

環境省請負業務

令和7年度

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
(魚類短期繁殖試験、
ベンジルパラベン (別名: 4-ヒドロキシ安息香酸ベンジル))
実施業務

報告書

令和8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 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（魚類短期繁殖試験、ベンジルパラベン（別名：4-ヒドロキシ安息香酸ベンジル））実施業務報告である。

令和 8 年 3 月

株式会社三菱ケミカルリサーチ

化学物質名

ベンジルパラベン（別名：4-ヒドロキシ安息香酸ベンジル）

SUMMARY

The study of Benzylparaben (also known as Benzyl 4-hydroxybenzoate) was conducted in accordance with the OECD Guidelines for the Testing of Chemicals 229 “Fish Short Term Reproduction Assay”. The study was conducted at nominal concentrations of 0.0063, 0.025, and 0.10 mg/L (mean measured concentrations: 0.00566, 0.0227, and 0.0882 mg/L). No statistically significant differences were observed in the total number of eggs produced, the total number of fertile eggs, fertility, mortality, wet weight, gonadosomatic index (GSI) in females, and secondary sexual characteristics (number of plates with papillary processes) in any treatment group compared with the control group (combined control and solvent control) or the solvent control.

Statistically significant differences were observed in the hepatosomatic index (HSI) in males at all treatment groups, in the HSI in females at 0.025 and 0.10 mg/L, and in the GSI in males at 0.10 mg/L compared with the control group.

From the above results, the LOECs were determined to be >0.10 mg/L and the NOECs were determined to be ≥ 0.10 mg/L for the endpoints related to reproduction and endocrine disruption.

Within the concentration range tested, no statistically significant differences were observed in endpoints related to reproduction and endocrine disruption at any concentration compared with the control group. Therefore, the results of this study provide no evidence of estrogenic, anti-estrogenic or androgenic activity of Benzylparaben under the conditions of this assay.

要 旨

I. 業務名

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（魚類短期繁殖試験、ベンジルパラベン（別名：4-ヒドロキシ安息香酸ベンジル））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いるところであり、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採用している。

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き、内分泌かく乱作用に関する評価等に必要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ベンジルパラベン（別名：4-ヒドロキシ安息香酸ベンジル）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ものである。

III. 魚類短期繁殖試験の実施

ベンジルパラベン（別名：4-ヒドロキシ安息香酸ベンジル）（CAS No. 94-18-8）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ミナミ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、ばく露終了時の肝臓中ビテロジェニン濃度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：ミナミメダカ（*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：0.0063、0.025、0.10 mg/L（公比；4））

試験液量：約 1.8 L／容器（換水率；約 44 回／日、流量；55 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±2℃

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、ベンジルパラベンについて、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 0.0063、0.025 および 0.10 mg/L であり、ばく露期間中の平均測定濃度はそれぞれ 0.00566、0.0227 および 0.882 mg/L であった。0.10 mg/L 区において、総産卵数、受精卵数、受精率に低値となる傾向が認められたが、全ての濃度区で総産卵数、受精卵数、受精率、死亡率、全長、湿重量、メスの生殖腺体指数、オスの二次性徴指標（乳頭状小突起を有する節板数）、肝臓中ビテロジェニン濃度に対照群（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。

肝臓体指数については、オスはすべての濃度区、メスは 0.025 mg/L 区および 0.10 mg/L 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た。また、オスの生殖腺体指数について、0.10 mg/L 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た。

本試験の試験濃度範囲においては、繁殖および内分泌かく乱作用に関わるエンドポイントについて統計学的に有意な差は認められず、ベンジルパラベンによるエストロゲン作用、抗エストロゲン作用、アンドロゲン作用は確認されなかった。

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ベンジルパラベン（別名：4-ヒドロキシ安息香酸ベンジル）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) ベンジルパラベンの魚類短期繁殖試験の実施

OECD TG229 に準拠して、ベンジルパラベ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. ベンジルパラベン（別名：4-ヒドロキシ安息香酸ベンジル）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

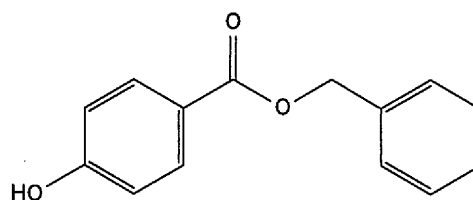
使用した被験物質の名称、物理化学的性状等を以下に示す。

CAS 登録番号：94-18-8

和 名：ベンジルパラベン（別名：4-ヒドロキシ安息香酸ベンジル）

英 名：Benzylparaben (別名：4-Hydroxy benzoic acid benzyl ester)

構造式：



分子式：C₁₄H₁₂O₃

分子量：228.25

入手先：東京化成工業株式会社

Lot 番号：6S3WE

純 度：99.8%

外 観：白色結晶

対水溶解度：53 mg/L（弊社測定値）

2.1.2 試験生物

(1) 供試生物種

一般名：ミナミメダカ（以下、メダカという）

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個体を使用した。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 10 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：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

以下の情報を元に試験濃度を決定した。

- ・簡易フラスコ法（24℃、48 時間）により、水溶解度を測定したところ、53 mg/L であった。
- ・既報にて、ベンジルパラベンのメダカに対する 96 時間半数致死濃度は 0.73 mg/L であった³⁾。また、予備検討において設定濃度 0.10 mg/L および 1.0 mg/L（流水式）にてメダカ成魚 8 尾を 15 日間ばく露したところ、0.10 mg/L では死亡などの毒性影響は認められなかったが、1.0 mg/L では全ての魚に対して死亡などの毒性影響が認められた。
- ・以上より、メダカに対する 96 時間半数致死濃度の 0.73 mg/L の約 1/7 であり、予備検討において毒性影響が認められなかった 0.10 mg/L を最高濃度として、0.0063 mg/L、0.025 mg/L、0.10 mg/L（公比 4）に設定した。

(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

試験用水：脱塩素水道水

ばく露方式：流水式（換水率 約 44 回／日、流量 55 mL/min）

ばく露期間：21 日間（2026 年 1 月 19 日～2026 年 2 月 9 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 0.0063、0.025 および 0.10 mg/L（公比；4）

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：16 週齢

供試魚体重：オス 0.264 ± 0.043 g、メス 0.360 ± 0.034 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℃

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-43X 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、156、625 および 2500 mg/L の原液を 19 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 29 日間安定であった。

(7) 被験物質の濃度測定

高速液体クロマトグラフ質量分析 (LC-MS/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：

アセトニトリル (HPLC 用、富士フイルム和光純薬株式会社製)

エタノール (特級、キシダ科学製)

DMF (富士フイルム和光純薬工業製)

超純水 (JIS K0557 A4 グレードの水)

高速液体クロマトグラフ質量分析計および測定条件

ばく露開始後 21 日目に分析装置の大幅な感度低下が生じたため、同日のみ試験水分析に用いる装置を変更した。

装置

(ばく露開始時、ばく露開始後 10 日およびばく露開始後 14 日)：

高速液体クロマトグラフ質量分析計	LCMS-8040 型 (No.2)、島津製作所製
ワークステーション：	LabSolutions
システムコントローラ：	CBM-20Alite 型 (送液ポンプ LC-30AD 型、A ポンプに内蔵)
高速液体クロマトグラフ (HPLC)：	Nexera X2
デガッサ：	DGU-20A _{SR} 型
送液ポンプ：	LC-30AD 型 (2 台)
オートサンプラ：	SIL-30AC 型
カラムオープン：	CTO-20AC 型
ディバートバルブ：	FCV-20AH ₂ 型
質量分析計 (MS)：	LCMS-8040 型

(ばく露開始後 21 日)：

高速液体クロマトグラフ質量分析計	LCMS-8050 型 (No.1)、島津製作所製
ワークステーション：	LabSolutions
システムコントローラ：	CBM-20Alite 型 (送液ポンプ LC-30AD 型、A ポンプに内蔵)
高速液体クロマトグラフ (HPLC)：	Nexera X2
デガッサ：	DGU-20A _{SR} 型
送液ポンプ：	LC-30AD 型 (2 台)
オートサンプラ：	SIL-30AC 型
カラムオープン：	CTO-20AC 型
ディバートバルブ：	FCV-20AH ₂ 型
質量分析計 (MS)：	LCMS-8040 型

[条件]

(HPLC)

カラム： ACQUITY UPLC BEH C18 1.7 μ m、1.0 mm i.d.×100 mm、Waters 製

溶離液： A 超純水
B アセトニトリル

時間
グラジエント： (min) A 液 B 液
0.00 70% 30%
1.50 5% 95%
3.50 5% 95%
3.51 70% 30%
6.00 70% 30%

流速： 0.2 mL/min

カラム温度： 40°C

注入量： 2 μ L

ディバートバルブ： 0 min (廃液側)、0.01 min (MS 側)、6.00 min (廃液側)

ランタイム： 6 min

(MS)

イオン化モード： DUIS-ESI

分析モード： MRM (Multiple Reaction Monitoring)

ポラリティ： Negative

ネブライザーガス流量： 2.0 L/min (窒素)

ヒートブロック温度： 400°C

DL 温度： 250°C

ドライイングガス流量： 15.0 L/min (窒素)

CID ガス： アルゴン

MRM (Multiple Reaction Monitoring) 条件

Precursor ion (<i>m/z</i>)	Product ion (<i>m/z</i>)	Dwell Time	CE (V)
227.20	92.05	100	25.0

標準溶液の調製：

ベンジルパラベン (別名：4-ヒドロキシ安息香酸ベンジル) 50 mg を秤量し、エタノールで溶解し 50 mL に定容、1000 mg/L の溶液を調製した。この溶液をエタノールで順次希釈し、0.00200、0.0200 および 0.200 mg/L の標準溶液を調製した。また、エタノールを 0 mg/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 0.75 mL

+

標準溶液 0.75 mL

|

混合

|

LC-MS/MS 測定

横軸に濃度 (mg/L) を、縦軸にピーク面積 (count) をとり、それぞれの分析装置で検量線を作成した。検量線の作成に、0 mg/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。いずれの分析装置の検量線においても、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 0.00200 mg/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 0.75 mL

+

エタノール 0.75 mL

|

混合

|

LC-MS/MS 測定

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設定の 80~120% の範囲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 2 回、試験系 (試験容器および吸引瓶、配管等) の洗浄・交換を実施した。

(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算出した。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°C、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、1.0 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。計数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

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 (1.0 ng/mg) を下回ったデータについては、定量下限の半値 (0.5 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。解析には統計解析ソフト「エクセル統計」(社会情報サービス社) 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、オスの二次性徴指標 (乳頭状小突起を有する節板数) 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 Application²⁾に従い、対照区と助剤対照区の結果を合算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

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）Dunnnett 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

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）を表 2 に示す。設定濃度 0.0063、0.025、0.100 mg/L に対して平均測定濃度はそれぞれ 0.00566、0.0227、0.0882 mg/L であり、設定濃度に対して 88～91%であった。なお、平均測定濃度が設定濃度の±20%以内だったため、結果は設定濃度を用いて記載する。

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 mg/L	試験液中の被験物質濃度 mg/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 10 日後	ばく露 14 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.	--
0.0063	0.00631	0.00547	0.00525	0.00562	0.00566
	(111)	(97)	(93)	(99)	[90]
0.025	0.0250	0.0227	0.0228	0.0203	0.0227
	(110)	(100)	(100)	(89)	[91]
0.10	0.0987	0.0831	0.0896	0.0813	0.0882
	(112)	(94)	(102)	(92)	[88]

N.D.：定量下限（0.002 mg/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24.5～25.0℃であり、25±2℃の範囲内であった。また、試験容器間の水温の変動は±1.5℃未満であり、試験の有効性基準を満たした。溶存酸素濃度は、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、溶存酸素濃度、pH、硬度およびアルカリ度

設定濃度 (mg/L)	水温 (℃)	溶存酸素濃度 (mg/L) [飽和濃度に対する割合 %]	pH	硬度 (mg CaCO ₃ /L)	アルカリ度 (mg CaCO ₃ /L)
対照区	24.5 - 24.9	7.7 - 8.2 [95 - 101]	7.5 - 7.8	49 - 51	45 - 55
助剤 対照区	24.7 - 24.9	7.6 - 8.3 [93 - 102]	7.6 - 7.8	45 - 54	40 - 50
0.0063	24.5 - 24.8	7.7 - 8.2 [94 - 100]	7.6 - 7.8	—	—
0.025	24.5 - 25.0	7.6 - 8.2 [93 - 100]	7.6 - 7.7	—	—
0.10	24.5 - 25.0	7.7 - 8.1 [94 - 99]	7.7 - 7.8	53 - 58	50 - 60

—：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。

対照区では死亡および行動・外観の異常は認められなかった。

助剤対照区では、ばく露開始 19 日目にメス 1 尾の死亡が認められた。また、ばく露開始 1～6 日目、13～14 日目にそれぞれ 1 個体に外見異常（出血）の症状が認められた。20 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。

0.0063 mg/L 区では、ばく露開始 18 日目にメス 1 尾の死亡が認められた。また、ばく露開始 13～15 日目および 18 日目に、それぞれ 1 個体、20～21 日目に 2 個体に外見異常（出血）および遊泳異常（不活発）の毒性症状が認められた。

0.025 mg/L 区では、ばく露開始 21 日目に 1 個体に外見異常（出血）の毒性症状が認められた。

0.10 mg/L 区では、ばく露開始 20 日目にメス 1 尾の死亡が認められた。また、以下の外見異常が認められた。

ばく露開始 19 日目：出血 1 個体、体色明化 1 個体

ばく露開始 20 日目：出血 1 個体

ばく露開始 21 日目：出血 2 個体、体色明化 2 個体

メスの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

設定濃度 (mg/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	1	8%	4%
0.0063	12	0	0%	12	1	8%	4%
0.025	12	0	0%	12	0	0%	0%
0.10	12	0	0%	12	1	8%	4%

対照群との有意差無し（Cochran-Armitage 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、受精率およびメス 1 個体の 1 日当たりの平均産卵数は、対照群と比較し統計的に有意な差は認められなかった。一方で、0.10 mg/L 区では、ばく露終盤に、他の試験区と比較して、死亡魚および外見異常の症状を示す個体が多く確認された。また、0.10 mg/L 区では、いずれの数値も他の試験区と比較して、最も低い数値を示した。これらは、ばく露終盤における、被験物質の毒性影響に起因する可能性があると考えられた。そのため、これらの項目について、ばく露終盤の 1 週間（ばく露 15～21 日目）の期間にて有意差検定を行ったが、対照群、助剤対照区のいずれとの比較においても統計学的な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

設定 濃度 (mg/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	1227 ± 89	1093 ± 99	88.9 ± 2.1	19.5 ± 1.4
助剤 対照区	1215 ± 106	1056 ± 80	86.9 ± 2.9	19.4 ± 1.4
0.0063	1289 ± 329	1180 ± 334	91.0 ± 2.9	20.8 ± 5.0
0.025	1162 ± 235	1009 ± 206	86.7 ± 3.3	18.4 ± 3.7
0.10	1109 ± 128	896 ± 180	77.8 ± 15.6	17.6 ± 2.0

容器平均値±標準偏差 (n=4)

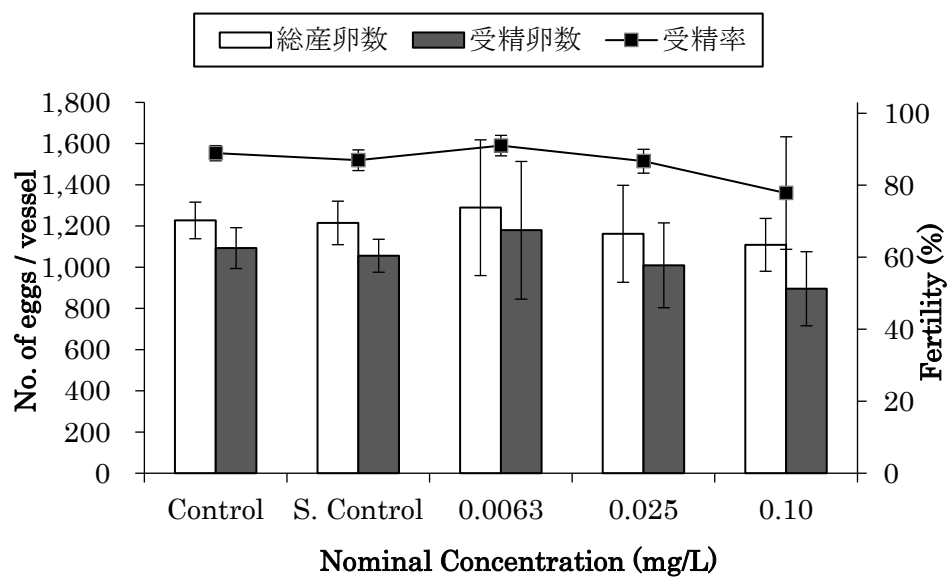


図1 平均総産卵数、平均受精卵数および平均受精率

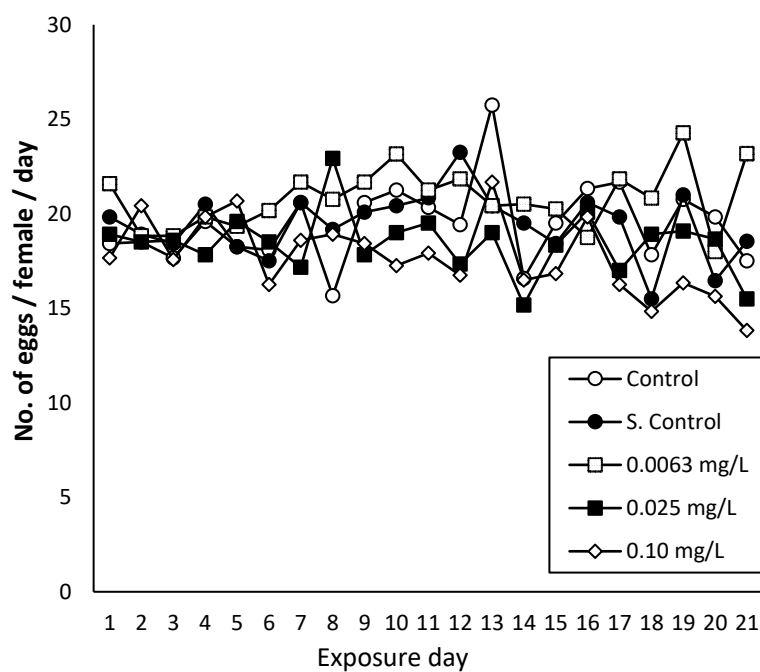


図2 ばく露期間中のメス1個体の1日当たりの平均産卵数

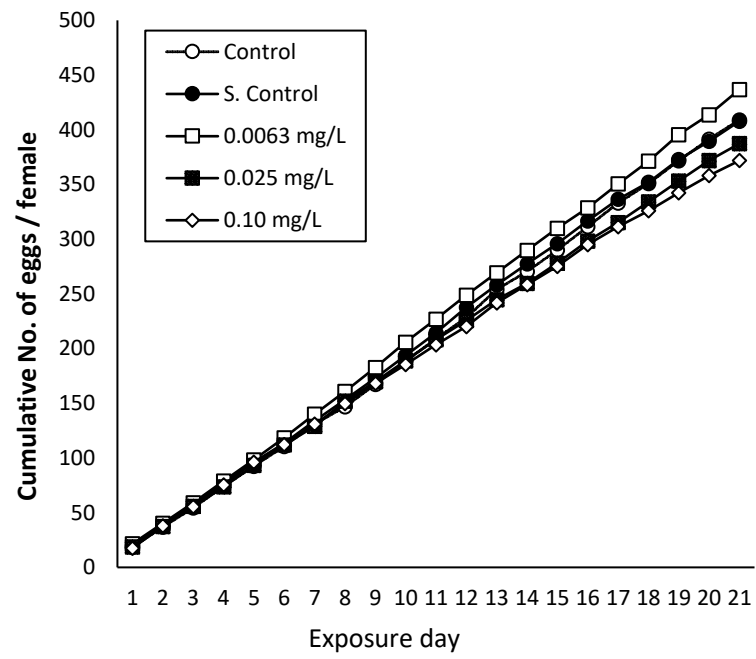


図3 ばく露期間中のメス1個体の累積産卵数

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。

全長および湿重量について、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 (mg/L)	全長 (mm)		湿重量 (g)	
	オス	メス	オス	メス
対照区	29.3 ± 1.5	29.8 ± 1.6	0.305 ± 0.036	0.356 ± 0.051
助剤 対照区	29.0 ± 0.8	29.6 ± 1.1	0.288 ± 0.037	0.337 ± 0.049
0.0063	30.0 ± 1.0	29.5 ± 1.3	0.316 ± 0.031	0.347 ± 0.056
0.025	30.0 ± 1.1	29.9 ± 0.9	0.320 ± 0.033	0.362 ± 0.030
0.10	29.5 ± 1.7	29.8 ± 1.5	0.310 ± 0.054	0.364 ± 0.065

容器平均値±標準偏差 (n=12、ただし助剤対照区、0.0063 mg/L 区および 0.10 mg/L 区のメスは n=11)

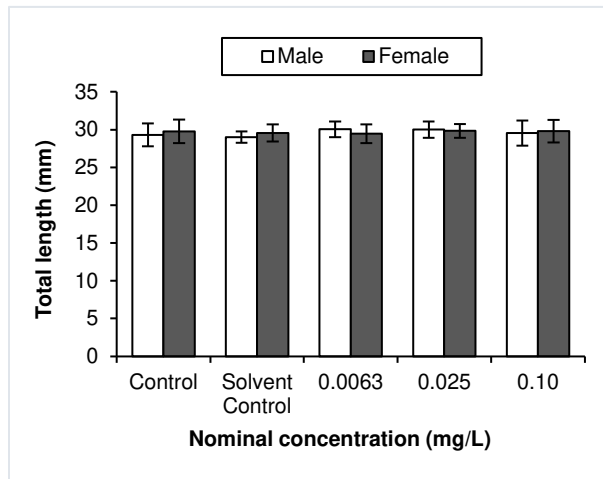


図 4 (a) ばく露終了時の全長

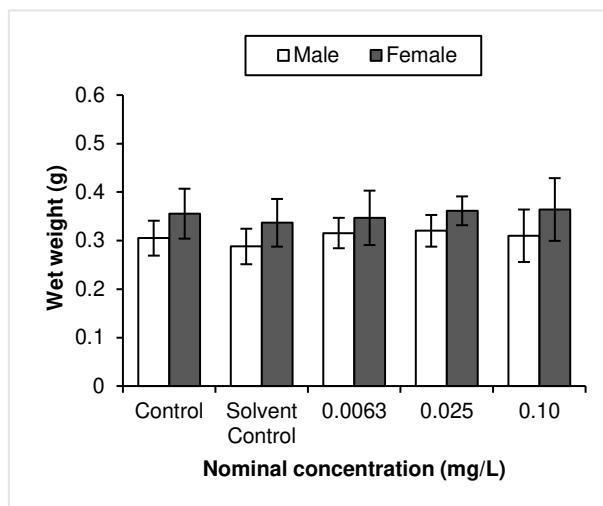


図 4 (b) ばく露終了時の湿重量

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、オスはすべての濃度区で対照群と比較して有意な増加が認められた。メスは 0.025 mg/L 区、0.10 mg/L 区において対照群と比較して有意な増加が認められた。

生殖腺体指数については、オスは 0.10 mg/L 区において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 (mg/L)	肝臓体指数 (%)		生殖腺体指数 (%)	
	オス	メス	オス	メス
対照区	2.27 ± 0.65	5.68 ± 1.46	0.607 ± 0.182	8.62 ± 1.69
助剤 対照区	1.77 ± 0.96	5.30 ± 1.19	0.550 ± 0.122	8.70 ± 1.00
0.0063	2.79 ± 0.61 **	5.40 ± 1.78	0.566 ± 0.160	9.26 ± 2.31
0.025	2.83 ± 0.91 **	6.21 ± 0.83 *	0.630 ± 0.135	8.68 ± 1.34
0.10	3.47 ± 0.92 **	7.25 ± 1.70 **	0.689 ± 0.175 *	9.79 ± 2.42

容器平均値±標準偏差（n=12、ただし助剤対照区、0.0063 mg/L 区および 0.10 mg/L 区のメスは n=11）

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

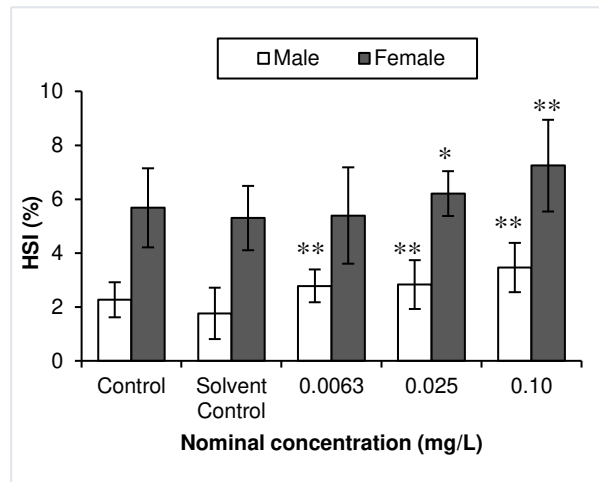


図 5(a) ばく露終了時の肝臓体指数 (HSI)

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

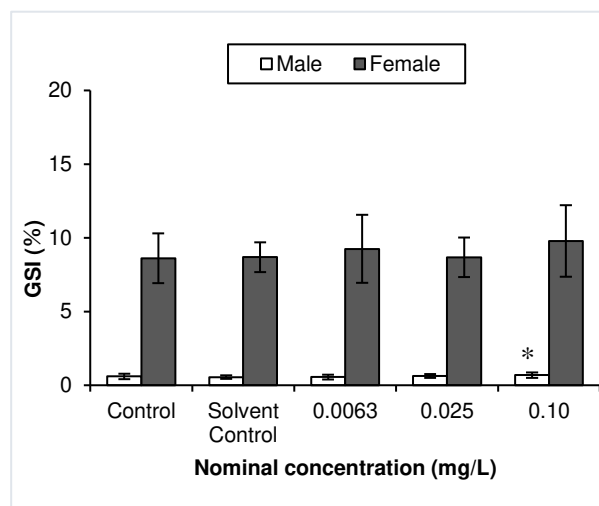


図 5(b) ばく露終了時の生殖腺体指数 (GSI)

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

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。

オスメスともにいずれの濃度区においても対照群と比較して有意な差が認められなかった。

表 8 ばく露終了時の肝臓中ビテロジェニン濃度

設定濃度 (mg/L)	肝臓中ビテロジェニン濃度 (ng/mg liver)					
	オス			メス		
対照区	1.04	±	1.88	1141	±	484
助剤対照区	0.50	±	0.00	1194	±	512
0.0063	0.98	±	1.24	854	±	505
0.025	0.79	±	0.45	1048	±	341
0.10	0.64	±	0.47	1245	±	416

平均値±標準偏差 (n=12、ただし助剤対照区、0.0063 mg/L 区および 0.10 mg/L 区のメスは n=11)

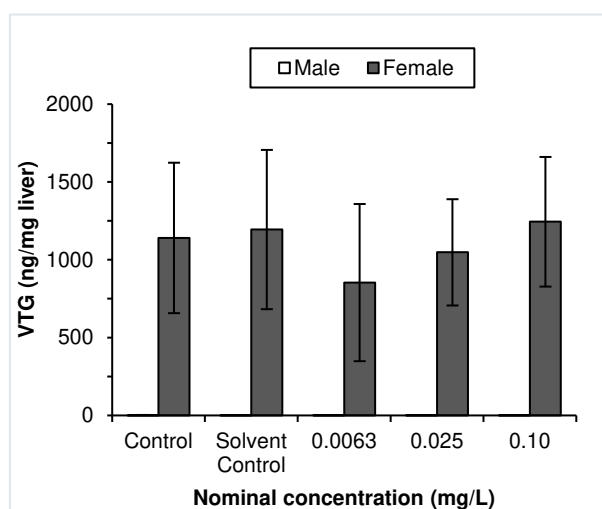


図 6 ばく露終了時の肝臓中ビテロジェニン

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。

オスは対照区と助剤対照区の間で有意差が認められたため、助剤対照区と比較し、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

設定濃度 (mg/L)	乳頭状小突起を有する節板数 (Plates/fish)					
	オス			メス		
対照区	45	±	18	0	±	0
助剤対照区	65	±	14	0	±	0
0.0063	67	±	17	0	±	0
0.025	62	±	12	0	±	0
0.10	62	±	15	0	±	0

平均値±標準偏差 (n=12、ただし助剤対照区、0.0063 mg/L 区および0.10 mg/L 区のメスはn=11)

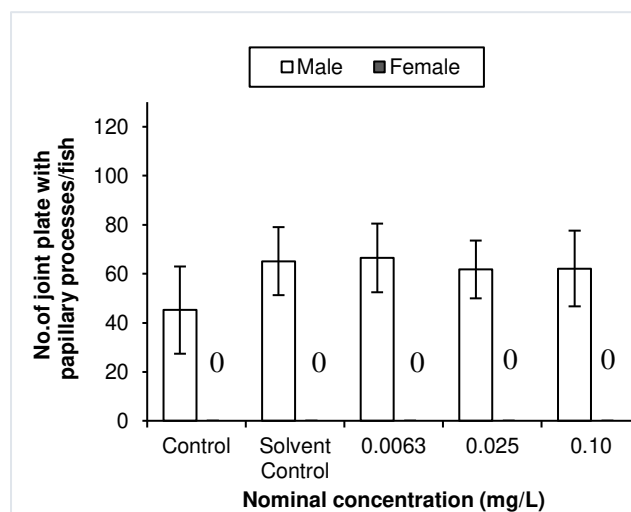


図 7 ばく露終了時の乳頭状小突起を有する節板数

2.3 結果のまとめおよび考察

OECD TG229 に準拠して、ベンジルパラベン（別名：4-ヒドロキシ安息香酸ベンジル）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。

0.0063、0.025 および 0.10 mg/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 0.00566、0.0227 および 0.0882 mg/L であり、設定濃度に対して 90、91 および 88% であった。

死亡率については、メスの助剤対照区、0.0063 mg/L 区および 0.10 mg/L 区、において、8% 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かった。

繁殖への影響に関する指標（産卵状況）のうち、ばく露の全期間を通しての総産卵数、受精卵数および受精率は試験濃度範囲において有意差は認められなかった。一方で、0.10 mg/L 区では、ばく露終盤に、他の試験区と比較して、死亡魚および外見異常の症状を示す個体が多く確認された。また、0.10 mg/L 区では、いずれの数値も他の試験区と比較して、最も低い数値を示した。これらは、ばく露終盤における、被験物質の毒性影響に起因する可能性があると考えられた。そのため、これらの項目について、ばく露終盤の 1 週間（ばく露 15～21 日目）の期間にて有意差検定を行ったが、対照群、助剤対照区のいずれとの比較においても統計学的な有意差は認められなかった。以上のことから、総産卵数、受精卵数および受精率の LOEC および NOEC は最高濃度区以上と判断した。

全長および湿重量については、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、全ての濃度区のおスと 0.025 mg/L 区および 0.10 mg/L 区のメスに有意な増加が認められたため、おスの LOEC が 0.0063 mg/L、NOEC は最低濃度区未満、メスの LOEC が 0.025 mg/L、NOEC は 0.0063 mg/L と判断した。生殖腺対指数については、0.10 mg/L 区のおスに有意な増加が認められ、全ての濃度区 of メスで有意差は認められなかったため、おスの LOEC が 0.10 mg/L、NOEC は 0.025 mg/L、メスの 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、おスメスともに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。

二次性徴指標（乳頭状小突起を有する節板数）については、全ての濃度区のおスで対照群と比較して、有意な増加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、おスメスともに LOEC および NOEC は最高濃度区以上とした。

本試験の試験濃度範囲においては、繁殖および内分泌かく乱作用に関わるエンドポイントについて統計学的に有意な差は認められず、ベンジルパラベンによるエストロゲン作用、抗エストロゲン作用、アンドロゲン作用は確認されなかった。

表 10 ベンジルパラベンの試験結果まとめ

エンドポイント		LOEC (mg/L)		NOEC (mg/L)
死亡率	オス	>0.10		≥0.10
	メス	>0.10		≥0.10
総産卵数		>0.10		≥0.10
受精卵数		>0.10		≥0.10
受精率		>0.10		≥0.10
全長	オス	>0.10		≥0.10
	メス	>0.10		≥0.10
湿重量	オス	>0.10		≥0.10
	メス	>0.10		≥0.10
肝臓体指数	オス	↑	0.0063	<0.0063
	メス	↑	0.025	0.0063
生殖腺体指数	オス	↑	0.10	0.025
	メス	>0.10		≥0.10
肝臓中ビテロジェニン濃度	オス	>0.10		≥0.10
	メス	>0.10		≥0.10
二次性徴（乳頭状小突起を有する節板数）	オス	>0.10		≥0.10
	メス	>0.10		≥0.10

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 7 年度 第 3 回生態影響評価検討班会議

開催日時：令和 8 年 3 月 11 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) OECD (2000), OECD Series on Testing and Assessment No.54: Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application
- 3) Yamamoto H, Nakamura Y, Nakamura Y, Kitani C, Imari T, Sekizawa J, et al. Initial ecological risk assessment of eight selected human pharmaceuticals in Japan. Environ Sci 2007a;14:177-93.

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 19, 2025

These data were obtained from report No. 25H-003021-0001.

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)		N.D.	Total Residue		
	[mg/L]	(< 0.3)		[mg/L]	97
Biochemical Oxygen Demand (BOD)		0.9	Conductivity		12
	[mg/L]			[mS/m]	
Chemical Oxygen Demand (COD)		0.7	Hardness		49
	[mg/L]			[mg CaCO ₃ /L]	
Total Phosphorus		N.D.	Alkalinity (pH4.8)		36
	[mg/L]	(< 0.02)		[mg CaCO ₃ /L]	
pH		7.5	Sodium		6.2
	[-(°C)]	(26)		[mg/L]	
Coliform Group		8	Potassium		0.9
	[MPN/100mL]			[mg/L]	
Total Mercury		N.D.	Calcium		15
	[mg/L]	(< 0.00005)		[mg/L]	
Copper		N.D.	Magnesium		3.1
	[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		0.03	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

設定濃度 (mg/L)	容器 No.	水温 (°C)				溶存酸素 (mg/L)				pH			
		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	暴露 開始時	暴露 7日後	暴露 14日後	暴露 終了時
対照区	1	24.8	24.8	24.8	24.5	8.2	7.9	7.9	8.1	7.8	7.5	7.6	7.6
	2	24.8	24.8	24.8	24.6	8.2	7.9	7.8	8.1	7.8	7.7	7.6	7.6
	3	24.8	24.8	24.8	24.7	8.1	7.9	7.7	8.0	7.8	7.7	7.6	7.7
	4	24.8	24.9	24.8	24.7	8.1	8.0	7.8	7.9	7.8	7.7	7.6	7.7
助剤対照区	1	24.7	24.8	24.8	24.7	8.2	7.9	7.6	8.0	7.8	7.7	7.6	7.7
	2	24.9	24.8	24.8	24.7	8.3	7.9	7.6	7.9	7.8	7.7	7.6	7.7
	3	24.8	24.8	24.8	24.7	8.2	7.8	7.8	8.0	7.8	7.7	7.6	7.7
	4	24.8	24.8	24.8	24.7	8.2	7.9	7.8	8.0	7.8	7.7	7.7	7.7
0.0063	1	24.7	24.8	24.7	24.5	8.2	7.8	7.7	8.1	7.8	7.7	7.6	7.7
	2	24.7	24.8	24.8	24.6	8.2	7.9	7.8	8.2	7.8	7.7	7.6	7.7
	3	24.7	24.8	24.8	24.6	8.2	7.9	7.7	8.2	7.8	7.7	7.7	7.7
	4	24.7	24.8	24.7	24.6	8.2	8.0	7.7	8.1	7.8	7.7	7.6	7.7
0.025	1	24.9	24.7	24.8	24.5	8.1	7.9	7.8	8.2	7.7	7.7	7.6	7.7
	2	24.9	24.8	24.8	24.5	8.0	7.8	7.8	8.2	7.7	7.7	7.6	7.7
	3	25.0	24.8	24.8	24.5	7.9	7.9	7.6	8.1	7.7	7.7	7.6	7.6
	4	24.9	24.8	24.8	24.5	8.1	7.9	7.7	8.1	7.7	7.7	7.7	7.7
0.10	1	24.9	25.0	24.5	24.6	8.0	7.8	7.7	8.0	7.7	7.7	7.7	7.7
	2	24.9	24.9	24.5	24.6	8.0	7.8	7.8	8.1	7.7	7.7	7.7	7.8
	3	24.9	24.9	24.5	24.6	8.0	7.8	7.9	8.0	7.8	7.7	7.7	7.7
	4	24.9	24.9	24.5	24.6	8.0	7.8	7.8	8.1	7.8	7.7	7.8	7.7

設定濃度 (mg/L)	容器 No.	硬度 (mg CaCO ₃ /L)				アルカリ度 (mg CaCO ₃ /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	51	50	49	51	50	45	55	50
助剤対照区	1	45	46	54	53	40	45	50	50
0.10	1	58	53	56	54	50	50	60	50

付表 3 ばく露期間中の産卵数、受精卵数、受精率

設定濃度 (mg/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		
対照区	1	産卵数	49	54	53	58	50	54	77	48	63	68	54	69	58	38	64	65	69	54	60	60	57	1222
		受精卵数	36	49	52	54	48	54	71	45	41	62	37	66	57	32	61	63	51	49	54	56	56	1094
		受精率	73	91	98	93	96	100	92	94	65	91	69	96	98	84	95	97	74	91	90	93	98	(89)
	2	産卵数	48	49	46	57	53	59	66	67	61	81	59	64	84	58	57	62	74	49	70	68	56	1288
		受精卵数	45	44	28	46	45	57	55	65	60	76	54	46	79	33	57	57	70	47	61	50	53	1128
		受精率	94	90	61	81	85	97	83	97	98	94	92	72	94	57	100	92	95	96	87	74	95	(87)
	3	産卵数	61	65	61	62	57	55	44	51	64	55	75	34	88	60	61	80	64	66	65	67	61	1296
		受精卵数	59	60	57	59	55	51	36	46	62	51	63	26	87	59	61	69	61	55	62	52	61	1192
		受精率	97	92	93	95	96	93	82	90	97	93	84	76	99	98	100	86	95	83	95	78	100	(92)
	4	産卵数	63	54	52	58	59	49	60	22	59	51	56	66	79	43	52	49	53	45	54	43	36	1103
		受精卵数	47	50	31	46	59	49	52	22	58	33	43	62	70	39	49	48	51	43	37	33	35	957
		受精率	75	93	60	79	100	100	87	100	98	65	77	94	89	91	94	98	96	96	69	77	97	(87)
助剤 対照区	1	産卵数	62	60	53	63	60	52	70	52	63	64	66	71	65	61	50	75	59	57	61	38	46	1248
		受精卵数	60	35	48	63	59	49	69	51	53	61	61	65	63	51	46	57	59	49	55	28	32	1114
		受精率	97	58	91	100	98	94	99	98	84	95	92	92	97	84	92	76	100	86	90	74	70	(89)
	2	産卵数	57	62	55	70	52	54	58	58	60	64	59	75	65	65	55	65	69	52	77	49	76	1297
		受精卵数	43	55	47	64	43	53	51	50	53	55	40	70	61	63	45	61	39	47	65	43	69	1117
		受精率	75	89	85	91	83	98	88	86	88	86	68	93	94	97	82	94	57	90	84	88	91	(86)
	3	産卵数	67	53	65	49	61	57	60	62	62	62	68	70	59	65	62	55	55	43	73	54	54	1256
		受精卵数	42	47	42	49	36	53	47	62	52	61	60	66	50	58	46	35	51	25	63	50	52	1047
		受精率	63	89	65	100	59	93	78	100	84	98	88	94	85	89	74	64	93	58	86	93	96	(83)
	4	産卵数	52	52	48	64	46	47	59	58	56	55	57	63	56	43	54	52	55	34	41	40	28	1060
		受精卵数	50	43	39	54	46	47	55	49	54	42	53	60	56	41	43	43	43	32	34	35	27	946
		受精率	96	83	81	84	100	100	93	84	96	76	93	95	100	95	80	83	78	94	83	88	96	(90)

付表3 ばく露期間中の産卵数、受精卵数、受精率（続き）

設定濃度 (mg/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	
0.0063	1	産卵数	73	78	76	76	72	77	88	78	91	108	74	96	77	86	70	89	98	82	92	77	95	1753
		受精卵数	72	72	75	76	70	72	73	75	90	106	71	94	72	72	70	88	98	82	90	77	68	1663
		受精率	99	92	99	100	97	94	83	96	99	98	96	98	94	84	100	99	100	100	98	100	72	(95)
	2	産卵数	58	56	41	56	52	51	51	53	50	63	53	56	60	53	60	35	44	39	51	27	40	1049
		受精卵数	57	41	32	55	49	51	43	49	50	58	53	54	50	50	57	19	43	37	48	25	36	957
		受精率	98	73	78	98	94	100	84	92	100	92	100	96	83	94	95	54	98	95	94	93	90	(91)
	3	産卵数	68	51	59	51	64	57	66	56	61	51	75	53	68	66	68	56	72	58	76	53	66	1295
		受精卵数	67	50	58	29	62	51	64	55	59	39	61	50	61	40	60	54	53	45	70	52	64	1144
		受精率	99	98	98	57	97	89	97	98	97	76	81	94	90	61	88	96	74	78	92	98	97	(88)
	4	産卵数	60	41	50	55	44	57	55	62	58	56	53	57	40	41	45	45	48	50	48	41	54	1060
		受精卵数	60	39	43	55	32	54	42	58	49	50	36	57	38	33	43	44	33	48	47	40	54	955
		受精率	100	95	86	100	73	95	76	94	84	89	68	100	95	80	96	98	69	96	98	98	100	(90)
0.025	1	産卵数	46	49	47	44	40	59	38	66	46	46	55	43	72	47	46	59	54	49	56	57	50	1069
		受精卵数	43	47	44	42	40	58	36	65	46	44	51	43	61	45	33	57	42	48	40	34	48	967
		受精率	93	96	94	95	100	98	95	98	100	96	93	100	85	96	72	97	78	98	71	60	96	(91)
	2	産卵数	68	58	67	67	61	60	71	67	60	63	78	66	69	57	71	69	69	72	57	68	51	1369
		受精卵数	57	58	61	58	37	57	68	60	53	54	69	50	61	51	66	69	60	42	51	59	39	1180
		受精率	84	100	91	87	61	95	96	90	88	86	88	76	88	89	93	100	87	58	89	87	76	(86)
	3	産卵数	56	63	60	43	85	52	58	60	70	63	63	70	66	59	65	69	65	74	68	70	59	1338
		受精卵数	53	57	37	42	70	48	35	58	56	59	62	35	65	49	52	66	58	60	67	67	59	1155
		受精率	95	90	62	98	82	92	60	97	80	94	98	50	98	83	80	96	89	81	99	96	100	(87)
	4	産卵数	57	52	49	60	49	51	39	82	38	56	38	29	21	19	38	44	16	32	48	29	26	873
		受精卵数	48	41	49	59	49	47	38	55	28	53	33	22	15	16	34	36	9	19	36	27	21	735
		受精率	84	79	100	98	100	92	97	67	74	95	87	76	71	84	89	82	56	59	75	93	81	(83)

付表3 ばく露期間中の産卵数、受精卵数、受精率（続き）

設定濃度 (mg/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		
0.10	1	産卵数	36	78	51	62	68	55	61	56	52	62	57	56	61	50	61	53	71	52	40	44	47	1173
		受精卵数	34	29	46	52	64	55	61	55	51	58	52	42	47	49	46	46	30	39	26	27	32	941
		受精率	94	37	90	84	94	100	100	98	98	94	91	75	77	98	75	87	42	75	65	61	68	(81)
	2	産卵数	67	56	70	63	66	45	47	52	62	76	60	53	60	50	48	61	42	56	67	61	60	1222
		受精卵数	65	50	52	56	60	43	47	51	49	68	45	36	43	42	24	43	30	29	41	32	41	947
		受精率	97	89	74	89	91	96	100	98	79	89	75	68	72	84	50	70	71	52	61	52	68	(77)
	3	産卵数	64	61	41	57	57	47	63	66	62	32	39	35	77	39	41	49	43	13	26	14	3	929
		受精卵数	58	59	39	53	56	26	39	49	49	16	21	12	57	38	30	18	18	0	0	0	0	638
		受精率	91	97	95	93	98	55	62	74	79	50	54	34	74	97	73	37	42	0	0	0	0	(57)
	4	産卵数	45	50	49	56	57	48	52	53	45	37	59	57	62	59	52	75	39	57	63	53	42	1110
		受精卵数	43	48	49	56	54	47	46	52	43	34	55	52	59	54	51	72	37	51	61	53	40	1057
		受精率	96	96	100	100	95	98	88	98	96	92	93	91	95	92	98	96	95	89	97	100	95	(95)

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

設定濃度 (mg/L)	水槽 No.	サンプル No.	性判別	全長 (mm)	湿重量 (g)	肝臓体 指数(%)	生殖腺 体指数	乳頭状 小突起	肝臓中VTG 濃度(ng/mg)
対照区	1	1	メス	29.59	0.3483	5.28	8.73	0	335.48
		2	メス	29.14	0.3554	6.16	8.33	0	334.19
		3	メス	29.13	0.3393	6.96	8.78	0	1249.03
		4	オス	30.20	0.3577	2.43	0.56	84	< L.O.Q
		5	オス	30.80	0.3319	2.89	0.81	19	< L.O.Q
		6	オス	30.10	0.3250	2.37	0.55	63	< L.O.Q
	2	7	メス	29.23	0.3549	7.95	10.57	0	1305.81
		8	メス	30.13	0.3761	5.93	7.87	0	772.90
		9	メス	28.89	0.3339	4.94	8.00	0	1045.16
		10	オス	30.53	0.3470	2.05	0.95	50	< L.O.Q
		11	オス	29.66	0.3015	1.29	0.66	44	< L.O.Q
		12	オス	29.77	0.3231	2.38	0.53	23	7.01
	3	13	メス	29.27	0.3605	5.52	12.21	0	1440.00
		14	メス	27.87	0.2657	5.53	7.87	0	947.10
		15	メス	31.86	0.4452	7.75	9.86	0	1916.13
		16	オス	29.15	0.2836	3.24	0.42	51	< L.O.Q
		17	オス	29.50	0.3069	1.86	0.62	54	< L.O.Q
		18	オス	25.11	0.2255	2.75	0.49	49	< L.O.Q
	4	19	メス	27.99	0.2757	2.58	5.55	0	1299.35
		20	メス	33.38	0.4183	5.14	7.15	0	1366.45
		21	メス	30.75	0.3931	4.43	8.52	0	1674.84
		22	オス	29.72	0.3039	0.95	0.53	31	< L.O.Q
		23	オス	27.98	0.2751	2.62	0.84	41	< L.O.Q
		24	オス	29.21	0.2814	2.45	0.32	34	< L.O.Q
助剤 対照区	1	25	メス	29.75	0.3073	4.52	6.93	0	2073.55
		26	メス	29.52	0.3227	5.14	8.46	0	1411.61
		27	メス	30.11	0.3894	4.85	8.99	0	725.16
		28	オス	28.79	0.2813	1.74	0.68	66	0.52
		29	オス	29.25	0.3160	2.41	0.38	79	< L.O.Q
		30	オス	28.57	0.2527	1.94	0.67	33	< L.O.Q
	2	31	メス	30.31	0.3837	5.86	9.36	0	1092.90
		32	メス	28.48	0.3165	5.15	8.06	0	1705.81
		33	メス	28.85	0.3021	7.98	10.13	0	378.06
		34	オス	29.82	0.3154	2.00	0.54	63	< L.O.Q
		35	オス	27.29	0.2391	0.88	0.54	71	< L.O.Q
		36	オス	28.92	0.2748	1.53	0.51	68	< L.O.Q
	3	37	メス	28.88	0.3177	4.72	8.84	0	654.19
		38	メス	30.87	0.4093	6.69	9.55	0	1763.87
		39	メス	30.60	0.3743	4.14	9.70	0	1067.10
		40	オス	29.16	0.2676	1.35	0.37	77	< L.O.Q
		41	オス	28.99	0.2988	3.18	0.67	49	< L.O.Q
		42	オス	30.09	0.3720	0.22	0.54	59	< L.O.Q
	4	43	メス	30.68	0.3439	5.47	8.35	0	1130.32
		44	メス	27.18	0.2401	3.79	7.29	0	1136.80
		45	メス	-	-	-	-	-	-
		46	オス	29.88	0.3093	2.88	0.58	60	< L.O.Q
		47	オス	29.09	0.2760	0.36	0.72	82	< L.O.Q
		48	オス	28.30	0.2536	2.72	0.39	75	< L.O.Q

< L.O.Q. : 定量下限 (1.0 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 (0.5 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）

設定濃度 (mg/L)	水槽 No.	サンプル No.	性判別	全長 (mm)	湿重量 (g)	肝臓 体指数	生殖腺 体指数	乳頭状 小突起	肝臓中VTG 濃度(ng/mg)
0.0063	1	49	メス	29.41	0.4005	6.59	12.53	0	343.23
		50	メス	29.97	0.4065	5.02	11.61	0	576.77
		51	メス	30.76	0.3535	6.79	9.05	0	360.00
		52	オス	29.27	0.2902	2.69	0.41	69	< L.O.Q
		53	オス	30.80	0.3524	2.89	0.91	52	< L.O.Q
		54	オス	30.93	0.3063	1.34	0.49	68	4.65
	2	55	メス	29.55	0.3748	5.58	10.17	0	610.32
		56	メス	29.30	0.3452	1.74	7.21	0	1881.29
		57	メス	-	-	-	-	-	-
		58	オス	31.36	0.3578	3.94	0.61	74	< L.O.Q
		59	オス	30.87	0.3454	2.40	0.58	71	< L.O.Q
		60	オス	29.12	0.2987	2.91	0.44	59	< L.O.Q
	3	61	メス	29.11	0.3432	5.62	9.41	0	860.65
		62	メス	28.94	0.3733	7.66	10.98	0	994.84
		63	メス	30.76	0.3529	5.89	8.08	0	1118.71
		64	オス	30.59	0.3381	2.48	0.68	64	2.07
		65	オス	28.20	0.2706	2.92	0.67	66	< L.O.Q
		66	オス	31.13	0.3260	2.73	0.55	54	< L.O.Q
	4	67	メス	29.33	0.3065	6.04	10.34	0	1460.65
		68	メス	30.72	0.3572	5.96	8.23	0	949.68
		69	メス	26.27	0.1997	2.45	4.21	0	233.20
		70	オス	29.75	0.3013	3.05	0.60	105	< L.O.Q
		71	オス	29.67	0.3343	2.78	0.60	56	< L.O.Q
		72	オス	28.90	0.2652	3.28	0.26	60	< L.O.Q
0.025	1	73	メス	29.19	0.3446	5.25	7.49	0	819.35
		74	メス	28.13	0.3207	4.30	6.24	0	974.13
		75	メス	29.47	0.3631	5.65	9.58	0	860.65
		76	オス	29.50	0.3256	2.83	0.37	54	< L.O.Q
		77	オス	30.49	0.3446	2.09	0.61	46	1.18
		78	オス	28.72	0.2851	3.61	0.70	67	< L.O.Q
	2	79	メス	31.05	0.3561	6.23	7.98	0	943.23
		80	メス	30.44	0.4121	6.62	9.80	0	739.35
		81	メス	28.79	0.3497	7.01	9.89	0	1237.42
		82	オス	30.17	0.3383	3.13	0.56	90	1.21
		83	オス	31.66	0.3827	1.25	0.78	55	< L.O.Q
		84	オス	30.50	0.3044	3.32	0.72	61	< L.O.Q
	3	85	メス	30.31	0.3898	6.59	9.62	0	791.86
		86	メス	30.44	0.3998	7.03	10.71	0	1037.06
		87	メス	31.07	0.3813	6.56	8.31	0	762.49
		88	オス	31.54	0.3598	3.45	0.56	48	1.74
		89	オス	29.22	0.3122	2.88	0.61	67	< L.O.Q
		90	オス	29.21	0.3073	3.16	0.62	61	1.35
	4	91	メス	29.18	0.3455	6.63	8.89	0	1954.58
		92	メス	29.99	0.3171	5.68	6.87	0	1159.10
		93	メス	30.21	0.3589	6.97	8.72	0	1299.21
		94	オス	30.53	0.2861	1.26	0.87	73	< L.O.Q
		95	オス	30.37	0.3275	2.72	0.67	60	< L.O.Q
		96	オス	28.16	0.2712	4.31	0.48	60	< L.O.Q

< L.O.Q. : 定量下限 (1.0 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 (0.5 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）

設定濃度 (mg/L)	水槽 No.	サンプル No.	性判別	全長 (mm)	湿重量 (g)	肝臓 体指数	生殖腺 体指数	乳頭状 小突起	肝臓中VTG 濃度(ng/mg)
0.10	1	97	メス	33.11	0.5075	7.07	10.66	0	1730.85
		98	メス	28.84	0.3411	6.07	7.65	0	1780.56
		99	メス	29.53	0.2982	4.83	6.41	0	249.49
		100	オス	28.33	0.2581	3.33	1.05	41	< L.O.Q
		101	オス	28.09	0.2776	3.39	0.54	65	< L.O.Q
		102	オス	31.48	0.3831	3.24	0.70	60	< L.O.Q
	2	103	メス	30.85	0.3550	8.48	12.65	0	1142.15
		104	メス	30.46	0.4590	8.54	11.66	0	1385.08
		105	メス	29.05	0.3404	5.05	5.64	0	881.13
		106	オス	29.40	0.2843	1.62	0.42	74	< L.O.Q
		107	オス	30.25	0.3211	3.46	0.69	78	< L.O.Q
		108	オス	27.60	0.2532	3.24	0.83	44	< L.O.Q
	3	109	メス	28.64	0.3550	10.39	11.92	0	1383.95
		110	メス	30.55	0.3805	6.68	8.52	0	1300.34
		111	メス	-	-	-	-	-	-
		112	オス	32.64	0.4022	2.91	0.60	65	2.13
		113	オス	31.38	0.3722	2.90	0.91	73	< L.O.Q
		114	オス	29.05	0.2722	4.11	0.55	45	< L.O.Q
	4	115	メス	28.90	0.3512	7.69	12.33	0	1405.42
		116	メス	27.52	0.3087	8.71	9.88	0	1157.97
		117	メス	30.44	0.3082	6.20	10.38	0	1274.35
		118	オス	29.00	0.2868	4.74	0.56	64	< L.O.Q
		119	オス	30.07	0.3532	5.21	0.68	47	< L.O.Q
		120	オス	27.20	0.2575	3.46	0.74	90	< L.O.Q

< L.O.Q. : 定量下限 (1.0 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 (0.5 ng/mg liver) を用いた。