

陳 述 書

財団法人 化 学 品 検 査 協 会
化学品安全センター 久留米研究所

試験委託者： 環境庁

表 題： ジクロロプロモメタンのヒメダカ (*Oryzias latipes*) に対する
延長毒性試験－21日間

試験番号： 91510

上記試験は契約書別添2「生態影響試験実施に関する基準」(平成7年9月26日)に準拠
したものである。

1996年 3月 28日

運営管理者

— [Redacted Signature] —

信頼性保証書

財団法人 化学品検査協会
化学品安全センター 久留米研究所

試験委託者： 環境庁

表 題： ジクロロプロモメタンのヒメダカ (*Oryzias latipes*) に対する
延長毒性試験－21日間

試験番号： 91510

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通り確認した。

監査又は査察内容	実施日	報告日 (通官管轄)	報告日 (試験責任者)
試験計画書監査	1996年 2月28日	1996年 2月28日	1996年 2月28日
試験実施状況査察	1996年 2月29日	1996年 3月11日	1996年 3月11日
試験実施状況査察	1996年 3月14日	1996年 3月27日	1996年 3月27日
試験実施状況査察	1996年 3月21日	1996年 3月27日	1996年 3月27日
最終報告書監査	1996年 3月28日	1996年 3月28日	1996年 3月28日

1996年 3月28日

信頼性保証部門責任者：



試験実施概要

1. 表 題

ジクロロプロモメタンのヒメダカ (*Oryzias latipes*) に対する延長毒性試験－21日間

2. 試験目的

ジクロロプロモメタンについて、ヒメダカ (*Oryzias latipes*) に対する延長毒性試験－21日間を行いヒメダカに対する致死、その他の観察される影響の閾値及び最大無作用濃度 (NOEC) を求める。

3. 試験方法

本試験は、OECD 化学品テストガイドライン No.204「魚類延長毒性試験－14日間」(1984年) に準拠した。

4. 適用 GLP

本試験は契約書別添 2「生態影響試験実施に関する基準」(平成7年9月26日) に準拠した。

5. 試験委託者

名 称： 環境庁
住 所： 〒100 東京都千代田区霞が関一丁目2-2

6. 試験受託者

名 称： 財団法人 化学品検査協会
所在地： 〒136 東京都江東区亀戸5-6-21

7. 試験施設

名 称： 化学品安全センター 久留米研究所
所在地： 〒830 福岡県久留米市中央町19-14
運営管理者： XXXXXXXXXX

8. 試験関係者

試験責任者

[REDACTED]

試験担当者

生物試験担当

[REDACTED]

分析担当

[REDACTED]

データ処理担当

[REDACTED]

試験資料管理部門責任者

[REDACTED]

9. 最終報告書の承認

1996 年 3 月 28 日

試験責任者

氏名

[REDACTED]

10. 試験期間

試験開始日

1996 年 2 月 28 日

試験終了日

1996 年 3 月 28 日

暴露期間

1996 年 2 月 29 日～1996 年 3 月 21 日

11. 保管

試験計画書、生データ、記録文書、最終報告書及び被験物質は、最終報告書作成後10年間、財団法人 化学品検査協会 化学品安全センター 久留米研究所の保管施設に保管する。その後の保管については試験委託者と協議のうえ決定する。

目 次

	頁
要 旨	1
1. 被験物質	2
1.1 名称、構造式及び物理化学的性状	2
1.2 被験物質の確認及び保管条件下での安定性	3
2. 供試生物	3
3. 試験方法	4
3.1 試験条件	4
3.2 希釈水	4
3.3 試験装置、試験容器及び恒温槽等	4
3.4 試験濃度の設定	5
3.5 試験液の調製	5
3.6 試験液の分析	5
3.7 試験操作	5
3.8 数値の取扱い	6
4. 結果の算出	6
4.1 最小致死濃度及び最小作用濃度	6
4.2 最大無作用濃度(NOEC)	6
4.3 半数致死濃度(LC50)の算出	7
5. 結果及び考察	7
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	7
5.2 試験液中の被験物質濃度	7
5.3 最小致死濃度、最小作用濃度	7
5.4 半数致死濃度 (LC50)	7
5.5 毒性症状及び摂餌状況	8
5.6 供試魚の成長率	8
5.7 最大無作用濃度	8
5.8 試験液の水溫、溶存酸素濃度及びpH	9
5.9 試験液の状態	9
Table 1～9	10～20
Figure 1	21
付属資料－1 希釈水の水質	
付属資料－2 試験液の分析方法及び分析チャート	

要 旨

試験委託者

環境庁

表 題

ジクロロブロモメタンのヒメダカ (*Oryzias latipes*) に対する延長毒性試験－21日間

試験番号

91510

試験方法

本試験は、OECD化学品テストガイドライン No.204「魚類延長毒性試験－14日間」(1984年)に準拠して実施した。

- 1) 被験物質： ジクロロブロモメタン
- 2) 暴露方式： 流水式(連続的に試験液を供給する方式)
- 3) 供試生物： ヒメダカ (*Oryzias latipes*)
- 4) 暴露期間： 21日間
- 5) 連 数： 1試験区につき1連
- 6) 生 物 数： 20尾／1試験区
- 7) 試験濃度： 20, 10, 5.0, 2.50, 1.25 mg/L (濃度公比：2.0) 及び対照区
- 8) 試験液量： 3.4 L／1試験区
- 9) 照 明： 16時間明／8時間暗
- 10) 水 温： 24±1℃
- 11) エアレーション： なし
- 12) 試験液中の被験物質の分析： ヘッドスペースガスクロマトグラフィー (HS-GC)
(0, 3, 7, 14及び21日目)

結 果

- 1) 21日間の最小致死濃度＝1.75 mg/L
 - 2) 21日間の最小作用濃度＝1.75 mg/L
 - 3) 21日間の最大無作用濃度 (NOEC)＝0.777 mg/L
 - 4) 7日間の半数致死濃度 (LC50) > 15.2 mg/L
 - 5) 14日間の半数致死濃度 (LC50)＝11.3 mg/L (95%信頼区間：9.32～13.6 mg/L)
 - 6) 21日間の半数致死濃度 (LC50)＝8.62 mg/L (95%信頼区間：7.33～10.5 mg/L)
- (上記濃度は、全て測定値に基づく値)

1.2 被験物質の確認及び保管条件下での安定性

被験物質は当研究所の冷蔵庫に保管した。

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、被験物質の特性と矛盾が認められないことを確認した。暴露終了後にも同様にスペクトルを測定し、暴露開始前に測定したスペクトルと比較した結果、スペクトルに変化は無かったことより被験物質は当研究所の冷蔵庫に保管中は安定であったと判断された。

2. 供試生物

試験に使用したヒメダカ (*Oryzias latipes*) を下記に示した。開始時の供試魚の体長 (被鱗体長) は $2.0 \pm 0.5\text{cm}$ であった。

- 1) 一般名： ヒメダカ
- 2) 学名： *Oryzias latipes*
- 3) 体長： 1.73 cm (1.53～1.96cm), n=120
- 4) 体重： 0.0796 g (0.0563～0.118g), n=120
- 5) ロット番号： LNR-960215
- 6) 購入先： 中島養魚場 (〒869-01 熊本県玉名郡長洲町大明神)
- 7) 購入日： 1996年2月8日

馴化

試験条件と同条件 (水質、温度等) で 12 日間以上、飼育馴化した。馴化開始時にエルバージュ (上野製薬製) を用いて止水状態で 24 時間薬浴を行った。餌は市販のテトラミン (テトラベルケ社) を与えた。暴露開始の 24 時間前からは給餌しなかった。試験には健康で肉眼的に正常な個体を使用した。暴露開始前 7 日間の死亡率は 5% 以下であった。また、基準物質 (硫酸銅 (II) 五水和物、試薬特級) の 96 時間 LC50 は 2.0 mg/L であった。

3. 試験方法

3.1 試験条件

- 1) 暴露方式： 被験物質を含む試験液へ試験生物を暴露する薬浴方式を用いた。
試験は流水式(試験液を連続的に供給する方式)で行った。
- 2) 暴露期間： 21日間
- 3) 連 数： 1試験区につき1連
- 4) 生 物 数： 20尾/1試験区
- 5) 試験液量： 3.4 L/1試験区
- 6) 流量と換水率： 流量60 mL/分で行った。この流量は試験液が
約25回/日換水される割合に相当する。
- 7) 水 温： $24 \pm 1^{\circ}\text{C}$
- 8) 照 明： 16時間明/8時間暗
- 9) 給 餌： 市販のテトラミンを毎日魚体重の2%与えた。
- 10) エアレーション： なし

3.2 希釈水

脱塩素水道水(久留米市水道水を活性炭処理し、残留塩素等を除去したもので、充分通気した)を使用した。希釈水の主な水質として、硬度は35.5 mg/L (CaCO₃換算)、pHは6.9であった。残留塩素については1日に1回オルトトリジン法により残留塩素濃度が0.02 mg/L以下であることを確認した。

[付属資料-1]

3.3 試験装置、試験容器及び恒温槽等

- 1) 試験容器： 3.4 L容のガラス容器(直径16 cm、深さ17 cm)を用いた。密閉にするため、容器上面に入水と排水用の穴があいたガラス板で蓋をした。
- 2) 恒温槽： 加温冷却機によって試験容器内の水温を $24 \pm 1^{\circ}\text{C}$ に維持する恒温槽を用いた。
- 3) 希釈装置： 試験原液から必要な濃度段階に希釈された試験液を連続的に供給するものを用いた。
- 4) 定量ポンプ： ガラス微量定量ポンプGMW-A型(東京理化器械株式会社)
- 5) 水温計： 検定済ガラス製棒状温度計
- 6) pH 計： ガラス電極式水素イオン濃度計HM-11P型(東亜電波工業)
- 7) 溶存酸素計： 溶存酸素計51B型(Yellow Springs Instrument Co., Inc.)

3.4 試験濃度の設定

魚類急性毒性試験の結果である96-h LC50値 (29.6 mg/L)、観察された症状及び被験物質の性状などから、試験濃度は20 mg/Lを最高濃度として濃度公比2.0で5濃度区 (20, 10, 5.0, 2.50及び1.25 mg/L) を設定した。対照には希釈水のみの対照区を設けた。

3.5 試験液の調製

必要量 (比重換算し、容量で添加) の被験物質を希釈水に添加し、マグネティックスターラーを用いて攪拌を行い、希釈水に溶解させることにより1,200 mg/Lの被験物質溶液を調製した。この被験物質溶液を適宜希釈して、各濃度区の20倍の濃度の試験原液を調製した (20 mg/L区 : 400 mg/L, 10 mg/L区 : 200 mg/L, 5.0 mg/L区 : 100 mg/L, 2.50 mg/L区 : 50 mg/L, 1.25 mg/L区 : 25 mg/L)。試験液は試験原液と希釈水を一定流量 (試験原液 : 3.0 mL/分、希釈水 : 57 mL/分) で混合して調製した。

3.6 試験液の分析

暴露開始時 (0日目)、3日目、7日目、14日目及び21日目に各試験容器の中層より試験液を採取し、HS-GC により分析した。試験液の分析に際しては、試料測定毎に標準溶液 (濃度5.0 mg/L) の測定を行い、そのピーク面積比から定量した。詳細は付属資料-2に示した。

3.7 試験操作

馴化した魚の中から必要数の魚の重量及び被鱗体長を測定 [測定にあたっては麻酔剤FA100(田辺製薬製)を使用] し、被鱗体長で $2.0 \pm 0.5\text{cm}$ であることを確認した。試験液の被験物質濃度が安定した後、各試験区の試験液の水温、溶存酸素濃度、pHを測定後、試験容器中に供試魚を1試験区当り20尾体重層別抽出法により投入した。

暴露開始後、週2回各試験区の試験液の水温、溶存酸素濃度、pHを測定した。

暴露期間中、餌は1日当たり個体重量の約2%を与えた。死亡により個体数が減少した場合は、その分給餌量を減らした。

暴露開始後、毎日死亡個体*数を記録した。死亡個体を発見した場合水質の悪化が起こらないよう速やかに取り除いた。また、毎日観察された毒性の徴候或いは異常 (例 : 外部刺激への反応異常、平衡感覚喪失、遊泳異常、呼吸機能の異常、体色変化、背曲がり、出血等) 及び摂餌量の低下を記録した。暴露終了時には全ての生存魚の重量及び被鱗体長を測定記録した。

* : ステンレス製ピンセットの先で尾部に軽く触れ反応がない個体を死亡とみなした

3.8 数値の取扱い

数値の丸め方は、JIS Z 8202-1985 参考3 規則Aによった。

4. 結果の算出

得られたデータを基に以下3項目の結果を算出した。結果の算出には被験物質濃度の測定濃度が設定値の±20%の範囲を越えたので測定濃度を用いた。

4.1 最小致死濃度及び最小作用濃度

試験において死亡個体が観察された濃度区の最も低い濃度を最小致死濃度とした。

試験において試験魚に致死以外の他の作用が観察された濃度区の最も低い濃度を最小作用濃度とした。

4.2 最大無作用濃度 (NOEC)

1) 成長率の算出

以下の式より成長率を算出した。

$$R = \frac{\log_e W_2 - \overline{\log_e W_1}}{t_2 - t_1} \times 100$$

R = 供試魚の成長率

W_1, W_2 = time t_1 及び t_2 での供試魚重量

$\overline{\log_e W_1}$ = 暴露開始時の供試魚重量の対数の平均値

$\log_e W_2$ = 暴露終了時の供試魚重量の対数

t_1, t_2 = 暴露開始及び暴露終了時間 (日)

2) 成長率の有意差検定

算出した成長率について、一元配置分散分析によって対照群との有意差の有無を調べた。なお、暴露終了時において10%を超える死亡が観察された15.0 mg/L区(測定濃度)は検定対象外とした。

この成長率の有意差検定結果及び供試生物の死亡率や観察された症状等も含めてNOECを評価した。

4.3 半数致死濃度 (LC50) の算出

7日における半数致死濃度 (LC50) は試験最高濃度で50%以上の死亡率が得られなかったため、7日までの測定濃度の算術平均値を用いて試験最高濃度以上と表した。14日及び21日における半数致死濃度 (LC50)は、それぞれ 14日及び21日までの測定濃度の算術平均値を用いてProbit 法及びMoving average法により算出した。また、それらの95%信頼限界も示した。

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

該当する要因はなかった。

5.2 試験液中の被験物質濃度

暴露開始時、3日後、7日後、14日後及び21日後に試験液中の被験物質濃度を測定した。暴露期間中の被験物質濃度は0.510～16.2 mg/L (設定値1.25～20 mg/L) であり、設定濃度に対する割合は40.8～81.2 %であった。

[Table 1(p.10), 付属資料-2]

5.3 最小致死濃度、最小作用濃度

試験において死亡個体が観察された濃度区の最も低い濃度 (最小致死濃度) は 1.75 mg/Lであった。

試験において試験魚に致死以外の他の作用が観察された濃度区の最も低い濃度 (最小作用濃度) は1.75 mg/L であった。

(上記濃度は、全て21日までの測定濃度の算術平均値を示す)

[Table 2,4(p.11,13,14)]

5.4 半数致死濃度 (LC50)

7日、14日及び21日の測定濃度に基づく半数致死濃度 (LC50) はそれぞれ > 15.2 mg/L, 11.3 mg/L及び8.62 mg/Lであった。

[Table 3(p.12), Figure 1(p.21)]

5.5 毒性症状及び摂餌状況

毒性症状として15.0 mg/L区において表層集中、活動度の低下、体色明化、平衡喪失、狂奔及び嗜眠状態の症状が、6.68 mg/L区においては活動度の低下、表層集中、体色明化及び平衡喪失が、3.47 mg/L区においては活動度の低下が、1.75 mg/L区においては活動度の低下及び体表出血が観察された。対照区では暴露期間中に異常な症状は観察されなかった。

ヒメダカの摂餌状況は15.0 mg/L及び6.68 mg/Lの濃度区において低下が認められた。その他の濃度区では摂餌低下はみられなかった。

(上記濃度は、全て21日までの測定濃度の算術平均値を示す)

[Table 4(p.13,14)]

5.6 供試魚の成長率

ジクロロブロモメタンに21日間暴露したヒメダカの体重に基づく成長率は、6.68 mg/L以下の濃度区において対照区と比較して有意差は認められなかった。

($p=0.05$ 、統計的方法：一元配置分散分析)

(上記濃度は、21日までの測定濃度の算術平均値を示す)

[Table 5,6(p.15~17)]

5.7 最大無作用濃度

死亡個体が観察されない濃度区の最も高い濃度は0.777 mg/L、毒性症状が観察されない最高濃度は0.777 mg/L、摂餌状況に異常が認められない最高濃度は3.47 mg/L、供試生物の成長率に関して対照区と比較して有意な差が認められない最高濃度は6.68 mg/Lであった。これらの濃度で最も低い濃度である0.777 mg/Lを最大無作用濃度 (NOEC) と判断した。

(上記濃度は、全て21日までの測定濃度の算術平均値を示す)

[Table 2,4,6(p.11,13,14,17)]

5.8 試験液の水溫、溶存酸素濃度及びpH

21日の暴露期間中の水溫は23.0～24.0℃であり、すべての試験区において $24 \pm 1^{\circ}\text{C}$ であった。暴露期間中の溶存酸素濃度は7.2～8.1 mg/Lであり、すべての試験区において飽和溶存酸素濃度の60%以上であった。暴露期間中のpHは7.21～7.87であった。

(24.0℃の飽和溶存酸素濃度：8.25 mg/L)

[Table 7,8,9(p.18～20)]

5.9 試験液の状態

暴露開始時には無色透明であり、その状態は暴露終了時まで変わらなかった。

以 上

Table 1. Concentrations of dichlorobromomethane in prolonged toxicity test(21-day) using orange killifish (*Oryzias latipes*) under flow-through conditions

Nominal concentration (mg/L)	Observed concentration (mg/L) (Percent of nominal)		
	0-day	3-day	7-day
Control	0	0	0
1.25	0.864 (69.1)	0.751 (60.1)	0.947 (75.8)
2.50	1.84 (73.5)	1.43 (57.1)	1.90 (75.9)
5.0	3.49 (69.8)	2.93 (58.5)	3.78 (75.6)
10	7.13 (71.3)	5.27 (52.7)	7.32 (73.2)
20	16.2 (81.2)	14.1 (70.6)	15.1 (75.6)

Table 1. (continued)

Nominal concentration (mg/L)	Observed concentration(mg/L) (Percent of nominal)		
	14-day	21-day	Mean
Control	0	0	-
1.25	0.812 (65.0)	0.510 (40.8)	0.777 (62.2)
2.50	1.70 (67.9)	1.89 (75.6)	1.75 (70.0)
5.0	3.34 (66.9)	3.79 (75.9)	3.47 (69.4)
10	6.57 (65.7)	7.08 (70.8)	6.68 (66.8)
20	14.3 (71.7)	- (-)	15.0 (75.0)

Table 2. Mortality of orange killifish (*Oryzias latipes*) exposed to dichlorobromomethane under flow-through test conditions

Observed concentration (mg/L)	Cumulative number of dead fish (Percent mortality)				
	2-day	4-day	7-day	9-day	11-day
Control	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
0.777 ^{a)}	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
1.75 ^{a)}	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
3.47 ^{a)}	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
6.68 ^{a)}	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
15.0 ^{b)}	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (5)	3 (15)

Table 2. (continued)

Observed concentration (mg/L)	Cumulative number of dead fish (Percent mortality)			
	14-day	16-day	18-day	21-day
Control	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
0.777 ^{a)}	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
1.75 ^{a)}	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (5)
3.47 ^{a)}	0 (0)	0 (0)	1 (5)	1 (5)
6.68 ^{a)}	1 (5)	1 (5)	2 (10)	2 (10)
15.0 ^{b)}	16 (80)	20 (100)	20 (100)	20 (100)

The values are expressed as arithmetic means calculated by the following equation :

a) $(C_0 + C_3 + C_7 + C_{14} + C_{21})/5$

b) $(C_0 + C_3 + C_7 + C_{14})/4$

where

C_0 : the observed concentrations at 0-day

C_3 : the observed concentrations at 3-day

C_7 : the observed concentrations at 7-day

C_{14} : the observed concentrations at 14-day

C_{21} : the observed concentrations at 21-day

Table 3. Calculated LC50 values for orange killifish (*Oryzias latipes*) exposed to dichlorobromomethane based on observed concentrations

Exposure time (day)	LC50 (mg/L)	95-Percent confidence limits (mg/L)	Statistical method
7	>15.2 ^{a)}	- ~ -	
14	11.3 ^{b)}	9.32 ~ 13.6	probit
21	8.62 ^{c)}	7.33 ~ 10.5	moving average

Each LC50 value was calculated by the concentrations based on the following equations:

a) $(C_0 + C_3 + C_7)/3$

b) $(C_0 + C_3 + C_7 + C_{14})/4$

c) $(C_0 + C_3 + C_7 + C_{14} + C_{21})/5$

where

C_0 : the observed concentrations at 0-day

C_3 : the observed concentrations at 3-day

C_7 : the observed concentrations at 7-day

C_{14} : the observed concentrations at 14-day

C_{21} : the observed concentrations at 21-day

Table 4. Toxic symptoms observed in orange killifish (*Oryzias latipes*) during exposure to dichlorobromomethane under flow-through test conditions

Observed concentration (mg/L)	Symptoms										
	1-day	2-day	3-day	4-day	5-day	6-day	7-day	8-day	9-day	10-day	11-day
Control	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0.777	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1.75	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3.47	-	-	-	-	-	-	-	-	RA(5)	RA(2)	RA(2)
6.68	-	-	-	-	-	LT(2) RA(4)	AS(1) LT(2) RA(4)	LT(20) RA(20)	LT(20) PLE(2) RA(20)	LT(20) PLE(2) RA(20)	LT(20) PLE(1) RA(20)
15.0	RA(20)	RA(20) RFA(5)	RA(20) RFA(5)	AS(1) RA(20) RFA(5)	AS(2) RA(20) RFA(5)	AS(4) RA(20) RFA(5)	AS(3) LT(20) PLE(3) RA(20) RFA(5)	AS(5) LT(20) PLE(2) RA(20) RFA(10)	AS(3) LT(19) PLE(3) RA(19) RFA(10)	AS(5) LT(19) PLE(5) RA(19) RFA(19)	AS(6) CLE(2) ERR(2) LT(17) PLF(1) RA(1) RFA(17)

The values in parentheses express the number of fish showing the symptom.

- AS : At the surface
 CLE : Complete loss of equilibrium
 ERR : Erratic
 LT : Light body color
 PLE : Partial loss of equilibrium
 RA : Reduced activity
 RFA : Reduced feeding activity
 - : no symptom

Table 4. (continued)

Observed concentration (mg/L)	Symptoms									
	12-day	13-day	14-day	15-day	16-day	17-day	18-day	19-day	20-day	21-day
Control	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0.777	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1.75	-	-	-	-	-	RA(5)	HEM(1) RA(2)	HEM(1) RA(1)	HEM(1) RA(2)	HEM(1) RA(1)
3.47	RA(10)	RA(8)	RA(5)	RA(10)	RA(10)	RA(19)	RA(19)	RA(19)	RA(19)	RA(19)
6.68	LT(20) PLE(1) RA(20)	AS(1) LT(20) PLE(1) RA(20)	LT(19) PLE(2) RA(19) RFA(5)	AS(6) LT(19) RA(19) RFA(19)	AS(1) LT(19) PLE(1) RA(19) RFA(19)	LT(18) PLE(2) RA(18) RFA(18)	AS(2) LT(18) PLE(1) RA(18) RFA(18)	AS(2) LT(18) PLE(2) RA(18) RFA(18)	LT(18) PLE(1) RA(18) RFA(18)	LT(18) PLE(1) RA(18) RFA(18)
15.0	AS(2) CLE(5) LT(12) RA(12) RFA(12)	AS(3) CLE(3) LT(7) PLE(1) RFA(7)	AS(4) CLE(1) ERR(1) LETH(1) LT(4) RFA(4)	AS(1) CLE(1) LT(1) RA(1) RFA(1)						

The values in parentheses express the number of fish showing the symptom.

AS : At the surface
CLE : Complete loss of equilibrium
ERR : Erratic
HEM : Hemorrhagic
LETH : Lethargic
LT : Light body color
PLE : Partial loss of equilibrium
RA : Reduced activity
RFA : Reduced feeding activity
- : no symptom

Table 5. Fish weight (g)

No.	Observed concentration (mg/L)					
	Control		0.777		1.75	
	0-day	21-day	0-day	21-day	0-day	21-day
1	0.0916	0.0784	0.0700	0.0880	0.0563	0.113
2	0.106	0.0723	0.0590	0.108	0.0886	0.0870
3	0.0696	0.0820	0.0671	0.0726	0.0662	0.122
4	0.0857	0.0780	0.0631	0.0779	0.0726	0.0774
5	0.0837	0.102	0.0705	0.0723	0.0766	0.0558
6	0.0818	0.102	0.0944	0.0701	0.0735	0.0771
7	0.0672	0.0688	0.0899	0.104	0.0610	0.0840
8	0.0736	0.112	0.0764	0.102	0.0952	0.102
9	0.0647	0.0916	0.0743	0.0674	0.0685	0.0964
10	0.0603	0.0643	0.105	0.112	0.0847	0.0679
11	0.0724	0.0690	0.0802	0.102	0.101	0.0724
12	0.0795	0.0644	0.0832	0.0686	0.0660	0.0902
13	0.0965	0.0711	0.0730	0.0566	0.0802	0.0866
14	0.0720	0.0883	0.0849	0.0701	0.0823	0.0603
15	0.0998	0.0985	0.0640	0.0796	0.0742	0.0845
16	0.0774	0.0761	0.0735	0.0922	0.0892	0.0667
17	0.0615	0.0916	0.0950	0.0523	0.0718	0.109
18	0.0755	0.0801	0.0973	0.114	0.118	0.0760
19	0.0902	0.0725	0.0806	0.0783	0.0937	0.110
20	0.0843	0.113	0.0881	0.0931	0.0832	n
Mean	0.0796	0.0838	0.0795	0.0841	0.0801	0.0862
S.D.	0.0127	0.0153	0.0127	0.0185	0.0148	0.0186

n : No measurement was made because orange killifish died.

Two weights of fish at 0-day and 21-day in each test group were not derived from the same fish.

Table 5. (continued)

No.	Observed concentration (mg/L)					
	3.47		6.68		15.0	
	0-day	21-day	0-day	21-day	0-day	21-day
1	0.0571	0.0765	0.0871	0.110	0.0649	n
2	0.0728	0.0670	0.0646	0.0851	0.0668	n
3	0.0785	0.0748	0.0723	0.0830	0.0635	n
4	0.0774	0.103	0.0958	0.0611	0.0777	n
5	0.0682	0.0822	0.0979	0.0746	0.0877	n
6	0.0668	0.0795	0.0792	0.0829	0.0753	n
7	0.0658	0.0730	0.0673	0.104	0.0851	n
8	0.0834	0.0804	0.0695	0.0800	0.100	n
9	0.0930	0.0748	0.0709	0.0540	0.0935	n
10	0.0847	0.0711	0.102	0.0920	0.0685	n
11	0.0720	0.102	0.0594	0.0555	0.0767	n
12	0.0948	0.0960	0.0894	0.0922	0.0824	n
13	0.0976	0.0793	0.0922	0.0642	0.0908	n
14	0.0873	0.100	0.0828	0.0976	0.104	n
15	0.0910	0.0728	0.0756	0.0941	0.0840	n
16	0.0636	0.0885	0.0853	0.112	0.0734	n
17	0.0812	0.0658	0.0734	0.0730	0.0599	n
18	0.102	0.103	0.0615	0.0993	0.0956	n
19	0.0737	0.0919	0.0828	n	0.0718	n
20	0.0753	n	0.0754	n	0.0732	n
Mean	0.0793	0.0832	0.0792	0.0841	0.0797	n
S.D.	0.0123	0.0125	0.0123	0.0178	0.0126	n

n : No measurement was made because orange killifish died.

Two weights of fish at 0-day and 21-day in each test group were not derived from the same fish.

Table 6. Growth rate(%) of fish weight

No.	Observed concentration (mg/L)					
	Control	0.777	1.75	3.47	6.68	15.0
1	-0.018	0.54	1.7	-0.12	1.6	n
2	-0.40	1.5	0.47	-0.75	0.40	n
3	0.20	-0.37	2.1	-0.22	0.28	n
4	-0.043	-0.039	-0.092	1.3	-1.2	n
5	1.2	-0.39	-1.6	0.22	-0.23	n
6	1.2	-0.54	-0.11	0.065	0.27	n
7	-0.64	1.3	0.30	-0.34	1.4	n
8	1.7	1.2	1.2	0.12	0.10	n
9	0.72	-0.73	0.95	-0.22	-1.8	n
10	-0.96	1.7	-0.72	-0.47	0.77	n
11	-0.63	1.2	-0.41	1.3	-1.6	n
12	-0.96	-0.64	0.64	0.96	0.78	n
13	-0.48	-1.6	0.44	0.053	-0.95	n
14	0.55	-0.54	-1.3	1.2	1.0	n
15	1.1	0.064	0.33	-0.35	0.87	n
16	-0.16	0.76	-0.80	0.58	1.7	n
17	0.72	-1.9	1.5	-0.84	-0.33	n
18	0.084	1.8	-0.18	1.3	1.1	n
19	-0.39	-0.015	1.6	0.76	n	n
20	1.7	0.81	n	n	n	n
Mean	0.23	0.21	0.32	0.23	0.23	n
S.D.	0.84	1.1	1.0	0.71	1.1	n

n : No measurement was made because orange killifish died.

The values were calculated from the data shown in Table 5.

Table 7. Temperature of media during 21-day flow-through exposure of orange killifish (*Oryzias latipes*) to dichlorobromomethane

Observed concentration (mg/L)	Temperature (°C)						
	0-day	4-day	7-day	11-day	14-day	18-day	21-day
Control	23.6	23.3	23.3	23.3	23.3	23.3	23.6
0.777	23.8	23.5	23.0	23.3	23.4	23.3	23.7
1.75	23.9	23.5	23.0	23.2	23.3	23.2	23.7
3.47	23.9	23.7	23.5	23.4	23.5	23.3	23.7
6.68	24.0	23.7	23.7	23.4	23.6	23.3	23.7
15.0	24.0	23.6	23.1	23.4	23.6	n	n

n : No measurement was made because all orange killifish died at this observation time.

Table 8. Dissolved oxygen concentrations during 21-day flow-through exposure of orange killifish (*Oryzias latipes*) to dichlorobromomethane

Observed concentration (mg/L)	Dissolved oxygen concentration (mg/L)						
	0-day	4-day	7-day	11-day	14-day	18-day	21-day
Control	8.1	7.6	7.4	8.3	8.0	7.3	7.8
0.777	8.1	7.6	7.4	8.1	7.9	7.2	7.6
1.75	8.1	7.5	7.4	8.1	7.8	7.2	7.5
3.47	7.9	7.6	7.6	7.8	7.8	7.2	7.5
6.68	7.8	7.4	7.4	8.0	7.8	7.4	7.6
15.0	7.9	7.5	7.2	7.6	7.8	n	n

n : No measurement was made because all orange killifish died at this observation time.

Table 9. pH values during 21-day flow-through exposure of orange killifish (*Oryzias latipes*) to dichlorobromomethane

Observed concentration (mg/L)	pH						
	0-day	4-day	7-day	11-day	14-day	18-day	21-day
Control	7.56	7.61	7.40	7.21	7.50	7.46	7.29
0.777	7.59	7.76	7.45	7.27	7.59	7.26	7.29
1.75	7.61	7.82	7.48	7.35	7.63	7.22	7.35
3.47	7.61	7.84	7.49	7.29	7.58	7.24	7.34
6.68	7.61	7.85	7.55	7.30	7.63	7.25	7.34
15.0	7.61	7.87	7.52	7.30	7.64	n	n

n : No measurement was made because all orange killifish died at this observation time.

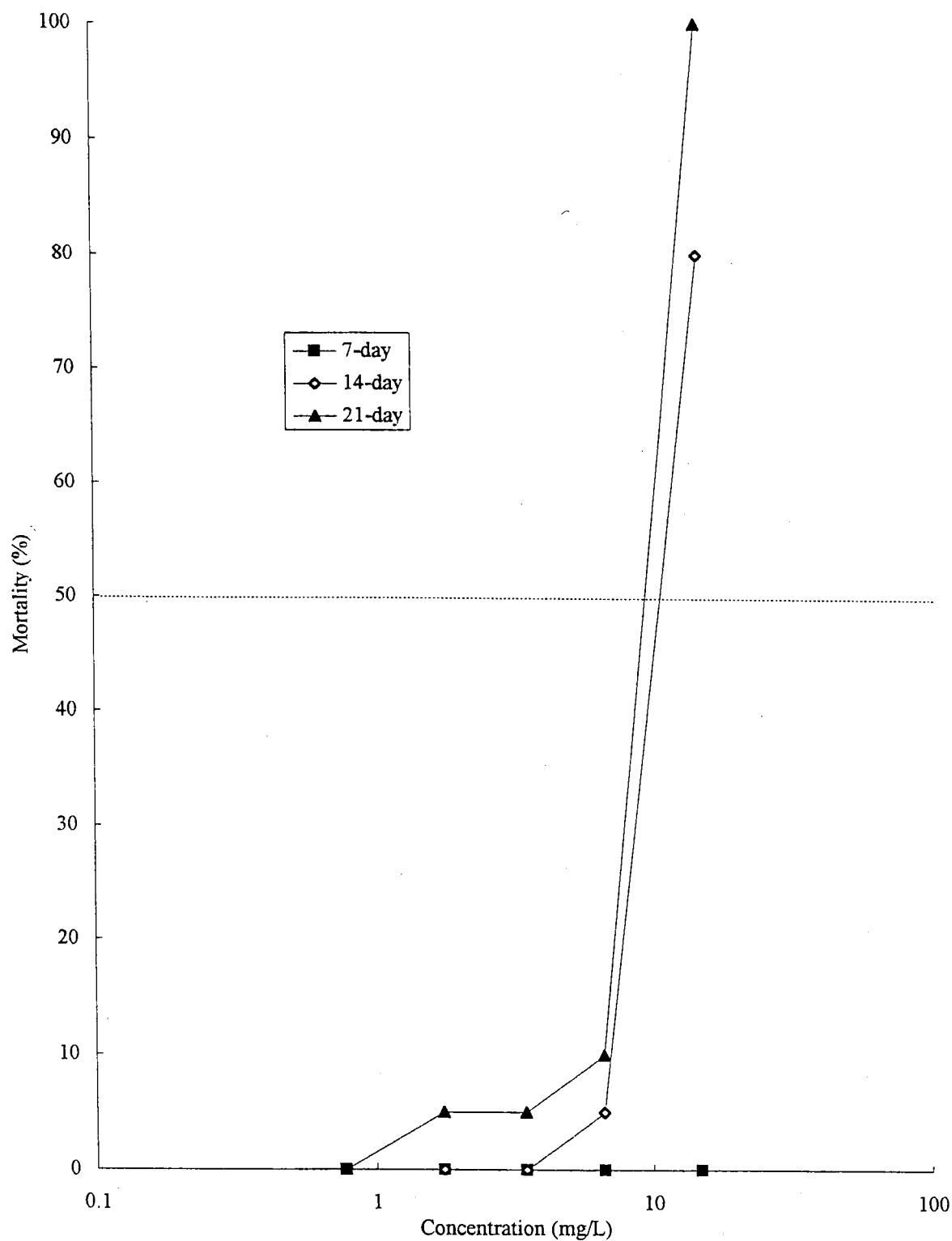


Figure 1. Concentration-toxicity curve of dichlorobromomethane in orange killifish (*Oryzias latipes*) based on observed concentrations.

付属資料－1

希釈水の水質
(全 2 頁)

Appendix 1. Water quality of dilution water

Parameter	Concentration	Lower limit
	1995.Nov.28	of detection
pH	6.9	
COD (mg/L)	0.2	
Coliform group bacteria (MPN/100mL)	0	
Total phosphorus (mg/L)	0.03	
Total mercury (mg/L)	N.D.	0.0005
Copper (mg/L)	N.D.	0.005
Cadmium (mg/L)	N.D.	0.005
Zinc (mg/L)	0.01	0.01
Lead (mg/L)	N.D.	0.005
Aluminium (mg/L)	N.D.	0.1
Nickel (mg/L)	N.D.	0.01
Total chromium (mg/L)	N.D.	0.02
Manganese (mg/L)	0.13	0.01
Tin (mg/L)	N.D.	0.5
Iron (mg/L)	0.02	0.01
Cyanide (mg/L)	N.D.	0.1
Free chlorine (mg/L)	N.D.	0.01
Bromide ion (mg/L)	N.D.	0.1
Fluoride (mg/L)	N.D.	0.15
Sulfide ion (mg/L)	N.D.	0.1
Ammonia nitrogen (mg/L)	0.01	
Arsenic (mg/L)	N.D.	0.002
Selenium (mg/L)	N.D.	0.002
Evaporation residue (mg/L)	118	
Electric conductivity (μ S/cm)	147	
Total hardness (as CaCO ₃) (mg/L)	35.5	
Alkalinity (mg/L)	21.0	
Sodium (mg/L)	12.85	
Potassium (mg/L)	3.55	
Calcium (mg/L)	9.2	
Magnesium (mg/L)	3.06	

Appendix 1. (continued)

Parameter		Concentration	Lower limit of detection
		1995.Nov.28	
1,2-Dichloropropane	(mg/L)	N.D.	0.006
Diazinon	(mg/L)	N.D.	0.0005
Isoxathion	(mg/L)	N.D.	0.0008
Fenitrothion (MEP)	(mg/L)	N.D.	0.0003
Isoprothiolane	(mg/L)	N.D.	0.004
Oxine copper	(mg/L)	N.D.	0.004
Chlorothalonil (TPN)	(mg/L)	N.D.	0.004
Propyzamide	(mg/L)	N.D.	0.0008
EPN	(mg/L)	N.D.	0.0006
Dichlorvos (DDVP)	(mg/L)	N.D.	0.001
Fenobucarb (BPMC)	(mg/L)	N.D.	0.002
Iprobenfos (IBP)	(mg/L)	N.D.	0.0008
Chlornitrofen (CNP)	(mg/L)	N.D.	0.0005
Thiram	(mg/L)	N.D.	0.0006
Simazine (CAT)	(mg/L)	N.D.	0.0003
Benthiocarb	(mg/L)	N.D.	0.002
PCB	(mg/L)	N.D.	0.0005

N.D. : not detected

付属資料－2

試験液の分析方法及び分析チャート

(全 11 頁)

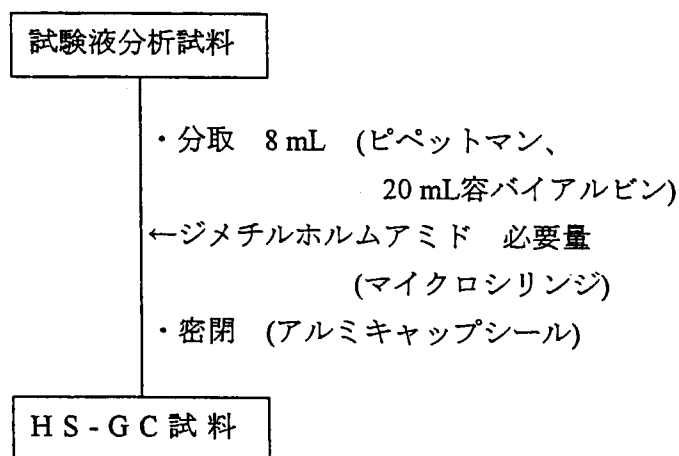
試 験 名 : 魚類延長毒性試験
被験物質物質名 : ジクロロブロモメタン

1) 試験液の分析方法

① 試験液の前処理操作

混合した溶液は、そのままもしくは蒸留水で希釈して、以下のフロースキームに従いヘッドスペース - ガスクロマトグラフィー(HS-GC)によって分析した。

フロースキーム



最終定容溶液中の被験物質濃度は、クロマトグラム上の被験物質のピーク面積を濃度既知の標準溶液のピーク面積と比較し、比例計算して求めた。

② 被験物質溶液の調製

被験物質 100 mg を正確にはかりとり、ジメチルホルムアミドに溶解して 1,000 mg/L の被験物質溶液を調製した。これをジメチルホルムアミドで希釈して 10 及び 100 mg/L の被験物質溶液を調製した。

③ 標準溶液の調製

分析試料中の被験物質濃度を求めるための標準溶液の調製は次のようにして行った。20 mL 容バイアルビンに蒸留水 8 mL を添加し、これに 1,000 mg/L の被験物質溶液を 40 μ L 添加した後、ただちにアルミキャップシールを行い、5.0 mg/L の標準溶液を調製した。

2) GCの分析条件

ヘッドスペース オートサンプラー条件

・機 器	PERKIN ELMER Head Space Sampler HS40 PERKIN ELMER 製
・サンプル加熱温度	80℃
・加 温 時 間	60 分
・ニードル温度	140℃
・トランスファー温度	150℃

ガスクロマトグラフ条件

・機 器	HP5890 Series -II (機器 No. GC-45) HEWLETT PACKARD 製
・検 出 器	水素炎イオン化検出器 (FID)
・検 出 器 温 度	250℃
・カ ラ ム	NeutraBond-1 (0.25 mmID×50 m)
・カ ラ ム 温 度	40℃ (2 min) → 200℃ (2 min)
・昇 温 速 度	10℃/min
・試料導入部温度	200℃
・キャリアーガス	ヘリウム 160 kPa
・水 素	1.2 Kg/cm ²
・空 気	2.0 Kg/cm ²
・スプリット比	1:50
・感 度	レンジ 1 V

3) 検量線の作成

1) ③の標準溶液の調製と同様にして5.0及び25.0 mg/Lの標準溶液を調製した。また、10及び100 mg/Lの被験物質溶液より、それぞれ0.20及び1.0 mg/Lの標準溶液を調製した。これらを分析機器の定量条件に従って分析し、得られたそれぞれのクロマトグラム上のピーク面積と濃度により、検量線を作成した。

Content of figure

- Figure 1. Calibration curve of dichlorobromomethane by GC analysis.
- Figure 2-1. Example of chromatogram.
(standard solution of 5.0 mg/L, 0-day)
- Figure 2-2. Example of chromatogram.
(fresh test solution of 5.0 mg/L as nominal concentration, 0-day)
- Figure 2-3. Example of chromatogram.
(fresh test solution of control, 0-day)
- Figure 2-4. Example of chromatogram.
(standard solution of 5.0 mg/L, 21-day)
- Figure 2-5. Example of chromatogram.
(expired test solution of 5.0 mg/L as nominal concentration, 21-day)
- Figure 2-6. Example of chromatogram.
(expired test solution of control, 21-day)

Test No. 91510

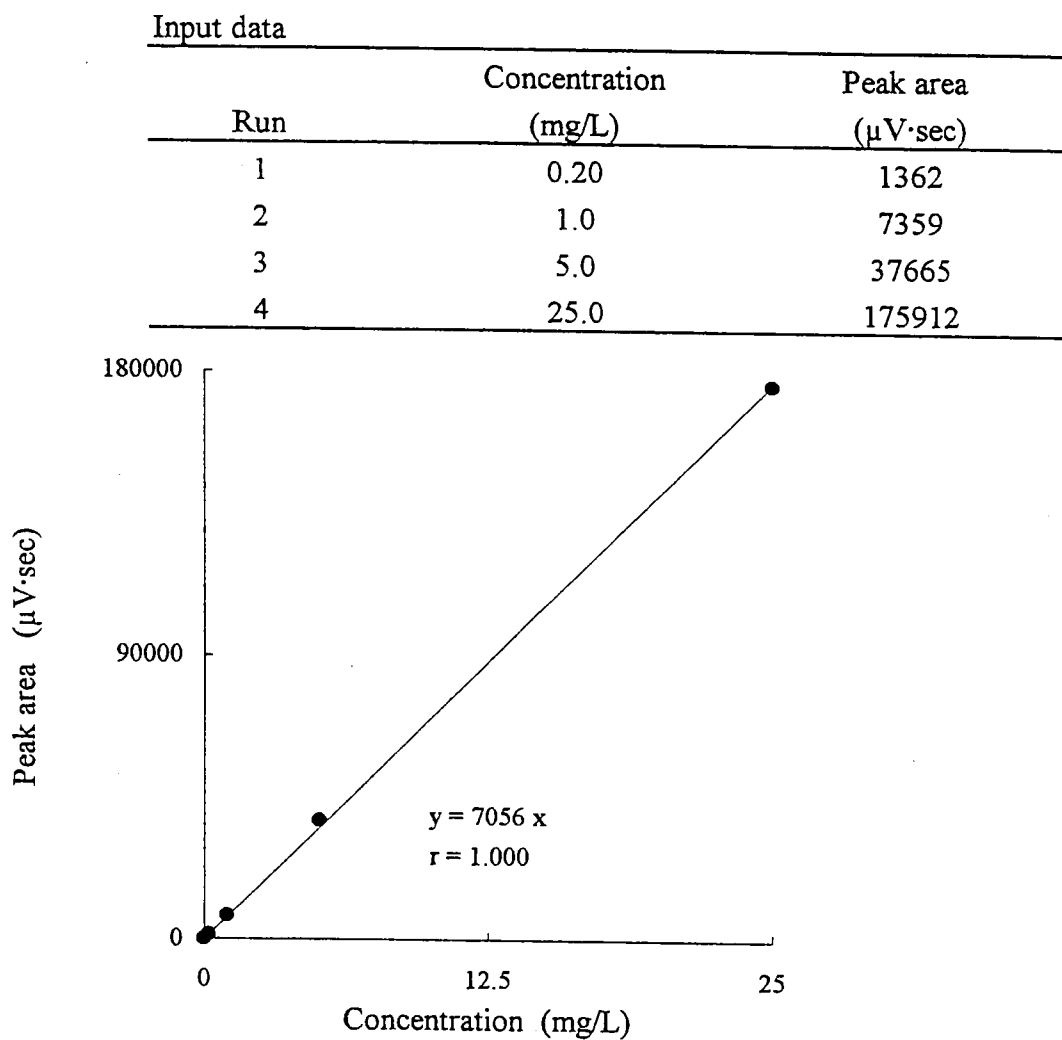


Figure 1. Calibration curve of dichlorobromomethane by GC analysis.

1996 1-25. [REDACTED]

1996. 3. 1

CLASS-GC10 システム番号=2 Ch=1 検体番号=219 データ=91510HIS.D01 96/03/01 07:55:02

サンプル名 : DCBM/std.

ID : 5

サンプル量 : 100

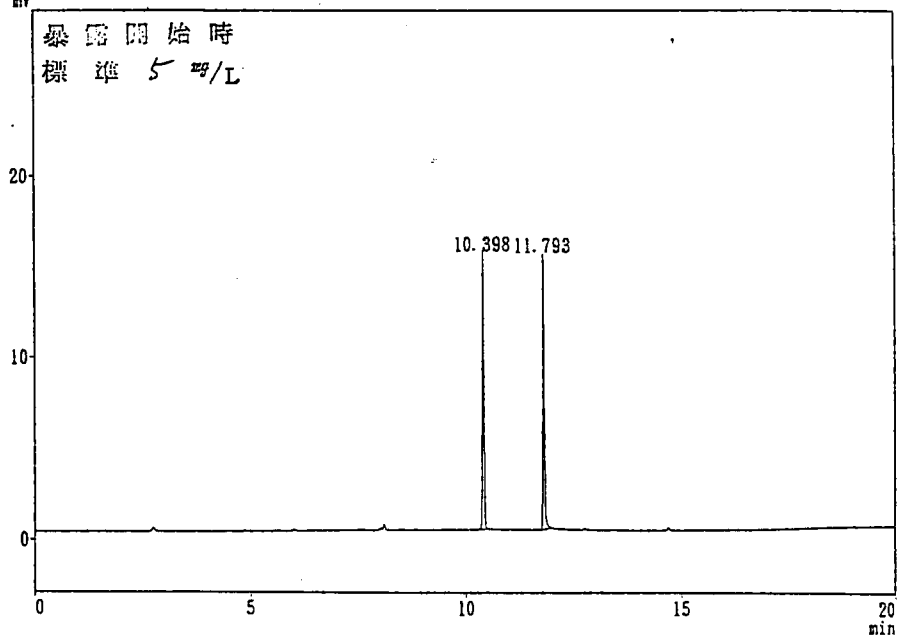
タイプ : 標準試料

検出器 : WFID

オペレータ名:

試験番号 91510

*** クロマトグラム *** ファイル名:91510HIS.C01



*** ピークレポート ***

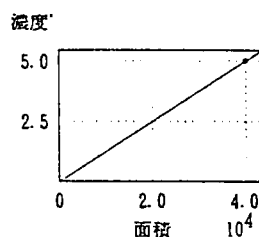
PKNO	TIME	AREA (μV.Sec)	HEIGHT	WK	IDNO	CONC	NAME
1	10.398	39917	15311		1		DCBM
2	11.793	38993	15133				
		78910	30444				

*** カリブレーション結果 ***

** ID テーブル **

IDNO	成分名	時間	濃度	F1	F2
1	DCBM	10.39	5	0.000125259	

** 検量線 **



IDNO: 1
NAME: DCBM
TIME: 10.39

濃度 面積
(1) 5 39917

RF1 RF2
(1) 0.000125259 0

r2 = 1

Figure 2-1. Example of chromatogram.
(standard solution of 5.0 mg/L, 0-day)

1996.3.1

CLASS-GC10 システム番号=2 Ch=1 ヴォルト番号=235 データ=91510HIC.D00 96/03/01 09:40:44

サンプル名 : DCBM/F3/0d

ID : 5

サンプル量 : 100

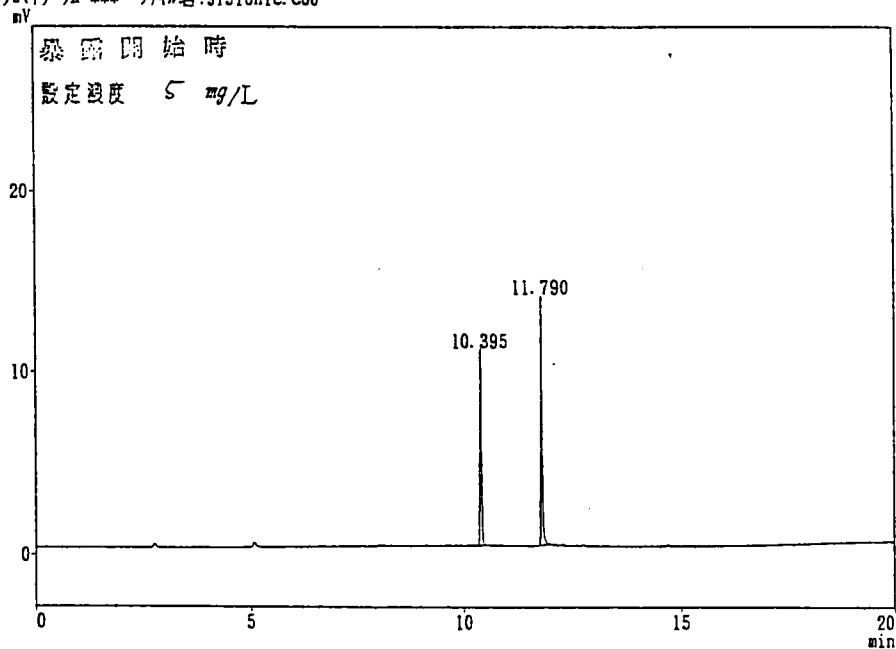
タイプ : 未知試料

検出器 : VFID

オペレータ名:

試験番号 91510

*** クロマトグラム *** ファイル名:91510HIC.C00



*** ピークレポート ***

PKNO	TIME	AREA(μV.Sec)	HEIGHT	WK	IDNO	CONC	NAME
1	10.395	27873	10776		1	3.4913	DCBM
2	11.790	35303	13681				

63176	24457	3.4913
-------	-------	--------

Figure 2-2. Example of chromatogram.

(fresh test solution of 5.0 mg/L as nominal concentration, 0-day)

1996. 3. 1

CLASS-GC10 システム番号=2 Ch=1 ポート番号=247 データ=91510H1Z.D00 96/03/01 11:26:26

サンプル : DCBM/F6/0d

ID : 対照区

サンプル量 : 100

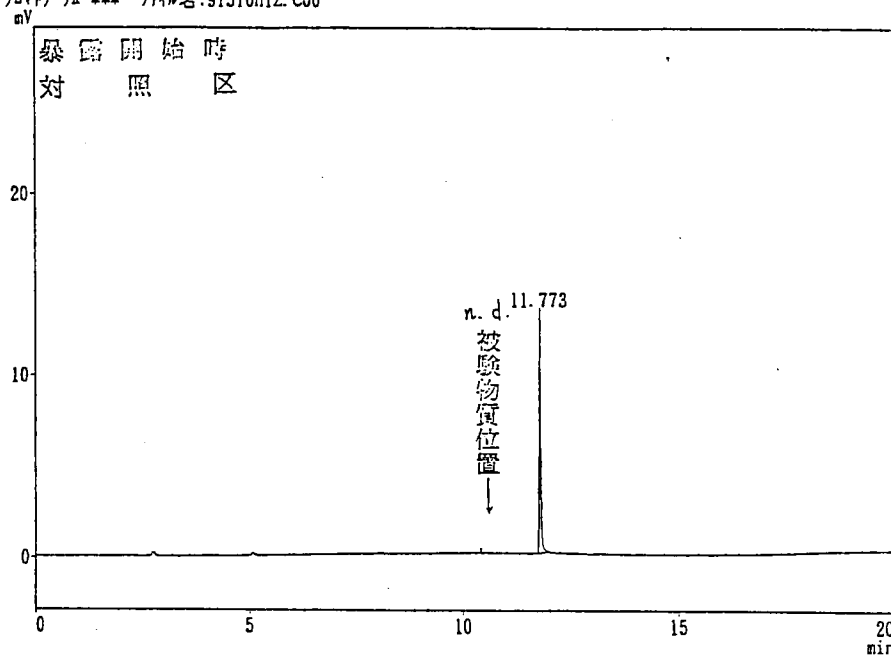
タイプ : 未知試料

検出器 : FID

オペレータ名 :

試験番号 91510

*** クロマトグラム *** ファイル名:91510H1Z.C00



*** ヒートマップ ***

PKNO	TIME	AREA (uV.Sec)	HEIGHT	WK	IDNO	CONC	NAME
1	11.773	35075	13450				
		35075	13450				

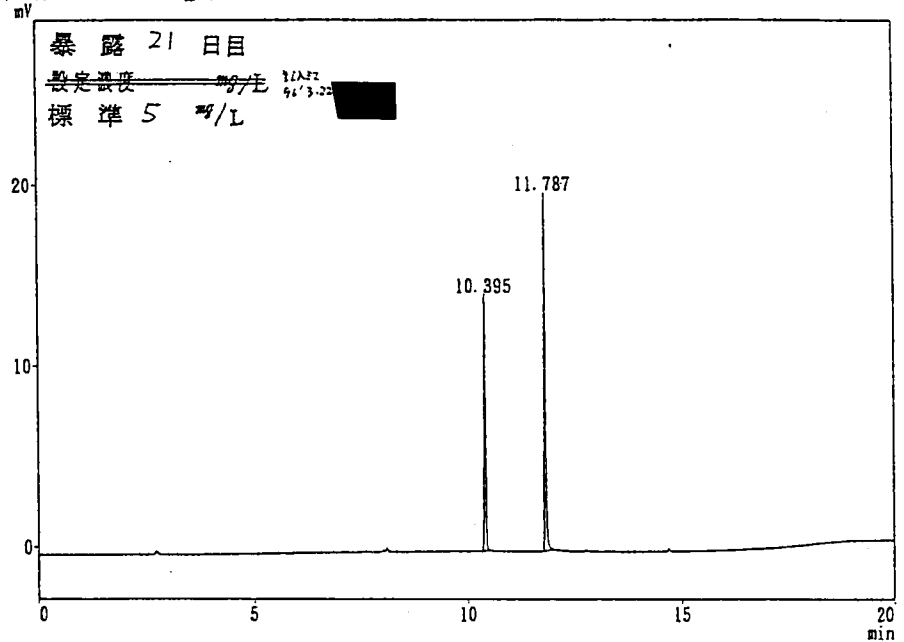
Figure 2-3. Example of chromatogram.
(fresh test solution of control, 0-day)

1996.3.22

CLASS-GC10 システム番号=2 Ch=1 レポート番号=668 データ=91510H7S.D01 96/03/21 15:09:18
 サンプル : DCBM/std.
 ID : 5
 サンプル量 : 100
 タイプ : 標準試料
 検出器 : VFID
 分析者名: [REDACTED]

試験番号 91510

*** クロマトグラム *** ファイル名:91510H7S.C01

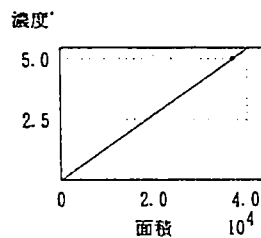


PKNO	TIME	AREA (μV·Sec)	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	10.395	37095	14246		1		DCBM
2	11.787	50300	19793				
		87394	34039				

*** キャリブレーション結果 ***

ID	成分名	時間	濃度	F1	F2
1	DCBM	10.40	5	0.00013479	

** 検量線 **



IDNO: 1
 NAME: DCBM
 TIME: 10.4

濃度	面積
(1) 5	37095
RF1	RF2
(1) 0.00013479	0
r2 = 1	

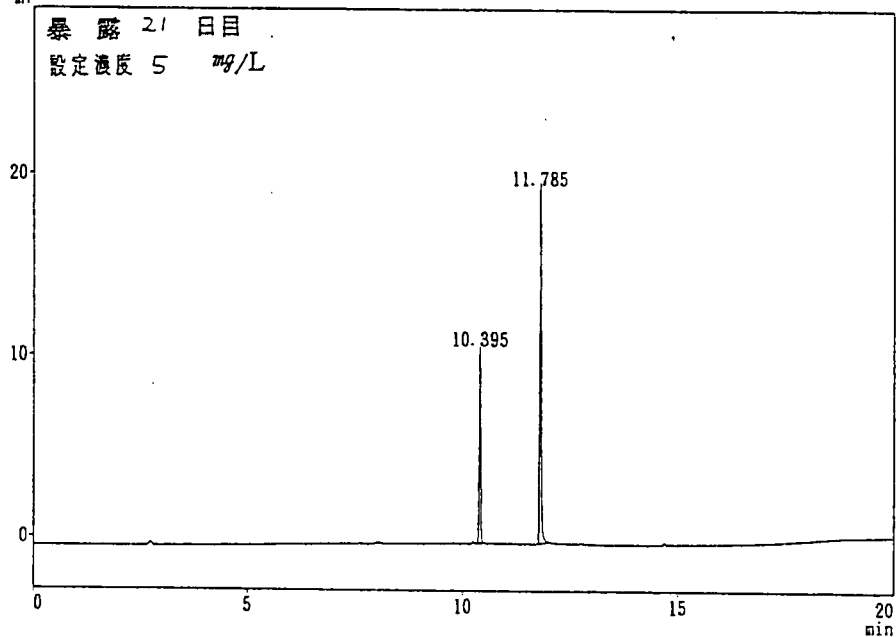
Figure 2-4. Example of chromatogram.
 (standard solution of 5.0 mg/L, 21-day)

1996. 3. 22

CLASS-GC10 システム番号=2 Ch=1 レポート番号=670 データ=91510H7C.D00 96/03/21 16:19:46
 サンプル : DCBM/F2/21d
 ID : 5
 サンプル量 : 100
 タイプ : 未知試料
 検出器 : FID
 サンプル名: [REDACTED]

試験番号 91510

*** クロマトグラム *** ファイル名:91510H7C.C00



*** ピークレポート ***

PKNO	TIME	AREA(μV·Sec)	HEIGHT	WK	IDNO	CONC	NAME
1	10.395	28146	10841		1	3.7939	DCBM
2	11.785	50339	19861				
		78485	30702			3.7939	

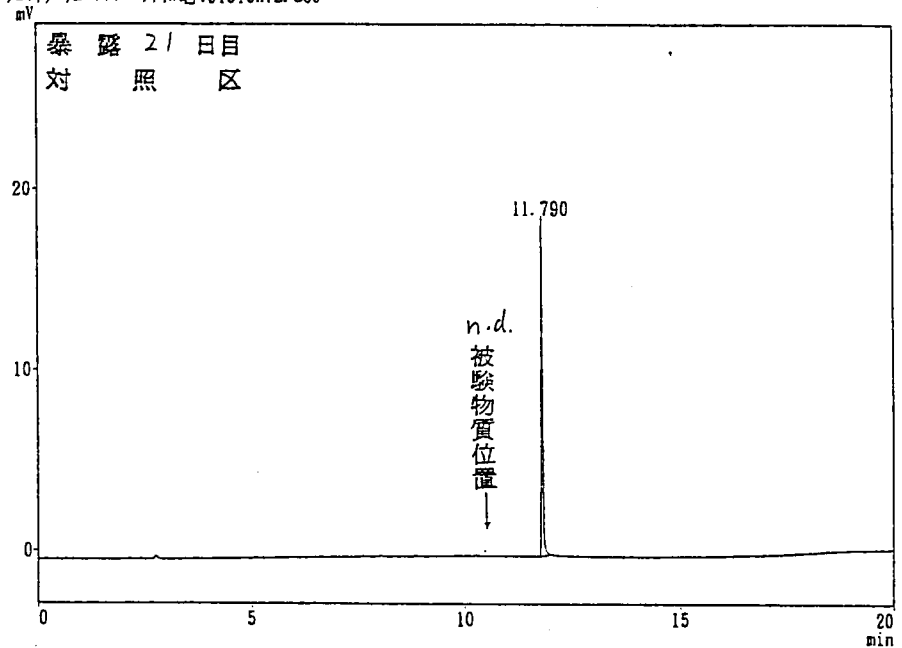
Figure 2-5. Example of chromatogram.
 (expired test solution of 5.0 mg/L as nominal concentration, 21-day)

CLASS-GC10 システム番号=2 Ch=1 レポート番号=673 データ=91510H7Z.D00 96/03/21 18:05:28
 サンプル : DCBM/F5/21d
 ID : 対照区
 サンプル量 : 100
 タイプ : 未知試料
 検出器 : FID
 サンプル名: [REDACTED]

1996.3.22

試験番号 91510

*** プロット *** ファイル名:91510H7Z.C00



*** ヒートマップ ***

PKNO	TIME	AREA (uV·Sec)	HEIGHT	WK	IDNO	CONC	NAME
1	11.790	48049	18796				
		48049	18796				

Figure 2-6. Example of chromatogram.
 (expired test solution of control, 21-day)