

受付番号	662-10-E-5284
試験番号	95284

## 最 終 報 告 書

トリクロロニトロメタンのヒメダカを用いる 96 時間急性毒性試験

2011 年 2 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 2 月 18 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ヒメダカを用いる 96 時間急性毒性試験

試験番号 95284

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 2 月 18 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ヒメダカを用いる 96 時間急性毒性試験

試験番号 95284

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 25 日	2010 年 11 月 25 日
試験計画書	2010 年 11 月 26 日	2010 年 11 月 26 日
暴露開始時、暴露開始後	2010 年 11 月 29 日	2010 年 12 月 1 日
	2010 年 12 月 1 日	2010 年 12 月 1 日
生データ、最終報告書草案	2011 年 1 月 19 日	2011 年 1 月 19 日
生データ、最終報告書草案 再査察	2011 年 2 月 18 日	2011 年 2 月 18 日
最終報告書	2011 年 2 月 18 日	2011 年 2 月 18 日

2011 年 2 月 18 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 .....	11
13.1 試験用水 .....	11
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 $LC_{50}$ 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 死亡率 .....	12
14.2 一般状態等の観察結果 .....	13
14.3 試験生物の大きさ .....	13
14.4 試験液の観察と測定結果 .....	13
14.5 $LC_{50}$ .....	13
14.6 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	Cumulative mortality .....	14
Table 2	Observed abnormal response.....	15
Table 3-1	Dissolved oxygen concentration of test solutions .....	16
Table 3-2	pH of test solutions.....	16
Table 3-3	Temperature of test solutions.....	17
Table 4	LC <sub>50</sub> to Medaka.....	17

## Figure

Figure 1	Concentration-cumulative mortality curve. ....	18
----------	--	----

Appendix 1	試験用水の水質
Appendix 2	被験物質濃度の測定方法及び結果
Appendix 3	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ヒメダカを用いる 96 時間急性毒性試験

## 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ヒメダカに対する急性毒性試験を行い、96 時間の半数致死濃度 (LC<sub>50</sub>) 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「魚類急性毒性試験」
- b) OECD Guidelines for Testing of Chemicals, No.203, July 17, 1992, "Fish, Acute Toxicity 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 26 日
実 験 開 始 日	2010 年 11 月 29 日
実 験 終 了 日	2010 年 12 月 3 日
試 験 終 了 日	2011 年 2 月 18 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、契約書の写し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

[REDACTED]

（所属 試験第四課）

試験担当者（生物試験の実施）

[REDACTED]

試験担当者（分析試験の実施）

[REDACTED]

## 10. 最終報告書の承認

2011 年 2 月 18 日

試験責任者

[REDACTED]

## 11. 要 約

試験条件

試験生物	ヒメダカ ( <i>Oryzias latipes</i> )
試験用水	脱塩素水道水
試験区	0.060、0.040、0.027、0.018、0.012 mg/L (公比 1.5) の 5 濃度区 〔測定濃度として 0.034、0.023、0.0096、0.0094、0.0063 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供試試料を水面下で添加後、 密栓し、攪拌して 100 mg/L の試験原液を調製した。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た。
暴露方式	半止水式 (24 時間ごとに換水)、密閉系
暴露期間	96 時間
連 数	1 連/試験区
試験生物数	7 尾/試験区
試験液量	約 5 L/試験区
水 温	23.2~24.0°C
エアレーション	無し
照 明	室内灯、16 時間明/8 時間暗
給 餌	無給餌
被験物質濃度の測定	GC-MS 法 (暴露開始時、換水前後及び暴露終了時又は全個体死亡確認時)

試験結果

96 時間 LC <sub>50</sub>	0.010 mg/L
96 時間 100%死亡最低濃度	0.023 mg/L
96 時間 0%死亡最高濃度	0.0063 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

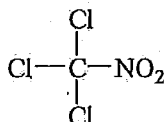
## 12.1 被験物質

## 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

 $\log \text{Pow} = 2.09$ <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 (CHRIP)

## e) 保管条件

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

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	ヒメダカ ( <i>Oryzias latipes</i> )
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
供給源	一般財団法人化学物質評価研究機構 久留米事業所
大きさ	全長 $2.3 \pm 1.2$ cm、5. a)に定める規定値を適用
群分け	無作為抽出
順 化	
ふ化日	2010 年 8 月 9 日 (供試時月齢 ; 3 か月齢)
飼育水	脱塩素水道水
溶存酸素濃度	飽和溶存酸素濃度の 80%以上
水 温	$24 \pm 1^{\circ}\text{C}$
明暗周期	室内灯による 16 時間明/8 時間暗
餌 料	コイ用配合餌料
薬 浴	実施せず
順化期間	18 日間 (2010 年 11 月 11 日～2010 年 11 月 29 日)
供試群の死亡率	0% (供試前 7 日間)
無給餌期間	供試前 24 時間は餌を与えなかった
試験系の再現性の確認	

定期的に基準物質による急性毒性試験を実施  
最新のデータを以下に示す。

基準物質：硫酸銅 (II) 五水和物

(和光純薬工業 試薬特級 ロット番号 TSE1413)

実施期間：2010 年 11 月 15 日～11 月 19 日

96 時間  $\text{LC}_{50}$  : 0.45 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  $0.54 \pm 0.20$  mg/L (n=46)]。以上のデータは全て硫酸銅 (II) 換算で表示した。

### 13. 試験の実施

#### 13.1 試験用水

十分にエアレーションし、温度調節した脱塩素水道水を用いた。定期的に測定した試験用水の水質測定結果を Appendix 1 に示す。なお、水質測定結果は久留米事業所の標準操作手順書で規定した基準を満たしていた。

#### 13.2 試験器具及び装置

試験容器	7.8 L 容ガラス製容器（直径 24 cm, 深さ 28 cm）
蓋	テフロンシートで密閉
恒温槽	プラスチック製水槽
	加温冷却装置 RX-401 HPN-Z（イワキ）

#### 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 g/cm<sup>3</sup>）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供試試料をプッシュボタン式液体用微量体積計（Eppendorf）により設定濃度になるように水面下で添加後、密栓し、マグネティックスターラーで攪拌して 100 mg/L の試験原液を調製した。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た。試験液表面にはテフロンシートを設置した。

#### 13.4 試験条件

暴露方式	半止水式（24 時間ごとに試験液の全量を交換）、密閉系
暴露期間	96 時間
試験濃度	0.060、0.040、0.027、0.018、0.012 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。 予備試験結果を Additional data に示す。
対照区	被験物質を含まない試験用水
連 数	1 連/試験区
試験生物数	7 尾/試験区
試験液量	約 5 L/試験区
水 温	24±1°C
エアレーション	実施せず
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

死亡と一般状態を暴露開始 3、24、48、72 及び 96 時間後に観察した。観察可能な動き（吻、鰓蓋の動き等）がなく、ガラス棒で尾柄部に軽く触れ反応がない個体を死亡とみなした。死亡した個体は確認した時点で、速やかにとり除いた。

##### b) 試験生物の全長及び体重

暴露終了後、対照区の試験生物について全長及び体重を測定

## c) 試験液の状態

暴露開始時及び換水前（24 時間後）又は全個体死亡確認時に観察

## d) 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、換水前後及び暴露終了時又は全個体死亡確認時
測定方法	試験容器より一部分取した試験液について測定（調製時） 各試験容器について測定（調製 24 時間後）
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

## e) 試験液中の被験物質濃度

測定頻度	暴露開始時、換水前後及び暴露終了時又は全個体死亡確認時
採水方法	各試験容器の中層から採取
採水量	約 50 mL（全試験区）
測定方法	Appendix 2 参照

13.6 LC<sub>50</sub> の算出法

Binomial 法により LC<sub>50</sub> を算出した。

LC<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、暴露期間中に測定した試験液中の被験物質濃度が設定濃度の±20%を超えたため、結果の算出には測定濃度の幾何平均値を用いることとした。

## 13.7 試験の有効性

- 暴露期間中、対照区における死亡数が 1 尾を超えてはならない。
- 暴露期間中の溶存酸素濃度は、試験水温での飽和溶存酸素濃度の 60% 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の表示は、設定濃度 0.060、0.040、0.027、0.018 及び 0.012 mg/L) における測定濃度の幾何平均値 (0.034、0.023、0.0096、0.0094 及び 0.0063 mg/L) で示す。

## 14.1 死亡率

各時間での累積死亡率を Table 1、濃度－累積死亡率曲線を Figure 1 に示す。

96 時間における 100% 死亡最低濃度は 0.023 mg/L であった。0% 死亡最高濃度は 0.0063 mg/L であった。なお、暴露終了時における対照区の死亡数は 0 尾であり、有効性基準 (1 尾を超えない) を満たしていた。

#### 14.2 一般状態等の観察結果

暴露期間中における一般状態の観察結果を Table 2 に示す。

対照区において、症状は認められなかった。

以下の観察結果は全て対照区との比較に基づくものである。暴露期間中に観察された症状は遊泳異常及び外見異常であった。

#### 14.3 試験生物の大きさ

[平均値±標準偏差 (n=7)]

全長 2.5±0.1 cm

体重 0.11±0.02 g

#### 14.4 試験液の観察と測定結果

##### a) 試験液の状態

暴露開始時は無色透明であった。換水前あるいは全個体死亡時も同様であった。

##### b) 試験液の水質

試験液の水質を Table 3-1、3-2 及び 3-3 に示す。

暴露期間中に測定した溶存酸素濃度は 7.8～8.7 mg/L、pH は 7.4～7.9、水温は 23.2～24.0℃ であった。なお、溶存酸素濃度は有効性基準（試験水温での飽和濃度の 60%以上\*）を満たしていた。

\* 23～25℃の飽和溶存酸素濃度: 8.39～8.11 mg/L、JIS K 0102: 2008

##### 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 2、検量線及びクロマトグラムを Appendix 3 に示す。

測定した試験液中の被験物質濃度は、暴露開始時及び換水後では 0.0091～0.050 mg/L、換水前及び暴露終了時（全個体死亡確認時含む）では検出下限値（0.00017 mg/L）未満～0.022 mg/L であった。

#### 14.5 LC<sub>50</sub>

24 時間ごとの LC<sub>50</sub> を Table 4 に示す。

被験物質のヒメダカに対する 48 及び 96 時間 LC<sub>50</sub> は共に 0.010 mg/L であった。

#### 14.6 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影響を求める試験として行った。その結果、96 時間 LC<sub>50</sub> は 0.010 mg/L であった。試験液中の被験物質濃度は調製 24 時間後において、調製時濃度に対して維持率はおおよそ 30～50%であり、0.027 mg/L 区（設定）での 48 時間後換水前では検出下限値（0.00017 mg/L）未満となった。これらの濃度低下は、揮発性という被験物質の特性に加え、生分解性を有することから、試験液中での微生物の増殖（特に試験液中に死亡個体が存在する場合）による分解等が原因である可能性が考えられる。結果として濃度維持率は充分ではなかったが、揮発性を考慮し密閉式で行い、可能な限り換水頻度を多くした半止水式を採用した。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 Cumulative mortality

Measured concentration <sup>a</sup> (mg/L)	Cumulative mortality (%)				
	3 hours	24 hours	48 hours	72 hours	96 hours
Control	0	0	0	0	0
0.0063	0	0	0	0	0
0.0094	0	0	14	14	14
0.0096	0	29	43	43	43
0.023	0	100	100	100	100
0.034	0	100	100	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

Nominal concentration (mg/L)	Category		Observation result of each category (Left column: number, Right column: Symptom detail)									
			3 hours		24 hours		48 hours		72 hours		96 hours	
Control	Death, Critical	D	0		0		0		0		0	
		IS	0		0		0		0		0	
	Abnormal		0	-	0	-	0	-	0	-	0	-
	Normal		7		7		7		7		7	
0.0063	Death, Critical	D	0		0		0		0		0	
		IS	0		0		0		0		0	
	Abnormal		0	-	0	-	0	-	0	-	0	-
	Normal		7		7		7		7		7	
0.0094	Death, Critical	D	0		0		1		1		1	
		IS	0		0		0		0		0	
	Abnormal		0	-	0	-	0	-	0	-	0	-
	Normal		7		7		6		6		6	
0.0096	Death, Critical	D	0		2		3		3		3	
		IS	0		0		0		0		0	
	Abnormal		0	-	1	ASW+AA(1)	0	-	1	AA(1)	1	AA(1)
	Normal		7		4		4		3		3	
0.023	Death, Critical	D	0		7		7		7		7	
		IS	0		0		0		0		0	
	Abnormal		0	-	0	-	0	-	0	-	0	-
	Normal		7		0		0		0		0	
0.034	Death, Critical	D	0		7		7		7		7	
		IS	0		0		0		0		0	
	Abnormal		0	-	0	-	0	-	0	-	0	-
	Normal		7		0		0		0		0	

Abbreviation of terms (D: Death, IS: Impossible swim, ASW: Abnormal swimming, AA: Abnormal appearance)

Table 3-1 Dissolved oxygen concentration of test solutions

Measured concentration (mg/L)	At the start	24 hours		48 hours		72 hours		At the end
		old	new	old	new	old	new	
Control	8.6	8.0	8.7	8.1	8.5	8.1	8.6	8.1
0.0063	8.6	8.0	8.7	8.0	8.4	7.9	8.7	8.2
0.0094	8.6	7.8	8.7	7.9	8.3	7.8	8.6	7.9
0.0096	8.5	7.8	8.7	7.8	8.5	8.2	8.7	8.1
0.023	8.6	8.2 <sup>b</sup>	-	-	-	-	-	-
0.034	8.5	8.4 <sup>b</sup>	-	-	-	-	-	-

old: before the renewal

new: after the renewal

Unit: mg/L

- : All test organisms died.

b It indicates the measured value at the time that confirmed all test organisms dead.

Table 3-2 pH of test solutions

Measured concentration (mg/L)	At the start	24 hours		48 hours		72 hours		At the end
		old	new	old	new	old	new	
Control	7.7	7.4	7.8	7.5	7.7	7.5	7.7	7.5
0.0063	7.7	7.4	7.8	7.5	7.7	7.5	7.9	7.6
0.0094	7.7	7.4	7.8	7.5	7.7	7.6	7.9	7.6
0.0096	7.8	7.4	7.8	7.4	7.8	7.6	7.9	7.6
0.023	7.8	7.5 <sup>b</sup>	-	-	-	-	-	-
0.034	7.8	7.6 <sup>b</sup>	-	-	-	-	-	-

old: before the renewal

new: after the renewal

- : All test organisms died.

b It indicates the measured value at the time that confirmed all test organisms dead.



Table 3-3 Temperature of test solutions

Measured concentration (mg/L)	At the start	24 hours		48 hours		72 hours		At the end
		old	new	old	new	old	new	
Control	23.4	24.0	23.3	23.6	23.5	23.4	23.3	23.8
0.0063	23.4	24.0	23.2	23.6	23.4	23.4	23.3	23.8
0.0094	23.4	24.0	23.2	23.6	23.4	23.4	23.4	23.8
0.0096	23.3	23.9	23.2	23.6	23.4	23.4	23.4	23.7
0.023	23.2	24.0 <sup>b</sup>	-	-	-	-	-	-
0.034	23.2	24.0 <sup>b</sup>	-	-	-	-	-	-

old: before the renewal

new: after the renewal

Unit: °C

- : All test organisms died.

b It indicates the measured value at the time that confirmed all test organisms dead.

Table 4 LC<sub>50</sub> to Medaka

Exposure duration	LC <sub>50</sub> (mg/L)	95% confidence interval (mg/L) (Slope of the dose-response curve)	Statistical procedure used for determination of LC <sub>50</sub>
24-hour	0.012		Binomial test
48-hour	0.010		Binomial test
72-hour	0.010		Binomial test
96-hour	0.010		Binomial test

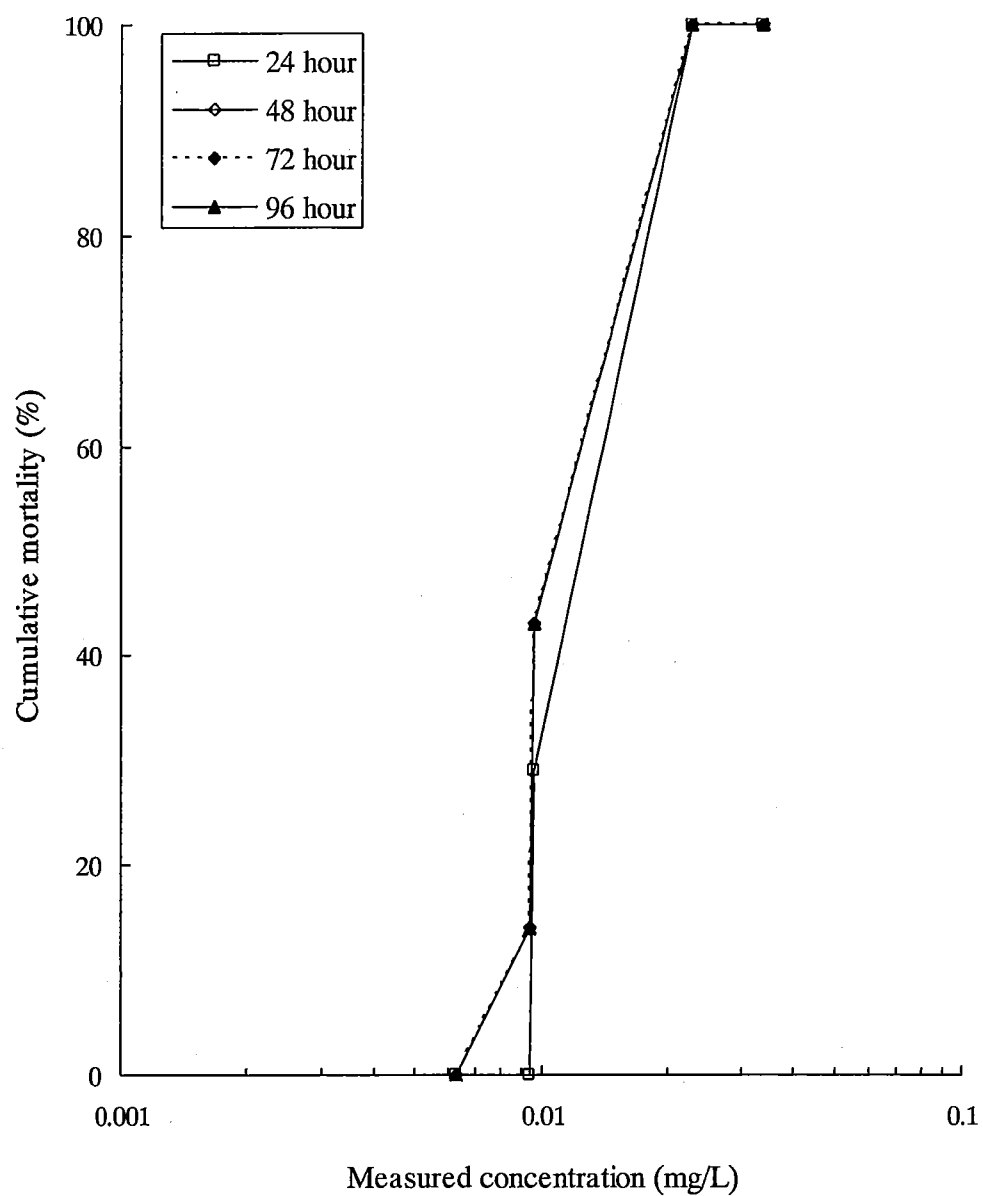


Figure 1 Concentration-cumulative mortality curve.

## Appendix 1



試験用水の水質

## Chemical characteristics of dilution water (Sampling on January 6, 2011)

Parameter	Unit	Results	Determination limit
Total hardness (as CaCO <sub>3</sub> )	mg/L	44	5
Suspended solid	mg/L	< 1	1
pH	—	7.6(20°C)	0.1
Total organic carbon	mg/L	0.4	0.3
Chemical oxygen demand	mg/L	0.8	0.5
Residual chlorine	mg/L	< 0.02	0.02
Ammonium ion	mg/L	0.01	0.01
Total cyan	mg/L	< 0.01	0.01
Alkalinity	mg/L	35	1
Electric conductivity	mS/m	17	0.1
Organic phosphorous	mg/L	< 0.1	0.1
Alkylmercury	mg/L	< 0.0005	0.0005
Mercury	mg/L	< 0.0005	0.0005
Cadmium	mg/L	< 0.001	0.001
Chromium (VI)	mg/L	< 0.005	0.005
Lead	mg/L	< 0.001	0.001
Arsenic	mg/L	< 0.001	0.001
Boron	mg/L	< 0.1	0.1
Fluorine	mg/L	< 0.08	0.08
Iron	mg/L	< 0.03	0.03
Copper	mg/L	< 0.001	0.001
Cobalt	mg/L	< 0.001	0.001
Manganese	mg/L	< 0.005	0.005
Zinc	mg/L	< 0.1	0.1
Aluminum	mg/L	0.02	0.02
Nickel	mg/L	< 0.001	0.001
Sulfate ion	mg/L	20	0.1
Chloride ion	mg/L	16	0.1
Sodium	mg/L	16	0.1
Potassium	mg/L	3.2	0.1
Calcium	mg/L	13	0.1
Magnesium	mg/L	3.3	0.1
Silver	mg/L	< 0.0001	0.0001
1,2-dichloropropane	mg/L	< 0.006	0.006
Chlorothalonil	mg/L	< 0.005	0.005
Propyzamide	mg/L	< 0.0008	0.0008
Chlornitrofen	mg/L	< 0.0001	0.0001
Simazine	mg/L	< 0.0003	0.0003
Thiobencarb	mg/L	< 0.002	0.002
Diazinon	mg/L	< 0.0005	0.0005
Isoxathion	mg/L	< 0.0008	0.0008
Fenitrothion	mg/L	< 0.0003	0.0003
EPN	mg/L	< 0.0006	0.0006
Dichlorvos	mg/L	< 0.001	0.001
Iprobenfos	mg/L	< 0.0008	0.0008
PCB	mg/L	< 0.0005	0.0005

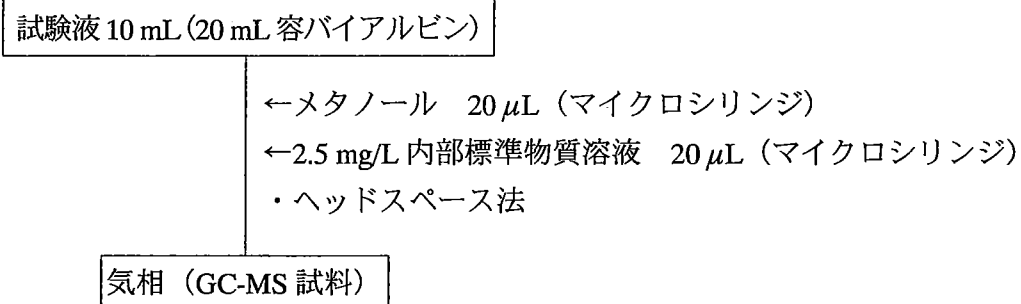
## Appendix 2

被験物質濃度の測定方法及び結果

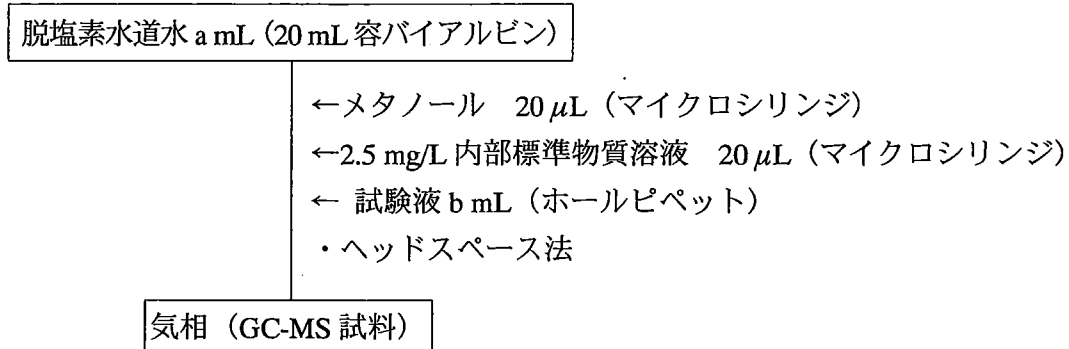
## 1. 試験液の前処理操作

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、 $0.012 \text{ mg/L}$  及び  $0.018 \text{ mg/L}$  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た 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 (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 μm, 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

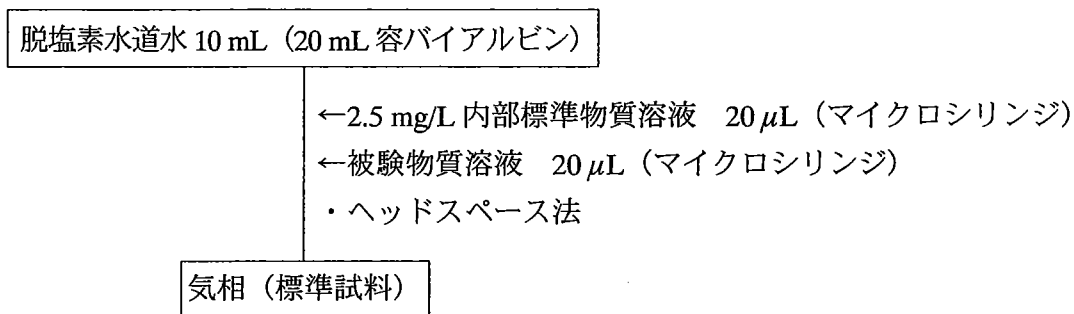
質量分析計条件

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. 標準溶液の調製

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 0.50、2.5、5.0、10 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、0.0010、0.0050、0.010 及び 0.020 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

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 2.5 mg/L の内部標準物質溶液を調製した。

### 5. 検量線の作成

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 (0.0010 mg/L) とした。



## 6. 検出下限値の算出

検量線の最低濃度である 0.0010 mg/L の標準溶液を 2. の定量条件に従って n=5 で分析した。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より検出下限値を算出した。その結果を以下に示す。

濃度 (mg/L)	被験物質の ピーク面積値	内部標準物質の ピーク面積値	項 目	被 験 物 質 の ピ ー ク 面 積 値 / 内 部 標 準 物 質 の ピ ー ク 面 積 値
0.0010	15889	182181	ピーク面積比	0.0872155
0.0010	16416	170737		0.0961479
0.0010	14173	170468		0.0831417
0.0010	15620	182996		0.0853571
0.0010	17004	194203		0.0875579
			ピーク面積比（平均値）R	0.0878840
			ピーク面積比の標準偏差 σ	0.0049427
			濃度 C（mg/L）	0.0010
			検出下限値（mg/L）	0.00017

$$\text{検出下限値} = 3 \times \frac{\sigma \times C}{R}$$

C: 濃度

R: ピーク面積比 (平均値)

σ: ピーク面積比の標準偏差

## 7. 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 2-1 Measured concentrations of test item in test solutions

Nominal concentration (mg/L)	Measured concentration (mg/L)								
	(Percentage of measured concentration versus that at each preparation %)								
	At the start	24 hours		48 hours		72 hours		At the end	Geometric mean
		old	new	old	new	old	new		
Control	n.d. <sup>a</sup>	n.d. <sup>a</sup>	n.d. <sup>a</sup>	n.d. <sup>a</sup>	n.d. <sup>a</sup>	n.d. <sup>a</sup>	n.d. <sup>a</sup>	n.d. <sup>a</sup>	
0.012	0.010	0.0037 (36)	0.0091	0.0039 (43)	0.0097	0.0049 (50)	0.0099	0.0041 (41)	0.0063
0.018	0.014	0.0043 (31)	0.014	0.0052 (36)	0.016	0.0073 (47)	0.016	0.0076 (48)	0.0094
0.027	0.021	0.0065 (31)	0.025	n.d. <sup>b</sup>	0.026	0.011 (43)	0.028	0.014 (50)	0.0096
0.040	0.037	0.014 <sup>a</sup> (38)	-	-	-	-	-	-	0.023
0.060	0.050	0.022 <sup>a</sup> (44)	-	-	-	-	-	-	0.034

old : before the renewal

new : after the renewal

n.d.<sup>a</sup>: < 0.0010 mg/L (determination limit)

n.d.<sup>b</sup>: < 0.00017 mg/L (detection limit)

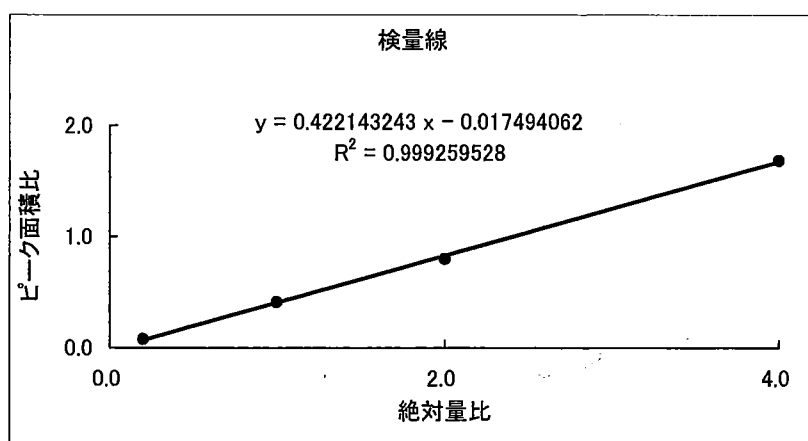
- : It shows no measurement because all test organisms died.

a It indicates the measured value at the time that confirmed all test organisms dead.

b In accordance with OECD Guidance Document No.23, the detection limit (0.00017 mg/L) was adopted for the calculation of the geometric mean, because the test item was not detected.

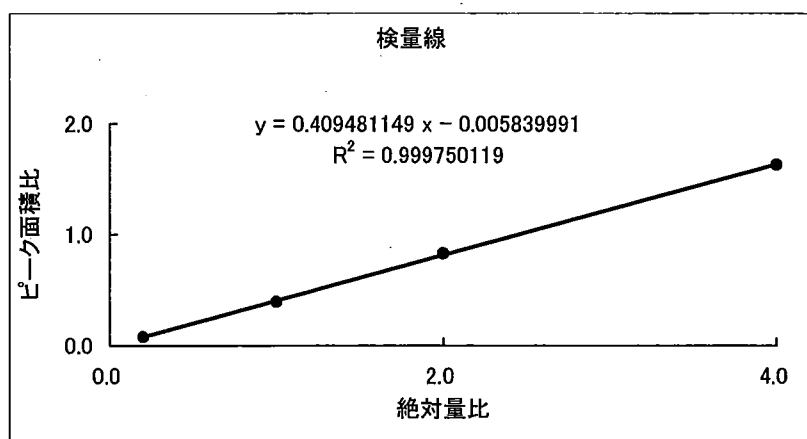
## Appendix 3

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	—	0.050	—	—	213228	—
0.0010	0.010	0.050	0.20	12773	168992	0.075583
0.0050	0.050	0.050	1.0	76524	185522	0.412479
0.010	0.10	0.050	2.0	147881	185172	0.798614
0.020	0.20	0.050	4.0	320443	190425	1.682778

Appendix figure 3-1-1 Calibration curve of test item for analysis by GC-MS at start of exposure.

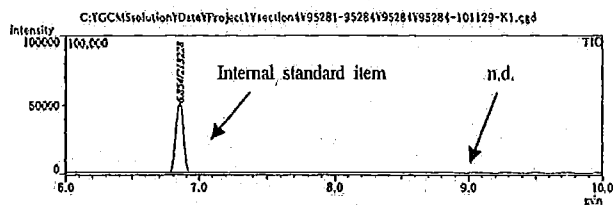


Std.濃度 (mg/L)	被験物質含有量 ( $\mu$ g)	内部標準物質含有量 ( $\mu$ g)	絶対量比	被験物質 ピーク面積値	内部標準物質 ピーク面積値	ピーク面積比
Solvent Blank	—	0.050	—	—	179795	—
0.0010	0.010	0.050	0.20	13774	180772	0.076195
0.0050	0.050	0.050	1.0	71981	182844	0.393674
0.010	0.10	0.050	2.0	158560	191542	0.827808
0.020	0.20	0.050	4.0	293070	180104	1.627226

Appendix figure 3-1-2 Calibration curve of test item for analysis by GC-MS at 24 hours after exposure (before renewal).

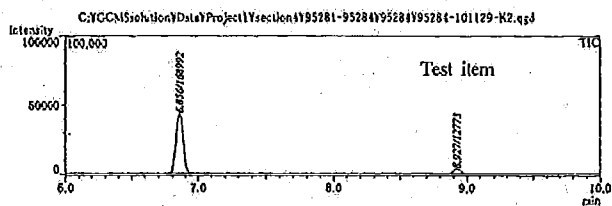
Solvent Blank

File name: C:\GCMSsolution\YData\Project1\Ysection4\95281-95284\95284-101129-K1.qgd



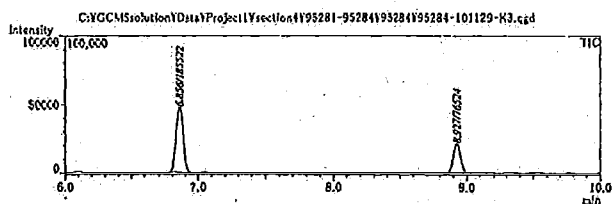
Standard solution 0.0010 mg/L

File name: C:\GCMSsolution\YData\Project1\Ysection4\95281-95284\95284-101129-K2.qgd



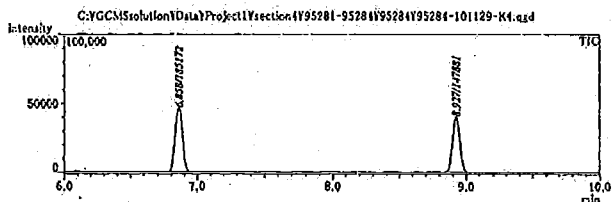
Standard solution 0.0050 mg/L

File name: C:\GCMSsolution\YData\Project1\Ysection4\95281-95284\95284-101129-K3.qgd



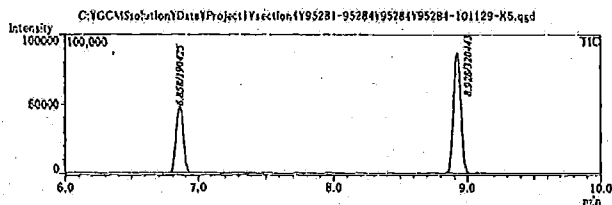
Standard solution 0.010 mg/L

File name: C:\GCMSsolution\YData\Project1\Ysection4\95281-95284\95284-101129-K4.qgd



Standard solution 0.020 mg/L

File name: C:\GCMSsolution\YData\Project1\Ysection4\95281-95284\95284-101129-K5.qgd



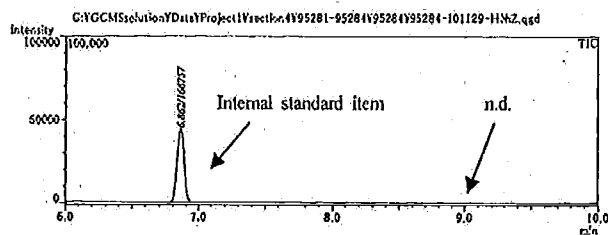
Date: 2010.11.29

Name: [REDACTED]

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

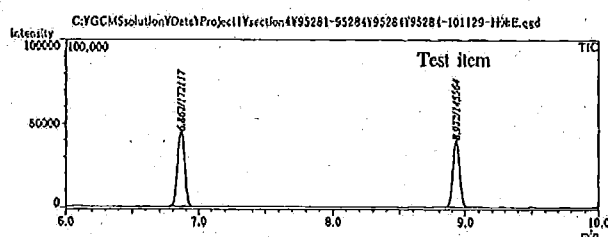
Control

File name: C:\YGCMSsolution\YData\Project1\Ysection4\Y95281-95284\Y95284-101129-H0hZ.qgd



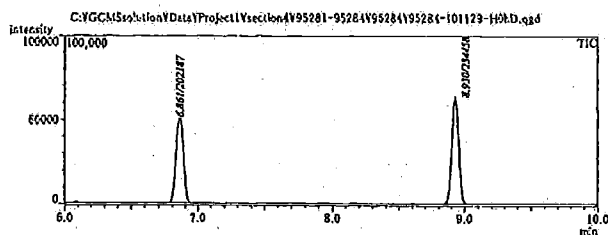
0.012 mg/L exposure level

File name: C:\YGCMSsolution\YData\Project1\Ysection4\Y95281-95284\Y95284-101129-H0hE.qgd



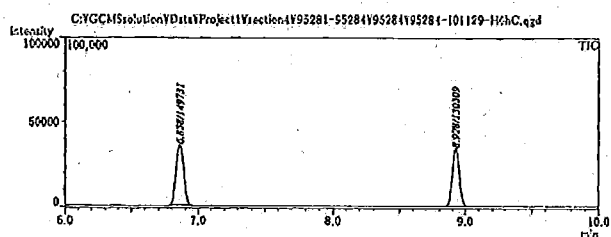
0.018 mg/L exposure level

File name: C:\YGCMSsolution\YData\Project1\Ysection4\Y95281-95284\Y95284-101129-H0hD.qgd



0.027 mg/L exposure level

File name: C:\YGCMSsolution\YData\Project1\Ysection4\Y95281-95284\Y95284-101129-H0hC.qgd



Date: 2010.11.29

Name:

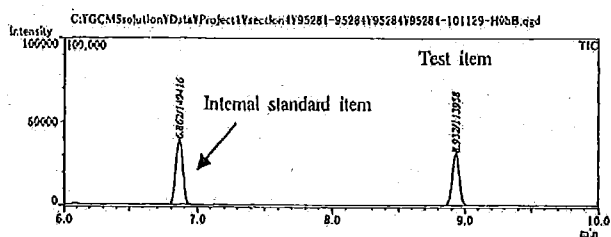
Appendix figure 3-2-2 GC-MS chromatograms at start of exposure.

95284

95284

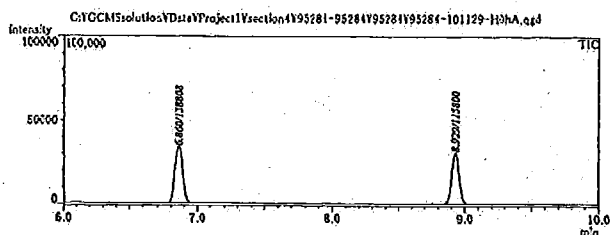
0.040 mg/L exposure level

File name: C:\GCMSolution\YData\Project1\Ysection4\95281-95284\95284-101129-H0hB.qgd



0.060 mg/L exposure level

File name: C:\GCMSolution\YData\Project1\Ysection4\95281-95284\95284-101129-H0hA.qgd



Date: 2010.11.29

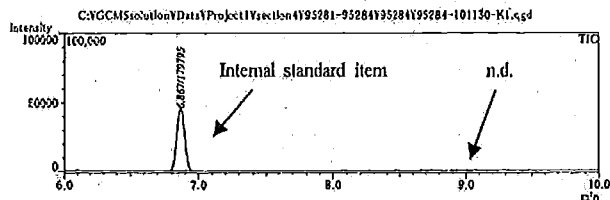
Name:

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



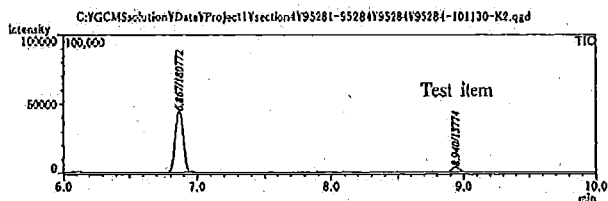
Solvent Blank

File name: C:\GCMSsolution\YData\Project1\Ysection4\95281-95284\95284\95284-101130-K1.qgd



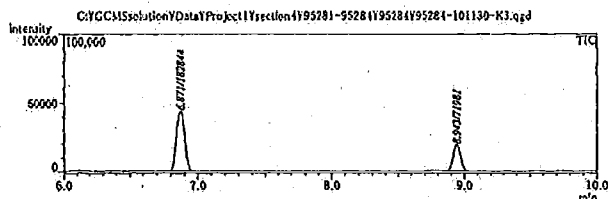
Standard solution 0.0010 mg/L

File name: C:\GCMSsolution\YData\Project1\Ysection4\95281-95284\95284\95284-101130-K2.qgd



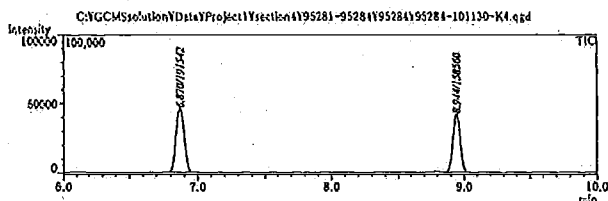
Standard solution 0.0050 mg/L

File name: C:\GCMSsolution\YData\Project1\Ysection4\95281-95284\95284\95284-101130-K3.qgd



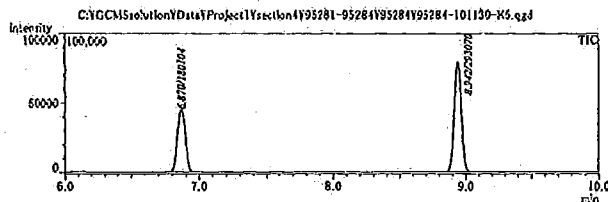
Standard solution 0.010 mg/L

File name: C:\GCMSsolution\YData\Project1\Ysection4\95281-95284\95284\95284-101130-K4.qgd



Standard solution 0.020 mg/L

File name: C:\GCMSsolution\YData\Project1\Ysection4\95281-95284\95284\95284-101130-K5.qgd



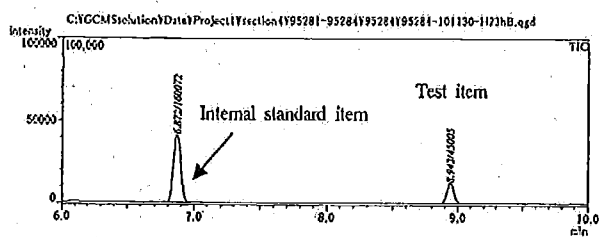
Date: 2010.11.30

Name: [REDACTED]

Appendix figure 3-3-1 GC-MS chromatograms at 24 hours after exposure (before renewal).

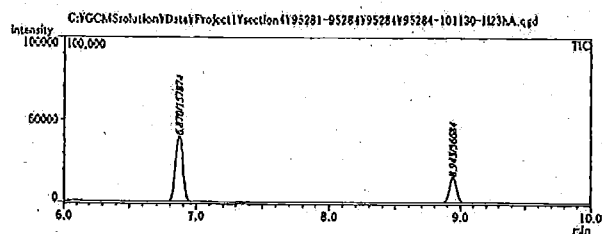
0.040 mg/L exposure level

File name: C:\GCMSsolution\Data\Project1\Ysection4\95281-95284\95284-101130-H23hB.qgd



0.060 mg/L exposure level

File name: C:\GCMSsolution\Data\Project1\Ysection4\95281-95284\95284-101130-H23hA.qgd



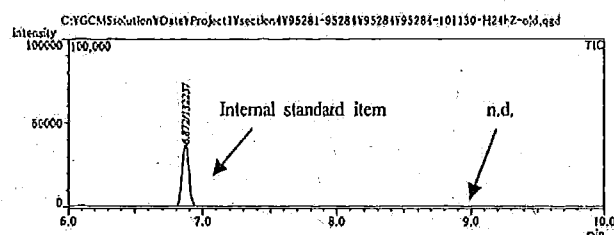
Date : 2010.11.8

Name :

Appendix figure 3-3-2 GC-MS chromatograms at the time that deaths of all test organisms were confirmed (at 23 hours after exposure).

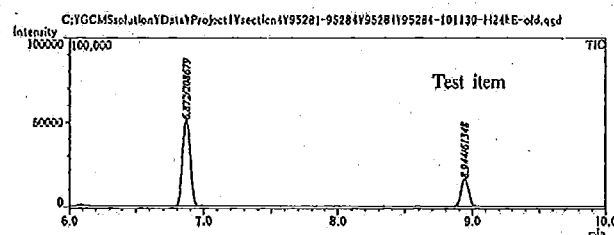
## Control

File name: C:\GCMSsolution\Data\Project1\Ysection4\95281-95284\95284-101130-H24hZ-old.qgd



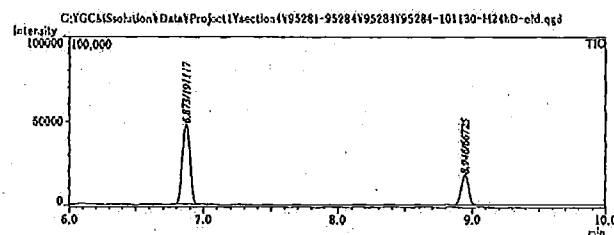
## 0.012 mg/L exposure level

File name: C:\GCMSsolution\Data\Project1\Ysection4\95281-95284\95284-101130-H24hE-old.qgd



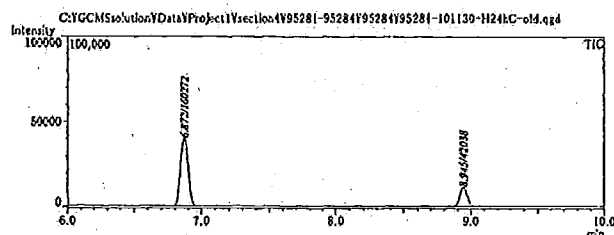
## 0.018 mg/L exposure level

File name: C:\GCMSsolution\Data\Project1\Ysection4\95281-95284\95284-101130-H24hD-old.qgd



## 0.027 mg/L exposure level

File name: C:\GCMSsolution\Data\Project1\Ysection4\95281-95284\95284-101130-H24hC-old.qgd



Date: 2010.11.30

Name: [REDACTED]

Appendix figure 3-3-3 GC-MS chromatograms at 24 hours after exposure (before renewal).

## 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：半止水式（48 時間後に換水）、密閉系

生物数/試験液量：3 尾/約 2.8 L

エアレーション：無し

試験液調製法：供試試料と試験用水を混合、攪拌、溶解して試験原液を調製し、試験用水で適宜希釈して試験液を調製した。なお、供試試料の添加は、比重を基に算出した密度（1.6558 g/cm<sup>3</sup>）換算による容量添加で行った。

## ＜試験生物への影響＞

設定濃度区 (mg/L)	左：累積死亡率(%)      右：症状の有無（有：*、無：N）									
	3時間		24時間		48時間		72時間		96時間	
0.0016	0	N	0	N	0	N	0	N	0	N
0.0047	0	N	0	N	0	N	0	N	0	N
0.014	0	N	0	N	0	N	0	N	0	N
0.040	100	—	100	—	100	—	100	—	100	—

—は全個体が死亡したことを示す。

## 2.2 予備試験 2

暴露方式：半止水式（24 時間ごとに換水）、密閉系

生物数/試験液量：2 尾/約 1L

エアレーション：無し

試験液調製法：供試試料と試験用水を混合、攪拌、溶解して試験原液を調製し、試験用水で適宜希釈して試験液を調製した。なお、供試試料の添加は、比重を基に算出した密度（1.6558 g/cm<sup>3</sup>）換算による容量添加で行った。

分析：0.0050 mg/L区に関して、試験液中の被験物質濃度の測定を行った。なお、生物未投入の試験液についても合わせて濃度維持を確認した。

＜試験生物への影響＞

設定濃度区 (mg/L)	左：累積死亡率(%)      右：症状の有無（有：*、無：N）									
	3時間		24時間		48時間		72時間		96時間	
0.0050	0	N	0	N	0	N	0	N	0	N
0.014	0	N	0	N	0	N	0	N	0	N
0.040	0	N	50	*	50	*	50	N	50	N

＜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	24時間後
0.0050	0.0049	0.0021 (43)
0.0050 (生物無)		0.0041 (84)

生物を投入した試験液に関しては暴露 24 時間後に濃度低下が確認されたが、この濃度低下は生物投入に起因したものと考えられる。本試験における暴露方式については 24 時間換水を採用することとした。

### 2.3 予備試験 3

被験物質は光により分解する可能性が懸念されるが、試験条件下における光分解性の程度の知見を得るため、下記の検討条件にて被験物質濃度の安定性を確認した。なお、本検討では試験用水に起因した生分解による濃度低下の可能性をなくすため、試験用水は滅菌したものをを用いた。

暴露方式：密閉系

試験生物の投入：有り（2尾／約 1L）、無し

照明条件：室内灯（16h 明/8h 暗）、遮光条件

エアレーション：無し

試験液調製法：予備試験 2 と同様の手法により調製

分析：0.012 mg/L の試験液を調製し、調製時濃度及び各検討条件における 24 時間後の試験液中の被験物質濃度の測定を行った。

＜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	24時間後
生物投入	室内灯下	0.010	0.0042 (40)
	遮光条件		0.0036 (34)
生物未投入	室内灯下		0.0096 (92)
	遮光条件		0.0089 (86)

設定濃度 : 0.012 mg/L

遮光条件にて濃度維持率が高まる結果は得られなかったことから、試験液調製24時間後までは、通常の照明条件下（室内灯、16h明/8h暗）において、光分解による被験物質濃度の低下の可能性はないものと判断された。

### 3. 本試験条件

試験濃度 : 0.060、0.040、0.027、0.018、0.012 mg/L（公比 1.5）及び対照区

暴露方式 : 半止水式（24 時間ごとに換水）、密閉系

エアレーション : 無し