

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
[Redacted]

最 終 報 告 書

ピバル酸のオオミジンコ (*Daphnia magna*) に対する急性遊泳阻害試験

(試験番号：1007-202)

2011年 2月 10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：ピバル酸のオオミジンコ (*Daphnia magna*) に対する急性遊泳阻害試験

試験番号：1007-202

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」に準拠して実施したものである。

2011 年 2 月 10 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 : ピバル酸のオオミジンコ (*Daphnia magna*) に対する急性遊泳阻害試験

試験番号 : 1007-202

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12月15日	2010年12月15日	2010年12月15日
試験計画書変更届	2010年12月17日	2010年12月17日	2010年12月17日
被験物質溶液調製時, 暴露実験開始時	2010年12月20日	2010年12月20日	2010年12月24日
被験物質溶液調製時, 暴露実験終了時, 試料 分析時	2010年12月22日	2010年12月22日	2010年12月24日
試験計画書変更届	2011年1月7日	2011年1月11日	2011年1月12日
最終報告書	2011年2月10日	2011年2月10日	2011年2月10日

2011 年 2 月 10 日

信頼性保証担当者

試験実施概要

1. 表題

ピバル酸のオオミジンコ (*Daphnia magna*) に対する急性遊泳阻害試験

2. 試験番号

1007-202

3. 試験目的

ピバル酸のオオミジンコ (*Daphnia magna*) に対する急性遊泳阻害試験を実施し、半数影響濃度を求めることを目的とする。

また、被験物質の影響により試験液のpH値が酸性側に変動するため、pH値を対照区のpH値±0.3に調整した試験濃度区を追加して試験を実施する。

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] (2011年2月10日)
(所属 リスク評価グループ)
試験担当者 : [REDACTED] (2011年2月10日)
(操作全般、化学分析、とりまとめ)
試験担当者 : [REDACTED] (2011年2月10日)
(暴露試験)
試験担当者 : [REDACTED] (2011年2月10日)
(化学分析)

10. 試験期間

試験開始日 : 2010年12月14日
暴露実験開始日 : 2010年12月20日
暴露実験終了日 : 2010年12月22日
試験終了日 : 2011年2月10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	14
4 結果の算出	15
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	16
5.2 試験液中の被験物質濃度	16
5.3 半数遊泳阻害濃度 (EiC50)	16
5.4 0%阻害最高濃度及び 100%阻害最低濃度	17
5.5 試験液の水温、溶存酸素濃度、pH 値及び全硬度	17
5.6 考察	18
Table 1～8	19～23
Figure 1	24
付属資料－1 試験用水の組成	25～26
付属資料－2 予備試験結果	27～28
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

ピバル酸のオオミジンコ (*Daphnia magna*) に対する急性遊泳阻害試験

試験番号

1007-202

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 | : 止水式 |
| 3) 供試生物 | : オオミジンコ (<i>Daphnia magna</i>) |
| 4) 暴露期間 | : 48 時間 |
| 5) 試験濃度 (設定値) | : 35.0、45.5、59.0、77.0、100 mg/L (公比 ; 1.3) 及び対照区、
pH 値を対照区の pH 値 \pm 0.3 に調整した 100 mg/L 試験濃度区 |
| 6) 試験液量 | : 90 mL/容器 |
| 7) 連数 | : 4 容器/試験区 |
| 8) 供試生物数 | : 20 頭/試験区、各容器に 5 頭ずつ供試 |
| 9) 試験温度 | : 20 \pm 1 $^{\circ}$ C |
| 10) 照明 | : 室内光、16 時間明/8 時間暗 (明 ; AM6:00~PM10:00)
(試験容器付近の光量子束密度:9~15 μ mol/m ² /s) |
| 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

pH 値を調整しない試験系については、試験液中の被験物質濃度は、暴露開始時、暴露終了時ともに、設定濃度の 101~102%であった。

pH 値を対照区の pH 値 \pm 0.3 に調整した試験系については、暴露開始時が設定濃度の 101%、暴露終了時が 102%であった。

以下の値の算出には実測濃度の算術平均値を用いた。

2) pH 値を調整しない試験系

24 時間暴露後の結果

半数遊泳阻害濃度 (EiC50) : 94.2 mg/L (95%信頼区間 : 78.7 - 101 mg/L)

0%阻害最高濃度 : 78.7 mg/L

100%阻害最低濃度 : >101 mg/L

48 時間暴露後の結果

半数遊泳阻害濃度 (EiC50) : 87.4 mg/L (95%信頼区間 : 78.7 - 101 mg/L)

0%阻害最高濃度 : 60.0 mg/L

100%阻害最低濃度 : 101 mg/L

3) pH 値を対照区の pH 値 \pm 0.3 に調整した試験系

24 時間暴露後の結果

半数遊泳阻害濃度 (EiC50) : >101 mg/L (95%信頼区間 : 算出不可)

0%阻害最高濃度 : 101 mg/L

100%阻害最低濃度 : >101 mg/L

48 時間暴露後の結果

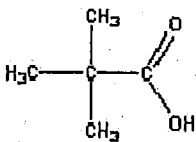
半数遊泳阻害濃度 (EiC50) : >101 mg/L (95%信頼区間 : 算出不可)

0%阻害最高濃度 : 101 mg/L

100%阻害最低濃度 : >101 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 : ピババル酸
- 2) 別名 : ピバリン酸、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 : $C_5H_{10}O_2$ ¹⁾
- 6) 分子量 : 102.13 ³⁾
- 7) 蒸気圧 : 0.1kPa (20℃) ¹⁾
- 8) 対水溶解度 : 2.5 g/100mL (20℃) ¹⁾、2.5% (20℃) ²⁾、1 g/40mL、温水に可溶 ³⁾
- 9) 1-オクタール/水分配係数 : 1.4 ¹⁾、1.48 ³⁾
- 10) 融点 : 34℃ (凝固点) ¹⁾、35.5℃ ²⁾、35.3℃ ³⁾
- 11) 沸点 : 164℃ ¹⁾、163.8℃ ²⁾、163.7℃ ³⁾
- 12) 常温における性状 : 白色の結晶～塊で刺激臭あり ¹⁾、白色の液体又は固体で刺激臭あり ²⁾、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 ³⁾
- 13) 安定性 : 通常条件で安定である ²⁾、安定 ³⁾
- 14) 溶媒に対する溶解度 : アルコール・エーテルに易溶 ¹⁾、エタノール・ジエチルエーテルに易溶 ²⁾、エタノール・エーテルに混和 ³⁾
- 15) 試験用水に対する溶解度 : ≥ 20 g/L (20.7℃) (当試験施設確認値)

参考資料)

- 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)、99.7% (中和滴定)
- 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11月19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被験物質と同一であることを製造会社の試験成績書【付属資料-5】で確認した。
- 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 29.6 mg/L 及び 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それぞれ 29.5 mg/L、101 mg/L、48 時間後ではそれぞれ 29.6 mg/L、101 mg/L であり、試験液調製時の濃度の 80% 以上を維持していることから、止水式で試験を実施するものとした。

2 供試生物

- 1) 和名 : オオミジンコ
- 2) 学名 : *Daphnia magna*
- 3) 入手先 : 旧 環境庁国立環境研究所
(現 独立行政法人国立環境研究所)
- 4) 入手日 : 1997 年 8 月 4 日
- 5) 入手後の管理 : 継代飼育 (世代更新までの飼育期間; 2~4 週間、換水頻度;
週 2 回)
- 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 2010 年 9 月 28 日~2010 年 9 月 30 日
48時間EiC50=0.73 mg/L 95%信頼区間: 0.65 - 0.81 mg/L
(当施設の規定範囲内【平均値±30%: 0.51~0.96 mg/L、
N=7 (試験実施期間: 2007 年 3 月~) であった)
- 7) 親の飼育期間 : 2010 年 11 月 16 日~2010 年 12 月 20 日
- 8) 供試齢 : 生後 24 時間齢未満の幼体

親ミジンコの飼育条件

- 1) 飼育水 : 試験用水 (3.2 参照)
- 2) 飼育方法 : 半止水式 (週 2 回、飼育水の全量を換水)
- 3) 飼育密度 : 7 日齢まで; 1 頭/15 mL 飼育水 (20 頭/300 mL)
7 日齢以降; 1 頭/40 mL 飼育水 (20 頭/800 mL)
- 4) 水温 : 20±1℃
- 5) 照明 : 室内光、16 時間明/8 時間暗 (明; AM6:00~PM10:00)
(試験容器付近の照明: 9~15 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$)
- 6) 餌 : 単細胞緑藻類 *Pseudokirchneriella subcapitata*
(培養液中の藻類を遠心操作により回収し、純水に置換して餌料とした)
- 7) 給餌量 : 親ミジンコ 1 頭当たり 0.1~0.2 mgC (有機炭素含量) / 日
- 8) 給餌日数 : 土日を除き毎日給餌し、金曜日の午後に土日分の餌料を給餌した。

3 試験方法

3.1 試験条件

- 1) 暴露方式 : 止水式
- 2) 暴露期間 : 48 時間
- 3) 試験液量 : 90 mL/容器
- 4) 連数 : 4 容器/試験区
- 5) 供試生物数 : 20 頭/試験区 各容器に 5 頭ずつ供試
- 6) 試験温度 : $20 \pm 1^{\circ}\text{C}$
- 7) 照明 : 室内光、16 時間明/8 時間暗 (明 ; AM6:00~PM10:00)
(試験容器付近の光量子束密度: $9 \sim 15 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$)
- 8) 溶存酸素濃度 : 暴露期間中の溶存酸素濃度は 3 mg/L 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 : $6.0 \sim 9.0$ 、 1.5 以内の変動とする。追加の試験濃度区については、対照区の pH 値 ± 0.3 に調整する
- 10) 全硬度 : 250 mg/L 以下 (CaCO_3 換算)
- 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 : -

3.2 試験用水

試験用水には Elendt M4 培地を使用した。試験用水の組成を【付属資料-1】に示した。使用した試験用水の主な水質は、全硬度 245 mg/L (CaCO_3 換算)、pH7.8 であった。

3.3 試験容器及び機器等

- 1) 試験容器 : 100 mL 容ガラスビーカー (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°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) 光量子計 : LICOR 社製ライトメーター (型式: LI-250)

7) 全硬度

: 共立理化学研究所 ドロップテスト全硬度 WAD-TH

3.4 試験濃度の設定

本試験に先立ち、公比を 1.5 として、設定濃度 29.6、44.4、66.5 及び 100 mg/L の 4 試験濃度区で予備試験を実施した。48 時間後の遊泳阻害率は、29.6、44.4、66.5 mg/L の各試験濃度区で 0%、100 mg/L 試験濃度区で 100%であった。予備試験の結果は、【付属資料-2】に示した。

また、本被験物質の添加により試験液の pH 値が酸性側に変動するため、pH 値を中性付近に調整した 100 mg/L 濃度の試験濃度区を設定した結果、48 時間後の遊泳阻害率は 0%であった。

以上の結果を踏まえ、本試験では公比を 1.3 とし、35.0、45.5、59.0、77.0 及び 100 mg/L の 5 試験濃度区【pH 値を調整しない試験系】とした。また、pH 値を対照区の pH 値 \pm 0.3 に調整した 100 mg/L 試験濃度区【pH 値を対照区の pH 値 \pm 0.3 に調整した試験系】を追加した。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、99.9% (GC)、99.7% (中和滴定) であることから、純度は補正しなかった。

被験物質濃度 2,500 mg/L の濃厚液を調製し、この濃厚液を試験用水に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) の新試験液、暴露終了時 (48 時間) の旧試験液から採取した。

3.7 試験操作

試験液の水温、溶存酸素濃度及び pH 値を測定後、供試ミジンコを投入し、その時点を暴露開始時とした。ミジンコの投入には、先端が比較的広口のガラスピペットを用いた。飼育水の新試験液への持ち込み量は、試験容器当たり 1 mL 以内を目安とした。

暴露開始時、暴露開始 24 及び 48 時間後にミジンコを観察し、遊泳阻害を受けた個体数を計数した。観察の順番は、対照区、試験濃度区の順とし、試験濃度区については設定濃度の

低い順番とした。遊泳阻害の判定は、下記の基準に従った。

試験液の水質（水温・D0・pH 値）は、暴露開始時及び暴露終了時に全試験区について測定した。全硬度については、対照区、最低試験濃度区及び pH 値を調整しない最高試験濃度区について測定した。

遊泳阻害の判定基準

試験容器を緩やかに動かした後、15 秒間の観察中に一度も遊泳しない場合、遊泳阻害されたと判断した。

4 結果の算出

各試験区におけるミジンコの遊泳阻害数と供試個体数（20頭）から遊泳阻害率（%）を算出した。pH値を調整しない試験系、pH値を対照区のpH値±0.3に調整した試験系ごとに、濃度－遊泳阻害率のグラフを作成した。

pH値を調整しない試験系については、半数遊泳阻害濃度（EiC50）はBinomial法により算出した。

pH値を対照区のpH値±0.3に調整した試験濃度区については、遊泳阻害が観察されなかったことから、半数遊泳阻害濃度（EiC50）は最高濃度を超える濃度として示した。

また、全てのミジンコが遊泳阻害を受けない最高濃度区を 0%阻害最高濃度、全てのミジンコが遊泳阻害を受ける最低濃度区を 100%阻害最低濃度とし、それぞれ暴露開始 24 及び 48 時間後について算出した。

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

被験物質濃度の測定結果をTable 1 に示した。

pH値を調整しない試験系については、試験液中の被験物質濃度は、暴露開始時、暴露終了時ともに、設定濃度の101~102%であった。

pH値を対照区のpH値 ± 0.3 に調整した試験系については、暴露開始時が設定濃度の101%、暴露終了時が102%であった。

半数遊泳阻害濃度 (EiC50)、0%阻害最高濃度及び100%阻害最低濃度の算出に際しては、各試験濃度区の実測濃度の算術平均値を用いた。

5.3 半数遊泳阻害濃度 (EiC50)

各暴露時間における遊泳阻害率をTable 2 に、半数遊泳阻害濃度 (EiC50) をTable 3、及び濃度-遊泳阻害率曲線を Figure 1 に示した。

暴露終了時の対照区の遊泳阻害率は0%、水面に浮いたミジンコの割合は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（遊泳阻害率及び水面浮上個体率が10%を超えない）を満たした。

【pH値を調整しない試験系】

24 時間 EiC50 : 94.2 mg/L (95%信頼区間 : 78.7 - 101 mg/L)

48 時間 EiC50 : 87.4 mg/L (95%信頼区間 : 78.7 - 101 mg/L)

【pH 値を対照区の pH 値 ± 0.3 に調整した試験系】

24 時間 EiC50 : >101 mg/L (95%信頼区間 : 算出不可)

48 時間 EiC50 : >101 mg/L (95%信頼区間 : 算出不可)

5.4 0%阻害最高濃度及び100%阻害最低濃度

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

【pH値を調整しない試験系】

24 時間 0%阻害最高濃度	: 78.7 mg/L
48 時間 0%阻害最高濃度	: 60.0 mg/L
24 時間 100%阻害最低濃度	: >101 mg/L
48 時間 100%阻害最低濃度	: 101 mg/L

【pH値を対照区のpH値±0.3に調整した試験系】

24 時間 0%阻害最高濃度	: 101 mg/L
48 時間 0%阻害最高濃度	: 101 mg/L
24 時間 100%阻害最低濃度	: >101 mg/L
48 時間 100%阻害最低濃度	: >101 mg/L

5.5 試験液の水温、溶存酸素濃度、pH 値及び全硬度

試験液の水温をTable 5、溶存酸素濃度をTable 6-1、溶存酸素飽和度をTable 6-2、pH値をTable 7 及び全硬度をTable 8 にそれぞれ示した。

暴露期間中の試験液の水温は、すべての試験区で19.8～20.6℃の範囲にあり、試験条件の範囲内（20±1℃）であった。暴露期間中の溶存酸素濃度は、全ての試験区で8.5～9.1 mg/Lの範囲内にあり、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（暴露終了時において3 mg/L以上であること）を満たしていた。溶存酸素飽和度は、全ての試験区で96.8～102.5%の範囲内であった。

対照区のpH値は、暴露開始時が7.8、暴露終了時が7.7であった。

pH値を調整しない試験系の開始時の試験濃度区のpH値は、35.5 mg/L試験濃度区で6.8、46.4 mg/L試験濃度区で6.5、60.0 mg/L試験濃度区で6.3、78.7 mg/L試験濃度区で5.9、101 mg/L試験濃度区で5.5であり、被験物質濃度の増加とともにpH値は低下した。また、78.7 及び101 mg/L試験濃度区は試験条件の範囲（6.0～9.0）を超えて低下していた。

試験終了時のpH値は、35.5 mg/L試験濃度区で7.5、46.4 mg/L試験濃度区で7.4、60.0 mg/L試験濃度区で7.3、78.7 mg/L試験濃度区で6.8、101 mg/L試験濃度区で5.8であった。

pH値を対照区のpH値±0.3に調整した試験系については暴露開始時が7.5、暴露終了時が7.4であった。

暴露期間中の全硬度は、240～250 mg/L (CaCO₃換算) であった。

以上から、本試験の試験液の水温、溶存酸素濃度、全硬度は、試験環境として適正範囲内であったと判断した。pH値については、pH値を調整しない試験系の78.7 及び101 mg/L試験濃度区について、試験条件の範囲 (6.0～9.0) を超えて低下していた。

5.6 考察

pH値を調整しない試験系では、pH値が試験条件の範囲 (6.0～9.0) を超えて低下していた78.7 及び101 mg/Lの試験濃度区において供試生物の遊泳阻害が観察された。一方、pH値を対照区のpH値±0.3に調整した試験系 (101 mg/L) において、遊泳阻害は観察されなかった。

したがって、試験を実施するにあたり準拠した試験法の試験上限濃度である 100 mg/L 以下の濃度においては、本被験物質の毒性は、被験物質の溶解に伴う pH 値の低下に起因するものと考えられた。なお、本被験物質の pKa は 4.69 (推定値)¹⁾ 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 (7.4～7.5) に調整した場合は 100%が解離状態になると推定され、pH 値を調整した場合でも、被験物質の解離状態は、pH 値を調整しない場合とほぼ同様の状態であると考えられた。

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

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	
	New	Old	
Control	<0.059	<0.059	<0.059
35.0	35.3 (101)	35.7 (102)	35.5 (101)
45.5	46.2 (102)	46.5 (102)	46.4 (102)
59.0	59.6 (101)	60.3 (102)	60.0 (102)
77.0	78.6 (102)	78.8 (102)	78.7 (102)
100	101 (101)	101 (101)	101 (101)
100 (pH: adjusted to the control)	101 (101)	102 (102)	101 (101)

*: arithmetic mean

New: freshly prepared test solutions

Old: test solution after 48 hours exposure

Table 2 The Numbers of Immobile *Daphnia magna* (Percentage of Immobility)

Nominal Concentration (mg/L)	Mean* measured Concentration (mg/L)	Cumulative Numbers of Immobilized <i>D. magna</i> (Percentage of Immobility)			
		24 hours		48 hours	
Control	<0.059	0	(0)	0	(0)
35.0	35.5	0	(0)	0	(0)
45.5	46.4	0	(0)	0	(0)
59.0	60.0	0	(0)	0	(0)
77.0	78.7	0	(0)	1	(5)
100	101	16	(80)	20	(100)
100 (pH: adjusted to the control)	101	0	(0)	0	(0)

*: arithmetic mean

Table 3-1 Calculated EiC50 Values

Exposure Period (hours)	EiC50 (mg/L)	95-Percent Confidence Limits (mg/L)	Statistical Method
24	94.2	78.7 ~ 101	Binomial
48	87.4	78.7 ~ 101	Binomial

Table 3-2 Calculated EiC50 Values (pH: adjusted to the control)

Exposure Period (hours)	EiC50 (mg/L)	95-Percent Confidence Limits (mg/L)	Statistical Method
24	>101	-- ~ --	--
48	>101	-- ~ --	--

Table 4-1 Highest Concentration causing 0% Immobility and Lowest Concentration causing 100% Immobility

Exposure Period (hours)	Highest Concentration causing 0% Immobility (mg/L)	Lowest Concentration causing 100% Immobility (mg/L)
24	78.7	>101
48	60.0	101

Table 4-2 Highest Concentration causing 0% Immobility and Lowest Concentration causing 100% Immobility (pH: adjusted to the control)

Exposure Period (hours)	Highest Concentration causing 0% Immobility (mg/L)	Lowest Concentration causing 100% Immobility (mg/L)
24	101	>101
48	101	>101

Table 5 Temperature (Static-condition)

Nominal Concentration (mg/L)	Mean* Measured Concentration (mg/L)	Temperature, °C	
		0 hour New	48 hours Old
Control	< 0.059	20.0	20.4
35.0	35.5	19.9	20.4
45.5	46.4	19.8	20.4
59.0	60.0	19.8	20.5
77.0	78.7	19.8	20.5
100	101	19.8	20.6
100 (pH: adjusted to the control)	101	19.8	20.6

*: arithmetic mean

New: freshly prepared test solutions

Old: test solution after 48 hours exposure

Table 6-1 Dissolved Oxygen Concentrations (Static-condition)

Nominal Concentration (mg/L)	Mean* Measured Concentration mg/L	Dissolved Oxygen Concentration, mg/L	
		0 hour New	48 hours Old
Control	<0.059	8.8	8.6
35.0	35.5	8.9	8.5
45.5	46.4	9.0	8.6
59.0	60.0	9.1	8.6
77.0	78.7	9.1	8.6
100	101	9.1	8.6
100 (pH: adjusted to the control)	101	8.9	8.7

*: arithmetic mean

New: freshly prepared test solutions

Old: test solution after 48 hours exposure

Table 6-2 Percentage of Dissolved Oxygen Concentration to Its Air Saturation Value (ASV)
(Static-condition)

Nominal Concentration (mg/L)	Mean* Measured Concentration (mg/L)	Saturation Degree of Oxygen, %	
		0 hour New	48 hours Old
Control	<0.059	99.5	98.0
35.0	35.5	100.5	96.8
45.5	46.4	101.4	98.0
59.0	60.0	102.5	98.1
77.0	78.7	102.5	98.1
100	101	102.5	98.3
100 (pH: adjusted to the control)	101	100.3	99.5

*: arithmetic mean

New: freshly prepared test solutions

Old: test solution after 48 hours exposure

Table 7 pH Values (Static-condition)

Nominal Concentration (mg/L)	Mean* Measured Concentration (mg/L)	pH	
		0 hour New	48 hours Old
Control	<0.059	7.8	7.7
35.0	35.5	6.8	7.5
45.5	46.4	6.5	7.4
59.0	60.0	6.3	7.3
77.0	78.7	5.9	6.8
100	101	5.5	5.8
100 (pH: adjusted to the control)	101	7.5	7.4

*: arithmetic mean

New: freshly prepared test solutions

Old: test solution after 48 hours exposure

Table 8 Measured Hardness (mg/L as CaCO₃) (Static-condition)

Nominal Concentration (mg/L)	Mean* Measured Concentration (mg/L)	Hardness values, mg/L	
		0 hour New	48 hours Old
Control	<0.059	245	245
35.0	35.5	250	250
45.5	46.4	--	--
59.0	60.0	--	--
77.0	78.7	--	--
100	101	240	250
100 (pH: adjusted to the control)	101	--	--

*: arithmetic mean

New: freshly prepared test solutions

Old: test solution after 48 hours exposure

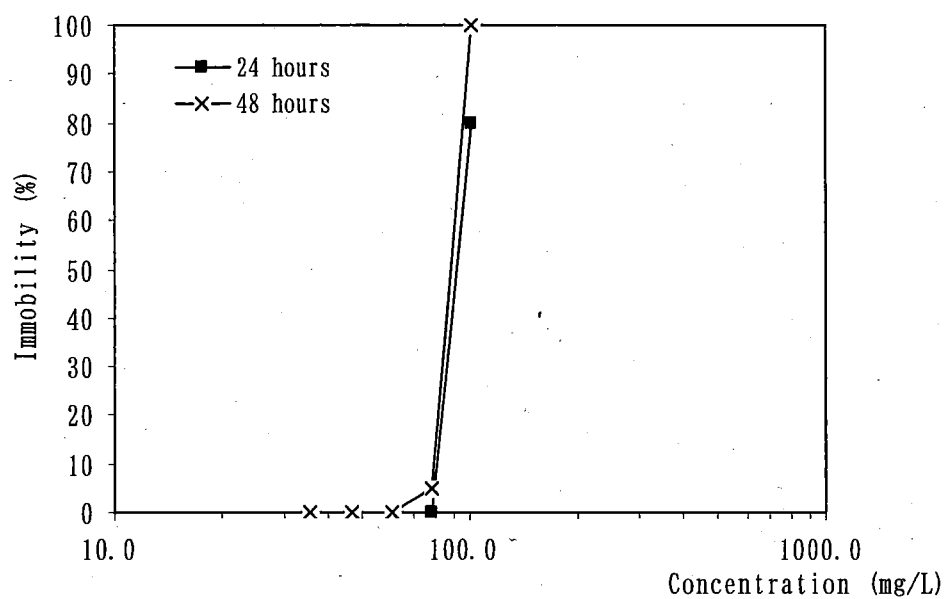
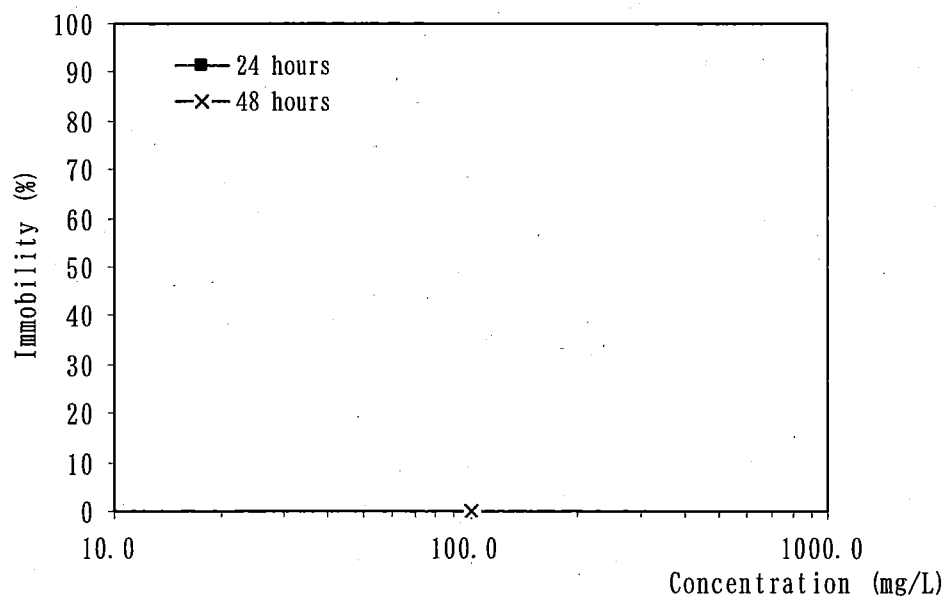


Figure 1-1 Concentration-Response (Immobilization) Curve



[pH: adjusted to the control]

Figure 1-2 Concentration-Response (Immobilization) Curve

付属資料－1

試験用水の組成

Elendt M4 medium

Substance	Amount added to water (mg)
H ₃ BO ₃	2.8595
MnCl ₂ · 4H ₂ O	0.3605
LiCl	0.306
RbCl	0.071
SrCl ₂ · 6H ₂ O	0.152
NaBr	0.016
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0.063
CuCl ₂ · 2H ₂ O	0.01675
ZnCl ₂	0.013
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0.01
KI	0.00325
Na ₂ SeO ₃	0.00219
NH ₄ VO ₃	0.000575
CaCl ₂ · 2H ₂ O	293.8
MgSO ₄ · 7H ₂ O	123.3
KCl	5.8
NaHCO ₃	64.8
Na ₂ SiO ₃ · 9H ₂ O	10.0
NaNO ₃	0.274
KH ₂ PO ₄	0.143
K ₂ HPO ₄	0.184
Thiamine hydrochloride	0.075
Cyanocobalamine (B12)	0.001
Biotine	0.00075
Na ₂ EDTA · 2H ₂ O	5.0
FeSO ₄ · 7H ₂ O	1.991
Pure water	1,000 mL

付属資料－2

予備試験結果

予備試験識別番号： 1007-Y-202
実施期間：2010年11月24日～26日

・ 試験条件

- 1) 暴露方式 : 止水式
- 2) 試験濃度 (設定値) : 29.6、44.4、66.5及び100 mg/L (公比：1.5) の4試験濃度区
別に100 mg/LのpH調整試験濃度区を設定する。
- 3) 試験液量 : 70 mL
- 4) 連数及び供試生物数 : 4 容器/試験区、20 頭/試験区 各容器に5頭ずつ供試
- 5) 照明 : 室内光、16時間明/8時間暗 (明；AM6:00～PM10:00)
- 6) 助剤の種類 : 使用しない
- 7) 試験液中の助剤濃度 : -
- 8) 分析方法 : HPLC

・ 予備試験の結果

Nominal Concentration (mg/L)	Mean* measured Concentration (mg/L)	Cumulative Numbers of Immobilized <i>D. magna</i> (Percentage of Immobility)			
		24 hours		48 hours	
Control	<0.059	0	(0)	0	(0)
29.6	29.6	0	(0)	0	(0)
44.4	44.8	0	(0)	0	(0)
66.5	67.3	0	(0)	0	(0)
100	101	14	(70)	20	(100)
100 (pH: adjusted)	99.6	0	(0)	0	(0)

*:arithmetic mean

・ 予備試験時の pH

Nominal Concentration (mg/L)	pH	
	0 hour New	48 hours Old
Control	7.8	7.8
29.6	7.0	7.7
44.4	6.6	7.6
66.5	6.1	7.4
100	5.5	5.8
100 (pH adjusted)	7.0	7.3

付属資料－3

試験液の調製方法



試験液の調製方法

1. 濃厚液 (2,500 mg/L) の調製方法

- 1) 被験物質をスパーテルで採取し、秤量皿に 249.8 mg 秤量した。
- 2) 秤量皿から 100 mL 容ガラス製メスフラスコに、スパーテルを使用して被験物質を移し入れた。
- 3) 秤量皿に試験用水を少量加えて残っている被験物質を溶解させ、100 mL 容ガラス製メスフラスコにパスツールピペットで移し入れた。
- 4) 試験用水でメスアップした。

2. 試験液の調製方法

以下の表に従い、濃厚液を各調製容器に試験濃度区ごとに加え、試験用水でメスアップした。

pH 値を調整する試験液 (100 mg/L) については、1L 容ガラス製ビーカーに約 500 mL 分取後、2 mol/L NaOH を添加して対照区と同じ pH 値 (± 0.3) に調整した。

表 1 試験液の調製方法

試験区番号	1	2	3	4	5
試験液濃度 (mg/L)	35.0	45.5	59.0	77.0	100
濃厚液の添加量 (mL)	7	9.1	11.8 (5.9×2)	15.4 (7.7×2)	40
濃厚液の定容器具	10 mL 容 マイクロピペット				50 mL 容 メスシリンダー
調製容器	500 mL 容メスフラスコ				1 L 容 メスフラスコ

対照区については、試験用水をそのまま試験液として使用した。

付属資料－4

試験液の分析方法

1. 分析試料の調製方法

暴露開始時は、試験区ごとに、試験液の入った水質測定用容器から 2.5 mL 容マイクロピペットで試料 1.2 mL を、1.5 mL 容 HPLC 用バイアルに採取した。暴露終了時は、各試験容器から試験液を 1 mL 容マイクロピペットで 1 mL ずつ採取して、試験区ごとに、10 mL 容ガラス試験管に入れ混合した後、2.5 mL 容マイクロピペットで試料 1.2 mL を、1.5 mL 容 HPLC 用バイアルに採取した。

1 mL 容マイクロピペットでアセトニトリル（和光純薬工業（株）製；HPLC 用）0.3 mL を各バイアルに加え、よく混合して分析試料とした。

分析試料は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 μ 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 μ 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 7 連で分析した。7 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 MQL (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 : 0.059 mg/L

定量下限値 : 0.18 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。これに伴い、回収率の補正も実施しなかった。

付属資料－5

供試試料の試験成績書



試験成績書

2010年11月18日

製品名: [REDACTED]					
製品コード: [REDACTED]	等級: GR	製品ロット: [REDACTED]	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