

環境省請負業務

令和6年度

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、オクタメチルシクロテトラシロキサン)
実施業務

報告書

令和7年3月

株式会社三菱ケミカルリサーチ

まえがき

本報告書は、令和 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、オクタメチルシクロテトラシロキサン）実施業務報告である。

令和 7 年 3 月

株式会社三菱ケミカルリサーチ

化学物質名

オクタメチルシクロテトラシロキサン

目 次

	頁
SUMMARY	1
要 旨	2
1. 実施内容	4
2. オクタメチルシクロテトラシロキサンの魚類短期繁殖試験の実施	5
2.1 材料および方法	5
2.1.1 被験物質	5
2.1.2 試験生物	6
2.1.3 試験環境および条件	7
2.1.4 ばく露および観察・計測方法	12
2.1.5 結果の算出	14
2.1.6 試験有効性基準	15
2.2 結果	16
2.2.1 試験液中の被験物質濃度	16
2.2.2 試験環境	17
2.2.3 死亡率	18
2.2.4 総産卵数、受精卵数および受精率	19
2.2.5 ばく露終了時の全長および湿重量	21
2.2.6 ばく露終了時の肝臓体指数および生殖腺体指数	23
2.2.7 ばく露終了時の肝臓中ビテロジェニン濃度	25
2.2.8 ばく露終了時の二次性徴指標	26
2.3 結果の概要および考察	27
3. 化学物質の内分泌かく乱作用に関する検討会への報告	29
4. 参考文献	29
付属資料	付 1～付 9

SUMMARY

A short term fish reproduction assay with octamethylcyclotetrasiloxane was conducted in accordance with OECD TG229. Nominal concentrations were 0.30, 3.0 and 30 µg/L, and the measured concentrations were 0.221, 2.18 and 22.0 µg/L, respectively. No statistically significant differences were observed in total number of eggs produced, total number of fertilized eggs, mortality, fish wet weight, female gonadosomatic index (GSI), female hepato somatic index (HSI), and female secondary sexual characteristic index (number of joint plate with papillary processes) compared to the control group (sum of control and solvent control) or solvent control.

Statistically significant differences were observed in the fertility and male secondary sexual characteristic index (number of joint plate with papillary processes) at 22.0 µg/L compared to the control group. However, no statistically significant differences were observed at any concentration compared to the solvent control, and all these comparative data were unlikely to show any biologically significant differences.

A statistically significant increase in liver vitellogenin concentration was observed in males at 22.0 µg/L and in females at all concentrations compared to the control group, suggesting that test substance has estrogenic effect.

From the above, it was suggested that octamethylcyclotetrasiloxane had estrogenic effects on mature medaka when exposed for 21 days at nominal concentrations of 0.221, 2.18 and 22.0 µg/L; however, since no effects on reproduction were observed, the LOEC and NOEC were determined to be 22.0 µg/L or higher.

要 旨

I. 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、オクタメチルシクロテトラシロキサン）実施業務

II. 業務の背景及び目的

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、化学物質の内分泌かく乱作用についての試験および評価を進めており、化学物質の内分泌かく乱作用に関連する報告の信頼性評価を行うとともに、試験対象となり得る物質を選定している。また、試験及び評価の考え方や枠組みについての検討も行っており、試験管内試験及び生物試験を用いて、2 段階での評価を行う枠組みを取りまとめたところである。

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き、内分泌かく乱作用に関する評価等に必要なデータを集積するため、既に実施された試験管内試験の結果等を踏まえて選定された第一段階生物試験を実施する優先順位が高いと考えられる物質の中から、オクタメチルシクロテトラシロキサンについて、第一段階生物試験である魚類短期繁殖試験を実施した。

III. 魚類短期繁殖試験の実施

オクタメチルシクロテトラシロキサン（CAS No. 556-67-2）を被験物質として、OECD テストガイドライン No.229（OECD Guideline for the testing of chemicals No.229: Fish Short Term Reproduction Assay、2012 年 10 月 2 日採択、以下、OECD TG229）¹⁾に準拠して、以下の試験条件下でメダカを用いた魚類短期繁殖試験を実施した。ばく露期間中の産卵数および受精率の繁殖に関するエンドポイント、ばく露終了時のビテロジェニンおよび二次性徴の発現状況の内分泌かく乱作用に関するエンドポイントなどの測定を行った。また、それらの結果からそれぞれの LOEC（最小影響濃度）および NOEC（最大無影響濃度）を決定した

ばく露方式：流水式

供試生物：メダカ（*Oryzias latipes*）

試験期間：21 日間

試験濃度区：対照区、助剤対照区および 3 濃度区

（設定濃度：0.30、3.0、30 $\mu\text{g/L}$ （公比；10））

試験液量：約 1.8 L／容器（換水率；約 20 回／日、流量；25 mL/min）

連 数：4 連／濃度

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

水 温：25 $\pm$ 2° C

光 周 期：明期 16 時間、暗期 8 時間

給 餌：3 回／日（ブラインシュリンプの孵化後 24 時間以内の幼生）

IV. 魚類短期繁殖試験の結果

OECD TG229 に準拠して、オクタメチルシクロテトラシロキサンについて、第一段階生物試験である魚類短期繁殖試験を実施した。

設定濃度は 0.30、3.0 および 30 $\mu\text{g/L}$ であり、実測濃度はそれぞれ 0.221、2.18 および 22.0 $\mu\text{g/L}$ であった。総産卵数、受精卵数、死亡率、魚体湿重量、生殖腺体指数、メスの肝臓対指数、メスの二次性徴指標（乳頭状小突起を有する節板数）に対照群（対照区と助剤対照区の総和）または助剤対照区と比較して統計学的な有意差は認められなかった。

受精率およびオスの二次性徴指標（乳頭状小突起を有する節板数）について、22.0 $\mu\text{g/L}$ 区に対照群と比較して統計学的な有意差が認められた。しかしながら、助剤対照区と比較した場合、すべての濃度区に統計学的な有意差は認めず、また、これらの比較データはすべて、生物学的に有意な差を示す可能性は低いと考えられた。

肝臓中ビテロジェニン濃度について、オスは 22.0 $\mu\text{g/L}$ 区、メスはすべての濃度区に対照群と比較して統計学的な有意な増加が認められ、エストロゲン作用を持つことが示唆された。

以上より、オクタメチルシクロテトラシロキサンは、測定濃度 0.221、2.18 および 22.0 $\mu\text{g/L}$ での 21 日間のばく露において成熟メダカに対してエストロゲン作用を持つことが示唆されたものの、繁殖への影響は認められないため、LOEC および NOEC は最高濃度区 22.0 $\mu\text{g/L}$ 以上と判断した。

V. 化学物質の内分泌かく乱作用に関する会議への報告

本業務で実施した第一段階生物試験について、環境省が別途開催する EXTEND2022 に基づく会議に提出する資料を作成するとともに、会議に出席して必要な報告説明を行った。

1. 実施内容

本業務は、EXTEND2022 において採用している試験及び評価の考え方や枠組みに基づき、内分泌かく乱作用に関する評価等に必要なデータを集積するため、既に実施された試験管内試験の結果を踏まえて優先順位が高いと考えられる物質（オクタメチルシクロテトラシロキサン）について、OECD テストガイドライン No. 229 (OECD Guideline for the testing of chemicals No.229: Fish Short Term Reproduction Assay、2012 年 10 月 2 日採択、以下、OECD TG229) ¹⁾に準拠し、第一段階生物試験である魚類短期繁殖試験を実施した。その結果から、繁殖への影響および内分泌かく乱作用に関するエンドポイントへの作用の有無および NOEC（最大無影響濃度）または LOEC（最小影響濃度）等を決定した。

(1) オクタメチルシクロテトラシロキサンの魚類短期繁殖試験の実施

OECD TG229 に準拠して、オクタメチルシクロテトラシロキサンの魚類短期繁殖試験を実施し、その結果を報告した。

(2) 化学物質の内分泌かく乱作用に関する検討会への報告

本業務の結果については、環境省が別途開催する検討会の会議に報告するため、環境省担当官の指示に従い資料を作成の上、電子メール等で資料を提出した。また、同会議に出席し、必要に応じて資料に関する説明、質疑応答を行った。

(3) 報告書の作成

上記(1)、(2)の結果を取りまとめた報告書（本報告書）を 3 部、報告書の電子データを収納した電子媒体（DVD-R）7 式を作成した。

2. オクタメチルシクロテトラシロキサンの魚類短期繁殖試験の実施

2.1 材料および方法

2.1.1 被験物質

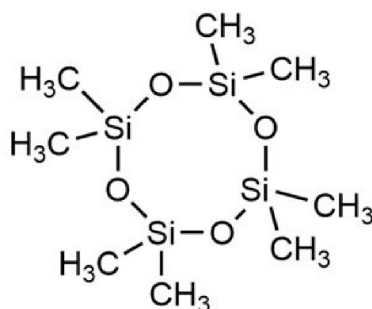
使用した被験物質の名称、物理化学的性状等を以下に示す。

CAS 登録番号：556-67-2

和 名：オクタメチルシクロテトラシロキサン

英 名：Octamethylcyclotetrasiloxane

構造式：



分子式：C₈H₂₄O₄Si₄

分子量：296.62

入手先：東京化成工業株式会社

Lot 番号：HVILN

純 度：100.0%

外 観：無色透明液体

対水溶解度：10 mg/L²⁾ (化学物質ファクトシート、環境省)

30 µg/L (弊社測定値)

2.1.2 試験生物

(1) 供試生物種

一般名：メダカ

学 名：*Oryzias latipes*

入手先：自家繁殖（入手元：国立研究開発法人国立環境研究所）

(2) じゅん化条件

14 日間以上飼育じゅん化した健康で正常な魚を使用した。じゅん化中、オスメス 3 個体ずつを試験容器と同等の飼育容器（30 水槽）に入れ、各容器における産卵状況を確認した。ばく露開始前に 5 日間、各容器の産出卵を全て採取し、1 日あたりの受精卵と未受精卵を計数し、各容器当たりの総産卵数および受精率を算出した。その結果から、各試験区間の産卵数および受精率が同等となるように供試生物を各試験区の容器に割り当てた。

じゅん化条件を以下に示す。

飼 育 水：脱塩素水道水

当施設の脱塩素水道水製造装置で横浜市水道水を脱塩素処理したもの（以下、試験用水）。水質測定結果の詳細を付表 1 に示す。

飼育方法：流水式

水 温： $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$

溶存酸素濃度：飽和酸素濃度の 60%以上

照 明：室内光、16 時間明（540-1000 lux）／8 時間暗

給 餌：2～3 回／日（ブラインシュリンプの孵化後 24 時間以内の幼生）

2.1.3 試験環境および条件

(1) 試験室

試験は、株式会社三菱ケミカルリサーチ 製品安全評価部門 安全科学研究センター（神奈川県横浜市青葉区鴨志田町 1000 番地 B12 棟）で行った。

(2) 試験装置

ばく露試験は流水式試験装置を使用した。試験液は、試験原液と試験用水を一定流量で連続的に混合槽にて混合し、混合槽から試験液供給ポンプにて各試験容器に供給した。試験原液、試験用水および試験液の流量は、ばく露期間中は定期的に確認し、流量の変動が 10%以内となるように維持した。

(3) 試験濃度の決定

- ① 簡易フラスコ法 (24℃、24 時間) により、水溶解度を測定したところ、30 µg/L であった。
- ② 弊社で過去実施したコイの濃縮度試験において、被験物質の濃縮性が高いことがわかっており、広い濃度範囲で繁殖に影響があった場合、NOEC が求められなくなる可能性を考慮し、公比を最大とする。
- ③ 設定濃度 1000 µg/L (流水式) にてメダカ成魚 6 尾を 13 日間暴露したところ、死亡などの毒性影響は認められなかった。なお、水中濃度 (実測値) のばらつきが大きく 1000 µg/L では濃度維持が困難であった。

以上より、本試験の濃度設定は 0.30、3.0、30 µg/L (公比 10) とした。

(4) ばく露条件

ばく露は、前述の OECD TG229 に準じて、以下の条件で行った。

試験容器：2 L 容オールガラス水槽

(被験物質の揮発を抑えるため、水面にテフロンシートで蓋をした)

試験用水：脱塩素水道水

ばく露方式：流水式（換水率 約 20 回／日、流量 25 mL/min）

ばく露期間：21 日間（2025 年 1 月 20 日～2025 年 2 月 10 日）

試験液量：約 1.8 L／容器

試験区数：対照区、助剤対照区および 3 濃度区

各濃度区の被験物質濃度は 0.30、3.0、30 µg/L（公比；10）

連 数：4 容器／試験区

供試魚数：6 個体（オス 3 個体、メス 3 個体）／容器

24 個体（オス 12 個体、メス 12 個体）／試験区

供試魚齢：18 週齢

供試魚体重：オス 0.364 ± 0.053 g、メス 0.417 ± 0.039 g

じゅん化した供試魚のうち、ばく露に使用しなかったオスメスそれぞれ
6 個体の測定結果

水 温：25 ± 2°C

溶存酸素濃度：飽和酸素濃度の 60%以上

光 周 期：明期 16 時間、暗期 8 時間

エアレーション：なし

給 餌：3 回／日（ブラインシュリンプの孵化後 24 時間以内の幼生）

(5) 環境測定機器

水温、pH、溶存酸素濃度、硬度およびアルカリ度の測定は、それぞれ以下の機器を用いて行った。

- ・デジタル温度計：TX1001 型 横河メータ&インスツルメンツ製
- ・温度記録計 おんどとり：TR42 型 ティアンドデイ製品
- ・マルチ水質計（溶存酸素濃度、pH 測定用）：東亜ディーケーケー製 MM-60R 型
- ・アルカリ度測定キット：ドロップテスト WAD-AL-M 共立理化学研究所製
- ・硬度測定キット：ポータブル全硬度測定器 HI 96735 型
ハンナ インスツルメンツ・ジャパン製

(6) 試験液の調製

被験物質を *N,N*-ジメチルホルムアミド（DMF）に溶解し、3000、30000、300000 µg/L の原液を 5～8 日ごとに調製した。それぞれの原液および助剤対照区用の DMF を流水試験装置にセットし、試験用水で希釈して各試験区の試験液を調製した。対照区は試験用水のみとした。なお、原液は、室温（ばく露）条件下において調製後 16 日間安定であった。

(7) 被験物質の濃度測定

ガスクロマトグラフ質量分析 (GC/MS) 計を用いて被験物質を定量した。ばく露開始前に流水式装置の空運転を行い、各試験区の 4 容器の試験液について被験物質の濃度を測定し、設定通りに試験液の濃度が維持されることを確認した。ばく露期間中は各試験区の全容器の試験液について、少なくとも週に 1 回 (ばく露終了時を含む) 分析を行った。

試薬：

DMF (富士フイルム和光純薬株式会社製)

超純水 (JIS K0557 A4 グレードの水)

ガスクロマトグラフ質量分析計および測定条件：

装置

ガスクロマトグラフ質量分析計 5975C 型、Agilent Technologies 製 No.2

ワークステーション：MSD ChemStation

ガスクロマトグラフ (GC)：7890A 型

オートインジェクタ：7693 型

注入口：Front Inlet スプリット/スプリットレス

[GC 条件]

カラム：Agilent Technologies 製 DB-5ms 60 m×0.25 mm, 1 μm

キャリアーガス：ヘリウム 1 mL/min

ランタイム：7 min

オーブン温度：100°C (0 min) → 35°C/min → 275°C (2 min)

注入口温度：150°C

MS インターフェース温度：200°C

注入条件：スプリット (スプリット比 20:1)

注入量：3.0 mL (HSS サンプルループ容量)

[HSS 条件]

温度条件：Oven : 80°C, Loop : 170°C, Transfer Line : 200°C

イベント時間：GC Cycle Time : 10.0 min

Vial Equilibration Time : 15.0 min

Pressurization Time : 0.20 min

Loop Fill Time : 0.03 min

Loop Equilibration Time : 0.20 min

Inject Time : 1.00 min

バイアルパラメータ：Shake : High

[MS 条件]

温度条件： イオン源 230°C 四重極 150°C

SIM (Selected Ion Monitoring) 条件：

Solvent Delay： 3 min

Quant ion： m/z 281.10

標準溶液の調製：

オクタメチルシクロテトラシロキサン 100 mg (または 200 mg) を秤量し、DMF で溶解し 100 mL (200 mg 秤量時は 200 mL) に定容、1000 mg/L の溶液を調製した。この溶液を DMF で順次希釈し、5.00、10.0、50.0、100、500 $\mu\text{g/L}$ の標準溶液を調製した。また、DMF を 0 $\mu\text{g/L}$ の標準溶液とした。

検量線の作成：

標準溶液を以下のように分析し、検量線を作成した。

超純水 10 mL

+

標準溶液 0.1 mL

|

混合

|

GC/MS 測定*

*: 測定値は 0 $\mu\text{g/L}$ および標準溶液原液濃度の 1/100 (0.0500、0.100、0.500、1.00、5.00 $\mu\text{g/L}$) に相当

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

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

定量下限：検量線の最低濃度である 0.0500 $\mu\text{g/L}$ をばく露期間中の定量下限とした。

試験液の分析：

試験液を以下のように分析した。

試験液* 10 mL（超純水との合計）

+

超純水*

+

DMF 0.1 mL

|

混合

|

GC/MS 測定

*：超純水と試験液の比率を変えることによって被験物質濃度を検量線範囲に入れる。検量線範囲に入ると予想される試験区は、試験液 10 mL（超純水=0 mL）とする。

被験物質濃度の定量：

試験液中の被験物質濃度の定量は、各分析時に測定する標準溶液のピーク面積との比較で行った。

2.1.4 ばく露および観察・計測方法

(1) ばく露方法

じゅん化終了後、試験容器内の試験液の測定濃度が適正值であることを確認してから、供試生物を各水槽（4 容器×5 試験区=計 20 容器）に投入してばく露を開始した。ばく露期間中は全ての容器の水温、溶存酸素濃度および pH を週に 1 回（ばく露終了時を含む）測定した。対照区および助剤対照区の 1 容器については毎日水温を測定した。対照区、助剤対照区および最高濃度区の各 1 容器について、硬度とアルカリ度を週に 1 回（ばく露終了時を含む）測定した。なお、週に 3～4 回、試験容器の掃除を実施した。

(2) ばく露期間中の観察・計測

ばく露期間中は試験容器内の産出卵を毎日採取し、メス 1 個体あたりの産卵数、受精卵数および受精率を計測した。また、死亡個体の有無および行動・外見の異常を、毎日目視によって観察した。死亡個体は、発見後速やかに取り除き外見上のオスメスを確認した。行動・外見の異常は、下記の項目について観察した。

行動観察項目：摂餌活動の低下、横転、平衡喪失、表層集中、活動度低下、
過運動など

外観観察項目：体幹湾曲、眼球突出、腹部膨満、体色異常、出血、粘液の異常、
立鱗など

(3) ばく露終了後の測定

21 日間のばく露期間終了後、生存した全個体を氷麻酔処理してすぐに解剖し、下記項目について測定した。

全長および湿重量の測定：

全長は電子ノギス（株式会社ミットヨ製）を用いて、湿重量は電子天秤（AG204 型 メトラー・トレド製）を用いて測定した。

二次性徴指標の計測：

メダカの臀鰭を切断し、1%テトラマリンソルト溶液に保管し、臀鰭軟条上に認められる乳頭状小突起を実体顕微鏡（SMZ-U 型、SMZ1270i 型 ニコン製）の下で観察し、突起を有する節板数を計測した。

肝臓の測定および肝臓中ビテロジェニン濃度の測定：

解剖により肝臓を摘出し、電子天秤（GX-124A 型、エー・アンド・デイ製）によって秤量した。計測した肝臓重量を基に肝臓体指数（肝臓重量／湿重量）を算出した。

また、肝臓中のビテロジェニン量を調べるため、摘出した肝臓をホモジナイズし、ELISA 法で測定した。ELISA は EnBio Medaka Vitellogenin ELISA System（藤倉化成株式会社製）を用いて実施した。

測定は以下のように行った。

- ① 肝臓を回収したビーズチューブ（セラミックビーズ径 2.8 mm）に冷却した検体希釈用バッファーを肝臓重量の 20 倍量加える。
- ② 肝臓をホモジナイズ（室温、6500 rpm、10 sec）後、遠心分離（4℃、11200 rpm、10 min）する。

ホモジナイザー： RECELLYS Evolution エムエス機器製

遠心分離機：微量高速遠心機 CF18R Himac 製

- ③ 分離した上清をチューブに回収し、測定まで-80℃で保存した。
- ④ この上清を ELISA（Enzyme Linked Immuno Solvent Assay）法によるビテロジェニン測定に供した。測定にはこのホモジネート上清をさらに 10 倍以上希釈したものを使用した。測定濃度を各個体の肝臓の重量で除算することにより、肝臓重量あたりのビテロジェニン含量（ng/mg）を求めた。なお、前処理操作を考慮した定量下限値は、0.4 ng/mg 肝臓重量 とした。

ビテロジェニン測定キット：EnBio Medaka Vitellogenin ELISA system

藤倉化成株式会社製

マルチラベルリーダー：NIVO レビティジャパン製

生殖腺の測定：

解剖後、胴体から生殖腺を摘出し、電子天秤（MS205TS 型 メトラー・トレド製）によって秤量した。計測した生殖腺重量を基に生殖腺体指数（生殖腺重量／湿重量）を算出した。

2.1.5 結果の算出

(1) 各エンドポイントの算出

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

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

(2) 統計処理

本試験では助剤対照区を設定したため、OECD TG229 記載の統計手順に従い、対照区と助剤対照区の間で有意差検定を行った。解析にはソフトウェア Statlight「#32 群の比較」(Yukms Co., Ltd) を用いた。等分散の検定 (F test) により等分散性が認められた場合は Student の t 検定を行い、等分散性が認められなかった場合は Welch の t 検定を行った。

対照区と助剤対照区の間での有意差検定の結果、総産卵数、受精卵数、メス 1 個体の 1 日当たりの平均産卵数において有意差が検出された。よって、この項目については助剤対照区と濃度区間での有意差検定を行った。これ以外の項目については、OECD Series on Testing and Assessment Number 54: Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application³⁾に従い、対照区と助剤対照区の結果を統合した対照群と濃度区間での有意差検定を行った。

NOEC および LOEC 算出のための統計手法は OECD TG229 の Annex 8 のフローチャートに基づき、各エンドポイントに対し表 1 に示す変数変換と統計手法を適用した。解析には US EPA がメダカ拡張一世代繁殖試験 (MEOGRT : Medaka Extended One Generation Test) および幼若両生類発達・成長試験 (LAGDA : Larval Amphibian Growth and Development Assay) 用に開発した統計解析ソフトウェア StatCharms v. 0.90.95 (2020 年 4 月 30 日版、R cran サイトより入手) および R-4.0.5 (win 64 bit) を用いた。検定は原則片側検定で実施し、正規性および等分散性検定は有意水準 1%、その他は有意水準 5%とした。

表 1 各エンドポイントの変数変換と統計手法

エンドポイント	変数変換	統計手法
総産卵数・受精卵数	平方根変換	単調性の検定 → (単調性あり) Jonckheere-Terpstra 検定
受精率	アークサイン変換	
死亡率	アークサイン変換	Cochran-Armitage 検定
全長・湿重量	なし	単調性の検定 → (単調性あり) Jonckheere-Terpstra 検定 → (単調性なし) 一元配置分散分析・正規性・ 等分散性の検定 → (正規性・等分散性あり) Dunnett 検定 → (正規性・等分散性なし) Dunn 検定
肝臓体指数・ 生殖腺体指数	なし	
ビテロジェニン	対数変換	
二次性徴	平方根変換	

2.1.6 試験有効性基準

以下の条件から、本試験の有効性を判断した。

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

2.2 結果

ばく露 18 日目に、3.0 µg/L 区の 4 容器中 1 容器について、試験液の供給が停止したことによる酸欠が原因で、供試魚すべてが死亡した。そのため、3.0 µg/L 区については、全魚死亡した容器の結果を除外した 3 容器で結果を算出した。

2.2.1 試験液中の被験物質濃度

ばく露期間中、全容器の試験液中の被験物質濃度を週 1 回（ばく露開始時およびばく露終了時を含む）合計 4 回測定した結果（4 容器の平均値、3.0 µg/L 区のみ 3 容器の平均値）を表 2 に示す。設定濃度 0.30、3.0、30 µg/L に対して平均測定濃度はそれぞれ 0.221、2.18、22.0 µg/L であり、設定濃度に対して 73～74%であった。なお、平均測定濃度が設定濃度の±20%を超えていたため、結果はすべて平均測定濃度を用いて記載した。

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

表 2 試験液中の被験物質濃度

設定濃度 µg/L	試験液中の被験物質濃度 µg/L (対平均測定濃度 %)				平均測定濃度 [対設定濃度 %]
	ばく露 開始時	ばく露 8 日後	ばく露 15 日後	ばく露 終了時	
対照区	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	--
助剤 対照区	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	--
0.30	0.236	0.204	0.220	0.224	0.221
	(107)	(92)	(100)	(101)	[74]
3.0	2.38	2.03	2.19	2.11	2.18
	(109)	(93)	(100)	(97)	[73]
30	24.5	20.0	21.8	21.8	22.0
	(111)	(91)	(99)	(99)	[73]

注) 「N.D.」は定量下限 (0.0500 µg/L) 未満であることを示す。

2.2.2 試験環境

水温、溶存酸素、pH、硬度およびアルカリ度のばく露期間中の最小値と最大値を表3に示す。

ばく露期間中の水温は、全ての試験区において25.0～25.6℃であり、 $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ 以内かつ、試験容器間の水温の変動は $\pm 1.5^{\circ}\text{C}$ 未満であり、試験の有効性基準を満たした。溶存酸素は、全ての試験区において飽和酸素濃度の60%以上であり、試験の有効性基準を満たした。測定結果の詳細を付表2に示す。

表3 ばく露期間中の水温、溶存酸素、pH、硬度およびアルカリ度

測定濃度 ($\mu\text{g/L}$)	水温 ($^{\circ}\text{C}$)	溶存酸素 (mg/L) [飽和濃度に対する割合 %]	pH	硬度 ($\text{mg CaCO}_3/\text{L}$)	アルカリ度 ($\text{mg CaCO}_3/\text{L}$)
対照区	25.0 - 25.3	7.0 - 8.8 [87 - 109]	7.0 - 7.2	40 - 56	45 - 50
助剤 対照区	25.0 - 25.6	6.5 - 8.3 [80 - 103]	7.0 - 7.2	41 - 59	45 - 60
0.221	25.0 - 25.5	6.5 - 8.3 [80 - 103]	7.0 - 7.2	—	—
2.18	25.0 - 25.4	6.7 - 8.3 [83 - 103]	7.1 - 7.2	—	—
22.0	25.0 - 25.6	6.5 - 8.3 [80 - 103]	7.1 - 7.2	41 - 59	50 - 55

注) 「—」は測定対象外であることを示す。

2.2.3 死亡率

ばく露期間中の死亡個体数を表 4 に示す。

対照区、助剤対照区、0.221 µg/L 区および 22.0 µg/L 区では死亡および行動・外観の異常は認められなかった。

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

オスメスともにいずれの死亡率も対照群と比較し統計的に有意差は認められなかった。

対照区および助剤対照区の死亡率が 10%を超えなかったため、試験の有効性基準を満たした。

表 4 ばく露期間中の死亡個体

測定濃度 (µg/L)	オス			メス			合計 死亡率
	供試数	死亡数	死亡率	供試数	死亡数	死亡率	
対照区	12	0	0%	12	0	0%	0%
助剤 対照区	12	0	0%	12	0	0%	0%
0.221	12	0	0%	12	0	0%	0%
2.18	9	1	11%	9	0	0%	6%
22.0	12	0	0%	12	0	0%	0%

対照群との有意差無し (Cochran-Amitage 検定)

2.2.4 総産卵数、受精卵数および受精率

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

総産卵数、受精卵数、およびメス 1 個体の 1 日当たりの平均産卵数は、助剤対照区と比較し統計的に有意な差は認められなかった。

受精率は対照群と比較し、22.0 $\mu\text{g/L}$ 区に有意な減少が認められた。なお、助剤対照区と比較した場合、すべての濃度区で有意差は認められなかった。

対照区は、ばく露期間を通じて産卵は活発であり、試験の有効性基準を満たした。

表 5 平均総産卵数、平均受精卵数、平均受精率およびメス 1 個体の 1 日当たりの平均産卵数

測定濃度 ($\mu\text{g/L}$)	平均総産卵数 (eggs/vessel)	平均受精卵数 (eggs/vessel)	平均受精率 (%)	メス 1 個体 1 日 当たり平均産卵数 (eggs/day/female)
対照区	1600 $\pm$ 154	1562 $\pm$ 163	97.4 $\pm$ 1.5	25.4 $\pm$ 2.4
助剤 対照区	1407 $\pm$ 88	1362 $\pm$ 76	96.9 $\pm$ 1.3	22.3 $\pm$ 1.4
0.221	1647 $\pm$ 101	1560 $\pm$ 131	94.7 $\pm$ 2.5	26.1 $\pm$ 1.6
2.18	1551 $\pm$ 216	1488 $\pm$ 248	95.6 $\pm$ 3.1	24.6 $\pm$ 3.4
22.0	1419 $\pm$ 179	1362 $\pm$ 179	96.0 $\pm$ 1.0 *	22.5 $\pm$ 2.8

容器平均値 $\pm$ 標準偏差 (n=4、2.18 $\mu\text{g/L}$ 区のみ n=3)

* : 対照群と有意差有り (p<0.05 : Jonckheere-Terpstra 検定)

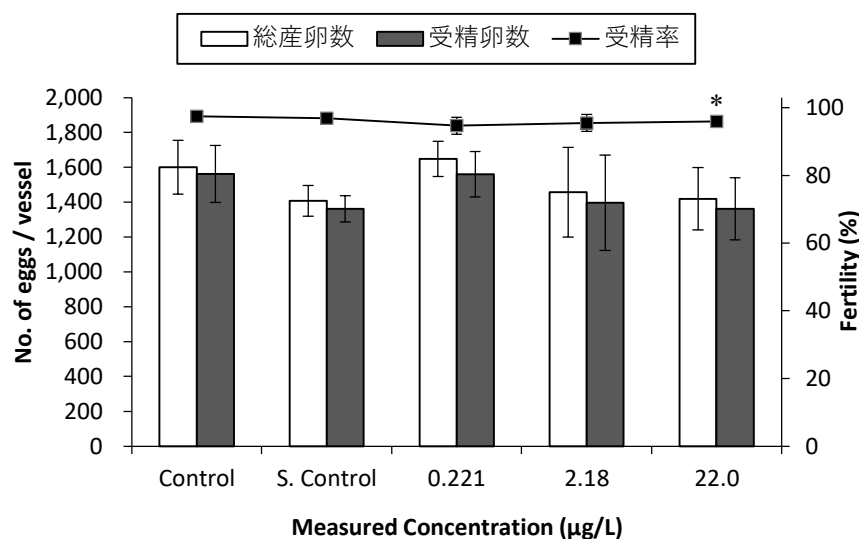


図 1 平均総産卵数、平均受精卵数および平均受精率

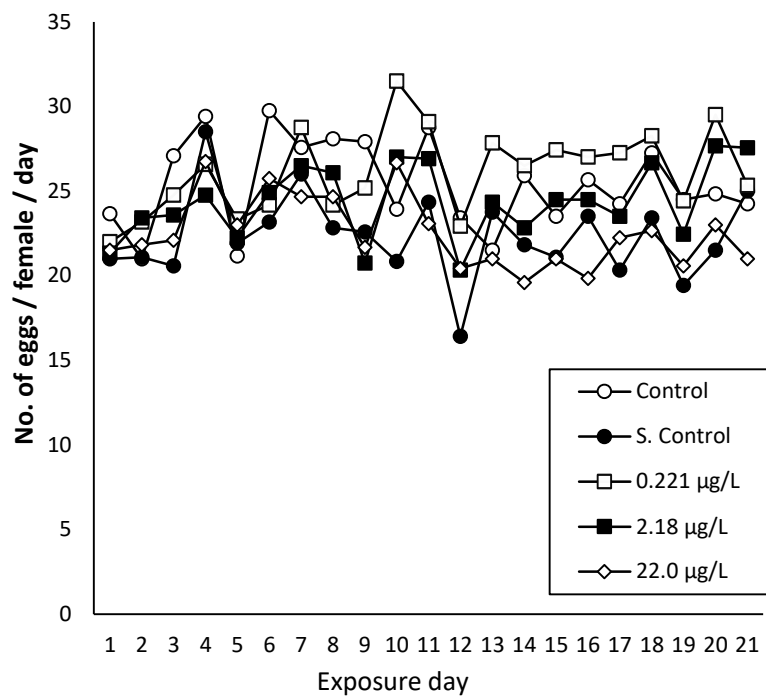


図2 ばく露期間中のメス1個体の1日当たりの平均産卵数

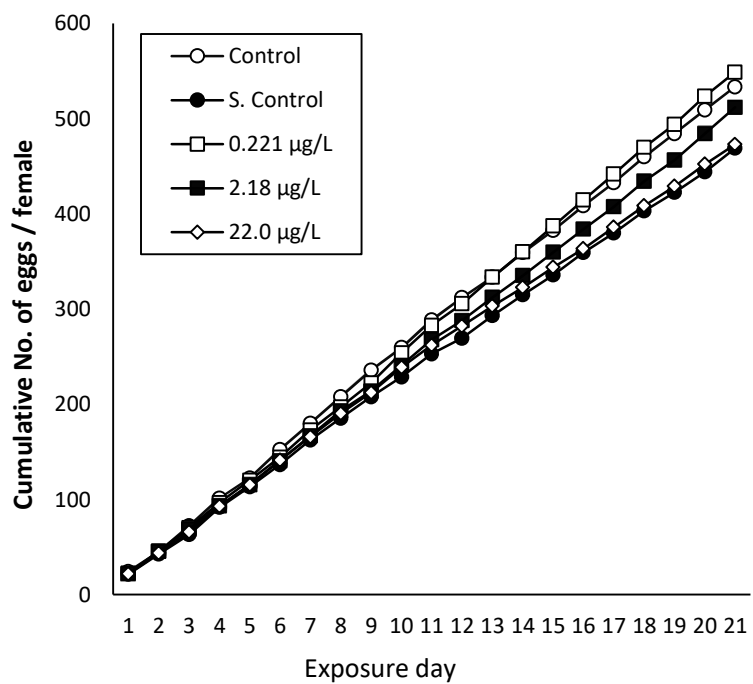


図3 ばく露期間中のメス1個体の累積産卵数

2.2.5 ばく露終了時の全長および湿重量

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

全長については、オスは全ての濃度区で対照群と比較して有意な減少が認められた。メスは 2.18 および 22.0 $\mu\text{g/L}$ 区で対照群と比較して有意な減少が認められた。

湿重量については、オスメスともに全ての濃度区において、対照群と比較して有意差は認められなかった。

表 6 ばく露終了時の全長および湿重量

設定 濃度 ($\mu\text{g/L}$)	全長 (mm)		湿重量 (g)	
	オス	メス	オス	メス
対照区	32.6 $\pm$ 1.5	31.8 $\pm$ 0.8	0.383 $\pm$ 0.049	0.408 $\pm$ 0.066
助剤 対照区	33.3 $\pm$ 1.2	32.1 $\pm$ 1.4	0.388 $\pm$ 0.049	0.417 $\pm$ 0.052
0.221	32.0 $\pm$ 1.0 *	31.7 $\pm$ 0.9	0.386 $\pm$ 0.034	0.424 $\pm$ 0.042
2.18	32.6 $\pm$ 1.6 *	31.1 $\pm$ 1.0 *	0.387 $\pm$ 0.060	0.400 $\pm$ 0.038
22.0	31.9 $\pm$ 1.2 **	30.7 $\pm$ 0.9 **	0.384 $\pm$ 0.048	0.401 $\pm$ 0.024

平均値 $\pm$ 標準偏差 (n=12、ただし 2.18 $\mu\text{g/L}$ 区のオスは n=8、メスは n=9)

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

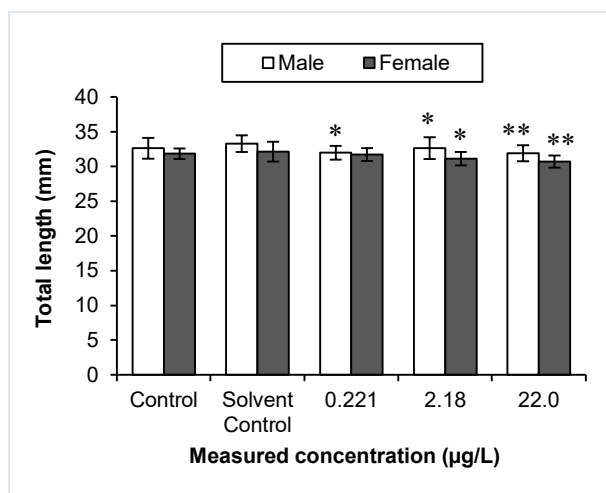


図 4 (a) ばく露終了時の全長

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

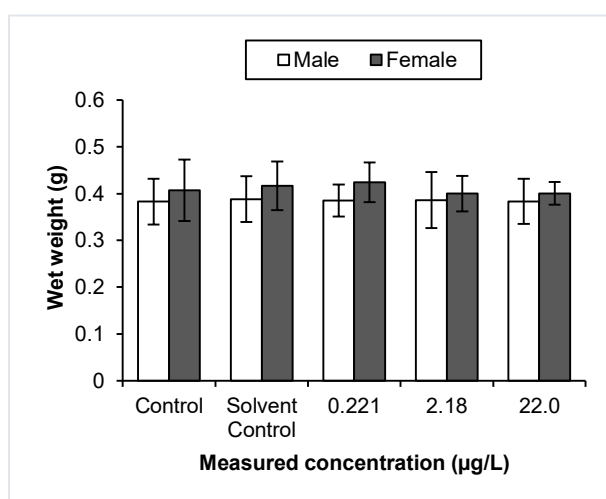


図 4 (b) ばく露終了時の湿重量

2.2.6 ばく露終了時の肝臓体指数および生殖腺体指数

ばく露終了時の肝臓体指数（HSI）および生殖腺体指数（GSI）の測定結果を表 7、図 5 (a) および(b)に示す。測定結果の詳細を付表 4 に示す。

肝臓体指数については、オスは 22.0 µg/L で対照群と比較して有意な増加が認められた。メスはいずれの濃度区においても有意差は認められなかった。

生殖腺体指数については、オスメスともに全ての濃度区に対照群と比較して有意差は認められなかった。

表 7 ばく露終了時の肝臓体指数（HSI）および生殖腺体指数（GSI）

設定 濃度 (µg/L)	肝臓体指数 (%)		生殖腺体指数 (%)	
	オス	メス	オス	メス
対照区	2.40 ± 0.69	5.31 ± 1.6	0.774 ± 0.16	9.16 ± 3.1
助剤 対照区	2.01 ± 0.53	5.89 ± 0.71	0.779 ± 0.25	8.25 ± 1.3
0.221	2.13 ± 0.30	6.12 ± 1.1	0.776 ± 0.28	8.91 ± 0.95
2.18	2.11 ± 0.40	6.47 ± 0.61	0.803 ± 0.18	8.81 ± 1.2
22.0	2.80 ± 0.48 **	6.00 ± 1.5	0.695 ± 0.17	8.69 ± 1.0

平均値±標準偏差（n=12、ただし 2.18 µg/L 区のオスは n=8、メスは n=9）、

**：対照群と有意差有り（p<0.01、：Jonckheere-Terpstra 検定）

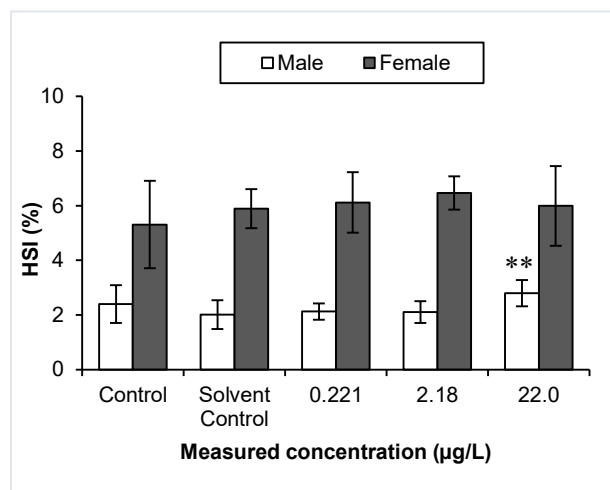


図 5(a) ばく露終了時の肝臓体指数 (HSI)

** : 対照群と有意差有り (p<0.01、: Jonckheere-Terpstra 検定)

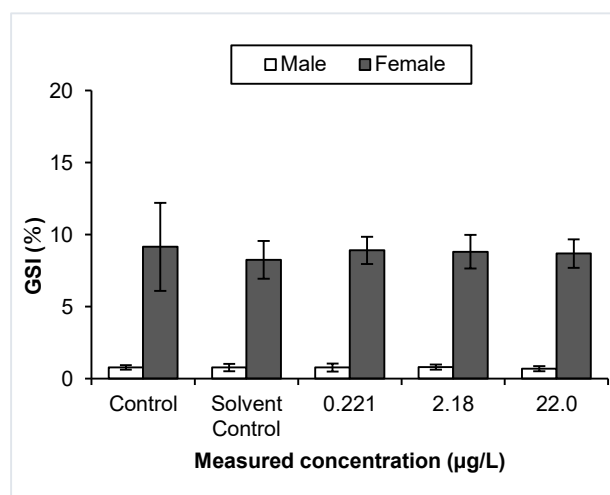


図 5(b) ばく露終了時の生殖腺体指数 (GSI)

2.2.7 ばく露終了時の肝臓中ビテロジェニン濃度

ばく露終了時の ELISA 法による肝臓中ビテロジェニン濃度の測定結果を表 8 および図 6 に示す。測定結果の詳細を付表 4 に示す。

オスは 22.0 µg/L 区で対照群と比較し有意な増加が認められた。

メスは全ての濃度区において、対照群と比較して有意な増加が認められた。

表 8 ばく露終了時の肝臓中ビテロジェニン濃度

測定濃度 (µg/L)	肝臓中ビテロジェニン濃度 (ng/mg liver)			
	オス		メス	
対照区	0.629	± 0.75	1004	± 747
助剤対照区	< L.O.Q.		941	± 310
0.221	< L.O.Q.		1303	± 222 **
2.18	0.530	± 0.57	1446	± 221 **
22.0	1003	± 687 **	1576	± 321 **

平均値±標準偏差 ((n=12、ただし 2.18 µg/L 区のオスは n=8、メスは n=9)、

「< L.O.Q.」は定量下限 (0.4 ng/mg liver) 未満であることを示す。

** : 対照群と有意差有り (p<0.01、Jonckheere-Terpstra 検定)

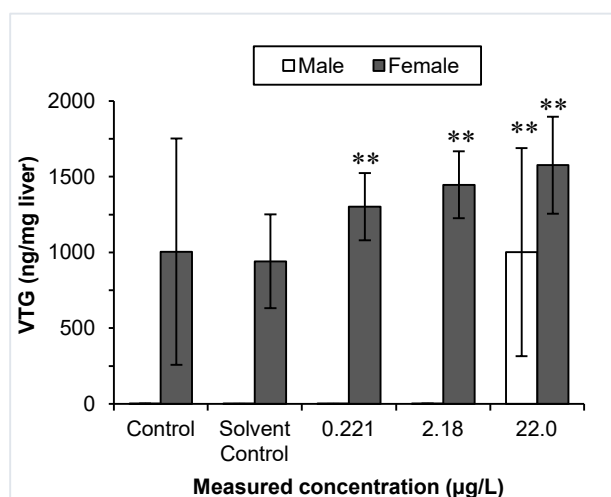


図 6 ばく露終了時の肝臓中ビテロジェニン

** : 対照群と有意差有り (p<0.01 : Jonckheere-Terpstra 検定)

2.2.8 ばく露終了時の二次性徴指標

二次性徴の指標として、ばく露終了時における乳頭状小突起を有する節板数（1 個体あたり）の計測結果を表 9 および図 7 に示す。測定結果の詳細を付表 4 に示す。

オスは 22.0 µg/L 区で対照群と比較し有意な増加が認められた。なお、助剤対照区と比較した場合、すべての濃度区で有意差は認められなかった。

メスはいずれの濃度区においても、乳頭状小突起を有する個体は確認されなかった。

表 9 ばく露終了時の二次性徴指標

測定濃度 (µg/L)	乳頭状小突起を有する節板数 (Plates/fish)					
	オス			メス		
対照区	90	±	12	0	±	0
助剤対照区	97	±	13	0	±	0
0.221	103	±	17	0	±	0
2.18	98	±	13	0	±	0
22.0	102	±	15	**	0	± 0

平均値±標準偏差（(n=12、ただし 2.18 µg/L 区のオスは n=8、メスは n=9)

**：対照群と有意差有り（p<0.01、Jonckheere-Terpstra 検定）

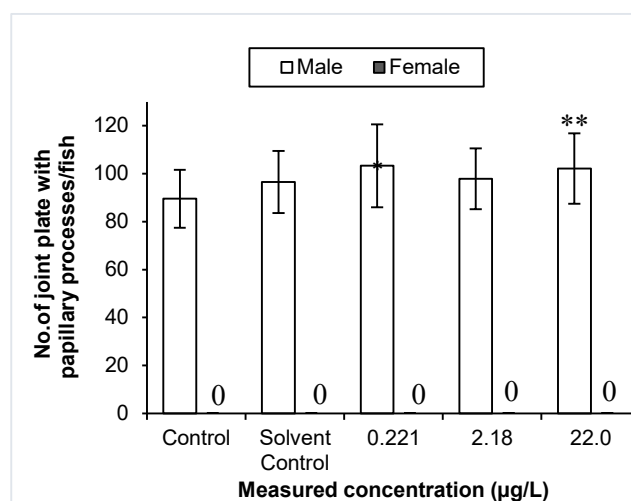


図 7 ばく露終了時の乳頭状小突起を有する節板数

**：対照群と有意差有り（p<0.01：Jonckheere-Terpstra 検定）

2.3 結果の概要および考察

OECD TG229 に準拠して、オクタメチルシクロテトラシロキサンについて第一段階生物試験である魚類短期繁殖試験を実施した。各エンドポイントについて、結果の概要を以下にまとめた。本試験の各エンドポイントの LOEC および NOEC を表 10 に示す。

0.30、3.0 および 300 $\mu\text{g/L}$ （設定濃度）のばく露濃度で試験を行ったところ、それぞれの平均測定濃度が 0.221、2.18 および 22.0 $\mu\text{g/L}$ であり、設定濃度に対して 74、73 および 73%であった。

死亡率については、オスの 2.18 $\mu\text{g/L}$ 区において、11%であった。その他の試験区で死亡は認められず、対照群に対して統計学的な有意差は認められないことから、自然発生的な死亡であると推測した。

繁殖への影響に関する指標（産卵状況）のうち、総産卵数、受精卵数は試験濃度範囲において有意差は認められず、LOEC および NOEC は最高濃度区以上と判断した。受精率は、対照群と比較して、22.0 $\mu\text{g/L}$ 区において、受精率に有意な減少が認められたが、助剤対照区と比較した場合、すべての濃度区に統計学的な有意差は認められなかった。そのため、対照群と間に認められた有意な差は、生物学的に有意なものではなく、試験濃度範囲において受精率への影響はないと判断し、LOEC および NOEC は最高濃度区以上とした。

全長については、全ての濃度区のおスと 2.18 $\mu\text{g/L}$ 区以上のメスに有意な減少が認められたため、オスの LOEC が 0.221 $\mu\text{g/L}$ 、NOEC は最低濃度区未満、メスの LOEC が 2.18 $\mu\text{g/L}$ 、NOEC は 0.221 $\mu\text{g/L}$ と判断した。湿重量については試験濃度範囲において有意差は認められず、LOEC および NOEC は最高濃度区以上と判断した。

肝臓体指数については、22.0 $\mu\text{g/L}$ 区のおスに、有意な増加が認められたため、LOEC が 22.0 $\mu\text{g/L}$ 、NOEC は 2.18 $\mu\text{g/L}$ と判断した。メスは全ての濃度区で有意差は認められなかった。生殖腺対指数については、おスメスともに全ての濃度区で有意差は認められず、それぞれの LOEC および NOEC は最高濃度区以上と判断した。

肝臓中ビテロジェニン濃度については、22.0 $\mu\text{g/L}$ 区のおスと全ての濃度区のメスに有意な増加が認められたため、オスの LOEC が 22.0 $\mu\text{g/L}$ 、NOEC は 2.18 $\mu\text{g/L}$ 、メスの LOEC が 0.221 $\mu\text{g/L}$ 、NOEC は最低濃度区未満と判断した。

二次性徴指標（乳頭状小突起を有する節板数）については、22.0 $\mu\text{g/L}$ 区のおスに対照群と比較して、有意な増加が認められたが、助剤対照区と比較した場合、すべての濃度区に統計学的な有意差は認められなかった。また、メスはいずれの濃度区においても、乳頭状小突起を有する個体は確認されなかったため、試験濃度範囲においてアンドロゲン作用はないと示唆された。以上のことから、おスにみられた有意な増加は被験物質による影響ではないと判断し、おスメスともに LOEC および NOEC は最高濃度区以上とした。

オクタメチルシクロテトラシロキサンについては、既報の動物試験において内分泌かく乱作用について言及され、生殖影響、発達影響、エストロゲン作用、抗エストロゲン作用、アンドロゲン作用、プロゲステロン作用又は抗プロゲステロン作用、下垂体細胞への影響を持つことが報告されている⁴⁾。加えて、第 1 段階試験管内試験結果⁵⁾より、エストロゲン作用 (EC_{10} 値 = $4.8 \times 10^{-5} \text{M}$ 、相対活性比 0.00032%) を持つことが想定された（抗エストロゲン作用、アン

ドロゲン作用、抗アンドロゲン作用はND)。今回の試験結果において、本試験濃度範囲（0.221～22.0 µg/L：水溶解度以下の濃度）において、オスの肝臓中ビテロジェニン濃度の高値が認められたため、エストロゲン作用を持つことが示唆され、第1段階試験管内試験の結果と一致した。

以上の結果から、本試験ではオクタメチルシクロテトラシロキサンは21日間のばく露期間において成熟メダカに対するエストロゲン作用は示唆され、全長の有意な減少が認められたものの、死亡や行動異常などの毒性は認められず、繁殖性への影響も認められないため、LOECおよびNOECは最高濃度区以上と判断した。

表 10 オクタメチルシクロテトラシロキサンの試験結果まとめ

エンドポイント		LOEC (µg/L)		NOEC (µg/L)
死亡率	オス		>22.0	≥22.0
	メス		>22.0	≥22.0
総産卵数			>22.0	≥22.0
受精卵数			>22.0	≥22.0
受精率			>22.0	≥22.0
全長	オス	↓	0.221	<0.221
	メス	↓	2.18	0.221
湿重量	オス		>22.0	≥22.0
	メス		>22.0	≥22.0
肝臓体指数	オス	↑	22.0	2.18
	メス		>22.0	≥22.0
生殖腺体指数	オス		>22.0	≥22.0
	メス		>22.0	≥22.0
肝臓中ビテロジェニン濃度	オス	↑	22.0	2.18
	メス	↑	0.221	<0.221
二次性徴（乳頭状小突起を有する節板数）	オス		>22.0	≥22.0
	メス		>22.0	≥22.0

3. 化学物質の内分泌かく乱作用に関する検討会への報告

本業務について、環境省主催の検討会（下記参照）に出席し、中間報告および最終報告を行った。

令和6年度 第3回生態影響評価検討班会議

開催日時：令和6年3月5日

開催形式：WEB

4. 参考文献

- 1) OECD (2012), OECD Guideline for the Testing of Chemicals No.229, Fish Short Term Reproduction Assay
- 2) 環境省 リスクコミュニケーションのための化学物質ファクトシート
(<https://www2.env.go.jp/chemi/prtr/factsheet/factsheet/pdf/fc00601.pdf>)
- 3) OECD (2000), OECD Series on Testing and Assessment No.54: Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application
- 4) 環境省 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 より
- 5) 環境省 令和6年度第1回化学物質の内分泌かく乱作用に関する検討会 資料2-1 より

付属資料

付表 1 試験用水の水質測定結果

付表 2 ばく露期間中の水温、溶存酸素、pH、硬度、アルカリ度

付表 3 ばく露期間中の産卵数、受精卵数、受精率

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

付表 1 試験用水の水質測定結果

Results of Analysis, Device No.1

Sample: Dechlorinated tap water generated with device No. 1 in building B12 of
Mitsubishi chemical research corporation [for rearing animals]

Measurement agency: MC Evolve Technologies Corporation
1-25-14, Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305-0856, Japan

Date for sample collection: August 20, 2024

These data were obtained from report No. 24H-003167-0001.

Item	[unit]	Result	Item	[unit]	Result
Suspended Substance (SS)		N.D.	Selenium		N.D.
	[mg/L]	(< 1.0)		[mg/L]	(< 0.001)
Total Organic Carbon (TOC)		0.3	Total Residue		100
	[mg/L]			[mg/L]	
Biochemical Oxygen Demand (BOD)		< 0.5	Conductivity		11
	[mg/L]			[mS/m]	
Chemical Oxygen Demand (COD)		1.4	Hardness		41
	[mg/L]			[mg CaCO ₃ /L]	
Total Phosphorus		N.D.	Alkalinity (pH4.8)		37
	[mg/L]	(< 0.02)		[mg CaCO ₃ /L]	
pH		7.5	Sodium		6.3
	[-/(°C)]	(24)		[mg/L]	
Coliform Group		N.D.	Potassium		1.0
	[MPN/100mL]	(< 2)		[mg/L]	
Total Mercury		N.D.	Calcium		11
	[mg/L]	(< 0.00005)		[mg/L]	
Copper		N.D.	Magnesium		3.0
	[mg/L]	(< 0.005)		[mg/L]	
Cadmium		N.D.	Oil (<i>n</i> -Hexane Extracts)		N.D.
	[mg/L]	(< 0.0003)		[mg/L]	(< 0.5)
Zinc		N.D.	Oil (Oily Film / Observation)		Not
	[mg/L]	(< 0.01)		[-]	Recognized
Lead		N.D.	Phenols		N.D.
	[mg/L]	(< 0.001)		[mg/L]	(< 0.005)
Aluminum		0.04	Polychlorinated Biphenyl (PCB)		N.D.
	[mg/L]			[mg/L]	(< 0.0005)
Nickel		N.D.	Thiram		N.D.
	[mg/L]	(< 0.01)		[mg/L]	(< 0.0006)
Hexavalent Chromium		N.D.	Simazine		N.D.
	[mg/L]	(< 0.005)		[mg/L]	(< 0.0003)
Manganese		N.D.	Thiobencarb		N.D.
	[mg/L]	(< 0.01)		[mg/L]	(< 0.002)
Tin		N.D.	Isoxathion		N.D.
	[mg/L]	(< 0.03)		[mg/L]	(< 0.001)
Silver		N.D.	Diazinon		N.D.
	[mg/L]	(< 0.01)		[mg/L]	(< 0.001)
Cobalt		N.D.	Fenitrothion (MEP)		N.D.
	[mg/L]	(< 0.01)		[mg/L]	(< 0.001)
Iron		N.D.	Isoprothiolane		N.D.
	[mg/L]	(< 0.04)		[mg/L]	(< 0.001)
Total Cyanide		N.D.	Oxine-Copper		N.D.
	[mg/L]	(< 0.001)		[mg/L]	(< 0.001)
Residual Chlorine		N.D.	Chlorothalonil (TPN)		N.D.
	[mg/L]	(< 0.1)		[mg/L]	(< 0.001)
Bromic Ion		N.D.	Propyzamide		N.D.
	[mg/L]	(< 0.5)		[mg/L]	(< 0.001)
Fluorine		N.D.	EPN		N.D.
	[mg/L]	(< 0.1)		[mg/L]	(< 0.001)
Hydrogen Sulfide		N.D.	Dichlorvos (DDVP)		N.D.
	[mg/L]	(< 0.002)		[mg/L]	(< 0.001)
Ammonium Nitrogen		N.D.	Fenobucarb (BPMC)		N.D.
	[mg/L]	(< 0.2)		[mg/L]	(< 0.001)
Nitrite Nitrogen		N.D.	Iprobenfos (IBP)		N.D.
	[mg/L]	(< 0.1)		[mg/L]	(< 0.001)
Arsenic		N.D.	Chlornitrofen (CNP)		N.D.
	[mg/L]	(< 0.001)		[mg/L]	(< 0.001)
Surface-Active Agents (Anionic)		N.D.			
	[mg/L]	(< 0.02)			

付表 2 ばく露期間中の水温，溶存酸素，pH，硬度，アルカリ度

測定濃度 ($\mu\text{g/L}$)	容器 No.	水温 ($^{\circ}\text{C}$)				溶存酸素 (mg/L)				pH			
		暴露 開始時	暴露 8日後	暴露 14日後	暴露 終了時	暴露 開始時	暴露 8日後	暴露 14日後	暴露 終了時	暴露 開始時	暴露 8日後	暴露 14日後	暴露 終了時
対照区	1	25.0	25.2	25.1	25.3	8.8	7.2	7.9	7.8	7.0	7.0	7.0	7.0
	2	25.2	25.2	25.1	25.2	8.3	7.0	7.9	7.8	7.2	7.0	7.0	7.0
	3	25.0	25.2	25.1	25.3	8.4	7.1	7.8	7.8	7.1	7.0	7.0	7.1
	4	25.0	25.2	25.2	25.3	8.4	7.1	7.8	7.9	7.2	7.0	7.1	7.1
助剤対照区	1	25.6	25.2	25.4	25.3	8.2	6.7	7.0	7.6	7.1	7.1	7.0	7.1
	2	25.5	25.0	25.4	25.3	8.2	6.7	7.2	7.7	7.2	7.0	7.0	7.1
	3	25.5	25.0	25.3	25.3	8.3	6.5	7.3	7.7	7.2	7.0	7.0	7.1
	4	25.5	25.0	25.3	25.3	8.3	6.6	7.4	7.5	7.2	7.1	7.0	7.1
0.221	1	25.5	25.0	25.3	25.3	8.1	6.6	7.5	7.7	7.1	7.0	7.1	7.1
	2	25.5	25.0	25.3	25.2	8.2	6.7	7.5	7.8	7.2	7.0	7.1	7.1
	3	25.4	25.0	25.3	25.3	8.2	6.5	7.5	7.7	7.1	7.0	7.1	7.1
	4	25.5	25.0	25.2	25.3	8.3	6.8	7.3	7.7	7.1	7.1	7.1	7.1
2.18	1	25.4	25.0	25.2	25.2	8.3	6.7	8.1	7.4	7.1	7.1	7.1	7.1
	2	25.4	25.0	25.2	25.2	8.3	6.7	8.0	7.7	7.2	7.1	7.1	7.1
	3	25.4	25.0	25.2	25.2	8.3	6.9	8.1	7.6	7.2	7.1	7.1	7.1
	4	25.4	25.0	25.2	-	8.3	6.7	7.9	-	7.1	7.1	7.1	-
22.0	1	25.5	25.0	25.2	25.3	8.1	6.5	8.0	7.7	7.2	7.1	7.2	7.1
	2	25.6	25.0	25.3	25.2	8.1	6.7	7.9	7.8	7.1	7.1	7.1	7.2
	3	25.6	25.0	25.2	25.2	8.2	6.7	7.9	7.7	7.2	7.1	7.1	7.2
	4	25.6	25.1	25.2	25.2	8.3	6.7	7.9	7.6	7.2	7.1	7.2	7.1

測定濃度 ($\mu\text{g/L}$)	容器 No.	硬度 ($\text{mg CaCO}_3/\text{L}$)				アルカリ度 ($\text{mg CaCO}_3/\text{L}$)			
		暴露 開始時	暴露 7日後	暴露 14日後	暴露 終了時	暴露 開始時	暴露 7日後	暴露 14日後	暴露 終了時
対照区	1	40	56	51	56	45	50	50	45
助剤対照区	1	41	59	52	55	45	55	60	45
22.0	1	41	59	53	56	50	55	50	50

付表 3 ばく露期間中の産卵数, 受精卵数, 受精率

測定濃度 (μg/L)	容器 No.	暴露日数																				合計 (平均)	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20		21
1	産卵数	71	57	90	80	72	82	79	78	79	65	83	62	41	70	58	70	68	73	66	64	66	1474
	受精卵数	69	51	88	79	72	78	79	78	79	65	82	62	40	70	27	68	66	65	66	64	65	1413
	受精率	97	89	98	99	100	95	100	100	100	100	99	100	98	100	47	97	97	89	100	100	98	(95)
	産卵数	83	77	88	106	56	94	112	93	103	67	99	81	72	86	80	88	84	107	58	98	87	1819
	受精卵数	80	76	88	105	55	93	110	92	100	67	99	79	70	85	80	87	82	104	55	97	80	1784
	受精率	96	99	100	99	98	99	98	99	97	100	100	98	97	99	100	99	98	97	95	99	92	(98)
2	産卵数	69	61	76	78	69	89	75	81	75	73	86	68	78	75	78	76	76	75	90	76	70	1594
	受精卵数	68	61	76	76	69	87	75	79	74	73	86	67	72	75	77	76	76	75	88	76	69	1575
	受精率	99	100	100	97	100	98	100	98	99	100	100	99	92	100	99	100	100	100	98	100	99	(99)
	産卵数	61	57	71	89	57	92	65	85	78	82	77	70	67	80	66	74	63	72	80	60	68	1514
	受精卵数	61	55	71	87	57	92	64	69	77	82	76	67	66	79	62	73	62	71	79	58	67	1475
	受精率	100	96	100	98	100	100	98	81	99	100	99	96	99	99	94	99	98	99	99	97	99	(98)
3	産卵数	61	67	66	89	87	78	81	65	54	59	65	61	59	54	61	72	52	46	63	60	71	1371
	受精卵数	60	67	66	84	85	77	80	64	48	55	50	61	59	54	61	69	52	46	63	59	71	1331
	受精率	98	100	100	94	98	99	99	98	89	93	77	100	100	100	100	96	100	100	100	98	100	(97)
	産卵数	66	62	48	106	58	73	80	77	71	51	81	52	84	64	73	70	59	102	52	74	85	1488
	受精卵数	65	62	47	106	58	72	77	72	68	51	76	51	82	63	70	69	57	100	52	74	74	1446
	受精率	98	100	98	100	100	99	96	94	96	100	94	98	98	98	96	99	97	98	100	100	87	(97)
4	産卵数	69	66	67	76	59	64	77	56	82	75	73	49	75	82	72	67	70	75	66	74	76	1470
	受精卵数	69	65	64	71	51	57	65	51	77	74	70	48	73	82	69	64	69	74	64	71	69	1397
	受精率	100	98	96	93	86	89	84	91	94	99	96	98	97	100	96	96	99	99	97	96	91	(95)
	産卵数	56	58	66	71	59	63	74	76	64	65	73	35	67	62	47	73	63	58	52	50	68	1300
	受精卵数	56	58	63	69	58	56	74	76	56	64	73	35	67	62	47	72	63	58	52	50	64	1273
	受精率	100	100	95	97	98	89	100	100	88	98	100	100	100	100	100	99	100	100	100	100	94	(98)

付表3 ばく露期間中の産卵数、受精卵数、受精率（続き）

測定濃度 (μg/L)	容器 No.	暴露日数																				合計 (平均)		
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20		21	
0.221	1	産卵数	72	80	86	88	72	80	94	88	82	109	95	68	102	77	78	101	83	94	80	94	74	1797
		受精卵数	72	78	83	84	72	78	92	88	78	100	95	65	100	75	77	100	81	92	80	83	71	1744
		受精率	100	98	97	95	100	98	98	100	95	92	100	96	98	97	99	99	98	98	100	88	96	(97)
	2	産卵数	64	73	64	72	65	69	86	68	76	102	95	64	77	77	89	74	90	76	75	85	78	1619
		受精卵数	63	68	62	71	64	68	86	66	73	99	89	62	77	76	88	67	90	60	74	83	75	1561
		受精率	98	93	97	99	98	99	100	97	96	97	94	97	100	99	99	91	100	79	99	98	96	(96)
	3	産卵数	58	62	75	77	73	73	80	59	79	73	81	76	82	75	88	80	78	78	80	84	74	1585
		受精卵数	46	49	73	77	71	72	79	57	75	73	63	70	81	73	58	79	75	73	77	84	69	1474
		受精率	79	79	97	100	97	99	99	97	95	100	78	92	99	97	66	99	96	94	96	100	93	(93)
	2.18	4	産卵数	70	63	72	82	70	68	85	75	65	94	78	67	73	89	74	69	76	91	58	91	78
受精卵数			69	62	66	82	70	64	51	75	47	94	73	65	73	73	67	63	72	75	53	89	77	1460
受精率			99	98	92	100	100	94	60	100	72	100	94	97	100	82	91	91	95	82	91	98	99	(92)
1		産卵数	72	87	64	95	71	86	75	89	70	96	87	57	87	80	66	92	80	81	83	84	93	1695
		受精卵数	72	87	64	95	70	85	75	89	70	90	81	52	87	76	66	89	77	80	80	75	92	1652
		受精率	100	100	100	100	99	99	100	100	100	94	93	91	100	95	100	97	96	99	96	89	99	(97)
2		産卵数	71	69	83	78	90	75	89	80	65	92	87	70	60	69	80	83	72	96	65	97	84	1655
		受精卵数	70	67	80	77	88	74	86	55	63	92	85	70	60	67	80	83	71	95	65	97	84	1609
		受精率	99	97	96	99	98	99	97	69	97	100	98	100	100	97	100	100	99	99	100	100	100	(97)
3		産卵数	53	63	69	57	38	72	79	64	61	70	58	54	78	44	70	56	60	63	54	68	71	1302
	受精卵数	53	51	65	54	36	69	79	62	60	68	44	37	78	42	69	56	52	50	50	60	67	1202	
	受精率	100	81	94	95	95	96	100	97	98	97	76	69	100	95	99	100	87	79	93	88	94	(92)	
	産卵数	60	62	67	67	68	66	75	80	53	66	91	63	67	81	78	63	70	0	0	0	0	1177	
4	受精卵数	60	62	66	66	66	65	72	70	52	64	86	62	67	79	77	38	68	0	0	0	0	1120	
	受精率	100	100	99	99	97	98	96	88	98	97	95	98	100	98	99	60	97	-	-	-	-	(95)	

2.18 μg/L 区の容器 No.4 について、試験液の供給が停止したことによる酸欠が原因で、供試魚すべてが死亡した。そのため、2.18 μg/L 区については、容器 No.4 の結果を除外した3容器で結果を算出した。

付表3 ばく露期間中の産卵数、受精卵数、受精率（続き）

測定濃度 (μg/L)	容器 No.	暴露日数																				合計 (平均)	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20		21
1	産卵数	59	68	77	73	73	77	67	67	61	70	44	53	54	45	47	56	49	59	55	65	56	1275
	受精卵数	59	68	77	68	67	77	66	67	57	57	38	53	52	43	46	50	46	59	55	48	52	1205
	受精率	100	100	100	93	92	100	99	100	93	81	86	100	96	96	98	89	94	100	100	74	93	(94)
	産卵数	62	80	66	98	73	76	77	100	75	79	98	88	73	75	83	75	81	79	73	71	98	1680
2	受精卵数	60	74	66	91	72	73	77	97	71	69	95	86	72	75	83	73	73	76	71	71	93	1618
	受精率	97	93	100	93	99	96	100	97	95	87	97	98	99	100	100	97	90	96	97	100	95	(96)
	産卵数	69	67	61	70	64	70	75	63	61	78	71	35	66	57	61	52	73	59	64	69	56	1341
	受精卵数	68	65	58	69	56	58	71	58	60	78	69	35	61	56	61	52	73	59	63	66	56	1292
3	受精率	99	97	95	99	88	83	95	92	98	100	97	100	92	98	100	100	100	100	98	96	100	(97)
	産卵数	68	47	61	80	66	86	77	66	63	93	64	69	59	58	61	55	64	75	55	71	42	1380
	受精卵数	67	47	59	80	64	82	75	62	63	91	61	69	52	57	59	53	61	70	53	66	41	1332
	受精率	99	100	97	100	97	95	97	94	100	98	95	100	88	98	97	96	95	93	96	93	98	(97)

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

測定濃度 ($\mu\text{g/L}$)	容器 No.	個体 No.	性別別	全長 (mm)	湿重量 (g)	HSI (%)	GSI (%)	乳頭状 小突起数	ビテロジェニン 濃度 (ng/mg liver)
対照区	1	1	メス	30.57	0.2894	9.02	18.24	0	617
		2	メス	31.42	0.4183	3.61	9.28	0	1167
		3	メス	31.36	0.4236	5.26	8.43	0	3332
		4	オス	32.09	0.3132	2.84	0.77	102	1.33
		5	オス	35.18	0.4637	2.07	0.67	80	< L.O.Q
		6	オス	31.94	0.4141	2.78	0.82	77	< L.O.Q
	2	7	メス	31.68	0.4065	3.91	8.68	0	705
		8	メス	32.23	0.4586	3.79	8.46	0	805
		9	メス	32.84	0.5043	4.92	9.56	0	799
		10	オス	32.37	0.3355	1.97	0.95	117	0.50
		11	オス	32.36	0.3794	1.21	0.58	86	2.63
		12	オス	33.47	0.3736	1.90	0.78	79	< L.O.Q
	3	13	メス	32.92	0.3928	6.11	8.63	0	666
		14	メス	31.91	0.3638	5.53	6.57	0	691
		15	メス	31.47	0.4193	3.22	6.08	0	761
		16	オス	30.56	0.3508	3.65	0.51	80	0.51
		17	オス	33.95	0.4078	2.06	0.93	97	1.19
		18	オス	34.20	0.4424	3.35	0.72	97	< L.O.Q
	4	19	メス	30.84	0.2932	5.90	7.71	0	746
		20	メス	32.00	0.4471	6.15	9.48	0	838
		21	メス	32.73	0.4734	6.34	8.75	0	926
		22	オス	29.88	0.3097	2.13	0.81	94	< L.O.Q
		23	オス	32.89	0.4132	2.06	1.06	86	< L.O.Q
		24	オス	32.45	0.3968	2.77	0.68	80	< L.O.Q
助剤 対照区	1	25	メス	31.86	0.3509	4.90	7.55	0	1009
		26	メス	31.46	0.3750	7.41	11.49	0	635
		27	メス	34.68	0.5127	5.89	7.90	0	1062
		28	オス	31.55	0.3341	1.02	0.96	91	< L.O.Q
		29	オス	33.44	0.3573	2.83	1.40	93	< L.O.Q
		30	オス	33.00	0.4043	2.25	0.59	101	< L.O.Q
	2	31	メス	31.73	0.3811	5.17	7.29	0	1016
		32	メス	32.26	0.4312	6.10	7.54	0	1022
		33	メス	32.79	0.4592	4.90	8.30	0	812
		34	オス	32.04	0.3231	2.07	0.84	93	< L.O.Q
		35	オス	33.56	0.4173	2.59	0.48	115	< L.O.Q
		36	オス	32.16	0.3649	1.97	0.90	63	< L.O.Q
	3	37	メス	29.86	0.3540	6.07	7.43	0	765
		38	メス	32.23	0.4802	6.48	9.89	0	839
		39	メス	30.86	0.3791	6.28	8.26	0	888
		40	オス	33.69	0.3953	1.72	0.58	101	< L.O.Q
		41	オス	32.04	0.3866	1.73	0.98	94	< L.O.Q
		42	オス	33.62	0.3886	1.72	0.69	97	< L.O.Q
	4	43	メス	31.93	0.4203	5.85	8.66	0	1802
		44	メス	31.30	0.4043	5.52	6.68	0	855
		45	メス	34.82	0.4539	6.17	8.00	0	591
		46	オス	33.70	0.3431	1.66	0.67	112	< L.O.Q
		47	オス	35.19	0.4786	1.76	0.59	103	0.79
		48	オス	35.26	0.4676	2.78	0.66	96	< L.O.Q

< L.O.Q. : 定量下限 (0.4 ng/mg liver) 未満。平均値, 標準偏差の算出および統計処理には定量下限の半値 (0.2 ng/mg liver) を用いた。

付表 4

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

測定濃度 ($\mu\text{g/L}$)	容器 No.	個体 No.	性判別	全長 (mm)	湿重量 (g)	HSI (%)	GSI (%)	乳頭状 小突起数	ビテロジェニン 濃度 (ng/mg liver)
0.221	1	49	メス	31.29	0.4626	5.99	10.57	0	767
		50	メス	32.49	0.4204	5.59	8.56	0	1289
		51	メス	31.10	0.4465	7.26	7.91	0	1303
		52	オス	33.27	0.4397	2.30	1.02	93	0.43
		53	オス	31.94	0.3699	1.95	1.30	134	< L.O.Q
		54	オス	31.05	0.3917	1.89	0.85	84	< L.O.Q
	2	55	メス	31.16	0.3525	5.16	8.20	0	1341
		56	メス	33.14	0.4665	7.80	7.48	0	1502
		57	メス	30.66	0.3882	6.88	9.69	0	1498
		58	オス	32.35	0.3831	2.06	0.68	92	< L.O.Q
		59	オス	31.23	0.3511	2.19	1.11	109	< L.O.Q
		60	オス	30.77	0.3311	2.23	0.72	98	< L.O.Q
	3	61	メス	32.19	0.4906	7.11	10.25	0	1382
		62	メス	31.67	0.4262	6.73	9.55	0	1437
		63	メス	30.00	0.3697	4.76	9.03	0	1129
		64	オス	30.40	0.3765	2.18	0.66	93	< L.O.Q
		65	オス	33.19	0.4200	2.14	0.31	140	< L.O.Q
		66	オス	33.17	0.3996	1.78	0.48	109	< L.O.Q
	4	67	メス	32.40	0.4416	4.39	8.29	0	1203
		68	メス	32.73	0.4426	5.11	8.90	0	1173
		69	メス	31.71	0.3856	6.66	8.45	0	1609
		70	オス	31.68	0.4343	2.46	0.78	93	< L.O.Q
		71	オス	32.53	0.3827	2.72	0.52	100	< L.O.Q
		72	オス	32.03	0.3464	1.62	0.87	95	0.62
2.18	1	73	メス	30.88	0.4157	6.54	8.06	0	1168
		74	メス	29.99	0.3556	7.56	7.71	0	1386
		75	メス	30.93	0.4473	6.77	9.95	0	1188
		76	オス	31.97	0.3967	2.07	0.71	112	0.61
		77	オス	31.91	0.3577	1.59	0.70	108	< L.O.Q
		78	オス	32.01	0.3500	1.97	0.63	88	< L.O.Q
	2	79	メス	31.81	0.4321	5.58	7.94	0	1282
		80	メス	31.72	0.3835	6.00	7.95	0	1731
		81	メス	29.63	0.3954	7.13	9.03	0	1411
		82	オス	34.44	0.4868	2.63	0.88	109	0.81
		83	オス	31.80	0.3997	1.68	0.78	78	< L.O.Q
		84	オス	--	--	--	--	--	--
	3	85	メス	30.73	0.3573	6.16	8.59	0	1642
		86	メス	32.86	0.4509	6.28	11.29	0	1757
		87	メス	31.49	0.3652	6.19	8.82	0	1451
		88	オス	34.89	0.4231	2.62	0.71	99	< L.O.Q
		89	オス	30.32	0.2802	1.93	0.82	85	< L.O.Q
		90	オス	33.75	0.3981	2.36	1.21	104	1.82
	4	91	メス	--	--	--	--	--	--
		92	メス	--	--	--	--	--	--
		93	メス	--	--	--	--	--	--
		94	オス	--	--	--	--	--	--
		95	オス	--	--	--	--	--	--
		96	オス	--	--	--	--	--	--

<L.O.Q. : 定量下限 (0.4 ng/mg liver) 未満。平均値, 標準偏差の算出および統計処理には定量下限の半値 (0.2 ng/mg liver) を用いた。

付表 4

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

測定濃度 ($\mu\text{g/L}$)	容器 No.	個体 No.	性判別	全長 (mm)	湿重量 (g)	HSI (%)	GSI (%)	乳頭状 小突起数	ビテロジェニン 濃度 (ng/mg liver)
22.0	1	49	メス	30.47	0.3571	5.99	7.50	0	1452
		50	メス	30.71	0.4005	7.59	7.94	0	1488
		51	メス	31.61	0.4302	6.14	9.11	0	1739
		52	オス	31.51	0.3539	2.20	0.59	113	1782
		53	オス	32.49	0.3539	2.43	1.07	92	324
		54	オス	31.53	0.3577	3.49	0.70	89	1484
	2	55	メス	31.28	0.3996	9.28	9.26	0	1881
		56	メス	30.23	0.4038	5.57	8.96	0	1659
		57	メス	30.90	0.4055	5.01	8.66	0	1353
		58	オス	30.90	0.3558	3.09	0.82	91	632
		59	オス	31.65	0.3531	2.58	0.62	136	1094
		60	オス	30.91	0.3456	2.89	0.55	109	794
	3	61	メス	31.88	0.4099	3.20	9.20	0	1751
		62	メス	28.64	0.3518	5.60	10.69	0	1426
		63	メス	31.20	0.4344	6.12	6.84	0	1182
		64	オス	30.72	0.4159	2.00	0.48	77	69
		65	オス	34.43	0.4822	2.78	0.81	104	1936
		66	オス	31.73	0.3541	2.80	0.68	105	859
	4	67	メス	29.98	0.4025	5.12	8.75	0	2321
		68	メス	31.38	0.4015	6.08	9.24	0	1482
		69	メス	30.25	0.4109	6.25	8.08	0	1174
		70	オス	30.92	0.3818	3.64	0.63	103	869
		71	オス	33.67	0.4747	3.03	0.88	105	117
		72	オス	32.27	0.3767	2.63	0.50	102	2070