

環境省請負業務

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

(ベンゾフェノン-2) 実施業務

業務報告書

平成31年3月

一般財団法人化学物質評価研究機構

目 次

	頁
1. 要 約.....	1
2. 背景及び目的.....	3
3. 業務内容.....	3
4. 試験対象物質の魚類短期繁殖試験の実施.....	4
4.1 試験施設.....	4
4.2 材料及び方法.....	4
4.2.1 被験物質.....	4
4.2.2 試験生物.....	5
4.2.3 希釈水.....	5
4.2.4 試験濃度.....	5
4.2.5 プレ暴露.....	6
4.2.6 暴露方式.....	6
4.2.7 試験液の調製.....	6
4.2.8 試験液中の被験物質濃度及び水質.....	7
4.2.9 観察と測定.....	7
4.2.10 結果の処理.....	8
4.2.11 試験の有効性.....	8
4.3 結 果.....	9
4.3.1 試験液中の被験物質濃度.....	9
4.3.2 試験液の水質.....	10
4.3.3 死亡率.....	10
4.3.4 産卵数及び受精率.....	11
4.3.5 暴露終了時の全長及び体重.....	15
4.3.6 暴露終了時の肝臓体指数、生殖腺体指数.....	15
4.3.7 暴露終了時の二次性徴（乳頭状小突起を有する節板数）.....	16
4.3.8 肝臓中ビテロジェニン濃度.....	16
4.4 まとめと考察.....	18
5. 化学物質の内分泌かく乱作用に関する検討会等への報告.....	20
6. 引用文献.....	20

1. 要 約

業務名

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（ベンゾフェノン-2）
実施業務

業務の背景及び目的

環境省では、平成 28 年 6 月に「化学物質の内分泌かく乱作用に関する今後の対応－EXTEND2016－」を取りまとめ、化学物質の内分泌かく乱作用についての評価手法の確立と評価の実施を加速化して進めており、化学物質の内分泌かく乱作用に関連する報告の信頼性評価、試験対象となり得る物質の選定を実施している。また、試験及び評価の考え方や枠組みについて検討を行い、試験管内試験及び生物試験を用いて、2 段階で評価を行う枠組みを取りまとめたところである。

本業務は、環境省が平成 22 年 11 月に取りまとめた化学物質の内分泌かく乱作用に関する試験及び評価の考え方や枠組みに基づき、内分泌かく乱作用に関する評価等に必要データを集積するため、既の実施された試験管内試験の結果等において第一段階生物試験を実施する優先順位が高いと考えられるベンゾフェノン-2 について、第一段階生物試験である魚類短期繁殖試験を実施したものである。

業務内容

ベンゾフェノン-2 を被験物質として、OECD Guideline for the testing of chemicals No.229: Fish Short Term Reproduction Assay (OECD TG229) に準拠し、試験生物にメダカ (*Oryzias latipes*) を用いて魚類短期繁殖試験を実施した。暴露期間中のメダカの産卵状況や暴露終了後の肝臓中ビテロジェニン濃度、二次性徴等、内分泌かく乱に関わるエンドポイントについて測定し、被験物質のメダカに対する LOEC 及び NOEC を求めた。

試験生物	メダカ (<i>Oryzias latipes</i>)
被験物質	ベンゾフェノン-2
暴露方式	流水式
試験期間	21 日間
試験濃度	設定濃度 10.0、1.00、0.100 mg/L (公比 10) の 3 濃度 (測定濃度として 9.53、0.939 及び 0.0943 mg/L) 及び対照区
対照区	被験物質を含まない希釈水
連 数	4 連/試験区
試験生物数	6 個体 (オス 3 個体、メス 3 個体) /試験容器 24 個体 (オス 12 個体、メス 12 個体) /試験区
試験水槽	3L 容ガラス製容器

試験水量	約 7.2 L/試験区 (約 1.8 L/試験容器)
換水率	約 6 回/日 (流量 7.5 mL/min)
試験水温	25±1℃
エアレーション	実施せず
明暗周期	室内灯による 16 時間明/8 時間暗
給 餌	アルテミアふ化幼生を 1 日 3 回飽食量給餌

試験結果

ベンゾフェノン-2 を被験物質として魚類短期繁殖試験を実施した結果、設定濃度 10.0、1.00 及び 0.100 mg/L に対して、暴露期間中の平均測定濃度はそれぞれ 9.53、0.939 及び 0.0943 mg/L であった。暴露試験の結果、暴露終了時の親メダカの死亡率に濃度依存的な増加傾向は認められず、試験濃度区において対照区と比較して統計学的に有意な差はみられなかった。また、暴露期間中の総産卵数、受精卵数及びメス 1 個体あたりの累積産卵数についても試験濃度区で対照区と比較して統計学的に有意な差はみられなかったが、受精率については、9.53 mg/L 区において対照区と比較して統計学的に有意な低下が認められた。暴露終了時における全長、体重、肝臓体指数、生殖腺体指数、二次性徴については、試験濃度区において対照区と比較して統計学的に有意な差はみられなかった。しかしながら、オスの肝臓中ビテロジェニン濃度については、9.53 mg/L 区において対照区と比較して有意な増加が認められた。その他の試験濃度区においては対照区と比較して統計学的に有意な差は認められなかった。

以上の結果より、ベンゾフェノン-2 はメダカに対してエストロゲン様の内分泌かく乱作用を示すことが示唆された。ベンゾフェノン-2 の魚類短期繁殖試験における LOEC 及び NOEC は、受精率及びオスの肝臓中ビテロジェニン濃度において 9.53 及び 0.939 mg/L であった。

2. 背景及び目的

環境省では、平成 28 年 6 月に「化学物質の内分泌かく乱作用に関する今後の対応－EXTEND2016－」を取りまとめ、化学物質の内分泌かく乱作用についての評価手法の確立と評価の実施を加速化して進めており、化学物質の内分泌かく乱作用に関連する報告の信頼性評価、試験対象となり得る物質の選定を実施している。また、試験及び評価の考え方や枠組みについて検討を行い、試験管内試験及び生物試験を用いて、2 段階で評価を行う枠組みを取りまとめたところである。

本業務は、環境省が平成 22 年 11 月に取りまとめた化学物質の内分泌かく乱作用に関する試験及び評価の考え方や枠組みに基づき、内分泌かく乱作用に関する評価等に必要データを集積するため、既に実施された試験管内試験の結果等において第一段階生物試験を実施する優先順位が高いと考えられるベンゾフェノン-2¹⁾について、第一段階生物試験である魚類短期繁殖試験を実施したものである。

3. 業務内容

(1) 試験対象物質の魚類短期繁殖試験の実施

EXTEND2016 において平成 29 年度に実施した第 1 段階試験管内試験結果並びに既存知見に基づき、エストロゲン作用について陽性の結果が得られたベンゾフェノン-2¹⁾を被験物質として、OECD Guideline for the testing of chemicals No.229: Fish Short Term Reproduction Assay (OECD TG229) に準拠し、試験生物にメダカ (*Oryzias latipes*) を用いて魚類短期繁殖試験を実施した。

被験物質の魚類繁殖性に関する潜在的影響を調べるため、試験では成魚の雌雄メダカを段階的な濃度の試験液に 21 日間流水条件下にて暴露し、暴露期間中のメダカの産卵状況を確認した。また暴露終了後、試験生物の肝臓中ビテロジェニン濃度や二次性徴等、内分泌かく乱に関わるエンドポイントについて測定し、被験物質のメダカの繁殖性に対する LOEC (最小影響濃度) 及び NOEC (最大無影響濃度) を求めた。

(2) 化学物質の内分泌かく乱作用に関する検討会等への報告

本業務の結果について、環境省が開催する検討会に報告するため、環境省担当官の指示に従い資料を作成の上、担当官に提出した。また、同会議に出席し、資料に関する説明、質疑応答を行った。

(3) 報告書の作成

(1)、(2) の成果を取りまとめた報告書 (本報告書) を作成した。

4. 試験対象物質の魚類短期繁殖試験の実施

4.1 試験施設

名称 一般財団法人化学物質評価研究機構 久留米事業所
所在地 〒839-0801 福岡県久留米市宮ノ陣三丁目2番7号

4.2 材料及び方法

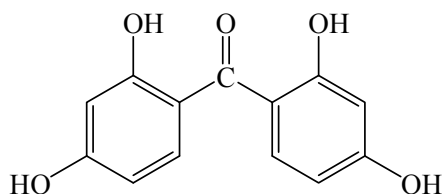
4.2.1 被験物質

a) 名称等

名称 2,2',4,4'-テトラヒドロキシベンゾフェノン
別名 ベンゾフェノン-2
CAS番号 131-55-5

b) 構造式等

構造式



分子式 $C_{13}H_{10}O_5$
分子量 246.22

c) 供試試料²⁾

被験物質純度 99.6% (HPLC area)
供給者 東京化成工業株式会社
ロット番号 32SLG

d) 物理化学的性状²⁾

外観 うすい黄緑色～赤みの黄色結晶～粉末
融点 $201.8^{\circ}C$
ヘンリー定数 $3.7 \times 10^{-11} PaM^3/mol$
溶解性 メタノールに可溶

e) 保管条件

冷蔵暗所保管した。

f) 取扱い上の注意

手袋、マスク、保護めがね及び白衣を着用し、皮膚、目への接触及び吸入を避けた。

4.2.2 試験生物

種	メダカ (<i>Oryzias latipes</i>)
供給源	自家生産 (当事業所において継代飼育)
供試週齢	16 週齢
供試魚体重	オス : 297±37 mg、メス : 289±36 mg (暴露開始時、サブサンプルより取り上げた雌雄各 12 個体の平均体重)
群分け	無作為抽出
順 化	
飼育水	脱塩素水道水
溶存酸素濃度	飽和溶存酸素濃度の 80%以上
水 温	25±2°C
明暗周期	室内灯による 16 時間明/8 時間暗
餌 料	アルテミアふ化幼生
給餌量・頻度	飽食量を 1 日 3 回、毎日給餌

4.2.3 希釈水

希釈水及び飼育水には十分にエアレーションし、温度調節した脱塩素水道水を用いた。定期的に測定した希釈水の水質測定結果を付属資料に示す。

4.2.4 試験濃度

試験濃度及び公比は以下の通り決定した。

予備試験として実施した急性毒性試験の結果、ベンゾフェノン-2 のメダカに対する 96 時間 LC₅₀ 値は 73 mg/L (95%信頼限界 : 59~94 mg/L) であった。このとき、設定濃度 29.6 mg/L 区において、メダカに症状等の影響は認められなかったことから、本試験における最高濃度は試験法の上限濃度である 10.0 mg/L とした。また、平成 29 年度検討会資料³⁾より、ベンゾフェノン-2 のレポータージーンアッセイの結果、メダカエストロゲンレセプターに対する活性比は 17β-エストラジオールと比較して 0.010%であった。既存データより、17β-エストラジオールの OECD TG229 の試験結果は、LOEC が 553 ng/L、NOEC が 115 ng/L であった⁴⁾ことから、活性比よりベンゾフェノン-2 では LOEC は 5 mg/L、NOEC は 1 mg/L 付近となると推察された。しかしながら、成熟雌雄ファットヘッドミノー(*Pimephales promelas*)への 15 日間の暴露において、設定濃度 1 mg/L でオスの血漿中のビテロジェニン濃度の上昇が報告されている⁵⁾ことから、本試験では LOEC を 1 mg/L 付近と想定し、公比を 10 として最低濃度区を設定した。

以上より、本試験の設定濃度は 10.0、1.00 及び 0.100 mg/L (公比 10) とした。

4.2.5 プレ暴露

暴露開始 14 日前より、被験物質を含まない希釈水にてプレ暴露を実施した。プレ暴露では、無作為抽出によって選別した雌雄各 3 尾ずつを 1 容器に入れ、試験と同条件にて飼育し各容器における産卵状況を確認した。プレ暴露の前半では産卵数が極端に少ない容器について供試魚の入れ替えを行い、暴露開始前 5 日間で 1 日あたりの受精卵と未受精卵を計数し、それぞれの容器あたりの総産卵数及び受精率を算出した。この結果を基に、各試験区間の産卵数及び受精率に統計学的な有意差がみられないように各試験区に試験容器（供試魚）を割り当てた。

4.2.6 暴露方式

暴露方式は流水式とし、ガラスプランジャーポンプ（GMW-A：東京理化工器株式会社）により送液された試験原液を混合槽にて一定流量の希釈水と混合、連続的に希釈して試験液を調製し、各水槽に分配した。以下に暴露条件を示した。なお、試験容器は週 1 回の頻度で交換、洗浄を行った。

暴露方式	流水式
試験期間	21 日間
試験濃度	10.0、1.00、0.100 mg/L（公比 10）の 3 濃度及び対照区
対照区	被験物質を含まない希釈水
連 数	4 連/試験区
試験生物数	6 個体（オス 3 個体、メス 3 個体）/試験容器 24 個体（オス 12 個体、メス 12 個体）/試験区
試験水槽	3 L 容ガラス製容器
試験水量	約 7.2 L/試験区（約 1.8 L/試験容器）
換水率	約 6 回/日（流量 7.5 mL/min）
試験水温	25±1℃
エアレーション	実施せず
明暗周期	室内灯による 16 時間明/8 時間暗
給 餌	アルテミアふ化幼生を 1 日 3 回飽食量給餌した。ただし、解剖前の 12 時間は給餌を行わなかった。

4.2.7 試験液の調製

必要量の被験物質をひょう量し希釈水と混合、約 30 分間超音波を照射した後、24 時間攪拌して 100 mg/L の試験原液を調製した。この試験原液をそのまま若しくは適宜希釈して各試験濃度の 10 倍の濃度の試験原液をそれぞれ調製した。これらの試験原液をガラスプランジャーポンプにより送液し、混合槽にて一定の割合で希釈水と混合することで連続的に各試験濃度の試験液を調製し、各水槽に分配した。試験原液は 4 日に 1 回の頻度で調製した。試験原液及び希釈水の流量については一定間隔（1 回/週）で確認し、暴露期間を通じた流量の変動を 10%未満に抑えた。

4.2.8 試験液中の被験物質濃度及び水質

a) 試験液中の被験物質濃度

測定頻度	暴露期間中 4 回（暴露開始時から 1 週間間隔）
測定対象	全試験容器
採水方法	各試験容器の中層から採取
測定方法	付属資料参照

b) 試験液の水質

①溶存酸素濃度（DO）、pH 及び水温

測定頻度	DO、pH、水温：1 回/週（暴露開始時及び終了時含む） 連続水温：1 回/1 時間間隔で測定
測定対象	DO、pH、水温：全試験容器 連続水温：対照区の 1 試験容器
測定機器	溶存酸素計 HQ30d (HACH) pH 計 HM-21P (東亜ディーケーケー) ガラス製棒状温度計 サーモレコーダー RT-11 (タバイ エスペック)

②全硬度及びアルカリ度

測定頻度	1 回/週（暴露開始時及び終了時含む）
測定対象	対照区及び試験最高濃度区の各 1 試験容器

4.2.9 観察と測定

a) 試験生物の一般状態

死亡と一般状態を暴露開始後に試験終了日まで毎日観察した。観察可能な動き（吻、鰓蓋の動き等）がなく、ガラス棒で尾柄部に軽く触れ反応がない個体を死亡とみなした。死亡した個体は確認した時点で外見より雌雄を判別し、速やかにとり除いた。

b) 産卵数及び受精率

暴露期間中は毎日全試験容器から全ての卵を採取し、1 日あたりの受精卵と未受精卵を計数し、生存するメス 1 個体あたりの産卵数及び受精率を算出した。

c) 暴露終了後の供試魚の取り上げ

暴露 21 日後に生存個体を全て取り上げ、氷水中にて麻酔後に全長及び体重を測定した。その後、解剖して肝臓及び生殖腺を摘出し、それぞれの重量を測定した。摘出した肝臓は、ピテロジェニン濃度の測定のため前処理を行うまで -80℃で保存した。肝臓及び生殖腺の摘出後、尻鰭を切り取り 10%中性緩衝ホルマリン（富士フィルム和光純薬株式会社）で固定し、二次性徴評価における乳頭状小突起を有する節板数の計数を行うまで室温で保存した。

d) 二次性徴（乳頭状小突起を有する節板数）の観察

10%中性緩衝ホルマリンで固定した尻鰭を実体顕微鏡下で観察し、軟条における乳頭状小突起がみられる節板数を計数した。

e) ビテロジェニン濃度測定

解剖により摘出した肝臓 1 mg 当たり 50 μ L の ELISA 希釈液 (ELISA 測定に用いるものと同等のもの) を添加してホモジナイズし、5°C、13000 \times g、10 分間の遠心分離 (高速冷却遠心機 CR21G II 日立工機株式会社) 後、上清を採取して前処理を行った。前処理後の上清はビテロジェニン濃度測定まで -80°C で保存した。この上清中のビテロジェニン濃度を、メダカビテロジェニン ELISA キット (EnBio Medaka Vitellogenin ELISA system、藤倉化成株式会社) を用いて測定した。なお、ビテロジェニン濃度測定の前処理操作を考慮した定量下限値は 1.00 ng/mg liver weight とした。

4.2.10 結果の処理

得られた結果から、死亡率、産卵数、受精率について容器平均値及び標準偏差を算出した。また、全長、体重、肝臓体指数、生殖腺体指数、二次性徴 (乳頭状小突起を有する節板数) 及び肝臓中ビテロジェニン濃度について、雌雄別に容器平均値及び標準偏差を算出した。死亡率及び受精率に関しては逆正弦変換を行い、分散を安定化させ有意差検定を行った。有意差検定は、はじめに等分散性の検定 (Bartlett's test) を行い、等分散性が認められた場合は多重検定 (Dunnett's test) を、等分散性が認められなかった場合はノンパラメトリックの多重検定 (Steel's test) を行った。ただし、肝臓中ビテロジェニン濃度については等分散性の検定を行わずにノンパラメトリックの多重検定を行った。この際、定量下限値以下のデータに関しては定量下限の半値 (0.5 ng/mg liver weight) を用いて検定した。すべての統計処理はエクセル統計 2012 for windows (株式会社 社会情報サービス) を用いて実施し、死亡率、産卵数、受精率、全長、体重については片側検定、肝臓体指数、生殖腺体指数、二次性徴及び肝臓中ビテロジェニン濃度については両側検定で、 $p < 0.05$ を有意差とみなした。

4.2.11 試験の有効性

- a) 暴露期間中、対照区における死亡率が 10% を超えてはならない。
- b) 暴露期間中の溶存酸素濃度は、試験水温での飽和溶存酸素濃度の 60% 以上でなければならない。
- c) 水温が $25 \pm 2^\circ\text{C}$ の範囲内で、なおかつ試験容器間の水温が $\pm 1.5^\circ\text{C}$ 以上変動してはならない。
- d) 試験液中の被験物質濃度が平均測定濃度の $\pm 20\%$ 以内に維持されなければならない。
- e) 暴露開始前の全ての試験容器及び試験期間中の対照群のメダカで活発に産卵が認められること。

4.3 結 果

4.3.1 試験液中の被験物質濃度

暴露期間中に測定した試験液中の被験物質濃度は、設定濃度 10.0、1.00 及び 0.100 mg/L に対してそれぞれ平均測定濃度が 9.53、0.939 及び 0.0943 mg/L であり、設定濃度に対して 95.3、93.9 及び 94.3%であった（表 1）。いずれの試験濃度区においても、試験液中の被験物質濃度は平均測定濃度の±20%以内に維持されており、有効性基準を満たしていた。測定した試験容器毎の濃度測定結果を付属資料に示す。

なお、以下の本文中における試験濃度は、平均測定濃度（9.53、0.939 及び 0.0943 mg/L）で示す。

表 1 試験液中の被験物質濃度の測定結果

設定濃度 (mg/L)	試験液中の被験物質濃度 (mg/L) (対設定濃度%)				
	暴露開始時	暴露7日後	暴露14日後	暴露終了時	算術平均値
対照区	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
0.100	0.0924 (92.4)	0.0949 (94.9)	0.0941 (94.1)	0.0957 (95.7)	0.0943 (94.3)
1.00	0.948 (94.8)	0.923 (92.3)	0.922 (92.2)	0.964 (96.4)	0.939 (93.9)
10.0	9.76 (97.6)	9.33 (93.3)	9.54 (95.4)	9.51 (95.1)	9.53 (95.3)

n.d.: <0.0199 mg/L

4.3.2 試験液の水質

暴露期間中に測定した試験液の各種水質項目の最小値及び最大値を表2に示す。暴露期間中の溶存酸素濃度は飽和濃度の60%以上であり、有効性基準を満たしていた。また、暴露期間中の水温は水槽間の温度差が1.5℃未満かつ25℃±2℃の範囲内であり、有効性基準を満たしていた。暴露期間中に測定した試験液の水質の詳細を付属資料に示す。

表2 暴露期間中の試験液の水質

測定濃度 (mg/L)	DO (mg/L)	水温 (°C)	pH	全硬度 (mgCaCO ₃ /L)	アルカリ度 (mgCaCO ₃ /L)
対照区	6.3 - 8.5	24.3 - 25.6	7.3 - 8.0	37.6 - 52.3	31.6 - 54.5
0.0943	6.4 - 8.5	24.3 - 25.6	7.3 - 8.1	—	—
0.939	6.4 - 8.5	24.3 - 25.6	7.4 - 8.1	—	—
9.53	6.3 - 8.5	24.5 - 25.6	7.4 - 8.0	34.0 - 51.7	31.0 - 56.7

4.3.3 死亡率

暴露期間中の各試験区の死亡率を表3に示す。

暴露期間中、0.939 mg/L区においてオス1個体が死亡したが、その他の試験濃度区において死亡個体は観察されず、親個体の死亡に濃度相関は認められなかった。また、この死亡率について統計学的に有意な差は認められなかった。

なお、対照区の死亡率は0%であり、有効性基準を満たしていた。

表3 暴露終了時の累積死亡率

測定濃度 (mg/L)	オス死亡率 (%)	メス死亡率 (%)	死亡率計 (%)
対照区	0	0	0
0.0943	0	0	0
0.939	8.3	0	4.2
9.53	0	0	0

4.3.4 産卵数及び受精率

暴露期間中の平均総産卵数、平均受精卵数、1日メス1個体あたりの平均産卵数及び平均受精率を表4に示す。暴露期間中の産卵数及び受精率は、9.53 mg/L 区においてわずかに低下傾向を示した。得られた結果について有意差検定を行ったところ、平均総産卵数、平均受精卵数、1日メス1個体あたりの平均産卵数においては試験濃度区で対照区と比較して有意差は認められなかったが、受精率については9.53 mg/L 区で対照区と比較して有意な低下が認められた。1日メス1個体あたりの平均総産卵数、平均受精卵数、平均受精率及びメス1個体あたりの累積産卵数のグラフを図1~5に示す。なお、対照区では、試験期間を通じて産卵は活発であった(図4、5)。

表4 産卵数及び受精率

測定濃度 (mg/L)	平均総産卵数 (eggs/vessel)	平均受精卵数 (eggs/vessel)	1日メス1個体 あたりの 平均産卵数 (eggs/female/day)	平均受精率 (%)
対照区	906 ± 111	857 ± 98	14.4 ± 1.8	94.6 ± 1.4
0.0943	972 ± 147	918 ± 138	15.4 ± 2.3	94.5 ± 2.2
0.939	913 ± 172	857 ± 143	14.5 ± 2.7	94.3 ± 2.5
9.53	870 ± 106	787 ± 110	13.8 ± 1.7	89.7 ± 3.5 *

各データは容器平均 ± 標準偏差で示す。

*は $p < 0.05$ で有意であることを示す。

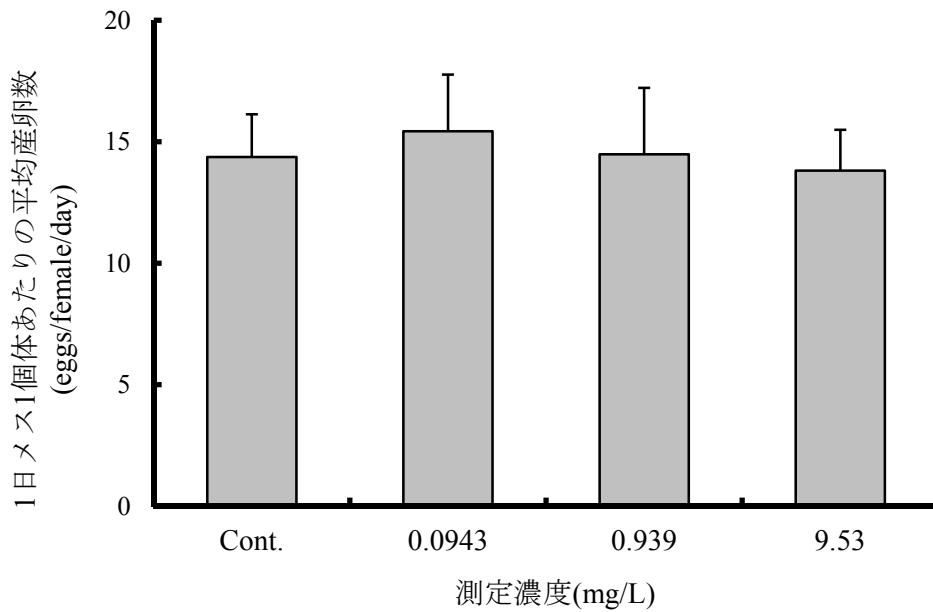


図1 各試験区における1日メス1個体あたりの平均産卵数.
各データは容器平均 ± 標準偏差として示す。

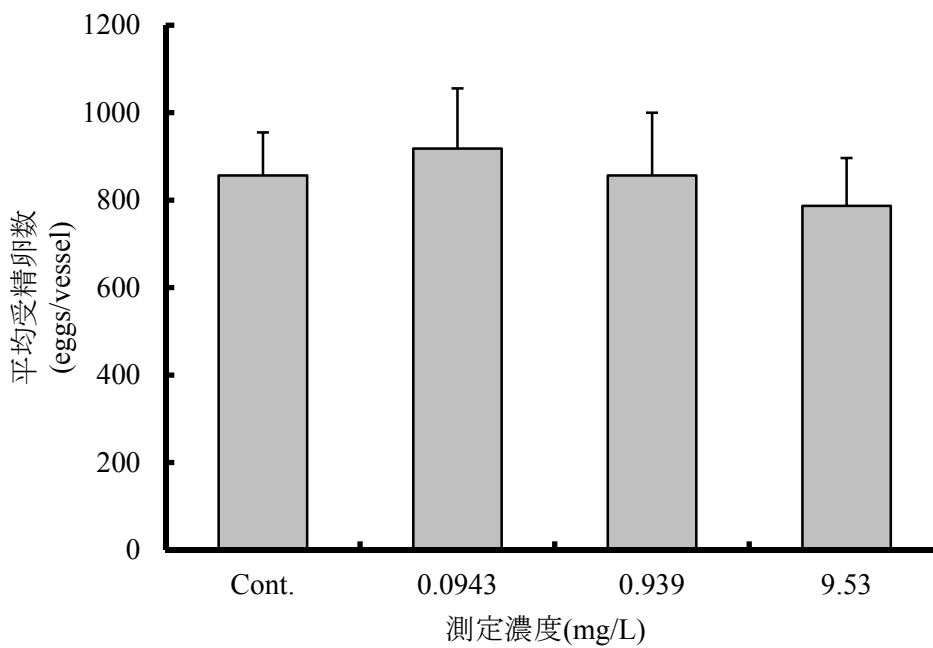


図2 各試験区における平均受精卵数.
各データは容器平均 ± 標準偏差として示す。

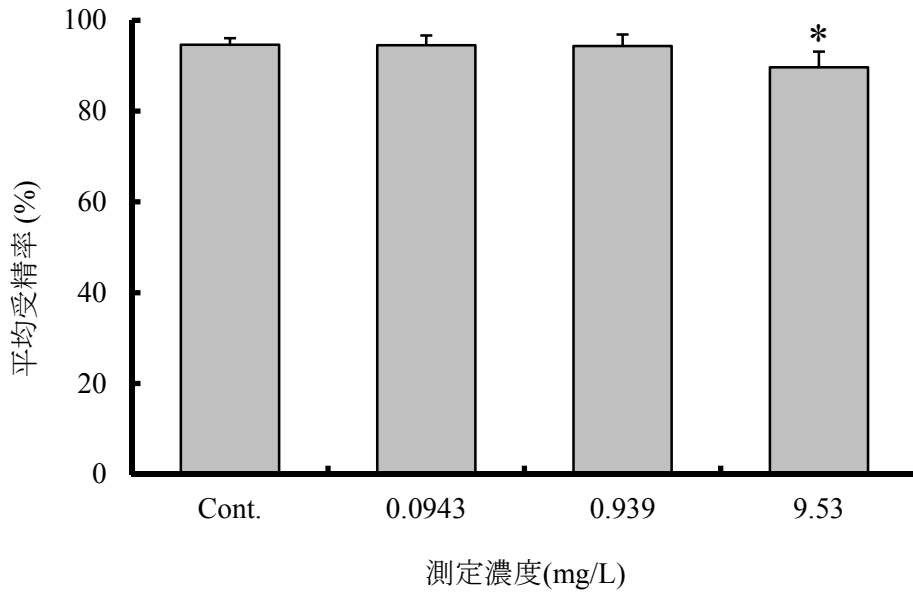


図3 各試験区における平均受精率.

各データは容器平均 ± 標準偏差として示す。*は $p < 0.05$ で有意であることを示す。

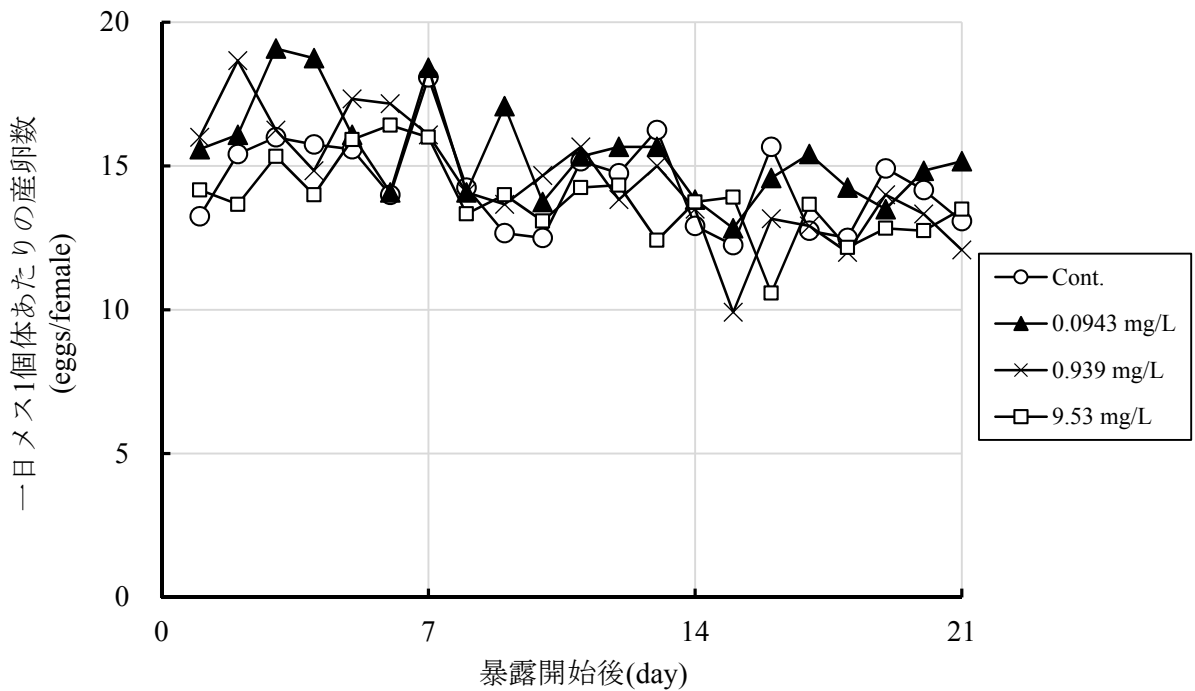


図4 各試験区における一日メス1個体あたりの暴露期間中の総産卵数.

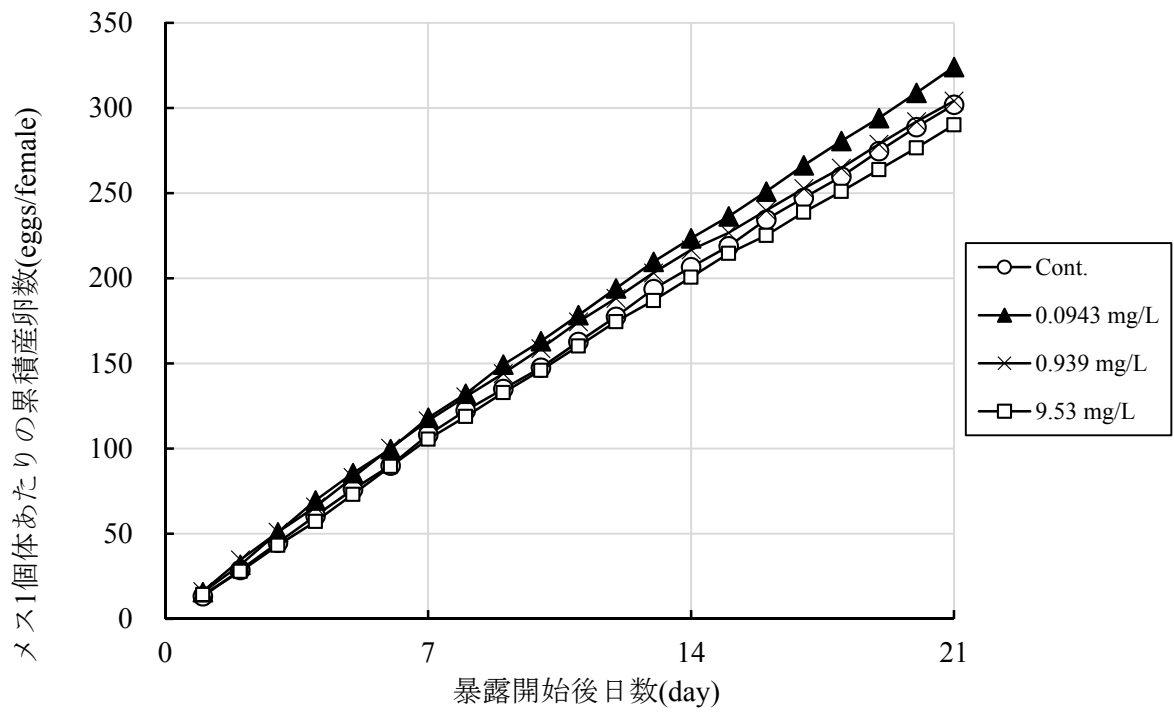


図5 各試験区におけるメス1個体あたりの暴露期間中の累積産卵数.

4.3.5 暴露終了時の全長及び体重

暴露終了時の各試験濃度区における全長及び体重を表 5 に示す。対照区と比較して、試験濃度区的全長及び体重に顕著な変動傾向は認められなかった。また、有意差検定の結果、いずれの試験濃度区においても対照区と比較して統計学的に有意な差は認められなかった。

表 5 全長及び体重

測定濃度 (mg/L)	全長 (cm)		体重 (mg)	
	オス	メス	オス	メス
対照区	3.09 ± 0.07	3.01 ± 0.10	288 ± 38	317 ± 39
0.0943	3.08 ± 0.12	3.02 ± 0.04	291 ± 27	296 ± 16
0.939	3.06 ± 0.11	3.03 ± 0.10	290 ± 32	304 ± 48
9.53	3.19 ± 0.11	3.04 ± 0.05	327 ± 34	295 ± 8

各データは容器平均 ± 標準偏差で示す。

4.3.6 暴露終了時の肝臓体指数、生殖腺体指数

暴露終了時の各試験濃度区における肝臓体指数及び生殖腺体指数を表 6 に示す。対照区と比較して、試験濃度区の肝臓体指数及び生殖腺体指数に明確な変動傾向は認められなかった。また、有意差検定の結果、いずれの試験濃度区においても対照区と比較して統計学的に有意な差は認められなかった。

表 6 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
対照区	1.93 ± 0.28	3.36 ± 0.42	0.856 ± 0.107	7.50 ± 1.38
0.0943	1.79 ± 0.37	2.83 ± 0.87	1.07 ± 0.14	6.93 ± 0.34
0.939	1.89 ± 0.24	3.08 ± 0.68	0.692 ± 0.154	7.56 ± 1.20
9.53	1.95 ± 0.55	3.48 ± 0.58	0.790 ± 0.226	8.56 ± 0.41

各データは容器平均 ± 標準偏差で示す。

4.3.7 暴露終了時の二次性徴（乳頭状小突起を有する節板数）

暴露終了時の二次性徴について、乳頭状小突起を有する節板数の各試験濃度区における平均値を表7に示す。オス個体でみられた乳頭状小突起を有する節板数に統計学的な有意差は認められなかった。また、メス個体の尻鰭に乳頭状小突起の発生は認められなかった。

表7 二次性徴

測定濃度 (mg/L)	乳頭状小突起を有する節板数	
	オス	メス
対照区	79.8 ± 4.8	0
0.0943	72.6 ± 7.0	0
0.939	77.0 ± 19.8	0
9.53	78.8 ± 8.4	0

各データは容器平均 ± 標準偏差で示す。

4.3.8 肝臓中ビテロジェニン濃度

暴露終了時の各試験濃度区における肝臓中ビテロジェニン濃度を表8に示す。オス個体において、対照区、0.0943及び0.939 mg/L区の肝臓中ビテロジェニン濃度は1 ng/mg liver weight未満であったが、9.53 mg/L区では統計学的に有意な上昇が認められた。メス個体では9.53 mg/L区においてビテロジェニン濃度が上昇する傾向はみられたものの、統計学的な有意差は認められなかった。暴露終了時の雌雄の肝臓中ビテロジェニン濃度のグラフを図6に示す。

表8 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 weight)	
	オス	メス
対照区	n.d. (0.567 ± 0.133)	345 ± 152
0.0943	n.d.	354 ± 105
0.939	n.d. (0.888 ± 0.460)	398 ± 230
9.53	393 ± 306 *	449 ± 114

n.d.: <1.00 ng/mg liver weight

各データは容器平均 ± 標準偏差で示す。

*は $p < 0.05$ で有意であることを示す。

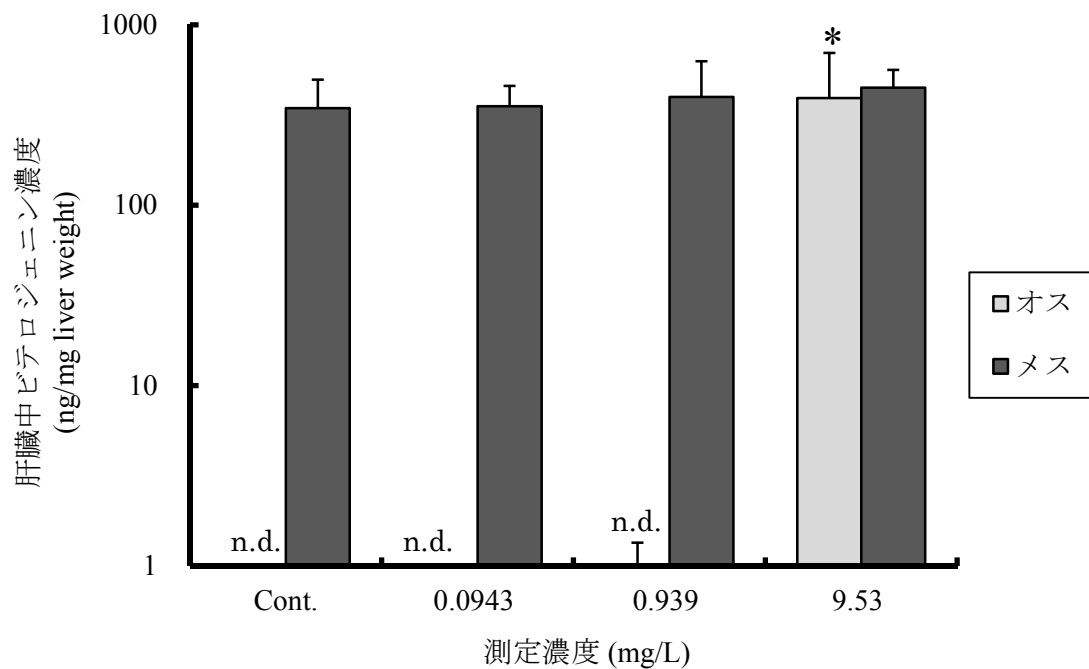


図6 各試験区における肝臓中ピテロジェニン濃度.
 各データは容器平均 ± 標準偏差として示す。
 *は $p < 0.05$ で有意であることを示す。
 n.d.は定量下限 (1.00 ng/mg liver weight) 未満であることを示す。

4.4 まとめと考察

ベンゾフェノン-2 を用いた魚類短期繁殖試験を実施した結果、暴露期間中に測定した試験液中の被験物質濃度は、設定濃度 10.0、1.00 及び 0.100 mg/L に対してそれぞれ平均測定濃度が 9.53、0.939 及び 0.0943 mg/L であり、設定濃度に対して 95.3、93.9 及び 94.3%であった。暴露終了時の死亡個体は 0.939 mg/L で 1 個体のみであり、試験濃度範囲において被験物質は明らかな致死の影響を示さなかった。暴露期間中の産卵数及び受精率については、9.53 mg/L 区においてわずかに低下傾向を示し、9.53 mg/L 区の受精率においてのみ統計学的な有意差が認められた。暴露終了時における全長、体重、肝臓体指数、生殖腺体指数、二次性徴については、試験濃度区で明確な変動傾向は示さず、対照区と比較して統計学的な有意差も認められなかった。肝臓中ビテロジェニン濃度については、9.53 mg/L 区のオスにおいて統計学的に有意な増加が認められた。メスの肝臓中ビテロジェニン濃度においては 9.53 mg/L 区でわずかに増加傾向がみられたものの、統計学的に有意な差は認められなかった。各エンドポイントにおける LOEC 及び NOEC を表 9 に示す。

表 9 各エンドポイントにおける影響のまとめ

エンドポイント		LOEC (mg/L)	NOEC (mg/L)
死亡率	オス	> 9.53	≥ 9.53
	メス	> 9.53	≥ 9.53
総産卵数		> 9.53	≥ 9.53
受精卵数		> 9.53	≥ 9.53
受精率		↓ 9.53	0.939
全長	オス	> 9.53	≥ 9.53
	メス	> 9.53	≥ 9.53
体重	オス	> 9.53	≥ 9.53
	メス	> 9.53	≥ 9.53
肝臓体指数	オス	> 9.53	≥ 9.53
	メス	> 9.53	≥ 9.53
生殖腺体指数	オス	> 9.53	≥ 9.53
	メス	> 9.53	≥ 9.53
二次性徴	オス	> 9.53	≥ 9.53
	メス	> 9.53	≥ 9.53
肝臓中ビテロジェニン濃度	オス	↑ 9.53	0.939
	メス	> 9.53	≥ 9.53

矢印は統計学的に有意に増加あるいは減少したことを示す。

本試験の結果、ベンゾフェノン-2 は 9.53 mg/L でオス個体の肝臓中ビテロジェニン濃度を有意に上昇させたが、0.939 mg/L では有意な濃度上昇は引き起こさなかった。これは、ベンゾフェノン-2 のレポーター遺伝子アッセイの 17β-エストラジオールとの活性比³⁾と 17β-エストラジオールの OECD TG229 の結果⁴⁾から推定した影響濃度とほぼ同じ結果であった。既存データでは成熟雌雄ファットヘッドミノーへの 15 日間の暴露において、設定濃度 1 mg/L でオスの血漿中のビテロジェニン濃度の上昇が報告されている⁵⁾が、本試験において 0.939 mg/L 区でオス個体の肝臓中ビテロジェニン濃度が上昇しなかった理由は、種の感受性差や暴露条件の違いなどが原因と推察される。ベンゾフェノン-2 は試験管内試験においてメダカエストロゲンレセプターへの結合が確認されており、本試験においてオス個体の肝臓中ビテロジェニン濃度を有意に上昇させたことから、本試験において、ベンゾフェノン-2 はオスのメダカに対してエストロゲン様の内分泌かく乱作用を示したものと考えられた。

また、本試験の 9.53 mg/L 区では受精率についても統計学的に有意な低下が認められた。しかしながら、有意な低下とはいえ対照区の受精率が 94.6%のところ、9.53 mg/L 区の受精率は 89.7%と、低下の割合は顕著ではなかった。また、総産卵数及び受精卵数については対照区と遜色がないことから、本試験における 9.53 mg/L 区の受精率の低下にベンゾフェノン-2 のエストロゲン活性が作用した可能性はあるものの、その寄与率は大きくはないと考えられる。

以上の結果より、ベンゾフェノン-2 はメダカに対してエストロゲン様の内分泌かく乱作用を示すことが示唆された。ベンゾフェノン-2 の魚類短期繁殖試験における LOEC 及び NOEC は、受精率及びオスの肝臓中ビテロジェニン濃度において 9.53 及び 0.939 mg/L であった。

なお、ベンゾフェノン-2 の環境中濃度は、平成 26 年度に環境省が実施した化学物質環境実態調査⁶⁾によると、初期環境調査において 21 地点中 1 点の水質試料を除き不検出（検出下限値 12 ng/L）であり、検出された 1 地点においても 13 ng/L であった。この値は今回得られた NOEC の約 1/70000 の濃度であった。

5. 化学物質の内分泌かく乱作用に関する検討会等への報告

本業務の結果について、環境省が開催する平成 30 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（平成 31 年 3 月 7 日 13:30~16:30、日本エヌ・ユー・エス株式会社本社大会議室にて開催）に報告するため、環境省担当官の指示に従い資料を作成の上、担当官に提出した。また、同会議に出席し、資料に関する説明、質疑応答を行った。

6. 引用文献

- 1) 環境省（2018）、平成 30 年度第 1 回 EXTEND2016 化学物質の内分泌かく乱作用に関する検討会、資料 3-2 生態影響評価のための第 1 段階生物試験の候補物質について(案)
- 2) 東京化成工業株式会社、試験成績書及び安全データシート 2,2',4,4'-Tetrahydroxy-benzophenone
- 3) 環境省（2018）、平成 29 年度第 2 回 EXTEND2016 化学物質の内分泌かく乱作用に関する検討会、資料 2-1 平成 29 年度第 1 段階試験管内試験(レポータージーン試験)の実施結果について(案)
- 4) 環境省（2017）、平成 29 年度第 1 回 EXTEND2016 化学物質の内分泌かく乱作用に関する検討会、資料 2-1 生態影響評価のための第 1 段階試験について(案)
- 5) 環境省（2017）、平成 29 年度第 1 回 EXTEND2016 化学物質の内分泌かく乱作用に関する検討会、資料 1-1 化学物質の内分泌かく乱作用に関連する報告の信頼性評価について(案)
- 6) 環境省（2015）、「平成 26 年度化学物質環境実態調査結果（概要）」について（お知らせ）（<https://www.env.go.jp/press/101804.html>）別表 1、2 初期・詳細環境調査における検出状況

付属資料

ベンゾフェノン-2 による魚類短期繁殖試験の条件及び結果

試験条件

1. 被験物質の分析

付表 1 被験物質濃度測定結果

2. 症状の観察項目

付表 2-1 観察項目

付表 2-2 死亡及び観察された症状

試験結果

付表 3 試験液の水質

付表 4 暴露期間中の産卵数及び受精率

付表 5 暴露終了時の全長、体重、二次性徴、肝臓体指数（HSI）、
生殖腺体指数（GSI）

付表 6 暴露終了時の肝臓中ビテロジェニン濃度

希积水の水質

1. 被験物質の分析

1.1 試験液の前処理方法

採取した試験液を分析用試料とし、最終試料の組成がメタノール/脱塩素水道水 (1/1 v/v) になるように適宜希釈して高速液体クロマトグラフィー (HPLC) により被験物質の定量を行った。

1.2 被験物質の定量分析

a) 定量方法

被験物質の定量は 1 濃度の標準溶液を用いた絶対検量線法で行った。

本定量方法の有効性を確認するために、c) の標準溶液と同様に調製した 0.00996、0.0996、0.996 及び 4.98 mg/L の 4 濃度の標準溶液を用いて検量線を作成した。その結果、クロマトグラム上のピーク面積と濃度により作成した検量線の回帰式が原点を通る直線であったことから、本定量方法は有効であった。

分析試料中の被験物質の定量下限値は、定量性が確認された範囲での標準溶液の最低濃度 (0.00996 mg/L) とした。よって、試験液中の被験物質の定量下限値は前処理操作 (最低希釈倍率 : 2 倍) を考慮して 0.0199 mg/L とした。

b) 分析条件

機 器	高速液体クロマトグラフ
ポンプ	LC-20AD (島津製作所)
紫外可視分光検出器	SPD-20AV (島津製作所)
カラムオーブン	CTO-20A (島津製作所)
オートインジェクター	SIL-20AC (島津製作所)
システムコントローラー	SCL-10A _{VP} (島津製作所)
デガッサー	DGU-20A ₃ (島津製作所)
カラム	L-column ODS (150 mm × 2.1 mm I.D., 粒子径 5 μm, 化学物質評価研究機構)
カラム温度	40℃
溶離液	A (55%) : メタノール B (45%) : 超純水
流 量	0.2 mL/min
測定波長	345 nm
注入量	20 μL

c) 標準溶液の調製及び被験物質濃度の算出

被験物質 50.0 mg を電子分析天びんで正確にはかりとり、メタノールに溶解して 99.6 mg/L の被験物質溶液を調製した。これをメタノールで希釈して 99.6 mg/L の被験物質溶液を調製した。さらにこれをメタノール/脱塩素水道水 (1/1 v/v) で希釈して 0.996 mg/L の標準溶液を調製した。

HPLC 試料中の被験物質濃度は、標準溶液及び HPLC 試料のクロマトグラム上で得られるピーク面積を比較し、比例計算して求めた。

1.3 被験物質濃度測定結果

付表 1 被験物質濃度測定結果

設定濃度 (mg/L)	容器	試験液中の被験物質濃度 (mg/L)				算術平均
		0 日後	7 日後	14 日後	終了時	
対照区	A	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	B	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
	C	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
	D	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
	平均	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
0.100	A	0.0922	0.0932	0.0922	0.0939	0.0943
	B	0.0921	0.0958	0.0949	0.0959	
	C	0.0926	0.0954	0.0942	0.0960	
	D	0.0927	0.0951	0.0950	0.0971	
	平均	0.0924	0.0949	0.0941	0.0957	
1.00	A	0.947	0.919	0.922	0.952	0.939
	B	0.939	0.925	0.924	0.975	
	C	0.955	0.929	0.920	0.969	
	D	0.949	0.918	0.923	0.961	
	平均	0.948	0.923	0.922	0.964	
10.0	A	9.82	9.32	9.49	9.53	9.53
	B	9.74	9.36	9.59	9.49	
	C	9.74	9.34	9.56	9.55	
	D	9.74	9.30	9.53	9.46	
	平均	9.76	9.33	9.54	9.51	

n.d. : <0.0199 mg/L

算術平均値は以下の式から算出した:

$$(C_0+C_7+C_{14}+C_{21})/4$$

ここで、

C₀: 暴露開始時の測定濃度

C_n: 暴露 n 日後の測定濃度

2. 死亡及び症状の観察項目

症状の観察項目は以下の通りであった。付表 2-1 に観察項目、付表 2-2 に死亡及び観察された症状を示す。

付表 2-1 観察項目

行動異常	外観異常
表層集中	胸鰭の前方拡張
平衡喪失	眼球突出
活動度低下	腹部膨満
過呼吸	体色明化及び暗化
嗜眠状態	粘液過剰分泌
過敏	粘液凝固
狂奔	出血
鰓内洗浄運動	体幹彎曲
呼吸数増加及び減少	立鱗
筋肉痙攣	
摂餌活動低下	

付表 2-2 死亡及び観察された症状

測定濃度 (mg/L)	死亡 (性別、容器、暴露後日数)	観察された症状
対照区	-	-
0.0943	-	-
0.939	オス、B 容器、21 日後	-
9.53	-	-

-は異常がなかったことを示す。

付表3 試験液の水質

測定濃度 (mg/L)	容器	溶存酸素濃度 (mg/L)				水温 (°C)				pH			
		0日後	7日後	14日後	21日後	0日後	7日後	14日後	21日後	0日後	7日後	14日後	21日後
対照区	A	8.5	7.1	7.2	7.2	24.3	25.4	25.6	25.5	8.0	7.6	7.4	7.4
	B	8.5	7.0	6.4	6.9	24.3	25.4	25.6	25.4	8.0	7.6	7.3	7.3
	C	8.5	6.9	6.3	7.2	24.3	25.4	25.4	25.2	8.0	7.6	7.3	7.4
	D	8.5	7.0	6.4	7.1	24.3	25.3	25.3	25.3	8.0	7.6	7.3	7.4
0.0943	A	8.5	7.1	6.5	6.9	24.3	25.4	25.6	25.4	8.1	7.6	7.4	7.4
	B	8.5	7.0	6.9	7.1	24.3	25.4	25.6	25.4	8.1	7.6	7.4	7.4
	C	8.5	7.0	6.4	6.9	24.3	25.4	25.6	25.4	8.1	7.6	7.3	7.4
	D	8.5	7.1	6.7	7.3	24.3	25.4	25.6	25.4	8.1	7.6	7.3	7.4
0.939	A	8.5	7.1	6.5	7.0	24.3	25.4	25.6	25.4	8.1	7.6	7.4	7.4
	B	8.5	7.1	6.6	7.0	24.3	25.3	25.6	25.4	8.1	7.6	7.4	7.4
	C	8.5	7.0	6.4	6.7	24.3	25.4	25.6	25.4	8.1	7.6	7.4	7.4
	D	8.5	7.0	6.5	7.1	24.3	25.4	25.6	25.4	8.1	7.6	7.4	7.4
9.53	A	8.5	7.2	6.8	7.3	24.5	25.4	25.6	25.3	8.0	7.7	7.4	7.5
	B	8.5	6.9	6.3	6.9	24.5	25.4	25.6	25.3	8.0	7.7	7.4	7.4
	C	8.5	7.1	6.4	7.0	24.5	25.4	25.6	25.3	8.0	7.7	7.4	7.4
	D	8.5	7.1	6.5	7.0	24.5	25.4	25.6	25.4	8.0	7.7	7.4	7.4

測定濃度 (mg/L)	容器	全硬度 (mgCaCO ₃ /L)				アルカリ度 (mgCaCO ₃ /L)			
		0日後	7日後	14日後	21日後	0日後	7日後	14日後	21日後
対照区	A	52.3	43.2	38.4	37.6	54.5	41.6	31.6	33.4
9.53	A	51.7	44.4	34.0	38.2	56.7	42.8	31.0	34.0

付表4 暴露期間中の産卵数及び受精率

測定 濃度 (mg/L)	容器	産卵数 (個) 上段:受精卵数 中段:未受精卵数 下段:受精率(%)																				受精卵計		総産卵数	容器平均 ± 標準偏差
		暴露日数 (日)																				未受精卵計			
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	(平均受精率)		
Cont.	A	40	43	40	48	44	45	49	40	31	45	46	42	42	37	29	52	24	28	44	64	39	872	904	総産卵数 906 ± 111 受精率 (94.6) ± 1.4
		0	0	0	0	6	3	1	5	0	0	0	0	0	3	2	2	6	0	0	3	1	32		
		100	100	100	100	88.0	93.8	98.0	88.9	100	100	100	100	100	92.5	93.5	96.3	80.0	100	100	95.5	97.5	(96.4)		
	B	41	51	58	54	36	39	53	49	39	36	47	37	50	36	34	40	37	38	42	11	48	876	934	
		0	4	0	0	4	10	1	0	2	2	0	12	0	1	6	5	1	0	4	0	6	58		
		100	92.7	100	100	90.0	79.6	98.1	100	95.1	94.7	100	75.5	100	97.3	85.0	88.9	97.4	100	91.3	100	88.9	(94.0)		
	C	34	42	46	29	42	33	45	35	43	27	38	31	44	38	30	35	28	37	31	20	13	721	759	
		1	2	0	2	3	0	11	1	1	4	1	1	2	0	1	0	0	0	4	3	1	38		
		97.1	95.5	100	93.5	93.3	100	80.4	97.2	97.7	87.1	97.4	96.9	95.7	100	96.8	100	100	100	88.6	87.0	92.9	(95.1)		
	D	41	39	48	55	37	34	51	33	34	33	39	54	56	37	45	54	57	47	54	65	44	957	1026	
		2	4	0	1	15	4	6	8	2	3	11	0	1	3	0	0	0	0	0	4	5	69		
		95.3	90.7	100	98.2	71.2	89.5	89.5	80.5	94.4	91.7	78.0	100	98.2	92.5	100	100	100	100	100	94.2	89.8	(93.0)		
0.0943	A	46	62	59	62	56	69	70	45	44	36	56	40	45	50	47	37	37	44	53	42	53	1053	1118	
		4	1	2	0	10	0	1	3	4	6	5	0	11	2	1	7	1	0	1	5	1	65		
		92.0	98.4	96.7	100	84.8	100	98.6	93.8	91.7	85.7	91.8	100	80.4	96.2	97.9	84.1	97.4	100	98.1	89.4	98.1	(94.1)		
	B	49	40	42	39	18	36	40	31	53	32	25	49	36	32	39	31	34	34	23	33	32	748	776	
		1	0	0	1	5	2	2	0	1	0	0	0	2	2	0	1	7	0	4	0	0	28		
		98.0	100	100	97.5	78.3	94.7	95.2	100	98.1	100	100	100	94.7	94.1	100	96.9	82.9	100	85.2	100	100	(96.0)		
	C	37	30	46	55	48	52	40	38	46	36	39	44	41	34	15	58	40	46	25	52	47	869	953	
		4	15	6	0	1	4	1	5	1	1	2	3	0	10	1	8	3	2	0	3	14	84		
		90.2	66.7	88.5	100	98.0	92.9	97.6	88.4	97.9	97.3	95.1	93.6	100	77.3	93.8	87.9	93.0	95.8	100	94.5	77.0	(91.7)		
	D	45	45	74	68	53	6	57	46	55	53	56	51	53	35	49	30	63	39	48	42	35	1003	1042	
		1	0	0	0	2	0	10	1	1	1	1	1	0	1	2	3	0	6	8	1	0	39		
		97.8	100	100	100	96.4	100	85.1	97.9	98.2	98.1	98.2	98.1	100	97.2	96.1	90.9	100	86.7	85.7	97.7	100	(96.4)		

付表4 (続き) 暴露期間中の産卵数及び受精率

測定濃度 (mg/L)	容器	産卵数 (個) 上段:受精卵数 中段:未受精卵数 下段:受精率(%)																				受精卵計		総産卵数	容器平均 ± 標準偏差		
		暴露日数 (日)																				未受精卵計					
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	(平均受精率)				
0.939	A	41	41	53	42	47	50	41	34	48	43	40	32	44	31	30	36	30	27	36	40	29	815	870	総産卵数 913 ± 172		
		18	5	0	1	6	1	6	0	3	0	2	1	0	1	1	1	2	4	0	1	2	55				
		69.5	89.1	100	97.7	88.7	98.0	87.2	100	94.1	100	95.2	97.0	100	96.9	96.8	97.3	93.8	87.1	100	97.6	93.5	(94.3)				
	B	29	44	32	26	36	33	36	40	30	43	35	34	39	34	23	31	27	26	34	27	20	679			698	
		0	1	6	0	2	0	1	2	0	0	1	0	2	1	1	0	0	0	2	0	0	19				
		100	97.8	84.2	100	94.7	100	97.3	95.2	100	100	97.2	100	95.1	97.1	95.8	100	100	100	94.4	100	100	(97.6)				
	C	50	82	46	60	63	64	54	56	49	35	56	45	44	49	23	38	39	46	40	42	32	1013			1105	受精率 (94.3) ± 2.5
		6	1	3	0	6	6	0	1	1	8	1	1	2	1	3	5	12	4	1	8	22	92				
		89.3	98.8	93.9	100	91.3	91.4	100	98.2	98.0	81.4	98.2	97.8	95.7	98.0	88.5	88.4	76.5	92.0	97.6	84.0	59.3	(91.3)				
	D	48	47	53	47	40	50	52	35	33	45	51	52	47	45	38	47	28	36	51	41	34	920			977	
		0	3	2	2	8	2	3	1	0	2	2	1	2	0	0	0	17	1	4	1	6	57				
		100	94.0	96.4	95.9	83.3	96.2	94.5	97.2	100	95.7	96.2	98.1	95.9	100	100	100	62.2	97.3	92.7	97.6	85.0	(94.2)				
9.53	A	33	28	41	41	38	47	28	31	30	34	39	27	35	28	16	27	31	26	13	15	16	624	721	総産卵数 870 ± 106		
		0	2	0	0	2	1	6	16	2	1	0	1	7	8	12	6	6	2	5	11	9	97				
		100	93.3	100	100	95.0	97.9	82.4	66.0	93.8	97.1	100	96.4	83.3	77.8	57.1	81.8	83.8	92.9	72.2	57.7	64.0	(85.4)				
	B	52	53	47	46	42	59	39	36	44	24	43	39	42	43	27	26	32	39	46	47	32	858			971	
		10	7	2	0	13	4	12	1	6	6	3	2	0	7	13	1	12	2	2	6	4	113				
		83.9	88.3	95.9	100	76.4	93.7	76.5	97.3	88.0	80.0	93.5	95.1	100	86.0	67.5	96.3	72.7	95.1	95.8	88.7	88.9	(88.6)				
	C	35	30	41	47	44	31	57	33	47	42	48	48	40	42	46	28	52	36	39	11	46	843			895	
		0	0	0	1	6	7	0	4	1	0	2	2	1	1	4	1	0	2	2	17	1	52				
		100	100	100	97.9	88.0	81.6	100	89.2	97.9	100	96.0	96.0	97.6	97.7	92.0	96.6	100	94.7	95.1	39.3	97.9	(93.2)				
	D	37	42	53	29	43	48	42	37	32	50	30	46	21	36	48	33	25	37	37	43	54	823			894	受精率 (89.7) ± 3.5
		3	2	0	4	3	0	8	2	6	0	6	7	3	0	1	5	6	2	10	3	0	71				
		92.5	95.5	100	87.9	93.5	100	84.0	94.9	84.2	100	83.3	86.8	87.5	100	98.0	86.8	80.6	94.9	78.7	93.5	100	(91.5)				

付表 5 暴露終了時の全長、体重、二次性徴、肝臓体指数 (HSI)、生殖腺体指数 (GSI)

容器	個体 番号	測定濃度 (mg/L)																			
		対照区										0.0943									
		オス					メス					オス					メス				
		全長 (cm)	体重 (mg)	二次 性徴	HSI (%)	GSI (%)	全長 (cm)	体重 (mg)	二次 性徴	HSI (%)	GSI (%)	全長 (cm)	体重 (mg)	二次 性徴	HSI (%)	GSI (%)	全長 (cm)	体重 (mg)	二次 性徴	HSI (%)	GSI (%)
A	1	2.96	223	75	1.35	0.808	3.10	331	0	3.02	8.88	3.11	281	99	2.38	1.14	3.12	358	0	2.99	7.98
	2	3.01	239	76	2.84	0.961	2.89	284	0	3.56	7.90	3.26	322	65	2.17	0.962	3.18	354	0	3.73	6.84
	3	3.04	281	74	1.56	0.747	2.74	242	0	2.15	6.42	3.17	288	81	1.81	1.32	2.78	231	0	3.59	5.41
B	4	3.38	335	58	2.09	0.716	3.32	380	0	4.14	12.8	3.22	374	80	2.09	1.07	3.10	298	0	4.09	6.51
	5	2.92	229	96	2.27	1.31	2.92	233	0	2.36	5.27	2.93	226	85	2.71	0.976	3.08	292	0	2.94	8.52
	6	3.12	318	78	2.01	0.881	2.90	241	0	3.44	6.30	2.87	208	57	1.06	0.577	2.94	260	0	3.23	7.19
C	7	3.26	332	75	2.80	1.17	3.00	289	0	5.81	5.61	3.05	295	76	1.80	0.882	3.11	329	0	1.37	5.65
	8	2.98	296	99	1.86	0.641	2.90	224	0	3.79	6.77	2.98	275	54	1.82	1.64	2.99	262	0	3.51	5.92
	9	3.25	386	84	1.76	0.881	2.95	497	0	2.21	4.14	2.79	241	66	1.87	1.08	3.05	319	0	3.70	9.22
D	10	2.99	269	79	1.38	0.781	3.25	386	0	3.53	10.1	3.19	327	62	1.44	1.22	3.05	316	0	1.68	7.08
	11	2.88	226	69	1.60	0.754	3.30	428	0	3.64	8.24	3.29	342	70	1.32	1.17	2.96	276	0	1.38	7.25
	12	3.29	323	95	1.67	0.620	2.83	272	0	2.72	7.61	3.08	313	76	1.02	0.766	2.86	255	0	1.73	5.58
A 容器平均		3.00	248	75.0	1.92	0.839	2.91	285	0	2.91	7.73	3.18	297	81.7	2.12	1.14	3.03	314	0	3.44	6.74
B 容器平均		3.14	294	77.3	2.12	0.969	3.05	285	0	3.31	8.12	3.01	269	74.0	1.95	0.874	3.04	283	0	3.42	7.41
C 容器平均		3.16	338	86.0	2.14	0.898	2.95	337	0	3.94	5.51	2.94	270	65.3	1.83	1.20	3.05	303	0	2.86	6.93
D 容器平均		3.05	272	81.0	1.55	0.718	3.13	362	0	3.30	8.66	3.19	327	69.3	1.26	1.05	2.96	282	0	1.59	6.64
試験区平均		3.09	288	79.8	1.93	0.856	3.01	317	0	3.36	7.50	3.08	291	72.6	1.79	1.07	3.02	296	0	2.83	6.93
標準偏差		0.07	38	4.8	0.28	0.107	0.10	39	0	0.42	1.38	0.12	27	7.0	0.37	0.14	0.04	16	0	0.87	0.34

付表5 (続き) 暴露終了時の全長、体重、二次性徴、肝臓体指数 (HSI)、生殖腺体指数 (GSI)

容器	個体 番号	測定濃度 (mg/L)																			
		0.939										9.53									
		オス					メス					オス					メス				
		全長 (cm)	体重 (mg)	二次 性徴	HSI (%)	GSI (%)	全長 (cm)	体重 (mg)	二次 性徴	HSI (%)	GSI (%)	全長 (cm)	体重 (mg)	二次 性徴	HSI (%)	GSI (%)	全長 (cm)	体重 (mg)	二次 性徴	HSI (%)	GSI (%)
A	1	3.51	420	76	1.81	0.738	2.82	287	0	3.03	5.43	3.32	373	89	2.79	0.751	2.94	260	0	3.15	5.96
	2	3.20	305	67	1.64	0.786	3.13	337	0	3.48	7.13	3.28	339	71	2.04	0.650	3.18	335	0	3.64	8.03
	3	2.88	245	96	1.88	0.897	2.95	257	0	2.76	7.16	3.39	420	76	2.33	0.929	2.91	270	0	4.49	13.5
B	4	2.97	268	92	2.05	0.933	2.82	225	0	2.67	5.52	3.22	321	75	2.25	0.967	2.98	240	0	2.62	9.86
	5	3.27	345	115	2.17	0.551	2.95	249	0	2.69	5.54	3.11	310	94	3.23	1.23	3.08	321	0	4.05	7.42
	6	-	-	-	-	-	3.04	279	0	3.34	8.36	3.26	328	100	1.83	0.672	3.24	334	0	2.70	7.98
C	7	3.04	330	42	1.57	0.636	3.04	313	0	3.19	7.63	3.11	298	89	1.68	0.604	3.02	265	0	4.65	8.65
	8	2.87	192	92	1.88	0.939	3.10	321	0	3.89	8.88	3.07	315	78	1.56	0.413	3.10	308	0	3.90	7.21
	9	2.97	232	66	1.38	0.691	3.37	469	0	4.84	9.34	3.09	294	65	1.70	0.408	3.11	298	0	3.92	8.85
D	10	2.86	235	61	2.05	0.469	3.17	341	0	2.58	8.21	3.05	302	48	1.39	0.794	2.93	303	0	2.90	7.82
	11	3.07	349	56	2.81	0.487	2.98	312	0	2.31	10.4	3.22	348	84	1.78	1.29	3.28	401	0	3.65	8.31
	12	3.01	251	57	1.31	0.438	2.96	261	0	2.15	7.13	3.10	283	76	0.812	0.777	2.76	211	0	2.14	9.11
A 容器平均		3.20	324	79.7	1.77	0.807	2.97	294	0	3.09	6.58	3.33	377	78.7	2.39	0.776	3.01	288	0	3.76	9.16
B 容器平均		3.12	306	103.5	2.11	0.742	2.94	251	0	2.90	6.47	3.20	319	89.7	2.44	0.955	3.10	298	0	3.12	8.42
C 容器平均		2.96	251	66.7	1.61	0.755	3.17	368	0	3.97	8.61	3.09	302	77.3	1.65	0.475	3.08	290	0	4.16	8.24
D 容器平均		2.98	278	58.0	2.06	0.465	3.04	305	0	2.34	8.58	3.12	311	69.3	1.33	0.955	2.99	305	0	2.89	8.42
試験区平均		3.06	290	77.0	1.89	0.692	3.03	304	0	3.08	7.56	3.19	327	78.8	1.95	0.790	3.04	295	0	3.48	8.56
標準偏差		0.11	32	19.8	0.24	0.154	0.10	48	0	0.68	1.20	0.11	34	8.4	0.55	0.226	0.05	8	0	0.58	0.41

-は暴露終了時に死亡していたことを示す。

付表6 暴露終了時の肝臓中ビテロジェニン濃度

測定濃度 (mg/L)	容器	個体 番号	オス			メス		
			測定濃度 (ng/mg)	容器平均	平均 ± 標準偏差	測定濃度 (ng/mg)	容器平均	平均 ± 標準偏差
対照区	A	1	n.d.	n.d.	0.567 ± 0.133	894	537	345 ± 152
		2	n.d.			303		
		3	n.d.			415		
	B	4	n.d.	n.d.		70.4	366	
		5	n.d.			450		
		6	n.d.			578		
	C	7	1.30	0.767		3.75	171	
		8	n.d.			18.7		
		9	n.d.			491		
	D	10	n.d.	n.d.		396	306	
		11	n.d.			272		
		12	n.d.			251		
0.0943	A	1	n.d.	n.d.	n.d.	480	237	354 ± 105
		2	n.d.			9.95		
		3	n.d.			220		
	B	4	n.d.	n.d.		290	462	
		5	n.d.			523		
		6	n.d.			573		
	C	7	n.d.	n.d.		484	419	
		8	n.d.			354		
		9	n.d.			420		
	D	10	n.d.	n.d.		242	297	
		11	n.d.			160		
		12	n.d.			488		

n.d.は定量下限（1.00 ng/mg liver weight）未満であることを示す。

n.d.の個体は定量下限値の半値を用いて平均値及び標準偏差を算出した。

付表 6 (続き) 暴露終了時の肝臓中ビテロジェニン濃度

測定濃度 (mg/L)	容器	個体 番号	オス			メス		
			測定濃度 (ng/mg)	容器平均	平均 ± 標準偏差	測定濃度 (ng/mg)	容器平均	平均 ± 標準偏差
0.939	A	1	n.d.	0.817	0.888 ± 0.460	757	730	398 ± 230
		2	1.45			1080		
		3	n.d.			354		
	B	4	n.d.	n.d.		392	319	
		5	n.d.			509		
		6	-			56.5		
	C	7	1.05	0.683		658	342	
		8	n.d.			85.1		
		9	n.d.			283		
	D	10	3.65	1.55		7.65	202	
		11	n.d.			214		
		12	n.d.			384		
9.53	A	1	2.10	381	393 ± 306	364	525	449 ± 114
		2	902			865		
		3	239			347		
	B	4	n.d.	79.6		7.70	293	
		5	1.55			612		
		6	237			259		
	C	7	3.85	810		915	433	
		8	27.6			7.25		
		9	2400			378		
	D	10	249	301		607	542	
		11	649			570		
		12	6.00			450		

n.d.は定量下限 (1.00 ng/mg liver weight) 未満であることを示す。

n.d.の個体はその定量下限値の半値を用いて平均値及び標準偏差を算出した。

-は暴露終了時に死亡していたことを示す。

希积水の水質 (2018年7月10日採水)

Parameter	Unit	Results	Determination limit
Total hardness (Ca, Mg)	mg/L	20	1
Suspended solid	mg/L	< 1	1
pH	-	7.6 (23.8°C)	-
Total organic carbon	mg/L	< 0.5	0.5
Chemical oxygen demand	mg/L	< 1	1
Free residual chlorin	mg/L	< 0.02	0.02
Ammonium ion	mg/L	< 0.1	0.1
Total cyanide	mg/L	< 0.05	0.05
Alkalinity	mg/L	21	1
Electric conductivity	mS/m	8.7	0.1
Total mercury	mg/L	< 0.0005	0.0005
Cadmium	mg/L	< 0.001	0.001
Chromium (VI)	mg/L	< 0.01	0.01
Lead	mg/L	< 0.001	0.001
Arsenic	mg/L	< 0.005	0.005
Iron	mg/L	< 0.01	0.01
Copper	mg/L	< 0.001	0.001
Cobalt	mg/L	< 0.001	0.001
Manganese	mg/L	< 0.005	0.005
Aluminum	mg/L	< 0.02	0.02
Zinc	mg/L	< 0.1	0.1
Nickel	mg/L	< 0.001	0.001
Silver	mg/L	< 0.0001	0.0001
1,2-dichloropropane	mg/L	< 0.002	0.002
Chlorothalonil	mg/L	< 0.001	0.001
Propyzamide	mg/L	< 0.0008	0.0008
Chlornitrofen	mg/L	< 0.0001	0.0001
Simazine	mg/L	< 0.0003	0.0003
Thiobencarb	mg/L	< 0.001	0.001
Diazinon	mg/L	< 0.0005	0.0005
Isoxathion	mg/L	< 0.0008	0.0008
Fenitrothion	mg/L	< 0.0003	0.0003
EPN	mg/L	< 0.0006	0.0006
Dichlorvos	mg/L	< 0.001	0.001
Iprobenfos	mg/L	< 0.0008	0.0008
PCB	mg/L	< 0.0005	0.0005
Boron	mg/L	< 0.1	0.1
Fluorine	mg/L	0.1	0.1
Sulfate ion	mg/L	6.9	0.5
Chloride ion	mg/L	7.8	0.2
Sodium	mg/L	8.4	0.2
Potassium	mg/L	1.6	0.2
Calcium	mg/L	5.7	0.1
Magnesium	mg/L	1.3	0.1