

環境省請負業務

令和2年度分

令和元年度及び令和2年度化学物質の内分泌かく乱作用に関する
第二段階生物試験（リン酸トリフェニル）実施業務

報告書（案）

令和3年3月

株式会社LSIメディエンス

1. 実施内容

本業務は、環境省により取りまとめられた「化学物質の内分泌かく乱作用に関する試験および評価の考え方や枠組み（平成 22 年 11 月）」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、既の実施された試験管内試験および第一段階生物試験の結果を踏まえて優先順位が高いと考えられる物質（リン酸トリフェニル）について、第二段階生物試験である MEOGRT を令和元年度から 2 年度にかけて実施し、内分泌かく乱に関わるエンドポイントへの作用・影響の有無および NOEC（最大無影響濃度）または LOEC（最小影響濃度）等のデータ収集を行った。

MEOGRT は、平成 27 年に OECD テストガイドラインとして認定されたメダカ拡張一世代繁殖試験（Medaka Extended One Generation Reproduction Test: OECD TG240）¹⁾の略称であり、内分泌かく乱化学物質の確定試験として、EXTEND2016 の中での第二段階生物試験として位置づけられている。

実施内容の詳細を以下に示す。

(1) リン酸トリフェニルのメダカ拡張一世代繁殖試験の実施

OECD TG240 に基づいてリン酸トリフェニルの MEOGRT を実施し、結果を報告した。

(2) 化学物質の内分泌かく乱作用に関する検討会への報告

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

(3) 報告書の作成

上記(1), (2)の結果を取りまとめた報告書（本報告書）を 3 部、報告書の電子データを収納した電子媒体（DVD-ROM）8 式を作成した。

2. リン酸トリフェニルのメダカ拡張一世代繁殖試験の実施

2.1 材料および方法

2.1.1 被験物質

被験物質の名称，物理化学的性状等を以下に示す。

試験に用いる試薬は，富士フィルム和光純薬株式会社（Lot 番号：CAN5722，純度：99.9%）より入手した。

(1) CAS 登録番号

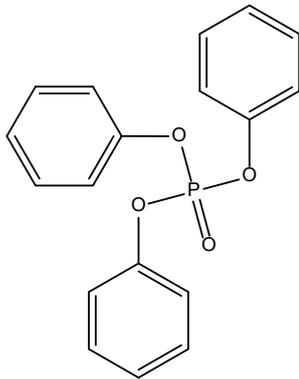
CAS: 115-86-6

(2) 一般名

和名：リン酸トリフェニル（別名：トリフェニル=ホスフェート）

英名：Triphenyl phosphate

(3) 構造式



(4) 分子式および分子量

分子式：C₁₈H₁₅O₄P

分子量：326.28

(5) 溶解性

対水溶解度 1.9 mg/L (25°C)²⁾

(6) 分配係数

オクタノール/水分配係数 4.59²⁾

(7) その他

蒸気圧： 6.28 × 10⁻⁶ mmHg (25°C, 外挿値)²⁾

生物分解性： BOD 90% (好氣的分解)³⁾

加水分解性： 半減期：30～300 日 (pH を 8～7 と仮定して計算)⁴⁾

半減期 7.5 日 (pH 8.2, 21 ± 2°C, 測定値)⁴⁾

2.1.2 試験生物

(1) 供試生物種

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

(2) 飼育環境および条件

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

- ・飼育水槽： オールガラス水槽 (5 L)
- ・飼育水： 脱塩素水道水
- ・飼育方法： 流水式
- ・水温： $25\pm 2^{\circ}\text{C}$
- ・pH： 6.5~8.5
- ・光周期： 明期 16 時間・暗期 8 時間
- ・エアレーション： なし
- ・飼料： ブラインシュリンプ (ベトナム産) の孵化後 24 時間以内の幼生を、1 日 2 回飽食量を給餌

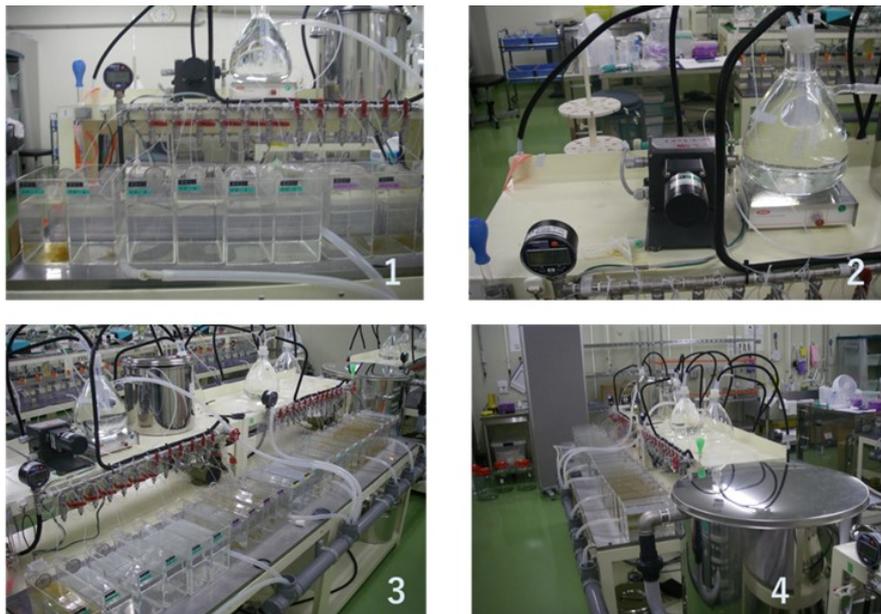
2.1.3 試験環境および条件など

(1) 試験室

試験はすべて、株式会社 L S I メディエンス環境リスク評価センター（神奈川県横浜市青葉区鴨志田町 1000 番地）で行った。

(2) 試験装置

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



1：流水式装置（濃度区）、2：混合槽、3：流水式装置（全体）、4：温調槽

図 1-1 流水式装置

(3) 試験条件

ばく露は、前述の OECD TG240 に準じて、以下の条件で行った。

- ・飼育水槽：オールガラス水槽（蓋：透明アクリル板）
- ・希釈水：脱塩素水道水
- ・ばく露方式：流水式（換水率 5 回/日以上）
- ・ばく露期間：F0 世代から F2 世代の孵化までの計 19 週
(2020 年 5 月 20 日～2020 年 9 月 29 日)
 - ・ F0 世代 : 4 週間
 - ・ F1 世代 : 15 週間
 - ・ F2 世代 : 対照区の孵化日の中央値の 2 倍（約 3 週間）
- ・試験液量：
 - ・ F0 世代 : 2 L/連
 - ・ F1 世代（受精後 0～6 週目） : 2 L/連
 - ・ F1 世代（受精後 7～10 週目） : 5 L/連
 - ・ F1 世代（受精後 10～15 週目） : 5 L/連
- ・試験区数：被験物質濃度区 5 濃度（50, 16, 5.0, 1.6, 0.50 $\mu\text{g/L}$ ），対照区
- ・連数：
 - ・ F0 世代 : 12 連（対照区），6 連（濃度区）
 - ・ F1 世代（受精後 1～10 週目） : 12 連（対照区），6 連（濃度区）
 - ・ F1 世代（受精後 10～15 週目） : 24 連（対照区），12 連（濃度区）
 - ・ F2 世代（受精後 1～3 週目） : 12 連（対照区），6 連（濃度区）
- ・供試生物数：
 - ・ F0 世代 : 2 個体（オス 1 個体・メス 1 個体）/連
 - ・ F1 世代（受精後 1 週目） : 20 個体/連
 - ・ F1 世代（受精後 2～10 週目） : 12 個体/連
 - ・ F1 世代（受精後 10～15 週目） : 2 個体（オス 1 個体・メス 1 個体）/連
 - ・ F2 世代（受精後 1～3 週目） : 20 個体/連
- ・供試生物齢：
 - ・ F0 世代 : 12-16 週齢（本試験では 15 週齢（受精後 105 日））
オス 250 mg 以上，メス 350 mg 以上
- ・継代時期：
 - ・ F0 世代 : 試験開始 4 週目のできるだけ早い日（+2 日）
（本試験では試験開始 23 日目，F0：19 週齢目）
 - ・ F1 世代 : 試験開始 120 日目（+1 日）（F1：15 週齢目）
（本試験では試験開始 120 日目）
- ・水温：25 \pm 1 $^{\circ}\text{C}$
- ・pH：6.5～8.5（ばく露期間中の変動は \pm 0.5 以内）
- ・溶存酸素飽和度：60%以上
- ・光周期：明期 16 時間・暗期 8 時間
- ・エアレーション：なし
- ・飼料：ブラインシュリンプ（ベトナム産）の孵化後 24 時間以内の幼生を 1 日 2～4 回給餌した。当施設のメダカの飽食量を考慮し、成長段階に応じ表 1-1 に示す量を給餌した。成魚については、給餌量は事前の予備検討およびじゅん化時の産卵数を考慮し決定した。

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

| 孵化後週齢 (wph) | 孵化後日齢 (dph) | 本試験 (mg dry weight/fish/day) |
|----------------|----------------|---------------------------------|
| Week1 | Day 1 | 0.1 |
| | Day 2 | 0.1 |
| | Day 3 | 0.1 |
| | Day 4 | 0.1 |
| | Day 5 | 0.1 |
| | Day 6 | 0.2 |
| | Day 7 | 0.2 |
| Week2 | Day 8 | 0.2 |
| | Day 9 | 0.3 |
| | Day 10 | 0.3 |
| | Day 11 | 0.3 |
| | Day 12 | 0.4 |
| | Day 13 | 0.6 |
| | Day 14 | 0.9 |
| Week3 | Day 15 | 0.9 |
| | Day 16-21 | 1.5 |
| Week 4 | Day 22-28 | 2.3 |
| Week 5 | Day 29-35 | 3.3 |
| Week 6 | Day 36-42 | 5.1~7.7 |
| Week 7 | Day 43-49 | 8.8 |
| Week 8 | Day 50-56 | 8.8~13.3 |
| Week 9 | Day 57-62 | (12 fish/tank) 21.2 |
| | Day 63 | (2 fish/tank) 21.2 |
| Week 10 | Day 64-70 | 21.2 |
| Week 11~ | Day 71~ | (F0)10.6, (F1)25.4 |

(4) 環境測定機器

水温, pH, 溶存酸素濃度の測定は, それぞれ以下の機器を用いて行った。

- ・水温計: 横河メータ&インスツルメンツ製 TX1001 型
- ・マルチ水質計 (溶存酸素濃度, pH 測定用): 東亜ディーケーケー製 MM-60R 型

(5) 試験液の調製

被験物質の溶解度が低いため, 0.50~50.0 µg/L 濃度区それぞれの試験液は, 負荷率 (Loading rate: 被験物質と水の重量対容積比) 5 mg/L の試験液をスターラーで 48 時間攪拌, 超音波処理 30 分した後, フィルター*1 でろ過した試験原液*2 (濃度測定を実施。分析方法は(6)被験物質の濃度測定と同様) を用い, それぞれ試験用水で希釈して調製した。

*1: ミリポア製 マイレクス HA 0.45 µm

*2: ろ過後の被験物質濃度は 1.5~2 mg/L 前後となることを予備検討にて確認

(6) 被験物質の濃度測定

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

【HPLC 測定条件】

装置

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

ワークステーション: ChemStation

デガッサ: G1322A 型

送液ポンプ: G1311A 型 (バイナリポンプ)

オートサンプラ: G1313A 型

カラムオーブン: G1316A 型

ダイオードアレイ検出器 (DAD): G1315B 型

条件

カラム: Agilent 製 Proshell 120 EC-C18 2.7 μ m 4.6 mm i.d. \times 50 mm

カラムオーブン: 40°C

溶離液: A1 液: 超純水*, B1 液: HPLC 用アセトニトリル
A 液 25%, B 液 75%

ストップタイム: 2.5 min

流速: 1.0 mL/min

測定波長: 210 nm

試料注入量: 200 μ L

*: JIS K0557 A4 グレードの水

【標準溶液の調製】

リン酸トリフェニル 100 mg を秤量し、HPLC 用アセトニトリルで溶解し 100 mL に定容とし、1000 mg/L の溶液を調製した。この溶液を HPLC 用アセトニトリルで順次希釈し、0.000200, 0.000500, 0.00100, 0.00200, 0.00500, 0.0100 mg/L の標準溶液を調製した。また、HPLC 用アセトニトリルを 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。

標準溶液を 0.75mL 採取

| ←超純水 0.75mL 添加

HPLC 測定

【試験水の分析】

試験液を以下のように分析した。

試験液 (超純水で適宜希釈*) を 0.75mL 採取

| ←HPLC 用アセトニトリル 0.75mL 添加

HPLC 測定

*: 検量線を超えると予想されるものについて希釈

2.1.4 ばく露および観察・測定の方法

MEOGRT (OECD TG240) のタイムラインを図 1-2, 試験期間中における連数の変化とプールおよび分配の手順を図 1-3 に示した。

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

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

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

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

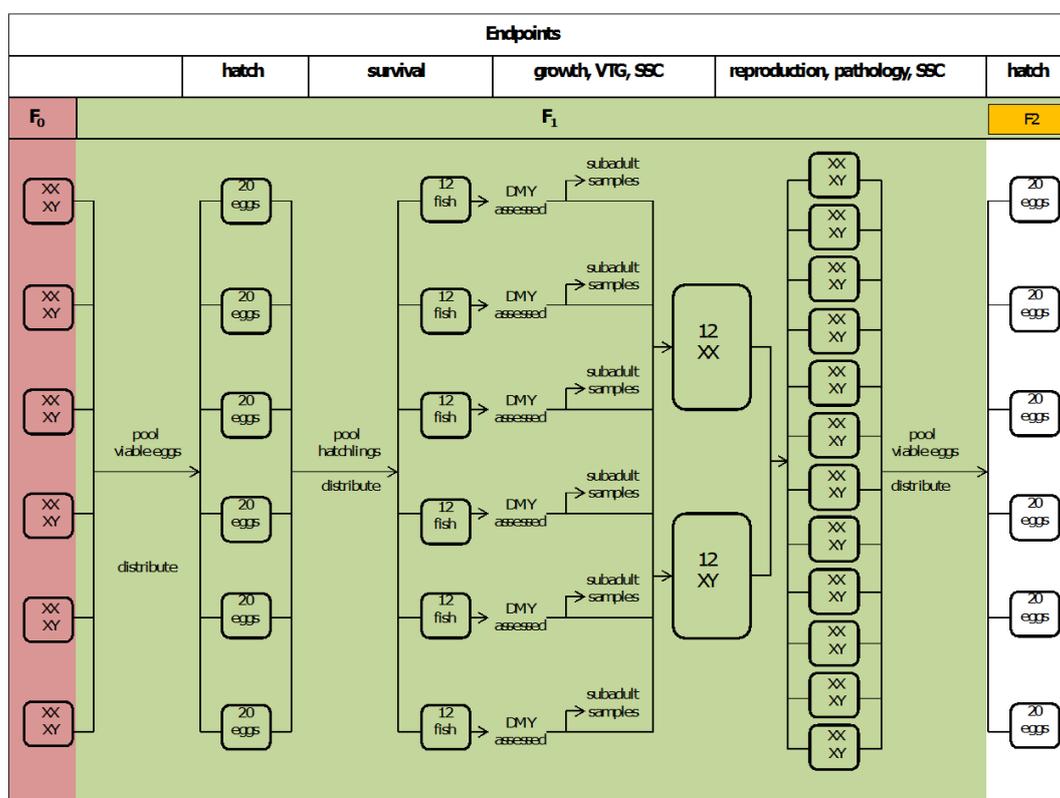


図 1-3 MEOGRT における連のプールと分配の手順

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

(1) F0 世代

[ばく露方法]

生後 12 週齢のメダカを雌雄選別し、1 水槽あたりにメス 1 個体・オス 1 個体を投入して 21 日間のじゅん化を行った (50 ペア)。その際、外観に異常が認められた個体や極端に成長差がある個体は除去した。

じゅん化終了後、被験物質の濃度が適正值であることを確認してから、供試メダカを各水槽 (12 水槽+6 水槽×5 濃度区=計 42 水槽) に投入して試験開始した。水温, pH, 溶存酸素濃度を試験区毎に毎日測定した。

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

[ばく露期間中の観察・計測]

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

- 1) 行動観察項目
摂餌活動の低下, 横転, 平衡喪失, 表層集中, 活動度低下, 過運動など
- 2) 外観観察項目
体幹湾曲, 眼球突出, 腹部膨満, 体色異常, 出血, 粘液の異常, 立鱗など

[F1 試験用受精卵の採取]

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

[ばく露終了後の測定]

4 週間のばく露期間終了後 (本試験では Test Day 23, 128 日齢), 生存した全個体を氷麻酔処理した上で解剖し、下記項目について測定した。

- 1) 全長・体長および湿重量の測定
全長・体長は電子ノギス (株式会社ミットヨ製) を用いて、湿重量は電子天秤 (メトラー製 AG204 型) を用いて測定した。
- 2) 二次性徴指標の計測
メダカの臀鰭を切断し、4%パラホルムアルデヒド・リン酸緩衝液で固定し、臀鰭軟条上に認められる乳頭状小突起を実体顕微鏡 (ニコン製 SMZ-U 型) の下で観察し、突起を有する節板数を計測し、対照区と比較した。
- 3) 肝臓の測定および肝臓中ビテロジェニン濃度の測定
解剖により肝臓を摘出し電子天秤 (メトラー製 AG204 型) 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 肝臓を回収したテストチューブ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し、4°C, 15000rpm, 10 分間の遠心分離にかける。
- ③ 分離した上清を 500 μ L マイクロテストチューブに回収し、直ちに氷冷し、続けてビテロジェニン測定に供することができない場合は-80 °Cで保存した。

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。定量下限値は 0.4 ng/mg liver weight とし、定量下限を下回ったものは定量下限の半値 (0.2 ng/mg) を用いて平均値を算出した。

4) 生殖腺の観察・測定

解剖後、胴体から生殖腺を摘出し、雌雄について観察した。電子天秤 (メトラ製 AG204 型) によって秤量した後、ブアン液によって固定した。

(2) F1 世代

[ばく露方法]

F0 世代より採取した受精卵は、水槽内に設置した孵化用シリンダーに投入し F0 世代と同一条件でばく露を継続した。孵化用シリンダーは、底面をステンレスメッシュ (No. 32) で覆った円筒状のガラス管 (内径 5 cm, 高さ 10 cm) であり、孵化後の仔魚は、ピペットを用いてシリンダー外に移動し、ばく露を継続した。

水質の測定、水槽の掃除、廃水の処理などは、F0 世代と同一である。

[ばく露期間中の観察]

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

各試験区において多くの孵化がみられた 5 日間 (本試験では受精後 6 日~10 日目) 分の各連の仔魚を再度プールし、12 個体ずつ対照区は 12 連、濃度区は 6 連ずつ再分配した。

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

[受精後 9 週目の遺伝的性判別およびペアリング]

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

- ① Test Day 78 に各個体を、尾部の一部を鋭利な剃刀で切断した。これを試料として DNA を抽出した。

- ② PCR は Takara Ex Taq® (タカラバイオ株式会社製) を用い、プライマーとして PG17.5 (CCG GGT GCC CAA GTG CTC CCG CTG), PG17.6 (GAT CGT CCC TCC ACA GAG AAG AGA) を使用した。PCR は、95°C・5 分の条件で 1 サイクル、その後、96°C・20 秒、55°C・30 秒、72°C・30 秒の条件を 38 サイクル繰り返して行った。
- ③ この後、増幅産物にミドリグリーンダイレクト(日本ジェネティクス株式会社製)を添加し、1.5% TAE-アガロースゲルで電気泳動してバンド (メスは 1 本、オスは 2 本現れる) を確認し、遺伝的な性別を判別した。

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

[亜成体 (10 週齢) のばく露終了後の測定]

繁殖用に用いなかった 10 週齢の亜成体 (Sub-adult) については、Test Day 89 および Test Day 90 (66 日齢または 67 日齢) に氷麻酔処理した上で解剖し、下記項目について測定した。各計測・測定方法は、F0 世代と同一である。

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

[産出卵の計測]

各ペアについて、受精後 12~14 週の 21 日間 (Test Day 99-119)、水槽内の産出卵を毎日採取し、1 ペアあたりの総産卵数、受精卵数、受精率を計測した。

[F2 試験用受精卵の採取]

ばく露 15 週目の第 1 日 (Test Day 120) に各ペアの産出した受精卵をすべて、試験溶液の入ったガラスシャーレにプールし、対照区は 12 連、濃度区は 6 連分、20 粒ずつ選択し、水槽に設置した孵化器に投入した。

[ばく露終了後の測定]

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

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

(3) F2 世代

[ばく露方法]

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

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

[ばく露期間中の観察]

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

2.1.5 結果の算出

(1) 各エンドポイントの算出

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

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

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

(2) 数値の取り扱い

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

(3) 統計処理

NOEC および LOEC 算出のための統計手法は OECD TG240 の Annex 10 および USEPA の Flynn K ら⁵⁾ の改訂版フローチャートに基づき、各エンドポイントに対し表 1-2 に示す変数変換と統計手法を適用した。解析には US EPA が MEOGRT および幼若両生類発達・成長試験 (LAGDA) 用に開発した統計解析ソフトウェア 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-4.0.3 (win 64 bit) を用いた⁶⁾。検定は原則片側検定で実施し、正規性および等分散性検定は有意水準 1%, その他は有意水準 5% とした。

表 1-2 各エンドポイントの変数変換と統計手法

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

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

2.1.6 試験有効性基準

以下の条件から、本試験の有効性を判断した。

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

2.2 結果

2.2.1 環境条件

表 1-3 に水温、pH、溶存酸素の試験期間中の平均値と標準偏差を示す。試験液の平均水温は 24.9~25.4℃であり、各水槽の水温の平均値からの変動は 2℃未満であった。pH の平均値は 7.2~7.4 であり、最小値は 7.0、最大値は 7.6 であった。ばく露期間中の変動は±0.5 以内であった。溶存酸素はすべての試験区において飽和酸素濃度の 60%以上であった。

表 1-3 試験期間中の平均水温、pH、溶存酸素

| 設定濃度 ($\mu\text{g/L}$) | 水温($^{\circ}\text{C}$) | pH | 溶存酸素(mg/L) |
|-----------------------------|--------------------------|-----------|-----------------------|
| Control | 24.9 ± 0.2 | 7.2 ± 0.1 | 7.8 ± 0.5 |
| 0.50 | 25.1 ± 0.2 | 7.3 ± 0.1 | 7.9 ± 0.4 |
| 1.6 | 25.1 ± 0.2 | 7.4 ± 0.1 | 7.9 ± 0.4 |
| 5.0 | 25.2 ± 0.2 | 7.4 ± 0.1 | 7.9 ± 0.5 |
| 16 | 25.1 ± 0.2 | 7.4 ± 0.1 | 7.9 ± 0.4 |
| 50 | 25.4 ± 0.2 | 7.4 ± 0.1 | 7.8 ± 0.4 |

2.2.2 試験液中の被験物質濃度

試験期間中、試験液の被験物質濃度を合計 20 回/濃度区測定し、結果を図 1-4 および表 1-4 に示す。各濃度区の期間平均値は設定濃度の 90.8~101%，変動係数は 7~11%であった。試験期間中において、被験物質濃度は測定平均値の±20%以内に維持されており、試験の有効性条件を満たした。よって、以降は測定濃度で結果を記述する。

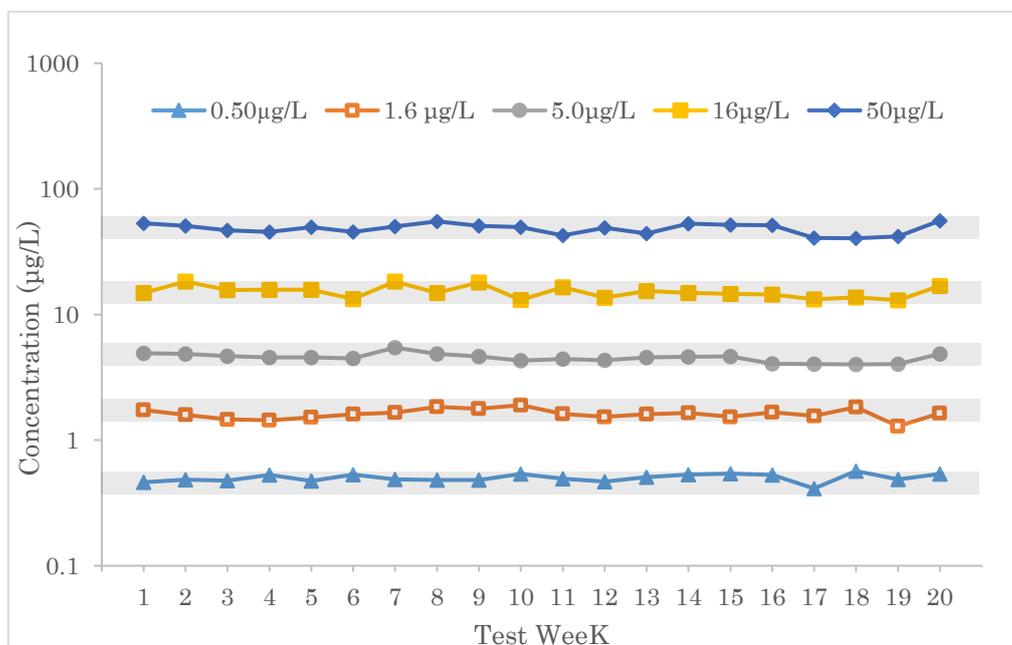


図 1-4 試験期間中の測定濃度の推移

注) 灰色部分は平均値±20%の範囲を示す。

表 1-4 試験液中の被験物質濃度

| 設定濃度 ($\mu\text{g/L}$) | 分析回数 | 平均測定濃度 ($\mu\text{g/L}$) | 設定濃度比 (%) | 変動係数 (%) |
|-----------------------------|------|-------------------------------|--------------|-------------|
| Control | 20 | N.D. | - | - |
| 0.50 | 20 | 0.501 | 100 | 7 |
| 1.6 | 20 | 1.62 | 101 | 9 |
| 5.0 | 20 | 4.54 | 90.8 | 8 |
| 16 | 20 | 15.2 | 95.0 | 11 |
| 50 | 20 | 48.4 | 96.8 | 10 |

注) 「N.D.」は定量下限 (0.200 $\mu\text{g/L}$) 未満であることを示す。

2.2.3 F0 世代の結果

1) 死亡および行動・外観の異常 (F0)

F0 世代試験期間中の死亡個体数を表 1-5 に示す。

対照区において、ばく露開始後 12 日目にメスが 1 個体死亡していたが、外観に異常はなく偶発的な死亡と考えられる。いずれの試験区においても、行動・外観の異常は認められなかった。

表 1-5 F0 世代の試験期間中の死亡個体

| 測定濃度 ($\mu\text{g/L}$) | オス | | | メス | | | 合計 死亡率 (%) |
|-----------------------------|-----|-----|------------|-----|-----|------------|------------------|
| | 供試数 | 死亡数 | 死亡率 (%) | 供試数 | 死亡数 | 死亡率 (%) | |
| Control | 12 | 0 | 0 | 12 | 1 | 8 | 4 |
| 0.501 | 6 | 0 | 0 | 6 | 0 | 0 | 0 |
| 1.62 | 6 | 0 | 0 | 6 | 0 | 0 | 0 |
| 4.54 | 6 | 0 | 0 | 6 | 0 | 0 | 0 |
| 15.2 | 6 | 0 | 0 | 6 | 0 | 0 | 0 |
| 48.4 | 6 | 0 | 0 | 6 | 0 | 0 | 0 |

2) 総産卵数・受精卵数・受精率 (F0)

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

総産卵数および受精卵数は、48.4 $\mu\text{g/L}$ 濃度区で対照区と比較し有意な減少が認められた。

受精率については、いずれの濃度区でも対照区と比較し有意差は認められなかった。また、経日変化グラフより、対照区と明らかに時間変動の異なる濃度区は観察されなかったため、ばく露時間による影響はなかったと考えられた。

対照区の総産卵数の平均値および各 12 ペアの総産卵数はすべて 20 個/ペア/日以上、21 日間で算出された計 6477 個 の卵の受精率は 97.8%であり、試験の有効性条件を満たした。

表 1-6 F0 世代の総産卵数・受精卵数・受精率

| 測定濃度 ($\mu\text{g/L}$) | 総産卵数 (eggs/pair/day) | | | | | | | |
|-----------------------------|----------------------|-------------|--------------|-----------|---------------|-------------|----------------|-------------|
| | 21 日間 | | 1 週目(DAY1-7) | | 2 週目(DAY8-14) | | 3 週目(DAY15-21) | |
| Control | 26.7 | \pm 6.2 | 26.6 | \pm 5.1 | 28.2 | \pm 4.7 | 28.9 | \pm 4.1 |
| 0.501 | 25.2 | \pm 3.3 | 22.6 | \pm 3.1 | 25.9 | \pm 3.6 | 26.9 | \pm 3.8 |
| 1.62 | 25.8 | \pm 3.8 | 26.0 | \pm 5.2 | 25.5 | \pm 2.5 | 25.9 | \pm 5.0 |
| 4.54 | 26.3 | \pm 3.3 | 25.6 | \pm 3.0 | 26.7 | \pm 3.4 | 26.5 | \pm 4.0 |
| 15.2 | 23.8 | \pm 4.3 | 25.1 | \pm 5.5 | 24.6 | \pm 4.6 | 21.7 | \pm 4.0 * |
| 48.4 | 22.7 | \pm 2.6 * | 23.4 | \pm 4.7 | 23.0 | \pm 3.1 * | 21.9 | \pm 3.1 * |

| 測定濃度 ($\mu\text{g/L}$) | 受精卵数 (eggs/day/female) | | | | | | | |
|-----------------------------|------------------------|-------------|--------------|-----------|---------------|-------------|----------------|-------------|
| | 21 日間 | | 1 週目(DAY1-7) | | 2 週目(DAY8-14) | | 3 週目(DAY15-21) | |
| Control | 26.1 | \pm 6.1 | 25.8 | \pm 5.4 | 27.6 | \pm 4.6 | 28.5 | \pm 4.1 |
| 0.501 | 24.6 | \pm 3.4 | 22.1 | \pm 3.2 | 25.2 | \pm 3.9 | 26.3 | \pm 4.0 |
| 1.62 | 24.9 | \pm 4.3 | 24.7 | \pm 6.0 | 24.7 | \pm 2.9 | 25.2 | \pm 5.2 |
| 4.54 | 25.7 | \pm 3.3 | 25 | \pm 2.8 | 25.9 | \pm 3.8 | 26 | \pm 3.9 |
| 15.2 | 22.6 | \pm 4.2 | 23.5 | \pm 5.3 | 23.4 | \pm 4.2 * | 20.9 | \pm 4.3 * |
| 48.4 | 22.2 | \pm 2.6 * | 22.8 | \pm 4.7 | 22 | \pm 3.2 * | 21.7 | \pm 3.0 * |

| 測定濃度 ($\mu\text{g/L}$) | 受精率 (%) | | | | | | | |
|-----------------------------|---------|-----------|--------------|-----------|---------------|-----------|----------------|-----------|
| | 21 日間 | | 1 週目(DAY1-7) | | 2 週目(DAY8-14) | | 3 週目(DAY15-21) | |
| Control | 97.8 | \pm 1.0 | 96.6 | \pm 3.1 | 98.2 | \pm 1.1 | 98.6 | \pm 1.1 |
| 0.501 | 97.6 | \pm 1.3 | 97.6 | \pm 1.6 | 97.2 | \pm 2.0 | 97.8 | \pm 1.4 |
| 1.62 | 96.2 | \pm 3.6 | 94.4 | \pm 6.1 | 97 | \pm 3.4 | 96.9 | \pm 2.3 |
| 4.54 | 97.7 | \pm 1.0 | 97.9 | \pm 1.3 | 97.1 | \pm 3.6 | 98.3 | \pm 1.2 |
| 15.2 | 95.0 | \pm 5.7 | 94.0 | \pm 8.7 | 95.4 | \pm 3.3 | 96.0 | \pm 5.2 |
| 48.4 | 97.4 | \pm 1.2 | 97.5 | \pm 1.8 | 95.7 | \pm 2.7 | 99.1 | \pm 0.9 |

注) 値は平均値 \pm 標準偏差 (対照区は n=12, 濃度区は n=6, ただし対照区はメス 1 個体死亡のため, 2 および 3 週目の集計は n=11) を示す。*は対照区と比較し統計学的な有意差があることを示す ($p<0.05$, Jonckheere-Terpstra 検定)。

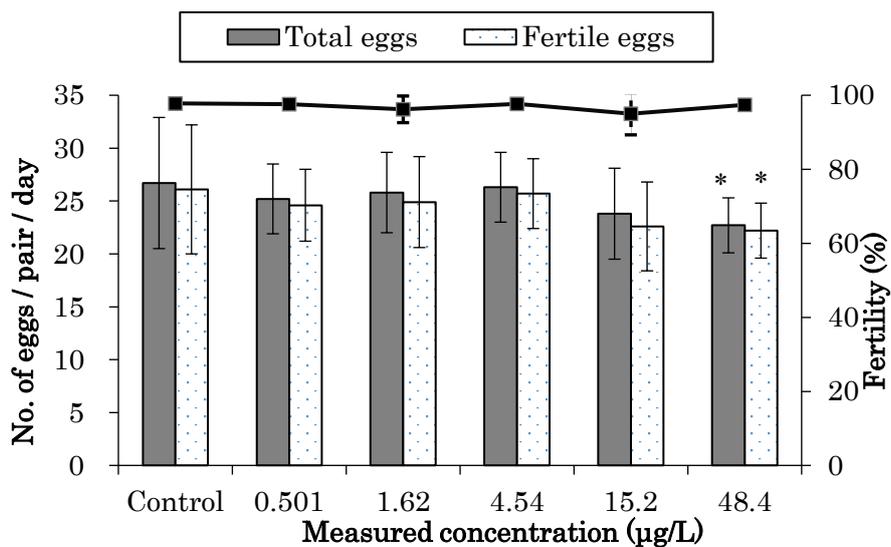
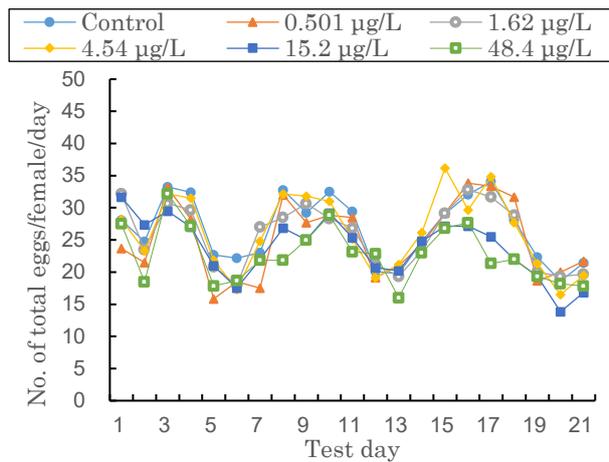


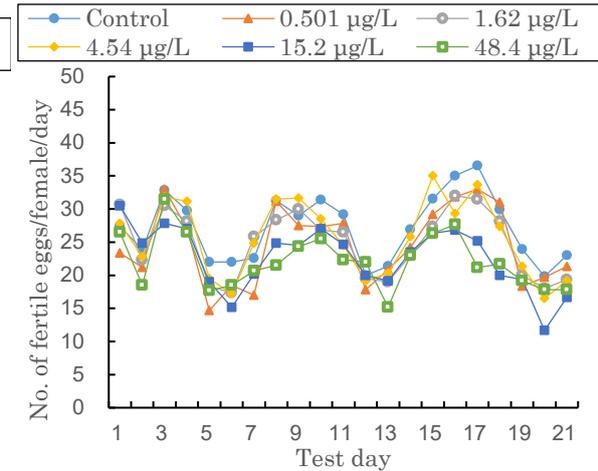
図 1-5 F0 世代の総産卵数・受精卵数・受精率 (各ペア・1 日当たり)

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

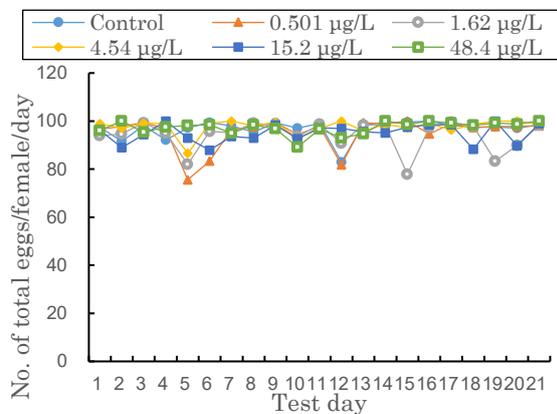
(a) 総産卵数



(b) 受精卵数



(c) 受精率



(d) 累積受精卵数

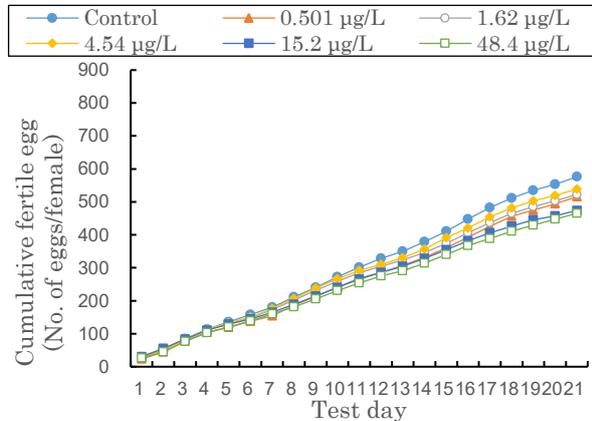


図 1-6 F0 世代の(a)総産卵数, (b)受精卵数, (c)受精率の日変動および(d)累積受精卵数 (値は各試験区の連平均値)

3) 全長・湿重量 (F0)

F0 世代の全長および湿重量の測定結果を表 1-7 および図 1-7(a)(b)に示す。

全長については、オスはいずれの濃度区でも対照区と比較し有意差は認められなかった。メスは 15.2 および 48.4 µg/L 濃度区で有意な減少が認められた。

湿重量については、オスはいずれの濃度区でも対照区と比較し有意差は認められなかった。メスは全濃度区で有意な減少が認められた。

表 1-7 F0 世代の全長および湿重量

| 測定濃度 (µg/L) | 全長 (mm) | | 湿重量 (mg) | |
|----------------|------------|--------------|----------|------------|
| | オス | メス | オス | メス |
| Control | 32.7 ± 1.5 | 34.2 ± 1.0 | 389 ± 56 | 514 ± 55 |
| 0.501 | 34.0 ± 0.6 | 33.3 ± 0.5 | 411 ± 33 | 468 ± 17 * |
| 1.62 | 33.2 ± 1.3 | 32.5 ± 1.1 | 380 ± 43 | 447 ± 38 * |
| 4.54 | 33.0 ± 1.4 | 34.3 ± 0.7 | 379 ± 48 | 451 ± 44 * |
| 15.2 | 33.1 ± 1.7 | 32.9 ± 1.2 * | 395 ± 49 | 396 ± 24 * |
| 48.4 | 32.3 ± 0.9 | 33.4 ± 0.7 * | 355 ± 27 | 434 ± 40 * |

注) 値は平均値±標準偏差 (対照区はオス n=12, メス n=11, 濃度区は n=6) を示す。*は対照区と比較し統計学的な有意差があることを示す ($p < 0.05$, Jonckheere-Terpstra 検定)。

4) 肝臓体指数および生殖腺体指数 (F0)

F0 世代の肝臓体指数および生殖腺体指数の測定結果を表 1-8 および図 1-7(c)(d)に示す。

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

生殖腺体指数については、オスはいずれの濃度区でも対照区と比較し有意差は認められなかった。メスは 15.2 および 48.4 $\mu\text{g/L}$ 濃度区で有意な低下が認められた。

表 1-8 F0 世代の肝臓体指数および生殖腺体指数

| 測定濃度 ($\mu\text{g/L}$) | 肝臓体指数 (%) | | | | 生殖腺体指数 (%) | | | |
|-----------------------------|-----------|-----------|-----|-----------|------------|-----------|------|-------------|
| | オス | | メス | | オス | | メス | |
| Control | 2.5 | \pm 0.4 | 5.0 | \pm 1.6 | 1.1 | \pm 0.4 | 10.4 | \pm 1.3 |
| 0.501 | 2.0 | \pm 0.5 | 5.2 | \pm 0.5 | 1.3 | \pm 0.3 | 10.8 | \pm 1.2 |
| 1.62 | 2.2 | \pm 0.9 | 5.7 | \pm 0.5 | 1.3 | \pm 0.5 | 11.0 | \pm 3.1 |
| 4.54 | 2.5 | \pm 1.2 | 5.0 | \pm 1.0 | 1.0 | \pm 0.5 | 9.6 | \pm 2.3 |
| 15.2 | 2.5 | \pm 0.5 | 5.0 | \pm 1.6 | 1.1 | \pm 0.3 | 8.4 | \pm 0.7 * |
| 48.4 | 2.4 | \pm 0.8 | 4.9 | \pm 0.5 | 1.0 | \pm 0.3 | 7.9 | \pm 1.4 * |

注) 値は平均値 \pm 標準偏差 (対照区はオス n=12, メス n=11, 濃度区は n=6) を示す。*は対照区と比較し統計学的な有意差があることを示す ($p < 0.05$, Jonckheere-Terpstra 検定)。

5) 肝臓中ビテロジェニン濃度 (F0)

ELISA による F0 世代の肝臓中ビテロジェニン濃度の測定結果を表 1-9 および図 1-7(e)に示す。オスメスともにいずれの濃度区でも対照区と比較し有意差は認められなかった。

表 1-9 F0 世代の肝臓中ビテロジェニン濃度

| 測定濃度 ($\mu\text{g/L}$) | 肝臓中ビテロジェニン濃度 (ng/mg liver) | |
|-----------------------------|----------------------------|----------------|
| | オス | メス |
| Control | 0.66 \pm 0.52 | 928 \pm 203 |
| 0.501 | 3.79 \pm 8.29 | 930 \pm 155 |
| 1.62 | 4.28 \pm 8.42 | 925 \pm 488 |
| 4.54 | 1.39 \pm 0.96 | 848 \pm 84 |
| 15.2 | 1.20 \pm 1.31 | 900 \pm 370 |
| 48.4 | 0.67 \pm 0.31 | 1160 \pm 505 |

注) 値は平均値 \pm 標準偏差 (対照区はオス n=12, メス n=11, 濃度区は n=6) を示す。

6) 二次性徴指標 (F0)

二次性徴の指標として、F0世代における乳頭状小突起を有する節板数の計測結果を表 1-10 および図 1-7(f)に示す。オスはいずれの濃度区でも対照区と比較し有意差は認められなかった。メスは全濃度区で乳頭状小突起を有する個体は確認されなかった。

表 1-10 F0世代の乳頭状小突起を有する節板数 (オス 1 個体あたり)

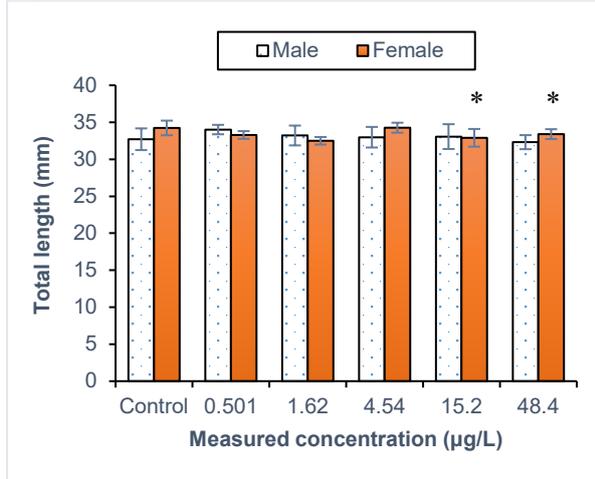
| 測定濃度 ($\mu\text{g/L}$) | 乳頭状小突起を有する節板数 (Plates/fish) | | | |
|-----------------------------|-----------------------------|----------|----|---------|
| | オス | | メス | |
| Control | 94 | ± 15 | 0 | ± 0 |
| 0.501 | 106 | ± 20 | 0 | ± 0 |
| 1.62 | 94 | ± 15 | 0 | ± 0 |
| 4.54 | 106 | ± 8 | 0 | ± 0 |
| 15.2 | 101 | ± 12 | 0 | ± 0 |
| 48.4 | 100 | ± 21 | 0 | ± 0 |

注) 値は平均値 \pm 標準偏差 (対照区はオス n=12, メス n=11, 濃度区は n=6) を示す。

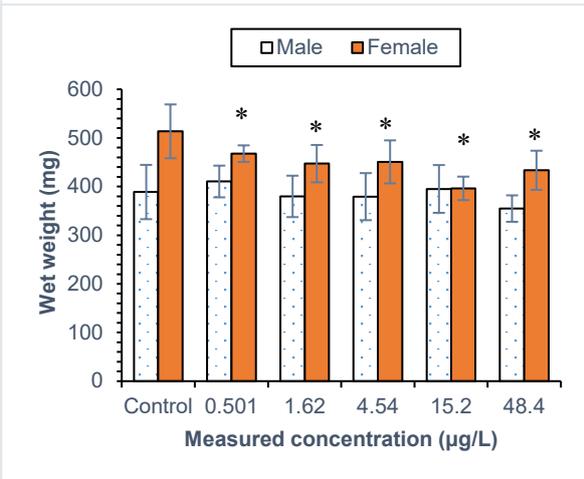
7) 表現型性別と生殖腺形態 (F0)

F0世代における表現型の性別・生殖腺形態は明確かつ一致していた。

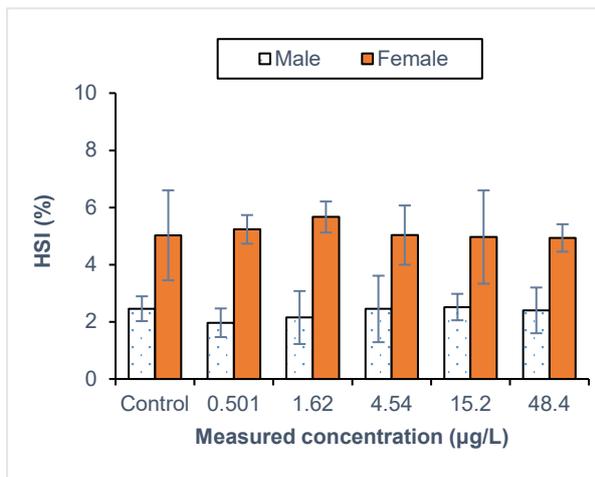
(a) 全長



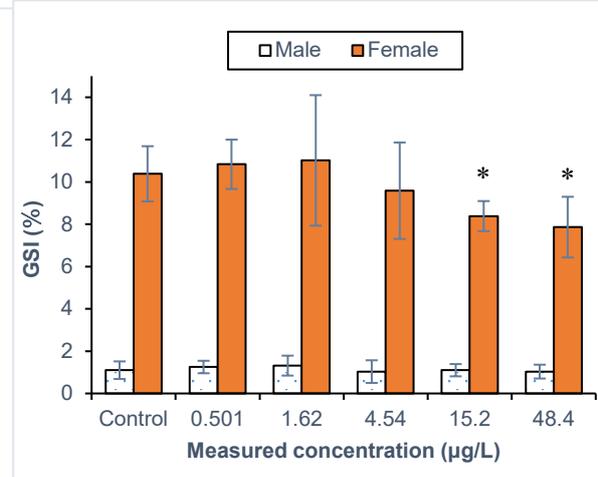
(b) 湿重量



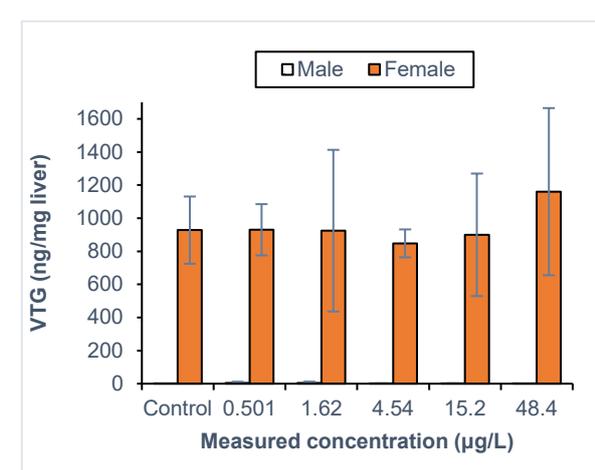
(c) 肝臓体指数 (HSI)



(d) 生殖腺体指数 (GSI)



(e) 肝臓中ピテロジェニン濃度



(f) 乳頭状小突起を有する節板数

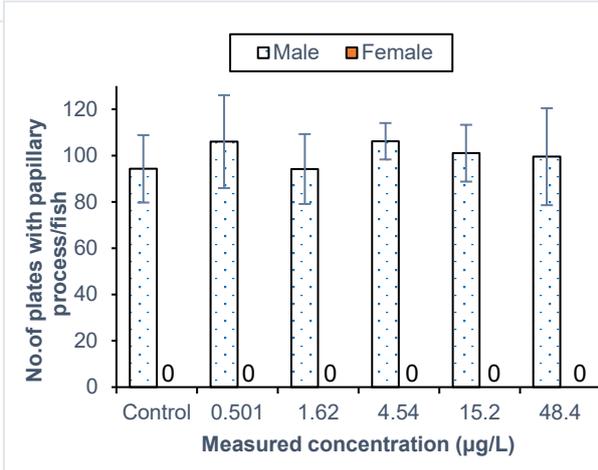


図 1-7 F0 世代の(a)全長, (b)湿重量, (c)肝臓体指数, (d)生殖腺体指数, (e)肝臓中ピテロジェニン濃度, (f)乳頭状小突起を有する節板数

注) 値は平均値±標準偏差 (対照区はオス n=12, メス n=11, 濃度区は n=6) を示す。*は対照区と比較し統計学的な有意差があることを示す ($p < 0.05$, Jonckheere-Terpstra 検定)。

2.2.4 F1 世代胚～仔魚期の結果

1) 孵化日数・孵化率 (F1 胚～仔魚期)

F1 世代胚・仔魚期の受精後 18 日目の孵化日数および孵化率を表 1-11 に、受精後 7 日目～12 日目における孵化個体数を図 1-8 に示す。対照区における孵化日の中央値が受精後 9 日目 (240 個体中 179 個体が孵化) であったことから (図 1-8)、その 2 倍である 18 日目において孵化日数および孵化率の計算を実施した。

孵化日数については、0.501～15.2 $\mu\text{g/L}$ 濃度区で対照区と比較し有意な差 (孵化日数が短い) が認められたが、48.2 $\mu\text{g/L}$ 濃度区では有意差は認められなかった。

孵化率については、4.54～48.4 $\mu\text{g/L}$ 濃度区で対照区と比較し有意な低下が認められた。孵化率低下のほとんどは、胚の死亡によるものであった。仔魚期以降のばく露において 1 水槽につき 12 尾必要なところ、孵化率が著しく低下した 15.2 $\mu\text{g/L}$ 濃度区では 9～10 尾となった。

対照区の孵化率は 80% 以上であり、試験の有効性条件を満たした。

| 測定濃度 ($\mu\text{g/L}$) | 孵化日数 (day) | | | 孵化率 (%) | | |
|-----------------------------|------------|-----------|----|-----------|----------|---|
| | 受精後 18 日目 | | | 受精後 18 日目 | | |
| Control | 8.7 | \pm 0.4 | | 96 | \pm 5 | |
| 0.501 | 7.6 | \pm 0.1 | *a | 96 | \pm 4 | |
| 1.62 | 7.7 | \pm 0.1 | *a | 96 | \pm 2 | |
| 4.54 | 7.4 | \pm 0.2 | *a | 77 | \pm 13 | * |
| 15.2 | 7.9 | \pm 0.4 | *a | 49 | \pm 20 | * |
| 48.4 | 8.3 | \pm 0.2 | | 73 | \pm 20 | * |

注) 値は平均値 \pm 標準偏差 (対照区は n=12, 濃度区は n=6) を示す。*は対照区と比較し統計学的な有意差があることを示す ($p<0.05$, 孵化日数は Mixed Effects Cox Models, 孵化率は Jonckheere-Terpstra 検定)。
a: 有意差が認められたが濃度依存性なし。

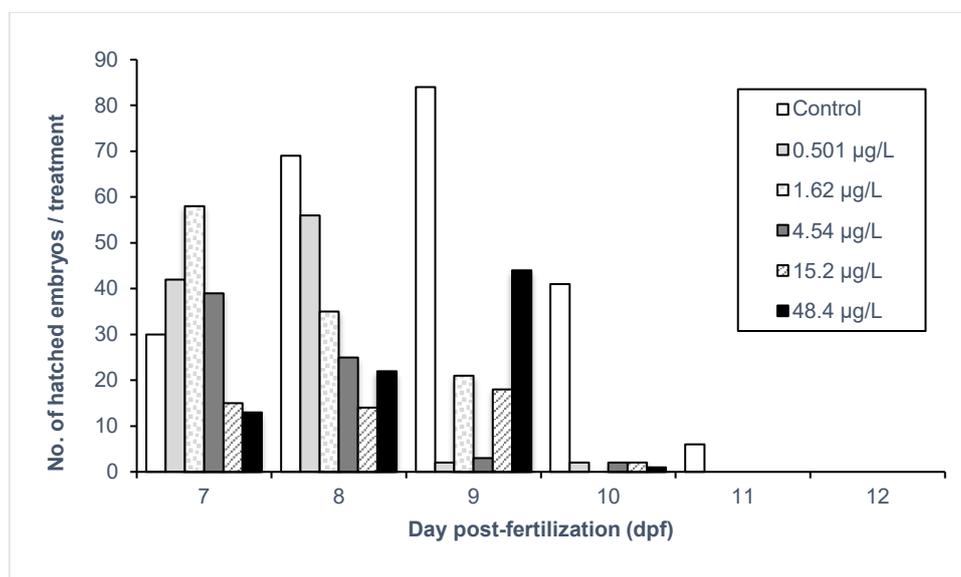


図 1-8 F1 の受精後 7～12 日目における孵化個体数 (各試験区の合計)

2.2.5 F1 世代亜成体の結果

1) 生存率 (F1 亜成体)

F1 世代の受精後 4 週目 (21 日目) および 8 週目 (55 日目, DMY 判定中) における生存率を表 1-12 に示す。

生存率については, 受精後 4 週目は 48.4 μ g/L 濃度区で対照区と比較し有意な低下が認められたが, 8 週目ではいずれの濃度区でも有意差は認められなかった。

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

表 1-12 F1 世代亜成体 (受精後 4, 8 週目) の生存率

| 測定濃度 (μ g/L) | 生存率 (%) | | | 生存率 (%) | | |
|----------------------|----------|---------|---|----------|---------|--|
| | 受精後 4 週目 | | | 受精後 8 週目 | | |
| Control | 100 | \pm 0 | | 99 | \pm 2 | |
| 0.501 | 100 | \pm 0 | | 100 | \pm 0 | |
| 1.62 | 100 | \pm 0 | | 99 | \pm 3 | |
| 4.54 | 100 | \pm 0 | | 100 | \pm 0 | |
| 15.2 | 100 | \pm 0 | | 100 | \pm 0 | |
| 48.4 | 97 | \pm 4 | * | 95 | \pm 7 | |

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

2) 全長・湿重量 (F1 亜成体)

10 週齢 (66・67 日齢) の亜成体の全長および湿重量の測定結果を表 1-13 および図 1-9(a)(b) に示す。

全長については, オスは全濃度区で対照区と比較し有意差が認められた。メスは 0.501~4.54 μ g/L 濃度区で有意差が認められたが, 15.2 および 48.4 μ g/L 濃度区では有意差は認められなかった。

湿重量については, オスは全濃度区で対照区と比較し有意差は認められなかった。メスは 0.501 および 4.54 μ g/L 濃度区で有意な増加が認められたが, 1.62, 15.2 および 48.4 μ g/L 濃度区では有意差は認められなかった。

表 1-13 F1 世代亜成体の全長・湿重量

| 測定濃度 (μ g/L) | 全長 (mm) | | | | 湿重量 (mg) | | | | | | |
|----------------------|---------|-----------|------|-----------|-----------|----------|-----|----------|-----|----------|----|
| | オス | | メス | | オス | | メス | | | | |
| Control | 21.7 | \pm 0.8 | 22.1 | \pm 0.8 | 118 | \pm 11 | 125 | \pm 14 | | | |
| 0.501 | 23.1 | \pm 0.2 | *a | 23.9 | \pm 0.5 | *a | 128 | \pm 5 | 149 | \pm 9 | *a |
| 1.62 | 23.8 | \pm 1.1 | *a | 23.6 | \pm 1.0 | *a | 135 | \pm 15 | 140 | \pm 23 | |
| 4.54 | 24.1 | \pm 0.7 | *a | 24.5 | \pm 0.8 | *a | 134 | \pm 8 | 146 | \pm 12 | *a |
| 15.2 | 23.9 | \pm 0.9 | *a | 22.7 | \pm 1.5 | | 133 | \pm 14 | 128 | \pm 19 | |
| 48.4 | 22.7 | \pm 0.9 | *a | 22.6 | \pm 0.8 | | 111 | \pm 10 | 119 | \pm 5 | |

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

3) 肝臓体指数および生殖腺体指数 (F1 亜成体)

F1 世代亜成体の肝臓体指数および生殖腺体指数の測定結果を表 1-14 および図 1-9(c)(d)に示す。対照区で 11 個体, 0.501 µg/L 濃度区で 1 個体, 1.62 µg/L 濃度区で 4 個体, 15.2 µg/L 濃度区で 1 個体, 48.4 µg/L 濃度区で 3 個体の生殖腺が見当たらなかったため, 平均値の算出から除外した。

肝臓体指数については, オスは全濃度区で対照区と比較し有意差が認められた。メスは 0.501~4.54 µg/L 濃度区で有意差が認められたが, 15.2 および 48.4 µg/L 濃度区では有意差は認められなかった。

生殖腺体指数については, オスはいずれの濃度区でも対照区と比較し有意差は認められなかった。メスは 15.2 および 48.4 µg/L 濃度区で有意な増加が認められた。

表 1-14 F1 世代亜成体の肝臓体指数・生殖腺体指数

| 測定濃度 (µg/L) | 肝臓体指数 (%) | | | | 生殖腺体指数 (%) | | | |
|-------------|-----------|-------|--------|-------|------------|-------|-----|---------|
| | オス | | メス | | オス | | メス | |
| Control | 3.2 | ± 0.5 | 4.2 | ± 0.9 | 1.0 | ± 0.8 | 2.6 | ± 1.4 |
| 0.501 | 1.8 | ± 0.3 | *a 3.1 | ± 0.4 | *a 0.8 | ± 0.3 | 3.8 | ± 1.6 |
| 1.62 | 2.4 | ± 0.1 | *a 3.1 | ± 0.4 | *a 0.7 | ± 0.2 | 3.0 | ± 2.5 |
| 4.54 | 2.0 | ± 0.2 | *a 3.1 | ± 0.2 | *a 1.0 | ± 0.4 | 3.5 | ± 0.9 |
| 15.2 | 2.3 | ± 0.2 | *a 4.0 | ± 1.0 | 0.9 | ± 0.2 | 5.2 | ± 0.7 * |
| 48.4 | 2.6 | ± 0.7 | *a 3.9 | ± 0.5 | 0.7 | ± 0.3 | 4.4 | ± 2.2 * |

注) 値は連平均値をもとに算出した平均値±標準偏差 (対照区~濃度区は, オス n=12,5,6,6,6,6, メス n=12,6,5,6,5,6) を示す。*は対照区と比較し統計学的な有意差があることを示す (p<0.05, 肝臓体指数はオスは単調性が認められず, 正規性および等分散性が認められたため Dunnett 検定, メスは単調性および正規性が認められず等分散性のみ認められたため Dunn 検定, 生殖腺体指数は Jonckheere-Terpstra 検定)。a: 有意差が認められたが濃度依存性なし。

4) 肝臓中ビテロジェニン濃度 (F1 亜成体)

ELISA による F1 世代亜成体の肝臓中ビテロジェニン濃度の測定結果を表 1-15 および図 1-9(e)に示す。オスはいずれの濃度区でも対照区と比較し有意差は認められなかった。一方, メスでは 4.54~48.4 µg/L 濃度区で有意に増加した。

表 1-15 F1 世代亜成体の肝臓中ビテロジェニン濃度

| 測定濃度 (µg/L) | 肝臓中ビテロジェニン濃度 (ng/mg liver) | | | |
|-------------|----------------------------|--------|-----|---------|
| | オス | | メス | |
| Control | 24.5 | ± 60.8 | 214 | ± 188 |
| 0.501 | 18.9 | ± 41.8 | 431 | ± 262 |
| 1.62 | N.D. | | 523 | ± 575 |
| 4.54 | N.D. | | 741 | ± 333 * |
| 15.2 | N.D. | | 609 | ± 189 * |
| 48.4 | 0.35 | ± 0.27 | 755 | ± 280 * |

注) 値は連平均値を元に算出した平均値±標準偏差 (対照区~濃度区は, オス n=12,5,6,6,6,6, メス n=12,6,5,6,5,6) を示す。「N.D.」は定量下限 (0.4 ng/mg) 未満であることを示す。*は対照区と比較し統計学的な有意差があることを示す (p<0.05, Jonckheere-Terpstra 検定)。

5) 二次性徴指標 (F1 亜成体)

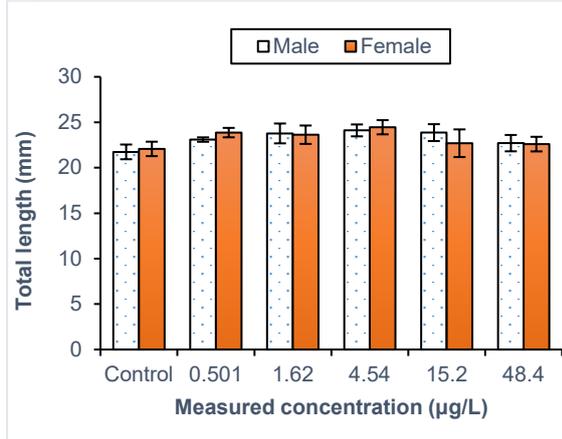
二次性徴の指標として、乳頭状小突起を有する節板数の計測の結果を表 1-16 および図 1-9(f)に示す。オスは全濃度区で対照区と比較して有意に増加した。メスは全濃度区で乳頭状小突起を有する個体は確認されなかった。

表 1-16 F1 世代亜成体の乳頭状小突起を有する節板数

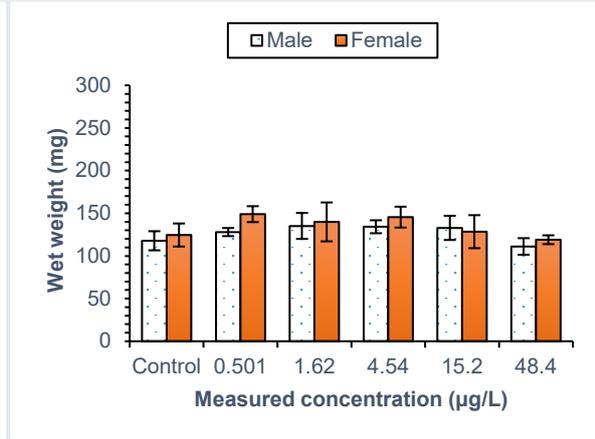
| 測定濃度 ($\mu\text{g/L}$) | 乳頭状小突起を有する節板数(Plates/fish) | | | | | | |
|-----------------------------|----------------------------|---|----|----|---|---|---|
| | オス | | | メス | | | |
| Control | 23 | ± | 14 | | 0 | ± | 0 |
| 0.501 | 52 | ± | 11 | *a | 0 | ± | 0 |
| 1.62 | 43 | ± | 11 | *a | 0 | ± | 0 |
| 4.54 | 56 | ± | 10 | *a | 0 | ± | 0 |
| 15.2 | 58 | ± | 3 | *a | 0 | ± | 0 |
| 48.4 | 50 | ± | 12 | *a | 0 | ± | 0 |

注) 値は連平均値を元に算出した平均値±標準偏差 (対照区～濃度区は、オス n=12,5,6,6,6,6, メス n=12,6,5,6,5,6) を示す。*は対照区と比較し統計学的な有意差があることを示す ($p<0.05$, Jonckheere-Terpstra 検定)。a : 有意差が認められたが濃度依存性なし。

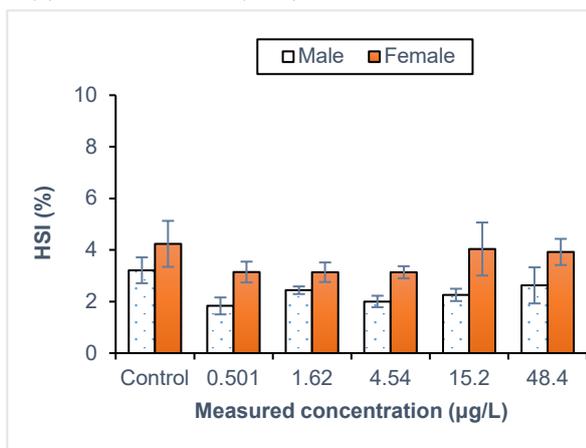
(a) 全長



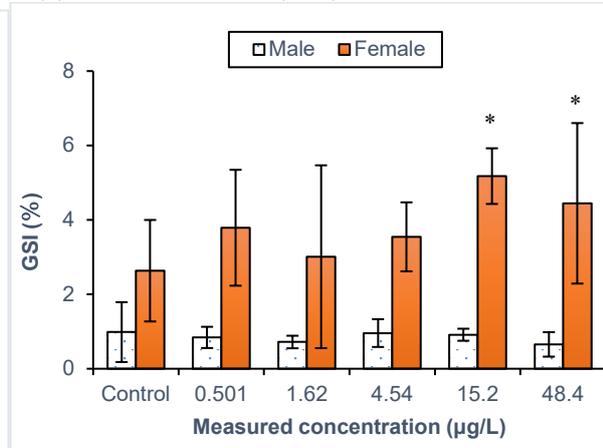
(b) 湿重量



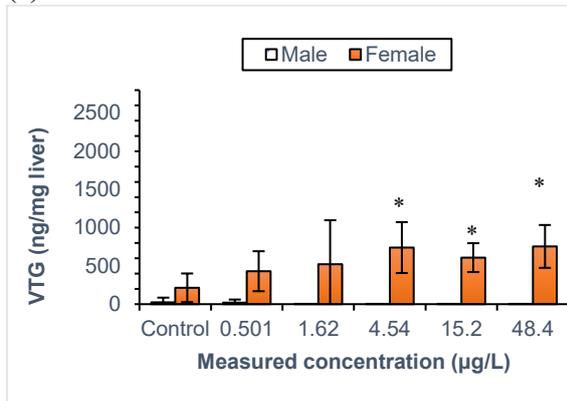
(c) 肝臓体指数 (HSI)



(d) 生殖腺体指数 (GSI)



(e) 肝臓中ピテロジェニン濃度



(f) 乳頭状小突起を有する節板数

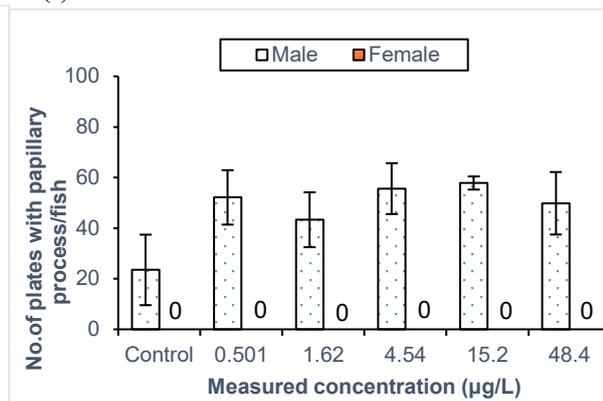


図 1-9 F1 世代亜成体の(a)全長, (b)湿重量, (c)肝臓体指数, (d)生殖腺体指数, (e)肝臓中ピテロジェニン濃度, (f)乳頭状小突起を有する節板数

注) 値は連平均値を元に算出した平均値±標準偏差 (対照区~濃度区は, オス n=12,5,6,6,6,6, メス n=12,6,5,6,5,6) を示す。*は対照区と比較し統計学的な有意差があることを示す。ただし濃度依存性が認められない有意差は表記していない ($p < 0.05$, Jonckheere-Terpstra 検定, ただしオスの湿重量およびメスの肝臓体指数は Dunn 検定, オスの肝臓体指数, メスの全長および湿重量は Dunnett 検定)。

6) 表現型性別と生殖腺形態 (F1 亜成体)

F1 世代亜成体の遺伝的オス個体 (DMY 保有個体) における表現型性別および生殖腺形態の比較を表 1-17, 遺伝的メス個体における表現型性別および生殖腺形態の比較を表 1-18 に示す。遺伝的にオスと判断した個体のうち, 対照区の 52 個体中 2 個体において, 尻ビレが小さく背ビレの切込み無く, メスの表現型と判断した。生殖腺の形態観察では, 対照区で 52 個体中 2 個体に卵巣が確認された。遺伝的にメスと判断した個体では, 0.501 µg/L 濃度区での 23 個体中 1 個体において尻びれが大きい, 背びれの切れ込みあり, 表現型がオスであると判断した。生殖腺形態は, 0.501 µg/L 濃度区で 23 個体中 1 個体に精巣が観察された。ほとんどの試験区において未成熟で表現型が不明瞭な個体や生殖腺が不明な個体が散見された。

表 1-17 F1 世代亜成体遺伝的オス個体の表現型性別・生殖腺形態

| 測定濃度 (µg/L) | n | 表現型 | | | 生殖腺形態 | | |
|----------------|----|-----|----|----|-------|----|----|
| | | オス | 不明 | メス | 精巣 | 不明 | 卵巣 |
| Control | 52 | 49 | 1 | 2 | 43 | 7 | 2 |
| 0.501 | 20 | 20 | 0 | 0 | 20 | 0 | 0 |
| 1.62 | 30 | 30 | 0 | 0 | 26 | 4 | 0 |
| 4.54 | 25 | 25 | 0 | 0 | 25 | 0 | 0 |
| 15.2 | 23 | 23 | 0 | 0 | 22 | 1 | 0 |
| 48.4 | 19 | 19 | 0 | 0 | 18 | 1 | 0 |

表 1-18 F1 世代亜成体遺伝的メス個体の表現型性別・生殖腺形態

| 測定濃度 (µg/L) | n | 表現型 | | | 生殖腺形態 | | |
|----------------|----|-----|----|----|-------|----|----|
| | | オス | 不明 | メス | 精巣 | 不明 | 卵巣 |
| Control | 40 | 0 | 0 | 40 | 0 | 4 | 36 |
| 0.501 | 23 | 1 | 0 | 22 | 1 | 1 | 21 |
| 1.62 | 15 | 0 | 0 | 15 | 0 | 0 | 15 |
| 4.54 | 23 | 0 | 0 | 23 | 0 | 0 | 23 |
| 15.2 | 9 | 0 | 0 | 9 | 0 | 0 | 9 |
| 48.4 | 22 | 0 | 0 | 22 | 0 | 2 | 20 |

2.2.6 F1 世代成熟個体の結果

1) ペアリング後の死亡および行動・外観の異常 (F1)

F1 世代ペアリング後の死亡個体数を表 1-19 に示す。

対照区および 0.501 µg/L 濃度区では死亡は見られず、行動・外観の異常は認められなかった。1.62~48.4µg/L 濃度区では 1~3 尾の死亡が見られ、オスは 15.2, 48.4 µg/L 濃度区で対照区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でも有意差は認められなかった。

表 1-19 F1 世代ペアリング後の死亡個体数

| 測定濃度 (µg/L) | オス | | | メス | | | 合計 |
|----------------|-----|-----|------------|-----|-----|------------|------------|
| | 供試数 | 死亡数 | 死亡率 (%) | 供試数 | 死亡数 | 死亡率 (%) | 死亡率 (%) |
| Control | 28 | 0 | 0 | 20 | 0 | 0 | 0 |
| 0.501 | 12 | 0 | 0 | 12 | 0 | 0 | 0 |
| 1.62 | 13 | 0 | 0 | 11 | 1 | 9 | 4 |
| 4.54 | 12 | 1 | 8 | 12 | 0 | 0 | 4 |
| 15.2 | 12 | 2 | 17 | 12 | 1 | 8 | 13 |
| 48.4 | 12 | 1 | 8 | 12 | 1 | 8 | 8 |

注) *は対照区と比較し統計的な有意差があることを示す ($p < 0.05$, Cochran-Armitage 検定)。同一性同士の水槽を含む。

2) 総産卵数・受精卵数・受精率 (F1)

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

総産卵数, 受精卵数については, 48.4 µg/L 濃度区で対照区と比較して減少し, 有意な差が認められた。

受精率については, 対照区と比較していずれの濃度区でも有意差は認められなかった。また, 経日変化グラフより, 対照区と明らかに時間変動の異なる濃度区は観察されず, ばく露時間に依存する影響は認められなかった。

対照区の総産卵数の平均値および各 24 ペアの総産卵数はすべて 20 個/ペア/日以上, 21 日間で算出された計 8567 個 の卵の受精率は 97%であり, 試験の有効性条件を満たした。

表 1-20 F1 世代の総産卵数・受精卵数・受精率

| 測定濃 ($\mu\text{g/L}$) | 総産卵数 (eggs/pair/day) | | | | | | | |
|----------------------------|----------------------|-------------|--------------|-------------|---------------|-------------|----------------|-----------|
| | 21 日間 | | 1 週目(DAY1-7) | | 2 週目(DAY8-14) | | 3 週目(DAY15-21) | |
| Control | 20.4 | \pm 1.9 | 15.4 | \pm 3.6 | 20.7 | \pm 2.3 | 25.1 | \pm 2.2 |
| 0.501 | 21.0 | \pm 1.4 | 14.2 | \pm 1.1 * | 21.1 | \pm 1.8 | 27.8 | \pm 2.1 |
| 1.62 | 20.1 | \pm 3.6 | 13.4 | \pm 3.5 * | 20.9 | \pm 4.4 | 26.1 | \pm 4.1 |
| 4.54 | 21.1 | \pm 1.8 | 13.8 | \pm 2.9 * | 21.2 | \pm 1.5 | 28.4 | \pm 2.6 |
| 15.2 | 18.8 | \pm 1.6 | 12.2 | \pm 1.7 * | 19.0 | \pm 2.3 | 25.2 | \pm 1.4 |
| 48.4 | 17.4 | \pm 4.2 * | 11.6 | \pm 2.5 * | 17.4 | \pm 4.8 * | 24.7 | \pm 2.8 |

| 測定濃 ($\mu\text{g/L}$) | 受精卵数 (eggs/day/female) | | | | | | | |
|----------------------------|------------------------|-------------|--------------|-------------|---------------|-------------|----------------|-----------|
| | 21 日間 | | 1 週目(DAY1-7) | | 2 週目(DAY8-14) | | 3 週目(DAY15-21) | |
| Control | 19.9 | \pm 1.9 | 14.8 | \pm 3.5 | 20.3 | \pm 2.0 | 24.5 | \pm 2.5 |
| 0.501 | 20.8 | \pm 1.4 | 13.9 | \pm 1.2 * | 21.0 | \pm 1.8 | 27.5 | \pm 2.1 |
| 1.62 | 19.8 | \pm 3.6 | 13.3 | \pm 3.5 * | 20.7 | \pm 4.5 | 25.8 | \pm 4.1 |
| 4.54 | 20.8 | \pm 1.6 | 13.4 | \pm 2.7 * | 21.1 | \pm 1.5 | 27.9 | \pm 2.2 |
| 15.2 | 18.5 | \pm 1.6 | 11.8 | \pm 1.8 * | 19.0 | \pm 2.3 | 24.6 | \pm 1.5 |
| 48.4 | 16.5 | \pm 5.5 * | 10.5 | \pm 3.4 * | 16.8 | \pm 6.1 * | 24.3 | \pm 2.8 |

| 測定濃 ($\mu\text{g/L}$) | 受精率 (%) | | | | | | | |
|----------------------------|---------|------------|--------------|------------|---------------|--------------------------|----------------|-----------|
| | 21 日間 | | 1 週目(DAY1-7) | | 2 週目(DAY8-14) | | 3 週目(DAY15-21) | |
| Control | 97.3 | \pm 1.8 | 95.9 | \pm 5.3 | 98.1 | \pm 2.5 | 97.6 | \pm 2.4 |
| 0.501 | 98.8 | \pm 1.2 | 97.4 | \pm 3.8 | 99.2 | \pm 0.8 | 99.1 | \pm 1.3 |
| 1.62 | 98.9 | \pm 0.6 | 99.0 | \pm 1.2 | 98.6 | \pm 1.2 | 99.0 | \pm 0.9 |
| 4.54 | 98.6 | \pm 1.5 | 97.8 | \pm 2.1 | 99.7 | \pm 0.5 * ^a | 98.2 | \pm 2.1 |
| 15.2 | 98.3 | \pm 1.2 | 97.1 | \pm 3.4 | 99.8 | \pm 0.4 | 97.7 | \pm 2.7 |
| 48.4 | 89.4 | \pm 28.2 | 86.6 | \pm 27.8 | 90.5 | \pm 28.6 | 98.3 | \pm 1.0 |

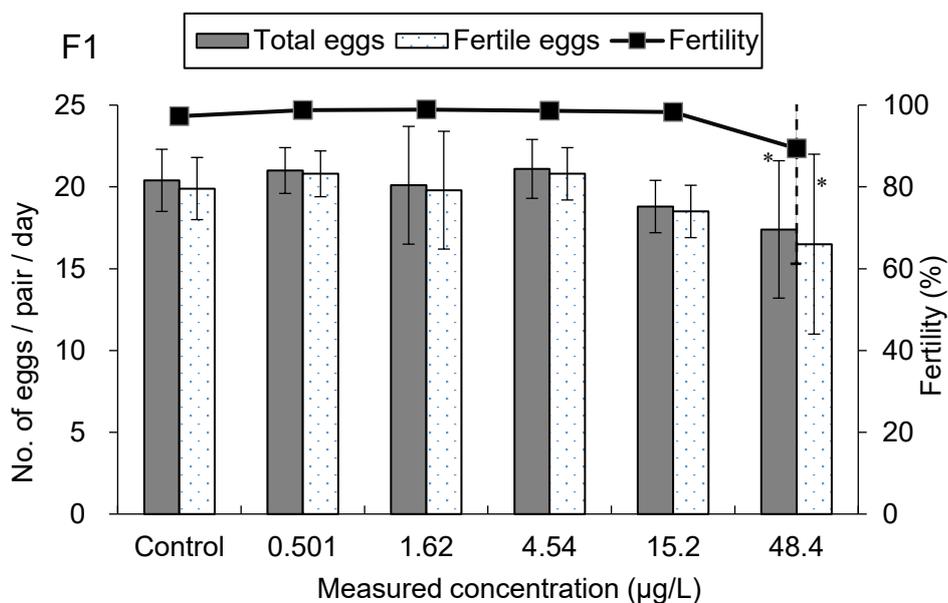
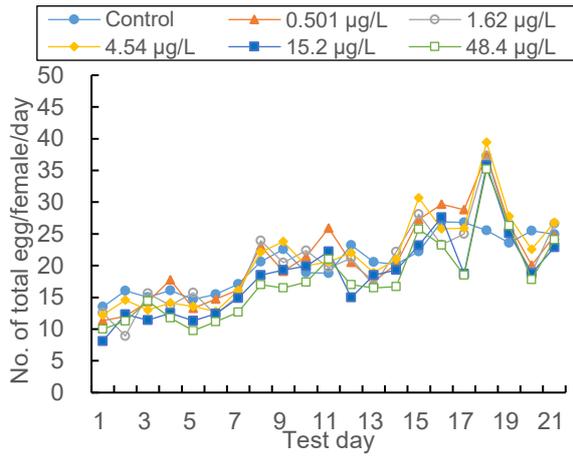


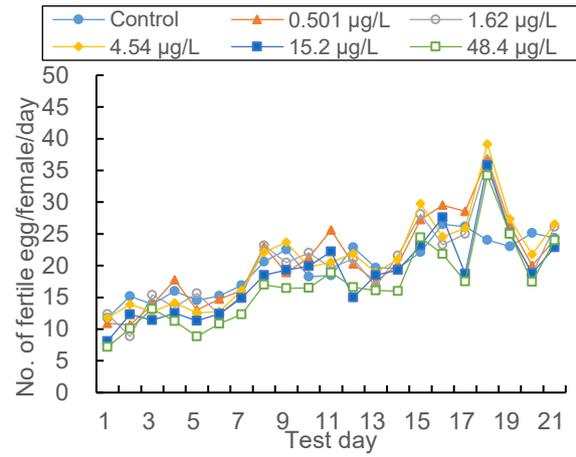
図 1-10 F1 世代の総産卵数・受精卵数・受精率 (各ペア・1 日当たり)

注) 値は平均値 \pm 標準偏差 (対照区~濃度区は同一性同士だった水槽を除きそれぞれ n=20,12,11,9,10,12, ただし途中で死亡が見られたため 3 週目はそれぞれ n=20,12,10,9,10,11) を示す。*は対照区と比較し統計学的な有意差があることを示す ($p<0.05$, Jonckheere-Terpstra 検定)。

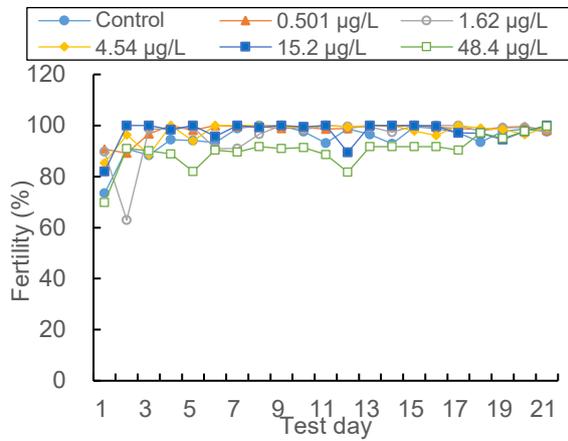
(a) 総産卵数



(b) 受精卵数



(c) 受精率



(d) 累積受精卵数

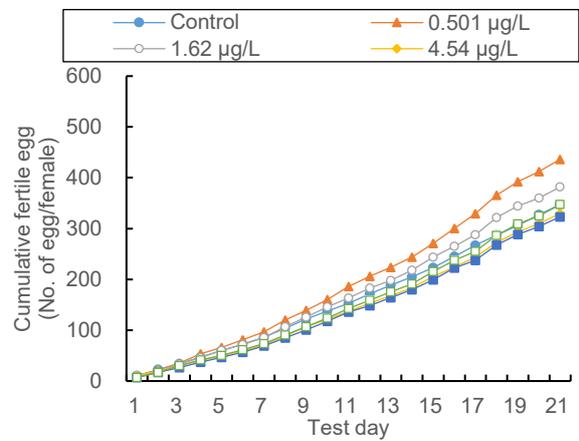


図 1-11 F1 世代の(a)総産卵数, (b)受精卵数, (c)受精率の日変動および(d)累積受精卵数 (値は各試験区の連平均値)

3) 全長・湿重量 (F1 成熟個体)

F1 世代成熟個体の全長および湿重量の測定結果を表 1-21, 図 1-12(a)(b)に示す。

全長については、オスはいずれの濃度区でも対照区と比較し有意差は認められなかった。メスは低濃度区側 (0.501~4.54 µg/L 濃度区) で有意な差が認められたが、高濃度区側 (15.2 および 48.4 µg/L 濃度区) では有意差は認められなかった。

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

表 1-21 F1 世代成熟個体の全長および湿重量

| 測定濃度 (µg/L) | 全長 (mm) | | | | 湿重量 (mg) | | | | |
|----------------|---------|-------|------|-------|----------|------|------|------|------|
| | オス | | メス | | オス | | メス | | |
| Control | 27.8 | ± 1.8 | 29.0 | ± 1.5 | 226 | ± 51 | 312 | ± 47 | |
| 0.501 | 30.7 | ± 0.9 | 30.6 | ± 0.5 | *a | 296 | ± 37 | 348 | ± 19 |
| 1.62 | 30.3 | ± 1.0 | 30.5 | ± 0.9 | *a | 267 | ± 23 | 361 | ± 26 |
| 4.54 | 30.3 | ± 0.9 | 30.7 | ± 1.3 | *a | 273 | ± 26 | 339 | ± 39 |
| 15.2 | 27.9 | ± 1.4 | 29.5 | ± 0.9 | | 215 | ± 37 | 318 | ± 30 |
| 48.4 | 27.8 | ± 1.2 | 28.6 | ± 0.8 | | 218 | ± 33 | 293 | ± 32 |

注) 値は平均値±標準偏差 (対照区~濃度区は, 同一性同士だった水槽および死亡魚を除きそれぞれ, オスは n=20,12,11,9,10,11, メスは n=20,12,10,10,11,11) を示す。*は対照区と比較し統計学的な有意差があることを示す (p<0.05, メスの全長は単調性が認められず, 正規性および等分散性が認められたため Dunnett 検定)。a: 有意差が認められたが濃度依存性なし。

4) 肝臓体指数および生殖腺体指数 (F1 成熟個体)

F1 世代成熟個体の肝臓体指数および生殖腺体指数の測定結果を表 1-22, 図 1-12(c)(d)に示す。

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

生殖腺体指数については、オスは最高濃度区 (48.4µg/L 濃度区) のみで対照区と比較し有意差が認められた。メスは 4.54~48.4 µg/L 濃度区で有意な差が認められた。

表 1-22 F1 世代成熟個体の肝臓体指数および生殖腺体指数

| 測定濃度 (µg/L) | 肝臓体指数 (%) | | | | 生殖腺体指数 (%) | | | |
|----------------|-----------|-------|-----|-------|------------|---------|------|---------|
| | オス | | メス | | オス | | メス | |
| Control | 2.3 | ± 0.5 | 6.2 | ± 0.8 | 1.3 | ± 0.4 | 11.6 | ± 1.8 |
| 0.501 | 2.0 | ± 0.5 | 6.2 | ± 1.0 | 1.5 | ± 0.4 | 12.0 | ± 1.7 |
| 1.62 | 1.8 | ± 0.3 | 5.8 | ± 1.1 | 1.7 | ± 0.4 | 12.4 | ± 1.2 |
| 4.54 | 3.0 | ± 1.1 | 6.4 | ± 0.9 | 1.7 | ± 0.7 | 13.3 | ± 1.0 * |
| 15.2 | 2.0 | ± 0.2 | 6.3 | ± 0.9 | 1.4 | ± 0.2 | 14.2 | ± 2.4 * |
| 48.4 | 2.3 | ± 0.5 | 6.5 | ± 0.9 | 1.7 | ± 0.5 * | 13.5 | ± 1.0 * |

注) 値は平均値±標準偏差 (対照区~濃度区は, 同一性同士だった水槽および死亡魚を除きそれぞれ, オスは n=20,12,11,9,10,11, メスは n=20,12,10,10,11,11) を示す。*は対照区と比較し統計学的な有意差があることを示す (p<0.05, Jonckheere-Terpstra 検定)。

5) 肝臓中ビテロジェニン濃度 (F1 成熟個体)

ELISA による F1 世代成熟個体の肝臓中ビテロジェニン濃度の測定結果を表 1-23, 図 1-12(e)に示す。オスは対照区と比較して全ての濃度区で有意差が認められた。メスは濃度依存的に減少し, 全濃度区で有意差が認められた。

表 1-23 F1 世代成熟個体の肝臓中ビテロジェニン濃度

| 測定濃度 ($\mu\text{g/L}$) | 肝臓中ビテロジェニン濃度 (ng/mg liver) | | | | | |
|-----------------------------|----------------------------|---|------|------|-----|---------|
| | オス | | | メス | | |
| Control | 21.5 | ± | 65.3 | 1000 | ± | 538 |
| 0.501 | N.D. | | *a | 553 | ± | 269 * |
| 1.62 | N.D. | | *a | 654 | ± | 341 * |
| 4.54 | 0.28 | ± | 0.24 | *a | 344 | ± 306 * |
| 15.2 | N.D. | | *a | 433 | ± | 93 * |
| 48.4 | 0.25 | ± | 0.17 | *a | 357 | ± 197 * |

注) 値は平均値±標準偏差 (対照区~濃度区は, 同一性同士だった水槽および死亡魚を除きそれぞれ, オスは n=20,12,11,9,10,11, メスは n=20,12,10,10,11,11) を示す。「N.D.」は定量下限 (0.200 $\mu\text{g/L}$) 未満であることを示す。*は対照区と比較し統計学的な有意差があることを示す ($p<0.05$, Jonckheere-Terpstra 検定)。a : 有意差が認められたが濃度依存性なし。

6) 二次性徴指標 (F1 成熟個体)

二次性徴を指標として, F1 世代成熟個体における乳頭状小突起を有する節板数の計測結果を表 1-24, 図 1-12(f)に示す。オスはいずれの濃度区でも対照区と比較し有意差は認められなかった。メスは全濃度区で乳頭状小突起を有する個体は観察されなかった。

表 1-24 F1 世代成熟個体の乳頭状小突起を有する節板数

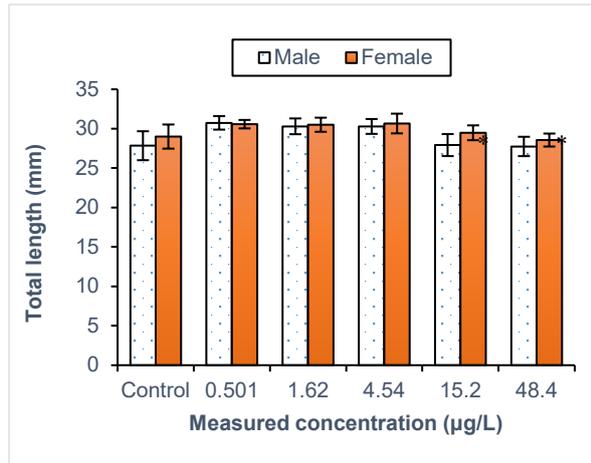
| 測定濃度 ($\mu\text{g/L}$) | 乳頭状小突起を有する節板数(Plates/fish) | | | | | |
|-----------------------------|----------------------------|---|----|----|---|---|
| | オス | | | メス | | |
| Control | 69 | ± | 12 | 0 | ± | 0 |
| 0.501 | 72 | ± | 11 | 0 | ± | 0 |
| 1.62 | 69 | ± | 13 | 0 | ± | 0 |
| 4.54 | 71 | ± | 9 | 0 | ± | 0 |
| 15.2 | 74 | ± | 16 | 0 | ± | 0 |
| 48.4 | 67 | ± | 15 | 0 | ± | 0 |

注) 値は平均値±標準偏差 (対照区~濃度区は, 同一性同士だった水槽および死亡魚を除きそれぞれ, オスは n=20,12,11,9,10,11, メスは n=20,12,10,10,11,11) を示す。

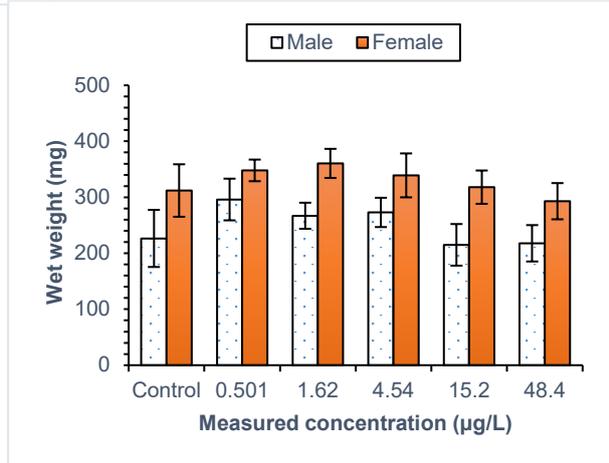
7) 表現型性別と生殖腺形態 (F1 成熟個体)

F1 世代成熟個体における表現型の性別・生殖腺形態は明確かつ一致していた。

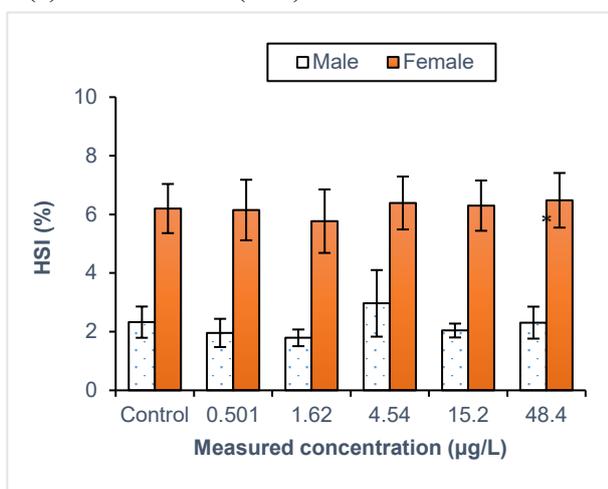
(a) 全長



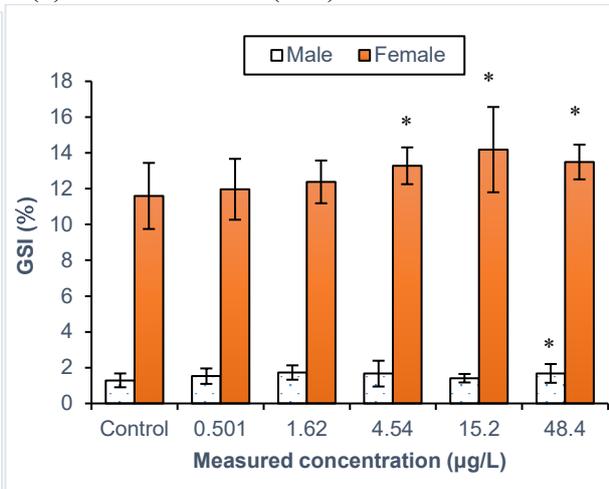
(b) 湿重量



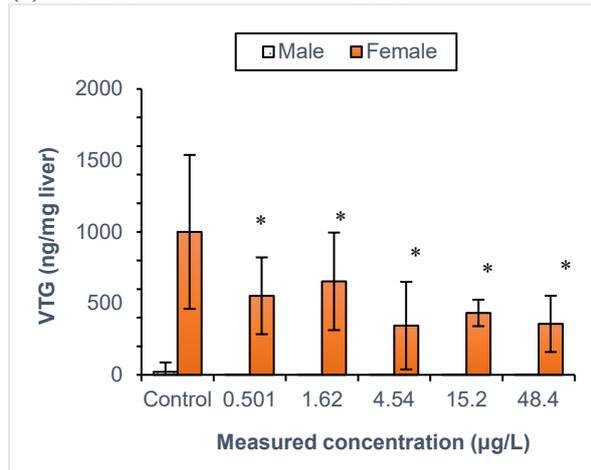
(c) 肝臓体指数 (HSI)



(d) 生殖腺体指数 (GSI)



(e) 肝臓中ビテロジェニン濃度



(f) 乳頭状小突起を有する節板数

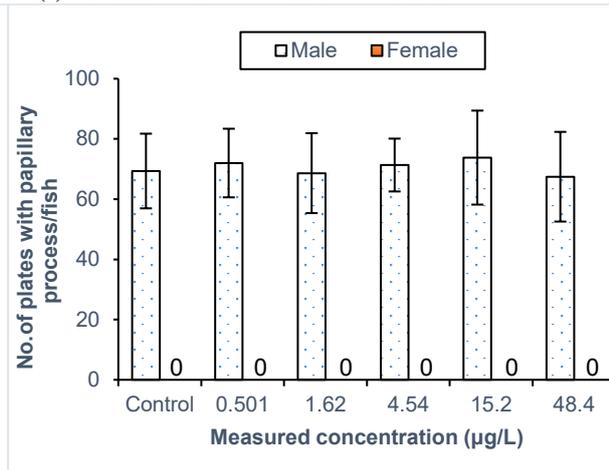


図 1-12 F1 世代成熟個体の(a)全長, (b)湿重量, (c)肝臓体指数, (d)生殖腺体指数,

(e)肝臓中ビテロジェニン, (f)乳頭状小突起を有する節板数

注) 値は平均値±標準偏差 (対照区~濃度区は, 同一性同士だった水槽および死亡魚を除きそれぞれ, オスは n=20,12,11,9,10,11, メスは n=20,12,10,10,11,11) を示す。*は対照区と比較し統計学的な有意差があることを示す。ただし, 濃度依存性が認められない有意差は表記していない ($p < 0.05$, Jonckheere-Terpstra 検定, ただしメスの全長は Dunnett 検定)。

2.2.7 F2 世代の結果

1) 胚・仔魚期の孵化率・孵化日数・孵化後生存率・生存率 (F2 世代)

F2 世代胚・仔魚期の受精後 18 日目の孵化日数および孵化率を表 1-25 に、受精後 7~14 日目における孵化個体数を図 1-13 に示す。

対照区における孵化日の中央値が受精後 9 日目 (240 個体中 112 個体が孵化) となり (図 1-13), その 2 倍である 18 日目での孵化日数および孵化率の計算を実施した。

孵化日数については、0.501~4.54 および 48.4 $\mu\text{g/L}$ 濃度区で対照区と比較し有意差 (孵化日数が短い) が認められたが、15.2 $\mu\text{g/L}$ 濃度区では有意差は認められなかった。

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

対照区の孵化率は 80%以上であり、試験の有効性条件を満たした。

表 1-25 F2 世代胚・仔魚期の孵化日数・孵化率

| 測定濃度 ($\mu\text{g/L}$) | 孵化日数 (day) | | | 孵化率 (%) | |
|-----------------------------|------------|-----------|----|-----------|---------|
| | 受精後 18 日目 | | | 受精後 18 日目 | |
| Control | 8.9 | \pm 0.3 | | 96 | \pm 7 |
| 0.501 | 8.3 | \pm 0.2 | *a | 97 | \pm 3 |
| 1.62 | 8.2 | \pm 0.1 | *a | 99 | \pm 2 |
| 4.54 | 8.3 | \pm 0.4 | *a | 93 | \pm 8 |
| 15.2 | 8.9 | \pm 0.3 | | 95 | \pm 6 |
| 48.4 | 8.0 | \pm 0.2 | *a | 98 | \pm 4 |

注) 値は連平均値を元に算出した平均値 \pm 標準偏差 (対照区は n=12, 濃度区は n=6) を示した。*は対照区と比較し統計学的な有意差があることを示す ($p<0.05$, 孵化日数は Mixed Effects Cox Models, 孵化率は Jonckheere-Terpstra 検定)。a: 有意差が認められたが濃度依存性なし。

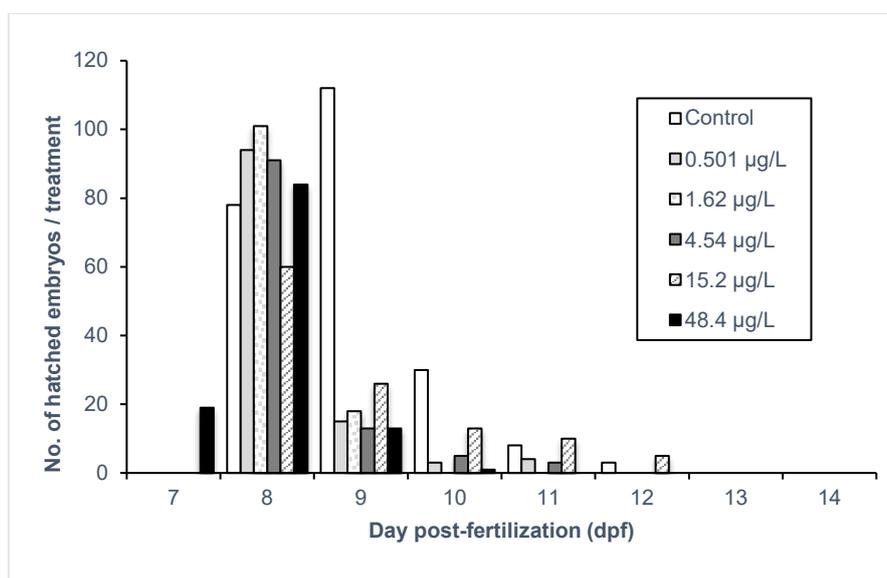


図 1-13 F2 の受精後 7~14 日目における孵化個体数 (各試験区の合計)

2.3 結果の概要

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

(1) F0 世代成熟個体（18 週齢）の結果

1) 繁殖に関する指標（総産卵数・受精卵数・受精率）

総産卵数および受精卵数：48.4 µg/L 濃度区で対照区と比べて有意に減少した。
受精率：全ての濃度区において対照区との有意差は認められなかった。

2) 二次性徴（乳頭状小突起を有する節板数）

オスでは全ての濃度区において対照区との有意差は認められなかった。
メスでは全ての試験区で乳頭状小突起を有する個体は観察されなかった。

3) 肝臓中ビテロジェニン濃度

オス、メスともに、全ての濃度区において対照区との有意差は認められなかった。

4) 表現型性別および生殖腺形態

全ての濃度区において、表現型性別および生殖腺形態は明確かつ一致していた。

5) その他の指標

全長：15.2 µg/L 濃度区以上のメスにおいて対照区と比べて有意に減少した。

湿重量：メスの全ての濃度区において対照区と比べて有意に減少した。

肝臓体指数：オス、メスともに、全ての濃度区において対照区との有意差は認められなかった。

生殖腺指数：15.2 µg/L 濃度区以上のメスにおいて、対照区と比べて有意に低下した。

(2) F1 世代胚～仔魚期の結果

1) 胚期孵化日数・孵化率

孵化日数：0.501 µg/L～15.2 µg/L 濃度区で対照区と比較し有意な差が認められたが、最高濃度区である 48.4 µg/L 濃度区では有意差は認められなかったため、0.501 µg/L～15.2 µg/L 濃度区の有意差は被験物質の影響ではないと考えられた。

孵化率：4.54 µg/L 濃度区以上で対照区と比べて有意に低下した。有意差が認められた濃度区では胚の死亡が観察されたが、F2 世代の胚期では死亡がほとんど観察されず、被験物質の影響よりもむしろ親魚の生殖能の個体差による可能性が考えられた。

(3) F1 世代亜成体の結果

1) 生存率（受精後 4 週目および 9 週目）

受精後 4 週目では 48.4 µg/L 濃度区で対照区と比べて有意に低下したが、受精後 8 週目では全ての濃度区で対照区と比べて有意な差は認められなかった。

2) 二次性徴（乳頭状小突起を有する節板数）

オスでは全ての濃度区において対照区と比べて有意に増加した。

メスでは全ての試験区で乳頭状小突起を有する個体は観察されなかった。

3) 肝臓中ビテロジェニン濃度

4.54 µg/L 濃度区以上のメスにおいて、対照区と比べて濃度依存的に有意に増加した。

4) 表現型性別および生殖腺形態

対照区で最大 7 個体、濃度区で最大 4 個体表現型性別や生殖腺形態と遺伝的性別が一致しなかったまたは不明であったが、それらはいずれも全長および湿重量も小さい個体だったため、未成熟個体であった可能性があった。

5) その他の指標

全長：オスでは全ての濃度区において、メスでは 0.501~4.54 µg/L 濃度区において、対照区と比べて有意な差が認められたが、濃度依存性は認められず、被験物質の影響ではないと考えられた。

湿重量：0.501 および 1.62 µg/L 濃度区のメスにおいて、対照区と比べて有意な差が認められたが、濃度依存は無く、被験物質の影響ではないと考えられた。

F1 世代亜成体では、全長および湿重量の値が全試験区の中で対照区が最も小さく、第 3 濃度区である 4.54 µg/L 濃度区が最も大きく濃度依存的では無かった。試験区ごとに成熟度にずれが生じていた可能性が考えられた。

肝臓体指数：オスでは全ての濃度区において、メスではメスでは 0.501~4.54 µg/L 濃度区において、対照区と比べて有意な差が認められたが、濃度依存は無く、被験物質の影響ではないと考えられた。

生殖腺指数：15.2 µg/L 濃度区以上のメスにおいて、対照区と比べて有意に増大した。

(4) F1 世代成熟個体（15 週齢）の結果

1) 生存率

すべての濃度区において対照区との有意差は認められなかった。

2) 繁殖に関する指標（総産卵数・受精卵数・受精率）

総産卵数および受精卵数：48.4 µg/L 濃度区で対照区と比べて有意に減少した。

受精率：全ての濃度区において対照区との有意差は認められなかった。

3) 二次性徴（乳頭状小突起を有する節板数）

オスでは全ての濃度区において対照区との有意差は認められなかった。

メスでは全ての試験区で乳頭状小突起を有する個体は観察されなかった。

4) 肝臓中ビテロジェニン濃度

全ての濃度区のメスにおいて、対照区と比べて有意に減少した（濃度依存性有り）。

5) 表現型性別および生殖腺形態

すべての濃度区において、表現型性別および生殖腺形態は明確かつ一致していた。

6) その他の指標

全長：メスでは 0.501 µg/L~4.54 µg/L 濃度区で対照区と比較し有意な差が認められたが、15.2 および 48.4 µg/L 濃度区では有意差は認められなかったため、0.501 µg/L~4.54 µg/L 濃度区の有意差は被験物質の影響ではないと考えられた。

湿重量：オス、メスともに、全ての濃度区において対照区との有意差は認められなかった。

肝臓体指数：オス、メスともに、全ての濃度区において対照区との有意差は認められなかった。

生殖腺指数：オスでは 48.4 µg/L 濃度区において、メスでは 4.54 µg/L 濃度区以上において、対照区と比べて有意に増大した。

(5) F2 世代胚・仔魚期の結果

孵化後日数：0.501 µg/L～4.54 および 48.4 µg/L 濃度区で対照区と比較し有意な差が認められたが、15.2 µg/L 濃度区では有意差は認められなかった。この有意差は被験物質の影響ではない可能性が考えられた。

孵化率：全ての濃度区において、対照区と比べて有意な差は認められなかった。

2.4 考察

MEOGRT 試験法を用いてリン酸トリフェニルの多世代影響について検討した。本試験の各世代および各エンドポイントの LOEC 一覧を表 1-26 に示す。

本試験において、F1 世代の 4.54 µg/L 濃度区以上で胚での死亡が見られ、孵化率が対照区と比べて有意に低下したが、ふ化から亜成体までの全長および湿重量に対照区との有意差は認められなかった。

繁殖に与える影響については、F0 および F1 世代において、総産卵数および受精卵数は 48.4 µg/L 濃度区で有意に低下した。受精率に有意差は認められなかった。

F1 世代成熟個体のメスの肝臓中のビテロジェニン濃度は、試験液中のリン酸トリフェニル濃度に依存して減少する傾向が見られた。F1 世代において、亜成体では全ての濃度区で対照区と比べて乳頭状小突起を有する節板数が増加したが、成熟個体では有意差は認められなかった。

以上の結果から、致死や孵化などの有害性に関わる深刻な影響は無かったと判断した。繁殖影響については最高濃度区である 48.4 µg/L 濃度区で影響が確認され、それらによるリン酸トリフェニルの継世代影響が懸念されたが、明確な内分泌かく乱作用は示さなかった。

なお、既報の結果（表 1-27）と併せ、リン酸トリフェニルによる何らかの毒性作用があった可能性は否定できない。また、内分泌かく乱作用の可能性は少ないと思わすが、明確な判断はできなかった⁸⁾。

表 1-26 リン酸トリフェニルの MEOGRT 試験結果まとめ
(各世代各エンドポイントに対する LOEC)

| Stage | wpcf | Endpoint | | LOEC (µg/L) | | |
|---------------------|--------------|----------|---------|-------------|--------|-------|
| | | | | F0 | F1 | F2 |
| Embryo | 2wpcf | 孵化率 | | | ↓ 4.54 | >48.4 |
| | | 孵化日数 | | | >48.4 | >48.4 |
| Larva | 4wpcf | 生存率 | | | ↓ 48.4 | |
| Sub-Adult | 8wpcf | 生存率 | | | >48.4 | |
| | 10wpcf | 全長 | ♂ | | >48.4 | |
| | | | ♀ | | >48.4 | |
| | | 湿重量 | ♂ | | >48.4 | |
| | | | ♀ | | >48.4 | |
| | | 肝臓体指数 | ♂ | | >48.4 | |
| | | | ♀ | | >48.4 | |
| | | 生殖腺体指数 | ♂ | | >48.4 | |
| | | | ♀ | | ↑ 15.2 | |
| | 肝臓中ビテロジェニン濃度 | ♂ | | >48.4 | | |
| ♀ | | | ↑ 4.54 | | | |
| 二次性徴（乳頭状小突起を有する節板数） | ♂ | | >48.4 | | | |
| | ♀ | | - | | | |
| 間性又は性転換の発生 | | | >48.4 | | | |
| Adult | 12~15wpcf | 生存率 | ♂ | >48.4 | ↓ 15.2 | |
| | | | ♀ | >48.4 | >48.4 | |
| | | 産卵数 | | ↓ 48.4 | ↓ 48.4 | |
| | | 受精卵数 | | ↓ 48.4 | ↓ 48.4 | |
| | 受精率 | | >48.4 | >48.4 | | |
| | 15wpcf | 全長 | ♂ | >48.4 | >48.4 | |
| | | | ♀ | ↓ 15.2 | >48.4 | |
| | | 湿重量 | ♂ | >48.4 | >48.4 | |
| | | | ♀ | ↓ <0.501 | >48.4 | |
| | | 肝臓体指数 | ♂ | >48.4 | >48.4 | |
| | | | ♀ | >48.4 | >48.4 | |
| | | 生殖腺体指数 | ♂ | 48.4 | ↑ 48.4 | |
| | | | ♀ | ↓ 15.2 | ↑ 4.54 | |
| | 肝臓中ビテロジェニン濃度 | ♂ | >48.4 | >48.4 | | |
| ♀ | | >48.4 | ↓ 0.501 | | | |
| 二次性徴（乳頭状小突起を有する節板数） | ♂ | >48.4 | >48.4 | | | |
| | ♀ | - | - | | | |
| 間性又は性転換の発生 | | >48.4 | >48.4 | | | |

表 1-27 リン酸トリフェニルの第一段階生物試験（短期繁殖試験，OECD TG229）⁸⁾
結果の比較

| 測定濃度 (μg/L) | | 44.9, 17.1, 7.19, 2.13 | |
|--------------|---|------------------------|--------|
| Endpoint | | LOEC (μg/L) | |
| 死亡 | ♂ | | > 44.9 |
| | ♀ | ↑ | 44.9 |
| 全長・湿重量 | ♂ | | > 44.9 |
| | ♀ | ↓ | 44.9 |
| 産卵数 | | ↓ | 44.9 |
| 受精卵数 | | ↓ | 44.9 |
| 受精率 | | | > 44.9 |
| 肝臓体指数 | ♂ | ↓ | 7.19 |
| | ♀ | | > 44.9 |
| 生殖腺体指数 | ♂ | | > 44.9 |
| | ♀ | | > 44.9 |
| 肝臓中ビテロジェニン濃度 | ♂ | | > 44.9 |
| | ♀ | ↓ | 7.19 |
| 二次性徴（乳頭状小突起） | ♂ | | > 44.9 |
| | ♀ | | > 44.9 |

2.5 参考文献

- 1) OECD 2015 OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 240, Medaka Extended One Generation Reproduction Test (MEOGRT)
- 2) 化学物質の環境リスク評価 第4巻, 環境書 HP より
- 3) 独立行政法人製品評価技術基盤機構 既存化学物質安全性点検データ
- 4) Howard, P.H. and Deo, P.G., Bulletin of Environmental Contamination Toxicology, 22: 337-344 (1979)
- 5) Pub Chem, Available from https://www.nite.go.jp/chem/chrip/chrip_search/systemTop
独立行政法人製品評価技術基盤機構：化学物質総合情報提供システム (CHRIP)
- 6) Swinrwk J, Flynn K, Haselman J, Package 'StatCharrms'. Available from: <https://cran.r-project.org/web/packages/StatCharrms/StatCharrms.pdf>
- 7) OECD (2015) Guidance Document on Medaka Histopathology Techniques and Evaluation for the medaka extended one-generation reproduction test (MEOGRT). Series on Testing and Assessment (No. 227). Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- 8) 平成 24 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 (りん酸トリフェニル)

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2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
開催日時：令和3年3月19日
開催形式：WEB

付属資料-1

Results of Analysis, Device No.1

Sample: Dechlorinated tap water generated with device No. 1 in building B12 of LSI Medience [for rearing animals]
 Measurement agency: MC Evolve Technologies Corporation
 1-25-14, Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305-0856, Japan
 Date for sample collection: August 18, 2020

These data were obtained from report 20H-003868-0001.

| 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] | 110 |
| Biochemical Oxygen Demand (BOD) | [mg/L] | < 0.5 | Conductivity | [mS/m] | 14 |
| Chemical Oxygen Demand (COD) | [mg/L] | 0.9 | Hardness | [mg CaCO ₃ /L] | 49 |
| Total Phosphorus | [mg/L] | N.D. (<0.02) | Alkalinity (pH4.8) | [mg CaCO ₃ /L] | 40 |
| pH | [-/(°C)] | 7.9 (19) | Sodium | [mg/L] | 6.5 |
| Coliform Group | [MPN/100mL] | N.D. (<2) | Potassium | [mg/L] | 0.8 |
| Total Mercury | [mg/L] | N.D. (<0.00005) | Calcium | [mg/L] | 14 |
| Copper | [mg/L] | N.D. (<0.005) | Magnesium | [mg/L] | 3.3 |
| Cadmium | [mg/L] | N.D. (<0.0003) | Oil (<i>n</i> -Hexane Extracts) | [mg/L] | N.D. (<0.5) |
| Zinc | [mg/L] | N.D. (<0.01) | Oil (Oily Film / Observation) | [-] | Not Recognized |
| Lead | [mg/L] | N.D. (<0.001) | Phenols | [mg/L] | N.D. (<0.005) |
| Aluminum | [mg/L] | 0.04 | Polychlorinated Biphenyl (PCB) | [mg/L] | N.D. (<0.0005) |
| Nickel | [mg/L] | N.D. (<0.01) | Thiram | [mg/L] | N.D. (<0.0006) |
| Hexavalent Chromium | [mg/L] | N.D. (<0.005) | Simazine | [mg/L] | N.D. (<0.0003) |
| Manganese | [mg/L] | N.D. (<0.01) | Thiobencarb | [mg/L] | N.D. (<0.002) |
| Tin | [mg/L] | N.D. (<0.03) | Isoxathion | [mg/L] | N.D. (<0.001) |
| Silver | [mg/L] | N.D. (<0.01) | Diazinon | [mg/L] | N.D. (<0.001) |
| Cobalt | [mg/L] | N.D. (<0.01) | Fenitrothion (MEP) | [mg/L] | N.D. (<0.001) |
| Iron | [mg/L] | N.D. (<0.04) | Isoprothiolane | [mg/L] | N.D. (<0.001) |
| Total Cyanide | [mg/L] | N.D. (<0.001) | Oxine-Copper | [mg/L] | N.D. (<0.001) |
| Residual Chlorine | [mg/L] | N.D. (<0.1) | Chlorothalonil (TPN) | [mg/L] | N.D. (<0.001) |
| Bromic Ion | [mg/L] | N.D. (<0.5) | Propyzamide | [mg/L] | N.D. (<0.001) |
| Fluorine | [mg/L] | N.D. (<0.1) | EPN | [mg/L] | N.D. (<0.001) |
| Hydrogen Sulfide | [mg/L] | N.D. (<0.002) | Dichlorvos (DDVP) | [mg/L] | N.D. (<0.001) |
| Ammonium Nitrogen | [mg/L] | N.D. (<0.2) | Fenobucarb (BPMC) | [mg/L] | N.D. (<0.001) |
| Nitrite Nitrogen | [mg/L] | N.D. (<0.1) | Iprobenfos (IBP) | [mg/L] | N.D. (<0.001) |
| Arsenic | [mg/L] | N.D. (<0.001) | Chlornitrofen (CNP) | [mg/L] | N.D. (<0.001) |
| Surface-Active Agents (Anionic) | [mg/L] | N.D. (<0.02) | | | |