

# 最 終 報 告 書

ピリドスチグミンのゼブラフィッシュ (*Danio rerio*)  
に対する胚・仔魚期魚類短期毒性試験

(試験番号：2501-203-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ゼブラフィッシュ (*Danio rerio*) に対する胚・仔魚期魚類短期毒性試験

### 2. 試験番号

2501-203-N

### 3. 試験目的

ピリドスチグミンのゼブラフィッシュ (*Danio rerio*) に対する胚・仔魚期魚類短期毒性試験を実施して、半数致死濃度 (LC<sub>50</sub>) 及び最大無作用濃度 (NOEC) を求める。

当施設において試験上限濃度である 100 mg/L での予備試験を実施した結果、各エンドポイント (生存率、ふ化率、ふ化後生存率及び生存指標) が対照区と比較して統計的な有意差が認められなかった。

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、「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 2. 胚・仔魚期の魚類を用いる短期毒性試験法」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26日  
試験終了日 : 2025年3月19日

## 目次

要約 .....	7
Summary.....	9
<b>1. 被験物質.....</b>	<b>11</b>
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
<b>2. 供試生物.....</b>	<b>13</b>
2.1 供試生物及び親魚の飼育方法 .....	13
2.2 胚の採取及び選別 .....	14
<b>3. 試験方法.....</b>	<b>14</b>
3.1 試験条件 .....	14
3.2 試験用水 .....	14
3.3 試験容器及び機器等 .....	15
3.4 試験濃度の設定 .....	15
3.5 試験液の調製 .....	15
3.6 試験液の分析 .....	15
3.7 試験操作 .....	16
<b>4. 結果の算出.....</b>	<b>17</b>
4.1 影響指標値の算出 .....	17
4.2 最小作用濃度及び最大無影響濃度の算出 .....	18
4.3 50%影響濃度の算出 .....	18
<b>5. 結果及び考察.....</b>	<b>18</b>
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 .....	18
5.2 試験液中の被験物質濃度 .....	18
5.3 生存率 .....	19
5.4 ふ化率 .....	19
5.5 ふ化後生存率 .....	19
5.6 生存指標 .....	19
5.7 一般状態等の観察結果 .....	19

5.8	最小作用濃度及び最大無影響濃度の算出	20
5.9	50%影響濃度の算出	20
5.10	試験液の水質	20
5.11	考察	20
Table		21
Figure		30
付属資料-1	試験用水の水質	33
付属資料-2	予備試験結果	35
付属資料-3	試験液の調製方法	37
付属資料-4	試験液の分析方法	39
付属資料-5	供試試料の試験成績書	43

## 要 約

### 試験委託者

環境省

### 表題

ピリドスチグミンのゼブラフィッシュ (*Danio rerio*) に対する  
胚・仔魚期魚類短期毒性試験

### 試験番号

2501-203-N

### 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 2. 胚・仔魚期の魚類を用いる短期毒性試験法」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 : 半止水式（48 時間後に全試験液を換水）
- 3) 供試生物 : ゼブラフィッシュ (*Danio rerio*)
- 4) 暴露期間 : ふ化日から 5 日間（ふ化日：対照区においてふ化率が $>50\%$ となった日）
- 5) 試験用水 : 脱塩素水道水
- 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 : 100 mL 容ガラス製容器及びガラス製の蓋
- 8) 試験液量 : 50 mL／容器
- 9) 連数 : 4 容器／試験濃度区、4 容器／対照区
- 10) 供試生物数 : 60 粒／試験区（15 粒／試験容器）
- 11) 試験温度 :  $26 \pm 1^\circ\text{C}$
- 12) 照明 : 室内光、16 時間明／8 時間暗（明；AM6:00～PM10:00）

- 13) 溶存酸素濃度 : 暴露期間中の飽和溶存酸素濃度は60%以上とする。暴露期間中はエアレーションを行わない。
- 14) 給餌 : 無給餌
- 15) 被験物質濃度の測定 : LC-MS/MS法(暴露開始時、換水前後及び暴露終了時)

## 結果

### 1) 試験液中の被験物質濃度

試験液調製時(暴露開始時、暴露2、4及び6日目)の実測濃度は設定濃度に対して88~102%、48時間経過した試験液(暴露2、4、6日目及び暴露終了時)の実測濃度は設定濃度に対して91~107%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。

半数影響濃度濃度(LC<sub>50</sub>及びEC<sub>50</sub>)及び最大無作用濃度(NOEC)は、実測濃度を時間加重平均した濃度に基づき示した。

### 2) 50%影響濃度(LC<sub>50</sub>及びEC<sub>50</sub>)及び最大無作用濃度(NOEC)

エンドポイント	50%影響濃度	最大無作用濃度 (NOEC)
生存率	>935 mg/L	935 mg/L
ふ化率	>935 mg/L	935 mg/L
ふ化後生存率	>935 mg/L	935 mg/L
生物指標	>935 mg/L	935 mg/L

## Summary

### Sponsor

Ministry of the Environment, Japan

### Title

Fish (*Danio rerio*), Short-term Toxicity Test on Embryo and Sac-Fry Stages of Pyridostigmine

### Study number

2501-203-N

### Method

This test was performed in accordance with “Part 3 2. Fish, Short-term Toxicity Test on Embryo and Sac-Fry Stages” of “Whole Effluent Toxicity Test Using Biological Responses (draft)” (March 2013). The upper limit test concentration was modified to 1,000 mg/L.

- 1) Test substance : pyridostigmine
- 2) Type of test : semi-static (test solution was renewed every 48 hours)
- 3) Test organism : zebrafish (*Danio rerio*)
- 4) Exposure duration : 5 days from hatching date (hatching date: the day when the hatching rate in the control reaches >50%)
- 5) Dilution water: tap water was treated with activated carbon filter to remove residual chlorine
- 6) Test concentrations (nominal) : control, 48.0, 100, 220, 460 and 1,000 mg/L (space factor: 2.2)
- 7) Test vessel : 100 mL glass beaker and glass cover
- 8) Water volume : 50 mL/vessel
- 9) Replicates numbers : 4/ control and exposure group
- 10) Embryo numbers : 60 embryos/ control and exposure group (15/ vessel)
- 11) Water temperature : 26 +/- 1 degrees C
- 12) Light condition : 16 hours light (fluorescent light) / 8 hours dark (8:00A.M. – 0:00A.M.)
- 13) Dissolved oxygen concentration (DO) : DO should be  $\geq 60\%$  of the air saturation value. No aeration during the exposure.
- 14) Feeding : No feeding
- 15) Analysis method : LC-MS/MS (at the start of exposure, before and after renewal and the end of exposure)

## Result

The measured concentrations of the test substance at the start of the exposure and renewal were 88 - 102% of the nominal concentration and, 91 - 107%. Thus, the test solutions were considered to maintain stable test substance concentrations during the exposure period.

The results were calculated using time weighted mean measured concentrations.

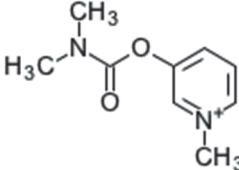
Endpoints	LC <sub>50</sub> or EC <sub>50</sub> (mg/L)	NOEC (mg/L)
Survival rate (%)	LC <sub>50</sub> :>935	935
Cumulative hatchability for a 5-day exposure(%)	EC <sub>50</sub> : >935	935
Survival rate after hatching(%)	LC <sub>50</sub> : >935	935
Survival index	EC <sub>50</sub> : >935	935

## 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。

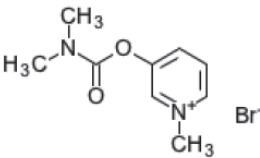
被験物質の情報については、被験物質であるピリドスチグミンとピリドスチグミンブロミドを併記した。

### 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 <sup>1)</sup>
- 3) CAS 番号 : 155-97-5
- 4) 構造式 : 
- 5) 分子式 : C<sub>9</sub>H<sub>13</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>
- 6) 分子量 : 181.21<sup>1)</sup>、181.214<sup>2)</sup>
- 7) 蒸気圧 : 1.21 × 10<sup>-2</sup> hPa (25°C) <sup>1)</sup>
- 8) 対水溶解度 : 1,040 mg/L (推定値) <sup>1)</sup>
- 9) 1-オクタノール/水分配係数 : -1.58 (推定値) <sup>1)</sup>
- 10) 融点 : 情報なし
- 11) 沸点 : 258.14°C (推定値) <sup>1)</sup>
- 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 <sup>3)</sup>
- 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 <sup>1)</sup>
- 3) CAS 番号 : 101-26-8
- 4) 構造式 : 
- 5) 分子式 : C<sub>9</sub>H<sub>13</sub>BrN<sub>2</sub>O<sub>2</sub>
- 6) 分子量 : 261.119 <sup>2)</sup>、261.114 <sup>3)</sup>
- 7) 蒸気圧 : 1.551 × 10<sup>-2</sup> mmHg <sup>2)</sup>
- 8) 対水溶解度 : 可溶 <sup>1)</sup>、1.29 mol/L <sup>2)</sup>
- 9) 1-オクタノール/水分配係数 : -3.43 (推定値) <sup>2)</sup>
- 10) 融点 : 154°C <sup>1)</sup>
- 11) 沸点 : 282°C (推定値) <sup>2)</sup>
- 12) 常温における性状 : 白色～ほとんど白色の結晶～粉末固体 <sup>1)</sup>
- 13) 安定性 : 適切な条件下においては安定 <sup>1)</sup>
- 14) 培地に対する溶解度 : >2,500 mg/L <sup>4)</sup>
- 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 <sup>1)</sup>

(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

予備試験に供した、被験物質の設定濃度 1.0 mg/L、10 mg/L 及び 100 mg/L の試験液について、暴露開始時及び暴露 48 時間目の被験物質濃度を測定した。実測濃度は、暴露開始時がそれぞれ 1.20 mg/L、10.5 mg/L 及び 102 mg/L、48 間後ではそれぞれ 1.30 mg/L、11.7 mg/L 及び 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

### 2.1 供試生物及び親魚の飼育方法

- 1) 和名 : ゼブラフィッシュ
- 2) 学名 : *Danio rerio*
- 3) 入手先 : 2010 年 3 月に国立研究開発法人 国立環境研究所から入手し、その後、試験施設内で自家繁殖
- 4) 飼育方法 : 流水式（130 mL/分、6 回転以上/日換水）
- 5) 飼育水 : 試験用水（3.2 参照）
- 6) 飼育容器 : 市販の 45 cm ガラス水槽（水量は 30 L）  
10 L 容ガラス水槽
- 7) 水温 : 26±1°C
- 8) 溶存酸素濃度 : 飽和溶存酸素濃度の 80% 以上とする
- 9) 照明 : 室内光、16 時間明/8 時間暗（明；AM8:00～PM12:00）
- 10) 餌 : アルテミア及び市販の観賞魚用飼料
- 11) 給餌量 : 15 分で食べつくす量を 1 日 2 回
- 12) 親魚の選別 : ふ化後、4 か月以上の飼育個体群から、外見的に異常が認められない成熟した個体を、試験に供する胚を得るための親魚として選別する。性別及び成熟状態は、体型及び体色から判別する。

## 2.2 胚の採取及び選別

### (1) 親魚のペアリング

暴露開始前日に、雄 6 個体と雌 3 個体を、10 L 容ガラス水槽に入れた目開き 2 mm のメッシュゲージ内に收容した。飼育容器以外の飼育条件は、2.1 に記載した条件と同様とした。

### (2) 採卵

暴露開始当日、室内の照明が点灯して 15~30 分後に、親魚の入ったメッシュゲージを取り出し、飼育水槽底に沈降している胚を、サイフォンを用いてガラス容器に回収した。

### (3) 胚の選別

容器に回収した胚は、先端の内径が 4 mm 程度のピペットで適量の飼育水と一緒にシャーレに移し入れ、実体顕微鏡で観察して、外見的に「透明感がない」又は「細胞分裂がみられな

い」状態のものを除去した。また、胚のうち、「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」等の異常が認められるものも除去した。このとき混入している糞等も除去した。

## 3. 試験方法

### 3.1 試験条件

- |           |   |
|-----------|---|
| 1) 暴露方式   | : 半止水式 (48 時間換水)                                |
| 2) 暴露期間   | : ふ化日から 5 日間 (ふ化日: 対照区においてふ化率が >50% となった日)      |
| 3) 試験液量   | : 50 mL / 容器                                    |
| 4) 連数     | : 4 容器 / 試験濃度区、4 容器 / 対照区                       |
| 5) 供試生物数  | : 60 粒 / 試験区 (15 粒 / 試験容器)                      |
| 6) 試験温度   | : 26 ± 1 °C                                     |
| 7) 照明     | : 室内光、16 時間明 / 8 時間暗 (明; AM6:00 ~ PM10:00)      |
| 8) 溶存酸素濃度 | : 暴露期間中の飽和溶存酸素濃度は 60% 以上とする。暴露期間中はエアレーションを行わない。 |
| 9) 給餌     | : 無給餌   |

### 3.2 試験用水

試験用水には、脱塩素水道水 (水道水を活性炭処理し、残留塩素等を除去した後、水温を 26 ± 1 °C に調温し、十分にばっ気したもの、pH は 7.2 ~ 7.8 の範囲内) を使用した。

試験用水の水質を【付属資料-1】に示した。

### 3.3 試験容器及び機器等

- 1) 試験容器 : 100 mL 容ガラス製容器 (ほこりの侵入や試験液の蒸散を防ぐため、ガラス製の蓋を乗せた)
- 2) 水浴槽 : ダイライト (株) 製角形容器 (ポリエチレン製 860 × 530 mm、高さ 150 mm)
- 3) 水温計 : 株式会社チノー製デジタル温度計 (型式: WT-200)
- 4) 溶存酸素計 : WTW 製 DO メーター (型式: MULTI3410)
- 5) pH 計 : 堀場製作所製 pH メーター (型式: D-51)
- 6) 塩分及び電気伝導度 : 堀場製作所製 伝導度計 (型式: ES-71)
- 7) 残留塩素 : 柴田科学株式会社製 ハンディ水質計アクアブ (型式: AQ-201)
- 8) 電子天びん : メトラー・トレド株式会社製 電子天秤 (型式: MS205DU)

### 3.4 試験濃度の設定

本試験に先立ち、対照区、試験濃度区は 4 連で、公比を 10 として設定濃度が 1.0、10 及び 100 mg/L の 3 試験濃度区で予備試験を実施した。予備試験の結果は、【付属資料-2】に示した。生存率及び生存指標の 1.0 mg/L で統計的な有意差が認められたが、10 及び 100 mg/L では有意差が認められなかったため、被験物質による濃度依存的な影響ではないと判断した。

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。

### 3.5 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ブ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ブ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。

### 3.6 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

分析用の試料は、試験液調製時（暴露開始時、暴露 2、4 及び 6 日目）及び 48 時間経過した試験液（暴露 2、4、6 日目及び暴露終了時）を採取した。

### 3.7 試験操作

#### 1) 暴露開始時

調製した試験液を、5つの試験容器に 50 mL ずつ分注した。試験容器をステンレス製ラックに収容し、恒温槽内で水浴させて試験液の水温を調整した。水温調整後、用意した供試用の 80 粒の胚を、ガラスピペットを使用して 1つの容器に移し入れてプレ暴露を開始した。その後、4つの試験容器に 15 粒ずつ胚を移し入れた。プレ暴露は、試験生物を試験容器に移し入れる時間をできる限り揃える、また試験生物の移し入れ時に、試験液が飼育水により希釈されることを防ぐことを目的として実施した。

胚を入れた試験容器は、水分の蒸発及び揮発成分の周囲への影響を防ぐために上面を半透明のプラスチック板で覆い、速やかに試験温度に調温した水が入った恒温槽内に入れた。

なお、対照区については試験用水を用いて同様の操作を経て試験容器に胚を入れた。

#### 2) 暴露期間中

暴露開始から 24 時間ごとに、対照区及び試験濃度区のすべての試験容器について試験生物を観察した。48 時間ごとに、観察の終了後に試験液を換水した。換水の際は、試験生物を傷つけたり逸失したりしないように注意した。また、換水時に試験液の水質を測定した。試験生物の観察後又は試験生物の観察及び試験液の換水後に、試験容器を速やかに恒温槽内に戻して水温の変化を防いだ。

一般に胚期の魚類は、物理的刺激に対して脆弱なため、ガラスピペットで試験溶液とともに吸引された際に骨折による奇形を生じることがある。そのため、換水は試験容器内の試験液のみを抜き取って新しいものに入れ換えた。

ガラスピペットを用いて、試験生物を吸わないように注意して古い試験液を約 5 mL 残して除去した。そこへ試験生物をかく乱しないよう緩やかに、水温調整した新しい試験液を 50 mL 入れた。

暴露期間中の観察は、生死及びふ化数に加えて、死亡 (D)、重篤 (C)、異常 (A) 又は正常 (N) のいずれかに区分した。また暴露 48 時間後以降は、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」、「行動異常」について個体数を記録した。死亡個体が認められた場合は、水質悪化を防ぐため速やかに取り除いた。

### 3) 暴露終了時

対照区において 50%を超える胚がふ化した日をふ化日とし、ふ化日から 5 日後まで試験生物を暴露した。試験生物を観察し試験液の水質を測定した後、試験に供した試験生物は適切な方法で処分した。

〔試験成立条件〕

- ・対照区におけるふ化率が 80%以上であること
- ・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
- ・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

## 4. 結果の算出

### 4.1 影響指標値の算出

暴露試験から得られたデータをもとに、以下に定義される影響指標値を試験容器ごとに算出した。

#### 1) 生存率

供試卵数に対する暴露終了時に生存した胚体又は仔魚数の割合 (%)

$$\text{生存率} = \text{暴露終了時の (生存胚体数+生存仔魚数)} / \text{供試卵数} \times 100$$

#### 2) ふ化率

供試卵数に対する最大ふ化所要日数までにふ化した卵数の割合 (%)

$$\text{ふ化率} = \text{最大ふ化所要日数での総ふ化仔魚数} / \text{供試卵数} \times 100$$

(最大ふ化所要日数：ゼブラフィッシュでは暴露 5 日後)

#### 3) ふ化後生存率

暴露期間中にふ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 (%)

$$\text{ふ化後生存率} = \text{暴露終了時の生存仔魚数} / \text{暴露期間の総ふ化仔魚数} \times 100$$

#### 4) 生存指標

ふ化に対する遅延の影響も加味した胚期からふ化後の仔魚に対する影響の指標

$$\text{生存指標} = \text{ふ化率} \times \text{ふ化後生存率} / 100$$

## 4.2 最小作用濃度及び最大無影響濃度の算出

ふ化率及び生存指標について、Steelの多重比較検定を実施した。なお、生存率及びふ化後生存率については、対照区及び試験濃度区でいずれも影響値が0%であったため有意差検定は実施しなかった。検定における有意水準は5%とし、片側検定を前提とした。各影響指標値について、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最小影響濃度（LOEC）、その1つ低い試験濃度を最大無影響濃度（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とした。各影響指標値について、すべての試験濃度において対照区と有意差が認められなかった場合は、最も高い試験濃度をNOECとし、LOECは推定しなかった。

## 4.3 50%影響濃度の算出

生存率、ふ化率、ふ化後生存率及び生存指標のいずれの影響指標においても、50%を超える影響は確認されなかったため、50%影響濃度（LC<sub>50</sub>又はEC<sub>50</sub>）は最高濃度を超える濃度とした。

## 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

対照区の暴露2日目に調製した試験液、暴露6日目及び暴露終了時の48時間経過した試験液において、検出下限値を超える被験物質濃度が検出されたが、調製時と暴露後の両方で検出された場合はなかった。本試験では最高濃度が1,000 mg/Lと高濃度であり、分析用試験液の採取操作時に採取器具又は採取容器に被験物質が混入した可能性が高いものと判断し、対照区の時間加重平均濃度は検出下限値以下として示した。その他に、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はないものと判断した。

### 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。

試験液調製時（暴露開始時、暴露2、4及び6日目）の実測濃度は設定濃度に対して88～102%、48時間経過した試験液（暴露2、4、6日目及び暴露終了時）の実測濃度は設定濃度に対して91～107%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。

半数影響濃度濃度（LC<sub>50</sub>及びEC<sub>50</sub>）及び最大無作用濃度（NOEC）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 生存率

各試験区における生存率を Table 2 に示した。

対照区における生存率は  $100 \pm 0.0\%$  であり、有効性基準（70%以上）を満たしていた。試験濃度区における生存率は、すべて  $100 \pm 0.0\%$  であった。

### 5.4 ふ化率

各試験区におけるふ化個体数及びふ化率を Table 3 に示した。

暴露 5 日後までにふ化した卵数の割合から算出した対照区におけるふ化率は  $100 \pm 0.0\%$  であり、有効性基準（80%以上）を満たしていた。45.9 mg/L、98.0 mg/L 及び 211 mg/L におけるふ化率は  $100 \pm 0.0\%$ 、442 mg/L 及び 935 mg/L におけるふ化率はそれぞれ、 $98.3 \pm 3.3\%$  及び  $93.3 \pm 7.7\%$  であった。

### 5.5 ふ化後生存率

各試験区におけるふ化後生存率を Table 4 に示した。ふ化後生存率は対照区及び試験濃度区ですべて  $100 \pm 0.0\%$  であった。

### 5.6 生存指標

各試験区における生存指標を Table 4 に示した。対照区の生存指標は  $100 \pm 0.0$  であった。45.9 mg/L、98.0 mg/L 及び 211 mg/L における生存指標は  $100 \pm 0.0$ 、442 mg/L 及び 935 mg/L における生存指標はそれぞれ、 $98.3 \pm 3.3$  及び  $93.3 \pm 7.7$  であった。

### 5.7 一般状態等の観察結果

暴露期間中における一般状態の観察結果を Table 5 に示した。

胚体については、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」は認められなかった。仔魚については、対照区で浮腫及び遊泳

不能が2個体確認された。浮腫が211 mg/Lで1個体、浮腫及び遊泳不能が45.9 mg/Lで1個体、98.0 mg/Lで1個体、211 mg/Lで1個体、442 mg/Lで1個体、935 mg/Lで2個体確認された。また442 mg/Lでは、奇形及び遊泳不能が1個体確認された。異常所見の観察された個体数に濃度依存的な増加は認められなかったことから、被験物質に起因する異常ではないものと判断した。

#### 5.8 最小作用濃度及び最大無影響濃度の算出

算出された各影響指標値の最小作用濃度（LOEC）及び最大無影響濃度（NOEC）をTable 6に示した。

#### 5.9 50%影響濃度の算出

算出された各影響指標値の50%影響濃度をTable 6に示した。

#### 5.10 試験液の水質

暴露期間中の温度をTable 7、溶存酸素濃度をTable 8、溶存酸素飽和度をTable 9、pHをTable 10、塩分をTable 11及び電気伝導度をTable 12に示した。

暴露期間中の試験溶液の水温は、対照区及び試験濃度区で25.8～26.0℃であり、試験条件の範囲内であった。溶存酸素濃度は、対照区で7.9～8.4 mg/L、試験濃度区で8.0～8.4 mg/Lであった。溶存酸素飽和度は、対照区で97.7%～103.9%、試験濃度区で98.9%～104.0%であった。暴露期間中のpHは、対照区で7.8～8.0、試験濃度区で7.8～8.1であった。塩分は、対照区ですべて0.1 psu、試験濃度区で0.1～0.3 psuであった。電気伝導度は、対照区で0.17～0.19 mS/cm、試験濃度区で0.19～0.70 mS/cmであった。試験液は、全試験区において、暴露期間を通して無色透明であり沈殿等は確認されなかった。

#### 5.11 考察

本試験は被験物質の胚-仔魚期のゼブラフィッシュに対する致死及び亜致死の影響を求め、ことを目的として実施した。なお、試験上限濃度は1,000 mg/Lに設定して実施した。

生存率及びふ化後生存率は、対照区及び試験濃度区でいずれも影響値が0%であった。ふ化率については、対照区で100 ± 0.0%、442 mg/Lで98.3 ± 3.3%、935 mg/Lで93.3 ± 7.7%であったが有意差は認められなかった。ふ化率×ふ化後生存率で計算される生存指標についてもふ化率と同様の結果であり、本試験のNOECは935 mg/Lと推定された。

暴露期間中における試験液中の被験物質濃度は、設定濃度の80～120%以内に維持されており、試験環境条件も試験の有効性を満たしていた。

以上

Table 1 Measured Concentrations of the Test Substance in Test Solution

NC* (mg/L)	Measured concentration (mg/L) (Percent of Nominal)								TWM** (mg/L)
	0 Day	2 Day		4 Day		6 Day		8 Day	
		Old	New	Old	New	Old	New		
Control	<0.00004	<0.00004	0.0002	<0.00004	<0.00004	0.00006	<0.00004	0.00027	<0.00004
48.0	46.7 (97)	46.6 (97)	44.4 (92)	44.8 (93)	44.5 (93)	47.5 (99)	45.8 (95)	46.8 (98)	45.9 (96)
100	95.0 (95)	102 (102)	96.9 (97)	92.2 (92)	89.1 (89)	100 (100)	102 (102)	107 (107)	98.0 (98)
220	207 (94)	218 (99)	207 (94)	207 (94)	206 (94)	214 (97)	215 (98)	213 (97)	211 (96)
460	431 (94)	473 (103)	438 (95)	437 (95)	424 (92)	438 (95)	446 (97)	448 (97)	442 (96)
1,000	883 (88)	977 (98)	934 (93)	913 (91)	904 (90)	952 (95)	983 (98)	937 (94)	935 (94)

\*: Nominal Concentration

\*\* : Time weighted mean

Old: Before the renewal

New: After the renewal

Table 2 Survival rate

NC* [TWM**] (mg/L)	Test vessel	At each exposure day (%)								At the End
		1	2	3	4	5	6	7	8	Average $\pm$ S.D.
Control [<0.00004]	1	100	100	100	100	100	100	100	100	100 $\pm$ 0.0
	2	100	100	100	100	100	100	100	100	
	3	100	100	100	100	100	100	100	100	
	4	100	100	100	100	100	100	100	100	
48.0 [45.9]	1	100	100	100	100	100	100	100	100	100 $\pm$ 0.0
	2	100	100	100	100	100	100	100	100	
	3	100	100	100	100	100	100	100	100	
	4	100	100	100	100	100	100	100	100	
100 [98.0]	1	100	100	100	100	100	100	100	100	100 $\pm$ 0.0
	2	100	100	100	100	100	100	100	100	
	3	100	100	100	100	100	100	100	100	
	4	100	100	100	100	100	100	100	100	
220 [211]	1	100	100	100	100	100	100	100	100	100 $\pm$ 0.0
	2	100	100	100	100	100	100	100	100	
	3	100	100	100	100	100	100	100	100	
	4	100	100	100	100	100	100	100	100	
460 [442]	1	100	100	100	100	100	100	100	100	100 $\pm$ 0.0
	2	100	100	100	100	100	100	100	100	
	3	100	100	100	100	100	100	100	100	
	4	100	100	100	100	100	100	100	100	
1,000 [935]	1	100	100	100	100	100	100	100	100	100 $\pm$ 0.0
	2	100	100	100	100	100	100	100	100	
	3	100	100	100	100	100	100	100	100	
	4	100	100	100	100	100	100	100	100	

\*: Nominal Concentration

\*\*: Time weighted mean

S.D.: Standard Deviation

Table 3 Hatching number and rate

NC* [TWM**] (mg/L)	Test vessel	Hatching number at each exposure day								Hatching rate until 5 days later (%)	
		1	2	3	4	5	6	7	8	Each vessel	Average ± S.D.
Control [<0.00004]	1	0	0	10	14	15	15	15	15	100	100 ± 0
	2	0	0	5	14	15	15	15	15	100	
	3	0	0	8	14	15	15	15	15	100	
	4	0	0	8	15	15	15	15	15	100	
48.0 [45.9]	1	0	0	5	15	15	15	15	15	100	100 ± 0
	2	0	0	4	13	15	15	15	15	100	
	3	0	0	5	13	15	15	15	15	100	
	4	0	0	6	15	15	15	15	15	100	
100 [98.0]	1	0	0	6	10	15	15	15	15	100	100 ± 0
	2	0	0	7	11	15	15	15	15	100	
	3	0	0	6	12	15	15	15	15	100	
	4	0	0	5	13	15	15	15	15	100	
220 [211]	1	0	0	7	12	15	15	15	15	100	100 ± 0
	2	0	0	6	13	15	15	15	15	100	
	3	0	0	7	15	15	15	15	15	100	
	4	0	0	13	15	15	15	15	15	100	
460 [442]	1	0	0	7	15	15	15	15	15	100	98.3 ± 3.3
	2	0	0	11	13	14	15	15	15	93.3	
	3	0	0	5	14	15	15	15	15	100	
	4	0	0	13	14	15	15	15	15	100	
1,000 [935]	1	0	0	10	13	15	15	15	15	100	93.3 ± 7.7
	2	0	0	3	6	13	15	15	15	86.7	
	3	0	0	4	14	15	15	15	15	100	
	4	0	0	3	9	13	15	15	15	86.7	

\*: Nominal Concentration

\*\*: Time weighted mean

S.D.: Standard Deviation

Table 4 Survival rate after hatching and survival index

NC* [TWM**] (mg/L)	Test vessel	Survival rate after hatching (%)		Survival index	
		Each vessel	Average ± S.D.	Each vessel	Average ± S.D.
Control [<0.00004]	1	100	100 ± 0	100	100 ± 0
	2	100		100	
	3	100		100	
	4	100		100	
48.0 [45.9]	1	100	100 ± 0	100	100 ± 0
	2	100		100	
	3	100		100	
	4	100		100	
100 [98.0]	1	100	100 ± 0	100	100 ± 0
	2	100		100	
	3	100		100	
	4	100		100	
220 [211]	1	100	100 ± 0	100	100 ± 0
	2	100		100	
	3	100		100	
	4	100		100	
460 [442]	1	100	100 ± 0	100	98.3 ± 3.3
	2	100		93.3	
	3	100		100	
	4	100		100	
1,000 [935]	1	100	100 ± 0	100	93.3 ± 7.7
	2	100		86.7	
	3	100		100	
	4	100		86.7	

Survival index: Hatching rate (until 5 days later)×Survival rate after hatching/100

Table 5 Observed abnormal response

NC* [TWM**] (mg/L)	Test vessel	Observed abnormality (Number of observed organism)							
		1	2	3	4	5	6	7	8
Control [<0.00004]	1	na	na	na	na	FE(1)	FE,IS(1)	FE,IS(1)	FE,IS(1)
	2	na	na	na	na	na	na	na	Na
	3	na	na	na	na	FE(1)	FE,IS(1)	FE,IS(1)	FE,IS(1)
	4	na	na	na	na	na	na	na	Na
48.0 [45.9]	1	na	na	na	na	na	na	na	Na
	2	na	na	na	na	na	na	na	Na
	3	na	na	na	na	na	na	na	Na
	4	na	na	na	na	na	FE,IS(1)	FE,IS(1)	FE,IS(1)
100 [98.0]	1	na	na	na	na	FE(1)	FE,IS(1)	FE,IS(1)	FE,IS(1)
	2	na	na	na	na	na	na	na	Na
	3	na	na	na	na	na	na	na	Na
	4	na	na	na	na	na	na	na	Na
220 [211]	1	na	na	na	na	na	na	na	Na
	2	na	na	na	na	na	na	na	Na
	3	na	na	na	na	na	na	FE,IS(1)	FE,IS(1)
	4	na	na	na	na	na	na	na	FE(1)
460 [442]	1	na	na	na	na	FE(1)	FE,IS(1)	FE,IS(1)	FE,IS(1)
	2	na	na	na	na	na	na	ML(1)	ML,IS(1)
	3	na	na	na	na	na	na	na	Na
	4	na	na	na	na	na	na	na	Na
1,000 [935]	1	na	na	na	na	na	na	na	Na
	2	na	na	na	na	na	FE,IS(1)	FE,IS(1)	FE,IS(1)
	3	na	na	na	na	na	na	na	Na
	4	na	na	na	na	FE(1)	FE,IS(1)	FE,IS(1)	FE,IS(1)

na; no abnormality (Normal)

For laevae; FE, formation of edema (Abnormal); ML, malformed larvae (Abnormal);

IS, impossible to swim (Critical).

Table 6 Calculated 50% Effective Concentration and NOEC

Endpoints	LC <sub>50</sub> or EC <sub>50</sub> (mg/L)	NOEC (mg/L)
Survival rate (%)	LC <sub>50</sub> :>935	935
Cumulative hatchability for a 5-day exposure(%)	EC <sub>50</sub> : >935	935
Survival rate after hatching(%)	LC <sub>50</sub> : >935	935
Survival index	EC <sub>50</sub> : >935	935

Calculated by Time weighted mean of all measured concentrations

Table 7 Temperature of test solution

NC* [TWM**] (mg/L)	Temperature (°C)							
	0 Day	2 Day		4 Day		6 Day		8 Day
		Old	New	Old	New	Old	New	
Control [<0.00004]	26.0	25.9	25.8	26.0	26.0	26.0	26.0	26.0
48.0 [45.9]	26.0	25.9	25.8	26.0	26.0	26.0	26.0	26.0
100 [98.0]	26.0	25.9	25.8	26.0	26.0	26.0	26.0	26.0
220 [211]	26.0	26.0	25.8	26.0	26.0	26.0	26.0	26.0
460 [442]	26.0	26.0	25.8	26.0	26.0	26.0	26.0	26.0
1,000 [935]	26.0	26.0	25.8	26.0	26.0	26.0	26.0	26.0

\*: Nominal Concentration

\*\*: Time weighted mean

Old: Before the renewal

New: After the renewal

Table 8 Dissolved oxygen concentration of test solution

NC* [TWM**] (mg/L)	Dissolved Oxygen Concentration (mg/L)							
	0 Day	2 Day		4 Day		6 Day		8 Day
		Old	New	Old	New	Old	New	
Control [<0.00004]	8.0	8.3	8.4	7.9	8.4	8.1	8.3	8.4
48.0 [45.9]	8.0	8.3	8.4	8.0	8.4	8.1	8.3	8.4
100 [98.0]	8.0	8.3	8.4	8.0	8.4	8.1	8.3	8.4
220 [211]	8.0	8.3	8.4	8.0	8.4	8.1	8.3	8.4
460 [442]	8.0	8.3	8.4	8.0	8.4	8.1	8.2	8.4
1,000 [935]	8.0	8.3	8.4	8.0	8.4	8.1	8.2	8.4

\*: Nominal Concentration

\*\*: Time weighted mean

Old: Before the renewal

New: After the renewal

Table 9 Percentage of Dissolved Oxygen Concentration to Its Air Saturation Value (ASV)

NC* [TWM**] (mg/L)	Saturation Degree of Oxygen (%)							
	0 Day	2 Day		4 Day		6 Day		8 Day
		Old	New	Old	New	Old	New	
Control [<0.00004]	98.9	102.4	103.5	97.7	103.9	100.2	102.6	103.9
48.0 [45.9]	98.9	102.4	103.5	98.9	103.9	100.2	102.6	103.9
100 [98.0]	98.9	102.4	103.5	98.9	103.9	100.2	102.6	103.9
220 [211]	98.9	102.6	103.5	98.9	103.9	100.2	102.6	103.9
460 [442]	99.0	102.7	103.6	99.0	103.9	100.2	101.5	103.9
1,000 [935]	99.0	102.8	103.6	99.0	104.0	100.3	101.5	104.0

\*: Nominal Concentration

\*\* : Time weighted mean

Old: Before the renewal

New: After the renewal

Table 10 pH values

NC* [TWM**] (mg/L)	pH							
	0 Day	2 Day		4 Day		6 Day		8 Day
		Old	New	Old	New	Old	New	
Control [<0.00004]	7.8	8.0	7.9	8.0	7.9	7.9	7.9	8.0
48.0 [45.9]	7.8	8.0	7.9	8.0	7.9	7.9	7.9	8.0
100 [98.0]	7.8	8.0	8.0	8.0	7.9	8.0	7.9	8.0
220 [211]	7.8	8.1	8.0	8.0	7.9	8.0	7.9	8.0
460 [442]	7.9	8.1	8.0	8.0	7.9	8.0	7.9	8.0
1,000 [935]	7.9	8.1	8.0	8.0	8.0	8.0	7.9	8.0

\*: Nominal Concentration

\*\* : Time weighted mean

Old: Before the renewal

New: After the renewal

Table 11 Salinity of the test solution.

NC* [TWM**] (mg/L)	Salinity (psu)							
	0 Day	2 Day		4 Day		6 Day		8 Day
		Old	New	Old	New	Old	New	
Control [<0.00004]	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
48.0 [45.9]	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
100 [98.0]	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
220 [211]	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
460 [442]	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
1,000 [935]	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3

\*: Nominal Concentration

\*\*: Time weighted mean

Old: Before the renewal

New: After the renewal

Table 12 Conductivity of the test solution.

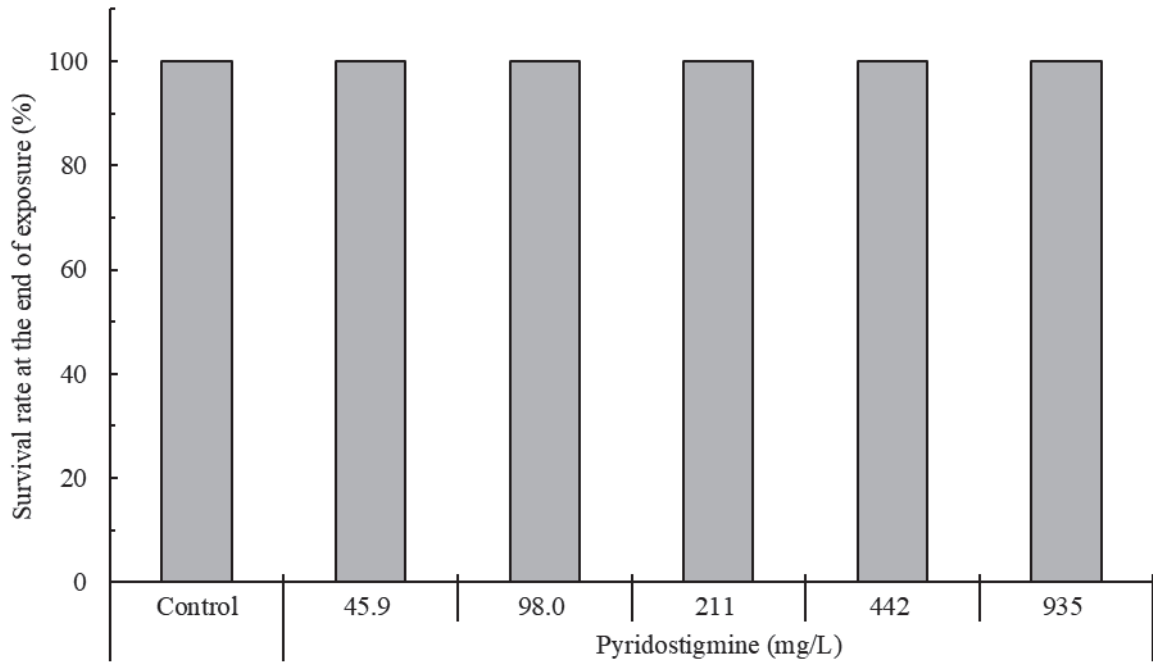
NC* [TWM**] (mg/L)	Conductivity (mS/cm)							
	0 Day	2 Day		4 Day		6 Day		8 Day
		Old	New	Old	New	Old	New	
Control [<0.00004]	0.19	0.17	0.17	0.18	0.17	0.18	0.17	0.17
48.0 [45.9]	0.21	0.19	0.19	0.20	0.19	0.20	0.19	0.19
100 [98.0]	0.24	0.23	0.21	0.23	0.21	0.23	0.22	0.22
220 [211]	0.30	0.28	0.27	0.28	0.27	0.28	0.28	0.28
460 [442]	0.44	0.41	0.39	0.41	0.39	0.41	0.40	0.40
1,000 [935]	0.70	0.69	0.65	0.69	0.65	0.69	0.65	0.67

\*: Nominal Concentration

\*\*: Time weighted mean

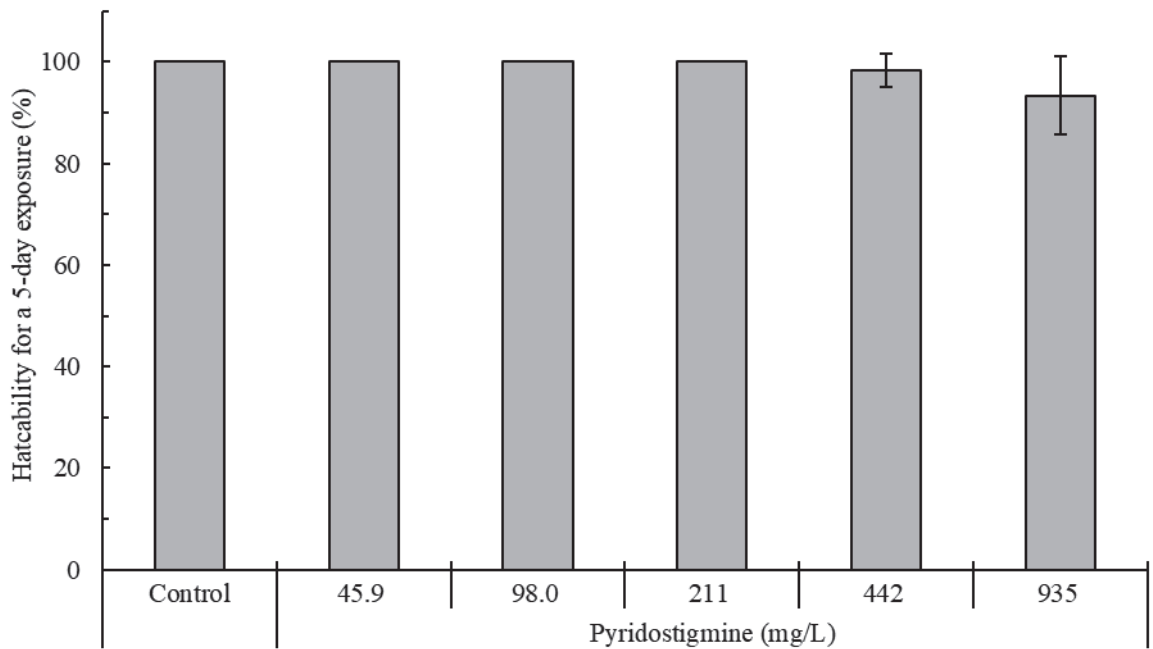
Old: Before the renewal

New: After the renewal



[time weighted mean of all measured concentrations]

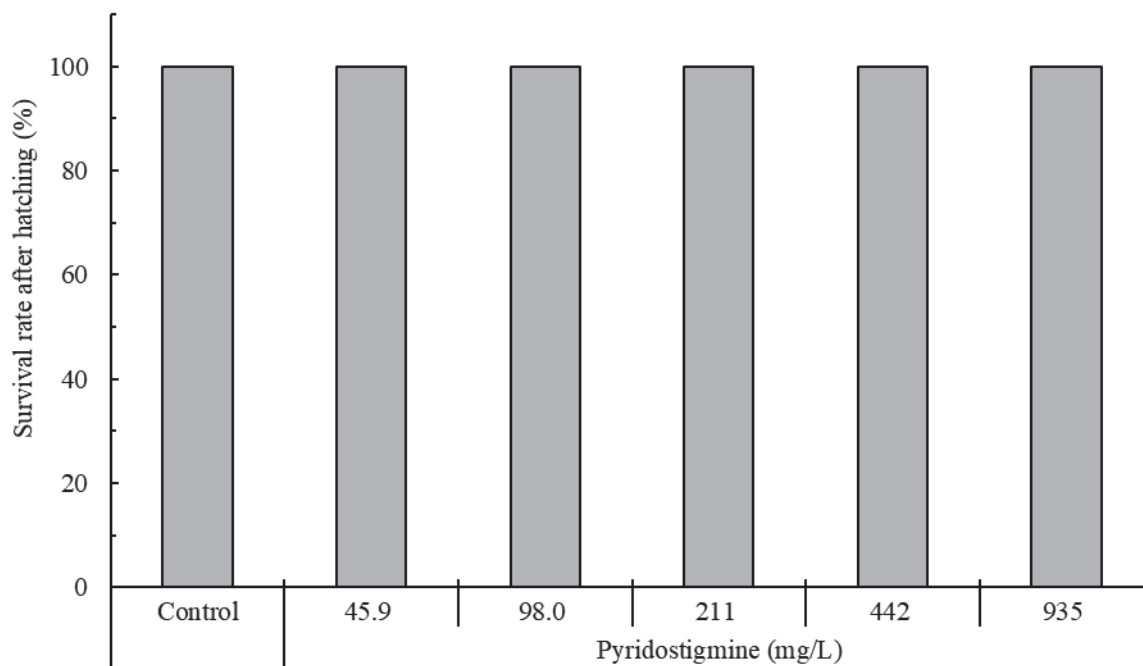
Figure 1 Survival rate of *Danio rerio* at the end of exposure to the test solution.



[time weighted mean of all measured concentrations]

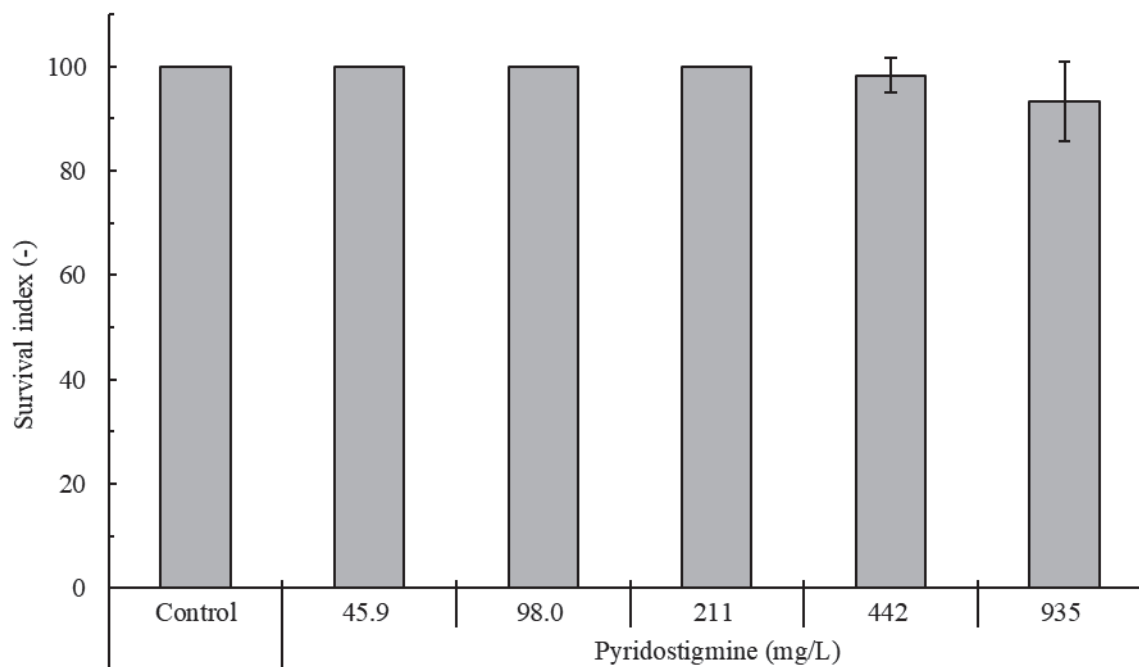
Figure 2 Cumulative hatchability of *Danio rerio* for a 5-day exposure to the test solution.

Column and error bar represent the mean and the standard deviation of replicates, respectively.



[time weighted mean of all measured concentrations]

Figure 3 Survival rate after hatching of *Danio rerio* during exposure to the test solution.



[time weighted mean of all measured concentrations]

Figure 4 Survival index of *Danio rerio* of exposure to the test solution.

Column and error bar represent the mean and the standard deviation of replicates, respectively.



付属資料-1 試験用水の水質

Water Quality of Dilution Water

Parameter	Concentration	Parameter	Concentration
pH	7.4 (22.9°C)	Thiuram	<0.0005 mg/L
Electric conductivity	18.2 mS/m	Simazine	<0.0001 mg/L
Free chlorine	<0.01 mg/L	Thiobencarb	<0.0001 mg/L
Suspended Solids	<1 mg/L	Fluorine	<0.04 mg/L
Beryllium	<0.00001 mg/L	Sodium	8.3 mg/L
Aluminium	<0.005 mg/L	Potassium	1.2 mg/L
Vanadium	0.00016 mg/L	Calcium	21 mg/L
Chromium	<0.0001 mg/L	Magnesium	2.2 mg/L
Manganese	<0.0002 mg/L	Bromide	<0.0002 mg/L
Iron	<0.003 mg/L	1,2-Dichloropropane	<0.1 mg/L
Cobalt	<0.00003 mg/L	Isoxathion	<0.0001 mg/L
Nickel	0.00011 mg/L	Diazinon	<0.0001 mg/L
Copper	0.0028 mg/L	Propyzamide	<0.0001 mg/L
Zinc	0.0050 mg/L	Fenitrothion	<0.0001 mg/L
Arsenic	0.00015 mg/L	Isoprothiolane	<0.0001 mg/L
Selenium	0.00029 mg/L	Oxine-copper	<0.001 mg/L
Molybdenum	0.00034 mg/L	Chlorothalonil	<0.0001 mg/L
Silver	<0.00001 mg/L	EPN	<0.0001 mg/L
Cadmium	<0.00001 mg/L	Dichlorvos	<0.0001 mg/L
Tin	<0.0001 mg/L	Fenobucarb	<0.0001 mg/L
Antimony	<0.0001 mg/L	Iprobenfos	<0.0001 mg/L
Lead	<0.0001 mg/L	Cholornitrofen	<0.0001 mg/L
CODMn	<0.5 mg/L	Alkalinity	38 mgCaCO <sub>3</sub> /L
Sulfide	<0.1 mg/L	Total hardness (as CaCO <sub>3</sub> )	63 mg/L
TOC	<0.1 mg/L		
Evaporated residue	120 mg/L		
Total ammonium	<0.01 mg/L	Date of measurement: November 28th, 2024	
Nitrate	0.35 mg/L		
T-P	0.003 mg/L		
Cyanide	<0.01 mg/L		
Total mercury	<0.0005 mg/L		
PCB	<0.0005 mg/L		

付属資料-2 予備試験結果

暴露条件

- 1) 暴露方式 : 半止水式 (48 時間換水)
- 2) 暴露期間 : ふ化日から 5 日間 (ふ化日: 対照区においてふ化率が>50%となった日)
- 3) 試験液量 : 50 mL/容器
- 4) 連数 : 4 容器/試験濃度区、4 容器/対照区
- 5) 試験濃度 (設定値) : 1、10、100 mg/L (公比; 10) の 3 試験濃度区及び対照区
- 6) 供試生物数 : 60 粒/試験区 (15 粒/試験容器)
- 7) 試験温度 : 26±1℃
- 8) 照明 : 室内光、16 時間明/8 時間暗 (明; AM6:00~PM10:00)
- 9) 溶存酸素濃度 : 暴露期間中の飽和溶存酸素濃度は 60%以上とする。暴露期間中はエアレーションを行わない。
- 10) 給餌 : 無給餌

Appendix Table 2 予備試験における各エンドポイントの結果

	生存率 (%)	ふ化率 (%)	ふ化後生存率 (%)	生存指標
対照区	100.0	100.0	100.0	100.0
1.0 mg/L	93.3 *	91.7	98.3	90.0 *
10 mg/L	98.3	98.3	100.0	98.3
100 mg/L	96.7	96.7	100.0	96.7

\*:対照区と比較して有意差あり

### 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 500 mg を含むピリドスチグミンブロミドは 721 mg とした。
  - 2) ミニスパーテルを使用して、ガラス製秤量容器に供試試料を 721 mg 秤量した。
  - 3) 秤量容器内の被験物質をガラス製 500 mL 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試験用水でメスフラスコ内に流し入れ試験用水でメスアップした。(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 250 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)	12	25	55	115
使用した 定容器具	10 mL 容 マイクロペレット	50 mL 容 メスシリンダー	100 mL 容 メスシリンダー	200 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。

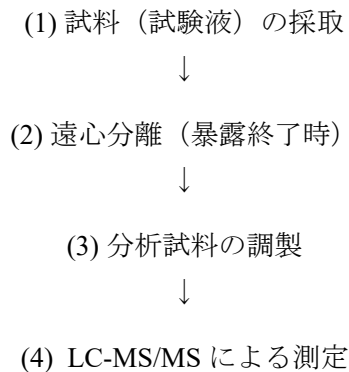
## 3. 試験液の分注

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 50 mL 容メスシリンダーを使用して、5つの試験容器に被験物質を含まない試験用水を 50 mL ずつ分注した。
- 2) 各試験濃度区は、ガラス製 50 mL 容メスシリンダーを使用して、5つの試験容器に調製した各試験液を 50 mL 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)



## 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する。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、パストゥ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。

$$Cs = Crs \times (As / Ars - b) / a \times v/V \times d / 1,000$$

$Cs$  : 水質試料中の対象物質濃度 (mg/L)

$Crs$  : 内標準の濃度 (ng/mL)

$As$  : 対象物質のピーク強度

$Ars$  : 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

$\sigma$  : 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 ( $\sigma$ ) を算出した。IDL の計算に用いた  $t$  及び  $\sigma$  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。