

3. 胚・仔魚期魚類短期毒性試験

要 約

試験委託者： 環境省

表 領題： ジソビラミドの魚類 (*Danio rerio*) 胚・仔魚期に対する短期毒性試験

試験番号： A211243

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

濃度区の試験液は不溶物を除去した水溶性画分^{*2}を試験液とした。

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

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

被験物質が溶解状態で存在しているとみなすことができる水溶性画分

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

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

8) 試験濃度 :

試験区	設定濃度 (mg/L)
対照区	—
濃度区 1	100

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用いて算出した。

最大無影響濃度 (NOEC) : > 104 mg/L

1 材料

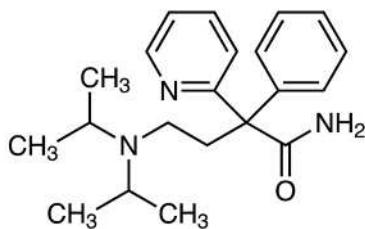
1.1 被験物質

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* : C₂₁H₂₉N₃O

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 サーモフィッシュ・サイエンティフィック製

1.2 試験用水

横浜市水道水を活性炭ろ過およびチオ硫酸ナトリウム添加により脱塩素処理した水（脱塩素水道水）を使用した。定期的（約6ヶ月毎）に株式会社MCエバテックに依頼して水質を測定し、試験用水として適切な水質（全硬度：40～250 mg CaCO₃/L, pH：6.7～8.5）であることを確認している。最新の測定結果を付属資料-2に示す。pHは7.9であり、適正範囲内であった。全硬度は34 mg CaCO₃/Lと範囲を下回ったが、飼育中の生物に異常は認められないと判断した。

1.3 供試生物

1)一般名（学名）：ゼブラフィッシュ (*Danio rerio*)

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

3)感受性の確認： 定期的に基準物質（塩化ナトリウム、試薬特級）による胚・仔魚期に対する短期毒性試験を行い、供試魚の感受性を調べている。

最新の結果および当施設における過去のロットの結果（2016年以降、n=8）を以下に示す。

孵化率（EC50）：6.29 g/L

（平均値8.28 g/L、標準偏差1.29 g/L、最小値～最大値6.29～9.82 g/L）

孵化後生存率（EC50）：3.16 g/L

（平均値3.25 g/L、標準偏差1.23 g/L、最小値～最大値2.29～6.15 g/L）

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

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

1.4 試験容器および恒温槽等

- 1) 試験容器 : ガラス容器（蓋：透明塩ビ板）
- 2) クロマトチャンバー : MC-30EF3 日本フリーザー製
- 3) 温度計 : TX1001 型 横河メータ&インスツルメンツ製
- 4) マルチ水質計（溶存酸素濃度、pH 測定用）: MM-60R 型 東亜ディーケー工業製
- 5) 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
MS3002S 型 メトラー・トレド製
- 6) ライト : LED ビュアー ST-A3 富士フィルム製
- 7) 実体顕微鏡 : SMZ-U 型 ニコン製
SPZT-50FTM 型 カートン光学製

2 方法

2.1 試験方法

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

濃度区の試験液は不溶物を除去した水溶性画分^{*2}を試験液とした。なお、試験用水に対する被験物質の溶解性について評価した結果を付属資料-3 に示す。

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

*2 水溶性画分（WSF, Water-soluble fraction）：被験物質が溶解状態で存在しているとみなすことができる水溶性画分

2.1.1 試験条件

- 1) 暴露方式 : 半止水式（48 時間毎に試験液を換水）
- 2) 暴露期間 : 8 日間（対照区において 50%を超える胚が孵化した日を孵化日とし、孵化 5 日後に終了）
- 3) 試験液量 : 50 mL／容器
- 4) 連数 : 4 容器／試験区
- 5) 供試生物数 : 60 個体／試験区（15 個体／容器）

- 6) 試験温度 : $26\pm1^{\circ}\text{C}$
 7) 溶存酸素濃度 : 鮑和濃度の 60%以上 (エアレーション無し)
 8) pH : 調整無し
 9) 照明 : 室内光, 16 時間明 (1000 lux 以下) / 8 時間暗
 10) 給餌 : 無給餌

2.1.2 予備試験結果

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^{*1}でろ過^{*2}して不溶の被験物質を除くことにより, 負荷率^{*3} 100 mg/L の原液を調製した。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 μm

*2 : ヤマト科学製, アスピレーター WP-15 型

*3 : 負荷率 (Loading rate) :

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

予備試験結果

設定濃度 (mg/L)	生存率 (%)	孵化率 (%)	孵化後生存率 (%)	試験液中の被験物質濃度 (mg/L)	
				暴露開始時	暴露 48 時間後
対照区	95	95	100	N.D.	N.D.
1.0 ^{*4}	91	91	100	0.932	0.987
10 ^{*4}	96	96	100	9.74	10.8
100	93	93	100	99.5	106

供試条件 : 45 個体 / 試験区 (15 個体 / 容器)

N.D. : Not detected

*4 : 負荷率 100 mg/L の試験液を希釈して調製したため, 希釈率から算出した値を記載。

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 ^{*5} (mg/L)
対照区	—
濃度区 1	100

*5 : 試験ガイドライン上限濃度による限度試験とした。

2.1.4 試験液の調製

試験液は付属資料-4 に示す方法に従って調製した。

2.1.5 試験液の分析

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： 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各濃度の試験液の水温を測定し、試験温度の範囲にあることを確認した。各試験容器に調製した試験液を 50 mL ずつ分注した。また、各試験区について、試験容器とは別に試験液を約 50 mL 入れた容器（各試験区 1 つずつ）を用意した（以下、分注用試験容器と呼ぶ）。

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

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

2) 換水

換水は暴露期間中 48 時間毎（観察の終了後）に実施した。

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

3) 観察

暴露期間中毎日（原則として暴露開始から 24 時間毎），試験容器中の試験生物を肉眼または実体顕微鏡下で観察し、生死および孵化した胚体数を記録した。発生前期（器官形成前）の胚では、全体の透明性が消失して白濁したものを死亡とした。発生後期（器官形成後）および孵化後

の仔魚では、白濁または心臓の拍動が認められないものを死亡とした。卵膜から胚（体躯部）が完全に出ていない状態のものは孵化前とした。

生死および孵化した胚体数に加えて、少なくとも、死亡（D）、重篤（C）、異常（A）または正常（N）のいずれかに区分するとともに、暴露開始から48時間後以降の観察では、各試験濃度の生存する胚または仔魚のうち、対照区と比較して、「体躯の発育不全」、「尾部の卵黄からの不分離」などの形態異常、「心拍数の低下」あるいは行動などに異常が認められる個体数を記録した。観察後、死亡した胚、仔魚および孵化後の卵膜を除去した。

4) 水質測定

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

2.2 試験結果の評価

2.2.1 結果の算出

1) 結果の算出に用いる被験物質濃度

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

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

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

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

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*×*Days*×*Renewal Times*とする。)

Days : n期間の終わりの日数

Renewal Times : 次の分析までの換水回数

l : 分析回数（セット数）

\overline{MC} : 時間加重平均値

2) 統計的手法

暴露試験から得られるデータをもとに、以下の影響指標を算出した。

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

また、孵化率、孵化後生存率を用い、以下の統計学的手法により比較し、有意差が認められない場合、最大無影響濃度を濃度区 1 以上とする。

2 群の比較 [対照区と濃度区 1]	
F 検定	
等分散が認められる場合	等分散が認められない場合
Student の t 検定	Welch の t 検定
Yukms ソフトウェア Statlight 「#3 2 群の比較」（Yukms Corp, 東京）	

2.2.2 試験の有効性

以下の条件から、本試験の有効性を判断した。

- 1) 対照区における孵化率が 80% 以上であること
- 2) 対照区における暴露終了時の生存率が 70% 以上であること
- 3) 対照区における溶存酸素が暴露期間を通して飽和酸素濃度の 60% 以上であること

3 結果および考察

3.1 試験成績の信頼性に影響を及ぼしたと思われる環境要因

該当する事象はなかった。

3.2 試験液の水質

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

水温は 25.0~26.3°C, 溶存酸素濃度は 7.5~8.9 mg/L, pH は 7.3~9.0 であった。水温および溶存酸素濃度は、対照区および濃度区 1 ともに試験条件を満たした。pH は、対照区で試験条件 (pH 6.5~8.5) を満たし、濃度区 1 でその範囲を超えるものがあった。これは、被験物質がアミンであることに起因すると考えられた。

3.3 試験液中の被験物質濃度

試験液中の被験物質濃度の分析結果を Table 4 に、代表的な測定結果を付属資料-5 に示す。

濃度区 1 の測定値の時間加重平均値は 104 mg/L であった。

3.4 供試生物の観察

暴露期間中における供試生物の観察結果を Table 5 に示す。各試験区の生存率、孵化率および孵化後生存率を Table 6 に、濃度一孵化率曲線および濃度一孵化後生存率曲線を Figure-1 に示す。

暴露終了時の生存率は、対照区で 98%, 濃度区 1 で 98% であった。孵化率は対照区で 98%, 濃度区 1 で 97% であった。また、孵化後生存率は、対照区で 100%, 濃度区 1 で 100% であった。

孵化率および孵化後生存率は、濃度区 1 において、対照区と比較し有意な差は認められなかつた。

3.5 最大無影響濃度 (NOEC)

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

NOEC : > 104 mg/L

3.6 試験の有効性

「3.2 試験液の水質および外観」および「3.4 供試魚の観察」の結果が試験の有効性の条件を全て満たしたため、試験是有効であると判断した。

以 上

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

Table 1 Temperatures of test solutions

Test Group	New Day 0	Old Day 2	New Day 2	Old Day 4	New Day 4	Old Day 6	New Day 6	Old Day 8
Temperature (°C)								
Control	26.3	25.6	25.3	25.5	25.9	25.2	25.1	25.3
Conc.1	26.3	25.2	25.2	25.5	25.9	25.0	25.1	25.5
							Minimum:	25.0
							Maximum:	26.3

New: New test solution freshly prepared

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

Table 2 Dissolved oxygen concentrations in test solutions

Test Group	New Day 0	Old Day 2	New Day 2	Old Day 4	New Day 4	Old Day 6	New Day 6	Old Day 8
Dissolved Oxygen (mg/L)								
Control	8.9	8.4	8.0	7.6	7.7	7.6	7.7	7.7
Conc.1	7.6	8.1	8.3	7.5	7.7	7.8	7.8	7.9
							Minimum:	7.5
							Maximum:	8.9

New: New test solution freshly prepared

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

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

Table 3 pH values of test solutions

Test Group	New Day 0	Old Day 2	New Day 2	Old Day 4	New Day 4	Old Day 6	New Day 6	Old Day 8
----- pH -----								
Control	7.3	7.5	7.6	8.2	8.1	8.5	8.0	7.5
Conc.1	8.5	7.6	8.6	8.2	9.0	8.1	9.0	8.3

Minimum: 7.3

Maximum: 9.0

New: New test solution freshly prepared

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

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

Table 4 Measured concentrations of the test substance in test solutions

Test Group	Nominal Conc. (mg/L)	Measured concentration (mg/L) (Percent of Nominal, %)				
		0 day New	2 day Old	4 day New	6 day Old	Mean
Control		<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	
Conc.1	100	99.0 (99)	→ (104)	104 (97)	97.1 (97)	113 (113)

Lower limit of quantification: 0.01 mg/L

New: New test solution freshly prepared

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

Mean: Time-weighted mean

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

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

Table 5 Observation of fish

Test Group	Vessel No.	Day 0				Day 1				Day 2				Day 3				Day 4				
		Death		Survival		Death		Survival		Death		Survival		Death		Survival		Death		Survival		
		E	F	E	F	E	F	E	F	E	F	E	F	E	F	E	F	E	F	E	F	
Control	1	0	0	15	0	0	0	15	0	1	0	12	2	1	0	2	12	1	0	0	14	
				[0]				[0]				[0]	[0]			[0]	[0]				[0]	
	2	0	0	15	0	0	0	15	0	0	0	15	0	0	0	0	2	13	0	0	0	15
				[0]				[0]				[0]					[0]	1[AN]			1[AN]	
Conc.1	3	0	0	15	0	0	0	15	0	0	0	14	1	0	0	0	4	11	0	0	0	15
				[0]				[0]				[0]	[0]			[0]	[0]				1[AN]	
	4	0	0	15	0	0	0	15	0	0	0	14	1	0	0	0	7	8	0	0	0	15
				[0]				[0]				[0]	[0]			[0]	[0]				[0]	
	1	0	0	15	0	0	0	15	0	1	0	14	0	1	0	1	13	1	0	0	14	
				[0]				[0]				[0]				[0]	[0]				[0]	
	2	0	0	15	0	0	0	15	0	0	0	11	4	0	0	0	0	15	0	0	0	15
				[0]				[0]				[0]	[0]				1[AN]			1[B]		
	3	0	0	15	0	0	0	15	0	0	0	14	1	0	0	0	4	11	0	0	1	14
				[0]				[0]				[0]	[0]			[0]	[0]				[0]	[0]
	4	0	0	15	0	0	0	15	0	0	0	15	0	0	0	0	13	2	0	0	0	15
				[0]				[0]				[0]				[0]	[0]				[0]	
	1	1	0	0	14	1	0	0	14	1	0	0	14	1	0	0	14	1	0	0	14	
				[0]				[0]				[0]				[0]					[0]	
	2	0	0	0	15	0	0	0	15	0	0	0	15	0	0	0	0	15	0	0	0	15
				1[AN]				1[AN]				1[AN]				1[AN]			1[AN]			
	3	0	0	0	15	0	0	0	15	0	0	0	15	0	0	0	15	0	0	0	15	
				1[AN]				1[AN]				1[AN]				1[AN]			1[AN]			
	4	0	0	0	15	0	0	0	15	0	0	0	15	0	0	0	15	0	0	0	15	
				[0]				[0]				[0]				[0]					[0]	
	1	1	0	0	14	1	0	0	14	1	0	0	14	1	0	0	14	1	0	0	14	
				[0]				[0]				[0]				[0]					[0]	
	2	0	0	0	15	0	0	0	15	0	0	0	15	0	0	0	15	0	0	0	15	
				1[B]				1[B]				1[B]				1[B]			1[B]			
	3	0	0	1	14	0	0	0	15	0	0	0	15	0	0	0	15	0	0	0	15	
				[0]	[0]			[0]				[0]				[0]			[0]			
	4	0	0	0	15	0	0	0	15	0	0	0	15	0	0	0	15	0	0	0	15	
				[0]				[0]				[0]				[0]					[0]	

Death : Cumulative number of death of embryo or fish

E : Embryo

B : Blister

Survival : Number of survival embryo or fish

F : Fish

AN : Abnormal notochord

[] : Number of abnormal embryo or fish

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

Table 6 Survival rate, hatching rate, and survival rate after hatching

Test Group	Lading rate		Survival rate	Hatching rate	Survival rate after hatching
	mg/L	[Mean ^a measured Concentration]	No.		
Control	--	1	93	93	100
		2	100	100	100
		3	100	100	100
		4	100	100	100
	100 [103]	Average	98	98	100
		SD	4	4	0
		1	93	93	100
		2	100	100	100
Conc. 1	100 [103]	3	100	93	100
		4	100	100	100
		Average	98	97	100
		SD	4	4	0

a: Time-weighted mean

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

/Total embryo at the start of exposure × 100

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

/Total embryo at the start of exposure × 100

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

/Total number of hatching during exposure period × 100

Table 7 No Observed Effect Concentration (NOEC)

Exposure period (day)	NOEC (mg/L)
8	>104

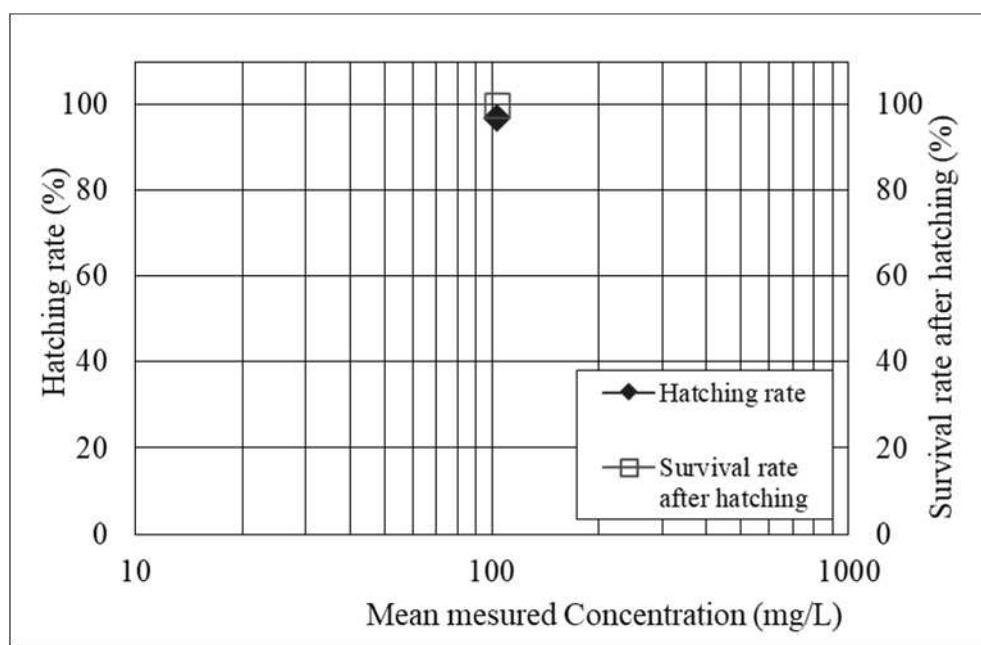


Figure 1 Concentration-hatching rate and concentration-survival rate after hatching

付属資料-1

赤外吸収スペクトル

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

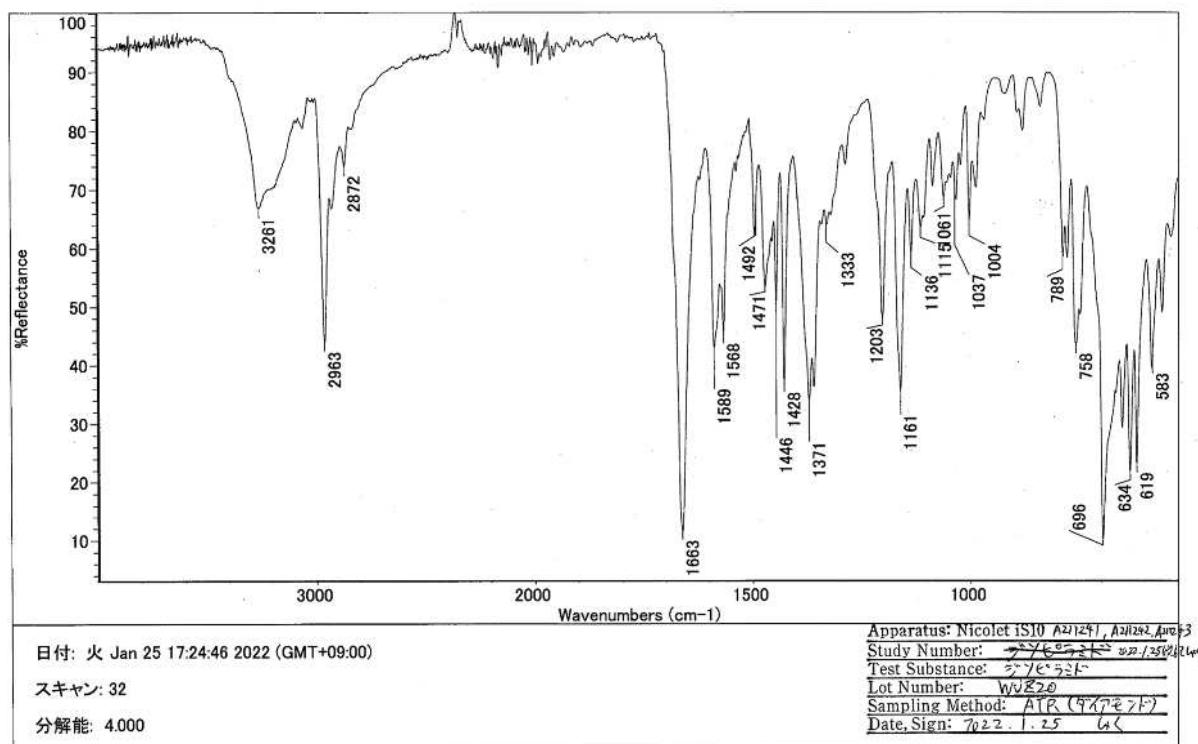


Figure A-1-1 Infrared absorption spectrum of the test substance before the study

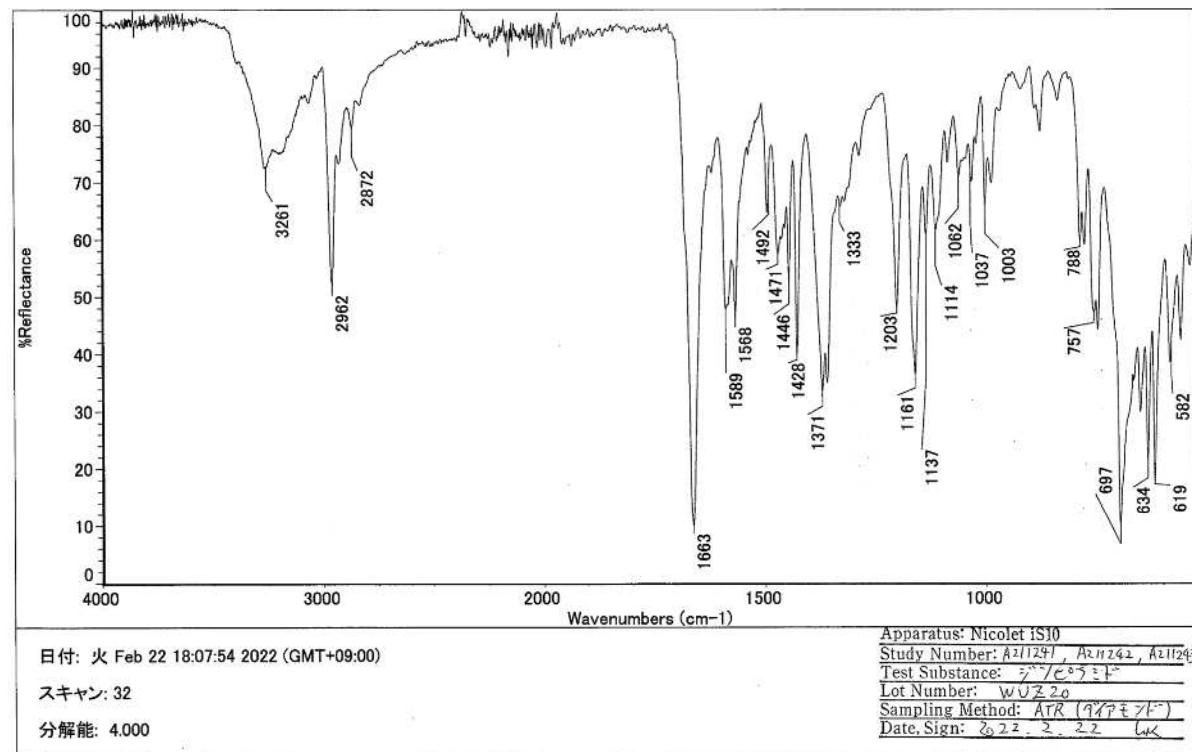


Figure A-1-2 Infrared absorption spectrum of the test substance after the end of exposure

付属資料－2

試験用水の水質

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

Results of Analysis, Device No.1

Sample: Dechlorinated tap water generated with device No. 1 in building B12 of Mitsubishi chemical research [for rearing animals]
 Measurement agency: MC Evolve Technologies Corporation
 1-25-14, Kannon-dai, Tsukuba, Ibaraki 305-0856, Japan
 Date for sample collection: August 17, 2021

These data were obtained from report 21H-003907-0001.

Item	[unit]	Result	Item	[unit]	Result
Suspended Substance (SS) [mg/L]		N.D. (<1.0)	Selenium	[mg/L]	N.D. (<0.001)
Total Organic Carbon (TOC) [mg/L]		0.3	Total Residue	[mg/L]	81
Biochemical Oxygen Demand (BOD) [mg/L]		<0.5	Conductivity	[mS/m]	10
Chemical Oxygen Demand (COD) [mg/L]		1.6	Hardness	[mg CaCO ₃ /L]	34
Total Phosphorus [mg/L]		N.D. (<0.02)	Alkalinity (pH4.8)	[mg CaCO ₃ /L]	31
pH [-/(°C)]		7.9 (20)	Sodium	[mg/L]	5.5
Coliform Group [MPN/100mL]		N.D. (<2)	Potassium	[mg/L]	0.8
Total Mercury [mg/L]		N.D. (<0.00005)	Calcium	[mg/L]	9.6
Copper [mg/L]		N.D. (<0.005)	Magnesium	[mg/L]	2.5
Cadmium [mg/L]		N.D. (<0.0003)	Oil (<i>n</i> -Hexane Extracts)	[mg/L]	N.D. (<0.5)
Zinc [mg/L]		N.D. (<0.01)	Oil (Oily Film / Observation)	[-]	Not Recognized
Lead [mg/L]		N.D. (<0.001)	Phenols	[mg/L]	N.D. (<0.005)
Aluminum [mg/L]		0.03	Polychlorinated Biphenyl (PCB)	[mg/L]	N.D. (<0.0005)
Nickel [mg/L]		N.D. (<0.01)	Thiram	[mg/L]	N.D. (<0.0006)
Hexavalent Chromium [mg/L]		N.D. (<0.005)	Simazine	[mg/L]	N.D. (<0.0003)
Manganese [mg/L]		N.D. (<0.01)	Thiobencarb	[mg/L]	N.D. (<0.002)
Tin [mg/L]		N.D. (<0.03)	Isoxathion	[mg/L]	N.D. (<0.001)
Silver [mg/L]		N.D. (<0.01)	Diazinon	[mg/L]	N.D. (<0.001)
Cobalt [mg/L]		N.D. (<0.01)	Fenitrothion (MEP)	[mg/L]	N.D. (<0.001)
Iron [mg/L]		N.D. (<0.04)	Isoprothiolane	[mg/L]	N.D. (<0.001)
Total Cyanide [mg/L]		N.D. (<0.001)	Oxine-Copper	[mg/L]	N.D. (<0.001)
Residual Chlorine [mg/L]		N.D. (<0.1)	Chlorothalonil (TPN)	[mg/L]	N.D. (<0.001)
Bromic Ion [mg/L]		N.D. (<0.5)	Propyzamide	[mg/L]	N.D. (<0.001)
Fluorine [mg/L]		N.D. (<0.1)	EPN	[mg/L]	N.D. (<0.001)
Hydrogen Sulfide [mg/L]		N.D. (<0.002)	Dichlorvos (DDVP)	[mg/L]	N.D. (<0.001)
Ammonium Nitrogen [mg/L]		N.D. (<0.2)	Fenobucarb (BPMC)	[mg/L]	N.D. (<0.001)
Nitrite Nitrogen [mg/L]		N.D. (<0.1)	Iprobenfos (IBP)	[mg/L]	N.D. (<0.001)
Arsenic [mg/L]		N.D. (<0.001)	Chlornitrofen (CNP)	[mg/L]	N.D. (<0.001)
Surface-Active Agents (Anionic) [mg/L]		N.D. (<0.02)			

付属資料-3

試験用水に対する溶解性

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

1. 概要

以下に示す試験用水に対する被験物質の溶解性を評価した。

OECD 培地（藻類生長阻害試験用）

硬度 約 60 CaCO₃ mg/L のミネラルウォーター^{*1}（ニセネコゼミジンコ繁殖試験用）

脱塩素水道水（魚類胚・仔魚期短期毒性試験用）

*1 : キリンビバレッジ株式会社販売

2. 方法

- 1) 被験物質 20 mg を共栓付 200 mL 三角フラスコに採取し、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 CaCO₃ mg/L のミネラルウォーターは 21°C, 脱塩素水道水は 24°C 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^{*2}でろ過し、得られたろ液の被験物質濃度を高速液体クロマトグラフ（HPLC）計により測定した。

*2 : メルクミリポア製 Millex HA 0.45 μm

3. 結果および考察

測定結果

No.	OECD培地		硬度 約60 CaCO ₃ mg/Lの ミネラルウォーター		脱塩素水道水	
	測定濃度 (mg/L)	平均値 (mg/L)	測定濃度 (mg/L)	平均値 (mg/L)	測定濃度 (mg/L)	平均値 (mg/L)
1	91.5		109		99.9	
2	103	98	105	110	101	99
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°C) , 硬度 約 60 CaCO₃ mg/L のミネラルウォーターで 110 mg/L (21°C) , 脱塩素水道水で 99 mg/L (24°C) であると判断した。

付属資料-4

試験液の調製

試験液の調製

試験用水：脱塩素水道水

1. 被験物質の負荷

被験物質を下記の表の通り採取し、脱塩素水道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。

被験物質	:	100	mg
最終容量	:	1000	mL
容器	:	1L メジャーム瓶	
調製頻度	:	暴露開始24時間前および換水24時間前に調製	

試験区	負荷率 (mg/L)	被験物質採取量 (g)
対照区用原液	-	-
濃度区用原液	100	100

2. 搅拌

スターラーで24時間搅拌する。(室温約24°C)

3. WSFの採取

フィルター^{*1}でろ過^{*2}する。

*1:メルクミリポア製メンブレンフィルター HA 0.45 μm

*2:アスピレーター ヤマト科学製 WP-15型

↓

ろ液はエアレーション後、試験液とする。

付属資料-5

試験液の分析

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

1. 機器および試薬

(機器)

電子天秤 : AG204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

PB3002型 メトラー製

(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

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

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 μ m, 4.6 mm i.d. \times 50 mm

Agilent Technologies 製

溶離液 : A 10mM りん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 μ 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

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。

試験液（超純水で適宜希釈^{*}）0.75 mL 採取

| ←アセトニトリル 0.75 mL 添加

混合^{*2}

|

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. 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。

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

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

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

$$a = -1.511E+00 \quad -5.731E+00 < a < 2.709E+00$$

$$b = 3.333E+01 \quad (95\% \text{ confidence interval})$$

$$r = 1.000$$

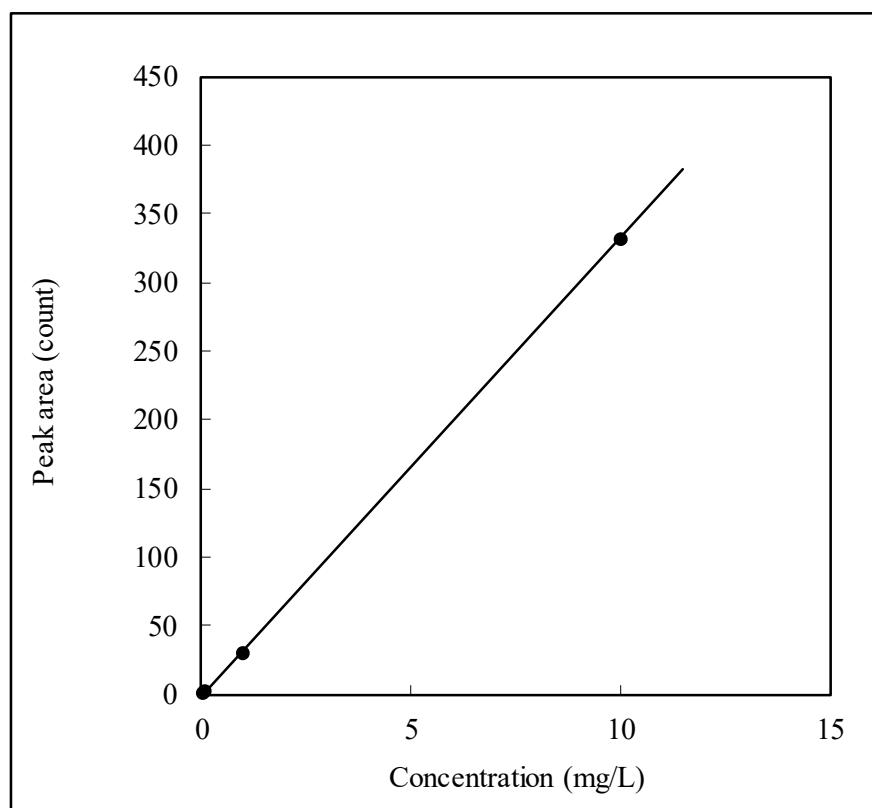
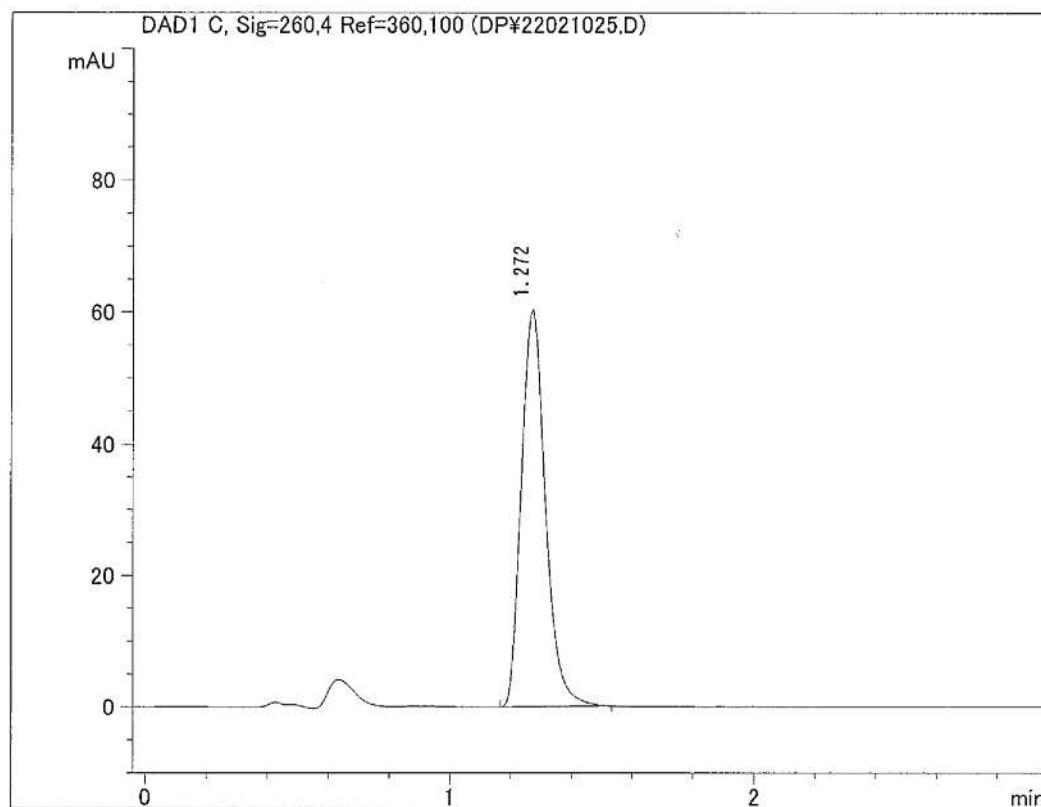


Figure A-5-1 Calibration curve

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

注入日	: 2022/02/10	シーケンスライン	: 19
試験番号, 名称	: ()A211241 ()A211242 ()A211243 ジリピラミド	バイアル No.	: 7
分析メソッド	: DP-3.M	注入 No.	: 1
サンプル名	: STD 10 mg/L	注入量	: 100 ul
測定 ペレタ	: <i>JK</i>		



面積パーセントレポート						
ピ-ク #	RT [min]	タイプ	幅 [min]	面積 [count]	高さ [mAU]	面積 [%]
1	1.272	MM	0.091	331.839	60	100.0
ト-タル:				331.839	60	

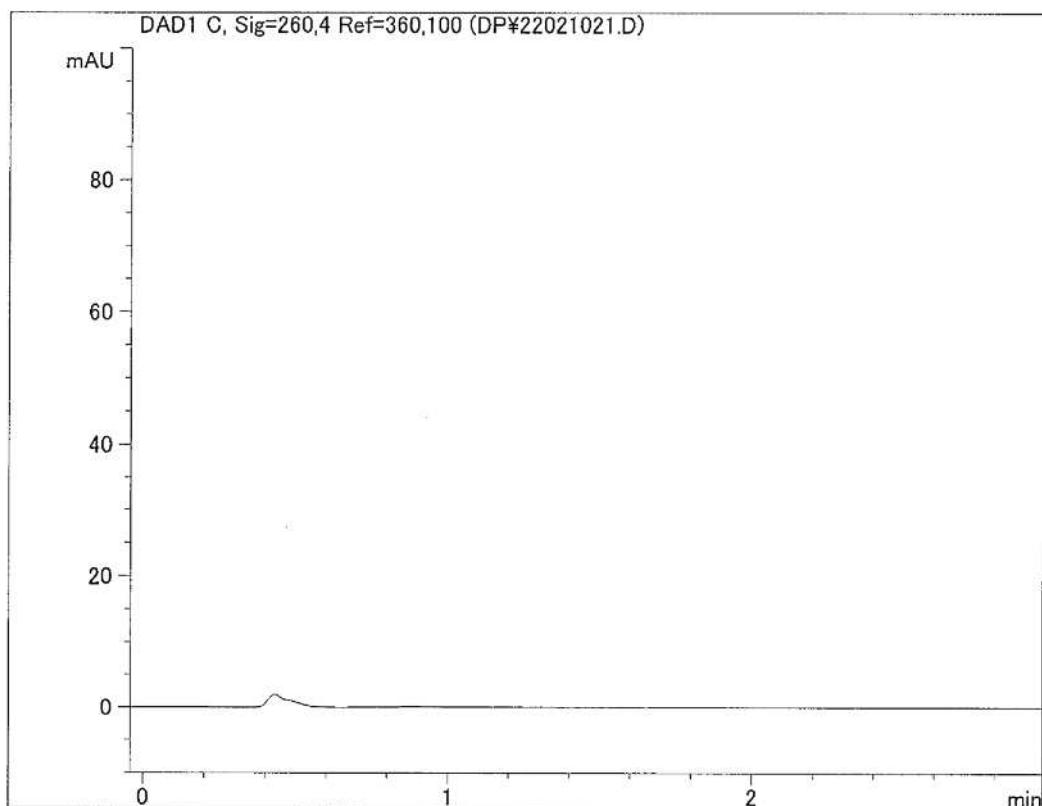
*** End of Report ***

Standard 10.0 mg/L: 0 day

Figure A-5-2 Representative measurement results

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

注入日	:	2022/02/10	シーケンスライン	:	15
試験番号, 名称	:	()A211241 ()A211242 ✓ A211243 ジ'リヒ'ラミド'	バ'イアル No.	:	3
分析炉ット	:	DP-3.M	注入 No.	:	1
サンプル名	:	F0hCn	注入量	:	100 u1
測定 パ'レ-タ	:	レ			



面積パ'セントレボ'ト						
ピ'ク #	RT [min]	タイプ	幅 [min]	面積 [count]	高さ [mAU]	面積 % [%]

ト-タル:

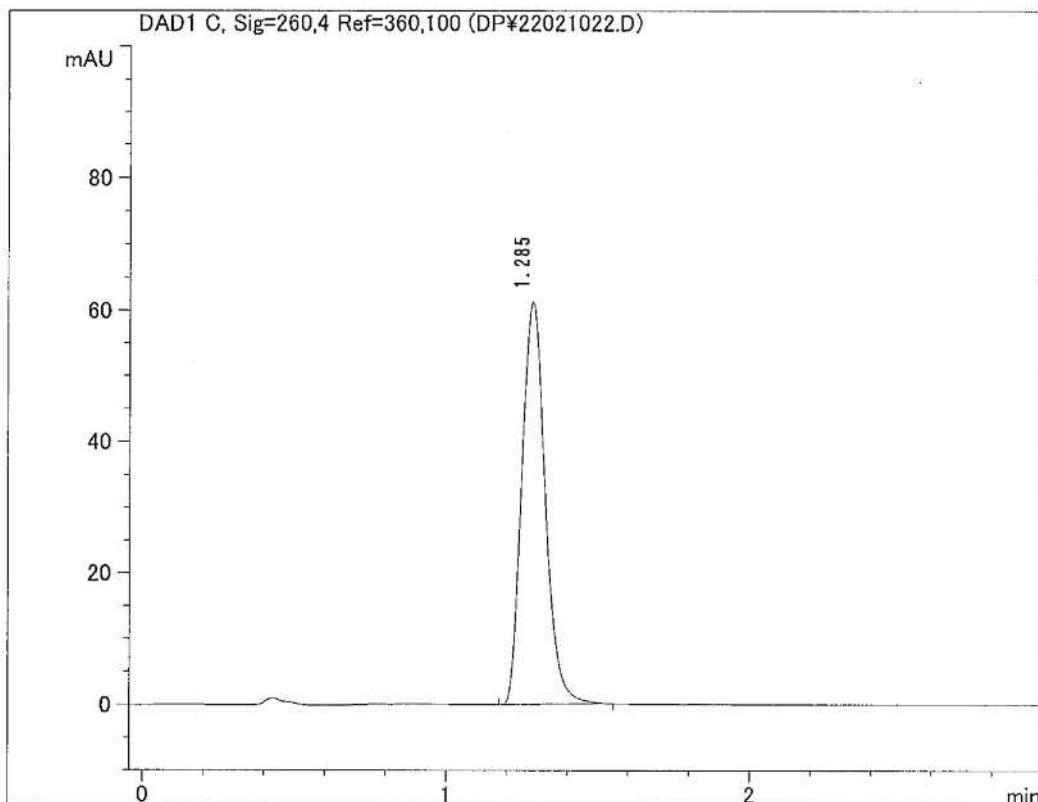
*** End of Report ***

Control: 0 day (new)

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

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

=====
 注入日 : 2022/02/10 シ-ケンスライン : 16
 試験番号, 名称 : ()A211241 ()A211242 ()A211243 ジ'リビ'ラミド
 分析メソッド パ'イアル No. : 4
 サンプル名 : F0hC1n
 測定 オ'ペレータ : レイ
 注入量 : 100 ul



=====
 面積パ' -セントレポ' -ト

ビ'ク #	RT [min]	タイプ	幅 [min]	面積 [count]	高さ [mAU]	面積 %
1	1.285	MM	0.089	328.431	62	100.0
	トータル:			328.431	62	

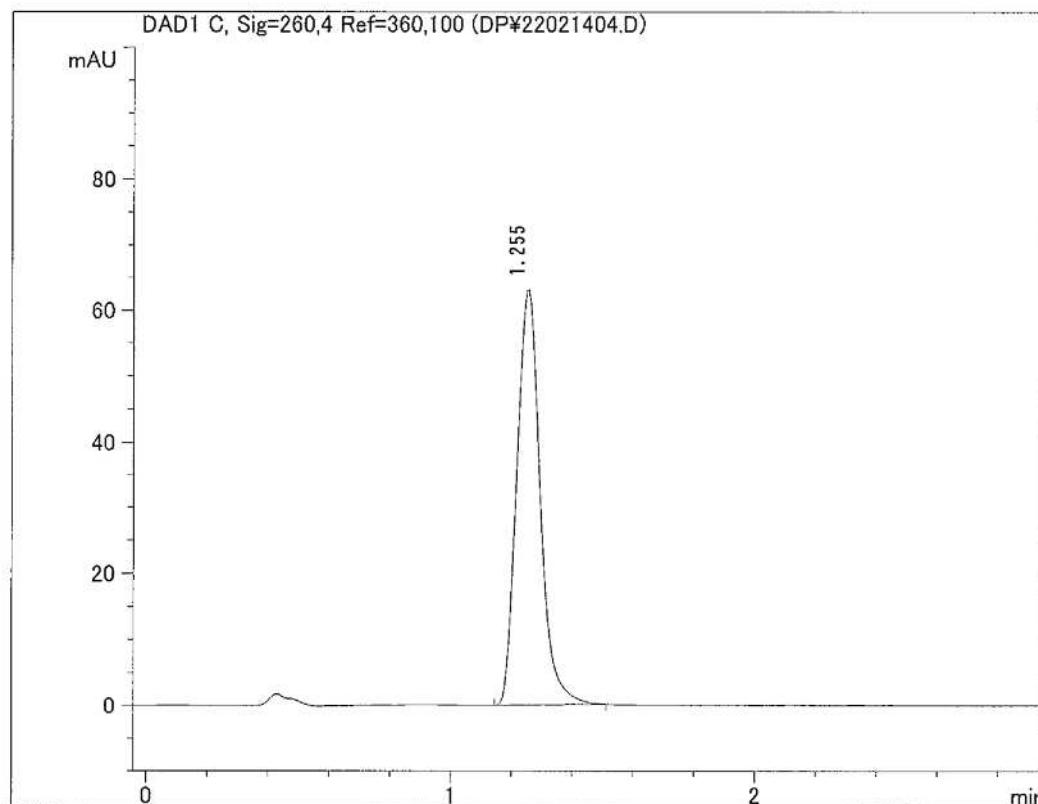
=====
 *** End of Report ***

Conc.1: 0 day (new)

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

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

=====
 注入日 : 2022/02/14 シーケンスライン : 2
 試験番号, 名称 : ()A211241 ()A211242 (✓)A211243 ジ'リビ'ラミド
 分析メソッド バ'イアル No. : 2
 サンプル名 : DP-3. M
 測定 オペレータ : STD 10 mg/L
 検出器名 : MJ
 注入 No. : 1
 注入量 : 100 ul



===== 面積% - セントレポート =====

ピ-ク #	RT [min]	タイプ	幅 [min]	面積 [count]	高さ [mAU]	面積 % [%]
1	1.255	MM	0.089	337.105	63	100.0
	ト-タル:			337.105	63	

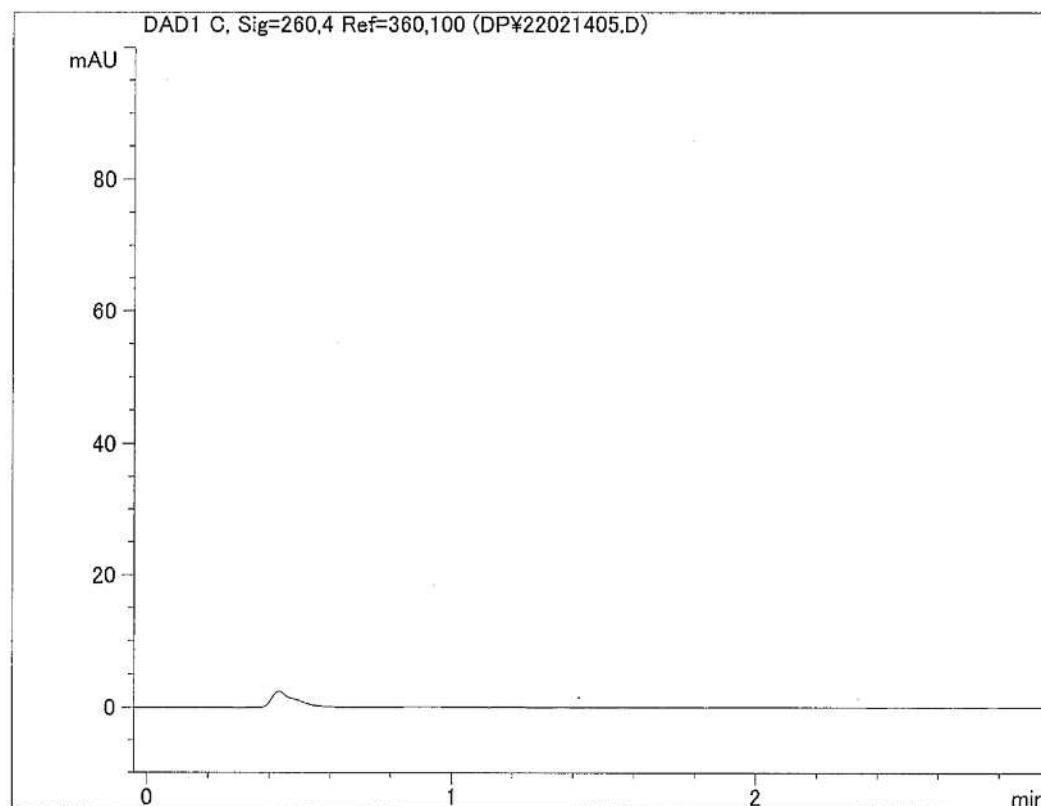
===== *** End of Report *** =====

Standard 10.0 mg/L: 2 day

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

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

注入日	:	2022/02/14	シーケンスライン	:	3
試験番号, 名称	:	()A211241 ()A211242 ()A211243 ジ'リピ'ラミド	バイアル No.	:	3
分析メソッド	:	DP-3.M	注入 No.	:	1
サンプル名	:	F2dCo	注入量	:	100 ul
測定 オペレータ	:	MJ			



面積パーセントレポート						
#	RT [min]	タイプ	幅 [min]	面積 [count]	高さ [mAU]	面積 %

ト-タル:

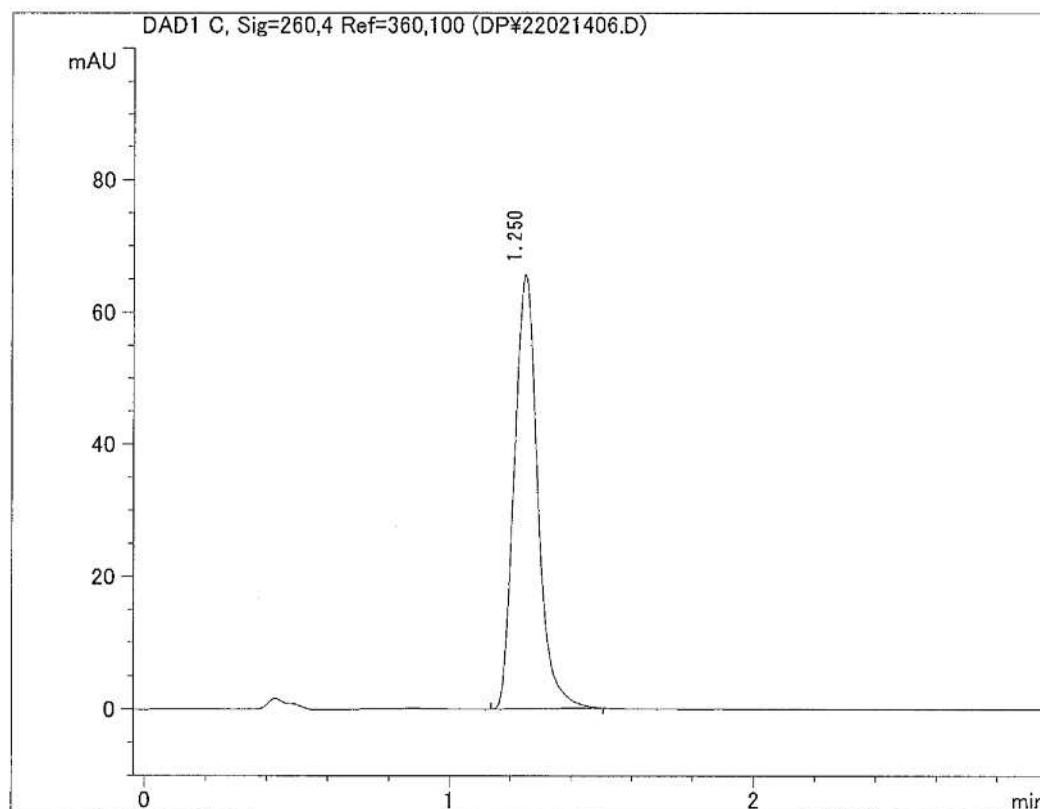
*** End of Report ***

Control: 2 day (old)

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

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

=====
 注入日 : 2022/02/14 シーケンスライン : 4
 試験番号, 名称 : ()A211241 ()A211242 ✓ A211243 ジリピラミド
 分析メソッド バイアル No. : 4
 サンプル名 : DP-3.M
 測定 サンプル名 : F2dC1o
 測定 オペレータ : MJ 注入 No. : 1
 注入量 : 100 ul



===== 面積%セントレポート =====

ピ-ク #	RT [min]	タイプ	幅 [min]	面積 [count]	高さ [mAU]	面積 % [%]
1	1.250	MM	0.089	350.985	66	100.0
ト-タル:					350.985	66

*** End of Report ***

Conc.1: 2 day (old)

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

付属資料-6

結果の算出

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

Results of Statistical Multicomparison Test

5-day hatching rate

Input Data Table	
control	Conc.1
Group1	Group2
93	93
100	100
100	93
100	100

Group	Samples	Mean	S.E.	S.D.	Variance		
1	4	98.2500	1.7500	3.5000	12.2500		
2	4	96.5000	2.0207	4.0415	16.3333		
Method	vs	Side	Stat.	0.0500	0.0100	0.001	Prob.
F test	1 vs 2	0	1.3333	9.2766	29.4567	141.1085	0.4094
Student test	1 vs 2	2	0.6547	2.4469	3.7072	5.9563	0.5370
Aspin-Welch t test	1 vs 2	2	0.6547	2.4590	3.7385	6.0411	0.5375

Survival rate after hatching

Input Data Table	
control	Conc.1
Group1	Group2
100	100
100	100
100	100
100	100

Group	Samples	Mean	S.E.	S.D.	Variance		
1	4	100.0000	0.0000	0.0000	0.0000		
2	4	100.0000	0.0000	0.0000	0.0000		
Method	vs	Side	Stat.	0.05	0.01	0.001	Prob.
F test	1 vs 2	0	1.0000	9.2766	29.4567	141.1085	0.5000
Student test	1 vs 2	2	999.9900	999.9900	999.9900	999.9900	999.9900
Aspin-Welch t test	1 vs 2	2	999.9900	999.9900	999.9900	999.9900	999.9900