

本写しは原本と相違ありません

いであ株式会社
環境創造研究所
運営管理者
大西悠太

最終報告書

スルファピリジンのオオミジンコ (*Daphnia magna*) に対する急性遊泳阻害試験

(試験番号 : 1905-202)

2020年3月19日作成

い で あ 株 式 会 社

陳述書

いであ株式会社
環境創造研究所

試験委託者：環境省

表題：スルファピリジンのオオミジンコ (*Daphnia magna*) に対する急性遊泳阻害試験

試験番号：1905-202

本試験は、厚生労働省医薬食品局長、経済産業省製造産業局長及び環境省総合環境政策局長通知「新規化学物質等に係る試験を実施する試験施設に関する基準について」（平成23年3月31日付け薬食発第0331第8号、平成23・03・29製局第6号、環保企発第110331010号）及び、同通知別添5「藻類生長阻害試験、ミジンコ急性遊泳阻害試験、魚類急性毒性試験、ミジンコの繁殖に及ぼす影響に関する試験、魚類の初期生活段階における生息又は生育に及ぼす影響に関する試験及びユスリカの生息又は生育に及ぼす影響に関する試験に際して付加される事項」に準拠して実施したものである。

2020年3月19日

試験責任者：石川英律

信頼性保証書

いであ株式会社
環境創造研究所

試験委託者：環境省

試験の表題：スルファピリジンのオオミジンコ (*Daphnia magna*) に対する急性遊泳阻害試験

試験番号：1905-202

本試験は試験計画書及び標準操作手順書に従って実施され、本最終報告書には試験に使用した方法、手順が正確に記載されており、試験結果は生データを正確に反映していることを下記のとおり確認した。

監査・査察項目	監査・査察実施日	試験責任者への報告日	運営管理者への報告日
試験計画書	2020年2月19日	2020年2月19日	2020年2月19日
被験物質溶液調製時 (試験液調製時)、暴露開始時	2020年2月24日	2020年2月25日	2020年2月25日
被験物質溶液調製時 (測定用標準溶液調製時)	2020年2月25日	2020年2月25日	2020年2月25日
暴露実験終了時、試料分析時(試料の前処理、試料の測定)	2020年2月26日	2020年2月26日	2020年2月26日
最終報告書	2020年3月17日	2020年3月18日	2020年3月19日

2020 年 3 月 19 日

信頼性保証担当者

深海 総一

試験実施概要

1. 表題

スルファピリジンのオオミジンコ (*Daphnia magna*) に対する急性遊泳阻害試験

2. 試験番号

1905-202

3. 試験目的

スルファピリジンのオオミジンコ (*Daphnia magna*) に対する急性遊泳阻害試験を実施し、半数影響濃度を求める目的とする。

4. 試験方法

本試験は、厚生労働省医薬食品局長、経済産業省製造産業局長及び環境省総合環境政策局長連名通知「新規化学物質等に係る試験の方法について」(平成 23 年 3 月 31 日付け薬食発 0331 第 7 号、平成 23・03・29 製局第 5 号、環保企発第 110331009 号) に準拠して実施した。

5. 適用 GLP

厚生労働省医薬食品局長、経済産業省製造産業局長及び環境省総合環境政策局長通知「新規化学物質等に係る試験を実施する試験施設に関する基準について」(平成 23 年 3 月 31 日付け薬食発第 0331 第 8 号、平成 23・03・29 製局第 6 号、環保企発第 110331010 号) 及び、同通知別添 5 「藻類生長阻害試験、ミジンコ急性遊泳阻害試験、魚類急性毒性試験、ミジンコの繁殖に及ぼす影響に関する試験、魚類の初期生活段階における生息又は生育に及ぼす影響に関する試験及びユスリカの生息又は生育に及ぼす影響に関する試験に際して付加される事項」

6. 試験委託者

名称 : 環境省
所在地 : 〒100-8975 東京都千代田区霞が関 1-2-2

7. 試験受託者

名称 : いであ株式会社
所在地 : 〒154-0012 東京都世田谷区駒沢 3-15-1
代表者 : 代表取締役社長 田畑 彰久

8. 試験施設

名称 : いであ株式会社 環境創造研究所
所在地 : 〒421-0212 静岡県焼津市利右衛門 1334-5

9. 試験関係者

試験責任者 : 石川 英律 
(所属 リスク評価部) (2020 年 3 月 19 日)

試験担当者 : 岡村 哲郎 
(操作全般、化学分析、とりまとめ) (2020 年 3 月 19 日)

試験担当者 : 戸田 美沙 
(暴露試験、化学分析) (2020 年 3 月 19 日)

試験担当者 : 戸塚 優 
(暴露試験、化学分析) (2020 年 3 月 19 日)

10. 試験期間

試験開始日 : 2020 年 2 月 18 日

暴露実験開始日 : 2020 年 2 月 24 日

暴露実験終了日 : 2020 年 2 月 26 日

試験終了日 : 2020 年 3 月 19 日

11. 記録及び試資料の保管

試験に関する下記の記録及び試資料は、試験終了後、当施設の試資料保管施設に10年間保管する。

- 1) 試験計画書、同変更の記録
- 2) 最終報告書
- 3) 生データ
- 4) 信頼性保証担当者の監査・査察記録
- 5) 被験物質（保管用以外の被験物質については廃棄）

目 次

要 約.....	7
1. 被験物質.....	9
1. 1 名称、構造式及び物理化学的性状	9
1. 2 供試試料	10
1. 3 保管方法及び保管条件下での安定性	10
1. 4 暴露条件下での安定性	10
2. 供試生物.....	11
3. 試験方法.....	12
3. 1 試験条件	12
3. 2 試験用水	12
3. 3 試験容器及び機器等	12
3. 4 試験濃度の設定	13
3. 5 試験液の調製	13
3. 6 試験液の分析	13
3. 7 試験操作	14
4. 結果の算出	14
5. 結果及び考察	15
5. 1 試験成績の信頼性に影響を及ぼしたと思われる環境要因	15
5. 2 試験液中の被験物質濃度	15
5. 3 半数遊泳阻害濃度 (E _{IC50})	15
5. 4 0%阻害最高濃度及び100%阻害最低濃度	15
5. 5 試験液の水温、溶存酸素濃度及びpH	15
5. 6 試験結果の評価及び考察	16
Table	17
Figure	21
付属資料-1 試験溶液の組成	22
付属資料-2 予備試験結果	24
付属資料-3 試験液の調製方法	26
付属資料-4 試験液の分析方法	28

要 約

試験委託者

環境省

表題

スルファピリジンのオオミジンコ (*Daphnia magna*) に対する急性遊泳阻害試験

試験番号

1905-202

試験方法

本試験は、厚生労働省医薬食品局長、経済産業省製造産業局長及び環境省総合環境政策局長連名通知「新規化学物質等に係る試験の方法について」（平成23年3月31日付け薬食発0331第7号、平成23・03・29製局第5号、環保企発第110331009号）に準拠して実施した。

- 1) 被験物質 : スルファピリジン
- 2) 暴露方式 : 止水式
- 3) 供試生物 : オオミジンコ (*Daphnia magna*)
- 4) 暴露期間 : 48 時間
- 5) 試験濃度（設定値） : 7.00、11.0、15.0、21.0、及び30.0 mg/L（公比1.4）
及び対照区
- 6) 試験液量 : 50 mL／容器
- 7) 連数 : 4 容器／試験区
- 8) 供試生物数 : 20 頭／試験区、各容器に5頭ずつ供試
- 9) 試験温度 : 20±1°C
- 10) 照明 : 室内光、16時間明／8時間暗（明；AM6:00～PM10:00）
(試験容器付近の光量子束密度：9～15 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)
- 11) 助剤の種類 : 使用しない
- 12) 試験液中の助剤濃度 : -
- 13) 分析方法 : HPLC

結果

1) 試験液中の被験物質濃度

設定濃度に対する実測濃度の割合は、暴露開始時の新試験液が 97～101%、暴露 48 時間後の旧試験液が 94～102% であった。

半数遊泳阻害濃度 (EiC50)、0%阻害最高濃度及び100%阻害最低濃度は、暴露開始時と暴露終了時の被験物質の実測濃度の平均濃度（算術平均）に基づき示した。

2) 24 時間暴露後の結果

半数遊泳阻害濃度 (EiC50) : >29.4 mg/L (95%信頼区間：算出不可)

0%阻害最高濃度 : 10.9 mg/L

100%阻害最低濃度 : >29.4 mg/L

3) 48 時間暴露後の結果

半数遊泳阻害濃度 (EiC50) : 13.8 mg/L (95%信頼区間：12.8 - 14.9 mg/L)

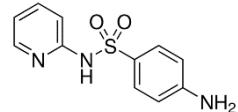
0%阻害最高濃度 : 6.69 mg/L

100%阻害最低濃度 : 29.4 mg/L

1. 被験物質

1.1 名称、構造式及び物理化学的性状

本被験物質は動物用医薬品の合成抗菌剤（サルファ剤）として使用されている。その作用機作は葉酸の合成阻害であり、動物細胞はもともと葉酸合成系がないことから微生物に対してのみ選択毒性を有する。このため、甲殻類及び魚類に対しての生理活性はないものと考えられる。一方、藻類は葉酸合成系を有することが知られていることから、藻類に高い毒性を有することが考えられる。

- 1) 名称 : スルファピリジン
- 2) 別名 : Sulfapyridine¹⁾、スルファピリジン^{2), 3)}、
2-(4-Aminobenzenesulfonamido) pyridine²⁾、
2-Sulfanilamidopyridine²⁾、N'-2-Pyridylsulfanilide²⁾
- 3) CAS番号 : 144-83-2^{2), 3)}
- 4) 構造式 : 
- 5) 分子式 : C₁₁H₁₁N₃O₂S^{2), 3)}
- 6) 分子量 : 249. 29³⁾
- 7) 蒸気圧 : データなし^{3), 4)}
- 8) 対水溶解度 : 情報なし²⁾、ほとんど溶けない³⁾、268 mg/L(25°C)⁴⁾、
275 mg/L(24. 4°C)⁵⁾
- 9) 1-オクタノール/水分配係数 : データなし³⁾、0. 35⁴⁾
- 10) 融点 : 190°C²⁾、193°C³⁾、192°C⁴⁾
- 11) 沸点 : 情報なし²⁾、データなし^{3), 4)}
- 12) 常温における性状 : 白色～うすい黄色の粉末結晶²⁾、白色～わずかにうすい黄褐色の粉末結晶³⁾
- 13) 安定性 : 適切な条件下においては安定²⁾、光により変質するおそれあり³⁾
- 14) 溶媒に対する溶解度 : アセトニトリル；≥4,000 mg/L(22.5°C)⁶⁾、
アセトン；≥6,666 mg/L(22.5°C)⁷⁾
- 15) 試験用水に
対する溶解度 : 288 mg/L(21.3°C)⁸⁾
- 16) 取扱い時の注意点 : 換気のよい場所で使用し、適切な保護具を着用する²⁾、局所排気を使用し、強酸化剤との接触を避ける³⁾

(参考資料)

1) PubChem

- 2) 東京化成工業(株)安全データシート(2018/10/4)
- 3) 富士フィルム和光純薬(株)安全データシート (2018/8/17, 版 2)
- 4) PhysProp Database (in EPI suite v4.1)
- 5) 当試験施設確認値 (191216-1905-Y-5)
- 6) 当試験施設確認値 (191216-1905-Y-3)
- 7) 当試験施設確認値 (191216-1905-Y-4)
- 8) 当試験施設確認値 (191216-1905-Y-202-2)

1.2 供試試料

- 1) ロット番号 : 5PSKD
- 2) 純度 : 99.8 area%(HPLC)、100.1% (中和滴定)
- 3) 不純物の名称及び
含有量 : 不明
- 4) 供給者 : 東京化成工業株式会社
- 5) 入手量 : 25 g × 2 本
- 6) 入手日 : 2019 年 12 月 10 日

【付属資料-1】試験成績書、東京化成工業（株）発行日 2019 年 12 月 11 日

1.3 保管方法及び保管条件下での安定性

- 1) 保管方法 : 被験物質は、当試験施設内調製室 (GLP 対象施設) の冷蔵庫内に設置した被験物質保管容器 (冷蔵) に保管した。
- 2) 供試試料の確認 : 入手した供試試料が目的とする被験物質と同一であることを製造会社の試験成績書で確認した。
- 3) 保管条件下での
安定性の確認 : 実験開始前及び実験終了後に測定した供試試料の赤外吸収スペクトルに変化がみられなかったことから、保管条件下で安定であったと判断した。

1.4 暴露条件下での安定性

Elendt M4 培地 (3.2 試験用水参照) を試験用水として使用して、設定濃度 12.5 及び 100 mg/L の試験液を調製した。試験と同様の光条件(16 時間明／8 時間暗)と暗条件(照明の点灯なし)の 2 条件でそれぞれの濃度の試料を保管した。水温の設定は 20.0 °C とした。

試験液調製時の実測濃度は 11.9 及び 119 mg/L であった。明条件では、24 時間後でそれぞれ 11.6 及び 95.0 mg/L、48 時間後では 11.7 及び 94.7 mg/L であった。暗条件では、24 時間後でそれぞれ 11.8 及び 92.6 mg/L、48 時間後では 11.6 及び 93.5 mg/L であった。

以上の結果より、本試験物質は当試験施設で用いる試験用水(Elendt M4 培地)に溶解した場合に著しい生分解は生じず、かつ暴露試験を実施する光条件下において光分解は生じないものと考えられた。したがって、本試験の暴露方式は、暴露期間を通じて試験液を交換しない止水式を採用した。

2. 供試生物

- 1) 和名 : オオミジンコ
- 2) 学名 : *Daphnia magna*
- 3) 入手先 : 旧 環境庁国立環境研究所
(現 国立研究開発法人 国立環境研究所)
- 4) 入手日 : 1997 年 8 月 4 日
- 5) 入手後の管理 : 繙代飼育(世代更新までの飼育期間; 2~6 週間、換水頻度;
週 2 回)
- 6) 感受性試験の結果 : 基準物質 二クロム酸カリウム
暴露期間 2019 年 12 月 31 日~2020 年 1 月 2 日
48 時間 EIC50 = 0.86 mg/L 95% 信頼区間 : 0.78 - 0.96 mg/L
(当施設の規定範囲内【平均値±2 標準偏差 : 0.58~1.08
mg/L、N=25 (試験実施期間 : 2007 年 3 月~】であった)
- 7) 親の飼育期間 : 2020 年 1 月 27 日~2020 年 2 月 23 日及び、
2020 年 2 月 4 日~2020 年 2 月 23 日の 2 ロットを使用
- 8) 供試齢 : 生後 24 時間齢未満の幼体

親ミジンコの飼育条件

- 1) 飼育水 : 試験用水 (3.2 参照)
- 2) 飼育方法 : 半止水式 (週 2 回、飼育水の全量を換水)
- 3) 飼育密度 : 7 日齢まで ; 1 頭/15 mL 飼育水 (20 頭/300 mL)
7 日齢以降 ; 1 頭/40 mL 飼育水 (20 頭/800 mL)
- 4) 水温 : 20±1°C
- 5) 照明 : 室内光、16 時間明/8 時間暗 (明 ; AM6:00~PM10:00)
(飼育容器付近の照明: 9~15 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)
- 6) 餌 : 単細胞緑藻類 *Raphidocelis subcapitata* 及び *Chlorella vulgaris* (培養した藻類を遠心して回収し、純水に置換し

た)

- 7) 納餌量 : 親ミジンコ 1 頭当たり 0.1~0.2 mgC (有機炭素含量) / 日
8) 納餌日数 : 土日を除き毎日給餌し、金曜日の午後に土日分の餌料を給餌した。

3. 試験方法

3.1 試験条件

- 1) 暴露方式 : 止水式
2) 暴露期間 : 48 時間
3) 試験液量 : 50 mL/容器
4) 連数 : 4 容器/試験区
5) 供試生物数 : 20 頭/試験区 各容器に 5 頭ずつ供試
6) 試験温度 : 20±1°C
7) 照明 : 室内光、16 時間明/8 時間暗 (明 ; AM6:00~PM10:00)
(試験容器付近の光量子束密度:9~15 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)
8) 溶存酸素濃度 : 暴露期間中の溶存酸素濃度は 3 mg/L 以上とする。暴露期間中はエアレーションを行わない。
9) pH : 6.0~9.0、1.5 以内の変動とする。
10) 納餌 : 無給餌
11) 助剤の種類 : 使用しない
12) 試験液中の助剤濃度 : -

3.2 試験用水

試験用水には Elendt M4 培地を使用した。試験用水の組成を【付属資料-1】に示した。使用した試験用水の主な水質は、全硬度 245 mg/L (CaCO₃換算)、pH7.9 であった。

3.3 試験容器及び機器等

- 1) 試験容器 : 100 mL 容ガラスビーカー (ほこりの侵入や試験液の蒸散を防ぐため、ガラス製の蓋を乗せた)
2) 恒温室 : ヤマザキ・シーエー製 恒温室 (設定可能温度 : 10~30°C)
3) 電子天びん : メトラー・トレド株式会社製 電子天秤 (型式 : MS205DU)
4) 水温計 : アズワン株式会社製 デジタル温度計 (型式 : WT-200)

- 5) 溶存酸素計 : 堀場製作所製 DO メーター (型式: OM-12-02)
 6) pH 計 : 堀場製作所製 カスタニーATC pH メーター (型式: D-21)
 7) 全硬度 : 共立理化学研究所製 ドロップテスト全硬度 WAD-TH
 8) 超音波洗浄器 : アズワン製 超音波洗浄器 (型式: MUC-63)
 9) 光量子計 : LICOR 社製 ライトメーター (型式: LI-250)

測定波長の範囲: 400~700 nm

3.4 試験濃度の設定

本試験に先立ち、公比を 2 として、設定濃度 12.5、25.0、50.0 及び 100 mg/L の 4 試験濃度区で予備試験を実施した。設定濃度は KATE2017 On NET で算出された半数遊泳阻害濃度 (E_iC₅₀) = 18 mg/L を参考にした。また、本被験物質は溶解度が 100 mg/L を超えるものの、速やかに溶解しないという物理的な特性があることから、溶解度付近での試験液の調製が難しい。そのため、50%以上の遊泳阻害が得られると予想される濃度付近に複数の濃度を設定するために、公比を小さくした。

予備試験における暴露 48 時間後の観察において、12.5 mg/L 区では 10%の阻害が確認された。また、25.0 mg/L 区以上では 100%の遊泳阻害であった。E_iC₅₀ については、16.2 mg/L と算出され、KATE の予測値とほぼ同様であった。予備試験の結果は【付属資料-2】に示した。

以上の結果より、公比を 1.4 として、7.00、11.0、15.0、21.0、及び 30.0 mg/L の 5 試験濃度区とした。また、別に対照区を設けた。

3.5 試験液の調製

被験物質の純度は、99.8 area%(HPLC)、100.1% (中和滴定) であることから、純度は補正しなかった。

本被験物質の試験液を直接添加法で調製した場合、溶液上面（水面）に非常に細かい粉状の被験物質が確認され、超音波処理や激しい転倒混和を実施した場合でも未溶解の被験物質が溶液上面（水面）に浮かぶことが確認された。そのため、試験液は 20 時間以上攪拌して調製した。調製方法は【付属資料-3】に示した。

3.6 試験液の分析

1) 分析方法

試験液中の被験物質濃度は、HPLC 分析計で測定した。分析における測定条件等は、【付属資

料-4】に示した。

2) 試料の採取頻度

試料は、暴露開始時（0 時間）の新試験液及び暴露 48 時間後の旧試験液を採取した。

3.7 試験操作

試験液の水温、溶存酸素濃度及び pH を測定後、供試ミジンコを投入し、その時点を暴露開始時とした。ミジンコの投入には、先端が比較的広口のガラスピペットを用いた。飼育水の新試験液への持ち込み量は、試験容器当たり 1 mL 以内を目安とした。

暴露開始時、暴露 24 及び 48 時間後にミジンコを観察し、遊泳阻害を受けた個体数を計数した。観察の順番は、対照区、試験濃度区の順とした。遊泳阻害の判定は、下記の基準に従つた。

試験液の水質（水温・DO・pH）は、暴露開始時の新試験液及び暴露 48 時間後の旧試験液を測定した。新試験液の水質は、水質測定用の試験液を準備して測定した。

遊泳阻害の判定基準

試験容器を緩やかに動かした後、15 秒間の観察中に一度も遊泳しない場合、遊泳が阻害されたと判断した。

4. 結果の算出

各試験区におけるミジンコの遊泳阻害数と供試個体数（20頭）から遊泳阻害率（%）を算出し、濃度－遊泳阻害率のグラフを作成した。

半数遊泳阻害濃度（E_{iC50}）は、Moving average 法により算出した。

また、全てのミジンコが遊泳阻害を受けなかった最高濃度区を0%阻害最高濃度、全てのミジンコが遊泳阻害を受けた最低濃度区を100%阻害最低濃度とし、それぞれ暴露開始24及び48 時間後について記録した。

5. 結果及び考察

5.1 試験成績の信頼性に影響を及ぼしたと思われる環境要因

該当する事項はなかった。

5.2 試験液中の被験物質濃度

被験物質濃度の測定結果をTable 1 に示した。

設定濃度に対する実測濃度の割合は、暴露開始時の新試験液が97～101%、暴露48時間後の旧試験液が94～102%であった。

半数遊泳阻害濃度 (EiC50) 、0%阻害最高濃度及び100%阻害最低濃度は、暴露開始時と暴露終了時の被験物質の実測濃度の平均濃度（算術平均）に基づき示した。

5.3 半数遊泳阻害濃度 (EiC50)

各暴露時間における遊泳阻害率をTable 2 に、半数遊泳阻害濃度 (EiC50) をTable 3 、及び濃度－遊泳阻害率曲線を Figure 1 に示した。

暴露終了時の遊泳阻害率は 対照区で0%であった。また、水面に浮いたミジンコの割合はいずれにおいても 0%であり、化審法テストガイドラインで定められた試験の有効性を判断する基準(遊泳阻害率及び水面浮上個体率が10%を超えない) を満たした。

24 時間 EiC50 : >29.4 mg/L (95%信頼区間：算出不可)

48 時間 EiC50 : 13.8 mg/L (95%信頼区間：12.8 - 14.9 mg/L)

5.4 0%阻害最高濃度及び100%阻害最低濃度

0%阻害最高濃度及び100%阻害最低濃度を Table 4 及び以下に示した。

24 時間 0%阻害最高濃度 : 10.9 mg/L

48 時間 0%阻害最高濃度 : 6.69 mg/L

24 時間 100%阻害最低濃度 : >29.4 mg/L

48 時間 100%阻害最低濃度 : 29.4 mg/L

5.5 試験液の水温、溶存酸素濃度及びpH

試験液の水温をTable 5、溶存酸素濃度をTable 6-1、溶存酸素飽和度をTable 6-2 、pH をTable 7 にそれぞれ示した。

暴露期間中の試験液の水温は、19.2～20.6°Cの範囲にあった。暴露期間中の溶存酸素濃度は全ての試験区で8.7～9.2 mg/Lの範囲内にあり、溶存酸素飽和度は98.7～102.7%の範囲内であった。pHは、全ての試験区で7.8～7.9の範囲内であった。

5.6 試験結果の評価及び考察

本試験は、止水式による溶解度での試験を実施した。本被験物質は、試験液を直接添加法で調製した場合、溶液上面（水面）に非常に細かい粉状の被験物質が確認され、超音波処理や激しい転倒混和を実施した場合でも未溶解の被験物質が溶液上面（水面）に浮かぶ現象が確認された。そのため、試験液は、20時間以上攪拌して調製した。

設定濃度に対する実測濃度の割合は、暴露開始時の新試験液が97～101%、暴露48時間後の旧試験液が94～102%であった。暴露期間中、概ね一定の被験物質濃度を維持していたものと考えられた。したがって、半数致死濃度（EIC₅₀）、0%阻害最高濃度及び100%阻害最低濃度は、各実測濃度を算術平均した濃度に基づき示した。

暴露試験の結果、被験物質濃度が高くなるに従い遊泳阻害が観察され、48時間の半数遊泳阻害濃度（EIC₅₀）は13.8 mg/L、100%阻害最低濃度が29.4 mg/L、また0%阻害最高濃度は6.69 mg/Lであった。

本試験は、対照区において供試生物の遊泳阻害が観察されず、溶存酸素濃度は暴露終了時に3 mg/L以上と試験の有効性をすべて満たしており、かつ、試験成績の信頼性に影響を及ぼしたと思われる環境要因として該当するものはなかった。

以 上

Table 1 Measured Concentrations of the Test Substance in Test Solution

Nominal Concentration (mg/L)	Measured concentration* (mg/L) (Percentage of Nominal**)		Mean*** Measured Concentration (mg/L)
	0 hour New	48 hours Old	
Control	<0.022	<0.022	<0.022
7.00	6.77 (97)	6.61 (94)	6.69 (96)
11.0	11.1 (101)	10.8 (98)	10.9 (100)
15.0	15.1 (101)	15.2 (102)	15.2 (101)
21.0	20.8 (99)	21.0 (100)	20.9 (100)
30.0	29.5 (98)	29.2 (97)	29.4 (98)

*: Rounded by the number of digits of quantitation lower limit.

**: Calculated using the value before rounding, the value was expressed as an integer.

***: arithmetic mean

New: freshly prepared test solutions

Old: test solution after 48 hours exposure

Table 2 The Numbers of Immobile *Daphnia magna* (Percentage of Immobility)

Nominal Concentration (mg/L)	Mean* measured Concentration (mg/L)	Cumulative Numbers of Immobilized <i>D. magna</i> (Percentage of Immobility)			
		24 hours		48 hours	
Control	<0.022	0	(0)	0	(0)
7.00	6.69	0	(0)	0	(0)
11.0	10.9	0	(0)	2	(10)
15.0	15.2	2	(10)	15	(75)
21.0	20.9	7	(35)	18	(90)
30.0	29.4	8	(40)	20	(100)

*: arithmetic mean

Table 3 Calculated EiC50 Values

Exposure Period (hours)	EiC50 (mg/L)	95-Percent Confidence Limits (mg/L)	Statistical Method
24	>29.4	--	-
48	13.8	12.8-14.9	Moving average

Table 4 Highest Concentration causing 0% Immobility and Lowest Concentration causing 100% Immobility

Exposure Period (hours)	Highest Concentration causing 0% Immobility (mg/L)	Lowest Concentration causing 100% Immobility (mg/L)
24	10.9	>29.4
48	6.69	29.4

Table 5 Temperature (Static Condition)

Nominal Concentration (mg/L)	Mean* Measured Concentration (mg/L)	Temperature, °C	
		0 hour New	48 hours Old
Control	<0.022	19.3	20.6
7.00	6.69	19.4	20.5
11.0	10.9	19.3	20.4
15.0	15.2	19.2	20.3
21.0	20.9	19.2	20.3
30.0	29.4	19.3	20.2

*: arithmetic mean

New: freshly prepared test solutions

Old: test solution after 48 hours exposure

Table 6-1 Dissolved Oxygen Concentrations (Static Condition)

Nominal Concentration (mg/L)	Mean* Measured Concentration (mg/L)	Dissolved Oxygen Concentration, mg/L	
		0 hour New	48 hours Old
Control	<0.022	9.1	8.8
7.00	6.69	9.1	8.8
11.0	10.9	9.2	8.8
15.0	15.2	9.2	8.7
21.0	20.9	9.1	8.7
30.0	29.4	9.1	8.7

*: arithmetic mean

New: freshly prepared test solutions

Old: test solution after 48 hours exposure

Table 6-2 Percentage of Dissolved Oxygen Concentration to Its Air Saturation Value (ASV)
(Static Condition)

Nominal Concentration (mg/L)	Mean* Measured Concentration (mg/L)	Saturation Degree of Oxygen, %	
		0 hour New	48 hours Old
Control	<0.022	101.6	100.6
7.00	6.69	101.8	100.4
11.0	10.9	102.7	100.2
15.0	15.2	102.5	98.9
21.0	20.9	101.4	98.9
30.0	29.4	101.6	98.7

*: arithmetic mean

New: freshly prepared test solutions

Old: test solution after 48 hours exposure

Table 7 pH Values (Static Condition)

Nominal Concentration (mg/L)	Mean* Measured Concentration (mg/L)	pH	
		0 hour New	48 hours Old
Control	<0.022	7.9	7.9
7.00	6.69	7.9	7.9
11.0	10.9	7.8	7.9
15.0	15.2	7.8	7.9
21.0	20.9	7.8	7.9
30.0	29.4	7.8	7.8

*: arithmetic mean

New: freshly prepared test solutions

Old: test solution after 48 hours exposure

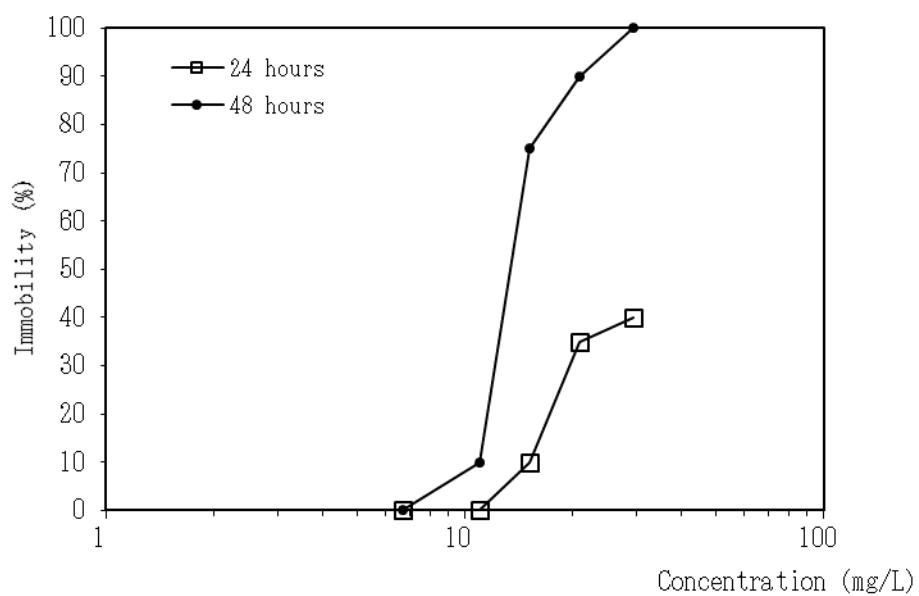


Figure 1 Concentration-Response (Immobility) Curve

Figure

付属資料-1 試験溶液の組成

Appendix Table 1 Elendt M4 medium

Substance	Amount added to water (mg)
H ₃ BO ₃	2.8595
MnCl ₂ • 4H ₂ O	0.3605
LiCl	0.306
RbCl	0.071
SrCl ₂ • 6H ₂ O	0.152
NaBr	0.016
Na ₂ MoO ₄ • 2H ₂ O	0.063
CuCl ₂ • 2H ₂ O	0.01675
ZnCl ₂	0.013
CoCl ₂ • 6H ₂ O	0.01
KI	0.00325
Na ₂ SeO ₃	0.00219
NH ₄ VO ₃	0.000575
CaCl ₂ • 2H ₂ O	293.8
MgSO ₄ • 7H ₂ O	123.3
KCl	5.8
NaHCO ₃	64.8
Na ₂ SiO ₃ • 9H ₂ O	10.0
NaNO ₃	0.274
KH ₂ PO ₄	0.143
K ₂ HPO ₄	0.184
Thiamine hydrochloride	0.075
Cyanocobalamine (B12)	0.001
Biotine	0.00075
Na ₂ EDTA • 2H ₂ O	5.0
FeSO ₄ • 7H ₂ O	1.991
Pure water	1,000 mL

付属資料-2 予備試験結果

暴露条件

- 1) 暴露方式 : 止水式
- 2) 試験濃度（設定値） : 12.5、25.0、50.0及び100 mg/Lの4試験濃度区、対照区
- 3) 試験液量 : 50 mL
- 4) 連数及び供試生物数 : 4 容器／試験区、20 頭／試験区 各容器に5頭ずつ供試
- 5) 試験温度 : 20±1°C
- 5) 照明 : 室内光、16時間明／8時間暗（明；AM6:00～PM10:00）
 (試験容器付近の光量子束密度：9～15 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)

Appendix Table2-1 The Numbers of Immobile *Daphnia magna* (Percentage of Immobility)

Nominal Concentration (mg/L)	Cumulative Numbers of Immobilized <i>D. magna</i> (Percentage of Immobility)		
	24 hours	48 hours	
Control	0	(0)	0 (0)
12.5	0	(0)	2 (10)
25.0	3	(15)	20 (100)
50.0	2	(10)	20 (100)
100	4	(20)	20 (100)

付属資料-3 試験液の調製方法

1. 濃厚液（被験物質濃度 100 mg/L、調製量 500 mL）の調製方法

- 1) 被験物質を秤量皿に 50.04 mg 秤量した。
- 2) 500 mL 容ガラス製共栓付き三角フラスコに被験物質を全量入れた。
- 3) 500 mL 容ガラス製メスシリンドラーを使用して、500 mL の試験用水を被験物質の入った三角フラスコに入れた。
- 4) 超音波洗浄器を使用して、30 分間超音波処理した。
- 5) 38 mm オクタゴン回転子をフラスコに入れ、約 23 時間強攪拌した。

2. 試験液の調製方法

調製には 300 mL 容メスフラスコを使用した。以下の表に従い、メスフラスコに濃厚液を試験濃度区ごとに加え、試験用水でメスアップした。対照区には被験物質を含まない試験用水を使用した。

付表 3-1 試験液の調製方法

試験区番号	01	02	03	04	05
試験濃度(mg/L)	7.00	11.0	15.0	21.0	30.0
濃厚液添加量(mL)	21	33	45	63	90
使用する定器具	50 mL 容 メスシリンドラー			100 mL 容 メスシリンドラー	

付属資料-4 試験液の分析方法

1. 分析方法 (HPLC 法)

- ```
(1) 試料 (試験液) の採取
↓
(2) 試料の前処理
↓
(3) HPLC 測定
```

## 2. 試料 (試験液) の採取及び前処理方法

- 1) 暴露開始時は水質測定用の試験液を試料とした。暴露終了時は、2.5 mL 容マイクロピペットで各試験容器から試験液を 2.0 mL 採取して 10 mL 容ガラス製試験管に入れ、よく混合した。
- 2) 水質測定用の試料又は試験管から、各試験区について 1 mL 容マイクロピペットで試験液を 0.75 mL 採取し、1.5 mL 容バイアルに入れた。
- 3) アセトニトリルを 1 mL 容マイクロピペットで 0.75 mL 採取し、1.5 mL 容バイアルに加えてよく混合し、分析試料とした。

分析試料は、分析直前まで冷蔵保管した。

## 3. 高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 測定条件

### (装置)

|             |   |                   |
|-------------|---|-------------------|
| 高速液体クロマトグラフ | : | Agilent HP-1200 型 |
| ワークステーション   | : | HP ケミステーション       |
| オペレーションシステム | : | Windows XP        |
| デガッサー       | : | G1322A 型          |
| 送液ポンプ       | : | G1311A 型          |
| オートサンプラー    | : | G1329A 型          |
| カラムオーブン     | : | G1316A 型          |
| 紫外線可視分光検出器  | : | G1315D 型          |

### (条件)

|         |   |                                                |
|---------|---|------------------------------------------------|
| カラム     | : | Mightysil RP-18 GP 150-4.6 (5 $\mu$ m) 関東化学(株) |
| カラムオーブン | : | 40 °C                                          |
| 溶離液     | : | CH <sub>3</sub> CN*: 水=27 : 73                 |
| 流速      | : | 0.2 mL/min                                     |
| 測定波長    | : | 270 nm                                         |

\*:富士フィルム和光純薬(株)製 HPLC 分析用

## 4. 検量線

アセトニトリル(富士フィルム和光純薬(株)製 HPLC 分析用)及び純水を等量混合した溶液(以下「調製溶液」とする)を調製した。

被験物質 10.04 mg を秤量して 100 mL 容メスフラスコに入れ、アセトニトリル(富士フィル

ム和光純薬(株)製 HPLC 分析用) でメスアップした (100 mg/L-STD)。

以下の表に従い、標準溶液を 10 mL 容ガラス製試験管に添加して 10 mL にメスアップした。

調製した標準溶液は、分析直前まで冷蔵保管した。

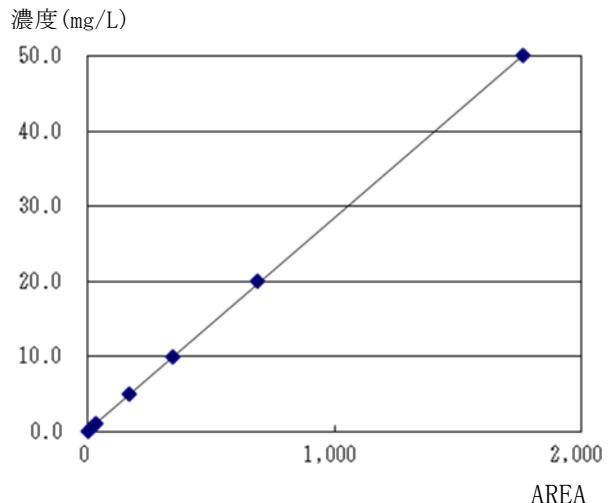
付表 4-1 標準溶液の調製方法

| 標準溶液(mg/L)         | 50  | 20 | 10      | 5  | 1 | 0.5 |
|--------------------|-----|----|---------|----|---|-----|
| 添加する STD の濃度(mg/L) | 100 | 50 | 20      | 10 | 5 | 1   |
| STD 添加量(mL)        | 5   | 4  | 5       | 5  | 2 | 5   |
| 使用する 定器具           |     |    | ホールピペット |    |   |     |
| メスアップする 溶液の種類      | 純水  |    | 調製溶液    |    |   |     |

なお、調製した標準溶液を測定して作成した検量線の  $R^2$  値は 0.9999 であり、高い直線性を示した。

付表 4-2 標準溶液の濃度及びピークエリヤ

| 濃度(mg/L) | AREA        |
|----------|-------------|
| 0        | 0.00000     |
| 0.5      | 15.40882    |
| 1        | 31.57984    |
| 5        | 167.93730   |
| 10       | 343.39941   |
| 20       | 687.40149   |
| 50       | 1,766.97095 |



付図 4-1 検量線

## 5. 装置検出下限 (IDL)

暴露試験実施前に、1.0 mg/L の標準溶液を 7 連で分析した。7 回の測定結果から標準偏差 (s) を算出し、IDL (装置検出下限値) を次式に従い算出した。また、その 3 倍値を IQL (測定定量下限値) として求めた。

$$IDL = t(n-1, 0.01) \times s$$

ここで、 $t(n-1, 0.01)$  は自由度  $n-1$  の危険率 1% (片側) の  $t$  値である『3.143』を与えた。

---

---

検出下限値 : 0.022 mg/L

---

---

定量下限値 : 0.066 mg/L