

環境省殿

本写しは原本と相違ありません

(株)三菱化学安全科学研究所  
横浜研究所 運営管理者

## 最 終 報 告 書

1,1-ジクロロエチレンのヒメダカ (*Oryzias latipes*)  
に対する急性毒性試験

(試験番号：A060031)

2006年 7月21日

株式会社三菱化学安全科学研究所

# 陳 述 書

株式会社三菱化学安全科学研究所

横浜研究所

試 験 委 託 者 : 環境省

表 題 : 1,1-ジクロロエチレンのヒメダカ (*Oryzias latipes*)  
に対する急性毒性試験

試 験 番 号 : A060031

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GLP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17年4月1日）

2006年 7月21日

試験責任者

[Redacted Signature]

[Redacted Stamp]

# 信 頼 性 保 証 書

株式会社三菱化学安全科学研究所

横浜研究所

試 験 委 託 者 : 環境省

表 題 : 1,1-ジクロロエチレンのヒメダカ (*Oryzias latipes*) に  
対する急性毒性試験

試 験 番 号 : A060031

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、下記の査察および監査実施により確認した。

## 記

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	2006年 5月23日	2006年 5月23日
変更書(変更番号:01)	2006年 6月 1日	2006年 6月 1日
試験液の査察		
試験液の調製	2006年 5月29日	2006年 5月29日
魚の投入	2006年 5月29日	2006年 5月29日
魚の観察	2006年 6月 2日	2006年 6月 2日
最終報告書監査	2006年 7月21日	2006年 7月21日

2006年 7月21日

信頼性保証部門担当者

## 試験実施概要

1. 表 題 : 1,1-ジクロロエチレンのヒメダカ (*Oryzias latipes*)  
に対する急性毒性試験  
(試験番号 : A060031)
2. 試験目的 : 被験物質のヒメダカ (*Oryzias latipes*) に対する急性毒性試験を行い、96 時間の半数致死濃度 (LC50) を求める。
3. 適用ガイドライン : 「新規化学物質等に係る試験の方法について<藻類生長阻害試験, ミジンコ急性遊泳阻害試験及び魚類急性毒性試験>」(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, 最終改正 : 平成 17 年 4 月 1 日)
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, 環保企発第 031121004 号, 最終改正 : 平成 17 年 4 月 1 日)
5. 試験委託者 : 環境省  
東京都千代田区霞が関一丁目 2-2
6. 試験受託者 : 株式会社三菱化学安全科学研究所  
東京都港区芝二丁目 1 番 30 号
7. 試験施設 : 株式会社三菱化学安全科学研究所 横浜研究所  
神奈川県横浜市青葉区鴨志田町 1000 番地
8. 試験責任者 : XXXXXXXXXX  
生態化学研究部

9. 試験担当者： [redacted] [redacted] (2006年 7月21日)  
(試験実施, 分析実施, 報告書作成)

[redacted] [redacted] (2006年 7月21日)  
(試験実施)

10. 試験日程： 試験開始日 2006年 5月23日  
実験開始日 2006年 5月29日  
実験終了日 2006年 6月 2日  
試験終了日 2006年 7月21日

11. 保管： 下記の試資料は、株式会社三菱化学安全科学研究所 横浜研究所の試資料保管施設に保管する。ただし、被験物質については揮散性が著しく、正常な保管が困難なため保管しない。

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

# 目 次

	頁
要 約	7
1 被験物質	9
1.1 名称, 構造式および物理化学的性状	9
1.2 供試試料	10
1.3 保管法および安定性の確認	10
2 供試生物	11
3 試験方法	12
3.1 試験条件	12
3.2 希釈水	12
3.3 試験容器および恒温槽等	12
3.4 試験濃度の設定	13
3.5 試験液の調製	14
3.6 試験液の分析	14
3.7 試験操作	14
3.8 結果の算出	15
4 結果および考察	16
4.1 試験成績の信頼性に影響を及ぼしたと思われる環境要因	16
4.2 試験液中の被験物質濃度	16
4.3 半数致死濃度 (LC50)	16
4.4 0%死亡最高濃度および100%死亡最低濃度	16
4.5 毒性症状	16
4.6 試験液の外観および水温, 溶存酸素濃度, pH	17
Table 1~9	18~25
Figure 1	26
付属資料-1 赤外吸収スペクトル	27~28
付属資料-2 希釈水の水質	29~30
付属資料-3 試験液の調製	31~32
付属資料-4 試験液の分析	33~42
付属資料-5 結果の算出	43~44

## 要 約

### 試験委託者

環境省

### 表 題

1,1-ジクロロエチレンのヒメダカ (*Oryzias latipes*) に対する急性毒性試験

### 試験番号

A060031

### 試験方法

本試験は「新規化学物質等に係る試験の方法について〈藻類生長阻害試験，ミジンコ急性遊泳阻害試験及び魚類急性毒性試験〉」（平成15年11月21日 薬食発第 1121002号，平成15・11・13製局第2号，環境企発第031121002号，最終改正：平成17年4月1日）に準拠して実施した。

- 1) 暴 露 方 式 : 半止水式 (24時間毎に試験液の全量を交換)  
水面をテフロンシートで被覆
- 2) 暴 露 期 間 : 96時間
- 3) 試 験 濃 度 : 対照区, 7.50 , 15.0 , 30.0 , 60.0 , 120 mg/L  
(設定値) 公比 : 2.0
- 4) 試 験 液 量 : 5.0 L/容器
- 5) 連 数 : 1 容器/試験区
- 6) 供試生物数 : 10尾/試験区
- 7) 試 験 温 度 : 24±1 ℃
- 8) 照 明 : 室内光, 16時間明 (1000 lux以下) / 8時間暗
- 9) 分 析 法 : ガスクロマトグラフィー質量分析 (GC/MS)

試 験 結 果 :

1) 試験液中の被験物質濃度

試験液の分析の結果、測定値の設定値に対する割合は、試験液調製時において53~66%、  
24時間後において47~59%であった。

2) 96時間暴露後の半数致死濃度 (LC 50) : 44.5 mg/L (95%信頼区間: 32.2 ~ 73.0 mg/L)

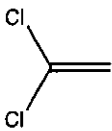
3) 96時間暴露後の0%死亡最高濃度 : 17.3 mg/L

4) 96時間暴露後の100%死亡最低濃度 : 73.0 mg/L



## 1 被験物質

### 1.1 名称，構造式および物理化学的性状

被験物質の名称	1,1-ジクロロエチレン		
別 名	(略称：DCE)		
C A S 番 号	75-35-4		
構 造 式 又 は 示 性 式			
分 子 量	96.94328		
試 験 に 供 し た 物 質 の 純 度 ( % )	99.99% <sup>*1</sup>		
試 験 に 供 し た 物 質 の ロ ッ ト 番 号	02320AD <sup>*1</sup>		
不 純 物 の 名 称 及 び 含 有 率	—		
蒸 気 圧	6.00E+02 mmHg (25℃)		
対 水 溶 解 度	2420 mg/L (25℃)		
1-オクタノール/水分配係数	2.13 (LogKOW)		
融 点	-122.5℃		
沸 点	31.6℃		
常 温 に お け る 性 状	無色透明液体 <sup>*1</sup>		
安 定 性	—		
溶 媒 に 対 す る 溶 解 度 等	溶 媒	溶 解 度	溶 媒 中 の 安 定 性
	アセトン	>1000 mg/L <sup>*2</sup>	—

上記内容は委託者提供資料による。

ただし\*の内容は以下の通り。

\*1：供給者提供資料

\*2：当社測定値

## 1.2 供試試料

供給者： XXXXXXXXXX

## 1.3 保管法および安定性の確認

被験物質は試験期間中、当研究所の試験物質保管用冷蔵庫（保管条件：冷蔵，暗所，窒素封入）内に保管した。試験終了時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試験開始時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

## 2 供試生物

- 1) 和 名 : ヒメダカ  
2) 学 名 : *Oryzias latipes*  
3) 入手先 : 綱島フィッシング (神奈川県横浜市港北区綱島西五丁目18番1号)  
4) 入手日 : 2006年 2月 7日  
5) ロット番号 : 06-H-0207  
6) 全 長 : 平均 2.24 cm (1.96 ~ 2.48 cm) , n=10  
7) 体 重 : 平均 0.102 g (0.057~0.144 g) , n=10  
8) 感受性 : 基準物質 (硫酸銅 (Ⅱ) 五水和物, 試薬特級) による96時間半数致死濃度 (LC50) = 0.77 mg/L (95%信頼区間 : 0.58~1.0 mg/L)  
以下に当研究所におけるLC50値 (1995年以降, n=34) を示す (全て無水物換算値)。

平均値 ± 標準偏差 = 0.85 ± 0.28 mg/L

最小値 ~ 最大値 = 0.44 ~ 1.5 mg/L

- 9) 年 齢 : 孵化後約 1 年  
10) じゅん化期間 : 2006年 5月12日~2006年 5月29日  
暴露開始前 7 日間の死亡率は 5%未満で, 試験には肉眼的に健康で正常な個体を使用した。じゅん化期間中は薬浴は行わなかった (暴露開始前 14 日間のじゅん化条件は以下に示す)。

じゅん化前の薬浴

有 (日本家庭用塩製食塩, 上野製薬製エルバージュ)

### 11) じゅん化条件 :

- 飼育水 : 希釈水 (3.2 参照)  
飼育方式 : 流水式 (飼育密度 : 1.0 g/L/日以下)  
水温 : 24±1 °C  
溶存酸素濃度 : 飽和濃度の 80%以上  
pH : 6.5~8.5  
照明 : 室内光, 16時間明 (1000 lux 以下) / 8時間暗  
餌の種類 : テトラベルケ社テトラミン  
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)

### 3 試験方法

本試験は「新規化学物質等に係る試験の方法について〈藻類生長阻害試験，ミジンコ急性遊泳阻害試験及び魚類急性毒性試験〉」（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，最終改正：平成17年4月1日）に準拠して実施した。

#### 3.1 試験条件

- 1) 暴露方式： 半止水式（24時間毎に試験液の全量を交換）
- 2) 暴露期間： 96 時間
- 3) 試験液量： 5.0 L／容器  
(試験液 1.0 L 当たり供試魚重量が 1.0 g を超えないようにした)
- 4) 連数： 1 容器／試験区
- 5) 供試生物数： 10 尾／試験区
- 6) 試験温度： 24±1 ℃
- 7) 溶存酸素濃度： 飽和濃度の 60% 以上（エアレーションなし）
- 8) pH： pH調整なし
- 9) 照明： 室内光，16 時間明（1000 lux 以下）／8 時間暗
- 10) 給餌： 無給餌

#### 3.2 希釈水

希釈水として，横浜市水道水を活性炭処理後，活性炭で除去できない極微量の遊離塩素を中和するため希釈水にチオ硫酸ナトリウム水溶液を添加することにより残留塩素等を除去し，充分通気，24±2℃に温度制御した脱塩素水道水を使用した。脱塩素水道水は，水産用水基準（昭和58年）に示された測定項目等計35項目について，定期的（約6ヶ月毎）に測定している。測定結果については付属資料－2に示す。硬度は通常 30～100 mg/L（CaCO<sub>3</sub>換算），pHは6.5～8.5である。使用時には残留塩素が無いことを確認した。魚飼育水として適正な水質であると判断した。

#### 3.3 試験容器および恒温槽等

- 1) 試験容器： 5.0 L 容ガラス製水槽（水面をテフロンシート製蓋で覆った）
- 2) 恒温槽： 塩ビ製水槽（恒温装置，タイテック製 クールユニット CL-80F 型）
- 3) 温度計： ハンナ製チェックテンプ
- 4) pH/DO計： 堀場製作所製 D-55 型

- 5) 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  
                             メトラー製 AB204 型

### 3.4 試験濃度の設定

試験濃度は、当該被験物質の希釈水に対する溶解度が >1000 mg/L（当社測定値）であるため、試験上限濃度（100 mg/L）以下に設定した。

以下の表に示す予備試験（各 1 連， 5 尾／2.5 L／試験区）の結果に基づき、本試験濃度を次のように決定した。

本試験濃度（設定値）：対照区， 7.50， 15.0， 30.0， 60.0， 120\* mg/L  
 （公比：2.0）

\*：試験液調製時に揮散による損失が予想されるため、試験上限濃度  
 （100 mg/L）以上になるように設定

なお、2 回の予備試験において暴露開始時の試験液濃度は、それぞれ 87.8 mg/L（設定に対して 59%，予備試験 1 回目）， 50.9 mg/L（設定に対して 68%，予備試験 2 回目）となり、設定どおりに調製ができなかった。本被験物質は、蒸気圧： $6 \times 10^2$  mmHg (25℃)，沸点：31.6℃であることから高い揮散性を有していると考えられる。したがって、設定通りに調製できなかった原因は、揮散による損失と判断した。

予備試験結果（1 回目）

設定濃度 (mg/L)	暴露開始時の 測定濃度 (mg/L)	96時間の死亡率(%)	毒性症状
1.50	-	20	無
15.0	-	20	無
150	87.8 (59%*)	100	--

予備試験結果（2 回目）

設定濃度 (mg/L)	暴露開始時の 測定濃度 (mg/L)	96時間の死亡率(%)	毒性症状
0.750	-	0	無
7.50	-	0	無
75.0	50.9 (68%*)	80	有

\*：設定に対する割合      --：全魚死亡のため、観察不適

### 3.5 試験液の調製

試験液の調製方法を付属資料-3に示す。被験物質原液は用時調製とした。

対照区は希釈水のみとした。

### 3.6 試験液の分析

暴露期間中に2セット（暴露開始時と24時間後の換水前、24時間後の換水後と48時間後の換水前）分析を行った。各試験容器より試験液を採取し分析試料とした。これをガスクロマトグラフィー質量分析（GC/MS）により分析した。詳細を付属資料-4に示す。

### 3.7 試験操作

暴露開始時に供試魚と同水槽でじゅん化した魚10尾の重量および全長を測定し、全長で $2.3 \pm 1.2$  cmであることを確認した。

試験液の外観を記録し、水温、溶存酸素濃度、pHを測定後、試験液中に供試魚を1試験区当り10尾無作為に（ランダム発生表に従い）投入した。試験液の外観の記録および水温、溶存酸素濃度、pHの測定は暴露期間中少なくとも毎日1回（換水前後も含む）行った。暴露期間中給餌は行わなかった。

暴露開始後24、48、72および96時間に死亡個体数を記録するとともに観察された毒性の徴候あるいは異常を記録した。一般的症例と定義を以下に示す\*。死亡個体を発見した場合は、水質の悪化が起こらないよう速やかに取り除いた。

#### \*一般的症例と定義

死亡： 刺激を与えた場合に反応の認められないもの。

異常呼吸： 対照区の魚と比較して鰓蓋の動きが異なるもの。

異常遊泳： 明らかに対照区の魚と異なる遊泳をしたもの。動作の緩慢、過敏、痙攣、反転等。

遊泳不能： 底部または水面で動いてはいるものの、水中を遊泳することが不可能なもの。横転、仮死を含む。

### 3.8 結果の算出

#### 1) 半数致死濃度算出に用いる被験物質濃度の決定

以下の式より実測濃度の平均値（時間加重平均値）を算出し、半数致死濃度算出に用いた。

（時間加重平均）

$$\overline{mc}_n = \frac{ConcA_n - ConcB_n}{\ln(ConcA_n) - \ln(ConcB_n)}$$

$$\overline{MC} = \frac{\overline{mc}_1 + \overline{mc}_2 + \cdots + \overline{mc}_n}{n}$$

$\overline{mc}_n$ : 各暴露期間の平均測定濃度

$ConcA_n$ : 暴露開始時又は換水後の測定濃度

$ConcB_n$ : 暴露終了時又は換水前の測定濃度

（ $ConcA_n$ と $ConcB_n$ の値が同じ場合は、 $\overline{mc}_n = ConcA_n = ConcB_n$ とする）

$\overline{MC}$ : 平均測定濃度

#### 2) 半数致死濃度（LC50）の算出

暴露開始後 24, 48, 72 および 96 時間の各試験区における、死亡数と供試個体数（10 尾）から死亡率（％）を求め、以下の方法で半数致死濃度（LC50）を決定した。

最高濃度区における死亡率	≥ 50%	< 50%
LC50の決定方法	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%信頼区間を算出。	推定される濃度領域を記載する。
濃度－死亡率曲線の記載	記載する。	記載する。

#### 3) 0%死亡最高濃度および100%死亡最低濃度

暴露開始後 24, 48, 72 および 96 時間の観察結果より、各時間における 0%死亡最高濃度および100%死亡最低濃度を可能な限り記録した。

なお、0%死亡最高濃度とは、死亡個体が観察されない試験最高濃度、100%死亡最低濃度とは全ての個体が死亡した試験最低濃度とした。

#### 4 結果および考察

##### 4.1 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。

##### 4.2 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 1に、代表的なクロマトグラムを付属資料－4に示す。

試験液の分析の結果、測定値の設定値に対する割合は、試験液調製時において53～66%、24時間後において47～59%であった。

##### 4.3 半数致死濃度 (LC50)

各時間における累積死亡率を Table 2に、濃度－死亡率曲線を Figure 1に示す。

暴露96時間の対照区の死亡率は 0%であり、試験成立条件を満たした。

以上の結果に基づき算出された半数致死濃度 (LC50) を Table 3 に、96 時間 LC50 の算出結果を付属資料－5 および以下に示す。

96時間 LC50 : 44.5 mg/L (95%信頼区間 : 32.2 ~ 73.0 mg/L)

##### 4.4 0%死亡最高濃度および100%死亡最低濃度

各時間における0%死亡最高濃度および100%死亡最低濃度を Table 4に、また暴露96時間における結果を以下に示す。

96時間の0%死亡最高濃度 : 17.3 mg/L

96時間の100%死亡最低濃度 : 73.0 mg/L

##### 4.5 毒性症状

観察された毒性症状を Table 5に示す。

対照区、7.50 mg/L、15.0 mg/Lの濃度区では暴露期間中に異常な症状は観察されなかった。30.0 mg/L、60.0 mg/Lの濃度区では異常呼吸が観察された。120 mg/Lの濃度区では初回観察時点で全魚死亡であった。



#### 4.6 試験液の外観および水温，溶存酸素濃度，pH

試験液の外観をTable 6，水温を Table 7，溶存酸素濃度を Table 8，pHを Table 9に示す。

試験液の外観は，すべての試験区で暴露期間を通じて無色であった。

すべての試験区で，水温は $24 \pm 1$  °C，溶存酸素濃度は飽和溶存酸素濃度（24.0 °Cの飽和溶存酸素濃度：8.25 mg/L）の60%以上であり，いずれも試験基準を満たした。pHはヒメダカの飼育環境として適正範囲（6.0～8.5）内であった。

以 上

Table 1 Measured Concentration of the Test Substance in Test Water

Nominal Concentration (mg/L)	(Semi-Static Condition)				Mean <sup>a</sup> Measured Concentration (mg/L)
	Measured Concentration, mg/L (Percent of Nominal)				
	0 Hour (new)	24 Hours (old)	24 Hours (new)	48 Hours (old)	
Control	<0.0002	<0.0002	<0.0002	<0.0002	—
7.50	3.95 (53)	3.53 (47)	3.94 (53)	4.03 (54)	3.86 (51)
15.0	8.14 (54)	7.54 (50)	9.05 (60)	8.91 (59)	8.41 (56)
30.0	18.4 (61)	16.3 (54)	17.2 (57)	17.3 (58)	17.3 (58)
60.0	33.0 (55)	28.9 (48)	33.6 (56)	33.4 (56)	32.2 (54)
120	78.7 (66)	67.6 (56)	-- --	-- --	73.0 (61)

a : time weighted mean

new : freshly prepared test solutions

old : test solutions on 24 hours after preparation of new solutions

The test water for analysis was sampled at two renewal sets of four during 96-hour exposure.

--: No measurement was made because all fish were dead at this observation time.

Table 2 Mortality of the Medaka (*Oryzias latipes*) Exposed to the Test Substance

Nominal Concentration (mg/L)	Mean <sup>a</sup> Measured Concentration (mg/L)	Cumulative Mortality (Percent Mortality)							
		24 Hours		48 Hours		72 Hours		96 Hours	
Control	—	0	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)
7.50	3.86	0	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)
15.0	8.41	0	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)
30.0	17.3	0	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)
60.0	32.2	1	(10)	1	(10)	1	(10)	1	(10)
120	73.0	10	(100)	10	(100)	10	(100)	10	(100)

a: time weighted mean

Table 3      Calculated LC50 Values

Exposure Period (Hours)	LC50 (mg/L)	95-Percent Confidence Limits (mg/L)	Statistical Method
24	44.5 *	32.2 - 73.0	Binomial
48	44.5 *	32.2 - 73.0	Binomial
72	44.5 *	32.2 - 73.0	Binomial
96	44.5 *	32.2 - 73.0	Binomial

\* : Using the concentrations of 3.86 – 73.0 mg/L

Table 4      Highest Concentration in 0% Mortality and the Lowest Concentration in 100% Mortality

Exposure Period (Hours)	Highest Concentration in 0% Mortality (mg/L)	Lowest Concentration in 100% Mortality (mg/L)
24	17.3	73.0
48	17.3	73.0
72	17.3	73.0
96	17.3	73.0

Table 5 Observed Toxicological Symptoms

Nominal Concentration (mg/L)	Mean <sup>a</sup> Measured Concentration (mg/L)	Symptoms (Symptom-number of fish)			
		24 Hours	48 Hours	72 Hours	96 Hours
Control	—	N	N	N	N
7.50	3.86	N	N	N	N
15.0	8.41	N	N	N	N
30.0	17.3	N	N	N	AR-1
60.0	32.2	N	AR-3	AR-3	AR-5
120	73.0	—	—	—	—

a : time weighted mean

N : No toxicological symptom was observed.

AR: abnormal respiration

—: No observation was made because all fish were dead at this observation time.

Table 6 Appearance of Test Solutions

Nominal Concentration (mg/L)	Mean <sup>a</sup> Measured Concentration (mg/L)	Appearance of Test Solutions							
		0 Hour new	24 Hours old	new	old	new	old	new	96 Hours old
Control	—	C-	C-	C-	C-	C-	C-	C-	C-
7.50	3.86	C-	C-	C-	C-	C-	C-	C-	C-
15.0	8.41	C-	C-	C-	C-	C-	C-	C-	C-
30.0	17.3	C-	C-	C-	C-	C-	C-	C-	C-
60.0	32.2	C-	C-	C-	C-	C-	C-	C-	C-
120	73.0	C-	C-	—	—	—	—	—	—

a : time weighted mean

new : freshly prepared test solutions

old : test solutions on 24 hours after preparation of new solutions

—: No observation was made because all fish were dead at this observation time.

Color

C-: Colorless

Table 7 Temperature of Test Solutions

Nominal Concentration (mg/L)	Mean <sup>a</sup> Measured Concentration (mg/L)	Temperature (°C)							
		0 Hour	24 Hours		48 Hours		72 Hours		96 Hours
		new	old	new	old	new	old	new	old
Control	—	24.0	24.0	24.0	24.0	24.3	24.0	24.0	24.0
7.50	3.86	24.0	24.0	24.0	24.0	24.4	24.0	24.0	24.0
15.0	8.41	24.0	24.0	24.0	24.0	24.1	24.0	24.0	24.0
30.0	17.3	23.9	24.0	24.0	24.0	24.1	24.0	24.0	24.0
60.0	32.2	23.8	24.1	24.1	24.0	24.1	24.0	24.0	24.0
120	73.0	23.8	24.0	—	—	—	—	—	—

minimum:23.8  
maximum:24.4

a : time weighted mean

new : freshly prepared test solutions

old : test solutions on 24 hours after preparation of new solutions

— : No measurement was made because all fish were dead at this observation time.

Table 8 Dissolved Oxygen Concentrations in Test Solutions

Nominal Concentration (mg/L)	Mean <sup>a</sup> Measured Concentration (mg/L)	Dissolved Oxygen Concentration (mg/L)							
		0 Hour	24 Hours	48 Hours		72 Hours		96 Hours	
		new	old	new	old	new	old	new	old
Control	—	8.3	6.7	8.3	6.8	8.3	6.9	8.3	7.4
7.50	3.86	8.3	6.5	8.3	6.5	8.3	6.7	8.3	7.2
15.0	8.41	8.3	6.6	8.3	6.6	8.3	6.9	8.3	7.4
30.0	17.3	8.2	6.3	8.3	6.3	8.2	6.7	8.2	7.3
60.0	32.2	8.1	6.5	8.1	6.6	8.1	6.9	8.1	7.3
120	73.0	7.9	7.8	—	—	—	—	—	—

minimum:6.3  
maximum:8.3

a : time weighted mean

new : freshly prepared test solutions

old : test solutions on 24 hours after preparation of new solutions

— : No measurement was made because all fish were dead at this observation time.



Table 9 pH Values of Test Solutions

Nominal Concentration (mg/L)	Mean <sup>a</sup> Measured Concentration (mg/L)	pH							
		0 Hour	24 Hours		48 Hours		72 Hours		96 Hours
		new	old	new	old	new	old	new	old
Control	—	7.4	7.2	7.4	7.0	7.3	7.0	7.3	7.1
7.50	3.86	7.4	7.0	7.3	7.0	7.3	7.0	7.3	7.1
15.0	8.41	7.4	7.1	7.3	7.0	7.3	7.0	7.3	7.0
30.0	17.3	7.4	7.0	7.3	6.9	7.3	7.0	7.3	7.0
60.0	32.2	7.3	7.0	7.3	6.9	7.3	7.0	7.3	7.1
120	73.0	7.1	7.0	—	—	—	—	—	—

minimum:6.9  
maximum:7.4

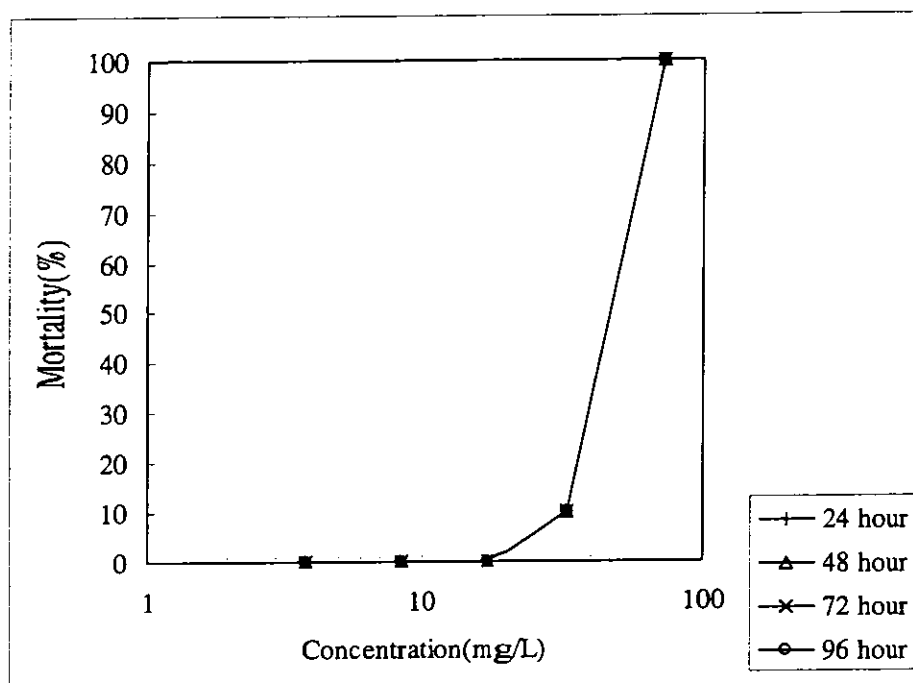
a : time weighted mean

new : freshly prepared test solutions

old : test solutions on 24 hours after preparation of new solutions

— : No measurement was made because all fish were dead at this observation time.

Figure 1      Concentration-Mortality Curve



## 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 at the start of the study

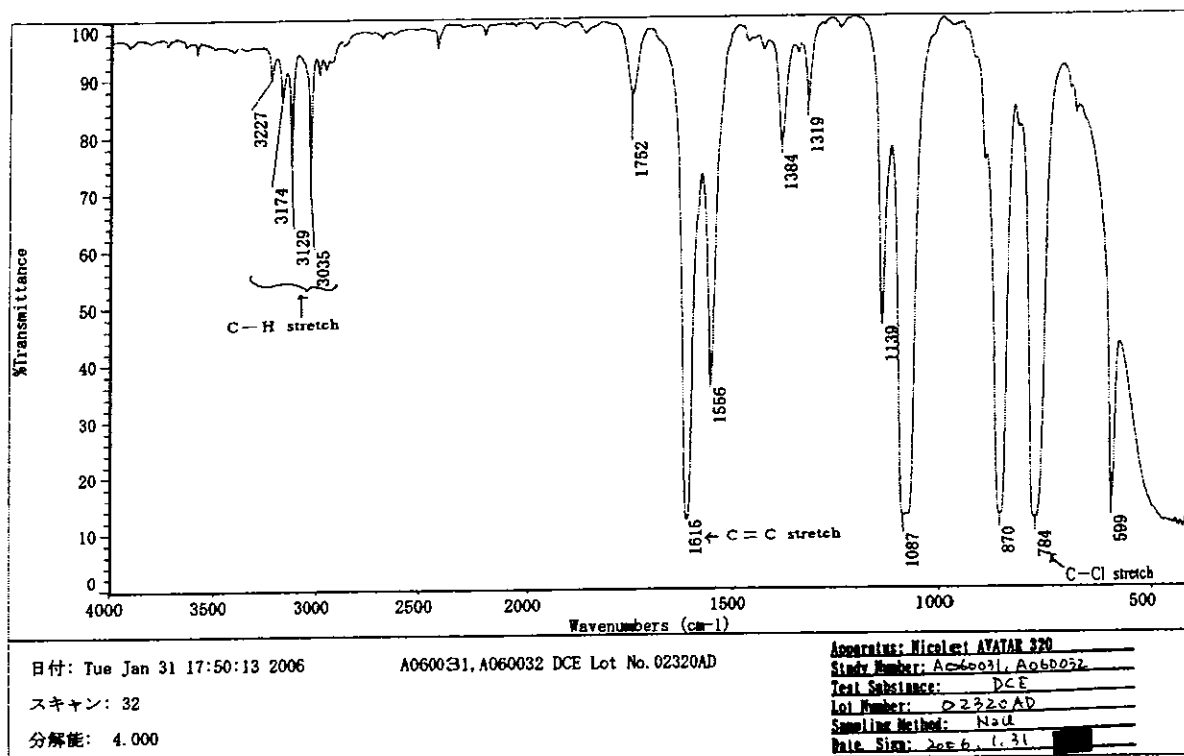
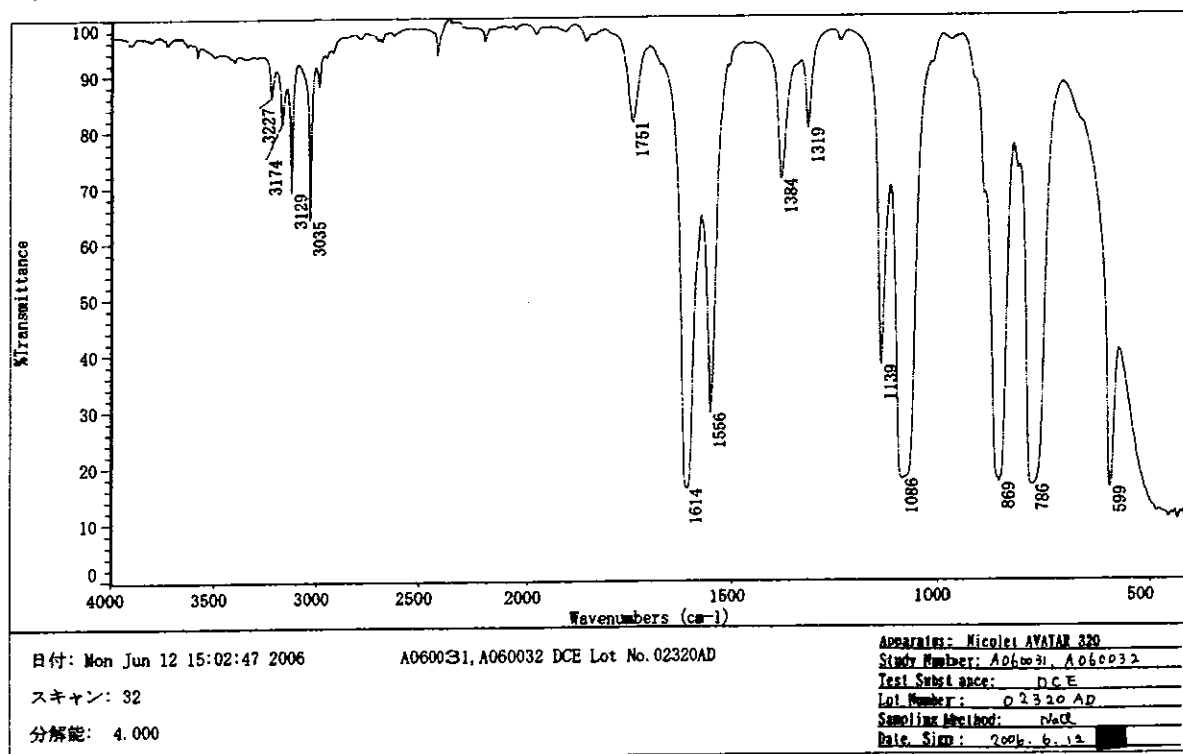


Figure A-1-2 Infrared absorption spectrum of the test substance at the end of the study



## 付属資料－ 2

希釈水の水質

Table A-2 Dilution Water Quality

Parameter	Concentration	
BOD	<2.0	mg/L
COD	<3.0	mg/L
pH	8.0	(20°C)
Coliform group bacteria	N.D.	
Oil	N.D.	
Cadmium	<0.01	mg/L
Cyanide	N.D.	
Lead	<0.1	mg/L
Chromium	<0.05	mg/L
Arsenic	<0.05	mg/L
Mercury	<0.0005	mg/L
Free chlorine	<0.02	mg/L
Bromide	<1.0	mg/L
Fluoride	<1.5	mg/L
Sulfide	<0.3	mg/L
Total ammonium	<1.0	mg/L
Copper	<0.005	mg/L
Zinc	<0.1	mg/L
Aluminum	<0.1	mg/L
Tin	<1.0	mg/L
Manganese	<1.0	mg/L
Iron	<1.0	mg/L
Nickel	<0.1	mg/L
Total phosphorus	<0.1	mg/L
Selenium	<0.001	mg/L
Phenol	<0.002	mg/L
Anionic surfactant	<0.02	mg/L
Evaporation residue	88	mg/L
Electric conductivity	131	$\mu$ S/cm
Total hardness (as CaCO <sub>3</sub> )	49	mg/L
Alkalinity	29	mg/L
Sodium	8.8	mg/L
Potassium	1.1	mg/L
Calcium	14	mg/L
Magnesium	3.6	mg/L

sampling date: February 6, 2006

## 付属資料－ 3

### 試験液の調製

## 試験液の調製

### 1. 準備

#### ① 被験物質原液の調製

採取量	---->	545	μL	(マイクロシリンジで採取)
比重	---->	1.21	(20℃)	
被験物質換算重量	---->	659	mg	
溶媒	---->	希釈水		
最終容量	---->	5500	mL	× 2 本
容器	---->	ポリウム瓶		
濃度	---->	120	mg/L	
混合方式	---->	スターラー攪拌1～5分, 超音波5分程度, 密栓 (目安として, 被験物質の液滴がなくなれば良い)		

### 2. 試験液の調製

①の原液を下記の表の通り採取し, 希釈水で希釈して試験液とする。

試験用水(最終容量)	---->	5.0	L
容器	---->	5.0L容ガラス水槽	
混合方式	---->	ガラス棒で攪拌	
濃度公比	---->	2.00	

(以下の濃度表示は, 最小桁数に合わせている)

設定試験濃度 (mg/L)	区No. (略称)	①原液 (mL)
対照区	C	0
7.50	Conc.1	313
15.00	Conc.2	625
30.00	Conc.3	1250
60.00	Conc.4	2500
120.00	Conc.5	5000



## 付属資料－ 4

### 試験液の分析

# 1 ガスクロマトグラフィー質量分析 (GC/MS) 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ブラ付き) No.2

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

ヘッドスペースサンブラ (HSS) : Agilent Technologies G1888 型

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

データ処理部 : MSD ケミステーション (Windows xp)

## (条件)

### [GC 条件]

カラム : Agilent HP-AL/S 30m×0.25mm×5μm

キャリアーガス : ヘリウム 1.1mL/min (Constant flow)

オープン温度 : 90℃ (2min) → 20℃/min → 180℃ (3min)

注入口温度 : 200℃

MS インターフェース温度 : 180℃

注入条件 : スプリット (スプリット比=80:1)

注入量 : 1.0mL (HSS サンプルループ容量)

### [HSS 条件]

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

イベント時間 : GC Cycle Time 18min

Vial Equilibration Time 20min

Pressurization Time 0.2min

Loop Fill Time 0.03min

Loop Equilibration Time 0.2min

Inject Time 1min

バイアルパラメータ : Shake (HIGH)

### [MSD 条件]

温度条件 : イオン源 200℃, 四重極マス・フィルタ 150℃

SIM (Selected Ion Monitoring) 条件 :

Solvent Delay 4min

Filament off 6min

Quant ion m/z 61.0, m/z 96.0, m/z 98.0 の TIC

## 2 検量線

アセトンを用い、0、1.00～100 mg/Lの標準溶液を調製した。標準溶液の分析を以下のように行った。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。検量線の最小二乗法による直線回帰式の相関係数は、1.00と良好であった。作成した検量線をFigure A-4-1に示す。

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

\*1: JIS K 0557 A4 グレードの水

\*2: 測定値は標準溶液濃度の 1/100 の値となる。

## 3 検出限界

最小検出ピーク面積を1000 countに設定し、これに相当する試験液中の被験物質濃度 0.0002 mg/Lを検出限界とした。

## 4 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 (2), (3), (4), (5), (6), (8), (9), (10), (11), (12) に示す。

精製水\*  
+  
アセトン 0.1 mL  
+  
試験液\*  
|  
混合  
|  
GC/MS測定

\*: 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るように希釈する。採取量の合計は 10 mL とする。ただし、対照区は希釈せず、試験液 10 mL (精製水: 0 mL) を採取する。

2) 標準溶液を「2 検量線」と同様に分析した。代表的なクロマトグラムをFigure A-4-2 (I), (7) に示す。

3) 各試験液の被験物質濃度は、各分析時に測定した標準溶液のピーク面積を用いて、一点検量法により定量した。

## 5 添加回収試験

分析前処理は「4 試験液の分析方法」に示すように、試験液と精製水、アセトンを混合する操作だけであるので、添加回収試験の必要はなかった。したがって、回収率による被験物質濃度の補正は行わなかった。

Figure A-4-1 Calibration curve

No.	Concentration (mg/L)	Peak Area (count)
1	0.00	0
2	0.01	92012
3	0.02	184320
4	0.05	478437
5	0.10	934177
6	0.20	1803908
7	0.50	4606498
8	1.00	9237439

$$Y = 9,227,487X$$

$$r = 1.00$$

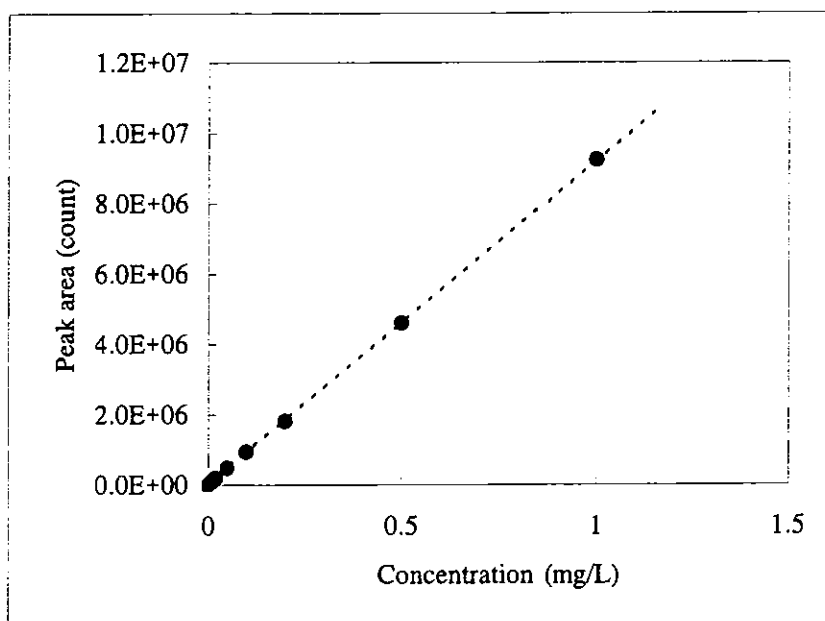
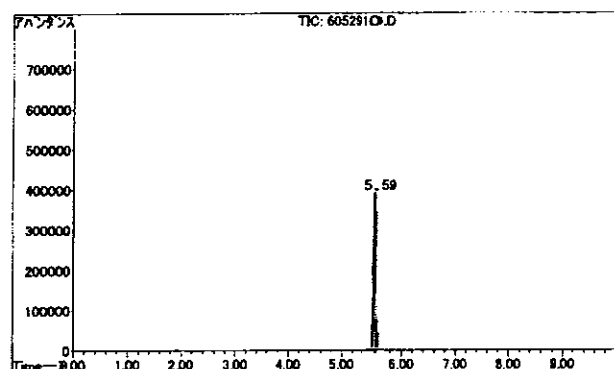


Figure A-4 -2 Representative chromatograms

(1) Standard 0.50 mg/L ; 0 Hour

Study No. : A060031  
 Date : 2006.05.29  
 Operator :   
 Sample Information: DCE  
 Sample Name : STD 0.5mg/L  
 Misc Info :  
 File Name : C:\MSDCHEM\1\DATA\dcce\6052910.D  
 Acquired : 29 May 2006 15:09 using AcqMethod DCE

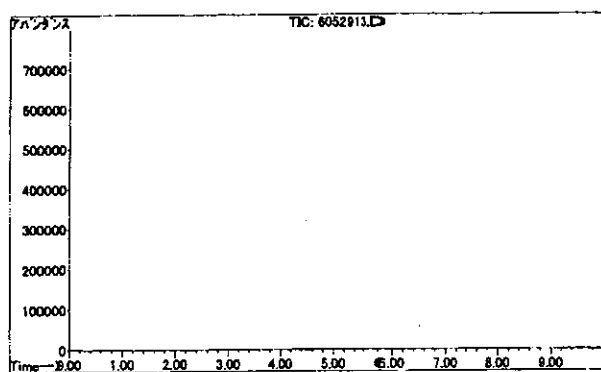


TIC: 6052910.D

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	6.588	M	0.020	4720067	5.553	5.658

(2) Control ; 0 Hour

Study No. : A060031  
 Date : 2006.05.29  
 Operator :   
 Sample Information: DCE  
 Sample Name : FISOHC  
 Misc Info :  
 File Name : C:\MSDCHEM\1\DATA\dcce\6052913.D  
 Acquired : 29 May 2006 16:54 using AcqMethod DCE



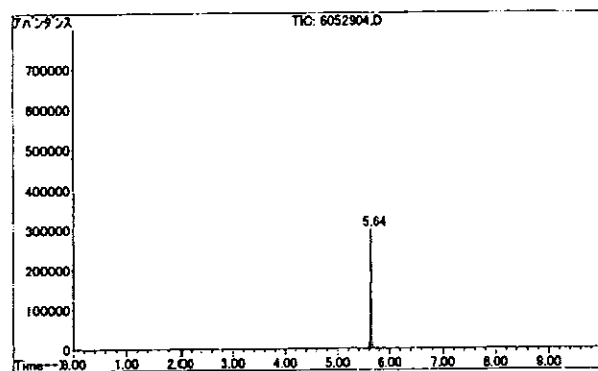
TIC: 6052913.D

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) 7.50 mg/L nominal ; 0 Hour

Study No. : A060031  
 Date : 2006.05.29  
 Operator :   
 Sample Information: DCE  
 Sample Name : FISOHC1  
 Misc Info :  
 File Name : C:\MSDCHEM\1\YDATA\Ydce\6052904.D  
 Acquired : 29 May 2006 13:19 using AcqMethod DCE

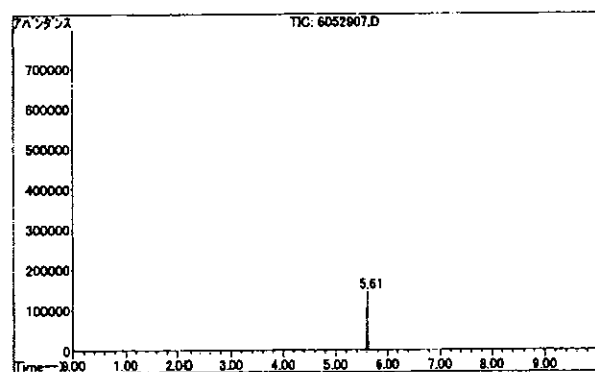


TIC: 6052904.D

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	5.636	M	0.020	3729362	5.598	5.713

(4) 30.0 mg/L nominal ; 0 Hour

Study No. : A060031  
 Date : 2006.05.29  
 Operator :   
 Sample Information: DCE  
 Sample Name : FISOHC3  
 Misc Info :  
 File Name : C:\MSDCHEM\1\YDATA\Ydce\6052907.D  
 Acquired : 29 May 2006 14:14 using AcqMethod DCE



TIC: 6052907.D

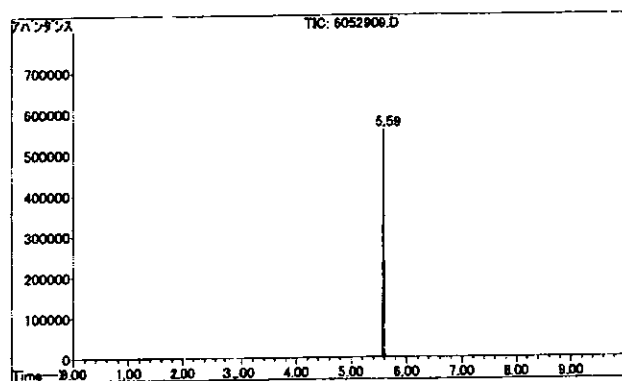
ピーク	リテンションタイム	タイプ	半値幅	面積	開始時間	終了時間
1	5.610	M	0.020	1767397	5.578	5.664

Figure A-4-2

Continued

(5) 120 mg/L nominal ; 0 Hour

Study No. : A060031  
 Date : 2006. 05. 29  
 Operator :   
 Sample Information: DCE  
 Sample Name : FISOHC5  
 Misc Info :  
 File Name : C:\MSDCHEM\1\DATA\dcce\6052909.D  
 Acquired : 29 May 2006 14:50 using AcqMethod DCE

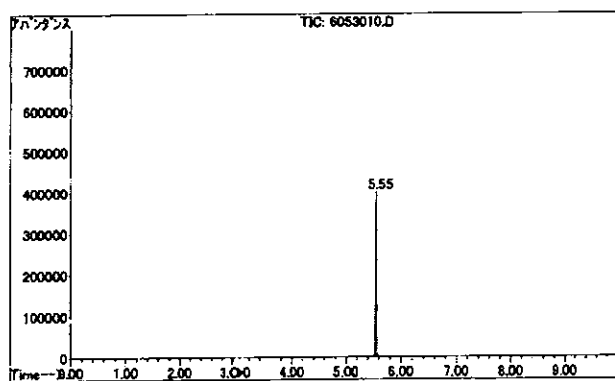


TIC: 6052909.D

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	5.591	M	0.021	7429016	5.558	5.650

(6) Standard 0.50 mg/L ; 24 Hours

Study No. : A060031  
 Date : 2006. 05. 30  
 Operator :   
 Sample Information: DCE  
 Sample Name : STD 0.5mg/L  
 Misc Info :  
 File Name : C:\MSDCHEM\1\DATA\dcce\6053010.D  
 Acquired : 30 May 2006 14:34 using AcqMethod DCE



TIC: 6053010.D

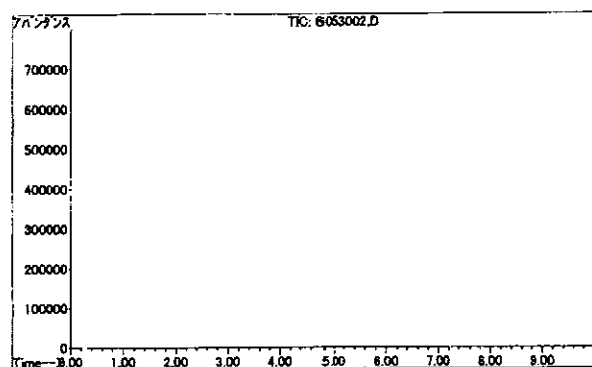
ピーク	リテンションタイム	タイプ	半値幅	面積	開始時間	終了時間
1	5.547	M	0.021	4999970	5.513	5.603



Figure A-4-2 Continued

(7) Control ; 24 Hours (old)

Study No. :A060031  
 Date :2006.05.30  
 Operator :  
 Sample Information:DCE  
 Sample Name :FIS24HC-old  
 Misc Info :  
 File Name :C:\MSDCHEM\1\DATA\dcce\6053002.D  
 Acquired :30 May 2006 12:07 using AcqMethod DCE

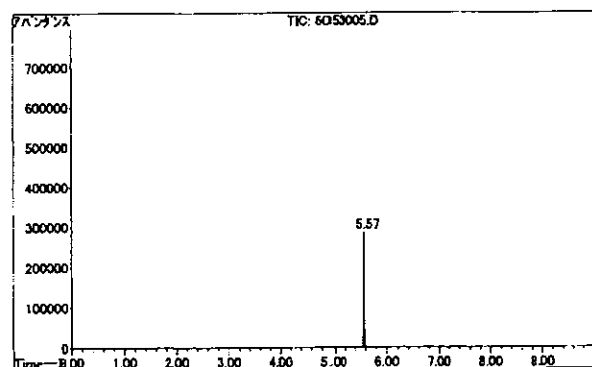


TIC: 6053002.D

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						

(8) 7.50 mg/L nominal ; 24 Hours (old)

Study No. :A060031  
 Date :2006.05.30  
 Operator :  
 Sample Information:DCE  
 Sample Name :FIS24HC1-old  
 Misc Info :  
 File Name :C:\MSDCHEM\1\DATA\dcce\6053005.D  
 Acquired :30 May 2006 13:02 using AcqMethod DCE



TIC: 6053005.D

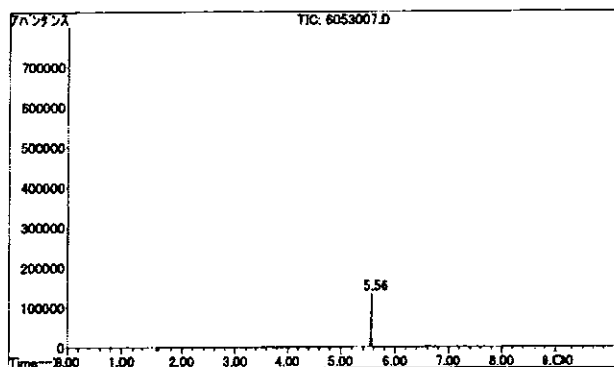
ピーク	リテンションタイム	タイプ	半値幅	面積	開始時間	終了時間
1	5.567	M	0.020	3527815	5.532	5.619

Figure A-4-2

Continued

(9) 30.0 mg/L nominal ; 24 Hours (old)

Study No. : A060031  
 Date : 2006.05.30  
 Operator : XXXXXXXXXX  
 Sample Information: DCE  
 Sample Name : FIS24HC3-old  
 Misc Info :  
 File Name : C:\MSDCHEM\1\DATA\Ydce\6053007.D  
 Acquired : 30 May 2006 13:39 using AcqMethod DCE

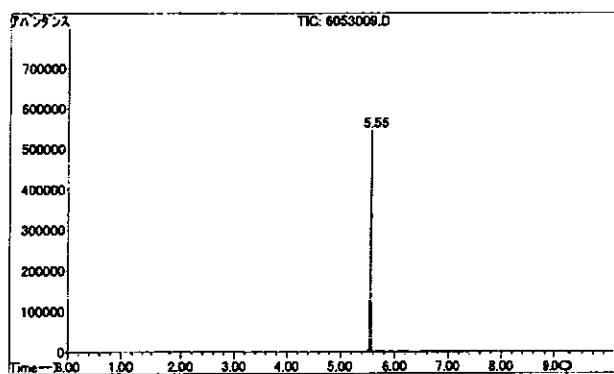


TIC: 6053007.D

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	5.559	M	0.020	1632762	5.527	5.617

(10) 120 mg/L nominal ; 24 Hours (old)

Study No. : A060031  
 Date : 2006.05.30  
 Operator : XXXXXXXXXX  
 Sample Information: DCE  
 Sample Name : FIS24HC5-old  
 Misc Info :  
 File Name : C:\MSDCHEM\1\DATA\Ydce\6053009.D  
 Acquired : 30 May 2006 14:16 using AcqMethod DCE



TIC: 6053009.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	5.548	M	0.021	6761415	5.517	5.606

## 付属資料－ 5

結果の算出

Table A-5 Calculation of the 96hr LC50

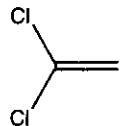
TOXDAT MULTI-METHOD PROGRAM (BINOMIAL, MOVING AVERAGE AND PROBIT METHODS)					
魚類急性毒性試験					
Time: 96hr					
Conc. No.	CONC. mg/L	NUMBER EXPOSED	NUMBER DEAD	PERCENT DEAD	BINOMIAL PROB. (%)
Control	0	10	0	0	-----
Conc. 1	3.86	10	0	0	0.09765625
Conc. 2	8.41	10	0	0	0.09765625
Conc. 3	17.3	10	0	0	0.09765625
Conc. 4	32.2	10	1	10	1.07421875
Conc. 5	73	10	10	100	0.09765625

THE BINOMIAL TEST SHOWS THAT 32.2 AND 73 CAN BE  
USED AS STATISTICALLY SOUND CONSERVATIVE 95 PERCENT  
CONFIDENCE LIMITS SINCE THE ACTUAL CONFIDENCE LEVEL  
ASSOCIATED WITH THESE LIMITS IS 98.828125 PERCENT.  
AN APPROXIMATE LC50 FOR THIS SET OF DATA IS 44.4735651358645

WHEN THERE ARE LESS THAN TWO CONCENTRATIONS AT WHICH THE PERCENT  
DEAD IS BETWEEN 0 AND 100, NEITHER THE MOVING AVERAGE NOR THE  
PROBIT METHOD CAN GIVE ANY STATISTICALLY SOUND RESULTS.

## 魚類急性毒性試験結果報告書

## 1. 一般的事項

被験物質の名称	1,1-ジクロロエチレン		
別名	(略称：DCE)		
C A S 番 号	75-35-4		
構 造 式 又 は 示 性 式			
分 子 量	96.94328		
試 験 に 供 し た 物 質 の 純 度 ( % )	99.99%		
試 験 に 供 し た 物 質 の ロ ッ ト 番 号	02320AD		
不 純 物 の 名 称 及 び 含 有 率	—		
蒸 気 圧	6.00E+02 mmHg (25℃)		
対 水 溶 解 度	2420 mg/L (25℃)		
1-オクタノール/水分配係数	2.13 (LogKOW)		
融 点	-122.5℃		
沸 点	31.6℃		
常 温 に お け る 性 状	無色透明液体		
安 定 性	—		
溶媒に対する溶解度等	溶媒	溶解度	溶媒中の安定性
	アセトン	>1000 mg/L*	—

上記内容は提供資料による。

ただし\*の内容は以下の通り。

\*：当社測定値

## 2. 試験溶液の被験物質濃度の分析方法

項 目	方 法
分析方法	各試験液をガスクロマトグラフィー質量分析（GC/MS）により分析した。
前処理法	精製水* + アセトン 0.1 mL + 試験液*   混合   GC/MS測定 *：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るように希釈する。採取量の合計は 10 mL とする。ただし、対照区は希釈せず、試験液 10 mL（精製水： 0 mL）を採取する。
定量条件	別紙－1 参照

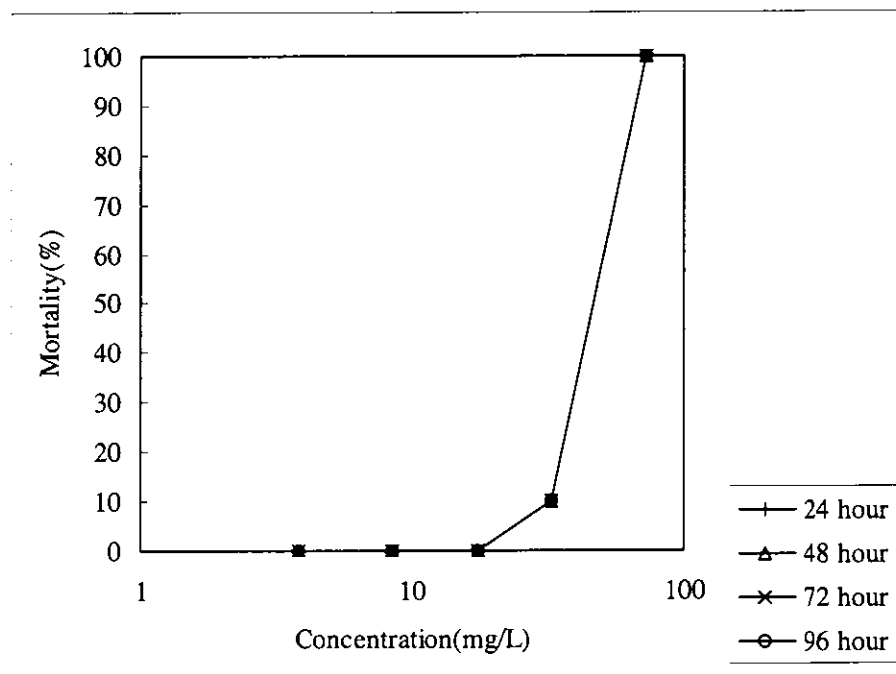
## 3. 材料及び方法

項 目		内 容
試験生物	種 (和名・学名・系統)	ヒメダカ ( <i>Oryzias latipes</i> , メダカ科)
	入手先	綱島フィッシング (神奈川県横浜市港北区綱島西五丁目18番1号)
	大きさ (体長, 体重) ・月齢	全長: 2.24 cm (1.96~2.48 cm), n=10 体重: 0.102 g (0.057~0.144 g), n=10 年齢: 孵化後約1年
	対照物質への感受性 (LC50) (対照物質名)	96時間半数致死濃度 (LC50) = 0.77 mg/L (95%信頼区間: 0.58~1.0 mg/L) 硫酸銅 (Ⅱ) 五水和物, 試薬特級
じゅん化	じゅん化期間	2006年 5月12日~2006年 5月29日
	飼育水の種類	脱塩素水道水
	じゅん化前の薬浴の有無	じゅん化期間中の薬浴は無
	じゅん化方式 (止水, 半止水, 流水式等)	流水式 (飼育密度: 1.0 g/L/日以下)
	環境条件 (水温, 明暗周期)	24±1℃ 16時間明 (1000 lux以下) / 8時間暗
	飼料 (種類, 量, 頻度等)	テトラベルケ社製テトラミン 魚体重の約2%/日 (暴露開始の24時間前からは無給餌)
	試験条件	試験容器
試験用水	種類 (天然水, 脱 塩素水道水, 人工 調製水)	脱塩素水道水
	硬度	30~100 mg/L (CaCO <sub>3</sub> 換算)
	pH	6.5~8.5
暴露期間		2006年 5月29日~2006年 6月 2日
試験濃度 (設定値)		対照区, 7.50, 15.0, 30.0, 60.0, 120 mg/L (公比: 2.0)
供試数		10尾/試験区
試験溶液量		5.0 L/容器
助剤	助剤の有無	無
	種類	—
	濃度	—
試験方式 (止水, 半止水, 流水式等)		半止水式
換水又は流水条件		24時間毎に試験液の全量を交換
水温		24±1℃
溶存酸素濃度 (DO)		飽和濃度の60%以上 (24.0℃の飽和溶存酸素濃度: 8.25 mg/L)
明暗周期		照明: 室内光, 16時間明 (1000 lux以下) / 8時間暗
結果の算出 方法	LC50	Binomial (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)

## 4. 試験結果及び考察

項目	内 容
毒性値	96hLC50=44.5 mg/L
試験濃度	1. 設定値 ②. 実測値
考察及び 特記事項	特になし

## 5. 魚類の濃度－死亡率曲線





## 6. その他

試験実施施設	名 称	株式会社三菱化学安全科学研究所 横浜研究所
	所 在 地	神奈川県横浜市青葉区鴨志田町1000番地 電話 045 (963) 3541 FAX 045 (961) 6296
試験責任者	職 氏 名	研究員 [REDACTED]
	経 験 年 数	8 年
試験番号	A 0 6 0 0 3 1	
試験期間	2 0 0 6 年 5 月 2 3 日 ~ 2 0 0 6 年 7 月 2 1 日	

作成責任者	所 属	株式会社三菱化学安全科学研究所 横浜研究所
	氏 名	[REDACTED]

別紙-1 ガスクロマトグラフィー質量分析（GC/MS）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ブラ付き）No.2

ガスクロマトグラフ (GC) : Agilent Technologies 6890N 型  
 ヘッドスペースサンブラ (HSS) : Agilent Technologies G1888 型  
 質量選択検出器 (MSD) : Agilent Technologies 5973 *inert* 型  
 データ処理部 : MSD クミステーション (Windows xp)

（条件）

[GC 条件]

カラム : Agilent HP-AL/S 30m×0.25mm×5μm  
 キャリアーガス : ヘリウム 1.1mL/min (Constant flow)  
 オープン温度 : 90℃ (2min) → 20℃/min → 180℃ (3min)  
 注入口温度 : 200℃  
 MS インターフェース温度 : 180℃  
 注入条件 : スプリット (スプリット比=80:1)  
 注入量 : 1.0mL (HSS サンプルループ容量)

[HSS 条件]

温度条件 : Oven 60℃, LOOP 120℃, Transfer Line 200℃  
 イベント時間 : GC Cycle Time 18min  
                   Vial Equilibration Time 20min  
                   Pressurization Time 0.2min  
                   Loop Fill Time 0.03min  
                   Loop Equilibration Time 0.2min  
                   Inject Time 1min  
 バイアルパラメータ : Shake (HIGH)

[MSD 条件]

温度条件 : イオン源 200℃, 四重極マス・フィルタ 150℃  
 SIM (Selected Ion Monitoring) 条件 :  
                   Solvent Delay 4min  
                   Filament off 6min  
                   Quant ion m/z 61.0, m/z 96.0, m/z 98.0 の TIC