

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

丸西 悠太

最 終 報 告 書

スルファピリジンのメダカ (*Oryzias latipes*) に対する急性毒性試験

(試験番号：1905-203)

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メダカ (*Oryzias latipes*) に対する急性毒性試験

試験番号：1905-203

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メダカ (*Oryzias latipes*) に対する生長阻害試験

試験番号 : 1905-203

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 (試験原液調製時)	2020年2月25日	2020年2月25日	2020年2月25日
被験物質溶液調製時 (試験液調製時)、暴露 実験開始時	2020年2月26日	2020年2月26日	2020年2月26日
暴露実験終了時	2020年3月1日	2020年3月2日	2020年3月2日
試料分析時	2020年3月2日	2020年3月2日	2020年3月2日
最終報告書案	2020年3月18日	2020年3月18日	2020年3月19日
最終報告書	2020年3月18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

試験実施概要

1. 表題

スルファピリジンのメダカ (*Oryzias latipes*) に対する急性毒性試験

2. 試験番号

1905-203

3. 試験目的

スルファピリジンのメダカ (*Oryzias latipes*) に対する急性毒性試験を実施し、半数致死濃度を求めることを目的とする。

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  (2020年3月19日)
(所属 リスク評価部)
試験担当者 : 岡村 哲郎  (2020年3月19日)
(操作全般、化学分析、とりまとめ)
試験担当者 : 戸田 美沙  (2020年3月19日)
(暴露試験、化学分析)
試験担当者 : 戸塚 優  (2020年3月19日)
(暴露試験、化学分析)

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26日
暴露実験終了日 : 2020年3月1日
試験終了日 : 2020年3月19日

11. 記録及び試資料の保管

本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	8
1. 被験物質	10
1.1 名称、構造式及び物理化学的性状	10
1.2 供試試料	11
1.3 保管方法及び保管条件下での安定性	11
1.4 暴露条件下での安定性	11
2. 供試生物	12
3. 試験方法	13
3.1 試験条件	13
3.2 試験用水	13
3.3 試験容器及び機器等	13
3.4 試験濃度の設定	14
3.5 試験液の調製	14
3.6 試験液の分析	15
3.7 試験操作	15
4. 結果の算出	16
5. 結果及び考察	17
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	17
5.2 試験液中の被験物質濃度	17
5.3 半数致死濃度 (LC50)	17
5.4 0%死亡最高濃度及び100%死亡最低濃度	17
5.5 毒性症状等	17
5.6 試験液の水温、溶存酸素濃度及びpH	18
5.7 試験結果の評価及び考察	18
Table	19
Figure	24
付属資料-1 試験用水の水質	25
付属資料-2 予備試験結果	27
付属資料-3 試験液の調製方法	29
付属資料-4 試験液の分析方法	31

要 約

試験委託者

環境省

表題

スルファピリジンのメダカ (*Oryzias latipes*) に対する急性毒性試験

試験番号

1905-203

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、環境企発第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 | : 半止水式 (48 時間後に全試験液を換水) |
| 3) 供試生物 | : メダカ (<i>Oryzias latipes</i>) |
| 4) 暴露期間 | : 96 時間 |
| 5) 試験濃度 (設定値) | : 100 mg/L (限度試験)、及び対照区 |
| 6) 試験液量 | : 2 L/容器 |
| 7) 連数 | : 1 容器/試験区 |
| 8) 供試生物数 | : 10 尾/試験区 |
| 9) 試験温度 | : 24±1℃ |
| 10) 照明 | : 室内光、16 時間明/8 時間暗 (明 ; AM6:00~PM10:00) |
| 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

暴露開始時及び暴露48時間後の換水時に調製した試験液（新試験液）の実測濃度は設定濃度に対して97～103%、暴露48時間後及び暴露96時間後の48時間経過した試験液（旧試験液）の実測濃度は設定濃度に対して99～102%であった。試験液は、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。

半数致死濃度（LC50）、0%死亡最高濃度及び100%死亡最低濃度は、各実測濃度を算術平均した濃度に基づき示した。

2) 半数致死濃度（LC50）

96 時間半数致死濃度（LC50）： >100 mg/L（95%信頼区間：算出不可）

3) 0%死亡最高濃度及び100%死亡最低濃度

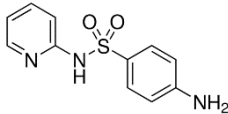
96 時間 0%死亡最高濃度： 100 mg/L

96 時間 100%死亡最低濃度： >100 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 | : Sulfapyridine ¹⁾ 、スルファピリジン ^{2), 3)} 、
2- (4-Aminobenzenesulfonamido) pyridine ²⁾ 、
2-Sulfanilamidopyridine ²⁾ 、N'-2-Pyridylsulfanilide ²⁾ |
| 3) CAS番号 | : 144-83-2 ^{2), 3)} |
| 4) 構造式 | :  |
| 5) 分子式 | : C ₁₁ H ₁₁ N ₃ O ₂ S ^{2), 3)} |
| 6) 分子量 | : 249.29 ³⁾ |
| 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℃) ⁴⁾ 、
275 mg/L (24.4℃) ⁵⁾ |
| 9) 1-オクタノール/水分配係数 | : データなし ³⁾ 、0.35 ⁴⁾ |
| 10) 融点 | : 190℃ ²⁾ 、193℃ ³⁾ 、192℃ ⁴⁾ |
| 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℃) ⁶⁾ 、
アセトン；≥6,666 mg/L (22.5℃) ⁷⁾ |
| 15) 試験用水に
対する溶解度 | : 254 mg/L (24.5℃) 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) 富士フイルム和光純薬(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-203-2)

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委託者提供資料の赤外吸収スペクトルで確認した。
- 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

脱塩素水道水 (3.2 試験用水参照) を試験用水として使用して、設定濃度 25.0 及び 250 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 24.0℃とした。

試験液調製時の実測濃度は 23.7 及び 234 mg/L であった。明条件では、24 時間後でそれぞれ 23.4 及び 239 mg/L、48 時間後では 23.2 及び 236 mg/L であった。暗条件では、24 時間後でそれぞれ 23.5 及び 237 mg/L、48 時間後では 23.4 及び 236 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(脱塩素水道水)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、48 時間後に全試験液を交換する半止水式を採用した。

2. 供試生物

- | | |
|--------------------|---|
| 1) 和名 | : メダカ (ヒメダカ) |
| 2) 学名 | : <i>Oryzias latipes</i> |
| 3) 入手先 | : 環境創造研究所内で自家繁殖 |
| 4) 全長 | : 平均 1.9 cm (1.8~2.0 cm)、N=10 |
| 5) 体重 | : 平均 0.058 g (0.048~0.065 g)、N=10 |
| 6) 感受性試験の結果 | : 基準物質 硫酸銅(Ⅱ)五水和物
暴露期間 2019 年 12 月 30 日~2020 年 1 月 3 日
LC50=0.19 mg/L (95%信頼区間: 0.14~0.24 mg/L)
(当施設の規定範囲内【平均値±2 標準偏差: 0.18~0.33 mg/L、N=27 (試験実施期間: 2005 年 4 月~)】であった) |
| 7) 供試齢 | : 孵化後 6 週齢 |
| 8) じゅん化期間 | : 2020 年 2 月 19 日~2 月 26 日
(2020 年 2 月 14 日より遊泳状況等を観察した) |
| 9) じゅん化期間中の
死亡率 | : 肉眼的に健康で異常が無いことを確認したメダカを 8 日間
じゅん化した。じゅん化期間中の死亡率は 0%であった。 |
| 10) その他 | : 卵の採取から薬浴しておらず、じゅん化期間中も薬浴は行
わなかった。 |

じゅん化条件

- | | |
|-----------|--|
| 1) 飼育水 | : 試験用水 (3.2 参照) |
| 2) 飼育方法 | : 流水式 (130 mL/分、6 回転以上/日換水) |
| 3) 飼育容器 | : 10 L 容ガラス水槽 |
| 4) 水温 | : 24±1℃ |
| 5) 溶存酸素濃度 | : 飽和溶存酸素濃度の 80%以上とする |
| 6) 照明 | : 室内光、16 時間明/8 時間暗 (明; AM6:00~PM10:00) |

- 7) 餌 : アルテミア
8) 給餌量 : 15 分で食べつくす量を 1 日 2 回 (ただし、暴露開始 24 時間前から無給餌)

3. 試験方法

3.1 試験条件

- 1) 暴露方式 : 半止水式 (48 時間後に全試験液を換水)
2) 暴露期間 : 96 時間
3) 試験液量 : 2 L/容器
4) 連数 : 1 容器/試験濃度区、1 容器/対照区
5) 供試生物数 : 10 尾/試験区
6) 収容量 : 0.29 魚体 g/L
7) 試験温度 : $24 \pm 1^{\circ}\text{C}$
8) 照明 : 室内光、16 時間明/8 時間暗 (明 ; AM6:00~PM10:00)
9) 溶存酸素濃度 : 暴露期間中の飽和溶存酸素濃度は 60%以上とする。暴露期間中はエアレーションを行わない。
10) pH : 6.0~8.5
11) 給餌 : 無給餌
12) 助剤の種類 : 使用しない
13) 試験液中の助剤濃度 : -

3.2 試験用水

試験用水には脱塩素水道水 (水道水を活性炭処理し、残留塩素等を除去した後、水温を $24 \pm 1^{\circ}\text{C}$ に調温し、十分にばっ気したもの) を使用した。暴露試験に使用した試験用水の主な水質は、全硬度 60 mg/L (CaCO_3 換算)、pH7.8 であった。試験用水の水質を定期的 (6 か月ごとに年 2 回) に測定した最新の結果を【付属資料-1】に示した。

3.3 試験容器及び機器等

- 1) 試験容器 : 5 L 容ガラス製ビーカー (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 : $10 \sim 30^{\circ}\text{C}$)

- | | |
|-----------|--|
| 3) 水温計 | : アズワン株式会社製 デジタル温度計 (型式: WT-200) |
| 4) 溶存酸素計 | : 堀場製作所製 DO メーター (型式: OM-12-02) |
| 5) pH 計 | : 堀場製作所製 カスタニーATC pH メーター (型式: D-21) |
| 6) 電子天びん | : メトラー・トレド株式会社製 電子天秤 (型式: MS205DU)
被験物質測定用 |
| 7) 電子天びん | : ザルトリウス製 電子天びん (型式: BP310S)
供試魚測定用 |
| 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 |
| 10) 全硬度 | : 共立理化学研究所製 ドロップテスト全硬度 (WAD-TH) |
| 11) 残留塩素 | : 共立理化学研究所製 パックテスト 残留塩素 (遊離)
(WAK-C10・DP) |

3.4 試験濃度の設定

KATE2017 0n NET による本被験物質の魚類への毒性を算出した結果、半数致死濃度は本被験物質の試験用水に対する溶解度を超える濃度であった。そのため、本試験に先立ち、公比 2 で 25、50、100 mg/L の 3 試験濃度区及び 250 mg/L 試験濃度区を追加して 48 時間換水の半止水式で予備試験を実施した。予備試験では、96 時間の暴露を通してすべての試験濃度区で毒性症状及び死亡個体は確認されなかった。予備試験の結果は【付属資料-2】に示した。

以上の結果より、本試験は、試験上限濃度である 100 mg/L での限度試験を実施した。別に対照区を設定した。

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

分析用の試料は、暴露開始時（0 時間）及び 48 時間後に調製した新試験液、48 時間後及び 96 時間後の旧試験液を採取した。

3.7 試験操作

試験容器内の試験液の水溫、溶存酸素濃度、pH を測定し、各試験容器に供試魚を 10 尾ずつ投入した。暴露期間中は無給餌とし、24 時間ごとに水質を測定した。

試験は、メダカを試験液の入った試験容器に投入した時点を暴露開始時とした（試験条件は 3.1 参照）。

試験液を 48 時間後に調製し、全量を換水した。供試生物は、旧試験液中での観察及び新旧の試験液の水質を測定後に、新試験液に再投入した。換水時の供試魚は、48 時間経過した旧試験液を廃液用の容器に移す際に手網で受け、新しく調製した新試験液に移した。

暴露開始時、2～3 時間後、5～6 時間後、24 時間後、30 時間後、48 時間後、54 時間後、72 時間後、78 時間後及び暴露終了時に観察された毒性の徴候及び異常を記録した。一般的に記載する症例と定義を下記に示した。

〔症状と定義〕

分類	症状	症状の定義
A: 死亡・重篤	死亡	観察可能な動き（例えば鰓蓋の動きなど）がなく、尾柄部に触れて反応がない状態。
	遊泳不能	鰓蓋のみが動いているが、遊泳等の運動が停止、又は極度の異常を示している状態。
B: 異常	遊泳異常	正常ではない遊泳行動を示す状態。以下の症状が含まれる。 <ul style="list-style-type: none"> ・ 表層遊泳（表層で遊泳。鼻上げ等を含む。） ・ 平衡失調（平衡感覚が失われており、背泳、スパイラル遊泳（鉛直方向）、コークスクリュース遊泳（水平方向）等をしている） ・ 方向不定遊泳（方向感覚がなく遊泳方向が定まらない） ・ 過活発（活動量が増加している、興奮、狂奔等） ・ 不活発（活動量が低下している） ・ 痙攣
	外見異常 （表面異常）	<ul style="list-style-type: none"> ・ 体色変化（明化・暗化） ・ 出血（内出血を含む） ・ びらん（ただれる） ・ 鰭腐れ ・ 立鱗（鱗が逆立つ） ・ 脱鱗 ・ 粘液異常（粘液過剰分泌、粘液凝固等）
	外見異常 （形態異常）	<ul style="list-style-type: none"> ・ 背曲がり ・ 骨折 ・ 眼球異常（眼球突出等）
	呼吸異常	正常ではない、鰓蓋の動きを示す状態。増加又は減少がある。
	その他	上記以外の毒性症状
C: 正常	なし	遊泳行動及び外見に異常がみられない状態。

4. 結果の算出

観察時ごとに、各試験区の死亡数と供試数（10 尾）から死亡率（％）を算出し、濃度－死亡率のグラフを作成した。

暴露 96 時間後までに死亡個体が認められなかったことから限度試験が成立し、LC50 は試験濃度区における平均実測濃度より大きい値として示した。

また、試験濃度区における平均実測濃度を 0%死亡最高濃度とし、それより大きい値として 100%死亡最低濃度を示した。

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。

暴露開始時及び暴露48時間後の換水時に調製した試験液（新試験液）の実測濃度は設定濃度に対して97～103%、暴露48時間後及び暴露96時間後の48時間経過した試験液（旧試験液）の実測濃度は設定濃度に対して99～102%であった。試験液は、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。

半数致死濃度（LC50）、0%死亡最高濃度及び100%死亡最低濃度は、暴露開始時の新試験液と暴露48時間後の旧試験液、暴露48時間後の換水時に調製した新試験液と暴露96時間後の旧試験液の各実測濃度を算術平均した濃度に基づき示した。

5.3 半数致死濃度（LC50）

各暴露時間における累積死亡個体数及び死亡率をTable 2 に、半数致死濃度（LC50）をTable 3 に、濃度－死亡率曲線をFigure 1 に示した。

暴露終了時（暴露96時間後）における対照区の累積死亡率は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（対照区の死亡率が暴露終了時に10%を超えない）を満たした。

96 時間 LC50 : >100 mg/L (95%信頼区間：算出不可)

5.4 0%死亡最高濃度及び 100%死亡最低濃度

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

96 時間 0%死亡最高濃度 : 100 mg/L

96 時間 100%死亡最低濃度 : >100 mg/L

5.5 毒性症状等

暴露期間中に観察された死亡を含む毒性症状を Table 5-1～5-3 に示した。

全試験区において、暴露期間を通して毒性症状は認められなかった。

5.6 試験液の水温、溶存酸素濃度及び pH

試験液の水温をTable 6、溶存酸素濃度をTable 7-1、溶存酸素飽和度をTable 7-2、pHをTable 8 にそれぞれ示した。

暴露期間中の試験液の水温は、対照区が24.5～24.8℃、試験濃度区が24.4～24.8℃であり、試験条件の範囲内（24±1℃）であった。暴露期間中の溶存酸素濃度は、全試験区で6.0～8.2 mg/Lであった。溶存酸素飽和度は、対照区が78.2～100.2%、試験濃度区が73.3～95.2%の範囲であった。

暴露期間中のpHは、全試験区で7.4～7.8であった。

5.7 試験結果の評価及び考察

本試験は、半止水式による試験上限濃度での限度試験を実施した。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、新試験液が97～103%、48時間後の旧試験液が99～102%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（LC50）、0%死亡最高濃度及び100%死亡最低濃度は、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、試験上限濃度において死亡個体が認められなかったことから、LC50及び100%死亡最低濃度は >100 mg/L（試験液濃度を超える濃度）、0%死亡最高濃度は、100 mg/Lとした。

本試験は、対照区の死亡率が0%であり、溶存酸素濃度も60%以上を維持されたことから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		48 hours			96 hours
	New	Old	New	Old		
Control	<0.022	<0.022	<0.022	<0.022	<0.022	
100	97.1	102	103	99.0	100	
	(97)	(102)	(103)	(99)	(100)	

*: 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 solutions after 48 hours exposure

Table 2 The Numbers of Dead Fish (Mortality)

Nominal Concentration (mg/L)	Mean* Measured Concentration (mg/L)	Cumulative Numbers of Dead Fish (Cumulative Mortality)			
		24 hours	48 hours	72 hours	96 hours
Control	<0.022	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
100	100	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)

*: arithmetic mean

Table 3 Calculated LC50 Values

Exposure Period (hours)	LC50 (mg/L)	95-Percent Confidence Limits (mg/L)	Statistical Method
24	>100	--	--
48	>100	--	--
72	>100	--	--
96	>100	--	--

Table 4 The Highest Concentration Causing 0% Mortality and the Lowest Concentration Causing 100% Mortality

Exposure Period (hours)	Highest Concentration Causing 0% Mortality (mg/L)	Lowest Concentration Causing 100% Mortality (mg/L)
24	100	>100
48	100	>100
72	100	>100
96	100	>100

Table 5-1 Observed Toxicological Symptoms

Nominal Concentration (mg/L)	Mean* Measured Concentration (mg/L)	Toxicological Symptoms	0hour	2.5hours	6hours
Control	<0.022	Death (cumulative)	0	0	0
		Critical	0	0	0
		Abnormal	0	0	0
		Normal	10	10	10
100	100	Death (cumulative)	0	0	0
		Critical	0	0	0
		Abnormal	0	0	0
		Normal	10	10	10

*: arithmetic mean

Table 5-2 Observed Toxicological Symptoms

Nominal Concentration (mg/L)	Mean* Measured Concentration (mg/L)	Toxicological Symptoms	24hours	30hours	48hours
Control	<0.022	Death (cumulative)	0	0	0
		Critical	0	0	0
		Abnormal	0	0	0
		Normal	10	10	10
100	100	Death (cumulative)	0	0	0
		Critical	0	0	0
		Abnormal	0	0	0
		Normal	10	10	10

*: arithmetic mean

Table 5-3 Observed Toxicological Symptoms

Nominal Concentration (mg/L)	Mean* Measured Concentration (mg/L)	Toxicological Symptoms	54hours	72hours	96hours
Control	<0.022	Death (cumulative)	0	0	0
		Critical	0	0	0
		Abnormal	0	0	0
		Normal	10	10	10
100	100	Death (cumulative)	0	0	0
		Critical	0	0	0
		Abnormal	0	0	0
		Normal	10	10	10

*: arithmetic mean

Table 6 Temperature (Semi-static Condition)

Nominal Conc. (mg/L)	Mean* Measured Conc. (mg/L)	Temperature (°C)					
		0 hour	24 hours	48 hours		72 hours	96 hours
		New	Old	Old	New	Old	Old
Control	<0.022	24.8	24.5	24.5	24.5	24.5	24.7
100	100	24.8	24.5	24.5	24.4	24.5	24.6

*: arithmetic mean

New: freshly prepared test solutions

Old: test solutions after 48 hours exposure

Table 7-1 Dissolved Oxygen Concentrations (Semi-static Condition)

Nominal Conc. (mg/L)	Mean* Measured Conc. (mg/L)	Dissolved Oxygen Concentration (mg/L)					
		0 hour	24 hours	48 hours		72 hours	96 hours
		New	Old	Old	New	Old	Old
Control	<0.022	8.1	6.8	6.4	8.2	7.2	7.0
100	100	7.7	6.0	6.1	7.8	6.8	6.0

*: arithmetic mean

New: freshly prepared test solutions

Old: test solutions after 48 hours exposure

Table 7-2 Percentage of Dissolved Oxygen Concentration to Its Air Saturation Value (ASV) (Semi-static Condition)

Nominal Conc. (mg/L)	Mean*	Saturation Degree of Oxygen (%)					
	Measured						
	Conc. (mg/L)	0 hour New	24 hours Old	48 hours Old	72 hours New	96 hours Old	
Control	<0.022	99.5	83.1	78.2	100.2	88.0	85.9
100	100	94.6	73.3	74.6	95.2	83.1	73.5

*: arithmetic mean

New: freshly prepared test solutions

Old: test solutions after 48 hours exposure

Table 8 pH values (Semi-static Condition)

Nominal Conc. (mg/L)	Mean*	pH					
	Measured						
	Conc. (mg/L)	0 hour New	24 hours Old	48 hours Old	72 hours New	96 hours Old	
Control	<0.022	7.8	7.6	7.7	7.8	7.6	7.6
100	100	7.7	7.5	7.5	7.6	7.6	7.4

*: arithmetic mean

New: freshly prepared test solutions

Old: test solutions after 48 hours exposure

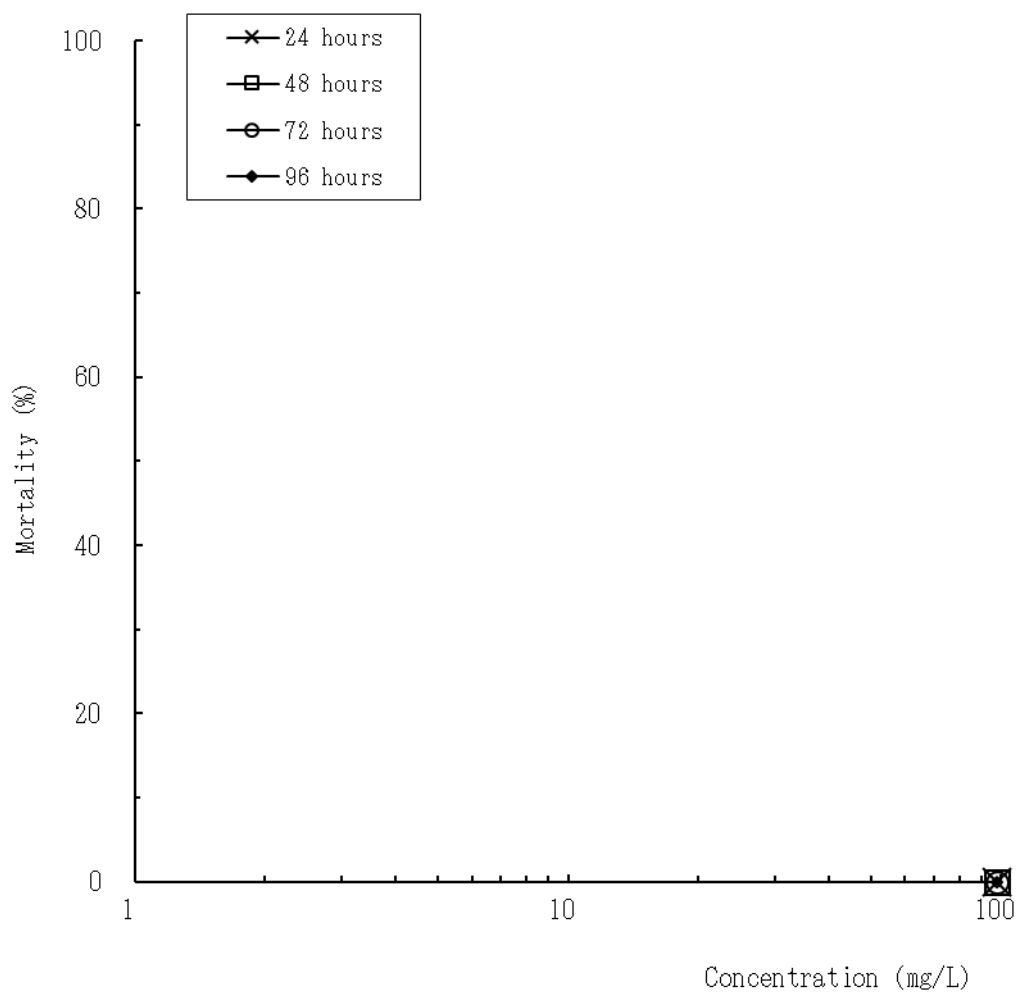


Figure 1 Concentration-Mortality Curve

付属資料-1 試験用水の水質

Appendix Table 1 Water Quality of Dilution Water

Items	Concentration	Items	Concentration
pH	6.9 (23.0 ° C)	Thiuram	<0.0006 mg/L
Electric conductivity	17.0 mS/m	Simazine	<0.0001 mg/L
Free chlorine	<0.01 mg/L	Thiobencarb	<0.0001 mg/L
Beryllium	<0.00001 mg/L	Fluorine	<0.04 mg/L
Aluminium	<0.005 mg/L	Sodium	7.4 mg/L
Vanadium	0.0002 mg/L	Potassium	0.9 mg/L
Chromium	<0.0001 mg/L	Calcium	20 mg/L
Iron	<0.003 mg/L	Magnesium	2.2 mg/L
Manganese	<0.0002 mg/L	Bromide	<0.1 mg/L
Nickel	<0.0001 mg/L	1,2-Dichloropropane	<0.0002 mg/L
Copper	<0.0001 mg/L	Isoxathion	<0.0001 mg/L
Zinc	<0.0006 mg/L	Diazinon	<0.0001 mg/L
Arsenic	0.0002 mg/L	Propyzamide	<0.0001 mg/L
Selenium	0.0003 mg/L	Fenitrothion	<0.0001 mg/L
Molybdenum	0.0005 mg/L	Isoprothiolane	<0.0001 mg/L
Cadmium	<0.00001 mg/L	Oxine-copper	<0.001 mg/L
Tin	<0.0001 mg/L	Chlorothalonil	<0.0001 mg/L
Antimony	<0.0001 mg/L	E P N	<0.0001 mg/L
Lead	<0.0001 mg/L	Dichlorvos	<0.0001 mg/L
CODMn	<0.5 mg/L	Fenobucarb	<0.0001 mg/L
Sulfide	<0.1 mg/L	Iprobenfos	<0.0001 mg/L
TOC	<0.1 mg/L	Cholornitrofen	<0.0001 mg/L
Evaporated residue	110 mg/L	Alkalinity	32 mgCaCO ₃ /L
Total ammonium	<0.01 mg/L	Total hardness (as CaCO ₃)	60 mg/L
T-P	0.005 mg/L		
Cyanide	<0.01 mg/L	Date of measurement:	November 21, 2019
Total mercury	<0.0005 mg/L		
PCB	<0.0005 mg/L		

付属資料-2 予備試験結果

暴露条件

- 1) 暴露方式 : 半止水式 (48 時間後に全量を換水)
- 2) 暴露期間 : 96 時間
- 3) 試験濃度 (設定値) : 25.0、50.0、100 及び 250 mg/L の 4 試験濃度区、対照区
- 4) 試験液量 : 1.5 L/容器
- 5) 連数 : 1 容器/試験区
- 6) 供試生物数 : 5 尾/試験区
- 7) 試験温度 : 24±1℃
- 8) 照明 : 室内光、16 時間明/8 時間暗 (明 ; AM6:00~PM10:00)

Appendix Table 2-1 The Numbers of Dead Fish (Mortality)

Nominal Concentration (mg/L)	Cumulative Numbers of Dead Fish (Cumulative Mortality)							
	24 hours		48 hours		72 hours		96 hours	
Control	0	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)
25.0	0	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)
50.0	0	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)
100	0	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)
250	0	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)

付属資料-3 試験液の調製方法

1. 試験液（被験物質濃度 100 mg/L、調製量 1.0 L×2 本）の調製方法

- 1) 被験物質を秤量皿に 100 mg（2 回の調製時とも 1 本目：100.0 mg、2 本目：100.0 mg）秤量した。
- 2) 1 L 容ガラス製栓付き三角フラスコに被験物質を全量入れた。
- 3) 1 L 容ガラス製メスシリンダーを使用して、1.0 L 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、20 時間以上（2 回の調製時とも約 23 時間）強撹拌した。

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）の調製方法

- 1) 事前に、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。
- 2) 5 mL 容ホールピペットで試験容器から試験液を採取して 10 mL 容ガラス製試験管に入れた。
- 3) アセトニトリルで 10 mL にメスアップした。
- 4) 1 mL 容マイクロピペットで、希釈した試験液を 0.75 mL 採取し、1.5 mL 容バイアルに入れた。
- 5) 調製溶液を 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。
- 6) 対照区については、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、アセトニトリルを等量加えてよく混合し、分析試料とした。
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 μm) 関東化学(株)
カラムオーブン	: 40 °C
溶離液	: CH ₃ 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。

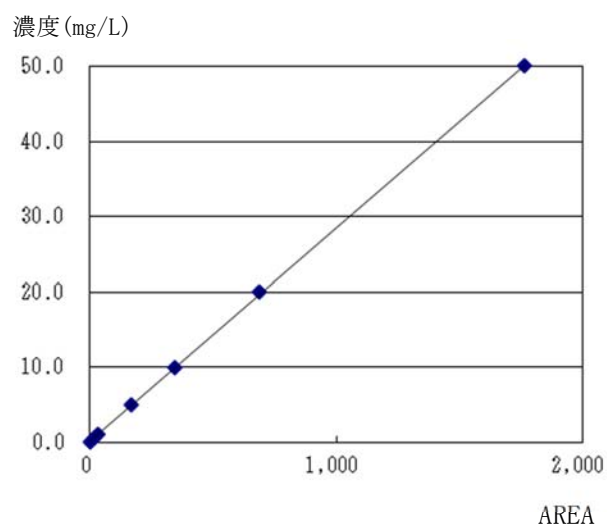
付表 4-1 標準溶液の調製方法

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 定容器具	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 0.9999～1.0000 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ア

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	1766.97095



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