


環境省 殿

最 終 報 告 書

2-メチルプロパン-2-オールのヒメダカ (*Oryzias latipes*) に対する急性毒性試験

(試験番号: No. 2009-生26)

2010年 3月29日作成

株式会社  センター

陳 述 書

株式会社 クレハ分析センター

試験委託者： 環境省

表題 ： 2-メチルプロパン-2-オールのヒメダカ (*Oryzias latipes*) に対する
急性毒性試験

試験番号 ： No. 2009-生26

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、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を実施する試験施設に関する基準について」(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15年11月21日、平成20年7月4日改正)

厚生労働省医薬食品局長、経済産業省製造産業局長、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」(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15年11月21日、平成18年11月20日改正)

に従って実施した。

本報告書の試験データの正確性および有効性について確認した。

2010年 3月29日

試験責任者



2010年 3月29日

確認 ： 運営管理者



信 頼 性 保 証 書

株式会社 クレハ分析センター

試験委託者： 環境省

表題： 2-メチルプロパン-2-オールのヒメダカ (*Oryzias latipes*) に対する
急性毒性試験

試験番号： No. 2009-生26

記

	監査, 査察実施日	報告日	
		運営管理者	試験責任者
試験計画書の監査	2010年 2月22日	2010年 2月22日	2010年 2月22日
実験状況の監査, 査察	2010年 3月15日	2010年 3月15日	2010年 3月15日
	2010年 3月19日	2010年 3月19日	2010年 3月19日
実験終了後の監査	2010年 3月23日	2010年 3月23日	2010年 3月23日
組織体制の監査	2010年 2月15日	2010年 2月15日	2010年 2月15日
施設・設備の査察 試験用機器等 施設, 設備等 試験系	2010年 2月12日	2010年 2月12日	2010年 2月12日
最終報告書の監査	2010年 3月29日	2010年 3月29日	2010年 3月29日

本試験は試験計画書および標準操作手順書に従って実施され、本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確認した。

2010年 3月29日

信頼性保証部門責任者：  

試験実施概要

1. 表題 : 2-メチルプロパン-2-オールのヒメダカ (*Oryzias latipes*) に対する急性毒性試験
2. 試験目的 : ヒメダカ (*Oryzias latipes*) を被験物質に 96 時間暴露し、死亡率を測定することにより、ヒメダカに対する被験物質の毒性を明らかにする。
3. 試験法ガイドライン :

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、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」(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15年11月21日、平成18年11月20日改正)に従って実施した。
4. 適用GLP : 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、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を実施する試験施設に関する基準について」(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15年11月21日、平成20年7月4日改正)に従って実施した。
5. 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一丁目2-2
6. 試験受託者
名称 : 株式会社 クレハ分析センター
本社所在地 : 〒974-8232 福島県いわき市錦町落合16番地
代表者 : XXXXXXXXXX
7. 試験施設
実施施設名 : 株式会社 クレハ分析センター
所在地 : 〒974-8232 福島県いわき市錦町落合16番地

8. 試験関係者 :
試験責任者 [redacted] (生物試験室)
試験担当者 [redacted] (生物試験担当者)
[redacted] (濃度分析責任者)
[redacted] (濃度分析担当者)

9. 試験期間 :
試験開始日 2010年 2月22日
実験開始日 2010年 2月24日
(暴露期間 2010年 3月15日～2010年 3月19日)
実験終了日 2010年 3月23日
試験終了日 2010年 3月29日

目 次

	頁
要 旨	1
1 被験物質	3
1.1 名称、構造式および物理化学的性状.....	3
1.2 供試試料	3
1.3 被験物質の保管方法および保管条件下での安定性.....	4
2 供試生物	4
2.1 供試生物	4
2.2 感受性確認	4
2.3 じゅん化	5
3 試験方法	5
3.1 試験条件	5
3.2 試験用水	6
3.3 試験容器および恒温槽等.....	6
3.4 被験物質の溶解性確認.....	6
3.5 試験濃度の設定.....	6
3.6 試験溶液の調製.....	7
3.7 被験物質濃度等の測定.....	7
3.8 試験操作	7
4 試験結果の算出	10
4.1 50 % 死亡濃度 (LC_{50}) の算出に用いる被験物質濃度の決定	10
4.2 50 % 死亡濃度 (LC_{50}) の算出	10
4.3 0 % 死亡最高濃度および 100 % 死亡最低濃度.....	10
5 結果および考察	10
5.1 試験成績の信頼性に影響をおよぼしたと思われる環境要因.....	10
5.2 試験用水に対する被験物質の溶解性.....	10
5.3 被験物質濃度の測定.....	10
5.4 50 % 死亡濃度 (LC_{50})	11
5.5 0 % 死亡最高濃度、100 % 死亡最低濃度および最大無作用濃度.....	11
5.6 毒性症状	11
5.7 試験溶液の水溫、溶存酸素濃度および pH.....	12
5.8 試験計画書からの逸脱の有無.....	12
6 保管	12
Table 1 ～ 8	14
付属資料－1 試験用水の水質.....	18
付属資料－2 予備試験の結果.....	20
付属資料－3 試験溶液の分析法.....	22

要 旨

試験委託者 環境省

表 題 2-メチルプロパン-2-オールのヒメダカ (*Oryzias latipes*) に対する
急性毒性試験

試験番号 No. 2009-生26

試験法ガイドライン

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、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」(薬食発第 1121002 号、平成15・11・13 製局第 2 号、環企発第 031121002 号、平成15年11月21日、平成18年11月20日改正)に従って実施した。

- | | |
|---------------|-----------------------------------|
| 1) 被験物質 | : 2-メチルプロパン-2-オール |
| 2) 暴露方式 | : 半止水式 (48 時間後に試験溶液の全量を交換) (密閉系) |
| 3) 供試生物 | : ヒメダカ (<i>Oryzias latipes</i>) |
| 4) 暴露期間 | : 96 時間 |
| 5) 試験濃度 (設定値) | : 対照区, 120 mg/L (限度試験) |
| 6) 試験溶液量 | : 5.0 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 °C |
| 10) 照明 | : 室内光、16 時間明/8 時間暗 |
| 11) 給餌 | : 無給餌 |
| 12) 通気 | : なし |
| 13) pH | : 試験溶液の pH 調整は行わなかった |
| 14) 分析法 | : GC 法 |

結 果

1) 試験溶液中の被験物質濃度

暴露期間中の被験物質濃度のわずかな減少は揮発によるものが主因と考えられた。従って、各影響濃度（50 % 死亡濃度、0 % 死亡最高濃度、100 % 死亡最低濃度および最大無作用濃度）の算出にあたっては、時間加重平均値（暴露開始時と 48 時間換水前、および 48 時間換水後と暴露終了時のそれぞれの測定値の幾何平均値の算術平均値）を採用した。

2) 50 % 死亡濃度 (LC_{50})

24 時間 50 % 死亡濃度 (LC_{50}) : >120 mg/L

48 時間 50 % 死亡濃度 (LC_{50}) : >120 mg/L

72 時間 50 % 死亡濃度 (LC_{50}) : >120 mg/L

96 時間 50 % 死亡濃度 (LC_{50}) : >120 mg/L

3) 0 % 死亡最高濃度、100 % 死亡最低濃度および最大無作用濃度

0 % 死亡最高濃度 : 120 mg/L

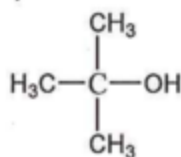
100 % 死亡最低濃度 : >120 mg/L

最大無作用濃度 : 120 mg/L

1 被験物質

1.1 名称、構造式および物理化学的性状

化学物質等の名称 : 2-メチルプロパン-2-オール
一般名^{**}, ^{***} : tert-ブタノール
CAS番号^{*, **} : 75-65-0
構造式 :



分子式^{*} : $\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}$
分子量^{*} : 74.12
蒸気圧^{*} : 40.7 mmHg (25°C)
水溶解度^{*} : 1×10^6 mg/L (25°C)
ヘンリー定数^{*} : 9.05×10^{-6} atm·m³/mole (25°C)
酸解離定数(pKa)^{*} : 19.2 (25°C)
1-オクタノール/水分配係数^{*} : 0.35
融点^{*} : 25.4°C
沸点^{*} : 82.4°C
外観^{**} : 白色の塊
安定性^{**} : 酸化剤、金属との接触を避ける。
溶媒に対する溶解性^{**} : 水、アルコール、エーテルに易溶

1.2 供試試料

入手先 : XXXXXXXXXX
入手量 : 25 mL × 5 本 (同一ロット)
ロット番号^{***} : XXXXXXXXXX
純度^{***} : 99.9 % (GC)
不純物の名称および含有率^{***} : 記載なし
性状^{**, ***} : 常温で澄明液体、又は白色の塊
入手日 : 2010年1月14日

[出典]

* : SRC PhysProp Database
** : XXXXXXXXXX「製品安全データシート 製品名: tert-Butanol」
(作成・改定日 2009年07月21日)
*** : XXXXXXXXXX「試験成績書 製品名: tert-Butanol」(製品コード: XXXXXXXXXX 2010年01月13日)

1.3 被験物質の保管方法および保管条件下での安定性

1) 保管方法

被験物質保管用冷蔵庫において、遮光・密閉保管した。

2) 被験物質の確認および保管条件下の安定性

入手した被験物質について、赤外吸収スペクトルを測定し、公的データ*との比較により、被験物質の特性が認められることを確認し、更に官能基のリストと照合して同一性を確認した。

実験終了後にも同様に赤外吸収スペクトルを測定し、試験開始前に測定したスペクトルと比較した。その結果、スペクトルに変化はなかったことから、被験物質は実験期間中安定であったと判断した。

*：独立行政法人 産業技術総合研究所「有機化合物スペクトルデータベース(SDBS)」

2 供試生物

2.1 供試生物

試験には、自家繁殖したヒメダカ (*Oryzias latipes*) を用いた。暴露開始時において、供試魚と同ロットのヒメダカの全長は使用基準の 2.3 ± 1.2 cmを満たした。

- | | |
|----------|--------------------------------|
| 1) ロット番号 | : FJ08A7 |
| 2) 齢 | : 20ヶ月齢 |
| 3) 全長 | : 平均 2.5 cm (範囲 2.2 ~ 2.8 cm) |
| 4) 体重 | : 平均 0.15 g (範囲 0.10 ~ 0.22 g) |
| 5) 測定数 | : n = 10 |

2.2 感受性確認

供試魚と同ロットのヒメダカの基準物質〔硫酸銅(Ⅱ)五水和物、試薬特級〕による急性毒性試験による 96 時間 50 % 死亡濃度(LC₅₀)は 0.31 mg/L (暴露期間；2010年1月25日 ~ 1月29日)であった。

当施設における 1997年12月以降の LC₅₀は \bar{X} = 0.30 mg/L、S. D. = 0.09 mg/L、n = 39 であった。

2.3 じゅん化

当該ロットのヒメダカの飼育中の観察において、寄生虫（ギロダクチルス、トリコディナ）が認められたことから、2009年 8月18日から 8月21日の 3 日間、薬浴〔薬剤：リフィッシュ（メーカー：三栄製薬 薬浴濃度：134 mg/ 20 L）薬浴期間中は流水式の給水を停止した〕を行ったが、トリコディナの駆除には至らなかったため、食塩水（2 %）でさらに 15分薬浴した。全ての寄生虫が除去されたことを確認後、じゅん化を行った。

供試魚については、暴露開始 2 日前に試験容器に移し、容器じゅん化を行った。

同ロットの暴露開始前までの 7 日間連続の死亡率は 0.3 % で、試験には肉眼的に健康で正常な個体を使用した。

じゅん化時の飼育条件、状態(死亡率等)を以下に記載した。

- 1) 飼育水 : 試験に用いる試験用水 (3.2 項を参照) で飼育した
- 2) 飼育方法 : 流水式
- 3) 飼育密度 : 300 匹/ 60 L水槽 (じゅん化開始時)
- 4) 水温 : 24 ± 1 °C
- 5) 照明 : 室内光、16 時間明/8 時間暗
- 6) 餌 : テトラミン (メーカー：(株)テトラ社)
- 7) 給餌量 : 魚体重の約 2 % /日 (暴露開始の 24 時間前からは無給餌)
- 8) じゅん化期間 : 2009年 9月 1日 ~ 2010年 3月15日
- 9) 7 日間死亡率 : 0.3 %

3 試験方法

以下の条件で試験を行った。

3.1 試験条件

- 1) 暴露方式 : 半止水式 (48 時間後に試験溶液の全量を交換) (密閉系)
- 2) 暴露期間 : 96 時間
- 3) 試験溶液量 : 5.0 L/容器
- 4) 連数 : 1 容器/試験区
- 5) 供試生物数 : 10 尾/試験区 (予備試験では 5 尾/試験区とする)
- 6) 試験温度 : 24°Cで設定し、経時的および各試験容器間の変動範囲は ± 1 °C以内とする。
- 7) 溶存酸素濃度 : 暴露期間中、通気は行わない。暴露期間中の溶存酸素濃度は飽和濃度の 60 % 以上 (約 5 mg/L) を維持する。
- 8) pH : 試験溶液の pH 調整は行わない。暴露期間中の pHは 6.0 ~

8.5 の範囲とし、変動は 1.0 以内とする。

- 9) 照明 : 室内光、16 時間明／8 時間暗
- 10) 給餌 : 無給餌
- 11) かく乱 : 魚の行動に影響を及ぼすような、かく乱操作は避ける。

3.2 試験用水

脱塩素水（給水施設の水を活性炭処理で残留塩素等を除去した後、空気による通気処理を行ったもの）を使用した。

暴露開始時における試験用水の全硬度は、31 mg/L (CaCO₃換算)、pH は 7.8 であった。また DPD法により残留塩素が検出されないことを確認した。

半年に 1 回、定期的に測定する試験用水の水質分析結果（2010年 3月 4日）を付属資料－1 「試験用水の水質」に示した。

3.3 試験容器および恒温槽等

- 1) 試験容器 : 5.0 L ネジロビンを使用し、密栓した。
(ヘッドスペース : 0.6 L)
- 2) 恒温槽 : 恒温器 ラボサーモ LH-2000 (アドバンテック)
- 3) 水温計 : ガラス製水銀温度計
- 4) 溶存酸素計 : B-505 (飯島電子工業)
- 5) pH 計 : HM-30 V (東亜ディーケーケー)
- 6) ICP(硬度分析用) : IRIS Advantage/AP (サーモエレクトロン)

3.4 被験物質の溶解性確認

被験物質の試験用水に対する溶解性は、フラスコ攪拌法で確認した。

被験物質の水溶解度の文献値が 1×10^6 mg/L (25℃) であることから、試験用水を用いて 500 mg/L 溶液を調製後、密閉状態でマグネチックスターラーを用いて試験温度(24℃)で 30 分間攪拌し、目視により溶解した状態であることを確認した。

この調製液をろ過しない場合と、試験温度で 0.2 μ m 親水性 PTFE タイプメンブランフィルター（商品名：H020A090C，メーカー：ADVANTEC）を用いて加圧ろ過したろ液中の被験物質濃度を GC 法により測定した。

3.5 試験濃度の設定

予備的検討において揮発によると思われる被験物質の濃度減少が認められたため、被験物質濃度を確実に 100 mg/L 以上に維持するために最高濃度区を 120 mg/L に

設定し、公比 $10^{1/2}$ (約 3.2) で 3 段階 (12 ～ 120 mg/L の範囲) の濃度設定による予備試験を行った。その結果 (付属資料-2)、96 時間後の死亡率は、最高濃度の 120 mg/L 区でも 0 % であり、毒性症状も観察されなかった。また、120 mg/L 区の被験物質の濃度は、暴露開始時に 111 mg/L、48 時間後には 112 mg/L であった。

この結果を基に、本試験においても確実に 100 mg/L 以上を維持できると考えられた 120 mg/L 区および対照区の限度試験とした。

3.6 試験溶液の調製

試験溶液は用時調製とした。

1500 mg の被験物質を 3 L メスフラスコに秤り入れ、試験用水で 3 L とした。これを、マグネチックスターラーを用いて試験温度 (24 °C) で 30 分間攪拌し、500 mg/L の試験原液とした (無色透明)。

次に、500 mg/L の試験原液 1200 mL を 5 L ネジロビンに採り、試験用水で 5 L として 120 mg/L 区の試験溶液を調製した (無色透明)。

対照区には被験物質を加えない試験用水を用いた。

3.7 被験物質濃度等の測定

1) 被験物質濃度の測定

暴露開始時と 48 時間換水前後および暴露終了時に、各試験容器の中層より試験溶液を採取し、GC 法により試験溶液中の被験物質濃度を測定した。試験溶液の分析に際しては、標準溶液の測定を行い、そのピーク面積 (カウント数) から定量した。

詳細な分析法は付属資料-3「試験溶液の分析法」(測定条件、検量線、添加回収率、保存安定性、定量下限値、検出限界値等) に示した。

2) 試験環境の測定

全試験区の水温、溶存酸素濃度、pH は暴露開始時および 24 時間毎に測定 (換水時には換水前後にも測定) した。試験水温の変動を監視するため、別に設けた試験容器および周囲の大気の温度を暴露期間中に継続して測定し記録した。

3.8 試験操作

本試験においては、供試魚は乱数を用いて各試験区に無作為に割り付け、試験容器中に 1 試験区当たり 10 尾投入し、2 日間の容器じゅん化を行った。

暴露開始前に、供試魚と同水槽で馴養した魚 10 尾の体重および全長を測定し、全

長が 2.3 ± 1.2 cm の範囲内であることを確認した。その後、各試験区の試験溶液の水溫、溶存酸素濃度ならびに pH を測定し、試験溶液に魚網を用いて供試魚を投入し、その時点を暴露開始時とした。

暴露期間中、給餌は行わなかった。

暴露開始直後、3、6、24、48、72 および 96 時間後に死亡個体数、ならびに観察された毒性の徴候あるいは異常の有無を記録した。鰓蓋の動きなどの観察可能な動きがなく、尾柄部に触れて反応がない場合には魚は死亡しているとみなした。観察時に死亡魚を発見した場合は、水質の悪化が起こらないよう速やかに取り除き、また死亡数を記録した。平衡、遊泳行動、呼吸機能、体色などに異常が観察された場合や、重致死的な影響が観察された場合には記録した。

一般的に報告書に記載する症状と定義を表 1 に示した。その他、特異的症状（背曲がり、出血、体色変化、粘液の分泌、平衡失調、立鱗等）が観察された場合には、具体的にその旨を記載した。

観察された症状を「死亡、遊泳不能、異常遊泳、外見異常、呼吸異常、その他、正常」に分類し、それぞれの個体数が分かるように記載した。また、暴露終了時には個体別に症状の観察を行った。症状が重複している場合には個体毎にそれぞれの症状を記載した。

表1 一般的な症状と定義

分類	症状	症状の定義			
死亡	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。			
重篤	遊泳不能	鰓蓋のみが動いているが、遊泳等の運動が停止、または極度の異常を示している状態（仮死、横臥、横転等と称される症状が相当する）			
異常	異常遊泳	正常ではない異常行動を示す状態。以下の症状が含まれる。 <ul style="list-style-type: none">・上層遊泳（鼻上げを含む）・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）、コークスクリュー遊泳（水平方向）等を示している。〕・方向不定遊泳（方向感覚がなく遊泳方向が定まらない）・過活発（活動量が増加している。興奮、狂奔等）・不活発（活動量が低下している）・痙攣			
	外見異常	正常ではない外見を示す状態。表面に関する異常と形態に関する異常の2つがある			
		表面	体色	明化、暗化	
			体表面	出血(内出血も含む) びらん(ただれる) 粘液異常(粘液過剰分泌、粘液凝固等)	
			鱗	立鱗(鱗が逆立つ) 脱鱗	
			鰭	欠損	
	形態	背曲がり(骨折を含む) 眼球異常(眼球突出等)			
	呼吸異常	正常ではないが、鰓蓋の動きを示す状態。増加または減少がある。			
その他	上記以外の毒性症状				
正常	正常	遊泳行動、外見等に異常が見られない状態。			

4 試験結果の算出

4.1 50 % 死亡濃度 (LC_{50}) の算出に用いる被験物質濃度の決定

暴露期間中の被験物質濃度のわずかな減少は、揮発によるものが主因と考えられた。従って各影響濃度 (50 % 死亡濃度、0 % 死亡最高濃度、100 % 死亡最低濃度および最大無作用濃度) の算出にあたっては、時間加重平均値 (暴露開始時と 48 時間換水前、および 48 時間換水後と暴露終了時のそれぞれの測定値の幾何平均値の算術平均値) を採用した。

4.2 50 % 死亡濃度 (LC_{50}) の算出

各試験区の死亡数と供試個体数から、観察時間毎に死亡率 (%) を算出した。

4.3 0 % 死亡最高濃度および 100 % 死亡最低濃度

死亡率が 0 % である最高濃度を 0 % 死亡最高濃度、死亡率が 100 % である最低濃度を 100 % 死亡最低濃度とした。

5 結果および考察

5.1 試験成績の信頼性に影響をおよぼしたと思われる環境要因

認められなかった。

5.2 試験用水に対する被験物質の溶解性

フラスコ攪拌法により調製した 500 mg/L 溶液が溶解した状態であることを目視で確認した。この調製液をろ過しない場合と、調製液を試験温度で 0.2 μ m 親水性 PTFE タイプメンブランフィルター (商品名: H020A090C, メーカー: ADVANTEC) を用いて加圧ろ過したろ液中の被験物質濃度を GC 法により測定した。その結果、被験物質濃度は、ろ過しない場合は 474 mg/L ($n = 1$) で、加圧ろ過した場合は 454 mg/L ($n = 1$) であった。測定値は設定濃度の 90 % 以上であり、加圧ろ過前後の測定値には軽度の差がみられたが、水溶解度の文献値と、加圧ろ過操作中の揮発による影響を考慮すると、未溶解分がろ過されたことによる減少ではないと考えられた。以上より、この調製液は溶解していると考えられた。

5.3 被験物質濃度の測定

暴露開始時、48 時間換水前後および暴露終了時に、試験溶液中の被験物質濃度を測定した。その結果を Table 1 に示した。

各濃度区の設定値に対する被験物質濃度の割合は、暴露開始時および 48 時間後の換水時において 95 % および 97 % であった。暴露開始時から 48 時間換水前、48 時間換水後から暴露終了時の濃度維持率はそれぞれ 100 %、99 % であり、被験物質濃度のわずかな低下は揮発によるものが主因と考えられた。

5.4 50 % 死亡濃度 (LC_{50})

各観察時における死亡率を Table 2 に、50 % 死亡濃度 (LC_{50}) を Table 3 に示した。また、各観察時間の濃度－死亡率について、Figure 1 に示した。

96 時間暴露の対照区の死亡率は 0 % であり、試験成立条件を満たした。

24 時間 50 % 死亡濃度 (LC_{50}) : >120 mg/L

48 時間 50 % 死亡濃度 (LC_{50}) : >120 mg/L

72 時間 50 % 死亡濃度 (LC_{50}) : >120 mg/L

96 時間 50 % 死亡濃度 (LC_{50}) : >120 mg/L

5.5 0 % 死亡最高濃度、100 % 死亡最低濃度および最大無作用濃度

0 % 死亡最高濃度、100 % 死亡最低濃度および最大無作用濃度を Table 4 および以下に示した。

0 % 死亡最高濃度 : 120 mg/L

100 % 死亡最低濃度 : >120 mg/L

最大無作用濃度 : 120 mg/L

5.6 毒性症状

暴露期間中に観察された個体毎の毒性症状を表 2 および Table 5 に示した。

表 2. 暴露期間中の観察結果(1)

設定濃度 (実測平均濃度) (mg/L)	区分	観察時間					
		3 時間	6 時間	24 時間	48 時間	72 時間	96 時間
対照区	死亡(累積)	0	0	0	0	0	0
	正常	10	10	10	10	10	10
120 (115)	死亡(累積)	0	0	0	0	0	0
	重篤	0	0	0	0	0	0
	異常	0	0	0	0	0	0
	正常	10	10	10	10	10	10

5.7 試験溶液の水温、溶存酸素濃度および pH

試験溶液の水温を Table 6、溶存酸素濃度を Table 7、pH を Table 8 に示した。

96 時間の暴露期間中の水温は 23.8 ～ 24.1 ℃の範囲内であり、暴露期間中の変動は 1 ℃以内であった。試験水温の変動を連続的に監視するために別に設けた試験容器内の水温は 24±1℃の範囲内であった。

溶存酸素濃度は 6.8 ～ 8.2 mg/L の範囲内であり、すべての試験区で飽和溶存酸素濃度の 60 % 以上が維持され(24.0 ℃の飽和溶存酸素濃度：8.25 mg/L)、試験成立条件を満たした。

pH は暴露期間中 7.3 ～ 7.9 の範囲内であり、暴露期間中の変動は 1.0 以内であった。

5.8 試験計画書からの逸脱の有無

被験物質溶液を調製する際、試験計画書では遮光して攪拌することとしているが、実際の溶液調製では遮光せずに行っていた。しかしながら、予備的検討において被験物質に光分解性は認められなかったことから、本逸脱は試験結果に影響を及ぼさなかったと考えられた。

6 保管

試験に関する下記の記録および試資料は、当施設の資料保管施設に保管する。

- 1) 主計画表
- 2) 試験計画書、生データおよび最終報告書

- 3) 信頼性保証部門によって実施された監査または査察の記録
- 4) 職員の資格、訓練、経験および職務分掌の記録
- 5) 機器類の保守点検および校正の記録および報告書
- 6) コンピュータ化されたシステムの有効性確認の記録
- 7) 全標準操作手順書の経時的ファイル
- 8) 環境モニター記録
- 9) 被験物質、対照物質
- 10) その他の資料

以 上

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

(Semi-Static Condition, Closed System)

Nominal Concentration (mg/L)	Measured Concentration,mg/L(Percent of Nominal)								Mean ^a Measured Concentration (mg/L)
	0 Hour		48 Hours				96 Hours		
	new	old	new	old	new	old			
Control	<2	(-)	<2	(-)	<2	(-)	<2	(-)	-
120	114	(95)	114	(95)	116	(97)	115	(96)	115

new : Freshly prepared test solutions

old : Test solutions after 48 hours exposure

a : Time-weighted mean

Table 2. The Numbers of Dead Fish (Mortality)

(Semi-Static Condition, Closed System)

Nominal Concentration (mg/L)	Mean ^a Measured Concentration (mg/L)	Cumulative Mortality ^b (Percent Mortality)			
		24 Hours	48 Hours	72 Hours	96 Hours
Control	-	0/10 (0)	0/10 (0)	0/10 (0)	0/10 (0)
120	115	0/10 (0)	0/10 (0)	0/10 (0)	0/10 (0)

a : Time-weighted mean

b : Number of dead fish / Number of applied fish

Table 3. Calculated LC_{50} Values

Exposure Period (Hours)	LC_{50} (mg/L)	95 % Confidence Limits (mg/L)	Statistical Method
24	>120	–	–
48	>120	–	–
72	>120	–	–
96	>120	–	–

Table 4. The Highest Concentration in 0 % Mortality, the Lowest Concentration in 100 % Mortality and No Observed Effect Concentration

Exposure Period (Hours)	Highest Concentration in 0 % Mortality (mg/L)	Lowest Concentration in 100 % Mortality (mg/L)	No Observed Effect Concentration (mg/L)
24	120	>120	120
48	120	>120	120
72	120	>120	120
96	120	>120	120

Table 5. Observed Toxic Symptoms

(Semi-Static Condition, Closed System)

Nominal Concentration (mg/L)	Mean ^a Measured Concentration (mg/L)	Toxic Symptoms					
		3 Hours	6 Hours	24 Hours	48 Hours	72 Hours	96 Hours
Control	–	N	N	N	N	N	N
120	115	N	N	N	N	N	N

a : Time-weighted mean

N : No toxic symptom was observed (Normal)

Table 6. Temperature

(Semi-Static Condition, Closed System)

Nominal Concentration (mg/L)	Mean ^a Measured Concentration (mg/L)	Temperature, °C					
		0 Hour new	24 Hours	48 Hours		72 Hours	96 Hours
				old	new		
Control	–	23.9	24.1	23.9	23.8	24.0	23.9
120	115	23.9	24.1	23.9	23.8	24.0	23.9

a : Time-weighted mean

new : Freshly prepared test solutions

old : Test solutions after 48 hours exposure

Table 7. Dissolved Oxygen Concentrations

(Semi-Static Condition, Closed System)

Nominal Concentration (mg/L)	Mean ^a Measured Concentration (mg/L)	Dissolved Oxygen Concentration, mg/L					
		0 Hour	24 Hours	48 Hours		72 Hours	96 Hours
		new		old	new		old
Control	-	8.2	7.6	6.9	8.2	7.6	7.1
120	115	8.2	7.6	6.8	8.2	7.6	7.2

a : Time-weighted mean

new : Freshly prepared test solutions

old : Test solutions after 48 hours exposure

Table 8. pH Values

(Semi-Static Condition, Closed System)

Nominal Concentration (mg/L)	Mean ^a Measured Concentration (mg/L)	pH					
		0 Hour	24 Hours	48 Hours		72 Hours	96 Hours
		new		old	new		old
Control	-	7.8	7.5	7.3	7.9	7.5	7.3
120	115	7.9	7.5	7.3	7.9	7.5	7.3

a : Time-weighted mean

new : Freshly prepared test solutions

old : Test solutions after 48 hours exposure

付 属 資 料 － 1

試 験 用 水 の 水 質

Table A-1 Water Quality of Dilution Water

Parameter	Concentration
BOD	<0.5 mg/L
COD	0.5 mg/L
Total phosphorus	<0.02 mg/L
pH	7.3 (15.3 °C)
Coliform group bacteria	N.D.
Mercury	<0.0005 mg/L
Copper	<0.01 mg/L
Cadmium	<0.002 mg/L
Zinc	<0.01 mg/L
Lead	<0.005 mg/L
Aluminium	<0.02 mg/L
Nickel	<0.005 mg/L
Chromium	<0.05 mg/L
Manganese	<0.02 mg/L
Tin	<0.1 mg/L
Iron	<0.1 mg/L
Cyanide	<0.1 mg/L
Free chlorine	<0.05 mg/L
Bromide	<0.2 mg/L
Fluoride	<0.04 mg/L
Sulfide	<0.5 mg/L
Total ammonium	<0.05 mg/L
Arsenic	<0.005 mg/L
Selenium	<0.005 mg/L
Evaporation residue	53 mg/L
Electric conductivity	8.36 mS/m
Total hardness (as CaCO ₃)	32 mg/L
Alkalinity	24 mg/L
Sodium	4.7 mg/L
Potassium	1.2 mg/L
Calcium	8.5 mg/L
Magnesium	2.0 mg/L

Date of measurement: 4 March, 2010

付 属 資 料 － 2

予 備 試 験 の 結 果

Table B-1. The Numbers of Dead Fish (Mortality)
(Range Finding Test)

(Semi-Static Condition, Closed System)				
Nominal Concentration (mg/L)	Cumulative Mortality ^a (Percent Mortality)			
	24 Hours	48 Hours	72 Hours	96 Hours
Control	0/5 (0)	0/5 (0)	0/5 (0)	0/5 (0)
12	0/5 (0)	0/5 (0)	0/5 (0)	0/5 (0)
38	0/5 (0)	0/5 (0)	0/5 (0)	0/5 (0)
120	0/5 (0)	0/5 (0)	0/5 (0)	0/5 (0)
a : Number of dead fish / Number of applied fish				

Table B-2. Measured Concentration of the Test Substance in Test Solution
(Range Finding Test)

(Semi-Static Condition, Closed System)				
Nominal Concentration (mg/L)	Measured Concentration (mg/L)			
	0 Hour	48 Hours		96 Hours
	new	old	new	old
Control	<2	<2	<2	<2
12	10.1	10.3	10.4	10.4
38	34.4	35.7	35.3	34.1
120	111	112	113	110
new : Freshly prepared test solutions				
old : Test solutions after 48 hours exposure				

Table B-3. Observed Toxic Symptoms
(Range Finding Test)

(Semi-Static Condition, Closed System)				
Nominal Concentration (mg/L)	Toxic Symptoms			
	24 Hours	48 Hours	72 Hours	96 Hours
Control	N	N	N	N
12	N	N	N	N
38	N	N	N	N
120	N	N	N	N
N : No toxic symptom was observed				

付 属 資 料 － 3

試 験 溶 液 の 分 析 法

2-メチルプロパン-2-オール分析法

1. 分析方法

(1) 分析法の概要

検量線の濃度範囲に入るように試験溶液を希釈後、その一定量を、FID 検出器を備えたガスクロマトグラフ (GC) に注入し、クロマトグラムと同時にピーク面積 (カウント数) をデータ処理装置から求める。このピーク面積を用い、標準液の検量線から試験溶液中の被験物質の濃度を求め、希釈倍率で換算し、試験溶液中の被験物質の濃度を算出する。

(2) 装置および器具

a) ガスクロマトグラフ	: GC-14A 型 (FID 付)	島津製作所
b) 分離カラム	: 10% PEG-6000 shimalite TPA 60/80 mesh glass 製 3 m×3.2 mmφ	ジーエルサイエンス
c) データ処理装置	: C-R5A 型	島津製作所
d) 化学天秤	: AE-166 型	メトラー
e) マイクロシリンジ	: 10 μ L	イトー
f) メスシリンダー	: 容量 1000 mL	柴田科学
g) メスフラスコ	: 容量 20, 100 mL	柴田科学
h) ホールピペット	: 容量 1, 2 mL	柴田科学
i) コマゴメピペット	: 容量 5 mL	柴田科学

(3) 試薬

- a) 2-メチルプロパン-2-オール : 純度 99.9 %、XXXXXXXXXX
b) 純水 : 純水製造装置で調製

(4) 試薬の調製

- a) 被験物質標準原液 (1000 mg/L)

被験物質約 100 mg を 100 mL メスフラスコに 0.1 mg の桁まで精秤する。これに純水を加えて溶解し 100 mL とする。秤量した質量から、純度換算を行った上、正確な被験物質の濃度を算出する。

(5) 操作

〔前処理〕

必要に応じ検量線の被験物質濃度範囲内に入るように試験溶液を純水で希釈する。

〔測定操作〕

- a) 「2. GC 測定条件」に記載する分析条件で GC を作動し、装置を安定させる。
- b) 「3. 検量線の作成」に記載する方法で検量線の標準液を調製する。
- c) 検量線の標準液、必要に応じて希釈した試料の溶液の 1 μL を GC に注入してクロマトグラムおよびピーク面積（カウント数）を得る。
- d) 検量線により濃度を求め、希釈率で換算し試験溶液の被験物質濃度を算出する。

2. GC 測定条件

- (1) 分離カラム : 10% PEG-6000, 3 m \times 3.2 mm ϕ shimalite TPA 60/80 mesh
- (2) 恒温槽温度 : 70 $^{\circ}\text{C}$
- (3) キャリヤーガス : 窒素
- (4) 流量 : 40 mL/min
- (5) 検出器 : FID
- (6) 注入量 : 1 μL

3. 検量線の作成

- (1) 被験物質標準原液（1059 mg/L）1 mL、2 mL をそれぞれ 20 mL メスフラスコに正確に分取し、純水で 20 mL とし、52.95 mg/L、105.9 mg/L 標準液を調製する。
105.9 mg/L 標準液から 2.0 mL を 20 mL メスフラスコに正確に分取して、純水で 20 mL とし、10.59 mg/L 標準液を調製する。
- (2) 各標準液について 1 μL を GC に注入し、データ処理装置からクロマトグラムおよびピーク面積（カウント数）を得る。被験物質濃度を横軸にピーク面積を縦軸にとり検量線を作成する。この時の回帰式の寄与率（ R^2 ）も算出する。

表1 検量線に使用したデータ例

No.	被験物質濃度 (mg/L)	ピーク面積 ($\mu\text{V} \cdot \text{sec}$)
1	0	0
2	10.59	11440
3	52.95	59870
4	105.9	119427

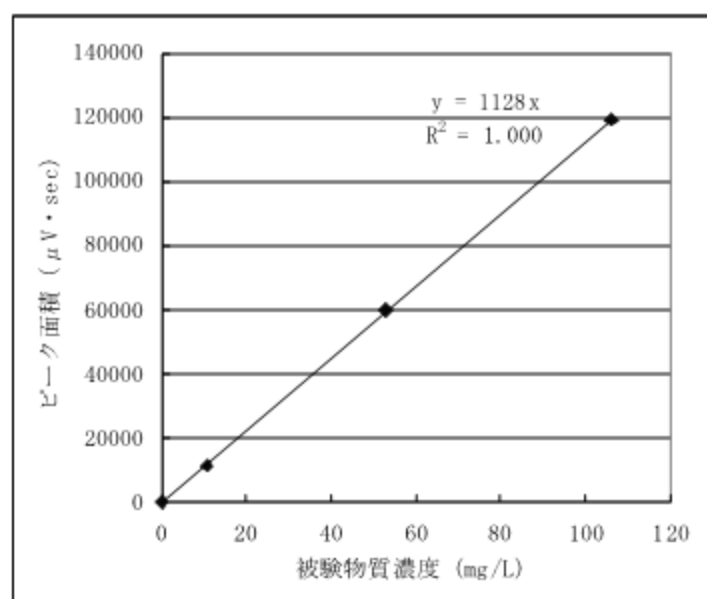


図1 検量線例

4. 添加回収率

被験物質標準原液（1048 mg/L）2 mL を 20 mL メスフラスコに正確に分取し、純水で 20 mL とし、104.8 mg/L 標準液を調製する。

標準原液および標準液の 2 mL を 20 mL メスフラスコに正確に分取し、脱塩素水で 20 mL とし、濃度が 104.8 mg/L、10.48 mg/L の溶液を調製する。これらの溶液について、回収率を算出した。

結果を表2 に示す。回収率は 95 ～ 98 %であった。

表2 添加回収率

試料濃度 (mg/L)	n	測定値 (mg/L)	測定値平均 (mg/L)	回収率 (%)
10.48	1	9.878	10.0	95
	2	10.21		
104.8	1	102.7	103	98
	2	102.7		

5. 保存安定性

「4. 添加回収率」で調製した2 濃度の試料溶液（10.0 mg/L、103 mg/L）を、密閉・遮光条件において冷蔵庫内（約 4 ℃）で 3日間保存し、試料溶液の安定性を確認した。

結果を表3 に示す。3日間冷蔵庫内保存溶液の濃度維持率は 102 ～ 106 % であった。

表3 保存安定性

開始時測定値 (mg/L)	3 日後			
	n	測定値 (mg/L)	測定値平均 (mg/L)	濃度維持率 (%)
10.0	1	10.20	10.2	102
	2	10.26		
103	1	106.1	109	106
	2	111.3		

6. 定量下限値および検出限界

被験物質濃度 11.38 mg/L の標準液 1 μ L を GC に 7 回注入し、得られた測定値の標準偏差値の 10 倍を定量下限値、3 倍を検出限界値とした。

結果を表4 に示す。定量下限値は 2 mg/L、検出限界値は 0.5 mg/L であった。

測定値の平均値と標準液濃度にみられた濃度差は、標準液の調製時に被験物質の揮発により生じた調製誤差が原因と考えられた。

表4 定量下限値および検出限界値の算出データ

n	測定値 (mg/L)
1	10.45
2	10.45
3	10.33
4	10.35
5	10.20
6	10.08
7	10.57
平均値	10.35
標準偏差 (σ_{n-1})	0.1654

$$\text{定量下限値} = 0.1654 \times 10 = 1.654 \approx 2 \text{ mg/L}$$

$$\text{検出限界値} = 0.1654 \times 3 = 0.4962 \approx 0.5 \text{ mg/L}$$