

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
(魚類短期繁殖試験、チアベンダゾール)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	2
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	7
5-7. 試験液の調製	7
5-8. 暴露操作	8
5-9. 試験物質濃度の測定	9
5-10. エンドポイント測定	9
5-11. データ解析	11
6. 試験の許容基準	12
7. 結果	13
7-1. 試験物質の測定濃度	13
7-2. 暴露期間中の試験環境	13
7-3. 死亡率及び一般症状	14
7-4. ビテロゲニン	15
7-5. 二次性徴	15
7-6. 産卵状況	16
7-7. 肝臓体指数及び生殖腺体指数	23
8. まとめ及び考察	24
8-1. 最小影響濃度(LOEC)及び最大無影響濃度(NOEC)	24
8-2. 試験物質のメダカに対する内分泌かく乱作用	24
9. 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
10. 引用文献	26
付属資料	付資 1～22

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(魚類短期繁殖試験、チアベンダゾール)実施業務

要旨

本業務では、チアベンダゾールについて、エストロゲン作用を含む魚類の視床下部-下垂体-生殖腺軸(HPG 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.229: Fish Short Term Reproduction Assay, (2012 年 10 月 2 日採択)に準拠して、魚類短期繁殖試験(FSTRA)を実施した。

試験物質

名 称 :チアベンダゾール
化 学 名 :2-(1,3-thiazol-4-yl)-1H-benzimidazole
CAS 登録番号:148-79-8

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: ミナミメダカ(*Oryzias latipes*) (ふ化 16 週齢の成魚)
暴露方式: 流水式
試験期間: 21 日間
試験濃度: 0.0360、0.114、0.360 mg/L(設定濃度)及び対照区
(平均測定濃度: 0.0371、0.116、0.360 mg/L)
試験水量: 2 L/容器
試験水の交換率: 約 15 回/日
連数: 4 連/濃度
生物数: 容器当たりオス及びメス各 3 個体
(濃度当たりオス及びメス各 12 個体)
水温: 25±1℃
照明: 16 h-L/8 h-D
給餌: ブラインシュリンプふ化幼生(3 回/日)

エンドポイントの測定

暴露中は、毎日、死亡及び行動異常の有無を観察し、産卵状況(産卵数、受精卵数及び受精率)を測定した。また、暴露終了時に、生存する全個体を対象として、二次性徴及び肝臓のビテロゲニン濃度を測定した。

結果及び結論

対照区及びチアベンダゾールの 0.0371 及び 0.116 mg/L では、暴露期間を通して死亡及並びに行動及び外見の異常は観察されなかった。チアベンダゾールの 0.360 mg/L では、試験物質の毒性によると推察される死亡(オス 2 個体及びメス 1 個体)並びに摂餌活動の低下及び行動又は外見に異常が認められる個体が観察された。暴露中の産卵状況については、受精卵数に関して 0.116 mg/L 以上、産卵数及び受精率に関して 0.360 mg/L で、対照区と比較して統計学的に有意な低下が認められたが、これらは、チアベンダゾールの HPG 軸に対する作用によるものではなく、毒性の影響であると推察された。暴露終了時における肝臓のビテロゲニン濃度については、メスでは 0.360 mg/L で対照区と比較して統計学的な増加が認められたが、オスでは、全試験濃度で対照区との間に統計学的な有意差は認められなかったことから、チアベンダゾールが試験生物に対してエストロゲン作用を示さなかったと考えられた。また、二次性徴については、オス及びメスともに、全ての試験濃度におい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。

本試験の結果から、チアベンダゾールは、ミナミメダカの成魚に対して、0.116 mg/L 以上の濃度で繁殖に影響を及ぼすことが示唆されたが、エストロゲン作用を含む明確な HPG 軸に対する作用を持つことは確認できなかった。

Title

Study on the Tier 1 *in vivo* assay for endocrine disrupting effects of chemical substances
(Fish Short Term Reproduction Assay for Thiabendazole)

Summary

Fish Short Term Reproduction Assay (FSTRA) was conducted for thiabendazole (TBZ), to identify an effect on hypothalamic–pituitary–gonadal (HPG) axis, including estrogenic activity, on fish, in accordance with the OECD guideline for the testing of chemicals No.229, Fish Short Term Reproduction Assay (adopted on 2 October 2012), as follows.

Test Substance

Common name: Thiabendazole (TBZ)

Chemical name: 2-(1,3-thiazol-4-yl)-1H-benzimidazole

CAS Registry Number: 148-79-8

Test conditions

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

Test animal:	<i>Oryzias latipes</i> (matured adults in 16 weeks post hatch)
Type of exposure:	Flow-through
Exposure period:	21 days
Test concentrations:	0.0360, 0.114, 0.360 mg/L (as nominal), and a dilution water control (DWC) at 0 mg/L TBZ (mean measured concentration was 0.0371, 0.116, 0.360 mg/L, respectively)
Test solution volume:	2 L/vessel
Volume exchanges of test solution:	ca. 15 times daily
Replication:	4 replicates for each test concentration and DWC
Number of test fish:	3 males and 3 females/vessel (12 males and 12 females for each concentration and DWC)
Water temperature:	25±1 degrees C
Photoperiod:	16 h light:8 h dark
Feeding:	Brine shrimp nauplii, three times daily

Endpoint measurements

During the exposure, mortality and abnormality on behavior and appearance, and spawning status (number of total and fertile eggs, and fertility rate) was assessed daily. Hepatic vitellogenin concentrations (VTG) and secondary sex characteristics (SCC) were measured in surviving fish at the termination of the exposure.

Results and conclusions

No mortality or abnormality on behavior and appearance was observed in the DWC, or in 0.116 and 0.360 mg/L groups of TBZ over the exposure period. In the TBZ 0.360 mg/L group, some mortalities (two males and one female), reduction of feeding activity, and individuals that showed an abnormality on appearance or behavior were found during the exposure. Regarding the spawning status, a significant decrease was observed compared to the DWC group in the number of fertile eggs at concentrations above 0.116 mg/L, and in the fertility rate and total number of eggs at concentrations above 0.360 mg/L. This suggests that the toxicity of TBZ, rather than its activity on the HPT axis, was responsible. In the hepatic VTG, an increase was statistically found in the females of TBZ 0.360 mg/L group but no significant difference from the DWC was observed in male fish in all TBZ concentrations, indicating that TBZ did not have an estrogenic activity on the test fish. A significant alteration from the control in SCC was observed in neither males nor females of the TBZ treatment groups.

Based on the results of the FSTRA, it is suggested that test substance, TBZ, had an affect on reproduction of test fish, *Oryzias latipes*, in the concentrations above 0.116 mg/L, but no obvious activity on HPT axis including an estrogenic activity was confirmed.

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—EXTEND2022—」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、化学物質の生殖に及ぼす影響に関する第1段階の生物試験である魚類短期繁殖試験を実施した。

2. 業務内容

本業務では、環境省が EXTEND2016 の枠組みの下で別途実施した第1段階の試験管内試験（レポータージーン試験）等の結果に基づいて、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試験対象物質であるチアベンダゾールについて、ミナミメダカを試験生物とする魚類短期繁殖試験を実施した。

魚類短期繁殖試験は、図 2-1 に示すとおり、性的に成熟したメス及びオスを試験生物として試験水槽に収容し、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、繁殖に関わるエンドポイントとして産卵状況（産卵数、受精卵数及び受精率）の測定を行う。また、暴露終了時には、生存した試験生物について、ビテログニン及び二次性徴の測定を行い、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。

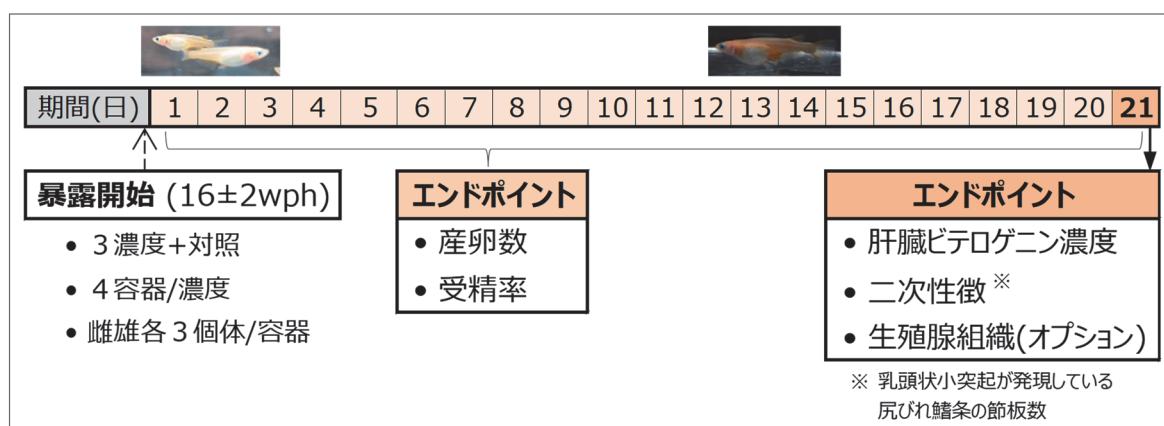


図 2-1 メダカを試験生物とする魚類短期繁殖試験の概要

3. 試験実施施設

本業務では、以下の施設で魚類短期繁殖試験(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

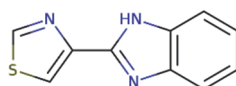
4. 試験物質

本試験では、チアベンダゾールを試験物質とした。チアベンダゾールについては、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、令和3年度に信頼性評価を実施する対象として選定され、令和4年度に実施された文献信頼性評価の結果、試験管内試験の報告において、エストロゲン作用を示すことが示唆され、エストロゲ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⁾。また、令和5年度に実施された第1段階試験管内試験(メダカ ER α レポーター遺伝子試験)の結果、メダカ ER α に対する転写活性化(エストロゲン作用)が認められた。

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⁽²⁾。

試験物質の名称及び物理化学的性状

一般名： チアベンダゾール(Thiabendazole)
化学名： 2-(1,3-thiazol-4-yl)-1H-benzimidazole
CAS 登録番号： 148-79-8
分子式： C₁₀H₇N₃S
分子量： 201.25
構造式：



融点： 300 to 305°C (Experimental range)
沸点： 336 to 446°C (Predicted range)
水溶解度： 2.48e-4 to 2.51e-4 mol/L (Experimental range)
蒸気圧： 4.00e-9 mm Hg (Experimental range)
Log Kow： 2.47 (Experimental range)

5. 材料及び方法

本試験は、OECD テストガイドライン No.229 Fish Short Term Reproduction Assay (Adopted: 2 October 2012)(以下、OECD TG229)に準拠して、以下に示す材料及び方法により実施した⁽³⁾。

5-1. 被験物質(試薬)

本試験に供した被験物質(チアベンダゾール試薬)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。被験物質は、入手後、試験施設内の保管庫(常温)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。

被験物質(試験に供したチアベンダゾール試薬)

試薬名: 2-(4-Thiazolyl)benzimidazole
供給者: 東京化成工業株式会社
ロット番号: UY6FI
純度: 100.0% (GC、製品規格 98.0%以上)
入手量: 50 g (25 g×2 本)

5-2. 試験生物

本試験では、ミナミメダカ (*Oryzias latipes*) 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 20 年間以上にわたり累代飼育している系群 (NIES-R 系と同履歴のヒメダカ系群) を自家繁殖(飼育) 及び試験環境に順化させた性的に成熟した成体(メス及びオス)を用いた。

(1) 供試前の飼育

ふ化後 3~6 か月齢の親魚が産卵した受精卵を採取し、付着糸を除去した後、脱塩素処理した水道水を入れたガラスシャーレに収容し、25℃に設定したインキュベータ内でふ化まで管理(培養)した。ふ化した仔魚は、脱塩素水道水を飼育水とする流水式のガラス水槽(容量 30 L、約 5 換水/日)に移し、試験供試用の個体を選別するまで飼育した。飼育水温は 25±2℃、餌料はふ化直後から約 2 週齢まではブラインシュリンプふ化幼生を 3~4 回/日、以降はブラインシュリンプふ化幼生を 2~3 回/日の頻度で飽食量与えた。飼育中は定期的を選別を行い、外見的に異常が認められる個体及び成長の悪い個体を除去した。

ふ化から 11 週間後(12 週齢時点)、飼育している個体の性別を外形的な二次性徴(尻びれの形状)から判別し、外見的に異常が認められない成長が良好な個体(メス及びオス各 100 個体以上)を選抜した。選別した個体(以下、供試群)は、容量 30 L の水槽に収容して、次項に示す順化に供するまで、試験と同じ環境(水温 25±1℃、照明 16 h-L/8 h-D、ブラインシュリンプふ化幼生を 3 回/日給餌)で飼育した。

(2) 順化

試験(試験物質での暴露)の開始 21 日前に、供試群から無作為に取り上げたメス及びオス各 48 個体を 16 個のガラス水槽(後述の試験容器と同じもの)に各 3 個体ずつ収容し、後述の試験と同じ条件(水温 25±1℃、照明 16 h-L/8 h-D、約 10 換水/日、ブラインシュリンプふ化幼生を 3 回/日給餌)で飼育して試験環境に順化させた。順化中は、毎日、全ての水槽について、供試魚の状態(行動や遊泳等の外見、摂餌活動等)を観察するとともに、後述の試験期間と同様に産卵状況(産卵数及び受精率)を調べた。順化中に外

見や行動に異常が認められた個体については、供試群の別個体と入れ換えた。また、相対的に産卵状況が悪い(受精卵数が少ない)状況が継続してみられた水槽については、水槽内のメスのうち、他の個体よりも産卵数が少ないと思われる個体や受精率が低いと思われる個体を供試群の別個体と入れ換えた(メスの入れ換えは、試験物質による暴露開始の9日前以降は行わなかった)。

試験物質による暴露開始前9日間の供試魚の死亡率は5%未満であり、OECD TG229の試験生物に関する基準を満たしていた。また、順化期間の終わり7日間に測定した各水槽における受精卵数(各水槽におけるメス1個体が1日に産卵した受精卵数の平均値)は、31.2～37.5 eggs/female/dayであった。

(3) 供試生物の齢及び大きさ

試験生物の齢は、本試験に供した時点(試験物質での暴露開始時)で16週齢であった。また、体重(平均±標準偏差)は、オスが 405 ± 71 mg、メスが 564 ± 47 mgであった(供試群からサブサンプルとして無作為に取り上げたオス及びメス各12個体で測定)。

(4) 順化中の受精卵数に基づく供試生物の割り当て

後述の試験生物の暴露開始にあたり、順化期間の終わり7日間(暴露開始前7日間)の産卵状況(各水槽における1日当たりの平均受精卵数)を基に試験区間(対照区及び試験物質の3つの濃度区)に偏りが生じないように配慮して、供試魚の16水槽を各試験区に割り当てた。各試験区に割り当てた4水槽の平均受精卵数(4水槽の平均)は103.0～104.8 eggs/dayであり、統計学的に試験区間に有意差がないことを確認した(一元配置分散分析、 $p=0.98$)。

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(タバイエスベック株式会社)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、ミニダイリ्यूーターシステム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水槽に供給できる。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2.0 L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、洗浄された清浄な水槽と交換した。

(3) 試験環境の測定機器

試験液の水溫、pH 及び溶存酸素は、それぞれ以下の機器を用いて測定した。

水溫 : デジタル温度計 MF 1000 (株式会社チノー)

pH : pH Meter D-51 (株式会社堀場製作所)

溶存酸素 : 蛍光式溶存酸素計 Multi3410 (WTW 社)

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水道水(脱塩素水道水)を使用した。希釈水は、試験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、東京理化学株式会社)により水溫を調整するとともに、十分に通気した。

試験実施施設では、定期的に希釈水の水質を測定し、生物試験での使用に問題がないことを確認している。本試験直近の水質の測定結果を付属資料 1 に示した。

5-5. 試験濃度

OECD TG229 では、試験濃度について、(1)死亡率が結果的に 10%を超えない最高濃度と定義する試験物質の最大許容濃度(maximum tolerated concentration)、(2) 10 mg/L、(3) 試験物質の水溶解度、のうち最も低い濃度を試験最高濃度に設定するべきとしている⁽³⁾。

チアベンダゾールの魚類に対する毒性に関して、急性毒性及び慢性毒性に関する既存知見が得られた。急性毒性については、稚魚期のニジマス(*Oncorhynchus mykiss*)を試験生物とする 96 時間暴露における半数致死濃度(LC₅₀)が 0.56 mg/L、死亡が認められた最小影響濃度(LOEC)が 0.275 mg/L、無影響濃度(NOEC)が 0.12 mg/L との報告がある^(4,5)。慢性毒性については、ニジマスを試験生物とする初期生活段階試験において、体重(成長)に対する最小毒性濃度(LOAEC)が 0.029 mg/L、無毒性濃度(NOAEC)が 0.012 mg/L と報告されている^(6,7)。また、ファットヘッドミノー(*Pimephales promelas*)を試験生物とする初期生活段階試験では、LOAEC が 0.23 mg/L、NOAEC が 0.11 mg/L と報告されている^(6,8)。

本試験の供試生物であるメダカへの毒性に関する既存知見が得られなかったことから、試験実施施設において、9 週齢のミナミメダカ(全長 23 mm 前後)を用いて、0.5、1.0、2.5 及び 5.0 mg/L の 4 濃度(設定濃度)での半止水式(48 時間ごとに試験液を全量交換)による 96 時間急性毒性試験を実施した結果、半止水式での暴露試験では、暴露 96 時間後の累積死亡率は、5.0 mg/L で 100%、2.5 mg/L 以下の濃度ではいずれも 0%であり、96 時間半数致死濃度(96h-LC₅₀)は 3.54 mg/L と算出された。なお、2.5 mg/L については、暴露 96 時間後まで死亡はみられなかったものの、暴露 24 時間後から一部の個体に行動異常(バランス喪失、らせん運動)や外見的異常(体表面の出血)が認められ、48 時間後には水面で横倒しの個体もみられたことから、2.5 mg/L 以下の全濃度について、暴露期間を 144 時間に延長した。その結果、2.5 mg/L では、7 尾のうちの 3 個体が暴露 144

時間で死亡したが、0.5 及び 1.0 mg/L では、暴露 144 時間後まで明確な毒性影響は観察されなかった。

暴露方式が半止水式の場合は、供試生物による試験物質の取り込みなどにより、試験液中の試験物質濃度の低下が考えられた。本試験の暴露方式は流水式を採用するため、試験物質濃度は半止水式よりも安定する可能性が高いことから、半止水式により 144 時間で死亡が確認された濃度付近について、流水式で 96 時間の急性毒性試験を実施した。暴露濃度は、0.5、1.0 及び 2.5 mg/L の 3 濃度とした。その結果、死亡した個体は、0.5、1.0 及び 2.5 mg/L の全ての濃度で確認されなかったが、2.5 mg/L では、試験物質(チアベンダゾール)の毒性影響と推察される行動の異常(水面又は底での横倒し(バランス喪失・不活発)、異常遊泳(らせん運動))が全個体にみられ、一部の個体では、体表面の出血も認められた。また、1.0 mg/L についても、暴露 96 時間後には全個体の遊泳が不活発な状態であり、断続的に水槽底部に着底する個体も観察された。

以上の知見より、チアベンダゾールについては、10 mg/L 及び水溶解度(既存知見)よりも毒性に対する最大許容濃度が低いと考えられることから、本試験では、以下のとおり、チアベンダゾールのミナミメダカに対する毒性を考慮して試験濃度を設定した。

試験物質の毒性に基づく濃度設定に関して、2008 年 10 月の OECD Fish Drafting Group meeting では、試験最高濃度について LC_{50} の 1/3 と 1/10 のどちらを目安にするべきかが議論され、会議参加の専門家より、試験最高濃度の設定は難しいが、経験から LC_{50} の 1/10 がより適切であるように思われる、との意見が出されている⁽⁹⁾。チアベンダゾールに関して、ミナミメダカに対する 96h- LC_{50} は 3.54 mg/L であり、FSTRA の試験最高濃度としては、 LC_{50} の 1/10～1/3 に相当する 0.36～1.2 mg/L が目安となると考えられた。ただし、半止水式の暴露では、暴露期間を 144 時間まで延長した結果、2.5 mg/L でも死亡が認められたことから、試験物質への暴露期間が長くなると毒性の影響が強く現れる可能性も示唆された。また、流水式の暴露では、1.0 mg/L でも不活発な遊泳状態が観察され、チアベンダゾールの生体内への取り込みによる濃度低下により、半止水式の暴露では毒性影響が過小になっていた可能性が示唆された。

以上を勘案すると、本試験における最高試験濃度については、半止水式での暴露試験から得られた 96h- LC_{50} の 1/3 相当よりも 1/10 相当の 0.36 mg/L が妥当と考えられた。なお、0.36 mg/L については、急性毒性に関する既存知見である稚魚期のニジマスに対する LOEC (0.275 mg/L) よりも高濃度であるが、予備試験のうち、流水式暴露の 0.5 mg/L ではチアベンダゾールの毒性によると推察される影響が観察されなかったこと及び EXTEND2022 の枠組みでスクリーニング試験に位置付けられる第1段階の試験として実施することから、試験物質の毒性が発現しない範囲でより高い濃度を試験最高濃度に設定することが望ましいことから、0.36 mg/L を試験最高濃度とすることが妥当と判断した。また、公比は、中間の試験濃度が、流水式の暴露で遊泳状態にのみ影響が観察された 1.0 mg/L の 1/10 程度となる 3.2 ($\sqrt{10}$) とした。

以上に基づいて、本試験における試験物質の試験濃度を以下の 3 濃度として、別に対照区を設けた。

試験濃度(設定濃度): 0.0360、0.114、0.360 mg/L

チアベンダゾールは、平成 29 年度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：11/26、検出範囲：nd～14 ng/L（検出下限値は 0.69 ng/L））⁽¹⁰⁾、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 25,714 倍に相当する。

5-6. 試験条件

試験条件は OECD TG229 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

試験期間： 21 日間

試験水温： 25±1℃

照明： 昼光用蛍光灯

照度： 540～1,000 Lux

光周期： 16 h-L/8 h-D

通気： なし

試験容器： 3 L 容総硬質ガラス製水槽

試験水量： 2 L

試験液

流量： 21 mL/min（換水率：15 回/日）

試験生物

生物種： ミナミメダカ (*Oryzias latipes*)

齢： 16 週齢（暴露開始時）

体重： オス 405±71 mg、メス 564±47 mg（サブサンプルでの測定値）

供試生物数：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）/濃度

収容密度： <5 g/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： ブラインシュリンプふ化幼生

頻度： 3 回/日

給餌量： 飽食を目安

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チアベンダゾールの試験原液は、暴露期間中、毎日、以下の手順により調製した。試験原液中のチアベンダゾールの安定性については、100 mg/L の溶液を用いた事前検討により、1 週間以上安定であることを確認した。

1 L 容ガラス製ビーカーに 500 mL の純水及び回転子を入れ、スターラーで攪拌しながら 6N NaOH を 350 µL 加えて、pH を 2.4 程度に下げた後、電子天秤でガラス製秤量皿に

分取したチアベンダゾール試薬 100 mg を加えた。1 分間スターラーで激しく攪拌後、超音波で 1 分間処理した。供試したチアベンダゾールは非常に微細な粉末であり、水中に容易に入り込まないことから、パスツールピペットで純水中に落とし込む操作、攪拌及び超音波処理を繰り返して試薬を溶解させた。試薬が溶解したことを確認後、2 L 容ガラス製メスフラスコに移し入れた。容器の 9 割程度まで希釈水で入れてから 5N NaOH を 350 μ L 加えた後、希釈水で定容した。十分に攪拌後、別に定容した 2 L の希釈水を用いて、5 L のメディウム瓶に全量に移し入れた(計 4 L)。回転子を入れ、スターラーで 10 分間攪拌し、25 mg/L の試験原液を調製した。

(2) 試験装置での試験液の調製

各設定濃度の試験液は、以下のとおり、試験装置のミニダイリ्यूーターシステムにより連続的に調製し、所定の流量で試験水槽に供給した。試験原液は、毎日、新たに調製したものと交換した。

試験原液は、ケミカルポンプ(KX204-010、日本精密機器株式会社)により、ミニダイリ्यूーターシステムの希釈混合槽の最上流のセルに 1.8 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同じセルに 123 mL/min の流量で供給される希釈水と混合され、0.360 mg/L の試験液が連続的(124.8 mL/min)に調製された。この 0.360 mg/L の試験液の一部(85 mL/min)は、ガラス製キャピラリー管で分配槽に供給され、更に試験最高濃度の 4 つの試験水槽にそれぞれ 21 mL/min の流量で供給された。分配槽に供給されなかった 0.360 mg/L の試験液(39.8 mL/min)は、希釈混合槽下流側のセル内で 86 mL/min の流量で供給される希釈水と混合、1/3.2 の濃度(0.114 mg/L)に希釈され、その一部が最高濃度の試験液と同様に分配層を通して、4 つの試験水槽に 21 mL/min の流量で供給された。同様に分配されなかった 0.114 mg/L の試験液(40.8 mL/min)が希釈混合槽下流側のセル内で 88 mL/min の流量で供給される希釈水と混合され、調製された 0.0360 mg/L の試験液が分配層を通して 4 つの試験水槽に供給された。対照区の 4 つの試験水槽には、それぞれ 21 mL/min の流量で希釈水のみが供給された。

試験原液、希釈水及び各試験水槽に供給される試験液の流量は、暴露期間中、毎日測定し、必要に応じて再調整した。

5-8. 暴露操作

(1) 暴露開始時

試験装置に設置した試験水槽(4 水槽/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、それぞれ割り当てられた順化水槽から供試魚(オス及びメス各 3 個体)をネットで移し入れた。この時点暴露開始とした。

(2) 暴露期間中

暴露期間中は、各試験水槽について、照明の点灯から約 4 時間後に 1 回目の給餌を行った。給餌では、約 30 分後に少量の残餌がみられる程度を目安に、全ての試験水槽に同量の餌料を投与した。1 回目の給餌から約 60 分後に水槽内の卵(塊)をすべて採取した。水槽底に落下している卵(塊)はガラスピペットで採取し、メスの排泄口に付着した状態の卵塊は、メス個体をネットですくい上げて指先でつまむように採取した。卵の採取時には、水槽内の死亡個体、残餌や糞等を除去した。2 回目及び 3 回目の給餌は、1 回目の給餌から 4 時間後及び 8 時間後に行った。給餌時は、試験生物の状態(死亡個体の有無、外見及び行動の異常並びに摂餌活動)を観察した。死亡又は異常が観察された場合は記録し、死亡した個体がいいた場合には水槽内から除去した。また、3 回目の給餌後に、残餌や糞等を除去した。

全ての試験水槽について、試験液の水温を毎日、溶存酸素濃度及び pH を週 2 回の頻度で測定した。

(3) 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、採卵及び試験環境の測定を行った後、生存するすべ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(チアベンダゾール)濃度を測定した。

試験物質濃度の測定に供する試料(試験液)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水槽について、水槽中央部の中層からガラス製ピペットを用いて必要量の試験液をガラス容器に採取した。試料を採取するガラス容器は、使用前に十分に洗浄し、試料採取時に共洗した。試料は、各濃度区及び対照区について 2 つの試験水槽から採取したものを等量混合して分析に供した。

上記の試料に純水及びメタノールを添加して、50%メタノール溶液に調製した分析試料のチアベンダゾール濃度を、液体クロマトグラフ質量分析計(LC-MS/MS)により定量した。本試験での分析におけるチアベンダゾール濃度の定量下限は 0.11 µg/L(0.00011 mg/L)、検出下限は 0.080 µg/L(0.000080 mg/L)であった。

分析における LC-MS/MS の測定条件は付属資料 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、暴露期間中の産卵状態並びに暴露終了時に生存した全個体を対象に二次性徴及び肝臓ビテログニン濃度を測定した。エンドポイントの測定は、以下のとおり、テストガイドラインに記載された方法及び手順に準じて行った。また、テストガイドラインでは主要なエンドポイントに含まれていないが、試験物質の毒性影響等を検討するための参考データとして、暴露終了時に生存した個体を対象に肝臓体指数及び生殖腺体指数(肝臓重量又は生殖腺重量の体重に対する百分率)を測定した。

(1) 全長及び体重の測定

暴露終了時に対照区及び試験物質の各濃度区の試験水槽から、対照区、試験物質の低濃度区から高濃度区の順にオス、メスを分けて、ネットを用いて生存する供試魚を取り上げ、1 個体ずつ氷水に入れて麻酔した。氷冷水中で全く動かなくなった個体を取り上げ、体表面の水分をペーパータオルで拭き取ってから、電子ノギス及び電子天秤を用いて全長及び体重を測定した。

(2) 解剖及びエンドポイント測定用試料の採取

全長及び体重を測定した個体は、直ちに、実体顕微鏡下で開腹して、肝臓を採取した。肝臓は、風袋引きした 1.5 mL マイクロチューブに入れ、電子天秤で重量を測定した。さらに、生殖腺を採取して、電子天秤で重量を測定した。生殖腺の採取後の魚体について、二次性徴を測定するために、実体顕微鏡に装着したデジタルカメラを用いて、拡張した状態の尻びれを撮影(画像を記録)した。ビテロゲニン測定用に採取した肝臓は、重量の測定後、直ちに -30°C に設定した冷凍庫に収容し、ビテロゲニン濃度測定のための前処理に供するまでそのまま保存した。

(3) 二次性徴

暴露終了時に生存した全個体を対象に、尻びれの画像をモニター上で観察し、乳頭状小突起が発現(形成)している節板数を計数した。

(2) ビテロゲニン

暴露終了時に生存した全個体を対象に、以下の手順で肝臓を前処理し、得られた肝臓抽出液を試料としてビテロゲニン濃度を定量した。定量に使用した試薬(キット)の情報、測定機器及び測定条件は付属資料 3 に示した。

(a) 前処理(肝臓抽出液の調製)

肝臓は、凍結状態を維持したまま、マイクロホモジナイザーを用いて、マイクロチューブに添加した ELISA キット付属の Buffer(肝臓 1 mg 当たり 25 又は 50 μL)と一緒に十分にホモジネートした。さらに冷却遠心機により、 4°C 、13,000 g の条件で 10 分間の遠心を行い、マイクロピペットを用いて、分離した上清(肝臓抽出液、抽出液中の肝臓濃度は 20 又は 40 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)を 30 μL ずつ 0.5 mL マイクロチューブ(3 本)に分取した。これら一連の前処理操作は氷冷下で行い、マイクロチューブに分取した肝臓抽出液は、直ちに凍結し、ビテロゲニン濃度の定量に供するまで -80°C で保存した。

(b) ビテロゲニン濃度の定量

肝臓抽出液中のビテロゲニン濃度は、Medaka Vitellogenin ELISA System(藤倉化成株式会社)で定量した。肝臓抽出液(試料)は、夾雑物の影響を軽減するため、検体希釈液で 500 倍以上に希釈(v/v)し、アッセイに供した。アッセイにおける操作は上記キットの説明書に準拠した。

本試験では、アッセイにおける定量範囲を 1~64 ng/mL とした。アッセイは、全ての試

料について二重で行い、各吸光度から算出したビテロゲニン濃度の平均値を用いた。ただし、吸光度の変動係数が 10%を超えた場合は、別の凍結試料を用い、再度、アッセイを行った。各試料について、得られた吸光度をプレートごとに作成する標準曲線に当てはめ、アッセイに供した希釈後の試料 1 mL 当たりのビテロゲニン濃度 (ng/mL) を算出した。肝臓の前処理に用いた Buffer 量 (肝臓 1 mg 当たりオスは 50 μ L 又はメスは 25 μ L) 及びアッセイ直前に実施した希釈操作 (オスは 10 倍、メスは 3, 000 倍) を乗じた倍率 (オスは 500 倍、メスは 75, 000 倍) を、算出したビテロゲニン濃度 (ng/mL) に乗じて肝臓重量当たりのビテロゲニン濃度 (ng/mg-liver) を算出した (定量下限: 1 ng/mg-liver)。

(3) 産卵状況に関するエンドポイント

各暴露日に水槽内から回収した卵 (塊) は、直ちに実体顕微鏡下で観察し、受精卵と未受精卵に区分して計数した。

各試験水槽について、暴露日ごとに、受精卵数と未受精卵数を合計した産卵数及び受精卵数を生存しているメスの個体数で除したメス 1 個体当たりの産卵数及び受精卵数を算出し、それらを基に暴露期間 (21 日間) を通した平均産卵数及び平均受精卵数 (eggs/female/day) を算出した。また、暴露期間中に回収した総卵数 (受精卵数と未受精卵数の合計) に対する総受精卵数の百分率として受精率を算出した。

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、各濃度区と対照区間に有意差が認められるかを統計学的に解析 (検定) した。検定は、各エンドポイントの試験容器ごとの平均値 (容器平均値) を用い、オス又はメスごとに行った。容器平均値の算出において、ビテロゲニンについては、個体の測定値が定量下限未満であった場合には定量下限の半数値を用いた。検定では、はじめに対照区及び各濃度区のデータについて、等分散性を Bartlett's test により検定した。等分散性が認められたデータについては Dunnett test により、等分散性が認められなかったデータについては Steel's test により、対照区と各濃度区間の有意差検定を行った。

全ての検定は、Excel 統計 Ver.7.0 (株式会社エスミ) で行い、有意水準 (p) は 0.05 とした。

(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. 試験の許容基準

OECD 229 に規定される本試験の許容基準 (Test acceptance criteria) は、以下のとおりである。

- 対照区における死亡率が 10% を超えないこと。
- 試験液の溶存酸素濃度が飽和の 60% 以上であること。
- 水槽間の水温差は $\pm 1.5^{\circ}\text{C}$ 未満で、かつ暴露期間を通して推奨温度 $\pm 2^{\circ}\text{C}$ 以内であること。
- 試験濃度が平均 $\pm 20\%$ で維持されていたことが示されること。
- 暴露前及び暴露期間中の対照区の供試魚について産卵が活発であったことが示されること。

7. 結果

7-1. 試験物質の測定濃度

試験液中のチアベンダゾール濃度の測定結果を表 7-1 に示す。

試験液中のチアベンダゾールの平均測定濃度は、低濃度側から 0.0371 ± 0.0023 、 0.116 ± 0.0044 及び 0.360 ± 0.014 mg/L (平均±標準偏差) であり、設定濃度 (0.0360、0.114 及び 0.360 mg/L) に対する割合は 100～106%、測定濃度の変動係数 (測定日間のばらつき) は 6.1、3.8 及び 3.9% であった。また、全ての測定濃度は平均測定濃度の±20% 以内であった。対照区については、試験液中のチアベンダゾール濃度は暴露期間を通して定量下限未満 (ND) であった。以下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 (0.0371 mg/L、0.116 mg/L 及び 0.360 mg/L) に基づいて記載した。

表 7-1 試験液中のチアベンダゾール濃度の測定結果

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	-	-
0.0360	0.0378 (105) 〈102〉	0.0399 (111) 〈108〉	0.0356 (99) 〈96〉	0.0349 (97) 〈94〉	0.0371 (103)	0.0023 [6.1]
0.114	0.121 (107) 〈105〉	0.118 (104) 〈102〉	0.113 (99) 〈97〉	0.113 (99) 〈97〉	0.116 (102)	0.0044 [3.8]
0.360	0.355 (99) 〈99〉	0.367 (102) 〈102〉	0.374 (104) 〈104〉	0.343 (95) 〈95〉	0.360 (100)	0.014 [3.9]

注) ND は定量下限未満、() 内の数値は設定濃度に対する割合(%)、〈 〉内の数値は平均測定濃度に対する割合(%)、[] 内の数値は変動係数(%)を示す。

7-2. 暴露期間中の試験環境

対照区及びチアベンダゾールの各濃度区における試験環境の測定結果を表 7-2 に示す。各試験水槽での測定結果は付属資料 4 に示した。

試験液の水温は、暴露期間を通して 25.2～25.7℃の範囲、同一日における試験水槽間の水温差は 0.2℃以下であり、OECD TG229 に規定された基準を満たした。試験液の溶存酸素も、暴露期間を通して 5.7～8.0 mg/L と飽和の 69% 以上を維持しており、OECD TG229 で規定された基準を満たしていた。また、試験液の pH は 7.5～8.0 の範囲にあり、照明等のその他の試験環境も暴露期間を通して適切に維持されていた。したがって、本試験において、得られた結果の信頼性に影響を及ぼしたと思われる環境要因はなかった。

表 7-2 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	25.3 - 25.7	5.7 - 8.0	7.5 - 8.0
0.0371	25.2 - 25.7	5.8 - 8.0	7.5 - 7.9
0.116	25.3 - 25.7	5.7 - 7.9	7.5 - 7.9
0.360	25.2 - 25.7	6.1 - 7.8	7.5 - 7.9

注) データは、暴露期間中の範囲(最低－最高)を示す。

7-3. 死亡率及び一般症状

対照区及びチアベンダゾールの各濃度区の累積死亡率を表 7-3-1 に示す。

対照区において、暴露期間中に死亡はみられず、OECD TG229 で規定された基準を満たした。暴露期間中に行動又は外見に異常が認められる個体も観察されなかった。

チアベンダゾールの 0.0371 及び 0.116 mg/L では、暴露期間中に死亡はみられず、行動及び外見に明らかな異常が認められる個体も観察されなかった。チアベンダゾールの 0.360 mg/L では、オスで暴露 10 日後及び 20 日後に各 1 個体、メスで 21 日後に 1 個体の死亡がみられた(暴露期間を通した累積死亡率は 12.5%)。また、暴露開始から 5 日後以降は、明らかな摂餌活動の低下(給餌から一定時間後の残餌量の増加)が観察されたほか、9 日後以降に明らかな体色の明化(1～4 個体)、18 日後以降に体表の出血(1 個体)、19 日後以降に水槽底での長時間停滞(1 個体)が観察された。

表 7-3-1 暴露終了時の累積死亡率

測定濃度 (mg/L)	累積死亡率 (%)	
	オス	メス
対照区	0	0
0.0371	0	0
0.116	0	0
0.360	16.7	8.3

対照区及びチアベンダゾールの各濃度区の暴露終了時における生存個体の全長及び体重を表 7-3-2 に示す。各個体の測定結果は付属資料 5 に示した。

暴露終了時のオスの体重に関して、チアベンダゾール濃度に依存的な減少傾向がみられた。参考として実施した統計学的な解析の結果、オスでは、0.360 mg/L の全長及び体重に関して、対照区との間に有意差(有意な低下)が認められた($p < 0.05$)。一方、メスについては、全長及び体重ともに、全濃度区に関して対照区との間に有意差は認められなかった。

表 7-3-2 暴露終了時における生存個体の全長及び体重

測定濃度 (mg/L)	全長 (mm)		体重 (mg)	
	オス	メス	オス	メス
対照区	36.2 ± 0.8	39.1 ± 1.1	475 ± 40	685 ± 32
0.0371	35.8 ± 0.5	38.3 ± 1.0	456 ± 56	643 ± 69
0.116	35.7 ± 0.3	39.4 ± 1.1	448 ± 18	726 ± 100
0.360	34.9 ± 0.3 (*)	37.6 ± 0.9	392 ± 5 (*)	630 ± 28

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

7-4. ビテロゲニン

対照区及びチアベンダゾールの各濃度区における暴露終了時における生存個体の肝臓ビテロゲニン濃度を表 7-4 及び図 7-4 に示す。各個体の測定結果は付属資料 5 に、測定の生データ(吸光度の測定値等)は付属資料 6 に示した。

オスでは、肝臓ビテロゲニン濃度の容器平均に関して、濃度依存的な増加は認められず、検定の結果、全濃度区に関して、対照区との間に統計学的な有意差(有意な高値)は認められなかった。

メスでは、肝臓ビテロゲニン濃度の容器平均に関して、明瞭ではないもののチアベンダゾール濃度に依存的な増加傾向がみられ、検定の結果、0.360 mg/L に関して、対照区との間に統計学的な有意差(有意な高値)が認められた。

表 7-4 暴露終了時における生存個体の肝臓ビテロゲニン濃度

測定濃度 (mg/L)	ビテロゲニン濃度 (ng/mg-liver)	
	オス	メス
対照区	0.8 ± 0.6	976 ± 141
0.0371	3.3 ± 2.7	1104 ± 228
0.116	3.5 ± 4.1	1238 ± 237
0.360	0.6 ± 0.5	1875 ± 522 (*)

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

7-5. 二次性徴

対照区及び試験物質の各濃度区における暴露終了時の生存個体における乳頭状小突起が発現していた尻びれの節板数(二次性徴)を表 7-5 及び図 7-5 に示す。各個体の測定結果は付属資料 5 に示した。

オスでは、二次性徴(乳頭状小突起を有する節板数)の容器平均に関して、チアベンダゾール濃度に依存的な増減傾向はみられず、検定の結果、全濃度区に関して、対照区との間に統計学的な有意差(有意な低値)は認められなかった。

メスでは、チアベンダゾールの全濃度区において、全個体で二次性徴(尻びれの乳頭状小突起)の発現はみられず、検定の結果、全濃度区に関して、統計学的に対照区との間に有意差は認められなかった。

表 7-5 暴露終了時における生存個体の二次性徴

測定濃度 (mg/L)	二次性徴 (乳頭状突起を有する節板数)	
	オス	メス
対照区	138 ± 11	0 ± 0
0.0371	135 ± 13	0 ± 0
0.116	136 ± 9.7	0 ± 0
0.360	135 ± 13	0 ± 0

注) データは容器平均±標準偏差を示す。

7-6. 産卵状況

対照区及びチアベンダゾールの各濃度区の産卵状況(産卵数、受精卵数及び受精率)を表 7-6 に示す。暴露期間中の 1 週間ごとの産卵状況は付属資料 7 及び付属資料 8-1～8-3、暴露日ごとの受精卵数及び未受精卵数の計数結果は付属資料 9 に示した。

(1) 産卵数

対照区及びチアベンダゾールの各濃度区における暴露期間を通した産卵数の推移(暴露日ごとの産卵数)を図 7-6-1、産卵数の容器平均を図 7-6-2 に示す。

対照区における各試験水槽の暴露期間を通したメス 1 個体 1 日当たりの産卵数は、40.2～42.0 eggs/female/day であり、試験水槽間の差(ばらつき)は小さかった。また、各暴露日における産卵数は、暴露の開始から中頃まで漸増傾向はみられたものの、産卵状況は暴露期間を通して安定かつ活発であった。

チアベンダゾールの各濃度区では、産卵数(容器平均)にチアベンダゾール濃度に依存的な傾向がみられ、検定の結果、0.360 mg/L に関して、対照区との間に統計学的な有意差が認められた。暴露期間中の推移をみると、0.360 mg/L では、産卵数が暴露期間の中頃から終了時にかけて漸減しており、参考として実施した検定では、暴露 2 週目及び 3 週目に関して、対照区との間に統計学的な有意差(有意な低値)が認められた(付属資料 8-1)。

(2) 受精卵数

対照区及びチアベンダゾールの各濃度区における暴露期間を通した受精卵数の推移(暴露日ごとの受精卵数)を図 7-6-3、受精卵数の容器平均を図 7-6-4 に示す。

対照区における各試験水槽の暴露期間を通したメス 1 個体 1 日当たりの受精卵数は、34.2～39.2 eggs/female/day であり、試験水槽間の差(ばらつき)は小さかった。

チアベンダゾールの各濃度区では、受精卵数(容器平均)にチアベンダゾール濃度に依存的な減少傾向がみられ、検定の結果、0.116 mg/L 及び 0.360 mg/L に関して、対照

区との間に統計学的な有意差が認められた。暴露期間中の受精卵数の推移をみると、0.360 mg/L では暴露期間の中頃から終了時にかけて顕著に漸減しており、0.116 mg/L では暴露期間の中頃から終了時にかけて 0.360 mg/L と比べてゆるやかに漸減した。参考として実施した検定では、0.360 mg/L では暴露 2 週目及び 3 週目に関して、0.116 mg/L では暴露 3 週目に関して対照区との間に統計学的な有意差(有意な低値)が認められた(付属資料 8-2)。

(3) 受精率

対照区及びチアベンダゾールの各濃度区における暴露期間を通した受精率の推移(暴露日ごとの受精率)を図 7-6-5、受精率の容器平均を図 7-6-6 に示す。

対照区における各試験水槽の暴露期間を通した受精率は 83.4～97.1%であり、試験水槽間の差(ばらつき)は若干大きかった。

チアベンダゾールの各濃度区では、受精率(容器平均)にチアベンダゾール濃度に依存する低下がみられ、検定の結果、0.360 mg/L に関して、対照区との間に統計学的な有意差(有意な低値)が認められた。暴露期間中の推移をみると、0.360 mg/L では、受精率が暴露期間の中頃から終了時にかけて漸減しており、参考として実施した検定では、暴露 2 週目及び 3 週目に関して、対照区との間に統計学的な有意差(有意な低値)が認められた(付属資料 8-3)。

表 7-6 暴露期間中の産卵状況

測定濃度 (mg/L)	総産卵数 (eggs/female/day)	受精卵数 (eggs/female/day)	受精率 (%)
対照区	40.8 ± 0.9	37.2 ± 2.4	91.1 ± 5.8
0.0371	40.6 ± 1.7	37.7 ± 2.5	92.6 ± 2.7
0.116	37.7 ± 2.0	32.9 ± 1.8 (*)	87.5 ± 3.7
0.360	25.0 ± 3.8 (*)	16.1 ± 2.5 (*)	64.9 ± 7.7 (*)

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

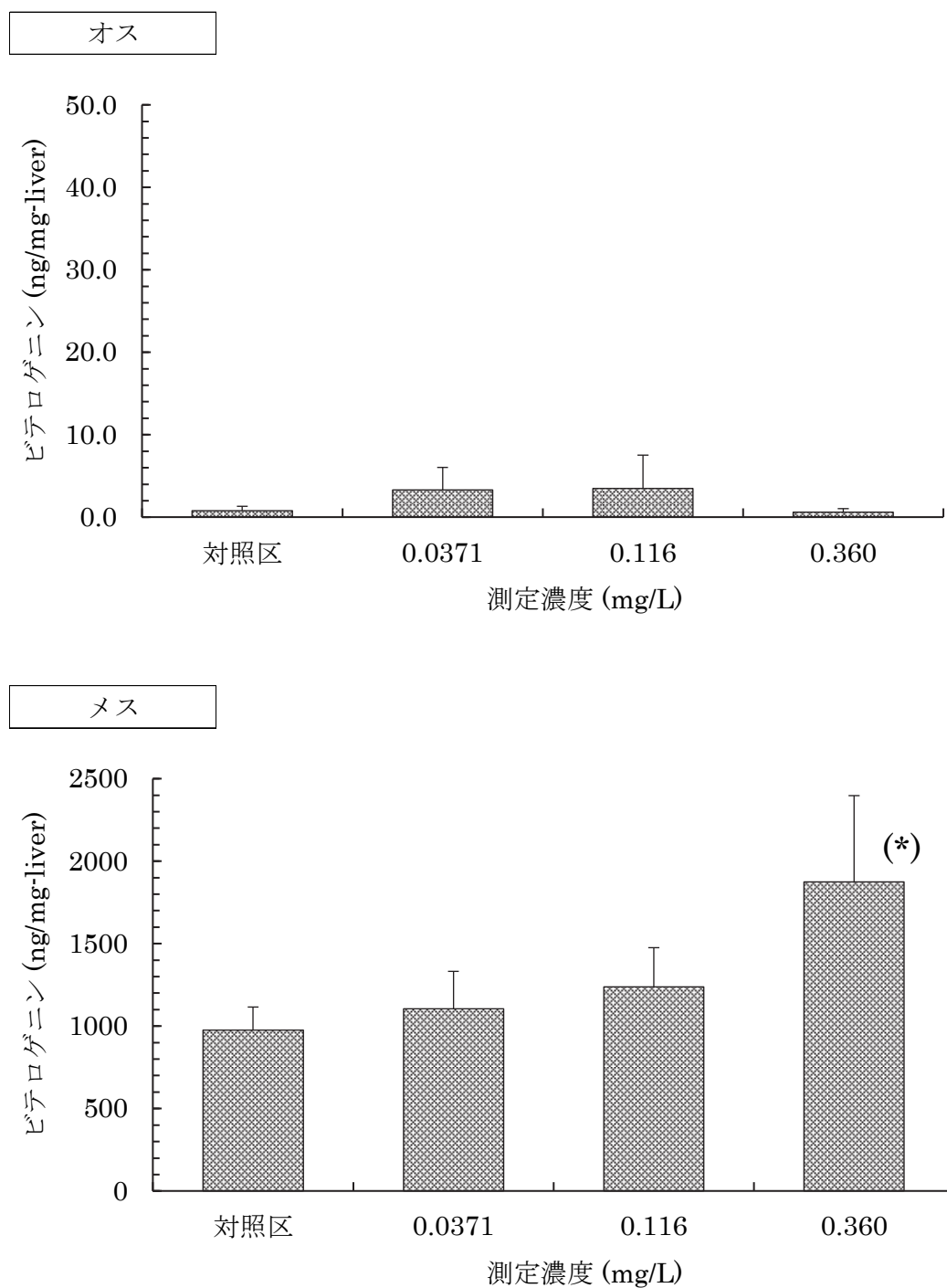


図 7-4 暴露終了時における生存個体の肝臓ビテロゲニン濃度

注) グラフは容器平均±標準偏差、(*)は統計学的に対照区と有意差($p<0.05$)が認められたことを示す。

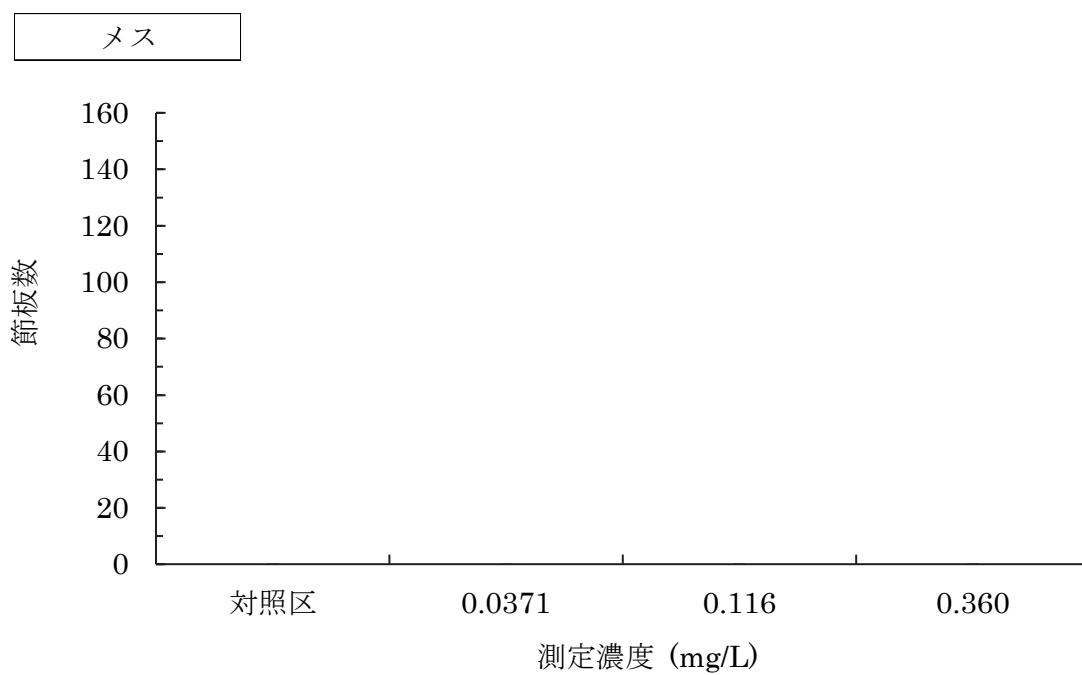
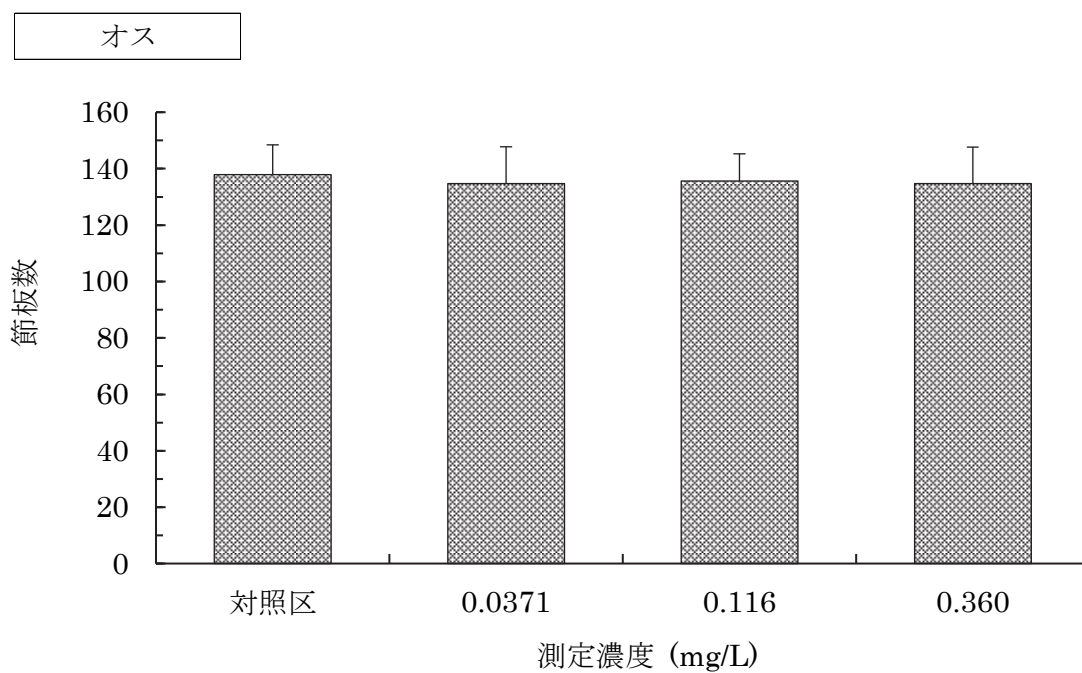


図 7-5 暴露終了時における生存個体の二次性徴
(乳頭状小突起が発現している尻びれの節板数)

注) グラフは容器平均±標準偏差を示す。

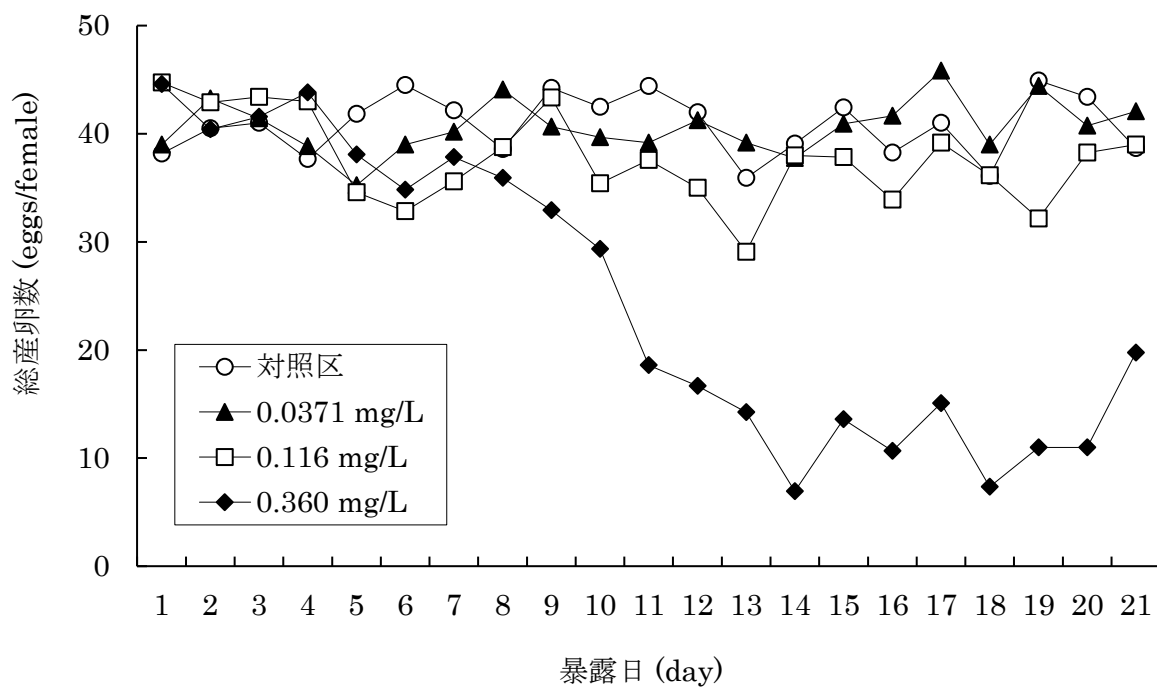


図 7-6-1 暴露期間中の総産卵数

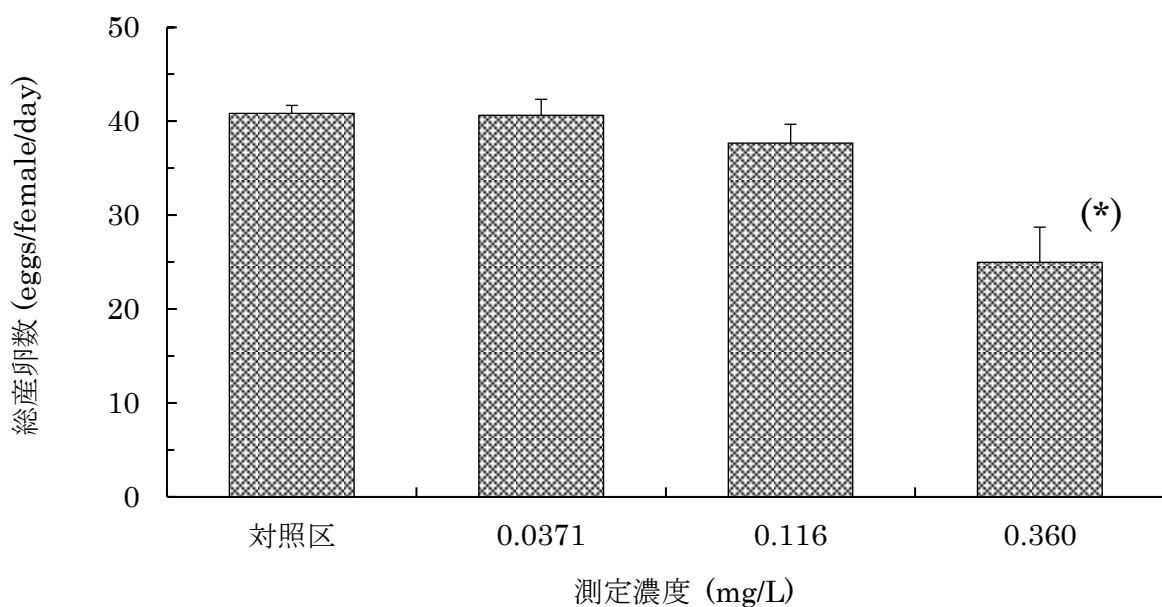


図 7-6-2 暴露期間中の平均総産卵数

注) グラフは容器平均±標準偏差、(*)は統計学的に対照区と有意差($p < 0.05$)が認められたことを示す。

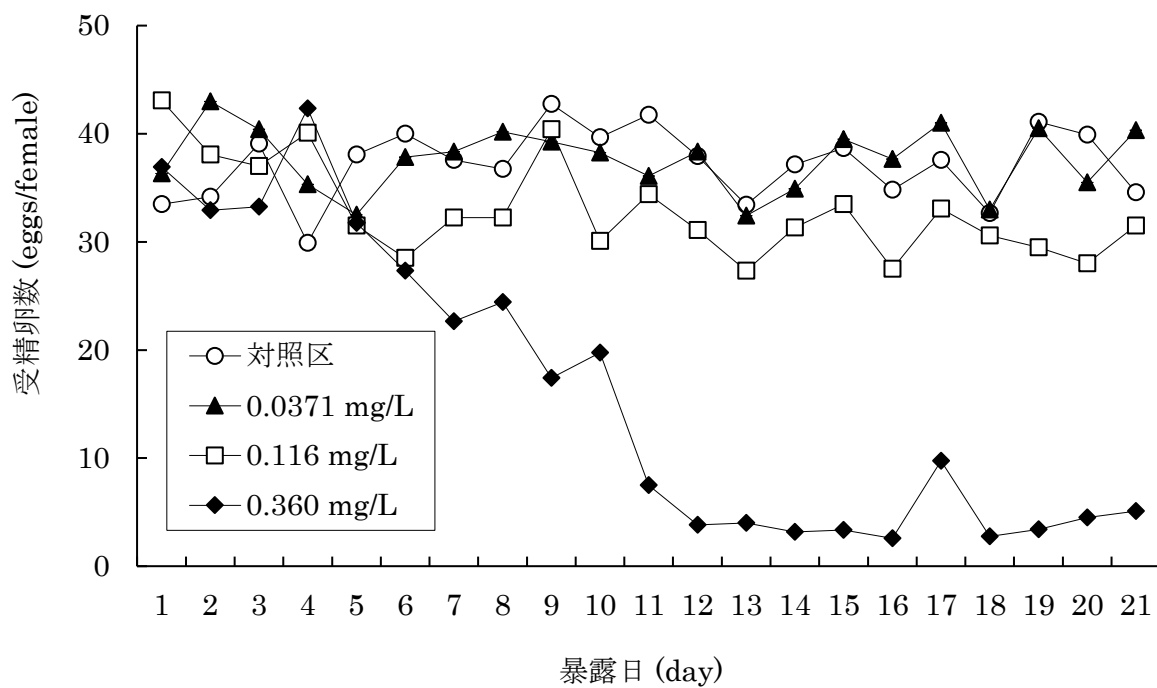


図 7-6-3 暴露期間中の受精卵数

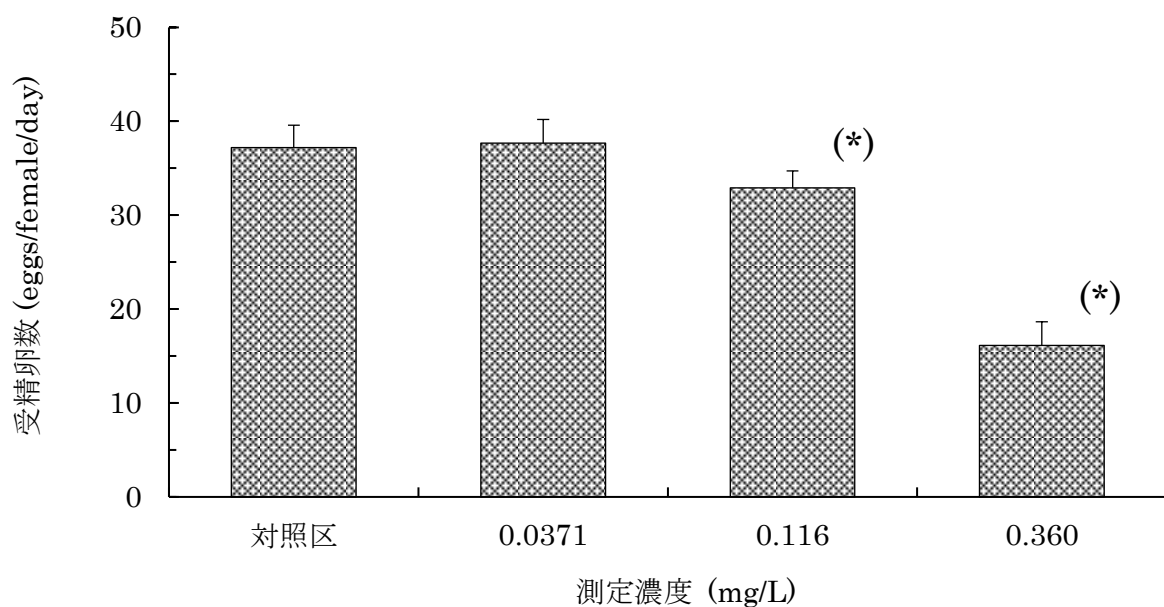


図 7-6-4 暴露期間中の平均受精卵数

注) グラフは容器平均±標準偏差、(*)は統計学的に対照区と有意差($p < 0.05$)が認められたことを示す。

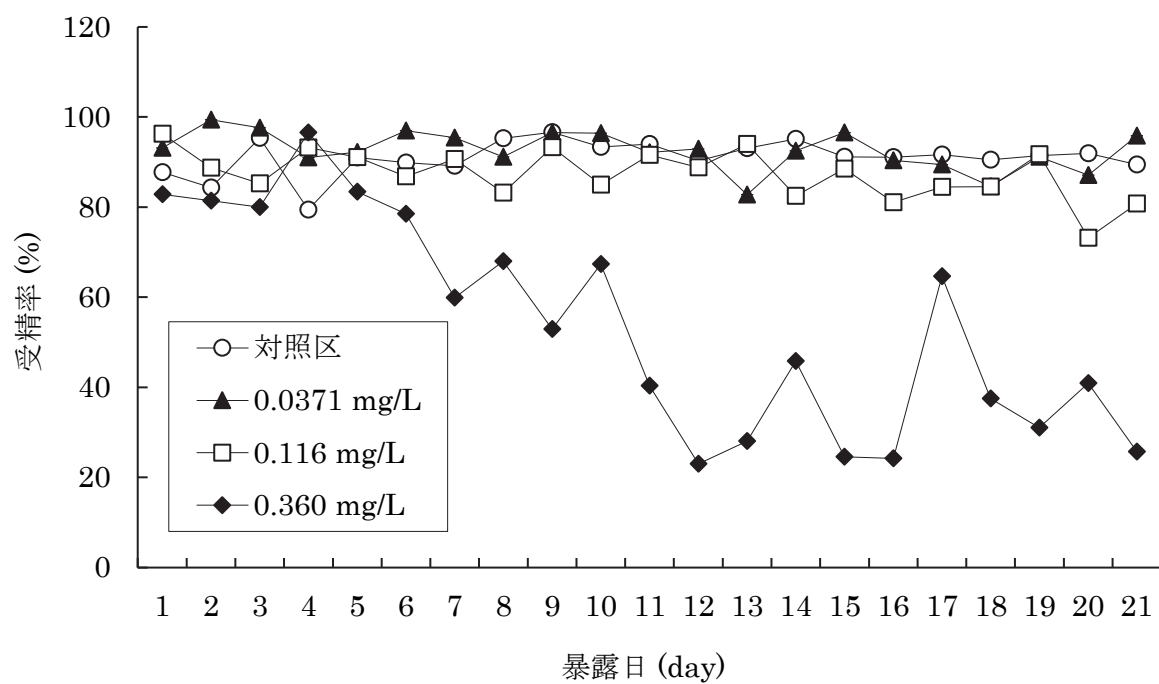


図 7-6-5 暴露期間中の受精率

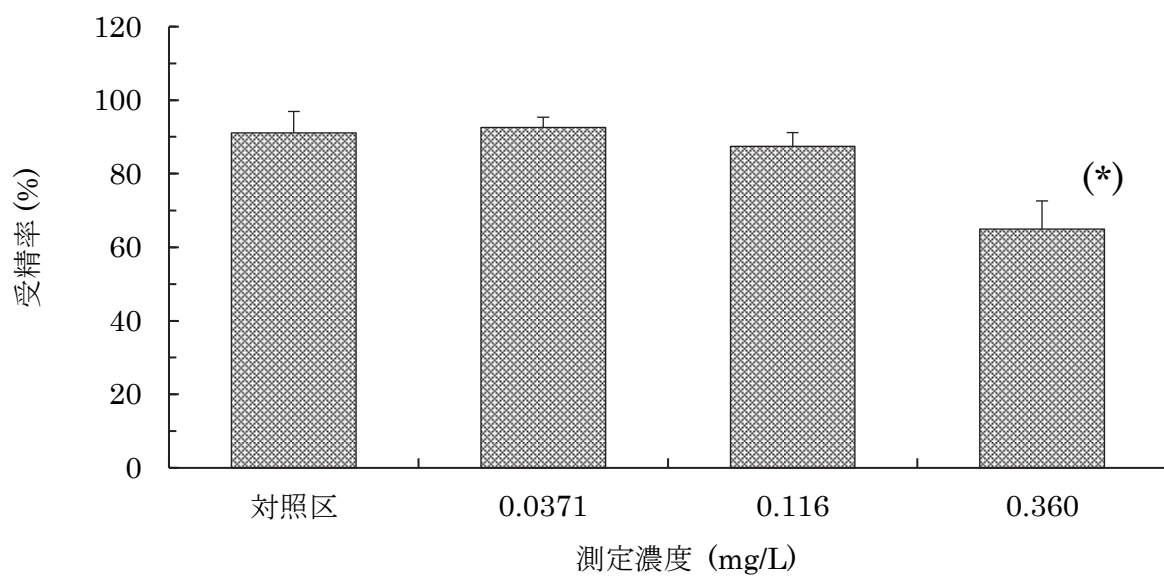


図 7-6-6 暴露期間中の平均受精率

注) グラフは容器平均±標準偏差、(*)は統計学的に対照区と有意差($p < 0.05$)が認められたことを示す。

7-7. 肝臓体指数及び生殖腺体指数

対照区及びチアベンダゾールの各濃度区の暴露終了時における生存個体の肝臓体指数及び生殖腺体指数を表 7-7 に示す。各個体の測定結果は付属資料 5 に示した。

肝臓体指数に関して、オスでは、チアベンダゾール濃度に依存的な減少傾向がみられたが、検定の結果、全濃度区に関して、対照区との間に統計学的な有意差は認められなかった。メスでは、明瞭ではないもののチアベンダゾール濃度に依存的な減少傾向がみられ、検定の結果、0.360 mg/L に関して、対照区との間に統計学的な有意差(有意な低値)が認められた。

生殖腺体指数に関して、オスでは、チアベンダゾール濃度に依存的な減少傾向がみられ、検定の結果、0.116 mg/L 及び 0.360 mg/L に関して、対照区との間に統計学的な有意差(有意な低値)が認められた。メスでは、明瞭ではないもののチアベンダゾール濃度に依存的な増加傾向がみられ、検定の結果、0.360 mg/L に関して、対照区との間に統計学的な有意差(有意な高値)が認められた。

表 7-7 暴露終了時における生存個体の肝臓体指数及び生殖腺体指数

測定濃度 (mg/L)	肝臓体指数 (%)		生殖腺体指数 (%)	
	オス	メス	オス	メス
対照区	1.8 ± 0.37	4.3 ± 0.28	0.98 ± 0.04	10.7 ± 0.43
0.0371	1.8 ± 0.17	4.7 ± 0.74	0.97 ± 0.05	9.8 ± 1.0
0.116	1.7 ± 0.14	4.8 ± 0.31	0.87 ± 0.07 (*)	10.8 ± 1.3
0.360	1.6 ± 0.17	3.6 ± 0.22 (*)	0.60 ± 0.08 (*)	13.0 ± 2.0 (*)

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

8. まとめ及び考察

8-1 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チアベンダゾールのメダカ (オス及びメス) 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 8-1 に示す。

肝臓ビテロゲニン濃度に関して、オスでは試験濃度範囲において有意な変化が認められなかったため、LOEC は得られず、NOEC が 0.360 mg/L であった。メスでは、試験濃度範囲において統計学的に有意な増加が認められ、LOEC は 0.360 mg/L、NOEC は 0.116 mg/L であった。二次性徴に関して、オス及びメスともに、試験濃度範囲において有意な変化が認められなかったため、LOEC は得られず、NOEC が 0.360 mg/L であった。また、産卵状況に関して、産卵数及び受精卵数、受精率のすべてで、試験濃度範囲において有意な低下が認められた。産卵数及び受精率では、LOEC は 0.360 mg/L、NOEC は 0.116 mg/L、受精卵数では、LOEC は 0.116 mg/L、NOEC は 0.0371 mg/L であった。

以上の結果から、チアベンダゾールは、21 日間の暴露において試験生物 (ミナミメダカ) の肝臓中ビテロゲニン濃度及び繁殖に有意な影響を及ぼすことが示唆され、その LOEC として 0.116 mg/L、NOEC として 0.0371 mg/L が得られた。

表 8-1 チアベンダゾールのメダカに対する LOEC 及び NOEC

エンドポイント		LOEC (mg/L)		NOEC (mg/L)
ビテロゲニン	オス	—	ND	0.360
	メス	↑	0.360	0.116
二次性徴	オス	—	ND	0.360
	メス	—	ND	0.360
産卵状況	総産卵数	↓	0.360	0.116
	受精卵数	↓	0.116	0.0371
	受精率	↓	0.360	0.116
試験濃度 (mg/L)		0.0371, 0.116, 0.360		

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。

8-2. 試験物質のメダカに対する内分泌かく乱作用

本試験の結果、ビテロゲニンに関して、メスでは、チアベンダゾール濃度に依存的な有意な増加が認められ、その LOEC は 0.360 mg/L であった。一方、オスのビテロゲニンについては、全試験濃度に関して、対照区との間に統計学的な有意差は認められなかった。OECD TG229 では、オスにおけるビテロゲニンの上昇がエストロゲン作用の指標とされており、チアベンダゾールは、本試験の試験濃度範囲において、試験生物 (ミナミメダカ) に対してエストロゲン作用を示さなかったと考えられる。

また、暴露期間中の産卵状況に関して、産卵数、受精卵数及び受精率にチアベンダゾール濃度に依存する有意な低下が認められたことから、チアベンダゾールがミナミメダカの繁殖(産卵)に影響を及ぼしたことが示唆され、本試験から得られた LOEC は受精卵数に対する 0.116 mg/L (NOEC は 0.0371 mg/L) であった。一方で、0.360 mg/L では、暴露期間中にチアベンダゾールの毒性によると推察される死亡並びに行動及び外見の異常が観察されていることから、産卵数、受精卵数及び受精率の低下については、チアベンダゾールの内分泌系 (HPG 軸) に対する作用によるものではなく、毒性に関連した変化である可能性が高い。また、0.360 mg/L では、メスの生殖腺体指数及びビテロゲニンに有意な増加が認められたが、産卵阻害に伴う卵巣内に滞留する卵母細胞(退行卵)の増加及びそれらの退行により吸収された卵黄タンパクの影響(ELISA によるビテロゲニン測定での交差)が考えられる。0.116 mg/L における受精卵数の低下については、暴露期間中に死亡及び行動等の異常が観察されていないことから、チアベンダゾールの HPG 軸に対する作用による可能性も考えられるが、チアベンダゾールの毒性に関連した変動(例えば、交配時の精子に対する毒性による受精率低下など)である可能性もあり、本試験の結果から要因を特定することはできないと考えられる。

以上のとおり、本試験の結果から、チアベンダゾールはミナミメダカの成魚に対して、0.116 mg/L 以上の濃度で繁殖に影響を及ぼすことが示唆されたが、エストロゲン作用を含む明確な HPG 軸に対する作用を持つことは確認できなかった。

9. 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 回内分泌かく乱作用に係る生態影響評価検討班会議

開催日： 令和 7 年 3 月 5 日(水)

10. 引用文献

- (1) 環境省: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(令和4年度実施分)(案). 令和4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2-3.
https://www.env.go.jp/chemi/end/extend2016/commi2022/page_00621.html
- (2) United States Environmental Protection Agency:CompTox Chemicals Dashboard v2.5.1, Thiabendazole
<https://comptox.epa.gov/dashboard/chemical/properties/DTXSID0021337>
- (3) OECD(2012):Fish Short Term Reproduction Assay. Guidelines for the Testing of Chemicals No. 229.
https://www.oecd-ilibrary.org/environment/oecd-guidelines-for-the-testing-of-chemicals-section-2-effects-on-biotic-systems_20745761
- (4) US EPA-Pesticides; Thiabendazole EEB Review (1989)
https://www3.epa.gov/pesticides/chem_search/cleared_reviews/csr_PC-060101_10-Jul-89_076.pdf
- (5) Beglinger J.M. and O'Boyle R.J. (1989) Acute Aquatic Effects of Thiabendazole on the Rainbow Trout, *Salmo gairdneri*.Eastman Kodak Report No.: EN-412-GWN001-2
Health and Environment Labs, Eastman Kodak Company, New York, USA (No Publish)
- (6) Review of New Use for Thiabendazole (Mertect 340-F) as a seed treatment on dry peas. US EPA (2006) p26
https://www3.epa.gov/pesticides/chem_search/cleared_reviews/csr_PC-060101_13-Apr-06_a.pdf
- (7) Wilson B.F., LeBlanc G.A. and Maston J.D. (1982) The Toxicity of MERTECT Fungicide to Rainbow Trout (*Salmo gairdneri*) Embryos and Larvae. EG&G Report No.: BW-82-1-1099
EG&G, Bionomics, Aquatic, Toxicology Laboratory, Wareham, Mass., USA (No Publish)
- (8) Holmes C.M., Swigert J.P. and Smith G.J. (1992) Thiabendazole: An Early Life-Stage Toxicity Test with the Fathead Minnow (*Pimephales promelas*). Wildlife International Report No.: 105A-111
Wildlife International, Easton, Maryland, USA (No Publish)
- (9) OECD(2008):Draft summary record of the meeting of the Fish Drafting Group. Task Force on Endocrine Disrupters Testing and Assessment (EDTA) of the Test

Guidelines Programme.

- (10)「令和元年度化学物質環境実態調査結果(概要)」について. 別表 1 初期環境調査における検出状況.

<https://www.env.go.jp/press/108839.html>

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	7.4 (22.9°C)	T-P	0.003 mg/L
Electric conductivity	18.2 mS/m	Cyanide	<0.01 mg/L
Free chlorine	<0.01 mg/L	Total mercury	<0.0005 mg/L
Suspended Solids	<1 mg/L	PCB	<0.0005 mg/L
Beryllium	<0.00001 mg/L	Thiuram	<0.0005 mg/L
Aluminium	<0.005 mg/L	Simazine	<0.0001 mg/L
Vanadium	0.00016 mg/L	Thiobencarb	<0.0001 mg/L
Chromium	<0.0001 mg/L	Fluorine	<0.04 mg/L
Manganese	<0.0002 mg/L	Sodium	8.3 mg/L
Iron	<0.003 mg/L	Potassium	1.2 mg/L
Cobalt	<0.00003 mg/L	Calcium	21 mg/L
Nickel	0.00011 mg/L	Magnesium	2.2 mg/L
Copper	0.0028 mg/L	Bromide	<0.0002 mg/L
Zinc	0.0050 mg/L	1,2-Dichloropropane	<0.1 mg/L
Arsenic	0.00015 mg/L	Isoxathion	<0.0001 mg/L
Selenium	0.00029 mg/L	Diazinon	<0.0001 mg/L
Molybdenum	0.00034 mg/L	Propyzamide	<0.0001 mg/L
Silver	<0.00001 mg/L	Fenitrothion	<0.0001 mg/L
Cadmium	<0.00001 mg/L	Isoprothiolane	<0.0001 mg/L
Tin	<0.0001 mg/L	Oxine-copper	<0.001 mg/L
Antimony	<0.0001 mg/L	Chlorothalonil	<0.0001 mg/L
Lead	<0.0001 mg/L	EPN	<0.0001 mg/L
CODMn	<0.5 mg/L	Dichlorvos	<0.0001 mg/L
Sulfide	<0.1 mg/L	Fenobucarb	<0.0001 mg/L
TOC	<0.1 mg/L	Iprobenfos	<0.0001 mg/L
Evaporated residue	120 mg/L	Cholornitrofen	<0.0001 mg/L
Total ammonium	<0.01 mg/L	Alkalinity	38 mgCaCO3/L
Nitrate	0.35 mg/L	Total hardness (as CaCO3)	63 mg/L

Date of measurement: November 28th, 2024

付属資料 2 チアベンダゾール分析の条件

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 社製 ACQUITY UPLC BEH C18 (2.1 ϕ $\times$ 100 mm, 粒径 1.7 μ m)
移動相	: MOLECULER DEVICES
カラム	: A: 水(0.5 mM 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(%)= 10 (0 min)– 99(10–15 min) –10(15.1–22min)
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)	: チアベンダゾール: 199.9>173.0 チアベンダゾール- d_4 : 204.0>177.0

付属資料 3 測定に使用した試薬(キット)の情報及び測定条件

肝臓抽出液中のビテロゲニン濃度は、メダカビテロゲニンに特異的に反応するモノクローナル抗体 2 種を用いたサンドイッチ ELISA アッセイ法(酵素免疫測定法)を採用した測定キットを使用して測定した。

使用した試薬(キット)

試薬(キット)の名称 : EnBio Medaka Vitellogenin ELISA system
製造元 : 藤倉化成株式会社
使用したロット : JKK091(5 キットとも同一)

吸光度測定機器

機器の名称 : SpectraMax[®] ABS Plus
製造元 : MOLECULER DEVICES

測定条件

標準溶液 : キット付属の 100 ng/mL メダカビテロゲニン標準品をキット付属の Assay buffer で希釈して、1、2、5、10、20 及び 50 ng/mL の標準溶液を調製した。0 ng/mL は Assay buffer のみを使用して、0～100 ng/mL の濃度範囲の標準溶液を測定した。

測定数(繰り返し数) : 標準溶液、試料ともに 2 連で測定した。

測定方法 : 付属のマニュアルに従い試料を調製した後、吸光度測定機器で 450 nm の吸光度を測定した。

検量線の作成 : 吸光度測定機器に付属されているアプリケーション (SoftMax[®] Pro 7.1)を使用して、適合性の高い 4 parameter-logistics で作成した検量線を採用した。

測定データの確認 : 2 回の繰り返し測定の吸光度の変動係数が 10%を超えた場合は再測定した。10%未満の場合は、2 回の測定の算術平均値を測定結果として採用した。定量範囲は 1～64 ng/mL とした。

付属資料 4 試験液の水温及び水質測定結果

暴露日	水温 (°C)															
	対照区				0.0371 mg/L				0.116 mg/L				0.360 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	25.7	25.6	25.6	25.6	25.7	25.7	25.7	25.7	25.7	25.7	25.7	25.7	25.7	25.7	25.7	25.6
1	25.6	25.6	25.6	25.6	25.6	25.6	25.6	25.6	25.6	25.6	25.6	25.6	25.6	25.5	25.5	25.6
2	25.6	25.6	25.6	25.6	25.6	25.5	25.5	25.5	25.6	25.6	25.6	25.6	25.5	25.6	25.6	25.5
3	25.5	25.4	25.4	25.4	25.5	25.4	25.5	25.4	25.5	25.6	25.5	25.5	25.5	25.5	25.4	25.4
4	25.4	25.4	25.4	25.5	25.5	25.5	25.5	25.5	25.5	25.5	25.5	25.5	25.5	25.5	25.4	25.4
5	25.4	25.3	25.4	25.4	25.4	25.5	25.5	25.4	25.5	25.5	25.5	25.5	25.5	25.5	25.4	25.5
6	25.5	25.5	25.4	25.4	25.5	25.4	25.5	25.4	25.6	25.6	25.6	25.6	25.5	25.4	25.4	25.5
7	25.5	25.4	25.5	25.5	25.4	25.4	25.4	25.4	25.4	25.6	25.6	25.5	25.5	25.5	25.4	25.5
8	25.5	25.5	25.5	25.6	25.6	25.5	25.6	25.6	25.6	25.6	25.6	25.6	25.6	25.6	25.6	25.5
9	25.6	25.5	25.5	25.5	25.5	25.5	25.6	25.6	25.6	25.6	25.6	25.5	25.5	25.5	25.5	25.5
10	25.6	25.5	25.5	25.6	25.6	25.6	25.6	25.6	25.7	25.7	25.6	25.6	25.5	25.5	25.5	25.5
11	25.5	25.5	25.4	25.5	25.6	25.6	25.6	25.6	25.6	25.6	25.6	25.6	25.5	25.5	25.4	25.5
12	25.6	25.6	25.5	25.6	25.6	25.6	25.6	25.6	25.6	25.6	25.6	25.6	25.6	25.6	25.6	25.5
13	25.4	25.4	25.4	25.5	25.5	25.6	25.6	25.5	25.6	25.6	25.6	25.6	25.5	25.6	25.6	25.5
14	25.5	25.4	25.4	25.5	25.5	25.5	25.5	25.5	25.5	25.5	25.5	25.5	25.5	25.4	25.4	25.5
15	25.3	25.3	25.3	25.3	25.3	25.3	25.3	25.3	25.4	25.4	25.3	25.3	25.3	25.3	25.3	25.3
16	25.3	25.3	25.3	25.4	25.4	25.3	25.5	25.3	25.5	25.4	25.4	25.3	25.4	25.3	25.3	25.4
17	25.3	25.3	25.3	25.3	25.4	25.4	25.4	25.4	25.4	25.4	25.4	25.4	25.3	25.2	25.2	25.2
18	25.3	25.3	25.3	25.3	25.3	25.3	25.3	25.2	25.3	25.3	25.3	25.3	25.3	25.3	25.3	25.3
19	25.6	25.6	25.6	25.6	25.5	25.6	25.6	25.6	25.5	25.7	25.6	25.6	25.5	25.5	25.5	25.6
20	25.6	25.5	25.5	25.6	25.5	25.5	25.5	25.5	25.6	25.5	25.6	25.5	25.5	25.5	25.5	25.5
21	25.4	25.4	25.3	25.4	25.4	25.5	25.4	25.4	25.4	25.4	25.4	25.4	25.4	25.4	25.4	25.4

付属資料 4(つづき)

暴露日	pH															
	対照区				0.0371 mg/L				0.116 mg/L				0.360 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	7.9	7.9	7.9	7.9	7.9	7.9	7.9	7.9	7.9	7.9	7.9
3	7.7	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.5	7.5	7.5	7.5
7	7.7	7.6	7.6	7.5	7.5	7.5	7.6	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5
10	7.7	7.7	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6
14	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.7	7.7
17	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.5	7.6	7.5	7.5	7.6	7.6	7.6	7.6
21	7.7	7.7	7.7	7.7	7.7	7.6	7.6	7.7	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.7	7.7	7.7
溶存酸素 (mg/L)																
暴露日	対照区				0.0371 mg/L				0.116 mg/L				0.360 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	7.9	7.9	7.9	8.0	7.9	8.0	7.9	7.9	7.8	7.9	7.8	7.8	7.8	7.8	7.8
3	6.1	6.2	6.1	6.3	6.3	6.1	6.1	6.1	6.1	6.1	6.1	6.1	6.1	6.1	6.2	6.2
7	6.4	6.7	6.5	6.4	6.2	6.2	6.3	6.3	6.5	6.5	6.6	6.6	6.6	6.7	6.7	6.8
10	5.8	5.7	5.8	5.9	6.0	6.0	5.9	6.1	6.0	5.9	5.9	5.7	6.2	6.1	6.1	6.2
14	5.9	5.7	5.8	5.9	5.9	5.9	5.8	5.8	5.7	5.9	5.9	5.9	6.4	6.2	6.4	6.6
17	6.4	6.2	6.2	6.3	6.4	6.3	6.4	6.2	6.2	6.2	6.1	6.2	6.7	6.6	6.6	6.6
21	6.4	6.3	6.3	6.4	6.5	6.5	6.7	6.4	6.5	6.5	6.4	6.4	6.6	6.7	6.8	6.8

付属資料 5 暴露終了時の生存個体のエンドポイント等の測定結果

測定濃度 (mg/L)	性別	水槽	番号	全長 (mm)	体重 (mg)	二次 性徴	VTG (ng/mg)	HSI (%)	GSI (%)
対照区	オス	1	01	36.9	504	137	<1.0	2.5	1.0
			02	34.1	375	153	<1.0	2.3	0.9
			03	35.8	516	155	<1.0	1.9	1.0
		2	04	36.4	498	96	<1.0	2.4	1.1
			05	37.3	500	134	<1.0	1.1	1.0
			06	38.4	566	154	<1.0	2.1	0.9
		3	07	35.0	390	111	<1.0	2.3	1.2
			08	36.7	633	160	<1.0	1.4	0.6
			09	36.1	439	166	3.9	2.0	1.0
		4	10	36.9	469	113	<1.0	1.2	1.1
			11	36.6	463	166	<1.0	1.4	0.9
			12	34.2	348	110	<1.0	1.4	1.1
	平均	水槽 1		35.6	465	148	0.5	2.3	1.0
		水槽 2		37.4	521	128	0.5	1.9	1.0
		水槽 3		35.9	487	146	1.6	1.9	0.9
		水槽 4		35.9	427	130	0.5	1.4	1.0
0.0371	オス	1	01	33.4	313	138	<1.0	1.9	0.9
			02	35.2	447	118	1.6	2.3	1.0
			03	37.0	501	142	1.3	1.5	1.0
		2	04	34.6	439	160	10.0	1.3	0.8
			05	37.4	553	128	1.4	1.6	1.0
			06	35.1	341	151	<1.0	1.8	0.9
		3	07	35.9	422	119	<1.0	1.5	0.8
			08	34.7	420	100	<1.0	1.4	0.9
			09	36.6	422	132	19.7	2.1	1.2
		4	10	36.8	529	162	3.0	2.1	1.2
			11	38.3	667	146	<1.0	1.8	1.0
			12	34.2	418	120	<1.0	1.9	0.9
	平均	水槽 1		35.2	420	133	1.1	1.9	1.0
		水槽 2		35.7	444	146	4.0	1.6	0.9
		水槽 3		35.7	421	117	6.9	1.7	1.0
		水槽 4		36.4	538	143	1.3	1.9	1.0

注) 二次性徴:乳頭状小突起を有する尻びれの節板数、VTG:ビテログニン濃度、HSI:肝臓体指数、GSI:生殖腺体指数

付属資料 5(つづき)

測定濃度 (mg/L)	性別	水槽	番号	全長 (mm)	体重 (mg)	二次 性徴	VTG (ng/mg)	HSI (%)	GSI (%)
0.116	オス	1	01	36.1	466	129	0.1	1.5	0.8
			02	34.3	403	114	27.8	1.7	1.1
			03	35.7	429	150	0.3	1.7	0.6
		2	04	34.3	371	146	2.6	1.9	0.7
			05	37.7	522	158	0.5	1.5	1.2
			06	36.4	423	121	0.9	1.3	0.7
		3	07	35.9	448	127	1.0	1.7	0.9
			08	35.5	419	158	0.2	2.0	0.9
			09	35.4	476	151	0.2	2.0	1.1
		4	10	34.9	402	115	6.8	1.7	0.8
			11	36.5	510	117	1.1	1.6	0.6
			12	35.9	505	141	0.4	1.8	1.1
	平均	水槽 1		35.4	433	131	9.4	1.6	0.8
		水槽 2		36.1	439	142	1.3	1.6	0.9
		水槽 3		35.6	448	145	0.5	1.9	1.0
		水槽 4		35.8	472	124	2.7	1.7	0.8
0.360	オス	1	01	33.7	360	111	2.1	1.6	0.7
			02	35.2	367	141	1.0	1.0	0.5
			03	37.1	471	94	0.6	1.8	0.8
		2	04	35.8	375	134	0.6	1.3	0.5
			05	34.7	409	142	0.4	2.0	0.7
			06	34.1	382	147	0.5	1.8	0.7
		3	07	34.4	356	144	0.1	1.8	0.7
			08	35.2	430	138	0.1	1.0	0.4
			09	-	-	-	-	-	-
		4	10	34.2	362	157	0.1	1.8	0.4
			11	34.9	414	126	1.0	1.7	0.6
			12	-	-	-	-	-	-
	平均	水槽 1		35.3	399	115	1.2	1.5	0.7
		水槽 2		34.9	389	141	0.5	1.7	0.6
		水槽 3		34.8	393	141	0.1	1.4	0.6
		水槽 4		34.6	388	142	0.6	1.7	0.5

注) 二次性徴:乳頭状小突起を有する尻びれの節板数、VTG:ビテログニン濃度、HSI:肝臓体指数、GSI:生殖腺体指数

付属資料 5(つづき)

測定濃度 (mg/L)	性別	水槽	番号	全長 (mm)	体重 (mg)	二次 性徴	VTG (ng/mg)	HSI (%)	GSI (%)
対照区	メス	1	01	38.7	704	0	1129.7	5.2	9.2
			02	41.0	789	0	1167.5	4.6	9.7
			03	38.8	618	0	983.6	4.5	12.1
		2	04	40.7	733	0	860.5	3.8	11.3
			05	40.1	737	0	1114.0	5.2	11.2
			06	39.5	656	0	1315.2	3.9	10.7
		3	07	39.3	624	0	724.5	3.7	12.0
			08	39.9	763	0	715.1	4.5	11.1
			09	38.9	679	0	1026.2	4.6	10.0
		4	10	34.8	568	0	1001.5	3.1	10.6
			11	39.6	717	0	949.7	3.8	9.3
			12	38.2	629	0	717.8	5.3	11.0
	平均	水槽 1		39.5	704	0	1090.0	4.7	10.3
		水槽 2		40.1	709	0	1100.0	4.3	11.1
		水槽 3		39.4	689	0	822.0	4.3	11.0
		水槽 4		37.5	638	0	890.0	4.1	10.3
0.0371	メス	1	01	34.6	473	0	1192.0	5.8	8.0
			02	35.7	491	0	1199.5	3.1	7.0
			03	40.1	673	0	1775.0	5.4	9.7
		2	04	39.4	688	0	1535.6	4.8	9.9
			05	38.6	706	0	1078.7	5.4	10.1
			06	38.4	703	0	884.5	6.3	11.2
		3	07	39.1	738	0	943.0	3.8	9.1
			08	40.2	755	0	833.2	4.6	11.3
			09	37.7	555	0	818.1	2.8	10.7
		4	10	39.1	663	0	1019.0	4.3	10.3
			11	37.7	578	0	931.1	5.7	8.1
			12	38.5	696	0	1024.4	4.8	12.0
	平均	水槽 1		36.8	546	0	1390.0	4.7	8.2
		水槽 2		38.8	699	0	1170.0	5.5	10.4
		水槽 3		39.0	683	0	865.0	3.7	10.4
		水槽 4		38.4	646	0	992.0	4.9	10.1

注) 二次性徴:乳頭状小突起を有する尻びれの節板数、VTG:ビテロゲニン濃度、HSI:肝臓体指数、GSI:生殖腺体指数

付属資料 5(つづき)

測定濃度 (mg/L)	性別	水槽	番号	全長 (mm)	体重 (mg)	二次 性徴	VTG (ng/mg)	HSI (%)	GSI (%)
0.116	メス	1	01	43.0	1065	0	1429.2	4.2	18.6
			02	40.1	755	0	1382.9	4.5	8.6
			03	39.0	741	0	805.7	4.7	8.3
		2	04	35.6	555	0	1753.7	3.8	7.8
			05	40.3	715	0	1562.5	4.6	8.1
			06	37.9	614	0	1296.6	5.3	11.3
		3	07	42.6	747	0	794.7	3.7	11.7
			08	39.1	709	0	1367.3	5.4	14.0
			09	36.3	544	0	722.1	5.9	9.9
		4	10	37.6	702	0	1244.2	5.1	11.3
			11	40.2	761	0	1408.7	4.1	8.5
			12	41.0	801	0	1067.3	6.1	11.3
	平均	水槽 1		40.7	854	0	1210.0	4.5	11.8
		水槽 2		37.9	628	0	1540.0	4.5	9.1
		水槽 3		39.3	667	0	961.0	5.0	11.9
		水槽 4		39.6	755	0	1240.0	5.1	10.4
0.360	メス	1	01	40.0	663	0	2515.0	3.4	7.2
			02	38.9	648	0	2957.7	4.3	12.3
			03	35.7	543	0	2380.4	3.1	11.1
		2	04	38.5	609	0	1080.5	4.0	12.4
			05	36.5	536	0	964.3	4.3	13.5
			06	37.9	716	0	2148.7	3.5	16.3
		3	07	37.5	682	0	1823.4	2.9	18.4
			08	38.8	661	0	1623.8	3.9	10.9
			09	-	-	-	-	-	-
		4	10	36.1	659	0	2159.1	3.2	17.1
			11	35.9	561	0	1526.8	3.5	11.4
			12	37.0	609	0	1586.7	3.9	10.2
	平均	水槽 1		38.2	618	0	2620.0	3.6	10.2
		水槽 2		37.6	620	0	1400.0	3.9	14.1
		水槽 3		38.2	671	0	1720.0	3.4	14.7
		水槽 4		36.3	610	0	1760.0	3.5	12.9

注) 二次性徴:乳頭状小突起を有する尻びれの節板数、VTG:ビテロゲン濃度、HSI:肝臓体指数、GSI:生殖腺体指数

付属資料 6 ビテロゲニン濃度測定の実データ

《Plate I -標準溶液》

濃度 (ng/mL)	吸光度(450 nm)				VTG濃度(ng/mL)				
	測定値	平均	標準偏差	CV%	濃度	平均	標準偏差	CV%	誤差%
0	0.043 0.046	0.045	0.002	4.9	ND 0.205	0.21			
1	0.056 0.057	0.057	0	0.9	1.16 1.211	1.19	0.04	3.0	119
2	0.070 0.069	0.07	0.001	1.1	2.065 2	2.03	0.06	3.1	102
5	0.129 0.131	0.13	0.001	1.1	4.891 4.979	4.94	0.05	0.9	99
10	0.259 0.266	0.262	0.005	2.1	9.745 10.008	9.88	0.19	1.9	99
20	0.58 0.588	0.584	0.006	1.0	19.984 20.251	20.12	0.19	0.9	101
50	1.472 1.418	1.445	0.038	2.6	51.063 48.84	49.95	1.57	3.1	100
100	2.326 2.285	2.305	0.029	1.3	101.789 98.313	100.05	2.46	2.5	100

注)NDは吸光度から計算したビテロゲニン濃度が0を下回った場合を示す。

《Plate I -分析試料》

測定濃度 (mg/L)	性別	水槽	番号	吸光度(450 nm)				VTG濃度(ng/mL)					
				測定値	平均	標準偏差	CV%	濃度	平均	標準偏差	CV%	希釈倍率	ng/肝臓mg
対照区	オス	1	1	0.046	0.046	0.000	0.0	0.1	0.1	0.012	8.4	500	0.1
				0.046				0.2					
			2	0.066	0.065	0.002	3.3	1.8	1.7	0.121	7.1	500	0.9
				0.063				1.6					
			3	0.044	0.044	0.000	0.0	ND				500	0.0
				0.044				ND					
		2	4	0.052	0.052	0.000	0.0	0.9	0.8	0.03	3.6	500	0.4
				0.052				0.8					
			5	0.054	0.054	0.001	1.3	1.0	1.0	0.079	8.1	500	0.5
				0.053				0.9					
			6	0.061	0.061	0.000	0.0	1.5	1.5	0.014	1.0	500	0.7
				0.061				1.5					
		3	7	0.047	0.047	0.000	0.0	0.3	0.3	0	0.0	500	0.2
				0.047				0.3					
			8	0.061	0.061	0.000	0.0	1.5	1.5	0.038	2.5	500	0.7
				0.061				1.5					
			9	0.207	0.205	0.003	1.4	7.9	7.9	0.1	1.3	500	3.9
				0.203				7.8					
		4	10	0.066	0.066	0.001	1.1	1.8	1.8	0.053	3.0	500	0.9
				0.065				1.7					
			11	0.044	0.044	0.000	0.0	ND				500	0.0
				0.044				ND					
			12	0.059	0.059	0.000	0.0	1.4	1.4	0.029	2.1	500	0.7
				0.059				1.4					
0.0371	オス	1	1	0.043	0.044	0.001	3.2	ND				500	0.0
				0.045				ND					
			2	0.090	0.090	0.000	0.0	3.2	3.1	0.025	0.8	500	1.6
				0.090				3.1					
			3	0.080	0.080	0.001	0.9	2.6	2.6	0.046	1.8	500	1.3
				0.079				2.5					
		2	4	0.579	0.578	0.001	0.2	20.0	19.9	0.046	0.2	500	10.0
				0.577				19.9					
			5	0.084	0.084	0.000	0.0	2.8	2.8	0.004	0.1	500	1.4
				0.084				2.8					
			6	0.051	0.051	0.000	0.0	0.8	0.8	0.006	0.8	500	0.4
				0.051				0.8					

注)NDは吸光度から計算したビテロゲニン濃度が0を下回った場合を示す。

付属資料 6(つづき)

《Plate I -分析試料》

測定濃度 (mg/L)	性別	水槽	番号	吸光度(450 nm)				VTG濃度(ng/mL)					
				測定値	平均	標準 偏差	CV%	濃度	平均	標準偏差	CV%	希釈 倍率	ng/肝臓mg
0.0371	オス	3	7	0.046	0.046	0.001	1.6	0.2	0.2	0	0.0	500	0.1
				0.045				ND					
			8	0.048	0.048	0.000	0.0	0.4	0.5	0.038	8.3	500	0.2
				0.048				0.5					
			9	1.164	1.171	0.009	0.8	39.1	39.4	0.316	0.8	500	19.7
				1.177				39.6					
		4	10	0.157	0.157	0.000	0.0	6.0	6.0	0.008	0.1	500	3.0
				0.157				6.1					
			11	0.049	0.050	0.001	1.4	0.6	0.6	0.021	3.5	500	0.3
				0.050				0.6					
			12	0.044	0.045	0.001	1.6	ND				500	0.0
				0.045				ND					
0.116	オス	1	1	0.045	0.045	0.000	0.0	ND	0.1	0	0.0	500	0.1
				0.045				0.1					
			2	1.532	1.576	0.062	3.9	53.7	55.6	2.779	5.0	500	27.8
				1.620				57.6					
			3	0.050	0.051	0.001	1.4	0.6	0.7	0.124	18.0	500	0.3
				0.051				0.8					
		2	4	0.135	0.138	0.004	2.6	5.2	5.3	0.143	2.7	500	2.6
				0.140				5.4					
			5	0.054	0.055	0.001	1.3	1.0	1.0	0.039	3.8	500	0.5
				0.055				1.0					
			6	0.065	0.065	0.000	0.0	1.7	1.8	0.018	1.0	500	0.9
				0.065				1.8					
		3	7	0.067	0.068	0.001	1.0	1.9	1.9	0.021	1.1	500	1.0
				0.068				1.9					
			8	0.048	0.048	0.000	0.0	0.5	0.5	0.031	6.6	500	0.2
				0.048				0.4					
			9	0.047	0.047	0.000	0.0	0.3	0.3	0.017	5.1	500	0.2
				0.047				0.4					
		4	10	0.367	0.373	0.008	2.1	13.3	13.5	0.247	1.8	500	6.8
				0.378				13.7					
			11	0.070	0.072	0.002	3.0	2.1	2.2	0.135	6.2	500	1.1
				0.073				2.3					
			12	0.050	0.052	0.003	5.4	0.6	0.8	0.274	33.7	500	0.4
				0.054				1.0					
0.360	オス	1	1	0.111	0.114	0.004	3.7	4.1	4.3	0.192	4.5	500	2.1
				0.117				4.4					
			2	0.067	0.069	0.002	3.1	1.9	2.0	0.14	7.1	500	1.0
				0.070				2.1					
			3	0.057	0.058	0.001	1.2	1.2	1.2	0.056	4.6	500	0.6
				0.058				1.3					
		2	4	0.057	0.057	0.001	1.3	1.2	1.2	0.037	3.1	500	0.6
				0.056				1.2					

注)NDは吸光度から計算したビテロゲン濃度が0を下回った場合を示す。

付属資料 6(つづき)

《Plate II -標準溶液》

濃度 (ng/mL)	吸光度(450 nm)				VTG濃度(ng/mL)				
	測定値	平均	標準偏差	CV%	濃度	平均	標準偏差	CV%	誤差%
0	0.060 0.045	0.052	0.011	20.4	0.852 ND	0.85			
1	0.060 0.059	0.059	0	0.8	0.86 0.801	0.83	0.04	5.0	83
2	0.075 0.077	0.076	0.001	1.6	1.914 2.011	1.96	0.07	3.5	98
5	0.149 0.147	0.148	0.002	1.2	5.192 5.098	5.15	0.07	1.3	103
10	0.301 0.292	0.297	0.006	2.1	10.185 9.923	10.05	0.19	1.8	101
20	0.664 0.633	0.649	0.022	3.4	20.328 19.488	19.91	0.59	3.0	100
50	1.634 1.595	1.614	0.028	1.7	50.835 49.29	50.06	1.09	2.2	100
100	2.479 2.502	2.49	0.017	0.7	98.944 100.997	99.97	1.45	1.5	100

注)NDは吸光度から計算したビテログニン濃度が0を下回った場合を示す。

《Plate II -分析試料》

測定濃度 (mg/L)	性別	水槽	番号	吸光度(450 nm)				VTG濃度(ng/mL)					
				測定値	平均	標準偏差	CV%	濃度	平均	標準偏差	CV%	希釈倍率	ng/肝臓mg
対照区	メス	1	1	0.481	0.472	0.013	2.7	15.3	15.1	0.36	2.4	75000	1129.7
				0.463				14.8					
			2	0.497	0.490	0.010	2.0	15.8	15.6	0.281	1.8	75000	1167.5
				0.483				15.4					
			3	0.408	0.403	0.008	1.9	13.3	13.1	0.22	1.7	75000	983.6
				0.397				13.0					
		2	4	0.343	0.345	0.003	0.8	11.4	11.5	0.072	0.6	75000	860.5
				0.347				11.5					
			5	0.470	0.464	0.008	1.8	15.0	14.9	0.232	1.6	75000	1114.0
				0.458				14.7					
			6	0.550	0.562	0.017	3.0	17.2	17.5	0.458	2.6	75000	1315.2
				0.574				17.9					
		3	7	0.285	0.284	0.002	0.7	9.7	9.7	0.069	0.7	75000	724.5
				0.282				9.6					
			8	0.281	0.280	0.002	0.8	9.6	9.5	0.078	0.8	75000	715.1
				0.278				9.5					
			9	0.426	0.422	0.006	1.3	13.8	13.7	0.157	1.1	75000	1026.2
				0.418				13.6					
		4	10	0.415	0.411	0.006	1.6	13.5	13.4	0.166	1.2	75000	1001.5
				0.406				13.2					
			11	0.379	0.386	0.010	2.6	12.5	12.7	0.278	2.2	75000	949.7
				0.393				12.9					
			12	0.285	0.281	0.006	2.0	9.7	9.6	0.181	1.9	75000	717.8
				0.277				9.4					
0.0371	メス	1	1	0.509	0.502	0.010	2.0	16.1	15.9	0.267	1.7	75000	1192.0
				0.495				15.7					
			2	0.511	0.506	0.008	1.5	16.1	16.0	0.204	1.3	75000	1199.5
				0.500				15.8					
			3	0.804	0.786	0.025	3.2	24.2	23.7	0.696	2.9	75000	1775.0
				0.768				23.2					
		2	4	0.671	0.670	0.002	0.3	20.5	20.5	0.062	0.3	75000	1535.6
				0.668				20.4					
			5	0.451	0.447	0.006	1.3	14.5	14.4	0.162	1.1	75000	1078.7
				0.443				14.3					
			6	0.356	0.356	0.000	0.0	11.8	11.8	0.008	0.1	75000	884.5
				0.356				11.8					

付属資料 6(つづき)

《Plate II-分析試料》

測定濃度 (mg/L)	性別	水槽	番号	吸光度(450 nm)				VTG濃度 (ng/mL)					
				測定値	平均	標準 偏差	CV%	濃度	平均	標準偏差	CV%	希釈 倍率	ng/肝臓mg
0.0371	メス	3	7	0.387	0.384	0.005	1.3	12.7	12.6	0.139	1.1	75000	943.0
				0.380				12.5					
			8	0.335	0.333	0.004	1.1	11.2	11.1	0.087	0.8	75000	833.2
				0.330				11.0					
			9	0.325	0.326	0.001	0.4	10.9	10.9	0.04	0.4	75000	818.1
				0.327				10.9					
		4	10	0.421	0.419	0.003	0.7	13.6	13.6	0.078	0.6	75000	1019.0
				0.417				13.5					
			11	0.381	0.378	0.005	1.3	12.5	12.4	0.121	1.0	75000	931.1
				0.374				12.3					
0.116	メス	1	1	0.622	0.618	0.006	1.0	19.2	19.1	0.168	0.9	75000	1429.2
				0.613				18.9					
			2	0.597	0.595	0.003	0.5	18.5	18.4	0.085	0.5	75000	1382.9
				0.593				18.4					
			3	0.319	0.320	0.001	0.4	10.7	10.7	0.036	0.3	75000	805.7
				0.321				10.8					
		2	4	0.773	0.776	0.004	0.5	23.3	23.4	0.09	0.4	75000	1753.7
				0.778				23.4					
			5	0.687	0.683	0.006	0.9	21.0	20.8	0.185	0.9	75000	1562.5
				0.678				20.7					
			6	0.549	0.553	0.005	0.9	17.2	17.3	0.132	0.8	75000	1296.6
				0.556				17.4					
		3	7	0.316	0.315	0.001	0.4	10.6	10.6	0.029	0.3	75000	794.7
				0.314				10.6					
			8	0.588	0.587	0.001	0.2	18.3	18.2	0.031	0.2	75000	1367.3
				0.586				18.2					
			9	0.283	0.283	0.000	0.0	9.6	9.6	0.006	0.1	75000	722.1
				0.283				9.6					
		4	10	0.526	0.527	0.001	0.3	16.6	16.6	0.052	0.3	75000	1244.2
				0.528				16.6					
			11	0.607	0.608	0.001	0.1	18.8	18.8	0.033	0.2	75000	1408.7
				0.608				18.8					
			12	0.442	0.442	0.000	0.0	14.2	14.2	0	0.0	75000	1067.3
				0.442				14.2					
0.360	メス	1	1	1.136	1.129	0.011	0.9	33.8	33.5	0.326	1.0	75000	2515.0
				1.121				33.3					
			2	1.321	1.316	0.007	0.5	39.6	39.4	0.225	0.6	75000	2957.7
				1.311				39.3					
			3	1.070	1.069	0.002	0.2	31.8	31.7	0.055	0.2	75000	2380.4
				1.067				31.7					
		2	4	0.449	0.449	0.001	0.2	14.4	14.4	0.026	0.2	75000	1080.5
				0.448				14.4					

付属資料 6(つづき)

《PlateⅢ-標準溶液》

濃度 (ng/mL)	吸光度(450 nm)				VTG濃度(ng/mL)				
	測定値	平均	標準偏差	CV%	濃度	平均	標準偏差	CV%	誤差%
0	0.044 0.044	0.044	0	0.8	ND ND				
1	0.058 0.058	0.058	0	0.5	0.512 0.454	0.48	0.04	8.5	48
2	0.077 0.077	0.077	0	0.3	2.188 2.167	2.18	0.01	0.7	109
5	0.143 0.139	0.141	0.003	2.1	5.723 5.538	5.63	0.13	2.3	113
10	0.271 0.257	0.264	0.009	3.6	10.697 10.222	10.46	0.34	3.2	105
20	0.542 0.533	0.538	0.006	1.2	19.578 19.3	19.44	0.20	1.0	97
50	1.512 1.382	1.447	0.092	6.3	52.943 47.712	50.33	3.70	7.3	101
100	2.372 2.262	2.317	0.078	3.4	104.673 95.332	100.00	6.61	6.6	100

注)NDは吸光度から計算したビテロゲニン濃度が0を下回った場合を示す。

《PlateⅢ-分析試料》

測定濃度 (mg/L)	性別	水槽	番号	吸光度(450 nm)				VTG濃度(ng/mL)					
				測定値	平均	標準偏差	CV%	濃度	平均	標準偏差	CV%	希釈倍率	ng/肝臓mg
0.360	オス	2	5	0.063	0.062	0.002	3.4	1.0	0.9	0.184	20.8	500	0.4
				0.060				0.8					
			6	0.063	0.062	0.001	2.3	1.0	0.9	0.111	11.7	500	0.5
				0.061				0.9					
		3	7	0.044	0.045	0.001	1.6	ND				500	0.0
				0.045				ND					
			8	0.048	0.048	0.000	0.0	ND				500	0.0
				0.048				ND					
0.360	オス	4	10	0.050	0.050	0.001	1.4	ND				500	0.0
				0.049				ND					
			11	0.075	0.076	0.001	0.9	2.1	2.1	0.005	0.2	500	1.0
				0.076				2.1					
0.0371	メス	4	12	0.364	0.357	0.010	2.8	13.9	13.7	0.331	2.4	75000	1024.4
				0.350				13.4					
0.360	メス	2	5	0.325	0.334	0.012	3.6	12.6	12.9	0.407	3.2	75000	964.3
				0.342				13.1					
			6	0.827	0.833	0.008	0.9	28.5	28.6	0.251	0.9	75000	2148.7
				0.838				28.8					
		3	7	0.700	0.695	0.008	1.1	24.5	24.3	0.234	1.0	75000	1823.4
				0.689				24.1					
			8	0.582	0.609	0.038	6.3	20.8	21.7	1.197	5.5	75000	1623.8
				0.636				22.5					
		4	10	0.823	0.837	0.019	2.3	28.4	28.8	0.613	2.1	75000	2159.1
				0.850				29.2					
			11	0.570	0.567	0.004	0.7	20.4	20.4	0.13	0.6	75000	1526.8
				0.564				20.3					
			12	0.597	0.593	0.006	1.0	21.3	21.2	0.172	0.8	75000	1586.7
				0.589				21.0					

注)NDは吸光度から計算したビテロゲニン濃度が0を下回った場合を示す。

付属資料 7 暴露期間中の 1 週間ごとの産卵状況

総産卵数

測定濃度 (mg/L)	総産卵数 (eggs/female/day)		
	暴露1週目	暴露2週目	暴露3週目
対照区	40.8 ± 0.4	41.0 ± 1.2	40.7 ± 1.7
0.0371	39.6 ± 2.6	40.3 ± 2	42.1 ± 2
0.116	39.6 ± 2.7	36.7 ± 5.2	36.6 ± 4.5
0.360	40.2 ± 2.3	22.1 ± 7.7 (*)	12.6 ± 4.7 (*)

注) 総産卵数は、容器平均±標準偏差を示す。

(*)は、対照区と統計学的有意差(p<0.05)が認められたことを示す。

受精卵数

測定濃度 (mg/L)	受精卵数 (eggs/female/day)		
	暴露1週目	暴露2週目	暴露3週目
対照区	36.0 ± 2.9	38.5 ± 3.0	37.0 ± 2.5
0.0371	37.7 ± 2	37.1 ± 3	38.2 ± 4
0.116	35.8 ± 4.4	32.4 ± 5.9	30.5 ± 5.0 (*)
0.360	32.5 ± 4.5	11.4 ± 3.5 (*)	4.5 ± 2.0 (*)

注) 受精卵数は、容器平均±標準偏差を示す。

(*)は、対照区と統計学的有意差(p<0.05)が認められたことを示す。

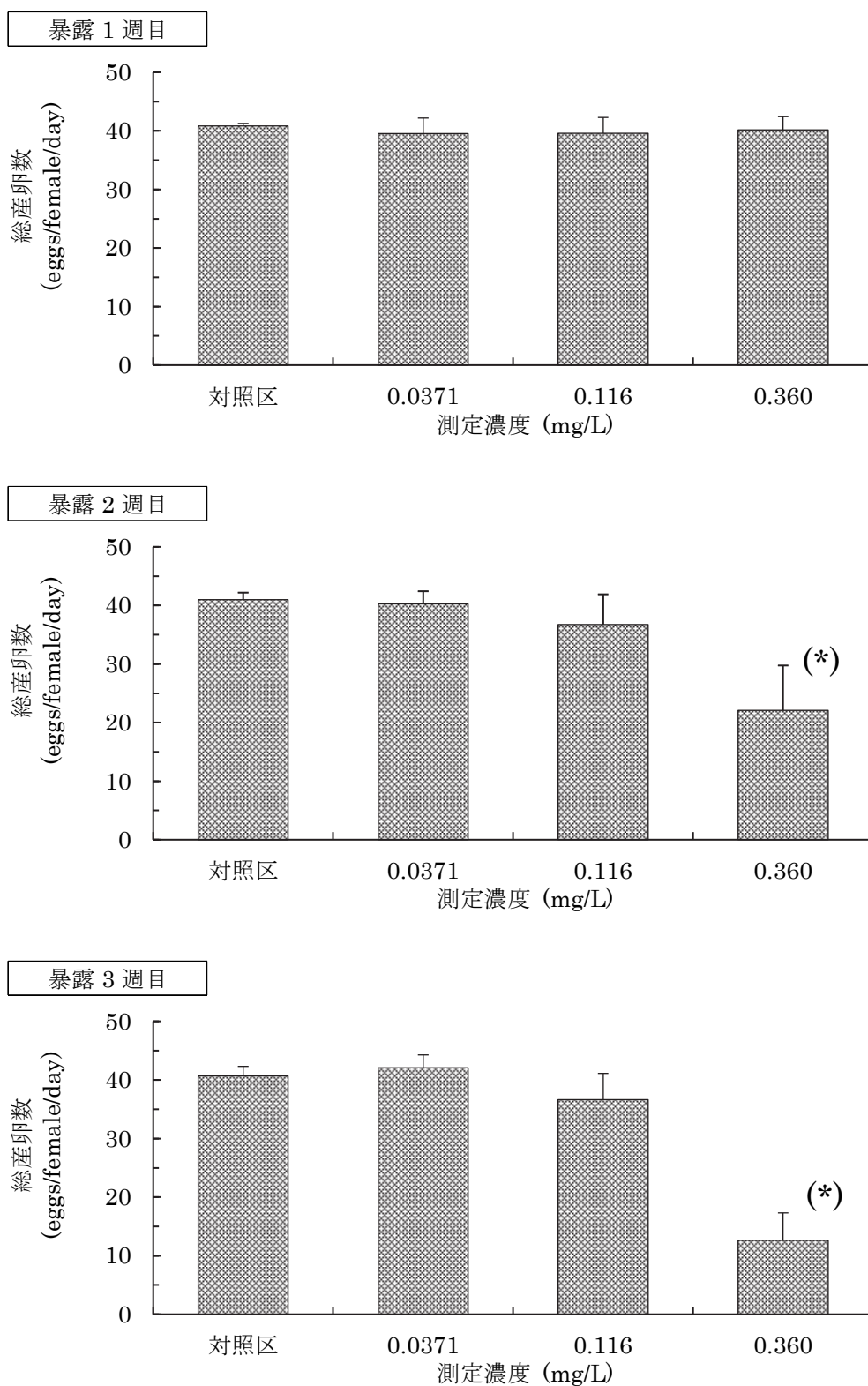
受精率

測定濃度 (mg/L)	受精率 (%)		
	暴露1週目	暴露2週目	暴露3週目
対照区	88.3 ± 6.9	93.9 ± 6.2	91.2 ± 6.8
0.0371	95.3 ± 3.1	92.0 ± 2.4	90.8 ± 7.3
0.116	90.2 ± 5.1	87.9 ± 5.2	83.3 ± 9.2
0.360	80.5 ± 7.61	52.8 ± 7 (*)	36.7 ± 15 (*)

注) 受精率は、容器平均±標準偏差を示す。

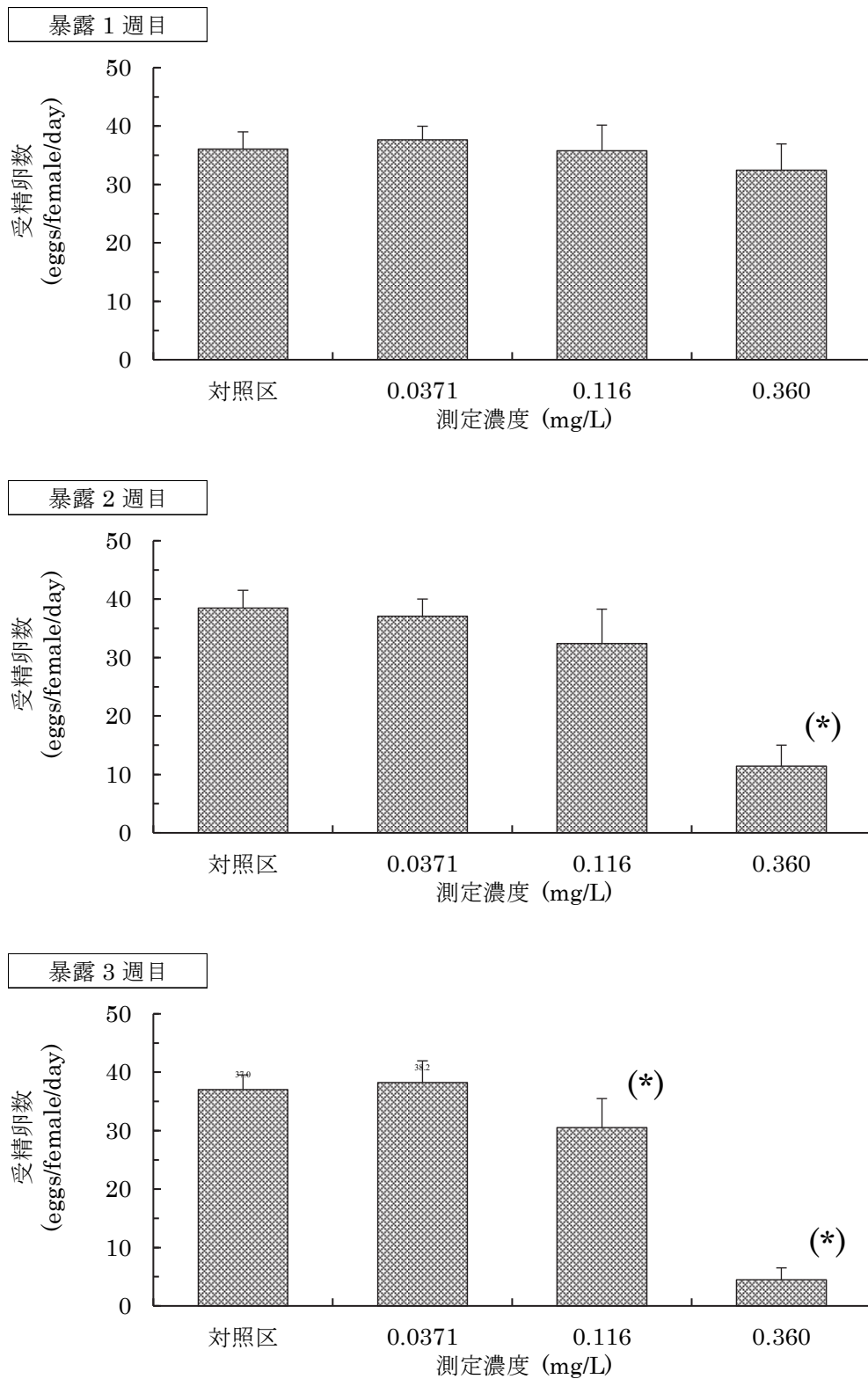
(*)は、対照区と統計学的有意差(p<0.05)が認められたことを示す。

付属資料 8-1 暴露期間中の 1 週間ごとの平均産卵数



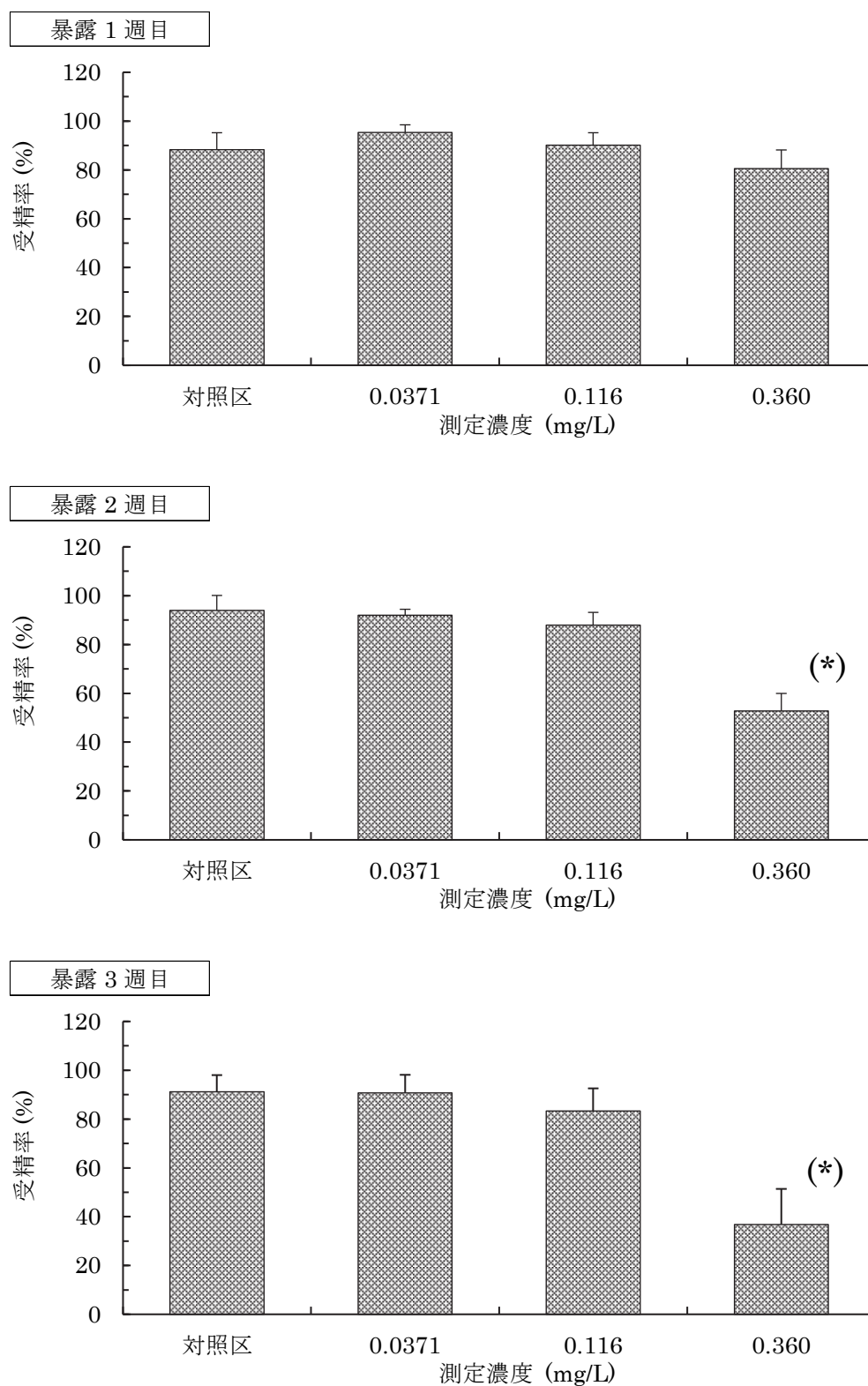
注) グラフは、容器平均±標準偏差を示す。

付属資料 8-2 暴露期間中の 1 週間ごとの平均受精卵数



注) グラフは、容器平均±標準偏差を示す。

付属資料 8-3 暴露期間中の 1 週間ごとの平均受精率



注) グラフは、容器平均±標準偏差を示す。

(*)は、対照区と統計学的有意差($p < 0.05$)が認められたことを示す。

付属資料 9 暴露期間中の受精卵及び未受精卵の計数結果

暴露日	受精卵数 (eggs/tank/day)															
	対照区				0.0371 mg/L				0.116 mg/L				0.360 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
1	95	84	101	122	121	120	98	97	145	154	113	105	72	119	127	125
2	106	104	82	118	129	136	128	123	119	128	91	119	120	97	80	98
3	126	111	101	131	138	120	108	119	99	122	100	123	124	118	74	83
4	97	84	81	97	87	95	108	134	123	134	100	124	116	131	121	140
5	115	116	91	135	121	97	88	84	77	79	97	125	120	111	54	96
6	126	117	130	107	121	124	103	106	84	93	42	123	85	104	51	88
7	118	108	105	120	134	116	109	101	75	96	93	123	69	97	44	62
8	110	85	124	122	142	121	103	116	80	105	92	110	87	84	70	52
9	122	164	102	125	113	120	116	122	105	147	97	136	74	41	66	28
10	145	99	125	107	125	103	110	121	66	75	75	145	71	69	63	34
11	133	94	135	139	97	125	96	115	70	121	93	129	30	22	31	7
12	128	114	106	107	106	124	96	134	95	79	100	99	13	20	5	8
13	90	70	114	127	122	67	95	105	52	74	92	110	26	11	1	10
14	114	88	118	126	108	84	94	133	86	77	93	120	17	11	10	0
15	116	121	121	106	122	105	120	127	102	70	122	108	12	14	10	4
16	121	73	112	112	123	108	90	131	107	89	118	16	3	12	2	14
17	104	130	110	107	127	111	140	114	118	84	124	71	46	25	21	25
18	108	63	116	105	104	98	72	122	112	80	102	73	11	9	0	13
19	134	118	113	128	129	104	101	152	89	63	87	115	25	8	4	4
20	138	111	119	111	116	118	90	102	100	81	82	73	18	14	10	12
21	121	98	89	107	96	133	101	154	76	90	120	92	36	9	0	16

付属資料 9(つづき)

暴露日	未受精卵数 (eggs/tank/day)															
	対照区				0.0371 mg/L				0.116 mg/L				0.360 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
1	15	36	5	0	1	0	2	29	10	1	1	8	56	10	20	6
2	15	1	57	3	1	0	1	1	19	2	27	10	19	2	32	37
3	6	13	1	3	4	1	5	2	45	12	11	9	14	13	25	48
4	24	28	36	5	26	12	0	4	0	1	33	1	4	0	10	4
5	4	2	38	1	1	3	4	25	8	17	3	9	20	19	23	14
6	14	28	2	10	7	4	2	1	5	4	42	1	9	19	51	11
7	8	28	17	2	3	2	3	14	14	16	3	7	48	24	61	49
8	4	16	2	0	6	5	27	9	29	6	10	33	45	14	53	26
9	1	12	4	1	0	3	6	8	12	21	2	0	56	35	51	44
10	1	21	1	11	2	14	0	1	30	11	20	3	34	25	46	10
11	2	28	1	1	29	2	4	2	10	15	11	2	36	22	69	6
12	3	44	1	1	12	3	14	6	8	3	6	30	45	28	65	16
13	20	3	6	1	7	43	11	20	8	6	3	4	60	26	26	11
14	21	1	1	0	5	4	24	1	40	12	19	9	17	16	10	2
15	14	31	0	0	8	4	2	3	13	27	1	11	43	45	23	12
16	2	37	2	0	3	5	40	0	22	8	3	44	29	36	19	13
17	18	3	13	7	2	15	5	36	23	10	3	37	18	18	25	3
18	2	35	2	2	9	22	39	2	24	17	5	21	25	22	0	8
19	2	19	22	3	2	15	30	0	3	23	6	0	31	49	10	1
20	2	15	6	19	2	18	42	1	65	23	3	32	38	16	10	14
21	2	26	18	3	1	2	15	3	44	18	4	24	26	60	46	21

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(魚類短期繁殖試験、チアベンダゾール)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。