

受付番号	662-21-E-9838
試験番号	99838

試 験 報 告 書

アロプリノールのニセネコゼミジンコを用いるミジンコ繁殖試験

2022 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 33

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
8.2 試験生物	8
9. 試験の実施	9
9.1 試験用水	9
9.2 試験器具及び装置	9
9.3 試験液の調製法	9
9.4 試験条件	9
9.5 観察と測定	10
9.6 結果の算出	10
9.7 LOEC 及び NOEC の算出	11
9.8 親個体の LC ₅₀	11
9.9 試験の有効性	11
10. 数値の取扱い	11
11. 試験結果及び考察	11
11.1 試験生物の一般状態	11
11.2 試験液の観察と測定	11
11.3 結果の算出	12
11.4 LOEC 及び NOEC の算出	12
11.5 親個体の LC ₅₀	12
11.6 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	12

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 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

アロプリノール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

アロプリノール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 2022 年 1 月 13 日

実 験 開 始 日 2022 年 1 月 14 日

実 験 終 了 日 2022 年 1 月 21 日

試 験 終 了 日 2022 年 3 月 1 日

7. 要 約

被験物質

アロプリノール

試験目的

アロプリノール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>) 7 日齢の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 [サントリー天然水 (阿蘇)]
試験区	設定濃度として 0.800、0.320、0.128、0.0512、0.0205 mg/L (公比 2.5) の 5 濃度区 (測定濃度として 0.800、0.308、0.119、0.0423、0.0117 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、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 (暴露 3 日後及び 5 日後、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	24.8～25.0℃
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）	>0.800 mg/L
LOEC	0.800 mg/L
NOEC	0.308 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

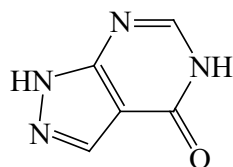
a) 名称等

名 称 アロプリノール

CAS 番号 315-30-0

b) 構造式等

構造式



分子式 $C_5H_4N_4O$

分子量 136.11

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 SKK1889

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±1℃) 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	試験に使用したシングルカルチャーは以下の条件を満たしていた。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、7 日齢の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 : 2021 年 4 月 16 日~4 月 23 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*1 (NOEC=400、800、400、800、800、400、800、800、590 及び 890 mg/L、n=10) 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。 *1 飼育水及び試験用水として市販のミネラルウォーターを混合したもの (Volvic*2/Evian*3 9/1 v/v、硬度約 80 mg CaCO ₃ /L) を用いて実施したデータ *2 販売元 : キリンビバレッジ *3 販売元 : 伊藤園

9. 試験の実施

9.1 試験用水

市販のミネラルウォーター [サントリー天然水 (阿蘇) *4] を用いた。溶存酸素濃度が飽和濃度の 90%以上であったため、エアレーションは行わなかった。

*4 販売元 サントリーフーズ (2.0 L ペットボトル)

栄養成分表示 (製品 100 mL 当たり、硬度約 80 mg/L、pH 約 7)

ナトリウム	0.8 mg
カルシウム	0.1~2.4 mg
マグネシウム	0.02~1.1 mg
カリウム	0.04~0.7 mg
エネルギー、たんぱく質、脂質、炭水化物	0 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 (暴露 3 日後及び 5 日後、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 0.800、0.320、0.128、0.0512、0.0205 mg/L (公比 2.5) 予備試験結果から試験濃度及び公比を決定した。 予備試験結果を Additional data 1 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	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℃
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%の範囲を超えたため、結果の算出には測定濃度の時間加重平均値を用いた。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

累積産仔数について、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なかったため、Steel 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

試験濃度範囲で 50%以上の死亡率が得られなかったため、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。

10. 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は、設定濃度（0.800、0.320、0.128、0.0512 及び 0.0205 mg/L）における測定濃度の時間加重平均値（0.800、0.308、0.119、0.0423 及び 0.0117 mg/L）で示す。

11.1 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。

0.119 mg/L 区において 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克蘭・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なかったため、死亡親個体の結果は集計から除外した。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。

11.2 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により薄黄緑色を呈しており、餌由来と思われる沈殿物も観察された。

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 24.8～25.0℃、溶存酸素濃度は 7.9～8.3 mg/L、pH は 7.8～8.2、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 0.0208～0.824 mg/L であった。換水前及び暴露終了時は 0.00189～0.806 mg/L であり、調製時濃度に対して 9.07～97.9%であった。

11.3 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。

平均累積産仔数は、対照区、0.0117、0.0423、0.119、0.308 及び 0.800 mg/L 区でそれぞれ 20.2、16.7、15.7、16.6、16.1 及び 3.4 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。

11.4 LOEC 及び 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、0.800 mg/L 区において対照区と比較して統計学的な有意差 ($p<0.01$) 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 0.800 mg/L、NOEC は 0.308 mg/L とした。

11.5 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 >0.800 mg/L であった。

11.6 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 0.800 mg/L、NOEC は 0.308 mg/L、親個体の LC₅₀ は >0.800 mg/L であった。暴露期間中に測定した試験液中の被験物質濃度は、調製時濃度に対して 9.07～97.9%の維持率であった。

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。

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 Cumulative number of dead parent

Measured concentration ^a (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)
0.0117	0	0	0	0	0	0	0	0
	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)
0.0423	0	0	0	0	0	0	0	0
	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)
0.119	0	0	0	0	0	1	1	1
	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(10)	(10)	(10)
0.308	0	0	0	0	0	0	0	0
	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)
0.800	0	0	0	0	0	0	0	0
	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)

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

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

Table 2 Cumulative number of juveniles produced per adult parent

Measured concentration (mg/L)	Vessel										Mean \pm S.D.
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	
Control	21	23	28	20	13	21	14	16	17	29	20.2 \pm 5.4
0.0117	23	14	12	26	12	13	15	24	13	15	16.7 \pm 5.4
0.0423	18	13	15	19	15	16	13	16	16	16	15.7 \pm 1.9
0.119	31	11	25	15	15	7 ^b	14	11	13	14	16.6 \pm 6.8
0.308	16	13	25	19	19	0	13	22	21	13	16.1 \pm 7.0
0.800	5	2	7	6	2	1	6	1	2	2	3.4 \pm 2.3

b : Parental *Ceriodaphnia dubia* died. This value was excluded from evaluation.

Table 3 Temperature of test solutions

Measured concentration (mg/L)		Exposure day					
		0	3	3	5	5	7
Control	New	24.8		25.0		25.0	
	Old		24.8		25.0		25.0
0.0117	New	24.8		25.0		25.0	
	Old		24.8		25.0		25.0
0.0423	New	24.9		25.0		25.0	
	Old		24.9		25.0		25.0
0.119	New	24.9		25.0		25.0	
	Old		25.0		25.0		25.0
0.308	New	24.9		25.0		25.0	
	Old		25.0		25.0		25.0
0.800	New	24.9		25.0		25.0	
	Old		25.0		25.0		25.0

New: Freshly prepared test solutions

Old: Test solutions before renewal

Unit: °C

Table 4 Dissolved oxygen concentration of test solutions

Measured concentration (mg/L)		Exposure day					
		0	3	3	5	5	7
Control	New	8.2		8.2		8.3	
	Old		8.1		8.2		8.3
0.0117	New	8.2		8.1		8.3	
	Old		8.0		8.2		8.1
0.0423	New	8.0		8.1		8.2	
	Old		8.0		8.2		8.1
0.119	New	8.0		8.1		8.2	
	Old		8.0		8.2		8.1
0.308	New	8.0		8.1		8.2	
	Old		8.0		8.2		8.0
0.800	New	8.0		8.1		8.2	
	Old		7.9		8.3		8.0

New: Freshly prepared test solutions

Old: Test solutions before renewal

Unit: mg/L

Table 5 pH of test solutions

Measured concentration (mg/L)		Exposure day					
		0	3	3	5	5	7
Control	New	7.9		7.9		8.2	
	Old		8.0		8.1		8.1
0.0117	New	7.8		8.0		8.2	
	Old		8.0		8.1		8.1
0.0423	New	7.8		8.0		8.2	
	Old		8.0		8.1		8.1
0.119	New	7.8		8.0		8.2	
	Old		8.0		8.1		8.1
0.308	New	7.9		8.0		8.2	
	Old		8.0		8.1		8.1
0.800	New	7.9		8.0		8.2	
	Old		8.0		8.1		8.1

New: Freshly prepared test solutions

Old: Test solutions before renewal

Table 6 Salinity of test solutions

Measured concentration (mg/L)	At the start
Control	0.01
0.0117	0.01
0.0423	0.01
0.119	0.01
0.308	0.01
0.800	0.01

Unit: %

Table 7 LOEC and NOEC

LOEC (mg/L)	NOEC (mg/L)
0.800	0.308

Table 8 Result of statistical analysis

Measured concentration (mg/L)	Statistical analysis	Statistical procedure
0.0117	n.s.	Bartlett's test Steel's test
0.0423	n.s.	
0.119	n.s.	
0.308	n.s.	
0.800	**	

n.s. : No significant difference

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

Table 9 LC₅₀ to parent *Ceriodaphnia dubia*

Exposure duration	LC ₅₀ (mg/L)
7-day	>0.800

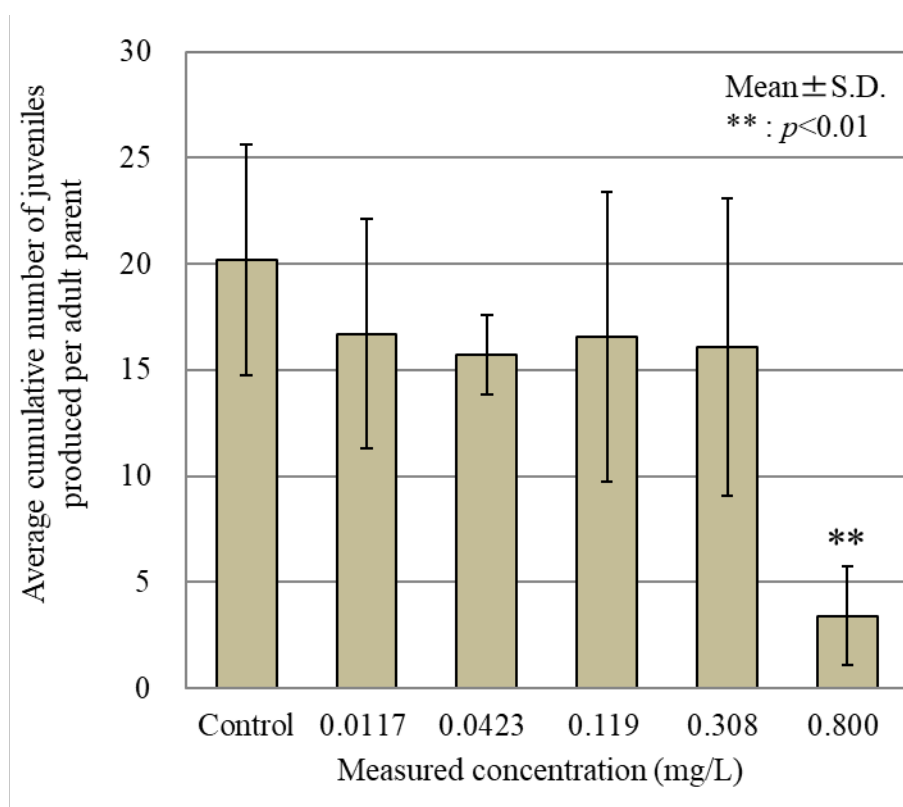


Figure 1 Average cumulative number of juveniles produced per adult parent.

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、そのまま若しくは試験用水で適宜希釈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 0.00100、0.00500、0.0500、0.100 及び 0.200 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（0.00100 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-153）	
ポンプ	LC-20AD	（島津製作所）
紫外可視分光検出器	SPD-20A	（島津製作所）
カラムオーブン	CTO-20A	（島津製作所）
オートインジェクター	SIL-20A _{HT}	（島津製作所）
システムコントローラー	CBM-20A	（島津製作所）
デガッサー	DGU-20A ₃	（島津製作所）
ソフトウェア	LabSolutions CS（島津製作所）	
カラム	L-column ODS (150 mm × 4.6 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（2%）：アセトニトリル B（98%）：超純水/ぎ酸（1000/1 v/v）	
流 量	1.0 mL/min	
測定波長	249 nm	
注入量	50 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、0.5%アンモニア水に溶解して 50 mL に定容し、1000 mg/L の被験物質溶液を調製した。これを試験用水で希釈して 2.00 mg/L の被験物質溶液を調製した。さらにこれを試験用水で希釈して 0.100 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 that at preparation %)						
	At the start	3 days		5 days		At the end	Time-weighted mean
		Old	New	Old	New		
Control	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	
0.0205	0.0208	0.00189 (9.07)	0.0212	0.00730 (34.4)	0.0217	0.0114 (52.3)	0.0117
0.0512	0.0526	0.0270 (51.3)	0.0517	0.0366 (70.8)	0.0542	0.0399 (73.5)	0.0423
0.128	0.129	0.0987 (76.7)	0.134	0.115 (85.5)	0.134	0.110 (82.3)	0.119
0.320	0.320	0.282 (88.3)	0.334	0.301 (90.2)	0.327	0.291 (89.0)	0.308
0.800	0.799	0.781 (97.8)	0.824	0.806 (97.9)	0.824	0.777 (94.3)	0.800

Old: Before the renewal

New: After the renewal

LOQ: 0.00100 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

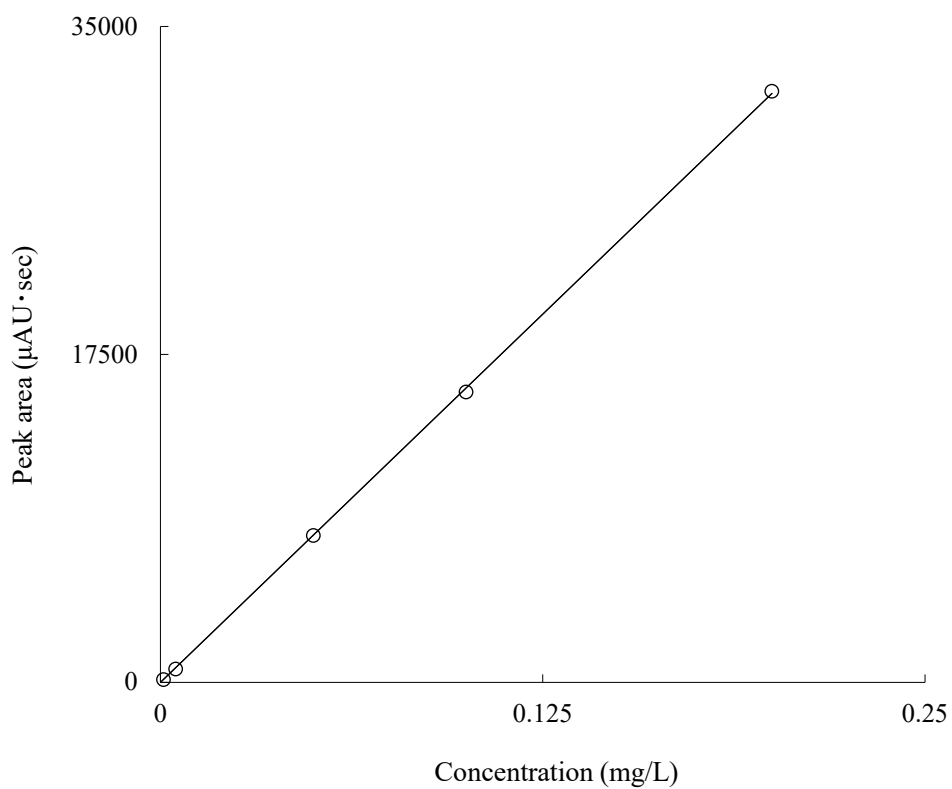
$\ln C_n$: the natural logarithm of C_n

E: Before the renewal

S: After the renewal

Appendix 2

検量線及びクロマトグラム



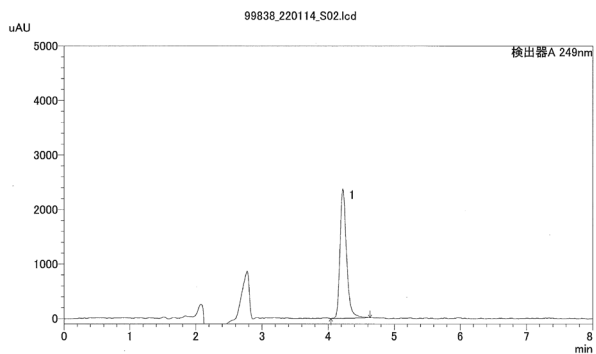
$$y = 157110x$$

$$r = 1.00$$

Concentration (mg/L)	Peak area ($\mu\text{AU} \cdot \text{sec}$)
0.00100	141
0.00500	716
0.0500	7839
0.100	15489
0.200	31539

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

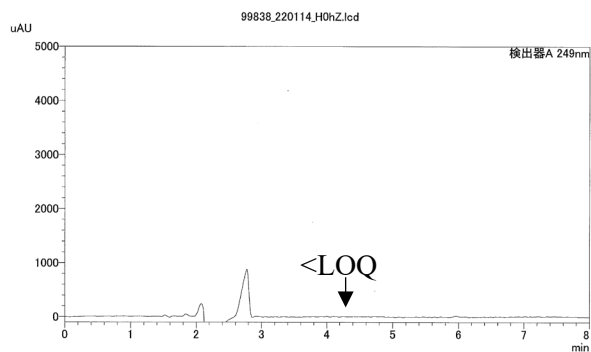
Sample ID : 99838
 Sample Name : Standard solution 0.100 mg/L
 Vial# : 1
 Injection Volume : 50
 Month-Day Acquired : 2022/01/14
 Data File : 99838_220114_S02.lcd
 Original Method File : 99837-99839_211124.lcm
 Acquired by : Chikako Yanagihara



99838_220114_S02.lcd
 検出器A 249nm

Peak No	Peak code	Time (min)	Height (μAU)	Area (μAU·sec)	Area (%)
1		4.22	2377	16256	100.0
合計				2377	16256

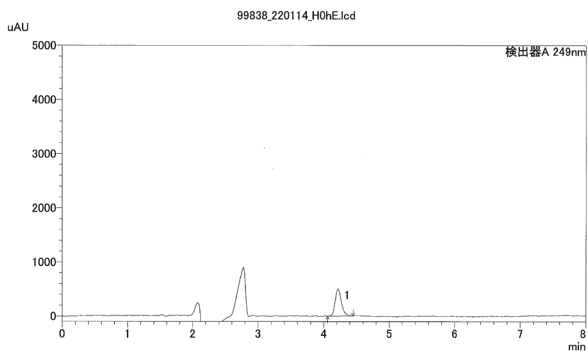
Sample ID : 99838
 Sample Name : Control
 Vial# : 2
 Injection Volume : 50
 Month-Day Acquired : 2022/01/14
 Data File : 99838_220114_H0hZ.lcd
 Original Method File : 99837-99839_211124.lcm
 Acquired by : Chikako Yanagihara



99838_220114_H0hZ.lcd
 検出器A 249nm

Peak No	Peak code	Time (min)	Height (μAU)	Area (μAU·sec)	Area (%)
合計					

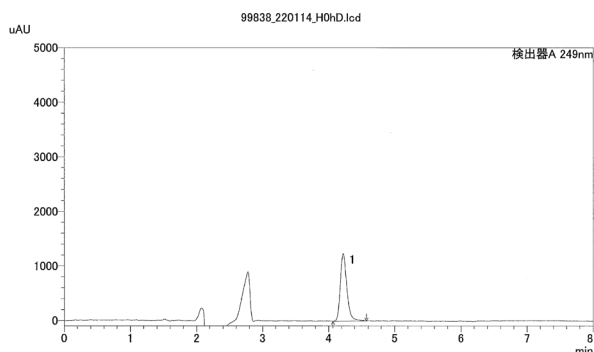
Sample ID : 99838
 Sample Name : 0.0205 mg/L exposure_level
 Vial# : 3
 Injection Volume : 50
 Month-Day Acquired : 2022/01/14
 Data File : 99838_220114_H0hE.lcd
 Original Method File : 99837-99839_211124.lcm
 Acquired by : Chikako Yanagihara



99838_220114_H0hE.lcd
 検出器A 249nm

Peak No	Peak code	Time (min)	Height (μAU)	Area (μAU·sec)	Area (%)
1		4.22	502	3383	100.0
合計			502	3383	100.0

Sample ID : 99838
 Sample Name : 0.0512 mg/L exposure_level
 Vial# : 4
 Injection Volume : 50
 Month-Day Acquired : 2022/01/14
 Data File : 99838_220114_H0hD.lcd
 Original Method File : 99837-99839_211124.lcm
 Acquired by : Chikako Yanagihara

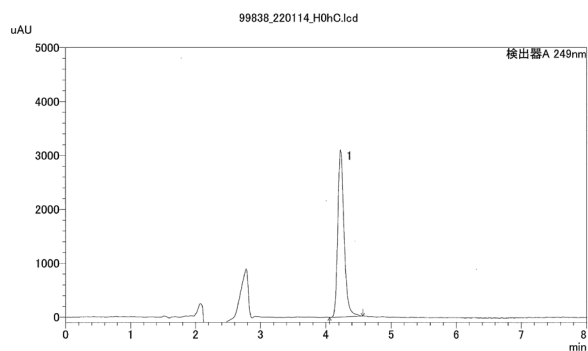


99838_220114_H0hD.lcd
 検出器A 249nm

Peak No	Peak code	Time (min)	Height (μAU)	Area (μAU·sec)	Area (%)
1		4.22	1243	8555	100.0
合計			1243	8555	100.0

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

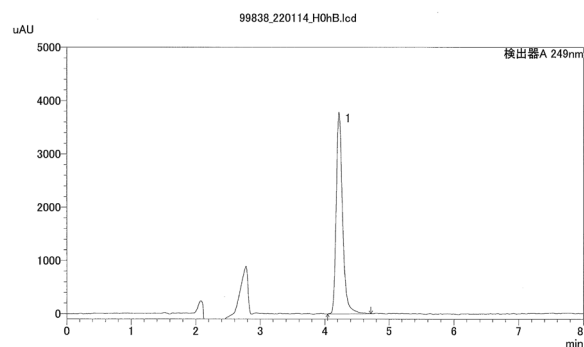
Sample ID : 99838
 Sample Name : 0.128 mg/L exposure_level
 Vial# : 5
 Injection Volume : 50
 Month-Day Acquired : 2022/01/14
 Data File : 99838_220114_H0hC.lcd
 Original Method File : 99837-99839_211124.lcm
 Acquired by : Chikako Yanagihara



99838_220114_H0hC.lcd
 検出器A 249nm

Peak No	Peak code	Time (min)	Height (μ AU)	Area (μ AU·sec)	Area (%)
1		4.22	3105	20913	100.0
合計			3105	20913	100.0

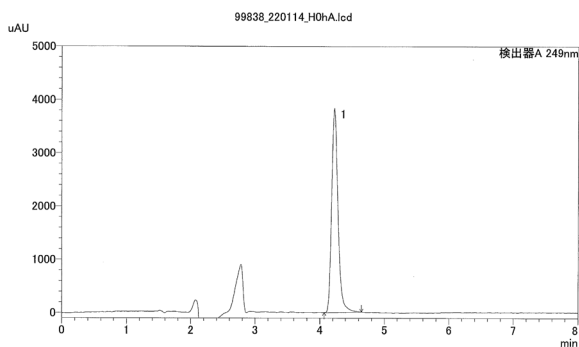
Sample ID : 99838
 Sample Name : 0.320 mg/L exposure_level
 Vial# : 6
 Injection Volume : 50
 Month-Day Acquired : 2022/01/14
 Data File : 99838_220114_H0hB.lcd
 Original Method File : 99837-99839_211124.lcm
 Acquired by : Chikako Yanagihara



99838_220114_H0hB.lcd
 検出器A 249nm

Peak No	Peak code	Time (min)	Height (μ AU)	Area (μ AU·sec)	Area (%)
1		4.22	3788	26003	100.0
合計			3788	26003	100.0

Sample ID : 99838
 Sample Name : 0.800 mg/L exposure_level
 Vial# : 7
 Injection Volume : 50
 Month-Day Acquired : 2022/01/14
 Data File : 99838_220114_H0hA.lcd
 Original Method File : 99837-99839_211124.lcm
 Acquired by : Chikako Yanagihara

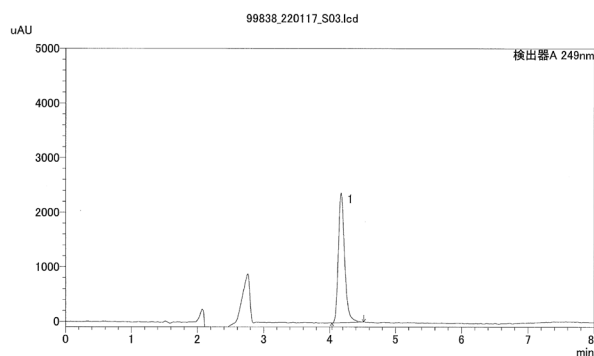


99838_220114_H0hA.lcd
 検出器A 249nm

Peak No	Peak code	Time (min)	Height (μ AU)	Area (μ AU·sec)	Area (%)
1		4.22	3833	25968	100.0
合計			3833	25968	100.0

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

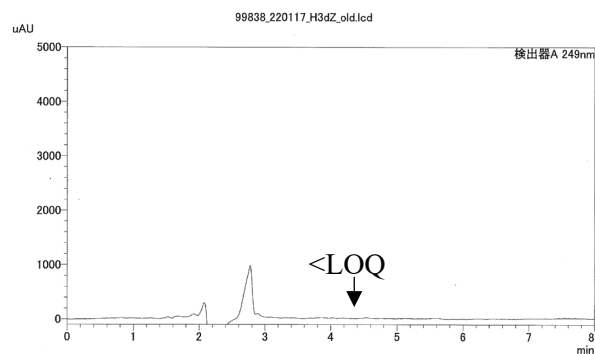
Sample ID : 99838
 Sample Name : Standard solution 0.100 mg/L (3.9MPa)
 Vial# : 1
 Injection Volume : 50
 Month-Day Acquired : 2022/01/17
 Data File : 99838_220117_S03.lcd
 Original Method File : 99837-99839_211124.lcm
 Acquired by : Chikako Yanagihara



99838_220117_S03.lcd
 検出器A 249nm

Peak No	Peak code	Time (min)	Height (μ AU)	Area (μ AU·sec)	Area (%)
1		4.17	2379	15891	100.0
合計			2379	15891	100.0

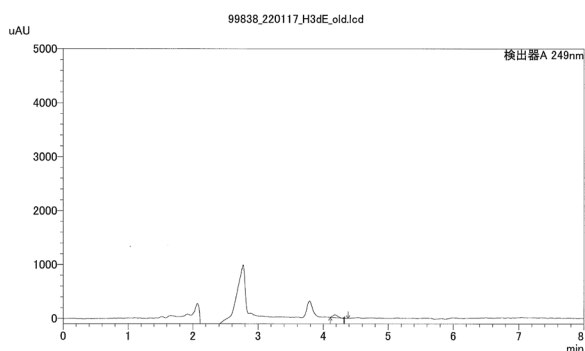
Sample ID : 99838
 Sample Name : Control
 Vial# : 2
 Injection Volume : 50
 Month-Day Acquired : 2022/01/17
 Data File : 99838_220117_H3dZ_old.lcd
 Original Method File : 99837-99839_211124.lcm
 Acquired by : Chikako Yanagihara



99838_220117_H3dZ_old.lcd
 検出器A 249nm

Peak No	Peak code	Time (min)	Height (μ AU)	Area (μ AU·sec)	Area (%)
合計					

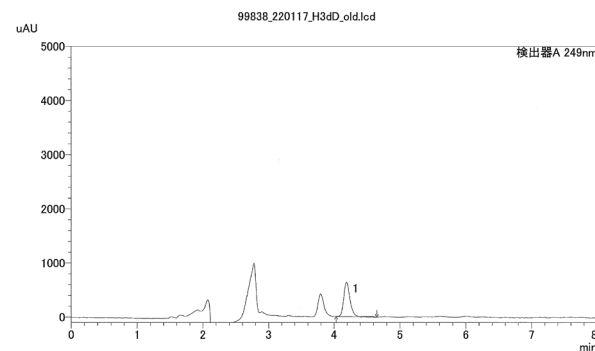
Sample ID : 99838
 Sample Name : 0.0205 mg/L exposure_level
 Vial# : 3
 Injection Volume : 50
 Month-Day Acquired : 2022/01/17
 Data File : 99838_220117_H3dE_old.lcd
 Original Method File : 99837-99839_211124.lcm
 Acquired by : Chikako Yanagihara



99838_220117_H3dE_old.lcd
 検出器A 249nm

Peak No	Peak code	Time (min)	Height (μ AU)	Area (μ AU·sec)	Area (%)
1		4.18	53	300	100.0
合計			53	300	100.0

Sample ID : 99838
 Sample Name : 0.0512 mg/L exposure_level
 Vial# : 4
 Injection Volume : 50
 Month-Day Acquired : 2022/01/17
 Data File : 99838_220117_H3dD_old.lcd
 Original Method File : 99837-99839_211124.lcm
 Acquired by : Chikako Yanagihara

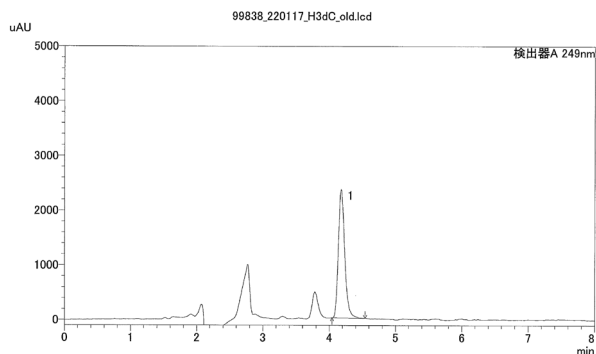


99838_220117_H3dD_old.lcd
 検出器A 249nm

Peak No	Peak code	Time (min)	Height (μ AU)	Area (μ AU·sec)	Area (%)
1		4.19	635	4286	100.0
合計			635	4286	100.0

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

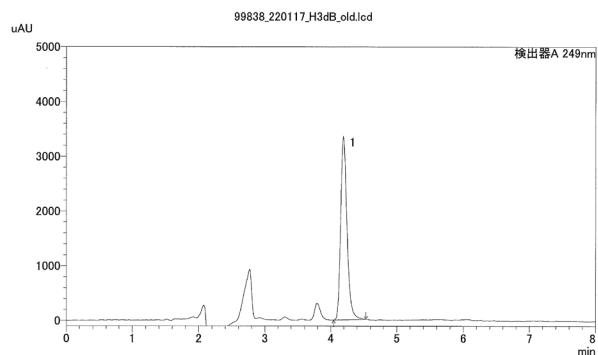
Sample ID : 99838
 Sample Name : 0.128 mg/L exposure_level
 Vial# : 5
 Injection Volume : 50
 Month-Day Acquired : 2022/01/17
 Data File : 99838_220117_H3dC_old.lcd
 Original Method File : 99837-99839_211124.lcm
 Acquired by : Chikako Yanagihara



99838_220117_H3dC_old.lcd

Peak No	Peak code	Time (min)	Height (μ AU)	Area (μ AU·sec)	Area (%)
1		4.18	2353	15686	100.0
合計			2353	15686	100.0

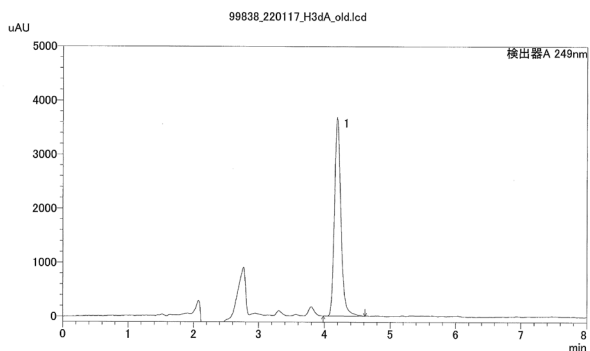
Sample ID : 99838
 Sample Name : 0.320 mg/L exposure_level
 Vial# : 6
 Injection Volume : 50
 Month-Day Acquired : 2022/01/17
 Data File : 99838_220117_H3dB_old.lcd
 Original Method File : 99837-99839_211124.lcm
 Acquired by : Chikako Yanagihara



99838_220117_H3dB_old.lcd

Peak No	Peak code	Time (min)	Height (μ AU)	Area (μ AU·sec)	Area (%)
1		4.19	3354	22436	100.0
合計			3354	22436	100.0

Sample ID : 99838
 Sample Name : 0.800 mg/L exposure_level
 Vial# : 7
 Injection Volume : 50
 Month-Day Acquired : 2022/01/17
 Data File : 99838_220117_H3dA_old.lcd
 Original Method File : 99837-99839_211124.lcm
 Acquired by : Chikako Yanagihara



99838_220117_H3dA_old.lcd

Peak No	Peak code	Time (min)	Height (μ AU)	Area (μ AU·sec)	Area (%)
1		4.19	3682	24830	100.0
合計			3682	24830	100.0

Appendix figure 2-3-2 HPLC chromatograms 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

2.1. 予備試験 1

試験濃度	設定濃度として 100、10、1.0、0.10 mg/L（公比 10）及び対照区
暴露方式	半止水式（3 日後及び 5 日後に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）になるように供試試料と試験用水を混合し、室温で 48 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
累積生存産仔数	コ克蘭・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を集計から除外して算出

<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	16.7	17.6	7.6
0.10	0	19.5	3.3
1.0	0	0.7	0.8
10	16.7	0	0
100	0	0	0

2.2. 予備試験 2

試験濃度	設定濃度として 1.0、0.32、0.10 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	8 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）になるように供試試料と試験用水を混合し、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を集計から除外して算出

<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	16.7	21.4	2.6
0.10	0	12.7	5.0
0.32	33.3	7.3	3.3
1.0	0	0.3	0.8

<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）
0.10	0.106 (106)	0.0790 (79.0)
0.32	0.334 (104)	0.290 (90.8)
1.0	1.03 (103)	1.01 (101)

3. 本試験条件

試験区	設定濃度として 0.800、0.320、0.128、0.0512、0.0205 mg/L（公比 2.5） 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）
濃度分析	暴露開始時、換水前後及び暴露終了時に実施

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	6	3	6	5	4	6	5	6	4	6
4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	0	5	8	8	5	8	6	5	7	8
6	3	0	0	7	4	7	3	5	6	0
7	12	15	14	12 ^c	14 ^c	16 ^c	12 ^c	17 ^c	0	15
Total	21	23	28	20	13	21	14	16	17	29

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

Additional Table 2 Result of reproduction test

0.0117 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	6	3	5	5	3	5	6	3	3	5
4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	7	4	3	5	5	5	6	6	5	3
6	10	7	4	0	4	3	3	0	5	7
7	12 ^c	16 ^c	17 ^c	16	14 ^c	14 ^c	15 ^c	15	15 ^c	14 ^c
Total	23	14	12	26	12	13	15	24	13	15

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

Additional Table 3 Result of reproduction test

0.0423 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	5	4	5	5	3	6	5	0	4	4
4	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0
5	5	4	0	4	4	6	7	6	5	8
6	8	5	5	10	8	4	0	7	0	4
7	14 ^c	15 ^c	5	16 ^c	14 ^c	13 ^c	1	0	7	13 ^c
Total	18	13	15	19	15	16	13	16	16	16

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

Additional Table 4 Result of reproduction test

0.119 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	5	4	4	6	3	5	4	3	4	5
4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	12	4	0	4	3	M(2)	5	3	3	4
6	0	3	10	5	9	-	5	5	6	5
7	14	13 ^c	11	15 ^c	11 ^c	-	12 ^c	10 ^c	10 ^c	14 ^c
Total	31	11	25	15	15	7 ^b	14	11	13	14

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

Additional Table 5 Result of reproduction test

0.308 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	5	4	3	3	4	0	5	6	3	5
4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	0	5	0	4	4	0	4	0	8	4
6	2	4	10	0	0	0	4	7	0	4
7	9	13 ^c	12	12	11	0	15 ^c	9	10	11 ^c
Total	16	13	25	19	19	0	13	22	21	13

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

Additional Table 6 Result of reproduction test

0.800 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	2	1	2	2	2	1	0	0	2	2
4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	0	1	2	0	0	0	4	1	0	0
7	3	0	3	4	0	0	2	0	0	0
Total	5	2	7	6	2	1	6	1	2	2