

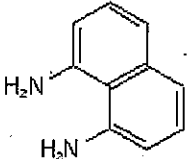
既存化学物質の生態影響に関する情報

平成19年12月21日 化審法3省合同会議

官報公示 整理番号	CAS No.	物質名称	頁
4-324	479-27-6	1, 8-ジアミノナフタリン	1
2-365	544-01-4	イソアミルエーテル	23
5-1917	2465-27-2	ベイシック エロー-2	55
3-608 9-1199	25013-16- 5	t-ブチル-p-ヒドロキシアニソール	68
3-4511	85068-29- 7	3, 5-ビス(トリフルオロメチル)ベンジルアミン	86
3-78	118-69-4	2, 6-ジクロロトルエン	99
3-540	1879-09-0	6-tert-ブチル-2, 4-キシレノール	119
2-1687	556-61-6	イソチオシアン酸メチル	139
3-502	4286-23-1	4-(1-メチルエテニル)フェノール	149

藻類生長阻害試験結果報告書

1. 一般的事項

新規化学物質等の名称 (IUPAC 命名法による)	1,8-ジアミノナフタレン		
別名 (略称)	B18		
CAS 番号	479-27-6		
構造式又は示性式 (いずれも不明な場合は、その製法の概要)	 <chem>C10H10N2</chem>		
分子量	158.20		
試験に供した新規化学物質の純度(%)	99.0%		
試験に供した新規化学物質のロット番号	08826KS		
不純物の名称 及び含有率(%)	不明物 ; 1.0%		
蒸気圧	—		
対水溶解度	—		
1-オクタノール/水分配係数	—		
融点	63°C		
沸点	205°C		
常温における性状	紫色結晶性固体		
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
	メタノール	0.1 g/mL	—

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	高速液体クロマトグラフィー
前処理法	<p>実験開始時の分析試料は試験液調製時の予備の1本から試験液を分取して分析試料とし、被験物質濃度を測定した。実験開始24及び48時間の分析試料は、被験物質濃度分析試料から分取した試験液、また実験終了時は対照区の6連及び各試験濃度区の3連の試験液から均等に分取した試験液を分析試料として前処理を行った。</p> <p>各試験液(分析試料)を遠心分離(3000 rpm, 5分間)後、各分析試料20 mLをあらかじめアセトニトリル約5 mL及び純水約5 mLでコンディショニングしたエムポアディスクカートリッジ C18HD(10 mm/6 mL)に吸引添加した。アセトニトリル0.9 mLで溶出し、アセトニトリルで1 mLに定容した。これを500 µL分取し、純水500 µLを加えて混和し、HPLC分析試料として20 µLを注入した。</p> <p>ただし、実験開始時の0.80及び1.60 mg/Lの試験液はOECD培地で2及び4倍に希釈し分析試料とした。実験開始24時間以降の試験液は被験物質濃度の低下が予測されたので希釈は行わなかった。</p> <p>フローチャートを以下に示す。</p> <pre> graph TD A[分析試料又は 回収率算出用試料 20 mL] --> B[エムポアディスクカートリッジ C18HD(10 mm/6 mL)] C[コンディショニング ←アセトニトリル 約5 mL ←純水 約5 mL] --> B B --> D[吸引添加(-0.4 100 × kPa)] D --> E[溶出 ←アセトニトリル 0.9 mL] E --> F[定容 ←アセトニトリルで1 mLに定容] F --> G[500 µL分取 ←純水 500 µL] G --> H[混和] H --> I[HPLC 分析試料 20 µL] </pre>

定量条件	・使用分析機器	
	HPLC :	LC-10A システム
	ポンプ :	LC-10AD
	システムコントローラー :	SCL-10A
	オートサンプラー :	SIL-10A
	カラムオープン :	CTO-10AC
	検出器 (UV/VIS) :	SPD-10A
	データ処理装置 :	C-R7A plus
	・測定条件	
	カラム :	Inertsil ODS-3 (4.6 mm I.D. × 150 mm, 5 μm) (GLサイエンス)
	移動相 :	アセトニトリル / 50 mmol/L リン酸二水素カリウム水溶液 = 1 : 1 (v/v)
	流速 :	1.0 mL/min.
	カラム温度 :	25°C
	サンプル設定温度 :	25°C
検出波長(UV) :	230 nm	
試料注入量 :	20 μL	

3. 試験材料及び方法

項目		内容	
試験生物	種 (学名・株名)	学名： <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> 株名：ATCC22662	
	入手先	名称： American Type Culture Collection 所在地： 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852 USA	
	対照物質への感受性 EC50 対照物質名	EbC50(0-72h)：0.50 mg/L 対照物質名：ニクロム酸カリウム	
前培養	前培養の期間	2006年4月21日 - 2006年4月24日	
	培地名	化審法培地	
	環境条件 (水温・光強度)	培養温度：23.0±2.0°C 照明：4440 - 8880 lux で連続照明	
試験条件	試験容器	300 mL ガラス製三角フラスコ-通気性のシリ コン栓	
	培地名	OECD 培地	
	暴露期間	2006年4月24日 - 2006年4月27日	
	試験濃度 (設定値)	0.05, 0.10, 0.20, 0.40, 0.80, 1.60 mg/L (公比：2.0)	
	初期細胞濃度	1×10 ⁴ cells/mL	
	連数	試験濃度区	3 連
		対照区	6 連
	試験溶液量	100 mL	
	助剤	助剤の有無	無し
		種類	—
		濃度	—
		助剤対照区の 連数	—
	培養方式 (振とう培養、 静置培養、連続培養等)	振とう培養 (100 rpm)	
水温又は培養温度	培養温度：23.0±2.0°C		
照明 (光強度・時間等)	4440 - 8880 lux で連続照明		
結果の算出 方法	速度法	EC50：プロビット法 NOEC：ダネット型の検定	
	面積法	EC50：プロビット法 NOEC：ダネット型の検定	

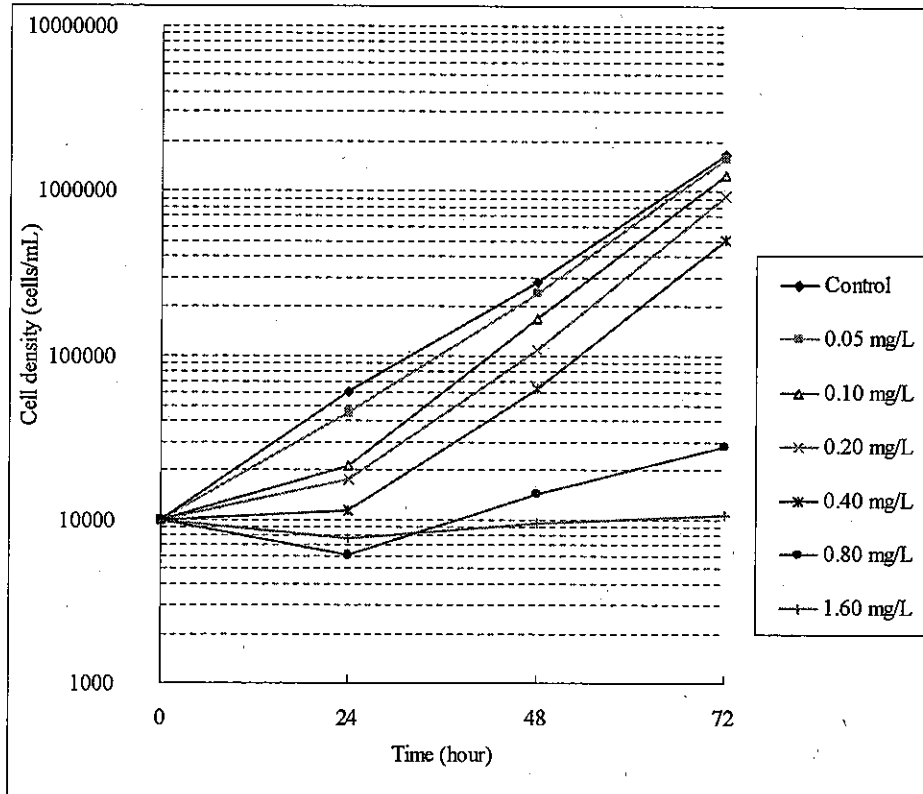
4. 試験結果及び考察

項目	内容
毒性値	<p>0-72hErC50= 0.477 mg/L</p> <p>0-72hEbC50= 0.177 mg/L</p> <p>NOEC(速度法)= 0.10 mg/L</p> <p>NOEC(面積法)= < 0.05 mg/L</p>
試験濃度	①設定値 ・ 2.実測値
考察及び特記事項	<ul style="list-style-type: none"> ・ 試験液中の被験物質濃度 実験開始時、24時間後、48時間後及び実験終了時(72時間後)に試験液中の被験物質濃度を測定した。試験液中の被験物質濃度は実験開始時において各設定値の52.0 - 91.8%、24時間後において各設定値の0.8 - 22.0%、48時間後及び実験終了時においては定量限界以下または検出不可能であった。 本被験物質は光分解をする可能性のある物質であり、24時間後において大半が消失したため、分解生成物質も同時に暴露されていることを考慮に入れて、被験物質の設定値を用いてEC50値及びNOECを算出した。 ・ 生長曲線下の面積の比較 (速度法)による結果 プロビット法を用いて設定値から算出したErC50(0-72h)は0.477 mg/Lであり、その 95%信頼区間は0.441 - 0.515 mg/Lであった。ダネット型の検定による最大無影響濃度[NOErC (0-72h)]は0.10 mg/Lであった。 ・ 生長速度の比較(面積法)による結果 プロビット法を用いて設定値から算出したEbC50(0-72h)は0.177 mg/Lであり、その 95%信頼区間は0.162 - 0.193 mg/Lであった。ダネット型の検定による最大無影響濃度[NOEbC(0-72h)]は<0.05 mg/Lであった。 ・ 温度及び pH 72時間の試験期間中の光照射式回転振盪培養機内の温度は23.0 - 23.1°Cと設定条件の23.0±2.0°Cの範囲内であった。 また、試験液のpHは実験開始時が8.0、実験終了時が7.9 - 8.1であった。被験物質の消失に伴うpHの変化は見られなかった。 ・ 照度 試験期間中の光照射式回転振盪培養機内の照度は、基準値(4440 - 8880 lux)の範囲内であった。また、開始時及び終了時の各照度は平均照度の±15%の範囲内であり、開始時と終了時の

	<p>平均照度の変動も±15%の範囲内であることを確認した。</p> <ul style="list-style-type: none">被験物質濃度と生長阻害への影響 <p>本被験物質は試験条件下(照明)の影響を受けて実験24時間後に著しい減少が見られ、実験48時間後には検出されなかった。試験液のHPLCクロマトグラムには被験物質の減少に伴う新たな数本のピークが検出されており、これらのピークは試験濃度区で特有に検出されることから、被験物質由来の分解生成物が複数生成されたことが示唆された。</p> <p>また、実験期間の0 - 24時間で生長阻害が著しく見られ、24-72時間では生長率の回復が生長曲線から観察された。阻害の著しい時期と被験物質が残留している期間が重なることから、分解生成物が藻類を阻害するよりも被験物質の阻害が高いと考えられた。これより、被験物質は環境中で自然光の影響を受けて、分解生成物となりその残留は低くなることが予測されるため、本試験で得られたEC50値(設定値)は被験物質の藻類への影響を厳しく評価していると考えられた。</p>
--	--

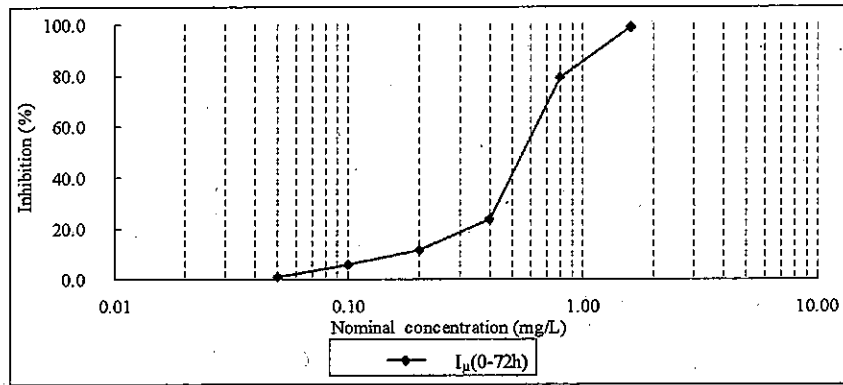
5. 藻類の生長曲線及び濃度-生長阻害率曲線

・生長曲線

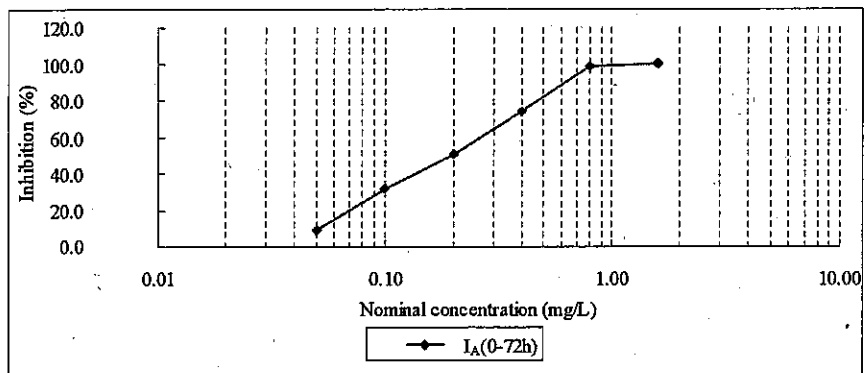


濃度－生長阻害率曲線

・速度法

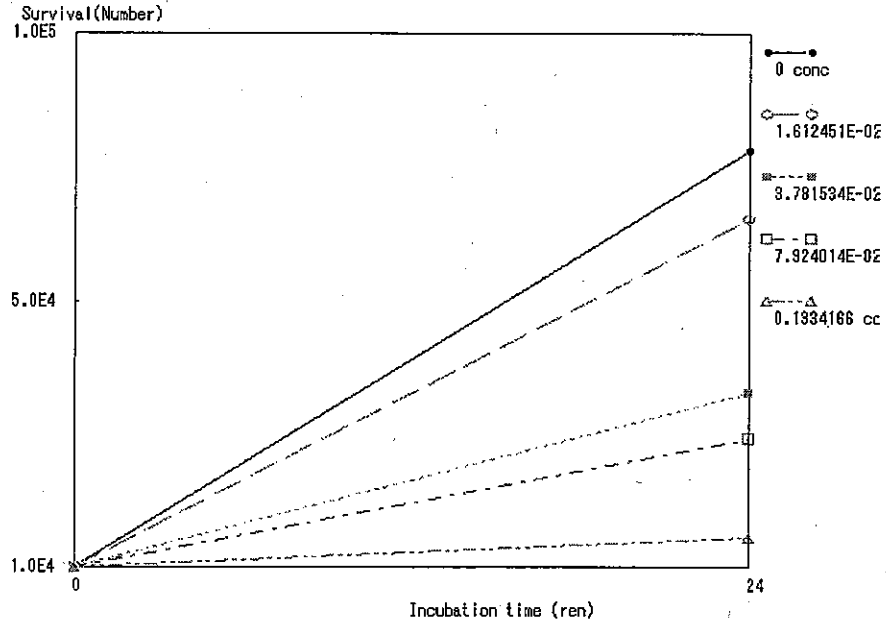


・面積法



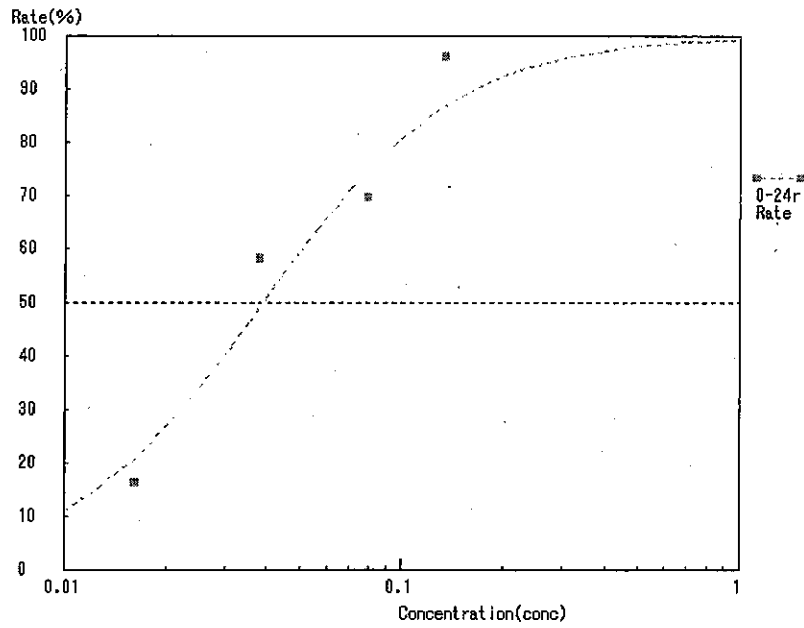
事務局再計算結果

①生長曲線



Time course pattern of Algae Growth Test
新-479276

②阻害率曲線



Dose-response curve for EC50 of Algae Growth Test (Logit method)
新-479276

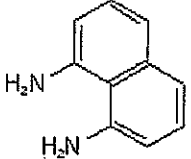
③毒性値

24hErC50 (実測値に基づく) =0.039 mg/L

24hNOECr (実測値に基づく) =0.016 mg/L

ミジンコ急性遊泳阻害試験結果報告書

1. 一般的事項

新規化学物質等の名称 (IUPAC 命名法による)	1,8-ジアミノナフタレン		
別名 (略称)	B18		
CAS 番号	479-27-6		
構造式又は示性式 (いずれも不明な場合は、その製法の概要)	 <chem>C10H10N2</chem>		
分子量	158.20		
試験に供した新規化学物質の純度(%)	99.0%		
試験に供した新規化学物質のロット番号	08826KS		
不純物の名称 及び含有率	不明物 ; 1.0%		
蒸気圧	—		
対水溶解度	—		
1-オクタノール/水分配係数	—		
融点	63°C		
沸点	205°C		
常温における性状	紫色結晶性固体		
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
	メタノール	0.1 g/mL	—

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	高速液体クロマトグラフィー
前処理法	<p>調製した試験液を実験開始時の測定試料とした。また、実験終了時に各濃度区の4連の試験液から均等に分取したもの(各3 mL)を測定試料とした。</p> <p>各分析試料10 mLをあらかじめアセトニトリル約5 mL及び純水5 mLでコンディショニングしたエムボアディスクカートリッジC18HD(10 mm/6 mL)に吸引添加した。アセトニトリル0.9 mLで溶出し、アセトニトリルで1 mLに定容した。これを500 μL分取し、純水500 μLを加えて混和し、HPLC分析試料として20 μLを注入した。なお、分析試料の前処理はできるだけ室内光を避けて行った。</p> <p>フローチャートを以下に示す。</p> <pre> 分析試料又は回収率算出用試料 10 mL コンディショニング ←アセトニトリル 約5 mL ←純水 約5 mL ----- エムボアディスクカートリッジ CH18HD(10 mm/6 mL) 吸引添加 (-0.4 100 × kPa) 溶出 ←アセトニトリル 0.9 mL 定容 ←アセトニトリルで1 mLに定容 500 μL分取 ←純水 500 μL 混和 HPLC分析試料 20 μL </pre>

定量条件	・使用分析機器
	HPLC : LC-10A システム
	ポンプ : LC-10AD
	システムコントローラー : SCL-10A
	オートサンプラー : SIL-10A
	カラムオープン : CTO-10AC
	検出器 (UV/VIS) : SPD-10A
	データ処理装置 : C-R7A plus
	・測定条件
	カラム : Inertsil ODS-3 (4.6 mm I.D. × 150 mm, 5 μm) (GLサイエンス)
	移動相 : アセトニトリル / 50 mmol/L リン酸二水素カリウム水溶液 = 1 : 1 (v/v)
	流速 : 1.0 mL/min.
	カラム温度 : 25°C
	サンプル設定温度 : 25°C
検出波長(UV) : 230 nm	
試料注入量 : 20 μL	

3. 試験材料及び方法

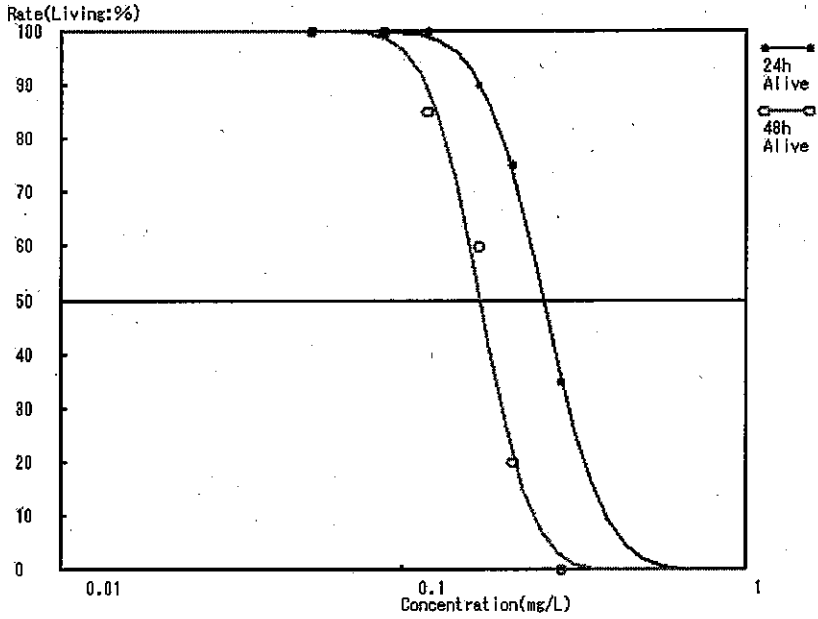
項目		内容	
試験生物	種 (学名・系統、時間齢)	学名： オオミジンコ (<i>Daphnia magna</i>) 系統： — 時間齢： 24 時間以内	
	入手先	名称： (旧)国立環境研究所 所在地： 茨城県つくば市小野川 16-2	
	対照物質への感受性 (EC ₅₀) (対照物質名)	48 時間 EC ₅₀ : 0.28 mg/L 対照物質名： ニクロム酸カリウム	
飼育	飼育水の種類	脱塩素水道水	
	環境条件 (水温、明暗周期)	水温： 20.0 ± 1.0°C 明暗周期： 16 時間明 / 8 時間暗 (室内光)	
試験条件	試験容器	200 mL 容ガラスビーカー	
	試験用水	種類 (天然水、脱塩素水道水、人工調製水等)	脱塩素水道水
		硬度	10 - 250 mg/L
		pH	6.0 - 9.0
	暴露期間	2006 年 4 月 24 日 - 2006 年 4 月 26 日	
	試験濃度 (設定値)	0.08, 0.11, 0.14, 0.18, 0.23, 0.30 mg/L (公比 : 1.3)	
	供試数	5 頭/試験容器	
	連数	試験濃度区	4 連
		対照区	4 連
	試験溶液量	100 mL	
	助剤	助剤の有無	無し
		種類	—
		濃度	—
		助剤対照区の連数	—
	試験方式 (止水、半止水、流水等)	止水式	
	換水又は流水条件	—	
	水温	20.0 ± 1.0°C	
溶存酸素濃度 (DO)	3.0 mg/L 以上		
明暗周期	24 時間暗		
結果の算出方法	EC ₅₀	Probit 法	

4. 試験結果及び考察

項目	内容
毒性値	48 時間 EC ₅₀ 値： 0.167 mg/L 95%信頼限界： 0.151 - 0.185 mg/L 最大無作用濃度： 0.088 mg/L 100%阻害最低濃度： 0.290 mg/L
試験濃度	1.設定値 ・ 2.実測値
考察及び特記事項	<ul style="list-style-type: none"> ・ 試験液中の被験物質濃度 実験開始時及び実験終了時に試験液中の被験物質濃度を測定した。実験開始時の試験液中の被験物質濃度は各設定濃度の 92.5 - 105.3%、実験終了時は各設定濃度の 50.0 - 89.0%であった。 半数遊泳阻害濃度(EC50)は、実験開始時及び終了時の測定濃度の幾何平均値を用いて算出した。以下、試験水濃度は算出した測定濃度で示す。 ・ 半数遊泳阻害濃度(EC50) 対照区における 24 及び 48 時間での遊泳阻害率は 0%となり、試験条件(10%以下)を満たしていた。 実験開始 24 時間の遊泳阻害率は 0.054, 0.088 及び 0.118 mg/L 濃度区で 0%となり、0.166, 0.209 及び 0.290 mg/L 濃度区では 10, 25 及び 65%であった。実験終了時の遊泳阻害率は 0.054 及び 0.088 mg/L 濃度区で 0%となり、0.118, 0.166, 0.209 及び 0.290 mg/L 濃度区で 15, 40, 80 及び 100%となった。 これらの結果から Probit 法で半数遊泳阻害濃度(EC50)を算出すると、24 及び 48 時間 EC50 値は 0.257 及び 0.167 mg/L となった。 ・ 最大無作用濃度(NOEC)及び 100%阻害最低濃度 24 及び 48 時間における最大無作用濃度は 0.118 及び 0.088 mg/L であった。 また、24 及び 48 時間 100%阻害最低濃度は >0.290 及び 0.290 mg/L であった。 ・ 試験液の水温、pH、溶存酸素濃度 実験期間中の試験液の水温は 20.5℃で、基準の 20.0±1.0℃の範囲内であった。 実験期間中の試験液の pH は対照区及び各濃度区で 7.5 - 7.7 で、被験物質による影響は見られなかった。

実験期間中の試験液の溶存酸素濃度は、実験開始時(供試ミジンコのいない状態)及び実験終了時(供試ミジンコを48時間暴露した試験液)で8.8 mg/Lであった。実験期間を通じて最低溶存酸素濃度は8.8 mg/Lで、基準の3 mg/L以上であった。

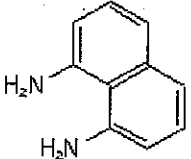
5. ミジンコの濃度-遊泳阻害率曲線



“Number of immobility (%)” indicated as “Rate”.
 “Measured concentration” indicated as “Concentration (mg/L)”.

魚類急性毒性試験結果報告書

1. 一般的事項

新規化学物質等の名称 (IUPAC 命名法による)	1,8-ジアミノナフタレン		
別名 (略称)	B18		
CAS 番号	479-27-6		
構造式又は示性式 (いずれも不明な場合は、その製法の概要)	 <chem>C10H10N2</chem>		
分子量	158.20		
試験に供した新規化学物質の純度(%)	99.0%		
試験に供した新規化学物質のロット番号	08826KS		
不純物の名称 及び含有率	不明物 ; 1.0%		
蒸気圧	-		
対水溶解度	-		
1-オクタノール/水分配係数	-		
融点	63°C		
沸点	205°C		
常温における性状	紫色結晶性固体		
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
	メタノール	0.1 g/mL	-

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	高速液体クロマトグラフィー
前処理法	<p>実験開始時、48 時間後及び実験終了時に各濃度区の試験水(約 2 mL)から分取し、測定試料とした。但し、9.0 mg/L 濃度区においては実験開始 72 時間後に供試魚が 100%死亡したため、その時点で試験水中の被験物質濃度測定を行い、実験終了時の測定を行わなかった。</p> <p>測定試料 300 μL にアセトニトリル 300 μL を加えて混合して HPLC 分析試料とした。なお、分析試料の前処理はできるだけ室内光を避けて行った。以下にフローチャートに前処理を示す。</p> <pre style="text-align: center;"> 測定試料(試験水) 300 μL ←アセトニトリル 300 μL 混合 HPLC 分析試料 10 μL </pre>
定量条件	<ul style="list-style-type: none"> ・使用分析機器 HPLC : LC-10A システム ポンプ : LC-10AD システムコントローラー : SCL-10A オートサンプラー : SIL-10A カラムオープン : CTO-10AC 検出器 (UV/VIS) : SPD-10A データ処理装置 : C-R7A plus ・測定条件 カラム : Inertsil ODS-3 (4.6 mm I.D. \times 150 mm, 5 μm) (GLサイエンス) 移動相 : アセトニトリル / 50 mmol/L リン酸二水素カリウム水溶液 = 1 : 1 (v/v) 流速 : 1.0 mL/min. カラム温度 : 25$^{\circ}$C サンプル設定温度 : 25$^{\circ}$C 検出波長(UV) : 230 nm 試料注入量 : 10 μL

3. 試験材料及び方法

項目		内容	
試験生物	種 (和名、学名、系統)	和名：ヒメダカ 学名： <i>Oryzias latipes</i> 系統：不明	
	入手先	名称： やまと錦魚園 所在地：〒639-1021 奈良県大和郡山市 新木町 107	
	大きさ (全長、体重)・月齢	全長：2.8 ± 0.1 cm (n=7) 体重：0.18 ± 0.03 g (n=7) 月齢：不明 (当歳魚)	
	対照物質への感受性 (LC50) (対照物質名)	96hLC50：0.37 mg/L 対照物質名：ベンザクロロフェノールトリム塩	
じゅん化	じゅん化期間	5 - 7 日以上	
	飼育水の種類	脱塩素水道水	
	じゅん化前の薬浴の有無	無	
	じゅん化方式 (止水、半止水、流水等)	半止水	
	環境条件 (水温、明暗周期)	水温：24 ± 2°C 明暗周期：16 時間明、8 時間暗 (室内光)	
	飼料 (種類・量・頻度等)	種類：メダカの飼料 (キョーリン) 量：魚体重の 1 - 2% 頻度等：2 回/日	
試験条件	試験容器	3 L 容ガラスビーカー	
	試験用水	種類 (天然水、脱塩素水道水、人工調製水等)	脱塩素水道水
		硬度	250 mg/L 以下
		pH	6.0 - 9.0
	暴露期間	2006 年 4 月 11 日 - 2006 年 4 月 15 日	
	試験濃度 (設定値)	2.4, 3.2, 4.1, 5.3, 6.9, 9.0 mg/L (公比: 1.3)	
	供試数	7 尾/試験容器	
	試験溶液量	3 L	
	助剤	助剤の有無	無し
		種類	—
濃度		—	

	試験方式（止水、半止水、流水等）	半止水
	換水又は流水条件	48時間換水
	水温	24 ± 2°C
	溶存酸素濃度（DO）	飽和酸素濃度の60%（5.0 mg/L）以上
	明暗周期	24時間暗
結果の算出方法	LC50	片対数グラフ

4. 試験結果及び考察

項目	内容
毒性値	96hLC50 : 5.6 mg/L
試験濃度	1.設定値 ・ 2.実測値
考察及び特記事項	<ul style="list-style-type: none"> ・ 試験水中の被験物質濃度 実験開始時及び換水後の試験水濃度は設定濃度の93.7 - 97.8%であった。換水前及び実験終了時の試験水濃度は設定濃度の86.6 - 91.6%であった。 また、半数致死濃度(LC50値)の算出には実験開始時、実験開始48時間及び実験終了時の測定濃度の幾何平均値を用いて算出した。但し、実験開始72時間で9.0 mg/L濃度区は死亡率が100%となったため、実験開始時、実験開始48時間及び実験開始72時間の測定濃度の幾何平均値を用いてLC50値を算出した。以下、試験水濃度は算出した測定濃度で示す。 ・ 累積死亡率(%) 実験開始96時間後の累積死亡率は対照区、2.2.及び3.0 mg/L濃度区で0%であった。 また、3.8, 4.9, 6.4及び8.5 mg/L濃度区の累積死亡率は14, 14, 86及び100%であった。 ・ 供試魚の異常な症状及び反応 対照区、2.2.及び3.0 mg/L濃度区においては、毒性の徴候や異常及び特異的症例は全く観察されなかった。 3.8, 4.9及び6.4 mg/L濃度区において実験開始48時間後まで毒性症状は観察されなかった。8.5 mg/L濃度区では実験開始6時間後に遊泳緩慢の毒性症状が観察された。観察結果より、実験開始96時間のNOECは3.0 mg/Lとなった。 実験開始96時間後の100%死亡最低濃度は8.5 mg/Lであると判

断した。また、実験開始 96 時間後の 0% 死亡最高濃度は 3.0 mg/L であった。

- ・ 試験水の水温、pH、溶存酸素濃度

実験期間中における試験水の水温は 23.8 - 24.3°C となり、基準の $24 \pm 2^\circ\text{C}$ の範囲内であった。

実験期間中における対照区の pH は 7.5 - 7.7 で、濃度区の pH は 7.4 - 7.8 となり、被験物質による pH の影響は見られなかった。溶存酸素濃度は対照区及びすべての濃度区について、実験開始時で 8.2 mg/L、24 時間後から実験終了時まで 7.1 - 8.2 mg/L であった。実験期間を通じて最低溶存酸素濃度は 7.1 mg/L で、飽和溶存酸素濃度の 60% 以上であった。

- ・ 供試魚の全長及び体重

実験開始時における供試魚 (n=7) の全長は平均値で 2.8 ± 0.1 cm であった。

また、魚体重の平均値 (n=7) は 0.18 ± 0.03 g であったことから、試験水量 (3 L) に対して魚体重が 0.42 g/L となり、基準 (試験水 1 L あたりの魚体重が 1.0 g 以下) の範囲内であった。

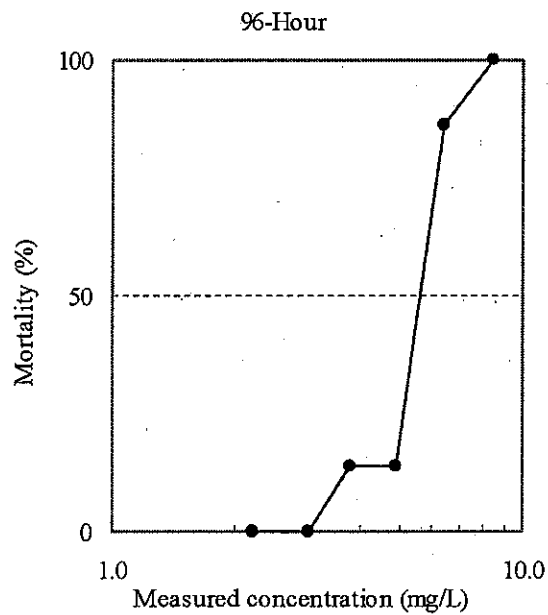
- ・ 試験成績の信頼性に影響を及ぼしたと思われる環境要因

本試験計画書では被験物質の純度を 98.5% として記載していたが、「1,8-ジアミノナフタレンのオオミジンコ (*Daphnia magna*) に対するミジンコ急性遊泳阻害試験 (試験番号: JCL058088)」の試験計画書作成時 (2006/4/18) に記載されていた純度に誤りがあり、純度は 99.0% が正しいことを確認した。その誤りの確認は本試験の実験終了した後であったため、既に試験水中の被験物質濃度の分析は終了していた。

試験水濃度の分析に使用した 100 mg/L 標準原液は誤った純度 (98.5%) で換算されていたため、調製された標準溶液濃度は実質の濃度よりも 2% 低い数値で記載されていた。また、標準原液より調製された標準溶液についても同様に実質の濃度よりも 2% 低い数値で記載されていた。純度 99.0% を 100.0% とみなして算出すると、訂正に該当する箇所は 100.0 mg/L 標準原液及び 10.0, 5.0, 2.5 mg/L 標準溶液となり、102.0 mg/L 標準原液及び 10.2, 5.1, 2.6 mg/L 標準溶液に訂正した。誤った表記を訂正し、既に得られていたデータ (ピーク面積値) から検量線を再作成して試験水濃度の再計算を行った。これらの訂正及び再計算により試験水濃度は正しく再計算され、その測定結果を用いて求められた

	<p>LC50値は信頼される結果となった。</p> <p>なお、試験水濃度は測定された測定結果からLC50値を算出することにしていたため、試験水は純度換算を行わずに100 mg/L 添加原液を調製しており、表示値の訂正は不要であった。</p> <p>これより、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はなくなったと判断した。</p>
--	---

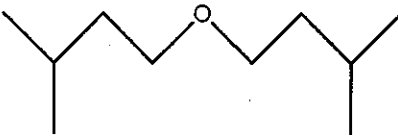
5. 魚類の濃度-死亡率曲線



Dose-response curve for LC50 (Measured concentration)

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	イソアミルエーテル		
別名	(略称: DIPE)		
CAS番号	544-01-4		
構造式又は示性式 (いずれも不明の場合は, その製法の概要)			
分子量	158.28		
試験に供した物質の純度 (%)	98.9%		
試験に供した物質のロット番号	EWL3191		
不純物の名称及び含有率	-		
蒸気圧	133Pa/18.6°C		
対水溶解度	不溶		
1-オクタノール/水分配係数	-		
融点	-75°C		
沸点	173°C		
常温における性状	無色~微黄色液体		
安定性	安定		
溶媒に対する溶解度等	溶媒	溶解度	溶媒中の安定性
	エノール	混和	-

上記内容は供給者提供資料による。

1.2 供試試料

供給者: 和光純薬工業株式会社

1.3 特記事項

特に無し。

2. 試験液中の被験物質の分析法 (概要)

2.1 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.1
ガスクロマトグラフ (GC) : Agilent Technologies 6890 型
ヘッドスペースサンブラ (HSS) : Agilent Technologies 7694 型
質量選択検出器 (MSD) : Agilent Technologies 5973N 型
データ処理部 : ケミステーション

(条件)

[GC条件]

カラム : J&W DB-5MS 60m×0.25mm×1.0μm
キャリアーガス : ヘリウム 1.0mL/min (Constant flow)
オープン温度 : 50°C (1min) → 20°C/min → 210°C (2.5 min)
注入口温度 : 230°C
MSインターフェース温度 : 200°C
注入条件 : スプリット (スプリット比 100:1)
注入量 : 3.0mL (HSSサンブラループ容量)

[HSS条件]

温度条件 : Oven 60°C, LOOP 120°C, Transfer Line 200°C
イベント時間 : GC Cycle Time 20分
Vial Equilibration Time 20分
Pressurization Time 0.2分
Loop Fill Time 0.03分
Loop Equilibration Time 0.2分
Inject Time 0.2分
バイアルパラメータ : Shake 2 (HIGH)

[MSD条件]

温度条件 : イオン源 = 230°C, 四重極マス・フィルタ = 150°C
SIM (Selected Ion Monitoring) 条件 :
Solvent Delay 10 min
Filament off 11 min
Quant ion m/z 71.0, 115.0 の TIC

2.2 検量線

アセトンを用い 0, 0.5~200 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、いずれも1.00と良好であった。

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

* 測定値は標準溶液濃度の1/100の値となる。

2.3 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、藻類生長阻害試験では 0.0001 mg/L, 魚類急性毒性試験では 0.00006 mg/L を検出限界とした。ミジンコ急性遊泳阻害試験では 0.002 mg/Lを検出限界とした。

2.4 試験液の分析方法

試験液を以下のように分析した。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。

1) 藻類生長阻害試験 (暴露開始時の濃度区)

精製水 10 mL
+
分析試料 (予めアセトンで適宜希釈*) 0.1 mL
|
混合
|
GC/MS測定

*1 検量線範囲を超えるものについて適宜希釈した。

- 2) 藻類生長阻害試験（暴露開始時の濃度区以外），ミジンコ急性遊泳阻害試験，
魚類急性毒性試験

精製水

+

アセトン 0.1 mL

+

分析試料* 10 mL（精製水との合計）

|

混合

|

GC/MS測定

* 精製水と分析試料の比率を変えることにより被験物質濃度を検量線範囲に入れた。
対照区は希釈無しのため，分析試料 10mL（精製水 = 0 mL）とした。

2.5 添加回収試験

分析前処理は，試験液と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，回収率の補正は行わなかった。

3. 藻類生長阻害試験

試験方法および結果の要約

供試生物	分類 : 単細胞緑藻類 学名 : <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> 入手先 : American Type Culture Collection (ATCC22662株) 感受性 : 重クロム酸カリウムの72時間50%生長阻害濃度 (EbC50) 平均値 ± 標準偏差 = 0.428 ± 0.0683 mg/L, n=18
試験方法	「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, 環企発第031121002号, 最終改正:平成17年4月1日)
試験条件	培養方式: 止水式(密閉系), 振とう培養(100rpm) 試験容器: 500mL容ガラス製共栓付き三角フラスコ ヘッドスペース容量: 当社測定値 490 mL 連数: 6容器/対照区および助剤対照区, 3容器/濃度区 培地: 化審法テストガイドライン推奨培地 試験液量: 100mL/容器 暴露期間: 72時間 生物数: 5×10^3 cells/mL (初期細胞濃度) 照明: $65 \mu E/m^2/s$ (装置中央フラスコ液面付近) で連続照明 装置内変動: ±8%以内 温度: $23 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ 測定値: $22.8 \sim 23.5 \text{ }^\circ\text{C}$ pH: 試験液のpH調整なし 測定値: 8.3~10.2 (72時間後)
助剤の種類と濃度	種類: テトラヒドロフラン 濃度: $65 \mu\text{L/L}$
試験濃度	対照区, 助剤対照区, 5.00, 7.10, 10.0, 14.1, 20.0* mg/L (公比: 1.4) * 試験液調製可能最高濃度
結果および考察	mg/L (95%信頼区間)
速度法	半数生長阻害濃度 ErC50(0-72h): >4.36 (算出不可) 最大無影響濃度 NOECr(0-72h): 1.15
面積法	半数生長阻害濃度 EbC50(0-72h): >4.36 (算出不可) 最大無影響濃度 NOECb(0-72h): 1.15
収量法	半数生長阻害濃度 ECy50(0-72h): >4.36 (算出不可) 最大無影響濃度 NOECy(0-72h): 1.15
統計的手法	半数生長阻害濃度: 直線回帰分析 有意差検定: Williamsの多重比較検定
特記事項	被験物質の培地に対する溶解度 20 mg/L (当社測定値) 測定値の設定値に対する割合は, 暴露開始時の試験液において 67~82%, 暴露終了時の試験培養液において 9~11%であった。暴露開始時における濃度減少は高濃度区側より低濃度区側が大きく, その原因として試験操作時の水中からの揮散が考えられた。この濃度減少は本被験物質の性質上避けられないと判断した。また, 暴露期間中の濃度減少は水中からの揮散が考えられた。阻害濃度の算出には測定値の平均値(時間加重平均)を用いた。

Table 1 Measured Concentration of the Test Substance in Test Cultures

Nominal Concentration (mg/L)	Measured Concentration (mg/L) (Percent of Nominal)				Mean ^a Measured Concentration (Percent of Nominal) (mg/L)
	0 Hour	24 Hour	48 Hours	72 Hours	
Control	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	----
Solvent Control	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	----
5.00	3.37 (67)	0.364 (7)	0.554 (11)	0.450 (9)	0.767 (15)
7.10	4.74 (67)	0.576 (8)	0.873 (12)	0.636 (9)	1.15 (16)
10.0	6.79 (68)	0.865 (9)	1.15 (11)	0.864 (9)	1.62 (16)
14.1	10.4 (74)	1.30 (9)	1.65 (12)	1.28 (9)	2.43 (17)
20.0	16.4 (82)	2.68 (13)	3.11 (16)	2.15 (11)	4.36 (22)

a : time weighted mean

Table 2 Cell Densities of *Pseudokirchmeriella subcapitata* during the 72-Hour Exposure

Nominal Concentration [Mean ^a Measured Conc.] (mg/L)	Vessel No.	Cell Densities (cells/mL)			
		0 Hour*	24 Hours	48 Hours	72 Hours
Control	1	5000	29200	228600	753800
	2	5000	28600	216600	700800
	3	5000	27600	202600	624800
	4	5000	24200	188600	693800
	5	5000	32500	234600	713800
	6	5000	28800	194600	593800
	Average	5000	28500	210900	680100
	SD	0	2700	18700	59500
Solvent Control	1	5000	28500	199600	517800
	2	5000	27900	207600	683800
	3	5000	29300	212600	620800
	4	5000	31600	209600	677800
	5	5000	32100	229600	515800
	6	5000	25600	192600	695800
	Average	5000	29200	208600	618600
	SD	0	2400	12600	83000
5.00 [0.767]	1	5000	25700	191600	660800
	2	5000	27100	181600	619800
	3	5000	26600	180600	615800
	Average	5000	26500	184600	632100
7.10 [1.15]	1	5000	22900	174600	638800
	2	5000	24900	179600	604800
	3	5000	30000	203600	601800
	Average	5000	25900	185900	615100
10.0 [1.62]	1	5000	27500	202600	418800
	2	5000	25800	182600	477800
	3	5000	25700	192600	428800
	Average	5000	26300	192600	441800
14.1 [2.43]	1	5000	22000	141600	333800
	2	5000	23400	148600	357800
	3	5000	22200	163600	378800
	Average	5000	22500	151300	356800
20.0 [4.36]	1	5000	12500	106600	326800
	2	5000	21700	112600	332800
	3	5000	22000	109600	300800
	Average	5000	18700	109600	320100
SD	0	5400	3000	17000	

a : time weighted mean

SD : Standard deviation

* : Nominal initial densities

Table 3 Growth Rate of Control

Vessel No.	Growth Rate			Average	SD	CV(%)
	μ (0-24h)	μ (24-48h)	μ (48-72h)			
1	0.0735	0.0857	0.0497	0.0682	0.0177	26.0
2	0.0727	0.0844	0.0489			
3	0.0712	0.0831	0.0469			
4	0.0657	0.0856	0.0543			
5	0.0780	0.0824	0.0464			
6	0.0730	0.0796	0.0465			
Average	0.0724	0.0835	0.0488			
SD	0.0040	0.0023	0.0030			
CV(%)	5.5	2.8	6.1			

SD: Standard deviation

CV: Coefficient of variation

Table 4 Growth Inhibition (%) of *Pseudokirchneriella subcapitata*

Nominal Concentration		Growth Rate		Area under the growth curves		Yield	
[Mean ^a Measured Conc.]		Rate	Inhibition(%) ^{*1}	Area	Inhibition(%) ^{*1}	Yield	Inhibition(%) ^{*1}
(mg/L)	Vessel No.	μ (0-72h)	I_{μ} (0-72h)	A (0-72h)	I_A (0-72h)	Y (0-72h)	I_Y (0-72h)
Control	1	0.0697		14933000		748800	
	2	0.0686		13994000		695800	
	3	0.0671		12722000		619800	
	4	0.0685		13133000		688800	
	5	0.0689		14676000		708800	
	6	0.0663		12187000		588800	
	Average SD	0.0682 0.0012	-	13608000 1102000	-	675100 59500	-
Solvent Control	1	0.0644		11388000		512800	
	2	0.0683		13558000		678800	
	3	0.0670		12955000		615800	
	4	0.0682		13622000		672800	
	5	0.0644		12170000		510800	
	6	0.0686		13286000		690800	
	Average SD	0.0666 0.0020	-	12830000 883000	-	613600 83000	-
5.00 [0.767]	1	0.0678		12845000		655800	
	2	0.0669		12146000		614800	
	3	0.0669		12062000		610800	
	Average SD	0.0672 0.0005	-0.9	12351000 430000	3.7	627100 24900	-2.2
7.10 [1.15]	1	0.0674		12106000		633800	
	2	0.0666		11866000		599800	
	3	0.0665		12528000		596800	
	Average SD	0.0668 0.0005	-0.3	12167000 335000	5.2	610100 20600	0.6
10.0 [1.62]	1	0.0615		10248000		413800	
	2	0.0633		10435000		472800	
	3	0.0618		10085000		423800	
	Average SD	0.0622 0.0010	6.6**	10256000 175000	20.1**	436800 31600	28.8**
14.1 [2.43]	1	0.0583		7632000		328800	
	2	0.0593		8122000		352800	
	3	0.0601		8705000		373800	
	Average SD	0.0592 0.0009	11.1**	8153000 537000	36.5**	351800 22500	42.7**
20.0* [4.36]	1	0.0581		6480000		321800	
	2	0.0583		6917000		327800	
	3	0.0569		6468000		295800	
	Average SD	0.0578 0.0008	13.2**	6622000 256000	48.4**	315100 17000	48.6**

a time weighted mean

*1 Values are the growth inhibition (%) relative to the solvent control.

SD Standard deviation

★ The maximum attainable concentration under the present test conditions and preparation methods.

* Indicates a significant difference ($\alpha=0.05$) from the solvent control. (There was no sign in this test.)** Indicates a significant difference ($\alpha=0.01$) from the solvent control.

Table 5 Calculated EC50 and NOEC

Based on I_{μ} (0-72h) value (Growth rates)

ErC50 (0-72h) (mg/L)	95-Percent Confidence Limits (mg/L)	NOECr (0-72h) (mg/L)
>4.36	--	1.15

Based on I_A (0-72h) value (Areas under growth curve)

EbC50 (0-72h) (mg/L)	95-Percent Confidence Limits (mg/L)	NOECb (0-72h) (mg/L)
>4.36	--	1.15

Based on I_y (0-72h) value (Yield)

EyC50 (0-72h) (mg/L)	95-Percent Confidence Limits (mg/L)	NOECy (0-72h) (mg/L)
>4.36	--	1.15

The EC50 values and associated 95% confidence limits could not be determined by least squares linear regression analysis because the growth inhibition (%) at the maximum concentration level was less than 50%.

-- not calculated

The NOEC values were determined by an analysis of variance (ANOVA), Williams test, subsequent to Bartlett test for homogeneity of variances. Statistical analyses were performed using Yukms Statlight #4 software (Yukms Corp., Tokyo) and all tests of significance were at $\alpha=0.05$, except Bartlett test, which was at $\alpha=0.01$.

Table 6 Temperature, Light Intensity and Revolutions in the Incubation Chamber

Exposure Period (Hours)	Temperature (°C)	Light Intensity ($\mu E/m^2/s$)	Revolutions (rpm)
0	23.4	65-66	100
24	23.5	64-65	100
48	23.3	64-65	100
72	22.8	65-66	100

Table 7 pH Values of Test Cultures

Nominal Concentration [Mean ^a Measured Conc.] (mg/L)	pH		
	0 Hour	72 Hours (Vessel No.)	
Control	8.2	10.2	(1)
Solvent Control	8.1	9.9	(1)
5.00 [0.767]	8.1	10.0	(1)
7.10 [1.15]	8.0	9.8	(1)
10.0 [1.62]	8.0	8.5	(1)
14.1 [2.43]	8.0	8.3	(1)
20.0 [4.36]	8.0	8.4	(1)

a : time weighted mean

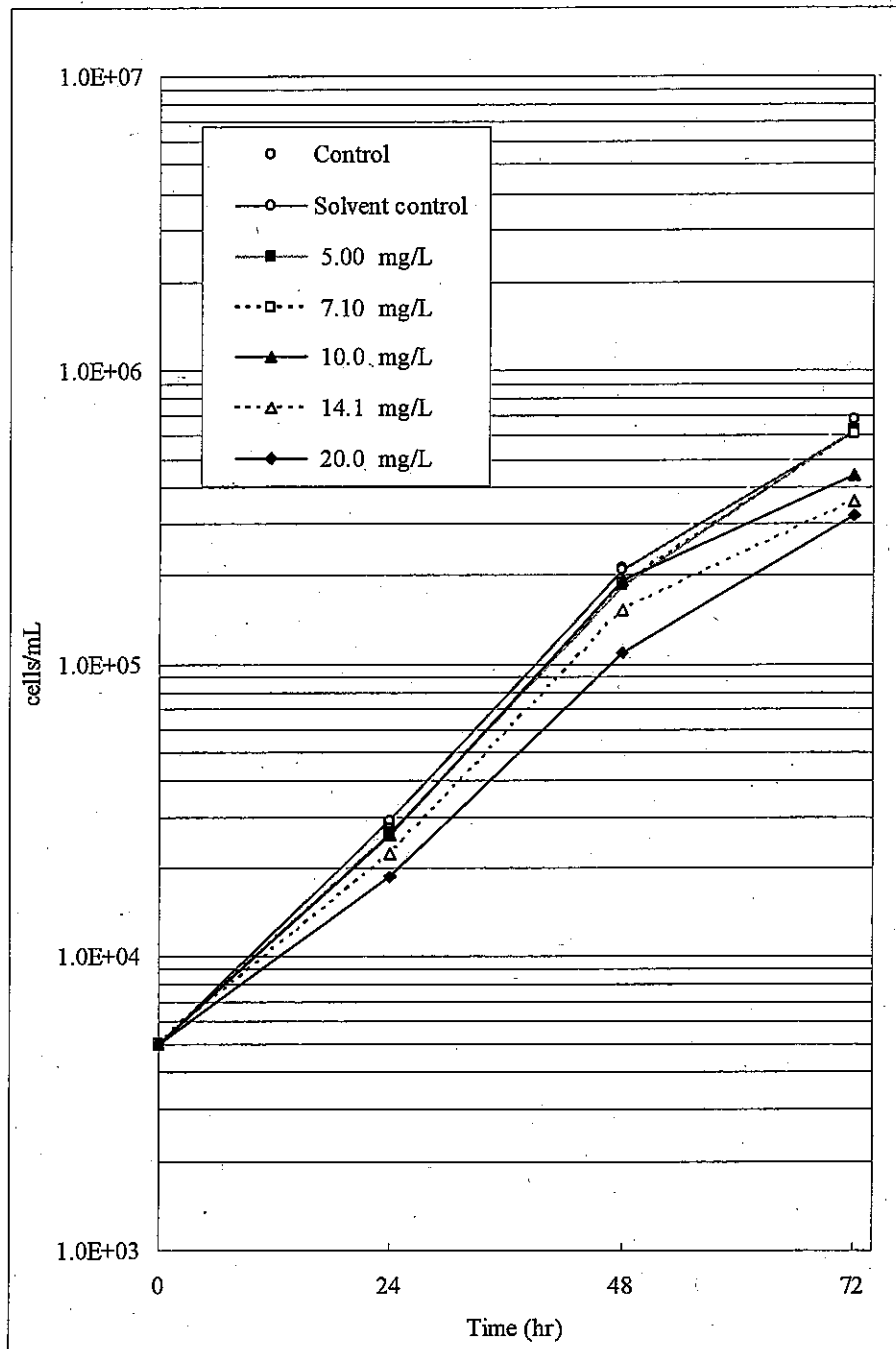
Table 8 Appearance of Test Solutions after Preparation

Nominal Concentration [Mean ^a Measured Conc.] (mg/L)	Suspended	Floating	Precipitation	Oily Substances	Color
	solids	solids			
Control	none	none	none	none	c-
Solvent Control	none	none	none	none	c-
5.00 [0.767]	none	none	none	none	c-
7.10 [1.15]	none	none	none	none	c-
10.0 [1.62]	none	none	none	none	c-
14.1 [2.43]	none	none	none	none	c-
20.0 [4.36]	none	none	none	none	c-

a : time weighted mean

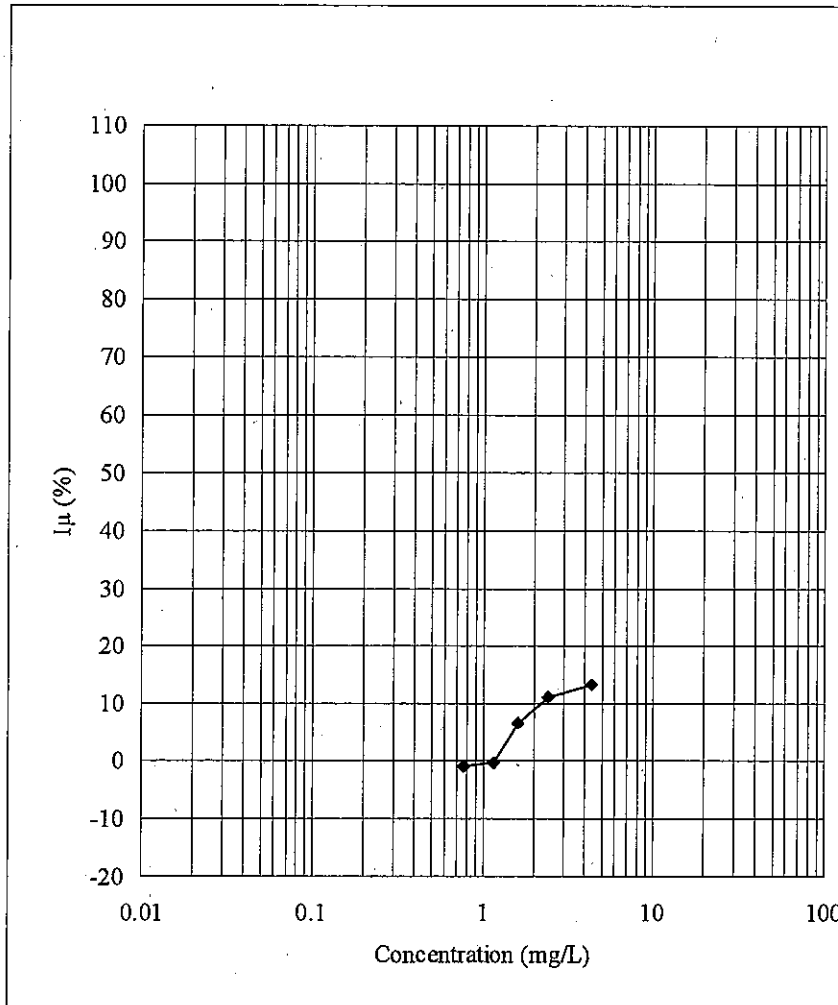
c- : colorless

Figure 1 Algal Growth Curve of *Pseudokirchneriella subcapitata*
(Mean cell counts vs time during the 72-hour exposure)



Values in legend are given in the nominal concentration.

Figure 2 Concentration-Inhibition Curve Based on I_{μ} values Calculated from the Growth Rates



4. ミジンコ急性遊泳阻害試験

試験方法および結果の要約

供試生物	和名 : オオミジンコ 学名 : <i>Daphnia magna</i> 入手先 : 国立環境研究所 感受性 : 重クロム酸カリウムの48時間半数遊泳阻害濃度 平均値±標準偏差=0.75±0.14mg/L, n=16	
試験方法	「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)	
試験条件	暴露方式: 半止水式 (24時間後に試験液の全量を交換) 試験容器: 共栓付き100 mL容ガラス三角フラスコ (被験物質の著しい揮散が考えられるため, 試験容器を試験液で満たし(130 mL), 共栓で蓋をして空隙をほぼなくした) 連数 : 4容器/試験区 飼育水 : Elendt M4 溶液 (希釈水) 試験液量: 130mL/容器 暴露期間: 48時間 生物数 : 20頭/試験区 (5頭/容器) 照明 : 室内光, 16時間明 (800 lux以下)/8時間暗 給餌 : 無し 温度 : 20±1 °C 測定値 : 19.9 °C D O : 飽和の60%以上 測定値 : 8.3~ 8.8 mg/L p H : 6.0~9.0 測定値 : 8.0~ 8.4 硬度 : 250 mg/L以下 CaCO ₃ 換算 (希釈水)	
助剤の種類と濃度	使用せず	
試験濃度	対照区, 0.500, 1.00, 2.00, 4.00, 8.00 mg/L (公比: 2.0)	
結果および考察	mg/L (95%信頼区間)	
24時間	半数遊泳阻害濃度 EC50 : 2.57 (1.75~3.30) 0%阻害最高濃度 : 1.75	
48時間	半数遊泳阻害濃度 EC50 : 2.31 (2.02~2.67) 0%阻害最高濃度 : 0.945	
統計的手法	24時間 EC50: Binomial法, 48時間 EC50: Probit法	
特記事項	被験物質の希釈水に対する溶解度 18 mg/L (当社測定値) 各試験液濃度の設定値に対する割合は, 試験液調製時において82~99%, その24時間後において80~93%であった。	

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

Nominal Concentration (mg/L)	Measured Concentration (mg/L) (Percent of Nominal, %)				Mean ^a Measured Concentration (mg/L) (Percent of Nominal, %)
	0 Hour New	24 Hours Old	24 Hours New	48 Hours Old	
Control	< 0.002*	< 0.002*	< 0.002*	< 0.002*	--
0.500	0.496 (99)	0.466 (93)	0.491 (98)	0.465 (93)	0.479 (96)
1.00	0.981 (98)	0.933 (93)	0.937 (94)	0.931 (93)	0.945 (95)
2.00	1.83 (92)	1.70 (85)	1.76 (88)	1.71 (86)	1.75 (88)
4.00	3.47 (87)	3.23 (81)	3.33 (83)	3.19 (80)	3.30 (83)
8.00	6.76 (85)	6.46 (81)	6.54 (82)	6.53 (82)	6.57 (82)

a: time weighted mean

New: freshly prepared test solutions

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

*: detection limit under the test conditions

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)
0.500	0.479	0 (0)	0 (0)
1.00	0.945	0 (0)	0 (0)
2.00	1.75	0 (0)	2 (10)
4.00	3.30	18 (90)	19 (95)
8.00	6.57	20 (100)	20 (100)

a: time weighted mean

Table 3 Calculated EC50 Values

Exposure Period (Hours)	EC50 (mg/L)	95-Percent Confidence Limits (mg/L)	Statistical Method
24	2.57	1.75 - 3.30	Binomial ^{*1}
48	2.31	2.02 - 2.67	Probit ^{*1}

*1: Using the concentrations of 0.479 - 6.57 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	1.75	6.57
48	0.945	6.57

Table 5 Appearance of Test Solutions

Nominal Concentration (mg/L)	Mean ^a Measured Concentration (mg/L)	Appearance of Test Solutions			
		0 Hour New	24 Hours Old	24 Hours New	48 Hours Old
Control	--	C-	C-	C-	C-
0.500	0.479	C-	C-	C-	C-
1.00	0.945	C-	C-	C-	C-
2.00	1.75	C-	C-	C-	C-
4.00	3.30	C-	C-	C-	C-
8.00	6.57	C-	C-	C-	C-

a: time weighted mean

New: freshly prepared test solutions

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

Color:

C-; colorless

Table 6 Temperature of Test Solutions

Nominal Concentration (mg/L)	Mean ^a Measured Concentration (mg/L)	Temperature (°C)			
		0 Hour New	24 Hours Old	24 Hours New	48 Hours Old
Control	--	19.9	19.9	19.9	19.9
0.500	0.479	19.9	19.9	19.9	19.9
1.00	0.945	19.9	19.9	19.9	19.9
2.00	1.75	19.9	19.9	19.9	19.9
4.00	3.30	19.9	19.9	19.9	19.9
8.00	6.57	19.9	19.9	19.9	19.9

a: time weighted mean

New: freshly prepared test solutions

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

Table 7 Dissolved Oxygen Concentrations in Test Solutions

Nominal Concentration (mg/L)	Mean ^a Measured Concentration (mg/L)	Dissolved Oxygen Concentration (mg/L)			
		0 Hour New	24 Hours Old	24 Hours New	48 Hours Old
Control	--	8.8	8.5	8.6	8.4
0.500	0.479	8.8	8.5	8.6	8.6
1.00	0.945	8.8	8.5	8.5	8.6
2.00	1.75	8.7	8.5	8.5	8.6
4.00	3.30	8.6	8.4	8.4	8.6
8.00	6.57	8.4	8.3	8.3	8.4

a: time weighted mean

New: freshly prepared test solutions

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

Table 8 pH Values of Test Solutions

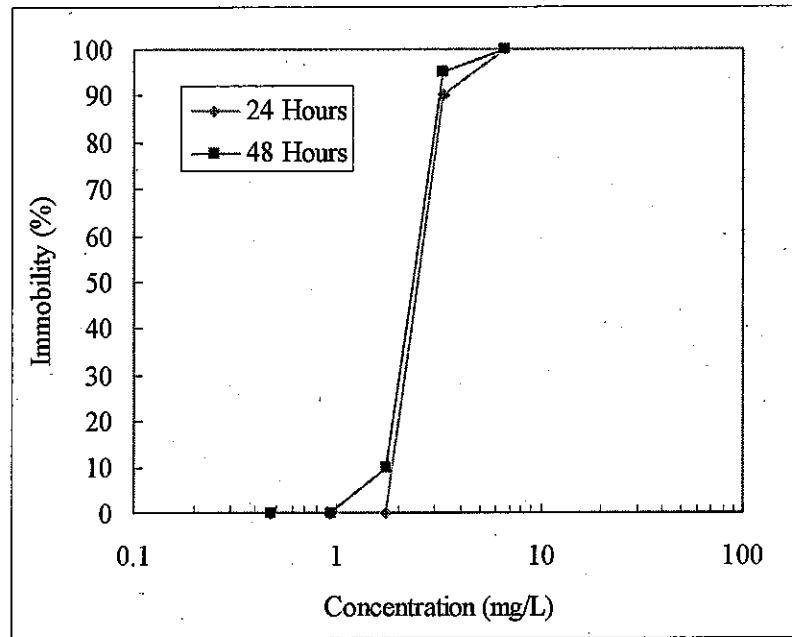
Nominal Concentration (mg/L)	Mean ^a Measured Concentration (mg/L)	pH			
		0 Hour New	24 Hours Old	24 Hours New	48 Hours Old
Control	--	8.4	8.3	8.3	8.3
0.500	0.479	8.3	8.2	8.2	8.2
1.00	0.945	8.3	8.2	8.1	8.2
2.00	1.75	8.3	8.2	8.0	8.2
4.00	3.30	8.3	8.2	8.1	8.2
8.00	6.57	8.3	8.3	8.1	8.2

a: time weighted mean

New: freshly prepared test solutions

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

Figure 1 Concentration-Immobilization Curve



5. 魚類急性毒性試験

試験方法および結果の要約

供試生物	和名 : ヒメダカ 学名 : <i>Oryzias latipes</i> 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) 感受性 : 硫酸銅 (II) の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)								
試験方法	「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)								
試験条件	<p>暴露方式 : 半止水式 (24時間毎換水)</p> <p>試験容器 : 5.0 L容ガラス製水槽 (テフロンシートで水面被覆)</p> <p>連数 : 1 容器/試験区</p> <p>飼育水 : 脱塩素水道水 (希釈水)</p> <p>試験液量 : 5.0 L/容器</p> <p>暴露期間 : 96時間</p> <p>生物数 : 10尾/試験区</p> <p>照明 : 室内光, 16時間明 (1000 lux以下)/8時間暗</p> <p>給餌 : 無し</p> <table border="1"> <tr> <td>温度 : 24±1 °C</td> <td>測定値 : 23.6~23.9 °C</td> </tr> <tr> <td>D O : 飽和の60%以上</td> <td>測定値 : 6.6~ 8.4 mg/L</td> </tr> <tr> <td>p H : 6.5~8.5</td> <td>測定値 : 7.1~ 7.6</td> </tr> <tr> <td>硬度 : 30~100 mg/L CaCO₃換算</td> <td>測定値 : 49 mg/L (希釈水)</td> </tr> </table>	温度 : 24±1 °C	測定値 : 23.6~23.9 °C	D O : 飽和の60%以上	測定値 : 6.6~ 8.4 mg/L	p H : 6.5~8.5	測定値 : 7.1~ 7.6	硬度 : 30~100 mg/L CaCO ₃ 換算	測定値 : 49 mg/L (希釈水)
温度 : 24±1 °C	測定値 : 23.6~23.9 °C								
D O : 飽和の60%以上	測定値 : 6.6~ 8.4 mg/L								
p H : 6.5~8.5	測定値 : 7.1~ 7.6								
硬度 : 30~100 mg/L CaCO ₃ 換算	測定値 : 49 mg/L (希釈水)								
助剤の種類と濃度	使用せず								
試験濃度	対照区, 1.00, 1.80, 3.20, 5.60, 10.0 mg/L (公比 : 1.8)								
結果および考察	<table border="1"> <tr> <td></td> <td>mg/L (95%信頼区間)</td> </tr> <tr> <td>96時間</td> <td>半数致死濃度 (LC50) : 6.82 (4.76~9.78)</td> </tr> <tr> <td></td> <td>0%死亡最高濃度 : 4.76</td> </tr> <tr> <td></td> <td>100%死亡最低濃度 : 9.78</td> </tr> </table>		mg/L (95%信頼区間)	96時間	半数致死濃度 (LC50) : 6.82 (4.76~9.78)		0%死亡最高濃度 : 4.76		100%死亡最低濃度 : 9.78
	mg/L (95%信頼区間)								
96時間	半数致死濃度 (LC50) : 6.82 (4.76~9.78)								
	0%死亡最高濃度 : 4.76								
	100%死亡最低濃度 : 9.78								
統計的手法	LC50 : Binomial法								
特記事項	被験物質の希釈水に対する溶解度 18 mg/L (当社測定値) 各試験液濃度の設定値に対する割合は, 試験液調製時において88~106%, 24時間後において75~101%であった。濃度減少の主な原因はヒメダカへの移行 (取り込みや, 体表への吸着) の可能性が考えられる。								

Table 1 Measured Concentration of the Test Substance in Test Water

Nominal Concentration (mg/L)	Measured Concentration, mg/L (Percent of Nominal)				(Semi-Static Condition) Mean ^a Measured Concentration (mg/L)
	0 Hour (new)	24 Hours (old)	24 Hours (new)	48 Hours (old)	
Control	<0.00006	<0.00006	<0.00006	<0.00006	----
1.00	0.925 (93)	0.750 (75)	0.879 (88)	0.822 (82)	0.842 (84)
1.80	1.91 (106)	1.47 (82)	1.77 (98)	1.66 (92)	1.70 (94)
3.20	2.91 (91)	2.55 (80)	2.89 (90)	2.69 (84)	2.76 (86)
5.60	5.06 (90)	4.24 (76)	5.07 (91)	4.69 (84)	4.76 (85)
10.0	10.3 (103)	8.67 (87)	10.1 (101)	10.1 (101)	9.78 (98)

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.

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

Nominal Concentration (mg/L)	Mean ^a 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)
1.00	0.842	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
1.80	1.70	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
3.20	2.76	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
5.60	4.76	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
10.0	9.78	8 (80)	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	7.80*	--	Binomial
48	6.82*	4.76 - 9.78	Binomial
72	6.82*	4.76 - 9.78	Binomial
96	6.82*	4.76 - 9.78	Binomial

--: Could not be determined.

*: Using the concentrations of 0.842 - 9.78 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	4.76	>9.78
48	4.76	9.78
72	4.76	9.78
96	4.76	9.78

Table 5 Observed Toxicological Symptoms

Nominal Concentration (mg/L)	Mean ^a Measured Concentration (mg/L)	Symptoms (Symptom-number of fish)			
		24 Hours	48 Hours	72 Hours	96 Hours
Control	----	N	N	N	N
1.00	0.842	N	N	N	N
1.80	1.70	N	N	N	N
3.20	2.76	N	N	N	N
5.60	4.76	ASR-6	ASR-10(SUR-1)	ASR-9(SUR-1) AP-1	ASR-8(SUR-1) ASL-1,AP-1
10.0	9.78	AP-2	--	--	--

a : time weighted mean

N : No toxicological symptom was observed.

ASR: abnormal swimming (reduced activity)

AP: paralyzation

SUR: surfacing

ASL: abnormal swimming (loss of equilibrium)

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

Table 6 Appearance of Test Solutions

Nominal Concentration (mg/L)	Mean ^a Measured Concentration (mg/L)	Appearance of Test Solutions											
		0 Hour		24 Hours		48 Hours		72 Hours		96 Hours			
		new	old	new	old	new	old	new	old	new	old		
Control	----	C-	C-	C-	C-	C-	C-	C-	C-	C-	C-	C-	C-
1.00	0.842	C-	C-	C-	C-	C-	C-	C-	C-	C-	C-	C-	C-
1.80	1.70	C-	C-	C-	C-	C-	C-	C-	C-	C-	C-	C-	C-
3.20	2.76	C-	C-	C-	C-	C-	C-	C-	C-	C-	C-	C-	C-
5.60	4.76	C-	C-	C-	C-	C-	C-	C-	C-	C-	C-	C-	C-
10.0	9.78	C-	C-	C-	C-	C-	C-	C-	C-	C-	C-	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 ^a Measured Concentration (mg/L)	Temperature (°C)											
		0 Hour		24 Hours		48 Hours		72 Hours		96 Hours			
		new	old	new	old	new	old	new	old	new	old		
Control	--	23.6	23.6	23.7	23.7	23.8	23.8	23.6	23.9	23.7	23.7	23.8	23.8
1.00	0.842	23.7	23.7	23.6	23.6	23.7	23.7	23.8	23.9	23.8	23.8	23.8	23.8
1.80	1.70	23.7	23.7	23.6	23.6	23.7	23.7	23.8	23.9	23.8	23.8	23.8	23.9
3.20	2.76	23.7	23.7	23.6	23.6	23.7	23.7	23.8	23.9	23.8	23.9	23.9	23.9
5.60	4.76	23.7	23.7	23.6	23.6	23.7	23.7	23.8	23.9	23.8	23.9	23.9	23.9
10.0	9.78	23.7	23.7	23.7	23.7	--	--	--	--	--	--	--	--

minimum:23.6
maximum:23.9

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 ^a 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	new	old		
Control	---	8.3	6.7	8.3	6.8	8.3	7.0	8.3	7.0	8.3	7.0		
1.00	0.842	8.4	6.6	8.3	6.8	8.3	7.0	8.3	7.0	8.4	7.0		
1.80	1.70	8.4	6.6	8.3	6.7	8.3	6.8	8.3	6.8	8.3	6.8		
3.20	2.76	8.2	6.8	8.3	6.8	8.3	7.0	8.3	7.0	8.3	7.0		
5.60	4.76	8.1	6.8	8.1	6.7	8.2	6.8	8.1	6.8	8.1	6.8		
10.0	9.78	8.2	7.0	7.9	--	--	--	--	--	--	--		

minimum:6.6
maximum:8.4

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 9 pH Values of Test Solutions

Nominal Concentration (mg/L)	Mean ^a Measured Concentration (mg/L)	pH											
		0 Hour		24 Hours		48 Hours		72 Hours		96 Hours			
		new	old	new	old	new	old	new	old	new	old		
Control	---	7.5	7.1	7.5	7.2	7.2	7.3	7.6	7.3	7.6	7.6	7.2	
1.00	0.842	7.6	7.1	7.6	7.1	7.1	7.2	7.5	7.2	7.6	7.6	7.2	
1.80	1.70	7.6	7.1	7.5	7.1	7.1	7.2	7.5	7.2	7.6	7.6	7.2	
3.20	2.76	7.6	7.1	7.5	7.1	7.1	7.2	7.5	7.2	7.6	7.6	7.2	
5.60	4.76	7.6	7.2	7.6	7.1	7.1	7.2	7.5	7.2	7.5	7.5	7.2	
10.0	9.78	7.6	7.2	7.6	7.2	7.2	7.2	7.6	7.2	7.6	7.6	7.2	

minimum: 7.1
maximum: 7.6

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

