

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

4,4'-オキシビス（ベンゼンスルホニルヒドラジド）の
オオミジンコ (*Daphnia magna*) に対する急性遊泳阻害試験

（試験番号：A020358-2）

2004年 2月27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 : 4,4'-オキシビス (ベンゼンスルホニルヒドラジド) のオオミ
ジンコ (*Daphnia magna*) に対する急性遊泳阻害試験

試 験 番 号 : A020358-2

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。

日本国環境省総合環境政策局環境保健部環境安全課環境リスク評価室長通知
「生態影響試験実施に関する基準の改正について」(別添)「生態影響試験実
施に関する基準」(環保安第242号, 2001年)

2004年 2月27日

試験責任者



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 : 4,4'-オキシビス(ベンゼンスルホニルヒドラジド)のオオミジンコ(*Daphnia magna*)に対する急性遊泳阻害試験

試 験 番 号 : A020358-2

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		2003年 1月17日	2003年 1月17日
試験の査察	試験液の調製	2003年 3月12日	2003年 3月12日
	ジンの投入	2003年 3月12日	2003年 3月12日
	ジンの観察	2003年 3月14日	2003年 3月14日
最終報告書監査		2004年 2月27日	2004年 2月27日

2004年 2月27日

信頼性保証部門担当者



試験実施概要

1. 表 題 : 4,4'-オキシビス (ベンゼンスルホニルヒドラジド) のオオミジンコ (*Daphnia magna*) に対する急性遊泳阻害試験
(試験番号 : A 0 2 0 3 5 8 - 2)
2. 試 験 目 的 : 被験物質のオオミジンコ (*Daphnia magna*) に対する急性遊泳阻害試験を行い, 24 および 48 時間の半数遊泳阻害濃度 (EC50) を求める。
3. 適用ガイドライン : OECD 化学品テストガイドライン No. 202 「ミジンコ類, 急性遊泳阻害試験および繁殖試験」 (1984 年)
(ただし, 同改訂案「ミジンコ類, 急性遊泳阻害試験」 (2002 年) *の内容を一部採用。)
*:OECD Guideline for Testing of Chemicals, Revised Proposal for Updating Guideline 202, ENV/JM/TG (2002) 3/REV1 (2002)
4. 適 用 G L P : 日本国環境省総合環境政策局環境保健部環境安全課環境リスク評価室長通知「生態影響試験実施に関する基準の改正について」 (別添) 「生態影響試験実施に関する基準」 (環保安第 242 号, 2001 年)
5. 試 験 委 託 者 : 環境省
〒100-8975 東京都千代田区霞が関一丁目 2 - 2
委託責任者 総合環境政策局環境保健部環境安全課
環境リスク評価室 室長補佐 XXXXXXXXXX
6. 試 験 受 託 者 : 株式会社三菱化学安全科学研究所
〒105-0014 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
〒227-0033 神奈川県横浜市青葉区鴨志田町 1000 番地

8. 試験責任者： [redacted]

生態科学研究部

(2003年 9月 1日付, グループ再編により名称変更)

9. 試験担当者： [redacted]



(2004年 2月27日)

(試験実施)



(2004年 2月27日)

(試験実施, 報告書作成)



(2004年 2月27日)

(試験実施)



(2003年 3月31日付 退職)

(試験実施)



(2004年 2月27日)

(試験実施)



(2004年 2月27日)

(分析実施)

10. 試験日程： 試験開始日 2003年 1月17日

実験開始日 2003年 3月12日

実験終了日 2003年 3月14日

試験終了日 2004年 2月27日

11. 保管： 試験計画書, 生データ, 被験物質, 記録文書および最終報告書は, 横浜研究所の保管施設に保管する。

保管期間は, 最終報告書作成後10年間とし, 以後の保管は試験委託者と協議の上, 決定する。

ただし, 被験物質については, 最終報告書作成後10年間または品質低下をおこさないで安定に保存しうる期間のいずれか短い方の期間とする。

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	9
1.3 被験物質の確認および保管条件下での安定性	10
2 供試生物	10
3 試験方法	11
3.1 試験条件	11
3.2 希釈水	11
3.3 試験容器および恒温槽等	11
3.4 試験濃度の設定	12
3.5 試験液の調製	13
3.6 試験液の分析	14
3.7 試験操作	14
4 結果の算出	15
4.1 阻害濃度算出に用いる被験物質濃度の決定	15
4.2 半数遊泳阻害濃度 (EiC50) の算出	15
4.3 0%阻害最高濃度および100%阻害最低濃度	15
5 結果および考察	16
5.1 試験成績の信頼性に影響を及ぼしたと思われる環境要因	16
5.2 試験液中の被験物質濃度	16
5.3 半数遊泳阻害濃度 (EiC50)	16
5.4 0%阻害最高濃度および100%阻害最低濃度	16
5.5 試験液の水温, 溶存酸素濃度, pHおよび硬度	17
5.6 試験計画書からの逸脱事項	17
Table 1~8	18~24
Figure 1	25
付属資料-1 希釈水の組成	26~27
付属資料-2 試験液の分析	28~37
付属資料-3 結果の算出	38~39

要 約

試 験 委 託 者 : 環境省

表 題 : 4,4'-オキシビス (ベンゼンスルホニルヒドラジド) のオオミジンコ
(*Daphnia magna*) に対する急性遊泳阻害試験

試 験 番 号 : A020358-2

試 験 方 法 :

- 1) 適用ガイドライン: OECD 化学品テストガイドライン No. 202「ミジンコ類, 急性遊泳阻害試験および繁殖試験」(1984年)
- 2) 暴 露 方 式 : 半止水式 (24時間後に試験液の全量を交換)
水面をテフロンシートで被覆
- 3) 供 試 生 物 : オオミジンコ (*Daphnia magna*)
- 4) 暴 露 期 間 : 48時間
- 5) 試 験 濃 度 : 対照区, 助剤対照区, 2.00, 3.60, 6.40, 11.2, 20.0 mg/L
(設定値) (公比: 1.8)
ただし, 20.0 mg/Lは試験液調製可能最高濃度
助剤濃度一定: 100 μ L/L (ジメチルホルムアミド使用)
- 6) 試 験 液 量 : 100 mL/容器
- 7) 連 数 : 4 容器/試験区
- 8) 供 試 生 物 数 : 20頭/試験区 (5頭/容器)
- 9) 試 験 温 度 : 20 \pm 1 $^{\circ}$ C
- 10) 照 明 : 室内光, 16時間明 (800 lux以下) / 8時間暗
- 11) 分 析 法 : 高速液体クロマトグラフィー (HPLC)

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、暴露開始時において 81～87%，換水前において 33～39%であった。水中で加水分解したと考えられるが、詳細は確認できなかった。なお、クロマトグラム上に分解物と思われるピークが何本か検出された。

2) 24時間暴露後の結果

	(mg/L)	95%信頼区間 (mg/L)
半数遊泳阻害濃度 (EiC50)	9.77	8.26 ～ 13.4
0%阻害最高濃度	3.39	—
100%阻害最低濃度	> 10.3	—

3) 48時間暴露後の結果

	(mg/L)	95%信頼区間 (mg/L)
半数遊泳阻害濃度 (EiC50)	2.91	2.44 ～ 3.47
0%阻害最高濃度	< 1.16	—
100%阻害最低濃度	10.3	—

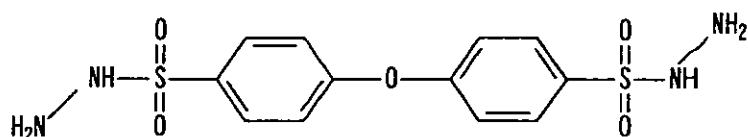
1 被験物質

1.1 名称、構造式および物理化学的性状

名称： 4,4'-オキシビス（ベンゼンスルホニルヒドラジド）（略称 O B S H）

CAS No： 80-51-3

構造式：



分子式： $C_{12}H_{14}N_4O_5S_2$

分子量^{*1}： 358.4

分解温度^{*1}： 150～165℃（自己反応性物質，白煙を発生して分解）

溶解度^{*1}： ジメチルスルホキシド；易溶，ケトン類；反応して溶解

水溶解度^{*1,*2}： 0.02g/100g（20℃）^{*1}

25.7mg/L（精製水^{*3}，20℃，48時間攪拌，HPLC測定）^{*2}

比重^{*1}： 1.525

*1： 供給者提供資料

*2： 当社測定値

*3： JIS K0557 A4グレードの水，ヤマト科学製 超純水製造装置 WR600A

1.2 供試試料

純度^{*1}： 99.3 wt%

〔不純物：4,4'-オキシビス（ベンゼンスルホン酸）及び4,4'-オキシビス（ベンゼンスルホニルクロライド）を微量に含有する〕

ロット番号^{*1}： 403650

供給者：

受領量^{*1}： 100 g

受領日： 2002年12月12日

外観： 白色微粉末

*1： 供給者提供資料

1.3 被験物質の確認および保管条件下での安定性

試験開始前に、入手した被験物質について赤外吸収スペクトルを測定し、被験物質の特性が認められることを確認した。

試験期間中、被験物質は当研究所の試験物質保管用冷蔵庫（保管条件：冷蔵，暗所）内に保管した。また、試験終了時にも赤外吸収スペクトルを測定し、試験開始時に測定したスペクトルと比較した。その結果、スペクトルに変化はなかったことより被験物質は保管中は安定であったと判断された。

2 供試生物

- 1) 和名： 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
- 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，供試生物の感受性を調べている。1998年6月以降の48時間の半数遊泳阻害濃度（EC50）は、以下の通りである。

平均値±標準偏差＝0.75±0.17 mg/L, n=10
（最小値～最大値＝0.57～1.02 mg/L）

- 6) 生育段階： 雌の幼体（24時間以内令）
- 7) 供試生物を得るための親ミジンコの飼育条件：
 - 飼育水： 希釈水（3.2 参照）
 - 飼育密度： 1頭／80mL（25頭／2L）以下
 - 飼育容器： 2Lガラス製容器
 - 水温： 20±1℃
 - 溶存酸素濃度： 飽和濃度の60％以上
 - pH： 6.7～8.5
 - 照明： 室内光，16時間明（800 lux以下）／8時間暗
 - 飼育期間： 2003年 2月19日～2003年 3月12日
 - 暴露開始前2週間の親の死亡率： 0％
 - 休眠卵および雄の発生： 無し
 - 餌の種類： *Chlorella vulgaris*（単細胞緑藻類）
（藻類培養液を遠心分離し，希釈水に置換して使用）
 - 給餌量： 0.2 mg C（有機炭素含量）／頭／日
 - 飼育水の交換： 定期的に（3回／週）交換。幼体は極力，毎日除去。

3 試験方法

3.1 試験条件

- 1) 暴露方式： 半止水式（24時間後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： 48時間
- 3) 試験液量： 100 mL／容器
- 4) 連数： 4 容器／試験区
- 5) 供試生物数： 20頭／試験区（5 頭／容器）
- 6) 試験温度： $20 \pm 1^{\circ}\text{C}$
- 7) 溶存酸素濃度： 飽和濃度の60％以上
- 8) pH： 試験液のpH調整は行わなかった
- 9) 硬度： 約 250mg/L (CaCO_3 換算)
- 10) 照明： 室内光，16時間明（800 lux以下）／8時間暗
- 11) 給餌： 無給餌

3.2 希釈水

OECD 化学品テストガイドライン No. 211「オオミジンコ繁殖試験」に記載してある調製水，Elendt M4を用いた。組成を付属資料－1に示した。

3.3 試験容器および恒温槽等

- 1) 試験容器： 100mL容ガラスピーカー（試験容器には蓋をし，水面をテフロンシートで覆った）
- 2) 恒温槽： 塩ビ製水槽（恒温装置，タイテック製 ケルニットCL-80F型）
- 3) 水温計： 横河電機製 2455 02型 No. 1
- 4) 溶存酸素計： 電気化学計器製 DOL-10型 No. 2
- 5) pH計： 東亜電波工業製 HM-40V型 No. 1
- 6) 硬度測定キット： 共立理化学研究所製 WAD-TH

3.4 試験濃度の設定

以下の表に示す予備試験（各2連，10頭／試験区）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：対照区，助剤対照区，2.00，3.60，6.40，11.2，20.0 mg/L（公比：1.8）

ただし，20.0 mg/Lは試験液調製可能最高濃度

予備試験結果

濃度 (mg/L)	遊泳阻害率 (%)	
	24時間後	48時間後
助剤対照区	0	0
0.200	0	0
2.00	0	0
20.0	0	100

3.5 試験液の調製

試験液調製時の希釈水は、調製前に暴気を行い、恒温槽内で $20 \pm 1^\circ\text{C}$ とした。

以下の表の通りに、被験物質原液－Ⅰ およびⅡを調製した。

		被験物質原液－Ⅰ	被験物質原液－Ⅱ*
調製方法	被験物質採取量	1000 mg	20.0 mg (被験物質原液－Ⅰを 100 μL 採取)
	定容液	ジメチルホルムアミド	希釈水
	定容量	5 mL	1000 mL
	溶解方法	--	超音波による機械的溶解 (10 分間)
	被験物質濃度	200000 mg/L	20.0 mg/L (助剤 (ジメチルホルムアミド) 濃度: 100 $\mu\text{L/L}$)
調製頻度		暴露開始時	用時調製
保管条件等		冷蔵, 暗所	--
上記条件下での安定性		48 時間以上安定	--

* : 2 本調製

		助剤原液
調製方法	ジメチルホルムアミド 採取量	500 μL
	定容液	希釈水
	定容量	50 mL
	ジメチルホルムアミド 濃度	10000 $\mu\text{L/L}$
調製頻度		用時調製
保管条件等		--

試験液は、試験濃度に応じた量の被験物質原液－Ⅱを採取し、同時に全濃度区で助剤濃度が一定 (助剤濃度: 100 $\mu\text{L/L}$) になるよう助剤原液を採取し、希釈水で 500 mL に定容した。1 濃度につき4個の試験容器に各 100 mL 入れた。

対照区は希釈水のみとし、助剤対照区には助剤のみを含むもの (助剤濃度: 100 $\mu\text{L/L}$) を調製した。

調製時の試験液の状態 (外観) は全試験区において無色透明であった。

3.6 試験液の分析

暴露開始時および換水前（暴露開始24時間後）に全試験区各1試験容器より試験液0.75 mLを採取し、アセトニトリルを等量添加し混合後、HPLCにより分析した。各試験液の被験物質濃度は、標準溶液のピーク面積との比から定量し、幾何平均値を求めた。詳細は付属資料－2に示した。

3.7 試験操作

試験液の水温、溶存酸素濃度、pHおよび硬度を測定後、ガラスピペットを用いて供試ミジンコを投入し、その時点暴露開始時とした。ミジンコ投入の際、試験液量に対するピペット内の飼育水が全量で1%以内となるようにした。

暴露開始 24 および 48 時間後にミジンコの遊泳阻害数の観察を行った。試験容器を穏やかに動かした後、15 秒間泳げない場合は遊泳阻害されたとみなした。

水温、溶存酸素濃度、pHおよび硬度は、暴露開始時および換水前（暴露開始 24 時間後）に、全試験区各1試験容器の試験液について測定した。

4 結果の算出

4.1 阻害濃度算出に用いる被験物質濃度の決定

阻害濃度の算出に用いる被験物質濃度は、測定値（平均）とした。

4.2 半数遊泳阻害濃度（EiC50）の算出

24および48時間の各試験区における、ミジンコの遊泳阻害数と供試個体数（20頭）から遊泳阻害率（％）を求め、以下の方法で半数遊泳阻害濃度（EiC50）を決定した。

最高濃度区における阻害率	≥ 50%	< 50%
EiC50の決定方法	Binomial法, Moving average法, Probit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－遊泳阻害率曲線の記載	記載する。	記載する。

4.3 0%阻害最高濃度および100%阻害最低濃度

ミジンコが遊泳阻害を受けない最高濃度区（0%阻害最高濃度）を24および48時間について可能な限り記録した。同様に、全てのミジンコが遊泳阻害を受ける最低濃度区（100%阻害最低濃度）を記録した。

5 結果および考察

5.1 試験成績の信頼性に影響を及ぼしたと思われる環境要因

該当する事象はなかった。

5.2 試験液中の被験物質濃度

暴露開始時および換水前（暴露開始24時間後）に試験液中の被験物質濃度を測定した。その結果を Table 1, 代表的なクロマトグラムを付属資料－2に示した。

試験液の分析（3.6 参照）の結果、測定値の設定値に対する割合は、暴露開始時において 81～87%，換水前において 33～39%であった。水中で加水分解したと考えられるが、詳細は確認できなかった。なお、クロマトグラム上に分解物と思われるピークが何本か検出された。

5.3 半数遊泳阻害濃度 (EiC50)

各時間における遊泳阻害率をTable 2 に、濃度－遊泳阻害率曲線を Figure 1 に示した。

暴露期間中の対照区および助剤対照区における遊泳阻害率は共に0%，水面に浮いたミジンコは共に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遊泳阻害濃度 (EiC50) を Table 3 および以下に、48 時間の算出結果を付属資料－3に示した

24 時間 EiC50 : 9.77 mg/L (95%信頼区間: 8.26 ～ 13.4 mg/L)

48 時間 EiC50 : 2.91 mg/L (95%信頼区間: 2.44 ～ 3.47 mg/L)

5.4 0%阻害最高濃度および 100%阻害最低濃度

0%阻害最高濃度および100%阻害最低濃度を Table 4 および以下に示した。

24 時間 0%阻害最高濃度 : 3.39 mg/L

24 時間 100%阻害最低濃度 : > 10.3 mg/L

48 時間 0%阻害最高濃度 : < 1.16 mg/L

48 時間 100%阻害最低濃度 : 10.3 mg/L

5.5 試験液の水温，溶存酸素濃度，pHおよび硬度

試験液の水温を Table 5，溶存酸素濃度を Table 6，pHを Table 7，硬度を Table 8に示した。

水温はすべての試験区で $20 \pm 1^{\circ}\text{C}$ で，溶存酸素濃度はすべての試験区で飽和溶存酸素濃度（ 20.0°C の飽和溶存酸素濃度： 8.8 mg/L ）の60%以上であり，いずれも試験基準を満たした。pHはミジンコの飼育環境として適正範囲（ $6.0 \sim 8.5$ ）内であった。また，硬度も適正範囲内（約 250 mg/L ）と判断した。

5.6 試験計画書からの逸脱事項

該当する事象はなかった。

以 上

Table 1 Measured Concentration of the Test Substance in Test Water
(Semi-Static Condition)

Nominal Concentration (mg/L)	Measured concentration (mg/L)				Geometric Mean During 24 Hours (mg/L)
	0 Hour New	Percent of Nominal	24 Hours Old	Percent of Nominal	
Control	< 0.02	--	< 0.02	--	--
Solvent Control	< 0.02	--	< 0.02	--	--
2.00	1.73	87	0.78	39	1.16
3.60	2.93	81	1.24	34	1.91
6.40	5.29	83	2.17	34	3.39
11.2	9.12	81	3.80	34	5.89
20.0	16.2	81	6.50	33	10.3

New: freshly prepared test solutions

Old: test solutions after 24 hours exposure

Table 2 The Number of Immobilized *Daphnia magna* (Percent Immobility)

Nominal Concentration (mg/L)	Mean ^a Measured concentration (mg/L)	Cumulative Number of Immobilized <i>Daphnia</i> (Percent Immobility)	
		24 Hours	48 Hours
Control	--	0 (0)	0 (0)
Solvent Control	--	0 (0)	0 (0)
2.00	1.16	0 (0)	1 (5)
3.60	1.91	0 (0)	3 (15)
6.40	3.39	0 (0)	12 (60)
11.2	5.89	2 (10)	19 (95)
20.0	10.3	11 (55)	20 (100)

a: geometric mean

Table 3 Calculated EiC50 Values

Exposure Period (Hours)	EiC50* (mg/L)	95-Percent Confidence Limits (mg/L)	Statistical Method
24	9.77	8.26 - 13.4	Probit
48	2.91	2.44 - 3.47	Probit

* : Using the concentrations of 1.16 - 10.3 mg/L

Table 4 Highest Concentration in 0% Immobility and Lowest Concentration in 100% Immobility

Exposure Period (Hours)	Highest Concentration in 0% Immobility (mg/L)	Lowest Concentration in 100% Immobility (mg/L)
24	3.39	> 10.3
48	< 1.16	10.3

Table 5 Temperature

Nominal Concentration (mg/L)	Mean ^a Measured Concentration (mg/L)	Temperature (°C)	
		0 Hour New	24 Hours Old
Control	--	20.1	19.8
Solvent Control	--	20.3	19.6
2.00	1.16	20.3	19.8
3.60	1.91	20.3	19.7
6.40	3.39	20.6	19.7
11.2	5.89	20.6	19.7
20.0	10.3	20.0	19.7

a: geometric mean

New: freshly prepared test solutions

Old: test solutions after 24 hours exposure

Table 6 Dissolved Oxygen Concentrations

Nominal Concentration (mg/L)	Mean ^a Measured Concentration (mg/L)	Dissolved Oxygen Concentration (mg/L)	
		0 Hour New	24 Hours Old
Control	--	8.7	8.6
Solvent Control	--	8.7	8.6
2.00	1.16	8.8	8.5
3.60	1.91	8.8	8.5
6.40	3.39	8.8	8.4
11.2	5.89	8.8	8.3
20.0	10.3	8.7	8.0

a: geometric mean

New: freshly prepared test solutions

Old: test solutions after 24 hours exposure

Table 7 pH Values

Nominal Concentration (mg/L)	Mean ^a Measured Concentration (mg/L)	pH	
		0 Hour New	24 Hours Old
Control	--	8.4	8.3
Solvent Control	--	8.4	8.2
2.00	1.16	8.3	8.2
3.60	1.91	8.3	8.1
6.40	3.39	8.3	8.0
11.2	5.89	8.3	7.9
20.0	10.3	8.3	7.7

a: geometric mean

New: freshly prepared test solutions

Old: test solutions after 24 hours exposure

Table 8 Total Hardness (as CaCO₃)

Nominal Concentration (mg/L)	Mean ^a Measured Concentration (mg/L)	Total Hardness (as CaCO ₃ , mg/L) ^b	
		0 Hour New	24 Hours Old
Control	--	260	255
Solvent Control	--	255	255
2.00	1.16	255	260
3.60	1.91	255	255
6.40	3.39	255	255
11.2	5.89	255	255
20.0	10.3	265	255

a: geometric mean

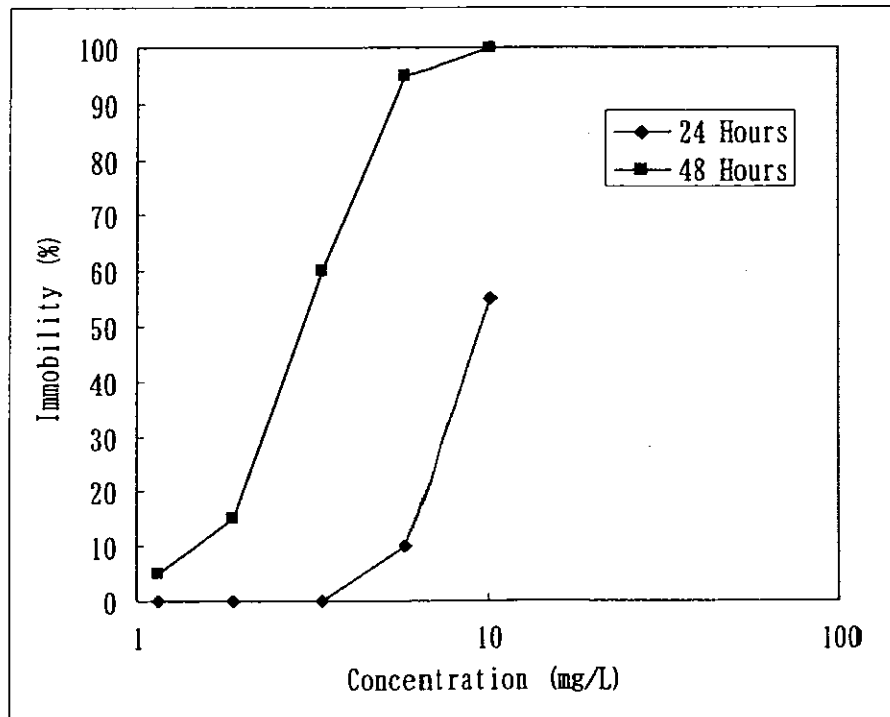
b: These values were determined by a total hardness measurement kit.

The same lot of this kit showed approximately 10~20 mg/L higher value than the theoretical standard value.

New: freshly prepared test solutions

Old: test solutions after 24 hours exposure

Figure 1 Concentration-Immobility Curve



付属資料－ 1

希积水の組成

Table A-1 Elendt M4 medium recommended by OECD Guideline 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	5.80
NaHCO_3	64.8
$\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$	10.0
NaNO_3	0.274
KH_2PO_4	0.143
K_2HPO_4	0.184

Trace elements	Concentration ($\mu\text{g/L}$)
H_3BO_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
ZnCl_2	13.0
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	10.0
KI	3.25
Na_2SeO_3	2.19
NH_4VO_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

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

付属資料－ 2

試験液の分析

1 試験液の分析方法

- 1) 各試験液0.75 mLを測定用バイアルに採取し、アセトニトリルを等量添加し混合後、HPLCにより分析した。代表的なクロマトグラムをFigure A-2-2 (2), (3), (4), (5), (7), (8), (9), (10)に示した。
- 2) アセトニトリルで調製した標準溶液0.75 mLを測定用バイアルに採取し、精製水を等量添加し混合後、HPLCにより分析した。代表的なクロマトグラムをFigure A-2-2 (1), (6)に示した。
- 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。
なお、暴露開始前に試験濃度範囲の全域にわたって検量線を作成し、直線性を確認している。（「3 検量線」参照）

2 高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 測定条件

(装置)

高速液体クロマトグラフ:	Agilent 1100 型 カラムスイッチング装置付 (No.2)
ワークステーション:	Agilent 1100 シリーズ ミニステーション (Windows NT)
デガッサ:	G1322A 型
送液ポンプ:	G1311A 型 (クォータリポンプ, 分析用) G1311A 型 (クォータリポンプ, 濃縮用)
オートサンプラ:	G1313A 型
カラムオープン:	G1316A 型 (カラムスイッチングバルブ)
フォトダイオードアレイ検出器:	G1315B 型

(条件)

カラム:	分析用	GL サイエンス製 Inertsil ODS-3V 5 μ m 4.6mm i.d. \times 150mm
	濃縮用	GL サイエンス製 Inertsil ODS-3 5 μ m 4mm i.d. \times 10mm
カラムオープン:	40 $^{\circ}$ C	
溶離液:	分析用	アセトニトリル/0.1% リン酸 = 25/75 (v/v)
	濃縮用	アセトニトリル/0.1% リン酸 = 10/90 (v/v)
流速:	分析用	1.0 mL/min
	濃縮用	0 ~ 3 min 2.5 mL/min 3 ~ 13 min 0.05 mL/min 13 ~ 15 min 2.5 mL/min
カラムスイッチングバルブ:	0min (濃縮側), 3min (分析側), 13min (濃縮側)	
測定波長:	247nm	
試料注入量:	20 μ L	

3 検量線

アセトニトリルを用い, 0, 0.0500~50.0 mg/L の標準溶液を調製した。この標準溶液を一定量採取し等量の精製水で希釈したものを HPLC で測定した。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 0.999 と良好であった。作成した検量線を Figure A-2-1 に示した。

4 検出限界

最小検出ピーク面積を 0.1 count に設定し, これに相当する試験液中の被験物質濃度 0.02 mg/L を検出限界とした。

5 添加回収試験

分析前処理は、「1 試験液の分析方法」に示したように、試験液採取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、回収率の補正は行わなかった。

Figure A-2-1 Calibration curve

No.	Concentration (mg/L)	Peak Area (Count)
1	0	0
2	0.0500	0.5
3	0.100	1.0
4	0.200	1.9
5	0.500	4.7
6	1.00	10.2
7	2.00	20.7
8	5.00	49.0
9	10.0	97.3
10	20.0	194.5
11	50.0	443.2

$$Y = 9.02X$$

$$r = 0.999$$

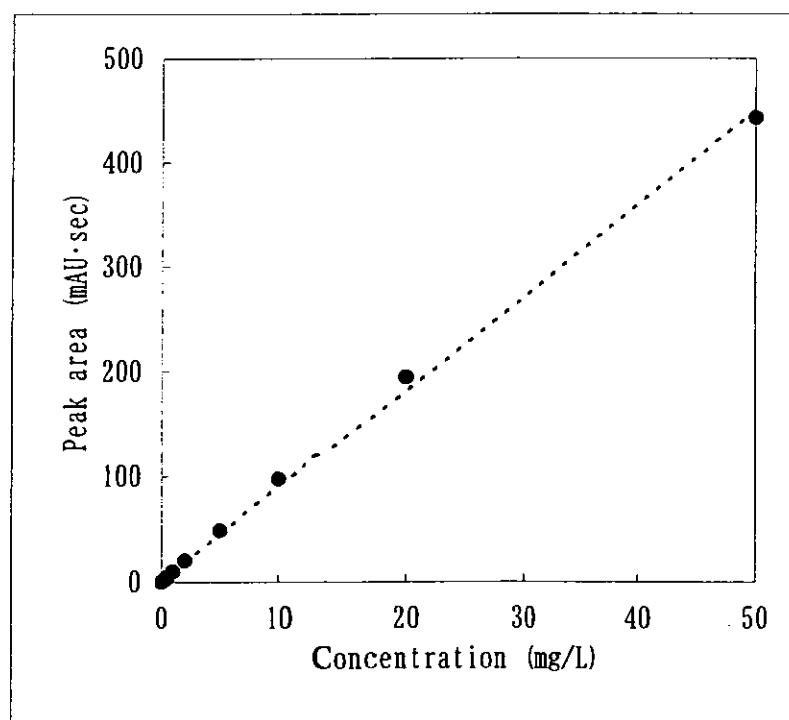
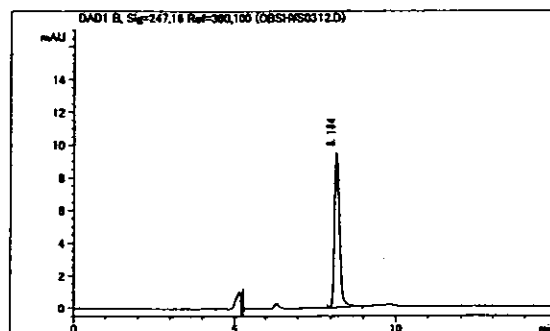


Figure A-2-2 Representative chromatograms

(1) Standard 10.0 mg/L ; 0 Hour

注入日 : 2003/03/12
 試験番号 : AD20358 08SH
 分析メソッド : 08SH.M
 サンプル名 : std10mg/L
 測定バレー : XXXXXXXXXX
 システム : XXXXXXXXXX
 分析機 : XXXXXXXXXX
 分析士 : XXXXXXXXXX
 検出器 : XXXXXXXXXX
 注入量 : 20 μ l

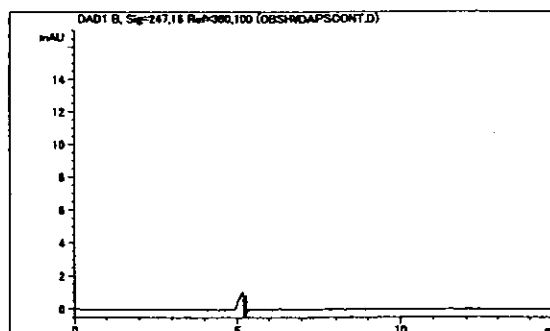


面積パーセントレポート						
ピーク	RT (min)	タイプ	幅 (min)	面積 (mAU*s)	高さ (mAU)	面積 %
1	8.184	SR	0.187	106.9	9.5	100
トータル:				106.9	9.5	

*** End of Report ***

(2) Solvent Control ; 0 Hour

注入日 : 2003/03/12
 試験番号 : AD20358 08SH
 分析メソッド : 08SH.M
 サンプル名 : dap0hrscont
 測定バレー : XXXXXXXXXX
 システム : XXXXXXXXXX
 分析機 : XXXXXXXXXX
 分析士 : XXXXXXXXXX
 検出器 : XXXXXXXXXX
 注入量 : 20 μ l



面積パーセントレポート						
ピーク	RT (min)	タイプ	幅 (min)	面積 (mAU*s)	高さ (mAU)	面積 %
1	8.184	SR	0.187	106.9	9.5	100
トータル:				106.9	9.5	

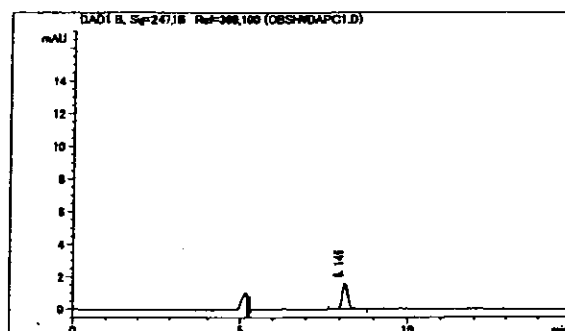
*** End of Report ***

Figure A-2-2 Continued

(3) 2.00 mg/L nominal; 0 Hour

注入日 : 2003/03/12
 試験番号, 名称 : A02035 B OHSII
 分析ロット : OHSII
 サンプル名 : dap04rc0ac1
 測定 パート :

シンシリン : 3
 N° (7# No. : 103
 注入 No. :
 注入量 : 20 ul



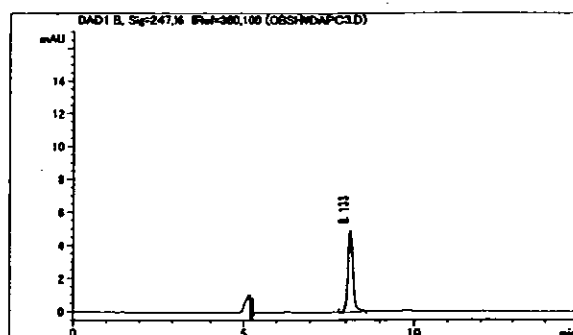
面積パーセントレポート						
ピーク #	RT [min]	タイプ	値 [min]	面積 [mAU*s]	高さ [mAU]	面積 %
1	8.145	MR	8.193	18.5	1.6	100
トータル:				18.5	1.6	

*** End of Report ***

(4) 6.40 mg/L nominal; 0 Hour

注入日 : 2003/03/12
 試験番号, 名称 : A02035 B OHSII
 分析ロット : OHSII
 サンプル名 : dap04rc0ac1
 測定 パート :

シンシリン : 5
 N° (7# No. : 105
 注入 No. :
 注入量 : 20 ul



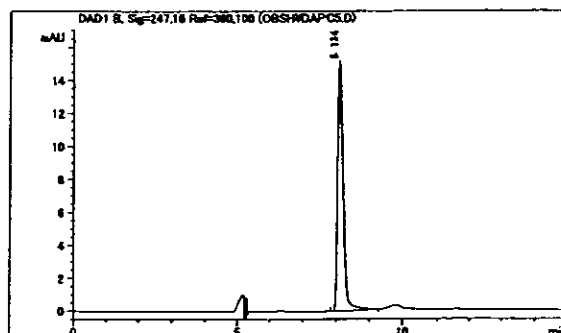
面積パーセントレポート						
ピーク #	RT [min]	タイプ	値 [min]	面積 [mAU*s]	高さ [mAU]	面積 %
1	8.133	MR	8.189	56.5	5.0	100
トータル:				56.5	5.0	

*** End of Report ***

Figure A-2-2 Continued

(5) 20.0 mg/L nominal ; 0 Hour

注入日 : 2003/03/12 シナジック : 7
 試験番号, 名称 : AD20358 OBSH バイロ No. : 101
 分析ロット : OBSH M 注入 No. : 1
 サンプル名 : dap04rcoms5 注入量 : 20 ul
 測定バレー :

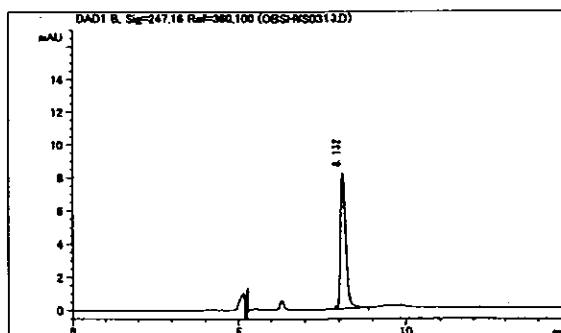


面積パーセントレポート						
ピーク #	RT (min)	タイプ	幅 (min)	面積 (mAU*s)	高さ (mAU)	面積 %
1	8.134	MM	0.189	173.1	15.2	100
トータル:				173.1	15.2	

*** End of Report ***

(6) Standard 10.0 mg/L ; 24 Hours

注入日 : 2003/03/13 シナジック : 1
 試験番号, 名称 : AD20358 OBSH バイロ No. : 101
 分析ロット : OBSH M 注入 No. : 1
 サンプル名 : 10.0mg/L 注入量 : 20 ul
 測定バレー :



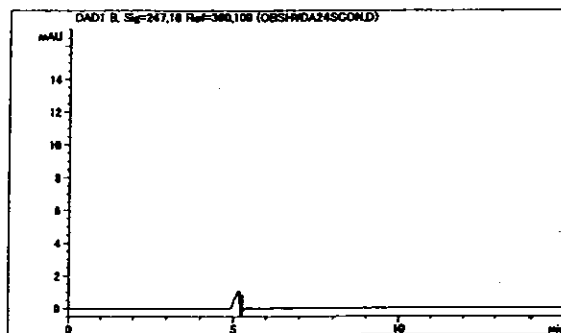
面積パーセントレポート						
ピーク #	RT (min)	タイプ	幅 (min)	面積 (mAU*s)	高さ (mAU)	面積 %
1	8.132	MM	0.182	89.4	8.2	100
トータル:				89.4	8.2	

*** End of Report ***

Figure A-2-2 Continued

(7) Solvent Control ; 24 Hours

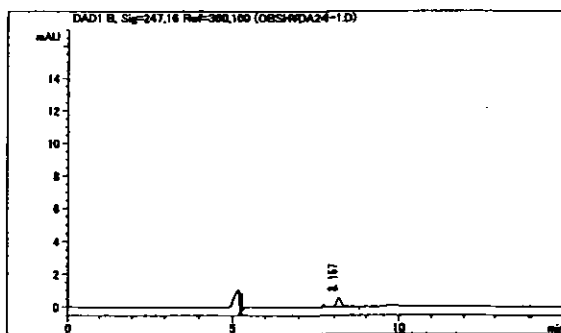
注入日 : 2002/03/13
 試験番号, 名称 : A020358 OCSH
 分析ロット : OCSH M
 サンプル名 : dapoldcont
 測定 パレーン : XXXXXXXXXX
 システム : システム
 パイプ No. : 104
 注入量 : 20 ul



面積パーセントレポート						
ピーク #	RT (min)	タイプ	時間 (min)	面積 (mAU*s)	高さ (mAU)	面積 %
トータル:						
*** End of Report ***						

(8) 2.00 mg/L nominal ; 24 Hours

注入日 : 2002/03/13
 試験番号, 名称 : A020358 OCSH
 分析ロット : OCSH M
 サンプル名 : dapoldconc1
 測定 パレーン : XXXXXXXXXX
 システム : システム
 パイプ No. : 104
 注入量 : 20 ul

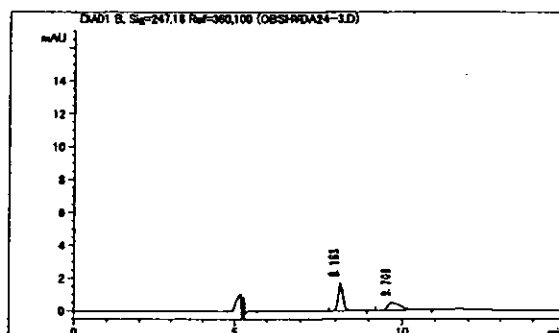


面積パーセントレポート						
ピーク #	RT (min)	タイプ	時間 (min)	面積 (mAU*s)	高さ (mAU)	面積 %
1	5.157	MM	0.204	7.0	0.6	100
トータル:				7.0	0.6	
*** End of Report ***						

Figure A-2-2 Continued

(9) 6.40 mg/L nominal ; 24 Hours

注入日 : 2001/03/13 シーケンス : 7
 試験番号, 名称 : A028358 OBSM R 178 No. : 106
 分析カット : OBSM R 注入 No. : 1
 サンプル名 : dapoldconc3 注入量 : 20 µl
 測定ハレタ :

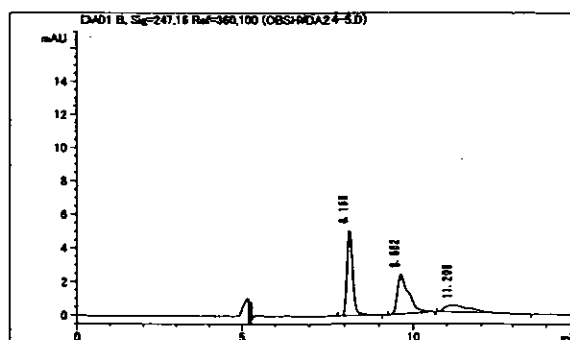


面積パーセントレポート						
ピーク #	RT (min)	タイプ	幅 (min)	面積 (mAU*s)	高さ (mAU)	面積 %
1	8.163	BB	0.254	15.4	1.7	58
2	9.709	BB	0.412	13.7	0.5	41
トータル:				33.1	2.2	

*** End of Report ***

(10) 20.0 mg/L nominal ; 24 Hours

注入日 : 2001/03/13 シーケンス : 9
 試験番号, 名称 : A028358 OBSM R 178 No. : 108
 分析カット : OBSM R 注入 No. : 1
 サンプル名 : dapoldconc5 注入量 : 20 µl
 測定ハレタ :



面積パーセントレポート						
ピーク #	RT (min)	タイプ	幅 (min)	面積 (mAU*s)	高さ (mAU)	面積 %
1	8.155	MM	0.190	58.1	5.1	42
2	9.652	MM	0.385	55.2	2.4	40
3	11.208	MM	0.913	23.0	0.4	16
トータル:				136.3	7.9	

*** End of Report ***

付属資料－ 3

結果の算出

Table A-3 Calculation of the EiC50 (Representative, 48hr.)

TOXDAT MULTI-METHOD PROGRAM (BINOMIAL, MOVING AVERAGE AND PROBIT METHODS)					
ミジンコ急性遊泳阻害試験					
Time: 48hr					
Conc. No	CONC. mg/L	NUMBER EXPOSED	NUMBER DEAD	PERCENT DEAD	BINOMIAL PROB. (%)
Control	0	20	0	0	---
Sol. cont.	0	20	0	0	---
Conc. 1	1.16	20	1	5	0.002002716
Conc. 2	1.91	20	3	15	0.1288414
Conc. 3	3.39	20	12	60	25.17223358
Conc. 4	5.89	20	19	95	0.002002716
Conc. 5	10.3	20	20	100	9.53674E-05

THE BINOMIAL TEST SHOWS THAT 1.91 AND 5.89 CAN BE
USED AS STATISTICALLY SOUND CONSERVATIVE 95 PERCENT
CONFIDENCE LIMITS SINCE THE ACTUAL CONFIDENCE LEVEL
ASSOCIATED WITH THESE LIMITS IS 99.8691558837891 PERCENT.
AN APPROXIMATE EC50 FOR THIS SET OF DATA IS 3.00903391629564

=====RESULTS CALCULATED USING THE MOVING AVERAGE METHOD

SPAN	G	EC50	95 PERCENT CONFIDENCE LIMITS
4	0.065255442	2.91891226	2.376091014 AND 3.512399008

=====RESULTS CALCULATED USING THE PROBIT METHOD

ITERATIONS	G	H	GOODNESS OF FIT PROBABILITY
5	0.105595876	1	0.824581544

SLOPE = 4.915808578

95 PERCENT CONFIDENCE LIMITS= 3.318391065 AND 6.513226091

EC50 = 2.911122765

95 PERCENT CONFIDENCE LIMITS= 2.44242543 AND 3.472405428

EC1 = 0.978886836

95 PERCENT CONFIDENCE LIMITS= 0.558859011 AND 1.326564987