

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、メフェナム酸) 実施業務
(環境省請負業務)

再試験結果
報告書

令和8年8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 8 年 3 月に業務報告書を提出済みである令和 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、メフェナム酸）実施業務について、試験目的により適した供試魚を選定し、当社が自主的に実施した再試験の結果を取りまとめたものである。

令和 8 年 8 月

株式会社三菱ケミカルリサーチ

化学物質名

メフェナム酸

目 次

	頁
SUMMARY	1
要 旨	2
1. 実施内容	4
2. メフェナム酸の魚類短期繁殖試験の実施	5
2.1 材料および方法	5
2.1.1 被験物質	5
2.1.2 試験生物	6
2.1.3 試験環境および条件	7
2.1.4 ばく露および観察・計測方法	13
2.1.5 結果の算出	15
2.1.6 試験有効性基準	16
2.2 結果	17
2.2.1 試験液中の被験物質濃度	17
2.2.2 試験環境	18
2.2.3 死亡率	19
2.2.4 総産卵数、受精卵数および受精率	20
2.2.5 ばく露終了時の全長および湿重量	22
2.2.6 ばく露終了時の肝臓体指数および生殖腺体指数	24
2.2.7 ばく露終了時の肝臓中ビテロジェニン濃度	26
2.2.8 ばく露終了時の二次性徴指標	27
2.3 結果の概要および考察	28
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	30
4. 参考文献	30
付属資料	付 1～付 9

SUMMARY

The study of Mefenamic acid was conducted in accordance with OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 229, “Fish Short Term Reproduction Assay”, as a voluntary re-testing to the FY 2025 study for the same substance. The nominal exposure concentrations were 0.020, 0.10, and 0.50 mg/L, and the corresponding mean measured concentrations during the exposure period were 0.0196, 0.0945, and 0.452 mg/L, respectively.

For the reproductive endpoints (total number of eggs, number of fertilized eggs, fertilization rate, and mean daily fecundity per female), a statistically significant decrease was observed at 0.50 mg/L compared with the control group (pooled control and solvent control). Therefore, the LOEC and NOEC for the reproductive effects were determined to be 0.50 and 0.10 mg/L, respectively.

However, since a statistically significant increase in mortality was also observed at 0.50 mg/L, the effects on reproduction observed within the tested concentration range were considered to be attributable to general toxicity.

For the endpoints related to endocrine-disrupting effects (hepatic vitellogenin concentration and secondary sexual characteristics [number of plates with papillary processes]), no statistically significant differences were observed at any concentration. Therefore, within the concentration range tested in this study, mefenamic acid showed no estrogenic, anti-estrogenic, or androgenic activity.

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、メフェナム酸）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。

そこで、EXTEND2022 において採用している試験及び評価の考え方や枠組みに基づき、内分泌かく乱作用に関する評価等に必要なデータを集積するため、既に実施された試験管内試験の結果等を踏まえて選定された第一段階生物試験を実施する優先順位が高いと考えられるメフェナム酸について、第一段階生物試験である魚類短期繁殖試験を実施した。

本業務の結果は既に報告済みであるが、試験目的により適した供試魚を選定し、自主的に再試験を実施した。

III. 魚類短期繁殖試験の実施

メフェナム酸（CAS No. 61-68-7）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）¹⁾に準拠し、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等の測定を行った。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：0.020、0.10、0.50 mg/L（公比；5））

試験液量：約 5 L／容器（換水率；約 23 回／日、流量；80 mL/min）

連数：4 連／濃度

助剤：THF

助剤濃度：100 μ L/L、助剤対照区および 3 濃度区で同一

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

水 温： $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$

光 周 期： 明期 16 時間、暗期 8 時間

給 餌： 3 回／日（ブラインシュリンプの孵化後 24 時間以内の幼生）

IV. 魚類短期繁殖試験の結果

OECD TG229 に準拠して、メフェナム酸について、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 0.020、0.10 および 0.50 mg/L であり、ばく露期間中の平均測定濃度はそれぞれ 0.0196、0.0945 および 0.452 mg/L であった。

繁殖に関する指標（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）については、対照群（対照区と助剤対照区の総和）と比較し 0.50 mg/L 区において有意な減少が認められたことから、LOEC は 0.50 mg/L、NOEC は 0.10 mg/L であると判断した。しかしながら、0.50 mg/L 区では死亡率にも統計学的に有意な増加が認められているため、本試験の試験濃度範囲において認められた繁殖への影響はメフェナム酸の毒性に起因するものであると考えられた。

内分泌かく乱作用に関する指標（肝臓中ビテロジェニン濃度および二次性徴指標（乳頭状小突起を有する節板数））については、全ての濃度区で統計学的に有意な差は認められず、本試験の試験濃度範囲においては、メフェナム酸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。

1. 実施内容

本業務では、EXTEND2022 において採用している試験及び評価の考え方や枠組みに基づき、内分泌かく乱作用に関する評価等に必要なデータを集積するため、既に実施された試験管内試験の結果を踏まえて優先順位が高いと考えられるメフェナム酸について、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 という)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、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への作用の有無、LOEC (最小影響濃度) および NOEC (最大無影響濃度) 等を決定した。

(1) メフェナム酸の魚類短期繁殖試験に係る再試験の実施

OECD TG229 に準拠して、メフェナム酸の魚類短期繁殖試験について再試験を実施し、その結果を報告した。

(2) 再試験結果報告書の作成

上記の結果を取りまとめた再試験結果報告書 (本報告書) 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. メフェナム酸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

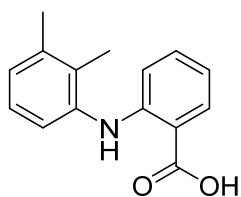
使用した被験物質の名称、物理化学的性状等を以下に示す。

和 名：メフェナム酸

英 名：Mefenamic acid

CAS No. : 61-68-7

構造式：



分子式：C₁₅H₁₅NO₂

分子量：241.11

入手先：東京化成工業

Lot 番号：GDVAC

純 度：100.2%

外 観：白色粉末

対水溶解度：32 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 5 日間、各容器の産出卵を全て採取し、1 日あたりの受精卵と未受精卵を計数し、各容器当たりの総産卵数および受精率を算出した。その結果から、各試験区間の産卵数および受精率が同等となるように供試生物を各試験区の容器に割り当てた。

じゅん化条件を以下に示す。

飼 育 水：脱塩素水道水

当施設の脱塩素水道水製造装置で横浜市水道水を脱塩素処理したもの（以下、試験用水という）。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±2℃

溶存酸素濃度：飽和酸素濃度の 60%以上

照 明：16 時間明（室内光、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

OECD TG 229 を参考にして、試験最高濃度は（1）被験物質の最大許容濃度（試験生物に対する毒性）、（2）10 mg/L、（3）被験物質の水溶解度または試験液を調製可能な最高濃度のうち、最も低い濃度に設定することとした。そこで、以下の①～④の検討により、試験最高濃度を決定した。

- ① 被験物質の水溶解度は、32 mg/L（簡易フラスコ法、24℃、当施設測定値）であった。
- ② 10 mg/L の濃度でばく露を行うためには、水のみを用いて試験液を調製する方法は、流水式試験装置に供給する試験原液を毎日大量に調製しなければならない、作業量の観点から現実的ではない。そこで、水溶液を試験原液とする方法は適用せず、100000 mg/L の助剤（有機溶媒）溶液を試験原液とする方法について検討した。まず、OECD Series on Testing and Assessment No. 23 (Second Edition)²⁾に記載されている有機溶媒の中から、N,N-ジメチルホルムアミドおよびエタノールへの溶解性を確認した。その結果、被験物質の溶解度はいずれの溶媒に対しても 2000 mg/L 未満であり、100000 mg/L の試験原液を調製することはできなかった。一方、テトラヒドロフラン（以下、THF）に対する被験物質の溶解度は 100000 mg/L 以上であり、100000 mg/L の試験原液の調製は可能であった。次に、試験液中の助剤の最高使用濃度である 100 μ L/L でのメダカへの毒性影響を調べたところ、THF のメダカに対する 48 時間半数致死濃度である 5800 mg/L³⁾と比較して十分に低いことから、THF を助剤として用いてもメダカに有害な影響を及ぼす可能性は低いと考えられた。これらの結果より、THF を助剤として選択した。
- ③ THF を助剤として用いて 0.50 mg/L、1.0 mg/L および 10 mg/L の各試験濃度について、流水式装置条件下における試験液調製時の安定性を確認した。その結果、1.0 mg/L およ

び 10 mg/L においては試験原液チューブの先端に析出物が認められた。0.50 mg/L においては析出物は認められず、安定した試験液の調製が可能であった。そのため、流水式装置条件下において安定した試験液を調製可能な最高濃度は 0.50 mg/L と判断した。

- ④ 試験液調製可能な最高濃度およびその 10 分の 1 に相当する濃度におけるメダカ成魚に対する毒性影響を確認するため、0.050 mg/L および 0.50 mg/L の 2 濃度区で、オスメス各 2 尾を投入し、14 日間の予備試験を実施した。暴露開始時の魚齢は 20 週齢であった。0.050 mg/L 区においては死亡および行動・外観異常等の毒性症状は認められなかった。0.50 mg/L 区においては 12 日目に 1 尾死亡が確認されたが、その他の個体に行動・外観異常等の毒性症状は認められなかったため、この死亡はメフェナム酸の毒性に起因するものではないと考えられた。これらの結果より、被験物質の最大許容濃度は 0.50 mg/L 以上と判断した。なお、測定濃度は両濃度区ともに設定濃度の約 80%を維持していた。

①～④より、流水式装置条件下で安定した試験液調製可能な最高濃度である 0.50 mg/L は、被験物質の最大許容濃度および 10 mg/L よりも低い濃度であったことから、0.50 mg/L を試験最高濃度として決定した。

次に、文献調査等からメダカの内分泌かく乱作用が検出できる濃度範囲を予測することが困難であった。そのため、試験最高濃度を維持したまま、低濃度域で影響が認められた場合にも評価可能な濃度範囲を確保することを目的として公比は 5 を採用した。

以上より、試験濃度は 0.020 mg/L、0.10 mg/L および 0.50 mg/L（公比；5）に設定した。

(4) ばく露条件

ばく露は、OECD TG229 に準拠して、以下の条件で行った。

試験容器：5 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 23 回／日、流量 80 mL/min）

ばく露期間：21 日間（2026 年 3 月 27 日～2026 年 4 月 17 日）

試験液量：約 5 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 0.020、0.10 および 0.50 mg/L（公比；5）

助 剤：THF

助 剤 濃 度：100 μ L/L、助剤対照区および 3 濃度区で同一

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 0.208～0.296 g、メス 0.239～0.375 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 $\pm$ 2 $^{\circ}$ C

溶存酸素濃度：飽和酸素濃度の 60%以上

光 周 期：明期 16 時間、暗期 8 時間

エアレーション：なし

給 餌：3 回／日（ブラインシュリンプの孵化後 24 時間以内の幼生）

(5) 環境測定機器

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

- ・デジタル温度計：TX1001 型 横河メータ&インスツルメンツ製
- ・温度記録計 おんどとり：TR42 型 ティアンドデイ製品
- ・マルチ水質計（溶存酸素濃度、pH 測定用）：東亜ディーケーケー製 MM-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 THF に溶解し、200、1000 および 5000 mg/L の試験原液を調製した。それぞれの試験原液および助剤対照区用の THF 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。

試験原液は、室温（ばく露）条件下において調製後 21 日間安定であることが確認できたため、試験原液の調製は安定性が確認された期間（7～10 日間）までに新しく調製し交換した。

(7) 被験物質の濃度測定

被験物質濃度は高速液体クロマトグラフ質量分析（LC/MS）計を用いて、以下の装置、条件および方法で測定した。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：

メタノール（HPLC 用、ナカライテスク製）

エタノール（特級、キシダ科学製）

ぎ酸（HPLC 用、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：

装置

高速液体クロマトグラフ質量分析計 UPLC SQD (No.1)、Waters 製

ワークステーション： MassLynx 4.1

高速液体クロマトグラフ (HPLC)： ACQUITY UPLC system

送液ポンプ： Binary Solvent Manager

オートサンブラ： Sample Manager

質量分析計 (MS)： SQ Detector

条件

(HPLC)

カラム： ACQUITY UPLC BEH C18, 1.7 μ m, 2.1 mm i.d.×50 mm, Waters 製

溶離液： A1 5 mM ぎ酸アンモニウム水溶液/ぎ酸=1000/1(v/v)

B1 HPLC 用メタノール

A1 : 70% B1 : 30%

Run Time 3 min

流速： 0.3 mL/min

カラム温度： 40°C

注入量： 3 μ L

(MS)

Ion mode： ES+

Detection mode： SIR

Quant ion： m/z 282.20 $[M+NH_4]^+$

Voltage： Capillary: 3.00 kV

Cone: 30.00 V

Temperatures： Source Temp: 120°C

Desolvation Temp: 350°C

Gas Flow： Desolvation: 600 L/hr

Cone: 50 L/hr

標準溶液の調製：

メフェナム酸 100 mg を秤量し、エタノールで溶解し 100 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、0.0100、0.0100 および 1.00 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 測定

横軸に濃度 (mg/L) を、縦軸にピーク面積 (count) をとり、検量線を作成した。検量線の作成に、0 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 0.0100 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 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

ばく露開始前から流水式装置の空運転を行い、供試生物投入前に各試験区の 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。

じゅん化終了後、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 容器については水温を毎日測定した。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、試験系（試験容器および吸引瓶、配管等）の洗浄・交換を週に 2 回実施した。

(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・外観の異常を目視によって毎日観察した。死亡個体は発見後速やかに取り除き、外観上のオスメスを確認した。行動・外観の異常は以下の項目を観察した。

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、
過運動等

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、
立鱗等

(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、以下の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（ミットヨ製）を用いて、湿重量は電子天秤（MS204TS 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数した。

肝臓重量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。測定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、肝臓中ビテロジェニン濃度を調べるため、摘出した肝臓をホモジナイズし、ELISA 法で以下の手順に従って測定した。なお、ELISA は EnBio Medaka Vitellogenin ELISA System（藤倉化成製）を用いた。

- 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 倍量加えた。
- 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）した。

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

藤倉化成製

マルチラベルリーダー：NIVO レビティジャパン製

生殖腺重量の測定：

解剖後、胴体から生殖腺を摘出し、電子天秤（AG204 型 メトラー・トレド製）によって秤量した。測定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求めた。

(2) 統計処理

本試験では助剤対照区を設定したため、OECD TG229 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、全ての項目において有意な差が認められなかった。そのため、全ての項目については、OECD Series on Testing and Assessment Number 54: Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application⁴⁾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。

LOEC および NOEC 算出のための統計手法は OECD TG229 の Annex 8 のフローチャートに基づき、各エンドポイントに対し表 1 に示す変数変換と統計手法を適用した。解析には US EPA がメダカ拡張一世代繁殖試験（MEOGRT : Medaka Extended One Generation Test）および幼若両生類発達・成長試験（LAGDA : Larval Amphibian Growth and Development Assay）用に開発した統計解析ソフトウェア StatCharrms 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
受精率	アークサイン変換	→（単調性あり）Jonckheere-Terpstra 検定
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
肝臓体指数・ 生殖腺体指数	なし	→（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
肝臓中ビテロジェニン濃度	対数変換	→（正規性・等分散性あり）Dunnett 検定
二次性徴指標	平方根変換	→（正規性・等分散性なし）Dunn 検定

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 0.020、0.10 および 0.50 mg/L に対して平均測定濃度はそれぞれ 0.0196、0.0945 および 0.452 mg/L であり、設定濃度に対して 98、99 および 90%であった。ばく露期間中に測定した各濃度区の被験物質濃度は全て平均測定濃度の $\pm 20\%$ 以内に維持されており、試験の有効性基準を満たした。

なお、平均測定濃度が設定濃度の $\pm 20\%$ 以内だったため、以降の結果はすべて設定濃度で記載した。

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 7 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.	--
0.020	0.0196	0.0200	0.0199	0.0188	0.0196
	(100)	(102)	(102)	(96)	[98]
0.10	0.0955	0.0948	0.0971	0.906	0.0945
	(101)	(100)	(103)	(96)	[99]
0.50	0.470	0.449	0.457	0.426	0.452
	(104)	(99)	(101)	(94)	[90]

N.D. : 定量下限 (0.0100 mg/L) 未満であることを示す。

2.2.2 試験環境

水温、溶存酸素濃度、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、測定結果の詳細を付表 2 に示す。

ばく露期間中の水温は、全ての試験区において 24.8～25.4℃ であり、 $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ の範囲内であった。また、試験容器間の水温の変動は $\pm 1.5^{\circ}\text{C}$ 未満であり、試験の有効性基準を満たした。溶存酸素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。

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 ($^{\circ}\text{C}$)	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	24.9 - 25.3	7.9 - 8.4 [97 - 104]	7.2 - 7.8	52 - 54	40 - 50
助剤 対照区	25.0 - 25.4	8.0 - 8.2 [99 - 102]	7.5 - 7.8	48 - 57	45
0.020	25.0 - 25.4	8.0 - 8.2 [98 - 106]	7.5 - 7.8	—	—
0.010	24.8 - 25.3	7.9 - 8.5 [97 - 105]	7.4 - 7.7	—	—
0.50	25.0 - 25.3	8.0 - 8.4 [99 - 104]	7.5 - 7.7	56 - 63	45 - 50

—：測定対象外であることを示す。

2.2.3 死亡個体数および死亡率

ばく露期間中の死亡個体数および死亡率を表 4 に示す。

対照区では死亡個体は認められなかったが、助剤対照区では 2 尾、0.020 mg/L 区では 1 尾、0.10 mg/L 区では 6 尾、0.50 mg/L 区では 16 尾の死亡個体が認められた。

オスは 0.10 mg/L 以上の濃度区において対照群と比較して有意な増加が認められた。メスは 0.50 mg/L 区において対照群と比較し統計的に有意な増加が認められた。

ばく露期間中、対照区および助剤対照区における死亡率は 10%未満であり、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数および死亡率

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	2	17%	8%
0.020	12	0	0%		12	1	4%	2%
0.10	12	3	25%	*	12	3	25%	25%
0.50	12	11	92%	**	12	5	42%	** 67%

* or ** : 対照群と有意差有り (p<0.05 or p<0.01 : 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、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、メス 1 個体の累積産卵数を図 3、測定結果の詳細を付表 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 0.50 mg/L 区において有意な減少が認められた。

ばく露期間を通じて、対照区および助剤対照区の産卵は活発であり、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 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	1212 ± 45	1100 ± 86	90.6 ± 4.4	19.2 ± 4.4
助剤対照区	1161 ± 96	1023 ± 182	87.9 ± 9.6	19.6 ± 3.1
0.020	1269 ± 62	1150 ± 93	90.5 ± 3.8	20.7 ± 2.1
0.10	998 ± 241	840 ± 280	81.9 ± 17.1	16.6 ± 3.3
0.50	591 ± 100 **	421 ± 90 **	62.1 ± 16.4 *	10.0 ± 1.4 **

容器平均値±標準偏差 (n=4)

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

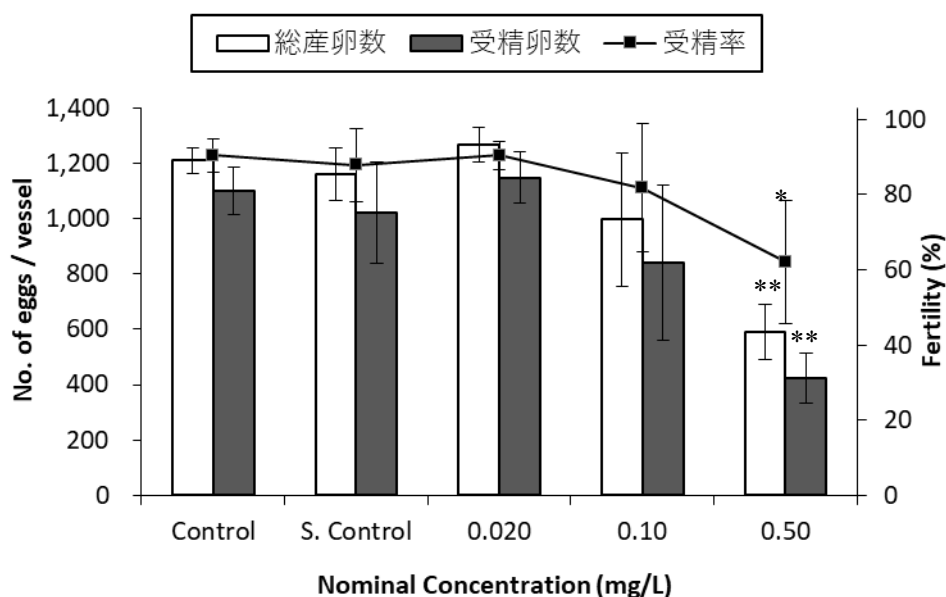


図 1 平均総産卵数、平均受精卵数および平均受精率

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

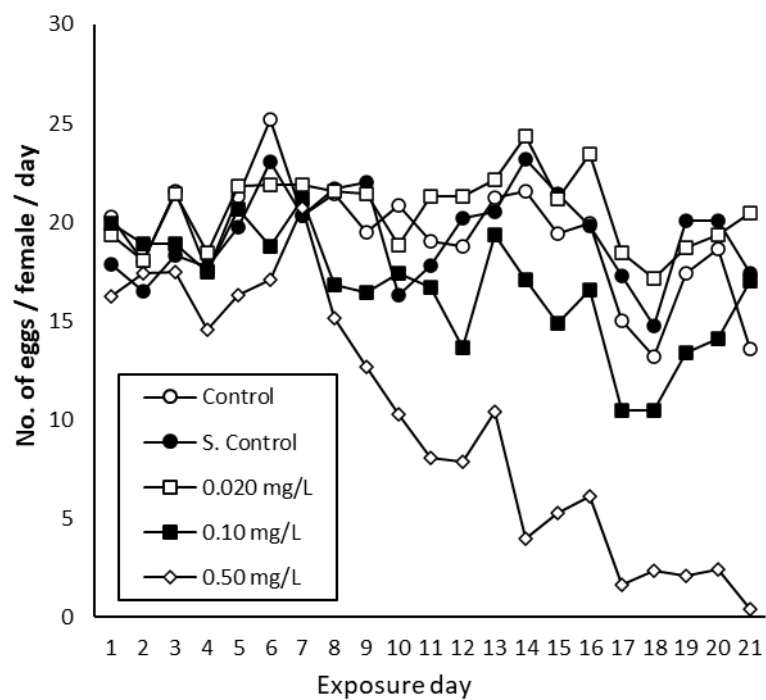


図2 ばく露期間中のメス1個体の1日当たりの平均産卵数

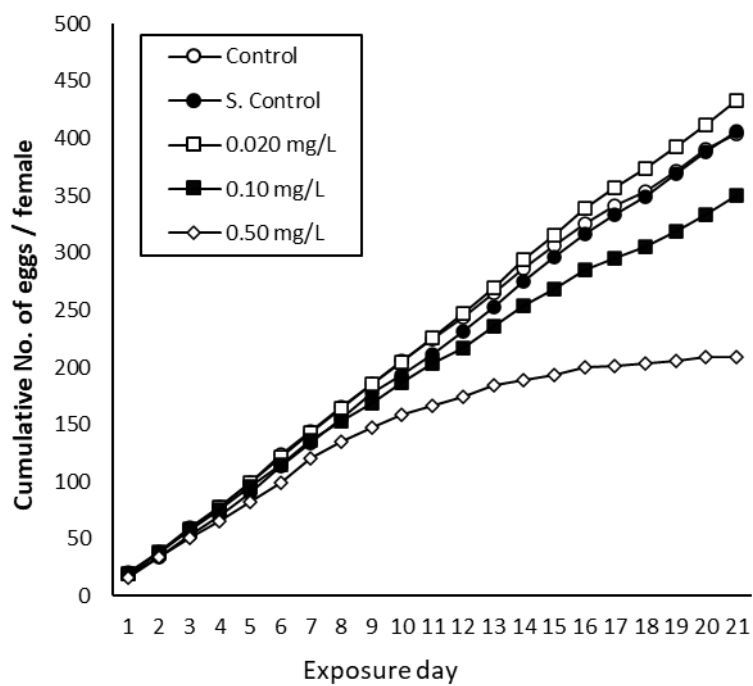


図3 ばく露期間中のメス1個体の累積産卵数

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)、測定結果の詳細を付表 4 に示す。なお、0.50 mg/L 区のばく終了時のオスは 1 尾であったため、統計処理からは除外した。

全長については、オスは 0.10 mg/L 区において対照群と比較して有意な減少が認められた。メスはすべての濃度区において対照群と比較して有意な差は認められなかった。

湿重量については、オスは 0.10 mg/L 区において対照群と比較して有意な減少が認められた。メスは 0.50 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。

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	30.8	± 1.7	30.4	± 1.6	0.338	± 0.068	0.357	± 0.041
助剤 対照区	30.2	± 1.8	30.0	± 1.9	0.310	± 0.035	0.339	± 0.050
0.020	30.4	± 1.4	30.7	± 1.3	0.324	± 0.055	0.361	± 0.046
0.10	28.3	± 1.4	**	30.9 ± 1.8	0.273	± 0.034 *	0.383	± 0.086
0.50	30.2		30.2	± 1.1	0.413		0.417	± 0.049 **

平均値±標準偏差（ただし、0.50 mg/L のオスは n=1 のため標準偏差算出不可）

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

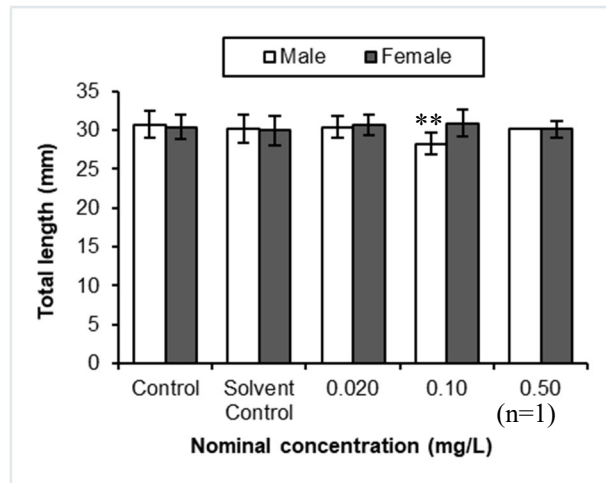


図 4 (a) ばく露終了時の全長

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

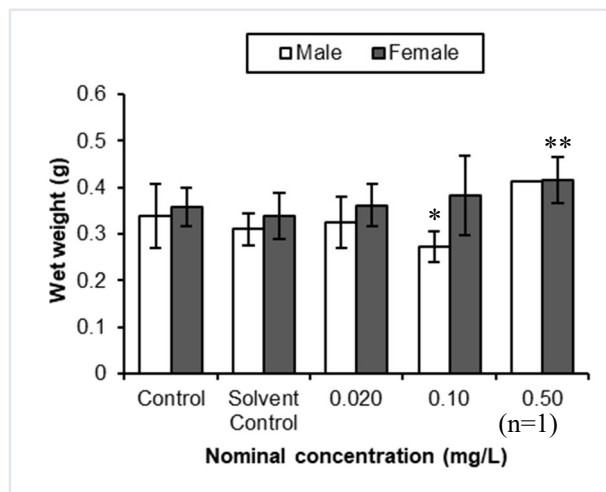


図 4 (b) ばく露終了時の湿重量

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

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)、測定結果の詳細を付表 4 に示す。なお、ばく露終了時の 0.50 mg/L 区のオスは 1 尾であったため、統計処理からは除外した。

肝臓体指数については、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。メスはすべての濃度区において対照群と比較して有意な差は認められなかった。

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減少が認められた。メスはすべての濃度区において対照群と比較して有意な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	2.57 ± 0.54	5.33 ± 0.99	0.681 ± 0.139	9.32 ± 0.94
助剤 対照区	2.21 ± 0.56	4.88 ± 1.21	0.634 ± 0.186	9.51 ± 1.15
0.020	2.43 ± 0.41	5.58 ± 0.84	0.559 ± 0.231	9.02 ± 1.36
0.10	2.99 ± 0.88 *	4.98 ± 1.02	0.500 ± 0.221 *	9.09 ± 2.36
0.50	2.54	5.14 ± 1.16	0.242	13.8 ± 2.83

平均値±標準偏差（ただし、0.50 mg/L のオスは n=1 のため標準偏差算出不可）

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

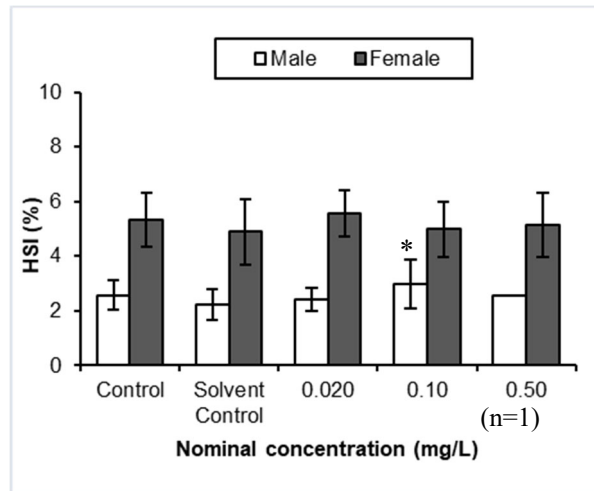


図 5(a) ばく露終了時の肝臓体指数 (HSI)

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

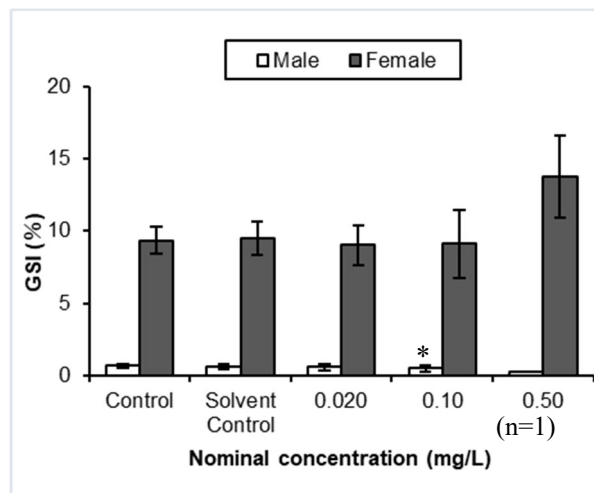


図 5(b) ばく露終了時の生殖腺体指数 (GSI)

* : 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、測定結果の詳細を付表 4 に示す。なお、ばく露終了時の 0.50 mg/L 区のおスは 1 尾であったため、統計処理からは除外した。

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は認められなかった。

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	0.50	±	0.00	1181	±	421
助剤対照区	0.58	±	0.27	1258	±	465
0.020	0.50	±	0.00	1333	±	565
0.10	0.62	±	0.36	1439	±	604
0.50	0.50			993	±	445

平均値±標準偏差（ただし、0.50 mg/L のオスは n=1 のため標準偏差算出不可）

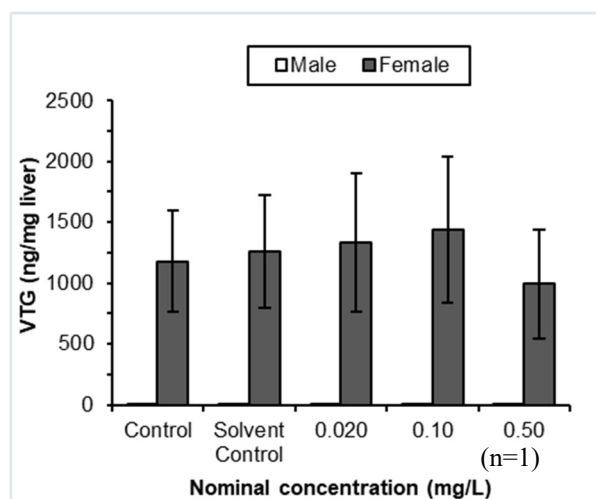


図 6 ばく露終了時の肝臓中ビテロジェニン

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、測定結果の詳細を付表 4 に示す。なお、ばく露終了時の 0.50 mg/L 区のオスは 1 尾であったため、統計処理からは除外した。

オスは対照群と比較し、すべての濃度区で有意な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	76	±	14	0	±	0
助剤対照区	78	±	16	0	±	0
0.020	78	±	13	0	±	0
0.10	68	±	13	0	±	0
0.50	84			0	±	0

平均値±標準偏差（ただし、0.50 mg/L のオスは n=1 のため標準偏差算出可）

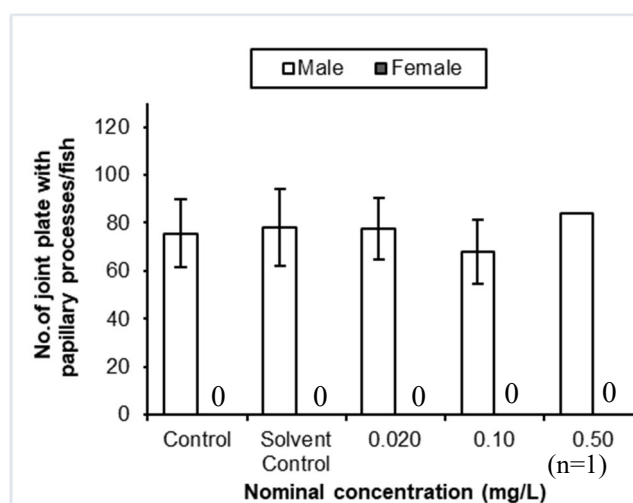


図 7 ばく露終了時の乳頭状小突起を有する節板数

2.3 結果のまとめおよび考察

OECD TG229 に準拠して、メフェナム酸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。

設定濃度 0.020、0.10 および 0.50 mg/L 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 0.0196、0.0945 および 0.452 mg/L であり、設定濃度に対して 98、99 および 90% であった。

死亡率については、オスは 0.10 mg/L 以上の濃度区、メスは 0.50 mg/L 区において対照群と比較し統計的に有意な増加が認められたことから、オスの LOEC は 0.10 mg/L、NOEC は 0.020 mg/L、メスの LOEC は 0.50 mg/L、NOEC は 0.10 mg/L と判断した。

繁殖への影響に関する指標である総産卵数、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 0.50 mg/L 区において有意な減少が認められたことから、LOEC は 0.50 mg/L、NOEC は 0.10 mg/L であると判断した。しかしながら、0.50 mg/L 区では死亡率にも有意な増加が認められ、特にオスは 1 個体を除いてすべて死亡したことから、繁殖への影響はメフェナム酸の毒性に起因するものであると考えられた。

全長については、オスは 0.10 mg/L 区において対照群と比較して有意な減少が認められた。メスはすべての濃度区において対照群と比較して有意な差は認められなかったことから、オスの LOEC は 0.10 mg/L、NOEC は 0.020 mg/L、メスの LOEC および NOEC は 0.50 mg/L 以上と判断した。

湿重量については、オスは 0.10 mg/L 区において対照群と比較して有意な減少が認められた。メスは 0.50 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ことから、オスの LOEC は 0.10 mg/L、NOEC は 0.020 mg/L、メスの LOEC は 0.50 mg/L、NOEC は 0.10 mg/L、と判断した。

肝臓体指数については、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。メスはすべての濃度区において対照群と比較して有意な差は認められなかったことから、オスの LOEC は 0.10 mg/L、NOEC は 0.020 mg/L、メスの LOEC および NOEC は 0.50 mg/L 以上と判断した。

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減少が認められた。メスはすべての濃度区において対照群と比較して有意な差は認められなかったことから、オスの LOEC は 0.10 mg/L、NOEC は 0.020 mg/L、メスの LOEC および NOEC は 0.50 mg/L 以上と判断した。

内分泌かく乱作用に関する指標である肝臓中ビテロジェニン濃度および二次性徴指標（乳頭状小突起を有する節板数）については、オスメスいずれも全ての濃度区において対照群と

比較して有意な増加は認められず、LOEC および NOEC は 0.50 mg/L 以上と判断した。したがって、本試験の試験濃度範囲においては、メフェナム酸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 メフェナム酸の試験結果まとめ

エンドポイント		LOEC (mg/L)		NOEC (mg/L)
死亡率	オス	↑	0.10	0.020
	メス	↑	0.50	0.10
総産卵数*		↓	0.50	0.10
受精卵数*		↓	0.50	0.10
受精率*		↓	0.50	0.10
全長	オス	↓	0.10	0.020
	メス		>0.50	≥0.50
湿重量	オス		0.10	0.020
	メス	↑	0.50	0.10
肝臓体指数	オス	↑	0.10	0.020
	メス		>0.50	≥0.50
生殖腺体指数	オス	↓	0.10	0.020
	メス		>0.50	≥0.50
肝臓中ビテロジェニン濃度	オス		>0.50	≥0.50
	メス		>0.50	≥0.50
二次性徴指標（乳頭状小突起を有する節板数）	オス		>0.50	≥0.50
	メス		>0.50	≥0.50

*繁殖への影響（総産卵数、受精卵数および受精率）は 0.50 mg/L 区において高い死亡率を示したことから、メフェナム酸の毒性に起因するものと考えられた。

3. 参考文献

- 1) OECD (2012), OECD Guideline for the Testing of Chemicals No.229, Fish Short Term Reproduction Assay
- 2) OECD (2019), OECD Series on Testing and Assessment No. 23 (Second Edition), Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures
- 3) EU (1995), IUCLID (International Uniform Chemical Information Data Base) Data Sheet
- 4) OECD (2000), OECD Series on Testing and Assessment No.54: Current Approaches in the Statistical Analysis of Ecotoxicity Data: A Guidance to Application

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、溶存酸素濃度、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、肝臓体指数、生殖腺体指数、乳頭状小突起数、
肝臓中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)	[mg/L]	N.D. (< 1.0)	Selenium	[mg/L]	N.D. (< 0.001)
Total Organic Carbon (TOC)	[mg/L]	N.D. (< 0.3)	Total Residue	[mg/L]	97
Biochemical Oxygen Demand (BOD)	[mg/L]	0.9	Conductivity	[mS/m]	12
Chemical Oxygen Demand (COD)	[mg/L]	0.7	Hardness	[mg CaCO ₃ /L]	49
Total Phosphorus	[mg/L]	N.D. (< 0.02)	Alkalinity (pH4.8)	[mg CaCO ₃ /L]	36
pH	[-(°C)]	7.5 (26)	Sodium	[mg/L]	6.2
Coliform Group	[MPN/100mL]	8	Potassium	[mg/L]	0.9
Total Mercury	[mg/L]	N.D. (< 0.00005)	Calcium	[mg/L]	15
Copper	[mg/L]	N.D. (< 0.005)	Magnesium	[mg/L]	3.1
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]	0.03	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)			

付表 2 ばく露期間中の水温、溶存酸素濃度、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	25.3	24.9	25.2	25.1	8.2	8.1	8.4	8.0	7.7	7.5	7.2	7.5
	2	25.3	25.0	25.3	25.1	8.3	7.9	8.3	8.0	7.8	7.7	7.3	7.5
	3	25.3	24.9	25.2	25.1	8.2	8.0	8.4	8.0	7.8	7.7	7.4	7.5
	4	25.3	24.9	25.2	25.1	8.1	8.0	8.3	8.0	7.8	7.8	7.4	7.5
助剤対照区	1	25.4	25.1	25.3	25.3	8.2	8.1	8.2	8.1	7.8	7.8	7.5	7.5
	2	25.4	25.1	25.3	25.3	8.2	8.1	8.2	8.1	7.8	7.8	7.6	7.5
	3	25.4	25.0	25.3	25.3	8.2	8.1	8.2	8.2	7.8	7.8	7.5	7.5
	4	25.4	25.0	25.2	25.3	8.2	8.0	8.1	8.2	7.9	7.8	7.6	7.5
0.0200	1	25.2	24.9	25.3	25.2	8.6	8.0	8.2	8.2	7.7	7.8	7.6	7.5
	2	25.1	24.8	25.3	25.3	8.4	8.0	8.3	8.2	7.7	7.8	7.6	7.5
	3	25.2	24.9	25.3	25.3	8.4	8.0	8.2	8.1	7.7	7.8	7.6	7.5
	4	25.3	24.9	25.3	25.1	8.4	8.0	8.2	8.1	7.7	7.7	7.6	7.5
0.10	1	25.3	24.8	25.3	25.1	8.4	7.9	8.3	8.2	7.7	7.7	7.6	7.5
	2	25.3	24.9	25.3	25.2	8.4	8.0	8.4	8.2	7.7	7.7	7.6	7.5
	3	25.3	24.8	25.3	25.1	8.4	8.1	8.3	8.2	7.7	7.8	7.6	7.5
	4	25.2	24.8	25.3	25.1	8.5	8.0	8.3	8.2	7.7	7.8	7.6	7.5
0.50	1	25.2	25.1	25.3	25.2	8.4	8.0	8.4	8.3	7.7	7.8	7.7	7.6
	2	25.3	25.0	25.3	25.3	8.4	8.0	8.3	8.3	7.7	7.8	7.6	7.6
	3	25.2	25.0	25.3	25.2	8.4	8.0	8.3	8.3	7.7	7.8	7.6	7.5
	4	25.3	25.0	25.3	25.2	8.4	8.1	8.4	8.3	7.7	7.8	7.6	7.6

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	54	47	42	46	50	40	45	45
助剤対照区	1	57	52	48	48	45	45	45	45
0.50	1	53	44	46	48	45	45	45	45

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
1	産卵数	77	55	64	44	72	63	57	69	55	62	47	64	62	59	56	60	31	44	43	46	33	1163
	受精卵数	69	55	59	38	65	62	51	64	42	56	44	46	43	58	56	47	31	19	38	27	33	1003
	受精率	90	100	92	86	90	98	89	93	76	90	94	72	69	98	100	78	100	43	88	59	100	(86)
2	産卵数	62	53	68	56	60	75	73	72	57	63	64	51	68	63	64	44	73	42	54	43	50	1255
	受精卵数	50	50	57	53	60	67	65	65	47	61	60	50	67	57	51	42	63	39	53	43	36	1136
	受精率	81	94	84	95	100	89	89	90	82	97	94	98	99	90	80	95	86	93	98	100	72	(91)
3	産卵数	40	52	62	56	61	82	56	59	67	56	66	58	65	63	56	67	45	39	50	56	27	1183
	受精卵数	37	52	59	53	50	75	48	52	64	43	59	56	59	53	52	59	35	36	48	54	16	1060
	受精率	93	100	95	95	82	91	86	88	96	77	89	97	91	84	93	88	78	92	96	96	59	(89)
4	産卵数	64	56	65	54	63	82	58	57	55	69	51	52	60	74	57	68	31	33	62	79	53	1243
	受精卵数	63	56	63	54	61	79	54	56	50	68	47	52	59	72	55	65	31	30	60	73	52	1200
	受精率	98	100	97	100	97	96	93	98	91	99	92	100	98	97	96	96	100	91	97	92	98	(97)
1	産卵数	55	54	46	49	53	59	69	45	63	47	44	68	59	57	53	58	36	38	54	53	39	1099
	受精卵数	50	53	45	48	44	49	69	39	53	44	39	67	55	56	50	56	31	34	48	48	36	1014
	受精率	91	98	98	98	83	83	100	87	84	94	89	99	93	98	94	97	86	89	89	91	92	(92)
2	産卵数	61	43	62	47	58	61	63	64	73	58	55	63	57	67	66	63	64	47	61	79	50	1262
	受精卵数	55	34	61	47	56	49	60	60	67	56	54	61	54	66	65	62	59	44	34	76	44	1164
	受精率	90	79	98	100	97	80	95	94	92	97	98	97	95	99	98	98	92	94	56	96	88	(92)
3	産卵数	41	34	38	58	61	77	48	74	57	52	52	39	49	85	64	47	41	33	51	33	28	1062
	受精卵数	18	32	17	21	40	38	37	52	47	46	42	16	36	59	62	39	38	33	43	28	24	768
	受精率	44	94	45	36	66	49	77	70	82	88	81	41	73	69	97	83	93	100	84	85	86	(74)
4	産卵数	57	67	74	59	65	80	64	77	71	39	45	52	61	46	53	50	49	44	55	56	57	1221
	受精卵数	39	66	74	55	65	79	63	55	69	39	45	52	59	38	47	45	48	44	53	54	56	1145
	受精率	68	99	100	93	100	99	98	71	97	100	100	100	97	83	89	90	98	100	96	96	98	(94)

助剤
対照区

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	
0.020	1	産卵数	54	57	85	58	73	75	65	86	62	57	75	71	75	88	62	63	41	54	51	40	56	1348
		受精卵数	48	54	85	52	60	72	65	86	61	50	72	68	67	84	60	63	33	54	51	39	54	1278
		受精率	89	95	100	90	82	96	100	100	98	88	96	96	89	95	97	100	80	100	100	98	96	(95)
	2	産卵数	62	59	56	52	66	58	66	60	68	57	62	58	64	66	59	56	59	45	58	61	56	1248
		受精卵数	59	51	48	27	60	54	65	48	49	56	51	56	64	65	55	48	45	42	32	48	46	1069
		受精率	95	86	86	52	91	93	98	80	72	98	82	97	100	98	93	86	76	93	55	79	82	(85)
	3	産卵数	57	61	66	49	63	65	68	53	72	55	56	65	69	65	66	61	54	53	51	64	65	1278
		受精卵数	56	59	65	45	59	65	65	50	72	46	50	63	58	63	60	46	49	48	49	64	26	1158
		受精率	98	97	98	92	94	100	96	94	100	84	89	97	84	97	91	75	91	91	96	100	40	(91)
0.10	4	産卵数	59	40	50	62	60	65	64	60	55	57	63	62	58	73	67	78	49	37	46	48	48	1201
		受精卵数	53	40	46	58	57	62	61	45	55	52	57	55	54	62	62	67	44	36	39	45	45	1095
		受精率	90	100	92	94	95	95	95	75	100	91	90	89	93	85	93	86	90	97	85	94	94	(92)
	1	産卵数	67	68	63	37	68	57	68	51	79	55	70	56	67	66	49	61	36	46	44	37	51	1196
		受精卵数	66	68	60	36	60	36	62	46	78	50	66	44	44	62	47	57	36	41	44	37	43	1083
		受精率	99	100	95	97	88	63	91	90	99	91	94	79	66	94	96	93	100	89	100	100	84	(91)
	2	産卵数	63	42	67	90	56	65	70	67	36	70	69	31	89	60	42	80	36	41	63	16	60	1213
		受精卵数	60	40	64	74	54	59	69	67	36	47	65	31	84	57	40	70	35	18	34	16	47	1067
		受精率	95	95	96	82	96	91	99	100	100	67	94	100	94	95	95	88	97	44	54	100	78	(89)
3	産卵数	67	54	48	37	61	60	68	38	47	40	20	40	21	37	40	17	21	9	17	56	24	822	
	受精卵数	34	42	46	34	58	44	51	35	37	24	11	23	11	30	17	8	4	0	1	3	6	519	
	受精率	51	78	96	92	95	73	75	92	79	60	55	58	52	81	43	47	19	0	6	5	25	(56)	
4	産卵数	42	63	49	46	63	43	48	46	35	44	25	23	36	25	33	24	22	19	23	32	18	759	
	受精卵数	40	58	39	46	54	40	42	44	30	37	18	22	35	23	30	23	22	18	23	32	16	692	
	受精率	95	92	80	100	86	93	88	96	86	84	72	96	97	92	91	96	100	95	100	100	89	(92)	

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
1	産卵数	32	44	45	30	42	45	33	22	24	15	19	15	22	20	17	12	0	0	5	0	0	442
	受精卵数	32	42	40	28	29	16	21	22	21	13	19	14	22	20	17	8	0	0	0	0	0	364
	受精率	100	95	89	93	69	36	64	100	88	87	100	93	100	100	100	67	-	-	0	-	-	(81)
2	産卵数	45	66	23	41	34	31	127	27	19	6	24	20	50	20	26	30	14	20	14	16	3	656
	受精卵数	38	64	22	25	23	31	50	26	7	0	0	13	21	18	22	15	1	1	0	2	0	379
	受精率	84	97	96	61	68	100	39	96	37	0	0	65	42	90	85	50	7	5	0	13	0	(49)
0.50	産卵数	60	53	64	64	64	71	67	65	52	48	0	0	11	0	10	0	1	0	0	0	0	630
	受精卵数	59	50	60	61	40	69	63	64	50	40	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	556
	受精率	98	94	94	95	63	97	94	98	96	83	-	-	0	-	0	-	0	-	-	-	-	(70)
	産卵数	58	46	78	40	56	58	22	68	57	34	38	44	21	0	0	13	0	1	0	1	0	635
	受精卵数	57	44	55	31	53	54	20	25	15	0	20	12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	386
	受精率	98	96	71	78	95	93	91	37	26	0	53	27	0	-	-	0	-	0	-	0	-	(48)

0.50

付表４ ばく露終了時の全長、湿重量、肝臓体指数、生殖腺体指数、乳頭状小突起数、肝臓中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	31.00	0.3454	5.27	8.14	0	1557
		2	メス	29.44	0.3447	6.73	8.96	0	696
		3	メス	30.01	0.3681	5.68	9.64	0	1583
		4	オス	30.40	0.3214	2.21	0.78	68	<L.O.Q
		5	オス	30.25	0.2831	2.37	0.67	80	<L.O.Q
		6	オス	31.55	0.3788	4.07	0.69	57	<L.O.Q
	2	7	メス	33.46	0.4268	5.88	8.01	0	1590
		8	メス	27.55	0.2978	4.80	10.11	0	1201
		9	メス	32.28	0.3937	6.45	10.03	0	1719
		10	オス	31.41	0.3302	2.48	0.79	77	<L.O.Q
		11	オス	32.56	0.4208	2.42	1.00	90	<L.O.Q
		12	オス	29.92	0.3181	2.55	0.66	60	<L.O.Q
	3	13	メス	30.28	0.3913	5.88	8.71	0	1122
		14	メス	31.50	0.3985	5.50	10.61	0	1183
		15	メス	30.84	0.3326	3.31	8.24	0	1527
		16	オス	29.50	0.2871	3.17	0.63	57	<L.O.Q
		17	オス	28.32	0.2641	2.57	0.64	81	<L.O.Q
		18	オス	27.81	0.2266	2.25	0.53	64	<L.O.Q
	4	19	メス	29.32	0.3331	5.58	9.37	0	791
		20	メス	30.24	0.3642	5.11	10.71	0	615
		21	メス	28.92	0.2934	3.78	9.27	0	583
		22	オス	33.08	0.4403	2.29	0.75	99	<L.O.Q
		23	オス	32.60	0.4187	2.25	0.45	90	<L.O.Q
		24	オス	31.76	0.3709	2.26	0.59	84	<L.O.Q
助剤 対照区	1	25	メス	31.79	0.3923	4.49	9.10	0	873
		26	メス	28.40	0.2797	5.29	9.08	0	787
		27	メス	30.48	0.3500	4.09	9.26	0	1289
		28	オス	30.92	0.3233	1.55	1.05	111	<L.O.Q
		29	オス	31.91	0.3441	2.64	0.61	72	<L.O.Q
		30	オス	28.93	0.3224	2.51	0.56	74	<L.O.Q
	2	31	メス	28.92	0.2923	3.32	9.92	0	740
		32	メス	32.83	0.4169	4.39	8.13	0	1184
		33	メス	28.14	0.3274	6.96	8.92	0	1108
		34	オス	31.16	0.3296	2.12	0.55	98	<L.O.Q
		35	オス	32.05	0.3322	2.20	0.66	64	<L.O.Q
		36	オス	32.32	0.3577	2.26	0.84	76	1.5
	3	37	メス	28.12	0.2748	3.35	8.19	0	1241
		38	メス	31.08	0.3456	5.79	10.85	0	2303
		39	メス	-	-	-	-	-	-
		40	オス	26.65	0.2324	1.51	0.60	58	<L.O.Q
		41	オス	30.96	0.3139	2.23	0.54	87	<L.O.Q
		42	オス	29.30	0.3121	3.30	0.38	67	<L.O.Q
	4	43	メス	31.88	0.3945	4.87	11.84	0	1673
		44	メス	28.00	0.3133	6.29	9.86	0	1383
		45	メス	-	-	-	-	-	-
		46	オス	29.63	0.3032	2.61	0.53	86	<L.O.Q
		47	オス	27.69	0.2612	2.37	0.46	60	<L.O.Q
		48	オス	30.41	0.2914	1.27	0.82	86	<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、肝臓体指数、生殖腺体指数、乳頭状小突起数、肝臓中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)
0.020	1	49	メス	29.28	0.3334	6.93	7.83	0	1154
		50	メス	31.53	0.4123	5.92	10.91	0	1123
		51	メス	-	-	-	-	-	-
		52	オス	29.83	0.3271	2.32	0.55	79	<L.O.Q
		53	オス	31.85	0.3783	3.09	0.69	73	<L.O.Q
		54	オス	29.45	0.3233	2.23	0.31	62	<L.O.Q
	2	55	メス	31.70	0.3789	5.36	8.66	0	549
		56	メス	29.27	0.3513	6.75	10.87	0	2366
		57	メス	30.74	0.3433	6.26	7.17	0	611
		58	オス	32.21	0.3858	2.83	0.47	75	<L.O.Q
		59	オス	28.46	0.2596	2.23	0.77	66	<L.O.Q
		60	オス	29.83	0.3211	2.90	0.40	93	<L.O.Q
	3	61	メス	31.54	0.3615	5.56	10.68	0	1316
		62	メス	31.05	0.4181	5.45	7.99	0	1059
		63	メス	31.62	0.3713	4.15	7.35	0	2288
		64	オス	29.55	0.2510	1.83	0.40	71	<L.O.Q
		65	オス	28.83	0.2770	2.64	0.29	75	<L.O.Q
		66	オス	30.56	0.2705	2.59	0.85	91	<L.O.Q
	4	67	メス	29.52	0.3344	5.86	8.28	0	1011
		68	メス	32.54	0.3940	5.05	9.44	0	1251
		69	メス	28.80	0.2595	4.78	8.21	0	1212
		70	オス	32.79	0.4266	2.27	0.49	94	<L.O.Q
		71	オス	30.21	0.3175	2.46	1.04	59	<L.O.Q
		72	オス	31.60	0.3556	1.72	0.45	95	<L.O.Q
0.10	1	73	メス	31.63	0.4166	5.23	8.40	0	1410
		74	メス	30.98	0.4232	5.43	9.43	0	1783
		75	メス	-	-	-	-	-	-
		76	オス	29.28	0.2789	2.83	0.72	70	<L.O.Q
		77	オス	28.40	0.2663	2.59	0.34	71	1.6
		78	オス	28.58	0.2651	4.34	0.64	69	<L.O.Q
	2	79	メス	30.40	0.3241	6.14	10.52	0	1801
		80	メス	33.06	0.5086	4.76	13.41	0	2127
		81	メス	28.65	0.3121	3.94	9.07	0	1336
		82	オス	29.95	0.2908	3.58	0.14	47	<L.O.Q
		83	オス	28.65	0.3167	3.82	0.32	57	<L.O.Q
		84	オス	-	-	-	-	-	-
	3	85	メス	30.91	0.3752	6.74	9.99	0	2062
		86	メス	33.29	0.4522	3.80	6.19	0	679
		87	メス	-	-	-	-	-	-
		88	オス	26.66	0.2200	2.86	0.45	70	<L.O.Q
		89	オス	25.40	0.2284	3.37	0.74	61	<L.O.Q
		90	オス	-	-	-	-	-	-
	4	91	メス	31.63	0.4125	4.80	9.45	0	1420
		92	メス	27.85	0.2211	3.98	5.38	0	336
		93	メス	-	-	-	-	-	-
		94	オス	29.06	0.3189	1.69	0.41	96	<L.O.Q
		95	オス	28.39	0.2681	1.83	0.75	70	<L.O.Q
		96	オス	-	-	-	-	-	-

<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、肝臓体指数、生殖腺体指数、乳頭状小突起数、肝臓中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)
0.50	1	97	メス	31.45	0.4624	4.17	15.70	0	1411
		98	メス	-	-	-	-	-	-
		99	メス	-	-	-	-	-	-
		100	オス	-	-	-	-	-	-
		101	オス	-	-	-	-	-	-
		102	オス	-	-	-	-	-	-
	2	103	メス	29.58	0.3810	5.30	12.34	0	767
		104	メス	29.20	0.3391	3.36	14.77	0	553
		105	メス	-	-	-	-	-	-
		106	オス	30.21	0.4131	2.54	0.24	84	<L.O.Q
		107	オス	-	-	-	-	-	-
		108	オス	-	-	-	-	-	-
	3	109	メス	30.93	0.4592	6.90	14.57	0	448
		110	メス	31.34	0.4463	4.75	16.69	0	935
		111	メス	-	-	-	-	-	-
		112	オス	-	-	-	-	-	-
		113	オス	-	-	-	-	-	-
		114	オス	-	-	-	-	-	-
	4	115	メス	30.02	0.4498	5.78	14.12	0	1650
		116	メス	28.76	0.3778	5.72	8.13	0	1188
		117	メス	-	-	-	-	-	-
		118	オス	-	-	-	-	-	-
		119	オス	-	-	-	-	-	-
		120	オス	-	-	-	-	-	-

<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。

リサイクル適性の表示：印刷用の紙にリサイクルできます。
この印刷物は、グリーン購入法に基づく基本方針における「印刷」に係る判断の基準にしたがい、印刷用の紙へのリサイクルに適した材料〔Aランク〕のみを用いて作製しています。