

環境省請負業務

平成30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

(ペンディメタリン) 実施業務

業務報告書

平成31年3月

一般財団法人化学物質評価研究機構

目 次

	頁
1. 要 約.....	1
2. 背景及び目的.....	3
3. 業務内容.....	3
4. 試験施設.....	3
5. 材料及び方法.....	4
5.1 被験物質.....	4
5.2 試験生物.....	5
5.3 希积水.....	5
5.4 試験濃度.....	5
5.5 プレ暴露.....	6
5.6 暴露方式.....	6
5.7 試験液の調製.....	7
5.8 試験液中の被験物質濃度及び水質.....	7
5.9 観察と測定.....	8
5.10 結果の処理.....	8
5.11 試験の有効性.....	9
6. 結 果.....	10
6.1 試験液中の被験物質濃度.....	10
6.2 試験液の水質.....	11
6.3 死亡率.....	11
6.4 産卵数及び受精率.....	12
6.5 暴露終了時の全長及び体重.....	15
6.6 暴露終了時の肝臓体指数、生殖腺体指数.....	15
6.7 暴露終了時の二次性徴（乳頭状小突起を有する節板数）.....	16
6.8 肝臓中ピテロジェニン濃度.....	16
7. まとめと考察.....	18
8. 引用文献.....	20

1. 要 約

業務名

平成 30 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（ペンディメタリン）
実施業務

業務の背景及び目的

環境省では、平成 28 年 6 月に「化学物質の内分泌かく乱作用に関する今後の対応－EXTEND2016－」を取りまとめ、化学物質の内分泌かく乱作用についての評価手法の確立と評価の実施を加速化して進めており、化学物質の内分泌かく乱作用に関連する報告の信頼性評価、試験対象となり得る物質の選定を実施している。また、試験及び評価の考え方や枠組みについて検討を行い、試験管内試験及び生物試験を用いて、2 段階で評価を行う枠組みを取りまとめたところである。

本業務は、環境省が平成 22 年 11 月に取りまとめた化学物質の内分泌かく乱作用に関する試験及び評価の考え方や枠組みに基づき、内分泌かく乱作用に関する評価等に必要データを集積するため、既に実施された試験管内試験の結果等において第一段階生物試験を実施する優先順位が高いと考えられるペンディメタリンについて、第一段階生物試験である魚類短期繁殖試験を実施したものである。

業務内容

ペンディメタリンを被験物質として、OECD Guideline for the testing of chemicals No.229: Fish Short Term Reproduction Assay (OECD TG229) に準拠し、試験生物にメダカ (*Oryzias latipes*) を用いて魚類短期繁殖試験を実施した。暴露期間中のメダカの産卵状況や暴露終了後の肝臓中ビテロジェニン濃度や二次性徴等、内分泌かく乱に関わるエンドポイントについて測定し、被験物質のメダカに対する LOEC 及び NOEC を求めた。

試験生物	メダカ (<i>Oryzias latipes</i>)
被験物質	ペンディメタリン
暴露方式	流水式
試験期間	21 日間
試験濃度	設定濃度 200、40.0、8.00 µg/L (公比 5.0) の 3 濃度区 (測定濃度として 100、28.8 及び 5.69 µg/L) 及び対照群
対照群	希釈水のみ対照区及び DMF を試験濃度区と同じ助剤濃度 (0.10 mL/L) にした助剤対照区
連 数	4 連/試験区
試験生物数	6 個体 (オス 3 個体、メス 3 個体) /試験容器 24 個体 (オス 12 個体、メス 12 個体) /試験区
試験水槽	3 L 容ガラス製容器

試験水量	約 7.2 L/試験区 (約 1.8 L/試験容器)
換水率	約 12 回/日 (流量 15 mL/min/試験容器)
試験水温	25±2°C
エアレーション	実施せず
明暗周期	室内灯による 16 時間明/8 時間暗
給 餌	アルテミアふ化幼生を 1 日 3 回飽食量給餌

試験結果

ペンディメタリンを用いた魚類短期繁殖試験を実施した結果、設定濃度 200、40.0 及び 8.00 µg/L に対して、暴露期間中の平均測定濃度はそれぞれ 100、28.8 及び 5.69 µg/L であった。暴露期間中、対照区及び 28.8 µg/L 区においてそれぞれ 1 個体、100 µg/L 区において 2 個体の死亡がみられたが、対照群と試験濃度区間に統計的な有意差は認められなかった。また、暴露期間中の産卵数についても対照群と試験濃度区間に統計的な有意差は認められず、メス 1 個体あたりの累積産卵数は対照群と同様の推移を示した。しかしながら、受精率については、100 µg/L 区において対照群と比較して有意な低下を示した。暴露終了時における試験濃度区の全長、体重、肝臓体指数、生殖腺体指数、二次性徴については、対照群と比較して統計的に有意な差はみられなかった。肝臓中ビテロジェニン濃度については、メスでは対照群と試験濃度区間に統計的に有意な差はみられなかったが、オスの 100 µg/L 区では対照群と比較してビテロジェニン濃度の有意な増加が認められた。その他の試験濃度区においては対照区と比較して統計的に有意な差は認められなかった。

以上の結果より、ペンディメタリンはメダカに対してエストロゲン様の内分泌かく乱作用を示すことが示唆された。ペンディメタリンの魚類短期繁殖試験における LOEC 及び NOEC は、受精率及びオスの肝臓中ビテロジェニン濃度において 100 及び 28.8 µg/L であった。

2. 背景及び目的

環境省では、平成 28 年 6 月に「化学物質の内分泌かく乱作用に関する今後の対応－EXTEND2016－」を取りまとめ、化学物質の内分泌かく乱作用についての評価手法の確立と評価の実施を加速化して進めており、化学物質の内分泌かく乱作用に関連する報告の信頼性評価、試験対象となり得る物質の選定を実施している。また、試験及び評価の考え方や枠組みについて検討を行い、試験管内試験及び生物試験を用いて、2 段階で評価を行う枠組みを取りまとめたところである。

本業務は、環境省が平成 22 年 11 月に取りまとめた化学物質の内分泌かく乱作用に関する試験及び評価の考え方や枠組みに基づき、内分泌かく乱作用に関する評価等に必要データを集積するため、既の実施された試験管内試験の結果等において第一段階生物試験を実施する優先順位が高いと考えられるペンディメタリンについて、第一段階生物試験である魚類短期繁殖試験を実施したものである。

3. 業務内容

EXTEND2016 において平成 29 年度に実施した第 1 段階試験管内試験結果並びに既存知見に基づき、エストロゲン作用について陽性の結果が得られたペンディメタリン¹⁾を被験物質として、OECD Guideline for the testing of chemicals No.229: Fish Short Term Reproduction Assay (OECD TG229) に準拠し、試験生物にメダカ (*Oryzias latipes*) を用いて魚類短期繁殖試験を実施した。

被験物質の魚類繁殖性に関する潜在的影響を調べるため、試験では成魚の雌雄メダカを段階的な濃度の試験液に 21 日間流水条件下にて暴露し、暴露期間中のメダカの産卵状況を確認した。また暴露終了後、試験生物の肝臓中ビテロジェニン濃度や二次性徴等、内分泌かく乱に関わるエンドポイントについて測定し、被験物質のメダカの繁殖性に対する LOEC (最小影響濃度) 及び NOEC (最大無影響濃度) を求めた。

4. 試験施設

名称	一般財団法人化学物質評価研究機構 久留米事業所
所在地	〒839-0801 福岡県久留米市宮ノ陣三丁目 2 番 7 号

5. 材料及び方法

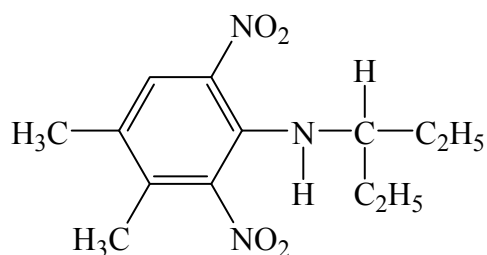
5.1 被験物質

a) 名称等²⁾

名称 *N*-(1-エチルプロピル)-2,6-ジニトロ-3,4-キシリジン
別名 ペンディメタリン
CAS 番号 40487-42-1

b) 構造式等²⁾

構造式



分子式 $C_{13}H_{19}N_3O_4$
分子量 281.3

c) 供試試料³⁾

名称 ペンディメタリン標準品 (残留農薬試験用)
被験物質純度 99.3% (キャピラリーカラム GC)
供給者 富士フイルム和光純薬株式会社
ロット番号 APL3870

d) 物理化学的性状

外観 黄赤色、結晶性粉末³⁾
融点 $57^{\circ}C$ ³⁾
水溶解度 $0.23 \times 10^3 \mu g/L$ ($20^{\circ}C$)²⁾
 $0.17 \times 10^3 \mu g/L$ ($20^{\circ}C$)²⁾
生物濃縮性 BCF_{ss} = 3,458 ($3.0 \mu g/L$)²⁾
BCF_{ss} = 1,600 ($0.1, 1.0 \mu g/L$)²⁾
オクタノール/水分配係数 $\log Pow = 5.18$ ($25^{\circ}C$)²⁾

e) 保管条件

冷蔵暗所保管した。

f) 取扱い上の注意

手袋、マスク、保護めがね及び白衣を着用し、皮膚、目への接触及び吸入を避けた。

5.2 試験生物

種	メダカ (<i>Oryzias latipes</i>)
供給源	自家生産 (当事業所において継代飼育)
供試週齢	18 週齢
供試魚体重	オス 291±49 mg、メス : 345±66 mg (暴露開始時、サブサンプルより取り上げた雌雄各 6 個体の平均体重)
群分け	無作為抽出
順 化	
飼育水	脱塩素水道水
溶存酸素濃度	飽和溶存酸素濃度の 80%以上
水 温	25±2°C
明暗周期	室内灯による 16 時間明/8 時間暗
餌 料	アルテミアふ化幼生
給餌量・頻度	飽食量を 1 日 2 回、毎日給餌

5.3 希釈水

希釈水及び飼育水には十分にエアレーションし、温度調節した脱塩素水道水を用いた。定期的に測定した希釈水の水質測定結果を付属資料に示す。

5.4 試験濃度

ペンディメタリンは水に難溶 (170~230 µg/L[20°C])²⁾であることから、高濃度の水原液を安定的に調製することが困難であった。そのため、OECD SERIES ON TESTING AND ASSESSMENT Number 23⁴⁾に記載されている有機溶媒の中から、ペンディメタリンを安定的に溶解させることが可能な *N,N*-ジメチルホルムアミド (DMF) を助剤として用いた。試験原液は試験濃度区間で試験液中の助剤濃度が一定 (0.10 mL/L) となるよう調製し、暴露試験では対照区と別に試験濃度区と同じ濃度の DMF のみを暴露する助剤対照区を設けた。

試験濃度及び公比は以下の通り決定した。ペンディメタリンのコイ (*Cyprinus carpio*) に対する急性毒性試験の既存データとして、助剤又は分散剤を用いて水溶解度以上を設定した結果、96 時間 LC₅₀ 値が 250 µg/L 又は 713 µg/L であったとの報告がある²⁾。また、事前検討として、ペンディメタリンのメダカに対する急性毒性試験を実施したところ、DMF を用いて調製した設定濃度 500 µg/L (測定濃度の幾何平均値 269 µg/L) において生物影響は認められなかった。以上の結果より、ペンディメタリンはメダカに対して水溶解度付近の濃度において急性影響を示さないと考えられたことから、本試験の最高濃度区はペンディメタリン水溶解濃度に近い 200 µg/L に設定した。また、平成 29 年度検討会資料⁵⁾より、ペンディメタリンのレポータージーンアッセイの結果、メダカエストロ

ゲンレセプターに対する活性比は 17 β -エストラジオールと比較して 0.0050%であった。既存データより、17 β -エストラジオールの OECD TG229 の試験結果は、LOEC が 553 ng/L、NOEC が 115 ng/L である⁶⁾ことから、活性比よりペンディメタリンでは LOEC が 10 mg/L、NOEC は 2 mg/L 付近と、本試験の最高濃度よりも高くなると推測された。しかしながら、コイの既存データでは 50 μ g/L 以上で症状が認められており、また、ペンディメタリンは生物濃縮性が比較的高い (BCF_{ss} = 1600~約 3500) ことから、設定濃度から推測するよりも強い影響が出ることが懸念された。そのため、分析感度も考慮し公比を 5.0 に設定し、本試験の設定濃度は 200、40.0、8.00 μ g/L (公比 5.0) とした。

5.5 プレ暴露

暴露開始 14 日前より、被験物質を含まない希釈水にてプレ暴露を実施した。プレ暴露では、無作為抽出によって選別した雌雄各 3 尾ずつを 1 容器に入れ、試験と同条件にて飼育し各容器における産卵状況を確認した。プレ暴露の前半では産卵数が極端に少ない容器について供試魚の入れ替えを行い、暴露開始前 5 日間で 1 日あたりの受精卵と未受精卵を計数し、それぞれの容器あたりの総産卵数及び受精率を算出した。この結果を基に、各試験区間の産卵数及び受精率に統計学的な有意差がみられないように各試験区に試験容器 (供試魚) を割り当てた。

5.6 暴露方式

被験物質を含む試験原液あるいは助剤 (DMF) 及び試験用水を、微量定量ポンプ (SP-D-2500S : 日本精密科学) 及び毛細管により一定流量に調整後混合部に導き、マグネティックスターラーにより攪拌して調製した試験液を 4 分割し、試験容器へ連続的に供給できるものを用いた。以下に暴露条件を記載した。なお、試験容器は週 1 回以上の頻度で交換、洗浄を行った。

暴露方式	流水式
試験期間	21 日間
試験濃度	200、40.0、8.00 μ g/L (公比 5.0) の 3 濃度及び対照群
対照群	希釈水のみ対照区及び DMF を試験濃度区と同じ助剤濃度 (0.10 mL/L) にした助剤対照区
連 数	4 連/試験区
試験生物数	6 個体 (オス 3 個体、メス 3 個体) /試験容器 24 個体 (オス 12 個体、メス 12 個体) /試験区
試験水槽	3 L 容ガラス製容器
試験水量	約 7.2 L/試験区 (約 1.8 L/試験容器)
換水率	約 12 回/日 (流量 15 mL/min/試験容器)

試験水温	25±2℃
エアレーション	実施せず
明暗周期	室内灯による 16 時間明/8 時間暗
給 餌	アルテミアふ化幼生を 1 日 3 回飽食量給餌した。ただし、解剖前の 12 時間は給餌を行わなかった。

5.7 試験液の調製

必要量の供試試料を DMF（試薬特級、富士フィルム和光純薬株式会社）に溶解して、2000 mg/L の試験原液を調製した。この試験原液をそのまま若しくは DMF で適宜希釈し、各試験濃度区の 10⁴ 倍の濃度の試験原液を調製した。試験液は、毛細管及び定量ポンプにより一定流量に調節した試験用水と試験原液あるいは助剤（DMF）をマグネティックスターラーで攪拌して連続的に調製した。試験原液及び希釈水の流量については一定間隔（1 回/週）で確認し、暴露期間を通じた流量の変動を 10%未満に抑えた。なお、試験原液は室温条件下にて調製後 17 日間安定であることが確認できたため、試験原液の調製は安定性が確認された期間までに新しく調製し交換した。

5.8 試験液中の被験物質濃度及び水質

a) 試験液中の被験物質濃度

測定頻度	暴露期間中 4 回（暴露開始時から 1 週間間隔）
採水方法	各試験容器の中層から均等量採取し、混合
測定方法	付属資料参照

b) 試験液の水質

①溶存酸素濃度（DO）、pH 及び水温

測定頻度	DO、pH、水温：1 回/週（暴露開始時及び終了時含む） 連続水温：1 回/1 時間間隔で測定
測定対象	DO、pH、水温：全試験容器 連続水温：対照区の 1 試験容器
測定機器	溶存酸素計 HQ30d (HACH) pH 計 HM-21P（東亜ディーケーケー） ガラス製棒状温度計 サーモレコーダー RT-11（タバイ エスペック）

②全硬度及びアルカリ度

測定頻度	1 回/週（暴露開始時及び終了時含む）
測定対象	対照区及び試験最高濃度区の 1 試験容器

5.9 観察と測定

a) 試験生物の一般状態

死亡と一般状態を暴露開始後に試験終了日まで毎日観察した。観察可能な動き（吻、鰓蓋の動き等）がなく、ガラス棒で尾柄部に軽く触れ反応がない個体を死亡とみなした。死亡した個体は確認した時点で外見より雌雄を判別し、速やかにとり除いた。

b) 産卵数及び受精率

暴露期間中は毎日全試験容器から全ての卵を採取し、1日あたりの受精卵と未受精卵を計数し、生存するメス1個体あたりの産卵数及び受精率を算出した。

c) 暴露終了後の供試魚の取り上げ

暴露 21 日後に生存個体を全て取り上げ、氷水中にて麻酔後に全長及び体重を測定した。その後、解剖して肝臓及び生殖腺を摘出し、それぞれの重量を測定した。摘出した肝臓は、ビテロジェニン濃度の測定のため前処理を行うまで -80°C で保存した。肝臓及び生殖腺の摘出後、尻鰭を切り取り 10%中性緩衝ホルマリン（富士フィルム和光純薬株式会社）で固定し、二次性徴評価における乳頭状小突起を有する節板数の計数を行うまで室温で保存した。

d) 二次性徴（乳頭状小突起を有する節板数）の観察

10%中性緩衝ホルマリンで固定した尻鰭を実体顕微鏡下で観察し、軟条における乳頭状小突起がみられる節板数を計数した。

e) ビテロジェニン濃度測定

解剖により摘出した肝臓 1 mg 当たり 50 μL の ELISA 希釈液（ELISA 測定に用いるものと同等のもの）を添加してホモジナイズし、 5°C 、 $13000\times g$ 、10 分間の遠心分離（高速冷却遠心機 CR21G II 日立工機株式会社）後、上清を採取して前処理を行った。前処理後の上清はビテロジェニン濃度測定まで -80°C で保存した。この上清中のビテロジェニン濃度を、メダカビテロジェニン ELISA キット（EnBio Medaka Vitellogenin ELISA system、藤倉化成株式会社）を用いて測定した。なお、ビテロジェニン濃度測定の前処理操作を考慮した定量下限値は 1.00 ng/mg liver weight とした。

5.10 結果の処理

得られた結果から、死亡率、産卵数、受精率について容器平均値及び標準偏差を算出した。また、全長、体重、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板数）及び肝臓中ビテロジェニン濃度について、雌雄別に容器平均値及び標準偏差を算出した。

統計処理は、はじめに対照区と助剤対照区の間で有意差検定を行った。検定は等分散性の検定（*F* test）により等分散性が認められた場合、2 群の検定（Student's *t*-test）を行い、等分散性が認められなかった場合は 2 群間のノンパラメトリック検定（Mann-Whitney's *u*-test）を行った。ただし、肝臓中ビテロジェニン濃度については等分散性の検

定を行わずに2群間のノンパラメトリック検定を行った。この際、定量下限値以下のデータに関しては定量下限の半値 (0.5 ng/mg liver weight) を用いて検定した。受精率に関しては逆正弦変換を行い、分散を安定化させ有意差検定を行った。対照群における有意差検定の結果、いずれの指標においても対照区と助剤対照区間に統計学的な有意差は認められなかった。このため、以降の統計処理に用いる対照群のデータは OECD SERIES ON TESTING AND ASSESSMENT Number 54 ⁷⁾ に従い、対照区と助剤対照区の結果をプールして用いた。

試験濃度区における有意差検定は、はじめに等分散性の検定 (Bartlett's test) を行い、等分散性が認められた場合は多重検定 (Dunnett's test) を、等分散性が認められなかった場合はノンパラメトリックの多重検定 (Steel's test) を行った。ただし、肝臓中ビテロジェニン濃度については等分散性の検定を行わずにノンパラメトリックの多重検定を行った。この際、定量下限値以下のデータに関しては定量下限の半値 (0.5 ng/mg liver weight) を用いて検定した。すべての統計処理はエクセル統計 2012 for windows (株式会社 社会情報サービス) を用いて実施し、死亡率、産卵数、受精率、全長、体重については片側検定、肝臓体指数、生殖腺体指数、二次性徴及び肝臓中ビテロジェニン濃度については両側検定で、 $p < 0.05$ を有意差とみなした。

5.11 試験の有効性

- a) 暴露期間中、対照群における死亡率が 10% を超えてはならない。
- b) 暴露期間中の溶存酸素濃度は、試験水温での飽和溶存酸素濃度の 60% 以上でなければならない。
- c) 水温が $25 \pm 2^\circ\text{C}$ の範囲内で、なおかつ試験容器間の水温が $\pm 1.5^\circ\text{C}$ 以上変動してはならない。
- d) 試験液中の被験物質濃度が平均測定濃度の $\pm 20\%$ 以内に維持されなければならない。
- e) 暴露開始前の全ての試験容器及び試験期間中の対照群のメダカで活発に産卵が認められること。

6. 結 果

6.1 試験液中の被験物質濃度

暴露期間中に測定した試験液中の被験物質濃度は、設定濃度 200、40.0 及び 8.00 µg/L に対して平均測定濃度が 100、28.8 及び 5.69 µg/L であり、それぞれ設定濃度に対して 50.2、72.0 及び 71.1%であった。高濃度区において、試験液中や暴露装置の流路に被験物質の析出がみられた。また、濃度依存的に魚体や卵の卵黄部分に被験物質による着色が認められた。いずれの試験濃度区においても、試験液中の被験物質濃度は平均測定濃度の±20%以内に維持されており、有効性基準を満たしていた。被験物質濃度の測定方法及び測定結果を付属資料に示す。

なお、以下の本文中における試験濃度は、設定濃度（200、40.0 及び 8.00 µg/L）におけるそれぞれの平均測定濃度（100、28.8 及び 5.69 µg/L）で示す。

表 1 試験液中の被験物質濃度の測定結果

設定濃度 (µg/L)	試験液中の被験物質濃度 (µg/L) (対設定濃度%)				
	暴露開始時	暴露7日後	暴露14日後	暴露終了時	算術平均値
対照区	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
助剤対照区	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
8.00	5.72 (71.5)	5.97 (74.6)	5.77 (72.2)	5.29 (66.1)	5.69 (71.1)
40.0	29.7 (74.3)	30.6 (76.4)	30.0 (75.0)	25.0 (62.5)	28.8 (72.0)
200	100 (50.0)	126 (63.2)	92.8 (46.4)	82.7 (41.3)	100 (50.2)

n.d.: <0.199 µg/L

6.2 試験液の水質

暴露期間中に測定した試験液の各種水質項目の最小値及び最大値を表2に示す。暴露期間中のDOは飽和濃度の60%以上であり、有効性基準を満たしていた。また、暴露期間中の水温は水槽間の温度差が1.5°C未満かつ25°C±2°Cの範囲内であり、有効性基準を満たしていた。暴露期間中に測定した試験液の水質の詳細を付属資料に示す。

表2 暴露期間中の試験液の水質

測定濃度 (µg/L)	DO (mg/L)	水温 (°C)	pH	全硬度 (mgCaCO ₃ /L)	アルカリ度 (mgCaCO ₃ /L)
対照区	6.7 - 8.7	25.0 - 25.5	7.5 - 8.0	43.4 - 46.4	40.0 - 43.8
助剤対照区	6.7 - 8.7	25.0 - 25.5	7.5 - 8.1	—	—
5.69	6.7 - 8.7	25.0 - 25.5	7.5 - 8.1	—	—
28.8	6.7 - 8.7	25.0 - 25.5	7.5 - 8.1	—	—
100	6.6 - 8.7	25.0 - 25.4	7.5 - 8.1	44.2 - 45.4	39.6 - 42.6

6.3 死亡率

暴露期間中の各試験濃度区の死亡率を表3に示す。

暴露期間中、対照区及び28.8 µg/L区においてそれぞれ1個体、100 µg/L区において2個体の死亡がみられた。有意差検定の結果、対照群と試験濃度区間に統計的な有意差は認められなかった。

なお、対照区及び助剤対照区の死亡率はともに10%以下であり、有効性基準を満たしていた。

表3 暴露終了時の累積死亡率

測定濃度 (µg/L)	オス死亡率 (%)	メス死亡率 (%)	死亡率計 (%)
対照区	8.3	0	4.2
助剤対照区	0	0	0
5.69	0	0	0
28.8	0	8.3	4.2
100	8.3	8.3	8.3

6.4 産卵数及び受精率

暴露期間中の平均総産卵数、1日メス1個体あたりの平均産卵数及び平均受精率を表4に示す。暴露期間中の産卵数について、試験濃度依存的な減少は認められなかった。受精率については100 µg/L区で61.7%と顕著な低下が認められた。得られた結果について有意差検定を行ったところ、産卵数についてはいずれの試験濃度区においても対照群と比較して統計学的な有意差は認められなかった。一方で、受精率については100 µg/L区で対照群と比較して1%水準で有意差が検出された。

1日メス1個体あたりの平均産卵数、平均受精率、1日メス1個体あたりの総産卵数及びメス1個体あたりの累積産卵数のグラフを図1~4に示す。なお、対照区では、試験期間を通じて産卵は活発であった(図4)。

表4 産卵数及び受精率

測定濃度 (µg/L)	平均総産卵数 (eggs/vessel)	1日メス1個体あたりの 平均産卵数 (eggs/female/day)	平均受精率 (%)
対照区	1309 ± 293	20.8 ± 4.7	91.2 ± 4.0
助剤対照区	1360 ± 131	21.6 ± 2.1	85.2 ± 6.7
5.69	1291 ± 214	20.5 ± 3.4	93.0 ± 0.9
28.8	1255 ± 239	20.4 ± 3.9	88.2 ± 4.9
100	1166 ± 55	19.1 ± 2.1	61.7 ± 10.9 **

各データは容器平均 ± 標準偏差で示す。

**は $p < 0.01$ で有意であることを示す。

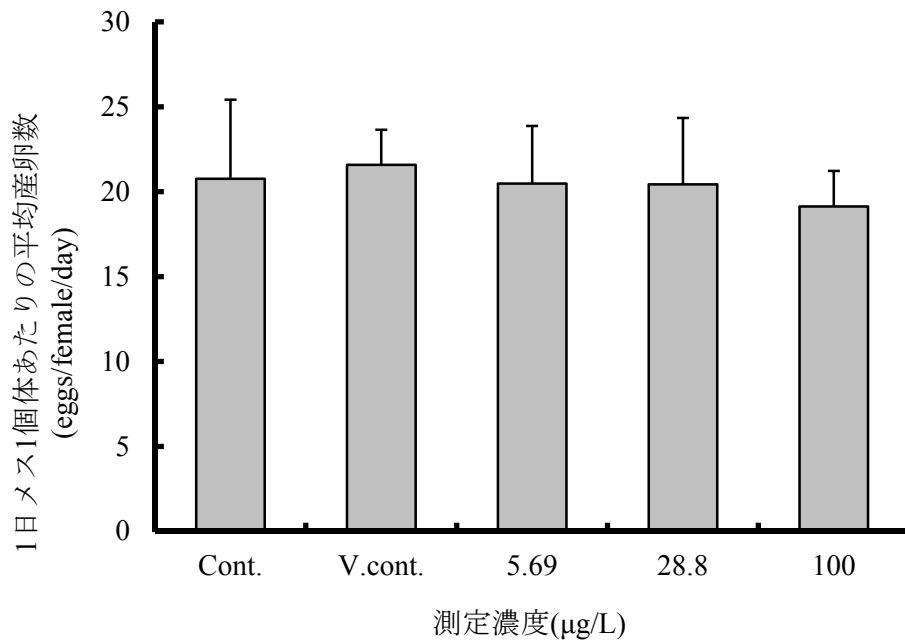


図1 各試験区における1日メス1個体あたりの平均産卵数.
各データは容器平均 ± 標準偏差として示す。

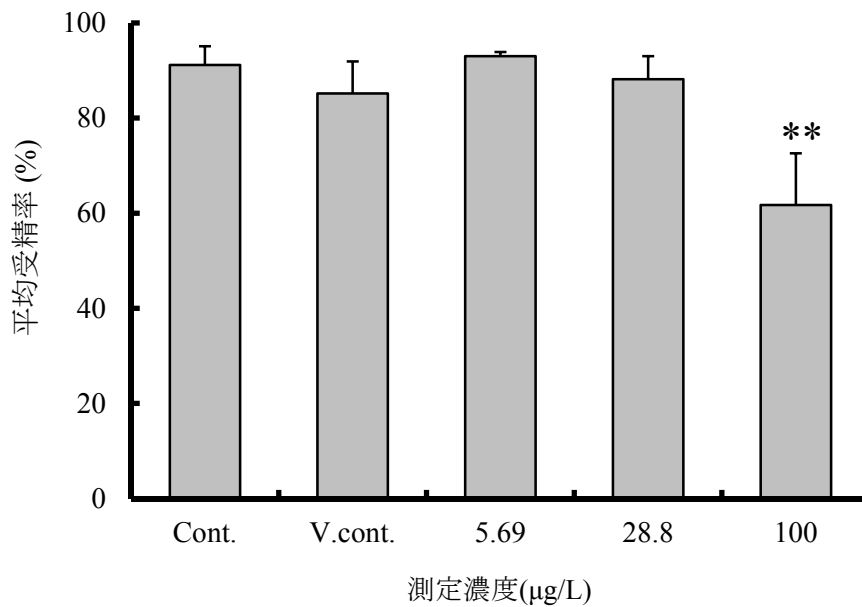


図2 各試験区における平均受精率.
各データは容器平均 ± 標準偏差として示す。
**は $p < 0.01$ で有意であることを示す。

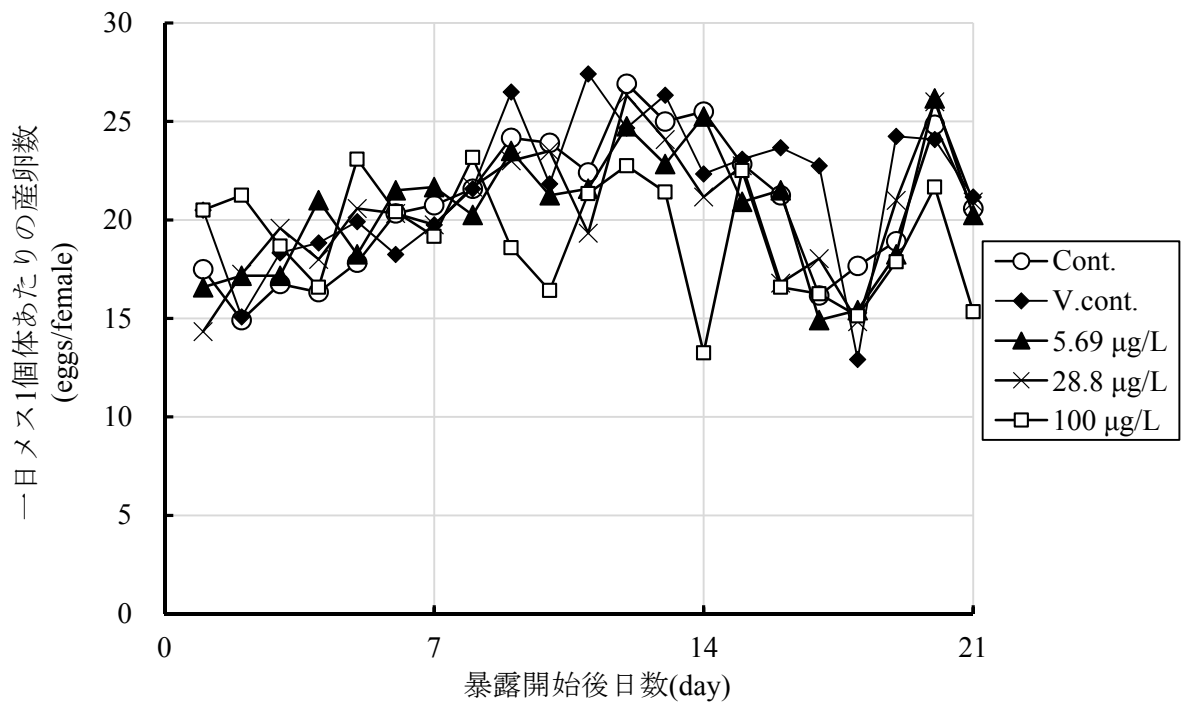


図3 各試験区における一日メス1個体あたりの暴露期間中の総産卵数.

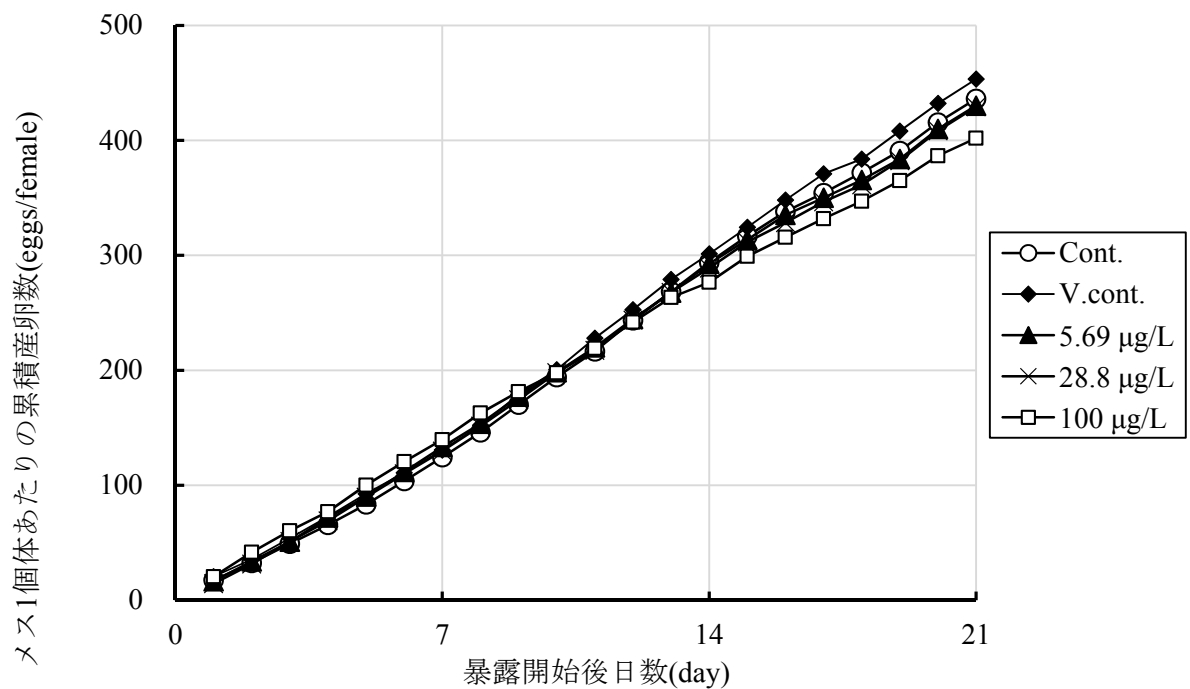


図4 各試験区におけるメス1個体あたりの暴露期間中の累積産卵数.

6.5 暴露終了時の全長及び体重

暴露終了時の各試験濃度区における全長及び体重を表 5 に示す。対照群と比較して、試験濃度区的全長及び体重に濃度依存的な変動傾向は認められなかった。また、有意差検定の結果、いずれの試験濃度区においても対照群と比較して統計学的に有意な低下は認められなかった。

表 5 全長及び体重

測定濃度 ($\mu\text{g/L}$)	全長 (cm)		体重 (mg)	
	オス	メス	オス	メス
対照区	3.18 ± 0.11	3.18 ± 0.12	367 ± 21	393 ± 43
助剤対照区	3.10 ± 0.09	3.12 ± 0.13	342 ± 31	369 ± 52
5.69	3.19 ± 0.07	3.24 ± 0.07	366 ± 25	427 ± 25
28.8	3.22 ± 0.02	3.31 ± 0.09	393 ± 20	455 ± 46
100	3.19 ± 0.07	3.14 ± 0.08	389 ± 28	423 ± 30

各データは容器平均 \pm 標準偏差で示す。

6.6 暴露終了時の肝臓体指数、生殖腺体指数

暴露終了時の各試験濃度区における肝臓体指数及び生殖腺体指数を表 6 に示す。対照群と比較して、試験濃度区の肝臓体指数及び生殖腺体指数について濃度依存的な変動傾向は認められなかった。また、有意差検定の結果、いずれの試験濃度区においても対照群と比較して統計学的に有意な差は認められなかった。

表 6 肝臓体指数、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
対照区	2.52 ± 0.39	3.75 ± 0.75	0.736 ± 0.225	10.6 ± 1.2
助剤対照区	2.79 ± 0.45	3.85 ± 0.34	0.647 ± 0.101	10.6 ± 1.0
5.69	2.69 ± 0.16	4.51 ± 0.70	0.635 ± 0.106	10.7 ± 0.8
28.8	2.72 ± 0.28	4.73 ± 0.58	0.554 ± 0.112	11.3 ± 0.8
100	2.85 ± 0.45	4.38 ± 1.04	0.603 ± 0.200	9.71 ± 0.34

各データは容器平均 \pm 標準偏差で示す。

6.7 暴露終了時の二次性徴（乳頭状小突起を有する節板数）

暴露終了時の二次性徴について、乳頭状小突起を有する節板数の各試験濃度区における平均値を表7に示す。オス個体でみられた乳頭状小突起を有する節板数に統計学的な有意差は認められなかった。また、メス個体の尻鰭に乳頭状小突起の発生は認められなかった。

表7 二次性徴

測定濃度 ($\mu\text{g/L}$)	乳頭状小突起を有する節板数	
	オス	メス
対照区	87.2 \pm 6.7	0
助剤対照区	80.2 \pm 7.4	0
5.69	84.7 \pm 10.6	0
28.8	79.8 \pm 8.2	0
100	79.9 \pm 12.6	0

各データは容器平均 \pm 標準偏差で示す。

6.8 肝臓中ビテロジェニン濃度

暴露終了時の各試験濃度区における肝臓中ビテロジェニン濃度を表8に示す。

オス個体において、対照区及び5.69 $\mu\text{g/L}$ 区の肝臓中ビテロジェニン濃度は全個体において定量下限値未満であった。28.8 $\mu\text{g/L}$ 区ではわずかに増加傾向がみられ、100 $\mu\text{g/L}$ 区ではメス個体の肝臓中ビテロジェニン濃度と同レベルの濃度が検出された。メス個体では全試験区においてビテロジェニンが検出され、著しくはないものの濃度依存的な増加傾向がみられた。これらの結果について有意差検定を行ったところ、オスの100 $\mu\text{g/L}$ 区において対照群と比較して統計学的に有意な差が認められた。その他の試験濃度区では統計学的な有意差は認められなかった。暴露終了時の雌雄の肝臓中ビテロジェニン濃度のグラフを図5に示す。

表8 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 ($\text{ng/mg liver weight}$)	
	オス	メス
対照区	n.d.	570 \pm 248
助剤対照区	1.38 \pm 1.03	515 \pm 328
5.69	n.d.	649 \pm 200
28.8	5.74 \pm 6.60	933 \pm 692
100	774 \pm 290 **	813 \pm 157

n.d.は定量下限 (1.00 $\text{ng/mg liver weight}$) 未満であることを示す。
各データは容器平均 \pm 標準偏差で示す。定量下限値未満の個体は定量
下限の半値を用いて平均値及び標準偏差を算出した。

**は $p < 0.01$ で有意であることを示す。

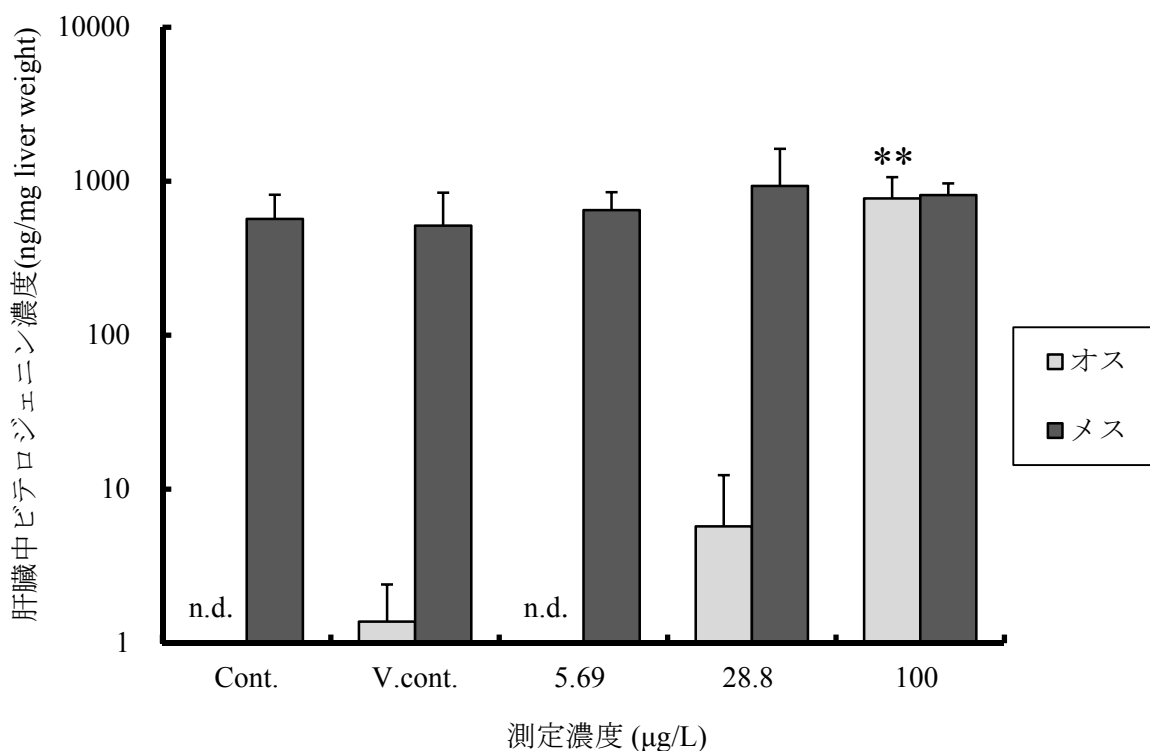


図5 各試験区における肝臓中ビテロジェニン濃度.

各データは容器平均 \pm 標準偏差として示す。

n.d.は定量下限 (1.00 $\text{ng/mg liver weight}$) 未満であることを示す。

**は $p < 0.01$ で有意であることを示す。

7. まとめと考察

ペンディメタリンを用いた魚類短期繁殖試験を実施した結果、暴露期間中に測定した試験液中の被験物質濃度は、平均測定濃度が 100、28.8 及び 5.69 µg/L であり、それぞれ設定濃度に対して 50.2、72.0 及び 71.1%であった。いずれの試験濃度区においても、試験液中の被験物質濃度は平均測定濃度の±20%以内に維持されていた。暴露期間中、対照区及び 28.8 µg/L 区においてそれぞれ 1 個体、100 µg/L 区において 2 個体の死亡がみられたが、対照群と試験濃度区の死亡率に統計学的な有意差は認められなかった。また、暴露期間中の産卵数についても対照群と試験濃度区に統計学的な有意差は認められず、メス 1 個体あたりの累積産卵数は対照群と同様の推移を示した。しかしながら、受精率については、100 µg/L 区において対照群と比較して有意な低下を示した。暴露終了時における試験濃度区にの全長、体重、肝臓体指数、生殖腺体指数、二次性徴については、対照群と比較して統計学的に有意な差はみられなかった。肝臓中ビテロジェニン濃度については、メスでは対照群と試験濃度区に統計学的に有意な差はみられなかったが、オスの 100 µg/L 区では対照群と比較してビテロジェニン濃度の有意な増加が認められた。その他の試験濃度区においては対照区と比較して統計学的に有意な差は認められなかった。各エンドポイントにおける LOEC 及び NOEC を表 9 に示す。

表 9 各エンドポイントにおける影響のまとめ

エンドポイント		LOEC (µg/L)	NOEC (µg/L)
死亡率	オス	> 100	≥ 100
	メス	> 100	≥ 100
産卵数		> 100	≥ 100
受精率		↓ 100	28.8
全長	オス	> 100	≥ 100
	メス	> 100	≥ 100
体重	オス	> 100	≥ 100
	メス	> 100	≥ 100
肝臓体指数	オス	> 100	≥ 100
	メス	> 100	≥ 100
生殖腺体指数	オス	> 100	≥ 100
	メス	> 100	≥ 100
二次性徴	オス	> 100	≥ 100
	メス	> 100	≥ 100
肝臓中ビテロジェニン濃度	オス	↑ 100	28.8
	メス	> 100	≥ 100

矢印は統計学的に有意に増加あるいは減少したことを示す。

本試験の結果、ペンディメタリンは100 µg/Lでオス個体の肝臓中ビテロジェニン濃度を有意に上昇させた。28.8 µg/Lにおいてもオス個体の肝臓中ビテロジェニン濃度が上昇しているように見えるものの、統計学的に有意な差は認められなかった。ペンディメタリンのレポータージーンアッセイの結果、ペンディメタリンは試験管内試験においてメダカエストロゲンレセプターへの結合が確認されており⁵⁾本試験においてオス個体の肝臓中ビテロジェニン濃度を有意に上昇させたことから、本試験においてペンディメタリンはオスのメダカに対してエストロゲン様の内分泌かく乱作用を示したものと考えられた。

ペンディメタリンのメダカエストロゲンレセプターへの活性比は17β-エストラジオールの0.0050%であり⁵⁾、17β-エストラジオールのOECD TG229の結果⁶⁾と単純に比較して推定した影響濃度は10 mg/L付近と本試験濃度よりも高い値であったが、本試験結果としては平均測定濃度100 µg/Lにおいてビテロジェニン濃度の上昇が認められた。この理由としては、ペンディメタリンは生物濃縮性が比較的高く、試験濃度区では魚体や卵黄の着色が観察されていたことから、暴露終盤におけるペンディメタリンのメダカの体内濃度は試験液中の濃度よりも高濃度であった可能性が考えられた。

本試験では、100 µg/L区において受精率の有意な低下が認められ、ペンディメタリンのエストロゲン活性が作用した可能性が考えられた。しかしながら、100 µg/L区ではペンディメタリンによる魚体の着色が顕著であり、統計学的に有意ではないものの2個体の死亡も観察されたことから、100 µg/L区での受精率の有意な低下は内分泌かく乱作用だけでなく、ペンディメタリンの毒性が影響した可能性が考えられる。

以上の結果より、ペンディメタリンはメダカに対してエストロゲン様の内分泌かく乱作用を示すことが示唆された。ペンディメタリンの魚類短期繁殖試験におけるLOEC及びNOECは、受精率及びオスの肝臓中ビテロジェニン濃度において100及び28.8 µg/Lであった。

なお、ペンディメタリンの環境中濃度は、平成19年度モニタリング調査において12地点で不検出（検出下限値0.0014 µg/L）であった¹⁾。また、水産動植物の被害防止に係る農薬登録保留基準で算出された非水田PEC_{Tier1}は0.017µg/L²⁾であり、この値は今回得られたNOECの約1/2000の濃度であった。

8. 引用文献

- 1) 環境省（2018）、平成 30 年度第 1 回 EXTEND2016 化学物質の内分泌かく乱作用に関する検討会、資料 3-2 生態影響評価のための第 1 段階生物試験の候補物質について(案)
- 2) 環境省（2009）、水産動植物の被害防止に係る農薬登録保留基準 として環境大臣の定める基準の設定に関する資料 (案) ペンディメタリン
- 3) 和光純薬工業、検査成績書 ペンディメタリン標準品（製品コード：168-11903）
- 4) OECD (2019), OECD SERIES ON TESTING AND ASSESSMENT Number 23 (Second Edition), GUIDANCE DOCUMENT AQUEOUS-PHASE AQUATIC TOXICITY TESTING OF DIFFICULT TEST CHEMICALS
- 5) 環境省（2018）、平成 29 年度度第 2 回 EXTEND2016 化学物質の内分泌かく乱作用に関する検討会、資料 2-1 平成 29 年度第 1 段階試験管内試験(レポータージーン試験)の実施結果について(案)
- 6) 環境省（2017）、平成 29 年度度第 1 回 EXTEND2016 化学物質の内分泌かく乱作用に関する検討会、資料 2-1 生態影響評価のための第 1 段階試験について(案)
- 7) OECD (2000), OECD SERIES ON TESTING AND ASSESSMENT Number 54, Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicity data: a guidance to application

付属資料

ペンディメタリンによる魚類短期繁殖試験の条件及び結果

試験条件

1. 被験物質の分析

付表 1 被験物質濃度測定結果

2. 症状の観察項目

付表 2 観察項目

試験結果

付表 3 試験液の水質

付表 4 暴露期間中の産卵数及び受精率

付表 5 暴露終了時の全長、体重、二次性徴、肝臓体指数（HSI）、
生殖腺体指数（GSI）

付表 6 暴露終了時の肝臓中ピテロジェニン濃度

希积水の水質

1. 被験物質の分析

1.1 試験液の前処理法

採取した試験液を分析用試料とし、最終試料の組成がメタノール/脱塩素水道水 (1/1 v/v) になるように適宜希釈して液体クロマトグラフィー質量分析法 (LC-MS) 試料を調製した。

1.2 被験物質の定量分析

a) 定量方法

被験物質の定量は 1 濃度の標準溶液を用いた絶対検量線法で行った。

本定量方法の有効性を確認するために、c)の標準溶液と同様に調製した 0.0993、0.993、1.99 及び 4.97 µg/L の 4 濃度の標準溶液を用いて検量線を作成した。その結果、クロマトグラム上のピーク面積と濃度により作成した検量線の回帰式が原点を通る直線であったことから、本定量方法は有効であった。

分析試料中の被験物質の定量下限値は、定量性が確認された範囲での標準溶液の最低濃度 (0.0993 µg/L) とした。よって、試験液中の被験物質の定量下限値は前処理操作 (最低希釈倍率 : 2 倍) を考慮して 0.199 µg/L とした。

b) 分析条件

機 器	液体クロマトグラフ質量分析計
液体クロマトグラフ	Nexera X2 (島津製作所)
質量分析計	LCMS-8060 (島津製作所)

液体クロマトグラフ条件

カラム	L-column2 ODS (150 mm × 2.1 mm I.D., 粒子径 5 µm, 化学物質評価研究機構)
カラム温度	40°C
溶離液	A (10%) : 超純水/ぎ酸 (1000/1 v/v) B (90%) : メタノール/ぎ酸 (1000/1 v/v)
流 量	0.2 mL/min
注入量	20 µL

質量分析計条件

イオン化法	エレクトロスプレーイオン化法 (ESI)
検出イオン	正イオン
検出法	選択イオンモニタリング (SIM)
インターフェイス温度	300°C
DL 温度	240°C
ネブライザーガス流量	1.50 L/min
ドライイングガス流量	10.00 L/min
測定イオン(m/z)	282.2

c) 標準溶液の調製及び被験物質濃度の算出

供試試料 10.0 mg を電子分析天びんで正確にはかりとり、メタノールに溶解して 99.3 mg/L の被験物質溶液を調製した。これをメタノール/脱塩素水道水 (1/1 v/v) で希釈して 0.0993 mg/L の被験物質溶液を調製した。さらにこれをメタノール/脱塩素水道水 (1/1 v/v) で希釈して 1.99 µg/L の標準溶液を調製した。

LC-MS 試料中の被験物質濃度は、標準溶液及び LC-MS 試料のクロマトグラム上で得られるピーク面積を比較し、比例計算して求めた。

1.4 被験物質濃度測定結果

付表 1 被験物質濃度測定結果

設定濃度 ($\mu\text{g/L}$)	容器	試験液中の被験物質濃度 ($\mu\text{g/L}$)				算術平均
		0日後	7日後	14日後	終了時	
対照区	A	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	B	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
	C	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
	D	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
	平均	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
助剤 対照区	A	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	B	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
	C	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
	D	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
	平均	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
8.00	A	5.62	5.83	5.59	5.29	5.69
	B	5.71	6.23	5.83	5.22	
	C	5.80	5.99	5.95	5.51	
	D	5.77	5.83	5.73	5.14	
	平均	5.72	5.97	5.77	5.29	
40.0	A	27.6	28.7	28.3	22.8	28.8
	B	28.7	29.6	27.9	27.3	
	C	33.0	30.9	30.2	24.7	
	D	29.5	33.2	33.5	25.2	
	平均	29.7	30.6	30.0	25.0	
200	A	95.7	120	80.4	68.1	100
	B	98.4	132	94.2	78.7	
	C	96.7	127	98.4	102	
	D	109	127	98.1	82.0	
	平均	100	126	92.8	82.7	

n.d. : < 0.199 $\mu\text{g/L}$

算術平均値は以下の式から算出した:

$$(C_0 + C_7 + C_{14} + C_{21}) / 4$$

ここで、

C_0 : 暴露開始時の測定濃度

C_n : 暴露 n 日後の測定濃度

2. 死亡及び症状の観察項目

症状の観察項目は以下の通りであった。

付表2 観察項目

行動異常	外観異常
表層集中	胸鰭の前方拡張
平衡喪失	眼球突出
活動度低下	腹部膨満
過呼吸	体色明化及び暗化
嗜眠状態	粘液過剰分泌
過敏	粘液凝固
狂奔	出血
鰓内洗浄運動	体幹彎曲
呼吸数増加及び減少	立鱗
筋肉痙攣	
摂餌活動低下	

付表3 試験液の水質

測定濃度 ($\mu\text{g/L}$)	容器	溶存酸素濃度 ($\mu\text{g/L}$)				水温 ($^{\circ}\text{C}$)				pH			
		0日後	7日後	14日後	21日後	0日後	7日後	14日後	21日後	0日後	7日後	14日後	21日後
対照区	A	8.7	6.8	7.1	7.7	25.1	25.5	25.3	25.2	8.0	7.5	7.5	7.5
	B	8.7	7.0	7.1	7.8	25.1	25.5	25.3	25.1	8.0	7.5	7.5	7.6
	C	8.7	7.3	6.7	7.9	25.0	25.5	25.2	25.0	8.0	7.6	7.5	7.6
	D	8.7	7.0	6.7	7.8	25.0	25.4	25.2	25.0	8.0	7.5	7.5	7.6
助剤 対照区	A	8.7	7.2	7.3	7.5	25.1	25.5	25.2	25.1	8.1	7.6	7.6	7.6
	B	8.7	7.2	7.3	7.4	25.1	25.5	25.2	25.0	8.1	7.6	7.6	7.6
	C	8.7	7.2	6.7	7.7	25.1	25.5	25.2	25.0	8.0	7.6	7.5	7.6
	D	8.7	7.3	6.9	7.6	25.1	25.5	25.2	25.1	8.0	7.6	7.5	7.6
5.69	A	8.7	7.1	7.5	7.4	25.0	25.5	25.2	25.1	8.1	7.6	7.6	7.6
	B	8.7	7.1	6.9	7.3	25.0	25.5	25.2	25.1	8.1	7.6	7.6	7.6
	C	8.7	7.1	6.8	6.7	25.0	25.5	25.2	25.0	8.1	7.6	7.5	7.6
	D	8.7	7.3	7.5	7.0	25.1	25.5	25.2	25.0	8.1	7.6	7.5	7.6
28.8	A	8.7	6.8	6.8	6.7	25.0	25.5	25.3	25.1	8.1	7.6	7.5	7.5
	B	8.7	7.3	7.0	7.3	25.0	25.4	25.3	25.0	8.1	7.7	7.5	7.6
	C	8.7	6.8	6.7	7.3	25.0	25.4	25.3	25.0	8.1	7.6	7.5	7.6
	D	8.7	7.0	7.5	7.3	25.1	25.4	25.2	25.0	8.1	7.6	7.6	7.6
100	A	8.7	7.1	7.3	7.0	25.0	25.4	25.2	25.0	8.1	7.6	7.6	7.6
	B	8.7	6.8	7.1	7.3	25.0	25.4	25.2	25.0	8.1	7.6	7.5	7.6
	C	8.7	7.0	7.1	8.0	25.0	25.4	25.2	25.0	8.1	7.5	7.5	7.6
	D	8.7	6.9	7.1	6.6	25.0	25.4	25.2	25.0	8.1	7.5	7.5	7.6

測定濃度 ($\mu\text{g/L}$)	容器	全硬度 (mgCaCO_3/L)				アルカリ度 (mgCaCO_3/L)			
		0日後	7日後	14日後	21日後	0日後	7日後	14日後	21日後
対照区	A	44.0	46.4	43.4	45.8	40.0	42.0	43.8	41.6
100	A	44.6	45.4	44.4	44.2	39.6	42.6	41.0	40.4

付表 4 暴露期間中の産卵数及び受精率

測定 濃度 (µg/L)	容器	産卵数 (個) 上段：受精卵数 中段：未受精卵数 下段：受精率 (%)																				受精卵計	総産卵数	容器平均 ± 標準偏差	
		暴露日数 (日)																				未受精卵計			
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21			(平均受精率)
対照区	A	58	36	45	54	58	58	72	73	79	79	76	71	61	86	60	72	46	53	68	79	75	1359	1584	総産卵数 1309 ± 293 受精率 (91.2) ± 4.0
		2	20	4	9	4	14	3	8	8	7	9	16	36	23	12	14	9	4	9	12	2	225		
		96.7	64.3	91.8	85.7	93.5	80.6	96.0	90.1	90.8	91.9	89.4	81.6	62.9	78.9	83.3	83.7	83.6	93.0	88.3	86.8	97.4	(86.2)		
	B	70	41	58	59	48	74	69	68	85	80	84	82	75	78	75	67	65	49	62	78	65	1432	1518	
		0	5	1	4	6	2	0	8	3	1	2	4	10	5	13	0	1	2	4	9	6	86		
		100	89.1	98.3	93.7	88.9	97.4	100	89.5	96.6	98.8	97.7	95.3	88.2	94.0	85.2	100	98.5	96.1	93.9	89.7	91.5	(94.4)		
	C	50	30	40	28	52	49	52	49	64	55	50	101	67	59	63	48	44	51	37	62	48	1099	1168	
		2	3	2	6	0	2	2	6	0	5	1	14	0	4	2	2	1	7	1	9	0	69		
		96.2	90.9	95.2	82.4	100	96.1	96.3	89.1	100	91.7	98.0	87.8	100	93.7	96.9	96.0	97.8	87.9	97.4	87.3	100	(94.3)		
	D	28	41	49	32	33	36	48	45	43	55	42	30	45	46	48	49	24	43	42	39	48	866	964	
		0	3	2	4	13	9	3	2	8	5	5	5	6	5	1	3	4	3	4	10	3	98		
		100	93.2	96.1	88.9	71.7	80.0	94.1	95.7	84.3	91.7	89.4	85.7	88.2	90.2	98.0	94.2	85.7	93.5	91.3	79.6	94.1	(89.8)		
助剤 対照区	A	42	4	47	48	46	32	52	74	67	71	77	56	83	81	62	81	70	41	87	84	48	1253	1383	
		2	3	3	7	1	8	7	8	12	4	8	10	7	5	2	0	8	1	7	2	25	130		
		95.5	57.1	94.0	87.3	97.9	80.0	88.1	90.2	84.8	94.7	90.6	84.8	92.2	94.2	96.9	100	89.7	97.6	92.6	97.7	65.8	(89.1)		
	B	64	51	50	63	66	67	73	22	86	85	35	65	50	41	47	64	76	30	85	88	45	1253	1535	
		4	5	12	3	0	6	4	3	7	2	37	30	49	40	26	7	1	2	11	5	28	282		
		94.1	91.1	80.6	95.5	100	91.8	94.8	88.0	92.5	97.7	48.6	68.4	50.5	50.6	64.4	90.1	98.7	93.8	88.5	94.6	61.6	(82.7)		
	C	42	46	30	36	38	66	40	78	49	55	60	48	55	55	89	48	40	17	26	14	43	975	1252	
		11	3	9	1	16	5	14	9	3	1	28	19	34	13	20	9	18	15	16	20	13	277		
		79.2	93.9	76.9	97.3	70.4	93.0	74.1	89.7	94.2	98.2	68.2	71.6	61.8	80.9	81.7	84.2	69.0	53.1	61.9	41.2	76.8	(77.0)		
	D	80	59	44	64	70	32	44	62	94	42	81	64	33	32	31	59	56	45	50	73	51	1166	1269	
		1	10	25	4	2	3	3	3	0	2	3	4	5	1	0	16	4	4	9	3	1	103		
		98.8	85.5	63.8	94.1	97.2	91.4	93.6	95.4	100	95.5	96.4	94.1	86.8	97.0	100	78.7	93.3	91.8	84.7	96.1	98.1	(92.0)		

付表4 (続き) 暴露期間中の産卵数及び受精率

測定濃度 (µg/L)	容器	産卵数 (個) 上段:受精卵数 中段:未受精卵数 下段:受精率(%)																				受精卵計	総産卵数	容器平均 ± 標準偏差	
		暴露日数 (日)																				未受精卵計			
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21			(平均受精率)
5.69	A	51	69	52	65	65	49	72	57	60	60	64	85	63	58	51	55	24	41	32	69	37	1179	1268	総産卵数 1291 ± 214
		1	0	3	3	0	18	4	0	5	5	2	8	2	5	6	1	0	2	7	7	10	89		
		98.1	100	94.5	95.6	100	73.1	94.7	100	92.3	92.3	97.0	91.4	96.9	92.1	89.5	98.2	100	95.3	82.1	90.8	78.7	(93.0)		
	B	48	38	32	67	45	61	67	41	69	62	52	60	64	69	49	59	42	52	46	76	50	1149	1229	受精率 (93.0) ± 0.9
		6	1	7	1	1	6	2	8	1	3	6	6	3	5	4	1	2	2	10	2	3	80		
		88.9	97.4	82.1	98.5	97.8	91.0	97.1	83.7	98.6	95.4	89.7	90.9	95.5	93.2	92.5	98.3	95.5	96.3	82.1	97.4	94.3	(93.2)		
	C	36	43	43	46	43	37	44	55	44	48	49	52	50	66	42	58	52	39	54	53	50	1004	1078	受精率 (93.0) ± 0.9
		1	0	1	0	2	0	1	2	4	2	2	3	3	6	3	0	2	2	11	22	7	74		
		97.3	100	97.7	100	95.6	100	97.8	96.5	91.7	96.0	96.1	94.5	94.3	91.7	93.3	100	96.3	95.1	83.1	70.7	87.7	(94.1)		
	D	46	46	65	66	49	84	64	76	89	75	73	81	87	84	89	81	55	45	50	75	85	1465	1587	受精率 (93.0) ± 0.9
		10	9	3	4	14	3	6	4	10	0	11	2	2	10	7	3	2	2	9	10	1	122		
		82.1	83.6	95.6	94.3	77.8	96.6	91.4	95.0	89.9	100	86.9	97.6	97.8	89.4	92.7	96.4	96.5	95.7	84.7	88.2	98.8	(92.0)		
28.8	A	37	51	35	37	35	57	44	63	58	58	46	63	38	42	44	52	33	28	38	55	12	926	1113	総産卵数 1255 ± 239
		7	1	12	8	16	0	6	1	12	10	15	13	7	2	22	5	4	11	8	5	22	187		
		84.1	98.1	74.5	82.2	68.6	100	88.0	98.4	82.9	85.3	75.4	82.9	84.4	95.5	66.7	91.2	89.2	71.8	82.6	91.7	35.3	(82.3)		
	B	36	36	77	54	65	64	60	56	70	64	48	85	80	60	62	28	41	31	42	56	54	1169	1246	受精率 (88.2) ± 4.9
		2	0	6	6	4	4	1	6	2	4	2	7	2	13	4	3	4	1	0	0	6	77		
		94.7	100	92.8	90.0	94.2	94.1	98.4	90.3	97.2	94.1	96.0	92.4	97.6	82.2	93.9	90.3	91.1	96.9	100	100	90.0	(94.1)		
	C	57	69	53	44	75	58	68	76	72	70	59	85	91	81	72	26	62	48	77	91	61	1395	1594	受精率 (88.2) ± 4.9
		2	4	14	0	5	5	9	3	5	13	13	14	7	7	12	35	3	7	11	8	22	199		
		96.6	94.5	79.1	100	93.8	92.1	88.3	96.2	93.5	84.3	81.9	85.9	92.9	92.0	85.7	42.6	95.4	87.3	87.5	91.9	73.5	(87.4)		
	D	31	46	38	64	42	56	44	48	46	47	43	44	51	43	55	33	41	32	46	59	33	942	1065	受精率 (88.2) ± 4.9
		0	0	0	3	5	0	5	7	11	16	6	5	13	6	2	4	6	4	9	10	11	123		
		100	100	100	95.5	89.4	100	89.8	87.3	80.7	74.6	87.8	89.8	79.7	87.8	96.5	89.2	87.2	88.9	83.6	85.5	75.0	(89.0)		

付表4 (続き) 暴露期間中の産卵数及び受精率

測定 濃度 (µg/L)	容器	産卵数 (個) 上段:受精卵数 中段:未受精卵数 下段:受精率(%)																				受精卵計	総産卵数	容器平均 ± 標準偏差	
		暴露日数 (日)																				未受精卵計			
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21			(平均受精率)
100	A	59	62	53	34	64	57	28	29	47	35	40	67	29	53	44	41	34	17	26	36	33	888	1238	総産卵数 1166 ± 55
		0	3	12	9	18	6	28	33	10	42	18	25	50	5	6	1	12	14	25	26	7	350		
		100	95.4	81.5	79.1	78.0	90.5	50.0	46.8	82.5	45.5	69.0	72.8	36.7	91.4	88.0	97.6	73.9	54.8	51.0	58.1	82.5	(72.6)		
	B	67	40	34	39	30	49	19	54	25	36	46	40	25	34	31	34	42	22	23	37	25	752	1178	受精率 (61.7) ± 10.9
		2	22	22	8	28	5	25	13	21	7	32	24	40	7	43	13	20	30	20	29	15	426		
		97.1	64.5	60.7	83.0	51.7	90.7	43.2	80.6	54.3	83.7	59.0	62.5	38.5	82.9	41.9	72.3	67.7	42.3	53.5	56.1	62.5	(64.2)		
	C	39	43	32	20	42	55	49	43	31	44	44	8	37	12	60	22	4	15	33	38	47	718	1116	受精率 (61.7) ± 10.9
		5	18	2	16	17	3	19	26	16	6	23	51	25	12	26	22	32	31	24	20	4	398		
		88.6	70.5	94.1	55.6	71.2	94.8	72.1	62.3	66.0	88.0	65.7	13.6	59.7	50.0	69.8	50.0	11.1	32.6	57.9	65.5	92.2	(63.4)		
	D	70	59	38	14	13	54	44	31	13	18	27	47	8	15	20	34	9	10	10	12	0	546	1130	受精率 (61.7) ± 10.9
		4	8	31	59	65	16	18	49	60	9	26	11	43	21	15	11	19	27	28	31	33	584		
		94.6	88.1	55.1	19.2	16.7	77.1	71.0	38.8	17.8	66.7	50.9	81.0	15.7	41.7	57.1	75.6	32.1	27.0	26.3	27.9	.0	(46.7)		

付表5 暴露終了時の全長、体重、二次性徴、肝臓体指数（HSI）、生殖腺体指数（GSI）

容器	個体 番号	測定濃度 (µg/L)																			
		対照区										助剤対照区									
		オス					メス					オス					メス				
		全長 (cm)	体重 (mg)	二次 性徴	HSI (%)	GSI (%)	全長 (cm)	体重 (mg)	二次 性徴	HSI (%)	GSI (%)	全長 (cm)	体重 (mg)	二次 性徴	HSI (%)	GSI (%)	全長 (cm)	体重 (mg)	二次 性徴	HSI (%)	GSI (%)
A	1	3.22	398	90	3.06	1.00	3.40	393	0	4.66	11.0	3.17	401	54	2.95	0.524	2.81	265	0	3.77	6.97
	2	3.11	354	75	3.33	0.819	3.30	476	0	4.31	12.7	3.12	282	84	1.99	0.497	3.05	338	0	3.55	9.24
	3	3.13	316	76	2.69	0.506	3.32	473	0	4.66	10.5	3.27	436	83	3.32	0.825	3.41	511	0	4.64	12.4
B	4	3.06	362	77	2.52	0.332	3.39	539	0	3.86	12.2	3.06	358	96	3.41	0.419	3.15	413	0	4.82	10.8
	5	3.01	329	96	1.67	0.486	3.07	300	0	3.40	8.33	3.06	362	76	4.53	0.801	3.36	470	0	3.98	12.8
	6	-	-	-	-	-	3.08	350	0	5.34	13.1	3.25	341	92	2.37	0.703	3.23	432	0	3.85	12.5
C	7	3.32	482	83	2.90	0.912	3.01	341	0	3.58	9.66	2.86	247	77	2.43	0.647	3.04	304	0	3.49	10.1
	8	3.28	425	91	1.79	0.942	3.08	333	0	2.58	8.01	2.89	305	73	2.98	0.557	2.94	305	0	3.61	8.67
	9	3.16	275	115	2.55	0.691	3.11	351	0	2.62	8.64	3.19	348	72	1.92	0.431	2.85	329	0	4.20	12.2
D	10	3.33	386	116	2.54	0.778	3.17	431	0	2.53	11.8	2.99	310	87	2.26	0.646	3.35	395	0	3.72	11.7
	11	3.19	337	66	2.58	1.37	2.99	333	0	2.97	12.8	3.11	344	69	3.20	0.785	3.21	349	0	3.79	12.4
	12	3.27	393	75	2.50	0.586	3.22	392	0	4.49	8.82	3.20	367	99	2.10	0.927	3.00	314	0	2.77	7.03
A 容器平均		3.15	356	80.3	3.03	0.777	3.34	447	0	4.54	11.4	3.19	373	73.7	2.75	0.616	3.09	371	0	3.99	9.55
B 容器平均		3.04	346	86.5	2.09	0.409	3.18	397	0	4.20	11.2	3.12	354	88.0	3.44	0.641	3.25	438	0	4.22	12.0
C 容器平均		3.25	394	96.3	2.41	0.849	3.07	342	0	2.93	8.77	2.98	300	74.0	2.44	0.545	2.94	312	0	3.77	10.3
D 容器平均		3.26	372	85.7	2.54	0.910	3.13	386	0	3.33	11.1	3.10	340	85.0	2.52	0.786	3.19	353	0	3.43	10.4
試験区平均		3.18	367	87.2	2.52	0.736	3.18	393	0	3.75	10.6	3.10	342	80.2	2.79	0.647	3.12	369	0	3.85	10.6
標準偏差		0.11	21	6.7	0.39	0.225	0.12	43	0	0.75	1.2	0.09	31	7.4	0.45	0.101	0.13	52	0	0.34	1.0

-は暴露終了時に死亡していたことを示す。

付表5 (続き) 暴露終了時の全長、体重、二次性徴、肝臓体指数 (HSI)、生殖腺体指数 (GSI)

容器	個体 番号	測定濃度 (µg/L)																			
		5.69										28.8									
		オス					メス					オス					メス				
		全長 (cm)	体重 (mg)	二次 性徴	HSI (%)	GSI (%)	全長 (cm)	体重 (mg)	二次 性徴	HSI (%)	GSI (%)	全長 (cm)	体重 (mg)	二次 性徴	HSI (%)	GSI (%)	全長 (cm)	体重 (mg)	二次 性徴	HSI (%)	GSI (%)
A	1	3.20	351	89	2.45	0.911	3.10	432	0	2.78	10.4	3.16	408	103	2.94	0.392	3.31	473	0	4.61	11.0
	2	3.18	330	68	2.00	0.364	3.30	423	0	6.13	12.0	3.25	406	80	3.52	0.861	3.15	401	0	4.12	11.9
	3	3.43	422	83	3.39	0.474	3.28	484	0	4.44	7.25	3.30	437	93	2.65	0.412	3.22	457	0	5.07	11.0
B	4	3.18	387	95	2.30	0.802	3.20	356	0	5.12	8.77	3.40	471	90	2.15	0.319	3.26	378	0	3.73	9.63
	5	3.02	338	90	3.55	0.355	3.10	379	0	4.46	10.5	3.19	352	86	2.27	0.455	3.23	415	0	4.29	11.3
	6	3.28	416	85	2.91	0.457	3.18	442	0	3.48	12.4	3.07	383	52	3.97	0.417	-	-	-	-	-
C	7	2.86	269	68	2.38	0.595	3.21	357	0	4.04	9.28	3.11	360	79	3.28	0.639	3.44	519	0	4.22	13.5
	8	3.31	376	67	3.06	0.825	3.22	449	0	3.45	12.3	3.22	394	71	2.01	0.787	3.34	451	0	5.24	12.9
	9	3.15	345	82	2.55	0.926	3.34	468	0	3.85	14.2	3.24	373	76	2.71	0.510	3.31	462	0	5.23	11.0
D	10	3.40	449	84	2.43	0.801	3.43	537	0	5.74	11.2	3.29	387	85	2.77	0.647	3.31	438	0	5.00	10.2
	11	3.34	395	108	2.56	0.481	3.35	417	0	5.59	11.5	3.17	360	69	2.28	0.638	3.47	509	0	5.50	10.9
	12	2.92	316	97	2.69	0.632	3.19	376	0	5.02	8.77	3.19	383	73	2.06	0.574	3.47	559	0	5.69	12.4
A 容器平均		3.27	368	80.0	2.61	0.583	3.23	446	0	4.45	9.89	3.24	417	92.0	3.04	0.555	3.23	444	0	4.60	11.3
B 容器平均		3.16	380	90.0	2.92	0.538	3.16	392	0	4.35	10.6	3.22	402	76.0	2.79	0.397	3.25	397	0	4.01	10.4
C 容器平均		3.11	330	72.3	2.66	0.782	3.26	425	0	3.78	11.9	3.19	375	75.3	2.67	0.645	3.36	477	0	4.90	12.5
D 容器平均		3.22	387	96.3	2.56	0.638	3.32	443	0	5.45	10.5	3.22	377	75.7	2.37	0.620	3.42	502	0	5.40	11.2
試験区平均		3.19	366	84.7	2.69	0.635	3.24	427	0	4.51	10.7	3.22	393	79.8	2.72	0.554	3.31	455	0	4.73	11.3
標準偏差		0.07	25	10.6	0.16	0.106	0.07	25	0	0.70	0.8	0.02	20	8.2	0.28	0.112	0.09	46	0	0.58	0.8

-は暴露終了時に死亡していたことを示す。

付表5（続き） 暴露終了時の全長、体重、二次性徴、肝臓体指数（HSI）、生殖腺体指数（GSI）

容器	個体 番号	測定濃度 (µg/L)									
		100									
		オス					メス				
		全長 (cm)	体重 (mg)	二次 性徴	HSI (%)	GSI (%)	全長 (cm)	体重 (mg)	二次 性徴	HSI (%)	GSI (%)
A	1	3.03	413	86	3.41	0.484	3.24	442	0	6.31	9.46
	2	3.17	393	49	3.00	0.382	3.21	487	0	5.19	10.7
	3	3.14	415	105	2.22	0.241	-	-	-	-	-
B	4	3.15	339	95	2.51	0.589	3.17	424	0	4.72	9.08
	5	3.32	432	100	2.84	0.463	3.15	373	0	3.88	9.29
	6	-	-	-	-	-	3.00	425	0	3.08	9.55
C	7	3.50	500	74	2.96	0.839	2.99	336	0	4.32	9.17
	8	3.21	398	60	2.36	0.754	3.40	561	0	5.51	10.9
	9	3.07	342	73	1.84	0.906	3.13	382	0	3.75	8.65
D	10	3.15	325	71	2.96	0.709	2.78	315	0	3.71	8.53
	11	2.99	308	59	3.86	0.389	3.37	527	0	4.58	10.4
	12	3.36	421	89	3.54	0.949	3.00	345	0	1.74	10.8
A 容器平均		3.11	407	80.0	2.88	0.369	3.23	465	0	5.75	10.1
B 容器平均		3.24	386	97.5	2.67	0.526	3.11	408	0	3.89	9.31
C 容器平均		3.26	414	69.0	2.39	0.833	3.17	426	0	4.53	9.56
D 容器平均		3.17	351	73.0	3.45	0.682	3.05	396	0	3.34	9.89
試験区平均		3.19	389	79.9	2.85	0.603	3.14	423	0	4.38	9.71
標準偏差		0.07	28	12.6	0.45	0.200	0.08	30	0	1.04	0.34

-は暴露終了時に死亡していたことを示す。

付表6 暴露終了時の肝臓中ビテロジェニン濃度

測定濃度 ($\mu\text{g/L}$)	容器	個体 番号	オス			メス		
			測定濃度 (ng/mg)	容器平均	平均 \pm 標準偏差	測定濃度 (ng/mg)	容器平均	平均 \pm 標準偏差
対照区	A	1	n.d.	n.d.	n.d.	5.85	402	570 \pm 248
		2	n.d.			677		
		3	n.d.			524		
	B	4	n.d.	n.d.		859	456	
		5	n.d.			100		
		6	-			411		
	C	7	n.d.	n.d.		573	483	
		8	n.d.			763		
		9	n.d.			112		
	D	10	n.d.	n.d.		728	939	
		11	n.d.			709		
		12	n.d.			1380		
助剤 対照区	A	1	n.d.	n.d.	1.38 \pm 1.03	768	982	515 \pm 328
		2	n.d.			31.7		
		3	n.d.			2140		
	B	4	6.25	2.42		108	274	
		5	n.d.			10.9		
		6	n.d.			703		
	C	7	n.d.	n.d.		122	296	
		8	n.d.			610		
		9	n.d.			157		
	D	10	n.d.	2.12		134	510	
		11	5.35			682		
		12	n.d.			714		

n.d.は定量下限（1.00 ng/mg liver weight）未満であることを示す。

n.d.の個体はその半数値を用いて平均値及び標準偏差を算出した。

-は暴露終了時に死亡していたことを示す。

付表6 (続き) 暴露終了時の肝臓中ビテロジェニン濃度

測定濃度 ($\mu\text{g/L}$)	容器	個体 番号	オス			メス		
			測定濃度 (ng/mg)	容器平均	平均 \pm 標準偏差	測定濃度 (ng/mg)	容器平均	平均 \pm 標準偏差
5.69	A	1	n.d.	n.d.	n.d.	131	456	649 \pm 200
		2	n.d.			347		
		3	n.d.			891		
	B	4	n.d.	n.d.		1170	808	
		5	n.d.			667		
		6	n.d.			588		
	C	7	n.d.	n.d.		1220	836	
		8	n.d.			571		
		9	n.d.			721		
	D	10	n.d.	n.d.		867	498	
		11	n.d.			471		
		12	n.d.			155		
28.8	A	1	n.d.	7.13	5.74 \pm 6.60	1180	878	933 \pm 692
		2	6.15			669		
		3	14.8			786		
	B	4	n.d.	n.d.		721	703	
		5	n.d.			685		
		6	n.d.			-		
	C	7	n.d.	14.5		143	257	
		8	42.6			150		
		9	n.d.			479		
	D	10	n.d.	0.817		122	1890	
		11	1.45			194		
		12	n.d.			5370		

n.d.は定量下限 (1.00 ng/mg liver weight) 未満であることを示す。

n.d.の個体は定量下限の半値を用いて平均値及び標準偏差を算出した。

-は暴露終了時に死亡していたことを示す。

付表 6 (続き) 暴露終了時の肝臓中ビテロジェニン濃度

測定濃度 ($\mu\text{g/L}$)	容器	個体 番号	オス			メス		
			測定濃度 (ng/mg)	容器平均	平均 \pm 標準偏差	測定濃度 (ng/mg)	容器平均	平均 \pm 標準偏差
100	A	1	1160	392	774 \pm 290	988	750	813 \pm 157
		2	9.35			512		
		3	5.60			-		
	B	4	1080	1020		605		
		5	960			1400	966	
		6	-			896		
	C	7	2.50	979		187	623	
		8	6.45			1070		
		9	2930			612		
	D	10	20.6	706		980	914	
		11	421			173		
		12	1680			1590		

n.d.は定量下限 (1.00 ng/mg liver weight) 未満であることを示す。

n.d.の個体は定量下限の半値を用いて平均値及び標準偏差を算出した。

-は暴露終了時に死亡していたことを示す。

希釈水の水質 (2018年7月10日採水)

Parameter	Unit	Results	Determination limit
Total hardness (Ca, Mg)	mg/L	20	1
Suspended solid	mg/L	< 1	1
pH	-	7.6 (23.8°C)	-
Total organic carbon	mg/L	< 0.5	0.5
Chemical oxygen demand	mg/L	< 1	1
Free residual chlorin	mg/L	< 0.02	0.02
Ammonium ion	mg/L	< 0.1	0.1
Total cyanide	mg/L	< 0.05	0.05
Alkalinity	mg/L	21	1
Electric conductivity	mS/m	8.7	0.1
Total mercury	mg/L	< 0.0005	0.0005
Cadmium	mg/L	< 0.001	0.001
Chromium (VI)	mg/L	< 0.01	0.01
Lead	mg/L	< 0.001	0.001
Arsenic	mg/L	< 0.005	0.005
Iron	mg/L	< 0.01	0.01
Copper	mg/L	< 0.001	0.001
Cobalt	mg/L	< 0.001	0.001
Manganese	mg/L	< 0.005	0.005
Aluminum	mg/L	< 0.02	0.02
Zinc	mg/L	< 0.1	0.1
Nickel	mg/L	< 0.001	0.001
Silver	mg/L	< 0.0001	0.0001
1,2-dichloropropane	mg/L	< 0.002	0.002
Chlorothalonil	mg/L	< 0.001	0.001
Propyzamide	mg/L	< 0.0008	0.0008
Chlornitrofen	mg/L	< 0.0001	0.0001
Simazine	mg/L	< 0.0003	0.0003
Thiobencarb	mg/L	< 0.001	0.001
Diazinon	mg/L	< 0.0005	0.0005
Isoxathion	mg/L	< 0.0008	0.0008
Fenitrothion	mg/L	< 0.0003	0.0003
EPN	mg/L	< 0.0006	0.0006
Dichlorvos	mg/L	< 0.001	0.001
Iprobenfos	mg/L	< 0.0008	0.0008
PCB	mg/L	< 0.0005	0.0005
Boron	mg/L	< 0.1	0.1
Fluorine	mg/L	0.1	0.1
Sulfate ion	mg/L	6.9	0.5
Chloride ion	mg/L	7.8	0.2
Sodium	mg/L	8.4	0.2
Potassium	mg/L	1.6	0.2
Calcium	mg/L	5.7	0.1
Magnesium	mg/L	1.3	0.1