

本写しは原本と相違ありません

いであ株式会社  
環境創造研究所  
運営管理者

## 最 終 報 告 書

ピバル酸のメダカ (*Oryzias latipes*) に対する急性毒性試験

(試験番号：0907-203)

2010年3月16日作成

い で あ 株 式 会 社

## 陳 述 書

いであ株式会社  
環境創造研究所

試験委託者：環境省

表 題：ピバル酸のメダカ (*Oryzias latipes*) に対する急性毒性試験

試験番号：0907-203

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通知「新規化学物質等に係る試験を実施する試験施設に関する基準について」（平成15年11月21日付け薬食発第1121003号、平成16・11・17製局第3号、環保企発第031121004号、平成20年7月4日最終改正）及び、同通知別添5「藻類生長阻害試験、ミジンコ急性遊泳阻害試験、魚類急性毒性試験、ミジンコの繁殖に及ぼす影響に関する試験、魚類の初期生活段階における生息又は生育に及ぼす影響に関する試験及びユスリカの生息又は生育に及ぼす影響に関する試験に際して付加される事項」に準拠して実施したものである。

2010年3月16日

試験責任者：

## 信 頼 性 保 証 書

いであ株式会社  
環境創造研究所

試験委託者 : 環境省

試験の表題 : ピバル酸のメダカ (*Oryzias latipes*) に対する急性毒性試験

試験番号 : 0907-203

本試験は試験計画書及び標準操作手順書に従って実施され、本最終報告書には試験に使用した方法、手順が正確に記載されており、試験結果は生データを正確に反映していることを下記のとおり確認した。

監査・査察項目	監査・査察実施日	試験責任者への報告日	運営管理者への報告日
試験計画書	2010年3月2日	2010年3月2日	2010年3月3日
試験計画書変更届	2010年3月4日	2010年3月4日	2010年3月4日
供試魚の測定	2010年3月7日	2010年3月8日	2010年3月9日
被験物質溶液調製時, 暴露実験開始時, 試料 分析時	2010年3月8日	2010年3月8日	2010年3月9日
暴露実験終了時	2010年3月12日	2010年3月12日	2010年3月12日
最終報告書	2010年3月16日	2010年3月16日	2010年3月16日

2010 年 3 月 16 日

信頼性保証担当者

## 試験実施概要

### 1. 表題

ピバル酸のメダカ (*Oryzias latipes*) に対する急性毒性試験

### 2. 試験番号

0907-203

### 3. 試験目的

ピバル酸のメダカ (*Oryzias latipes*) に対する急性毒性試験を実施し、半数致死濃度を求めることを目的とする。

当施設において本被験物質の予備試験を実施した結果、準拠する試験法の試験上限濃度である 100 mg/L の試験液においてメダカの死亡は認められなかった。

したがって、本試験では試験上限濃度での限度試験による確認を目的とする。

### 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通知「新規化学物質等に係る試験の方法について」（平成 15 年 11 月 21 日付け薬食発第 1121002 号、平成 15・11・13 製局第 2 号、環保企発第 031121002 号、平成 18 年 11 月 20 日最終改正）に準拠して実施した。

### 5. 適用 GLP

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通知「新規化学物質等に係る試験を実施する試験施設に関する基準について」（平成 15 年 11 月 21 日付け薬食発第 1121003 号、平成 15・11・17 製局第 3 号、環保企発第 031121004 号、平成 20 年 7 月 4 日最終改正）及び、同通知別添 5「藻類生長阻害試験、ミジンコ急性遊泳阻害試験、魚類急性毒性試験、ミジンコの繁殖に及ぼす影響に関する試験、魚類の初期生活段階における生息又は生育に及ぼす影響に関する試験及びユスリカの生息又は生育に及ぼす影響に関する試験に際して付加される事項」

6. 試験委託者

名称 : 環境省  
所在地 : 〒100-8975 東京都千代田区霞が関 1-2-2

7. 試験受託者

名称 : いであ株式会社  
所在地 : 〒154-0012 東京都世田谷区駒沢 3-15-1  
代表者 : 代表取締役会長兼社長 [REDACTED]

8. 試験施設

名称 : いであ株式会社 環境創造研究所  
所在地 : 〒421-0212 静岡県焼津市利右衛門 1334-5

9. 試験関係者

試験責任者 : [REDACTED] (2010年3月16日)

(所属 リスク評価グループ)

試験担当者 : [REDACTED] (2010年3月16日)

(操作全般、化学分析、とりまとめ)

試験担当者 : [REDACTED] (2010年3月16日)

(暴露試験)

10. 試験期間

試験開始日 : 2010年2月26日  
暴露実験開始日 : 2010年3月8日  
暴露実験終了日 : 2010年3月12日  
試験終了日 : 2010年3月16日

11. 記録及び試資料の保管

本試験に関する下記の記録及び試資料は、試験終了後、いであ株式会社環境創造研究所の試資料保管施設に保管する。

- 1) 試験計画書、同変更の記録
- 2) 最終報告書
- 3) 生データ
- 4) 信頼性保証業務担当者の監査・査察記録
- 5) 被験物質

# 目 次

	頁
要 約 .....	8
1 被験物質	
1.1 名称、構造式及び物理化学的性状 .....	10
1.2 供試試料 .....	10
1.3 保管方法及び保管条件下での安定性 .....	11
1.4 暴露条件下での安定性 .....	11
2 供試生物 .....	12
3 試験方法	
3.1 試験条件 .....	13
3.2 試験用水 .....	13
3.3 試験容器及び機器等 .....	13
3.4 試験濃度の設定 .....	14
3.5 試験液の調製 .....	14
3.6 試験液の分析 .....	14
3.7 試験操作 .....	15
4 結果の算出 .....	16
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 .....	17
5.2 試験液中の被験物質濃度 .....	17
5.3 半数致死濃度 (LC50) .....	17
5.4 0%死亡最高濃度及び100%死亡最低濃度 .....	17
5.5 毒性症状等 .....	17
5.6 試験液の水溫、溶存酸素濃度及び pH 値 .....	18
Table 1～8 .....	19～23
Figure 1 .....	23
付属資料－1 試験用水の水質 .....	24～25
付属資料－2 予備試験結果 .....	26～28
付属資料－3 試験液の調製方法 .....	29～30
付属資料－4 試験液の分析方法 .....	31～33
付属資料－5 供試試料の試験成績書 .....	34～35

## 要 約

### 試験委託者

環境省

### 表題

ピバル酸のメダカ (*Oryzias latipes*) に対する急性毒性試験

### 試験番号

0907-203

### 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通知「新規化学物質等に係る試験の方法について」（平成15年11月21日付け薬食発第1121002号、平成15・11・13製局第2号、環保企発第031121002号、平成18年11月20日最終改正）（以下、化審法テストガイドラインとする）に準拠して実施した。

- |               |  |
|---------------|--|
| 1) 被験物質       | : ピバル酸                                 |
| 2) 暴露方式       | : 半止水式 (48 時間後に全量を換水)                  |
| 3) 供試生物       | : メダカ ( <i>Oryzias latipes</i> )       |
| 4) 暴露期間       | : 96 時間                                |
| 5) 試験濃度 (設定値) | : 100 mg/L の限度試験、対照区                   |
| 6) 試験液量       | : 5 L/容器                               |
| 7) 連数         | : 1 容器/試験区                             |
| 8) 供試生物数      | : 10 尾/試験区                             |
| 9) 試験温度       | : 24±1℃                                |
| 10) 照明        | : 室内光、16 時間明/8 時間暗 (明; AM6:00~PM10:00) |
| 11) 助剤の種類     | : 使用しない                                |
| 12) 試験液中の助剤濃度 | : -                                    |
| 13) 分析方法      | : HPLC                                 |



## 結果

### 1) 試験液中の被験物質濃度

設定濃度に対する実測濃度の割合は、新試験液で 101～102%、旧試験液で 102%であった。半数致死濃度、0%死亡最高濃度及び 100%死亡最低濃度の算出には、暴露開始時の新試験液と暴露 48 時間後の旧試験液、暴露 48 時間後の換水時に調製した新試験液と暴露 96 時間後の旧試験液の各実測濃度の算術平均値を用いた。

### 2) 半数致死濃度 (LC50)

96 時間半数致死濃度 (LC50) : >102 mg/L (95%信頼区間: 算出不可)

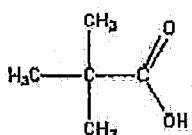
### 3) 0%死亡最高濃度及び 100%死亡最低濃度

96 時間 0%死亡最高濃度 : 102 mg/L

96 時間 100%死亡最低濃度 : >102 mg/L

## 1 被験物質

### 1.1 名称、構造式及び物理化学的性状

- 1) 名称 : ビバル酸
- 2) 別名 : ビパリン酸、トリメチル酢酸、2,2-Dimethyl-propanoic acid
- 3) CAS番号 : 75-98-9
- 4) 構造式 :
- 
- 5) 分子式 :  $C_5H_{10}O_2$  <sup>1)</sup>
- 6) 分子量 : 102.13 <sup>3)</sup>
- 7) 蒸気圧 : 0.1kPa (20℃) <sup>1)</sup>
- 8) 対水溶解度 : 2.5 g/100mL (20℃) <sup>1)</sup>、2.5% (20℃) <sup>2)</sup>、1 g/40mL、温水に可溶 <sup>3)</sup>
- 9) 1-オクタノール/水分分配係数 : 1.4 <sup>1)</sup>、1.48 <sup>3)</sup>
- 10) 融点 : 34℃ (凝固点) <sup>1)</sup>、35.5℃ <sup>2)</sup>、35.3℃ <sup>3)</sup>
- 11) 沸点 : 164℃ <sup>1)</sup>、163.8℃ <sup>2)</sup>、163.7℃ <sup>3)</sup>
- 12) 常温における性状 : 白色の結晶～塊で刺激臭あり<sup>1)</sup>、白色の液体又は固体で刺激臭あり<sup>2)</sup>、白色～わずかにうすい黄色の塊、無色～わずかにうすい黄色の液体<sup>3)</sup>
- 13) 安定性 : 通常条件で安定である <sup>2)</sup>、安定 <sup>3)</sup>
- 14) 溶媒に対する溶解度 : アルコール・エーテルに易溶 <sup>1)</sup>、エタノール・ジエチルエーテルに易溶 <sup>2)</sup>、エタノール・エーテルに混和 <sup>3)</sup>
- 15) 試験用水に対する溶解度 :  $\geq 200$  mg/L (23.9℃) (当試験施設確認値)

参考)

- 1) [redacted] 製品安全データシート [redacted]  
2) [redacted] 製品安全データシート [redacted]  
3) [redacted] 製品安全データシート [redacted]

### 1.2 供試試料

- 1) ロット番号 : [redacted]
- 2) 純度 : 99.9% (GC)
- 3) 不純物の名称及び含有量 : 不明

- 4) 供給者 : XXXXXXXXXX  
5) 入手量 : 25 g × 2 本  
6) 入手日 : 2010 年 1 月 21 日  
【付属資料-5】試験成績書、XXXXXXXXXX

### 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、遮光・密閉し、当試験施設内調製室（GLP 対象施設）内の被験物質保管容器（常温）に保管した。
- 2) 供試試料の確認 : 入手した供試試料が目的とする物質と同一であるとの確認は、製造会社の試験成績書【付属資料-5】をもって代用した。
- 3) 保管条件下での安定性の確認 : 実験開始前及び実験終了後に測定した被験物質の赤外吸収スペクトルに変化がみられなかったことから、保管条件下で安定であったと判断した。

### 1.4 暴露条件下での安定性

設定濃度 100 mg/L の試験液を用いて暴露条件下での安定性試験を実施した。試験液調製時の実測濃度は 94.6 mg/L であり、48 時間後では 99.8 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ものと考えられた。したがって、本試験は 48 時間後に全試験液を交換する半止水式で試験を実施するものとした。

## 2 供試生物

- 1) 和名 : メダカ (ヒメダカ)
- 2) 学名 : *Oryzias latipes*
- 3) 入手先 : 環境創造研究所内で自家繁殖
- 4) 全長 : 平均 2.5 cm (2.2~2.7 cm)、N=10
- 5) 体重 : 平均 0.12 g (0.082~0.17 g)、N=10
- 6) 感受性試験の結果 : 基準物質 硫酸銅(Ⅱ)五水和物  
暴露期間 2009 年 9 月 14 日~18 日  
LC50=0.26 mg/L (95%信頼区間: 0.21~0.34 mg/L)  
(当施設の規定範囲内【平均値±2 標準偏差: 0.20~0.34 mg/L、N=7 (試験実施期間: 2005 年 4 月~)】であった)
- 7) 供試齢 : 生後 4 か月齢
- 8) じゅん化期間 : 2010 年 2 月 26 日~3 月 8 日
- 9) じゅん化期間中の死亡率 : じゅん化期間中の連続した 7 日間の死亡率は 0%であった。  
肉眼的に健康で異常が無いことを確認したメダカを試験条件と同じ状態で 24 時間じゅん化したところ、死亡個体は確認されなかった。
- 9) その他 : 卵の採取から薬浴しておらず、じゅん化期間中も薬浴は行わなかった。

### じゅん化条件

- 1) 飼育水 : 試験用水 (3.2 参照)
- 2) 飼育方法 : 流水式 (130 mL/分、6 回転以上/日換水)
- 3) 飼育容器 : 10 L 容ガラス水槽
- 4) 水温 : 24±1℃
- 5) 溶存酸素濃度 : 飽和溶存酸素濃度の 80%以上とする
- 6) 照明 : 室内光、16 時間明/8 時間暗 (明; AM6:00~PM10:00)
- 7) 餌 : テトラミン (ドイツ ベルケテトラ製)、アルテミア
- 8) 給餌量 : 魚体重の約 2%/日  
(ただし、暴露開始 24 時間前から無給餌)

### 3 試験方法

#### 3.1 試験条件

- 1) 暴露方式 : 半止水式 (48 時間後に全量を換水)
- 2) 暴露期間 : 96 時間
- 3) 試験液量 : 5 L/容器 (試験液 1.0 L 当たりの供試魚体重は 0.25 g)
- 4) 連数 : 1 容器/試験区
- 5) 供試生物数 : 10 尾/試験区
- 6) 試験温度 :  $24 \pm 1^{\circ}\text{C}$
- 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) pH : 6.0~8.5
- 10) 給餌 : 無給餌
- 11) 助剤の種類 : 使用しない
- 12) 試験液中の助剤濃度 : -

#### 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  $24 \pm 1^{\circ}\text{C}$  に調温し、十分にばっ気したもの) を使用した。試験用水の主な水質は、全硬度 70 mg/L ( $\text{CaCO}_3$  換算)、pH 7.9~8.0 であった。試験用水の水質測定結果を【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 : 12 L 容ガラス容器 (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) 恒温室 : ヤマザキ・シーエー製 恒温室 (設定可能温度 :  $10 \sim 30^{\circ}\text{C}$ )
- 3) 水温計 : 水銀棒状標準温度計 (測定範囲 :  $0 \sim 50^{\circ}\text{C}$ 、最小目盛 :  $0.1^{\circ}\text{C}$ )
- 4) 溶存酸素計 : 堀場製作所製 DO メーター (型式 : OM-12-02)
- 5) pH 計 : 堀場製作所製 カスタニーATC pH メーター (型式 : D-21)
- 6) 全硬度 : 同仁化学研究所製 ボナールキットWH
- 7) 残留塩素 : 共立理化学研究所製 パックテスト 残留塩素 (遊離) (WAK-C10-DP) 及び結合残留塩素前処理剤 (C10-RB)

### 3.4 試験濃度の設定

本試験に先立ち、公比を 2.0 として、設定濃度が 25.0、50.0 及び 100 mg/L の 3 試験濃度区で予備試験を実施した結果、供試生物の死亡は観察されなかった。予備試験の結果は、【付属資料-2】に示した。

この結果を踏まえ、本試験では、試験上限濃度での限度試験を実施した。また、別に対照区を設けた。

一方、予備試験時において、試験上限濃度区における試験液の pH 値は、暴露期間を通じて 5.5～5.8 であった。化審法テストガイドラインでは、試験液調製時の pH 値が 6～8.5 の範囲にない場合、試験液の pH 値を被験物質添加前の試験用水の pH 値に調製した追加試験を行うことが望ましいと記載されている。

しかしながら、本被験物質の pKa は、4.69 (推定値)<sup>1)</sup> であり、試験上限濃度の試験液の pH 値 (5.5～5.8) では約 90% が解離状態に、試験液の pH 値を試験用水の pH 値 (7.8～8.0) に調製した場合は 100% が解離状態になると推定された。予備試験の結果より、試験液中の被験物質の約 90% が解離状態にある場合の死亡率は 0% であったことから、試験液の pH 値を上げ、解離状態の割合が 100% になった場合も死亡率に影響しないものと予想された。また、本被験物質の魚類毒性に関する既存の文献<sup>2)</sup> においても、24hLC50 が pH5.4 では 400 mg/L に対して pH7.0 では 4,500 mg/L になったとする結果が記載されていたことから、本被験物質については、試験液の pH を調製した追加試験を実施しないものとした。

1) : SPARC に基づく推定値 (<http://sparc.chem.uga.edu/sparc/>)

2) : IUCLID data sheet (CAS;75-98-9) EUROPEAN COMMISSION (2000), p11

### 3.5 試験液の調製

被験物質濃度 500 mg/L の濃厚液を調製し、この濃厚液を試験用水で希釈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、HPLC 分析計で測定した。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、暴露開始時（0時間）及び48時間目に調製する新試験液、48時間目及び暴露試験終了時の旧試験液から採取した。

### 3.7 試験操作

試験容器内の試験液の水温、溶存酸素濃度、pH値を測定し、各試験容器に供試魚を10尾ずつ投入した。暴露期間中は無給餌とし、対照区及び試験上限濃度区について、24時間ごとに水質を測定した。

試験は、メダカを試験液の入った試験容器に投入した時点を暴露開始時とした（試験条件は3.1参照）。

試験液は、48時間後に調製し、全量を換水した。供試生物は、旧試験液中での観察及び新旧の試験液の水質を測定後に、新試験液に再投入した。換水時の供試魚は、48時間経過した旧試験液を廃液用の容器に移す際に手網で受け、新しく調製した新試験液に移した。

暴露開始時、3時間後、6時間後、24時間後、48時間後、72時間後及び96時間後に観察された毒性の徴候及び異常を記録した。一般的に記載する症例と定義を下記に示した。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。

〔症状と定義〕

分類	症状	症状の定義
A: 死亡・重篤	死亡	観察可能な動き（例えば鰓蓋の動きなど）がなく、尾柄部に触れて反応がない状態。
	遊泳不能	鰓蓋のみが動いているが、遊泳等の運動が停止、又は極度の異常を示している状態。
B: 異常	遊泳異常	正常ではない遊泳行動を示す状態。以下の症状が含まれる。 <ul style="list-style-type: none"> <li>・ 表層遊泳（表層で遊泳。鼻上げ等を含む。）</li> <li>・ 平衡失調（平衡感覚が失われており、背泳、スパイラル遊泳（鉛直方向）、コークスクリュウ遊泳（水平方向）等をしている）</li> <li>・ 方向不定遊泳（方向感覚がなく遊泳方向が定まらない）</li> <li>・ 過活発（活動量が増加している、興奮、狂奔等）</li> <li>・ 不活発（活動量が低下している）</li> <li>・ 痙攣</li> </ul>
	外見異常 （表面異常）	<ul style="list-style-type: none"> <li>・ 体色変化（明化・暗化）</li> <li>・ 出血（内出血を含む）</li> <li>・ びらん（ただれる）</li> <li>・ 鰭腐れ</li> <li>・ 立鱗（鱗が逆立つ）</li> <li>・ 脱鱗</li> <li>・ 粘液異常（粘液過剰分泌、粘液凝固等）</li> </ul>
	外見異常 （形態異常）	<ul style="list-style-type: none"> <li>・ 背曲がり</li> <li>・ 骨折</li> <li>・ 眼球異常（眼球突出等）</li> </ul>
	呼吸異常	正常ではない、鰓蓋の動きを示す状態。増加又は減少がある。
	その他	上記以外の毒性症状
	なし	遊泳行動及び外見に異常がみられない状態。
C: 正常	なし	

#### 4 結果の算出

観察時ごとに、試験上限濃度区の死亡数と供試個体数（10 尾）から死亡率（％）を算出し、濃度－死亡率のグラフを作成した。

暴露終了時において死亡個体が認められなかったことから限度試験が成立し、LC50 は試験上限濃度区における平均実測濃度より大きい値として示した。

また、試験上限濃度区における平均実測濃度を 0％死亡最高濃度とし、それより大きい値として 100％死亡最低濃度を示した。



## 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

試験上限濃度区におけるpH値が暴露期間を通して試験条件（6.0～8.5）を逸脱した。

### 5.2 試験液中の被験物質濃度

被験物質濃度の測定結果をTable 1に示した。

設定濃度に対する実測濃度の割合は、新試験液で101～102%、旧試験液で102%であった。半数致死濃度、0%死亡最高濃度及び100%死亡最低濃度の算出には、暴露開始時の新試験液と暴露48時間後の旧試験液、暴露48時間後の換水時に調製した新試験液と暴露96時間後の旧試験液の各実測濃度の算術平均値を用いた。

### 5.3 半数致死濃度（LC50）

各暴露時間における累積死亡個体数及び死亡率をTable 2 に、半数致死濃度（LC50）をTable 3 及び以下に、濃度－死亡率曲線をFigure 1 に示した。

暴露終了時（96時間目）における対照区の累積死亡率は0%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（対照区の死亡率が暴露終了時に10%を超えない）を満たした。

試験上限濃度区における累積死亡率が0%であったことから限度試験が成立し、LC50は以下のようになった。

96 時間 LC50 : >102 mg/L (95%信頼区間：算出不可)

### 5.4 0%死亡最高濃度及び100%死亡最低濃度

0%死亡最高濃度及び100%死亡最低濃度を Table 4 及び以下に示した。

96 時間 0%死亡最高濃度 : 102 mg/L

96 時間 100%死亡最低濃度 : >102 mg/L

### 5.5 毒性症状等

暴露期間中に観察された死亡を含む毒性症状を Table 5-1及び 5-2 に示した。

対照区では、暴露期間を通して、毒性症状は認められなかった

試験上限濃度区では、暴露開始時に10個体に遊泳異常（表層遊泳）が観察されたが、暴露3

時間後には全個体が正常であった。暴露48時間後の換水後に再び8個体に遊泳異常（表層遊泳）、72時間後に1個体に遊泳異常（表層遊泳）が観察されたが、96時間後には全個体が正常であった。

また、暴露48時間後の換水時及び暴露終了時において、対照区では、試験容器底面に糞が観察されなかったのに対して、試験上限濃度区では多量の糞が観察された。

#### 5.6 試験液の水温、溶存酸素濃度及び pH 値

試験液の水温をTable 6、溶存酸素濃度をTable 7-1、溶存酸素飽和度をTable 7-2、pH値をTable 8 にそれぞれ示した。

暴露期間中の試験液の水温は、対照区が23.7～24.3℃、試験上限濃度区が23.7～24.3℃であり、試験条件の範囲内（24±1℃）であった。暴露期間中の溶存酸素濃度は、対照区が6.9～8.4 mg/L、試験上限濃度区が6.9～8.3 mg/Lであった。溶存酸素飽和度は、対照区が83.8～101.7%、試験上限濃度区が83.8～100.5%の範囲にあり、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（暴露期間中、溶存酸素飽和度が60%以上であること）を満たしていた。

暴露期間中のpH値は、対照区が7.5～8.0であり、試験条件の許容範囲内（6.0～8.5）の変動であったが、試験上限濃度区は5.4～5.7であり、暴露期間を通して許容範囲外であった。

以上

Table 1. Measured Concentrations of the Test Substance in Test Solution

Nominal Concentration (mg/L)	Measured Concentration (mg/L) (Percentage of Nominal)				Mean* Measured Concentration (mg/L)	
	0 hour		48 hours			96 hours
	New	Old	New	Old		
Control	<0.17	<0.17	<0.17	<0.17	<0.17	
100	102	102	101	102	102	
	(102)	(102)	(101)	(102)	(102)	

\*: arithmetic mean

New: freshly prepared test solutions

Old: test solutions after 48 hours exposure

Table 2. The Numbers of Dead Fish (Mortality)

Nominal Concentration (mg/L)	Mean* Measured Concentration (mg/L)	Cumulative Numbers of Dead Fish (Cumulative Mortality)			
		24 hours	48 hours	72 hours	96 hours
Control	<0.17	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
100	102	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)

\*: arithmetic mean

Table 3. Calculated LC50 Values

Exposure Period (hours)	LC50 (mg/L)	95-Percent Confidence Limits (mg/L)	Statistical Method
24	>102	-- -- --	--
48	>102	-- -- --	--
72	>102	-- -- --	--
96	>102	-- -- --	--

\*No adverse effects were observed at any exposure levels.

Table 4. The Highest Concentration causing 0% Mortality and the Lowest Concentration causing 100% Mortality

Exposure Period (hours)	Highest Concentration Causing 0% Mortality (mg/L)	Lowest Concentration Causing 100% Mortality (mg/L)
24	102	>102
48	102	>102
72	102	>102
96	102	>102

Table 5-1. Observed Toxicological Symptoms

Nominal Concentration (mg/L)	Mean* Measured Concentration (mg/L)	Toxicological Symptoms**	3 hours	6 hours	24 hours
Control	<0.17	Death (cumulative)	0	0	0
		Critical	0	0	0
		Abnormal	0	0	0
		Normal	10	10	10
100	102	Death (cumulative)	0	0	0
		Critical	0	0	0
		Abnormal	0	0	0
		Normal	10	10	10

\*: arithmetic mean

\*\*: Symptoms observed at old test solution.

Table 5-2. Observed Toxicological Symptoms

Nominal Concentration (mg/L)	Mean* Measured Concentration (mg/L)	Toxicological Symptoms**	48 hours	72 hours	96 hours
Control	<0.17	Death (cumulative)	0	0	0
		Critical	0	0	0
		Abnormal	0	0	0
		Normal	10	10	10
100	102	Death (cumulative)	0	0	0
		Critical	0	0	0
		Abnormal	0	1 AS 1	0
		Normal	10	9	10

\*: arithmetic mean

\*\*: Symptoms observed at old test solution.

AS: Abnormal swimming

Table 6. Temperature (Semi-static Condition)

Nominal Concentration (mg/L)	Mean* Measured Concentration (mg/L)	Temperature (°C)					
		0 hr	24 hrs	48 hrs		72 hrs	96 hrs
		New		Old	New		Old
Control	<0.17	23.9	24.3	24.1	23.7	24.3	24.3
100	102	23.9	24.3	24.1	23.7	24.2	24.1

\*: arithmetic mean

New: freshly prepared test solutions

Old: test solutions after 48 hours exposure

Table 7-1. Dissolved Oxygen Concentrations (Semi-static Condition)

Nominal Concentration (mg/L)	Mean* Measured Concentration (mg/L)	Dissolved Oxygen Concentration (mg/L)					
		0 hr	24 hrs	48 hrs		72 hrs	96 hrs
		New		Old	New		Old
Control	<0.17	8.4	7.2	6.9	8.2	7.4	7.1
100	102	8.3	7.4	6.9	8.1	7.4	7.3

\*: arithmetic mean

New: freshly prepared test solutions

Old: test solutions after 48 hours exposure

Table 7-2. Percentage of Dissolved Oxygen Concentration to Its Air Saturation Value (ASV)  
(Semi-static Condition)

Nominal Concentration (mg/L)	Mean* Measured Concentration (mg/L)	Saturation Degree of Oxygen, %					
		0 hr	24 hrs	48 hrs		72 hrs	96 hrs
		New		Old	New		Old
Control	<0.17	101.7	87.7	83.8	98.9	90.2	86.5
100	102	100.5	90.2	83.8	97.7	90.0	88.7

\*: arithmetic mean

New: freshly prepared test solutions

Old: test solutions after 48 hours exposure

Table 8. pH values (Semi-static Condition)

Nominal Concentration (mg/L)	Mean* Measured Concentration (mg/L)	pH					
		0 hr	24 hrs	48 hrs		72 hrs	96 hrs
		New		Old	New		Old
Control	<0.17	7.9	7.5	7.5	8.0	7.6	7.7
100	102	5.4	5.6	5.7	5.5	5.5	5.7

\*: arithmetic mean

New: freshly prepared test solutions

Old: test solutions after 48 hours exposure

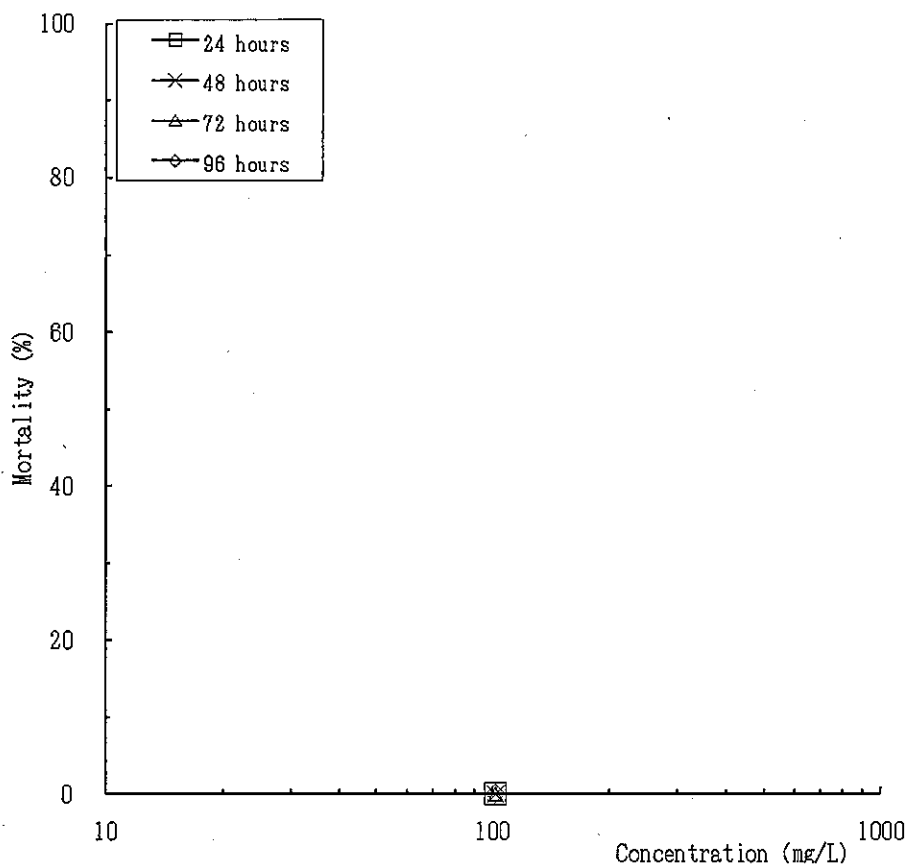


Figure 1. Concentration-Response (Mortality) Curve

## 付属資料－1

### 試験用水の水質



Appendix 1-Table 1. Water Quality of Dilution Water

Parameter	Concentration	Parameter	Concentration
pH	7.2 (23.1°C)	Thiuram	<0.0006 mg/L
Electric conductivity	16 mS/m	Simazine	<0.0001 mg/L
Free chlorine	<0.01 mg/L	Thiobencarb	<0.0001 mg/L
Beryllium	<0.00001 mg/L	Fluorine	<0.04 mg/L
Aluminium	<0.01 mg/L	Sodium	4.2 mg/L
Vanadium	0.0001 mg/L	Potassium	1.2 mg/L
Chromium	<0.001 mg/L	Calcium	20 mg/L
Iron	<0.001 mg/L	Magnesium	1.8 mg/L
Manganese	<0.001 mg/L	Bromide	<0.1 mg/L
Nickel	<0.001 mg/L	1,2-Dichloropropane	<0.0002 mg/L
Copper	<0.001 mg/L	Isoxathion	<0.0001 mg/L
Zinc	0.006 mg/L	Diazinon	<0.0001 mg/L
Arsenic	<0.001 mg/L	Propyzamide	<0.0001 mg/L
Selenium	<0.003 mg/L	Fenitrothion	<0.0001 mg/L
Molybdenum	0.0002 mg/L	Isoprothiolane	<0.0001 mg/L
Cadmium	<0.0003 mg/L	Oxine-copper	<0.001 mg/L
Tin	<0.0001 mg/L	Chlorothalonil	<0.0001 mg/L
Antimony	<0.0003 mg/L	EPN	<0.0001 mg/L
Lead	<0.001 mg/L	Dichlorvos	<0.0001 mg/L
CODMn	<0.5 mg/L	Fenobucarb	<0.0001 mg/L
Sulfide	<0.1 mg/L	Iprobenfos	<0.0001 mg/L
TOC	0.1 mg/L	Chloronitrofen	<0.0001 mg/L
Evaporated residue	99 mg/L	Alkalinity	39 mgCaCO <sub>3</sub> /L
Total ammonium	<0.01 mg/L	Total hardness (as CaCO <sub>3</sub> )	58 mg/L
T-P	0.005 mg/L		
Cyanide	<0.01 mg/L		
Total mercury	<0.0005 mg/L		
PCB	<0.0005 mg/L		

Date of measurement: November 5, 2009

付属資料－2

予備試験結果

・ 予備試験

予備試験識別番号： 0907-Y-203

実施期間：2010 年 2 月 9 日～2 月 13 日

・ 試験条件

- |               |  |
|---------------|--|
| 1) 暴露方式       | : 半止水式 (48 時間後に全量を換水)                          |
| 2) 暴露期間       | : 96 時間  |
| 3) 試験濃度 (設定値) | : 25.0、50.0 及び 100 mg/L の 3 試験濃度区、対照区、公比:2.0   |
| 4) 試験液量       | : 3 L/容器                                       |
| 5) 連数         | : 1 容器/試験区                                     |
| 6) 供試生物数      | : 10 尾/試験区                                     |
| 7) 試験温度       | : 24±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) pH        | : 6.0~8.5                                      |
| 11) 給餌        | : 無給餌  |
| 12) 助剤の種類     | : 使用しない  |
| 13) 試験液中の助剤濃度 | : -  |
| 14) 分析方法      | : HPLC   |

予備試験 (0907-Y-203) の結果

Table A2-1. The Numbers of Dead Fish (Mortality)

Nominal Concentration (mg/L)	Cumulative Mortality (Percentage of Mortality)			
	24 hours	48 hours	72 hours	96 hours
Control	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
25.0	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
50.0	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
100	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)

## 付属資料－3

### 試験液の調製方法

## 1. 濃厚液 (500 mg/L) の調製方法

- 1) 1,000 mL 容メスシリンダーにより、試験用水 1,000 mL を定容した。
- 2) 被験物質をスパーテルにより採取し、秤量トレイに約 500 mg (暴露開始時 : 500.1 mg、暴露 48 時間目 : 499.8 mg) を秤量した。
- 3) 試験用水を 1,000 mL 容ガラス栓付き三角フラスコに約 900 mL、100 mL 容ビーカーに約 100 mL 入れた。
- 4) 三角フラスコ内の試験用水を、マグネチックスターラー及び 38 mm オクタゴン回転子を使用し、空気を巻き込まない程度の強度で攪拌した。
- 5) 秤量した被験物質を三角フラスコ内に添加し、秤量トレイに付着した被験物質が無くなるまで、100 mL 容ビーカー内の試験用水で被験物質を三角フラスコ内に洗い込んだ。操作後に残った試験用水は、全量三角フラスコに入れた。一部の被験物質が秤量トレイに付着したため、試験用水をトレイ内に適量入れ、ガラス棒により擦り落とした後、フラスコ内に移し入れた。
- 6) 蓋をして、スターラーで約 5 分間攪拌した。

## 2. 試験液 (100 mg/L) の調製方法

- 1) 2,000 mL 容メスシリンダーで試験用水を 2,000 mL 定容し、試験容器に入れた。
- 2) 2,000 mL 容メスシリンダーで試験用水を 2,000 mL 定容した。
- 3) 試験容器に濃厚液を全量 (1,000 mL) 入れた後、2,000 mL 容メスシリンダー内の試験用水約 20 mL で濃厚液の入っていた容器を共洗いし、試験容器に入れた。
- 4) 2,000 mL 容メスシリンダー内の残りの試験用水を試験容器に入れた。
- 5) ガラス棒により、試験容器内の試験液をよく混合した。

## 付属資料－4

### 試験液の分析方法

## 1. 分析試料の調製方法

対照区及び試験濃度区について、各試験容器から試料を 2.5 mL 容マイクロピペットで 1.2 mL 採取して 1.5 mL 容 HPLC 用バイアルに入れた後、1 mL 容マイクロピペットでアセトニトリル 0.3 mL を各バイアルに加え、よく混合し分析試料とした。

分析試料は 2 連で採取・調製し、分析まで調製室内冷蔵庫（4℃設定）において保管した。

## 2. 分析方法（HPLC 法）

(1) 測定用バイアルに試料を採取

↓

(2) 試料 8 に対してアセトニトリル 2 を添加し、混合

↓

(3) HPLC 測定

## 3. 高速液体クロマトグラフィー（HPLC）測定条件

(装置)

高速液体クロマトグラフ	: Agilent HP-1200 型
ワークステーション	: HP ケミステーション
オペレーションシステム	: Windows XP
デガッサー	: G1322A 型
送液ポンプ	: G1311A 型
オートサンプラー	: G1329A 型
カラムオーブン	: G1316A 型
紫外線可視分光検出器	: G1315D 型

(条件)

カラム	: Inertsil C8-4 150-4.6 (5 $\mu$ m)、GL サイエンス(株)
カラムオーブン	: 40℃
溶離液	: アセトニトリル : 0.1%リン酸溶液=20 : 80
流速	: 1.2 mL/min
測定波長	: 210 nm
試料注入量	: 100 $\mu$ L

## 4. 検量線

アセトニトリルと 0.1%リン酸溶液を 2 : 8 で混合した溶液（以下「調製溶液」とする）を作製した。

被験物質 20 mg を秤量し、100 mL 容メスフラスコに入れ、調製溶液でメスアップした（200 mg/L-STD）。



以下の表に従い、ホールピペットで各標準溶液を 10 mL 容ガラス製試験管に入れ、調製溶液で 10 mL にメスアップした。0 mg/L の標準溶液は、調製溶液を使用した。調製した標準溶液は、1.5 mL 容 HPLC 用バイアルにバイアルの目盛で 1 mL 以上入れて分析に供した。

表 標準溶液の調製方法

標準溶液 (mg/L)	100	50	20	10	5
添加する標準溶液 (mg/L)	200	100	50	20	10
添加量 (mL)	5	5	4	5	5
使用する定容器具	5 mL 容 ホールピペット	5 mL 容 ホールピペット	4 mL 容 ホールピペット	5 mL 容 ホールピペット	5 mL 容 ホールピペット

## 5. 検出下限値

5 mg/L の標準溶液を 8 連で分析した。8 回の測定結果から標準偏差 (s) を算出し、MDL (測定検出限界) を次式に従い算出した。また、その 3 倍値を MQ (測定定量限界) として求めた。

$$MDL = t(n-1, 0.01) \times s$$

ここに、 $t(n-1, 0.01)$  は自由度  $n-1$  の危険率 1% (片側) の  $t$  値であり、下表を与える。

表 繰り返し回数とその  $t(n-1, 0.01)$

繰り返し回数 (n)	自由度 (n-1)	$t(n-1, 0.01)$ 、片側
7 回	6	3.143
8 回	7	2.998
9 回	8	2.896
10 回	9	2.821

検出下限値 : 0.17 mg/L

定量下限値 : 0.51 mg/L

## 6. 添加回収試験及び測定値の補正

本試験については、分析前処理が試験液とアセトニトリルを混合する操作だけであるため、添加回収試験は実施しなかった。また、これに伴い、回収率の補正も実施しなかった。

## 7. 分析結果の報告

分析は 2 連で行い、その算術平均値を報告値とした。

## 付属資料－5

### 供試試料の試験成績書

# 試験成績書

2010年01月21日

東京化成工業株式会社 品質保証部  
〒103-0023  
東京都中央区日本橋本町4丁目1番1号  
TEL: 03(5640)8860 FAX: 03(5640)8861

製品名: Pivalic Acid			
製品コード: P0461	等級: GR	製品ロット:	判定: 合格
項目	結果	規格値	
純度(GC)	99.9 %	99.0 %以上	
純度(中和滴定)	99.7 %	98.0 %以上	
凝固点	35.0 deg-C	32.0 ~ 36.0 deg-C	

2010/01/21