

1. 魚類急性毒性試験

要 約

試験委託者： 環境省

表題： チアムリンのメダカ (*Oryzias latipes*) に対する急性毒性試験

試験番号： A191112

試験方法： 本試験は、「新規化学物質等に係る試験の方法について＜藻類生長阻害試験，ミジンコ急性遊泳阻害試験及び魚類急性毒性試験＞」（平成23年3月31日 薬食発0331第7号，平成23・03・29製局第5号，環境企発第110331009号，最終改正：令和元年7月1日）に準拠して実施した。
本試験では被験物質としてフマル酸チアムリン（CAS 番号 55297-96-6）を用いたが，記載する被験物質濃度は，全てチアムリン（CAS 番号 55297-95-5）に換算した濃度とした。

- 1) 供試生物： メダカ (*Oryzias latipes*)
- 2) 試験用水： 脱塩素水道水
- 3) 暴露期間： 96 時間
- 4) 暴露方式： 半止水式（48 時間後に試験液の全量を交換）
- 5) 供試魚数： 10 尾／試験区
- 6) 水温： 24±1℃
- 7) 照明： 室内光，16 時間明（1000 lux 以下）／8 時間暗
- 8) 試験濃度：

試験区	設定濃度 (mg/L)
対照区	—
濃度区 1	2.0
濃度区 2	4.5
濃度区 3	10
濃度区 4	22
濃度区 5	50

公比：2.24

- 9) 分析方法： 高速液体クロマトグラフ質量分析 (LC/MS) 法

結果： 以下の結果は，被験物質濃度の測定値の時間加重平均値を用いて算出した。

96 時間半数致死濃度 (LC50) : 12.0 mg/L (95%信頼区間 4.20 ~ 22.1 mg/L)

1 材料

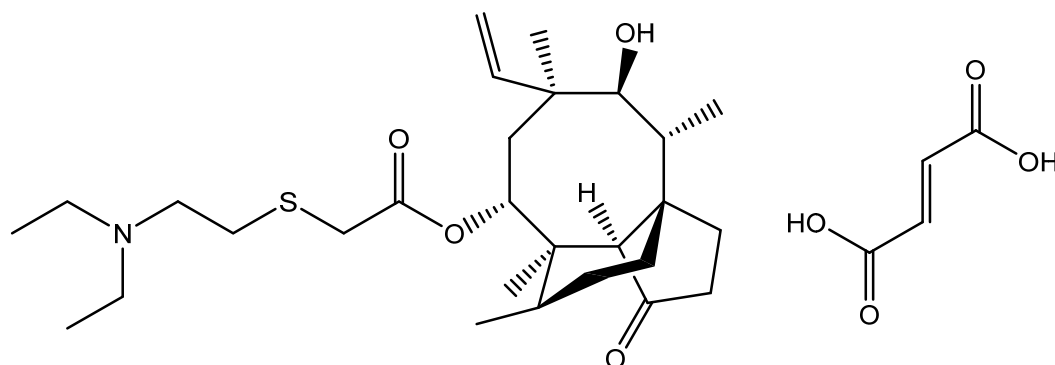
1.1 被験物質

1.1.1 名称、構造式および物理化学的性状

名称^{*1}: フマル酸チアムリン

CAS 番号^{*1}: 55297-96-6

構造式:



分子式^{*1*2}: $C_{32}H_{51}NO_8S$ (チアムリンとして「 $C_{28}H_{47}NO_4S$ 」)

分子量^{*1*2}: 609.81 (チアムリンとして「493.74」)

換算係数^{*2}: 0.810 (フマル酸チアムリンおよびチアムリンの分子量より算出した。

被験物質秤量値はフマル酸チアムリンとしての値を用いる。)

*1: 供給者提供資料

*2: 株式会社L S I メディエンスにて確認, 計算

1.1.2 供試試料

純度^{*1}: 99%

ロット番号^{*1}: KCM9905

供給者: 富士フィルム和光純薬株式会社

外観^{*1}: ほとんど白色の粉末

*1: 供給者提供資料

1.1.3 保管法および安定性の確認

試験期間中、被験物質を下記のとおり保管した。

保管条件: 室温, 暗所, 気密

保管場所: 試験物質保管用デシケータ

実験終了後に、被験物質の赤外吸収スペクトルを測定した。得られたスペクトルは試験前に測定したスペクトルと一致したことから、被験物質が保管条件下で安定であったと判断した。赤外

吸収スペクトルを付属資料－1 に示す。

(装置) フーリエ変換赤外分光分析装置：

サーモフィッシャーサイエンティフィック製 Nicolet iS10 型

1.2 試験用水

横浜市水道水を活性炭ろ過およびチオ硫酸ナトリウム添加により脱塩素処理した水（脱塩素水道水）を使用した。定期的（約 6 ヶ月毎）に株式会社 MC エバテックに依頼して水質を測定し、試験用水として適切な水質（全硬度：10～250 mg CaCO₃/L, pH：6.7～8.5）であることを確認している。最新の測定結果を付属資料－2 に示す。全硬度は 50 mg CaCO₃/L, pH は 7.7 であり、適正範囲内であった。

1.3 供試生物

- 1) 一般名： メダカ
- 2) 学名： *Oryzias latipes*
- 3) 入手先： 自家繁殖
- 4) 採卵開始日： 2019 年 12 月 5 日
- 5) ロット番号： 19-M-1205B
- 6) 大きさ： 全長： 推奨全長：2.3±1.2 cm
 実測値： 平均値 2.00 cm (1.86～2.20 cm) , n=10
 体重： 実測値： 平均値 0.059 g (0.045～0.078 g) , n=10
 (暴露終了時の対照区の生存魚について全長および体重を測定)
- 7) 年齢： 孵化後半年以内
- 8) 飼育条件：
 - 飼育水： 脱塩素水道水
 - 飼育方式： 流水式（供試魚 1 g あたり 1 L／日 以上）
 - 水温： 24±1℃
 - 溶存酸素濃度： 飽和酸素濃度の 80%以上
 - 照明： 室内光, 16 時間明（1000 lux 以下）／8 時間暗
 - 餌の種類： テトラ社製 テトラミン
 - 給餌量： 魚体重の約 2%／日（暴露開始の 24 時間前からは無給餌）

1.4 試験容器および恒温槽等

- 1) 試験容器： 5 L ガラス製水槽（蓋：透明塩ビ板）

- 2) 恒温槽： 塩ビ製水槽
- 3) 恒温循環器： タイテック製 クールユニット CL-80R 型
- 4) 温度計： 横河メータ&インスツルメンツ製 TX1001 型
- 5) マルチ水質計（溶存酸素濃度，pH 測定用）： 東亜ディーケーケー製 MM-60R 型
- 6) 電子天秤： メトラー製 AG204 型
メトラー製 AB204-S 型
メトラー製 PB3002 型
メトラー製 AB204 型
メトラー・トレド製 MS3002S 型

2 方法

2.1 試験方法

本試験は、「新規化学物質等に係る試験の方法について＜藻類生長阻害試験，ミジンコ急性遊泳阻害試験及び魚類急性毒性試験＞」（平成 23 年 3 月 31 日 薬食発 0331 第 7 号，平成 23・03・29 製局第 5 号，環保企発第 110331009 号，最終改正：令和元年 7 月 1 日）に準拠して実施した。

本試験では被験物質としてフマル酸チアムリン（CAS 番号 55297-96-6）を用いたが，記載する被験物質濃度は，全てチアムリン（CAS 番号 55297-95-5）に換算した濃度とした。

2.1.1 試験条件

- 1) 暴露期間： 96 時間
- 2) 暴露方式： 半止水式（48 時間後に試験液の全量を交換）
- 3) 試験液量： 5.0 L／容器（ここから水質測定用および分析用サンプルを採取，供試魚 1 g あたり 1 L 以上を確保）
- 4) 連数： 1 容器／試験区
- 5) 供試魚数： 10 尾／試験区
- 6) 水温： 24±1℃
- 7) 溶存酸素濃度：飽和酸素濃度の 60%以上（エアレーション無し）
- 8) pH： 調整無し
- 9) 照明： 室内光，16 時間明（1000 lux 以下）／8 時間暗
- 10) 給餌： 無給餌

2.1.2 予備試験結果

試験濃度を試験ガイドライン上限濃度（100 mg/L）以下とし，予備試験を実施した。結果を以下に示す。また，試験用水に対する被験物質の溶解性について評価した結果を付属資料－3 に示す。

予備試験結果

設定濃度 (mg/L)	96 時間の死亡率(%)	生存魚の異常
1.0	0	無
10	40	無
100	100	--

2.1.3 試験濃度の設定

2.1.2 に示した予備試験の結果に基づき，試験濃度を次のように決定した。

試験区	設定濃度 (mg/L)
対照区	—
濃度区 1	2.0
濃度区 2	4.5
濃度区 3	10
濃度区 4	22
濃度区 5	50

公比：2.24

2.1.4 試験液の調製

試験液は付属資料－4 に示す方法に従って調製した。

2.1.5 試験液の分析

調製時の試験液と換水直前（または暴露終了時）の試験液を 1 セットとし，全セットについて分析を行った。各試験区より試験液を採取し，高速液体クロマトグラフ質量分析（LC/MS）法により分析を行なった。詳細を付属資料－5 に示す。

2.1.6 試験操作

調製した試験液にじゅん化した供試魚を無作為に投入し，暴露を開始した。換水は，新しく調製した試験液に魚を移すことにより行った。下記の項目について測定，観察を行った。

1) 試験液の水質測定および外観観察

試験液の水温，溶存酸素濃度，pH の測定および外観の観察を毎日行った。換水がある場合は，換水直前の試験液と調製時の試験液について，ともに測定，観察を行った。

2) 魚の観察

暴露 24, 48, 72 および 96 時間に魚の様子を観察した。死亡魚を発見した場合は、水質の悪化が起こらないよう速やかに取り除いた。

症状の分類と定義

死亡 (D) : 観察可能な動き (例えば, 鰓蓋の動き等) がなく, 尾柄部に触れて反応がない状態

重篤 (C) :

遊泳不能 : 鰓蓋のみが動いているが, 遊泳等の運動が停止, または極度の異常を示している状態

異常 (A) :

遊泳異常 (AS) : 正常ではない遊泳行動を示す状態 — 不活発, 過活発, 表層遊泳, 平衡失調, 方向不定遊泳, 痙攣等

呼吸異常 (AR) : 正常ではない鰓蓋の動きを示す状態 — 増加, 減少, 不規則等

外見異常 (AA) : 正常ではない外見を示す状態 — 体色明化, 体色暗化, 出血, びらん, 粘液異常, 立鱗, 脱鱗, 鰭欠損, 背曲がり, 眼球異常等

正常 (N) : 遊泳行動, 外見等に異常が見られない状態

2.2 試験結果の評価

2.2.1 結果の算出

1) 結果の算出に用いる被験物質濃度

測定値の時間加重平均値を用いて結果を算出した。時間加重平均値の計算方法は以下の通りである。

$$Area = \frac{ConcA_n - ConcB_n}{\ln(ConcA_n) - \ln(ConcB_n)} \times Hours$$

$$\overline{MC} = \frac{Total\ Areas}{Total\ Hours}$$

$ConcA_n$: n 期間の初めの測定値 (試験液調製時)

$ConcB_n$: n 期間の終わりの測定値 (換水直前または暴露終了時)

($ConcA_n$ と $ConcB_n$ の値が同じ場合は, $Area = ConcA_n \times Hours$ とする。)

$\overline{MC}$: 時間加重平均値

2) 半数致死濃度 (LC50) の算出

暴露期間中に供試魚の 50%が死亡する被験物質濃度を半数致死濃度 (LC50) とする。各試験区の死亡率から以下の方法により、暴露 24, 48, 72 および 96 時間における LC50 を決定した。

最高濃度区 における死亡率	LC50 の決定方法
$\geq 50\%$	Probit 法, Moving average 法, Binomial 法での算出結果から適切と判断されたものを採用。可能な限り 95%信頼区間を算出。 データ処理プログラム : TOXDAT3_02*
$< 50\%$	推定される濃度領域とする。

* : EPA/600/4-85/013 March 1985

3) 統計学的手法

試験結果の算出に用いた統計学的手法は、結果とともに示した。

2.2.2 試験の有効性

以下の条件から、本試験の有効性を判断した。

- 1) 対照区の死亡率が暴露終了時に 10%を超えないこと
- 2) 溶存酸素濃度が暴露期間中少なくとも飽和酸素濃度の 60%以上を維持していること

3 結果および考察

3.1 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

該当する事象はなかった。

3.2 試験液の水質および外観

試験液の水温を Table 1, 溶存酸素濃度を Table 2, pH を Table 3, 外観を Table 4 に示す。

水温は 23.5～24.5℃, 溶存酸素濃度は 6.3～8.7 mg/L, pH は 6.9～7.8 であった。外観は全ての試験区で無色であり, けん濁物質, 浮遊物質および沈殿物質はみられなかった。

3.3 試験液中の被験物質濃度

試験液中の被験物質濃度の分析結果を Table 5 に, 代表的な測定結果を付属資料-5 に示す。

濃度区 1～5 の測定値の時間加重平均値はそれぞれ 1.80, 4.20, 9.03, 22.1, 49.4 mg/L であり, ほぼ設定値通りの濃度であった。

3.4 供試魚の観察

暴露 24, 48, 72 および 96 時間における供試魚の観察結果を Table 6 に, 濃度-死亡率曲線を Figure 1 に示す。

暴露 96 時間における死亡率は, 対照区で 0%, 濃度区 1～5 でそれぞれ 0, 0, 20, 100, 100% であった。

3.5 半数致死濃度 (LC50)

暴露 24, 48, 72 および 96 時間における LC50 を Table 7 に, 暴露 96 時間における LC50 を以下に, その算出結果を付属資料-6 に示す。

96 時間 LC50 : 12.0 mg/L (95%信頼区間 4.20 ～ 22.1 mg/L, Binomial 法)

3.6 試験の有効性

「3.2 試験液の水質および外観」および「3.4 供試魚の観察」の結果が試験の有効性の条件を全て満たしたため, 試験は有効であると判断した。

以 上

Table 1 Temperatures of Test Solutions

Test group	Temperature (°C)					
	0 hr New	24 hr	48 hr		72 hr	96 hr Old
			Old	New		
Control	24.5	23.9	23.8	23.7	23.7	23.9
Conc.1	24.1	23.6	23.7	23.7	23.7	23.9
Conc.2	24.1	23.6	23.7	23.8	23.7	23.9
Conc.3	24.1	23.6	23.7	23.7	23.7	23.8
Conc.4	24.2	23.6	23.5	--	--	--
Conc.5	24.3	23.6	23.5	--	--	--

Minimum: 23.5

Maximum: 24.5

New: New test solution freshly prepared

Old: Old test solution immediately prior to renewal or at the end of exposure

--: Not measured because all fish were dead.

Table 2 Dissolved Oxygen Concentrations in Test Solutions

Test group	Dissolved oxygen concentration (mg/L)					
	0 hr New	24 hr	48 hr		72 hr	96 hr Old
			Old	New		
Control	7.9	7.7	6.9	8.4	7.2	7.0
Conc.1	8.2	7.7	7.0	8.5	7.2	7.2
Conc.2	8.3	7.6	6.8	8.4	7.0	7.0
Conc.3	8.3	7.7	7.0	8.5	7.2	6.8
Conc.4	8.4	8.4	6.3	--	--	--
Conc.5	8.1	8.7	8.3	--	--	--

Minimum: 6.3

Maximum: 8.7

New: New test solution freshly prepared

Old: Old test solution immediately prior to renewal or at the end of exposure

--: Not measured because all fish were dead.

Table 3 pH Values of Test Solutions

Test group	pH					
	0 hr	24 hr	48 hr		72 hr	96 hr
	New		Old	New		Old
Control	7.2	7.0	7.2	7.7	7.3	6.9
Conc.1	7.3	7.1	7.3	7.7	7.3	7.1
Conc.2	7.4	7.1	7.3	7.8	7.3	7.1
Conc.3	7.4	7.2	7.4	7.8	7.4	7.2
Conc.4	7.3	7.3	7.4	--	--	--
Conc.5	7.1	7.4	7.7	--	--	--

Minimum: 6.9

Maximum: 7.8

New: New test solution freshly prepared

Old: Old test solution immediately prior to renewal or at the end of exposure

--: Not measured because all fish were dead.

Table 4 Appearances of Test Solutions

Test group	Appearance					
	0 hr	24 hr	48 hr		72 hr	96 hr
	New		Old	New		Old
Control	C-, S-, F-, P-	C-, S-, F-, P-	C-, S-, F-, P-	C-, S-, F-, P-	C-, S-, F-, P-	C-, S-, F-, P-
Conc.1	C-, S-, F-, P-	C-, S-, F-, P-	C-, S-, F-, P-	C-, S-, F-, P-	C-, S-, F-, P-	C-, S-, F-, P-
Conc.2	C-, S-, F-, P-	C-, S-, F-, P-	C-, S-, F-, P-	C-, S-, F-, P-	C-, S-, F-, P-	C-, S-, F-, P-
Conc.3	C-, S-, F-, P-	C-, S-, F-, P-	C-, S-, F-, P-	C-, S-, F-, P-	C-, S-, F-, P-	C-, S-, F-, P-
Conc.4	C-, S-, F-, P-	C-, S-, F-, P-	C-, S-, F-, P-	--	--	--
Conc.5	C-, S-, F-, P-	C-, S-, F-, P-	C-, S-, F-, P-	--	--	--

New: New test solution freshly prepared

Old: Old test solution immediately prior to renewal or at the end of exposure

--: Not observed because all fish were dead.

Color

C- : Colorless

Suspended solids

S- : Not observed (transparent)

Floating solids

F- : Not observed

Precipitation

P- : Not observed

Table 5 Measured Concentrations of the Test Substance in Test Solutions

Test Group	Nominal conc. (mg/L)	Measured concentration (mg/L) (Percent of Nominal, %)						
		0 hr New		48 hr Old	48 hr New		96 hr Old	Mean
Control		<0.005		<0.005	<0.005		<0.005	
Conc.1	2.0	2.32 (116)	→ 1.89 (95)	1.40 (70)		→ 1.59 (80)	1.80 (90)	
Conc.2	4.5	5.02 (112)	→ 4.36 (97)	3.62 (80)		→ 3.82 (85)	4.20 (93)	
Conc.3	10	10.5 (105)	→ 8.81 (88)	8.87 (89)		→ 8.00 (80)	9.03 (90)	
Conc.4	22	23.0 (105)	→ 21.2 (96)	-- --		→ -- --	22.1 (100)	
Conc.5	50	44.4 (89)	→ 54.7 (109)	-- --		→ -- --	49.4 (99)	

Lower limit of quantification: 0.005 mg/L

New: New test solution freshly prepared

Old: Old test solution immediately prior to renewal or at the end of exposure

Mean: Time-weighted mean

--: Not measured because all fish were dead.

Table 6 Observation of Fish

Control

Symptoms	24 hr		48 hr		72 hr		96 hr	
	N	Detail	N	Detail	N	Detail	N	Detail
Death (cumulative)	0		0		0		0	
Critical	0	--	0	--	0	--	0	--
Abnormal	0	--	0	--	0	--	0	--
Normal	10		10		10		10	
Total	10		10		10		10	

Conc.1 Nominal concentration: 2.0 mg/L
 Mean measured concentration: 1.80 mg/L

Symptoms	24 hr		48 hr		72 hr		96 hr	
	N	Detail	N	Detail	N	Detail	N	Detail
Death (cumulative)	0		0		0		0	
Critical	0	--	0	--	0	--	0	--
Abnormal	0	--	0	--	0	--	0	--
Normal	10		10		10		10	
Total	10		10		10		10	

Conc.2 Nominal concentration: 4.5 mg/L
 Mean measured concentration: 4.20 mg/L

Symptoms	24 hr		48 hr		72 hr		96 hr	
	N	Detail	N	Detail	N	Detail	N	Detail
Death (cumulative)	0		0		0		0	
Critical	0	--	0	--	0	--	0	--
Abnormal	0	--	0	--	0	--	0	--
Normal	10		10		10		10	
Total	10		10		10		10	

N: Number of fish showing corresponding symptoms

Table 6 Observation of Fish (Continued)

Conc.3 Nominal concentration: 10 mg/L
 Mean measured concentration: 9.03 mg/L

Symptoms	24 hr		48 hr		72 hr		96 hr	
	N	Detail	N	Detail	N	Detail	N	Detail
Death (cumulative)	0		1		2		2	
Critical	1	IS 1	0	--	0	--	0	--
Abnormal	0	--	1	AS(IA) 1	0	--	0	--
Normal	9		8		8		8	
Total	10		10		10		10	

Conc.4 Nominal concentration: 22 mg/L
 Mean measured concentration: 22.1 mg/L

Symptoms	24 hr		48 hr		72 hr		96 hr	
	N	Detail	N	Detail	N	Detail	N	Detail
Death (cumulative)	10		10		10		10	
Critical	0	--	0	--	0	--	0	--
Abnormal	0	--	0	--	0	--	0	--
Normal	0		0		0		0	
Total	10		10		10		10	

Conc.5 Nominal concentration: 50 mg/L
 Mean measured concentration: 49.4 mg/L

Symptoms	24 hr		48 hr		72 hr		96 hr	
	N	Detail	N	Detail	N	Detail	N	Detail
Death (cumulative)	10		10		10		10	
Critical	0	--	0	--	0	--	0	--
Abnormal	0	--	0	--	0	--	0	--
Normal	0		0		0		0	
Total	10		10		10		10	

N: Number of fish showing corresponding symptoms

IS: Impossible to swim

AS: Abnormal swimming

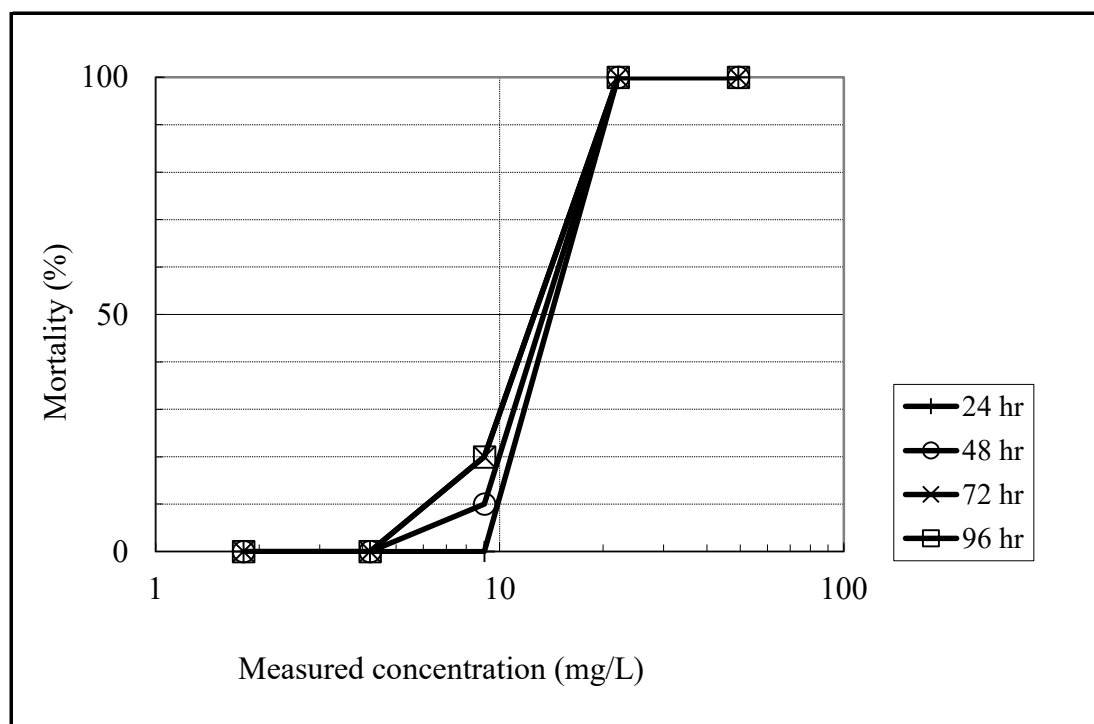
IA: Inactive

Table 7 Median Lethal Concentrations (LC50)

Exposure period (hr)	LC50 (mg/L)	95-Percent confidence limits (mg/L)	Statistical method
24	14.1 *	9.03 - 22.1	Binomial
48	12.9 *	9.03 - 22.1	Binomial
72	12.0 *	4.20 - 22.1	Binomial
96	12.0 *	4.20 - 22.1	Binomial

*: Using the data of Conc.1 – 5

Figure 1 Concentration-Mortality Curve



付属資料－1

赤外吸収スペクトル

Figure A-1-1 Infrared Absorption Spectrum of the Test Substance before the Study

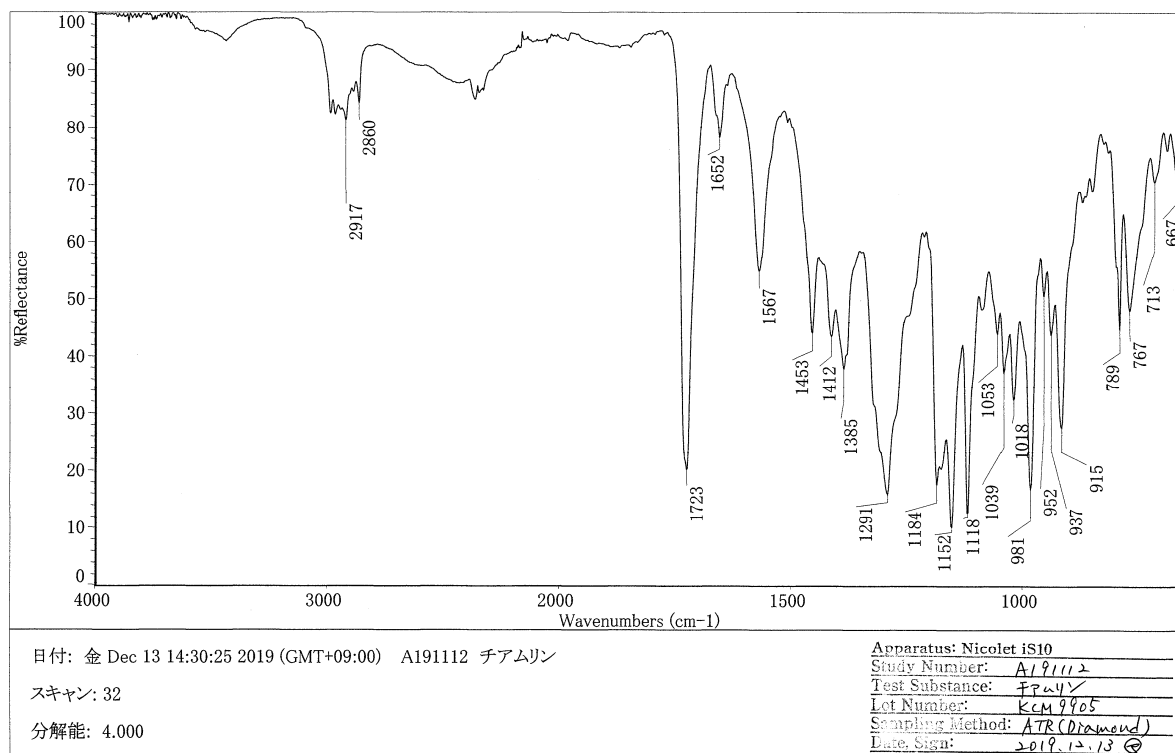
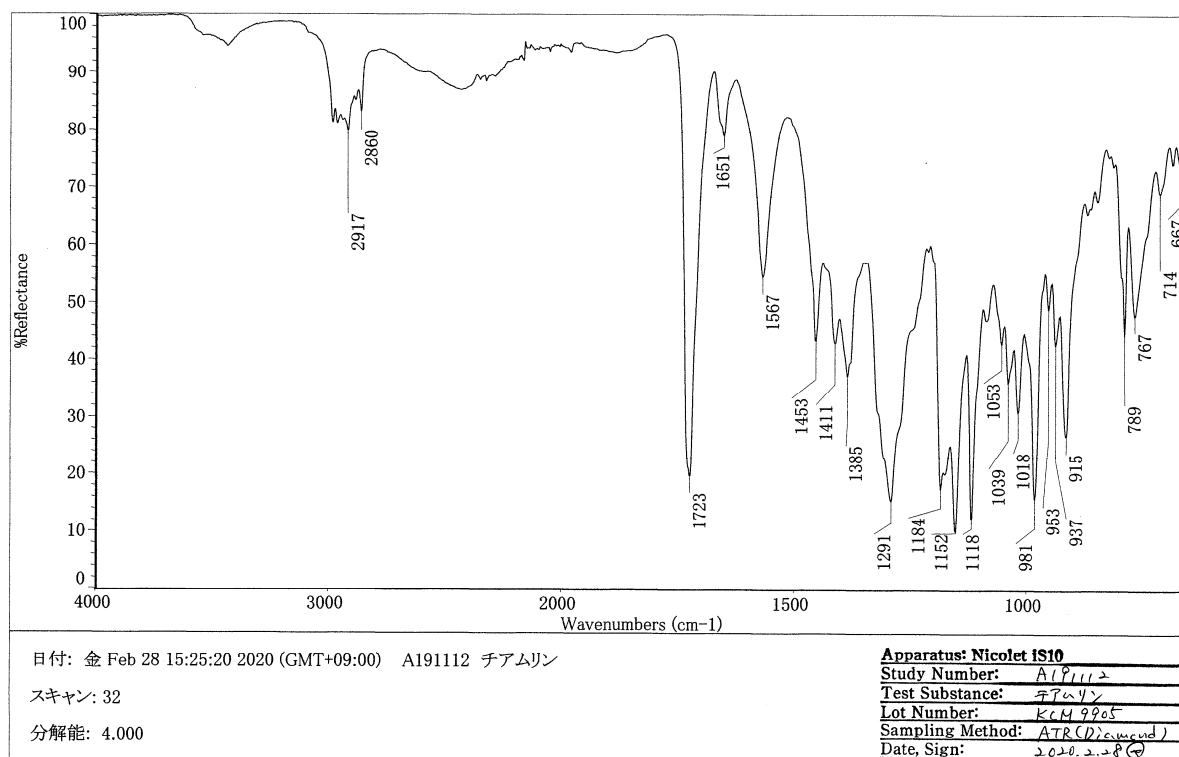


Figure A-1-2 Infrared Absorption Spectrum of the Test Substance after the End of Exposure



付属資料－2

試験用水の水質

Results of Analysis, Device No.1

Sample: Dechlorinated tap water generated with device No. 1 in building B12 of LSI Medience [for rearing animals]
 Measurement agency: MC Evolve Technologies Corporation
 8-3-1 Chuo, Ami-machi, Inashiki-gun, Ibaraki 300-0332, Japan
 Date for sample collection: August 6, 2019

These data were obtained from report 19H-004219-0001.

Item	[unit]	Result	Item	[unit]	Result
Suspended Substance (SS)	[mg/L]	N.D. (<1.0)	Selenium	[mg/L]	N.D. (<0.001)
Total Organic Carbon (TOC)	[mg/L]	N.D. (<0.3)	Total Residue	[mg/L]	76
Biochemical Oxygen Demand (BOD)	[mg/L]	0.9	Conductivity	[mS/m]	14
Chemical Oxygen Demand (COD)	[mg/L]	1.1	Hardness	[mg CaCO ₃ /L]	50
Total Phosphorus	[mg/L]	N.D. (<0.02)	Alkalinity (pH4.8)	[mg CaCO ₃ /L]	40
pH	[/(°C)]	7.7 (25)	Sodium	[mg/L]	7.4
Coliform Group	[MPN/100mL]	0	Potassium	[mg/L]	1.0
Total Mercury	[mg/L]	N.D. (<0.00005)	Calcium	[mg/L]	14
Copper	[mg/L]	N.D. (<0.005)	Magnesium	[mg/L]	3.5
Cadmium	[mg/L]	N.D. (<0.0003)	Oil (n -Hexane Extracts)	[mg/L]	N.D. (<0.5)
Zinc	[mg/L]	N.D. (<0.01)	Oil (Oily Film / Observation)	[-]	Not Recognized
Lead	[mg/L]	N.D. (<0.001)	Phenols	[mg/L]	N.D. (<0.005)
Aluminum	[mg/L]	0.03	Polychlorinated Biphenyl (PCB)	[mg/L]	N.D. (<0.0005)
Nickel	[mg/L]	N.D. (<0.01)	Thiram	[mg/L]	N.D. (<0.0006)
Hexavalent Chromium	[mg/L]	N.D. (<0.005)	Simazine	[mg/L]	N.D. (<0.0003)
Manganese	[mg/L]	N.D. (<0.01)	Thiobencarb	[mg/L]	N.D. (<0.002)
Tin	[mg/L]	N.D. (<0.03)	Isoxathion	[mg/L]	N.D. (<0.001)
Silver	[mg/L]	N.D. (<0.01)	Diazinon	[mg/L]	N.D. (<0.001)
Cobalt	[mg/L]	N.D. (<0.01)	Fenitrothion (MEP)	[mg/L]	N.D. (<0.001)
Iron	[mg/L]	N.D. (<0.04)	Isoprothiolane	[mg/L]	N.D. (<0.001)
Total Cyanide	[mg/L]	N.D. (<0.001)	Oxine-Copper	[mg/L]	N.D. (<0.001)
Residual Chlorine	[mg/L]	N.D. (<0.1)	Chlorothalonil (TPN)	[mg/L]	N.D. (<0.001)
Bromic Ion	[mg/L]	N.D. (<0.5)	Propyzamide	[mg/L]	N.D. (<0.001)
Fluorine	[mg/L]	N.D. (<0.1)	EPN	[mg/L]	N.D. (<0.001)
Hydrogen Sulfide	[mg/L]	N.D. (<0.002)	Dichlorovos (DDVP)	[mg/L]	N.D. (<0.001)
Ammonium Nitrogen	[mg/L]	N.D. (<0.2)	Fenobucarb (BPMC)	[mg/L]	N.D. (<0.001)
Nitrite Nitrogen	[mg/L]	N.D. (<0.1)	Iprobenfos (IBP)	[mg/L]	N.D. (<0.001)
Arsenic	[mg/L]	N.D. (<0.001)	Chlornitrofen (CNP)	[mg/L]	N.D. (<0.001)
Surface-Active Agents (Anionic)	[mg/L]	N.D. (<0.02)			

付属資料－3

試験用水に対する溶解性

1. 概要

試験用水（脱塩素水道水）に対するフマル酸チアムリンの溶解性を評価した。

2. 方法

1) フマル酸チアムリン 20 mg を共栓付 200 mL 三角フラスコに採取し，試験用水を 200 mL 加えた。（仕込み濃度：100 mg/L，連数：3）

2) 試験条件と同じ温度（24℃）でスターラー^{*1}により 24 時間攪拌した。

*1：ヤマト科学製 マグミキサー MG600

3) 攪拌後の試料をフィルター^{*2}でろ過し，得られたろ液のフマル酸チアムリン濃度を高速液体クロマトグラフ質量分析（LC/MS）計により測定した。

*2：ミリポア製 マイレクス HA 0.45 μ m

3. 結果および考察

測定結果

No.	測定濃度 (mg/L)	平均値 (mg/L)
1	105	100
2	107	
3	102	

以上の結果から，試験温度条件下におけるフマル酸チアムリンの試験用水に対する溶解度は，100 mg/L であると判断した。

付属資料－4

試験液の調製

試験液の調製

1. 準備

被験物質原液の調製		(チアムリンとして 520 mg)
被験物質採取量	---->	642 mg
溶 媒	---->	脱塩素水道水
最終容量	---->	5200 mL
容 器	---->	5 Lメジューム瓶
被験物質濃度	---->	100 mg/L (チアムリンとして)
混合方式	---->	スターラー攪拌24時間
調製頻度	---->	暴露開始前24時間、換水前24時間

2. 攪拌

スターラーで24時間攪拌する（室温約24℃）。

3. 試験液の調製

原液を下記の表の通り採取し、脱塩素水道水で希釈する。
 希釈した溶液を曝気後、試験液とする。
 対照区は脱塩素水道水のみとする。

溶 媒	---->	脱塩素水道水
最終容量	---->	5.0 L
容 器	---->	5 Lガラス製水槽
混合方式	---->	ガラス棒で攪拌
濃度公比	---->	2.24

試験区	設定濃度* (mg/L)	原液 (mL)
対照区	—	0
濃度区1	2.0	100
濃度区2	4.5	225
濃度区3	10	500
濃度区4	22	1100
濃度区5	50	2500

*: フマル酸チアムリンのチアムリン換算値

付属資料－5

試験液の分析

1. 高速液体クロマトグラフ質量分析 (LC/MS) 計 測定条件

装置

高速液体クロマトグラフ質量分析計 SL-HT システム No.1, Agilent Technologies 製

ワークステーション : ChemStation
 高速液体クロマトグラフ (HPLC) : Agilent 1200 型
 デガッサ : G1379B 型
 送液ポンプ : G1312B 型 (バイナリポンプ)
 オートサンプラ : G1367C 型
 カラムオープン : G1316B 型
 質量選択検出器 (MSD) : G6140A 型

[HPLC 条件]

カラム : Agilent 製, Poroshell 120 EC-C18, 2.7 μ m, 2.1 mm i.d.×50 mm
 カラムオープン : 50°C
 溶離液 : A1液 : 5mM ぎ酸アンモニウム水溶液/ぎ酸=1000/1 (v/v)
 B2液 : HPLC用アセトニトリル
 0.00 min A1液 95%, B2液 5%
 5.00 min A1液 5%, B2液 95%
 ストップタイム : 6.50 min
 ポストタイム : 3.00 min
 試料注入量 : 2 μ L
 流速 : 0.400 mL/min

[MSD 条件]

Ionization : API-ES
 Fragmentor : 200 V
 Nebulizer : N₂ (30 psig)
 Drying gas : N₂ (11 L/min, 350°C)
 Mode : Positive
 SIM (Selected Ion Monitoring) 条件 :
 Quant ion *m/z* 494.40

2. 検量線の作成と定量下限の決定

1) 標準溶液の調製

被験物質 123.9 mg を秤量し、HPLC 用テトラヒドロフランで溶解し 100 mL に定容とし、1000 mg/L（チアムリン換算値）の溶液を調製した。この溶液を HPLC 用テトラヒドロフランで順次希釈し、0.00500, 0.0100, 0.0250, 0.0500 mg/L の標準溶液を調製した。また、HPLC 用テトラヒドロフランを 0 mg/L の標準溶液とした。

2) 標準溶液の分析

標準溶液を以下のように分析した。

標準溶液 0.75 mL 採取

| ←超純水^{*1} 0.75 mL 添加

混合

|

LC/MS 測定

*1 : JIS K0557 A4 グレードの水

3) 検量線の作成

横軸に濃度（mg/L）を、縦軸にピーク面積（count）をとり、検量線を作成した（Figure A-5-1）。検量線の作成に 0 mg/L の標準溶液の結果は含めなかった。最小二乗法により直線回帰式 $Y=a+bX$ を求めた。相関係数 r は 1.000 となり、直線性の基準（0.995 以上）を満たした。また、切片 a の 95%信頼区間が原点を含むことから、検量線は原点を通過する直線とみなせた。

4) 定量下限

検量線作成に用いる標準溶液の最低濃度である 0.005 mg/L を定量下限濃度とした。

3. 試験液の分析

試験液を以下のように分析した。代表的な測定結果を Figure A-5-2 に示す。

試験液（超純水で適宜希釈^{*2}）0.75 mL 採取

| ←HPLC 用テトラヒドロフラン 0.75 mL 添加

混合

|

LC/MS 測定

*2 : 検量線範囲を超えると予想されるものについて希釈

4. 被験物質濃度の定量

試験液中の被験物質濃度の定量は、各分析時に測定する標準溶液のピーク面積との比較で行った。

Figure A-5-1 Calibration Curve

No.	Concentration X (mg/L)	Peak Area Y (count)
1	0.00500	14534
2	0.0100	31274
3	0.0250	81284
4	0.0500	159938

$$Y = a + b \times X$$

$$a = -9.080E+02$$

$$b = 3.230E+06$$

$$r = 1.000$$

$$-5.215E+03 < a < 3.399E+03$$

(95-Percent Confidence Limits)

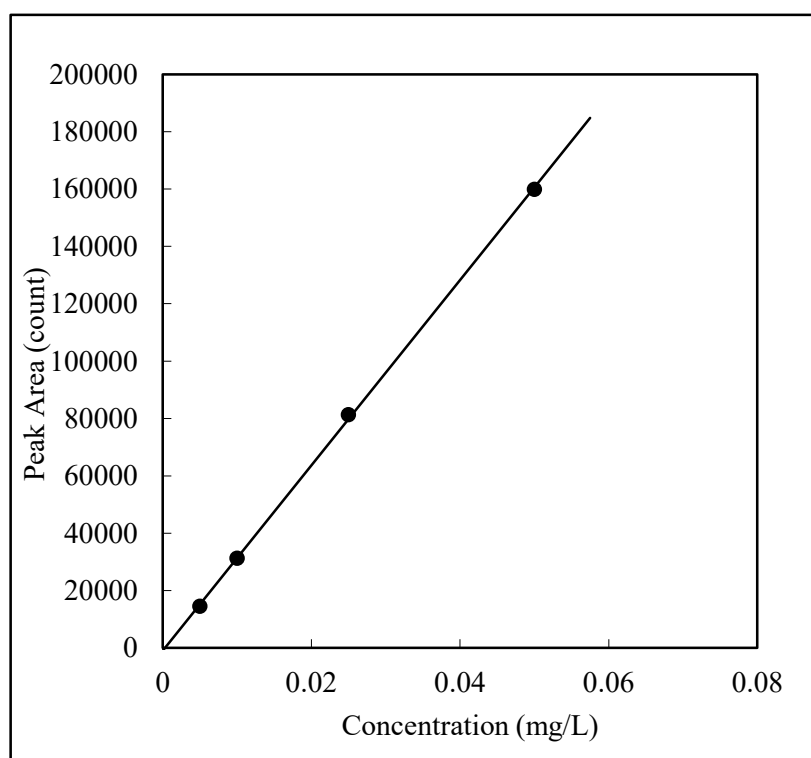


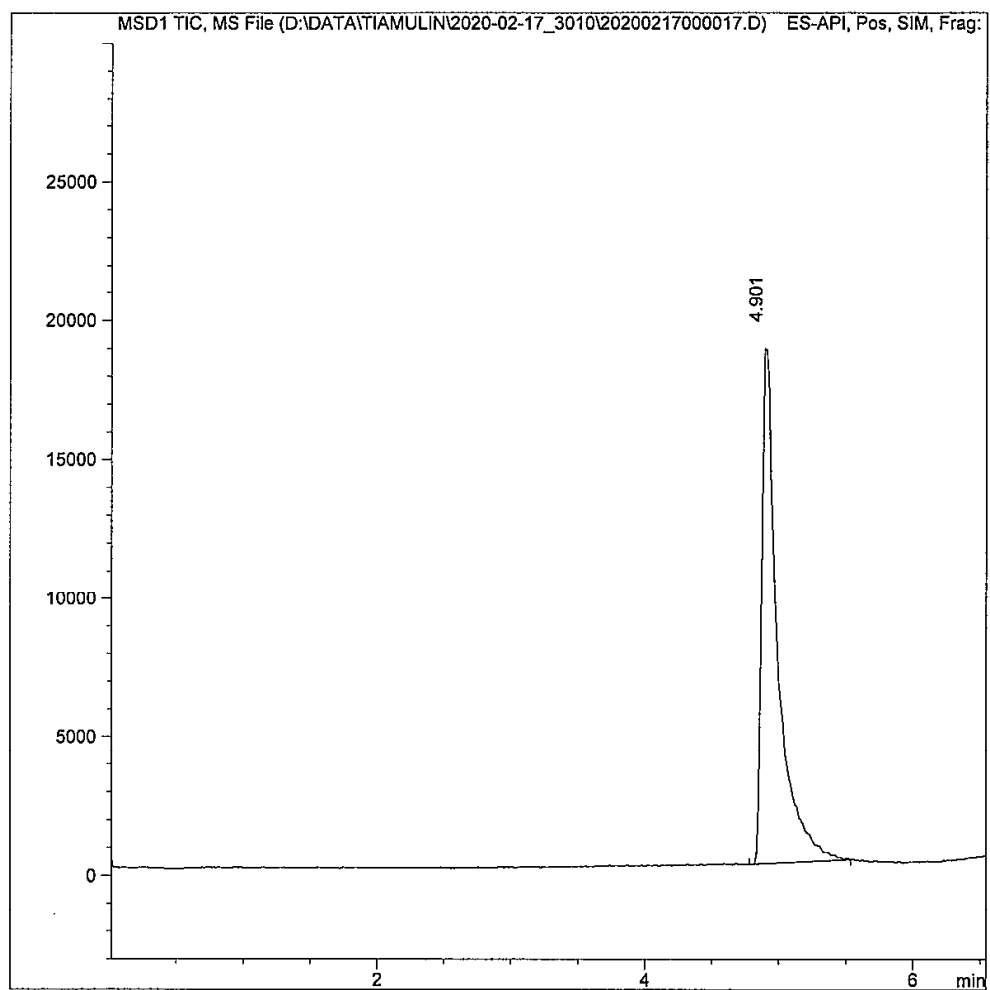
Figure A-5-2 Representative Measurement Results

(1) Standard 0.0500 mg/L, 0 hour

```

=====
Injection Date   : Mon, 17. Feb. 2020           Seq Line :      14
Study No.       : A191112                     Location:    P1-A-05
Test Substance  : Tiamulin                     Inj. No.:     1
Sample Name     : STD 0.05 mg/L                Inj. Vol.:    2 µl
Acq Method      : D:\DATA\TIAMULIN\2020-02-17_3010\TIAMULIN_G.M
Acq Operator    : 田村
=====

```



Area Percent Report

```

=====
#  Meas. Ret. Peak T  Width    Area    Height   Area %
-----
1   4.901    MM      0.13   154747   19343    100
-----
Total :      154747
=====

```

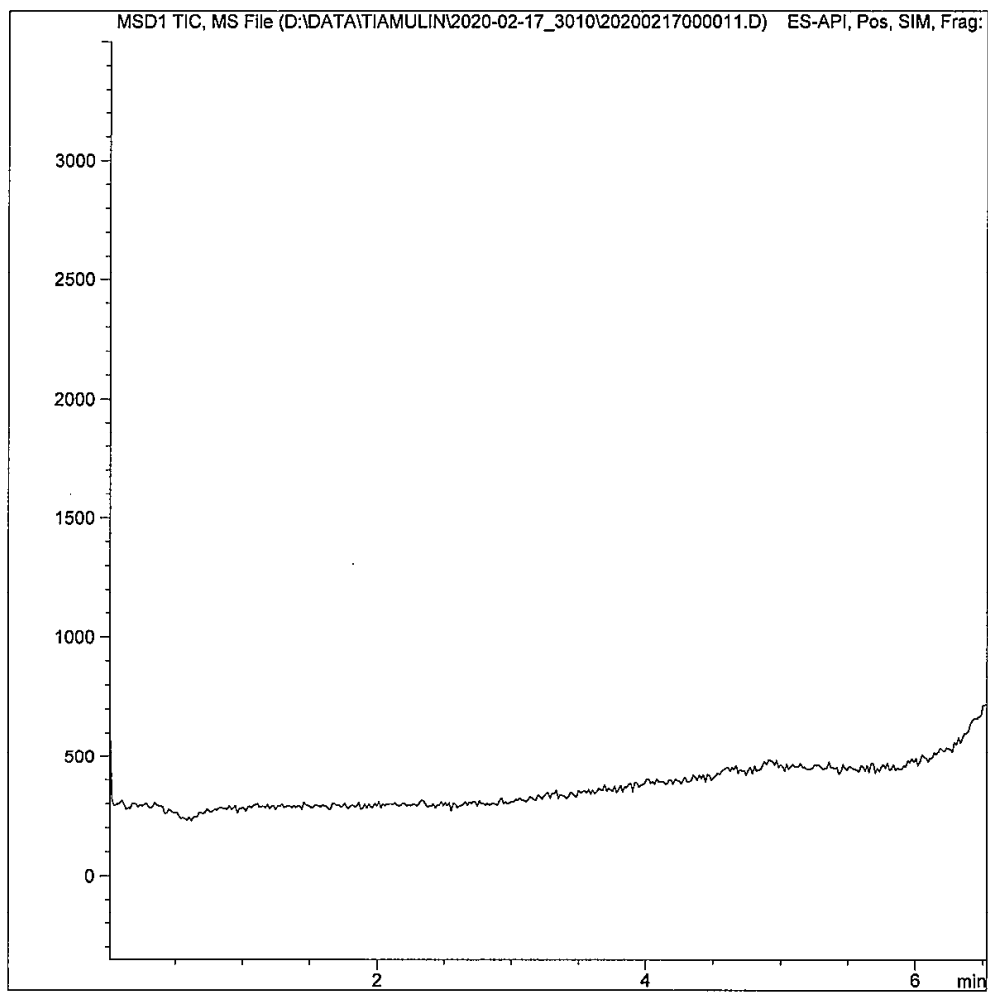
Figure A-5-2 Representative Measurement Results (Continued)

(2) Control, 0 hour (new)

```

=====
Injection Date   : Mon, 17. Feb. 2020           Seq Line :      8
Study No.       : A191112                     Location:    Pl-B-01
Test Substance  : Tiamulin                     Inj. No.:    1
Sample Name     : F0hCn                       Inj. Vol.:   2 µl
Acq Method      : D:\DATA\TIAMULIN\2020-02-17_3010\TIAMULIN_G.M
Acq Operator    : 田中
=====

```



```

=====
Area Percent Report
=====

```

```

=====
# Meas. Ret. Peak T Width Area Height Area %
=====

```

```

-----
Total :

```

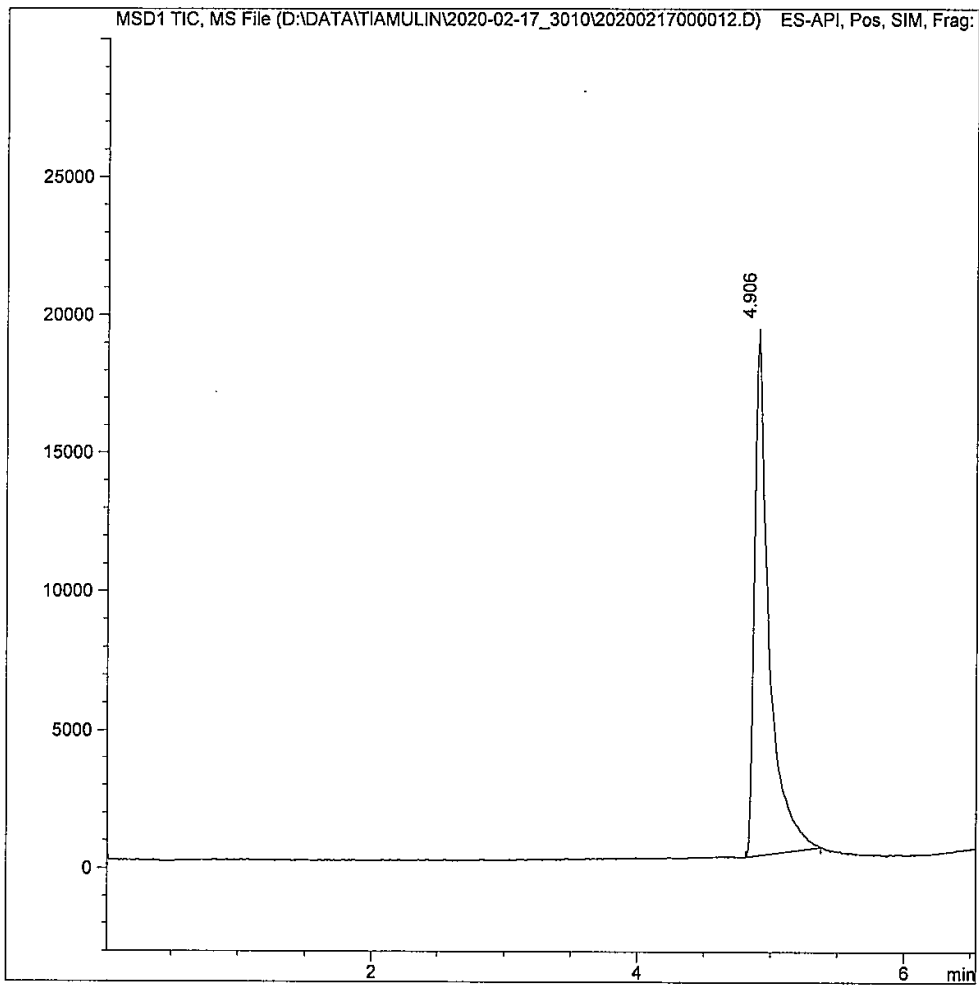
Figure A-5-2 Representative Measurement Results (Continued)

(3) Conc.1, 0 hour (new)

```

=====
Injection Date : Mon, 17. Feb. 2020          Seq Line :          9
Study No.      : A191112                    Location:      P1-B-02
Test Substance : Tiamulin                    Inj. No.:      1
Sample Name    : F0hC1n                     Inj. Vol.:     2 µl
Acq Method     : D:\DATA\TIAMULIN\2020-02-17_3010\TIAMULIN_G.M
Acq Operator   : 
=====

```



```

=====
Area Percent Report
=====

```

#	Meas.	Ret.	Peak T	Width	Area	Height	Area %
1	4.906	MM	0.12	143371	19246	100	
Total :					143371		

```

=====

```

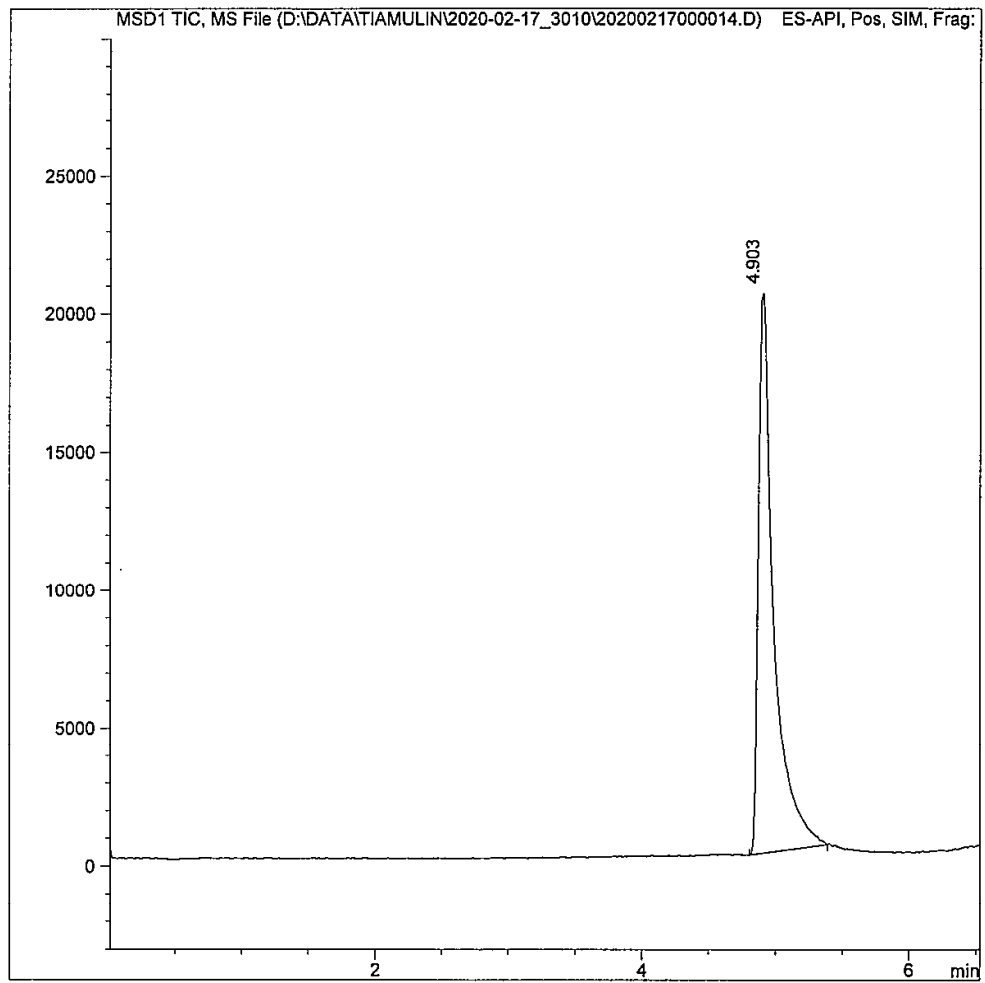
Figure A-5-2 Representative Measurement Results (Continued)

(4) Conc.3, 0 hour (new)

```

=====
Injection Date : Mon, 17. Feb. 2020          Seq Line :      11
Study No.      : A191112                    Location:      Pl-B-04
Test Substance : Tiamulin                    Inj. No.:      1
Sample Name    : F0hC3n                     Inj. Vol.:     2 µl
Acq Method     : D:\DATA\TIAMULIN\2020-02-17_3010\TIAMULIN_G.M
Acq Operator   : 田中
=====

```



```

=====
Area Percent Report
=====

```

#	Meas.	Ret.	Peak T	Width	Area	Height	Area %
1	4.903	MM	0.13	162838	20435	100	
Total :					162838		

```

=====

```

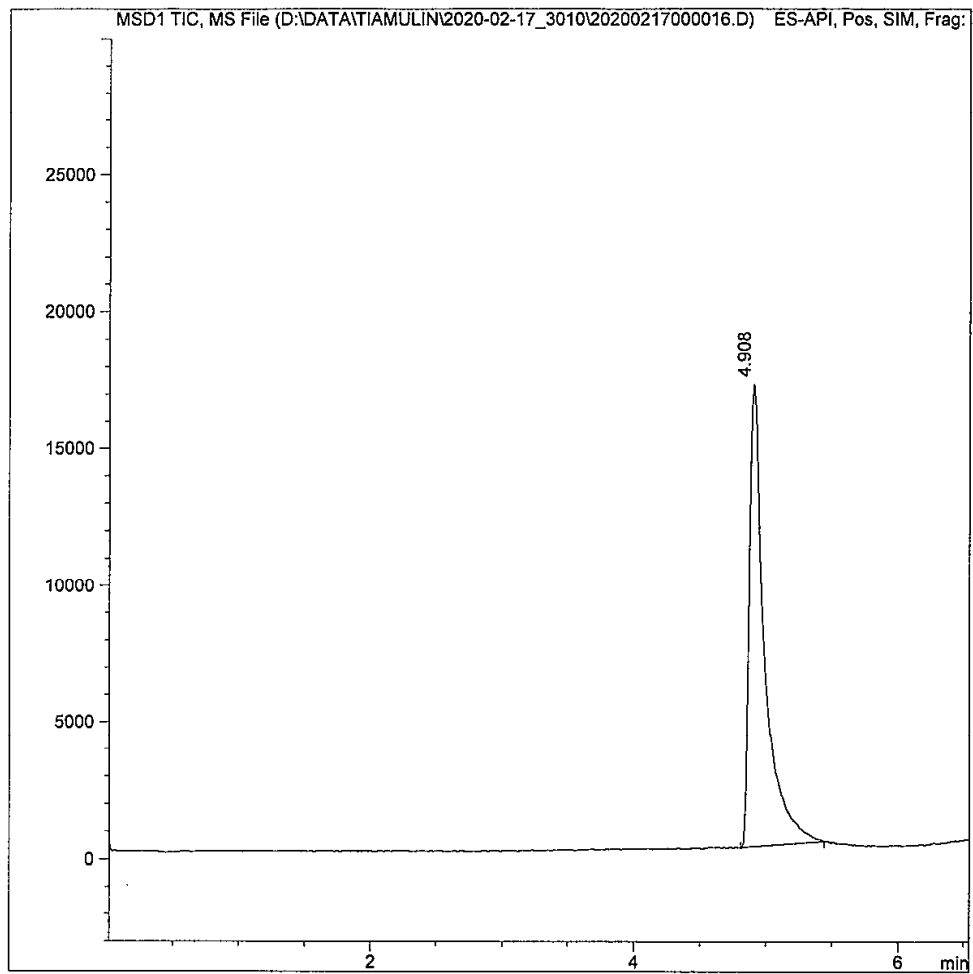
Figure A-5-2 Representative Measurement Results (Continued)

(5) Conc.5, 0 hour (new)

```

=====
Injection Date   : Mon, 17. Feb. 2020           Seq Line :      13
Study No.       : A191112                     Location:    P1-B-06
Test Substance  : Tiamulin                     Inj. No.:     1
Sample Name     : F0hC5n                      Inj. Vol.:    2 µl
Acq Method      : D:\DATA\TIAMULIN\2020-02-17_3010\TIAMULIN_G.M
Acq Operator    : [Signature]
=====

```



```

=====
                        Area Percent Report
=====

```

#	Meas.	Ret.	Peak T	Width	Area	Height	Area %
1	4.908	MM	0.13	137405	17001	100	
Total :					137405		

```

=====

```

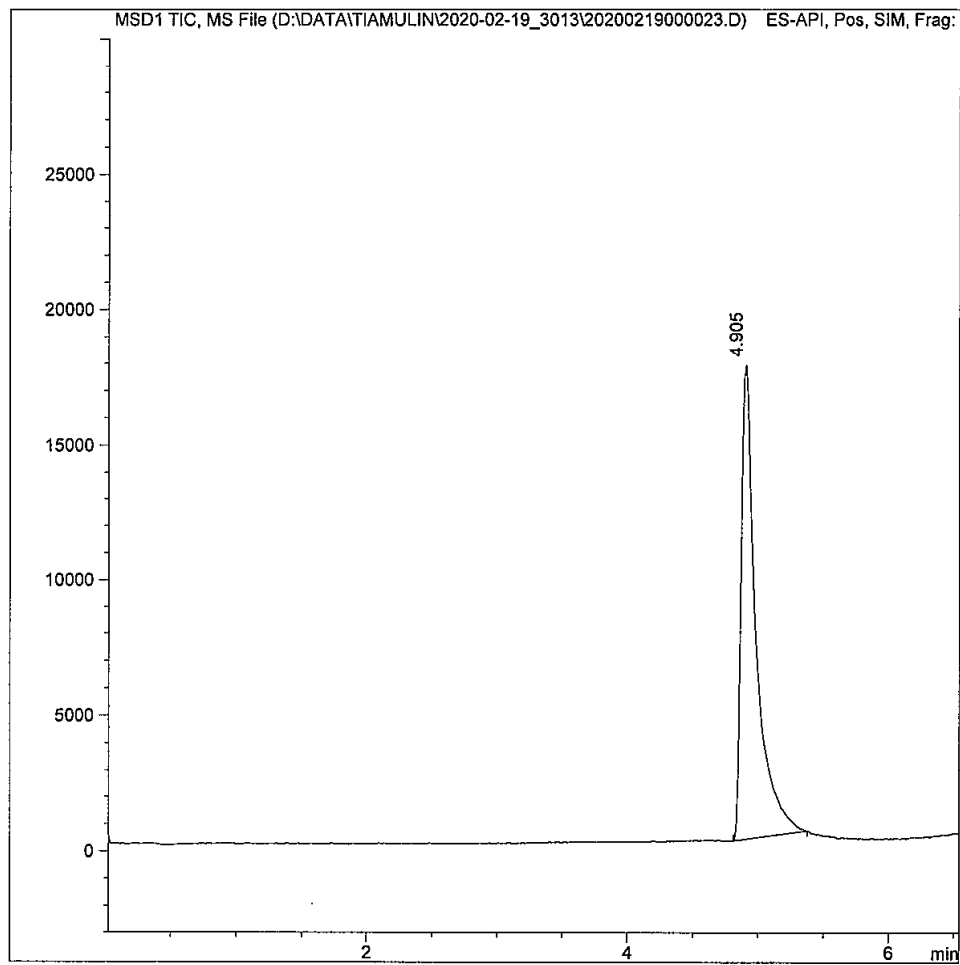
Figure A-5-2 Representative Measurement Results (Continued)

(6) Standard 0.0500 mg/L, 48 hours (old)

```

=====
Injection Date :Wed, 19. Feb. 2020          Seq Line :      13
Study No.      :A191112                    Location:      P1-A-02
Test Substance :Tiamulin                    Inj. No.:      1
Sample Name    :STD 0.05 mg/L              Inj. Vol.:     2 µl
Acq Method     :D:\DATA\TIAMULIN\2020-02-19_3013\TIAMULIN_G.M
Acq Operator   :田中
=====

```



```

=====
                        Area Percent Report
=====

```

#	Meas. Ret.	Peak T	Width	Area	Height	Area %
1	4.905	MM	0.13	140272	17651	100
Total :				140272		

```

=====

```

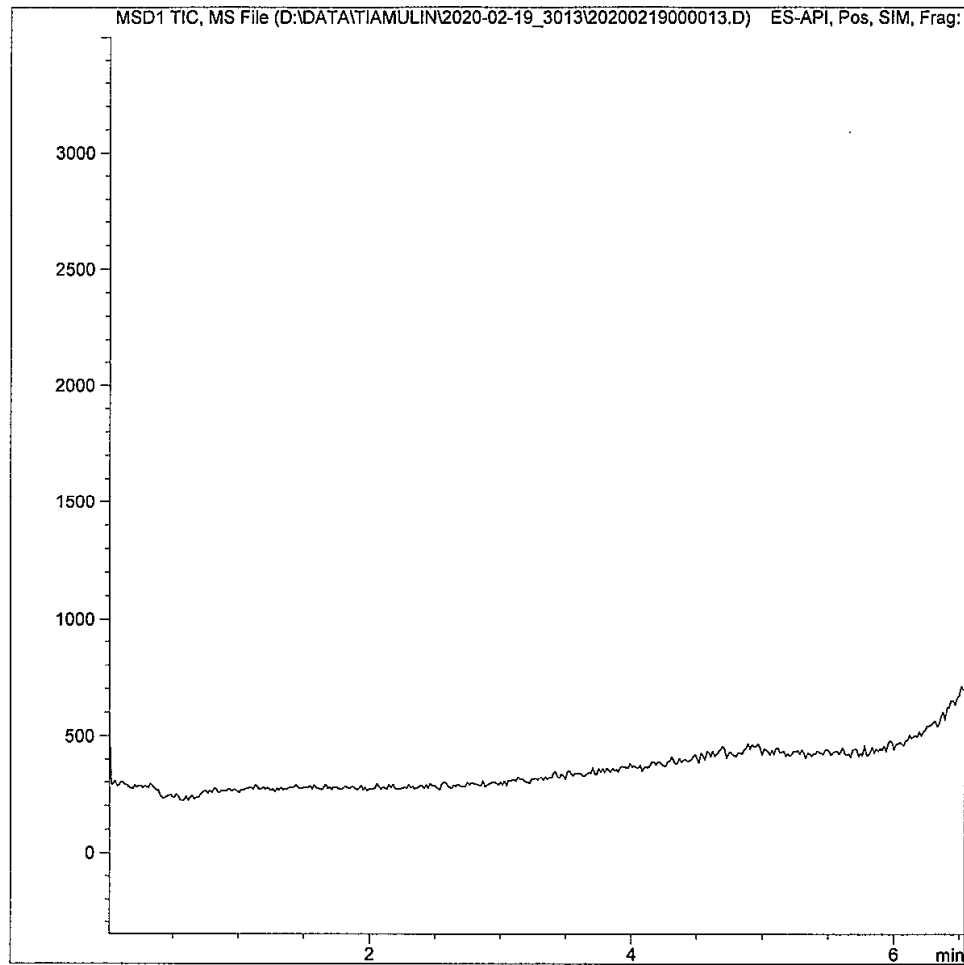
Figure A-5-2 Representative Measurement Results (Continued)

(7) Control, 48 hours (old)

```

=====
Injection Date :Wed, 19. Feb. 2020          Seq Line :      3
Study No.      :A191112                    Location:      P1-B-01
Test Substance :Tiamulin                    Inj. No.:      1
Sample Name    :F48hCo                     Inj. Vol.:     2 µl
Acq Method     :D:\DATA\TIAMULIN\2020-02-19_3013\TIAMULIN_G.M
Acq Operator   :田中
=====

```



```

=====
Area Percent Report
=====

```

```

# Meas. Ret. Peak T Width Area Height Area %
-----

```

```

-----
Total :

```

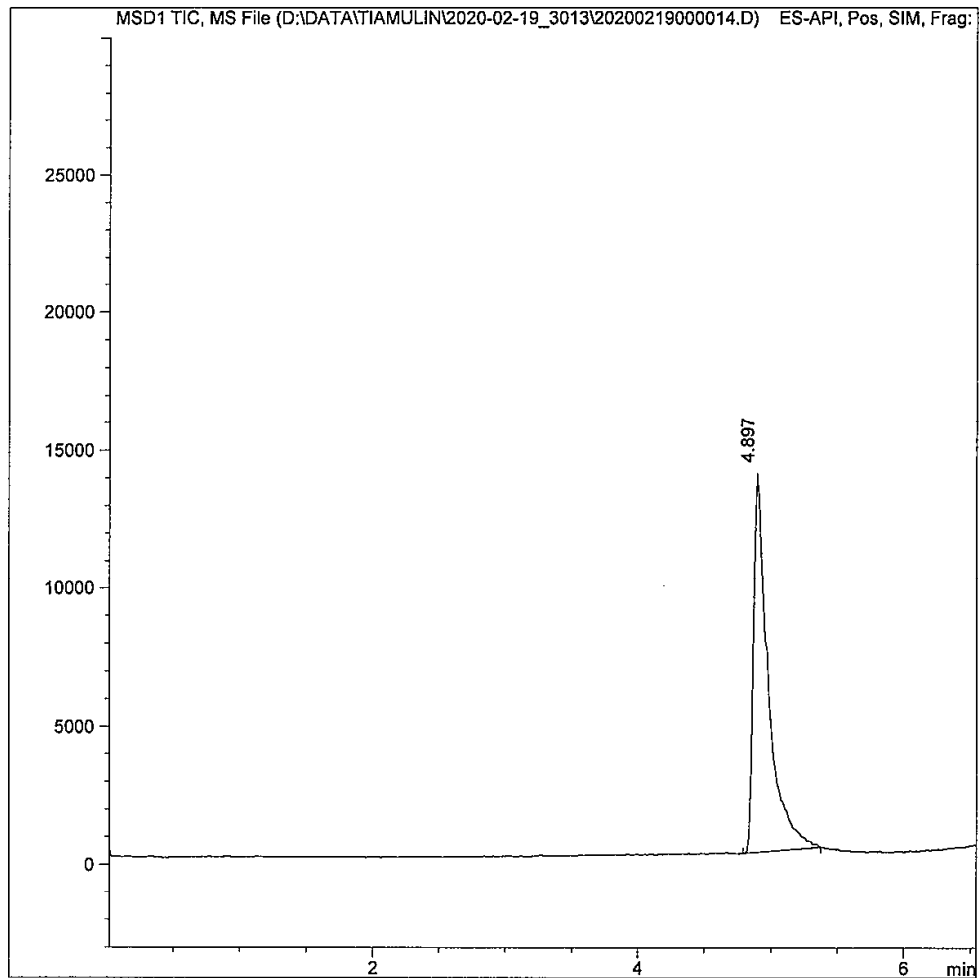
Figure A-5-2 Representative Measurement Results (Continued)

(8) Conc.1, 48 hours (old)

```

=====
Injection Date :Wed, 19. Feb. 2020          Seq Line :      4
Study No.      :A191112                    Location:      P1-B-02
Test Substance :Tiamulin                    Inj. No.:      1
Sample Name    :F48hClo                     Inj. Vol.:     2 µl
Acq Method     :D:\DATA\TIAMULIN\2020-02-19_3013\TIAMULIN_G.M
Acq Operator   :田端
=====

```



```

=====
Area Percent Report
=====

```

#	Meas.	Ret.	Peak T	Width	Area	Height	Area %
1	4.897	MM	0.13	105845	13933	100	
Total :					105845		

```

=====

```

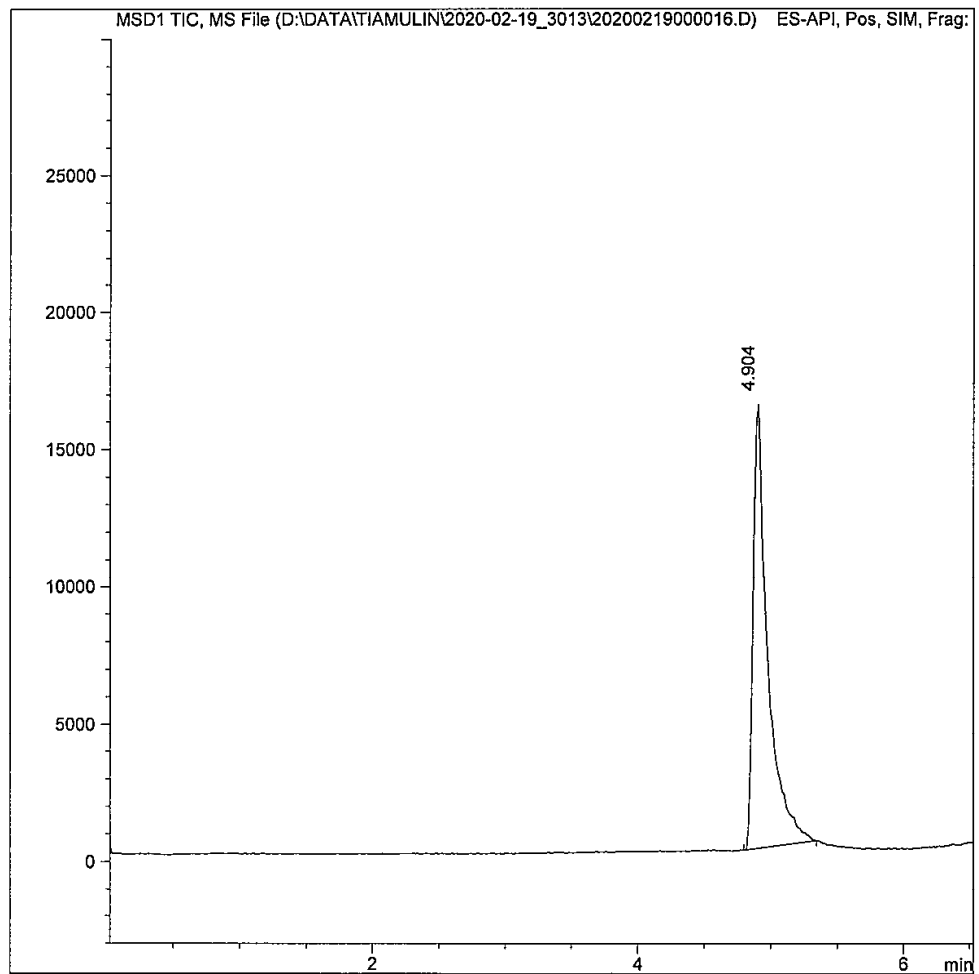
Figure A-5-2 Representative Measurement Results (Continued)

(9) Conc.3, 48 hours (old)

```

=====
Injection Date :Wed, 19. Feb. 2020          Seq Line :      6
Study No.      :A191112                    Location:      P1-B-04
Test Substance :Tiamulin                    Inj. No.:      1
Sample Name    :F48hC3o                     Inj. Vol.:     2 µl
Acq Method     :D:\DATA\TIAMULIN\2020-02-19_3013\TIAMULIN_G.M
Acq Operator   :田中
=====

```



```

=====
Area Percent Report
=====

```

#	Meas.	Ret.	Peak T	Width	Area	Height	Area %
1	4.904	MM	0.12	123617	16492	100	
Total :					123617		

```

=====

```

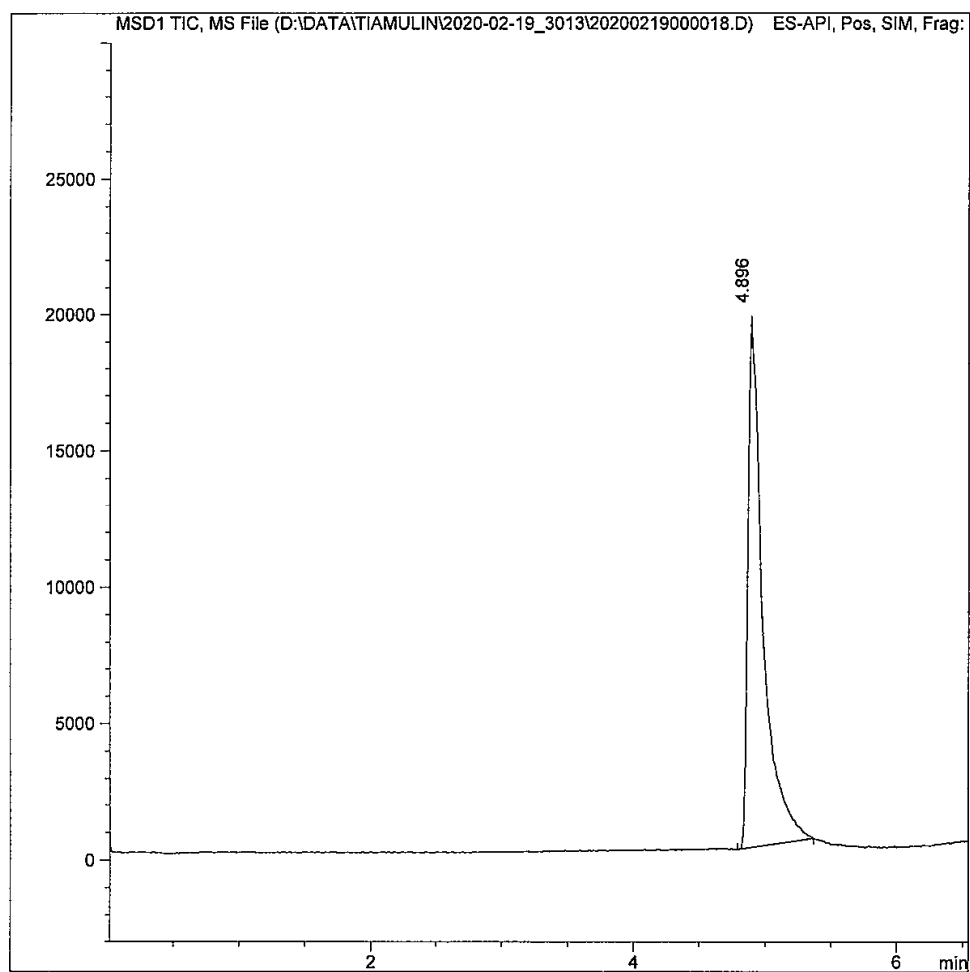
Figure A-5-2 Representative Measurement Results (Continued)

(10) Conc.5, 48 hours (old)

```

=====
Injection Date :Wed, 19. Feb. 2020          Seq Line :      8
Study No.      :A191112                    Location:      Pl-B-06
Test Substance :Tiamulin                    Inj. No.:      1
Sample Name    :F48hC5o                    Inj. Vol.:     2 µl
Acq Method     :D:\DATA\TIAMULIN\2020-02-19_3013\TIAMULIN_G.M
Acq Operator   :田端
=====

```



Area Percent Report

```

=====
#  Meas. Ret. Peak T  Width    Area    Height    Area %
-----
1   4.896   MM      0.13   153471   19810     100
-----
Total :      153471
=====

```

付属資料－6

結果の算出

Table A-6 Calculation of the 96hr LC50

TOXDAT MULTI-METHOD PROGRAM (BINOMIAL, MOVING AVERAGE AND PROBIT METHODS)					
魚類急性毒性試験 Time: 96hr					
Conc. No.	CONC. mg/L	NUMBER EXPOSED	NUMBER DEAD	PERCENT DEAD	BINOMIAL PROB. (%)
Conc. 1	1.80	10	0	0	0.09765625
Conc. 2	4.20	10	0	0	0.09765625
Conc. 3	9.03	10	2	20	5.46875
Conc. 4	22.1	10	10	100	0.09765625
Conc. 5	49.4	10	10	100	0.09765625

THE BINOMIAL TEST SHOWS THAT 4.2 AND 22.1 CAN BE
 USED AS STATISTICALLY SOUND CONSERVATIVE 95 PERCENT
 CONFIDENCE LIMITS SINCE THE ACTUAL CONFIDENCE LEVEL
 ASSOCIATED WITH THESE LIMITS IS 99.8046875 PERCENT.
 AN APPROXIMATE LC50 FOR THIS SET OF DATA IS 11.9682920596275

WHEN THERE ARE LESS THAN TWO CONCENTRATIONS AT WHICH THE PERCENT
 DEAD IS BETWEEN 0 AND 100, NEITHER THE MOVING AVERAGE NOR THE
 PROBIT METHOD CAN GIVE ANY STATISTICALLY SOUND RESULTS.
