

第 2 段階生物試験の検証結果について (案)

1. 平成 27 年度に実施した試験結果について

第 2 段階生物試験としての適用に向けて、4-ノニルフェノール(分岐型) (CAS No. 84852-15-3)について、メダカ拡張 1 世代繁殖試験(MEOGRT: OECD TG240)を実施した (試験結果の詳細については別添参照)。

メダカ (*Oryzias latipes*) を用い、1.27、2.95、9.81、27.79、89.35 $\mu\text{g/L}$ (実測値)のばく露濃度で試験(全ばく露期間：19 週間)を行った。

(1) F0 世代(ばく露期間：4 週間)

死亡率、外観異常、行動異常、産卵数、受精卵数、受精率、全長、体重、生殖腺体指数、雌の肝臓体指数、二次性徴、雌の肝臓中ビテロゲニン濃度に統計学的に有意な変化は認められなかった。

雄の肝臓中ビテロゲニン濃度は、ばく露濃度の上昇と共に増加し、9.81 $\mu\text{g/L}$ 以上のばく露群において、統計学的に有意な高値が認められた。

27.79 $\mu\text{g/L}$ 以上のばく露群において雄の肝臓体指数の統計学的に有意な高値が認められた。

(2) F1 世代(ばく露期間：16 週間)

ふ化日数、雄の生殖腺体指数 (10 週齢)、全長 (15 週齢) に統計学的に有意な変化は認められなかった。

10 週齢の雄の肝臓中ビテロゲニン濃度は、ばく露濃度の上昇と共に増加し、9.81 $\mu\text{g/L}$ 以上のばく露群において、統計学的に有意な高値が認められた。

15 週齢の雄の肝臓中ビテロゲニン濃度は、ばく露濃度の上昇と共に増加し、27.79 $\mu\text{g/L}$ 以上のばく露群において、統計学的に有意な高値が認められた。

2.95 $\mu\text{g/L}$ 以上のばく露群において雄の二次性徴 (10 週齢) の統計学的に有意な低値及び雄の肝臓体指数 (10 週齢) の統計学的に有意な高値が認められた。

9.81 $\mu\text{g/L}$ 以上のばく露群において雌の生殖腺体指数 (10 週齢)、産卵数、受精卵数の統計学的に有意な低値及び雄の肝臓体指数 (10 週齢) の統計学的に有意な高値が認められた。

27.79 $\mu\text{g/L}$ 以上のばく露群において、受精率、雄の二次性徴 (15 週齢) の統計学的に有意な低値及び雌の肝臓中ビテロゲニン濃度 (10 週齢) に統計学的に

有意な高値が認められた。

89.35 $\mu\text{g/L}$ のばく露群においてふ化率、ふ化後生存率（4週齢、10週齢）、雌の肝臓体指数（10週齢）、肝臓体指数（15週齢）の統計学的に有意な低値及び死亡率、外観異常、行動異常、体重（15週齢）、生殖腺体指数（15週齢）、雌の肝臓中ビテロゲニン濃度（15週齢）の統計学的に有意な高値が認められた。

（3）F2世代(ばく露期間：2週間)

27.79 $\mu\text{g/L}$ 以上のばく露群においてふ化日数の統計学的に有意な高値が認められた。

2. 試験結果のまとめ

4-ノニルフェノール(分岐型)については、既存知見（参考資料2参照）及び試験管内試験の結果（参考資料3参照）から、エストロゲン作用を持つことが想定された。

今回の試験結果において、用量相関的には死亡が認められなかった濃度範囲において、エストロゲン作用を示す雄の肝臓中ビテロゲニン濃度の統計学的に有意な高値、及び雄の二次性徴（尻鰭の乳頭状小突起を有する節板数）の統計学的に有意な低値が認められ、エストロゲン作用を持つことが確認された。

また、9.81 $\mu\text{g/L}$ 以上のばく露群において産卵数及び受精卵数の統計学的に有意な低値が認められたことから、メダカの繁殖に対する有害性を示すことが認められた。

なお、過年度に第1段階生物試験として実施したメダカを用いた魚類短期繁殖試験（OECD TG229）では、51.8 $\mu\text{g/L}$ 以上のばく露群において産卵数、受精卵数及び受精率の統計学的に有意な低値が認められていた（参考資料4参照）。

以上により、第2段階生物試験としての「メダカ拡張1世代繁殖試験（MEOGRT: OECD TG240）」の適用性に関する知見が得られた。

また、この試験結果から、4-ノニルフェノール(分岐型)はメダカに対してエストロゲン作用を示すことが確認されるとともに、本物質がメダカの繁殖に及ぼす影響に関する無影響濃度（NOEC）として、2.95 $\mu\text{g/L}$ が得られた。

なお、この濃度は、平成27年度に実施された公共用水域水質測定（類型指定されている水域）において検出された最高濃度 0.69 $\mu\text{g/L}$ （4-ノニルフェノール分岐型異性体の合計値）の約4倍であった。

メダカ拡張1世代繁殖試験結果(MEOGRT: OECD TG240)

4-ノニルフェノール (分岐鎖・異性体混合物)

実施機関：国立環境研究所

1. F0世代

表 1-A 試験結果

平均濃度実測値 (μ g/L)	試験個体数		死亡率 (%)		全長(mm)		体重(mg)	
	雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌
対照区	12	12	0	0	31.7 \pm 0.7	32.3 \pm 0.8	311 \pm 24	392 \pm 31
1.27	6	6	0	0	31.7 \pm 1.0	31.4 \pm 1.8	316 \pm 26	346 \pm 57
2.95	6	6	0	0	32.3 \pm 1.5	31.0 \pm 1.0	342 \pm 44	343 \pm 23
9.81	6	6	0	0	31.3 \pm 0.6	32.6 \pm 1.4	288 \pm 17	417 \pm 46
27.79	6	6	0	0	32.8 \pm 1.4	31.2 \pm 0.6	342 \pm 35	363 \pm 16
89.35	6	6	0	16.7	32.3 \pm 1.0	31.8 \pm 0.8	344 \pm 43	366 \pm 37

表 1-B 試験結果(続き)

平均濃度実測値 (μ g/L)	総産卵数 (eggs/day/pair)	受精卵数 (eggs/day/pair)	受精率 (%)	生殖腺体指数 (%)	
				雄	雌
対照区	31.7 \pm 2.2	31.2 \pm 2.6	98.4 \pm 2.0	1.5 \pm 1.66	9.2 \pm 1.0
1.27	29.9 \pm 3.2	29.0 \pm 3.3	96.3 \pm 3.8	1.3 \pm 0.27	9.0 \pm 0.7
2.95	30.0 \pm 3.0	29.2 \pm 3.2	98.0 \pm 2.5	1.3 \pm 0.20	9.4 \pm 0.7
9.81	35.1 \pm 4.2	33.4 \pm 3.6	95.7 \pm 6.6	1.3 \pm 0.18	9.6 \pm 1.4
27.79	31.4 \pm 4.2	30.4 \pm 5.5	95.8 \pm 6.6	1.1 \pm 0.19	9.9 \pm 0.7
89.35	29.1 \pm 5.4	28.5 \pm 5.4	97.7 \pm 2.6	1.2 \pm 0.20	9.2 \pm 1.2

表 1-C 試験結果(続き)

平均濃度実測値 (μ g/L)	肝臓体指数 (%)		ビテロゲン濃度 (ng/mg liver)		二次性徴	
	雄	雌	雄	雌	雄	雌
対照区	1.7 \pm 0.36	4.8 \pm 1.43	4.41 \pm 7.86	270 \pm 128	100 \pm 17	0 \pm 0
1.27	1.7 \pm 0.46	5.6 \pm 0.67	23.3 \pm 24.9	220 \pm 37	97 \pm 6.1	0 \pm 0
2.95	1.9 \pm 0.24	6.0 \pm 1.00	19.4 \pm 22.2	187 \pm 34	110 \pm 13	0 \pm 0
9.81	1.9 \pm 0.32	6.5 \pm 1.45	384 \pm 473 *	255 \pm 110	99 \pm 15	0 \pm 0
27.79	2.3 \pm 0.30 *	6.3 \pm 0.93	565 \pm 417 *	203 \pm 52	110 \pm 7	0 \pm 0
89.35	2.4 \pm 0.23 *	6.1 \pm 0.24	1,840 \pm 529 *	227 \pm 56	97 \pm 11	0 \pm 0

2. 1. F1世代(胚、仔魚期)

表 2-A 試験結果

平均濃度実測値 (μ g/L)	ふ化率 (%)	ふ化日数 (day)	ふ化後生存率 (%)	生存率 (%) (14日目)
対照区	93.7 \pm 12.5	7.0 \pm 0.3	96.1 \pm 10.4	91.2 \pm 18.0
1.27	98.3 \pm 2.7	7.2 \pm 0.2	100 \pm 0	98.3 \pm 2.7
2.95	95.8 \pm 3.8	7.2 \pm 0.2	100 \pm 0	95.8 \pm 3.8
9.81	99.2 \pm 2.0	7.3 \pm 0.2	100 \pm 0	99.2 \pm 2.0
27.79	99.2 \pm 2.0	7.1 \pm 0.1	100 \pm 0	99.2 \pm 2.0
89.35	77.2 \pm 7.3 *	7.3 \pm 0.1	98.9 \pm 2.7	78.0 \pm 5.1 *

表 2-B 試験結果(続き)

平均濃度実測値 (μ g/L)	生存率 (%)		全長(mm)(10週齢)		体重(mg)(10週齢)	
	(4週目)	(9週目)	雄	雌	雄	雌
対照区	99.3 \pm 2.4	95.1 \pm 5.6	25.7 \pm 1.3	26.8 \pm 1.7	193 \pm 35.3	241 \pm 44.7
1.27	100 \pm 0	95.8 \pm 7.0	24.5 \pm 1.3	26.2 \pm 1.8 *	162 \pm 28.5 *	213 \pm 41.7
2.95	98.6 \pm 3.4	98.6 \pm 3.4	24.8 \pm 1.5	25.6 \pm 1.7 *	156 \pm 32.0 *	198 \pm 44.6 *
9.81	100 \pm 0	87.5 \pm 8.7	24.9 \pm 2.0	24.3 \pm 4.2 *	159 \pm 35.2 *	172 \pm 73.3 *
27.79	100 \pm 0	97.2 \pm 6.8	24.5 \pm 1.4 *	25.0 \pm 1.7 *	169 \pm 38.6 *	190 \pm 48.7 *
89.35	88.9 \pm 10.1 *	79.2 \pm 18.1	22.6 \pm 2.6 *	23.0 \pm 2.1 *	137 \pm 48.9 *	139 \pm 42.2 *

表 2-C 試験結果(続き)

平均濃度実測値 (μ g/L)	肝臓体指数 (%)		ビテロゲン濃度 (ng/mg liver)		二次性徴	
	雄	雌	雄	雌	雄	雌
対照区	2.1 \pm 0.7	4.5 \pm 1.2	22.6 \pm 55.8	664 \pm 428	78 \pm 15	0 \pm 0
1.27	2.2 \pm 0.4	4.1 \pm 1.3	11.4 \pm 31.9	544 \pm 350	72 \pm 13	0 \pm 0
2.95	2.7 \pm 1.1 *	4.1 \pm 1.0	20.3 \pm 74.9	676 \pm 384	69 \pm 13 *	0 \pm 0
9.81	2.8 \pm 0.7 *	4.1 \pm 1.5	100 \pm 210 *	575 \pm 310	60 \pm 17 *	0 \pm 0
27.79	2.7 \pm 0.9 *	4.1 \pm 0.7	72.3 \pm 156 *	888 \pm 378 *	27 \pm 24 *	0 \pm 0
89.35	3.1 \pm 0.8 *	3.3 \pm 0.8 *	1,040 \pm 1,200 *	1,550 \pm 1,120 *	0 \pm 0 *	0 \pm 0

表 2-D 試験結果(続き)

平均濃度実測値 ($\mu\text{g/L}$)	生殖腺体指数 (%)	
	雄	雌
対照区	0.78 \pm 0.40	7.8 \pm 1.6
1.27	0.85 \pm 0.33	7.1 \pm 2.3
2.95	0.89 \pm 0.39	7.7 \pm 2.8
9.81	0.79 \pm 0.54	5.3 \pm 3.1 *
27.79	0.91 \pm 0.97	6.3 \pm 2.2 *
89.35	0.96 \pm 1.20	1.7 \pm 1.7 *

2. 2. F1世代(成熟個体)

表 2-E 試験結果(続き)

平均濃度実測値 ($\mu\text{g/L}$)	死亡率 (%)		全長(mm)		体重(mg)	
	雄	雌	雄	雌	雄	雌
対照区	0	4	31.2 \pm 0.9	31.1 \pm 1.3	302 \pm 26	350 \pm 41
1.27	8.3	0	30.8 \pm 0.6	30.5 \pm 1.2	276 \pm 24	349 \pm 94
2.95	0	0	29.9 \pm 0.9	30.6 \pm 1.2	260 \pm 19	329 \pm 37
9.81	0	33 *	31.6 \pm 1.0	31.2 \pm 0.9	301 \pm 31	331 \pm 45
27.79	0	25	31.9 \pm 1.6	30.0 \pm 1.1	335 \pm 63	300 \pm 39
89.35	33 *	25	31.7 \pm 2.4	30.5 \pm 1.2	449 \pm 132 *	403 \pm 58 *

表 2-F 試験結果(続き)

平均濃度実測値 ($\mu\text{g/L}$)	総産卵数 (eggs/day/pair)	受精卵数 (eggs/day/pair)	受精率 (%)	生殖腺体指数 (%)	
				雄	雌
対照区	28.4 \pm 4.9	27.5 \pm 4.9	95.4 \pm 5.4	0.91 \pm 0.24	7.7 \pm 1.1
1.27	24.9 \pm 3.7	24.0 \pm 3.8	94.1 \pm 5.9	0.94 \pm 0.29	8.6 \pm 2.2
2.95	25.3 \pm 4.7	22.6 \pm 6.7	89.5 \pm 20.0	1.0 \pm 0.2	9.4 \pm 1.6
9.81	18.0 \pm 6.0 **	17.2 \pm 6.0 *	83.5 \pm 18.1	1.0 \pm 0.4	7.6 \pm 2.0
27.79	18.4 \pm 5.9 **	15.7 \pm 6.6 *	73.6 \pm 23.1 *	1.0 \pm 0.3	8.6 \pm 1.1
89.35	5.2 \pm 2.9 **	0 \pm 0 *	0.05 \pm 0.17 *	16 \pm 18 *	15 \pm 8.7 *

表 2-G 試験結果(続き)

平均濃度実測値 ($\mu\text{g/L}$)	肝臓体指数 (%)		ビテロゲニン濃度 (ng/mg liver)		二次性徴	
	雄	雌	雄	雌	雄	雌
対照区	1.6 \pm 0.3	4.8 \pm 0.9	5.3 \pm 7.5	532 \pm 227	95 \pm 15	0 \pm 0
1.27	1.7 \pm 0.2	4.9 \pm 1.0	6.1 \pm 14.2	449 \pm 140	79 \pm 11	0 \pm 0
2.95	2.0 \pm 0.2	5.5 \pm 1.1	9.9 \pm 11.6	432 \pm 93	83 \pm 19	0 \pm 0
9.81	1.8 \pm 0.4	4.1 \pm 0.7	23.8 \pm 35.4	432 \pm 103	89 \pm 11	0 \pm 0
27.79	1.9 \pm 0.5	5.1 \pm 1.1	68.9 \pm 153 *	484 \pm 161	62 \pm 18 *	0 \pm 0
89.35	3.4 \pm 0.9 *	3.5 \pm 1.1 *	845 \pm 458 *	1,100 \pm 391 *	0 \pm 0 *	0 \pm 0

3. F2世代(胚、仔魚期)

表 3-A 試験結果

平均濃度実測値 ($\mu\text{g/L}$)	ふ化率 (%)	ふ化日数 (day)	ふ化後生存率 (%)	生存率 (%) (15日目)
対照区	83.3 \pm 9.8	7.4 \pm 0.2	100 \pm 0	85.0 \pm 8.8
1.27	95.0 \pm 6.3	7.8 \pm 0.4 *	100 \pm 0	95.0 \pm 6.3
2.95	86.5 \pm 4.2	7.4 \pm 0.3	100 \pm 0	89.0 \pm 3.9
9.81	90.0 \pm 8.9	7.6 \pm 0.5	100 \pm 0	92.5 \pm 7.6
27.79	89.0 \pm 5.1	8.1 \pm 0.6 *	100 \pm 0	91.6 \pm 4.1
89.35	NA	NA	NA	NA

結果は平均値 \pm 標準偏差.

有意差水準 (* p <0.05、** p <0.01).

ND は未検出 (< 1 ng/mg liver).

(-)は、未測定

NA: not available

二次性徴：乳頭状小突起を有する節板数

国内における生態リスク評価と今回の試験結果

出典	NP CAS No.	生物種	エンドポイント/影響 内容	ばく露 期間	毒性値 (μ g/L)	無毒性 値 (μ g/L)	アッセ メント係 数	PNEC (μ g/L)	水中濃度 (μ g/L)	PEC/PNEC 比
化学物質の初期リス ク評価書(2005) ²⁾	25154 -52-3	<i>Scenedes mus subspicat us</i> (藻類)	EC ₁₀ GRO	72 時間		3.3			EEC=0.4	MOE=8.3<10(不確 実係数積)
詳細リスク評価書 (2004) ³⁾		メダカ	感受性分布(NOECの対数正規分布)での 5%タイルに相当する濃度				10	2.1		
化学物質の環境リス ク評価(2003) ⁴⁾	25154 -52-3	<i>Hyalella azteca</i> (甲 殻類)	LC ₅₀ EC ₅₀	96 時間	20.7	-	100	0.21	5.9 程度(予測環境中濃度:PEC, 最大 値,2001)	28(PEC)
ノルフェノールが魚類に 与える内分泌攪乱 作用の試験結果に 関する報告 (案)(2001) ⁵⁾	84852 -15-3	メダカ	NOEC 精巣卵	60 日	11.6	6.08	10	0.608	0.59(95 パーセントイル値,1998-1999)	1.0
今回の試験結果	84852 -15-3	メダカ	NOEC REP	19 週	9.81	2.95				

海外における生態リスク評価と今回の試験結果

出典	NP CAS No.	生物種	エントポイント/影響内容	ばく露 期間	毒性値 (μ g/L)	無毒性値 (μ g/L)	アセスメント係 数	PNEC (μ g/L)	水中濃度 (μ g/L) PEC	PEC/PNEC 比
オーストラリア政府(2016?) ¹⁴⁾	84852-15-3	フアットヘッド ミノー	胚の生残	33 日		7.4	100	0.074	1.06	14.32
デンマーク環境省 (2013) ¹²⁾	25154-52-3	<i>Scenedesmus subspicatus</i> (藻類)	EC ₁₀ GRO	72 時間	3.3		10	0.33	0.02	0.06
EU リスク評価書 (2002) ⁷⁾ , 以下は、同一の内容 EC, JRC(2002) ⁸⁾ , EU リスクアセスメント報告 評価書(2002) ⁹⁾ , OECD SIDS 初期 評価書(2001) ⁶⁾	25154-52-3	<i>Scenedesmus subspicatus</i> (藻類)	EC ₁₀ GRO	72 時間	3.3		10	0.33	0.6	1.8
カナダ環境保護法優 先物質評価書 (2001) ¹⁰⁾ , (2000) ¹¹⁾	84852-15-3	カレイ <i>Pleuronectes americanus</i>	LC ₅₀	96 時間	17		100 50	0.17 0.34	62.08 (一次処理排水)	365 271
今回の試験結果	84852-15-3	メダカ	NOEC REP	19 週	9.81	2.95				

参考文献

- 1)2012(平成 24 年)中央環境審議会、水生生物の保全に係る水質環境基準の項目追加等について (第 1 次答申)
- 2)2005(平成 17 年)製品評価技術基盤機構、化学物質評価研究機構、化学物質の環境リスク評価書 Ver. 1.0 No. 1、ノニルフェノール
- 3)2004(平成 16 年)産業技術総合研究所、詳細リスク評価書 (リスク評価書シリーズ 3)、ノニルフェノール
- 4)2003(平成 15 年)環境省環境保健部環境リスク評価室、化学物質の環境リスク評価第 2 巻、ノニルフェノール
- 5)2001(平成 13 年)環境省総合環境政策局環境保健部、ノニルフェノールが魚類に与える内分泌攪乱作用の試験結果に関する報告 (案)
- 6)2001(平成 13 年)UK/EU, SIAM(SIDS initial Assessment meeting) 12, SIDS(Screening information dataset) initial assessment profile.
- 7)2002(平成 14 年)European Chemical Bureau, European Union Risk Assessment Report, 4-Nonylphenol(Branched) and Nonylphenol.
- 8)2002(平成 14 年)EC Joint Research Centre, 4-Nonylphenol(Branched) and Nonylphenol Summary Risk Assessment Report.
- 9)2001(平成 13 年)EU, European Union Risk Assessment Report, 4-Nonylphenol(Branched) and Nonylphenol.
- 10)2001(平成 13 年)Environment Canada, Health Canada, Priority Substances List Assessment Report, Nonylphenol and its Ethoxylates.
- 11)2000(平成 12 年)Environment Canada, Health Canada, Priority Substances List Assessment Report, Nonylphenol and its Ethoxylates.
- 12)2013(平成 25 年)Danish Ministry of the Environment, Survey and environmental and health assessment of nonylphenol and nonylphenol ethoxylates in textiles.
- 13)2016?(平成 28 年?)Government of Australia, Inventory multi-tiered assessment and prioritisation, Environment tier 2 assessment for nonylphenol.

ノニルフェノール(Nonylphenol:以下、NP と略記)の異性体について

CAS Number* 英語名 化学名	論文等での表記	略号	備考
25154-52-3 nonylphenol ノニルフェノール	NP 4-NP(mixture of isomers) NP(technical mixture)	NP	多種類の NP 異性体の混合物 工業製品 不純物として、オクチルフェノール、デシルフェノール等を含む
136-83-4 o-nonylphenol 2-ノニルフェノール	<i>ortho</i> -NP <i>O</i> -NP 2-NP	2- <i>n</i> -NP	単一製品としては製造されていない
104-40-5 4- <i>n</i> -nonylphenol p-ノニルフェノール	Normal-NP Linear-NP <i>n</i> -NP(mixed isomers)	4- <i>n</i> -NP	4- <i>n</i> -NP と 2- <i>n</i> -NP の混合物
84852-15-3 nonylphenol 4-ノニルフェノール (分岐鎖異性体混合物)	4-NP(mixture of branched chain isomers) NP 4-NP, tech 4-NP, (99%,)mixture of isomers 4-NP, verzweit 13, 259 4-NP(mixture)	4-NP(branched)	4-NP 異性体(分岐型)(>90%)の混合物で 2-NP(分岐型)(<4%)を不純物として含むことがある

*CAS Number:American Chemical Society に登録された化学物質固有の番号

III. 魚類試験法開発に係る業務

資料 2-3 別添

1. メダカ多世代試験の開発

1.1 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を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 1 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。

昨年度は、OECD のテストガイドライン化に向けた最終プロトコール案の策定及び OECD WNT への提出が行われた。第 10 回日米二国間実務者会議(平成 25 年 9 月)において最終プロト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¹⁾。

(7) 融点

-8℃

(8) 分配係数

Log Kow=3.80~4.77

1.3.2 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た個体を、当施設飼育馴化室において飼育繁殖させて使用した。

(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（5L）
- ・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のふ化後 24 時間以内の幼生を、1 日 2 回（休日は 1 回）飽食量を給餌

1.3.3 試験環境及び条件など

(1) 試験室

試験は全て魚類・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。

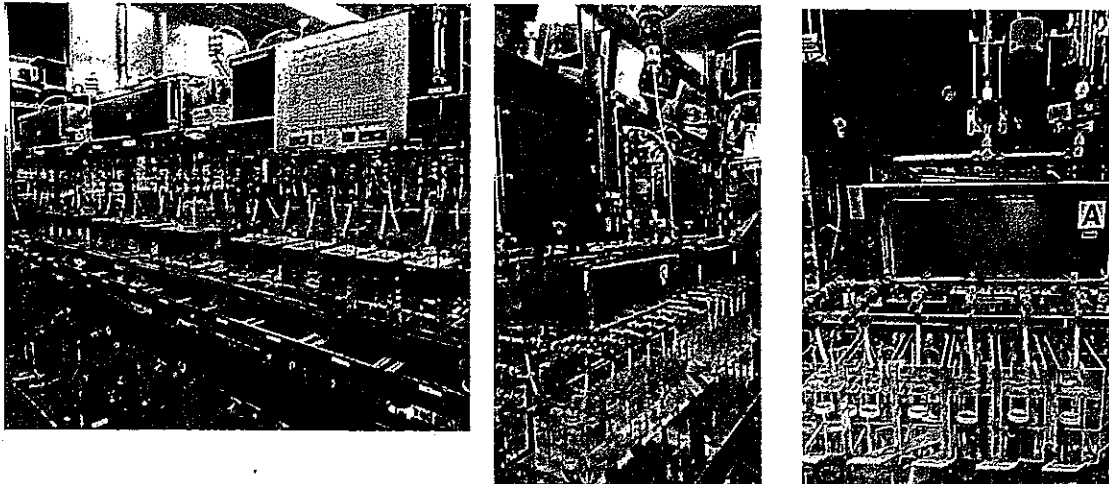


図 1-1 流水式装置（左：1号機、中央：2号機、右：2号機・ふ化器をセット）

- ・ p H 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 500 mg 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、5,000 mg/L のストックソリューション A を得た。これを、容量 1 L のねじ口瓶に 3.2 mL または 5 mL 投入し、乾固させた後に超純水 1 L を投入、30 分の超音波処理によって懸濁させた。これを超純水によって 5 L まで希釈し、さらに超音波処理による攪拌によって混合し、3.2 mg/L または 5 mg/L のストックソリューション B を得た。同様に、ストックソリューション A を適量、5 L のねじ口瓶に取り乾固させ、超純水を 5 L 投入、超音波処理によって 0.1、0.32、1 mg/L のストックソリューション B を得た。

各濃度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、調温清浄濾過水によって 100 µg/L 濃度区は 50 倍、以下の濃度区は 100 倍希釈を連続的に行い、調製直後の試験液を各水槽へ滴下した。ストックソリューション A は約 1 か月に一度新しいものを調製し、ストックソリューション B の調製は、3~4 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固相抽出法によって精製、濃縮し、GC/MS を用いて定量した。

【試薬】

- ・ 4-ノニルフェノール (分岐鎖・異性体混合物) : 環境分析用 関東科学株式会社製
- ・ 4-n-ノニルフェノール-d4 : 和光純薬工業株式会社製
- ・ アセトン : 残留農薬試験用 和光純薬工業株式会社製
- ・ 固相カートリッジ : SepPak Plus C18 Cartridges Waters 社製
- ・ 精製水 : 日本ミリポア製 Elix10 と ADVANTEC 製 RF0665DA を組み合わせたシステムにより処理したもの。

【器具】

メスシリンダー、メスフラスコ、マニホールド、シリンジ、共栓円錐管 10ml

【標準液の調整】

4-n-ノニルフェノール-d4 10mg を秤量しアセトンに溶解、定容して 1000 mg/L 標準液を作成した。さらにこれを 10mg/L に希釈し、内部標準溶液とした。

4-ノニルフェノール 10 mg を秤量し、アセトンに溶解、定容して 1000 mg/L 標準液を作成した。この標準液を希釈し、各々に 10µL の内部標準溶液を加えた 0.02, 0.05, 0.1, 0.2mg/L の標準液を作成して検量線として使用した。

【試験水の前処理】

試験水は溶液濃度に応じて 5~400mL を使用し、内部標準として 10mg/L の 4-n-ノニルフェノール-d4 溶液を 50µL 添加して抽出、精製処理に供した。

固相抽出カートリッジをマニホールドに設置してメタノール 10 mL、精製水 10 mL でコンディショニングした後、試験水を 20 ml/min.程度の流速で通水した。通水後、カートリッジを精製水 10 mL で洗浄し、マニホールド上で 1 時間通気して乾燥させた後、それぞれのカートリッジよりアセトン 5 mL で溶出し、分析機器による測定に供した。

【分析機器】

- ・ GC/MS : 島津製作所製 GCMS-QP2010

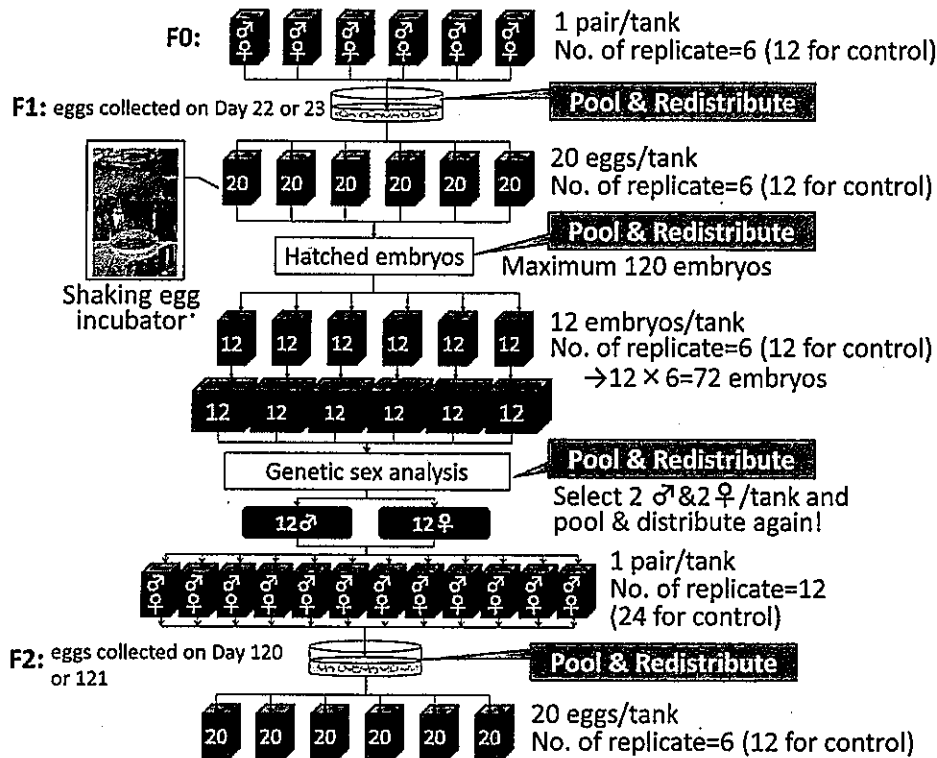


図 1-3 MEOGRT における連のプールと分配の手順

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

(1) F0 世代

[ばく露方法]

生後 11 週齢のヒメダカを雌雄選別し、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、溶存酸素飽和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。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

各サンプルについて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・測定

解剖後、胴体から生殖腺を摘出し、雌雄について観察した。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。ふ化後の仔魚は、ピペットを用いてシリンダー外に移動し、ばく露を継続した。

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。ふ化率は対照区のふ化日の中央値の 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。

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 7 日目および 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 DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN 社製) を用い、マニュアルに従って 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。

びカバーガラスにて永久標本化する。

- ③ 作成した標本を組織像の確認出来る倍率に顕微し、写真撮影する。

(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。ふ化後の仔魚は、ピペットを用いてシリンダー外に移動し、ばく露を継続した。

水質の測定、水槽の交換と洗浄、廃水の処理などは、F0 世代・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。ふ化率は対照区のふ化日の中央値の 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。

1.3.5 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。

(2) 統計処理

各データは、平均値±標準偏差で示した。Bartlett 検定によって等分散性を有意水準 5%で確認し、等分散性が棄却されない場合は Dunnett 法による多重比較を、等分散性が棄却された場合は Steel 法による多重比較の検定を行った。統計解析には Rstudio を用い、パッケージには multcomp を使用した。*及び**は、対照区と比較して有意差 (** $p<0.01$ 及び* $p<0.05$) が認められたことを示す。

1.3.6 試験成立条件

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変動は 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。

1.4.3 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 1-3 に示す。100 µg/L 濃度区においてメスが 1 個体死亡したが、採卵時の影響による事故死とみられる。何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 1-3 F0 世代試験期間中の死亡個体数

設定濃度 (µg/L)	供試個体数		死亡個体数(死亡率)	
	オス	メス	オス	メス
Control	12	12	0 (0.0%)	0 (0.0%)
1	6	6	0 (0.0%)	0 (0.0%)
3.2	6	6	0 (0.0%)	0 (0.0%)
10	6	6	0 (0.0%)	0 (0.0%)
32	6	6	0 (0.0%)	0 (0.0%)
100	6	6	0 (0.0%)	1 (16.7%)

(2) F0 世代の産卵数・受精卵数・受精率

F0 世代試験開始後 21 日間 (Test Day1-21) の各試験区における 1 ペア 1 日あたりの産卵数・受精卵数・受精率を表 1-4 および図 1-5 に、21 日間の連平均の日変動および積算受精卵数/ペアを図 1-6 に示す。産卵数・受精卵数・受精率の全てについて、何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 1-4、図 1-5)。日変動も CV=8~12% であり試験区間で大きな傾向の差は見られなかった (図 1-6)。また、対照区の産卵数の平均値および各 12 ペアの産卵数はすべて 20 個/ペア/日以上、21 日間で算出された計 7983 個の卵の受精率は 98% であり、試験成立条件をすべて満たしていた。

表 1-4 F0 世代の産卵数・受精卵数・受精率 (1 ペアあたり 21 日間平均)

設定濃度 (µg/L)	産卵数 (eggs/day/pair)	受精卵数 (eggs/day/pair)	受精率 (%)
Control	31.7 ± 2.2	31.2 ± 2.6	98.4 ± 2.0
1	29.9 ± 3.2	29.0 ± 3.3	96.3 ± 3.8
3.2	30.0 ± 3.0	29.2 ± 3.2	98.0 ± 2.5
10	35.1 ± 4.2	33.4 ± 3.6	95.7 ± 6.6
32	31.4 ± 4.2	30.4 ± 5.5	95.8 ± 6.6
100	29.1 ± 5.4	28.5 ± 5.4	97.7 ± 2.6

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) を示す。

(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 1-5 および図 1-7(a)(b) に示す。オス・メス共に、何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 1-5 F0 世代の全長および湿重量

設定濃度 ($\mu\text{g/L}$)	全長 (mm)		湿重量 (mg)	
	オス	メス	オス	メス
Control	31.7 \pm 0.7	32.3 \pm 0.8	311 \pm 24	382 \pm 31
1	31.7 \pm 1.0	31.4 \pm 1.8	316 \pm 26	346 \pm 57
3.2	32.3 \pm 1.5	31.0 \pm 1.0	342 \pm 44	343 \pm 23
10	31.3 \pm 0.6	32.6 \pm 1.4	288 \pm 17	417 \pm 46
32	32.8 \pm 1.4	31.2 \pm 0.6	342 \pm 35	363 \pm 16
100	32.3 \pm 1.0	31.8 \pm 0.8	344 \pm 43	366 \pm 37

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 (100 $\mu\text{g/L}$ のメスは n=5) を示す。

(4) 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 1-6 および図 1-7(c)(d) に示す。オスの肝臓体指数が 32 $\mu\text{g/L}$ 濃度区以上で対照区に比べて有意に増加した (LOEC=32 $\mu\text{g/L}$)。メスでは、肝臓体指数がやや増加傾向にあったが、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 1-6 F0 世代の肝臓体指数および生殖腺体指数

ばく露濃度 ($\mu\text{g/L}$)	肝臓体指数 (%)		生殖腺体指数 (%)	
	オス	メス	オス	メス
Control	1.7 \pm 0.36	4.8 \pm 1.43	1.5 \pm 1.66	9.2 \pm 1.0
1	1.7 \pm 0.46	5.6 \pm 0.67	1.3 \pm 0.27	9.0 \pm 0.7
3.2	1.9 \pm 0.24	6.0 \pm 1.00	1.3 \pm 0.20	9.4 \pm 0.7
10	1.9 \pm 0.32	6.5 \pm 1.45	1.3 \pm 0.18	9.6 \pm 1.4
32	2.3 \pm 0.30*	6.3 \pm 0.93	1.1 \pm 0.19	9.9 \pm 0.7
100	2.4 \pm 0.23*	6.1 \pm 0.24	1.2 \pm 0.20	9.2 \pm 1.2

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 (100 $\mu\text{g/L}$ のメスは n=5) を示す。*および**は対照区に比べて統計学的な有意差があることを示す (* $p<0.05$ 、** $p<0.01$)

(5) 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 1-7 および図 1-7(e) に示す。オスでは、10 $\mu\text{g/L}$ 濃度区以上で対照区に比べ有意な上昇がみられた。一方、メ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。

(6) 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 1-8 および図 1-7(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。

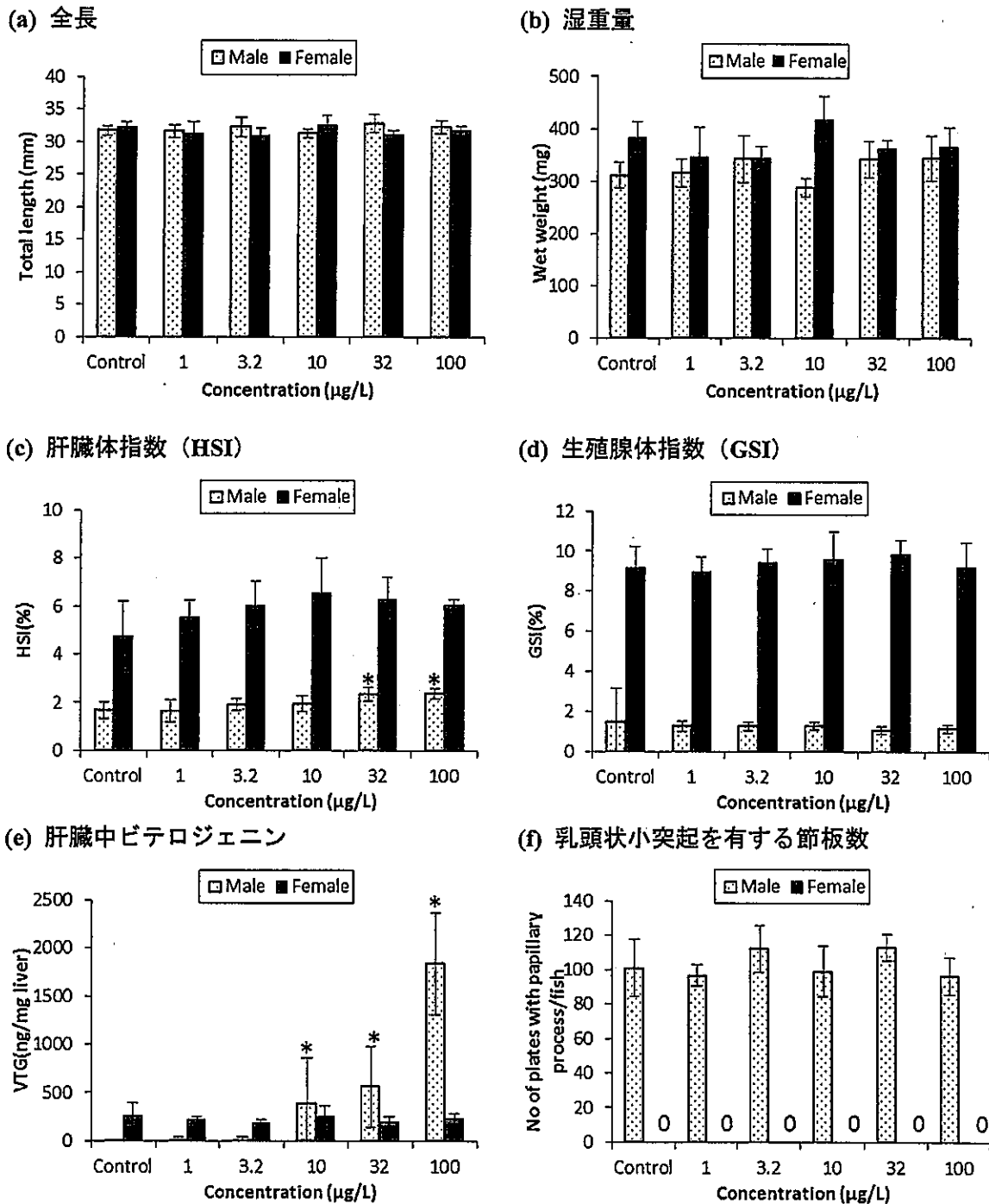


図 1-7 F0 世代の (a) 全長 (b) 湿重量 (c) 肝臓体指数 (d) 生殖腺体指数 (e) VTG (f) 乳頭状小突起を有する節板数

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 (100 μg/L のメスは n=5)) 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)

に供した。DMY 判定中の個体はステンレスメッシュ付ガラス円筒を用いて、同一水槽内で区別して維持していたところ、メッシュがふさがれていたため、試験開始 59 日目に DO の著しい低下が起こった。すべての連について DMY 判定済みの個体とそれ以外を区別して保持するための流水式装置および水槽数に限りがあったため、一部の連の個体をプールして維持した。そのため、10 週齢目の解剖時には各連の由来が一部不明になってしまったため、以降のエンドポイントの値は全個体の平均値で示す。

解剖時（10 週目）における死亡率はやや増加し、100 µg/L 濃度区で生存率は 76.4%であった。フィッシャーの正確確率検定により、10 µg/L および 100 µg/L 濃度区で対照区に対し有意差が示されたことから、10 週齢の生存率に対する LOEC は 100µg/L とする。

表 1-10 F1 世代亜成体の受精後 4 週目・9 週目・10 週目の生存率

設定濃度 (µg/L)	生存率(4wpf) (%)	生存率(9wpf) (%)	生存率(10wpf) (%)
Control	99.3 ± 2.4	95.1 ± 5.6	95.1
1	100 ± 0	95.8 ± 7.0	95.9
3.2	98.6 ± 3.4	98.6 ± 3.4	97.2
10	100 ± 0	87.5 ± 8.7	84.7*
32	100 ± 0	97.2 ± 6.8	95.8
100	88.9 ± 10.1*	79.2 ± 18.1	76.4*

注) 4wfp および 9wfp は各連の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)、10wfp は各試験区の合計値を示す。*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)

1.4.5 F1 世代亜成体（10 週齢個体）の結果

(1) F1 世代亜成体の全長・湿重量

10 週齢(64・65 日齢)の亜成体の全長及び湿重量の測定結果を表 1-10 および図 1-9 (a)(b) に示した。全長・湿重量ともに濃度依存的に減少傾向がみられ、オスの全長は 32 µg/L 濃度区以上、メスの全長はすべてのばく露区で対照区と比べて有意差が示されたが、その差はオス 1.2~3.1 mm、メス 0.6~3.8 mm とわずかであった。湿重量に対してはオスの LOEC は 1 µg/L、メスは 3.2 µg/L であり、その差はそれぞれ 31 mg および 28 mg であった。

表 1-10 F1 世代亜成体の全長・湿重量

設定濃度 (µg/L)	全長 (mm)		湿重量 (mg)	
	オス	メス	オス	メス
Control	25.7 ± 1.3	26.8 ± 1.7	193 ± 35.3	241 ± 44.7
1	24.5 ± 1.3	26.2 ± 1.8*	162 ± 28.5*	213 ± 41.7
3.2	24.8 ± 1.5	25.6 ± 1.7*	156 ± 32.0*	198 ± 44.6*
10	24.9 ± 2.0	24.3 ± 4.2*	159 ± 35.2*	172 ± 73.3*
32	24.5 ± 1.4*	25.0 ± 1.7*	169 ± 38.6*	190 ± 48.7*
100	22.6 ± 2.6*	23.0 ± 2.1*	137 ± 48.9*	139 ± 42.2*

注) 各個体を元に算出した平均値±標準偏差(対照区~ばく露濃度区の個体数はオス：n=46, 20, 17, 17, 20, 22、メス：n=43, 26, 29, 20, 25, 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)

(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 1-13 および図 1-9 (f) に示す。オスでは、3.2 $\mu\text{g/L}$ 濃度区以上で対照区に比べ有意な減少が確認された。また、メスでは何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 1-13 F1 世代受精 10 週後解剖個体における乳頭状小突起を有する節板数

設定濃度 ($\mu\text{g/L}$)	乳頭状小突起を有する節板数 (plates/fish)					
	オス			メス		
Control	78	\pm	15	0	\pm	0
1	72	\pm	13	0	\pm	0
3.2	69	\pm	13*	0	\pm	0
10	60	\pm	17*	0	\pm	0
32	27	\pm	24*	0	\pm	0
100	0	\pm	0*	0	\pm	0

注) 各個体を元に算出した平均値 \pm 標準偏差 (対照区 \sim ばく露濃度区の個体数はオス : n=46, 20, 17, 17, 20, 22、メス : n=43, 26, 29, 20, 25, 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, Steel Test)

(5) F1 世代亜成体の間性又は性転換

F1 世代亜成体の遺伝的オス個体 (DMY 保有個体) における表現型性別および生殖腺形態の比較を表 1-14、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 1-15 に示す。遺伝的オス個体では、32 µg/L 濃度区で 20 個体中 7 個体、100 µg/L 濃度区で 22 個体中 7 個体においてメスの表現型 (尻ビレが小さい、背ビレの切込みなし) を示し、生殖腺形態では 32 µg/L 濃度区で 20 個体中 1 個体、100 µg/L 濃度区で 22 個体中 9 個体 (表現型メス 7 個体 + 表現型不明の 2 個体) において卵巣が確認された。未成熟の判定不明個体を除いても、3 つの性別別結果は一致しておらず、すなわち 32 µg/L および 100 µg/L 濃度区で間性や性転換が認められた。

遺伝的メス個体では 3.2 µg/L 濃度区において 29 個体中 1 個体でオスの表現型を示したが、生殖腺は卵巣が確認された。100 µg/L 濃度区において 22 個体中 1 個体でメスの表現型を示したが、精巣が確認された (表 1-15)。

表 1-14 F1 世代亜成体遺伝的オス個体の表現型性別・生殖腺形態

設定濃度 (µg/L)	N	表現型			生殖腺形態		
		♂	不明	♀	精巣	不明	卵巣
Control	46	31	15	0	46	0	0
1	20	20	0	0	20	0	0
3.2	17	17	0	0	17	0	0
10	17	17	0	0	17	0	0
32	20	8	5	7	17	2	1
100	22	0	15	7	7	6	9

表 1-15 F1 世代亜成体遺伝的メス個体の表現型性別・生殖腺形態

設定濃度 (µg/L)	N	表現型			生殖腺形態		
		♂	不明	♀	精巣	不明	卵巣
Control	43	0	12	31	0	0	43
1	26	0	0	26	0	0	26
3.2	29	1	1	27	0	1	28
10	20	0	2	18	0	2	18
32	25	0	17	8	0	0	25
100	9	0	6	3	1	3	5

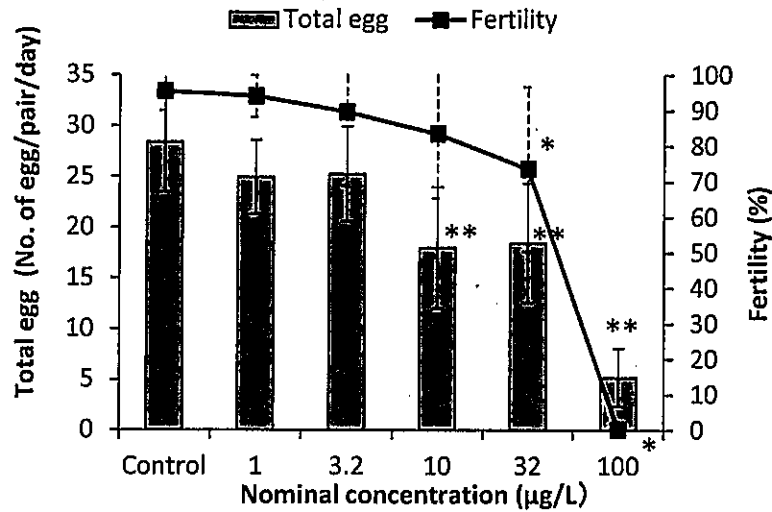
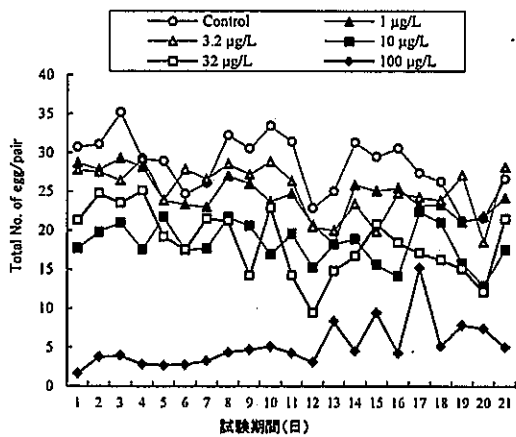


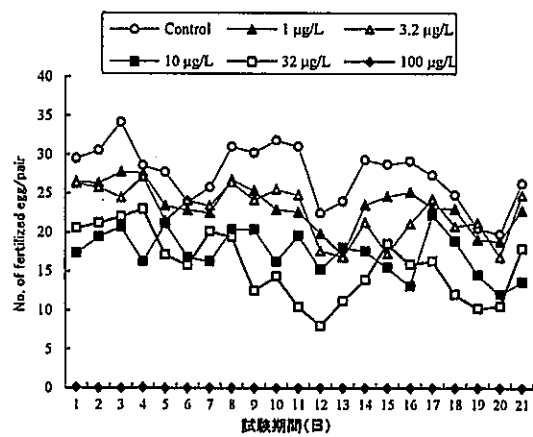
図 1-10 F1 世代の産卵数および受精率 (各ペア・1 日あたり)

注) 値は連平均値を元に算出した平均値±標準偏差 (対照区~ばく露濃度区の連数は、計測前にメス個体が死亡した連を除いて、n=23, 12, 12, 9, 10, 11) を示す。*および**は対照区に比べて統計学的な有意差があることを示す (* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$)

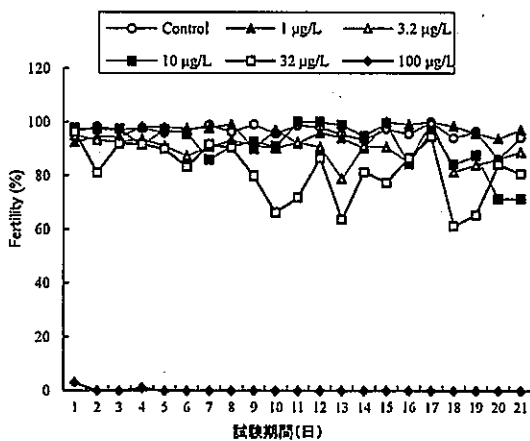
(a) 総産卵数



(b) 受精卵数



(c) 受精率



(d) 累積受精卵数

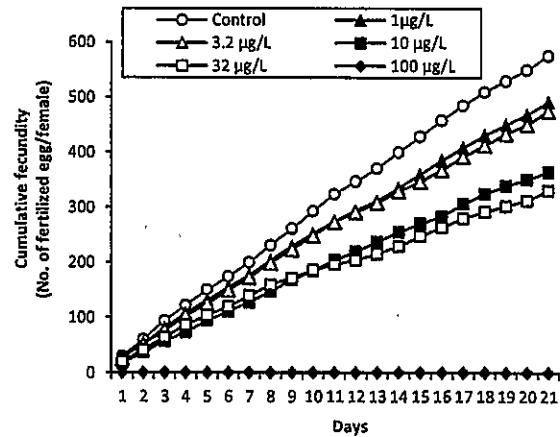


図 1-11 F1 世代の(a) 産卵数・(b) 受精卵数・(c) 受精率の日変動および (d) 累積受精卵数

(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 1-20、図 1-12(e)に示す。オスでは、32 $\mu\text{g/L}$ 濃度区以上、メスでは 100 $\mu\text{g/L}$ 濃度区において、対照区に比べ有意な上昇がみられた。

表 1-20 F1 世代成熟個体の肝臓中ビテロジェニン濃度

設定濃度 ($\mu\text{g/L}$)	ビテロジェニン濃度 (ng/mg liver)	
	オス	メス
Control	5.3 \pm 7.5	532 \pm 227
1	6.1 \pm 14.2	449 \pm 140
3.2	9.9 \pm 11.6	432 \pm 93
10	23.8 \pm 35.4	432 \pm 103
32	68.9 \pm 153*	484 \pm 161
100	845 \pm 458*	1100 \pm 391*

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~ばく露濃度区の連数は、計測前にメス個体が死亡した連を除いて、n=23, 12, 12, 9, 10, 11) 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, Steel test)。

(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 1-21、図 1-12(f) に示す。オスでは、32 $\mu\text{g/L}$ 濃度区で対照区に対して有意に乳頭状小突起を有する節板数が減少し、100 $\mu\text{g/L}$ 濃度区では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 1-21 F1 世代成熟個体における乳頭状小突起を有する節板数

設定濃度 ($\mu\text{g/L}$)	乳頭状小突起を有する節板数 (plates/fish)	
	オス	メス
Control	95 \pm 15	0 \pm 0
1	79 \pm 11	0 \pm 0
3.2	83 \pm 19	0 \pm 0
10	89 \pm 11	0 \pm 0
32	62 \pm 18*	0 \pm 0
100	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~ばく露濃度区の連数は、計測前にメス個体が死亡した連を除いて、n=23, 12, 12, 9, 10, 11) 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)。

(7) F1 世代成熟個体の間性又は性転換

F1 世代繁殖用個体における表現型性別・生殖腺形態・DMY 保有有無の比較を表 1-22 に示す。遺伝的メス個体 (DMY-) の表現型性別および生殖腺形態 (卵巣) は明確で一致していたが、遺伝的オス個体 (DMY+) は、100 $\mu\text{g/L}$ 濃度区において 8 個体の表現型は全てメスであり、このうち 6 個体で卵巣が確認され、間性および性転換が認められた。

表 1-22 F1 世代繁殖用個体における表現型性別・生殖腺形態・DMY 保有有無の比較

設定濃度 ($\mu\text{g/L}$)	N	表現型			生殖腺形態			DMY	
		♂	不明	♀	精巣	不明	卵巣	+	-
Control	47	24	0	23	24	0	23	24	23
1	23	11	0	12	11	0	12	11	12
3.2	24	12	0	12	12	0	12	12	12
10	20	12	0	8	12	0	8	12	8
32	21	12	0	9	12	0	9	12	9
100	17	0	0	17	2	0	15	8	9

(8) F1 世代成熟個体における生殖腺の病理組織学的観察結果

各濃度区からランダムにオスを 5 個体選び、生殖腺の組織切片を作成して病理組織学的観察を行った。表 1-23 に各オスの精巣卵と間質の有無をそのオスのいた水槽の産卵数および受精率とともに示した。図 1-13 に対照として正常なメスの卵巣、オスの精巣とともに、10 $\mu\text{g/L}$ 、32 $\mu\text{g/L}$ 、100 $\mu\text{g/L}$ 濃度区のオスの生殖腺組織切片画像を示す。1 $\mu\text{g/L}$ および 3.2 $\mu\text{g/L}$ 濃度区においては、5 個体すべて異常は観察されなかった。10 $\mu\text{g/L}$ 濃度区では 5 個体中 1 個体、32 $\mu\text{g/L}$ 濃度区では 5 個体すべて、100 $\mu\text{g/L}$ 濃度区では 2 個体すべて (生存 8 個体中、外観形態上精巣は 2 個体のみ) で精巣卵が確認された。10 $\mu\text{g/L}$ 濃度区において精巣卵が確認されたオス (図 1-13(C)) の水槽では産卵数及び受精率に明確な低下はみられず、反対に受精率の低い水槽 (No.1) においてオスの生殖腺に異常は観察されなかった。同様に 32 $\mu\text{g/L}$ 濃度区では 5 個体全てに精巣卵が認められ (図 1-13 (D))、うち 3 個体は間質も観察されたが、8 番水槽などは精巣卵、間質の両方が観察されても産卵数および受精率は低下しておらず、精巣卵および間質の有無と繁殖能との関連性は見い出せなかった。100 $\mu\text{g/L}$ 濃度区では受精卵が観察されておらず、精巣では精子の形成は認められたものの、間質や精巣卵が多くを占めていた (図 1-13(E)(F))。

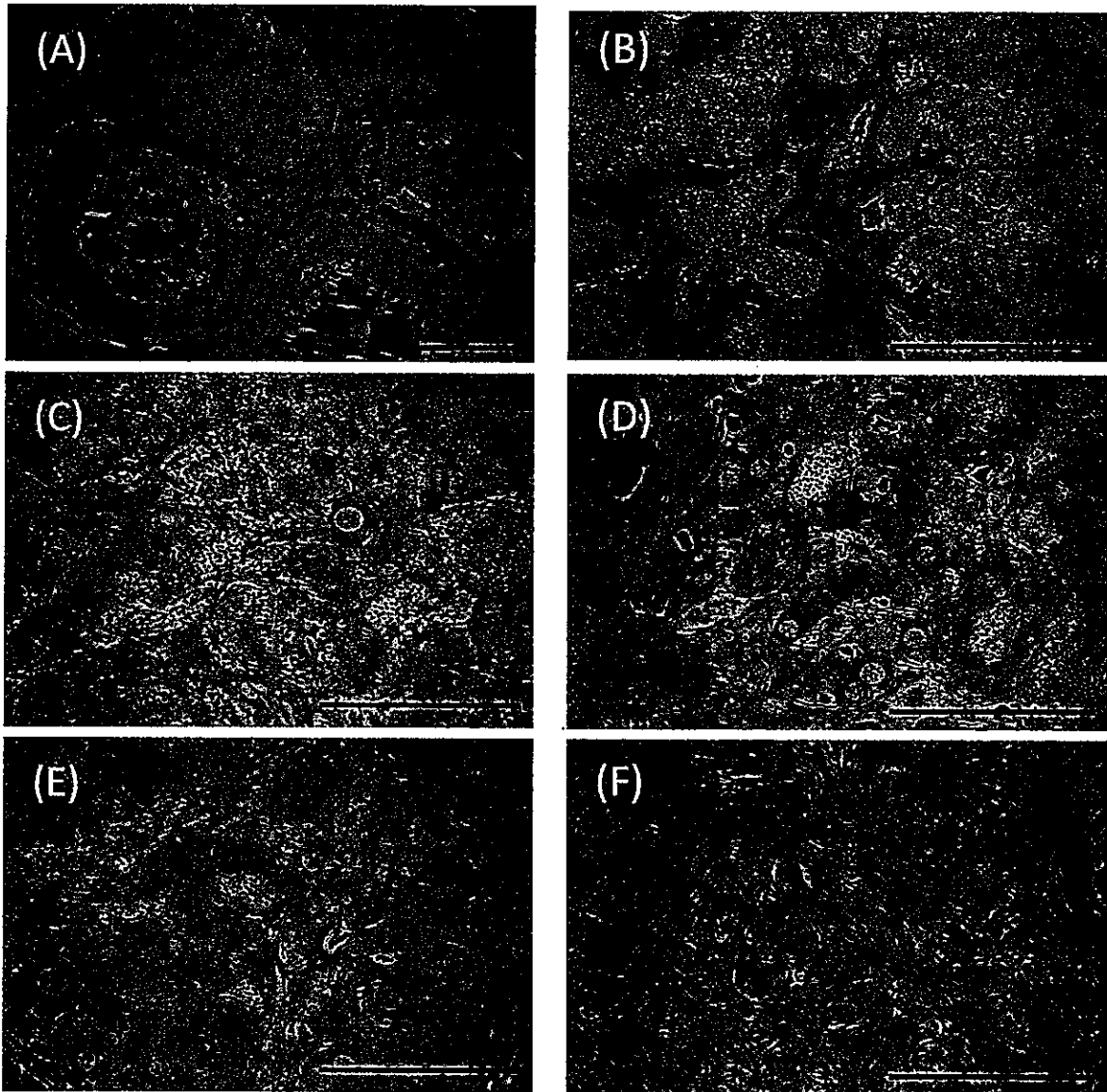


図 1-13 F1 世代成熟個体の生殖腺の組織切片写真 (A)対照区メス (B)対照区オス (C) 10 $\mu\text{g/L}$ オス (No.6) (D) 32 $\mu\text{g/L}$ オス (No.4) (E) 100 $\mu\text{g/L}$ オス (No.9) (F) 100 $\mu\text{g/L}$ オス (No.10)
注) 画像右下のバーは 20 μm を示す。

1.4.8 結果の概要

有害影響や内分泌かく乱作用に直結する主なエンドポイント、及びその他の指標について、各世代の結果の概要を以下に記載する。

(1) F0 世代の結果

- 1) 繁殖に関する指標（産卵数・受精卵数・受精率）
すべてのばく露区において対照区との有意差は認められなかった。
- 2) 二次性徴（乳頭状小突起を有する節板数）
すべてのばく露区において対照区との有意差は認められなかった。
- 3) 肝臓中ビテロジェニン濃度
10 µg/L（実測 9.8 µg/L）濃度区以上のオスにおいて、対照区に比べ有意に上昇した。
- 4) 間性又は性転換の発生
すべてのばく露区において発生は認められなかった。
- 5) 病理学的観察による精巣卵の確認
測定中
- 6) その他の指標
32 µg/L（実測 28 µg/L）濃度区以上のオスにおいて、肝臓体指数が対照区に比べ有意に上昇した。それ以外の指標については、すべてのばく露区で対照区との有意差は認められなかった。

(2) F1 世代胚・仔魚期～亜成体（10 週齢個体）の結果

- 1) 胚期ふ化率・ふ化日数
100 µg/L（実測 89.3 µg/L）濃度区において、対照区に比べてふ化率が有意に低下した。
- 2) 仔魚～稚魚期生存率
受精後 4 週目および 10 週目の 100 µg/L（実測 89.3 µg/L）濃度区において、対照区に比べてふ化率が有意に低下した。
- 2) 二次性徴（乳頭状小突起を有する節板数）
3.2 µg/L（実測 3.0 µg/L）濃度区以上のオスにおいて、対照区に有意に低下した。
- 3) 肝臓中ビテロジェニン濃度
10 µg/L（実測 9.8 µg/L）濃度区以上のオスおよび 32 µg/L（実測 28 µg/L）濃度区以上のメスにおいて、対照区に有意に増加した。
- 4) 間性又は性転換の発生
32 µg/L（実測 28 µg/L）濃度区以上のオスにおいて、間性または性転換の発生が認められた。
- 6) その他の指標
全長：32 µg/L（実測 28 µg/L）濃度区以上のオスおよび 1 µg/L（実測 1.3 µg/L）濃度区以上のメスにおいて、対照区と比べ有意に低下した。

1.5 考察

本試験の各世代・各エンドポイントの LOEC 一覧を表 1-25 に示す。参考までに、過年度に実施された短期および長期魚類試験の結果を表 1-26 にまとめた。

F0 世代においては、オスの肝臓中ビテロジェニン濃度および肝臓体指数が濃度依存的に上昇したことから 4-ノニルフェノールはメダカに対しエストロゲン作用を及ぼすことが示された。オスの肝臓中ビテロジェニンに対する LOEC は平均測定濃度で 9.8 $\mu\text{g/L}$ (設定濃度 10 $\mu\text{g/L}$) であったのに対し、SPEED'98 において実施されたビテロジェニンアッセイにおける同指標の LOEC は 22.5 $\mu\text{g/L}$ ²⁾、Ishibashi らによる 21 日間ばく露試験 (成熟個体 5 ペア、設定濃度 0、10、50、100 $\mu\text{g/L}$ 、CAS 番号不明) での LOEC は 10 $\mu\text{g/L}$ であり³⁾、既存研究と同程度の結果が得られた。

対して、メスのビテロジェニンの濃度依存的な上昇、産卵数・受精卵数・受精率の濃度依存的な減少は最高濃度 100 $\mu\text{g/L}$ でもみられなかった。Ishibashi らは 100 $\mu\text{g/L}$ 濃度区で産卵数・受精率の有意な減少を報告しており、本試験では繁殖に対する影響が既存研究より弱く示された。なお、本試験と同様の試験条件で行った予備検討でも 100 $\mu\text{g/L}$ 濃度区で産卵数・受精率の低下は観察されなかった。

F1 世代では、100 $\mu\text{g/L}$ 濃度区において、ふ化率が対照区に対して有意に低下し、受精後 4 週目および 10 週目の生存率も有意に低下した。二世世代目の仔魚～稚魚期の死亡率の増加はフルライフサイクル試験においても 17.7 $\mu\text{g/L}$ 濃度区以上で観察されている²⁾。10 週齢の亜成体では全長はメス個体、湿重量はオス個体において 1 $\mu\text{g/L}$ 濃度区以上で有意に低下した。本試験では DMY 判定時のアクシデントにより、水槽ごとの連を維持することができなかったため、個体ごとに統計解析に供している。そのため従来より検出力が上がっている可能性があり、例えば統計学的有意差がついた 1 $\mu\text{g/L}$ 濃度区において、その差はわずか数%である。便宜的に、対照区に対する減少率 20%以上を生物学的に有意な差とすると、全長の差はすべての濃度区で 20%未満、湿重量については、オスは 100 $\mu\text{g/L}$ 濃度区で 29%減少、メスは 10 $\mu\text{g/L}$ 濃度区で 29%減少していた。受精卵から 60 日齢までばく露するパーシャルライフサイクル試験においても 44.7 $\mu\text{g/L}$ 濃度区で全長、23.5 $\mu\text{g/L}$ で湿重量の減少が報告されており、4-ノニルフェノールに受精卵からばく露すると、数十 $\mu\text{g/L}$ レベルで生長阻害が生じることは既存研究の結果とも一致した。特にメスは生殖腺体指数も 10 $\mu\text{g/L}$ 濃度区以上で有意に低下しており、成熟の遅延も生じている可能性がある。

肝臓中ビテロジェニン濃度の増加は、F0 世代のメスでは観察されなかったが、F1 世代亜成体では 32 $\mu\text{g/L}$ 濃度区以上で有意に増加した。オス亜成体では 10 $\mu\text{g/L}$ 濃度区以上で有意に増加しており、これは F0 世代の結果と変わらなかった。受精卵からばく露を開始しているパーシャルライフサイクル試験においても 11.6 $\mu\text{g/L}$ 以上で有意な増加が観察されている。対して、15 週齢の成熟個体では、ビテロジェニン増加に対するオス個体の LOEC は 32 $\mu\text{g/L}$ 、メスは 100 $\mu\text{g/L}$ であり、亜成体より感受性がやや低下した。特にオスは F0 世代と比べて 10 および 32 $\mu\text{g/L}$ 濃度区におけるビテロジェニン濃度が 1 オーダー低くなっており (F0: 384 及び 565 ng/mg、F1: 23.8 および 68.9 ng/mg)、親ばく露によってビテロジェニンに対する応答が低下する可能性が示唆された。

オスの二次性徴の指標である乳頭状小突起を有する節板数は、3.2 $\mu\text{g/L}$ 濃度区以上で有意に減少し、100 $\mu\text{g/L}$ 濃度区では観察されなかった。F0 世代の成熟個体では有意な減少は観察されなかったため、一度形成された乳頭状小突起に影響することはないが、4-ノニルフェノールのエストロゲン作用により、乳頭状小突起の形成が阻害されたと考えられる。ただし成長の阻害により形成が遅延している可能性もある。成熟個体では有意な減少がみられたのは 32 $\mu\text{g/L}$ 濃度区であり、100 $\mu\text{g/L}$ 濃度区では生存 8 個体中 6 個体で卵巣が確認された。100 $\mu\text{g/L}$ 濃度区では性転換が原因と言えるが、32 $\mu\text{g/L}$ 濃度区については、成長のエンドポイントとともに再整理し、III.2 で後述する抗アンドロゲン作用検出試験法の開発において、抗アンドロゲン様物質ではない、エストロゲン様物質による二次性徴阻害例として考慮する必要がある。

F1 世代成熟個体においては、オスは 100 $\mu\text{g/L}$ 濃度区で 33%死亡、メスは 10、32、100 $\mu\text{g/L}$

表 1-25 MEOGRT 試験結果まとめ (各世代各エンドポイントに対する LOEC)

Stage	wpf	Endpoint	LOEC (µg/L)			
			F0	F1	F2	
Embryo	2wpf	ふ化率		↓ 100	>32*4	
		ふ化日数		>100	↑ 32	
Larva	4wpf	ふ化後生存率		↓ 100		
Sub-adult	10wpf	ふ化後生存率		↓ 100		
		全長	♂		↓ 32	
			♀		↓ 1	
		湿重量	♂		↓ 1	
			♀		↓ 3.2	
		肝臓体指数	♂		↑ 3.2	
			♀		↓ 100	
		生殖腺体指数	♂		>100	
			♀		↓ 10	
		二次性徴(乳頭状小突起を有する節版数)	♂		↓ 3.2	
			♀		-	
		肝臓中ピテロジェニン濃度	♂		↑ 10	
			♀		↑ 32	
間性又は性転換の発生			↑ 32*1			
病理組織学的観察による精巣卵の確認			-			
Adult	12~15wpf	死亡および外観・行動の異常	♂	>100	↑ 100	
			♀	>100	↑ (10)*2	
		産卵数		>100	↓ 10	
		受精卵数		>100	↓ 10	
		受精率		>100	↓ 32	
	15wpf	全長	♂	>100	>100	
			♀	>100	>100	
		湿重量	♂	>100	↑ 100	
			♀	>100	↑ 100	
		肝臓体指数	♂	↑ 32	↓ 100	
			♀	>100	↓ 100	
		生殖腺体指数	♂	>100	↑ 100	
			♀	>100	↑ 100	
		二次性徴(乳頭状小突起を有する節版数)	♂	>100	↓ 32	
			♀	>100	-	
肝臓中ピテロジェニン濃度	♂	↑ 10	↑ 32			
	♀	>100	↑ 100			
間性又は性転換の発生		>100	↑ 100			
病理組織学的観察による精巣卵の確認		-	↑ 10*3			

*1: オス 20 個体中表現型メスが 7 個体、卵巣確認が 1 個体確認された。
 *2: Fisher's Exact Test では有意差が示されなかったが死亡率 10%以上を LOEC とした。
 *3: オス 5 個体中 1 個体で精巣卵が確認された。
 *4: 100 µg/L はすべて未受精卵のため継代なし

- 4) PubChem (URL <http://webbook.nist.gov/chemistry/>)、平成 28 年 3 月 12 日閲覧
- 5) H Ishibashi, M Hirano, N Matsumura, N Watanabe, Y Takao, K Arizono (2006) Reproductive effects and bioconcentration of 4-nonylphenol in medaka fish (*Oryzias latipes*), *Chemosphere*, 65(6): 1019-1026.
- 6) 国立環境研究所 (2013) 平成 24 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