

受付番号	662-20-E-9485
試験番号	99485

試 験 報 告 書

クロトリマゾールのゼブラフィッシュを用いる胚-仔魚短期毒性試験

2021 年 3 月

一般財団法人化学物質評価研究機構
久留米事業所

目 次

総頁数 38

1. 表 題	4
2. 試験委託者	4
3. 試験施設	4
4. 試験目的	4
5. 試験法	4
6. 試験日程	4
7. 要 約	5
8. 試験材料	7
8.1 被験物質	7
9. 試験生物	7
10. 試験の実施	8
10.1 試験用水	8
10.2 試験器具及び装置	8
10.3 試験液の調製法	8
10.4 試験条件	9
10.5 受精卵の採取・選別	9
10.6 生物の暴露	9
10.7 試験液の換水	9
10.8 観察及び測定	10
10.9 結果の算出	10
10.10 LOEC 及び NOEC の算出	11
10.11 試験の有効性	11
10.12 数値の取扱い	11
11. 試験結果及び考察	11
11.1 生存率	11
11.2 ふ化率	11
11.3 ふ化後生存率	11
11.4 生存指標	12
11.5 一般状態等の観察結果	12
11.6 試験液の観察と測定結果	12
11.7 LOEC 及び NOEC	12
11.8 考 察	12
12. 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	13

Table 1	Survival rate	14
Table 2	Hatching number and rate	15
Table 3	Survival rate after hatching and survival index	16
Table 4	Observed abnormal response.....	17
Table 5	Dissolved oxygen concentration of test solution	18
Table 6	pH of test solution	18
Table 7	Temperature of test solution	19
Table 8	LOEC and NOEC	19
Table 9	Result of statistical analysis.....	19
Appendix 1	試験用水の水質	
Appendix 2	被験物質濃度の測定方法及び結果	
Appendix 3	検量線及びクロマトグラム	
Additional data	予備試験結果	

1. 表 題

クロトリマゾールのゼブラフィッシュを用いる胚-仔魚短期毒性試験

2. 試験委託者

名 称 環境省大臣官房環境保健部環境安全課

所在地 〒100-8975 東京都千代田区霞が関 1-2-2

3. 試験施設

名 称 一般財団法人化学物質評価研究機構 久留米事業所

所在地 〒839-0801 福岡県久留米市宮ノ陣三丁目 2 番 7 号

4. 試験目的

クロトリマゾールのゼブラフィッシュに対する胚-仔魚期における致死及び亜致死的影响を調べ、最小影響濃度（LOEC）及び最大無影響濃度（NOEC）を求める。

5. 試験法

- a) 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）「第 3 部 2. 胚・仔魚期の魚類を用いる短期毒性試験法」ただし、排水を対象とする場合にのみ適用すべき事項（試料の前処理等）は適用しなかった。
- b) OECD Guidelines for Testing of Chemicals, No.212, September 21, 1998 "Fish, Short-term Toxicity Test on Embryo and Sac-fry Stages"
ただし、被験物質に関する事項（試験濃度の設定、試験溶液の調製、試験物質濃度の測定等）のみ準じた。

6. 試験日程

試 験 開 始 日	2021 年 2 月 5 日
実 験 開 始 日	2021 年 2 月 10 日
実 験 終 了 日	2021 年 2 月 18 日
試 験 終 了 日	2021 年 3 月 19 日

7. 要 約

被験物質

クロトリマゾール

試験目的

クロトリマゾールのゼブラフィッシュに対する胚・仔魚期における致死及び亜致死的な影響を調べ、最小影響濃度（LOEC）及び最大無影響濃度（NOEC）を求める。

試験法

- a) 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）「第 3 部 2. 胚・仔魚期の魚類を用いる短期毒性試験法」ただし、排水を対象とする場合にのみ適用すべき事項（試料の前処理等）は適用しなかった。
- b) OECD Guidelines for Testing of Chemicals, No.212, September 21, 1998 "Fish, Short-term Toxicity Test on Embryo and Sac-fry Stages"
ただし、被験物質に関する事項（試験濃度の設定、試験溶液の調製、試験物質濃度の測定等）のみ準じた。

試験条件

試験生物	ゼブラフィッシュ (<i>Danio rerio</i>) 受精卵（受精後 4 時間以内）
試験用水	脱塩素水道水
試験区	試験原液含有率として 100、50.0、25.0、12.5、6.25%（公比 2.0） （測定濃度として 0.493、0.240、0.125、0.0639、0.0332 mg/L） 及び対照区
試験液の調製	100 mg/L（設定）になるように供試試料と試験用水を混合し、48 時間攪拌後、メンブランフィルターで吸引ろ過して調製した試験原液を試験用水で適宜希釈して調製。
暴露方式	半止水式（週 3 回、2 日または 3 日ごとに換水）
暴露期間	8 日間〔ふ化日（暴露 3 日後）から 5 日後〕
連 数	4 連/試験区
試験生物数	60 個体/試験区（15 個体/試験容器）
試験液量	約 200 mL/試験区（約 50 mL/試験容器）
水 温	25.9～26.1℃
エアレーション	実施せず
pH 調整	無し
照 明	室内灯、16 時間明/8 時間暗
給 餌	無給餌
被験物質濃度の測定	LC-MS/MS 法（暴露開始時、換水前後及び暴露終了時）

試験結果

試験用水への溶解度 (26±1℃)

0.491 mg/L (予備試験での測定値)

NOEC

0.493 mg/L

(上記濃度は、測定濃度の時間加重平均値に基づく値)

8. 試験材料

8.1 被験物質

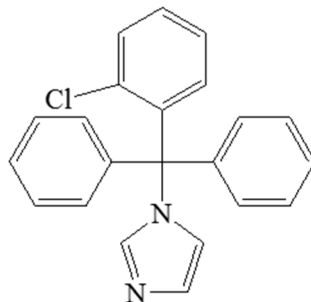
a) 名称等

名 称 クロトリマゾール

CAS 番号 23593-75-1

b) 構造式等

構造式



分子式 $C_{22}H_{17}ClN_2$

分子量 344.84

c) 供試試料

被験物質純度 100.0%

供給者 富士フイルム和光純薬株式会社

ロット番号 WDF0216

d) 物理化学的性状

融 点 146°C

外 観 白色の粉末

e) 保管条件

室温暗所保管した。

f) 取扱い上の注意

手袋、マスク、保護めがね及び白衣を着用し、皮膚、目への接触及び吸入を避けた。

9. 試験生物

種 ゼブラフィッシュ (*Danio rerio*)

生物種選択の理由 試験法に推奨されている種

供給源 国立研究開発法人国立環境研究所より入手した群

供試時の月齢（親魚） 3 か月齢

供試段階 受精後 4 時間以内の受精卵（桑実胚期）

群分け 無作為抽出

じゅん化（親魚）

飼育水 脱塩素水道水

じゅん化方式 流水式

溶存酸素濃度 飽和溶存酸素濃度の 80%以上

水 温 $26\pm 1^{\circ}\text{C}$

明暗周期 室内灯による 16 時間明/8 時間暗

餌 料 アルテミアふ化幼生（ソルトレイク産）

給餌量・頻度	飽食量・毎日
薬 浴	実施せず
エアレーション	実施
ペアリング	
雌雄数	1 容器（5 L 容ガラス製容器）あたり、オス 2 個体、メス 1 個体
飼育水量	約 3 L/容器
ペアリング時期	暴露開始当日（2021 年 2 月 10 日）
飼育水	脱塩素水道水
水 温	26±1℃
エアレーション	実施せず

試験系の再現性の確認

基準物質による胚-仔魚短期毒性試験を実施

最新のデータを以下に示す。

基準物質：塩化ナトリウム

（容量分析用、ロット番号 APM2033、富士フイルム和光純薬）

実施期間：2020 年 9 月 25 日～10 月 3 日

NOEC：1.5 g/L

この値は当試験施設におけるバックグラウンドデータ（NOEC=0.75、1.5、1.5、1.5、3.0、1.5、1.5、1.5 及び 1.5 g/L、n=9）とほぼ同等であり、試験系の顕著な変動は無かったものと判断される。

10. 試験の実施

10.1 試験用水

十分にエアレーションし、温度調節した脱塩素水道水を用いた。定期的に測定した試験用水の水質測定結果を Appendix 1 に示す。

10.2 試験器具及び装置

試験容器	80 mL 容ガラス製容器（直径 4.7 cm, 深さ 5.3 cm）
蓋	透明なプラスチック製の蓋
恒温槽	プラスチック製水槽
	加熱冷却装置 RX-401HPN-Z（イワキ）

10.3 試験液の調製法

100 mg/L（設定）になるように供試試料と試験用水を混合し、マグネティックスターラーで 48 時間攪拌後、メンブランフィルター（PVDF、孔径 0.45 μm、Merck）で吸引ろ過した。吸引ろ過によって低下した溶存酸素濃度を回復させるため、約 26℃の条件下でエアレーションしたものを試験原液とした。試験原液をそのまま若しくは試験用水で適宜希釈して各試験液を調製した。なお、試験原液及び試験液は換水ごとに新しく調製した。

10.4 試験条件

暴露方式	半止水式（週 3 回、2 日または 3 日ごとに換水）
暴露期間	8 日間 [対照区のふ化率が 50%を超えた日をふ化日として（ふ化日：暴露 3 日後）ふ化日から 5 日後まで暴露]
試験濃度	試験原液含有率として 100、50.0、25.0、12.5、6.25%（公比 2.0） 予備試験結果から試験濃度を決定した。 予備試験結果を Additional data に示す。
対照区	試験原液と同様の攪拌処理をした被験物質を含まない試験用水
連 数	4 連/試験区
試験生物数	60 個体/試験区（15 個体/試験容器）
試験液量	約 200 mL/試験区（約 50 mL/試験容器）
水 温	26±1℃
エアレーション	実施せず
pH 調整	無し
照 明	室内灯による 16 時間明/8 時間暗
給 餌	無給餌

10.5 受精卵の採取・選別

ペアリング水槽に産出された卵は、ガラスピペットを用いて飼育水と一緒に回収し、可能な限り空気に晒さないように注意して取り扱った。回収した卵は、水槽ごとにビーカーに適量の飼育水と一緒に移し入れ、実体顕微鏡下で観察し、未受精卵及び異常が認められるものを除去した。また、糞等の異物をできる限り除去した。選別した受精卵のうち、回収した卵数に対する正常な受精卵数が多いペアからの受精卵を試験に供した。試験に使用した受精卵は 1 ペアから採卵したものをを用いた。受精卵を入れたビーカーは、暴露開始時まで温度を試験温度に調整した恒温槽内に静置した。

10.6 生物の暴露

調製した試験液の水温を測定し、試験温度範囲にあることを確認後、各試験容器に分注した（各 50 mL）。また、各試験濃度について、試験容器とは別に試験液を約 50 mL 入れた容器（分注用試験容器：各試験濃度 1 つ）を用意した。供試用の受精卵を、各試験区用の分注用試験容器に必要数（試験区あたりの供試数）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、分注用試験容器に入れた受精卵を各試験容器に正確に規定数だけ移し入れた。

10.7 試験液の換水

試験液の換水は、試験容器内の試験液のみを抜き取って新しいものに入れ替える方法で行った（試験容器の交換は行わなかった）。ガラスピペットを用いて、試験生物を吸わないように注意して試験容器内の試験液を約 5 mL 残して除去した。そこにできるだけ試験生物をかく乱しないよう緩やかに、新調した試験液（水温調整したもの）を約 55 mL になるように入れた。

10.8 観察及び測定

a) 試験生物の一般状態

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、一般状態及びふ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みなした。発生後期（器官形成後）及びふ化後の仔魚では、白濁または心臓の拍動が認められないものを死亡とみなした。また、対照区と比較して、形態異常（発育不全、尾部の卵黄からの不分離等）や心拍数の低下、行動異常などが見られた個体数を記録した。卵膜から胚（体幹部）が完全に出ていない状態のものはふ化前とみなした。観察後、死亡した胚、仔魚及びふ化後の卵膜を除去した。

b) 試験液の状態

暴露開始時及び初回換水前（暴露 2 日後）に観察

c) 試験液の水質

測定項目	溶存酸素濃度、pH 及び水温
測定頻度	暴露開始時、換水前後及び暴露終了時
測定方法	調製容器より一部分取した試験液について測定（調製時） 各試験容器の中層から均等量採取し、混合した試験液について測定（換水前及び暴露終了時）
測定機器	溶存酸素計 HQ30d (HACH) pH 計 HM-21P（東亜ディーケーケー） ガラス製棒状温度計

d) 試験液中の被験物質濃度

測定頻度	暴露開始時、換水前後及び暴露終了時
測定試料	各試験容器の中層から均等量採取し、混合
採水量	約 10 mL（全試験区）
測定方法	Appendix 2 参照

10.9 結果の算出

暴露試験から得られたデータをもとに、以下に定義される影響指標値を試験容器ごとに算出する。

なお、結果の算出には暴露期間中に測定した試験液中の被験物質濃度の時間加重平均値を用いた。

a) 生存率

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 = 暴露終了時の（生存胚体数+生存仔魚数）/供試卵数×100

b) ふ化率

供試卵数に対する最大ふ化所要日数までにふ化した卵数の割合（％）

ふ化率 = 最大ふ化所要日数での総ふ化仔魚数/供試卵数×100

（最大ふ化所要日数：ゼブラフィッシュでは暴露 5 日後）

c) ふ化後生存率

暴露期間中にふ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 (%)

ふ化後生存率 = 暴露終了時の生存仔魚数/暴露期間の総ふ化仔魚数×100

d) 生存指標

ふ化に対する遅延の影響も加味した胚期からふ化後の仔魚に対する影響の指標

生存指標 = ふ化率×ふ化後生存率/100

10.10 LOEC 及び NOEC の算出

生存率、ふ化率、ふ化後生存率及び生存指標に関して、すべての試験濃度において、いずれの影響指標値も対照区と有意差が認められなかったため、最も高い試験濃度を NOEC とし、LOEC は推定しなかった。

各影響指標に関して、Steel の多重比較検定により有意差検定（片側検定）を行った。有意差検定はエクセル統計 2012 for Windows ver.1.16 を使用した。これらの有意差検定結果に加え試験結果全体を考慮し、NOEC を評価した。

10.11 試験の有効性

本試験は、以下を満たす場合に有効とみなす。

- a) 対照区におけるふ化率が 80%以上であること。
- b) 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。
- c) 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。

10.12 数値の取扱い

数値の丸め方は、JIS Z 8401: 2019 規則 B に従った。

11. 試験結果及び考察

以下の本文中における試験濃度の表示は、試験原液含有率 (100、50.0、25.0、12.5 及び 6.25%) における測定濃度の時間加重平均値 (0.493、0.240、0.125、0.0639 及び 0.0332 mg/L) で示す。

11.1 生存率

各試験区における生存率を Table 1 に示す。

対照区における生存率は 98.3%であり、有効性基準 (70%以上) を満たしていた。生存率に関して対照区と比較し、全試験濃度区において統計学的な有意差 ($p<0.05$) は認められなかった。

11.2 ふ化率

各試験区におけるふ化個体数及びふ化率を Table 2 に示す。

暴露 5 日後までにふ化した卵数の割合から算出した対照区におけるふ化率は 98.3%であり、有効性基準 (80%以上) を満たしていた。暴露 5 日後までのふ化率に関して対照区と比較し、全試験濃度区において統計学的な有意差 ($p<0.05$) は認められなかった。

11.3 ふ化後生存率

各試験区におけるふ化後生存率を Table 3 に示す。

ふ化後生存率に関して対照区と比較し、全試験濃度区において統計学的な有意差 ($p<0.05$) は認められなかった。

11.4 生存指標

各試験区における生存指標を Table 3 に示す。

生存指標に関して対照区と比較し、全試験濃度区において統計学的な有意差 ($p<0.05$) は認められなかった。

11.5 一般状態等の観察結果

暴露期間中における一般状態の観察結果を Table 4 に示す。

対照区では、症状は観察されなかった。試験濃度区では活動度の低下、体幹の湾曲、発生阻害及び腹部膨満が観察された。症状を示した個体が最高濃度区 (0.493 mg/L 区) で多く認められたことから、症状発現が被験物質に起因している可能性が高いものと判断される。

11.6 試験液の観察と測定結果

a) 試験液の状態

全試験区において、暴露開始時及び初回換水前（暴露 2 日後）で共に無色透明であった。

b) 試験液の水質

試験液の水質を Table 5、6 及び 7 に示す。

暴露期間中に測定した溶存酸素濃度は 7.9～8.4 mg/L、pH は 7.8～8.0、水温は 25.9～26.1℃であった。なお、溶存酸素濃度は有効性基準（試験水温での飽和濃度*の 60%以上）を満たしていた。

* 25～27℃の飽和溶存酸素濃度: 8.26～7.97 mg/L、JIS K 0102: 2019

c) 試験液中の被験物質濃度

被験物質濃度の測定方法及び結果を Appendix 2、検量線及びクロマトグラムを Appendix 3 に示す。

測定した試験液中の被験物質濃度は、暴露開始時及び換水後で 0.0337～0.523 mg/L であった。換水前及び暴露終了時は 0.0312～0.523 mg/L であり、調製時濃度に対して 86.4～102%であった。

11.7 LOEC 及び NOEC

LOEC 及び NOEC を Table 8、有意差検定結果を Table 9 に示す。これらの結果から、本試験における NOEC は 0.493 mg/L とした。

11.8 考 察

試験は被験物質の胚-仔魚期のゼブラフィッシュに対する致死及び亜致死の影響を求める試験として行った。その結果、各影響指標に関して対照区と比較し、全試験濃度区で統計学的な有意差 ($p<0.05$) は認められなかったことから、NOEC は 0.493 mg/L とした。しかしながら、最高濃度区 (0.493 mg/L 区) において、症状を示した個体が多く認められたことから、結果の取り扱いには注意が必要である。

測定した試験液中の被験物質濃度は調製時濃度の 80～120%以内に維持され、試験環境条件は適切な範囲内であり、試験の有効性も満たしていることから、本試験は試験法に準じたものであったと判断される。

12. 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
当該要因はなかった。

Table 1 Survival rate

Measured concentration ^a (mg/L)	Test vessel	At each exposure day (%)								At end of exposure (%)	
		1-day	2-day	3-day	4-day	5-day	6-day	7-day	8-day	Each vessel	Average \pm S.D.
Control	A	100.	100	100	100	100	100	100	100	100	98.3 \pm 3.3
	B	100	93.3	93.3	93.3	93.3	93.3	93.3	93.3	93.3	
	C	100	100	100	100	100	100	100	100	100	
	D	100	100	100	100	100	100	100	100	100	
0.0332	A	100	100	100	100	100	100	100	100	100	98.3 \pm 3.3
	B	100	100	100	100	100	100	100	100	100	
	C	100	100	100	100	100	100	100	100	100	
	D	100	93.3	93.3	93.3	93.3	93.3	93.3	93.3	93.3	
0.0639	A	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100 \pm 0
	B	100	100	100	100	100	100	100	100	100	
	C	100	100	100	100	100	100	100	100	100	
	D	100	100	100	100	100	100	100	100	100	
0.125	A	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100 \pm 0
	B	100	100	100	100	100	100	100	100	100	
	C	100	100	100	100	100	100	100	100	100	
	D	100	100	100	100	100	100	100	100	100	
0.240	A	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100 \pm 0
	B	100	100	100	100	100	100	100	100	100	
	C	100	100	100	100	100	100	100	100	100	
	D	100	100	100	100	100	100	100	100	100	
0.493	A	100	100	100	100	100	100	100	100	100	93.3 \pm 5.4
	B	100	93.3	93.3	93.3	93.3	93.3	93.3	93.3	93.3	
	C	100	100	100	93.3	93.3	93.3	93.3	93.3	93.3	
	D	100	100	100	100	93.3	93.3	86.7	86.7	86.7	

a: Time-weighted mean of the measured concentrations (also expressed as measured concentration in the following tables)

Table 2 Hatching number and rate

Measured concentration (mg/L)	Test vessel	Hatching number at each exposure day								Total hatching number until 5 days later	Hatching rate until 5 days later (%)	
		1-day	2-day	3-day	4-day	5-day	6-day	7-day	8-day		Each vessel	Average \pm S.D.
Control	A	0	4	8	3					15	100	98.3 \pm 3.3
	B	0	4	7	3					14	93.3	
	C	0	1	13	1					15	100	
	D	0	0	13	2					15	100	
0.0332	A	0	0	9	6					15	100	98.3 \pm 3.3
	B	0	1	11	3					15	100	
	C	0	1	5	9					15	100	
	D	0	2	11	1					14	93.3	
0.0639	A	0	0	10	5					15	100	100 \pm 0
	B	0	0	10	5					15	100	
	C	0	1	8	6					15	100	
	D	0	0	5	10					15	100	
0.125	A	0	0	12	3					15	100	100 \pm 0
	B	0	0	7	8					15	100	
	C	0	0	8	6	1				15	100	
	D	0	0	8	7					15	100	
0.240	A	0	0	5	9	1				15	100	100 \pm 0
	B	0	0	5	9	1				15	100	
	C	0	0	6	9					15	100	
	D	0	0	7	8					15	100	
0.493	A	0	0	8	7					15	100	91.7 \pm 8.4
	B	0	0	6	8					14	93.3	
	C	0	0	9	4	1				14	93.3	
	D	0	0	4	7	1	1	1		12	80.0	

Blank expresses no embryo for observation.

Table 3 Survival rate after hatching and survival index

Measured concentration (mg/L)	Test vessel	Survival rate after hatching (%)		Survival index	
		Each vessel	Average±S.D.	Each vessel	Average±S.D.
Control	A	100	100±0	100	98.3±3.3
	B	100		93.3	
	C	100		100	
	D	100		100	
0.0332	A	100	100±0	100	98.3±3.3
	B	100		100	
	C	100		100	
	D	100		93.3	
0.0639	A	100	100±0	100	100±0
	B	100		100	
	C	100		100	
	D	100		100	
0.125	A	100	100±0	100	100±0
	B	100		100	
	C	100		100	
	D	100		100	
0.240	A	100	100±0	100	100±0
	B	100		100	
	C	100		100	
	D	100		100	
0.493	A	100	98.2±3.6	100	90.2±11.1
	B	100		93.3	
	C	100		93.3	
	D	92.9		74.3	

Survival index: Hatching rate (until 5 days later) × Survival rate after hatching/100

Table 4 Observed abnormal response

Measured concentration (mg/L)	Result of observation at each exposure day (Left column: Total survival number, Right column: Symptom detail)															
	1-day		2-day		3-day		4-day		5-day		6-day		7-day		8-day	
Control	60	N	59	N	59	N	59	N	59	N	59	N	59	N	59	N
0.0332	60	N	59	N	59	N	59	N	59	N	59	N	59	N	59	N
0.0639	60	N	60	N	60	N	60	N	60	N	60	N	60	N	60	N
0.125	60	N	60	N	60	N	60	CV(1)	60	CV(1)	60	CV(1)	60	CV(1)	60	CV(1)
0.240	60	N	60	N	60	N	60	N	60	N	60	N	60	N	60	N
0.493	60	N	59	DA(1)	59	N	58	N	57	N	57	CV(9)	56	CV(8)	56	RA(36) CV(8) EA(8)

N: Normal (no abnormal response)

Value in parentheses expresses the number of individuals that showed the symptom.

Abbreviation of symptoms

RA: Reduced activity

CV: Curved body

DA: Developmental arrest

EA: Extended abdomen

Table 5 Dissolved oxygen concentration of test solutions

Measured concentration (mg/L)	0-day	2-day		5-day		7-day		8-day
		Old	New	Old	New	Old	New	
Control	8.4	8.2	8.2	8.1	8.0	8.2	8.2	8.2
0.0332	8.3	8.2	8.2	8.0	8.2	8.2	8.2	8.2
0.0639	8.3	8.1	8.2	8.0	8.2	8.1	8.2	8.2
0.125	8.3	8.1	8.2	8.0	8.2	8.1	8.1	8.2
0.240	8.3	8.1	8.2	7.9	8.2	8.0	8.2	8.1
0.493	8.3	8.1	8.2	7.9	8.2	8.0	8.1	8.1

Old: Before the renewal

New: After the renewal

Unit: mg/L

Table 6 pH of test solutions

Measured concentration (mg/L)	0-day	2-day		5day		7-day		8-day
		Old	New	Old	New	Old	New	
Control	7.9	7.9	7.9	7.8	7.8	7.9	7.9	7.9
0.0332	7.9	7.9	7.9	7.8	7.8	7.9	7.9	7.9
0.0639	7.9	7.9	7.9	7.8	7.9	7.9	7.9	7.9
0.125	7.9	7.9	7.9	7.8	7.9	7.9	7.9	7.9
0.240	7.9	7.9	8.0	7.8	7.9	7.9	7.9	7.9
0.493	7.9	7.9	8.0	7.8	7.9	7.9	8.0	7.9

Old: Before the renewal

New: After the renewal

Table 7 Temperature of test solutions

Measured concentration (mg/L)	0-day	2-day		5-day		7-day		8-day
		Old	New	Old	New	Old	New	
Control	25.9	26.0	26.0	26.0	26.0	26.0	26.0	26.1
0.0332	26.0	26.0	26.0	26.0	26.0	26.0	26.0	26.1
0.0639	26.0	26.0	26.0	26.0	26.0	26.0	26.0	26.1
0.125	26.0	26.0	26.0	26.0	26.1	26.0	26.0	26.1
0.240	26.0	26.0	26.0	26.0	26.1	26.0	26.0	26.1
0.493	26.0	26.0	26.0	26.0	26.1	26.0	26.0	26.1

Old: Before the renewal

New: After the renewal

Unit: °C

Table 8 LOEC and NOEC

LOEC (mg/L)	NOEC (mg/L)
	0.493

Table 9 Result of statistical analysis

Measured concentration (mg/L)	Survival rate	Hatching rate until 5 days later	Survival rate after hatching	Survival index
0.0332	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
0.0639	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
0.125	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
0.240	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
0.493	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Statistical procedure	Steel's test	Steel's test	Steel's test	Steel's test

n.s.: No significant difference from control

Appendix 1

試験用水の水質

Chemical characteristics of dilution water (Sampling on January 12, 2021)

Parameter	Unit	Results	Determination limit
Total hardness (Ca, Mg)	CaCO ₃ mg/L	40	1
Suspended solid	mg/L	< 1	1
pH	-	7.8 (23.5°C)	-
Total organic carbon	mg/L	< 0.5	0.5
Chemical oxygen demand	mg/L	< 1	1
Free residual chlorine	mg/L	< 0.02	0.02
Ammonium ion	mg/L	< 0.1	0.1
Total cyanide	mg/L	< 0.05	0.05
Alkalinity	CaCO ₃ mg/L	42	1
Electric conductivity (25°C)	mS/m	17	0.1
Total mercury	mg/L	< 0.0005	0.0005
Cadmium	mg/L	< 0.001	0.001
Chromium (VI)	mg/L	< 0.01	0.01
Lead	mg/L	< 0.001	0.001
Arsenic	mg/L	< 0.005	0.005
Iron	mg/L	< 0.01	0.01
Copper	mg/L	< 0.001	0.001
Cobalt	mg/L	< 0.001	0.001
Manganese	mg/L	< 0.005	0.005
Aluminum	mg/L	< 0.02	0.02
Zinc	mg/L	< 0.1	0.1
Nickel	mg/L	< 0.001	0.001
Silver	mg/L	< 0.0001	0.0001
1,2-dichloropropane	mg/L	< 0.002	0.002
Chlorothalonil	mg/L	< 0.001	0.001
Propyzamide	mg/L	< 0.0008	0.0008
Chlornitrofen	mg/L	< 0.0001	0.0001
Simazine	mg/L	< 0.0003	0.0003
Thiobencarb	mg/L	< 0.001	0.001
Diazinon	mg/L	< 0.0005	0.0005
Isoxathion	mg/L	< 0.0008	0.0008
Fenitrothion	mg/L	< 0.0003	0.0003
EPN	mg/L	< 0.0006	0.0006
Dichlorvos	mg/L	< 0.001	0.001
Iprobenfos	mg/L	< 0.0008	0.0008
PCB	mg/L	< 0.0005	0.0005
Boron	mg/L	< 0.1	0.1
Fluorine	mg/L	0.3	0.1
Sulfate ion	mg/L	15	0.5
Chloride ion	mg/L	14	0.2
Sodium	mg/L	14	0.2
Potassium	mg/L	3.3	0.2
Calcium	mg/L	11	0.1
Magnesium	mg/L	3.1	0.1

Appendix 2

被験物質濃度の測定方法及び結果

1. 試験液の前処理法

採取した試験液を分析用試料とし、最終試料の組成がメタノール/脱塩素水道水（1/1 v/v）になるように適宜希釈して液体クロマトグラフィー・タンデム質量分析法（LC-MS/MS）試料を調製した。

2. 被験物質の定量分析

a) 定量方法

本定量方法の有効性を確認するために、c)の標準溶液と同様に調製した 0.000500、0.00250、0.00500、0.0100 及び 0.0500 mg/L の 5 濃度の標準溶液を用いて検量線（最小二乗法による回帰式： $Y=aX+b$, Y:応答量, X:被験物質濃度）を作成した。その結果、クロマトグラム上のピーク面積と濃度により作成した検量線の相関係数 r は 0.995 以上であり、切片 b の絶対値は応答量の最大値の 5%以内であったことから、検量線は原点を通過する直線とみなし、被験物質の定量は 1 濃度の標準溶液を用いた絶対検量線法で行った（Appendix figure 3-1 参照）。また、LC-MS/MS 試料の分析によって得られたクロマトグラム（一例）を Appendix 3 に示す。

分析試料中の被験物質の定量下限値（LOQ : limit of quantification）は、定量性が確認された範囲での標準溶液の最低濃度（0.000500 mg/L）とした。よって、試験液中の被験物質の定量下限値（LOQ）は前処理操作（最低希釈倍率：2 倍）を考慮して 0.00100 mg/L とした。

b) 分析条件

機 器	液体クロマトグラフィー質量分析計（機器番号 LCMS-017）	
液体クロマトグラフ	Nexera X2	（島津製作所）
質量分析計	LCMS-8060	（島津製作所）

液体クロマトグラフ条件

カラム	L-column2 ODS（35 mm × 2.1 mm I.D., 粒子径 5 μm, 化学物質評価研究機構）
カラム温度	40℃
溶離液	A（30%）：5 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液 B（70%）：5 mmol/L 酢酸アンモニウムのメタノール溶液
流 量	0.2 mL/min
注入量	5 μL

質量分析計条件

イオン化法 エレクトロスプレーイオン化法 (ESI)
 検出イオン 正イオン
 検出法 選択反応モニタリング (SRM)
 測定イオン

プリカーサーイオン (<i>m/z</i>)	プロダクトイオン (<i>m/z</i>)	コリジョンエネルギー (eV)
345.2	165.1	-31
345.2	199.1	-38
345.2	239.2	-55
345.2	241.2	-37
347.2	165.2	-32
347.2	239.2	-55
347.2	241.1	-38
347.2	279.1	-12
367.1	165.2	-35
367.1	241.2	-43
367.1	277.2	-19
369.1	165.2	-34
369.1	279.1	-19

インターフェイス温度 120℃
 DL 温度 200℃
 ネブライザーガス流量 1.50 L/min
 ドライイングガス流量 10.00 L/min

c) 標準溶液の調製及び被験物質濃度の算出

供試試料 50.0 mg を電子分析天びんで正確にはかりとり、メタノールに溶解して 50 mL に定容し、1000 mg/L の被験物質溶液を調製した（試験番号:99483 で実施）。これをメタノールで希釈して 100 mg/L の被験物質溶液を調製した（試験番号:99483 で実施）。これをメタノール/脱塩素水道水（1/1 v/v）で希釈して 0.00500 mg/L の標準溶液を調製した。

LC-MS/MS 試料中の被験物質濃度は、標準溶液及び LC-MS/MS 試料のクロマトグラム上で得られるピーク面積を比較し、比例計算して求めた。

3. 測定結果

試験液中の被験物質濃度の測定結果を以下に示す。

Appendix table 2-1 Measured concentration of test item in test solution

Stock solution content (%)	Measured concentration (mg/L) (Percentage of measured concentration versus that at each preparation %)								
	At the start	2 days		5 days		7 days		At the end	Time-weighted mean
		Old	New	Old	New	Old	New		
Control	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	
6.25	0.0338	0.0327 (96.8)	0.0338	0.0312 (92.4)	0.0337	0.0334 (98.9)	0.0348	0.0340 (97.7)	0.0332
12.5	0.0631	0.0604 (95.7)	0.0644	0.0603 (93.7)	0.0688	0.0674 (98.0)	0.0657	0.0634 (96.5)	0.0639
25.0	0.120	0.118 (98.7)	0.135	0.118 (87.9)	0.134	0.133 (99.2)	0.123	0.116 (93.8)	0.125
50.0	0.231	0.222 (96.2)	0.262	0.226 (86.4)	0.251	0.250 (99.4)	0.238	0.231 (97.1)	0.240
100	0.476	0.468 (98.5)	0.523	0.483 (92.3)	0.514	0.523 (102)	0.457	0.450 (98.4)	0.493

Old : Before the renewal

New : After the renewal

LOQ : 0.00100 mg/L

The time-weighted mean is calculated by the following expression:

$$\begin{aligned} & [2(C_0-C_{2E})/(\ln C_0-\ln C_{2E})+3(C_{2S}-C_{5E})/(\ln C_{2S}-\ln C_{5E})+2(C_{5S}-C_{7E})/(\ln C_{5S}-\ln C_{7E}) \\ & + (C_{7S}-C_8)/(\ln C_{7S}-\ln C_8)]/8 \end{aligned}$$

where

C_n : the measured concentration at n days

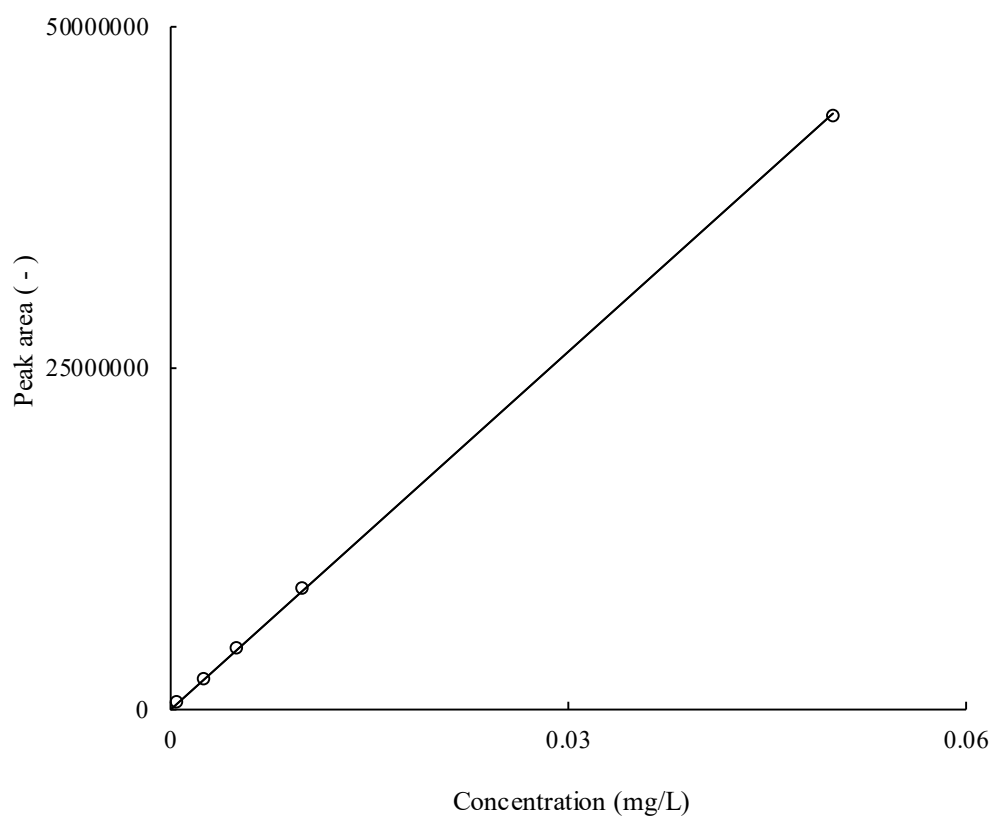
$\ln C_n$: the natural logarithm of C_n

E : Before the renewal

S : After the renewal

Appendix 3

検量線及びクロマトグラム



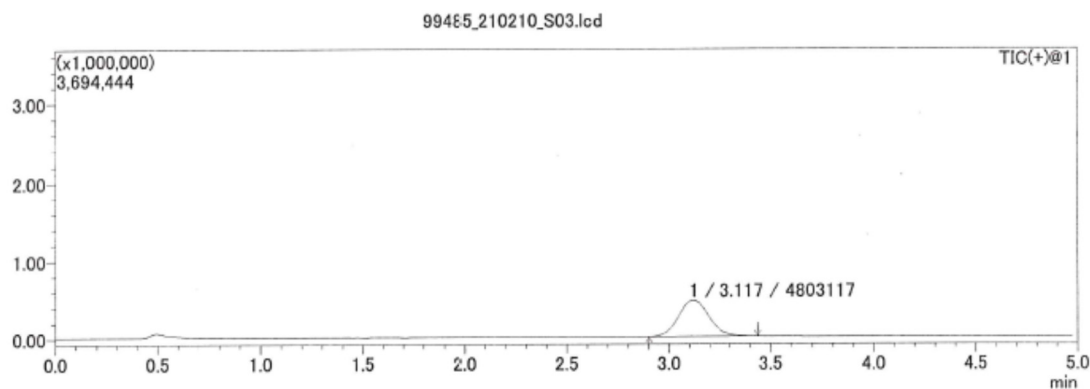
$$y = 870226473x$$

$$r = 1.00$$

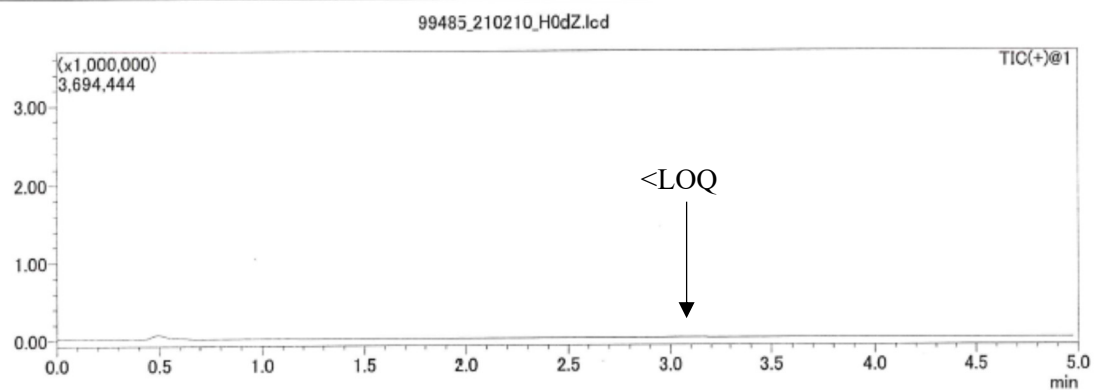
Concentration (mg/L)	Peak area (-)
0.000500	467525
0.00250	2233918
0.00500	4509251
0.0100	8897420
0.0500	43453239

Appendix figure 3-1 Calibration curve of test item for analysis by LC-MS/MS.

Sample ID : 99485
Sample name : Standard solution 0.00500 mg/L
Vial number : 31
Acquisition date : 2021/02/10
Inj. Volume : 5
Data file : 99485_210210_S03.lcd
Method file : 99483_99485_mrm_201210.lcm

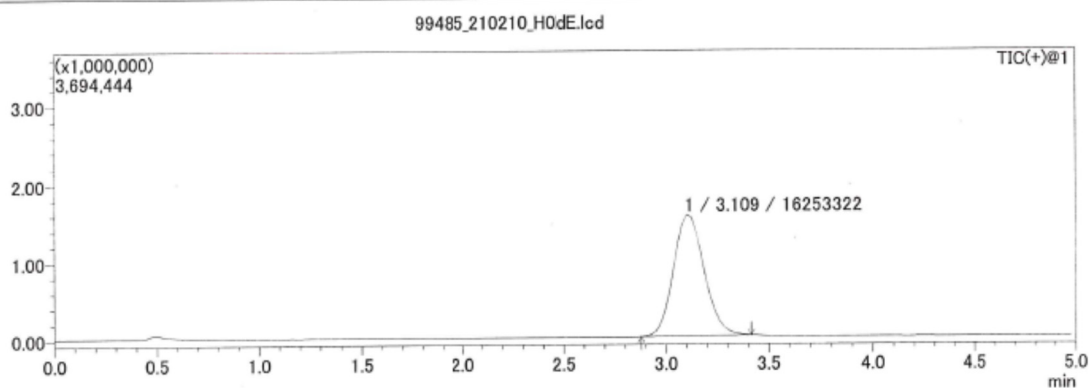


Sample ID : 99485
Sample name : Control
Vial number : 32
Acquisition date : 2021/02/10
Inj. Volume : 5
Data file : 99485_210210_H0dZ.lcd
Method file : 99483_99485_mrm_201210.lcm

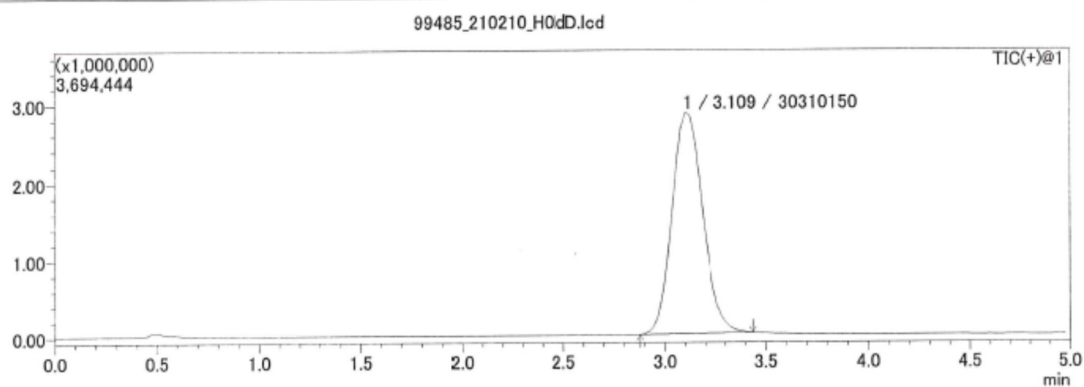


Appendix figure 3-2-1 LC-MS/MS chromatograms at start of exposure.

Sample ID : 99485
Sample name : 6.25% exposure level
Vial number : 33
Acquisition date : 2021/02/10
Inj. Volume : 5
Data file : 99485_210210_H0dE.lcd
Method file : 99483_99485_mrm_201210.lcm

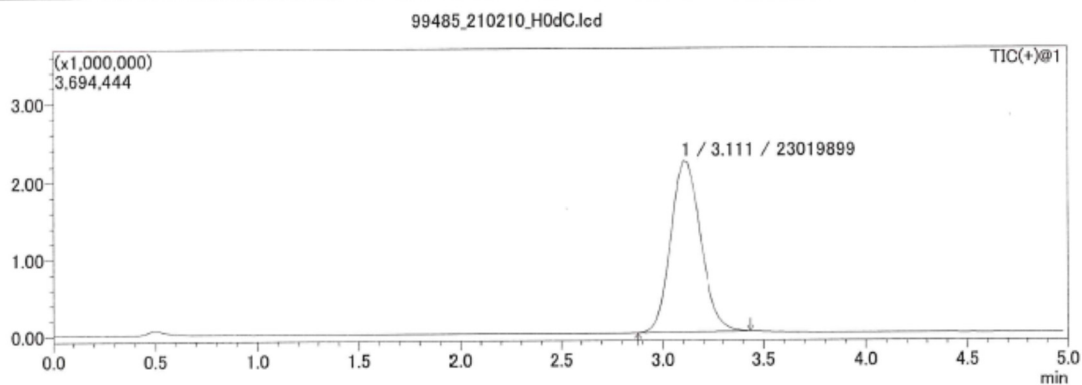


Sample ID : 99485
Sample name : 12.5% exposure level
Vial number : 34
Acquisition date : 2021/02/10
Inj. Volume : 5
Data file : 99485_210210_H0dD.lcd
Method file : 99483_99485_mrm_201210.lcm

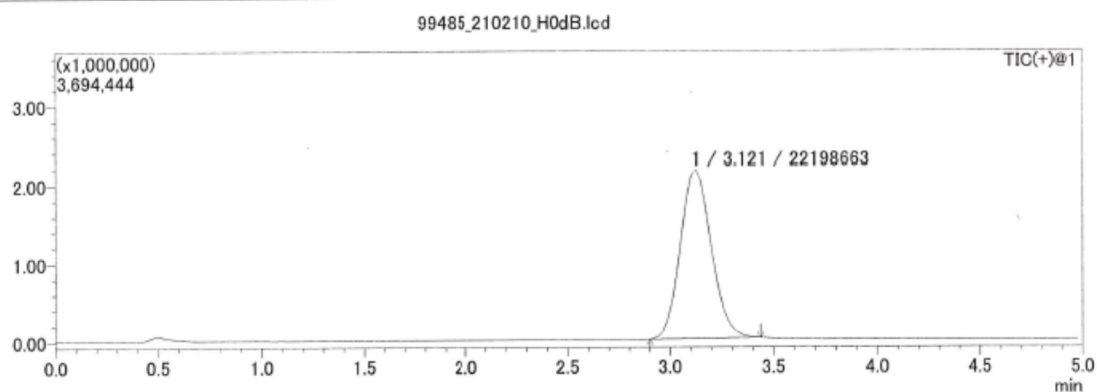


Appendix figure 3-2-2 LC-MS/MS chromatograms at start of exposure.

Sample ID : 99485
Sample name : 25.0% exposure level
Vial number : 35
Acquisition date : 2021/02/10
Inj. Volume : 5
Data file : 99485_210210_H0dC.lcd
Method file : 99483_99485_mrm_201210.lcm

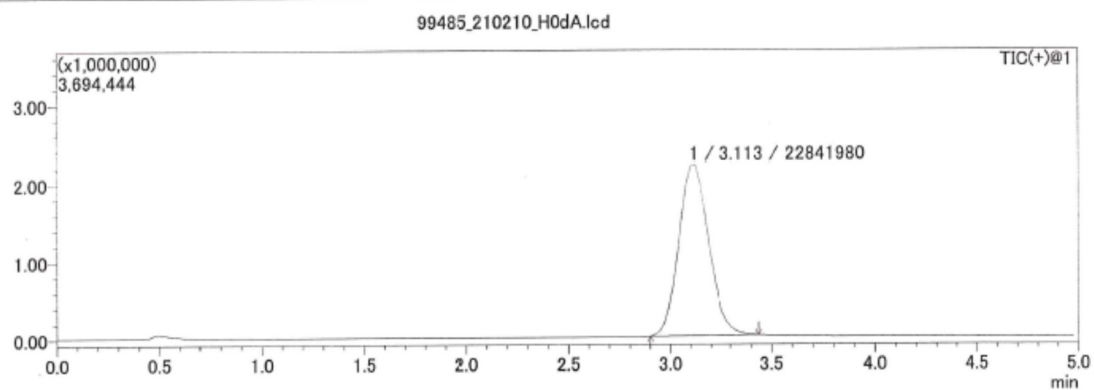


Sample ID : 99485
Sample name : 50.0% exposure level
Vial number : 36
Acquisition date : 2021/02/10
Inj. Volume : 5
Data file : 99485_210210_H0dB.lcd
Method file : 99483_99485_mrm_201210.lcm



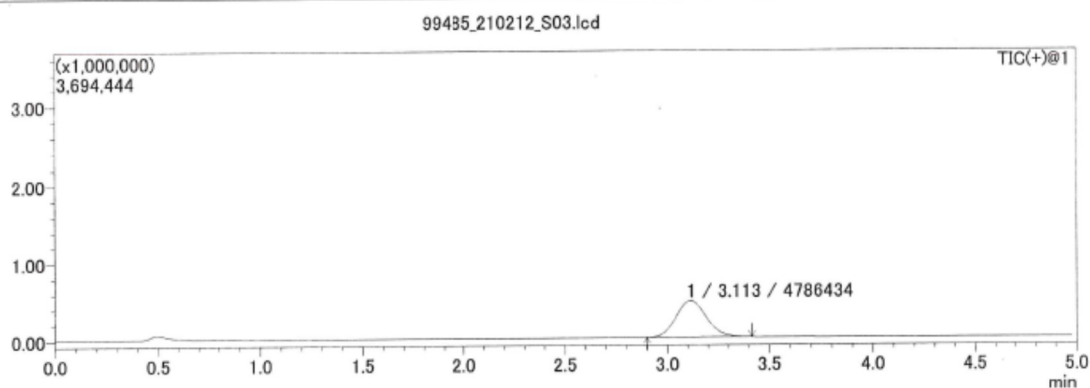
Appendix figure 3-2-3 LC-MS/MS chromatograms at start of exposure.

Sample ID	: 99485
Sample name	: 100% exposure level
Vial number	: 37
Acquisition date	: 2021/02/10
Inj. Volume	: 5
Data file	: 99485_210210_H0dA.lcd
Method file	: 99483_99485_mrm_201210.lcm

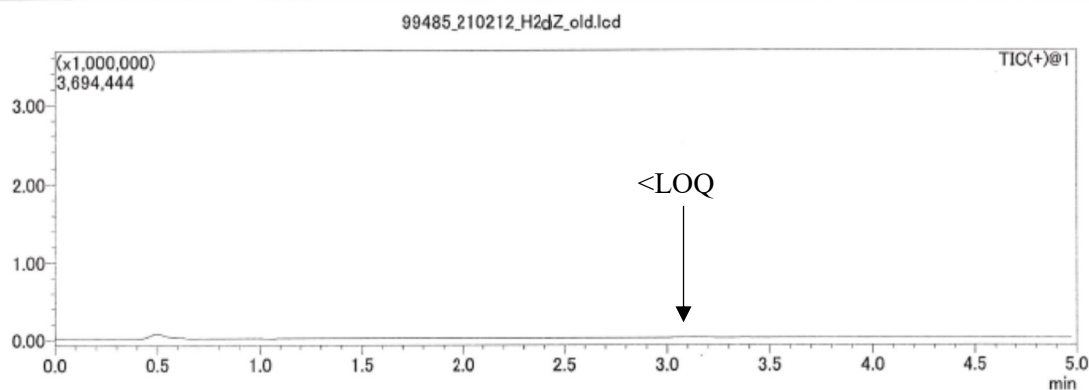


Appendix figure 3-2-4 LC-MS/MS chromatogram at start of exposure.

Sample ID : 99485
 Sample name : Standard solution 0.00500 mg/L
 Vial number : 31
 Acquisition date : 2021/02/12
 Inj. Volume : 5
 Data file : 99485_210212_S03.lcd
 Method file : 99483_99485_mrm_201210.lcm

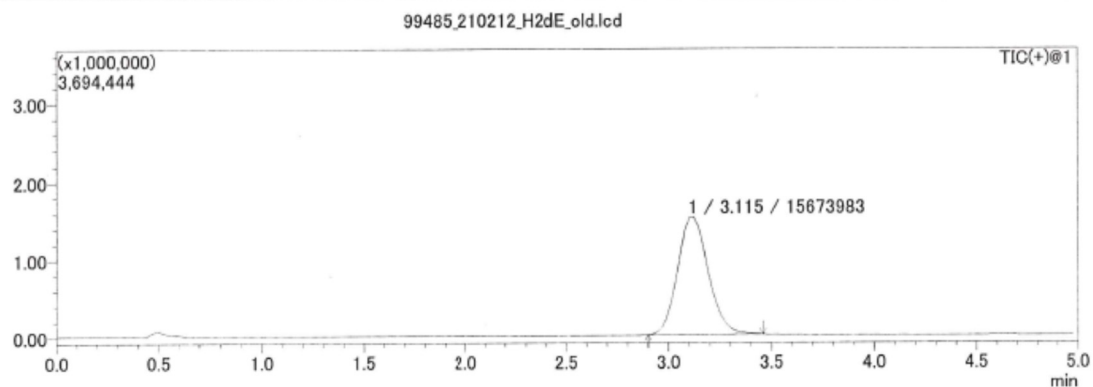


Sample ID : 99485
 Sample name : Control
 Vial number : 32
 Acquisition date : 2021/02/12
 Inj. Volume : 5
 Data file : 99485_210212_H2dZ_old.lcd
 Method file : 99483_99485_mrm_201210.lcm

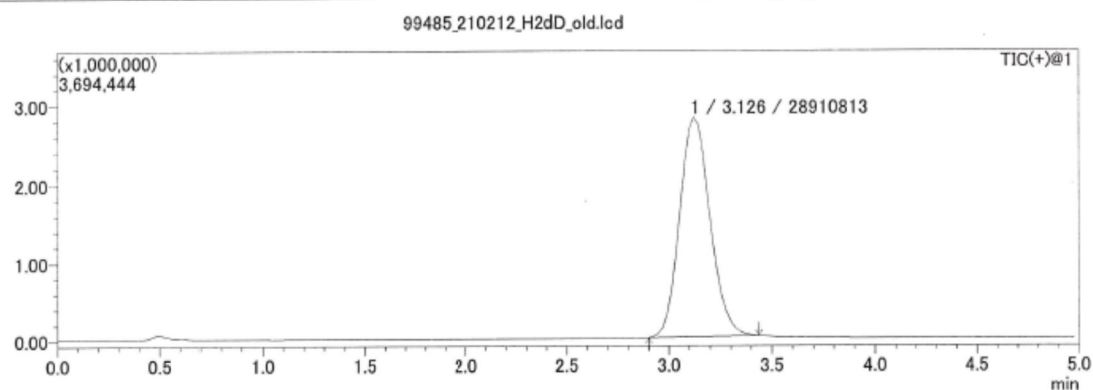


Appendix figure 3-3-1 LC-MS/MS chromatograms at 2 days after exposure (before renewal).

Sample ID	: 99485
Sample name	: 6.25% exposure level
Vial number	: 33
Acquisition date	: 2021/02/12
Inj. Volume	: 5
Data file	: 99485_210212_H2dE_old.lcd
Method file	: 99483_99485_mrm_201210.lcm

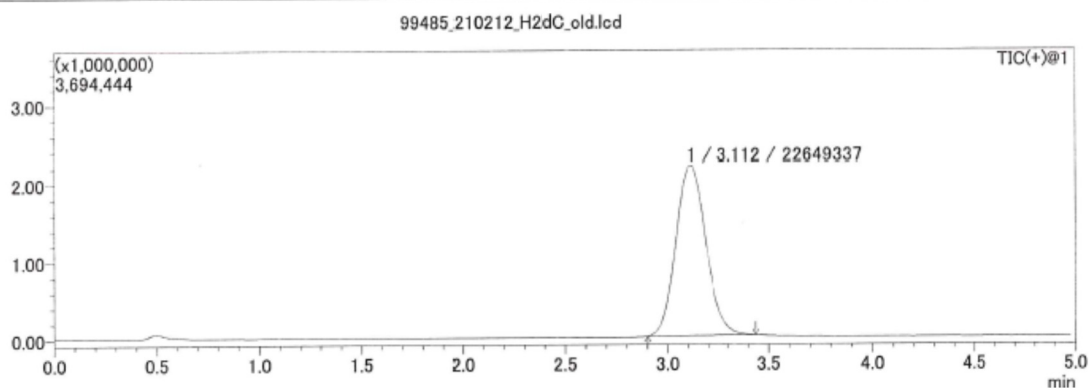


Sample ID	: 99485
Sample name	: 12.5% exposure level
Vial number	: 34
Acquisition date	: 2021/02/12
Inj. Volume	: 5
Data file	: 99485_210212_H2dD_old.lcd
Method file	: 99483_99485_mrm_201210.lcm

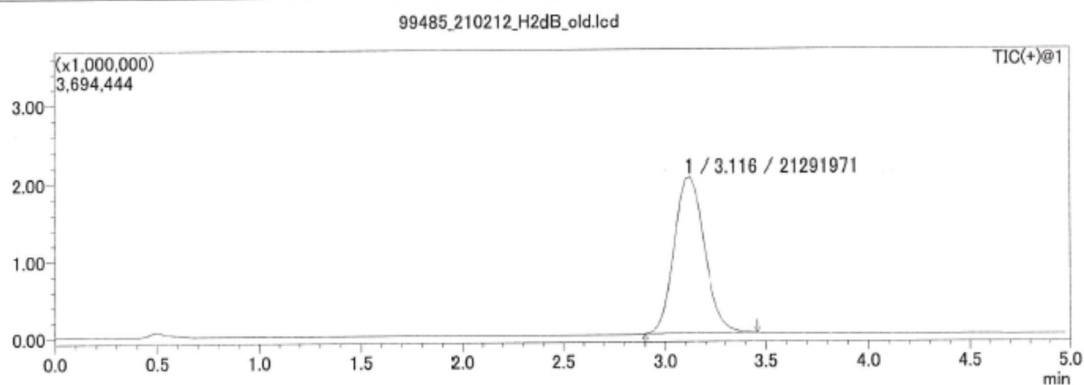


Appendix figure 3-3-2 LC-MS/MS chromatograms at 2 days after exposure (before renewal).

Sample ID : 99485
Sample name : 25.0% exposure level
Vial number : 35
Acquisition date : 2021/02/12
Inj. Volume : 5
Data file : 99485_210212_H2dC_old.lcd
Method file : 99483_99485_mrm_201210.lcm

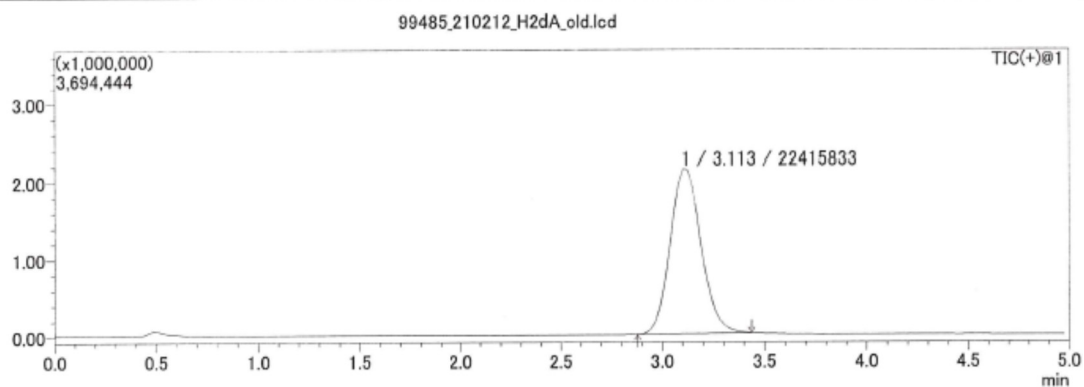


Sample ID : 99485
Sample name : 50.0% exposure level
Vial number : 36
Acquisition date : 2021/02/12
Inj. Volume : 5
Data file : 99485_210212_H2dB_old.lcd
Method file : 99483_99485_mrm_201210.lcm



Appendix figure 3-3-3 LC-MS/MS chromatograms at 2 days after exposure (before renewal).

Sample ID	: 99485
Sample name	: 100% exposure level
Vial number	: 37
Acquisition date	: 2021/02/12
Inj. Volume	: 5
Data file	: 99485_210212_H2dA_old.lcd
Method file	: 99483_99485_mrm_201210.lcm



Appendix figure 3-3-4 LC-MS/MS chromatogram at 2 days after exposure (before renewal).

Additional data

予備試験結果

1. 被験物質の試験用水への溶解度

設定濃度	100 mg/L
調製方法	供試試料と試験用水を混合して攪拌
温 度	26±1℃
攪拌時間	48 時間
不溶物除去	1 時間静置後、採取した中層をメンブランフィルター（PVDF, 孔径 0.45 μm, Merck）で吸引ろ過した。なお、フィルターはあらかじめ約 50 mL の試験液で洗浄を行った（フィルター吸着がないことは確認済み）
測定方法	Appendix 2 と同様

<溶解度測定結果>

試料名	測定濃度 (mg/L)	算術平均値 (mg/L)
	48 時間攪拌後	
試料-1	0.415	0.491
試料-2	0.473	
試料-3	0.584	

試験用水への溶解度:0.491 mg/L

2. 生物予備試験

2.1 予備試験

暴露方式	半止水式（週 3 回、2 日または 3 日ごとに換水）
試験生物数	15 個体/試験容器
連数	2 連/試験区
試験液量	約 50 mL/試験容器
試験液調製法	100 mg/L になるように供試試料と試験用水を混合し、48 時間攪拌後、メンブランフィルター（PVDF、孔径 0.45 μm、Merck）でろ過して調製した試験原液をそのまま若しくは試験用水で適宜希釈して各試験液を調製した。
分析	試験液中の被験物質濃度の測定を行った。

<試験生物への影響（平均値）>

試験原液含有率 (%)	生存率 (%)	ふ化率 (%) [暴露 5 日後まで]	ふ化後生存率 (%)	生存指標	観察された症状 (暴露終了時)
対照区	93.3	96.7	96.7	93.3	-
1.00	96.7	96.7	100	96.7	-
10.0	100	100	100	100	-
100	96.7	96.7	96.7	93.6	RA(14) CV(2) EA(9)

-は症状が観察されなかったことを示す。

RA：活動度の低下

CV：体幹の湾曲

EA：腹部膨満

<試験液中の被験物質濃度>

試験原液含有率 (%)	測定濃度 (mg/L) (対開始時濃度%)	
	暴露開始時	暴露 3 日後（換水前）
1.00	0.00505	0.00479 (94.9)
100	0.464	0.443 (95.6)

3. 本試験条件

試験区	試験原液含有率として 100、50.0、25.0、12.5、6.25%（公比 2.0） 及び対照区
暴露方式	半止水式（週 3 回、2 日または 3 日ごとに換水）
濃度分析	暴露開始時、換水前後及び暴露終了時又は全個体死亡確認時に実施