	↑ 1000	>3700	>3700	
生殖腺体指数	Male	↓ 3700	↑ 1000	↑ 3700	
	Female	>3700	↓ 3700	↑ 1000	
ビテロジェニン	Male	↑ 28	↑ 330	↑ 28	
	Female	↑ 3700	↑ 93	↑ 3700	
二次性徴 (尻びれ 乳頭状小突起)	Male	>3700	↓ 3700	↓ 3700	
	Female	NA	NA	NA	
表現型性別と生殖腺形態 <sup>1</sup>		>3700	↑ 3700 <sup>2</sup>	↑ 3700 <sup>2</sup>	

1: 遺伝的性別と表現型性別・生殖腺形態が不一致, 2: 遺伝的オスが外見・生殖腺メス化(卵巣)

#### 4.10 参考文献

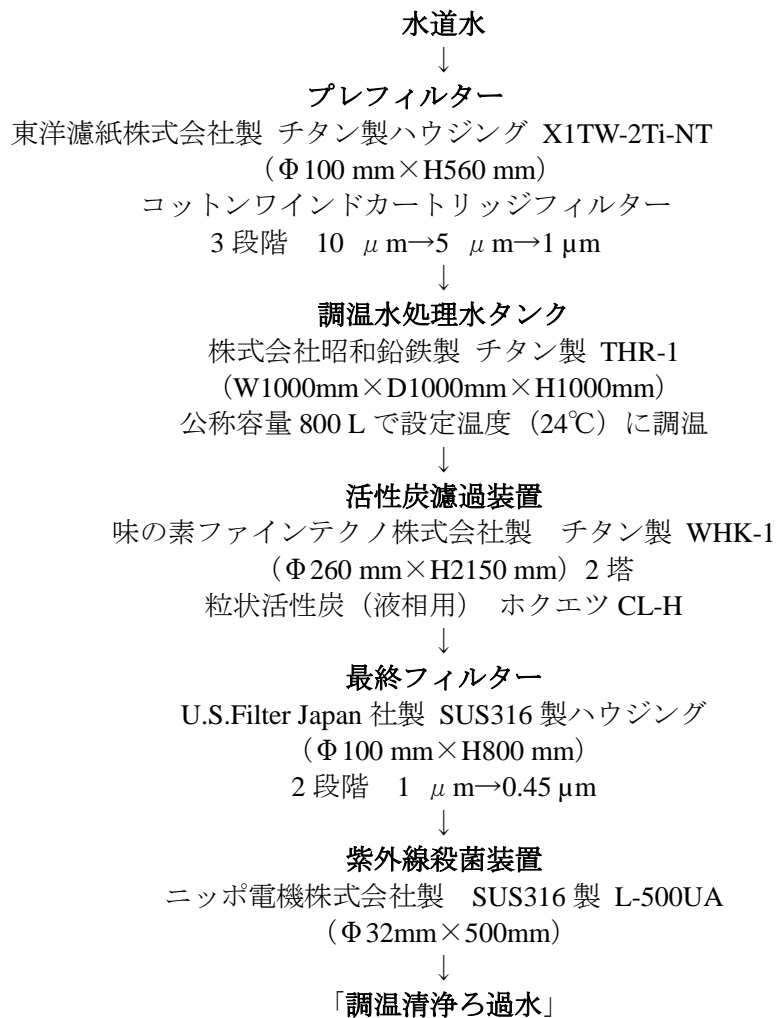
- 1) OECD (2015): OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 240, Medaka Extended One Generation Reproduction Test (MEOGRT)
- 2) 国立研究開発法人国立環境研究所 (2016) : 平成 27 年度「化学物質の内分泌かく乱作用に関する試験法開発に係る業務」、報告書 (改訂版)
- 3) (一財) 化学物質評価研究機構 (2015) : 平成 27 年度「化学物質の内分泌かく乱作用に関する第一段階生物試験 (ビスフェノール A : BPA) 実施業務」、平成 27 年度環境省委託業務報告書
- 4) Kang IJ, Yokota H, Oshima Y, Tsuruda Y, Oe T, Imada N, Tadokoro H, Honjo T. (2002). Effects of bisphenol a on the reproduction of Japanese medaka (*Oryzias latipes*). Environ Toxicol Chem. 21:2394-2400.
- 5) Yamaguchi A, Ishibashi H, Kohra S, Arizono K, Tominaga N. (2005). Short-term effects of endocrine-disrupting chemicals on the expression of estrogen-responsive genes in male medaka (*Oryzias latipes*). Aquat Toxicol. 72:239-249.
- 6) Flynn K, Lothenbach D, Whiteman F, Hammermeister D, Touart LW, Swintek J, Tatarazako N, Onishi Y, Iguchi T and Johnson R, 2017. Summary of the development the US Environmental Protection Agency's Medaka Extended One Generation Reproduction Test (MEOGRT) using data from 9 multigenerational medaka tests. Environ Toxicol Chem. doi:10.1002/etc.3923.
- 7) Swintek J, Flynn K, Haselman J. Package ‘StatCharrms’ . Available from: <https://cran.r-project.org/web/packages/StatCharrms/StatCharrms.pdf>.
- 8) 岩松鷹司(2006): 新版メダカ学全書、大学教育出版、473p.



## 参考資料 調温清浄ろ過水について

メダカおよびニセネコゼミジンの飼育及び試験用水に用いる調温清浄ろ過水は、以下に示す淡水処理装置によって上水（水道水）を処理することで生成した。

### 淡水処理装置の概要



接液部にはチタン、ステンレス、PVDF（ポリフッ化ビニリデン）、石英を用い、内分泌攪乱化学物質が含まれない材料を使用している。

## フィルターユニットの概要

近藤工業株式会社製 SUS-304 製  
(W400 mm×L1100 mm×H500 mm)

活性炭パネル

(305 mm×305 mm×t25 mm)



アルカリ系ケミカルフィルター

(305 mm×305 mm×t55 mm)



硫黄系ケミカルフィルター

(305 mm×305 mm×t55 mm)



有機系ケミカルフィルター

(305 mm×305 mm×t55 mm)



ULPA フィルター

(305 mm×305 mm×t55 mm)

集塵能力 99.9997%以上



「清浄空気」

使用部材はステンレスを用い、内分泌攪乱化学物質が含まれない材料を使用している。  
ここで生成された清浄空気によって清浄ろ過水をエアレーションし、飼育及び試験に使用する。

調温清浄濾過水の水質測定結果 (平成 29 年 3 月採水試料、分析：(株)環境研究センター)

分析項目	単位	分析結果	分析方法
臭素酸	mg/l	< 0.001	平成 15 年厚生労働省告示第 261 号
総トリハロメタン*	mg/l	< 0.001	平成 15 年厚生労働省告示第 261 号
トリクロロ酢酸	mg/l	< 0.003	平成 15 年厚生労働省告示第 261 号
ブロモジクロロメタン	mg/l	< 0.001	平成 15 年厚生労働省告示第 261 号
ブロモホルム	mg/l	< 0.001	平成 15 年厚生労働省告示第 261 号
ホルムアルデヒド	mg/l	< 0.008	平成 15 年厚生労働省告示第 261 号
亜鉛及びその化合物	mg/l	< 0.01	平成 15 年厚生労働省告示第 261 号
アルミニウム及びその化合物	mg/l	< 0.01	平成 15 年厚生労働省告示第 261 号
鉄及びその化合物	mg/l	< 0.01	平成 15 年厚生労働省告示第 261 号
銅及びその化合物	mg/l	< 0.01	平成 15 年厚生労働省告示第 261 号
ナトリウム及びその化合物	mg/l	27	平成 15 年厚生労働省告示第 261 号
マンガン及びその化合物	mg/l	< 0.01	平成 15 年厚生労働省告示第 261 号
塩化物イオン	mg/l	37	平成 15 年厚生労働省告示第 261 号
カルシウム、マグネシウム等 (硬度)	mg/l	71	平成 15 年厚生労働省告示第 261 号
蒸発残留物	mg/l	170	平成 15 年厚生労働省告示第 261 号
陰イオン界面活性剤	mg/l	< 0.02	平成 15 年厚生労働省告示第 261 号
ジオスミン	mg/l	< 0.000001	平成 15 年厚生労働省告示第 261 号
2-メチルイソボルネオール	mg/l	< 0.000001	平成 15 年厚生労働省告示第 261 号
非イオン界面活性剤	mg/l	< 0.002	平成 15 年厚生労働省告示第 261 号
フェノール類	mg/l	< 0.0005	平成 15 年厚生労働省告示第 261 号
有機物 (TOC)	mg/l	0.6	平成 15 年厚生労働省告示第 261 号
pH 値	—	7.8	平成 15 年厚生労働省告示第 261 号
臭気	—	異常なし	平成 15 年厚生労働省告示第 261 号
色度	度	< 0.5	平成 15 年厚生労働省告示第 261 号
濁度	度	< 0.1	平成 15 年厚生労働省告示第 261 号
化学的酸素要求量	mg/l	< 1	JIS K 0102 17
電気伝導率	µS/m	27.4	JIS K 0102 13
酸消費量 (pH4.8)	mgCaCO <sub>3</sub> /l	10	JIS K 0102 15.1
ニッケル	mg/l	< 0.01	JIS K 0102 59.3
残留塩素	mg/l	0.1	JIS K 0102 33.2
以下余白			
備 考			
< 印は定量下限値未満を示す。 *総トリハロメタン(クロホルム、ジブロモクロメタン、ブロモジクロロメタン、及びブロモホルムのそれぞれの濃度の総和)			

担当者

鑪迫 典久	渡部 春奈
山本 裕史	堀江 好文
山岸 隆博	高橋 裕子
小塩 正朗	新宅 洋子
重本 良子	八木 文乃

---

平成 28 年度

化学物質の内分泌かく乱作用に関する第二段階生物試験（ビスフェノール A）実施業務  
報告書

国立研究開発法人国立環境研究所 環境リスク・健康研究センター  
〒305-8506 つくば市小野川 16-2 TEL&FAX 029-850-2851

無断複写・転載を禁じます。この印刷物は、古紙パルプ配合率 70%以上・白色度 70%程  
度の印刷用紙を使用しています。Printed on recycled paper

---