

環境省請負業務

令和7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
(幼若メダカ抗アンドロゲン作用検出試験、酢酸クロルマジノン)実施業務

報告書

令和8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	6
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. 生存個体の遺伝型判別及びエンドポイント等の測定	9
5-11. データ解析	10
6. 試験の許容基準	11
7. 結果	12
7-1. 試験物質の測定濃度	12
7-2. 暴露期間中の試験環境	12
7-3. 死亡率及び一般症状	13
7-4. 二次性徴	14
7-5. 全長及び体重	14
8. まとめ及び考察	17
8-1. 試験物質の試験生物に対す抗アンドロゲン作用	17
8-2. 最小影響濃度(LOEC)及び最大無影響濃度(NOEC)	17
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	18
10. 引用文献	19
付属資料	付資 1～10

要旨

本業務では、酢酸クロルマジノン(CAS NR:302-22-7)について、抗アンドロゲン作用の有無を確認するために、幼若メダカ抗アンドロゲン作用検出試験(JMASA)を実施した。

暴露方法及び条件

試験では、OECD ガイダンスドキュメント No.379 (Guidance Document on a Juvenile Medaka anti-androgen screening assay (JMASA)) に準拠して、以下の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 (<i>Oryzias latipes</i>) (受精後 41 日齢)
暴露方式:	流水式
試験期間:	28 日間
試験濃度:	5.00、16.0、50.0 µg/L (設定濃度) 及び対照区 (平均測定濃度: 6.14、18.8、52.5 µg/L)
連数:	4 連/濃度
生物数:	容器当たり 7 個体 (濃度当たり 28 個体)
試験水量:	2 L/容器 (試験水交換率: 8 回/日)
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)

エンドポイント測定

暴露中は、毎日、死亡並びに行動及び外見の異常の有無を観察した。暴露終了時には、生存する全個体を対象として、性決定に関わる遺伝型の判別を行い、二次性徴に関わるエンドポイントとして、乳頭状小突起が発現している尻びれ鰭条の節板数を測定した。

結果及び結論

酢酸クロルマジノンの全濃度に関して、暴露期間を通して試験物質の毒性によると推察される死亡及び行動又は外見の異常は観察されなかった。暴露終了時に生存した個体に関して、遺伝型 XY 個体では、二次性徴に酢酸クロルマジノン濃度に依存的な低下がみられ、検定の結果、18.8 µg/L 及び 52.5 µg/L について、対照区との間に統計学的な有意差が認められた。また、遺伝型 XY の全長及び体重では、それぞれ 52.5 µg/L 又は 18.8 µg/L 以上の濃度に関して、対照区と比較して統計学的に有意な増加が認められた。

JMASA の結果、成長低下が認められない濃度において、遺伝型 XY 個体で二次性徴に有意な低下が認められたことから、酢酸クロルマジノンはミナミメダカ(魚類)に対する抗アンドロゲン作用を有すると結論した。本試験から得られた酢酸クロルマジノンの抗アンドロゲン作用に関する LOEC 及び NOEC は、18.8 µg/L 及び 6.14 µg/L であった。

Summary

In this work, a Juvenile Medaka Anti-Androgen Screening Assay (JMASA) was conducted to assess the anti-androgenic effect of chlormadinone acetate (CMA; CAS NR 302-22-7).

Methods and conditions of exposure

In the assay, test organisms were exposed to the test chemical under the following conditions, in accordance with OECD guidance document for the testing of chemicals No. 379.

· Test animal	Minami-medaka (<i>Oryzias latipes</i>) at 41 days post fertilization
· Type of exposure	Flow-through
· Exposure period	28 days
· Test concentrations	5.00, 16.0, and 50.0 µg/L (as nominal), and a control (6.14, 18.8, 52.5 µg/L in mean measured concentration)
· Number of replicates	Four replicates per treatment for test chemical and control
· Number of test fish:	Seven fish per vessel (28 fish per concentration)
· Test solution volume	2 L/vessel (8 exchanges of test solution per day)
· Temp. of test solution	25 ± 1 degrees C
· Photoperiod	16 hours light and 8 hours dark
· Feeding	Brine shrimp nauplii, three times daily

Endpoint measurements

During the exposure period, mortality and behavioral and physical abnormalities were observed daily. At the termination of the exposure, a genetic type related to sex determination, secondary sex characteristics (SSC), and the number of joint plates with the papillary process of the anal fin were assessed for all surviving fish.

Results and conclusion

No mortality or behavioral or appearance abnormalities related to CMA toxicity were observed at any test concentration throughout the exposure period. A concentration-dependent reduction was found in SSC in XY genetic type fish and significant differences (decreases) compared with the control were statistically found at CMA concentrations of 18.8 and 52.5 µg/L. In the XY genetic type fish, statistically significant increases in total length and body weight compared with the control were observed at 18.8 and 52.5 µg/L, respectively.

It is concluded that CMA has an anti-androgenic effect on Minami Medaka (fish) based on the results of the JMASA, where a significant reduction in SSC in XY genetic-type fish was found within the concentration at which no growth reduction was observed. The LOEC and NOEC for the anti-androgenic effects of CMA obtained from the assay were 18.8 and 6.14 µg/L, respectively.

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幼若メダカ抗アンドロゲン作用検出試験(JMASA)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酢酸クロルマジノンについて、ミナミメダカを試験生物とする幼若メダカ抗アンドロゲン作用検出試験を実施した。

JMASA は、図 2-1 に示すとおり、受精後 35～42 日齢の二次性徴(尻びれの乳頭状小突起)が発現前の幼若期にあるメダカを試験生物とする。試験では、各容器に 7 個体を収容し、28 日間(4 週間)にわたり試験物質(化学物質)に暴露する。暴露終了時に、二次性徴に関するエンドポイントとして、乳頭状小突起を発現している尻びれ鰭条の節板数を測定する。また、全個体について、性決定遺伝子(DMY 遺伝子)の有無から遺伝型(XY 又はXX)を判別し、遺伝型 XY 個体における二次性徴の変化(抑制)から、試験物質の試験生物に対する抗アンドロゲン作用の有無を評価(スクリーニング)する。

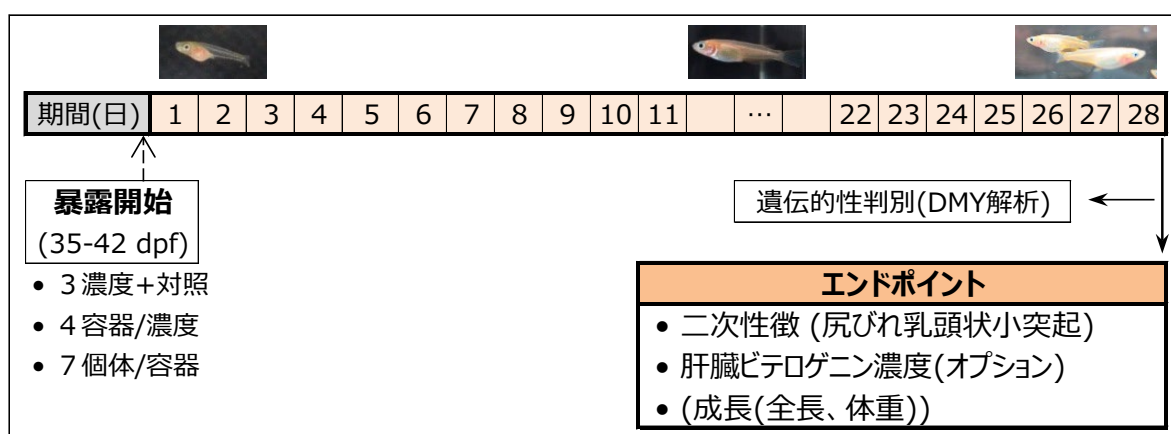


図 2-1 幼若メダカ抗アンドロゲン作用検出試験(JMASA)の概要

3. 試験実施施設

本業務では、以下の施設で JMASA(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

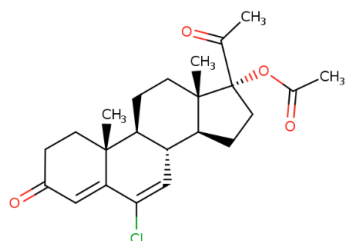
4. 試験物質

本試験では、酢酸クロルマジノンを試験物質とした。酢酸クロルマジノンについては、EXTEND2010 における内分泌かく乱作用に関する試験及び評価に関する枠組みの下で、平成 27 年度に信頼性評価を実施する対象として選定され、同年度に実施された文献情報に基づく影響評価(信頼性評価)の結果、内分泌かく乱作用に関する試験対象物質となり得る物質とされた。既存知見から示唆された作用は、抗エストロゲン、アンドロゲン、抗アンドロゲン様作用及びその他作用(視床下部一下垂体一生殖腺軸への作用等)である⁽¹⁾。また、環境省が実施した試験管内試験において、平成 28 年度にアンドロゲン及び抗アンドロゲン作用⁽²⁾、平成 29 年度に抗エストロゲン作用⁽³⁾、平成 30 年度にエストロゲン作用⁽⁴⁾の有無の確認を目的とした第 1 段階の試験管内試験(レポータージーン試験)が実施され、メダカのアンドロゲン受容体 β を用いたレポータージーン試験の結果から、抗アンドロゲン様作用を有することが示唆されている。

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⁽⁵⁾。

試験物質の名称及び物理化学的性状

一般名： 酢酸クロルマジノン(Chlormadinone acetate)
化学名： 6-Chloro-17-acetoxy-pregna-4,6-diene-3,20-dione
CAS 登録番号： 302-22-7
分子式： $C_{23}H_{29}ClO_4$
分子量： 404.93
構造式：



融点： 213°C (Experimental value)
沸点： 389 to 513°C (Predicted range)
水溶解度： 3.95×10^{-7} mol/L (Experimental value)
蒸気圧： 1.28×10^{-7} to 1.50×10^{-7} mm Hg (Predicted range)
Log Kow： 3.14 to 3.72 (Experimental range)

5. 材料及び方法

本試験は、OECD ガイダンスドキュメント No.379 Guidance Document a Juvenile Medaka anti-androgen screening assay (JMASA)(Adopted: 24 July 2023)(以下、OECD GD379)に準拠して、以下に示す材料及び方法により実施した⁽⁶⁾。

5-1. 被験物質(試薬)

本試験に供した被験物質(酢酸クロルマジノン試薬)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(試験に供した酢酸クロルマジノン試薬)

試薬名: Chlormadinone acetate

供給者: LKT Laboratories, Inc.

ロット番号: 23924503

純度: 98.7% (UHPLC、製品規格 98.0%以上)

入手量: 5.0 g

5-2. 試験生物

試験生物は、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ミナミメダカ(*Oryzias latipes*, NIES-R 系と同履歴のヒメダカ系群)を使用した。本試験では、以下のとおり、親魚から採卵した受精卵を培養し、ふ化後、試験と同じ環境及び希釈水で飼育し、試験環境に順化させた個体を試験生物として用いた。

採卵及び受精卵の採取

ふ化後 4 か月齢の外見的に健康で成熟したオス 20 個体とメス 40 個体を親魚として 30 L 容水槽内で飼育し、産卵させた。親魚の産卵状況を毎朝確認し、十分量の産卵が確認された日に当日産出された卵を全て回収し、受精卵を選別した(受精卵数及び未受精卵数から算出した受精率は 83.8%)。受精卵は、纏絡糸を除去した後、試験で用いる希釈水と同じ脱塩素処理した水道水(脱塩素水道水)を入れたガラスシャーレに収容し、水温が $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$ となるように室温設定した恒温室内に置き、ふ化まで管理(培養)した。受精 10 日後(初ふ化日)から 15 日後までにふ化した仔魚(487 個体)を回収し、以降の順化飼育に用いた(回収した仔魚の個体数は、培養に供した受精卵数の 89.4%であった)。

ふ化後の飼育

ふ化後の仔魚は、容量 10 L のガラス水槽に収容し、試験開始7日前の受精後 34 日齢まで飼育した。水槽には、飼育水として脱塩素水道水を流水式で供給し(流量は 5 換水/日)、水温は $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ とした。餌料は、ブラインシュリンプふ化幼生をふ化直後から 2

週間まで 3～4 回/日、以降は 2～3 回/日の頻度で飽食量与えた。外見的に異常が認められる個体及び成長の悪い個体は除去した。

順化及び供試個体の選別

飼育した稚魚が受精後 34 日齢に達した時点で、試験環境に順化させる供試群として、外見的に異常が認められる個体、全長が著しく大きい又は小さい個体を除く 380 個体を別のガラス水槽に移し入れ、試験に供するまで 7 日間、試験と同じ環境下で飼育(順化)した。

本試験には、上記により試験環境に順化させた受精 41 日後(受精後 41 日齢)の稚魚を供試した。供試した稚魚に関して、供試前 7 日間の死亡率は 0%であり、無作為に取り上げた 12 個体(サブサンプル)で測定した全長及び体重(平均±標準偏差)は、 16.6 ± 0.8 mm 及び 48.3 ± 9.2 mg であった。また、サブサンプル 12 個体について、実体顕微鏡下で尻びれを観察した結果、全個体で乳頭状小突起(二次性徴)の発現は観察されなかった。したがって、全長及び体重はやや小さいものの、GD 379 で推奨される供試魚の要件を満たしていた。

5-3. 装置及び機器等

(1) 試験装置

本試験では、試験生物の暴露に、大気循環型安定性試験室(タバイエスペック株式会社)に設置した流水式の暴露試験装置を用いた。この試験装置は、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容器に供給できる。また、接液部には、化学的に不活性な素材(ガラス、テフロン、ステンレス鋼、シリコン等)が使用されている。

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

(2) 試験容器

試験容器には、試験液量が 2.0 L となる位置に排水口を設けた総硬質ガラス製の容器を用いた。試験容器は、使用前に十分に洗浄した。また、暴露期間中に残餌等による汚れにより試験物質濃度の低下等が懸念された場合には、必要に応じて、洗浄された清浄な容器と交換した。

(3) 試験環境の測定機器

試験液の水温、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。

水温 : 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)により水温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 GD379 では、試験濃度について、(1)試験物質の最大耐用濃度(試験生物に対する毒性)、(2)試験物質の水溶解度(又は試験液を調製可能な最高濃度)、(3)10 mg/L、のうち、最も低い濃度を試験最高濃度に設定する、としている。

酢酸クロルマジノンの水溶解度については、実験値が 0.16 mg/L(3.95×10^{-7} mol/L)、モデルによる推定値が 2.2~25.0 mg/L(5.35×10^{-6} ~ 6.17×10^{-5} mol/L)、との既存知見が得られた。また、試験施設で実施した検討では、脱塩素水道水(試験用水)に過剰量の試験物質を添加し、48 時間かく拌後に遠心処理した試料中の酢酸クロルマジノン濃度は 0.93 ± 0.07 mg/L(n=3)であった。これらの知見から、酢酸クロルマジノンの水溶解度は、(3)10 mg/L より低いと判断し、本試験では、(1)試験物質の最大耐用濃度、又は(2)試験液を調製可能な最高濃度、のうち、最も低い濃度を試験最高濃度とすることにした。

酢酸クロルマジノンの最大耐用濃度に関して、試験生物(ミナミメダカ)を含む魚類に対する急性又は慢性毒性値等の既存知見は得られなかったため、試験施設において、ミナミメダカ成魚(受精後 98 日齢、全長 25 mm 前後)を用いた急性毒性試験を実施した。暴露濃度(設定濃度)は、160、320、640 及び 1,280 µg/L の 5 濃度、試験液を 24 時間ごとに全量交換する半止水方式により、試験生物(7 個体/濃度)を 96 時間暴露した。試験液は、助剤としてアセトニトリルを用いて調製し、酢酸クロルマジノン濃度は、液体クロマトグラフ質量分析計(LC-MS/MS)により、調製直後及び 24 時間経過後に採取した試料(n=2)で測定した。その結果、測定濃度の設定濃度に対する割合(回収率)は、調製直後の試験液で 51~80%、24 時間経過後の試験液で 43~70%であり、設定濃度が高い試験液で相対的に低い傾向にあり、助剤に溶解させて添加した試験物質の一部が添加後に試験液中に析出し、そのまま溶解しなかった可能性が示唆された。なお、調製直後及び 24 時間経過後の測定濃度から算出した平均測定濃度(時間加重平均)は、113、225、394 及び 657 µg/L であった(以下では、平均測定濃度に基づいて急性毒性試験の結果を示す)。

急性毒性試験の結果、暴露 96 時間後の累積死亡率は、113 及び 225 µg/L が 0%、394 µg/L が 57%、657 µg/L が 71%であり、それらを基に算出した 96 時間半数致死濃度(96h-LC₅₀)は 446 µg/L となった。657 µg/L では、暴露開始 1 時間後から過活発な遊泳など行動異常が観察され、8 時間後には全個体が横転(浮力喪失)し、24 時間後に最初の死亡(1 個体)が確認された。また、394 µg/L でも、暴露開始 2 時間後から過活発な遊泳など行動異常が観察され、24 時間後には全個体でバランス喪失など重篤な毒性症状

が観察された。この濃度では、暴露開始から 56 時間後に最初の死亡(2 個体)が確認された。225 µg/L では、暴露期間を通して重篤な毒性症状は観察されなかったが、遊泳中に体軀を”くの字状”に屈曲させる行動が観察された。この体軀の屈曲行動については、394 µg/L 及び 657 µg/L でも頻繁に観察されたことから、酢酸クロルマジノンの毒性によると考えられた。これらの結果から、酢酸クロルマジノンは、(2)試験液を調製可能な最高濃度、より低い濃度で試験生物に毒性影響を及ぼす、と判断し、本試験の最高濃度は、以下のとおり、(1)魚類に対する毒性を考慮して設定した。

試験物質の最大耐用濃度について、OECD GD379 では、暴露による急性の死亡率が 10%を超えない最高濃度と定義し、一般的には、 LC_{50} の 1/10 又は 1/3 に近い濃度が想定されるとしている。また、試験物質の一般毒性による成長抑制が、JMASA で重要な尻びれ鰭条における乳頭状小突起の発達を著しく遅延させる可能性があるとしている。本試験の最高濃度について、試験施設で実施した急性毒性試験における 96h- LC_{50} (446 µg/L) を考慮すると、その 1/3 相当の 149 µg/L 又は 1/10 相当の 45 µg/L が目安となる。また、成魚のミナメダカを試験生物とした急性毒性試験では、225 µg/L で酢酸クロルマジノンの毒性による行動異常が観察されており、JMASA は、暴露期間が 28 日間と長く、試験生物が稚魚期のミナメダカであることを考慮すると、96h- LC_{50} の 1/3 に近い濃度(149 µg/L)では、酢酸クロルマジノンの毒性による摂餌活動の低下などにより、試験生物の成長が低下する可能性が高いと考えられることから、96h- LC_{50} の 1/10 に近い濃度(45 µg/L)を試験最高濃度とすることが妥当と判断した。

本試験では、以上を勘案して、50 µg/L を最高濃度、公比を 3.2($\sqrt{10}$)とする以下の 3 濃度を試験濃度とした。

試験濃度(設定濃度): 5.00、16.0、50.0 µg/L

酢酸クロルマジノンは、平成 25 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:13/18、検出範囲:nd~0.76 ng/L(検出下限値は 0.033 ng/L))⁽⁷⁾、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(0.76 ng/L)の 65,789 倍に相当する。

5-6. 試験条件

試験条件は OECD GD379 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:	28 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： 11.2 mL/min(換水率:8 回/日)
試験生物
 生物種： ミナミメダカ (*Oryzias latipes*)
 齢： 受精後 41 日 齢(暴露開始時)
 全長： 16.6±0.8 mm(サブサンプル 12 個体の測定値)
供試生物数： 7 個体/容器(28 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

本試験で設定した最高濃度を考慮すると、流水式暴露での試験液の調製には、飽和に近い濃度の試験原液を用いることが望ましい。事前検討の結果、酢酸クロルマジノン水溶液の水溶解度が低く、助剤を使用しても、機械的かく拌など一般的な手法では飽和に近い濃度の水溶液を調製することは難しいと考えられたため、本試験では、以下に示すとおり、サチュレーター内で脱塩素水道水(希釈水)に酢酸クロルマジノンを継続的に溶解させた水溶液を分取し、試験原液として用いた。

十分量の酢酸クロルマジノン試薬(暴露期間を通しての全試験水槽への供給量の 10 倍相当の 1,600 mg)をアセトンに溶解し、付着担体(ポリエチレン製多孔フィルター、8 本)に均一になるように駒込ピペットで滴下した(担体 1 本当たりの酢酸クロルマジノン付着量は 200 mg)。担体は、気流下でアセトンを完全に蒸発除去して試薬を固着させた後、サチュレーター(40 L 容)にセットした。サチュレーターでは、槽内に所定流量で希釈水を注水しながら緩やかにかく拌することにより、飽和に近い濃度の酢酸クロルマジノン水溶液(試験原液)を連続的に調製した。サチュレーターは、試験開始の 72 時間前から稼働させ、槽内の酢酸クロルマジノン水溶液の濃度を安定させた。事前検討の結果、担体に十分量の酢酸クロルマジノン試薬を付着させた場合でも、サチュレーター内で連続的に調製される酢酸クロルマジノン水溶液の濃度は徐々に低下していくことが示唆されたため、本試験では、1 週間に 1 回、槽内の付着担体 2 本を新たに酢酸クロルマジノン試薬 200 mg を付着させたものと交換した。

本試験では、事前検討で調製した酢酸クロルマジノン水溶液の平均濃度(1,100 µg/L)を試験原液濃度と仮定して、各濃度の試験液を調製した。

(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ューターにより連続的に調製し、所定の流量で試験容器に供給した。

試験装置では、ケミカルポンプ(KX204-010、日本精密機器株式会社)により、サチュレーター内の試験原液が、ミニダイリューターの希釈混合槽の最上流のセルに 3.0 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 61 mL/min の流量で供給される希釈水と混合され、50.0 µg/L の試験液が連続的(64 mL/min)に調製された。この 50.0 µg/L の試験液の一部(45 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 つの試験容器にそれぞれ 11.2 mL/min の流量で供給された。分配槽に供給されなかった 50.0 µg/L の試験液(19 mL/min)は、希釈混合槽下流側のセル内で 42 mL/min の流量で供給される希釈水と混合、1/3.2 の濃度(16.0 µg/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 つの試験容器に 11.2 mL/min の流量で供給された。同様に分配されなかった 16.0 µg/L の試験液(16 mL/min)が希釈混合槽下流側のセル内で 35 mL/min の流量で供給される希釈水と混合され、調製された 5.00 µg/L の試験液が分配層を通して 4 つの試験容器に供給された。対照区の 4 つの試験容器には、それぞれ 11.2 mL/min の流量で希釈水のみが供給された。

試験原液、希釈水及び各試験容器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容器(4 容器/試験区)について、試験液の水温、溶存酸素濃度及び pH、対照区及び最高濃度の 1 容器について全硬度及びアルカリ度を測定して、試験環境に問題がないことを確認した。順化水槽から各試験容器に供試魚を無作為に 7 個体ずつ移し入れた。この時点暴露開始とした。

(2) 暴露期間中

暴露期間中は、各試験容器について、照明の点灯から約 2 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、全ての試験容器に同量の餌料を投与した。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 7 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、外見及び摂餌行動等についての異常)を観察した。死亡又は異常が観察された場合は記録し、死亡した個体がいいた場合には試験容器内から除去した。また、3 回目の給餌後に、残餌や糞等を除去した。

全ての試験容器について、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 28 日後に暴露を終了した。暴露終了日は無給餌とし、暴露期間中と同

様に、試験環境を測定した後、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

試験液中の試験物質(酢酸クロルマジノン)濃度は、暴露開始日(暴露0日後)、暴露7日後、14日後、21日後及び28日後に測定した。測定に供する試料(試験液)は、各測定日の最初の給餌前に採取した。対照区を含む全ての試験容器について、容器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、試料採取時に共洗いをした。試料は、各濃度区及び対照区について2つの試験容器から採取したものを等量混合して分析に供した。

上記の試料にアセトニトリルを添加して、50%アセトニトリル溶液に調製した分析試料の酢酸クロルマジノン濃度を、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酢酸クロルマジノン濃度の定量下限は0.044 µg/L、検出下限は0.017 µg/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. 生存個体の遺伝型判別及びエンドポイント等の測定

本試験では、エンドポイントとして、暴露終了時に生存した全個体を対象に二次性徴を測定した。また、試験物質の一般毒性による成長への影響(成長低下)を確認するため、暴露終了時に生存した全個体を対象に全長及び体重を測定した。

(1) 全長及び体重の測定

暴露終了時に、対照区、試験物質の低濃度区から高濃度区の順に、各試験容器からたも網を用いて生存する個体を取り上げた。取り上げた個体は、氷水に入れて麻酔し、動きが完全に止まった後体表面の水分をペーパータオルで拭き取り、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) 二次性徴

全長及び体重の測定後、実体顕微鏡に装着したデジタル撮影装置を用いて、鰭条が重ならないように拵げた状態で尻びれを撮影した。後日、尻びれの画像をモニターに映し、目視で乳頭状小突起が発現(形成)している鰭条の節板数を計数した。

(3) 遺伝型判別

尻びれの撮影後、遺伝型判別用試料とするため、解剖ばさみで尾ひれの一部を切除した。切除した試料(尾ひれ)は、直ちに1.5 mL マイクロチューブに入れ、-30℃に設定した冷凍庫に収容した。遺伝型判別用試料の採取後、適宜、開腹して生殖腺の形状から表現型を確認した。

暴露終了時に生存した全個体を対象として、以下の手順により、遺伝型判別用試料を用いて、DNAの抽出、PCR及び電気泳動を行い、性に関連する遺伝型(XY又はXX)を判別した。なお、本試験では、最初の遺伝型判別の結果から遺伝型XXと判断された個

体について、オスの表現型(尻びれ鰭条の乳頭状突起の発現、精巣様の生殖腺)を持つ個体がみられたため、これらの個体については、確認のために、初回と異なるプライマーセットを用いて、遺伝型の再判別を行った。

DNAの抽出

遺伝型判別用試料の DNA は、DNeasy Blood and Tissue Kit (QIAGEN N.V.)を用いて抽出した。抽出操作は、Kit 付属のプロトコルに準じた。Buffer AE (50 μ L) で溶出した DNA 試料は、PCR に供するまで、 -30°C に設定した冷凍庫内で保存した。

PCR(Polymerase Chain Reaction)

暴露終了時に生存した全個体について、遺伝型判別用試料から抽出した DNA を試料として、ミナメダカの *dmrt1* と *dmy* 遺伝子を増幅する、PG17.5(配列:5'-CCG GGT GCC CAA GTG CTC CCG CTG-3')及びPG17.6(5'-GAT CGT CCC TCC ACA GAG AAG AGA-3')プライマー、サーマルサイクラーは QuantStudio™ 5 PCR System (Applied Biosystems Inc.)を使用した。DNA 合成酵素 (DNA Polymerase) は TaKaRa Ex Taq® Hot Start Version (タカラバイオ株式会社)を使用し、 95°C :10 秒、 55°C :30 秒、 72°C :1 分のサイクルを 30 回繰り返し、標的 DNA 領域を増幅した。

遺伝型の再判別では、遺伝型判別用試料から抽出した DNA を試料として、*dmy* 及び *dmrt1* の第 2 エキソン上の DNA 領域を増幅する(Myosho *et.al*, 2019)、Dmy/Dmrt1-ex2f(配列:5'-GAC ATG AGC AAG GAG AAG CAG-3')及びDmy/Dmrt1-ex2r(配列:5'-AAG CGC TTG TGG CCT TTC-3')をプライマーとして、前述と同じ機器及び酵素を用いて、標的とする DNA 領域を増幅した。 95°C で 4 分間の熱変性の後、 95°C :30 秒、 65°C から 54°C まで 1 サイクルごとに 1°C 低下:30 秒及び 72°C :2 分のサイクルを 12 回繰り返し、さらに、 95°C :30 秒、 53°C :30 秒、 72°C :2 分のサイクルを 22 回繰り返し、標的 DNA 領域を増幅した。

電気泳動

PCR 産物 (PCR により増幅させた特定の DNA 領域)、2.0%アガロースゲルを用いて電気泳動した。泳動後、ゲルを SYBR® Green I (タカラバイオ株式会社)で染色し、トランスイルミネーター上で電気泳動像(蛍光染色されたバンド)を撮影した。

遺伝型の決定

PG17.5 及び PG17.6 並び Dmy/Dmrt1-ex2f 及び Dmy/Dmrt1-ex2r のプライマーセットは、*dmy* 及び *dmrt1* の DNA 領域が増幅されることから、電気泳動像に 2 本のバンド (PCR 産物)が確認できる個体の遺伝型は XY、確認できたバンドが 1 本のみの個体の遺伝型は XX と決定した。

5-11. データ解析

(1) 統計学的手法

二次性徴並びに全長及び体重の測定結果について、OECD GD379 ANNEX 6 に示さ

れたフローを参考に、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、遺伝型ごとに行い、有意水準(p)は0.05とした。

二次性徴については、単調性は認められるが、等分散性が認められなかったため、容器中央値を用いて、step-down Jonckheere-Terpstra test により検定した。全長及び体重については、容器平均値に等分散性が認められたため、容器平均値を用いて Dunnett test により検定した。

二次性徴の検定には StatCharrms ver.0.90.9(米国環境保護庁作成)、全長及び体重の検定には Excel 統計 ver.7.0(株式会社エスミ)を用いた。

(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 GD379 に規定される本試験の許容基準(Validity of the Test)は、以下のとおりである。

- the mean mortality in the water controls and, where relevant, in the solvent controls, should not exceed 10 per cent at the end of the exposure period;
- the concentrations of the test chemical in each test vessel is satisfactorily maintained within $\pm 20\%$ of the mean measured value in the treatment group;
- the dissolved oxygen concentration should be at least 60% of the air saturation value (ASV) in each test vessel throughout the exposure period;
- the water temperature should not differ by more than $\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ between test vessels at any one time during the exposure period and should be maintained within the temperature range specified;
- the number of males per tank should be at least one in at least three out of four replicates;

7. 結果

7-1. 試験物質の測定濃度

試験液中の酢酸クロルマジノン濃度の測定結果を表 7-1 に示す。

試験液中の酢酸クロルマジノンの平均測定濃度は、低濃度側から 6.14 ± 0.90 、 18.8 ± 2.1 及び 52.5 ± 3.1 $\mu\text{g/L}$ (平均 $\pm$ 標準偏差) であり、設定濃度 (5.00、16.0 及び 50.0 $\mu\text{g/L}$) に対する割合は 105~123%、測定濃度の変動係数 (測定日間のばらつき) は 14.7、11.3 及び 6.0% であった。また、全ての測定濃度は平均測定濃度の $\pm 20\%$ 以内であった。対照区については、試験液中の酢酸クロルマジノン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 (6.14 $\mu\text{g/L}$ 、18.8 $\mu\text{g/L}$ 及び 52.5 $\mu\text{g/L}$) に基づいて記載した。

表 7-1 試験液中の酢酸クロルマジノン濃度の測定結果

設定濃度 ($\mu\text{g/L}$)	測定濃度 ($\mu\text{g/L}$)						
	0日後	7日後	14日後	21日後	28日後	平均	標準偏差
対照区	ND	ND	ND	ND	ND	-	-
5.00	6.56 (131) 〈107〉	7.27 (145) 〈119〉	6.38 (128) 〈104〉	5.05 (101) 〈82〉	5.41 (108) 〈88〉	6.14 (123)	0.9 [14.7]
16.0	19.8 (124) 〈105〉	21.1 (132) 〈112〉	20.0 (125) 〈106〉	17.1 (107) 〈91〉	16.1 (100) 〈85〉	18.8 (118)	2.1 [11.3]
50.0	51.1 (102) 〈97〉	56.0 (112) 〈107〉	55.7 (111) 〈106〉	49.1 (98) 〈94〉	50.7 (101) 〈97〉	52.5 (105)	3.1 [6.0]

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

対照区及び酢酸クロルマジノン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。各試験容器での測定結果は付属資料 3 に示した。

試験液の水温は、暴露期間を通して $24.4 \sim 25.3^\circ\text{C}$ の範囲、同一日における試験容器間の水温差は 0.5°C 以下であり、OECD GD379 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 $6.8 \sim 8.5$ mg/L と飽和の 83% 以上を維持しており、OECD GD379 で規定された基準を満たしていた。また、試験開始時に測定した対照区及び酢酸クロルマジノン $52.5 \mu\text{g/L}$ (試験最高濃度) の試験液の全硬度は 62 mg/L (as CaCO_3)、アルカリ度は 42 mg/L (as CaCO_3) であった。その他、対照区及び酢酸クロルマジノンの各濃度の試験液の pH 及び照明等も暴露期間を通して適切に維持されていた。

以上のとおり、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 ($\mu\text{g/L}$)	水温 ($^{\circ}\text{C}$)	溶存酸素 (mg/L)	pH
対照区	24.5 - 25.3	7.0 - 8.4	7.7 - 7.8
6.14	24.4 - 25.2	7.1 - 8.5	7.6 - 7.8
18.8	24.4 - 25.1	7.3 - 8.5	7.6 - 7.8
52.5	24.5 - 25.3	6.8 - 8.5	7.6 - 7.8

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

対照区及び酢酸クロルマジノンの各濃度区における暴露終了時の累積死亡率を表 7-3 に示す。

対照区における暴露終了時の累積死亡率は 0%であり、OECD GD379 で規定された基準(対照区における死亡率が 10%を超えないこと)を満たした。また、対照区では、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。酢酸クロルマジノンの 6.14 及び 18.8 $\mu\text{g/L}$ では、暴露終了時の累積死亡率は 0%であった。また、暴露期間中に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。52.5 $\mu\text{g/L}$ では、暴露終了時の累積死亡率は 3.6%であった(暴露開始 26 日後に1個体死亡)であったが、暴露期間を通して摂餌活動の低下を含む行動異常及び外見異常が認められる個体は観察されなかった。したがって、本試験では、酢酸クロルマジノンの全濃度に関して、酢酸クロルマジノンの一般毒性によると推察される影響は認められなかった。

表 7-3 暴露終了時の累積死亡率及び生存個体の遺伝型

測定濃度 ($\mu\text{g/L}$)	供試 個体数	累積死亡 個体数	累積死亡率 (%)	遺伝型 XY : XX
対照区	28	0	0	16 : 12
6.14	28	0	0	17 : 11
18.8	28	0	0	13 : 15
52.5	28	1	3.6	15 : 12

暴露終了時に生存した個体の遺伝型は、表 7-3 に示すとおり、対照区及び酢酸クロルマジノンの全濃度の合計でみると、XY:XX=61:50(1.0:0.82)であった。試験容器ごとに見ると、遺伝型 XY は 2～6 個体/容器の範囲にあり、1 又は 0 個体の試験容器はなかった。したがって、本試験では、対照区及び酢酸クロルマジノンの各濃度における遺伝型 XY 個体に関して、OECD GD379 で規定された基準(4 連の試験容器のうちの 3 試験容器で、少なくともオス(遺伝型 XY)が1個体以上いること)を満たしていた。

ミナミメダカでは、遺伝型 XX 個体が発生初期に水温等の環境依存的に性転換するこ

とが知られていることから、遺伝型 XX と判別された個体について、表現型の性(尻びれにおける乳頭状小突起の発現及び生殖腺の形状)を調べた結果、対照区の 2 個体、酢酸クロルマジノンの 18.8 及び 52.5 µg/L の各 1 個体は、オスの表現型を有していた。これらの個体については、Dmy/Dmrt1-ex2f 及び Dmy/Dmrt1-ex2r のプライマーセットを用いた遺伝型の再判別でも XX と確認されたことから、環境依存的に性転換した個体と判断し、以下に示す二次性徴、全長及び体重の測定結果及びその解析(検定)には用いなかった。

7-4. 二次性徴

対照区及び酢酸クロルマジノン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鰭条の節板数(二次性徴)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 4 に示した。

遺伝型 XY 個体の二次性徴(乳頭状小突起を発現している尻びれ鰭条の節板数)には、酢酸クロルマジノン濃度に依存する明確な低下(減少)がみられた。検定の結果、18.8 µg/L 及び 52.5 µg/L に関して、対照区と比較して統計学的な有意差(有意な低値)が認められた。酢酸クロルマジノンの 52.5 µg/L では、15 個体の遺伝型 XY のうち 10 個体の尻びれで乳頭状小突起がまったく発現していなかった。遺伝型 XX 個体については、対照区及び酢酸クロルマジノンの全濃度において、二次性徴が発現している個体はみられなかった(環境依存的に性転換したと判断した個体は除く)。

表 7-4 暴露終了時の生存個体における二次性徴

測定濃度 (µg/L)	二次性徴 (乳頭状突起が発現する節板数)	
	遺伝型XY	遺伝型XX
対照区	117 ± 8.8	0 ± 0
6.14	113 ± 6.9	0 ± 0
18.8	75 ± 23 (*)	0 ± 0
52.5	3.5 ± 4.4 (*)	0 ± 0

注) データは容器平均±標準偏差を示す。

(*)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. 全長及び体重

対照区及び酢酸クロルマジノン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 7-5 及び図 7-5 に示す。各個体の測定結果は付属資料 4 に示した。

遺伝型 XY 個体では、全長及び体重に関して、酢酸クロルマジノン濃度に依存して増加する傾向がみられた。検定の結果、全長では 52.5 µg/L、体重では 18.8 µg/L 及び 52.5 µg/L に関して、対照区との間に有意差(有意な高値)が認められた。遺伝型 XX 個体では、全長及び体重に関して、酢酸クロルマジノンの全濃度と対照区との間に統計学的な有意差は認められなかった。

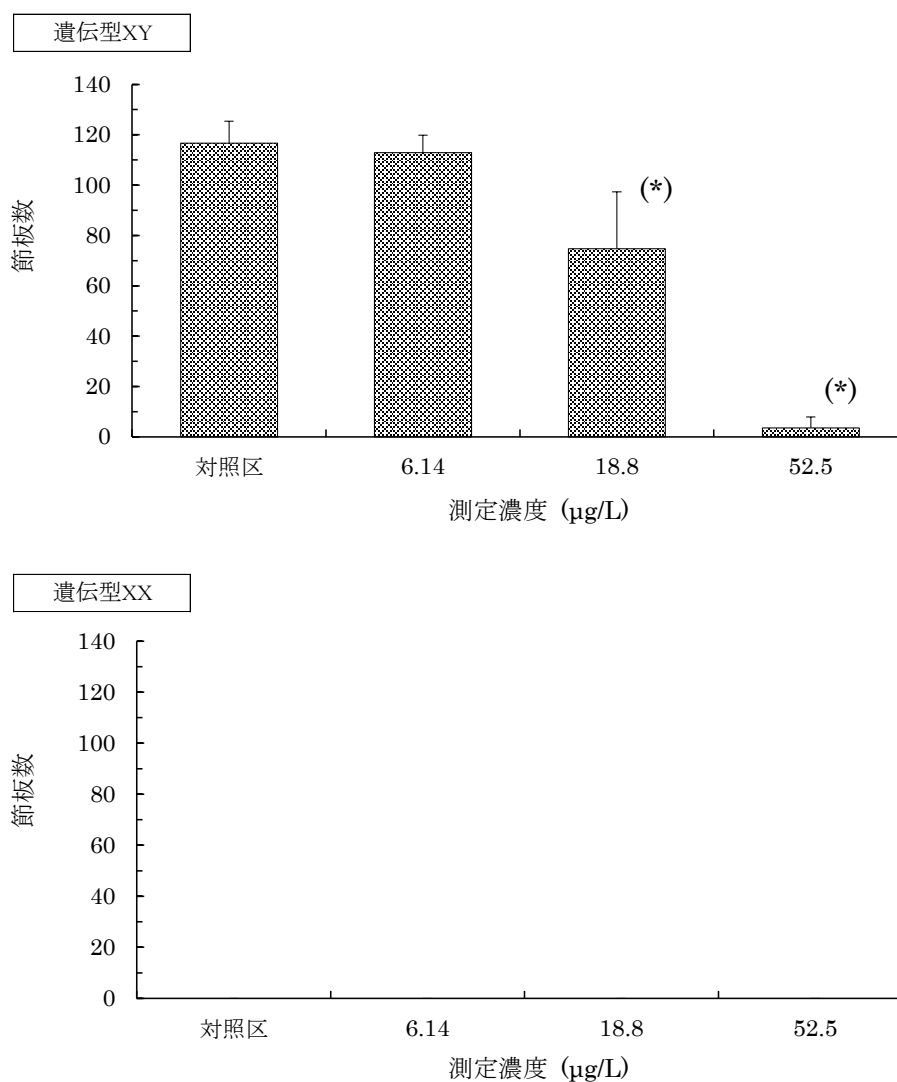


図 7-4 暴露終了時の生存個体における二次性徴
(乳頭状小突起を発現する尻びれ鰭条の節板数)

注) グラフは容器平均±標準偏差を示す。

(*)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。

表 7-5 暴露終了時の生存個体における全長及び体重

測定濃度 (µg/L)	全長 (mm)		体重 (mg)	
	遺伝型XY	遺伝型XX	遺伝型XY	遺伝型XX
対照区	29.9 ± 0.4	31.1 ± 0.2	277 ± 10	377 ± 17
6.14	30.2 ± 0.7	31.2 ± 0.9	287 ± 16	384 ± 18
18.8	30.8 ± 0.4	30.8 ± 0.5	306 ± 18 (*)	361 ± 10
52.5	31.0 ± 0.3 (*)	31.1 ± 0.8	326 ± 6.6 (*)	366 ± 23

注) データは容器平均±標準偏差を示す。

(*)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。

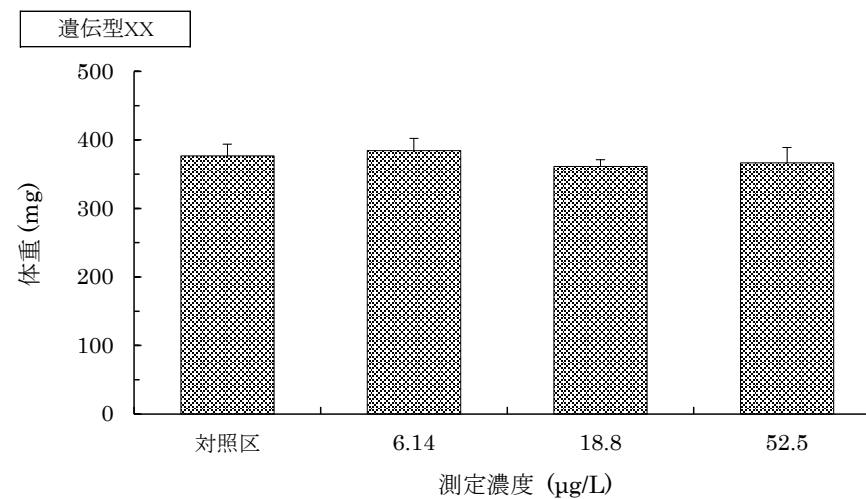
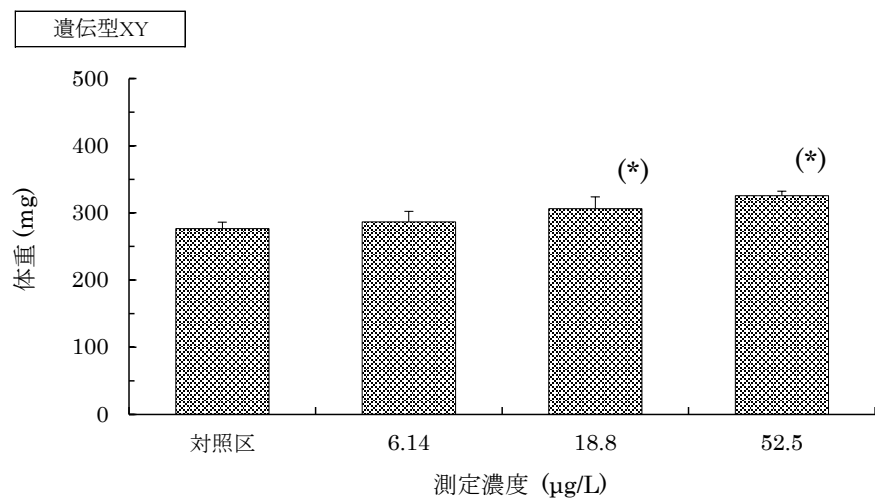
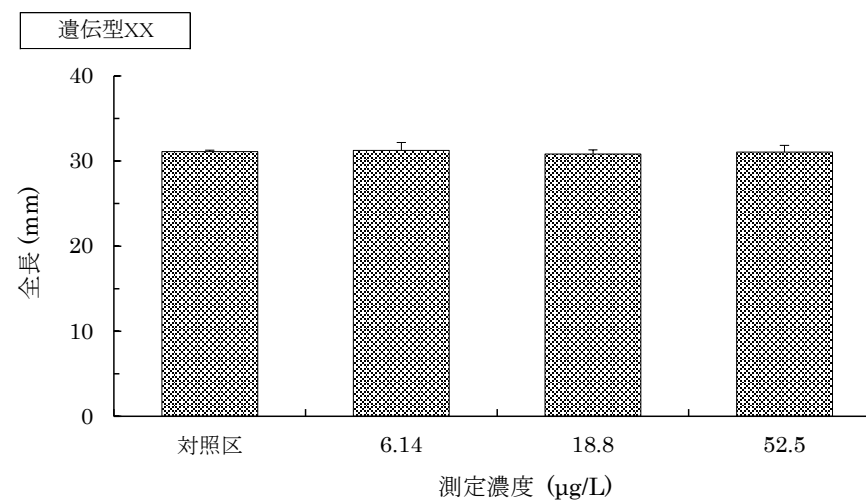
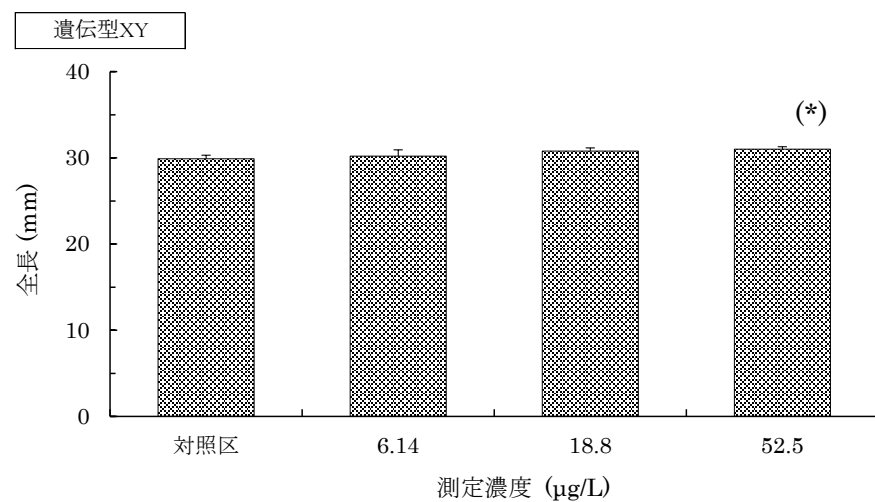


図 7-5 暴露終了時の生存個体における全長(上図)及び体重(下図)

注) グラフは容器平均±標準偏差を示す。(*)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. 試験物質の試験生物に対する抗アンドロゲン作用

対照区及び酢酸クロルマジノンの各濃度に関して、遺伝型 XY の個体における全長と二次性徴の関係を図 8-1 に示す。

対照区及び酢酸クロルマジノンの各濃度に関して、遺伝型 XY 個体の全長と二次性徴の間に明確な傾向はみられなかった。また、本試験では、遺伝型 XY 個体の体重に関して、酢酸クロルマジノンの 18.8 µg/L 及び 52.5 µg/L では対照区と比較して有意な増加(高値)が認められた。OECD GD379 では、試験物質の毒性による成長への影響(成長低下)が明らかな場合には、二次性徴の測定結果の解釈にあたり考慮を必要とする場合があると指摘している。本試験では、酢酸クロルマジノンの 18.8 µg/L 及び 52.5 µg/L では、暴露期間中の成長に有意な低下は認められなかったことから、この暴露濃度における二次性徴の有意な低下は、酢酸クロルマジノンの一般毒性の影響ではなく、抗アンドロゲン作用によって引き起こされたと考えられる。

以上のとおり、本試験の結果から、酢酸クロルマジノンは、幼若期のミナミメダカに対して抗アンドロゲン作用を有すると結論される。

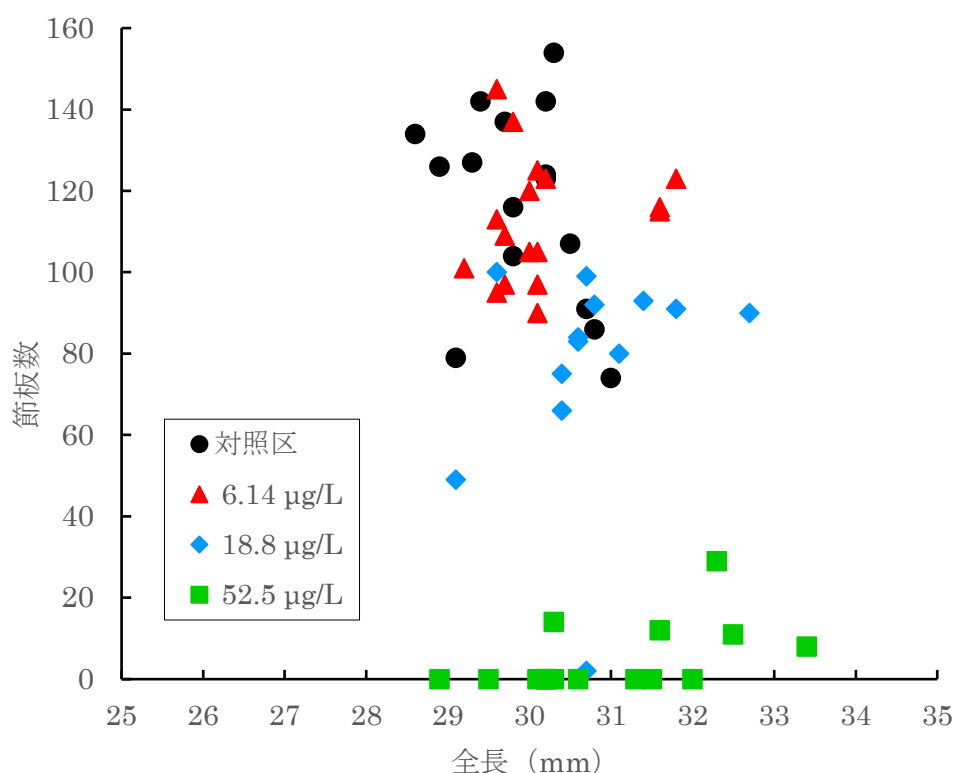


図 8-1 遺伝型 XY の個体における全長と二次性徴の関係

8-2 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酢酸クロルマジノンの試験生物(幼若期のミナミメダカ)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 に取りまとめた。

本試験の結果から得られた酢酸クロルマジノンの幼若期のミナミメダカの二次性徴に対する LOEC 及び NOEC は、遺伝的 XY 個体では 18.8 µg/L 及び 6.14 µg/L、遺伝的 XX 個体では、LOEC は得られず、NOEC が 52.5 µg/L であった。また、遺伝的 XY 個体の全長及び体重に対する LOEC として、52.5 µg/L 及び 18.8 µg/L (NOEC は 18.8 µg/L 及び 6.14 µg/L) が得られた。

表 8-1 酢酸クロルマジノンの幼若期のミナミメダカに対する LOEC 及び NOEC

エンドポイント		LOEC (µg/L)		NOEC (µg/L)
死亡		—	ND	52.5
二次性徴	遺伝型XY	↓	18.8	6.14
	遺伝型XX	—	ND	52.5
全長	遺伝型XY	↑	52.5	18.8
	遺伝型XX	—	ND	52.5
体重	遺伝型XY	↑	18.8	6.14
	遺伝型XX	—	ND	52.5
測定濃度 (µg/L)		6.14、18.8、52.5		

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

9. 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 7 年度第 2 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 8 年 3 月 11 日 (水)

10. 引用文献

- (1) 酢酸クロルマジノン (CAS no. 302-22-7) 文献信頼性評価結果
<https://www.env.go.jp/content/000044125.pdf>
- (2) いであ株式会社 (2016) : 平成 28 年度化学物質の内分泌かく乱作用に関する試験管内試験実施業務. 報告書
- (3) いであ株式会社 (2017) : 平成 29 年度化学物質の内分泌かく乱作用に関する試験管内試験 (フルタミド他 29 物質) 実施業務. 報告書
- (4) いであ株式会社 (2018) : 平成 30 年度化学物質の内分泌かく乱作用に関する試験管内試験 (メフェナム酸他 25 物質) 実施業務. 報告書
- (5) United States Environmental Protection Agency: CompTox Chemicals Dashboard v2.5.1, Chlormadinone acetate
<https://comptox.epa.gov/dashboard/chemical/details/DTXSID6020274>
- (6) OECD (2023) : OECD Environment, Health and Safety Publications – Series on Testing & Assessment No. 379 Guidance Document on a Juvenile Medaka anti-androgen screening assay (JMASA)
[https://one.oecd.org/document/ENV/CBC/MONO\(2023\)15/en/pdf](https://one.oecd.org/document/ENV/CBC/MONO(2023)15/en/pdf)
- (7) 平成 25 元年度化学物質環境実態調査結果」別表 平成 25 年度初期環境調査分析機関報告データ(水質)
https://www.env.go.jp/chemi/kurohon/2014/sokutei/pdf/01_01_01-2.pdf
- (8) Myosho T., Sato T., Nishiyama H., Watanabe A., Yamamoto J., Okamura T., Onishi Y., Fujimaki R., Hamaguchi S., Sakaizumi M., Kobayashi T. (2019): Inter- and intra-specific variation in sex hormone-induced sex-reversal in medaka, *Oryzias latipes* and *Oryzias sakaizumii*, Zoological Science, 36, 425-431.

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 (23.8 °C)	Total mercury	<0.0005
Electric conductivity	17.6 (mS/m)	PCB	<0.0005
Free chlorine	<0.01	Thiuram	<0.0006
Beryllium	<0.00001	Simazine	<0.0001
Aluminium	<0.005	Thiobencarb	<0.0001
Vanadium	0.0002	Fluorine	<0.04
Chromium	0.0001	Sodium	8.2
Iron	<0.003	Potassium	1.1
Manganese	<0.0002	Calcium	21
Nickel	0.0004	Magnesium	2.1
Copper	0.0076	Bromide	<0.1
Zinc	0.0047	1,2-Dichloropropane	<0.0002
Arsenic	0.0002	Isoxathion	<0.0001
Selenium	0.0003	Diazinon	<0.0001
Molybdenum	0.0004	Propyzamide	<0.0001
Cadmium	<0.00001	Fenitrothion	<0.0001
Tin	<0.0001	Isoprothiolane	<0.0001
Antimony	<0.0001	Oxine-copper	<0.001
Lead	<0.0001	Chlorothalonil	<0.0001
COD Mn	<0.5	EPN	<0.0001
Sulfide	<0.1	Dichlorvos	<0.0001
TOC	<0.1	Fenobucarb	<0.0001
Evaporated residue	100	Iprobenfos	<0.0001
Total ammonium	<0.01	Cholornitrofen	<0.0001
T-P	0.003	Alkalinity (as CaCO ₃)	35
Cyanide	<0.01	Total hardness (as CaCO ₃)	61

Date of measurement: May 28th, 2025

付属資料 2 酢酸クロルマジノン分析の条件

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 $\times$ 50 mm, 粒径 1.7 μ m)
移動相	: A: 水(0.1%ギ酸) B: アセトニトリル
流量	: 0.2 mL/min
グラジエント	: B(%)= 40 (0 min)- 99(10-13 min) -10(13.1-18 min)
カラム温度	: 40°C
注入量	: 10 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	: 酢酸クロルマジノン: 405.3 $\rightarrow$ 309.2, 267.2 (m/z)

付属資料 3 試験液の水温及び水質測定結果

暴露日	水温 (°C)															
	対照区				6.14 µg/L				18.8 µg/L				52.5 µg/L			
	容器1	容器2	容器3	容器4	容器1	容器2	容器3	容器4	容器1	容器2	容器3	容器4	容器1	容器2	容器3	容器4
0	24.9	24.9	24.9	24.9	24.9	24.8	24.8	24.8	24.7	24.7	24.7	24.7	24.8	24.7	24.8	24.8
1	25.2	25.2	25.2	25.3	25.2	25.1	25.1	25.1	25.1	25.0	25.0	25.1	25.2	25.2	25.2	25.3
2	25.3	25.3	25.3	25.3	25.1	25.0	25.0	25.1	25.1	25.0	25.0	25.0	25.2	25.2	25.2	25.2
3	25.2	25.2	25.2	25.3	25.0	24.9	24.9	24.9	24.8	24.8	24.8	24.8	24.9	24.9	24.9	25.0
4	25.3	25.3	25.3	25.3	25.0	25.0	25.0	25.0	25.0	25.0	25.0	25.0	25.1	25.1	25.1	25.1
5	25.1	25.0	25.0	25.1	25.0	25.0	24.9	24.9	24.8	24.8	24.9	24.9	25.0	25.0	25.0	25.0
6	25.2	25.2	25.3	25.3	25.1	25.1	25.0	25.0	25.0	25.0	25.0	25.0	25.0	25.0	25.0	25.1
7	25.3	25.3	25.3	25.3	25.1	25.0	25.0	25.0	25.0	25.0	25.0	25.0	25.0	25.0	25.1	25.1
8	25.2	25.2	25.2	25.2	25.0	25.0	24.9	24.9	24.9	24.8	24.8	24.9	25.0	25.0	25.0	25.0
9	25.1	25.1	25.1	25.2	25.0	25.0	25.0	25.0	24.9	24.9	24.9	24.9	25.0	25.0	25.1	25.1
10	25.0	24.9	24.9	24.9	24.8	24.8	24.8	24.8	24.8	24.7	24.8	24.8	24.8	24.9	24.9	24.9
11	24.9	24.9	24.9	25.0	24.8	24.8	24.7	24.8	24.9	24.7	24.7	24.8	25.0	25.0	24.9	25.0
12	25.0	25.0	25.0	25.0	24.9	24.9	24.9	24.9	24.9	24.8	24.9	24.9	25.1	25.1	25.1	25.2
13	25.3	25.2	25.2	25.2	25.1	25.0	25.0	25.0	25.0	25.0	24.9	25.0	25.0	25.0	25.0	25.0
14	25.2	25.1	25.1	25.2	25.0	24.9	24.9	24.9	24.9	24.9	24.8	24.9	24.9	25.0	25.0	25.1
15	24.8	24.7	24.7	24.7	24.5	24.5	24.5	24.5	24.5	24.5	24.5	24.5	24.5	24.5	24.5	24.5
16	24.5	24.5	24.6	24.6	24.5	24.5	24.4	24.5	24.4	24.4	24.4	24.5	24.6	24.6	24.6	24.7
17	24.6	24.5	24.5	24.6	24.5	24.5	24.5	24.5	24.4	24.4	24.4	24.5	24.5	24.5	24.5	24.6
18	24.7	24.7	24.6	24.6	24.6	24.5	24.5	24.5	24.6	24.6	24.6	24.6	24.7	24.6	24.6	24.6
19	25.1	25.1	25.1	25.1	24.9	24.8	24.8	24.8	24.8	24.8	24.8	24.8	24.9	24.9	24.9	24.9
20	25.0	25.0	25.0	25.0	24.9	24.8	24.8	24.8	24.9	24.8	24.8	24.8	24.9	24.8	24.8	24.9
21	25.0	25.0	25.0	25.0	24.9	24.8	24.8	24.8	24.9	24.8	24.8	24.8	24.9	24.8	24.8	24.9
22	25.0	24.9	25.0	25.0	24.9	24.9	24.9	24.9	24.9	24.9	24.9	24.9	24.9	24.9	24.9	24.9
23	25.0	24.9	24.9	25.0	24.8	24.8	24.8	24.8	24.8	24.8	24.8	24.8	24.8	24.8	24.8	24.9
24	24.8	24.7	24.7	24.8	24.8	24.7	24.7	24.7	24.8	24.7	24.7	24.8	24.8	24.8	24.8	24.8
25	24.8	24.7	24.7	24.7	24.7	24.7	24.7	24.7	24.7	24.7	24.6	24.7	24.8	24.8	24.8	24.8
26	24.8	24.7	24.7	24.7	24.8	24.8	24.8	24.8	24.8	24.8	24.8	24.8	24.9	25.0	25.0	25.0
27	24.7	24.7	24.7	24.7	24.7	24.7	24.6	24.6	24.6	24.6	24.6	24.6	24.6	24.6	24.6	24.7
28	24.7	24.7	24.7	24.7	24.5	24.5	24.5	24.5	24.5	24.5	24.5	24.5	24.6	24.6	24.6	24.6

付属資料 3(つづき)

暴露日	pH															
	対照区				6.14 µg/L				18.8 µg/L				52.5 µg/L			
	容器1	容器2	容器3	容器4	容器1	容器2	容器3	容器4	容器1	容器2	容器3	容器4	容器1	容器2	容器3	容器4
0	7.8	7.8	7.8	7.8	7.8	7.8	7.8	7.8	7.8	7.8	7.8	7.8	7.8	7.8	7.8	7.8
5	7.8	7.8	7.8	7.8	7.8	7.8	7.8	7.8	7.8	7.8	7.8	7.8	7.8	7.8	7.8	7.8
8	7.8	7.8	7.7	7.8	7.7	7.7	7.7	7.7	7.7	7.7	7.7	7.7	7.7	7.7	7.7	7.7
12	7.7	7.7	7.7	7.7	7.7	7.7	7.7	7.7	7.7	7.7	7.7	7.7	7.7	7.7	7.7	7.7
15	7.7	7.7	7.7	7.7	7.7	7.7	7.7	7.7	7.7	7.7	7.7	7.7	7.7	7.7	7.7	7.7
19	7.7	7.7	7.7	7.7	7.7	7.7	7.7	7.7	7.7	7.7	7.7	7.7	7.7	7.7	7.7	7.7
22	7.7	7.7	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
26	7.7	7.7	7.7	7.7	7.7	7.7	7.7	7.7	7.7	7.7	7.7	7.7	7.7	7.7	7.7	7.7

暴露日	溶存酸素 (mg/L)															
	対照区				6.14 µg/L				18.8 µg/L				52.5 µg/L			
	容器1	容器2	容器3	容器4	容器1	容器2	容器3	容器4	容器1	容器2	容器3	容器4	容器1	容器2	容器3	容器4
0	8.4	8.4	8.4	8.4	8.5	8.5	8.5	8.5	8.5	8.5	8.5	8.5	8.5	8.5	8.5	8.5
5	8.1	8.1	8.0	8.0	8.0	8.0	8.1	8.1	8.1	8.1	8.1	8.1	8.1	8.0	8.0	8.0
8	7.7	7.7	7.6	7.8	7.6	7.6	7.6	7.8	7.9	7.8	7.8	7.7	7.9	7.8	7.8	7.7
12	7.8	7.7	7.6	7.5	7.5	7.5	7.4	7.4	7.5	7.5	7.4	7.4	7.4	7.4	7.3	7.4
15	7.4	7.5	7.6	7.5	7.6	7.6	7.6	7.6	7.7	7.7	7.6	7.6	7.5	7.4	7.4	7.4
19	7.4	7.4	7.4	7.3	7.3	7.3	7.3	7.3	7.3	7.3	7.4	7.3	7.3	7.3	7.3	7.3
22	7.0	7.2	7.3	7.2	7.2	7.2	7.1	7.4	7.5	7.5	7.4	7.3	7.3	7.4	7.1	7.2
26	7.1	7.2	7.3	7.3	7.2	7.2	7.1	7.1	7.3	7.3	7.3	7.3	7.2	7.2	7.2	6.8

付属資料 4 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 (µg/L)	遺伝型	試験 容器	個体 番号	全長 (mm)	体長 (mm)	体重 (mg)	二次性徴 (節板数)
対照区	XY	1	01	30.3	24.6	291	154
			02	30.5	25.5	281	107
			04	31.0	25.6	304	74
			07	29.7	24.3	252	137
		2	03	29.8	24.3	279	104
			04	29.4	24.0	256	142
			06	28.6	23.3	242	134
			07	29.8	24.2	278	116
		3	01	30.8	25.1	308	86
			03	30.2	25.4	297	124
			05	29.1	23.6	263	79
			07	29.3	24.3	236	127
		4	01	30.7	25.9	311	91
			03	30.2	24.6	281	123
			05	30.2	24.9	289	142
			07	28.9	23.7	260	126
		1	平均	30.4	25.0	282	118
		2	平均	29.4	24.0	264	124
		3	平均	29.9	24.6	276	104
		4	平均	30.0	24.8	285	121
	XX	1	03	31.0	25.4	364	0
			05	30.7	25.4	274	125
			06	31.6	25.8	344	0
		2	01	30.4	24.4	362	0
			02	31.4	25.8	288	136
			05	31.4	26.2	406	0
		3	02	31.6	26.6	390	0
			04	30.7	25.7	395	0
			06	31.1	25.8	399	0
		4	02	31.0	25.3	345	0
			04	29.7	24.5	318	0
			06	32.5	26.9	460	0
		1	平均	31.3	25.6	354	0
		2	平均	30.9	25.3	384	0
		3	平均	31.1	26.0	395	0
		4	平均	31.1	25.6	374	0

注) 遺伝型 XX 個体の試験容器-1 及び試験容器-2 の容器平均値については、性に関わる表現型から環境依存的な性転換個体と判別された個体（試験容器-1 の 05 及び試験容器-2 の 02）を除いて算出した。

付属資料 4(つづき)

測定濃度 ($\mu\text{g/L}$)	遺伝型	試験 容器	個体 番号	全長 (mm)	体長 (mm)	体重 (mg)	二次性徴 (節板数)
6.14	XY	1	01	29.6	24.1	269	113
			03	29.6	24.8	289	145
			05	30.2	24.6	300	123
			07	29.7	24.8	289	109
		2	02	29.2	23.3	286	101
			04	30.0	24.5	262	120
			05	29.8	24.3	287	137
			06	29.6	24.7	272	95
			07	29.7	24.7	247	97
		3	02	30.1	25.1	266	105
			04	30.0	24.1	266	105
			06	30.1	24.7	295	90
			07	30.1	25.3	298	125
		4	02	31.6	25.5	266	116
			04	31.6	25.4	322	115
			06	30.1	24.7	302	97
			07	31.8	26.0	342	123
		1	平均	29.8	24.6	287	123
		2	平均	29.7	24.3	271	110
		3	平均	30.1	24.8	281	106
		4	平均	31.3	25.4	308	113
	XX	1	02	30.9	25.8	369	0
			04	30.9	25.5	381	0
			06	30.6	24.9	388	0
		2	01	34.1	28.9	467	0
			03	31.2	25.9	351	0
		3	01	32.9	26.9	443	0
			03	30.7	25.6	400	0
			05	29.1	23.9	305	0
		4	01	30.8	25.6	359	0
			03	31.4	26.0	374	0
			05	29.7	24.3	365	0
		1	平均	30.8	25.4	379	0
		2	平均	32.7	27.4	409	0
		3	平均	30.9	25.5	383	0
		4	平均	30.6	25.3	366	0

付属資料 4(つづき)

測定濃度 ($\mu\text{g/L}$)	遺伝型	試験 容器	個体 番号	全長 (mm)	体長 (mm)	体重 (mg)	二次性徴 (節板数)
18.8	XY	1	02	31.8	25.3	307	91
			04	30.7	25.0	282	99
		2	01	30.7	25.1	362	2
			02	30.6	24.9	300	83
		3	02	29.6	23.2	275	100
			04	30.4	24.3	314	66
			05	31.1	24.7	277	80
			06	30.6	24.8	305	84
			07	32.7	26.6	356	90
		4	02	30.8	24.4	318	92
			04	30.4	24.6	286	75
			06	29.1	22.7	258	49
			07	31.4	25.9	313	93
		1	平均	31.3	24.4	313	62
		2	平均	30.7	24.5	296	73
		3	平均	30.9	25.3	327	89
		4	平均	30.4	24.4	286	72
	XX	1	01	31.3	25.8	352	0
			03	30.2	24.6	400	0
			05	30.6	24.8	359	0
			06	30.0	25.1	315	0
			07	29.6	23.4	315	0
		2	03	31.0	26.0	350	0
			04	29.8	24.0	294	85
			05	30.7	25.0	371	0
			06	31.4	26.3	386	0
			07	29.4	24.6	352	0
		3	01	31.8	26.8	369	0
			03	31.0	25.6	353	0
		4	01	30.8	25.7	334	0
			03	31.1	26.1	397	0
			05	31.0	25.6	383	0
		1	平均	30.3	24.7	348	0
		2	平均	30.6	25.5	365	0
		3	平均	31.4	26.2	361	0
		4	平均	31.0	25.8	371	0

注) 遺伝型 XX 個体の試験容器-2 の容器平均値については、性に関わる表現型から環境依存的な性転換個体と判別された個体(試験容器-2 の 04)を除いて算出した。

付属資料 4(つづき)

測定濃度 (µg/L)	遺伝型	試験 容器	個体 番号	全長 (mm)	体長 (mm)	体重 (mg)	二次性徴 (節板数)
52.5	XY	1	01	30.2	24.6	306	0
			02	30.1	25.4	362	0
			03	32.3	26.5	316	29
			04	28.9	23.8	300	0
			05	32.5	26.2	368	11
			07	30.3	24.7	335	14
		2	04	31.5	26.1	345	0
			05	30.2	25.3	305	0
		3	02	31.6	26.0	329	12
			05	29.5	24.0	296	0
			06	33.4	27.5	388	8
			07	30.6	24.5	306	0
		4	02	32.0	25.5	349	0
			04	31.3	26.0	334	0
			06	30.3	25.1	267	0
		1	平均	30.7	25.2	331	9
		2	平均	30.9	25.7	325	0
		3	平均	31.3	25.5	330	5
		4	平均	31.2	25.5	317	0
	XX	1	06	32.0	26.5	387	0
		2	01	31.0	25.6	356	0
			02	32.5	26.7	359	38
			03	30.4	24.8	348	0
			06	29.9	24.3	308	0
			07	29.3	24.5	331	0
		3	01	30.5	25.5	375	0
			03	30.0	24.4	395	0
			04	31.8	25.9	321	0
		4	01	30.8	26.0	359	0
			03	32.6	27.1	426	0
			05	30.5	26.0	351	0
		1	平均	32.0	26.5	387	0
		2	平均	30.2	24.8	336	0
		3	平均	30.8	25.3	363	0
		4	平均	31.3	26.4	379	0

注) 遺伝型 XX 個体の試験容器-2 の容器平均値については、性に関わる表現型から環境依存
的な性転換個体と判別された個体 (試験容器-2 の 02) を除いて算出した。