

環境省請負業務

令和 3 年度及び令和 4 年度
化学物質の内分泌かく乱作用に関する
第二段階生物試験（ 17β -エストラジオール）
実施等業務

報告書
（令和 4 年度分）

令和 5 年 3 月

国立研究開発法人 国立環境研究所

目次

1.	背景と目的	1
2.	令和4年度の実施内容	2
3.	材料及び方法	2
3.1	被験物質	2
3.2	試験生物	3
3.3	試験環境及び条件など	3
3.4	ばく露及び観察・測定の方法	8
3.5	結果の産出	13
3.6	試験有効性基準	15
4.	結果	16
4.1	試験環境	16
4.2	試験液の被験物質濃度	16
4.3	F0世代の結果	17
4.3.1	F0世代試験期間中の死亡及び行動・外観の異常	17
4.3.2	F0世代の総産卵数・受精卵数・受精率	18
4.3.3	F0世代の全長・湿重量	20
4.3.4	F0世代の肝臓中ビテロゲン濃度	21
4.3.5	F0世代の二次性徴指標	21
4.3.6	F0世代の表現型性別と生殖腺形態	22
4.3.7	F0世代の肝臓体指数および生殖腺体指数	22
4.4	F1世代胚～稚魚期の結果	24
4.4.1	F1世代胚・仔魚期のふ化率・ふ化日数・生存率	24
4.5	F1世代亜成体の結果	25
4.5.1	F1世代亜成体の生存率	25
4.5.2	F1世代亜成体の全長・湿重量	25
4.5.3	F1世代亜成体の肝臓中ビテロゲン濃度	26
4.5.4	F1世代亜成体の二次性徴指標	27
4.5.5	F1世代亜成体の表現型性別と生殖腺形態	27
4.5.6	F1世代亜成体の肝臓体指数・生殖腺体指数	28
4.6	F1世代成熟個体の結果	31
4.6.1	F1世代ペアリング後の死亡及び行動・外観の異常	31
4.6.2	F1世代の総産卵数・受精卵数・受精率	31
4.6.3	F1世代成熟個体の全長・湿重量	36

4.6.4	F1 世代成熟個体の肝臓中ビテロゲニン濃度	36
4.6.5	F1 世代成熟個体の二次性徴指標	37
4.6.6	F1 世代成熟個体の肝臓体指数	39
4.6.7	F1 世代成熟個体オスの生殖腺の病理組織学的解析結果	39
4.7	F2 世代の結果	40
4.8	結果の概要	41
4.9	考察	44
5.	MEOGRT の円滑な実施に向けた指導、支援等	49
6.	化学物質の内分泌かく乱作用に関連する委員会への報告	49
7.	MEOGRT 実施に係る留意事項等の抽出	50
8.	参考文献	52

1. 背景と目的

EXTEND2022 の前身である EXTEND2016 における内分泌かく乱作用の有害性評価の枠組み（生殖に及ぼす影響）では、メダカを用いる多世代試験法の開発を進めてきた。メダカ多世代試験は、化学物質の母体から卵への移行による次世代、あるいは次世代から次々世代への影響（有害性）の評価を目的として、メダカを複数世代にわたって化学物質にばく露、各世代においてビテロゲニン、生殖腺組織、二次性徴、間性又は性転換、繁殖（産卵数・受精率など）及び成長などのエンドポイントを測定し、化学物質のメダカに対するエストロゲン様作用、抗エストロゲン様作用、アンドロゲン様作用、抗アンドロゲン様作用、アロマターゼ阻害作用及び視床下部・下垂体・生殖腺軸への影響などの評価を行う。これは、OECD の内分泌かく乱に関する試験法・評価体系を取りまとめたガイダンス文書 No.150¹⁾で Level 5 に位置付けられる試験法である。

メダカを用いる Level 5 の試験法については、2009 年に日米共同で OECD に提出した Medaka Life Cycle (MLC) / Multi-generation Test (MMT) のテストガイドライン化に向けた取り組みが開始され、2010 年には試験プロトコールが提案された。その後、動物愛護や統計学的検出力を考慮した試験生物数・繰り返し数や各世代のばく露期間等について、テストガイドライン化に向けた再検討及び改訂プロトコール案の策定が行われ、これをもとに試験法に係る技術的課題の再検討を行い、エストロゲン作用の陽性対照物質であるエストロンを被験物質として 2012 年度に実施され、試験法としての妥当性や技術的課題などについて検討を行った²⁾。その結果を踏まえて、MMT として 27 週で検討されていた試験期間を 19 週に短縮するメダカ拡張 1 世代繁殖試験（MEOGRT : Medaka Extended One Generation Reproduction Test）がドラフトテストガイドライン案として OECD の専門家グループに提出され、2015 年の OECD-WWT 会議において OECD TG240 として承認、同 7 月に公表されている³⁾。

環境省では、2022 年 10 月にこれまでの「化学物質の内分泌かく乱作用に関する今後の対応—EXTEND2016—」を受け継ぐ「化学物質の内分泌かく乱作用に関する今後の対応—EXTEND2022—」を取りまとめた⁴⁾。この中では、令和 12 年度（2030 年度）を見据え、EXTEND2016 に引き続き、(1)作用・影響の評価及び試験法の開発、(2)環境中濃度の実態把握及びばく露の評価、(3)リスク評価及びリスク管理、(4)化学物質の内分泌かく乱作用に関する知見収集ならびに(5)国際協力及び情報発信の推進、で構成されている。また、内分泌かく乱作用に関する作用・影響評価の実施のため、「内分泌かく乱物質の試験・評価のための OECD Conceptual Framework」及び米国の内分泌かく乱物質スクリーニングプログラム（EDSP）の双方を参考としながら、試験管内試験と比較的簡易かつ短期間で実施可能な生物試験で構成される第一段階試験に加え、内分泌かく乱作用による有害性を確認するため、長期間のばく露による生物試験による第二段階試験を実施する 2 段階の試験・評価の枠組みが構築されている。

上記の通り、2015 年に OECD テストガイドラインとして認定されたメダカ拡張一世代繁殖試験（Medaka Extended One Generation Reproduction Test、以下「MEOGRT」という。）は内分泌かく乱化学物質の確定試験として重要であり、EXTEND2022 の中でも、引き続き第二段階試験として位置づけられている⁴⁾。

本業務は、環境省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及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（17β-エストラジオール）について、第二段階生物試験である MEOGRT を実施するものである。

2. 令和4年度の実施内容

2015年にOECDで承認されたTG240³⁾に基づいて、令和3年度から実施しているメダカ拡張1世代繁殖試験(MEOGRT: Medaka Extended One Generation Reproduction Test)を継続・完了し、試験条件の確認等を行うとともに、F0世代の産卵数、F1世代の成長、二次性徴、肝臓中ビテロゲン濃度及び繁殖に係わるパラメータ(産卵数、受精卵数及び受精率)、生殖腺の観察、F2世代胚の死亡、孵化率等の各エンドポイントに関するデータを取得する。被験物質としては、天然の女性ホルモンであり、環境中検出濃度と影響が検出されと考えられる濃度の比が比較的小さい17β-エストラジオールを用いる。本報告書は、内分泌かく乱物質に対する魚類を用いた第二段階試験(有害性の確認)として、メダカ拡張一世代繁殖試験(OECDテストガイドラインNo. 240)を用いて、対象となる17β-エストラジオールについての結果を報告するものである。

3. 材料及び方法

3.1 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⁵⁾。試験に用いる試薬は、富士フイルム和光純薬株式会社(型番: 058-04043、純度: >97.0%)より入手した。

(1) CAS登録番号

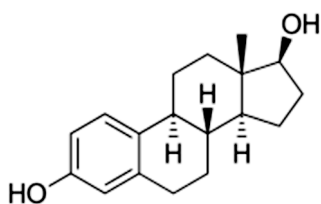
CAS: 50-28-2

(2) 一般名

和名: 17β-エストラジオール

英名: 17β-Estradiol (E2)

(3) 構造式



(4) 分子式及び分子量

分子式: C₁₈H₂₄O₂

分子量: 272.4

(5) 化学名

和名: (8R,9S,13S,14S,17S)-13-メチル-6,7,8,9,11,12,14,15,16,17-デカヒドロジクロペンタ[a]フェナントレン-3,17-ジオール (IUPAC 命名法)

英名: (8R,9S,13S,14S,17S)-13-methyl-6,7,8,9,11,12,14,15,16,17-decahydrocyclopenta[a]phenanthrene-3,17-diol (IUPAC 命名法)

(6) 水溶解度⁵⁾

21.3 mg/L (25°C)

(7) 融点・沸点⁵⁾

融点：178-179°C

沸点：355.44°C

(8) オクタノール／水分配係数⁵⁾

$\log P_{ow} = 4.01$

3.2 試験生物

(1) 供試生物

生物種はミナミメダカ (*Oryzias latipes*) (以下、「メダカ」という。) とした。試験に用いたメダカは、財団法人化学物質評価研究機構より供与され、10 年以上、当施設飼育馴化室において 30 代以上累代飼育している系統 (NIES-R 系統) を使用した。

(2) 飼育環境及び条件

飼育水には、当施設の淡水処理装置で製造された「調温清浄ろ過水 (付属資料)」を使用した。メダカの飼育は全て飼育馴化室において、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：調温清浄ろ過水
- ・飼育方法：流水式
- ・水温・pH：25 ± 2°C、pH 7.5 ± 0.5
- ・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 (Aquafauna Bio-Marine 社製) のふ化後 24 時間以内の幼生を、1 日 2 回飽食量を給餌

3.3 試験環境及び条件など

(1) 試験室

試験は全て、国立環境研究所 環境リスク研究棟 魚類・両棲類試験室で行った。

(2) 試験装置

流水式魚類試験装置 (SIS-24F、柴田科学株式会社製) を使用した。



図 1 流水式装置（左：1号機、中央：2号機、右：2号機・ふ化器をセット）

(3) 試験条件

ばく露は、前述の OECD TG240 に準じて、以下の条件で実施した。

- ・飼育水槽 : オールガラス水槽
- ・希釈水 : 調温清浄ろ過水
- ・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 世代のふ化までの計 19 週
 - ・ F0 世代 : 4 週間
 - ・ F1 世代 : 15 週間
 - ・ F2 世代 : 対照区のふ化日の中央値の 2 倍（約 2 週間）
- ・試験液量 :
 - ・ F0 世代 : 2 L/連
 - ・ F1 世代（受精後 1～6 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） : 2 L/連
- ・試験区数 : 被験物質ばく露区 5 濃度（1.0、3.2、10、32、100 ng/L）、対照区
- ・連数 :
 - ・ F0 世代 : 12 連（対照区）、6 連（ばく露区）
 - ・ F1 世代（受精後 1～10 週目） : 12 連（対照区）、6 連（ばく露区）
 - ・ F1 世代（受精後 10～15 週目） : 24 連（対照区）、12 連（ばく露区）
 - ・ F2 世代（受精後 1～2 週目） : 12 連（対照区）、6 連（ばく露区）
- ・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 1～2 週目） : 20 個体/連

- ・ 供 試 生 物 齢 :
 - ・ F0 世代 : 12-16 週齢（本試験では 14 週齢（受精後 97 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 : 17 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 日目および 121 日目）
- ・ 水 温 : 24～26 ± 2℃
- ・ p H : pH 6.5～8.5（変動± 0.5）
- ・ 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（Aquafauna Bio-Marine 社製）のふ化後
24 時間以内の幼生を、OECD TG240 Annex 1 と NIES 系統の飽
食量を考慮して、成長段階に応じ表 1 に示す量を 1 日 2 回給餌
した。

表 1 ブラインシュリンプ (*Artemia* spp. nauplii) の給餌量 (mg dry weight/fish/day)

ふ化後週齢 (wph)	ふ化後日齢 (dph)	本試験	OECD TG240 ANNEX 5
Week1	Day 1		0.5
	Day 2		0.5
	Day 3	1.0	0.6
	Day 4	1.0	0.7
	Day 5	1.0	0.8
	Day 6	1.0	1.0
	Day 7	1.0	1.3
Week2	Day 8	2.0	1.7
	Day 9	2.0	2.2
	Day 10	3.0	2.8
	Day 11	3.0	3.5
	Day 12	4.0	4.2
	Day 13	4.0	4.5
	Day 14	5.0	4.8
Week3	Day 15	5.0	5.2
	Day 16-21	6.0	5.6
Week 4	Day 22-28	8.0	7.7
Week 5	Day 29-35	16.0	9.0
Week 6	Day 36-42	24.0	11.0
Week 7	Day 43-49	40.0	13.5
Week 8	Day 50-56	48.0	22.5
Week 9	Day 57-63	(20 fish/tank) 53.3	22.5
		(2 fish/tank) 56.0	22.5
Week 10	Day 64-70	60.0	22.5
Week 11~	Day 71~	60.0	22.5

(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：CT-430WP、株式会社カスタム製
- ・pH計：D-55、株式会社堀場製作所製
- ・溶存酸素計：HQ30d、HACH 社製

(5) 試験溶液の調製

E2 について、まずアセトン約 9 mL に E2 10 mg を溶解後、アセトンを用いて 10 mL にメスアップし、1000 mg/L のストックソリューション A を得た。これを 100 倍希釈し、10 mg/L のストックソリューション B を得た。これを容量 5 L のねじ口瓶に 40、128、400、1280 および 4000 μ L 添加し、乾固させた後に超純水 4 L を入れて 1 時間超音波処理をした。その後、スターラーで 24 時間攪拌させて 0.10、0.32、1.0、3.2 および 10 μ g/L のストックソリューション C を得た。ストックソリューション C を流水式ばく露装置にセットし、飼育水を用いて連続的に 100 倍希釈を行い、混合直後の試験溶液を各水槽へ滴下した。ストックソリューション A、B は、試験の工程において同一のものを用了。

(6) 被験物質の濃度測定

生物試験に使用した試験水を固相抽出法によって精製、濃縮し、LC/MS/MS を用いて定量した。

【試薬】

17 β -エストラジオール：富士フイルム和光純薬株式会社製

17 β -エストラジオール-d₃：富士フイルム和光純薬株式会社製

メタノール：残留農薬・PCB 試験用 和光純薬工業株式会社製

固相抽出カートリッジ：OASIS HLB Plus LP Extraction Cartridge Waters 社製

精製水：栗田工業株式会社 PURECONTI SYSTEM と MERCK 社 Direct Q 3UV を組み合わせた系により処理したもの。

【標準液の調製】

17 β -エストラジオール標準品 10 mg を精秤し、メタノールに溶解、定容して 1000 mg/L 標準液を作成した。また、17 β -エストラジオール-d₃ 5.0 mg を精秤し、メタノールに溶解し、定容して 500 mg/L の内部標準溶液を作成した。この標準液と内部標準液を希釈、混合し、17 β -エストラジオールを 0.10、0.20、0.50、1.0、2.0、5.0 μ g/L、17 β -エストラジオール-d₃ を 5.0 μ g/L 含む標準液を作成して検量線に使用した。

【測定試料の調製】

固相抽出カートリッジをメタノール 10 mL、精製水 10 mL でコンディショニングし、内部標準液を添加した試料溶液を 20 mL/min の流速で通水させた。通水後の固相抽出カートリッジは精製水 10 mL を通して洗浄し、約 1 時間通気して乾燥させた。さらにカートリッジにヘキサン 3 mL を通して洗浄し、数分間通気して乾燥させた後、メタノール 5 mL で溶出した。

溶出液に窒素ガスを吹き付けて乾固直前まで濃縮し、抽出物をメタノール 1 mL に溶解して測定に供した。

【分析機器】

・ LCMS-8060NX 島津製作所製

【測定条件】

・ LC

カラム：Shim-pack VP-ODS 4.6 μ m 2.0×150 mm column 島津製作所製

移動相：A；水／B；メタノール（1/4,v/v）

流量：0.4 mL/min

カラム温度：50℃

注入量：50 μ L

・ MS/MS

検出方法：MRM

イオン化法：ESI(-)

インターフェース温度：350℃
 ヒーティングガス流量：20 L/min
 ヒートブロック温度：500℃
 ドライングガス流量：10 L/min

17β-エストラジオール

Precursor ion：m/z 271.15

Product ion：m/z 183.05

17β-エストラジオール-d₃

Precursor ion：m/z 274.3

Product ion：m/z 185.20

3.4 ばく露及び観察・測定の方法

MEOGRT（OECD TG240）のタイムラインを図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3に示す。

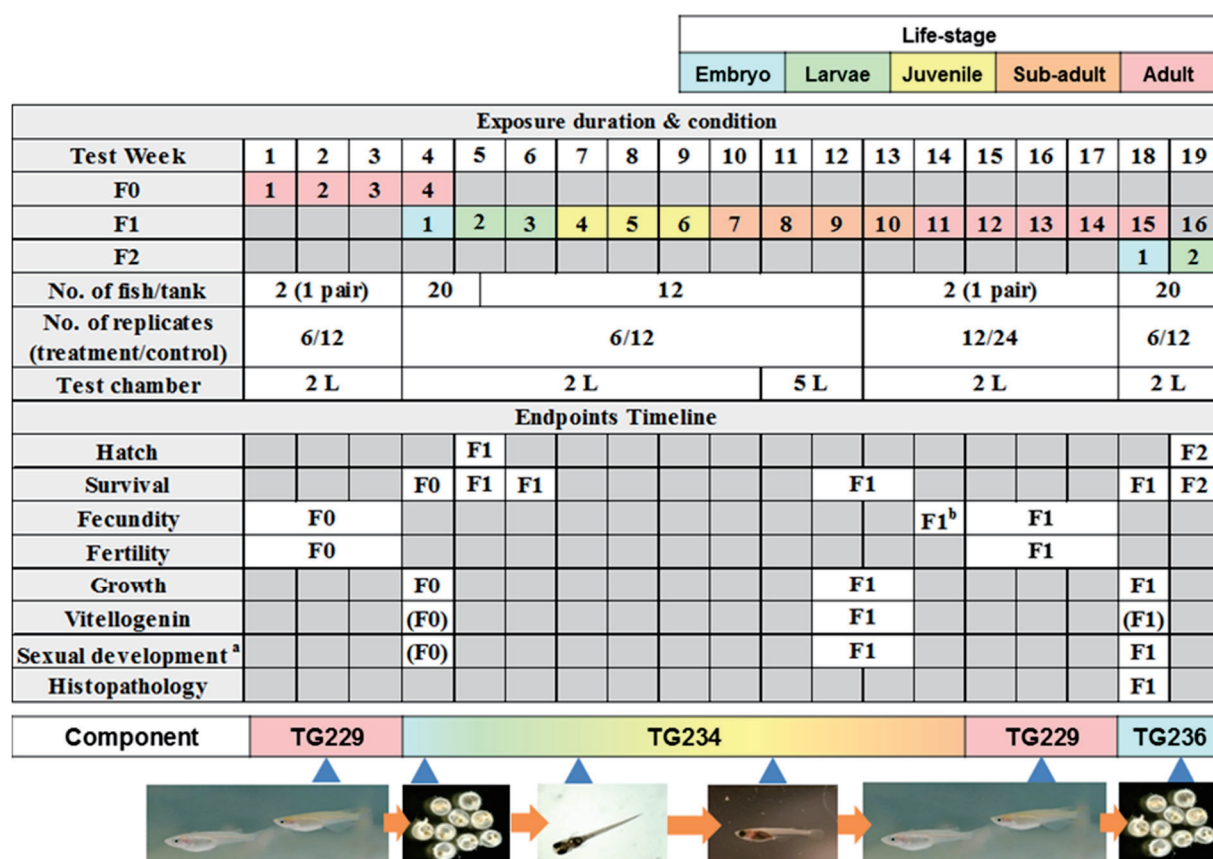


図2 OECD TG240 メダカ拡張1世代繁殖試験（MEOGRT）のタイムライン

注）括弧内はガイドラインにおいて必須ではないが、本試験で測定を行ったもの。

^aオスの二次性徴（臀鰭乳頭状突起）、^b産卵開始

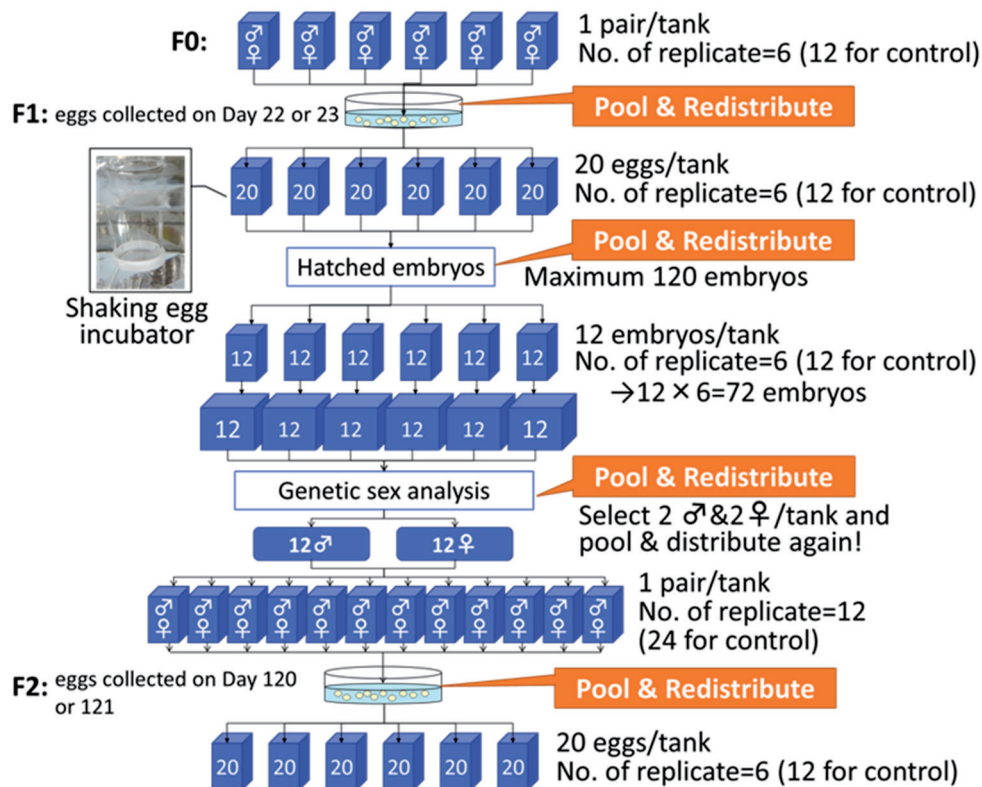


図3 MEOGRTにおける連のプールと分配手順

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13週齢のメダカを雌雄選別し、1水槽あたりにメス1個体・オス1個体を投入して7日間の馴化を行った(48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、7日間の平均産卵数が多い42ペアを選び、各試験区の平均値と標準偏差が同程度になるよう各試験区への分配を決定した。

馴化終了後、被験物質の濃度が適正值であることを確認してから、供試メダカを各水槽(12水槽+6水槽×5濃度区=計42水槽)に投入して試験を開始した。週に1回程度、水温・pH、溶存酸素飽和量を試験区毎に測定した。

ばく露水槽への藻類付着を防ぐため、週に1回程度水槽交換を行った。交換後の水槽は実験器具用自動洗浄機(G7887、Miele社製)を用いて洗浄し、乾燥の上再使用した。尚、ばく露・洗浄に用いた排水は、環境リスク研究棟内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、死亡個体の有無及び行動・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、水槽に設置したふ化器に投入した。（※1 日で必要数（20×連数）の受精卵が得られない場合は、2 日間に渡って採取する。それでも足りない場合は、各 20 粒から 15 粒に減らし、最終的には 15 粒で確保できるだけの連数とする。本試験では Day 22 に必要な受精卵数を確保できた。）

[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、117 日齢）、生存した全個体を氷冷麻醉処理した上で解剖し、下記項目について測定した。

1) 全長・体長及び湿重量の測定

全長・体長はノギス（CD-S10C、株式会社ミットヨ製）を用いて、湿重量は電子天秤（AG204、Mettler Toledo 社製）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突起を実体顕微鏡（MZ16、Leica 社製）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) 肝臓の測定及び肝臓中ビテロゲニン濃度の測定

解剖により肝臓を摘出し電子天秤（AG204、Mettler Toledo 社製）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、肝臓中のビテロゲ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、EnBioMedaka Vitellogenin ELISA system（株式会社エンバイオテック・ラボラトリーズ製）を用い、付属のマニュアルに従い実施した。具体的な手順は以下の通り。

- 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 200 μ L を加えた。
- ② 肝臓をホモジナイズし、遠心分離（4°C、9000 g、10 分間）した。
- ③ 分離した上清を 500 μ L マイクロチューブに回収し、直ちに氷冷した。続けてビテロゲ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）法によるビテロゲニン測定に供した。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ゲニンの分析にはエンバイオ社製のメダカビテロゲニン測定用 ELISA キットを使用した。操作は以下の通り。

- ① wash buffer で洗浄した抗体固着化マイクロプレートの各 well に測定サンプルを 50 μ L 添加し、室温で 1 時間インキュベートした。

- ② 溶液を捨て、well 内を wash buffer で 3 回洗浄し、HRP-抗メダカビテロゲニン抗体溶液を、各 well に 50 μ L ずつ添加し、室温で 1 時間インキュベートした。
- ③ 溶液を捨てて洗浄した後、発色液を各 well に 50 μ L ずつ添加し、室温で正確に 20 分間反応させ、反応停止液を 50 μ L ずつ添加して反応を停止させた。
- ④ マイクロプレートリーダー（BioTek 社製 SYNERGY H1）を用い、450 nm の吸光度を測定した。各サンプルについて 2 well を使用し、デュプリケーションで測定を行った。検量線にはキットに付属のメダカビテロゲニン標準液を使用した。標準液（100 ng/mL）を希釈し、5、10、20、50 ng/mL 溶液を調整し、上記と同様の手順によって測定した。測定サンプルの吸光度より、検量線を使用して測定試料中のビテロゲニン濃度を算出し、これに希釈率を乗じることでホモジナイズ上清中のビテロゲニン濃度を求めた。さらに、この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ゲニン含量（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。その後、ブアン固定液中に浸漬して固定して保存した。

(2) F1 世代

[ばく露方法]

F0 世代より採取した受精卵は、水槽内に設置したふ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。ふ化用シリンダーは、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、卵上下機構（柴田科学株式会社製）によってゆっくりと振とうさせた。ふ化後の仔魚は、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、排水処理などは、F0 世代と同一である。

[ばく露期間中の観察]

ばく露期間中はふ化や死亡個体の有無及び行動・外見の異常を TG240 では目視で観察するところがあるが、目視による観察が困難であるため、受精 3 日後以降、毎日ふ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。ふ化率は対照区のふ化日の中央値（本試験では受精後 7 日目）の 2 倍の時点で算出し、それ以降は未ふ化で死亡とみなした。

各試験区において最も多くのふ化がみられた受精後 7 日目に、各連のふ化仔魚を再度プールし、対照区は 12 連、1.0~100 ng/L 濃度区は 6 連に、12 個体ずつ再分配した。

受精後 21 日目に（Test Day 43）に仔魚の生死を確認した。その後も死亡個体は、発見後速やかに取り除き外見上の雌雄（もしくは未成熟）を確認した。行動・外見の異常は、F0 世代と同様の基準で対照区と比較した。

[受精後 9 週目の遺伝的性判別およびペアリング]

受精後 9~10 週目（Test Day 78~85）に、生存した全個体についてメダカの性決定遺伝子である *DMY* の保有有無を解析する事で、各個体の遺伝的な性別を判別した。方法は、以下の通りである。

- ① Test Day 78 に各個体の尾部の一部を営利な剃刀で切断した。これを試料として DNA 抽出液 (800 mM グアニジン HCL、30 mM Tris-HCl pH 8.0、30 mM EDTA pH 8.0、5% Tween-20、0.5% Triton X-100) を用い、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、94℃・5 分の条件で 1 サイクル、その後、94℃・20 秒、55℃・30 秒、72℃・60 秒の条件を 30 サイクル繰り返し行って行った。
- ③ この後、増幅産物を 1.5%TAE-アガロースゲルで電気泳動し、GelGreen (富士フイルム和光純薬工業社製) 染色によりバンド (メスは 1 本、オスは 2 本現れる) を確認して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無作為に各連から 2 個体ずつ選別し、対照区は 24 ペア、ばく露区は 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]

繁殖用に用いない 10 週齢の亜成体 (Sub-adult) については、Test Day 87 および Test Day 88 (受精後 65 日齢または 66 日齢) に氷冷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・体長及び湿重量の測定
- 2) 二次性徴指標の計測
- 3) 肝臓の測定及び肝臓中ビテロゲニン濃度の測定
- 4) 生殖腺の観察・測定

[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観察・計測終了後に F2 試験に供した。必要な受精卵数 (20 個×6 連 = 120 個) が得られなかった場合、第 2 日 (Test Day 121) においてもすべての試験区で F2 用の採卵を行うが (※)、32 および 100 ng/L 濃度区は両日とも受精卵が得られなかったため、F2 の継代を行わなかった。対照区および 1~10 ng/L 濃度区については、Test Day 120 に採取した卵を試験区毎にプールし、各連 (対照区は 12 連、ばく露区は 6 連) に 20 個ずつ、水槽に設置したふ化器に投入した。

※各日から採取する卵をそれぞれプールし、10 個ずつ各連に分配する。それでも足りない場合は、各 20 粒から 15 粒に減らし、最終的には 15 粒で確保できるだけ連数とする。

[ばく露終了後の測定]

15 週間のばく露期間終了後 (本試験では Test Day 121、99 日齢)、生存した全個体を氷冷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・体長及び湿重量の測定
- 2) 二次性徴指標の計測

3) 肝臓の測定及び肝臓中ビテロゲン濃度の測定

4) 生殖腺の観察・測定

5) 生殖腺の病理組織学的観察

4) のブアン固定液から生殖腺を取り出してエタノールですすぎ、10%中性ホルマリンに移し、一部の個体は病理学的組織切片解析に供した。

(3) F2 世代

[ばく露方法]

F1 世代より採取した受精卵は、水槽内に設置したふ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。ふ化用シリンダーは、F1 世代に用いたものと同一である。

水質の測定、水槽の交換と洗浄、排水処理などは、F0 世代・F1 世代と同一である。

[ばく露期間中の観察]

ばく露期間中はふ化や死亡個体の有無及び行動・外見の異常を TG240 では目視で観察するところがあるが、目視による確認が困難であるため、受精 3 日後以降、毎日ふ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。ふ化率は対照区のふ化日の中央値（本試験では受精後 7 日目）の 2 倍の時点（本試験では 14 日目）で算出し、それ以降は未ふ化で死亡とみなした。

3.5 結果の産出

(1) 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 に従う。有効数字は測定精度を考慮して、ふ化率・ふ化後生存率・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（ただし二次性徴は 1 の位までとする）とし、標準偏差の桁数は平均値の値に合わせた。

(2) 統計処理

各データは、繁殖データや胚仔魚期のデータを除き、遺伝的性別ごとに平均値±標準偏差で示す。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⁶⁾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 2 に示す変数変換と統計手法を適用することとした。解析には USEPA が MEOGRT および幼生期両生類成長発達試験（LAGDA）用に開発した統計解析ソフトウェア StatCharrms v.90.95（2020 年 4 月 30 日版、R cran サイトより入手）および R-4.0.4（win 64 bit）を用いた⁷⁾。繰り返しのない生存率ふ化日数以外のエンドポイントは、「Other endpoints」解析において Test type で「Auto」を選択すると、まず単調性の検定（Linear quadratic contrast: 線形二次項対比（仮訳））を行い、単調性がある場合（二次項のみ有意のケース以外）は、Jonkheere-Terpstra（JT）検定、単調性がない場合（二次項のみ有意）は、正規性検定（Shapiro Wilks 検定）および等分散性検定（Levene 検定）を行った後、等分散の場合は Dunnett 検定、非等分散の場合は Dunn 検定を適用した。連内に繰り返しデータがある亜成体の場合は、単調性がない場合、正規性（Shapiro Wilks 検定）および等分散性（Levene 検定）を満たす場合は、Mixed Effect ANOVA（混合モデルの分散分析）に基づき、Dunnett 検定を行った。

総産卵数と受精卵数の場合は、「Other endpoints」解析において、上記の手法に加えて、ばく露時間による影響（Time effect）をみるため、週間毎データとして反復測定分散分析（Repeated measures ANOVA：時間と濃度の2要因）およびDunnett検定も実施した。

ふ化日数は「Time to Event」を選択し、各観察日の各個体のイベント（ふ化を1、未ふ化または死亡を0とする）を入力し、Mixed Effects Cox ModelsのDunnett検定により解析した。

フローチャートに記載はないが、F0やF1の繁殖期における繰り返しのない生存率は、Step-down Cochran-Armitage検定を適用した。

表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 →(正規性&等分散性あり) Dunnett 検定 →(正規性&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 →(正規性&等分散性あり) Dunnett 検定 →(正規性&等分散性なし) Dunn 検定
生存率（繰り返しなし）	アークサイン変換	Step-down Cochran-Armitage 検定
ふ化率・ふ化後生存率・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)
ふ化日数（F1）	なし	亜成体の場合：Mixed effect ANOVA→Dunnett 検定 成熟個体の場合：一元配置分散分析・正規性・等分散性の検定 →(正規性&等分散性あり) Dunnett 検定 →(正規性&等分散性なし) Dunn 検定
全長・湿重量	なし	
肝臓体指数・生殖腺体指数	なし	
ビテロゲニン	対数変換	
二次性徴	平方根変換	
ふ化日数（F2）	なし	Mixed Effects Cox Models

3.6 試験有効性基準

以下の条件が満たされたとき、この試験は有効とする。

- 溶存酸素が試験期間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一時的な (Brief) 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%) において各ペアの日平均総産卵数が 20 以上であること。
- 各世代 (F1 および F2) の対照区におけるふ化率が 80%以上であること。
- F1 の対照区において、受精後 3 週目までのふ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 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。

4. 結果

4.1 試験環境

表 3 に水温、pH、溶存酸素の全期間中を通じた平均値と標準偏差をまとめた。各試験区の平均水温は、24.8～25.0℃の範囲であり、24～26℃までという有効性基準を満たしていた。また各水槽の最小値～最大値は 24.2～25.6℃で、平均値からの一時的なずれは 2℃未満であった。

平均 pH は 7.81～7.91 の範囲であり、6.5～8.5 までという有効性基準を満たしていた。平均溶存酸素は 8.44～8.50 mg/L の範囲であり、各水槽の最小値～最大値は 7.69～8.97 mg/L で、全ての濃度区で飽和酸素濃度の 90%を超えており、60%以上という有効性基準を満たしていた。

表 3 試験期間中の平均水温、pH、溶存酸素

設定濃度 (ng/L)	水温 (°C)	pH	溶存酸素 (mg/L)	溶存酸素 (飽和度%)
Control	24.8 ± 0.2	7.81 ± 0.12	8.50 ± 0.23	103.7 ± 2.9
1.0	24.8 ± 0.2	7.85 ± 0.10	8.47 ± 0.22	103.3 ± 2.7
3.2	24.9 ± 0.2	7.87 ± 0.09	8.44 ± 0.22	103.1 ± 2.6
10	25.0 ± 0.2	7.88 ± 0.07	8.44 ± 0.22	103.2 ± 2.8
32	24.9 ± 0.2	7.89 ± 0.07	8.46 ± 0.20	103.1 ± 2.8
100	24.9 ± 0.2	7.91 ± 0.08	8.44 ± 0.23	102.9 ± 2.9

4.2 試験液の被験物質濃度

E2 の定量下限値は 0.091 ng/L、検出下限値は 0.030 ng/L であった。期間中の各濃度につき計 21 回（F1 世代の産卵数が不十分で F2 世代の試験を実施できなかった設定、32 および 100 ng/L は 18 回）の測定結果を表 4 に、また期間中の濃度の変動を表したグラフを図 4 にまとめる。特筆すべきは、Control において F1 の成体時期の 4 週間にわたって天然の女性ホルモンである E2 が定量限界以上で検出され、その間の平均測定濃度は 1.31 ± 0.12 ng/L であった。また、同様に、設定濃度 1.0 ng/L 区および 3.2 ng/L 区でも、同時期に設定濃度よりもそれぞれ 1 ng/L 程度高い濃度で検出され、平均濃度は設定濃度の 107%および 101%であった。そのため、変動係数も比較的高く、それぞれ 46%、25%であった。一方、設定濃度 10 ng/L 区以上では、この濃度の増加は顕著ではなかった。平均測定濃度は設定濃度 10 ng/L 区以上の濃度で設定濃度比が 80～84%、変動係数は 7.7～8.9%であった。設定濃度 10 ng/L 以上の濃度区では、平均値の±20%に収まっており、比較的濃度が維持されていたと考えられる。

表 4 試験液中の被験物質濃度

設定濃度 (ng/L)	N	実測濃度 (ng/L)		設定濃度比 (%)	変動係数 (%)
		平均	標準偏差		
Control ^{a)}	21(4) ^{b)}	(1.31 ± 0.12) ^{b)}		-	9.3
1.0	21	1.07 ± 0.49		107	46
3.2	21	3.22 ± 0.82		101	25
10	21	8.21 ± 0.73		82	8.9
32	18	25.7 ± 2.0		80	7.7
100	18	84.4 ± 7.3		84	8.6

^{a)}: 21 回中 17 回は検出限界未満; ^{b)}: 平均値と標準偏差は検出された 4 回のみから算出し、検出限界未満の値は除外

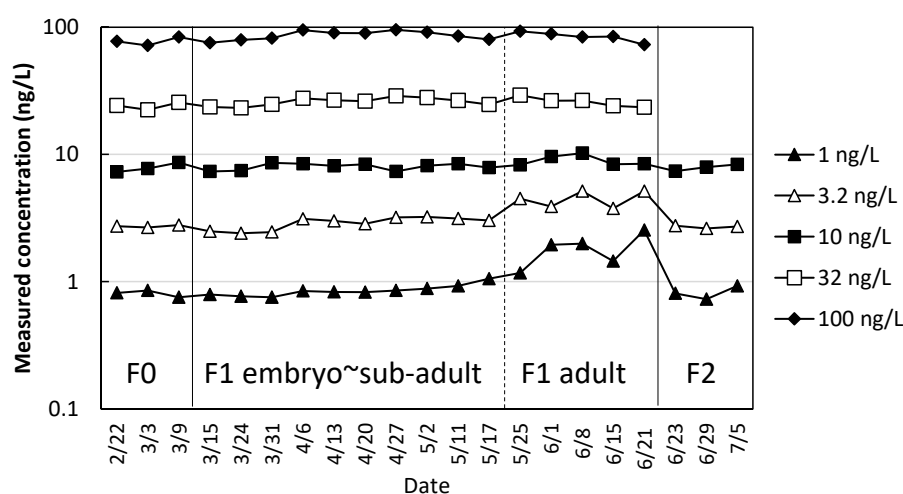


図 4 試験液中の被験物質濃度の各週での変化

4.3 F0 世代の結果

4.3.1 F0 世代試験期間中の死亡及び行動・外観の異常

F0 世代試験期間中の死亡個体数を表 5 に示す。Control においてオスが Day 7 に 1 個体死亡したが、外見に異常は無く偶発的な死亡と考えられる。また、1.07 ng/L 区において、Day 18 に体色が白くなったメスが 1 個体あった。なお、当該メス個体はその後は産卵せず、解剖直前に死亡した。

表 5 F0 世代試験期間中の死亡個体数

実測濃度 (ng/L)	オス			メス			合計
	供試数	死亡数	死亡率	供試数	死亡数	死亡率	死亡率
Control	12	1	8%	12	0	0%	4%
1.07	6	0	0%	6	1	17%	8%
3.22	6	0	0%	6	0	0%	0%
8.21	6	0	0%	6	0	0%	0%
25.7	6	0	0%	6	0	0%	0%
84.4	6	0	0%	6	0	0%	0%

4.3.2 F0 世代の総産卵数・受精卵数・受精率

F0 世代試験開始後 21 日間 (Test Day1-21) 平均の総産卵数・受精卵数・受精率を図 5 に、21 日間平均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 6 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 6 に示す。

まず対照区の 21 日平均総産卵数の平均値は 35 個/ペア/日、各 12 ペアの 21 日平均総産卵数は 25~39 個/ペア/日で、21 日間で算出された計 7757 個の卵の受精率は 98%であり、試験有効条件をすべて満たしていた。

21 日間の総産卵数・受精卵数・受精率のうち、総産卵数および受精卵数について、対照区と比べ有意な減少が検出された濃度区はなかった (表 6、図 5)。25.7 ng/L および 84.4 ng/L 区で受精率に統計的有意差が検出されたが、それぞれ平均値は 97.9%、97.9%と十分高かった。

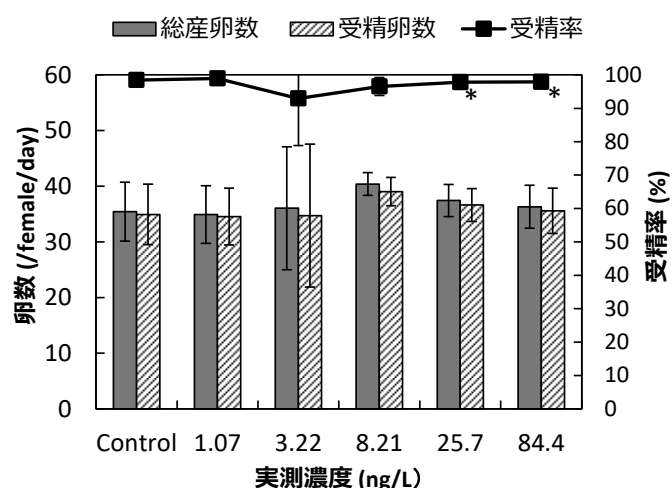
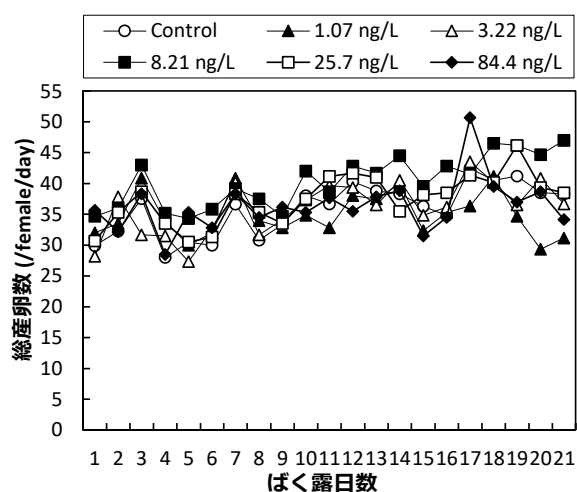


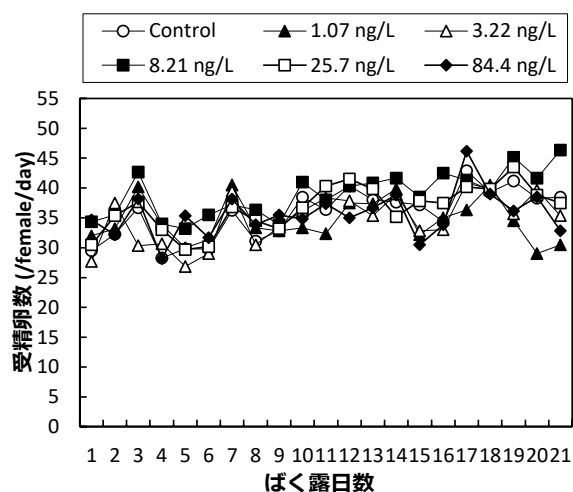
図 5 F0 世代の総産卵数、受精卵数および受精率 (各ペア・1 日あたり)

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=12、ばく露区は n=6) を示す。*は対照区に比べて統計学的な有意差があることを示す ($p<0.05$ 、Jonckheere-Terpstra 検定)。

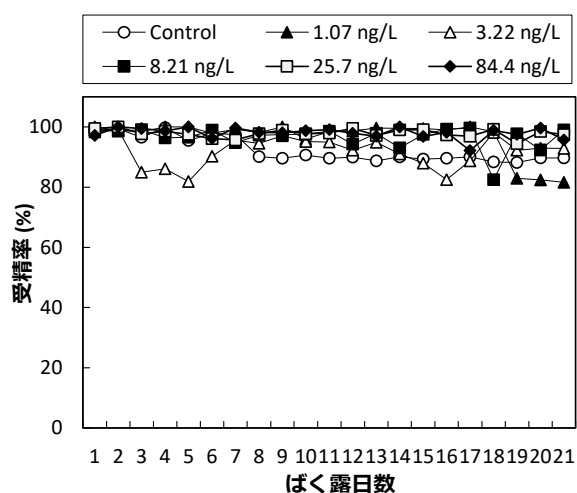
(a) 総産卵数



(b) 受精卵数



(c) 受精率



(d) 累積受精卵数

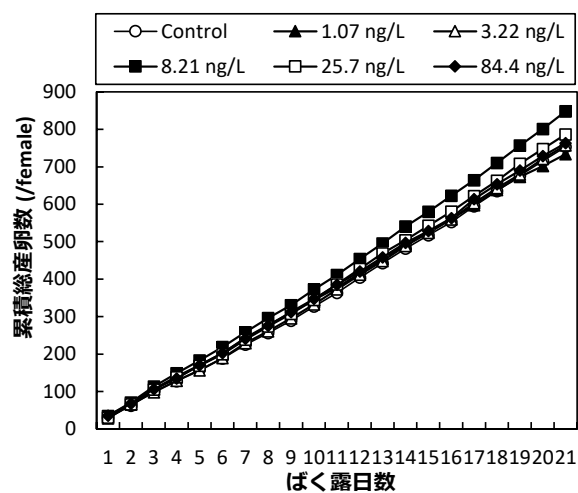


図 6 F0 世代の(a) 総産卵数 (b) 受精卵数 (c) 受精率の日変動および (d) 累積受精卵数
(値は各試験区の連平均値)

週ごとに統計解析を実施した際も、3 週目の受精率を除き、すべてのばく露区で対照区に対する有意差は確認されなかった。3 週目の受精率は 25.7 ng/L 区で 97.4%、84.4 ng/L 区で 96.6%と十分高かった。

表 6 F0 世代の総産卵数・受精卵数・受精率

実測濃度 (ng/L)	N	総産卵数 (eggs/day/female)				
		21 日間	1 週目 (Day 1-7)	2 週目 (Day 8-14)	3 週目 (Day 15-21)	
Control	12	35.4 ± 5.3	32.4 ± 4.2	36.8 ± 5.1	39.2 ± 4.6	
1.07	6	34.9 ± 5.2	34.7 ± 4.0	35.7 ± 5.4	34.3 ± 8.7	
3.22	6	36.1 ± 11.0	32.8 ± 7.7	37.0 ± 12.4	38.4 ± 13.2	
8.21	6	40.4 ± 2.0	36.9 ± 2.4	40.3 ± 2.4	44.0 ± 2.4	
25.7	6	37.4 ± 2.9	34.0 ± 4.4	38.0 ± 3.2	40.3 ± 3.8	
84.4	6	36.3 ± 3.9	34.5 ± 4.0	36.5 ± 4.6	38.0 ± 3.7	
実測濃度 (ng/L)	N	受精卵数 (eggs/day/female)				
		21 日間	1 週目 (Day 1-7)	2 週目 (Day 8-14)	3 週目 (Day 15-21)	
Control	12	34.9 ± 5.4	31.8 ± 4.6	36.4 ± 5.1	38.8 ± 4.7	
1.07	6	34.5 ± 5.1	34.4 ± 3.9	35.2 ± 5.3	34.0 ± 8.7	
3.22	6	34.7 ± 12.8	31.6 ± 9.5	35.8 ± 13.5	36.7 ± 15.6	
8.21	6	39.0 ± 2.5	36.0 ± 2.2	38.9 ± 2.4	42.2 ± 4.1	
25.7	6	36.6 ± 2.9	33.3 ± 4.1	37.3 ± 3.0	39.3 ± 4.2	
84.4	6	35.6 ± 4.1	34.0 ± 4.1	36.0 ± 4.5	36.7 ± 4.1	
実測濃度 (ng/L)	N	受精率 (%)				
		21 日間	1 週目 (Day 1-7)	2 週目 (Day 8-14)	3 週目 (Day 15-21)	
Control	12	98.5 ± 1.0	97.9 ± 3.0	98.8 ± 0.6	98.9 ± 0.6	
1.07	6	98.9 ± 0.4	99.2 ± 0.6	98.6 ± 0.7	99.0 ± 0.6	
3.22	6	93.0 ± 14.1	94.5 ± 11.3	93.9 ± 11.0	89.9 ± 21.5	
8.21	6	96.6 ± 2.7	97.8 ± 1.7	96.6 ± 3.7	95.6 ± 4.8	
25.7	6	97.9 ± 0.8*	97.9 ± 1.5	98.3 ± 0.8	97.4 ± 1.7	**
84.4	6	97.9 ± 1.3*	98.8 ± 1.2	98.5 ± 0.4	96.6 ± 3.9	**

注) 値は平均値±標準偏差 (対照区は n=11、ばく露区は n=6) を示す。なお、2 週目と 3 週目の対照区は n=11。

は対照区に比べて統計学的な有意差があることを示す ($p<0.05$ 、** $p<0.01$ 、Jonckheere-Terpstra 検定)。

4.3.3 F0 世代の全長・湿重量

F0 世代の全長及び湿重量の測定結果を表 7 および図 7 (a)(b) に示す。湿重量はメスの 84.4 ng/L 区において対照区と比べ統計学的に有意な減少が確認された (メスの LOEC=84.4 ng/L) が、それ以外については、対照区との有意差は検出されなかった。

表 7 F0 世代の全長および湿重量

実測濃度 (ng/L)	全長 (mm)		湿重量 (mg)	
	オス	メス	オス	メス
Control	34.7 ± 1.5	34.4 ± 1.5	469 ± 55	587 ± 66
1.07	35.4 ± 1.6	35.1 ± 0.8	478 ± 78	590 ± 46
3.22	35.2 ± 1.3	34.5 ± 0.9	465 ± 54	590 ± 50
8.21	34.1 ± 0.9	35.4 ± 0.9	437 ± 56	622 ± 25
25.7	35.3 ± 1.3	34.8 ± 1.1	498 ± 54	598 ± 51
84.4	35.6 ± 1.5	33.5 ± 0.9	493 ± 59	513 ± 30 *

注) 値は連平均値を元に算出した平均値±標準偏差 (対照区はオス n=11、メス n=12、ばく露区は 1.07 ng/L 区のメスは n=5、それ以外は n=6) を示す。*は対照区に比べて統計学的な有意差があることを示す (* $p<0.05$ 、Jonckheere-Terpstra 検定)。

4.3.4 F0 世代の肝臓中ビテロゲニン濃度

ELISA による F0 世代の肝臓中ビテロゲニン濃度の測定結果を表 8 および図 7 (c)に示す。オス・メスともに 25.7 ng/L 区以上の濃度区で対照区に比べて有意な増加が認められた。(オス・メスともに LOEC=25.7 ng/L)。

表 8 F0 世代の肝臓中ビテロゲニン濃度

実測濃度 (ng/L)	肝臓中ビテロゲニン濃度 (ng/mg liver)	
	オス	メス
Control	8.7 ± 20.9	228 ± 75
1.07	8.0 ± 12.1	237 ± 46
3.22	38.4 ± 88.0	270 ± 110
8.21	61.1 ± 69.9	250 ± 67
25.7	293 ± 248 **	1330 ± 2410 *
84.4	3110 ± 995 **	4580 ± 6780 **

注) 値は連平均値を元に算出した平均値±標準偏差 (対照区はオス n=11、メス n=12、ばく露区は 1.07 ng/L 区のメスは n=5、それ以外は n=6) を示す。*は対照区に比べて統計学的な有意差があることを示す (** $p<0.01$ 、Jonckheere-Terpstra 検定)。

4.3.5 F0 世代の二次性徴指標

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 9 および図 7 (d)に示す。オスでは、いずれのばく露区においても対照区と比べ統計学的な有意差は確認されなかった。また、メスではすべてのばく露区で乳頭状小突起を有する個体は確認されなかった。

表 9 F0 世代における乳頭状小突起を有する節板数（オス 1 個体あたり）

実測濃度 (ng/L)	乳頭状小突起を有する節板数 (Plates/fish)			
	オス		メス	
Control	109	± 14	0	± 0
1.07	117	± 9	0	± 0
3.22	112	± 17	0	± 0
8.21	110	± 9	0	± 0
25.7	104	± 11	0	± 0
84.4	121	± 12	0	± 0

注) 値は連平均値を元に算出した平均値±標準偏差（対照区はオス n=11、メス n=12、ばく露区は 1.07 ng/L 区のメスは n=5、それ以外は n=6）を示す。

4.3.6 F0 世代の表現型性別と生殖腺形態

F0 世代における表現型性別・生殖腺形態は明確かつ一致しており、間性や性転換は認められなかった。

4.3.7 F0 世代の肝臓体指数および生殖腺体指数

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 10 および図 7(e)(f) に示す。肝臓体指数、生殖腺体指数いずれも、オス・メスともにいずれの濃度区でも対照区と統計学的に有意な増減は確認されなかった。

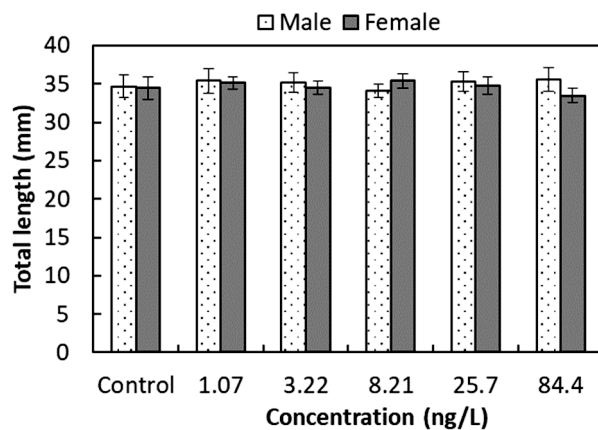
表 10 F0 世代の肝臓体指数および生殖腺体指数

実測濃度 (ng/L)	肝臓体指数 (%)		生殖腺体指数 (%)	
	オス	メス	オス	メス
Control	2.2 ± 0.6	5.2 ± 1.2	1.0 ± 0.3	10.6 ± 1.5
1.07	2.1 ± 0.8	5.5 ± 0.4	1.2 ± 0.3	9.6 ± 1.1
3.22	2.0 ± 0.5	5.3 ± 0.3	1.1 ± 0.2	11.0 ± 2.6
8.21	1.8 ± 0.3	5.3 ± 1.3	1.1 ± 0.3	11.3 ± 1.0
25.7	2.2 ± 1.0	4.7 ± 1.0	1.1 ± 0.2	9.5 ± 0.7
84.4	2.6 ± 0.7	5.8 ± 2.0	0.7 ± 0.2	9.2 ± 1.7

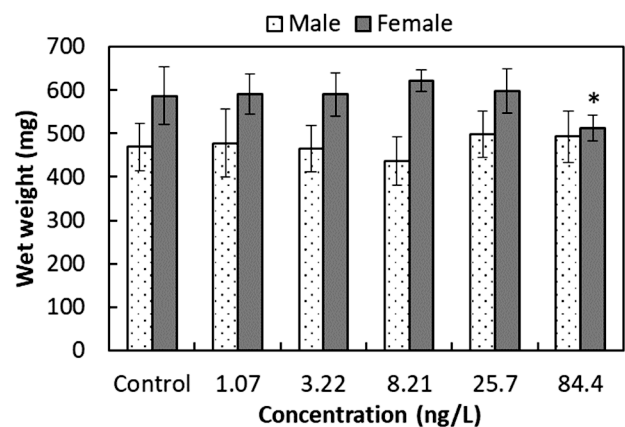
注) 値は連平均値を元に算出した平均値±標準偏差（対照区はオス n=11、メス n=12、ばく露区は 1.07 ng/L 区のメスは n=5、それ以外は n=6）を示す。

*は対照区に比べて統計学的な有意差があることを示す ($p<0.05$ 、Jonckheere-Terpstra 検定)。

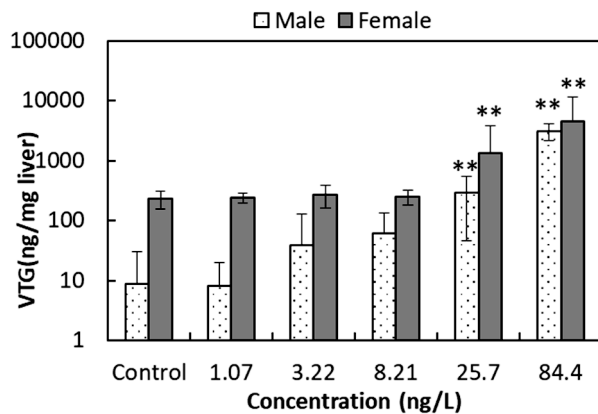
(a) 全長



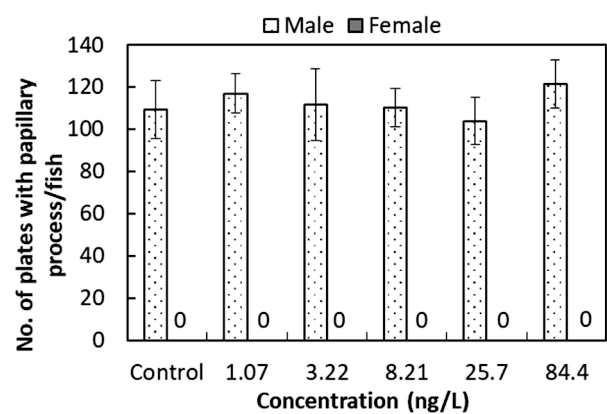
(b) 湿重量



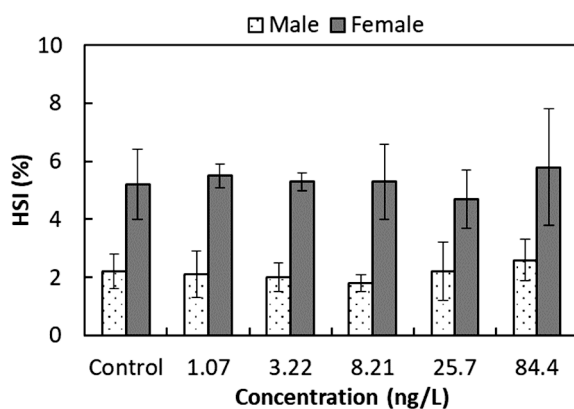
(c) 肝臓中ビテロゲニン



(d) 乳頭状小突起を有する節板数



(e) 肝臓体指数 (HSI)



(f) 生殖腺体指数 (GSI)

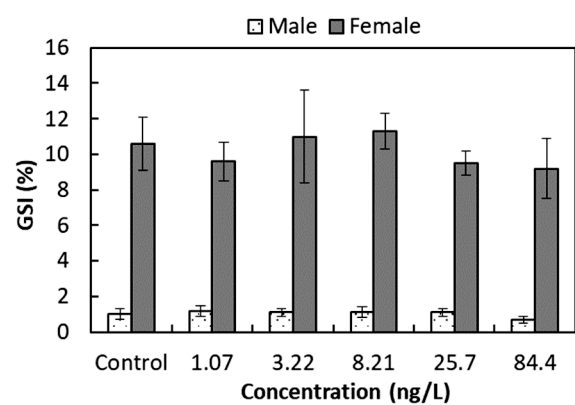


図7 F0世代の (a) 全長 (b) 湿重量 (c) 肝臓中ビテロゲニン (d) 乳頭状小突起を有する節板数 (e) 肝臓体指数 (f) 生殖腺体指数

注) 値は連平均値を元に算出した平均値±標準偏差 (対照区はオス n=11、メス n=12、ばく露区は 1.07 ng/L 区のメスは n=5、それ以外は n=6) を示す。*は対照区に比べて統計学的な有意差があることを示す (* $p<0.05$, ** $p<0.01$, Jonckheere-Terpstra 検定)

4.4 F1 世代胚～稚魚期の結果

4.4.1 F1 世代胚・仔魚期のふ化率・ふ化日数・生存率

F1 世代胚の受精後 14 日目のふ化率、ふ化日数および受精後 4 週目（21 日目）の生存率を表 11 に、受精後 7 日目～14 日目におけるふ化個体数を図 8 に示す。対照区のふ化率は 80%以上、受精後 21 日目（3 週目）までのふ化後の生存率は平均 80%であり、試験有効性基準を満たしていた。対照区において 240 個中 200 個が 7 日目にふ化し、ふ化日の中央値が受精後 7 日目であったことから（図 8）、その 2 倍である 14 日目において各エンドポイントを計算した。なお、14 日目までにふ化しなかった個体は死亡とみなし、ふ化から受精後 14 日目までの仔魚致死が確認されなかったため、ふ化率と生存率（14 日後）は等しい値となった。受精後 7 日目にふ化仔魚をプールして 12 個体ずつ各連に分配後、受精後 21 日目まですべての試験区で死亡は観察されなかった。ふ化率および 14 日目の生存率は 84.4 ng/L 区で対照区に比べて有意に減少した。ふ化日数は、いずれのばく露区においても対照区と比べ統計学的な有意差は確認されなかった。

表 11 F1 世代胚～稚魚期のふ化率・ふ化日数・生存率

実測濃度 (ng/L)	N	ふ化率 (%)	ふ化日数 (day)	生存率(14 日目) (%)	生存率(21 日目) (%)
Control	12	98.3 ± 3.3	7.2 ± 0.1	98.3 ± 3.3	100 ± 0
1.07	6	99.2 ± 2.0	7.1 ± 0.1	99.2 ± 2.0	100 ± 0
3.22	6	99.2 ± 2.0	7.3 ± 0.1	99.2 ± 2.0	100 ± 0
8.21	6	98.3 ± 2.6	7.0 ± 0.0	98.3 ± 2.6	100 ± 0
25.7	6	97.5 ± 2.7	7.2 ± 0.2	97.5 ± 2.7	100 ± 0
84.4	6	95.8 ± 3.8*	7.3 ± 0.2	95.8 ± 3.8*	100 ± 0

注) 値は連平均値を元に算出した平均値±標準偏差を示す。*は対照区に比べて統計学的な有意差があることを示す (* $p<0.05$, Jonckheere-Terpstra 検定)

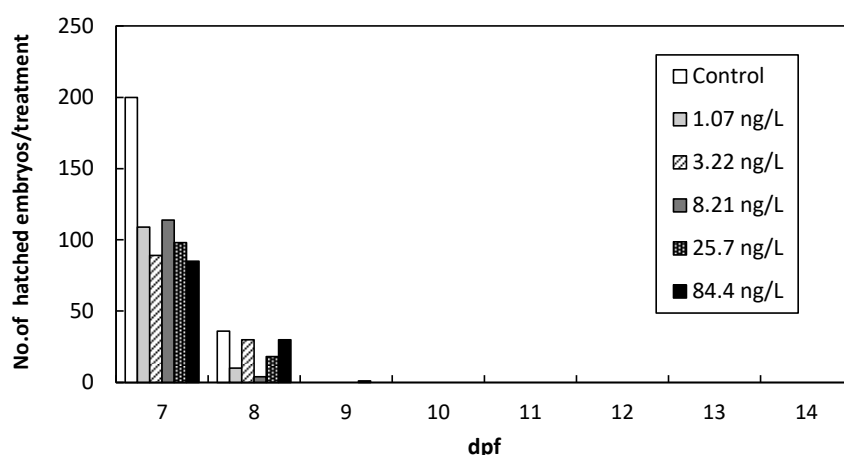


図 8 F1 の受精後 7～14 日目における各試験区の総ふ化個体数

注) 10～14 日目はふ化個体なし。

4.5 F1 世代亜成体の結果

4.5.1 F1 世代亜成体の生存率

受精後 9 週目 (DMY 判定中) の生存率を表 12 に示す。受精後 57 日目に 1.07 ng/L 区で 1 個体のみ死亡したが、いずれのばく露区においても対照区と比べ統計学的な有意差は確認されなかった。

表 12 F1 世代亜成体 (受精後 9 週目) の生存率

実測濃度 (ng/L)	生存率 (9 週目) (%)
Control	100 ± 0
1.07	98.6 ± 3.4
3.22	100 ± 0
8.21	100 ± 0
25.7	100 ± 0
84.4	100 ± 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=12、ばく露区は n=6)。

4.5.2 F1 世代亜成体の全長・湿重量

10 週齢の亜成体の全長及び湿重量の測定結果を表 13 および図 9 (a)(b)に示す。なお、対照区の水槽 1 において、ペアリングに用いた個体以外はすべてメス、また水槽 8 では同様に全てオスであったため、対照区の連数はオス、メスともに 11 となった。同様に 1.07 ng/L 区の水槽 3 ではペアリングに用いた個体以外はすべてメス、8.21 ng/L 区の水槽 6 で同様に全てオスであったため、これらの連数は 5 であったが、それ以外のばく露区の連数は 6 であった。

全長は、オスは 8.21 ng/L 区以上の濃度区で対照区と比べ有意な増加が、逆にメスは最高濃度区の 84.4 ng/L で対照区と比べて有意な減少が確認された。ただし LOEC (オスは 8.21 ng/L、メスは 84.4 ng/L) における差は平均値で 0.5~1.4 mm であった。

湿重量は、オスは 25.7 ng/L 区以上で対照区と比べ有意な増加が、逆にメスは 25.7 ng/L 区以上の濃度区で対照区と比べて有意な減少が確認された。

表 13 F1 世代亜成体の全長・湿重量

実測濃度 (ng/L)	全長 (mm)		湿重量 (mg)	
	オス	メス	オス	メス
Control	28.3 ± 0.6	29.0 ± 0.4	269 ± 25	347 ± 14
1.07	28.6 ± 0.5	29.5 ± 0.4	271 ± 22	365 ± 12
3.22	28.8 ± 0.4	29.6 ± 0.6	265 ± 17	351 ± 24
8.21	28.8 ± 1.0 **	29.2 ± 0.3	281 ± 24	338 ± 18
25.7	29.7 ± 0.4 **	28.3 ± 0.3	338 ± 34 **	322 ± 17 **
84.4	28.6 ± 0.7 **	27.9 ± 1.5 *	305 ± 18 **	313 ± 51 **

注) 値は連平均値を元に算出した平均値±標準偏差 (対照区のオス、メスともに n=11、ばく露区は 1.07 ng/L 区のオスは n=5、8.21 ng/L 区のメスは n=5、それ以外は n=6)。*は対照区に比べて統計学的な有意差があることを示す (* $p<0.05$, ** $p<0.01$, Jonckheere-Terpstra 検定)

4.5.3 F1 世代亜成体の肝臓中ビテロゲニン濃度

ELISA による F1 世代亜成体の肝臓中ビテロゲニン濃度の測定結果を表 14 および図 9 (c)に示す。オスではすべての濃度区で、メスでは 3.22 ng/L 区以上の濃度区で、対照区と比べて有意な増加が確認された。ただし、オスの 1.07 および 3.22 ng/L 区におけるビテロゲニン濃度の平均値は 10 ng/mg 未満であった。他のエンドポイントと比べて連間のばらつきが大きいため、連 (水槽) をランダム効果、試験区を固定効果とした Mixed Effect ANOVA による Dunnett 検定を行った。その結果、メスの肝臓中ビテロゲニン濃度は、84.4 ng/L および 3.22 ng/L 区では対照区と比べて有意な増加が認められたが、中間の 8.21 および 25.7 ng/L 区では有意な変化は認められなかった。

表 14 F1 世代亜成体の肝臓中ビテロゲニン濃度

実測濃度 (ng/L)	肝臓中ビテロゲニン濃度 (ng/mg liver)	
	オス	メス
Control	1.52 ± 0.27	571 ± 175
1.07	2.18 ± 0.46 *	603 ± 195
3.22	2.58 ± 1.09 **	962 ± 374 * (*)
8.21	62.2 ± 48.7 **	754 ± 62 **
25.7	1290 ± 62 **	701 ± 208 *
84.4	2740 ± 1068 **	2320 ± 1510 ** (***)

注) 値は連平均値を元に算出した平均値±標準偏差 (対照区のオス、メスともに n=11、ばく露区は 1.07 ng/L 区のオスは n=5、8.21 ng/L 区のメスは n=5、それ以外は n=6)。

は対照区に比べて統計学的な有意差があることを示す ($p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$, Jonckheere-Terpstra 検定; メスのカッコ内は ME ANOVA-Dunnett 検定)。

4.5.4 F1 世代亜成体の二次性徴指標

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結果を表 15 および図 9 (d)に示す。オスでは 25.7 および 84.4 ng/L 区で乳頭状小突起を有する個体は確認されなかった。メスではいずれのばく露区においても、乳頭状小突起を有する個体は確認されなかった。

表 15 F1 世代亜成体の乳頭状小突起を有する節板数

実測濃度 (ng/L)	乳頭状小突起を有する節板数 (Plates/fish)			
	オス		メス	
Control	90	± 10	0	± 0
1.07	84	± 6	0	± 0
3.22	95	± 6	0	± 0
8.21	85	± 14	0	± 0
25.7	0	± 0	**	0 ± 0
84.4	0	± 0	**	0 ± 0

注) 値は連平均値を元に算出した平均値±標準偏差 (対照区のオス、メスともに n=11、ばく露区は 1.07 ng/L 区のオスは n=5、8.21 ng/L 区のメスは n=5、それ以外は n=6)。

*は対照区に比べて統計学的な有意差があることを示す (** $p<0.01$, Jonckheere-Terpstra 検定)。

4.5.5 F1 世代亜成体の表現型性別と生殖腺形態

F1 世代亜成体の遺伝的オ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 16 に、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 17 に示す。遺伝的オス個体では 84.4 ng/L 区において、31 個体中 14 個体で明確なオスの表現型 (尻びれが大きい、背びれの切込みあり) が認められなかった。生殖腺形態は 25.7 ng/L 区以上の濃度区で解剖所見では判別できない個体が多かった。84.4 ng/L 区において 31 個体中 16 個体で卵巣が確認された。

遺伝的メス個体では 84.4 ng/L 区の 16 個体中 1 個体でオスの表現型が認められた。また、生殖腺形態においても、解剖所見による精巣様の生殖腺が対照区で 48 個体中 1 個体から、また 25.7 ng/L 区の 27 個体中 1 個体から確認された。ただし、84.4 ng/L 区では 16 個体中 5 個体で外観からは精巣か卵巣か判別できなかった。

なお、ペアリング開始後の初産日は、対照区は 24 連中 14 連、1.07 ng/L 区は 12 連中 11 連、3.22 ng/L 区は 12 連中 10 連、8.21 ng/L 区では 12 連中 11 連でペアリング開始の翌日 (Test Day 79) に観察された。また、ばく露区の残り全ての連と、対照区の 24 連中 3 連は Test Day 80 までに、対照区の残り 7 連も Test Day 84 までに初産が確認された。

表 16 F1 世代亜成体における遺伝的オス個体の表現型性別・生殖腺形態

実測濃度 (ng/L)	N	表現型オス		生殖腺形態		
		+	—	精巢	卵巢	不明
Control	48	48	0	48	0	0
1.07	18	18	0	17	1	0
3.22	26	26	0	26	0	0
8.21	31	31	0	31	0	0
25.7	21	21	0	11	0	10
84.4	31	17	14	0	16	15

表 17 F1 世代亜成体における遺伝的メス個体の表現型性別・生殖腺形態

実測濃度 (ng/L)	N	表現型メス		生殖腺形態		
		+	—	精巢	卵巢	不明
Control	48	0	48	1	46	1
1.07	29	0	29	0	29	0
3.22	22	0	22	0	22	0
8.21	17	0	17	0	17	0
25.7	27	0	27	1	26	0
84.4	16	1	15	0	11	5

4.5.6 F1 世代亜成体の肝臓体指数・生殖腺体指数

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 18 および図 9 (e)(f)に示す。オスの肝臓体指数は 25.7 ng/L 区以上の濃度区で、対照区と比べて有意差な増加が認められた。メスでは肝臓体指数は対照区と比べて有意な差は認められなかったが、生殖腺体指数は 84.4 ng/L 区でオスは対照区の約 4 倍に、メスは逆に対照区の約半分に減少しているにもかかわらず、いずれのばく露区においても有意差は認められなかった。そこで、連をランダム効果とした ME-ANOVA-Dunnnett 検定によると、オス 84.4 ng/L 区で対照区に対し有意な増加が、またメス 84.4 ng/L 区については、通常の Dunnnett 検定によると対照区に対して有意な減少が認められた。

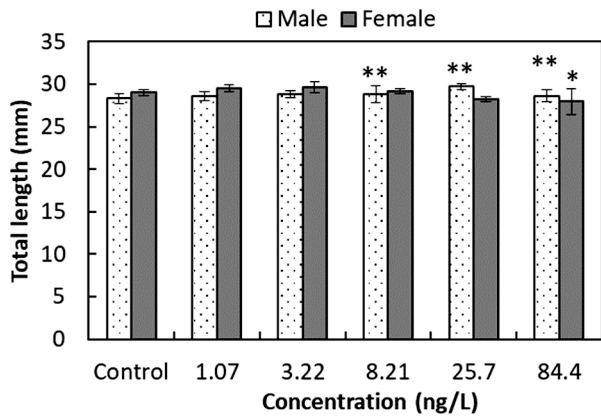
表 18 F1 世代垂成体の肝臓体指数・生殖腺体指数

実測濃度 (ng/L)	肝臓体指数 (%)		生殖腺体指数 (%)	
	オス	メス	オス	メス
Control	2.2 ± 0.3	5.4 ± 0.5	1.1 ± 0.3	8.8 ± 1.7
1.07	2.2 ± 0.2	5.1 ± 0.6	1.3 ± 0.3	10.8 ± 1.4
3.22	2.1 ± 0.3	5.0 ± 0.4	1.3 ± 0.1	10.3 ± 1.3
8.21	2.6 ± 0.3	5.1 ± 0.8	1.3 ± 0.2	11.2 ± 2.2
25.7	4.7 ± 0.4 **	5.3 ± 0.6	0.8 ± 0.2	11.6 ± 2.6
84.4	5.3 ± 0.4 **	5.1 ± 0.9	4.3 ± 1.9 (**)	5.9 ± 2.8 (**)

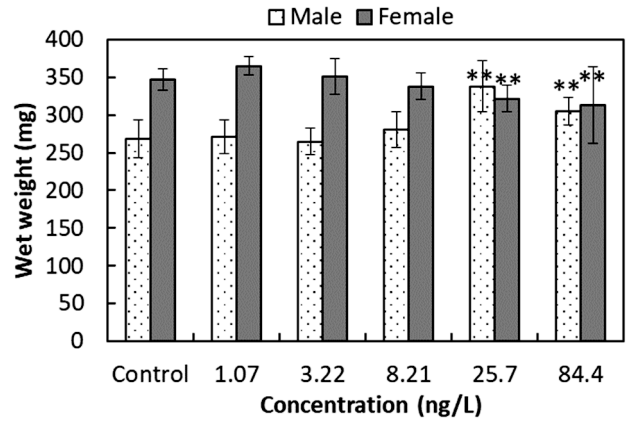
注) 値は連平均値を元に算出した平均値±標準偏差 (対照区のオス、メスともに n=11、ばく露区は 1.07 ng/L 区のオスは n=5、8.21 ng/L 区のメスは n=5、それ以外は n=6)。

は対照区に比べて統計学的な有意差があることを示す ($p<0.05$, ** $p<0.01$, Jonckheere-Terpstra 検定; オスの生殖腺体指数は ME ANOVA-Dunnett 検定、メスの生殖腺体指数は Dunnett 検定)。

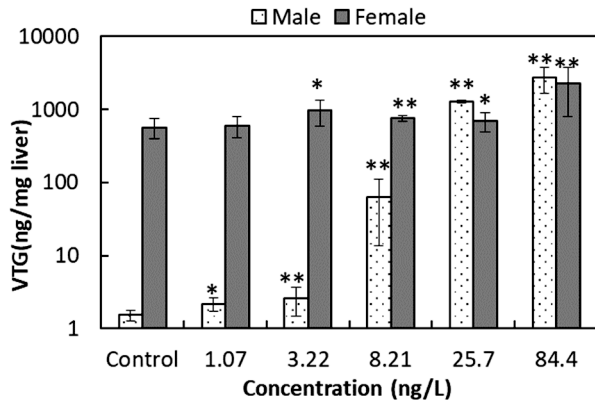
(a) 全長



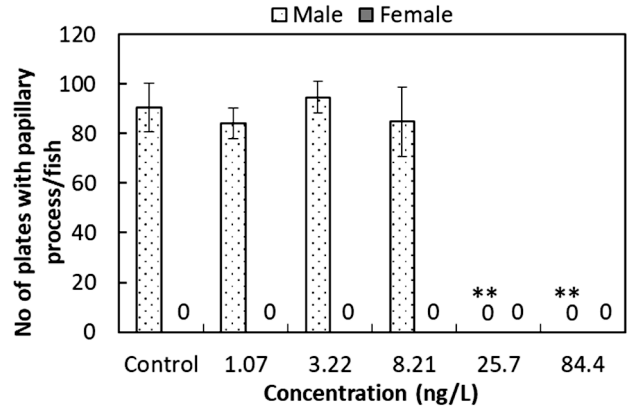
(b) 湿重量



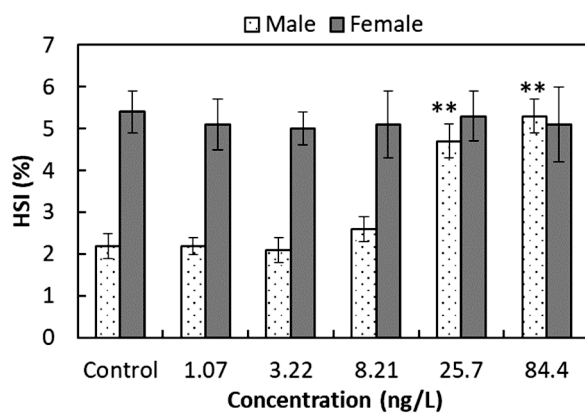
(c) 肝臓中ビテロゲン



(d) 乳頭状小突起を有する節板数



(e) 肝臓体指数 (HSI)



(f) 生殖腺体指数 (GSI)

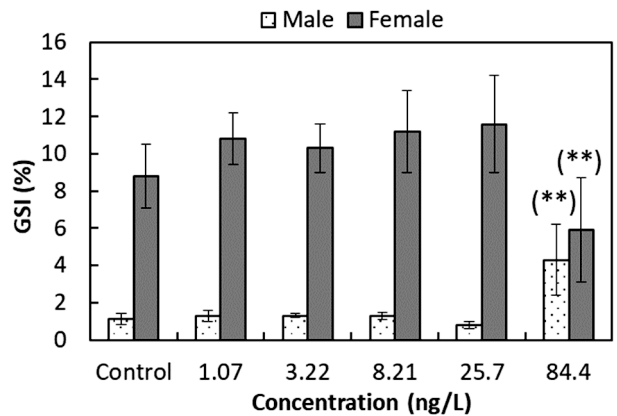


図9 F1世代垂成体の (a) 全長 (b) 湿重量 (c) 肝臓中ビテロゲン (d) 乳頭状小突起を有する節板数 (e) 肝臓体指数 (f) 生殖腺体指数

注) 値は連平均値を元に算出した平均値±標準偏差 (対照区のおス、メスともに n=11、ばく露区は 1.07 ng/L 区のおスは n=5、8.21 ng/L 区のメスは n=5、それ以外は n=6)。

は対照区に比べて統計学的な有意差があることを示す (p <0.05, ** p <0.01, 生殖腺体指数は ME-ANOVA-Dunnett 検定、それ以外は Jonckheere-Terpstra 検定)。

4.6 F1 世代成熟個体の結果

4.6.1 F1 世代ペアリング後の死亡及び行動・外観の異常

F1 世代ペアリング後の死亡個体数を表 19 に示す。対照区でオス 24 個体中 2 個体、1.07 ng/L 区でメス 12 個体中 1 個体、25.7 ng/L 区でメス 12 個体中 1 個体、84.4 ng/L 区でオス、メスともに 12 個体中 1 個体で死亡が観察された。死亡率は濃度依存的な増加は認められなかった。

表 19 F1 世代ペアリング後の死亡個体数

実測濃度 (ng/L)	オス			メス			合計
	供試数	死亡数	死亡率	供試数	死亡数	死亡率	死亡率
Control	24	2	8%	24	0	0%	4%
1.07	12	0	0%	12	1	8%	4%
3.22	12	0	0%	12	0	0%	0%
8.21	12	0	0%	12	0	0%	0%
25.7	12	0	0%	12	1	8%	4%
84.4	11	1	9%	11	1	9%	9%

注) 統計解析は Step-down Cochran-Armitage Test を用いた。

4.6.2 F1 世代の総産卵数・受精卵数・受精率

F1 世代受精後 12 週目～14 週目の 21 日間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・受精率を図 10 に、21 日間平均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 20 に、対照区に対する総産卵数・受精卵数・受精率の阻害率を表 21 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 11 に示す。

まず対照区の 21 日平均総産卵数の平均値は 42 個/ペア/日、各 22 ペアの 21 日平均総産卵数は 32～54 個/ペア/日で、21 日間で算出された計 20582 個の卵の受精率は 98%であり、試験有効条件をすべて満たしていた。

25.7 ng/L 区以上の濃度区では総産卵数と受精卵数について、8.21 ng/L 区以上の濃度区では受精率が対照区と比べて有意な減少が認められた。受精率の LOEC (8.21 ng/L) における対照区に対する阻害率は 4.1%、総産卵数および受精卵数の LOEC (25.7 ng/L) における対照区に対する阻害率はいずれも 100%であった。なお、対照区と比べて統計学的な有意差は検出されなかったが、8.21 ng/L でも総産卵数および受精卵数の減少が認められ、阻害率はそれぞれ 15%および 17%であった。

総産卵数および受精卵数について週ごとに反復測定分散分析を実施した結果、各週で互いに有意差は示されなかった。

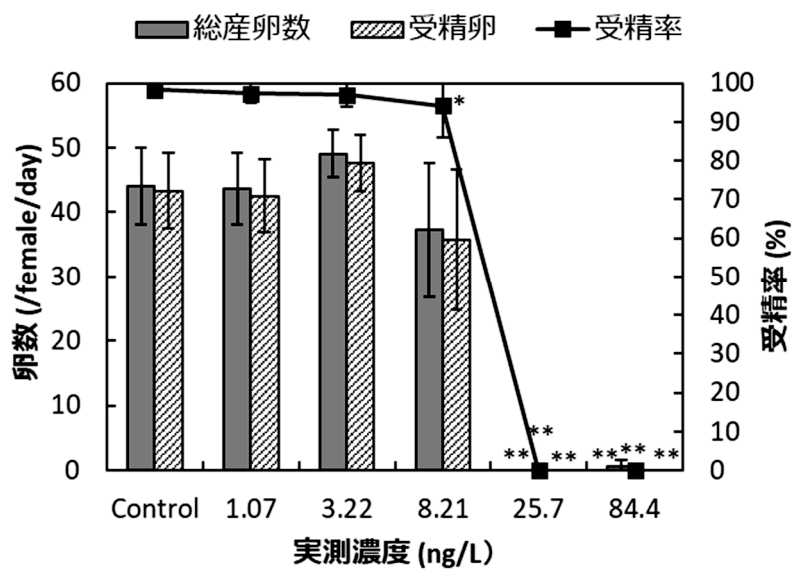


図 10 F1 世代の総産卵数・受精卵数・受精率（各ペア・1 日あたり）

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=22、ばく露区は 25.7 ng/L 区で n=11、84.4 ng/L 区で n=10、それ以外は n=12）を示す。*は対照区に比べて統計学的な有意差があることを示す (** $p < 0.01$, Jonckheere-Terpstra Test)。

表 20 F1 世代の総産卵数・受精卵数・受精率

実測濃度 (ng/L)	N	総産卵数 (eggs/ pair/day)							
		21 日間		1 週目(Day 1-7)		2 週目(Day 8-14)		3 週目(Day 15-21)	
Control	22	44.0 ± 5.9		41.7 ± 8.0		44.8 ± 5.8		45.6 ± 5.7	
1.07	12	43.7 ± 5.6		44.9 ± 3.9		45.8 ± 6.8		40.0 ± 13.1	
3.22	12	49.1 ± 3.7		47.5 ± 4.3		50.2 ± 4.1		49.6 ± 4.0	
8.21	12	37.2 ± 10.4	(**)	36.4 ± 12.7		38.2 ± 11.2		37.0 ± 11.9	
25.7	11	0.0 ± 0.0	** (**)	0.0 ± 0.0	**	0.0 ± 0.0	**	0.0 ± 0.0	**
84.4	10	0.6 ± 1.1	** (**)	0.0 ± 0.0	**	1.1 ± 2.6	**	0.0 ± 0.0	**
実測濃度 (ng/L)	N	受精卵数 (eggs/pair/day)							
		21 日間		1 週目(Day 1-7)		2 週目(Day 8-14)		3 週目(Day 15-21)	
Control	22	43.3 ± 5.9		41.0 ± 8.0		43.7 ± 6.1		45.1 ± 5.7	
1.07	12	42.5 ± 5.6		43.3 ± 4.9		45.1 ± 6.8		38.8 ± 14.3	
3.22	12	47.7 ± 4.4		46.6 ± 4.1		48.7 ± 5.3		47.6 ± 5.3	
8.21	12	35.8 ± 10.9	(**)	35.3 ± 12.6		36.8 ± 11.3		35.1 ± 13.7	
25.7	11	0.0 ± 0.0	** (**)	0.0 ± 0.0	**	0.0 ± 0.0	**	0.0 ± 0.0	**
84.4	10	0.0 ± 0.0	** (**)	0.0 ± 0.0	**	0.0 ± 0.0	**	0.0 ± 0.0	**
実測濃度 (ng/L)	N	受精率 (%)							
		21 日間		1 週目(Day 1-7)		2 週目(Day 8-14)		3 週目(Day 15-21)	
Control	22	98.3 ± 1.4		98.4 ± 1.9		97.4 ± 4.5		99.0 ± 0.8	
1.07	12	97.4 ± 2.4		96.4 ± 5.5		98.5 ± 1.5		94.3 ± 14.2	*
3.22	12	97.0 ± 3.0		98.2 ± 1.8		96.9 ± 3.4		95.9 ± 6.0	**
8.21	12	94.2 ± 8.1	* (*)	97.1 ± 2.7		94.7 ± 7.3	*	91.9 ± 11.7	**
25.7	11	0.0 ± 0.0	** (**)	0.0 ± 0.0	**	0.0 ± 0.0	**	0.0 ± 0.0	**
84.4	10	0.0 ± 0.0	** (**)	0.0 ± 0.0	**	0.0 ± 0.0	**	0.0 ± 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=22、ばく露区は 25.7 ng/L 区で n=11、84.4 ng/L 区で n=10、それ以外は n=12) を示す。*は対照区に比べて統計学的な有意差があることを示す (* $p<0.05$, ** $p<0.01$, Jonckheere-TerpstraTest, カッコ内は Dunnett 検定)

表 21 F1 世代の総産卵数・受精卵数・受精率の対照区に対する阻害率 (%)

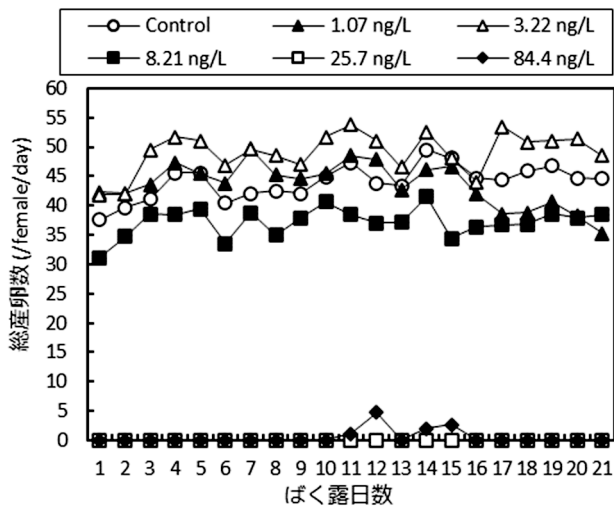
実測濃度 (ng/L)	N	総産卵数 (eggs/day/female)							
		21日間	1週目 (Day 1-7)	2週目 (Day 8-14)	3週目 (Day 15-21)				
1.07	12	0.8 ± 18	-7.6 ± 23	-2.2 ± 20	12.2 ± 31				
3.22	12	-12 ± 17	-13.9 ± 24	-12.0 ± 17	-8.9 ± 16				
8.21	12	15 ± 26	13 ± 35	15 ± 27	18.8 ± 28				
25.7	11	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0	**	**	**	**
84.4	10	99 ± 3	100 ± 0	98 ± 6	100 ± 0	**	**	**	**

実測濃度 (ng/L)	N	受精卵数 (eggs/day/female)							
		21日間	1週目 (Day 1-7)	2週目 (Day 8-14)	3週目 (Day 15-21)				
1.07	12	1.7 ± 19	-5.6 ± 24	-3.3 ± 21	14.0 ± 33				
3.22	12	-10.1 ± 18	-13.6 ± 24	-11.6 ± 20	-5.6 ± 18				
8.21	12	17 ± 28	14 ± 35	16 ± 28	22 ± 32				
25.7	11	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0	**	**	**	**
84.4	10	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0	**	**	**	**

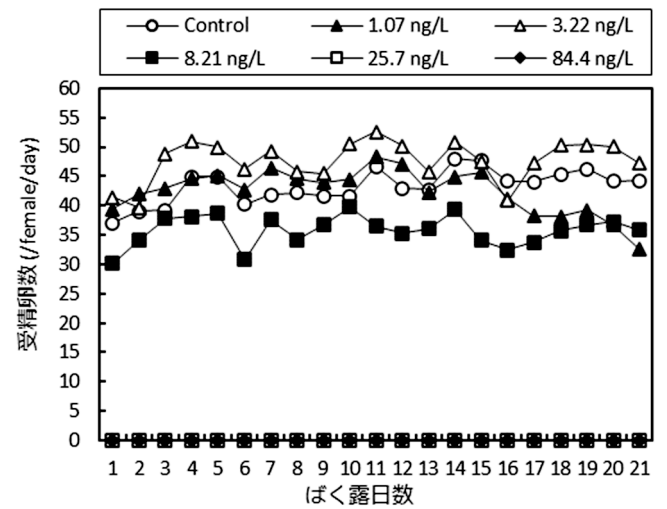
実測濃度 (ng/L)	N	受精率 (%)							
		21日間	1週目 (Day 1-7)	2週目 (Day 8-14)	3週目 (Day 15-21)				
1.07	12	1.0 ± 2.8	2.0 ± 5.9	-1.1 ± 4.9	4.7 ± 14				*
3.22	12	1.4 ± 3.3	0.2 ± 2.7	0.6 ± 5.8	3.1 ± 6.2				**
8.21	12	4.1 ± 8.4	1.2 ± 3.3	2.8 ± 8.7	7.1 ± 12	*	*	*	**
25.7	11	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0	**	**	**	**
84.4	10	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 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=22、ばく露区は 25.7 ng/L 区で n=11、84.4 ng/L 区で n=10、それ以外は n=12) を示す。*は対照区に比べて統計学的な有意差があることを示す (* p <0.05, ** p <0.01, Jonckheere-Terpstra Test)。

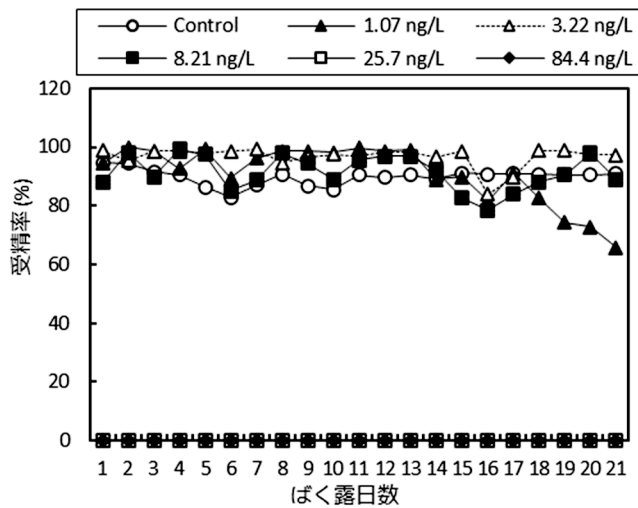
(a) 総産卵数



(b) 受精卵数



(c) 受精率



(d) 累積受精卵数

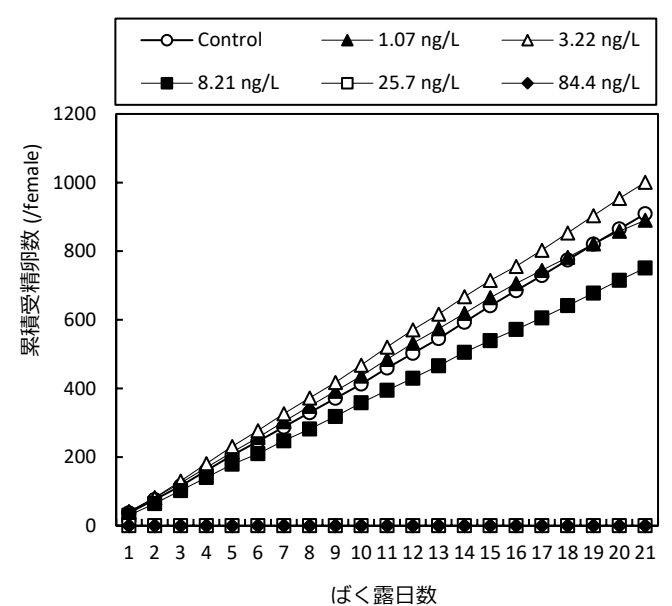


図 11 F1 世代の(a) 総産卵数 (b) 受精卵数 (c) 受精率の日変動および (d) 累積受精卵数

(値は各試験区の連平均値)

4.6.3 F1 世代成熟個体の全長・湿重量

F1 世代成熟個体の全長および湿重量の測定結果を表 22、図 12 (a)(b) に示す。全長は、オスは 8.21 ng/L 区以上の濃度区、対照区と比べて有意な増加が認められた。メスは 25.7 ng/L 区以上の濃度区以上で対照区と比べて有意な減少が認められた。

湿重量は、オスは 25.7 ng/L 区以上の濃度区で対照区と比べて有意な増加が、メスは 8.21 ng/L 以上の濃度区で有意な減少が認められた。

表 22 F1 世代成熟個体の全長・湿重量

実測濃度 (ng/L)	全長 (mm)						湿重量 (mg)									
	オス			メス			オス			メス						
Control	35.8	±	1.4		36.7	±	1.0		462	±	62		618	±	67	
1.07	36.3	±	1.3		37.0	±	0.6		466	±	62		624	±	87	
3.22	36.3	±	1.1		37.4	±	1.2		443	±	48		593	±	36	
8.21	37.9	±	1.7	**	35.7	±	1.0		544	±	98		539	±	47	**
25.7	42.3	±	2.1	**	34.2	±	0.9	**	864	±	90	**	524	±	45	**
84.4	36.0	±	0.9	**	34.6	±	1.5	**	597	±	79	**	548	±	72	**

注) 値は連平均値を元に算出した平均値±標準偏差 (対照区はオス n=22、メス n=24、ばく露区は 1.07 ng/L 区でメス n=11、25.7 ng/L 区でメス n=11、84.4 ng/L 区でオス、メスともに n=10、それ以外は n=12) を示す。

*は対照区に比べて統計学的な有意差があることを示す (** $p<0.01$, オスの体長は Dunnett 検定、それ以外は Jonckheere-Terpstra 検定)

4.6.4 F1 世代成熟個体の肝臓中ビテロゲニン濃度

ELISA による F1 世代成熟個体の肝臓中ビテロゲニン濃度の測定結果を表 23、図 12 (c)に示す。オスは 3.22 ng/L 区以上の濃度区で対照区と比べて有意な増加が認められた。メスは 84.4 ng/L 区で対照区と比べて有意な減少が認められたが、その平均値の減少はあまり大きくなく、その値はむしろ 3.22 ng/L 区や 8.21 ng/L 区よりも高かった。

表 23 F1 世代成熟個体の肝臓中ビテロゲニン濃度

実測濃度 (ng/L)	肝臓中ビテロゲニン濃度 (ng/mg liver)	
	オス	メス
Control	4.64 ± 7.59	383 ± 96
1.07	5.82 ± 8.04	398 ± 258
3.22	47.9 ± 106	282 ± 73
8.21	100 ± 78	309 ± 60
25.7	948 ± 490	390 ± 142
84.4	401 ± 171	349 ± 187

注) 値は連平均値を元に算出した平均値±標準偏差 (対照区はオス n=22、メス n=24、ばく露区は 1.07 ng/L 区でメス n=11、25.7 ng/L 区でメス n=11、84.4 ng/L 区でオス、メスともに n=10、それ以外は n=12) を示す。*は対照区に比べて統計学的な有意差があることを示す (* $p<0.05$, ** $p<0.01$, Jonckheere-Terpstra Test による)

4.6.5 F1 世代成熟個体の二次性徴指標

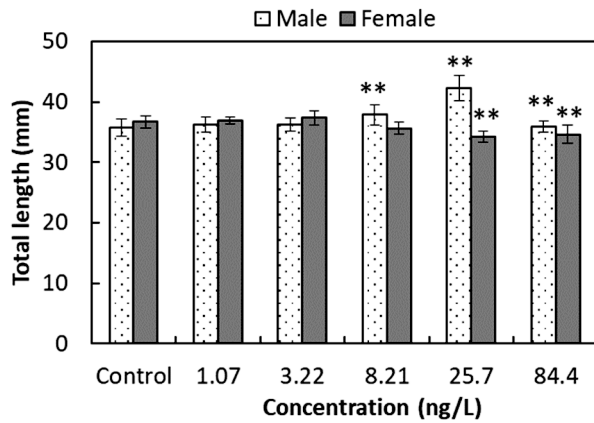
二次性徴の指標として、F1 世代成熟個体における乳頭状小突起を有する節板数の計測結果を表 24、図 12 (d) に示す。オスでは、25.7 および 84.4 ng/L 濃度区では乳頭状小突起を有する個体は確認されず、8.21 ng/L 濃度区以上で対照区に比べて有意な減少が確認された。メスではすべての試験区で、乳頭状小突起を有する個体は確認されなかった。

表 24 F1 世代成熟個体における乳頭状小突起を有する節板数

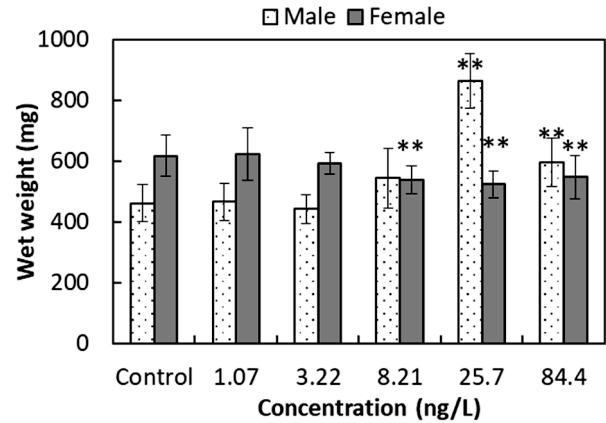
実測濃度 (ng/L)	乳頭状小突起を有する節板数 (Plates/fish)	
	オス	メス
Control	121 ± 21	0 ± 0
1.07	128 ± 20	0 ± 0
3.22	120 ± 15	0 ± 0
8.21	102 ± 16	0 ± 0
25.7	0 ± 0	0 ± 0
84.4	0 ± 0	0 ± 0

注) 値は連平均値を元に算出した平均値±標準偏差 (対照区はオス n=22、メス n=24、ばく露区は 1.07 ng/L 区でメス n=11、25.7 ng/L 区でメス n=11、84.4 ng/L 区でオス、メスともに n=10、それ以外は n=12) を示す。*は対照区に比べて統計学的な有意差があることを示す (** $p<0.01$, Jonckheere-Terpstra Test)

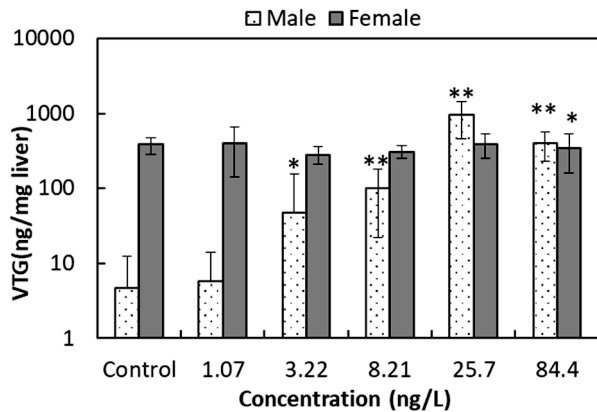
(a) 全長



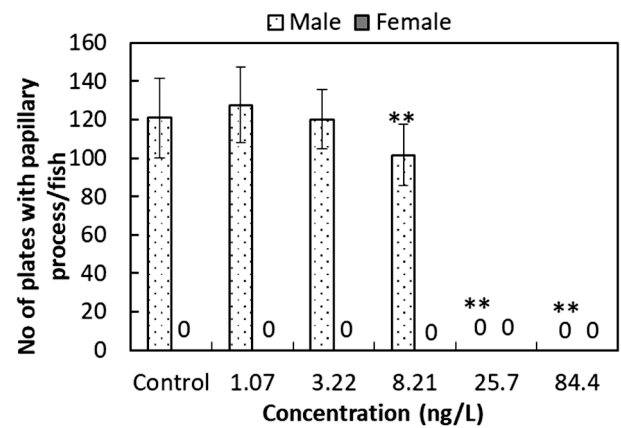
(b) 湿重量



(c) 肝臓中ビテロゲニン濃度



(d) 乳頭状小突起を有する節板数



(e) 肝臓体指数 (HSI)

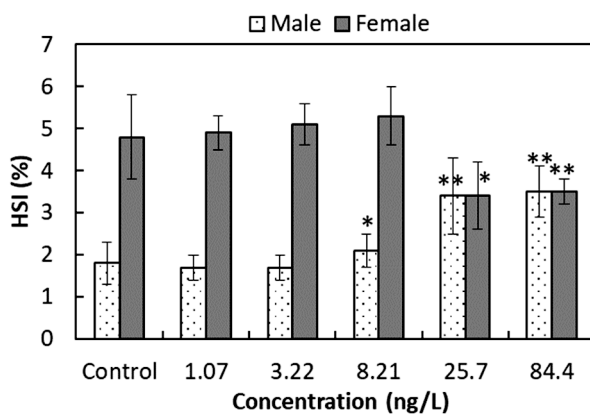


図 12 F1 世代成熟個体の (a) 全長 (b) 湿重量 (c) 肝臓中ビテロゲニン (d) 乳頭状小突起を有する節板数 (e) 肝臓体指数

注) 値は連平均値を元に算出した平均値±標準偏差 (対照区はオス n=22、メス n=24、ばく露区は 1.07 ng/L 区でメス n=11、25.7 ng/L 区でメス n=11、84.4 ng/L 区でオス、メスともに n=10、それ以外は n=12) を示す。*は対照区に比べて統計学的な有意差があることを示す (* $p<0.05$, ** $p<0.01$, オスの体長とメスのビテロゲニンは Dunn 検定、それ以外は Jonckheere-Terpstra 検定)

4.6.6 F1 世代成熟個体の肝臓体指数

F1 世代成熟個体の肝臓体指数の測定結果を表 25、図 11(e)に示す。オスでは 8.21 ng/L 区以上の濃度区で対照区と比べて統計的に有意な増加が認められたが、メスでは 25.7 ng/L 区以上の濃度区で対照区と比べて有意な減少が認められた。

表 25 F1 世代成熟個体の肝臓体指数

実測濃度 (ng/L)	肝臓体指数 (%)	
	オス	メス
Control	1.8 ± 0.5	4.8 ± 1.0
1.07	1.7 ± 0.3	4.9 ± 0.4
3.22	1.7 ± 0.3	5.1 ± 0.5
8.21	2.1 ± 0.4 *	5.3 ± 0.7
25.7	3.4 ± 0.9 **	3.4 ± 0.8 *
84.4	3.5 ± 0.6 **	3.5 ± 0.3 **

注) 値は連平均値を元に算出した平均値±標準偏差 (対照区はオス n=22、メス n=24、ばく露区は 1.07 ng/L 区でメス n=11、25.7 ng/L 区でメス n=11、84.4 ng/L 区でオス、メスともに n=10、それ以外は n=12) を示す。*は対照区に比べて統計学的な有意差があることを示す (* $p<0.05$, ** $p<0.01$, Jonckheere-Terpstra Test)。

4.6.7 F1 世代成熟個体オスの生殖腺の病理組織学的解析結果

上記の通り、8.21 ng/L 区ではオスの二次性徴指標 (尻びれ上の乳頭状小突起) の低下や肝臓中ビテロゲン濃度の上昇、受精率の低下などが認められたことから、25.7 ng/L 区と合わせてオスの生殖腺の解析を行った。その結果、25.7 ng/L の遺伝的オスについては 1 個体で図 13(a)に示すように卵黄の蓄積が見られる卵母細胞を有することが確認され、卵巣であると確認され性転換が生じたものと考えられる。一方で、残りの 11 個体については、全て精巣であることが確認された。なお、8.21 ng/L 区については、現時点では一部の所見であるが、2 個体で精巣卵および interstitial fibrosis (間質性線維症) が確認された (図 13b および 13c) ほか、1 個体は精巣卵は確認されなかったが間質性線維症が確認された (図 13d)。

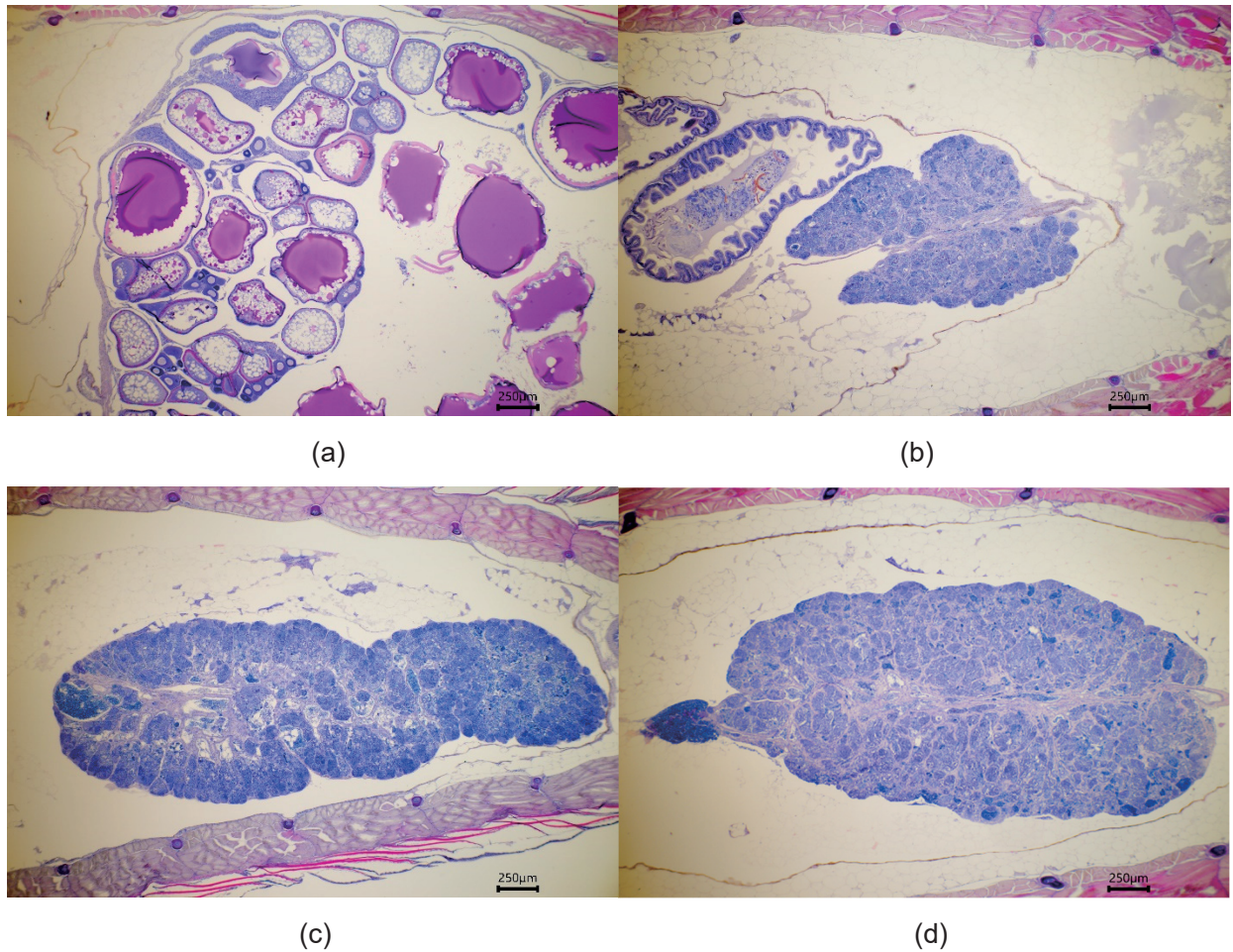


図 13 F1 世代成熟個体オスの生殖腺の組織切片の病理学的解析の結果 (a) 25.7 ng/L で卵巣と判定された個体 (b) 8.21 ng/L で精巣卵ありと判定された個体 1 (c) 8.21 ng/L で精巣卵ありと判定された個体 2 (d) 8.21 ng/L で精巣なしと判定されたものの間質性線維症が確認された個体

4.7 F2 世代の結果

25.7 および 84.4 ng/L 濃度区は受精卵が得られなかったため、F2 世代に継代することができなかった。対照区のふ化率は 80%以上であり、試験有効性基準をみなしていた。対照区におけるふ化日の中央値が受精後 7 日目であったことから (図 14、240 個中 209 個ふ化)、その 2 倍である 14 日目において各エンドポイントを計算した (表 26)。8.21 ng/L 濃度区以下のふ化率、ふ化日数はすべて対照区との有意差は認められなかった。

表 26 F2 世代胚期のふ化率・ふ化日数（受精後 14 日目）

実測濃度 (ng/L)	ふ化率 (%)		ふ化日数 (day)	
Control	96.7	± 4.4	7.1	± 0.1
1.07	98.3	± 2.6	7.1	± 0.1
3.22	91.7	± 9.8	7.1	± 0.1
8.21	96.7	± 4.1	7.2	± 0.2
25.7	NA		NA	
84.4	NA		NA	

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、ばく露区は n=6）を示す。ふ化率は Jonckheere-Terpstra 検定、ふ化日数は Mixed Effects Cox Models で有意差なし。NA: Not available（継代なし）。

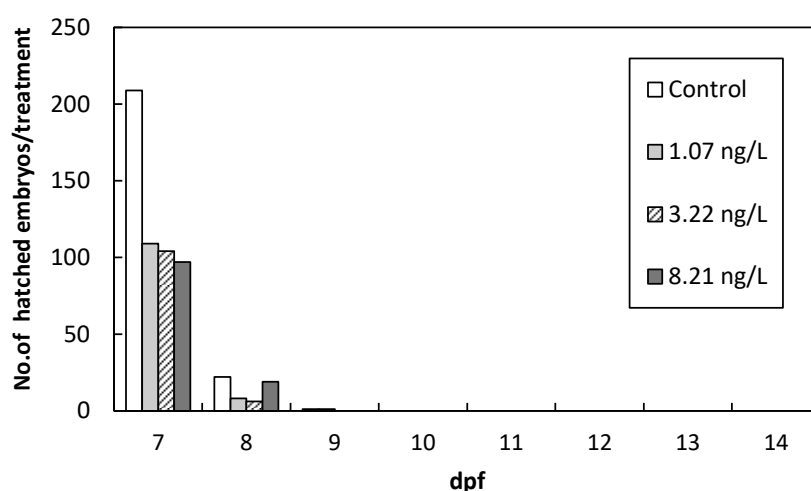


図 14 F2 の受精後 7～14 日目におけるふ化個体数（各試験区の合計）

注) 10～14 日目はふ化個体なし。

4.8 結果の概要

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 世代成熟個体の結果

1) 繁殖に関する指標（総産卵数・受精卵数・受精率）

総産卵数と受精卵数は全ての濃度区で対照区と比べて有意な差は認められなかった。

受精率は 25.7 ng/L 区以上の濃度区で対照区と比べて有意な減少が認められた。

2) 二次性徴（乳頭状小突起を有する節板数）

オス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観察されなかった。

3) 肝臓中ビテロゲニン濃度

オス・メスともに 25.7 ng/L 区以上の濃度区で対照区と比べて有意な増加が認められた。

4) 表現型性別と生殖腺形態

すべての濃度区において表現型性別・生殖腺形態は明確かつ一致していた。

5) その他の指標

全長はオス・メスともに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。

湿重量は、84.4 ng/L 区のメスにおいて対照区と比べて有意な減少が認められた。

肝臓体指数・生殖腺体指数は、オス・メスともに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。

(2) F1 世代胚～稚魚期の結果

1) 胚期ふ化率・ふ化日数・生存率、稚魚期の生存率

ふ化率と受精後 14 日目の生存率は、84.4 ng/L で対照区と比べて有意な減少が認められた。ふ化日数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。またふ化日数は、当研究所での平均的なふ化日数と一致していた。受精後 21 日目（4 週目）はすべての稚魚が生存していた。

(3) F1 世代亜成体の結果

1) 生存率

受精後 9 週目の生存率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。

2) 二次性徴（乳頭状小突起を有する節板数）

オスでは 25.7 ng/L 区以上の濃度区で乳頭状小突起を有する節板数が対照区と比較して有意な減少が認められた。

メスではすべての濃度区で観察されなかった。

3) 肝臓中ビテロゲニン濃度

オスでは 1.07 ng/L 区以上のすべての濃度区で、メスでは 3.22 ng/L 区以上の濃度区で対照区と比べて有意な増加が認められた。

4) 表現型性別と生殖腺形態

遺伝的オス個体では 84.4 ng/L 区において、31 個体中 14 個体で明確なオスの表現型（尻びれが大きい、背びれの切込みあり）が認められなかった。生殖腺形態は 25.7 ng/L 区以上の濃度区で解剖所見では判別できない個体が多かった。84.4 ng/L 区において 31 個体中 16 個体で卵巣が確認された。

遺伝的メス個体では 84.4 ng/L 区の 16 個体中 1 個体でオスの表現型が認められた。また、生殖腺形態においても、解剖所見による精巣様の生殖腺が対照区で 48 個体中 1 個体から、また 25.7 ng/L 区の 27 個体中 1 個体から確認されなかった。ただし、84.4 ng/L 区では 16 個体中 5 個体で外観からは精巣か卵巣か判別できなかった。

5) その他の指標

全長は、オスは 8.21 ng/L 区以上の濃度区で対照区と比べ有意な増加が、逆にメスは最高濃度区の 84.4 ng/L で対照区と比べて有意な減少が確認された。湿重量は、オスは 25.7 ng/L 区以上で対照区と比べ有意な増加が、逆にメスは 25.7 ng/L 区以上の濃度区で対照区と比べて有意な減少が確認された。

オスの肝臓体指数は 25.7 ng/L 区以上の濃度区で、生殖腺体指数は 84.4 ng/L 区のみで、対照区と比べて有意差な増加が認められた。メスの肝臓体指数は対照区と比べて有意な差は認められなかった。また、メスの生殖腺体指数は 84.4 ng/L 区で対照区と比べて半分程度に減少し、Dunn の検定ならびに Mixed Effect ANOVA では対照区と有意な差は認められなかったが、Dunnett 検定では有意な減少が認められた。

(4) F1 世代成熟個体の結果

1) 生存率

対照区でオス 24 個体中 2 個体、1.07 ng/L 区でメス 12 個体中 1 個体、25.7 ng/L 区でメス 12 個体中 1 個体、84.4 ng/L 区でオス、メスともに 12 個体中 1 個体で死亡が観察された。生存率は濃度依存的な減少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）

25.7 ng/L 区以上の濃度区では総産卵数と受精卵数について、8.21 ng/L 区以上の濃度区では受精率が対照区と比べて有意な減少が認められた。

3) 二次性徴（乳頭状小突起を有する節板数）

オスでは 25.7 ng/L 区以上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。
また 8.21 ng/L 区以上の濃度区において有意な減少が認められた。
メスではすべての濃度区で観察されなかった。

4) 肝臓中ビテロゲニン濃度

オスでは 3.22 ng/L 区以上の濃度区で対照区と比べて有意な増加が認められた。メスでは、84.4 ng/L 区で、対照区と比べて有意な減少が認められた。

5) その他の指標

全長は、オスは 8.21 ng/L 区以上の濃度区で対照区と比べて有意な増加が認められた。
メスは 25.7 ng/L 区以上の濃度区で対照区と比べて有意な減少が認められた。
湿重量は、オスは 25.7 ng/L 区以上の濃度区で対照区と比べて有意な増加が、メスは 8.21 ng/L 以上の濃度区で有意な減少が認められた。

肝臓体指数は、オスは 8.21 ng/L 以上の濃度区で対照区と比べて有意な増加が認められた。メスは 25.7 ng/L 以上の濃度区で対照区と比べて有意な減少が認められた。

オスの生殖腺の病理組織学的解析の結果、8.21 ng/L で一部の個体から精巣卵および間質性線維症が確認された。25.7 ng/L では 1 個体が卵巣様を示して性転換が示唆されたが、他の個体は精巣卵は認められたものの卵巣とは判定されなかった。

(5) F2 世代胚・仔魚期の結果

25.7 ng/L 区以上の濃度区では継代できず、F2 の観察はできなかった。ふ化率、ふ化日数、ふ化後生存率および生存率は継代ができた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。

またふ化日数は、当研究所での平均的なふ化日数と一致していた。

4.9 考察

本業務では、MEOGRT（OECD TG240）の試験法を用いて 17β-エストラジオール（E2）の多世代影響について検討した。E2 は女性ホルモンの 1 つであり、本試験の各世代・各エンドポイントの LOEC 一覧を表 30 に示す。

本試験では、水温や pH、DO などは有効性基準を満たしたものの、E2 は天然女性ホルモンであるため、F1 の成熟個体時期に対照区で約 1.3 ng/L、1.07 ng/L および 3.22 ng/L 濃度区でも他の期間と比べておよそ 1 ng/L 程度高い濃度で検出された。なお、F0、F1、F2 のいずれの世代についても、ふ化率および生存率については、いずれの濃度区についても対照区との有意差は認め

られなかった。致死やふ化などの有害性に直接関わる深刻な影響は確認されていなかったと考えられる。

E2 が繁殖に与える影響を検討したところ、F0 世代では、3 週目で受精率のみが最高濃度区の 84.4 ng/L と 25.7 ng/L で有意な減少が確認され、21 日間平均でも統計的に有意な減少が確認されたが、その対照区と比較した際の阻害率は、2%程度を下回っていた。しかしながら、繁殖影響は時間が経つにつれて少しずつ顕著になっており、先に令和元年度から 2 年度にかけて国立環境研究所で MEOGRT 試験を実施した経口避妊薬の 17 α -エチニルエストラジオール (EE2) ほど顕著ではないが⁸⁾、有意差が検出されたものと考えられる。成熟個体からのばく露であったとしても、3 週間以上の期間続けば、繁殖に対する影響が顕著になる恐れがある。それに対して、F1 世代の繁殖では、総産卵数、受精卵数、受精率は 25.7 ng/L 濃度区ではほぼ 0 になっており、8.21 ng/L 濃度区でも受精率は統計的に有意な減少が確認されたほか、総産卵数・受精卵数も 15 ないし 17%低下しており、Dunnett 検定を用いると有意な差が検出された。

F0 および F1 世代のオスの肝臓中のビテロゲニン濃度は 25.7 ng/L 濃度区以上では対照区と比較して有意に増加した。F0 世代の成熟個体における E2 の肝臓中ビテロゲニン濃度に対する LOEC が 25.7 ng/L であったのに対して、F1 亜成体では LOEC が 1.07 ng/L、F1 成熟個体では 3.22 ng/L となっていたが、1.07 ng/L および 3.22 ng/L 濃度区での肝臓中ビテロゲニン濃度は対照区と比較すると 10 倍程度以内であり、100 倍以上となっている 25.7 ng/L 濃度区以上ほどは顕著な影響は認められなかった。

また、F1 世代において、84.4 ng/L 濃度区の全ての個体、25.7 ng/L 濃度区の 1 個体において遺伝的オス個体から卵巢を有したメス個体へと性転換したと考えられる個体が観察された。これらの現象はいずれもエストロゲン作用によって誘導される現象であり、繁殖への顕著な影響と合わせて、E2 はメダカに対してエストロゲン作用を有することが示された。さらに、25.7 ng/L 濃度区では乳頭状小突起を有する遺伝的オス個体は確認されなかったほか、8.21 ng/L 濃度区でも有意な減少が認められたことから、エストロゲン作用と合わせて抗アンドロゲン作用も生じている可能性が示唆される。

以上のように繁殖影響、オスの乳頭状小突起や肝臓中ビテロゲニン濃度いずれも F0 世代よりも F1 世代での LOEC は低くなる傾向があり、母体から胚への移行ならびに胚から性成熟までの間のばく露によって E2 のエストロゲンないし抗アンドロゲン作用による影響が増強される恐れがあることや、経世代の影響も懸念される。

表 30 E2 の MEOGRT 試験結果まとめ（各世代各エンドポイントの LOEC）

エンドポイント		F0	F1		F2
		成体	胚～亜成体	成体	胚
ふ化率			↓ 84.4		>8.21
ふ化日数			>84.4		>8.21
生存率 (2 wpf)			↓ 84.4		>8.21
生存率 (4 wpf)			>84.4		
齢		13-16 wpf	9 wpf	12-15 wpf	
生存率	Male	>84.4	>84.4	>84.4	
	Female	>84.4		>84.4	
総産卵数		>84.4		↓ 25.7	
受精卵数		>84.4		↓ 25.7	
受精率		↓ 25.7		↓ 8.21	
全長	Male	>84.4	↑ 8.21	↑ 8.21	
	Female	>84.4	↓ 84.4	↓ 25.7	
湿重量	Male	>84.4	↑ 25.7	↑ 25.7	
	Female	↓ 84.4	↓ 25.7	↓ 8.21	
肝臓体指数	Male	>84.4	↑ 25.7	↑ 8.21	
	Female	>84.4	>84.4	↓ 25.7	
生殖腺体指数	Male	>84.4	↑ 84.4	NA	
	Female	>84.4	(↓) 84.4 ²	NA	
ビテロゲニン	Male	↑ 25.7	↑ 1.07	↑ 3.22	
	Female	↑ 25.7	↑ 3.22	↓ 84.4	
二次性徴 (尻びれ 乳頭状小突起)	Male	>84.4	↓ 25.7	↓ 8.21	
	Female	NA	NA	NA	
表現型性別と生殖腺形態 ¹		>84.4	↑ 84.4 ³	↑ 25.7	

¹: 遺伝的性別と表現型性別・生殖腺形態が不一致, ²: Dunnett 検定による, ³: 遺伝的オスが外見・生殖腺メス化(卵巣)

E2 は、エストロン (E1) とならび、最もよく知られる天然女性ホルモンであり、EXTEND2016 において実施されたメダカ ERα レポータージーンアッセイでは、基準の陽性対照物質（相対活性比の基準であり、100%）となっている。過年度に MEOGRT 試験が実施⁸⁾された人工女性ホルモン・経口避妊薬である EE2 の相対活性比は 320%であり⁹⁾、E2 は EE2 よりやや活性は低い。

その一方で、既に MEOGRT の試験が実施されている天然女性ホルモンの E1 の 4.3%¹⁰⁾に比べると 20 倍を超えるかなり高い値である。これらの 3 物質については、内分泌かく乱作用に関する多くの試験が実施されていることから、これまでの、昨年度報告書¹¹⁾で取りまとめた情報について、本試験の結果と合わせて表 31 に再掲する。

表 31 17β-エストラジオール、17α-エチニルエストラジオールおよびエストロンについて、これまで実施されてきた内分泌かく乱作用に関する試験結果のまとめ⁸⁻¹⁴⁾

	17β-エストラジオール (E2)	17α-エチニルエストラジオール (EE2)	エストロン (E1)
メダカ ERα レポーター ジーンアッセイ (17β-エストラジオールに対する相対活性比)	100%	320%	4.3%
TG229 試験結果の繁殖の LOEC	115 ng/L	84.9 ng/L (産卵数)、 424 ng/L (受精卵数、 受精率)	1009 ng/L
MEOGRT もしくはフルライフサイクル試験の LOEC	MEOGRT 試験： 8.21 ng/L (F1 受精) 25.7 ng/L (F1 産卵) フルライフサイクル試験：28 ng/L (成魚の産卵) 8.7 ng/L (受精) 多世代試験： 28 ng/L (F1 世代の繁殖・受精)	MEOGRT 試験： 7.48 ng/L (F1 繁殖) フルライフサイクル試験：9.3 ng/L (成魚の産卵・受精)	MEOGRT 試験： 284 ng/L (F1 繁殖) (89.1 ng/L でも F1 繁殖の低下あり)

過年度、E1 について、EXTEND2016 では第一段階生物試験とされる魚類短期繁殖毒性試験 (FSTRA, OECD TG229) を国立環境研究所で実施した結果¹²⁾では、総産卵数、受精卵数、受精率などに対する最小無影響濃度は 1009 ng/L であった。その結果をもとに平成 29～30 年度に同じく国立環境研究所で実施した MEOGRT 試験の結果¹³⁾では、最高濃度の 284 ng/L (400 ng/L) で F1 世代の総産卵数、受精卵数および受精率に有意な低下が確認されるなど、最小影響濃度 (LOEC) であったほか、その 1 つ下の 89.1 ng/L (設定 125 ng/L) では有意差はないものの、総産卵数・受精卵数の低下が確認された。また、垂成体のオスの肝臓中ビテロゲニン濃度は 8.54 ng/L (設定 12.5 ng/L) で有意な高値が確認されている。

EE2 については、平成 23 年度にいで株式会社において OECD TG229 が実施されており、総産卵数の LOEC が 84.9 ng/L、受精卵数と受精率の LOEC は 424 ng/L であったと報告されている。国立環境研究所においては、平成 14 年度にフルライフサイクル試験が 0.99、3.1、9.3、30、94 ng/L の 5 濃度区で実施され、成魚の産卵および受精の有意な低下を引き起こす LOEC が 9.3 ng/L、次世代の未成魚のオスの肝臓中ビテロゲニン濃度の低下の LOEC が 0.99 ng/L と報告され

ている¹⁴⁾。これらの結果に基づき、令和元年及び2年度に国立環境研究所で実施した MEOGRT 試験⁸⁾では、0.698、2.36、7.48、24.6、75.5 ng/L の5濃度区で実施された。その結果、7.48 ng/L (設定 10 ng/L) で F1 世代の総産卵数、受精卵数および受精率に有意な低下が確認された。また、垂成体のオスの肝臓中ビテロゲニン濃度は 2.36 ng/L (設定 3.2 ng/L) で有意な高値が確認されている。

E2 については、平成 26 年度にいであ株式会社において OECD TG229 が実施されており、総産卵数、受精卵数と受精率の LOEC は 535 ng/L であったと報告されている¹⁵⁾。また、化学物質評価研究機構において平成 14 年度にフルライフサイクル試験が 0.94、2.9、8.7、28、92 ng/L の5濃度区で実施され、成魚の産卵の有意な低下を引き起こす LOEC は 28 ng/L、成魚の受精に有意な低下を引き起こす LOEC は 8.7 ng/L、次世代の未成魚のオスの肝臓中ビテロゲニン濃度の低下の LOEC は 8.7 ng/L 超と報告されている¹⁶⁾。また、同機構では平成 19 年度に MEOGRT 試験の前身であるメダカ多世代試験 (MMT) が 0.92、2.8、8.9、28、84 ng/L の5濃度区で実施されており、F1 世代の繁殖および受精ならびに垂成体のオスの肝臓中ビテロゲニン濃度上昇の LOEC は 28 ng/L と報告されている¹⁷⁾。本業務における MEOGRT 試験では、1.07、3.22、8.21、25.7、84.4 ng/L の5濃度区で実施した。その結果の LOEC である 8.21 ng/L (F1 の受精率) および 25.7 ng/L (F1 の総産卵数・受精卵数) は、上記の MMT の結果とほぼ近似していた。

E2 と EE2、E1 を比較した際には、いずれも比較的強い女性ホルモン作用を有するものの、繁殖への影響は E2 および EE2 は E1 と比較すると 10 倍を大きく上回って (LOEC は 1/10 を下回って) いてその作用はかなり強いが、ほぼ同じ濃度区で実施した E2 と EE2 の MEOGRT 結果を比較すると、EE2 の方が E2 よりもやや低い濃度で影響が認められる傾向があり、レポーター遺伝子アッセイの結果とほぼ一致している。一方で、オスの肝臓中ビテロゲニン濃度の上昇の LOEC は、同じ MEOGRT 試験であっても、EE2 は繁殖の LOEC よりも高く、E1 と E2 は逆にかなり低い。オスの二次性徴への影響では、EE2 と E2 は繁殖の LOEC よりも低く、E1 は同程度であることから、作用メカニズム (魚体への取り込みや代謝などを含む) は少し異なり、EE2 と E2 にはエストロゲン作用と同程度かそれ以上の抗アンドロゲン作用も有している可能性がある。また、EE2 の活性が E2 に比べてやや高いことは、魚体への取り込まれやすさも関連していることが示唆されるが、疎水性の指標である $\log K_{ow}$ の値は、逆に E2 が 4.01、EE2 が 3.67 と E2 の方が 2 倍程度 ($\log$ で 0.34 の差なので $10^{0.34}=2.2$ 倍の違い) 高いので、説明するのは難しい。なお、現在、OECD に提案中の幼若メダカ抗アンドロゲンスクリーニング試験 (Juvenile Medaka Anti-androgen Screening Assay: JMASA) の検証の対象物質として、E1 に加え E2 と EE2 でも検証を実施することも、E2 や EE2 の作用点の理解を深めるためにも有効となる可能性がある。

5. MEOGRT の円滑な実施に向けた指導、支援等

「令和 3 年度及び令和 4 年度化学物質の内分泌かく乱作用に関する第二段階生物試験（プロピルパラベン）」を実施する機関である三菱ケミカルリサーチに対し、昨年度に引き続き、対面および Web 会議で、試験濃度設定、ならびに試験実施上の課題に関する相談、試験結果の整理・解釈の方法等について技術的な指導、支援等を行った。

● 対面による試験結果の整理に関する指導・支援

打合せの日時：2022 年 5 月 24 日（火）15 時 00 分～17 時 00 分

請負者出席： 山本裕史、渡部春奈、山岸隆博

内容： プロピルパラベンの予備試験や過去に実施された TG229 の結果を受けて、実施機関から提案のあった設定濃度 0.2、0.08、0.032、0.013、0.0052（公比 2.5）mg/L について、環境省および他の専門家などと協議して、1.0、0.32、0.1、0.032、0.01（公比 3.2）mg/L とするよう指導した。また、過去の試験結果において課題のあった F0 開始時の成熟度、F1 の仔魚期の取扱い、F1 ペアリングなどの内容について助言を行った。

● Web 会議による試験結果の整理に関する指導・支援

打合せの日時：2023 年 3 月 1 日（水）17 時 00 分～18 時 40 分

請負者出席： 山本裕史、渡部春奈、山岸隆博

内容： プロピルパラベンの MEOGRT 試験の結果の取りまとめをレビューし、結果の提示方法や統計手法について助言を行った。

6. 化学物質の内分泌かく乱作用に関連する委員会への報告

本業務について報告を行うため、環境省が別途開催する「化学物質の内分泌かく乱作用に関する検討会」に提出するための資料を作成し提出の上、同検討会に出席し、資料に関する説明、質疑応答を行った。

令和 4 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

- ・ 日 時： 2023 年 3 月 8 日（水）9 時 30 分～12 時 00 分
- ・ 場 所： 新型コロナウイルス感染症対策を目的にして Web 会議で実施
- ・ 請負者出席： 山本裕史

7. MEOGRT 実施に係る留意事項等の抽出

本業務における MEOGRT 試験、ならびに上記の 5 章で実施した「令和 3 年度及び令和 4 年度化学物質の内分泌かく乱作用に関する第二段階生物試験（プロピルパラベン）」を実施する機関に対する指導、支援等、そして 6 章の検討班会議等での専門家意見などに基づき、MEOGRT 実施において問題となる可能性のある以下の事項を抽出し、一部はその改善のための手法を提案する。

● MEOGRT の濃度設定についての課題

プロピルパラベンの MEOGRT 試験を実施した機関では、予備試験や過去の OECD TG229 の結果を総合的に考え、ビテログニン濃度の LOEC を取得するために 0.2、0.08、0.032、0.013、0.0052（公比 2.5）mg/L という TG229 の濃度設定を大きく下回る設定濃度の提案があった。しかしながら、MEOGRT の目的は必ずしもビテログニン濃度の LOEC を取得する事だけではなく、有害性のエンドポイントとしてリスク評価などに利用可能な F1 世代の繁殖への影響の LOEC を取得することである。その助言に従い、1.0、0.32、0.1、0.032、0.01（公比 3.2）mg/L で実施したところ、LOEC は最高濃度区となったことから、この判断は的確であったといえる。今後も、MEOGRT 試験の実施時は、同様の観点から設定濃度を決定することを提案する。

● F0 および F1 採卵時の成体の成熟度

プロピルパラベンおよび過去の同機関で実施した MEOGRT 試験では、F0 および F1 成体の採卵時には、対照区で採卵の 3 週間の間に産卵数が増加する傾向が認められる。この傾向が生じる原因として採卵開始前の成熟度が不十分であることが考えられ、産卵数が十分でないことは検出力の低下につながることから、今後の試験では特に対照区の十分な成熟度や産卵数の確認を行うなど、留意する必要がある。

● F1 ペアリング前（遺伝的性別判定時）の仮置き

MEOGRT の F1 世代のペアリング前に、遺伝的性別を性決定遺伝子 DMY の測定結果に基づいて行うが、その判定の待ち時間が 2～3 日程度生じる。OECD TG240³⁾のパラグラフ 42 には、

42. The information on genotypic sex is used to establish XX-XY breeding pairs regardless of external phenotype which may be altered by exposure to a test chemical. On the day after the genotypic sex of each fish is determined, **two XX fish and two XY fish from each replicate are randomly selected and two XX-XY breeding pairs are established. If a replicate does not have either two XX or two XY fish, appropriate fish should be obtained from other replicates within the treatment.** The priority is to have the recommended number of replicate breeding pairs (12) in each treatment and in the controls (24). Fish with obvious abnormalities (swim bladder problems, spinal deformities, extreme size variations, etc.) would be precluded when establishing breeding pairs. During the reproductive phase for F1 each replicate tank should contain only one breeding pair.

との記述があり、XX を 2 個体、XY を 2 個体ずつ、各連でランダムに選び 2 ペアを作成し、その後もし DMY 判定によって XX と XY が 2 個体以上いない場合、他の連から追加することが記載されている。それに対して、ANNEX 7 の Figure 1 (図 15) では、Subadult の 12 個体×6 連について個別に DMY 判定し、XX と XY を 12 個体ずつプールし、その後 12 ペアを作成するようにも読める。実際のところ、これまでは DMY による遺伝的オス・メスの判別まで、表現型オスと表現型メスを 2 ペアずつ仮置きし、その後に DMY 判定結果に間違いが生じた場合、差し替えを行っていた。この手法について、USEPA の専門家や行政官と詳細な打合せを行い、現在の日本側の手法について、記述の改訂をすることなく読み込むことができることを確認できた。

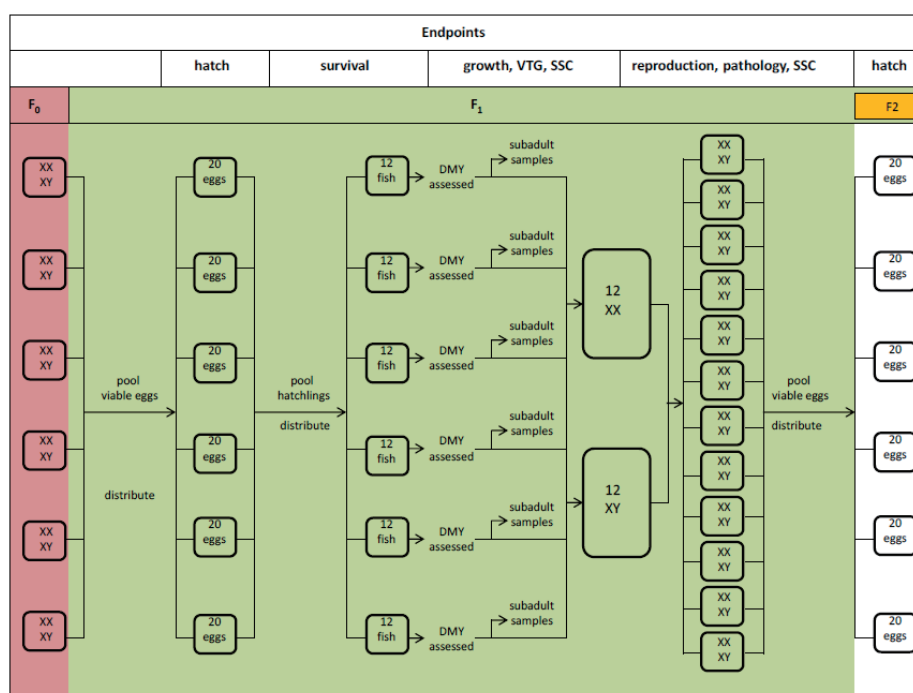


Figure 1. Pooling and repopulating replicates throughout the MEOGRT. The figure represents one treatment or ½ of a control. Due to pooling, replicate identity is not continuous throughout the test. Note that the term ‘eggs’ refers to viable, fertilized eggs (equivalent to embryos).

図 15 TG240 の ANNEX7 の Figure 1 に示されている各連のプールの概念図³⁾

● ビテロゲニン濃度の定量下限値の取扱い

肝臓中ビテロゲニン濃度の定量下限値の取扱いについて、国立環境研究所とプロピルパラベンの MEOGRT 試験を実施した機関とで異なることが、専門家会合で指摘された。低濃度域の定量下限値の算出方法にも違いがあることから、この点については今後、専門家を交えながらコンセンサスを得て、一貫性のある取扱いを進める必要がある。

● 遺伝的性別判定の不確実性

プロピルパラベンの MEOGRT 試験など、いくつかの遺伝的性別判定後にペアリングを実施し

て、産卵数を計測する試験では、特に期間が厳密に決まっている F1 世代での成長がやや遅れることで外見的オス・メスの判定に誤りが生じるほか、性決定遺伝子 DMY の PCR 後の判定でバンドが不鮮明であり、遺伝的性別にも誤りが生じたことから、性別の誤判定が採卵時や解剖時に発見された例が散見された。特に F1 の成長・成熟に十分に配慮して給餌を行うことはもちろんのこと、専門家会合では、現在 TG240 に記載しているプライマー PG17.5 (CCG GGT GCC CAA GTG CTC CCG CTG) および PG17.6 (GAT CGT CCC TCC ACA GAG AAG AGA) が不適切であり、別のプライマーを利用する方が感度良く検出できる可能性が指摘された。今後、この別のプライマーないし、電気泳動手法を改良・検証し、誤りを防止する必要がある。

8. 参考文献

- 1) OECD (2018) Revised Guidance Document 150 on Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption, OECD Series on Testing and Assessment, OECD Publishing, Paris. (<https://doi.org/10.1787/9789264304741-en>) (最終チェック日 2023 年 2 月 23 日)
- 2) 国立環境研究所 (2013) 平成 24 年度化学物質の内分泌かく乱作用に関する試験法開発に係る業務報告書
- 3) OECD (2015) Guideline for the Testing of Chemicals No. 240, Medaka Extended One Generation Reproduction Test (MEOGRT)
- 4) 環境省 (2022) 化学物質の内分泌かく乱作用に関する今後の対応 — EXTEND 2022 — (<https://www.env.go.jp/content/000114063.pdf>) (最終チェック日 2023 年 3 月 2 日)
- 5) PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/estradiol>、最終チェック日 2023 年 3 月 2 日)
- 6) Flynn K, Lothenbach D, Whiteman F, Hammermeister D, Touart LW, Swintek J, Tatarazako N, Onishi Y, Iguchi T and Johnson R, 2017. Summary of the development the US Environmental Protection Agency's Medaka Extended One Generation Reproduction Test (MEOGRT) using data from 9 multigenerational medaka tests. Environ Toxicol Chem. doi:10.1002/etc.3923.
- 7) Swintek J, Flynn K, Haselman J. Package 'StatCharrms'. Available from: <https://cran.r-project.org/src/contrib/Archive/StatCharrms/> (最終チェック日 2023 年 3 月 2 日)
- 8) 国立環境研究所 (2021) 令和元・2 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 (17 α -エチニルエストラジオール) 業務報告書 (令和 2 年度分)
- 9) 環境省 (2018) 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)、平成 29 年度第 2 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.
- 10) 環境省 (2020) エストロンを対象としてこれまでに実施した第 1 段階生物試験結果及び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結果、令和元年度第 2 回化学物質の

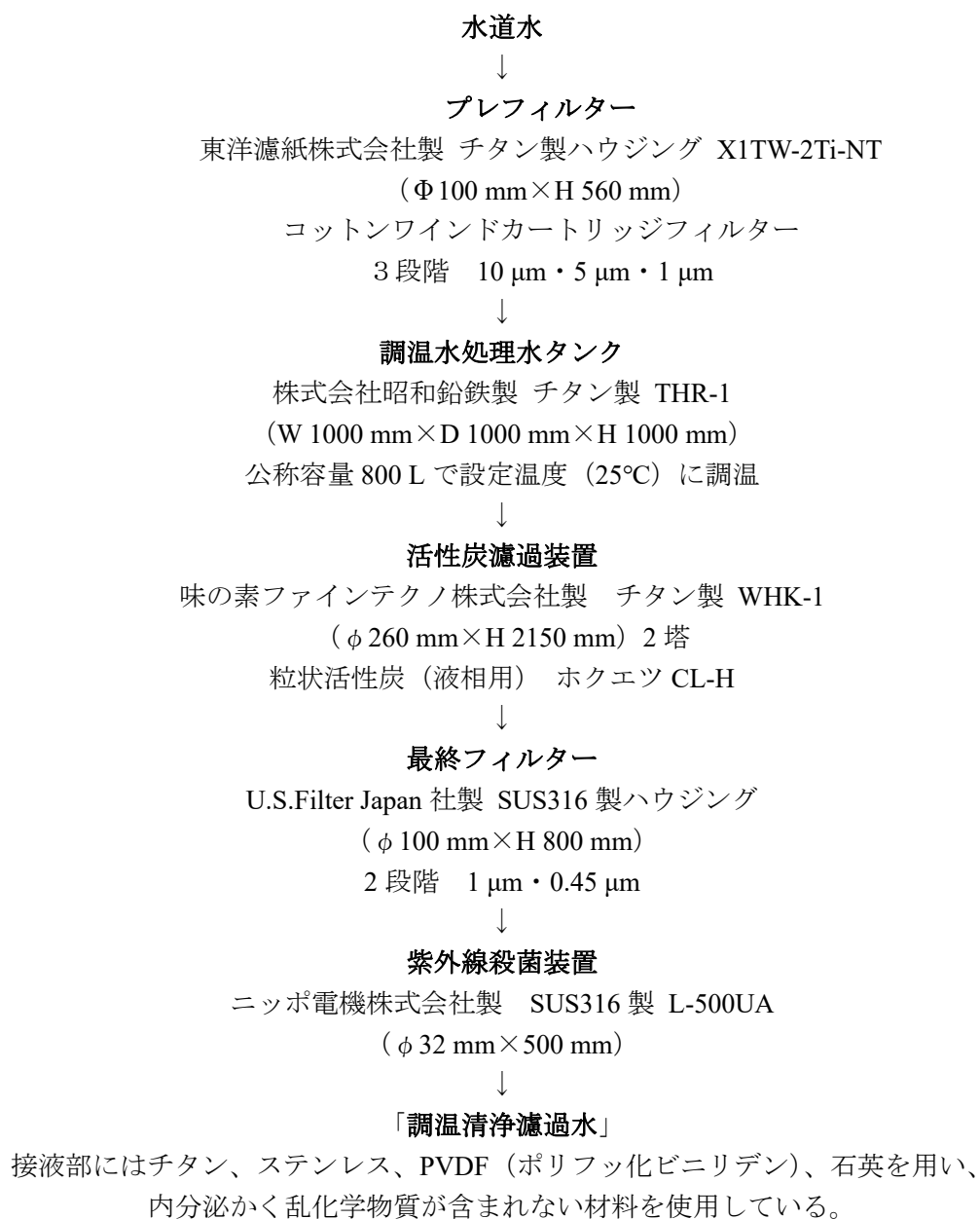
内分泌かく乱作用に関する検討会参考資料 3－3.

- 11) 国立環境研究所 (2022) 令和 3 年及び 4 年度化学物質の内分泌かく乱作用に関する第二段階生物試験 (17 β -エストラジオール) 業務報告書 (令和 3 年度分)
- 12) 国立環境研究所 (2012) 平成 23 年度化学物質の内分泌かく乱作用に関する試験法開発に係る業務報告書
- 13) 国立環境研究所 (2019) 平成 29・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 (エストロン) 業務報告書 (平成 30 年度分)
- 14) いであ株式会社 (2014) 平成 25 年度化学物質の内分泌かく乱作用に関する日英・日米二国間協力及び OECD 等への国際協力推進に係る業務報告書
- 15) Onishi Y, Tatarazako N, Koshio M, Okamura T, Watanabe H, Sawai A, Yamamoto J, Ishikawa H, Sato T, Kawashima Y, Yamazaki K, Iguchi T, 2021. Summary of reference chemicals evaluated by the fish short-term reproduction assay, OECD TG229, using Japanese Medaka, *Oryzias latipes*, J Appl Toxicol, 41, 1200-1221.
- 16) Seki M, Yokota H, Maeda M, Kobayashi K, 2009: Fish full life-cycle testing for 17 β -estradiol on medaka (*Oryzias latipes*), Environ Toxicol Chem, 24, 1259-1266.
- 17) OECD, 2013. Validation of the Medaka Multigeneration Test: Integrated Summary Report, (<https://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/MMT-Integrated-Summary-Report.pdf>、2023 年 3 月 12 日閲覧)

付属資料 調温清浄ろ過水について

本業務で魚類の飼育及び試験用水に用いた調温清浄ろ過水は、以下に示す淡水処理装置によって上水（水道水）を処理することで生成した。エアレーションには、フィルターユニットを通した清浄空気を用いた。

淡水処理装置の概要



フィルターユニットの概要

近藤工業株式会社製 SUS-304 製
(W 400 mm×L 1100 mm×H 500 mm)

活性炭パネル

(305 mm×305 mm×t25 mm)



アルカリ系ケミカルフィルター

(305 mm×305 mm×t55 mm)



硫黄系ケミカルフィルター

(305 mm×305 mm×t55 mm)



有機系ケミカルフィルター

(305 mm×305 mm×t55 mm)



ULPA フィルター

(305 mm×305 mm×t55 mm)

集塵能力 99.9997%以上



「清浄空気」

使用部材はステンレスを用い、内分泌かく乱化学物質が含まれない
材料を使用している。

分析結果報告書

国立研究開発法人国立環境研究所 様

水質分析

受付年月日 2023/01/10

報告年月日 2023/01/27

株式会社 環境研究センター
〒305-0857 茨城県つくば市成3番地1
TEL: 029 (839) 5511 FAX: 029 (839) 5527
計量証明事業登録 茨城県第25号
環境計量士 高橋 徹

試料名称	リスク棟 飼育水	天 候	晴
採取場所		気温 (°C)	18.0
採取日時	2023/01/10 10:05	水温 (°C)	25.9
採取者	株式会社環境研究センター 杉山 佳寿子	透視度	50以上

御依頼のありました試料について分析した結果を下記の通り報告いたします。

検体番号 22100092 (1/3)

分析項目	分析結果	単位	分析方法
1 一般細菌	0	CFU/ml	標準寒天培地法
2 大腸菌	不検出	-	特定酵素基質培地法
3 カドミウム及びその化合物	< 0.0003	mg/l	平成15年厚生労働省告示第261号
4 水銀及びその化合物	< 0.00005	mg/l	平成15年厚生労働省告示第261号
5 セレン及びその化合物	< 0.001	mg/l	平成15年厚生労働省告示第261号
6 鉛及びその化合物	< 0.001	mg/l	平成15年厚生労働省告示第261号
7 ヒ素及びその化合物	< 0.001	mg/l	平成15年厚生労働省告示第261号
8 六価クロム化合物	< 0.005	mg/l	平成15年厚生労働省告示第261号
9 亜硝酸態窒素	< 0.01	mg/l	平成15年厚生労働省告示第261号
10 シアン化物イオン及び塩化シア ン	< 0.001	mg/l	平成15年厚生労働省告示第261号
11 硝酸態窒素及び亜硝酸態窒素	0.07	mg/l	平成15年厚生労働省告示第261号
12 フッ素及びその化合物	0.09	mg/l	平成15年厚生労働省告示第261号
13 ホウ素及びその化合物	< 0.1	mg/l	平成15年厚生労働省告示第261号
14 四塩化炭素	< 0.0002	mg/l	平成15年厚生労働省告示第261号
15 1,4-ジオキサン	< 0.005	mg/l	平成15年厚生労働省告示第261号
16 シス-1,2-ジクロロエチレン及 びトランス-1,2-ジクロロエチ レン	< 0.001	mg/l	平成15年厚生労働省告示第261号
17 ジクロロメタン	< 0.001	mg/l	平成15年厚生労働省告示第261号
18 テトラクロロエチレン	< 0.001	mg/l	平成15年厚生労働省告示第261号
19 トリクロロエチレン	< 0.001	mg/l	平成15年厚生労働省告示第261号
20 ベンゼン	< 0.001	mg/l	平成15年厚生労働省告示第261号

備考

<は定量下限値未満を示す。

総トリハロメタン、クロホルム、ジブ、トリクロロメタン、ブ、テトラクロロメタン、及びブ、クロホルムのそれぞれの濃度の総和

分析項目	分析結果	単位	分析方法
21 塩素酸	0.07	mg/l	平成15年厚生労働省告示第261号
22 クロロ酢酸	< 0.002	mg/l	平成15年厚生労働省告示第261号
23 クロロホルム	< 0.001	mg/l	平成15年厚生労働省告示第261号
24 ジクロロ酢酸	< 0.003	mg/l	平成15年厚生労働省告示第261号
25 ジブロモクロロメタン	< 0.001	mg/l	平成15年厚生労働省告示第261号
26 臭素酸	< 0.001	mg/l	平成15年厚生労働省告示第261号
27 総トリハロメタン	< 0.001	mg/l	平成15年厚生労働省告示第261号
28 トリクロロ酢酸	< 0.003	mg/l	平成15年厚生労働省告示第261号
29 ブロモジクロロメタン	< 0.001	mg/l	平成15年厚生労働省告示第261号
30 ブロモホルム	< 0.001	mg/l	平成15年厚生労働省告示第261号
31 ホルムアルデヒド	< 0.008	mg/l	平成15年厚生労働省告示第261号
32 亜鉛及びその化合物	< 0.005	mg/l	平成15年厚生労働省告示第261号
33 アルミニウム及びその化合物	< 0.01	mg/l	平成15年厚生労働省告示第261号
34 鉄及びその化合物	< 0.03	mg/l	平成15年厚生労働省告示第261号
35 銅及びその化合物	< 0.01	mg/l	平成15年厚生労働省告示第261号
36 ナトリウム及びその化合物	29	mg/l	平成15年厚生労働省告示第261号
37 マンガン及びその化合物	< 0.005	mg/l	平成15年厚生労働省告示第261号
38 塩化物イオン	42	mg/l	平成15年厚生労働省告示第261号
39 カルシウム、マグネシウム等 (硬度)	79	mg/l	平成15年厚生労働省告示第261号
40 蒸発残留物	170	mg/l	平成15年厚生労働省告示第261号
41 陰イオン界面活性剤	< 0.02	mg/l	平成15年厚生労働省告示第261号
42 ジェオスミン	< 0.000001	mg/l	平成15年厚生労働省告示第261号
43 2-メチルイソボルネオール	< 0.000001	mg/l	平成15年厚生労働省告示第261号
44 非イオン界面活性剤	< 0.002	mg/l	平成15年厚生労働省告示第261号
45 フェノール類	< 0.0005	mg/l	平成15年厚生労働省告示第261号
46 有機物 (全有機炭素量)	1.0	mg/l	平成15年厚生労働省告示第261号
47 pH値	7.8	-	平成15年厚生労働省告示第261号
48 臭気	異常なし	-	平成15年厚生労働省告示第261号
49 色度	< 0.5	度	平成15年厚生労働省告示第261号
50 濁度	< 0.1	度	平成15年厚生労働省告示第261号
51 化学的酸素要求量	1.3	mg/l	JIS K 0102-1 17.2
52 電気伝導率	27	mS/m	JIS K 0102-1 13
53 酸消費量 (pH4.8)	52	mgCaCO ₃ /l	JIS K 0102-1 15.2
54 ニッケル	< 0.01	mg/l	JIS K 0102 59.3

備考

<は定量下限値未満を示す。

総トリハロメタン クロホルム ジブロモクロロメタン ブロモジクロロメタン 及びブロモホルムのそれぞれの濃度の総和

				検体番号	22100092	(3/3)
分析項目		分析結果	単位	分析方法		
55	残留塩素	< 0.01	mg/l	JIS K 0102-1 23.2		
—以下余白—						

備考

<は定量下限値未満を示す。

総トリハロメタン、クロロホルム、ジブクロロメタン、ブクロロメタン及びブクロホルムのそれぞれの濃度の総和

担当者

山本 裕史	山岸 隆博
渡部 春奈	小塩 正朗
飯田 和之	八木 文乃
新宅 洋子	高橋 裕子
横山真紀子	

令和 3 年度及び令和 4 年度

化学物質の内分泌かく乱作用に関する第二段階生物試験（ 17β -エストラジオール）
業務実施等報告書（令和 4 年度分）

国立研究開発法人国立環境研究所 環境リスク・健康領域

〒305-8506 つくば市小野川 16-2 TEL 029-850-2754 FAX 029-850-2870

無断複写・転載を禁じます。この印刷物は、古紙パルプ配合率 70%以上・白色度 70%程度
の印刷用紙を使用しています。Printed on recycled paper

リサイクル適性の表示：印刷用の紙にリサイクルできます

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