

受付番号	662-10-E-5282
試験番号	95282

## 最 終 報 告 書

トリクロロニトロメタンのオオミジンコによる 48 時間急性遊泳阻害試験

2011 年 3 月

一般財団法人化学物質評価研究機構

久留米事業所

本文書は正本を正確に転写したものです。  
 一般財団法人 化学物質評価研究機構 久留米事業所  
 2011 年 3 月 11 日  
 試験責任者

## 陳 述 書

一般財団法人化学物質評価研究機構  
久留米事業所

試験委託者 環境省

試験の表題 トリクロロニトロメタンのオオミジンコによる 48 時間急性遊泳阻害試験

試験番号 95282

上記試験は以下の GLP に従って実施したものである。

- a) 「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、平成 20 年 7 月 4 日 最終改正) に定める「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」
- b) OECD Principles of Good Laboratory Practice, November 26, 1997

また、本最終報告書は生データを正確に反映しており、試験データが有効であることを確認した。

2011 年 3 月 11 日

試験責任者

## 信 頼 性 保 証 書

一般財団法人化学物質評価研究機構  
久留米事業所

試験委託者 環境省

試験の表題 トリクロロニトロメタンのオオミジンコによる 48 時間急性遊泳阻害試験

試験番号 95282

本最終報告書は、試験の方法、手順が正確に記載され、試験結果は生データを正確に反映していることを保証する。

なお、監査又は査察の結果については、下記の通り試験責任者及び運営管理者に報告した。

監査又は査察内容	監査又は査察日	報告日 (試験責任者及び運営管理者)
試験計画書草案	2010 年 11 月 18 日	2010 年 11 月 18 日
試験計画書草案再査察	2010 年 11 月 18 日	2010 年 11 月 18 日
試験計画書	2010 年 11 月 18 日	2010 年 11 月 18 日
暴露開始時、暴露開始後	2010 年 11 月 24 日	2010 年 11 月 26 日
	2010 年 11 月 26 日	2010 年 11 月 26 日
生データ、最終報告書草案	2011 年 3 月 10 日	2011 年 3 月 10 日
生データ、最終報告書草案 再査察	2011 年 3 月 11 日	2011 年 3 月 11 日
最終報告書	2011 年 3 月 11 日	2011 年 3 月 11 日

2011 年 3 月 11 日

信頼性保証部門責任者

## 目 次

	頁
1. 表 題 .....	6
2. 試験委託者 .....	6
3. 試験施設 .....	6
4. 試験目的 .....	6
5. 試験法 .....	6
6. GLP 基準 .....	6
7. 試験日程 .....	6
8. 試資料の保管 .....	7
9. 試験関係者 .....	7
10. 最終報告書の承認 .....	7
11. 要 約 .....	8
12. 試験材料 .....	9
12.1 被験物質 .....	9
12.2 試験生物 .....	10
13. 試験の実施 .....	10
13.1 試験用水 .....	10
13.2 試験器具及び装置 .....	11
13.3 試験液の調製法 .....	11
13.4 試験条件 .....	11
13.5 観察と測定 .....	11
13.6 EC <sub>50</sub> の算出法 .....	12
13.7 試験の有効性 .....	12
13.8 数値の取扱い .....	12
14. 試験結果及び考察 .....	12
14.1 遊泳障害率 .....	12
14.2 一般状態の観察 .....	12
14.3 試験液の観察と測定 .....	13
14.4 EC <sub>50</sub> .....	13
14.5 考 察 .....	13
15. 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 .....	13

## Tables

Table 1	Immobility .....	14
Table 2	Observed abnormal response.....	15
Table 3	Condition of test solutions.....	16
Table 4	EC <sub>50</sub> to <i>Daphnia magna</i> .....	16

## Figure

Figure 1	Concentration-immobility curve.....	17
----------	-------------------------------------	----

Appendix 1 被験物質濃度の測定方法及び結果

Appendix 2 検量線及びクロマトグラム

Additional data 予備試験結果



## 1. 表 題

トリクロロニトロメタンのオオミジンコによる 48 時間急性遊泳阻害試験

## 2. 試験委託者

名 称 環境省

住 所 〒100-8975 東京都千代田区霞が関 1-2-2

## 3. 試験施設

名 称 一般財団法人化学物質評価研究機構 久留米事業所

住 所 〒839-0801 福岡県久留米市宮ノ陣三丁目 2 番 7 号

## 4. 試験目的

トリクロロニトロメタンのオオミジンコに対する急性遊泳阻害試験を行い、48 時間の半数遊泳阻害濃度 ( $EC_{50}$ ) を求める。

## 5. 試験法

a) 「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、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) に定める「ミジンコ急性遊泳阻害試験」

b) OECD Guidelines for Testing of Chemicals, No.202, April 13, 2004, "*Daphnia* sp., Acute Immobilisation Test"

c) OECD Guidance Document, No.23, September 2000, "Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures"

## 6. GLP 基準

a) 「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、平成 20 年 7 月 4 日 最終改正) に定める「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」

b) OECD Principles of Good Laboratory Practice, November 26, 1997

## 7. 試験日程

試 験 開 始 日	2010 年 11 月 18 日
実 験 開 始 日	2010 年 11 月 24 日
実 験 終 了 日	2010 年 11 月 26 日
試 験 終 了 日	2011 年 3 月 11 日

## 8. 試資料の保管

試験計画書（正本）、最終報告書（正本）、生データ、試験委託書、被験物質調査票及びその他の記録は当試験施設に保管する。なお、被験物質は保管しない。

保管期間は最終報告書提出後 10 年間とする。

保管期間終了後の処置（継続保管、廃棄又は返却）は、試験委託者と協議の上決定する。

## 9. 試験関係者

試験責任者

（所属 試験第四課）

試験担当者（生物試験の実施）

試験担当者（分析試験の実施）

## 10. 最終報告書の承認

2011年 3 月 11 日

試験責任者

## 11. 要 約

試験条件

試験生物	オオミジンコ ( <i>Daphnia magna</i> )
試験用水	ASTM 調製水
試験区	0.40、0.27、0.18、0.12、0.079、0.053、0.035 mg/L (公比 1.5) の 7 濃度区 [測定濃度として 0.34、0.23、0.15、0.11、0.071、0.036、0.024 mg/L] 及び対照区
試験液の調製	試験用水を満たした三角フラスコ内に必要量の供試試料を水面下に 添加後、攪拌して試験原液を調製し、試験用水を混合、攪拌して試 験液を調製
暴露方式	止水式 (密閉系)
暴露期間	48 時間
連 数	4 連/試験区
試験生物数	20 頭/試験区 (5 頭/試験容器)
試験液量	約 200 mL/試験区 (約 50 mL/試験容器)
水 温	20.0~20.2°C
照 明	室内灯、16 時間明/8 時間暗
給 餌	無給餌
エアレーション	無し
被験物質濃度の測定	GC-MS 法 (暴露開始時及び終了時)

試験結果

48 時間 EC <sub>50</sub>	0.11 mg/L
48 時間 100%遊泳阻害最低濃度	0.15 mg/L
48 時間 0%遊泳阻害最高濃度	0.071 mg/L

(上記濃度は、測定濃度の幾何平均値に基づく値)



## 12. 試験材料

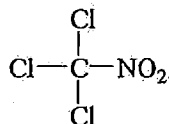
## 12.1 被験物質

## a) 名称等

名 称	トリクロロニトロメタン
別 名	クロロピクリン
CAS 番号	76-06-2

## b) 構造式等

構造式

分子式  $\text{CCl}_3\text{NO}_2$ 分子量 164.38<sup>\*1</sup>

\*1 原子量表 (2010) を用いて算出した値

## c) 純度等

被験物質純度 99.9%<sup>\*2</sup>不純物 水分 18 ppm<sup>\*2</sup>

供給者

ロット番号

被験物質は純度 100%として取り扱った。

\*2 供給者提供の検査成績書

## d) 物理化学的性状

蒸気圧 24 mmHg (25°C) <sup>\*4</sup>対水溶解度 0.1621 g/100 mL (25°C) <sup>\*4</sup>

1-オクタノール/水分配係数

log Pow = 2.09<sup>\*4</sup>融 点 -64°C<sup>\*3,4</sup>沸 点 112°C (757 mmHg) <sup>\*4</sup>常温における性状 わずかに油状、無色液体<sup>\*3</sup>

安定性 酸に安定、アルカリに不安定。

加熱や光の影響下で分解して、有害ヒュームのニトロシルクロリドとホスゲン、窒素酸化物を発生する。<sup>\*3</sup>

溶媒に対する溶解度等

ベンゼン、アルコール、二硫化炭素と混和、エーテルに可溶<sup>\*3</sup>比 重  $d_4^{20}$  1.6558<sup>\*4</sup>

\*3 クロロピクリン工業会の製品安全データシート

\*4 化学物質総合情報提供システム (CHRIIP)

## e) 保管条件 (SOP: MNG/C-310)

容器を密閉し換気の良い場所で施錠して室温暗所保管した。

## f) 被験物質の同一性及び保管条件下における安定性の確認 (SOP: ANA/091)

入手した供試試料について赤外吸収スペクトルを測定し、供試試料の特性が認められることを確認した。また、実験開始前及び終了後の赤外吸収スペクトルを比較することにより、保管条件下における供試試料の安定性を確認した。

## g) 取扱い上の注意

被験物質は揮発性を有するため、局所排気装置内で取り扱った。

## 12.2 試験生物

種 オオミジンコ (*Daphnia magna* Clone A)  
 生物種選択の理由 テストガイドラインに推奨されている種  
 入手源 英国 Sheffield 大学 (所在地 Sheffield S10 2UQ, United Kingdom)  
 入手日 1990 年 7 月 9 日  
 順 化 久留米事業所で継代飼育している成体より産出された幼体を用いた。幼体を産出する成体は、試験条件と同じ水質 (脱塩素水道水)、水温 ( $20\pm 1^{\circ}\text{C}$ ) 及び明暗周期 (16 時間明/8 時間暗) 下で 14 日間以上飼育したもの (19 日齢) で成体の生存率が 100% の群 (ロット) を使用した。継代飼育中はミジンコ 1 頭当たり *Chlorella vulgaris* を  $0.1\sim 0.2\text{ mgC}$  (有機炭素含量) /日の割合で 1 日に 1 回給餌した。

幼体の選別 生後 24 時間以内の幼体  
 群分け 無作為抽出  
 試験系の再現性の確認 定期的に基準物質による急性遊泳阻害試験を実施  
 最新のデータを以下に示す。  
 基準物質：ニクロム酸カリウム  
 (和光純薬工業 試薬特級 ロット番号 ALP5310)  
 実施期間：2010 年 11 月 2 日～11 月 4 日  
 48 時間  $\text{EC}_{50}$  :  $0.78\text{ mg/L}$   
 この値は久留米事業所におけるバックグラウンドデータの規定範囲内 (平均 $\pm 2\times$ 標準偏差) であった [平均 $\pm$ 標準偏差 :  $0.83\pm 0.23\text{ mg/L}$  (n=3) ] 。

## 13. 試験の実施

## 13.1 試験用水

ASTM 調製水 (ASTM E 729 ; 2007) を用いた (セレン  $1\text{ }\mu\text{g/L}$ 、ビタミン B<sub>12</sub>  $1\text{ }\mu\text{g/L}$  含有)。

Substance	Formula	Final concentration in aqueous dilution media (mg/L)
Sodium hydrogen carbonate	$\text{NaHCO}_3$	192
Calcium sulphate dihydrate	$\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	120
Magnesium sulphate heptahydrate	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	246
Potassium chloride	KCl	8
Sodium selenite	$\text{Na}_2\text{SeO}_3$	0.00219
Vitamin B <sub>12</sub>	-	0.001

## 13.2 試験器具及び装置

試験容器	50 mL 容共栓付ガラス製三角フラスコ（密閉容器）
恒温槽	プラスチック製水槽
	加熱・冷却ユニット HCA 250（佐藤工業）

## 13.3 試験液の調製法

供試試料の添加は、比重を基に算出した密度（ $1.6558 \text{ g/cm}^3$ ）換算による容量添加で行った。この操作は局所排気装置内で行った。

試験用水を満たした三角フラスコ内に必要量の供試試料をプッシュボタン式液体用微量体積計（Eppendorf）で水面下に添加後、気相がないように密栓した。約  $20^\circ\text{C}$  の条件下で約 1 時間攪拌したものを試験原液とした。調製容器にて必要量の試験原液と試験用水を混合、攪拌して試験液を調製し、各試験容器に分割後、気相が無いように密閉した。

## 13.4 試験条件

暴露方式	止水式（試験液の交換無し）、密閉系
暴露期間	48 時間
試験濃度	0.40、0.27、0.18、0.12、0.079、0.053、0.035 mg/L（公比 1.5） 予備試験結果から試験濃度及び公比を決定した。 予備試験結果は Additional data に示す。
対照区	被験物質を含まない試験用水
連 数	4 連/試験区
試験生物数	20 頭/試験区（5 頭/試験容器）
試験液量	約 200 mL/試験区（約 50 mL/試験容器）
水 温	$20 \pm 1^\circ\text{C}$
溶存酸素濃度	3 mg/L 以上（エアレーション無し）
pH 調整	無し
照 明	室内灯による 16 時間明/8 時間暗
給 餌	無給餌

## 13.5 観察と測定

## a) 試験生物の一般状態

暴露開始 24 及び 48 時間後に遊泳阻害及び行動や外見の異常を観察した。試験容器を穏やかに動かした後、15 秒間一度も泳げない場合を遊泳阻害されたとみなした。

## b) 試験液の状態

暴露開始時及び終了時に観察

## c) 試験液の水質

測定項目	溶存酸素濃度、pH 及び水温
測定頻度	暴露開始時及び終了時
測定方法	調製容器より別途分取した試験液について測定（暴露開始時） 各試験区につき 1 試験容器について測定（暴露終了時）
測定機器	溶存酸素計 YSI MODEL 58（YSI Incorporated） ポータブル pH 計 HM-21P（東亜ディーケーケー） 検定済ガラス製棒状温度計

## d) 試験液中の被験物質濃度

測定頻度 暴露開始時及び終了時

採水方法 調製容器より別途分取（暴露開始時）

各試験容器の中層から均等量採取し、混合（暴露終了時）

採水量 約 30 mL（全試験区）

測定方法 Appendix 参照

13.6 EC<sub>50</sub>の算出法

24 時間については Moving average 法により EC<sub>50</sub> を算出した。また、その 95%信頼限界も算出した。48 時間については Binomial 法により EC<sub>50</sub> を算出した。

EC<sub>50</sub> は、当事業所にて開発したコンピュータプログラム（Microsoft Excel により起動）により算出した。

なお、結果の算出には試験濃度として暴露期間中に測定した試験液中の被験物質濃度の幾何平均値を用いた。

## 13.7 試験の有効性

- a) 暴露期間中において対照区の遊泳阻害率が 10%を超えてはならない。
- b) 暴露期間中において 10%を超える対照区のみジンコが脱色、水面に浮いているなどの異常な症状、行動を示してはならない。
- c) 溶存酸素濃度は暴露終了時において、3 mg/L 以上でなければならない。

## 13.8 数値の取扱い

数値の丸め方は、JIS Z 8401 : 1999 規則 B に従った。

## 14. 試験結果及び考察

以下の本文中における試験濃度は、設定濃度（0.40、0.27、0.18、0.12、0.079、0.053 及び 0.035 mg/L）における測定濃度の幾何平均値（0.34、0.23、0.15、0.11、0.071、0.036 及び 0.024 mg/L）で示す。

## 14.1 遊泳阻害率

暴露開始 24 及び 48 時間後での遊泳阻害率を Table 1、濃度－遊泳阻害率曲線を Figure 1 に示す。

暴露 48 時間における 100%遊泳阻害最低濃度は 0.15 mg/L、0%遊泳阻害最高濃度は 0.071 mg/L であった。なお、対照区の遊泳阻害率は 0%であり、有効性基準（10%を超えない）を満たしていた。

## 14.2 一般状態の観察

暴露期間中における一般状態の観察結果を Table 2 に示す。

暴露期間中に嗜眠状態、遊泳阻害及び活動度の低下が観察された。なお、暴露期間中の対照区において異常な行動や外観（脱色、水面に浮くなど）を示した個体はみられず、有効性基準（10%を超えない）を満たしていた。

### 14.3 試験液の観察と測定

#### a) 試験液の状態

暴露開始時は無色透明であった。暴露終了時も同様であった。

#### b) 試験液の水質

試験液の水質を Table 3 に示す。

暴露期間中に測定した溶存酸素濃度は 8.6～8.8 mg/L、pH は 7.6～7.7、水温は 20.0～20.2℃ であった。なお、溶存酸素濃度は有効性基準（暴露終了時において 3 mg/L 以上）を満たしていた。

#### c) 試験液中の被験物質濃度

被験物質濃度の測定方法及び結果を Appendix 1、検量線及びクロマトグラムを Appendix 2 に示す。

測定した試験液中の被験物質濃度は、暴露開始時で 0.028～0.35 mg/L であった。暴露終了時は 0.021～0.33 mg/L であり、開始時濃度に対して 75～95% であった。

### 14.4 EC<sub>50</sub>

各時間での EC<sub>50</sub> を Table 4 に示す。

被験物質のオオミジンコに対する 24 時間 EC<sub>50</sub> は 0.15 mg/L（95%信頼限界：0.12～0.18 mg/L）、48 時間 EC<sub>50</sub> は 0.11 mg/L であった。

### 14.5 考 察

試験は被験物質の試験用水への溶解濃度以下での試験生物に対する EC<sub>50</sub> を求める試験として行った。被験物質は揮発性を有することから、密閉容器にて試験を実施した。その結果 48 時間 EC<sub>50</sub> は 0.11 mg/L であった。暴露期間中、試験液中の被験物質濃度は暴露開始時濃度の 75%以上を維持しており、また、試験環境条件も適切な範囲内であったことから、試験は試験法に準じたものであったと判断される。

### 15. 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

当該要因はなかった。

Table 1 Immobility

Measured concentration <sup>a</sup> (mg/L)		Immobility (%)			
		24 hours		48 hours	
		Replicate	Test level	Replicate	Test level
Control	A	0	0	0	0
	B	0		0	
	C	0		0	
	D	0		0	
0.024	A	0	0	0	0
	B	0		0	
	C	0		0	
	D	0		0	
0.036	A	0	0	0	5
	B	0		0	
	C	0		20	
	D	0		0	
0.071	A	0	0	0	0
	B	0		0	
	C	0		0	
	D	0		0	
0.11	A	0	20	40	50
	B	40		60	
	C	20		20	
	D	20		80	
0.15	A	80	80	100	100
	B	80		100	
	C	100		100	
	D	60		100	
0.23	A	80	75	100	100
	B	80		100	
	C	60		100	
	D	80		100	
0.34	A	60	75	100	100
	B	80		100	
	C	60		100	
	D	100		100	

a Geometric mean of the measured concentrations (also expressed as measured concentration in the following tables and figure)

Table 2 Observed abnormal response

Measured concentration (mg/L)	Observed abnormal response (Number of affected test organism)			
	24 hours		48 hours	
	Immobilization	Other symptom	Immobilization	Other symptom
Control	-	-	-	-
0.024	-	-	-	-
0.036	-	-	IM(1)	RA(1)
0.071	-	-	-	RA(2)
0.11	IM(4)	RA(2)	IM(10) LETH(9)	RA(1)
0.15	IM(16) LETH(16)	-	IM(20) LETH(20)	-
0.23	IM(15) LETH(14)	-	IM(20) LETH(20)	-
0.34	IM(15) LETH(15)	-	IM(20) LETH(20)	-

- : Normal (No abnormal response)

Abbreviation of symptoms

IM : Immobilization

LETH : Lethargic

RA : Reduced activity

Table 3 Condition of test solutions

Measured concentration (mg/L)	Dissolved oxygen concentration (mg/L)		pH		Temperature (°C)	
	At the start	At the end	At the start	At the end	At the start	At the end
Control	8.8	8.7	7.6	7.6	20.2	20.0
0.024	8.8	8.7	7.6	7.6	20.2	20.0
0.036	8.8	8.6	7.6	7.6	20.2	20.0
0.071	8.7	8.6	7.6	7.6	20.2	20.0
0.11	8.7	8.7	7.6	7.6	20.2	20.0
0.15	8.7	8.6	7.6	7.6	20.2	20.0
0.23	8.7	8.6	7.6	7.6	20.2	20.0
0.34	8.7	8.7	7.6	7.7	20.2	20.0

Table 4 EC<sub>50</sub> to *Daphnia magna*

Exposure duration	EC <sub>50</sub> (mg/L)	95% confidence interval (mg/L) (Slope of the dose-response curve)	Statistical procedure used for determination of EC <sub>50</sub>
24-hour	0.15	0.12 to 0.18 (3.6)	Moving average method
48-hour	0.11		Binomial test



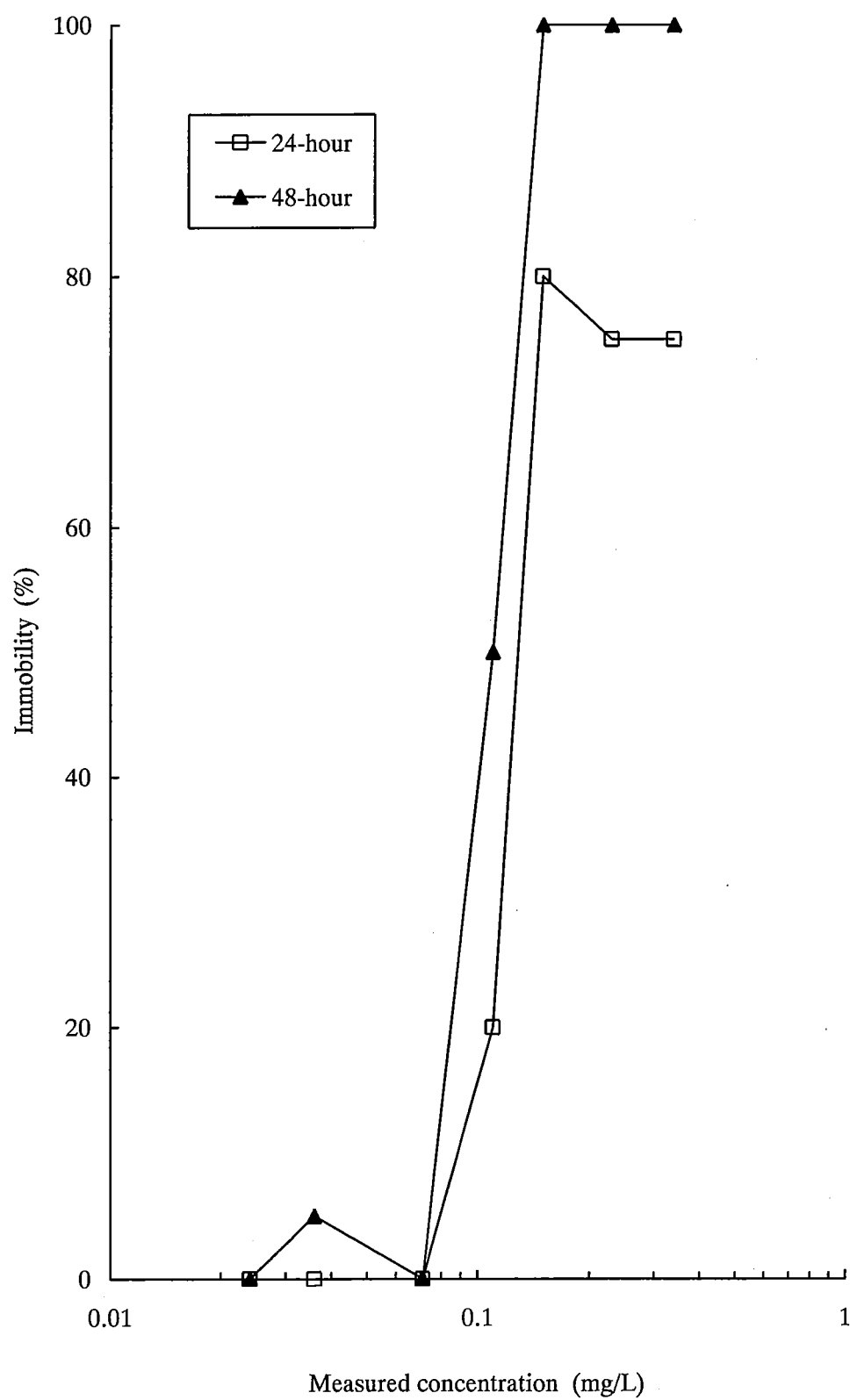


Figure 1 Concentration-immobility curve.

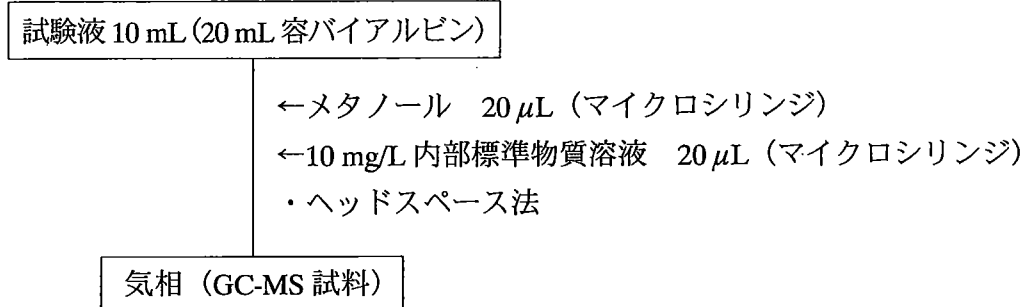
## Appendix 1

被験物質濃度の測定方法及び結果

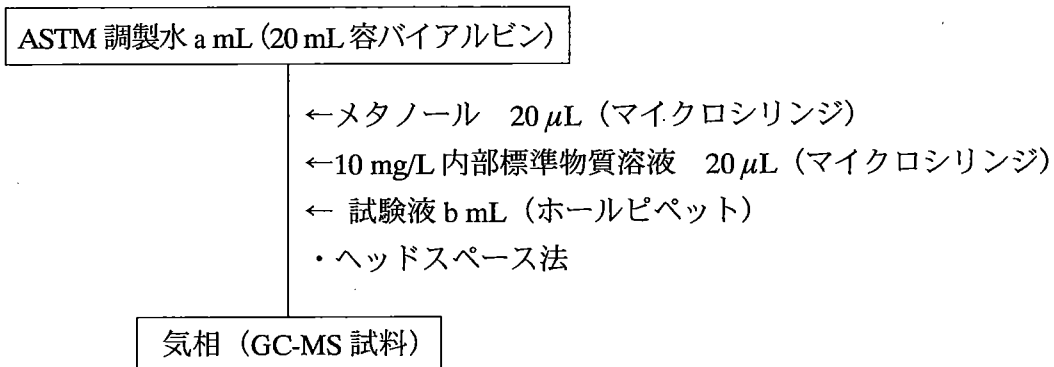
## 1. 試験液の前処理操作

採取した試験液について、以下のフロースキーム①、②に従って前処理操作を行い、ガスクロマトグラフィー質量分析法（GC-MS）試料を調製した。なお、フロースキーム②は  $a + b = 10 \text{ mL}$  になるように調製した。

フロースキーム①（対照区、 $0.035 \text{ mg/L}$  及び  $0.053 \text{ mg/L}$  濃度区）



フロースキーム②（その他の濃度区）



## 2. 被験物質濃度の測定

GC-MS 試料中の被験物質濃度は、クロマトグラム上で得られる GC-MS 試料の被験物質 ( $m/z$  117、119 のトータルイオンカレント) と内部標準物質のピーク面積比を、濃度既知の標準試料の被験物質と内部標準物質の絶対量比とピーク面積比で作成した検量線の回帰式に代入して求めた。得られたクロマトグラム (一例) を Appendix 3 に示す。

## 定量条件

機 器	ガスクロマトグラフー質量分析計 GCMS-QP2010 (No.2) (島津製作所)
-----	---

ヘッドスペース条件

加圧時間	3.0 min
保温時間	20 min
注入時間	0.12 min
オープン温度	60°C
ニードル温度	100°C
トランスファ温度	150°C
ヘッドスペースキャリアガス	100.0 kPa

ガスクロマトグラフ条件

カラム	Inert Cap 624 (60 m×0.32 mm I.D., 膜厚 1.80 $\mu$ m, ジーエルサイエンス)
カラム温度	80°C (3.0 min) → 140°C (3.0 min)
昇温速度	15°C/min
試料導入部温度	150°C
キャリアガス	ヘリウム

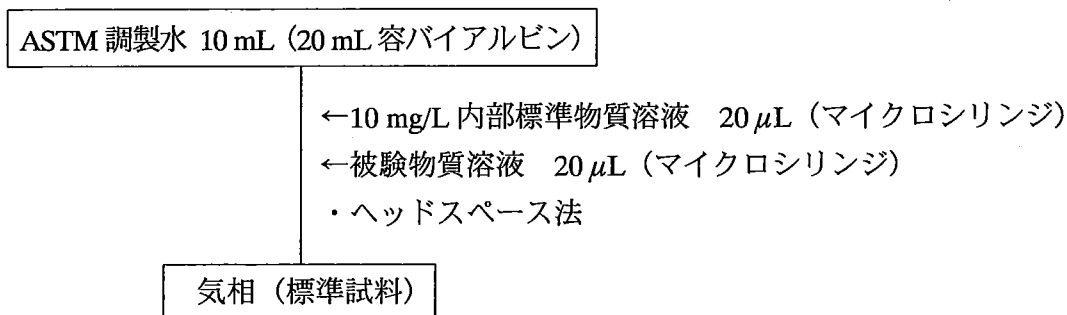
質量分析計条件

イオン化法	電子イオン化法 (EI)
検出法	選択イオンモニタリング (SIM)
測定イオン ( $m/z$ )	被験物質 117、119 内部標準物質 96
イオン源温度	200°C
イオン化エネルギー	70 eV
インタフェース温度	260°C

### 3. 標準試料の調製

供試試料 100 mg を正確にはかりとり、メタノールに溶解して 2000 mg/L の被験物質溶液を調製した。これをメタノールで希釈して 2.0、10、20、40 mg/L の被験物質溶液を調製した。これらの被験物質溶液を以下のフロースキームに従って前処理操作を行い、0.0040、0.020、0.040 及び 0.080 mg/L の標準試料を調製した。

フロースキーム



### 4. 内部標準物質溶液の調製

(SOP: ANA/019)

1000 mg/L フルオロベンゼン標準原液（関東化学 水質試験用 ロット番号 208U1494）をメタノールで希釈して 10 mg/L の内部標準物質溶液を調製した。

### 5. 検量線の作成

3.の標準溶液の調製と同様にして 0.0040、0.020、0.040 及び 0.080 mg/L の標準溶液を調製した。これらを 2.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被験物質と内部標準物質のピーク面積比と、標準試料中の被験物質と内部標準物質の絶対量比により、測定日毎に検量線を作成した。作成した検量線を Appendix 3 に示す。なお、試験液中の被験物質の定量下限値は、定量性が確認された範囲での標準溶液の最低濃度 (0.0040 mg/L) とした。

### 6. 測定結果

試験液中の被験物質濃度の測定結果を以下に示す。

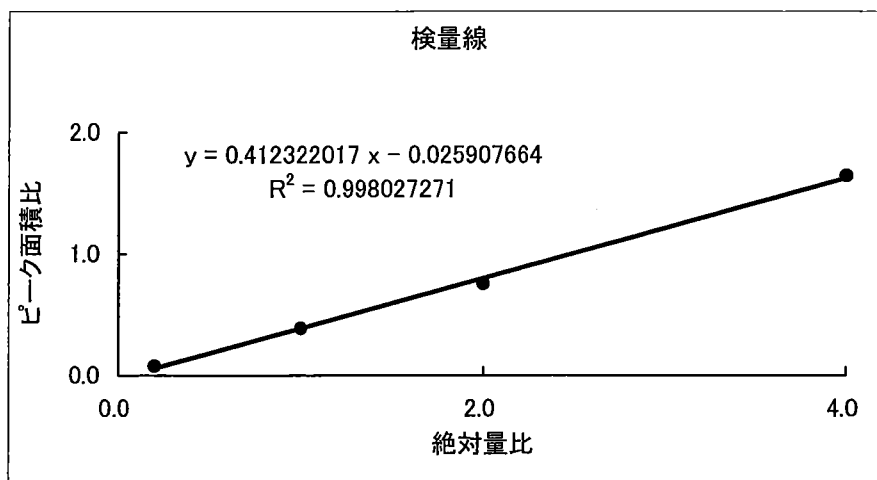
Appendix table 1-1 Measured concentrations of test item in test solutions

Nominal concentration (mg/L)	Measured concentration (mg/L) (Percentage of measured concentration versus that at the start %)		
	At the start	At the end	Geometric mean
Control	n.d.	n.d.	
0.035	0.028	0.021 (75)	0.024
0.053	0.038	0.035 (93)	0.036
0.079	0.075	0.067 (90)	0.071
0.12	0.11	0.10 (91)	0.11
0.18	0.16	0.14 (89)	0.15
0.27	0.25	0.22 (88)	0.23
0.40	0.35	0.33 (95)	0.34

n.d. : &lt; 0.0040 mg/L

## Appendix 2

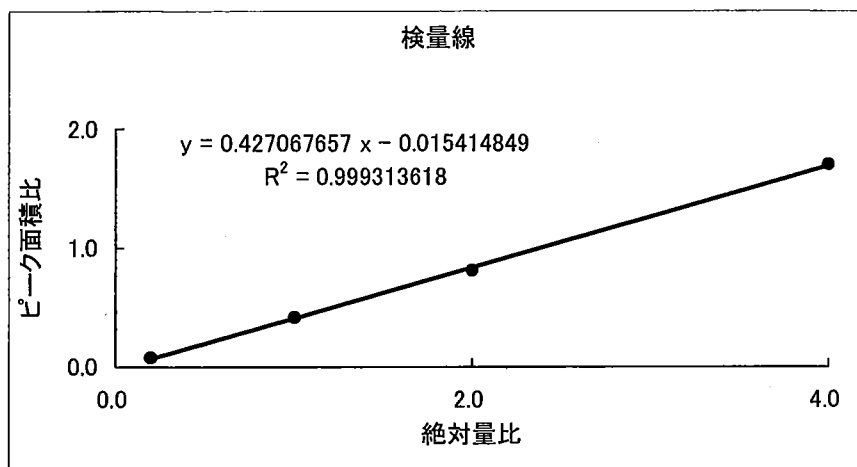
検量線及びクロマトグラム



Std.濃度 (mg/L)	被験物質含有量 ( $\mu$ g)	内部標準物質含有量 ( $\mu$ g)	絶対量比	被験物質 ピーク面積値	内部標準物質 ピーク面積値	ピーク面積比
Solvent Blank	—	0.20	—	—	916503	—
0.0040	0.040	0.20	0.20	66455	850952	0.078095
0.020	0.20	0.20	1.0	322082	830575	0.387782
0.040	0.40	0.20	2.0	595333	787725	0.755762
0.080	0.80	0.20	4.0	1355919	825045	1.643449

Appendix figure 2-1-1 Calibration curve of test item for analysis by GC-MS at start of exposure.



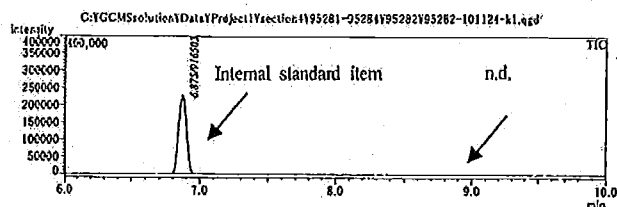


Std.濃度 (mg/L)	被験物質含有量 ( $\mu\text{g}$ )	内部標準物質含有量 ( $\mu\text{g}$ )	絶対量比	被験物質 ピーク面積値	内部標準物質 ピーク面積値	ピーク面積比
Solvent Blank	—	0.20	—	—	863434	—
0.0040	0.040	0.20	0.20	58846	738150	0.079721
0.020	0.20	0.20	1.0	317080	759386	0.417548
0.040	0.40	0.20	2.0	602648	742721	0.811406
0.080	0.80	0.20	4.0	1191493	699006	1.704553

Appendix figure 2-1-2 Calibration curve of test item for analysis by GC-MS at end of exposure.

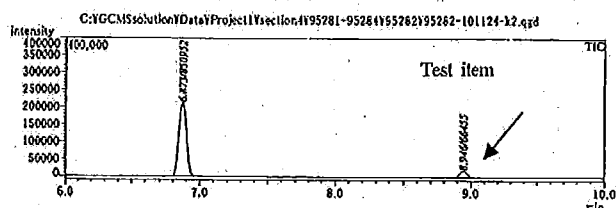
Solvent Blank

File name: C:\YGCM\Solution\YData\Project1\Ysection4\Y95281-95284\Y95282\Y95282-101124-k1.qgd



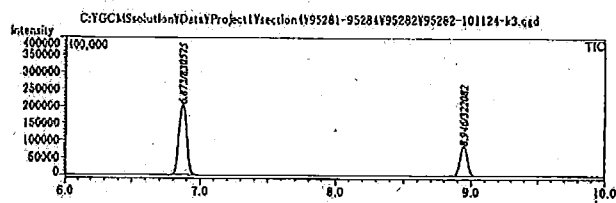
Standard solution 0.0040 mg/L

File name: C:\YGCM\Solution\YData\Project1\Ysection4\Y95281-95284\Y95282\Y95282-101124-k2.qgd



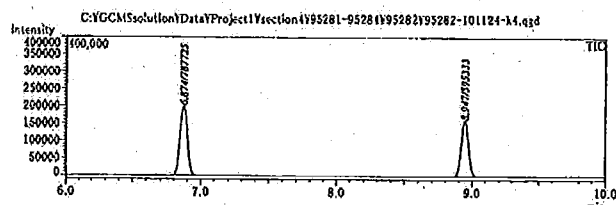
Standard solution 0.020 mg/L

File name: C:\YGCM\Solution\YData\Project1\Ysection4\Y95281-95284\Y95282\Y95282-101124-k3.qgd



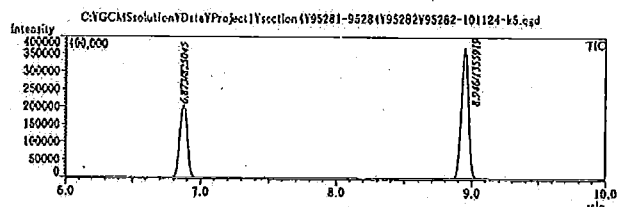
Standard solution 0.040 mg/L

File name: C:\YGCM\Solution\YData\Project1\Ysection4\Y95281-95284\Y95282\Y95282-101124-k4.qgd



Standard solution 0.080 mg/L

File name: C:\YGCM\Solution\YData\Project1\Ysection4\Y95281-95284\Y95282\Y95282-101124-k5.qgd



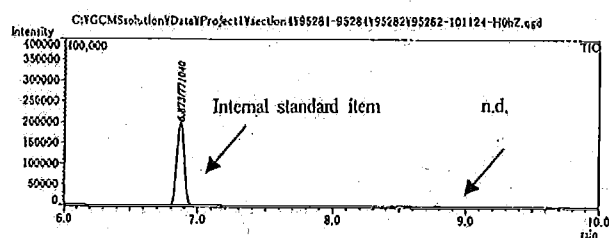
Date: 2010.11.24

Name: [REDACTED]

Appendix figure 2-2-1 GC-MS chromatograms at start of exposure.

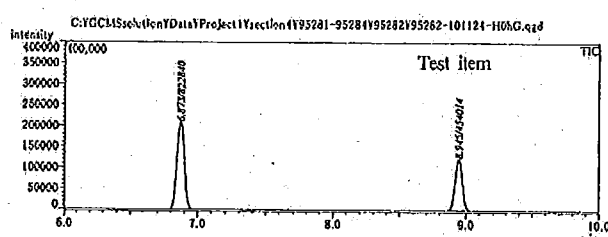
Control

File name: C:\GCMSsolution\Data\Project1\Ysection4\95281-95284\95282\95282-101124-H0hZ.qgd



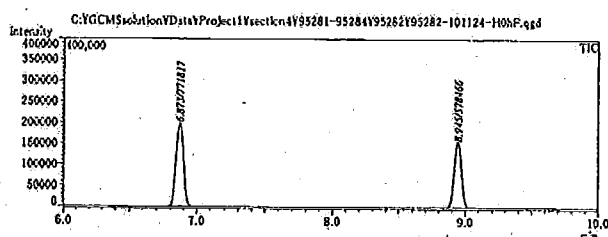
0.035 mg/L exposure level

File name: C:\GCMSsolution\Data\Project1\Ysection4\95281-95284\95282\95282-101124-H0hG.qgd



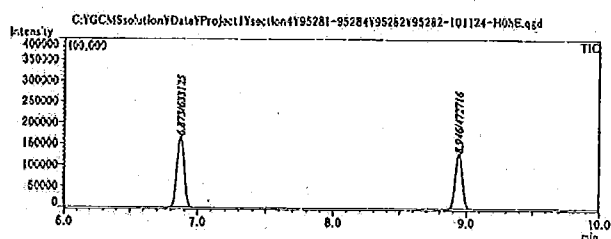
0.053 mg/L exposure level

File name: C:\GCMSsolution\Data\Project1\Ysection4\95281-95284\95282\95282-101124-H0hF.qgd



0.079 mg/L exposure level

File name: C:\GCMSsolution\Data\Project1\Ysection4\95281-95284\95282\95282-101124-H0hE.qgd



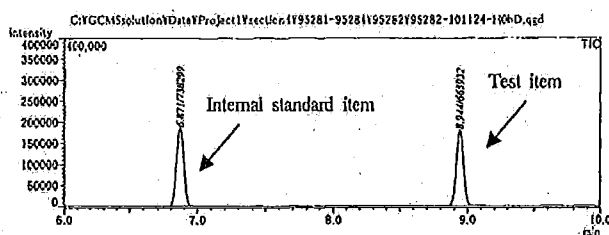
Date: 2010.11.24

Name: [REDACTED]

Appendix figure 2-2-2 GC-MS chromatograms at start of exposure.

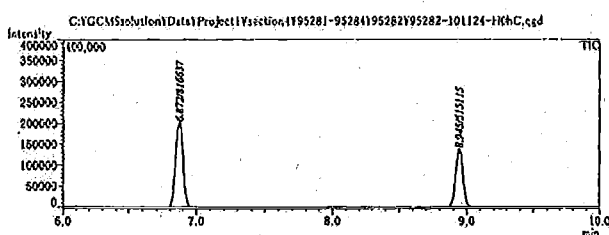
0.12 mg/L exposure level

File name: C:\GCMSsolution\Data\Project1\Ysection4\95281-95284\95282\95282-101124-H0hD.qgd



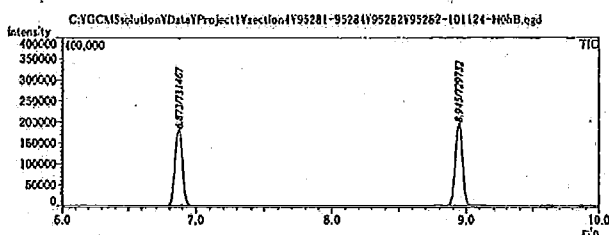
0.18 mg/L exposure level

File name: C:\GCMSsolution\Data\Project1\Ysection4\95281-95284\95282\95282-101124-H0hC.qgd



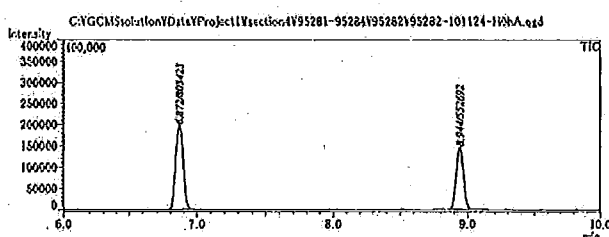
0.27 mg/L exposure level

File name: C:\GCMSsolution\Data\Project1\Ysection4\95281-95284\95282\95282-101124-H0hB.qgd



0.40 mg/L exposure level

File name: C:\GCMSsolution\Data\Project1\Ysection4\95281-95284\95282\95282-101124-H0hA.qgd



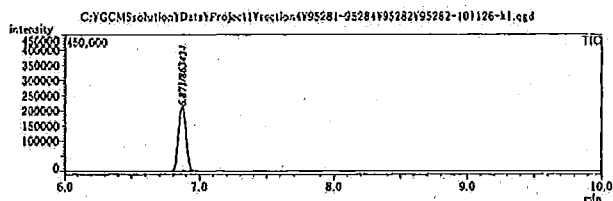
Date : 2010.11.24

Name : [REDACTED]

Appendix figure 2-2-3 GC-MS chromatogram at start of exposure.

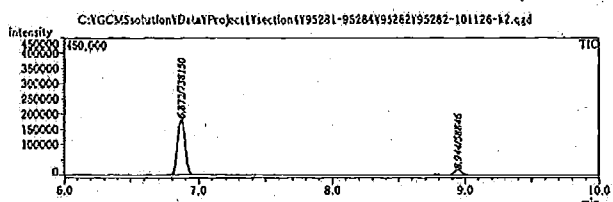
Solvent Blank

File name: C:\GCMSolution\YData\Project1\Ysection4\Y95281-95284\Y95282\Y95282-101126-k1.qgd



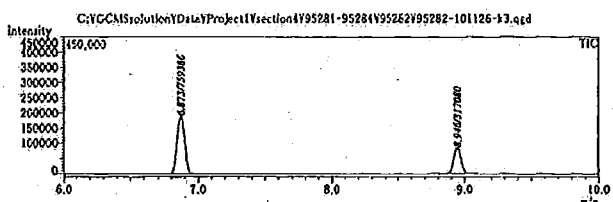
Standard solution 0.0040 mg/L

File name: C:\GCMSolution\YData\Project1\Ysection4\Y95281-95284\Y95282\Y95282-101126-k2.qgd



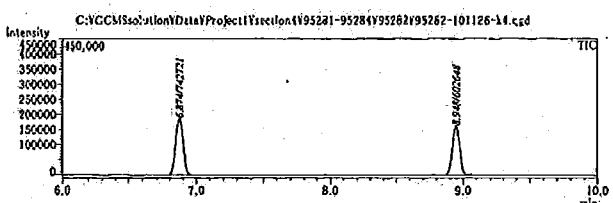
Standard solution 0.020 mg/L

File name: C:\GCMSolution\YData\Project1\Ysection4\Y95281-95284\Y95282\Y95282-101126-k3.qgd



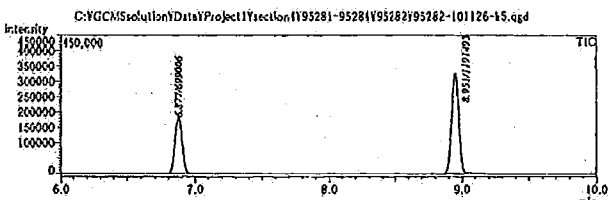
Standard solution 0.040 mg/L

File name: C:\GCMSolution\YData\Project1\Ysection4\Y95281-95284\Y95282\Y95282-101126-k4.qgd



Standard solution 0.080 mg/L

File name: C:\GCMSolution\YData\Project1\Ysection4\Y95281-95284\Y95282\Y95282-101126-k5.qgd



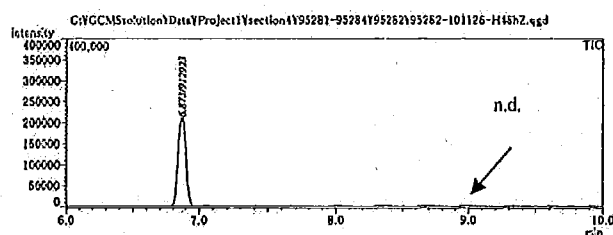
Date: 2010.11.26

Name: [REDACTED]

Appendix figure 2-3-1 GC-MS chromatograms at end of exposure.

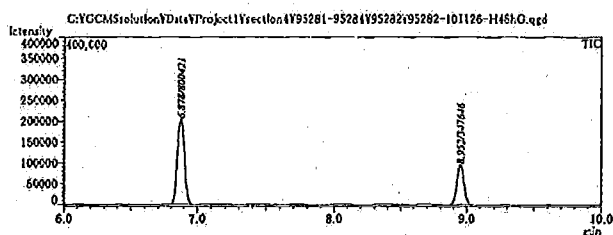
Control

File name: C:\YGCMSSolution\Data\Project1\Ysection4\95281-95284\95282\95282-101126-H48hZ.qgd



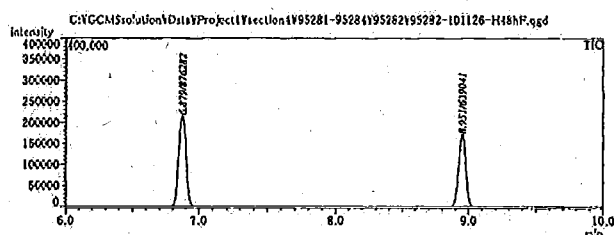
0.035 mg/L exposure level

File name: C:\YGCMSSolution\Data\Project1\Ysection4\95281-95284\95282\95282-101126-H48hG.qgd



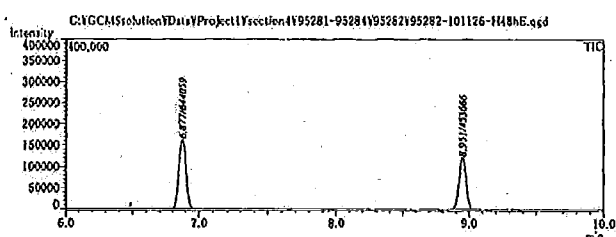
0.053 mg/L exposure level

File name: C:\YGCMSSolution\Data\Project1\Ysection4\95281-95284\95282\95282-101126-H48hF.qgd



0.079 mg/L exposure level

File name: C:\YGCMSSolution\Data\Project1\Ysection4\95281-95284\95282\95282-101126-H48hE.qgd



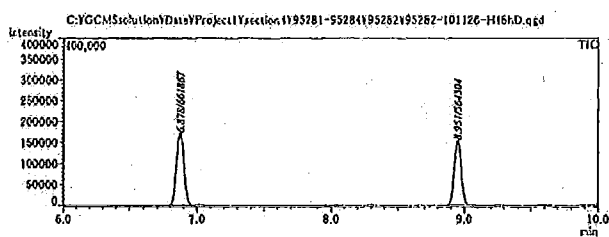
Date : 2010.11.26

Name :

Appendix figure 2-3-2 GC-MS chromatograms at end of exposure.

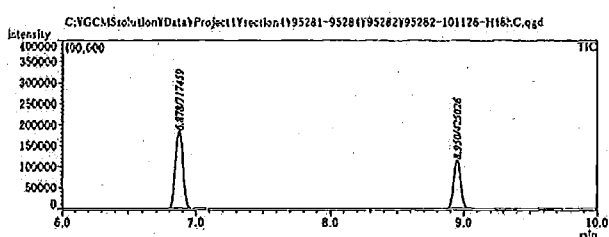
0.12 mg/L exposure level

File name: C:\GCMSsolution\YData\Project1\Ysection4\Y95281-95284\Y95282\Y95282-101126-H48hD.qgd



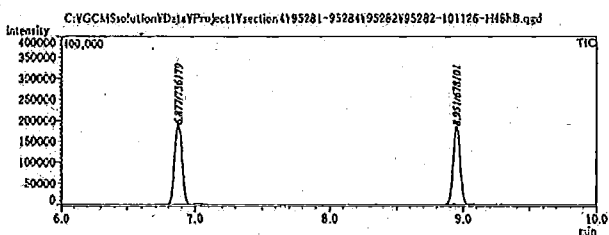
0.18 mg/L exposure level

File name: C:\GCMSsolution\YData\Project1\Ysection4\Y95281-95284\Y95282\Y95282-101126-H48hC.qgd



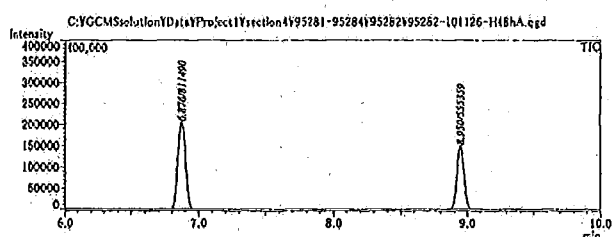
0.27 mg/L exposure level

File name: C:\GCMSsolution\YData\Project1\Ysection4\Y95281-95284\Y95282\Y95282-101126-H48hB.qgd



0.40 mg/L exposure level

File name: C:\GCMSsolution\YData\Project1\Ysection4\Y95281-95284\Y95282\Y95282-101126-H48hA.qgd



Date : 2018. 11. 26

Name :

Appendix figure 2-3-3 GC-MS chromatogram at end of exposure.

## Additional data



予備試験結果

(



## 1. 被験物質の試験用水への溶解度

被験物質の試験用水への溶解度は目視で 100 mg/L 以上と判断された。

## 2. 生物予備試験

## 2.1 予備試験 1

暴露方式 止水式（密閉系）

試験生物数 5 頭/試験区（5 頭/試験容器）

試験用水 ASTM 調製水

試験液調製法 100 mg/L になるように供試試料を密度（1.6558 g/mL）換算による容量添加し、ただちに密栓し、約 20℃ の条件下で攪拌、溶解後、試験用水で希釈して試験原液を調製した。試験原液を試験用水で適宜希釈して試験液を調製した。

## &lt;試験生物への影響&gt;

設定濃度区 (mg/L)	24 時間		48 時間	
	遊泳阻害率 (%)	その他の症状	遊泳阻害率 (%)	その他の症状
0.0032	0	—	0	—
0.010	0	—	0	—
0.032	0	—	0	—
0.10	0	—	20	—
0.32	0	—	100	—

—はその他の症状が観察されなかったことを示す。

## 2.2 予備試験 2

暴露方式 止水式（密閉系）

試験生物数 10 頭/試験区（5 頭/試験容器）

試験用水 ASTM 調製水

試験液調製法 予備試験 1 と同様

分析 試験液中の被験物質濃度の測定を行った。

## &lt;試験生物への影響&gt;

設定濃度区 (mg/L)	24 時間		48 時間	
	遊泳阻害率 (%)	その他の症状	遊泳阻害率 (%)	その他の症状
0.050	0	—	0	RA
0.11	90	—	100	—
0.23	100	—	100	—
0.50	100	—	100	—

—はその他の症状が観察されなかったことを示す。

症状の略称

RA (Reduced activity) : 活動度の低下

＜試験液中の被験物質濃度＞

設定濃度区 (mg/L)	測定濃度 (mg/L) 対開始時濃度 (%)	
	暴露開始時	暴露終了時
0.050	0.040	0.035 (87)
0.50	0.40	0.36 (91)

3. 本試験条件

試験濃度      0.40、0.27、0.18、0.12、0.079、0.053、0.035 mg/L (公比 1.5)

暴露方式      止水式 (密閉)