

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
			<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ことがありません。

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	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で、本来のデータとは異なる可能性がある。 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。特にメスはどうか。	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) 。 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。	(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ど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。 (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。	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。
F 1 世代亜成体の間性または性転換 (表 1-17、1-18、Page33)	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。	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。	(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すが、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。	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。
F 1 世代亜成体の間性または性転換 (表 1-19、Page34)	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。	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。	(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。	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。
全体の感想	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	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。 フルライフサイクル試験は MEOGRT と様々な試験条	(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。	< 特に対応なし >

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	
METI2018/3/19	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 との比較でみても 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"> 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) 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) 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 (Oryzias latipes). Aquat Toxicol., 101, 254 (2011) 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). 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

< 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	MOE 2018/03/16 回答	METI 2018/3/26	MOE 2018/06/18 回答
(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	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。	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。	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。
		・ 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。	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。

< 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
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。	
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。	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。

＜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)。本試験ではすべての試験区で 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、室温を何度に設定すると水温が 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
<p>[添付資料]</p> <p>参考 1 ノニルフェノール MEOGRT 温度変化と F1 繁殖への影響</p> <p>参考 2 試験を実施した部屋の室温の測定データ</p> <p>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</p>	

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)

<p>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。</p>	<p>開示済み</p>
<p>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、</p> <p>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)。</p> <p>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。</p>	<p>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。</p>
<p>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。</p> <p>円筒底の食べ残しの餌が原因でしょうか。</p> <p>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。</p> <p>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。</p> <p>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。</p>	<p>残餌分解、試験魚呼吸による酸素消費が考えられます。</p> <p>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。</p> <p>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。</p> <p>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。</p>
<p>【水温・室温関連】</p> <p>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)。</p> <p>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。</p> <p>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)。</p> <p>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。</p>	<p>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。</p> <p>1 個ずつの水槽で同日です。</p> <p>サーキュレータの故障です。</p> <p>すでにお送りしているものがすべてです。</p>
<p>【LOEC の計算方法】</p> <p>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</p>	<p>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</p>

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