

3. 魚 類 急 性 毒 性 試 験

要 約

試験委託者： 環境省

表題： レバミピドのメダカ (*Oryzias latipes*) に対する急性毒性試験

試験番号： A200021

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*1を試験液とし生物への暴露を行った。

*1 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： 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 | 負荷率*2 (mg/L) |
|---------|--------------|
| 対照区 | — |
| 濃度区 1*3 | 100 |

*2：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

*3：試験ガイドライン上限濃度を負荷率とした限度試験

- 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用いて算出した。

96 時間半数致死濃度（LC50）： >97.0. mg/L （95%信頼区間 算出不可）

1 材料

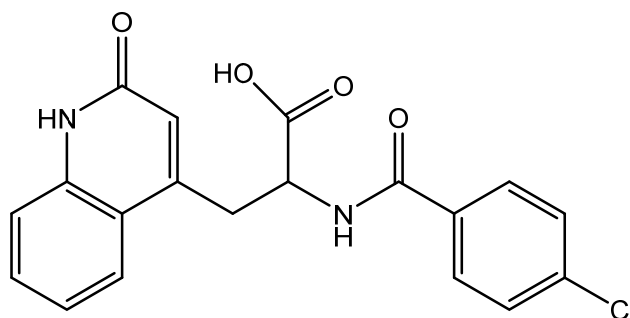
1.1 被験物質

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* : $C_{19}H_{15}ClN_2O_2$

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

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 2.44 cm (2.24～2.78 cm) , n=10
 体重： 実測値： 平均値 0.137 g (0.101～0.179 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。

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： 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。被験物質を試験用水に添加し、48 時間スターラー攪拌後、フィルター^{*1}でろ過^{*2}し不溶の被験物質を除くことにより、負荷率^{*3} 100 mg/L の試験液を調製した。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（孔径 0.45µm）

*2：アスピレーター ヤマト科学製 WP-15 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

| 負荷率（mg/L） | 96 時間の死亡率(%) | 生存魚の異常 |
|-----------|--------------|--------|
| 1.0 | 0 | 無 |
| 10 | 0 | 無 |
| 100 | 0 | 無 |

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 | 負荷率（mg/L） |
|---------------------|-----------|
| 対照区 | — |
| 濃度区 1 ^{*4} | 100 |

*4：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（HPLC）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

試験液の水溫，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。

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。通常は、各試験区の死亡率から統計学的手法により、暴露 24, 48, 72 および 96 時間における LC50 を決定するが、本試験は限度試験であるため、LC50 は推定される濃度領域（>試験濃度）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 23.6～24.0℃, 溶存酸素濃度は 5.9～8.3 mg/L, pH は 6.7～7.5 であった。外観は対照区および濃度区 1 において無色であり, 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 の測定値の時間加重平均値は 97.0 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 に示す。

対照区および濃度区 1 において, 死亡魚は認められず, 生存魚に異常は観察されなかった。

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 を以下に示す。

96 時間 LC50 : >97.0 mg/L (95%信頼区間 算出不可)

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 | 24 hr | 48 hr | | 72 hr | 96 hr |
| | New | | Old | New | | Old |
| Control | 23.8 | 24.0 | 23.9 | 23.6 | 23.8 | 23.8 |
| Conc.1 | 23.9 | 24.0 | 23.9 | 23.6 | 23.8 | 23.8 |

Minimum: 23.6

Maximum: 24.0

New: New test solution freshly prepared

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

Table 2 Dissolved Oxygen Concentrations in Test Solutions

| Test group | Dissolved oxygen concentration (mg/L) | | | | | |
|------------|---------------------------------------|-------|-------|-----|-------|-------|
| | 0 hr | 24 hr | 48 hr | | 72 hr | 96 hr |
| | New | | Old | New | | Old |
| Control | 7.8 | 6.2 | 6.0 | 8.3 | 6.3 | 5.9 |
| Conc.1 | 7.7. | 6.4 | 6.2 | 8.3 | 6.6 | 6.1 |

Minimum: 5.9

Maximum: 8.3

New: New test solution freshly prepared

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

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 | 6.7 | 6.9 | 7.5 | 6.7 | 6.8 |
| Conc.1 | 6.8 | 6.7 | 6.9 | 7.4 | 6.7 | 6.7 |

Minimum: 6.7

Maximum: 7.5

New: New test solution freshly prepared

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

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- |

New: New test solution freshly prepared

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

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 | Loading rate [*] (mg/L) | Measured concentration (mg/L) (Percent of Loading rate, %) | | | | |
|------------|-------------------------------------|---|--------------|--------------|--------------|--------------|
| | | 0 hr New | 48 hr | | 96 hr Old | Mean |
| | | | Old | New | | |
| Control | | <0.5 | <0.5 | <0.5 | <0.5 | |
| Conc.1 | 100 | 99.2 (99) | 102 (102) | 93.4 (93) | 93.5 (94) | 97.0 (97) |

Lower limit of quantification: 0.5 mg/L

New: New test water freshly prepared

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

Mean: Time-weighted mean

*:The ratio of test substance to water (in mg/L) used in the preparation of the WSF.

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

Loading rate

100 mg/L

Mean measured concentration:

97.0 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 7 Median Lethal Concentrations (LC50)

| Exposure period (hr) | LC50 (mg/L) | 95-Percent confidence limits (mg/L) | Statistical method |
|----------------------|-------------|-------------------------------------|--------------------|
| 24 | >97.0 * | -- | -- |
| 48 | >97.0 * | -- | -- |
| 72 | >97.0 * | -- | -- |
| 96 | >97.0 * | -- | -- |

--: Not calculated

*: The LC50 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

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

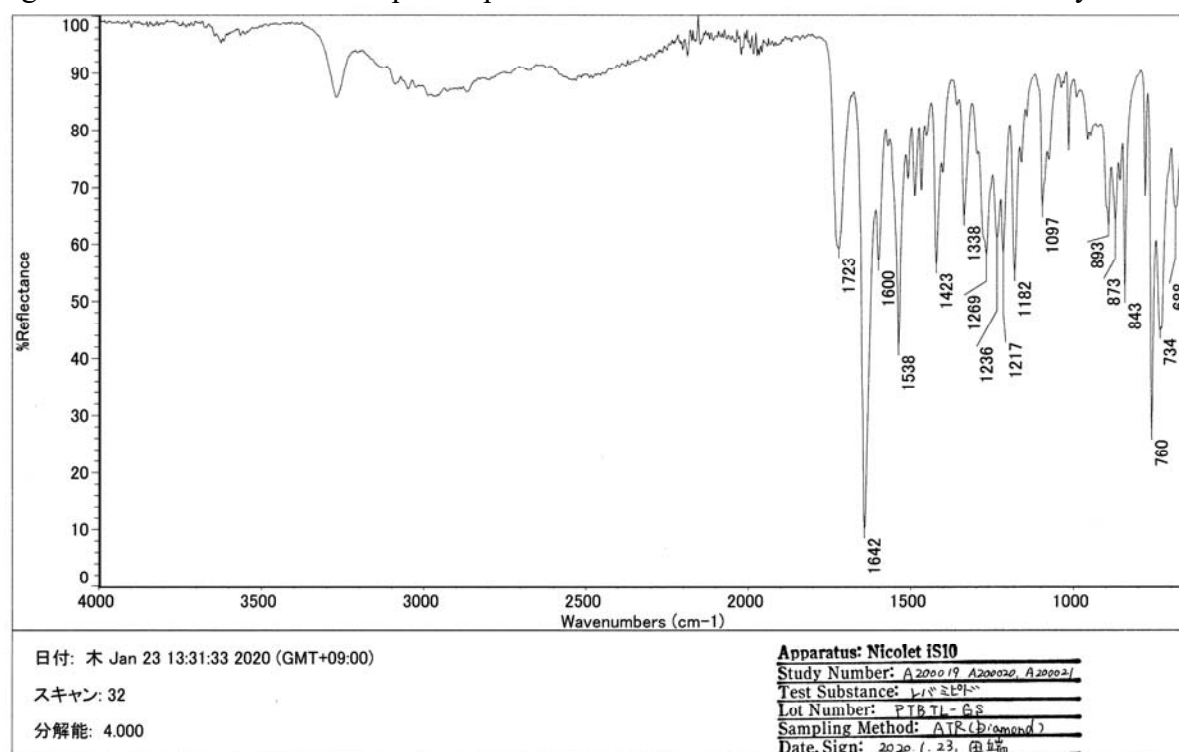
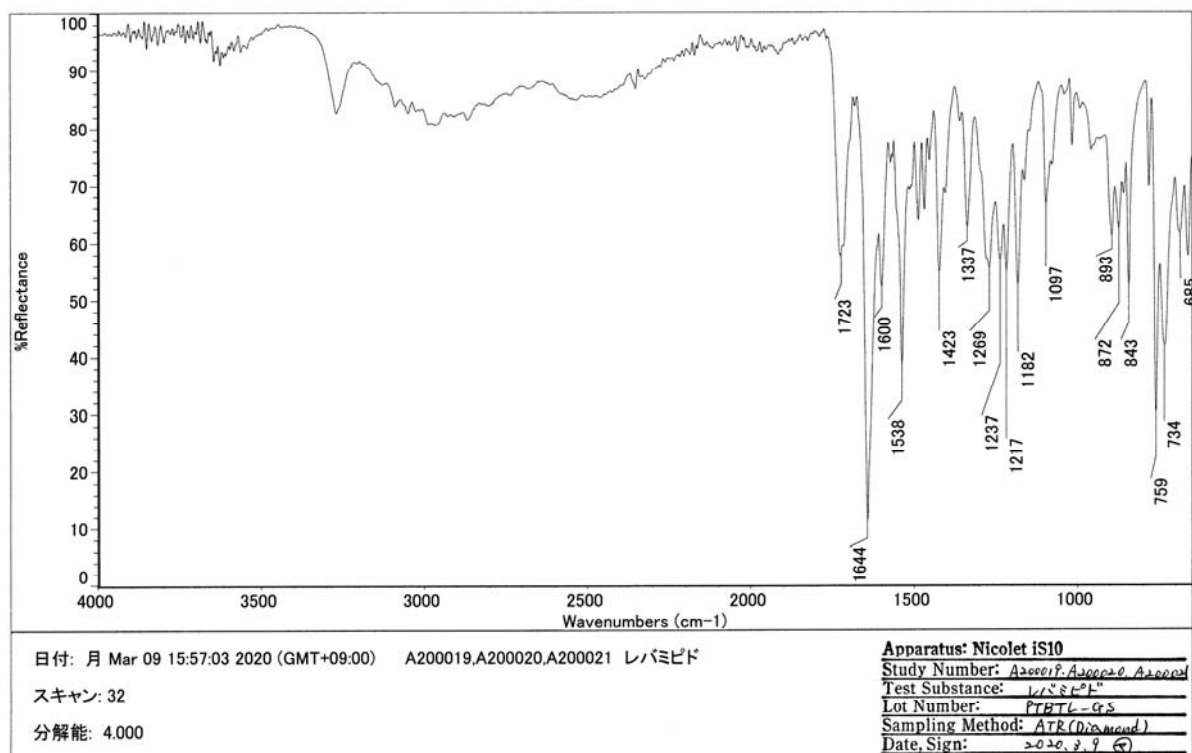


Figure A-1-2 Infrared Absorption Spectrum of the Test Substance after the End of Exposure



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

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^{*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

被験物質の負荷

| | | | |
|---------|-------|----------|------------------|
| 被験物質採取量 | ----> | 520 | mg |
| 溶 媒 | ----> | 脱塩素水道水 | |
| 最終容量 | ----> | 5200 | mL |
| 容 器 | ----> | 5Lメジューム瓶 | |
| 被験物質濃度 | ----> | 100 | mg/L |
| 混合方式 | ----> | スターラー攪拌 | 24時間 |
| 調製頻度 | ----> | 暴露開始 | 24時間前および24時間後に調製 |

2. 攪拌

スターラーで 24時間攪拌する（室温約24℃）。

3. ろ過

フィルター^{*1}でろ過^{*2}する。

*1: メルクミリポア製 メンブレンフィルター HA 0.45 μm

*2: アスピレーター ヤマト科学製 WP-15型

↓

ろ液を試験原液とする。

4. 試験液の調製

試験原液を曝気後、試験液とする。

対照区は脱塩素水道水のみとする。

| | | | |
|------|-------|----------|---|
| 最終容量 | ----> | 5.0 | L |
| 容 器 | ----> | 5Lガラス製水槽 | |

| 試験区 | 負荷率 (mg/L) | | 試験原液 (mL) |
|------|-----------------|-------|----------------|
| 対照区 | — | ----> | - |
| 濃度区1 | 100 | ----> | 5000 |

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 (バリエーション)

オートサンブラ: 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 μ m, 2.1 mm i.d. \times 100 mm

カラムオーブン: 40°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 μ 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 50 mg を秤量し、超純水 N, N-ジメチルホルムアミド (DMF) 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

標準溶液 0.75 mL 採取

| ←超純水*1 0.75 mL 添加

混合

|

HPLC 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

検量線作成に用いた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。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

|

HPLC 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. 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 | 0.500 | 4.616 |
| 2 | 1.00 | 9.486 |
| 3 | 5.00 | 48.167 |
| 4 | 10.0 | 97.585 |

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

$$a = -3.795E-01$$

$$b = 9.780E+00$$

$$r = 1.000$$

$$-1.305E+00 < a < 5.456E-01$$

(95 % confidence interval)

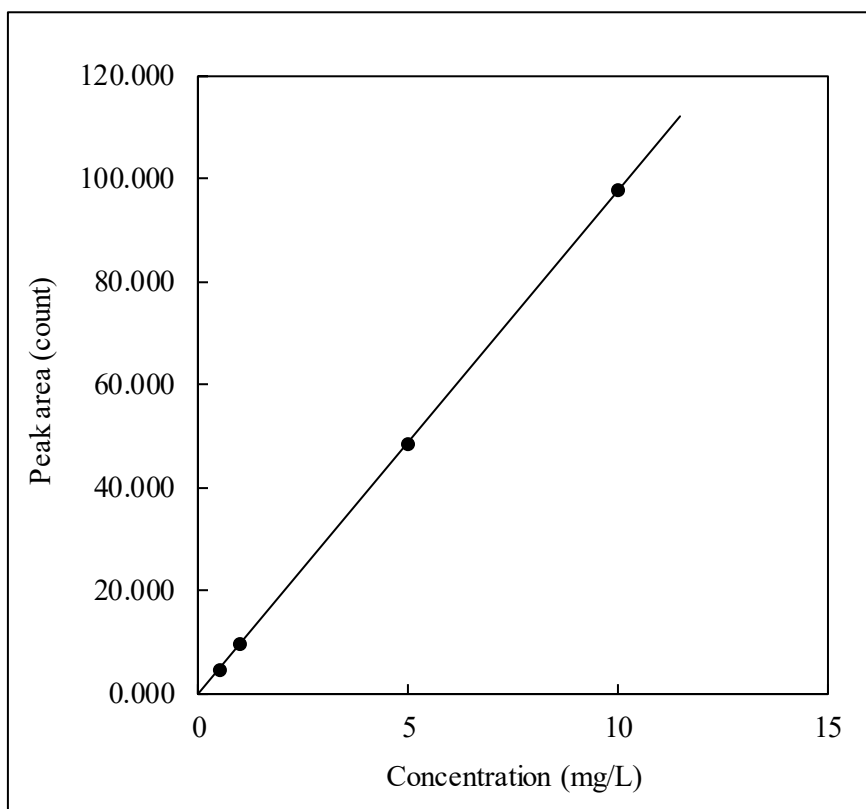


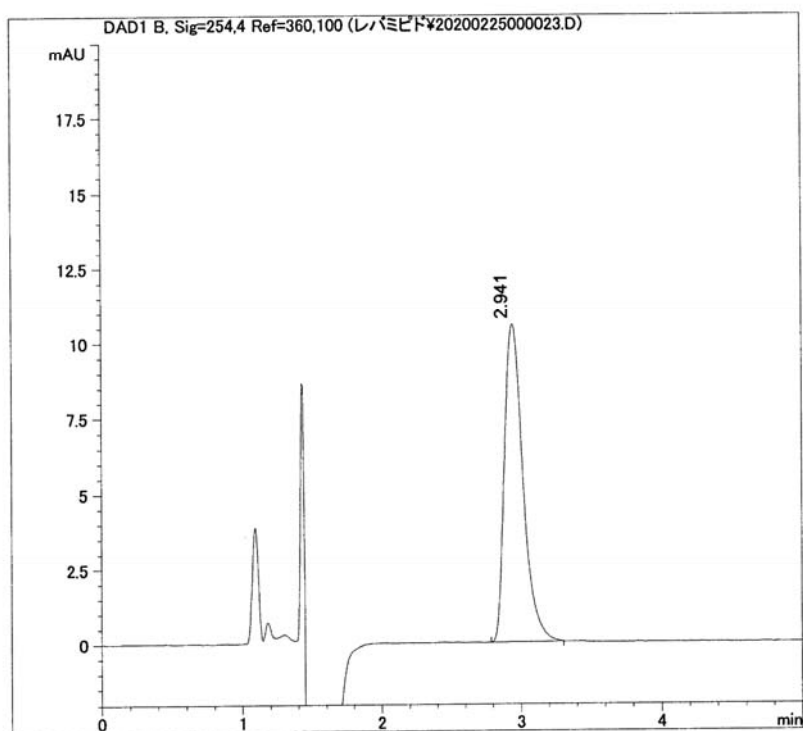
Figure A-5-2 Representative Measurement Results

(1) Standard 10.0 mg/L, 0 hour

```

=====
Injection Date:2020/02/25                      Seq Line   :      3
Study No.      : [ ]A200019 [ ]A200020 [✓]A200021 レバミピド
Acq. Method    : C:\CHEM32\1\METHODS\レバミピド.M      Inj. No.    : 171 5
Sample Name     : STD 10 mg/L                          Location    :      1
Acq Operator    : 田中 (T)                               Inj. Vol.   :    50 µl
=====

```



Area Percent Report

| # | Meas. | Ret. Peak T | Width | Area | Height | Area % |
|--------|-------|-------------|-------|--------|--------|--------|
| 1 | | 2.941 MM | 0.153 | 96.933 | 11 | 100.0 |
| Total: | | | | 96.933 | 11 | |

*** End of Report ***

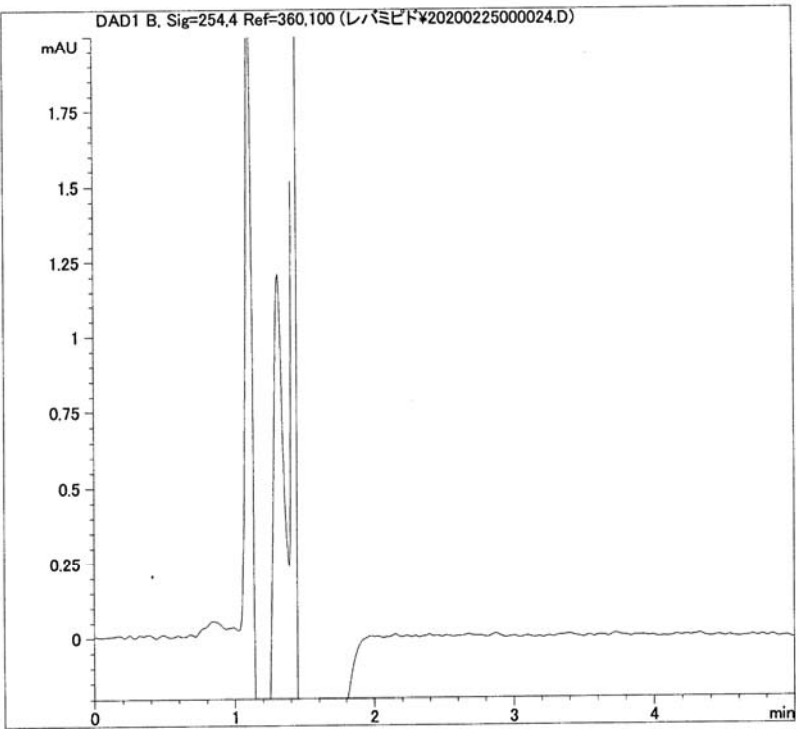
Figure A-5-2 Representative Measurement Results (Continued)

(2) Control, 0 hour (new)

=====

| | |
|--|-------------------|
| Injection Date: 2020/02/25 | Seq Line : 4 |
| Study No. : [JA200019 [JA200020 [✓]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 : F0hCn | Inj. Vol. : 50 µl |
| Acq Operator : 田 立尚 | |

=====



=====

| Area Percent Report | | | | | | |
|---------------------|-------|------|--------|-------|------|--------|
| # | Meas. | Ret. | Peak T | Width | Area | Area % |
| ----- | | | | | | |
| Total: | | | | | | |

=====

*** End of Report ***

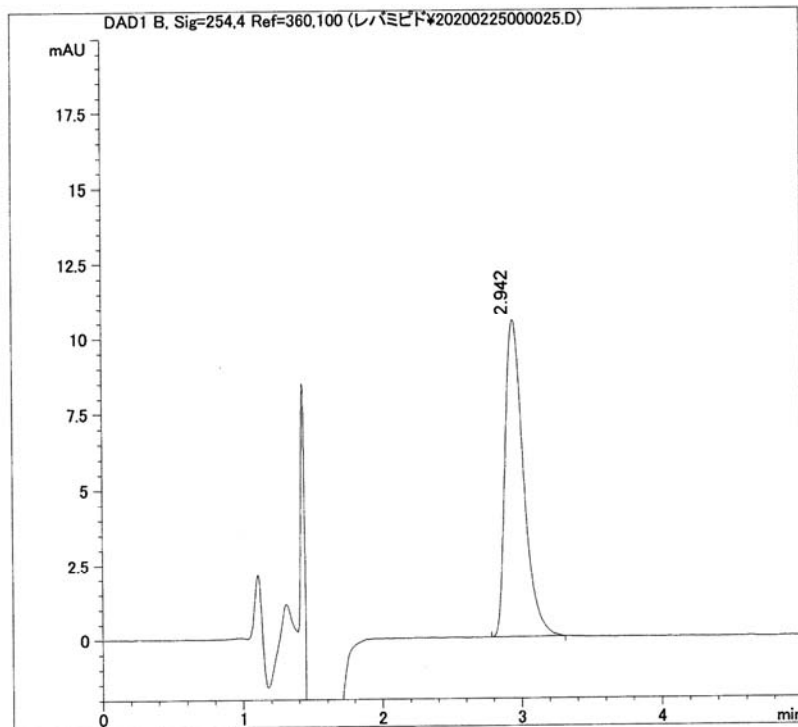
Figure A-5-2 Representative Measurement Results (Continued)

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

```

=====
Injection Date:2020/02/25                      Seq Line   :      5
Study No.      : [ ]A200019 [ ]A200020 [✓]A200021 レバミピド
Acq. Method    : C:\CHEM32\1\METHODS\レバミピド.M  Inj. No.    :   1712
Sample Name    : F0hC1n                          Location   :      1
Acq Operator   : 田中                          Inj. Vol.   :   50 µl
=====

```



```

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

```

| # | Meas. Ret. | Peak T | Width | Area | Height | Area % |
|--------|------------|--------|-------|--------|--------|--------|
| 1 | 2.942 | MM | 0.152 | 96.191 | 11 | 100.0 |
| Total: | | | | 96.191 | 11 | |

```

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

```

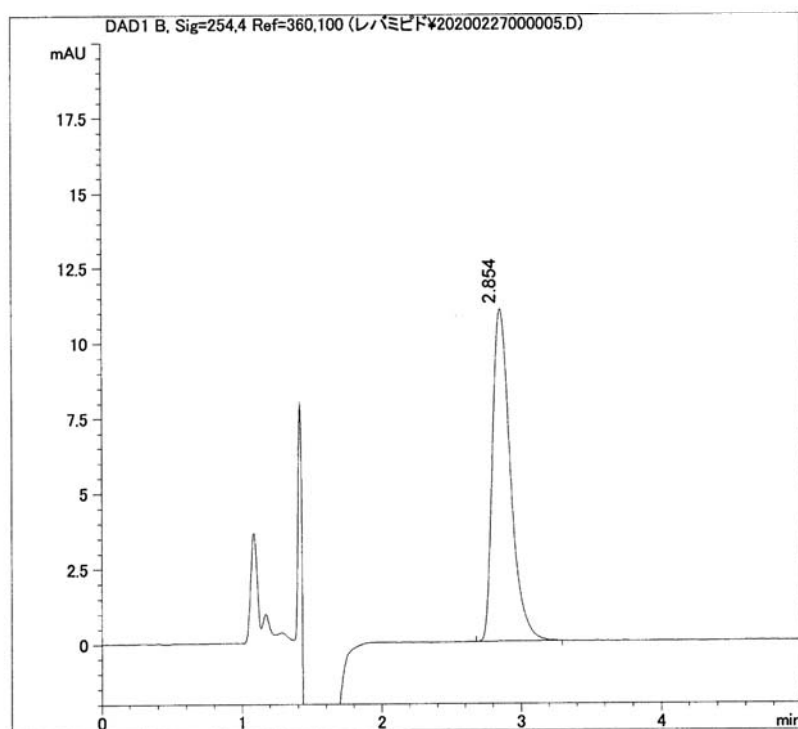
Figure A-5-2 Representative Measurement Results (Continued)

(4) Standard 10.0 mg/L, 48 hours (old)

```

=====
Injection Date:2020/02/27                      Seq Line   :      5
Study No.      :[ J]A200019 [ J]A200020 [ J]A200021 レバミピド      Inj. No.    :   1717 2
Acq. Method    :C:¥CHEM32¥1¥METHODS¥レバミピド.M      Location   :      1
Sample Name    :STD 10 mg/L                      Inj. Vol.   :    50 µl
Acq Operator   : 田中
=====

```



```

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

```

| # | Meas. Ret. | Peak T | Width | Area | Height | Area % |
|--------|------------|--------|-------|--------|--------|--------|
| 1 | 2.854 | MM | 0.149 | 98.392 | 11 | 100.0 |
| Total: | | | | 98.392 | 11 | |

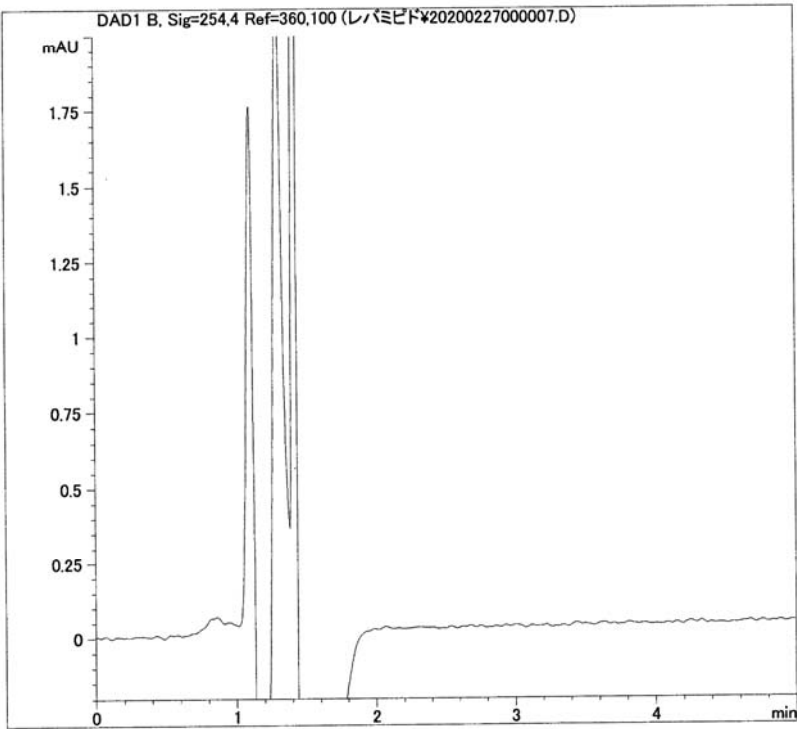
```

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

```

Figure A-5-2 Representative Measurement Results (Continued)
(5) Control, 48 hours (old)

```
=====
Injection Date:2020/02/27                      Seq Line   :       7
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711
Sample Name    :F48hCo                            Location   :       1
Acq Operator   : 田嶋                            Inj. Vol.   :   50 µl
=====
```



| Area Percent Report | | | | | | | |
|-----------------------|-------|------|--------|-------|------|--------|--------|
| # | Meas. | Ret. | Peak T | Width | Area | Height | Area % |
| Total: | | | | | | | |
| *** End of Report *** | | | | | | | |

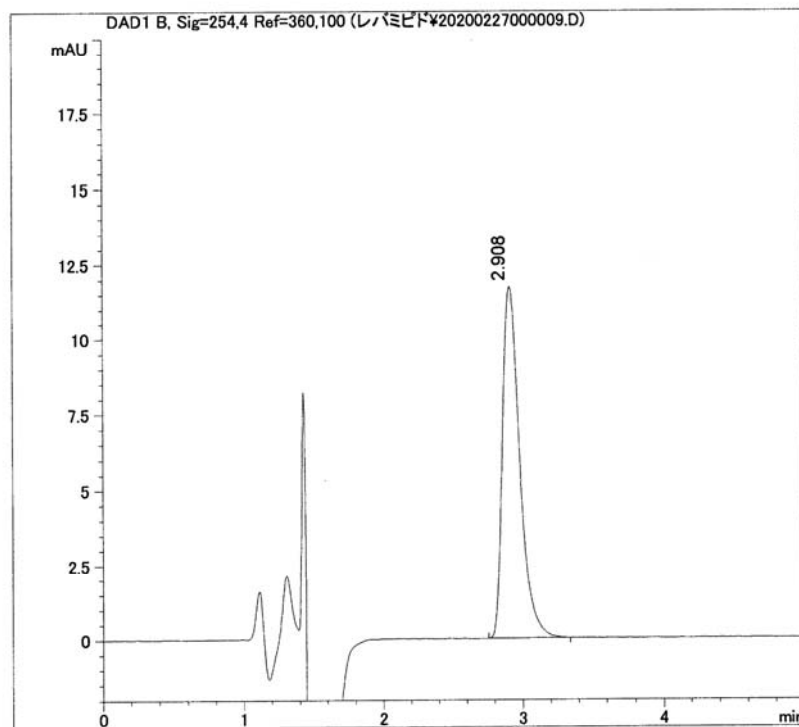
Figure A-5-2 Representative Measurement Results (Continued)

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

```

=====
Injection Date:2020/02/27                      Seq Line   :      9
Study No.      :[ ]A200019 [ ]A200020 [x]A200021 レバミピド
Acq. Method    :C:\CHEM32\1\METHODS\レバミピド.M Inj. No.    : 171 12
Sample Name    :F48hC1o                        Location   :      1
Acq Operator   : 田端                            Inj. Vol.   :    50 µl
=====

```



```

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

```

| # | Meas. Ret. | Peak T | Width | Area | Height | Area % |
|--------|------------|--------|-------|---------|--------|--------|
| 1 | 2.908 | MM | 0.142 | 100.094 | 12 | 100.0 |
| Total: | | | | 100.094 | 12 | |

```

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

```