

2. ニセネコゼミジンコ繁殖試験

要 約

試験委託者： 環境省大臣官房環境保健部環境安全課

表題： N-デスマチルタモキシフェンのニセネコゼミジンコ (*Ceriodaphnia dubia*) に対する繁殖試験

試験番号： A201129

試験方法： 本試験は、「生物応答を用いた排水試験法（検討案）」（平成25年3月 排水（環境水）管理のバイオアッセイ技術検討分科会）の「第3部 3. ニセネコゼミジンコを用いるミジンコ繁殖試験法 案」に準拠して実施した。なお、被験物質に関する事項は、OECD Guideline for the Testing of Chemicals 211 (2012) “*Daphnia magna* Reproduction Test”に準拠して実施した。

本試験では被験物質としてN-デスマチルタモキシフェン（CAS番号 31750-48-8）のニセネコゼミジンコに対する繁殖試験として依頼されたが、N-デスマチルタモキシフェン塩酸塩（CAS番号 15917-65-4）を被験物質として試験を実施した。記載する被験物質濃度は全てN-デスマチルタモキシフェンに換算した濃度とした。

不溶物を除去した水溶性画分*を濃度区用原液とした。濃度区1～5の試験液は、負荷率10 mg/Lの濃度区用原液を希釈して調製した。

* 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 : ニセネコゼミジンコ (*Ceriodaphnia dubia*)
- 2) 試験用水 : 硬度 約 60 CaCO₃ mg/L のミネラルウォーター
- 3) 暴露期間 : 6日間
- 4) 暴露方式 : 半止水式（隔日換水）
- 5) 供試生物数 : 10 個体／試験区 (1 個体／容器)
- 6) 試験温度 : 25±1°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	0.010
濃度区 2	0.032
濃度区 3	0.10
濃度区 4	0.32
濃度区 5	1.0

公比 3.16

* : 設定濃度は負荷率 10 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

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。

親ミジンコの半数致死濃度 (LC50) : 0.00777 mg/L (95%信頼区間 0.00147～0.0105 mg/L)

最大無影響濃度 (NOEC) : 0.00147 mg/L (Steel test)

最小影響濃度 (LOEC) : 0.00711 mg/L

1 材料

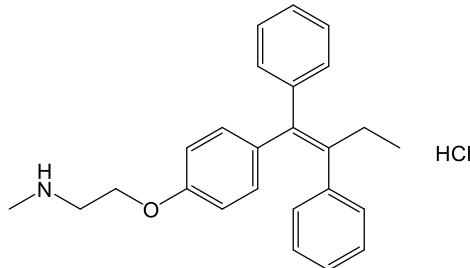
1.1 被験物質

1.1.1 名称、構造式および物理化学的性状

名 称^{*1} : N-デスマチルタモキシフェン塩酸塩

CAS 番号^{*1} : 15917-65-4

構造式^{*1} :



分子式^{*1*2} : C₂₅H₂₈ClNO (N-デスマチルタモキシフェンとして「C₂₅H₂₇NO」)

分子量^{*1*2} : 393.95 (N-デスマチルタモキシフェンとして「357.48」)

外観^{*1} : 白色固体

換算係数^{*2} 0.907 (N-デスマチルタモキシフェン塩酸塩およびN-デスマチルタモキシフェンの分子量より算出した。被験物質秤量値はN-デスマチルタモキシフェン塩酸塩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} : 98%

ロット番号^{*1} : 6-SKS-119-2

供給者 : Toronto Research Chemicals

*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 : 遮光瓶、-20°C冷凍

保管場所 : 試験物質保管用冷凍庫

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

硬度 約 60 CaCO₃ mg/L のミネラルウォーター*を 25±1 °Cに調整して使用した。成分情報を付属資料-2 に示す。硬度および pH を測定した結果、それぞれ 64 mg CaCO₃/L および 7.9 であり、適正範囲内（硬度 60~100 mg CaCO₃/L, pH 6.5~8.5）であることを確認した。

* : キリンビバレッジ株式会社販売

1.3 供試生物

- 1) 一般名 : ニセネコゼミジンコ
- 2) 学名 : *Ceriodaphnia dubia*
- 3) 入手先 : 国立研究開発法人国立環境研究所（以降、当施設にて継代飼育）
- 4) 感受性の確認 : 定期的に基準物質（塩化ナトリウム、試薬特級）による繁殖試験を行い、ニセネコゼミジンコの感受性を調べている。
最新の半数阻害濃度 (IC50) の結果を示す。

IC50 : 1430 mg/L

以下に 2019 年以降の IC50 平均値を示す。

IC50 平均値 ± 標準偏差 = 1090 ± 255 mg/L, n=4

(最小値 ~ 最大値 = 818 ~ 1430 mg/L)

- 5) 供試生物の準備 : 供試するミジンコは、個別飼育によりじゅん化した生後 7~8 日目の親個体が産仔した（3 または 4 腹目）生後 24 時間以内の仔虫個体（雌）を用いた。仔虫の大きさを目視で確認し、大きさをそろえることで成長のバラツキを抑えた。肉眼で健康に異常が認められないものを試験に用いた。

1.4 試験容器および恒温槽等

- 1) 試験容器 : ガラス製カップ（蓋：透明塩ビ板）
- 2) クロマトチャンバー : 日本フリーザー製 MC-30EF3
- 3) 水温計 : ハンナ製 チェックテンプ
- 4) マルチ水質計 : 東亜ディーケー工業製 MM-60R 型
- 5) 硬度測定 : ハンナ インスツルメンツ・ジャパン製 ポータブル全硬度測定器 HI 96735 型
- 6) 電気伝導率計 : HORIBA 製 LAQUATwinB-771
- 7) 電子天秤 : メトラー製 AG204 型
メトラー製 PB3002 型
- 8) ライト : 富士フィルム製 LED ビューアー ST-A3

2 方法

2.1 試験方法

本試験は、「生物応答を用いた排水試験法（検討案）」（平成 25 年 3 月 排水（環境水）管理のバイオアッセイ技術検討分科会）の「第 3 部 3. ニセネコゼミジンコを用いるミジンコ繁殖試験法 案」に準拠して実施した。なお、被験物質に関する事項は、OECD Guideline for the Testing of Chemicals 211 (2012) “*Daphnia magna* Reproduction Test” に準拠して実施した。

本試験では被験物質として N-デスマチルタモキシフェン (CAS 番号 31750-48-8) のニセネコゼミジンコに対する繁殖試験として依頼されたが、N-デスマチルタモキシフェン塩酸塩 (CAS 番号 15917-65-4) を被験物質として試験を実施した。記載する被験物質濃度は全て N-デスマチルタモキシフェンに換算した濃度とした。

不溶物を除去した水溶性画分*を濃度区用原液とした。濃度区 1～5 の試験液は、負荷率 10 mg/L の濃度区用原液を希釈して調製した。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) 暴露方式 : 半止水式 (隔日換水)
- 2) 暴露期間 : 6 日間 (対照区で 60% 以上の個体が 3 腹以上産仔した時点で終了)
- 3) 試験液量 : 15 mL/容器
- 4) 連数 : 10 容器/試験区
- 5) 供試生物数 : 10 個体/試験区 (1 個体/容器)
- 6) 試験温度 : 25±1°C
- 7) 溶存酸素濃度 : 3 mg/L 以上 (エアレーションなし)
- 8) pH : 試験液の pH 調整は行わない。暴露期間中の pH は 6.5～8.5 とする。
- 9) 照明 : 室内光, 16 時間明 (800 lux 以下) / 8 時間暗
- 10) 納餌 : YCT (リーセンテック製) およびクロレラ (クロレラ工業製) を毎日一定量納餌

2.1.2 予備試験結果

被験物質の入手量が少ないため、予備試験の試験上限濃度を 10mg/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 48 時間実施した後、フィルター^{*1}でろ過^{*2}して不溶の被験物質を除くことにより、負荷率^{*3} 10 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：ヤマト科学製、アスピレーター 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

設定濃度 (mg/L)	繁殖阻害率 ^{*4} (%)
対照区	--
0.010 ^{*5}	-7
0.10 ^{*5}	33
1.0 ^{*5}	100
10	100

供試生物数 : 5 個体／試験区 (1 個体／容器)

*4 : 「2.2.1 結果の算出の 3) 平均累積産仔数および繁殖阻害率の算出」に示した方法により算出した。

*5 : 負荷率 10mg/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

-- : 計算には該当せず

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 ^{*6} (mg/L)
対照区	—
濃度区1	0.010
濃度区2	0.032
濃度区3	0.10
濃度区4	0.32
濃度区5	1.0

公比 3.16

*6 : 設定濃度は負荷率 10 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

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

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-5に示す。なお、試料採取当日に分析に供することができない場合は、遮光で冷蔵保管した。

分析回数： 2セット（試験液調製時と換水直前または暴露終了時およびその間に行った分析を1セットとした）

試料採取方法： 試験液調製時

－各試験区1試験容器の試験液の中層を採取

試験液調製時と換水直前または暴露終了時の間に行った分析時

－各試験区1試験容器の試験液の中層を採取

換水直前および暴露終了時

－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

1) 暴露の開始

あらかじめ調製した試験液の水温を測定し、試験温度の範囲にあることを確認した。各試験容器に、調製した試験液を15mLずつ分注した。各試験区の連数は10とした。

個別飼育により準備した仔虫のうち、同じ親個体から産まれた同一腹の仔虫を全ての試験区に配置し、これを一群とした。その群を10連用意した。仔虫を投入し終えた時点を、暴露開始とした。

2) 換水

換水は暴露期間中1日おきに実施した。

新たに調製した試験液を加えた試験容器に、供試個体を移し替えて、その都度の換水を終了した。

3) 観察

暴露期間中、毎日（原則として暴露開始から24時間毎）、試験容器中の試験生物を肉眼で観察し、供試生物の生死観察と産まれた仔虫の数を計測し、記録した。計測した仔虫は除去した。

4) 水質測定

試験液調製時と換水直前（または暴露終了時）の試験液について、すべての試験区の水質（温度、pH、溶存酸素濃度）を測定した。試験液調製時には、電気伝導度を測定した。

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

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。なお、測定値が定量下限値を下回った場合は定量下限の半分の値を用いて時間加重平均値を算出したが、実測できた最低濃度区の測定値から公比で除した値も参考のため算出した。

$$Area = \left[\frac{ConcA_n - ConcB_n}{\ln(ConcA_n) - \ln(ConcB_n)} \times Days + \frac{ConcB_n - ConcC_n}{\ln(ConcB_n) - \ln(ConcC_n)} \times Days \right] \times Renewal\ Times$$

$$Total\ Areas = \sum_{m=1}^l Area$$

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

ConcAn : n 期間の初めの測定値
(試験液調製時の測定値)

ConcBn : n 期間の中間の測定値
(試験液調製時と換水直前または暴露終了時の間に行なった分析の測定値)

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

(*ConcAn* と *ConcBn* または *ConcBn* と *ConcCn* の値が同じ場合は、

$$\frac{ConcA_n - ConcB_n}{\ln(ConcA_n) - \ln(ConcB_n)} = ConcAn \text{ または } \frac{ConcB_n - ConcC_n}{\ln(ConcB_n) - \ln(ConcC_n)} = ConcBn \text{ とする。)$$

Days : n 期間の終わりの日数 ÷ 2

Renewal Times : 次の分析までの換水回数

l : 分析回数（セット数）

\overline{MC} : 時間加重平均値

2) 親個体の半数致死濃度 (LC50) の算出

暴露期間中に、供試生物の 50% が死亡する被験物質濃度を半数致死濃度 (LC50) とする。暴露終了時に、各試験区における親個体の死亡率 (%) から、以下の方法で半数致死濃度 (LC50) を可能な限り決定した。暴露終了時における濃度－死亡率曲線を作成した。

最高濃度区における死亡率	LC50 の決定方法
≥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
< 50%	推定される濃度領域とする

*: データ処理プログラム : TOXDAT3_02_D

3) 平均累積産仔数および繁殖阻害率の算出

暴露終了時に、各試験区における親個体（偶発的に死亡した場合を除く）1 頭当たりの平均累積産仔数（生存幼体数、ΣF1/P）を求めた。平均累積産仔数から対照区に対する各濃度区の繁殖阻害率を算出した。

4) 最大無影響濃度 (NOEC) および最小影響濃度 (LOEC)

各試験区における累積産仔数を用い、統計学的手法により濃度区と対照区との有意差の有無を求め、繁殖阻害率、親個体の死亡率等含め、総合的に最小影響濃度 (LOEC) および最大無影響濃度 (NOEC) を決定した。

多重比較に関する統計解析手法手順を以下に示す。

- ① 試験区間（対照区を含む）の等分散性を検定する（Bartlett test）。
- ② 等分散性が認められた場合、Dunnett test により対照区と濃度区間の有意差を検定し、有意差が認められた最低濃度区を LOEC、その一つ下の濃度区を NOEC とする。濃度依存性のある（高濃度ほど値が増加あるいは減少する）データの場合、Dunnett test より検出力の高い Williams test を実施してもよい。Dunnett test または Williams test において有意差が認められなかった場合、NOEC は最高濃度区とする。
- ③ ①で等分散性が認められない場合、データを Log 変換して再度等分散性を検定する。等分散性が認められた場合は②を実施する。
- ④ ③で等分散性が認められない場合、ノンパラメトリックの Steel test により対照区と濃度区間の有意差を検定し、有意差が認められた最低濃度区を LOEC、その一つ下の濃度区を NOEC とする。Steel test により有意差が認められなかった場合、NOEC は最高濃度区とする。

- ⑤ ④において結果の妥当性を検討するために、パラメトリックの多重比較検定である Dunnett test を実施してもよい。
- ⑥ それぞれの検定における有意水準 (α) は 0.05 とする。

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) 対照区のミジンコ（親個体）の死亡率が 20%を超えないこと
- 2) 6 日間で対照区の親個体の少なくとも 60%が 3 腹産んでいること
- 3) 対照区における生存仔虫数が最初の 3 腹で平均して 15 を超えること
- 4) 対照区において休眠卵の生産が確認されないこと

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

試験液の水温, 溶存酸素濃度, pH および電気伝導度の測定結果をそれぞれ Table 1, Table 2, Table 3 および Table 4 に示す。

水温は 24.0~25.1°C, 溶存酸素濃度は 8.1~9.5 mg/L, pH は 7.7~8.4、電気伝導度は 220~250 $\mu\text{S}/\text{cm}$ であった。いずれの試験区においても、水温は $25 \pm 1^\circ\text{C}$, 溶存酸素濃度は 3 mg/L 以上であり、試験条件の範囲内であった。

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、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 0.000114 [0.000122], 0.000452 [0.000453], 0.00147, 0.00711 および 0.0105 mg/L であった。なお、暴露開始後 1 日目の濃度区 1, 暴露開始後 2 日目の濃度区 1 および 2, 暴露開始後 6 日目の濃度区 1 の測定値が定量下限値 (0.00004 mg/L) を下回ったため、これらについては定量下限の半分の値を用いて時間加重平均値を算出した。また、上記 [] 内の数値は、実測できた最低濃度区の測定値から公比で除した値を用いて算出した時間加重平均値の参考値である。暴露期間中に被験物質濃度の減少が認められた。詳細は不明であるが、濃度減少の原因として本試験条件下の照明光が影響している可能性が推察された。

3.4 親個体および産出幼体の観察

1) 親個体の死亡率

親個体の累積死亡率を Table 6 に、濃度-死亡率曲線を Figure 1 に示す。

対照区における親個体の暴露終了時の死亡率は、0% であった。濃度区 1~5 における死亡率は、暴露終了時でそれぞれ 0, 0, 0, 30 および 100% であった。

2) 平均累積産仔数および繁殖阻害率

各試験区の親個体 1 頭当たりの平均累積産仔数 (3 腹分の生存幼体数, $\Sigma F1/P$) および繁殖阻害率を Table 7 に、濃度-繁殖阻害率曲線を Figure 2 に示す。

対照区における平均累積産仔数は 17.8 頭であり、対照区の親個体のうち、7 頭で 3 腹以上の産仔がみられた。濃度区 1~4 における平均累積産仔数は、それぞれ 19.5, 15.9, 17.2 および 0.6 頭

であった。濃度区4においては、親ミジンコの3頭が初産前に死亡し、5頭は初産のないまま暴露が終了した。濃度区5においては、全ての親ミジンコが初産前に死亡したため、平均累積産仔数は求めなかった。

対照区に対する繁殖阻害率は、濃度区1～5において、それぞれ-10, 11, 3, 97および100%であった。

3) 休眠卵の発生

休眠卵はいずれの試験区においても、認められなかった。

3.5 親個体の半数致死濃度 (LC50) の算出

6日間の親個体の半数致死濃度 (LC50) および算出に用いた統計学的手法を Table 8, 付属資料-6および以下に示す。

6日間の LC50 : 0.00777 mg/L (95%信頼区間 0.00147～0.0105 mg/L, Binomial 法)

3.6 最大無影響濃度 (NOEC) および最小影響濃度 (LOEC)

累積産仔数の有意差検定の結果を Table 7 に、詳細を付属資料-6 に示す。対照区と比べた累積産仔数は、濃度区1～3 では有意差は認められなかったが、濃度区4～5においては有意差が認められた。

以上の結果から決定した 6 日間の最大無影響濃度 (NOEC) および最小影響濃度 (LOEC) を Table 9 および以下に示す。NOEC は Bartlett test の等分散検定 ($\alpha=0.01$) において等分散性が認められなかったため、ノンパラメトリックの Steel test ($\alpha=0.05$) を用い決定した。

最大無影響濃度 (NOEC) : 0.00147 mg/L (ノンパラメトリックの Steel test)

最小影響濃度 (LOEC) : 0.00711 mg/L

NOEC となった濃度区3 および LOEC となった濃度区4 は実測値を基に算出した濃度であり、測定値が定量下限を下回った濃度区1 および 2 は上記影響濃度の算出には使用していない。

3.7 試験の有効性

「3.4 親個体および産出幼体の観察」において、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 Temperature of Test Solutions

Test Group	Temperture (°C)					
	Day 0	Day 2	Day 2	Day 4	Day 4	Day 6
	New	Old	New	Old	New	Old
Control	25.1	24.8	24.3	24.7	25.0	24.8
Conc.1	25.1	24.4	24.3	24.7	25.0	24.8
Conc.2	25.1	24.4	24.1	24.7	24.9	24.8
Conc.3	25.0	24.4	24.4	24.7	24.9	24.8
Conc.4	25.1	24.2	24.0	24.7	24.9	24.8
Conc.5	25.1	24.3	*	*	*	*
				Minimum: 24.0	Maximum: 25.1	

New: New test solution freshly prepared

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

*: Not measured because all parent *Ceriodaphnia* were dead.

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

Test Group	D.O. (mg/L)					
	Day 0	Day 2	Day 2	Day 4	Day 4	Day 6
	New	Old	New	Old	New	Old
Control	8.2	8.7	8.1	8.6	8.2	8.5
Conc.1	8.5	8.6	8.9	8.6	8.6	8.5
Conc.2	8.6	8.7	9.2	8.8	8.7	8.7
Conc.3	8.5	8.8	9.4	8.9	8.6	8.7
Conc.4	8.5	8.7	9.5	8.8	8.6	8.4
Conc.5	8.4	8.2	*	*	*	*
				Minimum: 8.1	Maximum: 9.5	

New: New test solution freshly prepared

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

*: Not measured because all parent *Ceriodaphnia* were dead.

Table 3 pH Values of Test Solutions

Test Group	pH					
	Day 0	Day 2	Day 2	Day 4	Day 4	Day 6
	New	Old	New	Old	New	Old
Control	7.9	8.4	8.1	8.2	8.0	8.2
Conc.1	7.8	8.4	8.0	8.3	7.7	8.3
Conc.2	8.0	8.4	7.8	8.3	7.8	8.4
Conc.3	7.9	8.4	7.7	8.4	7.7	8.3
Conc.4	7.9	8.3	7.7	8.4	7.7	8.3
Conc.5	7.9	8.2	*	*	*	*

New: New test solution freshly prepared

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

*: Not measured because all parent *Ceriodaphnia* were dead.

Table 4 Electrical conductivity

Test Group	Electrical conductivity (µS/cm)					
	Day 0	Day 2	Day 2	Day 4	Day 4	Day 6
	New	Old	New	Old	New	Old
Control	230	-	220	-	230	-
Conc.1	240	-	230	-	230	-
Conc.2	240	-	230	-	230	-
Conc.3	240	-	220	-	230	-
Conc.4	250	-	230	-	230	-
Conc.5	240	-	*	-	*	-

New: New test solution freshly prepared

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

*: Not measured because all parent *Ceriodaphnia* were dead.

Table 5 Measured Concentrations of the Test Substance in Test Solutions

(Semi-Static Condition)

Test Group	Nominal Concentration (mg/L)	Measured Concentration (mg/L)					
		Exposure Time (Days)			Mean		
Control	--	--	--	--	--	--	--
Conc. 1	0.010	0.000122	<0.00004 ^{*2} [0.0000453] ^{*3}	<0.00004 ^{*2} [0.00000725] ^{*3}	0.000894	0.000189	<0.00004 ^{*2} [0.0000274] ^{*3} [0.000122] ^{*4}
Conc. 2	0.032	0.000689	0.000143	<0.00004 ^{*2} [0.0000229] ^{*3}	0.00350	0.000587	0.0000866 [0.000453] ^{*4}
Conc. 3	0.10	0.00197	0.000630	0.0000724	0.0108	0.00184	0.000348 0.00147
Conc. 4	0.32	0.00727	0.00234	0.000672	0.0368	0.0127	0.00551 0.00711
Conc. 5	1.0	0.0181	0.0101	0.00495	*	*	*
							0.0105

Lower limit of quantification: 0.00004 mg/L

^{*1}: Time-weighted mean^{*2}: The half value (0.00002 mg/L) of the lower limit of quantification was used for calculation of the concentration of time weighted mean.^{*3}: Each value was calculated with measured concentration of Conc.2 or Conc.3 based on the separation factor (3.16).^{*4}: The value calculated from the separation factor was used for calculation of the concentration of time weighted mean.

-: Blank peak was detected in the Control. The value of blank peak was used for correction of measured value of concentration group.

*: Not measured because all parent Ceriodaphnia were dead.

Table 6 Cumulative Mortality of Parent *Ceriodaphnia*

Test Group	Nominal Concentration (mg/L)	Mean ^a Measured Concentration (mg/L)	Cumulative Mortality (%)
Control	Control	--	0
Conc.1	0.010	0.000114	0
Conc.2	0.032	0.000452	0
Conc.3	0.10	0.00147	0
Conc.4	0.32	0.00711	30
Conc.5	1.0	0.0105	100

a: Time-weighted mean

Table 7 Mean Cumulative Number of Offspring Produced per Parent *Ceriodaphnia*, Inhibition Rate and Results of Statistical Comparison

Test Group	Nominal Conc. (mg/L)	Mean ^a Measured Conc. (mg/L)	Cumulative Number of Offspring										Inhibition rate %	SD		
			Vessel No.													
			A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	(b)			
Control	--	--	1	24	18	21	18	12	23	22	23	16	17.8	7.0	--	--
Conc.1	0.010	0.000114	24	23	15	22	15	16	19	18	23	20	19.5	3.4	-10	47
Conc.2	0.032	0.000452	15	20	13	19	15	17	23	1	16	20	15.9	6.0	11	49
Conc.3	0.10	0.00147	21	20	15	18	19	16	14	20	8	21	17.2	4.1	3	44
Conc.4	0.32	0.00711	0	1	0	0	5	0	0	0	0	0	0.6 **	1.6	97	9
Conc.5	1.0	0.0105	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.0 **	0.0	100	0

a : Time-weighted mean

b : Not rounded

SD : Standard Deviation

Equations : $c = (b_{\text{control}} - b) / b_{\text{control}} \times 100$

**: Indicates a significant difference ($\alpha=0.01$) from the control.

Table 8 LC50 of Parent *Ceriodaphnia*

		95-Percent Confidence Limits (mg/L)	Statistical Method
LC50	0.00777*	0.00147 - 0.0105	Binomial

*: Using the data of Conc.1 - 5

Table 9 NOEC and LOEC

Exposure period	LOEC	NOEC
(Day)	(mg/L)	(mg/L)
6	0.00711	0.00147

Figure 1 Concentration-Mortality Curve

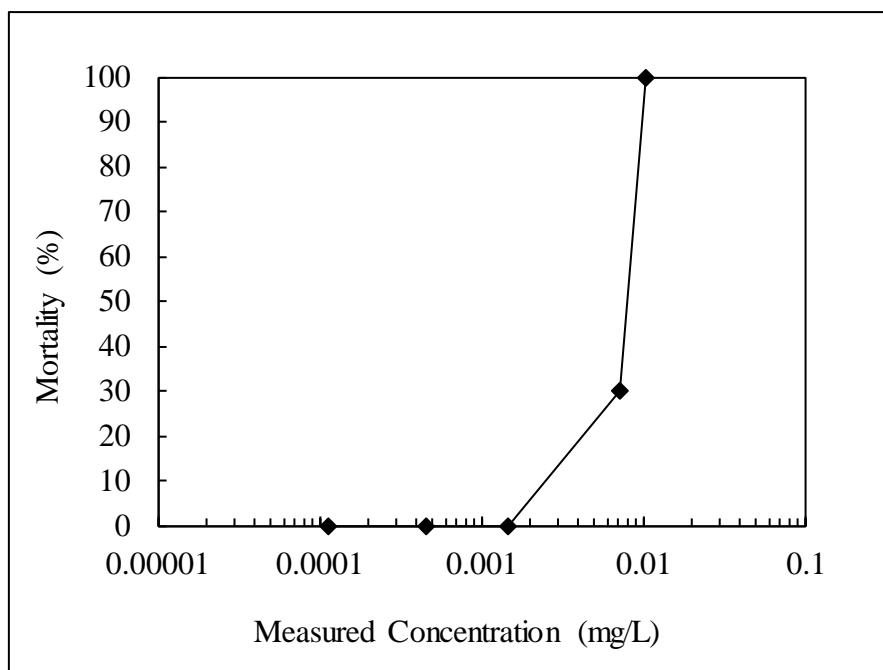
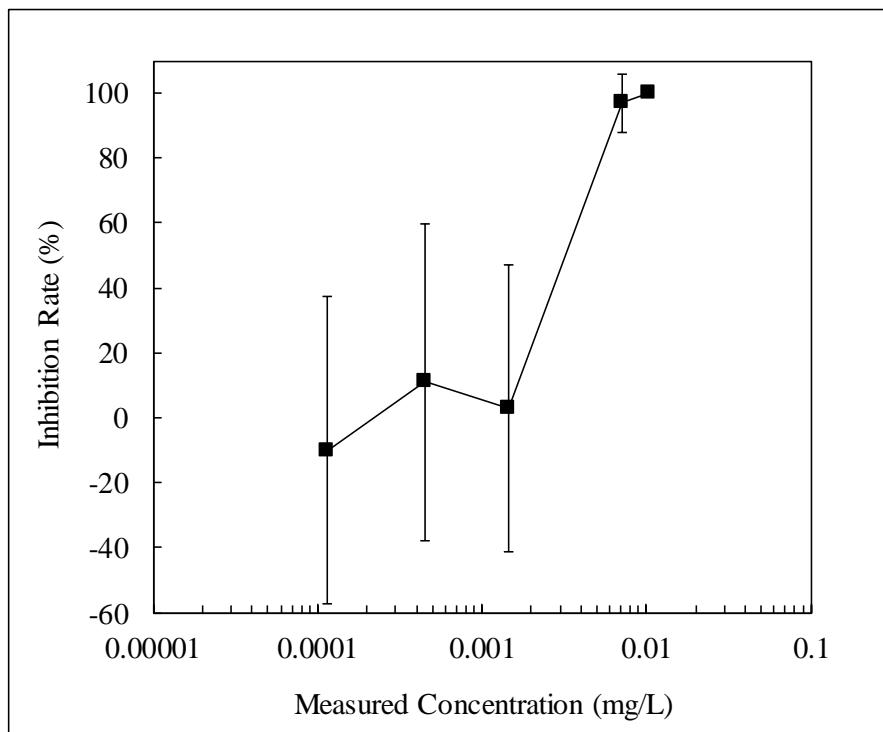


Figure 2 Concentration- Inhibition Rate Curve



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

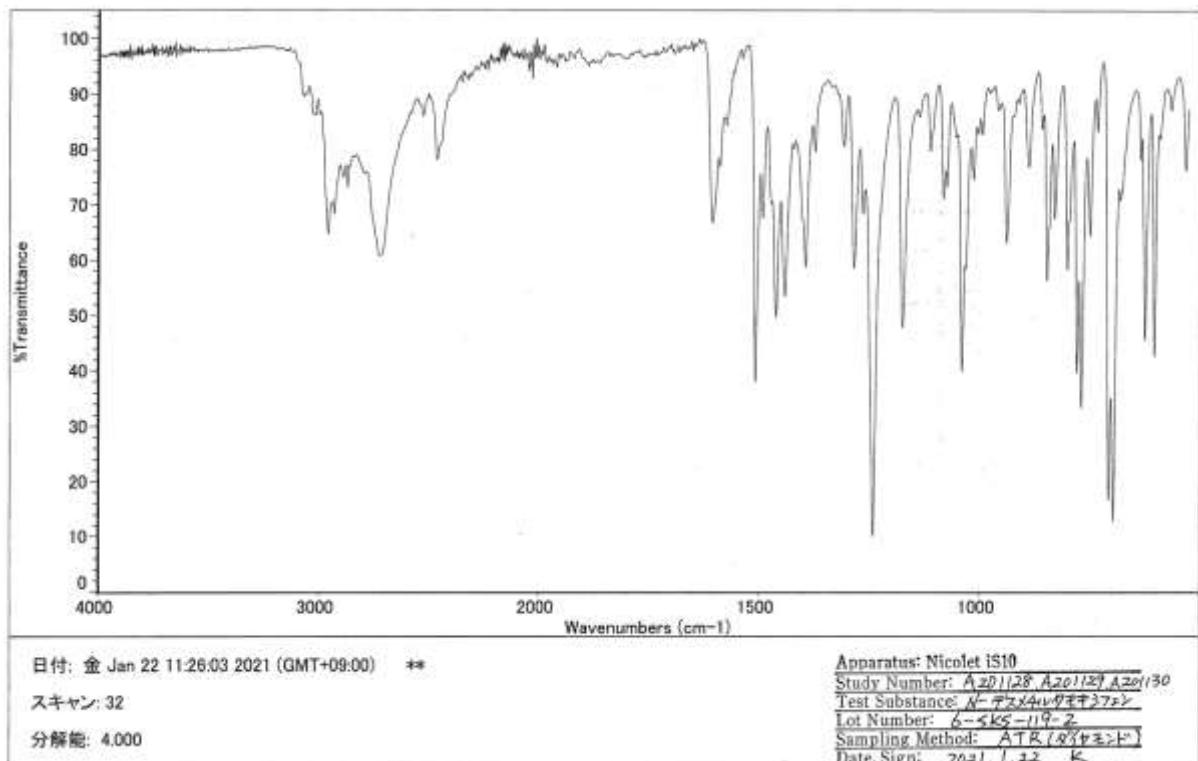
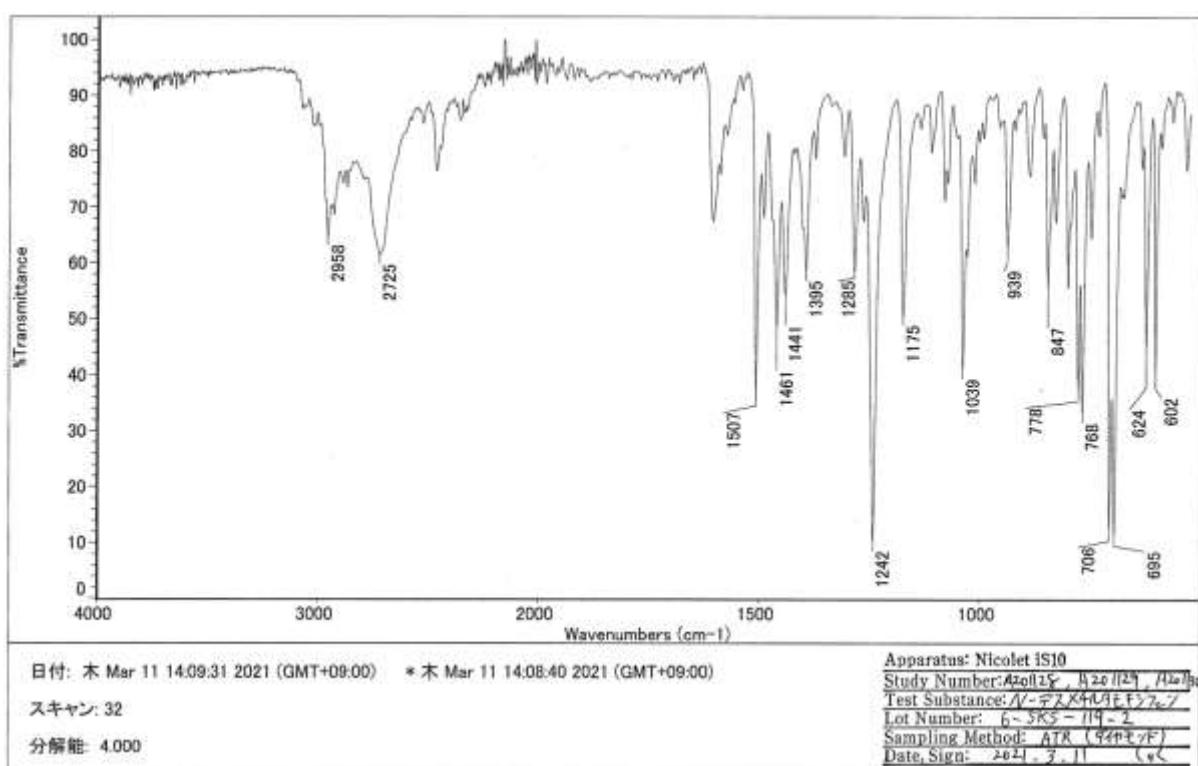


Figure A-1-2 Infrared Absorption Spectrum of the Test Substance after the End of Exposure



付属資料-2

試験用水の成分

Table A-2 Natural Mineral Water

- ・名称： ナチュラルミネラルウォーター
- ・原材料名： 水（鉱泉水）
- ・原産国名： フランス
- ・採水地： ボルヴィック
- ・輸入者： キリンビバレッジ株式会社

成分	含有量（製品 100 mL 当たり）
たんぱく質・脂質・炭水化物	0 g
ナトリウム	1.16 mg
カルシウム	1.15 mg
マグネシウム	0.80 mg
カリウム	0.62 mg

pH 値 7.0
硬度 60 mg/L

（上記内容は製品ラベルによる）

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。

OECD 培地 (藻類生長阻害試験用)

硬度 約 60 CaCO₃ mg/L のミネラルウォーター^{*1} (ニセネコゼミジンコ繁殖試験用)

脱塩素水道水 (魚類胚・仔魚期短期毒性試験用)

*1 : キリンビバレッジ株式会社販売

2. 方法

- 被験物質 10 mg を共栓付 200 mL 三角フラスコに採取し、試験用水を 100 mL 加えた。 (仕込み濃度 : 100 mg/L, 連数 : 3)
- OECD 培地は 22°C, 脱塩素水道水および硬度 約 60 CaCO₃ mg/L のミネラルウォーターは 25°C で 48 時間スターラーにより攪拌した。
- 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分析計 (HPLC) 計により測定した。

*2 : メルクミリポア製 Millex HA 0.45 μm

3. 結果および考察

測定結果

No.	OECD 培地		硬度 約 60 CaCO ₃ mg/L の ミネラルウォーター		脱塩素水道水	
	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	5.08		5.51		1.66	
2	3.21	3.8	1.50	3.2	1.74	3.2
3	3.24		2.70		6.13	

以上の結果から、被験物質の試験用水に対する溶解度は、OECD 培地 (22°C) 3.8 mg/L, 硬度 約 60 CaCO₃ mg/L のミネラルウォーター (25°C) 3.2 mg/L, 脱塩素水道水 (25°C) 3.2 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. 被験物質の負荷

- 1) 被験物質を下記の表の通りに採取する。
- 2) 容器に被験物質を添加し、試験用水を最終容量まで加える。対照区は試験用水のみを容器に採取する。

試験用水 : volvic
 調製頻度 : 暴露開始前48時間および換水前48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	-	-	0.5	0.5 Lメジューム瓶
濃度区用原液	10*	11.0	1.0	1 Lメジューム瓶

*:N-デスマチルタモキシフェン塩酸塩のN-デスマチルタモキシフェン換算値

2. 搅拌および試験液の調製

- 1) インキュベータ内(温度:25°C)において、スターラーで48時間搅拌する。
 インキュベータ : 日立アプライアンス製 CRB-41A型
- 2) アスピレーターを用いて1)の試験液をフィルターろ過する。
 フィルター: メルクミリポア製メンブレンフィルター HA 0.45μm
 アスピレーター : ヤマト科学製 WP-15型
- 3) 各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。

試験用水: volvic
 最終容量: 300 mL
 容器: 三角フラスコ
 混合方式: 転倒搅拌
 調製頻度: 暴露開始前48時間および換水前48時間に調製
 公比: 3.16

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	0.010	0.30
濃度区2	0.032	0.96
濃度区3	0.10	3.0
濃度区4	0.32	9.6
濃度区5	1.0	30

設定濃度は負荷率10 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

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.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 : Agilent 製 Poroshell 120 EC-C18 2.7 μ m, 4.6 mm i.d. \times 50 mm
カラムオーブン : 40°C
溶離液 : A2 液 : 5mM 亜酸アンモニウム水溶液/亜酸=1000/1 (v/v)
B2 液 : HPLC 用アセトニトリル
A2 液 30%, B2 液 70%
ストップタイム : 4 min
試料注入量 : 3 μ L
流速 : 0.4 mL/min

[MSD 条件]

Ionization : API-ES
Fragmentor : 125 V
Nebulizer : N₂ (30 psig)
Drying gas : N₂ (10 L/min, 300°C)
Mode : Positive
SIM (Selected Ion Monitoring) 条件 : m/z 358.20 [C₂₅H₂₇NO+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 22.1 mg を秤量し, HPLC 用メタノールで溶解し 20 mL に定容とし, 1000 mg/L (N-デスマチルタモキシフェン換算値) の溶液を調製した。この溶液を HPLC 用メタノールで順次希釈し, 0.000200, 0.000500, 0.00200, 0.00500 mg/L の標準溶液を調製した。また, HPLC 用メタノールを 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

|

LC/MS測定

* : 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 0.998 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。なお, 0 mg/L の標準溶液においてブランクピークが認められたため, 各標準溶液のピーク面積からブランクピークの面積を差し引いた。

4) 定量下限

0 mg/L の標準溶液を 2) に従って n=3 で分析した。各測定値から次式を用いて被験物質濃度を算出し, これ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 0.00004 mg/L であった。

$$\text{定量下限 (LLOQ)} = 10\sigma / \text{slope}$$

σ : 0 mg/L の標準溶液のピーク面積の標準偏差

slope : 検量線の傾き

3. 試験液の分析方法

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^{*1}） 0.75 mL 採取

| ←HPLC用メタノール 0.75 mL 添加

混合^{*2}

|

LC/MS 測定

*1：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。

*2：暴露開始後2日目において、各分析試料は混合後、測定に供するまで遮光で冷蔵保存した。
同様に、試験液中の被験物質濃度の定量に使用する標準溶液も、超純水と混合後は遮光で冷蔵保存した。

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。なお、暴露開始後 2 日目の試験液中の被験物質濃度の定量は、各試験液と同日に採取し遮光で冷蔵保管した標準溶液のピーク面積との比較により算出した。

0 mg/L の標準溶液においてブランクピークが認められたため、標準溶液のピーク面積からブランクピークの面積を差し引いた。対照区においてブランクピークが認められたため、濃度区のピーク面積から対照区のピーク面積を差し引いて被験物質濃度を算出した。

Figure A-5-1 Calibration Curve

No.	Concentration X (mg/L)	Peak area Y(count)	Peak area Y' (count)
1	0	485	0
2	0.000200	3871	3386
3	0.000500	7361	6876
4	0.00200	30324	29839
5	0.00500	64416	63931

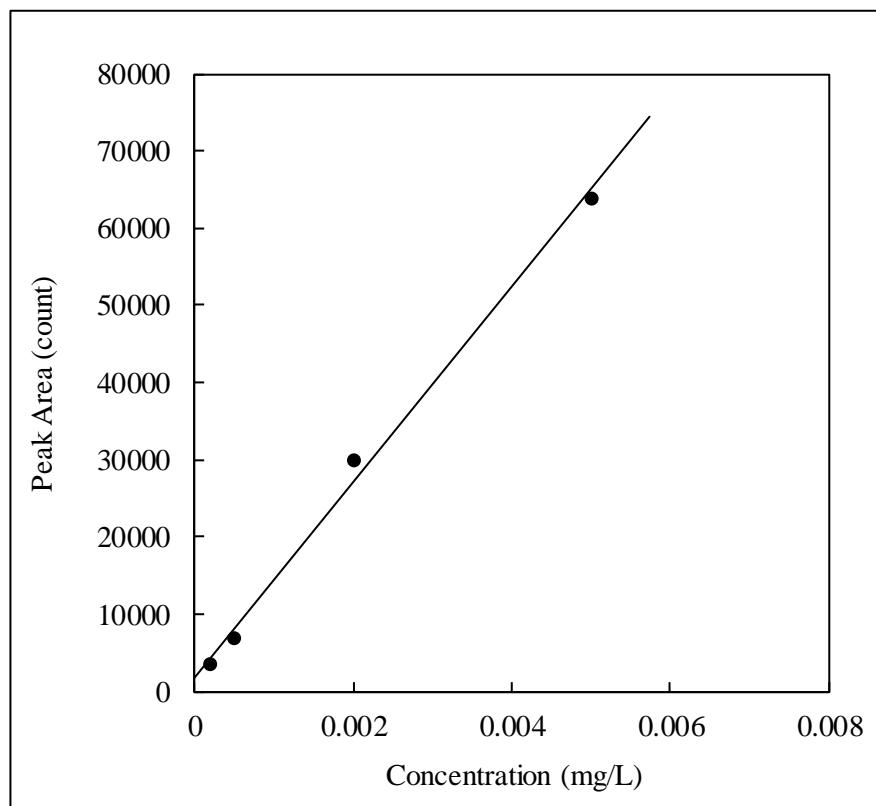
$$Y' = Y - Y(0)$$

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

$$a = 1.634E+03 \quad -5.584E+03 < a < 8.852E+03$$

$$b = 1.266E+07 \quad (95\text{-Percent Confidence Limits})$$

$$r = 0.998$$



Ceriodaphnia dubia Reproduction Test

Figure A-5-2 Representative Measurement Results

Standard 0.000200 mg/L : Day 0

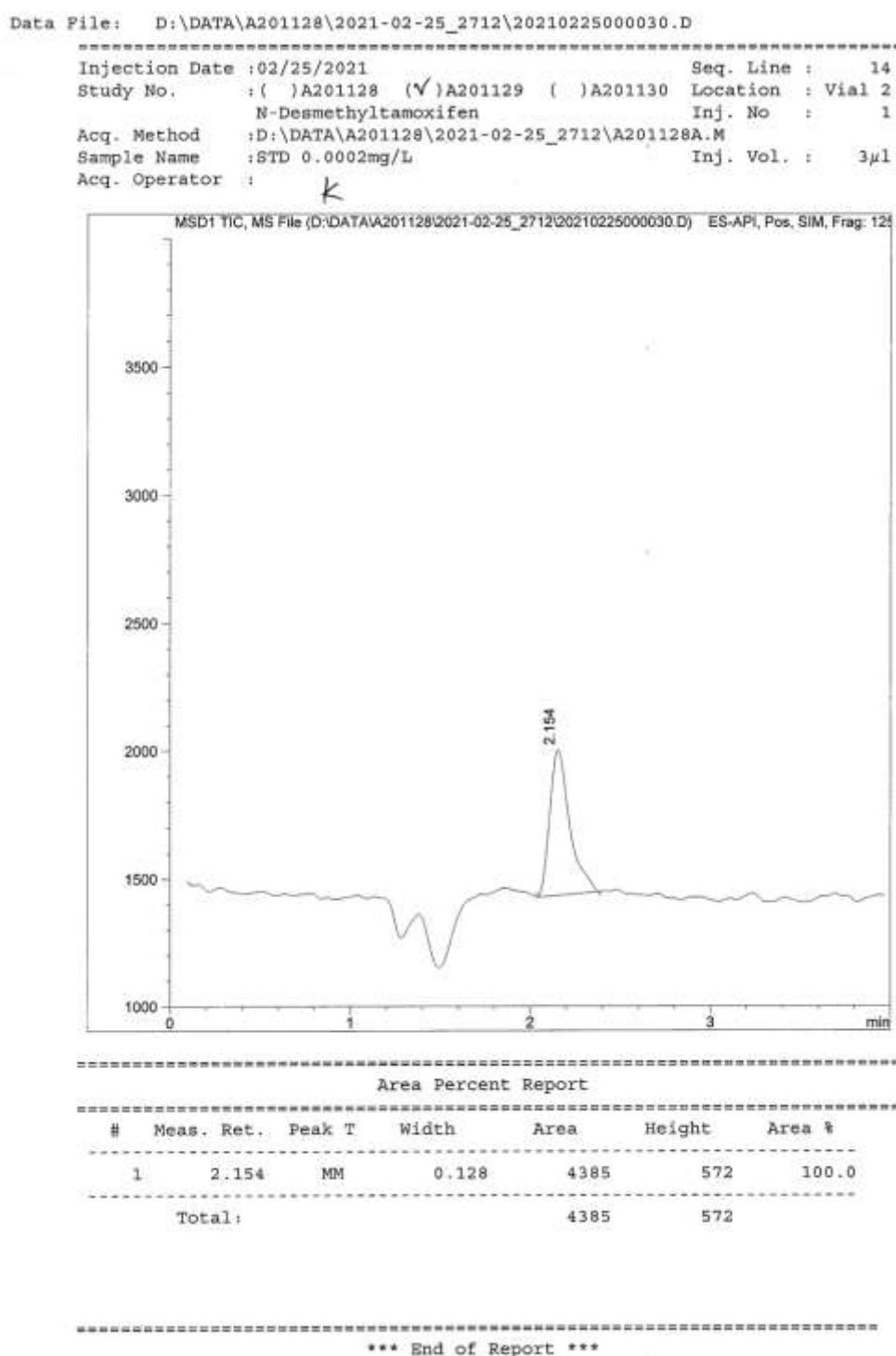
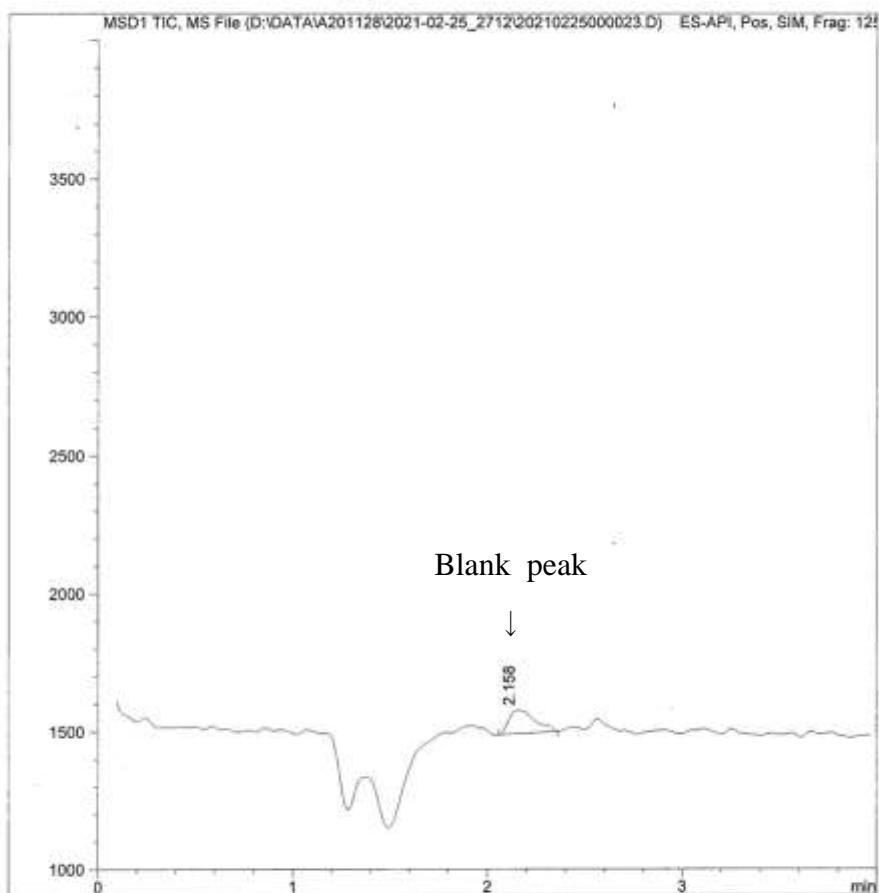


Figure A-5-2 Representative Measurement Results (Continued)

Standard 0 mg/L : Day 0

Data File: D:\DATA\A201128\2021-02-25_2712\20210225000023.D

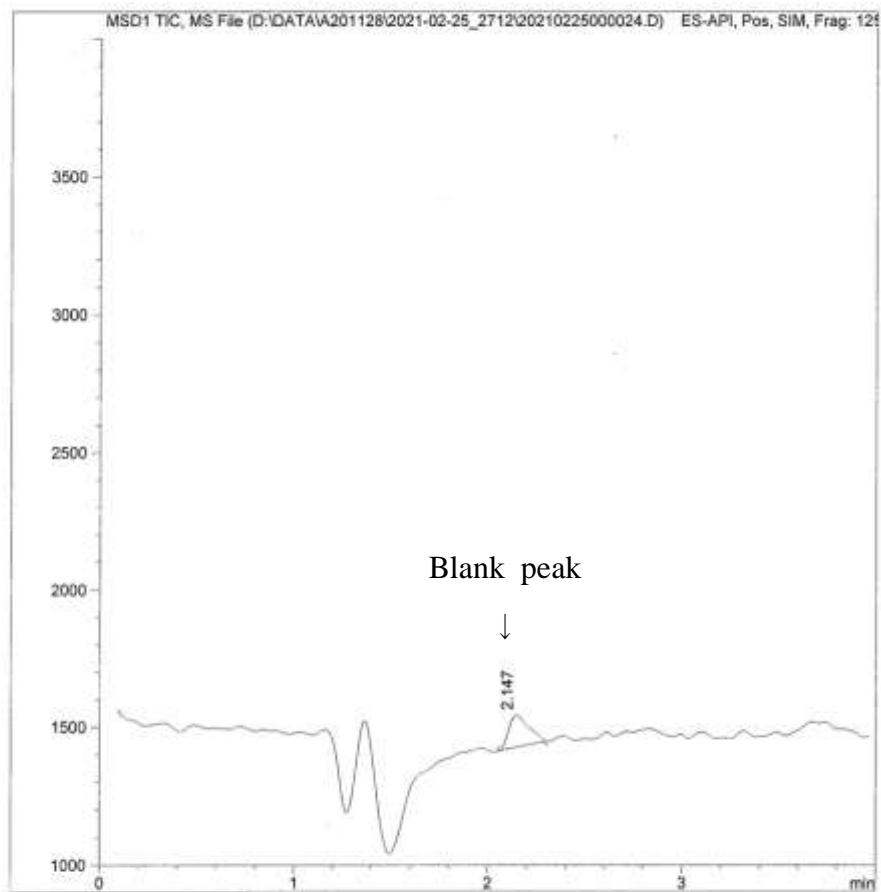


Area Percent Report							
#	Meas.	Ret.	Peak T	Width	Area	Height	Area %
1		2.158	MM	0.156	799	86	100.0
	Total:				799	86	

*** End of Report ***

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

Control : Day 0



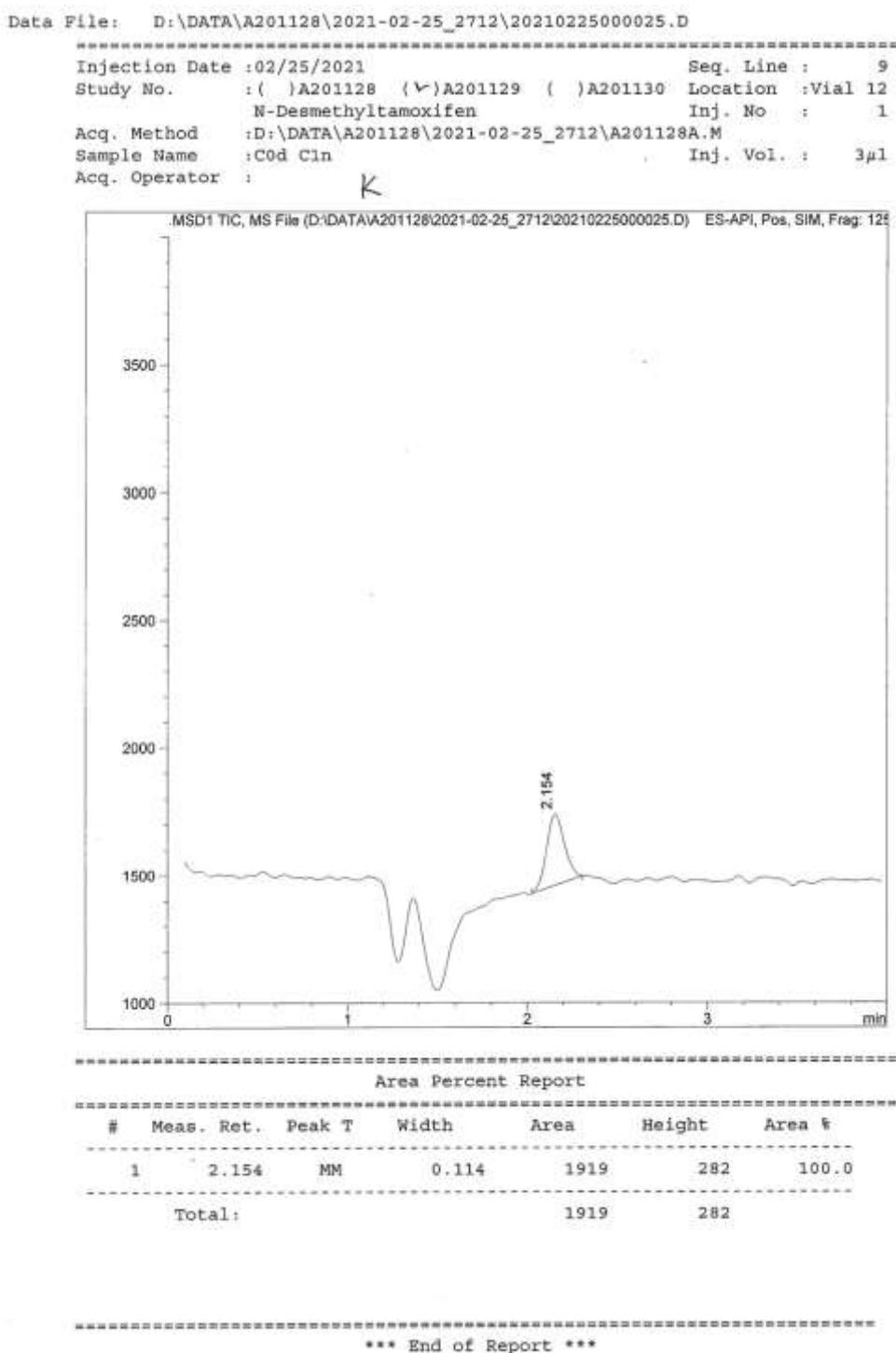
Area Percent Report							
#	Meas.	Ret.	Peak T	Width	Area	Height	Area %
1		2.147	MM	0.117	829	118	100.0
Total:					829	118	

*** End of Report ***

Ceriodaphnia dubia Reproduction Test

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

Conc. 1 : Day 0

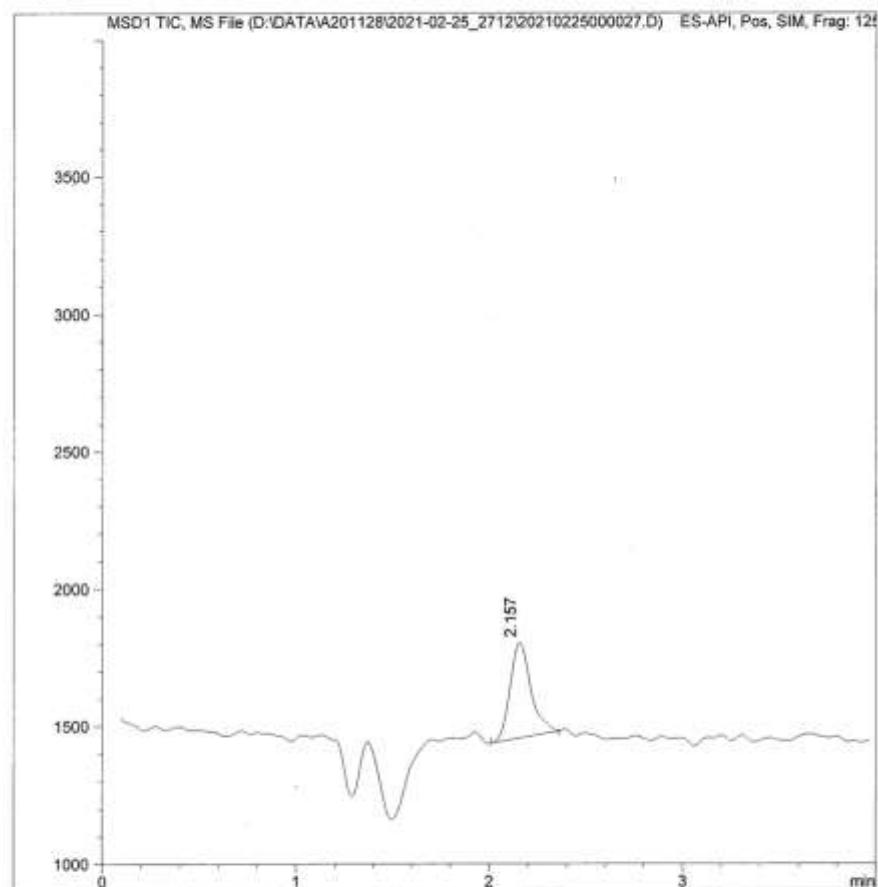


Ceriodaphnia dubia Reproduction Test

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

Conc. 3 : Day 0

Data File: D:\DATA\A201128\2021-02-25_2712\20210225000027.D
=====
Injection Date : 02/25/2021 Seq. Line : 11
Study No. : ()A201128 (V)A201129 ()A201130 Location : Vial 14
N-Desmethyltamoxifen Inj. No : 1
Acq. Method : D:\DATA\A201128\2021-02-25_2712\A201128A.M
Sample Name : C0d C3n Inj. Vol. : 3 μ l
Acq. Operator : K



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

#	Meas.	Ret.	Peak T	Width	Area	Height	Area %
1		2.157	MM	0.123	2592	351	100.0
Total:					2592	351	

=====

*** End of Report ***

Ceriodaphnia dubia Reproduction Test

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

Conc. 5 : Day 0

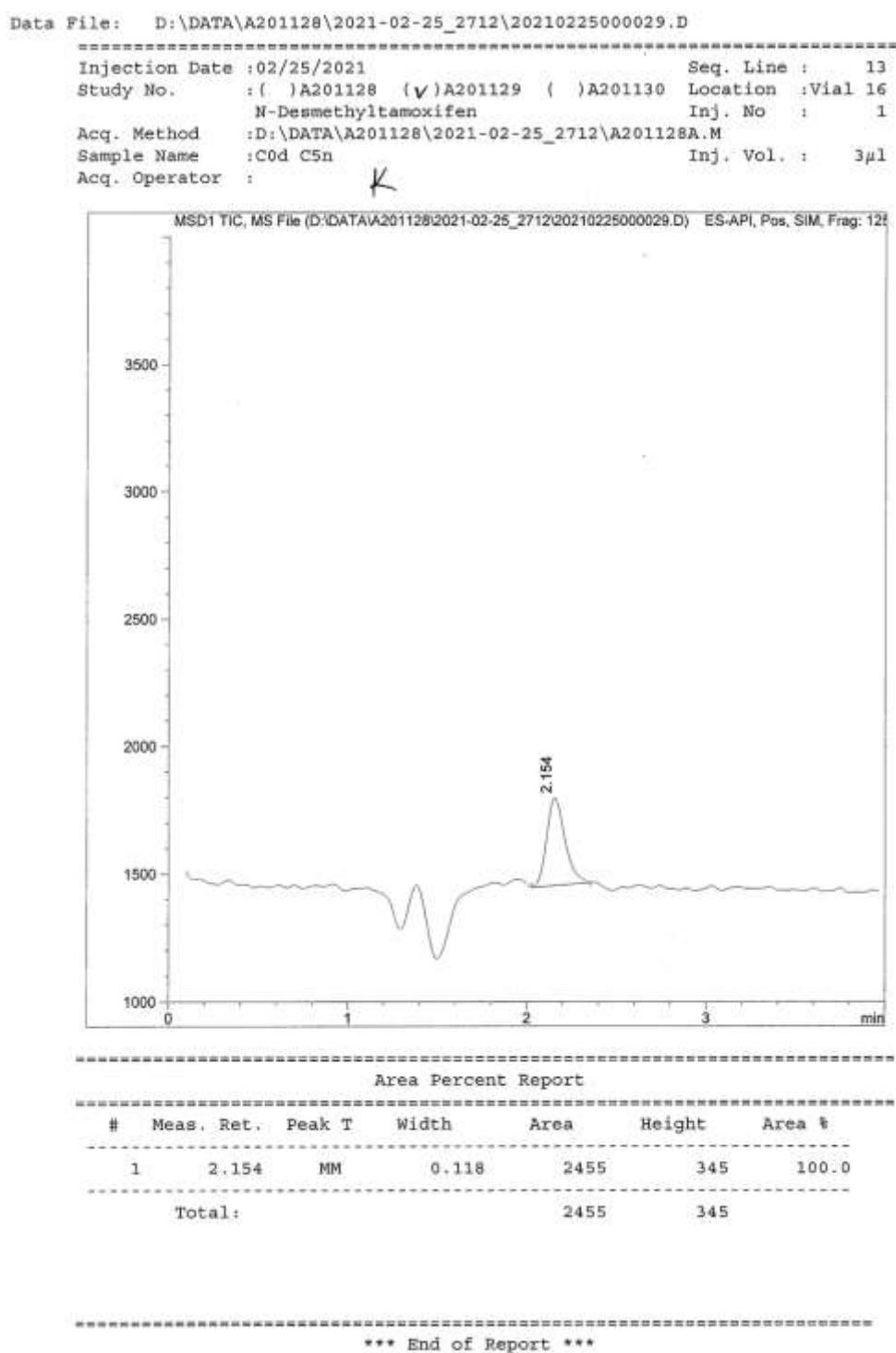


Figure A-5-2 Representative Measurement Results (continued)

Standard 0.000200 mg/L : Day 2

Data File: D:\DATA\A201128\2021-03-01_2715\20210301000007.D

=====
 Injection Date : 03/01/2021 Seq. Line : 7
 Study No. : () A201128 (v) A201129 () A201130 Location : Vial 12
 N-Desmethyltamoxifen Inj. No : 1
 Acq. Method : D:\DATA\A201128\2021-03-01_2715\A201128A.M
 Sample Name : STD 0.0002mg/L 2/27 Inj. Vol. : 3μl
 Acq. Operator : k

MSD1 TIC, MS File (D:\DATA\A201128\2021-03-01_2715\20210301000007.D) ES-API, Pos, SIM, Frag: 128

=====
 Area Percent Report

#	Meas.	Ret.	Peak T	Width	Area	Height	Area %
1		2.134	MM	0.125	4714	630	100.0
Total:					4714	630	

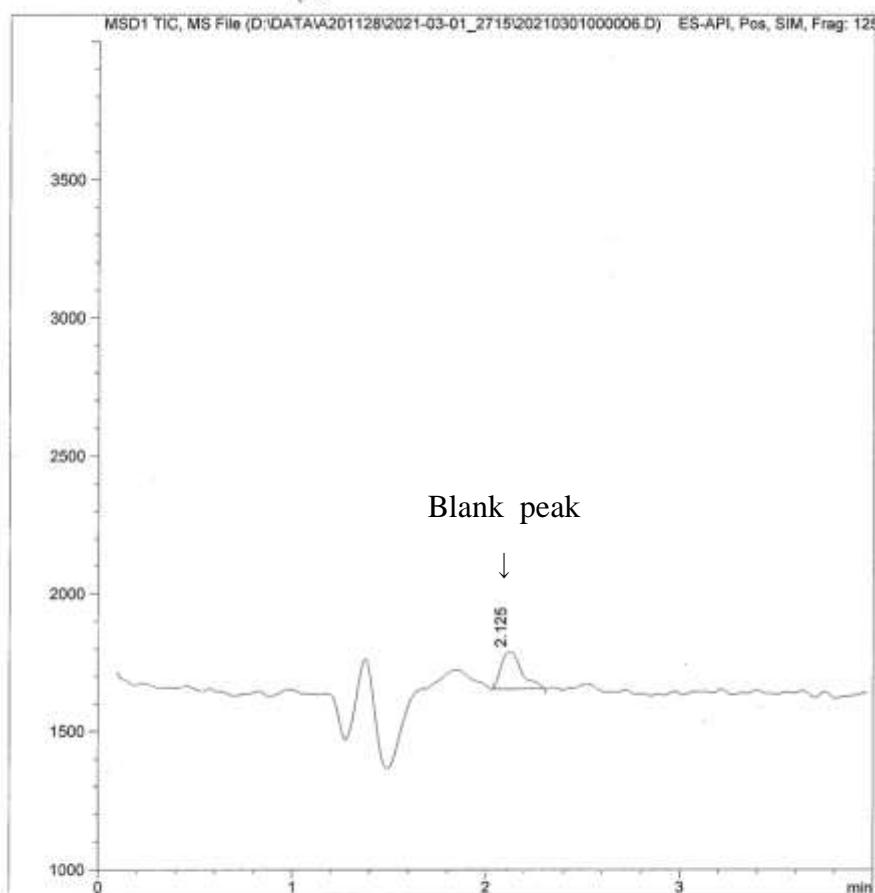
=====
 *** End of Report ***

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

Standard 0 mg/L : Day 2

Data File: D:\DATA\A201128\2021-03-01_2715\20210301000006.D
=====

Injection Date	: 03/01/2021	Seq. Line :	6
Study No.	: (<input checked="" type="checkbox"/>) A201128 (<input checked="" type="checkbox"/>) A201129 (<input type="checkbox"/>) A201130	Location :	Vial 11
	N-Desmethyltamoxifen	Inj. No :	1
Acq. Method	: D:\DATA\A201128\2021-03-01_2715\A201128.A.M		
Sample Name	: STD 0mg/L 2/27	Inj. Vol. :	3μl
Acq. Operator	:		K



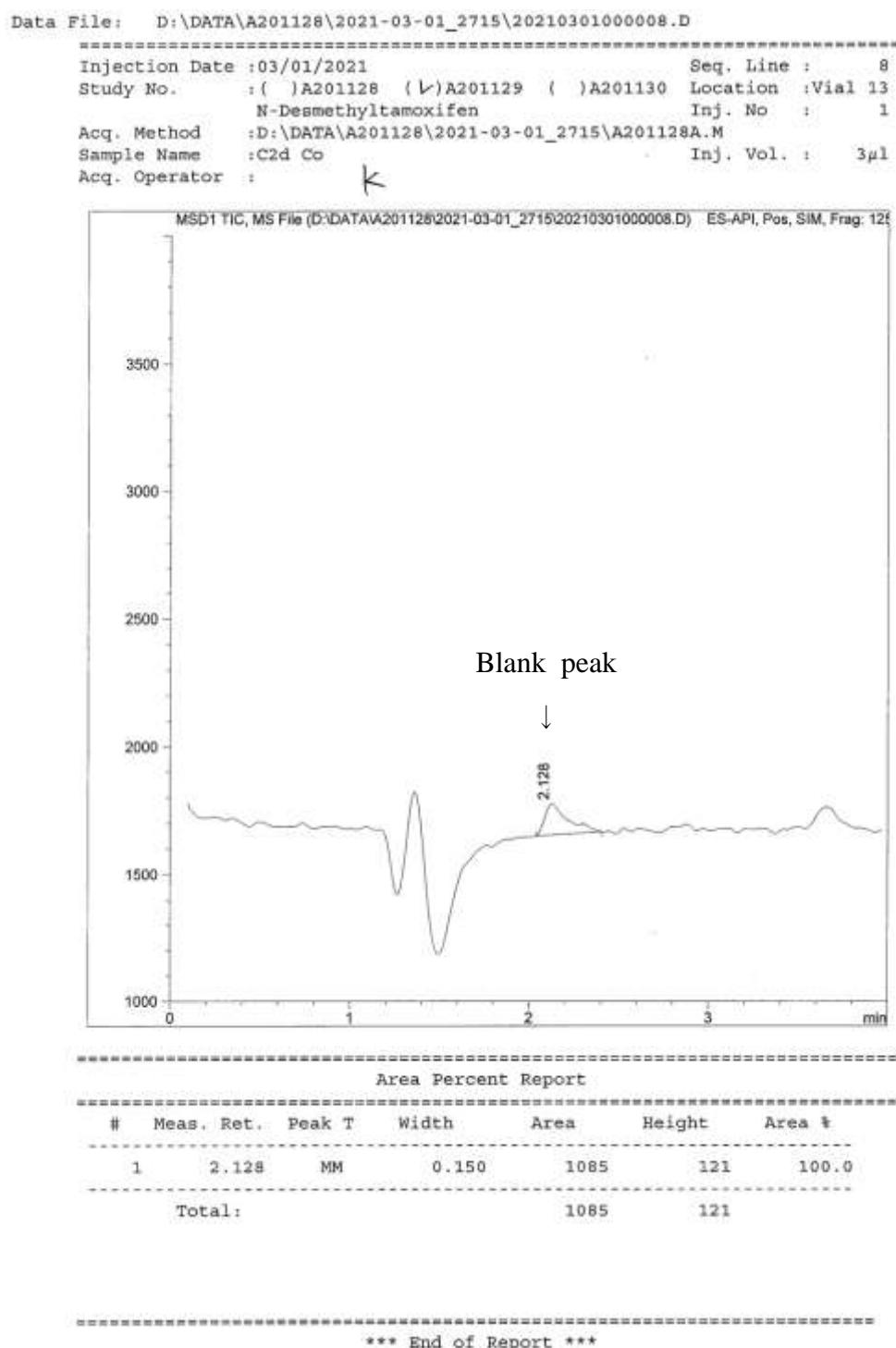
Area Percent Report							
#	Meas.	Ret.	Peak T	Width	Area	Height	Area %
1		2.125	MM	0.122	995	136	100.0
Total:					995	136	

*** End of Report ***

Ceriodaphnia dubia Reproduction Test

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

Control : Day 2



Ceriodaphnia dubia Reproduction Test

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

Conc. 1 : Day 2

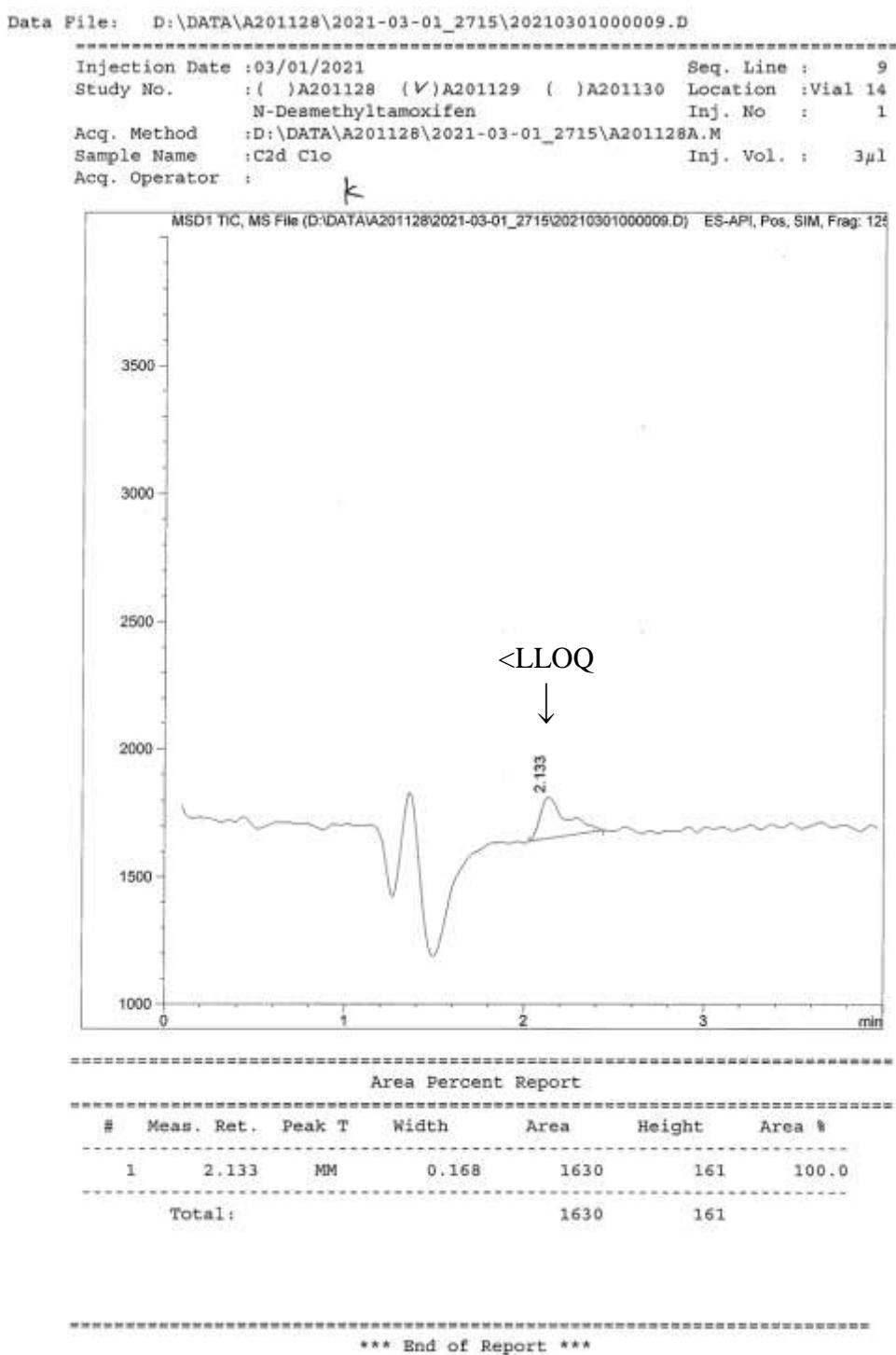


Figure A-5-2 Representative Measurement Results (continued)

Conc. 3 : Day 2

Data File: D:\DATA\A201128\2021-03-01_2715\20210301000011.D

=====
 Injection Date :03/01/2021 Seq. Line : 11
 Study No. : ()A201128 (✓)A201129 ()A201130 Location :Vial 16
 Acq. Method :D:\DATA\A201128\2021-03-01_2715\A201128A.M Inj. No : 1
 Sample Name :C2d C3o Inj. Vol. : 3µl
 Acq. Operator : K

MSD1 TIC, MS File (D:\DATA\A201128\2021-03-01_2715\20210301000011.D) ES-API, Pos, SIM, Frag: 125

=====
 Area Percent Report

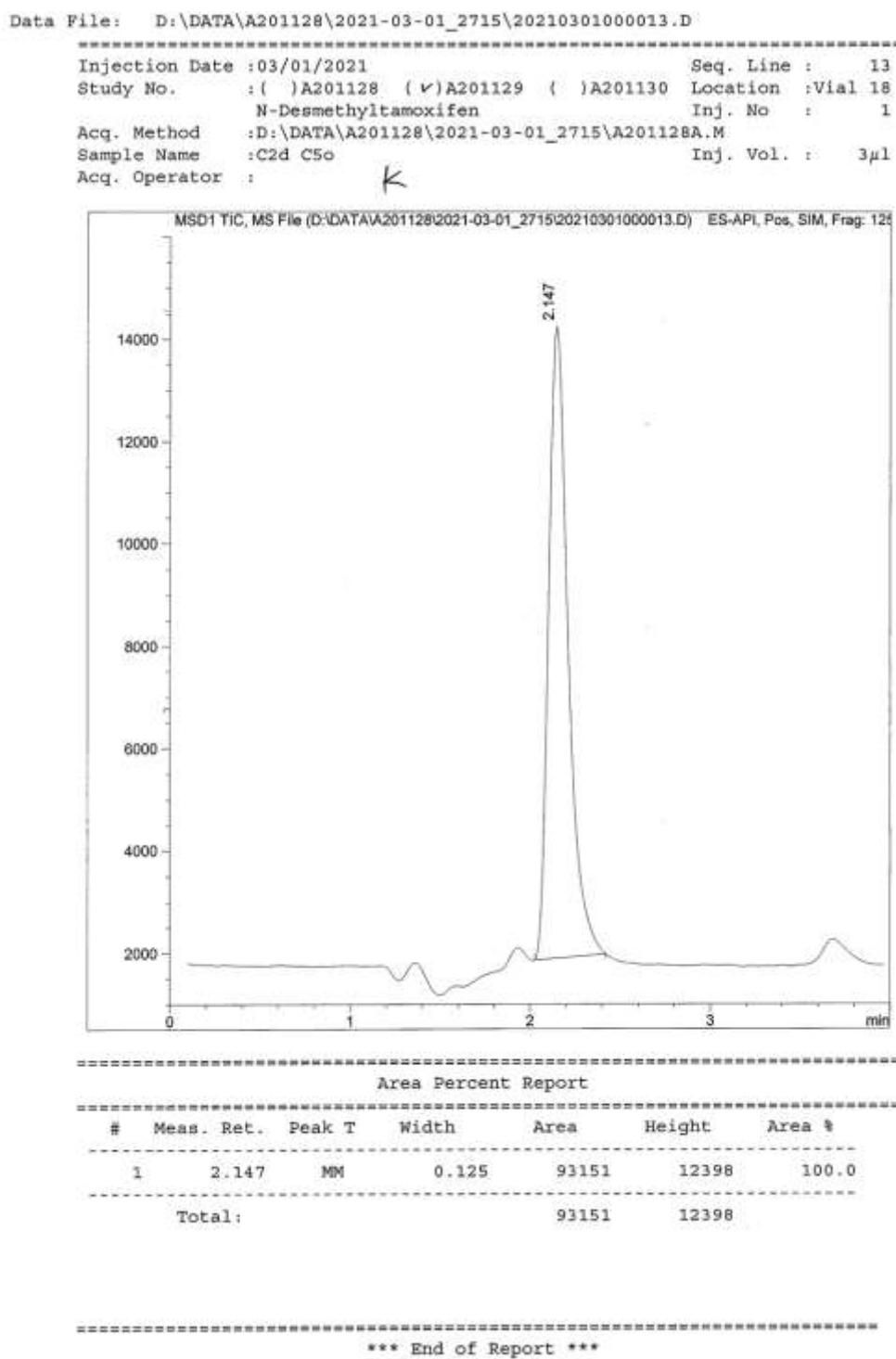
#	Meas.	Ret.	Peak T	Width	Area	Height	Area %
1		2.138	MM	0.112	2432	361	100.0
Total:					2432	361	

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

Ceriodaphnia dubia Reproduction Test

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

Conc. 5 : Day 2



付属資料-6

結果の算出

Table A-6-1 Calculation of the LC50 (6 days)

TOXDAT MULTI-METHOD PROGRAM
(BINOMIAL, MOVING AVERAGE AND PROBIT METHODS)

ミジンコ繁殖阻害試験
Time: 6day

Conc. No.	CONC. mg/L	NUMBER EXPOSED	NUMBER DEAD	PERCENT DEAD	BINOMIAL PROB. (%)
Conc. 1	0.000114	10	0	0	0.09766
Conc. 2	0.000452	10	0	0	0.09766
Conc. 3	0.00147	10	0	0	0.09766
Conc. 4	0.00711	10	3	30	17.18750
Conc. 5	0.0105	10	10	100	0.09766

THE BINOMIAL TEST SHOWS THAT 0.00147 AND 0.0105 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 7.77179221776065E-03

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.

Table A-6-2 Results of Statistical Multicomparison Test

Cumulative Number of Offspring

Input Data Table					
control	Conc.1	Conc.2	Conc.3	Conc.4	Conc.5
Group1	Group2	Group3	Group4	Group5	Group6
1	24	15	21	0	0
24	23	20	20	1	0
18	15	13	15	0	0
21	22	19	18	0	0
18	15	15	19	5	0
12	16	17	16	0	0
23	19	23	14	0	0
22	18	1	20	0	0
23	23	16	8	0	0
16	20	20	21	0	0

Group	Samples	Mean	S.E.	S.D.	Variance
1	10	17.8000	2.2101	6.9889	48.8444
2	10	19.5000	1.0878	3.4400	11.8333
3	10	15.9000	1.9058	6.0268	36.3222
4	10	17.2000	1.2893	4.0770	16.6222
5	10	0.6000	0.4989	1.5776	2.4889
6	10	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000

Method	vs	Side	Stat.	0.0500	0.0100	0.001 Prob.
Bartlett test			0	999.9999	11.0705	15.0863

□ 等分散である
■ 等分散でない

Table A-6-2 Results of Statistical Multicomparison Test (continued)

Cumulative Number of Offspring

等分散性が認められなかつたため、
結果を log 変換した

Input Data Table

control	Conc.1	Conc.2	Conc.3	Conc.4	Conc.5
Group1	Group2	Group3	Group4	Group5	Group6
0.301	1.398	1.204	1.342	0.000	0.000
1.398	1.380	1.322	1.322	0.301	0.000
1.279	1.204	1.146	1.204	0.000	0.000
1.342	1.362	1.301	1.279	0.000	0.000
1.279	1.204	1.204	1.301	0.778	0.000
1.114	1.230	1.255	1.230	0.000	0.000
1.380	1.301	1.380	1.176	0.000	0.000
1.362	1.279	0.301	1.322	0.000	0.000
1.380	1.380	1.230	0.954	0.000	0.000
1.230	1.322	1.322	1.342	0.000	0.000

Group	Samples	Mean	S.E.	S.D.	Variance			
1	10	1.2065	0.1043	0.3298	0.1088			
2	10	1.3061	0.0236	0.0746	0.0056			
3	10	1.1667	0.0987	0.3121	0.0974			
4	10	1.2474	0.0375	0.1185	0.0140			
5	10	0.1079	0.0803	0.2538	0.0644			
6	10	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000			
Method	vs	Side	Stat.			0.0500	0.0100	0.001 Prob.
Bartlett test			0	999.9999		11.0705	15.0863	20.5150 0.0000

□ 等分散である
■ 等分散でない

Table A-6-2 Results of Statistical Multicomparison Test (continued)

Cumulative Number of Offspring

等分散性が認められなかつたため、
ノンパラメトリック手法を用いた

Input Data Table

control	Conc.1	Conc.2	Conc.3	Conc.4	Conc.5
Group1	Group2	Group3	Group4	Group5	Group6
1	24	15	21	0	0
24	23	20	20	1	0
18	15	13	15	0	0
21	22	19	18	0	0
18	15	15	19	5	0
12	16	17	16	0	0
23	19	23	14	0	0
22	18	1	20	0	0
23	23	16	8	0	0
16	20	20	21	0	0

Group	Samples	Mean	S.E.	S.D.	Variance
1	10	17.8000	2.2101	6.9889	48.8444
2	10	19.5000	1.0878	3.4400	11.8333
3	10	15.9000	1.9058	6.0268	36.3222
4	10	17.2000	1.2893	4.0770	16.6222
5	10	0.6000	0.4989	1.5776	2.4889
6	10	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000

Method	vs	Side	Stat.	0.05	0.01	0.001	Prob.
Steel		1	0.1903	2.2323	2.8338	999.9900	0.7704
Steel		1	1.1377	2.2323	2.8338	999.9900	0.3524
Steel		1	0.9488	2.2323	2.8338	999.9900	0.4375
Steel		1	3.7924	>2.2323	>2.8338	999.9900	0.0004 **
Steel		1	4.0419	>2.2323	>2.8338	999.9900	0.0001 **

参考のため、Dunnett検定も行う。

Method	vs	Side	Stat.	0.05	0.01	0.001	Prob.
Dunnett	1 vs 2	1	0.1755	2.2323	2.8338	999.9900	0.7758
Dunnett	1 vs 3	1	0.8578	2.2323	2.8338	999.9900	0.4799
Dunnett	1 vs 4	1	0.5784	2.2323	2.8338	999.9900	0.6100
Dunnett	1 vs 5	1	4.0356	>2.2323	>2.8338	999.9900	0.0001 **
Dunnett	1 vs 6	1	4.3345	>2.2323	>2.8338	999.9900	0.0000 **