

環境省請負業務

## 令和4年度分報告書

令和3年度及び令和4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（プロピルパラベン）実施業務

株式会社三菱ケミカルリサーチ

## まえがき

本報告書は、令和3年度及び令和4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（プロピルパラベン）実施業務報告である。

令和 5年 3月

株式会社三菱ケミカルリサーチ

化学物質名

プロピルパラベン

# 目 次

	頁
1 実施内容	1
2 プロピルパラベン <sup>1</sup> のメダカ拡張一世代繁殖試験の実施	2
2.1 材料および方法	2
2.1.1 被験物質	2
2.1.2 試験生物	3
2.1.3 試験環境および条件など	3
2.1.4 ばく露および観察・測定の方法	7
2.1.5 結果の算出	11
2.1.6 試験有効性基準	12
2.2 結果	13
2.2.1 環境条件	13
2.2.2 試験液中の被験物質濃度	13
2.2.3 F0 世代の結果	14
2.2.4 F1 世代胚～仔魚期の結果	20
2.2.5 F1 世代亜成体の結果	21
2.2.6 F1 世代成熟個体の結果	26
2.2.7 F2 世代の結果	32
2.3 結果の概要	33
2.4 考察	35
2.5 参考文献	38
3 化学物質の内分泌かく乱作用に関する検討会への報告	39
付属資料-1	40

## 1. 実施内容

本業務は、環境省により取りまとめられた「化学物質の内分泌かく乱作用に関する試験および評価の考え方や枠組み（平成22年11月）」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、既の実施された試験管内試験およ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（プロピルパラベン）について、第二段階生物試験である MEOGRT を令和3年度から4年度にかけて実施し、内分泌かく乱に関わるエンドポイントへの作用・影響の有無および NOEC（最大無影響濃度）または LOEC（最小影響濃度）等のデータ収集を行った。

MEOGRT は、平成27年に 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: OECD TG240）<sup>1)</sup>の略称であり、内分泌かく乱化学物質の確定試験として、EXTEND2016 中での第二段階生物試験として位置づけられている。

実施内容の詳細を以下に示す。

### (1) プロピルパラベンのメダカ拡張一世代繁殖試験の実施

OECD TG240 に基づいてプロピルパラベンの MEOGRT を実施し、結果を報告した。

### (2) 化学物質の内分泌かく乱作用に関する検討会への報告

本業務の結果については、環境省が別途開催する検討会の会議に中間報告および最終報告するため、環境省担当官の指示に従い資料を作成の上、電子メール等で環境省担当官に提出した。また、同会議に出席し、必要に応じて資料に関する説明、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-R）4式を作成した。

## 2. プロピルパラベンのメダカ拡張一世代繁殖試験の実施

### 2.1 材料および方法

#### 2.1.1 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。

試験に用いる試薬は、東京化成工業株式会社（Lot 番号：KCJOA、純度：100.0%）より入手した。

#### (1) CAS 登録番号<sup>2)</sup>

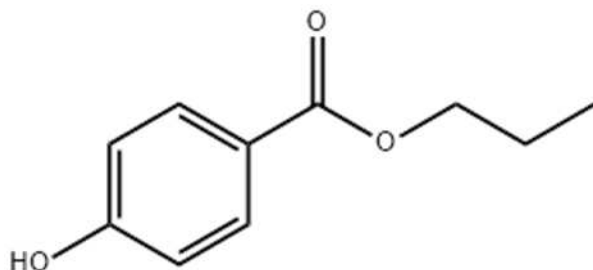
CAS: 94-13-3

#### (2) 一般名<sup>2)</sup>

和名：プロピルパラベン（別名：4-ヒドロキシ安息香酸プロピル）

英名：Propylparaben

#### (3) 構造式<sup>2)</sup>



#### (4) 分子式および分子量<sup>2)</sup>

分子式：C<sub>10</sub>H<sub>12</sub>O<sub>3</sub>

分子量：180.20

#### (5) 溶解性<sup>2)</sup>

対水溶解度 400mg/1000g (25°C)、463 mg/L (25°C)

#### (6) 分配係数<sup>2)</sup>

オクタノール/水分配係数 3.01 (pH=7.5)、3.04

#### (7) その他

外観：白色結晶性粉末

## 2.1.2 試験生物

### (1) 供試生物種

メダカ (*Oryzias latipes*) を使用した。  
国立環境研究所 (NIES 系統) より入手し、当施設で自家繁殖させているメダカを用いた。

### (2) 飼育環境および条件

試験用水および飼育水については、当施設の脱塩素水道水製造装置で製造（横浜市水道水を脱塩素処理）された「脱塩素水道水」を使用した。水質測定結果を付属資料-1 に示す。メダカの飼育はすべて試験室とは隔離された飼育室において、以下の条件で行った。

- ・飼育水槽： ガラス製水槽
- ・飼育水： 脱塩素水道水
- ・飼育方法： 流水式
- ・水温： 25±1°C
- ・pH： 6.5～8.5
- ・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（ベトナム産）の孵化後 24 時間以内の幼生を、1～3 回/日飽食量を給餌

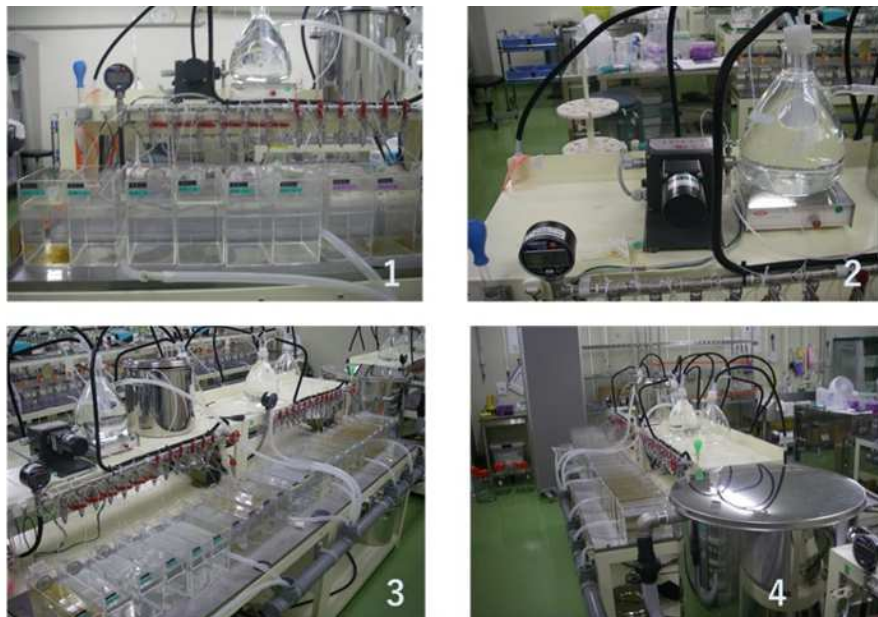
## 2.1.3 試験環境および条件など

### (1) 試験室

試験はすべて、株式会社三菱ケミカルリサーチ 環境・健康・安全評価センター（神奈川県横浜市青葉区鴨志田町 1000 番地）で行った。

### (2) 試験装置

流水式試験装置を使用した。試験原液と試験用水を一定流量で連続的に混合し、試験液供給ポンプにて試験液を各試験容器に供給した。流水式試験装置の写真を図 1-1 に示す。



1：流水式装置（濃度区）、2：混合槽、3：流水式装置（全体）、4：温調槽

図 1-1 流水式装置

### (3) 試験条件

魚短期繁殖試験<sup>3)</sup> (OECD TG229、測定濃度 0.311、0.926、2.94 mg/L) の結果、産卵に関する LOEC は 0.926 mg/L、ビテロジェニンについてはオスの LOEC が 0.311 mg/L、メスの LOEC が 2.94 mg/L であった。また、予備試験として魚類短期繁殖試験および胚・仔魚短期毒性試験の併合試験を実施した。0.010、0.10、1.0 mg/L (設定濃度) でばく露試験を実施し、同等の結果を得た。以上の結果に基づき、試験濃度を 0.010、0.032、0.10、0.32、1.00 mg/L に設定した。

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 (蓋：透明アクリル板)
- ・希釈水：脱塩素水道水
- ・ばく露方式：流水式 (換水率 5 回/日以上 16 回/日以下)
- ・ばく露期間：F0 世代から F2 世代の孵化までの計 19 週  
(2022 年 5 月 23 日～2022 年 10 月 5 日)
  - ・ F0 世代 : 4 週間
  - ・ F1 世代 : 15 週間
  - ・ F2 世代 : 対照区の孵化日の中央値の 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：被験物質濃度区 5 濃度 (0.010、0.032、0.10、0.32、1.00 mg/L)、対照区
- ・連数：
  - ・ F0 世代 : 12 連 (対照区)、6 連 (濃度区)
  - ・ F1 世代 (受精後 1～10 週目) : 12 連 (対照区)、6 連 (濃度区)
  - ・ F1 世代 (受精後 10～15 週目) : 24 連 (対照区)、12 連 (濃度区)
  - ・ F2 世代 (受精後 1～2 週目) : 12 連 (対照区)、6 連 (濃度区)
- ・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 1～3 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 112 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 23 日目、F0 : 19 週齢目)
  - ・ F1 世代 : 試験開始 18 週目のできるだけ早い日 (+1 日) (F1 : 15 週齢目)  
(本試験では試験開始 121 日目)
- ・水温 : 25±1°C
- ・pH : 6.5～8.5 (ばく露期間中の変動は±0.5 以内)
- ・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（ベトナム産）の孵化後 24 時間以内の幼生を 1 日 3 回給餌した。当施設のメダカの飽食量を考慮し、成長段階に応じ表 1-1 に示す量を給餌した。成魚については、給餌量は事前の予備検討およびじゅん化時の産卵数を考慮し決定した。

表 1-1 ブラインシュリンプ (*Artemia spp. nauplii*) の給餌量

孵化後週齢 (wph)	孵化後日齢 (dph)	本試験 (mg dry weight/fish/day)
Week1	Day 1-2	0.5
	Day 3-7	1.0
Week2	Day 8-9	2.0
	Day 10-11	3.0
	Day 12-13	4.0
	Day 14	5.0
Week3	Day 15	5.0
	Day 16-21	6.0
Week 4	Day 22-28	8.0-11.0
Week 5	Day 29-35	11.5-14.5
Week 6	Day 36-42	15.0-21.0
Week 7	Day 43-49	22.0-28.0
Week 8	Day 50-56	29.0-35.0
Week 9	Day 57-60	36.0-39.0
	Day 61-63	40.0
Week 10	Day 64-70	40.0
Week 11~	Day 71~	40.0

#### (4) 環境測定機器

水温、pH、溶存酸素濃度の測定は、それぞれ以下の機器を用いて行った。

- ・水温計：横河メータ&インスツルメンツ製 TX1001 型
- ・マルチ水質計（溶存酸素濃度、pH 測定用）：東亜ディーケーケー製 MM-60R 型

#### (5) 試験液の調製

被験物質 3200 mg を超純水 10L に添加し、スターラーで 24 時間攪拌（室温）後、目開き 59  $\mu\text{m}$  ナイロンメッシュでろ過して原液 320 mg/L を調製した。原液を超純水で希釈し、濃度区ごとの試験原液 2.0、6.4、20、64、200 mg/L を調製した。試験原液を流水式ばく露装置にセットし、試験用水を用いて連続的に希釈し各水槽に供給した。



## (6) 被験物質の濃度測定

生物試験に使用した試験水は試験区毎に、高速液体クロマトグラフ (HPLC) を用いて定量した。

### 【HPLC 測定条件】

#### 装置

高速液体クロマトグラフ Agilent 1100 型、 Agilent Technologies 製  
ワークステーション： ChemStation  
デガッサ： G1322A 型  
送液ポンプ： G1311A 型 (バイナリポンプ)  
オートサンプラ： G1313A 型  
カラムオーブン： G1316A 型  
ダイオードアレイ検出器 (DAD)： G1315B 型

#### 条件

カラム： 資生堂製 CAPCELL PAK AQ C18 5  $\mu$ m 3.0 mm i.d.×150 mm  
カラムオーブン： 40°C  
溶離液： A 液：超純水\*、B 液：HPLC 用アセトニトリル  
A 液 50%、B 液 50%  
ストップタイム： 3.0 min  
流速： 1.0 mL/min  
測定波長： 254 nm  
試料注入量： 50  $\mu$ L

\*: JIS K0557 A4 グレードの水

### 【標準溶液の調製】

プロピルパラベン 50 mg を秤量し、HPLC 用アセトニトリルで溶解し 50 mL に定容とし、1000 mg/L の溶液を調製した。この溶液を HPLC 用アセトニトリルで順次希釈し、0.00500、0.0100、0.100、1.00 mg/L の標準溶液を調製した。また、HPLC 用アセトニトリルを 0 mg/L の標準溶液とした。

### 【検量線の作成】

標準溶液を以下のように分析し、検量線を作成した。

標準溶液を 0.75mL 採取  
| ←超純水 0.75mL 添加  
HPLC 測定

### 【試験水の分析】

試験液を以下のように分析した。

試験液を 0.75mL 採取  
| ←HPLC 用アセトニトリル 0.75mL 添加  
HPLC 測定

## 2.1.4 ばく露および観察・測定の方法

MEOGRT (OECD TG240) のタイムラインを図 1-2、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 1-3 に示した。

MEOGRT Exposure and Endpoint Timeline																			
F0	1	2	3	4															
F1				1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	
F2																	1	2	
Test Week	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
Lifestage Key					Embryo			Larvae			Juvenile			Subadult		Adult			
Endpoints																			
Fecundity	F <sub>0</sub>														F <sub>1</sub>				
Fertility	F <sub>0</sub>														F <sub>1</sub>				
Hatch					F <sub>1</sub>													F <sub>2</sub>	
Survival					F <sub>1</sub>			F <sub>1</sub>			F <sub>1</sub>			F <sub>1</sub>					
Growth					F <sub>0</sub>			F <sub>1</sub>			F <sub>1</sub>			F <sub>1</sub>					
Vitellogenin								F <sub>1</sub>											
Secondary sex								F <sub>1</sub>						F <sub>1</sub>					
Histopathology											F <sub>1</sub>								
Test Week	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19

- **Experimental design has 7 groups of replicates**
  - 5 for test chemical treatments
  - 2 for control treatments (4 if solvent is used)
- **Within-group design**
  - 12 replicates for reproduction, adult pathology and SSC (Wks 10 through to 18)
  - 6 replicates for hatch, survival, Vtg; and - subadult SSC and growth (Wks 1 through to 9)

SSC: secondary sex characters; Wks: weeks; Vtg: vitellogenin

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

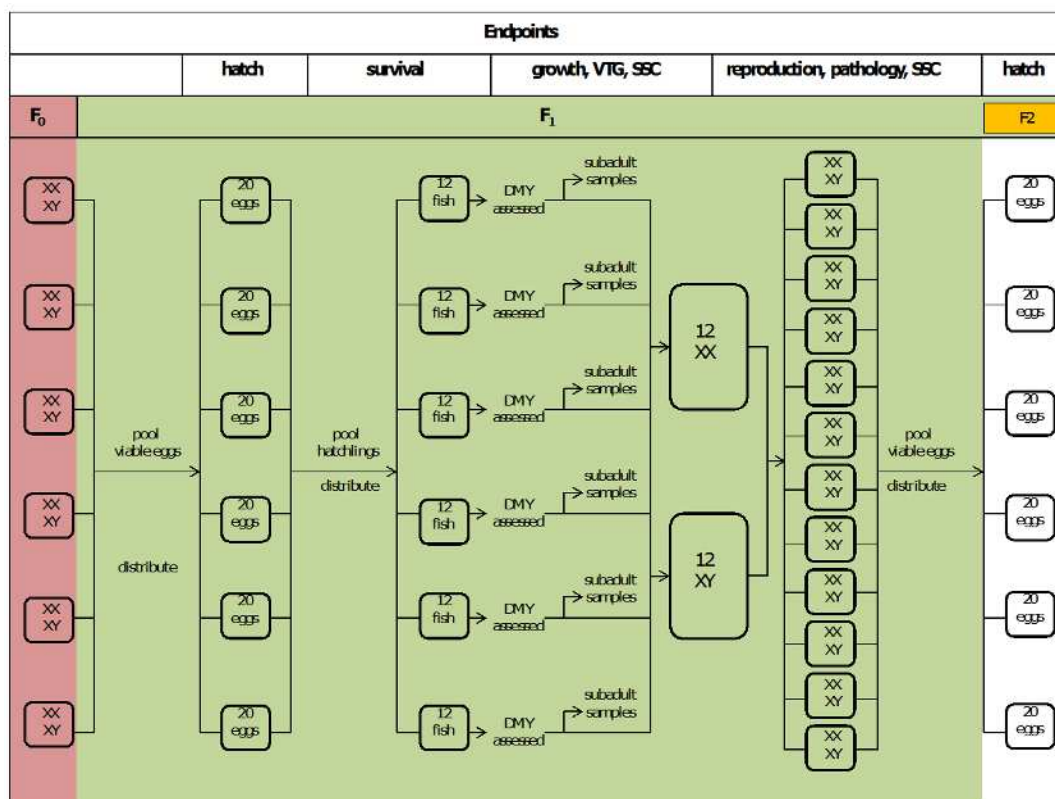


図 1-3 MEOGRT における連のプールと分配の手順

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

## (1) F0 世代

### [ばく露方法]

生後 10 週齢の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 40 日間のじゅん化を行った (168 個体)。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。

じゅん化終了後、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。水温、pH、溶存酸素濃度を試験区毎に毎日測定した。

ばく露水槽への藻類付着を防ぐため、週に 1~2 回程度水槽の掃除を実施した。なお、ばく露および器具洗浄に用いた廃水は、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、死亡個体の有無および行動・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

### [F1 試験用受精卵の採取]

ばく露 4 週目の第 1、2 日、すなわち試験開始 22、23 日目 (以下、Test Day 22、23) 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、水槽に設置した孵化器に投入した。

### [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、136 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。

- 1) 全長・体長および湿重量の測定  
全長・体長は電子ノギス (株式会社ミットヨ製) を用いて、湿重量は電子天秤 (メトラー・トレド製 AG204 型、AB204 型、MS205TS 型) 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 (ニコン製 SMZ-U 型) 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) 肝臓の測定およ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 (メトラー・トレド製 AG204 型、AB204 型、MS205TS 型) 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 EnBio Medaka Vitellogenin ELISA System (藤倉化成株式会社製) を用いて実施した。

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を肝臓重量の 20 倍量加える。
- ② 肝臓をホモジナイズし、4°C、15000rpm、10 分間の遠心分離にかける。
- ③ 分離した上清を適量採取し、1.5 mL マイクロテストチューブに回収、直ちに氷冷した。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希釈したものを使用した。測定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。定量下限値は 0.4 ng/mg liver weight とし、定量下限を下回ったものは定量下限の半値 (0.2 ng/mg) を用いて平均値を算出した。

#### 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。電子天秤 (メトラー・トレド製 AG204 型、AB204 型、MS205TS 型) によって秤量した後、ブアン液によって固定した。

## (2) F1 世代

### [ばく露方法]

F0 世代より採取した受精卵は、水槽内に設置した孵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。孵化用シリンダーは、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、孵化後の仔魚は、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、水槽の掃除、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]

ばく露期間中は孵化や死亡個体の有無および行動・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、毎日孵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。各日に孵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。孵化率は対照区の孵化日の中央値の 2 倍の時点で算出し、それ以降は未孵化で死亡とみなした。

各試験区において多くの孵化がみられた 3 日間 (本試験では受精後 7 日~9 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、濃度区は 6 連ずつ再分配した。

受精後 21 日目 (Test Day 43) に仔魚の生死を確認した。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 を抽出した。

- ② PCR は Takara Ex Taq® (タカラバイオ株式会社製) を用い、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、94°C・5 分の条件で 1 サイクル、その後、94°C・30 秒、55°C・30 秒、72°C・1 分の条件を 30 サイクル繰り返して行った。
- ③ この後、増幅産物にミドリグリーンダイレクト(日本ジェネティクス株式会社製)を添加し、1.5% TAE-アガロースゲルで電気泳動してバンド (メスは 1 本、オスは 2 本現れる) を確認し、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各連から 2 個体ずつ選別し、対照区は 24 ペア、濃度区は 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、繁殖用個体のばく露を継続した。

[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 (63 日齢または 64 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 世代と同一である。

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

[産出卵の計測]

各ペアについて、受精後 11~13 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]

受精後 14 週目の第 1 日 (Test Day 120) 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、水槽に設置した孵化器に投入した。

[ばく露終了後の測定]

14 週間のばく露期間終了後、生存した全個体を Test Day 121 (98 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。その他の観察についても、各計測・測定方法は、F1 世代亜成体 (10 週齢) と同様に実施した。

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

### (3) F2 世代

[ばく露方法]

F1 世代より採取した受精卵は、水槽内に設置した孵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。孵化用シリンダーは、F1 世代に用いたものと同じである。孵化後の仔魚は、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]

ばく露期間中は孵化や死亡個体の有無および行動・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、毎日孵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。孵化率は対照区の孵化日の中央値の 2 倍の時点で算出し、それ以降は未孵化で死亡とみなした。

## 2.1.5 結果の算出

### (1) 各エンドポイントの算出

繁殖データは各ペアの日平均総産卵数および受精卵数を算出し、各試験区の平均値を求めた。途中でメスまたはオスが死亡した場合、観察期間 (21 日間) の半分以上の記録があれば、それまでの日平均を計算に含めた。受精率は、21 日間の累積受精卵数/累積産卵数で算出した (週平均を求める場合は 7 日間毎算出した)。

その他のエンドポイントは、胚仔魚期データを除き、遺伝的な性別ごとにとりまとめ、平均値±標準偏差で示した (ただし F0 世代は遺伝的な性別判定をしていないため、表現型の性別に基づいた)。F1 世代の受精後 3 週間目の孵化日数、孵化率、および受精後 4、9、10 週目の生存率は、性別の区別なしに連ごとに算出し、そこから各試験区の平均値を求めた。F0、F1 世代の成熟個体の生存率は、試験区ごとにまとめて各性別に対して算出した。

F0、F1 世代の成熟個体および F1 世代の亜成体について計測した肝臓湿重量および生殖腺湿重量をもとに、肝臓体指数 (肝臓湿重量/湿重量) および生殖腺体指数 (生殖腺湿重量/湿重量) を算出した。F1 世代亜成体の各エンドポイントは、各個体のデータから連平均値を算出し、そこから各試験区の平均値を求めた。F0、F1 世代の成熟個体の各エンドポイントは、各個体のデータから各試験区の平均値を求めた。

### (2) 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、孵化率・孵化後生存率・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 (ただしピテロジェニン濃度は、1 未満は小数点以下 2 桁まで、二次性徴は 1 の位までとした) とし、標準偏差の桁数は平均値の位に合わせた。

### (3) 統計処理

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>4)</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 1-2 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 StatCharms v. 0.90.95 および R-4.0.5 (win 64 bit) を用いた<sup>5)</sup>。検定は原則片側検定で実施し、正規性および等分散性検定は有意水準 1%、その他は有意水準 5%とした。

表 1-2 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 →(等分散性あり) Dunnett 検定 →(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 →(等分散性あり) Dunnett 検定 →(等分散性なし) Dunn 検定
生存率 (F0・F1 成熟個体)	アークサイン変換	Cochran-Armitage 検定
孵化率・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 →(単調性なし)
全長または体長・湿重量	なし	亜成体の場合：Mixed effect ANOVA →(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	成熟個体の場合： 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
ビテロジェニン	対数変換	成熟個体の場合： 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
二次性徴	平方根変換	
孵化日数	なし	Mixed Effects Cox Models

\*：経日変化グラフより Time effect が見られる場合に実施するが、本試験では対照区と明らかに時間変動の異なる濃度区は観察されなかったため、Time effect はないとして実施しなかった。

### 2.1.6 試験有効性基準

以下の条件から、本試験の有効性を判断した。

- ・ 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°Cから 26°Cの間であること。各水槽の水温の平均値からのずれは 2°C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) の対照区における孵化率が 80%以上であること
- ・ F1 の対照区において、受精後 3 週目までの孵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。

## 2.2 結果

### 2.2.1 環境条件

表 1-3 に水温、pH、溶存酸素の試験期間中の平均値と標準偏差を示す。試験液の平均水温は 25.1~25.2°C であり、各水槽の水温の平均値からの変動は 2°C 未満であった。pH の平均値は 7.4~7.5 であり、最小値は 7.0、最大値は 7.8 であった。ばく露期間中の変動は ±0.5 以内であった。溶存酸素はすべての試験区において飽和酸素濃度の 60% 以上であった。

表 1-3 試験期間中の平均水温、pH、溶存酸素

設定濃度 (mg/L)	水温(°C)		pH		溶存酸素(mg/L)[飽和度(%)]	
Control	25.1	± 0.3	7.4	± 0.2	7.8 [96]	± 0.5
0.010	25.2	± 0.3	7.4	± 0.2	7.7 [95]	± 0.5
0.032	25.2	± 0.3	7.5	± 0.2	7.7 [95]	± 0.6
0.10	25.1	± 0.3	7.5	± 0.2	7.7 [96]	± 0.5
0.32	25.2	± 0.3	7.5	± 0.2	7.6 [94]	± 0.6
1.0	25.2	± 0.3	7.5	± 0.2	7.6 [94]	± 0.7

### 2.2.2 試験液中の被験物質濃度

試験期間中、試験液の被験物質濃度を合計 20 回/濃度区測定し、結果を図 1-4 および表 1-4 に示す。各濃度区の期間平均値は設定濃度の 99.0~104%、変動係数は 6~8% であった。試験期間中において、被験物質濃度は測定平均値の ±20% 以内に維持されており、試験の有効性条件を満たした。よって、以降は測定濃度で結果を記述する。

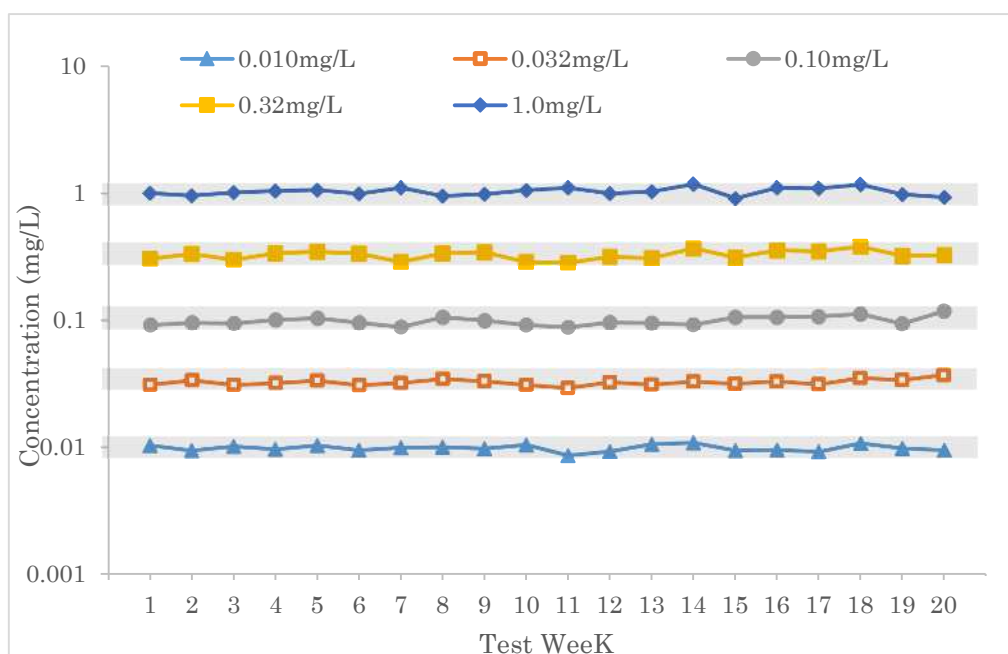


図 1-4 試験期間中の測定濃度の推移

注) 灰色部分は平均値±20%の範囲を示す。



表 1-4 試験液中の被験物質濃度

設定濃度 (mg/L)	分析回数	平均測定濃度 (mg/L)	設定濃度比 (%)	変動係数 (%)
Control	20	N.D.	-	-
0.010	20	0.00990	99.0	6
0.032	20	0.0326	102	6
0.10	20	0.0994	99.0	8
0.32	20	0.328	103	8
1.0	20	1.04	104	7

注)「N.D.」は定量下限(0.005mg/L)未満であることを示す。

### 2.2.3 F0 世代の結果

#### 1) 死亡および行動・外観の異常 (F0)

F0 世代試験期間中の死亡個体数を表 1-5 に示す。

いずれの試験区においても、死亡や行動・外観の異常は認められなかった。

表 1-5 F0 世代の試験期間中の死亡個体

測定濃度 (mg/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	0	0	12	0	0	0
0.00990	6	0	0	6	0	0	0
0.0326	6	0	0	6	0	0	0
0.0994	6	0	0	6	0	0	0
0.328	6	0	0	6	0	0	0
1.04	6	0	0	6	0	0	0

#### 2) 総産卵数・受精卵数・受精率 (F0)

F0 世代試験開始後 21 日間 (Test day1-21) および各週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・受精率を表 1-6 に、21 日間平均を図 1-5 に、21 日間の連平均の日変動および累積受精卵数/ペアを図 1-6 に示す。

総産卵数および受精卵数は、全ての濃度区で対照区と比較し有意差は認められなかった。

21 日間の受精率については、1.04 mg/L 濃度区で対照区と比較し有意な差が認められた。また、経日変化グラフより、対照区と明らかに時間変動の異なる濃度区は観察されなかった。

対照区の総産卵数の平均値および各 12 ペアの総産卵数はすべて 20 個/ペア/日以上、21 日間で算出された計 8655 個の卵の受精率は 95.3%であり、試験の有効性条件を満たした。

表 1-6 F0 世代の総産卵数・受精卵数・受精率

測定濃度 (mg/L)	総産卵数 (eggs/pair/day)							
	21 日間		1 週目(DAY1-7)		2 週目(DAY8-14)		3 週目(DAY15-21)	
Control	34.3	± 6.2	34.3	± 6.8	35.8	± 6.8	32.9	± 6.4
0.00990	36.9	± 4.2	35.7	± 6.6	37.3	± 3.4	37.7	± 3.5
0.0326	35.1	± 1.9	34.6	± 1.6	34.7	± 2.7	36.0	± 3.9
0.0994	33.0	± 5.3	32.2	± 2.2	33.4	± 8.3	33.5	± 7.1
0.328	36.6	± 7.6	35.4	± 7.5	37.1	± 7.1	37.2	± 8.3
1.04	35.0	± 4.1	32.6	± 12.9	35.7	± 5.2	36.8	± 2.7

測定濃度 (mg/L)	受精卵数 (eggs/day/female)							
	21 日間		1 週目(DAY1-7)		2 週目(DAY8-14)		3 週目(DAY15-21)	
Control	32.8	± 5.9	32.1	± 6.4	34.6	± 6.4	31.6	± 6.1
0.00990	35.9	± 4.2	34.8	± 6.5	36.4	± 3.5	36.3	± 4.2
0.0326	33.6	± 2.3	33.3	± 2.1	32.1	± 3.1	35.3	± 3.9
0.0994	29.7	± 6.6	29.6	± 4.4	29.0	± 13.3	30.6	± 8.8
0.328	32.7	± 4.8	32.5	± 4.1	33.6	± 5.4	32.1	± 5.9
1.04	28.9	± 9.9	27.5	± 12.9	30.6	± 8.4	28.7	± 9.4

測定濃度 (mg/L)	受精率 (%)							
	21 日間		1 週目(DAY1-7)		2 週目(DAY8-14)		3 週目(DAY15-21)	
Control	95.7	± 2.6	93.9	± 6.1	96.9	± 1.7	96.3	± 2.5
0.00990	96.9	± 2.3	97.5	± 1.4	97.4	± 2.3	95.8	± 5.7
0.0326	95.2	± 4.1	95.6	± 5.2	92.0	± 8.1	98.1	± 1.7
0.0994	89.5	± 10.9	92.7	± 10.3	80.6	± 34.9	91.0	± 9.8
0.328	90.6	± 9.9	93.4	± 9.2	91.7	± 9.7	86.7	± 12.3
1.04	84.4	± 20.9 *	85.2	± 25.7	88.0	± 16.6 *	80.1	± 20.4 *

注) 値は平均値±標準偏差 (対照区は n=12、濃度区は n=6) を示す。\*は対照区と比較し統計学的な有意差があることを示す (p<0.05、Jonckheere-Terpstra 検定)。

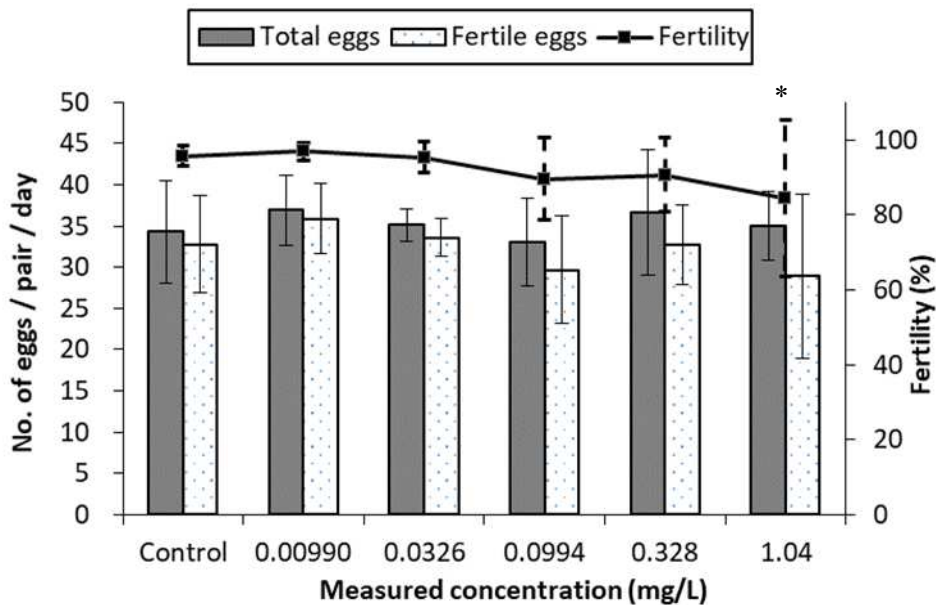
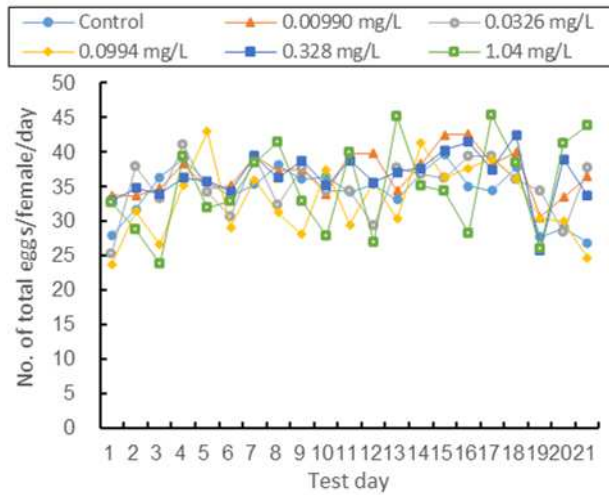


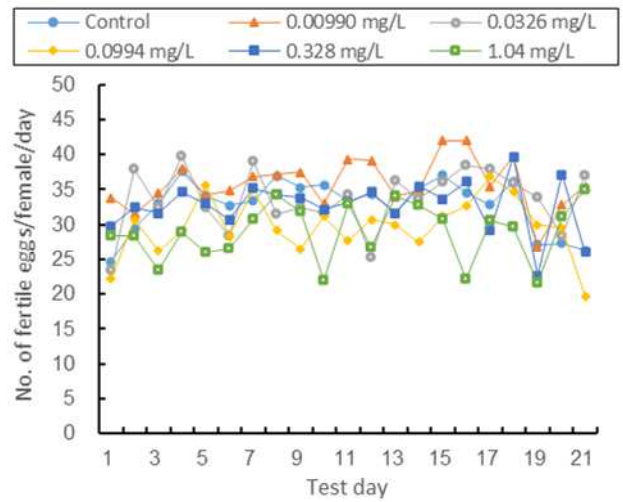
図 1-5 F0 世代の総産卵数・受精卵数・受精率 (各ペア・1 日当たり)

注) 値は平均値±標準偏差 (対照区は n=12、濃度区は n=6) を示す。\*は対照区と比較し統計学的な有意差があることを示す (p<0.05、Jonckheere-Terpstra 検定)。

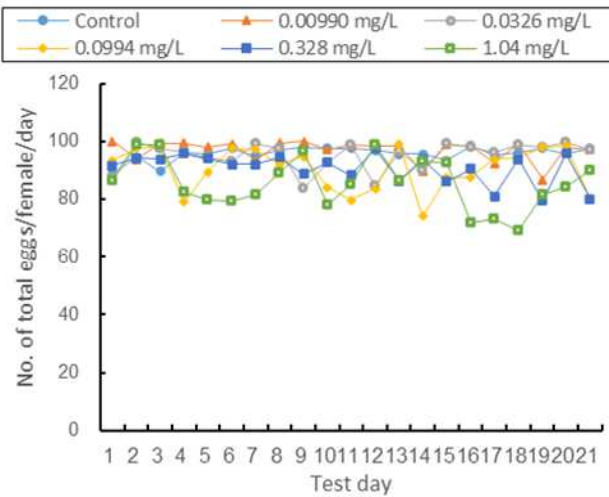
(a) 総産卵数



(b) 受精卵数



(c) 受精率



(d) 累積受精卵数

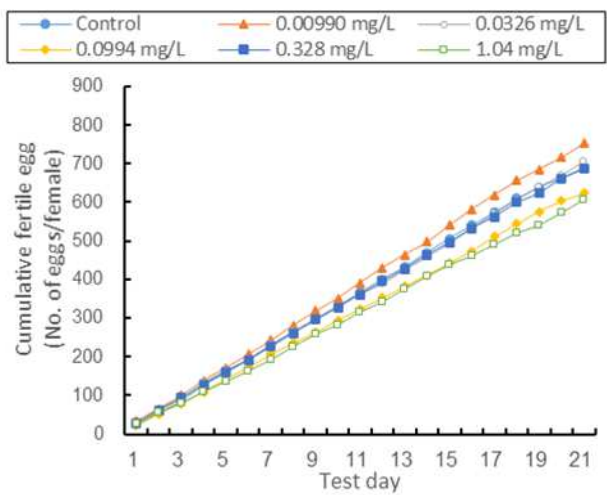


図 1-6 F0 世代の(a)総産卵数、(b)受精卵数、(c)受精率の日変動および(d)累積受精卵数 (値は各試験区の連平均値)

### 3) 全長・湿重量 (F0)

F0 世代の全長および湿重量の測定結果を表 1-7 および図 1-7(a)(b)に示す。

全長については、オスメスともにいずれの濃度区でも対照区と比較し有意差は認められなかった。

湿重量についても、オスメスともにいずれの濃度区でも対照区と比較し有意差は認められなかった。

表 1-7 F0 世代の全長および湿重量

測定濃度 (mg/L)	全長 (mm)				湿重量 (mg)			
	オス		メス		オス		メス	
Control	30.9	± 2.0	32.1	± 1.3	307	± 60	430	± 56
0.00990	32.7	± 2.2	33.0	± 1.0	349	± 74	458	± 35
0.0326	31.6	± 1.4	32.9	± 1.1	323	± 23	455	± 26
0.0994	31.2	± 1.0	33.2	± 0.6	307	± 34	484	± 29
0.328	31.3	± 1.8	32.7	± 1.4	316	± 71	460	± 59
1.04	30.4	± 0.9	31.7	± 1.3	289	± 42	413	± 40

注) 値は平均値±標準偏差 (対照区は n=12、濃度区は n=6) を示す。

### 4) 肝臓体指数および生殖腺体指数 (F0)

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 1-8 および図 1-7(c)(d)に示す。

肝臓体指数については、オスはいずれの濃度区でも対照区と比較し有意差は認められなかった。メスは 0.328 および 1.04 mg/L 濃度区で有意な差が認められた。

生殖腺体指数については、オスは全ての濃度区で対照区と比較し有意な差が認められた。メスは 1.04 mg/L 濃度区で有意な差が認められた。

表 1-8 F0 世代の肝臓体指数および生殖腺体指数

測定濃 (mg/L)	肝臓体指数 (%)				生殖腺体指数 (%)			
	オス		メス		オス		メス	
Control	2.4	± 0.8	7.9	± 1.4	0.9	± 0.3	11.4	± 1.5
0.00990	2.2	± 0.5	7.3	± 1.4	1.2	± 0.3 *	12.5	± 0.6
0.0326	2.6	± 0.6	6.9	± 0.8	1.2	± 0.3 *	10.9	± 0.8
0.0994	1.9	± 0.3	7.3	± 1.5	1.2	± 0.3 *	13.2	± 3.7
0.328	2.7	± 1.0	6.4	± 1.4 *	1.6	± 0.6 *	12.8	± 2.1
1.04	2.8	± 0.8	6.3	± 1.3 *	1.5	± 0.4 *	15.7	± 4.1 *

注) 値は平均値±標準偏差 (対照区は n=12、濃度区は n=6) を示す。\*は対照区と比較し統計学的な有意差があることを示す (p<0.05、Jonckheere-Terpstra 検定)。

### 5) 肝臓中ビテロジェニン濃度 (F0)

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 1-9 および図 1-7(e)に示す。オスはいずれの濃度区でも対照区と比較し有意な差が認められたが、濃度依存性は認められなかった。メスは 0.0326~1.04 mg/L 濃度区で対照区と比較し有意な差が認められた。

表 1-9 F0 世代の肝臓中ビテロジェニン濃度

測定濃度 (mg/L)	肝臓中ビテロジェニン濃度 (ng/mg liver)			
	オス		メス	
Control	< L.O.Q.		458 ± 183	
0.00990	20.6 ± 48.0	*a	568 ± 56	
0.0326	4.04 ± 3.95	*a	767 ± 307	*
0.0994	11.3 ± 17.9	*a	882 ± 602	*
0.328	26.2 ± 32.3	*a	1170 ± 1280	*
1.04	12.8 ± 14.6	*	708 ± 64	*

注) 値は平均値±標準偏差 (対照区は n=12、濃度区は n=6) を示す。「<L.O.Q.」は定量下限 (0.4 ng/mg) 未満であることを示す。\*は対照区と比較し統計学的な有意差があることを示す ( $p<0.05$ 、Jonckheere-Terpstra 検定)。a: 有意差が認められたが濃度依存性なし。

### 6) 二次性徴指標 (F0)

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 1-10 および図 1-7(f)に示す。オスは 1.04 mg/L 濃度区で対照区と比較し有意な差が認められた。メスは全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。

表 1-10 F0 世代の乳頭状小突起を有する節板数 (オス 1 個体あたり)

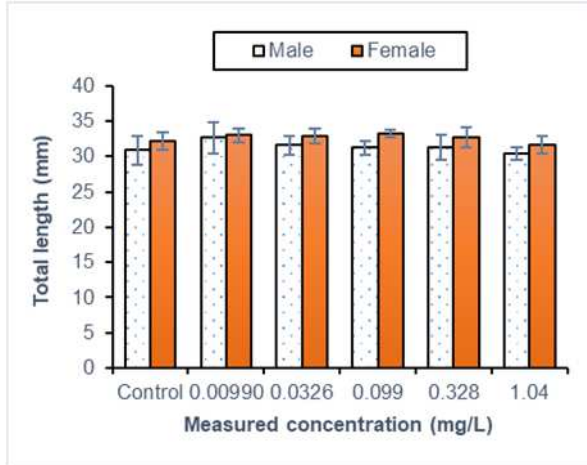
測定濃度 (mg/L)	乳頭状小突起を有する節板数 (Plates/fish)			
	オス		メス	
Control	74 ± 14		0 ± 0	
0.00990	69 ± 27		0 ± 0	
0.0326	76 ± 11		0 ± 0	
0.0994	72 ± 11		0 ± 0	
0.328	77 ± 14		0 ± 0	
1.04	55 ± 7	*	0 ± 0	

注) 値は平均値±標準偏差 (対照区は n=12、濃度区は n=6) を示す。\*は対照区と比較し統計学的な有意差があることを示す ( $p<0.05$ 、Jonckheere-Terpstra 検定)。

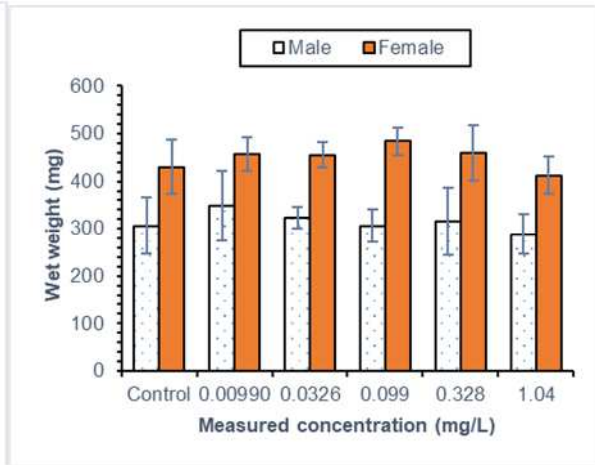
### 7) 表現型性別と生殖腺形態 (F0)

F0 世代における表現型の性別・生殖腺形態は明確かつ一致していた。

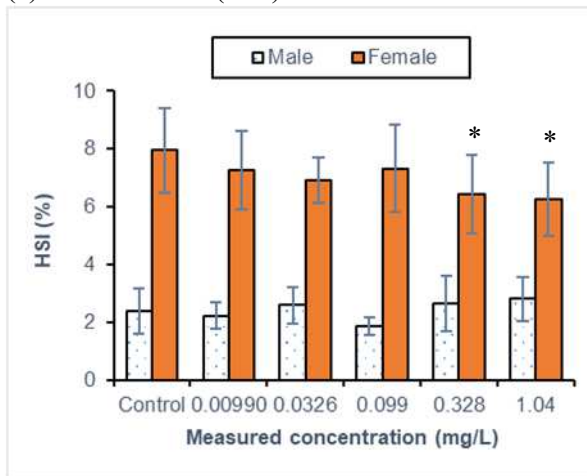
(a) 全長



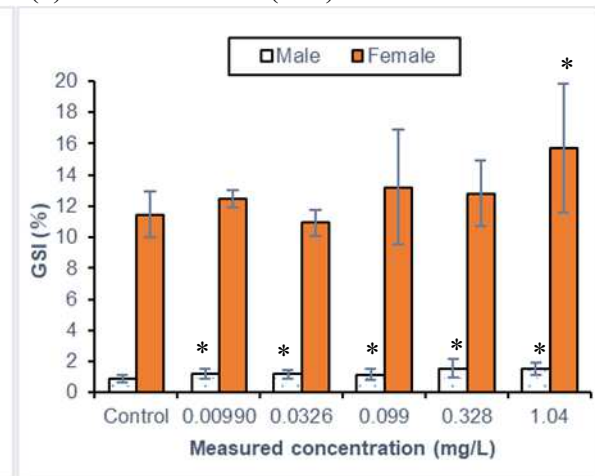
(b) 湿重量



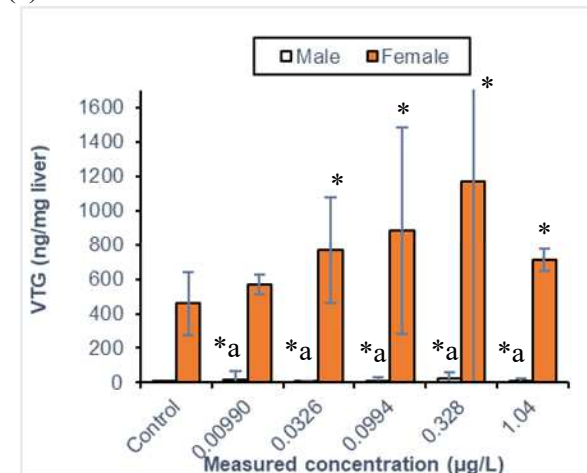
(c) 肝臓体指数 (HSI)



(d) 生殖腺体指数 (GSI)



(e) 肝臓中ピテロジェニン濃度



(f) 乳頭状小突起を有する節板数

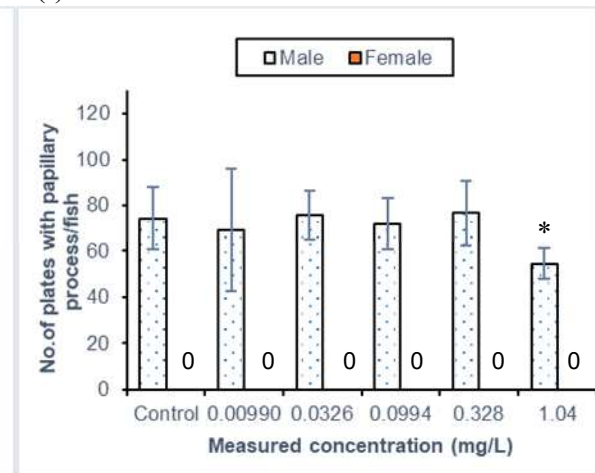


図 1-7 F0 世代の(a)全長、(b)湿重量、(c)肝臓体指数、(d)生殖腺体指数、  
(e)肝臓中ピテロジェニン濃度、(f)乳頭状小突起を有する節板数

注) 値は平均値±標準偏差 (対照区は n=12、濃度区は n=6) を示す。\*は対照区と比較し統計学的に有意差があることを示す ( $p < 0.05$ , Jonckheere-Terpstra 検定)。a: 有意差が認められたが濃度依存性なし。

## 2.2.4 F1 世代胚～仔魚期の結果

### 1) 孵化日数・孵化率 (F1 胚～仔魚期)

F1 世代胚・仔魚期の受精後 18 日目の孵化日数および孵化率を表 1-11 に、受精後 7 日目～12 日目における孵化個体数を図 1-8 に示す。対照区における孵化日の中央値が受精後 9 日目 (240 個体中 172 個体が孵化) であったことから (図 1-8)、その 2 倍である 18 日目において孵化日数および孵化率の計算を実施した。

孵化日数については、いずれの濃度区で対照区と比較し有意な差が認められたが、濃度依存性は認められなかった。

孵化率については、0.328 および 1.04 mg/L 濃度区で対照区と比較し有意な差が認められた。孵化率低下のほとんどは、胚の死亡によるものであった。

対照区の孵化率は 80% 以上であり、試験の有効性条件を満たした。

測定濃度 (mg/L)	孵化日数 (day)			孵化率 (%)		
	受精後 18 日目			受精後 18 日目		
Control	9.0	±	0.4	99	±	3
0.00990	7.9	±	0.2	*a	93	± 8
0.0326	8.0	±	0.1	*a	98	± 3
0.0994	7.9	±	0.1	*a	98	± 4
0.328	8.2	±	0.1	*a	89	± 6 *
1.04	7.8	±	0.2	*a	90	± 8 *

注) 値は平均値±標準偏差 (対照区は n=12、濃度区は n=6) を示す。\*は対照区と比較し統計学的な有意差があることを示す ( $p<0.05$ 、孵化日数は Mixed Effects Cox Models、孵化率は Jonckheere-Terpstra 検定)。

a: 有意差が認められたが濃度依存性なし。

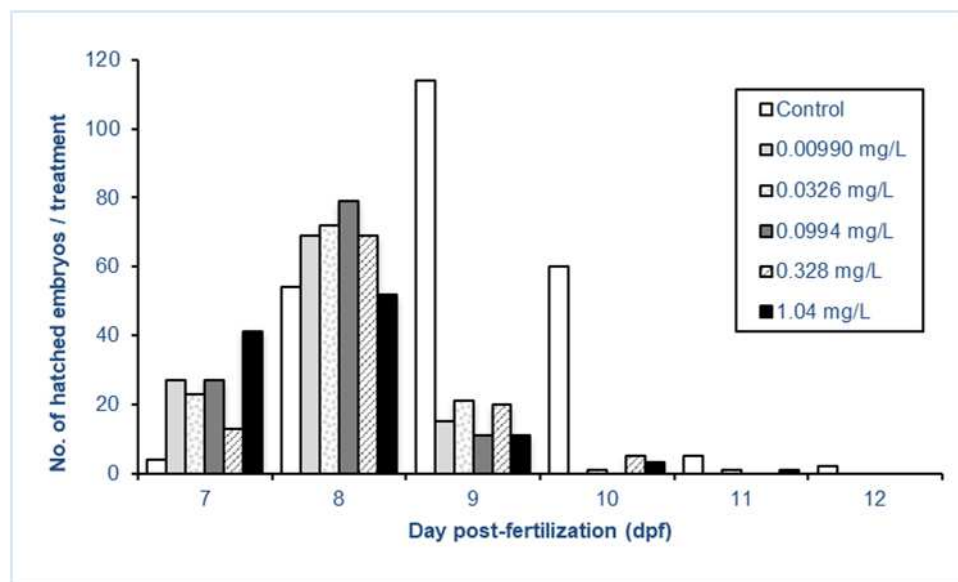


図 1-8 F1 の受精後 7～12 日目における孵化個体数 (各試験区の合計)

## 2.2.5 F1 世代亜成体の結果

### 1) 生存率 (F1 亜成体)

F1 世代の受精後 4 週目 (21 日目) および 8 週目 (55 日目、DMY 判定中) における生存率を表 1-12 に示す。

生存率については、いずれの濃度区でも対照区と比較し有意差は認められなかった。

対照区の受精後 21 日目までの孵化後の生存率は 80%以上であり、試験の有効性条件を満たした。

表 1-12 F1 世代亜成体 (受精後 4、8 週目) の生存率

測定濃度 (mg/L)	生存率 (%)			生存率 (%)		
	受精後 4 週目			受精後 8 週目		
Control	100	±	0	100	±	0
0.00990	100	±	0	97	±	4
0.0326	100	±	0	100	±	0
0.0994	100	±	0	100	±	0
0.328	99	±	3	100	±	0
1.04	100	±	0	100	±	0

注) 値は平均値±標準偏差 (対照区は n=12、濃度区は n=6) を示す。

### 2) 体長・湿重量 (F1 亜成体)

DMY 解析のための尾部切断により全長測定ができない個体があったため、全て体長を測定した。10 週齢 (66・67 日齢) の亜成体の体長および湿重量の測定結果を表 1-13 および図 1-9(a)(b)に示す。

体長については、オスは 0.00990~0.0994 mg/L 濃度区、メスは全濃度区で対照区と比較し有意差が認められたが、濃度依存性は見られなかった。いずれも対照区の成長がやや遅く、0.00990~0.0994 mg/L 濃度区の成長が早かったものとする。

湿重量については、オスは 0.00990~0.0994 mg/L 濃度区、メスは 0.00990~0.328 mg/L 濃度区で対照区と比較し有意差が認められたが、濃度依存性は見られなかった。

表 1-13 F1 世代亜成体の体長・湿重量

測定濃度 (mg/L)	体長 (mm)						湿重量 (mg)									
	オス			メス			オス			メス						
Control	19.5	±	1.6	20.2	±	1.3	150	±	35	183	±	40				
0.00990	22.6	±	1.0	*a	23.6	±	1.1	*a	227	±	28	*a	305	±	48	*a
0.0326	23.2	±	1.4	*a	24.3	±	1.0	*a	244	±	42	*a	349	±	47	*a
0.0994	21.8	±	1.3	*a	23.1	±	1.2	*a	199	±	36	*a	291	±	43	*a
0.328	20.7	±	1.1		21.8	±	1.0	*a	163	±	19		227	±	27	*a
1.04	20.7	±	1.1		21.6	±	1.2	*a	164	±	27		216	±	36	

注) 値は連平均値を元に算出した平均値±標準偏差 (対照区はオスメスともに n=12、濃度区オスは n=6、メスは n=6,6,5,6,6) を示す。\*は対照区と比較し統計学的な有意差があることを示す ( $p<0.05$ 、オスの体長は単調性および正規性が認められず等分散性のみ認められたため Dunn 検定、メスの体長およびオスメスの湿重量は単調性が認められず、正規性および等分散性が認められたため Dunnett 検定)。a: 有意差が認められたが濃度依存性なし。



### 3) 肝臓体指数および生殖腺体指数 (F1 亜成体)

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 1-14 および図 1-9(c)(d)に示す。対照区で 1 個体、1.04 mg/L 濃度区で 4 個体の生殖腺が見当たらなかったため、平均値の算出から除外した。

肝臓体指数については、オスは 0.0326 および 0.994 mg/L 濃度区、メスは 0.00990、0.0326 および 0.328 mg/L 濃度区で対照区と比較し有意差が認められたが、いずれも非単調性であり濃度依存性は見られなかった。

生殖腺体指数については、オスはいずれの濃度区でも対照区と比較し有意差は認められなかった。メスは全濃度区で有意な差が認められた。

表 1-14 F1 世代亜成体の肝臓体指数・生殖腺体指数

測定濃度 (mg/L)	肝臓体指数 (%)				生殖腺体指数 (%)			
	オス		メス		オス		メス	
Control	3.5	± 0.8	5.2	± 1.1	1.3	± 1.2	6.7	± 4.0
0.00990	3.1	± 0.8	5.8	± 0.8 * <sup>a</sup>	1.0	± 0.3	9.5	± 2.1 *
0.0326	2.6	± 0.6 * <sup>a</sup>	6.2	± 0.8 * <sup>a</sup>	0.95	± 0.3	10.3	± 1.6 *
0.0994	2.5	± 0.3 * <sup>a</sup>	5.6	± 0.7	1.1	± 0.3	10.7	± 1.9 *
0.328	3.1	± 0.5	6.2	± 0.7 * <sup>a</sup>	1.5	± 1.4	11.2	± 1.4 *
1.04	4.0	± 1.2	5.4	± 0.9	1.3	± 2.3	10.3	± 4.6 *

注) 値は連平均値をもとに算出した平均値±標準偏差 (対照区はオスメスともに n=12、濃度区オスは n=6、メスは n=6,6,5,6,6) を示す。\*は対照区と比較し統計学的な有意差があることを示す (p<0.05、オスの肝臓体指数は単調性および正規性が認められず等分散性のみ認められたため Dunn 検定、メスは単調性が認められず、正規性および等分散性が認められたため Dunnett 検定、オスメスの生殖腺体指数は Jonckheere-Terpstra 検定)。a : 有意差が認められたが濃度依存性なし。

### 4) 肝臓中ビテロジェニン濃度 (F1 亜成体)

ELISA による F1 世代亜成体の肝臓中ビテロジェニン濃度の測定結果を表 1-15 および図 1-9(e)に示す。オスは 0.328 および 1.04 mg/L 濃度区で、メスは 0.0326~1.04 μg/L 濃度区で有意な差が認められた。

表 1-15 F1 世代亜成体の肝臓中ビテロジェニン濃度

測定濃度 (mg/L)	肝臓中ビテロジェニン濃度 (ng/mg liver)			
	オス		メス	
Control	< L.O.Q.		1200	± 898
0.00990	0.69	± 0.58	1520	± 706
0.0326	0.91	± 3.53	1890	± 711 *
0.0994	0.48	± 0.19	1310	± 584 *
0.328	56.7	± 275 *	1740	± 361 *
1.04	58.9	± 190 *	1520	± 690 *

注) 値は連平均値を元に算出した平均値±標準偏差 (対照区はオスメスともに n=12、濃度区オスは n=6、メスは n=6,6,5,6,6) を示す。「< L.O.Q.」は定量下限 (0.4 ng/mg) 未満であることを示す。\*は対照区と比較し統計学的な有意差があることを示す (p<0.05、Jonckheere-Terpstra 検定)。

5) 二次性徴指標 (F1 亜成体)

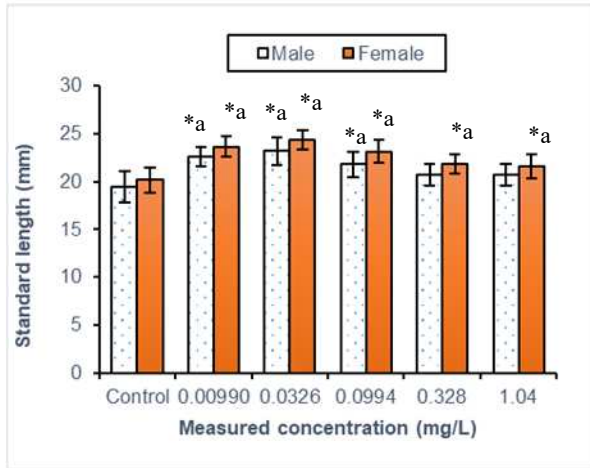
二次性徴の指標として、乳頭状小突起を有する節板数の計測の結果を表 1-16 および図 1-9(f)に示す。オスは全濃度区で対照区と比較して有意な差は認められなかったが、1.04 mg/L 濃度区では低値となった。メスは全濃度区で乳頭状小突起を有する個体は確認されなかった。

表 1-16 F1 世代亜成体の乳頭状小突起を有する節板数

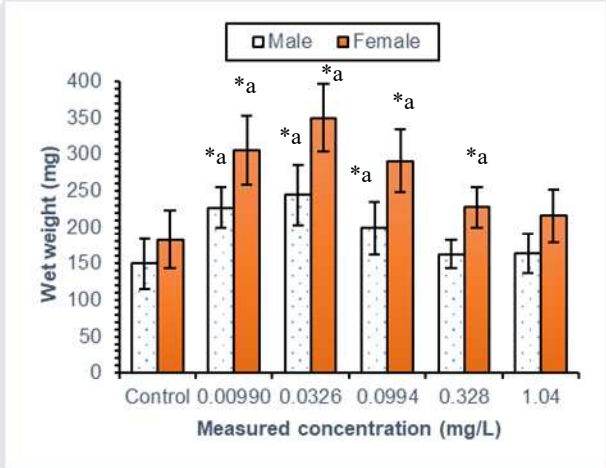
測定濃度 (mg/L)	乳頭状小突起を有する節板数(Plates/fish)					
	オス			メス		
Control	44	±	20	0	±	0
0.00990	51	±	8	0	±	0
0.0326	59	±	10	0	±	0
0.0994	58	±	12	0	±	0
0.328	61	±	17	0	±	0
1.04	17	±	17	0	±	0

注) 値は連平均値を元に算出した平均値±標準偏差(対照区はオスメスともに n=12、濃度区オスは n=6、メスは n=6,6,5,6,6) を示す。

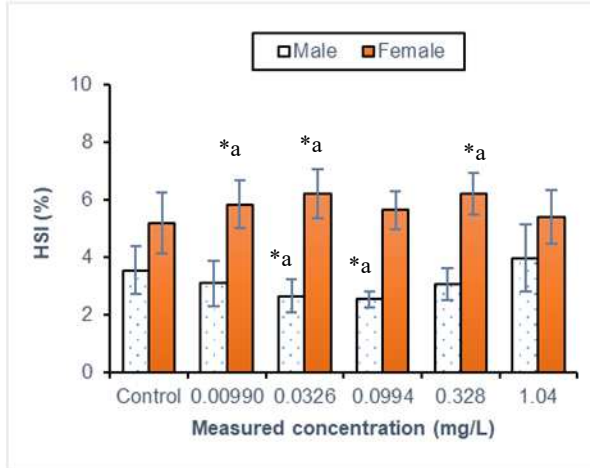
(a) 体長



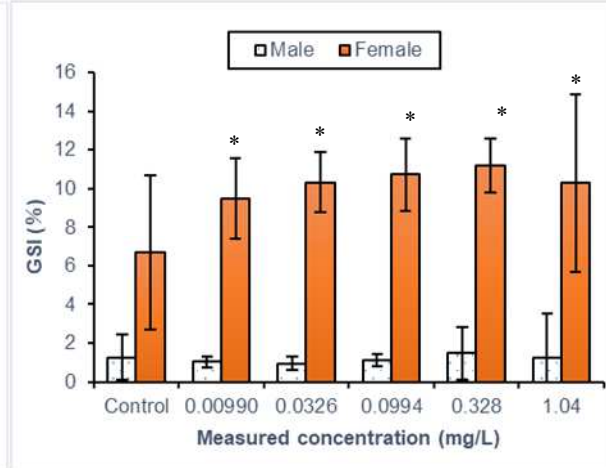
(b) 湿重量



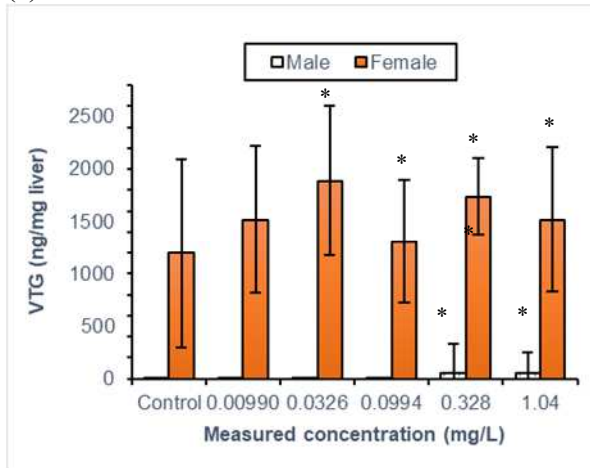
(c) 肝臓体指数 (HSI)



(d) 生殖腺体指数 (GSI)



(e) 肝臓中ビテロジェニン濃度



(f) 乳頭状小突起を有する節板数

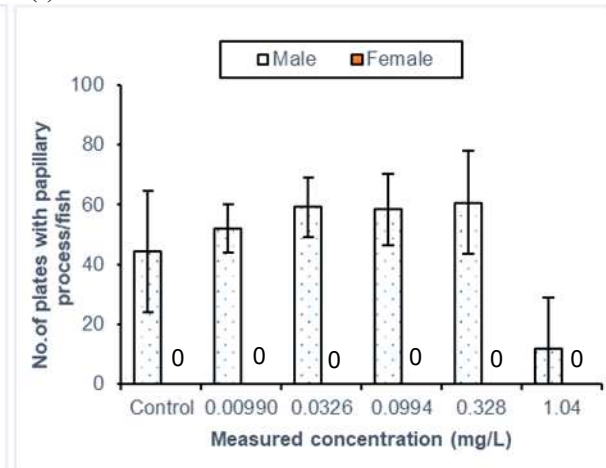


図 1-9 F1 世代亜成体の(a)体長、(b)湿重量、(c)肝臓体指数、(d)生殖腺体指数、(e)肝臓中ビテロジェニン濃度、(f)乳頭状小突起を有する節板数

注) 値は連平均値を元に算出した平均値±標準偏差 (対照区はオスメスともに n=12、濃度区オスは n=6、メスは n=6,6,5,6,6) を示す。\*は対照区と比較し統計学的な有意差があることを示す。ただし濃度依存性が認められない有意差は表記していない ( $p < 0.05$ 、オスの体長、肝臓体指数および乳頭状小突起は Dunn 検定、オスメスの湿重量、メスの体長および肝臓体指数は Dunnett 検定、オスメスの生殖腺体指数および肝臓中ビテロジェニン濃度は Jonckheere-Terpstra 検定)。a: 有意差が認められたが濃度依存性なし。

6) 表現型性別と生殖腺形態 (F1 亜成体)

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 1-17、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 1-18 に示す。

遺伝的にオスと判断した個体のうち、対照区、0.00990、0.328、1.04 mg/L 濃度区においてそれぞれ 2、1、1、9 個体を、尻ビレが小さく背ビレの切込みは無かった。生殖腺の形態観察では、対照区、0.328、1.04 mg/L 濃度区でそれぞれ 3、1、2 個体に卵巣が確認された。

遺伝的にメスと判断した個体では、対照区、0.0326、0.0994、1.04 mg/L 濃度区でそれぞれ 3、2、2、1 個体において尻びれが大きい、背びれの切れ込みあった。生殖腺形態は、対照区および 1.04 mg/L 濃度区でそれぞれ 4 および 3 個体に精巣が観察された。ほとんどの試験区において未成熟で表現型が不明瞭な個体や生殖腺が不明な個体が散見された。

表 1-17 F1 世代亜成体遺伝的オス個体の表現型性別・生殖腺形態

測定濃度 (mg/L)	n	表現型オス		生殖腺形態		
		+	-	精巣	不明	卵巣
Control	48	44	4	43	2	3
0.00990	20	19	1	20	0	0
0.0326	26	26	0	26	0	0
0.0994	27	27	0	27	0	0
0.328	24	23	1	23	0	1
1.04	23	10	13	17	4	2

表 1-18 F1 世代亜成体遺伝的メス個体の表現型性別・生殖腺形態

測定濃度 (mg/L)	n	表現型オス		生殖腺形態		
		+	-	精巣	不明	卵巣
Control	48	3	45	4	2	42
0.00990	26	0	26	0	0	26
0.0326	22	2	20	0	0	22
0.0994	21	2	19	0	0	21
0.328	22	0	22	0	0	22
1.04	25	1	24	3	0	22

## 2.2.6 F1 世代成熟個体の結果

### 1) ペアリング後の死亡および行動・外観の異常 (F1)

F1 世代ペアリング後の死亡個体数を表 1-19 に示す。

対照区では死亡は見られず、行動・外観の異常は認められなかった。0.00990 mg/L 濃度区では水槽清掃時の操作ミスによりメス 1 尾が死亡したため、供試数を 11 尾とした。また、暴露期間中にメス 1 尾の死亡が見られた。0.0326~0.328 mg/L 濃度区では死亡は見られなかった。1.04 mg/L 濃度区ではメス同士の水槽が 3 水槽あったため供試数を 9 尾として計数、また、メス 3 尾の死亡が見られた。0.0994~1.04 mg/L 濃度区では、メス 1 尾、3 尾、4 尾に腹部肥大が見られた。死亡率については、オスは対照区と比較して有意差は認められなかったが、メスは 1.04 mg/L 濃度区で有意な差が認められた。

表 1-19 F1 世代ペアリング後の死亡個体数

測定濃度 (mg/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
0.00990	12	0	0	11	1	9	4
0.0326	12	0	0	12	0	0	0
0.0994	12	0	0	12	0	0	0
0.328	12	0	0	12	0	0	0
1.04	9	0	0	9	3	23 *	13

\*は対照区と比較し統計学的な有意差があることを示す ( $p < 0.05$ , Cochran 検定)。

### 2) 総産卵数・受精卵数・受精率 (F1)

F1 世代受精後 12~14 週目の 21 日間および各週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・受精率を表 1-20 に、21 日間平均を図 1-10 に、21 日間の日変動および累積受精卵数/ペアを図 1-11 に示す。

総産卵数、受精卵数および受精率については、いずれも 1.04 mg/L 濃度区で対照区と比較して有意な差が認められた。

対照区の総産卵数の平均値および各 24 ペアの総産卵数はすべて 20 個/ペア/日以上、21 日間で算出された計 14646 個 の卵の受精率は 91%であり、試験の有効性条件を満たした。

表 1-20 F1 世代の総産卵数・受精卵数・受精率

測定濃度 (mg/L)	総産卵数 (eggs/pair/day)							
	21 日間		1 週目(DAY1-7)		2 週目(DAY8-14)		3 週目(DAY15-21)	
Control	29.1	± 5.0	25.9	± 4.7	29.9	± 5.4	31.4	± 5.5
0.00990	35.0	± 6.1	33.4	± 4.8	36.8	± 6.6	36.6	± 6.9
0.0326	41.8	± 5.3	39.2	± 6.4	43.9	± 5.4	42.2	± 5.3
0.0994	35.2	± 3.0	32.3	± 3.6	37.5	± 3.6	35.8	± 5.2
0.328	30.0	± 2.2	27.2	± 4.6	31.9	± 5.4	30.8	± 4.2
1.04	15.6	± 8.2 *	16.7	± 6.2	15.4	± 8.9	18.6	± 10.2 *

測定濃度 (mg/L)	受精卵数 (eggs/day/female)							
	21 日間		1 週目(DAY1-7)		2 週目(DAY8-14)		3 週目(DAY15-21)	
Control	26.6	± 7.2	24.0	± 6.9	27.1	± 7.6	28.8	± 7.9
0.00990	33.9	± 5.8	32.3	± 4.5	35.7	± 6.6	35.4	± 6.6
0.0326	40.5	± 5.2	37.1	± 7.6	43.0	± 5.0	41.5	± 5.2
0.0994	32.7	± 3.8	30.1	± 3.8	35.4	± 4.6	32.5	± 8.9
0.328	28.0	± 2.2	24.7	± 6.3	29.2	± 5.9	29.9	± 4.4
1.04	6.9	± 8.6 *	6.2	± 7.2 *	6.3	± 8.6	10.7	± 12.0

測定濃度 (mg/L)	受精率 (%)							
	21 日間		1 週目(DAY1-7)		2 週目(DAY8-14)		3 週目(DAY15-21)	
Control	91.4	± 19.0	92.2	± 19.1	90.7	± 19.2	91.3	± 20.4
0.00990	97.0	± 3.5	96.7	± 5.3	97.1	± 3.3	97.1	± 3.0
0.0326	96.9	± 3.8	94.1	± 9.8	98.1	± 1.8	98.5	± 1.3
0.0994	93.4	± 5.6	94.1	± 3.9	95.3	± 5.2	89.2	± 21.0
0.328	93.6	± 4.2	90.4	± 12.7	92.7	± 7.9	97.2	± 3.3
1.04	28.6	± 36.9 *	28.3	± 33.6 *	28.2	± 38.1 *	40.6	± 45.2 *

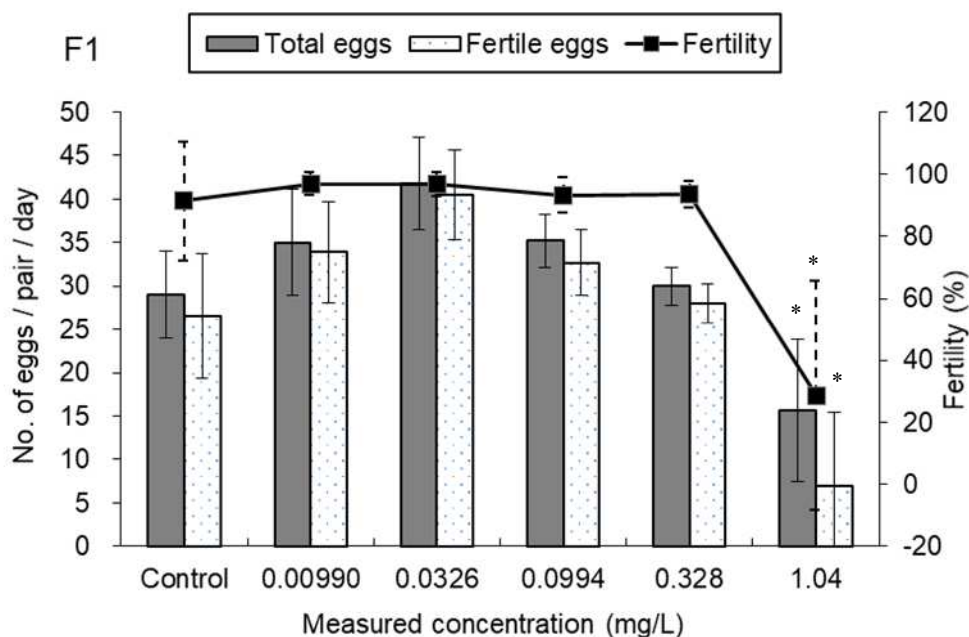
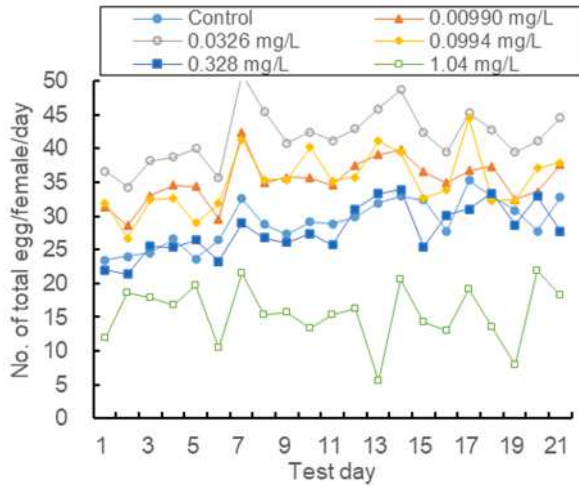


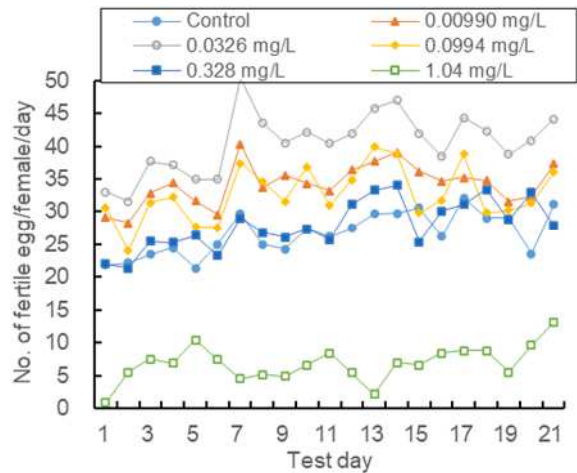
図 1-10 F1 世代の総産卵数・受精卵数・受精率 (各ペア・1 日当たり)

注) 値は平均値±標準偏差 (対照区～濃度区はメス同士だった水槽および死亡魚を除きそれぞれ n=24、11、12、12、12、9、ただし途中で死亡が見られたため 3 週目はそれぞれ n=24、10、12、12、12、9) を示す。\*は対照区と比較し統計学的な有意差があることを示す ( $p < 0.05$ , Jonckheere-Terpstra 検定)。

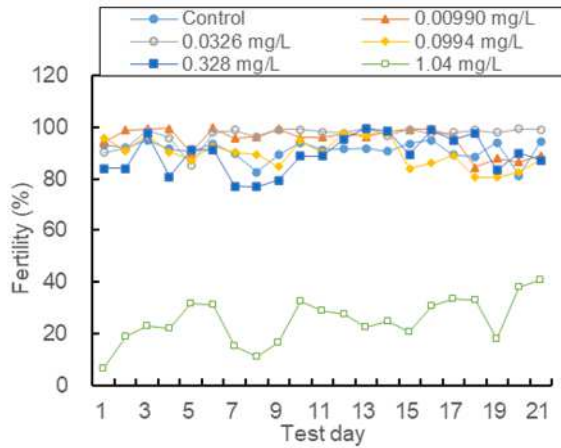
(a) 総産卵数



(b) 受精卵数



(c) 受精率



(d) 累積受精卵数

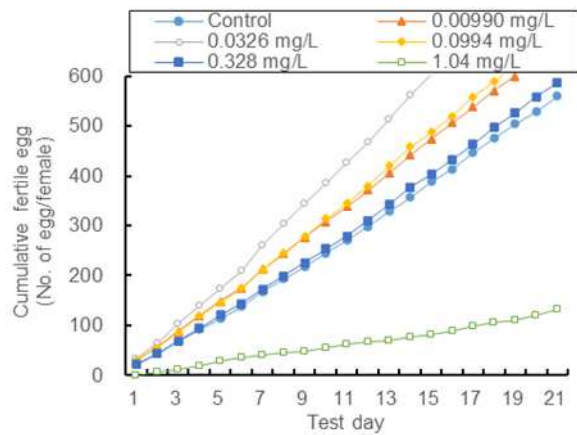


図 1-11 F1 世代の(a)総産卵数、(b)受精卵数、(c)受精率の日変動および(d)累積受精卵数 (値は各試験区の連平均値)

### 3) 体長・湿重量 (F1 成熟個体)

F1 世代成熟個体の体長および湿重量の測定結果を表 1-21、図 1-12(a)(b)に示す。

体長については、オスはいずれの濃度区でも対照区と比較し有意な差が認められ、メスは低濃度区側 (0.00990~0.0994 mg/L 濃度区) で有意な差が認められたが、いずれも対照区の成長がやや遅く、濃度区は非単調な増加であり、最高濃度区を NOEC とした。

湿重量については、オスは 0.00990~0.0994、1.04 mg/L 濃度区で対照区と比較し有意な差が認められ、メスは低濃度区側 (0.00990~0.0994 mg/L 濃度区) で有意な差が認められたが、濃度依存性は見られなかった。

表 1-21 F1 世代成熟個体の体長および湿重量

測定濃度 (mg/L)	体長 (mm)						湿重量 (mg)									
	オス			メス			オス			メス						
Control	23.5	±	1.5	25.3	±	1.4	236	±	48	353	±	53				
0.00990	27.1	±	1.1	*a	27.1	±	1.5	*a	344	±	28	*a	454	±	58	*a
0.0326	27.5	±	1.3	*a	28.3	±	1.2	*a	358	±	33	*a	494	±	68	*a
0.0994	26.1	±	1.2	*a	27.3	±	1.2	*a	301	±	37	*a	428	±	50	*a
0.328	24.7	±	1.1	*a	25.5	±	0.9		254	±	43		364	±	47	
1.04	25.7	±	1.7	*a	25.3	±	1.6		284	±	62	*a	405	±	97	

注) 値は平均値±標準偏差 (対照区体長は n=24、湿重量はオスメス各 1 尾ずつ人為的ミスによりデータ欠損につき n=23、濃度区は、メス同士だった水槽および死亡魚を除きそれぞれ、オスは n=12、12、12、12、10、メスは n=10、12、12、12、9) を示す。\*は対照区と比較し統計学的な有意差があることを示す (p<0.05、単調性が認められず、正規性および等分散性が認められたため Dunnett 検定)。a: 有意差が認められたが濃度依存性なし。

### 4) 肝臓体指数および生殖腺体指数 (F1 成熟個体)

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 1-22、図 1-12(c)(d)に示す。

肝臓体指数については、オスはいずれの濃度区でも対照区と比較し有意差は認められなかった。メスはいずれの濃度区でも対照区と比較し有意な差が認められた。

生殖腺体指数については、オスは 0.328 および 1.04 mg/L 濃度区で、メスは 1.04 mg/L 濃度区で対照区と比較して有意な差が認められた。

表 1-22 F1 世代成熟個体の肝臓体指数および生殖腺体指数

測定濃度 (mg/L)	肝臓体指数 (%)						生殖腺体指数 (%)								
	オス			メス			オス			メス					
Control	2.5	±	0.5	7.2	±	0.9	1.5	±	0.4	14.9	±	2.2			
0.00990	1.9	±	0.4	6.4	±	1.1	*	1.2	±	0.3	13.6	±	1.2		
0.0326	1.7	±	0.3	6.7	±	0.6	*	1.6	±	0.4	14.1	±	0.6		
0.0994	1.8	±	0.3	5.7	±	0.8	*	1.8	±	0.5	16.6	±	5.7		
0.328	2.2	±	0.6	6.4	±	1.2	*	1.9	±	0.4	*	15.2	±	1.4	
1.04	3.2	±	1.0	5.4	±	1.2	*	3.6	±	4.6	*	24.5	±	7.6	*

注) 値は平均値±標準偏差 (対照区オスメス各 1 尾ずつ人為的ミスによりデータ欠損につき、n=23、濃度区は、メス同士だった水槽および死亡魚を除きそれぞれ、オスは n=12、12、12、12、10、メスは n=10、12、12、12、11) を示す。\*は対照区と比較し統計学的な有意差があることを示す (p<0.05、Jonckheere-Terpstra 検定)。



5) 肝臓中ビテロジェニン濃度 (F1 成熟個体)

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 1-23、図 1-12(e)に示す。オスは 0.0994~1.04 mg/L 濃度区で、メスは 0.0326~1.04 mg/L 濃度区で対照区と比較して有意な差が認められた。

表 1-23 F1 世代成熟個体の肝臓中ビテロジェニン濃度

測定濃度 (mg/L)	肝臓中ビテロジェニン濃度 (ng/mg liver)				
	オス		メス		
Control	< L.O.Q.		1040	±	359
0.00990	0.48	± 0.54	1145	±	321
0.0326	< L.O.Q.		1309	±	240 *
0.0994	< L.O.Q.	*	1763	±	582 *
0.328	< L.O.Q.	*	1572	±	373 *
1.04	1.98	± 1.73 *	1674	±	733 *

注) 値は平均値±標準偏差 (対照区~濃度区は、同一性同士だった水槽および死亡魚を除きそれぞれ、オスは n=20、12、11、9、10、11、メスは n=20、12、10、10、11、11) を示す。「<L.O.Q.」は定量下限 (0.4 ng/mg) 未満であることを示す。\*は対照区と比較し統計学的な有意差があることを示す (p<0.05、Jonckheere-Terpstra 検定)。a : 有意差が認められたが濃度依存性なし。

6) 二次性徴指標 (F1 成熟個体)

二次性徴を指標として、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 1-24、図 1-12(f)に示す。オスは 1.04 mg/L 濃度区で対照区と比較して有意な差が認められた。メスは全濃度区で乳頭状小突起を有する個体は観察されなかった。

表 1-24 F1 世代成熟個体の乳頭状小突起を有する節板数

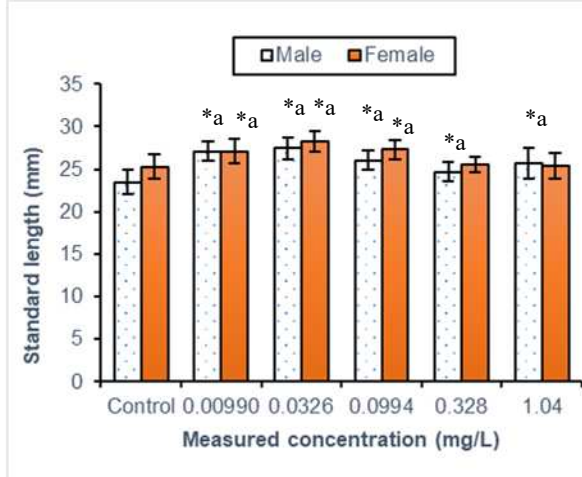
測定濃度 (mg/L)	乳頭状小突起を有する節板数(Plates/fish)					
	オス			メス		
Control	61	±	10	0	±	0
0.00990	67	±	8	0	±	0
0.0326	67	±	10	0	±	0
0.0994	62	±	9	0	±	0
0.328	67	±	15	0	±	0
1.04	30	±	24 *	0	±	0

注) 値は平均値±標準偏差 (対照区~濃度区は、同一性同士だった水槽および死亡魚を除きそれぞれ、オスは n=24、12、12、12、12、10、メスは n=24、10、12、12、12、11) を示す。

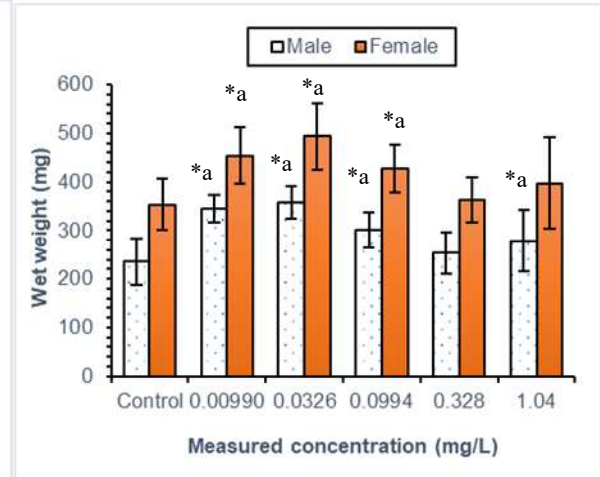
7) 表現型性別と生殖腺形態 (F1 成熟個体)

F1 世代成熟個体における表現型の性別・生殖腺形態は、対照区および 0.00990~0.328 mg/L 濃度区では明確かつ一致していた。1.04 mg/L 濃度区でメス 2 尾が表現型はオスであると判断した。

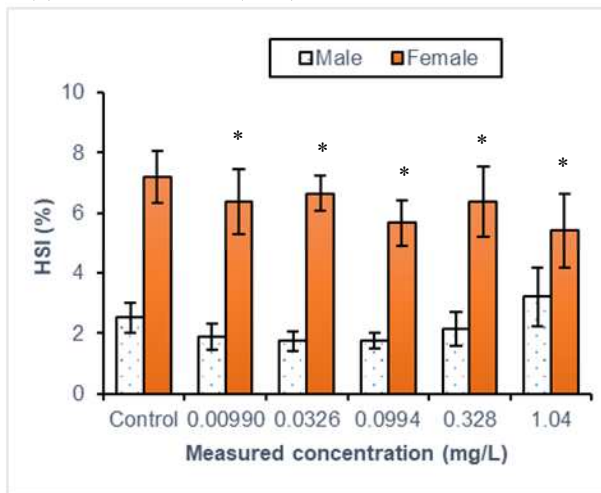
(a) 体長



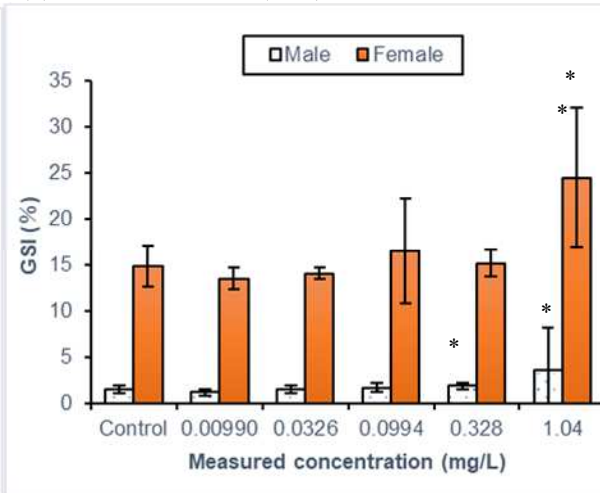
(b) 湿重量



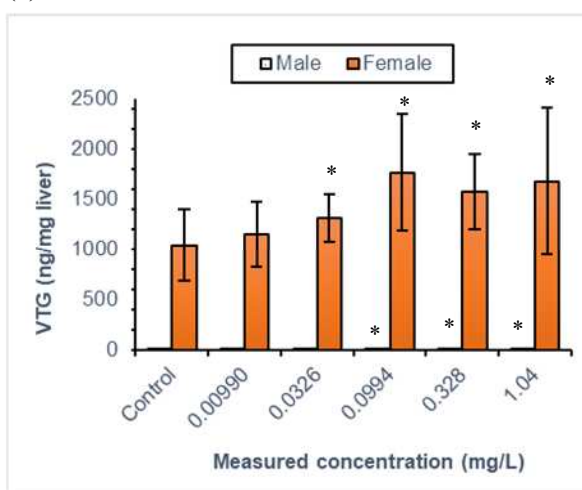
(c) 肝臓体指数 (HSI)



(d) 生殖腺体指数 (GSI)



(e) 肝臓中ビテロジェニン濃度



(f) 乳頭状小突起を有する節板数

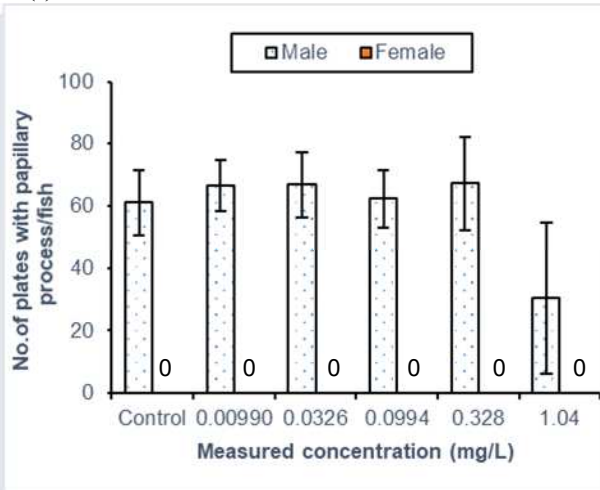


図 1-12 F1 世代成熟個体の(a)体長、(b)湿重量、(c)肝臓体指数、(d)生殖腺体指数、  
(e)肝臓中ビテロジェニン、(f)乳頭状小突起を有する節板数

注) 値は平均値±標準偏差(対照区～濃度区は、同一性同士だった水槽および死亡魚を除きそれぞれ、オスは n=20、12、11、9、10、11、メスは n=20、12、10、10、11、11) を示す。\*は対照区と比較し統計学的な有意差があることを示す。ただし、濃度依存性が認められない有意差は表記していない ( $p < 0.05$ , Jonckheere-Terpstra 検定、ただし体長および湿重量は Dunnett 検定)。a: 有意差が認められたが濃度依存性なし。

## 2.2.7 F2 世代の結果

### 1) 胚・仔魚期の孵化率・孵化日数・孵化後生存率・生存率 (F2 世代)

F2 世代胚・仔魚期の受精後 14 日目の孵化日数および孵化率を表 1-25 に、受精後 7~14 日目における孵化個体数を図 1-13 に示す。

対照区における孵化日の中央値が受精後 10 日目 (240 個体中 192 個体が孵化) となり (図 1-13)、その 2 倍である 20 日目より短い 14 日で全試験区の孵化が確認できたため、14 日目の孵化日数および孵化率の計算を実施した。

孵化日数については、全ての濃度区で対照区と比較し有意差が認められたが、濃度依存性は認められなかった。

孵化率については、1.04 mg/L 濃度区で対照区と比較して有意な差が認められた。

対照区の孵化率は 80%以上であり、試験の有効性条件を満たした。

表 1-25 F2 世代胚・仔魚期の孵化日数・孵化率

測定濃度 (mg/L)	孵化日数 (day)			孵化率 (%)		
	受精後 14 日目			受精後 14 日目		
Control	9.8	±	0.3	95	±	6
0.00990	8.6	±	0.2	*a	98	± 3
0.0326	8.5	±	0.3	*a	98	± 4
0.0994	8.4	±	0.2	*a	93	± 5
0.328	9.0	±	0.2	*a	93	± 5
1.04	9.7	±	0.3	*a	77	± 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、濃度区は n=6) を示した。\*は対照区と比較し統計学的な有意差があることを示す ( $p<0.05$ 、孵化日数は Mixed Effects Cox Models、孵化率は Jonckheere-Terpstra 検定)。a: 有意差が認められたが濃度依存性なし。

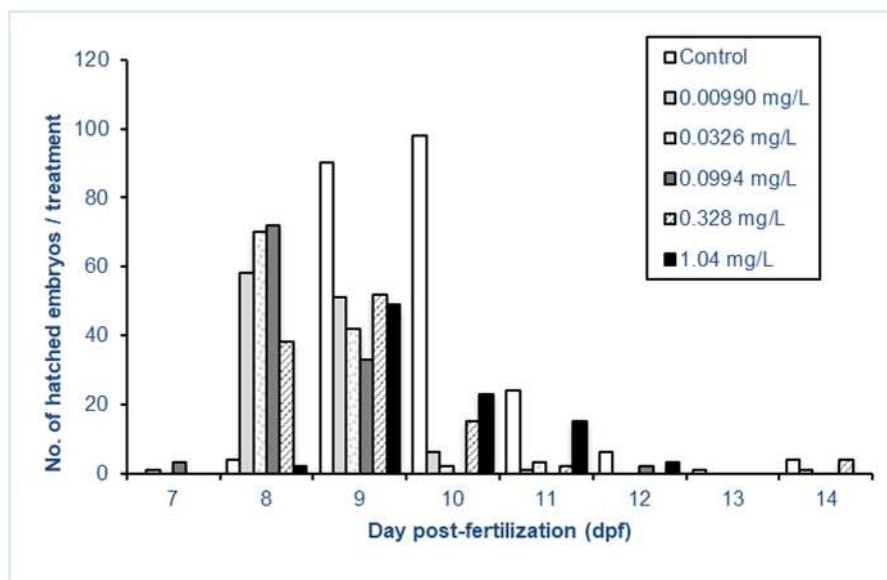


図 1-13 F2 の受精後 7~14 日目における孵化個体数 (各試験区の合計)

## 2.3 結果の概要

試験の有効性の条件をすべて満たしたため、本試験は有効であると判断した。  
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（18 週齢）の結果

#### 1) 繁殖に関する指標（総産卵数・受精卵数・受精率）

総産卵数および受精卵数：全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。  
受精率：最高濃度区（1.04 mg/L）において対照区と比較し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）

オスは最高濃度区（1.04 mg/L）において対照区と比較し有意な減少が認められた。  
メスは全ての試験区で乳頭状小突起を有する個体は観察されなかった。

#### 3) 肝臓中ビテロジェニン濃度

オスは全ての濃度区において対照区と比較し有意な増加が認められた。  
メスは 0.0326～1.04 mg/L 濃度区において対照区と比較し有意な増加が認められた。

#### 4) 表現型性別および生殖腺形態

全ての濃度区において、表現型性別および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：全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。

湿重量：全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。

肝臓体指数：オスは全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。メスは 0.328 および 1.04 mg/L 濃度区において対照区と比較し濃度依存的に有意な低下が認められた。

生殖腺指数：オスは全ての濃度区、メスは 1.04 mg/L 濃度区において対照区と比べて濃度依存的に有意な上昇が認められた。

### (2) F1 世代胚～仔魚期の結果

#### 1) 胚期孵化日数・孵化率

孵化日数：全ての濃度区において対照区と比較し有意な差（孵化日数が短い）が認められた。

孵化率：0.328 および 1.04 mg/L 濃度区において対照区と比較して有意な低下が認められた。孵化率低下のほとんどは、胚の死亡によるものであった。

### (3) F1 世代亜成体の結果

#### 1) 生存率（受精後 4 週目および 8 週目）

全ての濃度区において対照区と比べて有意な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）

オスは全ての濃度区において対照区と比較して有意差は認められなかったが、1.04 mg/L 濃度区では減少傾向が見られた。

メスは全ての試験区において乳頭状小突起を有する個体は観察されなかった。

#### 3) 肝臓中ビテロジェニン濃度

オスは 0.328 および 1.04 mg/L 濃度区において、メスは 0.0326～1.04 mg/L 濃度区において、対照区と比較して有意な増加が認められた。

#### 4) 表現型性別および生殖腺形態

オスは対照区で4個体、0.00990、0.328、1.04 mg/L 濃度区でそれぞれ1、1、13個体が表現型性別や生殖腺形態と遺伝的性別が一致しなかったまたは不明であった。メスは対照区で5個体、0.328、1.04 mg/L 濃度区でそれぞれ1、6個体が表現型性別や生殖腺形態と遺伝的性別が一致しなかったまたは不明であった。それらはいずれも体長および湿重量も小さい個体だったため、未成熟個体であった可能性があった。

#### 5) その他の指標

体長：オスは0.00990～0.0994 mg/L 濃度区において、メスは全ての濃度区において、対照区と比較して有意な増加が認められたが、濃度依存性は認められず被験物質の影響ではないと考えられた。

湿重量：オスは0.00990～0.0994 mg/L 濃度区において、メスは0.00990～0.328 mg/L 濃度区において、対照区と比較して有意な増加が認められたが、濃度依存は認められず被験物質の影響ではないと考えられた。

F1世代亜成体では、体長および湿重量の値が全試験区の中で対照区が最も小さく、第2濃度区である0.0326 mg/L 濃度区が最も大きく濃度依存的では無かった。試験区ごとに成熟度にずれが生じていた可能性が考えられた。

肝臓体指数：オスは0.0326 および0.0994 mg/L 濃度区において対照区と比較して有意な低下が認められ、メスは0.00990、0.0326 および0.328 mg/L 濃度区において対照区と比較して有意な増加が認められた。いずれも濃度依存は認められず被験物質の影響ではないと考えられた。

生殖腺指数：オスは全濃度区において対照区と比較して有意差は認められなかった。メスは全濃度区において対照区と比較して有意な上昇が認められた。

#### (4) F1世代成熟個体（15週齢）の結果

##### 1) 生存率

オスは対照区および濃度区ともに死亡は見られなかった。メスは1.04 mg/L 濃度区において対照区と比較して有意差が認められた。

##### 2) 繁殖に関する指標（総産卵数・受精卵数・受精率）

総産卵数および受精卵数：最高濃度区（1.04 mg/L）において、対照区と比較して有意な減少が認められた。

受精率：最高濃度区（1.04 mg/L）において、対照区と比較し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）

オスは最高濃度区（1.04 mg/L）において対照区と比較して有意な減少が認められた。

メスは全ての試験区において乳頭状小突起を有する個体は観察されなかった。

##### 4) 肝臓中ビテロジェニン濃度

オスは0.0994～1.04 mg/L 濃度区において、メスは0.0326～1.04 mg/L 濃度区において、対照区と比較して濃度依存的に有意な増加が認められた。

##### 5) 表現型性別および生殖腺形態

対照区および0.00990～0.328 mg/L 濃度区においては表現型性別および生殖腺形態は明確かつ一致していたが、1.04 mg/L 濃度区でメス2個体が表現型はオスであると判断した。

#### 6) その他の指標

体長：オスは全濃度区において、メスは 0.00990～0.0994 mg/L 濃度区において、対照区と比較し有意な増加が認められた。いずれも濃度依存は認められず被験物質の影響ではないと考えられた。

湿重量：オスは 0.00990～0.0994 および 1.04 mg/L 濃度区において、メスは 0.00990～0.0994mg/L 濃度区において、対照区と比較して有意な増加が認められた。いずれも濃度依存は認められず被験物質の影響ではないと考えられた。

肝臓体指数：オスは全ての濃度区において対照区と比較して有意差は認められなかった。メスは全ての濃度区において対照区比較して有意な低下が認められた。

生殖腺指数：オスは 0.328 および 1.04 mg/L 濃度区において、メスは 1.04 mg/L 濃度区において、対照区と比較して濃度依存的に有意な上昇が認められた。

#### (5) F2 世代胚・仔魚期の結果

孵化後日数：全ての濃度区において対照区と比較して有意な差（孵化日数が短い）が認められた。

孵化率：1.04 mg/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。

## 2.4 考察

MEOGRT 試験 (OECD TG240) を用いてプロピルパラベンの多世代影響について検討した。本試験の各世代および各エンドポイントの LOEC 一覧を表 1-26 に示す。

本試験において、F0 から F1 成体までの全長および湿重量に対照区との濃度依存的な有意な差は認められなかった。プロピルパラベンが繁殖に与える影響については、1.04 mg/L 濃度区で F0 世代では受精率が、F1 世代で総産卵数、受精卵数および受精率が対照区に対して有意に低下した。また、F1 世代の 1.04 mg/L 濃度区において成体の死亡が観察された。

F0 および F1 世代のメスの肝臓中のビテロジェニン濃度は 0.0326 mg/L 濃度区以上で対照区との有意な増加が認められ、F1 世代のオスにおいても増加傾向を示した。また、F0 から F1 世代のメスの生殖腺体指数も濃度依存的に増加、F1 世代のオス成熟個体においても増加した。一方、F0 および F1 世代のオスの乳頭状小突起を有する節板数は 1.04 mg/L 濃度区で減少した (F0 および F1 成熟個体は有意に減少した)。さらに 1.04 mg/L 濃度区において遺伝的オス個体からビテロジェニン高値の卵巣を有したメス個体が観察された。

これまでの研究において、プロピルパラベンはエストロゲン作用を有することが報告されており、環境省の第一段階生物試験 (OECD TG229) においても同様に報告されている

<sup>3)</sup>。Bjerregaard ら (2003) は、プロピルパラベンの幼若ニジマス (*Oncorhynchus mykiss*) への 12 日間ばく露試験において 250  $\mu$ g/L のばく露区で、10 日間 (隔日) 経口投与した試験において 33 mg/kg/day 以上のばく露群で、それぞれ血漿中ビテロゲニン濃度の高値を報告している <sup>6)</sup>。Pedersen ら (2000) も幼若ニジマス (*Oncorhynchus mykiss*) への腹腔内投与試験において、同様の血漿中ビテロゲニン濃度の高値を報告している <sup>7)</sup>。Inui ら (2003) は、7 日間の成熟雄メダカ (*Oryzias latipes*) へのばく露試験において 55  $\mu$ M (=9,900  $\mu$ g/L) 以上のばく露区での肝臓中ビテロゲニン等のエストロゲン作用に関連する RNA 相対発現量の高値を報告している <sup>8)</sup>。また、Oishi (2002) によって、プロピルパラベンの雄 Wistar ラットへの混餌投与ばく露 (4 週間) により、精巣中精子数の低値、精巣上体尾中精子数の低値、体重、血清中テストステロン濃度の低値が報告されており、視床下部-下垂体-生殖腺軸への作用の可能性が論じられている <sup>9)</sup>。本試験においても、プロピルパラベンの肝臓中ビテロジェニン濃度に対する影響、生殖腺体指数の濃度依存的増加、オスの二次性徴指標減少および繁殖影響が確認され、特徴的な継世代影響は認められなかったものの、メダカに対するエストロゲン作用を有することが示された。

表 1-26 プロピルパラベンの 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	wpcf	Endpoint		LOEC (mg/L)		
				F0	F1	F2
Embryo	2wpcf	孵化率			↓ 0.328	↓ 1.04
		孵化日数			↓ (0.00990)	↓ 0.00990
Larva	4wpcf	生存率			>1.04	
Sub-Adult	8wpcf	生存率			>1.04	
		体長	♂		>1.04	
	♀			>1.04		
	湿重量	♂		>1.04		
		♀		>1.04		
	肝臓体指数	♂		>1.04		
		♀		>1.04		
	10wpcf	生殖腺体指数	♂		>1.04	
			♀		↑ 0.00990	
	肝臓中ビテロジェニン濃度	♂		↑ 0.328		
♀			↑ (0.0326)			
二次性徴 (乳頭状小突起を有する節板数)	♂		>1.04			
	♀		-			
間性又は性転換の発生			>1.04			
Adult	12~15wpcf	生存率	♂	>1.04	>1.04	
			♀	>1.04	↓ 1.04	
		産卵数		>1.04	↓ 1.04	
		受精卵数		>1.04	↓ 1.04	
	受精率		↓ 1.04	↓ 1.04		
	15wpcf	全長または体長	♂	>1.04	>1.04	
			♀	>1.04	>1.04	
		湿重量	♂	>1.04	>1.04	
			♀	>1.04	>1.04	
		肝臓体指数	♂	>1.04	>1.04	
			♀	↓ 0.328	↓ 0.00990	
		生殖腺体指数	♂	↑ 0.00990	↑ 0.328	
			♀	↑ 1.04	↑ 1.04	
		肝臓中ビテロジェニン濃度	♂	↑ (0.00990)	↑ (0.0994)	
♀			↑ 0.0326	↑ 0.0326		
二次性徴 (乳頭状小突起を有する節板数)	♂	↓ 1.04	↓ 1.04			
	♀	-	-			
間性又は性転換の発生		>1.04	>1.04			

( ): 濃度依存性確認できず

表 1-27 プロピルパラベンの第一段階生物試験（短期繁殖試験、OECD TG229）<sup>3)</sup>  
結果の比較

測定濃度 (mg/L)		0.311、0.926、2.94	
Endpoint		LOEC (mg/L)	
産卵数		↓	2.94
受精卵数		↓	0.926
受精率		↓	2.94
肝臓中ビテロジェニン濃度	♂	↑	0.311
	♀	↑	2.94
二次性徴（乳頭状小突起）	♂		ND
	♀		ND



## 2.5 参考文献

- 1) OECD 2015 OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 240, Medaka Extended One Generation Reproduction Test (MEOGRT)
- 2) 化学物質の環境リスク評価 第18巻、環境書HPより
- 3) 環境省, 平成30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 (4-ヒドロキシ安息香酸プロピル)
- 4) Flynn K, Lothenbach D, Whiteman F, Hammermeister D, Touart LW, Swintek J, Tatarazako N, Onishi Y, Iguchi T, and Jonson 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.
- 5) Swinrwk J, Flynn K, Haselman J, Package 'StatCharrms'.
- 6) Bjerregaard P, Andersen DN, Pedersen KL, Pedersen SN and Korsgaard B (2003) Estrogenic effect of propylparaben (propylhydroxybenzoate) in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* after exposure via food and water. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology*, 136 (4), 309-317.
- 7) Pedersen KL, Pedersen SN, Christiansen LB, Korsgaard B and Bjerregaard P (2000) The preservatives ethyl-, propyl- and butylparaben are oestrogenic in an in vivo fish assay. *Pharmacology and Toxicology*, 86 (3), 110-113.
- 8) Inui M, Adachi T, Takenaka S, Inui H, Nakazawa M, Ueda M, Watanabe H, Mori C, Iguchi T and Miyatake K (2003) Effect of UV screens and preservatives on vitellogenin and choriogenin production in male medaka (*Oryzias latipes*). *Toxicology*, 194 (1-2), 43-50.
- 9) Oishi S (2002) Effects of propylparaben on the male reproductive system. *Food and Chemical Toxicology*, 40 (12), 1807-1813.

### 3. 化学物質の内分泌かく乱作用に関する検討会への報告

本業務について、環境省主催の検討会（下記参照）に出席し、報告を行った。

- ・令和4年度 第3回 内分泌かく乱作用に係る生態影響評価検討班会議  
開催日時：令和5年3月8日  
開催形式：WEB

付属資料-1

## Results of Analysis, Device No.1

Sample: Dechlorinated tap water generated with device No. 1 in building B12 of Mitsubishi chemical research [for rearing animals]  
 Measurement agency: MC Evolve Technologies Corporation  
 1-25-14, Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305-0856, Japan  
 Date for sample collection: August 23, 2022

These data were obtained from report No. 22H-003441-0001.

Item	[unit]	Result	Item	[unit]	Result
Suspended Substance (SS)	[mg/L]	N.D. ( <1.0 )	Selenium	[mg/L]	N.D. ( <0.001 )
Total Organic Carbon (TOC)	[mg/L]	N.D. ( <0.3 )	Total Residue	[mg/L]	92
Biochemical Oxygen Demand (BOD)	[mg/L]	<0.5	Conductivity	[mS/m]	11
Chemical Oxygen Demand (COD)	[mg/L]	0.8	Hardness	[mg CaCO <sub>3</sub> /L]	42
Total Phosphorus	[mg/L]	N.D. ( <0.02 )	Alkalinity (pH4.8)	[mg CaCO <sub>3</sub> /L]	34
pH	[-(°C)]	7.1 ( 18 )	Sodium	[mg/L]	6.0
Coliform Group	[MPN/100mL]	N.D. ( <2 )	Potassium	[mg/L]	0.8
Total Mercury	[mg/L]	N.D. ( <0.00005 )	Calcium	[mg/L]	12
Copper	[mg/L]	N.D. ( <0.005 )	Magnesium	[mg/L]	2.9
Cadmium	[mg/L]	N.D. ( <0.0003 )	Oil (n-Hexane Extracts)	[mg/L]	N.D. ( <0.5 )
Zinc	[mg/L]	N.D. ( <0.01 )	Oil (Oily Film / Observation)	[-]	Not Recognized
Lead	[mg/L]	N.D. ( <0.001 )	Phenols	[mg/L]	N.D. ( <0.005 )
Aluminum	[mg/L]	0.04	Polychlorinated Biphenyl (PCB)	[mg/L]	N.D. ( <0.0005 )
Nickel	[mg/L]	N.D. ( <0.01 )	Thiram	[mg/L]	N.D. ( <0.0006 )
Hexavalent Chromium	[mg/L]	N.D. ( <0.005 )	Simazine	[mg/L]	N.D. ( <0.0003 )
Manganese	[mg/L]	N.D. ( <0.01 )	Thiobencarb	[mg/L]	N.D. ( <0.002 )
Tin	[mg/L]	N.D. ( <0.03 )	Isoxathion	[mg/L]	N.D. ( <0.001 )
Silver	[mg/L]	N.D. ( <0.01 )	Diazinon	[mg/L]	N.D. ( <0.001 )
Cobalt	[mg/L]	N.D. ( <0.01 )	Fenitrothion (MEP)	[mg/L]	N.D. ( <0.001 )
Iron	[mg/L]	N.D. ( <0.04 )	Isoprothiolane	[mg/L]	N.D. ( <0.001 )
Total Cyanide	[mg/L]	N.D. ( <0.001 )	Oxine-Copper	[mg/L]	N.D. ( <0.001 )
Residual Chlorine	[mg/L]	N.D. ( <0.1 )	Chlorothalonil (TPN)	[mg/L]	N.D. ( <0.001 )
Bromic Ion	[mg/L]	N.D. ( <0.5 )	Propyzamide	[mg/L]	N.D. ( <0.001 )
Fluorine	[mg/L]	N.D. ( <0.1 )	EPN	[mg/L]	N.D. ( <0.001 )
Hydrogen Sulfide	[mg/L]	N.D. ( <0.002 )	Dichlorvos (DDVP)	[mg/L]	N.D. ( <0.001 )
Ammonium Nitrogen	[mg/L]	N.D. ( <0.2 )	Fenobucarb (BPMC)	[mg/L]	N.D. ( <0.001 )
Nitrite Nitrogen	[mg/L]	N.D. ( <0.1 )	Ipobfenfos (IBP)	[mg/L]	N.D. ( <0.001 )
Arsenic	[mg/L]	N.D. ( <0.001 )	Chlornitrofen (CNP)	[mg/L]	N.D. ( <0.001 )
Surface-Active Agents (Anionic)	[mg/L]	N.D. ( <0.02 )			

リサイクル適性の表示：印刷用の紙にリサイクルできます。  
この印刷物は、グリーン購入法に基づく基本方針における「印刷」に係る判断の基準にした  
がい、印刷用の紙へのリサイクルに適した材料【Aランク】のみを用いて作製しています。