

## 第1段階生物試験(魚類短期繁殖試験:2,4-ジクロロフェノール) の結果について(案)

株式会社三菱ケミカルリサーチ

### 1. 実施内容

本業務は、EXTEND2022 において採用してい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なデータを集積するため、既に行わ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(2,4-ジクロロフェノール)について、OECD テストガイドライン(OECD Guideline for the testing of chemicals No.229: Fish Short Term Reproduction Assay、2012年10月2日採択)<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。

### 2. 2,4-ジクロロフェノールの魚類短期繁殖試験

#### 2.1 材料および方法

##### 2.1.1 被験物質

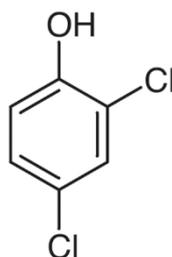
使用した被験物質は、東京化成工業株式会社(Lot番号:TX66J、純度:99.4%)より入手した。名称、物理化学的性状等を以下に示す。

CAS登録番号: CAS: 120-83-2

和名: 2,4-ジクロロフェノール

英名: 2,4-Dichlorophenol

構造式:



分子式: C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>Cl<sub>2</sub>O

分子量: 163.00

対水溶解度: 4.5 × 10<sup>3</sup> mg/L (25°C)<sup>2)</sup>

外観: 白色結晶

比重: 1.38 (60°C/25°C)<sup>2)</sup>

## 2.1.2 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：国立研究開発法人国立環境研究所）

### (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（29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、各容器の産出卵を全て採取し、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： $25 \pm 2^\circ\text{C}$

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 8 回（少なくとも週 2 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 24 回／日、流量 30 mL/min）

ばく露期間：21 日間（2023 年 1 月 11 日～2023 年 2 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 100、320、1000  $\mu\text{g/L}$ （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  $\pm$  2 週齢（本試験では 18 週齢）

供試魚体重：オス 0.246  $\pm$  0.012 g、メス 0.485  $\pm$  0.072 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  $\pm$  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 3 回給餌した。

#### (4) 環境測定機器

水温、pH、溶存酸素濃度、硬度およびアルカリ度の測定は、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）

アルカリ度測定キット：ドロップテスト WAD-AL-M 共立理化学研究所製

硬度測定キット：ポータブル全硬度測定器 HI 96735 型

ハンナ インスツルメンツ・ジャパン製

#### (5) 試験濃度

平成 29 年度検討会資料<sup>3)</sup>より、2, 4-ジクロロフェノール 30、100、300 µg/L（設定濃度）に 21 日間ばく露した成熟雌雄ゼブラフィッシュ (*Danio retio*) への影響が検討された結果として、100 µg/L 以上のばく露区で孵化率の低値、300 µg/L のばく露区で日毎産卵数の低値が認められたとの報告があった。平成 15 年度生態影響試験実施事業において実施された魚類急性毒性試験結果として、1000 µg/L のばく露区で 1 尾のみ異常遊泳（動作の緩慢）、1800 µg/L のばく露区で 4 尾で異常遊泳（動作の緩慢）が見られた。また、予備試験としてメダカに対する 9 日間繁殖試験を実施したところ、300 µg/L のばく露区で産卵数の若干の低値が見られた。

以上より、本試験の濃度設定は 100、320、1000 µg/L（公比 3.2）とした。

#### (6) 試験液の調製

被験物質を超純水に溶解し、20000、64000、200000 µg/L の原液を 3～4 日毎に調製した。それぞれの原液を流水試験装置にセットし、試験用水で希釈して各試験区の試験液を調製した。対照区は試験用水のみとした。

なお、原液は、室温（ばく露）条件下において調製後 23 日間安定であった。

## (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。ばく露開始前に流水式装置の空運転を行い、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し、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 (HPLC 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 Agilent 1100 型 (No.3), Agilent Technologies 製  
ワークステーション：ChemStation  
デガッサ：G1322A 型  
送液ポンプ：G1311A 型 (バイナリポンプ)  
オートサンプラ：G1313A 型  
カラムオーブン：G1316A 型  
ダイオードアレイ検出器 (DAD)：G1315B 型

### 条件

カラム：Agilent Eclipse Plus C18 1.8  $\mu\text{m}$  4.6 mm i.d.×50 mm  
カラムオーブン：40 °C  
溶離液：A 液：超純水、C 液：アセトニトリル  
A 液 50%、C 液 50%  
流速：1.0 mL/min  
測定波長：220 nm  
ランタイム：3.0 min  
試料注入量：250  $\mu\text{L}$

標準溶液の調製：2, 4-ジクロロフェノール 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。この溶液を超純水で順次希釈し、50.0、100、500、1000  $\mu\text{g/L}$  の標準溶液を調製した。また、超純水を 0  $\mu\text{g/L}$  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 適量採取

|

HPLC 測定

横軸に濃度 ( $\mu\text{g/L}$ ) 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、 $0 \mu\text{g/L}$  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  $50.0 \mu\text{g/L}$  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 適量採取

|

HPLC 測定

被験物質濃度の定量：

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。

## 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。ばく露期間中は全ての容器の水温、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。

### (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・トレド製 AG204 型、AB204 型、MS204TS 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、1%テトラマリンソルト溶液に保管し、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、SMZ1270i 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（エー・アンド・デイ製 GX-124A 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 肝臓を回収したビーズチューブ（セラミックビーズ径 2.8mm）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（室温、6500 rpm、10 sec）後、遠心分離（4°C、11200 rpm、10 min）する。

ホモジナイザー：エムエス機器製、RECELLYS Evolution

遠心分離機：Himac 製、微量高速遠心機 CF18R

- ③ 分離した上清をチューブに回収し、測定まで-80°C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。

マルチラベルリーダー：レビティジャパン製、NIVO

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・トレド製 AG204 型、AB204 型、MS204TS 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 StatCharms v. 0.90.95（2020 年 4 月 30 日版、R cran サイトより入手）および R-4.0.5（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）Dunnnett 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
- ・ ばく露開始前の全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100、320、1000 µg/Lに対して平均測定濃度はそれぞれ93.9、301、964 µg/Lであり、設定濃度に対して94～96%であった。なお、平均測定濃度が設定濃度の±20%以内だったため、結果は設定濃度を用いて記載する。

ばく露期間中に測定した各濃度区の被験物質濃度は全て平均測定濃度の±20%以内に維持されており、試験の有効性基準を満たした。

表2 試験液中の被験物質濃度

設定濃度 µg/L	試験液中の被験物質濃度 µg/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.	--
100	106	88.3	93.6	88.4	93.9
	(113)	(94)	(100)	(94)	[94]
320	326	317	293	270	301
	(108)	(105)	(97)	(90)	[94]
1000	1010	1040	931	884	964
	(105)	(108)	(97)	(92)	[96]

注) 「N.D.」は定量下限（50.0 µg/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、全ての試験区において25.2～26.3℃であり、 $25\pm 2$ ℃以内かつ、試験容器間の水温の変動は $\pm 1.5$ ℃未満であり、試験の有効性基準を満たした。溶存酸素は、全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 ( $\mu\text{g/L}$ )	水温 ( $^{\circ}\text{C}$ )	溶存酸素 ( $\text{mg/L}$ ) [飽和濃度に対する割合 %]	pH	硬度 ( $\text{mg CaCO}_3/\text{L}$ )	アルカリ度 ( $\text{mg CaCO}_3/\text{L}$ )
対照区	25.3 - 25.8	7.2 - 8.2 [ 90 - 102 ]	6.9 - 7.4	60 - 64	40 - 55
100	25.6 - 26.3	7.3 - 8.0 [ 91 - 101 ]	7.1 - 7.4	—	—
320	25.4 - 26.2	7.4 - 8.0 [ 93 - 100 ]	7.2 - 7.4	—	—
1000	25.2 - 26.0	7.2 - 8.0 [ 89 - 100 ]	7.2 - 7.5	57 - 62	40 - 45

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。

対照区では死亡および行動・外観の異常は認められなかった。

100 µg/L 濃度区では、ばく露開始 12 日目にメス 1 尾、18 日目にオス 1 尾の死亡が認められたが、その他の個体に行動・外観の異常は認められなかった。

320 µg/L 濃度区では、ばく露開始 12～14 日目に、1 個体に外見異常（出血）の毒性症状が認められたが、15 日目以降は毒性症状が認められなくなった。また、その他の個体に行動・外観の異常は認められなかった。

1000 µg/L 濃度区では、ばく露開始 12 日目にオス 1 尾の死亡が認められた。また、ばく露開始 1、6～10 日目に、2～3 個体に遊泳異常（不活発、表層遊泳）の毒性症状が認められたが、11 日目以降はすべての個体で毒性症状が認められなくなった。

死亡率について統計処理を実施したところ、オスメスともに有意差は検出されなかった。

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 (µg/L)	オス			メス			合計 死亡率
	供試数	死亡数	死亡率	供試数	死亡数	死亡率	
対照区	12	0	0%	12	0	0%	0%
100	12	1	8%	12	1	8%	8%
320	12	0	0%	12	0	0%	0%
1000	12	1	8%	12	0	0%	4%

対照区との有意差無し (Cochran-Amitage 検定)

## 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。結果の詳細を付表 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、対照区と比較し統計的に有意な差は認められなかった。受精率は、320 および 1000  $\mu\text{g/L}$  濃度区で対照区と比較し優位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。

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 ( $\mu\text{g/L}$ )	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 1 日 当たり平均産卵数 (eggs/day/female)
対照区	1752 $\pm$ 110	1658 $\pm$ 130	94.5 $\pm$ 2.6	27.8 $\pm$ 1.8
100	1731 $\pm$ 276	1566 $\pm$ 273	90.8 $\pm$ 3.4	28.8 $\pm$ 3.7
320	1898 $\pm$ 174	1655 $\pm$ 208	86.8 $\pm$ 3.7 **	30.1 $\pm$ 2.8
1000	1429 $\pm$ 488	1048 $\pm$ 558	66.6 $\pm$ 26.9 **	22.7 $\pm$ 7.7

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

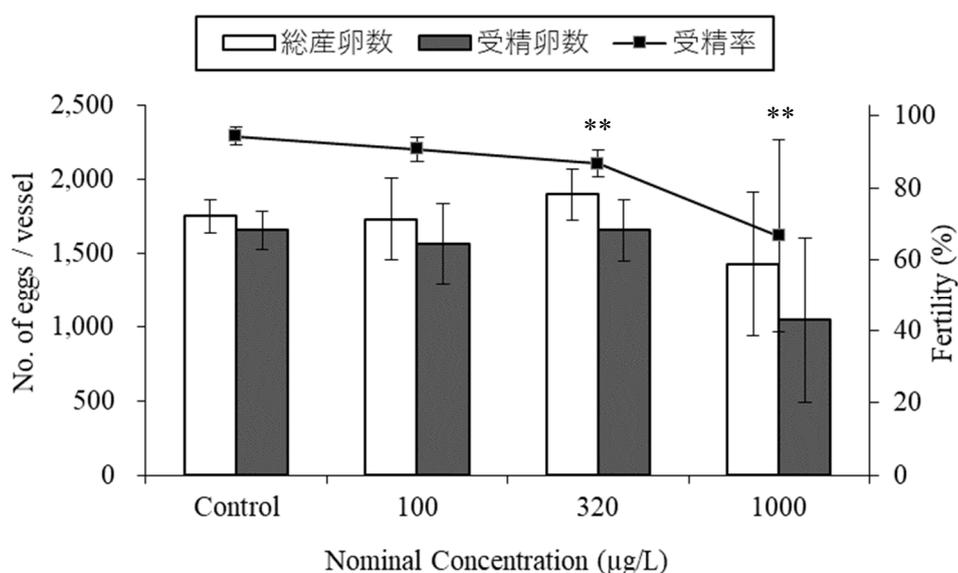


図 1 平均総産卵数・平均受精卵数・平均受精率

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

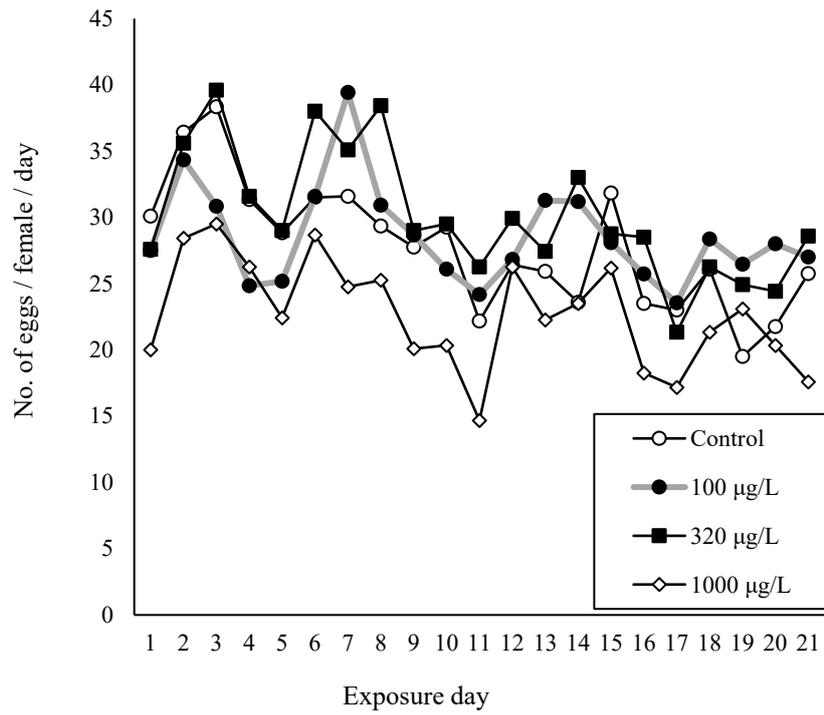


図2 ばく露期間中のメス1個体の1日当たりの平均産卵数

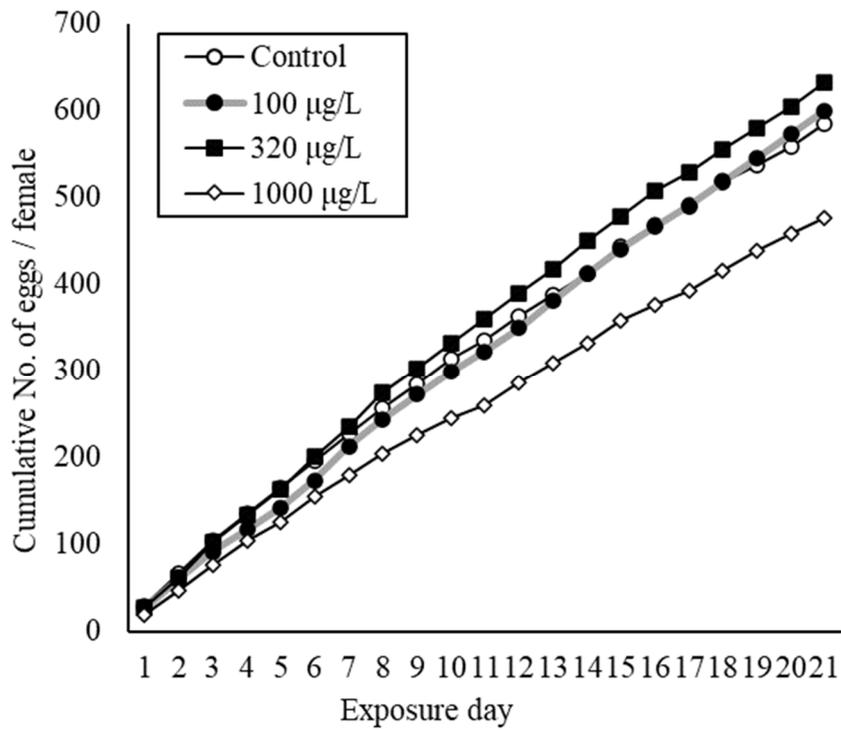


図3 ばく露期間中のメス1個体の累積産卵数

## 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。測定結果の詳細を付表 4 に示す。

全長については、オスは 1000  $\mu\text{g/L}$  濃度区で対照区と比較して有意な減少が認められた。メス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。

湿重量についても、オスは 1000  $\mu\text{g/L}$  濃度区で対照区と比較して有意な減少が認められた。メス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。

表 6 ばく露終了時の全長および湿重量

設定 濃度 ( $\mu\text{g/L}$ )	全長 (mm)		湿重量 (g)	
	オス	メス	オス	メス
対照区	30.7 $\pm$ 1.0	32.5 $\pm$ 1.4	0.304 $\pm$ 0.028	0.453 $\pm$ 0.047
100	31.3 $\pm$ 0.8	32.8 $\pm$ 0.9	0.326 $\pm$ 0.033	0.473 $\pm$ 0.054
320	30.4 $\pm$ 1.7	32.6 $\pm$ 1.1	0.299 $\pm$ 0.049	0.471 $\pm$ 0.026
1000	29.3 $\pm$ 0.9 **	33.0 $\pm$ 0.7	0.261 $\pm$ 0.019 **	0.487 $\pm$ 0.098

平均値 $\pm$ 標準偏差 (n=12、ただし 100  $\mu\text{g/L}$ 濃度区のおスメスおよび 1000  $\mu\text{g/L}$  濃度区のおスは n=11)

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

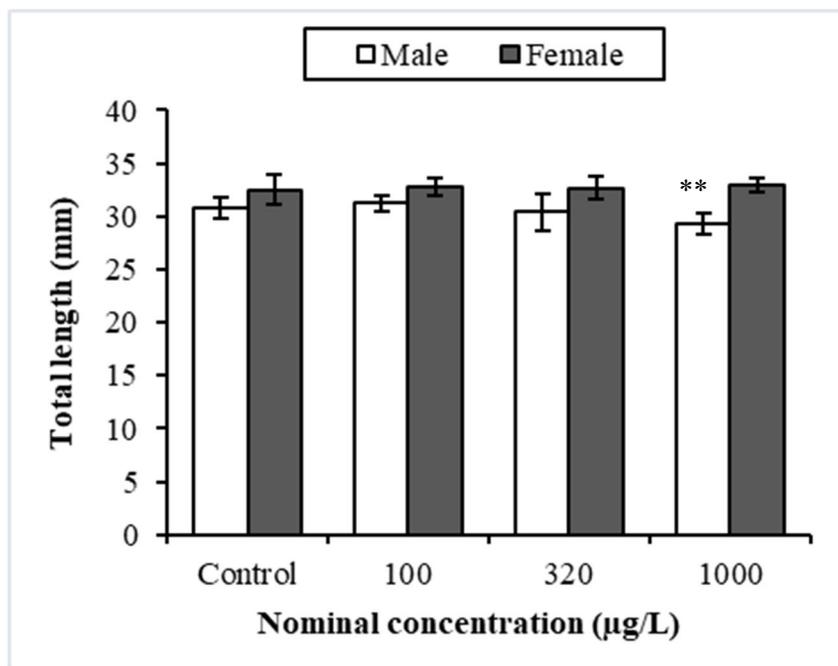


図 4 (a) ばく露終了時の全長

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

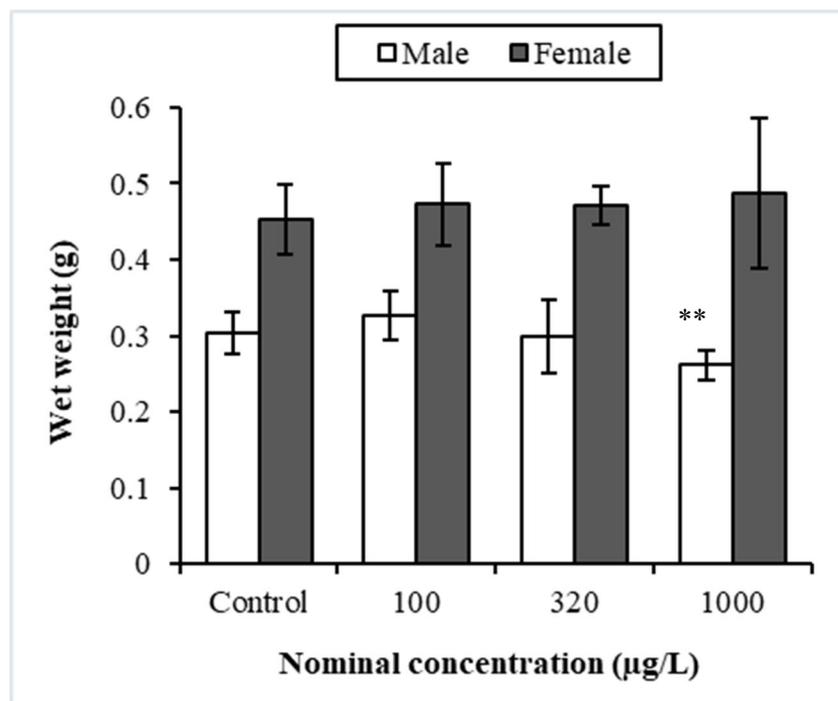


図 4 (b) ばく露終了時の湿重量

\*\* : 対照区と有意差有り (p<0.01 : 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 (HSI) および生殖腺体指数 (GSI) の測定結果を表 7、図 5 (a) および(b)に示す。測定結果の詳細を付表 4 に示す。

肝臓体指数については、オスは 1000  $\mu\text{g/L}$  濃度で対照区と比較して有意な増加が認められた。メス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。

生殖腺体指数については、オスは 1000  $\mu\text{g/L}$  濃度で対照区と比較して有意な減少が認められた。メスは 320  $\mu\text{g/L}$  以上の濃度区で有意な増加が認められた。

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 ( $\mu\text{g/L}$ )	肝臓体指数 (%)		生殖腺体指数 (%)		
	オス	メス	オス	メス	
対照区	2.49 $\pm$ 0.56	6.33 $\pm$ 1.7	0.775 $\pm$ 0.18	8.73 $\pm$ 1.3	
100	2.51 $\pm$ 0.45	6.94 $\pm$ 1.5	0.765 $\pm$ 0.29	8.76 $\pm$ 1.0	
320	2.80 $\pm$ 0.64	6.65 $\pm$ 1.4	0.691 $\pm$ 0.20	10.3 $\pm$ 1.1	**
1000	4.76 $\pm$ 1.3	6.96 $\pm$ 1.4	0.466 $\pm$ 0.26	11.6 $\pm$ 6.0	* * *

平均値 $\pm$ 標準偏差 (n=12、ただし 100  $\mu\text{g/L}$ 濃度区のオスメスおよび 1000  $\mu\text{g/L}$  濃度区のオスは n=11)、

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

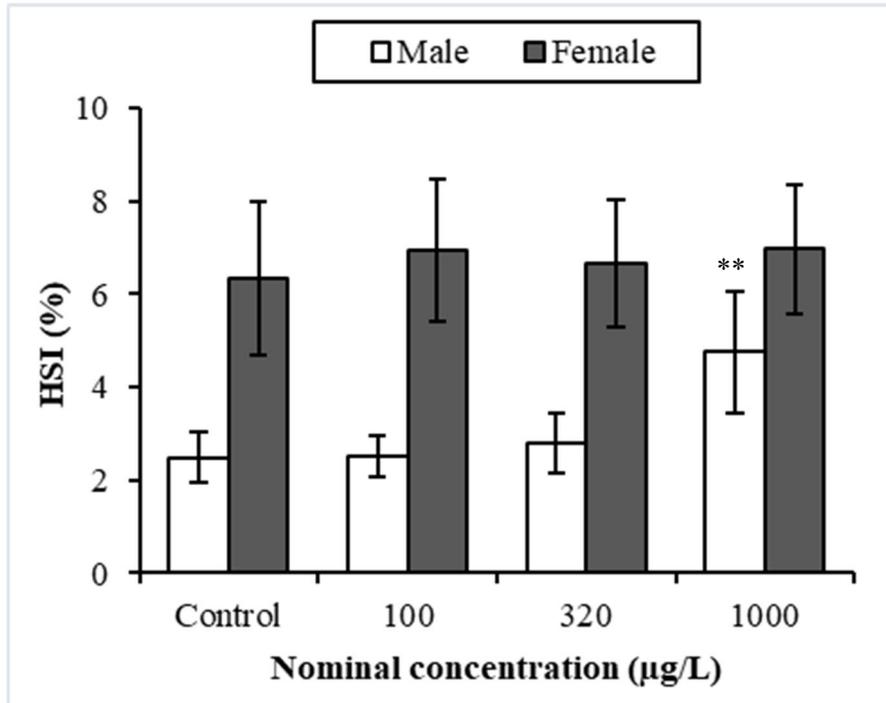


図 5(a) ばく露終了時の肝臓体指数 (HSI)

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

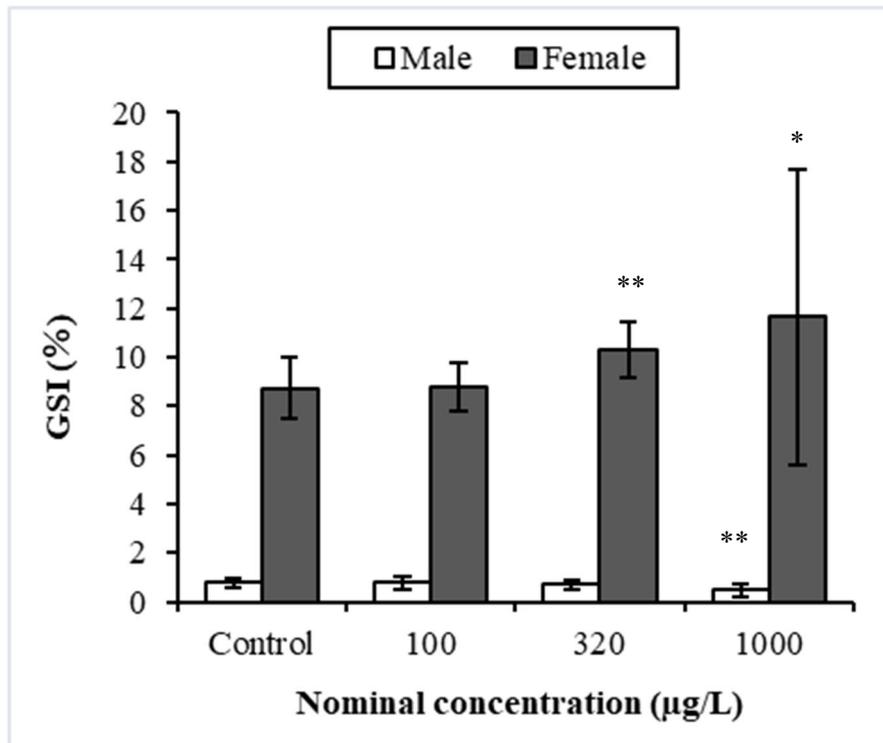


図 5(b) ばく露終了時の生殖腺体指数 (GSI)

\* or \*\* : 対照区と有意差有り (p<0.05 or p<0.01、: 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。測定結果の詳細を付表 4 に示す。

オスは 320 µg/L 以上の濃度区で平均値は定量下限未満であったが、1000 µg/L 濃度区で対照区と比較し有意な減少が認められた。対照区に認められた測定値のバラツキと、濃度相関が認められないことを考慮し、対照区との有意な減少は被験物質の生物反応に起因したものでは無いと判断した。

メスはいずれの濃度区においても対照区と比較して有意な差は認められなかった。

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 (µg/L)	肝臓中ビテロジェニン濃度 (ng/mg liver)			
	オス		メス	
対照区	2.89	± 5.95	566	± 199
100	5.32	± 9.09	738	± 375
320	<L.O.Q.		620	± 139
1000	<L.O.Q.	**	664	± 191

平均値±標準偏差(n=12、ただし 100 µg/濃度区のオスメスおよび 1000 µg/L 濃度区のオスは n=11)、  
「<L.O.Q.」は定量下限 (0.4 ng/mg) 未満であることを示す。

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

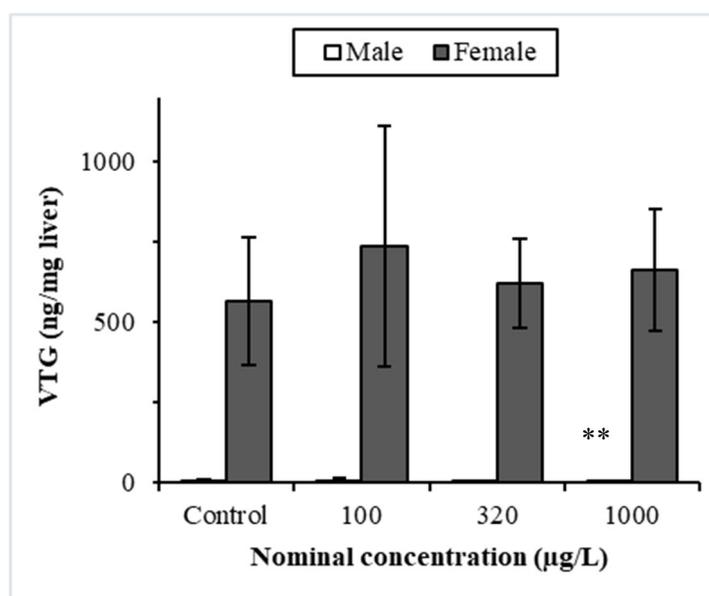


図 6 ばく露終了時の肝臓中ビテロジェニン

\*\* : 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。測定結果の詳細を付表 4 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。

表 9 ばく露終了時の二次性徴指標

設定濃度 ( $\mu\text{g/L}$ )	乳頭状小突起を有する節板数 (Plates/fish)			
	オス		メス	
対照区	79	$\pm$ 8	0	$\pm$ 0
100	78	$\pm$ 10	0	$\pm$ 0
320	84	$\pm$ 13	0	$\pm$ 0
1000	84	$\pm$ 12	0	$\pm$ 0

平均値 $\pm$ 標準偏差 (n=12、ただし 100  $\mu\text{g}$ /濃度区のおスメスおよび 1000  $\mu\text{g/L}$  濃度区のおスは n=11)

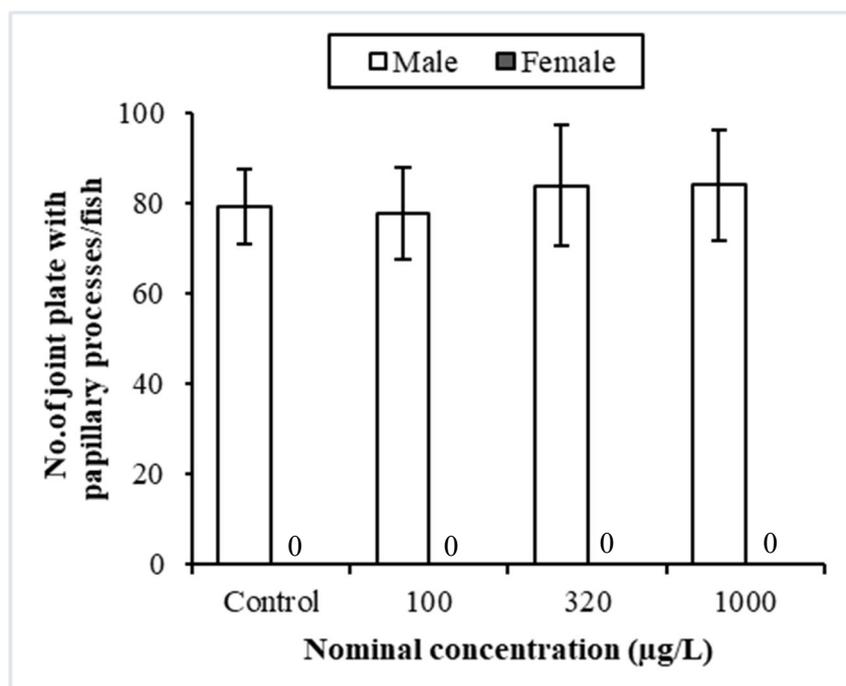


図 7 ばく露終了時の乳頭状小突起を有する節板数

## 2.3 結果の概要

本試験の各エンドポイントの LOEC および NOEC を表 10 に示す。

表 10 2, 4-ジクロロフェノールの試験結果まとめ

Endpoint		LOEC (µg/L)	NOEC (µg/L)
死亡率	オス	>1000	≥1000
	メス	>1000	≥1000
産卵数		>1000	≥1000
受精卵数		>1000	≥1000
受精率		↓ 320	100
全長	オス	↓ 1000	320
	メス	>1000	≥1000
湿重量	オス	↓ 1000	320
	メス	>1000	≥1000
肝臓体指数	オス	↑ 1000	320
	メス	>1000	≥1000
生殖腺体指数	オス	↓ 1000	320
	メス	↑ 320	100
肝臓中ビテロジェニン濃度	オス	>1000	≥1000
	メス	>1000	≥1000
二次性徴（乳頭状小突起を有する節板数）	オス	>1000	≥1000
	メス	>1000	≥1000