

## 2. ニセネコゼミジンコ繁殖試験

### 要 約

試験委託者： 環境省

表 題： ジソピラミドのニセネコゼミジンコ (*Ceriodaphnia dubia*) に対する繁殖試験

試験番号： A211242

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

最高濃度区の試験液は不溶物を除去した水溶性画分\*を試験液とした。濃度区 1～4 の試験液は、負荷率 100 mg/L の濃度区用原液を希釈して調製した。

\* 水溶性画分（WSF, Water-soluble fraction）：

被験物質が溶解状態で存在しているとみなすことができる水溶性画分

- 1) 供試生物： ニセネコゼミジンコ (*Ceriodaphnia dubia*)
- 2) 試験用水： 硬度 約 60 CaCO<sub>3</sub> mg/L のミネラルウォーター
- 3) 暴露期間： 7 日間
- 4) 暴露方式： 半止水式（隔日換水）
- 5) 供試生物数： 10 個体／試験区（1 個体／容器）
- 6) 試験温度： 25±1℃
- 7) 照明： 室内光，16 時間明（800 lux 以下）／8 時間暗

8) 試験濃度 :

試験区	設定濃度* (mg/L)
対照区	—
濃度区 1	5.0
濃度区 2	11
濃度区 3	22
濃度区 4	47
濃度区 5	100

公比 2.11

\* : 設定濃度は負荷率 100 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 (HPLC) 法

結 果 : 以下の結果は、被験物質濃度の測定値の時間加重平均値をもとに算出した。

親ミジンコの半数致死濃度 (LC50) : 36.5 mg/L (95%信頼区間 22.0~100 mg/L)

最大無影響濃度 (NOEC) : 4.95 mg/L (Dunnett test)

最小影響濃度 (LOEC) : 10.8 mg/L

## 1 材料

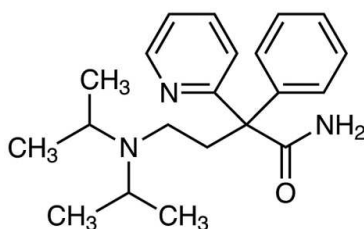
### 1.1 被験物質

#### 1.1.1 名称, 構造式および物理化学的性状

名 称\*: ジソピラミド

CAS 番号\*: 3737-09-5

構造式\*:



分子式\*:  $C_{21}H_{29}N_3O$

分子量\*: 339.48

\*: 供給者提供資料

#### 1.1.2 供試試料

純度\*: 99.8 area% (HPLC)

ロット番号\*: WUZ2O

供給者: 東京化成工業株式会社

外観\*: 白色結晶性粉末

\*: 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: 室温, 暗所

保管場所: 試験物質保管用デシケータ

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:

Nicolet iS10 型 サーモフィッシャーサイエンティフィック製

## 1.2 試験用水

硬度 約 60 CaCO<sub>3</sub> mg/L のミネラルウォーター\*を 25±1 °Cに調整して使用した。成分情報を付属資料-2 に示す。硬度および pH を測定した結果、それぞれ 56 mg CaCO<sub>3</sub>/L および 7.2 であった。

\* 製造元, Danone S.A.

## 1.3 供試生物

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

IC50 : 1510 mg/L

以下に 2019 年以降の IC50 平均値を示す。

IC50 平均値 ± 標準偏差 = 1170 ± 291 mg/L, n=5

(最小値 ~ 最大値 = 818 ~ 1510 mg/L)

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

## 1.4 試験容器および恒温槽等

- 1) 試験容器 : ガラス製カップ (蓋 : 透明塩ビ板)
- 2) クロマトチャンバー : MC-30EF3 日本フリーザー製
- 3) 水温計 : HI98501 型 ハンナ インスツルメンツ・ジャパン製
- 4) マルチ水質計 : MM-60R 型 東亜ディーケーケー製
- 5) 硬度測定 : デジタルタイトレーター ハック製
- 6) 電気伝導率計 : LAQUATwinB-771 HORIBA 製
- 7) 電子天秤 : AG204 型 メトラー製  
PB3002型 メトラー製  
MS3002S型 メトラー・トレド製  
MS204TS型 メトラー・トレド製

8) ライト： 富士フィルム製 LEDビューアー ST-A3

## 2 方法

### 2.1 試験方法

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

最高濃度区の試験液は不溶物を除去した水溶性画分\*を試験液とした。濃度区 1～4 の試験液は、負荷率 100 mg/L の濃度区用原液を希釈して調製した。なお、試験用水に対する被験物質の溶解性について評価した結果を付属資料－3 に示す。

\* 水溶性画分（WSF, Water-soluble fraction）：

被験物質が溶解状態で存在しているとみなすことができる水溶性画分

#### 2.1.1 試験条件

- 1) 暴露方式： 半止水式（隔日換水）
- 2) 暴露期間： 7 日間（対照区で 60%以上の個体が 3 腹以上産仔した時点で終了）
- 3) 試験液量： 15mL／容器
- 4) 連数： 10 容器／試験区
- 5) 供試生物数： 10 個体／試験区（1 個体／容器）
- 6) 試験温度： 25±1℃
- 7) 溶存酸素濃度： 3 mg/L 以上（エアレーションなし）
- 8) pH： 試験液の pH 調整は行わない。暴露期間中の pH は 6.5～8.5 とする。
- 9) 照明： 室内光，16 時間明（800 lux 以下）／8 時間暗
- 10) 給餌： YCT（リーセンテック製）およびクロレラ（クロレラ工業製）を  
毎日一定量給餌

### 2.1.2 予備試験結果

予備試験の試験上限濃度を 100 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 24 時間実施した後、フィルター\*<sup>1</sup>でろ過\*<sup>2</sup>して不溶の被験物質を除くことにより、負荷率\*<sup>3</sup> 100 mg/L の原液を調製した。この原液を試験用水で希釈して試験液を調製した。結果を以下に示す。

\*1：メルクミリポア製 メンブレンフィルター HA 0.45  $\mu$  m

\*2：ヤマト科学製、アスピレーター WP-15 型

\*3：負荷率（Loading rate）：WSF の調製の際に用いられる被験物質と水の重量対容積比

### 予備試験結果

設定濃度 (mg/L)	繁殖阻害率* <sup>4</sup> (%)	試験液中の被験物質濃度 (mg/L)	
		暴露開始時	暴露開始後 48 時間
対照区	--	N.D.	N.D.
0.010* <sup>5</sup>	41	-	-
0.10* <sup>5</sup>	-8	0.0803	0.0793
1.0* <sup>5</sup>	15	0.967	1.03
10* <sup>5</sup>	-10	9.94	10.2
100	100	99.3	101

供試生物数：5 個体／試験区（1 個体／容器）

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

\*5：負荷率 100mg/L の濃度区用原液を希釈して調製するため希釈率から算出した値を記載

--：計算には該当せず

N.D.：Not detected

-：計算対象外

### 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* (mg/L)
対照区	—
濃度区 1	5.0
濃度区 2	11
濃度区 3	22
濃度区 4	47
濃度区 5	100

公比 2.11

\*：設定濃度は負荷率 100 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。1 試験区につき 10 個の試験容器に、試験液をそれぞれ 15 mL ずつ入れ、余剰の試験液を水質測定用とした。

### 2.1.5 試験液の分析

試験液の分析を、以下の要領に従って高速液体クロマトグラフ（HPLC）法により行った。分析方法の詳細を付属資料－5に示す。なお、試料採取当日に分析に供することができない場合は、冷蔵保管した。

分析回数： 2 セット（試験液調製時と換水直前を 1 セットとした）

試料採取方法： 試験液調製時－各試験区の水質測定用容器の中層を採取  
換水直前－各試験区 1 試験容器の試験液の中層を採取

### 2.1.6 試験操作

#### 1) 暴露の開始

あらかじめ調製した試験液の水温を測定し、試験温度の範囲にあることを確認した。

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

## 2) 換水

換水は暴露期間中 1 日おきに実施した。

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

## 3) 観察

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

## 4) 水質測定

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

## 2.2 試験結果の評価

### 2.2.1 結果の算出

#### 1) 結果の算出に用いる被験物質濃度

結果の算出は、被験物質濃度の測定値の時間加重平均値に基づいて行った。平均値の計算方法は以下の通りである。

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

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

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

*ConcAn* : n 期間の初めの測定値  
(試験液調製時の測定値)

*ConcBn* : n 期間の終わりの測定値  
(換水直前の測定値)

(*ConcAn* と *ConcBn* の値が同じ場合は、 $Area = ConcAn \times Days \times Renewal\ Times$  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) 親個体の半数致死濃度 (LC50) の算出

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

最高濃度区 における死亡率	LC50 の決定方法
≥ 50%	Probit 法, Moving average 法, Binomial 法での算出結果*から適切と判断されたものを採用, 可能な限り 95%信頼区間を算出
< 50%	推定される濃度領域とする

\*: データ処理プログラム: TOXDAT3\_02\_D

3) 平均累積産仔数および繁殖障害率の算出

暴露終了時に、各試験区における親個体（偶発的に死亡した場合を除く）1 頭当たりの平均累積産仔数（生存幼体数,  $\Sigma F1/P$ ）を求めた。平均累積産仔数から対照区に対する各濃度区の繁殖障害率を算出した。

4) 最大無影響濃度 (NOEC) および最小影響濃度 (LOEC)

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

多重比較に関する統計解析手法手順を以下に示す。

- ① 試験区間（対照区を含む）の等分散性を検定する (Bartlett test)。
- ② 等分散性が認められた場合、Dunnett test により対照区と濃度区間の有意差を検定し、有意差が認められた最低濃度区を LOEC, その一つ下の濃度区を NOEC とする。濃度依存性のある（高濃度ほど値が増加あるいは減少する）データの場合、Dunnett test より検出力の高い Williams test を実施してもよい。Dunnett test または Williams test において有意差が認められなかった場合、NOEC は最高濃度区とする。
- ③ ①で等分散性が認められない場合、データを Log 変換して再度等分散性を検定する。等分散性が認められた場合は②を実施する。
- ④ ③で等分散性が認められない場合、ノンパラメトリックの Steel test により対照区と濃度区間の有意差を検定し、有意差が認められた最低濃度区を LOEC, その一つ下の濃度区を NOEC とする。Steel test により有意差が認められなかった場合、NOEC は最高濃度区とする。
- ⑤ ④において結果の妥当性を検討するために、パラメトリックの多重比較検定である Dunnett

test を実施してもよい。

- ⑥ それぞれの検定における有意水準 ( $\alpha$ ) は 0.05 とする。

### 2.2.2 試験の有効性

以下の条件から、本試験の有効性を判断した。

- 1) 対照区のみジンコ（親個体）の死亡率が 20%を超えないこと
- 2) 7 日間で対照区の親個体の少なくとも 60%が 3 腹産んでいること
- 3) 対照区における生存仔虫数が最初の 3 腹で平均して 15 を超えること
- 4) 対照区において休眠卵の生産が確認されないこと

### 3 結果および考察

#### 3.1 試験成績の信頼性に影響を及ぼしたと思われる環境要因

該当する事象はなかった。

#### 3.2 試験液の水質

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

水温は 24.0～25.5℃、溶存酸素濃度は 7.7～9.0 mg/L、pH は 7.3～8.5、電気伝導度は 220～240  $\mu\text{S}/\text{cm}$  であった。いずれの試験区においても、水温は  $25\pm 1^\circ\text{C}$ 、溶存酸素濃度は 3 mg/L 以上であり、試験条件の範囲内であった。

#### 3.3 試験液中の被験物質濃度

試験液中の被験物質濃度の分析結果を Table 5 に、代表的な測定結果を付属資料-5 に示す。

濃度区 1～5 の測定値の時間加重平均値は、それぞれ 4.95, 10.8, 22.0, 46.1 および 100 mg/L であり、ほぼ設定値どおりであった。

#### 3.4 親個体および産出幼体の観察

##### 1) 親個体の死亡率

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

対照区における親個体の暴露終了時の死亡率は、0%であった。濃度区 1～5 における暴露終了時の死亡率は、それぞれ 0, 0, 0, 80, および 100%であった。

##### 2) 平均累積産仔数および繁殖障害率

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

対照区における平均累積産仔数は 18.6 頭であり、全ての親個体で 3 腹以上の産仔がみられた。濃度区 1～5 における平均累積産仔数は、それぞれ 20.8, 10.5, 6.1, 0.6 および 0 頭であった。

対照区に対する繁殖障害率は、濃度区 1～5 において、それぞれ 12, 44, 67, 97 および 100%であった。

##### 3) 休眠卵の発生

休眠卵はいずれの試験区においても、認められなかった。

### 3.5 親個体の半数致死濃度 (LC50) の算出

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

7 日間の LC50 : 36.5 mg/L (95%信頼区間 22.0~100 mg/L, Binomial 法)

### 3.6 最大無影響濃度 (NOEC) および最小影響濃度 (LOEC)

累積産仔数の有意差検定の結果を Table 7 に, 詳細を付属資料-6 に示す。

NOEC は Bartlett test の等分散検定 ( $\alpha=0.01$ ) において等分散性が認められなかったため, ノンパラメトリックの Steel test ( $\alpha=0.05$ ) を用い算出した。対照区と比べた累積産仔数は, 濃度区 1 および 2 では有意差は認められなかったが, 濃度区 3~5 においては有意差が認められた。しかし, 濃度区 2 の繁殖阻害率は 44%であることから, 結果の妥当性の確認のためにパラメトリックの Dunnett test ( $\alpha=0.05$ ) を実施した。対照区と比べた累積産仔数は, 濃度区 1 では有意差は認められなかったが, 濃度区 2~5 においては有意差が認められた。また, 同様に, 10%繁殖阻害濃度 (EC10) を統計解析ソフト R\*を用いて算出し, 6.06 mg/L (95%信頼区間 4.02~8.11 mg/L) であった。以上のことから, NOEC の算出はパラメトリックの Dunnett test を用い決定することが適当と判断した。

決定した NOEC および LOEC を Table 9 および以下に示す。

最大無影響濃度 (NOEC) : 4.95 mg/L (パラメトリックの Dunnett test)

最小影響濃度 (LOEC) : 10.8 mg/L

\* : R Core Team (2021). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.

### 3.7 試験の有効性

「3.4 親個体および産出幼体の観察」において, 結果が試験の有効性の条件を全て満たしたため, 試験は有効であると判断した。

以 上

Table 1 Temperatures of test solutions

Test Group	Temperature (°C)							
	Day 0 New	Day 2 Old	Day 2 New	Day 4 Old	Day 4 New	Day 6 Old	Day 6 New	Day 7 Old
Control	24.6	24.2	24.2	24.2	25.0	25.2	25.5	24.6
Conc.1	24.6	24.2	24.1	24.1	24.9	25.2	25.5	24.5
Conc.2	24.6	24.2	24.1	24.0	24.8	25.1	25.5	24.2
Conc.3	24.6	24.3	24.1	24.2	24.9	25.2	25.5	24.1
Conc.4	24.7	24.2	24.2	24.1	25.0	25.2	25.5	24.0
Conc.5	24.7	24.2	*	*	*	*	*	*
Minimum: 24.0						Maximum: 25.5		

New: New test solution freshly prepared

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

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

Table 2 Dissolved oxygen concentrations (D.O.) of test solutions

Test Group	D.O. (mg/L)							
	Day 0 New	Day 2 Old	Day 2 New	Day 4 Old	Day 4 New	Day 6 Old	Day 6 New	Day 7 Old
Control	8.2	8.8	8.7	8.6	7.7	8.5	7.8	8.4
Conc.1	8.4	8.7	8.6	8.5	8.4	8.4	8.0	8.2
Conc.2	8.5	8.6	8.7	8.5	8.7	8.5	8.6	8.3
Conc.3	8.4	8.6	8.9	8.9	8.5	8.6	8.7	8.3
Conc.4	8.3	8.5	9.0	8.9	8.2	8.4	8.6	8.3
Conc.5	8.2	8.6	*	*	*	*	*	*
Minimum: 7.7						Maximum: 9.0		

New: New test solution freshly prepared

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

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

Table 3 pH values of test solutions

Test Group	pH							
	Day 0	Day 2	Day 2	Day 4	Day 4	Day 6	Day 6	Day 7
	New	Old	New	Old	New	Old	New	Old
Control	7.3	7.9	7.9	8.4	7.9	8.3	7.4	8.3
Conc.1	7.5	8.0	7.9	8.4	7.8	8.3	7.5	8.2
Conc.2	7.6	8.0	7.9	8.4	7.8	8.3	7.6	8.2
Conc.3	7.7	7.9	7.7	8.5	8.0	8.3	7.7	8.2
Conc.4	7.9	8.1	7.8	8.5	8.3	8.4	7.9	8.3
Conc.5	8.5	7.9	*	*	*	*	*	*
Minimum: 7.3						Maximum: 8.5		

New: New test solution freshly prepared

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

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

Table 4 Electrical conductivity

Test Group	Electrical conductivity (μS/cm)							
	Day 0	Day 2	Day 2	Day 4	Day 4	Day 6	Day 6	Day 7
	New	Old	New	Old	New	Old	New	Old
Control	220	—	220	—	220	—	230	—
Conc.1	220	—	220	—	220	—	230	—
Conc.2	220	—	220	—	220	—	230	—
Conc.3	220	—	220	—	230	—	230	—
Conc.4	230	—	230	—	230	—	230	—
Conc.5	240	—	*	—	*	—	*	—
Minimum: 220						Maximum: 240		

New: New test solution freshly prepared

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

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

Table 5 Measured concentrations of the test substance in test solutions

(Semi-static condition)						
Test Group	Nominal Concentration  (mg/L)	Measured Concentration (mg/L)				
		Exposure Time (Days)				Mean *
		0	2	4	6	
		New	Old	New	Old	
		[Percent of Nominal, %]				
Control	--	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	--
Conc. 1	5.0	4.74	5.11	4.91	5.06	4.95
		[95]	[102]	[98]	[101]	[99]
Conc. 2	11	10.3	11.3	10.7	11.0	10.8
		[94]	[103]	[97]	[100]	[98]
Conc. 3	22	21.3	22.5	22.2	22.2	22.0
		[97]	[102]	[101]	[101]	[100]
Conc. 4	47	45.9	47.1	46.7	44.6	46.1
		[98]	[100]	[99]	[95]	[98]
Conc. 5	100	98.9	101	-	-	100
		[99]	[101]			[100]

Lower limit of quantification: 0.01 mg/L

\*: Time-weighted mean

New: New test solution freshly prepared

Old: Old test solution immediately prior to renewal

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

Table 6 Cumulative mortality of parent *Ceriodaphnia*

Test Group	Nominal Concentration (mg/L)	Mean <sup>a</sup> Measured Concentration (mg/L)	Cumulative Mortality (%)
Control	--	-	0
Conc.1	5.0	4.95	0
Conc.2	11	10.8	0
Conc.3	22	22.0	0
Conc.4	47	46.1	80
Conc.5	100	100	100

a: Time-weighted mean

Table 7 Mean cumulative number of offspring produced per parent *Ceriodaphnia*, inhibition rate and results of statistical comparison

Test Group	Nominal Conc. (mg/L)	Mean <sup>a</sup> Measured Conc. (mg/L)	Cumulative Number of offspring											Mean	SD	Repro. inhibition rate % (c)	SD
			Vessel No.														
			A	B	C	D	E	F	G	H	I	J					
Control	--	--	20	16	22	16	13	25	20	25	17	12	18.6	4.6	--	--	
Conc.1	5.0	4.95	14	19	20	26	19	22	22	24	20	22	20.8	3.3	-12	33	
Conc.2	11	10.8	2	0	14	0	25	22	20	12	8	2	10.5 **	9.5	44	53	
Conc.3	22	22.0	0	0	0	3	12	14	10	9	11	2	6.1 **	5.6	67	31	
Conc.4	47	46.1	0	0	0	0	3	0	0	0	0	3	0.6 **	1.3	97	7	
Conc.5	100	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.0 **	0.0	100	0	

a : Time-weighted mean

b : Not rounded

SD : Standard Deviation

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

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



Table 8 LC50 of parent *Ceriodaphnia*

	(mg/L)	95-Percent confidence limits (mg/L)	Statistical method
LC50	36.5 *	22.0 -- 100	Binomial

\* : Using the data of conc.1-5

Table 9 NOEC and LOEC

Exposure period (day)	LOEC (mg/L)	NOEC (mg/L)
7	10.8	4.95

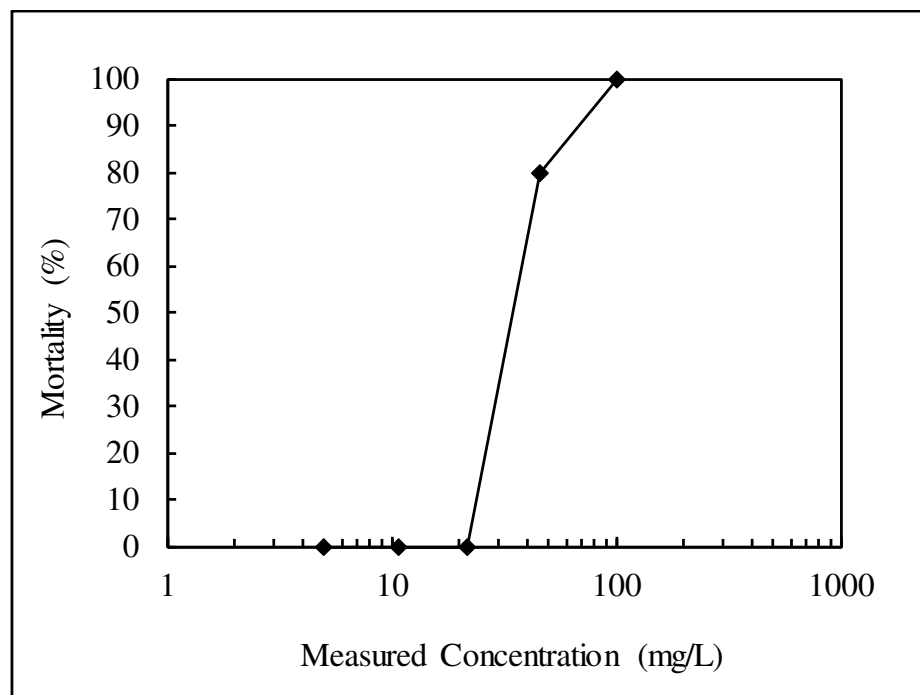


Figure 1 Concentration-Mortality Curve

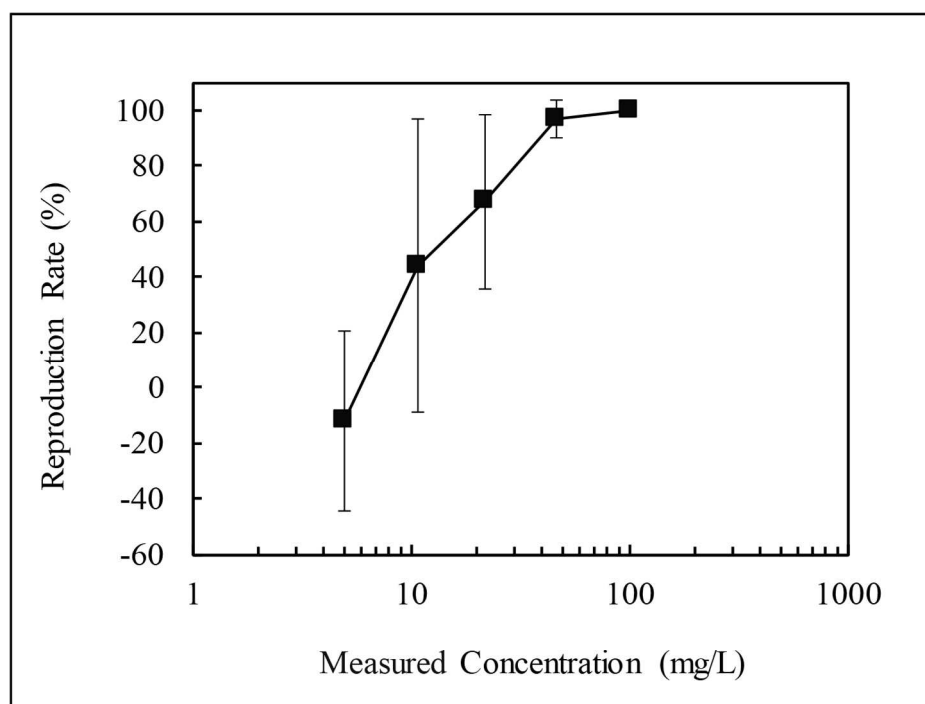


Figure 2 Concentration- inhibition rate curve

## 付属資料－1

赤外吸収スペクトル

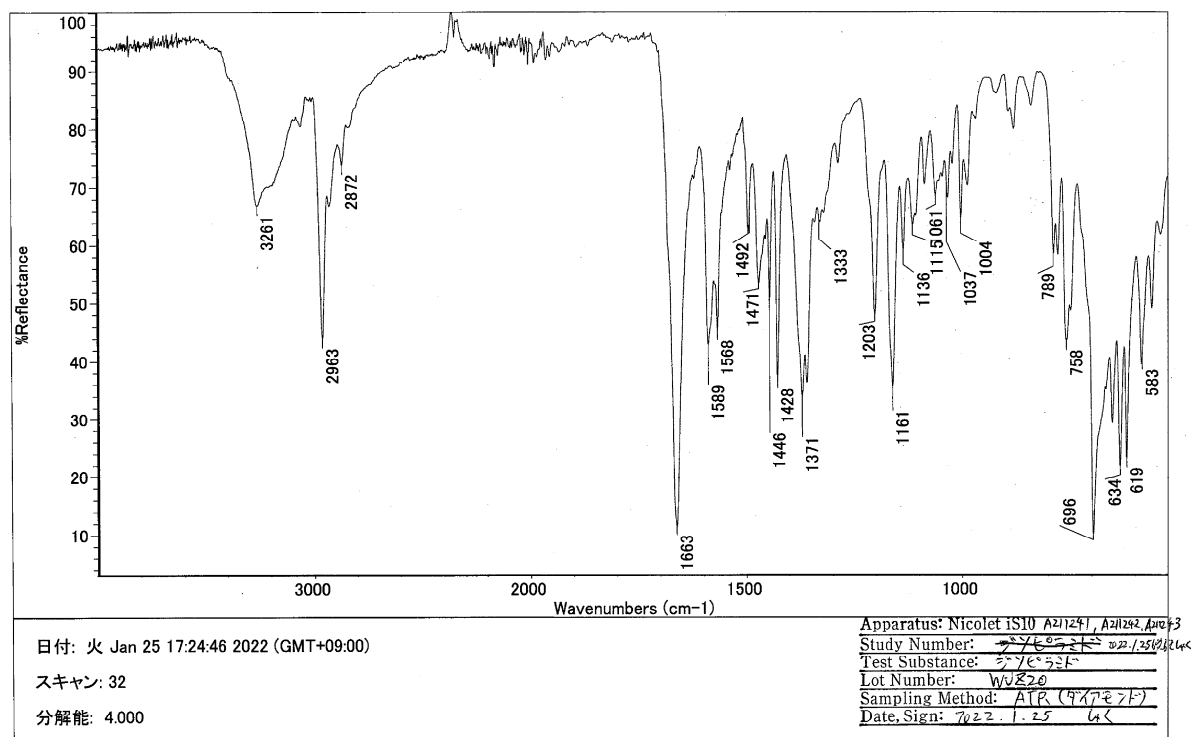


Figure A-1-1 Infrared absorption spectrum of the test substance before the study

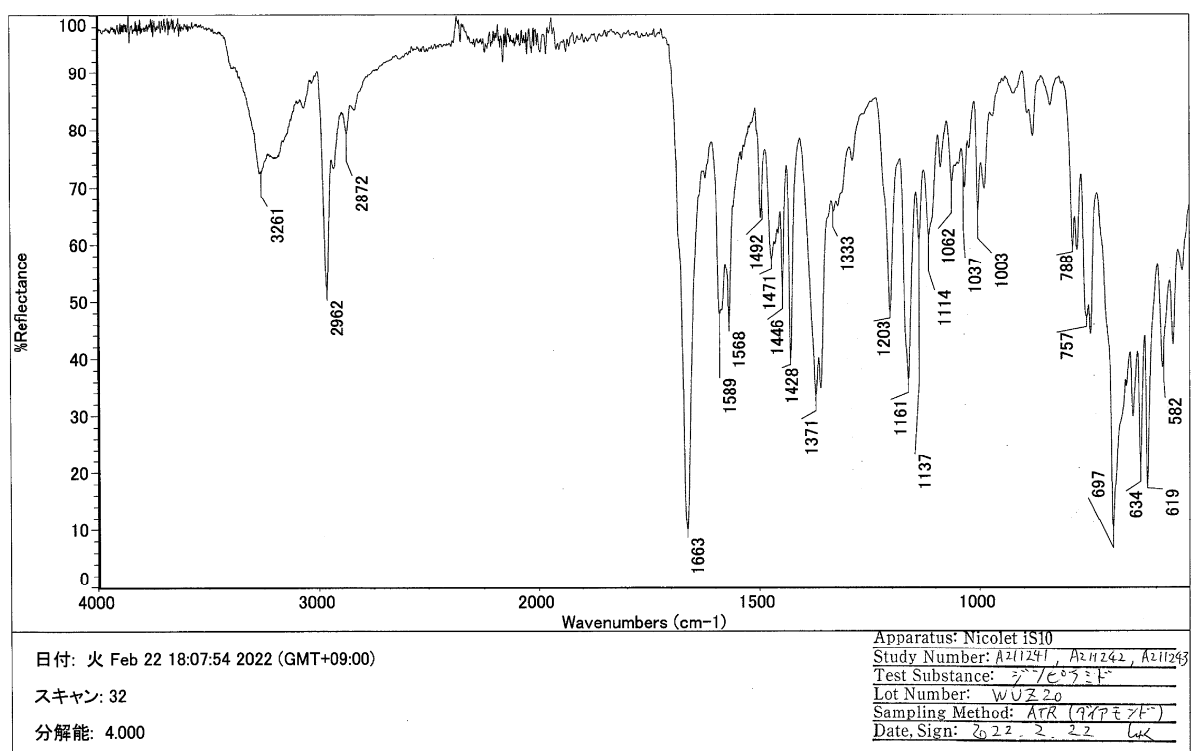


Figure A-1-2 Infrared absorption spectrum of the test substance after the end of exposure

## 付属資料－2

試験用水の成分

Table A-2-1 Natural Mineral Water

- ・名称： ナチュラルミネラルウォーター
- ・原材料名： 水（鉱泉水）
- ・原産国名： フランス
- ・採水地： ボルヴィック
- ・製造元： Danone S.A.

ミネラル組成	(mg/L)
カルシウム	12
硫酸塩	9
マグネシウム	8
ナトリウム	12
重炭酸塩	74
カリウム	6
シリカ	32
塩化物	15
硝酸塩	7.3
乾燥残留物（180℃）	130 — pH 7

（上記内容は製品ラベルによる）

### 付属資料－3

試験用水に対する溶解性

## 1. 概要

以下に示す試験用水に対する被験物質の溶解性を評価した。

OECD 培地（藻類生長阻害試験用）

硬度 約 60 CaCO<sub>3</sub> mg/L のミネラルウォーター\*<sup>1</sup>（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）

\*<sup>1</sup>：製造元，Danone S.A.

## 2. 方法

- 1) 被験物質 20 mg を共栓付 200 mL 三角フラスコに採取し，各試験用水を 200 mL 加えた。（仕込み濃度：100 mg/L，連数：3）
- 2) OECD 培地および硬度 約 60 CaCO<sub>3</sub> mg/L のミネラルウォーターは 21℃，脱塩素水道水は 24℃ で 24 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\*<sup>2</sup> 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（HPLC）計により測定した。

\*<sup>2</sup>：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 <sub>3</sub> 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	91.5	98	109	110	99.9	99
2	103		105		101	
3	100		103		97.1	

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 培地で 98 mg/L（21℃），硬度 約 60 CaCO<sub>3</sub> mg/L のミネラルウォーターで 110 mg/L（21℃），脱塩素水道水で 99 mg/L（24℃）であると判断した。



## 付属資料－4

### 試験液の調製

試験液の調製

1. 被験物質の負荷

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

試験用水	: volvic
調製頻度	: 暴露開始前24時間および換水前24時間に調製

	負荷率 (mg/L)	被験物質採取量 (mg)	最終容量 (L)	容器
対照区用原液	-	-	0.5	0.5 Lメジューム瓶
濃度区用原液	100	100	1.0	1 Lメジューム瓶

2. 攪拌および試験液の調製

- 1) スターラーで24時間攪拌する。（室温：約24℃）
- 2) アスピレーターを用いて1)の試験液をフィルターろ過する。  
フィルター：メルクミリポア製 メンブレンフィルター HA 0.45μm  
アスピレーター：ヤマト科学製 WP-15型
- 3) 各原液を下記の表の通り採取し、試験用水を加え最終容量とする。

試験用水	: volvic
最終容量	: 250 mL
容器	: 三角フラスコ
混合方式	: 転倒攪拌
調製頻度	: 暴露開始時および換水時に調製
公比	: 2.11

試験区	設定濃度 (mg/L)	原液採取量 (mL)
対照区	—	対照区用原液をそのまま使用
濃度区1	5.0	12.5
濃度区2	11	27
濃度区3	22	56
濃度区4	47	118
濃度区5	100	濃度区用原液をそのまま使用

設定濃度は負荷率100 mg/Lの濃度区用原液を希釈して調製するため、希釈率から算出した値を記載

## 付属資料－5

試験液の分析

1. 機器および試薬

(機器)

電子天秤：                   AG204 型 メトラー製  
                                  PB3002 型 メトラー製  
                                  MS3002S型 メトラー・トレド製  
                                  MS204TS型 メトラー・トレド製

(試薬)

アセトニトリル：           HPLC 用  
りん酸水素二ナトリウム 12 水：特級相当  
超純水：                   JIS K0557 A4 グレード

## 2. 高速液体クロマトグラフ (HPLC) 計 測定条件

### 1) 装置

高速液体クロマトグラフ (HPLC) Agilent 1100 型 (No.6) , Agilent Technologies 製  
ワークステーション : ChemStation  
デガッサ : G1379A 型  
送液ポンプ : G1311A 型  
オートサンプラ : G1313A 型  
カラムオーブン : G1316A 型  
ダイオードアレイ検出器 (DAD) : G1315B 型

### 2) 条件

カラム : Poroshell 120 EC-C18 2.7 $\mu$ m, 4.6 mm i.d.×50 mm  
Agilent Technologies 製  
カラムオーブン : 40°C  
溶離液 : A 10mM リン酸水素二ナトリウム水溶液  
B アセトニトリル  
A液 45%, B液 55%  
ストップタイム : 3 min  
流速 : 1 mL/min  
測定波長 : 260 nm  
注入量 : 100  $\mu$ L

### 3. 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 100 mg を秤量し、アセトニトリルで溶解し 100 mL に定容とし、1000 mg/L の溶液を調製した。この溶液をアセトニトリルで順次希釈し、0.0100, 0.100, 1.00 および 10.0 mg/L の標準溶液を調製した。また、アセトニトリルを 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

|

HPLC測定

#### 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 1.000 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。

#### 4) 定量下限

検量線作成に用いる標準溶液の最低濃度である 0.01 mg/L を定量下限とした。

#### 4. 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。

暴露開始時，暴露開始後4日目および6日目

試験液（超純水で適宜希釈<sup>\*1</sup>） 0.75 mL 採取

    | ←アセトニトリル 0.75 mL 添加

混合

    |

HPLC 測定

暴露開始後2日目

試験液 5 mL 採取

    | ←アセトニトリル 5 mL 添加

混合<sup>\*2</sup>

    |

混合液（超純水：アセトニトリル = 1：1 (v/v)で適宜希釈<sup>\*1</sup>）適量 採取

    |

HPLC 測定

\*1：検量線範囲を超えると予想されたものについて希釈した。

\*2：暴露開始後2日目において，各分析試料は混合後，測定に供するまで冷蔵保存した。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，超純水と混合後は冷蔵保存した。

#### 5. 試験液中の被験物質濃度の定量

試験液中の被験物質濃度の定量は，各分析時に測定する標準溶液のピーク面積との比較で行った。なお，暴露開始後 2 日目の試験液中の被験物質濃度の定量は，各試験液と同日に採取し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。

No.	Concentration X (mg/L)	Peak area Y (count)
1	0.0100	0.162
2	0.100	2.149
3	1.00	29.969
4	10.0	331.938

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

$$a = -1.511\text{E}+00$$

$$-5.731\text{E}+00 < a < 2.709\text{E}+00$$

$$b = 3.333\text{E}+01$$

$$(95\% \text{ confidence interval})$$

$$r = 1.000$$

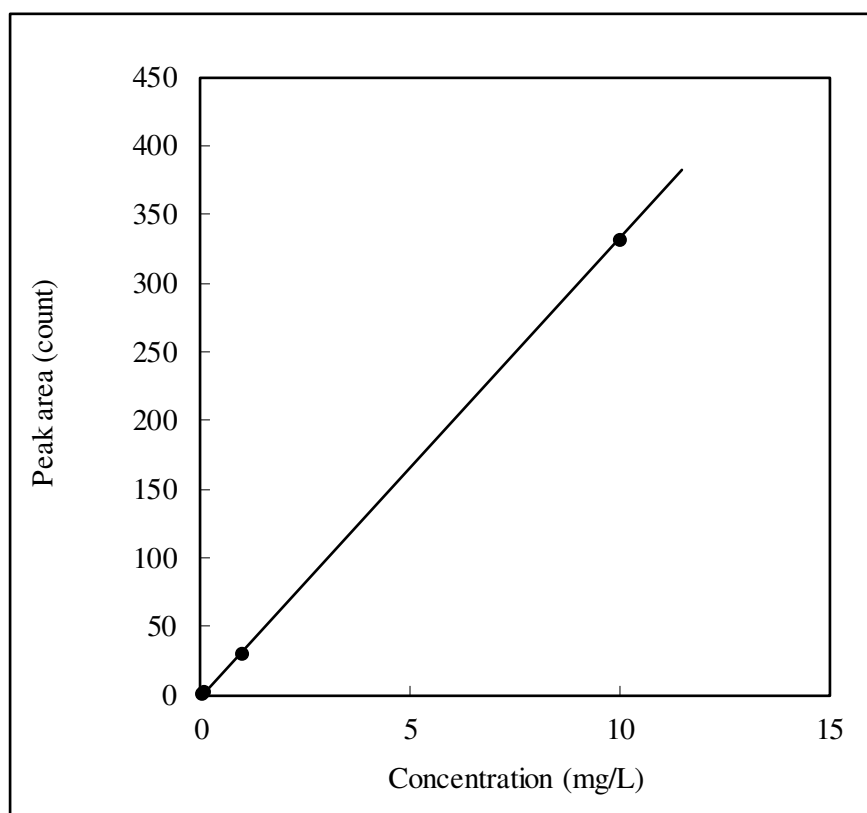
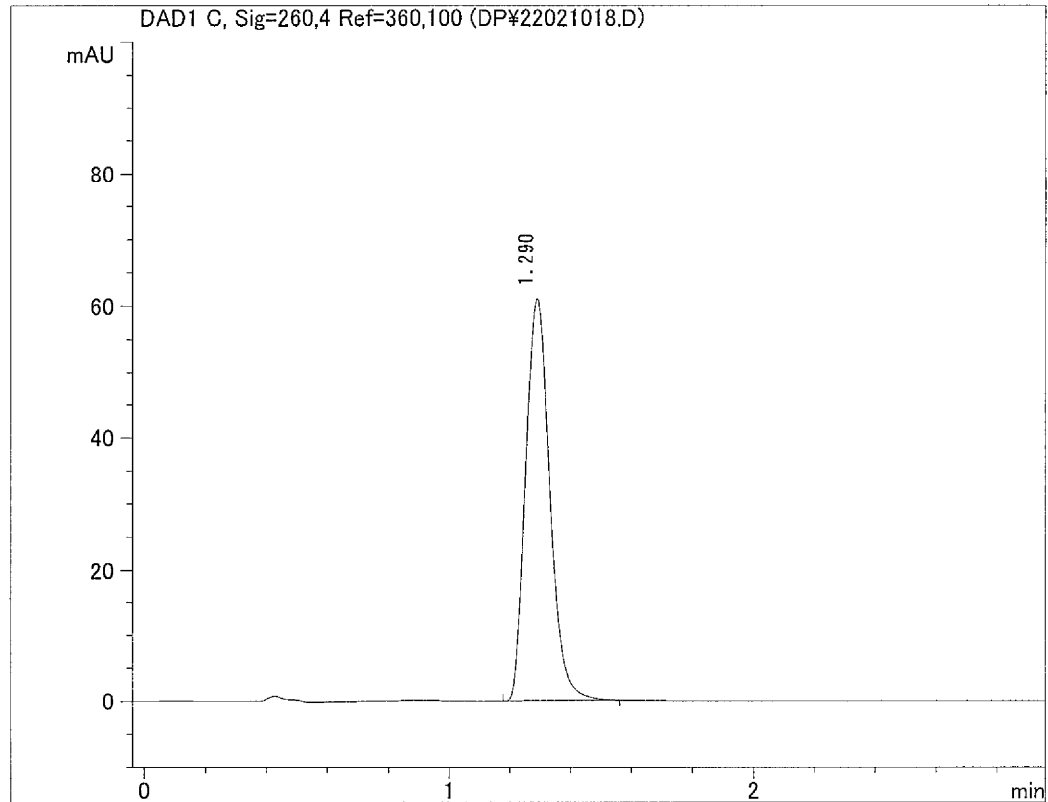


Figure A-5-1 Calibration curve



```

=====
注入日       : 2022/02/10
試験番号, 名称 : ( ) A211241 (✓) A211242 ( ) A211243 シーケンサイン : 12
分析ロット   : DP-3.M                      バイアル No. : 27
サンプル名   : STD 10 mg/L                  注入 No. : 1
測定オペレータ : ikt                      注入量 : 100 ul
=====
  
```



面積パーセントレポート						
ピーク #	RT [min]	タイプ	幅 [min]	面積 [count]	高さ [mAU]	面積 %
1	1.290	MM	0.092	337.324	61	100.0
トータル:				337.324	61	

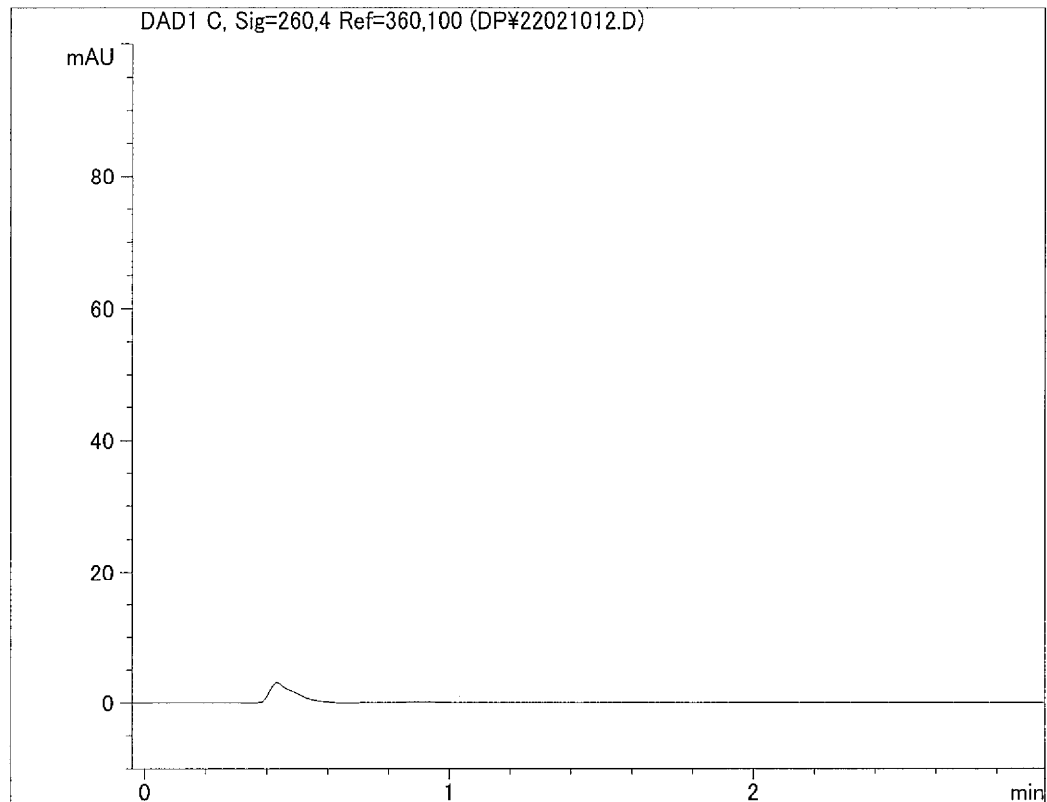
\*\*\* End of Report \*\*\*

Standard 10.0 mg/L: Day 0

Figure A-5-2 Representative measurement results

```

=====
注入日       : 2022/02/10
試験番号, 名称 : ( ) A211241 (✓) A211242 ( ) A211243 シーケンライン : 6
分析ロット   : DP-3.M                      バイアル No. : 21
サンプル名    : C0hCn                      注入 No. : 1
測定 検体レタ : 4<                      注入量 : 100 ul
=====
  
```



面積ハセントレポト						
ピーク #	RT [min]	タイプ	幅 [min]	面積 [count]	高さ [mAU]	面積 %

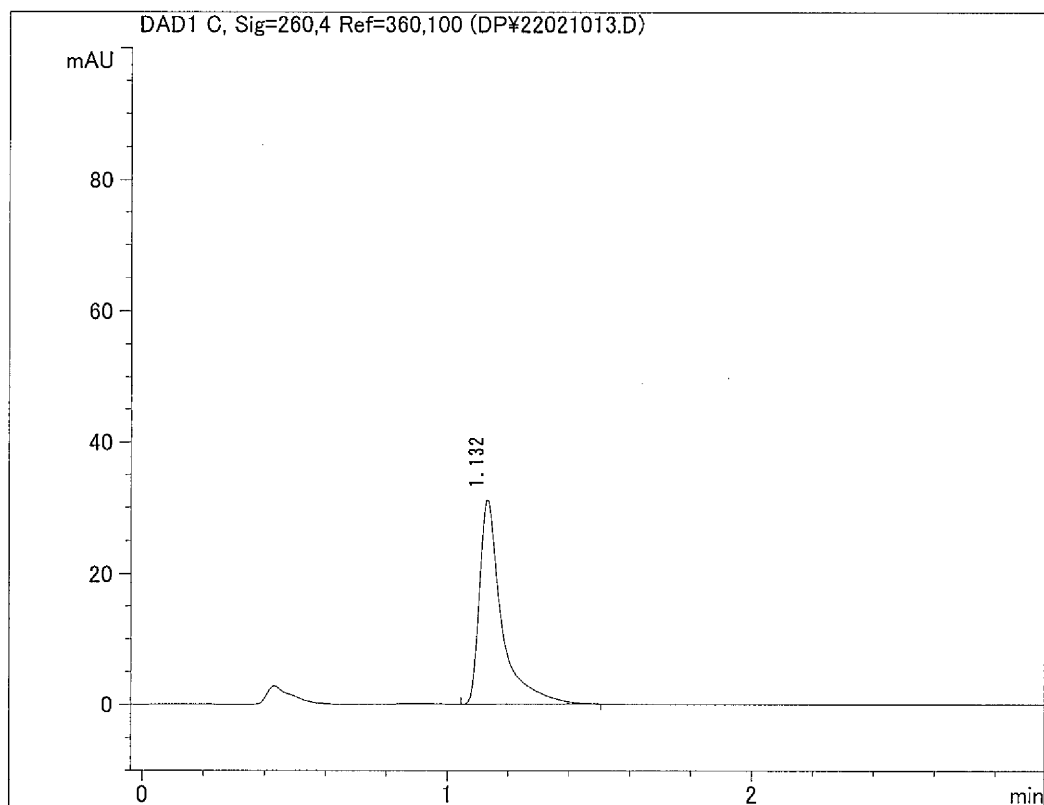
トータル:

\*\*\* End of Report \*\*\*

Control: Day 0 – New

Figure A-5-2 Representative measurement results (continued)

=====  
 注入日 : 2022/02/10 シーケンスライン : 7  
 試験番号, 名称 : ( ) A211241 (✓) A211242 ( ) A211243 ジェットラミット  
 分析ロット : DP-3.M バイアル No. : 22  
 サンプル名 : C0hC1n 注入 No. : 1  
 測定ポレタ : 4< 注入量 : 100 ul  
 =====



=====  
 面積パーセントレポート  
 =====

ピーク #	RT [min]	タイプ	幅 [min]	面積 [count]	高さ [mAU]	面積 %
1	1.132	MM	0.085	159.976	31	100.0
トータル:				159.976	31	

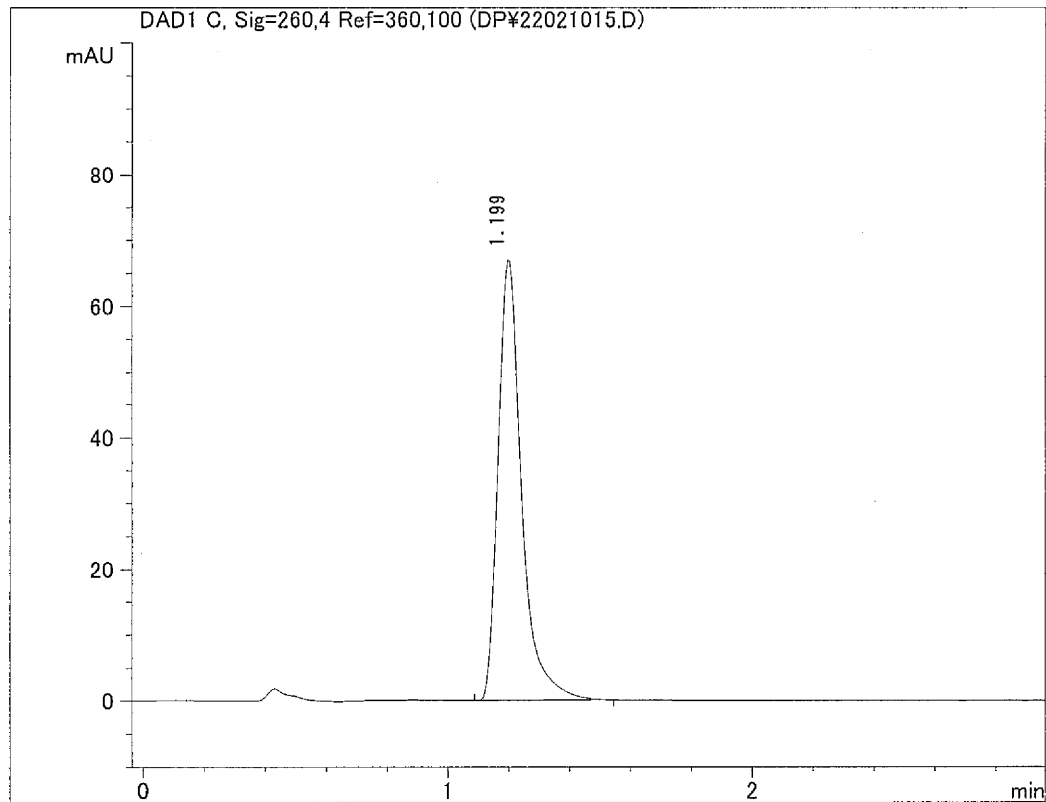
=====

\*\*\* End of Report \*\*\*

Conc. 1: Day 0 – New

Figure A-5-2 Representative measurement results (continued)

注入日 : 2022/02/10  
 試験番号, 名称 : ( ) A211241 (✓) A211242 ( ) A211243 シーケンスライン : 9  
 分析ロット : DP-3. M シリテラミド :  
 サンプル名 : C0hC3n バイアル No. : 24  
 測定オペレータ : *ky* 注入 No. : 1  
 注入量 : 100 ul



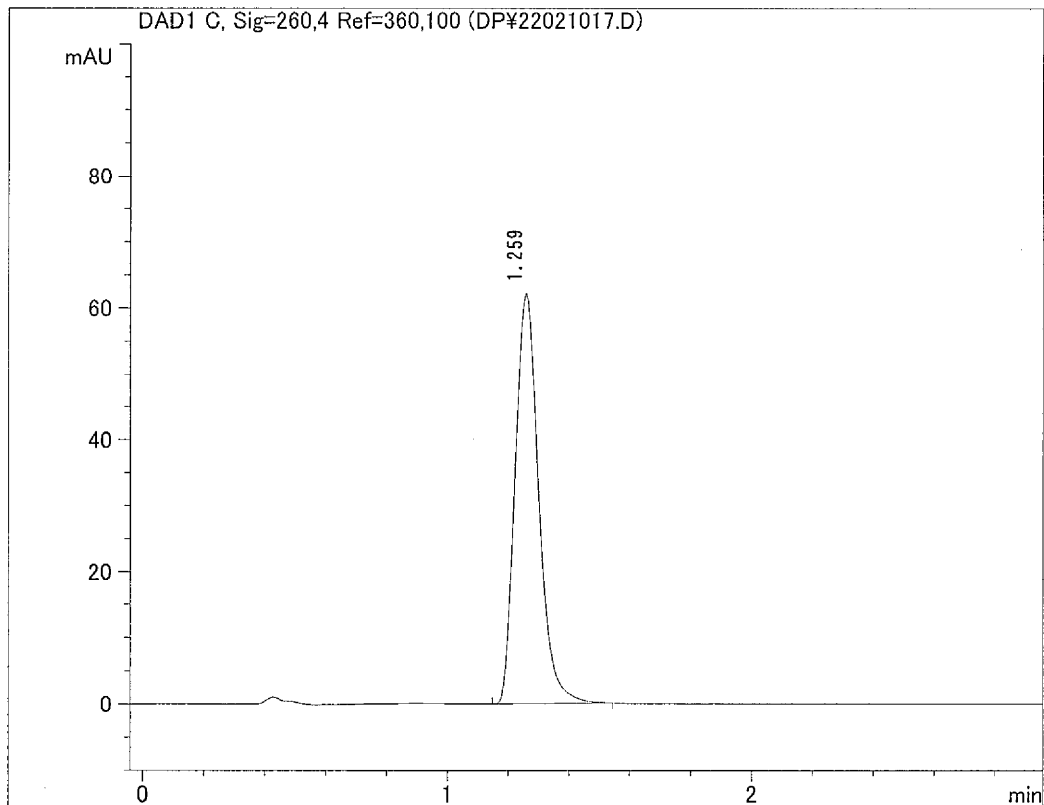
面積パーセントレポート						
ピーク #	RT [min]	タイプ	幅 [min]	面積 [count]	高さ [mAU]	面積 %
1	1.199	MM	0.089	359.556	67	100.0
トータル:				359.556	67	

\*\*\* End of Report \*\*\*

Conc. 3: Day 0 – New

Figure A-5-2 Representative measurement results (continued)

注入日 : 2022/02/10 シーケンスライン : 11  
 試験番号, 名称 : ( ) A211241 (✓) A211242 ( ) A211243 ジェネラト :  
 分析メソッド : DP-3.M バイール No. : 26  
 サンプル名 : C0hC5n 注入 No. : 1  
 測定オペレータ : *huk* 注入量 : 100 ul



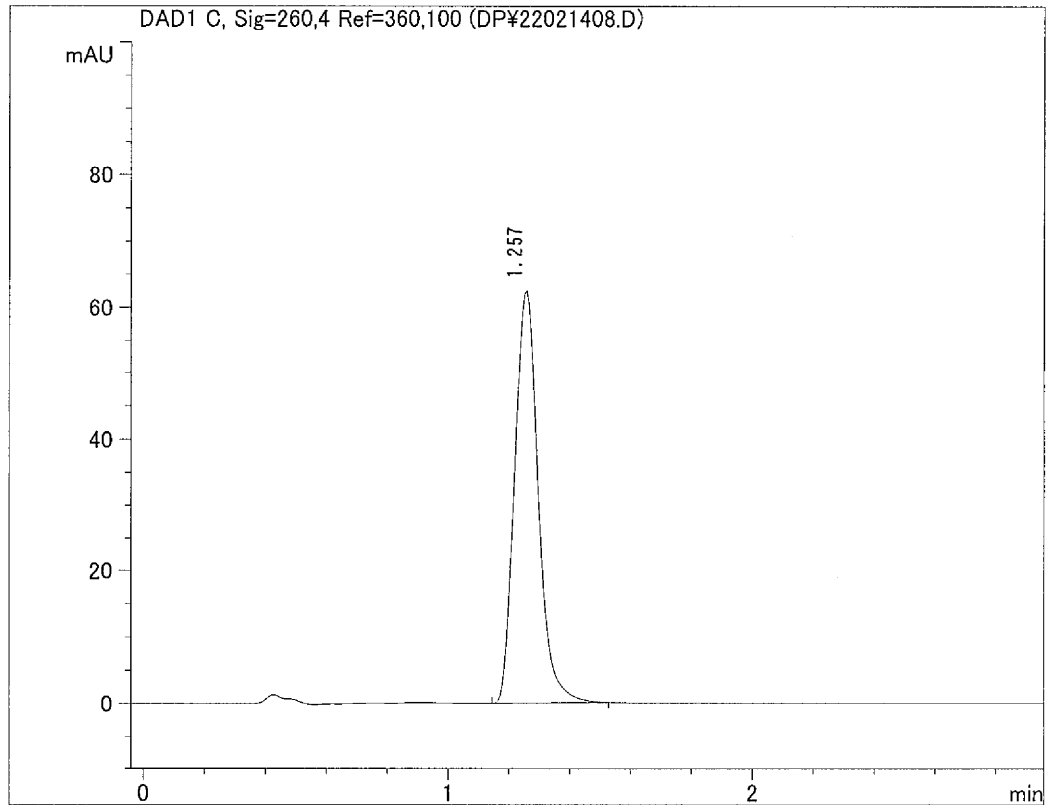
面積パーセントレポート						
ピーク #	RT [min]	タイプ	幅 [min]	面積 [count]	高さ [mAU]	面積 %
1	1.259	MM	0.089	333.712	62	100.0
トータル:				333.712	62	

\*\*\* End of Report \*\*\*

Conc. 5: Day 0 – New

Figure A-5-2 Representative measurement results (continued)

注入日 : 2022/02/14 シーケンスライン : 6  
 試験番号, 名称 : ( ) A211241 ( ) A211242 ( ) A211243 ジェネラリゼーション :  
 分析ロット : DP-3.M バイアル No. : 12  
 サンプル名 : STD 10 mg/L 注入 No. : 1  
 測定オペレータ : MJ 注入量 : 100 ul



面積パーセントレポート						
ピーク #	RT [min]	タイプ	幅 [min]	面積 [count]	高さ [mAU]	面積 %
1	1.257	MM	0.089	336.381	63	100.0
トータル:				336.381	63	

\*\*\* End of Report \*\*\*

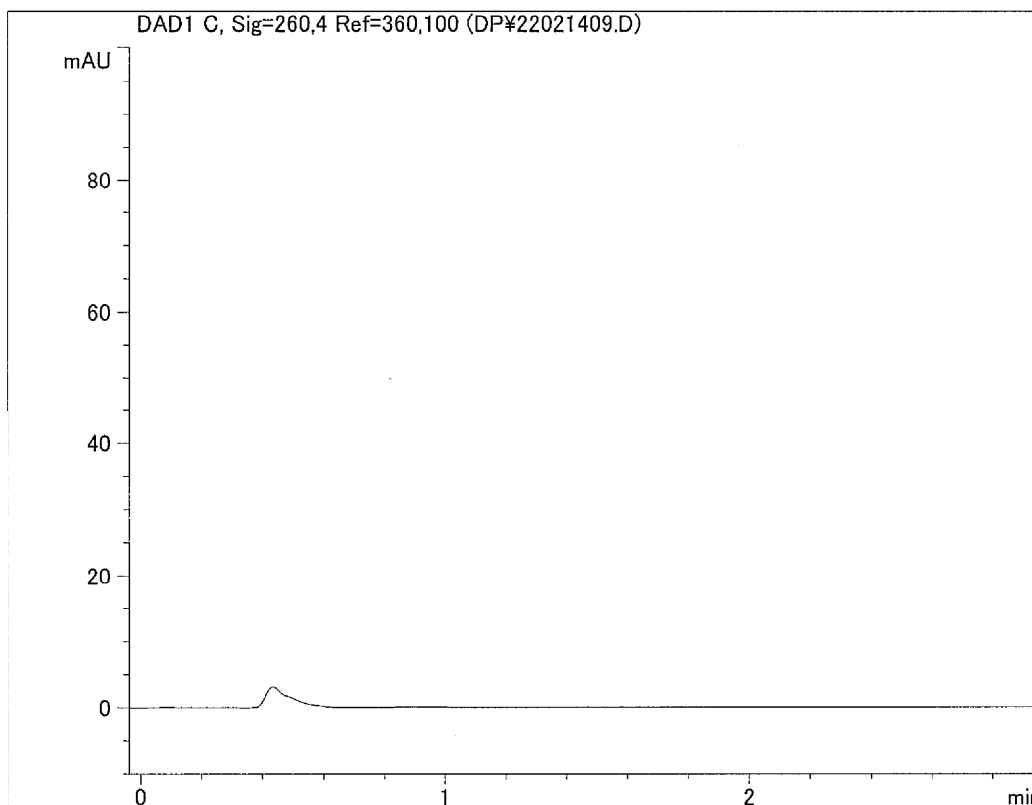
Standard 10.0 mg/L: Day 2

Figure A-5-2 Representative measurement results (continued)

```

=====
注入日       : 2022/02/14                      シーケンスライン :      7
試験番号, 名称 : ( ) A211241 ( / ) A211242 ( ) A211243 ジェルラミット
分析ロット   : DP-3.M                          バイアル No.   :     13
サンプル名   : C2dCo                           注入 No.      :      1
測定 検体レタ : MJ                           注入量        :    100 ul
=====

```



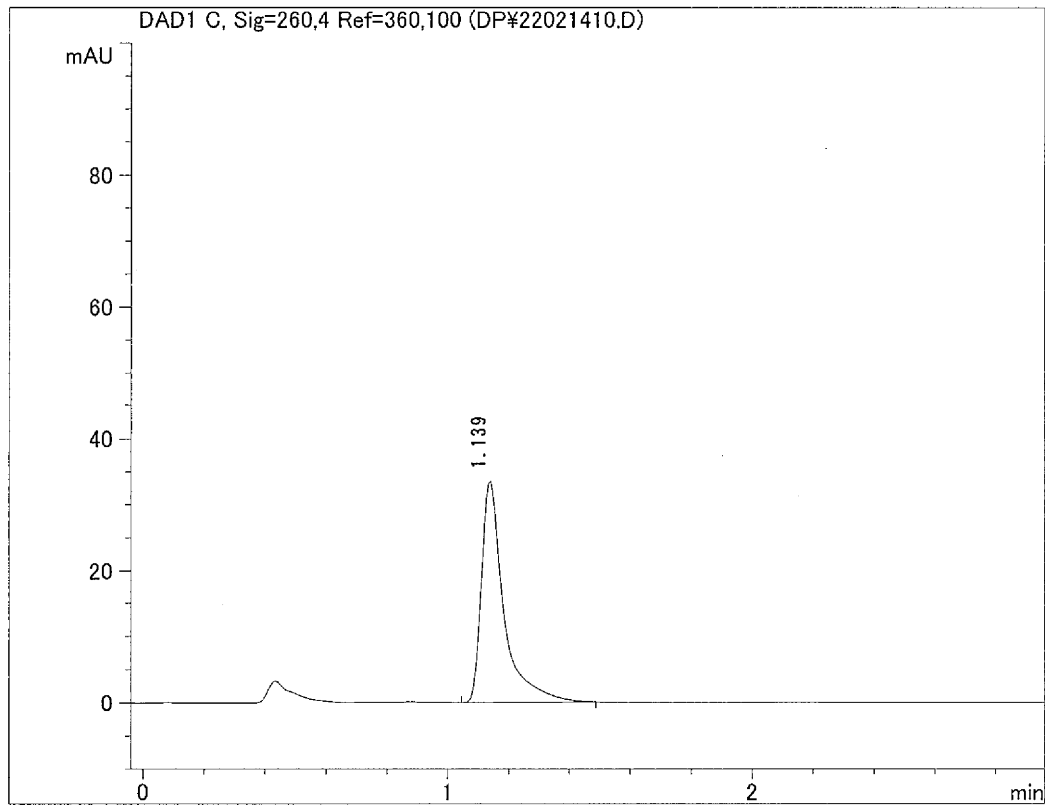
面積パーセントレポート						
ピーク #	RT [min]	タイプ	幅 [min]	面積 [count]	高さ [mAU]	面積 % [%]
トータル:						
*** End of Report ***						

Control: Day 2 – Old

Figure A-5-2 Representative measurement results (continued)

```

=====
注入日       : 2022/02/14                      シーケンスライン :      8
試験番号, 名称 : ( )A211241 (✓)A211242 ( )A211243 ジェルラミド
分析ロット   : DP-3.M                          バイアル No.   :     14
サンプル名   : C2dC10                         注入 No.       :      1
測定オペレータ : MJ                           注入量        :    100 ul
=====
  
```



面積パ°-セントレポ°-ト						
ピーク #	RT [min]	タイプ	幅 [min]	面積 [count]	高さ [mAU]	面積 %
1	1.139	MM	0.085	171.728	34	100.0
トータル:				171.728	34	

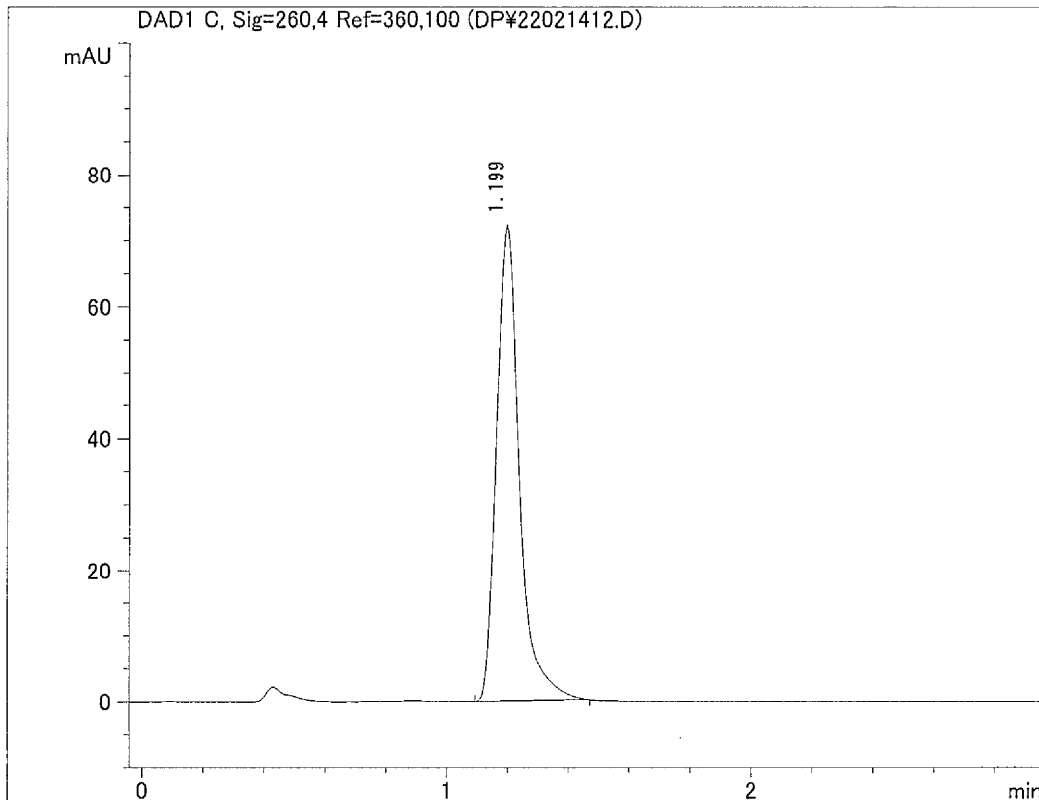
\*\*\* End of Report \*\*\*

Conc. 1: Day 2 – Old

Figure A-5-2 Representative measurement results (continued)



注入日 : 2022/02/14 シーケンスライン : 10  
 試験番号, 名称 : ( ) A211241 ( / ) A211242 ( ) A211243 シリカミド  
 分析キット : DP-3.M バイアル No. : 16  
 サンプル名 : C2dC30 注入 No. : 1  
 測定 ヲレタ : MJ 注入量 : 100 ul



面積パセントレポート						
ピーク #	RT [min]	タイプ	幅 [min]	面積 [count]	高さ [mAU]	面積 %
1	1.199	MM	0.087	377.750	72	100.0
トータル:				377.750	72	

\*\*\* End of Report \*\*\*

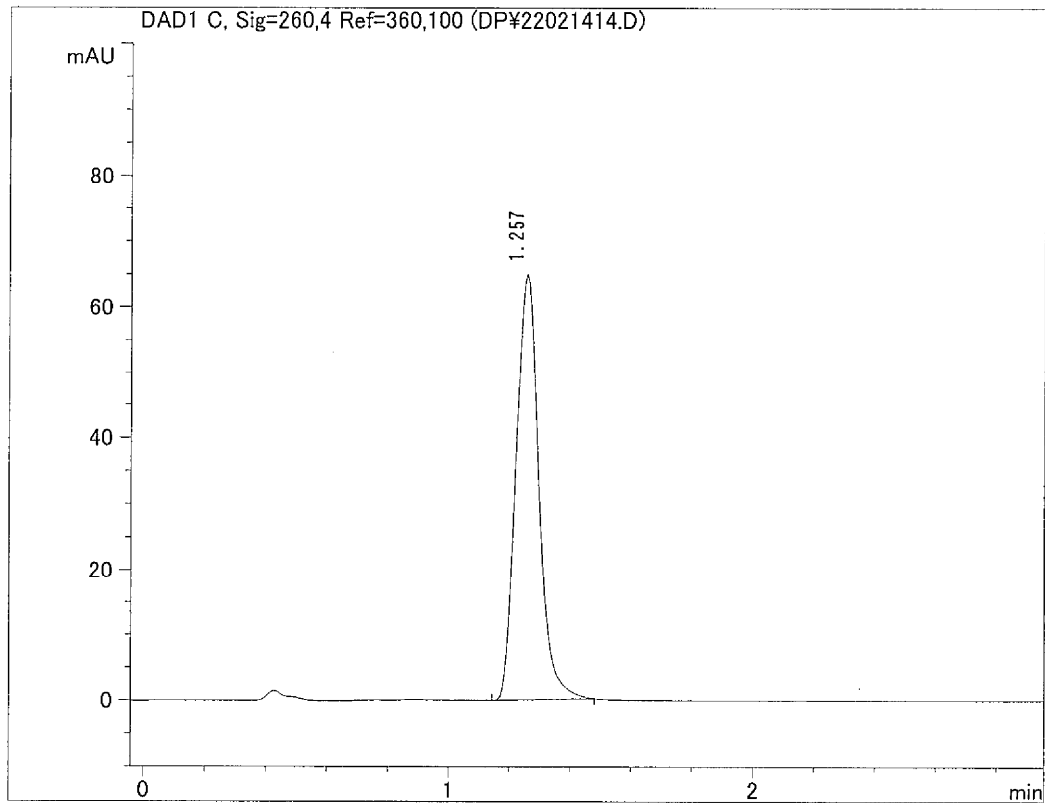
Conc.3: Day 2 – Old

Figure A-5-2 Representative measurement results (continued)

```

=====
注入日       : 2022/02/14
試験番号, 名称 : ( ) A211241 (✓) A211242 ( ) A211243 シーケンスライン : 12
分析ロット   : DP-3.M
サンプル名   : C2dC50
測定オペレータ : MJ
                ハイアル No. : 18
                注入 No. : 1
                注入量 : 100 ul
=====

```



面積パーセントレポート						
ピーク #	RT [min]	タイプ	幅 [min]	面積 [count]	高さ [mAU]	面積 %
1	1.257	MM	0.087	338.064	65	100.0
トータル:				338.064	65	

\*\*\* End of Report \*\*\*

Conc. 5: Day 2 – Old

Figure A-5-2 Representative measurement results (continued)

## 付属資料－6

結果の算出

Table A-6-1 Calculation the LC50 (7 days)

TOXDAT MULTI-METHOD PROGRAM (BINOMIAL, MOVING AVERAGE AND PROBIT METHODS)					
ミジンコ繁殖阻害試験 Time: 7day					
Conc. No.	CONC. mg/L	NUMBER EXPOSED	NUMBER IMMOBILIZATION	PERCENT IMMOBILIZATION	BINOMIAL PROB. (%)
Conc. 1	4.95	10	0	0	0.09765625
Conc. 2	10.8	10	0	0	0.09765625
Conc. 3	22.0	10	0	0	0.09765625
Conc. 4	46.1	10	8	80	5.46875
Conc. 5	100	10	10	100	0.09765625
THE BINOMIAL TEST SHOWS THAT 22 AND 100 CAN BE USED AS STATISTICALLY SOUND CONSERVATIVE 95 PERCENT CONFIDENCE LIMITS SINCE THE ACTUAL CONFIDENCE LEVEL ASSOCIATED WITH THESE LIMITS IS 99.8046875 PERCENT. AN APPROXIMATE EC50 FOR THIS SET OF DATA IS 36.5240444485504					
WHEN THERE ARE LESS THAN TWO CONCENTRATIONS AT WHICH THE PERCENT IMMOBILIZATION IS BETWEEN 0 AND 100, NEITHER THE MOVING AVERAGE NOR THE PROBIT METHOD CAN GIVE ANY STATISTICALLY SOUND RESULTS.					

Table A-6-2 Results of statistical multicomparison test

**Cumulative Number of offspring**

<b>Input Data Table</b>							
	control Group1	Conc.1 Group2	Conc.2 Group3	Conc.3 Group4	Conc.4 Group5	Conc.5 Group6	
	20	14	2	0	0	0	
	16	19	0	0	0	0	
	22	20	14	0	0	0	
	16	26	0	3	0	0	
	13	19	25	12	3	0	
	25	22	22	14	0	0	
	20	22	20	10	0	0	
	25	24	12	9	0	0	
	17	20	8	11	0	0	
	12	22	2	2	3	0	
Group	Samples	Mean	S.E.	S.D.	Variance		
1	10	18.6000	1.4468	4.5753	20.9333		
2	10	20.8000	1.0306	3.2592	10.6222		
3	10	10.5000	3.0157	9.5365	90.9444		
4	10	6.1000	1.7729	5.6065	31.4333		
5	10	0.6000	0.4000	1.2649	1.6000		
6	10	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000		
Method	vs	Side	Stat.	0.05	0.01	0.001	Prob.
Bartlett test		0	999.9999	>11.0705	15.0863	20.5150	0.0000
<div> <input type="checkbox"/> 等分散である                 <input checked="" type="checkbox"/> 等分散でない             </div>							

Table A-6-2 Results of statistical multicomparison test (continued)

**Cumulative Number of offspring**

等分散性が認められなかったため、  
結果を log変換した

**Input Data Table**

control Group1	Conc.1 Group2	Conc.2 Group3	Conc.3 Group4	Conc.4 Group5	Conc.5 Group6
1.322	1.176	0.477	0.000	0.000	0.000
1.230	1.301	0.000	0.000	0.000	0.000
1.362	1.322	1.176	0.000	0.000	0.000
1.230	1.431	0.000	0.602	0.000	0.000
1.146	1.301	1.415	1.114	0.602	0.000
1.415	1.362	1.362	1.176	0.000	0.000
1.322	1.362	1.322	1.041	0.000	0.000
1.415	1.398	1.114	1.000	0.000	0.000
1.255	1.322	0.954	1.079	0.000	0.000
1.114	1.362	0.477	0.477	0.602	0.000

Group	Samples	Mean	S.E.	S.D.	Variance		
1	10	1.2812	0.0329	0.1042	0.0109		
2	10	1.3337	0.0219	0.0693	0.0048		
3	10	0.8297	0.1735	0.5487	0.3011		
4	10	0.6490	0.1582	0.5002	0.2502		
5	10	0.1204	0.0803	0.2539	0.0644		
6	10	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000		
Method	vs	Side	Stat.	0.05	0.01	0.001	Prob.
Bartlett test		0	999.9999	>11.0705	15.0863	20.5150	0.0000

□ 等分散である  
■ 等分散でない

Table A-6-2 Results of statistical multicomparison test (continued)

**Cumulative Number of offspring**

等分散性が認められなかったため、  
ノンパラメトリック手法を用いた

**Input Data Table**

control	Conc.1	Conc.2	Conc.3	Conc.4	Conc.5
Group1	Group2	Group3	Group4	Group5	Group6
20	14	2	0	0	0
16	19	0	0	0	0
22	20	14	0	0	0
16	26	0	3	0	0
13	19	25	12	3	0
25	22	22	14	0	0
20	22	20	10	0	0
25	24	12	9	0	0
17	20	8	11	0	0
12	22	2	2	3	0

Group	Samples	Mean	S.E.	S.D.	Variance
1	10	18.6000	1.4468	4.5753	20.9333
2	10	20.8000	1.0306	3.2592	10.6222
3	10	10.5000	3.0157	9.5365	90.9444
4	10	6.1000	1.7729	5.6065	31.4333
5	10	0.6000	0.4000	1.2649	1.6000
6	10	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000

Method	vs	Side	Stat.	0.05	0.01	0.001	Prob.
Steel	1 vs 2	2	1.1057	2.5093	3.0564	999.9900	0.7006
Steel	1 vs 3	2	1.8991	2.5093	3.0564	999.9900	0.2068
Steel	1 vs 4	2	3.6015	>2.5093	>3.0564	999.9900	0.0015 **
Steel	1 vs 5	2	3.9113	>2.5093	>3.0564	999.9900	0.0004 **
Steel	1 vs 6	2	4.0437	>2.5093	>3.0564	999.9900	0.0003 **

参考のため、Dunnett検定も行う。

Method	vs	Side	Stat.	0.05	0.01	0.001	Prob.
Dunnett	1 vs 2	2	0.9662	2.5906	3.2055	999.9900	0.7959
Dunnett	1 vs 3	2	3.5574	>2.5906	>3.2055	999.9900	0.0036 **
Dunnett	1 vs 4	2	5.4898	>2.5906	>3.2055	999.9900	0.0000 **
Dunnett	1 vs 5	2	7.9054	>2.5906	>3.2055	999.9900	0.0000 **
Dunnett	1 vs 6	2	8.1689	>2.5906	>3.2055	999.9900	0.0000 **