

関連資料集

(平成31年3月22日審議資料抜粋)

- ・ MEOGRTにおけるTG240からの逸脱とNOECへの影響について【平成31年3月22日審議資料 資料1-3-1別添1】
- ・ MEOGRTに関する経済産業省と環境省の質疑のまとめ【平成31年3月22日審議資料 資料1-3別添2】
- ・ 物理化学的性状等の詳細(#86_NPE)(案)【平成31年3月22日審議会資料 資料1-3-1別添4】
- ・ #86_NPE進捗報告鑑資料【平成31年3月22日審議会資料 資料1-3別添5】
- ・ NPEの変化物であるNPの有害性評価に係る経緯と論点【平成31年3月22日審議会資料 資料1-3-2】
- ・ 経済産業省委員の論点に関する見解【平成31年3月22日審議会資料 当日配付資料】
- ・ ノニルフェノール曝露が魚の赤血球に及ぼす影響について【平成31年3月22日審議会資料 当日配付資料】
- ・ 3/22の3省合同審議会の議論を踏まえたMEOGRTに関する意見

MEOGRT 試験における TG240 からの逸脱と NOEC への影響について

「生態影響に係る有害性情報の詳細資料」（資料 1-3-1）においてキーデータとされた Watanabe らの MEOGRT 試験は TG240 に準拠して実施されたもののいくつかの逸脱事項があった。これらの逸脱の内容と NOEC への影響についての有害性評価における考え方を整理した。

TG240 からの逸脱事項：

- (1) 水温測定がおおむね週 1 回（TG では原則、毎日）
- (2) 水温が平均 27.1 ± 0.8 （TG では試験期間を通じた平均水温が 24 ~ 26、各水槽の逸脱は短期間で平均水温から 2 以内）
- (3) 59 日目（F0 繁殖期と F1 繁殖期の間）に溶存酸素濃度が一時的に低下（TG では全期間、飽和酸素濃度の 60% 以上）

[試験水温について]

国環研が実施した MEOGRT 試験では、OECD TG240 で定める試験水温を超える水温が測定されている。また、OECD TG240 では水温の測定は、原則、毎日行うこととしているものの測定はおおむね週に一度の実施であった（参考 1）。

同試験で用いた試験水は、別室に設置した調温槽（1000L、25 ~ 26 に調温、計画停電¹時は 22 ~ 24 に低下）から常時給水し、最終的に、試験を実施した部屋の室温（以下「室温」という。）によって水温の管理を行っていた。このため、試験水温は、給水される水の温度と室温の間に収まっていたものと考えられる。また室温の変動に対する水温の応答は緩やかであると考えられる。室温については、F1 繁殖計測期間の 1 時間ごとの連続測定データ（参考 2。以下「室温データ」という。）によれば、F1 繁殖計測期間（1/7 ~ 1/27）はおおむね 27 ~ 29 の間に保たれていた²が、1/16 は室温が 22 ~ 24 まで下がった時間があり³、1/17、18、20、21 には室温が 30 を超えていた時間があった⁴。なお、10/17 の計画停電時の室温データの記録はないが、1/16 の室温と変動幅は同程度またはそれ以下と推察される。

上記の情報を踏まえ、MEOGRT 試験の OECD TG240 からの逸脱とそれによる影響を検討した。

1 計画停電の詳細は以下のとおり。

- ・計画停電：平成 27 年 10 月 17 日 9:00-17:00、平成 28 年 1 月 16 日 9:00-16:30
（MEOGRT の実施期間：平成 27 年 9 月 30 日 ~ 平成 28 年 2 月 10 日）
- ・計画停電により停止した機器：
 - 3F に設置された調温槽（1000L）の温度調整ヒーター及びクーラー
 - 供給水の水温測定口ガー（1F で測定）
 - 1F 試験室の試験水槽下部に設置された 250L 貯水タンクから試験水槽上部の濃度調整ビーカー（1L）への揚水ポンプ

- 濃度調整ビーカー（1L）への薬物投入ポンプ
- 試験室の空調
- ・計画停電による影響：
 - 室温の低下、再通電後の室温のオーバーヒート
 - 3F 調温槽中の供給水の水温の低下（26 22～24 ）
 - 1F 揚水ポンプの停止による濃度調整後の水槽（30L）の水位低下による試験水槽への注水速度の低下（換水率の低下） ただし止水状態になった期間はない
 - 2 OECD TG240 で定める水温は 25 ± 1 とされている。
 - 3 1/16 に実験施設全体の計画停電（9:00～15:00 の6時間）が実施されたことが原因。1/16 に24回計測したうち22～23 が1回、23～24 が1回。
 - 4 1/18 は33～34 が1回、32～33 が2回、30～31 が1回で24回計測中4回。そのほかの日は31～32 が24回計測中1回のみ。

【論点】定常的な水温の逸脱について

実測された水温、供給水の水温（25～26 ）及びF1 繁殖計測期間中のおおむねの室温（27～29 ）を踏まえると、F1 繁殖計測期間中の水温はおおむね26～28 の間で推移し、OECD TG240 で定める水温を定常的に逸脱していたと推定される。この推定は、実測された水温（ 27.1 ± 0.8 ）と整合している。

この逸脱による影響について、NP 以外の物質で実施した MEOGRT 試験（ 26.7 ± 0.7 、 25.6 ± 0.8 ）と本試験のF1 世代におけるコントロール区のペア・1日あたりの平均総産卵数の変動を比較したところ、温度による傾向の違いは認められない（参考3）。これを踏まえると、F1 世代においてTG240 で定める水温から定常的に1 程度逸脱していたことは本試験の結果に大きな影響を与えていないと推察される。

【論点】10/17、1/16 の停電による低温について

1/16 の計画停電による空調の停止により、当日の室温は24回計測中22～23 が1回、23～24 が1回計測された。（他の22回は24～29 の範囲内であった）。一方、試験水の循環装置は運転を続けており、タンクに貯留されていた25～26 の試験水が試験系に供給され続けていた。このため、TG240 に定める水温の下限24 からの逸脱はないか、あったとしてもその程度は大きくななく、本試験の結果に影響を与えていないと推察される。10/17 の計画停電についても、上記のとおり、1/16 の室温と変動幅は同程度またはそれ以下と推察されるため、本試験の結果に影響を与えていないと推察される。

【論点】1/17～1/21 の高温について

1/16 の計画停電後、室温は1/18 に30 を超えたデータが24回計測中4回、1/17、1/20、1/21 は30 を超えたデータがそれぞれ24回計測中1回計測されている（他の23回は27～30 の範囲内であった）。

供給水温は低いものの、室温変動からは、高温側への逸脱の可能性が推定される。この逸脱による影響について、NP以外の物質で実施した MEOGRT 試験 (26.7 ± 0.7 、 25.6 ± 0.8) と本試験 (27.1 ± 0.8) の F1 世代におけるコントロール区のペア・1日あたりの平均総産卵数の変動を比較したところ、傾向の違いは認められなかった(参考3)。このことから、この逸脱はなかったか、あったとしても本試験の結果に大きな影響を与えていないと推察される。

なお、計画停電以降の平均総産卵数及び平均受精卵数から LOEC を算出すると $2.95 \mu\text{g/L}$ 、計画停電実施前までのデータから算出すると $1.27 \mu\text{g/L}$ となり、本試験において計画停電以降に室温が高温となったことにより毒性が増強される傾向は認められない。

[溶存酸素について]

F1 世代の受精後 9 週目に、ペアリングを行うため DMY 判定を実施。DMY 判定中の個体はステンレスメッシュ付き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 59 日目に一部の円筒で溶存酸素の低下が確認された。

【論点】 溶存酸素の一時的な低下について

59 日目の溶存酸素の低下後、溶存酸素が低下したもの、低下していないものからランダムに繁殖ペアが選ばれたため、酸素低下のダメージを受けたとされる個体は全試験区にランダムに分配されているが、他のペアと比べて、成長や繁殖が低い個体がみられなかった(例えば総産卵数の変動係数は、ほぼ繁殖がみられなかった $89.4 \mu\text{g/L}$ 濃度区を除くと 15~32%と小さい)ことから、酸素低下を受けた個体と受けなかった個体に差はなかったと推察される。

また、対照区の産卵数に F0 と F1 で異常に起因すると考えられる差が認められないため、短時間の溶存酸素低下によってそれ以降の実験に何らかの影響があったとは考えにくい。

[添付資料]

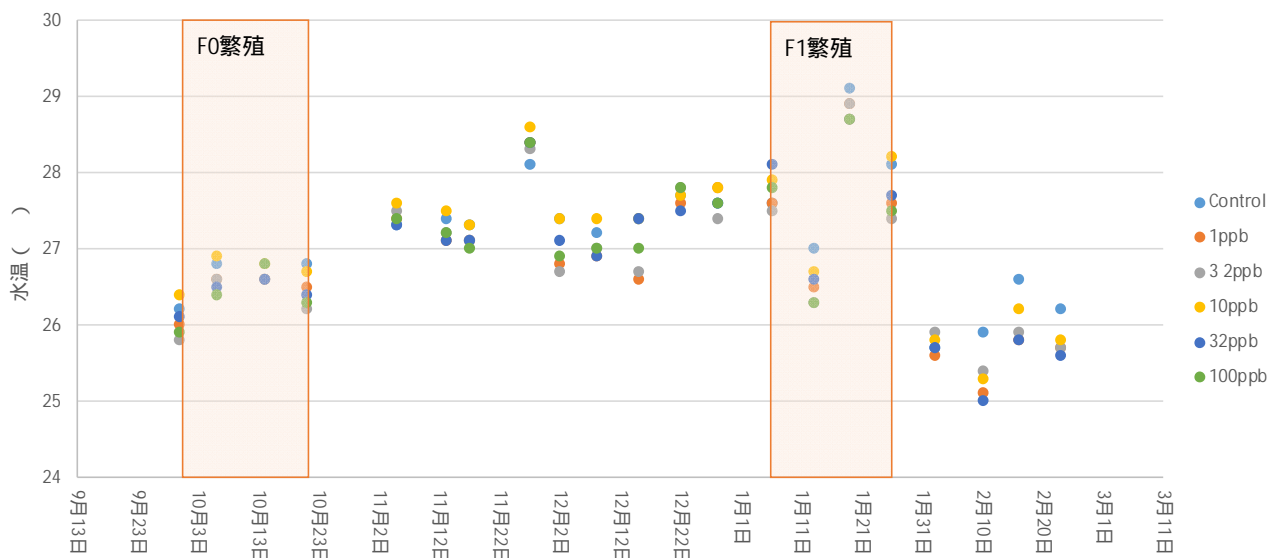
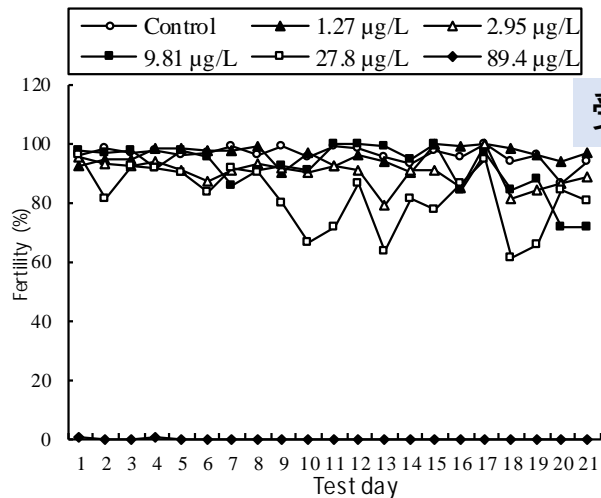
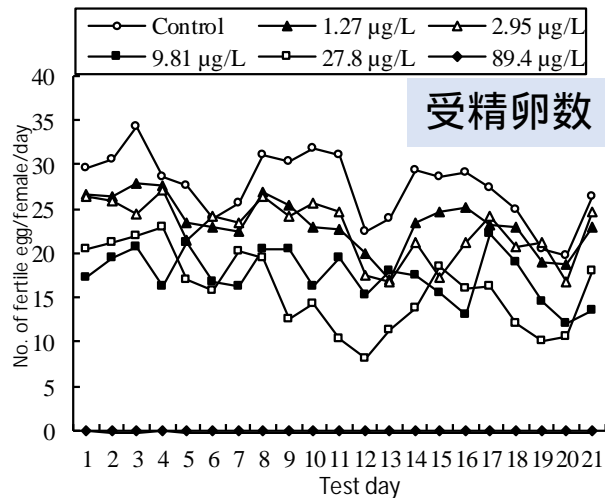
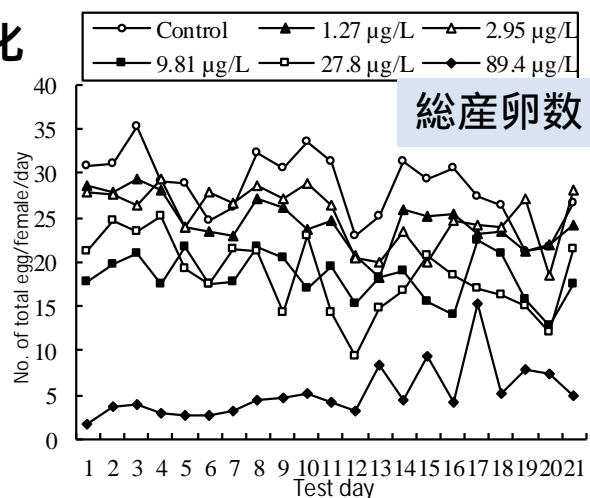
参考 1 ノニルフェノール MEOGRT 温度変化と F1 繁殖への影響

参考 2 試験を実施した部屋の室温の測定データ

参考 3 NP 以外の物質で実施した MEOGRT 試験と本試験の F1 世代におけるコントロール区のペア・1日あたりの平均総産卵数の変動の比較

(参考1) ノニルフェノールMEOGRT温度変化とF1繁殖への影響

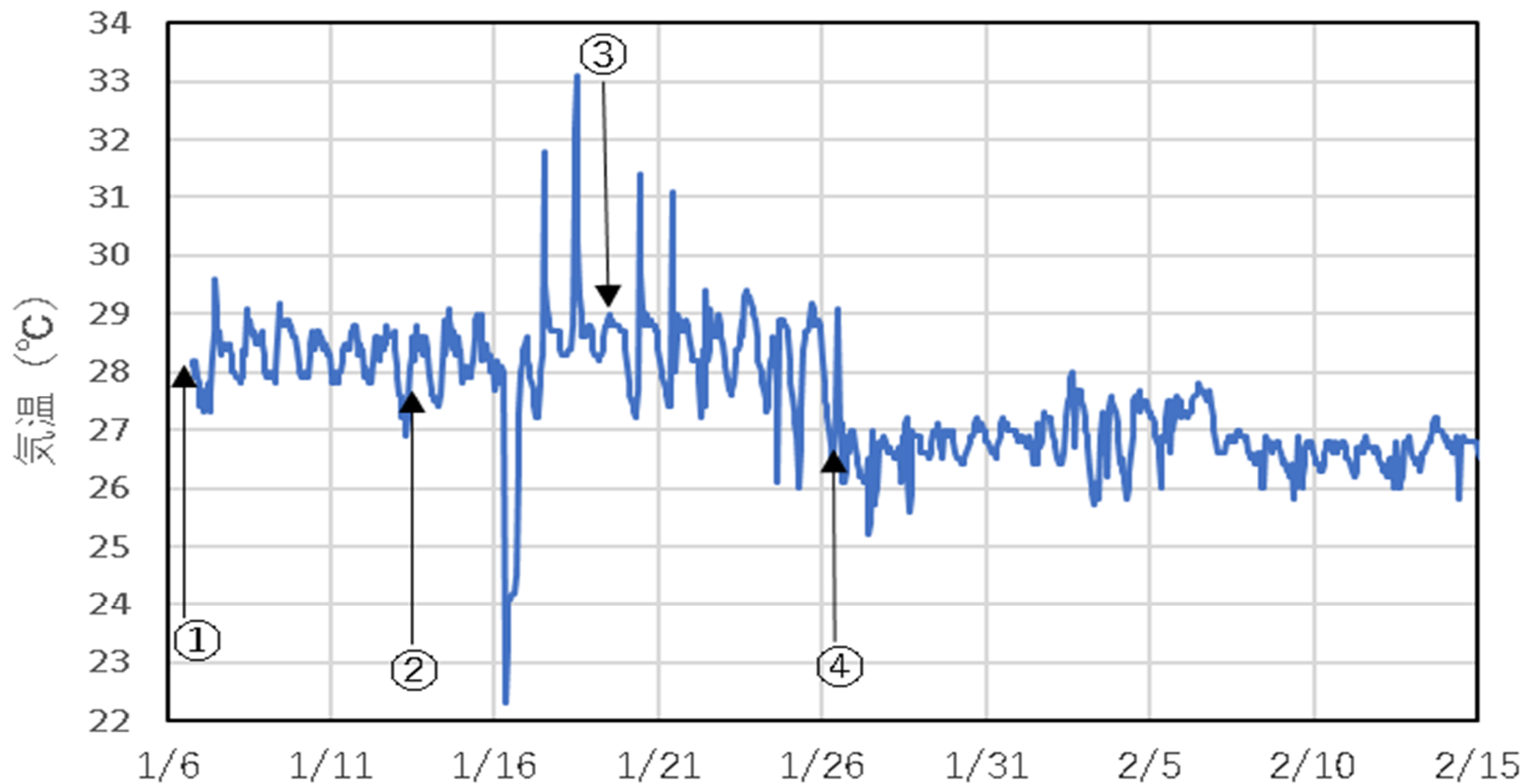
経日変化



F1繁殖計測中の水温()

繁殖期間	平均	最小	最大
1/6 : 開始前日	27.8	27.5	28.1
1/13 : 7日目 (1週目の最後)	26.8	26.3	27.0
1/19 : 13日目 (2週目終了前日)	28.8	28.7	29.1
1/26 : 20日目 (3週目終了前日)	27.8	27.4	28.2

(参考2) 試験を実施した部屋の室温の測定データ



MEOGRT に関する経済産業省と環境省の質疑のまとめ

(1) 全般

項目	< 第 1 回 > NPE (NP を含む) の有害性評価結果への意見 MEOGRT 法試験結果についての英語論文は確認してない範囲での質問、意見等		< 第 2 回再質問 > NPE (NP を含む) の有害性評価結果への意見	
	経済産業省 (以下、METI) 2018/02/27	環境省 (以下、MOE) 2018/03/05 回答	METI 2018/3/9 再意見・質問	MOE (回答案) 2018/3/20 再々回答
【 1 . 有害性情報の詳細資料へのコメント等】				
p.9 ~ 変化物 の二次消費者(魚類)のキースタディ選定について	今回の MEOGRT 法による試験には、下記「 2 . 試験法開発報告書へのコメント等」に挙げた疑問、問題点が存在すると思います。その点が解明できるまでは、既に実施済みのフルライフサイクル試験等の結果をリスク評価に用いるべきと考えます。少なくとも現時点では、F1 世代から得られた結果は参考程度の結果として扱うべきと考えます。			
p9 31 行目 : LOEC を『 2 』で除した値を採用することについて	慢性毒性候補値として、LOEC (0.00127mg/L) を『 2 』で除した値 (0.00063mg/L) を使用しています。試験設計の問題で NOEC が得られなかったため、専門家判断にて『 2 』で除した値をキーデータとしたものと考えますが、適用係数『 2 』の基本的な考え方について、コンセンサスを得る必要があるのではないのでしょうか。	環境省では、リスク評価 (一次) 評価 において、毒性試験から得られた既往知見の信頼性をガイダンス文書に従い確認しています。原著では、最低濃度区において対照区と繁殖に関する有意差が認められたことから、最小濃度区を繁殖に対する最小影響濃度 (LOEC) として採用しています。このような場合に、無影響濃度 (NOEC) を推定するには、いくつかの考え方があります。例えば、欧州連合 REACH では、NOEC が得られていないが、LOEC の阻害率が 10 ~ 20% の場合には NOEC を LOEC/2 として導出できるとされています。また、NOEC は LOEC の 1 つ前の濃度区となることから公比 (この場合は 3.2) を考慮する方法もあります。当該試験では、LOEC での繁殖に係る阻害率が 10% 程度であることから、NOEC は LOEC を公比で除するほどではないと判断し、LOEC を「 2 」で除して NOEC とすることとしました。	(再意見・質問など) LOEC から NOEC を推定する基本的な考え方については、理解致しました。 2 点ご確認させて下さい。 REACH の考え方、『 NOEC を LOEC/2 として導出できる』の科学的根拠について、ご存知でしたらご教授下さい。また、『 NOEC を LOEC/公比として導出』する方法は、化審法有害性 WG 等において、専門家の中で合意を得ているのでしょうか。 化審法新規化学物質に係る生態毒性試験においては、最小濃度区で毒性影響が見られた (NOEC が算出できない) 場合は、これまで届出資料として受理されてこなかった (再試験が必要) と認識しております。本物質は新規物質ではありませんが、規制に係るキースタディとなることから、本来は同様の扱いをされるべき事案かと考えます。今回お示し頂いた LOEC から NOEC を推定する基本的な考え方については、今後の化審法審査における前例となると理解してよろしいでしょうか。	先に示しました REACH のガイダンス文書 (脚注 1) を調べましたが、LOEC/2 から NOEC を算出する根拠は見当たりませんでした。また、NOEC 値をどのようにするかを専門家で構成された WG でご検討いただいた際に、公比で除する方法も提示しております。その結果として、阻害率を考慮すると公比で割るのではなく、「 2 」で除することとなりました。毒性試験の濃度区は公比により設定されることから、公比で除するという考え方については専門家からの疑義はありませんでした。 過年度の状況を調査したところ、そもそも新規化学物質に係る生態毒性試験においては急性毒性試験が提出されており、慢性毒性試験の提出は非常に少ないケースでした。過年度の記録を確認したところ、最小濃度区で影響が出なかった試験については確認ができませんでした。いずれにせよ、試験ごとの採否は専門家により精査を行っており、本試験も同様です。また、LOEC から NOEC を算出する方法については、個別物質ごとに試験データを精査し、ふさわしい方法で推測をいたしますので前例とはなりません。
p11 3 行目 - 7 行目 : 親物質 (NPE) の有害性データの信頼性評価について	毒性情報は変化物も含め 2000 テータ程度収集されていますが、親物質 (NPE) については、1 データのみの採用となっており、不確実性係数として『 1,000 』が適用されております。有害性データが数多く存在するにも関わらず、詳細評価の段階で大きい不確実性係数を適用している点に関して問題があると思います。個々のデータに関して化審法信頼性基準を満たしていなくとも、総合的に判断することで活用可能なデータ、不確実性をさげることは可能ではないのでしょうか。	信頼性評価は一定の根拠に従って専門家が行っており、NPE の場合、1 データのみが PNEC の導出に採用となりました。信頼性不明として不採用になったデータについては、従来どおりガイダンス文書に従いキースタディを選定する際の参考としてクロスチェックや証拠の重み付け等に利用しましたが、今回は不確実性係数を変更する根拠となるデータはございませんでした。魚類の慢性データがないことにより急性慢性毒性比 100 と屋内から屋外への外挿係数 10 で除されることになっております。事業者様におかれましては、魚類の慢性データを取得されて御提供いただければ不確実係数のうち 100 を用いる必要はなくなります (ただし、甲殻類と藻類の慢性毒性値が得られないことによる種間差 10 は新たに考慮されます) 。	(再意見・質問など) 信頼性不明のデータについても、参考としてクロスチェックや証拠の重み付け等に利用した上で不確実性係数として『 1,000 』を適用したことについて、理解致しました。 当概物質の有害性評価の透明性を確保する上で、個々のデータについて信頼性不明とした理由を含め、収集したデータ一覧を審議会資料として添付を希望いたします。	収集した毒性情報のデータ数につきまして、2000 としておりましたが、約 1000 データの誤りでした。訂正いたします。なお、収集したデータは添付いたします。
【 2 . 試験法開発報告書へのコメント等】				
被 験 化 合 物 (Page 9)	今回使用されたノニルフェノール (NP) (CAS : 84852-15-3) の選定理由が不明。多数の NP がある中で、何故にこの CAS No. の NP を使用したのかの説明が必要。また、異性体混合比率、不純物組成を明確にすべきである。 理由は、ご存知のように、NP の異性体間で一	水環境中では主に工業的に多く製造されている分岐型ノニルフェノールの異性体混合物が検出されています。分岐型ノニルフェノールとして CAS に登録されている物質の CAS No. は、84852-15-2 であり、米国、欧州連合の化学物質規制でもこれが登録されています。 環境省が SPEED ' 98 の下で平成 11 年度に実施したフル	(再意見・質問など) 化合物の選択理由は了解しました。只、異性体混合比率や不純物を確認することは重要と考えます。例えば、同じ CAS No. NP であっても異性体混合比率が異なれば毒性値は大きく異なる可能性があると思います。法的よりも科学的に、今後、毒性を比較する上で、重要な情報だと思います。誰かが本試験を追試する時も、こ	関東化学の当該製品の異性体比は、小西ら (化学生物総合管理、4、49-56、2008) ならびに堀井ら (分析化学、59、319-327、2010) に他のメーカーの製品との詳細な比較が記載されています。それぞれの異性体比の差は一定程度の範囲内にあると考えられるほか、当該製品の異性体比は平均的な値です。分析は m/z=107 を定量イオンと

項目	< 第 1 回 > NPE (NP を含む) の有害性評価結果への意見 MEOGRT 法試験結果についての英語論文は確認してない範囲での質問、意見等		< 第 2 回再質問 > NPE (NP を含む) の有害性評価結果への意見	
	経済産業省 (以下、METI) 2018/02/27	環境省 (以下、MOE) 2018/03/05 回答	METI 2018/3/9 再意見・質問	MOE (回答案) 2018/3/20 再々回答
	<p>般毒性、エストロゲン様活性は異なると報告されている。混合物を被験化合物とする時は、成分比を明確にすべきである。さらに、これまでに実施されたメダカでの試験に使用された NP の異性体混合比率との比較、毒性の強さの相関性を最後の考察の部分で言及すべきである。今回報告された試験結果は、過去の試験に比べてやや毒性が強く出ているような印象を受けるが、それは試験法により毒性検出感度が鋭敏になったのか、それとも被験化合物の NP の異性体比率が変わったのか、試験条件の差等によるものか不明である。</p> <p>原則的には、被験化合物 NP の異性体は、環境中に残存量の多い異性体に近い組成の CAS No の NP を選抜すべきである。</p>	<p>ライフサイクル試験(一般財団法人化学物質評価研究機構実施)において用いられたノニルフェノールは、報告書に CAS No. 104-40-5 と記載されていますが、のちに今回使用した分岐型ノニルフェノールの異性体混合物と同等であると訂正されており(GC/MS 分析により確認)、環境省ではこれを分岐型ノニルフェノールに係る試験結果として公開しています。</p> <p>以上を踏まえ、環境中で検出されている主要な異性体をすべて含む物質である、関東化学製ノニルフェノールの分岐型異性体混合物 (CAS No. 84852-15-2) を被験物質として使用しました。</p> <p>異性体混合比率や不純物を厳密に求めることは難しく、法的な要求項目としても、異性体比率までは必要としないという判断の下で、分岐型ノニルフェノールの異性体混合物 (CAS No. 84852-15-2) と純度 (4 - ノニルフェノール (分岐) >97%) によって被験物質を定義しています。</p>	<p>の情報がなければ結果の科学的な議論ができないと思います。そこで、本試験では、何ロットの試薬を使用されたのか。また、もし、複数のロットを使用されたなら、GC-MS でロット間の同等性を確認されていますか。さらに、本化合物の GC-MS で濃度測定されていますが、この測定条件下で主ピークは何本 (それと質量数) だったのか。また、不純物ピーク何本 (それと質量数) ほど確認されましたか。被験物質の純度は測定値かそれともメーカーからの提供データでしょうか。異性体混合物を被験化合物するときは、この情報は重要なのでご教授ください。</p>	<p>して主ピークは 10 本程度確認しています。なお、純度はメーカーからの提供データです。ロット番号は本試験の間は同じものを使用しました。</p>
給餌量 (表 1-1、Page12)	給餌量が TG240 で提示された量よりも最大で 2 倍ほどになっているが、その説明を記載すべきである。	TG240 の給餌量は参考として記載した目安であり、各試験機関において十分な成長と繁殖が確保できる量を与えるべきとされ、ガイドラインでも量を変更することは許容されています。本試験で用いた系統を継代・維持するために試験機関で最適化された給餌量を与えております。	了解しました。	
濃度設定 (Page 21)	5 濃度の設定根拠の記載がない。予備試験の結果等から本試験での 5 試験濃度の設定根拠を記載すべきである。	<p>学術論文や過去に環境省事業において実施された試験、特に、フルライフサイクル試験の結果を踏まえて設定しました。フルライフサイクル試験の実測試験濃度は、4.2、8.2、17.7、51.5、183 $\mu\text{g/L}$ であり、183 $\mu\text{g/L}$ では第一世代のすべてが swim-up できず死亡していました。</p> <p>51.5 $\mu\text{g/L}$ ではふ化後 60 日齢までにオスの二次性徴を示す個体が見られなかったため、繁殖データは 17.7 $\mu\text{g/L}$ 以下のみですが、繁殖への統計学的に有意な影響はみられませんでした。ただし第一世代では 17.7 $\mu\text{g/L}$ 以上、第二世代では 8.2 $\mu\text{g/L}$ 以上で精巣卵が観察されました。MEOGRT はフルライフサイクル試験よりも繰り返し数が多く、繁殖影響への統計学的な検出力が高くなっているため、より低い濃度での影響検出の可能性を踏まえて、1、3.2、10、32、100 $\mu\text{g/L}$ を設定濃度としました。</p>	了解しました。	
水温 (Page 21) (2) に続く	TG240 が定義する水温の有効性基準は 24 ~ 26 であるが、この範囲を逸脱し、試験区によっては最大で約 3 も上昇している。この逸脱した温度上昇により、化合物の取り込みが促進され、毒性への影響の可能性がある。また、遺伝的メス (XX) の表現型のオス化が促進される可能性がある。何故に、このような温度設定になったのかの説明を記載する必要がある。	<p>試験期間中の平均水温は各試験区において 26.9 ~ 27.1 であり、試験法記載の 24 ~ 26 の範囲から約 1 高くなっていますが、平均からの変動は ± 2 以内に抑えられており条件の 1 つを満たしていました。各週の測定値は、水温の上限範囲である 26 ± 2 の幅にほぼ入っていましたが、F1 孵化後の 4 週目と 11 週目の測定値が 0.1 ~ 0.9 ほど範囲を超えていました。温度上昇に伴う化学物質の取り込み、代謝、排泄量の変化、および影響の増加または低減に影響を与えた可能性は否定できませんが、どの程度全体の結果に影響を与えたかは不明です。化審法の審査では、一時的な温度の変化については軽微な影響として取り扱っています。</p>	<p>(再意見・質問など) 試験有効性基準 (Page20 に記載) に従うと平均水温は 24 ~ 26 ですが、標準偏差値から見て、26 以上が常態的で指定水温域から逸脱していて、有効性基準から判断して試験は無効と考えます。温度分布が正規分布していたとすれば 26 以下 (有効基準内) は全体の約 15% ((100% - 68.3%) / 2) で、約 85% 以上は 26 以上で、一時的な逸脱ではなく、殆どが有効基準外であると判断します。この指摘は間違っていますか。</p> <p>即ち、OECD TG240 テストガイドライン (英語版)、8 .Test Validity Criteria および Annex3 3. Water temperature 記載では nominal temperature は 25 で試験水温は試験を通じて 24-26 とすべきであると記載されています。ただし、平均値からの一時的な逸脱 (brief excursions) は 2 を超えてはならないとされています。この英文からは、試験水温の平均値はまずは 24 ~ 26 (中央値、25) 内で、この範囲内の平均水温からの一時的な逸脱は 2 を超えてはならないと解釈しました。また、これ以外の解釈は残念ながらできませんでした。</p>	<p>MOE 回答のバージョンが複数ありましたが、併記しています。</p> <p>(3/20 環境省再々回答 : 2018/06/18 送付バージョンに記載されている回答)</p> <p>TG240 では 9 週齢でペアリングを、13 週齢 ~ 15 週齢で繁殖データを得るため、なるべく性成熟が進んでいることが望ましく、上限温度の 26 で試験計画を立案しました。しかし、空調の不調等のため、一時的に 29 を超えてしまったこともあり、結果的に平均水温が $26.9 \pm 0.95 \sim 27.1 \pm 0.91$ になってしまいました。</p> <p>一方、新版メダカ学全書 (岩松鷹司著、2006 年、大学教育出版) によると、繁殖の適温は 26 ~ 28 とあります。そのため、平均水温が 1 高い 27 でも影響は軽微であると考えております。</p> <p>また、化評研が実施したフルライフサイクル試験は、通常は 24 ± 1、繁殖期のみ 28 ± 1 に昇温するという試験条件でしたが、当時の専門家判断により結果は受理され、専門誌 Environmental Toxicology and Chemistry</p>

項目	< 第 1 回 > NPE (NP を含む) の有害性評価結果への意見 MEOGRT 法試験結果についての英語論文は確認してない範囲での質問、意見等		< 第 2 回再質問 > NPE (NP を含む) の有害性評価結果への意見	
	経済産業省 (以下、METI) 2018/02/27	環境省 (以下、MOE) 2018/03/05 回答	METI 2018/3/9 再意見・質問	MOE (回答案) 2018/3/20 再々回答
		メダカは水温が性決定に関与することが知られていますが、性決定時期に継続的に温度が高いことが条件となります。今回、対照区で性比が偏っていないことを考えると、今回の水温が性比に影響を与えた可能性は非常に低いと考えられます。	<p>ですから常態的に 26 以上の試験水温は許容されないと解釈しました。もし、仮にご説明の 26±2 が許容されるのなら 24 ~ 28 の平均水温なら試験は成立することになります。このような幅広い試験水温が許容されるのでしょうか。</p> <p>(再意見・質問など) XXmale の出現はもっと高い温度で起きることは承知しております。ご存じのように水中被験化合物の取り込みは、水温上昇でかなり促進されたように考えます。化合物により異なりますが、一般的には、水温と毒性値が正の相関をし、水温上昇で急性 LD50 は強くなると考えられます。本試験では、水温は最大 29 まで上昇している場合があり、今回の試験での高い水温域は他の NP 毒性試験の毒性値より強く表れる要因の一つの可能性ががあります。</p>	<p>にも投稿・受理されております (Yokota et al., 2001)。したがって繁殖影響については、連数が異なることを除き、両試験で比較可能と考えます。</p> <p>また、下線部の引用文献について、本試験への適用性を精査させていただきたく、具体的にご教授いただけますと幸いです。</p> <p>(水温の METI 質問 (2018/3/19) に記載されている回答)</p> <p>水温と毒性の関係は試験生物種やエンドポイント、化学物質により異なります。魚類の急性毒性については、ご指摘のように水温と正の相関を示す物質が多く報告されていますが、DDT のように負の相関を示す場合もあります (Mayer and Ellersieck: Manual of Acute Toxicity: Identification and Data Base for 410 Chemicals and 66 Species of Freshwater Animals, 1986)。</p> <p>水温の毒性に対する影響は、試験の信頼性を損なう変動ではないとみなせると環境省の有害性情報の信頼性確認を行っているワーキンググループの生態毒性の専門家会議でも考え、データを採用しました</p> <p>(上記での回答)</p> <p>ご指摘の「一般的には、水温と毒性値が正の相関を示す」は、試験生物種や化学物質の種類に依存します。例えばブルーギル等の魚類急性試験データ (96 h-LC50) と水温の関係を解析した Mayer と Ellersieck (Manual of Acute Toxicity: Identification and Data Base for 410 Chemicals and 66 Species of Freshwater Animals, 1986) によると、最も減少率が高い物質でも、たとえば TG240 で許容されている最高温度の 26 から本試験で観察された 27 の 1 の水温上昇による LC50 の減少は約 18% です。</p> <p>なお、参考までに、参考文献となっている化評研が実施したフルライフサイクル試験では、通常は 24±1 で維持されておりましたが、繁殖期のみ 28±1 に昇温されておりました (51.5 µg/L で繁殖への影響なし)。</p> <p>F1 繁殖期の水温の影響に着目した場合、3 週目で特に一時的に 29 近くまで上昇しましたが、3 週目の繁殖に対する LOEC は逆に 1 週目、2 週目より 1-2 濃度区高く、逆に毒性が低くなりました。</p> <p>水温の毒性に対する影響は、試験の信頼性を損なう変動ではないとみなせると環境省化審法評価(II)ワーキンググループの生態毒性の専門家会議でも考え、データを採用しました。</p>
FO 世代試験 (Page15)	TG240 で厳格に求められている条件であるが、FO で選ばれたヒメダカの雌雄は遺伝的検査をして選別しているのか、それとも、表現型で雌雄を選別しているのか、その記載がない。つまり、XX、XY を検定して選んでいるのかが不明。もし、この遺伝子検査がなければ試験全体の信頼性が著しく損なわれる。	OECD テストガイドラインで FO の DMY 測定は要求していないため、FO で遺伝的検査は実施していません。仮に遺伝子異常の個体が混ざっていたとしても F1 の遺伝的検査と外観からその個体を排除できるため、試験の信頼性は確保できていると考えます。	(再意見・質問など) OECD TG240 プロトコル (英語版) Paraphrase 18、Annex9 で FO の XX,XY を確認すべきと記載されていますが、XX,XY を確認されたのでしょうか。表現型で、ある程度 XX,XY を判定できることはわかりますが、厳密ではないと思います。貴研究所で長年飼育されているヒメダカの系統はストレスのないときは表現型と遺伝型は完全に一致しているのでしょうか。もしそうであれば、それを示す公表論文をご教授ください。それとも、遺伝子検査以外で XX,XY を verify できる方法はあるのでしょうか。この点をご教授ください。F1 に関する	OECD Test guideline No240 の annex 9 には、Each replicate tank houses a single breeding fish pair (XX female-XY male breeding pair) と書いてあり、XX-XY ペアを使うようにとも解釈できますが、DMY を測定しなければならぬとは書いてありません。酒泉ら (Zool. Sci. 21, 613-619, 2014) によると、野生のメダカは自然発生的に 1~3% の性転換個体が存在する可能性はありますが、我々の実験室で長年飼育されているメダカにおいて、経験的に遺伝子型と表現型が一致していない個体の発生例はみだたありません。

項目	< 第 1 回 > NPE (NP を含む) の有害性評価結果への意見 MEOGRT 法試験結果についての英語論文は確認してない範囲での質問、意見等		< 第 2 回再質問 > NPE (NP を含む) の有害性評価結果への意見	
	経済産業省 (以下、METI) 2018/02/27	環境省 (以下、MOE) 2018/03/05 回答	METI 2018/3/9 再意見・質問	MOE (回答案) 2018/3/20 再々回答
			る点は、了解いたしました。	遺伝子検査以外で verify する方法として、メンデルの法則を利用する方法があります。仮に F0 に XY 雌が混ざっていた場合、正常な XY 雄との間には、遺伝子型 XX、2XY、YY で、表現型が雌：雄 = 1：3 の F1 個体が生まれてくるはずですが、今回の F1 でそのような外見的に雄が多いタンクの事例は観察されていません。一方、XX 雄 (こちらの発生確率はさらに低い) と正常な XX 雌との間には、すべて XX 雌の F1 が生まれるはずですが、そのような事例も生じていません。XX 雄と XY 雌のペアがもし F0 にいた場合には F1 は性比で異常を検知できませんが、そのような組み合わせが起こりうる確率は非常に低く、無視できると考えられます。今回の MEOGRT の曝露区で生じた性転換個体はすべて XY 雌なので、濃度依存的に化学物質によって発生した雌であり、F0 の遺伝子と外見の性不一致によって生じたケースとは考えられず、結果の信用性に影響はありません。
<u>F 1 世代垂成体の生存率 (page29)</u>	3 行目に “ 対照区、1.27、2.95、9.81 µg/L 濃度区では 12 個体中 6 個体/連、27.8 µg/L 濃度区では 8 個体/連、89.4 µg/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。 ” とあるが、対照区でも半数がメスの表現型を示したのは何故か不明である。この記載は正しいのか。飼育条件に問題はないのか。	F1 を繁殖用のペアリングに供するため、各水槽の 12 個体中、オス、メスを 2 匹ずつ選抜する必要があります。通常、メダカの性比は 1：1 であり、9 週目で外見的に既に雌雄の違いが出ている個体もあるため対照区および低濃度区は 6 個体の DMY 判定を行えば十分雄雌 2 個体以上を確保できました。ところが高濃度区ではすべての個体が雌の表現型を示し、外見的に性別ができなかったため、すべて DMY 判定に供する必要がありました。なお、対照区で半数がメスの表現型を示していることは、標準的であり、言い換えれば飼育条件に問題がないことを示しています。	(再意見・質問など) 当方の読み間違いで、内容了解しました。“ . . . 示していたために、全個体を DMY 判定に供した。 ” の文章で、メス型を示したので、全てを DMY 遺伝子検査すると読めましたので誤解をしました。本来は、実験の部で記載のあるように表現型はどうあれ、全て DMY 遺伝子検査をするのですね。	
<u>F 1 世代垂成体の生存率 (page29) (2) に続く</u>	59 日目に溶存酸素の著しい低下が起こったとあるが、その後の生存率に影響がなかったために問題視していないが、正確な情報の記載がないので試験の信頼性に疑問が残る。まず、溶存酸素がどの程度低下したのか、また、その低下した期間はどの程度なのかを明記すべきである。さらに、死亡率が変わらないから、それ以降の結果に影響を与えていないとする根拠はないのではないか。この溶存酸素の低下の影響は不明で、試験への影響に不安があり、信頼性に疑問が残る。	DMY 判定の結果が出るまでの間 (一晩) は、1 頭ずつガラス円筒に保持しておく必要がありましたが、その時に一部の円筒内で水の循環が低下したために、鼻上げ行動を起こしたメダカが見られましたが死亡はありませんでした。円筒内の溶存酸素が下がった期間は最大でも夜間の 12 時間であり、その後、溶存酸素の低下が起こった水槽と起こっていない水槽との間に、成長、産卵数、生存率等のエンドポイントに差は見られませんでした。このことから、一時的な溶存酸素の低下による試験結果への大きな影響はなかったと考えられます。	(再意見・質問など) この点は大変重要な箇所なので、詳しくご教授ください。ご存知のように、溶存酸素の低下は、最近の論文で、魚類の生殖 (transgeneration の影響を含めて) に大きな影響を与えるといくつか報告されています。今回の 12 時間程度の溶存酸素の低下ですが、どの程度低下したかを教えてください。また、どの群、雌雄のそれぞれの何匹に溶存酸素の低下が起こったかが文章からは理解できませんでした。つまり何が起こり、どのように対処されたのか全体像がレポートからはっきりと理解出来ませんでした。次に、最も知りたいのは、成長、産卵数、生存率に関して溶存酸素の低下した水槽とそうでない水槽との間で差はなかったとご説明頂きましたが、どの表、図を見ればそれが理解できるかをご教授ください。短期の溶存酸素の低下でも、魚に対して遺伝子発現の大きな変動を惹起し、その後どのような生理学的影響を与えるかが不明なので、この点を明確にする必要があると考えるからです。	全 42 水槽中の合計 100 個弱の円筒の内、どの程度の円筒で溶存酸素の低下が起きていたのかは不明です。一部だけ測定した溶存酸素は 1mg/L 程度でした。その後、ランダムに繁殖ペアが選ばれたため、酸素低下のダメージを受けたとされる個体は全試験区にランダムに分配されているはずですが、他のペアと比べて、成長や繁殖が低い個体がみられなかった (例えば総産卵数の変動係数は、ほぼ繁殖がみられなかった 89.4 µg/L 濃度区を除くと 15 ~ 32% と小さい) ことから、酸素低下を受けた個体と受けなかった個体に差はなかったと考えています。なお、メダカの場合、通常飼育でポンプの故障などで貧酸素が発生しても鼻上げ行動により酸素不足を解消する能力があります。さらに対照区の産卵数に F0 と F1 で異常に起因すると考えられる差が認められないため、短時間の溶存酸素低下によってそれ以降の実験に何らかの後遺症があったとは考えにくいです。

項目	< 第 1 回 > NPE (NP を含む) の有害性評価結果への意見 MEOGRT 法試験結果についての英語論文は確認してない範囲での質問、意見等		< 第 2 回再質問 > NPE (NP を含む) の有害性評価結果への意見	
	経済産業省 (以下、METI) 2018/02/27	環境省 (以下、MOE) 2018/03/05 回答	METI 2018/3/9 再意見・質問	MOE (回答案) 2018/3/20 再々回答
F1 世代亜成体での連数と LOEC が過小評価になっている可能性 (2) に続く	<p>さらに、F1 世代亜成体では、6 連で実施すべきところを 2 連で実施したとあるが、ガイドラインが設定している 6 連ではないという逸脱がある。考察で“ 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。”(Page47)とあるが、その通りと考える。また、“ 表現型の性別ごとに 3 連ずつプールして維持した ”とあり、連数を減少することによりヒメダカにとって試験環境が大きく変わることにより、本来のデータとは異なる可能性がある。</p> <p>表 1-13、1-14、1-16、1-15、図 1-9 (Page 30-32) これらの図表について説明文に“ 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 ”とあるが、この匹数の由来がよくわからない。特にメスはどのようにしてなのか。</p>	<p>ペアリングの準備のため、DMY 測定に供した個体と供していない個体、さらに雌雄で個体を分けておく必要がありました。DMY による雌雄判定後にペアリングに使用しない個体を、解剖直前に、上記の通り一時的にプールしておく必要がありましたが、プールされるまではガイドラインどおり 6 連で曝露されております。プールしたため解剖時には各個体の元の水槽の由来が不明になってしまい、解剖データは水槽ごとではなく個体ごとに取り扱っていません。すなわち、今回は 12 個体中 4 個体を繁殖用個体として選抜し、残りの最大 8 個体×6 連=48 個体 (対照区は 96 個体) を雌雄別に集計した数 (約半数) が n 数となっています (つまり、通常繰り返し数 n=6 のところ n=おおよそ 24 (対照区は n=48) として計算しています)。</p> <p>OECD テストガイドラインの他の魚類試験においても、以前は個体ごとに集計しておりましたが、最近のテストガイドライン改訂で、水槽ごとにデータを取り扱うことになりました。さらに MEOGRT の統計フローチャートによると、水槽内の変動も加味する統計手法が用いられることから、個体ごとに集計した結果と大きな検出力の差はないと考えています。</p>	<p>(再意見・質問など) ご説明頂きましたが、溶存酸素低下の事態発生後ののように対応されたのかの全体像が、不明瞭なので上記 の回答と同じく判断できません。</p> <p>(再意見・質問など) 考察で、“ 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。”と記載されていますが、LOEC の過小評価に関してはどのようにお考えなのかご教授ください。</p>	<p>別に実施された MEOGRT データにおいて、個別に扱った場合と、プールした場合に LOEC が異なるかを検証したところ、両者に差は認められませんでした。よって過小評価した可能性は低いと考えられます。</p>
F 1 世代亜成体の間性または性転換 (表 1-17、1-18、Page33)	<p>対照群の遺伝的オスの表現型での不明が 46 例中 13 とあり、これは性成熟が対照群だけで遅延したのか。また遺伝的メスでも同様なことが生じているが、F1 の対照群におけるデータに説明が一切ないので、何らかの説明が必要である。これは飼育条件に何かが起こっているのではないかと懸念がある。</p>	<p>9 週齢目ではまだ 2 次性徴の発現が完全ではなく、表現型の性別が明確ではないのが通常です。対照区は曝露区の 2 倍の個体数があるため、不明個体が多いように見えますが、通常の飼育条件の成熟速度と同程度です。一方、女性ホルモン様作用を持つノニルフェノールを投与した曝露区の場合には雌の 2 次性徴が早めに現れる可能性があります。</p>	<p>(再意見・質問など) 遺伝的オスおよびメスの対照区での表現型が不明の例数は、曝露区よりも明らかに多いと思います。オス、メス両性での表現型の不明数は、NP のエストロゲン作用を考えても、少なくとも 1.27、2.95、9.81ug/L 曝露区の数値と比べると際立っています。対照区の個数は 2 倍あるのはわかりませんが、やはり両性での表現型の不明数の多さは理解できません。何か説明できる理由は考えられますか。それとも曝露区だけで性成熟が両性で促進されたのでしょうか。</p>	<p>表現型はヒレの形状や体型によって判断しますが、通常の飼育条件では 9 週目の対照区において明確な表現型が現れていないのは正常な状態です。生殖腺判別は対照区でもすべて一致しているため、問題ないと考えております。</p>
F 1 世代亜成体の間性または性転換 (表 1-19、Page34)	<p>メスでの死亡率に NP の濃度依存性が認められず化合物以外の偶発的な要因で死亡率が上がったのではないかと。それはペアリングがうまくいかなかったのではないかと。また、メスが死亡した連は、テストガイドラインが規定している 12/24 連の確保の為に追加のペアを準備すべきだったのではないかと。</p>	<p>コ克蘭・アーミテージ傾向検定によると濃度依存性が認められます。メダカはバタなどとは異なり雌雄の相性の悪さにより相手を死亡させることはないため、ペアリングの影響で死亡したのではないかと考えられます。個体の死亡はペアリング後、数日から数週間経って起こっており、ペア個体以外は既に解剖されているためペアを交換することは不可能でした。また、ガイドライン上も途中の連の補充は許容されていません。</p>	<p>(再意見・質問など) 当該表は統計分析に基づき有意差表示 (フットノートに記載) をされていることはわかっていましたが、データに濃度依存的な生物学的影響を示す傾向が外見上認められないので確認させて頂きました。ガイドライン上は途中の連の補充は許容されていませんとのことですが、本レポートの考察のところで、“ 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 連のペアを用意する方が安全と考えられるが、試験スペースや労力負担が大きいため、”と記載されていることより、ペアリングを追加できるものと考えました。途中の連の補充は認められていないとのことですが、TG240 プロトコルを確認しましたが、どこに記載あるのかを確認できず、ご教授頂ければと思います。</p>	<p>TG240 プロトコルには、実験の途中でのペアリングの追加について記載はありませんし、過去の同様の試験でも実施されていません。</p>
全体の感想	<p>本試験は、日本を代表する生態試験の専門家が関与し、新テストガイドライン MEOGRT 法 (TG240) に従い、NP の魚毒性試験をかなり大掛かりで精密に実施され、試験結果もよく考察されている。しかし、本レポートの記載は不完全なところが多く、もう少し詳細な記載がないと試験結果を正しく評価できないと考える。また、テス</p>	<p>本試験は、OECD テストガイドライン 240 番として採用されたメダカ拡張一代繁殖試験 (MEOGRT) の開発において、日本側で中心的な役割を果たした研究者らによって実施されたものです。TG240 からの逸脱という指摘がありますが、結果の信頼性を失うような逸脱とは考えておりません。</p> <p>フルライフサイクル試験は MEOGRT と様々な試験条</p>	<p>(再意見・質問など) 当方の質問、疑問点に丁寧にご回答いただき有難うございました。また、本テストガイドライン作成で論文著者が大きな貢献をされたことに敬意を表します。ただ、ご回答の多くは理解・了解しましたが、今回のご回答でも疑問は残り、特に、F0 世代の遺伝子確認、水温、溶存酸素低下後のご対応状況が不明なので、それらのご回答を頂ければと考えます。</p>	<p>< 特に対応なし ></p>

項目	< 第 1 回 > NPE (NP を含む) の有害性評価結果への意見 MEOGRT 法試験結果についての英語論文は確認してない範囲での質問、意見等		< 第 2 回再質問 > NPE (NP を含む) の有害性評価結果への意見	
	経済産業省 (以下、METI) 2018/02/27	環境省 (以下、MOE) 2018/03/05 回答	METI 2018/3/9 再意見・質問	MOE (回答案) 2018/3/20 再々回答
	<p>トガイドライン TG240 からの逸脱も散見されるが、逸脱理由に対する説明がないものもある。特に、試験の途中で溶存酸素の低下の実態、それ以降の対応状況、環境条件の記載が不十分なので、得られた結果の信頼性に疑念が残る。以上より、F0 世代に関する試験では遺伝子検査 (XX,XY) が実施済みであれば特に問題はないと考える。また、F2 世代に関する項目では特に問題はない様に思える。しかし、F1 世代の結果は連数不足、溶存酸素の影響等を考えると信頼性に疑問が残る。以上より、現時点では、F1 世代から得られた結果は参考程度の結果として扱うべきと考える。</p> <p>残念ながら、過去の NP のフルライフサイクル試験等のレポートが入手できなかったために詳細な比較はできなかったが、今回のデータとの詳細な比較が必要と考える。今回の結果は、先に実施されたフルライフサイクル試験よりも毒性が強い結果になっているような印象がある。その原因は試験法の毒性検出力の向上なのか、ヒメダカの系統差、試験環境条件の差、被験化合物の違いによるものなのか不明である。</p>	<p>件 (F0 を曝露しない、連数、容器当たりの個体数等) が異なるため、毒性値を直接比較すべきはないと考えています。特にフルライフサイクルは H11 年度に実施しているため、遺伝的性判別法が未確立であり高濃度区のペアリングができなかったこと、ピテロジェニンの測定精度が低く正確な測定値が得られていないなど、技術的な制約により、毒性が過小評価されている可能性があります。一方、新たに採択された TG240 では、OECD テストガイドラインプログラムにおける検出力向上に係る要請を踏まえ、試験連数を増やし、新たな統計解析手法を採用するなどの工夫がなされています。</p>		
【 3 . 有害性情報の詳細資料と試験法開発報告書にまたがるコメント 】				
	<p>本コメントは、 で指摘した F1 世代のデータについてもリスク評価に適用可能となったとしたらという前提のコメントになります。</p> <p>TG240 のパラグラフ 33 で " Endpoints measured include fecundity, fertility, hatching, growth and survival for evaluation of possible population-level effects. " とありますように、これら計測されている複数のデータを使って個体群レベルの影響の評価をすることができます。具体的には、人口学や個体群生態学の分野で使われるレスリー行列というものをメダカ個体群について構築すると、個体群増殖率はその行列の最大固有値になります。個体群増殖率 (もしくはその自然対数の内的自然増加率) が、個体群レベルの影響を評価するエンドポイントとして適切だと言われています。fecundity, fertility, hatching, survival データは行列要素に使います。毒性影響のない個体群と影響下 (濃度区ごと) の個体群増殖率を計算すれば、横軸に濃度、縦軸に個体群増殖率 (又は内的自然増加率) をプロットし、個体群レベルの評価が可能と考えます。</p> <p>今回の PNEC は TG240 による F1 世代の産卵数減少・受精卵数減少をエンドポイントとした LOEC から設定されています。一方、本試験で、F2 世代胚期のふ化率やふ化後生存率には影響はでていません (試験法開発報告書 p.43)。レスリー行列の 1 行目に並ぶのは正味の Fecundity (次のセンサスまで生き残る子の数 = 産卵数 × 受精率 × ふ化率 × ふ化後生存率) であり、各濃度区の「産卵数 × 受精率 × ふ化率 × ふ化後生存率」の連結データ、さらには生存率もさらに加味して上述</p>	<p>化審法では OECD テストガイドラインで認められたエンドポイントにおいて影響が出ていた場合、ある成長 (生長) 段階であっても生態系への影響が懸念されるためそれを評価に用いておりますので、本物質でも同様の対応をすることが適切と考えております。</p>	<p>(再意見・質問など) 「リスク評価に係る今後の課題」の中で、「現行の化審法の枠組み上想定されていない有害性データや手法については、リスク評価の主軸として用いることはできない。しかしながら、信頼性が確保できる入手可能な情報や個別の物質に応じた評価手法については総合的な判断を行う上で広く活用することが望ましいため、その活用の方法については、新規化学物質の審査やスクリーニング評価における取扱いも含めて、今後、具体的に個別の事例の中で検討をしていく。」と記載しております。本件は、めったにない、個体群レベルの評価の議論をしよう個別事例であると考えており、データの適用如何によりませんが、今後、議論をしていくきっかけにならないかと考えております。</p>	<p>化審法での有害性評価は、基本的に国内外で実施されている手法を参考に、化審法としての適切な手法を検討・構築し、実施しています。毒性試験結果から個体群レベルへの評価への応用については、未だ国際的に認められた手法はないと考えており、今回の試験結果の応用についても研究として実施されることが望ましいと考えております。従いまして、現時点で化審法での検討事項にすることは難しいと考えられますが、今後の研究成果を見守りつつ、議論することになると考えております。</p>

項目	< 第 1 回 > NPE (NP を含む) の有害性評価結果への意見 MEOGRT 法試験結果についての英語論文は確認してない範囲での質問、意見等		< 第 2 回再質問 > NPE (NP を含む) の有害性評価結果への意見	
	経済産業省 (以下、METI) 2018/02/27	環境省 (以下、MOE) 2018/03/05 回答	METI 2018/3/9 再意見・質問	MOE (回答案) 2018/3/20 再々回答
	した個体群増殖率について、コントロールと各濃度区で影響がみられるかの評価をしていただきたい。生態リスクについては個体群レベルの評価が理想的といわれているところ、適用可能なデータがあり、適用事例等その分野の知見も蓄積されてきているため、適用を検討していただきたい。			

(2) NPE (NP を含む) の有害性評価結果 (試験水温、溶存酸素低下) への確認など 水温

< 第 3 回再々質問 > NPE (NP を含む) の有害性評価結果 (水温に関して) への確認		< 第 4 回質問 > NPE (NP を含む) の有害性評価結果 (水温に関して) への確認	
METI2018/3/19	MOE 2018/03/20 回答	METI 2018/3/26	MOE 2018/06/18 回答
<p>水温に関して、色々丁寧にご回答いただきましたが、やはりまだ納得ができず、ご教授ください。</p> <p>下記にこれまでのやり取りを添付していますが、試験水温が有効性基準を逸脱して、何故にそのような水温設定になったのかお聞きしても明確な回答が得られず再度確認させていただきます。</p> <p>TG240 ガイドラインは、報告書図 1 - 2 にありますように OECDTG229、TG234、TG236 ガイドラインから構成されていると記載があります。</p> <p>それぞれのガイドラインの水温設定は下記のようになっています。</p> <p>TG229 :</p> <p>The water temperature should not differ by more than 1.5 between test vessels at any one time during exposure period and be maintained within a range of 2 within the temperature ranges specific for the test species (Annex2)</p> <p>Annex2: 25±2</p> <p>TG234 :</p> <p>The water temperature should not differ by more than 1.5 between test vessels at any one time during exposure period and be maintained within a range of 2 within the temperature ranges specific for the test species (Annex2)</p> <p>Annex2: 25±2</p> <p>TG236 :</p> <p>The water temperature should be maintained at 26±1 in test chambers at any time during test.</p> <p>以上のように、上記 3 ガイドラインは 27 以上の試験水温は認められていません。また、逸脱に関する免責の記載もありません。本試験は平均水温が 26.9~27.1 で実施されたこと</p>	<p>TG240 では 9 週齢でペアリングを、13 週齢~15 週齢で繁殖データを得るため、なるべく性成熟が進んでいることが望ましく、上限温度の 26 で試験計画を立案しました。しかし、空調の不調等のため、一時的に 29 を超えてしまったこともあり、結果的に平均水温が 26.9±0.95~27.1±0.91 になってしまいました。</p> <p>一方、新版メダカ学全書 (岩松鷹司著、2006 年、大学教育出版) によると、繁殖の適温は 26~28 とあります。そのため、平均水温が 1 高い 27 でも影響は軽微であると考えております。</p> <p>また、化評研が実施したフルライフサイクル試験は、通常は 24±1、繁殖期のみ 28±1 に昇温するという試験条件でしたが、当時の専門家判断により結果は受理され、専門誌 Environmental Toxicology and Chemistry にも投稿・受理されております (Yokota et al., 2001)。したがって繁殖影響については、連数が異なることを除き、両試験で比較可能と考えます。</p> <p>また、下線部の引用文献について、本試験への適用性を精査させていただきたく、具体的にご教授いただけますと幸いです。</p>	<p>種々ご意見を頂きましたが、OECDTG240 作成の際に、貴研究所の研究者が参加されているので、どうして上述のことを踏まえて試験水温の設定をされなかったのか不明です。長期・慢性魚毒性試験を中心に関連する主要 OECD ガイドライン (TG236、234、230、229、212、215、212、210、203) の全てを確認しましたが、メダカでは試験水温の最大は 27 です。また、TG240 以外は試験水温の指定域からの一時的な逸脱の免責条項の記載もありません。</p> <p>フルライフサイクル試験は、繁殖期のみが高温で、それ以外は低い温度となっていますので、今回の試験のように、魚の全ステージ、全試験期間で高水温とは全く異なると考え、試験条件の同等性はないと考えます。また、専門家判断で雑誌にアクセプトされたとありますが、フルライフサイクル試験の報文投稿の際の reviewer とのやり取りを見ないと reviewer がこの点につき認識し判断したかどうか不明です。往々にして reviewer が見逃すことは多いと思います。以上より、フルライフサイクル試験が雑誌に受理されたことと今回の試験とは関係がないと思います。</p> <p>ご要望頂きました水温とエストロゲン活性に関する公表論文をお知らせいたします。試験水温とエストロゲン活性は正の相関を示すことが報告されています。in vitro 試験結果もありますが、in vivo 試験にだけに絞り回答いたします。ご検討の程、お願い申し上げます。</p>	<p>試験法検討中には、成熟・繁殖を促進させるため、試験温度をもう少し上げる提案も出されましたが、上記のガイドラインを含めた関連する試験法を踏まえ、平均温度は 24~26 とし、変動は 2 以内となりました。前回、ご説明申し上げました通り、本試験では空調の不調などにより、やむを得ず平均して 27 と 1 高くなってしまいました。</p> <p>ご提供いただいた水温とエストロゲン活性に関する論文ですが、性決定のメカニズムがメダカとは異なる、ゼブラフィッシュやブラントラウト、トウゴロウイワシも含まれるため、一概に比較できないと考えられます。ご提供いただいた文献 1~5 では、高温 + エストロゲン様物質ばく露によって、性分化の遅れや偏り、エストロゲン作用に係わる遺伝子発現の微増が見られたものの、明確に繁殖への影響が増強したと示したものはありませんでした (詳細は下記補足をご参照ください)。</p> <p>一方、メダカに関しては、高水温 (32-34) ではオス化が促進されるが、高水温 + 17 -estradiol (E2) ばく露処理でオス化が抑制されたという反対の症例も報告されています (文献 7、8)。文献 4 においても、メスはオスと比べて、異なる水温や明暗周期による EDCs 応答への影響は大きくないと報告しています。したがって、文献 4 および文献 7-8 で傾向が異なるため、高水温でエストロゲン作用が増強されるかどうかは、現時点では判断できません。</p> <p>加えて、文献では適温に対して 5~10 の温度上昇との比較を行っていますが、本試験の温度上昇は平均水温でみれば 1 と小さく、繁殖影響の増強に至った可能性は低いと考えております。そもそも、ゼブラフィッシュやメダカなど、多くの魚類は性分化期に高温で処理するとオス化が促進されます (文献 2、6-9)。本試験では Control において明確な成熟の遅れや性分化のオスへの偏りが見られていないため、平均水温 1 上昇自体による影響はないと考えられます。</p> <p>(補足 : 各文献についてのコメント)</p> <p>文献 1 のトウゴロウイワシでは EE2 ばく露系で 22 と 28 を比べると 28 で繁殖が低下しているようですが、対照区も 28 で繁殖が低下しているため、繁殖阻害率で見ると明確に低減しているように見えません。</p> <p>文献 2、3 のゼブラフィッシュは、追加した文献 6 に詳しくレビ</p>

< 第 3 回再々質問 > NPE (NP を含む) の有害性評価結果 (水温に関して) への確認		< 第 4 回質問 > NPE (NP を含む) の有害性評価結果 (水温に関して) への確認	
METI 2018/3/19	MOE 2018/03/20 回答	METI 2018/3/26	MOE 2018/06/18 回答
<p>より、標準偏差値を考慮すると試験期間の半分はガイドラインの設定温度を超えていることとなります。また TG240 の試験水温の設定は下記のようにされています。</p> <p>TG240 :</p> <p>The mean water temperature over the entire duration of the study should be between 24 -26 .</p> <p>Breif excursions from the mean by individual aquaria should not be more than 2 .</p> <p>【質問】</p> <p>以上より、本試験は TG240 ガイドラインから判断しても、また、TG240 ガイドラインを構成する 3 種 OECDTG ガイドラインの水温設定から見ても上限を超えていると判断します。何故に、このような温度設定にされたのかの回答がありません。また、試験水温と毒性の関係ではありますが、ご存知のように、化学物質によるエストロゲン活性は温度と正比例の関係があると報告があり、温度が高くなればエストロゲン活性は強くなると考えます。また、水温の上昇によるエストロゲン作用は魚の成長期等でより強くでるとの報告もあります。NP のエストロゲン活性について、定性的には既によく認知され、本報告書の結果につきましても定性的には疑問の余地はありませんが、NOEC もしくは LOEC のような定量的データは若干の環境変化でも大きく異なる可能性があると思います。以上より、ガイドラインを熟知されている研究者が上限を超えるような試験水温の設定をされたのか不思議です。TG240、TG229、TG234、TG236 ガイドラインから見ても今回の試験水温の設定が不明で、この点について再度ご教授ください。</p>			<p>ユーされていますが、性決定遺伝子が見つかっておらず、遺伝的性決定と環境性決定の複数の因子により性分化する複雑なメカニズムを持っているとされています。ゼブラフィッシュの場合、温度自体の上昇はオス化を促進します。異なる水温 (23、28、33) + EE2 ばく露した文献 2 では、確かに水温上昇 (28 33) によりオスの成熟が遅れる一方、メスは成熟が進むようですが、23 と 28 では生殖腺判別の性比に差はほとんどなく (23 は未成熟が多い) 33 でもメスが 50% 60% に増加したのみです。</p> <p>文献 3 ではピテロジェニンやエストロゲン受容体遺伝子の発現を測定していますが、前提としてこれらの遺伝子発現と繁殖との定量的な相関関係が不明です (どの程度 vtg が増加すれば繁殖が何%下がるのか?)。統計解析は Control との比較や明暗周期の違いについてのみ行われており、同じ明暗周期・同じばく露濃度において 20 と 30 で有意差がつくのかは不明です。図からはほとんど差はないように見えます。Control との比較でも 30 で著しく発現量が増えているように見えません。</p> <p>文献 4 では文献 3 と同じグループがメダカでも同様な実験を行っていますが、季節変動を想定しているため、温度に加えて明暗時間も変えているため、正確な比較が出来ません。明暗は関係ないとして比較しても、文献 3 と同様に、遺伝子発現と繁殖との定量的な相関関係が不明である点、同じばく露濃度における温度の比較 (20 と 30) では、反対に 30 において発現量が減っているものもある点、メスは明暗や温度に対する感受性は低いと結論している点などから、メスに対する影響が重要な産卵数において温度による差は大きくないと考えられます。</p> <p>文献 5 のブラウントラウトは低水温域の魚のため、温度に対する応答がメダカと大きく異なるので省略させていただきます。</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. DeCourten B M and Brander S M: Combined effects of increased temperature and endocrine disrupting pollutants on sex determination, survival, and developments across generations Scientific Reports ,7, 9310, (2017) 2. Luzio A, Santos D, Fontainhas-Fernandes AA, Monteiro SM, and Coimbra AM: Effects of 17α-ethinylestradiol at different water temperatures on zebrafish sex differentiation and gonad development. Aquat Toxicol., 174, 22 (2016) 3. Jin Y, Shu L, Huang F, Cao L, Sun L, and Fu Z: Environmental cues influence EDC-mediated endocrine disruption effects in different developmental stages of Japanese medaka (<i>Oryzias latipes</i>). Aquat Toxicol., 101, 254 (2011) 4. Jin Y, Chen R, Sun L, Liu W, and Fu Z: Photoperiod and temperature influence endocrine disruptive chemical-mediated effects in male adult zebrafish. Aquat Toxicol., 92, 38 (2009). 5. Körner O, Kohno S, Schönenberger R, Suter MJ, Knauer K, Guillet L J Jr, and Burkhardt-Holm P: Water temperature and concomitant waterborne ethinylestradiol

< 第 3 回再々質問 > NPE (NP を含む) の有害性評価結果 (水温に関して) への確認		< 第 4 回質問 > NPE (NP を含む) の有害性評価結果 (水温に関して) への確認	
METI2018/3/19	MOE 2018/03/20 回答	METI 2018/3/26	MOE 2018/06/18 回答
			exposure affects the vitellogenin expression in juvenile brown trout (Salmo trutta). Aquat Toxicol., 90, 188 (2008). (以下、追加) 6. Santos D et al. (2017) Zebrafish sex differentiation and gonad development: A review on the impact of environmental factors, Aquatic Toxicology 191, 141-163. 7. Hayashi Y1, Kobira H, Yamaguchi T, Shiraishi E, Yazawa T, Hirai T, Kamei Y, Kitano T. (2010) High temperature causes masculinization of genetically female medaka by elevation of cortisol. Mol Reprod Dev. 77(8):679-86. doi: 10.1002/mrd.21203. 8. Kitano T1, Hayashi Y, Shiraishi E, Kamei Y. (2012) Estrogen rescues masculinization of genetically female medaka by exposure to cortisol or high temperature. Mol Reprod Dev. 79(10):719-26. doi: 10.1002/mrd.22080. 9. 山下倫明・川口奈々美, 環境水温と魚類の性分化との関係, 国立研究開発法人水産研究・教育機構, https://www.fra.affrc.go.jp/bulletin/bull/bull-b4/03.pdf .

< 第 5 回再々再質問 >	
METI2018/12/3	MOE
1. 試験水温は OECDTG240 からは毎日測定すべきとされていますが、連続モニタリングか、それとも毎日のある一定時間に測定されたのでしょうか。水温計の型式は記載されていますが、その点が解りませんでした。 もし、連続ではなく毎日数回の測定データであれば測定時間は 1 日のうち何時間ぐらい間隔をあけて測定されましたか。	< 週 1 回測定であることを後日回答 >
2. 試験水温はどのようにコントロールされていましたか。報告書を見てもわかりませんでした。報告書に 25 ± 2 (飼育) 25 ± 1 (試験) の水温条件が記載されていますが、どのようなシステムで温度制御をされたのかの情報が見当たりませんでした。OECDTG240 では温度制御が十分にできる装置を使用するようにと記載されていますが、飼育状態と試験状態での温度制御のためにどのようなシステムもしくはサーモスタットを使用されたのでしょうか。流水式魚類試験装置内蔵のサーモスタットか、別のサーモスタットを使用したのでしょうか。また、下記の質問とも関連しますが、可能でしたらサーモスタットの性能をご教授ください。	< 室温を調整し対応であることを後日回答 >
3. 全試験期間中の毎日の試験水温を教えてください。先に F1 孵化後の 4 週目と 11 週目の測定値が 0.1 ~ 0.9 ほど範囲を超えていましたとご回答頂きましたが、毎日の試験水温の挙動が把握できず、29 を超えることがあったと回答頂きましたが、このような高温期間がどの時期に、どの程度の頻度で、どの程度の時間継続したのか判明しませんでした。 また、疑問ですが、この一時的に試験水温が上昇したのは空調機の不調との説明がありましたが、サーモスタットでは空調機の不調をカバーできなかったのでしょうか。	< 週 1 回の水温測定データと F1 繁殖時の室温の 1 時間ごとの記録を後日提示 >

溶存酸素

<p>< 第 3 回再々質問 > NPE (NP を含む) の有害性評価結果 (水温に関して) への確認</p>		<p>< 第 4 回質問 > NPE (NP を含む) の有害性評価結果 (水温に関して) への確認</p>	
METI	MOE 2018/03/16 回答	METI 2018/3/26	MOE 2018/06/18 回答
<p>(1) 質問における下記項目での回答に対して F 1 世代亜成体の生存率 (page29) F1 世代亜成体での連数と LOEC が過小評価になっている可能性</p>	<p>全 42 水槽中の合計 100 個弱の円筒の内、どの程度の円筒で溶存酸素の低下が起きていたのかは不明です。一部だけ測定した溶存酸素は 1mg/L 程度でした。その後、ランダムに繁殖ペアが選ばれたため、酸素低下のダメージを受けたとされる個体は全試験区にランダムに分配されているはずですが、他のペアと比べて、成長や繁殖が低い個体が見られなかった (例えば総産卵数の変動係数は、ほぼ繁殖がみられなかった 89.4 μg/L 濃度区を除くと 15 ~ 32% と小さい) ことから、酸素低下を受けた個体と受けなかった個体に差はなかったと考えています。 さらに対照区の産卵数に F0 と F1 で異常に起因すると考えられる差が認められないため、短時間の溶存酸素低下によってそれ以降の実験に何らかの後遺症があったとは考えにくいです。</p>	<p>ご回答頂きましたが、残念ながら、溶存酸素低下後の試験状況、対応状況がよくわかりません。再度ご教授ください。 下記の文章の試験操作 Page29 : 流水式装置および水槽数に限りがあるため、.....(6-9 匹 X 2 水槽 X 性別 X DMY 判定あり・なし)。 ・ 上述文章の具体的な実験内容が分かりません。例えば、“性別”と“DMY 判定あり、なし”とありますが、性別は表現型で判定されていますが、暴露区では雄でも雌に変換している魚もいるので、どのようにして性別を判定されたのかが不明です。また、最終的には何匹 DMY 判定されたのでしょうか。一方、単純にこの式に従い計算すると、1 暴露区的全匹数は 6-9 匹 X 2 (水槽) X 2 (性別) X 2 (DMY 判定有り・無し) に従うと 48 - 72 匹になりますが、これは正しくありません。この式の意味が分かりません。このように、基本的なところが理解できていませんので、具体的に詳細にご教授ください。 ・ 表現型の性別ごとに 3 連ずつプールして維持したとありますが、容器の大きさと飼育密度はどう変わったのかを教えてください。要するに、試験魚から見て、試験系の変更により、飼育環境がどのように変わったのかをご教授ください。</p>	<p>DMY による性別判定の流れからの飼育環境の変化については別紙 (パワーポイント資料) をご参照ください。なお、分配を変えた 2 日後にはペアリングを、5 日後には解剖を行っています。</p>
		<p>・ 確認ですが、F1 亜成体として全長、湿重量、臓器重量等を測定されていますが、これらの測定に供された魚の中には、溶存酸素の低下の被害を受けた魚も含まれていますね。</p>	<p>含まれます。別紙 (パワーポイント資料) の通り、ペアリングに必要なのは各濃度区で 2 匹 x 12 水槽 (計 24 匹) だけなので、DMY に供した約 36 ~ 59 匹の内、余った個体は全て亜成体として解剖に供しております。ランダムに含まれていますが、先に回答したとおり、他と著しくエンドポイントが異なった個体はみられなかったことから、酸素低下を受けた個体と受けなかった個体に差はなかったと考えています。</p>

<p>< 第 3 回再々質問 > NPE (NP を含む) の有害性評価結果 (水温に関して) への確認</p>	
METI2018/9/7	MOE
<p>溶存酸素の低下が起こった後の操作に関してスライドを作成してご説明頂き有難うございました。このご説明である程度全体像は理解できましたが、一方、新たな疑問が起こりました。執拗に質問すると思いますが、当方の理解のためにご教授の程、お願い申し上げます。まだ、理解不足で誤解があるかもしれませんが、その時はご容赦ください。</p>	
<p>溶存酸素の低下で、6 連を 3 連にされて対応されましたが、安全対策部会で関係委員が一過性の溶存酸素の低下は一般的に魚に何ら影響も与えないとのご説明があったように記憶していますが、もしそうであれば、溶存酸素の低下があっても、死亡もなければそのまま計画通りに 6 連で継続されても良いと考えますが、連数を変更されたのは何故か。どのようなご判断だったのでしょうか。つまり、溶存酸素低下の状態にあった魚は破棄して試験に使用せずに試験を継続するのであれば理解できますが、そのまま、連数を変更しただけのことで、その意味合いが理解できません。</p>	<p>別紙 (パワーポイント資料) の通り、溶存酸素が低下したとみられる円筒から DMY 判別中の個体を取り出し、その後のペアリングのため、最低でも表現型で雌雄別に維持しておく必要がありました。しかし連数を保持したまま、DMY 判別中の表現型オス、DMY 判別中のメス、さらに DMY に供していない個体を別々に維持するためには、それまでの 3 倍の水槽が必要になりますが、流水式装置のスペースおよび水槽数が足りませんでした。そのため別紙に示したとおり、やむをえず、3 水槽ずつプールして、DMY の有無 x 雌雄の 4 グループを区別することを優先しました。なお、ペアリングは 6 水槽の遺伝的オス・メスをそれぞれプールしてから 12 水槽に再分配するため、ペアリングのための操作としてはプールされたことは問題ないといえます。</p>

＜第3回再々質問＞ NPE（NPを含む）の有害性評価結果（水温に関して）への確認							
METI2018/9/7							MOE
F1 亜成体につき、種々疑問があり質問させていただきます。下記の表は表 1-12～1-16 の脚注に基づき、F1 亜成体の使用別匹数を作成しました。							
	対照群	1.27 μg/L	2.95 μg/L	9.81 μg/L	27.8 μg/L	89 μg/L	備考置
オス 匹数	46	20	17	17	20	22	解剖
メス 匹数	43	26	29	20	25	9	解剖
ペアリングに使用した匹数							2 匹 X12 連 2 匹 X24 連
	48	24	24	24	24	24	
合計(a)	137	70	70	61	69	55	
元匹数(b)							12 匹 X 6 連 12 匹 X12 連
	144	72	72	72	72	72	
生存率% (10 週目)	95	97	97	85	96	76	(a)/(b)X100
生存率% (9 週目)	96	96	99	93	97	82	表 1-12
表 1-17 で、遺伝的オス、メス個体の表現型性別・生殖腺形態の結果を表していますが、ご提供頂きましたスライドによれば F1 亜成体では、ペアリングに使用した以外の対照群、暴露群の全ての魚の遺伝子検査はしていないと表記されています。表 1-17 で表されているオス (n=46、20、17、17、20、22、) メス (n=43、26、29、20、25、9) はペアリングに使用されなかった匹数を表していると考えますが(上図を参照ください) 全て遺伝子試験 (DMY 判定) をされたのでしょうか。表 1-17 の説明では全て遺伝子検査を完了しているような表現になっていますが、この点が理解できないのでご教授ください。							
表 1-17 のデータと上図を見ると、死亡例が少ない 1.27 μg/L、2.95 μg/L、27.8 μg/L 暴露群では遺伝的メスがオスよりも明らかに多数ということになります(例えば、2.95 μ/L 暴露群ではオス 20 匹、メス 29 匹)。しかし、対照群では雌雄匹数はあまり差はありません。F1 のふ化子魚を 12 仔魚/水槽(連数 6) に再分配するためにランダムに魚を採取されたと思いますが、遺伝的にこのような偏りがあったのでしょうか。その理由が理解できません。							
前にもお聞きしましたが、再度ご教授ください。							
表 1-17、1-18 で対照群では表現型が不明とされているものが雌雄ともに約 30%程度ありますが、1.27～9.81 μg/L 暴露群では表現型不明はほぼ 0%です。これは対照群では性成熟が遅延しているようなのですが、メスではノルフェノール (NP) のエストロゲン作用で性成熟が促進されている可能性を先般お教えいただいています。オスでも同様なことが起こっています。飼育環境に何らかの原因があるのではないかと推測しますが、ご見解を再度お聞かせください。							
上記質問と関連しますが、F1 亜成体の解剖前の 1 週間の飼育状況をご教授ください。							
・飼育環境：対照群、暴露群で各 5 L 水槽当たり何匹を飼育したのかをご教授ください。また、溶存酸素低下が起きた前と後では 5 L の水槽での魚の匹数が変化していると考えますが、その影響をどう考えるか。							
・給餌量：表 1-1 ではよくわかりませんが、対照群、暴露群で 1 匹あたりの給餌量は飼育密度が変わっても同じなのかどうか。							
F1 亜成体の暴露群で、9.81 μg/L と 89.4 μg/L 暴露群だけで、生存率が 9 週目と 10 週目で大きく異なり、9 週から 10 週にかけて他の暴露群に比べて死亡数が多いが、特に 9.81 μg/L で濃度依存的でなく偶発的に死亡数が多いが、これについての原因等についてご見解をお聞かせください。							
9.81 μg/L 区の 9 週目と 10 週目の差は 6 個体で 1 水槽あたり 1 匹、89.4 μg/L 区の差は 4 個体で 1 水槽あたり 0.7 匹であるため大きな差はないと考えております。また、F1 亜成体ほぼ同じ日齢まで観察する性発達試験 (OECD TG234) では、対照区におけるふ化後の生存率は 70%以上であることというクライテリアがあります(つまり 30%程度の死亡はランダムに起こりうると思われる)。本試験ですべての試験区で 10 週目の生存率は 70%以上であり、よって問題はないと考えています。							
全長、湿重量を表 1-13 (F1 亜成体) と表 1-21 (F1 成熟個体) で比較すると、成熟個体では明確に NP に対する影響が軽減されています。つまり、成熟すると亜成体で認められた影響が顕著に軽減されることを表している。亜成体での影響が成熟するとその影響が弱くなる場合は、亜成体での影響をどのように評価すべきかの見							
成長への影響については、ご指摘の通りの結果がでております。しかし、成長段階による結果の相違については現時点で科学的に説明できる状況にはなく、この結果の取り扱いには注意が必要と考えております。							

< 第 3 回再々質問 >	
NPE (NP を含む) の有害性評価結果 (水温に関して) への確認	
METI2018/9/7	MOE
解をご教授ください	

> 2019/1/10 室温及び水温データの提供 (資料 1 - 3 別添 1 参照)

< メールにての質問 >	
NPE (NP を含む) の有害性評価結果 (水温に関して) への確認	
METI	MOE
・試験水温の測定は週一度測定したとあるが、各暴露区に何ヶ所測定したかが不明であるので、ご教授頂きたい。また、対照区および暴露区の温度測定は同日に測定されたのでしょうか。	各暴露区で 1 カ所の測定です。対照区及び暴露区の温度測定は同日に測定されています。
全ての水槽が同一の実験室であったのか、複数の実験室に分かれて実施されたのかをご教授ください。このご回答がなければ、空調の不調の試験全体への影響が判明しません。	対照区及び暴露区の全ての水槽が同一の実験室に置かれていました。水槽間の距離もごく近傍でした。
空調で水温を制御するとありますが、空調機の位置で部屋では温度勾配ができると推測されますが、それを回避するためにどのような工夫をされているのかをご教授ください。	空調からの送風が直接一箇所に吹き込むことを防ぎ室内に拡散するように送風口近傍にシートを張っており、さらに、部屋の上部に複数のサーキュレーターを設置していました。
停電であっても試験水は供給されたとありますが、その理由をご教授頂きたい。その機械だけに自家発電等から特別に通電があったのでしょうか。	水槽の上部に設置している分配槽に約 10 時間分の試験水を貯留しているため、停電時も供給が維持されておりました。
1 月 6 日 26 日間の室温は平均 28 のように見えるが、1 月 26 日～ 2 月 15 日間の室温は平均 27 のように見える。26 日を境に空調の設定温度を変更されたのでしょうか。	お見込みのとおりです。
参考 2 の室温(気温)変動を見ますと、パルス状となり 1 日に最低 1 2 の変動があると思いますが、以前に 26 で実験を設計したとご説明頂きましたが、室温を何度に変更すると水温が 26 になると考えられたのでしょうか、ご教授ください。	室温を 27 に設定し水温が 26 になると想定していました。

MEOGRT 試験の水温に係る逸脱の影響について (提出した回答書及び追記資料)	
平成 31 年 1 月 10 日 平成 31 年 2 月 6 日追記 (MOE)	
試験概要/論点等	回答等
【論点】 定常的な水温の逸脱について 週に一度の水温データ、給水されていた水の水温 (25 ~ 26) 及び F1 繁殖計測期間中のおおむねの室温 (27 ~ 29) を踏まえると、F1 繁殖計測期間中の水温はおおむね 26 ~ 29 の間で推移し、OECD TG240 で定める水温を定常的に逸脱していたと推定される。	この逸脱による影響について、NP 以外の物質で実施した MEOGRT 試験 (26.7±0.7 、 25.6±0.8) と本試験の F1 世代におけるコントロール区のペア・1 日あたりの平均総産卵数の変動を比較したところ、温度による傾向の違いは認められなかった (参考 3)。これを踏まえると、F1 世代において TG240 で定める水温から定常的に 2 程度逸脱していたことは本試験の結果に大きな影響を与えていないと推察される。
【論点】 1/16 の停電による低温について	1/16 の計画停電による空調の停止により、当日の室温は 24 回計測中 22 ~ 23 が 1 回、23 ~ 24 が 1 回計測された。しかしながら、停電の間も試験水の循環装置は運転を続けており、タンクに貯留されていた 25 ~ 26 の試験水が試験系に供給され続けていた。このため、TG240 に定める水温の下限 24 からの逸脱の程度はさほど小さくなく、本試験の結果に影響を与えていないと推察される。
【論点】 1/17 ~ 1/21 の高温について	1/16 の計画停電後、室温は 1/18 に 30 を超えたデータが 24 回計測中 4 回、1/17、1/20、1/21 は 30 を超えたデータがそれぞれ 24 回計測中 1 回計測されている。この間の水温は給水されていた水の水温 25 ~ 26 から室温の間にあったものと考えられ、また室温の変動に対する水温の変動への影響は緩和される可能性も考えられる。 この高温側への逸脱による影響について、この逸脱による影響について、NP 以外の物質で実施した MEOGRT 試験 (26.7±0.7 、 25.6±0.8) と本試験の F1 世代におけるコントロール区のペア・1 日あたりの平均総産卵数の変動を比較したところ、傾向の違いは認められなかった (参考 3)。このことから、この逸脱は本試験の結果に大きな影響を与えていないと推察される。 なお、計画停電以降の平均総産卵数及び平均受精卵数から LOEC を算出すると 2.95 µg/L、計画停電実施前までのデータから算出すると 1.27 µg/L となり、本試験において計画停電以降に室温が高温となったことにより毒性が増強される傾向にはない。

MEOGRT 試験の水温に係る逸脱の影響について (提出した回答書及び追記資料) 平成 31 年 1 月 10 日 平成 31 年 2 月 6 日追記 (MOE)	
試験概要/論点等	回答等
[添付資料] 参考 1 ノニルフェノール MEOGRT 温度変化と F1 繁殖への影響 参考 2 試験を実施した部屋の室温の測定データ 参考 3 NP 以外の物質で実施した MEOGRT 試験と本試験の F1 世代におけるコントロール区のペア・1 日あたりの平均総産卵数の変動の比較	

NP 試験法に関する未回答事項等について	
METI (2 月 22 日)	MOE (3 月 4 日回答)
溶存酸素に関する試験期間の全データをご開示頂きたい。	開示済み
国環研報告書 P.21 表 1-3 「試験期間中の平均水温、pH、溶存酸素」について、 設定濃度が大きくなるに従い、平均溶存酸素濃度が低下する傾向があるが、原因をどのようにお考えかご教示ください (人的なエラーか、測定日の違いでしょうか)。 溶存酸素と水温の測定水槽の数、水槽の場所と日時は同じでしょうか。即ち、同日、同場所の水槽で水温と溶存酸素を週 1 回測定されたのでしょうか。	の回答で示したデータを見る限り、特に濃度区による差は認められず、平均値の差は溶存酸素濃度で 0.2 mg/L 程度 (飽和酸素濃度で 2.5% 程度) とわずかです。また、飽和酸素濃度はいずれも 90% 以上を満たしています。また、人的エラーや測定日の違いなどは確認していません。溶存酸素と水温の測定水槽の数、場所と日時は同じで、週 1 回の測定です。
平成 31 年 2 月 18 日の貴省から厚労省委員への説明会で、F1 受精後 59 日目に一夜 (12 時間程度) 溶存酸素が低下したとの報告がありました。が、 円筒底の食べ残しの餌が原因でしょうか。 また、その溶存酸素が低下した水槽は対照群、曝露群でいくつ程度生じたのかをご教示ください。 もし、円筒の底の餌詰りが原因とすると、対照群、曝露群が同じ確率で生じたとは考えにくく、恐らく、曝露群ほど毒性症状が強く出て、摂餌量減り、餌が底に多く積り、多くの溶存酸素低下が起こったと推察しますが、正しいでしょうか。 また、溶存酸素が低下したと考えられる時に測定した溶存酸素量 (1mg/L) を教えて頂きましたが、それは何個の平均値でしょうか。	残餌分解、試験魚呼吸による酸素消費が考えられます。 対照区、曝露区の区別なくほぼ全ての水槽で同様の状態でした。 上記の通り、対照区・曝露区の区別なく同じ状態であったこと、この後の成体の体長・湿重量への影響が認められないことから、曝露区ほど毒性症状が強く出て残餌が多く、多くの溶存酸素低下が起こったとは推察できません。 溶存酸素濃度については、詳細な記録は残っておらず、不明です。
【水温・室温関連】 別室に設置したタンクからの供給水 (25~26 に調温したもの) の全試験期間の水温データをご開示頂きたい (平成 31 年 1 月 18 日審議会前の貴省との電話でご開示頂けることになっていたもの)。 対照群、曝露群それぞれに何個の水槽の水温を毎週測られていたのでしょうか。これらの水槽の水温測定は同じ日に全ての水槽を測定されたのか、それとも、日を変えて測定されたのかをご教示ください。 冬期なので停電等があると室温が著しく低下するのは理解できますが、室温が高温になる場合があるのは何故か理由を具体的にご教示ください (空調機の不調だけが理由ということではよろしいでしょうか)。 試験水温の実際の範囲をご教示ください (標準偏差から推測すると 24~30 と考えますが)、試験水温と室温のデータは全て当省に開示したとのことですが、水温の最大値と最小値のデータはないのでしょうか。あればご開示いただきたい。	非常に長いチャートですが、スキャンしたものを準備中です。 1 個ずつの水槽で同日です。 サーキュレータの故障です。 すでにお送りしているものがすべてです。
【LOEC の計算方法】 平成 31 年 1 月 10 日付けの貴省ペーパーで、「なお、計画停電以降の平均総産卵数及び平均受精卵数から LOEC を算出すると 2.95 μg/L、計画停電実施前までのデータから算出すると 1.27 μg/L となり、本試験において計	米国 USEPA によって開発された StatCHARRMS を用いて、解析をしています。停電実施前後の各個体の各日の総産卵数と受精卵数を入力しています。基本的には単調性を調べた後、Jonckheere-Terpstra 検定が

NP 試験法に関する未回答事項等について	
METI (2月22日)	MOE (3月4日回答)
画停电以降に室温が高温となったことにより毒性が増強される傾向にはない。」とのことですが、LOEC の具 合的な算出方法を (low data を提示の上、どの data の平均を取ったのか、どのような検定を行ったのか等 LOEC の算出過程が明確になるように) ご教示いただきたい。	行われます。詳細は、下記の USEPA の試験法をご確認下さい。 https://www.regulations.gov/document?D=EPA-HQ-OPPT-2009-0576-0019 3/7 追加回答 生データは、Watanabe et al. (2017) の supporting information にあります。 https://setac.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/etc.3895

(案)

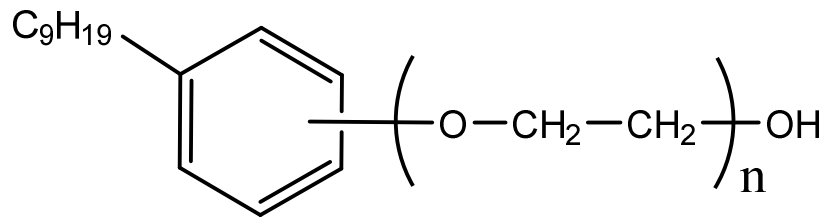
優先評価化学物質のリスク評価（一次）

生態影響に係る評価Ⅱ

物理化学的性状等の詳細資料

α -(ノニルフェニル)- ω -ヒドロキシポリ(オキシエチレン) (別名ポリ(オキシエチレン)ニノニルフェニルエーテル)

優先評価化学物質通し番号 86



平成 30 年 1 月

経済産業省

目 次

1		
2		
3	1 評価対象物質の性状.....	1
4	1-1 評価対象物質の設定.....	1
5	1-2 NPE（親化合物）.....	8
6	1-3 NPE2、NPE1、NP（変化物）.....	16
7	2 【付属資料】.....	19
8	2-1 物理化学的性状等一覧.....	19
9	2-2 その他.....	21
10		
11		

1 1 評価対象物質の性状

2 本章では、モデル推計に用いる物理化学的性状データ、環境中における分解性に係るデー
3 タを示す。

5 1-1 評価対象物質の設定

6 優先通し番号 86「 α - (ノニルフェニル) - ω - ヒドロキシポリ (オキシエチレン) (別名
7 ポリ (オキシエチレン) = ノニルフェニルエーテル)」(以下、「NPE」という。)は、エチレ
8 ンオキシド (EO) の平均付加モル数、ノニル基の炭素鎖構造及びノニル基の芳香環への置
9 換位置の組み合わせにより、様々な構造を有する。また、NPE は環境中で生分解により、よ
10 り短いエチレンオキシド鎖を有する NPE やノニルフェノールに分解される。そのため評価
11 対象物質等について実態調査や検討を行い、親化合物と変化物のそれぞれについて評価対
12 象物質とリスク評価の方針を設定した。親化合物の評価対象物質とリスク評価方針を表 1
13 - 1 に、変化物のそれを表 1 - 2 示す。変化物の評価対象物質は NPE2、NPE1、NP とした
14 (平均 EO の付加モル数 n の NPE を NPE n と表記、NP はノニルフェノール)。

16 表 1 - 1 NPE の親化合物の評価対象物質・試験対象物質及びリスク評価の方針

設定事項	内訳・補足	化学構造上の項目		
		EO 付加モル数	ノニル基の構造	ノニル基の置換位置
優先評価化学物質の指定単位		1 以上で特定なし	特定なし	特定なし
評価対象物質	親化合物 「ポリ (オキシエチレン) = ノニルフェニルエーテル」	3 以上で平均付加モル数 9~10	特定しない	<i>o-p</i> -異性体 又は特定しない
試験対象物質 (評価対象物質に最も関連性 Relevance がある既知見データの試験等の対象物質)	物理化学的性状等	9 または 10 (実測がない場合には 9 で推計)	直鎖/分岐区別なし (実測がない場合には分岐で推計)	<i>p</i> -、 <i>o</i> -または特定なし (実測がない場合には <i>p</i> 位で推計)
	有害性情報	3 以上について収集し、信頼性があり、最も毒性値が小さいデータを選定	直鎖/分岐区別なし	特定なし
リスク評価の方針	有害性評価	<ul style="list-style-type: none"> ・ 3 以上について収集し、信頼性があり最も毒性値が小さいデータをキーデータとして選定 ・ 傍証として信頼性が低いデータも利用し、EO 付加モル数による毒性傾向を把握 		

設定事項	化学構造上の項目			
	内訳・補足	EO 付加モル数	ノニル基の構造	ノニル基の置換位置
			・ 評価結果に応じて付加モル数別環境中での存在状況を加味した PNEC の補正などを検討	
	暴露評価	シミュレーション	物化性状等は上記で、排出量については PRTR 排出量を使用するため区別なし	
		環境モニタリング	3～15 の付加モル数別	区別なし（要調査等）
	リスク評価	シミュレーション	評価対象物質の環境中濃度、有害性評価値と想定して PEC/PNEC 値を推計	
環境モニタリング		<ul style="list-style-type: none"> ・ 3～15 の付加モル数別の濃度を合算して有害性評価値と比較 ・ リスクが懸念された地点については、付加モル数別の PEC/PNEC 推計も検討 		

1

2

表 1 - 2 NPE の変化物の評価対象物質・試験対象物質及びリスク評価の方針

設定事項	化学構造上の項目			
	内訳・補足	EO 付加モル数	ノニル基の構造	ノニル基の置換位置
優先評価化学物質の指定単位		1 以上で特定なし	特定なし	特定なし
評価対象物質	変化物 「NPE2,NPE1,NP」	0,1,2	特定しない	特定しない
試験対象物質 (評価対象物質に最も関連性 Relevance がある既知見データの試験等の対象物質)	物理化学的性状等	0,1,2 (暴露シミュレーションを行わないので、底生生物の有害性評価用に logP,Koc データのみ収集)	特定しない	特定しない
	有害性情報	0,1,2	直鎖/分岐区別なし	特定なし
リスク評価の方針	有害性評価		・ PNEC は NPE (NPE2 と NPE1) で 1 つ、NP で 1 つの合計 2 つ導出	
	暴露評価	シミュレーション	実施しない	
		環境モニタリング	1,2 のデータ	区別なし（要調査等）
		NP のデータ	分岐 (生活環境項目等)	p 位のみ (生活環境項目等)

設定事項	化学構造上の項目				
	内訳・補足		EO 付加モル数	ノニル基の構造	ノニル基の置換位置
リスク評価	シミュレーション		実施しない		
	環境モニタリング		<ul style="list-style-type: none"> ・ NPE2 と NPE1：付加モル数 1,2 のモニタリングデータを合算した PEC と PNEC を比較 ・ NP： NP のモニタリングデータ（PEC）と PNEC を比較 		

1
2 以上のように評価対象物質を決めるにあたって調査・検討した内容を以降で説明する。

3

4 **NPE（親化合物）の評価対象物質について**

5 水域への全国推計排出量（ただし長期使用製品の排出量は除く）が多かった用途（13-a、
6 25-l、45-b、20-f、25-p、12-a、14-b、14-a）について届出があった物質の構造について届出者
7 に確認したところ、概要は表 1 - 3 のとおりであった。

8

9 **表 1 - 3 届出者への NPE の構造に係る製造数量等届出者への調査結果概要**

構造上の調査項目	結果概要（水域排出量への寄与率）
エチレンオキシド（EO）の付加モル数	<ul style="list-style-type: none"> ・ 平均付加モル数 9 の合計： 50% ・ 10 : 39% ・ 40 : 0.28%
ノニル基の炭素鎖構造（直鎖 / 分岐）	<ul style="list-style-type: none"> ・ 分岐 71% ・ 直鎖 24% ・ 不明 5%
ノニル基の芳香環への置換位置（ <i>o</i> -, <i>p</i> -, <i>m</i> -異性体）	<ul style="list-style-type: none"> ・ <i>o</i>,<i>p</i>-体を主 64% ・ 不明 29% ・ <i>p</i>体のみ 7%

10

11 上表について詳細を次に示す。

12

13 **エチレンオキシド(EO)の平均付加モル数 n について**

14 NPE の水域への全排出量^{1,2} に対する寄与率を EO 平均付加モル数別に集計した結果を表
15 1 - 4 に示す。

16 NPE は EO 付加モル数が 18 以上で分子量が 1000 超となることから、ここでは EO 平均
17 付加モル数が 17 以下を「低分子」、18 以上を「高分子」と書き分けることとする。

18

19

¹ 各用途において、水溶解度区分 1-100mg/L の排出係数を用いて算出。

² 本実態調査で照会を行った出荷物全体のことを示す。

1

表 1 - 4 全排出量に対する寄与率の EO 平均付加モル数別集計

EO 平均付加モル数 n	分子量	水域への全排出量に対する寄与率 1	
3	352.52	0.01%	97.35%
4	396.57	3.74%	
5	440.63	0.36%	
6	484.68	0.51%	
7	528.73	1.37%	
8	572.79	0.03%	
9	616.84	50.16%	
10	660.89	38.62%	
11	704.95	0.81%	
12	749.00	1.25%	
13	793.05	0.16%	
15	881.16	0.08%	
16	925.22	0.23%	
17	969.27	0.03%	2.65%
18	1013.32	- (18 ~ 39: 0%) 2	
40	1982.50	0.28%	
51	2467.09	0.04%	

2

- 3 1. EO 平均付加モル数 n の水域への全排出量に対する寄与率であり、各 n の分布範囲について
4 考慮していない。
- 5 2. EO 平均付加モル数が 18 ~ 39 の NPE が 0% であるが、EO 平均付加モル数 n=17 までのもの
6 の分布範囲に 18 ~ 25 のものが含まれる。
- 7 例：n=10：EO 付加モル数の分布範囲 1 ~ 18
8 n=11：EO 付加モル数の分布範囲 5 ~ 20
9 n=12：EO 付加モル数の分布範囲 5 ~ 21
10 n=13：EO 付加モル数の分布範囲 5 ~ 22
11 n=15：EO 付加モル数の分布範囲 6 ~ 22
12 n=17：EO 付加モル数の分布範囲 6 ~ 25

13

14 取扱い実態調査の結果から、低分子の水域への全排出量に対する寄与率が 90% 以上であ
15 ることを鑑みて、評価対象物質の候補からは「高分子」を検討対象外とする。

16 低分子の中では、取扱い実績から、EO 平均付加モル数 9 の物質が全排出量に対し約
17 42% を占め、EO 平均付加モル数 10 は 32% であった。この 2 つが全体の 73% を占めた。

18

19 ノニル基の炭素鎖構造(分岐鎖/直鎖)について

20 NPE の水域への全排出量を取扱い実態調査の出荷物別にみると、最も排出量が多い製品
21 のノニル基は直鎖構造であったが(全排出量に対して 23.1% の寄与)、全体的にみるとノ
22 ニル基が分岐構造のものが多く、全排出量の 71.1% を占めた(全排出量に対して、構造不
23 明 4.85%、直鎖 24.1%)。

24

1 ノニル基の芳香環への置換位置

2 *o*-, *p*-体を主とするものが全排出量に対して 63.5%、*p* 体のみのもものが 6.6%、不明のもの
3 が 28.9%であった。*o*-, *p*-体を主とするもの、あるいは *p* 体のみのももので全排出量の 71.1%
4 を占めた。

5

6 水溶解度、logPow、Koc 及び分解性の 4 項目について ~ の構造上の違いによる性状へ
7 の影響を調べたところ、 の EO 付加モル数が支配的であることが分かった。そのため暴露
8 評価の面からは は特定せず、EO 付加モル数が評価対象物質の設定を行えばよいと考え
9 られた。

10 水生生物のリスク評価を行うための評価対象物質は、難分解性であることから親化合物
11 の中の排出量への寄与が大きい EO 付加モル数ものもものが妥当と考えられる。また、水生
12 生物のリスク評価に用いる水中濃度には溶存態濃度を用いるため、安全側にリスク推計す
13 るには Koc が小さいほうがよいと考えられる。

14

15 以上のように調査・検討した結果、NPE の親化合物についてリスク評価を行うための評
16 価対象物質・試験対象物質及びリスク評価の方針は前述の表 1 - 1 のように決められた。

17

18

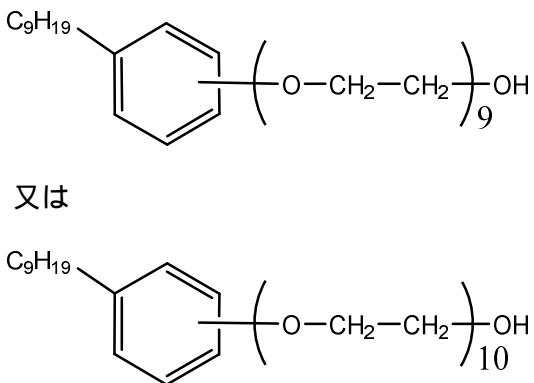
1 **変化物の評価対象物質について**

2 既往情報の調査では、ノニルフェノールおよびノニルフェノールモノエトキシレート
 3 (NPE1)、ノニルフェノールジエトキシレート(NPE2)は、複数の評価に共通して評価対象と
 4 なっている。NPE1 および NPE2 の毒性について情報は少ないが、カナダの評価書では NPE1
 5 および NPE2 の混合物および NPE2 の毒性情報が記載されている。オーストラリアの評価書
 6 には NPE1 及び NPE2 の毒性情報が記載されており、また、それらのカルボン酸誘導体につ
 7 いて毒性値の記載はないが、“毒性は NP よりも 100~200 倍小さい”という定性的な記述があ
 8 った。

9 以上の国内外の既知見情報の調査結果を踏まえ、NPE の親化合物についてリスク評価を
 10 行うための評価対象物質・試験対象物質及びリスク評価の方針は前述の表 1 - 2 のように
 11 決められた。

12
 13 評価対象物質(親化合物)の主成分構造等を表 1 - 5、評価対象物質(変化物)の構造等
 14 を表 1 - 6、表 1 - 7、表 1 - 8 に示す。

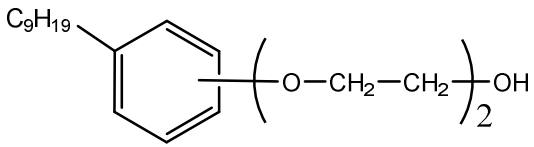
15
 16 **表 1 - 5 評価対象物質(親化合物:NPE)の主成分構造等**

	
評価対象物質名称	α - (ノニルフェニル) - ω - ヒドロキシポリ(オキシエチレン) (別名ポリ(オキシエチレン) = ノニルフェニルエーテル) ただし、エチレンオキシドの平均付加モル数は 3 以上で 9 ~ 10
分子式	C ₃₃ H ₆₀ O ₁₀ 又は C ₃₅ H ₆₄ O ₁₁
CAS 登録番号	26571-11-9 (n = 9) 27177-08-8 (n = 10)など

17
 18
 19
 20
 21

1

表 1 - 6 評価対象物質(変化物 1:NPE2)の構造等

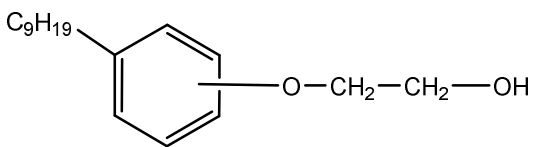
	
評価対象物質名称	ノニルフェノールジエトキシレート
分子式	C ₁₉ H ₃₂ O ₃
CAS 登録番号	20427-84-3 など

2

3

4

表 1 - 7 評価対象物質(変化物 2:NPE1)の構造等

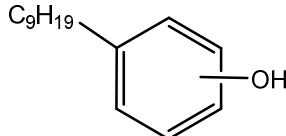
	
評価対象物質名称	ノニルフェノールモノエトキシレート
分子式	C ₁₇ H ₂₈ O ₂
CAS 登録番号	104-35-8 など

5

6

7

表 1 - 8 評価対象物質(変化物 3:NP)の構造等

	
評価対象物質名称	ノニルフェノール
分子式	C ₁₅ H ₂₄ O
CAS 登録番号	25154-52-3 など

8

9

10

1 1-2 NPE (親化合物)

2 1-2-1 物理化学的性状及び濃縮性

3 下表にモデル推計に採用した物理化学的性状及び生物濃縮係数を示す。なお、表中の下線
4 部は、評価 において精査した結果、評価 から変更した値を示している。

5

6 表 1-9 モデル推計に採用した物理化学的性状等データのまとめ(親化合物(NPE))

項目	単位	採用値	詳細	評価 I で用いた値(参考)
分子量	-	616.81	NPE9 の値	264.41
融点		2.8 ^{1),9),10)}	測定値か推定値か不明な値	2.8 ¹⁾
沸点		(634) ²⁾	MPBPVP による推計値	369.64 ²⁾
蒸気圧	Pa	<u>6.7×10⁻¹³</u> ²⁾	MPBPVP による推計値	99 ³⁾
水に対する溶解度	mg/L	<u>(1×10⁶)</u> ^{5),10)}	水に可溶とみなす ただし臨界ミセル濃度は 49.6 mg/L ¹³⁾	1.53×10 ⁵ ³⁾
1-オクタノールと水との間の分配係数(logPow)	-	<u>(3.2)</u> ²⁾	KOWWIN による推計値	3.7 ³⁾
ヘンリー係数	Pa・m ³ /mol	<u>4.0×10⁻¹⁷</u> ²⁾	HENRYWIN による推計値	2.48×10 ⁻⁴ ⁴⁾
有機炭素補正土壌吸着係数(Koc)	L/kg	<u>6100</u> ¹¹⁾	河川の底質 7 地点における測定値に基づき算出	6.1 ^{1),4),5)}
生物濃縮係数(BCF)	L/kg	<u>11.4</u> ¹²⁾	濃縮度試験における測定値	1.4 ⁶⁾
生物蓄積係数(BMF)	-	1 ⁷⁾	logPow と BCF から設定	1 ⁷⁾
解離定数(pKa)	-	- ⁵⁾	解離性の基を有さない物質	- ⁸⁾

- 7 1) MOE (2006) 7) MHLW, METI, MOE (2014)
8 2) EPI Suite (2012) 8) 評価 I においては解離定数は考慮しない
9 3) ECHA 9) Canada (2001)
10 4) HSDB 10) AIST (2004)
11 5) NITE (2005a) 11) Urano (1984)
12 6) MITI (1982) 12) MITI (1979)
13 13) Australia (2017)

14 括弧内はモデルを動かすための参考値であることを示す。

15

16 上記性状項目について、精査概要を以下に示す。

17 なお、評価 では CAS RN 9016-45-9 の物質の情報のデータを用いていた。この CAS RN
18 の物質のエチレンオキシド (EO) の付加モル数の規定はない。

19 また、評価 において推計値を用いる場合は、1-1 で記載したように NPE9 のノニル基
20 が分岐した *p*-体を対象とする。その場合、「平成 29 年度第 1 回化審法リスク評価等検討会」
21 (平成 29 年 8 月 31 日) の資料に記載されている次の 6 種類の *p*-体を対象とした。

22

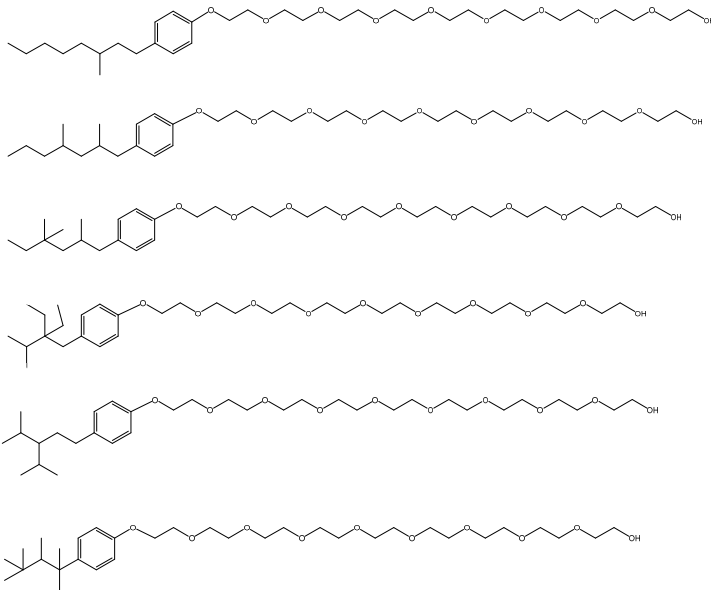
23

24

25

26

27



1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23

融点

評価 で採用した値 (2.8)は、MOE (2006) に記載された値 (NPE9) であるが、測定値であるか不明である。この値は Canada (2001)に記載のもので AIST (2004) でも引用されている。また、HSDB には NPE9 の流動点が 2.8 という記載があった。EO 付加モル数の記載があるもので信頼性の定まった情報源において測定値は見つからなかったため、評価 においてもこの値 (2.8)を用いる。

沸点

評価 で採用した値 (369.64)は便宜的に決めた代表構造 (NPE1) について MPBPVP (v1.43) を用いた推計値である。EO 付加モル数の記載があるもので信頼性の定まった情報源において測定値は見つからなかった。MPBPVP (v1.43) を用いた NPE9 の推計値は 622 ~ 645 (対象とした 6 種類の *p*-体の推計値の範囲。以下同様。) であり、評価 においては、算術平均値 (634)を用いる。ただし、通常の有機化合物は存在できない高温であるため参考値の扱いとする。

蒸気圧

評価 で採用した値 (99 Pa) は、ECHA に記載された 25 での測定値 (140 Pa) を 20 に補正したものであるが EO 付加モル数の記載がなかった。EO 付加モル数の記載があるもので信頼性の定まった情報源において測定値は見つからなかった。MPBPVP (v1.43) を用いた NPE9 の推計値は 2.5×10^{-13} Pa ~ 1.4×10^{-12} Pa であり、評価 においては、MPBPVP の算術平均値 (6.7×10^{-13} Pa)を用いる。

1
2 水に対する溶解度

3 評価 で採用した値 (1.53×10^5 mg/L) は、ECHA に記載された 20 で測定された測定値で
4 あるが EO 付加モル数の記載がなかった。HSDB や MITI (1982) には NPE10 の測定値かど
5 うか不明な値 (1000 mg/L) の記載がある。NITE (2005a) には、NPE9.5 は水に可溶という
6 情報と、EO 付加モル数の増加により水溶解性は増加し、付加モル数が 7 以上で水に可溶、
7 また、アルキル鎖の分岐により水溶解性は増加するという記載があり (AIST (2004) でも引
8 用) 他の信頼性の定まった情報源にも同様の記載があるため、評価 においては、水に対
9 する溶解度を 1×10^6 mg/L (参考値) とする。ただし、Australia (2017) によれば NPE10 の臨界ミ
10 セル濃度 (CMC) の測定値が 49.6 mg/L であることに注意が必要である。

11
12 logPow

13 評価 で採用した値 (3.7) は、ECHA に記載された OECD TG117 による測定値 (EO 付加
14 モル数記載なし) である。MOE (2006) と Canada (2001) に NPE9 の値 (3.59) の記載があり、
15 元文献である Ahel (1993) を確認したところ測定値ではなく付加モル数又は水溶解度と
16 logPow との回帰式を基にした推計値とみられたが、この値は見つからなかった。EO 付加モ
17 ル数の記載があるもので信頼性の定まった情報源において測定値は見つからなかった。
18 KOWWIN (v.1.68) を用いた NPE9 の推計値は 3.1 ~ 3.3 であり、評価 においては、KOWWIN
19 の算術平均値 (3.2) を用いる。ただし、NPE は界面活性剤であることから正しく推計ができ
20 ていない可能性があるため参考値の扱いとする。(なお、KOWWIN (v.1.68) のヘルプ 6.2.3 に
21 よれば現在のところモデルドメインの明確な定義はないとのこと。)

22
23 ヘンリー係数

24 評価 で採用した値 (2.48×10^{-4} Pa·m³/mol) は、HSDB に記載された測定値であるが、NP
25 の値であった。EO 付加モル数の記載があるもので信頼性の定まった情報源において測定値
26 は見つからなかった。HENRYWIN (v.3.30) を用いた NPE9 の 20 での推計値は 4.0×10^{-17} Pa·
27 m³/mol であり、評価 においてはこの値 (4.0×10^{-17} Pa·m³/mol) を用いる。

28
29 Koc

30 評価 で採用した値 (6.1 L/kg) は、MOE (2006)、NITE (2005a)、HSDB に記載された値で
31 ある。MOE (2006)、NITE (2005a) では NPE6 の値として記載しているが、これは元文献であ
32 る Urano (1984) を確認すると NPE10 の値であり、引用間違いと考えられた。Urano (1984)
33 によれば日本の河川 (小鮎川、水沢川、相模川、平瀬川) の 7 つの底質を測定し Freundlich
34 の吸着等温式に基づいて Koc を求めている。ただし論文中の Koc の値 (6.1) の単位は L/g
35 であるため、単位換算すると 6100 L/kg となる。

36 HSDB には NPE9 の Koc の推計値 (4300 L/kg) の記載があったが、他に信頼性の定まった

1 情報源において測定値は見つからなかった。評価 においては NPE10 の値として、Urano
2 (1984) の値 (6100 L/kg) を用いる。

3 4 BCF

5 評価 で採用した値 (1.4 L/kg) は、MITI (1982) に記載された平均重合度 30 の NPE を用
6 いた濃縮倍率である 0.2 L/kg 以下 (6 週間、試験濃度:2 mg/L)、1.4 L/kg 以下 (6 週間、試験
7 濃度:0.2 mg/L) の最大値である。他に MITI (1979) には NPE10 を用いた濃縮倍率として 9.09
8 ~ 16.0 L/kg (6 週間、試験濃度:1.0 mg/L)、(7.6) ~ (12 L/kg) (6 週間、試験濃度:0.1 mg/L、()の
9 値は参考値) の値の記載があった。評価 では NPE10 を用いた参考値を除いた試験の後半
10 3 回の濃縮倍率の算術平均値(11.4 L/kg) を用いる。なお、試験濃度はいずれも 水に対する
11 溶解度で前述した臨界ミセル濃度未満である。

12 13 BMF

14 評価 で採用した値は、logPow (3.7) 及び BCF (1.4 L/kg) から化審法における優先評価化
15 学物質に関するリスク評価の技術ガイダンス (以下、「技術ガイダンス」という。) に従って
16 設定したものである。BMF の測定値は得られなかったため、評価 においては新たに評価
17 で選定した logPow (3.2) 及び BCF (11.4 L/kg) から設定した値 (1) を用いる。

18 19 解離定数

20 評価 においては解離を考慮しないため、参考値は設定されていない。NITE (2005a) に
21 は解離基はないとの記載があり、評価 においても本物質は解離性を考慮しないこととす
22 る。

1 1-2-2 分解性

2 下表にモデル推計に採用した分解に係るデータを示す。

3
4 **表 1 - 10 分解に係るデータのまとめ(親化合物(NPE))**

項目		半減期 (日)	詳細
大気	大気における総括分解半減期		NA
	機序別の半減期	OH ラジカルとの反応	0.10
		オゾンとの反応	NA
		硝酸ラジカルとの反応	NA
水中	水中における総括分解半減期		NA
	機序別の半減期	生分解	6.1
		加水分解	-
		光分解	NA
土壌	土壌における総括分解半減期		NA
	機序別の半減期	生分解	6.1
		加水分解	-
底質	底質における総括分解半減期		NA
	機序別の半減期	生分解	25
		加水分解	-

5 1) EPI Suite(2012)

6 2) Kveštak (1995)

7 3) HSDB

8 NA:情報が得られなかったことを示す

9
10 上記分解項目について、精査概要を以下に示す。なお、「総括分解半減期」とは、分解の
11 機序を区別しない環境媒体ごとのトータルの半減期のことを示す。精査では物理的性状
12 と同様に基本的に平均 EO 付加モル数が 9、10 であるものを対象にした。

13
14 **大気**

15 大気中での総括分解半減期に関する情報は得られなかった。また、機序別の半減期につい
16 ても、オゾン及び硝酸ラジカルとの反応に関する情報は得られなかった。

17 **-1 OH ラジカルとの反応の半減期**

18 大気中における OH ラジカルとの反応速度定数の測定値に関する情報は得られなかった
19 ため、AOPWIN (v1.92) により推計された $1.5 \times 10^{-10} \sim 1.6 \times 10^{-10} \text{ cm}^3/\text{molecule/s}$ のうち、最小
20 値である $1.5 \times 10^{-10} \text{ cm}^3/\text{molecule/s}$ を半減期算出に採用する。大気中 OH ラジカル濃度を技術
21 ガイドンスの $5 \times 10^5 \text{ molecule/cm}^3$ とした場合、半減期は 0.10 日と算出される。評価 ではこ
22 の値 (0.10 日) を用いる。

1 水中

2 水中での総括分解半減期に関する情報は得られなかったが、生分解と加水分解の機序別
3 の半減期に関する情報が得られた。

4 -1 生分解の半減期

5 Kveštak (1995) (HSDB、AIST (2004)で引用) は、EO 範囲 1~18 (平均 EO 付加モル数 10)
6 の NPE を使い、静的ダイヤウェイ試験法に従い水中の生分解試験を実施している。被験物
7 質濃度 0.1 mg/L 又は 1 mg/L でクロアチアのクルカ川 (Krka River) の河口から微生物を含ん
8 だ汽水層 (水深 0.5m) と塩水層 (水深 6m) を用いて 30 日間試験し、トータルの NPE 濃度
9 を、逆相 HPLC で分離し、蛍光分光光度計を用い、励起光波長 230 nm、蛍光波長 300 nm で
10 検出することによって分析した。その結果、半減期を下表のように冬季 (13) で 23 日~
11 69 日、夏季 (22.5) で 2.5 日~35 日と推計している。

12

初期濃度 (mg/L)	微生物の採取地点	塩分濃度 (%)	温度 ()	誘導期 (日)	一次分解速度定数 (1/日)	半減期 (1/日)
1	汽水層 0.5m	8	13	7	0.02	35
	汽水層 0.5m	8.5	18	4	0.03	23
	汽水層 0.5m	32	20	<1	0.17	4
	汽水層 0.5m	24	22.5	<1	0.17	4
0.1	汽水層 0.5m	8	13	3	0.03	23
	汽水層 0.5m	8.5	18	5	0.07	10
	汽水層 0.5m	24	22.5	<1	0.28	2.5
1	塩水層 6m	38	13	7	0.01	69
	塩水層 6m	38	18	13	0.02	35
	塩水層 6m	38	22.5	3	0.02	35
0.1	塩水層 6m	38	13	3	0.02	35
	塩水層 6m	38	18	5	0.03	23
	塩水層 6m	38	22.5	<1	0.05	14

13

汽水層、塩水層は brackish water layer、saline water layer の訳

14

15 Yoshimura (1986) (HSDB、AIST (2004)で引用) は、平均 EO 付加モル数 9 の NPE の生分解
16 性を調査した。被験物質、川崎市の矢作川の底質をそれぞれ濃度 20 mg/L、3000 mg/L と
17 なるように試験溶液に混ぜ、攪拌状態または攪拌なし状態での生分解性試験を 30 日間実施し、
18 HPLC—比色法 (コバルト—チオシアネート法) で分析した。結果、10 日以内に約 98 % が分
19 解した。また、汽水を使用したりバーダイヤウェイ試験において、39 %、90 %、92 % 及び
20 94 % の分解がそれぞれ 4、5、8 及び 10~16 日間の試験後に認められた。

21

22 Urano (1985) (HSDB で引用) は、平均 EO 付加モル数 10 の NPE を使い、水中の生分解試
23 験を実施している。被験物質濃度 3、10、30、100 mg/L で、活性汚泥濃度を被験物質濃度の
24 1/3 として下水処理場の活性汚泥を用い、MITI () 法に類似した方法によって 20 で 14 日
25 間試験を行った結果、被験物質濃度 3、10、30、100 mg/L に対して BOD 分解度 57 %、42 %、

1 40%、25%であった。

2
3 なお、MITI(1974)において化審法の試験方法に従って、平均EO付加モル数9.5、被験物
4 質濃度100mg/L、活性汚泥濃度30mg/Lで14日間試験を行った結果、BOD分解度、UV分
5 解度、TOC分解度、LC分解度はそれぞれ0%、6.8%、9.0%、5.2%であった。更に、MITI
6 (1975)において平均EO付加モル数9.5、被験物質濃度30mg/L、活性汚泥濃度30mg/Lで
7 21日間試験を行った結果、BOD分解度、UV分解度、TOC分解度はそれぞれ0%、0%、
8 14.3%であった。

9
10 以上の得られた情報のうち、Kveštak(1995)は励起光波長、検出光波長の値からベンゼン
11 環があるノニルフェノール基を検出していると考えられるため、EO数が異なる全てのNPE
12 が消失することに対する半減期を求めていると考えられる。モデル推計では主に河川(表層
13 水)の濃度推計を行うことから、Kveštak(1995)に記載された汽水層(0.5m)の値を選ぶと
14 分解速度の範囲は0.02(1/日)~0.28(1/日)であり、アレニウスプロットを行って20の値を
15 算出すると0.11(1/日)となり、半減期は6.1日となる。評価ではこの値(6.1日)を用いる。

16 なお、AIST(2009)には文献から得られた半減期をもとに、NPE_n(EO付加モル数は特に
17 規定していない)及びNPの分解速度求めたところ、分解速度は0.014(1/日)~1.0(1/日)の
18 範囲に収まっていたとし、算術平均値の0.15(1/日)(半減期4.7日)を水系モデルの分解速度
19 パラメータの参考にしたと記載されている。

20 -2 加水分解の半減期

21 HSDBには、環境条件下で加水分解する官能基がないため環境中で加水分解を受けるとは
22 考えられていないと記載されており、加水分解は考慮しない。

23 24 土壌

25 土壌中での総括分解半減期に関する情報は得られなかった。また、機序別の半減期に関す
26 る情報も得られなかった。

27 -1 生分解の半減期

28 半減期に関するデータは得られなかったため、評価においては技術ガイダンスに従っ
29 て、土壌中での生分解半減期を水中の生分解半減期の6.1日とする。

30 -2 加水分解の半減期

31 水中での加水分解と同様に土壌中での加水分解は考慮しない。

32 33 底質

34 底質中での総括分解半減期に関する情報は得られなかった。また、機序別の半減期に関す
35 る情報も得られなかった。

36 -1 生分解の半減期

- 1 半減期に関するデータは得られなかったため、底質中での生分解半減期は、技術ガイダンスに従って、水中の生分解半減期の 4 倍である 25 日とする。
- 2
- 3 -2 加水分解の半減期
- 4 水中での加水分解と同様に底質中での加水分解は考慮しない。
- 5
- 6

1 1-3 NPE2、NPE1、NP（変化物）

2 「平成29年度化審法リスク評価等検討会」（第1回 平成29年8月31日、第2回 平
3 成29年11月20日、第3回平成29年12月22日）において変化物の暴露評価の方針は次
4 のように取りまとめられた。

5
6 変化物の暴露評価に関しては、既存の知見でNPEからNPへの変換率は数%程度とされ
7 ているため、変化物の環境中濃度を親化合物から全量変化物になるとして推計することは
8 極端な過大評価になると考えられる。また、親化合物から変化物への分解速度に関するデー
9 タも限られることからモデル推計を行うことは困難と考えられる。以上のことと、EO付加
10 モル数1又は2及びNPの環境モニタリング情報が得られることから、暴露評価、リスク推
11 計には環境モニタリング情報を用いて行うこととする。

12
13 上記のように変化物は環境モニタリング情報を用いた暴露評価を行うため、モデル推計
14 のための物理化学的性状等の収集は行わない。しかし、変化物の底生生物の評価の実施を判
15 断するためにlogPowが必要となり、logPowが3以上の場合には平衡分配法による有害性評
16 価値算出のためにKocが必要となる。そこでlogPowとKocを収集し精査した。

17
18 1-3-1 ノニルフェノールジエトキシレート(NPE2)のlogPowとKoc

19
20 下表に底生生物の評価に採用したNPE2のlogPowとKocを示す。

21
22 **表 1 - 11 底生生物の評価に採用したlogPowとKocのまとめ(NPE2)**

項目	単位	採用値	詳細	評価Iで用いた値(参考)
1-オクタノールと水との間の分配係数(logPow)	-	4.21	20.5 での実測値 ¹⁾	-
有機炭素補正土壌吸着係数(Koc)	L/kg	640	推計値 ²⁾	-

23 1) Ahel (1993)

24 2) EPI Suite (2012)

25 上記性状項目について、精査概要を以下に示す。

26 logPow

27 Canada (2001) には NP の値が記載されているが、その元文献である Ahel (1993) には
28 OECD TG 107 のフラスコ振とう法により測定した NPE2 の 20.5 での測定値 (4.21) が記載
29 されている。評価 においてはこの値 (4.21) を用いる。なお、NPE は界面活性剤であるた
30 め、OECD TG107 を適用できない。しかし元文献では、NPE2 について、親水性部分である
31 EO 付加モル数が少ないため親油性化合物であるとし、OECD TG107 を適用できると見なし
32 ている。

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32

Koc

EO付加モル数の記載があるもので信頼性の定まった情報源において測定値は見つからなかった。KOCWIN (v2.00) を用いた NPE2 の推計値は 640 L/kg (Log Kow Estimation Method ; logPow = 4.21 とする) であった。評価 において、この値 (640 L/kg) を用いる。

1-3-2 ノニルフェノールモノエトキシレート(NPE1)の logPow と Koc

下表に底生生物の評価に採用した NPE1 の logPow と Koc を示す。

表 1 - 12 底生生物の評価に採用した logPow と Koc のまとめ(NPE1)

項目	単位	採用値	詳細	評価 I で用いた値(参考)
1-オクタノールと水との間の分配係数(logPow)	-	4.17	20.5 での実測値 ¹⁾	-
有機炭素補正土壌吸着係数(Koc)	L/kg	750	推計値 ²⁾	-

1) Ahel (1993)

2) EPI Suite (2012)

上記性状項目について、精査概要を以下に示す。

logPow

Canada (2001) には NP の値が記載されているが、その元文献である Ahel (1993) には OECD TG 107 のフラスコ振とう法により測定した NPE1 の 20.5 での測定値が記載されている。評価 においてはこの値 (4.17) を用いる。なお、NPE は界面活性剤であるため、OECD TG107 を適用できない。しかし元文献では、NPE1 について、親水性部分である EO 付加モル数が少ないため親油性化合物であるとし、OECD TG107 を適用できると見なしている。

Koc

EO付加モル数の記載があるもので信頼性の定まった情報源において測定値は見つからなかった。KOCWIN (v2.00) を用いた NPE1 の推計値は 750 L/kg (Log Kow Estimation Method ; logPow = 4.17 とする) であった。評価 においては、この値 (750 L/kg) を用いる。

1-3-3 ノニルフェノール (NP) の logPow と Koc

下表に底生生物の評価に採用した NP の logPow と Koc を示す。

1 表 1 - 13 底生生物の評価に採用した logPow と Koc のまとめ (NP)

項目	単位	採用値	詳細	評価 I で用いた値(参考)
1-オクタノールと水との間の分配係数(logPow)	-	5.28	3 つの値の算術平均値 ¹⁾⁻¹⁰⁾	-
有機炭素補正土壌吸着係数(Koc)	L/kg	1.0×10 ⁴	推計値 ¹¹⁾	-

- 2 1) SIDS (2001) 7) Itokawa (1989)
 3 2) Ahel (1993) 8) PhysProp
 4 3) Canada (2001) 9) HSDB
 5 4) AIST (2004) 10) ECHA
 6 5) Mackay (2006) 11) EPI Suite (2012)
 7 6) NITE (2005b)

8

9 上記性状項目について、精査概要を以下に示す。

10 logPow

11 SIDS (2001) には、Ahel (1993) が OECD TG 107 のフラスコ振とう法により測定した NP
 12 の 20.5 での測定値 (4.48) が記載されており、Canada (2001)、AIST (2004)、Mackay (2006)
 13 にもこの値が採用されている。

14 一方、NITE (2005b) には、Itokawa (1989) が HPLC 法により測定した NP の 40 での測定
 15 値 (5.76 (*o* 体、*p* 体)、5.61 (*m* 体)) が記載されており、PhysProp、HSDB、ECHA、AIST (2004)、
 16 Mackay (2006) にもこれらの値が採用されている。

17 評価 においてはこれらの 3 つの値の算術平均値 (5.28) を用いる。

18 Koc

19 SIDS (2001) には、USEPA TSCA 環境運命試験ガイドラインに沿って実測した測定値
 20 (22,000-490,000 L/kg) が記載されているが、試験容器への吸着のために測定値が高すぎる可
 21 能性があると述べている。

22 KOCWIN (v2.00) を用いた NP の推計値は 1.0×10⁴ L/kg (Log Kow Estimation Method ;
 23 logPow = 5.28 とする) であった。評価 においては、この値 (1.0×10⁴ L/kg) を用いる。

24

1 2 【付属資料】

2 2 - 1 物理化学的性状等一覽

3 収集した物理化学的性状等は別添資料を参照。

4

5 出典)

6 Ahel (1993): Marijan Ahel. and Walter Giger (1993) Partitioning of alkylphenols and alkylphenol
7 polyethoxylates between water and organic solvents, Chemosphere, Vol. 26, No. 8, pp. 1471-1478.

8 AIST (2004): 産業技術総合研究所, 詳細リスク評価書, ノニルフェノール. 2004.

9 Australia (2017): Environment Tier II Assessment for Nonylphenol Ethoxylates and their Sulfate and
10 Phosphate Esters (25 July 2017).

11 Canada (2001): PRIORITY SUBSTANCES LIST ASSESSMENT REPORT, Nonylphenol and its
12 Ethoxylates. 2001.

13 ECHA: Information on Chemicals – Registered substances.

14 <http://echa.europa.eu/web/guest/information-on-chemicals/registered-substances>, (2017-10-24 閱
15 覧).

16 EPI Suite (2012): US EPA. Estimation Programs Interface Suite. Ver. 4.11, 2012.

17 HSDB: US NIH. Hazardous Substances Data Bank.

18 <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB>, (2017-10-24 閱覧).

19 Itokawa (1989): Itokawa, H., Totsuka, N., Hakahara, K., Meazuru, M., Takeya, K., Konda, M.,
20 Inamatsu, M., Morita, H (1989) A quantitative structureactivity relationship for antitumor activity of
21 long-chain phenols from Ginkgo biloba L, Chem. Pharm. Bull. 36, 1619–1621.

22 Kveštak (1995): R. Kveštak, M. Ahel (1995) Biotransformation of nonylphenol polyethoxylate
23 surfactants by estuarine mixed bacterial cultures, Archives of Environmental Contamination and
24 Toxicology, 29 (4), 551-556.

25 Mackay (2006): Mackay, D., Shiu, W. Y., Ma, K. C., & Lee, S. C. Handbook of physical-chemical
26 properties and environmental fate for organic chemicals. 2nd ed., CRC press, 2006.

27 MHLW, METI, MOE(2014): 化審法における優先評価化学物質に関するリスク評価の技術ガイ
28 ダンス, V. 暴露評価～排出源ごとの暴露シナリオ～. Ver. 1.0, 2014.

- 1 MITI (1974): ポリオキシエチレンアルキルフェニルエーテル (A : n (平均付加モル数) =
2 9.5、B : n (平均付加モル数) = 40) の分解度試験報告書. 既存化学物質点検, 1974.
- 3 MITI (1975): ポリオキシエチレンアルキルフェニルエーテル (試料 No.K-49) の分解度試験
4 報告書. 既存化学物質点検, 1975.
- 5 MITI (1979): ポリオキシエチレンアルキル(ノニル)フェニルエーテル (試料 No.K-49A) の
6 濃縮度試験報告書. 既存化学物質点検, 1982.
- 7 MITI (1982): ポリオキシエチレンアルキルフェニルエーテル (ポリ (平均重合度 30) オキ
8 シエチレンアルキル (C=9) フェニルエーテル) (試料 No.K-49B) の濃縮度試験報告書. 既存
9 化学物質点検, 1982.
- 10 MOE (2006): 化学物質の健康影響に関する暫定的有害性評価シート DB - 42, ポリ (オキシ
11 エチレン) = ノニルフェニルエーテル. 2006.
- 12 NITE (2005a): 化学物質の初期リスク評価書, ポリ(オキシエチレン)ノニルフェニルエーテ
13 ル. Ver. 1.0, No. 96, 2005.
- 14 NITE (2005b): 化学物質の初期リスク評価書, ノニルフェノール. Ver. 1.0, No. 1, 2005.
- 15 PhysProp: Syracuse Research Corporation. SRC PhysProp Database. (2017-10-24 閲覧).
- 16 SIDS (2001): SIDS INITIAL ASSESSMENT PROFILE, Phenol, 4-nonyl-, branched and
17 Nonylphenol. 2001
- 18 Urano (1984): K. Urano, M. Saito, C. Murata (1984) Adsorption of surfactants on sediments,
19 Chemosphere, 13 (2), 293-300.
- 20 Urano (1985): K. Urano, M. Saito (1985) Biodegradability of surfactants and inhibition of
21 surfactants to biodegradation of other pollutants, Chemosphere, 14 (9), 1333-1342.
- 22 Yoshimura (1986): K. Yoshimura (1986) Biodegradation and fish toxicity of nonionic surfactants,
23 Journal of the American Oil Chemists' Society, 63 (12), 1590-1596.
- 24

- 1 2-2 その他
- 2 特になし。

1
2 優先評価化学物質「 α -(ノニルフェニル)- ω -ヒドロキシポリ(オキシエチレ
3 ン)(別名ポリ(オキシエチレン)=ノニルフェニルエーテル)」

4
5 生態影響に係るリスク評価(一次)評価Ⅱの進捗報告

6
7 平成30年3月

8 <概要>

9 ○評価対象物質とリスク評価方針について

10 優先通し番号 86「 α -(ノニルフェニル)- ω -ヒドロキシポリ(オキシエチレン)(別名ポリ
11 (オキシエチレン)=ノニルフェニルエーテル)」(以下、「NPE」という。)は、エチレンオキシド
12 (以下、「EO」という。)の平均付加モル数、ノニル基の炭素鎖構造及びノニル基の芳香環への置
13 換位置の組み合わせにより、様々な構造を有する。また、NPEは環境中での生分解により、より
14 短いエチレンオキシド鎖を有するNPEやノニルフェノールに変化する。そのため評価対象物質等
15 について実態調査や検討を行い、親化合物と変化物のそれぞれについて評価対象物質とリスク評
16 価の方針を設定した。親化合物の評価対象物質とリスク評価方針を表1に、変化物のそれを表2
17 示す。変化物の評価対象物質はEO数が1及び2のNPE(以下、「NPE1及びNPE2」という。)EO
18 数が0のノニルフェノール(以下、「NP」という。)とした(詳細は資料2参考2参照)。

19 親化合物NPEの暴露評価・リスク評価は、数理モデルによるシミュレーション結果と環境モニ
20 タリング調査結果の両方を併用することとし、変化物の暴露評価・リスク評価は、環境モニタリ
21 ング調査結果を用いることとした。

22
23 表1 NPEの親化合物の評価対象物質・試験対象物質及びリスク評価の方針

設定事項	内訳・補足	化学構造上の項目		
		EO付加モル数	ノニル基の構造	ノニル基の置換位置
優先評価化学物質の指定単位		1以上で特定なし	特定なし	特定なし
評価対象物質	親化合物 NPE	3以上 平均付加モル数9~ 10	特定しない	<i>o-p</i> -異性体 又は特定しない
試験対象物質 (評価対象物質に最も関連性 Relevanceがある 既知見データの 試験等の対象物 質)	物理化学的性状等	9または10 (実測がない場合には 9で推計)	直鎖/分岐区別なし (実測がない場合には 分岐で推計)	<i>p</i> -, <i>o</i> -または 特定なし(実測がない 場合には <i>p</i> 位で推計)
	有害性情報	3以上について収集 し、信頼性があり、 最も毒性値が小さい データを選定	直鎖/分岐区別なし	特定なし

設定事項	化学構造上の項目			
	内訳・補足	EO 付加モル数	ノニル基の構造	ノニル基の置換位置
リスク評価の方 針	有害性評価	<ul style="list-style-type: none"> ・ 3 以上について収集し、信頼性があり最も毒性値が小さいデータをキーデータとして選定 ・ 傍証として信頼性が低いデータも利用し、EO 付加モル数による毒性傾向を把握 ・ 評価結果に応じて付加モル数別環境中での存在状況を加味した PNEC の補正などを検討 		
	暴露 評価	シミュレーション	物化性状等は上記で、排出量については PRTR 排出量を使用するため区別なし	
		環境モニタリング	3～15 の付加モル数別	区別なし（要調査等）
	リス ク 評 価	シミュレーション	評価対象物質の環境中濃度、有害性評価値と想定して PEC/PNEC 値を推計	
環境モニタリング		<ul style="list-style-type: none"> ・ 3～15 の付加モル数別の濃度を合算して有害性評価値と比較 ・ リスクが懸念された地点については、付加モル数別の PEC/PNEC 推計も検討 		

1

2

表 2 NPE の変化物の評価対象物質・試験対象物質及びリスク評価の方針

設定事項	化学構造上の項目			
	内訳・補足	EO 付加モル数	ノニル基の構造	ノニル基の置換位置
優先評価化学物質の指定単位		1 以上で特定なし	特定なし	特定なし
評価対象物質	変化物 NPE2,NPE1,NP	0,1,2	特定しない	特定しない
試験対象物質 (評価対象物質に最も関連性 Relevance がある 既知見データの 試験等の対象物 質)	物理化学的性状等	0,1,2 (暴露シミュレーションを行わないので、 底生生物の有害性評価用に logP,Koc データのみ収集)	特定しない	特定しない
	有害性情報	0,1,2	直鎖/分岐区別なし	特定なし
リスク評価の方 針	有害性評価	・ PNEC は NPE (NPE2 と NPE1) で 1 つ、NP で 1 つの合計 2 つ導出		
	暴露 評価	シミュレーション	実施しない	
		環境モニタリング	1,2 のデータ	区別なし（要調査等）
	リス ク 評 価	環境モニタリング	NP のデータ	分岐 (生活環境項目等)
シミュレーション			実施しない	
環境モニタリング	<ul style="list-style-type: none"> ・ NPE2 と NPE1：付加モル数 1,2 のモニタリングデータを合算した PEC と PNEC を比較 ・ NP： NP のモニタリングデータ (PEC) と PNEC を比較 			

3

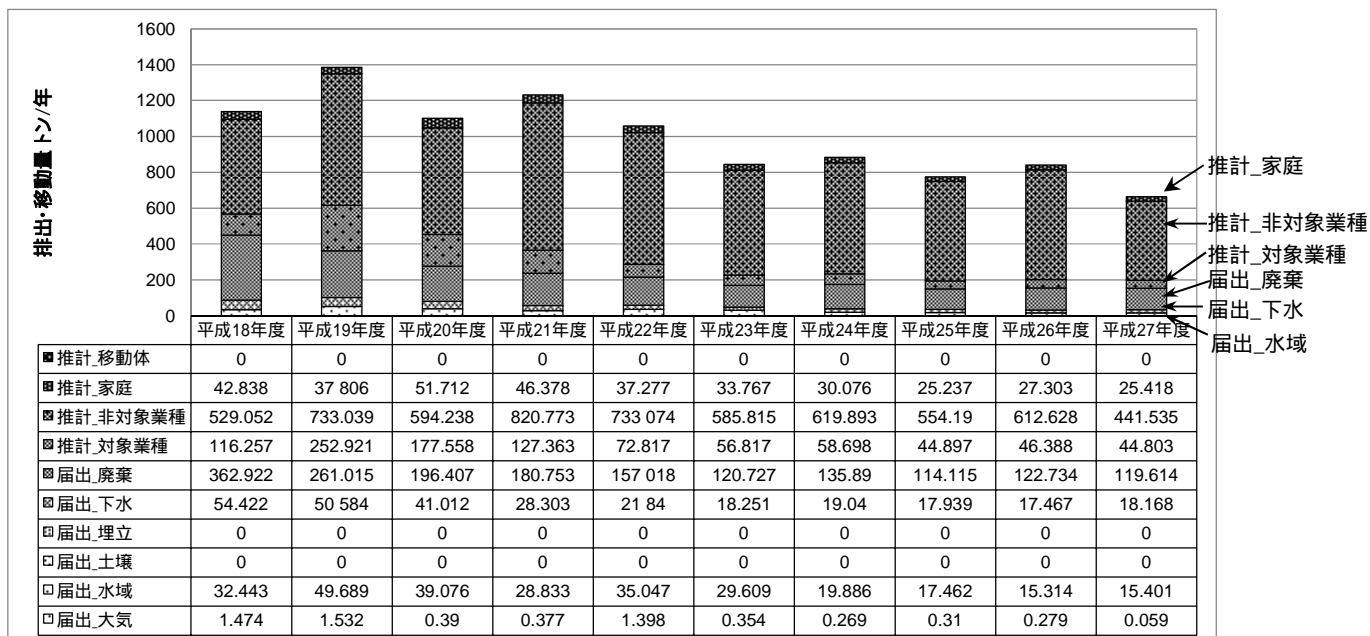
1 排出源情報

2 NPE は界面活性剤として幅広い産業分野で使用されており、化審法の製造数量等の届出情報に
3 よると、製造・輸入数量の合計は年間約 5000 トン程度で推移している。

4 NPE は PRTR 対象物質でもあり、図 1 に排出・移動量の内訳・推移を示す。PRTR 制度に基
5 づく排出・移動量は減少傾向にある。平成 27 年度の水域への届出排出量は約 15 トンである一
6 方、届出外推計排出量は約 512 トンであった（表 3 参照）。届出外排出量のうち 387 トンは農薬
7 の補助剤としての排出量である。農薬のほか、家庭用・防疫用殺虫剤及び化粧品用界面活性剤か
8 らの排出量については化審法適用範囲外である。

9 NPE の環境中濃度推計にはこれら PRTR 情報とともに、化審法の製造数量等の届出に基づ
10 き、長期使用製品の使用段階からの排出量（約 53 トン）も加味している（詳細は参考資料）。

11



12 図 1 PRTR 制度に基づく排出・移動量の経年変化

14 表 3 PRTR 届出外排出量の内訳（平成 27 年度）

		年間排出量(トン/年)																						
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21		
		対象業種の事業者 のすそ切り以下	農薬	殺虫剤	接着剤	塗料	漁網防汚剤	洗浄剤・化粧品等	防虫剤・消臭剤	汎用エンジン	たばこの煙	自動車	二輪車	特殊自動車	船舶	鉄道車両	航空機	水道	オゾン層破壊物質	ダイオキシン類	低含有率物質	下水処理施設	合計	
大区分	移動体																							
	家庭																							25.4
	非対象業種																							441.5
	対象業種(すそ切り)																							44.8
	推計量	38.0	387.0	2.5				77.5														6.8	511.8	

16
17
18

1
2 **有害性評価について**

3 親化合物 NPE、変化物（NPE1 及び NPE2）及び変化物（NP）のそれぞれについて PNEC
4 を導出した（詳細は資料 2 - 2 参照）。

6 **表 4 有害性情報のまとめ（NPE の親化合物）**

	水生生物	底生生物
PNEC	0.014 mg/L (14 µg/L)	8.6mg/kg-dw
キースタディの毒性値	14 mg/L	-
UFs	1000	-
(キースタディの エンドポイント)	甲殻類の遊泳阻害に対する半数影響濃度	(水生生物に対する PNEC _{water} と Koc からの平衡分配法による換算値)

8 **表 5 有害性情報のまとめ（変化物：NPE1 及び NPE2）**

	水生生物	底生生物
PNEC	0.00015 mg/L (0.15 µg/L)	0.010mg/kg-dw
キースタディの毒性値	0.0077 mg/L (7.7 µg/L)	-
UFs	50	-
(キースタディの エンドポイント)	甲殻類の繁殖影響に対する無影響濃度	(水生生物に対する PNEC _{water} と Koc からの平衡分配法による換算値)

10 **表 6 有害性情報のまとめ（変化物：NP）**

	水生生物	底生生物
PNEC	0.000063 mg/L (0.063 µg/L)	4.5 mg/kg-dw
キースタディの毒性値	0.00127 mg/L (1.27 µg/L)	229mg/kg-dw
UFs	20	50
(キースタディの エンドポイント)	魚類の繁殖に対する無影響濃度 (相当)	ドブスリカの羽化に対する 10% 影響濃度

11 LOEC から NOEC への導出に用いた 2 を含む

12 NP のキースタディは、2015 年に採択された OECD TG240 に準拠した Watanabe らによるメダ
13 カ拡張 1 世代繁殖試験 (MEOGRT) を、関東化学株式会社製、純度 99.7% の 4-ノニルフェノール
14 (分岐型) を用いて流水式 (5 回転/日) で実施されたものである。設定濃度は 5 濃度区 (公比
15 3.2) で平均実測濃度は 1.27、2.95、9.81、27.8、89.4 µg/L、メダカの繁殖影響 (F1 世代の産卵数
16 の減少) に関する最小影響濃度 (LOEC) 1.27µg/L を PNEC の根拠としている。

17 NP のキースタディについて、事務局の中で議論を継続中である (詳細は資料 2 - 1 別紙参
18 照)。議論の中心は、PNEC の根拠とされた試験系における水温の設定がテストガイドラインの
19 水温設定の上限を超えていること及び溶存酸素の低下が毒性を強めて、LOEC 値を下げてい
20 可能性があるのではないかという点についてである。

1 仮に、表 6 の MEOGRT 試験データを採用しなかった場合、PNEC は甲殻類の慢性毒性試験に
2 よる NOEC 0.0039mg/L と室内から野外への不確実係数 10 に基づき、PNEC は 0.00039 mg/L
3 (0.39µg/L) となる。

4 5 リスク試算結果について

6 < 排出源ごとの暴露シナリオによる評価 >

- 7 ・化審法の届出情報を用いた結果及び、PRTR 届出情報を用いて、排出源ごとの暴露シナリオの推
8 計モデル (PRAS-NITE Ver.1.1.1) により、評価を行った。このうち、PRTR 届出情報に基づく
9 リスク推計結果の方がより実態を反映していると考えられたため、結果を表 7 に示す。
- 10 ・PRTR 届出情報を用いた結果では、水生生物及び底生生物ともにリスク懸念箇所は 1 箇所であ
11 った。

12
13 **表 7 PRTR 情報に基づく生態に係るリスク推計結果**

	リスク懸念箇所数	排出源の数
水生生物に対するリスク推計結果	1	299
底生生物に対するリスク推計結果	1	299

14 届出事業所に加えて、移動先の下水道終末処理施設も排出源として考慮した。PRTR 届出外排出量推計手法に
15 従って下水処理場での水域移行率を 1%とした。

16
17 < 様々な排出源の影響を含めた暴露シナリオによる評価 >

- 18 ・PRTR 届出情報 (H27 年度) を用いて、様々な排出源の影響を含めた暴露シナリオによる推計
19 モデル (G-CIEMS ver.0.9¹) により、NPE の親化合物の水質濃度及び底質濃度の計算を行い、
20 水域における評価対象地点 3,705 流域のリスク推計を行った。
- 21 ・化審法届出情報に基づく推計排出量 (H27 年度) のうち、長期使用製品の使用段階からの排出
22 量及び家庭用・業務用用途の使用段階からの排出量は、PRTR の排出量に含まれていないと考え
23 られる。その推計排出量は PRTR の排出量と比較して少なくないことから、本評価では、これ
24 らの推計排出量を人口に比例して 3 次メッシュに割り当てて PRTR の排出量に加えて G-
25 CIEMS の濃度推計に用いた。
- 26 ・水質濃度の推計結果は以下の表 8 のとおり。この結果、PECwater/PNECwater 比 1 となるの
27 は 100 流域超であった。なお、NPE の親化合物の排出量のうち、PRTR 届出外推計における農
28 薬、家庭用・防疫用殺虫剤及び化粧品用界面活性剤からの排出量については化審法適用範囲外で
29 あることから、それら用途の PRTR 届出外推計排出量を除外した推計も行った。
- 30 ・底質濃度の推計結果は表 9 のとおり。この結果、PECsed/PNECsed 比 1 となるのは 1 流域で
31 あった。

32

¹ リスク評価向けに一部修正を加えている (全国一括計算を可能にした)。

1 表 8 G-CIEMS による濃度推計結果に基づく PECwater/PNECwater 比区分別地点数
2 (NPE の親化合物)

PECwater / PNECwater 比の区分	水生生物		
	PRTR(化審法対象除外用途含む) +化審法長期使用	PRTR(化審法対象範囲)のみ	PRTR(化審法対象範囲) +化審法長期使用
1 PECwater/PNECwater	173	128	173
0.1 PECwater/PNECwater < 1	811	746	807
PECwater/PNECwater < 0.1	2,721	2,831	2,725

3
4 表 9 G-CIEMS による濃度推計結果に基づく PECsed/PNECsed 比区分別地点数
5 (NPE の親化合物)

PECsed / PNECsed 比の区分	底生生物		
	PRTR(化審法対象除外用途含む) +化審法長期使用	PRTR(化審法対象範囲)のみ	PRTR(化審法対象範囲) +化審法長期使用
1 PECsed/PNECsed	1	1	1
0.1 PECsed/PNECsed < 1	214	166	214
PECsed/PNECsed < 0.1	3,490	3,538	3,490

6
7 < 環境モニタリングデータによる評価 >

8 ・直近 5 年及び過去 10 年の評価対象物質に係る水質モニタリングにおける最大濃度を元に、リス
9 クを評価した。結果は表 10 のとおり。

10 ・直近 5 年及び 10 年の底質モニタリング調査が行われていないため、底質においては環境モニタ
11 リングデータによる評価は実施していない。

12
13 表 10 水質モニタリングによる PEC/PNEC 比区分別地点数

PECwater / PNECwater 比の区分	水生生物		
	NPE の親化合物	変化物 1(NPE1 及び 2)	変化物 2(NP)
1 PECwater/PNECwater	0	7	524
0.1 PECwater/PNECwater < 1	2	11	102
PECwater/PNECwater < 0.1	36	14	2

14 注：変化物 2 (NP) について次点のデータを使用した場合 PECwater/PNECwater が 1 以上の地点は 49 箇所となる。

15
16 変化物 NP についてはキースタディの選定について議論中であるため、PNEC を以下の 2 種
17 類とした場合について、水質モニタリング情報を用いたリスク推計を行った。結果を表 11 に示
18 す。

19 MEOGRT 試験データを採用した場合 0.000063 mg/L

20 甲殻類の慢性毒性試験データを採用した場合 0.00039 mg/L

1
2

表 11 PNEC の違いによる水質モニタリングデータによるリスク推計結果

測定年度	調査名	測定地点数	検出地点数	検出下限値 (括弧内は地点 数内訳)	MEOGRT_PNEC (0.000063mg/L) PEC/PNEC 1地 点数	甲殻類PNEC (0.00039mg/L) PEC/PNEC 1地 点数
平成27年度	公共用水域水質調査	3077	210	0.00003(10) 0.00006(3067)	189	27
平成26年度	公共用水域水質調査	2662	269	0.0000003(1) 0.00003(10) 0.00006(2648) 0.0001(3)	235	17
	黒本	30	25	0.000005(9) 0.000006(18) 0.000007(2) 0.000018(1)	8	0
平成25年度	公共用水域水質調査	2675	393	0.0001(2) 0.0006(22) 0.00006(2651)	329	24
平成24年度	公共用水域水質調査	188	18	0.00006	17	0
	国交省	38	1	不明	1	0
合計		8670	916		779	68

3
4
5
6
7
8

なお、NP については平成 24 年に環境基本法に基づく水生生物保全水質環境基準が淡水域は 4 つの類型で 0.0006 ~ 0.002mg/L 以下、海域は 2 つの類型で 0.0007 ~ 0.001mg/L 以下と設定されているが、平成 27 年度の水質モニタリングでは環境基準値を超える地点はない。

NPE の変化物であるノニルフェノールの有害性評価に係る経緯と論点

平成31年3月22日
経済産業省化学物質管理課
化学物質安全室

1. 経済産業省と環境省の前回審議(H30.3.23)以降のやりとり経緯概要

- ✓ 平成30年3月23日の3省合同審議会において、NPEの変化物であるノニルフェノール(以下、NPという)の国立環境研究所(以下、国環研という)によるMEOGRT試験について、試験水温及び溶存酸素の低下を中心に両省専門家間で議論をするものの結論が出ず継続審議となった。
- ✓ 審議会直後から、上記審議会の質疑でも明確にならなかった試験水温及び溶存酸素の低下に関する当省専門家の追加質問を環境省に提出し、その後、数次の質疑のやりとりを継続した。
- ✓ 当省専門家としては、OECD TG240のMEOGRTは、平成30年3月23日の3省合同審議会において環境省専門家も発言されたとおり、“内分泌かく乱作用”の影響を検出するために開発された試験法であるため、試験水温の管理が特に重要であり、TG240でも厳格な温度管理の規定が定まっているとの認識であったため質問を継続していたが、環境省からはOECD TG240の指定水温域からの逸脱は問題ないという主張であり、また、国環研試験の試験水温やその管理の状況等の全容が不明のままであったため、国環研試験の妥当性について判断ができなかった。
- ✓ そのような状況で、当省専門家は最終的な意見書の準備を進め、昨年12月にも数次にわたり、試験水温とその管理状況に関する具体的な質問を当省から環境省に追加提出した。
- ✓ この試験水温とその管理状況に関する具体的な内容に関する両省専門家同士の打ち合わせを昨年末に実施したものの、依然、試験水温及びその管理状況に関する回答はいただけなかったため、これまで開示されていない試験水温データそのものの提出を環境省に求めた。
- ✓ 本年1月10日に、その試験水温に関するデータが環境省の整理紙とともに当省に提出があったため、当省専門家はこの時点で初めて、国環研のMEOGRT試験はTG240指定水温域からの定常的な水温の逸脱があったこと、F1繁殖期に停電があり水温に急激な変化があったこと、水温の測定が1回/週程度(TG240では毎日測定)であったことなどを知ることができ、その検証を開始することとなった。
(下記、「(参考)環境省から提供のあった水温測定データ及びF1繁殖期近辺の室温データ」を参照)。

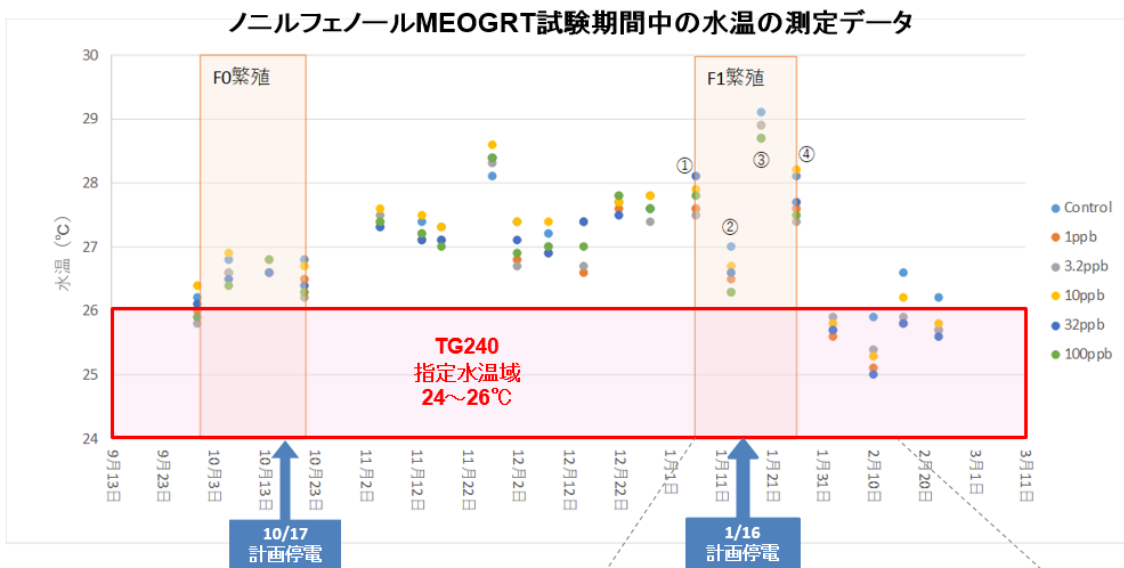
36 ✓ 本年1月18日の3省合同審議会において、環境省から平成30年3月23日審議
 37 会以降の現状報告がなされ、厚労省及び環境省専門家と経済省事務局間で質疑が
 38 あった。

39

40 **(参考)環境省から提供のあった水温測定データ及びF1繁殖期近辺の室温データ**

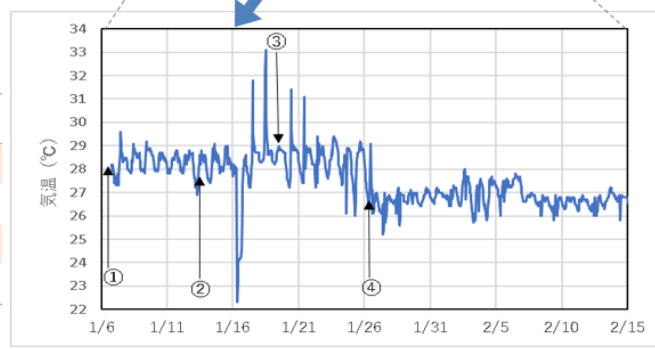
- 41 ✓ 試験水温の測定は不定期に1回/週程度(TG240では毎日測定)。
- 42 ✓ 試験水温を室温で管理(なお、室温データは下図の期間のみしかない)。
- 43 ✓ F1繁殖期までTG240指定水温域 25±1℃を定常的に逸脱。
- 44 ✓ F1繁殖期中の1/16及びF0繁殖期中の10/17の2回、計画停電があり、F1繁殖
 45 期中の停電の際は、サーキュレーターの故障(詳細不明)が原因で、水温が高くなっ
 46 ている。
- 47 ✓ また、1/16は室温が22~24℃まで下がった時間があり、1/17、18、20、21には室温
 48 が30℃を超えていた時間があった。
- 49 ✓ 11/22~12/2の間に原因不明の高水温あり。

50



F1繁殖計測中の水温(°C)

繁殖期間	平均	最小-最大
①1/6:開始前日	27.8	27.5-28.1
②1/13:7日目(1週目の最後)	26.8	26.3-27.0
③1/21:13日目(2週目終了前日)	28.8	28.7-29.1
④1/26:20日目(3週目終了前日)	27.8	27.4-28.2



試験を実施した部屋の室温の測定データ(1/6~2/15)

51

52

※環境省からの1月10日提供資料より作成。

53 2. OECD TG240¹及び国環研報告書²の記載事項の整理など

54 (1) OECD TG240

55 ① OECD TG240 水温関連部分等の抜粋

56 ・試験有効性基準

TEST VALIDITY CRITERIA

8. The following criteria for test validity apply:

- The dissolved oxygen concentration should be $\geq 60\%$ of air saturation value throughout the test;
- The mean water temperature over the entire duration of the study should be between 24 and 26°C. Brief excursions from the mean by individual aquaria should not be more than 2°C.
(仮訳)平均水温は試験期間中を通して24～26°Cとします。個々の水槽の平均水温からの逸脱は短期間であったとしても2°Cを超えてはなりません。
- The mean fecundity of controls in each of the generations (F0 and F1) should be greater than 20 eggs per pair per day. Fertility of all the eggs produced during the assessment should be greater than 80%. In addition, 16 of the recommended 24 control breeding pairs ($> 65\%$) should produce greater than 20 eggs per pair per day;
- Hatchability of eggs should be $\geq 80\%$ (average) in the controls (in each of the F1 and F2 generations);
- Survival after hatching until 3 wpf and from 3 wpf through termination for the generation F1 (i.e. 15 wpf) should be $\geq 80\%$ (average) and $\geq 90\%$ (average), respectively in the controls (F1);
- Evidence should be available to demonstrate that the concentrations of the test chemical in solution have been satisfactorily maintained within $\pm 20\%$ of the mean measured values.

Regarding water temperature, while not a validity criterion, replicates within a treatment should not be statistically different from each other, and treatment groups within the test should not be statistically different from each other (based on daily temperature measurements, and excluding brief excursions).

(仮訳)水温に関しては、妥当性の基準ではありませんが、同一処理区内および処理グループ間で互いに統計的に異なるべきではありません(こうした統計処理は毎日の水温測定に基づき行い、短期間の逸脱を除きます)。

57

58 ・試験器具一式

DESCRIPTION OF THE METHOD

Apparatus

11. Normal laboratory equipment and especially the following:

¹ OECD TG240(OECD GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS Medaka Extended One Generation Reproduction Test (MEOGRT), Adopted: 28 July 2015

² 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 月国立研究法人 国立環境研究所

- (a) oxygen and pH meters;
- (b) equipment for determination of water hardness and alkalinity;
- (c) adequate apparatus for temperature control and preferably continuous monitoring;
- (d) tanks made of chemically inert material and of a suitable capacity in relation to the recommended loading and stocking density (see Annex 3);
- (e) suitably accurate balance (i.e. accurate to ± 0.5 mg).

59

60 ・試験生物

Test animals

Selection and holding of fish

16. The test species is Japanese medaka *Oryzias latipes* because of its short life-cycle and the possibility to determine genetic sex. (中略)

61

62 ・暴露環境

PROCEDURE

Conditions of exposure

28. During the test, dissolved oxygen, pH, and temperature should be measured in at least one test vessel of each treatment group and the control. As a minimum, these measurements, except temperature, should be made once a week through the exposure period. The mean water temperature over the entire duration of the study should be between 24 and 26°C throughout the test. Temperature should be measured every day throughout the exposure period. The pH of the water should be within the range 6.5 to 8.5, but during a given test it should be within a range of ± 0.5 pH units. Replicates within a treatment should not be statistically different from each other, and treatment groups within the test should not be statistically different from each other (based on daily temperature measurements, and excluding brief excursions).

63

64 ・試験報告書に記載すべき試験環境

Test report

59. The test report should include the following:

Test conditions:

(中略)

- Water quality within test vessels, pH, temperature (daily) and dissolved oxygen concentration;

(中略)

65

66

67

68 **②OECD TG240 制定にかかる OECD VMG-eco 等における議論経緯**

69 TG240 承認に関わる OECD コメントラウンドでは、2011 年に開催された VMG-eco
70 (Validation Management Group for ecotoxicity testing: 生態毒性試験検証管理グループ会合)
71 8、2013 年に開催された VMG-eco 9、2014 年に開催された VMG-eco 10、2015 年に開催され
72 た WNT (Working group of National co-ordinators of the Test guidelines programme) 27 におい
73 て、TG240 の水温及び影響等に関して検討された。その議論経緯の概要は以下のとおり (参
74 加国等のコメントの詳細は【別紙 1 (委員限り)】参照)。

75

76 **<水温について>**

77 ▶ 試験成立条件で提案された水温 $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ に対しては、「試験区間で異なる水温で試験が行われ
78 った場合、 $23\sim 24^{\circ}\text{C}$ 、 $26\sim 27^{\circ}\text{C}$ のような温度差は試験結果に影響をもたらす」との指摘か
79 ら、「1 回の測定時に複数回の測定間で 2°C を超えて変動しないようにし、各試験区の平均
80 測定温度は 1°C 未満の差でなければならない」と提案され、「 $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ の推奨温度範囲を提
81 案、個々の水槽の平均値からの短期間の逸脱は、 2°C を超えてはならない」とのコメント
82 もされた。

83 ▶ また、「 27°C は高すぎで 24°C は低すぎる。発達速度を上げ試験短縮を図るために試験温度
84 を可能な限り高くする要望はあるが、高すぎる温度は適切な発達にとって弊害をもたら
85 す」とのコメントがあった。

86 ▶ 最終的な水温に係る試験成立条件は、 $24\sim 26^{\circ}\text{C}$ となっており、 27°C は除かれた。

87

88 **<水温測定の頻度について>**

89 ▶ 水温の測定頻度、試験結果の信頼性に関しては、TG240 案について「1 週間に 1 回測定す
90 るのでは十分ではない」、「水温はすべての試験水槽で測定する必要があり、すべてのパラ
91 メータの測定は、すべての試験水槽が類似していることを保証するため、レプリケート間
92 において交互に行われるべきである」など、水温測定は頻繁に行う必要性が示されている。

93 ▶ また、「試験水槽間と日間の水温には上限・下限があり、各試験区につき 1 水槽で 1 週間
94 に 1 回の測定だけでは、水温の厳格な規定 (例えば、 $\pm 1^{\circ}\text{C}$) を制御するのは難しい」こ
95 と、「実際には $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ で試験間の差は 4 度になることもある (※当初の指定水温域案)。
96 成長率を正規化する唯一の方法は積算水温モデル※であり、繁殖率や魚の成長や大きさの
97 違いの理由を特定するのに役立つ。毎日の平均水温の報告と積算水温の計算も検討する」
98 ことなどが示されている。

99 ※積算水温モデル：魚貝類の産卵やふ化の適温範囲における、水温と産卵・ふ化までの日数
100 との積。

101 ▶ 試験は濃度区ごとに複数の試験容器で実施されることから、「同じ濃度区の試験容器間で
102 水温に統計学的な有意差がないこと」、また、「試験容器の水温に濃度区間で統計学的な有
103 意差がないこと」を確認するために、原則、毎日、水温測定をすることが記載された。

104

105 (2)国環研報告書

106 ①国環研報告書の試験水温に関する記載等抜粋

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。

107

1.3.3 試験環境及び条件など

(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。**

・水温: $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$

108

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°C から 26°C の間であること。各水槽の水温の平均値からのずれは 2°C 未満であること。**
- ・ 各世代 (F0およびF1) の対照区における各ペアの日平均総産卵数の平均が20以上であること。計測期間中のすべての卵の受精率が80%以上であること。推奨される24ペア中16ペア (>65%) において各ペア日平均総産卵数が20以上であること。
- ・ 各世代 (F1およびF2) の対照区におけるふ化率が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 $\pm 20\%$ 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。

109

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 $26.9 \sim 27.2^{\circ}\text{C}$ の範囲であり、**試験有効性基準の $24 \sim 26^{\circ}\text{C}$ を約 1°C 上回っていたが、各水槽の水温の平均値からの変動は 2°C 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(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

110

111 (参考)昨年 3 月審議会前の経済省と環境省の試験水温に関するやりとり(H30.3.23 審議会資料として公開)

<p>(経済省の H30.2/27 質問)</p> <p>TG240 が定義する水温の有効性基準は 24~26$^{\circ}\text{C}$であるが、この範囲を逸脱し、試験区によっては最大で約3$^{\circ}\text{C}$も上昇している。この逸脱した温度上昇により、化合物の取り込みが促進され、毒性への影響の可能性がある。また、遺伝的メス(XX)の表現型のオス化が促進される可能性がある。何故に、このような温度設定になったのかの説明を記載する必要がある。</p>	<p>(環境省の H30. 3/5 回答)</p> <p>試験期間中の平均水温は各試験区において 26.9~27.1$^{\circ}\text{C}$であり、試験法記載の 24~26$^{\circ}\text{C}$の範囲から約 1$^{\circ}\text{C}$高くなっていますが、平均からの変動は±2$^{\circ}\text{C}$以内に抑えられており条件の 1 つを満たしていました。各週の測定値は、水温の上限範囲である 26±2$^{\circ}\text{C}$の幅にほぼ入っていましたが、F1 孵化後の 4 週目と 11 週目の測定値が 0.1~0.9$^{\circ}\text{C}$ほど範囲を超えていました。温度上昇に伴う化学物質の取り込み、代謝、排泄量の変化、および影響の増加または低減に影響を与えた可能性は否定できませんが、どの程度全体の結果に影響を与えたかは不明です。化審法の審査では、一時的な温度の変化については軽微な影響として取り扱っています。</p>
--	--

112

113 ※【別紙2】化審法における優先評価化学物質に関するリスク評価の技術ガイダンス Ⅲ. 生態影響に

114 関する有害性評価 Ver. 1.0 抜粋

115

116 3. 経済産業省専門家の論点

117 (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3】参照。

118 ①変温動物である魚類における水温の重要性

- 119 ✓ 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
120 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
121 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
122 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。
123 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。

124

125 ②魚類毒性と水温の関係

- 126 ✓ 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
127 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
128 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
129 性が強く現れていた。

130

131 (2)国環研 MEOGRT 試験結果による PNEC 値について

132 ①メダカの最適温度について

- 133 ✓ 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
134 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、
135 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
136 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
137 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
138 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
139 適温度は25~26℃であると報告している。
- 140 ✓ 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
141 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。
- 142 ✓ 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
143 繁殖方法が記載されおり、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
144 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
145 どが25℃を推奨している。
- 146 ✓ USEPAが出しているMMT(Medaka Multigeneration Test)及びMEOGRT試験の
147 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
148 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
149 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℃±0.5℃が適切である
150 との結論を得ている。さらに、追加試験も行って25℃±1℃を指定水温域に決定してい
151 る。

- 152 ✓ 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
153 点については当時、環境省も合意済みと認識している。
- 154 ✓ 以上より、26～28℃で試験を実施する必要はなく、ガイドライン通り 25℃前後が適温と考
155 える。

156

157 ②試験の水温状況

158 i 水温データが不足している（週 1 回期日不規則測定）

- 159 ✓ 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
160 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
161 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
162 は世界各国の専門家による議論がなされた。結果、毎日の水温測定は必須となった経
163 緯がある。

164 【参考】日々の水温測定が重要であることを示唆する Germany コメント

165 「No.88 Germany

166 One measurement per week is not enough.

167 There is a limit given for water temperature (+/- 2° C between tanks and days).

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

- 170 ✓ 水温に係る試験有効性基準に、試験期間中の平均水温が24～26℃であることに加えて、
171 短期間の水温の逸脱が2℃を超えないことというものがあるが、週 1 回程度の水温
172 測定なので、例えば数日間の水温の逸脱をとらまえられない。試験有効性基準の客観
173 的な確認のために、本 TG では試験方法で毎日の水温測定が求められている。
- 174 ✓ しかし、毎日の水温は測定されていないためデータが不足している。
- 175 ✓ 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
176 日不規則測定でのデータのみであり、その中の 11 月 22 日頃の水温に、理由がわから
177 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温についても逸脱があった可
178 能性は否定できず、水温の全体像を把握するにはデータが不足していると考える。
- 179 ✓ 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
180 確認することとなっているが、それも確認できておらず、水温データが不足していると考
181 える。

182

183 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

- 184 ✓ 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～
185 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
186 かいただけではない。
- 187 ✓ 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
188 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

189 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
190 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
191 の水温に、理由がわからない高温が記録されている。

192

193 iii 平均水温について

194 ✓ 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
195 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
196 間の平均水温より高くなる。

197

198 iv まとめ

199 ✓ 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
200 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
201 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°Cの上昇
202 であったとは言えない。

203 ✓ 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
204 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
205 る。

206

207 ③最適温度からの逸脱許容程度

208 i 許容されているのは一時的な逸脱

209 ✓ 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
210 一時的な期間であり、常時 2°C 以内の逸脱や、平均水温の逸脱が 2°C 以内であればい
211 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
212 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。

213 ✓ なぜなら、TG240 の Validity Criteria の記述「Brief excursions from the mean by
214 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
215 る記述「(based on daily temperature measurements, and excluding brief excursions). (若
216 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
217 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、
218 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。

219 ✓ 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、
220 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
221 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
222 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
223 いると推測できる。

224

225 ii 本試験の逸脱の程度

- 226 ✓ 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
227 ~2°Cの上昇であったとは考えていない。
- 228 ✓ 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
229 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。
- 230 ✓ 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
231 可能性が高いと考える。
- 232 ✓ 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
233 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
234 える。
- 235 ✓ 「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
236 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
237 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、
238 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
239 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
240 とは言えない。

241

242 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

243 i 水温と毒性の一般的な関係

- 244 ✓ 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
245 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
246 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
247 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
248 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
249 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。

250 【参考】Q10理論

251 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
252 はQ10理論が成り立つといわれている。

253 ↑温度上昇に伴い急性毒性が強くなる理由

254 【参考】呼吸速度=1400*体重^{0.65}/溶存酸素濃度

- 255 ✓ 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
256 いる。
- 257 ✓ 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
258 -3-2別紙3)からも読み取れる。

259

260 ii NPの毒性と水温の関係

- 261 ✓ 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
262 いる。

- 263 ✓ 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
264 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
265 いる。
- 266 ✓ 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
267 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
268 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
269 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。
- 270 ✓ また、異なる温度(20℃と30℃)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
271 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
272 エストロゲン様活性が高まったと報告されている。
- 273 ✓ 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
274 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
275 を増強されることが判明した。
- 276 ✓ 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
277 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
278 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。
- 279 ✓ 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、
280 それは繁殖性にも影響を与えると考える

281

282 iii NP 毒性と本試験のエンドポイントとの関係

- 283 ✓ 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
284 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。
- 285 ✓ 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
286 している可能性があるという推測する。
- 287 ✓ 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
288 と考える。

289

290 ⑤まとめ

- 291 ✓ 要約すると、
- 292 ✓ 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。
293 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
294 であるために、水温の全体像が不明である。
- 295 ✓ 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
296 ざるを得ない。
- 297 ✓ 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
298 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。

- 299 ✓ 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
300 性が高いと考えられる
301 ✓ 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
302 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
303 用することはできないと判断する。

304

305 4. 結論

- 306 ✓ 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こ
307 と、②本試験では水温の全体像が不明で、そのために実際の平均水温も不明であると言
308 わざるを得ないこと、③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
309 脱は許容できない程度であること、④NP の両毒性(一般毒性とエストロゲン作用)は水温
310 の変化により毒性値は変化する可能性が高いと考えられることから、NP による一般毒性、
311 エストロゲン様作用があることを否定するものではないが、本データを定量的リスク評価の
312 ための PNEC 値として採用することはできないと判断する。
- 313 ✓ なぜなら、リスク評価で有害性評価値として採用される PNEC 値の決定は二特指定の際
314 の規制値になる可能性が高いことを踏まえ、安全サイドにたてばよいということではなく、
315 可能な限り正確なデータを用いて評価すべきと考えているからであり、本試験のデータを
316 採用できると判断するのであれば、その判断の根拠、理由を示すべき。

317

318

319

以 上

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。

【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います。

- ✓ 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.

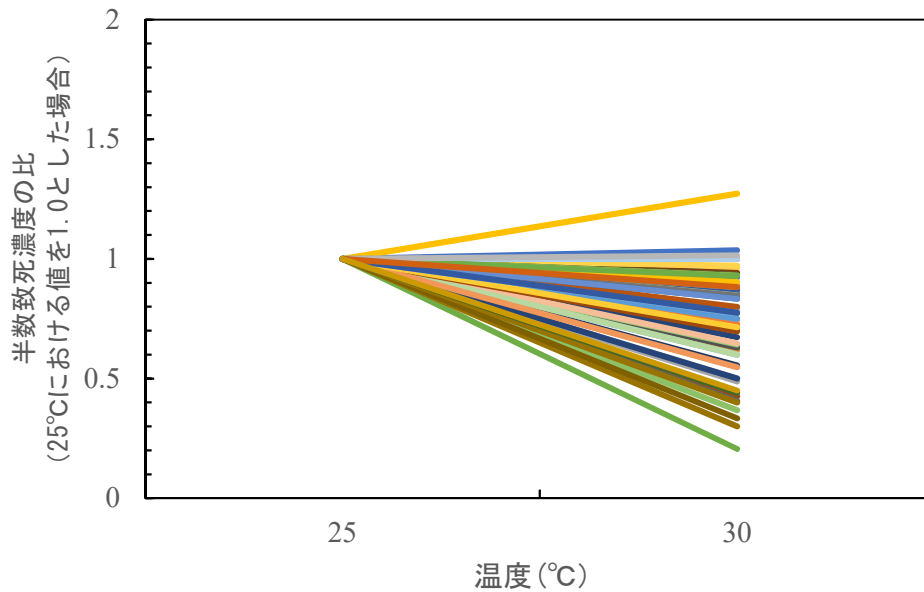


図2-1 殺虫剤における半数致死濃度の温度による変化

【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。

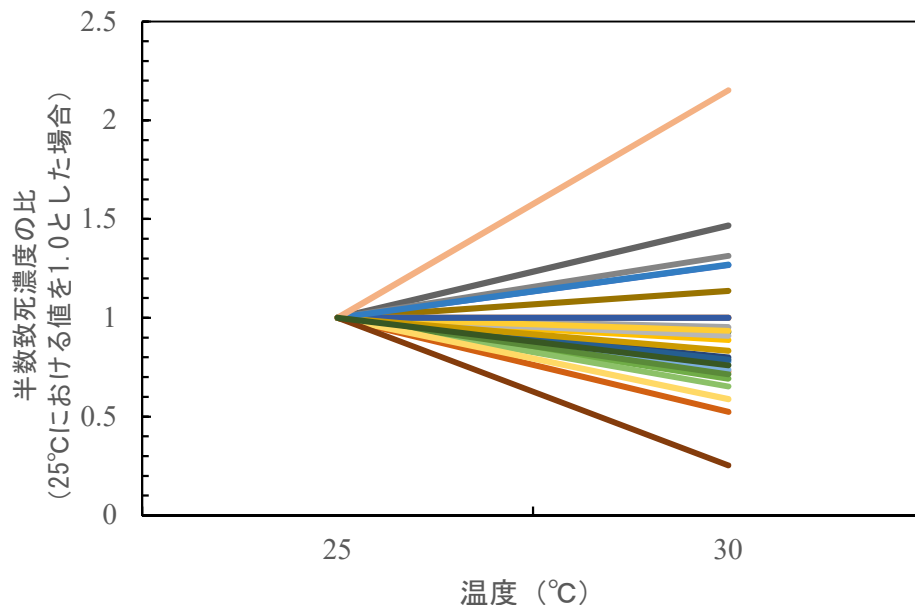


図2-2 殺菌剤における半数致死濃度の温度による変化

【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。

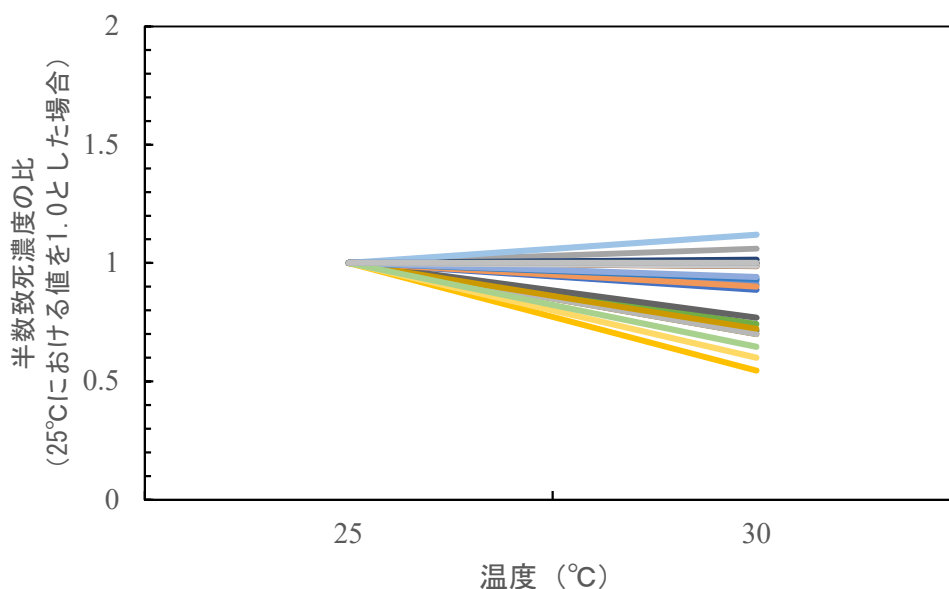


図2-3 除草剤における半数致死濃度の温度による変化

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)。

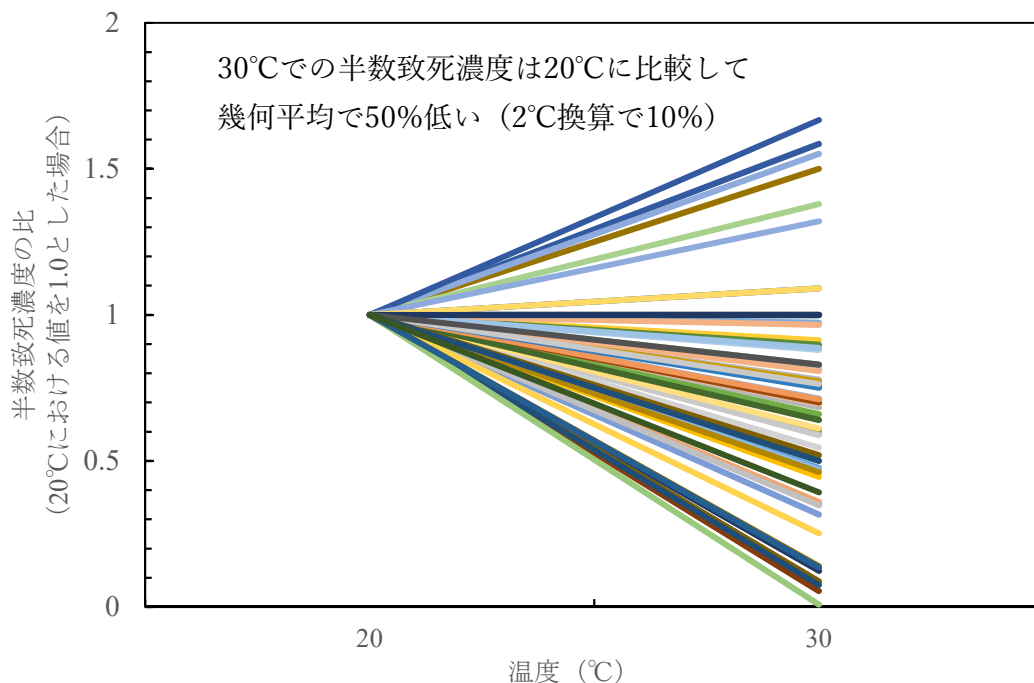


図2-4 様々な化学物質の半数致死濃度の温度による変化（辻らより）

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。

ノニルフェノール曝露が魚の赤血球に及ぼす影響について

青木康展

‘erythrocyte’ ‘fish’ ‘nonylphenol’をキーワードとした PubMed により検索したところ、26 報の文献が見出され、うち、実験室内で魚への NP 曝露による赤血球への血液学的影響と病理学的変化を観察している 16 報の論文をレビューした。

多くの NP の曝露実験では、100 $\mu\text{g/L}$ (MEOGRT 試験の LOEC 1.27 $\mu\text{g/L}$ の 79 倍) 以上の sublethal 濃度で NP の曝露実験が行われている。100 $\mu\text{g/L}$ 以上の濃度で NP は赤血球の核の形態の変異や DNA の断片化を引き起こしているが、これら赤血球への影響は、NP 曝露による酸化ストレス発生等を原因とするものである。同時に、100 $\mu\text{g/L}$ 以上の sublethal 濃度での NP 曝露は、肝臓や腎臓などの様々の臓器にも影響を及ぼしている。

一方、100 $\mu\text{g/L}$ より低濃度を曝露し、赤血球への影響を観察した報文は 3 報である。

論文[1]では、メダカ (雌、Hd-rR) に 50, 80, 100 $\mu\text{g/L}$ の濃度で NP を 15 日間曝露し、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 $\mu\text{g/L}$ で、小核の誘発は 80, 100 $\mu\text{g/L}$ 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 $\mu\text{g/L}$ であった。これは、MEOGRT 試験の LOEL 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響によるものと考えられる。

論文[16]では、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 \pm 3.8 g) に 1, 5, 10, 15 $\mu\text{g/L}$ NP を、より長期間 (70 日間) 曝露した。また、ethinylestradiol (EE2) を 500 $\mu\text{g/kg}$ 体重の用量で 4 週に 1 回筋肉注射した。10, 15 $\mu\text{g/L}$ 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 曝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 $\mu\text{g/L}$ (MEOGRT 試験と同等濃度) の長期間曝露で明確な貧血状態は発生していない。

一方、EE2 投与はヘマトクリット値の変動を起こさず、ヘモグロビン濃度を

有意に減少した。さらに 15 µg/L NP 曝露で、魚の造血器官である腎臓、および肝臓に病理学的変化が認められないが、EE2 投与魚の腎臓の尿細管に血球の滞留が認められた。

文献[11]では、アフリカナマズ（体重 500–1200 g、河川で採取）に、50, 80, 100 µg/L NP を 15 日間曝露し、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、同じ濃度の NP 曝露で、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。

100 µg/L 以上の濃度の NP 曝露中で観察された知見は、以下の通りである。

幾つかの魚種で検討されているが、中でも、アフリカナマズへの 14 日間曝露による赤血球への影響の観察が詳細である。200 µg/L [2]および 100 µg/L [3][9]の濃度でアポトーシスの発生が有意に上昇した。さらに、100 µg/L で核の形態に変異のある赤血球数上昇も観察された[10]。これらの濃度の NP 曝露では、肝臓の SOD (superoxide dismutase)やカタラーゼ(CAT)など酸化ストレスを防御する酵素の活性も変動し[2][3]、これに呼応して、酸化ストレス発生のマーカー（過酸化脂質量など）が上昇した。また、論文[9]では、血清中の SOD と CAT が増加した。これらの知見は、体内で酸化ストレス発生を示している。これらの知見は、100-200 µg/L NP は全身で酸化ストレスを誘導し、赤血球の異常を引き起こしたことを示している。より高濃度の 750, 1000 µg/L (1000 µg/L は LD50 の約 1/3 の濃度) では、ヘモグロビン濃度とヘマトクリット値（赤血球総体積）の有意な減少が観察されている[12]。

より高濃度での NP の曝露実験が、spotted snakehead を用いても実施されている。LD50=1270 µg/L の 1/2 (635 µg/L), 1/4 (317 µg/L), 1/8 (158 µg/L)の濃度の NP を 24, 48, 64, 96 時間曝露したところ、すべての濃度区で、すべての観察時間において、小核、および核の形態に異常のある赤血球数の上昇が観察され[4]、同様の濃度で、腎臓、肝臓、エラの細胞でも小核、核の形態異常、DNA の切断が観察された[7]。また、70, 100, 150 µg/L で 30, 60, 90 日間曝露したが、

どの曝露期間をとっても 100, 150 $\mu\text{g/L}$ の曝露で、小核発生が有意に増加したが [5]。さらに、158 $\mu\text{g/L}$ NP の 96 時間曝露で、ヘモグロビン量、赤血球数等が減少したが [6]、635 $\mu\text{g/L}$ 96 時間、および 126 $\mu\text{g/L}$ 90 時間の曝露で、肝臓での空胞形成、脂肪沈着、魚での造血組織である腎臓での各種の組織変成が観察されている [8]。赤血球の傷害は、NP が全身で細胞傷害を引き起こす状態のもとで発生している。

他にも、テラピアに、NP を 1000, 10000, 16000 $\mu\text{g/L}$ ($\text{LD}_{50} = 32 \text{ mg/L}$) の濃度で 72 時間曝露したが、小核の上昇は認められず、10000 $\mu\text{g/L}$ 以上の濃度で、核の形態に異常のある赤血球数が有意に増加した [13]。また、海水魚では、イシビラメに 30 $\mu\text{g/L}$ で 3 週間曝露を行っても、赤血球の小核数は上昇しなかったが [14]、シーバスでは、890 $\mu\text{g/L}$ の濃度での 24 時間曝露により、赤血球の小核数が増加した [15]。

しかしながら、これらの実験で用いた魚は、河川で採取、養魚場で入手、あるいは市場で購入したものであり（ただし、[2]では研究室内で維持した魚）、実験動物としての均一性や信頼性が確保できていない。従って、上記の実験からの知見は、NP 曝露の赤血球への影響といった定性的な有害性の知見となり得るが、定量的な量反応関係を明らかにする対象となる知見ではないことに留意する必要がある。

1 . Sensitivity of medaka (*Oryzias latipes*) to 4-nonylphenol subacute exposure; erythrocyte alterations and apoptosis.

Sayed AEH, Kataoka C, Oda S, Kashiwada S, Mitani H.

Environ Toxicol Pharmacol. 2018 Mar;58:98-104. doi: 10.1016/j.etap.2017.12.023. Epub 2017 Dec 26.

2 . Modulatory effects of green tea extract against the hepatotoxic effects of 4-nonylphenol in catfish (*Clarias gariepinus*).

Sayed AEH, Soliman HAM.

Ecotoxicol Environ Saf. 2018 Mar;149:159-165. doi: 10.1016/j.ecoenv.2017.11.007. Epub 2017 Dec 19.

3 . Induction of apoptosis and DNA damage by 4-nonylphenol in African catfish (*Clarias gariepinus*) and the antioxidant role of *Cydonia oblonga*.

Sayed AE, Hamed HS.

Ecotoxicol Environ Saf. 2017 May;139:97-101. doi: 10.1016/j.ecoenv.2017.01.024.

4 . Study on DNA damaging effects of 4-nonylphenol using erythrocytes from peripheral circulation, gill and kidney of fish *Channa punctatus*.

Sharma M, Chadha P.

J Environ Biol. 2016 Mar;37(2):313-8.

5 . 4-Nonylphenol induced DNA damage and repair in fish, *Channa punctatus* after subchronic exposure.

Sharma M, Chadha P.

Drug Chem Toxicol. 2017 Jul;40(3):320-325. doi: 10.1080/01480545.2016.1223096.

Epub 2016 Sep 1.

6 . Acute Toxicity of 4-nonylphenol on Haematological profile of Fresh water Fish *Channa punctatus*.

Sharma M. Chadha P.

Res. J. Recent. Sci. 2015 4, 25-31.

7 . Widely used non-ionic surfactant 4-nonylphenol: showing genotoxic effects in various tissues of *Channa punctatus*.

Sharma M, Chadha P.

Environ Sci Pollut Res Int. 2017 Apr;24(12):11331-11339. doi: 10.1007/s11356-017-8759-1. Epub 2017 Mar 16.

8 . Histological alterations induced by 4-Nonylphenol in different organs of fish, *Channa punctatus* after acute and sub chronic exposure

Sharma M. Chadha P. Borah MK.

Journal of Entomology and Zoology Studies 2018; 6(4): 492-499

9 . Antioxidant and antiapoptotic activities of *Calotropis procera* latex on Catfish (*Clarias gariepinus*) exposed to toxic 4-nonylphenol.

Sayed Ael-D, Mohamed NH, Ismail MA, Abdel-Mageed WM, Shoreit AA.

Ecotoxicol Environ Saf. 2016 Jun;128:189-94. doi: 10.1016/j.ecoenv.2016.02.023. Epub 2016 Mar 3.

1 0 . The biological activity of new thieno[2,3-c]pyrazole compounds as anti-oxidants against toxicity of 4-nonylphenol in *Clarias gariepinus*.

Sayed AEH, Zaki RM, El-Dean AMK, Abdulrazzaq AY.

Toxicol Rep. 2015 Oct 21;2:1445-1453. doi: 10.1016/j.toxrep.2015.10.008. eCollection 2015.

1 1 . Effects of 4-nonylphenol on blood cells of the African catfish *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822).

Mekkawy IA, Mahmoud UM, Sayed Ael-D.

Tissue Cell. 2011 Aug;43(4):223-9. doi: 10.1016/j.tice.2011.03.006. Epub 2011 Apr 17.

1 2 . Toxicity studies of nonylphenol and octylphenol: hormonal, hematological and biochemical effects in *Clarias gariepinus*.

Senthil Kumaran S, Kavitha C, Ramesh M, Grummt T.

J Appl Toxicol. 2011 Nov;31(8):752-61. doi: 10.1002/jat.1629. Epub 2011 Mar 15.

1 3 . Evaluation of genotoxicity and effects on reproduction of nonylphenol in *Oreochromis niloticus* (Pisces: Cichlidae).

Rivero CL, Barbosa AC, Ferreira MF, Dorea JG, Grisolia CK.

Ecotoxicology. 2008 Nov;17(8):732-7. doi: 10.1007/s10646-008-0222-0. Epub 2008 May 9.

1 4 . Assessment of micronuclei induction in peripheral erythrocytes of fish exposed to

xenobiotics under controlled conditions.

Bolognesi C, Perrone E, Roggieri P, Pampanin DM, Sciutto A.
Aquat Toxicol. 2006 Jun 1;78 Suppl 1:S93-8. Epub 2006 Apr 4.

1 5 . Juvenile sea bass biotransformation, genotoxic and endocrine responses to beta-naphthoflavone, 4-nonylphenol and 17 beta-estradiol individual and combined exposures.

Teles M, Gravato C, Pacheco M, Santos MA.
Chemosphere. 2004 Oct;57(2):147-58.

1 6 . Chronic toxicity of nonylphenol and ethinylestradiol: haematological and histopathological effects in juvenile Common carp (*Cyprinus carpio*).

Schwaiger J, Spieser OH, Bauer C, Ferling H, Mallow U, Kalbfus W, Negele RD.
Aquat Toxicol. 2000 Nov;51(1):69-78.

環境省化学物質審査室 御中

3/22 の 3 省合同審議会の議論を踏まえた MEOGRT に関する意見

令和元年6月7日
経済産業省化学物質安全室

平成 31 年 3 月 22 日に開催された 3 省合同審議会での MEOGRT の妥当性に関する議論を踏まえて、当省専門家とも調整のうえ以下のとおり意見を提出させていただきますので、ご検討及びご回答のほど、よろしくお願いいたします。

- ✓ 当省専門家が MEOGRT 試験結果を PNEC の算出根拠に採用することが認められないとしている根本的な原因は、実際の試験水温が測定されていないことである。これは、実際の試験水温が判明しない限り試験水温の逸脱の程度が分からず、それが試験結果に与えた影響に関する議論はできないとの考えによるものである(不確かな前提のもとで科学的な議論はできないため)。
- ✓ なぜなら、MEOGRT の試験結果の毒性値をキースタディとして採用する場合、試験水温等については、試験結果を科学的に解釈する前提となるため、その試験水温は推定では認められないためである。
- ✓ なお、3/22 審議会での当省金子委員及び原田委員の指摘(下記参照※)に対する明確な回答を環境省側から頂いておらず、試験水温の逸脱の程度は不明のまま認識している。
- ✓ このため、も全試験期間中の毎日の実際の試験水温データを提示いただき、逸脱の程度を確認させていただきたい(貴省専門家が議論の前提にしている「試験水温の逸脱の程度が 1~2℃」であることの確認)。
- ✓ なお、そのデータを頂けた場合は、その実際の試験水温に基づいた逸脱の程度を踏まえ、MEOGRT の試験結果に与えた影響に関する追加質問等を提出させていただく予定である。

(※3/22 3 省合同審議会での当省委員発言抜粋)

- 金子委員 そうすれば、今までのところで平均水温については、環境省様のレポートでは 27℃が平均水温と言われていますが、これは測定された期間の 14%というのですか、7

日に1回だけの測定の温度なので、この平均水温をもって規定の26℃より1、2℃上がっただけだという結論は出せないと考えます。というのは、室温も不安定だし、水温も定期的に測られてないということ、私どもも、例えば環境省様が恒温槽につけるとか、サーモスタットを使っているとかというのであれば、このような議論はしませんが、空調機が不安定で、室温が不安定で、かつ、それによって水温を制御されている状況なので、ここで得られた平均水温は、全体の一部を表しているだけなので、1、2℃が基準値よりも高いというふうには考えてはございません。

・・・中略・・・

- 原田委員 室温に関しての議論がなされていますが、重要なのは、いかに試験が再構築できるかという点、透明性確保が必要だと思っています。今お話を聞いていますと、生データ保管に基づいた試験の成立性というところが第一に考えております。

事務局から巻物のような給水温のデータはありますというお話がありました。実際に今、提示された水温のデータを見ると、明らかに高くなっているところがあります。給水されている水の温度ではなくて、やはり実際に測られた水温のデータ、これをもとに、このデータがもう一度同じ試験をやった場合、再現できるか、この点も考慮に入れて、このデータを二特の指定に使えるものかどうか、そういった質の面も御検討いただければと思います。

- 白石委員長 わかりました。

以上