

経済産業省委員の論点に関する見解

小山次朗、山本裕史、青木康展

(1) 水温と魚類毒性の関係について(水温の重要性) ※詳細は【別紙】参照。

① 変温動物である魚類における水温の重要性

- ✓ 水温が魚類の生理機能に影響を与えることから、同様に魚類に対する化学物質影響も水温の影響を受けると考えられている。それは、化学物質の代謝(解毒)、化学物質の生物利用可能性(水溶解度など)、トキシコキネティクス(取り込み、分布、代謝、排泄)、化学物質-受容体の結合性など様々な要因が、水温影響を受けると考えられるからである。更に、水温が化学物質の魚毒性に影響を示すことを示す報告がある。

【当方の見解】 ご指摘の通りかと思しますので、環境省専門家により、同様のレビューを実施しました。

② 魚類毒性と水温の関係

- ✓ 水温と化学物質の魚類毒性の関係は、農薬について西内(1997年)、Mayerら(1986年)、無機化学物質を含む様々な化学物質について辻ら(1986年)によって調べられている。83.2%の農薬および75.3%の様々な化学物質において、水温が上昇すると魚類毒性が強く現れていた。

【当方の見解】 別紙をご確認下さい。定性的には温度上昇に伴い、魚類毒性が増強する傾向を示す知見が多く、多くの物質について網羅的に調べた報告でも多数の物質についてその傾向が現れています。一方で、これらの報告の温度変化は5~10℃単位でのものであり、今回の報告で逸脱が問題とされている1~2℃では、最大でも毒性値の変化は10%程度に過ぎず、MEOGRTの公比である3.2(320%)に比べた場合は小さい変化といえます。

(2) 国環研 MEOGRT 試験結果による PNEC 値について

① メダカの最適温度について

- ✓ 本試験の水温の妥当性の根拠として環境省様から26~28℃がメダカの繁殖の適温と主張しその根拠として岩松鷹司先生の新版メダカ学全書(2006年)を引用しているが、正確には25~28℃である。何故に25℃を26℃に変更されているかは不明。この温度は飢餓状態のような劣悪な環境条件でのメダカでも十分な栄養と同温度にすると産卵すると述べているだけで、通常の栄養状態のメダカの繁殖の最適な温度とは説明されていない。事実、同先生は全訂増補版メダカ学全書(2018年)では通常メダカの繁殖・産卵の最適温度は25~26℃であると報告している。

【当方の見解】 新版メダカ全書（岩松鷹司著、2006年）の70ページの第2章飼育と管理・VII 繁殖のための世話の部分に「メダカは飢餓状態にあったものでも、25～28℃、連続光下で、十分な餌を与えれば2週間前後で産卵するようになる」という部分の引用をされているようです。一方で、ほかにもメダカの適温についてはいくつか記述があり、たとえば、3ページの概説では、「自然でも3～4か月間、条件が良ければ毎日産卵し続けるが、卵形成及び産卵時刻は光周期性に基づいている（Egami, 1954b）から、暗室で温度25～30℃に保ち、人工照明（150Lux, 1日14時間連続光）を施して飼えば、産卵時刻を自由にコントロールできる」という解説があるほか、200ページの第6章生殖のI 生殖活動では、「実際、冬のように短い日照時間と低温下で飼育していたメダカを、14時間照明の光周期・適温（26～28℃）の条件下に移し、十分な餌を与えて飼育すると、まず最初の3～4日に肝臓が発達する。すなわち、卵黄物質は肝臓で合成され、おそらく濾胞細胞を通して卵母細胞に取り込まれて卵母細胞が大きくなる。そして約10日目には卵母細胞が急激に成長し始める。その後3～4日で卵母細胞は成熟し、排卵する」という記述があります。「適温」という記述があるのは26～28℃の部分だけです。

- ✓ 岩松先生が著者の一人であるNPのメダカ3世代試験の報告書(2004年)では、試験水温は25℃であり、繁殖のために水温を上げることはしていない。

【当方の見解】 ある1つの試験の条件であり、論点とは直接関係ないのではないのでしょうか。

- ✓ メダカを繁殖・販売している業者が日本に多数存在するが、彼らのWebsiteにはメダカの繁殖方法が記載されており、最も販売量の多いと推定される“めだか本舗”のサイトには、産卵の適温は25℃とある。またその他の多くの販売会社の説明でも、産卵の温度はほとんどが25℃を推奨している。

【当方の見解】 メダカの繁殖については、いくつかの論文があります。たとえば、Hirshfield (Ecology, 61, 282-292, 1980)では、繁殖や繁殖行動に必要なエネルギーについて、摂餌（多い、中程度、少ないの3条件）、温度（25, 27, 29℃の3条件）の関係から詳細に調べています。その結果、産卵数は温度が高くなるにつれて多くなる一方で、成長は逆に鈍くなる傾向があることを確認しています。また、Dhillon and Fox (2004)はメダカの摂餌量（飽食量もしくは一定量）および温度（24, 27, 30, 33℃の4条件）と成熟度や成長との関係を調べています。その結果、30℃までは温度

が上昇するにしたがって成長や成熟速度は上昇するものの、33°Cでは逆に低下する傾向があることを報告しています。

さらに、Hemmer-Brepson et al. (2014)はメダカの4か月間の20°Cと30°Cの温度の違いが、成長、繁殖、卵のサイズ、膜損傷、酸化ストレスマーカーなどを調べたところ、繁殖は10~20%程度、30°Cの方が下がる傾向があるものの、酸化ストレスなどは変わらず、逆に抗酸化酵素のはたらきは上昇し、打ち消し合うとの考察をしています。

Hirshfield MF (1980): An experimental analysis of reproductive effort and cost in the Japanese medaka (*Oryzias latipes*), *Ecology*, 61, 282-292.

Dhillon RS and Fox MG (2004): Growth-independent effects of temperature on age and size at maturity in Japanese medaka (*Oryzias latipes*), *Copeia*, 1, 37-45.

Hemmer-Brepson C, Replumaz L, Romestraing C, Voituron Y, Daufresne M (2014): Non-stressful temperature effect on oxidative balance and life history traits in adult fish (*Oryzias latipes*), *J. Experiment Biol*, 217, 274-282.

なお、繁殖・販売業者の目的と、本試験の科学的な議論とは立場も目的も異なると考えます。

- ✓ USEPA が出している MMT (Medaka Multigeneration Test) 及び MEOGRT 試験の Validation report (MMT ISR final) で、USEPA と環境省が水温について議論し、①これまでのメダカを用いた生態毒性試験での温度範囲との整合性、②繁殖性の最適温度、③ XXmale 出現を最小限に抑えるといった点を総合的に考察し、25°C±0.5°C が適切であるとの結論を得ている。さらに、追加試験も行って 25°C±1°C を指定水温域に決定している。
- ✓ そのような決定経緯から考えても、繁殖目的で水温を上げる必要はないと考えるし、その点については当時、環境省も合意済みと認識している。
- ✓ 以上より、26~28°C で試験を実施する必要はなく、ガイドライン通り 25°C 前後が適温と考える。

【当方の見解】過去の経緯については、別途説明します。一方で、USEPA からは、2002 年に” Draft Detailed Review paper on A Fish Two-Generation Toxicity Test (EPA Contract Number 68-W-01-023, Work Assignment 2-13)” を公表しています。この中で、Candidate Protocol の中では Test Conditions として、” The water temperature for fathead minnow will be 25±1°C. For the other candidate

species, a water temperature of (ファットヘッドミノーの水溫は $25 \pm 1^\circ\text{C}$ とする。他の候補となっている魚種 (メダカを含む) は $28 \pm 1^\circ\text{C}$ とする) ” という記述があります。USEPA の系統は、高温によって XX オスが出現する傾向があったため、その後水溫を下げるという議論になりましたが、日本の国環研の系統については、 27°C 程度では XX オスの出現は実験結果からもほとんどないことが確認されており、 27°C 程度の水溫設定を科学的に否定するものではないといえます。

②試験の水溫状況

i 水溫データが不足している (週 1 回期日不規則測定)

- ✓ TG240 は、内分泌攪乱化学物質の疑いのあるものを含む化学物質の生態学的危害およびリスクアセスメントに関連するデータを与えるために、複数世代にわたって暴露された魚に基づく包括的な試験である。TG240 を作成するに当たり、温度管理については世界各国の専門家による議論がなされた。結果、毎日の水溫測定は必須となった経緯がある。

【参考】日々の水溫測定が重要であることを示唆する Germany コメント

「No.88 Germany

One measurement per week is not enough.

There is a limit given for water temperature ($\pm 2^\circ\text{C}$ between tanks and days).

With only one measurement per week in only one vessel per treatment, this is hard to control and will not stand any discussion.」

- ✓ 水溫に係る試験有効性基準に、試験期間中の平均水溫が $24 \sim 26^\circ\text{C}$ であることに加えて、短期間の水溫の逸脱が 2°C を超えないことというものがあるが、週 1 回程度の水溫測定なので、例えば数日間の水溫の逸脱をとらまえられない。試験有効性基準の客観的な確認のために、本 TG では試験方法で毎日の水溫測定が求められている。
- ✓ しかし、毎日の水溫は測定されていないためデータが不足している。
- ✓ 具体的には、今回判断に使えるデータは、室温が安定しない実験室での週 1 回の期日不規則測定でのデータのみであり、その中の 11 月 22 日頃の水溫に、理由がわからない高温が記録されていることから、記録されていない水溫についても逸脱があった可能性は否定できず、水溫の全体像を把握するにはデータが不足していると考ええる。
- ✓ また、日々の試験群間、試験群内での温度差は規定により統計的有意差がないことを確認することとなっているが、それも確認できておらず、水溫データが不足していると考ええる。

ii 水温は室温で管理されており、その室温データも不足している

- ✓ データが保存されていないなどの理由から、室温のデータなどは全期間(9月30日～2月10日:134日)のうちのわずか30%に相当する41日分(1月6日～2月15日)しかいただけていない。
- ✓ また、試験期間中に2回の停電(10月と1月)と、2回目はそれに伴うオーバーヒートがあり、その時期と重なるF1繁殖期に少なくとも4回室温が30℃を超えている。その原因はサーキュレーター故障とのことであるが、詳細は不明であり、停電・オーバーヒート以外の原因で高温になった時期があった可能性も否定できない。現に、11月22日頃の水温に、理由がわからない高温が記録されている。

iii 平均水温について

- ✓ F1繁殖期後に水温が下げられており、今回のエンドポイントがF1の産卵数であるため、その時期までの平均水温が影響を及ぼしていると考えられるが、それは試験全期間の平均水温より高くなる。

iv まとめ

- ✓ 本試験は上記のような事情があったことから、記録されていない日の水温についても逸脱があった可能性は否定できず、週1回程度の水温測定では、水温の全体像が判明したとは言えず、実際の水温は、ガイドライン指定の平均水温域よりも1～2℃の上昇であったとは言えない。
- ✓ また、判明している水温から推測すると、F1の繁殖期までの平均水温は試験全期間の平均水温より高くなるため、試験全期間の平均水温以上の影響を受けていると推測する。

【当方の見解】ガイドラインからの逸脱やデータの不足は、既存の文献の信頼性評価、新規物質の審査などでもこれまで有害性評価(評価II)や化審法本審などで議論されてきたところです。逸脱とデータ不足ではありますが、これまでの信頼性評価や審査基準に照らし合わせて十分に検討した結果、対照区のデータや存在する情報から総合的に専門家判断を行い、信頼性ランク2であるとの評価は、有害性評価を行う評価II WGの委員各位の総意です。

③最適温度からの逸脱許容程度

i 許容されているのは一時的な逸脱

- ✓ Brief excursionのbriefは短期間を意味する。TGにおいて逸脱が認められているのは一時的な期間であり、常時2℃以内の逸脱や、平均水温の逸脱が2℃以内であればい

いということではないと解釈すべき。もし常時 2°C 以内の逸脱を認めると解釈すると、試験水温は 22°C~28°C と広域となり、水温に関する各国間での議論結果と反することとなる。

- ✓ なぜなら、TG240 の Validity Criteria の記述「Brief excursions from the mean by individual aquaria should not be more than 2° C.」と、後半に水温に関して追記されている記述「(based on daily temperature measurements, and excluding brief excursions). (若干の逸脱を除いて、毎日測定した水温に基づき)」を併せ読むと、本試験は毎日水温測定することが前提であり、その中で水温が逸脱した日があればその水温は除いていい、ただし、若干の日数に限ると読むのが自然であるからである。
- ✓ なお、MEOGRT 試験の素過程を規定する 3 種の OECD ガイドライン (TG229、TG234、TG236) の変動可能温度幅は 2°C で TG240 と同じである。しかし、逸脱の許容条項はなく TG240 にのみ定められているもの。MEOGRT 試験は長期試験なので、逸脱事故が起きる可能性があるため、そのような際に一時的な逸脱であれば許容する条項がつけられていると推測できる。

【当方の見解】 ガイドラインからの逸脱事項に関するすべての情報をもとに、これまでの環境省における信頼性評価や新規審査等の基準や実績に照らし合わせ、有害性評価（評価 II）の WG において信頼性ランク 2 としています。

ii 本試験の逸脱の程度

- ✓ 本試験は、水温の全体像が判明したとは言えず、実際の水温は、環境省様が主張する 1~2°C の上昇であったとは考えていない。
- ✓ 魚類は変温動物であり、温度管理は哺乳類などの恒温動物と比べて変化による影響が大きく、仮に数°C の上昇であっても、微小な変化とは言えない。
- ✓ また、仮に数°C の上昇であっても、試験期間の温度差の総和・蓄積は大きくなり、影響の可能性が高いと考える。
- ✓ また、開示された限定的なデータから推測すると F1 の繁殖期までの平均水温は試験全期間の平均水温より高くなるため、試験全期間の平均水温以上の影響を受けていると考える。
- ✓ 「長期試験で失敗したくない、産卵を確実にしたいため、26 もしくは 27 度前後に調整して行った」との発言もしくは説明があったが、水温は開示された限定的なデータから推測すると試験開始後から一定せず、徐々に上昇し F1 繁殖期前までは、水温は 27 度前後で、F1 繁殖期は 28°C 前後で推移しているようにグラフから見える。当初から TG240 の水温域内での試験の意思はなく、試験設計の段階から逸脱しているのであれば、若干な逸脱とは言えない。

【当方の見解】試験はガイドラインの上限である 26°C を目指して計画・実施されたものの、厳密な温度コントロールができず、結果的にその温度から 1~2°C の逸脱があったものと考えています。逸脱のレベルが「若干」であるかどうかは、すべてのデータを有害性評価（評価 II）WG の委員がこれまでの他の物質の信頼性評価や審査基準に照らし合わせて、十分に議論して判断したものです。

④水温と毒性値の関係を加味した水温逸脱の試験結果への影響の大きさ

i 水温と毒性の一般的な関係

- ✓ 1970 年代より、水温と魚毒（主に農薬）の関係が良く研究され、多くの化合物は水温が上昇すれば毒性が強くなることが知られている。一部の化合物は逆の方向を示すものがあるが、限定的である。若林等の論文では、「温度上昇により毒性が上昇するのは、溶存酸素が低下し呼吸速度が増加するため、鰓からの呼吸量が増大し、その結果、化合物の吸収量が増加するためと考えられ、ほとんどの化合物において、温度が 10°C 上がると LC50 は 2~4 倍変わる。」と報告されている。これは Q10 理論に従うためとされている。

【参考】 Q10 理論

魚の代謝機能は温度が 10°C 上昇すると通常 2 倍になるとの理論。通常、冷血動物では Q10 理論が成り立つといわれている。

↑ 温度上昇に伴い急性毒性が強くなる理由

【参考】 呼吸速度 = $1400 * \text{体重}^{0.65} / \text{溶存酸素濃度}$

- ✓ また、最近も、水温上昇により物質の毒性が増強されるという報告がいくつか発表されている。
- ✓ これは、多数の農薬等のデータを俯瞰した、上記 3.(1) で説明のあった参考資料（資料 1-3-2_別紙 3）からも読み取れる。

【当方の見解】一般的には Q10 理論が直接成り立つかどうかは不明ですが、呼吸や代謝など魚類の体内での化学反応は水温の上昇に伴い、速度が増加するものと考えられます。実際は呼吸や取り込みだけでなく、代謝・分解・排泄も増加して一定の相殺作用があると考えられますが、もしたとえ Q10 理論に従って 10°C の違いで呼吸速度が 2 倍になり、結果として毒性値が 2 分の 1 になると仮定したとしても、今回議論になっている 2°C 程度では呼吸速度の増加率は 14% 程度、毒性値は 13% 程度の減少になるものと推定されます。

なお、別紙については、別途用意しましたが、同様に、農薬等のデータを俯瞰したところ、2°C 程度の水温上昇の毒性値への影響は 10% 程度であると推定されます。

以下の5論文をレビューしたところ、5~10°C程度の水温変動は水生生物の化学物質生物濃縮に対して大きな影響を及ぼさないことがわかります。以下にレビューをまとめます。

1. TAKIMOTO ら (1987) は、水温 15、25°Cにおけるメダカのフェニトロチオン BCF (文献中では Bioaccumulation ratio) の変動を7日間ばく露試験(給餌あり)で調べた。代謝物も含めた体内濃度を14Cの radioactivity で測定して BCF を求めた場合、15°Cで421、25°Cで299であった。またフェニトロチオンに注目した場合、15°Cで339、25°Cで235であった。水温の低い場合でより高い BCF を得ている。

2. 山田ら(1996)は、水温20および25°Cにおけるマダイ、シロギス、アミメハギの γ -HCHのBCF(脂質換算)の変動を2週間ばく露試験で調べた。その結果、マダイで18000および20400、シロギスで20200および22300、アミメハギで24900および26000であり、水温20および25°CでのBCFに差のないことを報告している。

3. Jimenez ら(1987)は水温13および23°CにおけるブルーギルのBaPのBCFの変動を48時間ばく露試験(給餌あり)で調べた。その結果、BCFとして377および608を報告している。

23°Cで得られたBCFが若干大きい、通常の生物濃縮試験ではBCFの個体間のバラツキの範囲内にあると考えられる。

4. 岡本ら(2014)は平均水温14.8および25.4°Cの下水処理水中トリクロサンにメダカに約2か月ばく露して体内トリクロサン濃度を測定した。その結果、両者でBCFは1000前後で差のないことを報告している。

5. Ernst (1979)は、海産生物を用いた実験における化学物質の評価に影響を及ぼす因子について調べ、水温5、10および15°Cでのイガイ(*Mytilus edulis*)のPCPおよび γ -HCHのBCFを求めた。その結果、PCPでは326、304および324、 γ -HCHで177、142および151のBCFを報告している。水温によるBCFの変動の小さいことが分かる。

1. Takimoto Y., Ohshima M. and Miyamoto J. 1987. Comparative metabolism of fenitrothion in aquatic organism. *Ecotox. Environ. Safe*, 13, 104-117.

2. 山田 久、立石晶浩、池田久美子. 1996. α -ヘキサクロロシクロヘキサンの生物濃縮特性に及ぼす試験水温の影響、*日本水産学会誌*、62(2)、280-285.

3. Jimenez, B.D., Cirno, C.P and McCarthy, J.F. 1987. Effect of feeding and temperature on uptake, elimination and metabolism of benzo(a)pyrene in the bluegill sunfish (*Lepomis macrochirus*) . *Aquat. Toxicol.*, 10, 41-57.
4. 岡本誠一郎、小林行也、北村友一. 2014. 水生生物の蓄積している未規制化学物質の実態の解明に関する研究、土木研究所報告、ページ数不明。
5. Ernst, W. 1979. Factors affecting the evaluation of chemicals in laboratory experiments using marine organisms, *Ecotox. Environ. Safe*, 3, 90-98.

ii NP の毒性と水温の関係

- ✓ 血液学的検査により、NPは慢性的・急性的にも魚に強い貧血を惹起することが判明している。
- ✓ 貧血の理由として、NPはリン脂質に高い親和性を示すことから、赤血球へ直接作用して膜の安定性を欠き溶血を促進する、もしくはNPが浸透圧を変化させることと考えられている。
- ✓ 水温の上昇に伴い溶存酸素が低下し、呼吸速度が増加するため、鰓からの呼吸量が増大し、その結果、NPの吸収量も増大する。その結果、一般毒性としての貧血が増強する可能性が高いと推察する。この貧血作用により、各組織への酸素運搬能力を欠いていることが考えられ、それは繁殖性にも影響を与える可能性が高い。

【当方の見解】NPが魚の赤血球に与える影響については、いくつかの文献が見当たります。ただ、多くは、100 µg/L (MEOGRT 試験の LOEC 1.27 µg/L の 79 倍) 以上の sublethal 濃度で NP のばく露実験が行われています。100 µg/L より低濃度の NP をばく露し、赤血球への影響を観察した報文 3 報のレビューを以下にまとめます。

Sayed et al. (2018)はメダカ(雌、Hd-rR)に50, 80, 100 µg/Lの濃度でNPを15日間ばく露し、赤血球の核形態の異常、アポトーシス(細胞死の過程でありDNAの断片化が発生する)、小核発生への影響を調べた。核形態異常の発生、アポトーシスの誘発は100 µg/Lで、小核の誘発は80, 100 µg/Lで統計学的に有意に上昇した。赤血球へのNPの影響のNOECは50 µg/Lであった。これは、MEOGRT試験のLOECの39倍の濃度である。

これまでNPがin vitro, in vivoの遺伝毒性試験で陽性を示す報告はなく、魚類でのNPの小核誘発は酸化ストレスなど二次的影響によるものと考えられる。

Schwaiger(2000)は、より低濃度でNPの影響を試験している。5か月齢(幼若)のコイ(体重15.2 +/- 3.8 g)に1, 5, 10, 15 µg/L NPを、より長期間(70日間)ばく

露した。また、ethinylestradiol (EE2)を 500 µg/kg 体重の用量で 4 週に 1 回筋肉注射した。10, 15 µg/L NP で赤血球数の有意な減少は見られるものの、血中ヘモグロビン濃度とヘマトクリット値（赤血球総体積の指標）には NP ばく露による有意な変化は見られなかった。赤血球数、血中ヘモグロビン濃度、ヘマトクリット値の 3 指標の同時低下をもって明確な貧血の発生と言える。従って、コイにおいて、1-15 µg/L（MEOGRT 試験と同等濃度）の長期間ばく露で、明確な貧血状態は発生していない。

Mekkawy (2011)では、アフリカナマズ（体重 500-1200 g）に、50, 80, 100 µg/L NP を 15 日間ばく露し、影響を観察している。赤血球のアポトーシス、小核、核の形態の異常は濃度に依存して増加した。しかし、これらの濃度の NP ばく露で、赤血球数は有意に減少したものの、ヘモグロビン濃度は有意に減少せず、また、ヘマトクリット値は 80, 100 µg/L で有意に減少したが、50 µg/L では減少しなかった。従って 50 µg/L で明確な貧血は発生していない。ただし、河川から採取した魚を用いた実験であり、本知見は定性的な有害性評価に用いられるものである。

以上を総合すると、50 µg/L 以下の濃度で NP が明確に貧血状態を引き起こす、証拠は見当たらない。

Sayed AEH, Kataoka C, Oda S, Kashiwada S, Mitani H. (2018): Sensitivity of medaka (*Oryzias latipes*) to 4-nonylphenol subacute exposure; erythrocyte alterations and apoptosis. *Environ Toxicol Pharmacol.* 58: 98-104.

Schwaiger J, Spieser OH, Bauer C, Ferling H, Mallow U, Kalbfus W, Negele RD. (2000): (2) Chronic toxicity of nonylphenol and ethinylestradiol: haematological and histopathological effects in juvenile Common carp (*Cyprinus carpio*). *Aquat Toxicol.* 51(1): 69-78.

Mekkawy IA, Mahmoud UM, Sayed Ael-D. (2011): Effects of 4-nonylphenol on blood cells of the African catfish *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822). *Tissue Cell.* 43(4): 223-229.

- ✓ また、異なる温度 (20°C と 30°C) 条件下で、NP によるゼブラフィッシュでのビテロジェニンの遺伝子発現を比べると、温度が高い方が 1.5~2.5 倍遺伝子発現が増え、温度によりエストロゲン様活性が高まったと報告されている。

- ✓ さらに、他のエンドクリン物質では、成長段階の異なるメダカを用いて温度を変えてビテロジェニンの遺伝子発現誘導を調べたところ、温度上昇とともに、また幼若段階で発現誘導を増強されることが判明した。

【当方の見解】 はじめに、遺伝子発現量の増加と毒性影響の発現は一定の相関がありますが、毒性作用の発現経路は複雑であり、定量的な評価は難しいことに留意する必要があります。

おそらく、引用されているのは、Jin et al (2009)ではないかと考えています。

この論文では、6か月齢のゼブラフィッシュを用いて、20°Cと30°Cで光周期（8時間明16時間暗の短日、12時間明12時間暗、16時間明8時間暗の長日）を変えてE2（25、250 ng/L）、NP（10、100 μg/L）の2日間ばく露の影響を卵黄前駆タンパク・ビテロジェニン（Vtg）1、2およびエストロゲン受容体α（ERα）のmRNA発現量の変化を調べています。Vtg1、Vtg2の発現量は20°Cから30°Cへの温度上昇により、増加している条件が多く、E2で2~10倍程度の発現量上昇、NPで1.5~2.5倍の発現量上昇があったと報告しています。ただ、一方で、E2の25 ng/Lでは逆にERαやVtg2の発現量が減少しているケースも多く認められます。NPの10、100 μg/Lでも同様に、光周期によって発現量の増加・減少には一貫性が認められないとも読み取れます。一部だけを切り取ってたとえ2.5倍の遺伝子発現の増加が認められたとしても、10°Cの温度上昇の影響であり、2°Cに換算すると30%程度の上昇となりますが、あくまでも遺伝子発現量の上昇であり、産卵数の増加とは一定の相関はあるものの、これまでの魚類繁殖毒性試験ではエストロゲン様作用等によって卵黄前駆タンパク・ビテロジェニンの濃度が上昇したとしても産卵数への影響が認められないケースが多くあることに留意が必要です

また、同じ研究グループでは、成長段階の異なるメダカに関する検討（Jin et al., 2011）も行っています。この論文では、ふ化後1日の仔魚、1か月半齢の幼魚、4か月半齢の成魚の3種類の成長段階のメダカ（d-rR）に対して、冬季を想定した10°C（明10時間）、春・秋期を想定した20°C（明12時間）、夏季を想定した30°C（明14時間）の条件で、7日間天然女性ホルモンE2（5、50 ng/L）とノニルフェノール（5、50 μg/L）を曝露し、仔魚はそのまま、幼魚はオス・メスのwhole bodyについて、成魚は肝臓についてビテロジェニン（Vtg）1および2、そしてエストロゲン受容体α（ERα）のmRNA発現量の増減を調べています。その結果を20°Cと30°CのNPばく露に絞って比較してみると、胚ではVtg1の発現量がNP 50 μg/Lで有意に上昇しているが、Vtg2やERαは有意な差は検出していません。オスの幼魚ではVtg1の発現量は増加しているものの、Vtg2やERαは逆に減少しています。また、メスのVtg1、Vtg2およびERαは減少が認められませんでした。オスの成魚では、NP 5 μg/Lが20°Cと30°CでVtg1、Vtg2お

よび ER α で有意な差は検出されず、50 μ g/L では Vtg1 は減少、Vtg2 はほぼ同等、ER α はやや上昇していました。メスの成魚では、NP5 μ g/L では同様に 20°C と 30°C でほぼ同等、50 μ g/L では Vtg1 は 2 倍程度増加、Vtg2 は減少、ER α は 1.5 倍程度上昇していました。このように、当該論文では Vtg1, Vtg2, ER α の発現量と 20°C から 30°C への温度上昇との関係に一貫性がないことに留意が必要です。

Jin Y, Shu L, Huang F, Cao L, Sun L, and Fu Z (2011): Environmental cues influence EDC-mediated endocrine disruption effects in different developmental stages of Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Aquat Toxicol*, 101, 254-260

Jin Y, Chen R, Sun L, Liu W, and Fu Z (2009): Photoperiod and temperature influence endocrine disruptive chemical-mediated effects in male adult zebrafish. *Aquat Toxicol*, 92, 38-43.

- ✓ このように、NP を含むエストロゲン様作用を保有している化合物は水温の上昇とともにエストロゲン様活性が上昇することが示唆される複数の報告があり、ビテロジェニンと同様にエストロゲン応答遺伝子の転写活性が増大している可能性が高い。

【当方の見解】

ご指摘のようにエストロゲン様作用を保有している化合物を水温の異なる条件でばく露してビテロジェニンやエストロゲン応答遺伝子の転写活性などを調べた研究は多くあります。

たとえば、Brian ら (2008) らは、環境中の混合物とその濃度を想定してエストロゲン様作用物質の混合物 (E2, EE2, NP, オクチルフェノール、ビスフェノール A) をファットヘッドミノーに 2 週間および 7 日間のばく露し、VTG 濃度の上昇を 20°C と 30°C で調べています。その結果、VTG タンパク誘導および遺伝子発現の EC50 は 2 週間後には 2 つの異なる温度でもほぼ同等 (差は 5%) でした。また、7 日間ばく露の 24 時間後に想定した際には 20°C に比べて 30°C では 4 から 5 倍程度増加しているものの、7 日後には、その遺伝子発現は逆転、タンパク誘導もほぼ同様になっていました。このことから、短期的には水温の上昇は温度の上昇が影響を増強させる可能性があるものの、長期的に考えた場合は温度上昇による効果はあまり大きくないと結論づけており、MEOGRT 試験のような長期の試験における温度影響があまり大きくないことを示唆しています。

Körner et al. (2008) は、ブラウントラウト (*Salmo trutta*) を用いて 12°C、19°C および 12~19°C を変化させる条件で、3 ng/L のエチニルエストラジオール (EE2) を 21 日間ばく露したところ、19°C の方がビテロジェニン (VTG) 濃度 40% 程度高くなったと報

告しています。ここで、7°Cで40%は2°Cで予測される10%程度の影響となりますが、留意しないとイケないのはあくまでも卵黄前駆タンパクの濃度であり、最終的な繁殖等の有害影響がどの程度変化するかは定量的には議論できません。

Chandra et al (2012)はマミチヨグを用いて、10、20、26°Cの3条件でエチニルエストラジオール(EE2)を14日間ばく露したところ、統計的な有意差は確認されなかったものの、20°Cと26°Cを比較すると60%程度のオスの肝臓中ビテロジェニン1(vtg1)のmRNA発現の上昇が観察されたとしています。この60%の差を、2°Cに換算するとおよそ20%程度の発現上昇が予測されるレベルですが、エラーバー(個体差)が大きく、統計的有意差が確認されませんでした。

Shappell et al. (2018)では、ファットヘッドミノーに21日間、9~135 ng/Lのエストロン(E1)をばく露し、18°Cから26°Cへの温度上昇の影響としてのオスの致死、成長、精巣発達、ビテロジェニン、HSI, GSI, BCF, ヘマクリットなどを調べています。E1のばく露の有無にかかわらず、温度上昇により、成長阻害や肝臓指数の減少、精子形成の遅れが確認されています。なお、温度によるビテロジェニン濃度の増加は認められていません。

Brian J V, Harris CA, Runnalls TJ, Fantinati A, Pojana G, Marcomini A, Booy P, Lamoree M, Kortenkamp A, Sumpter JP (2008): Evidence of temperature-dependent effects on the estrogenic response of fish: implications with regard to climate change, *Sci Total Environ.*, 397, 72-81.

Körner O, Kohno S, Schönenberger R, Suter MJF, Knauer K, Guillette LJ Jr, Burkhardt-Holm P (2008): Water temperature and concomitant waterborne ethinylestradiol exposure affects the vitellogenin expression in juvenile brown trout (*Salmo trutta*), *Aquat Toxicol*, 90, 188-196.

Chandra K, Bosker T, Hogan N, Lister A, MacLatchy D, Currie S (2012), Sustained high temperature increases the vitellogenin response to 17 α -ethinylestradiol in mummichog (*Fundulus heteroclitus*), *Aquat Toxicol*, 118-119, 130-140.

Shappell NW, Feifarek DJ, Rearick DC, Bartell SE, Schoenfuss HL (2018): Do environmental factors affect male fathead minnow (*Pimephales promelas*) response to estrone? Part 2, Temperature and food availability, *Sci Total Environ*, 610-611.

- ✓ 以上より、温度上昇により一般毒性とエストロゲン活性が上昇する可能性が高いと考え、それは繁殖性にも影響を与えると考える

【当方の見解】 温度上昇の繁殖への影響と毒性・内分泌かく乱との関係についてはある程度あることは、すでに上記で述べた通りです。実際に繁殖まで調べた研究は少なく、Lee et al. (2014)が、100 mg/Lの過塩素酸ばく露と温度(26, 29, 33°C)のメダカの甲状腺ホルモンや繁殖への影響を調べています。T4濃度について33°Cは有意な影響が認められたほか、過塩素酸ばく露区の繁殖が26°C(75個程度)、29°C(65個程度)、33°C(50個程度)で温度依存的に、やや低下したと報告しています。他のストレス応答バイオマーカーなどには影響が認められなかったこと、このケースでは繁殖への影響について、2°Cで10%程度の影響があると考えられます。

Lee S, Ji K, Choi K (2014): Effects of water temperature on perchlorate toxicity to the thyroid and reproductive system of *Oryzias latipes*, *Ecotox Environ Safe*, 108, 311-317.

iii NP 毒性と本試験のエンドポイントとの関係

- ✓ 本試験では種々の毒性項目(エンドポイント)で測定されているが、そのうちの、二次性徴、生殖腺形態・精巣卵はエストロゲン様活性に関連していると推測する。

【当方の見解】 ご指摘の通りかと思えます。

- ✓ 死亡を含めてその他のエンドポイントは一般毒性(貧血)とエストロゲン作用の両方が寄与している可能性があるかと推測する。

【当方の見解】 一般毒性については、濃度的にも無視できるレベルです。貧血の影響も MEOGRT の LOEC 付近では上記のレビューの通り、無関係と考えます。

- ✓ 産卵数は一般毒性とエストロゲン作用両方の温度変化による影響を確認する必要があると考える。

【当方の見解】 産卵数は、ご指摘の通り、一般毒性とエストロゲン作用の両方の影響があると考えられます。ただ、温度変化による影響は、上記の通り、2°C程度の変化であれば10%程度の限定的なものであり、環境省専門家は毒性値に大きな影響を与えるものとは考えておりません。

⑤まとめ

- ✓ 要約すると、
- ✓ ①ガイドライン制定の経緯などからみても、本試験では水温の管理が非常に重要である。
- ✓ ②本試験では停電が2回、原因不明の水温の上昇等があるが、週1回程度の水温測定であるために、水温の全体像が不明である。
- ✓ ③そのために日々の群間比較、群内比較もできず、実際の平均水温も不明であると言わざるを得ない。
- ✓ ④開示された限定的(1日/7日、14%)な水温データから判断しても、メダカの最適温度、briefの意味などを考慮すると今回の温度の逸脱は許容できない程度である。

【当方の見解】ガイドラインとの逸脱が主要な論点のようですが、すでに情報量不足や1~2℃の水温の逸脱を踏まえてもPNECの算出やリスク評価に採用可能である信頼性ランク2として有害性評価(評価II)委員がこれまでの信頼性評価および新規審査等の基準や実績に照らし合わせて判断したものです。

- ✓ ⑤NPの両毒性(一般毒性とエストロゲン様作用)は水温の変化で毒性値は変化する可能性が高いと考えられる

【当方の見解】水温の2℃程度の変化では、文献をレビューした限りでは生物濃縮性への影響は小さく、毒性値への影響は変化したとしても10%程度であるとのことが考えられます。

- ✓ 以上より、実際の水温の全体像が不明で、開示された限定的なデータから判断しても逸脱は許容できない程度なので、本データを定量的リスク評価のためのPNEC値として採用することはできないと判断する。

【当方の見解】これまでの文献データや新規化学物質の審査の際にも、リスク評価の合理化・加速化の観点から、ガイドラインからの逸脱事項がある程度明確な場合は、それらの値を採用してきた実績があります。本試験は、これまで信頼性評価、新規審査を行ってきた基準と実績に基づき、リスク評価のためのPNEC算出に採用可能な信頼性ランク2と判断したものです。また、NPのほかの毒性データから考えても、ばく露期間やエンドポイントを考慮すると極端に低い値ではないことは、有害性評価(評価II)委員が確認しており、十分にPNEC値の算出の根拠として利用可能と考えます。

「化学物質による生態影響の水温による変化」に関する見解

1. 魚類における水温の重要性

魚類は変温性の動物であり、水温によって魚種の生息域が異なることは周知の事実である。魚類の種々の生理機能は環境水温の影響を大きく受け、特に成熟に関しては、水温の上昇が直接的に代謝の活発化を促すだけでなく、水温変化が情報伝達のシグナルとして働き、脳や生殖内分泌系を介して影響するケースが多いのが特徴である。¹ 水温が魚類の生理機能に影響を与えることから、同様に魚類に対する化学物質影響も水温の影響を受けると考えられている。それは、化学物質の代謝（解毒）、化学物質の生物利用可能性（水溶解度など）、トキシコキネティクス（取り込み、分布、代謝、排泄）、化学物質-受容体の結合性など様々な要因が、水温影響を受けると考えられるからである。²

更に、以下のとおり、水温が化学物質の魚毒性に影響を示すことを示す報告がある。

【当方の見解】 水温が変化すると、化学物質の物性や体内への取り込み、代謝に伴う化学反応、排泄など毒性にかかわる様々な影響が生じるという認識では一致しています。

2. 化学物質の魚毒性と水温の関係【当方の見解】

西内（水産増殖、24, 140-145, 1977）では、162種類の農薬について水温を5段階（15、20、25、30、35℃）設定し、コイを用いた24時間の急性毒性試験が行われている。魚毒性が弱い43種類を除くと、119種類中99種類（83.2%）で水温が高くなるにしたがって魚毒性が強くなり現れていた。図2-1～2-3に農薬種別（殺虫剤、殺菌剤、除草剤）にデータを整理した結果を示す。

【殺虫剤】

魚毒性が弱い14農薬を除いた68農薬中61農薬で水温が高くなるにしたがって魚毒性が強くなり現れていたが、25℃から30℃に変化した際の半数致死濃度の変化の幾何平均は29%の減少であり、これを2℃に換算すると12%となる。そのため、25℃から27℃に変化した際の急性毒性値の変化は12%に過ぎないと考えられる。

¹ 清水昭男、(2006) 魚類の生殖周期と水温等環境条件との関係、水産総合研究センター研究報告 supplement No.4、1-12.

² Kennedy C.J. and Walsh P.J. (1997) Effects of temperature on xenobiotic metabolism, Global warming: implications for freshwater and marine fish, Cambridge university press, 303-324.

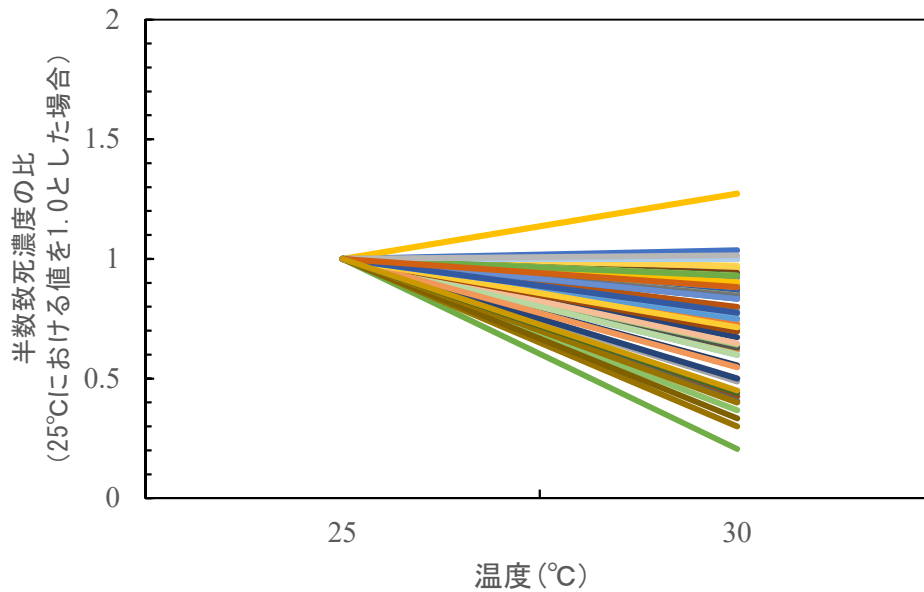


図2-1 殺虫剤における半数致死濃度の温度による変化

【殺菌剤】

魚毒性が弱い14農薬を除いた27農薬中18農薬で水温が高くなるにしたがって魚毒性が強く現れていたが、25°Cから30°Cに変化した際の半数致死濃度の変化の幾何平均は13%の減少であり、これを2°Cに換算すると5%となる。そのため、25°Cから27°Cに変化した際の急性毒性値の変化は5%に過ぎないと考えられる。

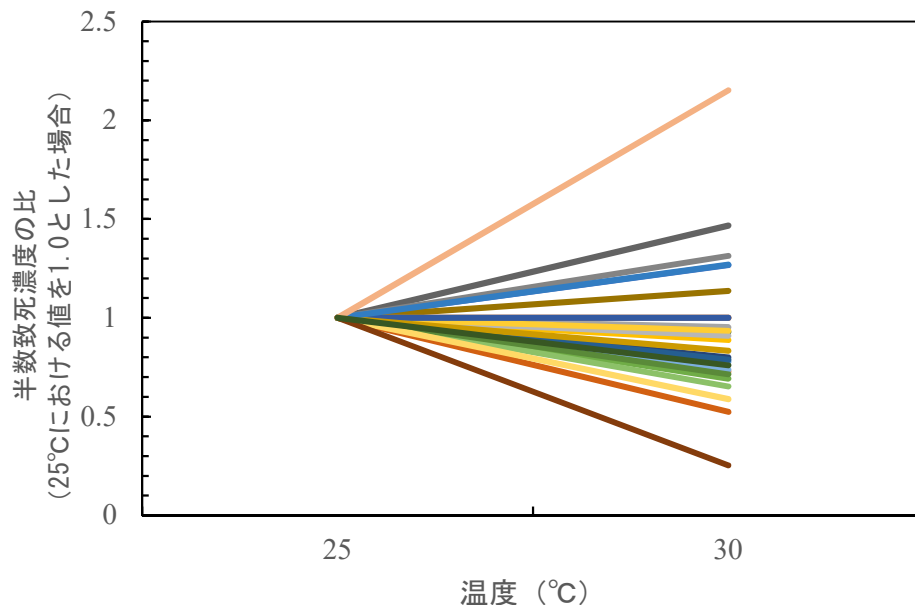


図2-2 殺菌剤における半数致死濃度の温度による変化

【除草剤】

魚毒性が弱い 15 農薬を除いた 24 農薬中 17 農薬で水温が高くなるにしたがって魚毒性が強くなり現れていたが、25℃から 30℃に変化した際の半数致死濃度の変化の幾何平均は 15%の減少であり、これを 2℃に換算すると 6%となる。そのため、25℃から 27℃に変化した際の急性毒性値の変化は 5%に過ぎないと考えられる。

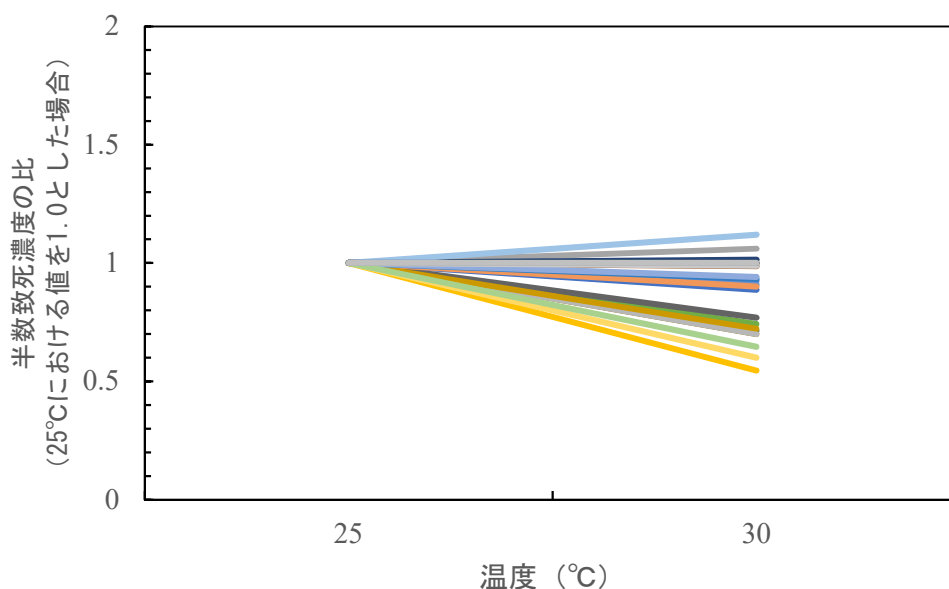


図2-3 除草剤における半数致死濃度の温度による変化

辻ら(衛生化学、32、46-53、1986)では、15種の無機化学物質、8種類の有機金属、13種類の農薬、6種類の防炎加工剤、8種の洗剤及び乳化剤、5種の可塑剤、4種の染料、3種のポリリン酸ナトリウム、25種の有機溶剤、2種の酸化防止剤について、水温を3段階(10, 20, 30℃)設定し、ヒメダカを用いた48時間の急性毒性試験が行われている。試験した90物質のうち、毒性値が算出できたものが73物質あり、そのうち20℃から30℃への水温上昇により毒性が強くなり現れたものが52種類(71.2%、6種の無機化学物質、4種の有機金属、11種類の農薬、6種類の防炎加工剤、3種の洗剤及び乳化剤、3種の可塑剤、3種のポリリン酸ナトリウム、14種の有機溶剤、2種の酸化防止剤)、毒性が変化しなかったものが13物質(17.8%、4種の無機化学物質、3種の有機金属、3種の洗剤及び乳化剤、1種の可塑剤、2種の有機溶剤)であった(図2-4)。

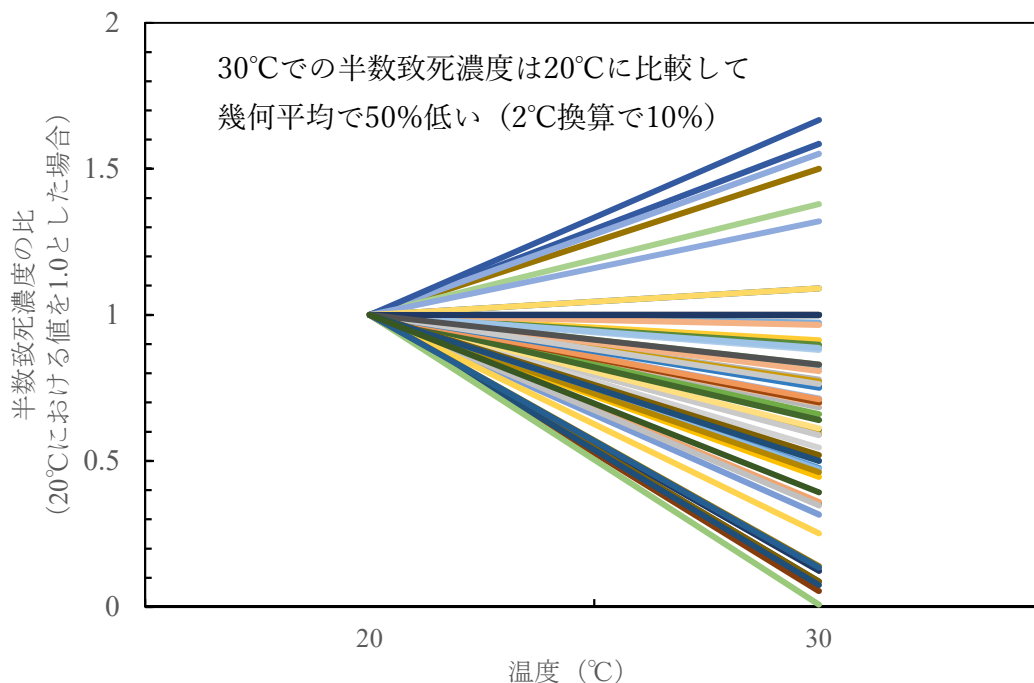


図2-4 様々な化学物質の半数致死濃度の温度による変化（辻らより）

確かに、定性的には毒性値は温度上昇に伴い下がる傾向にあるものの、定量的に見てみると、20°Cに対して30°Cの半数致死濃度の比の幾何平均は50%となり、2°Cに換算すると約13%であった。この毒性値の変化はMEOGRTの公比である3.2（320%）に比べてわずかであり、水温の2°C程度の上昇が毒性値に与える効果が非常に大きいとはいえず、1濃度区分以上変化させるというものではないと考えられる。

他にも、水温と毒性との関係は非常に多くのものがある。たとえば、若林（環境毒性学会誌）の総説に引用されている魚毒性に関する論文を見てみる。

MacLeod and Pessah (J Fish Res. Board Can, 30, 485-492, 1973)は、塩化水銀のニジマスへの急性毒性を5°C、10°C、20°Cの3条件で調べており、それぞれ96時間LC50を0.40, 0.28, 0.22 mg/Lであった（5°C上昇で43%、10°C上昇で27%）としている。この差を2°C程度に換算すると、それぞれ17%と5%となる。

Smith and Heath (Bull Environ Contam Toxicol, 2, 113-119, 1979)は、ニジマス、ブルーギル、キンギョ、ナマズ、ゴールドンシャイナーの5種の魚種について、5, 15, 30°C（ニジマスは5, 12, 18°C）の3条件で3種の金属（銅、クロム、亜鉛）及びシアンを用いて24時間LC50を比較している。キンギョは5°Cと30°Cで毒性が最大でシアンの約9倍になったものの、他の魚種では温度によって3倍以上の変化はなかったと報告している。キンギョのシアンを除いた最大の3倍（5から30°Cの25°Cの温度変化による）の変化は、2°Cに

換算すると16%であった。

Mayer and Ellersieck (Ambio, 17, 367-375, 1988)はブルーギルやニジマスなどの7魚種について、19の農薬(主として有機リン、有機塩素系殺虫剤)の26試験の実施し、96時間LC50が温度によってどの程度変化するかを求め、近似式を算出している。多くの農薬で高温になるほど毒性が強くなる傾向があった一方で、DDT、ジメトリン、メトキシクロルの3種では、高温になるほど毒性が弱いとの報告があった。

Brechen-Folse et al. (Environ Toxicol Chem, 13, 67-77, 1994)は、4-ニトロフェノールと、2,4-ジニトロフェノール、有機リン系殺虫剤のterbufosとトリクロルホンの4物質の毒性を調べたところ、トリクロルホンのみ、それぞれ25.2、18.8、13.3 mg/Lと温度上昇が毒性増強にはたらいたものの、残りの3物質の毒性値はほぼ同等であった。ちなみに、トリクロルホンの毒性値の10°Cでの変化を2°Cに換算すると、14%となる。