

## 令和3年度

令和3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-*t*-ブチルフェノール）実施業務

## 報告書

令和4年3月

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-*t*-ブチルフェノール）実施業務報告である。

令和4年3月

株式会社三菱ケミカルリサーチ

### 化学物質名

4-*t*-ブチルフェノール

# 目 次

	頁
要 旨	1
1. 実施内容	3
2. 4- <i>t</i> -ブチルフェノールの魚類短期繁殖試験の実施	4
2.1 材料および方法	4
2.1.1 被験物質	4
2.1.2 試験生物	4
2.1.3 試験環境および条件など	5
2.1.4 ばく露および観察・測定の方法	9
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 試験液中の被験物質濃度	13
2.2.2 環境条件	13
2.2.3 死亡率	14
2.2.4 総産卵数・受精卵数・受精率	15
2.2.5 ばく露終了時の全長・湿重量	17
2.2.6 ばく露終了時の肝臓体指数および生殖腺体指数	19
2.2.7 ばく露終了時の肝臓中ビテロジェニン濃度	21
2.2.8 ばく露終了時の二次性徴指標	22
2.3 結果の概要および考察	23
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	24
4. 参考文献	25
付属資料	付 1～付 7

## 要 旨

### I. 業務名

令和3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-*t*-ブチルフェノール)実施業務

### II. 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—」を公表し、EXTEND2010に引き続き、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進めている。このEXTEND2016の枠組みでは、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を実施し、試験対象となり得る選定された化学物質について、試験管内試験及び生物試験による2段階での評価を行うこととしている。

本業務では、EXTEND2016の枠組みに基づいて、内分泌かく乱作用に関する評価等に必要となるデータを集積するため、別途実施された試験管内試験の結果等において第1段階生物試験を実施する優先順位が高いと考えられる物質について、魚類短期繁殖試験(第1段階生物試験)を実施した。

### III. 魚類短期繁殖試験の実施

4-*t*-ブチルフェノール(CAS No. 98-54-4)を被験物質として、OECDテストガイドライン(OECD Guideline for the testing of chemicals No.229: Fish Short Term Reproduction Assay)<sup>1)</sup>に準拠して、以下の試験条件下でメダカを用いる魚類短期繁殖試験を実施した。ばく露期間中の産卵状況、ばく露終了時のビテロジェニンおよび二次性徴の発現状況などの内分泌かく乱作用に関わるエンドポイントについての測定を行い、それらに対する試験物質のLOEC(最小影響濃度)およびNOEC(最大無作用濃度)を決定した。

ばく露方式：流水式

供試生物：メダカ (*Oryzias latipes*)

試験期間：21日間

試験濃度区：対照区および濃度区(設定濃度：0.10, 0.32, 1.0 mg/L(公比；3.2))

試験液量：約1.8 L/容器(換水率；約28回/日, 流量；35 mL/min)

連数：4連/濃度

供試生物数：容器あたりオス及びメス各3個体(濃度あたりオス及びメス各12個体)

水温：25±2°C

光周期：明期16時間, 暗期8時間

飼料：2~3回/日 給餌(ブラインシュリンプの孵化後24時間以内の幼生)

#### IV. 魚類短期繁殖試験の結果

ばく露終了時における肝臓体指数については、オスで 0.32 および 1.0 mg/L において対照区との有意な増加が、メスでは、1.0 mg/L で対照区との有意な増加が認められた。肝臓中ピテロジェニン濃度については、オスおよびメスともに 4-*t*-ブチルフェノールの濃度に（試験濃度範囲において）依存的であり、統計学的に有意な増加が認められ、LOEC は 1.0 mg/L、NOEC は 0.32 mg/L であった。二次性徴（乳頭状小突起を有する節板数）については、オスおよびメスともに有意な変化は認められず、LOEC および NOEC は最高濃度区以上とした (> 1.0 mg/L および ≥ 1.0 mg/L)。繁殖に関する指標（産卵状況）については、受精卵数および受精率ともに、濃度依存的かつ統計学的に有意な低下が認められ、受精卵数において、LOEC が 0.32 mg/L、NOEC が 0.10 mg/L であった。

以上本試験の結果から、4-*t*-ブチルフェノールは 21 日間のばく露期間において、メダカに対するエストロゲン様作用を示し、繁殖にも有意な影響を及ぼす可能性が示唆され、LOEC は 0.32 mg/L、NOEC は 0.10 mg/L とした。

#### V. 化学物質の内分泌かく乱作用に関する会議への報告

本業務で実施した第 1 段階生物試験について、環境省が別途開催する EXTEND2016 に基づく会議に提出する資料を作成するとともに、会議に出席して必要な報告説明を行う。

## 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、既に実施された試験管内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*-ブチルフェノール）について、Fish Short Term Reproduction Assay (OECD TG229)<sup>1</sup>に準拠し第一段階生物試験である魚類短期繁殖試験を実施し、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。

### (1) 4-*t*-ブチルフェノールの魚類短期繁殖試験の実施

OECD TG229 に基づいて 4-*t*-ブチルフェノールの魚類短期繁殖試験を実施し、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. 4-*t*-ブチルフェノールの魚類短期繁殖試験の実施

### 2.1 材料および方法

#### 2.1.1 被験物質

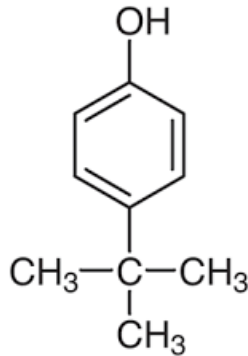
使用した被験物質は、東京化成工業株式会社（Lot 番号：8JHKE，純度：99.9%）より入手した。名称，物理化学的性状等を以下に示す。

CAS 登録番号：CAS: 98-54-4

和 名：4-*t*-ブチルフェノール

英 名：4-*tert*-Butylphenol

構造式：



分子式：C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>O

分子量：150.22

対水溶解度：580 mg/L (25°C)<sup>2)</sup>，500 mg/L (25°C，当施設測定値)

オクタノール／水分配係数：3.31<sup>2)</sup>

外 観：白色結晶

密 度：0.908 g/cm<sup>3</sup> (80°C)<sup>2)</sup>

蒸気圧：0.0381 mmHg (25°C)<sup>2)</sup>

#### 2.2.2 試験生物

##### (1) 供試生物種

一般名：メダカ

学 名：*Oryzias latipes*

入手先：自家繁殖（入手元：国立環境研究所）

##### (2) じゅん化条件

14 日間以上飼育じゅん化した健康で正常な魚を使用した。じゅん化中，雌雄 3 個体ずつを試験容器と同等の飼育容器（30 水槽）に入れ，各容器における産卵状況を確認した。ばく露開始前に少なくとも 5 日間，各容器の産出卵をすべて採取し，1 日あたりの受精卵と未受精卵を計数し，各容器当たりの総産卵数および受精率を算出した。その結果を基に，各試験区間の産卵数および受精率が同等となるよう各試験区に容器（供試生物）を割り当てた。

じゅん化条件を以下に示す。

飼育水：脱塩素水道水

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したもの。  
以下試験用水とする。水質測定結果を付表 1 に示す。

飼育方法：流水式

水温：25 ± 2°C

溶存酸素濃度：飽和酸素濃度の 60%以上

照明：室内光，16 時間明（540-1000 lux）／8 時間暗

餌の種類：ブラインシュリンプ孵化幼生

給餌量：飽食量（2～3 回／日）

### 2.1.3 試験環境および条件など

#### (1) 試験室

試験は，株式会社三菱ケミカルリサーチ 製品安全評価部門 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

ばく露試験は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。試験原液，試験用水および試験液の流量は，ばく露期間中 5 回（少なくとも週 1 回）確認し，ばく露期間中の流量の変動が 10%以内となるよう設定した。

#### (3) 試験条件

ばく露条件は，前述の OECD TG229 に準じて，以下の条件で行った。

飼育水槽：2 L 容オールガラス水槽

試験用水：脱塩素水道水

ばく露方式：流水式（換水率 約 28 回／日，流量 35 mL/min）

ばく露期間：21 日間（2021 年 11 月 10 日～2021 年 12 月 1 日）

試験液量：約 1.8 L／容器

試験区数：対照区および 3 濃度区

各濃度区の被験物質濃度は 0.10，0.32，1.0 mg/L（公比 3.2）

連数：4 容器／試験区



供試魚数：6 個体（オス 3 個体，メス 3 個体）／容器

24 個体（オス 12 個体，メス 12 個体）／試験区

供試魚齢：16 ± 2 週齢（本試験では 16 週齢）

供試魚体重：オス 0.226 ± 0.028 g，メス 0.294 ± 0.053 g

ばく露開始前にばく露に使用しない雌雄各 6 個体について魚体重を測定した結果

水 温：25 ± 2°C

溶存酸素濃度：飽和酸素濃度の 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の孵化後 24 時間以内の幼生を，1 日 2～3 回給餌した。

#### (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：東亜ディーケーケー製 MM-60R 型（溶存酸素濃度，pH 測定用）

#### (5) 試験濃度

事前に 4-*t*-ブチルフェノールのメダカに対する急性毒性試験（10 個体／試験区）を実施し，設定濃度 5.0 mg/L 区において全魚死亡，0.50 mg/L および 1.0 mg/L 区では急性影響および，遊泳，外見，呼吸異常も認められなかった。

環境省による令和 2 年度の第 1 段階試験管内試験結果より<sup>5)</sup>，4-*t*-ブチルフェノールのレポータージーンアッセイの結果，エストロゲン作用における LOEC は 0.5 mg/L 付近と推察された。

以上より，本試験の設定濃度は 1.0，0.32，0.10 mg/L（公比 3.2）とした。

#### (6) 試験液の調製

被験物質を必要量秤量し，試験用水と混合，24 時間スターラー攪拌して被験物質原液 400 mg/L を調製した。この被験物質原液を試験用水で適宜希釈し，各試験濃度の 200 倍となるよう，各試験原液をそれぞれ調製した。各試験液は，これらの各試験原液を流水試験装置により試験用水で希釈して調製した。対照区は試験用水のみとした。なお，被験物質原液および試験原液は室温（ばく露）条件下において調製後 22 日間安定であったため，13～18 日毎に新しく調製し交換した。

## (7) 被験物質の濃度測定

高速液体クロマトグラフ (HPLC) 計を用いて被験物質を定量した。ばく露開始前に空運転を行い、各試験区の 1 容器の試験液について被験物質の濃度を測定、設定通りに試験液の濃度が維持されることを確認した。ばく露期間中は各試験区の全容器の試験液について、少なくとも週に 1 回 (ばく露終了時を含む) 分析を行った。

試薬：アセトニトリル (高速液体クロマトグラフ用 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)

HPLC 測定条件：以下に示す

### 装置

高速液体クロマトグラフ (HPLC)

Agilent 1100 型 (No.4) , 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 (クォータナリポンプ)

オートサンプラ ; G1313A 型

カラムオープン ; G1316A 型 (カラムスイッチングバルブ)

ダイオードアレイ検出器 (DAD) ; G1315B 型

### 条件

カラム ; Intert Sustain Swift™ C18 5µm 4.6×150mm(W)  
ジーエルサイエンス製

溶離液 ; A 超純水  
B アセトニトリル  
A 液 30%, B 液 70%

ストップタイム ; 5 min

流速 ; 1.0 mL/min

測定波 ; 275 nm

カラム温度 ; 40°C

注入量 ; 500 µL

標準溶液の調製 : 4-*t*-ブチルフェノール 100 mg を秤量し、アセトニトリルで溶解し 100 mL に定容、1000 mg/L の溶液を調製した。この溶液をアセトニトリルで順次希釈し、0.0300, 0.0400, 0.0500, 0.100, 1.00, 10.0 mg/L の標準溶液を調製した。また、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 0.75 mL 採取

| ←超純水 0.75 mL 添加

混合

|

HPLC 測定

横軸に濃度 (mg/L) を、縦軸にピーク面積 (count) をとり、検量線を作成した。検量線の作成に、0 mg/L の標準溶液の結果は含めなかった。

最小二乗法により直線回帰式  $Y=a+bX$  を求めた。相関係数  $r$  は 1.000 となり、直線性の基準 (0.995 以上) を満たした。また、切片  $a$  の 95%信頼区間が原点を含むことから、検量線は原点を通過する直線とみなせた。

定量下限：検量線の最低濃度である 0.0300 mg/L をばく露期間中の定量下限とした。

試験液の分析：試験液を以下のように分析した。試験液中の被験物質濃度の定量は、各分析時に測定する標準溶液のピーク面積との比較で行った。

試験液 0.75 mL 採取

| ←アセトニトリル 0.75 mL 添加

混合

|

HPLC 測定

## 2.1.4 ばく露および観察・測定の方法

### (1) ばく露方法

じゅん化終了後、試験容器内の試験液の測定濃度が適正值であることを確認してから、供試生物を各水槽（4 容器×4 試験区＝計 16 容器）に投入してばく露を開始した。ばく露期間中はすべての容器の水温、溶存酸素濃度および pH を少なくとも週に 1 回（ばく露終了時を含む）測定した。対照区の 1 容器については毎日水温を測定した。対照区および最高濃度区の各 1 容器について、硬度とアルカリ度を少なくとも週に 1 回（ばく露終了時を含む）測定した。

なお、週に 1～2 回程度試験容器の掃除を実施した。ばく露および器具洗浄に用いた廃水は、廃水処理装置に通水し、試験廃水中の被験物質を吸着処理させた上で処理した。

### (2) ばく露期間中の観察・計測

ばく露期間中は試験容器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。死亡個体があった場合は、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、下記の項目について観察した。

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

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

### (3) ばく露終了後の測定

21 日間のばく露期間終了後、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。

全長および湿重量の測定：

全長は電子ノギス（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。

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た。

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 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℃、15000 rpm、10 分間の遠心分離にかける。
- ③ 分離した上清を 500  $\mu$ L 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℃で保存した。
- ④ 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 倍以上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。なお、前処理操作を考慮した定量下限値は、0.4 ng/mg 肝臓重量 とした。

生殖腺の測定：

解剖後、胴体から生殖腺を摘出し、電子天秤（メトラー製 AG204 型）によって秤量した。計測した生殖腺重量を基に生殖腺体指数（生殖腺重量／湿重量）を算出した。

## 2.1.5 結果の算出

### (1) 各エンドポイントの算出

繁殖データは各試験容器の平均総産卵数、受精卵数およびメス 1 個体の 1 日当たりの平均産卵数を算出し、各試験区の平均値および標準偏差を求めた。受精率は、各試験容器の受精卵数／産卵数より毎日算出した。また、全長、湿重量、肝臓体指数、生殖腺体指数、肝臓中のビテロジェニン濃度および二次性徴（乳頭状小突起を有する節板数）については雌雄別に各試験区の平均値および標準偏差を求めた。

なお、肝臓中のビテロジェニン濃度が定量下限値（0.4 ng/mg）を下回ったデータについては、定量下限の半値（0.2 ng/mg）を用いて平均値および標準偏差を算出した。

### (2) 統計処理

NOEC および LOEC 算出のための統計手法は OECD TG229 の Annex 8 のフローチャートに基づき、各エンドポイントに対し表 1 に示す変数変換と統計手法を適用した。解析には US EPA がメダカ拡張一世代繁殖試験（MEOGRT：Medaka Extended One Generation Test）および幼若両生類発達・成長試験（LAGDA：Larval Amphibian Growth and Development Assay）用に開発した統計解析ソフトウェア StatCharrms v. 0.90.92（2019 年 2 月 11 日版、R cran サイトより入手）および R-3.5.2（win 64 bit）を用いた。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 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	単調性の検定
受精率	アークサイン変換	→(単調性あり) Jonckheere-Terpstra 検定
死亡率	アークサイン変換	Cochran-Armitage 検定
全長・湿重量	なし	単調性の検定
肝臓体指数・生殖腺体指数	なし	→(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
ビテロジェニン	対数変換	→(正規性・等分散性あり) Dunnett 検定
二次性徴	平方根変換	→(正規性・等分散性なし) Dunn 検定

#### 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。

- ・ ばく露期間中、対照区における死亡率が10%を超えないこと
- ・ ばく露期間中、溶存酸素が飽和酸素濃度の60%以上であること
- ・ ばく露期間中、水温が $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ 以内かつ、試験容器間の水温が $\pm 1.5^{\circ}\text{C}$ 以上変動しないこと
- ・ 試験液中の被験物質濃度が平均測定濃度の $\pm 20\%$ 以内に維持されていること
- ・ ばく露開始前のすべての試験容器およびばく露期間中の対照区において産卵が活発であること

## 2.2 結果

### 2.2.1 試験液中の被験物質濃度

ばく露期間中、全容器の試験液中の被験物質濃度を週に1回（ばく露開始時およびばく露委終了時を含む）合計4回測定した結果（4容器の平均値）を表2に示す。設定濃度0.10, 0.32, 1.0 mg/Lに対して平均測定濃度はそれぞれ0.102, 0.313, 1.00 mg/Lであり、設定濃度に対して98~102%であった。

ばく露期間中に測定した各濃度区の被験物質濃度はすべて平均測定濃度の±20%以内に維持されており、試験の有効性基準を満たした。なお、平均測定濃度が設定濃度の±20%以内であったため、結果は設定濃度を用いて記載する。

表2 試験液中の被験物質濃度

設定濃度 (mg/L)	試験液中の被験物質濃度 (mg/L) (対平均測定濃度%)				平均測定濃度 [対設定濃度%]
	ばく露 開始時	ばく露 7日後	ばく露 14日後	ばく露 終了時	
対照区	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.	--
0.10	0.104	0.101	0.103	0.0997	0.102
	(102)	(99)	(101)	(98)	[102]
0.32	0.310	0.320	0.304	0.319	0.313
	(98)	(102)	(97)	(102)	[98]
1.0	0.982	0.972	1.03	1.02	1.00
	(98)	(97)	(103)	(102)	[100]

注) 「N. D.」は定量下限 (0.0300 mg/L) 未満であることを示す。

### 2.2.2 環境条件

表3に水温、溶存酸素、pH、硬度、アルカリ度のばく露期間中の最小値と最大値を示す。

ばく露期間中の水温は、すべての試験区において25.4~26.3℃であり、25±2℃以内かつ、試験容器間の水温の変動は±1.5℃未満であり、試験の有効性基準を満たした。溶存酸素は、すべての試験区において飽和酸素濃度の60%以上であり、試験の有効性基準を満たした。

測定結果の詳細を付表2に示す。



表3 ばく露期間中の水温，溶存酸素，pH，硬度，アルカリ度

設定濃度 (mg/L)	水温 (°C)	溶存酸素 (mg/L)		pH	硬度 (mg CaCO <sub>3</sub> /L)	アルカリ度 (mg CaCO <sub>3</sub> /L)
		[飽和濃度に対する割合 (%) ]				
対照区	25.4 - 26.1	7.8 - 8.5	[ 98 - 110 ]	6.9 - 7.8	47 - 52	45 - 50
0.10	25.5 - 26.3	7.7 - 8.4	[ 97 - 110 ]	7.2 - 7.8	—	—
0.32	25.5 - 26.1	7.8 - 8.4	[ 98 - 110 ]	7.3 - 7.8	—	—
1.0	25.4 - 26.1	7.6 - 8.4	[ 95 - 110 ]	7.3 - 7.8	47 - 50	45 - 50

注) 「—」は測定対象外であることを示す。

### 2.2.3 死亡率

ばく露期間中の死亡個体数を表4に示す。いずれの試験区においても，死亡および行動・外観の異常は認められなかった。対照区の死亡率は10%を超えなかったため，試験の有効性基準を満たした。

表4 ばく露期間中の死亡個体

設定濃度 (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	
対照区	12	0	0%	12	0	0%	0%
0.10	12	0	0%	12	0	0%	0%
0.32	12	0	0%	12	0	0%	0%
1.0	12	0	0%	12	0	0%	0%

## 2.2.4 総産卵数・受精卵数・受精率

各試験区における総産卵数・受精卵数・受精率を表5および図1に、メス1個体の1日当たりの平均産卵数を表5および図2に、メス1個体の累積産卵数を図3に示す。

総産卵数、受精卵数およびメス1個体の1日当たりの平均産卵数は、1.0 mg/L濃度区で対照区と比較し有意な減少が認められた。受精率は、0.32および1.0 mg/L濃度区で対照区と比較し有意な減少が認められた。対照区は、ばく露期間を通じて産卵は活発であり、試験の有効性基準を満たした。結果の詳細を付表3に示す。

表5 平均総産卵数・平均受精卵数・平均受精率・メス1個体の1日当たりの平均産卵数

設定濃度 (mg/L)	平均総産卵数 (eggs/vessel)	平均受精卵数 (eggs/vessel)	平均受精率 (%)	メス1個体の1日 当たりの平均産卵数 (eggs/day/female)
対照区	1282 ± 48	1249 ± 52	97.5 ± 0.9	20.4 ± 0.8
0.10	1212 ± 46	1179 ± 51	97.2 ± 1.6	19.2 ± 0.7
0.32	1219 ± 40	1170 ± 44 *	96.0 ± 1.9	19.3 ± 0.6
1.0	1153 ± 38 **	1067 ± 57 **	92.4 ± 1.9 **	18.3 ± 0.6 **

容器平均値±標準偏差 (n=4) , \* or \*\* : 対照区と有意差有り ( $p<0.05$  or  $p<0.01$ , Jonckheere-Terpstra 検定)

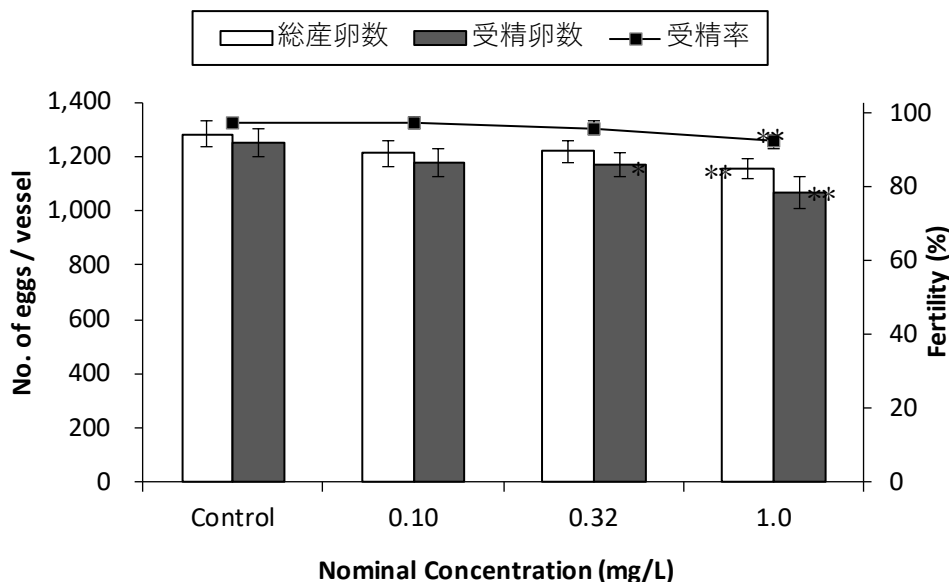


図1 平均総産卵数・平均受精卵数・平均受精率

\* or \*\* : 対照区と有意差有り ( $p<0.05$  or  $p<0.01$  : Jonckheere-Terpstra 検定)

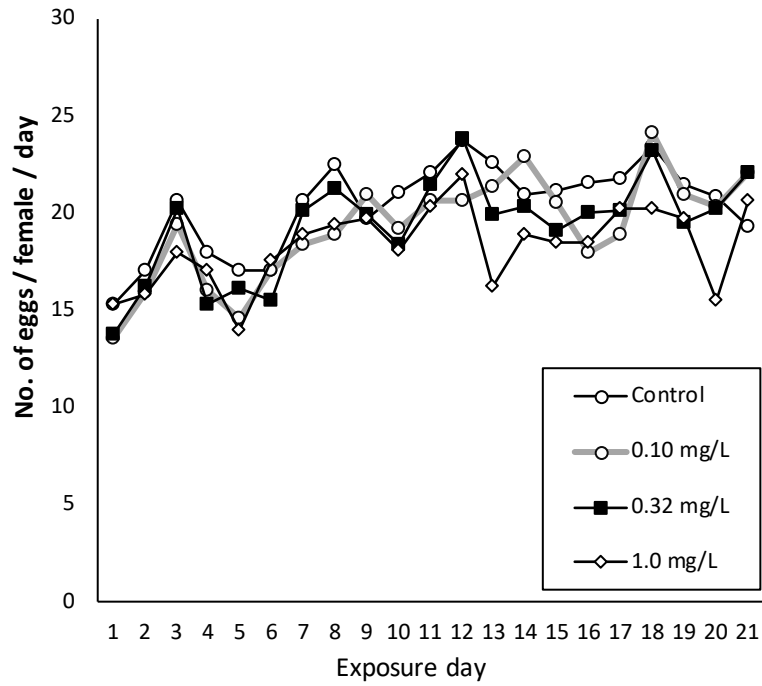


図2 ばく露期間中のメス1個体の1日当たりの平均産卵数

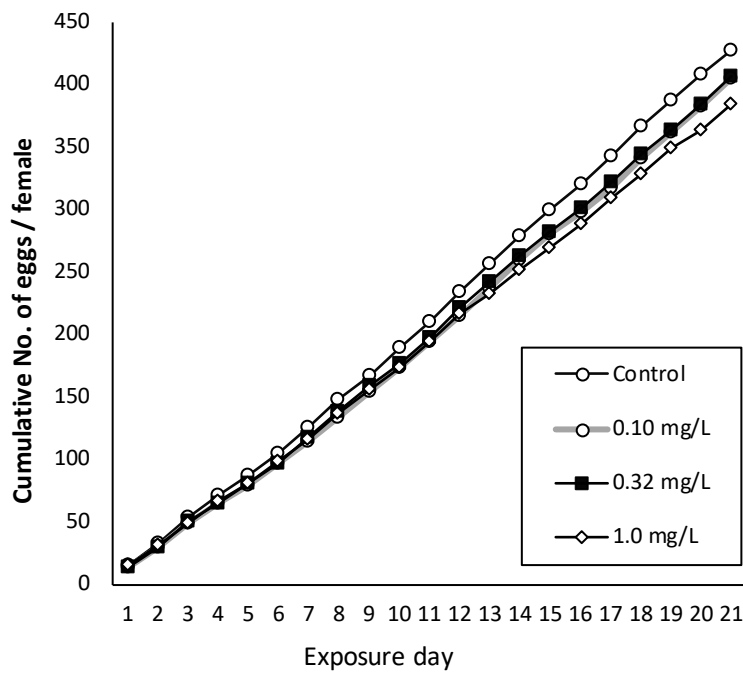


図3 ばく露期間中のメス1個体の累積産卵数

### 2.2.5 ばく露終了時の全長・湿重量

ばく露終了時の全長および湿重量の測定結果を表 6、図 4 (a)および(b)に示す。

オスの全長は、1.0 mg/L 濃度区で対照区と比較し有意な減少が認められたが、メスの全長はいずれの濃度区においても有意な差は認められなかった。湿重量は、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。測定結果の詳細を付表 4 に示す。

表 6 暴露終了時の全長および湿重量

設定濃度 (mg/L)	全長 (mm)		湿重量 (g)	
	オス	メス	オス	メス
対照区	29.4 ± 1.5	29.7 ± 1.6	0.250 ± 0.033	0.318 ± 0.069
0.10	29.2 ± 1.5	29.7 ± 0.8	0.258 ± 0.036	0.322 ± 0.032
0.32	28.7 ± 0.8	29.0 ± 1.1	0.256 ± 0.026	0.315 ± 0.047
1.0	28.3 ± 1.3 *	29.5 ± 1.4	0.234 ± 0.035	0.328 ± 0.053

平均値±標準偏差 (n=12) , \* : 対照区と有意差有り (p<0.05, Jonckheere-Terpstra 検定)

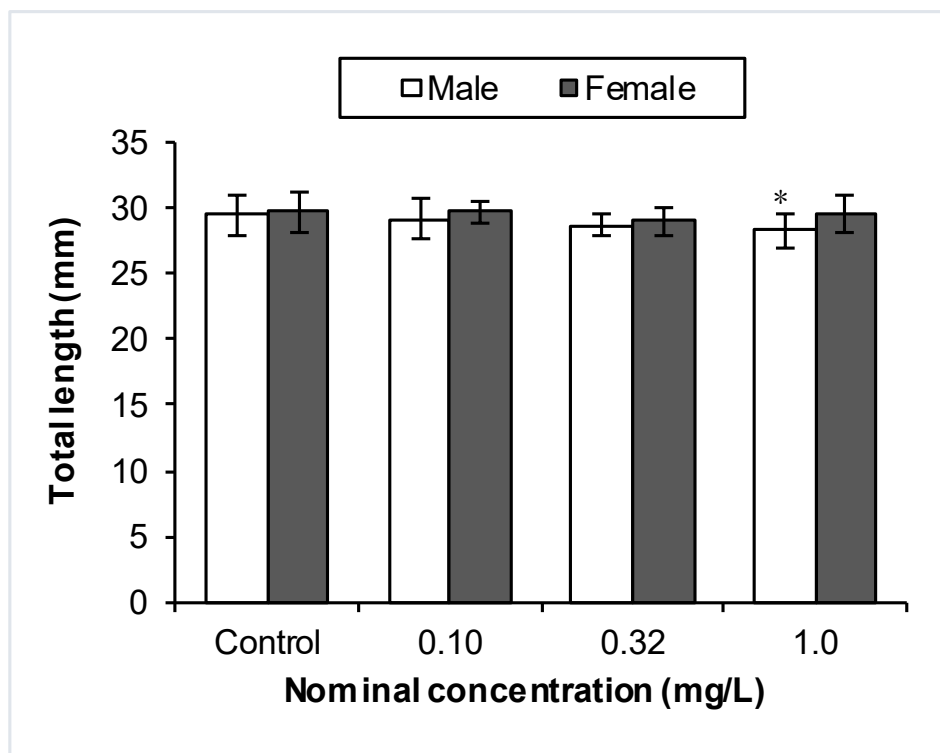


図 4 (a) ばく露終了時の全長

\* : 対照区と有意差有り (p<0.05, Jonckheere-Terpstra 検定)

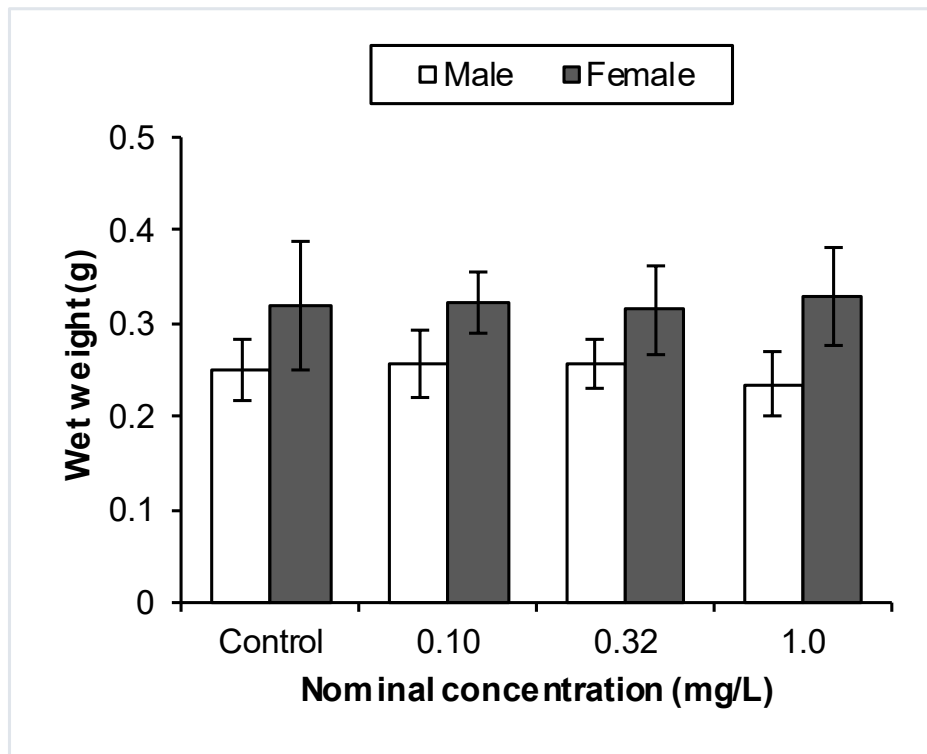


図 4 (b) ばく露終了時の湿重量

\* : 対照区と有意差有り (p<0.05, Jonckheere-Terpstra 検定)

### 2.2.6 ばく露終了時の肝臓体指数および生殖腺体指数

ばく露終了時の肝臓体指数および生殖腺体指数の測定結果を表 7, 図 5 (a) および (b) に示す。

肝臓体指数において、オスは 0.32 および 1.0 mg/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 1.0 mg/L 濃度区で対照区と比較し有意な増加が認められた。

生殖腺体指数は、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。測定結果の詳細を付表 4 に示す。

表 7 ばく露終了時の肝臓体指数および生殖腺体指数

設定濃度 (mg/L)	肝臓体指数 (%)		生殖腺体指数 (%)	
	オス	メス	オス	メス
対照区	2.43 ± 0.28	6.34 ± 1.1	0.937 ± 0.27	9.51 ± 1.5
0.10	2.30 ± 0.34	6.38 ± 0.69	1.16 ± 0.25	10.4 ± 1.4
0.32	3.02 ± 0.31 **	6.84 ± 0.85	0.898 ± 0.30	10.2 ± 1.1
1.0	3.42 ± 0.31 **	7.02 ± 0.75 *	1.02 ± 0.19	9.74 ± 1.8

平均値±標準偏差 (n=12) , \* or \*\* : 対照区と有意差有り ( $p < 0.05$  or  $p < 0.01$ , Jonckheere-Terpstra 検定)

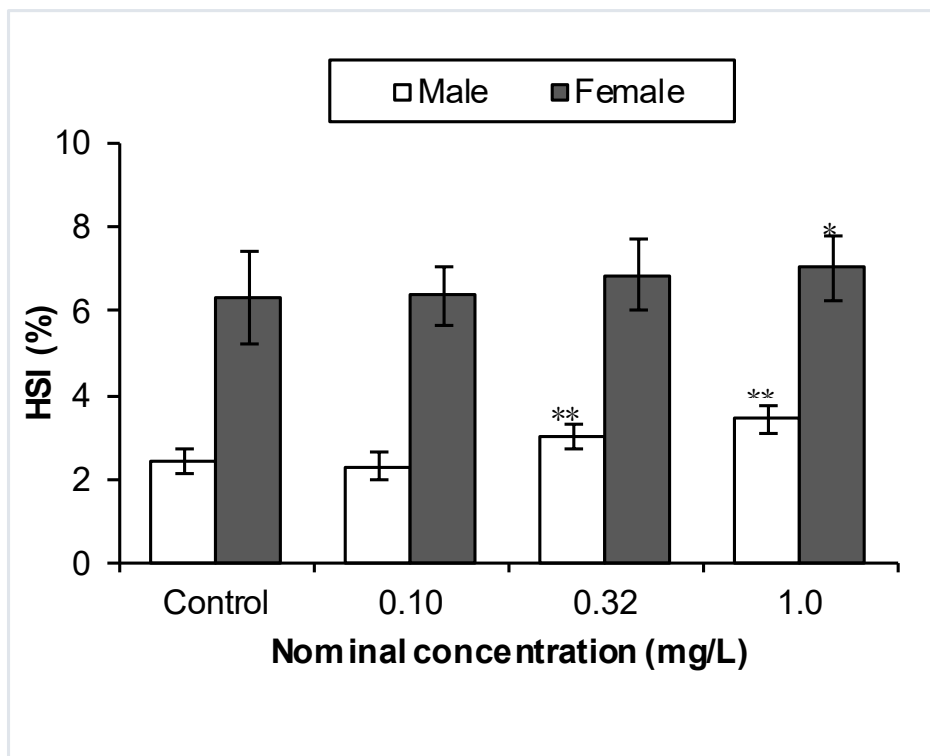


図 5(a) ばく露終了時の肝臓体指数 (HSI)

\* or \*\* : 対照区と有意差有り ( $p < 0.05$  or  $p < 0.01$  : Jonckheere-Terpstra 検定)

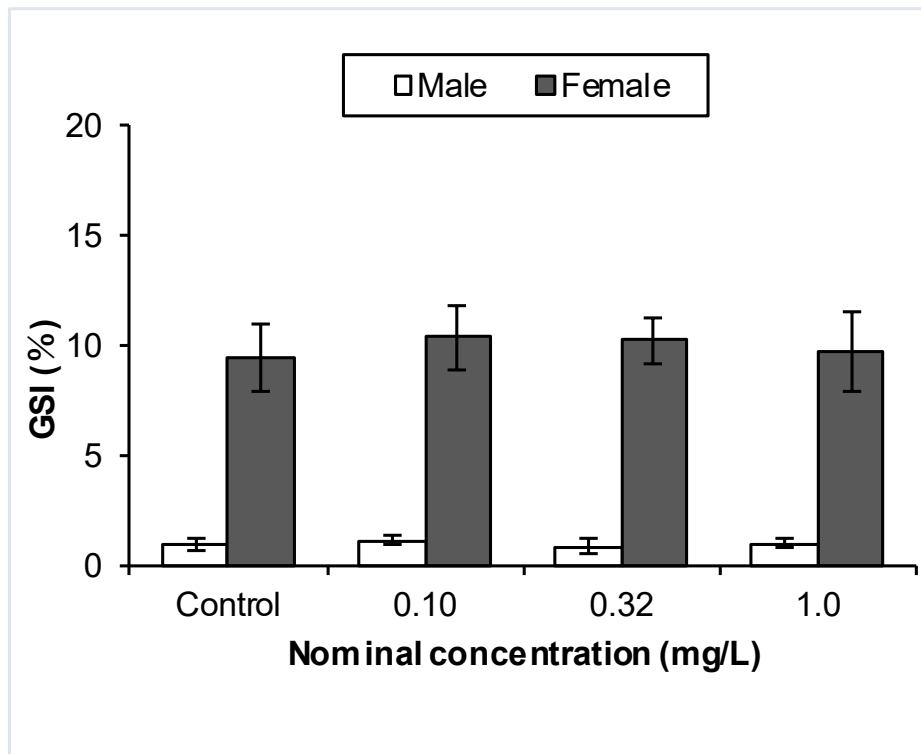


図 5(b) ばく露終了時の生殖腺体指数 (GSI)  
 対照区と有意差無し (Jonckheere-Terpstra 検定)

### 2.2.7 ばく露終了時の肝臓中ビテロジェニン濃度

ばく露終了時のELISAによる肝臓中ビテロジェニン濃度の測定結果を表8および図6に示す。オスメスともに1.0 mg/L濃度区で対照区と比較し有意な増加が認められた。測定結果の詳細を付表5に示す。

表8 ばく露終了時の肝臓中ビテロジェニン濃度

設定濃度 (mg/L)	肝臓中ビテロジェニン濃度 (ng/mg liver)			
	オス		メス	
対照区	0.583	± 1.3	698	± 74
0.10	0.334	± 0.47	686	± 97
0.32	0.521	± 0.76	754	± 100
1.0	68.1	± 160 **	882	± 140 *

平均値±標準偏差 (n=12) , \*\* : 対照区と有意差有り (p<0.01, Jonckheere-Terpstra 検定)

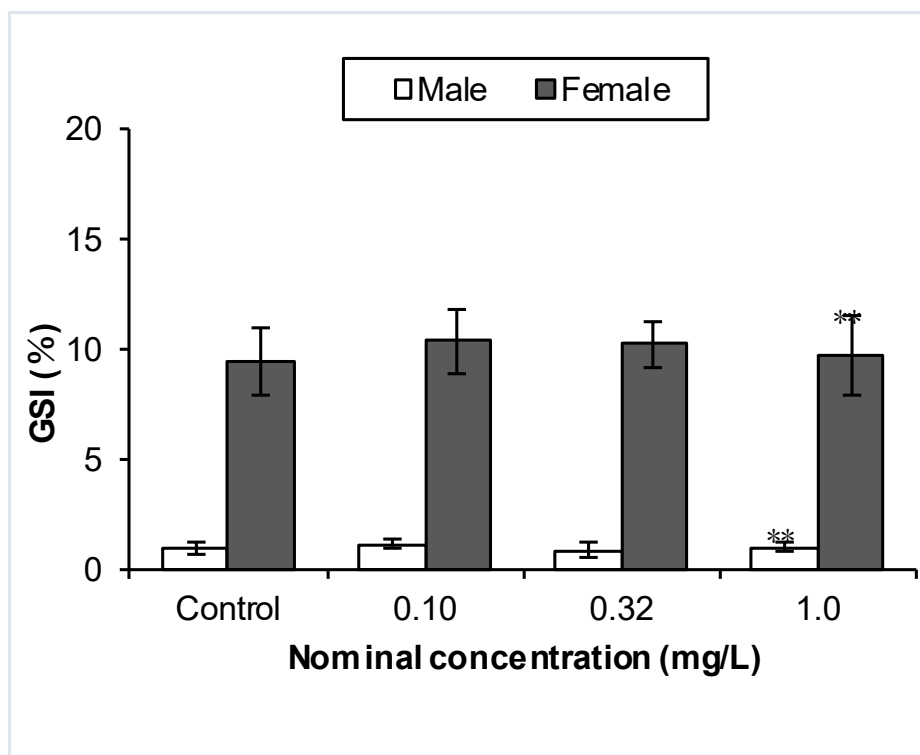


図6 ばく露終了時の肝臓中ビテロジェニン

\*\* : 対照区と有意差有り (p<0.01 : Jonckheere-Terpstra 検定)



### 2.2.8 ばく露終了時の二次性徴指標

二次性徴の指標として、ばく露終了時における乳頭状小突起を有する節板数（1 個体あたり）の計測結果を表 9 および図 7 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。メスはいずれの濃度区においても、乳頭状小突起を有する個体は確認されなかった。測定結果の詳細を付表 5 に示す。

表 9 ばく露終了時の二次性徴指標

設定濃度 (mg/L)	乳頭状小突起を有する節板数 (Plates/fish)	
	オス	メス
対照区	69 ± 11	0 ± 0
0.10	67 ± 17	0 ± 0
0.32	63 ± 11	0 ± 0
1.0	66 ± 10	0 ± 0

平均値±標準偏差 (n=12)

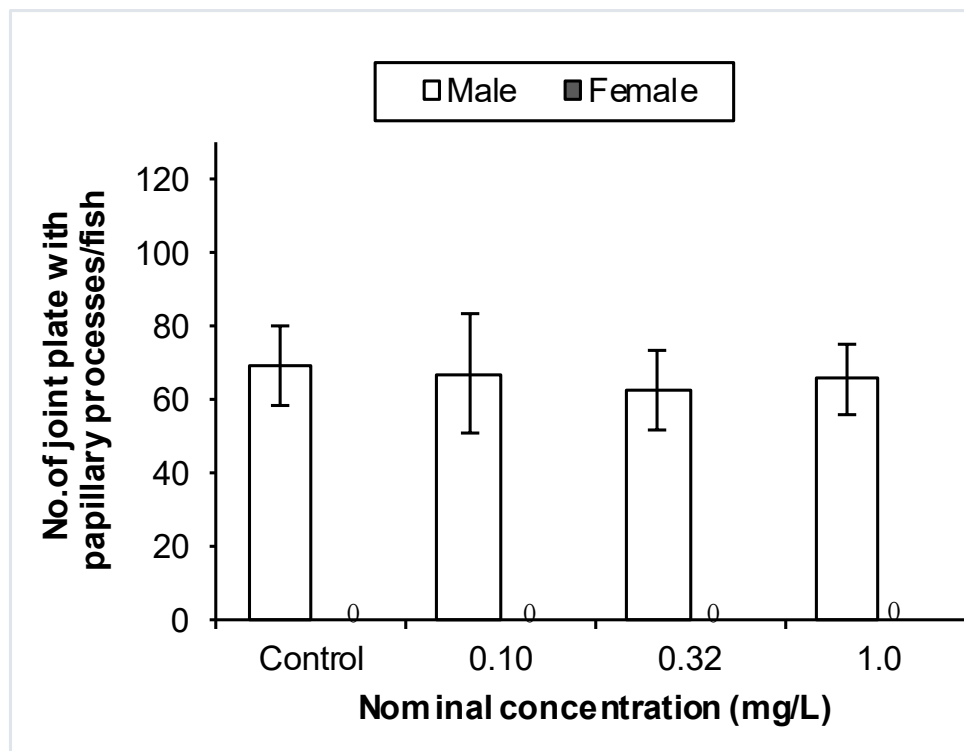


図 7 ばく露終了時の乳頭状小突起を有する節板数

## 2.3 結果の概要および考察

4-*t*-ブチルフェノールを用いた魚類短期繁殖試験を実施した。各エンドポイントについて、結果の概要を以下にまとめた。本試験の各エンドポイントの LOEC および NOEC を表 10 に示す。

ばく露期間中の試験液中の被験物質濃度は、設定濃度 0.10, 0.32 および 1.0 mg/L に対し、それぞれの平均測定濃度は 0.102, 0.313 および 1.00 mg/L であり、設定濃度に対して 102, 98 および 100%であった。また全ての試験区において、ばく露終了時の死亡および行動・外観異常は認められなかった。また、試験の有効性基準をすべて満たしたため、本試験は有効であると判断した。

ばく露終了時における湿重量、生殖腺体指数については、全ての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。全長についてはオスにのみ、1.0 mg/L で対照区と比較し有意な減少が認められた。肝臓体指数については、オスで 0.32 および 1.0 mg/L において対照区との有意な増加が、メスでは、1.0 mg/L で対照区との有意な増加が認められた。肝臓中ビテロジェニン濃度については、試験濃度範囲において、オスおよびメスともに 4-*t*-ブチルフェノール濃度に依存的かつ統計学的に有意な増加がみられ、LOEC は 1.0 mg/L, NOEC は 0.32 mg/L であった。二次性徴（乳頭状小突起を有する節板数）については、オスおよびメスともに試験濃度範囲において有意な変化は認められず、LOEC および NOEC は最高濃度区以上とした (> 1.0 mg/L および  $\geq 1.0$  mg/L)。繁殖に関する指標（産卵状況）については、受精卵数および受精率とともに、試験濃度範囲において濃度依存的かつ統計学的に有意に低下し、受精卵数において、LOEC が 0.32 mg/L, NOEC が 0.10 mg/L であった。以上の結果から、4-*t*-ブチルフェノールは 21 日間のばく露期間においてメダカに有意な影響を及ぼし、LOEC は 0.32 mg/L, NOEC は 0.10 mg/L と判断した。

4-*t*-ブチルフェノールについては、既報において、動物試験（生態影響）や培養細胞でのエストロゲン作用の報告がなされている。Barse ら<sup>3)</sup>は成熟コイへの 28 日間のばく露試験において、0.690 mg/L 以上の濃度での肝臓体指数や筋肉組織中ビテロジェニン濃度の高値を報告している。また、Tollefsen ら<sup>4)</sup>は 98 時間ばく露したニジマス肝培養細胞（未成熟オス由来）においてビテロジェニン産生濃度の上昇によるエストロゲン作用の可能性について報告している。本試験の結果では、オスおよびメスともに、ばく露 21 日後の肝臓中ビテロジェニン濃度に 4-*t*-ブチルフェノールのばく露濃度に依存的かつ統計学的に有意な増加が認められ、繁殖指標での濃度依存的な減少と併せ、4-*t*-ブチルフェノールがメダカ成魚に対してエストロゲン様作用を示すことが示唆された。本結果は、令和 2 年度の第 1 段階試験管内試験<sup>5)</sup>にて報告されたメダカ ER $\alpha$  に対する転写活性化（エストロゲン作用の検出）、およびメダカ ER $\alpha$  の転写活性化倍率に対する有意な低下が認められなかったこと（抗エストロゲン作用の不検出）と一致する結果となった。

表 10 4-*t*-ブチルフェノールの試験結果まとめ

Endpoint		LOEC (mg/L)	NOEC (mg/L)
死亡率	オス	>1.0	≥1.0
	メス	>1.0	≥1.0
産卵数		↓ 1.0	0.32
受精卵数		↓ 0.32	0.10
受精率		↓ 1.0	0.32
全長	オス	1.0	0.32
	メス	>1.0	≥1.0
湿重量	オス	>1.0	≥1.0
	メス	>1.0	≥1.0
肝臓体指数	オス	↑ 0.32	0.10
	メス	↑ 1.0	0.32
生殖腺体指数	オス	>1.0	≥1.0
	メス	>1.0	≥1.0
肝臓中ビテロジェニン濃度	オス	↑ 1.0	0.32
	メス	↑ 1.0	0.32
二次性徴（乳頭状小突起を有する節板数）	オス	>1.0	≥1.0
	メス	>1.0	≥1.0

### 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う。

令和3年度 第2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4年3月7日

開催形式：WEB

#### 4. 参考文献

- 1) OECD (2012), OECD Guideline for the Testing of Chemicals No.229, Fish Short Term Reproduction Assay
- 2) 環境省環境保健部環境リスク評価室 (2015) 化学物質の環境リスク評価 第13巻
- 3) Barse AV, Chakrabarti T, Ghosh TK, Pal AK and Jadhao SB (2006) One-tenth dose of LC50 of 4-tert-butylphenol causes endocrine disruption and metabolic changes in *Cyprinus carpio*. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 86, 172-179
- 4) Tollefsen KE, Eikvar S, Finne EF, Fogelberg O and Gregersen IK (2008) Estrogenicity of alkylphenols and alkylated non-phenolics in a rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) primary hepatocyte culture. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 71, 370-383
- 5) 環境省 (2021), 令和3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, 資料 2-1 令和2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)

付属資料

付表 1 試験用水の水質測定結果

付表 2 ばく露期間中の水温, 溶存酸素, pH, 硬度, アルカリ度

付表 3 ばく露期間中の産卵数, 受精卵数, 受精率

付表 4 ばく露終了時の全長, 湿重量, HSI, GSI, 二次性徴, ビテロジェニン濃度

付表 1 試験用水の水質測定結果

## 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 17, 2021

These data were obtained from report 21H-003907-0001.

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]	0.3	Total Residue	[mg/L]	81
Biochemical Oxygen Demand (BOD)	[mg/L]	<0.5	Conductivity	[mS/m]	10
Chemical Oxygen Demand (COD)	[mg/L]	1.6	Hardness	[mg CaCO <sub>3</sub> /L]	34
Total Phosphorus	[mg/L]	N.D. ( <0.02 )	Alkalinity (pH4.8)	[mg CaCO <sub>3</sub> /L]	31
pH	[-/(°C)]	7.9 ( 20 )	Sodium	[mg/L]	5.5
Coliform Group	[MPN/100mL]	N.D. ( <2 )	Potassium	[mg/L]	0.8
Total Mercury	[mg/L]	N.D. ( <0.00005 )	Calcium	[mg/L]	9.6
Copper	[mg/L]	N.D. ( <0.005 )	Magnesium	[mg/L]	2.5
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 )	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 )	Iprobenfos (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 )			

測定濃度 (mg/L)	容器 No.	水温 (°C)				溶存酸素 (mg/L)				pH			
		暴露 開始時	暴露 7日後	暴露 14日後	暴露 終了時	暴露 開始時	暴露 7日後	暴露 14日後	暴露 終了時	暴露 開始時	暴露 7日後	暴露 14日後	暴露 終了時
対照区	1	25.5	25.9	25.6	26.1	8.5	8.3	8.1	7.9	7.7	7.7	7.6	6.9
	2	25.4	25.9	25.6	26.1	8.4	8.4	8.2	7.8	7.7	7.8	7.7	7.0
	3	25.6	26.0	25.7	26.0	8.3	8.3	8.2	7.9	7.8	7.8	7.7	7.1
	4	25.5	26.0	25.6	26.0	8.5	8.3	8.1	7.8	7.8	7.8	7.7	7.2
0.10	1	25.7	26.2	25.9	26.2	8.4	8.3	8.2	7.8	7.7	7.8	7.8	7.2
	2	25.5	26.1	25.9	26.3	8.4	8.4	8.1	7.7	7.8	7.8	7.8	7.2
	3	25.6	26.0	25.8	26.2	8.2	8.2	8.1	7.7	7.8	7.8	7.7	7.2
	4	25.7	26.0	25.7	26.2	8.2	8.2	8.2	7.8	7.8	7.7	7.8	7.3
0.32	1	25.5	26.1	25.6	25.7	8.3	8.2	8.2	7.8	7.8	7.8	7.8	7.3
	2	25.6	26.0	25.6	25.9	8.3	8.3	8.2	7.8	7.8	7.8	7.8	7.3
	3	25.5	26.0	25.6	25.8	8.3	8.3	8.2	7.8	7.8	7.8	7.8	7.3
	4	25.5	26.0	25.6	25.8	8.3	8.4	8.3	7.8	7.8	7.8	7.8	7.3
1.0	1	25.4	26.1	25.7	26.1	8.4	8.3	8.3	7.8	7.8	7.8	7.8	7.3
	2	25.5	26.0	25.7	26.0	8.4	8.4	8.2	7.9	7.8	7.8	7.8	7.4
	3	25.5	26.0	25.6	26.0	8.3	8.4	8.2	7.8	7.8	7.8	7.8	7.4
	4	25.5	26.0	25.7	25.9	8.4	8.4	8.2	7.6	7.8	7.8	7.8	7.4

測定濃度 (mg/L)	容器 No.	硬度 (mg CaCO <sub>3</sub> /L)				アルカリ度 (mg CaCO <sub>3</sub> /L)			
		暴露 開始時	暴露 7日後	暴露 14日後	暴露 終了時	暴露 開始時	暴露 7日後	暴露 14日後	暴露 終了時
対照区	1	52	49	49	47	50	50	50	45
	1	50	47	50	48	50	50	50	45

測定濃度 (mg/L)	容器 No.	暴露日数																			合計 (平均)		
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19		20	21
		46	48	63	50	52	55	63	70	64	62	70	71	72	62	65	69	66	71	68	65	64	1316
	1	44	48	58	49	51	54	61	70	61	62	70	71	72	62	65	69	66	71	68	64	64	1300
		96	100	92	98	98	98	97	100	95	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	(99)
		40	47	65	53	48	49	67	64	59	66	62	64	64	51	61	59	62	63	61	56	62	1223
	2	39	46	49	53	48	49	67	64	59	62	60	64	62	49	57	59	61	62	60	54	60	1184
		98	98	75	100	100	100	100	100	100	94	97	100	97	96	93	100	98	98	98	96	97	(97)
		48	66	57	52	54	51	55	76	51	68	69	80	64	75	55	72	70	79	65	67	53	1327
	3	47	57	55	51	52	51	54	76	50	67	69	76	64	72	55	69	66	65	65	67	52	1280
		98	86	96	98	96	100	98	100	98	99	100	95	100	96	100	96	94	82	100	100	98	(97)
		49	44	62	60	50	49	63	60	62	57	64	69	71	63	73	59	63	68	63	62	52	1263
	4	46	42	60	58	49	49	63	60	62	55	63	65	70	62	65	58	60	68	63	62	51	1231
		94	95	97	97	98	100	100	100	100	96	98	94	99	98	89	98	95	100	100	100	98	(98)
		42	43	64	47	45	59	50	47	62	65	63	64	77	68	64	57	62	65	73	58	64	1239
	1	42	41	62	46	42	59	50	47	50	64	62	53	72	61	50	57	61	64	73	57	62	1175
		100	95	97	98	93	100	100	100	81	98	98	83	94	90	78	100	98	100	100	98	97	(95)
		43	54	52	52	45	55	58	67	61	66	62	54	63	70	69	58	60	85	62	62	65	1263
	2	39	52	52	52	45	55	58	65	61	66	62	53	63	70	68	58	60	85	62	62	64	1252
		91	96	100	100	100	100	100	97	100	100	100	98	100	100	99	100	100	100	100	100	98	(99)
	0.10	38	45	62	47	33	48	63	50	69	46	69	59	56	70	57	48	50	81	58	61	57	1167
	3	37	44	59	46	32	47	62	50	67	46	67	57	56	70	55	45	47	79	58	59	57	1140
		97	98	95	98	97	98	98	100	97	100	97	97	100	100	96	94	94	98	100	97	100	(98)
		40	49	55	46	52	42	50	62	59	53	54	70	60	66	56	53	55	58	58	63	79	1180
	4	40	48	53	45	51	42	50	62	57	45	54	70	58	64	52	52	52	55	57	63	77	1147
		100	98	96	98	98	100	100	100	97	85	100	100	97	97	93	98	95	95	98	100	97	(97)

対照区



測定濃度 (mg/L)	容器 No.	暴露日数																				合計 (平均)	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20		21
0.32	産卵数	36	54	65	45	54	56	62	70	65	58	65	79	54	69	51	60	61	71	62	56	66	1259
	受精卵数	33	53	64	44	53	56	59	66	59	58	58	79	45	66	51	60	61	69	62	52	66	1214
	受精率	92	98	98	98	98	100	95	94	91	100	89	100	83	96	100	100	100	97	100	93	100	(96)
	産卵数	38	49	56	51	47	50	50	48	64	49	61	68	61	59	61	55	58	69	63	61	72	1190
	受精卵数	36	48	43	51	36	46	49	47	64	47	57	55	58	55	58	55	56	67	59	58	70	1115
	受精率	95	98	77	100	77	92	98	98	100	96	93	81	95	93	95	100	97	97	94	95	97	(94)
	産卵数	57	51	62	48	50	48	61	71	53	61	68	72	57	61	60	57	55	64	61	70	60	1247
	受精卵数	53	51	62	48	50	48	60	69	53	61	64	70	55	60	58	51	50	59	57	70	46	1195
	受精率	93	100	100	100	100	100	98	97	100	100	94	97	96	98	97	89	91	92	93	100	77	(96)
	産卵数	34	40	60	40	42	32	68	66	57	52	63	67	67	55	57	68	67	74	48	55	67	1179
受精卵数	34	40	58	40	42	32	68	66	51	52	63	67	63	55	56	67	67	63	48	55	67	1154	
受精率	100	100	97	100	100	100	100	100	89	100	100	100	94	100	98	99	100	85	100	100	100	(98)	
産卵数	53	45	62	53	40	56	54	64	63	47	58	77	46	50	63	52	58	63	57	27	52	1140	
受精卵数	37	35	59	52	40	54	54	62	61	46	57	76	46	49	58	50	58	59	52	21	35	1061	
受精率	70	78	95	98	98	100	96	100	97	98	98	99	100	98	92	96	100	94	91	78	67	(92)	
産卵数	42	50	59	51	45	57	57	57	58	64	61	61	54	49	47	52	55	58	61	52	72	1162	
受精卵数	42	47	57	49	39	57	56	57	57	63	58	61	54	47	41	40	49	45	61	49	67	1096	
受精率	100	94	97	96	87	100	98	100	98	98	95	100	100	96	87	77	89	78	100	94	93	(94)	
産卵数	46	47	42	50	34	48	52	57	60	47	63	54	40	62	59	54	58	63	60	51	63	1110	
受精卵数	43	47	37	46	34	46	52	57	59	44	63	52	29	48	54	54	58	30	43	49	45	990	
受精率	93	100	88	92	100	96	100	100	98	94	100	96	73	77	92	100	100	48	72	96	71	(90)	
産卵数	43	48	53	51	49	49	63	55	55	59	62	71	54	66	53	64	71	59	58	56	61	1200	
受精卵数	41	47	50	48	49	41	62	40	53	59	61	69	46	66	40	63	70	59	57	39	61	1121	
受精率	95	98	94	94	100	84	98	73	96	100	98	97	85	100	75	98	99	100	98	70	100	(93)	

付表4 ばく露終了時の全長, 湿重量, HSI, GSI, 乳頭状小突起数, ビテロジェニン濃度

測定濃度 (mg/L)	容器 No.	個体 No.	性判別	全長 (mm)	湿重量 (g)	HSI (%)	GSI (%)	乳頭状 小突起数	ビテロジェニン 濃度
対照区	1	1	メス	28.9	0.296	6.45	9.67	0	564
		2	メス	30.6	0.315	7.53	10.2	0	694
		3	メス	30.7	0.375	5.41	8.88	0	769
		4	オス	28.7	0.218	2.11	0.368	77	N.D.
		5	オス	31.9	0.307	2.22	0.848	79	N.D.
		6	オス	30.3	0.258	2.48	1.09	64	N.D.
	2	7	メス	30.8	0.343	7.17	10.6	0	683
		8	メス	28.7	0.275	4.48	7.36	0	657
		9	メス	30.0	0.297	7.14	8.69	0	576
		10	オス	31.3	0.284	2.18	1.16	80	N.D.
		11	オス	27.6	0.204	2.80	0.835	62	N.D.
		12	オス	29.9	0.244	2.13	1.11	68	4.80
	3	13	メス	28.2	0.303	8.06	12.8	0	701
		14	メス	32.0	0.426	5.61	9.96	0	710
		15	メス	28.6	0.239	7.04	8.29	0	806
		16	オス	28.4	0.236	2.20	1.27	83	N.D.
		17	オス	26.3	0.200	2.65	0.600	44	N.D.
		18	オス	29.6	0.240	2.50	0.710	61	N.D.
	4	19	メス	32.1	0.448	6.61	10.8	0	710
		20	メス	28.6	0.274	5.18	7.47	0	787
		21	メス	27.1	0.223	5.34	9.47	0	713
		22	オス	29.1	0.266	2.25	1.05	76	N.D.
		23	オス	30.0	0.261	2.84	1.04	64	N.D.
		24	オス	30.2	0.283	2.76	1.17	74	N.D.
0.10	1	25	メス	30.8	0.368	6.47	10.6	0	668
		26	メス	29.9	0.316	5.73	11.1	0	758
		27	メス	28.9	0.324	6.44	8.73	0	604
		28	オス	28.0	0.235	2.30	1.11	58	N.D.
		29	オス	29.4	0.260	1.81	0.692	85	1.81
		30	オス	26.8	0.192	1.92	1.25	38	N.D.
	2	31	メス	30.8	0.358	6.42	9.69	0	559
		32	メス	30.7	0.336	5.89	9.43	0	678
		33	メス	30.3	0.364	7.07	14.3	0	691
		34	オス	28.9	0.253	2.33	1.19	64	N.D.
		35	オス	30.2	0.256	1.91	1.52	92	N.D.
		36	オス	27.1	0.211	2.65	1.37	44	N.D.
	3	37	メス	28.7	0.328	5.39	10.4	0	716
		38	メス	29.8	0.327	5.32	9.60	0	814
39		メス	28.7	0.299	7.66	9.70	0	536	
40		オス	31.2	0.286	2.24	1.22	74	N.D.	
41		オス	30.0	0.257	2.88	1.25	77	N.D.	
42		オス	28.1	0.239	2.76	1.38	55	N.D.	
4	43	メス	29.5	0.264	6.55	9.50	0	860	
	44	メス	28.5	0.288	6.82	10.8	0	633	
	45	メス	29.6	0.291	6.80	10.7	0	721	
	46	オス	28.9	0.321	2.06	0.717	84	N.D.	
	47	オス	31.2	0.296	2.43	1.05	73	N.D.	
	48	オス	30.5	0.284	2.29	1.16	63	N.D.	

N.D. : 定量下限 (0.4 ng/mg) 未満

付表 4 (続き) ばく露終了時の全長, 湿重量, HSI, GSI, 乳頭状小突起数, ビテロジェニン濃度

測定濃度 (mg/L)	容器 No.	個体 No.	性別別	全長 (mm)	湿重量 (g)	HSI (%)	GSI (%)	乳頭状 小突起	ビテロジェニン 濃度
0.32	1	49	メス	29.4	0.303	5.57	11.2	0	768
		50	メス	29.2	0.303	6.83	9.71	0	521
		51	メス	28.4	0.321	8.61	12.2	0	849
		52	オス	27.7	0.239	2.64	0.502	55	N.D.
		53	オス	28.8	0.264	3.41	1.10	68	N.D.
		54	オス	28.4	0.264	3.07	0.645	50	N.D.
	2	55	メス	30.0	0.357	6.66	8.68	0	762
		56	メス	29.3	0.313	6.29	11.20	0	814
		57	メス	29.0	0.339	7.64	9.70	0	666
		58	オス	29.7	0.292	2.74	1.27	63	N.D.
		59	オス	27.7	0.241	3.33	0.915	72	N.D.
		60	オス	28.1	0.241	2.78	0.746	40	N.D.
	3	61	メス	27.9	0.285	5.72	9.68	0	777
		62	メス	30.1	0.357	7.34	10.5	0	663
		63	メス	28.6	0.303	7.00	10.1	0	895
		64	オス	28.6	0.266	3.45	1.01	72	0.63
		65	オス	29.5	0.271	3.39	1.03	71	N.D.
		66	オス	28.8	0.268	2.87	1.42	69	2.77
	4	67	メス	30.9	0.382	7.41	9.22	0	813
		68	メス	28.5	0.316	6.89	11.5	0	728
		69	メス	27.0	0.196	6.17	9.03	0	791
70		オス	30.0	0.275	2.91	0.509	76	1.04	
71		オス	29.1	0.257	2.61	0.623	55	N.D.	
72		オス	27.6	0.188	3.03	1.01	62	N.D.	
1.0	1	73	メス	29.2	0.395	7.25	10.5	0	840
		74	メス	30.2	0.367	6.53	7.97	0	909
		75	メス	27.0	0.251	6.63	9.02	0	932
		76	オス	28.6	0.250	3.28	0.880	63	N.D.
		77	オス	29.8	0.256	2.97	1.17	84	1.19
		78	オス	27.4	0.205	3.66	0.781	55	N.D.
	2	79	メス	29.4	0.289	6.37	6.27	0	1197
		80	メス	30.9	0.357	7.20	11.0	0	585
		81	メス	31.5	0.410	6.49	9.56	0	861
		82	オス	29.5	0.274	3.76	0.911	77	2.84
		83	オス	29.8	0.257	3.23	1.13	70	7.44
		84	オス	25.9	0.193	4.00	1.04	50	N.D.
	3	85	メス	28.9	0.306	7.91	10.4	0	814
		86	メス	29.2	0.327	7.15	13.1	0	929
		87	メス	27.3	0.251	5.49	8.04	0	915
		88	オス	28.2	0.202	3.41	1.09	56	1.23
		89	オス	29.0	0.240	3.45	1.25	67	539
		90	オス	29.8	0.301	2.96	1.06	68	248
4	91	メス	30.0	0.322	7.28	9.58	0	971	
	92	メス	29.3	0.288	7.92	10.4	0	844	
	93	メス	31.3	0.374	8.03	11.2	0	790	
	94	オス	26.5	0.189	3.49	0.90	74	10.3	
	95	オス	27.1	0.217	3.23	1.34	62	0.65	
	96	オス	27.9	0.222	3.60	0.72	62	5.92	

N.D. : 定量下限 (0.4 ng/mg) 未満