

意見交換会で配布した資料一式

資料1 NPE の有害性評価に関する審議会委員による意見交換の場の設定について

資料2 MEOGRT 試験における TG240 からの逸脱と NOEC への影響について
(平成 31 年 3 月 22 日審議会資料 1-3-1 別添 1、審議会後修正)

資料2別紙1 試験機関の試験水供給システム模式図

資料2別紙2 供給水水温のチャート図(停電時を中心に)

資料3 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 日審議会資料 資料 1-3-2 審議会後修正)

資料3別紙1 OECD VMG-eco 等での水温に関する議論経緯について【委員限り】

資料3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. 生態影響に関する有害性評価)Ver.1.0 抜粋

資料3別紙 3 化学物質による生態影響の水温による変化

(平成 31 年 3 月 22 日審議会資料 資料 1-3-2 別紙 意見交換会后回収)

資料4 経済産業省委員の論点に関する見解
(平成 31 年 3 月 22 日審議会当日配布資料)

資料 5 Watanabe H. et.al., 2017. MEDAKA EXTENDED ONE-GENERATION REPRODUCTION TEST EVALUATING 4-NONYLPHENOL. Environ Toxicol Chem 36: 3254-3266.

NPE の有害性評価に関する審議会委員による意見交換の場の設定について

令和元年 9 月 20 日

令和元年 11 月 1 日改定

厚生労働省化学物質安全対策室

経済産業省化学物質安全室

環境省環境保健部化学物質審査室

優先評価化学物質「 α -（ノニルフェニル）- ω -ヒドロキシポリ（オキシエチレン）（別名ポリ（オキシエチレン）=ノニルフェニルエーテル）」（優先通し番号 86。以下「NPE」という。）については、平成 30 年 3 月に開催された 3 省合同審議会において進捗報告がなされた後約 1 年半以上に渡り有害性評価について審議が継続している状況であり、令和元年 7 月時点においても議論の収束の目途が立っていない。WSSD2020 年目標の達成に向け本物質に係る評価を加速化するため、本物質については特例的に、審議会とは別に 3 省の審議会委員が忌憚のない意見交換を行う場を設置することとする。なお、この場では必ずしも特定の結論を得ることを目的としない。

1. 趣旨

NPE の有害性評価について、3 省の審議会委員により、それぞれが有している情報の共有や科学的な観点から意見交換を行うことにより、3 省合同審議会における議論を円滑化することを目的とする。なお、評価書の取りまとめは従来通り 3 省合同審議会において実施される。

2. 意見交換を行う事項

NPE 及びその変化物に関し収集された有害性情報のうち、Watanabe らによるメダカ拡張 1 世代繁殖試験（MEOGRT）について、関連情報の共有、OECD テストガイドラインからの逸脱事項や試験における不確実性、それらを踏まえた NPE の有害性評価値としての妥当性の検討。

具体的に共有又は議論を行う事項は下記の①～⑤のとおりとするが、下記論点は、前の項目の結論を基に次の項目を議論する必要があることから、議論は①から始め、段階的に進めることとする。なお、本意見交換の場または審議会において別の論点が提示された場合にそれを除外するものではない。

- ① 試験条件、本試験の水温等の状況に係る認識の共有
- ② 水温が NP の魚類毒性に及ぼす影響について
- ③ 本試験の水温が試験結果に与えた影響について
- ④ NP の暴露による生物学的に有効といえる影響が検出されているかどうかについて
- ⑤ MEOGRT の結果を用いて定量的なリスク評価に使う化審法の PNEC を算出することの妥

当性について

3. 組織等

- (1) 各審議会委員のうち、毒性評価に関する専門的知識を有する者として各審議会の座長が指名する委員各3名からなる9名をもって構成する。意見交換に係る事務は各審議会の事務局が行う。
- (2) リスク評価に係る議論の透明性を確保するため、議事録については原則、公開とすることとし¹、3省合同審議会において概要報告を行う。報告者は参加した委員のうち互選で決定することとする。
- (3) 機密性の高い情報を共有する場合は、意見交換に参加した委員は当該情報を他者に漏らしてはならない。

4. 開催時期等

令和元年9月20日から NPE のリスク評価書が3省合同審議会において了承されるまでの期間において、必要な回数実施とする。なお、次回以降の開催にあたっては、議題等について当該意見交換会における3省委員の意向を踏まえて3省事務局で調整して決定する。

¹ 公開することにより公正かつ中立な審議に著しい支障を及ぼすおそれがある場合又は特定な者に不当な益若しくは不利益をもたらすおそれがある場合等は非公開とする。

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 $27.1 \pm 0.8^{\circ}\text{C}$ （TG では試験期間を通じた平均水温が $24 \sim 26^{\circ}\text{C}$ 、各水槽の逸脱は短期間で平均水温から 2°C 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、 $25 \sim 26^{\circ}\text{C}$ に調温、計画停電^{*1}時は $22 \sim 24^{\circ}\text{C}$ 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 $27 \sim 29^{\circ}\text{C}$ の間に保たれていた^{*2}が、1/16 は室温が $22 \sim 24^{\circ}\text{C}$ まで下がった時間があり^{*3}、1/17、18、20、21 には室温が 30°C 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 9:30-16:30
（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
 - 供給水の水温測定ロガー（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（9:30～16:30）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①】 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②】 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り、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③】 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（ $26.7 \pm 0.7^\circ\text{C}$ 、 $25.6 \pm 0.8^\circ\text{C}$ ）と本試験（ $27.1 \pm 0.8^\circ\text{C}$ ）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分けけ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④】 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]

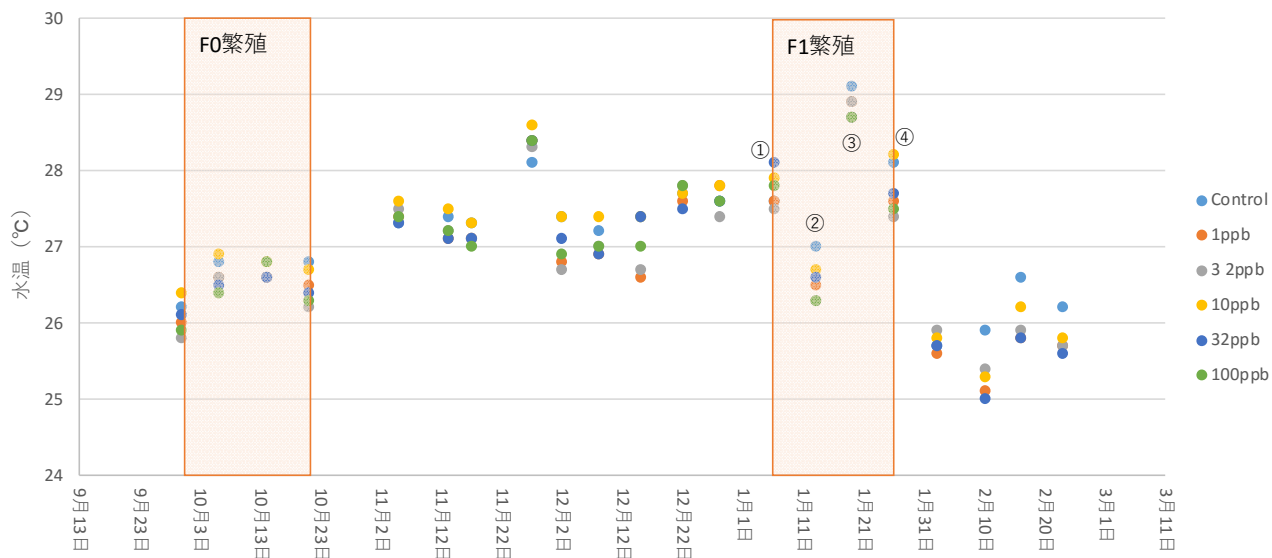
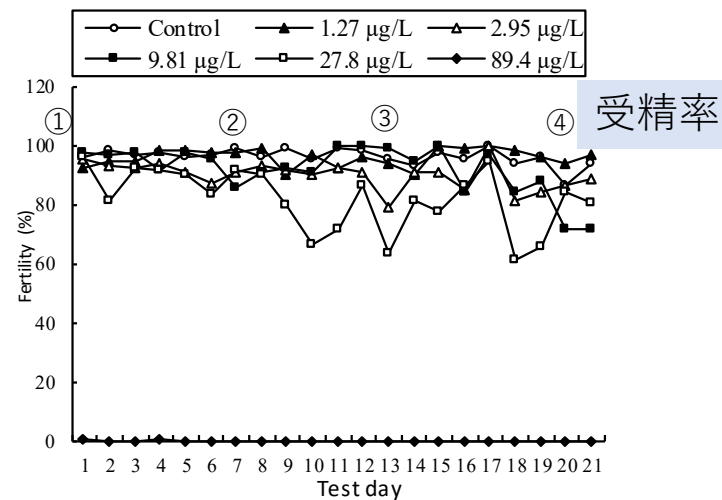
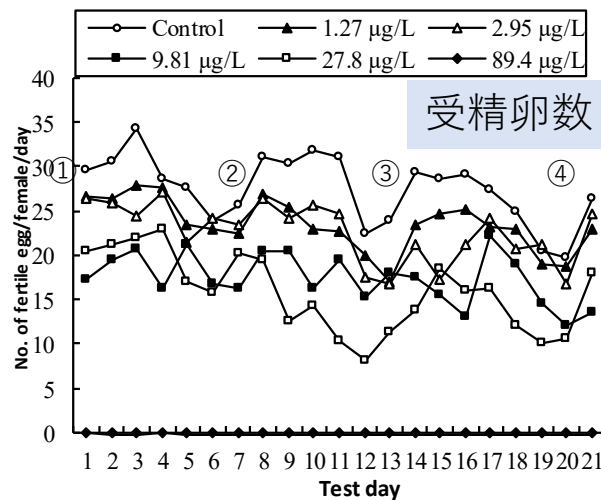
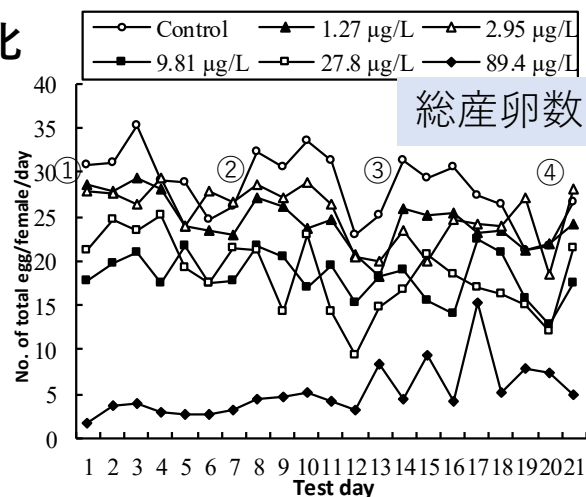
参考 1 ノニルフェノール MEOGRT 温度変化と F1 繁殖への影響

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

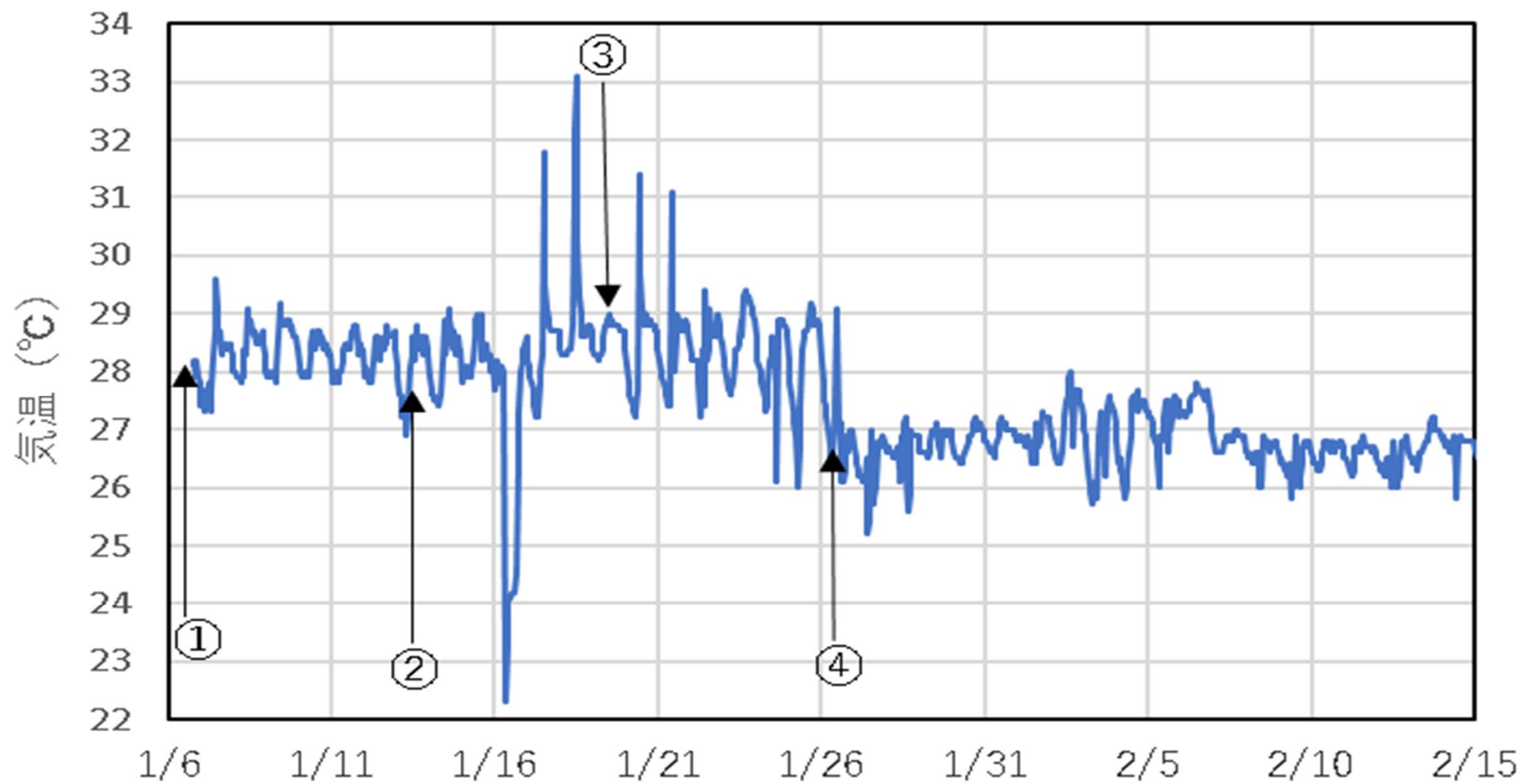
経日変化



F1繁殖計測中の水温(°C)

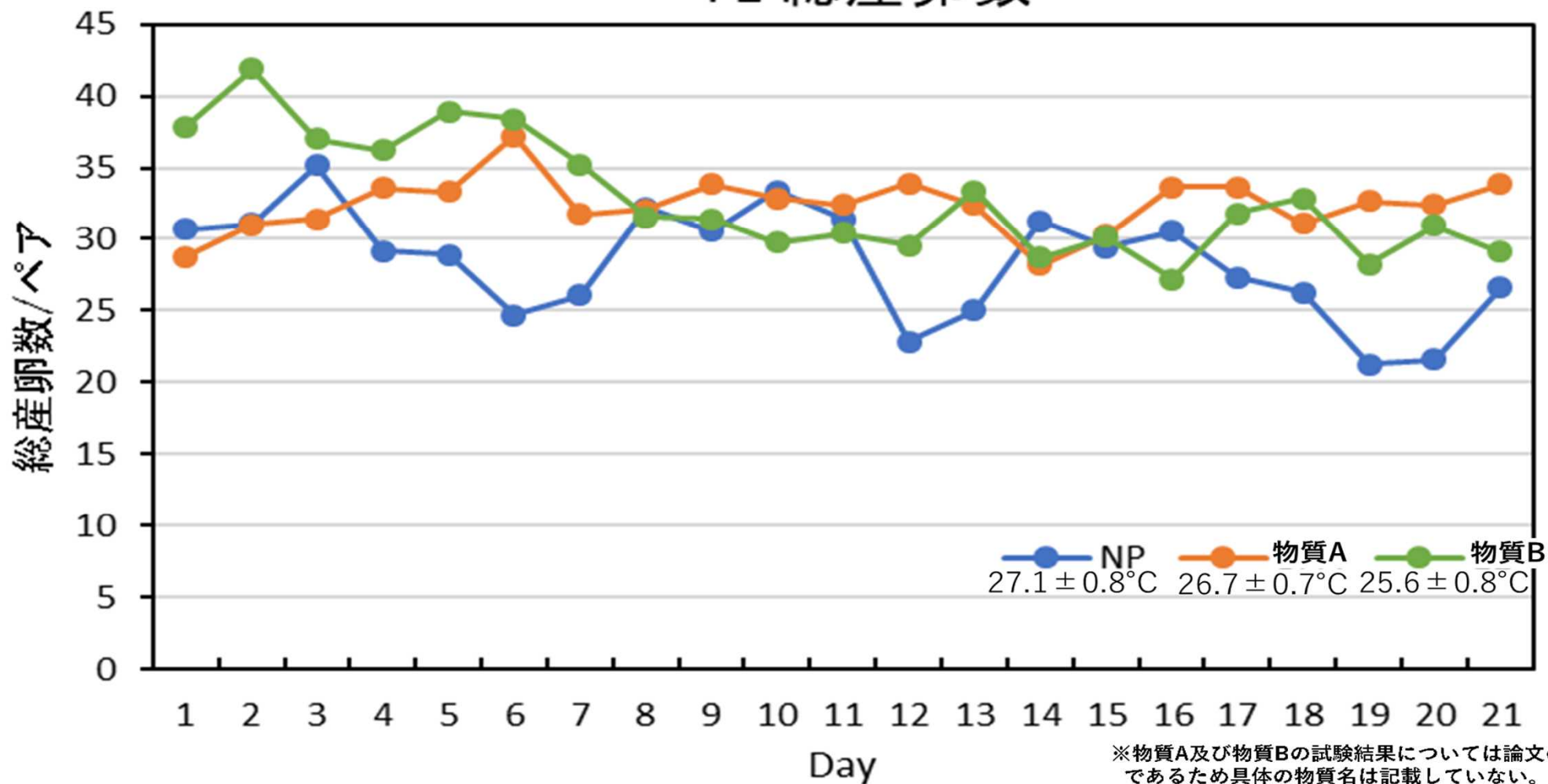
繁殖期間	平均	最小—最大
①1/6：開始前日	27.8	27.5—28.1
②1/13：7日目（1週目の最後）	26.8	26.3—27.0
③1/19：13日目（2週目終了前日）	28.8	28.7—29.1
④1/26：20日目（3週目終了前日）	27.8	27.4—28.2

(参考 2) 試験を実施した部屋の室温の測定データ

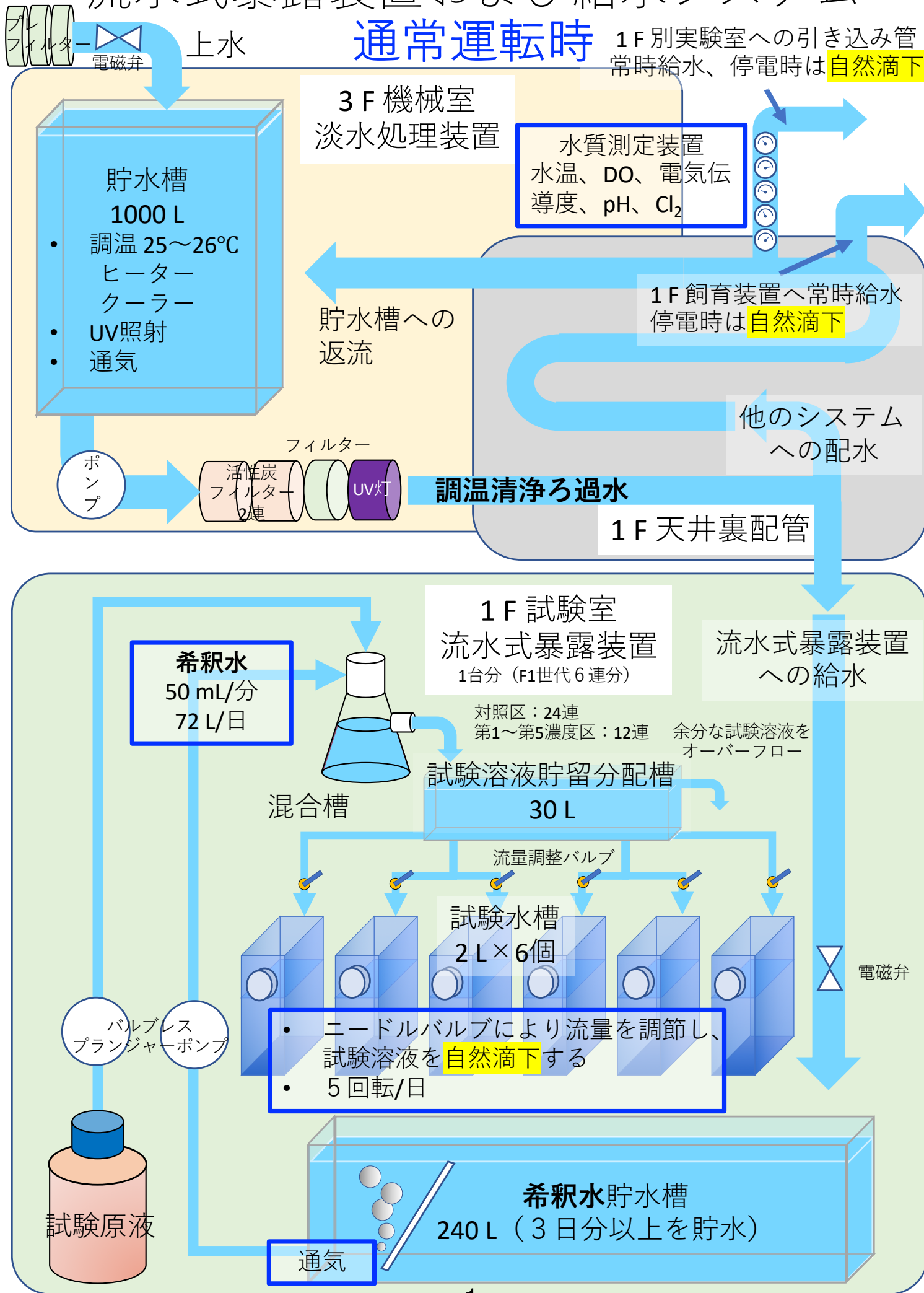


(参考3) NP以外の物質で実施したMEOGRT試験と本試験のF1世代における
コントロール区のペア・1日あたりの平均総産卵数の変動の比較

F1 総産卵数

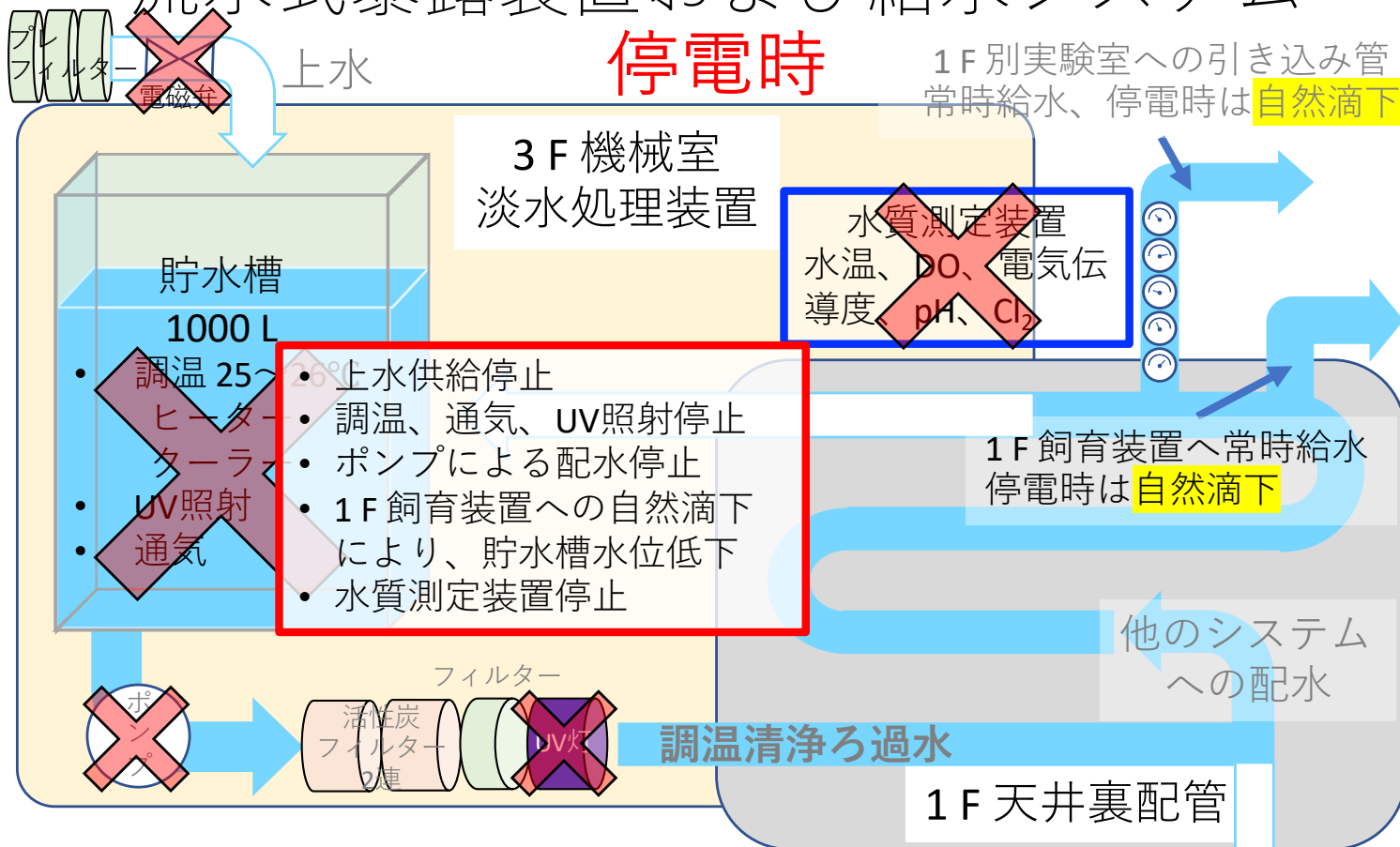


流水式暴露装置および給水システム



流水式暴露装置および給水システム

停電時



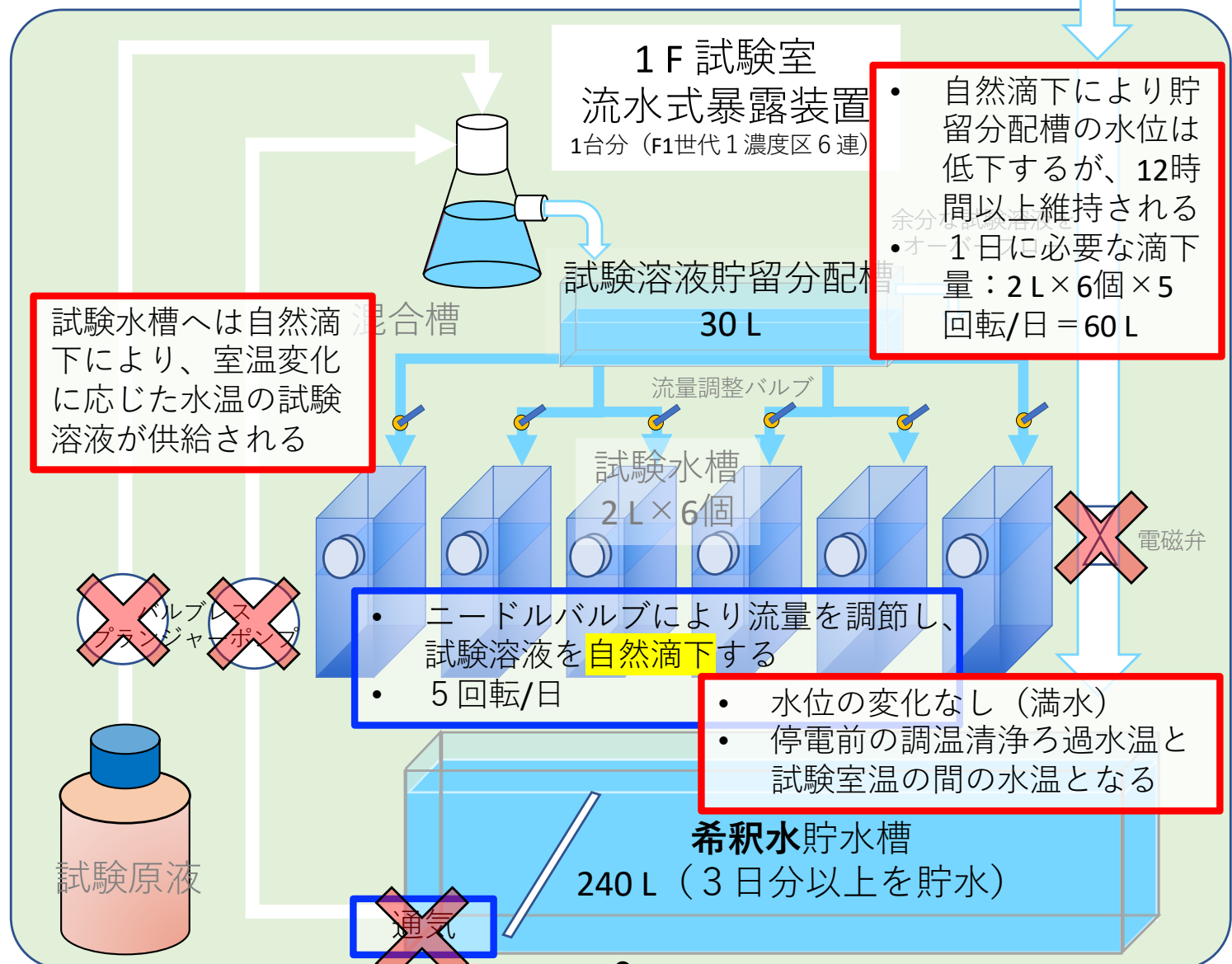
- 上水供給停止
- 調温、通気、UV照射停止
- ポンプによる配水停止
- 1 F 飼育装置への自然滴下により、貯水槽水位低下
- 水質測定装置停止

- 自然滴下により貯留分配槽の水位は低下するが、12時間以上維持される
- オーバー1日に必要な滴下量：2 L × 6 個 × 5 回転/日 = 60 L

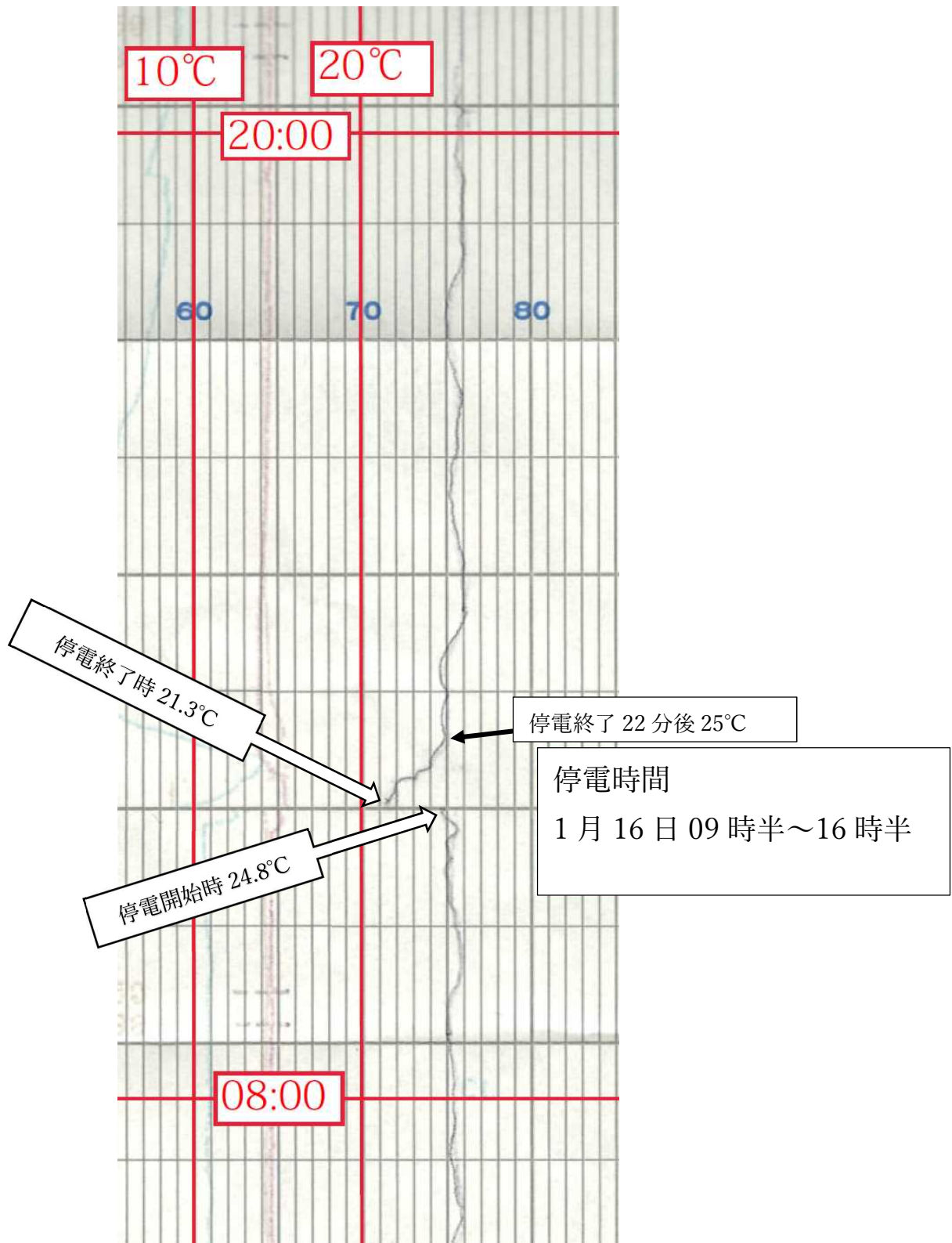
試験水槽へは自然滴下により、室温変化に応じた水温の試験溶液が供給される

- ニードルバルブにより流量を調節し、試験溶液を自然滴下する
- 5 回転/日

- 水位の変化なし（満水）
- 停電前の調温清浄ろ過水温と試験室温の間の水温となる



供給水水温のチャート図（停電時を中心に）



1 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)。

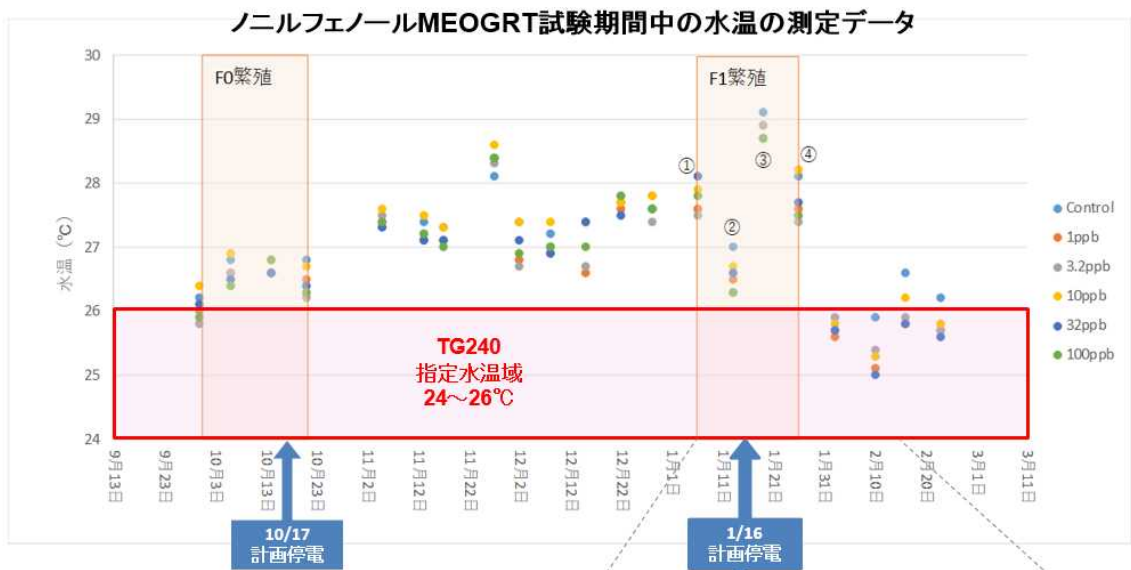
36 ✓ 本年1月18日の3省合同審議会において、環境省から平成30年3月23日審議
 37 会以降の現状報告がなされ、厚労省及び環境省専門家と経済省事務局間で質疑が
 38 あった。

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**

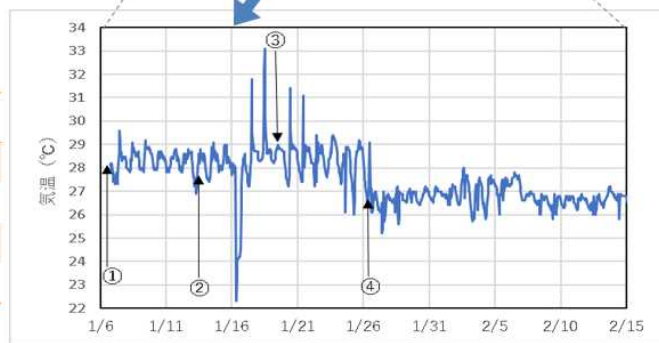
- 41 ✓ 試験水温の測定は不定期に1回/週程度(TG240では毎日測定)。
- 42 ✓ 試験水温を室温で管理(なお、室温データは下図の期間のみしかない)。
- 43 ✓ F1繁殖期までTG240指定水温域 25±1℃を定常的に逸脱。
- 44 ✓ F1繁殖期中の1/16及びF0繁殖期中の10/17の2回、計画停電があり、F1繁殖
 45 期中の停電の際は、サーキュレーターの故障(詳細不明)が原因で、水温が高くなっ
 46 ている。
- 47 ✓ また、1/16は室温が22~24℃まで下がった時間があり、1/17、18、20、21には室温
 48 が30℃を超えていた時間があった。
- 49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

※環境省からの1月10日提供資料より作成。

51

52

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 OECDTG240(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
78 れた場合、 $23\sim 24^{\circ}\text{C}$ 、 $26\sim 27^{\circ}\text{C}$ 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」こと、
95 「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)。成長
96 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違い
97 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」こと
98 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)では通常メダカの産卵の最適温
139 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
171 て、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の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) の水温の上限は 27°C である。しかし、逸脱の許容条項はなく TG240 にのみ定め
221 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の
222 で、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。

223

224 **ii 本試験の逸脱の程度**

- 225 ✓ 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
226 ~2°Cの上昇であったとは考えていない。
- 227 ✓ 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
228 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。
- 229 ✓ 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
230 可能性が高いと考える。
- 231 ✓ 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
232 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
233 える。
- 234 ✓ 「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
235 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
236 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、
237 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
238 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
239 とは言えない。

240

241 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

242 i 水温と毒性の一般的な関係

- 243 ✓ 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
244 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
245 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
246 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
247 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
248 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。

249 【参考】Q10理論

250 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
251 はQ10理論が成り立つといわれている。

252 ↑温度上昇に伴い急性毒性が強くなる理由

253 【参考】呼吸速度=1400*体重^{0.65}/溶存酸素濃度

- 254 ✓ 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
255 いる。
- 256 ✓ 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
257 -3-2別紙3)からも読み取れる。

258

259 ii NPの毒性と水温の関係

- 260 ✓ 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
261 いる。

- 262 ✓ 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
263 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
264 いる。
- 265 ✓ 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
266 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
267 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
268 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。
- 269 ✓ 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
270 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
271 エストロゲン様活性が高まったと報告されている。
- 272 ✓ 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
273 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
274 を増強されることが判明した。
- 275 ✓ 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
276 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
277 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。
- 278 ✓ 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、
279 それは繁殖性にも影響を与えると考える

280

281 iii NP 毒性と本試験のエンドポイントとの関係

- 282 ✓ 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
283 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。
- 284 ✓ 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
285 している可能性があるという推測する。
- 286 ✓ 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
287 と考える。

288

289 ⑤まとめ

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

- 298 ✓ 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
299 性が高いと考えられる
300 ✓ 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
301 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
302 用することはできないと判断する。

303

304 4. 結論

- 305 ✓ 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と、
306 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
307 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
308 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
309 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、
310 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
311 ための PNEC 値として採用することはできないと判断する。
312 ✓ 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
313 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、
314 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
315 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。

316

317

318

以 上

資料1-3-2_別紙集【議場配布用】

目次

別紙1: OECD VMG-eco 等での水温に関する議論経緯について【委員限り】P1
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ドン(Ⅲ. 生態影響に関する有害性評価)Ver.1.0 抜粋P27
別紙3: 化学物質による生態影響の水温による変化P31

1 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 2 (Ⅲ. 生態影響に関する有害性評価) Ver. 1.0 抜粋 3

4 Ⅲ.2.7 有害性評価と審議会の意見聴取との関係 (P6, 10行目～)

5 本ガイダンスの有害性評価の考え方・手法では、優先評価化学物質のリスク評価に用い
6 る PNEC 導出等の基本的なルールを示している。ただし、本ルールに基づくことはリスク
7 評価に用いる有害性データの決定を意味するのではなく、専門家による個別判断の余地を
8 残すものである。それは、化審法の以下のような仕組みによる。

9
10 化審法では、「化学物質の有害性やリスクの評価が必要となる措置に関しては、専門家
11 による科学的知見を踏まえた上で判断を行うことが適当である」との考え方のもと、いくつ
12 かの措置については審議会の意見を聴くものとされている (法第 56 条)。それらの措置のう
13 ち、優先評価化学物質のリスク評価に関連するのは以下の事項である。

14
15 (ア) 第二種特定化学物質の政令指定 (法第 2 条第 3 項)

16 (イ) 優先評価化学物質の有害性調査の指示 (法第 10 条第 2 項)

17 (ウ) 優先評価化学物質の有害性調査の報告より第二種特定化学物質該当性の判定 (法
18 第 10 条第 3 項)

19
20 これらについて、所管する各省の審議会 の意見を聴取することとなっている。

21
22 **本ガイダンスの手法は、上記の審議会に付議されるリスク評価書の案を作成するためのも
23 のである。リスク評価の中でも、特に有害性評価については、データの解釈等において高度
24 な専門的知識を要し、定型化には限界がある。このため、審議会に付議するリスク評価書の
25 案においては、リスク評価に利用可能な有害性データを明示し、有害性データの選択の適切
26 性等について専門家による個別判断の余地を残すものとする。**

27 28 Ⅲ.4.2 既知見の更新状況の確認・収集及び精査の観点 (P14, 4行目～)

29 Ⅲ.4.2.2 有害性データの精査の観点

30 (1)有害性データ精査に際しての基本原則

31 有害性等の性状データの質の評価 (evaluation) を行う際には、以下の 3 つの観点 (①
32 「reliability」(信頼性)、②「relevance」(適切さ)、③「adequacy」(有用性)) を考慮する
33 ことが適当である。

34

35 欧州連合の REACH では、得られた情報が REACH の目的に十分な質を有しているかが
36 評価されている。データの質の評価では、2つの基本的な事項（「basic elements」）として
37 「relevance」（適切さ）と「reliability」（信頼性）の観点で検討が行われ、その結果から、そ
38 のデータがリスク評価等に有用であるか（「adequacy」）が評価される。これらの用語は、
39 Klimisch et al (1997)¹により定義されたものである²。

40 ① reliability（信頼性）：試験報告書又は公表資料の評価であり、標準化された試験
41 方法に準拠しているか。

42 ② relevance（適切さ）：データと試験は、特有の有害性やリスク特性を適切に捉え
43 ているか。³

44 ③ adequacy（有用性）：有害性評価・リスク評価の目的に、データが有用であるか。
45 最も適切で信頼性のあるデータの評価に用いられる。

46

47 化審法の生態影響に関する有害性評価は、「III.1.2 生態影響に関する有害性評価の基本的
48 な流れ」に従い実施される。スクリーニング評価及び評価Ⅰの段階では、原則、定型的な
49 手順に従い実施することになるが、この手順にはスクリーニング評価及び評価Ⅰの目的に
50 応じた①から③の観点が含まれる(III.2.5 参照)。有害性評価Ⅱ以降は、データの精査を踏ま
51 えた総合的な判断を行うこととしており、性状データについて「総合的な観点による精査
52 を踏まえたキースタディの見直し」を実施する⁴(図表 III-3 参照)。「総合的な判断」をする
53 ための「総合的な観点による精査」には以下の観点が含まれる。

54

55 (ア) 当該優先評価化学物質の評価において、評価対象物質の設定と試験対象物質の関係
56 等から、性状データのカバーする範囲が適切かどうかを評価する。

57 (イ) 水-オクタノール分配係数が大きいなど底質に分布し残留しやすいと考えられる物質
58 については、水生生物に加えて底生生物についても評価する。

59 (ウ) 生活環境の多種多様な動植物への影響を評価するため、情報を収集する生物種を化
60 審法試験法の対象種だけでなく特定試験法の対象種も加えて評価する。特定試験法
61 は、国内外の権威ある機関に認められたもののみを用いることでデータの有用性を

¹ Klimisch, H.J. et al. (1997) A systematic approach for evaluation the quality of experimental toxicological and ecotoxicological data. Regulatory Toxicology and Pharmacology 25, 1-5.

Klimisch コードには以下の4つのランクがあり、原則として1と2のデータが評価に利用される。1：信頼性あり(制限なし)、2：信頼性あり(制限付き)、3：信頼性なし、4：評価不能

² OECD Manual for the Assessment of Chemicals.

http://www.oecd.org/document/7/0,3746,en_2649_34379_1947463_1_1_1_1,00.html

³ 例えば、主要な暴露経路で毒性試験の投与経路が設定されているか、対象媒体での物質の安定性等から勘案して試験設定等が適切かなどといった観点が考えられる。

⁴ 化審法のスクリーニング評価及びリスク評価(一次)評価Ⅰに用いる性状データの信頼性評価等の基本的考え方
http://www.meti.go.jp/policy/chemical_management/kasinhou/information/shinraisei_kijun.html

62 確保する。

63 (エ) 信頼性評価では、可能な限り個別の原著にさかのぼって試験法への適合等を確認し、
64 (2)に定める4つの信頼性ランクに区分する。なお、PNEC 導出に使用可能な有害性デ
65 ータは、信頼性ランク「1」、「2」に該当するものとし、これらは同等に扱うものと
66 する。

67 (オ) 信頼性ランク「4」とされた有害性データは、ケーススタディを選定する際の参考
68 としてクロスチェックや証拠の重み付け等に利用する。

69 (カ) 国内外の規制値等が定められている場合は、当該規制値の導出に用いられた毒性値
70 等との比較・検証を行う。

71

72 (2)信頼性ランクの区分

73 評価Ⅱに用いる有害性データについて、reliability 及び relevance の観点から信頼性ラン
74 クを付与する。信頼性ランクは、基本的にスクリーニング評価での考え方を踏襲する。具
75 体的には、以下の4ランクに区分する。

76 【ランク1 信頼性あり（制限なし）】

77 ・ 化審法試験法又は特定試験法を用いて、GLP（Good Laboratory Practice、優良試
78 験所基準）に従って試験が実施されている。

79 かつ

80 ・ 試験対象物質に関する情報（純度、成分等）が明記されており、含まれている不
81 純物等の成分は毒性に影響しないと考えられる。

82

83 【ランク2 信頼性あり（制限付き）】

84 ・ 化審法試験法又は特定試験法からの逸脱や不明な点が若干あるが、総合的に判断し
85 て信頼性がある。

86 かつ

87 ・ 試験対象物質に関する情報（純度、成分等）が明記されており、含まれている不
88 純物等の成分は毒性に影響しないと考えられる。

89

90 【ランク3 信頼性なし】

91 ・ 試験方法は、化審法試験法又は特定試験法からの逸脱が著しく、これら試験法へ
92 の適合性が判断できないか、科学的に妥当ではない。

93 又は

94 ・ 試験対象物質に関する情報（純度、成分等）が明記されているが、不純物が毒性
95 値に影響している可能性が否定できない。

96

97 【ランク4 評価不能】

98 ・ 試験方法に不明な点が多く、化審法試験法又は特定試験法への適合性が判断でき
99 ないか科学的な妥当性を判断する情報がない。

100 又は

101 ・ 試験対象物質に関する情報（純度、成分等）が明記されておらず、その妥当性が
102 判断できない。

103

104 III.4.3 PNEC の導出（P15, 13 行目～）

105 III.4.3.1 キースタディの選定

106 収集された有害性データについて信頼性ランクを付与し、使用可能なデータを選別す
107 る。エンドポイントについては、慢性毒性では無影響濃度（NOEC）、急性毒性について
108 は半数致死濃度（LC50）と半数影響濃度（EC50）とする。なお、慢性毒性での無影響
109 濃度が得られない場合は、x%影響濃度（ECx）または最大許容濃度（MATC）等を活用
110 することができる。

111 **各栄養段階又は各生息・食餌条件の急性・慢性の試験項目ごとに信頼性ランク 1 及び 2**
112 **の毒性値のうち、原則、より小さな毒性値を採用することとして、専門家判断によりキー**
113 **スタディを選定する。なお、信頼性ランク 4 が付与された毒性値は、キースタディ選定の**
114 **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するが、キースタディとはしな**
115 **い。**

116

化学物質による生態影響の水温による変化

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機会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。

2. 化学物質の魚毒性と水温の関係

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³。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】

82 農薬中 80 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。

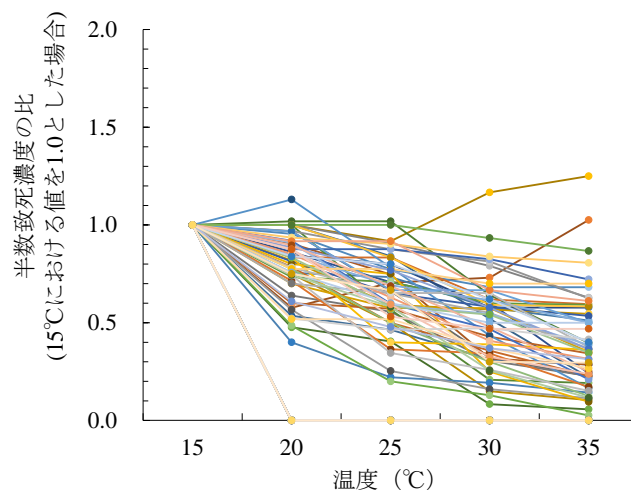


図 2-1 殺虫剤における半数致死濃度の温度による変化

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.

³ 西内 (1977) 農薬製剤の数種淡水産動物に対する毒性・XXXX、水産増殖、24(4)、140-145

35 【殺菌剤】

36 41 農薬中 37 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。

37

38

39

40

41

42

43

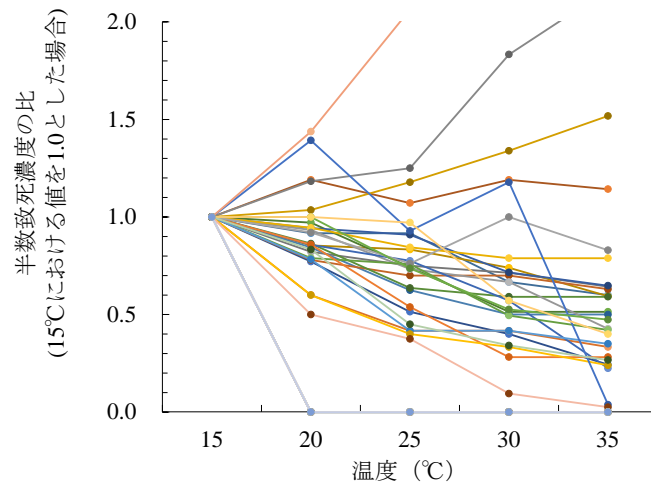
44

45

46

47

48



49 図 2-2 殺菌剤における半数致死濃度の温度による変化

50

51 【除草剤】

52 39 農薬中 36 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。

53

54

55

56

57

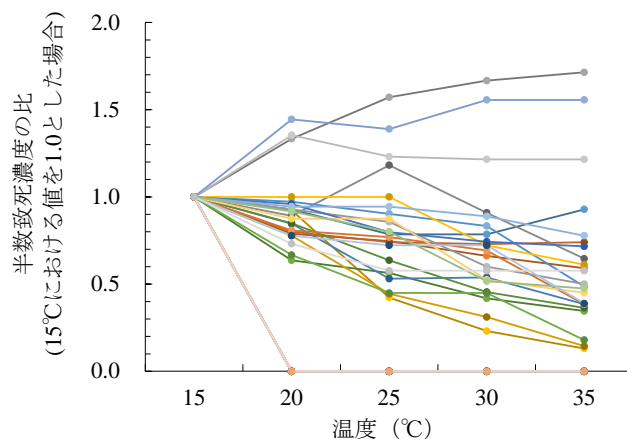
58

59

60

61

62



63 図 2-3 除草剤における半数致死濃度の温度による変化

64

65 その他、15 種類の無機化学物質、8 種類の有機金属、13 種類の農薬、6 種類の防炎加工
66 剤、8 種類の洗剤及び乳化剤、5 種類の可塑剤、4 種類の染料、4 種類のポリリン酸ナトリ
67 ウム、25 種類の有機溶剤、2 種類の酸化防止剤について水温を 3 段階 (10°C、20°C、30°C)
68 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⁴。試験した 90 物質のう
69 ち、毒性値が算出できたものが 73 物質あり、そのうち水温上昇により毒性が強く現れたも
70 のが 55 物質 (75.3%、6 種類の無機化学物質、4 種類の有機金属、11 種類の農薬、6 種類の

⁴ 辻ら (1986) 各種環境汚染物質のヒメダカ (*Oryzias latipes*) に対する致死濃度に及ぼす飼育水温の影響、衛生化学、32(1)、46-53

71 肺炎加工剤、3 種類の洗剤及び乳化剤、4 種類の可塑剤、3 種類のポリリン酸ナトリウム、
72 16 種類の有機溶剤、2 種類の酸化防止剤)、毒性が変化しなかったものが 9 物質 (12.3%、4
73 種類の無機化学物質、2 種類の有機金属、3 種類の洗剤及び乳化剤) であった(図 2-4)。生理
74 活性を目的としない一般化学物質においても、先の西内の報告と同様に温度上昇による毒
75 性の増加傾向が見られた。

76

77

78

79

80

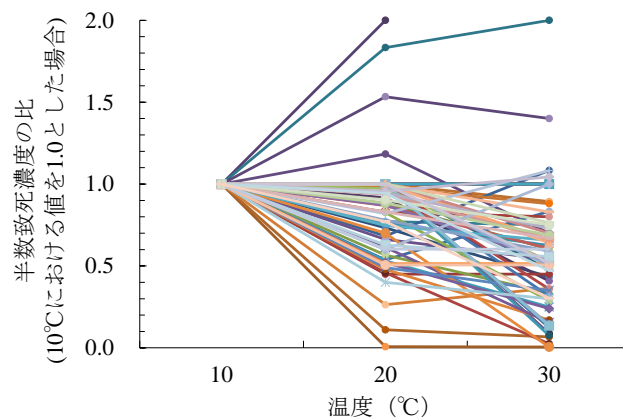
81

82

83

84

85



86 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

87

88

89 以上のように、水温は魚類の成長、繁殖、代謝に影響を及ぼすと共に、化学物質毒性発
90 現にも影響する。化学物質管理において、魚類に対する化学物質の影響をより精確に評価
91 するうえで、魚類の生活環境にとって重要な水温という環境因子による影響がないように
92 試験条件を出来る限り厳密に管理することが重要であると考えられる。

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

い。事実、同先生は全訂増補版メダカ学全書(2018年)では通常メダカの繁殖・産卵の最適温度は25~26℃であると報告している。

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

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

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

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

【当方の見解】 メダカの繁殖については、いくつかの論文があります。たとえば、Hirshfield (Ecology, 61, 282-292, 1980)では、繁殖や繁殖行動に必要なエネルギーについて、摂餌(多い、中程度、少ないの3条件)、温度(25, 27, 29℃の3条件)の関係から詳細に調べています。その結果、産卵数は温度が高くなるにつれて多くなる

一方で、成長は逆に鈍くなる傾向があることを確認しています。また、Dhillon and Fox (2004)はメダカの摂餌量（飽食量もしくは一定量）および温度（24, 27, 30, 33°C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°C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、③XXmale 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温は 25±1°Cとする。他の候補となっている魚種(メダカを含む)は 28±1°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、その後水温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程度の水温設定を科学的に否定するものではないといえます。

②試験の水温状況

i 水温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、毎日の水温測定は必須となった経緯がある。

【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

「No.88 Germany

One measurement per week is not enough.

There is a limit given for water temperature (+/- 2° 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°Cであることに加えて、短期間の水温の逸脱が2°Cを超えないことというものがあるが、週1回程度の水温測定なので、例えば数日間の水温の逸脱をとらまえられる。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温測定が求められている。
- ✓ 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。
- ✓ 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日頃の水温に、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温についても逸脱があった可能性は否定できず、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られる。

- ✓ 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、水温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°C 以内の逸脱や、平均水温の逸脱が 2°C 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℃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℃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℃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℃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℃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 におけるメダカのカフェニトロチオン 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。またカ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 α -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., Cirmo, 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 $\mu\text{g/L}$ (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ERαで有意な差は検出されず、50 µg/LではVtg1は減少、Vtg2はほぼ同等、ERαはやや上昇していました。メスの成魚では、NP 5 µg/Lでは同様に20°Cと30°Cでほぼ同等、50 µg/LではVtg1は2倍程度増加、Vtg2は減少、ERα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, ERα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、統計的な有意差が確認されませんでした。

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

形成の遅れが確認されています。なお、温度によるビテロジェニン濃度の増加は認められていません。

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

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

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

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

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

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

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

iii NP 毒性と本試験のエンドポイントとの関係

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

【当方の見解】 ご指摘の通りかと思えます。

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

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

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

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

⑤まとめ

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

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

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

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

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

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

「化学物質による生態影響の水温による変化」に関する見解

1. 魚類における水温の重要性

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

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

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

2. 化学物質の魚毒性と水温の関係【当方の見解】

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

【殺虫剤】

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

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

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

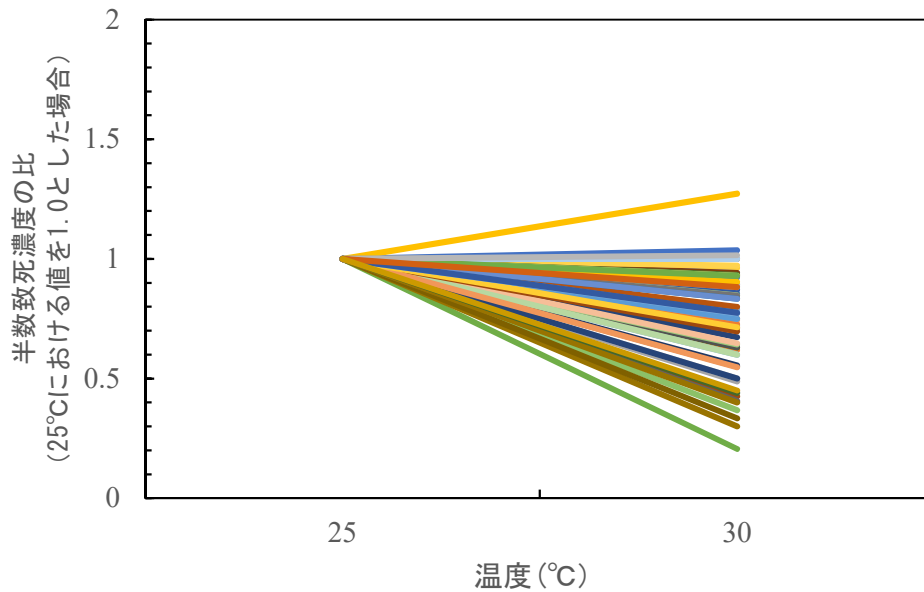


図2-1 殺虫剤における半数致死濃度の温度による変化

【殺菌剤】

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

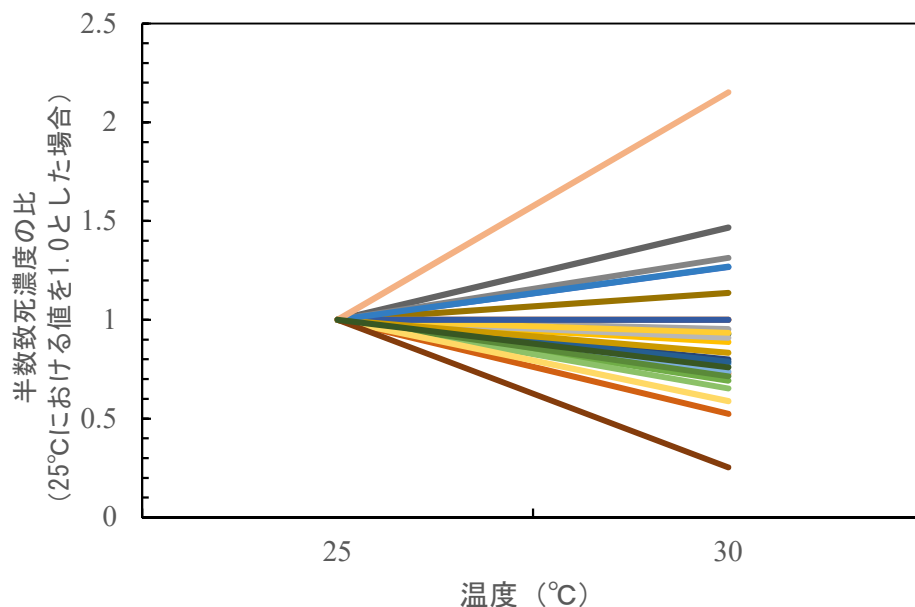


図2-2 殺菌剤における半数致死濃度の温度による変化

【除草剤】

魚毒性が弱い 15 農薬を除いた 24 農薬中 17 農薬で水温が高くなるにしたがって魚毒性が強く現れていたが、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。

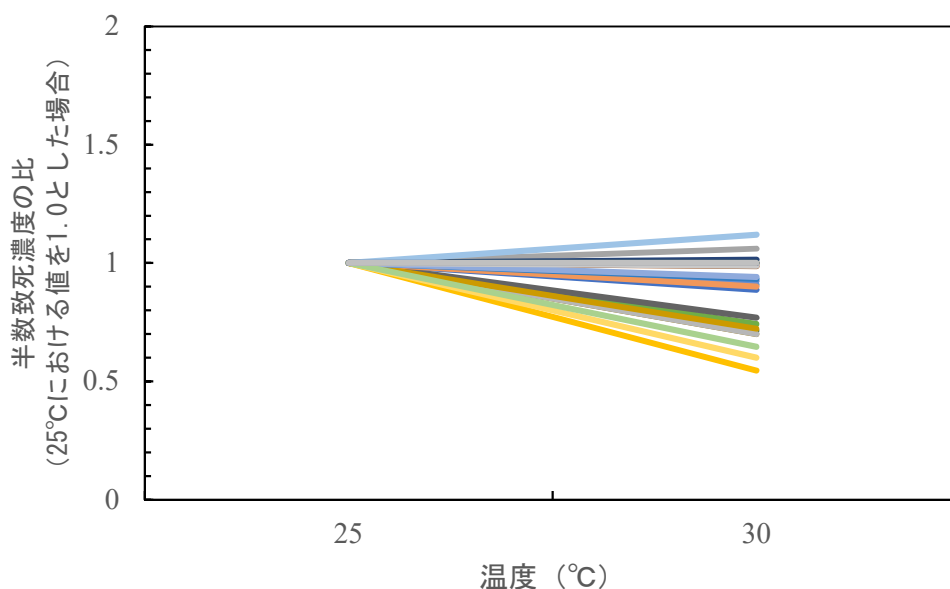


図2-3 除草剤における半数致死濃度の温度による変化

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)。

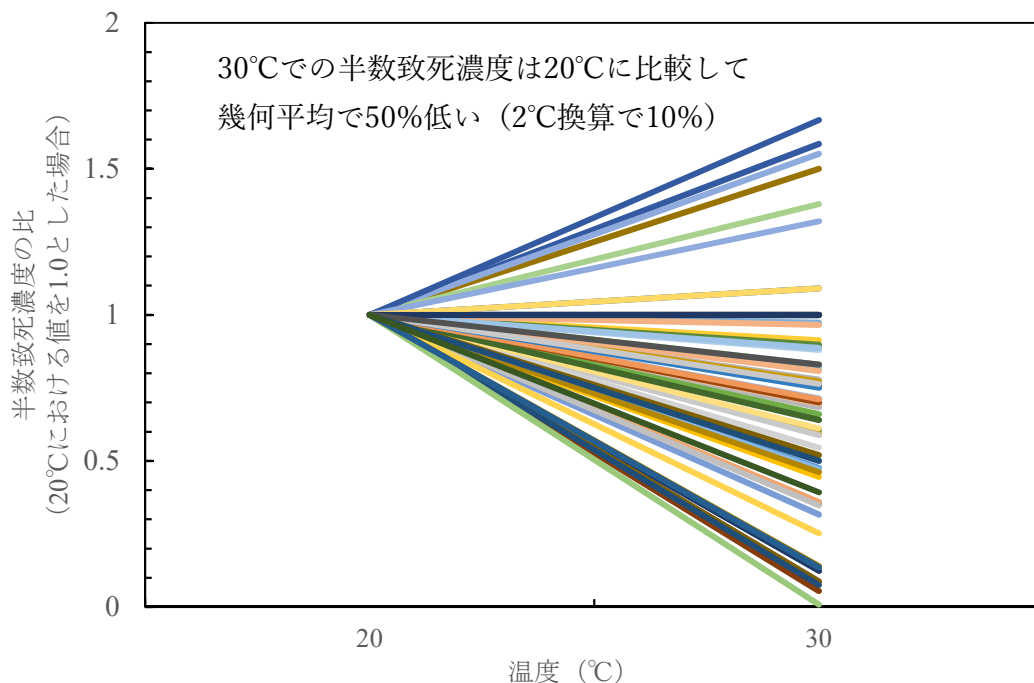


図2-4 様々な化学物質の半数致死濃度の温度による変化（辻らより）

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のかを求め、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 µg/L (MEOGRT 試験の LOEC 1.27 µg/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 µg/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 µg/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 µg/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 µg/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 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 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 +/- 3.8 g) に 1, 5, 10, 15 µg/L NP を、より長期間 (70 日間) 曝露した。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 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 µg/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.

10. [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.

11. 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.

12. 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.

13. [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.

14. 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.

15. [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.

16. [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.