

環境省請負業務

令和6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(両生類変態試験、ベンゾフェノン-2)実施業務

報告書

令和7年3月

 いであ株式会社

目次

目次	i
要旨	iii
1. 背景及び目的	1
2. 業務内容	1
3. 試験実施施設	2
4. 試験物質	2
5. 材料及び方法	3
5-1. 被験物質(試薬)	3
5-2. 試験生物	3
5-3. 装置及び機器等	4
5-4. 希釈水	5
5-5. 試験濃度	5
5-6. 試験条件	6
5-7. 試験液の調製	7
5-8. 暴露操作	7
5-9. 試験物質濃度の測定	8
5-10. エンドポイント測定	8
5-11. データ解析	11
6. パフォーマンスクライテリア	12
7. 試験の有効性基準	13
8. 結果	14
8-1. 試験物質の測定濃度	14
8-2. 暴露期間中の試験環境	14
8-3. 死亡個体数及び一般症状	15
8-4. 発生段階	16
8-5. 形態に関するパラメータ(後肢長、頭胴長及び体重(湿重量))	17
8-6. 甲状腺組織	21
9. まとめ及び考察	23
9-1. 最小影響濃度(LOEC)及び最大無影響濃度(NOEC)	23
9-2. ベンゾフェノン-2 の両生類に対する内分泌かく乱作用	24
10. 化学物質の内分泌かく乱作用に関する検討会等への報告	25
11. 引用文献	25
付属資料	付資 1～16

業務名

令和6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(両生類変態試験、ベンゾフェノン-2)実施業務

要旨

本業務では、ベンゾフェノン-2 について、両生類の視床下部-下垂体-甲状腺軸(HPT軸)に対する作用の有無を確認するために、OECD テストガイドライン No.231: Amphibian Metamorphosis Assay (2009 年 9 月 7 日採択)に準拠して、両生類変態試験(AMA)を実施した。

試験物質

名 称 : ベンゾフェノン-2
化 学 名 : 2,2',4,4'-Tetrahydroxybenzophenone
CAS 登録番号: 131-55-5

試験条件

本試験では、以下の試験条件下で試験生物を試験物質に暴露した。

供試生物:	アフリカツメガエル (<i>Xenopus laevis</i>) 幼生 (Nieuwkoop and Faber (NF) stage 51)
暴露方式:	流水式
試験期間:	21 日間
試験濃度:	1.00、3.16 及び 10.0 mg/L (設定濃度) 及び対照区 (平均測定濃度: 0.916、2.84、9.55 mg/L)
試験水量:	5 L / 容器
試験水の交換率:	約 7 回 / 日
連数:	4 連 / 濃度
生物数:	20 個体 / 容器
水温:	22 ± 1 °C
照明:	12 h-L / 12 h-D
給餌:	規定量の Sera Micron® Nature を 2 回 / 日

エンドポイントの測定

暴露中は、毎日、死亡及び異常の有無を観察した。暴露 7 日後には、各水槽から試験生物を 5 個体ずつ取り上げ、発生段階及び形態に関するエンドポイント(後肢長、頭胴長及び体重(湿重量))を測定した。暴露終了時には、生存する全個体について、発生段階及び形態に関するエンドポイントを測定した。また、2.84 mg/L 及び対照区について、試験容器当たり 5 個体を対象に甲状腺の病理組織学的検査を行った(なお、追加で、9.55 mg/L についても 6 個体で病理組織学的検査を行った)。

結果及び結論

暴露中の死亡に関して、試験物質の各濃度及び対照区に有意な増加はみられなかったが、ベンゾフェノン-2 の 9.55 mg/L では、外見異常が観察された個体がみられた。9.55 mg/L では、7 日後及び暴露終了時における発達段階に有意な低下(遅延)が認められた。後肢長については、暴露 7 日後には、各濃度に関して対照区との間に統計学的な有意差は認められなかったが、暴露終了時には、9.55 mg/L に関して有意な低下が認められた。また、頭胴長については、暴露 7 日後には 0.916 mg/L 以上、終了時には 9.55 mg/L に関して、対照区と比較して有意な低下が認められ、体重については、暴露 7 日後及び終了時ともに、9.55 mg/L に関して、対照区と比較して有意な低下が認められた。また、甲状腺の病理組織学的検査では、甲状腺肥大と診断された個体数が 2.84 mg/L (及び 9.55 mg/L) に関して、対照区よりも統計学的に有意に多かった。

上記の試験から得られた結果を OECD TG 231 に示された decision logic に基づいて解釈すると、発達段階及び後肢長における有意な増加(発達促進)並びに非同調的発達の増加は認められなかったが、甲状腺組織に有意な影響が観察されたことから、試験物質のベンゾフェノン-2 は両生類の HPT 軸に対する作用を有することが示唆された。

以上、本試験の結果から、ベンゾフェノン-2 は両生類の HPT 軸に対する作用(抗甲状腺ホルモン作用)を有すると判断された。また、その最小影響濃度は 2.84 mg/L、最大無影響濃度は 0.916 mg/L であった。

Title

Study on Tier 1 *in vivo* assay for endocrine disrupting effects of chemical substances (Amphibian Metamorphosis Assay for Benzophenone-2)

Summary

Amphibian Metamorphosis Assay (AMA) was conducted for benzophenone-2, to identify an activity on hypothalamic-pituitary-thyroid (HPT) axis of amphibians, in accordance with the OECD guideline for the testing of chemicals No.231, Amphibian Metamorphosis Assay (adopted on 7 September 2009), as follows.

Test Substance

Common name: Benzophenone-2 (BP-2)

Chemical name: 2,2',4,4'-Tetrahydroxybenzophenone

CAS Registry Number: 131-55-5

Test conditions

In the assay, test animals were exposed to the test substance under following conditions.

Test animal:	<i>Xenopus laevis</i> , larvae at Nieuwkoop and Faber (NF) stage 51
Type of exposure:	Flow-through
Exposure period:	21 days
Test concentrations:	1.00, 3.16 and 10.0 mg/L (as nominal), and a dilution water control (DWC) at 0 mg/L BP-2 (mean measured concentration was 0.916, 2.84 and 9.55 mg/L, respectively)
Test solution volume:	5 L/vessel
Volume exchanges of test solution:	ca. 7 times daily
Replication:	4 replicates for each test concentration and DWC
Number of test animals:	20 animals/vessel (for each concentration and DWC)
Water temperature:	22±1 degrees C
Photoperiod:	12 h light:12 h dark
Feeding:	A controlled specified amount of Sera Micron® Nature, twice daily

Endpoint measurements

During the exposure, mortality and abnormality was observed daily. Developmental stage and morphological endpoints, i.e. hind limb length (HLL), snout-vent length (SVL) and wet body weight (BW), were measured for five tadpoles collected each from all test vessels on day 7. At the termination of the exposure, developmental stage and morphological endpoints were assessed for all survived animals, and histopathological examination of thyroid gland was conducted for the five tadpoles sampled from the middle test concentration group and the DWC (6 animals from the highest concentration were additionally assessed for histopathological examination).

Results and conclusions

For the mortality over the exposure period, no significant increase was observed in all BP-2 treatment and DWC groups, but externally abnormal individuals were found in 9.55 mg/L of BP-2. Developmental stages were significantly delayed in 9.55 mg/L at day 7 and at the termination of the exposure. For HLL, a statistically significant decrease was found in 9.55 mg/L at the test termination, whereas there was no significant difference for all BP-2 treatment groups at day 7. A significant decrease from the DWC was observed for more than 0.916 mg/L at day 7 and in 9.55 mg/L at the test termination for SVL and a significant decrease in 9.55 mg/L at both the day 7 and the test termination for BW. In the histopathological examination, regarding thyroid gland hypertrophy, the number of incidence was significantly greater than the DWC at 2.84 mg/L (and 9.55 mg/L).

When the results of this assay were interpreted by the decision logic OECD TG 231 provides, neither significant advanced development in developmental stage and HLL nor asynchronous development was found. However, the remarkable effect observed in thyroid gland by histopathological examination was indicative of BP-2 activity on the HTP axis of the test animals.

Based on the results of AMA, it is concluded that BP-2 has an activity on HPT axis (anti-thyroidal activity) in amphibians and the lowest observed effect concentration of 2.84 mg/L and the no observed effect concentration of 0.916 mg/L were suggested.

1. 背景及び目的

環境省では、「化学物質の内分泌かく乱作用に関する今後の対応—EXTEND 2022—」の下で、試験管内試験及び生物試験を用いて2段階で試験及び評価を行う枠組みを採用し、試験対象となり得る物質として選定された化学物質の内分泌かく乱作用についての試験及び評価を進めている。

本業務では、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いて、内分泌かく乱作用に関する評価等に必要なデータの集積を目的として、過年度に実施された試験管内試験の結果等に基づいて第1段階の生物試験を実施する優先順位が高いと考えられた化学物質について、化学物質の甲状腺に及ぼす影響に関する第1段階の生物試験である両生類変態試験を実施した。

2. 業務内容

本業務では、環境省が EXTEND2016 の枠組みの下で実施した第1段階の試験管内試験の結果等に基づいて、第1段階の生物試験を実施する優先順位が高いとされたベンゾフェノン-2 (CAS No. 131-55-5) について、アフリカツメガエルを試験生物とする両生類変態試験を実施した。

両生類変態試験は、図 2-1 に示すとおり、アフリカツメガエルの Nieuwkoop and Faber (NF) stage 51 の幼生を試験生物として、21 日間にわたり試験物質による暴露を行う。暴露期間中は、毎日、試験生物の死亡及び異常等の観察を行うとともに、暴露開始から 7 日後に、一部の個体を取り上げて、発生段階 (NF stage) の確認、頭胴長、後肢長及び体重の測定を行う。また、暴露終了時には、生存する個体について、暴露 7 日後と同様のエンドポイントを調べるほか、一部の個体 (5 個体/容器) を対象に、甲状腺について、病理組織学的に異常の有無及び重症度を調べ、これらエンドポイント測定値の変動 (対照区との比較) 等に基づいて、試験物質の試験生物に対する内分泌かく乱作用の有無を評価 (スクリーニング) する。

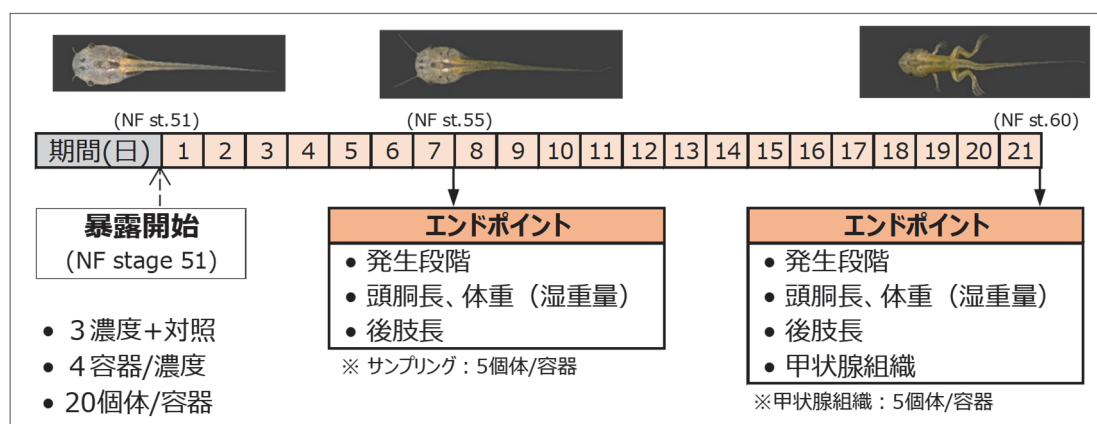


図 2-1 両生類変態試験の概要

3. 試験実施施設

本業務では、以下の施設において両生類変態試験（以下、本試験）を実施した。

施設名： いであ株式会社環境創造研究所

所在地： 静岡県焼津市利右衛門 1334-5

4. 試験物質

本業務の試験対象物質であるベンゾフェノン-2 については、EXTEND2016 における内分泌かく乱作用に関する試験及び評価に関する枠組みの下で、平成 28 年度に信頼性評価を実施する調査対象物質として選定され、平成 29 年度に実施された文献信頼性評価の結果、生態影響に関する動物試験及び疫学的調査に関する報告において、視床下部一下垂体—甲状腺軸への作用を示すことが示唆されることから、甲状腺ホルモン作用及び抗甲状腺ホルモン作用について確認すべき作用（試験管内試験の実施対象候補）と結論された⁽¹⁾。平成 29 年度に実施された第1段階試験管内試験（ニシツメガエル TR β レポータージーン試験）の結果、ニシツメガエル TR β の陽性物質（トリヨードサイロニン）による転写活性に対する阻害作用（抗甲状腺ホルモン作用）が認められた⁽²⁾ことから、甲状腺に及ぼす影響（抗甲状腺ホルモン作用）に関する第1段階生物試験を実施する候補物質とされた。

試験物質の識別及び物理化学的性状等に関わる情報は以下に示すとおりである⁽³⁾。

試験物質の名称及び物理化学的性状

一般名： ベンゾフェノン-2

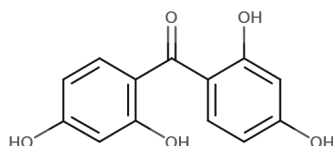
化学名： 2,2',4,4'-Tetrahydroxybenzophenone

CAS登録番号： 131-55-5

分子式： $C_{13}H_{10}O_5$

分子量： 246.218

構造式：



水溶解度： 7.08e-4 to 3.90e-3 mol/L (Predicted range)

蒸気圧： 6.69e-12 to 1.03e-8 mm Hg (Predicted range)

Log Kow： 2.53 to 3.16 (Predicted range)

p K a : 7.95 (Predicted range)

5. 材料及び方法

本試験は、OECD テストガイドライン No.231 Amphibian Metamorphosis Assay (Adopted: 7 September 2009)(以下、OECD TG231)に準拠して、以下に示す材料及び方法により実施した⁽⁴⁾。

5-1. 被験物質(試薬)

本試験に供した被験物質(ベンゾフェノン-2)の供給者、ロット番号、入手量及び純度は以下に示すとおりであった。

被験物質(試験に供したベンゾフェノン-2 試薬)

試薬名: 2,2',4,4'-Tetrahydroxybenzophenone
供給者: 東京化成工業株式会社
ロット番号: 2Q33G
純度: 99.8 area% (HPLC)、100.0% (中和滴定)
入手量: 125 g

被験物質は、入手後、試験施設内の保管庫(冷蔵)内で保管し、取り扱う際には、必要に応じて、防護手袋、ゴーグル及びマスクを着用した。

5-2. 試験生物

本試験では、アフリカツメガエル(*Xenopus laevis*)を試験生物種として、以下のとおり、試験実施施設において、親動物を交配させて得た受精卵(胚)を飼育した NF stage 51 の幼生を用いた。

(1) 親動物の飼育及び性腺刺激ホルモンによる産卵誘発

アフリカツメガエルの親動物(成熟齢に達しているオス及びメス)は、アフリカツメガエル血統・系統種養殖販売ワタナベ増殖(兵庫県多可郡)より購入した。親動物は、試験実施施設に受入れ後、受精卵を得るための交配に用いるまで、ポリプロピレン製水槽に収容し、本試験と同条件(流水式、水温 22℃、12 h-L/12 h-D)で飼育した。飼育水には、活性炭を通した水道水(脱塩素水道水)を使用し、餌料としてウナギウキエ稚魚用(日本配合飼料株式会社)を3回/週、飽食量を目安に与えた。

本試験での試験生物の暴露開始の14日前に、交配に用いる親動物に350単位(オス)又は800単位(メス)の胎盤性性腺刺激ホルモン(動物用ゴナドトロピン3000、あすかアニマルヘルス株式会社)を投与(皮下注射)した。この性腺刺激ホルモン投与による産卵誘発には雌雄各5個体(5ペア)を用い、投与後のペアは、産卵行動を促すため、それぞれ水温を22℃に調整した活性炭を通した地下水を満たした40 L容ガラス水槽に設置したステンレス製メッシュ内に収容し、翌日まで静置した。

(2) 受精卵の採取

性腺刺激ホルモン投与の翌日に、親動物(雌雄ペア)を収容した各水槽内を確認し、産卵が行われていた場合には、水槽内の卵塊を回収し、一部(100 粒程度)を実体顕微鏡下で観察して、受精率を算定した。本試験では、産卵した各ペアのうち、受精率が最も高かった卵塊(受精率 69.2%、卵数 1500 粒以上)を選定し、供試用に飼育した。

(3) 幼生の飼育

採取した受精卵は、本試験の希釈水と同質の活性炭を通した地下水を入れた 40 L 容ガラス水槽に収容し、本試験と同じ環境条件(流水式、水温 $22 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 、12 h-L/12 h-D)で飼育した。飼育中は、毎日、死亡及び異常の有無を観察し、死亡個体は水槽内を掃除する際に回収した。また、発生段階が NF stage 45 に達した個体がみられた時点から、幼生の個体数と成長度合いを考慮した量の Sera Micron® Nature (Sera GmbH、ドイツ)を 2 回/日に分けて給餌した。

(4) 供試個体の選別

受精卵の飼育開始から 13 日後(本試験での試験生物の暴露開始日)に、飼育している幼生を観察し、発生段階が NF stage 51 にあり、外部形態に異常が認められない個体を選抜した。さらに、ここから個体間の全長差が 6 mm 以下となるように個体を選別し、本試験の供試群とした。供試群については、受精(採卵)及び NF stage 45/46 に到達した時点から NF stage 51 に到達するまで要した日数は、13 日間及び 9 日間であり、OECD TG231 に示された条件(17 日間以内及び 12 日間以内)を満たしていた。

供試群から無作為に取り上げた 20 個体で測定した全長は 26.1~29.9 mm であり、全個体が OECD TG231 で推奨される平均 $28.4 \text{ mm} \pm 3 \text{ mm}$ の範囲に含まれた。

5-3. 装置及び機器等

(1) 試験装置

本試験では、試験生物の暴露に、大気循環型安定性試験室(タバイエスペック株式会社)に設置した流水式の暴露試験装置を用いた。この試験装置は、各試験濃度区について、試験物質の原液と希釈水をそれぞれ定流量で希釈混合槽に供給し、混合させることにより所定濃度で試験物質が添加された試験液を連続的に調製し、試験生物を収容する試験容器に供給できる。また、接液部には、化学的に不活性な素材(ガラス、テフロン、ステンレス鋼、シリコン等)が使用されている。

本試験では、暴露開始の 2 日以上前から試験装置を稼働させ、試験液の濃度及び流量並びに試験環境に問題がないことを確認した。

(2) 試験容器

試験容器には、試験液量が 5.0 L、水深が 18 cm となる位置に排水口を設けた総硬質ガラス製の水槽を用いた。試験容器は、使用前に十分に洗浄した。また、暴露期間中に残餌等による汚れにより試験物質濃度の低下等が懸念された場合には、必要に応じて、洗浄された清浄な容器と交換した。

(3) 試験環境の測定機器

暴露期間中の試験液の水温、溶存酸素及び pH は、それぞれ以下の機器を用いて測定した。

水温： デジタル温度計 MF 1000(株式会社チノー)

溶存酸素：蛍光式溶存酸素計 LDO-HQ10(HACH 社)

pH: pH Meter D-21(株式会社堀場製作所)

5-4. 希釈水

希釈水(飼育水)には、活性炭ろ過機に通水して残留塩素及び化学物質等を除去した地下水を使用した。希釈水は、流水式暴露装置の希釈水タンク(ステンレス鋼製)内でクーリングサーモポンプ(CTP-3000、東京理化学器械株式会社)により水温を調整するとともに、十分に通気した。また、OECD TG231 で推奨されるヨウ素濃度(0.5~10 µg/L)を満たすように、試験液の調製時(試験原液との混合前)に 3.0 mg/L のヨウ化カリウム水溶液を添加した(流量 480 mL/min の希釈水に流量 0.2 mL/min でヨウ化カリウム水溶液を添加)。希釈水の水質の測定結果は付属資料 1 に示した。

5-5. 試験濃度

OECD TG231 では、試験濃度の設定に関して、(1)試験物質の毒性に対する試験生物の耐忍濃度(maximum tolerated concentration (MTC))、(2)試験物質の水溶解度、(3)100 mg/L、のうち最も低い濃度を試験最高濃度に設定するとしている。また、MTC は、結果的に死亡率が 10%未満となる最も高い濃度と定義され、試験生物に対する急性の半数致死濃度(LC₅₀)の 1/3 相当の濃度が実用的近似値とされている。MTC に関して、試験生物での急性毒性データがない場合、両生類変態試験と同じ発生段階の試験生物を用いて 96 時間の急性毒性試験を実施するか、又は他の水生生物種のデータ(魚類又は試験生物種以外の両生類に対する LC₅₀)を代用するとしている。

ベンゾフェノン-2 のアフリカツメガエルに対する毒性に関して、既存知見は得られなかったが、環境省は平成 23 年度に、幼生期両生類成長発達試験(OECD TG241, LAGDA)を、実測濃度 1.6, 3.4, 6.1 mg/L の 3 濃度(設定濃度 1.5, 3.0, 6.0 mg/L)で実施しており、6.1 mg/L で累積死亡率 44%であった(試験濃度 3.4 及び 1.6 mg/L では 3%未満)⁽⁵⁾。一方、OECD による、AMA のバリデーション試験(リングテスト)では、2 試験機関が参加し、0.75、1.5、3.0、6.0 mg/L の設定濃度で 21 日間の暴露が実施されているが、6.0 mg/L(平均測定濃度は、5.65 及び 4.76 mg/L)における 21 日間の累積死亡率は、0%及び 3.8%と報告されている⁽⁶⁾。魚類では、環境省が平成 30 年度に実施したミナミダカの成魚を試験生物とする魚類短期繁殖試験において、試験最高濃度の 9.53 mg/L(設定濃度 10.0 mg/L)における暴露 21 日後の累積死亡率は 0%であったと報告されている⁽⁷⁾。また、試験実施施設において、NF stage 47 のアフリカツメガエル幼生を用いて(10 個体/濃度)、6.25、12.5、25.0、50.0 及び 100 mg/L の 5 濃度での半止水式(試験液は 24 時間ごとに全量を交換)による 96 時間の暴露試験を実施した。その結果、96 時間後の累積死亡率は、50.0 及び 100 mg/L で 100%、25.0 mg/L で 40%、対照区を

含む 12.5 mg/L 以下の各濃度で 10%であり、LC₅₀ は 27.0 mg/L となった。また、25.0 mg/L では、生存個体にも遊泳異常(水槽底での横臥)が観察されたが、6.25 及び 12.5 mg/L では、試験生物の行動及び外見異常は観察されなかった。本試験については、EXTEND2022 の枠組みの下、第1段階の生物試験として、内分泌かく乱作用の有無の確認(スクリーニング)を目的に実施することから、試験最高濃度は試験生物の死亡を招かない範囲でより高い濃度を設定することが望ましいと考えられる。

以上を勘案して、本試験の試験濃度は、10.0 mg/L を最高濃度、公比を 3.16($\sqrt{10}$)とする以下の 3 濃度とした。

試験濃度(設定濃度): 1.00, 3.16, 10.0 mg/L

ベンゾフェノン-2 は、平成 26 年度に化学物質環境実態調査で水質から検出されており(検出頻度: 1/21、検出範囲: nd(検出下限値 12 ng/L) ~ 13 ng/L)⁽⁸⁾、本試験で設定した試験最高濃度は、環境中(水質)から検出された最高濃度の 769,230 倍に相当する。

5-6. 試験条件

試験条件は OECD TG231 に準拠して設定した。本試験における主要な試験条件(設定条件)は、以下のとおりであった。

暴露方式: 流水式

暴露期間: 21 日間

試験水温: 22±1℃

照明: 昼光用蛍光灯

照度: 600~2000 Lux

光周期: 12 h-L/12 h-D

通気: なし

試験容器: 8.4 L 容硬質ガラス製水槽(幅 10 cm、奥行 28 cm、高さ 30 cm)

試験水量: 5.0 L

試験液流量: 25 mL/min(交換率: 約 7 回/日)

試験生物

生物種: アフリカツメガエル

発生段階: NF stage 51(暴露開始時)

全長: 28.4±1.10 mm(サブサンプル 20 個体の測定値)

供試生物数: 20 個体/容器(80 個体/濃度)

収容密度: 4 個体/L

試験濃度数: 3 濃度及び対照区

連数: 4 連(容器)/濃度

給餌

餌料: Sera Micron® Nature(Sera GmbH、ドイツ)

給餌量： 1 個体・1 日当たり、30 mg (Day 0-4)、40 mg (Day 5-7)、50 mg (Day 8-10)、70 mg (Day 11-14) 又は 80 mg (Day 15-20)
頻度： 2 回／日 (上記給餌量を 2 回に分けて給餌)

5-7. 試験液の調製

(1) 試験原液の調製

試験装置での試験液の調製に用いるベンゾフェノン-2 の試験原液は、暴露期間中、2 日ごとに、以下の手順により調製した。試験原液に関して、後述の方法で調製したベンゾフェノン-2 濃度 3.5 g/L の溶液では、少なくとも調製から 48 時間後まで、ベンゾフェノン-2 濃度が調製した濃度の 95% 以上を維持することを事前に確認した。

電子天びんを使用してガラス製ひょう量皿ロートに分取したベンゾフェノン-2 7.7 g と 1 M NaOH 88 mL を 300 mL 容ガラス製ビーカーに入れ、スターラーで 40 分間攪拌した。その後、220 mL 程度までイオン交換水を加えて攪拌し、2 L 容ガラス製ビーカーに溶液を移し入れた。300 mL 容ガラス製ビーカーを洗いこみながら、2 L 程度まで、イオン交換水を加えた。ホールピペットと pH 計 (pH/ION Meter F-73 株式会社堀場製作所) を用いて、pH が 8.5~8.8 になるまで 1 M HCl を少しずつ加えた後、2.2 L になるようにイオン交換水を加えることで、3.5 g/L の試験原液を調製した。調製した試験原液については、試験物質が完全に溶解していることを目視で確認し、pH が 8.5~8.8 の範囲内であることを再度確認した。

(2) 試験液の調製

各設定濃度の試験液は、以下のとおり、試験装置の希釈混合槽で試験原液と希釈水を混合することにより連続的に調製し、所定の流量で試験容器に供給した。本試験では、試験原液は 3 日ごとに新たに調製したものと交換した。また、試験原液、希釈水及び各試験容器に供給される試験液の流量は、週 1 回測定し、必要に応じて再調整した。

試験原液 (ベンゾフェノン-2 濃度 3.5 g/L) は、ケミカルポンプ (NRX-01-L、NRX04-01-L 又は NP-KX-210 日本精密機器株式会社) により、各試験濃度の希釈混合槽に 0.034、0.11 又は 0.34 mL/min の流量で供給され、同時にガラス製キャピラリー管を通して希釈槽から 120 mL/min の流量で供給される希釈水と混合され、設定濃度 (1.00、3.16 又は 10.0 mg/L) の試験液が連続的に調製される。これらの試験液は、ガラス製キャピラリー管で分配槽に供給され、4 つの試験容器に流量 25 mL/min で供給される。対照区については、希釈槽から分配槽を経由して、ヨウ化カリウム水溶液のみが添加された希釈水が 4 つの試験容器に流量 25 mL/min で供給される。

5-8. 暴露操作

(1) 暴露開始時

試験装置に設置した試験容器 (4 容器／試験区) について、試験液の水温、溶存酸素濃度及び pH を測定し、試験環境に問題がないことを確認し、選別しておいた供試群から試験生物を無作為に 20 個体ずつ移し入れた。この時点を暴露開始とした。

(2) 暴露期間中

暴露期間中は、各試験容器について、午前及び午後の 2 回、定時に給餌を行った。給餌時は、試験生物の状態(死亡個体の有無並びに外見及び行動等の異常)を観察した。死亡又は異常が観察された場合は記録し、死亡した個体がい場合には試験容器内から除去した。また、定期的にサイフォンを用いて試験容器の底に残った餌料や糞を除去した。

全ての試験容器について、試験液の水温を毎日、溶存酸素及び pH を週 1 回測定した。また、暴露期間中に 1 回、試験液の導電率、全硬度及びアルカリ度並びに水面付近の照度を測定し、試験環境に問題がないことを確認した。

(3) 暴露7日後

暴露開始から 7 日後の給餌及び水質測定前に、各試験容器から無作為に 5 個体を取り上げ、後述のエンドポイント測定に供した。

(4) 暴露終了時

暴露開始から 21 日後に暴露を終了した。暴露終了時には、暴露期間中と同様に、試験環境の測定を行った後、生存する全ての個体を取り上げて、後述のエンドポイント測定に供した。

5-9. 試験物質濃度の測定

暴露開始日(暴露 0 日後)、暴露 7 日後、14 日後及び 21 日後に、試験液中の試験物質(ベンゾフェノン-2)濃度を液体クロマトグラフタンデム質量分析計(LC-MS/MS)により測定(定量)した。

試験物質濃度の測定に供する試験液(試料)は、各測定日の給餌前に採取した。対照区を含む全ての試験容器について、水槽中央部の中層からガラス製駒込ピペットを用いて試験液を 3~4 mL 採取した。採取後、試料の一部を直ちに定量のメタノール(LC/MS 用、富士フィルム和光純薬株式会社)を入れたポリプロピレン容器に移し、希釈した。

上記によりメタノールと混合した試験液を分析試料として、LC-MS/MS により、試験液中のベンゾフェノン-2 濃度を定量した。本試験における定量下限は 0.84 µg/L であった。LC-MS/MS での分析条件は付属資料 2 に示した。

5-10. エンドポイント測定

本試験では、エンドポイントとして、全ての試験区に関して、暴露期間中の累積死亡個体数、暴露 7 日後に取り上げた各試験容器につき 5 個体及び暴露終了時に生存した全個体を対象に発生段階及び形態に関するパラメータ(後肢長、頭胴長及び体重(湿重量))を測定した。また、対照区及びベンゾフェノン-2 の 2.84 mg/L について、暴露終了時に取り上げた個体の一部(各試験容器につき 5 個体)を対象に、甲状腺の病理組織学的検査を行い、典型症例に関して 0~3 の各重症度に該当する個体数を計数した。

(1) 死亡個体数

全ての試験容器について、暴露期間中に記録した各暴露日における死亡個体数を基に、暴露期間中の累積死亡個体数を算出した。

(2) 発生段階及び形態に関するパラメータの測定

暴露 7 日後に取り上げた 5 個体及び暴露終了時に生存した個体のエンドポイントを測定した。各試験容器から取り上げた試験生物は麻酔液 (pH を 7.0 調整した 3-アミノ安息香酸エチルメタンスルホン酸塩 (Sigma-Aldrich) の 200 mg/L 水溶液) に入れて放置し、深麻酔により安楽死させた。刺激に対して反応しなくなった個体は、麻酔液から取り上げ、体表の水分をペーパータオルで除去してから、電子ノギスを用いて頭胴長及び後肢長、電子天びんを用いて体重 (湿重量) を測定した。また、各個体の発生段階は、Nieuwkoop and Faber (1994) の発生段階表に従って後肢長等の形態学的特徴に基づいて判別した⁽⁹⁾。後肢長の測定及び発生段階判別のための形態観察は、必要に応じて実体顕微鏡下で行った。

(3) 病理組織学的検査試料の採取

対照区及びベンゾフェノン-2 の各濃度区について、暴露終了時のエンドポイント測定に供した個体を対象に、両生類での病理組織学的検査に関する OECD のガイダンス文書 No.82 (以下、OECD GD82) に準じて、甲状腺の組織標本作製に供する試料を採取した⁽¹⁰⁾。

前項の発生段階及び形態に関するパラメータの測定後、供試個体の心臓上端付近をメスで切断し、甲状腺を含む頭部側を 30 mL 容のポリエチレンテレフタレート製サンプル容器に入れた Davidson 液に浸漬した。各試料は、組織の固定及び脱灰を行うため、Davidson 液中で 48~96 時間静置した後、固定液を 10% 中性緩衝ホルマリン液に替え、組織標本の作製に供するまで保存した。

(4) 甲状腺の病理組織学的検査

(a) 組織標本 (薄切標本) の作製

甲状腺の病理組織学的検査は、対照区及びベンゾフェノン-2 の各濃度区のうち、後述のとおり、暴露終了時の発生段階、頭胴長及び体重に関して、対照区と比較して有意な低下が認められた 1 つ下の濃度区である 2.84 mg/L を対象に行った。対照区では、暴露終了時に生存した全個体における発生段階の中央値が NF stage 58 であることから、OECD TG231 の規定に従い、各試験容器から無作為に抽出した NF stage 58 の 5 個体を甲状腺の病理組織学的検査に供した。対照区については、暴露終了時に NF stage 58 が 5 個体であった 3 つの試験容器はその 5 個体を病理組織学的検査に供したが、他の 1 つの試験容器は、NF stage 58 が 5 個体未満であったため、NF stage 58 の個体以外に、NF stage 59 の個体から無作為に抽出した個体を加えた 5 個体を甲状腺の病理組織学的検査に供した。これら病理組織学的検査の対象とした個体について、10% 中性緩衝ホルマリン液で保存されていた固定試料を用いて、以下のとおり、甲状腺を含む組織の薄切標本作製した。

試料(甲状腺を含む組織片)は、適宜、不要な部分を切除(トリミング)してから、常法により、パラフィンに包埋した。パラフィンプロックは、台木に固定し、回転式ミクロームで尾部方向(甲状腺の下端側)から 6 μm 厚で薄切した。作製した連続切片について、甲状腺が含まれる部分を識別し、甲状腺の下端から上端まで 8 又は 9 枚ごとに 1 枚(切片)を切り出し、順番にスライドガラスに添付(進展)することにより、約 50 μm 間隔のステップセクションを作製した。薄切標本(組織切片)は、常法によりヘマトキシリン-エオシンの二重染色を施し、病理組織学的検査に供した。

アフリカツメガエル幼生の甲状腺(位置及び組織標本)を図 5-10-1 に例示した。

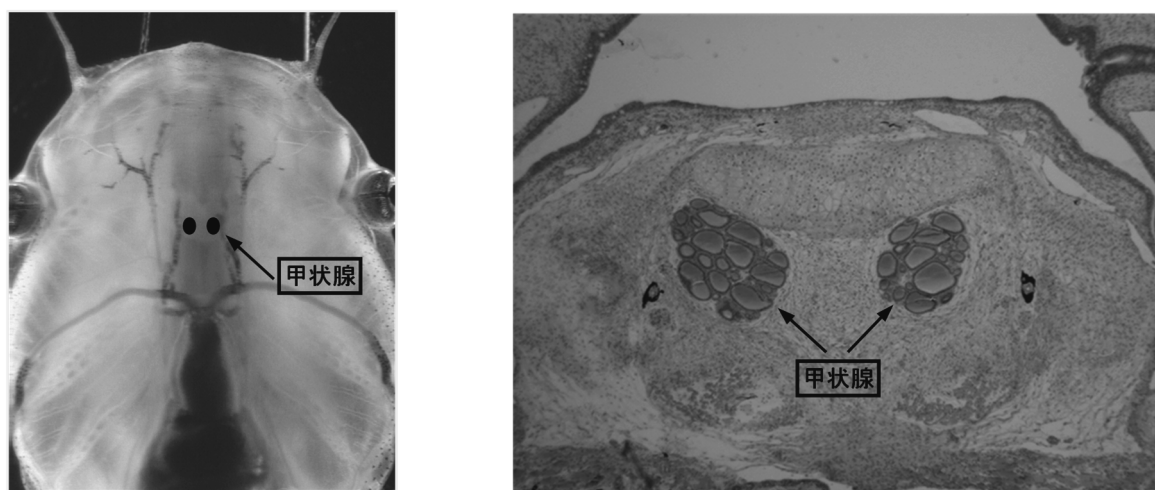


図 5-10-1 アフリカツメガエル幼生の甲状腺

(b) 病理組織学的検査(典型症例の診断)

組織標本を光学顕微鏡下で観察し、OECD GD82 に従い、プレパラートに添付された複数の組織切片(甲状腺のステップセクション)のうち、甲状腺の中央部に最も近いと判断した切片を対象に、表 5-10-1 に示す基準により、Thyroid gland hypertrophy(甲状腺の肥大)、Thyroid gland atrophy(甲状腺の萎縮)、Follicular cell hypertrophy(濾胞上皮細胞の肥大)及び Follicular cell hyperplasia(濾胞上皮細胞の過形成)の 4 タイプの症例(典型症例)に関して、各個体の重症度を Grade 0~3 の 4 段階で診断した。

表 5-10-1 病理組織学的検査の対象とした症例及び重症度の診断基準

Criteria	Grade	Descriptor	Criteria
Thyroid gland hypertrophy	0	Non-remarkable	Less than 20% enlargement of glands in comparison to controls.
	1	Mild	Diffuse enlargement of glands that exceeds control glands size by 30-50%.
	2	Moderate	Diffuse enlargement of glands that exceeds control glands size by 60-80%.
	3	Severe	Diffuse enlargement of glands that exceeds control glands size by over 80%. There is contact of both glands at the midline and they exceed normal boundaries into surrounding tissue space.
Thyroid gland atrophy	0	Non-remarkable	Less than a 20% reduction in size in comparison to controls.
	1	Mild	Gland size is 30-50% reduced from the size of control glands.
	2	Moderate	Gland size is 60-80% reduced from the size of control glands.
	3	Severe	Gland size is over 80% reduced from the size of control glands.
Follicular cell hypertrophy	0	Non-remarkable	Fewer than 20% of the cells exhibit hypertrophy.
	1	Mild	30-50% of follicular cells exhibit hypertrophy.
	2	Moderate	60-80% of follicular cells exhibit hypertrophy.
	3	Severe	Over 80% of follicular cells exhibit hypertrophy.
Follicular cell hyperplasia	0	Non-remarkable	Focal or diffuse crowding of follicular cells affecting less than 20% of the tissue.
	1	Mild	Focal or diffuse crowding of follicular cells affecting 30-50% of the tissue, and/or single or multiple papillary infoldings of follicular cell layer.
	2	Moderate	60-80% of the follicles exhibit focal hyperplasia characterized by pseudostratified or stratified follicular epithelium – papillary infolding may be present.
	3	Severe	Over 80% of follicles exhibit extensive hyperplasia with stratification 2-3 cell layers thick – papillary infolding may be present.

5-11. データ解析

(1) 統計学的手法

各エンドポイントの測定結果について、以下の手順により、各濃度区と対照区の間有意差が認められるかを統計学的に解析(検定)した。死亡個体数の検定は Excel 統計 Ver.7.0(株式会社エスミ)、その他のエンドポイントの検定は、StatCharrms Ver.0.90.9 又は Ver.0.90.96(米国環境保護庁が開発し、公表している統計解析プログラム)を用いて

行った。全ての検定において、有意水準(p)は 0.05 とした。

(a) 死亡個体数

暴露終了時における各試験区の生存個体数と累積死亡個体数を用いて、Bonferroni-Holm adjustment による有意確率補正を適用した Fisher's exact test により、対照区と試験物質の各濃度区間の有意差を検定した。

(b) 発生段階(NF stage)

各試験容器における中央値を用いて、ステップダウン法を適用した Jonckheere-Terpstra trend test(以下、step-down JT test)により、対照区と試験物質の各濃度区間の有意差を検定した。

(c) 形態に関するパラメータ(頭胴長、体重及び後肢長)

初めに各試験容器の中央値を用いて、Linear contrast 及び Quadratic contrast により、データの単調性(monotonicity)を解析した。本試験では、全てのデータ(エンドポイント)について単調性が認められたため、試験容器の中央値を用いて step-down JT test により、対照区と各濃度区間の有意差を検定した。ただし、暴露終了時については、OECD TG231 の推奨に従い、NF stage 61 以上の個体データを除外した。

また、参考データとして、後肢長を頭胴長で除した後肢長と頭胴長の比を算出した。

(d) 甲状腺組織

各典型症例について、重症度が 0～3 と診断された個体数を用いて、Rao-Scott Cochran-Armitage by Slices 法により、対照区と各濃度区間の有意差を検定した。

(2) 最小影響濃度及び最大無影響濃度

各エンドポイントに関して、検定の結果、対照区と比較して統計学的な有意差が認められた最も低い試験濃度を最小影響濃度(LOEC)、その下の濃度を最大無影響濃度(NOEC)とした。ただし、統計学的な有意差が認められた最低試験濃度より高い試験濃度で同程度以上の影響(反応)が認められない場合には、特段の理由がない限り当該濃度を LOEC とはしなかった。また、最も低い試験濃度において統計学的に有意な差が認められた場合には、NOEC は推定しなかった。

6. パフォーマンスクライテリア

OECD TG231 では、試験方法から著しく逸脱した試験では、解釈や報告において許容できないデータが得られることから、表 6-1 に示すとおり、実施した試験に関して品質及び対照区の試験生物の状態を判断する基準及び許容範囲を示したパフォーマンスクライテリアが示されている。

表 6-1 両生類変態試験のパフォーマンスクライテリア

Criterion	Acceptable limits
Test concentrations	Maintained at $\leq 20\%$ CV (variability of measured test concentration) over the 21-day test
Mortality in controls	$\leq 10\%$ - mortality in any one replicate in the controls should not exceed 2 tadpoles
Minimum median developmental stage of controls at end of test	57
Spread of development stage in control group	The 10 th and the 90 th percentile of the development stage distribution should not differ by more than 4 stages
Dissolved Oxygen	$\geq 40\%$ air saturation
pH	pH should be maintained between 6.5-8.5. The inter-replicate/inter-treatment differentials should not exceed 0.5.
Water temperature	$22^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ - the inter-replicate/inter-treatment differentials should not exceed 0.5°C
Test concentrations without overt toxicity	≥ 2
Replicate performance	≤ 2 replicates across the test can be compromised

注) OECD TG231 に規定されている溶解助剤の使用及び半止水式での暴露の特別な条件に関する許容範囲は、本試験に該当しないため記載を省略した。

7. 試験の有効性基準

OECD TG231 に規定される両生類変態試験の有効性基準 (Test Validity) は、以下のとおりである。OECD TG231 では、試験物質の甲状腺に対する活性がない (陰性) と判断された試験及び試験物質の甲状腺に対する活性がある (陽性) と判断された試験に関して、それぞれ有効性基準 (Test Validity) を規定している。

Valid experiment in a test determined to be negative for thyroid activity:

1. For any given treatment (including controls), mortality cannot exceed 10%. For any given replicate, mortality cannot exceed three tadpoles, otherwise the replicate is considered compromised.
2. At least two treatment levels, with all four uncompromised replicates, should be available for analysis
3. At least two treatment levels without overt toxicity should be available for analysis

Valid experiment in a test determined to be positive for thyroid activity:

1. Mortality of no more than two tadpoles/replicate in the control group can occur.

8. 結果

8-1. 試験物質の測定濃度

試験液中のベンゾフェノン-2 濃度の測定結果を表 8-1-1 に示す。

試験液中のベンゾフェノン-2 の平均測定濃度は、低濃度側から順に、 0.916 ± 0.075 mg/L、 2.84 ± 0.21 mg/L 及び 9.55 ± 0.87 mg/L (平均±標準偏差)であり、設定濃度 (1.00、3.16 及び 10.0 mg/L) に対する割合は 90.0～95.5%であった。また、暴露開始時 (0 日後)、7 日後、14 日後及び 21 日後の測定濃度に基づく暴露期間における測定濃度の変動係数は 7.4～9.1%であり、OECD TG231 が示す許容範囲内であった。対照区については、試験液中のベンゾフェノン-2 濃度は暴露期間を通して定量下限未満 (ND) であった。

以下の項で示す本試験の結果については、各濃度区の平均測定濃度 (0.916 mg/L、2.84 mg/L 及び 9.55 mg/L) に基づいて記載した。

表 8-1-1 試験液中のベンゾフェノン-2 濃度の測定結果

設定濃度 (mg/L)	測定濃度 (mg/L)					
	0日後	7日後	14日後	21日後	平均	標準偏差
対照区	ND	ND	ND	ND	—	—
1.00	0.887 (88.7)	0.866 (86.6)	1.03 (103)	0.885 (88.5)	0.916 (91.6)	0.075 (8.1)
3.16	2.64 (83.6)	2.81 (89.0)	3.14 (99.3)	2.78 (88.1)	2.84 (90.0)	0.21 (7.4)
10.0	8.48 (84.8)	9.31 (93.1)	9.86 (98.6)	10.5 (105)	9.55 (95.5)	0.87 (9.1)

注) ND は定量下限未満、()内の数値は設定濃度に対する割合(%)、< >内の数値は変動係数(%)を示す。

8-2. 暴露期間中の試験環境

対照区及びベンゾフェノン-2 の各濃度区における試験環境の測定結果を表 8-2-1 に示す。各試験容器における試験液の水温、溶存酸素及び pH の測定結果は付属資料 3 に示した。

試験液の水温は、暴露期間を通して $21.9 \sim 22.5^{\circ}\text{C}$ 、同一日における試験容器間及び試験区間の差は 0.3°C 以下であった。試験液の溶存酸素は、暴露期間を通して $5.2 \sim 9.1$ mg/L であり、飽和の 60% 以上を維持していた。また、試験液の pH は、暴露期間を通して $7.3 \sim 8.1$ 、同一日における試験容器間及び試験区間の差は 0.2 以下であった。したがって、試験液の水温、溶存酸素及び pH は、いずれも OECD TG231 が示す許容範囲内であった。また、暴露期間中に測定した照度、導電率、硬度及びアルカリ度の各々についても OECD TG231 で規定された範囲内にあった。

以上のことから、本試験では、試験環境が暴露期間を通して適切に維持され、得られた結果の信頼性に影響を及ぼしたと思われる要因はなかった。

表 8-2-1 暴露期間中の試験液の水温、溶存酸素及び pH

測定濃度 (mg/L)	水温 (°C)	溶存酸素 (mg/L)	pH
対照区	22.1 — 22.5	5.4 — 9.1	7.4 — 8.0
0.916	22.0 — 22.4	5.2 — 8.8	7.3 — 8.0
2.84	21.9 — 22.4	5.6 — 8.8	7.3 — 8.0
9.55	22.0 — 22.4	5.8 — 8.8	7.4 — 8.1

注) データは、暴露期間中の範囲(最低－最高)を示す。

8-3. 死亡個体数及び一般症状

対照区及びベンゾフェノン-2 の各濃度区の暴露終了時における生存個体数及び累積死亡個体数を表 8-3-1 に示す。

対照区の暴露終了時における累積死亡個体数は 0 個体であり、OECD TG231 が示す許容範囲内であった。ベンゾフェノン-2 の暴露終了時における累積死亡個体数は 0.916 及び 2.84 mg/L では 0 個体、9.55 mg/L では 4 個体であった。検定の結果、対照区との間に統計学的な有意差は認められなかった。

対照区、0.916 mg/L 及び 2.84 mg/L については、暴露期間を通して、外見や行動に明らかな異常が観察された個体はみられなかった。ベンゾフェノン-2 の 9.55 mg/L については、暴露 4 日後から 21 日後(終了時)まで、対照区の個体と比較して体色が暗化した個体が多く観察された。また、暴露 6 日後以降に下顎に浮腫がみられる個体が観察され、暴露 21 日後のエンドポイント測定時の観察では、3 個体で下顎の浮腫を確認した。

本試験に関して、対照区における暴露期間中の死亡率は 0% であり、OECD TG231 の Performance criteria に規定された許容範囲(死亡率は全試験水槽で 10% 以下)を満たしていた。また、対照区及びベンゾフェノン-2 の各試験濃度における暴露期間中の死亡率は 10% 未満であり、4 個体の死亡がみられた 9.55 mg/L についても、全試験水槽に関して死亡は 2 個体以下(2 つの試験水槽で各 2 個体の死亡)であった。したがって、OECD TG231 の Test Validity の試験物質の甲状腺活性を陰性と判断できる試験(対照区を含む全試験濃度で死亡率が 10% 未満かつ全試験水槽で 3 個体を超えないこと及び少なくとも 2 つの試験濃度に関して 4 連(試験水槽)が解析に利用でき、また明確な毒性がみられないこと)及び陽性と判断できる試験(対照区の全試験水槽で死亡が 2 個体以下であることを満たしていた(以上を踏まえて、本試験では 9.55 mg/L を含む全試験濃度から得られたデータを解析に用いた))。

表 8-3-1 暴露終了時の生存個体数及び累積死亡個体数

測定濃度 (mg/L)	生存個体数	累積死亡個体数
対照区	60	0
0.916	60	0
2.84	60	0
9.55	56	4

8-4. 発生段階

(1) 暴露7日後

対照区及びベンゾフェノン-2 の各濃度区の暴露 7 日後における発生段階の測定結果を表 8-4-1 に示す。各個体の発生段階は付属資料 4 に示した。

対照区の発生段階(容器中央値)は、全試験容器で NF stage 54 であった。検定の結果、9.55 mg/L に関して、対照区との間に統計学的な有意差(有意な低下)が認められた。

(2) 暴露終了時

対照区及びベンゾフェノン-2 の各濃度区の暴露終了時における発生段階の測定結果を表 8-4-1 に示す。各個体の発生段階は付属資料 5 に示した。

対照区の発生段階(容器中央値)は、1 つの試験容器が NF stage 59、その他の試験容器は NF stage 58 であった。また、各個体の発生段階は NF stage 58～60、それらの 10 及び 90 パーセンタイルは 58 及び 60 であり、いずれも OECD TG231 が示す許容範囲内であった。検定の結果 9.55 mg/L に関して、対照区との間に統計学的な有意差(有意な低下)が認められた。

0.916 mg/L では、80 匹中 1 個体に頭部の形状が NF stage 61 と同程度であるが、前肢の長さが NF stage 59 と同程度の非同調的発達と判断される個体が 1 個体みられたが、より高い濃度では確認できなかったため、本試験の結果では、当個体のデータを除いて集計した。

表 8-4-1 暴露 7 日後及び暴露終了時の発生段階

測定濃度 (mg/L)	暴露7日後		暴露終了時	
	中央値	(最小－最大)	中央値	(最小－最大)
対照区	54.0	(54.0－54.0)	58.0	(58.0－59.0)
0.916	54.0	(54.0－54.0)	58.0	(58.0－58.5)
2.84	54.0	(54.0－54.0)	58.0	(58.0－58.0)
9.55	53.0 (*)	(53.0－54.0)	56.0 (*)	(56.0－56.0)

注) データは容器中央値に基づく 4 試験容器における中央値及び(最小-最大)、(*)は統計学的に対照区との間に有意差($p<0.05$)が認められたことを示す。

8-5. 形態に関するパラメータ(後肢長、頭胴長及び体重(湿重量))

(1) 暴露7日後

対照区及びベンゾフェノン-2 の各濃度区の暴露 7 日後における形態に関するパラメータ(後肢長、頭胴長及び体重)の測定結果を表 8-5-1 及び図 8-5-1 に示す。各個体の測定結果は付属資料 4 に示した。

また、OECD TG231 では、発達の促進を評価するエンドポイントとして、後肢長を頭胴長で補正した後肢長と頭胴長の比を用いることが記載されているため、算出した数値を示した。

対照区の後肢長、頭胴長及び体重(平均±標準偏差)は、 2.72 ± 0.22 mm、 20.0 ± 0.42 mm 及び 544 ± 34.9 mg、後肢長と頭胴長の比は 0.13 ± 0.008 であった。

検定の結果、後肢長及び後肢長と頭胴長の比は対照区との間に統計学的な有意差が認められなかったが、頭胴長は 0.916 mg/L 以上、体重は 9.55 mg/L の濃度区に関して、対照区との間に統計学的な有意差(有意な低下)が認められた。

表 8-5-1 暴露 7 日後の形態に関するパラメータの測定結果

測定濃度 (mg/L)	後肢長 (mm)	頭胴長 (mm)	体重(湿重量) (mg)	後肢長／頭胴長
対照区	2.72 ± 0.22	20.0 ± 0.42	544 ± 34.9	0.13 ± 0.008
0.916	2.75 ± 0.16	19.6 ± 0.24 (*)	505 ± 15.6	0.14 ± 0.007
2.84	2.82 ± 0.32	19.6 ± 0.57 (*)	492 ± 13.7	0.14 ± 0.013
9.55	2.53 ± 0.30	18.2 ± 0.86 (*)	464 ± 44.9 (*)	0.14 ± 0.010

注) データは容器平均±標準偏差、(*)は統計学的に対照区との間に有意差($p < 0.05$)が認められたことを示す。

(2) 暴露終了時

対照区及びベンゾフェノン-2 の各濃度区の暴露終了時における形態に関するパラメータ(後肢長、頭胴長及び体重)の測定結果を表 8-5-2 及び図 8-5-2 に示す。各個体の測定結果は付属資料 5 に示した。

また、OECD TG231 では、発達の促進を評価するエンドポイントとして、後肢長を頭胴長で補正した後肢長と頭胴長の比を用いることが記載されているため、算出した数値を示した。

対照区の後肢長、頭胴長及び体重(平均±標準偏差)は、 14.0 ± 0.48 mm、 29.6 ± 0.39 mm 及び 1988 ± 32.6 mg、後肢長と頭胴長の比は 0.48 ± 0.014 であった。

検定の結果、後肢長、頭胴長、体重及び後肢長と頭胴長の比は 9.55 mg/L の濃度区に関して、対照区との間に統計学的な有意差(有意な低下)が認められた。

表 8-5-2 暴露終了時の形態に関するパラメータの測定結果

測定濃度 (mg/L)	後肢長 (mm)	頭胴長 (mm)	体重(湿重量) (mg)	後肢長／頭胴長
対照区	14.0 ± 0.48	29.6 ± 0.39	1988 ± 32.6	0.48 ± 0.014
0.916	14.6 ± 0.33	29.4 ± 0.66	1903 ± 75.9	0.49 ± 0.016
2.84	13.7 ± 0.73	29.6 ± 0.42	1907 ± 67.4	0.46 ± 0.027
9.55	6.42 ± 0.92 (*)	28.4 ± 0.85 (*)	1676 ± 47.2 (*)	0.23 ± 0.032 (*)

注) データは容器平均±標準偏差、(*)は統計学的に対照区との間に有意差($p<0.05$)が認められたことを示す。

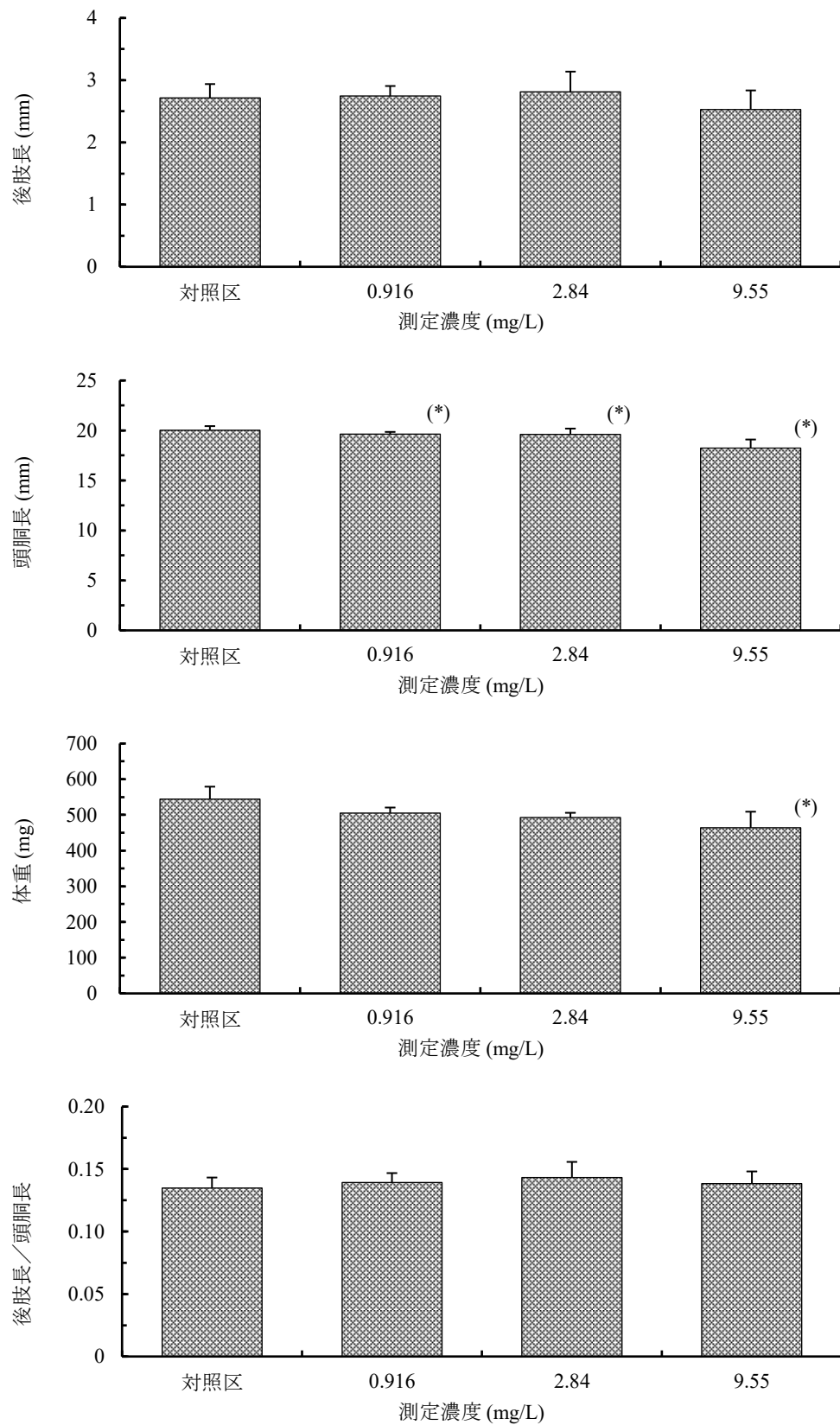


図 8-5-1 暴露 7 日後の形態に関するパラメータの測定結果

注) データは容器平均±標準偏差、(*)は統計学的に対照区との間に有意差($p < 0.05$)が認められたことを示す。

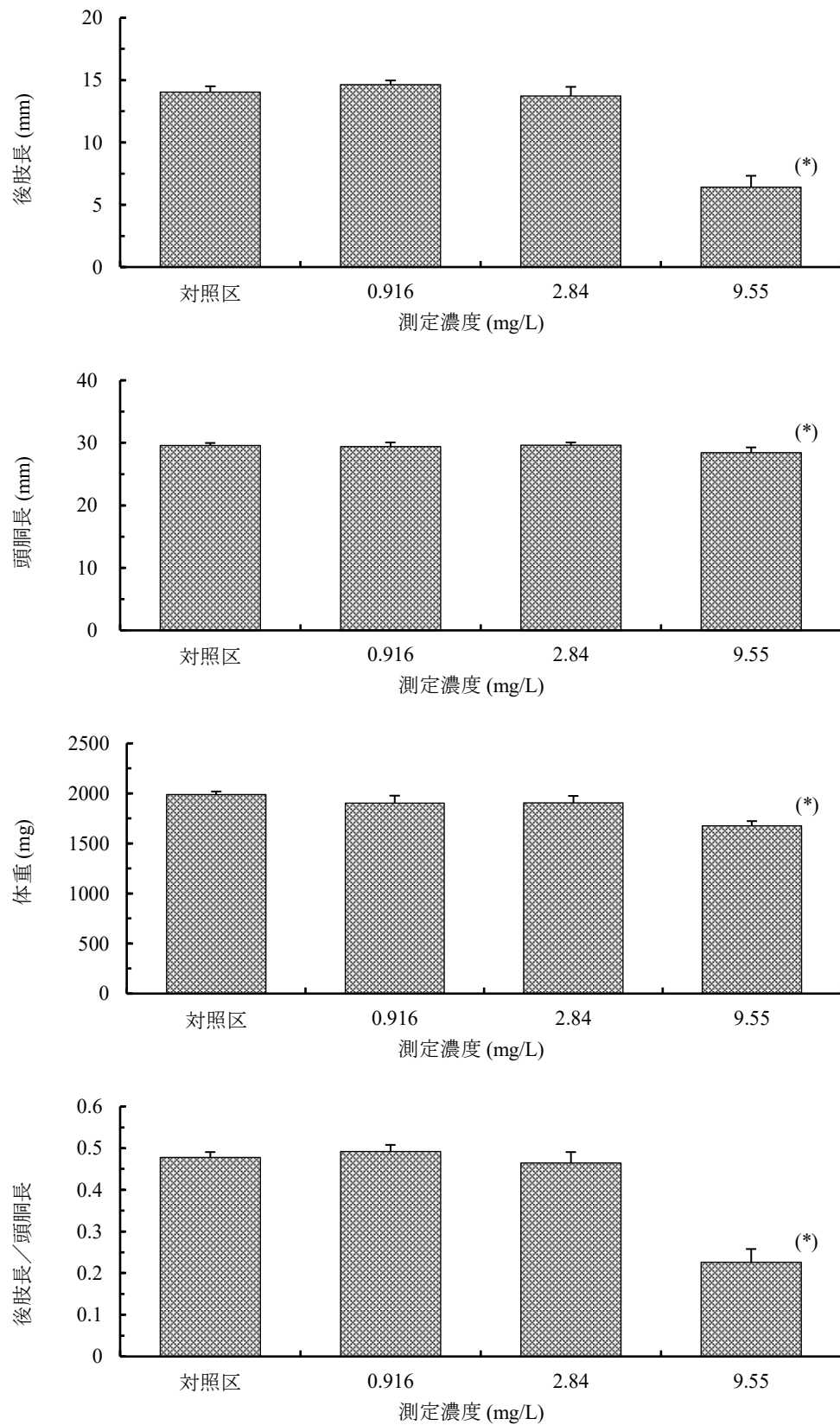


図 8-5-2 暴露終了時の形態に関するパラメータの測定結果

注) データは容器平均±標準偏差、(*)は統計学的に対照区との間に有意差($p<0.05$)が認められたことを示す。

8-6.甲状腺組織

対照区及びベンゾフェノン-2 の 2.84 mg/L の暴露終了時における甲状腺の病理組織学的検査の結果(4タイプの症例に関する重症度の診断結果)を表 8-6-1 に示す。また、典型的な甲状腺の組織像として、対照区の全症例が Grade 0 と診断された個体及びベンゾフェノン-2 の 2.84 mg/L の甲状腺の肥大と濾胞上皮細胞の肥大が Grade 1 と診断された個体の甲状腺の組織像を表 8-6-3 に示す。各個体の診断結果は付属資料 6 に示した。

対照区では、甲状腺の肥大、甲状腺の萎縮、濾胞上皮細胞の肥大及び濾胞上皮細胞の過形成の全症例に関して、検査に供した全個体(20 個体)で重症度は Grade 0 であった。ベンゾフェノン-2 の 2.84 mg/L では、甲状腺の萎縮及び濾胞上皮細胞の過形成に関して、検査に供した全個体(20 個体)で重症度は Grade 0 であったが、甲状腺の肥大に関して、4 個体で重症度が Grade 1、濾胞上皮細胞の肥大に関して、2 個体で重症度が Grade 1 と診断された。検定の結果、甲状腺の肥大に関して、重症度が Grade 1 と診断された個体数に対照区との間に統計学的な有意差(有意な増加)が認められた。なお、0.916 mg/L については、甲状腺組織の検査を実施していないが、2.84 mg/L の診断結果を勘案すると、4 つの典型症例に関して有意な変化(重症度 1 以上の個体数の増加)はなかったと考えられる。

表 8-6-1 暴露終了時の甲状腺の病理組織学的検査の結果

測定濃度 (mg/L)	甲状腺の肥大			
	Grade 0	≥Grade 1	≥Grade 2	Grade 3
対照区	20 / 20	0 / 20	0 / 20	0 / 20
2.84	16 / 20	4 / 20 (*)	0 / 20 (ns)	0 / 20 (ns)
測定濃度 (mg/L)	甲状腺の萎縮			
	Grade 0	≥Grade 1	≥Grade 2	Grade 3
対照区	20 / 20	0 / 20	0 / 20	0 / 20
2.84	20 / 20	0 / 20 (ns)	0 / 20 (ns)	0 / 20 (ns)
測定濃度 (mg/L)	濾胞上皮細胞の肥大			
	Grade 0	≥Grade 1	≥Grade 2	Grade 3
対照区	20 / 20	0 / 20	0 / 20	0 / 20
2.84	18 / 20	2 / 20 (ns)	0 / 20 (ns)	0 / 20 (ns)
測定濃度 (mg/L)	濾胞上皮細胞の過形成			
	Grade 0	≥Grade 1	≥Grade 2	Grade 3
対照区	20 / 20	0 / 20	0 / 20	0 / 20
2.84	20 / 20	0 / 20 (ns)	0 / 20 (ns)	0 / 20 (ns)

注) データは検査に供した個体数(20 個体)のうち該当の重症度以上と診断された個体数、(*)は対照区との間に統計学的な有意差が認められたこと($p<0.05$)、(ns)は統計学的な有意差が認められなかったことを示す。

参考データとして、ベンゾフェノン-2 の 9.55 mg/L の一部個体 (6 個体、NF stage 58 が 3 個体、NF stage 56 が 3 個体) の暴露終了時における甲状腺の病理組織学的検査の結果 (4 タイプの症例に関する重症度の診断結果) を表 8-6-2 に示す。また、典型的な甲状腺の組織像として、甲状腺の肥大、濾胞上皮細胞の肥大及び濾胞上皮細胞の過形成が Grade 3 と診断された個体の甲状腺の組織像を表 8-6-3 に示す。

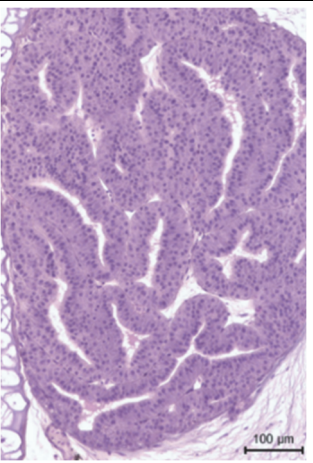
ベンゾフェノン-2 の 9.55 mg/L では、甲状腺の萎縮に関して、検査に供した全個体 (6 個体) で重症度は Grade 0 であったが、甲状腺の肥大に関して、4 個体で重症度が Grade 3、濾胞上皮細胞の肥大に関して、5 個体で重症度が Grade 3、1 個体で重症度が Grade 2、濾胞上皮細胞の過形成に関して、5 個体で重症度が Grade 3、1 個体で重症度が Grade 1 と診断された。検定の結果、それぞれ Grade 3 と診断された個体数 (及び Grade 2 以上又は Grade 1 以上とされた個体数) に関して、対照区との間に統計学的な有意差 (有意な増加) が認められた。

表 8-6-2 暴露終了時の甲状腺の病理組織学的検査の結果 (参考データ)

測定濃度 (mg/L)	甲状腺の肥大			
	Grade 0	≥Grade 1	≥Grade 2	Grade 3
対照区	20 / 20	0 / 20	0 / 20	0 / 20
9.55	2 / 6	4 / 6 (*)	4 / 6 (*)	4 / 6 (*)
測定濃度 (mg/L)	甲状腺の萎縮			
	Grade 0	≥Grade 1	≥Grade 2	Grade 3
対照区	20 / 20	0 / 20	0 / 20	0 / 20
9.55	6 / 6	0 / 6 (ns)	0 / 6 (ns)	0 / 6 (ns)
測定濃度 (mg/L)	濾胞上皮細胞の肥大			
	Grade 0	≥Grade 1	≥Grade 2	Grade 3
対照区	20 / 20	0 / 20	0 / 20	0 / 20
9.55	0 / 6	6 / 6 (*)	6 / 6 (*)	5 / 6 (*)
測定濃度 (mg/L)	濾胞上皮細胞の過形成			
	Grade 0	≥Grade 1	≥Grade 2	Grade 3
対照区	20 / 20	0 / 20	0 / 20	0 / 20
9.55	0 / 6	6 / 6 (*)	5 / 6 (*)	5 / 6 (*)

注) データは検査に供した個体数のうち該当の重症度以上と診断された個体数、(*)は対照区との間に統計学的な有意差が認められたこと ($p < 0.05$)、(ns) は統計学的な有意差が認められなかったことを示す。

表 8-6-3 暴露終了時の甲状腺の組織像

	対照区	2.84 mg/L	9.55 mg/L
典型症例			
甲状腺肥大	Grade 0	Grade 1	Grade 3
甲状腺萎縮	Grade 0	Grade 0	Grade 0
濾胞上皮細胞の肥大	Grade 0	Grade 1	Grade 3
濾胞上皮細胞の過形成	Grade 0	Grade 0	Grade 3

注) 参考として、最高濃度区の 9.55 mg/L の甲状腺の一部の病理組織学的検査を実施した。

9. まとめ及び考察

9-1. 最小影響濃度(LOEC)及び最大無影響濃度(NOEC)

本試験から得られた暴露 7 日後及び終了時におけるベンゾフェノン-2 の各エンドポイントに対する最小影響濃度(LOEC)及び最大無影響濃度(NOEC)を表 9-1-1 に示す。

本試験では、暴露終了時における累積死亡個体数に関して、ベンゾフェノン-2 の全濃度区で対照区と比較して有意な増加が認められなかったことから、死亡(致死影響)に関する LOEC は得られず、NOEC は 9.55 mg/L であった。

試験生物(アフリカツメガエル幼生)の発達(変態)に関わるエンドポイントである発生段階(NF stage)に関して、本試験では、暴露 7 日後及び終了時ともに、LOEC は 9.55 mg/L、NOEC は 2.84 mg/L であった。ベンゾフェノン-2 の 2.84 mg/L については、暴露終了時に生存した 20 個体を対象とした甲状腺の病理組織学的検査の結果、OECD GD82 で主要な症例の 1 つとされる甲状腺の肥大に関して、甲状腺のサイズが対照よりも 30~50% 大きい(肥大)ことから Grade 1 と診断された個体数に関して、対照区と比較して統計学的に有意な増加が認められた。また、試験生物の発達や成長に関わるエンドポイントである後肢長、頭胴長及び体重について、暴露 7 日後については、後肢長に対す

る LOEC は得られず、NOEC は 9.55 mg/L、頭胴長に対する LOEC は 0.916 mg/L、NOEC は得られず、体重に対する LOEC は 9.55 mg/L、NOEC は 2.84 mg/L であった。暴露終了時については、後肢長、頭胴長及び体重に対する LOEC は 9.55 mg/L、NOEC は 2.84 mg/L であった。

以上の結果から、ベンゾフェノン-2 は、試験生物としたアフリカツメガエル幼生に対して、有意な死亡が認められない濃度範囲において、発達(変態)及び成長を有意に低下(遅延)させることが示唆された。

表 9-1-1 ベンゾフェノン-2 のアフリカツメガエル幼生に対する LOEC 及び NOEC

エンドポイント			LOEC (mg/L)		NOEC (mg/L)
暴露7日後	発生段階		↓	9.55	2.84
	形態	後肢長	—	ND	9.55
		頭胴長	↓	0.916	ND
		体重（湿重量）	↓	9.55	2.84
		後肢長／頭胴長	—	ND	9.55
暴露21日後	死亡		—	ND	9.55
	発生段階		↓	9.55	2.84
	形態	後肢長	↓	9.55	2.84
		頭胴長	↓	9.55	2.84
		体重（湿重量）	↓	9.55	2.84
		後肢長／頭胴長	↓	9.55	2.84
		甲状腺	甲状腺肥大	↑	2.84
	甲状腺萎縮		—	ND	2.84
	濾胞上皮細胞の肥大		—	ND	2.84
	濾胞上皮細胞の過形成		—	ND	2.84
試験濃度 (mg/L)			0.916, 2.84, 9.55		

注) 「↑」、「↓」は濃度依存的かつ統計学的に有意な増加又は低下が認められたこと、「—」は統計学的に有意な反応が認められなかったこと、「ND」は LOEC 又は NOEC が得られなかったことを示す。

9-2. ベンゾフェノン-2 の両生類に対する内分泌かく乱作用

OECD TG231 では、両生類変態試験 (AMA) から得られた結果の解釈における論理的な支援ツールとして図 9-2-1 の decision logic が示されている。ここに本試験から得られた結果を当てはめると、Valid Experiment は YES、Advanced development 及び Asynchronous development は NO、Remarkable histological effects は YES となり、試験物質 (ベンゾフェノン-2) は Thyroid Active (視床下部-下垂体-甲状腺軸 (HPT 軸) に対

する作用を有する)となる。

本試験の結果から、ベンゾフェノン-2 の両生類に対する内分泌かく乱作用の関連性(抗甲状腺ホルモン作用の有無)があることが示唆された。

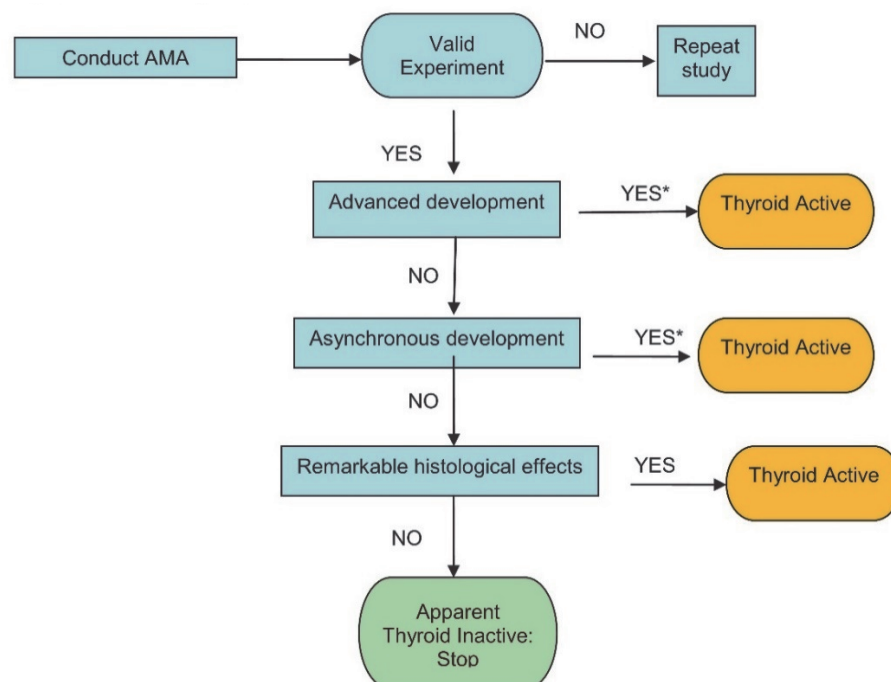


図 9-2-1 Decision logic for the conduct of the AMA
(OECD TG231 より引用)

10. 化学物質の内分泌かく乱作用に関する検討会等への報告

本業務で実施した第1段階生物試験に関して、環境省が開催した以下の会議に報告するための資料を作成するとともに、請負者が同会議に出席し、必要な説明等を行った。

会議名： 令和 6 年度第 3 回生態影響評価検討班会議

開催日： 令和 7 年 3 月 5 日(水)

11. 引用文献

- (1) 環境省(2017):平成 29 年度第 1 回 EXTEND2016 化学物質の内分泌かく乱作用に関する検討会 資料 1-1. 化学物質の内分泌かく乱作用に関連する報告の信頼性評価の実施結果について(案).

https://www.env.go.jp/chemi/end/extend2016/commi_2016/com01-03.html

- (2) 環境省(2018):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. 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).

<https://www.env.go.jp/chemi/292extend2016.html>

- (3) United States Environmental Protection Agency: CompTox Chemicals Dashboard v2.4.1, 2,2',4,4'-Tetrahydroxybenzophenone.
<https://comptox.epa.gov/dashboard/chemical/details/DTXSID5041306>
- (4) OECD(2009): The Amphibian Metamorphosis Assay. Guideline for the Testing of Chemicals, No.231.
https://www.oecd-ilibrary.org/environment/oecd-guidelines-for-the-testing-of-chemicals-section-2-effects-on-biotic-systems_20745761
- (5) いであ株式会社(2012):平成 23 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. 業務報告書.
- (6) OECD(2008): Report of the validation of The Amphibian Metamorphosis Assay (Phase 3), Series on testing and Assessment, No. 91.
[https://one.oecd.org/document/ENV/JM/MONO\(2008\)18/en/pdf](https://one.oecd.org/document/ENV/JM/MONO(2008)18/en/pdf)
- (7) 環境省(2019):令和元年度第 1 回化学物質の内分泌かく乱作用に関する検討会 参考資料 3. 平成 30 年度化学物質の内分泌かく乱作用に関する第一段階生物試験(ベンゾフェノン-2)実施業務 業務報告書.
https://www.env.go.jp/chemi/post_137.html
- (8) 環境省(2016):平成 27 年度版 化学物質と環境(平成 26 年度初期環境調査結果)
https://www.env.go.jp/chemi/kurohon/2015/shosai/1_0.pdf
- (9) Nieuwkoop PD, Faber J. (1994): Normal Table of *Xenopus laevis* (Daudin). Garland, New York.
- (10) OECD(2007):Guidance Document on Amphibian Thyroid Histology. Series on Testing and Assessment, No.82.
[https://one.oecd.org/document/env/jm/mono\(2007\)31/en/pdf](https://one.oecd.org/document/env/jm/mono(2007)31/en/pdf)

付属資料

付属資料 1 希釈水の水質測定結果

Parameter	Concentration (mg/L)	Parameter	Concentration (mg/L)
pH	8.0 (22.3°C)	Calcium	21
Electric conductivity	17 mS/m	Magnesium	2.3
Suspended solids	0	Iodine	0.000247
Residual chlorine	<0.01	Sulfide	<0.1
Chloramine	<0.01	Fluorine	0.05
Perchlorate	<0.0005	NH ₄ -N	<0.01
Chlorate	0.0005	TOC	<0.1
Total organic chlorine	<0.4	Total mercury	<0.0005
Aluminium	<0.005	PCB(ECD)	<0.0005
Chromium	<0.0001	1,2-Dichloropropane	<0.0002
Iron	<0.003	Isoxathion	<0.0001
Cobalt	<0.00003	Diazinon	<0.0001
Nickel	0.00042	Fenitrothion	<0.0001
Copper	0.00074	Chlorothalonil	<0.0001
Zinc	0.018	EPN	<0.0001
Arsenic	0.00018	Dichlorvos	<0.0001
Silver	<0.00001	Fenobucarb	<0.0001
Cadmium	<0.00001	Iprobenfos	<0.0001
Lead	<0.0001	Cholornitrofen	<0.0001
Sodium	7.1	Alkalinity (as CaCO ₃)	33
Potassium	1.0	Total hardness (as CaCO ₃)	62

Date of measurement: October 27th, 2024

付属資料 2 ベンゾフェノン-2 分析の条件

液体クロマトグラフ質量分析計(LC-MS/MS)の測定条件

カラム: Waters CSH Fluoro-phenyl (2.1 ϕ $\times$ 100 mm, 粒径 1.7 μ m)

移動相: A: 水(10mM 酢酸アンモニウム)

B: メタノール

流量: 0.2 mL/min

グラジエント: B(%) = 40(0-1min) - 70(6min) -- 99(6.1-11min) - 40(11.1-17min)

カラム温度: 40°C

注入量: 2 μ L

イオン化法: エレクトロスプレー法ネガティブ (ESI-Negative)

モード: 選択反応検出法 (SRM)

モニターイオン (m/z): ベンゾフェノン-2: 244.9 > 134.9

付属資料 3 試験液の水温及び水質測定結果

暴露日	水温 (°C)															
	対照区				0.916 mg/L				2.84 mg/L				9.55 mg/L			
	水槽1	水槽2	水槽3	水槽4	水槽1	水槽2	水槽3	水槽4	水槽1	水槽2	水槽3	水槽4	水槽1	水槽2	水槽3	水槽4
0	22.4	22.2	22.2	22.3	22.3	22.3	22.3	22.3	22.2	22.2	22.2	22.2	22.2	22.1	22.1	22.1
1	22.2	22.1	22.1	22.1	22.0	22.0	22.0	22.0	22.0	21.9	21.9	21.9	22.0	22.0	22.0	22.0
2	22.4	22.3	22.3	22.3	22.3	22.3	22.3	22.3	22.3	22.3	22.3	22.3	22.3	22.3	22.4	22.4
3	22.3	22.2	22.2	22.2	22.2	22.2	22.1	22.1	22.2	22.2	22.1	22.1	22.2	22.2	22.2	22.2
4	22.3	22.2	22.1	22.1	22.2	22.1	22.1	22.1	22.1	22.1	22.1	22.1	22.1	22.2	22.2	22.2
5	22.4	22.3	22.2	22.3	22.3	22.2	22.2	22.2	22.2	22.2	22.2	22.2	22.2	22.2	22.2	22.3
6	22.3	22.2	22.1	22.1	22.2	22.1	22.1	22.1	22.2	22.1	22.1	22.1	22.2	22.1	22.2	22.2
7	22.4	22.2	22.1	22.2	22.2	22.2	22.1	22.2	22.2	22.1	22.1	22.1	22.1	22.1	22.2	22.2
8	22.4	22.2	22.2	22.2	22.2	22.1	22.1	22.2	22.4	22.3	22.3	22.3	22.4	22.4	22.4	22.4
9	22.4	22.2	22.2	22.2	22.3	22.2	22.2	22.2	22.3	22.3	22.2	22.3	22.3	22.3	22.4	22.4
10	22.4	22.2	22.2	22.2	22.2	22.2	22.1	22.1	22.2	22.2	22.1	22.2	22.3	22.3	22.3	22.3
11	22.3	22.2	22.2	22.2	22.2	22.2	22.2	22.2	22.2	22.2	22.2	22.2	22.2	22.3	22.3	22.3
12	22.3	22.2	22.2	22.2	22.2	22.1	22.1	22.1	22.1	22.1	22.1	22.1	22.1	22.1	22.1	22.1
13	22.2	22.1	22.1	22.1	22.1	22.1	22.1	22.1	22.1	22.1	22.1	22.1	22.1	22.2	22.2	22.2
14	22.4	22.3	22.3	22.3	22.3	22.2	22.2	22.3	22.2	22.2	22.2	22.2	22.3	22.3	22.3	22.3
15	22.4	22.3	22.3	22.3	22.3	22.2	22.2	22.3	22.2	22.2	22.2	22.2	22.3	22.3	22.3	22.3
16	22.4	22.3	22.3	22.4	22.3	22.3	22.3	22.4	22.2	22.2	22.2	22.3	22.3	22.3	22.3	22.3
17	22.5	22.4	22.3	22.3	22.3	22.2	22.2	22.3	22.2	22.2	22.2	22.3	22.3	22.3	22.3	22.3
18	22.3	22.2	22.2	22.2	22.1	22.0	22.0	22.1	22.1	22.1	22.1	22.1	22.1	22.1	22.1	22.0
19	22.4	22.3	22.2	22.2	22.2	22.2	22.2	22.2	22.2	22.2	22.2	22.2	22.3	22.3	22.3	22.3
20	22.4	22.3	22.2	22.2	22.2	22.2	22.2	22.2	22.2	22.2	22.2	22.2	22.3	22.2	22.2	22.2
21	22.3	22.1	22.1	22.1	22.1	22.1	22.1	22.1	22.0	22.1	22.1	22.1	22.1	22.1	22.1	22.1

付属資料 3 (つづき)

暴露日	pH															
	対照区				0.916 mg/L				2.84 mg/L				9.55 mg/L			
	水槽1	水槽2	水槽3	水槽4	水槽1	水槽2	水槽3	水槽4	水槽1	水槽2	水槽3	水槽4	水槽1	水槽2	水槽3	水槽4
0	8.0	8.0	8.0	8.0	7.9	8.0	8.0	8.0	8.0	8.0	8.0	8.0	8.0	8.0	8.0	8.1
7	7.6	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.4	7.4	7.4	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5
14	7.4	7.4	7.4	7.4	7.4	7.4	7.4	7.4	7.4	7.4	7.4	7.4	7.5	7.5	7.5	7.6
21	7.5	7.5	7.4	7.4	7.4	7.4	7.4	7.3	7.3	7.4	7.4	7.4	7.4	7.4	7.4	7.4

暴露日	溶存酸素 (mg/L)															
	対照区				0.916 mg/L				2.84 mg/L				9.55 mg/L			
	水槽1	水槽2	水槽3	水槽4	水槽1	水槽2	水槽3	水槽4	水槽1	水槽2	水槽3	水槽4	水槽1	水槽2	水槽3	水槽4
0	9.1	8.7	8.7	8.8	8.7	8.7	8.8	8.7	8.8	8.8	8.7	8.7	8.8	8.7	8.7	8.7
7	6.7	6.3	6.7	6.3	6.4	6.2	6.2	6.5	6.4	6.8	6.7	6.6	6.4	6.4	6.4	6.3
14	7.1	6.4	7.2	6.5	6.4	6.5	6.8	7.0	6.5	6.6	6.4	6.5	6.7	6.8	7.0	6.9
21	6.0	5.5	5.8	5.4	5.5	5.5	5.9	5.2	6.0	5.9	5.6	6.1	5.8	5.9	6.2	5.8

付属資料 4 暴露 7 日後の形態に関するパラメータの測定結果

測定濃度 (mg/L)	試験 水槽	番号	発生段階 (NF stage)	後肢長 (mm)	頭胴長 (mm)	体重 (mg)	後肢長/ 頭胴長
対照区	1	01	54	2.2	17.8	412	0.126
		02	53	2.0	18.0	395	0.110
		03	54	2.8	20.2	552	0.136
		04	54	2.8	20.5	619	0.135
		05	54	2.6	20.7	591	0.125
	2	06	54	3.4	21.9	754	0.153
		07	53	2.1	19.1	419	0.111
		08	54	3.2	20.6	599	0.155
		09	55	3.5	22.1	754	0.160
		10	54	2.6	18.4	446	0.141
	3	11	54	2.8	21.8	650	0.131
		12	53	2.2	18.2	480	0.120
		13	53	2.2	18.5	400	0.120
		14	54	2.5	20.1	517	0.126
		15	54	3.2	21.3	621	0.152
	4	16	54	2.7	21.3	605	0.128
		17	53	2.4	17.2	349	0.141
		18	54	3.7	21.3	587	0.171
		19	53	2.3	18.3	396	0.123
		20	54	3.1	23.0	737	0.133
0.916	1	01	54	3.3	21.7	664	0.150
		02	54	2.9	20.9	619	0.137
		03	53	2.2	17.8	392	0.121
		04	54	2.5	17.7	365	0.139
		05	53	2.1	19.7	542	0.106
	2	06	54	3.1	19.9	547	0.154
		07	54	3.3	20.9	608	0.156
		08	54	3.1	20.0	547	0.153
		09	53	2.6	18.0	353	0.146
		10	54	2.7	20.1	498	0.132
	3	11	54	2.6	19.8	519	0.133
		12	54	2.3	18.0	381	0.129
		13	54	2.5	18.5	414	0.137
		14	54	3.0	20.4	594	0.147
		15	54	2.8	19.9	502	0.141
	4	16	54	3.3	21.8	640	0.152
		17	54	3.1	22.4	736	0.140
		18	53	2.6	18.2	375	0.143
		19	54	2.5	19.1	440	0.133
		20	53	2.4	17.8	365	0.137

付属資料 4(つづき)

測定濃度 (mg/L)	試験 水槽	番号	発生段階 (NF stage)	後肢長 (mm)	頭胴長 (mm)	体重 (mg)	後肢長/ 頭胴長
2.84	1	01	54	2.5	18.5	452	0.134
		02	54	2.5	20.2	564	0.125
		03	54	2.4	18.7	460	0.126
		04	55	3.2	20.5	583	0.157
		05	53	2.4	17.7	357	0.136
	2	06	54	3.1	20.4	555	0.153
		07	54	3.0	18.7	389	0.162
		08	54	3.4	21.2	542	0.160
		09	54	3.5	21.4	610	0.164
		10	54	2.6	19.1	405	0.138
	3	11	53	2.3	19.1	421	0.119
		12	54	2.5	18.8	494	0.134
		13	54	2.5	19.0	476	0.132
		14	55	2.9	20.5	585	0.143
		15	53	2.2	18.1	414	0.122
	4	16	54	3.3	20.0	561	0.165
		17	53	2.8	18.9	394	0.150
		18	54	3.5	20.7	552	0.169
		19	53	2.6	19.4	448	0.133
		20	54	3.1	21.2	580	0.144
9.55	1	01	54	2.6	19.0	619	0.137
		02	53	2.1	15.2	309	0.141
		03	54	2.5	18.4	671	0.137
		04	53	2.3	20.0	522	0.114
		05	53	2.1	16.4	360	0.125
	2	06	54	2.4	17.3	346	0.138
		07	53	2.7	17.4	339	0.154
		08	53	2.7	18.6	416	0.145
		09	54	3.4	21.6	661	0.156
		10	54	2.8	18.4	405	0.150
	3	11	54	2.4	20.2	554	0.117
		12	54	2.5	16.8	454	0.151
		13	53	2.3	17.6	482	0.132
		14	53	2.0	15.9	285	0.124
		15	53	1.9	15.9	316	0.122
	4	16	53	2.4	19.3	646	0.124
		17	54	3.2	18.5	474	0.172
		18	53	2.5	18.2	432	0.138
		19	53	2.4	18.6	361	0.129
		20	54	3.4	21.4	629	0.160

付属資料 5 暴露終了時の形態に関するパラメータの測定結果

測定濃度 (mg/L)	試験 水槽	番号	発生段階 (NF stage)	後肢長 (mm)	頭胴長 (mm)	体重 (mg)	後肢長/ 頭胴長
対照区	1	01	58	11.7	30.1	1769	0.390
		02	58	13.8	30.6	2115	0.450
		03	58	12.4	30.5	2028	0.405
		04	58	15.1	31.5	2163	0.481
		05	59	16.2	30.8	2214	0.525
		06	59	14.6	26.6	1651	0.548
		07	58	14.8	30.8	2077	0.480
		08	58	11.9	30.3	1850	0.393
		09	59	15.1	27.7	1875	0.544
		10	58	13.5	31.4	2168	0.430
		11	58	12.3	30.4	2116	0.405
		12	58	12.3	30.0	2162	0.409
		13	60	17.0	25.9	1508	0.654
		14	58	15.5	31.1	2203	0.499
		15	59	14.6	30.6	2265	0.476
	2	16	58	11.6	27.5	1489	0.422
		17	60	16.6	27.4	1917	0.606
		18	58	10.9	31.4	2209	0.348
		19	59	13.5	28.1	1698	0.479
		20	58	13.9	31.6	2338	0.441
		21	58	13.1	27.7	1855	0.473
		22	58	12.4	29.1	2196	0.427
		23	59	11.4	28.7	1830	0.399
		24	58	13.9	30.5	2087	0.457
		25	60	13.7	27.5	1668	0.498
		26	60	15.9	29.6	2020	0.535
		27	58	15.2	29.8	2257	0.508
		28	58	12.0	28.7	1879	0.418
		29	58	11.6	28.8	2085	0.401
		30	58	15.5	28.8	1799	0.540
	3	31	60	18.0	30.5	2174	0.590
		32	58	12.6	30.3	2151	0.415
		33	59	15.8	30.0	1900	0.527
		34	60	15.8	25.1	1501	0.630
		35	59	16.4	23.4	1203	0.700
		36	59	15.7	31.9	2337	0.493
		37	58	14.2	29.2	2085	0.485
		38	58	13.2	32.0	2244	0.411
		39	58	12.6	31.6	2244	0.397
		40	58	15.3	32.9	2570	0.466

付属資料 5(つづき)

測定濃度 (mg/L)	試験 水槽	番号	発生段階 (NF stage)	後肢長 (mm)	頭胴長 (mm)	体重 (mg)	後肢長/ 頭胴長
対照区	3	41	58	14.7	29.4	1893	0.502
		42	58	15.7	28.4	1805	0.554
		43	58	11.1	29.3	1846	0.379
		44	58	12.7	30.7	2227	0.415
		45	59	14.8	31.1	2126	0.477
	4	46	59	16.5	30.4	2137	0.543
		47	59	11.9	30.4	2020	0.393
		48	59	12.5	31.4	2191	0.398
		49	58	13.9	29.2	1759	0.475
		50	58	13.1	28.9	1867	0.454
		51	59	15.1	26.3	1752	0.574
		52	59	14.3	30.2	2033	0.475
		53	59	14.8	31.0	2218	0.479
		54	59	16.8	29.9	2010	0.561
		55	59	15.3	31.6	2223	0.483
		56	58	8.8	30.4	1954	0.289
		57	59	14.8	30.1	1953	0.490
		58	59	12.7	30.3	2014	0.418
		59	60	16.5	28.4	1655	0.580
		60	60	14.6	27.2	1689	0.538
0.916	1	01	58	14.9	30.7	2106	0.483
		02	60	17.0	29.3	1913	0.579
		03	58	13.7	30.0	1981	0.458
		04	59	17.2	27.9	1834	0.614
		05	58	14.7	28.3	1757	0.518
		06	58	15.6	33.1	2495	0.472
		07	59	13.8	27.8	1657	0.496
		08	59	13.3	28.9	1806	0.460
		09	58	14.0	28.9	1758	0.484
		10	58	14.8	31.0	2136	0.476
		11	58	15.2	27.8	1750	0.547
		12	59	14.1	27.4	1569	0.513
		13	58	13.6	29.4	1752	0.463
		14	58	12.5	29.8	1928	0.418
		15	58	14.5	29.5	1843	0.493
	2	16	59	16.5	26.7	1686	0.617
		17	58	12.0	28.5	1749	0.421
		18	59	12.0	26.6	1465	0.452
		19	NA	16.6	24.2	1325	0.685
		20	58	13.6	30.4	2204	0.449

注) 「NA」は非同調的発達個体のため、発生段階が判定できなかったことを示す。

付属資料 5(つづき)

測定濃度 (mg/L)	試験 水槽	番号	発生段階 (NF stage)	後肢長 (mm)	頭胴長 (mm)	体重 (mg)	後肢長/ 頭胴長
0.916	2	21	58	13.4	30.7	2196	0.436
		22	61	20.0	23.8	1360	0.841
		23	58	15.7	29.3	1998	0.537
		24	58	13.5	30.2	1967	0.446
		25	60	16.1	27.6	1640	0.584
		26	60	17.4	27.5	1631	0.633
		27	58	12.5	27.9	1677	0.447
		28	58	13.0	29.6	1998	0.440
		29	59	16.2	28.7	1843	0.566
		30	60	19.4	30.9	2323	0.627
	3	31	58	13.4	29.2	2077	0.458
		32	58	12.2	29.6	1903	0.411
		33	58	14.6	31.5	2319	0.464
		34	58	15.6	28.7	1743	0.544
		35	60	19.8	24.9	1347	0.794
		36	58	13.0	30.7	1913	0.423
		37	58	13.0	28.2	1698	0.462
		38	58	12.3	29.6	2039	0.418
		39	58	10.0	30.3	1849	0.329
		40	59	17.1	28.5	1721	0.600
		41	58	9.7	30.6	2037	0.316
		42	59	14.4	26.8	1335	0.537
		43	58	15.3	29.3	1787	0.524
		44	61	22.3	25.1	1451	0.888
		45	58	11.8	30.1	1959	0.393
	4	46	59	16.5	29.3	1903	0.563
		47	58	11.9	29.1	1958	0.410
		48	58	12.4	31.3	1937	0.394
		49	60	16.8	29.5	1767	0.568
		50	58	15.7	29.7	1967	0.528
		51	58	12.6	32.9	2257	0.383
		52	59	14.9	30.3	1989	0.491
		53	59	17.7	29.8	2012	0.593
		54	58	15.4	31.9	2324	0.481
		55	59	15.5	29.9	1846	0.518
		56	58	14.0	31.1	2094	0.451
		57	59	15.3	29.2	1973	0.525
		58	58	10.9	31.5	2238	0.346
		59	58	13.9	30.8	2140	0.451
		60	59	15.4	29.0	1779	0.531

付属資料 5(つづき)

測定濃度 (mg/L)	試験 水槽	番号	発生段階 (NF stage)	後肢長 (mm)	頭胴長 (mm)	体重 (mg)	後肢長/ 頭胴長
2.84	1	01	58	13.0	29.4	1881	0.442
		02	59	14.4	30.4	1955	0.473
		03	59	14.8	29.2	1966	0.507
		04	58	13.8	30.9	2042	0.445
		05	58	13.6	26.6	1437	0.512
		06	58	15.1	29.1	1755	0.521
		07	58	12.3	28.1	1692	0.438
		08	58	12.6	30.2	2350	0.418
		09	58	13.4	29.7	1865	0.451
		10	59	16.1	30.5	2104	0.529
		11	59	16.9	29.5	2036	0.574
		12	59	15.0	28.2	1752	0.532
		13	60	16.0	27.7	1619	0.580
		14	58	12.3	29.2	1800	0.421
		15	59	15.0	27.5	1714	0.544
	2	16	58	14.0	28.8	1714	0.486
		17	59	13.1	28.5	1601	0.461
		18	56	9.5	28.9	1751	0.329
		19	58	12.6	32.2	2321	0.391
		20	59	14.2	30.9	2032	0.459
		21	59	16.5	29.8	1919	0.553
		22	58	9.0	27.0	1404	0.333
		23	60	15.5	28.5	1672	0.544
		24	58	11.1	31.2	2112	0.357
		25	58	10.5	29.8	1919	0.351
		26	58	12.6	32.0	2335	0.392
		27	58	13.4	29.5	1783	0.454
		28	58	14.6	29.9	1743	0.489
		29	59	13.5	28.9	1750	0.468
		30	58	9.9	27.7	1606	0.358
	3	31	58	15.1	31.3	2058	0.482
		32	58	13.0	30.0	2172	0.432
		33	59	16.7	28.6	1712	0.586
		34	59	16.1	30.3	2106	0.532
		35	58	12.8	31.0	2080	0.413
		36	58	11.4	31.1	2190	0.365
		37	58	13.4	30.2	2046	0.444
		38	58	12.1	29.3	1903	0.414
		39	58	14.5	30.4	2052	0.475
		40	58	12.4	28.6	1824	0.434

付属資料 5(つづき)

測定濃度 (mg/L)	試験 水槽	番号	発生段階 (NF stage)	後肢長 (mm)	頭胴長 (mm)	体重 (mg)	後肢長/ 頭胴長
2.84	3	41	58	11.0	31.8	2324	0.345
		42	59	16.7	29.0	1930	0.576
		43	58	11.8	30.1	1778	0.392
		44	60	20.3	29.0	1800	0.698
		45	58	14.5	30.7	1934	0.473
	4	46	60	13.7	27.2	1460	0.502
		47	60	16.7	28.9	1731	0.577
		48	58	11.1	30.2	1999	0.368
		49	58	10.9	29.8	1762	0.367
		50	58	15.3	29.6	1922	0.518
		51	58	13.7	30.3	2133	0.452
		52	58	15.2	30.1	1938	0.506
		53	58	14.0	31.5	2263	0.443
		54	59	12.9	28.8	1871	0.448
		55	58	13.3	29.8	1879	0.446
		56	58	12.1	30.4	1988	0.400
		57	60	18.2	30.1	2050	0.603
		58	58	13.5	30.2	1980	0.447
		59	59	15.0	30.4	2046	0.493
		60	58	11.9	29.3	1844	0.405
9.55	1	01	56	6.9	30.8	2196	0.226
		02	56	5.8	28.7	1686	0.204
		03	56	5.3	29.7	1995	0.180
		04	56	5.8	30.4	1964	0.192
		05	57	7.8	25.0	1248	0.314
		06	56	8.9	31.5	2406	0.282
		07	56	6.6	25.3	1248	0.262
		08	57	3.9	30.2	2246	0.128
		09	57	5.5	24.9	1142	0.222
		10	58	11.3	29.6	1726	0.382
		11	57	8.0	24.8	1495	0.323
		12	56	6.1	27.8	1808	0.218
		13	56	9.3	26.7	1273	0.349
		14	56	7.7	23.0	945	0.336
		15	56	6.3	25.7	1377	0.246
	2	16	57	9.5	31.8	1776	0.299
		17	57	6.9	27.5	1504	0.249
		18	56	6.0	29.7	1797	0.201
		19	58	12.2	32.7	2114	0.373
		20	56	5.6	24.9	1103	0.226

付属資料 5(つづき)

測定濃度 (mg/L)	試験 水槽	番号	発生段階 (NF stage)	後肢長 (mm)	頭胴長 (mm)	体重 (mg)	後肢長/ 頭胴長
9.55	2	21	57	9.9	28.6	1489	0.347
		22	57	8.4	30.7	1884	0.274
		23	56	4.9	32.6	2046	0.149
		24	58	10.0	28.9	1559	0.344
		25	56	5.0	27.0	1364	0.184
		26	56	6.0	32.4	2218	0.186
		27	56	5.8	29.7	1875	0.195
		28	56	5.5	28.4	1713	0.194
		29	NA	NA	NA	NA	NA
		30	NA	NA	NA	NA	NA
	3	31	56	3.7	27.0	1549	0.136
		32	56	3.8	26.7	1485	0.141
		33	56	5.3	31.8	2022	0.166
		34	57	4.8	26.4	1526	0.180
		35	56	5.4	29.4	1646	0.185
		36	57	11.4	27.7	1486	0.410
		37	56	7.1	29.7	1969	0.240
		38	56	4.5	25.6	1648	0.174
		39	56	4.4	28.0	1838	0.157
		40	56	3.3	24.0	1272	0.138
		41	56	7.6	28.5	1713	0.265
		42	56	4.7	31.4	2177	0.148
		43	56	4.1	29.5	1806	0.139
		44	NA	NA	NA	NA	NA
		45	NA	NA	NA	NA	NA
	4	46	56	4.9	22.7	1139	0.215
		47	56	8.3	25.6	1088	0.324
		48	56	5.7	30.2	1749	0.188
		49	56	6.8	32.0	1969	0.211
		50	56	6.4	30.5	1862	0.208
		51	57	8.3	25.3	1186	0.328
		52	57	5.8	30.7	1937	0.187
		53	56	4.7	26.2	1391	0.180
		54	56	4.4	26.6	1222	0.166
		55	57	7.7	31.4	2071	0.246
		56	56	4.4	28.0	1405	0.158
		57	56	4.7	27.7	1565	0.170
		58	56	6.0	29.8	1909	0.200
		59	56	5.2	28.6	1938	0.184
		60	56	5.6	30.3	1920	0.185

注) 「NA」は死亡のため、測定が実施されていないことを示す。

付属資料 6 暴露終了時の甲状腺組織検査の診断結果

測定濃度 (mg/L)	試験 水槽	番号	Thyroid gland hypertrophy	Thyroid gland atrophy	Follicular cell hypertrophy	Follicular cell hyperplasia
対照区	1	02	Grade0	Grade0	Grade0	Grade0
		03	Grade0	Grade0	Grade0	Grade0
		04	Grade0	Grade0	Grade0	Grade0
		07	Grade0	Grade0	Grade0	Grade0
		10	Grade0	Grade0	Grade0	Grade0
	2	05	Grade0	Grade0	Grade0	Grade0
		06	Grade0	Grade0	Grade0	Grade0
		07	Grade0	Grade0	Grade0	Grade0
		09	Grade0	Grade0	Grade0	Grade0
		12	Grade0	Grade0	Grade0	Grade0
	3	02	Grade0	Grade0	Grade0	Grade0
		07	Grade0	Grade0	Grade0	Grade0
		08	Grade0	Grade0	Grade0	Grade0
		09	Grade0	Grade0	Grade0	Grade0
		10	Grade0	Grade0	Grade0	Grade0
	4	02	Grade0	Grade0	Grade0	Grade0
		03	Grade0	Grade0	Grade0	Grade0
		04	Grade0	Grade0	Grade0	Grade0
		05	Grade0	Grade0	Grade0	Grade0
		11	Grade0	Grade0	Grade0	Grade0
2.84	1	01	Grade0	Grade0	Grade0	Grade0
		04	Grade1	Grade0	Grade0	Grade0
		05	Grade0	Grade0	Grade0	Grade0
		06	Grade0	Grade0	Grade0	Grade0
		07	Grade0	Grade0	Grade0	Grade0
	2	01	Grade0	Grade0	Grade0	Grade0
		04	Grade0	Grade0	Grade1	Grade0
		09	Grade0	Grade0	Grade0	Grade0
		10	Grade0	Grade0	Grade0	Grade0
		11	Grade0	Grade0	Grade0	Grade0
	3	01	Grade0	Grade0	Grade0	Grade0
		02	Grade0	Grade0	Grade0	Grade0
		05	Grade0	Grade0	Grade0	Grade0
		06	Grade0	Grade0	Grade0	Grade0
		07	Grade1	Grade0	Grade0	Grade0
	4	03	Grade1	Grade0	Grade0	Grade0
		04	Grade0	Grade0	Grade0	Grade0
		05	Grade0	Grade0	Grade0	Grade0
		06	Grade0	Grade0	Grade0	Grade0
		07	Grade1	Grade0	Grade1	Grade0

付属資料 6 （つづき）

測定濃度 (mg/L)	試験 水槽	番号	Thyroid gland hypertrophy	Thyroid gland atrophy	Follicular cell hypertrophy	Follicular cell hyperplasia
9.55	1	10	Grade3	Grade0	Grade3	Grade3
		13	Grade0	Grade0	Grade2	Grade1
	2	03	Grade3	Grade0	Grade3	Grade3
		04	Grade3	Grade0	Grade3	Grade3
		09	Grade0	Grade0	Grade3	Grade3
	3	01	Grade3	Grade0	Grade3	Grade3

令和6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(両生類変態試験、ベンゾフェノン-2)実施業務 報告書

いであ株式会社

〒154-8585 東京都世田谷区駒沢 3-15-1
TEL: 03-4544-7600 FAX: 03-4544-7700
URL: <https://www.ideacon.co.jp>

IDEA Consultants, Inc.

3-15-1 Komazawa, Setagaya-ku, Tokyo 154-8585, Japan
TEL: +81-3-4544-7600 FAX: +81-3-4544-7700
URL: <https://www.ideacon.co.jp>

無断複写・転載を禁じます。