

最 終 報 告 書

ピリドスチグミンの
藻類 (*Raphidocelis subcapitata*) に対する生長阻害試験

(試験番号：2501-201-N)

2025年3月19日作成

い で あ 株 式 会 社

試験実施概要

1. 表題

ピリドスチグミンの藻類 (*Raphidocelis subcapitata*) に対する生長阻害試験

2. 試験番号

2501-201-N

3. 試験目的

ピリドスチグミンの藻類 (*Raphidocelis subcapitata*) に対する生長阻害試験を実施して、50%生長阻害濃度 (ErC₅₀) 及び最大無作用濃度 (NOEC) を求める。

当施設において 100 mg/L での予備試験を実施した結果、対照区と比較して統計的な有意差は認められなかった。

本試験では、100 mg/L での影響を確認するとともに、試験上限濃度を 1,000 mg/L に設定して、100 mg/L を超える濃度の影響についても確認する。

4. 試験方法

本試験は、厚生労働省医薬食品局長、経済産業省製造産業局長及び環境省総合環境政策局長連名通知「新規化学物質等に係る試験の方法について」（平成 23 年 3 月 31 日付け薬食発 0331 第 9 号、平成 23・03・29 製局第 7 号、環保企発第 110331011 号）に準拠して実施した。ただし、試験上限濃度は 1,000 mg/L とした。

5. 試験委託者

名称 : 環境省大臣官房環境保健部化学物質安全課

本社所在地 : 〒100-8975 東京都千代田区霞が関 1-2-2

6. 試験受託者

名称 : いであ株式会社

本社所在地 : 〒154-0012 東京都世田谷区駒沢 3-15-1

代表者 : 代表取締役社長 田畑 彰久

7. 試験施設

実施施設名 : いであ株式会社 環境創造研究所
住 所 : 〒421-0212 静岡県焼津市利右衛門 1334-5

8. 試験関係者

試験責任者 : 戸田 美沙 (2025年3月19日)
(所属 リスク評価部)
試験担当者 : 岡村 哲郎 (2025年3月19日)
(操作全般、とりまとめ)
分析担当者 : 山本 潤 (2025年3月19日)
(化学分析)
分析担当者 : 山口 夏純 (2025年3月19日)
(化学分析)

9. 試験期間

試験開始日 : 2025年2月12日
暴露実験開始日 : 2025年2月18日
暴露実験終了日 : 2025年2月21日
試験終了日 : 2025年3月19日

目 次

要 約	7
Summary	9
1. 被験物質	11
1.1 名称、構造式及び物理化学的性状	11
1.2 供試試料	12
1.3 保管方法及び保管条件下での安定性	13
1.4 暴露条件下での安定性	13
2. 供試生物	13
3. 試験方法	13
3.1 前培養	13
3.2 培地	14
3.3 試験条件	14
3.4 試験容器及び機器等	14
3.5 試験濃度の設定	14
3.6 試験液の調製	15
3.7 試験液の分析	15
3.8 試験操作	15
4. 結果の算出	16
4.1 生長曲線	16
4.2 生長阻害率の算出	16
4.3 50%生長阻害濃度 (ErC ₅₀) の算出	17
4.4 最大無作用濃度 (NOEC)	17
5. 結果及び考察	17
5.1 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	17
5.2 試験液中の被験物質濃度	17
5.3 生長曲線	18
5.4 50%生長阻害濃度 (ErC ₅₀) 及び最大無作用濃度 (NOEC)	18
5.5 温度、光量子束密度及び pH	18
5.6 試験液の色調及び細胞形態の観察結果	19
5.7 考察	19

Table	20
Figure	26
付属資料-2 予備試験結果	29
付属資料-3 試験液の調製方法	33
付属資料-4 試験液の分析方法	35
付属資料-5 供試試料の試験成績書	39

要 約

試験委託者

環境省

表題

ピリドスチグミンの藻類 (*Raphidocelis subcapitata*) に対する生長阻害試験

試験番号

2501-201-N

試験方法

本試験は、厚生労働省医薬食品局長、経済産業省製造産業局長及び環境省総合環境政策局長連名通知「新規化学物質等に係る試験の方法について」(平成23年3月31日付け薬食発0331第9号、平成23・03・29製局第7号、環保企発第110331011号)に準拠して実施した。ただし、試験上限濃度は1,000 mg/Lとした。

- | | | |
|---------------|---|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1) 被験物質 | : | ピリドスチグミン |
| 2) 暴露方式 | : | 開放系 (通気性シリコン製栓)、振とう培養 (100 rpm) |
| 3) 供試生物 | : | <i>Raphidocelis subcapitata</i> (ATCC22662) |
| 4) 暴露期間 | : | 72 時間 |
| 5) 試験培地 | : | OECD 培地 |
| 6) 試験濃度 (設定値) | : | 48.0、100、220、460 及び 1,000 mg/L (公比 2.2) の 5 濃度別に対照区を設定 |
| 7) 試験容器 | : | 300 mL 容ガラス製三角フラスコ (通気性シリコン製栓付) |
| 8) 試験液量 | : | 100 mL/容器 |
| 9) 連数 | : | 3 容器/試験濃度区、6 容器/対照区 |
| 10) 初期生物量 | : | 細胞濃度で 0.5×10^4 cells/mL |
| 11) 試験温度 | : | 23°C 設定 (変動幅は $\pm 2^\circ\text{C}$) |
| 12) 照明 | : | 蛍光灯による連続照明 (波長 400~700 nm の範囲の光量子について $60 \sim 90 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) |

13) 被験物質濃度の測定 : LC-MS/MS 法 (暴露開始時及び暴露終了時)

結果

1) 試験液中の被験物質濃度

暴露開始時の実測濃度は設定濃度に対して 95~112%、暴露 72 時間後の実測濃度は設定濃度に対して 87~96%の範囲であり、試験液は暴露期間中、概ね一定の被験物質濃度を維持していたものと考えられた。

50%生長阻害濃度 (ErC₅₀) 及び最大無作用濃度 (NOEC) は、暴露開始時の実測濃度と暴露 72 時間後の実測濃度を時間加重平均した濃度に基づき示した。

2) 生長速度の比較による影響濃度

ErC ₅₀ (0-3d)	805 mg/L (95%信頼区間 : 797 – 812 mg/L)
NOECr (0-3d)	215 mg/L

Summary

Sponsor

Ministry of the Environment, Japan

Title

Algal (*Raphidocelis subcapitata*) Growth Inhibition Test of Pyridostigmine

Study number

2501-201-N

Purpose

The purpose of this test was to determine the effects of pyridostigmine on the growth of freshwater alga (*Raphidocelis subcapitata*). Exponentially growing test organisms were exposed to the test substance in batch cultures over a period of 72 hours. From the average specific growth rates recorded in the series of test solutions, the 50% inhibition of growth rate (ErC₅₀) and the no observed effect concentration (NOEC) was determined.

Method

This test was performed in accordance with "Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test" based on "Test Methods Concerning New Chemical Substances" (March 31, 2011, No. 0331 9, Pharmaceutical and Food Safety Bureau, MHLW, March 29, 2011, No.7, Manufacturing industries Bureau, METI, No. 110331011, Environmental Policy Bureau, MOE, final amendment, December 27, 2024). The upper limit test concentration was modified to 1,000 mg/L.

- 1) Test substance : pyridostigmine
- 2) Type of test : open-system (air permeable silicon stoppers), shaking culture (100 rpm)
- 3) Test organism : Green alga (*Raphidocelis subcapitata* ATCC 22662)
- 4) Test duration : 72 hours
- 5) Growth medium : OECD medium
- 6) Test concentrations (nominal) : control, 48.0, 100, 220, 460, and 1,000 mg/L (space factor: 2.2)
- 7) Test vessel : 300 mL glass Erlenmeyer flasks capped with air permeable silicon stoppers
- 8) Medium volume : 100 mL/vessel

- 9) Replicates numbers : 6/control group, 3/exposure group
- 10) Initial Biomass : 5,000 cells/mL
- 11) Water temperature : 23 +/- 2 degrees C
- 12) Light condition : continuous illumination of white, fluorescent light (approx. 60 - 90 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)
- 13) Analysis method : LC-MS/MS

Result

The measured concentrations of the test substance at the start of the exposure were 93 - 98% of the nominal concentration and, 94 - 97% at the end of exposure. Thus, the test solution was considered to maintain stable test substance concentrations during the exposure period.

The results were calculated using time weighted mean measured concentrations.

ErC₅₀ (0-3d): 805 mg/L (95% confidence interval: 797 - 812 mg/L)

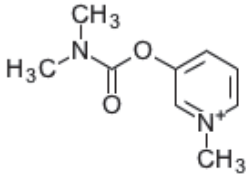
NOEC (0-3d) : 215 mg/L

1. 被験物質

本試験の被験物質であるピリドスチグミンは市販されていないため、暴露試験に使用する供試試料は、ピリドスチグミンが臭素化しているピリドスチグミンブロミドを使用した。ピリドスチグミンブロミドは、試験容器に溶解後ただちに臭素が解離して、ピリドスチグミン単体となる。

被験物質の情報については、被験物質であるピリドスチグミンとピリドスチグミンブロミドを併記した。

1.1 名称、構造式及び物理化学的性状

- 1) 名称 : ピリドスチグミン
- 2) 別名 : 3-[[Dimethylamino]carbonyl]oxy-1-methylpyridinium
IUPAC 名 :
(1-Methylpyridin-1-ium-3-yl) *N,N*-dimethylcarbamate ¹⁾
- 3) CAS 番号 : 155-97-5
- 4) 構造式 :

- 5) 分子式 : C₉H₁₃N₂O₂
- 6) 分子量 : 181.21¹⁾、181.214²⁾
- 7) 蒸気圧 : 1.21 × 10⁻² hPa (25°C) ¹⁾
- 8) 対水溶解度 : 1,040 mg/L (推定値) ¹⁾
- 9) 1-オクタノール/水分配係数 : -1.58 (推定値) ¹⁾
- 10) 融点 : 情報なし
- 11) 沸点 : 258.14°C (推定値) ¹⁾
- 12) 常温における性状 : 情報なし
- 13) 安定性 : 情報なし
- 14) 培地に対する溶解度 : >1,700 mg/L ³⁾
- 15) 取扱い時の注意点 : 情報なし

(参考資料)

- 1) 平成 30 年度化学物質と環境 化学物質分析法開発調査報告書
- 2) 日本化学会 原子量専門委員会作成の「4 桁の原子量表 (2024)」から算出
- 3) 当試験施設確認値

- 1) 名称 : ピリドスチグミンブロミド
- 2) 別名 : 3-(Dimethylcarbamoyloxy)-1-methylpyridinium Bromide ¹⁾
- 3) CAS 番号 : 101-26-8
- 4) 構造式 :
-
- 5) 分子式 : C₉H₁₃BrN₂O₂
- 6) 分子量 : 261.119 ²⁾、261.114 ³⁾
- 7) 蒸気圧 : 1.551 × 10⁻² mmHg ²⁾
- 8) 対水溶解度 : 可溶 ¹⁾、1.29 mol/L ²⁾
- 9) 1-オクタノール/水分配係数 : -3.43 (推定値) ²⁾
- 10) 融点 : 154°C ¹⁾
- 11) 沸点 : 282°C (推定値) ²⁾
- 12) 常温における性状 : 白色～ほとんど白色の結晶～粉末固体 ¹⁾
- 13) 安定性 : 適切な条件下においては安定 ¹⁾
- 14) 培地に対する溶解度 : >2,500 mg/L ⁴⁾
- 15) 取扱い時の注意点 : 防塵・防毒マスク、不浸透性の手袋及び保護眼鏡の着用 ¹⁾

(参考資料)

1)東京化成 安全データシート (2022/03/20)

2)US. EPA Comptox Chemicals Dashboardv2.5.1,

<https://comptox.epa.gov/dashboard/chemical/details/DTXSID9023540>

3)日本化学会 原子量専門委員会作成の「4桁の原子量表 (2024)」から算出

4)当試験施設確認値

1.2 供試試料

- 1) ロット番号 : OCZHM
- 2) 純度 : 99.8 area%(HPLC)
- 3) 不純物の名称及び量 : 情報なし
- 4) 供給者 : 東京化成工業株式会社
- 5) 入手量 : 5 g
- 6) 入手日 : 2024年9月11日

【付属資料-5】試験成績書、東京化成工業株式会社

1.3 保管方法及び保管条件下での安定性

- 1) 保管方法 : 被験物質は、吸水性が高いため、試薬保管用除湿器（常温）に保管した。

1.4 暴露条件下での安定性

OECD 培地（3.2 培地参照）を試験用水として使用して、被験物質の設定濃度 1 mg/L 及び 100 mg/L の試験液を用いて試験条件下での安定性試験を実施した。実測濃度は、試験液調製時がそれぞれ 1.18 mg/L、111 mg/L、72 時間後ではそれぞれ 1.07 mg/L、110 mg/L であったことから、本被験物質は、試験用水中で安定性が高いと判断した。

2. 供試生物

- 1) 学名 : *Raphidocelis subcapitata*
- 2) 株名 : ATCC 22662
- 3) 入手先 : American Type Culture Collection
- 4) 入手日 : 2002 年 9 月 7 日
- 5) 入手後の管理 : ATCC Culture Medium 625（以下、ATCC 培地とする）の斜面培地を用いて無菌的に継代培養
- 6) 感受性試験の結果 : 基準物質 ニクロム酸カリウム
暴露期間 2024 年 12 月 23 日～12 月 26 日
ErC₅₀(0-72h)=0.93 mg/L（95%信頼区間：0.90～0.97 mg/L）
（当施設の規定範囲内【平均値±2 標準偏差：0.71～1.16 mg/L、N=38（試験実施期間：2005 年 5 月～）】であった）
- 7) 前々培養 : 供試藻類を継代培養している斜面培地から化審法テストガイドラインに記載されている推奨培地（以下、OECD 培地とする）に植え換え、2025 年 2 月 13 日～2 月 15 日まで振とう培養した。【OECD 培地：付属資料-1】

3. 試験方法

3.1 前培養

試験と同じ環境条件で 2025 年 2 月 15 日～2025 年 2 月 18 日の間培養した。

3.2 培地

前培養及び暴露試験には、OECD培地を使用した。

3.3 試験条件

- 1) 暴露方式 : 開放系 (通気性シリコン製栓)、振とう培養 (100 rpm)
- 2) 暴露期間 : 72 時間
- 3) 試験液量 : 100 mL / 容器
- 4) 連数 : 3 容器 / 試験濃度区、6 容器 / 対照区
- 5) 初期生物量 : 細胞濃度で 0.5×10^4 cells / mL
- 6) 試験温度 : 23°C 設定 (変動幅は $\pm 2^\circ\text{C}$)
- 7) 照明 : 蛍光灯による連続照明 (波長 400~700 nm の範囲の光量子について $60 \sim 90 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$)
- 8) pH : 試験液の pH は調整しない
- 9) 助剤の種類 : 使用しない
- 10) 試験液中の助剤濃度 : -

3.4 試験容器及び機器等

- 1) 試験容器 : 300 mL 容ガラス製三角フラスコ (通気性シリコン製栓付)
- 2) 藻類培養試験装置 : タイテック製 恒温振とう培養器 (型式: BR-300LF)
- 3) 光学顕微鏡 : メイジテクノ株式会社製 位相差生物顕微鏡 (型式: MT5310L)
- 4) 粒子計数装置 : シスメックス株式会社製細胞計数分析装置 (型式: CDA-1000)
- 5) 電子天びん : メトラー・トレド株式会社製 電子天秤 (型式: MS205DU)
- 6) 水温計 : 安藤計器製工所製 標準温度計 (型式: 1-NM-11)
- 7) pH 計 : 堀場製作所製 カスタニーATC pH メーター (型式: D-21)
- 8) 光量子計 : LICOR 社製 ライトメーター (型式: LI-250)
測定波長の範囲: 400~700 nm

3.5 試験濃度の設定

本試験に先立ち、対照区は 6 連、試験濃度区は 3 連で、公比を 4 として設定濃度が 0.40、1.6、6.4、25 及び 100 mg/L の 5 試験濃度区で予備試験を実施した結果、対照区に対する 72 時間の平

均生長阻害率（速度法）は、各設定濃度でそれぞれ、0.6%、0.7%、-0.7%、-2.0%及び6.3%であった。設定濃度 100 mg/Lにおける各容器の生長阻害率（速度法）は、それぞれ-0.5%、0.9%及び18.6%であり、1容器のみ10%を超える生長阻害率が確認されたが、2容器については、ほぼ対照区と同様の生長が確認されていた。そこで、対照区、試験濃度区ともに3連で、設定濃度 100 mg/Lで予備試験を実施した結果、対照区に対する72時間の平均生長阻害率（速度法）は2.1%であり、統計的な有意差は認められなかった。

本試験では100 mg/Lでの影響を確認するとともに、試験上限濃度を1,000 mg/Lに設定して、100 mg/Lを超える濃度の影響についても確認するものとし、設定濃度は48.0、100、220、460及び1,000 mg/Lとした。別に対照区を設けた。

3.6 試験液の調製

被験物質の純度は、99.8%であることから、純度は補正しなかった。

本試験は、供試試料としてピリドスチグミンが臭素化しているピリドスチグミンプロミドを使用するため、ピリドスチグミンの設定濃度を調製するために必要なピリドスチグミンプロミドの量を分子量から算出して試験液を調製した。試験液の調製方法は【付属資料-3】に示した。

3.7 試験液の分析

1) 分析方法

試験液中の被験物質濃度は、液体クロマトグラフタンデム質量分析計（LC-MS/MS）で測定した。分析における測定条件等は、【付属資料-4】に示した。

2) 試料の採取頻度

試料は、全試験区について、暴露開始時（0時間）及び暴露72時間後（暴露終了時）の試験液から採取した。

3.8 試験操作

前培養した供試藻類の細胞数を粒子計数装置により計数し、試験液中の生物量（細胞濃度）が 0.5×10^4 cells/mLとなるように前培養液を試験液の入った試験容器に無菌的に接種した。

各試験容器を藻類培養試験装置内に設置し、この時点を暴露開始時とした。暴露期間中は、24、48及び72時間後に培地ブランク、各試験区の細胞数を、粒子計数装置を使用して計数した。各試験容器の細胞数から培地ブランクを差し引き、生物量を算出した。

藻類培養試験装置内の試験容器の配置は、24時間ごとに乱数表を用いて変更した。

藻類培養試験装置内の温度及び光量子束密度を暴露開始時から暴露 72 時間後まで 24 時間ごとに測定した。また、試験液の pH を暴露開始時及び暴露 72 時間後に全試験区について測定した。暴露開始時は、調製した試験液の余りを用いて測定した。暴露 72 時間後は、各試験区で 1 つの試験容器内の試験液の pH を測定した。

暴露開始時、24、48 及び 72 時間後に、各試験区について肉眼による試験液の色調を観察した。また、暴露終了時に各試験区の 1 つの試験容器について、試験液中の藻類の細胞形態を観察した。

4. 結果の算出

4.1 生長曲線

各試験区の生物量の平均値を時間に対してプロットし、生長曲線を作成した。

4.2 生長阻害率の算出

生長阻害率 (I_μ) は、生長速度の比較 (速度法) による方法で算出した。

各々の試験容器について暴露開始時から 72 時間後までの生長速度 (μ) を次式より算出した。

$$\mu_{i-j} = \frac{\ln X_j - \ln X_i}{t_j - t_i}$$

ここで、

μ_{i-j} : t_i 時から t_j 時までの期間の生長速度 (d^{-1})

X_i : t_i 時の生物量 (cells/mL)、暴露開始時(t_0)の生物量は 5,000 (cells/mL)

X_j : t_j 時の生物量 (cells/mL)

t_i : 暴露開始後 i 回目に生物量を測定した時間 (d)

t_j : 暴露開始後 j 回目に生物量を測定した時間 (d)

試験濃度区における各試験容器での生長阻害率 (I_μ) を次式より算出した。

$$I_\mu = \frac{\mu_c - \mu_T}{\mu_c} \times 100$$

ここで、

μ_c : 対照区における全試験容器での生長速度 (d^{-1})の平均値

μ_T : 試験濃度区における各試験容器での生長速度 (d^{-1})

4.3 50%生長阻害濃度 (ErC₅₀) の算出

50%生長阻害濃度 (ErC₅₀) 及び最大無作用濃度 (NOEC) (4.4 参照) は、各試験濃度区の実測濃度を平均した濃度 (5.2 参照) に基づき示した。

50%生長阻害濃度 (ErC₅₀) は、4.2 で算出した速度法による生長阻害率 (I_{μ}) が 10%以上の試験濃度区及び 75%以下の試験濃度区の実測濃度をを用い、最小二乗法により算出した。

4.4 最大無作用濃度 (NOEC)

最大無作用濃度 (NOEC) は、最小作用濃度 (LOEC) の一段階下の試験濃度で、対照区と比較したとき、暴露期間中に統計的に有意な影響 ($\alpha < 0.05$) を与えない最高試験濃度とした。最小作用濃度 (LOEC) は、暴露期間中に対照区と比較して被験物質が供試生物の生長を統計的に有意に減少させている ($\alpha < 0.05$) ことが観察される最低の試験濃度とした。

全試験区の 0-72 時間生長速度について Bartlett 法による等分散性の検定 ($\alpha:0.05$) の結果、等分散性が認められなかったことから、Kruskal-Wallis の順位検定を行った ($\alpha:0.05$)。その結果、試験区間において有意差を認めたため、対照区と試験濃度区についてノンパラメトリックの Dunnett 法による多重比較検定 ($\alpha:0.05$ 、両側) を行った。統計処理には、「EcoTox-Statics」(ver.3.01.01、吉岡義正氏作製) を使用した。

5. 結果及び考察

5.1 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

該当する事項はなかった。

5.2 試験液中の被験物質濃度

各試験区における被験物質濃度の測定結果を Table 1 に示した。

暴露開始時の実測濃度は設定濃度に対して 95~112%、暴露 72 時間後の実測濃度は設定濃度に対して 87~96%の範囲であり、試験液は暴露期間中、概ね一定の被験物質濃度を維持していたものと考えられた。

50%生長阻害濃度 (ErC₅₀) 及び最大無作用濃度 (NOEC) は、暴露開始時の実測濃度と暴露 72 時間後の実測濃度を算術平均した濃度に基づき示した。暴露期間中の平均濃度は、OECD ガイダンスドキュメント No.23 (second Editon, 2019) に基づき、各実測濃度の時間加重平均により算出した。以下の結果及び考察については平均濃度で示した。

【時間加重平均の計算方法】

$$C_w = \frac{\sum_{i=1}^n \frac{(C_{old,i} - C_{new,i})}{\ln C_{old,i} - \ln C_{new,i}} w_i}{\sum_{i=1}^n w_i}$$

ここで

C_w は時間加重平均濃度

n はサンプリング回数

$C_{new,i}$ は期間 i の新しい試験溶液の濃度

$C_{old,i}$ は期間 i の古い試験溶液の濃度

w_i は時間 $t_i - t_{i-1}$ であり、濃度の i 番目の測定間隔における時間数又は日数

5.3 生長曲線

暴露期間中の生物量を Table 2 に、生長曲線を Figure 1 に示した。また、暴露期間中の対照区の生長速度を Table 3 に示した。

暴露 72 時間後の対照区の生物量は、平均で初期生物量の約 198 倍に増加した。また、対照区の毎日の生長速度の変動係数は暴露期間を通じて 3.4%、繰り返し間の生長速度の変動係数は 0.6% であり、化審法テストガイドラインで定められた試験の有効性を判断する基準をすべて満たしていた。

5.4 50%生長阻害濃度 (ErC₅₀) 及び最大無作用濃度 (NOEC)

各試験濃度区における生長阻害率を Table 4 に示した。

50%生長阻害濃度 (ErC₅₀) 及び最大無作用濃度 (NOEC) を Table 5 及び以下に、濃度-阻害率曲線を Figure 2 に示した。

ErC₅₀ は、425 及び 990 mg/L 試験濃度区の生長阻害率を用い、最小二乗法により算出した。最大無作用濃度 (NOEC) については、425 mg/L 以上の試験濃度区が対照区と比較して 5% の危険率で有意差を認めたため、215 mg/L とした。

ErC ₅₀ (0-3d)	805 mg/L (95%信頼区間 : 797 – 812 mg/L)
NOECr (0-3d)	215 mg/L

5.5 温度、光量子束密度及び pH

暴露期間中の温度を Table 6、光量子束密度を Table 7、pH を Table 8 に示した。

暴露期間中の藻類培養試験装置内の温度は 22.7～22.8℃、光量子束密度は 68.57～68.77 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ であった。

試験液の pH は、暴露開始時は対照区及びすべての濃度で 7.7、暴露 72 時間後は 8.1～8.2 であった。対照区における変動幅は 0.5 であった。

5.6 試験液の色調及び細胞形態の観察結果

調製時の試験液は無色透明であった。

暴露 72 時間後は、47.7～215 mg/L 試験濃度区では細胞増殖のため緑色を呈し、ほぼ対照区と同様の色調であった。425 mg/L 試験濃度区では薄緑色を呈し、990 mg/L 試験濃度区は無色透明であった。

暴露 72 時間後の細胞形態を観察した結果、全試験区で形態変化や凝集等の異常は認められなかった。なお、990 mg/L 試験濃度区については、遠心処理（3,000 prm、10 分間）して沈殿させた藻体について観察した。

5.7 考察

本試験は、厚生労働省医薬食品局長、経済産業省製造産業局長及び環境省総合環境政策局長連名通知「新規化学物質等に係る試験の方法について」（平成 23 年 3 月 31 日付け薬食発 0331 第 9 号、平成 23・03・29 製局第 7 号、環保企発第 110331011 号）に準拠して実施した。試験法では、100 mg/L 以上の濃度で試験する必要がないものの、本試験では、試験上限濃度を 1,000 mg/L に設定して実施した。

本試験の結果、試験法で定められている 100 mg/L（実測濃度 93.3 mg/L）では被験物質の影響は確認されず、最大無作用濃度（NOEC）は、215 mg/L と算出された。また、50%生長阻害濃度（ErC₅₀）についても 100 mg/L を超える濃度で算出された。本試験は高い被験物質濃度で暴露試験を実施していることから、算出した ErC₅₀ は、被験物質の物理化学的影響が含まれている可能性があるものと考えられた。

以 上

Table 1 Measured Concentrations of the Test Substance in Test Solution

Nominal Concentration (mg/L)	Measured concentration (mg/L) (Percent of Nominal)		Mean * Measured Concentration (mg/L)
	0 hour	72 hours	
Control	<0.00004	<0.00004	<0.00004
48.0	49.9 (104)	45.5 (95)	47.7 (99)
100	95.7 (96)	91.0 (91)	93.3 (93)
220	219 (100)	211 (96)	215 (98)
460	439 (95)	412 (90)	425 (92)
1,000	1,120 (112)	869 (87)	990 (99)

*: Time weighted mean

Table 2 Cell Densities of *Raphidocelis subcapitata* during the 72-hour Exposure

Nominal Concentration (mg/L)	Mean* Measured Concentration (mg/L)	Vessel No.	Cell Densities (cells/mL)					
			0 hour	24 hours	48 hours	72 hours		
Control	<0.00004	1	5,000	28,058	174,449	949,936		
		2	5,000	30,258	183,449	999,936		
		3	5,000	28,458	181,449	999,936		
		4	5,000	31,058	184,449	1,029,936		
		5	5,000	30,158	174,449	951,936		
		6	5,000	29,558	182,449	1,019,936		
		Average	5,000	29,591	180,116	991,936		
		SD	0	1,145	4,502	33,823		
48.0	47.7	1	5,000	27,758	183,449	1,029,936		
		2	5,000	29,158	176,449	991,936		
		3	5,000	29,358	189,449	1,149,936		
		Average	5,000	28,758	183,116	1,057,269		
		SD	0	872	6,506	82,470		
		CV(%)	0.0	3.0	3.6	7.8		
		100	93.3	1	5,000	28,758	189,449	1,069,936
				2	5,000	30,158	181,449	1,069,936
3	5,000			29,858	182,449	1,039,936		
Average	5,000			29,591	184,449	1,059,936		
SD	0			737	4,359	17,321		
CV(%)	0.0			2.5	2.4	1.6		
220	215			1	5,000	29,758	194,449	1,119,936
				2	5,000	30,558	192,449	1,089,936
		3	5,000	28,658	193,449	1,109,936		
		Average	5,000	29,658	193,449	1,106,603		
		SD	0	954	1,000	15,275		
		CV(%)	0.0	3.2	0.5	1.4		
		460	425	1	5,000	29,758	149,449	590,936
				2	5,000	35,158	157,449	646,936
3	5,000			30,958	151,449	618,936		
Average	5,000			31,958	152,782	618,936		
SD	0			2,835	4,163	28,000		
CV(%)	0.0			8.9	2.7	4.5		
1,000	990			1	5,000	23,658	28,649	34,536
				2	5,000	26,358	31,949	34,836
		3	5,000	24,658	30,049	34,936		
		Average	5,000	24,891	30,216	34,769		
		SD	0	1,365	1,656	208		
		CV(%)	0.0	5.5	5.5	0.6		

*: Time weighted mean

SD : Standard deviation

Table 3 Growth of *Raphidocelis subcapitata* during the 72-hours Exposure at Control condition.

Vessel No.	Growth Rate (d ⁻¹)			Ave.	SD	CV(%)	Average of CV(%) 【A】
	0-24h	24-48h	48-72h				
1	1.73	1.83	1.70	1.75	0.07	3.9	3.4
2	1.80	1.80	1.70	1.77	0.06	3.4	
3	1.74	1.85	1.71	1.77	0.08	4.3	
4	1.83	1.78	1.72	1.78	0.05	3.0	
5	1.80	1.75	1.70	1.75	0.05	2.9	
6	1.78	1.82	1.72	1.77	0.05	2.8	
Average				1.76			
SD				0.01			
CV(%) 【B】				0.6			

SD: Standard deviation

A: mean CV(%) for section-by-section specific growth rates

B: CV(%) of average specific growth rates during the whole test period in replicate

Table 4 Percentage of Growth Inhibition of *Raphidocelis subcapitata*

Nominal Concentration (mg/L)	Mean* Measured Concentration (mg/L)	Vessel No.	Growth rate		
			Rate $\mu(0-72h)$	Inhibition(%) $I\mu(0-72h)$	
Control	<0.00004	1	1.75		
		2	1.77		
		3	1.77		
		4	1.78		
		5	1.75		
		6	1.77		
		Average	1.76	-	
	SD	0.01			
	CV(%)	0.6			
48.0	47.7	1	1.78	-0.7	
		2	1.76	0.0	
		3	1.81	-2.8	
		Average	1.78	-1.2	
			SD	0.03	
			CV(%)	1.4	
100	93.3	1	1.79	-1.4	
		2	1.79	-1.4	
		3	1.78	-0.9	
		Average	1.79	-1.3	
			SD	0.01	
			CV(%)	0.3	
220	215	1	1.80	-2.3	
		2	1.79	-1.8	
		3	1.80	-2.1	
		Average	1.80	-2.1	
			SD	0.00	
			CV(%)	0.3	
460	425	1	1.59	9.8	
		2	1.62	8.1	
		3	1.61	8.9	
		Average	1.61	8.9	
			SD	0.02	
			CV(%)	0.9	
1,000	990	1	0.64	63.5	
		2	0.65	63.3	
		3	0.65	63.2	
		Average	0.65	63.3	
			SD	0.00	
			CV(%)	0.3	

*: Time weighted mean
SD : Standard deviation

Table 5 Calculated EC₅₀ and NOEC

ErC ₅₀ (0-3d) (mg/L)	95-Percent Confidence Interval (mg/L)		NOECr(0-3d) (mg/L)
805	797	- 812	215

Calculated by time weighted mean of all measured concentrations

Table 6 Temperature in the Incubation Chamber

Exposure Period (hours)	Temperature (°C)
0	22.7
24	22.8
48	22.7
72	22.8

Table 7 Photon Flux Density in the Incubation Chamber

Exposure Period (hours)	Photon Flux Density ^a ($\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$)
0	68.57
24	68.65
48	68.77
72	68.66

a: average of five sites

Table 8 pH Values

Nominal Concentration (mg/L)	Mean* Measured Concentration (mg/L)	Vessel NO.	pH	
			0 hour	72 hours
Control	<0.00004	1	7.7	8.2
48.0	47.7	1	7.7	8.2
100	93.3	1	7.7	8.2
220	215	1	7.7	8.2
460	425	1	7.7	8.2
1,000	990	1	7.7	8.1

*: time weighted mean

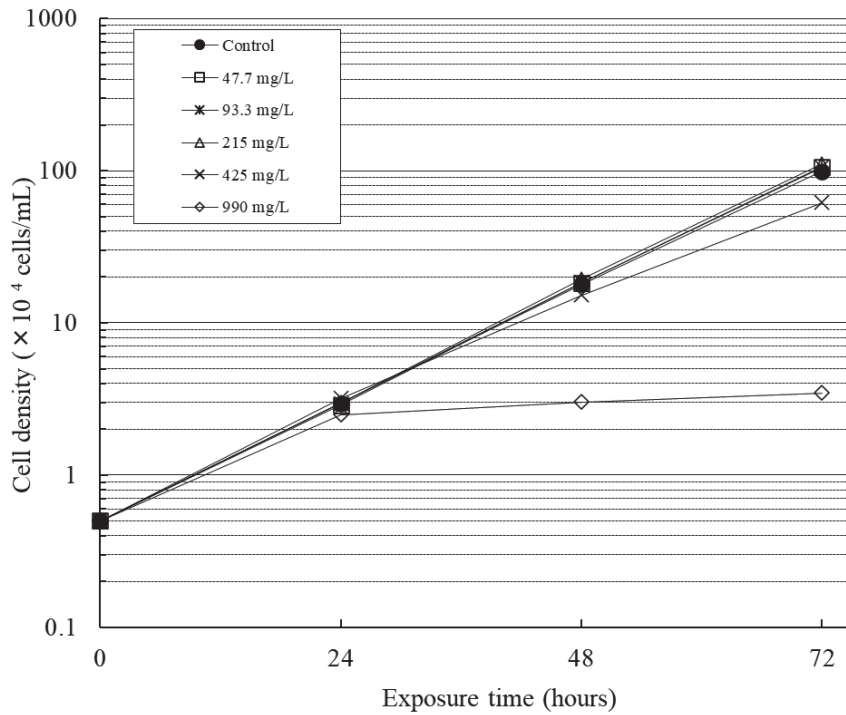
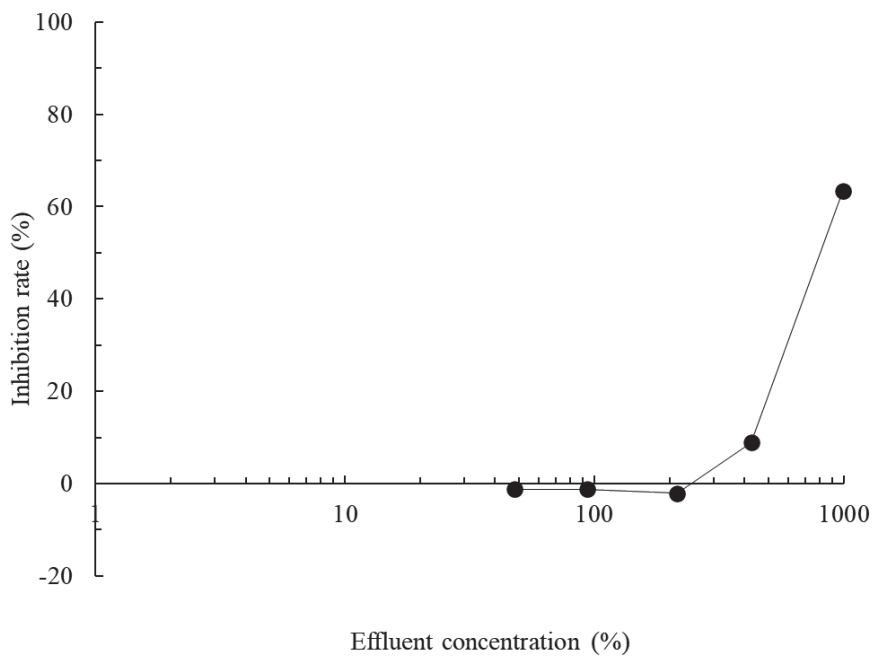


Figure 1 Algal Growth Curve of *Raphidocelis subcapitata* at several concentrations.

(Mean cell counts vs. time during the 72-hours exposure)



[time weighted mean of all measured concentrations]

Figure 2 Concentration-Inhibition Curve Based on Group Means of I_{μ} Values

Calculated from the Growth Rate.

付属資料-1 OECD 培地

Appendix Table 1 OECD medium

Nutrient salts	Concentration (mg/L)
NH ₄ Cl	15
MgCl ₂ ·6H ₂ O	12
CaCl ₂ ·2H ₂ O	18
MgSO ₄ ·7H ₂ O	15
KH ₂ PO ₄	1.6
FeCl ₃ ·6H ₂ O	0.064
Na ₂ EDTA·2H ₂ O	0.1
H ₃ BO ₃	0.185
MnCl ₂ ·4H ₂ O	0.415
ZnCl ₂	0.003
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.0015
CuCl ₂ ·2H ₂ O	0.00001
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.007
NaHCO ₃	50

pH (was not controlled) :8.1 ± 0.3

付属資料-2 予備試験結果

暴露条件

- 1) 暴露方式 : 開放系 (通気性シリコン製栓)、振とう培養 (100 rpm)
- 2) 供試生物 : *Raphidocelis subcapitata* (ATCC 22662)
- 3) 暴露期間 : 72 時間
- 4) 試験濃度 (設定値) : 1 回目 : 0.40、1.6、6.4、25 及び 100 mg/L (公比 ; 4)
の 5 試験濃度区及び対照区
2 回目 : 100 mg/L の 1 試験濃度区及び対照区
- 5) 試験液量 : 100 mL / 容器、
- 6) 連数 : 1 回目 : 3 容器 / 試験濃度区、6 容器 / 対照区
2 回目 : 3 容器 / 試験濃度区、3 容器 / 対照区
- 7) 初期生物量 : 0.5×10^4 cells / mL
- 8) 試験温度 : 23°C 設定 (変動幅は $\pm 2^\circ\text{C}$)
- 9) 照明 : 蛍光灯による連続照明
(波長 400~700 nm の範囲の光量子について $60 \sim 90 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$)

Appendix Table 2-1 Percentage of Growth Inhibition of *Raphidocelis subcapitata* (1st)

Nominal Concentration (mg/L)	Vessel No.	Growth rate		
		Rate $\mu(0-72h)$	Inhibition(%) $I\mu(0-72h)$	Inhibition(%) Average
Control	1	1.72		
	2	1.78		
	3	1.75		
	4	1.76		
	5	1.78		
	6	1.76		
0.4	1	1.72	1.8	0.6
	2	1.73	1.6	
	3	1.78	-1.5	
1.6	1	1.78	-1.5	0.7
	2	1.75	0.4	
	3	1.70	3.1	
6.4	1	1.78	-1.1	-0.7
	2	1.78	-1.1	
	3	1.76	0.0	
25	1	1.79	-1.9	-2.0
	2	1.79	-2.0	
	3	1.79	-2.2	
100	1	1.76	-0.5	6.3
	2	1.43	18.6	
	3	1.74	0.9	

Appendix Table 2-2 Percentage of Growth Inhibition of *Raphidocelis subcapitata* (2nd)

Nominal Concentration (mg/L)	Vessel No.	Growth rate		
		Rate $\mu(0-72h)$	Inhibition(%) $I\mu(0-72h)$	Inhibition(%) Average
Control	1	1.75		
	2	1.74		
	3	1.79		
100	1	1.71	2.7	2.1
	2	1.73	1.9	
	3	1.73	1.7	

付属資料-3 試験液の調製方法

1. 試験原液の調製方法

- 1) 日本化学会 原子量専門委員会作成の「4桁の原子量表 (2024)」から算出したピリドスチグミン及びピリドスチグミンブロミドのそれぞれの分子量は、181.214 及び 261.114 であった。したがって、ピリドスチグミン 1,000 mg を含むピリドスチグミンブロミドは 1,441 mg とした。
 - 2) ミニスピーテルを使用して、ガラス製秤量容器に供試試料を 1,441 mg 秤量した。
 - 3) 秤量容器内の被験物質をガラス製 1 L 容メスフラスコに全量入れた。
 - 4) 秤量容器に付着した被験物質を OECD 培地でメスフラスコ内に流し入れ、OECD 培地でメスアップした。(ピリドスチグミンの濃度は 1,000 mg/L)
- 1,000 mg/L 設定の試験濃度区については、試験原液を試験液として使用した。また、対照区には被験物質を含まない試験用水を使用した。

2. 試験液の調製

- 1) 試験原液を以下の表にしたがい 500 mL 容メスフラスコに入れた。

付表 3-1 試験液の調製方法

試験区番号	01	02	03	04
試験濃度(mg/L)	48.0	100	220	460
試験原液添加量(mL)	24	50	110	230
使用した 定容器具	50 mL 容 メスシリンダー	50 mL 容 メスシリンダー	200 mL 容 メスシリンダー	250 mL 容 メスシリンダー

- 2) 試験用水でメスアップして転倒混和した。
- 3) 0.22 µm フィルター (MERCK、Sterivex-GP) でろ過滅菌し、ろ液は乾熱滅菌済みの 500 mL 容デュラン瓶に入れた。

3. 試験液の分注

以下の操作では、乾熱滅菌済みの器具のみを使用し、無菌環境下で操作した。

- 1) 対照区は、ガラス製 100 mL 容メスシリンダーを使用して、6 基の試験容器に被験物質を含まない試験用水を 100 mL ずつ分注した。
- 2) 試験濃度区は、ガラス製 100 mL 容メスシリンダーを使用して、各 3 基の試験容器に試験液を 100 mL ずつ分注した。

付属資料-4 試験液の分析方法

1. 分析方法 (LC-MS/MS 法)

(1) 試料 (試験液) の採取



(2) 遠心分離 (暴露終了時)



(3) 分析試料の調製



(4) LC-MS/MS による測定

2. 試料 (試験液) の採取及び遠心分離

- 1) 暴露開始時は調製した試験液の余りを試料とした。試料は 10 mL 容ガラス製遠沈管に遠沈管の目盛りで 10 mL ずつ、対照区及び各試験濃度区について採取した。
- 2) 暴露終了時の対照区及び各試験濃度区について、対照区については 6 基の各試験容器から 5 mL 容マイクロピペットで 1.5 mL ずつ、試験濃度区について 3 基の各試験容器から 3 mL ずつ試験液を採取し、10 mL 容ガラス製試験管に入れた。
- 3) 試料を遠心分離 (1,700× g、10 min) して藻体を沈殿させた後、藻体が混入しないように注意しながら、パスツールピペットを使用して 10 mL 容ガラス製試験管に 4 mL 程度移し入れた。

3. 前処理

- 1) 各試験液は、さらに 80%アセトニトリル水溶液で検量線内の濃度に入るように希釈した。
- 2) 希釈液をマイクロピペットで、正確に 1 mL バイアルに分取し、内標準物質 (ピリドスチグミン-d3) を入れて分析試料とした。
- 3) 分析試料は、測定直前まで冷蔵保存した。

4. 液体クロマトグラムタンデム質量分析計 (LC-MS/MS) の測定条件

カラム	: Waters HILIC (2.1×100 mm, 1.7 μm)
移動相	: A : 水 (5mM 酢酸アンモニウム含有) B:アセトニトリル
グラジエント	: B(%): 95(0-1min)–20(10-13min)-95(13.1-18min)
カラム温度	: 40°C
注入量	: 5 μL
流速	: 0.2 mL/min

イオン化法	:	エレクトロスプレー法 ポジティブ (ESI positive)
モード	:	選択反応検出法 (SRM)
モニターイオン (m/z)	:	ピリドスチグミン : 181.1>71.9 (定量用イオン) , 181.1>123.9 (確認用イオン) ピリドスチグミン-d3 : 184.2>72.0 (内標準)

5. 検量線の作成

被験物質約 14.4 mg を秤量して 100 mL 容メスフラスコに入れ、アセトニトリル (関東化学(株) 製 HPLC 分析用、以下同じ) で定容した (100 mg/L-標準原液)。

標準原液を 80%アセトニトリル溶液で段階希釈した。なお各濃度には一定濃度の内標準物質を添加した。調製した標準溶液は、分析直前まで冷蔵保管した。

6. 濃度の算出

水質試料中のピリドスチグミン濃度 (mg/L) は次式により算出した。

$$C_s = C_{rs} \times (A_s / A_{rs} - b) / a \times v/V \times d / 1,000$$

C_s : 水質試料中の対象物質濃度 (mg/L)

C_{rs} : 内標準の濃度 (ng/mL)

A_s : 対象物質のピーク強度

A_{rs} : 内標準のピーク強度

a : 検量線の一時回帰式の傾き

b : 検量線の一時回帰式の y 切片

v : 最終定容量 (mL)

V : 試料量 (mL)

d : 希釈倍率

7. 下限値の算出

装置検出下限値 (IDL) は、「化学物質環境実態調査の手引き」(令和 3 年 3 月) に従い、次式を用いて算出した。また、本試験は分析試料の調整が希釈のみとなるため、分析方法の検出下限値 (MDL) は、装置下限値の試料換算値を用いた。

$$\text{IDL}(\text{ng/mL}) = t(n-1, 0.05) \times \sigma \times 2$$

$$\text{IDL 試料換算値}(\text{mg/L}) = \text{IDL}(\text{ng/mL}) \times \text{最終定容量}(\text{mL}) / \text{試料量}(\text{mL}) \times \text{希釈倍率} / 1,000$$

$t(n-1, 0.05)$: 自由度 $n-1$, $\alpha=0.05$ における t 値

σ : 繰り返し測定の標準偏差

0.1 mg/L の標準溶液を 8 連で分析し、8 回の測定結果から標準偏差 (σ) を算出した。IDL の計算に用いた t 及び σ は以下の通りであった。

$$t = 1.895$$

$$\sigma = 0.00208$$

装置検出下限値 (IDL) : 0.00788 mg/L

分析方法の検出下限値 (MDL) : 0.00004 mg/L

付属資料-5 供試試料の試験成績書



試験成績書

2025年01月22日

東京化成工業株式会社 品質保証部
〒103-0001
東京都中央区日本橋小伝馬町16番12号
T-PLUS 日本橋小伝馬町
E-mail:
Quality.Assurance@TCIchemicals.com



製品名： Pyridostigmine Bromide			
製品コード： P1339 CAS RN： 101-26-8	等級：	製品ロット： OCZHM	判定： 合格

項目	結果	規格値
外観	白色結晶	白色～ほとんど白色粉末～結晶
純度(HPLC)	99.8 area%	98.0 area%以上
純度(非水法)	99.6 %	98.0 %以上
融点	155.7 °C	153.0～157.0 °C
NMR	試験適合	構造を支持

製品ラベルに記載された弊社のロット番号は、半角のアルファベットと数字の組み合わせで4桁又は5桁です。それ以降は、社内管理用の記号となります。
規格の内容は予告なく変更する場合があります。本書面に掲載されている内容が最新です。製品に貼付されているラベルの内容と異なる場合がありますが、製品自体の品質は最新の規格を満たしています。