

2. ミジンコ急性遊泳阻害試験

要 約

試験委託者： 環境省

表 領題： トランキサム酸のオオミジンコ (*Daphnia magna*) に対する急性遊泳阻害試験

試験番号： A191223

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 薦食発 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。

- 1) 供試生物： オオミジンコ (*Daphnia magna*)
- 2) 試験用水： Elendt M4 medium
- 3) 暴露期間： 48 時間
- 4) 暴露方式： 止水式
- 5) 供試生物数： 20 頭／試験区 (5 頭／容器)
- 6) 試験温度： $20 \pm 1^{\circ}\text{C}$
- 7) 照明： 室内光、16 時間明 (800 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*	100

* : 試験ガイドライン上限濃度での限度試験

- 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もとに算出した。

48 時間 半数遊泳阻害濃度 (EC50) : $>96.7 \text{ mg/L}$ (95%信頼区間 算出不可)

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} : トランキサム酸

CAS 番号^{*1} : 1197-18-8

構造式 :



分子式^{*1} : C₈H₁₅NO₂

分子量^{*2} : 157.21

*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} : 99.5%

ロット番号^{*1} : 3F2CB

供給者 : 東京化成工業株式会社

外観^{*1} : 白色～ほとんど白色、結晶～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 :

サーモフィッシュャーサイエンティフィック製 Nicolet iS10 型

1.2 試験用水

Elendt M4 medium（試験ガイドラインに示されている調製水）を十分ばつ氣し、 $20\pm1^{\circ}\text{C}$ に調整して使用した。組成を付属資料-2に示す。理論的硬度は $250 \text{ mg CaCO}_3/\text{L}$ である。暴露開始前に硬度および pH を測定した結果、それぞれ $238 \text{ mg CaCO}_3/\text{L}$ および 7.6 であり、適正範囲内（硬度 $250 \text{ mg CaCO}_3/\text{L}$ 以下、pH 6.0～9.0）であることを確認した。

1.3 供試生物

- 1) 一般名：オオミジンコ
- 2) 学名：*Daphnia magna*
- 3) 入手先：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：1995年7月18日（以降、当施設にて継代飼育）
- 5) 生育段階：24時間未満齢の幼体（雌）
- 6) 供試生物を得るための親ミジンコの飼育条件：

飼育水：Elendt M4 medium

飼育密度（飼育開始7日目以降）：1頭／80 mL（25頭／2 L）以下

飼育容器：2 L ガラス製ビーカー

水温： $20\pm1^{\circ}\text{C}$

溶存酸素濃度：飽和酸素濃度の 60%以上

pH：6.0～9.0

照明：室内光、16 時間明（800 lux 以下）／8 時間暗

飼育期間：最長 28 日間

餌：*Chlorella vulgaris*（単細胞緑藻類）

給餌量：6 mg C（有機炭素含量）／2 L／日

飼育水の交換：初回の交換を飼育開始後 5 日以内に実施、その後は少なくとも週 3 回交換

- 7) 供試生物（24 時間未満齢の幼体）の採取方法：

暴露開始前日に全ての幼体を除去し、暴露開始日に産出された 24 時間未満齢の幼体（雌）を暴露に用いた。暴露開始日に、親ミジンコについて以下の項目を満たすことを確認した。

週齢：2～4 週齢（飼育期間：2020 年 1 月 21 日～2020 年 2 月 12 日）

暴露開始前 2 週間の死亡率：20%以内

異常：観察されず

最初の幼体産出日（初産日）：12 日目以内

1.4 試験容器および恒温槽等

- 1) 試験容器 : 100 mL ガラス製ビーカー (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 クールネット CL-80R 型
- 4) 水温計 : ハンナ製 チェックテンプ
- 5) マルチ水質計 (溶存酸素濃度, pH 測定用) : 東亜ディーケーベー製 MM-60R 型
- 6) 硬度測定: ハック製 デジタルタイトレーター
- 7) 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・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 葉食発 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。

2.1.1 試験条件

- 1) 暴露期間 : 48 時間
- 2) 暴露方式 : 止水式
- 3) 試験液量 : 100 mL／容器
- 4) 連数 : 4 容器／試験区
- 5) 供試生物数 : 20 頭／試験区 (5 頭／容器)
- 6) 試験温度 : $20 \pm 1^{\circ}\text{C}$
- 7) 溶存酸素濃度 : 3 mg/L 以上, エアレーションなし
- 8) pH : 6.0～9.0 (変動は 1.5 未満), 調整なし
- 9) 照明 : 室内光, 16 時間明 (800 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。

予備試験結果

設定濃度 (mg/L)	48 時間後の 遊泳阻害率(%)
対照区	0
1.0	0
10	0
100	0

供試生物数：10 頭／試験区（5 頭／容器、各 2 連）

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*	100

*：試験ガイドライン上限濃度での限度試験

2.1.4 試験液の調製

試験液は、付属資料－3 に示す方法に従って調製した。1 試験区につき 5 つの試験容器に、試験液をそれぞれ 100 mL ずつ入れた。そのうち 1 つは試験環境測定用容器とした。

2.1.5 試験液の分析

試験液の分析を、以下の要領に従って高速液体クロマトグラフ質量分析（LC/MS）法により行った。分析方法の詳細を付属資料－4 に示す。

分析回数： 1 セット（試験液調製時と暴露終了時を 1 セットとした）

試料採取方法： 試験液調製時－各試験区の試験環境測定用容器の試験液の中層を採取

暴露終了時－各試験区 1 試験容器の試験液の中層を採取

2.1.6 試験操作

ガラスピペットを用いて供試生物を試験液に投入し、暴露開始とした。試験液の蒸散、被験物質の揮散防止のために、試験容器に透明塩ビ板で蓋をした。暴露開始後 48 時間で暴露を終了とした。暴露期間中、以下の要領に従って、供試生物の観察、試験環境の測定および観察を行った。

1) 供試生物の観察

頻度：暴露開始後 24 時間および 48 時間

項目：遊泳阻害^{*1}数、その他異常の有無^{*2}

*1：試験容器を穩やかに動かした後、15 秒間泳げない場合、遊泳阻害されたと見なす。

*2：行動や外見の異常（脱色等）が見られたり、水面に浮いたミジンコがあった場合は記録する。

2) 試験環境の測定および観察

回数：1 セット

試料：試験液調製時—各試験区の試験環境測定用容器の試験液

暴露終了時—各試験区 1 試験容器の試験液

項目：試験液の水温、溶存酸素濃度、pH、外観

2.2 試験結果の評価

2.2.1 結果の算出

1) 算出に用いる被験物質濃度

結果の算出は、被験物質濃度の測定値の時間加重平均値に基づいて行った。平均値の計算方法は以下の通りである。

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

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

ConcAn: n 期間の初めの測定値
(暴露 0 時間の測定値)

ConcBn: n 期間の終わりの測定値
(暴露 48 時間の測定値)

(*ConcAn* と *ConcBn* の値が同じ場合は、*Area=ConcAn×Hours* とする。)

\overline{MC} : 時間加重平均値

2) 半数遊泳阻害濃度（EC50）の算出

暴露期間中に、供試生物の 50%を遊泳阻害する被験物質濃度を半数遊泳阻害濃度（EC50）とする。通常は、暴露開始後 24 および 48 時間の各試験区における遊泳阻害率（%）から統計学的手法により EC50 を決定するが、本試験は限度試験であるため、EC50 は推定される濃度領域とした。

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) 対照区において、ミジンコが 10%を超えて遊泳阻害されたり、水面に浮いたりしてはならないこと。
- 2) 溶存酸素濃度は、暴露終了時において 3 mg/L 以上であること。

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 試験環境の測定および観察

試験液の水温, 溶存酸素濃度, pH の測定結果および外観の観察結果をそれぞれ Table 1, Table 2, Table 3 および Table 4 に示す。

いずれの試験区においても, 水温は $20 \pm 1^{\circ}\text{C}$, 溶存酸素濃度は 3 mg/L 以上, pH は 6.0~9.0 (変動は 1.5 未満) であり, 試験条件の範囲内であった。試験液の外観は, いずれの試験区においても暴露期間を通して, けん渦物質, 浮遊物質, 沈殿物質は認められず, 色調は無色であった。

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, 測定結果を付属資料-4 に示す。

濃度区 1 の測定値 (時間加重平均値) は, 96.7 mg/L であり, ほぼ設定値どおりであった。

3.4 供試生物の観察

各時間における遊泳阻害数および遊泳阻害率を Table 6 に示す。

対照区において, 暴露終了時の遊泳阻害率は 0% であり, 水面に浮いたミジンコは認められなかつた。

濃度区 1 において, 暴露終了時の遊泳阻害率は, 0% であった。

3.5 半数遊泳阻害濃度 (EC50)

各時間における EC50 を Table 7 に, 48 時間の EC50 を以下に示す。

48 時間 EC50 : >96.7 mg/L (95%信頼区间 算出不可)

3.6 試験の有効性

「3.2 試験環境の測定および観察」および「3.4 供試生物の観察」の結果が試験の有効性の条件をすべて満たしたため, 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 Hour New	48 Hours Old
Control	20.4	20.1
Conc.1	20.4	20.1
Minimum: 20.1		Maximum: 20.4

New: New test solution freshly prepared

Old: Old test solution at the end of the exposure

Table 2 Dissolved Oxygen Concentrations (D.O.) of Test Solutions

Test Group	D.O. (mg/L)	
	0 Hour New	48 Hours Old
Control	8.9	8.7
Conc.1	8.7	8.6
Minimum: 8.6		Maximum: 8.9

New: New test solution freshly prepared

Old: Old test solution at the end of the exposure

Table 3 pH Values of Test Solutions

Test Group	pH	
	0 Hour New	48 Hours Old
Control	7.6	7.5
Conc.1	7.7	7.5
Minimum: 7.5		Maximum: 7.7

New: New test solution freshly prepared

Old: Old test solution at the end of the exposure

Table 4 Appearances of Test Solutions

Test Group		Appearance	
		0 Hour New	48 Hours Old
Control	Color	C-	C-
	Suspended solids	S-	S-
	Floating solids	F-	F-
	Precipitation	P-	P-
Conc.1	Color	C-	C-
	Suspended solids	S-	S-
	Floating solids	F-	F-
	Precipitation	P-	P-

New: New test solution freshly prepared

Old: Old test solution at the end of the exposure

C- : Colorless

S- : Not observed (transparent)

F- : Not observed

P- : Not observed

Table 5 Measured Concentrations of the Test Substance in Test Solutions

(Static Condition)

Test Group	Nominal Concentration	Measured Concentration (mg/L)			Mean ^a
		0 Hour		48 Hours	
		New	Old		
(mg/L)		(Percent of Nominal, %)			
Control	--	<0.02	<0.02	--	
Conc.1	100	95.7	97.8	96.7	
		(96)	(98)	(97)	

Lower limit of quantification: 0.02 mg/L

a: Time-weighted mean

New: New test solution freshly prepared

Old: Old test solution at the end of the exposure

Daphnia Acute Immobilization Test

Table 6 The Number of Immobilised *Daphnia magna* (Percent Immobility)

Test Group	Nominal Concentration (mg/L)	Mean ^a Measured Concentration (mg/L)	Cumulative Number of Immobilised <i>Daphnia</i> (Percent Immobility)	
			24 Hours	48 Hours
Control	--	--	0 (0)	0 (0)
Conc.1	100	96.7	0 (0)	0 (0)

a: Time-weighted mean

Table 7 Median Effect Concentration (EC50)

Exposure Period (Hours)	EC50 (mg/L)	95-Percent Confidence Limits (mg/L)	Statistical Method
24	>96.7 *	--	--
48	>96.7 *	--	--

*: The EC50 value was given as an estimated concentration range because this test was a limit test.

付属資料－1

赤外吸収スペクトル

Daphnia Acute Immobilization Test

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

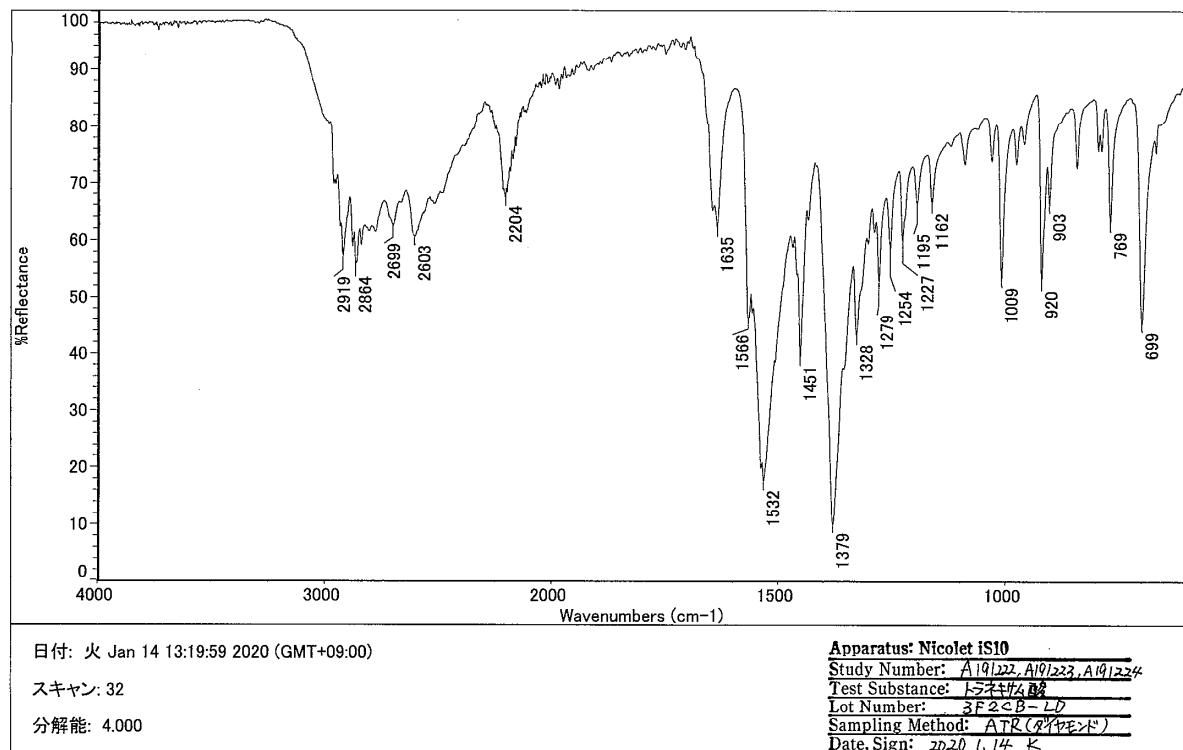
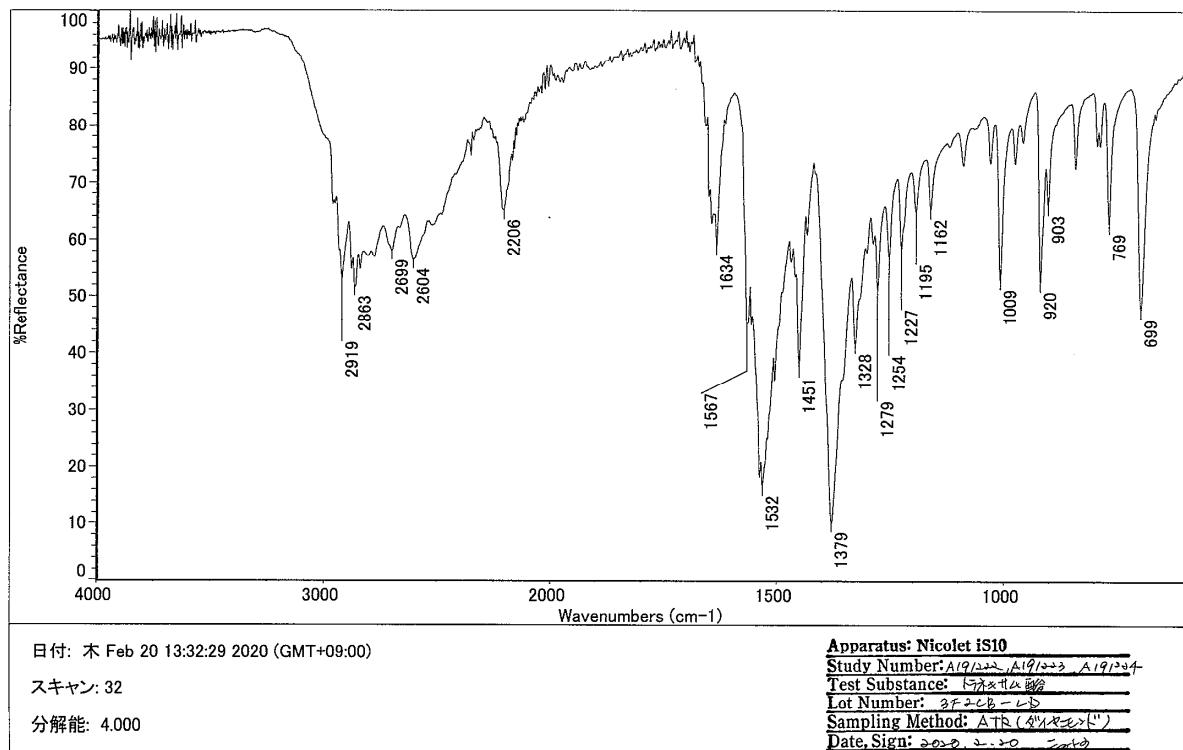


Figure A-1-2 Infrared Absorption Spectrum of the Test Substance after the End of Exposure



付属資料-2

試験用水の組成

Table A-2 Elendt M4 medium recommended by OECD Guideline used as dilution water

Macro nutrients	Concentration (mg/L)
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

Trace elements	Concentration (µg/L)
H ₃ BO ₃	2859.5
MnCl ₂ ·4H ₂ O	360.5
LiCl	306.0
RbCl	71.0
SrCl ₂ ·6H ₂ O	152.0
NaBr	16.0
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	63.0
CuCl ₂ ·2H ₂ O	16.8
ZnCl ₂	13.0
CoCl ₂ ·6H ₂ O	10.0
KI	3.25
Na ₂ SeO ₃	2.19
NH ₄ VO ₃	0.575
Na ₂ EDTA·2H ₂ O	2500
FeSO ₄ ·7H ₂ O	995.5

Vitamins	Concentration (µg/L)
Thiamine hydrochloride	75.0
Cyanocobalamin (B12)	1.00
Biotine	0.750

付属資料-3

試験液の調製

試験液の調製

試験用水を十分ばっ氣する。

被験物質を下記の表の通り採取し、試験用水を最終容量まで加える。

対照区は、試験用水のみとする。

溶媒	--->	試験用水
最終容量	--->	1000 mL
容器	--->	1000mL メスフラスコ
混合方式	--->	転倒攪拌
調製頻度	--->	暴露開始前に調製

試験区	設定濃度 (mg/L)	被験物質採取量 (mg)
対照区	対照区	---
濃度区1	100	---> 100

付属資料-4

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.2, 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)
オートサンプラー : G1329B 型
カラムオーブン : G1316B 型
質量選択検出器 (MSD) : G6140A 型

[HPLC 条件]

カラム : Shodex 製, Asahipak NH2P-50 4D, 粒径 5 μm , 4.6 mm i.d. \times 150 mm
カラムオーブン : 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
 A液 50%, B液 50%
ストップタイム : 3 min
試料注入量 : 1 μL
流速 : 0.8 mL/min

[MSD 条件]

Ionization : API-ES
Fragmentor : 100 V
Nebulizer : N₂ (30 psig)
Drying gas : N₂ (10 L/min, 300°C)
Mode : Positive
SIM (Selected Ion Monitoring) 条件 :
Quant ion m/z 158.10 [M+H]⁺

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 20 mg を秤量し、超純水^{*1}で溶解し 200 mL に定容とし、100 mg/L の溶液を調製した。この溶液を超純水で順次希釈し、0.0500, 0.100, 0.200, 0.500 mg/L の標準溶液を調製した。また、超純水を 0 mg/L の標準溶液とした。

*1 : JIS K0557 A4 グレードの水

2) 標準溶液の分析方法

標準溶液を適量採取し、LC/MS 測定に供した。

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-4-1)。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

1)で調製した 0.0500 mg/L の標準溶液を 2) に従って n=3 で分析した。各測定値から S/N 比 = 10 のシグナルを与える被験物質濃度をそれぞれ算出し、その平均値を暴露期間中の定量下限とした。暴露期間中の定量下限は 0.02 mg/L であった。

3. 試験液の分析

試験液を以下のように分析した。測定結果を Figure A-4-2 に示す。

試験液（超純水で適宜希釈^{*2}）を適量採取

|

LC/MS 測定

*2 : 検量線範囲を超えると予想されたものについて希釈した。

4. 試験液中の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-4-1 Calibration Curve

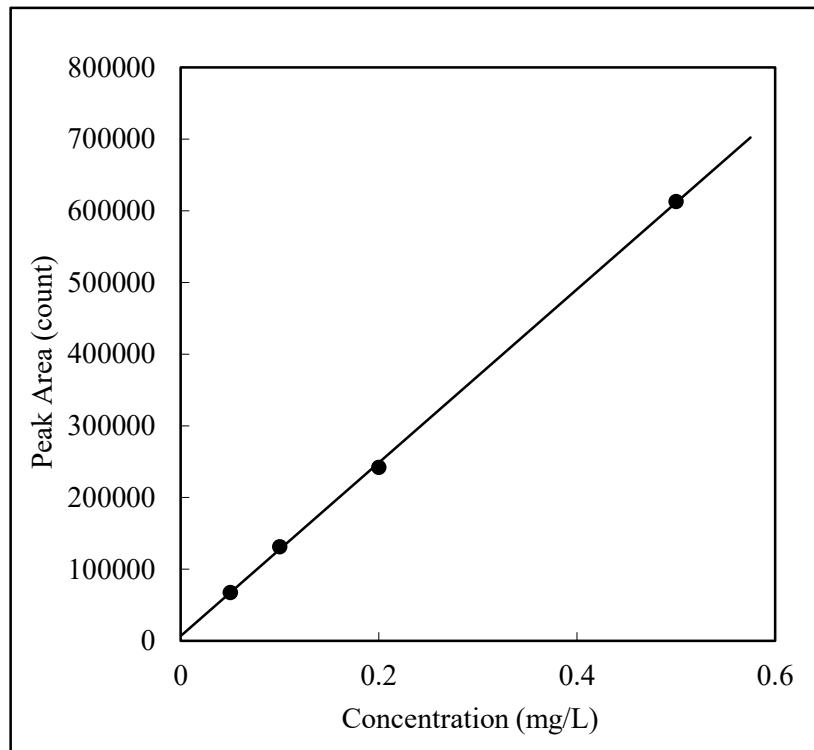
No.	Concentration X (mg/L)	Peak Area Y (count)
1	0.0500	67819
2	0.100	131615
3	0.200	242311
4	0.500	612915

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

$$a = 6.735E+03 \quad -1.149E+04 < a < 2.496E+04$$

b = 1.209E+06 (95-Percent Confidence Limits)

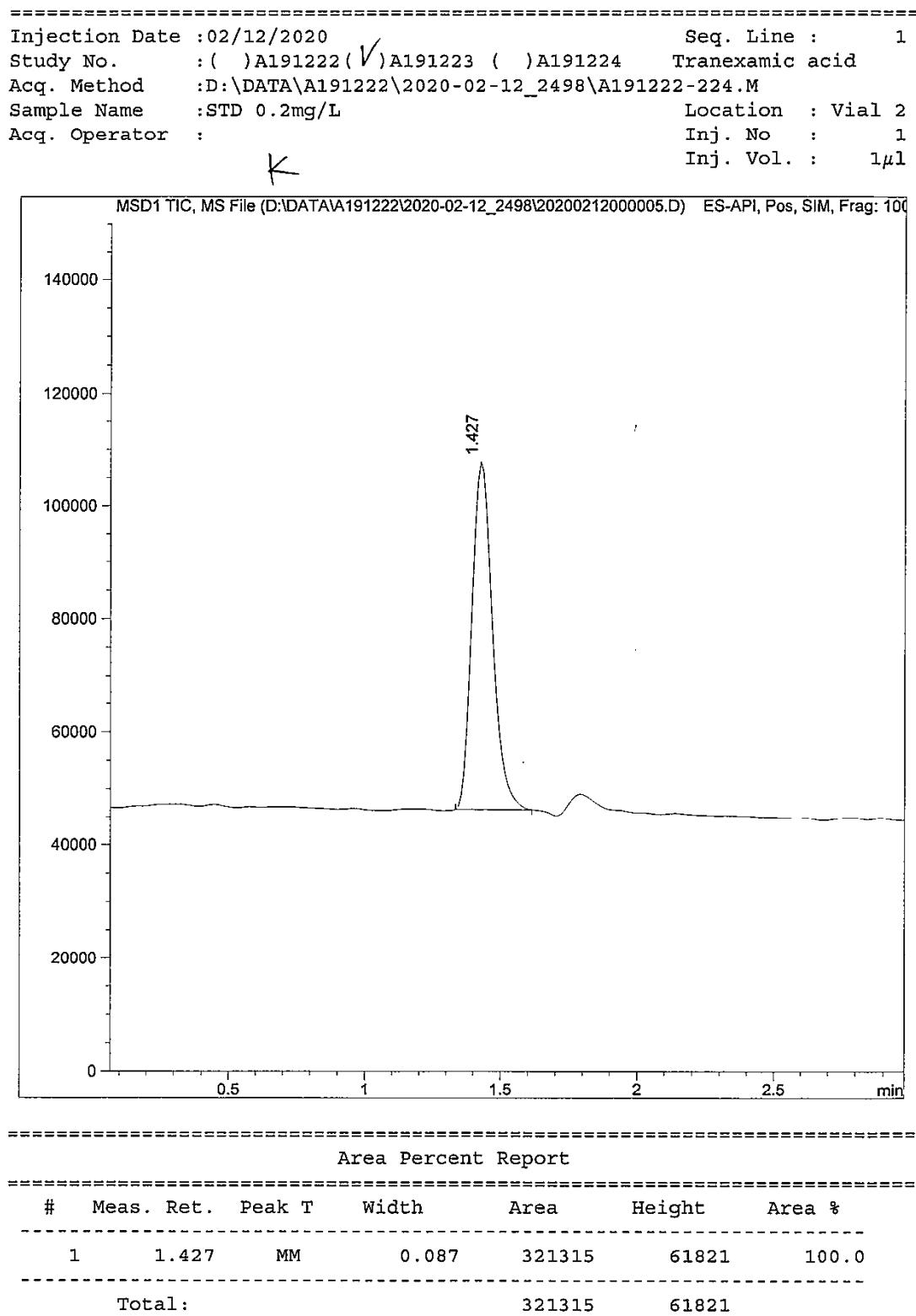
r = 1.000



Daphnia Acute Immobilization Test

Figure A-4-2 Measurement Results

(1) Standard 0.200 mg/L : 0 Hour

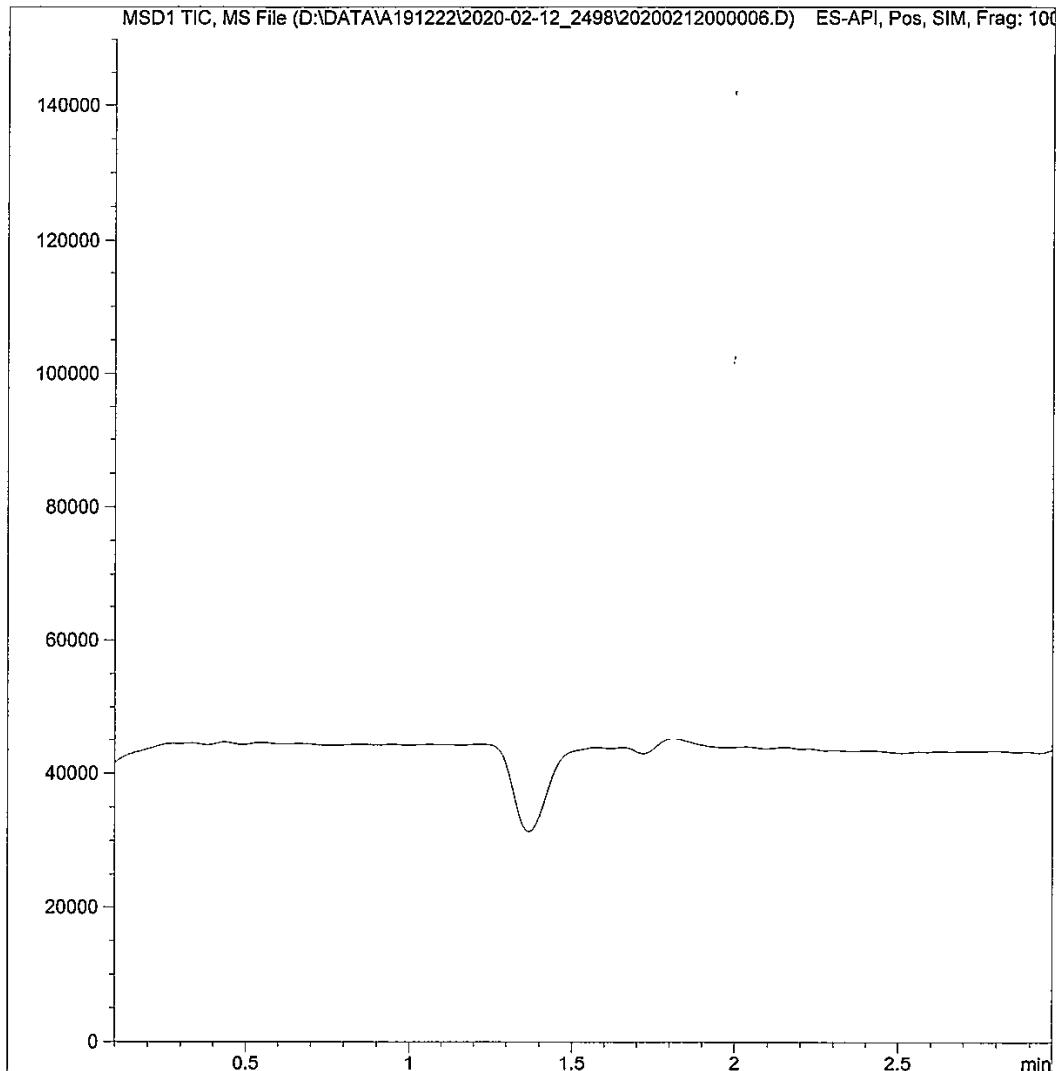


Daphnia Acute Immobilization Test

Figure A-4-2 Measurement Results (continued)

(2) Control : 0 Hour – New

```
=====
Injection Date : 02/12/2020          Seq. Line :      2
Study No.    : ( )A191222(✓)A191223 ( )A191224   Tranexamic acid
Acq. Method   : D:\DATA\A191222\2020-02-12_2498\A191222-224.M
Sample Name    : D0hCn                Location  : Vial 11
Acq. Operator  : K                  Inj. No   :      1
                                         Inj. Vol. : 1µl
```



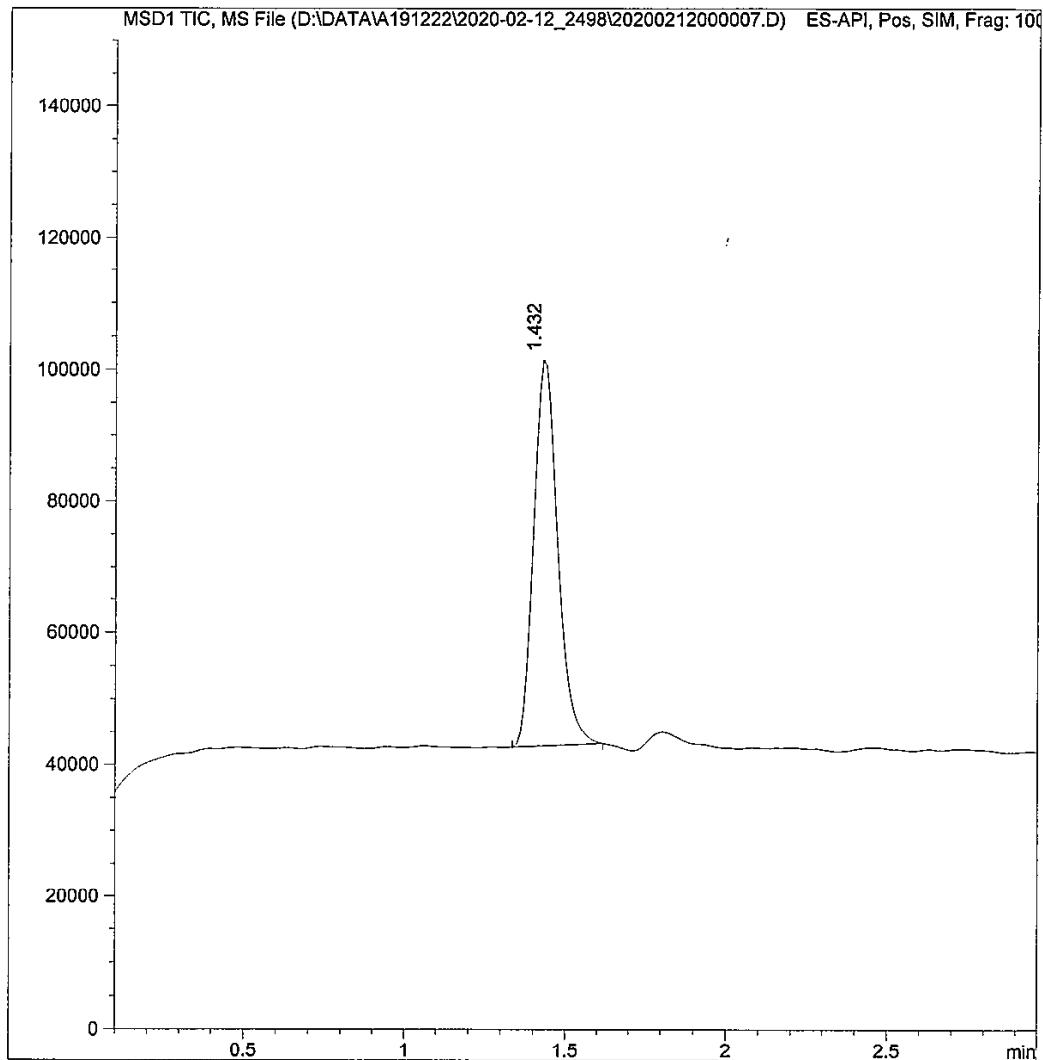
```
=====
Area Percent Report
=====
# Meas. Ret. Peak T Width Area Height Area %
-----
Total:
```

Daphnia Acute Immobilization Test

Figure A-4-2 Measurement Results (continued)

(3) Conc. 1 : 0 Hour – New

```
=====
Injection Date : 02/12/2020          Seq. Line :      3
Study No.      : ( )A191222(✓)A191223 ( )A191224    Tranexamic acid
Acq. Method    : D:\DATA\A191222\2020-02-12_2498\A191222-224.M
Sample Name     : D0hC1n           Location  : Vial 12
Acq. Operator   : F               Inj. No   :      1
                                         Inj. Vol. : 1µl
```



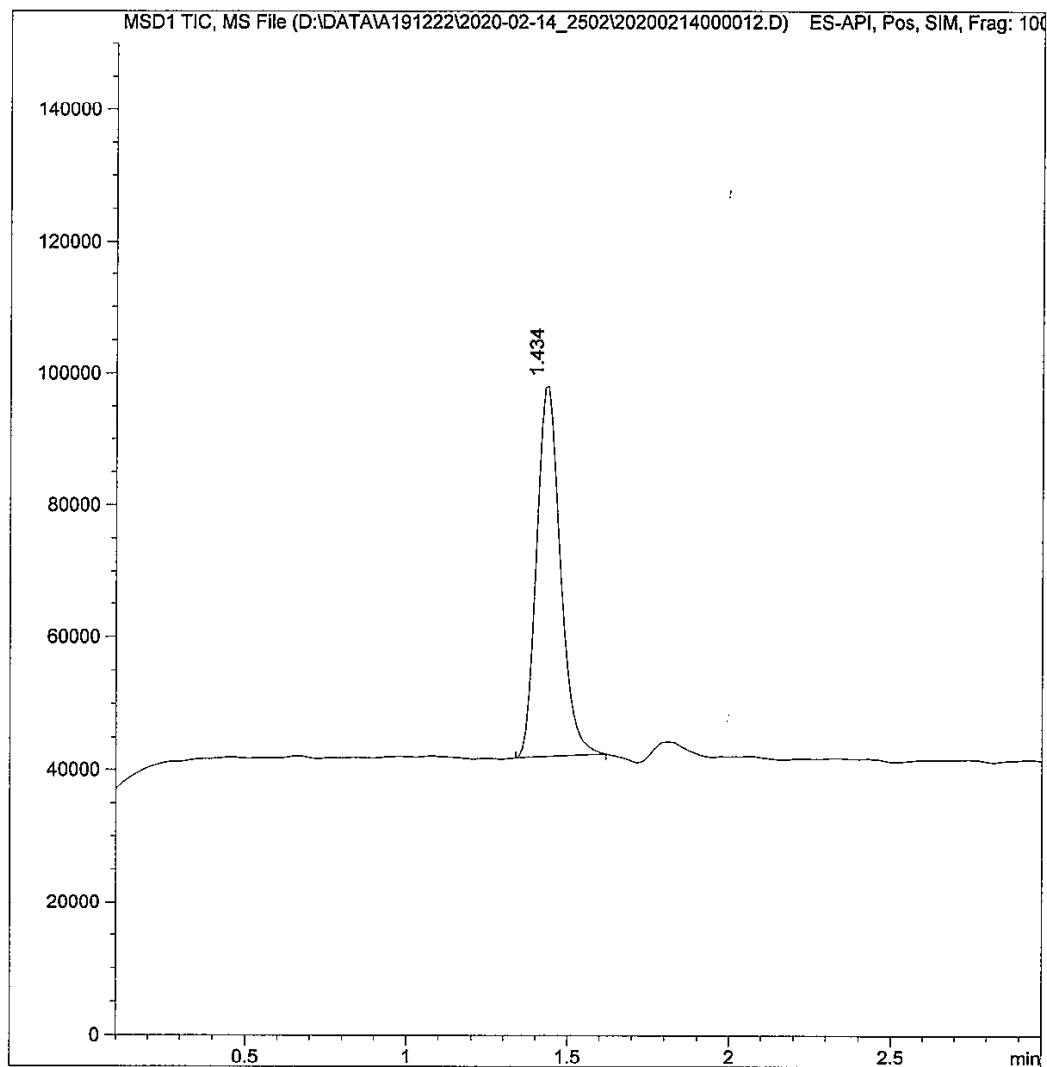
```
=====
Area Percent Report
=====
# Meas. Ret. Peak T      Width       Area        Height      Area %
-----+
1      1.432      MM      0.087    307412    59106    100.0
-----+
Total:                               307412    59106
```

Daphnia Acute Immobilization Test

Figure A-4-2 Measurement Results (continued)

(4) Standard 0.200 mg/L : 48 Hours

```
=====
Injection Date : 02/14/2020           Seq. Line :        4
Study No.      : ( )A191222( ✓)A191223 ( )A191224   Tranexamic acid
Acq. Method    : D:\DATA\A191222\2020-02-14_2502\A191222-224.M
Sample Name     : STD 0.2mg/L          Location  : Vial 2
Acq. Operator   : K                 Inj. No   :        1
                                         Inj. Vol. : 1µl
```

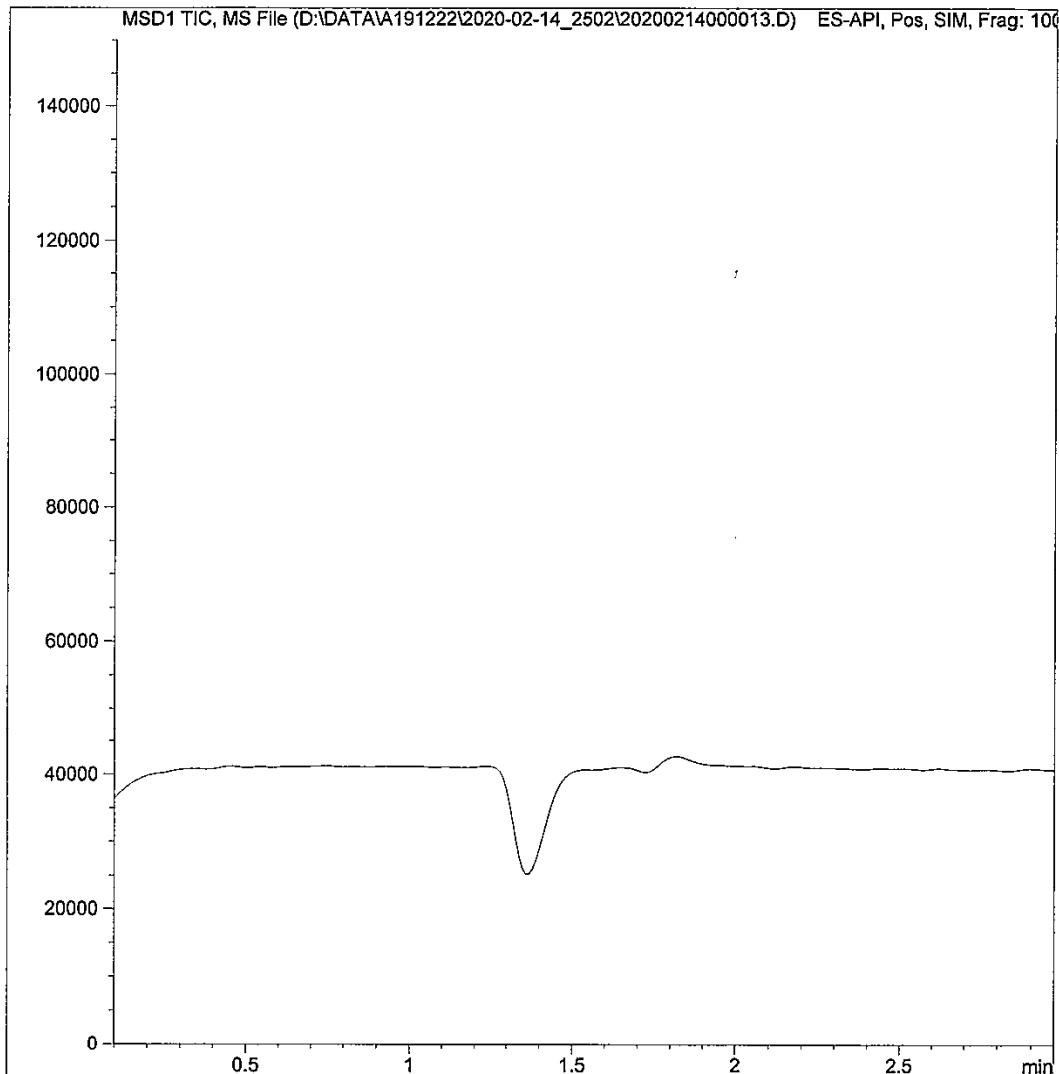


```
=====
Area Percent Report
=====
# Meas. Ret. Peak T Width Area Height Area %
-----+
1       1.434   MM     0.085  289580  56732  100.0
-----+
Total:                           289580  56732
```

Figure A-4-2 Measurement Results (continued)

(5) Control : 48 Hours – Old

```
=====
Injection Date :02/14/2020          試料削除2020.2.14 K Seq. Line :      5
Study No.      :( )A191222(✓)A191223 ( )A191224 Tranexamic acid
Acq. Method    :D:\DATA\A191222\2020-02-14_2502\A191222-224.M
Sample Name     :D48hC0           Location   :Vial 13
Acq. Operator   :K              Inj. No.   :      1
                                Inj. Vol. : 1μl
```



=====
Area Percent Report

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

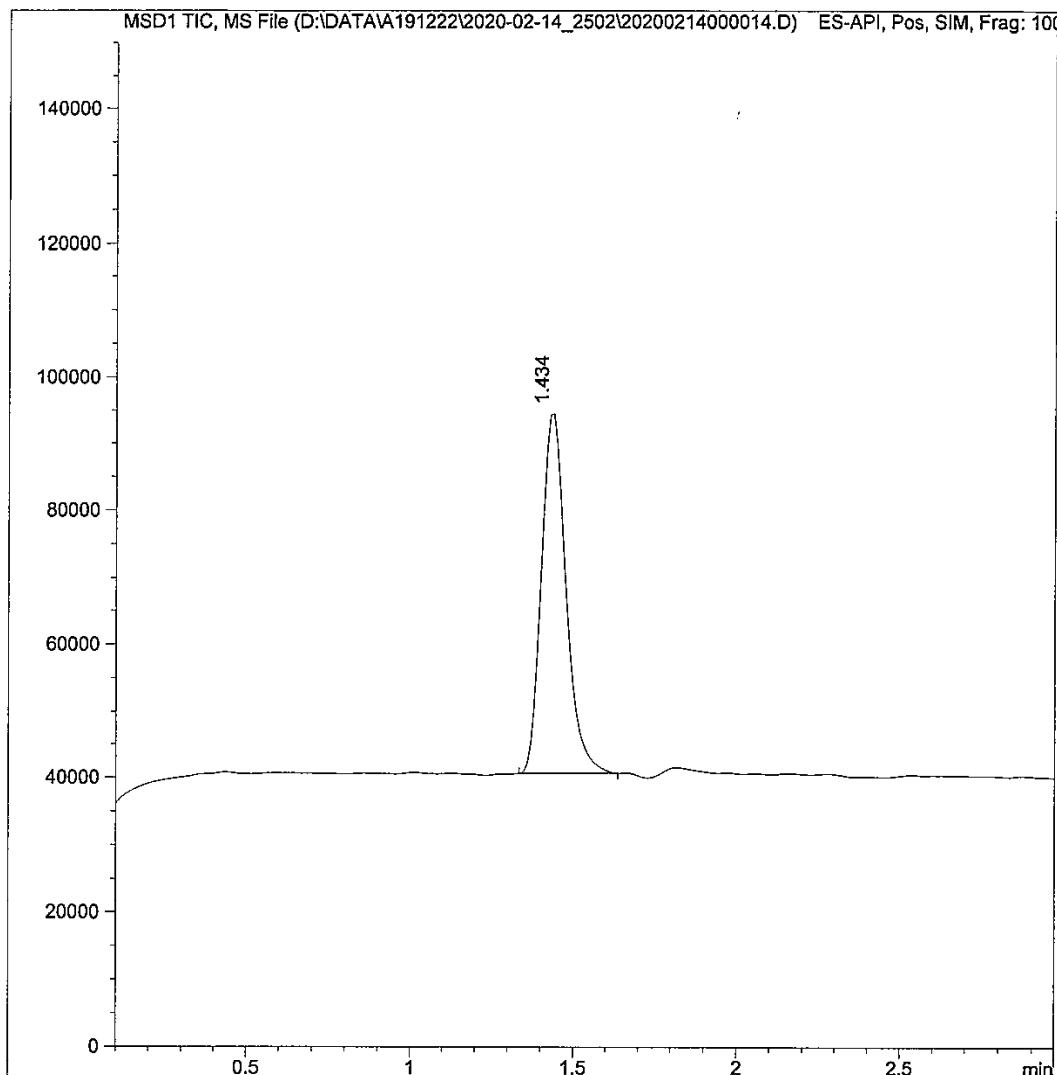
Total:

Daphnia Acute Immobilization Test

Figure A-4-2 Measurement Results (continued)

(6) Conc. 1 : 48 Hours – Old

```
=====
Injection Date :02/14/2020           Seq. Line :      6
Study No.      :( )A191222(√)A191223 ( )A191224   Tranexamic acid
Acq. Method    :D:\DATA\A191222\2020-02-14_2502\A191222-224.M
Sample Name     :D48hC10          Location  :Vial 14
Acq. Operator   :K             Inj. No   :      1
                                Inj. Vol. : 1μl
```



```
=====
Area Percent Report
=====
# Meas. Ret. Peak T Width Area Height Area %
-----+
1     1.434   MM    0.087  283305  54541  100.0
-----+
Total:                               283305  54541
```