

参考資料 4

参考資料 2-5 (抜粋)

第 1 段階生物試験の実施結果について (案)

1. 平成 26 年度に実施した試験結果について

試験管内試験の結果等から第 1 段階生物試験を実施する優先順位が高いと考えられた 3 物質 (4-ノニルフェノール(分岐型)、4-*tert*-オクチルフェノール及び 4-ヒドロキシ安息香酸メチル) について、メダカを用いた魚類短期繁殖試験(TG229)を実施した (試験法の概要については p 3 参照)。

(1) 4-ノニルフェノール(分岐型)の試験結果

5.63、18.8、51.8、170 $\mu$ g/L(実測値)のばく露濃度で試験を行ったところ、二次性徴、生殖腺体指数、肝臓体指数、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、18.8  $\mu$ 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。

51.8 $\mu$ g/L 以上のばく露群において総産卵数、受精卵数、受精率の統計学的に有意な低値が認められた。

(2) 4-*tert*-オクチルフェノールの試験結果

25.3、82.3、250 $\mu$ g/L(実測値)のばく露濃度で試験を行ったところ、受精率、総産卵数、受精卵数、二次性徴、生殖腺体指数、肝臓体指数、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、82.3 $\mu$ 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。

(3) 4-ヒドロキシ安息香酸メチルの試験結果

0.357、1.90、9.75mg/L(実測値)のばく露濃度で試験を行ったところ、生殖腺体指数、二次性徴、肝臓体指数、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、1.90mg/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。

9.75mg/Lのばく露群において、総産卵数、受精卵数、受精率の統計学的に有意な低値が認められた。

## 2. 試験結果のまとめ

### (1) 4-ノニルフェノール(分岐型)

51.8µg/L以上のばく露群において総産卵数、受精卵数、受精率の統計学的に有意な低値が認められたことから、メダカの生殖に対する有害性を示すことが示唆された。

4-ノニルフェノール(分岐型)については既存知見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、死亡が認められない濃度範囲において、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高値が認められ、エストロゲン作用を持つことが確認された。

メダカの生殖に対する有害性が示唆されたばく露濃度 51.8µg/Lは、平成 17 年度に実施された化学物質環境実態調査において測定された最高濃度 0.48µg/L の約 108 倍であった。

### (2) 4-*tert*-オクチルフェノール

今回の試験結果からは、メダカに対する有害性を示すことは示唆されなかった。

4-*tert*-オクチルフェノールについては既存知見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、死亡が認められない濃度範囲において、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高値が認められ、エストロゲン作用を持つことが確認された。

なお、今回の最高ばく露濃度 250µg/Lは、平成 24 年度に実施された化学物質環境実態調査において検出された最高値 0.031µg/L の約 8,060 倍であった。

### (3) 4-ヒドロキシ安息香酸メチル

9.75mg/Lのばく露群において、総産卵数、受精卵数、受精率の統計学的に有意な低値ことから、メダカの生殖に対する有害性を示すことが示唆された。

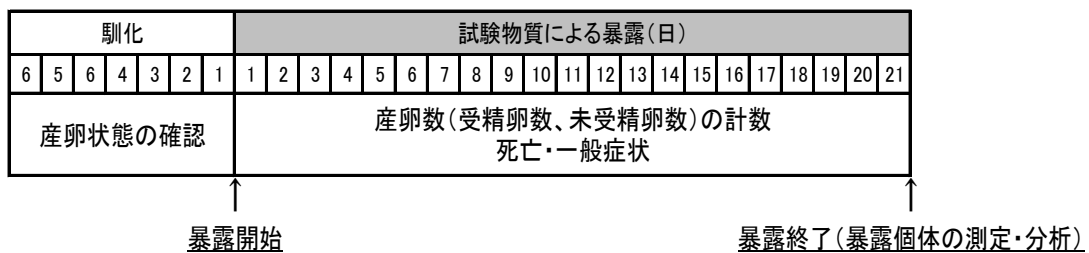
4-ヒドロキシ安息香酸メチルについては既存知見からエストロゲン作用を持つことが想定された。今回の試験結果において、死亡が認められない濃度範囲において、エストロゲン作用を示す雄の肝臓中ビテロゲニン濃度の高値が認められ、エストロゲン作用を持つことが確認された。

なお、メダカの生殖に対する有害性が示唆されたばく露濃度 9.75mg/Lは、平成 20 年度に実施された化学物質環境実態調査において検出された最高値 0.003µg/L の約 3,250,000 倍であった。

(参考)

### メダカを用いた魚類短期繁殖試験法

魚類短期繁殖試験（OECD TG229）は、成熟したメダカを雌雄混合で試験対象物質に 21 日間ばく露し、ばく露期間中の産卵状況並びにばく露終了時の生存個体の肝臓中ピテロジェニン濃度及び二次性徴を調べる試験法である。



**エンドポイント**

- ・産卵状態(産卵数、受精率、受精卵数)
- ・肝臓中ピテロジェニン濃度
- ・二次性徴
- ・生殖腺組織(オプション:実施せず)

- ・全長、体重
- ・肝臓、生殖腺重量(HSI、GSI)
- ・肝臓中ピテロジェニン濃度
- ・二次性徴(尻鰭乳頭状突起)

第 1 段階生物試験結果(TG229)

4-ノニルフェノール (分岐鎖・異性体混合物)

実施機関：(独)国立環境研究所

表 3-A 試験結果

平均濃度実測値 ( $\mu$ 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	37.0 $\pm$ 0.8	35.62 $\pm$ 0.6	508 $\pm$ 33	492 $\pm$ 18
5.63	12	12	0	0	36.8 $\pm$ 1.3	36.71 $\pm$ 1.3	515 $\pm$ 45	535 $\pm$ 82
18.8	12	12	0	0	37.6 $\pm$ 0.6	35.49 $\pm$ 1.2	552 $\pm$ 34	500 $\pm$ 46
51.8	12	12	0	0	37.6 $\pm$ 1.2	36.37 $\pm$ 0.8	552 $\pm$ 69	537 $\pm$ 45
170	12	12	8.3	8.3	38.6 $\pm$ 1.5	36.04 $\pm$ 1.6	602 $\pm$ 64	540 $\pm$ 64

表 3-B 試験結果(続き)

平均濃度実測値 ( $\mu$ g/L)	総産卵数 (eggs/female/day)	受精卵数 (eggs/female/day)	受精率 (%)	生殖腺体指数 (%)	
				雄	雌
対照区	20.8 $\pm$ 2.5	19.9 $\pm$ 2.8	95.4 $\pm$ 3.5	0.89 $\pm$ 0.06	7.2 $\pm$ 0.47
5.63	21.0 $\pm$ 0.9	20.2 $\pm$ 1.2	96.5 $\pm$ 2.2	1.02 $\pm$ 0.07	7.8 $\pm$ 1.6
18.8	18.3 $\pm$ 4.9	17.3 $\pm$ 5.4	93.6 $\pm$ 7.1	1.08 $\pm$ 0.06	8.9 $\pm$ 0.60
51.8	12.7 $\pm$ 3.0 *	7.9 $\pm$ 2.7 *	60.5 $\pm$ 10.4 *	1.15 $\pm$ 0.20	7.7 $\pm$ 0.58
170	4.05 $\pm$ 1.7 *	1.4 $\pm$ 0.8 *	32.7 $\pm$ 9.7 *	1.05 $\pm$ 0.15	7.9 $\pm$ 1.5

表 3-C 試験結果(続き)

平均濃度実測値 ( $\mu$ 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	1.4 $\pm$ 0.10	3.4 $\pm$ 0.20	2.0 $\pm$ 0.8	664 $\pm$ 201	90 $\pm$ 4.8	0 $\pm$ 0
5.63	1.7 $\pm$ 0.10	3.4 $\pm$ 0.55	2.9 $\pm$ 2.6	606 $\pm$ 264	89 $\pm$ 3.7	0 $\pm$ 0
18.8	1.7 $\pm$ 0.28	4.1 $\pm$ 0.59	17.2 $\pm$ 6.1 *	571 $\pm$ 387	92 $\pm$ 8.0	0 $\pm$ 0
51.8	2.0 $\pm$ 0.22	4.2 $\pm$ 0.66	215.5 $\pm$ 94.0 *	692 $\pm$ 171	86 $\pm$ 7.7	0 $\pm$ 0
170	2.4 $\pm$ 0.10	3.9 $\pm$ 0.58	4,020 $\pm$ 1830 *	539 $\pm$ 310	89 $\pm$ 4.1	0 $\pm$ 0

表 3-D 試験結果(続き)

平均濃度実測値 ( $\mu$ g/L)	その他の所見
対照区	特になし
5.63	特になし
18.8	特になし
51.8	特になし
170	試験開始9日後以降, 雄個体の求愛行動が観察されなかった

結果は平均値 $\pm$ 標準偏差.

有意差水準 (\* $p$ <0.05).

ND は未検出 (< 1 ng/mg liver).

(-)は、未測定

二次性徴：乳頭状小突起を有する節板数

## Speed'98において実施した生物試験結果

**4-Nonylphenol (branched)****1. Vitellogenin Assay**

Table 1 Results (21 days)

Average measured concentration ( $\mu\text{g/L}$ )	Mortality (%)	Hepatosomatic Index (%)		Vitellogenin (ng/mg liver)	
		Male	Female	Male	Female
Control	0	2.82 $\pm$ 0.951	5.23 $\pm$ 0.923	2.06 $\pm$ 1.84	1,130 $\pm$ 288
Solvent control	0	2.20 $\pm$ 0.747	4.92 $\pm$ 0.764	1.85 $\pm$ 1.92	1,130 $\pm$ 307
7.40	0	2.86 $\pm$ 1.00	4.68 $\pm$ 0.814	1.24 $\pm$ 1.32	1,400 $\pm$ 232
12.8	0	2.62 $\pm$ 1.13	5.17 $\pm$ 1.22	5.36 $\pm$ 10.8	1,150 $\pm$ 514
22.5	0	3.27 $\pm$ 1.11	6.02 $\pm$ 1.55	26.9 $\pm$ 35.7*	1,280 $\pm$ 341
56.2	0	3.11 $\pm$ 1.40	5.36 $\pm$ 1.23	113 $\pm$ 167*	1,330 $\pm$ 319
118	0	3.07 $\pm$ 1.30	4.38 $\pm$ 2.34	2,990 $\pm$ 2,090**	2,620 $\pm$ 1,130**

Data shows mean  $\pm$  standard deviation.

Statistically significant differences from control and solvent control group (\*\* $p$ <0.01, \* $p$ <0.05).

ND means not detected (< 1 ng/mg liver).

**2. Partial Life Cycle Test**

Table 2-A Results

Average measured concentration ( $\mu\text{g/L}$ )	Hatchability (%)	Time to hatching (Day)	Mortality (%)	Total length (mm)	Body weight (mg)
Control	96.7 $\pm$ 3.9	9.3 $\pm$ 0.1	5.24 $\pm$ 3.50	28.7 $\pm$ 2.0	232 $\pm$ 40
Solvent control	100	9.3 $\pm$ 0.1	3.57 $\pm$ 7.14	29.1 $\pm$ 1.1	282 $\pm$ 28
3.30	100	9.2 $\pm$ 0.1	1.67 $\pm$ 3.33	29.4 $\pm$ 1.2	230 $\pm$ 31
6.08	100	9.2 $\pm$ 0.1	1.67 $\pm$ 3.33	29.1 $\pm$ 1.1	231 $\pm$ 31
11.6	100	9.2 $\pm$ 0.1	5.00 $\pm$ 6.38	29.1 $\pm$ 1.2	229 $\pm$ 31
23.5	100	9.2 $\pm$ 0.1	3.33 $\pm$ 3.85	28.4 $\pm$ 1.0	209 $\pm$ 20**
44.7	100	9.2 $\pm$ 0.1	0	27.8 $\pm$ 1.2**	201 $\pm$ 23**

Table 2-B Results (Continued)

Average measured concentration ( $\mu\text{g/L}$ )	Gonadosomatic Index (%)		No. of fishes	Testis-ova
	Male	Female		
Control	0.680 $\pm$ 0.265	3.32 $\pm$ 2.56	20	0/8
Solvent control	0.627 $\pm$ 0.248	4.47 $\pm$ 3.20	20	0/10
3.30	0.726 $\pm$ 0.197	3.61 $\pm$ 3.29	20	0/9
6.08	0.666 $\pm$ 0.229	3.79 $\pm$ 3.77	20	0/10
11.6	0.512 $\pm$ 0.254	4.10 $\pm$ 2.94	20	4/13*
23.5	0.441 $\pm$ 0.269	3.55 $\pm$ 2.39	20	9/11**
44.7	0.396 $\pm$ 0.105	2.94 $\pm$ 3.41	20	4/5**

Table 2-C Results (Continued)

Average measured concentration ( $\mu\text{g/L}$ )	Hepatosomatic Index (%)		Vitellogenin (ng/mg liver)	
	Male	Female	Male	Female
Control	2.39 $\pm$ 0.271	3.84 $\pm$ 1.60	8.00 $\pm$ 5.06	851 $\pm$ 690
Solvent control	1.80 $\pm$ 0.596	3.00 $\pm$ 0.935	1.81 $\pm$ 1.75	1,770 $\pm$ 1,380
3.30	2.50 $\pm$ 0.789	4.23 $\pm$ 1.18	ND	1,350 $\pm$ 1,230
6.08	2.58 $\pm$ 0.749*	3.71 $\pm$ 0.558	8.97 $\pm$ 9.39	1,350 $\pm$ 1,060
11.6	2.46 $\pm$ 0.501	3.55 $\pm$ 0.515	19.2 $\pm$ 21.6*	3,100 $\pm$ 1,270**
23.5	2.53 $\pm$ 0.408	3.45 $\pm$ 0.552	80.4 $\pm$ 96.7**	5,350 $\pm$ 1,230**
44.7	2.66 $\pm$ 0.933	3.48 $\pm$ 0.751	98.2 $\pm$ 79.6**	3,750 $\pm$ 2,470**

Testis-ova means No. of Males with testis-ova/No. of Males.

Data shows mean  $\pm$  standard deviation.

Statistically significant differences from control and solvent control group (\*\* $p$ <0.01, \* $p$ <0.05).

ND means not detected (< 1 ng/mg liver).

### 3. Life Cycle Test

Table 3-A F<sub>0</sub> generation

Average measured concentration (µg/L)	Hatchability (%)	Time to hatching (Day)	Mortality (%)	Total length (mm)	Body weight (mg)	No. of fishes	Testis-ova
Control	90.0±8.6	9.4±0.2	1.7±3.4	26.4±1.7	178±36	20	0/9
Solvent control	93.3±5.4	9.9±0.3	9.5±7.1	25.9±1.8	170±45	20	0/8
4.2	95.0±6.4	9.5±0.02	3.9±4.5	26.0±1.4	167±33	20	0/12
8.2	90.0±8.6	9.6±0.2	8.7±6.8	26.9±2.0	197±44	20	0/14
17.7	88.3±6.4	10.2±0.4	21.1±4.7*	26.1±2.3	179±48	20	4/9**
51.5	93.3±7.7	10.2±0.6	33.2±17.0**	25.2±1.9	167±42	20	8/8**
183	46.7±18.1**	9.6±0.3	100	-	-	-	-

Table 3-B F<sub>0</sub> generation (Continued)

Average measured concentration (µg/L)	No. of eggs	Fertility (%)	Gonadosomatic Index (%)	
			Male	Female
Control	572±100	98.9±1.2	1.03±0.0721	8.81±0.829
Solvent control	630±97	98.9±0.8	1.04±0.266	9.24±0.614
4.2	582±90	98.0±2.6	1.19±0.180	9.91±1.11
8.2	672±99	97.4±2.2	1.14±0.243	10.0±0.581*
17.7	591±104	78.5±33	0.893±0.296	11.1±0.983**
51.5	-	-	-	-
183	-	-	-	-

Table 3-C F<sub>0</sub> generation (Continued)

Average measured concentration (µg/L)	Hepatosomatic Index (%)		Vitellogenin (ng/mg liver)	
	Male	Female	Male	Female
Control	-	-	-	-
Solvent control	-	-	-	-
4.2	-	-	-	-
8.2	-	-	-	-
17.7	-	-	-	-
51.5	-	-	-	-
183	-	-	-	-



Table 3-D F<sub>1</sub> generation

Average measured concentration (µg/L)	Hatchability (%)	Time to hatching (Day)	Mortality (%)	Total length (mm)	Body weight (mg)	No. of fishes	Testis-ova
Control	74.4	10.2	1.7±3.4	26.5±1.4	169±38	20	0/7
Solvent control	76.4	10.7	10.0±6.7	26.6±1.8	174±40	20	0/11
4.2	74.0	10.4	10.0±11.5	26.9±1.5	177±35	20	0/9
8.2	76.9	10.6	18.3±6.4	27.5±3.2	178±46	20	2/12
17.7	85.4	11.6	6.7	25.9±1.9	171±38	20	5/9**
51.5	-	-	-	-	-	-	-
183	-	-	-	-	-	-	-

Table 3-E F<sub>1</sub> generation (Continued)

Average measured concentration (µg/L)	Vitellogenin (ng/mg liver)	
	Male	Female
Control	-	-
Solvent control	-	-
4.2	-	-
8.2	-	-
17.7	-	-
51.5	-	-
183	-	-

Testis-ova means No. of Males with testis-ova/No. of Males.

Data shows mean ± standard deviation.

Statistically significant differences from control and solvent control group (\*\* $p < 0.01$ , \* $p < 0.05$ ).

ND means not detected (< 1 ng/mg liver).

Data not measured or performed (-).