

受付番号	662-22-E-0299
試験番号	910299

試 験 報 告 書

N-アセチル-5-アミノサリチル酸のニセネコゼミジンコを用いるミジンコ繁殖試験

2023 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 36

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	8
9.5 観察と測定	9
9.6 結果の算出	9
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	10
10.1 試験生物の一般状態	10
10.2 試験液の観察と測定	10
10.3 結果の算出	11
10.4 LOEC 及び NOEC の算出	11
10.5 親個体の LC ₅₀	11
10.6 考 察	11
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	11

Table 1	Cumulative number of dead parent	12
Table 2	Cumulative number of juveniles produced per adult parent.....	12
Table 3	Temperature of test solution	13
Table 4	Dissolved oxygen concentration of test solution.....	13
Table 5	pH of test solution	14
Table 6	Salinity of test solution.....	14
Table 7	LOEC and NOEC	15
Table 8	Result of statistical analysis.....	15
Table 9	LC ₅₀ to parent <i>Ceriodaphnia dubia</i>	15
Figure 1	Average cumulative number of juveniles produced per adult parent.	16
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

N-アセチル-5-アミノサリチル酸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

N-アセチル-5-アミノサリチル酸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 2023 年 1 月 26 日

実 験 開 始 日 2023 年 1 月 27 日

実 験 終 了 日 2023 年 2 月 2 日

試 験 終 了 日 2023 年 3 月 6 日

7. 要 約

被験物質

N-アセチル-5-アミノサリチル酸

試験目的

N-アセチル-5-アミノサリチル酸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 80.0、40.0、20.0、10.0、5.00 mg/L (公比 2.0) 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後、30 分間攪拌し、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	6 日間 (対照区で 60%以上の個体が 3 腹以上産仔した日まで)
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	24.8～25.3℃
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)	>80.0 mg/L
LOEC	10.0 mg/L
NOEC	5.00 mg/L
(上記濃度は、設定濃度に基づく値)	

8. 試験材料

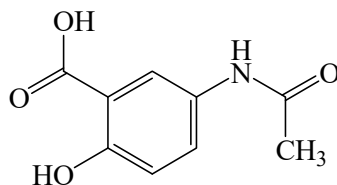
8.1 被験物質

a) 名称等

名 称	<i>N</i> -アセチル-5-アミノサリチル酸
別 名	5-アセトアミド-2-ヒドロキシ安息香酸
CAS 番号	51-59-2

b) 構造式等

構造式

分子式 $C_9H_9NO_4$

分子量 195.17

c) 供試試料

被験物質純度	98%
供給者	BLD Pharmatech Ltd.
ロット番号	CLW023

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 淡黄色固体

e) 保管条件

デシケーター中で冷暗所保管した。

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°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、富士フイルム和光純薬) 実施期間 : 2022 年 6 月 10 日~6 月 17 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=400、400 ^{*1} 、800 ^{*1} 、400 ^{*1} 、800 ^{*1} 、800 ^{*1} 、400 ^{*1} 、800 ^{*1} 、800 ^{*1} 、590 ^{*1} 及び 890 ^{*1} mg/L、 n=11) 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) *] 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。

* 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

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 0.200 g をひょう量し、試験用水 2000 mL と混合後、マグネティックスターラーで 30 分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。試験原液は暴露開始時のみ調製し、試験液は暴露開始時及び換水時ごとに調製した。

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	6 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 80.0、40.0、20.0、10.0、5.00 mg/L (公比 2.0) 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	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（換水前及び暴露終了時）
測定機器	溶存酸素計 HQ30d (HACH) pH 計 HM-21P (東亜ディーケーケー) ガラス製棒状温度計 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、換水前後及び暴露終了時
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（換水前及び暴露終了時）
餌除去	遠心分離（3000 rpm, 10 分間）（換水前及び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% の範囲内であったため、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 6 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。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る検定を行った。有意差検定はエクセル統計（version 4.02、社会情報サービス）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。

9.10 数値の取扱い

数値の丸め方は、JIS Z 8401: 2019 規則 B に従った。

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。

80.0 mg/L 区において 2 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たため、死亡親個体の結果を含めて累積産仔数を集計した。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。

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（暴露 3 日後）は全試験区で餌により薄黄緑色懸濁であり、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 24.8～25.3℃、溶存酸素濃度は 7.9～9.0 mg/L、pH は 7.5～8.2、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 5.01～81.1 mg/L（設定濃度に対して 99.2～103%）であった。換水前及び暴露終了時又は 5.05～81.6 mg/L（設定濃度に対して 101～102%）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。

平均累積産仔数は、対照区、5.00、10.0、20.0、40.0 及び 80.0 mg/L 区でそれぞれ 15.6、13.4、11.5、9.6、1.1 及び 0.2 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 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、10.0～80.0 mg/L 区において対照区と比較して統計学的な有意差（ $p<0.05$ ）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 10.0 mg/L、NOEC は 5.00 mg/L とした。

10.5 親個体の LC₅₀

暴露 6 日後までの親個体の LC₅₀ を Table 9 に示す。

暴露 6 日後までの親個体の LC₅₀ は >80.0 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 10.0 mg/L、NOEC は 5.00 mg/L、親個体の LC₅₀ は >80.0 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、設定濃度の 80～120%以内に維持されていた。

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
Control	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
5.00	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
10.0	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
20.0	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
40.0	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
80.0	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (20)

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	14	14	17	10	18	15	17	15	19	17	15.6 \pm 2.6
5.00	15	12	10	13	11	14	11	15	16	17	13.4 \pm 2.4
10.0	10	18	13	12	7	11	12	12	11	9	11.5 \pm 2.9
20.0	10	7	14	11	8	10	8	15	7	6	9.6 \pm 3.0
40.0	1	1	2	3	1	2	0	1	0	0	1.1 \pm 1.0
80.0	0	2	0	0	0 ^a	0	0	0	0	0 ^a	0.2 \pm 0.6

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

Table 3 Temperature of test solution

Nominal concentration (mg/L)		Exposure day					
		0	3	3	5	5	6
Control	New	24.8		25.2		25.2	
	Old		25.2		25.2		24.9
5.00	New	24.8		25.3		25.2	
	Old		25.2		25.2		24.9
10.0	New	24.9		25.3		25.2	
	Old		25.2		25.2		24.9
20.0	New	24.9		25.3		25.2	
	Old		25.2		25.2		24.9
40.0	New	24.9		25.3		25.2	
	Old		25.2		25.2		24.9
80.0	New	24.9		25.3		25.2	
	Old		25.2		25.2		24.9

New: Freshly prepared test solution

Old: Test solution before renewal

Unit: °C

Table 4 Dissolved oxygen concentration of test solution

Nominal concentration (mg/L)		Exposure day					
		0	3	3	5	5	6
Control	New	8.6		8.5		8.7	
	Old		8.3		8.3		8.3
5.00	New	8.6		8.6		8.5	
	Old		8.3		8.1		8.3
10.0	New	8.6		8.6		8.5	
	Old		8.2		8.1		8.1
20.0	New	8.6		8.6		8.6	
	Old		8.2		8.0		8.0
40.0	New	8.5		8.6		8.8	
	Old		8.2		8.0		8.0
80.0	New	8.4		8.8		9.0	
	Old		8.2		7.9		8.0

New: Freshly prepared test solution

Old: Test solution before renewal

Unit: mg/L

Table 5 pH of test solution

Nominal concentration (mg/L)		Exposure day					
		0	3	3	5	5	6
Control	New	7.6		7.8		7.8	
	Old		8.2		8.1		8.1
5.00	New	7.6		7.8		7.9	
	Old		8.2		8.0		8.0
10.0	New	7.6		7.8		7.9	
	Old		8.2		8.0		8.0
20.0	New	7.6		7.8		7.8	
	Old		8.2		8.0		8.0
40.0	New	7.5		7.8		7.7	
	Old		8.1		8.0		8.0
80.0	New	7.5		7.6		7.7	
	Old		8.1		7.9		8.0

New: Freshly prepared test solution

Old: Test solution before renewal

Table 6 Salinity of test solution

Nominal concentration (mg/L)	At the start
Control	0.01
5.00	0.01
10.0	0.01
20.0	0.01
40.0	0.01
80.0	0.01

Unit: %

Table 7 LOEC and NOEC

LOEC (mg/L)	NOEC (mg/L)
10.0	5.00

Table 8 Result of statistical analysis

Nominal concentration (mg/L)	Statistical analysis	Statistical procedure
5.00	n.s.	Bartlett's test Steel's test
10.0	*	
20.0	**	
40.0	**	
80.0	**	

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)
6-day	>80.0

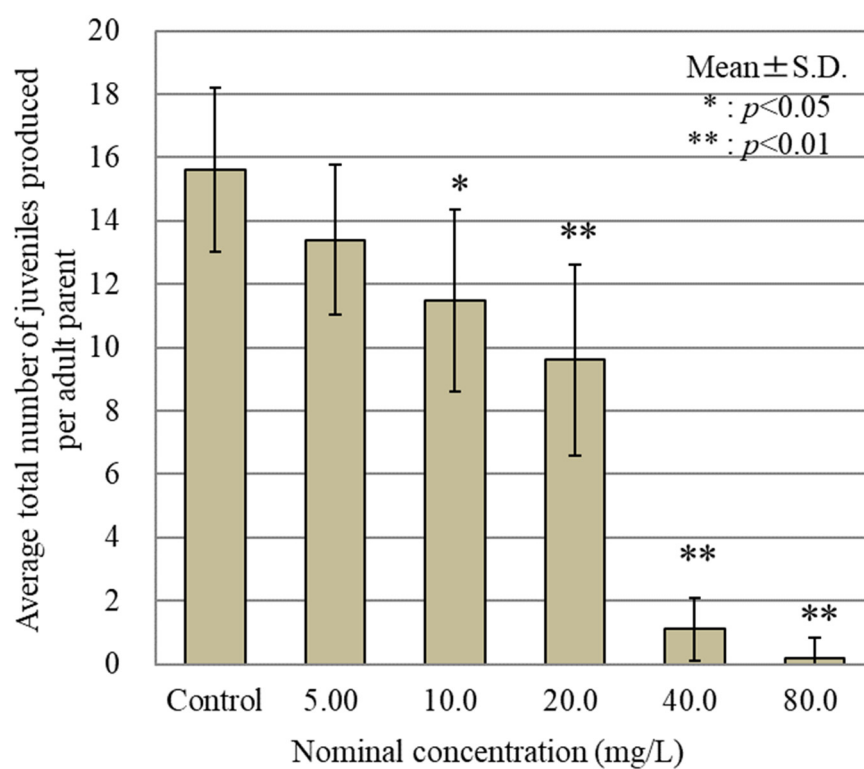


Figure 1 Average cumulative number of juveniles produced per adult parent.

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、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、0.0100、0.100、0.500、1.00 及び 2.00 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（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（0.0100 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-139）	
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	（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 _{3R}	（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（48%）：メタノール/りん酸（1000/1 v/v） B（52%）：超純水/りん酸（1000/1 v/v）	
流 量	1.0 mL/min	
測定波長	254 nm	
注入量	100 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、メタノールに溶解して 50 mL に定容し、1000 mg/L の被験物質溶液を調製した（試験番号:910300 で実施）。これをメタノールで希釈して 10.0 mg/L の被験物質溶液を調製した（試験番号:910300 で実施）。さらにこれを試験用水で希釈して 1.00 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た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	
5.00	5.01 (100)	5.06 (101)	5.09 (102)	5.05 (101)	5.10 (102)	5.09 (102)	5.06 (101)
10.0	9.92 (99.2)	10.1 (101)	10.2 (102)	10.1 (101)	10.2 (102)	10.1 (101)	10.1 (101)
20.0	19.9 (99.4)	20.2 (101)	20.6 (103)	20.4 (102)	20.5 (103)	20.3 (102)	20.2 (101)
40.0	40.9 (102)	40.4 (101)	40.7 (102)	40.2 (101)	40.7 (102)	40.4 (101)	40.5 (101)
80.0	81.0 (101)	81.6 (102)	81.1 (101)	80.9 (101)	80.9 (101)	80.8 (101)	81.1 (101)

Old: Before the renewal

New: After the renewal

LOQ: 0.0100 mg/L

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

$$[3(C_0-C_{3E})/(\ln C_0-\ln C_{3E})+2(C_{3S}-C_{5E})/(\ln C_{3S}-\ln C_{5E})+(C_{5S}-C_6)/(\ln C_{5S}-\ln C_6)]/6$$

where

C_n: The measured concentration at n days

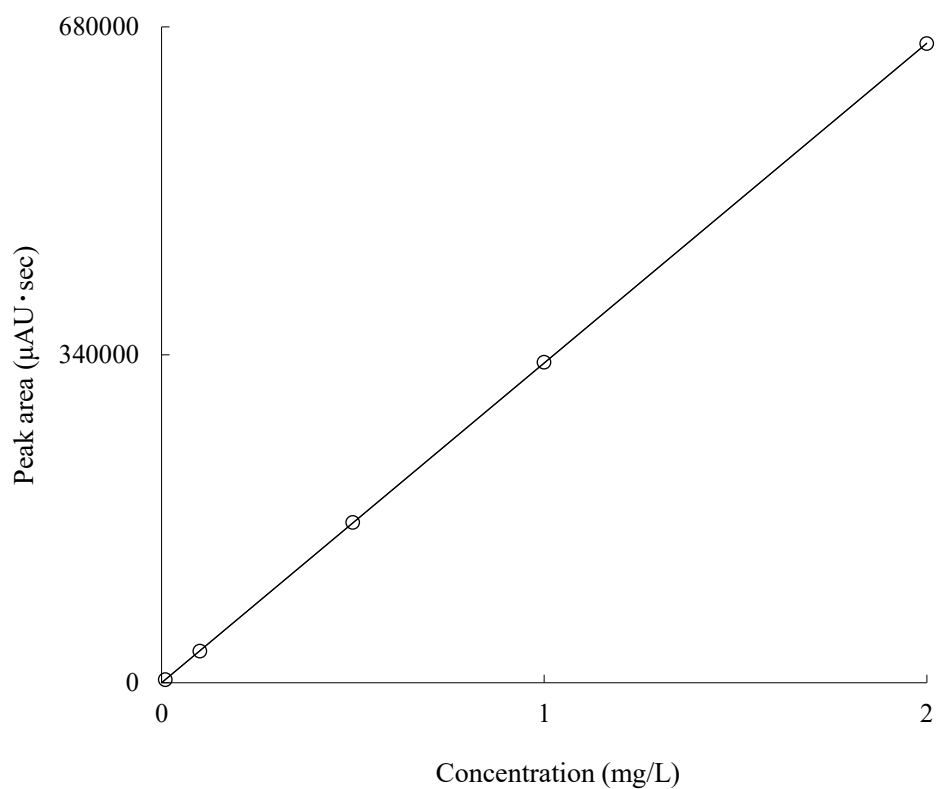
lnC_n: The natural logarithm of C_n

E: Before the renewal

S: After the renewal

Appendix 2

検量線及びクロマトグラム



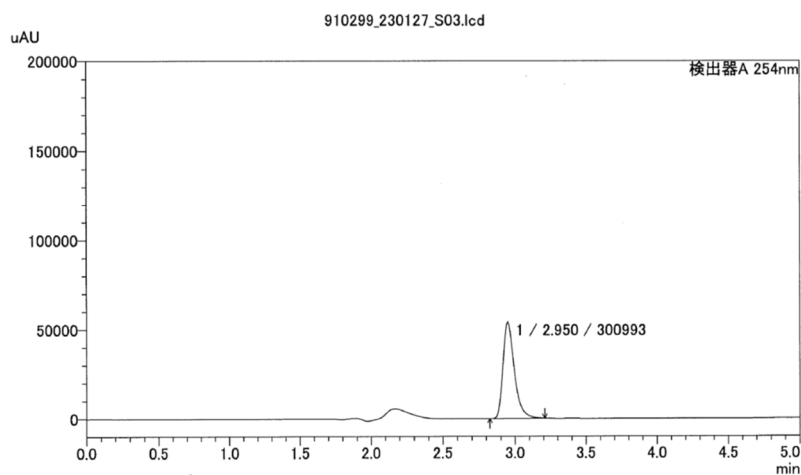
$$y = 331544x$$

$$r = 1.00$$

Concentration (mg/L)	Peak area (μAU·sec)
0.0100	3306
0.100	32677
0.500	166168
1.00	332169
2.00	662701

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

Sample ID : 910299
 Sample Name : Standard solution 1.00 mg/L
 Vial# : 6
 Injection Volume : 100
 Month-Day Acquired : 2023/01/27
 Data File : 910299_230127_S03.lcd
 Original Method File : 910298_910300_B52.lcm
 Acquired by : Yumi Nonaka

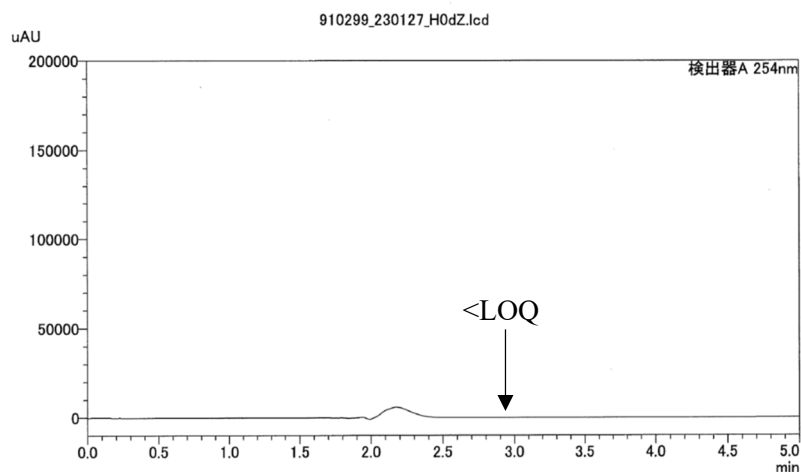


910299_230127_S03.lcd

検出器A 254nm

Peak No	Peak code	Time (min)	Height (μ AU)	Area (μ AU·sec)	Area (%)
1	1	2.95	54184	300993	100.0
合計			54184	300993	100.0

Sample ID : 910299
 Sample Name : Control
 Vial# : 7
 Injection Volume : 100
 Month-Day Acquired : 2023/01/27
 Data File : 910299_230127_H0dZ.lcd
 Original Method File : 910298_910300_B52.lcm
 Acquired by : Yumi Nonaka



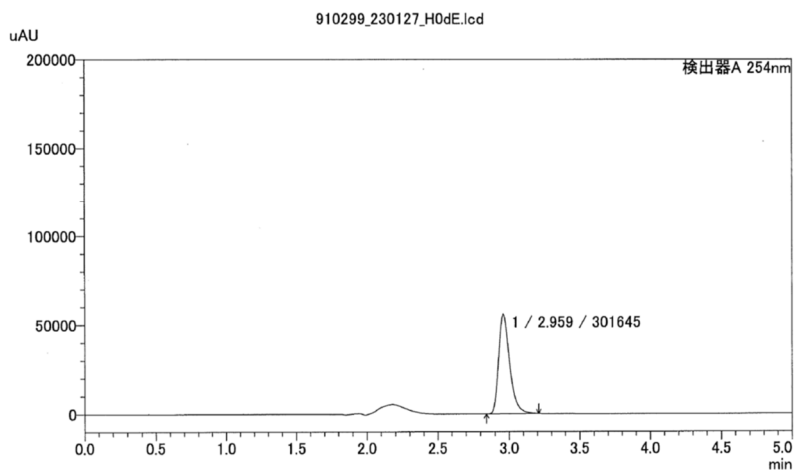
910299_230127_H0dZ.lcd

検出器A 254nm

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

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

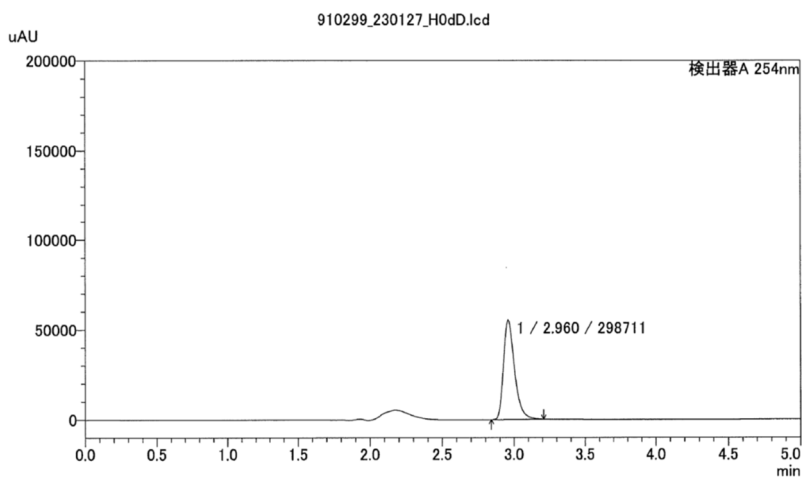
Sample ID : 910299
 Sample Name : 5.00 mg/L exposure level
 Vial# : 8
 Injection Volume : 100
 Month-Day Acquired : 2023/01/27
 Data File : 910299_230127_H0dE.lcd
 Original Method File : 910298_910300_B52.lcm
 Acquired by : Yumi Nonaka



910299_230127_H0dE.lcd

Peak No	Peak code	Time (min)	Height (μ AU)	Area (μ AU·sec)	Area (%)
1	1	2.96	56093	301645	100.0
合計			56093	301645	100.0

Sample ID : 910299
 Sample Name : 10.0 mg/L exposure level
 Vial# : 9
 Injection Volume : 100
 Month-Day Acquired : 2023/01/27
 Data File : 910299_230127_H0dD.lcd
 Original Method File : 910298_910300_B52.lcm
 Acquired by : Yumi Nonaka

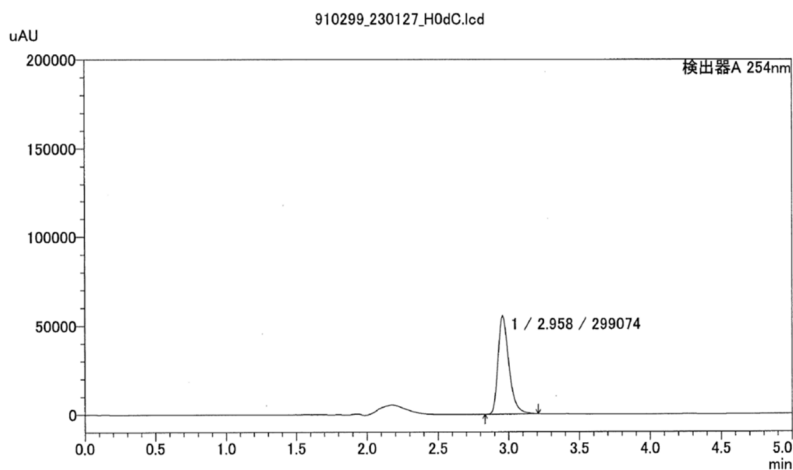


910299_230127_H0dD.lcd

Peak No	Peak code	Time (min)	Height (μ AU)	Area (μ AU·sec)	Area (%)
1	1	2.96	55551	298711	100.0
合計			55551	298711	100.0

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

Sample ID : 910299
 Sample Name : 20.0 mg/L exposure level
 Vial# : 10
 Injection Volume : 100
 Month-Day Acquired : 2023/01/27
 Data File : 910299_230127_H0dC.lcd
 Original Method File : 910298_910300_B52.lcm
 Acquired by : Yumi Nonaka

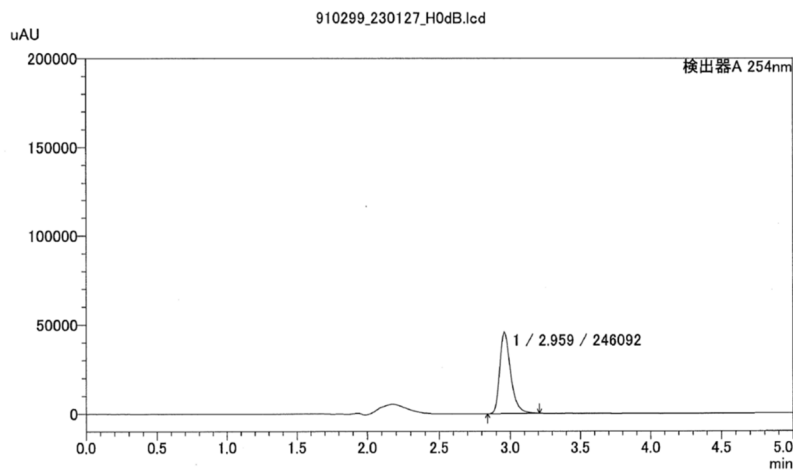


910299_230127_H0dC.lcd

検出器A 254nm

Peak No	Peak code	Time (min)	Height (μ AU)	Area (μ AU \cdot sec)	Area (%)
1	1	2.96	55609	299074	100.0
合計			55609	299074	100.0

Sample ID : 910299
 Sample Name : 40.0 mg/L exposure level
 Vial# : 11
 Injection Volume : 100
 Month-Day Acquired : 2023/01/27
 Data File : 910299_230127_H0dB.lcd
 Original Method File : 910298_910300_B52.lcm
 Acquired by : Yumi Nonaka



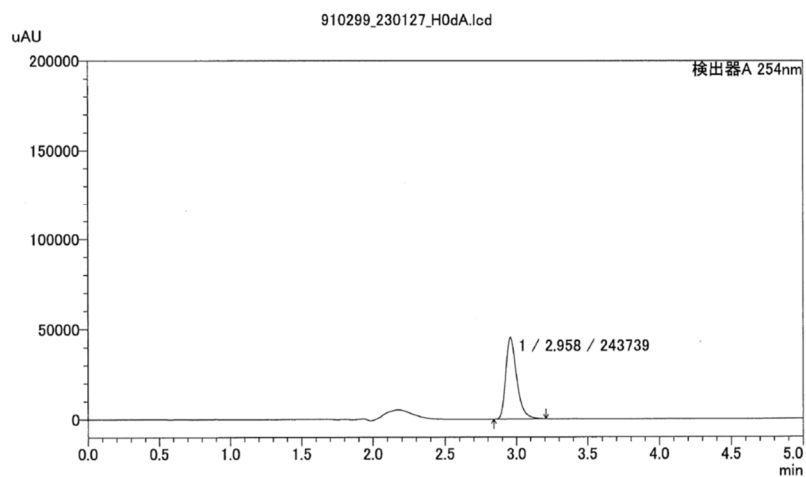
910299_230127_H0dB.lcd

検出器A 254nm

Peak No	Peak code	Time (min)	Height (μ AU)	Area (μ AU \cdot sec)	Area (%)
1	1	2.96	45787	246092	100.0
合計			45787	246092	100.0

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

Sample ID : 910299
 Sample Name : 80.0 mg/L exposure level
 Vial# : 12
 Injection Volume : 100
 Month-Day Acquired : 2023/01/27
 Data File : 910299_230127_H0dA.lcd
 Original Method File : 910298_910300_B52.lcm
 Acquired by : Yumi Nonaka



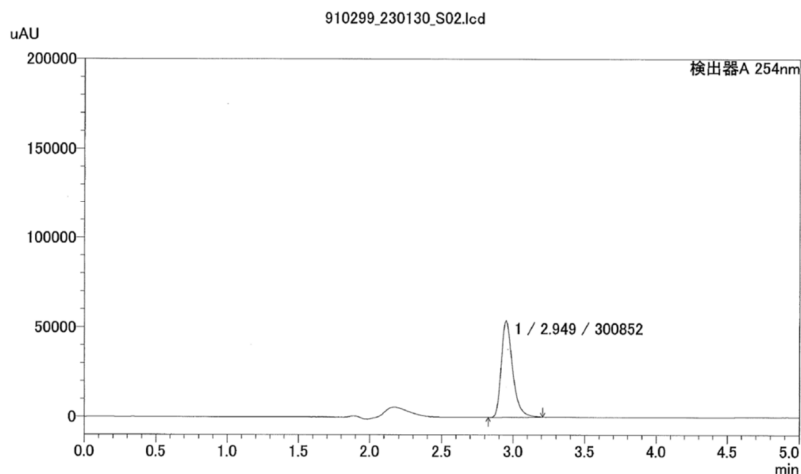
910299_230127_H0dA.lcd

検出器A 254nm

Peak No	Peak code	Time (min)	Height (μ AU)	Area (μ AU·sec)	Area (%)
1	1	2.96	45342	243739	100.0
合計			45342	243739	100.0

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

Sample ID : 910299
 Sample Name : Standard solution 1.00 mg/L
 Vial# : 6
 Injection Volume : 100
 Month-Day Acquired : 2023/01/30
 Data File : 910299_230130_S02.lcd
 Original Method File : 910298_910300_B52.lcm
 Acquired by : Yumi Nonaka

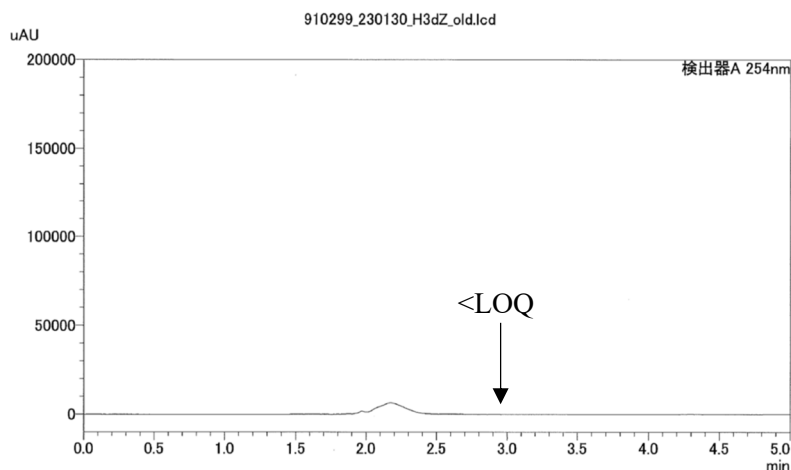


910299_230130_S02.lcd

検出器A 254nm

Peak No	Peak code	Time (min)	Height (μAU)	Area (μAU·sec)	Area (%)
1	1	2.95	54074	300852	100.0
合計			54074	300852	100.0

Sample ID : 910299
 Sample Name : Control
 Vial# : 7
 Injection Volume : 100
 Month-Day Acquired : 2023/01/30
 Data File : 910299_230130_H3dZ_old.lcd
 Original Method File : 910298_910300_B52.lcm
 Acquired by : Yumi Nonaka



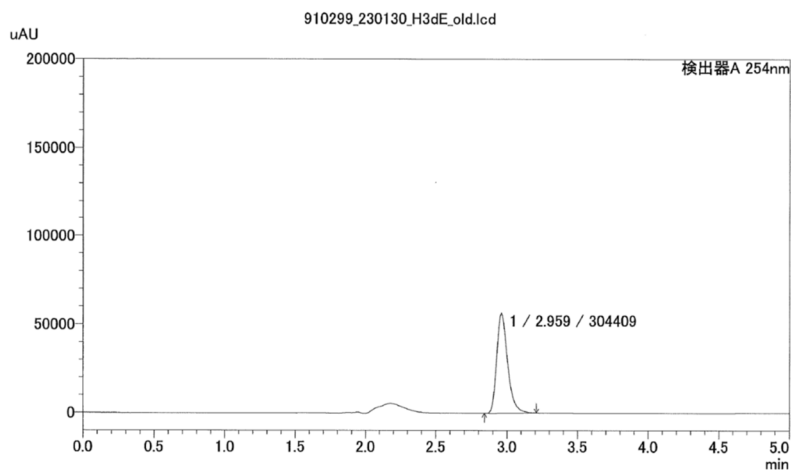
910299_230130_H3dZ_old.lcd

検出器A 254nm

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

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

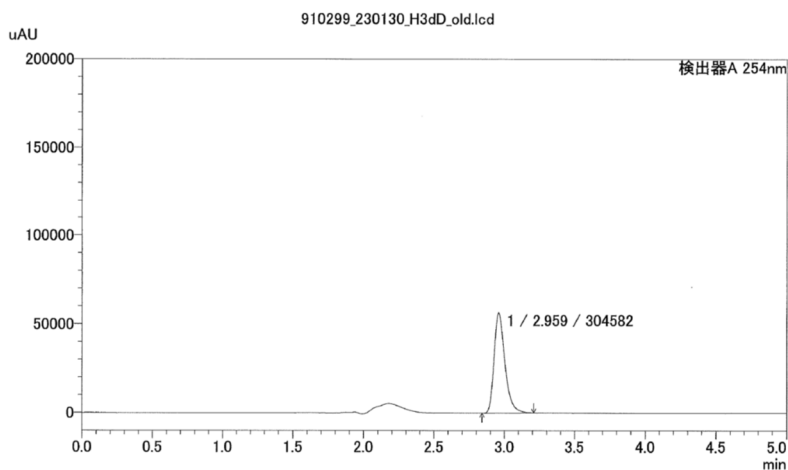
Sample ID : 910299
 Sample Name : 5.00 mg/L exposure level
 Vial# : 8
 Injection Volume : 100
 Month-Day Acquired : 2023/01/30
 Data File : 910299_230130_H3dE_old.lcd
 Original Method File : 910298_910300_B52.lcm
 Acquired by : Yumi Nonaka



910299_230130_H3dE_old.lcd
検出器A 254nm

Peak No	Peak code	Time (min)	Height (μ AU)	Area (μ AU·sec)	Area (%)
1	1	2.96	56658	304409	100.0
合計			56658	304409	100.0

Sample ID : 910299
 Sample Name : 10.0 mg/L exposure level
 Vial# : 9
 Injection Volume : 100
 Month-Day Acquired : 2023/01/30
 Data File : 910299_230130_H3dD_old.lcd
 Original Method File : 910298_910300_B52.lcm
 Acquired by : Yumi Nonaka

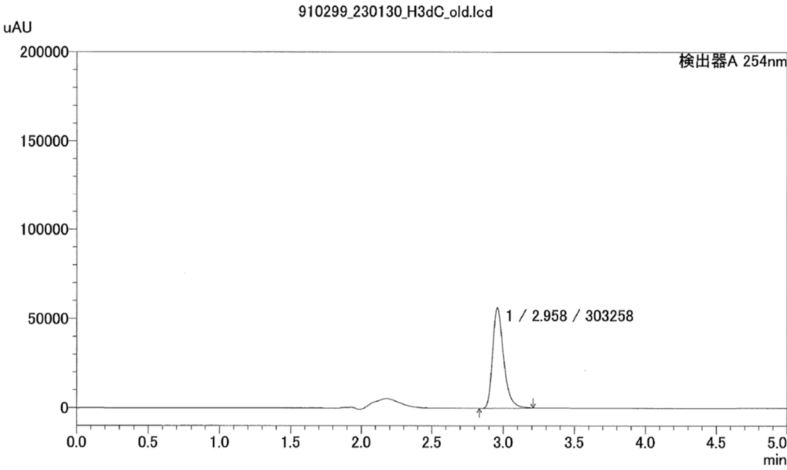


910299_230130_H3dD_old.lcd
検出器A 254nm

Peak No	Peak code	Time (min)	Height (μ AU)	Area (μ AU·sec)	Area (%)
1	1	2.96	56711	304582	100.0
合計			56711	304582	100.0

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

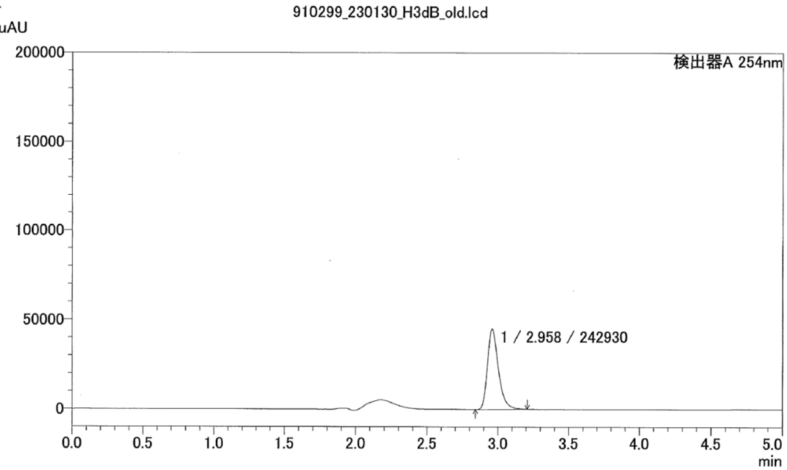
Sample ID : 910299
Sample Name : 20.0 mg/L exposure level
Vial# : 10
Injection Volume : 100
Month-Day Acquired : 2023/01/30
Data File : 910299_230130_H3dC_old.lcd
Original Method File : 910298_910300_B52.lcm
Acquired by : Yumi Nonaka



910299_230130_H3dC_old.lcd
検出器A 254nm

Peak No	Peak code	Time (min)	Height (μ AU)	Area (μ AU·sec)	Area (%)
1	1	2.96	56468	303258	100.0
合計			56468	303258	100.0

Sample ID : 910299
Sample Name : 40.0 mg/L exposure level
Vial# : 11
Injection Volume : 100
Month-Day Acquired : 2023/01/30
Data File : 910299_230130_H3dB_old.lcd
Original Method File : 910298_910300_B52.lcm
Acquired by : Yumi Nonaka

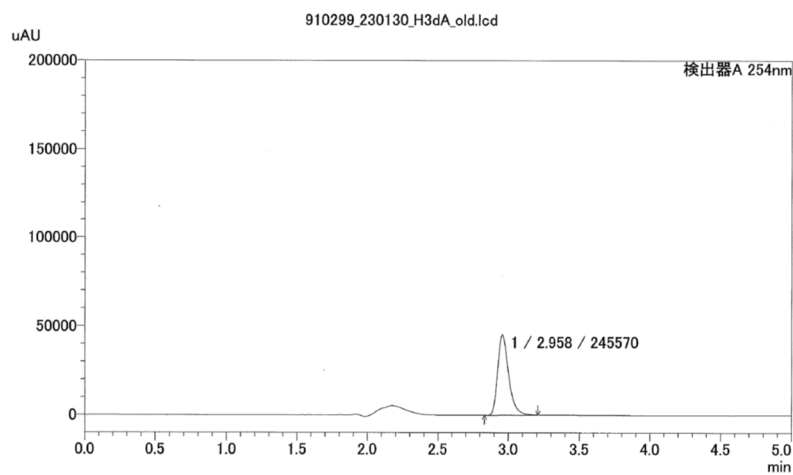


910299_230130_H3dB_old.lcd
検出器A 254nm

Peak No	Peak code	Time (min)	Height (μ AU)	Area (μ AU·sec)	Area (%)
1	1	2.96	45222	242930	100.0
合計			45222	242930	100.0

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

Sample ID : 910299
 Sample Name : 80.0 mg/L exposure level
 Vial# : 12
 Injection Volume : 100
 Month-Day Acquired : 2023/01/30
 Data File : 910299_230130_H3dA_old.lcd
 Original Method File : 910298_910300_B52.lcm
 Acquired by : Yumi Nonaka



910299_230130_H3dA_old.lcd

検出器A 254nm

Peak No	Peak code	Time (min)	Height (μ AU)	Area (μ AU \cdot sec)	Area (%)
1	1	2.96	45689	245570	100.0
合計			45689	245570	100.0

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

Additional data 1

予備試験結果

1. 予備試験で用いた供試試料

N-アセチル-5-アミノサリチル酸（ロット番号 CLW023）

2. 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。

3. 生物予備試験

3.1 予備試験 1

試験濃度	設定濃度として 10、3.2、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 日後及び 5 日後に試験液の全量を交換）
暴露期間	6 日間
試験生物数	6 頭／試験区（1 頭／試験容器）
試験液調製法	10 mg/L（設定）になるように供試試料と試験用水を混合し、約 30 分攪拌し、溶解させて調製した試験原液を試験用水で適宜希釈して調製
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	10、1.0 及び 0.10 mg/L 区における試験液中の被験物質濃度を測定

<試験生物への影響 1>

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	16.8	3.2
0.10	0	13.0	3.4
0.32	0	12.3	4.2
1.0	0	11.0	5.7
3.2	0	12.3	4.3
10	0	12.0	2.8

<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	0.104 (104)	0.101 (101)
1.0	1.06 (106)	1.02 (102)
10	10.3 (103)	9.97 (99.7)

試験液の状態は、暴露開始時は全試験区で無色透明であった。換水前（暴露 3 日後）は全試験区で餌により淡黄緑色を呈しており、全試験区で餌由来と思われる沈殿物も観察された。

3.2 予備試験 2

試験濃度	設定濃度として 100、10、1.0 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	6 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、30 分間 攪拌し、溶解させて調製した試験原液を試験用水で適宜希釈して調製
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	100 mg/L の試験原液中の被験物質濃度を測定

<試験生物への影響 2>

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	17.8	4.2
1.0	0	20.5	2.2
10	0	15.8	4.3
100	0	0	0

<試験原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%)	
	調製時	調製 6 日後
100	99.4 (99.4)	101 (101)

上記分析結果から、100 mg/L の試験原液中の被験物質濃度は 6 日間安定であると判断された。

4. 本試験条件

試験区	設定濃度として 80.0、40.0、20.0、10.0、5.00 mg/L（公比 2.0） 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	4	4	5	1	5	4	5	6	5	5
4	2	2	2	2	7	2	2	3	2	3
5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	8	8	10	7	6	9	10	6	12	9
Total	14	14	17	10	18	15	17	15	19	17

Additional Table 2 Result of reproduction test

5.00 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	4	6	4	4	4	4	5	6	4	3
4	2	0	0	3	1	4	1	3	2	3
5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	9	6	6	6	6	6	5	6	10	11
Total	15	12	10	13	11	14	11	15	16	17

Additional Table 3 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	4	4	4	3	5	4	5	5	6	5
4	0	2	2	3	1	4	3	1	0	1
5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	6	12	7	6	1	3	4	6	5	3
Total	10	18	13	12	7	11	12	12	11	9

Additional Table 4 Result of reproduction test

20.0 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	2	4	1	4	4	5	3	6	4	2
4	0	2	1	5	2	1	1	2	0	1
5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	8	1	12	2	2	4	4	7	3	3
Total	10	7	14	11	8	10	8	15	7	6

Additional Table 5 Result of reproduction test

40.0 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	2	0	1	0	0	0	0
4	1	1	0	1	1	0	0	1	0	0
5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	0	0	2	0	0	1	0	0	0	0
Total	1	1	2	3	1	2	0	1	0	0

Additional Table 6 Result of reproduction test

80.0 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	2	0	0	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	M	0	0	0	0	M
Total	0	2	0	0	0 ^a	0	0	0	0	0 ^a

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