

環境省請負業務

令和6年度分報告書

令和5年度及び令和6年度化学物質の内分泌かく乱作用に関する
第二段階生物試験（4-t-ブチルフェノール）実施業務

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5年度及び令和6年度化学物質の内分泌かく乱作用に関する第二段階生物試験（4-t-ブチルフェノール）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

4-t-ブチルフェノール

目 次

	頁
1 実施内容.....	1
2 4-t-ブチルフェノールのメダカ拡張一世代繁殖試験の実施.....	2
2.1 材料および方法.....	2
2.1.1 被験物質.....	2
2.1.2 試験生物.....	3
2.1.3 試験環境および条件など	3
2.1.4 ばく露および観察・測定の方法	7
2.1.5 結果の算出.....	12
2.1.6 試験有効性基準.....	13
2.2 結果.....	14
2.2.1 環境条件.....	14
2.2.2 試験液中の被験物質濃度	14
2.2.3 F0 世代の結果.....	15
2.2.4 F1 世代胚～仔魚期の結果.....	21
2.2.5 F1 世代亜成体の結果.....	22
2.2.6 F1 世代成熟個体の結果.....	27
2.2.7 F2 世代の結果.....	33
2.3 結果の概要.....	34
2.4 考察.....	37
2.5 参考文献.....	40
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.....	41
付属資料-1.....	42

1. 実施内容

本業務は、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及び第一段階生物試験の結果を踏まえて優先順位が高いと考えられる物質（4-t-ブチルフェノール）について、第二段階生物試験である MEOGRT を令和 5 年度から 6 年度にかけて実施した。また、MEOGRT による 4-t-ブチルフェノールの内分泌かく乱に関わるエンドポイントへの作用・影響の有無及びそれらによる NOEC（最大無影響濃度）または LOEC（最小影響濃度）等を決定した。

MEOGRT は、平成 27 年に OECD テストガイドラインとして認定されたメダカ拡張一世代繁殖試験（Medaka Extended One Generation Reproduction Test: OECD TG240）¹⁾の略称であり、内分泌かく乱化学物質の確定試験として、EXTEND2022 の中での第二段階生物試験として位置づけられている。

実施内容の詳細を以下に示す。

(1) 4-t-ブチルフェノールのメダカ拡張一世代繁殖試験の実施

4-t-ブチルフェノールの MEOGRT（OECD TG240 に準拠）を実施し、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中間報告および最終報告するため、環境省担当官の指示に従い資料を作成の上、電子メール等で環境省担当官に提出した。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）4 式を作成した。

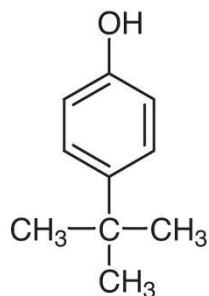
2. 4-t-ブチルフェノールのメダカ拡張一世代繁殖試験の実施

2.1 材料および方法

2.1.1 被験物質

被験物質の名称、物理化学的性状等を以下に示す。

名称： 4-t-ブチルフェノール（英名：4-*tert*-Butylphenol）



分子式： $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{O}$

分子量： 150.22

CAS 番号： 98-54-4

供給者： 東京化成工業株式会社

Lot 番号： QXA8I

純度： 99.9% (GC)

外観： 白色結晶

対水溶解度：580 mg/L (25°C)²⁾、500 mg/L (25°C、当施設測定値)

オクタノール／水分配係数：3.31²⁾

密度：0.908 g/cm³ (80°C)²⁾

蒸気圧：0.0381 mmHg (25°C)²⁾

2.1.2 試験生物

(1) 供試生物種

メダカ (*Oryzias latipes*) を使用した。

国立環境研究所 (NIES 系統) より入手し、当施設で自家繁殖させているメダカを用いた。

(2) 飼育環境および条件

試験用水および飼育水については、当施設の脱塩素水道水製造装置で製造（横浜市水道水を脱塩素処理）された「脱塩素水道水」を使用した。水質測定結果を付属資料-1 に示す。メダカの飼育はすべて試験室とは隔離された飼育室において、以下の条件で行った。

- ・飼 育 水 槽： ガラス製水槽
- ・飼 育 水： 脱塩素水道水
- ・飼 育 方 法： 流水式
- ・水 温： $25\pm 1^{\circ}\text{C}$
- ・p H： 6.5～8.5
- ・光 周 期： 明期 16 時間・暗期 8 時間（室内光、1000 lux 以下）
- ・エアレーション： なし
- ・飼 料： ブラインシュリンプ（ベトナム産）の孵化後 24 時間以内の幼生を、1～3 回／日飽食量を給餌

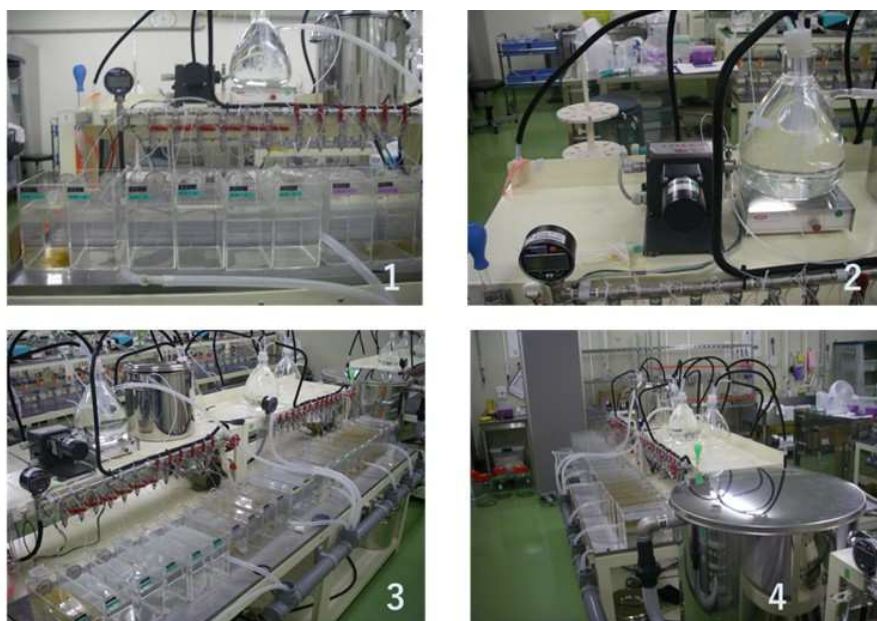
2.1.3 試験環境および条件など

(1) 試験室

試験はすべて、株式会社三菱ケミカルリサーチ 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）で行った。

(2) 試験装置

流水式試験装置を使用した。試験原液と試験用水を一定流量で連続的に混合し、試験液供給ポンプにて試験液を各試験容器に供給した。流水式試験装置の写真を図 1 に示す。



1：流水式装置（濃度区）、2：混合槽、3：流水式装置（全体）、4：温調槽

図 1 流水式装置

(3) 試験条件

魚類短期繁殖試験³⁾ (OECD TG229、測定濃度 102、313、1000 µg/L) の結果、産卵、ビテロジェニンの LOEC はともに 1000 µg/L であった。この結果に基づき、試験濃度を 10.0、32.0、100、320、1000 µg/L に設定した。

ばく露は、前述の OECD TG240 に準じて、以下の条件で行った。

- ・飼育水槽：オールガラス水槽（蓋：透明アクリル板）
- ・希釈水：脱塩素水道水
- ・ばく露方式：流水式（換水率 5 回/日以上 16 回/日以下）
- ・ばく露期間：F0 世代から F2 世代の孵化までの計 19 週
(2024 年 7 月 10 日～2024 年 11 月 21 日)
 - ・ F0 世代 : 4 週間
 - ・ F1 世代 : 15 週間
 - ・ F2 世代 : 対照区の孵化日の中央値の 2 倍（約 2 週間）
- ・試験液量：
 - ・ F0 世代 : 2 L/連
 - ・ F1 世代（受精後 0～6 週目） : 2 L/連
 - ・ F1 世代（受精後 7～10 週目） : 5 L/連
 - ・ F1 世代（受精後 10～15 週目） : 5 L/連
 - ・ F2 世代（受精後 0～2 週目） : 2 L/連
- ・試験区数：被験物質濃度区 5 濃度（10.0、32.0、100、320、1000 µg/L）、
対照区
- ・連数：
 - ・ F0 世代 : 12 連（対照区）、6 連（濃度区）
 - ・ F1 世代（受精後 1～10 週目） : 12 連（対照区）、6 連（濃度区）
 - ・ F1 世代（受精後 10～15 週目） : 24 連（対照区）、12 連（濃度区）
 - ・ F2 世代（受精後 1～2 週目） : 12 連（対照区）、6 連（濃度区）
- ・供試生物数：
 - ・ F0 世代 : 2 個体（オス 1 個体・メス 1 個体）/連
 - ・ F1 世代（受精後 1 週目） : 20 個体/連
 - ・ F1 世代（受精後 2～10 週目） : 12 個体/連
 - ・ F1 世代（受精後 10～15 週目） : 2 個体（オス 1 個体・メス 1 個体）/連
 - ・ F2 世代（受精後 1～3 週目） : 20 個体/連
- ・供試生物齢：
 - ・ F0 世代 : 12-16 週齢（本試験では 16 週齢（受精後 118 日））
オス 250 mg 以上、メス 300 mg 以上
- ・継代時期：
 - ・ F0 世代 : 試験開始 4 週目のできるだけ早い日（+1 日）
（本試験では試験開始 21 日目、F0 : 19 週齢目）
 - ・ F1 世代 : 試験開始 18 週目のできるだけ早い日（+1 日）（F1 : 15 週齢目）
（本試験では試験開始 120 日目）
- ・水温 : 25±1℃
- ・pH : 6.5～8.5（ばく露期間中の変動は±0.5 以内）
- ・溶存酸素飽和度 : 60%以上
- ・光周期 : 明期 16 時間・暗期 8 時間
- ・エアレーション : なし

- ・飼料：ブラインシュリンプ（ベトナム産）の孵化後 24 時間以内の幼生を 1 日 3 回給餌した。当施設のメダカの飽食量を考慮し、成長段階に応じ表 1 に示す量を給餌した。成魚については、給餌量は事前の予備検討およびじゅん化時の産卵数を考慮し決定した。

表 1 ブラインシュリンプ (*Artemia spp. nauplii*) の給餌量

孵化後週齢 (wph)	孵化後日齢 (dph)	本試験 (mg dry weight/fish/day)
Week1	Day 1-2	0.5
	Day 3-7	1.0
Week2	Day 8-9	2.0
	Day 10-11	3.0
	Day 12-13	4.0
	Day 14	5.0
Week3	Day 15	5.0
	Day 16-21	6.0
Week 4	Day 22-28	8.0-11.0
Week 5	Day 29-35	11.5-14.5
Week 6	Day 36-42	15.0-21.0
Week 7	Day 43-49	22.0-28.0
Week 8	Day 50-56	29.0-35.0
Week 9	Day 57-60	36.0-39.0
	Day 61-63	40.0
Week 10	Day 64-70	40.0
Week 11~	Day 71~	40.0

(4) 環境測定機器

水温、pH、溶存酸素濃度の測定は、それぞれ以下の機器を用いて行った。

- ・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

(5) 試験液の調製

被験物質 2320 mg を超純水 5.8 L に添加し、スターラーで 48 時間攪拌（室温）し、原液 400 mg/L を調製した。原液を超純水で希釈し、濃度区ごとの試験原液 1.5、4.8、15、48、150 mg/L を調製した。試験原液を流水式ばく露装置にセットし、試験用水を用いて連続的に希釈し各水槽に供給した。

(6) 被験物質の濃度測定

生物試験に使用した試験水は試験区毎に、高速液体クロマトグラフ（HPLC）を用いて定量した。

【HPLC 測定条件】

装置

高速液体クロマトグラフ Agilent 1100 型、 Agilent Technologies 製

ワークステーション： ChemStation

デガッサ： G1322A 型

送液ポンプ： G1311A 型

オートサンプラ： G1313A 型

カラムオーブン： G1316A 型

ダイオードアレイ検出器（DAD）： G1315B 型

条件

カラム： InertSustainSwift C18 5 μ m 4.6 $\times$ 150mm ジーエルサイエンス製

カラムオーブン： 40 $^{\circ}$ C

溶離液： A：超純水*、C：HPLC 用アセトニトリル

A 25%、C 75%

ストップタイム： 4.5 min

流速： 1 mL/min

測定波長： 275 nm

試料注入量： 500 μ L

*: JIS K0557 A4 グレードの水

【標準溶液の調製】

被験物質 50 mg を秤量し、HPLC 用アセトニトリルで溶解し 50 mL に定容とし、1000 mg/L の溶液を調製した。この溶液を HPLC 用アセトニトリルで順次希釈し、5.00、10.0、50.0、100、500、1000 μ g/L の標準溶液を調製した。また、HPLC 用アセトニトリルを 0 μ g/L の標準溶液とした。

【検量線の作成】

標準溶液を以下のように分析し、検量線を作成した。

標準溶液を 0.75mL 採取

 | ←超純水 0.75mL 添加

HPLC 測定

【試験水の分析】

試験液を以下のように分析した。

試験液を 0.75mL 採取

 | ←HPLC 用アセトニトリル 0.75mL 添加

HPLC 測定

2.1.4 ばく露および観察・測定の方法

MEOGRT (OECD TG240) のタイムラインを図 2、試験期間中における連数の変化とプールおよび分配の手順を図 3 に示した。

MEOGRT Exposure and Endpoint Timeline																				
F0	1	2	3	4																
F1				1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15		
F2																	1	2		
Test Week	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	
Lifestage Key					Embryo				Larvae				Juvenile				Subadult		Adult	
Endpoints																				
Fecundity	F ₀														F ₁					
Fertility	F ₀														F ₁					
Hatch					F ₁													F ₂		
Survival						F ₁					F ₁						F ₁			
Growth				F ₀								F ₁					F ₁			
Vitellogenin												F ₁								
Secondary sex												F ₁						F ₁		
Histopathology																		F ₁		
Test Week	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	

- **Experimental design** has 7 groups of replicates
 - 5 for test chemical treatments
 - 2 for control treatments (4 if solvent is used)
- **Within-group design**
 - 12 replicates for reproduction, adult pathology and SSC (Wks 10 through to 18)
 - 6 replicates for hatch, survival, Vtg; and - subadult SSC and growth (Wks 1 through to 9)

SSC: secondary sex characters; Wks: weeks; Vtg: vitellogenin

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

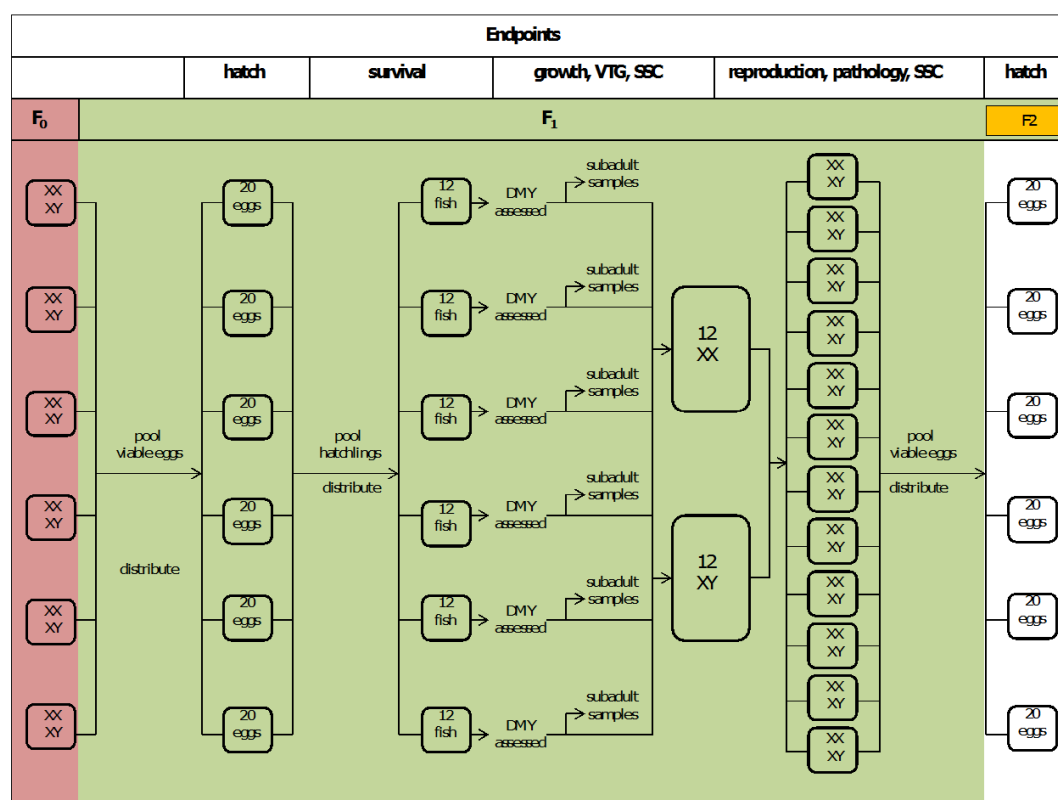


図 3 MEOGRT における連のプールと分配の手順

注) 連数は濃度区の場合で、対照区はこの 2 倍数用いる。「egg」は受精卵を意味する。

(1) F0 世代

[ばく露方法]

生後 10 週齢のメダカを雌雄選別し、1 水槽あたりにメス 1 個体・オス 1 個体を投入して 40 日間のじゅん化を行った (168 個体)。その際、外観に異常が認められた個体や極端に成長差がある個体は除去した。

じゅん化終了後、被験物質の濃度が適正值であることを確認してから、供試メダカを各水槽 (12 水槽+6 水槽×5 濃度区=計 42 水槽) に投入して試験開始した。投入前にじゅん化魚からオスメス 6 尾ずつ採取して湿重量を測定、オスは 250mg 以上、メスは 300mg 以上であることを確認した。メダカ水温、pH、溶存酸素濃度を試験区毎に毎日測定した。

ばく露水槽への藻類付着を防ぐため、週に 1~2 回程度水槽の掃除を実施した。なお、ばく露および器具洗浄に用いた廃水は、排水処理装置に通水し、試験排水中の被験物質を吸着処理させた上で処理した。

[ばく露期間中の観察・計測]

ばく露期間中は水槽内の産出卵を毎日採取し、メス 1 個体あたりの産卵数、受精卵数、受精率を計測した。また、死亡個体の有無および行動・外見の異常を、毎日目視によって観察した。死亡個体は、発見後速やかに取り除き外見上の雌雄を確認した。行動・外見の異常は、下記について対照区と比較した。

1) 行動観察項目

摂餌活動の低下、横転、平衡喪失、表層集中、活動度低下、過運動など

2) 外観観察項目

体幹湾曲、眼球突出、腹部膨満、体色異常、出血、粘液の異常、立鱗など

[F1 試験用受精卵の採取]

ばく露 4 週目の第 1、2 日、すなわち試験開始 22、23 日目 (以下、Test Day 22、23) に各ペアの産出した受精卵をすべて、試験溶液の入ったガラスシャーレにプールし、対照区は 12 連、濃度区は 6 連分、20 粒ずつ選択し、水槽に設置した孵化器に投入した。

[ばく露終了後の測定]

4 週間のばく露期間終了後 (本試験では Test Day 24、136 日齢)、生存した全個体を氷麻酔処理した上で解剖し、下記項目について測定した。

1) 全長および湿重量の測定

全長は電子ノギス (株式会社ミットヨ製) を用いて、湿重量は電子天秤 (メトラー・トレド製 AG204 型、メトラー・トレド製 MS205TS 型、エー・アンド・デイ製 GX-124A 型) を用いて測定した。

2) 二次性徴指標の計測

メダカの臀鰭を切断し、1%人工海水溶液 (スペクトラム ブランズ ジャパン製 テトラマリンソルトを使用して調製) で固定し、臀鰭軟条上に認められる乳頭状小突起を実体顕微鏡 (ニコン製 SMZ-U 型) の下で観察し、突起を有する節板数を計測し、対照区と比較した。

3) 肝臓の測定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によって秤量した。計測した肝臓重量を基に肝臓体指数（肝臓重量/湿重量）を算出した。

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

測定は以下のように行った。

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

ホモジナイザー：エムエス機器製、RECELLYS Evolution

遠心分離機：Himac 製、微量高速遠心機 CF18R

- ③ 分離した上清をチューブに回収し、測定まで-80℃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、

4) 生殖腺の観察・測定

解剖後、胴体から生殖腺を摘出し、雌雄について観察した。電子天秤（メトラー・トレド製 AG204 型、MS205TS 型、エー・アンド・デイ製 GX-124A）によって秤量した。

(2) F1 世代

[ばく露方法]

F0 世代より採取した受精卵は、水槽内に設置した孵化用シリンダーに投入し F0 世代と同一条件でばく露を継続した。孵化用シリンダーは、底面をステンレスメッシュ（No. 32）で覆った円筒状のガラス管（内径 5 cm、高さ 10 cm）であり、孵化後の仔魚は、ピペットを用いてシリンダー外に移動し、ばく露を継続した。孵化用シリンダーは、魚卵振とう機を用いて受精後 5 日目（受精日を 0 日目とする）までメモリ値 800（4 rpm、上下の幅 35 mm）で緩やかに振とうし、その後は孵化まで静止させた。

水質の測定、水槽の掃除、廃水の処理などは、F0 世代と同一である。

[ばく露期間中の観察]

ばく露期間中は孵化や死亡個体の有無および行動・外見の異常を TG240 では目視で観察するとあるが、目視による確認が困難であったため、受精 3 日後以降、毎日孵化器から取り出して実体顕微鏡下で観察した。卵の生死は心拍の有無によって判別した。各日に孵化した仔魚はガラス円筒を用いて水槽内で区別して維持した。孵化率は対照区の孵化日の中央値の 2 倍の時点で算出し、それ以降は未孵化で死亡とみなした。

各試験区において多くの孵化がみられた 3 日間（本試験では受精後 7 日～9 日目）分の各連の仔魚を再度プールし、12 個体ずつ対照区は 12 連、濃度区は 6 連ずつ再分配した。

受精後 21 日目（Test Day 43）に仔魚の生死を確認した。行動・外見の異常は、F0 世代と同様の基準で対照区と比較した。

[受精後 9 週目の遺伝的性判別およびペアリング]

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

- ① Test Day 78 に各個体を、尾部の一部を鋭利な剃刀で切断し、試料とした。プロテイナーゼ K を添加し、56℃で一昼夜インキュベートすることで DNA を抽出した後、キットを用いて精製したものを PCR に供した。
- ② PCR は Takara Ex Taq®（タカラバイオ株式会社製）を用い、プライマーとして PG17.5（CCG GGT GCC CAA GTG CTC CCG CTG）、PG17.6（GAT CGT CCC TCC ACA GAG AAG AGA）を使用した。PCR は、94℃・5 分の条件で 1 サイクル、その後、94℃・30 秒、55℃・30 秒、72℃・1 分の条件を 30 サイクル繰り返して行った。
- ③ キャピラリー電気泳動装置を用いて増幅産物を泳動し、得られたバンド（メスは 1 本、オスは 2 本現れる）を確認することで遺伝的な性別を判別した。

判別結果を基に、遺伝的なメスとオスを各連から 2 個体ずつ選別し、対照区は 24 ペア、濃度区は 12 ペアのペアリングを行った。これらを 1 ペア毎に水槽に投入し、繁殖用個体のばく露を継続した。

DNA 抽出キット： QIAamp DNA Micro Kit キアゲン製

PCR 装置： T100 サーマルサイクラー Bio-Rad 製 T100TM 型

GeneAmp PCR PE Applied Biosystem 製 9700 型

キャピラリー電気泳動装置：電気泳動装置 キアゲン製 QIAxcel Advanced System

[亜成体（10 週齢）のばく露終了後の測定]

繁殖用に用いなかった 10 週齢の亜成体（Sub-adult）については、Test Day 86 および Test Day 87（63 日齢または 64 日齢）に氷麻酔処理した上で解剖し、下記項目について測定した。各計測・測定方法は、F0 世代と同一である。

- 1) 全長および湿重量の測定
- 2) 二次性徴指標の計測
- 3) 肝臓の測定および肝臓中ビテロジェニン濃度の測定
- 4) 生殖腺の観察

[産出卵の計測]

各ペアについて、受精後 11～13 週の 21 日間（Test Day 99-119）、水槽内の産出卵を毎日採取し、1 ペアあたりの総産卵数、受精卵数、受精率を計測した。

[F2 試験用受精卵の採取]

受精後 14 週目の第 1 日 (Test Day 120) に各ペアの産出した受精卵をすべて、試験溶液の入ったガラスシャーレにプールし、対照区は 12 連、濃度区は 6 連分、20 粒ずつ選択し、水槽に設置した孵化用シリンダーに投入した。孵化用シリンダーは、魚卵振とう機を用いて受精後 5 日目 (受精日を 0 日目とする) までメモリ値 800 で緩やかに振とうし、その後は孵化まで静止させた。

[ばく露終了後の測定]

14 週間のばく露期間終了後、生存した全個体を Test Day 121 (98 日齢) に氷麻酔処理した上で解剖し、下記項目について測定した。その他の観察についても、各計測・測定方法は、F1 世代亜成体 (10 週齢) と同様に実施した。

- 1) 全長および湿重量の測定
- 2) 二次性徴指標の計測
- 3) 肝臓の測定および肝臓中ビテロジェニン濃度の測定
- 4) 生殖腺の観察

(3) F2 世代

[ばく露方法]

F1 世代より採取した受精卵は、水槽内に設置した孵化用シリンダーに投入し F1 世代と同一条件でばく露を継続した。孵化用シリンダーは、F1 世代に用いたものと同一である。孵化後の仔魚は、ピペットを用いてシリンダー外に移動し、ばく露を継続した。

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

[ばく露期間中の観察]

ばく露期間中は孵化や死亡個体の有無および行動・外見の異常を TG240 では目視で観察するとあるが、目視による確認が困難であったため、受精 3 日後以降、毎日孵化器から取り出して実態顕微鏡下で観察した。卵の生死は心拍の有無によって判別した。孵化率は対照区の孵化日の中央値の 2 倍の時点で算出し、それ以降は未孵化で死亡とみなした。

2.1.5 結果の算出

(1) 各エンドポイントの算出

繁殖データは各ペアの日平均総産卵数および受精卵数を算出し、各試験区の平均値を求めた。途中でメスまたはオスが死亡した場合、観察期間（21 日間）の半分以上の記録があれば、それまでの日平均を計算に含めた。受精率は、21 日間の累積受精卵数／累積産卵数で算出した（週平均を求める場合は 7 日間毎算出した）。

その他のエンドポイントは、胚仔魚期データを除き、遺伝的な性別ごとにとりまとめ、平均値±標準偏差で示した（ただし F0 世代は遺伝的性別判定をしていないため、表現型の性別に基づいた）。F1 世代の受精後 3 週間目の孵化日数、孵化率、および受精後 4、9、10 週目の生存率は、性別の区別なしに連ごとに算出し、そこから各試験区の平均値を求めた。F0、F1 世代の成熟個体の生存率は、試験区ごとにまとめて各性別に対して算出した。

F0、F1 世代の成熟個体および F1 世代の垂成体について計測した肝臓湿重量および生殖腺湿重量をもとに、肝臓体指数（肝臓湿重量／湿重量）および生殖腺体指数（生殖腺湿重量／湿重量）を算出した。F1 世代垂成体の各エンドポイントは、各個体のデータから連平均値を算出し、そこから各試験区の平均値を求めた。F0、F1 世代の成熟個体の各エンドポイントは、各個体のデータから各試験区の平均値を求めた。

(2) 数値の取り扱い

分析値などの数値の処理は、JIS Z 8401:1999 参考 1 規則 B に従った。有効数字は測定精度を考慮して、孵化率・孵化後生存率・生存率は 2 桁（ただし 1 の位までとする）、肝臓体指数および生殖腺体指数は、1 未満は 1 桁、1 以上は 2 桁、それ以外のエンドポイントは 3 桁（ただしビテロジェニン濃度は、1 未満は小数点以下 2 桁まで、二次性徴は 1 の位までとした）とし、標準偏差の桁数は平均値の位に合わせた。

(3) 統計処理

NOEC および LOEC 算出のための統計手法は OECD TG240 の Annex 10 および USEPA の Flynn K ら⁴⁾の改訂版フローチャートに基づき、各エンドポイントに対し表 2 に示す変数変換と統計手法を適用した。解析には US EPA が MEOGRT および幼若両生類発達・成長試験（LAGDA）用に開発した統計解析ソフトウェア StatCharrms v. 0.90.95 および R-4.0.5 (win 64 bit) を用いた⁵⁾。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 1-2 各エンドポイントの変数変換と統計手法

エンドポイント	変数変換	統計手法
総産卵数・受精卵数	平方根変換	1) 単調性の検定 →(単調性あり) Jonckheere-Terpstra 検定 →(単調性なし) 一元配置分散分析・正規性・等分散性の検定 →(等分散性あり) Dunnett 検定 →(等分散性なし) Dunn 検定 2) 反復測定分散分析→Dunnett 検定*
受精率	アークサイン変換	単調性の検定 →(単調性あり) Jonckheere-Terpstra 検定 →(単調性なし) 一元配置分散分析・正規性・等分散性の検定 →(等分散性あり) Dunnett 検定 →(等分散性なし) Dunn 検定
生存率 (F0・F1 成熟個体)	アークサイン変換	Cochran-Armitage 検定
孵化率・生存率	アークサイン変換	単調性の検定 →(単調性あり) Jonckheere-Terpstra 検定 →(単調性なし) 亜成体の場合: Mixed effect ANOVA →(正規性・等分散性あり) Dunnett 検定 →(正規性・等分散性なし) Dunn 検定 成熟個体の場合: 一元配置分散分析・正規性・等分散性の検定 →(正規性・等分散性あり) Dunnett 検定 →(正規性・等分散性なし) Dunn 検定
全長・湿重量	なし	
肝臓体指数・生殖腺体指数	なし	
ビテロジェニン	対数変換	
二次性徴	平方根変換	
孵化日数	なし	Mixed Effects Cox Models

*: 経日変化グラフより Time effect が見られる場合に実施するが、本試験では対照区と明らかに時間変動の異なる濃度区は観察されなかったため、Time effect はないとして実施しなかった。

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。

- ・ 溶存酸素が試験期間を通じて飽和酸素濃度の 60%以上であること。
- ・ 試験期間を通じた平均水温が 24℃から 26℃の間であること。各水槽の水温の平均値からのずれは 2℃未満であること。
- ・ 各世代 (F0 および F1) の対照区における各ペアの日平均総産卵数の平均が 20 以上であること。計測期間中のすべての卵の受精率が 80%以上であること。推奨される 24 ペア中 16 ペア (>65%) において各ペア日平均総産卵数が 20 以上であること。
- ・ 各世代 (F1 および F2) の対照区における孵化率が 80%以上であること
- ・ F1 の対照区において、受精後 3 週目までの孵化後の生存率が平均 80%以上、および受精後 3 週目から F1 終了時(受精後 15 週目)までの生存率が平均 90%以上であること。
- ・ 試験期間中において被験物質濃度が測定平均値の±20%以内に十分維持されていることを示す証拠が得られていること。

2.2 結果

2.2.1 環境条件

表 3 に水温、pH、溶存酸素の試験期間中の平均値と標準偏差を示す。試験液の平均水温は 25.0～25.3℃であり、各水槽の水温の平均値からの変動は 2℃未満であり、いずれも試験の有効性条件を満たした。pH の平均値は 7.4～7.6 であり、最小値は 7.0、最大値は 8.1 であった。ばく露期間中の変動は±0.5 以内であった。溶存酸素はすべての試験区において飽和酸素濃度の 60%以上であり、試験の有効性条件を満たした。

表 3 試験期間中の平均水温、pH、溶存酸素

設定濃度 ($\mu\text{g/L}$)	水温($^{\circ}\text{C}$)			pH			溶存酸素(mg/L)[飽和度(%)]		
Control	25.1	±	0.3	7.4	±	0.3	7.6 [94]	±	0.5
0.010	25.1	±	0.3	7.5	±	0.2	7.6 [94]	±	0.5
0.032	25.0	±	0.3	7.5	±	0.2	7.5 [93]	±	0.5
0.10	25.0	±	0.2	7.5	±	0.2	7.6 [94]	±	0.5
0.32	25.3	±	0.3	7.6	±	0.2	7.6 [94]	±	0.5
1.0	25.2	±	0.3	7.6	±	0.2	7.5 [93]	±	0.5

2.2.2 試験液中の被験物質濃度

試験期間中、試験液の被験物質濃度を合計 20 回/濃度区測定し（F1 世代の産卵数が不十分で F2 世代の試験を実施できなかった設定濃度 1000 $\mu\text{g/L}$ は 18 回測定）、結果を図 4 および表 4 に示す。各濃度区の期間平均値は設定濃度の 91.0～112%、変動係数は 3～5%であった。試験期間中において、被験物質濃度は測定平均値の±20%以内に維持されており、試験の有効性条件を満たした。よって、以降は測定濃度で結果を記述する。

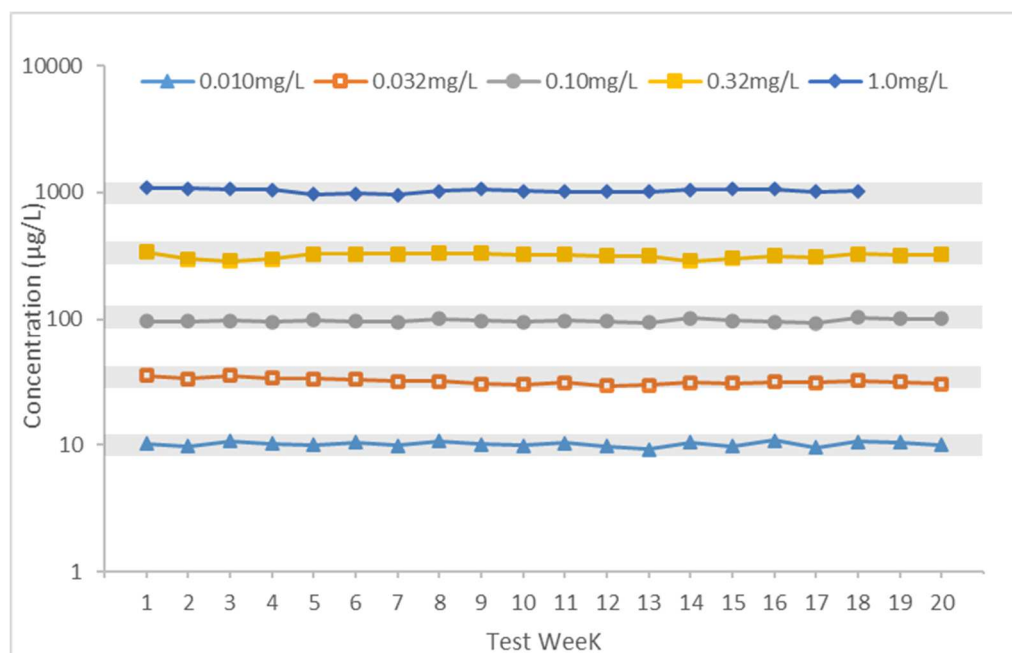


図 4 試験期間中の測定濃度の推移

注) 灰色部分は平均値±20%の範囲を示す。

表 4 試験液中の被験物質濃度

設定濃度 ($\mu\text{g/L}$)	分析回数	平均測定濃度 ($\mu\text{g/L}$)	設定濃度比 (%)	変動係数 (%)
Control	20	N.D.	-	-
10	20	10.2	102	4
32	20	31.8	99.0	5
100	20	97.4	97.0	3
320	20	316	99.0	5
1000	18	1030	103	3

注)「N.D.」は定量下限 (0.005 $\mu\text{g/L}$) 未満であることを示す。

2.2.3 F0 世代の結果

1) 死亡および行動・外観の異常 (F0)

F0 世代試験期間中の死亡個体数を表 5 に示す。

14 日目に対照区、17 日目に 316 $\mu\text{g/L}$ 濃度区でメス 1 尾が死亡したが、対照区と比較し有意差は認められなかった。いずれも偶発的な死亡と考えた。その他の魚に死亡や行動・外観の異常は認められなかった。

表 5 F0 世代の試験期間中の死亡個体

測定濃度 ($\mu\text{g/L}$)	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 (%)	
Control	12	0	0	12	1	8	4
10.2	6	0	0	6	0	0	0
31.8	6	0	0	6	0	0	0
97.4	6	0	0	6	0	0	0
316	6	0	0	6	1	17	8
1030	6	0	0	6	0	0	0

2) 総産卵数・受精卵数・受精率 (F0)

F0 世代試験開始後 21 日間 (Test day1-21) および各週の各試験区における 1 ペア 1 日あたりの総産卵数・受精卵数・受精率を表 6 に、21 日間平均を図 5 に、21 日間の連平均の日変動および累積受精卵数/ペアを図 6 に示す。

21 日間の総産卵数、受精卵数および受精率は、いずれも全ての濃度区で対照区と比較し有意差は認められなかったが、総産卵数は 1030 $\mu\text{g/L}$ 濃度区で、受精卵数および受精率は 316 $\mu\text{g/L}$ 濃度区以上で減少が見られた。

対照区の総産卵数の平均値は 20 個/ペア/日以上であり、12 ペア中 9 ペア (75%) の総産卵数は 20 個/ペア/日以上、21 日間で算出された計 5381 個 の卵の受精率は 96.0%であり、試験の有効性条件を満たした。

表 6 F0 世代の総産卵数・受精卵数・受精率

測定濃度 ($\mu\text{g/L}$)	総産卵数 (eggs/pair/day)							
	21 日間		1 週目(DAY1-7)		2 週目(DAY8-14)		3 週目(DAY15-21)	
Control	21.4	$\pm$ 4.8	21.9	$\pm$ 5.0	21.6	$\pm$ 4.7	22.5	$\pm$ 3.5
10.2	21.2	$\pm$ 2.9	21.0	$\pm$ 3.6	20.5	$\pm$ 2.9	21.9	$\pm$ 3.0
31.8	22.5	$\pm$ 5.3	23.2	$\pm$ 3.2	21.9	$\pm$ 6.8	22.5	$\pm$ 7.4
97.4	22.5	$\pm$ 7.0	22.8	$\pm$ 3.4	22.4	$\pm$ 9.8	22.2	$\pm$ 8.1
316	21.9	$\pm$ 5.3	21.9	$\pm$ 5.3	22.8	$\pm$ 5.2	24.3	$\pm$ 3.7
1030	16.3	$\pm$ 6.0	19.5	$\pm$ 3.6	15.2	$\pm$ 6.6	14.0	$\pm$ 9.9

測定濃度 ($\mu\text{g/L}$)	受精卵数 (eggs/day/female)							
	21 日間		1 週目(DAY1-7)		2 週目(DAY8-14)		3 週目(DAY15-21)	
Control	20.5	$\pm$ 4.6	20.6	$\pm$ 4.1	20.5	$\pm$ 4.3	22.2	$\pm$ 3.5
10.2	20.4	$\pm$ 3.1	20.3	$\pm$ 4.2	19.5	$\pm$ 3.2	21.3	$\pm$ 3.3
31.8	21.9	$\pm$ 5.2	22.9	$\pm$ 3.1	20.7	$\pm$ 6.8	22.2	$\pm$ 7.4
97.4	21.7	$\pm$ 6.8	22.5	$\pm$ 3.3	21.3	$\pm$ 9.7	21.2	$\pm$ 7.7
316	17.3	$\pm$ 4.1	16.4	$\pm$ 4.9	17.8	$\pm$ 3.1	20.2	$\pm$ 3.4
1030	15.3	$\pm$ 6.4	18.5	$\pm$ 3.6	14.5	$\pm$ 7.1 *	12.9	$\pm$ 10.0 *

測定濃度 ($\mu\text{g/L}$)	受精率 (%)							
	21 日間		1 週目(DAY1-7)		2 週目(DAY8-14)		3 週目(DAY15-21)	
Control	96.1	$\pm$ 3.9	95.2	$\pm$ 6.6	95.4	$\pm$ 4.0	98.8	$\pm$ 1.3
10.2	96.2	$\pm$ 2.9	96.0	$\pm$ 5.0	94.9	$\pm$ 8.4	97.6	$\pm$ 2.4
31.8	97.6	$\pm$ 2.9	98.8	$\pm$ 1.0	94.9	$\pm$ 9.1	98.8	$\pm$ 1.1
97.4	96.8	$\pm$ 2.5	98.7	$\pm$ 1.0	95.9	$\pm$ 6.0	95.6	$\pm$ 3.2 *
316	80.9	$\pm$ 14.0	75.9	$\pm$ 17.4	82.4	$\pm$ 14.7	84.1	$\pm$ 13.7 **
1030	90.6	$\pm$ 12.4	93.2	$\pm$ 6.7	89.6	$\pm$ 17.4	84.1	$\pm$ 29.2 *

注) 値は平均値 $\pm$ 標準偏差 (対照区は n=12、濃度区は n=6) を示す。*および**は対照区と比較し統計学的な有意差があることを示す ($p<0.05$ および $p<0.01$ 、Jonckheere-Terpstra 検定)。

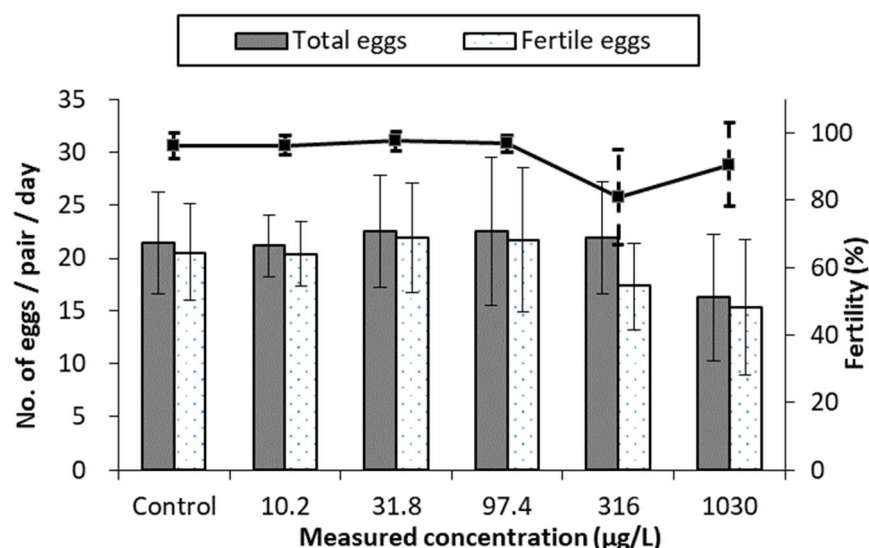
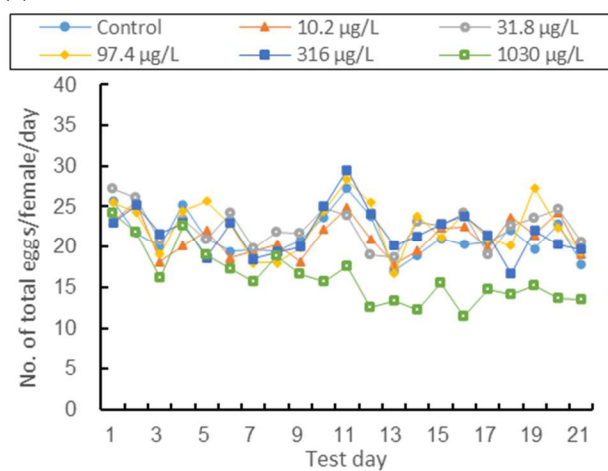


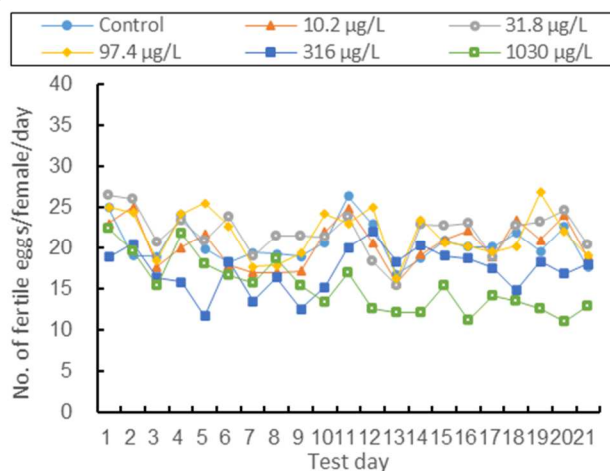
図 5 F0 世代の総産卵数・受精卵数・受精率 (各ペア・1 日当たり)

注) 値は平均値 $\pm$ 標準偏差 (対照区は n=12、濃度区は n=6) を示す。

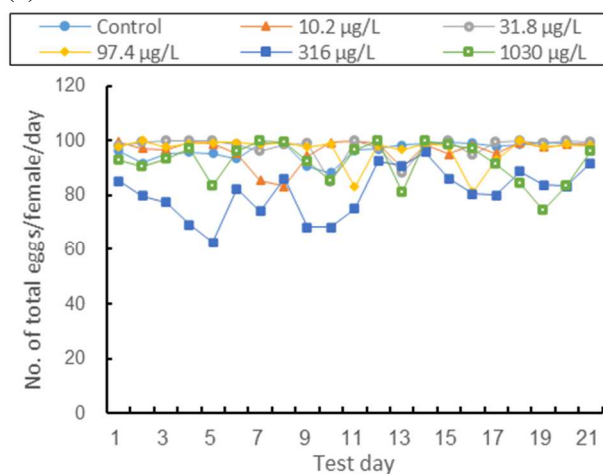
(a) 総産卵数



(b) 受精卵数



(c) 受精率



(d) 累積受精卵数

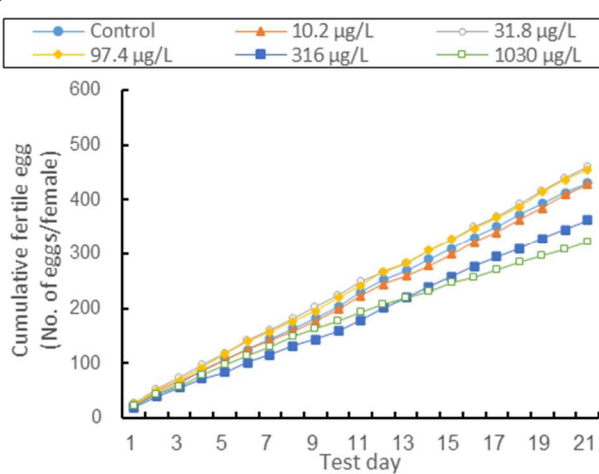


図 6 F0 世代の(a)総産卵数、(b)受精卵数、(c)受精率の日変動および(d)累積受精卵数
(値は各試験区の連平均値)

3) 全長・湿重量 (F0)

F0 世代の全長および湿重量の測定結果を表 7 および図 7(a)(b)に示す。

全長については、オスメスともにいずれの濃度区でも対照区と比較し有意差は認められなかった。

湿重量についても、オスメスともにいずれの濃度区でも対照区と比較し有意差は認められなかった。

表 7 F0 世代の全長および湿重量

測定濃度 ($\mu\text{g/L}$)	全長 (mm)						湿重量 (mg)					
	オス			メス			オス			メス		
Control	30.3	±	1.5	30.6	±	0.9	305	±	44	373	±	41
10.2	30.6	±	2.2	29.3	±	1.0	322	±	47	333	±	50
31.8	30.7	±	1.3	30.0	±	1.6	311	±	48	346	±	59
97.4	30.7	±	1.4	30.4	±	1.3	304	±	46	355	±	54
316	28.8	±	2.0	30.6	±	1.7	285	±	64	378	±	60
1030	30.1	±	1.6	29.0	±	1.5	319	±	49	329	±	68

注) 値は平均値±標準偏差 (対照区は n=12、濃度区は n=6) を示す。

4) 肝臓体指数および生殖腺体指数 (F0)

F0 世代の肝臓体指数および生殖腺体指数の測定結果を表 8 および図 7(c)(d)に示す。

肝臓体指数については、オスは 1030 $\mu\text{g/L}$ 濃度区で対照区と比較し有意差が認められた。メスはいずれの濃度区でも有意差は認められなかった。

生殖腺体指数についても、オスは 1030 $\mu\text{g/L}$ 濃度区で対照区と比較し有意差が認められた。メスはいずれの濃度区でも有意差は認められなかった。

表 8 F0 世代の肝臓体指数および生殖腺体指数

測定濃 ($\mu\text{g/L}$)	肝臓体指数 (%)						生殖腺体指数 (%)							
	オス			メス			オス			メス				
Control	2.5	±	0.7	5.3	±	1.2	1.2	±	0.4	9.0	±	1.3		
10.2	2.4	±	1.3	5.8	±	1.1	1.0	±	0.2	11.0	±	2.9		
31.8	2.4	±	0.6	7.3	±	2.8	1.2	±	0.4	9.9	±	2.2		
97.4	2.3	±	0.5	4.9	±	1.4	1.0	±	0.3	9.7	±	3.1		
316	3.3	±	0.6	6.1	±	0.7	1.2	±	0.5	11.0	±	2.1		
1030	4.2	±	0.5	**	5.5	±	1.0	0.7	±	0.2	*	9.2	±	4.4

注) 値は平均値±標準偏差 (対照区は n=12、濃度区は n=6) を示す。*および**は対照区と比較し統計学的な有意差があることを示す ($p<0.05$ および $p<0.01$ 、Jonckheere-Terpstra 検定)。

5) 肝臓中ビテロジェニン濃度 (F0)

ELISA による F0 世代の肝臓中ビテロジェニン濃度の測定結果を表 9 および図 7(e)に示す。オスは 1030 µg/L 濃度区で対照区と比較し有意差が認められた。メスはいずれの濃度区でも有意差が認められたが、濃度依存性は認められなかった。

表 9 F0 世代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		
Control	1.21	±	3.4	627	±	99
10.2	< L.O.Q.			864	±	172 ** a
31.8	< L.O.Q.			790	±	301 ** a
97.4	7.6	±	16.4	775	±	227 * a
316	0.5	±	0.6	910	±	100 ** a
1030	65.9	±	143.1 **	856	±	333 **a

注) 値は平均値±標準偏差 (対照区は n=12、濃度区は n=6) を示す。「<L.O.Q.」は定量下限 (0.4 ng/mg) 未満であることを示す。*および**は対照区と比較し統計学的な有意差があることを示す ($p<0.05$ および $p<0.01$ 、Jonckheere-Terpstra 検定)。a: 有意差が認められたが濃度依存性なし。

6) 二次性徴指標 (F0)

二次性徴の指標として、F0 世代における乳頭状小突起を有する節板数の計測結果を表 10 および図 7(f)に示す。オスはいずれの濃度区でも対照区と比較し有意差が認められなかった。メスは全濃度区で乳頭状小突起を有する個体は確認されなかった。

表 10 F0 世代の乳頭状小突起を有する節板数 (オス 1 個体あたり)

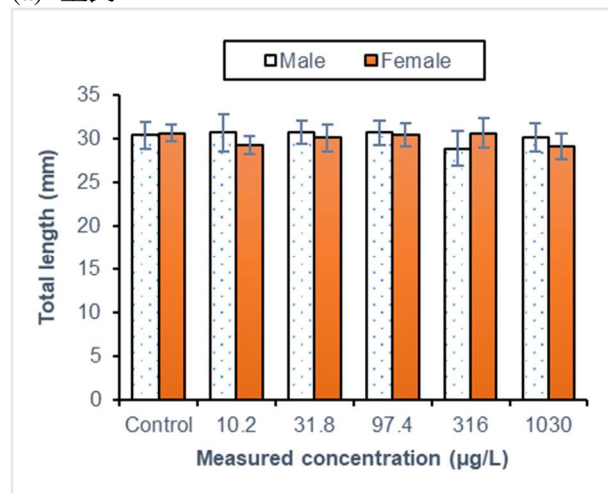
測定濃度 (µg/L)	乳頭状小突起を有する節板数 (Plates/fish)					
	オス			メス		
Control	67	±	11	0	±	0
10.2	73	±	12	0	±	0
31.8	66	±	15	0	±	0
97.4	67	±	6	0	±	0
316	69	±	10	0	±	0
1030	60	±	10	0	±	0

注) 値は平均値±標準偏差 (対照区は n=12、濃度区は n=6) を示す。

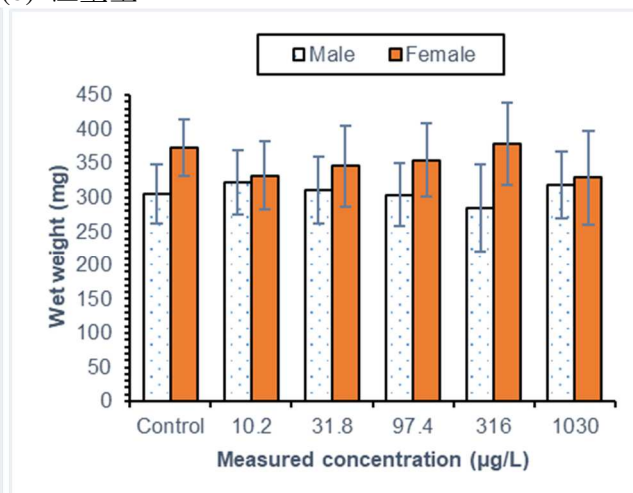
7) 表現型性別と生殖腺形態 (F0)

F0 世代における表現型の性別・生殖腺形態は明確かつ一致していた。

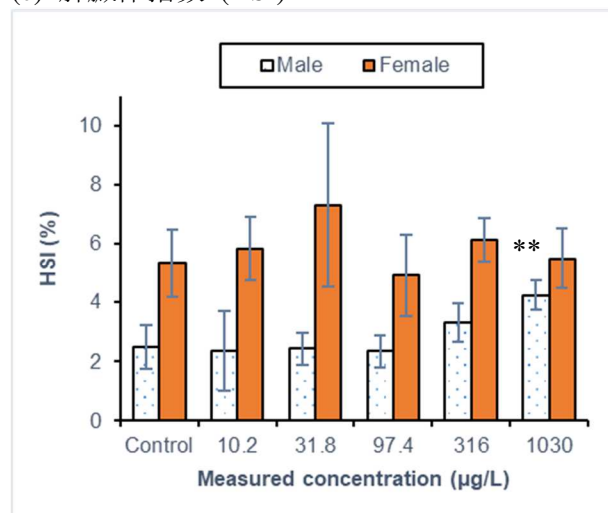
(a) 全長



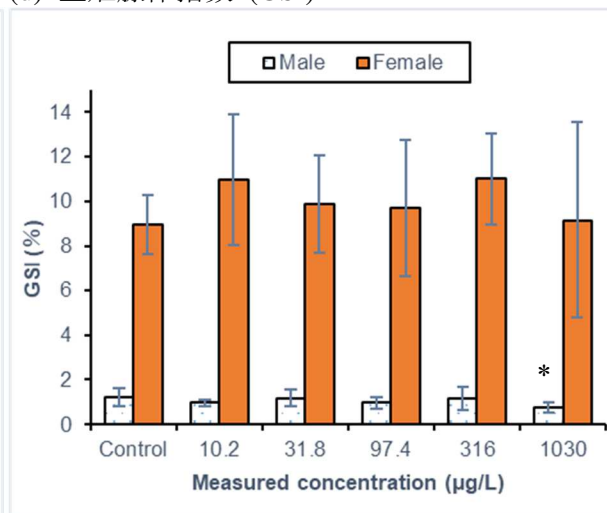
(b) 湿重量



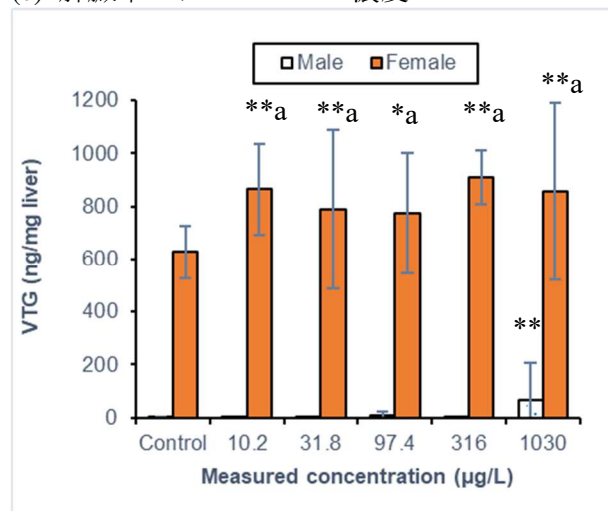
(c) 肝臓体指数 (HSI)



(d) 生殖腺体指数 (GSI)



(e) 肝臓中ビテロジェニン濃度



(f) 乳頭状小突起を有する節板数

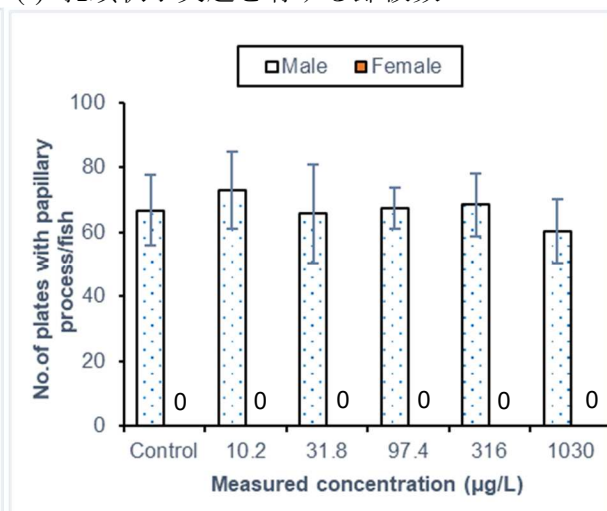


図7 F0世代の(a)全長、(b)湿重量、(c)肝臓体指数、(d)生殖腺体指数、
(e)肝臓中ビテロジェニン濃度、(f)乳頭状小突起を有する節板数

注) 値は平均値±標準偏差 (対照区は n=12、濃度区は n=6) を示す。*および**は対照区と比較し統計学的に有意差があることを示す ($p<0.05$ および $p<0.01$, Jonckheere-Terpstra 検定)。a: 有意差が認められたが濃度依存性なし。

2.2.4 F1 世代胚～仔魚期の結果

1) 孵化日数・孵化率 (F1 胚～仔魚期)

F1 世代胚・仔魚期の受精後 14 日目の孵化日数および孵化率を表 11 に、受精後 7 日目～13 日目における孵化個体数を図 8 に示す。対照区における孵化日の中央値が受精後 7 日目 (240 個体中 127 個体が孵化) であったことから (図 8)、その 2 倍である 14 日目において孵化日数および孵化率の計算を実施した。

孵化日数については、316 および 1030 $\mu\text{g/L}$ 濃度区で対照区と比較し有意差が認められたが、濃度相関性は無く、数値に大きな差も見られなかったため、自然発生的なバラツキの範囲であると思われる。

孵化率については、いずれの濃度区でも対照区と比較し有意差は認められなかった。

対照区の孵化率は 80%以上であり、試験の有効性条件を満たした。

表 11 F1 世代胚・仔魚期の孵化日数・孵化率

測定濃度 ($\mu\text{g/L}$)	孵化日数 (day)			孵化率 (%)		
	受精後 14 日目			受精後 14 日目		
Control	7.5	$\pm$	0.3	96	$\pm$	4
10.2	7.4	$\pm$	0.1	99	$\pm$	2
31.8	7.4	$\pm$	0.1	97	$\pm$	4
97.4	7.6	$\pm$	0.2	98	$\pm$	4
316	7.4	$\pm$	0.2	**	100	$\pm$ 0
1030	7.4	$\pm$	0.1	*	98	$\pm$ 3

注) 値は平均値 $\pm$ 標準偏差 (対照区は $n=12$ 、濃度区は $n=6$) を示す。*および**は対照区と比較し統計学的な有意差があることを示す ($p<0.05$ および $p<0.01$ 、孵化日数は Mixed Effects Cox Models)。

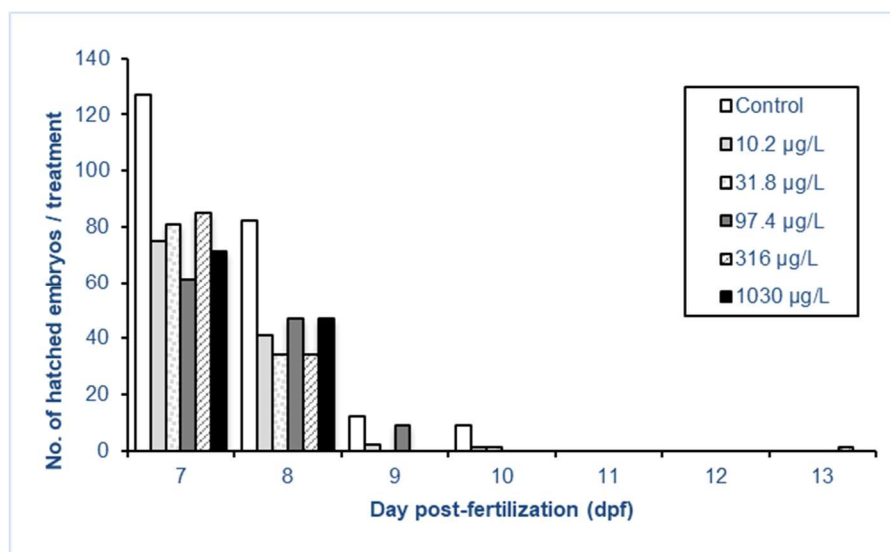


図 8 F1 の受精後 7～13 日目における孵化個体数
(対照区は $n=12$ 、濃度区は $n=6$ 。各試験区の合計)

2.2.5 F1 世代亜成体の結果

1) 生存率 (F1 亜成体)

F1 世代の受精後 4 週目 (21 日目) および 8 週目 (55 日目) における生存率を表 12 に示す。

生存率については、1030 $\mu\text{g/L}$ 濃度区で対照区と比較し有意差が認められた。

対照区の受精後 21 日目までの孵化後の生存率は 80%以上であり、試験の有効性条件を満たした。

表 12 F1 世代亜成体 (受精後 4、8 週目) の生存率

測定濃度 ($\mu\text{g/L}$)	生存率 (%)			生存率 (%)		
	受精後 4 週目			受精後 8 週目		
Control	97	$\pm$	4	96	$\pm$	4
10.2	100	$\pm$	0	100	$\pm$	0
31.8	99	$\pm$	3	99	$\pm$	3
97.4	100	$\pm$	0	100	$\pm$	0
316	93	$\pm$	6	93	$\pm$	6
1030	83	$\pm$	8	** 83	$\pm$	8 *

注) 値は平均値 $\pm$ 標準偏差 (対照区は n=12、濃度区は n=6) を示す。*および**は対照区と比較し統計学的な有意差があることを示す ($p<0.05$ および $p<0.01$ 、Jonckheere-Terpstra 検定)。

2) 全長・湿重量 (F1 亜成体)

10 週齢 (63・64 日齢) の亜成体の全長および湿重量の測定結果を表 13 および図 9(a)(b) に示す。なお、解剖時に、31.8 および 1030 $\mu\text{g/L}$ 濃度区でオスが生存しなかった水槽が 1 および 2 水槽あったため、オスの濃度区の n 数は変則的になった。

全長については、オスはいずれの濃度区でも対照区と比較し有意差は認められなかった。メスは 1030 $\mu\text{g/L}$ 濃度区で有意差が認められた。

湿重量については、オスは 10.2~316 $\mu\text{g/L}$ 濃度区で対照区と比較し有意差が認められたが、濃度依存性は見られなかった。メスはいずれの濃度区でも有意差は認められなかった。

表 13 F1 世代亜成体の全長・湿重量

測定濃度 ($\mu\text{g/L}$)	全長 (mm)				湿重量 (mg)			
	オス		メス		オス		メス	
Control	25.9	$\pm$ 1.1	27.3	$\pm$ 1.0	209	$\pm$ 28	301	$\pm$ 45
10.2	28.5	$\pm$ 1.0	29.7	$\pm$ 1.6	287	$\pm$ 35	**a 388	$\pm$ 54
31.8	27.8	$\pm$ 2.0	30.1	$\pm$ 1.6	279	$\pm$ 50	**a 415	$\pm$ 79
97.4	27.9	$\pm$ 1.2	28.9	$\pm$ 1.0	285	$\pm$ 41	**a 384	$\pm$ 58
316	25.2	$\pm$ 2.1	26.7	$\pm$ 1.3	265	$\pm$ 74	*a 341	$\pm$ 48
1030	23.8	$\pm$ 1.4	23.1	$\pm$ 1.8 *	223	$\pm$ 42	228	$\pm$ 47

注) 値は連平均値を元に算出した平均値 $\pm$ 標準偏差 (対照区はオスメスともに n=12、濃度区オスは n=6,5,6,6,4、メスは n=6) を示す。*および**は対照区と比較し統計学的な有意差があることを示す ($p<0.05$ および $p<0.01$ 、メスの全長は Jonckheere-Terpstra 検定、オスの湿重量は単調性が認められず、正規性および等分散性が認められたため Dunnett 検定)。a: 有意差が認められたが濃度依存性なし。

3) 肝臓体指数および生殖腺体指数 (F1 亜成体)

F1 世代亜成体の肝臓体指数および生殖腺体指数の測定結果を表 14 および図 9(c)(d)に示す。対照区で 1 個体、10.2 µg/L 濃度区で 2 個体、316 µg/L および 1030 µg/L 濃度区で 1 個体の生殖腺が見当たらなかったため、平均値の算出から除外した。

肝臓体指数については、オスは 316 および 1030 µg/L 濃度区、メスは 1030 µg/L 濃度区で対照区と比較し有意差が認められた。

生殖腺体指数については、オスは 1030 µg/L 濃度区で対照区と比較し有意差が認められたが、メスはいずれの濃度区でも有意差は認められなかった。

表 14 F1 世代亜成体の肝臓体指数・生殖腺体指数

測定濃 (μg/L)	肝臓体指数 (%)						生殖腺体指数 (%)								
	オス			メス			オス			メス					
Control	3.8	±	1.1	7.3	±	1.5	0.95	±	0.3	8.3	±	2.7			
10.2	4.1	±	1.2	7.0	±	1.6	1.0	±	0.3	9.7	±	3.2			
31.8	3.4	±	0.9	6.3	±	1.2	1.0	±	0.3	10.3	±	4.0			
97.4	3.8	±	0.6	6.6	±	1.1	0.99	±	0.2	9.2	±	2.5			
316	5.2	±	1.1	*	7.4	±	0.9	3.0	±	3.9	8.3	±	3.1		
1030	6.0	±	1.0	**	5.8	±	1.0	*	4.5	±	4.5	*	6.0	±	3.2

注) 値は連平均値をもとに算出した平均値±標準偏差 (対照区はオスメスともに n=12、濃度区オスは n=6,5,6,6,4、メスは n=6) を示す。*および**は対照区と比較し統計学的な有意差があることを示す ($p<0.05$ および $p<0.01$ 、Jonckheere-Terpstra 検定)。性なし。

4) 肝臓中ビテロジェニン濃度 (F1 亜成体)

ELISA による F1 世代亜成体の肝臓中ビテロジェニン濃度の測定結果を表 15 および図 9(e)に示す。オスは 316 および 1030 µg/L 濃度区で対照区と比較し有意差が認められたが、メスはいずれの濃度区でも有意差は認められなかった。

表 15 F1 世代亜成体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	
Control	< L.O.Q.		935	± 407
10.2	< L.O.Q.		1450	± 473
31.8	< L.O.Q.		676	± 372
97.4	< L.O.Q.		1300	± 485
316	235	± 383	**	942 ± 305
1030	389	± 552	**	826 ± 411

注) 値は連平均値を元に算出した平均値±標準偏差 (対照区はオスメスともに n=12、濃度区オスは n=6,5,6,6,4、メスは n=6) を示す。「< L.O.Q.」は定量下限 (0.4 ng/mg) 未満であることを示す。**は対照区と比較し統計学的な有意差があることを示す ($p<0.01$ 、Jonckheere-Terpstra 検定)。

5) 二次性徴指標 (F1 亜成体)

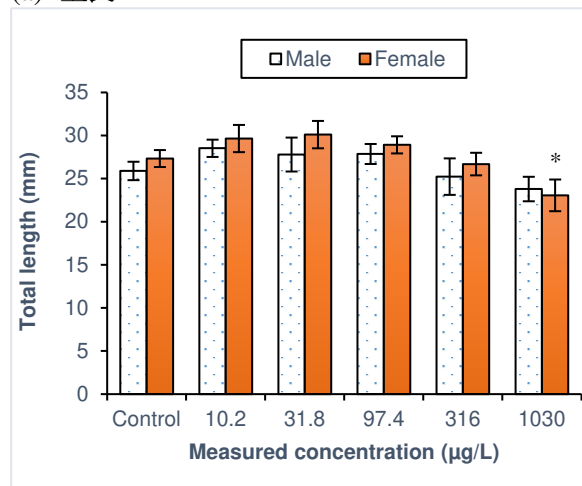
二次性徴の指標として、乳頭状小突起を有する節板数の計測の結果を表 16 および図 9(f) に示す。オスはいずれの濃度区でも対照区と比較し有意差は認められなかったが、316 µg/L 濃度区以上では減少傾向にあり、1030 µg/L 濃度区では乳頭上昇突起を有する個体は確認されなかった。メスは全濃度区で乳頭状小突起を有する個体は確認されなかった。

表 16 F1 世代亜成体の乳頭状小突起を有する節板数

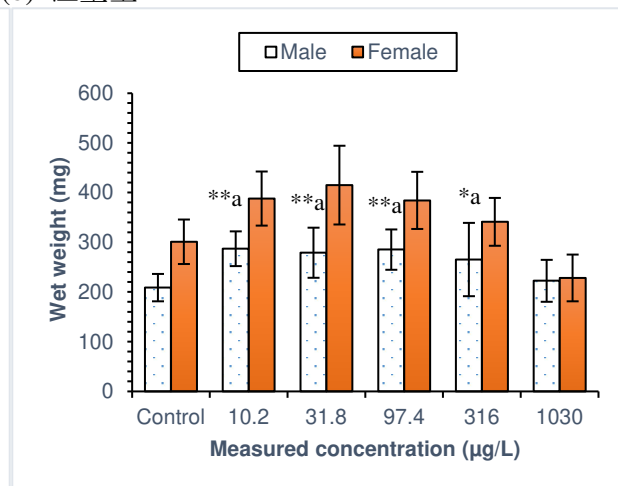
測定濃度 (µg/L)	乳頭状小突起を有する節板数(Plates/fish)					
	オス			メス		
Control	68	±	12	0	±	0
10.2	74	±	16	0	±	0
31.8	80	±	15	0	±	0
97.4	81	±	11	0	±	0
316	36	±	28	0	±	0
1030	0	±	0	0	±	0

注) 値は連平均値を元に算出した平均値±標準偏差 (対照区はオスメスともに n=12、濃度区オスは n=6,5,6,6,4、メスは n=6) を示す。

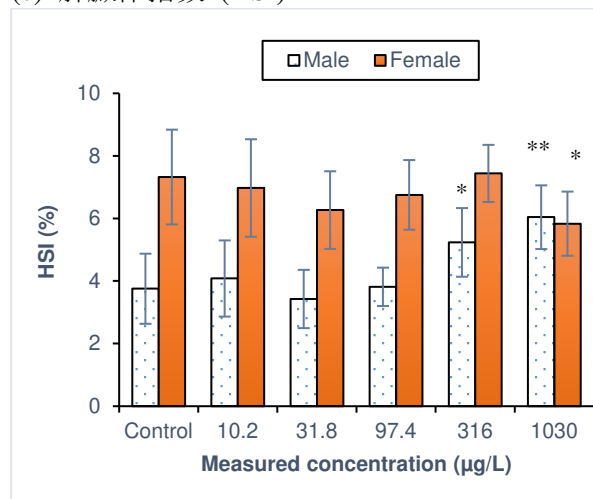
(a) 全長



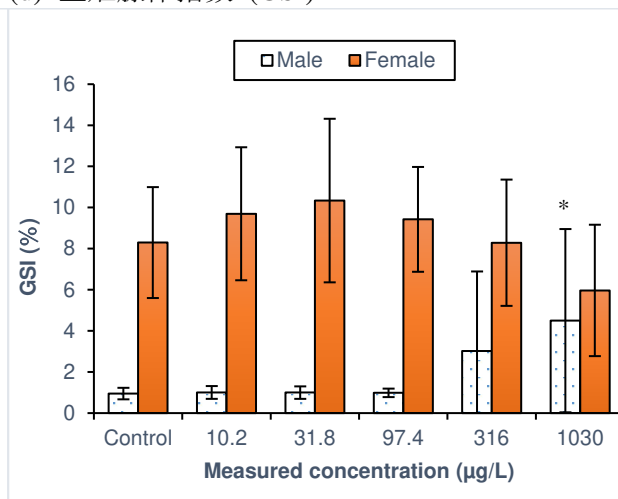
(b) 湿重量



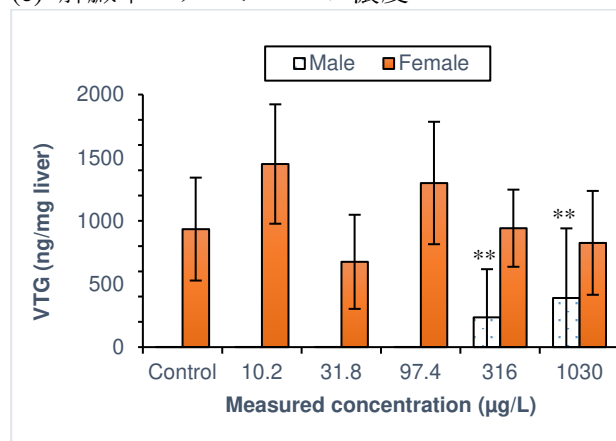
(c) 肝臓体指数 (HSI)



(d) 生殖腺体指数 (GSI)



(e) 肝臓中ビテロジェニン濃度



(f) 乳頭状小突起を有する節板数

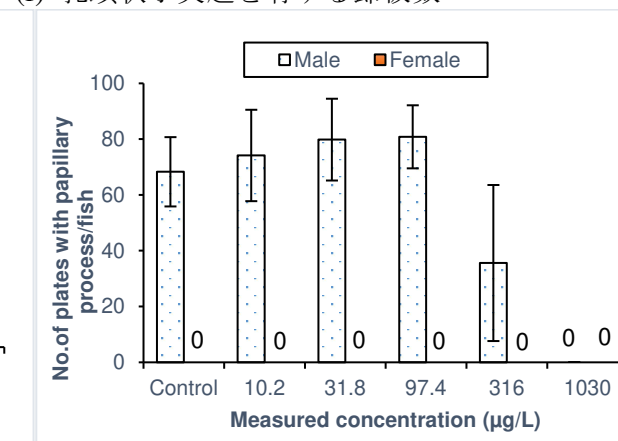


図9 F1世代亜成体の(a)全長、(b)湿重量、(c)肝臓体指数、(d)生殖腺体指数、
(e)肝臓中ビテロジェニン濃度、(f)乳頭状小突起を有する節板数

注) 値は連平均値を元に算出した平均値±標準偏差 (対照区はオスメスともに n=12、濃度区オスは n=6,5,6,6,4、メスは n=6) を示す。*および**は対照区と比較し統計学的な有意差があることを示す ($p<0.05$ および $p<0.01$ 、メスの全長、オスメスの肝臓体指数、オスの生殖腺体指数およびオスのビテロジェニン濃度は Jonckheere-Terpstra 検定、オスの湿重量は Dunnett 検定)。a: 有意差が認められたが濃度依存性なし。

6) 表現型性別と生殖腺形態 (F1 亜成体)

F1 世代亜成体の遺伝的オス個体 (DMY 保有個体) における表現型性別および生殖腺形態の比較を表 17、遺伝的メス個体における表現型性別および生殖腺形態の比較を表 18 に示す。

遺伝的にオスと判断した個体のうち、316 および 1030 $\mu\text{g/L}$ 濃度区においてそれぞれ 4 および 8 個体において、尻ビレが小さく背ビレの切込みは無かった。生殖腺の形態観察では、316 および 1030 $\mu\text{g/L}$ 濃度区でそれぞれ 3 および 6 個体に卵巣が確認された。

遺伝的にメスと判断した個体では、対照区、31.8 および 97.4 $\mu\text{g/L}$ 濃度区で 1 個体において尻びれが大きい、背びれの切れ込みがあった。生殖腺形態は、対照区、31.8、97.4 および 1030 $\mu\text{g/L}$ 濃度区で 1 個体に精巣が観察された。

表 17 F1 世代亜成体遺伝的オス個体 (n) の表現型性別・生殖腺形態

測定濃度 ($\mu\text{g/L}$)	n	表現型オス		生殖腺形態		
		+	-	精巣	不明	卵巣
Control	45	45	0	45	0	0
10.2	21	21	0	21	0	0
31.8	23	23	0	23	0	0
97.4	28	28	0	28	0	0
316	17	13	4	14	0	3
1030	8	0	8	1	1	6

表 18 F1 世代亜成体遺伝的メス個体 (n) の表現型性別・生殖腺形態

測定濃度 ($\mu\text{g/L}$)	n	表現型オス		生殖腺形態		
		+	-	精巣	不明	卵巣
Control	45	1	44	1	0	44
10.2	27	0	27	0	0	27
31.8	24	1	23	1	0	23
97.4	20	1	19	1	0	19
316	26	0	26	0	0	26
1030	28	0	28	1	1	26

2.2.6 F1 世代成熟個体の結果

1) ペアリング後の死亡および行動・外観の異常 (F1)

F1 世代ペアリング後の死亡個体数を表 19 に示す。

対照区および全濃度区で死亡および行動・外観の異常は認められなかった。対照区でメス 6 尾、全濃度区でメス 4、4、4、5、3 尾に腹部肥大が見られた。

表 19 F1 世代ペアリング後の死亡個体数

測定濃度 ($\mu\text{g/L}$)	オス			メス			合計
	供試数	死亡数	死亡率 (%)	供試数	死亡数	死亡率 (%)	死亡率 (%)
Control	24	0	0	24	0	0	0
10.2	12	0	0	12	0	0	0
31.8	12	0	0	12	0	0	0
97.4	12	0	0	12	0	0	0
316	12	0	0	12	0	0	0
1030	12	0	0	12	0	0	0

2) 総産卵数・受精卵数・受精率 (F1)

F1 世代受精後 12～14 週目の 21 日間および各週の各試験区における 1 ペア 1 日あたりの総産卵数・受精卵数・受精率を表 20 に、21 日間平均を図 10 に、21 日間の日変動および累積受精卵数/ペアを図 11 に示す。

総産卵数、受精卵数については、いずれも 1030 $\mu\text{g/L}$ 濃度区で対照区と比較して有意差が認められた。

受精率については、97.4～1030 $\mu\text{g/L}$ 濃度区で対照区と比較して有意差が認められた。

対照区の総産卵数の平均値および各 24 ペアの総産卵数はすべて 20 個/ペア/日以上、21 日間で算出された計 19251 個 の卵の受精率は 93%であり、試験の有効性条件を満たした。

表 20 F1 世代の総産卵数・受精卵数・受精率

測定濃度 (μg/L)	総産卵数 (eggs/pair/day)															
	21 日間			1 週目(DAY1-7)			2 週目(DAY8-14)			3 週目(DAY15-21)						
Control	38.2	±	6.0	31.7	±	5.0	40.4	±	7.1	42.5	±	7.8				
10.2	48.4	±	3.2	42.0	±	3.3	50.2	±	4.1	53.0	±	3.5				
31.8	52.3	±	6.3	47.6	±	6.8	53.0	±	5.5	56.2	±	7.4				
97.4	47.4	±	5.0	40.4	±	6.0	50.0	±	5.7	51.8	±	5.5				
316	33.6	±	8.0	28.4	±	7.1	35.2	±	9.3	37.1	±	10.0				
1030	16.9	±	9.6	**	16.0	±	10.8	*	17.7	±	8.9	**	17.1	±	11.7	**

測定濃度 (μg/L)	受精卵数 (eggs/day/female)															
	21 日間			1 週目(DAY1-7)			2 週目(DAY8-14)			3 週目(DAY15-21)						
Control	35.7	±	7.1	30.4	±	6.1	37.5	±	8.4	39.2	±	9.1				
10.2	46.2	±	3.1	39.9	±	3.1	47.6	±	4.5	51.1	±	3.1				
31.8	48.2	±	8.7	43.8	±	7.9	47.8	±	9.6	53.1	±	10.4				
97.4	42.8	±	5.0	37.1	±	4.6	44.0	±	9.2	47.2	±	4.2				
316	27.6	±	12.5	25.0	±	9.8	29.7	±	13.7	28.0	±	17.8				
1030	0.4	±	0.6	**	0.3	±	0.6	**	0.2	±	0.3	**	0.8	±	1.5	**

測定濃度 (μg/L)	受精率 (%)															
	21 日間			1 週目(DAY1-7)			2 週目(DAY8-14)			3 週目(DAY15-21)						
Control	93.4	±	8.8	95.8	±	10.8	92.5	±	11.2	91.4	±	9.2				
10.2	95.6	±	2.4	95.4	±	3.8	*	94.9	±	3.7	96.6	±	1.9			
31.8	91.9	±	9.8	92.6	±	7.4	**	89.3	±	13.8	93.6	±	11.2			
97.4	90.4	±	6.3	*	92.2	±	5.5	**	87.0	±	14.4	91.5	±	5.4		
316	74.7	±	30.4	**	81.7	±	25.5	**	74.8	±	32.8	*	66.4	±	40.8	
1030	3.3	±	4.4	**	4.3	±	9.7	**	1.0	±	1.4	**	3.6	±	5.7	**

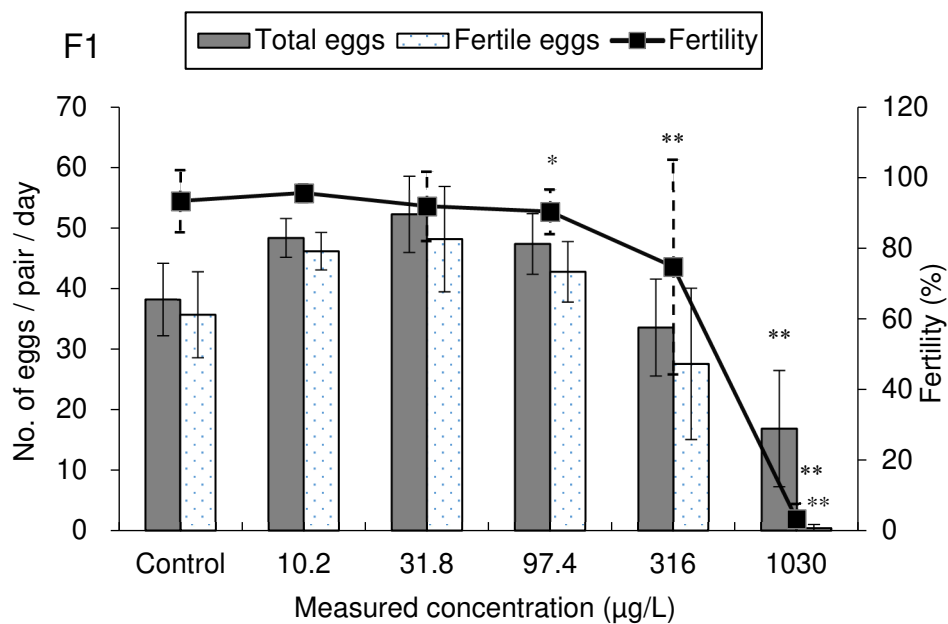
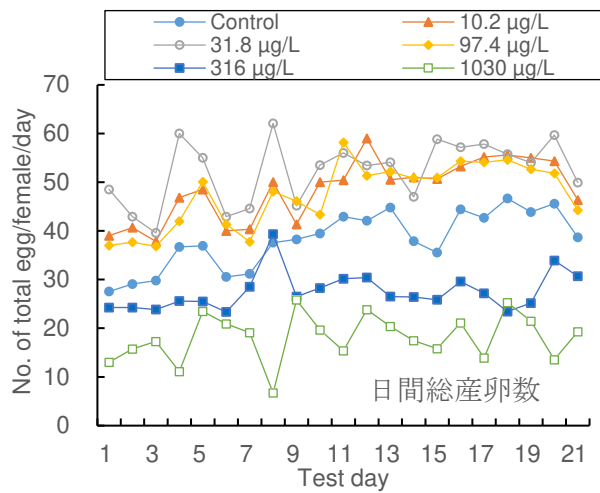


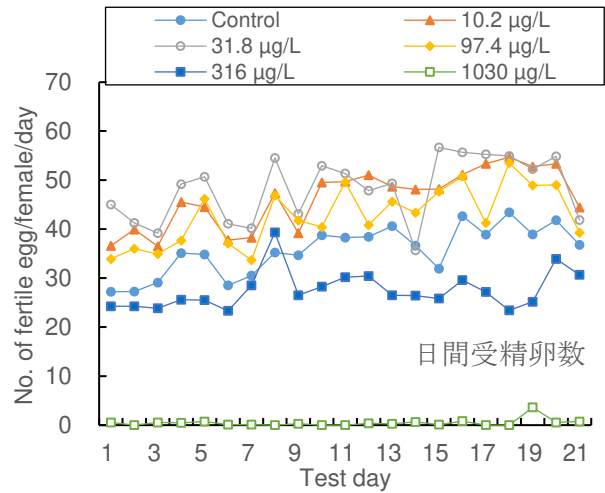
図 10 F1 世代の総産卵数・受精卵数・受精率 (各ペア・1 日当たり)

注) 値は平均値 $\pm$ 標準偏差 (対照区は $n=24$ 、濃度区は $n=12$) を示す。*および**は対照区と比較し統計学的に有意差があることを示す ($p<0.05$ および $p<0.01$, Jonckheere-Terpstra 検定)。

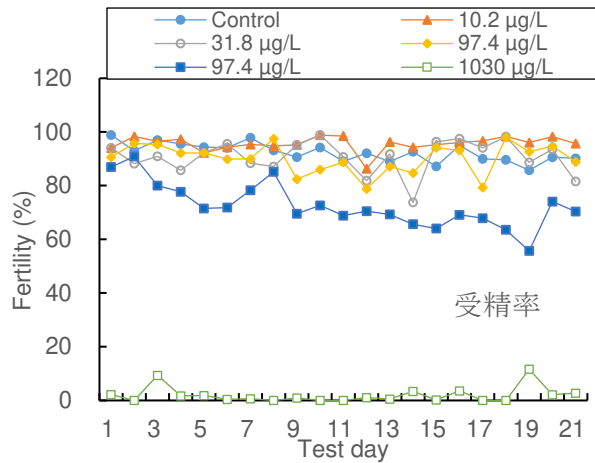
(a) 総産卵数



(b) 受精卵数



(c) 受精率



(d) 累積受精卵数

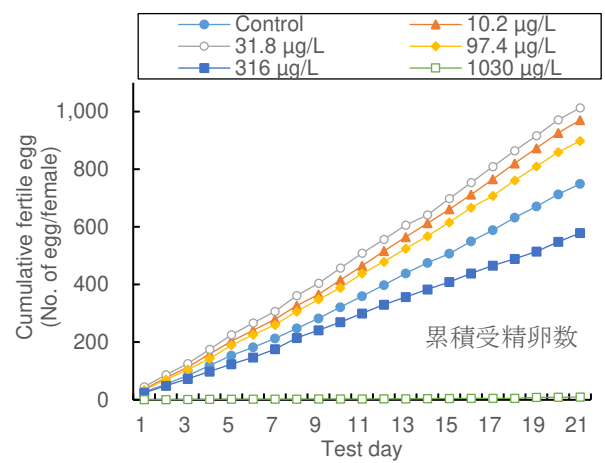


図 11 F1 世代の(a)総産卵数、(b)受精卵数、(c)受精率の日変動および(d)累積受精卵数
(値は各試験区の連平均値)

3) 全長・湿重量 (F1 成熟個体)

F1 世代成熟個体の全長および湿重量の測定結果を表 21、図 12(a)(b)に示す。

全長については、オスメスともに 1030 $\mu\text{g/L}$ 濃度区で対照区と比較し有意差が認められた。

湿重量については、オスは 1030 $\mu\text{g/L}$ 濃度区で対照区と比較し有意差が認められたが、メスはいずれの濃度区でも有意差は認められなかった。

表 21 F1 世代成熟個体の全長および湿重量

測定濃度 ($\mu\text{g/L}$)	全長 (mm)				湿重量 (mg)			
	オス		メス		オス		メス	
Control	32.0	$\pm$ 1.6	33.5	$\pm$ 1.0	352	$\pm$ 50	545	$\pm$ 67
10.2	33.2	$\pm$ 1.2	34.9	$\pm$ 1.2	378	$\pm$ 42	601	$\pm$ 77
31.8	33.5	$\pm$ 1.1	34.6	$\pm$ 1.6	416	$\pm$ 34	619	$\pm$ 72
97.4	32.7	$\pm$ 2.0	33.6	$\pm$ 1.0	375	$\pm$ 69	603	$\pm$ 72
316	31.1	$\pm$ 0.9	32.4	$\pm$ 1.0	351	$\pm$ 35	573	$\pm$ 92
1030	30.4	$\pm$ 0.8 **	29.1	$\pm$ 1.0 **	445	$\pm$ 50 **	458	$\pm$ 49

注) 値は平均値 $\pm$ 標準偏差 (対照区は n=24、濃度区は n=12) を示す。**は対照区と比較し統計学的な有意差があることを示す ($p<0.01$ 、Jonckheere-Terpstra 検定)。

4) 肝臓体指数および生殖腺体指数 (F1 成熟個体)

F1 世代成熟個体の肝臓体指数および生殖体指数の測定結果を表 22、図 12(c)(d)に示す。

肝臓体指数については、オスは 1030 $\mu\text{g/L}$ 濃度区で対照区と比較し有意差が認められたが、メスはいずれの濃度区でも有意差は認められなかった。

生殖腺体指数については、オスは 1030 $\mu\text{g/L}$ 濃度区で、メスは 31.8~1030 $\mu\text{g/L}$ 濃度区で対照区と比較して有意差が認められた。

表 22 F1 世代成熟個体の肝臓体指数および生殖腺体指数

測定濃度 ($\mu\text{g/L}$)	肝臓体指数 (%)				生殖腺体指数 (%)			
	オス		メス		オス		メス	
Control	2.9	$\pm$ 0.9	6.9	$\pm$ 1.9	1.2	$\pm$ 0.4	13.7	$\pm$ 1.4
10.2	2.9	$\pm$ 2.2	6.6	$\pm$ 1.9	1.1	$\pm$ 0.1	14.4	$\pm$ 1.1
31.8	2.1	$\pm$ 0.5	7.3	$\pm$ 1.1	1.2	$\pm$ 0.2	14.9	$\pm$ 1.1 **
97.4	2.1	$\pm$ 0.7	7.4	$\pm$ 1.0	1.2	$\pm$ 0.2	14.9	$\pm$ 1.3 **
316	3.0	$\pm$ 0.9	7.2	$\pm$ 2.1	1.2	$\pm$ 0.2	18.0	$\pm$ 7.0 **
1030	5.8	$\pm$ 0.9 *	5.7	$\pm$ 0.9	11.9	$\pm$ 8.0 **	18.3	$\pm$ 4.7 **

注) 値は平均値 $\pm$ 標準偏差 (対照区は n=24、濃度区は n=12) を示す。*および**は対照区と比較し統計学的な有意差があることを示す ($p<0.05$ および $p<0.01$ 、Jonckheere-Terpstra 検定)。

5) 肝臓中ビテロジェニン濃度 (F1 成熟個体)

ELISA による F1 世代成熟個体の肝臓中ビテロジェニン濃度の測定結果を表 23、図 12(e) に示す。オスは 1030 $\mu\text{g/L}$ 濃度区で、メスは 31.8~1030 $\mu\text{g/L}$ 濃度区で対照区と比較して有意差が認められた。

表 23 F1 世代成熟個体の肝臓中ビテロジェニン濃度						
測定濃度 ($\mu\text{g/L}$)	肝臓中ビテロジェニン濃度 (ng/mg liver)					
	オス			メス		
Control	0.43	$\pm$	0.97	1010	$\pm$	364
10.2	0.55	$\pm$	0.91	1080	$\pm$	180
31.8	< L.O.Q.			1350	$\pm$	559 *
97.4	< L.O.Q.			1350	$\pm$	663 **
316	0.86	$\pm$	1.92	1340	$\pm$	384 **
1030	1305	$\pm$	611 **	1850	$\pm$	541 **

注) 値は平均値 $\pm$ 標準偏差 (対照区は n=24、濃度区は n=12) を示す。「< L.O.Q.」は定量下限 (0.4 ng/mg) 未満であることを示す。*および**は対照区と比較し統計学的な有意差があることを示す ($p<0.05$ および $p<0.01$ 、Jonckheere-Terpstra 検定)。

6) 二次性徴指標 (F1 成熟個体)

二次性徴を指標として、F1 世代成熟個体における乳頭状小突起を有する節板数の計測結果を表 24、図 12(f)に示す。オスは 97.4~1030 $\mu\text{g/L}$ 濃度区で対照区と比較して有意差が認められた。1030 $\mu\text{g/L}$ 濃度区は乳頭上昇突起を有する個体は観察されなかった。メスは全濃度区で乳頭状小突起を有する個体は観察されなかった。

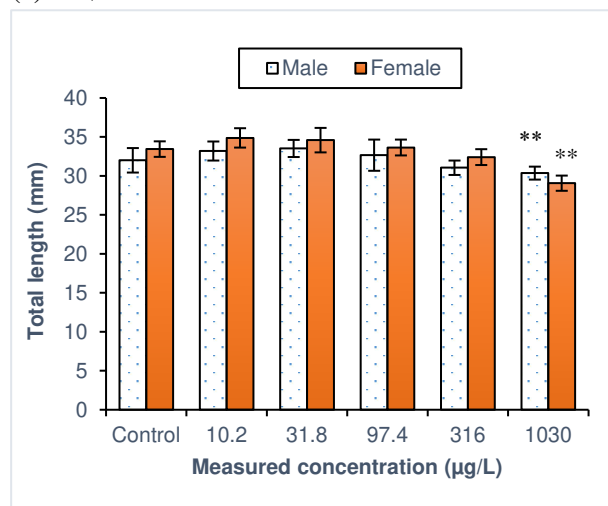
表 24 F1 世代成熟個体の乳頭状小突起を有する節板数						
測定濃度 ($\mu\text{g/L}$)	乳頭状小突起を有する節板数(Plates/fish)					
	オス			メス		
Control	100	$\pm$	15	0	$\pm$	0
10.2	100	$\pm$	14	0	$\pm$	0
31.8	97	$\pm$	8	0	$\pm$	0
97.4	90	$\pm$	9 **	0	$\pm$	0
316	77	$\pm$	10 **	0	$\pm$	0
1030	0	$\pm$	0 **	0	$\pm$	0

注) 値は平均値 $\pm$ 標準偏差 (対照区は n=24、濃度区は n=12) を示す。

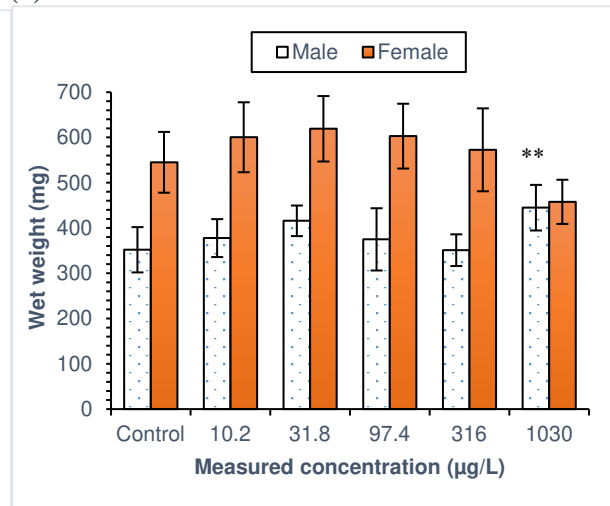
7) 表現型性別と生殖腺形態 (F1 成熟個体)

F1 世代成熟個体における表現型の性別・生殖腺形態は、対照区および 10.2~316 $\mu\text{g/L}$ 濃度区では明確かつ一致していた。1030 $\mu\text{g/L}$ 濃度区では全てのオスが表現型および生殖腺形態はメスであると判断した。

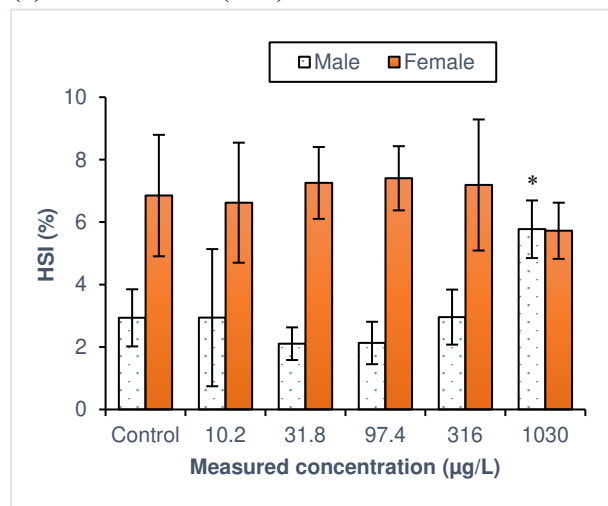
(a) 全長



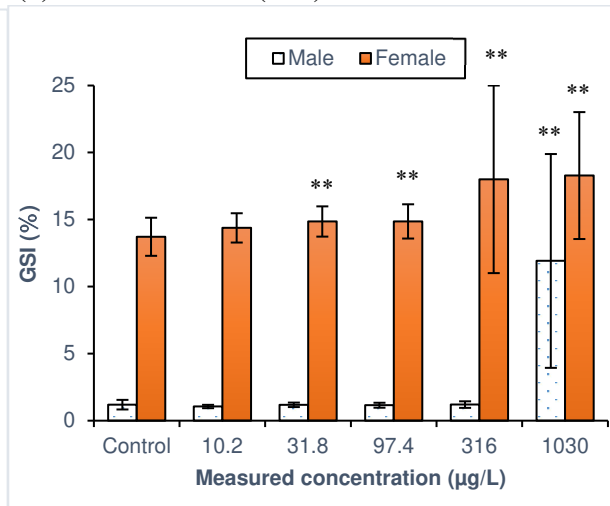
(b) 湿重量



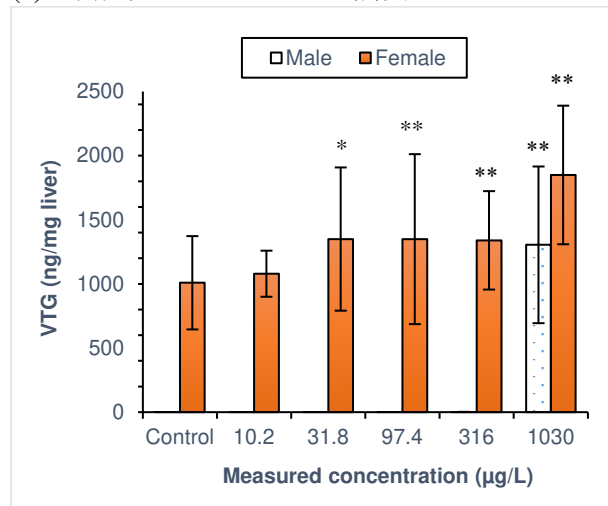
(c) 肝臓体指数 (HSI)



(d) 生殖腺体指数 (GSI)



(e) 肝臓中ビテロジェニン濃度



(f) 乳頭状小突起を有する節板数

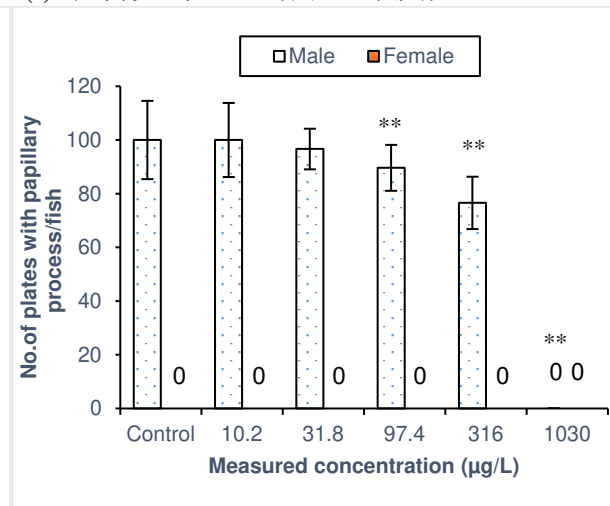


図 12 F1 世代成熟個体の(a)全長、(b)湿重量、(c)肝臓体指数、(d)生殖腺体指数、
(e)肝臓中ビテロジェニン、(f)乳頭状小突起を有する節板数

注) 値は平均値±標準偏差 (対照区は n=24、濃度区は n=12) を示す。*および**は対照区と比較し統計学的な有意差があることを示す ($p<0.05$ および $p<0.01$, Jonckheere-Terpstra 検定)。

2.2.7 F2 世代の結果

1030 $\mu\text{g/L}$ 濃度区は受精卵が得られなかったため、F2 世代に継代することができなかった。

F2 世代胚・仔魚期の受精後 16 日目の孵化日数および孵化率を表 25 に、受精後 7～14 日目における孵化個体数を図 13 に示す。

対照区における孵化日の中央値が受精後 8 日目（240 個体中 166 個体が孵化）となり（図 13）、その 2 倍である 16 日目の孵化日数および孵化率の計算を実施した。

孵化日数については、31.8 $\mu\text{g/L}$ 濃度区で対照区と比較し有意差が認められたが、濃度依存性は認められなかった。

孵化率については、10.2 および 31.8 $\mu\text{g/L}$ 濃度区で対照区と比較して有意差が認められたが、濃度依存性は認められなかった。

対照区の孵化率は 80%以上であり、試験の有効性条件を満たした。

表 25 F2 世代胚・仔魚期の孵化日数・孵化率

測定濃度 ($\mu\text{g/L}$)	孵化日数 (day)			孵化率 (%)		
	受精後 16 日目			受精後 16 日目		
Control	8.4	$\pm$	0.2	98	$\pm$	3
10.2	8.1	$\pm$	0.1	90	$\pm$	8 * ^a
31.8	8.0	$\pm$	0.1 ** ^a	88	$\pm$	4 * ^a
97.4	8.5	$\pm$	0.2	96	$\pm$	4
316	8.3	$\pm$	0.2	94	$\pm$	6
1030	--	$\pm$	--	--	$\pm$	--

注) 値は連平均値を元に算出した平均値 $\pm$ 標準偏差（対照区は $n=12$ 、濃度区は $n=6$ ）を示した。*および**は対照区と比較し統計学的な有意差があることを示す（ $p<0.05$ および $p<0.01$ 、孵化日数は Mixed Effects Cox Models、孵化率は単調性が認められず、正規性および等分散性が認められたため Dunnett 検定）。a：有意差が認められたが濃度依存性なし。

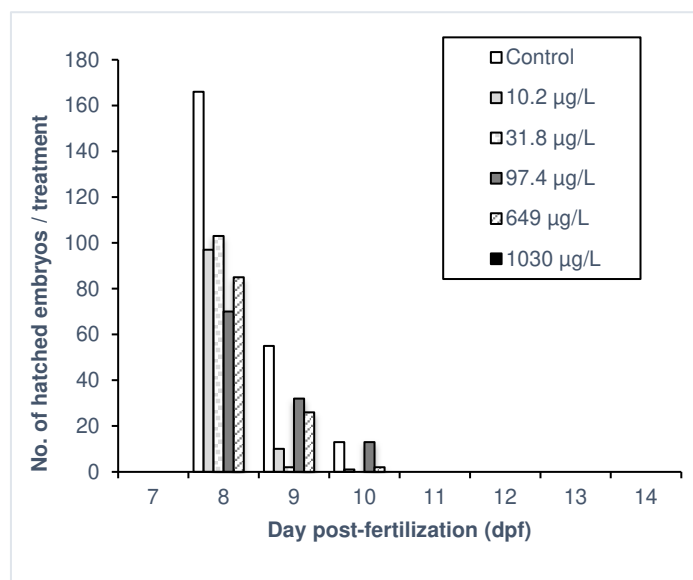


図 13 F2 の受精後 7～14 日目における孵化個体数
（対照区は $n=12$ 、濃度区は $n=6$ 。各試験区の合計）

2.3 結果の概要

試験の有効性の条件をすべて満たしたため、本試験は有効であると判断した。
各エンドポイントについて、各世代の結果の概要を以下にまとめた。

(1) F0 世代成熟個体（19 週齢）の結果

1) 繁殖に関する指標（総産卵数・受精卵数・受精率）

総産卵数、受精卵数および受精率：全ての濃度区において対照区との有意差は認められなかった。

2) 二次性徴（乳頭状小突起を有する節板数）

オスは全ての濃度区において対照区との有意差は認められなかった。

メスは全ての試験区で乳頭状小突起を有する個体は観察されなかった。

3) 肝臓中ビテロジェニン濃度

オスは 1030 µg/L 濃度区において対照区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区と比較し有意な増加が認められたが、濃度依存性は認められなかった。

4) 表現型性別および生殖腺形態

全ての濃度区において表現型性別および生殖腺形態は明確かつ一致していた。

5) その他の指標

全長：全ての濃度区において対照区との有意差は認められなかった。

湿重量：全ての濃度区において対照区との有意差は認められなかった。

肝臓体指数：オスは 1030 µg/L 濃度区において対照区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区との有意差は認められなかった。

生殖腺指数：オスは 1030 µg/L 濃度区において対照区と比較し有意な低下が認められた。

メスは全ての濃度区において対照区との有意差は認められなかった。

(2) F1 世代胚～仔魚期の結果

1) 胚期孵化日数・孵化率

孵化日数：316 および 1030 µg/L 濃度区において対照区と比較し有意差（孵化日数が短い）が認められた。

孵化率：全ての濃度区において対照区との有意差は認められなかった。

(3) F1 世代亜成体の結果

1) 生存率（受精後 4 週目および 8 週目）

1030 µg/L 濃度区において対照区と比較し有意な低下が認められた。

2) 二次性徴（乳頭状小突起を有する節板数）

オスは全ての濃度区において対照区との有意差は認められなかったが、316 µg/L 濃度区以上では減少傾向が見られ、1030 µg/L 濃度区では乳頭状小突起を有する個体は観察されなかった。

メスは全ての試験区において乳頭状小突起を有する個体は観察されなかった。

3) 肝臓中ビテロジェニン濃度

オスは 316 および 1030 µg/L 濃度区において対照区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区との有意差は認められなかった。

4) 表現型性別および生殖腺形態

オスは 316 および 1030 $\mu\text{g/L}$ 濃度区においてそれぞれ 4 および 8 個体の表現型性別と遺伝的性別が一致せず、3 および 6 個体の生殖腺形態と遺伝的性別が一致しなかった。メスは対照区および 31.8、97.4 $\mu\text{g/L}$ 濃度区でそれぞれ 1 個体ずつ表現型性別と遺伝的性別が一致せず、対照区および 31.8、97.4、1030 $\mu\text{g/L}$ 濃度区で 1 および 1、1、2 個体ずつ生殖腺形態と遺伝的性別が一致しないまたは不明であった。

5) その他の指標

全長：オスは全ての濃度区において対照区との有意差は認められなかった。メスは 1030 $\mu\text{g/L}$ 濃度区において対照区と比較し有意な低下が認められた。

湿重量：オスは 10.2～316 $\mu\text{g/L}$ 濃度区において対照区と比較し有意な増加が認められたが、濃度依存性は認められなかった。メスは全ての濃度区において対照区との有意差は認められなかった。

肝臓体指数：オスは 316 および 1030 $\mu\text{g/L}$ 濃度区において対照区と比較し有意な増加が認められ、メスは 1030 $\mu\text{g/L}$ 濃度区において有意な低下が認められた。

生殖腺指数：オスは 1030 $\mu\text{g/L}$ 濃度区において対照区と比較し有意な増加が認められた。メスは全濃度区において対照区との有意差は認められなかった。

(4) F1 世代成熟個体（15 週齢）の結果

1) 生存率

全ての試験区において死亡は認められなかった。

2) 繁殖に関する指標（総産卵数・受精卵数・受精率）

総産卵数および受精卵数：1030 $\mu\text{g/L}$ 濃度区において対照区と比較し有意な減少が認められた。

受精率：97.4～1030 $\mu\text{g/L}$ 濃度区において対照区と比較し有意な低下が認められた。

3) 二次性徴（乳頭状小突起を有する節板数）

オスは 97.4～1030 $\mu\text{g/L}$ 濃度区において対照区と比較し有意な減少が認められ、1030 $\mu\text{g/L}$ 濃度区では乳頭状小突起を有する個体は観察されなかった。

メスは全ての試験区において乳頭状小突起を有する個体は観察されなかった。

4) 肝臓中ビテロジェニン濃度

オスは 1030 $\mu\text{g/L}$ 濃度区において、メスは 31.8～1030 $\mu\text{g/L}$ 濃度区において、対照区と比較し有意な増加が認められた。

5) 表現型性別および生殖腺形態

対照区および 10.2～316 $\mu\text{g/L}$ 濃度区においては表現型性別および生殖腺形態は明確かつ一致していたが、1030 $\mu\text{g/L}$ 濃度区においては全てのオスが表現型および生殖腺形態はメスであると判断した。

6) その他の指標

全長：オスメスともに 1030 µg/L 濃度区において対照区と比較し有意な低下が認められた。

湿重量：オスは 1030 µg/L 濃度区において対照区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区との有意差は認められなかった。

肝臓体指数：オスは 1030 µg/L 濃度区において対照区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区との有意差は認められなかった。

生殖腺指数：オスは 1030 µg/L 濃度区において、メスは 31.8～1030 µg/L 濃度区において、対照区と比較し有意な増加が認められた。

(5) F2 世代胚・仔魚期の結果

1030 µg/L 濃度区は受精卵が得られなかったため、F2 世代に継代することができなかった。

孵化後日数：31.8 µg/L 濃度区において対照区と比較し有意差（孵化日数が短い）が認められたが、濃度依存性は認められなかった。

孵化率：10.2 および 31.8 µg/L 濃度区において、対照区と比較し有意な低下が認められたが、濃度依存性は認められなかった。

2.4 考察

本試験の各世代・各エンドポイントの LOEC 一覧を表 26 に示す。MEOGRT 試験法を用いて 4-t-ブチルフェノールの継世代影響について検討した。これまでの研究から、4-t-ブチルフェノールはエストロゲン作用を持つことが想定されている^{3,4,5)}。本試験において F1 世代の、10.2、31.8、97.4、316 µg/L 濃度区では、孵化から亜成体までの生存率・全長・湿重量において対照区との有意な差は認められなかった。F0 および F1 世代の成体ではオスメス共に肝臓中のビテロジェニン濃度は 4-t-ブチルフェノール濃度に依存して増加した。成熟個体における 4-t-ブチルフェノールの肝臓中ビテロジェニン濃度はオスおよびメスともに F0 および F1 世代間で同じ傾向を示し、LOEC 値も近似した。また、F1 世代（亜成体）において、316 µg/L 以上の濃度区において遺伝的オス個体から卵巣を有したメス個体が観察され、性転換の可能性が示された。さらに、1030 µg/L 濃度区では乳頭状小突起を有する遺伝的オス個体は確認されなかった。加えて F1 世代での受精率は 97.4 µg/L 以上の濃度区で濃度相関的に減少した。これらの結果より、4-t-ブチルフェノールにより誘導されたエストロゲン作用をメダカに対して有することが示唆された。4-t-ブチルフェノール が繁殖に与える影響を検討した結果、総産卵数および受精卵数は F0 では 1030 µg/L 濃度区で、F1 では 316 µg/L 濃度区以上で対照区に対して減少傾向を示し、受精率の LOEC は F1 で 97.4 µg/L であった。また各エンドポイントの LOEC は F1 が F0 より低い濃度となるケースが多くなったことから、継世代の影響の可能性が示された。

4-t-ブチルフェノールについては、既報において、動物試験（生態影響）や培養細胞でのエストロゲン作用の報告がなされている。Barse ら⁴⁾ は成熟コイへの 28 日間のばく露試験において、0.690 mg/L 以上の濃度での肝臓体指数や筋肉組織中ビテロジェニン濃度の高値を報告している。また、Tollefsen ら⁵⁾ は 98 時間ばく露したニジマス肝培養細胞（未成熟オス由来）においてビテロジェニン産生濃度の上昇によるエストロゲン作用の可能性について報告している。令和 3 年度第一段階生物試験（魚短期繁殖試験、OECD TG229）³⁾における各エンドポイントの LOEC 一覧を表 27 に示す。この試験では、オスメスともに、ばく露 21 日後の肝臓中ビテロジェニン濃度に 4-t-ブチルフェノールのばく露濃度に依存のかつ統計学的に有意な増加が認められ、繁殖指標での濃度依存的な減少と併せ、4-t-ブチルフェノールがメダカ成魚に対してエストロゲン様作用を示すことが示唆された。

本結果は、令和 2 年度の第一段階試験管内試験⁶⁾にて報告されたメダカ ER α に対する転写活性化（エストロゲン作用の検出）、およびメダカ ER α の転写活性か倍率に対する有意な低下が認められなかったこと（抗エストロゲン作用の不検出）と一致し、令和 3 年度の第一段階生物試験とも一致する結果となった。

表 26 4-t-ブチルフェノールの MEOGRT 試験結果まとめ
(各世代各エンドポイントに対する LOEC)

Stage	wpcf	Endpoint		LOEC (μg/L)					
				F0		F1		F2	
Embryo	2wpcf	孵化率			>1030		↓	1030	
		孵化日数			↓	316	↓	1030	
Larva	4wpcf	生存率			↓	1030			
Sub-Adult	8wpcf	生存率			↓	1030			
	10wpcf	全長	♂		>1030				
			♀	↓	1030				
		湿重量	♂	↑	(10.2)				
			♀	>1030					
		肝臓体指数	♂	↑	316				
			♀	↓	1030				
		生殖腺体指数	♂	↑	1030				
			♀	>1030					
		肝臓中ビテロジェニン濃度	♂	↑	316				
			♀	>1030					
		二次性徴（乳頭状小突起を有する節板数）	♂	↓	1030				
			♀	-					
	Adult	12～15wpcf	生存率	♂	>1030	>1030			
♀				>1030	>1030				
産卵数			>1030	↓	1030				
受精卵数			>1030	↓	1030				
受精率			>1030	↓	97.4				
15wpcf		全長	♂	>1030	↓	1030			
			♀	>1030	↓	1030			
		湿重量	♂	>1030	↑	1030			
			♀	>1030	>1030				
		肝臓体指数	♂	↑	1030	↑	1030		
			♀	>1030	>1030				
		生殖腺体指数	♂	↓	1030	↑	1030		
			♀	>1030	↑	31.8			
		肝臓中ビテロジェニン濃度	♂	↑	1030	↑	1030		
			♀	↑	(10.2)	↑	31.8		
		二次性徴（乳頭状小突起を有する節板数）	♂	>1030	↓	97.4			
			♀	-	-				

() : 濃度依存性確認できず

表 27 4-t-ブチルフェノールの第一段階生物試験（魚短期繁殖試験、OECD TG229）
結果の比較

測定濃度 (μg/L)		102、313、1000	
Endpoint		LOEC (μg/L)	
産卵数		↓	1000
受精卵数		↓	313
受精率		↓	1000
肝臓中ビテロジェニン濃度	♂	↑	1000
	♀	↑	1000
二次性徴（乳頭状小突起）	♂		ND
	♀		ND

2.5 参考文献

- 1) OECD 2023 OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 240, Medaka Extended One Generation Reproduction Test (MEOGRT)
- 2) 化学物質の環境リスク評価 第13巻、環境書 HP より
- 3) 環境省, 令和3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 (4-t-ブチルフェノール)
- 4) Barse AV, Chakrabarti T, Ghosh TK, Pal AK and Jadhao SB (2006) One-tenth dose of LC50 of 4-tert-butylphenol causes endocrine disruption and metabolic changes in *Cyprinus carpio*. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 86, 172-179
- 5) Tollefsen KE, Eikvar S, Finne EF, Fogelberg O and Gregersen IK (2008) Estrogenicity of alkylphenols and alkylated non-phenolics in a rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) primary hepatocyte culture. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 71, 370-383
- 6) 環境省 (2021), 令和3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 令和2年度第1段階試験管内試験 (レポータージーン試験) の実施結果について (案)

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、報告を行った。

- ・ 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

開催日時：令和 6 年 3 月 5 日

開催形式：WEB

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