

環境省請負業務

平成 30 年度

平成 29 年度及び平成 30 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（4-*t*-オクチルフェノール）実施業務

報告書

平成 31 年 3 月

株式会社 L S I メディエンス

まえがき

本報告書は、平成29年度及び平成30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（4-*t*-オクチルフェノール）実施業務報告である。

平成31年3月

株式会社LSIメディエンス

化学物質名

4-*t*-オクチルフェノール

目 次

	頁
1 実施内容	1
2 4- <i>t</i> -オクチルフェノール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	25
2.2.7 F2 世代の結果	31
2.3 結果の概要	32
2.4 考察	34
2.5 参考文献	37
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	38
附属資料-1	39

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（4-*t*-オクチルフェノール）について、第二段階生物試験である MEOGRT を平成 29 年度から 30 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 9 月に OECD テストガイドラインとして認定されたメダカ拡張一世代繁殖試験（Medaka Extended One Generation Reproduction Test: OECD TG240）¹⁾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 の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) 4-*t*-オクチルフェノールのメダカ拡張一世代繁殖試験の実施

OECD TG240 に基づいて 4-*t*-オクチルフェノールの 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-ROM）8 式を作成した。

2. 4-*t*-オクチルフェノール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。²⁾

試験に用いる試薬は，Sigma-Aldrich Co. LLC. (Lot 番号：MKCC1183，純度：98.7%) より入手した。

(1) CAS 登録番号

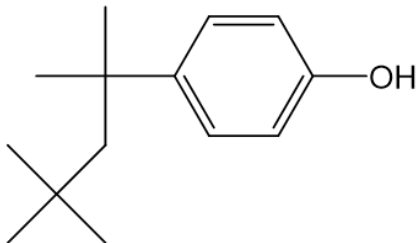
CAS: 140-66-9

(2) 一般名

和名：4-*t*-オクチルフェノール

英名：4-*tert*-Octylphenol

(3) 構造式



(4) 分子式および分子量

分子式：C₁₄H₂₂O

分子量：206.34

(5) 化学名

和名：4-(1,1,3,3-テトラメチルブチル)フェノール (IUPAC 命名法)

英名：4-(1,1,3,3-tetramethylbutyl)phenol (IUPAC 命名法)

(6) 溶解性

対水溶解度：7 mg/L (20°C 推定値)

(7) 分配係数

オクタノール/水分配係数 1.4 (実測値)

(8) その他

外観： 白色粉末

比重： 0.889 (120°C)

蒸気圧：0.000478 mmHg (25°C 外挿値)

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： オールガラス水槽（5 L）
- ・飼育水： 調温清浄濾過水
- ・飼育方法： 流水式
- ・水温： $25\pm 2^{\circ}\text{C}$
- ・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（A&A Marine LLC, USA 製）の孵化後 24 時間以内の幼生を、1 日 2 回飽食量を給餌

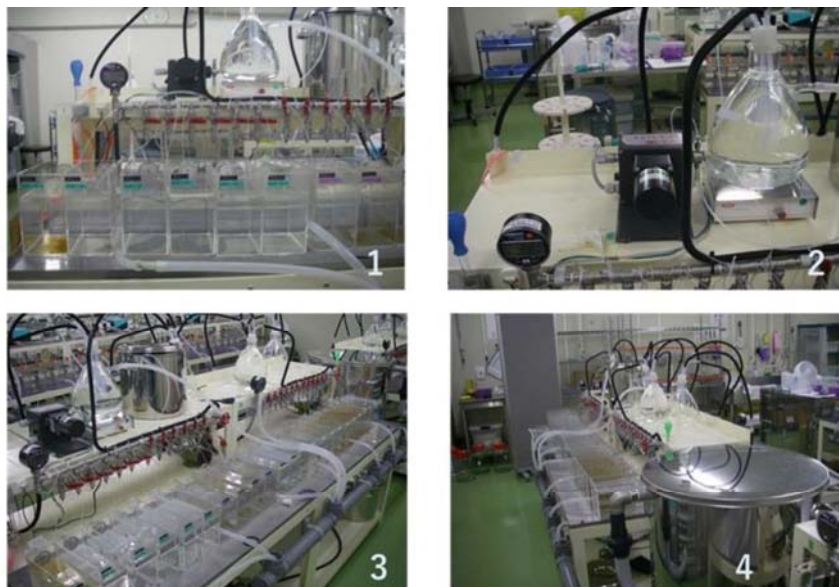
2.1.3 試験環境および条件など

(1) 試験室

試験はすべて、株式会社 L S I メディエンス環境リスク評価センター（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

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*）
- * F0 世代のばく露開始後 3 日目にメダカが水槽から飛び出して死亡したため以降設置
- ・希釈水：調温清浄濾過水
- ・ばく露方式：流水式（換水率 5 回/日以上）
- ・ばく露期間：F0 世代から F2 世代の孵化までの計 20 週
 - ・ 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 3 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（100, 32, 10, 3.2, 1.0 $\mu\text{g/L}$ ），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 1～3 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 15 週齢（受精後 102 日））
オス 250 mg 以上，メス 350 mg 以上
- ・継代時期：
 - ・ F0 世代：試験開始 4 週目のできるだけ早い日（+1 日）
（本試験では試験開始 22 日目，F0：18 週齢目）
 - ・ F1 世代：試験開始 120 日目（+1 日）（F1：15 週齢目）
（本試験では試験開始 120 日目）
- ・水温：25 \pm 1 $^{\circ}\text{C}$
- ・pH：6.5～8.5（ばく露期間中の変動は \pm 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（A&A Marine LLC, USA 製）の孵化後 24 時間以内の幼生を 1 日 2 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	0.1
	Day 2	0.1
	Day 3	0.1
	Day 4	0.1
	Day 5	0.1
	Day 6	0.2
	Day 7	0.2
Week2	Day 8	0.2
	Day 9	0.3
	Day 10	0.3
	Day 11	0.3
	Day 12	0.4
	Day 13	0.6
	Day 14	0.9
Week3	Day 15	0.9
	Day 16-21	1.5
Week 4	Day 22-28	2.3
Week 5	Day 29-35	3.3
Week 6	Day 36-42	5.1
Week 7	Day 43-49	8.8
Week 8	Day 50-56	8.8
Week 9	Day 57-62	(12 fish/tank) 8.8
	Day 63	(2 fish/tank) 10.6
Week 10	Day 64-70	10.6
Week 11~	Day 71~	(F0)10.6, (F1)12.7

(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

被験物質の溶解度が低いため、1.0~100 µg/L 濃度区それぞれの試験液は、負荷率 (Loading rate：被験物質と水の重量対容積比) 10 mg/L の試験液をスターラーで 48 時間攪拌し、フィルター*1でろ過した試験原液*2 (濃度測定を実施。分析方法は(6)被験物質の濃度測定と同様) を用い、それぞれ試験用水で希釈して調製した。

*1：メルクミリポア製メンブレンフィルター 0.22 µm GS

*2：ろ過後の被験物質濃度は約 6 mg/L 前後となることを予備検討にて確認

(6) 被験物質の濃度測定

生物試験に使用した試験水を液々抽出法によって前処理を実施し、ガスクロマトグラフ質量分析計 (GC/MS) を用いて定量した。

【試薬】

- ・4-*t*-オクチルフェノール：Sigma-Aldrich Co. LLC製
- ・フェナントレン-d10：環境分析用 富士フイルム和光純薬株式会社製
- ・*n*-ヘキサン：特級相当 富士フイルム和光純薬株式会社製
- ・超純水：JIS K0557 A4 グレードの水

【GC/MS 測定条件】

装置

ガスクロマトグラフ質量分析計 5975C型 No.1, Agilent Technologies製
ワークステーション : MSD ChemStation
ガスクロマトグラフ (GC) : 7890A型
オートインジェクタ : 7683B型 (Back Inlet)
質量選択検出器 (MSD) : 5975C inertXL型

条件

[GC 条件]

カラム : Agilent Technologies 製 J&W DB-1 30m×0.25mm×0.25µm
キャリアーガス : ヘリウム 1.00 mL/min
オープン温度 : 180°C(1 min)→5°C/min→215°C(0 min)
注入口温度 : 180°C
MS インターフェース温度 : 250°C
注入条件 : スプリット (スプリット比 = 20 : 1)
注入量 : 2 µL

[MSD 条件]

温度条件 : イオン源 230°C, 四重極マス・フィルタ 150°C
SIM (Selected Ion Monitoring) 条件 :
Solvent Delay : 2.0 min
Quant ion : *m/z* 135.1
188.0(内部標準)

【標準溶液の調製】

4-*t*-オクチルフェノール 50 mg を秤量し, *n*-ヘキサンで溶解し 50 mL に定容とし, 1000 mg/L の溶液を調製した。この溶液を *n*-ヘキサンで順次希釈し, 0.0250, 0.0500, 0.100, 0.500 mg/L の標準溶液を調製した。また, *n*-ヘキサンで 0 mg/L の標準溶液とした。

フェナントレン-*d*₁₀ 20 mg を秤量し, *n*-ヘキサンで溶解し 20 mL に定容とし, 1000 mg/L の溶液を調製した。さらにこれを *n*-ヘキサンで 0.250 mg/L に希釈し, 内部標準溶液とした。

【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 100µL 採取 (インサートバイアル使用)
| ←フェナントレン-*d*₁₀ (0.250 mg/L) 20µL 添加
GC/MS 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 45 mL を 50 ml 共栓付きガラス製遠沈管に採取
| ←*n*-ヘキサン 0.5 mL 添加
振とう攪拌 (東京理化学器械株式会社製, マルチシェーカーMMS3010, 20 分間)
|
遠心分離 (4°C, 3000rpm, 10 分間 : 日立工機製 CR21GII型)
|
上層を 100µL 採取 (インサートバイアル使用)
| ←フェナントレン-*d*₁₀ (0.250 mg/L) 20µL 添加
GC/MS 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 ₀														F ₁					
Fertility	F ₀														F ₁					
Hatch					F ₁														F ₂	
Survival					F ₁								F ₁				F ₁			
Growth				F ₀									F ₁				F ₁			
Vitellogenin													F ₁							
Secondary sex													F ₁				F ₁			
Histopathology																	F ₁			
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

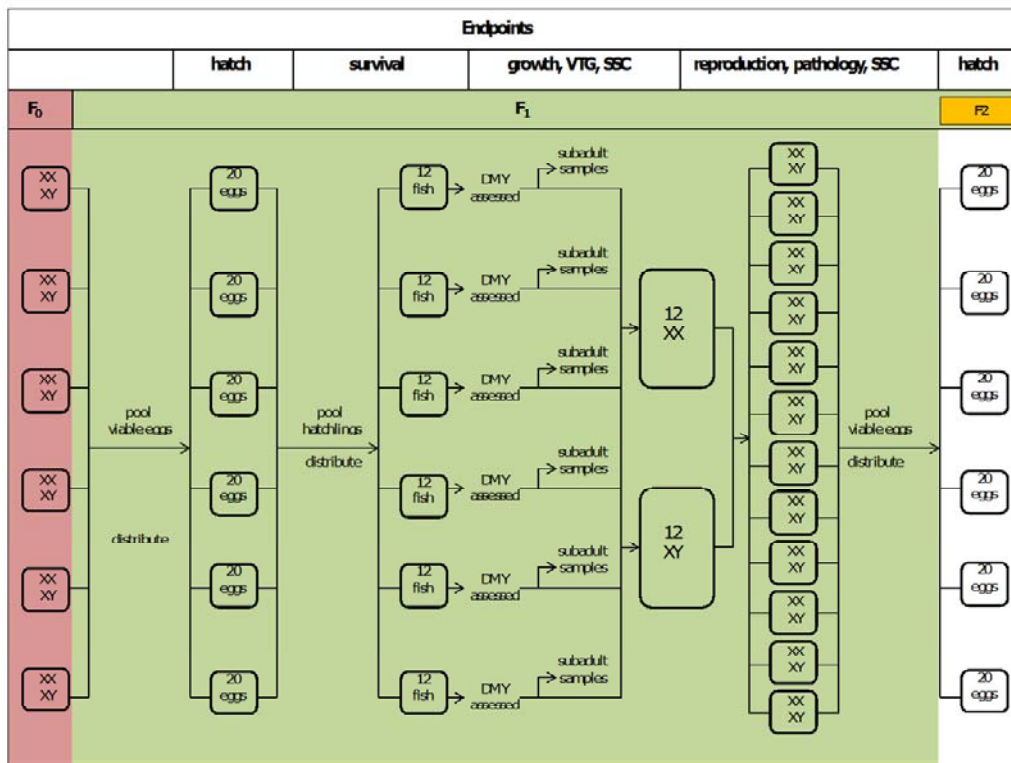


図 1-3 MEOGRT における連のプールと分配の手順

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 14 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 日間のじゅん化を行った (50 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。

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

[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 23, 125 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 (メトラー製 AG204 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 (メトラー製 AG204 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 Vitellogenin MEDAKA ELISA System (GE ヘルスケア・ジャパン株式会社製) 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200 μL を加える。
- ② 肝臓をホモジナイズし、4°C、9000g、10 分間の遠心分離にかける。
- ③ 分離した上清を 500 μL マイクロテストチューブに回収し、直ちに氷冷し、続けてビテロジェニン測定に供することができない場合は-80 °Cで保存した。

この上清を ELISA (Enzyme Linked Immuno Solvent Assay) 法によるビテロジェニン測定に供した。測定にはこのホモジネート上清をさらに 10 倍希釈したものを使用した。ホモジネート上清中に含まれるビテロジェニンの分析には GE ヘルスケア・ジャパン株式会社製のメダカビテロジェニン測定用 ELISA キットを使用し、付属のマニュアルに従って測定した。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。

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 (メトラー製 AG204 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。

各試験区において最も多くの孵化がみられた 2 日間 (本試験では受精後 8 日目および 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 Takara Ex Taq® (タカラバイオ株式会社製) 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。
- 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 (64 日齢または 65 日齢) に氷麻酔処理した上で解剖し, 下記項目について測定した。各計測・測定方法は, F0 世代と同一である。

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

[F2 試験用受精卵の採取]

ばく露 15 週目の第 1 日 (Test Day 120) に各ペアの産出した受精卵をすべて, 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]

15 週間のばく露期間終了後, 生存した全個体を Test Day 122 および Test Day 123 (100 日齢または 101 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一である。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（ただしビ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³⁾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 StatCharrms v. 0.90.91（2018 年 6 月 16 日版、R cran サイトより入手）および R-3.4.4（win 64 bit）を用いた⁴⁾。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・孵化後生存率・生存率	アークサイン変換	単調性の検定 →(単調性あり) Jonckheere-Terpstra 検定 →(単調性なし)
全長・湿重量	なし	垂成体の場合：Mixed effect ANOVA
肝臓体指数・生殖腺体指数	なし	→(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：
二次性徴	なし	一元配置分散分析・正規性・等分散性の検定 →(正規性・等分散性あり) Dunnett 検定 →(正規性・等分散性なし) Dunn 検定
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 25.2~25.4°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 7.1~7.2 であり, 最小値は 6.9, 最大値は 7.7 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濃度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 ($\mu\text{g/L}$)	水温($^{\circ}\text{C}$)	pH	溶存酸素(mg/L)
Control	25.2 ± 0.3	7.1 ± 0.2	7.9 ± 0.3
1.0	25.3 ± 0.3	7.1 ± 0.1	7.9 ± 0.3
3.2	25.2 ± 0.4	7.2 ± 0.2	7.8 ± 0.3
10	25.4 ± 0.3	7.2 ± 0.2	7.8 ± 0.4
32	25.4 ± 0.3	7.2 ± 0.1	7.8 ± 0.3
100	25.4 ± 0.4	7.2 ± 0.1	7.8 ± 0.3

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 92.6~100%, 変動係数は 9~11%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。

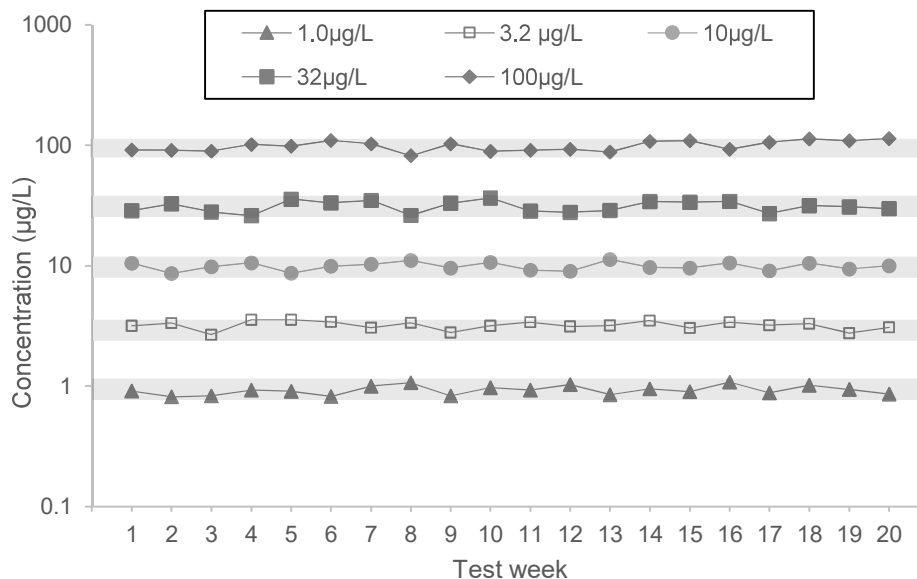


図 1-4 試験期間中の測定濃度の推移

注) 灰色部分は平均値±20%の範囲を示した。

表 1-4 試験液中の被験物質濃度

設定濃度 ($\mu\text{g/L}$)	分析回数	平均測定濃度 ($\mu\text{g/L}$)	設定濃度比 (%)	変動係数 (%)
Control	20	ND	-	-
1.0	20	0.926	92.6	9
3.2	20	3.21	100	8
10	20	9.91	99.1	8
32	20	31.1	97.2	11
100	20	99.2	99.2	10

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。

3.21 $\mu\text{g/L}$ 濃度区において、ばく露開始後 3 日目にメスが 1 個体水槽より飛び出して死亡していた。そのため、この死亡は事故死とした。いずれの試験区においても、行動・外観の異常は認められなかった。

表 1-5 F0 世代の試験期間中の死亡固体

測定濃度 ($\mu\text{g/L}$)	オス			メス			合計 死亡率 (%)
	供試数	死亡数	死亡率 (%)	供試数	死亡数	死亡率 (%)	
Control	12	0	0	12	0	0	0
0.926	6	0	0	6	0	0	0
3.21	6	0	0	6	1	17	8
9.91	6	0	0	6	0	0	0
31.1	6	0	0	6	0	0	0
99.2	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、受精卵数および受精率において、いずれの濃度区でも対照区と比較し有意な差は認められなかった。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ため、ばく露時間による影響はなかったと考えられた。

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 9264 個の卵の受精率は 98%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 ($\mu\text{g/L}$)	総産卵数 (eggs/day/female)							
	21 日間		1 週目(DAY1-7)		2 週目(DAY8-14)		3 週目(DAY15-21)	
Control	36.8	\pm 3.8	37.9	\pm 5.1	41.3	\pm 4.2	31.1	\pm 4.8
0.926	38.9	\pm 6.6	38.7	\pm 7.0	43.3	\pm 7.0	34.6	\pm 6.4
3.21	38.9	\pm 5.5	40.3	\pm 6.6	42.4	\pm 6.2	34.1	\pm 3.9
9.91	36.4	\pm 2.5	36.8	\pm 1.8	39.2	\pm 3.1	33.3	\pm 3.3
31.1	35.8	\pm 5.8	38.7	\pm 7.0	40.4	\pm 5.0	28.3	\pm 6.9
99.2	36.5	\pm 4.1	40.1	\pm 6.1	38.6	\pm 4.5	30.8	\pm 2.8

測定濃度 ($\mu\text{g/L}$)	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	35.9	\pm 4.0	37.0	\pm 5.1	40.2	\pm 4.9	30.5	\pm 4.8
0.926	37.1	\pm 5.8	35.4	\pm 5.4	42.3	\pm 6.8	33.7	\pm 6.6
3.21	37.6	\pm 5.4	39.2	\pm 6.3	41.0	\pm 6.7	32.4	\pm 3.9
9.91	35.7	\pm 2.3	35.9	\pm 2.0	38.3	\pm 2.9	32.9	\pm 3.5
31.1	35.1	\pm 5.6	37.5	\pm 6.3	40.1	\pm 4.9	27.5	\pm 6.6
99.2	35.6	\pm 4.2	38.8	\pm 6.1	38.3	\pm 4.7	29.5	\pm 2.6

測定濃度 ($\mu\text{g/L}$)	受精率 (%)							
	21 日間		1 週目(DAY1-7)		2 週目(DAY8-14)		3 週目(DAY15-21)	
Control	97.6	\pm 1.9	97.5	\pm 1.1	97.3	\pm 4.2	98.1	\pm 0.7
0.926	95.7	\pm 2.5	91.9	\pm 7.0	97.8	\pm 0.8	97.5	\pm 2.9
3.21	96.4	\pm 2.2	97.3	\pm 1.7	96.5	\pm 2.4	95.1	\pm 4.4
9.91	98.0	\pm 1.2	97.5	\pm 1.8	97.8	\pm 2.2	98.7	\pm 1.3
31.1	98.0	\pm 0.9	97.1	\pm 2.3	99.3	\pm 0.5	97.3	\pm 2.0
99.2	97.4	\pm 1.4	96.8	\pm 1.4	98.9	\pm 0.7	96.0	\pm 3.9

注) 値は連平均値を元に算出した平均値 \pm 標準偏差 (対照区は n=12, 濃度区は n=6, ただし 3.21 $\mu\text{g/L}$ 濃度区はメス 1 個体事故死のため除外し n=5) を示した。

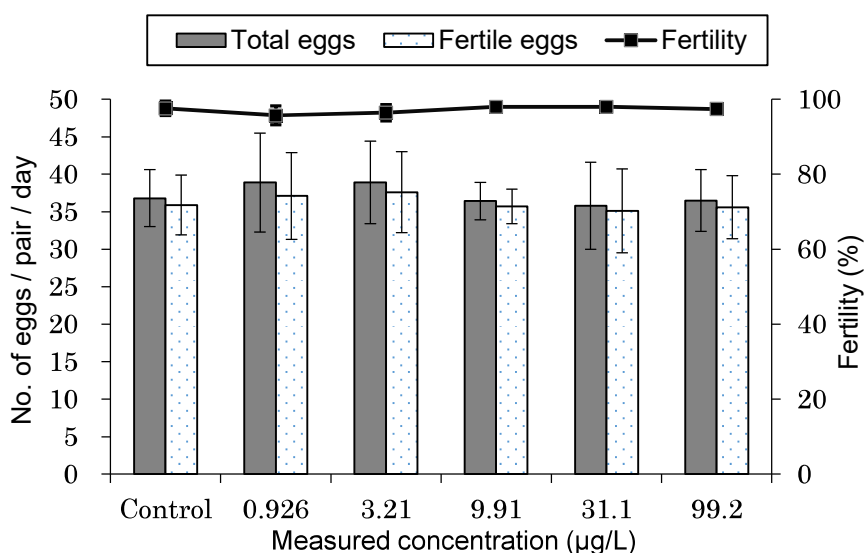


図 1-5 F0 世代の総産卵数・受精卵数・受精率 (各ペア・1 日当たり)

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, 濃度区は n=6, ただし 3.21 $\mu\text{g/L}$ 濃度区はメス 1 個体事故死のため除外し n=5) を示した。

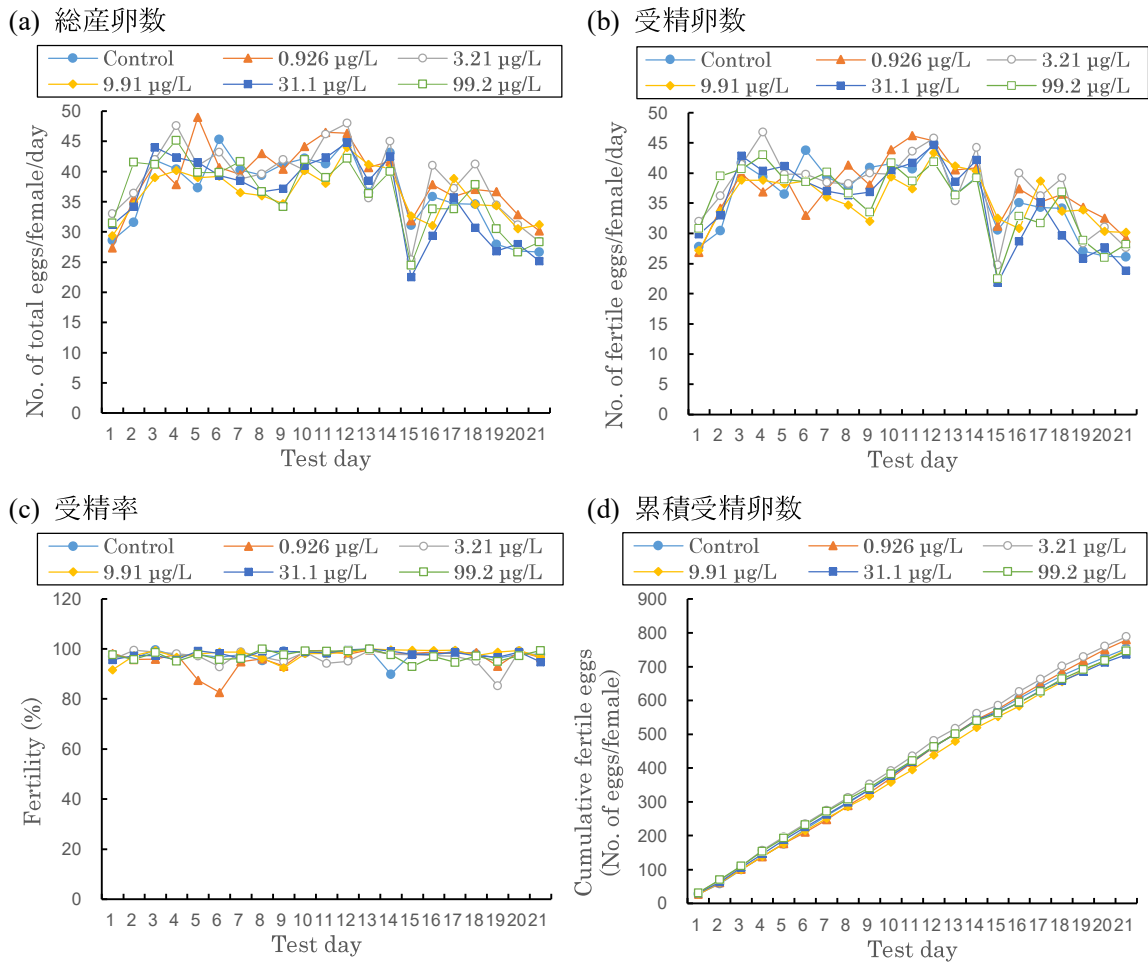


図 1-6 F0 世代の(a)総産卵数, (b)受精卵数, (c)受精率の日変動および(d)累積受精卵数 (値は各試験区の連平均値)

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。オス, メスともに, いずれの濃度区においても, 対照区と比較し有意な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 (µg/L)	全長 (mm)				湿重量 (mg)			
	オス		メス		オス		メス	
Control	32.4	± 1.1	33.3	± 1.0	344	± 41	467	± 46
0.926	32.8	± 0.9	33.9	± 1.3	370	± 29	454	± 35
3.21	32.3	± 0.9	33.8	± 1.4	332	± 21	472	± 46
9.91	32.6	± 1.6	34.0	± 0.4	343	± 55	475	± 28
31.1	32.5	± 1.4	32.4	± 1.2	348	± 45	419	± 50
99.2	32.9	± 1.0	33.7	± 0.8	359	± 30	452	± 37

注) 値は連平均値をに算出した平均値±標準偏差 (対照区は n=12, 濃度区は n=6, ただし 3.21 µg/L 濃度区のメスは n=5) を示した。

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。肝臓体指数において、オスは 99.2 µg/L 濃度区で対照区と比較し有意な減少が認められた。3.21µg/L および 9.91 µg/L 濃度区においても、有意な減少が認められたが、31.1 µg/L 濃度区では有意差は認められなかった。メスはいずれの濃度区においても、対照区と比較し有意な差は認められなかった。生殖腺体指数は、オスは 9.91 µg/L 濃度区以上、メスは 31.1 µg/L 濃度区以上で対照区と比較し有意な増加が認められた。

表 1-8 F0 世代の肝臓体指数および生殖腺体指数

測定濃度 (µg/L)	肝臓体指数 (%)				生殖腺体指数 (%)				
	オス		メス		オス		メス		
Control	2.8	± 0.5	6.2	± 0.6	1.2	± 0.2	10.3	± 1.4	
0.926	2.5	± 0.2	5.7	± 0.5	1.3	± 0.2	11.2	± 0.7	
3.21	2.2	± 0.1	*a	6.0	± 0.8	1.4	± 0.2	10.5	± 1.2
9.91	2.1	± 0.3	*a	6.2	± 0.9	1.5	± 0.3	* 10.9	± 0.8
31.1	2.6	± 0.3		6.1	± 0.7	1.6	± 0.2	* 12.3	± 1.9 *
99.2	2.4	± 0.5	*	6.0	± 1.1	1.4	± 0.3	* 11.8	± 1.7 *

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, ただし 3.21 µg/L 濃度区のメスは n=5) 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, Jonckheere-Terpstra 検定, ただしオスの肝臓体指数は単調性および正規性が認められなかったため Dunn 検定)。a: 有意差が認められたが濃度依存性なし

5) 肝臓中ビテロジェニン濃度 (F0)

ELAISA 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, メスともに 31.1 µg/L および 99.2 µg/L 濃度区において、対照区と比較し有意な上昇が認められた。

表 1-9 F0 世代の肝臓中ビテロジェニン濃度

測定濃度 (µg/L)	肝臓中ビテロジェニン濃度 (ng/mg liver)			
	オス		メス	
Control	3.90	± 11.21	509	± 89
0.926	9.85	± 13.93	422	± 28
3.21	4.29	± 4.27	478	± 127
9.91	4.35	± 8.89	470	± 236
31.1	6.44	± 5.46	* 847	± 592 *
99.2	38.3	± 3.9	* 728	± 157 *

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, ただし 3.21 µg/L 濃度区のメスは n=5) 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, Jonckheere-Terpstra 検定)。

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。オスでは、いずれの濃度区においても、対照区と比較し有意な差は認められなかった。メスでは、すべての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)

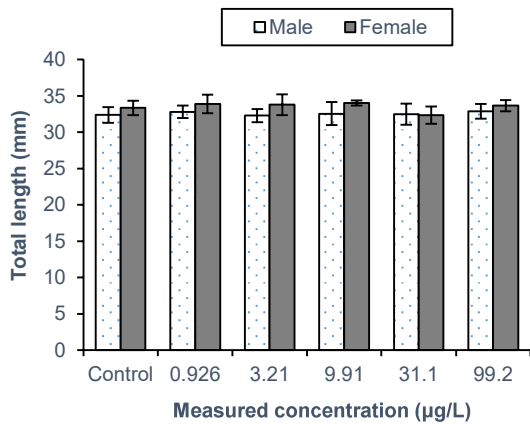
測定濃度 ($\mu\text{g/L}$)	乳頭状小突起を有する節板数 (Plates/fish)			
	オス		メス	
Control	100	\pm 11	0	\pm 0
0.926	82	\pm 13	0	\pm 0
3.21	92	\pm 15	0	\pm 0
9.91	104	\pm 16	0	\pm 0
31.1	96	\pm 12	0	\pm 0
99.2	95	\pm 15	0	\pm 0

注) 値は連平均値を元に算出した平均値 \pm 標準偏差 (対照区は n=12, 濃度区は n=6, ただし 3.21 $\mu\text{g/L}$ 濃度区のメスは n=5) を示した。

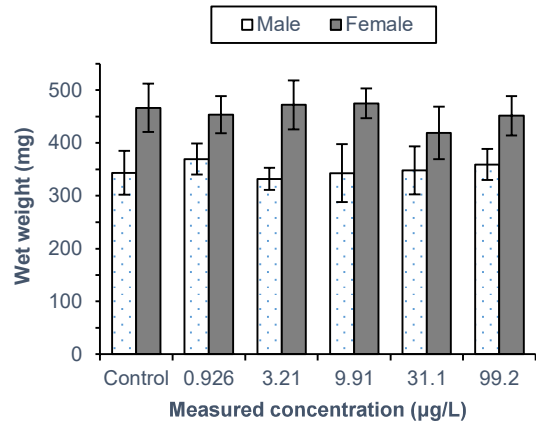
7) 表現型性別と生殖腺形態 (F0)

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。

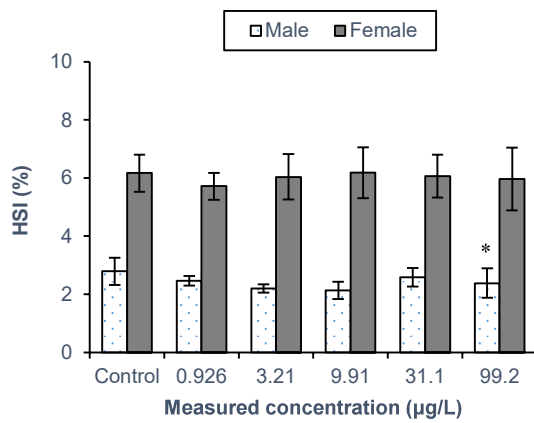
(a) 全長



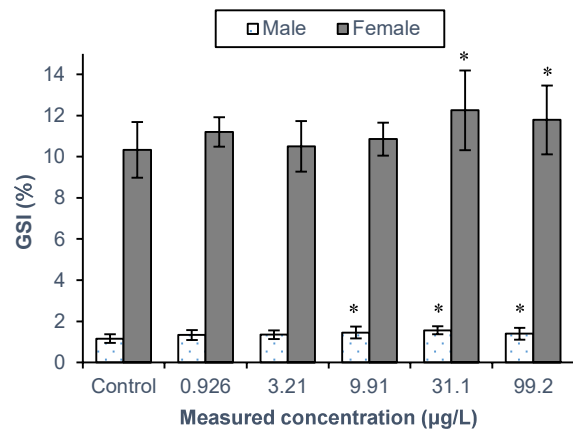
(b) 湿重量



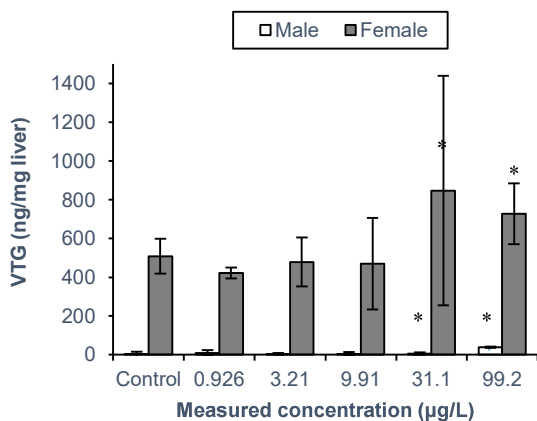
(c) 肝臓体指数 (HSI)



(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

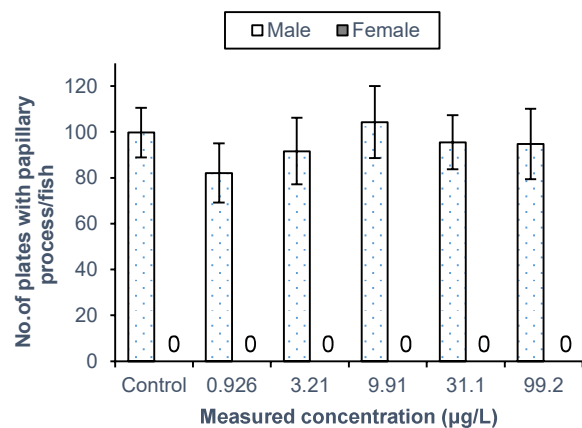


図 1-7 F0 世代の(a)全長, (b)湿重量, (c)肝臓体指数, (d)生殖腺体指数, (e)肝臓中ピテロジェニン濃度, (f)乳頭状小突起を有する節板数

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, ただし 3.21 µg/L 濃度区のみは n=5) 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。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, ただしオスの肝臓体指数は単調性および正規性が認められなかったため Dunn 検定)。

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 112 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。

孵化日数において, 0.926 $\mu\text{g/L}$ ～9.91 $\mu\text{g/L}$ 濃度区で対照区と比較し有意な差が認められたが, 31.1 $\mu\text{g/L}$ および 99.2 $\mu\text{g/L}$ 濃度区では有意差は認められなかった。

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。

表 1-11 F1 世代胚・仔魚期の孵化日数・孵化率

測定濃度 ($\mu\text{g/L}$)	孵化日数 (day)			孵化率 (%)		
	受精後 18 日目			受精後 18 日目		
Control	8.7	\pm 0.2		98	\pm 5	
0.926	8.0	\pm 0.1	*a	98	\pm 4	
3.21	7.9	\pm 0.1	*a	99	\pm 2	
9.91	8.0	\pm 0.2	*a	98	\pm 3	
31.1	8.3	\pm 0.1		97	\pm 3	
99.2	8.7	\pm 0.4		97	\pm 5	

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, 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

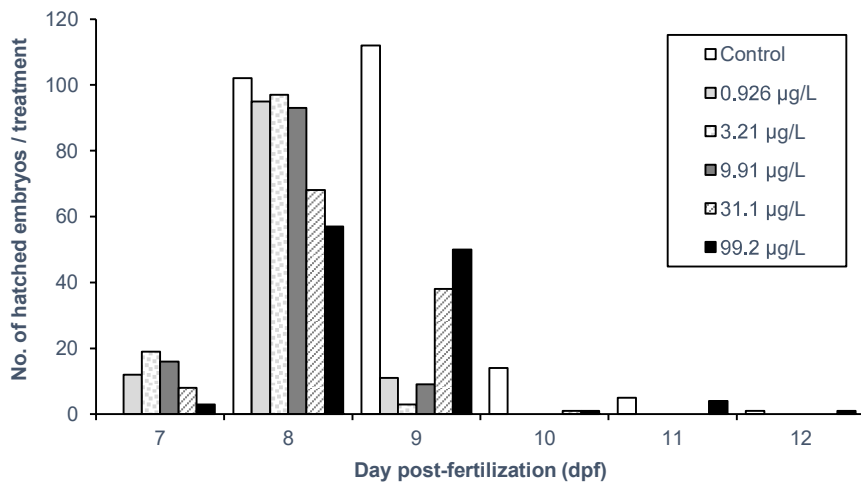


図 1-8 F1 の受精後 7～12 日目における孵化個体数 (各試験区の合計)

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 9 週目 (57 日目, DMY 判定中) における生存率を表 1-12 に示す。

生存率は, 受精後 4 週目では対照区と比較し有意な差は認められなかったが, 受精後 9 週目では 31.1 µg/L および 99.2 µg/L 濃度区で対照区と比較し有意な低下が認められた。

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, 9 週目) の生存率

測定濃度 (µg/L)	生存率 (%)			生存率 (%)		
	受精後 4 週目			受精後 9 週目		
Control	95	±	8	95	±	8
0.926	100	±	0	100	±	0
3.21	93	±	10	93	±	10
9.91	100	±	0	96	±	4
31.1	92	±	5	92	±	5 *
99.2	93	±	6	93	±	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, 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, Jonckheere-Terpstra 検定)。

2) 全長・湿重量 (F1 亜成体)

10 週齢 (65・66 日齢) の亜成体の全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。

オスについては, 全長および湿重量ともにいずれの濃度区においても対照区と比較し有意な差は認められなかった。メスについては, 全長および湿重量ともに 99.2 µg/L 濃度区で対照区と比較し有意な減少が認められた。

表 1-13 F1 世代亜成体の全長・湿重量

測定濃度 (µg/L)	全長 (mm)				湿重量 (mg)			
	オス		メス		オス		メス	
Control	25.8	± 1.1	27.0	± 1.1	174	± 25	229	± 32
0.926	27.2	± 1.0	28.0	± 1.1	203	± 21	252	± 31
3.21	26.6	± 1.4	27.8	± 1.3	192	± 28	249	± 37
9.91	27.0	± 1.1	27.2	± 1.1	197	± 21	225	± 22
31.1	26.2	± 1.2	26.4	± 1.4	187	± 25	212	± 34
99.2	25.5	± 1.0	25.0	± 0.9 *	182	± 24	179	± 24 *

注) 各個体を元に算出した平均値±標準偏差 (対照区~濃度区の個体数はそれぞれオス: n=41,19,24,25,24,21, メス: n=48,29,19,20,18,22) 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, オ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, メスは Jonckheere-Terpstra 検定)。

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。99.2 µg/L 濃度区のみメス 2 個体で生殖線が見当たらなかったため、平均値の算出から除外した。

肝臓体指数において、オスはいずれの濃度区においても、対照区と比較し有意な差は認められなかった。メスはすべての濃度区で対照区と比較し有意な減少が認められた。生殖腺体指数は、オスはいずれの濃度区においても、対照区と比較し有意な差は認められなかった。メスは 31.1 µg/L および 99.2 µg/L 濃度区で対照区と比較し有意な減少が認められた。

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 (µg/L)	肝臓体指数 (%)				生殖腺体指数 (%)			
	オス		メス		オス		メス	
Control	2.9	± 0.5	6.0	± 1.0	1.5	± 0.5	8.2	± 2.3
0.926	2.1	± 0.3	4.7	± 0.7 *	1.5	± 0.4	8.9	± 2.9
3.21	2.3	± 0.5	5.2	± 0.8 *	1.2	± 0.4	8.3	± 3.1
9.91	2.0	± 0.3	4.9	± 0.6 *	1.3	± 0.3	7.5	± 0.9
31.1	2.5	± 0.5	5.1	± 0.8 *	1.5	± 0.5	6.7	± 2.6 *
99.2	3.2	± 0.5	4.9	± 1.1 *	1.0	± 0.7	4.5	± 3.1 *

注) 各個体を元に算出した平均値±標準偏差 (対照区～濃度区の個体数はそれぞれオス: n=41,19,24,25,24,21, メス: n=48,29,19,20,18,22(生殖腺体指数は 20)) 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, Jonckheere-Terpstra 検定, ただしメスの肝臓体指数は単調性および等分散性が認められなかったため Dunn 検定)。

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。オスはいずれの濃度区においても、対照区と比較し有意な差は認められなかった。メスは 99.2 µg/L 濃度区で対照区と比較し有意な差が認められた。0.926～9.91 µg/L 濃度区でも対照区と比較し有意な差が認められたが、31.1 µg/L 濃度区では有意差は認められなかった。

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 (µg/L)	肝臓中ビテロジェニン濃度 (ng/mg liver)			
	オス		メス	
Control	0.56	± 0.25	789	± 264
0.926	0.02	± 0.11	1630	± 376 *a
3.21	11.7	± 28.6	1030	± 477 *a
9.91	3.80	± 4.21	1180	± 362 *a
31.1	0.37	± 0.24	1050	± 456
99.2	116	± 165	1630	± 1050 *

注) 各個体を元に算出した平均値±標準偏差 (対照区～濃度区の個体数はそれぞれオス: n=41,19,24,25,24,21, メス: n=48,29,19,20,18,22) 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, オスは Jonckheere-Terpstra 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なかったため Dunn 検定)。a: 有意差が認められたが濃度依存性なし

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。

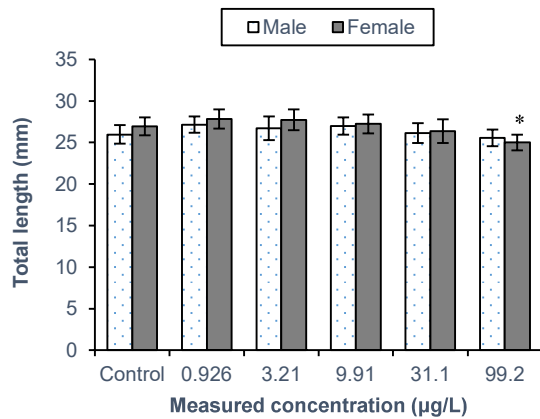
オスでは、31.1 および 99.2 $\mu\text{g/L}$ 濃度区において対照区と比較して有意な減少が認められた。メスではいずれの試験区においても、乳頭状小突起を有する個体は確認されなかった。

表 1-16 F1 世代亜成体の乳頭状小突起を有する節板数

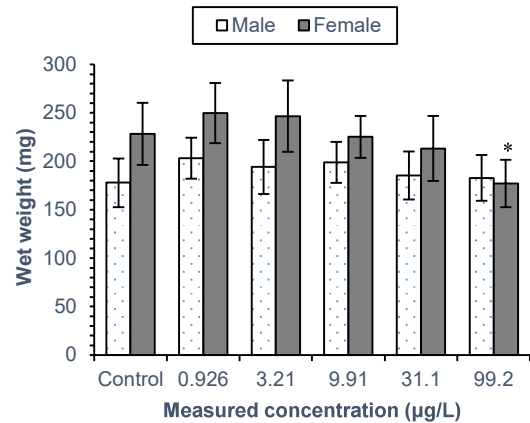
測定濃度 ($\mu\text{g/L}$)	乳頭状小突起を有する節板数(Plates/fish)					
	オス			メス		
Control	66	±	12	0	±	0
0.926	67	±	20	0	±	0
3.21	54	±	18	0	±	0
9.91	67	±	12	0	±	0
31.1	54	±	15 *	0	±	0
99.2	15	±	15 *	0	±	0

注) 各個体を元に算出した平均値±標準偏差 (対照区～濃度区の個体数はそれぞれオス: n=41,19,24,25,24,21, メス: n=48,29,19,20,18,22) 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 ($p<0.05$, Jonckheere-Terpstra 検定)。

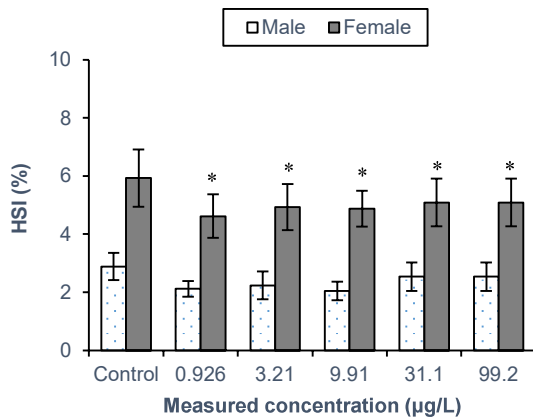
(a) 全長



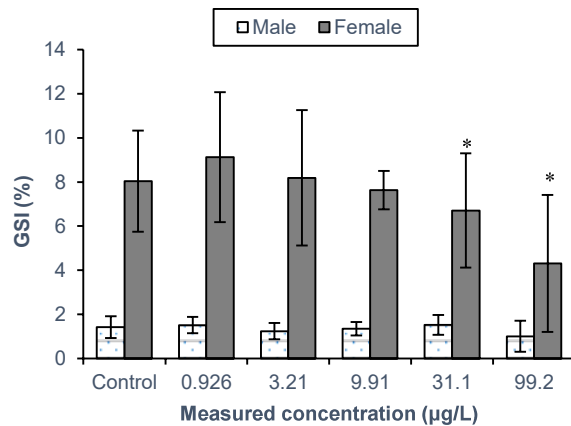
(b) 湿重量



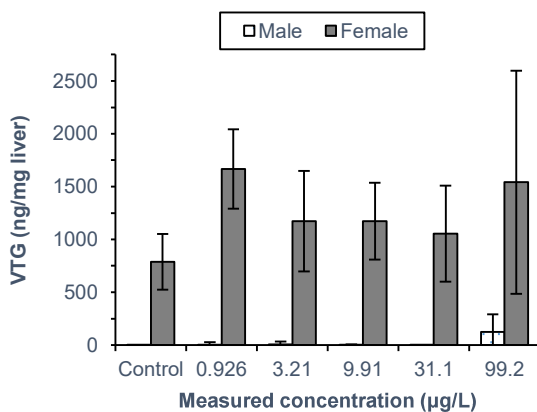
(c) 肝臓体指数 (HSI)



(d) 生殖腺体指数 (GSI)



(e) 肝臓中ピテロジェニン濃度



(f) 乳頭状小突起を有する節板数

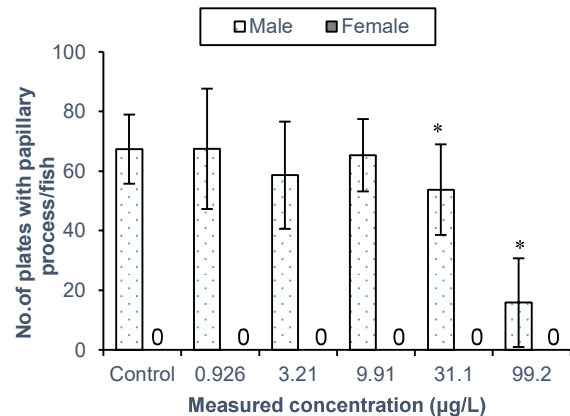


図 1-9 F1 世代亜成体の(a)全長, (b)湿重量, (c)肝臓体指数, (d)生殖腺体指数, (e)肝臓中ピテロジェニン濃度, (f)乳頭状小突起を有する節板数

注) 各個体を元に算出した平均値±標準偏差 (対照区～濃度区の個体数はそれぞれオス : n=41, 19, 24, 25, 24, 21, メス : n=48, 29, 19, 20, 18, 22) 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。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, ただしオスの全長・湿重量, メスの肝臓体指数およびメスの肝臓中ピテロジェニン濃度は, 単調性および等分散性または正規性が認められなかったため Dunn 検定)。

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。遺伝的オス個体では, 99.2 µg/L 濃度区で 21 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) を示した。生殖腺形態は, すべての試験区の全個体で精巣が確認された。遺伝的メス個体では, 99.2 µg/L 濃度区で生殖腺形態が不明だった 3 個体中 1 個体は未成熟であり, 残り 2 個体は生殖腺が見当たらなかった。生殖腺が見当たらなかった 2 個体中の 1 個体はオスの表現型を示した。

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 (µg/L)	n	表現型			生殖腺形態		
		オス	不明	メス	精巣	不明	卵巣
Control	41	41	0	0	41	0	0
0.926	19	19	0	0	19	0	0
3.21	24	24	0	0	24	0	0
9.91	25	25	0	0	25	0	0
31.1	24	24	0	0	24	0	0
99.2	21	14	0	7	21	0	0

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 (µg/L)	n	表現型			生殖腺形態		
		オス	不明	メス	精巣	不明	卵巣
Control	48	0	0	48	0	0	48
0.926	29	0	0	29	0	0	29
3.21	19	0	0	19	0	0	19
9.91	20	0	0	20	0	0	20
31.1	18	0	0	18	0	0	18
99.2	22	1	1	20	0	3	19

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。

いずれの試験区においても死亡は見られず, 行動・外観の異常は認められなかった。

表 1-19 F1 世代ペアリング後の死亡個体数

測定濃度 (µg/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
0.926	12	0	0	12	0	0	0
3.21	12	0	0	12	0	0	0
9.91	12	0	0	12	0	0	0
31.1	12	0	0	12	0	0	0
99.2	12	0	0	12	0	0	0

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。

総産卵数および受精卵数では、9.91 µg/L 濃度区以上において対照区と比較して有意な減少が認められた。受精率では、99.2 µg/L 濃度区において対照区と比較して有意な減少が認められた。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ため、ばく露時間による影響はなかったと考えられた。

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 14055 個の卵の受精率は 97%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 (µg/L)	総産卵数 (eggs/day/female)			
	21 日間	1 週目(DAY1-7)	2 週目(DAY8-14)	3 週目(DAY15-21)
Control	27.9 ± 2.9	22.7 ± 3.3	29.2 ± 3.5	31.7 ± 2.8
0.926	27.2 ± 3.3	21.8 ± 2.8	28.3 ± 3.6	31.5 ± 4.2
3.21	28.0 ± 3.1	23.8 ± 2.5	29.7 ± 3.3	30.6 ± 4.8
9.91	25.0 ± 2.4 *	21.3 ± 2.5	26.5 ± 3.0	27.0 ± 2.3 *
31.1	25.7 ± 3.0 *	21.7 ± 2.5	27.3 ± 3.4	28.2 ± 3.5 *
99.2	16.1 ± 8.2 *	15.7 ± 6.0 *	16.4 ± 10.2 *	16.2 ± 9.7 *
測定濃度 (µg/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	27.1 ± 2.9	22.0 ± 3.4	28.5 ± 3.5	30.9 ± 2.6
0.926	26.5 ± 3.2	21.0 ± 2.5	27.8 ± 3.8	30.8 ± 4.0
3.21	26.8 ± 3.1	22.2 ± 3.0	28.9 ± 3.3	29.5 ± 4.6
9.91	24.5 ± 2.5 *	20.9 ± 2.6	26.1 ± 3.0	26.5 ± 2.4 *
31.1	25.0 ± 2.9 *	20.9 ± 2.4	26.8 ± 3.3 *	27.3 ± 3.7 *
99.2	12.4 ± 9.1 *	12.3 ± 7.0 *	12.9 ± 10.5 *	11.9 ± 10.8 *
測定濃度 (µg/L)	受精率 (%)			
	21 日間	1 週目(DAY1-7)	2 週目(DAY8-14)	3 週目(DAY15-21)
Control	97.3 ± 1.8	96.9 ± 2.1	97.5 ± 1.9	97.5 ± 2.8
0.926	97.5 ± 1.4	96.7 ± 2.1	98.0 ± 2.2	97.7 ± 1.6
3.21	95.8 ± 3.0	93.1 ± 8.2	97.5 ± 1.8	96.4 ± 2.2
9.91	98.2 ± 0.7	97.9 ± 1.5	98.4 ± 0.7	98.1 ± 1.5
31.1	97.2 ± 1.4	96.7 ± 2.7	98.0 ± 1.4	96.8 ± 2.5
99.2	68.1 ± 27.8 *	72.2 ± 24.5 *	72.5 ± 30.0	58.8 ± 36.5 *

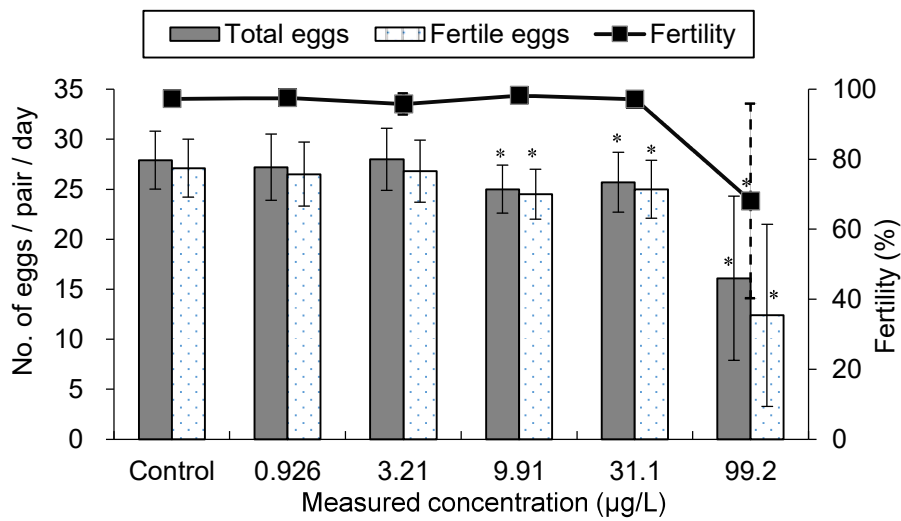
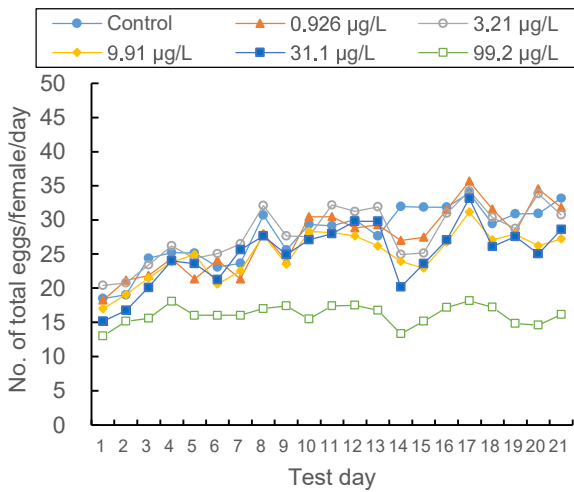


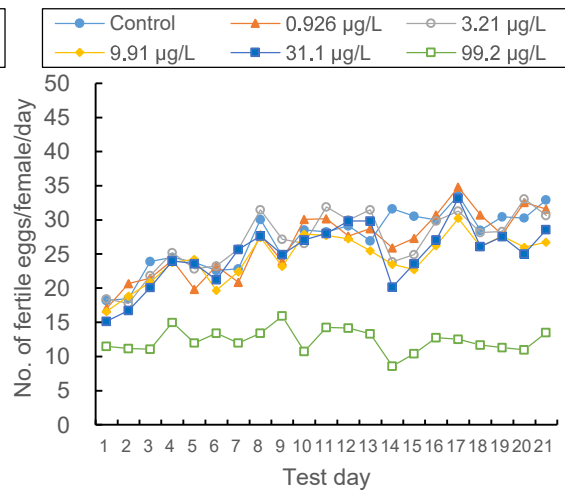
図 1-10 F1 世代の総産卵数・受精卵数・受精率 (各ペア・1 日当たり)

注) 値は連平均値を元に算出した平均値±標準偏差 (対照区は n=24, 濃度区は n=12) 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, Jonckheere-Terpstra 検定)。

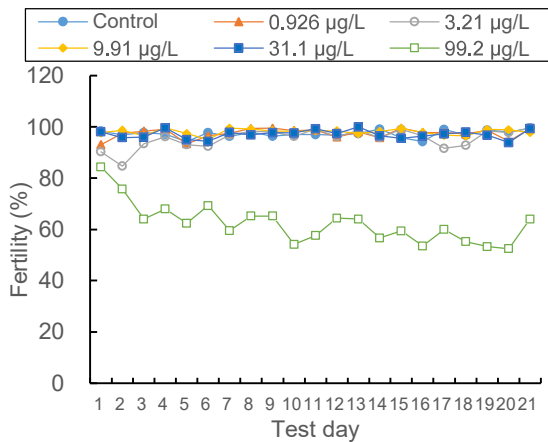
(a) 総産卵数



(b) 受精卵数



(c) 受精率



(d) 累積受精卵数

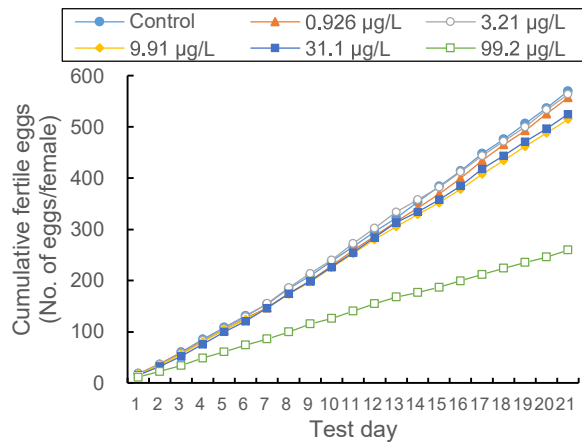


図 1-11 F1 世代の(a)総産卵数, (b)受精卵数, (c)受精率の日変動および(d)累積受精卵数 (値は各試験区の連平均値)

3) 全長・湿重量 (F1 成熟個体)

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

オスについては, 全長および湿重量ともに 99.2 µg/L 濃度区で対照区と比較し有意な増加が認められた。メスについては, 全長および湿重量ともに 31.1 µg/L および 99.2 µg/L 濃度区で対照区と比較し有意な減少が認められた。

表 1-21 F1 世代成熟個体の全長および湿重量

測定濃度 (µg/L)	全長 (mm)				湿重量 (mg)			
	オス		メス		オス		メス	
Control	31.3	± 1.4	31.0	± 1.1	305	± 42	367	± 34
0.926	33.6	± 0.7	32.1	± 0.8	361	± 28	384	± 28
3.21	31.7	± 1.1	31.8	± 1.4	301	± 27	383	± 44
9.91	32.3	± 1.1	30.5	± 0.4	317	± 31	338	± 16
31.1	31.7	± 1.3	30.0	± 0.5 *	303	± 35	327	± 29 *
99.2	33.7	± 1.5 *	30.1	± 0.5 *	400	± 70 *	315	± 31 *

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=24, 濃度区は n=12) 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, Jonckheere-Terpstra 検定)。

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。

肝臓体指数において, オスは 99.2 µg/L 濃度区で対照区と比較し有意な増加が認められた。メスはすべての濃度区で対照区と比較し有意な減少が認められた。生殖腺体指数においては, オスは 99.2 µg/L 濃度区で対照区と比較し有意な減少が認められた。メスは 31.1 µg/L 濃度区で対照区と比較し有意な増加が認められたが, 99.2 µg/L 濃度区では有意差が認められなかった。

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 (µg/L)	肝臓体指数 (%)				生殖腺体指数 (%)			
	オス		メス		オス		メス	
Control	2.3	± 0.3	8.0	± 0.8	1.4	± 0.4	11.4	± 1.3
0.926	2.0	± 0.5	6.3	± 1.1 *	1.4	± 0.2	11.2	± 1.0
3.21	1.9	± 0.4	7.1	± 1.1 *	1.4	± 0.2	12.1	± 1.7
9.91	2.0	± 0.3	6.8	± 0.7 *	1.5	± 0.2	11.6	± 0.9
31.1	2.5	± 0.5	7.1	± 0.9 *	1.7	± 0.3	13.6	± 0.8
99.2	4.1	± 1.1 *	5.6	± 1.0 *	0.7	± 0.6 *	10.7	± 2.7

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=24, 濃度区は n=12) 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, オスの肝臓体指数は Jonckheere-Terpstra 検定, メスの肝臓体指数, 生殖腺体指数およびオスの生殖腺体指数は単調性および正規性または等分散性が認められなかったため Dunn 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。

オスにおいて, 99.2 µg/L 濃度区で対照区と比較し有意な上昇が認められた。メスにおいては, すべての濃度区で対照区と比較し有意な上昇が認められた。

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 (µg/L)	肝臓中ビテロジェニン濃度 (ng/mg liver)					
	オス			メス		
Control	1.16	±	3.37	430	±	327
0.926	9.90	±	25.57	1070	±	719 *
3.21	9.81	±	11.45	1010	±	260 *
9.91	165	±	409	929	±	146 *
31.1	17.2	±	37.9	749	±	200 *
99.2	779	±	1160 *	936	±	392 *

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=24, 濃度区は n=12) 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, 単調性および正規性が認められなかったため Dunn 検定)。

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。

オスでは, 9.91 µg/L 濃度区以上において対照区と比較して有意な減少が認められた。メスではいずれの試験区においても, 乳頭状小突起を有する個体は確認されなかった。

表 1-24 F1 世代成熟個体の乳頭状小突起を有する節板数

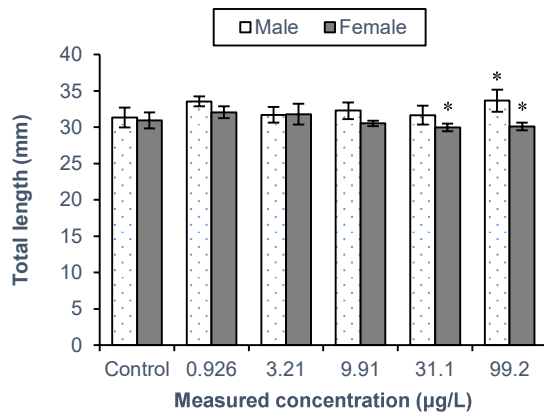
測定濃度 (µg/L)	乳頭状小突起を有する節板数(Plates/fish)					
	オス			メス		
Control	81	±	14	0	±	0
0.926	83	±	10	0	±	0
3.21	69	±	13	0	±	0
9.91	72	±	18 *	0	±	0
31.1	59	±	12 *	0	±	0
99.2	25	±	21 *	0	±	0

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 n=24, 濃度区は n=12) 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, Jonckheere-Terpstra 検定)。

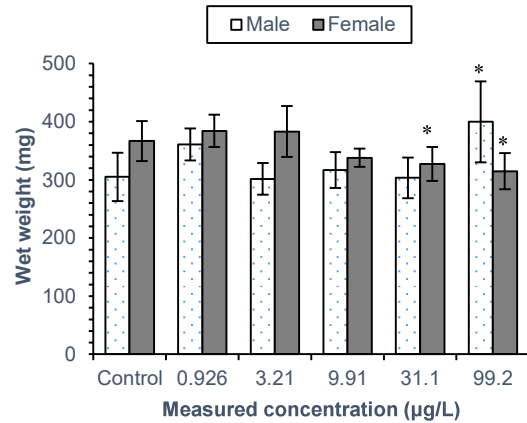
7) 表現型性別と生殖腺形態 (F1 成熟個体)

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。

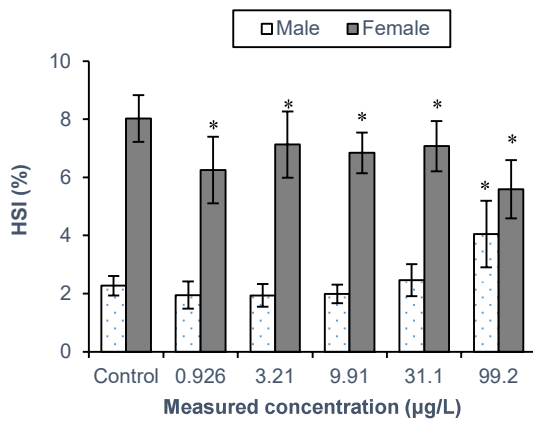
(a) 全長



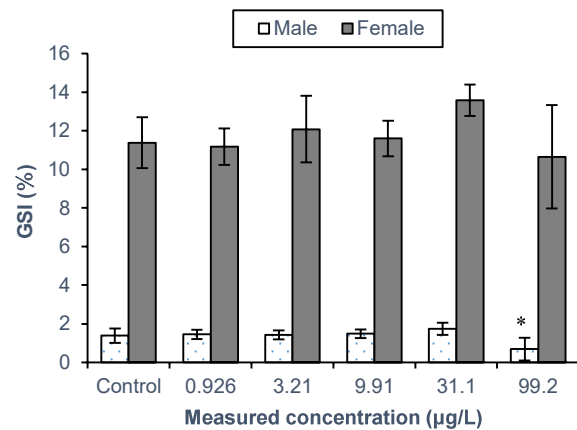
(b) 湿重量



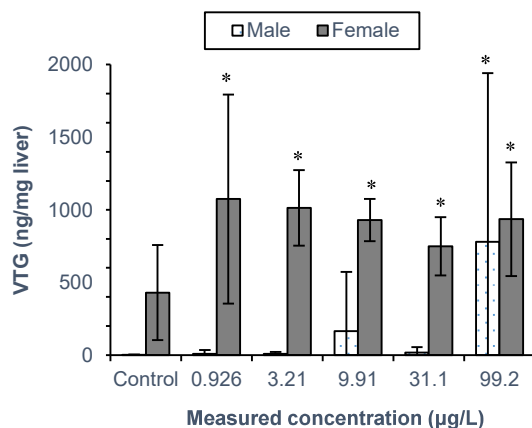
(c) 肝臓体指数 (HSI)



(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

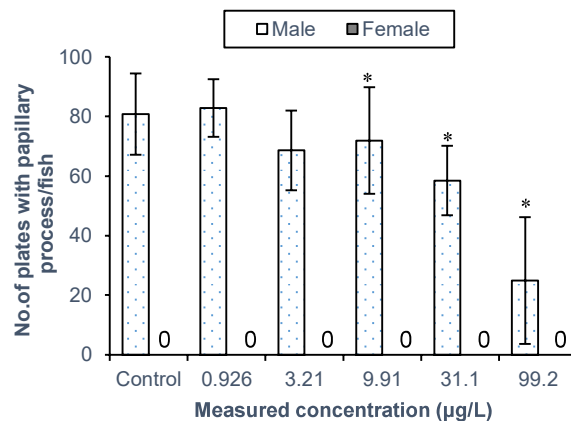


図 1-12 F1 世代成熟個体の(a)全長, (b)湿重量, (c)肝臓体指数, (d)生殖腺体指数, (e)肝臓中ビテロジェニン, (f)乳頭状小突起を有する節板数

注) 値は連平均値を元に算出した平均値±標準偏差 (対照区は n=24, 濃度区は n=12) 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 ($p<0.05$, 全長, 湿重量, オスの肝臓体指数およびオスの乳頭状小突起を有する節板数は Jonckheere-Terpstra 検定, メスの肝臓体指数, ビテロジェニン濃度および生殖腺体指数は単調性が認められず, 正規性または等分散性が認められなかったため Dunn 検定)。

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 18 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 9 日目 (240 個体中 131 個体が孵化) であったことから (図 1-13), 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。対照区において、受精後 18 日目まで未孵化の生存個体が 1 個体認められた。対照区の孵化は、この個体を除くと受精後 10 日目までに完了していたため、この未孵化の個体は孵化日の中央値の算出からは除外した。0.926 $\mu\text{g/L}$ 濃度区および 9.91 $\mu\text{g/L}$ 濃度区においても、未孵化の生存個体がそれぞれ 2 および 1 個体認められた。

孵化日数において、すべての濃度区で対照区と比較し有意な差が認められた。濃度区の孵化日数は対照区よりも 0.8~0.9 日短かった。孵化率においては、99.2 $\mu\text{g/L}$ 濃度区で対照区と比較し有意な減少が認められた。

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 ($\mu\text{g/L}$)	孵化日数 (day)			孵化率 (%)		
	受精後 18 日目			受精後 18 日目		
Control	9.0	\pm 0.2		95	\pm 5	
0.926	8.2	\pm 0.2	*	91	\pm 4	
3.21	8.2	\pm 0.1	*	99	\pm 2	
9.91	8.1	\pm 0.1	*	96	\pm 7	
31.1	8.1	\pm 0.1	*	88	\pm 9	
99.2	8.1	\pm 0.2	*	82	\pm 7	*

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, 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)。

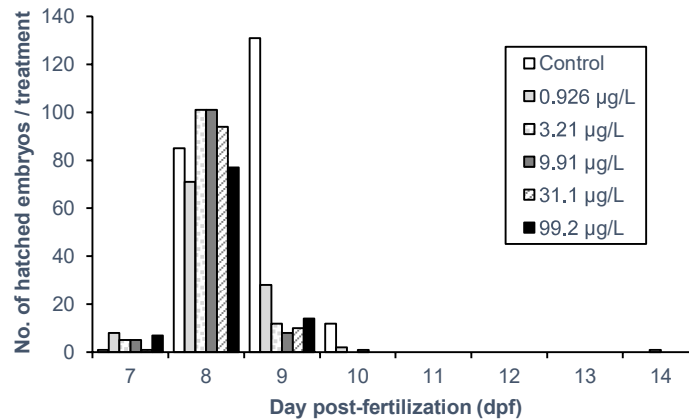


図 1-13 F2 の受精後 7~14 日目における孵化個体数 (各試験区の合計)

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）

すべての濃度区において対照区との有意差は認められなかった。

2) 二次性徴（乳頭状小突起を有する節板数）

オスではすべての濃度区において対照区との有意差は認められなかった。メスではすべての試験区で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、メスともに、31.1 µg/L 濃度区以上において対照区と比べて有意に上昇した。

4) 表現型性別および生殖腺形態

すべ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

全長および湿重量：すべての濃度区において対照区との有意差は認められなかった。

肝臓体指数：99.2 µg/L 濃度区のオスにおいて、対照区と比べて有意に減少した。Dunn 検定において、3.21 µg/L および 9.91 µg/L 濃度区でも有意な減少が認められたが、31.1 µg/L 濃度区では有意差は認められなかったため、3.21 µg/L および 9.91 µg/L 濃度区の有意差は被験物質の影響ではないと判断した。

生殖腺指数：9.91 µg/L 濃度区以上のオスおよび 31.1 µg/L 濃度区以上のメスにおいて、対照区と比べて有意に上昇した。

(2) F1 世代胚～仔魚期の結果

1) 胚期孵化日数・孵化率

孵化日数において、0.926 µg/L～9.91 µg/L 濃度区で対照区と比較し有意な差が認められたが、31.1 µg/L および 99.2 µg/L 濃度区では有意差は認められなかったため、0.926 µg/L～9.91 µg/L 濃度区の有意差は被験物質の影響ではないと判断した。孵化率においては、すべての濃度区で対照区との有意差は認められなかった。

(3) F1 世代亜成体の結果

1) 生存率（受精後 4 週目および 9 週目）

受精後 4 週目では対照区と比較し有意な差は認められなかったが、受精後 9 週目では 31.1 µg/L および 99.2 µg/L 濃度区で対照区と比べて生存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）

31.1 µg/L 濃度区のオスにおいて、対照区と比べて有意に低下した。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観察されなかった。

3) 肝臓中ビテロジェニン濃度

99.2 µg/L 濃度区のメスにおいて、対照区と比べて有意に増加した。Dunn 検定において、0.926 µg/L～9.91 µg/L 濃度区でも有意差が認められたが、31.1 µg/L 濃度区では有意差は認められなかったため、0.926 µg/L～9.91 µg/L 濃度区の有意差は被験物質の影響ではないと判断した。

4) 表現型性別および生殖腺形態

99.2 µg/L 濃度区の遺伝的メスにおいて、表現型性別と遺伝的性別が一致しなかった個体が1個体確認されたが、この個体は生殖腺が見当たらず、全長および湿重量も濃度区の平均値より小さい個体だったため、未成熟個体であった可能性がある。その他の個体においては、生殖腺形態と遺伝的性別が一致しなかった個体は未成熟個体を除いて確認されなかった。

5) その他の指標

全長：99.2 µg/L 濃度区のメスにおいて、対照区と比べて有意に減少した。

湿重量：99.2 µg/L 濃度区のメスにおいて、対照区と比べて有意に減少した。

肝臓体指数：すべての濃度区のメスにおいて、対照区と比べて有意に減少した。

生殖腺指数：31.1 µg/L 濃度区以上のメスにおいて、対照区と比べて有意に減少した。

(4) F1 世代成熟個体（15 週齢）の結果

1) 生存率

すべての濃度区において対照区との有意差は認められなかった。

2) 繁殖に関する指標（総産卵数・受精卵数・受精率）

総産卵数と受精卵数は、9.91 µg/L 濃度区以上において、対照区と比べて有意に減少した。

受精率は、99.2 µg/L 濃度区において、対照区と比べて有意に減少した。

3) 二次性徴（乳頭状小突起を有する節板数）

9.91 µg/L 濃度区のオスにおいて、対照区と比べて有意に低下した。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観察されなかった。

4) 肝臓中ビテロジェニン濃度

99.2 µg/L 濃度区のオスおよびすべての濃度区のメスにおいて、対照区と比べて有意に増加した。

5) 表現型性別および生殖腺形態

すべ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。

6) その他の指標

全長および湿重量：99.2 µg/L 濃度区のオスおよび31.1 µg/L 濃度区以上のメスにおいて、対照区と比べて有意に減少した。

肝臓体指数：99.2 µg/L 濃度区のオスにおいて、対照区と比べて有意に上昇した。すべての濃度区のメスにおいて、対照区と比べて有意に減少した。

生殖腺指数：99.2 µg/L 濃度区のオスにおいて、対照区と比べて有意に減少した。

(5) F2 世代胚・仔魚期の結果

孵化後日数：すべての濃度区において、対照区と比べて有意に減少した。濃度区の孵化日数は対照区よりも0.8~0.9日短かった。

孵化率：99.2 µg/L 濃度区において、対照区と比べて有意に減少した。

2.4 考察

MEOGRT 試験法を用いて 4-*t*-オクチルフェノール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、F1 世代の 0.926~31.3 µg/L 濃度区では、ふ化から亜成体までの全長および湿重量に对照区との有意差は見られなかった。生存率においては、31.3 µg/L 濃度区にて有意差が見られたが、对照区の生存率は 95%、31.3 µg/L 濃度区の生存率は 92%であった。

4-*t*-オクチルフェノールの繁殖に与える影響を検討した結果、F1 世代において、総産卵数および受精卵数は 9.91 µg/L 濃度区以上で、受精率は 99.2 µg/L 濃度区で有意に低下した。F0 世代では各エンドポイントにおいて影響は見られなかった。

F0 および F1 世代成熟個体のオスの肝臓中のビテロジェニン濃度は、試験液中の 4-*t*-オクチルフェノール濃度に依存して増加した。F0 世代の LOEC は 31.1 µg/L、F1 世代の LOEC は 99.2 µg/L であり、経世代の影響は確認されなかった。一方で、F1 世代の亜成体において、99.2 µg/L 濃度区で遺伝的オスの表現型性別がメスを示した個体が観察された。さらに F1 世代において、亜成体では 31.1µg/L 濃度区以上で、成熟個体では 9.91µg/L 濃度区以上で乳頭状小突起を有する節板数が有意に減少した。F0 世代ではこれらの現象は見られなかった。

以上の結果から、致死や孵化などの有害性に関わる深刻な影響は 31.1 µg/L 濃度区以下では無かったと判断した。繁殖影響においては、F0 世代での影響が認められなかったのに対し、F1 世代では 9.91µg/L 濃度区以上で影響が確認され、4-*t*-オクチルフェノールの経世代での影響が懸念された。なお、既報の結果（表 1-27）より、4-*t*-オクチルフェノールはエストロゲン作用を有することが想定されている⁵⁾⁶⁾。

表 1-26 4-t-オクチルフェノールの 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	wpf	Endpoint		LOEC (µg/L)		
				F0	F1	F2
Embryo	2wpf	孵化率			>99.2	↓ 99.2
		孵化日数			>99.2	↓ <0.926
Larva	4wpf	生存率			>99.2	
Sub-Adult	10wpf	生存率			↓ 31.1	
		全長	♂		>99.2	
			♀		↓ 99.2	
		湿重量	♂		>99.2	
			♀		↓ 99.2	
		肝臓体指数	♂		>99.2	
			♀		↓ <0.926	
		生殖腺体指数	♂		>99.2	
			♀		↓ 31.1	
		肝臓中ビテロジェニン濃度	♂		>99.2	
♀			↑ 99.2			
二次性徴（乳頭状小突起を有する節板数）	♂		↓ 31.1			
	♀		-			
間性又は性転換の発生			>99.2			
Adult	12~15wpf	生存率	♂	>99.2	>99.2	
			♀	>99.2	>99.2	
		産卵数		>99.2	↓ 9.91	
		受精卵数		>99.2	↓ 9.91	
	受精率		>99.2	↓ 99.2		
	15wpf	全長	♂	>99.2	↓ 99.2	
			♀	>99.2	↓ 31.1	
		湿重量	♂	>99.2	↓ 99.2	
			♀	>99.2	↓ 31.1	
		肝臓体指数	♂	>99.2	↑ 99.2	
			♀	↓ 99.2	↓ <0.926	
		生殖腺体指数	♂	↑ 9.91	↓ 99.2	
			♀	↑ 31.1	>99.2	
		肝臓中ビテロジェニン濃度	♂	↑ 31.1	↑ 99.2	
♀			↑ 31.1	↑ <0.926		
二次性徴（乳頭状小突起を有する節板数）	♂	>99.2	↓ 9.91			
	♀	-	-			
間性又は性転換の発生		>99.2	>99.2			

表 1-27 4-*t*-オクチルフェノールの1世代拡張繁殖試験とパーシャルライフサイクル試験⁵⁾の結果の比較

Stage	wpcf	Endpoint		パーシャルライフサイクル試験
		設定濃度 (μg/L)		94.0, 48.1, 23.7, 11.4, 6.94
Embryo	2wpcf	孵化率		>94.0
		孵化日数		>94.0
Larva	4wpcf	生存率		>94.0
Sub-Adult	10wpcf	生存率		>94.0
		全長	♂	>94.0
			♀	
		湿重量	♂	>94.0
			♀	
		肝臓体指数	♂	-
			♀	-
		生殖腺体指数	♂	-
			♀	-
		肝臓中ビテロジェニン濃度	♂	↑ 11.4
			♀	↑ 48.1
二次性徴 (表現型性比の偏り)	♂	↓ 48.1		
	♀	-		
間性又は性転換の発生			↑ 48.1	
病理組織学的観察による精巣卵の確認			↑ 11.4	

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) Pub Chem, Available from https://www.nite.go.jp/chem/chrip/chrip_search/systemTop
独立行政法人製品評価技術基盤機構：化学物質総合情報提供システム（CHRIP）
- 3) Swinrwk J, Flynn K, Haselman J, Package ‘StatCharrms’. Available from: <https://cran.r-project.org/web/packages/StatCharrms/StatCharrms.pdf>
- 4) OECD (2015) Guidance Document on Medaka Histopathology Techniques and Evaluation for the medaka extended one-generation reproduction test (MEOGRT). Series on Testing and Assessment (No. 227). Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- 5) Seki M, Yokota H, Maeda M, Tadokoro H, and Kobayashi K. 2003 Effects of 4-Nonylphenol and 4-tert-Octylphenol on sex differentiation and vitellogenin induction in Medaka (*Oryzias latipes*). *Environ Toxicol Chem* 22:1507-1516.
- 6) EXTEND2010 に基づく平成 27 年度第 1 回化学物質の内分泌かく乱作用に関する検討会参考資料 2-5

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、中間報告および最終報告を行った。

- ・平成 29 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：平成 30 年 3 月 7 日
開催場所：日本エヌ・ユー・エス株式会社 本社 大会議室
- ・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
開催日時：平成 31 年 3 月 7 日
開催場所：日本エヌ・ユー・エス株式会社 本社 大会議室

付属資料－1

Results of Analysis, Device No.2

Sample: Dechlorinated tap water generated with device No. 2 in building B12 of LSI Medience [for testing]
 Measurement agency: MC Evolve Technologies Corporation
 8-3-1 Chuo, Ami-machi, Inashiki-gun, Ibaraki 300-0332, Japan
 Date for sample collection: August 7, 2018

These data were obtained from report 18H-004291-0001.

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]	85
Biochemical Oxygen Demand (BOD)	[mg/L]	<0.5	Conductivity	[mS/m]	14
Chemical Oxygen Demand (COD)	[mg/L]	N.D. (<0.5)	Hardness	[mg CaCO ₃ /L]	53
Total Phosphorus	[mg/L]	N.D. (<0.02)	Alkalinity (pH4.8)	[mg CaCO ₃ /L]	34
pH	[-/(°C)]	7.6 (20)	Sodium	[mg/L]	6.9
Coliform Group	[MPN/100mL]	0	Potassium	[mg/L]	1.1
Total Mercury	[mg/L]	N.D. (<0.00005)	Calcium	[mg/L]	15
Copper	[mg/L]	N.D. (<0.005)	Magnesium	[mg/L]	3.8
Cadmium	[mg/L]	N.D. (<0.0003)	Oil (<i>n</i> -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]	0.03	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)	Dichlorovos (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)	Iprobenfos (IBP)	[mg/L]	N.D. (<0.001)
Arsenic	[mg/L]	N.D. (<0.001)	Chloronitrofen (CNP)	[mg/L]	N.D. (<0.001)
Surface-Active Agents (Anionic)	[mg/L]	N.D. (<0.02)			