

環境省請負業務

平成 27 年度

化学物質の内分泌かく乱作用に関する  
試験法開発に係る業務

報告書  
(改訂版)

平成 28 年 3 月

国立研究開発法人 国立環境研究所

### III. 魚類試験法開発に係る業務

#### 1. メダカ多世代試験の開発

##### 1.1 背景と目的

EXTEND2010 における内分泌かく乱作用の有害性評価の枠組み（生殖に及ぼす影響）では、化学物質の（試験対象物質）の内分泌かく乱作用による有害性を確認する第 2 段階生物試験（長期間のばく露による生物試験）として、メダカを用いる多世代試験法の開発を進めている。メダカ多世代試験は、化学物質の母体から卵への移行による次世代、あるいは次世代から次々世代への影響（有害性）の評価を目的として、メダカを複数世代にわたって化学物質にばく露、各世代においてビテロジェニン、生殖腺組織、二次性徴、間性又は性転換、繁殖（産卵数・受精率など）及び成長などのエンドポイントを測定し、化学物質のメダカに対するエストロゲン様作用、抗エストロゲン様作用、アンドロゲン様作用、抗アンドロゲン様作用、アロマトーゼ阻害作用及び視床下部・下垂体・生殖腺軸への影響などの評価を行う。これは、OECD の試験法・評価体系で Level 5 に位置付けられる試験法である。

メダカを用いる Level 5 の試験法については、平成 18 年当時、OECD においてガイドライン化が進んでいなかったことから、第 3 回日米二国間実務者会議（平成 18 年 12 月）において、米国提案のメダカ二世代試験法について日米共同で検証及び標準化を進めることに合意した。以降、年 1 回開催の日米二国間実務者会議における議論及び合意などを踏まえて、日米両国において共通の試験プロトコールによる検証試験などを実施し、試験法の標準化に向けた技術的課題などの検討を行うことになった。平成 21 年 4 月に、日米共同で OECD に提出した Medaka Life Cycle (MLC) / Multi-generation Test (MMT) のガイドライン化のためのプロジェクト提案書 (SPSF) が承認され、OECD のテストガイドラインプログラムのもとでテストガイドライン化に向けた取り組みが開始された。平成 22 年（2010 年）4 月には、米国より、試験プロトコールが提案された。日本は、このガイドライン案に準じてタモキシフェンクエン酸塩を用いた検証試験を行い、その過程で試験法や条件など関わる技術的課題を整理し、再検討した。一方、米国では、これまでに日米で実施された検証試験の結果（データ）に基づいて、主に繁殖に関わるエンドポイント（産卵数等）における統計学的検出力の観点から試験条件の妥当性等についての検証を行った。第 7 回及び第 8 回日米二国間実務者会議（平成 22・23 年度）では、動物愛護及び統計学的検出力を考慮した試験生物数・繰り返し数や各世代のばく露期間等について、テストガイドライン化に向けた再検討及び改訂プロトコール案の策定が行われ、これをもとに試験法に関わる技術的課題の再検討を行う事が合意された。改定プロトコール案に準じた試験の実施は、エストロゲン作用の陽性対象物質であるエストロンを被験物質として平成 24 年度に実施され、試験法としての妥当性や技術的課題などについて検討を行った。その結果は、第 9 回日米二国間実務者会議（平成 25 年度）にて報告され、協議結果を踏まえて、MMT として 27 週で検討されていた試験期間を 19 週に短縮するメダカ拡張 1 世代繁殖試験（MEOGRT: the Medaka Extended One Generation Reproduction Test）がドラフトテストガイドライン案として OECD の専門家グループに提出された。

昨年度は、第 10 回日米二国間実務者会議（平成 26 年度）において OECD のテストガイドライン化に向けた最終プロコール案が取りまとめられた。試験期間を 19 週に短縮する米国案の MEOGRT に対し、過年度の検討結果より F2 世代の繁殖影響を確認することに重要性が示唆されることから、試験期間について 3 つのオプション、即ち 19 週・27 週・31 週の 3 種を設けて、試験目的に応じて選択するスキームを作成し、日本案として提案した。しかし、協議の結果、米国案の MEOGRT を最終プロトコールとすることで合意し、OECD に提出、平成 27 年 4 月に開催された第 27 回 OECD-WNT 会議においてドラフトテストガイドライン OECD TG240 として承認、7 月にガイドラインとして公表された<sup>1)</sup>。

## 1.2 実施内容

承認された OECD TG240 に基づいて MEOGRT を実施し、試験条件の確認等を行うとともに、各エンドポイントに関するデータ等を取得する。試験物質として、SPEED' 98 においてフルライフサイクル試験<sup>2)</sup>が実施されている 4-ノニルフェノールを用い、試験条件の違いや MEOGRT の妥当性について検討する。また、得られたデータを踏まえて、試験生物数の削減等、試験の簡素化に繋がる試験条件の変更案及びその妥当性等について検討を行う。各エンドポイントの統計学的検出力を踏まえた試験物質の有害性評価の観点等から、試験生物数を削減することの妥当性等について検討する。

## 1.3 材料及び方法

### 1.3.1 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<sup>3),4)</sup>。試験に用いる試薬は、関東化学株式会社（型番：28640-96、純度：99.7%、分岐型・異性体混合物）より入手した。

#### (1) CAS 登録番号

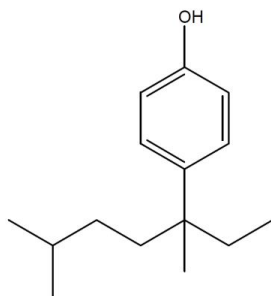
CAS: 84852-15-3

#### (2) 一般名

和名：4-ノニルフェノール（分岐鎖・異性体混合物）

英名：4-Nonylphenol (NP)

#### (3) 構造式（異性体の一例を下記に示す）



4-(3,6-dimethylheptan-3-yl)phenol

#### (4) 分子式及び分子量

分子式：C<sub>9</sub>H<sub>19</sub>O

分子量：220.35

#### (5) 化学名

和名：4-(X, Y ジメチルヘプタン-Z-イル)フェノール（IUPAC 命名法）

英名：4-(X,Y-dimethylheptan-Z-yl)phenol, 4-Nonylphenol (mixture of branched chain isomers)（IUPAC 命名法）

X, Y, Z は異性体によって異なる。

#### (6) 溶解性

水溶解度：6 mg/L（20°C）

(7) 融点

-8℃

(8) 分配係数

Log Kow=3.80~4.77

1.3.2 試験生物

(1) 供試生物種

生物種はヒメダカ (*Oryzias latipes*) とした。試験に用いたヒメダカは、財団法人化学物質評価研究機構より供与され、10年以上、当施設飼育馴化室において飼育繁殖している系統 (NIES 系統) を使用した。

(2) 飼育環境及び条件

飼育水には、当施設の淡水処理装置で製造された「調温清浄濾過水」を使用した (参考資料Ⅲ)。ヒメダカの飼育は全て飼育馴化室において、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：調温清浄濾過水
- ・飼育方法：流水式
- ・水温・pH：25±2℃、pH 7.5±0.5
- ・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 (Aquafauna Bio-Marine 社製) のふ化後 24 時間以内の幼生を、1 日 2 回 (休日は 1 回) 飽食量を給餌

1.3.3 試験環境及び条件など

(1) 試験室

試験は全て、国立環境研究所 環境リスク研究棟 魚類・両棲類試験室で行った。

(2) 試験装置

流水式魚類試験装置 (SIS-24F、柴田科学株式会社製) を使用した。



図 1-1 流水式装置 (左：1号機、中央：2号機、右：2号機・ふ化器をセット)

## (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
- ・希釈水：調温清浄濾過水
- ・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 世代のふ化までの計 19 週
  - ・F0 世代：4 週間
  - ・F1 世代：15 週間
  - ・F2 世代：対照区のふ化日の中央値の 2 倍（約 2 週間）
- ・試験液量：
  - ・F0 世代：2 L/連
  - ・F1 世代（受精後 0～6 週目）：2 L/連
  - ・F1 世代（受精後 7～10 週目）：5 L/連
  - ・F1 世代（受精後 10～15 週目）：5 L/連
- ・試験区数：被験物質ばく露区 5 濃度（100, 32, 10, 3.2, 1.0  $\mu\text{g/L}$ ）、対照区
- ・連数：
  - ・F0 世代：12 連（対照区）、6 連（ばく露区）
  - ・F1 世代（受精後 1～10 週目）：12 連（対照区）、6 連（ばく露区）
  - ・F1 世代（受精後 10～15 週目）：24 連（対照区）、12 連（ばく露区）
  - ・F2 世代（受精後 1～2 週目）：12 連（対照区）、6 連（ばく露区）
- ・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 1～2 週目）：20 個体/連
- ・供試生物齢：
  - ・F0 世代：12-16 週齢（本試験では 12 週齢（受精後 82 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（+1 日）  
（本試験では試験開始 22 日目、F0：15 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 日目および 121 日目）
- ・水温：25 $\pm$ 1 $^{\circ}\text{C}$
- ・pH：pH 7.5 $\pm$ 0.5
- ・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（Aquafauna Bio-Marine 社製）のふ化後 24 時間以内の幼生を、OECD TG240 Annex 1 と NIES 系統の飽食量を考慮して、成長段階に応じ表 1-1 に示す量を 1 日 2 回（休日は 1 回）給餌した。

表 1-1 ブラインシュリンプ (*Artemia spp. nauplii*) の給餌量 (mg dry weight/fish/day)

ふ化後週齢 (wph)	ふ化後日齢 (dph)	本試験	OECD TG240 ANNEX 5
Week1	Day 1		0.5
	Day 2		0.5
	Day 3	1.0	0.6
	Day 4	1.0	0.7
	Day 5	1.0	0.8
	Day 6	1.0	1.0
	Day 7	1.0	1.3
Week2	Day 8	2.0	1.7
	Day 9	2.0	2.2
	Day 10	3.0	2.8
	Day 11	3.0	3.5
	Day 12	4.0	4.2
	Day 13	4.0	4.5
Week3	Day 14	5.0	4.8
	Day 15	5.0	5.2
	Day 16-21	6.0	5.6
Week 4	Day 22-28	8.0	7.7
Week 5	Day 29-35	16.0	9.0
Week 6	Day 36-42	24.0	11.0
Week 7	Day 43-49	40.0	13.5
Week 8	Day 50-56	48.0	22.5
Week 9	Day 57-63	(20 fish/tank) 53.3	22.5
		(2 fish/tank) 56.0	22.5
Week 10	Day 64-70	60.0	22.5
Week 11~	Day 71~	60.0	22.5

#### (4) 環境測定機器

水温、pH、溶存酸素の測定は、それぞれ以下の機器を用いて行った。

- ・水温計：CT-430WP、株式会社カスタム製
- ・pH計：D-55、株式会社堀場製作所製
- ・溶存酸素計：HQ30d、HACH社製

#### (5) 試験液の調製

被験物質 500 mg を電子天秤 (AG204、Mettler Toledo 社製) によって秤量し、アセトン (残留農薬試験用 和光純薬工業株式会社製) 100 mL に溶解させ、5,000 mg/L のストックソリューション A を得た。これを、容量 1 L のねじ口瓶に 3.2 mL または 5 mL 投入し、乾固させた後に超純水 1 L を投入、30 分の超音波処理によって懸濁させた。これを超純水によって 5 L まで希釈し、さらに超音波処理による攪拌によって混合し、3.2 mg/L または 5 mg/L のストックソリューション B を得た。同様に、ストックソリューション A を適量、5 L のねじ口瓶に取り乾固させ、超純水を 5 L 投入、超音波処理によって 0.1、0.32、1 mg/L のストックソリューション B を得た。

各濃度区用のストックソリューション B を流水式ばく露装置にセットし、調温清浄濾

過水によって 100 µg/L 濃度区は 50 倍、以下の濃度区は 100 倍希釈を連続的に行い、調製直後の試験液を各水槽へ滴下した。ストックソリューション A は約 1 か月に一度新しいものを調製し、ストックソリューション B の調製は、3~4 日に 1 度の頻度で行った。

## (6) 被験物質の濃度測定

生物試験に使用した試験水を固相抽出法によって精製、濃縮し、GC/MS を用いて定量した。

### 【試薬】

- ・4-ノニルフェノール（分岐鎖・異性体混合物）：環境分析用 関東科学株式会社製
- ・4-n-ノニルフェノール-d4：和光純薬工業株式会社製
- ・アセトン：残留農薬試験用 和光純薬工業株式会社製
- ・固相カートリッジ：SepPak Plus C18 Cartridges Waters 社製
- ・精製水：日本ミリポア製 Elix10 と ADVANTEC 製 RF0665DA を組み合わせたシステムにより処理したもの。

### 【器具】

メスシリンダー、メスフラスコ、マニホールド、シリンジ、共栓円錐管 10ml

### 【標準液の調整】

4-n-ノニルフェノール-d4 10 mg を秤量しアセトンに溶解、定容して 1000 mg/L 標準液を作成した。さらにこれを 10 mg/L に希釈し、内部標準溶液とした。

4-ノニルフェノール 10 mg を秤量し、アセトンに溶解、定容して 1000 mg/L 標準液を作成した。この標準液を希釈し、各々に 10 µL の内部標準溶液を加えた 0.02, 0.05, 0.1, 0.2 mg/L の標準液を作成して検量線として使用した。

### 【試験水の前処理】

試験水は溶液濃度に応じて 5~400 mL を使用し、内部標準として 10 mg/L の 4-n-ノニルフェノール-d4 溶液を 50 µL 添加して抽出、精製処理に供した。

固相抽出カートリッジをマニホールドに設置してメタノール 10 mL、精製水 10 mL でコンディショニングした後、試験水を 20 mL/min 程度の流速で通水した。通水後、カートリッジを精製水 10 mL で洗浄し、マニホールド上で 1 時間通気して乾燥させた後、それぞれのカートリッジよりアセトン 5 mL で溶出し、分析機器による測定に供した。

### 【分析機器】

- ・GC/MS：島津製作所製 GCMS-QP2010

### 【測定条件】

- ・GC
  - カラム：Agilent Technologies 製 DB-5MS(29.5 m×0.25 mm i.d. 膜厚 0.25 µm)
  - 液相：5%フェニルメチルシリコン
  - カラム温度：40°C (2 min)→8°C/min→310°C、5 min
  - 気化室温度：250°C
  - 注入法：スプリットレス法(1 分後パージ)
  - 注入量：2 µL
  - キャリアーガス：ヘリウム(線速度：40.0 cm/min)
- ・MS
  - イオン化法：EI
  - イオン化電圧：70eV

イオン源温度：250℃  
 検出モード：SIM 法  
 モニターイオン(m/z)  
 4-ノニルフェノール：107 (定量イオン)、135 (確認イオン)  
 4-n-ノニルフェノール-d4：110 (定量イオン)、112 (確認イオン)

1.3.4 ばく露及び観察・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。

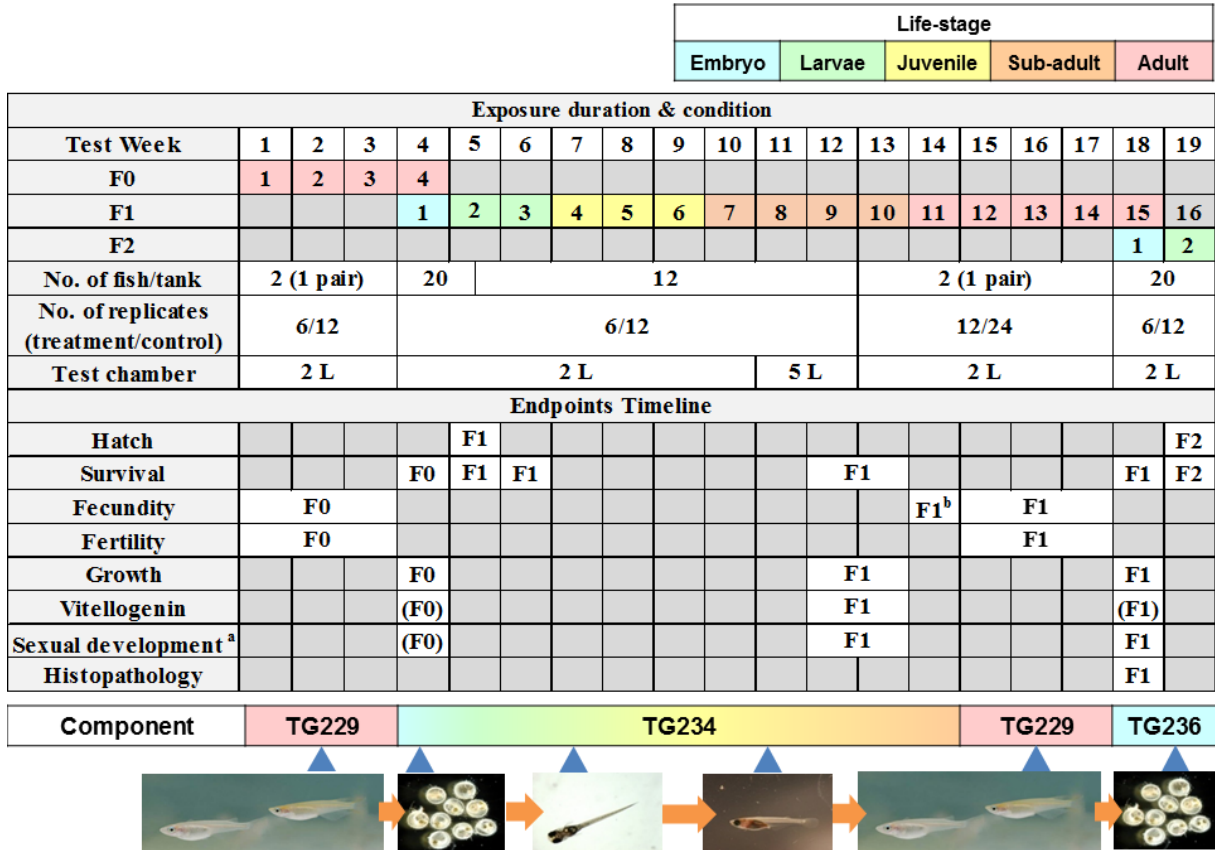


図 1-2 OECD TG240 メダカ拡張 1 世代繁殖試験(MEOGRT)のタイムライン

注) 括弧内はガイドラインにおいて必須ではないが、本試験で測定を行ったもの。

<sup>a</sup> オスの二次性徴 (尻鰭乳頭状小突起)、<sup>b</sup> 産仔開始日



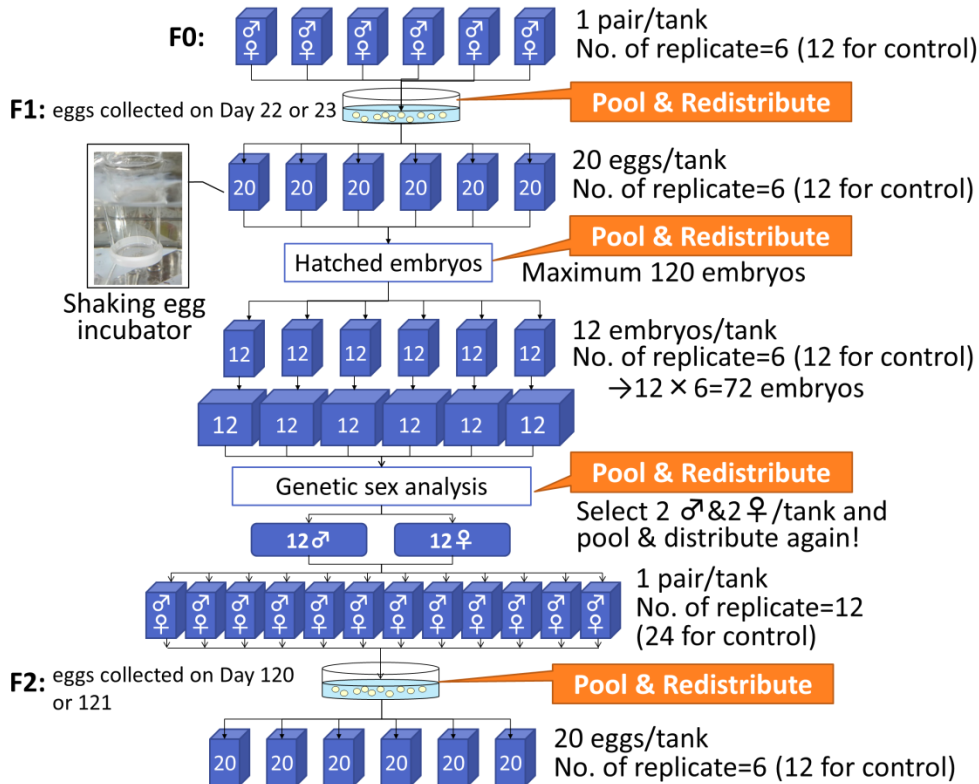


図 1-3 MEOGRT における連のプールと分配の手順

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 11 週齢のヒ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 7 日間の馴化を行った (48 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。

馴化終了後、被験物質の濃度が適正值であることを確認してから、供試ヒメダカを各水槽 (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。週に 1 回程度、水温・pH、溶存酸素飽和量を試験区毎に測定した。

ばく露水槽への藻類付着を防ぐため、週に 1 回程度水槽交換を行った。交換後の水槽は実験器具用自動洗浄機 (G7887、Miele 社製) を用いて洗浄し乾燥の上再使用した。尚、ばく露・洗浄に用いた廃水は、環境リスク研究棟内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、死亡個体の有無及び行動・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2日、すなわち試験開始22日目（以下、Test Day 22）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、水槽に設置したふ化器に投入した。※1日で必要数（20×連数）の受精卵が得られない場合は、2日間に渡って採取する。それでも足りない場合は、各20粒から15粒に減らし、最終的には15粒で確保できるだけの連数とする。

[ばく露終了後の測定]

4週間のばく露期間終了後（本試験ではTest Day 24、105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・体長及び湿重量の測定  
全長・体長はノギス（CD-S10C、株式会社ミットヨ製）を用いて、湿重量は電子天秤（AG204、Mettler Toledo 社製）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（MZ16、Leica 社製）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) 肝臓の測定及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（AG204、Mettler Toledo 社製）によって秤量した。計測した肝臓重量を基に肝臓体指数（肝臓重量/湿重量）を算出した。  
また、肝臓中のビテロジェニン量を調べるため、摘出した肝臓をホモジナイズし、ELISA法で測定した。ELISAはEnBioMedaka Vitellogenin ELISA system（株式会社エンバイオテック・ラボラトリーズ製）を用い、付属のマニュアルに従い実施した。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200 µLを加える。
  - ② 肝臓をホモジナイズし、4℃、9000 g、10分間の遠心分離にかける。
  - ③ 分離した上清を500 µL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℃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10倍希釈したものを使用した。ホモジネート上清中に含まれるビテロジェニンの分析にはエンバイオ社製のメダカビテロジェニン測定用ELISAキットを使用した。操作は以下の通りである。

- ① Wash Bufferで洗浄した抗体固層化マイクロプレートの各wellに、測定サンプルを50 µL添加し、室温で1時間インキュベートする。
- ② 溶液を捨て、well内をwash bufferで3回洗浄し、HRP-抗メダカビテロジェニン抗体溶液を、各wellに50 µLずつ添加し、室温で1時間インキュベートする。
- ③ 溶液を捨て、洗浄した後、発色液を各wellに50 µLずつ添加し、室温で正確

に 20 分間反応させ、反応停止液を 50  $\mu$ L ずつ添加して反応を停止させる。

- ④ マイクロプレートリーダーを用い、450 nm の吸光度を測定する。各サンプルについて 2 well を使用し、デュプリケーションで測定を行った。検量線にはキットに付属のメダカビテロジェニン標準液を使用した。標準液 (100 ng/mL) を希釈し、50, 20, 10, 5 ng/mL 溶液を調製し、上記と同様の手順によって測定した吸光度より検量線を作成した。検量線はマイクロプレートごとに作成した。測定サンプルの吸光度より、検量線を使用して測定試料中のビテロジェニン濃度を算出し、これに希釈率を乗じることでホモジナイズ上清中のビテロジェニン濃度を求めた。さらに、この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。

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。その後、Davidson 固定液中に浸漬し固定した。

(2) F1 世代

[ばく露方法]

F0 世代より採取した受精卵は、水槽内に設置したふ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。ふ化用シリンダーは、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、卵上下機構 (柴田科学株式会社製) によってゆっくりと振とうさせた。ふ化後の仔魚は、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 世代と同一である。

[ばく露期間中の観察]

ばく露期間中はふ化や死亡個体の有無及び行動・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、毎日ふ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。各日にふ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。ふ化率は対照区のふ化日の中央値の 2 倍の時点で算出し、それ以降は未ふ化で死亡とみなした。

各試験区において最も多くのふ化がみられた 2 日間 (本試験では受精後 7 日目および 8 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、ばく露区は 6 連ずつ再分配した。

受精後 21 日目に (Test Day 43) に仔魚の生死を確認した。死亡個体は、発見後速やかに取り除き外見上の雌雄 (もしくは未成熟) 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 DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN 社製) を用い、マニュアルに従って DNA を抽出した。
- ② PCR はプライマーとして 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、増幅産物を 1.5% TAE-アガロースゲルで電気泳動し、EtBr 染色によりバンド（メスは 1 本、オスは 2 本現れる）を確認して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無作為に各連から 2 個体ずつ選別し、再度メス個体、オス個体でそれぞれプールしてから、対照区は 24 ペア、ばく露区は 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、繁殖用個体ばく露を継続した。

[亜成体（10 週齢）の曝露終了後の測定]

繁殖用に用いなかった 10 週齢の亜成体（Sub-adult）については、Test Day 86 および Test Day 87（64 日齢または 65 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 世代とほぼ同一であるが、生殖腺の固定はブアン液によって行った。

- 1) 全長・体長及び湿重量の測定
- 2) 二次性徴指標の計測
- 3) 肝臓の測定及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、観察・計測終了後に F2 試験に供した。このとき 10 µg/L および 100 µg/L 濃度区において必要な受精卵数（20 個×6 連=120 個）が得られなかったため、第 2 日（Test Day 121）においてもすべての試験区で F2 用の採卵を行った。各日から採取した卵をそれぞれプールし、10 個体ずつ各連に分配することで、合計 20 個体/連、対照区は 12 連、ばく露区は 6 連分、水槽に設置したふ化器に投入した。※それでも足りない場合は、各 20 粒から 15 粒に減らし、最終的には 15 粒で確保できるだけの連数とする。

[ばく露終了後の測定]

15 週間のばく露期間終了後（本試験では Test Day 122、100 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。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）と同一のものに加えて、5) 生殖腺の病理組織学的観察を行った。

- 1) 全長・体長及び湿重量の測定
- 2) 二次性徴指標の計測
- 3) 肝臓の測定及び肝臓中ビテロジェニン濃度の測定
- 4) 生殖腺の観察
- 5) 生殖腺の病理組織学的観察

各試験区の遺伝的オス 12 個体（対照区は 24 個体）中、8 個体（対照区は 3 個体）について、生殖腺の組織切片を作成し、精巣卵など異常の有無を観察した。切片の作成及び観察は、以下のように行った。

- ① ブアン液で固定した試料中の生殖腺を冠状方向で 10 枚程度に切断する。
- ② 切断した切片を H&E 染色した上で、スライドガラス上に伸展させ、封入剤及びカバーガラスにて永久標本化する。
- ③ 作成した標本を組織像の確認出来る倍率に顕微し、写真撮影する。
- ④ OECD ガイダンス文書<sup>5)</sup>に基づき、組織学的異常の評価と Grade 判定を行う。

### (3) F2 世代

#### [ばく露方法]

F1 世代より採取した受精卵は、水槽内に設置したふ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。ふ化用シリンダーは、F1 世代に用いたものと同じである。ふ化後の仔魚は、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]

ばく露期間中はふ化や死亡個体の有無及び行動・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、毎日ふ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。ふ化率は対照区のみふ化日の中央値の 2 倍の時点で算出し、それ以降は未ふ化で死亡とみなした。

## 1.3.5 結果の算出

### (1) 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、ふ化率・ふ化後生存率・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（ただし二次性徴は 1 の位までとする）とし、標準偏差の桁数は平均値の位に合わせた。

### (2) 統計処理

各データは、繁殖データや胚仔魚期のデータを除き、遺伝的性別ごとに平均値±標準偏差で示した。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<sup>6)</sup>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 USEPA が MEOGRT および幼若両生類発達・成長試験 (LAGDA) 用に開発した統計解析ソフトウェア StatCharrms v.090 (2017 年 4 月 18 日版、2017 年 6 月 20 日より Rcran サイトで公開) を用いた<sup>7)</sup>。検定は原則、片側検定で有意水準 5%とした。

病理組織学的観察データや繰り返しのない生存率（亜成体、成熟個体）を除いて、まず単調性の検定（Linear quadratic contrast: 線形二次項対比(仮訳)）を行い、単調性がある場合（二次項のみ有意のケース以外）は Jonckheere-Terpstra 検定を適用した。単調性がない（二次項のみ有意）場合は、正規性検定（Shapiro Wilks 検定）および等分散性検定（Levene 検定）を行い、等分散の場合は Dunnett 検定、非等分散の場合は Dunn 検定を適用した。

繁殖に関するエンドポイント（総産卵数、受精卵数、受精率）の場合は、上記の手法に加えて、ばく露時間による影響をみるため、週間毎データとして反復測定分散分析（時間と濃度の 2 要因）および Dunnett 検定を実施した。繰り返しのない生存率（亜成体、成熟個体）は Step-down Cochran-Armitage 検定を適用した。病理組織学的観察データは OECD ガイダンス文書<sup>5)</sup>に基づき、生殖腺形態（Phenotype 1：完全に精巣組織、2：精巣組織が

支配的、3：精巣組織と卵巣組織が半々、4：卵巣組織が支配的、5：完全に卵巣組織）と精巣卵数（Grade 0：なし、1：minimal、2：mild、3：moderate、4：severe）の Grade 判定を行い、Rao-Scott adjusted Cochran-Armitage test for trend By Slices (RSCABS)で各 Grade が有意な最小濃度を算出した。

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) 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	
生存率（繰り返しなし）	アークサイン変換	Step-down Cochran-Armitage 検定
ふ化率・ふ化後生存率・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) 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
ふ化日数	なし	
全長・湿重量	なし	
肝臓体指数・生殖腺体指数	なし	
ビテロジェニン	対数変換	
二次性徴	なし	
生殖腺形態・精巣卵	なし	Rao-Scott adjusted Cochran-Armitage test for trend By Slices (RSCABS)

### 1.3.6 試験有効性基準

以下の条件が満たされたとき、この試験は有効とする。

- ・ 溶存酸素が試験期間を通じて飽和酸素濃度の 60%以上であること。
- ・ 試験期間を通じた平均水温が 24℃から 26℃の間であること。各水槽の水温の平均値からのずれは 2℃未満であること。
- ・ 各世代（F0 および F1）の対照区における各ペアの日平均総産卵数の平均が 20 以上であること。計測期間中のすべての卵の受精率が 80%以上であること。推奨される 24 ペア中 16 ペア（>65%）において各ペア日平均総産卵数が 20 以上であること。
- ・ 各世代（F1 および F2）の対照区におけるふ化率が 80%以上であること
- ・ F1 の対照区において、受精後 3 週目までのふ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。

## 1.4 結果

### 1.4.1 試験環境

表 1-3 に水温、pH、溶存酸素の試験期間中を通じた平均値と標準偏差をまとめた。試験液の平均水温は 26.9～27.2℃の範囲であり、試験有効性基準の 24～26℃を約 1℃上回っていたが、各水槽の水温の平均値からの変動は 2℃未満であった。pH の最小値は 7.3、最大値は 8.7 で、各濃度区で平均値±0.5 程度変動していた。溶存酸素飽和度は全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( $\text{mg/L}$ )(飽和度%)
Control	27.1 $\pm$ 0.80	7.96 $\pm$ 0.38	7.92 (100%) $\pm$ 0.33
1	26.9 $\pm$ 0.94	7.97 $\pm$ 0.34	7.89 (99.0%) $\pm$ 0.30
3.2	26.9 $\pm$ 0.90	7.95 $\pm$ 0.33	7.89 (99.0%) $\pm$ 0.30
10	27.1 $\pm$ 0.91	7.93 $\pm$ 0.31	7.83 (98.8%) $\pm$ 0.33
32	26.9 $\pm$ 0.95	7.91 $\pm$ 0.31	7.85 (98.6%) $\pm$ 0.31
100	27.2 $\pm$ 0.75	7.82 $\pm$ 0.27	7.72 (97.5%) $\pm$ 0.21

### 1.4.2 試験液の被験物質濃度

試験期間中の各濃度につき計 20 回の測定結果を図 1-4、平均値を表 1-4 にまとめた。最低濃度区の 1  $\mu\text{g/L}$  濃度区は設定濃度の±20%を超えた時があったが、100 倍濃度のストックソリューション B の測定濃度が設定濃度 100  $\mu\text{g/L}$  の 98%であったことから、分析時の濃縮による影響と考えられる。他の濃度区は期間平均で設定濃度の 86.1～98.4%、変動係数は 11～18%、対照区は検出下限以下であった。各濃度区で 20 回中 1～4 回、測定平均値の±20%をやや逸脱していたが、変動係数はすべての濃度区で 20%未満であったことから、試験期間を通じて比較的維持されていたと考えられる。以降は実測濃度で記述する。

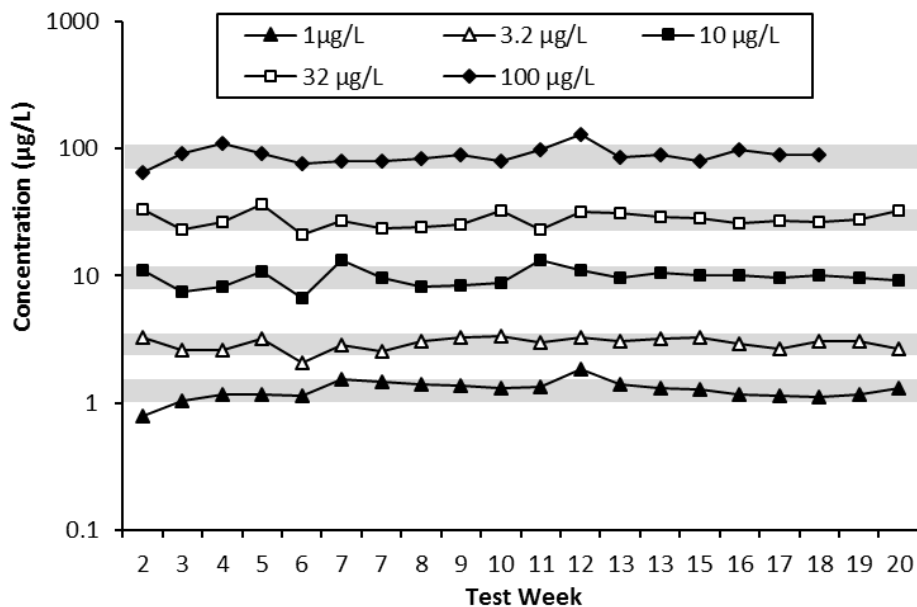


図 1-4 試験期間中の測定濃度の推移

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 ( $\mu\text{g/L}$ )	N	平均測定濃度 ( $\mu\text{g/L}$ )	設定濃度比 (%)	変動係数 (%)
Control	20	ND	-	-
1	20	1.27	127	17%
3.2	20	2.95	92.7	11%
10	20	9.81	98.4	18%
32	20	27.8	86.1	15%
100	20	89.4	89.4	15%
Stock B (100 $\mu\text{g/L}$ )	14	97.9	97.9	9%

### 1.4.3 F0 世代の結果

#### (1) F0 世代試験期間中の死亡及び行動・外観の異常

F0 世代試験期間中の死亡個体数を表 1-5 に示す。89.4  $\mu\text{g/L}$  濃度区においてメスが 1 個体死亡したが、外見に異常は無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 世代試験期間中の死亡個体数

実測濃度 ( $\mu\text{g/L}$ )	供試個体数		死亡個体数(死亡率)	
	オス	メス	オス	メス
Control	12	12	0 (0%)	0 (0%)
1.27	6	6	0 (0%)	0 (0%)
2.95	6	6	0 (0%)	0 (0%)
9.81	6	6	0 (0%)	0 (0%)
27.8	6	6	0 (0%)	0 (0%)
89.4	6	6	0 (0%)	1 (17%)

#### (2) F0 世代の総産卵数・受精卵数・受精率

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・受精卵数・受精率のすべてについて、いずれのばく露区においても対照区と比べ統計学的な有意差は確認されなかった (表 1-6、図 1-5)。日変動も変動係数は 8~12%であり試験区間で大きな傾向の差はみられなかった (図 1-6)。また、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 7983 個の卵の受精率は 98%であり、試験有効条件をすべて満たしていた。



表 1-6 F0 世代の総産卵数・受精卵数・受精率

実測濃度 ( $\mu\text{g/L}$ )	総産卵数 (eggs/day/female)			
	21 日間	1 週目 (Day 1-7)	2 週目 (Day 8-14)	3 週目 (Day 15-21)
Control	31.7 $\pm$ 2.2	29.1 $\pm$ 2.2	32.7 $\pm$ 3.0	33.2 $\pm$ 2.8
1.27	29.9 $\pm$ 3.2	29.8 $\pm$ 3.8	29.6 $\pm$ 3.6	30.3 $\pm$ 2.7
2.95	30.0 $\pm$ 3.0	28.4 $\pm$ 3.4	31.4 $\pm$ 3.3	30.4 $\pm$ 3.6
9.81	35.1 $\pm$ 4.2	31.9 $\pm$ 4.4	37.2 $\pm$ 4.2	36.2 $\pm$ 5.8
27.8	31.4 $\pm$ 4.2	28.7 $\pm$ 4.5	32.6 $\pm$ 5.0	32.8 $\pm$ 5.4
89.4	29.2 $\pm$ 4.8	26.8 $\pm$ 4.3	30.6 $\pm$ 4.5	31.8 $\pm$ 6.8

実測濃度 ( $\mu\text{g/L}$ )	受精卵数 (eggs/day/female)			
	21 日間	1 週目 (Day 1-7)	2 週目 (Day 8-14)	3 週目 (Day 15-21)
Control	31.2 $\pm$ 2.6	28.8 $\pm$ 2.5	31.9 $\pm$ 4.0	32.9 $\pm$ 2.9
1.27	29.0 $\pm$ 3.3	29.0 $\pm$ 4.2	27.9 $\pm$ 4.0	30.1 $\pm$ 2.7
2.95	29.2 $\pm$ 3.2	27.2 $\pm$ 2.8	30.7 $\pm$ 3.5	29.8 $\pm$ 4.1
9.81	33.4 $\pm$ 3.6	31.6 $\pm$ 4.3	35.5 $\pm$ 3.3	33.0 $\pm$ 5.4
27.8	30.4 $\pm$ 5.5	27.9 $\pm$ 5.6	31.0 $\pm$ 6.9	32.3 $\pm$ 5.9
89.4	28.4 $\pm$ 4.9	26.4 $\pm$ 4.5	29.4 $\pm$ 4.6	30.7 $\pm$ 6.3

実測濃度 ( $\mu\text{g/L}$ )	受精率 (%)			
	21 日間	1 週目 (Day 1-7)	2 週目 (Day 8-14)	3 週目 (Day 15-21)
Control	98.4 $\pm$ 2.0	98.6 $\pm$ 4.2	97.7 $\pm$ 0.9	98.9 $\pm$ 11.6
1.27	96.3 $\pm$ 3.8	96.6 $\pm$ 9.9	93.6 $\pm$ 1.8	98.9 $\pm$ 1.7
2.95	98.0 $\pm$ 2.5	96.1 $\pm$ 1.0	98.8 $\pm$ 0.8	98.9 $\pm$ 1.4
9.81	95.7 $\pm$ 6.6	85.1 $\pm$ 6.4	95.6 $\pm$ 8.6	92.6 $\pm$ 3.6
27.8	95.8 $\pm$ 6.6	82.8 $\pm$ 10.9	92.4 $\pm$ 3.6	98.3 $\pm$ 5.0
89.4	95.4 $\pm$ 6.0	83.7 $\pm$ 5.3	95.8 $\pm$ 3.0	96.9 $\pm$ 1.9

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、ばく露区は n=6、ただし 89.4  $\mu\text{g/L}$  はメス 1 個体事故死のため除外し n=5) を示す。

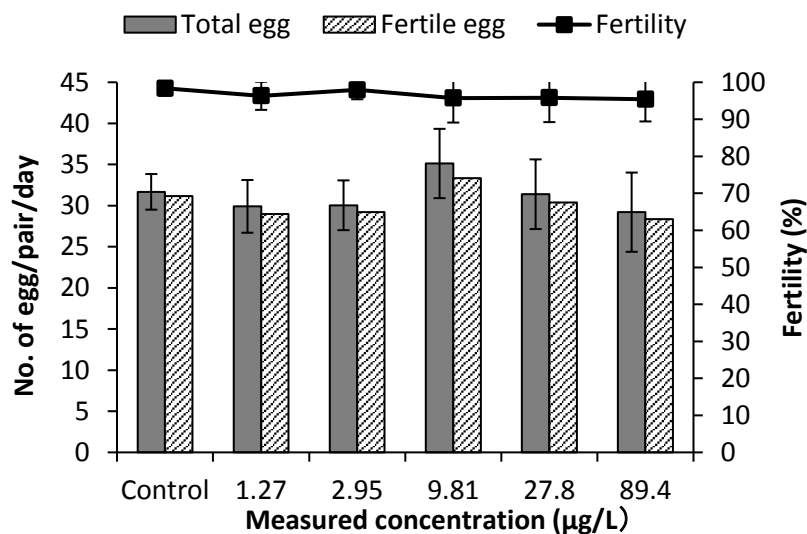
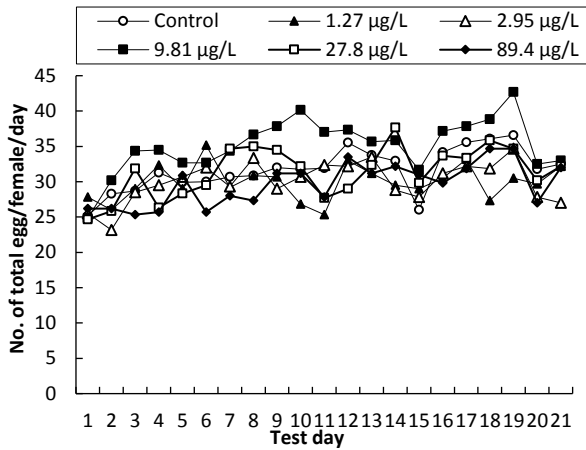


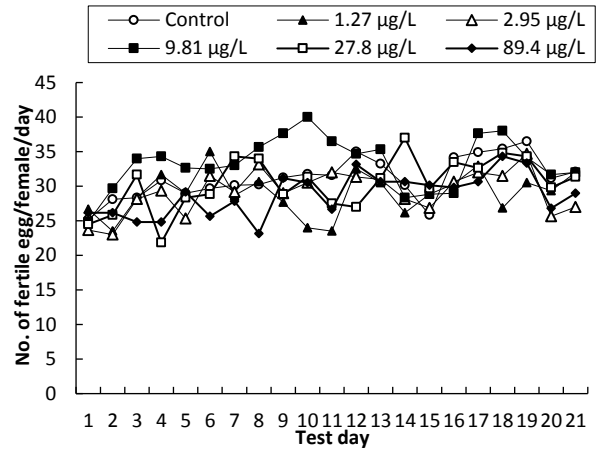
図 1-5 F0 世代の総産卵数、受精卵数および受精率 (各ペア・1 日あたり)

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、ばく露区は n=6、ただし 89.4  $\mu\text{g/L}$  はメス 1 個体事故死のため除外し n=5) を示す。

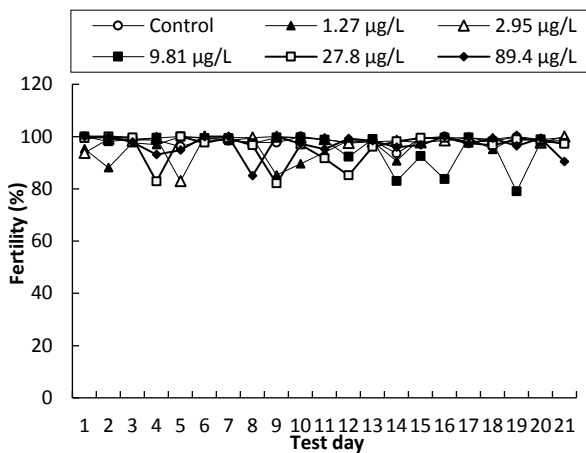
(a) 総産卵数



(b) 受精卵数



(c) 受精率



(d) 累積受精卵数

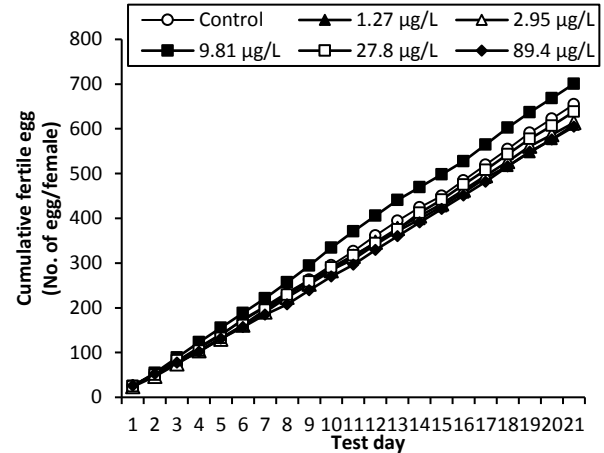


図 1-6 F0 世代の(a) 総産卵数 (b) 受精卵数 (c) 受精率の日変動および (d) 累積受精卵数  
(値は各試験区の連平均値)

(3) F0 世代の全長・湿重量

F0 世代の全長及び湿重量の測定結果を表 1-7 および図 1-7(a)(b) に示す。オス・メス共に、いずれのばく露区においても対照区と比べ統計学的な有意差は確認されなかった。

表 1-7 F0 世代の全長および湿重量

実測濃度 (µg/L)	全長 (mm)		湿重量 (mg)	
	オス	メス	オス	メス
Control	31.7 ± 0.7	32.3 ± 0.8	311 ± 24	382 ± 31
1.27	31.7 ± 1.0	31.4 ± 1.8	316 ± 26	346 ± 57
2.95	32.3 ± 1.5	31.0 ± 1.0	342 ± 44	343 ± 23
9.81	31.3 ± 0.6	32.6 ± 1.4	288 ± 17	417 ± 46
27.8	32.8 ± 1.4	31.2 ± 0.6	342 ± 35	363 ± 16
89.4	32.3 ± 1.0	31.8 ± 0.8	344 ± 43	366 ± 37

注) 値は連平均値を元に算出した平均値±標準偏差 (対照区は n=12、ばく露区は n=6 (89.4 µg/L のメスは n=5) を示す。

## (4) F0 世代の肝臓体指数および生殖腺体指数

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。肝臓体指数は、オスは 9.81  $\mu\text{g/L}$  濃度区以上、メスは 2.95  $\mu\text{g/L}$  濃度区以上で対照区に比べて有意に増加した (LOEC=9.81  $\mu\text{g/L}$ (オス)、2.95  $\mu\text{g/L}$ (メス))。生殖腺体指数はいずれのばく露区においても対照区と比べ統計学的な有意差は確認されなかった。

表 1-8 F0 世代の肝臓体指数および生殖腺体指数

実測濃度 ( $\mu\text{g/L}$ )	肝臓体指数 (%)		生殖腺体指数 (%)	
	オス	メス	オス	メス
Control	1.7 $\pm$ 0.4	4.8 $\pm$ 1.4	1.5 $\pm$ 1.7	9.2 $\pm$ 1.0
1.27	1.7 $\pm$ 0.5	5.6 $\pm$ 0.7	1.3 $\pm$ 0.3	9.0 $\pm$ 0.7
2.95	1.9 $\pm$ 0.2	6.0 $\pm$ 1.0 *	1.3 $\pm$ 0.2	9.4 $\pm$ 0.7
9.81	1.9 $\pm$ 0.3 *	6.5 $\pm$ 1.5 *	1.3 $\pm$ 0.2	9.6 $\pm$ 1.4
27.8	2.3 $\pm$ 0.3 *	6.3 $\pm$ 0.9 *	1.1 $\pm$ 0.2	9.9 $\pm$ 0.7
89.4	2.4 $\pm$ 0.2 *	6.1 $\pm$ 0.2 *	1.2 $\pm$ 0.2	9.2 $\pm$ 1.2

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、ばく露区は n=6 (89.4  $\mu\text{g/L}$  のメスは n=5)) を示す。\*は対照区に比べて統計学的な有意差があることを示す ( $p<0.05$ 、Jonckheere-Terpstra 検定)。

## (5) F0 世代の肝臓中ビテロジェニン濃度

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。オスでは、Jonckheere-Terpstra 検定によると 2.95  $\mu\text{g/L}$  濃度区以上で対照区に比べ有意な上昇がみられた。1 濃度区下の 1.27  $\mu\text{g/L}$  濃度区では、ビテロジェニン濃度が 2.95  $\mu\text{g/L}$  濃度区よりやや高かったが、有意差は示されなかった。なお、単調性を仮定しない Dunn 検定では LOEC は 9.81  $\mu\text{g/L}$  となった。一方、メスではいずれのばく露区においても、対照区と比べ統計学的な有意差は確認されなかった。

表 1-9 F0 世代の肝臓中ビテロジェニン濃度

実測濃度 ( $\mu\text{g/L}$ )	肝臓中ビテロジェニン濃度 (ng/mg liver)	
	オス	メス
Control	4.41 $\pm$ 7.86	270 $\pm$ 128
1.27	23.3 $\pm$ 24.9	220 $\pm$ 37
2.95	19.4 $\pm$ 22.2 <sup>a</sup>	187 $\pm$ 34
9.81	384 $\pm$ 473 *	255 $\pm$ 110
27.8	565 $\pm$ 417 *	203 $\pm$ 52
89.4	1840 $\pm$ 530 *	227 $\pm$ 56

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、ばく露区は n=6 (89.4  $\mu\text{g/L}$  のメスは n=5)) を示す。\*は対照区に比べて統計学的な有意差があることを示す ( $p<0.05$ 、Jonckheere-Terpstra 検定)。a: Dunn 検定によると有意差なし。

## (6) F0 世代の二次性徴指標

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。オスでは、いずれのばく露区においても対照区と比べ統計学的な有意差は確認されなかった。また、メスではすべてのばく露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 世代における乳頭状小突起を有する節板数（オス 1 個体あたり）

実測濃度 ( $\mu\text{g/L}$ )	乳頭状小突起を有する節板数(plates/fish)	
	オス	メス
Control	101 $\pm$ 17	0 $\pm$ 0
1.27	97 $\pm$ 6	0 $\pm$ 0
2.95	112 $\pm$ 13	0 $\pm$ 0
9.81	99 $\pm$ 15	0 $\pm$ 0
27.8	113 $\pm$ 7	0 $\pm$ 0
89.4	97 $\pm$ 11	0 $\pm$ 0

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、ばく露区は n=6（89.4  $\mu\text{g/L}$  のメスは n=5））を示す。

## (7) F0 世代の間性又は性転換

F0 世代における表現型性別・生殖腺形態は明確かつ一致しており、間性や性転換は認められなかった。

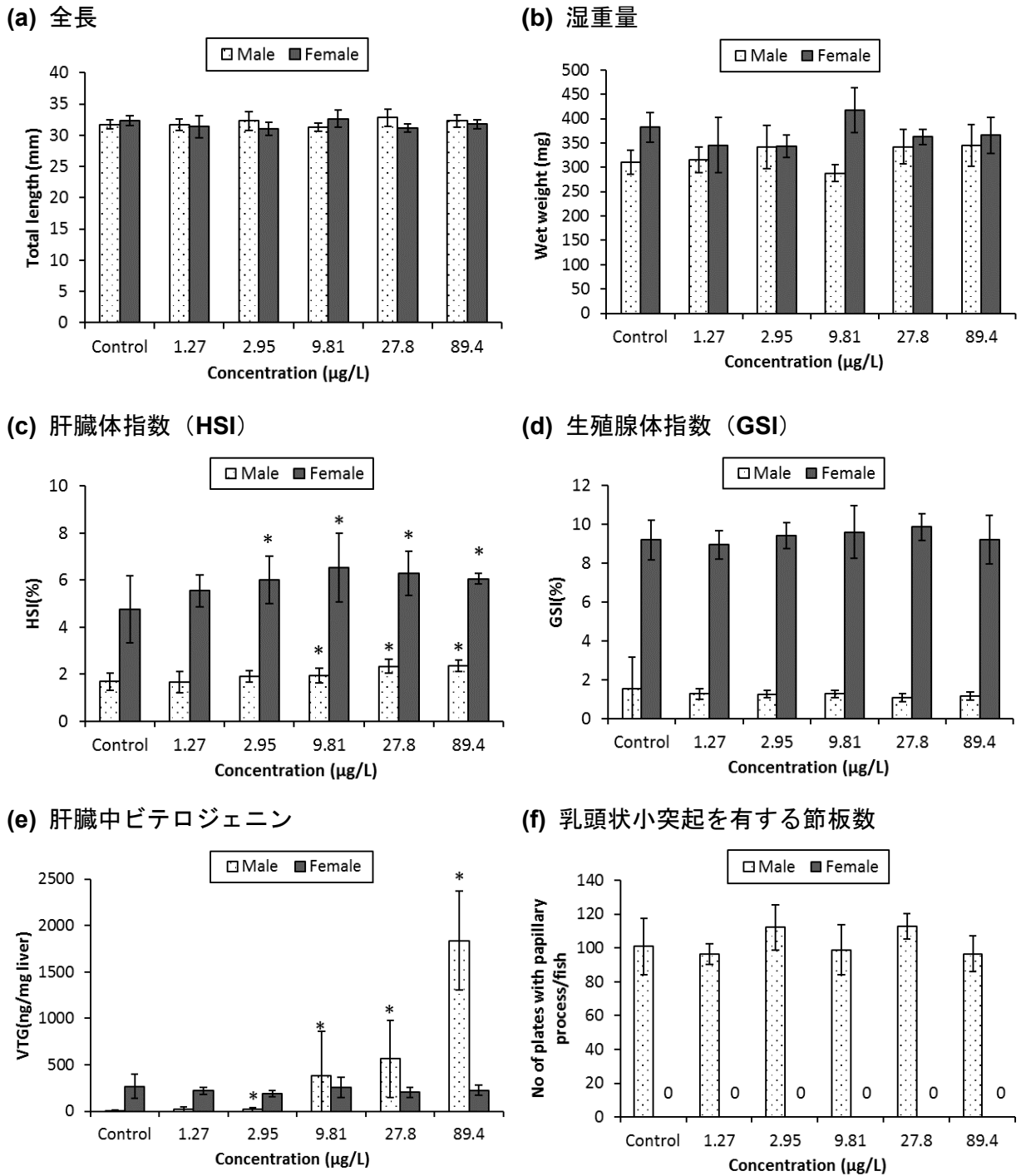


図 1-7 F0 世代の (a) 全長 (b) 湿重量 (c) 肝臓体指数 (d) 生殖腺体指数 (e) 肝臓中ビテロジェニン (f) 乳頭状小突起を有する節板数

注) 値は連平均値を元に算出した平均値±標準偏差 (対照区は n=12、ばく露区は n=6 (89.4 μg/L のメスは n=5)) を示す。\*は対照区に比べて統計学的な有意差があることを示す ( $p < 0.05$ , Jonckheere-Terpstra 検定)

1.4.4 F1 世代胚～稚魚期の結果

(1) F1 世代胚・仔魚期のふ化率・ふ化日数・ふ化後生存率・生存率

F1 世代胚・仔魚期の受精後 14 日目のふ化率・ふ化日数・ふ化後生存率および生存率、受精後 21 日目の生存率を表 1-11 に、受精後 6 日目～12 日目におけるふ化個体数を図 1-8 に示す。対照区におけるふ化日の中央値が受精後 7 日目（240 個中 193 個体がふ化）であったことから（図 1-8）、その 2 倍である 14 日目において各エンドポイントを計算した。89.4  $\mu\text{g/L}$  濃度区においてふ化率および生存率が 77%および 78%に低下していた。Jonckheere-Terpstra 検定では対照区に対し有意差が示されなかったが Dunnett 検定による有意差が示された。ふ化率、生存率の低下の程度と統計結果を総合的に判断して、LOEC は 89.4  $\mu\text{g/L}$  とする。また、対照区でのふ化率は 80%以上であり、試験有効性条件を満たしていた。

受精後 21 日目の 89.4  $\mu\text{g/L}$  濃度区における生存率は 89%と 80%以上であったが、対照区に対して有意な減少が示された。また、対照区において受精後 3 週目までのふ化後の生存率が平均 80%以上という試験有効条件は満たされていた。

表 1-11 F1 世代胚・仔魚期のふ化率・ふ化日数・ふ化後生存率（受精後 14 日目）  
・生存率（受精後 14 日目、21 日目）

実測濃度 ( $\mu\text{g/L}$ )	ふ化率 (14 日目) (%)	ふ化日数 (14 日目) (day)	ふ化後生存率 (14 日目) (%)	生存率 (14 日目) (%)	生存率 (21 日目) (%)
Control	94 $\pm$ 12	7.0 $\pm$ 0.3	96 $\pm$ 10	91 $\pm$ 18	99 $\pm$ 2
1.27	98 $\pm$ 3	7.2 $\pm$ 0.2	100 $\pm$ 0	98 $\pm$ 3	100 $\pm$ 0
2.95	96 $\pm$ 4	7.2 $\pm$ 0.2	100 $\pm$ 0	96 $\pm$ 4	99 $\pm$ 3
9.81	99 $\pm$ 2	7.3 $\pm$ 0.2	100 $\pm$ 0	99 $\pm$ 2	100 $\pm$ 0
27.8	99 $\pm$ 2	7.1 $\pm$ 0.1	100 $\pm$ 0	99 $\pm$ 2	100 $\pm$ 0
89.4	77 $\pm$ 7 <sup>*a</sup>	7.3 $\pm$ 0.1	99 $\pm$ 3	78 $\pm$ 5 <sup>*a</sup>	89 $\pm$ 10 <sup>*</sup>

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、ばく露区は n=6）を示す。\*は対照区に比べて統計学的な有意差があることを示す（\* $p < 0.05$ , Jonckheere-Terpstra 検定, ただし a は Dunnett 検定）

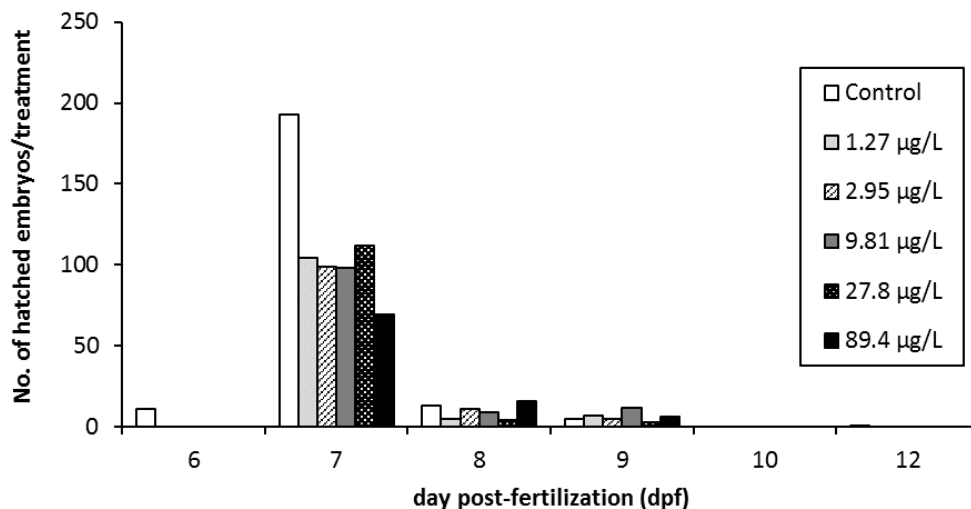


図 1-8 F1 の受精後 6～12 日目におけるふ化個体数（各試験区の合計）

## 1.4.5 F1 世代亜成体の結果

## (1) F1 世代亜成体の生存率

F1 世代の受精後 9 週目 (59 日目、DMY 判定中)、10 週目 (65 日目、亜成体解剖) における生存率を表 1-12 に示した。受精後 9 週目 (56 日目) にはペアリングを行うため、尾びれの一部を切除し DMY 判定に供した。対照区、1.27、2.95、9.81  $\mu\text{g/L}$  濃度区では 12 個体中 6 個体/連、27.8  $\mu\text{g/L}$  濃度区では 8 個体/連、89.4  $\mu\text{g/L}$  濃度区では、ほぼすべてメスの表現型を示していたため、全個体を DMY 判定に供した。DMY 判定中の個体はステンレスメッシュ付ガラス円筒を用いて、同一水槽内で区分けして維持していたところ、3 日後の受精後 59 日目に溶存酸素の著しい低下が起こった。原因は残餌がメッシュをふさいだためと考えられたため直ちに対処し回復させた。溶存酸素の低下は短期間であった事、その後の生存率に異常が認められていない事などから、結果に影響を及ぼす程度ではなかったと判断される。流水式装置および水槽数に限りがあるため、ガラス円筒から取り出した後にすべての連について DMY 判定前後の個体を同時に識別して保持することができなかつたため、表現型の性別ごとに 3 連ずつプールして維持した (6-9 匹 $\times$ 2 水槽 $\times$ 性別 $\times$ DMY 判定あり・なし)。そのため、10 週齢目の解剖時には各個体について連の由来が不明になってしまったため、F1 亜成体のエンドポイントの値は各濃度区的全個体の平均値で示す。

解剖時 (10 週、65 日目) における 89.4  $\mu\text{g/L}$  濃度区の生存率は、対照区と比べて有意な低下がみられた。

表 1-12 F1 世代亜成体 (受精後 9、10 週目) の生存率

実測濃度 ( $\mu\text{g/L}$ )	生存率(9 週目) (%)	生存率(10 週目) (%)
Control	96 $\pm$ 6	95
1.27	96 $\pm$ 7	96
2.95	99 $\pm$ 3	97
9.81	93 $\pm$ 6	85
27.8	97 $\pm$ 7	96
89.4	82 $\pm$ 17	76 *

注) 9 週目は各連の値を元に算出した平均値 $\pm$ 標準偏差 (対照区は n=12、ばく露区は n=6)。\*は対照区に比べて統計学的な有意差があることを示す (\* $p$ <0.05, 9 週目: Jonckheere-Terpstra 検定, 10 週目: Step-down Cochran-Armitage 検定)

## (2) F1 世代亜成体の全長・湿重量

10 週齢（64・65 日齢）の亜成体の全長及び湿重量の測定結果を表 1-13 および図 1-9 (a)(b)に示した。全長・湿重量ともに濃度依存的に減少傾向がみられ、オスの全長はすべての濃度区で、メスの全長は 2.95  $\mu\text{g/L}$  濃度区以上で対照区と比べて有意差が示されたが、その差はオス 1.2~3.1 mm、メス 1.2~3.8 mm とわずかであった。湿重量に対してはオス・メスともに LOEC は 1.27  $\mu\text{g/L}$  であり、対照区との最小差はそれぞれ 24 mg および 28 mg であった。

表 1-13 F1 世代亜成体の全長・湿重量

実測濃度 ( $\mu\text{g/L}$ )	全長 (mm)		湿重量 (mg)	
	オス	メス	オス	メス
Control	25.7 $\pm$ 1.3	26.8 $\pm$ 1.7	193 $\pm$ 35	241 $\pm$ 45
1.27	24.5 $\pm$ 1.3 *	26.2 $\pm$ 1.8	162 $\pm$ 29 *	213 $\pm$ 42 *
2.95	24.8 $\pm$ 1.5 *	25.6 $\pm$ 1.7 *	156 $\pm$ 32 *	198 $\pm$ 45 *
9.81	24.9 $\pm$ 2.0 *	24.3 $\pm$ 4.2 *	159 $\pm$ 35 *	172 $\pm$ 73 *
27.8	24.5 $\pm$ 1.4 *	25.0 $\pm$ 1.7 *	169 $\pm$ 39 *	190 $\pm$ 49 *
89.4	22.6 $\pm$ 2.6 *	23.0 $\pm$ 2.1 *	137 $\pm$ 49 *	139 $\pm$ 42 *

注) 各個体を元に算出した平均値 $\pm$ 標準偏差（対照区~ばく露濃度区の個体数はオス：n=46, 20, 17, 17, 20, 22、メス：n=43, 26, 29, 20, 25, 9）を示す。\*は対照区に比べて統計学的な有意差があることを示す（\* $p$ <0.05, Jonckheere-Terpstra 検定）

## (3) F1 世代亜成体の肝臓体指数・生殖腺体指数

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。オスの肝臓体指数は 2.95  $\mu\text{g/L}$  濃度区以上で対照区と比べて有意差に増加したが、生殖腺体指数は有意差が示されなかった。メスでは肝臓体指数は 89.4  $\mu\text{g/L}$ 、生殖腺体指数は 9.81  $\mu\text{g/L}$  濃度区以上で、対照区に比べて有意な低下が確認された。

表 1-14 F1 世代亜成体の肝臓体指数・生殖腺体指数

実測濃度 ( $\mu\text{g/L}$ )	肝臓体指数 (HSI) (%)		生殖腺体指数 (GSI) (%)	
	オス	メス	オス	メス
Control	2.1 $\pm$ 0.7	4.5 $\pm$ 1.2	0.8 $\pm$ 0.4	7.8 $\pm$ 1.6
1.27	2.2 $\pm$ 0.4	4.1 $\pm$ 1.3	0.8 $\pm$ 0.3	7.1 $\pm$ 2.3
2.95	2.7 $\pm$ 1.1 *	4.1 $\pm$ 1.0	0.9 $\pm$ 0.4	7.7 $\pm$ 2.8
9.81	2.8 $\pm$ 0.7 *	4.1 $\pm$ 1.5	0.8 $\pm$ 0.5	5.3 $\pm$ 3.1 *
27.8	2.7 $\pm$ 0.9 *	4.1 $\pm$ 0.7	0.9 $\pm$ 1.0	6.3 $\pm$ 2.2 *
89.4	3.1 $\pm$ 0.8 *	3.3 $\pm$ 0.8 *	1.0 $\pm$ 1.2	1.7 $\pm$ 1.7 *

注) 各個体を元に算出した平均値 $\pm$ 標準偏差（対照区~ばく露濃度区の個体数はオス：n=46, 20, 17, 17, 20, 22、メス：n=43, 26, 29, 20, 25, 9）を示す。\*は対照区に比べて統計学的な有意差があることを示す（\* $p$ <0.05, Jonckheere-Terpstra 検定）。



## (4) F1 世代垂成体の肝臓中ビテロジェニン濃度

ELISA による F1 世代垂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。オスでは 9.81  $\mu\text{g/L}$  濃度区以上、メスでは 27.8  $\mu\text{g/L}$  濃度区以上で、対照区に比べて有意な増加が確認された。

表 1-15 F1 世代垂成体の肝臓中ビテロジェニン濃度

実測濃度 ( $\mu\text{g/L}$ )	ビテロジェニン濃度 (ng/mg liver)	
	オス	メス
Control	22.6 $\pm$ 55.8	664 $\pm$ 428
1.27	11.4 $\pm$ 31.9	544 $\pm$ 350
2.95	20.3 $\pm$ 74.9	676 $\pm$ 384
9.81	100 $\pm$ 210 *	575 $\pm$ 310
27.8	72.3 $\pm$ 155.9 *	888 $\pm$ 378 *
89.4	1040 $\pm$ 1200 *	1550 $\pm$ 1120 *

注) 各個体を元に算出した平均値 $\pm$ 標準偏差 (対照区 $\sim$ ばく露濃度区の個体数はオス: n=46, 20, 17, 17, 20, 22、メス: n=43, 26, 29, 20, 25, 9) を示す。\*は対照区に比べて統計学的な有意差があることを示す (\* $p$ <0.05, Jonckheere-Terpstra 検定)

## (5) F1 世代垂成体の二次性徴指標

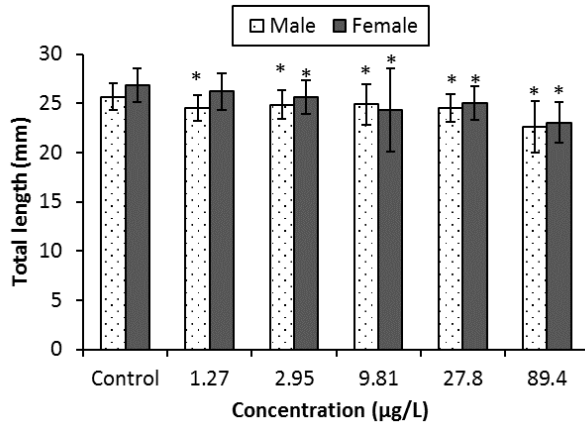
二次性徴の指標として、乳頭状小突起を有する節板数の計測結果を表 1-16 および図 1-9 (f)に示す。オスでは、2.95  $\mu\text{g/L}$  濃度区以上で対照区に比べ有意な減少が確認された。メスではいずれの試験区においても、乳頭状小突起を有する個体は確認されなかった。

表 1-16 F1 世代受精 10 週後解剖個体における乳頭状小突起を有する節板数

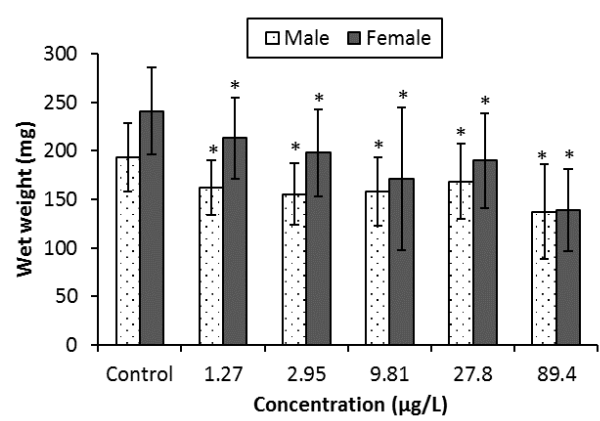
実測濃度 ( $\mu\text{g/L}$ )	乳頭状小突起を有する節板数 (plates/fish)	
	オス	メス
Control	78 $\pm$ 15	0 $\pm$ 0
1.27	72 $\pm$ 13	0 $\pm$ 0
2.95	69 $\pm$ 13 *	0 $\pm$ 0
9.81	60 $\pm$ 17 *	0 $\pm$ 0
27.8	27 $\pm$ 24 *	0 $\pm$ 0
89.4	0 $\pm$ 0 *	0 $\pm$ 0

注) 各個体を元に算出した平均値 $\pm$ 標準偏差 (対照区 $\sim$ ばく露濃度区の個体数はオス: n=46, 20, 17, 17, 20, 22、メス: n=43, 26, 29, 20, 25, 9) を示す。\*は対照区に比べて統計学的な有意差があることを示す (\* $p$ <0.05, Jonckheere-Terpstra 検定)

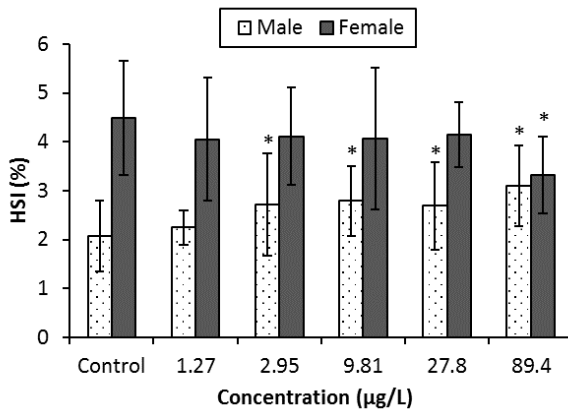
(a) 全長



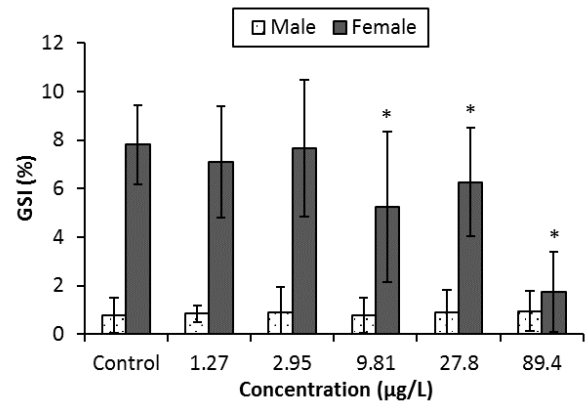
(b) 湿重量



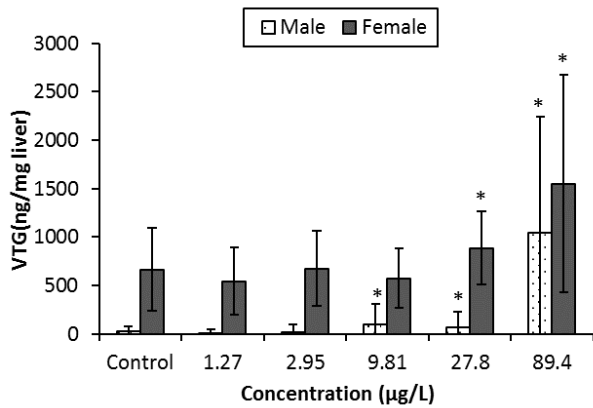
(c) 肝臓体指数 (HSI)



(d) 生殖腺体指数 (GSI)



(e) 肝臓中ビテロジェニン



(f) 乳頭状小突起を有する節板数

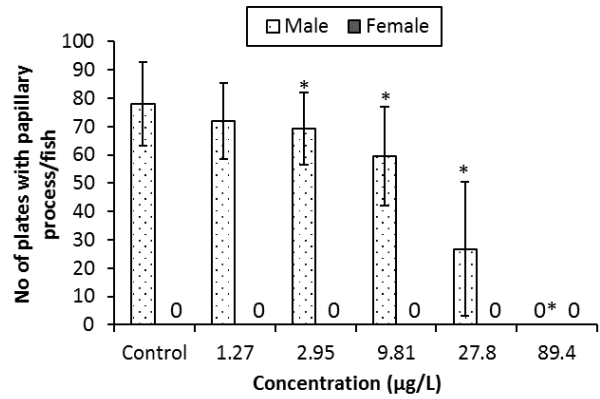


図 1-9 F1 世代亜成体の (a) 全長 (b) 湿重量 (c) 肝臓体指数 (d) 生殖腺体指数 (e) 肝臓中ビテロジェニン (f) 乳頭状小突起を有する節板数

注) 値は連平均値を元に算出した平均値±標準偏差 (対照区~ばく露濃度区の個体数はオス : n=46, 20, 17, 17, 20, 22、メス : n=43, 26, 29, 20, 25, 9) \*は対照区に比べて統計学的な有意差があることを示す (\* $p < 0.05$ , Jonckheere-Terpstra 検定)

(6) F1 世代亜成体の間性又は性転換

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。遺伝的オス個体では、27.8 µg/L 濃度区で 20 個体中 7 個体、89.4 µg/L 濃度区で 22 個体中 7 個体においてメスの表現型 (尻ビレが小さい、背ビレの切込みなし) を示し、生殖腺形態では 27.8 µg/L 濃度区で 20 個体中 1 個体、89.4 µg/L 濃度区で 22 個体中 9 個体 (表現型メス 7 個体 + 表現型不明の 2 個体) において卵巣が確認された。未成熟の判定不明個体を除いても、3 つの性判別結果は一致しておらず、すなわち 27.8 µg/L および 89.4 µg/L 濃度区で間性や性転換が認められた。

遺伝的メス個体では 2.95 µg/L 濃度区において 29 個体中 1 個体でオスの表現型を示したが、生殖腺は卵巣が確認された。89.4 µg/L 濃度区において 22 個体中 1 個体でメスの表現型を示したが、精巣が確認された。

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

実測濃度 (µg/L)	N	表現型			生殖腺形態		
		♂	不明	♀	精巣	不明	卵巣
Control	46	31	15	0	46	0	0
1.27	20	20	0	0	20	0	0
2.95	17	17	0	0	17	0	0
9.81	17	17	0	0	17	0	0
27.8	20	8	5	7	17	2	1
89.4	22	0	15	7	7	6	9

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

実測濃度 (µg/L)	N	表現型			生殖腺形態		
		♂	不明	♀	精巣	不明	卵巣
Control	43	0	12	31	0	0	43
1.27	26	0	0	26	0	0	26
2.95	29	1	1	27	0	1	28
9.81	20	0	2	18	0	2	18
27.8	25	0	17	8	0	0	25
89.4	9	0	6	3	1	3	5

## 1.4.6 F1 世代成熟個体の結果

## (1) F1 世代ペアリング後の死亡及び行動・外観の異常

F1 世代ペアリング後の死亡個体数を表 1-19 に示す。9.81 µg/L 濃度区以上でメス個体の死亡、89.4 µg/L 濃度区でオス個体の死亡がみられ、Step-down Cochran-Armitage 検定により、対照区に対し有意差が示された。また、89.4 µg/L 濃度区ではペア 2 個体とも表現型はメスであり、交尾行動が示されなかった。

F1 の対照区において受精後 3 週目以降の生存率は、9 週目 96%、10 週目 95% (表 1-12)、15 週目 98% (表 1-19) であり、平均 90%以上という試験有効条件は満たされていた。

表 1-19 F1 世代ペアリング後の死亡個体数

実測濃度 (µg/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	24	0	0%	24	1	4%	2%
1.27	12	1	8%	12	0	0%	4%
2.95	12	0	0%	12	0	0%	0%
9.81	12	0	0%	12	4	33% *	17% *
27.8	12	0	0%	12	3	25% *	13% *
89.4	12	4	33% *	12	3	25% *	29% *

注) \*は対照区に比べて統計学的な有意差があることを示す (\* $p$ <0.05, Step-down Cochran-Armitage Test)

## (2) F1 世代の総産卵数・受精卵数・受精率

F1 世代受精後 12 週目～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。死亡による繁殖への影響を除外するため、日平均産卵数の算出においては、計数前にメス個体が死亡した連は除外し、メス個体が途中で死亡した場合、それまでの期間の日平均を算出した。89.4 µg/L 濃度区では表現型はすべてメスで、遺伝的メス個体が死亡後も遺伝的オス個体が産卵行動を示していたため、12 連すべて計算に含めた。

総産卵数・受精卵数・受精率は単調減少が示され、Jonckheere-Terpstra 検定によると総産卵数・受精卵数の LOEC は 1.27 µg/L、受精率の LOEC は 27.8 µg/L であった。89.4 µg/L 濃度区ではすべての連で合計 1,312 個の産卵が確認されたが、このうち受精卵は 2 個体のみであった。

図 1-11 の日変動グラフより総産卵数が試験後半にかけて減少していく傾向がみられた。ばく露時間による影響を考慮するため、週間毎のデータとして 2 要因反復測定分散分析および Dunnett 検定を実施したところ、総産卵数・受精卵数・受精率の LOEC はそれぞれ 9.81 µg/L、2.95 µg/L、9.81 µg/L となった (図 1-10)。受精卵数および受精率は、ばく露時間 (週間) による有意な影響が示された。そこで各週のデータに Jonckheere-Terpstra 検定を行ったところ、1 週目と 2 週目は 21 日間平均と同じ LOEC が示されたが、3 週目は総産卵数および受精卵数の LOEC は 9.81 µg/L、受精率は 89.4 µg/L であった (表 1-20)。

また、対照区の産卵数の平均値および各 24 ペアの産卵数はすべて 20 個/ペア/日以上、21 日間で算出された計 13,877 個の卵の受精率は 97%であり、試験有効条件をすべて満たしていた。

表 1-20 F1 世代の総産卵数・受精卵数・受精率

実測濃度 ( $\mu\text{g/L}$ )	総産卵数 (eggs/day/female)			
	21 日間	1 週目 (Day 1-7)	2 週目 (Day 8-14)	3 週目 (Day 15-21)
Control	28.4 $\pm$ 4.9	29.6 $\pm$ 4.5	29.5 $\pm$ 7.2	26.1 $\pm$ 7.2
1.27	24.9 $\pm$ 3.7 *	26.3 $\pm$ 4.3 *	23.7 $\pm$ 4.2 *	25.0 $\pm$ 4.2
2.95	25.3 $\pm$ 4.7 *	27.0 $\pm$ 4.5 *	25.0 $\pm$ 5.5 *	23.8 $\pm$ 5.5
9.81	18.0 $\pm$ 6.0 * <sup>a</sup>	19.2 $\pm$ 5.1 *	18.7 $\pm$ 8.2 *	15.6 $\pm$ 8.2 *
27.8	18.4 $\pm$ 5.9 * <sup>a</sup>	21.8 $\pm$ 4.2 *	16.2 $\pm$ 8.4 *	17.3 $\pm$ 8.4 *
89.4	5.2 $\pm$ 2.9 * <sup>a</sup>	3.0 $\pm$ 2.8 *	4.9 $\pm$ 5.3 *	7.8 $\pm$ 5.3 *

実測濃度 ( $\mu\text{g/L}$ )	受精卵数 (eggs/day/female)			
	21 日間	1 週目 (Day 1-7)	2 週目 (Day 8-14)	3 週目 (Day 15-21)
Control	27.5 $\pm$ 4.9	28.7 $\pm$ 4.5	28.5 $\pm$ 5.8	25.2 $\pm$ 7.3
1.27	24.0 $\pm$ 3.8 *	25.3 $\pm$ 4.4 *	22.6 $\pm$ 4.7 *	24.0 $\pm$ 3.8
2.95	22.6 $\pm$ 6.7 * <sup>a</sup>	24.7 $\pm$ 6.8 *	22.4 $\pm$ 7.6 *	20.9 $\pm$ 8.0
9.81	17.2 $\pm$ 6.0 * <sup>a</sup>	18.5 $\pm$ 5.4 *	18.2 $\pm$ 8.9 *	14.4 $\pm$ 8.9 *
27.8	15.7 $\pm$ 6.6 * <sup>a</sup>	20.0 $\pm$ 5.6 *	12.8 $\pm$ 8.2 *	14.5 $\pm$ 8.6 *
89.4	0.0 $\pm$ 0.0 * <sup>a</sup>	0.0 $\pm$ 0.1 *	0.0 $\pm$ 0.0 *	0.0 $\pm$ 0.0 *

実測濃度 ( $\mu\text{g/L}$ )	受精率 (%)			
	21 日間	1 週目 (Day 1-7)	2 週目 (Day 8-14)	3 週目 (Day 15-21)
Control	95.4 $\pm$ 5.4	97.2 $\pm$ 3.1	96.6 $\pm$ 4.9	92.4 $\pm$ 13.2
1.27	94.1 $\pm$ 5.9	95.0 $\pm$ 6.2	91.9 $\pm$ 11.1	96.5 $\pm$ 5.3
2.95	89.5 $\pm$ 20.6	92.0 $\pm$ 19.6	89.7 $\pm$ 23.5	87.0 $\pm$ 24.8
9.81	83.5 $\pm$ 18.1 <sup>a</sup>	94.6 $\pm$ 5.7	81.6 $\pm$ 31.3	70.4 $\pm$ 39.0
27.8	73.6 $\pm$ 23.1 * <sup>a</sup>	89.4 $\pm$ 12.2 *	61.8 $\pm$ 35.2 *	69.5 $\pm$ 29.3
89.4	0.0 $\pm$ 0.1 * <sup>a</sup>	0.1 $\pm$ 0.4 *	0.0 $\pm$ 0.0 *	0.0 $\pm$ 0.0 *

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 $\sim$ ばく露濃度区の連数は、計測前にメス個体が死亡した連を除いて、n=23, 12, 12, 9, 10, 12) を示す。\*は対照区に比べて統計学的な有意差があることを示す (\* $p$ <0.05, Jonckheere-Terpstra 検定)

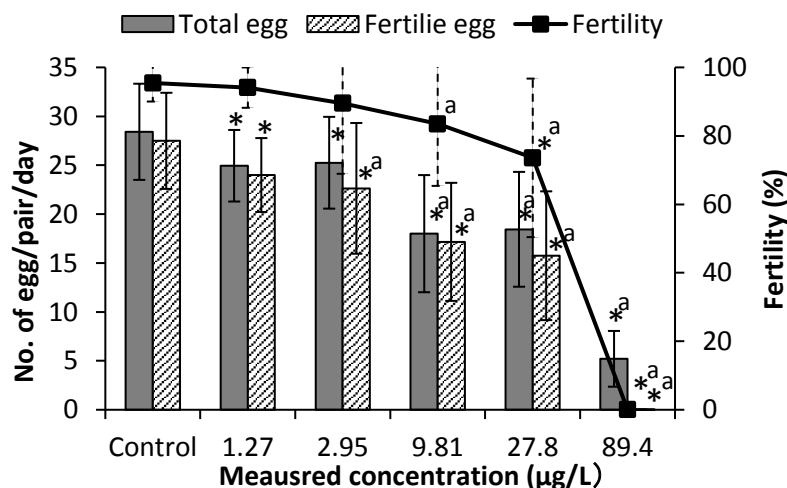
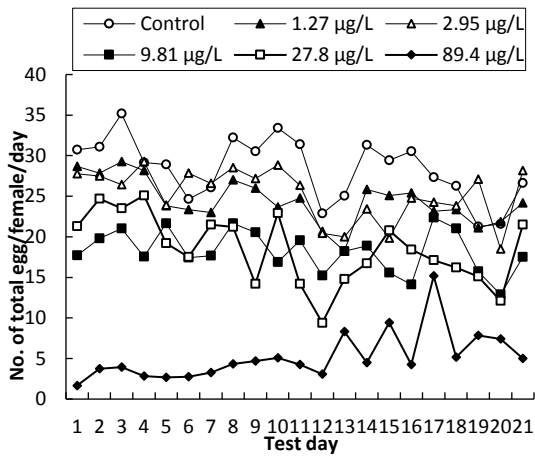


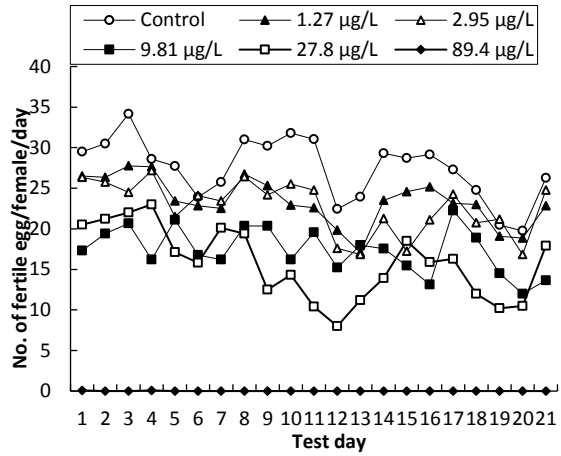
図 1-10 F1 世代の総産卵数・受精卵数・受精率 (各ペア・1 日あたり)

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 $\sim$ ばく露濃度区の連数は、計測前にメス個体が死亡した連を除いて、n=23, 12, 12, 9, 10, 12) を示す。\*は対照区に比べて Jonckheere-Terpstra 検定により統計学的な有意差があることを示す ( $p$ <0.05)。a は反復測定分散分析+Dunnett 検定により統計学的な有意差があることを示す ( $p$ <0.05)。

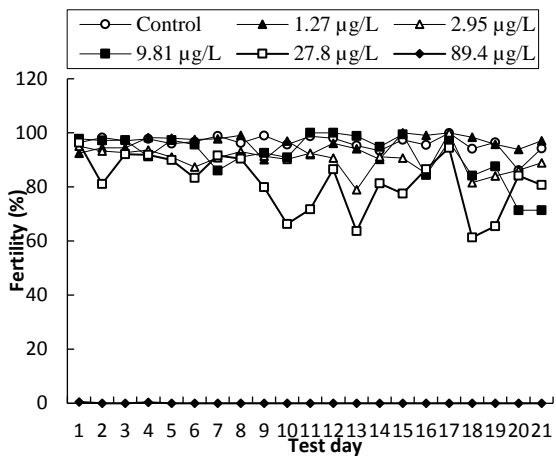
(a) 総産卵数



(b) 受精卵数



(c) 受精率



(d) 累積受精卵数

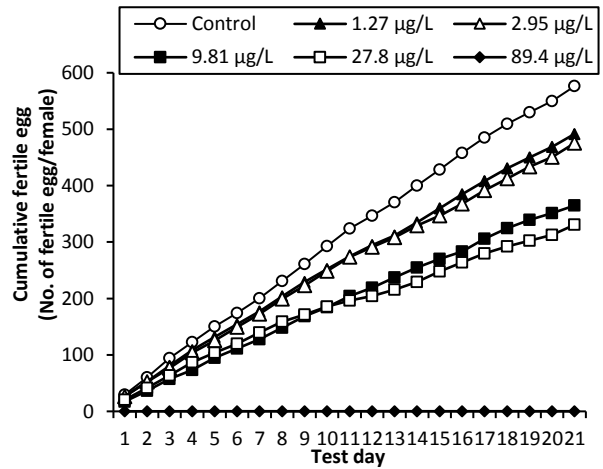


図 1-11 F1 世代の(a) 総産卵数 (b) 受精卵数 (c) 受精率の日変動および (d) 累積受精卵数  
(値は各試験区の連平均値)

## (3) F1 世代成熟個体の全長・湿重量

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、オスはすべてのばく露区において対照区に対する有意差は示されなかった。メスは 27.8  $\mu\text{g/L}$  濃度区以上で対照区に比べて有意な減少が示されたが、平均値の差は 0.6~1.1 mm であった。

湿重量については、オス・メス共に 89.4  $\mu\text{g/L}$  濃度区で対照区に比べ有意な増加が確認された。

表 1-21 F1 世代成熟個体の全長・湿重量

実測濃度 ( $\mu\text{g/L}$ )	全長 (mm)		湿重量 (mg)	
	オス	メス	オス	メス
Control	31.2 $\pm$ 0.9	31.1 $\pm$ 1.3	302 $\pm$ 26	350 $\pm$ 41
1.27	30.8 $\pm$ 0.6	30.5 $\pm$ 1.2	276 $\pm$ 24	349 $\pm$ 94
2.95	29.9 $\pm$ 0.9	30.6 $\pm$ 1.2	260 $\pm$ 19	329 $\pm$ 37
9.81	31.6 $\pm$ 1.0	31.2 $\pm$ 0.9	304 $\pm$ 31	331 $\pm$ 45
27.8	31.9 $\pm$ 1.6	30.0 $\pm$ 1.1 *	335 $\pm$ 63	300 $\pm$ 39
89.4	31.7 $\pm$ 2.4	30.5 $\pm$ 1.2 *	449 $\pm$ 132 *	403 $\pm$ 58 *

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~ばく露濃度区の連数は、オスは n=24, 11, 12, 12, 12, 8、メスは n=23, 12, 12, 8, 9, 9) を示す。\*は対照区に比べて統計学的な有意差があることを示す (\* $p$ <0.05, Jonckheere-Terpstra 検定, ただしメスの湿重量は非単調性のため Dunnett 検定による)。

## (4) F1 世代成熟個体の肝臓体指数・生殖腺体指数

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、オスは 2.95  $\mu\text{g/L}$  濃度区以上で対照区に対し有意に増加したが、メスはすべての濃度区で有意差は示されなかった。生殖腺体指数については、オスは 9.81  $\mu\text{g/L}$  濃度区以上で、メスは 27.8  $\mu\text{g/L}$  濃度区以上で有意に増加した。

表 1-22 F1 世代成熟個体の肝臓体指数・生殖腺体指数

実測濃度 ( $\mu\text{g/L}$ )	肝臓体指数 (%)		生殖腺体指数 (%)	
	オス	メス	オス	メス
Control	1.6 $\pm$ 0.3	4.8 $\pm$ 0.9	0.9 $\pm$ 0.2	7.7 $\pm$ 1.1
1.27	1.7 $\pm$ 0.2	4.9 $\pm$ 1.0	0.9 $\pm$ 0.3	8.6 $\pm$ 2.2
2.95	2.0 $\pm$ 0.2 *	5.5 $\pm$ 1.1	1.0 $\pm$ 0.2	9.4 $\pm$ 1.6
9.81	1.8 $\pm$ 0.4 *	4.1 $\pm$ 0.7	1.0 $\pm$ 0.4 *	7.6 $\pm$ 2.0
27.8	1.9 $\pm$ 0.5 *	5.1 $\pm$ 1.1	1.0 $\pm$ 0.3 *	8.6 $\pm$ 1.1 *
89.4	3.4 $\pm$ 0.9 *	3.5 $\pm$ 1.1	16 $\pm$ 18 *	15 $\pm$ 9 *

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~ばく露濃度区の連数は、オスは n=24, 11, 12, 12, 12, 8、メスは n=23, 12, 12, 8, 9, 9) を示す。\*は対照区に比べて統計学的な有意差があることを示す (\* $p$ <0.05, Jonckheere-Terpstra 検定)。

## (5) F1 世代成熟個体の肝臓中ビテロジェニン濃度

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。オスでは、27.8 µg/L 濃度区以上、メスでは 89.4 µg/L 濃度区において、対照区に比べ有意な増加がみられた。

表 1-23 F1 世代成熟個体の肝臓中ビテロジェニン濃度

実測濃度 (µg/L)	ビテロジェニン濃度 (ng/mg liver)	
	オス	メス
Control	5.28 ± 7.48	532 ± 227
1.27	6.12 ± 14.24	449 ± 140
2.95	9.89 ± 11.58	432 ± 93
9.81	23.8 ± 35.4	432 ± 103
27.8	68.9 ± 152.6 *	484 ± 161
89.4	845 ± 457 *	1100 ± 390 *

注) 値は連平均値を元に算出した平均値±標準偏差(対照区~ばく露濃度区の連数は、オスは n=24, 11, 12, 12, 12, 8、メスは n=23, 12, 12, 8, 9, 9)を示す。\*は対照区に比べて統計学的な有意差があることを示す (\* $p<0.05$ , Jonckheere-Terpstra 検定)。

## (6) F1 世代成熟個体の二次性徴指標

二次性徴の指標として、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。オスでは、27.8 µg/L 濃度区で対照区に対して有意に乳頭状小突起を有する節板数が減少し、89.4 µg/L 濃度区では乳頭状小突起を有する個体は確認されなかった。メスではすべての試験区で、乳頭状小突起を有する個体は確認されなかった。

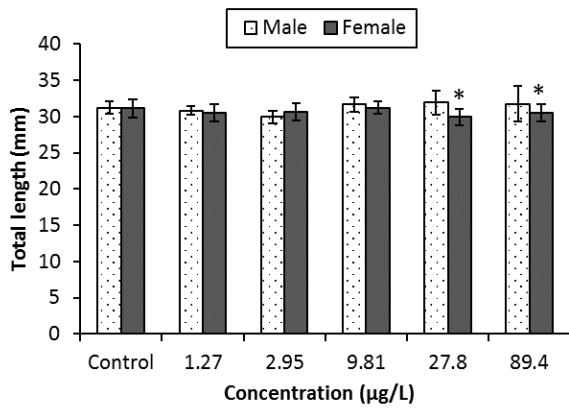
表 1-24 F1 世代成熟個体における乳頭状小突起を有する節板数

実測濃度 (µg/L)	乳頭状小突起を有する節板数 (plates/fish)	
	オス	メス
Control	95 ± 15	0 ± 0
1.27	79 ± 11	0 ± 0
2.95	83 ± 19	0 ± 0
9.81	89 ± 11	0 ± 0
27.8	62 ± 18 *	0 ± 0
89.4	0 ± 0 *	0 ± 0

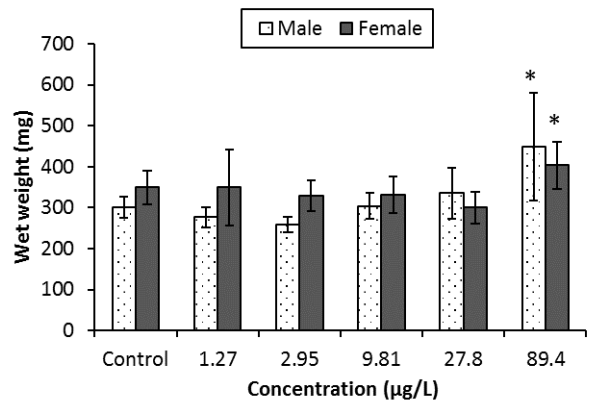
注) 値は連平均値を元に算出した平均値±標準偏差(対照区~ばく露濃度区の連数は、オスは n=24, 11, 12, 12, 12, 8、メスは n=23, 12, 12, 8, 9, 9)を示す。\*は対照区に比べて統計学的な有意差があることを示す (\* $p<0.05$ , Jonckheere-Terpstra 検定)。



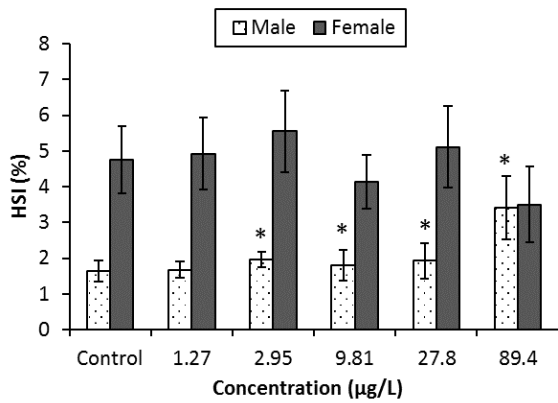
(a) 全長



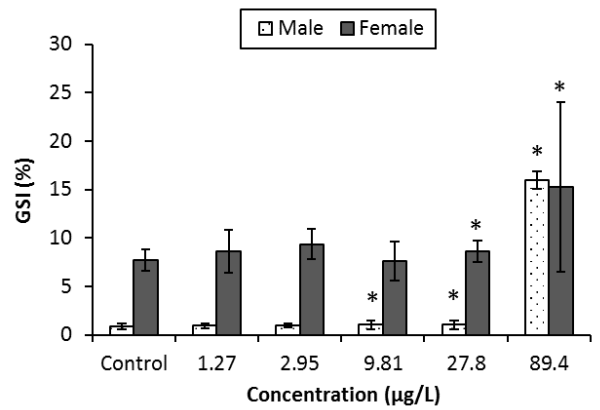
(b) 湿重量



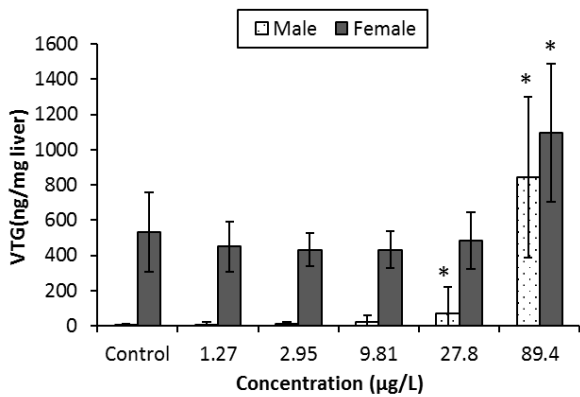
(c) 肝臓体指数 (HSI)



(d) 生殖腺体指数 (GSI)



(e) 肝臓中ビテロジェニン



(f) 乳頭状小突起を有する節板数

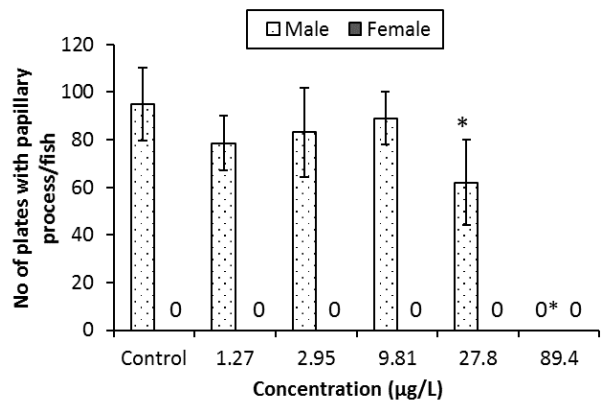


図 1-12 F1 世代成熟個体の (a) 全長 (b) 湿重量 (c) 肝臓体指数 (d) 生殖腺体指数 (e) 肝臓中ビテロジェニン (f) 乳頭状小突起を有する節板数

注) 値は連平均値を元に算出した平均値±標準偏差 (対照区~ばく露濃度区の間は、オスは n=24, 11, 12, 12, 12, 8、メスは n=23, 12, 12, 8, 9, 9) を示す。\*は対照区に比べて統計学的な有意差があることを示す (\* $p < 0.05$ , Jonckheere-Terpstra 検定。ただしメスの湿重量は Dunnett 検定)。

## (7) F1 世代成熟個体の間性又は性転換

F1 世代成熟個体における表現型性別・生殖腺形態・DMY 保有有無の比較を表 1-25 に示す。遺伝的メス個体 (DMY-) の表現型性別および生殖腺形態 (卵巣) は明確で一致していたが、遺伝的オス個体 (DMY+) は、89.4  $\mu\text{g/L}$  濃度区において 8 個体の表現型は全てメスであり、このうち 6 個体で卵巣が確認され、間性および性転換が認められた。

表 1-25 F1 世代繁殖用個体における表現型性別・生殖腺形態・DMY 保有有無の比較

実測濃度 ( $\mu\text{g/L}$ )	N	表現型			生殖腺形態			DMY	
		♂	不明	♀	精巣	不明	卵巣	+	-
Control	47	24	0	23	24	0	23	24	23
1.27	23	11	0	12	11	0	12	11	12
2.95	24	12	0	12	12	0	12	12	12
9.81	20	12	0	8	12	0	8	12	8
27.8	21	12	0	9	12	0	9	12	9
89.4	17	0	0	17	2	0	15	8	9

## (8) F1 世代成熟個体における生殖腺の病理組織学的観察結果

対照区からオス 3 個体、各濃度区からオス 8 個体をランダムに選び、生殖腺の組織切片を作成して病理組織学的観察を行った。表 1-26 に各オスの生殖腺形態と精巣卵の多さの Grade 判定および間質の有無を、そのオスのいたペアの総産卵数および受精率とともに示した。図 1-13 に対照として正常なメスの卵巣とオスの精巣、9.81  $\mu\text{g/L}$ 、27.8  $\mu\text{g/L}$ 、89.4  $\mu\text{g/L}$  濃度区のオスの生殖腺組織切片画像を示す。1.27  $\mu\text{g/L}$  および 2.95  $\mu\text{g/L}$  濃度区においては、8 個体すべて異常は観察されなかった。9.81  $\mu\text{g/L}$  濃度区では 8 個体中 1 個体、27.8  $\mu\text{g/L}$  濃度区では 6 個体、89.4  $\mu\text{g/L}$  濃度区では精巣組織をもつ 2 個体中 2 個体すべて (残り 6 個体は形態上、完全に卵巣組織) で精巣卵が確認された。89.4  $\mu\text{g/L}$  濃度区ではほぼ受精卵が観察されておらず、精巣では精子の形成は認められたものの、間質や精巣卵が多くを占めていた (図 1-13(E)(F))。

RSCAS 解析によると、生殖腺形態の Phenotype 3 (精巣組織と卵巣組織が半々) は 27.8  $\mu\text{g/L}$  濃度区以上で、Phenotype 5 (完全に卵巣組織) は 89.4  $\mu\text{g/L}$  濃度区で有意に認められた。精巣卵の Grade 2 (mild) および Grade 3 (moderate) は 27.8  $\mu\text{g/L}$  濃度区以上で、Grade 4 (severe) は 89.4  $\mu\text{g/L}$  濃度区で有意に認められた。

精巣卵の Grade と受精率には弱い正の相関 ( $r^2=0.56$ ) が示されたが、9.81  $\mu\text{g/L}$  濃度区において精巣卵が確認されたオス ((図 1-13(C)) の水槽 (No.6) では総産卵数及び受精率に明確な低下は観察されておらず、反対に受精率の低い水槽 (No.3) ではオスの生殖腺に異常は観察されなかった (表 1-26)。同様に 27.8  $\mu\text{g/L}$  濃度区では精巣卵のある 6 個体 (No. 2, 4, 5, 8, 9, 12) のうち 3 個体 (No. 2, 4, 8) では間質も観察されたが、No.8 では総産卵数および受精率は低下しておらず、精巣卵および間質の有無と繁殖能との明確な一致は見られなかった。

表 1-26 F1 世代成熟オス個体の生殖腺の病理組織学的観察結果とそのペアの繁殖能

実測濃度	水槽 No.	生殖腺 形態	精巣卵	間質	総産卵数 (egg/pair/day)	受精率 (%)
Control	1	1	0	-	28 ± 7	98 ± 5
	2	1	0	-	25 ± 11	89 ± 30
	3	1	0	-	26 ± 12	83 ± 24
1.27 µg/L	1	1	0	-	23 ± 8	92 ± 6
	3	1	0	-	32 ± 6	96 ± 5
	5	1	0	-	27 ± 5	99 ± 2
	6	1	0	-	26 ± 5	94 ± 11
	7	1	0	-	25 ± 11	95 ± 1
	8	1	0	-	25 ± 4	83 ± 18
	9	1	0	-	26 ± 6	98 ± 2
	12	1	0	-	26 ± 3	100 ± 1
2.95 µg/L	1	1	0	-	28 ± 6	27 ± 27
	2	1	0	-	33 ± 6	98 ± 2
	3	1	0	-	29 ± 11	77 ± 35
	4	1	0	-	22 ± 8	94 ± 22
	5	1	0	-	28 ± 7	99 ± 2
	6	1	0	-	24 ± 5	99 ± 2
	7	1	0	-	31 ± 6	100 ± 1
	8	1	0	-	17 ± 5	91 ± 20
9.81 µg/L	1	1	0	-	11 ± 8	62 ± 38
	2	1	0	-	20 ± 6	97 ± 5
	3	1	0	-	6.3 ± 6.5	49 ± 26
	4	1	0	-	17 ± 8	90 ± 22
	5	1	0	-	12 ± 4	97 ± 5
	6	2	2	+	20 ± 6	89 ± 21
	7	1	0	-	NA	NA
	9	1	0	+	23 ± 14	73 ± 32
27.8 µg/L	1	1	0	-	21 ± 9	91 ± 13
	2	3	3	+	16 ± 7	51 ± 25
	3	1	0	-	28 ± 13	83 ± 20
	4	3	3	+	18 ± 3	66 ± 28
	5	2	2	-	21 ± 6	94 ± 8
	8	3	3	+	20 ± 6	98 ± 3
	9	2	2	-	12 ± 12	48 ± 37
	12	2	1	-	25 ± 9	94 ± 15
89.4 µg/L	1	5	4	-	4.2 ± 8.8	0 ± 0
	3	5	4	-	10 ± 14	0 ± 0
	4	5	4	-	3.6 ± 9.6	0 ± 0
	5	5	4	-	8.0 ± 9.4	0 ± 0
	6	5	4	-	2.9 ± 4.7	0 ± 0
	7	5	4	-	0.9 ± 2.7	0 ± 0
	9	3	3	+	6.7 ± 7.5	0 ± 0
	10	3	4	+	3.6 ± 4.5	0 ± 0

注) +: あり、-: なし、NA: Not available (メス個体死亡のためデータなし)。生殖腺形態 (Phenotype 1: 完全に精巣組織、2: 精巣組織が支配的、3: 精巣組織と卵巣組織が半々、4: 卵巣組織が支配的、5: 完全に卵巣組織) と精巣卵数 (Grade 0: なし、1: minimal、2: mild、3: moderate、4: severe)。総産卵数および受精率は 21 日間平均±標準偏差で示す。

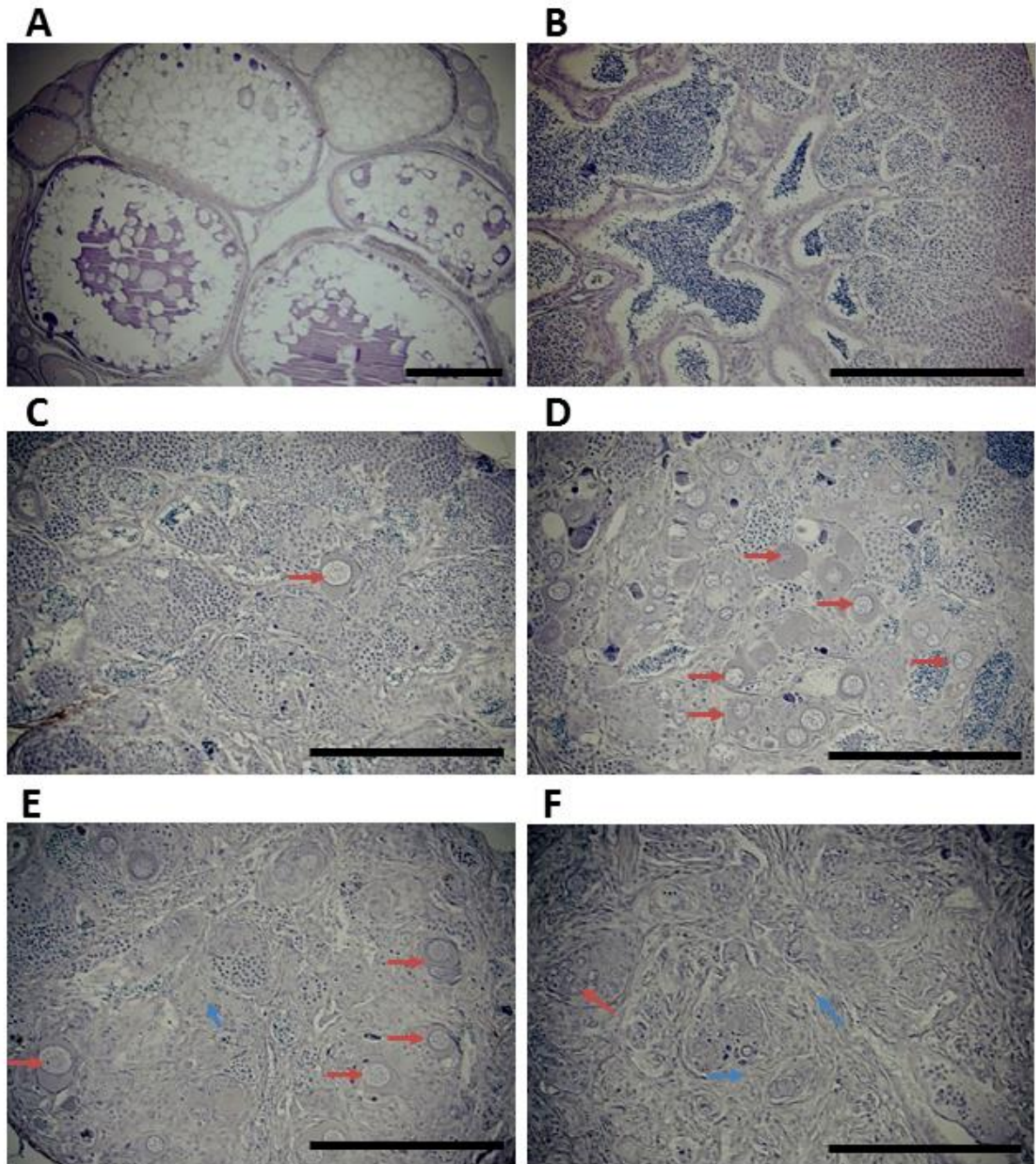


図 1-13 F1 世代成熟個体の生殖腺の組織切片写真 (A)対照区メス, (B)対照区オス, (C) 9.81 µg/L オス(No.6), (D) 27.8 µg/L オス (No.4), (E) 89.4 µg/L オス (No.9), (F) 89.4 µg/L オス(No.10)  
注) 画像右下のバーは 20 µm を示す。赤矢印は精巣卵、青矢印は間質を示す。

1.4.7 F2 世代の結果

(1) F2 世代胚・仔魚期のふ化率・ふ化日数・ふ化後生存率・生存率

F2 世代の卵は、高濃度区において 1 日あたりの受精卵数では必要数 (20 卵×6=120) を得られなかったため、試験開始 120 日目および 121 日目に分けて半数ずつ採卵した。対照区におけるふ化日の中央値が受精後 7(8)日目 (240 個中 124 個体がふ化) であったことから (図 1-14)、その 2 倍である 14(15)日目において各エンドポイントを計算した (表 1-27)。89.4 μg/L 濃度区ではすべて未受精卵であったため F2 世代に継代することができなかった。ふ化率、ふ化後生存率、生存率はすべての濃度区で対照区との有意差は認められなかった。ふ化日数は 27.8 μg/L 濃度区において有意に増加したが、その差は 0.7 日であった。

また、対照区においてふ化率 80%以上であり、試験有効条件を満たしていた。

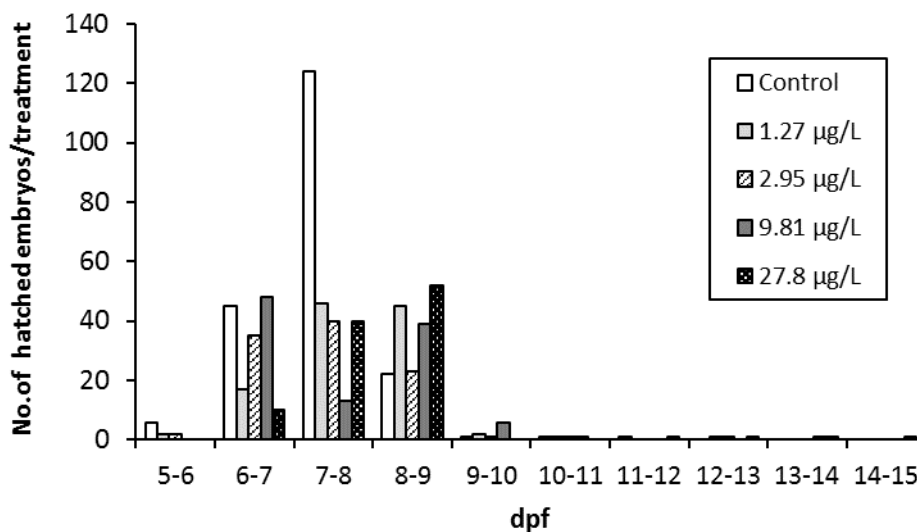


図 1-14 F2 の受精後 5～14 日目におけるふ化個体数 (各試験区の合計)

表 1-27 F2 世代胚期のふ化率・ふ化日数・ふ化後生存率・生存率 (受精後 14(15)日目)

実測濃度 (μg/L)	ふ化率 (%)	ふ化日数 (Day)	ふ化後生存率 (%)	生存率 (%)
Control	83 ± 10	7.4 ± 0.2	100 ± 0.0	85 ± 9
1.27	95 ± 6	7.8 ± 0.4	100 ± 0.0	95 ± 6
2.95	87 ± 4	7.4 ± 0.3	100 ± 0.0	89 ± 4
9.81	90 ± 9	7.6 ± 0.5	100 ± 0.0	93 ± 8
27.8	89 ± 5	8.1 ± 0.6*	100 ± 0.0	92 ± 4
89.4	NA	NA	NA	NA

注) 値は連平均値を元に算出した平均値±標準偏差 (対照区は n=12、ばく露区は n=6) を示す。\*は対照区に比べて統計学的な有意差があることを示す (\*p<0.05, Jonckheere-Terpstra 検定)。NA: Not available (継代不可)。

### 1.4.8 結果の概要

本試験は試験有効条件のうち、水温と被験物質濃度の変動で軽微な逸脱が認められたが、その他のふ化率、生存率、総産卵数および受精率に関する条件は満たされていたことから、十分な試験有効性が示されたと考えられる。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（16 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）  
すべてのばく露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）  
オスではすべてのばく露区において対照区との有意差は認められなかった。メスではすべての試験区で観察されなかった。
- 3) 肝臓中ビテロジェニン濃度  
2.95 µg/L 濃度区以上のオスにおいて、対照区と比べて有意に上昇した。
- 4) 間性又は性転換  
すべてのばく露区において発生は認められなかった。
- 5) その他の指標  
9.81 µg/L 濃度区以上のオスおよび 2.95 µg/L 濃度区以上のメスにおいて、肝臓体指数が対照区と比べて有意に上昇した。それ以外の指標については、すべてのばく露区で対照区との有意差は認められなかった。

#### (2) F1 世代胚～稚魚期の結果

- 1) 胚期ふ化率・ふ化日数・生存率  
89.4 µg/L 濃度区において、対照区と比べてふ化率および生存率が有意に低下した。ふ化日数は対照区との有意差は認められなかった。
- 2) 生存率（受精後 21 日目）  
89.4 µg/L 濃度区において、対照区と比べて生存率が有意に低下した。

#### (3) F1 世代亜成体の結果

- 1) 生存率  
9 週目ではすべての濃度区で有意差は示されなかった。10 週目の 89.4 µg/L 濃度区において、対照区と比べて生存率が有意に低下した。
- 2) 二次性徴（乳頭状小突起を有する節板数）  
2.95 µg/L 濃度区以上のオスにおいて、対照区と比べて有意に低下した。メスではすべての試験区で観察されなかった。
- 2) 肝臓中ビテロジェニン濃度  
9.81 µg/L 濃度区以上のオスおよび 27.8 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加した。
- 3) 間性又は性転換  
27.8 µg/L 濃度区以上のオスにおいて、間性または性転換が認められた。

4) その他の指標

全長：1.27 µg/L 濃度区以上のオスおよび 2.95 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。

湿重量：1.27 µg/L 濃度区以上のオスおよびメスにおいて、対照区と比べて有意に低下した。

肝臓体指数：2.95 µg/L 濃度区のオスにおいて対照区と比べて有意に増加し、89.4 µg/L 濃度区以上のメスにおいて有意に低下した。

生殖腺体指数：9.81 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。オスではすべてのばく露くにおいて対照区との有意差は示されなかった。

(4) F1 世代成熟個体（15 週齢）の結果

1) 生存率

89.4 µg/L 濃度区以上のオスおよび 9.81 µg/L 濃度区以上のメスにおいて、対照区と比べて生存率が有意に低下した。

2) 繁殖に関する指標（総産卵数・受精卵数・受精率）

総産卵数と受精卵数は 1.27 µg/L 濃度区以上において、受精率は 27.8 µg/L 濃度区以上において対照区と比べて有意に低下した。

3) 二次性徴（乳頭状小突起を有する節板数）

27.8 µg/L 濃度区以上のオスにおいて対照比べて有意に低下した。メスではすべての試験区で観察されなかった。

4) 肝臓中ビテロジェニン濃度

27.8 µg/L 濃度区以上のオスおよび 89.4 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加した。

5) 間性又は性転換の有無

89.4 µg/L 濃度区以上のオスにおいて、間性または性転換が認められた。

6) 病理学的観察による精巣卵の確認

9.81 µg/L 濃度区以上のオスにおいて精巣卵が確認された。統計学的には 27.8 µg/L 濃度区以上で有意な増加が見られた。

7) その他の指標

全長：オスはすべての濃度区で対照区との有意差は示されなかった。メスは 27.8 µg/L 濃度区以上で対照区と比べて有意に低下した。

湿重量：オス・メスともに 89.4 µg/L 濃度区で有意に増加した。

肝臓体指数：オスでは 2.95 µg/L 濃度区以上で有意に増加した。メスでは有意差は示されなかった。

生殖腺体指数：オスでは 9.81 µg/L 濃度区以上で、メスでは 27.8 µg/L 濃度区以上で有意に増加した。

(5) F2 世代胚・仔魚期の結果

ふ化率・ふ化後生存率・生存率：すべて対照区と比べて有意差は示されなかった。

ふ化後日数：27.8 µg/L 濃度区で有意に増加した。

## 1.5 考察

本試験の各世代・各エンドポイントの LOEC 一覧を表 1-28 に示す。参考までに、SPEED'98 に 4-ノニルフェノールを用いて実施された短期および長期魚類試験の結果<sup>29)10)</sup>を表 1-29 にまとめた。

F0 世代においては、オスの肝臓中ビテロジェニン濃度が濃度依存的に上昇したことから 4-ノニルフェノール（分岐型）はメダカに対しエストロゲン作用を及ぼすことが示された。オスの肝臓中ビテロジェニンに対する LOEC は 2.95  $\mu\text{g/L}$  であったのに対し、SPEED'98 において実施されたビテロジェニンアッセイにおける同指標の LOEC は 22.5  $\mu\text{g/L}$ <sup>2)</sup>、Ishibashi らによる 21 日間ばく露試験（成熟個体 5 ペア、設定濃度 0、10、50、100  $\mu\text{g/L}$ 、CAS 番号不明）での LOEC は 10  $\mu\text{g/L}$  であり<sup>8)</sup>、既存研究と同程度の結果が得られた。

対して、メスのビテロジェニンの濃度依存的な上昇、総産卵数・受精卵数・受精率の濃度依存的な減少はみられなかった。なお、本試験と同様の試験条件で行った予備検討でも設定濃度 100  $\mu\text{g/L}$  で総産卵数・受精率の低下は観察されなかった。Ishibashi らは 100  $\mu\text{g/L}$  濃度区で産卵数・受精率の有意な減少を報告しており、本試験では繁殖に対する影響が既存研究より弱く示された。メダカの系統の違いや異性体の違いが影響したと考えられる。

F1 世代では、89.4  $\mu\text{g/L}$  濃度区において、ふ化率が対照区に対して有意に低下し、受精後 21 日目および 10 週目の生存率も有意に低下した。二世世代目の仔魚～稚魚期の死亡率の増加はフルライフサイクル試験においても 17.7  $\mu\text{g/L}$  濃度区以上で観察されている<sup>2)10)</sup>。10 週齢の垂成体では 1.27  $\mu\text{g/L}$  濃度区以上でオスの全長（メスは 2.95  $\mu\text{g/L}$  濃度区以上）、オス・メスともに湿重量が有意に低下し、成長への影響がみられた。受精卵から 60 日齢までばく露するパーシャルライフサイクル試験<sup>29)</sup>においても 44.7  $\mu\text{g/L}$  濃度区で全長、23.5  $\mu\text{g/L}$  で湿重量の減少が報告されている。特にメスは生殖腺体指数も 9.81  $\mu\text{g/L}$  濃度区以上で有意に低下しており、成熟の遅延も生じている可能性がある。

ただし本試験では DMY 判定時に一部の水槽がプールされたため、垂成体は個体ごとに統計解析に供している。そのため想定より連数が多くなっているため（ばく露区では 6 連に対し、17～29 連）、連内の変動を考慮しつつ連平均を比較する、Mixed effect ANOVA + Dunnett/Dunn 検定よりも検出力が上がっている可能性がある。例えば Jonckheere-Terpstra 検定で全長の有意差がついた 1.27  $\mu\text{g/L}$  濃度区において、対照区との差はわずか数%である。

肝臓中ビテロジェニン濃度の増加は、F0 世代のメスでは観察されなかったが、F1 世代垂成体では 27.8  $\mu\text{g/L}$  濃度区以上で有意に増加した。オス垂成体では 9.81  $\mu\text{g/L}$  濃度区以上で有意に増加した。受精卵からばく露を開始しているパーシャルライフサイクル試験においても 11.6  $\mu\text{g/L}$  以上で有意な増加が観察されている<sup>29)</sup>。対して、15 週齢の成熟個体では、ビテロジェニン増加に対するオス個体の LOEC は 27.8  $\mu\text{g/L}$ 、メスは 89.4  $\mu\text{g/L}$  であり、垂成体より応答がやや低下した。特にオスは F0 世代と比べて 9.81 および 27.8  $\mu\text{g/L}$  濃度区におけるビテロジェニン濃度が 1 オーダー低くなっており（F0：384 および 565 ng/mg、F1：23.8 および 68.9 ng/mg）、親ばく露によってビテロジェニンに対する応答が低下する可能性が示唆された。

オスの二次性徴の指標である乳頭状小突起を有する節板数は、F1 世代垂成体では 2.95  $\mu\text{g/L}$  濃度区以上で、F1 世代成熟個体では 27.8  $\mu\text{g/L}$  濃度区以上で有意に減少し、89.4  $\mu\text{g/L}$  濃度区では観察されなかった。一方、F0 世代の成熟個体では有意な減少は観察されなかったため、一度形成された乳頭状小突起が消失することはないが、二次性徴前から 4-ノニルフェノールにばく露されることにより、エストロゲン作用によって乳頭状小突起の形成が阻害されたと考えられる。ただし成長阻害がみられた垂成体に対し、成長阻害がみられなかった成熟個体では、乳頭状小突起数が増加していることから、垂成体では成長遅延による影響も寄与している可能性がある。成長のエンドポイントとともに再整理し、III.2 で後述する抗アンドロゲン作用検出試験法の開発において、抗アンドロゲン様物質ではない、エストロゲン様物質による二次性徴阻害例として考慮する必要がある。

F1 世代成熟個体においては、オスは 89.4  $\mu\text{g/L}$  濃度区で 33%死亡、メスは 9.81、27.8、89.4  $\mu\text{g/L}$  濃度区で 33%、25%、25%死亡した。メスの死亡率が高いが、エストロゲン作用による



ものか、一般毒性によるものかは判断できない。

総産卵数および受精卵数は 1.27  $\mu\text{g/L}$  濃度区以上で、受精率は 27.8  $\mu\text{g/L}$  濃度区以上で有意に低下した。1.27  $\mu\text{g/L}$  濃度区における総産卵数および受精卵数の対照区に対する阻害率は 12%および 13%であった。メスの死亡個体がみられなかった 9.81  $\mu\text{g/L}$  濃度区未満でも繁殖阻害が見られたことから、エストロゲン作用による影響であると考えられる。

間性および性転換は、F0 世代では認められなかったが、F1 亜成体では 27.8  $\mu\text{g/L}$  濃度区以上のオスにおいて、F1 成熟個体では 89.4  $\mu\text{g/L}$  濃度区で間性または性転換が認められた。一方、フルライフサイクル試験<sup>10)</sup>では一世代目の 51  $\mu\text{g/L}$  濃度区では外観的二次性徴のオスがみられなかったため、ペアリングと産卵の観察を実施できなかった。本試験でも 27.8  $\mu\text{g/L}$  濃度区以上のオスは外観的二次性徴での判別は困難であったが、遺伝的性別判定技術 (DMY) によりペアリングすることが可能であった。

精巣卵は F1 成熟個体では 9.81  $\mu\text{g/L}$  濃度区において 8 個体中 1 個体で確認された。精巣卵の見られたペアにおける産卵状況を確認したところ、第 3 週目に総産卵数および受精率の低下がみられた。一方、総産卵数および受精率の低下がより大きい 3 ペア (受精率 49%、62% および 73%) において精巣卵は確認されなかった。27.8  $\mu\text{g/L}$  濃度区では 8 個体中 6 個体で精巣卵が確認されたが、このうち 3 個体では総産卵数および受精率の低下は確認されなかった。したがって、精巣卵の有無と繁殖能力への影響は一致しておらず、これは平成 24 年度に実施したエストロンを用いたメダカ多世代試験と同様の結果であった<sup>11)</sup>。繁殖能力の低下はメスにも由来する可能性が高く、今後はメスの生殖腺の病理組織学的解析技術の向上が必要である。

F2 世代は 89.4  $\mu\text{g/L}$  濃度区では受精卵が得られなかったため、27.8  $\mu\text{g/L}$  濃度区以下で継代したが、ふ化率に対する影響はみられず、ふ化遅延も 27.8  $\mu\text{g/L}$  濃度区において +0.7 日とわずかであった。F1 世代では、ふ化率に対する影響がみられなかった 27.8  $\mu\text{g/L}$  濃度区以下でも繁殖影響がみられたため、F2 世代における繁殖影響を胚期までの結果から予測することは難しいと考えられる。

MEOGRT の連数は統計学的検出力の向上のため、F0 および F2、F1 の胚～亜成体までは 6 連 (対照区は 12 連)、F1 の繁殖観察期間 (12~15 wpf) は 12 連 (対照区は 24 連) となっている。本試験では F1 の繁殖観察期間で 9.81 および 27.8  $\mu\text{g/L}$  濃度区においてメスが 33% および 25% 死亡し、連数が 9 と 10 に減少した。また、F0 では馴化期間において、各ペアの産卵状況を踏まえてオス・メスの入れ替えや選別を行うことができるが、F1 ではそのようなペアリングの選別を行うことができない。したがって、ペアリング後の死亡だけではなく、ペアリングの成否が繁殖に影響する可能性がある。これらの可能性を考慮すると、繁殖に関するエンドポイントの統計学的検出力を維持するためには、12 連/24 連のペアを用意の方が安全であると考えられるが、試験スペースや労力負担は大きいため、作用や影響の異なる物質を用いてさらに検証していく必要がある。

また本試験では、F1 の亜成体の解剖時において水槽ごとに連を維持することができなかったため、個体ごとに統計解析に供した。MEOGRT では F0 と F1 成熟個体は個体ごとに扱っているため、F1 の亜成体も個体ごとに扱うのは妥当であると言えるが、本来の水槽ごと (各約 8 個体) に平均値を出して  $n=6/12$  として扱う場合と、対照区ではオス 43 個体、メス 46 個体、ばく露区ではオス 17~22 個体、メス 9~29 個体を個別に扱う場合では統計学的検出力が異なっていると考えられる。個別に扱う方がサンプルサイズは大きくなるが、群内誤差も増加する可能性があるため、一概に検出力が上がったとは言えないが、LOEC が過小評価になっている可能性がある。したがって、他の世代とのエンドポイントの比較には注意が必要である。

統計解析手法に着目すると、単調性を考慮した新規のノンパラメトリックの多重比較検定である Jonckheere-Terpstra 検定は、従来の Dunnett および Dunn 検定より高い検出力を示すことが分かった。例えば、F1 の総産卵数および受精卵数は Dunnett 検定によると LOEC は 9.81  $\mu\text{g/L}$  濃度区および 2.95  $\mu\text{g/L}$  濃度区であるが、Jonckheere-Terpstra 検定では両者とも 1.27  $\mu\text{g/L}$  濃度区であった。F0 世代のメスの肝臓体指数は Dunnett 検定では有意差は示されないが、

### III. 魚類試験法開発に係る業務

Jonckheere-Terpstra 検定では LOEC は 2.95  $\mu\text{g/L}$  濃度区であった。また、成長に関するエンドポイントでは数%の差を検出した。一方、F1 世代のふ化率では Dunnett 検定によると 89.4  $\mu\text{g/L}$  濃度区で有意な低下が検出されるが、Jonckheere-Terpstra 検定では有意差は検出されなかった。

表 1-28 4-ノニルフェノール（分岐型）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	wpf	Endpoint	LOEC (µg/L)			
			F0	F1	F2	
Embryo	2wpf	ふ化率		↓ 89.4	>27.8	
		ふ化日数		>89.4	↑ 27.8	
		生存率		↓ 89.4	>27.8	
Larva	4wpf	生存率		↓ 89.4		
Sub-adult	10wpf	生存率		↓ 89.4		
		全長	♂		↓ 1.27	
			♀		↓ 2.95	
		湿重量	♂		↓ 1.27	
			♀		↓ 1.27	
		肝臓体指数	♂		↑ 2.95	
			♀		↓ 89.4	
		生殖腺体指数	♂		>89.4	
			♀		↓ 9.81	
		肝臓中ビテロジェニン濃度	♂		↑ 9.81	
			♀		↑ 27.8	
		二次性徴(乳頭状小突起を有する節版数)	♂		↓ 2.95	
			♀		-	
		間性又は性転換の発生 <sup>1</sup>				↑ 27.8
病理組織学的観察による精巣卵の確認				-		
Adult	12~15wpf	生存率	♂	>89.4	↓ 89.4	
			♀	>89.4	↓ 9.81	
		産卵数		>89.4	↓ 1.27 (9.81*)	
		受精卵数		>89.4	↓ 1.27 (2.95*)	
	受精率		>89.4	↓ 27.8 (9.81*)		
	15wpf	全長	♂	>89.4	>89.4	
			♀	>89.4	↓ 27.8	
		湿重量	♂	>89.4	↑ 89.4	
			♀	>89.4	↑ 89.4	
		肝臓体指数	♂	↑ 9.81	↑ 2.95	
			♀	↑ 2.95	>89.4	
		生殖腺体指数	♂	>89.4	↑ 9.81	
			♀	>89.4	↑ 27.8	
		肝臓中ビテロジェニン濃度	♂	↑ 2.95**	↑ 27.8	
			♀	>89.4	↑ 89.4	
		二次性徴(乳頭状小突起を有する節版数)	♂	>89.4	↓ 27.8	
♀			-	-		
間性又は性転換の発生			>89.4	↑ 89.4		
病理組織学的観察による生殖腺形態 <sup>2</sup>			-	↑ 27.8		
病理組織学的観察による精巣卵の確認 <sup>3</sup>			-	↑ 27.8		

1: 遺伝的性別に対し表現型・生殖腺形態の性別が一致しなかった個体が見られた最小濃度とした。  
 2: OECD ガイダンス文書に基づき、精巣組織か卵巣組織のどちらが支配的か Grade 判定し Rao-Scott Cochran-Armitage by Slice で検定した。  
 3: OECD ガイダンス文書に基づき、精巣卵の多さを Grade 判定し Rao-Scott Cochran-Armitage by Slice で検定した。  
 \*: 括弧内は反復測定分散分析+Dunnett 検定による LOEC  
 \*\*: Dunnett 検定による LOEC は 9.81 µg/L

表 1-29 4-ノニルフェノールの既存研究結果まとめ（各エンドポイントに対する LOEC）<sup>2)</sup>  
9) 10)

Stage	wpcf	Endpoint		ビテロジェニン アッセイ	パーシャルライ フサイクル試験	フルライフサイクル試験	
		設定濃度 (µg/L)				F1	F2
				118, 56.2, 22.5, 12.8, 7.4	44.7, 23.5, 11.6, 6.08, 3.30	183, 51.5, 17.7, 8.2, 4.2	
Embryo	2wpcf	ふ化率			-	-	>17.7
		ふ化日数			-	-	>17.7
Larva	4wpcf	ふ化後生存率			-	↓ 183	>17.7
Sub-adult	10wpcf	ふ化後生存率			>44.7	↓ 17.7	>17.7
		全長	♂		↓ 44.7	>51.5	>17.7
			♀			>51.5	>17.7
		湿重量	♂		↓ 23.5	>51.5	>17.7
			♀			>51.5	>17.7
		肝臓体指数	♂		-	-	-
			♀		-	-	-
		生殖腺体指数	♂		-	-	-
			♀		-	-	-
		二次性徴(表現型性比の偏り)	♂		↓ (23.5) <sup>*1</sup>	↓ (51.5) <sup>*1</sup>	-
			♀		-	-	-
		肝臓中ビテロジェニン濃度	♂		↑ 11.6	-	-
♀			-	-	-		
間性又は性転換の発生			↑ 11.6	↑ 17.7	-		
病理組織学的観察による精巣卵の確認			↑ 11.6	↑ 17.7	↑ 8.2		
Adult	12~ 15wpcf	死亡および外観・行動の異常		♂	>118	-	-
				♀	>118	-	-
		産卵数			-	>17.7	
		受精卵数			-	>17.7	
	受精率			-	(↓) >17.7 <sup>*2</sup>		
	15wpcf	全長	♂		-	-	-
			♀		-	-	-
		湿重量	♂		-	-	-
			♀		-	-	-
		肝臓体指数	♂		-	-	-
			♀		-	-	-
		生殖腺体指数	♂		-	-	-
			♀		-	-	-
		二次性徴(乳頭状小突起を有する 節版数)	♂		-	-	-
			♀		-	-	-
		肝臓中ビテロジェニン濃度	♂		↑ 22.5	-	-
♀				-	-	-	
間性又は性転換の発生			-	-	-		
病理組織学的観察による精巣卵の確認			-	-	-		

\*1: 表現型から判定した性比に偏りが生じた最大濃度、\*2: 統計学的有意差は付いていないものの、76%に減少した。

## 1.6 参考文献

- 1) OECD. 2015. OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 240, Medaka Extended One Generation Reproduction Test (MEOGRT)
- 2) 環境省総合環境政策局環境保健部. 2001. ノニルフェノールが魚類に与える内分泌攪乱作用の試験結果に関する報告 (案)
- 3) 中央環境審議会 2012. 水生生物の保全に係る水質環境基準の項目追加等について (第1次答申) .
- 4) PubChem, Available from <http://webbook.nist.gov/chemistry/>. (平成 28 年 3 月 12 日閲覧)
- 5) Flynn K, Lothenbach D, Whiteman F, Hammermeister D, Touart LW, Swintek J, Tatarazako N, Onishi Y, Iguchi T and Johnson R, 2017. Summary of the development the US Environmental Protection Agency's Medaka Extended One Generation Reproduction Test (MEOGRT) using data from 9 multigenerational medaka tests. *Environ Toxicol Chem.* doi:10.1002/etc.3923.
- 6) Swintek J, Flynn K, Haselman J. Package 'StatCharrms'. Available from: <https://cran.r-project.org/web/packages/StatCharrms/StatCharrms.pdf>. (平成 29 年 9 月 7 日閲覧)
- 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. ENV/JM/MONO(2015)36/PART1-4.
- 8) H Ishibashi, M Hirano, N Matsumura, N Watanabe, Y Takao, K Arizono (2006) Reproductive effects and bioconcentration of 4-nonylphenol in medaka fish (*Oryzias latipes*), *Chemosphere*, 65(6): 1019-1026.
- 9) Seki M, Yokota H, Maeda M, Tadokoro H, Kobayashi K. 2003. Effects of 4-nonylphenol and 4-tert-octylphenol on sex differentiation and vitellogenin induction in medaka (*Oryzias latipes*). *Environ Toxicol Chem* 22:1507–1516.
- 10) Yokota H, Seki M, Maeda M, Oshima Y, Tadokoro H, Honjo T, Kobayashi K. 2001. Life-cycle toxicity of 4-nonylphenol to medaka (*Oryzias latipes*). *Environ Toxicol Chem* 20: 2552–2560.
- 11) 国立環境研究所 (2013) 平成 24 年度化学物質の内分泌かく乱作用に関する試験法開発に係る業務報告書