

環境省殿

本写しは原本と相違ありません

三菱化学メディエンス㈱  
横浜研究センター 試験責任者

## 最 終 報 告 書

プロモジクロロメタン の

オオミジンコ (*Daphnia magna*) に対する繁殖試験

(試験番号：A090245)

2010年 2月 3日

三菱化学メディエンス株式会社

## 陳 述 書

三菱化学メディエンス株式会社 メディケム事業本部

安科研事業部 横浜研究センター

試 験 委 託 者 : 環境省

表 題 : プロモジクロロメタン のオオミジンコ (*Daphnia magna*) に  
対する繁殖試験

試 験 番 号 : A 0 9 0 2 4 5

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、本報告書はその結果を正しく記載したものである。

また、本試験は下記のG L Pに従って実施したものである。

「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 薬食発第 1121003 号, 平成 15・11・17 製局第 3 号, 環保企発第 031121004 号, 最終改正: 平成 20 年 7 月 4 日)

2 0 1 0 年 2 月 3 日

試験責任者

[Redacted]

[Redacted]

## 信 頼 性 保 証 書

三菱化学メディエンス株式会社 メディケム事業本部

安科研事業部 横浜研究センター

試験委託者 : 環境省

表 題 : プロモジクロロメタン  
のオオミジンコ (*Daphnia magna*) に対する繁殖試験

試験番号 : A090245

本試験は下記のG L Pに従って実施され、最終報告書が生データを反映していることを保証する。

「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 薬食発第 1121003号, 平成15・11・17製局第3号, 環境企発第 031121004号, 最終改正: 平成20年7月4日)


監査および査察の実施事項, 実施日および報告日を以下に示す。


実施事項	実施日	運営管理者および 試験責任者への報告日
試験計画書監査		
試験計画書草案	2009年11月18日	2009年11月19日
試験計画書	2009年11月20日	2009年11月24日
変更書(変更番号: 01)	2009年12月2日	2009年12月2日
変更書(変更番号: 02)	2010年1月4日	2010年1月4日
試験の査察		
試験液の調製	2009年11月25日	2009年11月25日
ミジンコの投入	2009年11月25日	2009年11月25日
試験液の分析	2009年11月25日	2009年11月25日
試験液の調製	2009年12月4日	2009年12月4日
ミジンコの投入	2009年12月4日	2009年12月4日
ミジンコの観察, 幼体の計数	2009年12月15日	2009年12月15日
最終報告書監査		
最終報告書草案	2010年1月27日	2010年1月29日
最終報告書	2010年2月3日	2010年2月3日

信頼性保証部門主担当 : 2010年2月3日

## 試験実施概要

1. 表 題 : ブロモジクロメタン のオオミジンコ (*Daphnia magna*) に対する繁殖試験  
(試験番号 : A090245)
2. 試験目的 : 被験物質のオオミジンコ (*Daphnia magna*) に対する繁殖試験を行い、21 日間の最小作用濃度 (LOEC) と最大無作用濃度 (NOEC) を求める。
3. 適用ガイドライン : OECD Guidelines for Testing of Chemicals 211 (2008)  
“*Daphnia magna* Reproduction Test”
4. 適用 G L P : 「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 薬食発第 1121003 号, 平成 15・11・17 製局第 3 号, 環企発第 031121004 号, 最終改正 : 平成 20 年 7 月 4 日)
5. 試験委託者 : 環境省  
東京都千代田区霞が関一丁目 2 番 2 号
6. 試験受託者 : 三菱化学メディエンス株式会社  
東京都港区芝浦四丁目 2 番 8 号
7. 試験施設 : 三菱化学メディエンス株式会社 メディケム事業本部  
安科研事業部 横浜研究センター  
神奈川県横浜市青葉区鴨志田町 1000 番地
8. 試験責任者 : XXXXXXXXXX  
生態影響評価グループ

9. 試験担当者：   
(試験実施)

  
(分析実施)

10. 試験日程： 試験開始日 2009年11月20日  
暴露開始日(1回目) 2009年11月25日  
暴露中止日 2009年12月 2日\*  
暴露開始日(2回目) 2009年12月 4日  
暴露終了日 2009年12月25日  
試験終了日 2010年 2月 3日

\*対照区および濃度区において親ミジンコの白色化、死亡が認められ、暴露6日目で濃度区1での親ミジンコの死亡率が30%となった。最大無作用濃度(NOEC)の決定が不可能となったため、この暴露を中止し不採用とした。

11. 保管： 下記の試資料を、当施設の試資料保管施設に保管する。

- 1) 試験計画書
- 2) 最終報告書
- 3) 生データ
- 4) 被験物質
- 5) 対照物質
- 6) その他必要なもの

## 目 次

	頁
要 約	7
1 材料	9
1.1 被験物質	9
1.1.1 名称, 構造式および物理化学的性状	9
1.1.2 供試試料	10
1.1.3 保管法および安定性の確認	10
1.2 試験用水	10
1.3 供試生物	10
1.4 試験容器および恒温槽等	11
2 方法	12
2.1 試験方法	12
2.1.1 試験条件	12
2.1.2 試験濃度の設定	12
2.1.3 試験液の調製	13
2.1.4 試験液の分析	13
2.1.5 試験操作	13
2.2 試験結果の評価	14
2.2.1 結果の算出	14
2.2.2 試験の有効性	16
3 結果および考察	17
3.1 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
3.2 試験環境の測定および観察	17
3.3 試験液中の被験物質濃度	17
3.4 親ミジンコおよび産出幼体の観察	17
3.5 親ミジンコの半数致死濃度 (LC50)	18
3.6 50%繁殖阻害濃度 (EC50)	18
3.7 最大無作用濃度 (NOEC) および最小作用濃度 (LOEC)	18
3.8 試験の有効性	19
Table 1~13	20~30
Figure 1,2	26, 28
付属資料-1 赤外吸収スペクトル	31~32
付属資料-2 試験水の組成	33~34
付属資料-3 試験液の調製	35~36
付属資料-4 試験液の分析	37~45
付属資料-5 ミジンコの観察結果	46~52
付属資料-6 統計結果	53~55
参考資料 被験物質の濃度減少に関する検討	56~57

## 要 約

試験委託者： 環境省

表 題： ブロモジクロロメタンのオオミジンコ (*Daphnia magna*) に対する繁殖試験

試験番号： A090245

試験方法： 本試験は、OECD Guidelines for Testing of Chemicals 211 (2008) “*Daphnia magna* Reproduction Test” に準拠して実施した。

- 1) 供試生物： オオミジンコ (*Daphnia magna*)
- 2) 試験用水： Elendt M4 medium
- 3) 暴露期間： 21 日間
- 4) 暴露方式： 半止水式（毎日試験液の全量を交換）
- 5) 供試生物数： 10 頭／試験区（1 頭／容器）
- 6) 試験温度：  $20 \pm 1$  °C
- 7) 照明： 室内光，16 時間明（800 lux 以下）／8 時間暗
- 8) 試験濃度（設定値）：

試験区	濃度 (mg/L)
対照区	—
濃度区 1	0.30
濃度区 2	0.95
濃度区 3	3.0
濃度区 4	9.5
濃度区 5	30

公比 3.2

- 9) 分析方法： ガスクロマトグラフ質量分析（GC/MS）法

結 果：以下の結果は、被験物質濃度の測定値をもとに算出した。

21日間の結果		(95%信頼限界)
親ミジンコの半数致死濃度 (LC50) :	>19.7 mg/L	( 算出不可 )
50%繁殖阻害濃度 (EC50) :	11.3 mg/L	( 10.1~12.7 mg/L )
最大無作用濃度 (NOEC) :	2.17 mg/L	( - )
最小作用濃度 (LOEC) :	6.89 mg/L	( - )



## 1 材料

## 1.1 被験物質

## 1.1.1 名称, 構造式および物理化学的性状

被 験 物 質 の 名 称	ブロモジクロロメタン <sup>*1</sup>		
別 名	(略称: BDCM <sup>*2</sup> )		
C A S 番 号	75-27-4 <sup>*1</sup>		
構 造 式 又 は 示 性 式	$  \begin{array}{c}  \text{Cl} \quad \text{Cl} \\  \diagdown \quad \diagup \\  \text{C} \\    \\  \text{Br}  \end{array}  $ <sup>*3</sup>		
分 子 量	163.829 <sup>*3</sup>		
試 験 に 供 し た 物 質 の 純 度 ( % )	97.8 (GC)		
試 験 に 供 し た 物 質 の ロ ッ ト 番 号	FKHGA		
不 純 物 の 名 称 及 び 含 有 率	—		
蒸 気 圧	6.7kPa/20℃		
対 水 溶 解 度	不溶		
1-オクタノール/水分配係数	1.88		
融 点	-57℃		
沸 点	90℃		
常 温 に お け る 性 状	無色透明液体		
安 定 性	光に暴露すると徐々に着色する		
溶 媒 に 対 す る 溶 解 度 等	溶 媒	溶 解 度	溶 媒 中 の 安 定 性
	エタノール	可溶	—
	エーテル	可溶	—
	アセトン	可溶	—
	ベンゼン	可溶	—

上記内容は供給者提供資料による。ただし \* の内容は以下の通り。

\*1 試験委託者提供資料による。

\*2 当施設にて決定。

\*3 JSTの有機化合物辞書DB「日本化学物質辞書」検索サービス  
(<http://nikkajiweb.jst.go.jp>) による。

## 1.1.2 供試試料

供給者： XXXXXXXXXX

## 1.1.3 保管法および安定性の確認

被験物質は試験期間中、当施設の試験物質保管用冷蔵庫（保管条件：冷蔵，遮光，窒素封入）内に保管した。

実験終了後に、保管した被験物質の赤外吸収スペクトルを測定した。得られたスペクトルは実験開始前に測定したスペクトルと一致したことから、被験物質は保管中安定であったと判断した。赤外吸収スペクトルを付属資料－1に示す。

（装置）フーリエ変換赤外分光分析装置：Nicolet 製 AVATAR 320 型

## 1.2 試験用水

Elendt M4 medium（OECD Guidelines for Testing of Chemicals 211（2008）“*Daphnia magna* Reproduction Test”に記載されている調製水）を十分暴気し、 $20\pm 1^{\circ}\text{C}$ に調整して使用した。組成を付属資料－2に示す。理論的硬度は  $250\text{ mg CaCO}_3/\text{L}$  である。

## 1.3 供試生物

- 1) 一般名： オオミジンコ
- 2) 学名： *Daphnia magna*
- 3) 入手先： 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： 1995 年 7 月 18 日（以降，当施設にて継代飼育）
- 5) 感受性： 定期的（約 6 ヶ月毎）に基準物質（重クロム酸カリウム，試薬特級）による急性遊泳阻害試験を行い，オオミジンコの感受性を調べている。  
48 時間半数遊泳阻害濃度（48 時間 EC50）を以下に示す。  
最新の結果：  
0.66 mg/L（95%信頼限界：0.62～0.70 mg/L）  
暴露期間：2009 年 7 月 8 日～2009 年 7 月 10 日  
1998 年 6 月以降の結果：  
平均値±標準偏差：0.73±0.13 mg/L，n=23  
（最小値～最大値：0.57～1.02 mg/L）
- 6) 生育段階： 24 時間以内齢の幼体（雌）

## 7) 供試生物を得るための親ミジンコの飼育条件：

飼育水： Elendt M4 medium  
 飼育密度： 1 頭／80 mL (25 頭／2 L) 以下  
 飼育容器： 2 L ガラス製ビーカー  
 水温： 20±1℃  
 溶存酸素濃度： 飽和酸素濃度の 60%以上  
 pH： 6.0～9.0  
 照明： 室内光, 16 時間明 (800 lux 以下) ／8 時間暗  
 飼育期間： 最長 28 日間  
 餌： *Chlorella vulgaris* (単細胞緑藻類)  
 給餌量： 6 mg C (有機炭素含量) ／2 L／日  
 飼育水の交換： 飼育開始後 5 日以内に 1 回, その後は週 3 回交換  
 幼体除去： 幼体が産出された日に除去

## 8) 供試生物 (24 時間以内齢の幼体) の採取方法：

暴露開始日に産出された 24 時間以内齢の幼体 (雌) を暴露に用いた。暴露開始日に、  
 親ミジンコについて以下の項目を満たすことを確認した。

週齢： 3～4 週齢 (飼育期間：2009 年 11 月 10 日～2009 年 12 月 4 日)

暴露開始前 2 週間の死亡率：20%以内

異常： 観察されず

最初の幼体産出日 (初産日)：12 日目以内

## 1.4 試験容器および恒温槽等

- 1) 試験容器： 100 mL ガラス製ビーカー (蓋：テフロンシート)
- 2) 恒温槽： 塩ビ製水槽
- 3) 恒温循環器： タイテック製 クールユニット CL-80R 型
- 4) 水温計： ハンナ製 チェックテンプ
- 5) 溶存酸素計： 電気化学計器製 DOL-10 型
- 6) pH 計： 東亜電波工業製 HM-40V 型
- 7) 硬度測定： ハック製 デジタルタイトレーター
- 8) 電子天秤：
  - メトラー製 AG204 型
  - メトラー製 AE163 型
  - メトラー製 AB204-S 型
  - メトラー製 PB3002 型

## 2 方法

### 2.1 試験方法

本試験は、OECD Guidelines for Testing of Chemicals 211 (2008) “*Daphnia magna* Reproduction Test” に準拠して実施した。

#### 2.1.1 試験条件

- 1) 暴露期間： 21 日間
- 2) 暴露方式： 半止水式（毎日、試験液の全量を交換）
- 3) 試験液量： 80 mL／容器
- 4) 連数： 10 容器／試験区
- 5) 供試生物数： 10 頭／試験区（1 頭／容器）
- 6) 試験温度：  $20 \pm 1^{\circ}\text{C}$
- 7) 溶存酸素濃度： 3 mg/L 以上，エアレーションなし
- 8) pH： 6.0～9.0（変動は 1.5 未満），調整なし
- 9) 硬度： 250 mg  $\text{CaCO}_3$  /L 以下
- 10) 照明： 室内光，16 時間明（800 lux 以下）／8 時間暗
- 11) 餌の種類： *Chlorella vulgaris*（単細胞緑藻類）
- 12) 給餌量： 0.15 mg C（有機炭素含量）／頭／日

#### 2.1.2 試験濃度の設定

プロモジクロロメタンのオオミジンコ急性遊泳阻害試験における48 時間 EC50 値は29 mg/L であるとの報告（環境省，化学物質の環境リスク初期評価 第7巻，2009）に基づき，本試験濃度を次のように決定した。

試験区	濃度 (mg/L)
対照区	—
濃度区 1	0.30
濃度区 2	0.95
濃度区 3	3.0
濃度区 4	9.5
濃度区 5	30

公比 3.2

### 2.1.3 試験液の調製

試験液は、付属資料－3に示す方法に従って調製した。1試験区につき10個の試験容器に、試験液をそれぞれ80 mLずつ入れた。試験液調製時における試験液の分析、試験環境の測定および観察の際は、試験容器1個を余分に用意し、試験環境測定用容器とした。

### 2.1.4 試験液の分析

試験液の分析を、以下の要領に従ってガスクロマトグラフ質量分析（GC/MS）法により行った。分析方法の詳細を付属資料－4に示す。

分析回数： 暴露開始日（0日目）と1日目、6日目と7日目、13日目と14日目、20日目と21日目の4セット（試験液調製時と換水直前または暴露終了時を1セットとする）

試料採取方法： 試験液調製時：各試験区の試験環境測定用容器の試験液の中層を採取  
換水直前および暴露終了時：各試験区1試験容器の試験液の中層を採取

### 2.1.5 試験操作

ガラスピペットを用いて供試生物を試験液に投入し、暴露開始とした。試験液の蒸散、被験物質の揮散防止のために水面をテフロンシートで覆った。暴露期間中毎日、新しく調製した試験液にガラスピペットを用いて親ミジンコを移しかえた（換水）。暴露開始後21日間で終了とした。暴露期間中、以下の要領に従って、給餌、ミジンコの観察、試験環境の測定および観察を行った。

#### 1) 給餌

頻度：毎日

#### 2) 親ミジンコの観察

頻度：毎日（換水直前および暴露終了時）

項目：生死、遊泳状態および外観の異常の有無、死亡個体があれば除去

#### 3) 産出幼体の観察

頻度：暴露開始後7日目以降毎日（換水直前および暴露終了時）

項目：幼体の生存数の計数および除去、死亡幼体、墮胎卵、休眠卵の発生等の有無の確認および除去

#### 4) 最初の幼体産出日（初産日）の記録

頻度：暴露終了時

項目：各親ミジンコにおける最初の幼体産出日（初産日）、各試験区における初産日の範囲

## 5) 試験環境の測定および観察

回数：暴露開始日（0日目）と1日目，6日目と7日目，13日目と14日目，20日目と21日目の4セット（試験液調製時と換水直前または暴露終了時を1セットとする）

試料：試験液調製時：各試験区の試験環境測定用容器の試験液

換水直前および暴露終了時：各試験区1試験容器の試験液

項目：試験液の水温，溶存酸素濃度，pH，硬度，外観

## 2.2 試験結果の評価

## 2.2.1 結果の算出

## 1) 結果の算出に用いる被験物質濃度

結果の算出は，被験物質濃度の測定値の時間加重平均値に基づいて行った。平均値の計算方法は以下の通りである。

$$Area = \frac{ConcA_n - ConcB_n}{\ln(ConcA_n) - \ln(ConcB_n)} \times Days \times Renewal\ Times$$

$$Total\ Areas = \sum_{m=1}^l Area$$

$$\overline{MC} = \frac{Total\ Areas}{Total\ Days}$$

$ConcA_n$ ： n 期間の初めの測定値  
（試験液調製時の測定値）

$ConcB_n$ ： n 期間の終わりの測定値  
（換水直前または暴露終了時の測定値）

（ $ConcA_n$  と  $ConcB_n$  の値が同じ場合は， $Area = ConcA_n \times Days \times Renewal\ Times$  とする。）

$Days$ ： n 期間の終わりの日数

$Renewal\ Times$ ：次の分析までの換水回数

$l$ ： 分析回数（セット数）

$\overline{MC}$ ： 時間加重平均値

## 2) 親ミジンコの半数致死濃度 (LC50) の算出

暴露期間中に、供試生物の 50% が死亡する被験物質濃度を半数致死濃度 (LC50) とする。

暴露終了時に、各試験区における死亡率 (%) から、以下の方法で 21 日間の半数致死濃度 (21d-LC50) を可能な限り決定した。暴露期間中の累積死亡率曲線を作成した。

最高濃度区 における死亡率	LC50 の決定方法
≥ 50%	Probit 法, Moving average 法, Binomial 法での算出結果から適切と判断されたものを採用, 可能な限り 95% 信頼限界を算出
< 50%	推定される濃度領域とする

## 3) 50% 繁殖阻害濃度 (EC50) の算出

暴露期間中に、供試生物の繁殖率を 50% 阻害する濃度を 50% 繁殖阻害濃度 (EC50) とする。

暴露終了時に、各試験区における生存親ミジンコ 1 頭当たりの平均累積産仔数 (生存幼体数,  $\Sigma F1/P$ ) を求めた。平均累積産仔数から対照区に対する各濃度区の繁殖率を求め、繁殖阻害率 % (100 - 繁殖率) を算出した。以下の方法で 21 日間の 50% 繁殖阻害濃度 (21d-EC50) を可能な限り決定した。暴露期間中の平均累積産仔数曲線を作成した。

繁殖阻害率 の最大値	EC50 の決定方法
≥ 50%	Logistic 曲線による回帰分析 (Logit 法*) 95% 信頼限界を算出
< 50%	推定される濃度領域とする

\* : Yukms ソフトウェア Statlight 「#8 回帰分析」 (Yukms Corp, 東京)

## 4) 最大無作用濃度 (NOEC) および 最小作用濃度 (LOEC)

対照区と比べて、何ら繁殖性、親ミジンコの死亡率等に影響が認められない試験最高濃度を最大無作用濃度 (NOEC) とする。対照区と比べて、繁殖性、親ミジンコの死亡率等に影響が認められた試験最低濃度を最小作用濃度 (LOEC) とする。

暴露終了時に、各試験区における累積産仔数から、濃度区と対照区との有意差の有無を以下の統計学的手法により求め、繁殖阻害率や親ミジンコの死亡率等を含め総合的に NOEC および LOEC を決定した。

多群の比較 (対照区以外に 2 群以上ある)	
Bartlett の等分散検定	
等分散が認められる場合	等分散が認められない場合
一元配置分散分析 (ANOVA)  パラメトリックの Dunnett, Williams または Scheffe の多重比較検定	Kruskal-Wallis の検定  ノンパラメトリックの Dunnett, Williams または Scheffe の多重比較検定
Yukms ソフトウェア Statlight 「#4 多群の比較」 (Yukms Corp, 東京)	

## 5) 統計学的手法

試験結果の算出に用いた統計学的手法は、結果とともに示した。

## 2.2.2 試験の有効性

以下の条件が満たされた場合、試験を有効とみなした。

- 1) 対照区での親ミジンコの死亡率が、暴露終了時で 20% 以下であること。
- 2) 対照区において、暴露終了時に生存している親ミジンコ 1 頭当たりの平均累積産仔数 (生存幼体) が 60 頭以上であること。



### 3 結果および考察

#### 3.1 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

該当する事象はなかった。

#### 3.2 試験環境の測定および観察

試験液の水温、溶存酸素濃度、pH、硬度の測定結果および外観の観察結果をそれぞれ Table 1, Table 2, Table 3, Table 4 および Table 5 に示す。

すべての試験区において、試験液の水温は  $20 \pm 1^\circ\text{C}$ 、溶存酸素濃度は 3 mg/L 以上、pH は 6.0~9.0 (変動は 1.5 未満)、硬度は 250 mg  $\text{CaCO}_3$  /L 以下であり、いずれも試験条件の範囲内であった。試験液の外観は、すべての試験区において、暴露期間を通して無色であった。

#### 3.3 試験液中の被験物質濃度

試験液中の被験物質濃度の分析結果を Table 6 に、代表的なクロマトグラムを付属資料-4 に示す。

濃度区 1~5 の測定値 (平均値) は、それぞれ 0.211, 0.676, 2.17, 6.89 および 19.7 mg/L であり、設定値に対して低かった。また、暴露中経時的に濃度減少が認められた。その原因として、事前に行った検討から、水中からの揮散が考えられた。詳細を参考資料に示す。

#### 3.4 親ミジンコおよび産出幼体の観察

##### 1) 親ミジンコの死亡数および死亡率

親ミジンコの累積死亡数および死亡率を Table 7、累積死亡率曲線を Figure 1 に示す。

対照区および濃度区 1~5 における死亡率は、暴露終了時においてすべて 0% であった。

親ミジンコの詳細な観察結果を付属資料-5 に示す。

##### 2) 親ミジンコの遊泳状態および外観

すべての試験区において親ミジンコの遊泳異常は観察されなかった。

対照区および濃度区 1~3 では親ミジンコの外観に異常は認められなかったが、濃度区 4 および 5 では被験物質の影響と推察される白色化した小さい個体が観察された。

##### 3) 最初の幼体産出日 (初産日)

親ミジンコの初産日を Table 8 に示す。

対照区および濃度区 1~4 における親ミジンコの初産日は、暴露開始 9 日以内であった。濃度区 5 においては 1 頭が幼体を産出しないまま暴露終了を迎え、残りの親ミジンコの初産日は暴露開始 15 日以内であった。

#### 4) 平均累積産仔数および繁殖障害率

生存親ミジンコ 1 頭当たりの平均累積産仔数 ( $\Sigma F1/P$ ) を Table 9, 平均累積産仔数曲線を Figure 2, 繁殖障害率の算出結果を Table 10, 産出幼体の詳細な観察結果を付属資料-5 に示す。

対照区における平均累積産仔数は, 101.3 頭であった。濃度区 1~5 においては, それぞれ 110.3, 114.7, 115.8, 87.1 および 11.6 頭であった。

濃度区 1~5 の繁殖障害率は, それぞれ -8.9, -13.2, -14.3, 14.0 および 88.5%であった。

#### 5) 死亡幼体, 墮胎卵, 休眠卵の発生等

死亡幼体, 墮胎卵, 休眠卵の発生等の観察結果を付属資料-5 に示す。

死亡幼体および墮胎卵は, すべての試験区において観察された。休眠卵の発生は認められなかった。

#### 3.5 親ミジンコの半数致死濃度 (LC50)

最高濃度区における親ミジンコの死亡率が < 50%であったため, 21 日間の親ミジンコの半数致死濃度 (LC50) は推定される濃度領域とした。21 日間の LC50 を Table 11 および以下に示す。

21 日間 LC50 : >19.7 mg/L (95%信頼限界 : 算出不可)

#### 3.6 50%繁殖障害濃度 (EC50)

対照区に対する濃度区の繁殖障害率の最大値が  $\geq 50\%$ であったため, 21 日間の 50%繁殖障害濃度 (EC50) は Logit 法により算出した。21 日間の EC50 を Table 12 および以下に, 統計結果を付属資料-6 に示す。

21 日間 EC50 : 11.3 mg/L (95%信頼限界 : 10.1~12.7 mg/L)

#### 3.7 最大無作用濃度 (NOEC) および最小作用濃度 (LOEC)

累積産仔数の有意差検定の結果を Table 10 に, 統計結果を付属資料-6 に示す。対照区と比べた累積産仔数は, 濃度区 1~4 では有意差は認められなかったが, 濃度区 5 では有意差が認められた。また, 濃度区 4 および 5 では親ミジンコの外観異常が観察された。

以上の結果から決定した 21 日間の最大無作用濃度 (NOEC) および最小作用濃度 (LOEC) を, Table 13 および以下に示す。

21 日間 NOEC : 2.17 mg/L

21 日間 LOEC : 6.89 mg/L

### 3.8 試験の有効性

「3.4 親ミジンコおよび産出幼体の観察」において試験の有効性の条件をすべて満たしたため、試験は有効であるとみなした。

以 上

Table 1 Temperature of Test Water

Test Group	Nominal Concentration (mg/L)	Temperature (°C)							
		Exposure Time (Days)							
		0	1	6	7	13	14	20	21
		New	Old	New	Old	New	Old	New	Old
Control	--	19.9	19.9	19.8	19.8	19.8	19.7	19.8	19.8
Conc.1	0.30	19.8	19.8	19.8	19.8	19.8	19.6	19.8	19.7
Conc.2	0.95	19.8	19.8	19.8	19.7	19.8	19.6	19.8	19.6
Conc.3	3.0	19.8	19.8	19.8	19.7	19.8	19.6	19.8	19.6
Conc.4	9.5	19.9	19.8	19.9	19.7	19.8	19.6	19.8	19.7
Conc.5	30	20.0	19.8	20.0	19.7	19.8	19.6	19.8	19.7
		Min.: 19.6 Max.: 20.0							

New: New test water freshly prepared

Old: Old test water immediately prior to renewal or at the end of the exposure

Table 2 Dissolved Oxygen Concentrations (D.O.) of Test Water

Test Group	Nominal Concentration (mg/L)	D.O. (mg/L)							
		Exposure Time (Days)							
		0	1	6	7	13	14	20	21
		New	Old	New	Old	New	Old	New	Old
Control	--	8.4	8.4	8.8	7.9	8.8	7.7	8.8	8.2
Conc.1	0.30	8.3	8.3	8.8	7.9	8.7	7.6	8.8	7.9
Conc.2	0.95	8.4	8.3	8.8	7.9	8.8	7.7	8.8	7.8
Conc.3	3.0	8.3	8.3	8.8	7.8	8.7	7.7	8.6	7.8
Conc.4	9.5	8.2	8.2	8.8	8.1	8.7	8.2	8.8	8.2
Conc.5	30	8.3	8.3	8.8	8.0	8.8	7.9	8.8	8.0
		Min.:		7.6	Max.:		8.8		

New: New test water freshly prepared

Old: Old test water immediately prior to renewal or at the end of the exposure

Table 3 pH Values of Test Water

Test Group	Nominal Concentration (mg/L)	pH									
		Exposure Time (Days)								Min.	Max.
		0	1	6	7	13	14	20	21		
		New	Old	New	Old	New	Old	New	Old		
Control	--	8.2	8.1	8.3	7.7	8.2	7.6	8.2	7.7	7.6	8.3
Conc.1	0.30	8.3	8.1	8.3	7.7	8.2	7.6	8.3	7.7	7.6	8.3
Conc.2	0.95	8.4	8.1	8.4	7.7	8.3	7.6	8.4	7.7	7.6	8.4
Conc.3	3.0	8.4	8.2	8.4	7.8	8.3	7.6	8.4	7.6	7.6	8.4
Conc.4	9.5	8.4	8.3	8.4	7.9	8.3	7.8	8.4	7.8	7.8	8.4
Conc.5	30	8.4	8.1	8.4	7.8	8.3	7.8	8.4	7.8	7.8	8.4
Total										7.6	8.4

New: New test water freshly prepared

Old: Old test water immediately prior to renewal or at the end of the exposure

Table 4 Total Hardness (as CaCO<sub>3</sub>) of Test Water

Test Group	Nominal Concentration (mg/L)	Total hardness (mg CaCO <sub>3</sub> /L)							
		Exposure Time (Days)							
		0	1	6	7	13	14	20	21
		New	Old	New	Old	New	Old	New	Old
Control	--	230	232	236	238	240	240	242	236
Conc.1	0.30	234	236	238	236	246	248	236	240
Conc.2	0.95	236	236	242	240	244	248	240	238
Conc.3	3.0	236	236	238	242	242	242	240	240
Conc.4	9.5	238	240	238	238	238	242	242	240
Conc.5	30	238	234	240	242	246	244	236	234
		Min.:		230	Max.:		248		

New: New test water freshly prepared

Old: Old test water immediately prior to renewal or at the end of the exposure

Table 5 Appearances of Test Water

Test Group	Nominal Concentration (mg/L)		Appearance							
			Exposure Time (Days)							
			0	1	6	7	13	14	20	21
			New	Old	New	Old	New	Old	New	Old
Control	--	Color	C-	C-	C-	C-	C-	C-	C-	C-
		Suspended solids	S-	S-	S-	S-	S-	S-	S-	S-
		Floating solids	F-	F-	F-	F-	F-	F-	F-	F-
		Precipitation	P-	P-	P-	P-	P-	P-	P-	P-
Conc.1	0.30	Color	C-	C-	C-	C-	C-	C-	C-	C-
		Suspended solids	S-	S-	S-	S-	S-	S-	S-	S-
		Floating solids	F-	F-	F-	F-	F-	F-	F-	F-
		Precipitation	P-	P-	P-	P-	P-	P-	P-	P-
Conc.2	0.95	Color	C-	C-	C-	C-	C-	C-	C-	C-
		Suspended solids	S-	S-	S-	S-	S-	S-	S-	S-
		Floating solids	F-	F-	F-	F-	F-	F-	F-	F-
		Precipitation	P-	P-	P-	P-	P-	P-	P-	P-
Conc.3	3.0	Color	C-	C-	C-	C-	C-	C-	C-	C-
		Suspended solids	S-	S-	S-	S-	S-	S-	S-	S-
		Floating solids	F-	F-	F-	F-	F-	F-	F-	F-
		Precipitation	P-	P-	P-	P-	P-	P-	P-	P-
Conc.4	9.5	Color	C-	C-	C-	C-	C-	C-	C-	C-
		Suspended solids	S-	S-	S-	S-	S-	S-	S-	S-
		Floating solids	F-	F-	F-	F-	F-	F-	F-	F-
		Precipitation	P-	P-	P-	P-	P-	P-	P-	P-
Conc.5	30	Color	C-	C-	C-	C-	C-	C-	C-	C-
		Suspended solids	S-	S-	S-	S-	S-	S-	S-	S-
		Floating solids	F-	F-	F-	F-	F-	F-	F-	F-
		Precipitation	P-	P-	P-	P-	P-	P-	P-	P-

New: New test water freshly prepared

Old: Old test water immediately prior to renewal or at the end of the exposure

Color:

C-: Colorless

Suspended solids:

S- : Not observed (transparent)

Floating solids:

F- : Not observed

Precipitation:

P- : Not observed



Table 6 Measured Concentrations of the Test Substance in Test Water

(Semi-Static Condition)

Test Group	Nominal Concentration  (mg/L)	Measured Concentration (mg/L)								Mean*1
		Exposure Time (Days)								
		0	1	6	7	13	14	20	21	
		New	Old	New	Old	New	Old	New	Old	
[Percent of Nominal, %]										
Control	--	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	-
Conc.1	0.30	0.236 [79]	0.192 [64]	0.235 [78]	0.160 [53]	0.258 [86]	0.193 [64]	0.236 [79]	0.185 [62]	0.211 [70]
Conc.2	0.95	0.777 [82]	0.595 [63]	0.741 [78]	0.515 [54]	0.811 [85]	0.644 [68]	0.744 [78]	0.617 [65]	0.676 [71]
Conc.3	3.0	2.46 [82]	1.93 [64]	2.32 [77]	1.67 [56]	2.59 [86]	2.13 [71]	2.44 [81]	2.00 [67]	2.17 [72]
Conc.4	9.5	7.95 [84]	6.32 [67]	7.35 [77]	5.43 [57]	8.05 [85]	6.47 [68]	7.63 [80]	6.60 [69]	6.89 [73]
Conc.5	30	21.3 [71]	18.1 [60]	21.0 [70]	14.6 [49]	24.6 [82]	19.4 [65]	21.3 [71]	19.3 [64]	19.7 [66]

\*1: Time-weighted mean

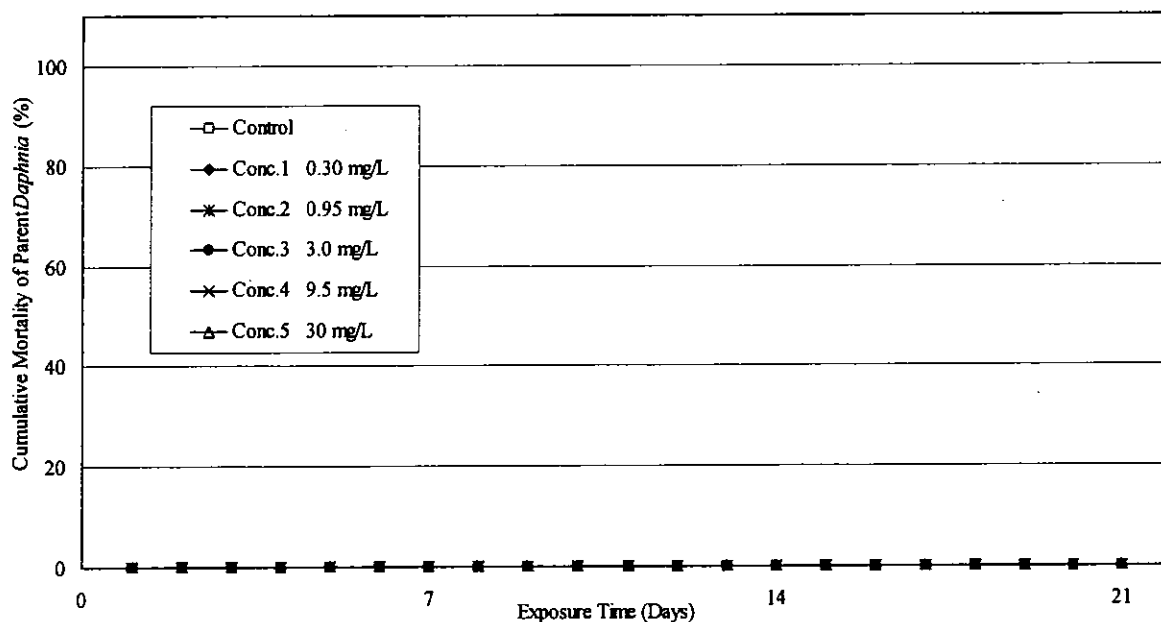
New: New test water freshly prepared

Old: Old test water immediately prior to renewal or at the end of the exposure

Table 7 Cumulative Numbers of Dead Parent *Daphnia* and Cumulative Mortality

Test Group	Nominal Concentration (mg/L)	Mean <sup>*1</sup> Measured Concentration (mg/L)	Cumulative Number																				
			Cumulative Mortality (%)																				
			Exposure Time (Days)																				
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
Control	--	--	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
			0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Conc.1	0.30	0.211	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
			0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Conc.2	0.95	0.676	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
			0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Conc.3	3.0	2.17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
			0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Conc.4	9.5	6.89	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
			0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Conc.5	30	19.7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
			0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

\*1 : Time-weighted mean

Figure 1 Cumulative Mortality of Parent *Daphnia*

Values in legend are given in the nominal concentration.

Table 8 First Brood - Production Days

Test group	Nominal Concentration (mg/L)	Mean <sup>*1</sup> Measured Concentration (mg/L)	First Brood - Production Days											
			Vessel No.										Min.	Max.
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
Control	--	--	9	9	8	8	8	9	9	9	8	8	8	9
Conc.1	0.30	0.211	9	9	9	9	8	9	8	9	8	9	8	9
Conc.2	0.95	0.676	9	9	8	8	9	8	8	8	8	8	8	9
Conc.3	3.0	2.17	9	8	9	8	9	9	8	8	9	9	8	9
Conc.4	9.5	6.89	8	8	9	9	9	8	9	8	9	9	8	9
Conc.5	30	19.7	9	9	12	15	*	9	15	9	12	9	9	>21

\*1 : Time-weighted mean

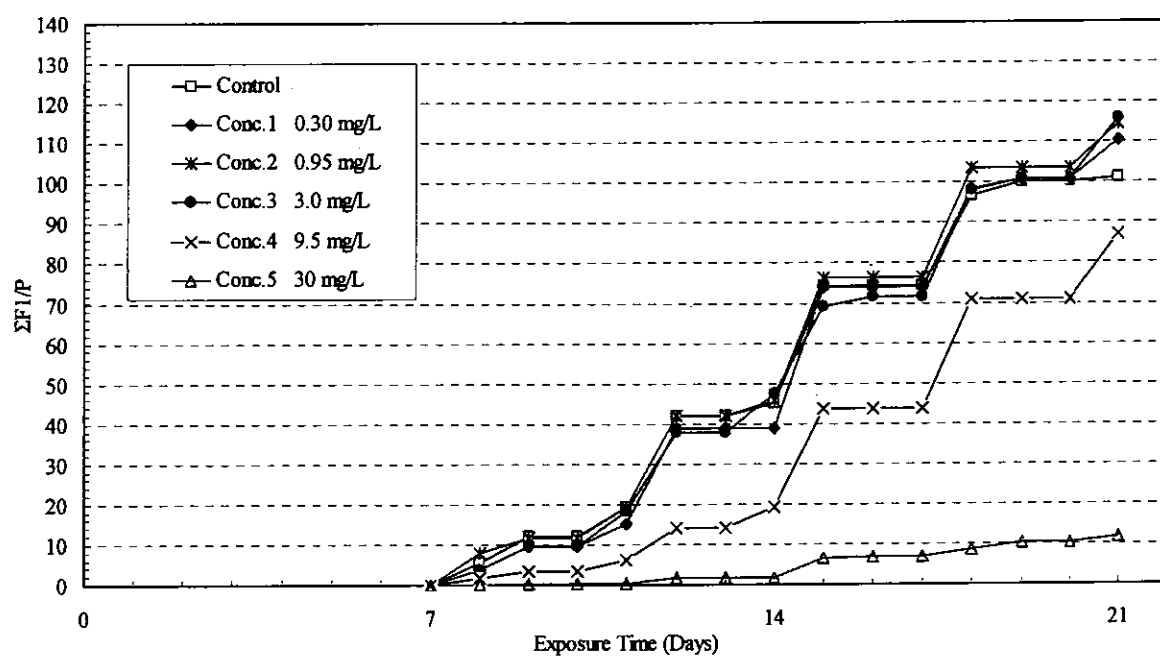
\* : No brood production for 21 days.

Table 9 Mean Cumulative Number of Offsprings Produced per Parent *Daphnia* Alive ( $\Sigma F1/P$ )

Test Group	Nominal	Mean <sup>*1</sup>	$\Sigma F1/P$																
	Concentration	Measured	Exposure Time (Days)																
	(mg/L)	Concentration (mg/L)	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21		
Control	—	—	0.0	5.6	12.1	12.1	19.2	42.1	42.1	45.1	74.4	74.4	74.4	96.6	100.2	100.2	101.3		
Conc.1	0.30	0.211	0.0	3.7	9.8	9.8	15.2	39.0	39.0	39.0	74.0	74.0	74.0	98.5	100.9	100.9	110.3		
Conc.2	0.95	0.676	0.0	7.9	11.8	11.8	19.1	42.0	42.0	45.7	76.2	76.2	76.2	103.7	103.7	103.7	114.7		
Conc.3	3.0	2.17	0.0	3.9	9.6	9.6	18.4	37.9	37.9	47.3	69.2	71.7	71.7	98.1	100.8	100.8	115.8		
Conc.4	9.5	6.89	0.0	1.7	3.5	3.5	6.1	14.0	14.0	19.2	43.6	43.6	43.6	71.0	71.0	71.0	87.1		
Conc.5	30	19.7	0.0	0.0	0.5	0.5	0.5	1.6	1.6	1.6	6.6	6.8	6.8	8.5	10.2	10.2	11.6		

\*1 : Time-weighted mean

Figure 2 Mean Cumulative Number of Offsprings Produced per Parent *Daphnia* Alive ( $\Sigma F1/P$ )



Values in legend are given in the nominal concentration.

Table 10    Reproduction Rate, Inhibition Rate and Results of Statistical Comparison  
(by Dunnett's Multicomparison Test)

Test Group	Nominal Conc. (mg/L)	Mean <sup>*1</sup> Measured Conc. (mg/L)	Cumulative Number of Offsprings										A		B		C
			Vessel No.										Mean	S.D.	Reproduction Inhibition		Rate (%)
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10					
Control	--	--	101	102	104	98	101	91	103	105	109	99	101.3	4.8	--	--	--
Conc.1	0.30	0.211	98	98	99	106	127	92	130	87	141	125	110.3	18.7	108.9	-	8.9
Conc.2	0.95	0.676	103	99	139	98	98	96	127	155	134	98	114.7	21.9	113.2	-	13.2
Conc.3	3.0	2.17	102	94	98	133	106	93	129	139	127	137	115.8	18.8	114.3	-	14.3
Conc.4	9.5	6.89	95	109	103	73	77	100	108	107	88	11	87.1	29.6	86.0		14.0
Conc.5	30	19.7	6	12	7	6	0	12	7	23	13	30	11.6 <sup>**</sup>	8.9	11.5		88.5

\*1 : Time-weighted mean

- : Indicates no significant difference.

\* : Indicates a significant difference ( $\alpha=0.05$ ) from the control.  
(There was no sign in this test.)

\*\* : Indicates a significant difference ( $\alpha=0.01$ ) from the control.

Equations:  $B = A/A_{\text{control}} \times 100$

$C = 100 - B$

Table 11 Median Lethal Concentration (LC50) for Parent *Daphnia*

Exposure Period (Days)	LC50 (mg/L)	95-Percent Confidence Limits (mg/L)	Statistical Method
21	>19.7 <sup>*1</sup>	--	--

\*1: The LC50 value and its 95 % confidence limits could not be determined by statistical method because the mortality of parent *Daphnia* at the maximum concentration level was less than 50 %. Therefore, the LC50 value was given in estimated concentration range.

--: Not determined

Table 12 Median Effect Concentration (EC50) for Reproduction

Exposure Period (Days)	EC50 (mg/L)	95-Percent Confidence Limits (mg/L)	Statistical Method
21	11.3 <sup>*1</sup>	10.1 - 12.7	Logit

\*1: Using the data of Conc.1 - 5

Table 13 No Observed Effect Concentration (NOEC) and Lowest Observed Effect Concentration (LOEC)

Exposure Period (Days)	NOEC (mg/L)	LOEC (mg/L)
21	2.17	6.89

## 付属資料－ 1

赤外吸収スペクトル

Figure A-1-1 Infrared Absorption Spectrum of the Test Substance before the Start of Exposure

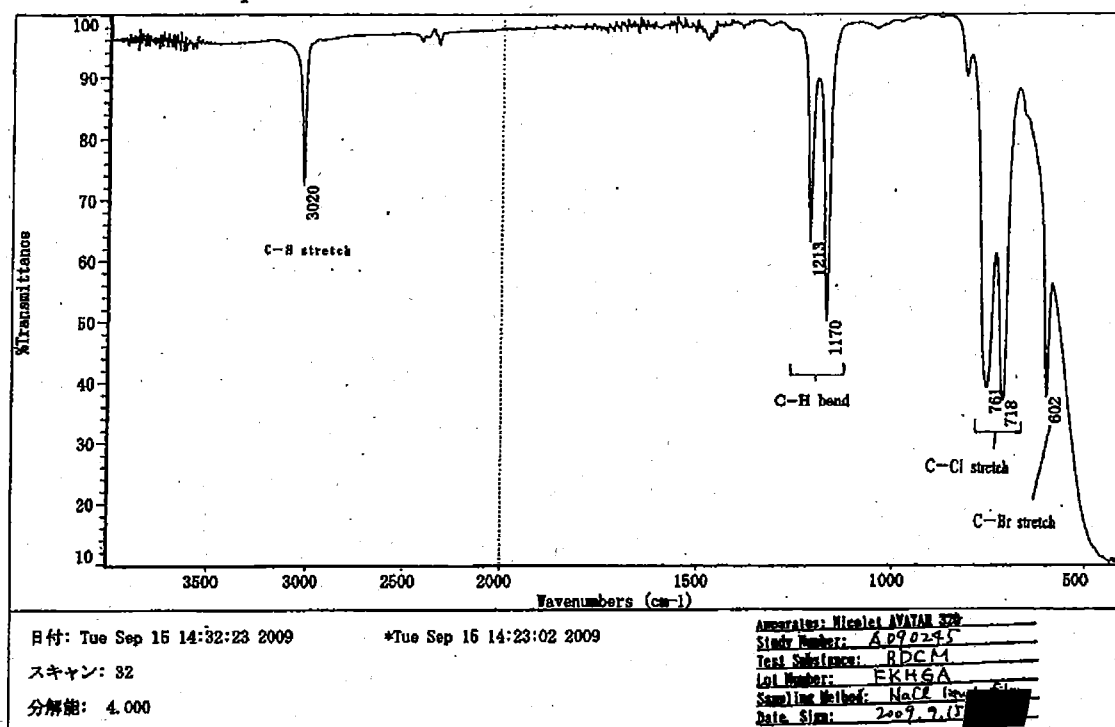
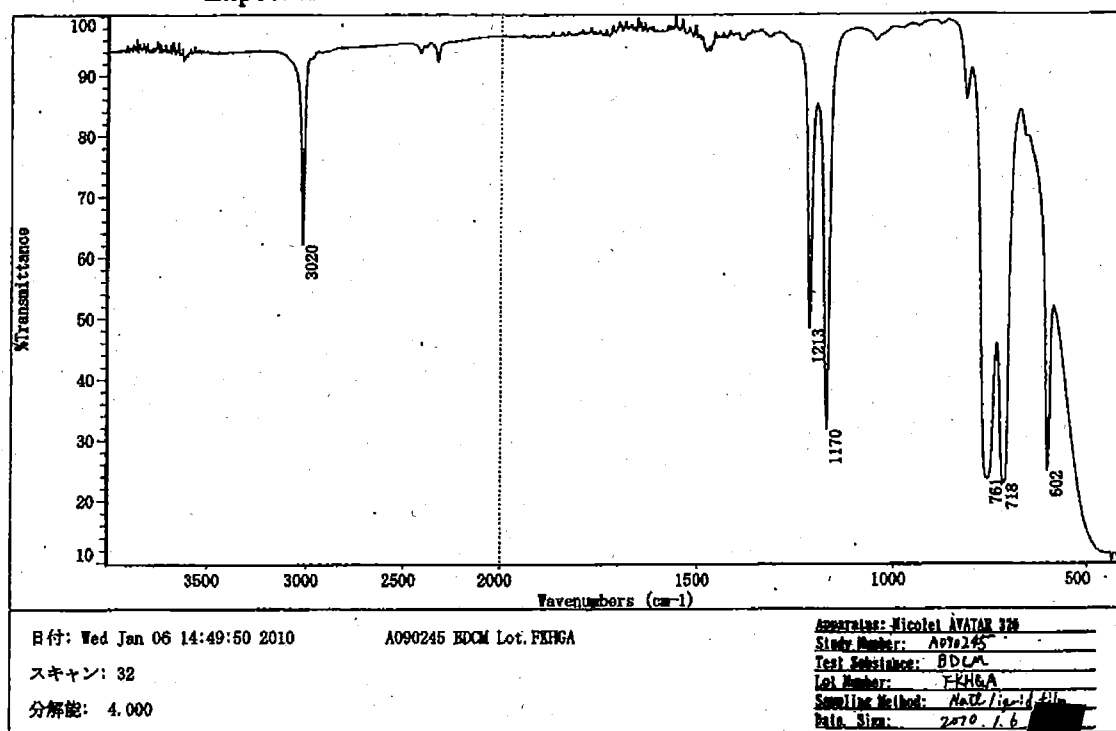


Figure A-1-2 Infrared Absorption Spectrum of the Test Substance after the End of Exposure





## 付属資料－ 2

### 試験用水の組成

Table A-2 Elendt M4 medium recommended by OECD Guidelines No.211 used as dilution water

Macro nutrients	Concentration (mg/L)
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	293.8
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	123.3
KCl	5.8
$\text{NaHCO}_3$	64.8
$\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$	10.0
$\text{NaNO}_3$	0.274
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0.143
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	0.184

Trace elements	Concentration ( $\mu\text{g/L}$ )
$\text{H}_3\text{BO}_3$	2859.5
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	360.5
LiCl	306.0
RbCl	71.0
$\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	152.0
NaBr	16.0
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	63.0
$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	16.8
$\text{ZnCl}_2$	13.0
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	10.0
KI	3.25
$\text{Na}_2\text{SeO}_3$	2.19
$\text{NH}_4\text{VO}_3$	0.575
$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	2500
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	995.5

Vitamins	Concentration ( $\mu\text{g/L}$ )
Thiamine hydrochloride	75.0
Cyanocobalamine(B12)	1.00
Biotine	0.750

## 付属資料－ 3

### 試験液の調製

## 試験液の調製

## 1. 準備

## 被験物質原液の調製

被験物質採取量	----	100	mg
溶媒	----	試験用水	
最終容量	----	200	mL
容器	----	200 mL マスボトル	
被験物質濃度	----	500	mg/L
混合方式	----	転倒攪拌	
調製頻度	----	暴露開始前、暴露開始後7日目および14日目に8本ずつ調製 (この内1本は予備とする)	
保管条件	----	冷蔵・暗所で保管 (7日間安定)	

## 2. 試験液の調製

被験物質原液を下記の表の通り採取し、試験用水を加え最終容量とする。

対照区は試験用水のみとする。

溶媒	----	試験用水
最終容量	----	1.0 L
容器	----	1 L マスフラスコ
混合方式	----	転倒攪拌
濃度公比	----	3.16

試験区	設定濃度 (mg/L)	被験物質原液 (mL)
対照区	—	0.00
濃度区1	0.30	0.60
濃度区2	0.95	1.90
濃度区3	3.0	6.00
濃度区4	9.5	19.00
濃度区5	30	60.00

## 付属資料－ 4

試験液の分析

## 1. ガスクロマトグラフ質量分析 (GC/MS) 計 測定条件

装置

ガスクロマトグラフ質量分析計 (ヘッドスペースサンプラ付き) No.1

ガスクロマトグラフ (GC) : Agilent Technologies 6890 型

ヘッドスペースサンプラ (HSS) : Agilent Technologies 7694 型

質量選択検出器 (MSD) : Agilent Technologies 5973N 型

データ処理部 : MSD ケミステーション

[GC 条件]

カラム : J&amp;W DB-5MS 60 m×0.25 mm×1.0 μm

キャリアーガス : ヘリウム 1.0 mL/min (Constant flow)

ストップタイム : 12 min

オープン温度 : 50°C (0 min) → 15°C/min → 200°C (2 min)

注入口温度 : 200°C

MS インターフェース温度 : 280°C

注入条件 : スプリット (スプリット比 = 50.1 : 1)

注入量 : 3.0 mL (HSS サンプルループ容量)

[HSS 条件]

温度条件 : Oven : 60°C, LOOP : 120°C, Transfer Line : 200°C

イベント時間 : GC Cycle Time : 18 min

Vial Equilibration Time : 10 min

Pressurization Time : 0.2 min

Loop Fill Time : 0.03 min

Loop Equilibration Time : 0.2 min

Inject Time : 0.2 min

バイアルパラメータ : Shake : 2

[MSD 条件]

温度条件 : イオン源 230°C, 四重極マス・フィルタ 150°C

SIM (Selected Ion Monitoring) 条件 :

Solvent Delay : 5.50 min

Quant ion  $m/z$  83.0

## 2. 検量線の作成と試験液中の被験物質濃度の定量

1) 被験物質をアセトンで溶解，希釈し，0，0.0500～1.00 mg/L の標準溶液を調製した。

2) 標準溶液を以下のように分析した。

```

精製水*1 10 mL
+
標準溶液 0.1 mL
|
混合
|
GC/MS測定*2

```

\*1: JIS K0557 A4 グレードの水

\*2: 測定値は標準溶液濃度の 1/100 に相当

3) 横軸に濃度 (mg/L) を，縦軸にピーク面積 (count) をとり，検量線を作成した (Figure A-4-1)。最小二乗法により直線回帰式  $Y=a+bX$  を求めた。相関係数は 0.9998 となり，直線性の基準 (0.995 以上) を満たした。また，切片 a の 95%信頼区間が原点を含むことから，検量線は原点を通過する直線とみなせた。そこで，試験液中の被験物質濃度の定量は，各分析時に測定した標準溶液のピーク面積との比較で行った。

4) 検量線の最低濃度に対し，1/10 で視覚的に分析可能と思われる被験物質濃度 0.005 mg/L を暴露期間中の検出限界とした。

## 3. 試験液の分析方法

1) 試験液を以下のように分析した。代表的なクロマトグラムを Figure A-4-2 に示す。

```

精製水
+
アセトン 0.1 mL
+
試験液*1 10 mL (精製水との合計)
|
混合
|
GC/MS測定

```

\*1: 精製水と試験液の比率を変えることによって被験物質濃度を検量線範囲に入れた。希釈せずに検量線範囲に入ると予想される試験区は，試験液 10 mL (精製水 = 0 mL) とした。

Figure A-4-1 Calibration Curve

No.	Concentration X (mg/L)	Peak Area Y (count)
1	0	0
2	0.0500	273890
3	0.100	562652
4	0.200	1106870
5	0.500	2776459
6	1.00	5806969

$$Y = a + b \times X$$

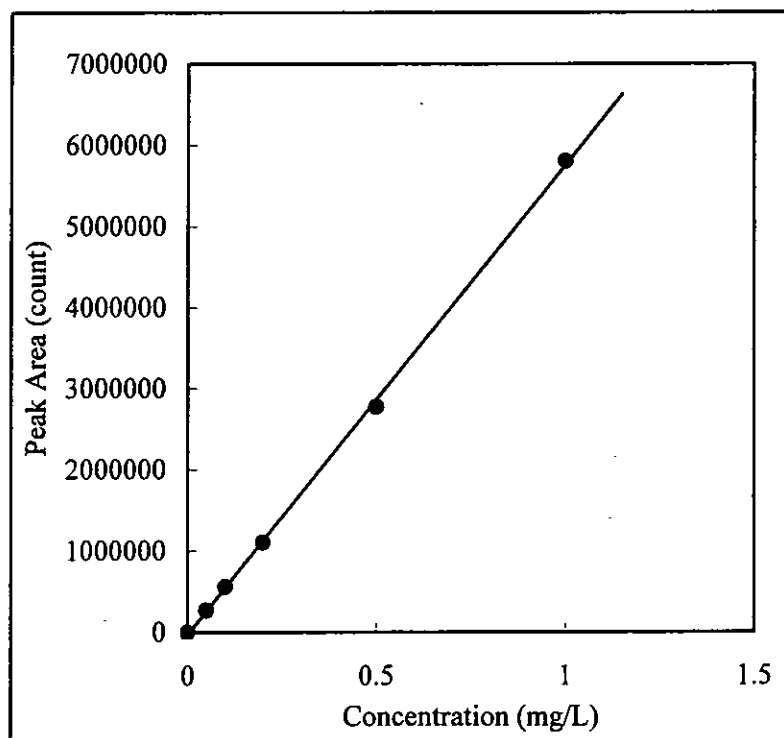
$$a = -3.162\text{E}+04$$

$$-1.137\text{E}+05 < a < 5.042\text{E}+04$$

$$b = 5.793\text{E}+06$$

$$(95\text{-Percent Confidence Limits})$$

$$r = 0.9998$$

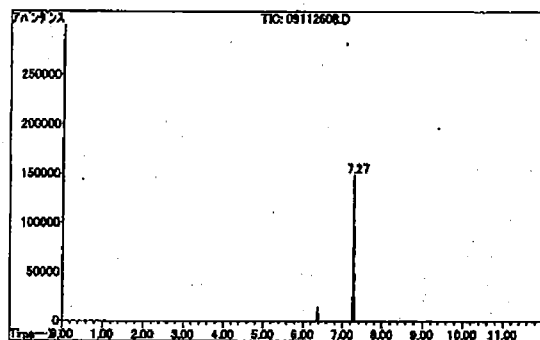




## Figure A-4-2 Representative Chromatograms

## (1) Standard 0.500 mg/L : Day 0

Study No. : A090245  
 Date : 2009-12-04  
 Operator : XXXXXXXXXX  
 Sample Information: BDCM  
 Sample Name : STD 0.500mg/L  
 Misc Info :  
 File Name : C:\MSDCHEM\1\DATA\BDCM\F09112608.D  
 Acquired : 4 Dec 2009 13:38 using AcqMethod BDCM

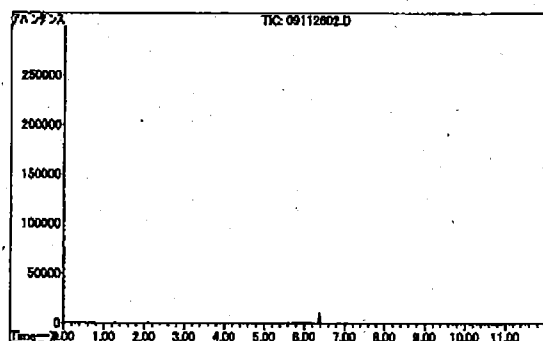


TIC: 09112608.D

ピーク	リテンションタイム	タイプ	半値幅	面積	開始時間	終了時間
1	7.272	M	0.031	2746564	7.214	7.358

## (2) Control : Day 0 - New

Study No. : A090245  
 Date : 2009-12-04  
 Operator : XXXXXXXXXX  
 Sample Information: BDCM  
 Sample Name : D0dCu  
 Misc Info :  
 File Name : C:\MSDCHEM\1\DATA\BDCM\F09112602.D  
 Acquired : 4 Dec 2009 11:49 using AcqMethod BDCM



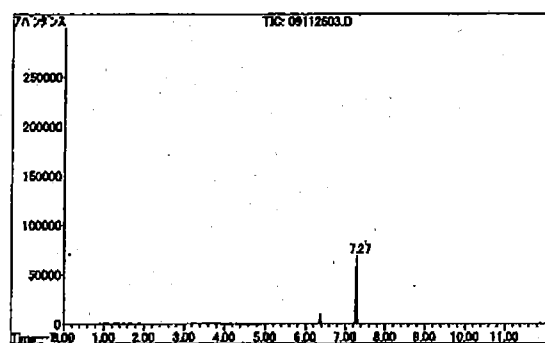
TIC: 09112602.D

ピーク リテンションタイム タイプ 半値幅 面積 開始時間 終了時間  
 ピークが検出できません

Figure A-4-2 Continued

## (3) Conc.1 : Day 0 - New

Study No. : A090245  
 Date : 2009.12.04  
 Operator :   
 Sample Information: BDCM  
 Sample Name : D0dC1n  
 Misc Info :  
 File Name : C:\MSDCHEM\1\DATA\FRDCHEM\09112603.D  
 Acquired : 4 Dec 2009 12:07 using AcqMethod EDCM

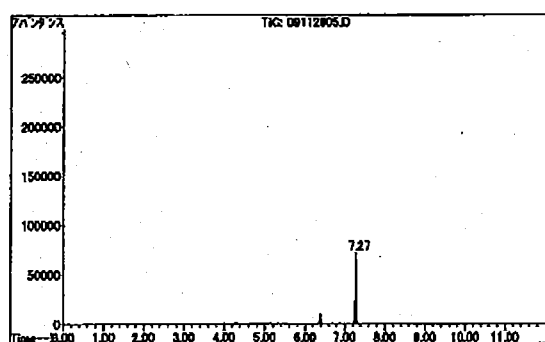


TIC: 09112603.D

ピーク	リテンション	タイプ	半値幅	面積	開始時間	終了時間
1	7.271	M	0.031	1298790	7.212	7.351

## (4) Conc.3 : Day 0 - New

Study No. : A090245  
 Date : 2009.12.04  
 Operator :   
 Sample Information: BDCM  
 Sample Name : D0dC3n  
 Misc Info :  
 File Name : C:\MSDCHEM\1\DATA\FRDCHEM\09112605.D  
 Acquired : 4 Dec 2009 12:43 using AcqMethod EDCM



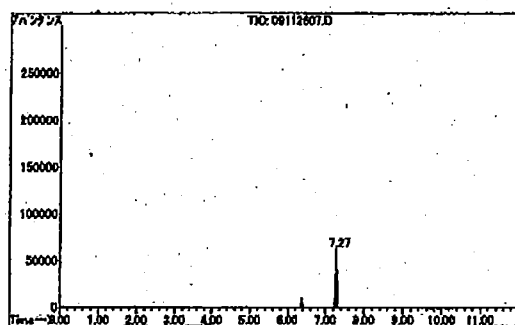
TIC: 09112605.D

ピーク	リテンション	タイプ	半値幅	面積	開始時間	終了時間
1	7.273	M	0.031	1351544	7.215	7.354

Figure A-4-2 Continued

## (5) Conc.5 : Day 0 - New

Study No. : A090245  
 Date : 2009.12.4  
 Operator :   
 Sample Information: BDCM  
 Sample Name : D04C5u  
 Misc Info :  
 File Name : C:\MSDCHEM\1\DATA\BDCM\09112607.D  
 Acquired : 4 Dec 2009 13:20 using AcqMethod BDCM

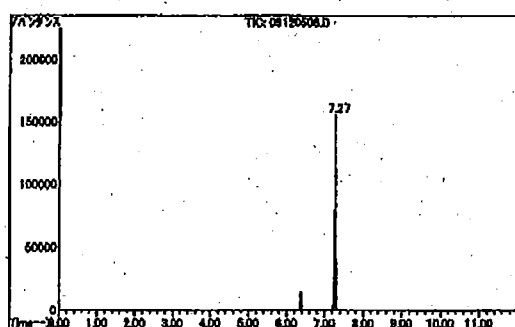


TIC: 09112607.D

ピーク	リテンション	タイプ	半値幅	面積	開始時間	終了時間
1	7.272	M	0.031	1171568	7.213	7.361

## (6) Standard 0.500 mg/L : Day 1

Study No. : A090245  
 Date : 2009.12.5  
 Operator :   
 Sample Information: STD 0.500mg/L  
 Sample Name :  
 Misc Info :  
 File Name : C:\MSDCHEM\1\DATA\BDCM\09120508.D  
 Acquired : 5 Dec 2009 9:33 using AcqMethod BDCM



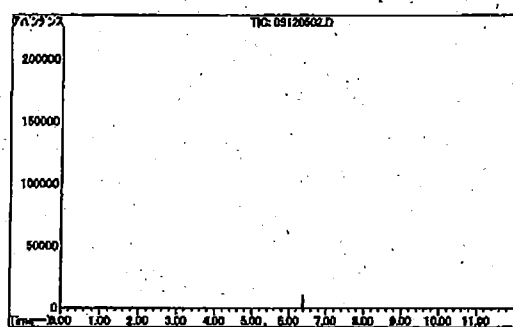
TIC: 09120508.D

ピーク	リテンション	タイプ	半値幅	面積	開始時間	終了時間
1	7.273	M	0.031	2901368	7.218	7.349

Figure A-4-2 Continued

## (7) Control : Day 1 - Old

Study No. : A090245  
 Date : 2009.12.05  
 Operator :   
 Sample Information :   
 Sample Name : DiDCo  
 Misc Info :   
 File Name : C:\MSDCHEM\1\DATA\BDCM\09120502.D  
 Acquired : 5 Dec 2009 7:44 using AcqMethod BDCM

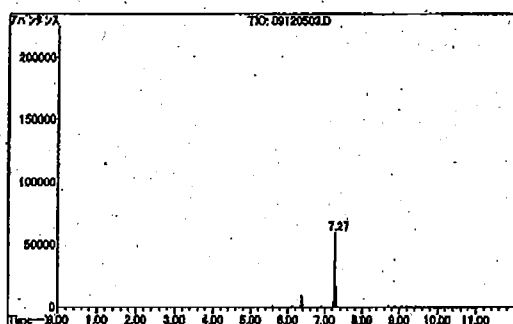


TIC: 09120502.D

ピーク リテンション タイプ 半値幅 面積 開始時間 終了時間  
 ピークが検出できません

## (8) Conc.1 : Day 1 - Old

Study No. : A090245  
 Date : 2009.12.05  
 Operator :   
 Sample Information : BDCM  
 Sample Name : DiDCo  
 Misc Info :   
 File Name : C:\MSDCHEM\1\DATA\BDCM\09120503.D  
 Acquired : 6 Dec 2009 8:02 using AcqMethod BDCM



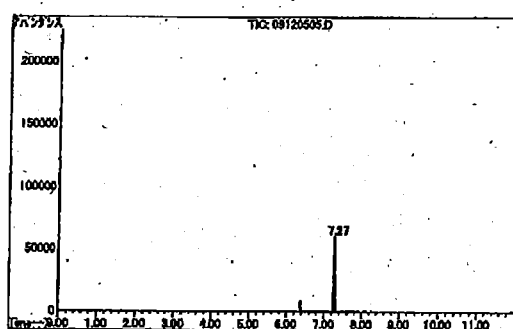
TIC: 09120503.D

ピーク リテンション タイプ 半値幅 面積 開始時間 終了時間  
 1 7.273 M 0.031 1114868 7.216 7.358

Figure A-4-2 Continued

## (9) Conc.3 : Day 1 - Old

Study No. : A090245  
 Date : 2009.12.5  
 Operator :   
 Sample Information :   
 Sample Name : DiDC3o  
 Misc Info :   
 File Name : C:\MSDCHEM\1\DATA\BDCM\09120505.D  
 Acquired : 5 Dec 2009 8:39 using AcqMethod BDCM

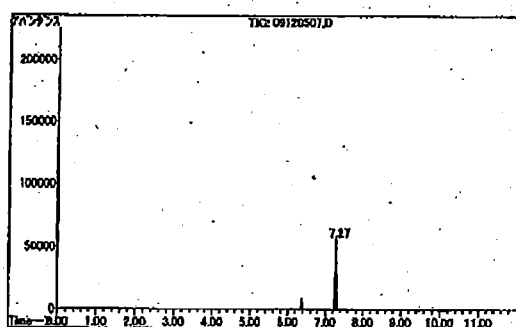


TIC: 09120505.D

ピーク	Retention Time (分)	Height (高さ)	Area (面積)	Start Time (開始時間)	End Time (終了時間)
1	7.273	M 0.031	1170013	7.215	7.359

## (10) Conc.5 : Day 1 - Old

Study No. : A090245  
 Date : 2009.12.5  
 Operator :   
 Sample Information :   
 Sample Name : DiDC5o  
 Misc Info :   
 File Name : C:\MSDCHEM\1\DATA\BDCM\09120507.D  
 Acquired : 5 Dec 2009 9:16 using AcqMethod BDCM



TIC: 09120507.D

ピーク	Retention Time (分)	Height (高さ)	Area (面積)	Start Time (開始時間)	End Time (終了時間)
1	7.273	M 0.031	1050293	7.213	7.365

## 付属資料－ 5

ミジンコの観察結果

### Table A-5-1 Observation of *Daphnia*

[illegible]

Table A-5-1 Continued

Conc.1

Vessel No.	Exposure Time (days)																				
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
1	Parent <i>Daphnia</i>	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	Symptom																				
	Live Number	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	Cumulative Live Number	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Symptom																				
	Live Number	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	Cumulative Live Number	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Symptom																				
	Live Number	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	Cumulative Live Number	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Symptom																				
	Live Number	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	Cumulative Live Number	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Symptom																				
	Live Number	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	Cumulative Live Number	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Symptom																				
	Live Number	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7	Cumulative Live Number	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Symptom																				
	Live Number	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8	Cumulative Live Number	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Symptom																				
	Live Number	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9	Cumulative Live Number	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Symptom																				
	Live Number	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10	Cumulative Live Number	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Symptom																				
	Live Number	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

D: Dead

C: White

B: Small

A: Abnormal behaviour

N: Normal

- : None

a: Dead offspring

b: Aborted egg

c: Ephippia



Table A-5-1 Continued

[illegible]

### Conc.3

[illegible]

Table A-5-1 Continued

Conc.4

Vessel No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	Total
Parent <i>Daphnia</i>	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Offspring Live Number							0	3	0	0	10	0	0	29	0	0	0	27	0	0	0	26
Symptom							-	a,b	-	-	a,b	-	-	-	b	-	-	b	-	-	-	b
Cumulative Live Number							0	3	3	3	13	13	13	42	42	42	42	69	69	95	95	95
Parent <i>Daphnia</i>	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Offspring Live Number							0	6	0	0	0	10	0	0	35	0	0	32	0	0	0	26
Symptom							-	a,b	-	-	-	b	-	-	-	-	-	b	-	-	-	-
Cumulative Live Number							0	6	6	6	16	16	16	16	51	51	51	83	83	109	109	109
Parent <i>Daphnia</i>	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Offspring Live Number							0	0	2	0	0	10	0	0	38	0	0	32	0	0	0	21
Symptom							-	-	b	-	-	b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cumulative Live Number							0	0	2	2	12	12	12	12	50	50	50	82	82	103	103	103
Parent <i>Daphnia</i>	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Offspring Live Number							0	0	6	0	0	7	0	0	27	0	0	33	0	0	0	0
Symptom							-	-	b	-	-	b	-	-	b	-	-	-	-	-	-	-
Cumulative Live Number							0	0	6	6	13	13	13	13	40	40	40	73	73	73	73	73
Parent <i>Daphnia</i>	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Offspring Live Number							0	0	3	0	0	13	0	0	30	0	0	29	0	0	0	2
Symptom							-	-	a	-	-	b	-	-	b	-	-	a,b	-	-	-	-
Cumulative Live Number							0	0	3	3	16	16	16	16	46	46	46	75	75	75	77	77
Parent <i>Daphnia</i>	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Offspring Live Number							0	1	0	0	11	4	0	5	25	0	0	30	0	0	0	24
Symptom							-	a,b	-	-	-	b	-	-	b	-	-	-	-	-	-	-
Cumulative Live Number							0	1	1	1	12	16	16	21	46	46	46	76	76	76	100	100
Parent <i>Daphnia</i>	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Offspring Live Number							0	0	1	0	0	11	0	0	36	0	0	30	0	0	0	30
Symptom							-	-	a,b	-	-	b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cumulative Live Number							0	0	1	1	12	12	12	12	48	48	48	78	78	78	108	108
Parent <i>Daphnia</i>	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Offspring Live Number							0	7	0	0	5	1	0	18	16	0	0	33	0	0	0	27
Symptom							-	b	-	-	-	b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cumulative Live Number							0	7	7	7	12	13	13	31	47	47	47	80	80	80	107	107
Parent <i>Daphnia</i>	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Offspring Live Number							0	0	3	0	0	16	0	0	36	0	0	28	0	0	0	5
Symptom							-	-	a,b	-	-	b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cumulative Live Number							0	0	3	3	19	19	19	19	55	55	55	83	83	83	88	88
Parent <i>Daphnia</i>	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Offspring Live Number							0	0	3	0	0	7	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
Symptom							-	-	b	-	-	a,b	-	-	a,b	-	-	b	-	-	-	-
Cumulative Live Number							0	0	3	3	10	10	10	10	11	11	11	11	11	11	11	11

D : Dead

C : White

B : Small

A : Abnormal behaviour

N : Normal

- : None

Table A-5-1

### Conc.5

[illegible]

## 付属資料－ 6

### 統計結果

Table A-6-1 Calculation of the EC50 (21days)

Drug	Dose	N	Events	Yukms	StatLight #08 回帰分析
1	0.211 mg/L	100	0.0 %	ロジット法 (一般化線形モデル/最尤法)	
1	0.676 mg/L	100	0.0 %		
1	2.17 mg/L	100	0.0 %		
1	6.89 mg/L	100	14.0 %		
1	19.7 mg/L	100	88.5 %		

Logit method (Generalized linear model / likelihood method)

No.				
1	100	0	-0.676	
2	100	0	-0.17	
3	100	0	0.336	
4	100	14	0.838	
5	100	88.5	1.294	

Dummy variable matrix

No.	N	Y	Y/N	1	2
1	100	0	0	1	-0.68
2	100	0	0	1	-0.17
3	100	0	0	1	0.34
4	100	14	0.14	1	0.84
5	100	88.5	0.885	1	1.29

Matched test

Test	Statistic	D.F.	Probability
Deviance	0.4497	3	0.92979
Logistic likelihood ratio	-76.4055	3	0
Pearson's chi-square	0.23667	3	0.97146
Akaike's information criterion	156.811		

Estimation of parameter

NO.	Parameter	$\theta_{\text{hat}}$	Standard error	$\theta_{\text{hat/se}}$
1	Y	-9.0504	0.962	-9.4076
2		8.5863	0.9008	9.5315

50 percent Effective/lethal dose

Estimated 95 percent Student confidence limit

ED/LD50	Lower	Upper
11.32551	10.1095	12.72077

Estimated values and residuals

No.	y	$y_{\text{hat}}$	Count Residual	y/n	$\pi_{\text{hat}}$	Rate residual
1	0	0	0	0	0	0
2	0	0.0027	-0.0027	0	0	0
3	0	0.2105	-0.2105	0	0.0021	-0.0021
4	14	13.5492	0.4508	0.14	0.1355	0.0045
5	88.5	88.7376	-0.2376	0.885	0.8874	-0.0024

Diagnosed statistics

No.	Cook's distance	Leverage	Deviance residual	Pearson residual	Std. deviance residual	Std. Pearson residual
1	0	0.0001	-0.0084	-0.006	-0.0084	-0.006
2	0	0.0034	-0.0738	-0.0522	-0.0739	-0.0523
3	0.0121	0.0943	-0.6491	-0.4592	-0.6821	-0.4826
4	1.4849	0.9264	0.1311	0.1317	0.4834	0.4856
5	4.7115	0.9758	-0.0749	-0.0752	-0.4818	-0.4833

Table A-6-2 Results of Statistical Comparison Test  
(Cumulative Number of Offsprings for 21 Days)

**Input Data Table**

No.	Control	Conc.1	Conc.2	Conc.3	Conc.4	Conc.5
	(Group1)	(Group2)	(Group3)	(Group4)	(Group5)	(Group6)
1	101	98	103	102	95	6
2	102	98	99	94	109	12
3	104	99	139	98	103	7
4	98	106	98	133	73	6
5	101	127	98	106	77	0
6	91	92	96	93	100	12
7	103	130	127	129	108	7
8	105	87	155	139	107	23
9	109	141	134	127	88	13
10	99	125	98	137	11	30

Group	Samples	Mean	S.E.	S.D.	Variance
1	10	101.3000	1.5133	4.7854	22.9000
2	10	110.3000	5.9181	18.7145	350.2333
3	10	114.7000	6.9187	21.8787	478.6778
4	10	115.8000	5.9457	18.8019	353.5111
5	10	87.1000	9.3612	29.6027	876.3222
6	10	11.6000	2.8095	8.8844	78.9333

Method	vs	Side	Stat.	0.0500	0.0100	0.0010 Prob.
Bartlett test			0 27.1344	11.0705	>15.0863	20.5150 5.37E-05

Method	vs	Side	Stat.	0.05	0.01	0.001 Prob.
Kruskal-Wallis test			0 27.3653	>11.0705	15.0863	20.5150 4.84E-05

Method	vs	Side	Stat.	0.0500	0.0100	0.0010 Prob.
Dunnett	1 vs 2		2 0.3140	2.5093	3.0564	999.9900 0.9980
Dunnett	1 vs 3		2 0.6088	2.5093	3.0564	999.9900 0.9616
Dunnett	1 vs 4		2 0.9036	2.5093	3.0564	999.9900 0.8349
Dunnett	1 vs 5		2 0.8652	2.5093	3.0564	999.9900 0.8569
Dunnett	1 vs 6		2 3.5760	>2.5093	>3.0564	999.9900 0.001656 **

## 参考資料

被験物質の濃度減少に関する検討



### 1. 目的

被験物質濃度の減少について、開放系と閉鎖系で比較を行い、被験物質の試験液中からの揮散の有無について確認した。

### 2. 方法

設定濃度 10 mg/L の試験液を開放系と閉鎖系で 24 時間静置し、その前後の被験物質濃度をガスクロマトグラフ質量分析 (GC/MS) 計により測定した。

静置条件：

- 1) 設定濃度： 10 mg/L
- 2) 試験容器： 開放系：100 mL ガラス製ビーカー，テフロン蓋なし  
閉鎖系：100 mL ガラス製ビーカー，テフロン蓋あり
- 3) 試験液量： 100 mL／容器
- 4) 連数： 各 1 容器
- 5) 温度： 20℃

### 3. 結果および考察

測定結果を以下に示す。開放系において、閉鎖系よりも顕著な濃度減少が認められたことから、被験物質は試験液中から揮散する性質があるものと推察された。

#### 測定結果

設定濃度 (mg/L)	測定値 (mg/L) (調製時に対する割合, %)		
	調製時	24 時間後	
		開放系	閉鎖系
10	4.98	1.83 (37)	4.39 (88)