

3. 胚・仔魚期魚類短期毒性試験

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-デスメチルタモキシフェンの魚類 (*Danio rerio*) 胚・仔魚期に対する短期毒性試験

試験番号： A201130

試験方法： 本試験は、OECD テストガイドライン 212 “Fish, Short-term Toxicity Test on Embryo and Sac-fry Stages”，ISO 規格 15088 および USEPA 試験法 “Fathead Minnow, *Pimephales Promelas*, embryo-larval survival and teratogenicity test method” を参考とした試験法マニュアル*1 “胚・仔魚期の魚類を用いる短期毒性試験法案” に準拠して実施した。

本試験は被験物質としてN-デスメチルタモキシフェンの胚・仔魚期魚類に対する短期毒性試験として依頼されたが、N-デスメ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-デスメ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*2 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。

*1 国立研究開発法人国立環境研究所（環境省請負事業），生物応答を用いた排水試験法（検討案），排水（環境水）管理のバイオアッセイ技術検討分科会，2015 年 3 月

*2 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： ゼブラフィッシュ (*Danio rerio*)
- 2) 試験用水： 脱塩素水道水
- 3) 暴露期間： 8 日間
- 4) 暴露方式： 半止水式 (48 時間毎に試験液を交換)
- 5) 供試生物数： 60 個体／試験区 (15 個体／容器)
- 6) 試験温度： 26±1℃
- 7) 照明： 室内光，16 時間明 (1000 lux 以下) ／8 時間暗

8) 試験濃度：

試験区	設定濃度* (mg/L)
対照区	—
濃度区 1	0.050
濃度区 2	0.16
濃度区 3	0.50
濃度区 4	1.6
濃度区 5	5.0

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用いて算出した。

最小影響濃度 (LOEC) : 0.0129 mg/L

最大無影響濃度 (NOEC) : 0.00469 mg/L (多重比較検定：Steel Test)

1 材料

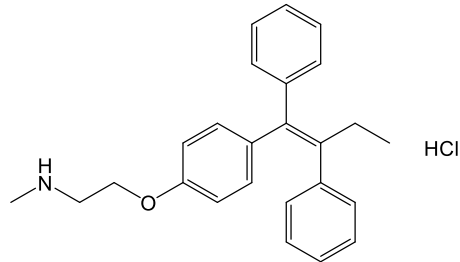
1.1 被験物質

1.1.1 名称, 構造式および物理化学的性状

名 称^{*1}: N-デスメ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}: $C_{25}H_{28}ClNO$ (N-デスメチルタモキシフェンとして「 $C_{25}H_{27}NO$ 」)

分子量^{*1*2}: 393.95 (N-デスメ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-デスメチルタモキシフェン塩酸塩およびN-デスメ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-デスメ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 Reserch 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, $-20^{\circ}C$ 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49 mg CaCO₃/L, pHは7.8であり、適正範囲内であった。

1.3 供試生物

1)一般名（学名）：ゼブラフィッシュ (*Danio rerio*)

2)入手先： 国立研究開発法人国立環境研究所および綱島フィッシング（以降、当施設にて継代飼育）

3)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）による胚・仔魚期に対する短期毒性試験を行い、供試魚の感受性を調べている。
最新の結果および当施設における過去のロットの結果（2016年以降, n=7）を以下に示す。

孵化率（EC50）：9.54 g/L

（平均値 8.56 g/L, 標準偏差 1.09 g/L, 最小値～最大値 7.40～9.82 g/L）

孵化後生存率（EC50）：3.29 g/L

（平均値 3.27 g/L, 標準偏差 1.33 g/L, 最小値～最大値 2.29～6.15 g/L）

4)受精卵の採取： 採卵予定日の前日に、分離飼育しておいた雄と雌を同じ採卵用水槽に収容した。採卵当日朝、照明を点灯し、産卵が確認され次第、水槽底に沈降した卵を容器に回収した。

容器に回収した卵は、ピペットで適量の飼育水と一緒にシャーレに移し入れ、実体顕微鏡下で観察し、未受精卵（外見的に、「透明感がない」、「囲卵腔が形成されていない」または「細胞分裂がみられない」状態のもの）を除去した。また、受精卵のうち、「形状が歪んでいる」、「卵膜や卵黄に白濁部がみられる」、「卵黄が小さい」、「囲卵腔が狭い」等の異常が認められるものも除去した。加えて、混入している糞等も除去した。

1.4 試験容器および恒温槽等

1) 試験容器： ガラス容器（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) 温度計： 横河メータ&インスツルメンツ製 TX1001 型

Fish, Short-term Toxicity Test on Embryo and Sac-fry Stages

- 4) 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
- 5) 電子天秤： メトラー製 AG204 型
 メトラー製 PB3002 型
- 6) ライト： 富士フィルム製 LED ビュアー ST-A3
- 7) 実体顕微鏡： ニコン製 SMZ-U 型
 カートン光学製 SPZT-50FTM 型

2 方法

2.1 試験方法

本試験は、OECD テストガイドライン 212 “Fish, Short-term Toxicity Test on Embryo and Sac-fry Stages”，ISO 規格 15088 および USEPA 試験法 “Fathead Minnow, *Pimephales Promelas*, embryonal larval survival and teratogenicity test method” を参考とした試験法マニュアル^{*1} “胚・仔魚期の魚類を用いる短期毒性試験法 案” に準拠して実施した。

本試験は、被験物質として N-デスメチルタモキシフェンの胚・仔魚期魚類に対する短期毒性試験として依頼されたが、N-デスメ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-デスメ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^{*2} 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。

*1 国立研究開発法人国立環境研究所（環境省請負事業），生物応答を用いた排水試験法（検討案），排水（環境水）管理のバイオアッセイ技術検討分科会，2015 年 3 月

*2 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（48 時間毎に試験液を換水） |
| 2) 暴露期間： | 8 日間（対照区において 50%を超える胚が孵化した日を孵化日とし，孵化 5 日後に終了） |
| 3) 試験液量： | 50 mL／容器 |
| 4) 連数： | 4 容器／試験区 |
| 5) 供試生物数： | 60 個体／試験区（15 個体／容器） |
| 6) 試験温度： | 26±1 °C |
| 7) 溶存酸素濃度： | 飽和濃度の 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

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 10 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 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 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。

設定濃度 (mg/L)	生存率 (%)	孵化率 (%)	孵化後生存率 (%)
対照区	100	100	100
0.010	100	100	100
0.10	100	100	100
1.0	0	100	0
10	0	0	-

供試条件：30 個体／試験区（15 個体／容器）

*1：メンブレンフィルター HA 0.45 μm, メルクミリポア製

*2：アスピレーター WP-15型, ヤマト科学製

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 ^{*3} (mg/L)
対照区	—
濃度区 1	0.050
濃度区 2	0.16
濃度区 3	0.50
濃度区 4	1.6
濃度区 5	5.0

公比：3.16

*3：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

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、暴露開始時（0 日目）と 2 日目、6 日目と暴露終了時（8 日目）の 2 セットについて分析を行った。各試験区より試験液を採取し、高速液体クロマトグラフ質量分析（LC/MS）法により分析を行なった。詳細を付属資料-5 に示す。

2.1.6 試験操作

1) 暴露の開始

あらかじめ調製した各濃度の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 50 mL ずつ分注した。また、各試験区について、試験容器とは別に試験液を約 50 mL 入れた容器（各試験区 1 つずつ）を用意した（以下、分注用試験容器と呼ぶ）。

受精後 4 時間以内の受精卵を、試験濃度ごとに分注用試験容器に必要な数（試験濃度あたりの供試数 60 粒）よりやや多めの数を手早くガラスピペットを用いて移し入れた。この時点を暴露開始とした。次に、ガラスピペットを用いて、上記容器に入れた受精卵を各試験容器に 15 粒ずつ移し入れた。

受精卵を入れた試験容器は、水分の蒸発および揮発成分の周囲への影響を防ぐために上面を塩ビ製のふた（透光性のあるもの）で覆い、すみやかに恒温槽内に入れた。

2) 換水

換水は暴露期間中 48 時間毎（観察の終了後）に実施した。

ゼブラフィッシュの胚は極めて脆弱で、ガラスピペットで試験液とともに吸引された際等に骨折による奇形を生じることがあるため、約 80% の試験液を除去した後、新たに調製した試験液を追加することで換水を実施した。

3) 観察

暴露期間中毎日（原則として暴露開始から 24 時間ごと）、試験容器中の試験生物を肉眼または実体顕微鏡下で観察し、生死および孵化した胚体数を記録した。発生前期（器官形成前）の胚では、全体の透明性が消失して白濁したものを死亡とした。発生後期（器官形成後）および孵化後の仔魚では、白濁または心臓の拍動が認められないものを死亡とした。卵膜から胚（体幹部）が完全に出ていない状態のものは孵化前とした。

生死および孵化した胚体数に加えて、少なくとも、死亡（D）、重篤（C）、異常（A）または正常（N）のいずれかに区分するとともに、暴露開始から 48 時間後以降の観察では、各試験濃度の生存する胚または仔魚のうち、対照区と比較して、「体躯の発育不全」、「尾部の卵黄からの

不分離」などの形態異常，「心拍数の低下」あるいは行動などに異常が認められる個体数を記録した。観察後，死亡した胚，仔魚および孵化後の卵膜を除去した。

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。

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。

$$Area = \frac{ConcA_n - ConcB_n}{\ln(ConcA_n) - \ln(ConcB_n)} \times Days \times Renewal Times$$

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

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

$ConcA_n$: n 期間の初めの測定値
(試験液調製時の測定値)

$ConcB_n$: n 期間の終わりの測定値
(換水直前の測定値)

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

$Days$: n 期間の終わりの日数

$Renewal Times$: 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) 統計的手法

暴露試験から得られるデータをもとに，以下の影響指標を算出した。

- ・ 供試卵数に対する，暴露終了時に生存した胚体または仔魚数の割合（生存率：％）
- ・ 供試卵数に対する，暴露開始 5 日後までに孵化した卵数の割合（孵化率：％）
- ・ 暴露期間に孵化した仔魚数に対する，暴露終了時に生存した仔魚数の割合（孵化後生存率：％）

また，孵化率，孵化後生存率を用い，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、生存率、外観観察等含め、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 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。
- ② ①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。
- ③ 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) 対照区における孵化率が 80%以上であること
- 2) 対照区における暴露終了時の生存率が 70%以上であること
- 3) 対照区における溶存酸素が暴露期間を通して飽和酸素濃度の 60%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 試験液の水質

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

水温は 25.1～26.8℃, 溶存酸素濃度は 7.4～8.5 mg/L, pH は 7.3～7.9 であった。水質測定の結果, 水温, 溶存酸素濃度および pH, ゼブラフィッシュの飼育環境として適正範囲内であり, 試験条件を満たした。

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 4 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 0.000488, 0.00154, 0.00469, 0.0129, 0.0469 mg/L であった。

調製時の被験物質濃度と換水直前（または暴露終了時）の被験物質濃度を比べると, すべての濃度区において, 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クロマトチャンバーの照明が影響している可能性が考えられた。

3.4 供試生物の観察

暴露期間中における供試生物の観察結果を Table 5 に示す。各試験区の生存率, 孵化率および孵化後生存率を Table 6 に, 濃度-孵化率曲線および濃度-孵化後生存率曲線を Figure 1 に示す。

暴露終了時の生存率は対照区で 100%, 濃度区 1～5 でそれぞれ 97, 98, 98, 0, 0% であった。孵化率は対照区で 100%, 濃度区 1～5 でそれぞれ 100, 98, 100, 100, 85% であった。また, 孵化後生存率は, 対照区で 100%, 濃度区 1～5 でそれぞれ 97, 100, 98, 0, 0% であった。

孵化率は, すべての濃度区において, 対照区と比較し有意な差は認められなかった。

孵化後生存率は, 濃度区 1～3 において, 対照区と比較し有意な差は認められなかった。濃度区 4, 5 において, 対照区と比較し有意な差が認められた。

濃度区 4 において, 孵化数は 60 尾であった。暴露 3 日目までに 60 尾が孵化し, 暴露 5 日目に遊泳異常が 48 尾観察された。その後, 暴露 6 日目に 59 尾, 暴露 7 日目に 1 尾が死亡し, すべての死亡が確認された。

濃度区 5 において, 孵化数は 51 尾であった。暴露 3 日目までに 51 尾が孵化し, 孵化後すぐに死亡したと考えられる個体が 30 尾, 形態異常（脊椎湾曲）が 14 尾観察された。その後, 暴露 4 日目にすべての死亡が確認された。

3.5 最小影響濃度 (LOEC) および最大無影響濃度 (NOEC)

最小影響濃度 (LOEC) および最大無影響濃度 (NOEC) を Table 7 および以下に示す。統計結果の詳細を付属資料-6 に示す。

LOEC : 0.0129 mg/L

NOEC : 0.00469 mg/L

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	New Day 0	Old Day 2	New Day 2	Old Day 4	New Day 4	Old Day 6	New Day 6	Old Day 8
	----- Temperature (°C) -----							
Control	25.3	26.3	26.2	26.1	26.1	26.3	26.3	25.9
Conc.1	25.3	26.6	26.8	26.1	26.1	26.3	26.4	26.0
Conc.2	25.3	26.6	26.8	26.1	26.1	26.4	26.6	26.0
Conc.3	25.3	25.9	26.8	26.2	26.0	26.5	26.8	26.1
Conc.4	25.2	25.1	26.8	26.0	25.8	26.3	26.6	26.0
Conc.5	25.1	25.8	26.8	26.0	--	--	--	--

Minimum: 25.1

Maximum: 26.8

New: New test solution freshly prepared

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

--: Not measured because all organisms were dead.

Table 2 Dissolved Oxygen Concentrations in Test Solutions

Test Group	New Day 0	Old Day 2	New Day 2	Old Day 4	New Day 4	Old Day 6	New Day 6	Old Day 8
	----- Dissolved Oxygen (mg/L) -----							
Control	8.2	8.2	8.3	7.6	7.8	8.2	8.4	7.7
Conc.1	8.4	7.9	8.5	7.5	7.9	8.0	8.3	7.6
Conc.2	8.4	8.0	8.4	7.6	7.9	8.0	8.4	7.7
Conc.3	8.3	8.0	8.1	7.4	7.7	7.8	8.3	7.9
Conc.4	8.3	8.0	8.2	7.5	7.9	7.8	8.3	7.9
Conc.5	8.3	7.9	8.3	7.7	--	--	--	--

Minimum: 7.4

Maximum: 8.5

New: New test solution freshly prepared

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

--: Not measured because all organisms were dead.

Table 3 pH Values of Test Solutions

Test Group	New Day 0	Old Day 2	New Day 2	Old Day 4	New Day 4	Old Day 6	New Day 6	Old Day 8
			----- pH -----					
Control	7.3	7.6	7.7	7.5	7.4	7.5	7.8	7.3
Conc.1	7.4	7.6	7.8	7.5	7.5	7.6	7.7	7.5
Conc.2	7.5	7.6	7.8	7.5	7.5	7.8	7.9	7.6
Conc.3	7.5	7.6	7.8	7.5	7.6	7.8	7.9	7.7
Conc.4	7.6	7.7	7.8	7.6	7.6	7.8	7.9	7.3
Conc.5	7.8	7.6	7.9	7.8	--	--	--	--

Minimum: 7.3

Maximum: 7.9

New: New test solution freshly prepared

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

--: Not measured because all organisms were dead.

Table 4 Measured Concentrations of the Test Substance in Test Solutions

Test group	Nominal conc. (mg/L)	Measured concentration (mg/L)				
		0 day New	2 day Old	6 day New	8 day Old	Mean
Control		-	-	-	-	
Conc.1	0.050	0.000647 → 0.000464	0.000523 → 0.000155	0.000488		
Conc.2	0.16	0.00209 → 0.00133	0.00162 → 0.000730	0.00154		
Conc.3	0.50	0.00582 → 0.00459	0.00446 → 0.00224	0.00469		
Conc.4	1.6	0.0150 → 0.0104	0.0141 → 0.0139	0.0129		
Conc.5	5.0	0.0561 → 0.0388	--	--	0.0469	

Lower limit of quantification: 0.00004 mg/L

New: New test solution freshly prepared

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

Mean: Time-weighted mean

--: Not measured because all organisms were dead.

The test solutions for analysis were sampled at two renewal sets of four during 8-day exposure.

Fish, Short-term Toxicity Test on Embryo and Sac-fry Stages

Table 5 **Observation of Fish**

Test Group	Vessel No.	Day 0				Day 1				Day 2				Day 3				Day 4			
		Death		Survival		Death		Survival		Death		Survival		Death		Survival		Death		Survival	
		E	F	E	F	E	F	E	F	E	F	E	F	E	F	E	F	E	F	E	F
Control	1	0	0	15	0	0	0	15	0	0	0	15	0	0	0	15	0	0	0	15	
				[0]				[0]				[0]				[0]				[0]	
	2	0	0	15	0	0	0	15	0	0	0	15	0	0	0	2	13	0	0	0	15
				[0]				[0]				[0]				[0]	[0]				[0]
	3	0	0	15	0	0	0	15	0	0	0	15	0	0	0	0	15	0	0	0	15
				[0]				[0]				[0]				[0]					[0]
	4	0	0	15	0	0	0	15	0	0	0	15	0	0	0	4	11	0	0	0	15
				[0]				[0]				[0]				[0]	[0]				[0]
Conc.1	1	0	0	15	0	0	0	15	0	0	0	15	0	0	0	0	15	0	0	0	15
				[0]				[0]				[0]					[0]				[0]
	2	0	0	15	0	0	0	15	0	0	0	15	0	0	0	0	15	0	0	0	15
				[0]				[0]				[0]					[0]				[0]
	3	0	0	15	0	0	0	15	0	0	0	15	0	0	0	5	10	0	0	0	15
				[0]				[0]				[0]				[0]	1[Cs-1]				[0]
	4	0	0	15	0	0	0	15	0	0	0	15	0	0	0	1	14	0	0	0	15
				[0]				[0]				[0]				[0]	[0]				[0]
Conc.2	1	0	0	15	0	0	0	15	0	0	0	13	2	0	0	0	15	0	0	0	15
				[0]				[0]				[0]	[0]				[0]				[0]
	2	0	0	15	0	0	0	15	0	0	0	15	0	0	0	1	14	0	0	0	15
				[0]				[0]				[0]				[0]	[0]				[0]
	3	0	0	15	0	0	0	15	0	0	0	15	0	0	0	1	14	0	0	0	15
				[0]				[0]				[0]				[0]	[0]				[0]
	4	0	0	15	0	0	0	15	0	0	0	15	0	1	0	1	13	1	0	0	14
				[0]				[0]				[0]				[0]	[0]				[0]
Conc.3	1	0	0	15	0	0	0	15	0	0	0	12	3	0	0	0	15	0	0	0	15
				[0]				[0]				[0]	[0]				[0]				[0]
	2	0	0	15	0	0	0	15	0	0	0	13	2	0	0	0	15	0	0	0	15
				[0]				[0]				[0]	[0]				[0]				[0]
	3	0	0	15	0	0	0	15	0	0	0	15	0	0	0	0	15	0	0	0	15
				[0]				[0]				[0]					[0]				[0]
	4	0	0	15	0	0	0	15	0	0	0	13	2	0	0	0	15	0	0	0	15
				[0]				[0]				[0]	[0]				[0]				[0]
Conc.4	1	0	0	15	0	0	0	15	0	0	0	14	1	0	0	0	15	0	0	0	15
				[0]				[0]				[0]	[0]				[0]				[0]
	2	0	0	15	0	0	0	15	0	0	0	10	5	0	0	0	15	0	0	0	15
				[0]				[0]				[0]	[0]				[0]				[0]
	3	0	0	15	0	0	0	15	0	0	0	12	3	0	0	0	15	0	0	0	15
				[0]				[0]				[0]	[0]				[0]				[0]
	4	0	0	15	0	0	0	15	0	0	0	12	3	0	0	0	15	0	0	0	15
				[0]				[0]				[0]	[0]				[0]				[0]
Conc.5	1	0	0	15	0	1	0	14	0	1	0	14	0	1	6	0	8	1	14	0	0
				[0]				[0]				[0]				4[Cs-4]					
	2	0	0	15	0	0	0	15	0	0	0	15	0	1	8	2	4	3	12	0	0
				[0]				[0]				[0]				[0]	4[Cs-4]				
	3	0	0	15	0	0	0	15	0	0	0	15	0	3	8	1	3	4	11	0	0
				[0]				[0]				[0]				[0]	3[Cs-3]				
	4	0	0	15	0	0	0	15	0	0	0	15	0	0	8	1	6	1	14	0	0
				[0]				[0]				[0]				[0]	3[Cs-3]				

Death : Cumulative number of death of embryo or fish

E : Embryo

Cs : Curved spine

Survival : Number of survival embryo or fish

F : Fish

[] : Number of abnormal embryo or fish

Fish, Short-term Toxicity Test on Embryo and Sac-fry Stages

Table 5 Observation of Fish (Continued)

Test Group	No.	Day 5				Day 6				Day 7				Day 8			
		Death		Survival		Death		Survival		Death		Survival		Death		Survival	
		E	F	E	F	E	F	E	F	E	F	E	F	E	F	E	F
Control	1	0	0	0	15	0	0	0	15	0	0	0	15	0	0	0	15
					[0]				[0]				[0]				[0]
	2	0	0	0	15	0	0	0	15	0	0	0	15	0	0	0	15
					[0]				[0]				[0]				[0]
	3	0	0	0	15	0	0	0	15	0	0	0	15	0	0	0	15
					[0]				[0]				[0]				[0]
	4	0	0	0	15	0	0	0	15	0	0	0	15	0	0	0	15
					[0]				[0]				[0]				[0]
Conc.1	1	0	2	0	13	0	2	0	13	0	2	0	13	0	2	0	13
					[0]				[0]				1[As-1]				1[As-1]
	2	0	0	0	15	0	0	0	15	0	0	0	15	0	0	0	15
					[0]				[0]				1[As-1]				1[As-1]
	3	0	0	0	15	0	0	0	15	0	0	0	15	0	0	0	15
					[0]				[0]				[0]				[0]
	4	0	0	0	15	0	0	0	15	0	0	0	15	0	0	0	15
					[0]				[0]				[0]				[0]
Conc.2	1	0	0	0	15	0	0	0	15	0	0	0	15	0	0	0	15
					[0]				[0]				[0]				[0]
	2	0	0	0	15	0	0	0	15	0	0	0	15	0	0	0	15
					[0]				[0]				[0]				[0]
	3	0	0	0	15	0	0	0	15	0	0	0	15	0	0	0	15
					[0]				[0]				[0]				[0]
	4	1	0	0	14	1	0	0	14	1	0	0	14	1	0	0	14
					[0]				[0]				[0]				[0]
Conc.3	1	0	0	0	15	0	0	0	15	0	0	0	15	0	0	0	15
					[0]				[0]				[0]				1[As-1]
	2	0	0	0	15	0	0	0	15	0	0	0	15	0	0	0	15
					[0]				[0]				1[As-1]				1[As-1]
	3	0	0	0	15	0	0	0	15	0	0	0	15	0	0	0	15
					[0]				[0]				1[As-1]				2[As-2]
	4	0	0	0	15	0	0	0	15	0	0	0	15	0	1	0	14
					1[Cs-1]				1[Cs-1]				1[Cs-1]				1[As-1]
Conc.4	1	0	0	0	15	0	15	0	0	0	15	0	0	0	15	0	0
					12[As-12]												
	2	0	0	0	15	0	15	0	0	0	15	0	0	0	15	0	0
					14[As-14]												
	3	0	0	0	15	0	15	0	0	0	15	0	0	0	15	0	0
					13[As-13]												
	4	0	0	0	15	0	14	0	1	0	15	0	0	0	15	0	0
					9[As-9]				1[As-1]								
Conc.5	1	1	14	0	0	1	14	0	0	1	14	0	0	1	14	0	0
	2	3	12	0	0	3	12	0	0	3	12	0	0	3	12	0	0
	3	4	11	0	0	4	11	0	0	4	11	0	0	4	11	0	0
	4	1	14	0	0	1	14	0	0	1	14	0	0	1	14	0	0

Death : Cumulative number of death of embryo or fish

Survival : Number of survival embryo or fish

[] : Number of abnormal embryo or fish

E : Embryo

F : Fish

Cs : Curved spine

As : Abnormal swimming

Table 6 Survival Rate, Hatching Rate, and Survival Rate After Hatching

Test Group	Nominal Concentration [Mean ^a measured Concentration] mg/L	No.	Survival rate %	Hatching rate %	Survival rate after hatching %
Control	-- [--]	1	100	100	100
		2	100	100	100
		3	100	100	100
		4	100	100	100
		Average	100	100	100
		SD	0	0	0
Conc. 1	0.050 [0.000488]	1	87	100	87
		2	100	100	100
		3	100	100	100
		4	100	100	100
		Average	97	100	97
		SD	7	0	7
Conc. 2	0.16 [0.00154]	1	100	100	100
		2	100	100	100
		3	100	100	100
		4	93	93	100
		Average	98	98	100
		SD	4	4	0
Conc. 3	0.50 [0.00469]	1	100	100	100
		2	100	100	100
		3	100	100	100
		4	93	100	93
		Average	98	100	98
		SD	4	0	4
Conc. 4	1.6 [0.0129]	1	0	100	0
		2	0	100	0
		3	0	100	0
		4	0	100	0
		Average	0	100	0
		SD	0	0	0
Conc. 5	5.0 [0.0469]	1	0	93	0
		2	0	80	0
		3	0	73	0
		4	0	93	0
		Average	0	85	0
		SD	0	10	0

a: Time-weighted mean

Survival rate: Survival embryo or fish at the end of exposure

/Total embryo at the start of exposure $\times 100$

Hatching rate: Total number of hatching at 5 day after exposure

/Total embryo at the start of exposure $\times 100$

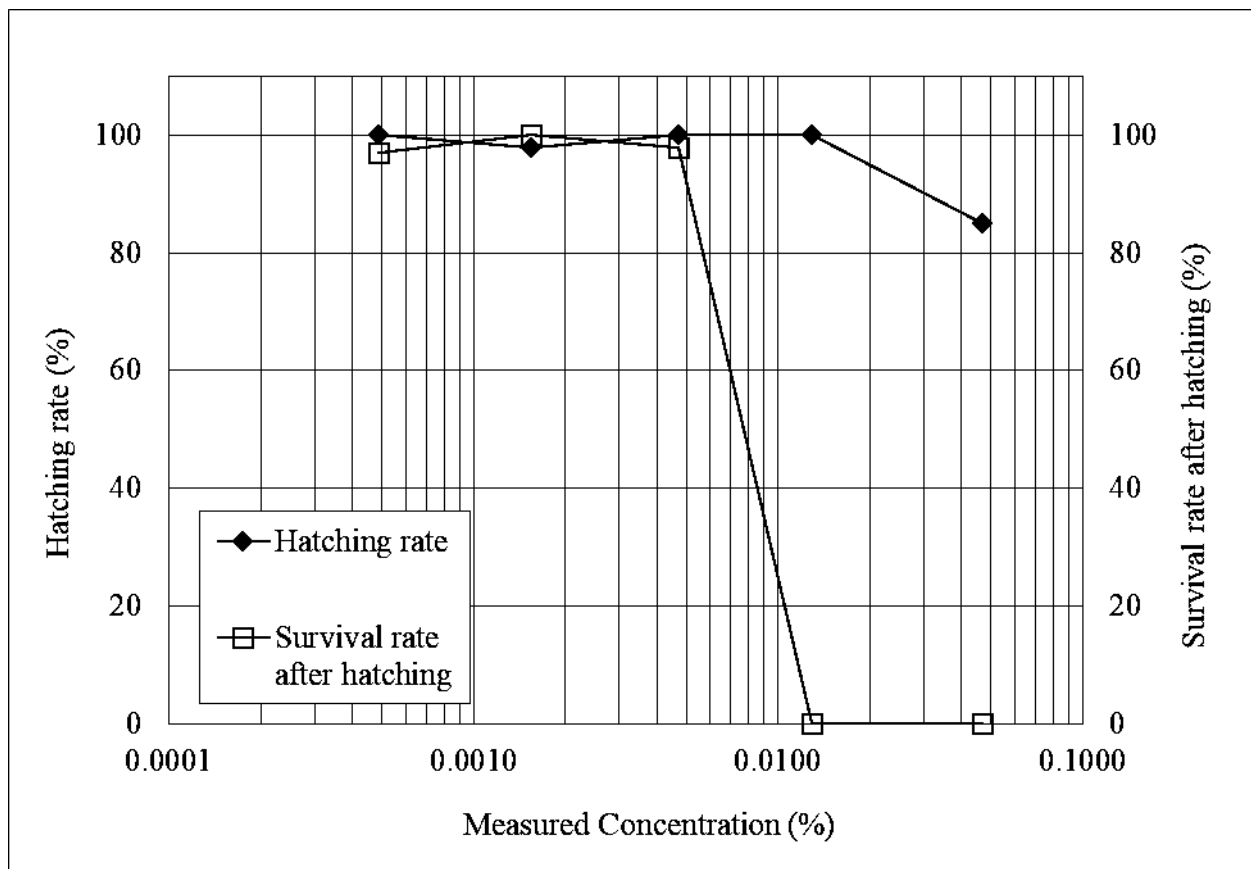
Survival rate after hatching: Survival fish at the end of exposure

/Total number of hatching during exposure period $\times 100$

Table 7 LOEC and NOEC

Exposure period (day)	LOEC (mg/L)	NOEC (mg/L)
8	0.0129	0.00469

Figure 1 Concentration-Hatching Rate and Concentration-Survival Rate After Hatching



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

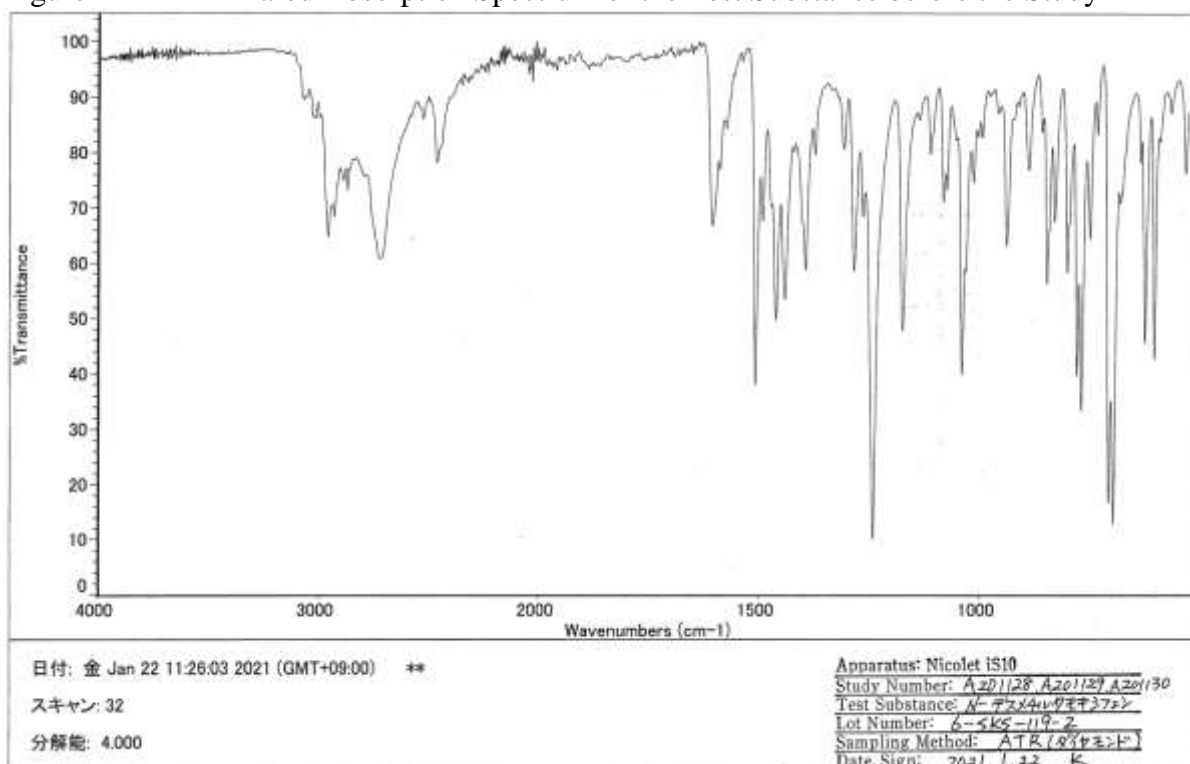
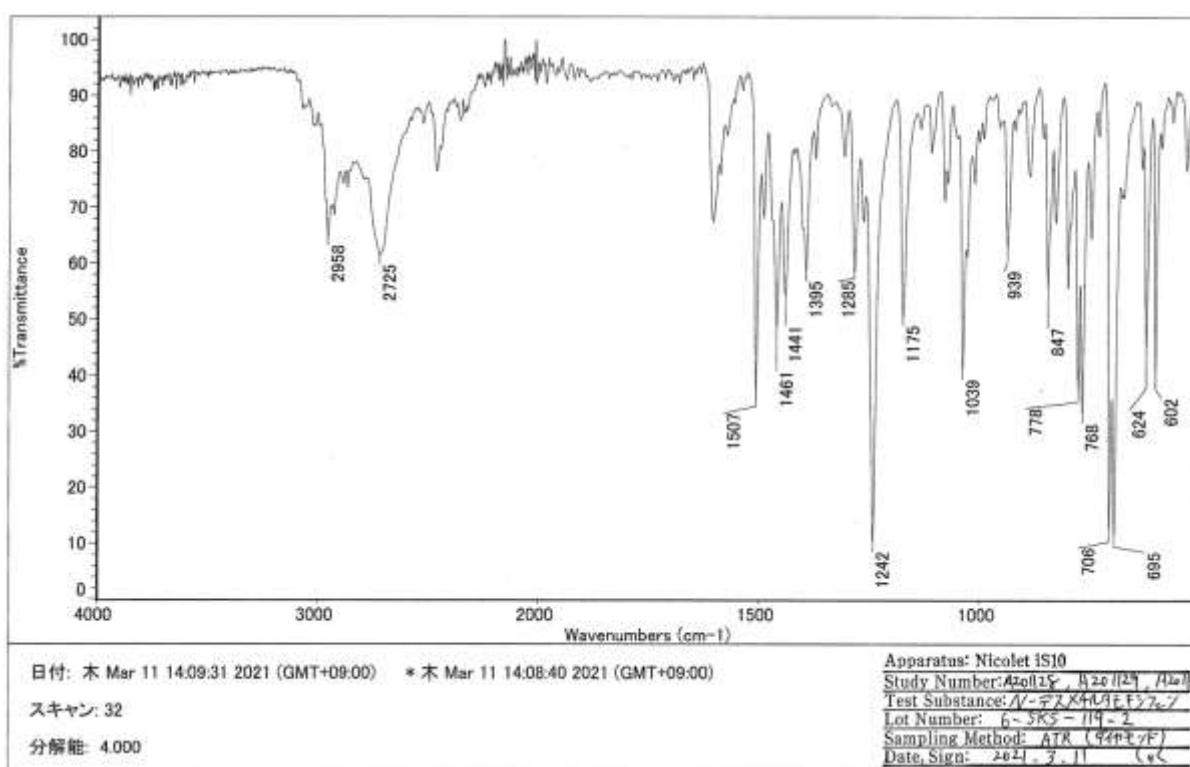


Figure A-1-2 Infrared Absorption Spectrum of the Test Substance after the End of Exposure



付属資料－2

試験用水の水質

Fish, Short-term Toxicity Test on Embryo and Sac-fry Stages

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
 1-25-14, Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305-0856, Japan
 Date for sample collection: February 2, 2021

These data were obtained from report 20H-009284-0001.

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]	54
Biochemical Oxygen Demand (BOD)	[mg/L]	1.0	Conductivity	[mS/m]	13
Chemical Oxygen Demand (COD)	[mg/L]	1.0	Hardness	[mg CaCO ₃ /L]	49
Total Phosphorus	[mg/L]	N.D. (<0.02)	Alkalinity (pH4.8)	[mg CaCO ₃ /L]	39
pH	[-/(°C)]	7.8 (24)	Sodium	[mg/L]	6.2
Coliform Group	[MPN/100mL]	N.D. (<2)	Potassium	[mg/L]	0.8
Total Mercury	[mg/L]	N.D. (<0.00005)	Calcium	[mg/L]	14
Copper	[mg/L]	N.D. (<0.005)	Magnesium	[mg/L]	3.7
Cadmium	[mg/L]	N.D. (<0.0003)	Oil (<i>n</i> -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]	0.02	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)	Dichlorvos (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

Fish, Short-term Toxicity Test on Embryo and Sac-fry Stages

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

- 1) 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）
- 2) OECD 培地は 22℃，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℃ で 48 時間スターラーにより攪拌した。
- 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	3.8	5.51	3.2	1.66	3.2
2	3.21		1.50		1.74	
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 3.8 mg/L（22℃），硬度 約 60 CaCO₃ mg/L のミネラルウォーター3.2 mg/L（25℃），脱塩素水道水 3.2 mg/L（25℃）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

試験用水：脱塩素水道水

1. 被験物質の負荷

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。
 対照区原液は試験用水のみとする。

被験物質	: 11.0	mg
容器	: 1Lまたは2Lメジューム瓶	
調製頻度	: 暴露開始48時間前および換水48時間前に調製	

試験区	負荷率 (mg/L)	被験物質採取量 (mg)	最終容量 (L)
対照区原液	-	-	2
濃度区原液	10 ^{*1}	11.0	1

*1: 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. 攪拌

スターラーで48時間攪拌する（室温約24℃）。

3. WSFの採取

フィルター^{*2}でろ過^{*3}する。

*2: メンブレンフィルター HA 0.45 µm, メルクミリポア製

*3: アスピレーター WP-15型, ヤマト科学製

↓

ろ液はエアレーション後、試験液とする。

4. 試験液の調製

濃度区原液を下記の表の通り採取し、対照区原液を最終容量まで加える。

容 器	---->	三角フラスコ
混合方式	---->	転倒攪拌
濃度公比	---->	3.16

試験区	設定濃度 (mg/L)	濃度区原液 採取量 (mL)	最終容量 (mL)
対照区	—	----> 対照区原液をそのまま使用	
濃度区1	0.050	----> 1.25	250
濃度区2	0.16	----> 4	250
濃度区3	0.50	----> 12.5	250
濃度区4	1.6	----> 40	250
濃度区5	5.0	----> 250	500

分 注	---->	100 mL容ビーカーに50 mLずつ分注
-----	-------	-----------------------

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)

オートサンブラ : 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.×50 mm

カラムオーブン : 40°C

溶離液 : A2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

A1 液 30%, B1 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-デスメ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 r 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。

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るものについて希釈

*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. 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

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

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

$$a = 1.634E+03$$

$$b = 1.266E+07$$

$$r = 0.998$$

$$-5.584E+03 < a < 8.852E+03$$

(95-Percent Confidence Limits)

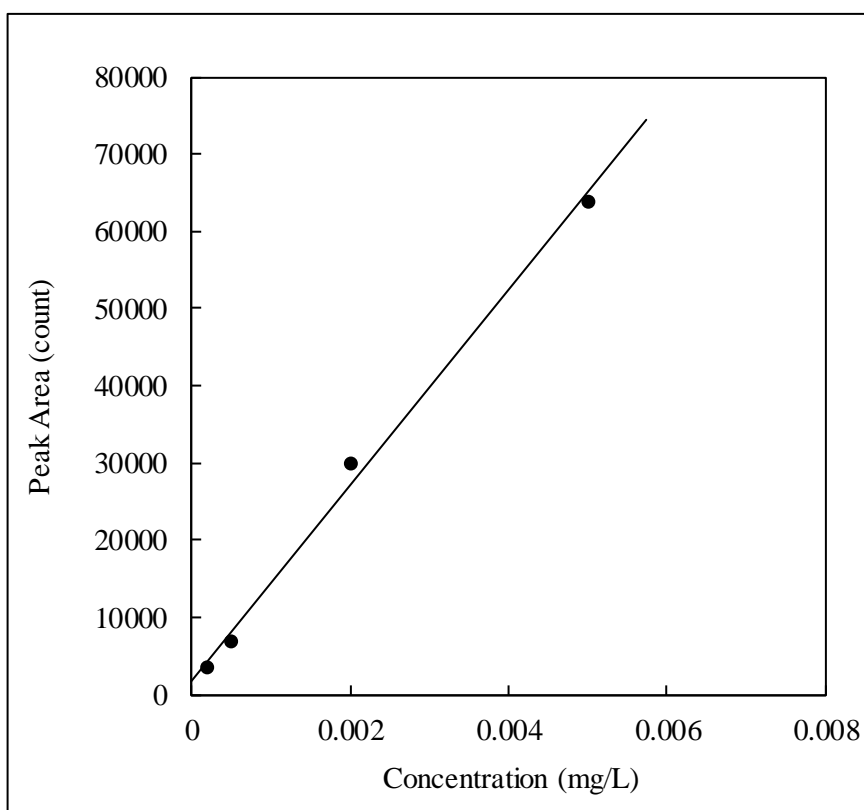
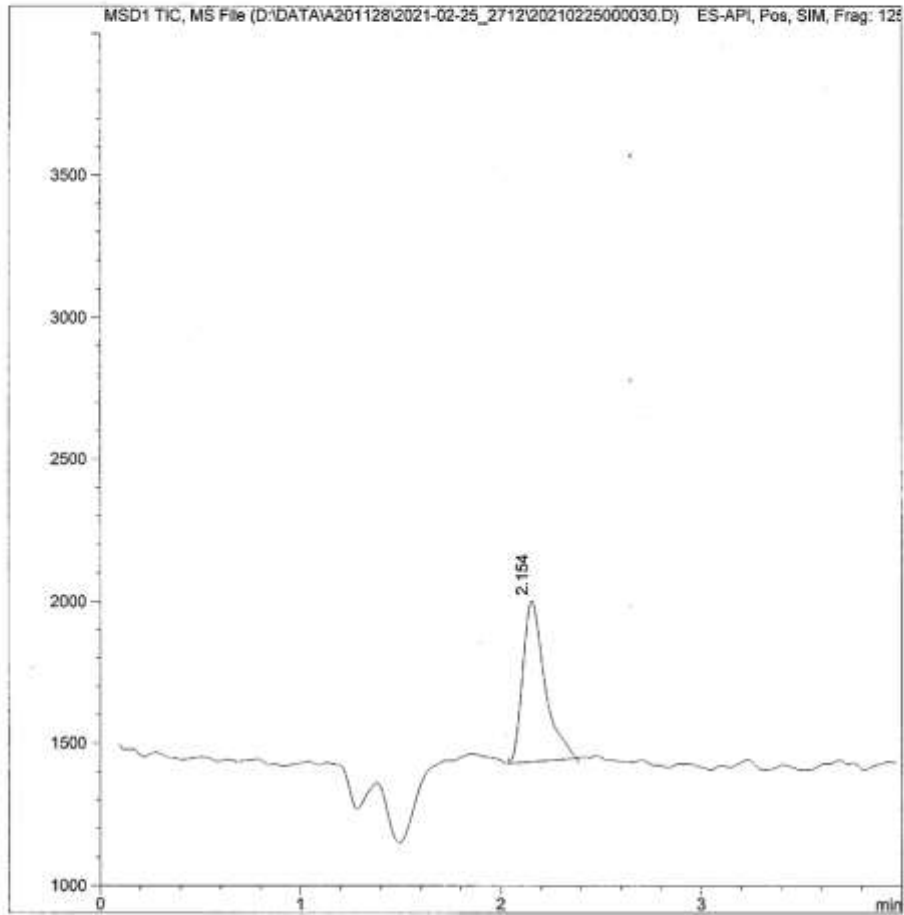


Figure A-5-2 Representative Measurement Results

Standard 0.000200 mg/L, 0 day

Data File: D:\DATA\A201128\2021-02-25_2712\20210225000030.D
=====

Injection Date	: 02/25/2021	Seq. Line	: 14
Study No.	: () A201128 () A201129 (V) A201130	Location	: Vial 2
	N-Desmethyldamoxifen	Inj. No	: 1
Acq. Method	: D:\DATA\A201128\2021-02-25_2712\A201128A.M		
Sample Name	: STD 0.0002mg/L	Inj. Vol.	: 3µl
Acq. Operator	: K		



Area Percent Report						
#	Meas. Ret.	Peak T	Width	Area	Height	Area %
1	2.154	MM	0.127	4365	571	100.0
Total:				4365	571	

*** End of Report ***

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

Standard 0 mg/L, 0 day

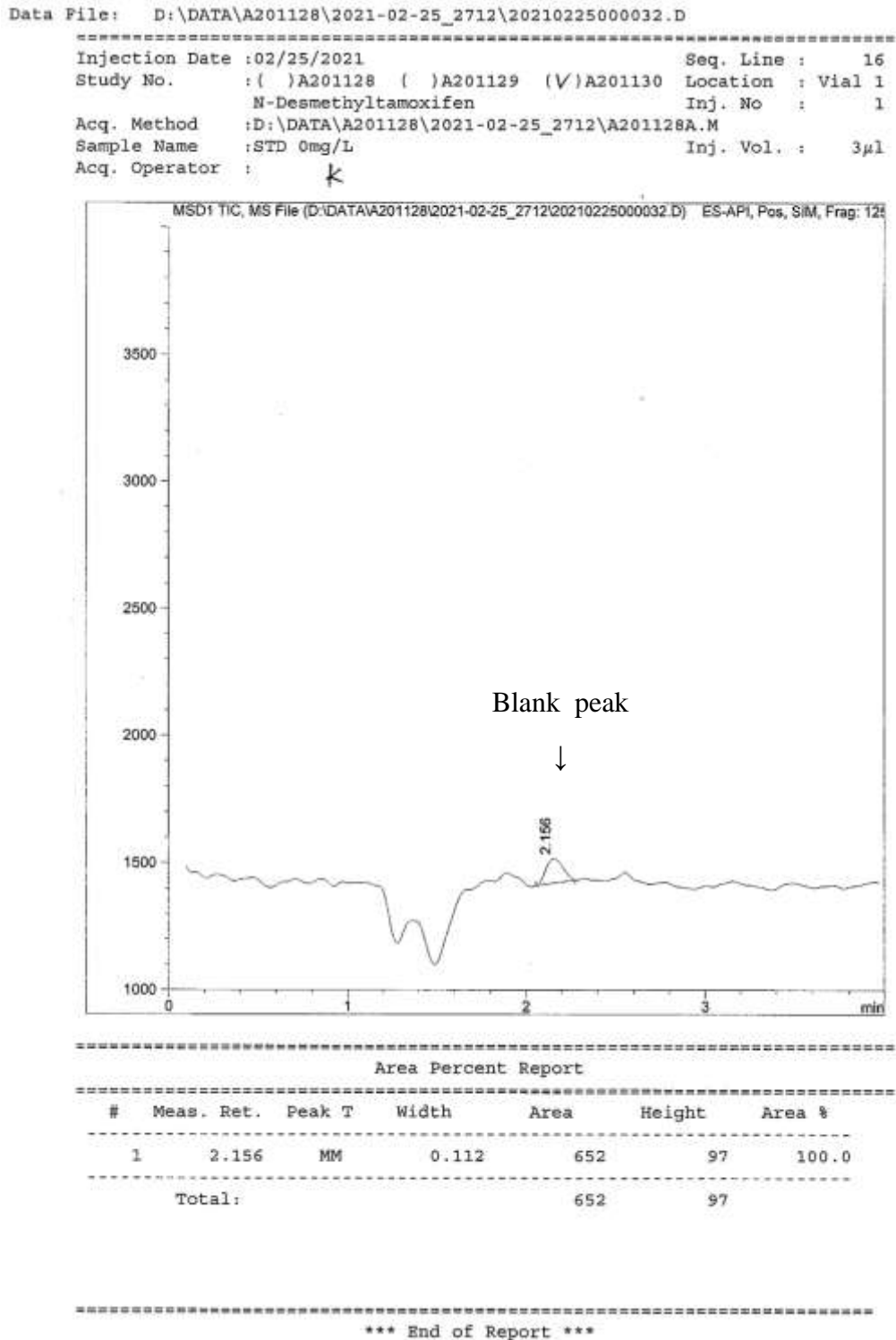
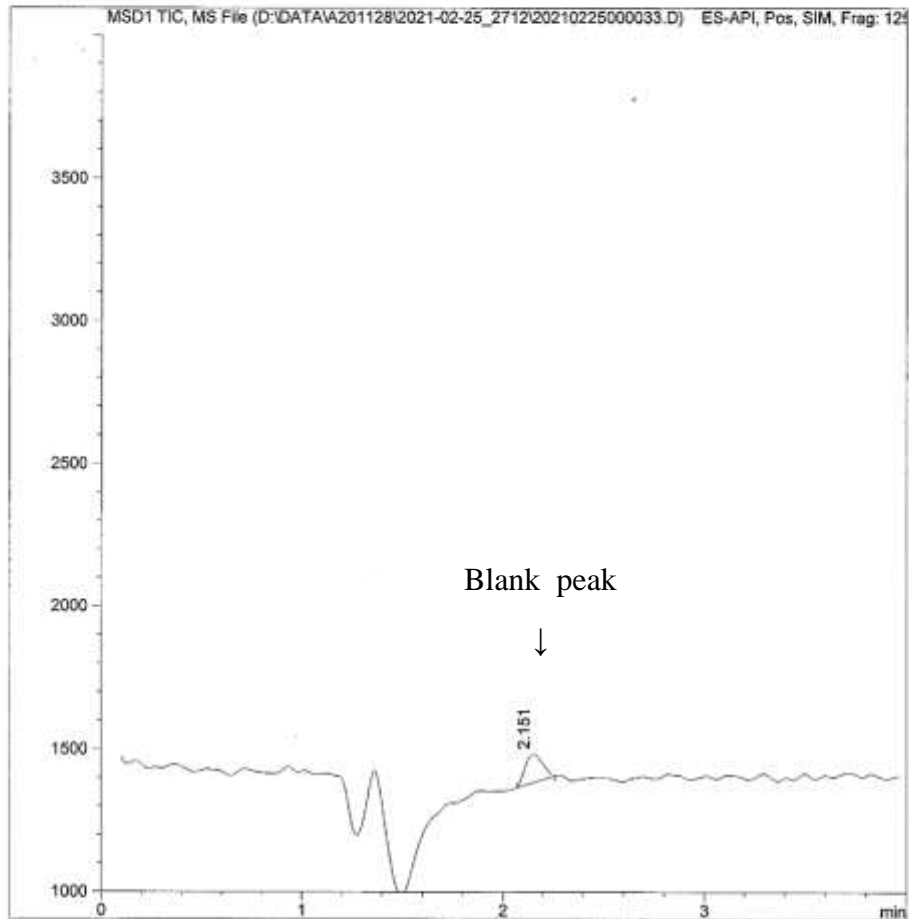


Figure A-5-2 Representative Measurement Results (Continued)

Control, 0 day (new)

Data File: D:\DATA\A201128\2021-02-25_2712\20210225000033.D

```
=====
Injection Date :02/25/2021                      Seq. Line :    17
Study No.      : ( ) A201128 ( ) A201129 (✓) A201130 Location  :Vial 21
               : N-Desmethyldamoxifen          Inj. No   :     1
Acq. Method    :D:\DATA\A201128\2021-02-25_2712\A201128A.M
Sample Name    :F0h Cn                          Inj. Vol.  :    3µl
Acq. Operator  :                               K
=====
```



Area Percent Report

#	Meas. Ret.	Peak T	Width	Area	Height	Area %
1	2.151	MM	0.101	609	100	100.0
Total:				609	100	

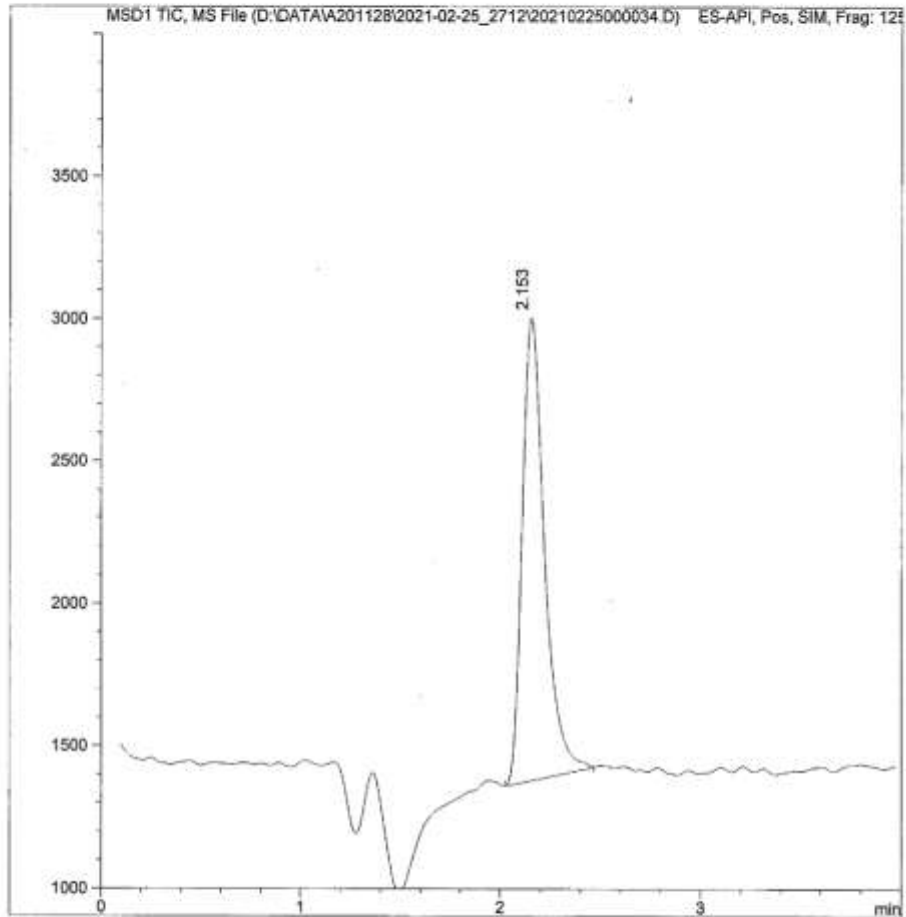
*** End of Report ***

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

Conc.1, 0 day (new)

Data File: D:\DATA\A201128\2021-02-25_2712\20210225000034.D
=====

Injection Date : 02/25/2021	Seq. Line : 18
Study No. : () A201128 () A201129 (✓) A201130	Location : Vial 22
N-Desmethyldamoxifen	Inj. No : 1
Acq. Method : D:\DATA\A201128\2021-02-25_2712\A201128A.M	
Sample Name : F0h C1n	Inj. Vol. : 3µl
Acq. Operator : K	



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

#	Meas. Ret.	Peak T	Width	Area	Height	Area %
1	2.153	MM	0.128	12615	1639	100.0
Total:				12615	1639	

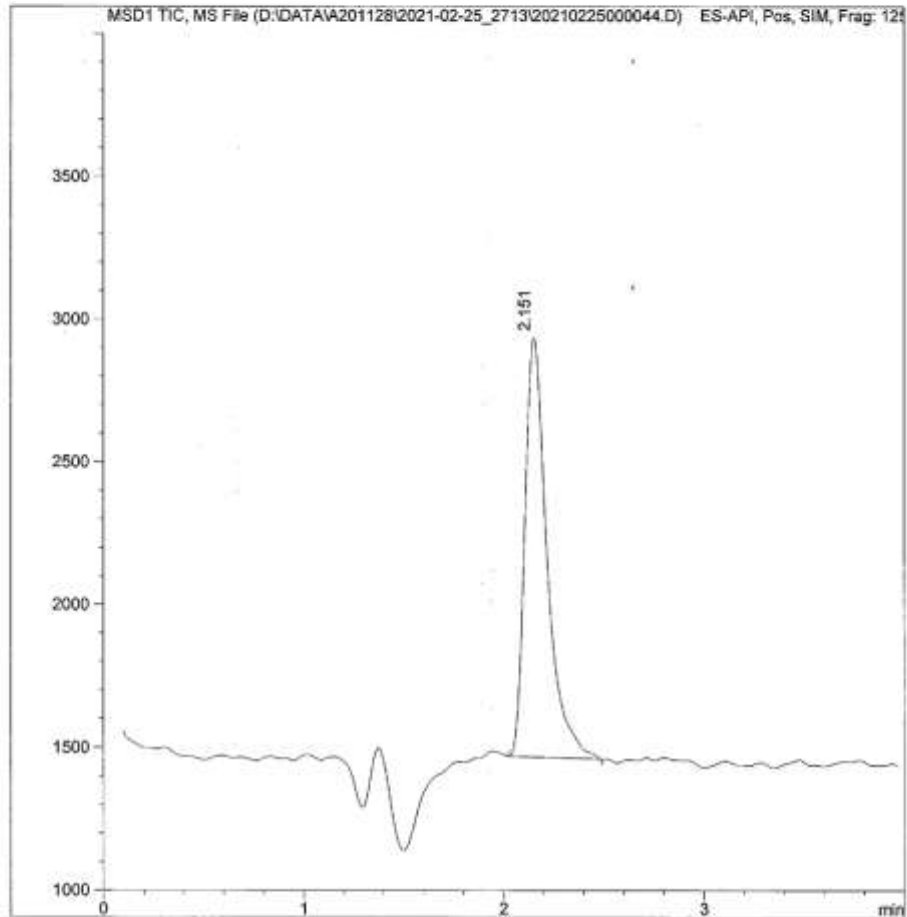
=====
*** End of Report ***

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

Conc.3, 0 day (new)

Data File: D:\DATA\A201128\2021-02-25_2713\20210225000044.D

```
=====
Injection Date : 02/25/2021                      Seq. Line :    3
Study No.      : ( ) A201128 ( ) A201129 (V) A201130 Location : Vial 51
               : N-Desmethyldamoxifen              Inj. No  :    1
Acq. Method    : D:\DATA\A201128\2021-02-25_2713\A201128A.M
Sample Name    : F0h C3n *10                      Inj. Vol. :   3µl
Acq. Operator  : K
=====
```



Area Percent Report

#	Meas. Ret.	Peak T	Width	Area	Height	Area %
1	2.151	MM	0.129	11419	1477	100.0
Total:				11419	1477	

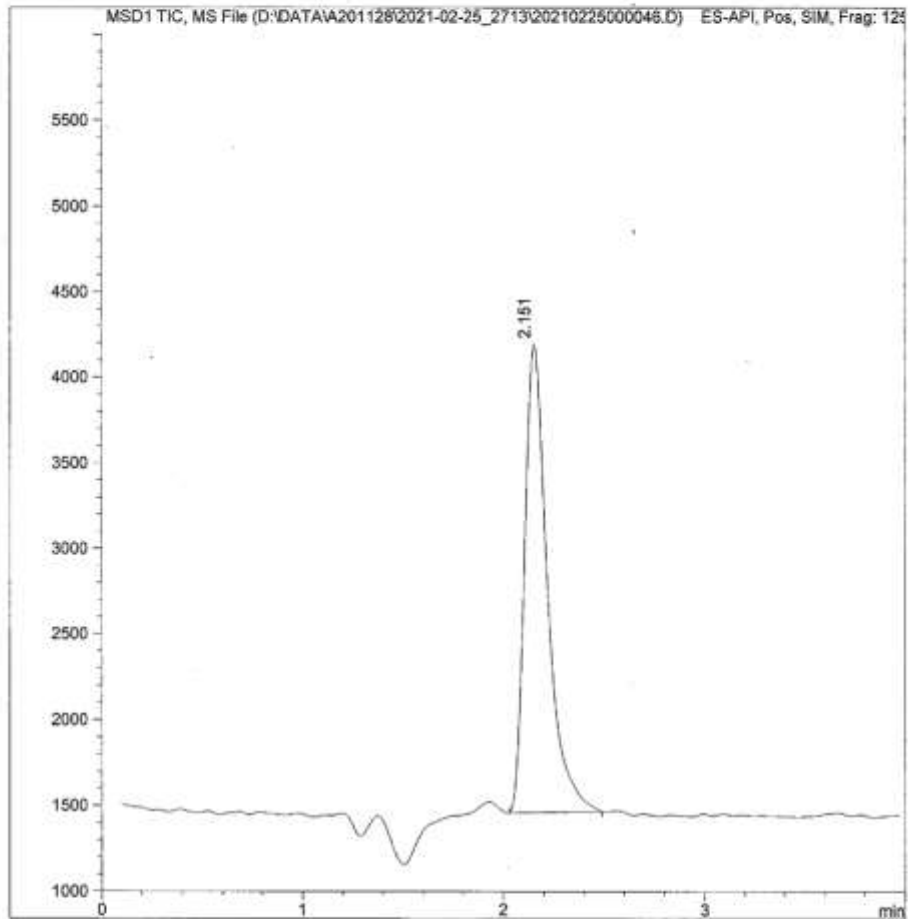
*** End of Report ***

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

Conc.5, 0 day (new)

Data File: D:\DATA\A201128\2021-02-25_2713\20210225000046.D

```
=====
Injection Date :02/25/2021                      Seq. Line :    5
Study No.      : ( ) A201128 ( ) A201129 ( ✓ ) A201130 Location :Vial 53
               : N-Desmethyldamoxifen                      Inj. No  :    1
Acq. Method    :D:\DATA\A201128\2021-02-25_2713\A201128A.M
Sample Name    :F0h C5n *50                          Inj. Vol. :   3µl
Acq. Operator  :                                     K
=====
```



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

#	Meas. Ret.	Peak T	Width	Area	Height	Area %
1	2.151	MM	0.130	21442	2742	100.0
Total:				21442	2742	

```
=====
```

*** End of Report ***

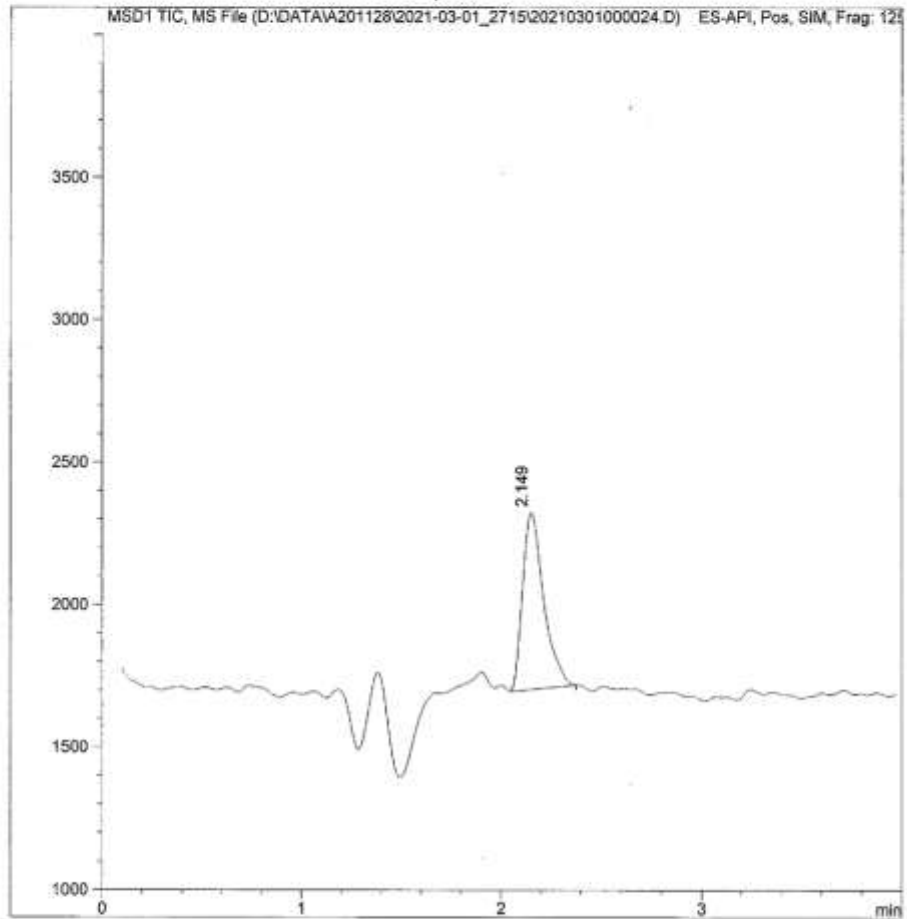
Figure A-5-2 Representative Measurement Results (Continued)

Standard 0.000200 mg/L, 2 day

Data File: D:\DATA\A201128\2021-03-01_2715\20210301000024.D

```

=====
Injection Date : 03/01/2021                      Seq. Line :    24
Study No.      : ( ) A201128 ( ) A201129 (✓) A201130  Location  : Vial 12
                  N-Desmethyldamoxifen              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   :
  
```



Area Percent Report						
#	Meas. Ret.	Peak T	Width	Area	Height	Area %
1	2.149	MM	0.123	4608	626	100.0
Total:				4608	626	

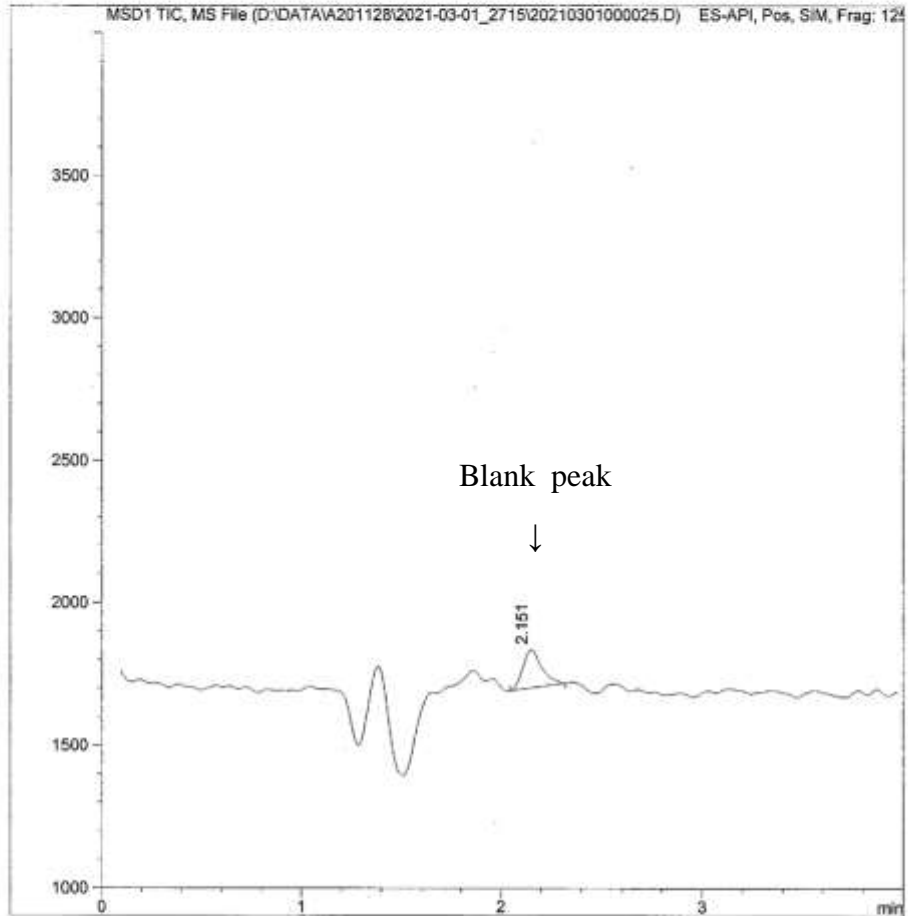
*** End of Report ***

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

Standard 0 mg/L, 2 day

Data File: D:\DATA\A201128\2021-03-01_2715\20210301000025.D

```
=====
Injection Date : 03/01/2021                      Seq. Line :    25
Study No.      : ( ) A201128 ( ) A201129 (✓) A201130 Location : Vial 11
                N-Desmethyldamoxifen              Inj. No  :    1
Acq. Method    : D:\DATA\A201128\2021-03-01_2715\A201128A.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	2.151	MM	0.109	880	135	100.0
Total:				880	135	

*** End of Report ***

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

Control, 2 day (old)

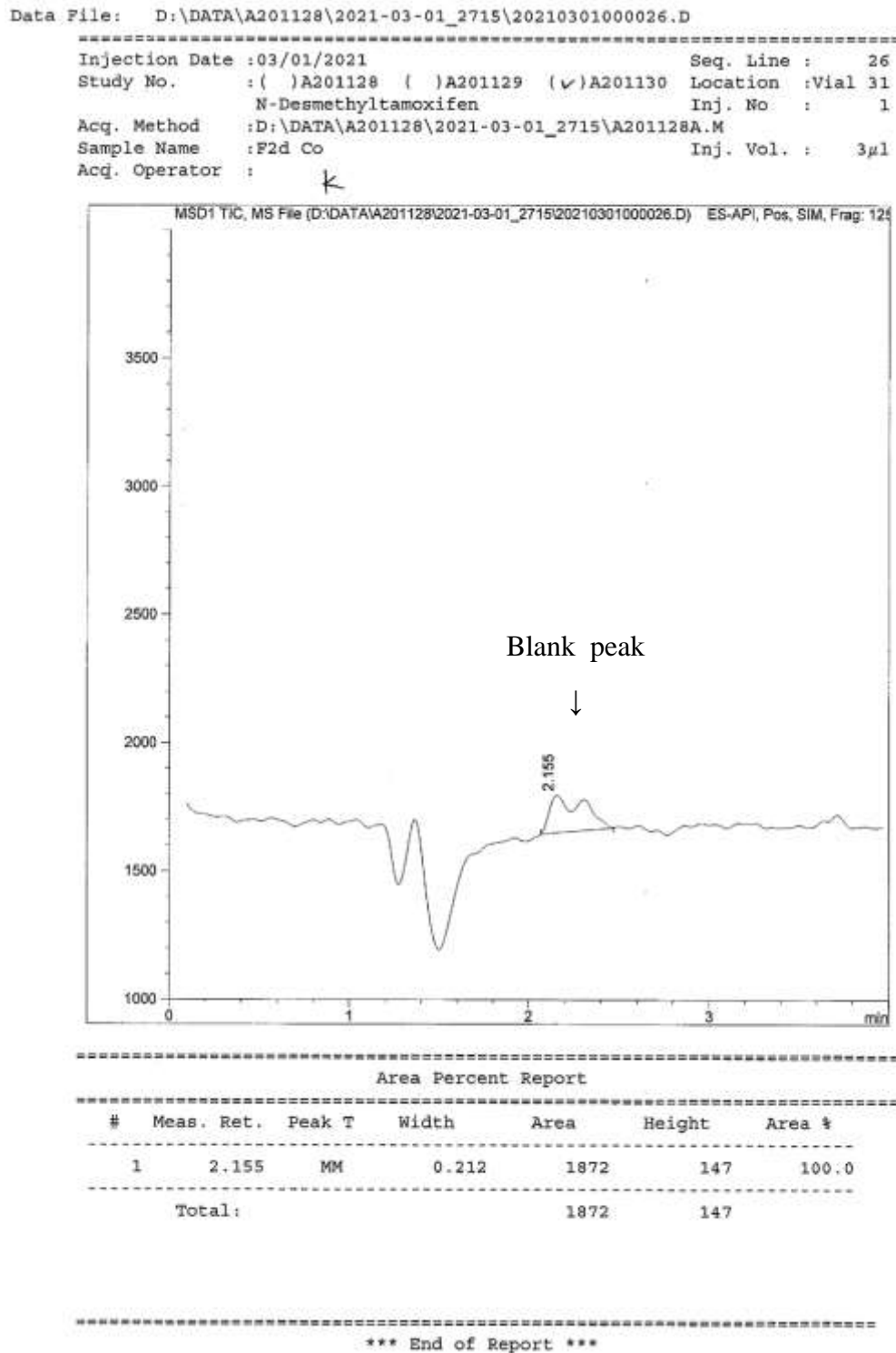
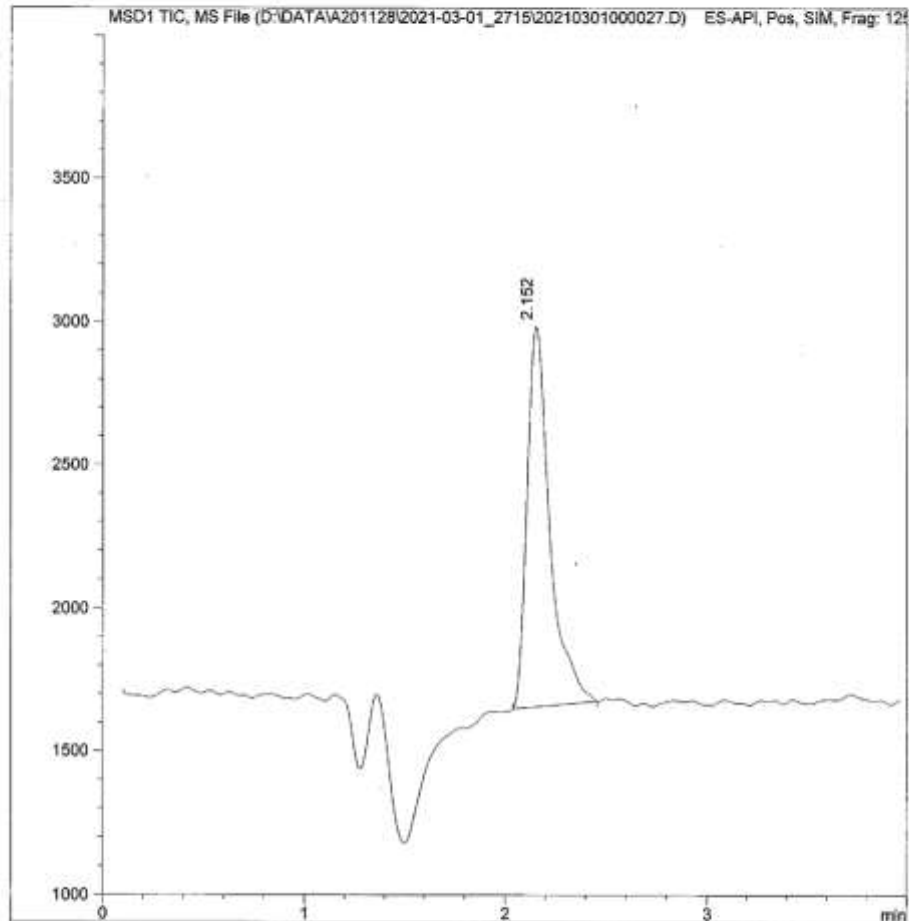


Figure A-5-2 Representative Measurement Results (Continued)

Conc.1, 2 day (old)

Data File: D:\DATA\A201128\2021-03-01_2715\20210301000027.D

```
=====
Injection Date :03/01/2021                      Seq. Line :   27
Study No.      : ( ) A201128 ( ) A201129 (✓) A201130 Location :Vial 32
               : N-Desmethyldamoxifen              Inj. No  :    1
Acq. Method    :D:\DATA\A201128\2021-03-01_2715\A201128A.M
Sample Name    :F2d C1o                          Inj. Vol. :   3µl
Acq. Operator  : K
=====
```



Area Percent Report

#	Meas. Ret.	Peak T	Width	Area	Height	Area %
1	2.152	MM	0.131	10530	1337	100.0
Total:				10530	1337	

*** End of Report ***

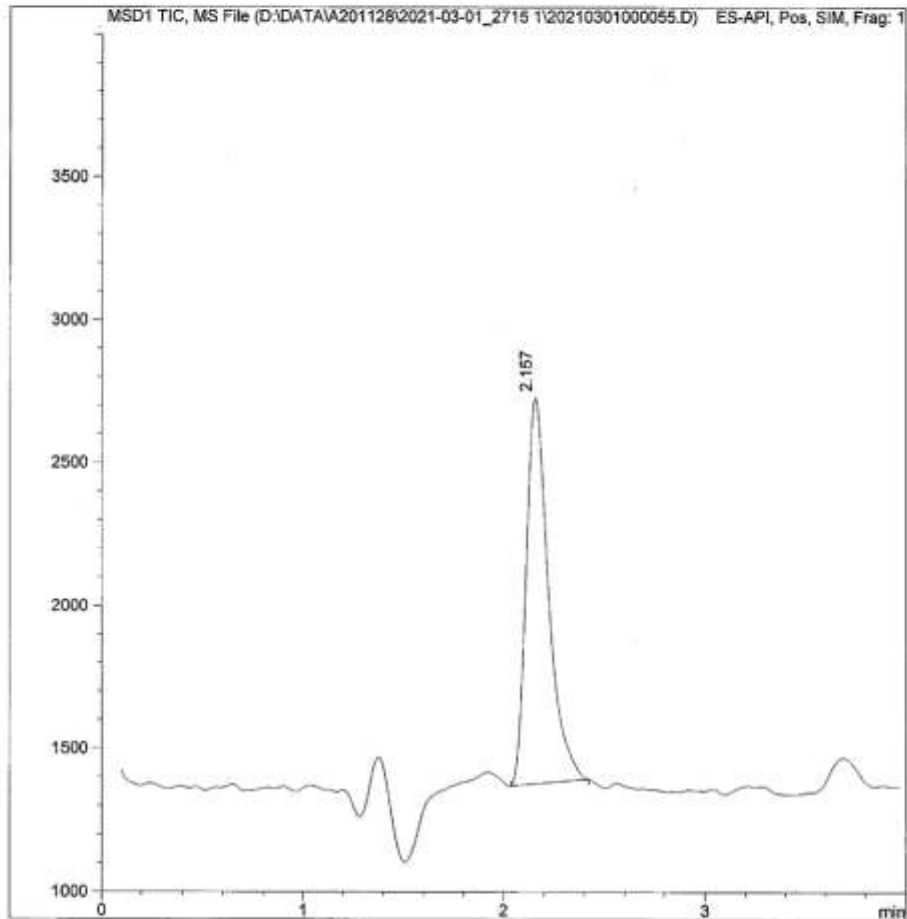
Figure A-5-2 Representative Measurement Results (Continued)

Conc.3, 2 day (old)

Data File: D:\DATA\A201128\2021-03-01_2715 1\20210301000055.D

```

=====
Injection Date : 03/01/2021                      Seq. Line :    19
Study No.      : ( ) A201128 ( ) A201129 (✓) A201130 Location : Vial 34
               : N-Desmethyldamoxifen              Inj. No  :     1
Acq. Method    : D:\DATA\A201128\2021-03-01_2715 1\A201128A.M
Sample Name    : F2d C3o                          Inj. Vol. :    3µl
Acq. Operator  :
    
```



Area Percent Report						
#	Meas. Ret.	Peak T	Width	Area	Height	Area %
1	2.157	MM	0.128	10419	1357	100.0
Total:				10419	1357	

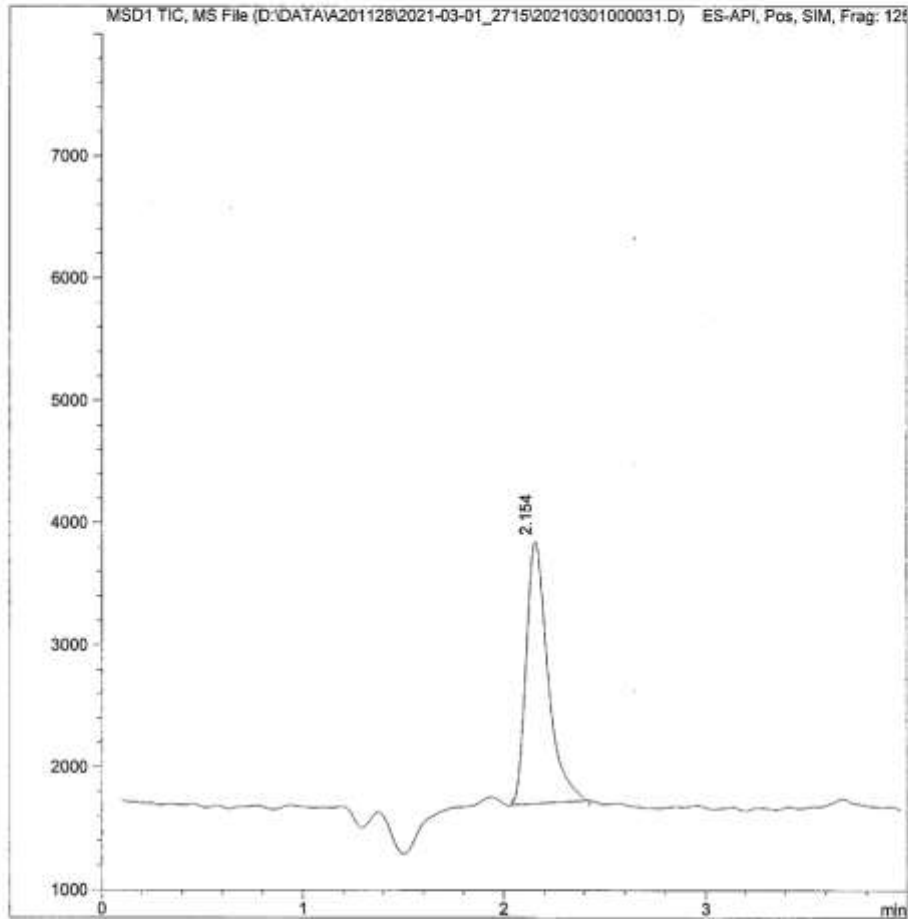
*** End of Report ***

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

Conc.5, 2 day (old)

Data File: D:\DATA\A201128\2021-03-01_2715\20210301000031.D

```
=====
Injection Date :03/01/2021                      Seq. Line :    31
Study No.      : ( )A201128 ( )A201129 ( ✓)A201130 Location :Vial 36
               :N-Desmethyldtamoxifen              Inj. No  :     1
Acq. Method    :D:\DATA\A201128\2021-03-01_2715\A201128A.M
Sample Name    :F2d C5o                          Inj. Vol. :    3µl
Acq. Operator  :
=====
```



Area Percent Report						
#	Meas. Ret.	Peak T	Width	Area	Height	Area %
1	2.154	MM	0.126	16319	2158	100.0
Total:				16319	2158	

*** End of Report ***

付属資料－6

結果の算出

Fish, Short-term Toxicity Test on Embryo and Sac-fry Stages

Results of Statistical Multicomparison Test

5-day hatching rate

Input Data Table

control	Conc.1	Conc.2	Conc.3	Conc.4	Conc.5
Group1	Group2	Group3	Group4	Group5	Group6
100	100	100	100	100	93
100	100	100	100	100	80
100	100	100	100	100	73
100	100	93	100	100	93

Group	Samples	Mean	S.E.	S.D.	Variance
1	4	100.0000	0.0000	0.0000	0.0000
2	4	100.0000	0.0000	0.0000	0.0000
3	4	98.2500	1.7500	3.5000	12.2500
4	4	100.0000	0.0000	0.0000	0.0000
5	4	100.0000	0.0000	0.0000	0.0000
6	4	84.7500	4.9728	9.9457	98.9167

Method	vs	Side	Stat.	0.0500	0.0100	0.001	Prob.
Steel	1 vs 2	2	0.0000	< 2.5093	3.0564	999.990	1.0000
Steel	1 vs 3	2	1.0000	< 2.5093	3.0564	999.990	0.7740
Steel	1 vs 4	2	0.0000	< 2.5093	3.0564	999.990	1.0000
Steel	1 vs 5	2	0.0000	< 2.5093	3.0564	999.990	1.0000
Steel	1 vs 6	2	2.4773	< 2.5093	3.0564	999.990	0.0547

Survival rate after hatching

Input Data Table

control	Conc.1	Conc.2	Conc.3	Conc.4	Conc.5
Group1	Group2	Group3	Group4	Group5	Group6
100	87	100	100	0	0
100	100	100	100	0	0
100	100	100	100	0	0
100	100	100	93	0	0

Group	Samples	Mean	S.E.	S.D.	Variance
1	4	100.0000	0.0000	0.0000	0.0000
2	4	96.7500	3.2500	6.5000	42.2500
3	4	100.0000	0.0000	0.0000	0.0000
4	4	98.2500	1.7500	3.5000	12.2500

Method	vs	Side	Stat.	0.0500	0.0100	0.0010	Prob.
Steel	1 vs 2	2	1.0000	< 2.3471	2.9115	999.990	0.6243
Steel	1 vs 3	2	0.0000	< 2.3471	2.9115	999.990	1.0000
Steel	1 vs 4	2	1.0000	< 2.3471	2.9115	999.990	0.6243