

受付番号	662-20-E-9487
試験番号	99487

試験報告書

ヒドロクロロチアジドのニセネコゼミジンコを用いるミジンコ繁殖試験

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 37

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	6
8.1 被験物質	6
8.2 試験生物	7
9. 試験の実施	8
9.1 試験用水	8
9.2 試験器具及び装置	8
9.3 試験液の調製法	8
9.4 試験条件	9
9.5 観察と測定	9
9.6 結果の算出	10
9.7 LOEC 及び NOEC の算出	10
9.8 親個体の LC ₅₀	10
9.9 試験の有効性	10
9.10 数値の取扱い	10
10. 試験結果及び考察	11
10.1 試験生物の一般状態	11
10.2 試験液の観察と測定	11
10.3 結果の算出	11
10.4 LOEC および NOEC の算出	12
10.5 親個体の LC ₅₀	12
10.6 考 察	12
11. 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	12

Tables

Table 1	Cumulative number of dead parent	13
Table 2	Cumulative number of juveniles produced per adult parent.....	13
Table 3	Temperature of test solutions.....	14
Table 4	Dissolved oxygen concentration of test solutions	14
Table 5	pH of test solutions.....	15
Table 6	Salinity of test solutions	15
Table 7	LOEC and NOEC	16
Table 8	Result of statistical analysis.....	16
Table 9	LC ₅₀ to parent <i>Ceriodaphnia dubia</i>	16

Figure

Figure 1	Average cumulative number of juveniles produced per adult parent.	17
----------	--	----

Appendix 1	被験物質濃度の測定方法及び結果
Appendix 2	検量線及びクロマトグラム
Additional data 1	予備試験結果
Additional data 2	暴露期間中の産仔状況

1. 表 題

ヒドロクロロチアジドのニセネコゼミジンコを用いるミジンコ繁殖試験

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

ヒドロクロロチアジドのミジンコ類の繁殖に対する影響を調べ、最小影響濃度（LOEC）、最大無影響濃度（NOEC）、可能ならば親個体の半数致死濃度（LC₅₀）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 3. ニセネコゼミジンコを用いるミジンコ繁殖試験法」
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. 211, October 2, 2012, "Daphnia magna Reproduction Test"
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 19 日
実 験 終 了 日	2021 年 2 月 26 日
試 験 終 了 日	2021 年 3 月 19 日

7. 要 約

被験試料

ヒドロクロロチアジド

試験目的

ヒドロクロロチアジドのミジンコ類の繁殖に対する影響を調べ、最小影響濃度 (LOEC)、最大無影響濃度 (NOEC)、可能ならば親個体の半数致死濃度 (LC₅₀) 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 3. ニセネコゼミジンコを用いるミジンコ繁殖試験法」
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. 211, October 2, 2012, "Daphnia magna Reproduction Test"
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	ニセネコゼミジンコ (<i>Ceriodaphnia dubia</i>) 生後 1 週間以上経過した成熟個体が産仔した 3 腹目以降の生後 24 時間以内の雌幼体
試験用水	ミネラルウォーター (Volvic/Evian 9/1 v/v)
試験区	設定濃度として 100、31.6、10.0、3.16、1.00 mg/L (公比 $\sqrt{10}$) の 5 濃度区及び対照区
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、24 時間攪拌し、溶解させて調製した試験原液を用いて調製
暴露方式	半止水式 (3 回/週、試験液の全量を交換)
暴露期間	7 日間
連 数	10 連/試験区
試験生物数	10 個体/試験区 (1 個体/試験容器)
試験液量	約 150 mL/試験区 (約 15 mL/試験容器)
水 温	25.2~25.7°C
pH 調整	無し
照 明	室内灯、16 時間明/8 時間暗
給 餌	1 日 1 個体当たり YCT (50µL) と <i>Chlorella vulgaris</i> (有機炭素換算量 0.02~0.05 mgC/個体を目安) を毎日給餌
被験物質濃度の測定	HPLC 法 (暴露開始時、換水前後及び暴露終了時)

試験結果

LC ₅₀ (親個体の半数致死濃度)	>100 mg/L
LOEC	3.16 mg/L
NOEC	1.00 mg/L

(上記濃度は、設定濃度に基づく値)

8. 試験材料

8.1 被験物質

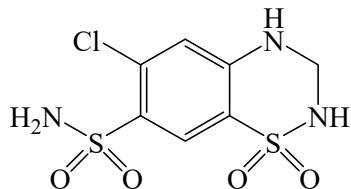
a) 名称等

名 称 ヒドロクロロチアジド

CAS 番号 58-93-5

b) 構造式等

構造式

分子式 C₇H₈ClN₃O₄S₂

分子量 297.74

c) 供試試料

被験物質純度 99.6%

供給者 富士フィルム和光純薬株式会社

ロット番号 SKM6640

被験物質の純度は 100% として取り扱った。

d) 物理化学的性状

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。

8.2 試験生物

種	ニセネコゼミジンコ (<i>Ceriodaphnia dubia</i>)
生物種選択の理由	5.試験法 a)に推奨されている種
入手源	国立研究開発法人国立環境研究所(その後、当試験施設で自家生産)
じゅん化	シングルカルチャーは、試験条件と同じ水質、水温 ($25\pm1^{\circ}\text{C}$) 及び明暗周期 (16 時間明/8 時間暗) でじゅん化した。約 15 mL の飼育水を満たした容器で 1 個体ずつ飼育を行い、飼育開始から 7 日間の産仔数を記録した。継代飼育中はミジンコ 1 個体当たり YCT (Yeast・Cerophyll・Trout Chow) を 50 μL 及び <i>Chlorella vulgaris</i> を有機炭素換算量として 0.02~0.05 mgC になるよう 1 日に 1 回給餌した。
幼体の選別	試験に使用するシングルカルチャーは以下の条件を満たしたものとした。①試験前 7 日間の平均死亡率が 20%を超えない。②試験に用いる 3 腹目以降の産仔数が 1 親個体あたり 8 個体以上であること。③試験前 7 日間の 3 腹分の累積産仔数の平均値が 15 個体以上であること。④休眠卵が観察されないこと。 試験に使用した幼体は、生後 1 週間以上経過した成熟個体が産仔した (3 腹目以降の) 生後 24 時間以内の雌の幼体で、可能な限り生後 12 時間以内の個体 (成長のばらつきを目視で確認) とした。
群分け	同じ親個体から産まれた同一腹仔の幼体を全ての試験濃度に配置し、これを 1 群とし、その群の繰り返し数 (10 連) を準備した。
試験系の再現性の確認	基準物質による繁殖試験を実施 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、富士フィルム和光純薬) 実施期間：2020 年 8 月 28 日~9 月 3 日 NOEC : 400 mg/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=800、400、800、800、400、800、800、590、890、590、890 及び 590 mg/L, n=12) 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。

9. 試験の実施

9.1 試験用水

市販のミネラルウォーターを混合したもの(Volvic^{*1}/Evian^{*2} 9/1 v/v、硬度約80 mg CaCO₃/L)を用いた。溶存酸素濃度が飽和濃度の90%未満にならないようエアレーションを行った。

*¹販売元 キリンビバレッジ (1.5 L ペットボトル)

栄養成分表示 (製品 100 mL 当たり、硬度 60 mg/L、pH 7.0)

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

*²販売元 伊藤園 (1.5 L ペットボトル)

栄養成分表示 (100 mL 当たり、硬度 304 mg/L、pH 7.2)

ナトリウム	0.7 mg
カルシウム	8.0 mg
マグネシウム	2.6 mg

9.2 試験器具及び装置

試験容器 50 mL 容ガラス製容器

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)

9.3 試験液の調製法

供試試料 0.0500 g をひょう量し、試験用水 500 mL と混合後、マグネティックスターーラーで 24 時間攪拌し溶解させて 100 mg/L の試験原液を調製した。調製容器にて必要量の試験原液と対照区と同様の攪拌処理をした試験用水を混合して試験液を調製し、各試験容器に分割した。調製した試験液は、恒温槽内に静置して水温を試験温度付近に調整した。

9.4 試験条件

暴露方式	半止水式（3回/週、試験液の全量を交換）
暴露期間	7日間（対照区で60%以上の個体が3腹以上産仔した日まで）
試験濃度	設定濃度として100、31.6、10.0、3.16、1.00 mg/L（公比 $\sqrt{10}$ ） 試験濃度は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 1に示す。
対照区	試験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	10連/試験区
試験生物数	10個体/試験区（1個体/試験容器）
試験液量	約150 mL/試験区（約15 mL/試験容器）
水 温	25±1°C
pH 調整	無し
照 明	室内灯による16時間明/8時間暗
給 餌	1日1個体当たりYCT（50μL）と <i>Chlorella vulgaris</i> （有機炭素換算量0.02～0.05 mgC/個体を目安）を毎日給餌した。

9.5 観察と測定

a) 試験生物の一般状態

暴露開始後から終了時まで毎日、親個体の生死を観察した。

親個体が産出した生存幼体数を初産日から暴露終了時まで毎日計数した（死亡幼体数は計数しなかった）。また、観察時に休眠卵の有無などを観察した。

b) 試験液の状態

暴露期間中に1回、試験液の状態を調製時及び換水前に観察

c) 試験液の水質及び環境条件

測定項目	溶存酸素濃度、pH、水温、塩分
測定頻度	暴露開始時、換水前後及び暴露終了時 塩分は暴露開始時（調製時）のみ測定
測定方法	調製容器より別途分取した試験液について測定（調製時） 各試験容器より分取し、混合したものについて測定（換水前、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) ガラス製棒状温度計 電気伝導率計 CM-31P (東亜ディーケー)

d) 試験液中の被験物質濃度

測定頻度	暴露開始時、換水前後及び終了時
採水方法	調製容器より別途分取（調製時） 各試験容器より分取し、混合したものについて測定（換水前、暴露終了時）
餌除去	遠心分離（3000 rpm, 10 分間）（換水前、暴露終了時のみ実施）
採水量	約 10 mL（全試験区）
測定方法	Appendix 1 参照

9.6 結果の算出

暴露期間中に測定した試験液中の被験物質濃度が設定濃度の 80~120%の範囲内であつたため、結果の算出には設定濃度を用いた。暴露試験から得られたデータをもとに、累積産仔数を試験容器ごとに算出した。累積産仔数は、対照区における親個体の 60%以上が 3 腹産仔した時点（暴露開始 7 日後まで）における初産から最大 3 腹分の産仔数を容器ごとに集計した。

9.7 LOEC 及び NOEC の算出

産仔数について、対照区と比較して統計学的に有意な低下が認められた最も低い試験濃度を LOEC、その一つ下の試験濃度を NOEC とした（ただし、LOEC より高濃度では、LOEC と同等以上の影響がみられること）。

有意差検定は 5. 試験法 a)（第 4 部 1. 統計解析-最大無影響濃度（NOEC）の算出）に従って実施し、有意水準 5%、片側検定とした。始めに Bartlett 法による等分散検定を行い、等分散性が認められたため、Dunnett の多重比較検定により検定を行った。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、LOEC 及び NOEC を評価した。

9.8 親個体の LC₅₀

本試験濃度範囲で 50%以上の死亡率が得られなかつたため、LC₅₀は「>試験最高濃度」と表示した。

9.9 試験の有効性

- a) 暴露終了時に対照区の親個体の死亡率が 20%以下であること。
- b) 暴露期間中に対照区における親個体の 60%以上が最大 8 日間で 3 腹分の産仔をすること。
- c) 対照区における最初の 3 腹の累積産仔数が平均して 15 個体以上であること。
- d) 対照区において休眠卵の生産が確認されないこと。

9.10 数値の取扱い

数値の丸め方は、JIS Z 8401: 2019 規則 B に従つた。

10. 試験結果及び考察

10.1 試験生物の一般状態

暴露期間中における親個体の累積死亡数を Table 1 に、試験法に従って集計した累積産仔数を Table 2 に示す。

100、31.6 及び 3.16 mg/L 区においてそれぞれ 4 個体、2 個体及び 1 個体の親個体の死亡がみられた。親個体の死亡についてコクラン・アーミテージの傾向検定（シングルステップ）を実施したところ、濃度依存性が認められたため死亡親個体の結果は集計に含めた。暴露終了時の対照区の親個体の死亡率は 0% であったため、有効性基準を満たしていた。

このほか、全試験濃度区について、休眠卵の生産は確認されなかった。

10.2 試験液の観察と測定

a) 試験液の状態

暴露開始時は全試験区で無色透明であった。換水前は全試験区で餌由来と思われる淡黄緑色透明を呈していた。

b) 試験液の水質

試験液の温度を Table 3、溶存酸素濃度を Table 4、pH を Table 5、塩分を Table 6 に示す。

暴露期間中に測定した水温は 25.2～25.7°C、溶存酸素濃度は 7.1～8.4 mg/L、pH は 8.1～8.3、暴露開始時に測定した塩分は 0.01% であった。

c) 試験液中の被験物質濃度

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 0.991～98.7 mg/L（設定濃度に対して 93.6～104%）、換水前及び暴露終了時で 0.959～98.1 mg/L（設定濃度に対して 92.7～102%）であり、設定濃度の 80～120% 以内に維持されていた。

10.3 結果の算出

暴露期間中の各試験区における親個体 1 個体当たりの平均累積産仔数の結果及びグラフを Table 2 及び Figure 1、暴露期間中の産仔状況の結果を Additional data 2 に示す。

暴露試験から得られたデータをもとに、親個体 1 個体当たりの平均累積産仔数を各試験区で算出した。対照区において暴露開始 7 日後の時点で 60% 以上の個体が 3 腹産仔したため、全試験区において暴露開始 7 日後までの結果を集計した。

平均累積産仔数は、対照区、1.00、3.16、10.0、31.6 及び 100 mg/L 区でそれぞれ 17.7、16.2、12.9、12.8、7.9 及び 6.4 個体であった。対照区の 60% 以上の個体が 3 腹産仔しており、累積産仔数が平均して 15 個体以上であったため、有効性基準を満たしていた。

10.4 LOEC および NOEC の算出

LOEC 及び NOEC を Table 7、有意差検定結果を Table 8 に示す。

各試験区の累積産仔数について有意差検定を行った結果、3.16 mg/L 区以上の試験濃度区において対照区と比較して統計学的な有意差 ($p<0.05$) が認められた。

以上の結果より、有意差検定結果及び試験全体の結果を考慮し、LOEC は 3.16 mg/L、NOEC は 1.00 mg/L とした。

10.5 親個体の LC₅₀

暴露開始 7 日後までの親個体の LC₅₀ を Table 9 に示す。

暴露開始 7 日後までの親個体の LC₅₀ は>100 mg/L であった。

10.6 考 察

試験は被験試料のニセネコゼミジンコに対する繁殖の影響を求める試験として行った。その結果、LOEC は 3.16 mg/L、NOEC は 1.00 mg/L、親個体の LC₅₀ は>100 mg/L であった。試験液中の被験物質濃度は設定濃度の 80~120%以内に維持され、また、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。

11. 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 Cumulative number of dead parent

Nominal concentration (mg/L)	Exposure day							
	0	1	2	3	4	5	6	7
Control	0	0	0	0	0	0	0	0
	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)
1.00	0	0	0	0	0	0	0	0
	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)
3.16	0	0	0	0	0	0	0	1
	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(10)
10.0	0	0	0	0	0	0	0	0
	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)
31.6	0	1	1	1	1	2	2	2
	(0)	(10)	(10)	(10)	(10)	(20)	(20)	(20)
100	0	0	0	0	0	0	2	4
	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(20)	(40)

The values in parentheses express cumulative mortality (%) of parental *Ceriodaphnia dubia*.

Table 2 Cumulative number of juveniles produced per adult parent

Nominal concentration (mg/L)	Vessel										Mean \pm S.D.
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	
Control	22	18	24	20	16	16	24	15	17	5	17.7 ± 5.6
1.00	18	13	17	14	14	18	16	15	15	22	16.2 ± 2.7
3.16	16	13	17	1 ^a	17	15	18	15	9	8	12.9 ± 5.4
10.0	8	20	13	12	12	14	17	9	12	11	12.8 ± 3.6
31.6	0 ^a	0 ^a	13	12	8	5	15	10	5	11	7.9 ± 5.3
100	1	14	6 ^a	6	0 ^a	8 ^a	13 ^a	2	6	8	6.4 ± 4.7

a : Parental *Ceriodaphnia dubia* died. This value was included in evaluation.

Table 3 Temperature of test solutions

Nominal concentration (mg/L)		Exposure day				
		0	3	3	5	5
Control	New	25.3		25.7		25.3
	Old		25.6		25.4	25.2
1.00	New	25.3		25.7		25.3
	Old		25.6		25.4	25.2
3.16	New	25.3		25.7		25.3
	Old		25.6		25.4	25.2
10.0	New	25.3		25.7		25.3
	Old		25.6		25.4	25.2
31.6	New	25.3		25.7		25.3
	Old		25.6		25.4	25.2
100	New	25.3		25.7		25.3
	Old		25.6		25.4	25.2

New: Freshly prepared test solutions

Old: Test solutions before renewal

Unit: °C

Table 4 Dissolved oxygen concentration of test solutions

Nominal concentration (mg/L)		Exposure day				
		0	3	3	5	5
Control	New	8.2		8.1		8.4
	Old		7.5		7.8	8.3
1.00	New	8.2		8.1		8.4
	Old		7.1		7.7	8.2
3.16	New	8.2		8.0		8.4
	Old		7.4		7.9	8.2
10.0	New	8.2		8.0		8.4
	Old		7.3		8.0	8.2
31.6	New	8.2		8.1		8.4
	Old		7.6		8.0	8.2
100	New	8.2		8.0		8.3
	Old		7.7		8.1	8.2

New: Freshly prepared test solutions

Old: Test solutions before renewal

Unit: mg/L

Table 5 pH of test solutions

Nominal concentration (mg/L)	Exposure day					
	0	3	3	5	5	7
Control	New	8.3		8.3		8.3
	Old		8.1		8.2	8.2
1.00	New	8.3		8.3		8.3
	Old		8.1		8.2	8.3
3.16	New	8.3		8.3		8.3
	Old		8.2		8.2	8.3
10.0	New	8.3		8.3		8.3
	Old		8.2		8.3	8.3
31.6	New	8.3		8.3		8.3
	Old		8.2		8.3	8.3
100	New	8.2		8.2		8.2
	Old		8.2		8.3	8.3

New: Freshly prepared test solutions

Old: Test solutions before renewal

Table 6 Salinity of test solutions

Nominal concentration (mg/L)	At the start
Control	0.01
1.00	0.01
3.16	0.01
10.0	0.01
31.6	0.01
100	0.01

Unit: %

Table 7 LOEC and NOEC

LOEC (mg/L)	NOEC (mg/L)
3.16	1.00

Table 8 Result of statistical analysis

Nominal concentration (mg/L)	Statistical analysis	Statistical procedure
1.00	n.s.	Bartlett's test Dunnett's test
3.16	*	
10.0	*	
31.6	**	
100	**	

n.s. : No significant difference

* : Significant difference ($p < 0.05$)

** : Significant difference ($p < 0.01$)

Table 9 LC₅₀ to parent *Ceriodaphnia dubia*

Exposure duration	LC ₅₀ (mg/L)	95% confidence limits (%)	Statistical procedure used for determination of LC ₅₀
7-day	>100	-	-

- : Not obtained

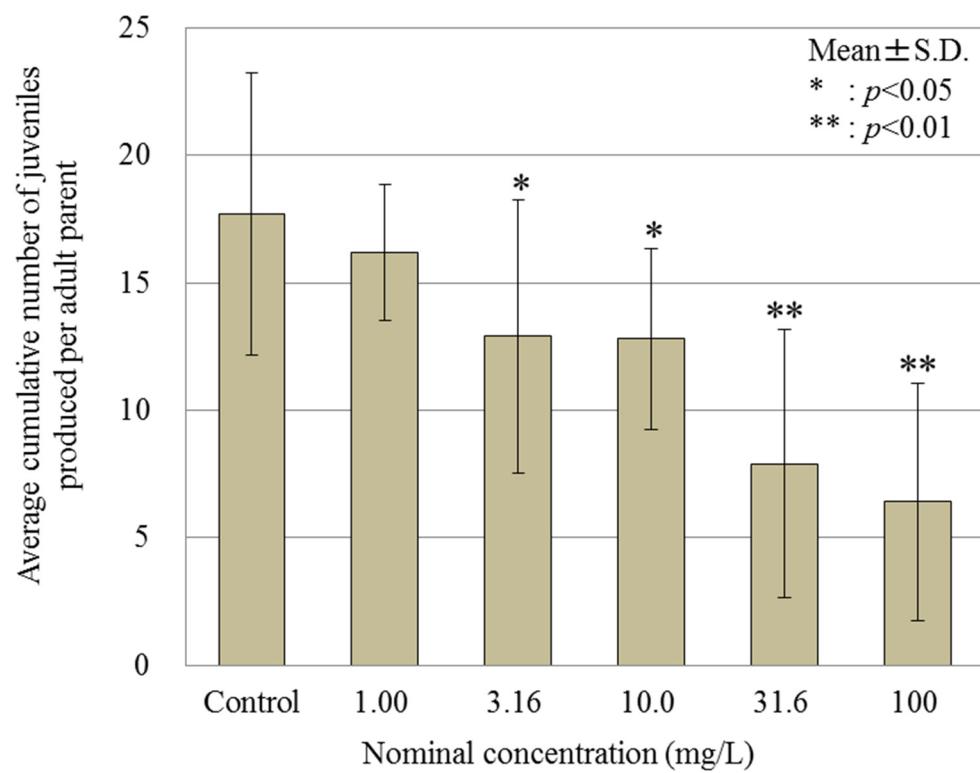


Figure 1 Average cumulative number of juveniles produced per adult parent.

Appendix 1

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、そのまま若しくは Volvic/Evian (9/1 v/v) で適宜希釀して高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 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 0.100、0.500、1.00、2.00 及び 4.00 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 2-1 参照）。また、HPLC 試料の分析によって得られたクロマトグラム（一例）を Appendix 2 に示す。

試験液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 (0.100 mg/L) とした。

b) 分析条件

機 器	高速液体クロマトグラフ (機器番号 LC-176)	
ポンプ	LC-20AD	(島津製作所)
紫外可視分光検出器	SPD-20AV	(島津製作所)
カラムオーブン	CTO-20AC	(島津製作所)
オートインジェクター	SIL-20AC _{HT}	(島津製作所)
デガッサー	DGU-20A _{3R}	(島津製作所)
カラム	L-column C8 (150 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°C	
溶離液	A (60%) : アセトニトリル B (40%) : 超純水	
流 量	0.2 mL/min	
測定波長	270 nm	
注入量	1 µL	

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、アセトニトリルに溶解して 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:99486 で実施）。これを Volvic/Evian (9/1 v/v) で希釀して 20.0 mg/L の被験物質溶液を調製した。さらにこれを Volvic/Evian (9/1 v/v) で希釀して 2.00 mg/L の標準溶液を調製した。

HPLC 試料中の被験物質濃度は、標準溶液及び HPLC 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 1-1 Measured concentration of test item in test solution

Nominal concentration (mg/L)	Measured concentration (mg/L)						
	(Percentage of measured concentration versus nominal concentration %)						
	At the start	3 days		5 days		At the end	Time-weighted mean
		Old	New	Old	New		
Control	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	
1.00	0.995 (99.5)	0.984 (98.4)	1.04 (104)	0.959 (95.9)	0.991 (99.1)	1.02 (102)	0.997 (99.7)
3.16	3.14 (99.4)	2.96 (93.7)	3.18 (101)	3.04 (96.3)	3.04 (96.1)	3.18 (101)	3.08 (97.6)
10.0	9.77 (97.7)	9.29 (92.9)	9.64 (96.4)	9.48 (94.8)	9.36 (93.6)	9.74 (97.4)	9.54 (95.4)
31.6	31.2 (98.8)	29.9 (94.5)	30.7 (97.2)	30.1 (95.2)	29.9 (94.7)	31.0 (98.0)	30.5 (96.4)
100	98.7 (98.7)	92.7 (92.7)	97.0 (97.0)	95.2 (95.2)	94.4 (94.4)	98.1 (98.1)	96.0 (96.0)

Old : Before the renewal

New : After the renewal

LOQ : 0.100 mg/L

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

$$[3(C_0 - C_{3E})/(\ln C_0 - \ln C_{3E}) + 2(C_{3S} - C_{5E})/(\ln C_{3S} - \ln C_{5E}) + 2(C_{5S} - C_7)/(\ln C_{5S} - \ln C_7)]/7$$

where

C_n : the measured concentration at n days

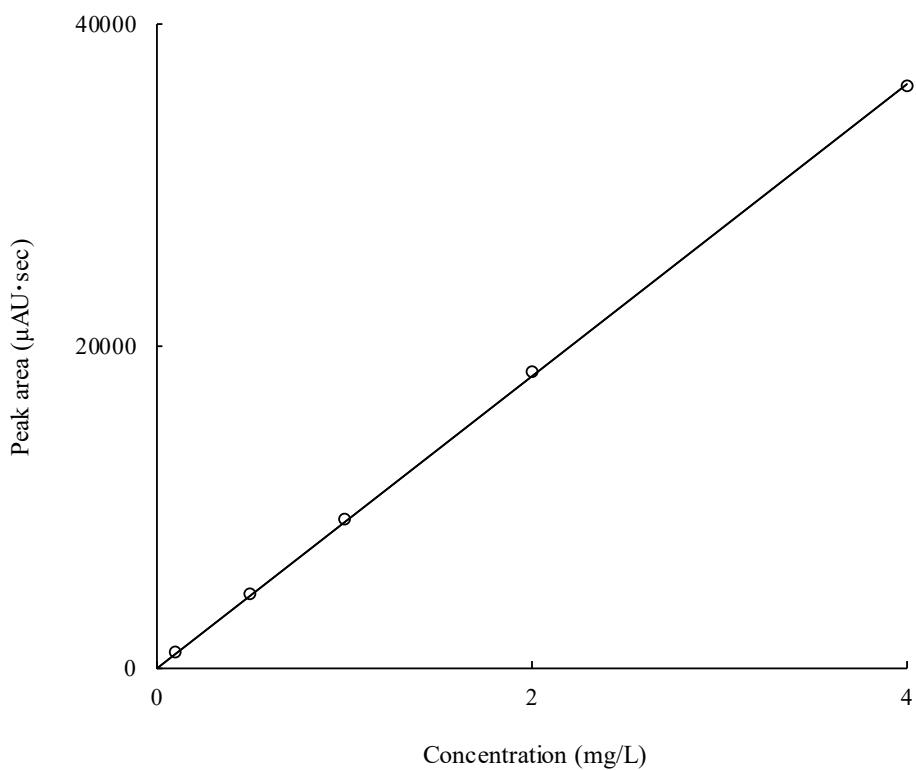
$\ln C_n$: the natural logarithm of C_n

E : Before the renewal

S : After the renewal

Appendix 2

検量線及びクロマトグラム



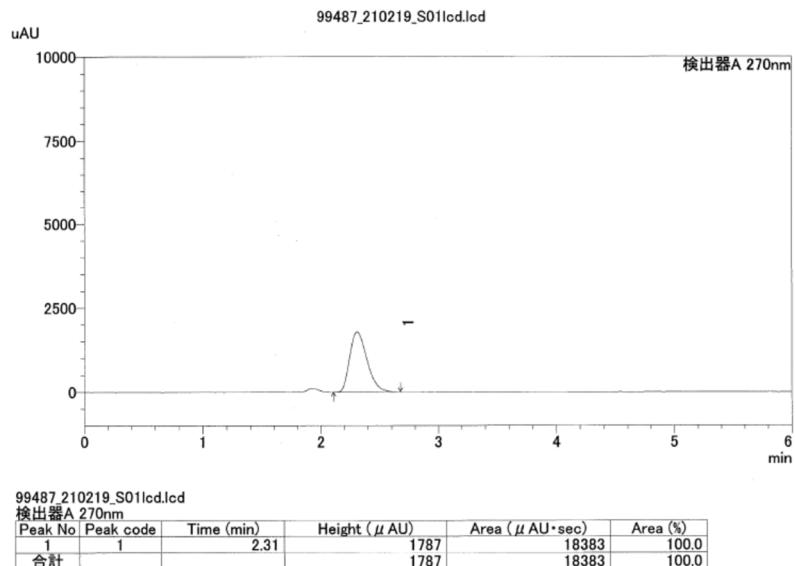
$$y = 9059x$$

$$r = 1.00$$

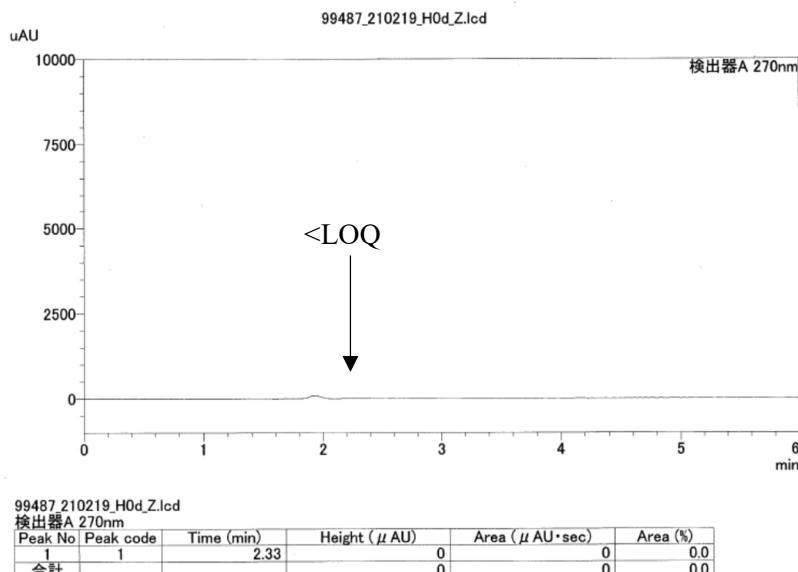
Concentration (mg/L)	Peak area ($\mu\text{AU}\cdot\text{sec}$)
0.100	991
0.500	4592
1.00	9161
2.00	18355
4.00	36084

Appendix figure 2-1 Calibration curve of test item for analysis by HPLC.

Sample ID : 99487
 Sample Name : Standard solution 2.00 mg/L
 Vial# : 1
 Injection Volume : 1
 Month-Day Acquired : 2021/02/19
 Data File : 99487_210219_S01lcd.lcd
 Original Method File : 99486_99488 - 99486_99488.lcm
 Acquired by : Kaho Murakami

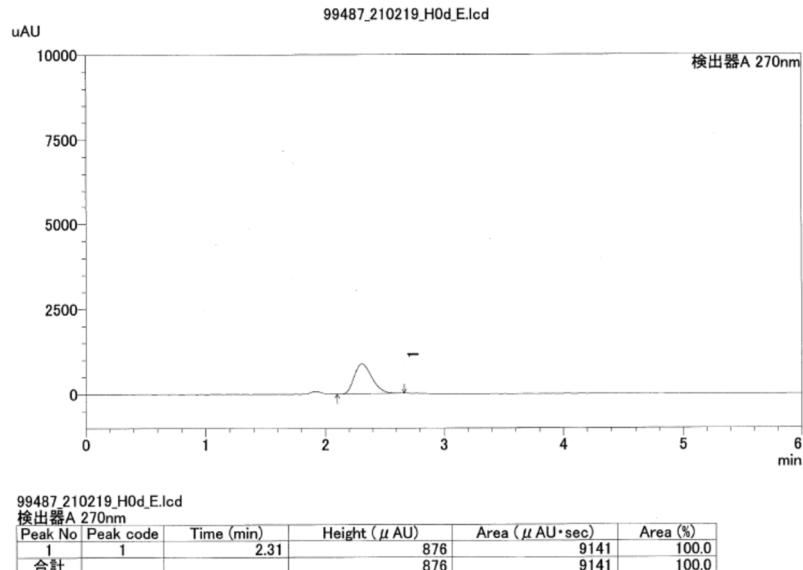


Sample ID : 99487
 Sample Name : Control
 Vial# : 2
 Injection Volume : 1
 Month-Day Acquired : 2021/02/19
 Data File : 99487_210219_H0d_Z.lcd
 Original Method File : 99486_99488 - 99486_99488.lcm
 Acquired by : Kaho Murakami

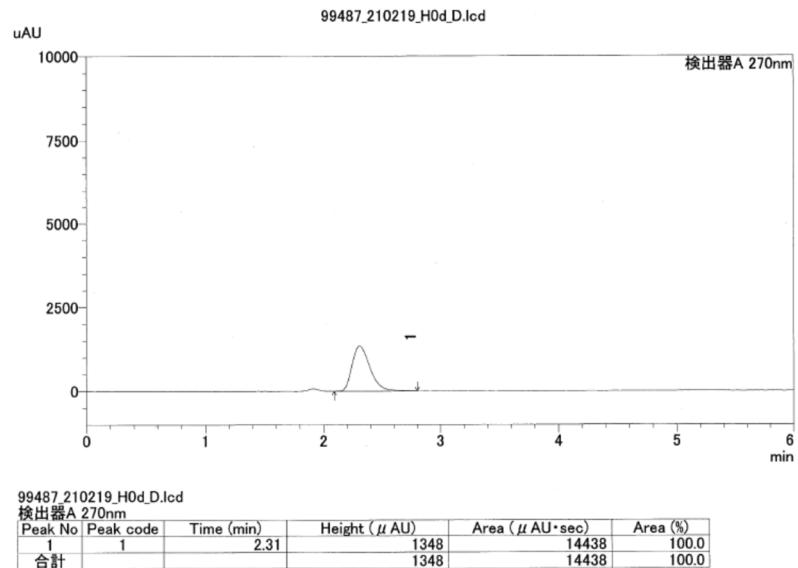


Appendix figure 2-2-1 HPLC chromatograms at start of exposure.

Sample ID : 99487
 Sample Name : 1.00 mg/L exposure level
 Vial# : 3
 Injection Volume : 1
 Month-Day Acquired : 2021/02/19
 Data File : 99487_210219_H0d_E.lcd
 Original Method File : 99486_99488 - 99486_99488.lcm
 Acquired by : Kaho Murakami

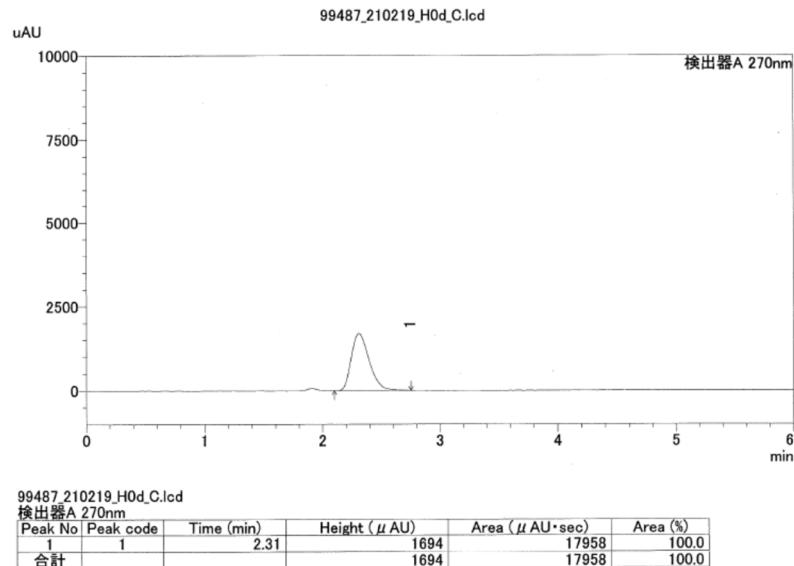


Sample ID : 99487
 Sample Name : 3.16 mg/L exposure level
 Vial# : 4
 Injection Volume : 1
 Month-Day Acquired : 2021/02/19
 Data File : 99487_210219_H0d_D.lcd
 Original Method File : 99486_99488 - 99486_99488.lcm
 Acquired by : Kaho Murakami

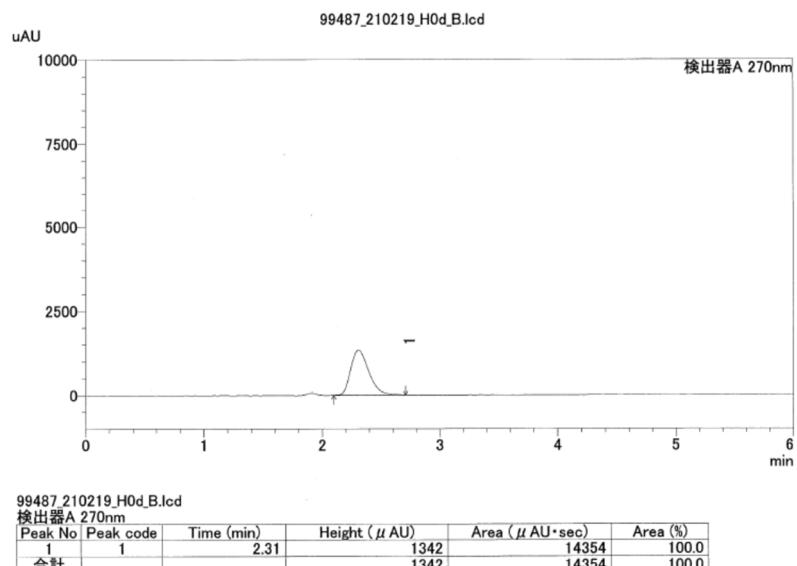


Appendix figure 2-2-2 HPLC chromatograms at start of exposure.

Sample ID : 99487
 Sample Name : 10.0 mg/L exposure level
 Vial# : 5
 Injection Volume : 1
 Month-Day Acquired : 2021/02/19
 Data File : 99487_210219_H0d_C.lcd
 Original Method File : 99486_99488 - 99486_99488.lcm
 Acquired by : Kaho Murakami

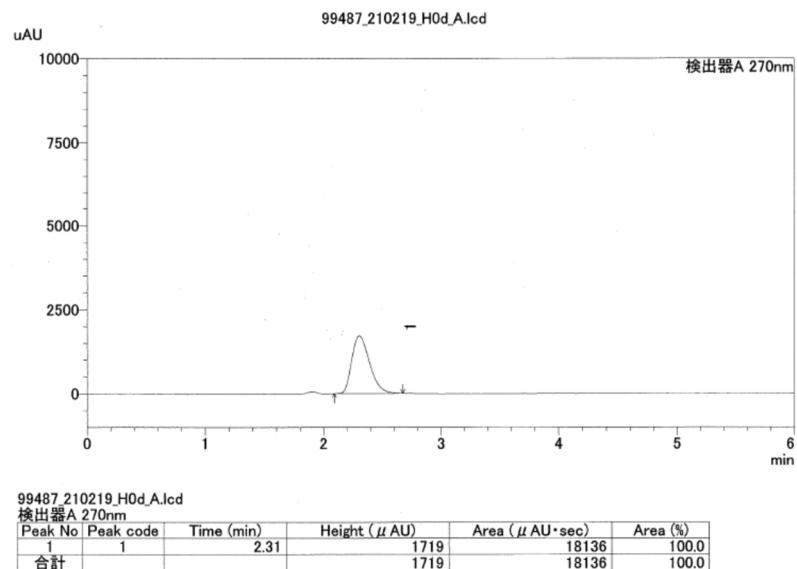


Sample ID : 99487
 Sample Name : 31.6 mg/L exposure level
 Vial# : 6
 Injection Volume : 1
 Month-Day Acquired : 2021/02/19
 Data File : 99487_210219_H0d_B.lcd
 Original Method File : 99486_99488 - 99486_99488.lcm
 Acquired by : Kaho Murakami



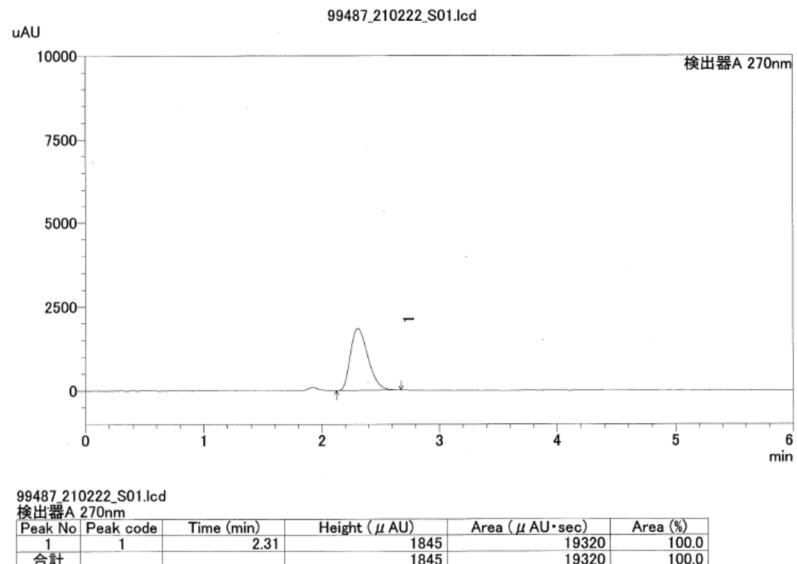
Appendix figure 2-2-3 HPLC chromatograms at start of exposure.

Sample ID : 99487
Sample Name : 100 mg/L exposure level
Vial# : 7
Injection Volume : 1
Month-Day Acquired : 2021/02/19
Data File : 99487_210219_H0d_A.lcd
Original Method File : 99486_99488 - 99486_99488.lcm
Acquired by : Kaho Murakami

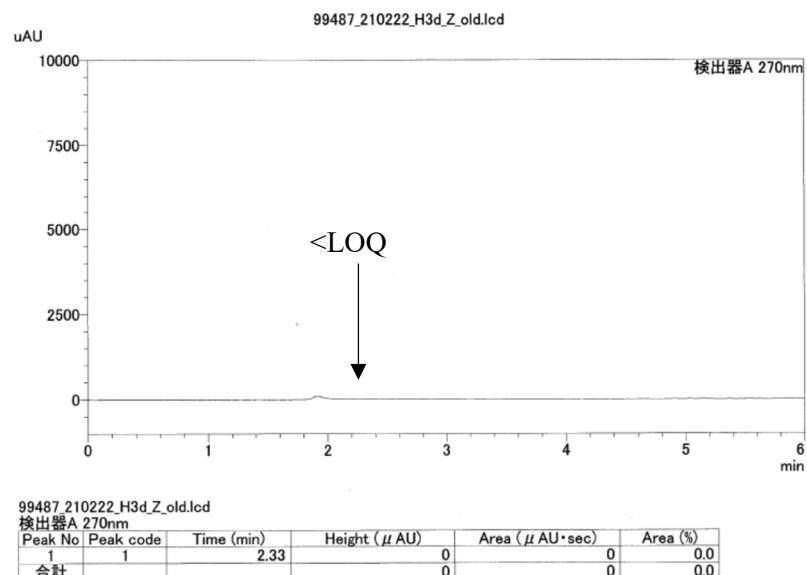


Appendix figure 2-2-4 HPLC chromatogram at start of exposure.

Sample ID : 99487
 Sample Name : Standard solution 2.00 mg/L
 Vial# : 1
 Injection Volume : 1
 Month-Day Acquired : 2021/02/22
 Data File : 99487_210222_S01.lcd
 Original Method File : 99486_99488 - 99486_99488.lcm
 Acquired by : Kaho Murakami

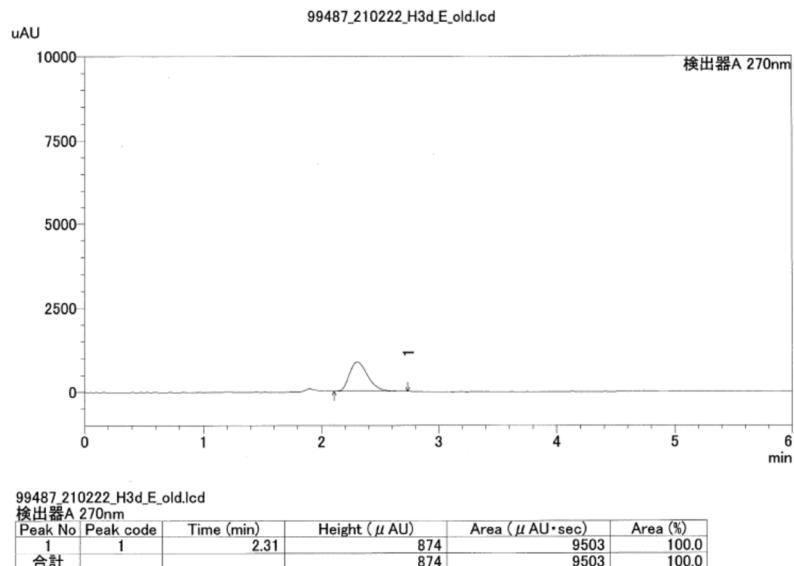


Sample ID : 99487
 Sample Name : Control
 Vial# : 2
 Injection Volume : 1
 Month-Day Acquired : 2021/02/22
 Data File : 99487_210222_H3d_Z_old.lcd
 Original Method File : 99486_99488 - 99486_99488.lcm
 Acquired by : Kaho Murakami

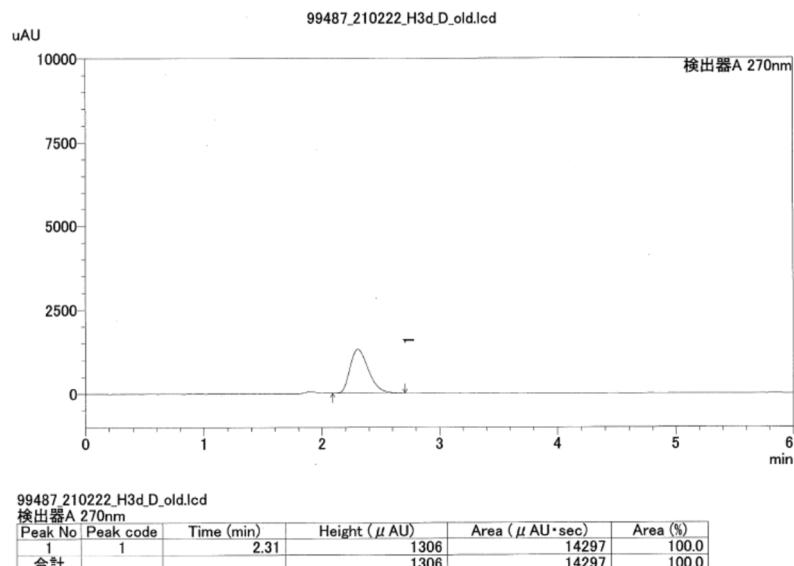


Appendix figure 2-3-1 HPLC chromatograms at 3 days after exposure (before renewal).

Sample ID : 99487
 Sample Name : 1.00 mg/L exposure level
 Vial# : 3
 Injection Volume : 1
 Month-Day Acquired : 2021/02/22
 Data File : 99487_210222_H3d_E.old.lcd
 Original Method File : 99486_99488 - 99486_99488.lcm
 Acquired by : Kaho Murakami

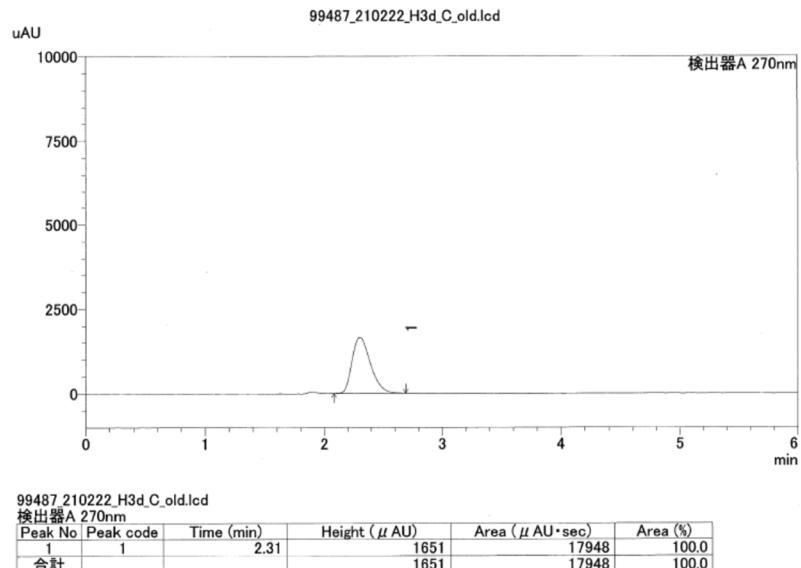


Sample ID : 99487
 Sample Name : 3.16 mg/L exposure level
 Vial# : 4
 Injection Volume : 1
 Month-Day Acquired : 2021/02/22
 Data File : 99487_210222_H3d_D.old.lcd
 Original Method File : 99486_99488 - 99486_99488.lcm
 Acquired by : Kaho Murakami

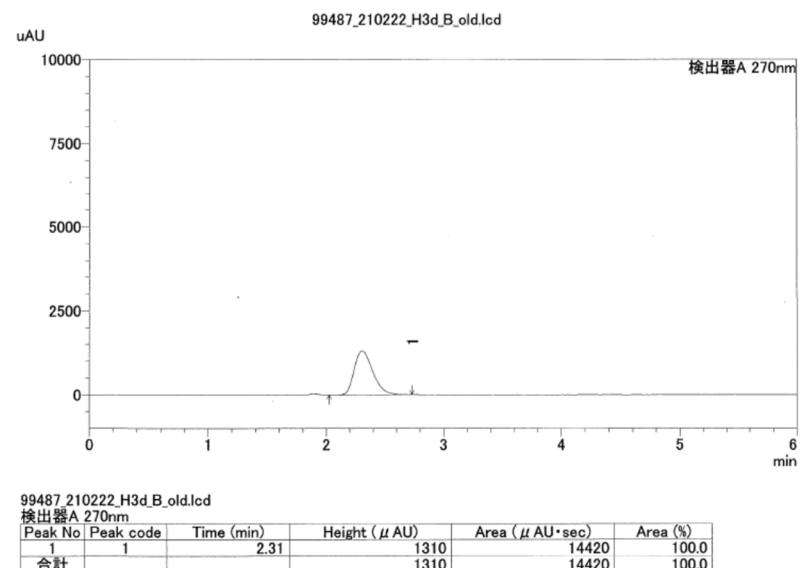


Appendix figure 2-3-2 HPLC chromatograms at 3 days after exposure (before renewal).

Sample ID : 99487
 Sample Name : 10.0 mg/L exposure level
 Vial# : 5
 Injection Volume : 1
 Month-Day Acquired : 2021/02/22
 Data File : 99487_210222_H3d_C.old.lcd
 Original Method File : 99486_99488 - 99486_99488.lcm
 Acquired by : Kaho Murakami

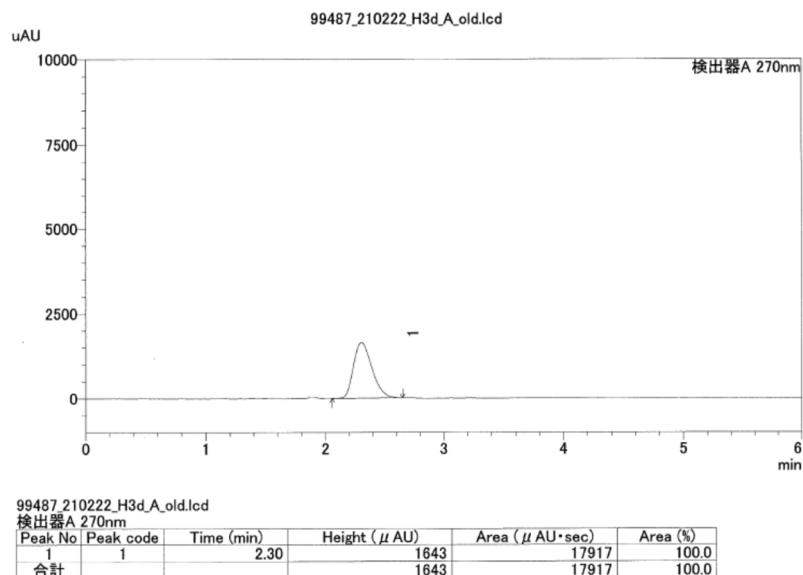


Sample ID : 99487
 Sample Name : 31.6 mg/L exposure level
 Vial# : 6
 Injection Volume : 1
 Month-Day Acquired : 2021/02/22
 Data File : 99487_210222_H3d_B.old.lcd
 Original Method File : 99486_99488 - 99486_99488.lcm
 Acquired by : Kaho Murakami



Appendix figure 2-3-3 HPLC chromatograms at 3 days after exposure (before renewal).

Sample ID : 99487
Sample Name : 100 mg/L exposure level
Vial# : 7
Injection Volume : 1
Month-Day Acquired : 2021/02/22
Data File : 99487_210222_H3d_A_old.lcd
Original Method File : 99486_99488 - 99486_99488.lcm
Acquired by : Kaho Murakami



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

Additional data 1

予備試験結果

1. 被験物質の試験用水への溶解度

被験物質の試験用水への溶解度は目視で 100 mg/L 以上と判断された。

2. 生物予備試験

試験濃度	設定濃度として 100、32.0、10.0、3.20、1.00 mg/L (公比 $\sqrt{10}$) 及び対照区
暴露方式	半止水式 (3 回/週、試験液の全量を交換)
暴露期間	7 日間
試験生物数	6 頭／試験区 (1 頭／試験容器)
試験液調製法	100 mg/L (設定) になるように被験物質と試験用水を混合、室温で 24 時間攪拌し、溶解させて調製した試験原液を試験用水で希釈して調製
給 餌	1 日 1 個体当たり YCT (50 μ L) と <i>Chlorella vulgaris</i> (有機炭素換算量 0.02 ~0.05 mgC/個体を目安) を毎日給餌
分 析	試験液中の被験物質濃度の測定を行った。
累積生存産仔数	コクラン・アーミテージ傾向検定の結果に基づき、暴露期間中に死亡した親ミジンコの産仔数について、3.20 mg/L 区は集計から除外し、100 mg/L 区は集計に含めて算出した。

<試験生物への影響>

設定濃度 (mg/L)	親ミジンコの 累積死亡率 (%)	累積生存産仔数/親 1 頭	
		平均	標準偏差
対照区	0	19.3	7.2
1.00	0	19.5	5.3
3.20	16.7	14.6	2.7
10.0	0	16.8	4.3
32.0	0	8.7	6.3
100	50.0	8.0	5.2

<試験液中の被験物質濃度>

設定濃度 (mg/L)	測定濃度 (mg/L) (対設定濃度%)	
	暴露開始時	暴露 3 日後 (換水前)
1.00	0.994 (99.4)	0.950 (95.0)
100	96.9 (96.9)	94.8 (94.8)

3. 本試験条件

試験区 設定濃度として 100、31.6、10.0、3.16、1.00 mg/L (公比 $\sqrt{10}$)
及び対照区

暴露方式 半止水式 (3 回/週、試験液の全量を交換)

Additional data 2

暴露期間中の産仔状況

Additional Table 1 Result of reproduction test

Control

Day	Vessel									
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	0	3	0	5	3	2	0	0	0	0
5	4	6	6	7	7	6	5	0	0	1
6	9	9	7	8	6	8	10	11	11	3
7	9	0	11	0	11 ^b	7 ^b	9	4	6	1
Total	22	18	24	20	16	16	24	15	17	5

b : This value was excluded from counting because of 4th breeding.

Additional Table 2 Result of reproduction test

1.00 mg/L

Day	Vessel									
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	4	2	2	4	0	4	2	0	0	0
5	0	4	7	8	7	4	4	3	0	6
6	7	7	8	0	7	10	10	10	11	10
7	7	6 ^b	7 ^b	2	0	4 ^b	7 ^b	2	4	6
Total	18	13	17	14	14	18	16	15	15	22

b : This value was excluded from counting because of 4th breeding.

Additional Table 3 Result of reproduction test

3.16 mg/L

Day	Vessel									
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	0	3	2	0	4	2	3	0	0	0
5	0	0	7	1	6	4	5	0	3	4
6	10	10	8	0	7	9	10	7	5	4
7	6	0	9 ^b	M	3 ^b	9 ^b	2 ^b	8	1	0
Total	16	13	17	1 ^a	17	15	18	15	9	8

M: Mortality of parental *Ceriodaphnia dubia*a : Parental *Ceriodaphnia dubia* died. This value was included in evaluation.b : This value was excluded from counting because of 4th breeding.

Additional Table 4 Result of reproduction test

10.0 mg/L

Day	Vessel									
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	4	0	2	3	0	0	0
5	2	3	6	3	2	4	5	0	3	3
6	0	7	2	5	10	8	9	4	7	8
7	6	10	5	0	0	8 ^b	3 ^b	5	2	0
Total	8	20	13	12	12	14	17	9	12	11

b : This value was excluded from counting because of 4th breeding.

Additional Table 5 Result of reproduction test

31.6 mg/L

Day	Vessel									
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	0	M	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	-	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0	-	0	0	0	0	0	0	0	0
4	0	-	4	2	0	0	2	3	0	0
5	M	-	4	5	3	3	4	1	1	4
6	-	-	5	5	5	2	9	6	4	7
7	-	-	0	0	0	0	0	0	0	0
Total	0 ^a	0 ^a	13	12	8	5	15	10	5	11

M: Mortality of parental *Ceriodaphnia dubia*a : Parental *Ceriodaphnia dubia* died. This value was included in evaluation.

Additional Table 6 Result of reproduction test

100 mg/L

Day	Vessel									
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	0	0	2	1	0	0	2	1	1	0
5	1	4	2	3	0	4	3	0	1	1
6	0	9	M(2)	0	M	0	8	0	4	7
7	0	1	-	2	-	M(4)	M	1	0	0
Total	1	14	6 ^a	6	0 ^a	8 ^a	13 ^a	2	6	8

M: Mortality of parental *Ceriodaphnia dubia*a : Parental *Ceriodaphnia dubia* died. This value was included in evaluation.