

## 2. ミジンコ急性遊泳阻害試験

### 要 約

試験委託者： 環境省

表 題： レバミピドのオオミジンコ (*Daphnia magna*) に対する急性遊泳阻害試験

試験番号： A200020

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。

不溶物を除去した水溶性画分<sup>\*1</sup>を試験液とし生物への暴露を行った。

<sup>\*1</sup>：水溶性画分（WSF，Water-soluble fraction）：

被験物質が溶解状態で存在しているとみなすことができる水溶性画分

- 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±1℃
- 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	10 <sup>*2</sup>
濃度区 2	18 <sup>*2</sup>
濃度区 3	32 <sup>*2</sup>
濃度区 4	56 <sup>*2</sup>
濃度区 5 <sup>*3</sup>	100

<sup>\*2</sup>：濃度区 1-4 は負荷率 100 mg/L の濃度区用原液を希釈して調製したため，希釈率から算出した値を記載

<sup>\*3</sup>：試験ガイドライン上限濃度

9) 分析方法： 高速液体クロマトグラフ (HPLC) 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) : >93.1 mg/L (95%信頼区間 算出不可)

## 1 材料

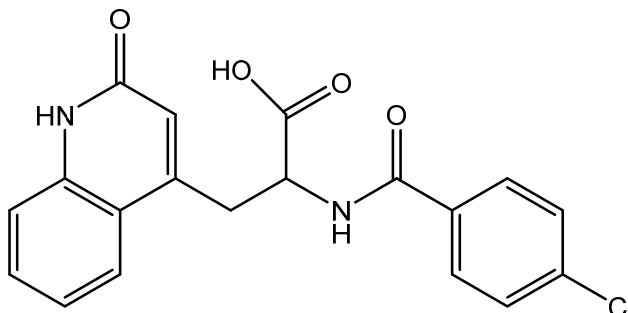
### 1.1 被験物質

#### 1.1.1 名称, 構造式および物理化学的性状

名 称\*: レバミピド

CAS 番号\*: 90098-04-7

構造式:



分子式\*:  $C_{19}H_{15}ClN_2O_4$

分子量\*: 370.79

\*: 供給者提供資料

#### 1.1.2 供試試料

純度\*: 99.3%

ロット番号\*: PTBTL-GS

供給者: 東京化成工業株式会社

外観\*: 白色～ほとんど白色, 結晶～粉末

\*: 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, 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

Elendt M4 medium（試験ガイドラインに示されている調製水）を十分ばっ気し、 $20 \pm 1^\circ\text{C}$  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  $240 \text{ mg CaCO}_3/\text{L}$  および 7.8 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：  $20 \pm 1^\circ\text{C}$
  - 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 2 月 5 日～2020 年 3 月 4 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 ガラス容ビーカー（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 クールユニット 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）：東亜ディーケーケー製 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 薬食発 0331 第 7 号，平成 23・03・29 製局第 5 号，環企発第 110331009 号，最終改正：令和元年 7 月 1 日）に準拠して実施した。

不溶物を除去した水溶性画分\*を試験液とし生物への暴露を行った。なお，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。

\* 水溶性画分（WSF，Water-soluble fraction）：

被験物質が溶解状態で存在しているとみなすことができる水溶性画分

#### 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。被験物質を試験用水に添加し、スターラー攪拌を 24 時間実施した後、フィルター<sup>\*1</sup>でろ過<sup>\*2</sup>して不溶の被験物質を除くことにより、負荷率<sup>\*3</sup> 100 mg/L の原液を調製した。この原液を試験用水で希釈して試験液を調製した。結果を以下に示す。

\*1：メルクミリポア製，メンブレンフィルター HA 0.45 μm

\*2：東洋濾紙製，吸引ポンプ EP-01 型

\*3：負荷率（Loading rate）：WSF の調製の際に用いられる被験物質と水の重量対容積比

## 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 <sup>*4</sup>	0
10 <sup>*4</sup>	0
100	0

供試生物数：10 頭／試験区（5 頭／容器，各 2 連）

\*4：負荷率 100 mg/L の濃度区用原液を希釈して調製したため，希釈率から算出した値を記載

## 2.1.3 不採用とした試験結果

2.1.2 に示した予備試験の結果に基づき，本試験を実施した。結果を以下に示す。濃度区 1 において，30%の遊泳阻害が認められた。そのため，この暴露を不採用とした。

試験区	負荷率 (mg/L)	48 時間後の 遊泳阻害率(%)
対照区	—	0
濃度区1 <sup>*5</sup>	100	30

\*5：試験ガイドライン上限濃度を負荷率とした限度試験

## 2.1.4 試験濃度の設定

2.1.2 および 2.1.3 に示した予備試験の結果および不採用とした本試験の暴露結果に基づき、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	10 <sup>*1</sup>
濃度区 2	18 <sup>*1</sup>
濃度区 3	32 <sup>*1</sup>
濃度区 4	56 <sup>*1</sup>
濃度区 5 <sup>*2</sup>	100

公比：1.78

\*1：負荷率 100 mg/L の濃度区用原液を希釈して調製したため、希釈率から算出した値を記載

\*2：試験ガイドライン上限濃度

## 2.1.5 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。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。

## 2.1.6 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（HPLC）法により行った。分析方法の詳細を付属資料－5 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

## 2.1.7 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：試験容器を穏やかに動かした後、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。

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

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

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、 $Area = ConcAn \times Hours$  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。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、濃度－遊泳阻害率曲線を作成し、以下の方法で EC50 を決定した。

最高濃度区 における阻害率	EC50 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_D*
$< 50\%$	推定される濃度領域とする

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

## 3) 0%阻害最高濃度 (EC0) および 100%阻害最低濃度 (EC100)

暴露期間中に、全ての供試生物が遊泳阻害を受けない最高濃度区を 0%阻害最高濃度 (EC0) とし、全ての供試生物が遊泳阻害を受ける最低濃度区を 100%阻害最低濃度 (EC100) とする。暴露終了時に、各試験区の遊泳阻害率 (%) から EC0 および EC100 を可能な限り決定した。

## 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

試験液の水溫、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、水溫は  $20 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 、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、けん濁物質、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-5 に示す。

濃度区 1~5 の測定値 (時間加重平均値) は、それぞれ 9.36, 16.9, 30.1, 52.4 および 93.1 mg/L であり、暴露期間中に被験物質濃度の減少はみられなかった。

#### 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、濃度-遊泳阻害率曲線を Figure 1 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った。

濃度区 1~5 において、暴露終了時の遊泳阻害率は、それぞれ 0, 0, 10, 10 および 20% 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 : >93.1 mg/L (95%信頼区間 算出不可)

#### 3.6 0%阻害最高濃度 (EC0) および 100%阻害最低濃度 (EC100)

暴露終了時における EC0 および EC100 を Table 8 および以下に示す。

48 時間 EC0 : 16.9 mg/L

48 時間 EC100 : 観察されなかった。

### 3.7 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	Temperture (°C)	
	0 Hour New	48 Hours Old
Control	20.1	20.1
Conc.1	20.0	20.0
Conc.2	19.9	20.0
Conc.3	19.9	20.0
Conc.4	19.8	20.1
Conc.5	19.9	20.1
	Minimum: 19.8	Maximum: 20.1

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	8.3	8.6
Conc.1	8.9	8.6
Conc.2	8.8	8.6
Conc.3	8.8	8.7
Conc.4	8.5	8.6
Conc.5	8.0	8.6
	Minimum: 8.0	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	7.7	7.1
Conc.1	7.7	7.1
Conc.2	7.6	7.2
Conc.3	7.5	7.3
Conc.4	7.4	7.2
Conc.5	7.1	7.2
	Minimum: 7.1	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-
Conc.2	Color	C-	C-
	Suspended solids	S-	S-
	Floating solids	F-	F-
	Precipitation	P-	P-
Conc.3	Color	C-	C-
	Suspended solids	S-	S-
	Floating solids	F-	F-
	Precipitation	P-	P-
Conc.4	Color	C-	C-
	Suspended solids	S-	S-
	Floating solids	F-	F-
	Precipitation	P-	P-
Conc.5	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 (mg/L)	Measured Concentration (mg/L)		
		0 Hour New	48 Hours Old	Mean <sup>a</sup>
		(Percent of Nominal, %)		
Control	--	<0.5	<0.5	--
Conc.1	10	9.39 (94)	9.33 (93)	9.36 (94)
Conc.2	18	17.0 (94)	16.9 (94)	16.9 (94)
Conc.3	32	30.5 (95)	29.7 (93)	30.1 (94)
Conc.4	56	52.9 (94)	52.0 (93)	52.4 (94)
Conc.5	100	95.6 (96)	90.7 (91)	93.1 (93)

Lower limit of quantification: 0.5 mg/L

a: Time-weighted mean

New: New test solution freshly prepared

Old: Old test solution at the end of the exposure

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

Test Group	Nominal Concentration (mg/L)	Mean <sup>a</sup> Measured Concentration (mg/L)	Cumulative Number of Immobilised <i>Daphnia</i> (Percent Immobility)	
			24 Hours	48 Hours
Control	--	--	0 (0)	0 (0)
Conc.1	10	9.36	0 (0)	0 (0)
Conc.2	18	16.9	0 (0)	0 (0)
Conc.3	32	30.1	1 (5)	2 (10)
Conc.4	56	52.4	2 (10)	2 (10)
Conc.5	100	93.1	2 (10)	4 (20)

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	>93.1 *	--	--
48	>93.1 *	--	--

\* : The EC50 value and its 95% confidence limits could not be determined by statistical method because the immobility of *Daphnia* at the maximum concentration level was less than 50%. Therefore, the EC50 value was given as an estimated concentration range.

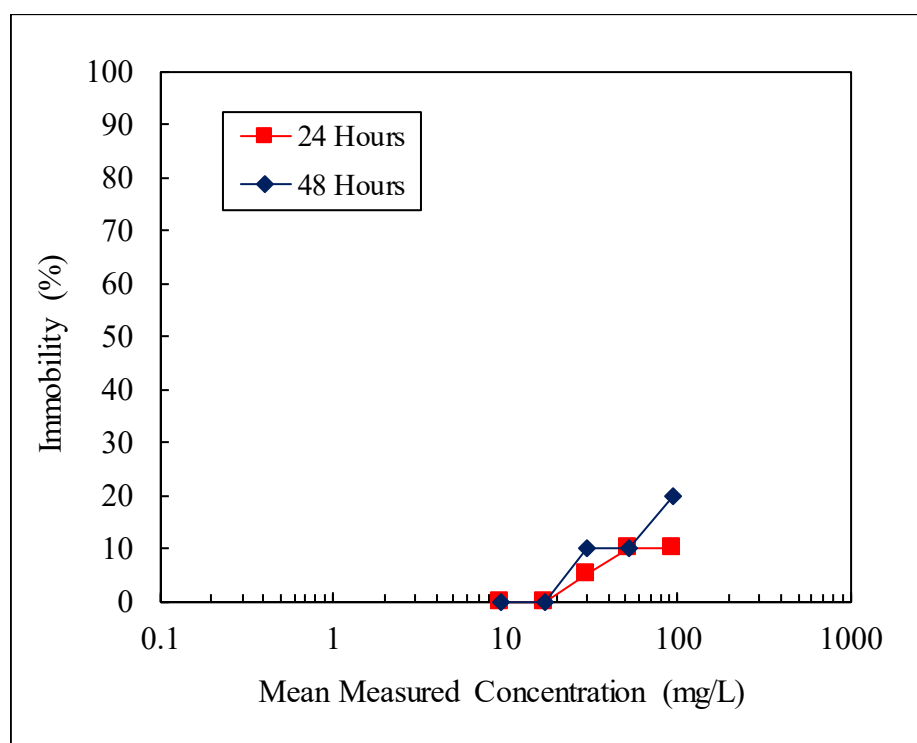


Table 8 Highest Concentration with 0% Immobility (EC0) and Lowest Concentration with 100% Immobility (EC100)

Exposure Period (Hours)	EC0 (mg/L)	EC100 (mg/L)
48	16.9	--

-- : Not observed

Figure 1 Concentration-Immobilization 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

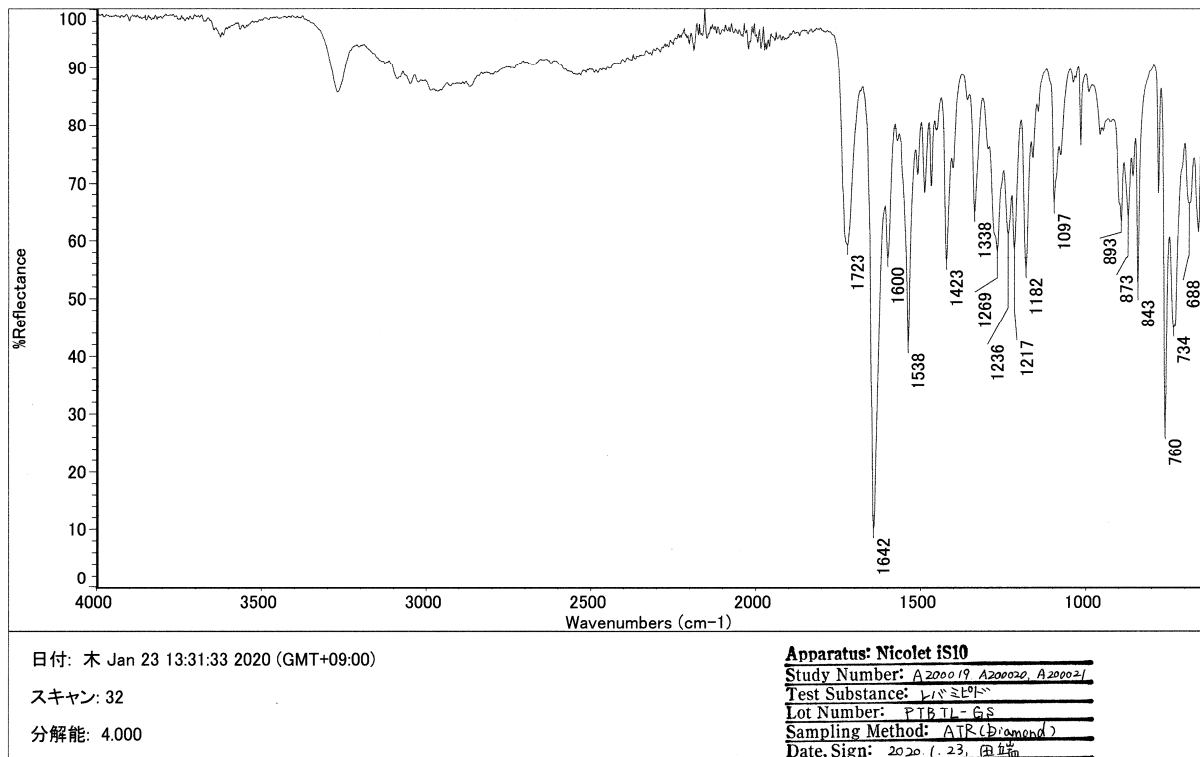
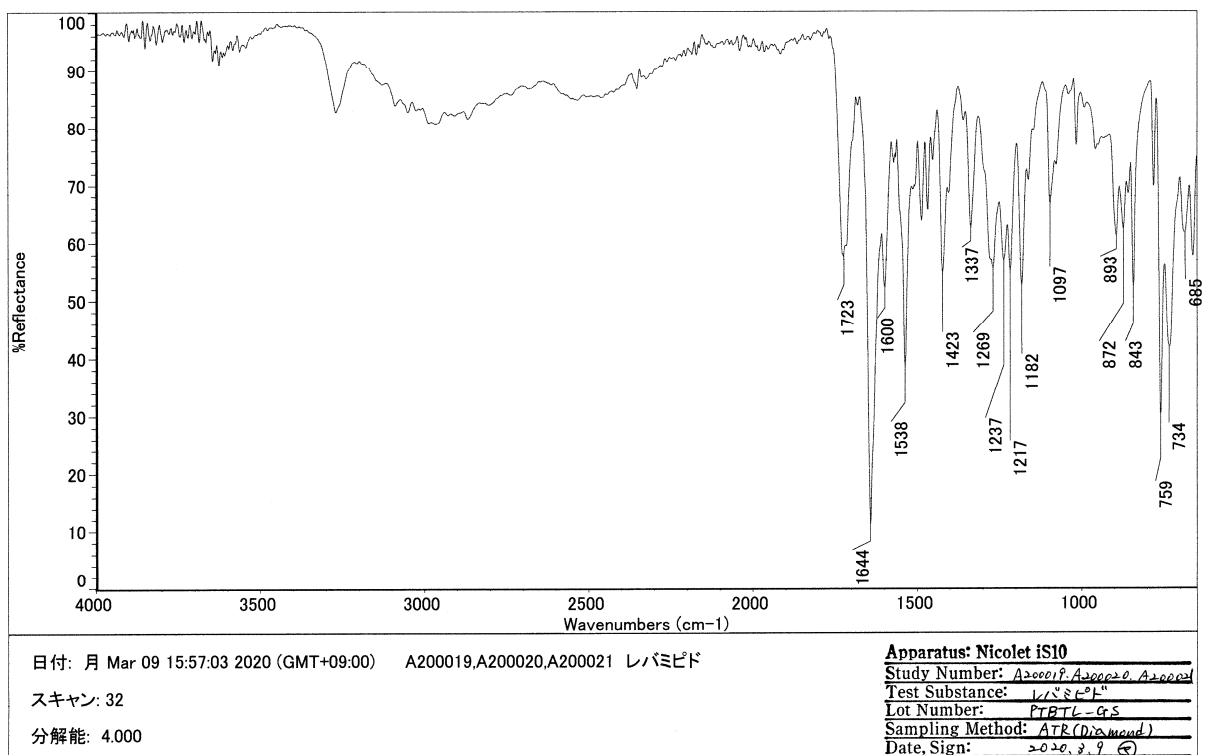


Figure A-1-2 Infrared Absorption Spectrum of the Test Substance after the End of Exposure



## 付属資料－2

試験用水の組成

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

Macro nutrients	Concentration (mg/L)
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	293.8
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	123.3
KCl	5.8
NaHCO <sub>3</sub>	64.8
Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub> ·9H <sub>2</sub> O	10.0
NaNO <sub>3</sub>	0.274
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.143
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.184

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

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

### 付属資料一3

試験用水に対する溶解性

## 1. 概要

以下に示す試験用水に対する被験物質の溶解性を評価した。

脱塩素水道水（魚類急性毒性試験用）

Elendt M4 medium（ミジンコ急性遊泳阻害試験用）

OECD 培地（藻類生長阻害試験用）

## 2. 方法

1) 被験物質 20 mg を共栓付 200 mL 三角フラスコに採取し、各試験用水を 200 mL 加えた。（仕込み濃度：100 mg/L，連数：3）

2) 脱塩素水道水は 24℃，Elendt M4 medium および OECD 培地は 21℃でスターラー<sup>\*1</sup>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<sup>\*2</sup> でろ過し、得られたろ液の被験物質濃度を高速液体クロマトグラフ（HPLC）計により測定した。

\*2：メルクミリポア製 HAWP09000 0.45 μm

## 3. 結果および考察

## 測定結果

No.	脱塩素水道水		Elendt M4 medium		OECD培地	
	測定濃度 (mg/L)	平均値 (mg/L)	測定濃度 (mg/L)	平均値 (mg/L)	測定濃度 (mg/L)	平均値 (mg/L)
1	85.9	85	84.8	84	85.5	85
2	84.1		83.4		85.6	
3	84.6		83.6		83.9	

以上の結果から、被験物質の試験用水に対する溶解度は、脱塩素水道水（24℃）で 85 mg/L，Elendt M4 medium（21℃）で 84 mg/L，OECD 培地（21℃）で 85 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

試験用水を十分ばっ気する。

1. 被験物質を下記の表の通り採取し、溶媒を最終容量まで加える。
2. スターラーで24時間（20℃）<sup>\*1</sup>攪拌する。
3. フィルター<sup>\*2</sup>でろ過後<sup>\*3</sup>，原液とする。

対照区は，試験用水のみ調製する。

<sup>\*1</sup>:日立アプライアンス製インキュベータ CRB-41A型

<sup>\*2</sup>:メルクミリポア製メンブレンフィルター 0.45 µm HA

<sup>\*3</sup>:アスピレーター ヤマト科学製 WP-15型

溶 媒	----	試験用水
調製頻度	----	暴露開始前24時間に調製

	負荷率 (mg/L)		被験物質採取量 (mg)	最終容量 (L)	容器
対照区用原液	--	----	0	1.0	1 L メジューム瓶
濃度区用原液	100	----	200	2.0	2 L メジューム瓶

## 2. 試験液の調製

原液を下記の表の通り採取し，試験用水を加え最終容量とする。

溶 媒	----	試験用水
最終容量	----	500 mL
容 器	----	500 mL メスフラスコ
混合方式	----	転倒攪拌

試験区	設定濃度 (mg/L)		原液採取量 (mL)
対照区	—	----	対照区用原液をそのまま使用
濃度区1	10 <sup>*4</sup>	----	50
濃度区2	18 <sup>*4</sup>	----	90
濃度区3	32 <sup>*4</sup>	----	160
濃度区4	56 <sup>*4</sup>	----	280
濃度区5 <sup>*5</sup>	100	----	濃度区用原液をそのまま使用

<sup>\*4</sup>: 濃度区1-4は負荷率100 mg/Lの濃度区用原液を希釈して調製するため，希釈率から算出した値を記載

<sup>\*5</sup>: 試験ガイドライン上限濃度

## 付属資料－5

### 試験液の分析

1. 高速液体クロマトグラフ (HPLC) 計 測定条件

装置

高速液体クロマトグラフ Agilent 1200 型(No.1), Agilent Technologies 製

ワークステーション : ChemStation

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 : G1329B 型

カラムオーブン : G1316B 型

ダイオードアレイ検出器 (DAD) : G1315C 型

条件

カラム : GLサイエンス製 InertSustain Phenyl 2 $\mu$ m, 2.1 mm i.d.  $\times$  100 mm

カラムオーブン : 40 $^{\circ}$ C

溶離液 : A2液 : 0.1%酢酸水\*溶液, B2液 : HPLC用アセトニトリル

A液 68%, B液 32%

ストップタイム : 5 min

流 速 : 0.3 mL/min

測定波長 : 254 nm

試料注入量 : 50  $\mu$ L

\* : 超純水 JIS K0557 A4 グレードの水

## 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 0.0500 mg を秤量し、*N, N*-ジメチルホルムアミドで溶解し 50 mL に定容とし、1000 mg/L 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、0.500, 1.00, 5.00 および 10.0 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) 標準溶液の分析方法

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 0.75 mL 添加  
混合  
|  
HPLC測定

### 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)で調製した検量線作成に用いる標準溶液の最低濃度である 0.500 mg/L を定量下限とした。

## 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\*) 0.75 mL 採取  
| ←HPLC用テトラヒドロフラン 0.75 mL 添加  
混合  
|  
HPLC 測定

\* : 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	0.500	4.403
2	1.00	9.088
3	5.00	47.060
4	10.0	91.059

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

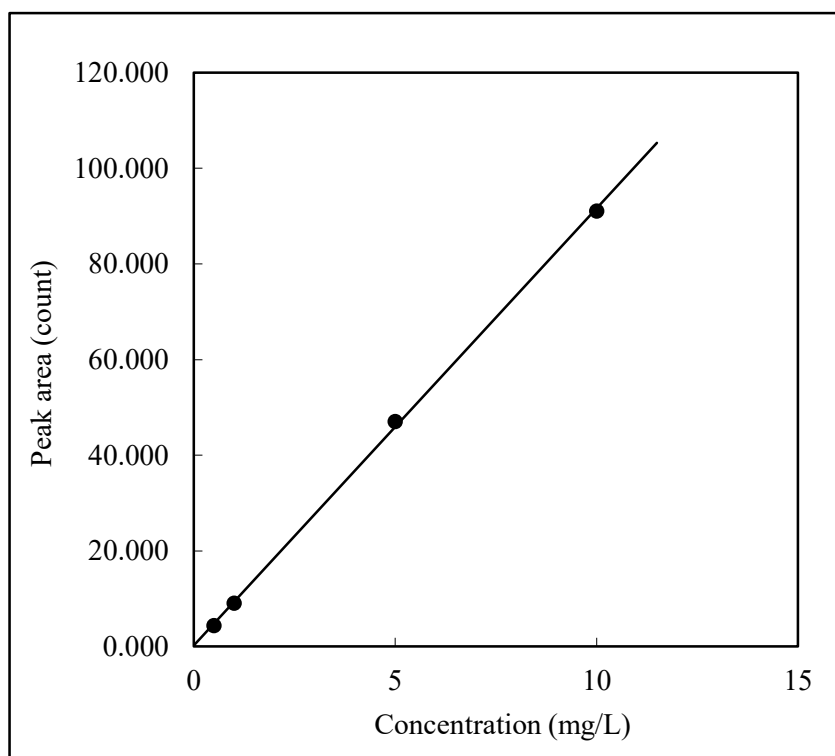
$$a = 2.032E-01$$

$$b = 9.139E+00$$

$$r = 1.000$$

$$-2.833E+00 < a < 3.240E+00$$

( 95 % confidence interval)



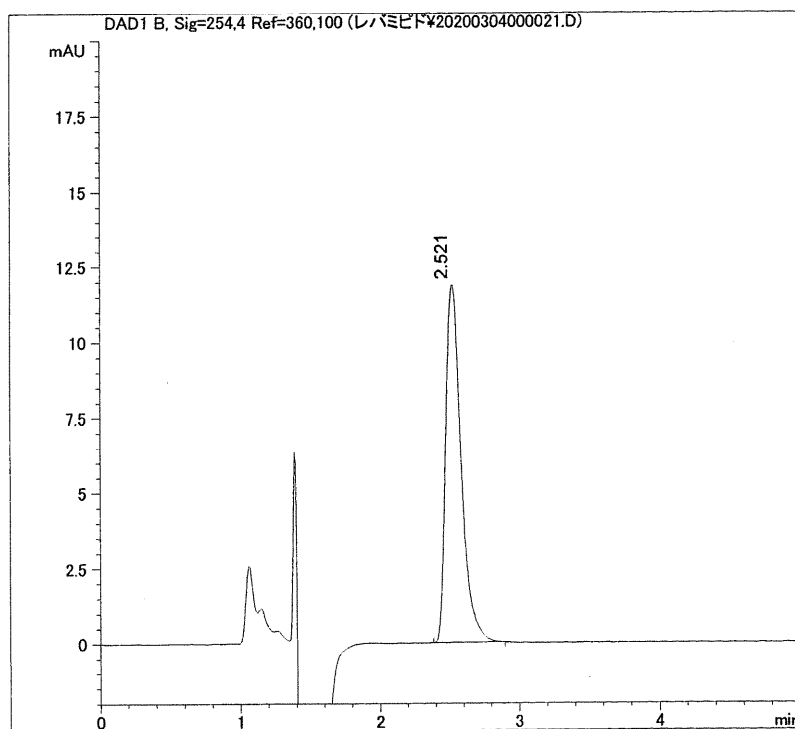
## Figure A-4-2 Representative Measurement Results

(1) Standard 10.0 mg/L : 0 Hour

```

=====
Injection Date:2020/03/04                      Seq Line   :      21
Study No.    : [ JA200019 [V]A200020 [V]A200021 レバミピド
Acq. Method  : C:\CHEM32\1\METHODS\レバミピド.M  Inj. No.    : 171 25
Sample Name   : STD 10 mg/L                      Location    :      1
Acq Operator  : 田中                               Inj. Vol.   :    50 µl
=====

```



## Area Percent Report

#	Meas. Ret.	Peak T	Width	Area	Height	Area %
1	2.521	MM	0.128	91.059	12	100.0
Total:				91.059	12	

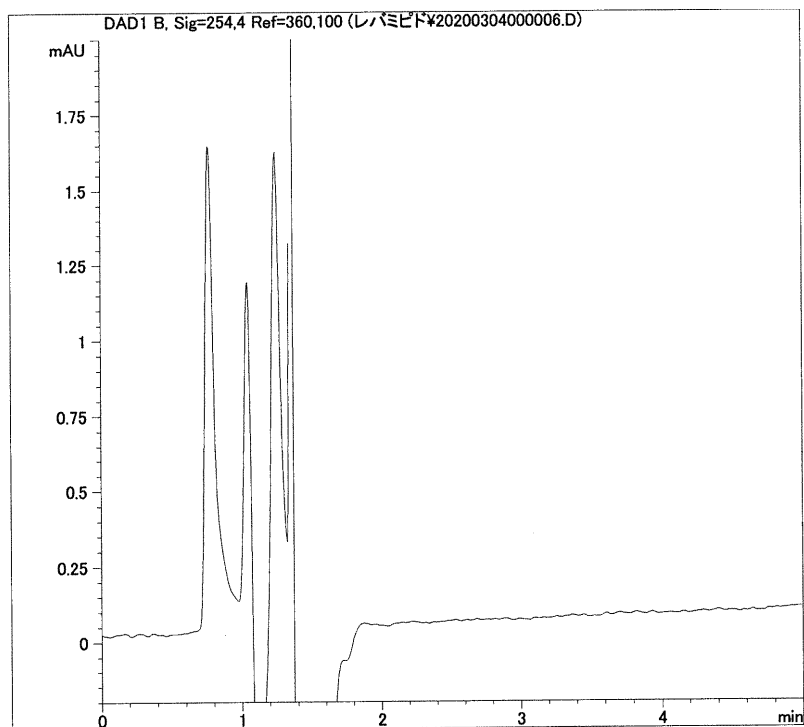
\*\*\* End of Report \*\*\*



Figure A-4-2 Representative Measurement Results (continued)

(2) Control : 0 Hour – New

Injection Date: 2020/03/04	Seq Line : 6
Study No. : [ ]A200019 [✓]A200020 [ ]A200021 レバミピド	Inj. No. : 1711
Acq. Method : C:\CHEM32\1\METHODS\レバミピド.M	Location : 1
Sample Name : DOhCn	Inj. Vol. : 50 µl
Acq Operator : 田中	



## Area Percent Report

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

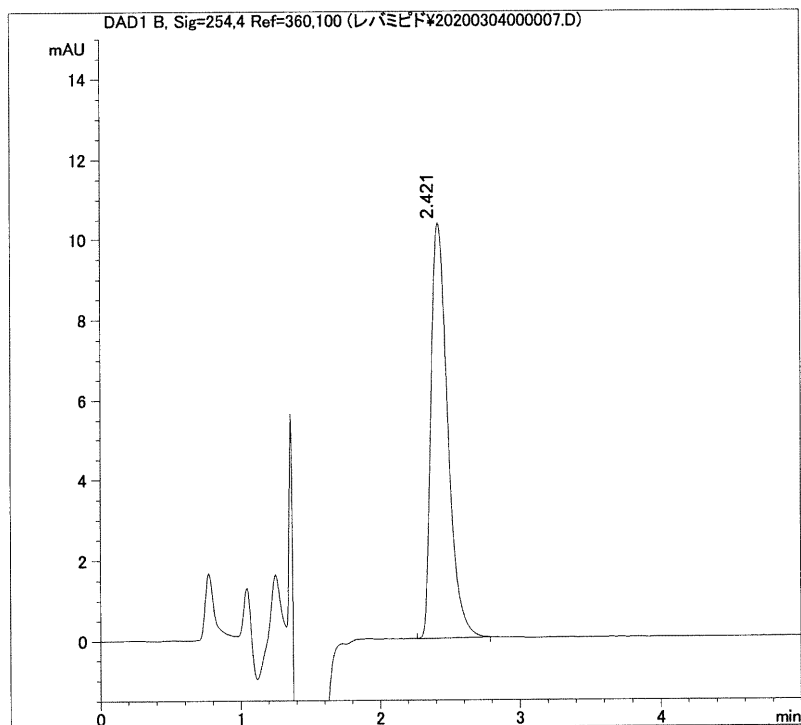
Total:

\*\*\* End of Report \*\*\*

Figure A-4-2 Representative Measurement Results (continued)

(3) Conc. 1 : 0 Hour – New

Injection Date: 2020/03/04	Seq Line : 7
Study No. : [ ] A200019 [✓] A200020 [ ] A200021 レバミピド	Inj. No. : 1712
Acq. Method : C:\CHEM32\1\METHODS\レバミピド.M	Location : 1
Sample Name : DOhC1n	Inj. Vol. : 50 µl
Acq Operator : 田端	



## Area Percent Report

#	Meas.	Ret.	Peak T	Width	Area	Height	Area %
1		2.421	MM	0.138	85.539	10	100.0
Total:					85.539	10	

\*\*\* End of Report \*\*\*

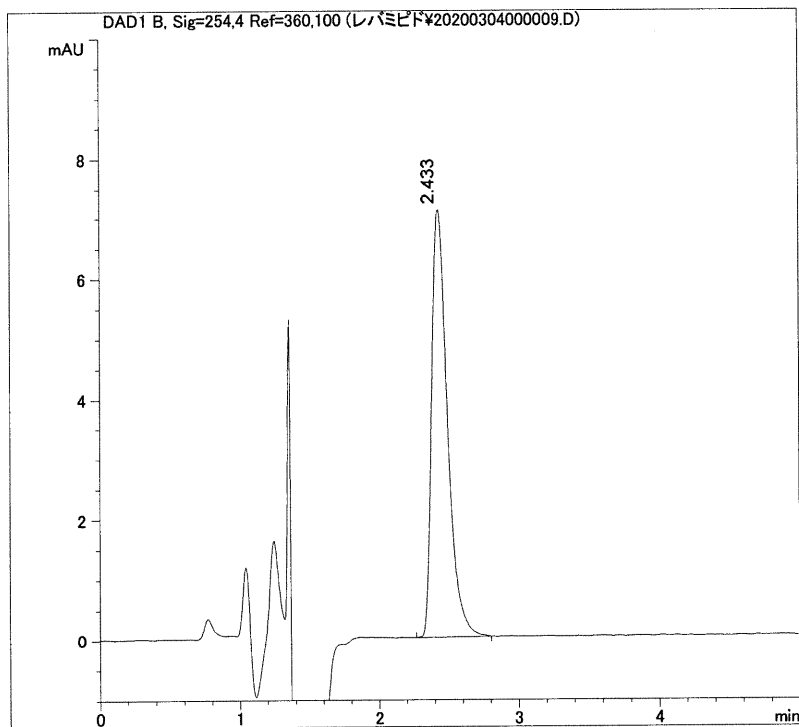
Figure A-4-2 Representative Measurement Results (continued)

(4) Conc. 3 : 0 Hour – New

```

=====
Injection Date:2020/03/04                      Seq Line   :      9
Study No.      : [ ]A200019 [✓]A200020 [ ]A200021 レバミピド
Acq. Method    : C:¥CHEM32¥1¥METHODS¥レバミピド.M  Inj. No.      : パイプル 14
Sample Name    : D0hC3n                          Location     :      1
Acq Operator   : 田嶋                               Inj. Vol.     :     50 µl
=====

```



```

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

```

#	Meas. Ret.	Peak T	Width	Area	Height	Area %
1	2.433	MM	0.130	55.508	7	100.0
Total:				55.508	7	

```

=====
*** End of Report ***
=====

```

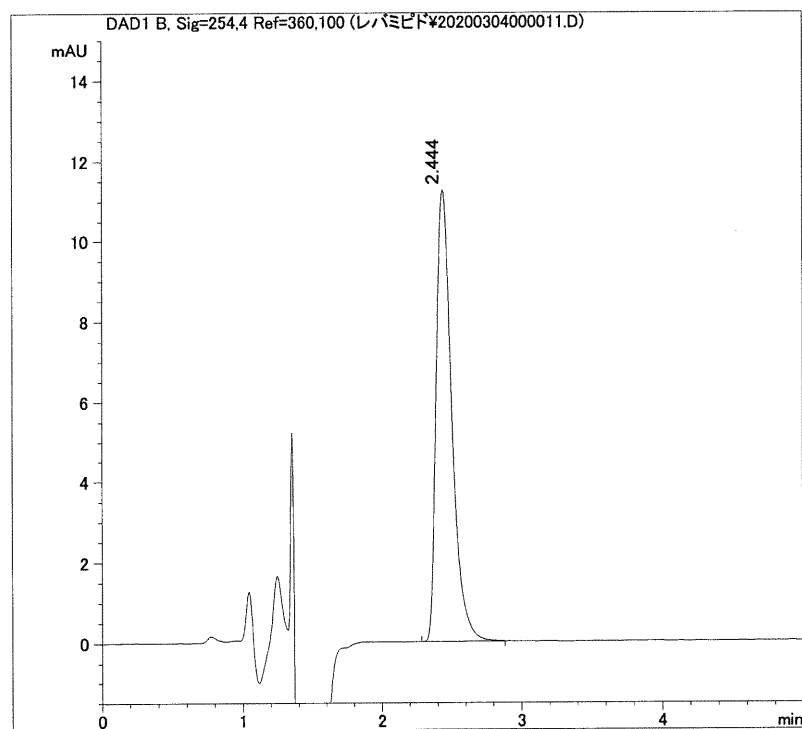
Figure A-4-2 Representative Measurement Results (continued)

(5) Conc. 5 : 0 Hour – New

```

=====
Injection Date: 2020/03/04                      Seq Line   :      11
Study No.      : [ ]A200019 [✓]A200020 [ ]A200021 レバミピド
Acq. Method    : C:\CHEM32\1\METHODS\レバミピド.M  Inj. No.    : 1716
Sample Name    : D0hC5n                          Location    :      1
Acq Operator   : 田端                               Inj. Vol.   :    50 µl
=====

```



```

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

```

#	Meas. Ret.	Peak T	Width	Area	Height	Area %
1	2.444	MM	0.129	87.013	11	100.0
Total:				87.013	11	

```

=====
*** End of Report ***
=====

```

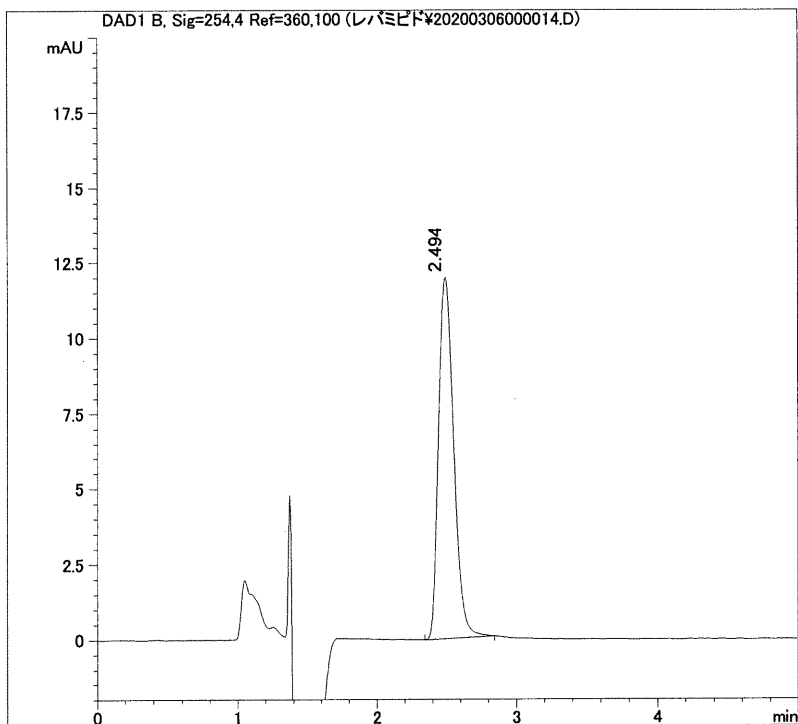
Figure A-4-2 Representative Measurement Results (continued)

(6) Standard 10.0 mg/L : 48 Hours – Old

```

=====
Injection Date:2020/03/06                      Seq Line   :      4
Study No.      : [ ]A200019 [✓]A200020 [ ]A200021 レバミピド
Acq. Method    : C:\CHEM32\1\METHODS\レバミピド.M  Inj. No.    :   バイル 2
Sample Name     : STD 10 mg/L                      Location    :      1
Acq Operator    : 田端                               Inj. Vol.   :   50 µl
=====

```



Area Percent Report						
#	Meas. Ret.	Peak T	Width	Area	Height	Area %
1	2.494	MM	0.126	90.567	12	100.0
Total:				90.567	12	
*** End of Report ***						

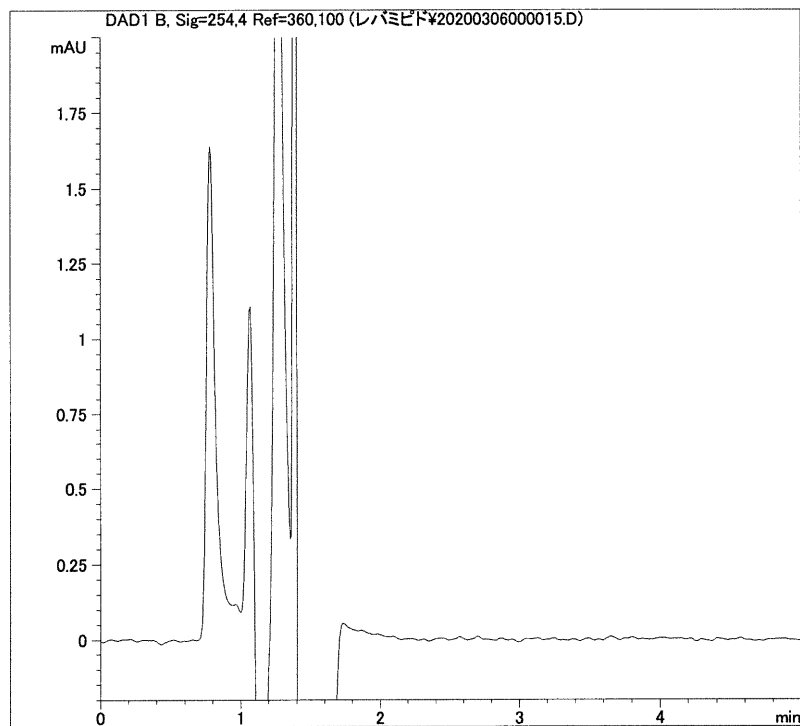
Figure A-4-2 Representative Measurement Results (continued)

(7) Control : 48 Hours – Old

```

=====
Injection Date:2020/03/06                      Seq Line   :      5
Study No.      : [ ]A200019 [x]A200020 [ ]A200021 レバミピド
Acq. Method    : C:\CHEM32\1\METHODS\レバミピド.M      Inj. No.    : ハイ7ル 11
Sample Name    : D48hCo                                Location   :      1
Acq Operator   : 田中 崇                               Inj. Vol.   :     50 µl
=====

```



```

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

```

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

```

-----
Total:
=====

```

```

*** End of Report ***
=====

```

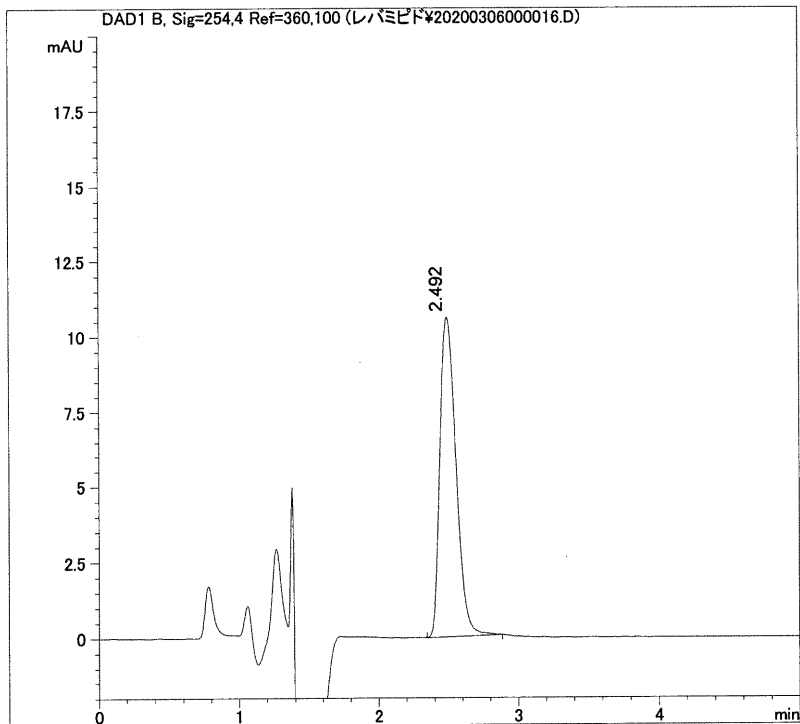
Figure A-4-2 Representative Measurement Results (continued)

(8) Conc. 1 : 48 Hours – Old

```

=====
Injection Date:2020/03/06                      Seq Line   :           6
Study No.      : [ ]A200019 [x]A200020 [ ]A200021 レバミピド
Acq. Method    : C:\CHEM32\1\METHODS\レバミピド.M Inj. No.    : ハイル 12
Sample Name    : D48hC1o                        Location   :           1
Acq Operator   : 田中                          Inj. Vol.   :          50 µl
=====

```



## Area Percent Report

#	Meas. Ret.	Peak T	Width	Area	Height	Area %
1	2.492	MM	0.133	84.542	11	100.0
Total:				84.542	11	

\*\*\* End of Report \*\*\*

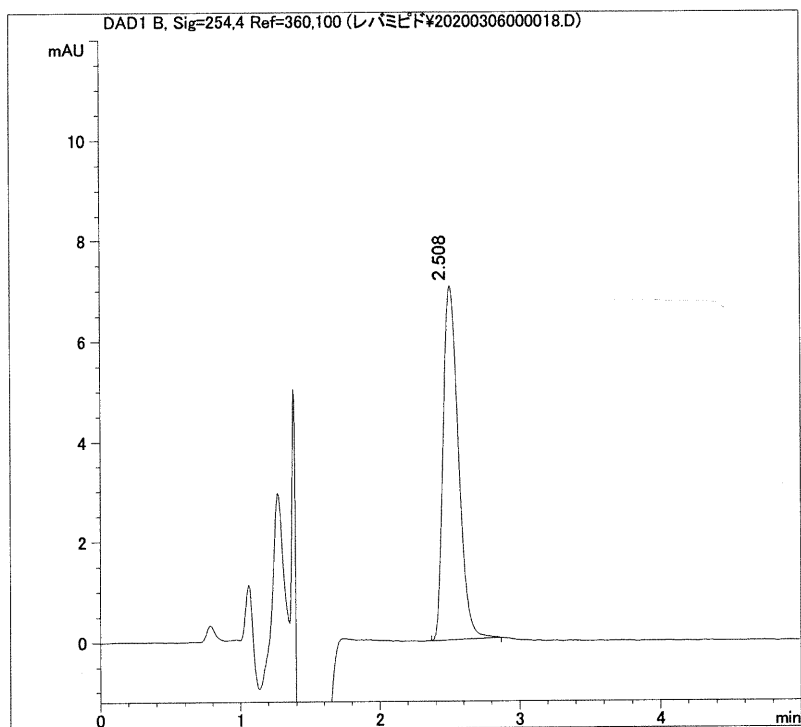
Figure A-4-2 Representative Measurement Results (continued)

(9) Conc. 3 : 48 Hours – Old

```

=====
Injection Date:2020/03/06                      Seq Line   :      8
Study No.      :[ ]A200019 [✓]A200020 [ ]A200021 レバミピド
Acq. Method    :C:¥CHEM32¥1¥METHODS¥レバミピド.M  Inj. No.    :   ハ'17ル 14
Sample Name    :D48hC3o                          Location    :      1
Acq Operator   : 田端                               Inj. Vol.   :   50 µl
=====

```



Area Percent Report						
#	Meas.	Ret.	Peak T	Width	Area	Height
1	2.508	MM	0.127	53.829	7	100.0
Total:					53.829	7

\*\*\* End of Report \*\*\*



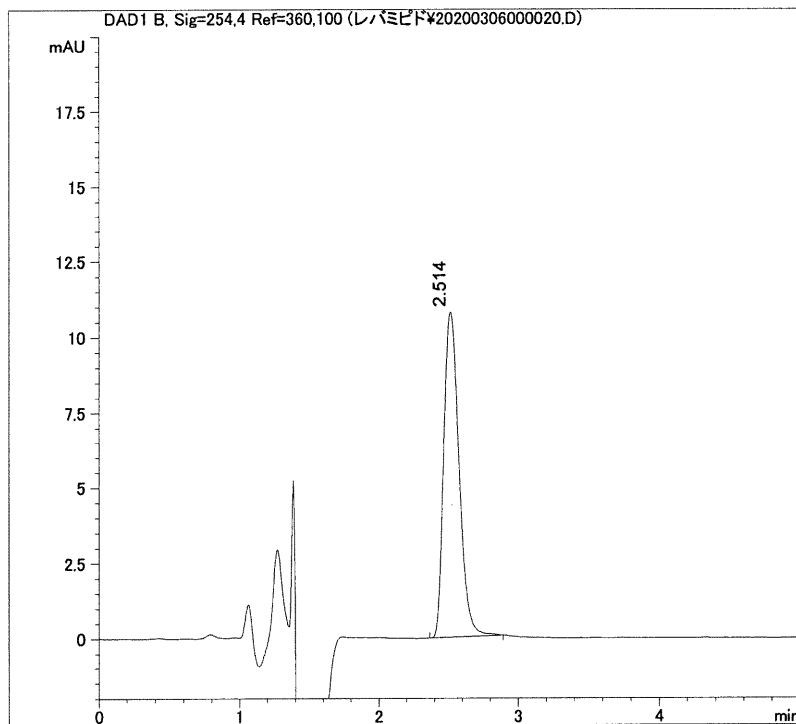
Figure A-4-2 Representative Measurement Results (continued)

(10) Conc. 5 : 48 Hours – Old

```

=====
Injection Date: 2020/03/06                      Seq Line   :      10
Study No.      : [ ]A200019 [x]A200020 [ ]A200021 レバミピド
Acq. Method    : C:\CHEM32\1\METHODS\レバミピド.M Inj. No.    : 1716
Sample Name    : D48hC5o                        Location   :      1
Acq Operator   : 田上 智                          Inj. Vol.   :     50 µl
=====

```



Area Percent Report						
#	Meas. Ret.	Peak T	Width	Area	Height	Area %
1	2.514	MM	0.127	82.171	11	100.0
Total:				82.171	11	

\*\*\* End of Report \*\*\*