

## メダカ拡張1世代繁殖試験 (MEOGRT) 試験データに関する質疑

No	質問等	回答
質 問 1  L O E C の 扱 い	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。	リスク評価 (一次) 評価II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 質 問	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。 ①REACH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。	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。
①	②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。	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。
質 の 問 信 頼 性 N P E に の つ 有	毒性情報は変化物も含め2000データ程度収集されていますが、親物質 (NPE)については、1データのみが採用となっており、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はいても、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)。

No	質問等		回答
い害性データ	再質問 ①	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。
信頼性評価	2	毒性情報は変化物も含め2000デ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』が適用されています。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）。
	再質問	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。
被験物質	3	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の異性体間で一般毒性、エストロゲン様活性C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。 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。	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。 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。 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。

No	質問等	回答
再 質 問	<p>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したのか。また、もし、複数のロットを使用したなら、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>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、m/z=135を確認イオンとして使用し、m/z=107として主ピークは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（Lot No. 605H1679）を使用しました。</p>
4 給 餌 量	<p>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。</p>	<p>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。</p>
5 濃 度 設 定	<p>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>	<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 <math>\mu\text{g/L}</math>であり、183 <math>\mu\text{g/L}</math>では第一世代のすべての個体がswim-upできず死亡していました。51.5 <math>\mu\text{g/L}</math>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 <math>\mu\text{g/L}</math>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 <math>\mu\text{g/L}</math>以上、第二世代では8.2 <math>\mu\text{g/L}</math>以上で精巣卵が観察されていました。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 <math>\mu\text{g/L}</math>を設定濃度としました。</p>

No	質問等	回答
6 水 温	G240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はある。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。	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。
再 質 問 ①	<p>試験有効性基準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、OECDTG240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。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>	メダカは水温が性決定に関与することが知られていますが、性決定時期に継続的に温度が高いことが条件となります。今回、対照区で性比が偏っていないことを考えると、今回の水温が性比に影響を与えた可能性は非常に低いと考えられます。
再 質 問 ②	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。	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）。 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。

No	質問等	回答
	<p>再 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 質 得られず再度確認させてください。</p> <p>問 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 ③ 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： The water temperature should not differ by more than 1.5°C between test vessels at any one time during exposure period and be maintained within a range of 2°C within the temperature ranges specific for the test species (Annex2) Annex2: 25 ± 2°C</p> <p>TG234： The water temperature should not differ by more than 1.5°C between test vessels at any one time during exposure period and be maintained within a range of 2°C within the temperature ranges specific for the test species (Annex2) Annex2: 25 ± 2°C</p> <p>TG236： The water temperature should be maintained at 26 ± 1°C 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°C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°Cで実施されたことより、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°C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°C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°C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°Cとあります。そのため、平均水温が1°C高い27°C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°C、繁殖期のみ28 ± 1°C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、「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。」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>

No	質問等	回答
	<p>TG240 :</p> <p>The mean water temperature over the entire duration of the study should be between 24°C-26°C. Breif excursions from the mean by individual aquaria should not be more than 2°C.</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が不思議です。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>	
7 F 0 世 代	<p>TG240で厳格に求められている条件であるが、F0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、表現型で雌雄を選抜しているのか、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。</p>	<p>OECDテストガイドラインでF0のDMY測定は要求していないため、F0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。</p>

No	質問等	回答
再 質 問 ①	<p>OECDTG240プロトコル（英語版）、Paraphrase 18、Annex9でF0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に関する点は、了解いたしました。</p>	<p>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ない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たことがありません。</p> <p>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。</p> <p>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。</p>
8  F 1 世 代 生 存 率	<p>“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。</p> <p>再 コ メ ン ト</p> <p>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。</p>	<p>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、外見的に性別がでなかったため、すべてDMY判定に供する必要がありました。</p> <p>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。</p>

No	質問等	回答
9 F 1 世 代 垂 成 体 の 生 存 率 ①	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、信頼性に疑念が残る。	DMY判定の結果が出るまでの間（一晚）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 質 問 ①	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き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。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。
9 F 1 世 代 垂 成 体 の 生 存 率 ②	② さらに、F1世代垂成体では、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。”とあるが、その通りと考える。また、“表現型の性別ごとに3連ずつプールして維持した”とあり、連数を減少することによりヒメダカにとって試験環境が大きく変わることにより、本来のデータとは異なる可能性がある。表1-13、1-14、1-16、1-15、図1-9これらの図表について説明文に“対照区～ばく露濃度区の個体数はオス：n=46, 20, 17, 17, 20, 22、メス：n=43, 26, 29, 20, 25, 9”とあるが、この匹数の由来がよくわからない。特にメスはどのようにしてなのか。	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す。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=およそ24（対照区はn=48）として計算しています）。
再 質 問 ①	ご説明頂きましたが、溶存酸素低下の事態発生後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②の回答と同じく判断できません。	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でないと考えています。

No	質問等	回答
	再 質 問 ② 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。
の 間 性 ま F た 1 は 世 性 代 転 垂 換 成 ① 体	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 質 問 ① 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ると、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。
た は 0 性 転 F 換 1 ② 世 代 垂 成 体 の 間 性 ま	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。それはペアリングがうまくいかなかったのではないか。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。	コクラン・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。メダカはベ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 質 問 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たことが、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。

No	質問等	回答
エ ン ド ポ イ ン ト に 関 する 試 験 に 関 する デ ータ を 活 用 し て 個 体 群 レ ベル の	<p>本コメントは、①、⑮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用されます。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。</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 コ メ ン ト</p> <p>「リスク評価に係る今後の課題（<a href="http://www.meti.go.jp/policy/chemical_management/kasinhou/files/information/ra/riskassess_kadai.pdf">http://www.meti.go.jp/policy/chemical_management/kasinhou/files/information/ra/riskassess_kadai.pdf</a>）」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うる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すが、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>御指摘の趣旨は理解いたしますが、今回の評価における本試験の採否とは関係のない御指摘であるため、別途議論をさせていただければ幸いです。</p>