

Appendix table 2-1 Measured concentrations of test item in test solutions

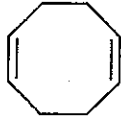
Stock solution content (%)	Measured concentration (mg/L) (Compared to concentration at each preparation ^a %)				
	At the start	24 hours		At the end	Geometric mean
		Before the renewal	After the renewal		
Control	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
0.25	0.21	0.19 (91)	0.20	0.20 (99)	0.20
0.50	0.35	0.32 (91)	0.42	0.40 (96)	0.37
1.0	0.66	0.65 (99)	0.62	0.59 (95)	0.63
2.0	1.3	1.2 (98)	1.3	1.2 (88)	1.3
4.0	3.1	2.0 (64)	2.8	2.5 (93)	2.6

n.d. : Not determined (<0.053 mg/L)

^a At the start and after the renewal

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)	1,5-シクロオクタジエン		
別 名	—		
C A S 番 号	111-78-4		
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)			分子式: C ₈ H ₁₂
分 子 量	108.18		
試験に供した新規 化学物質の純度 (%)	99.6% (GC)		
試験に供した新規 化学物質のロット番号	DPL5810		
不 純 物 の 名 称 及 び 含 有 率	不明		
蒸 気 圧	—		
対 水 溶 解 度	不溶		
1-オクタノール/水分配係数	log Pow 3.384		
融 点	-69°C		
沸 点	約 150°C		
常温における性状	ごくうすい黄色、澄明の液体		
安 定 性	光により変質する		
溶媒に対する溶解度等	溶媒	溶解度	溶媒中の安定性
	エタノール	易溶	—

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	<p>[分析試料のサンプリング]</p> <ul style="list-style-type: none"> ・分析実施区：全試験区 ・分析頻度：暴露開始時、24時間後換水前、72時間後換水後及び暴露終了時 ・採取量：約100 mL (全試験区) ・採取方法：暴露開始時及び72時間後換水後；調製容器より別途分取した。 24時間後換水前及び暴露終了時；各試験区の試験容器の中層からそれぞれ均等量採取し、混合した。 <p>[被験物質の定量]</p> <p>ガスクロマトグラフィー (GC) を用い、濃度既知の標準溶液のピーク面積と比較し、比例計算して求めた。</p>
前 処 理 法	<p>採取した試験液について、以下のフロースキームにより前処理操作を行い、GC 試料を調製した。</p> <p>フロースキーム</p> <pre> graph TD A[試験液* 40 mL] --> B[水層] A --> C[クロロホルム層] C --> D[GC 試料] </pre> <ul style="list-style-type: none"> ←塩化ナトリウム 12 g (電子上皿天びん) ←クロロホルム 20 mL (メスシリンダー) ・振とう (10 分間) ・ピーカーに入れたクロロホルム層をメスフラスコに移す ・定容 25 mL (クロロホルム, メスフラスコ) <p>* そのまま若しくは脱塩素水道水で適宜希釈した試験液</p>

定 量 条 件	機 器	ガスクロマトグラフ Agilent Technologies 製 Agilent 7890A
	検 出 器	水素炎イオン化検出器 (FID)
	カ ラ ム	HP-5MS 膜厚 0.25 μ m (Agilent Technologies 製) 30 m \times 0.25 mm I.D. フューズドシリカ製
	カ ラ ム 温 度	60 $^{\circ}$ C (1 min) $\xrightarrow{\textcircled{1}}$ 100 $^{\circ}$ C (0 min) $\xrightarrow{\textcircled{2}}$ 200 $^{\circ}$ C (0 min)
	昇 温 速 度	$\textcircled{1}$ 10 $^{\circ}$ C/min $\textcircled{2}$ 50 $^{\circ}$ C/min
	試料導入部温度	200 $^{\circ}$ C
	キャリアガス	ヘリウム
	カラム流量	1 mL/min
	水 素	40 mL/min
	空 気	450 mL/min
	注 入 量	1 μ L
	導 入 モード	スプリット
	スプリット比	5:1
	パージ流量	20 mL/min
	パージ時間	2 min
	検 出 器	
	検出器温度	200 $^{\circ}$ C
検出器感度	レンジ 2 $^{\circ}$	
	平均回収率 : 96%	
	定量下限値 : 0.33 mg/L	

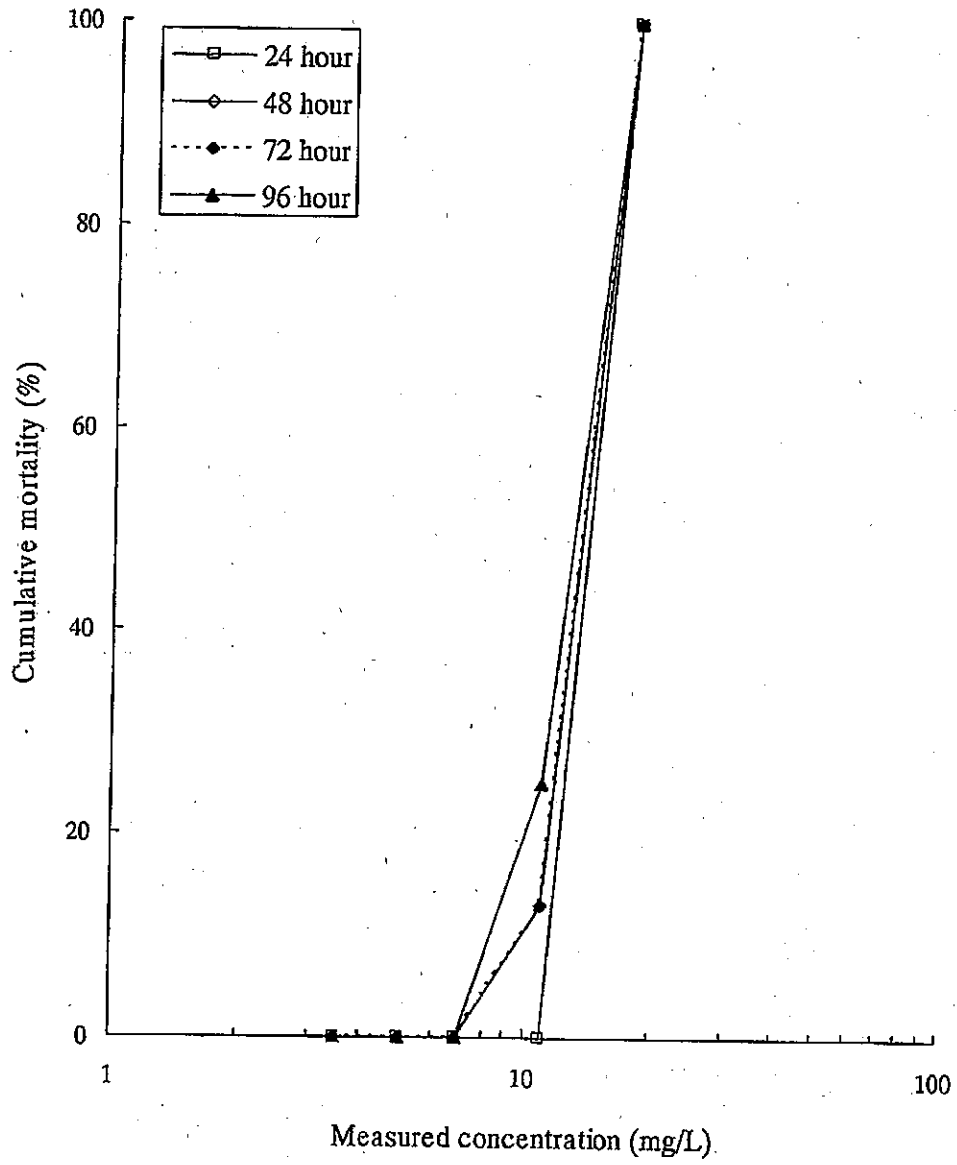
3. 試験材料及び方法

項 目		内 容	
試験生物	種 (和名・学名・系統)	ヒメダカ (<i>Oryzias latipes</i>)	
	入手先	財団法人化学物質評価研究機構 久留米事業所 (〒839-0801 福岡県久留米市宮ノ陣三丁目2番7号)	
	大きさ (全長、体重)・月齢	全長 2.4 ± 0.15 cm、体重 0.11 ± 0.026 g 月齢 8ヶ月齢	
	対照物質への感受性 (LC_{50}) (対照物質名)	96h LC_{50} : 0.34 mg/L (CuSO ₄ 換算) 硫酸銅(II)五水和物 (和光純薬工業製 試薬特級)	
じゅん化	じゅん化期間	31日間 (2008年11月14日~12月15日)	
	飼育水の種類	脱塩素水道水	
	じゅん化前の葉浴の有無	無	
	じゅん化方式	流水式	
	環境条件 (水温、明暗周期)	24±1℃ 16時間明/8時間暗 (室内灯)	
	餌料 (種類・量・頻度等)	コイ用配合餌料 (2C) 魚体重の2%量/日を毎日	
試験条件	試験容器	3L容のガラス製容器 (直径16 cm、 深さ17 cm) ガラス製の蓋の蓋を設置	
	試験用水	種類	脱塩素水道水
		硬度 (mg/L)	28
		pH	7.6 (22℃)
	暴露期間	2008年12月15日~12月19日	
	試験濃度 (設定値)	5濃度区 [試験原液の含有率が30、 20、13、8.9及び5.9% (公比1.5)]	
	供試数	8尾/試験区 (4尾/試験容器)	
	試験溶液量	約6L/試験区 (約3L/試験容器)	
	助剤	助剤の有無	無
		種類	—
		濃度	—
	試験方式	半止水式、密閉系	
	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)	7.7~7.9 mg/L		
明暗周期	16時間明/8時間暗 (室内灯)		
結果の 算出方法	LC_{50}	Binomial法	

4. 試験結果及び考察

項目	内容
毒性値	96hLC ₅₀ : 13 mg/L
試験濃度	測定濃度の幾何平均値
考察及び特記事項	<p>試験用水への溶解度 (24±1℃): 81 mg/L (予備試験での測定値)</p> <p>試験液の調製法: 供試試料を100 mg/L (設定) になるように水面下で添加後、密栓し約24時間攪拌後、約1時間静置して採取した中層液を用いて調製</p> <p>行動や外観の異常: 重篤、遊泳異常及び呼吸異常</p> <p>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LC₅₀を求める試験として行った。その結果、試験液中の被験物質濃度は調製時濃度の±20%以内に保たれ、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。</p>

5. ヒメダカの濃度-累積死亡率曲線



Appendix table 2-1 Measured concentrations of test item in test solutions

Stock solution content (%)	Measured concentration (mg/L) (Compared to concentration at each preparation ^a %)				
	At the start	24 hours (before the renewal)	72 hours (after the renewal)	At the end	Geometric mean
Control	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
5.9	3.4	3.2 (92)	3.7	3.6 (97)	3.5
8.9	4.9	4.9 (99)	5.3	4.7 (89)	5.0
13	7.2	6.6 (91)	6.9	7.0 (102)	6.9
20	12	10 (91)	12	10 (85)	11
30	18	17 ^b (97)	-	-	18

n.d. : Not determined (<0.33 mg/L)

^a : At the start or after the renewal

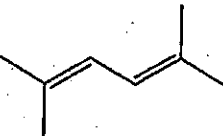
^b : It indicates the measured value at the time that confirmed all test organisms dead.

- : All test organisms died

[様式7]

藻類生長阻害試験結果報告書

1. 一般的事項

新規化学物質の名称 (IUPAC 命名法による)	2,5-ジメチルヘキサ-2,4-ジエン		
別名	2,5-ジメチル-2,4-ヘキサジエン ジイソクロチル		
C A S 番号	764-13-6		
構造式または示性式 (いずれも不明な場合は、その製法の概要)			
分子量	110.20		
試験に供した新規化学物質の純度(%)	97.0		
試験に供した新規化学物質のロット番号	GG02		
不純物の名称及び含有率	MEHQ(ヒドロキノンモノメチルエーテル; 安定剤として)を含む		
蒸気圧	1.0 kPa(20°C)		
対水溶解度	32 mg/L(25°C)		
1-オクタール/水分配係数	3.5		
融点	10°C		
沸点	135°C		
常温における性状	無色透明液体		
安定性	重合する恐れがある		
溶媒に対する溶解度等	溶媒	溶解度	溶媒中の安定性
	メノール	可溶	—

2. 試験液の被験物質濃度の分析法

項目	方法
<p>分析方法</p>	<p>分析試料を適宜アセトニトリルで希釈したものを分析試料溶液とし、HPLCに注入して被験物質を定量した。以下の式により被験物質濃度を算出した。</p> <p>濃度 (mg a.i./L) = 分析試料溶液の被験物質濃度 × 希釈倍率 × 2*</p> <p>* 分析試料の揮発を防ぐため、採取時に試験液と等量のアセトニトリルで希釈したため</p> <p>サンプリング: 全試験区 頻度: 暴露期間中 24 時間毎 サンプリング量: 3 mL/試験区 サンプリング法: 試験液の中層から採取</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ 暴露開始時: 分析および水温、pH 測定用に別途調製した試験液から採取。 ・ 暴露 24、48、72 時間: 試験区毎に全速の中層から試験液を 1.0 mL ずつ(助剤対照区のみ 0.5 mL ずつ)採取。 <p>それぞれ、あらかじめアセトニトリル 3.0 mL を分注しておいたバイアルに速やかに添加して測定用試料(計 6.0 mL)とした。</p>
<p>前処理法</p>	<p>適宜アセトニトリルで希釈した。</p>
<p>定量条件</p>	<p>装置(HPLC): L-7000システム 日立製作所製 データ処理装置: D-7000 日立製作所製 カラム: L-column ODS (5 μm, 4.6 mm I.D × 150 mm) カラム温度: 40°C 移動相: メタノール: 超純水 = 90:10 流量: 1.0 mL/min 波長: UV 230 nm 感度: 1 AU/V 注入量: 40.0 μL 定量限界: 0.050 mg a.i./L 平均回収率: 0.05 mg a.i./L (91%)、30 mg a.i./L (102%)</p>

3. 試験材料及び方法

項目		内容	
試験方法			
試験生物	種(学名・株名)	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> ATCC22662 株	
	入手先	American Type Culture Collection	
	対照物質への感受性 (EC ₅₀) (対照物質名)	0-72h E ₁ C ₅₀ : 0.63 mg/L 重クロム酸カリウム(関東化学㈱製、試薬特級)	
前培養	前培養の期間	3日間	
	培地名	OECD 培地	
	環境条件(水温、光強度)	21±2°C 62~63 μE/m ² /s	
試験条件	試験容器	500mL 容栓付ガラス製三角フラスコ	
	培地名	OECD 培地	
	暴露期間	2009年3月16日~2009年3月19日	
	試験濃度(設定値)	9.5、14、20 および 30 mg a.i./L 公比 1.5(= $\sqrt[6]{10}$)	
	初期生物量	1×10 ⁴ cells/mL	
	連数	試験濃度区	3連
		対照区	3連
	試験溶液量	100 mL/試験容器	
	助剤	助剤の有無	有
		種類	N,N-ジメチルホルムアミド(DMF)
		濃度	100 μL/L
		助剤対照区の連数	6連
	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)、密閉系	
水温又は培養温度	実測値: 20.9~21.5°C		
照明(光強度・時間等)	実測値: 60~72 μE/m ² /s、72 時間連続照明		
結果の算出方法	速度法	E ₁ C ₅₀ : 試験最高濃度より大(>)とした NOEC _r : 多重比較検定(Dunnett, α=0.05)	

4. 試験結果及び考察

項目	内容
毒性値	0-72h E _r C ₅₀ : >4.7 mg a.i./L 0-72h NOEC _r : 1.7 mg a.i./L
試験濃度	実測値
考察及び特記事項	<ul style="list-style-type: none"> ・被験物質が揮発性を有したため、密閉容器を使用し試験容器毎に試験液を調製した。 ・その際、被験物質を希釈水に直接添加する方法では、秤量精度の観点から低濃度区の試験液の調製が困難であったため、助剤として DMF を用いて試験原液を調製することとした。 ・培地での溶解度が 30 mg a.i./L であったため、試験最高濃度は 30 mg a.i./L を上限とした。 ・分析頻度は、暴露期間中設定濃度の 80% を維持できなかったため、24 時間毎とした。 ・分析の際、測定用試料からの遠心分離による藻体の除去操作は、被験物質が揮散するため実施しなかった。 ・試験液中の平均測定濃度を幾何平均で算出した結果、設定値に対する割合は 16~18% であった。 設定濃度: 9.5、14、20、30 mg a.i./L 幾何平均値: 1.7、2.5、3.5、4.7 mg a.i./L ・E_rC₅₀ は、生長阻害率がすべての濃度区で 50% 未満であったため、試験最高濃度より大(>)とした。 ・試験の有効性については基準値を全て満たしており、本試験はガイドラインに準じて適切に行われたと判断した。

5. 藻類の生長曲線および濃度—生長阻害曲線

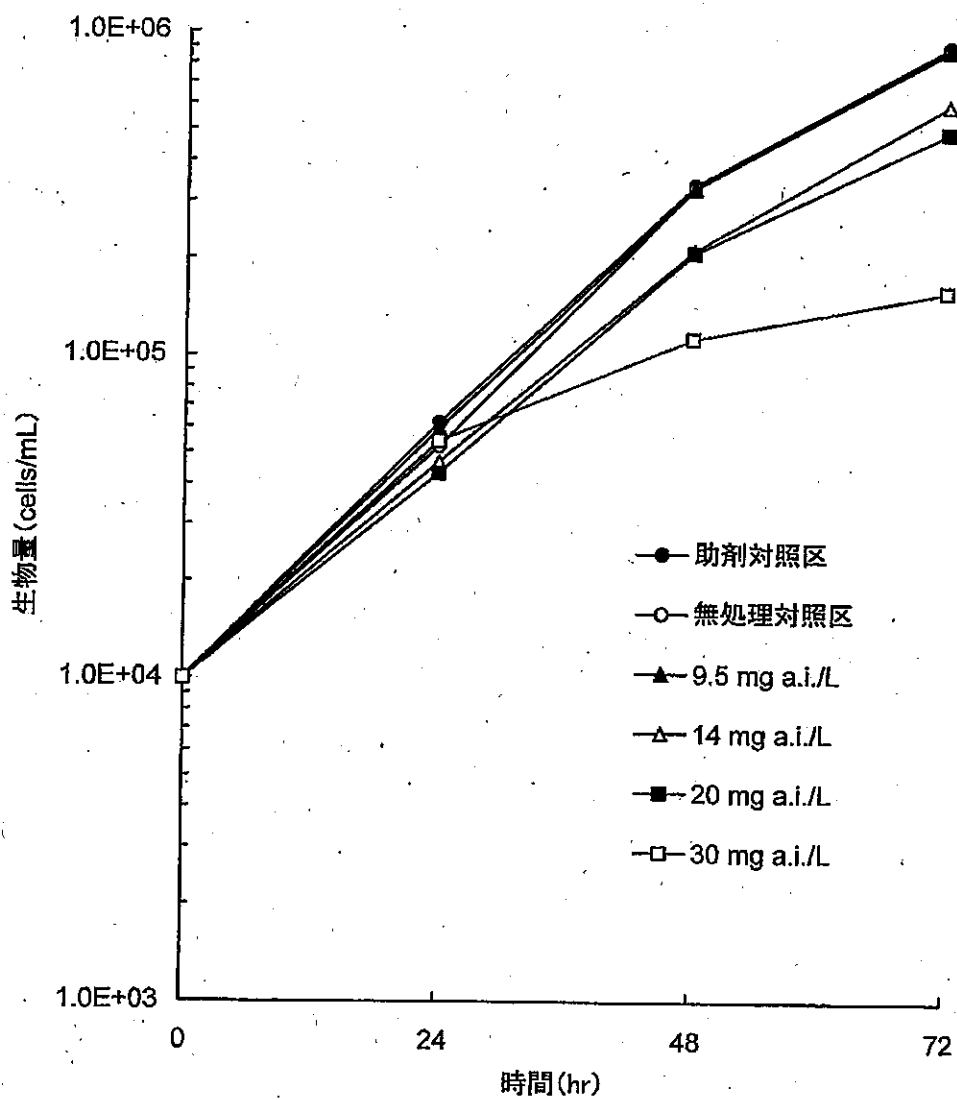


図 1. 藻類の生長曲線

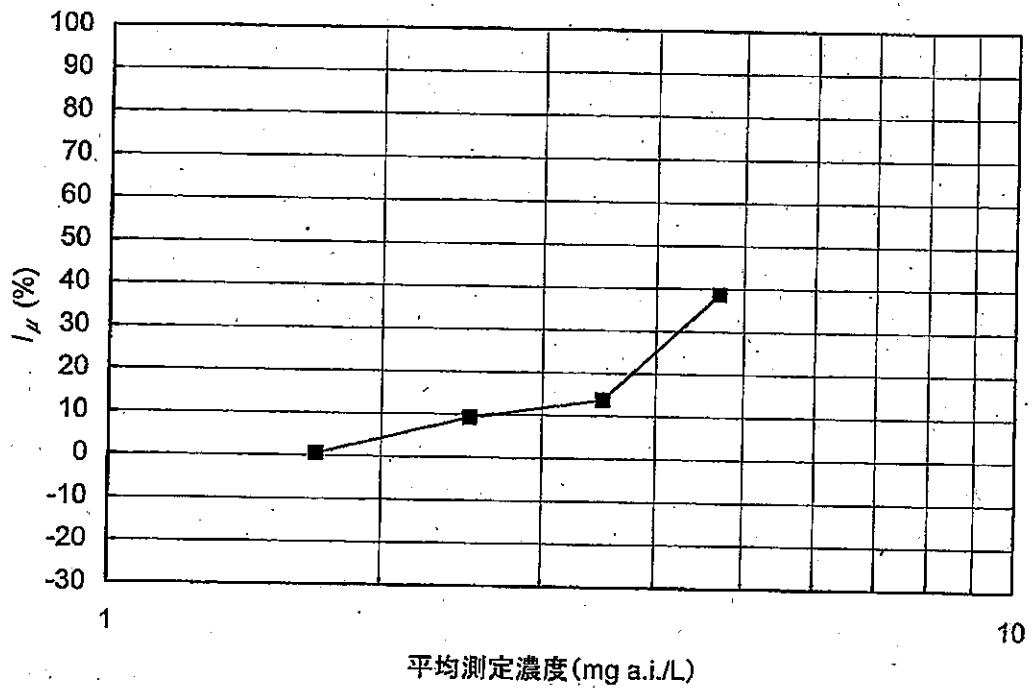


図2. 2,5-ジメチルヘキサ-2,4-ジエンに暴露された藻類(*P. subcapitata*)の濃度-阻害率曲線

表 1. 2,5-ジメチルヘキサ-2,4-ジエンの試験液中濃度

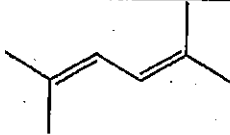
設定濃度 (mg a.i./L)	測定濃度 (mg a.i./L)				
	0 時間	24 時間	48 時間	72 時間	平均値
助剤対照区	<0.050	<0.050	<0.050	<0.050	—
無処理対照区	<0.050	<0.050	<0.050	<0.050	—
9.5	8.8 [93]	1.2 [13]	1.0 [11]	0.87 [9.2]	1.7 [18]
14	14 [100]	1.5 [11]	1.6 [11]	1.2 [8.6]	2.5 [18]
20	18 [90]	2.2 [11]	1.8 [9.0]	2.0 [10]	3.5 [18]
30	22 [73]	3.3 [11]	2.5 [8.3]	2.7 [9.0]	4.7 [16]

[]: 設定に対する割合 (%)

[様式 8]

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)	2,5-ジメチルヘキサ-2,4-ジエン		
別 名	2,5-ジメチル-2,4-ヘキサジエン ジイソクロチル		
C A S 番 号	764-13-6		
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)			
分 子 量	110.20		
試験に供した新規 化学物質の純度(%)	97.0		
試験に供した新規 化学物質のロット番号	GG02		
不 純 物 の 名 称 及 び 含 有 率	MEHQ(ヒドロキノンモノメチルエーテル; 安定剤として)		
蒸 気 圧	1.0 kPa(20°C)		
対 水 溶 解 度	32 mg/L(25°C)		
1-オクタノール/水分配係数	3.5		
融 点	10°C		
沸 点	135°C		
常温における性状	無色透明液体		
安 定 性	重合する恐れがある		
溶媒に対する溶解度等	溶媒	溶解度	溶媒中の安定性
	メノール	可溶	—

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	<p>分析試料を適宜アセトニトリルで希釈したものを分析試料溶液とし、HPLC に注入して被験物質を定量した。以下の式により被験物質濃度を算出した。</p> <p>濃度(mg a.i./L)=分析試料溶液の 2,5-ジメチルヘキサ-2,4-ジエン濃度×希釈倍率×2[*]</p> <p>(*: 分析試料の揮発を防ぐため、採取時に試験液と等量のアセトニトリルで希釈したため)</p> <p>サンプリング: 全試験区 頻度: 暴露開始時および終了時 サンプリング量: 8.0 mL サンプリング法: 試験液を攪拌することなく中層から採取</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ 暴露開始時: 分析および水質測定用に別途調製した試験液から採取。 ・ 暴露終了時: 試験区毎に全連の中層から試験液を 2.0 mL ずつ採取。それぞれ、あらかじめアセトニトリル 8.0 mL を分注しておいたバイアルに速やかに添加して測定用試料(計 16.0 mL)とした。
前処理法	適宜アセトニトリルで希釈した。
定量条件	<p>装置(HPLC): L-7000システム 日立製作所製 データ処理装置: D-7000 日立製作所製 カラム: L-column ODS(5 μm, 4.6 mm I.D×150 mm) カラム温度: 40°C 移動相: メタノール:超純水= 90:10 流量: 1.0 mL/min 波長: UV 230 nm 感度: 1 AU/V 注入量: 40.0 μL 定量限界: 0.050 mg a.i./L 平均回収率: 0.05 mg a.i./L(91%)、30 mg a.i./L(102%)</p>

3. 試験材料及び方法

項目		内容	
試験生物	種(和名・系統・時間齢)	オオミジンコ(<i>Daphnia magna</i>) 24 時間未満齢	
	入手先	独立行政法人 国立環境研究所 (元環境庁国立環境研究所)	
	対照物質への感受性 (EC ₅₀) (対照物質名)	48 時間 EC ₅₀ =0.89 mg/L 重クロム酸カリウム(関東化学㈱製、試薬特級)	
飼育	飼育水の種類	人工調製水 Elendt M4	
	環境条件(水温、明暗周期)	水温: 20±1°C 明暗周期: 16 時間明/8 時間暗(室内光)	
試験条件	試験容器		100 mL 容ガラス製栓付ビン
	試験用水	種類	人工調製水 Elendt M4
		硬度	250 mg/L(CaCO ₃ 換算)
		pH	8.1
	暴露期間		本試験: 2009 年 3 月 3 日~2009 年 3 月 5 日
	試験濃度(設定値)		1.0, 1.8, 3.2, 5.6, 10 mg a.i./L 公比 1.8(= $\sqrt[3]{10}$)
	供試数		20 頭/試験区(5 頭/容器×4 連)
	連数	試験濃度区	4 連
		対照区	4 連
	試験溶液量		135 mL/試験容器
	助剤	助剤の有無	有
		種類	N,N-ジメチルホルムアミド(DMF)
		濃度	100 μL/L
		助剤対照区の連数	4 連
	試験方式		止水式、密閉系
	換水又は流水条件		—
	水温		19.8~19.9°C(実測値)
	溶存酸素濃度(DO)		8.6~8.8 mg/L(実測値)
	明暗周期		16 時間明/8 時間暗 室内光(190~356 lux*, 実測値) (*: 試験容器が栓付ビンのため、同じ栓を照度計にかざした状態で測定)
	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 = 4.2 mg a.i./L
試験濃度	実測値
考察及び特記事項	<ul style="list-style-type: none"> 被験物質が揮発性を有したため、試験容器を試験液で満たした密閉容器を使用し、試験容器毎に試験液を調製した。 その際、被験物質を希釈水に直接添加する方法では、秤量精度の観点から低濃度区の試験液の調製が困難であったため、助剤としてDMFを用いて試験原液を調製することとした。 試験液中の被験物質濃度は測定濃度の平均値を採用した。 試験の有効性については基準値を満たしており、本試験はガイドラインに準じて適切に行われたと判断した。

5. ミジノコの濃度—遊泳阻害率曲線

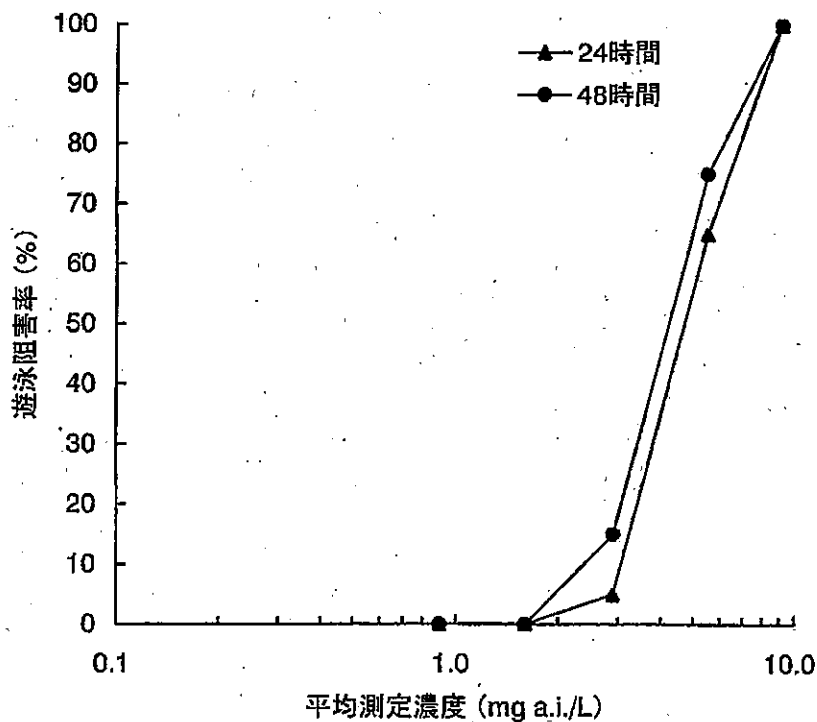


表 1. 2,5-ジメチルヘキサ-2,4-ジエンの試験液中濃度

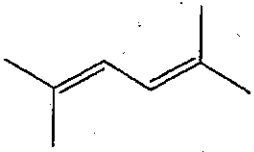
設定濃度 (mg a.i./L)	測定濃度 (mg a.i./L)		
	0 時間	48 時間	平均値
無処理対照区	<0.050	<0.050	—
助剤対照区	<0.050	<0.050	—
1.0	0.98 [98]	0.82 [82]	0.90 [90]
1.8	1.7 [94]	1.5 [83]	1.6 [89]
3.2	3.0 [94]	2.9 [91]	2.9 [91]
5.6	5.9 [105]	5.1 [91]	5.5 [98]
10	9.5 [95]	8.7 [87]	9.1 [91]

[]: 設定に対する割合 (%)

[様式9]

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)	2,5-ジメチルヘキサ-2,4-ジエン		
別名	2,5-ジメチル-2,4-ヘキサジエン、ジイソクロチル		
C A S 番号	764-13-6		
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)			
分子量	110.20		
試験に供した新規化学物質の純度(%)	97.0		
試験に供した新規化学物質のロット番号	GG02		
不純物の名称及び含有率	MEHQ(ヒドロキノンモノメチルエーテル; 安定剤として)		
蒸気圧	1.0 kPa(20°C)		
対水溶解度	32 mg/L(25°C)		
1-オクタノール/水分配係数	3.5		
融点	10°C		
沸点	135°C		
常温における性状	無色透明液体		
安定性	重合する恐れがある		
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	可溶	-

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	<p>分析試料を適宜アセトニトリルで希釈したものを分析試料溶液とし、HPLCに注入して被験物質を定量した。以下の式により被験物質濃度を算出した。 濃度 (mg a.i./L) = 分析試料溶液の被験物質濃度 × 希釈倍率 × 2*</p> <p>* 分析試料の揮発を防ぐため、採取時に試験液と等量のアセトニトリルで希釈したため</p> <p>サンプリング: 全試験区 頻度: 暴露開始時と終了時を含めた換水前後の 2 セットについて測定 (0 および 24 時間、72 および 96 時間) サンプリング量: 4.0 mL (2.0 mL/試験容器 × 2 連) サンプリング法: 試験液を攪拌することなく、2連の中層から採取あらかじめアセトニトリル 4.0 mL を分注しておいたバイアルに速やかに添加して測定用試料 (計 8.0 mL) とした。</p>
前処理法	適宜アセトニトリルで希釈した。
定量条件	<p>装置 (HPLC): L-7000 システム 日立製作所製 データ処理装置: D-7000 日立製作所製 カラム: L-column ODS (5μm, 4.6mm I.D. × 150mm) カラム温度: 40°C 移動相: メタノール: 水 = 90:10 流量: 1.0 mL/min 波長: UV230nm 感度: 1AU/V 注入量: 40.0μL 定量限界: 0.050 mg a.i./L 平均回収率: 0.050 mg a.i./L (91%)、30 mg a.i./L (102%)</p>

3. 試験材料及び方法

項 目		内 容	
試験生物	種(和名・学名・系統)	メダカ(<i>Oryzias latipes</i>)	
	入手先	自家繁殖	
	大きさ(全長、体重)・月齢	全長: 2.5 cm (2.3~2.6 cm), n=20 体重: 0.12 g (0.10~0.15 g), n=20 齢: 成魚	
	対照物質への感受性 (LC ₅₀) (対照物質名)	96 時間 LC ₅₀ : 0.99 mg/L 硫酸銅(Ⅱ)五水和物(関東化学(株)製 試薬特級)	
じゅん化	じゅん化期間	12日間以上	
	飼育水の種類	脱塩素水道水	
	じゅん化前の薬浴の有無	薬浴せず	
	じゅん化方式(止水、半止水、流水等)	流水循環濾過式	
	環境条件(水温、明暗周期)	23±2°C、16 時間明/8 時間暗	
	餌料(種類・量・頻度等)	テトラミン®・体重の約 2%/日	
試験条件	試験容器		5 L 容ガラス製栓付ビン
	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	50 mg (CaCO ₃)/L
		pH	7.6
	暴露期間		2009年3月2日~2009年3月6日
	試験濃度(設定値)		1.0, 1.5, 2.2および3.2 mg a.i./L 公比: 1.5(= $\sqrt[3]{10}$)
	供試数		10尾/試験容器
	試験溶液量		約5.6~5.8 L/試験容器
	助剤	助剤の有無	有
		種類	N,N-ジメチルホルムアミド(DMF)
		濃度	100 μL/L
	試験方式(止水、半止水、流水等)		半止水、密閉系
	換水又は流水条件		24時間換水
	水温		23±2°C
	溶存酸素濃度(DO)		7.0~8.4 mg/L
明暗周期		16時間明/8時間暗	
結果の算出 方法	LC ₅₀	Moving average法	

4. 試験結果及び考察

項目	内容
毒性値	96h-LC ₅₀ = 2.6 mg a.i./L
試験濃度	実測値
考察及び特記事項	<ul style="list-style-type: none"> ・被験物質が揮発性を有したため、試験容器を試験液で満たした密閉容器を使用した。 ・その際、被験物質を希釈水に直接添加する方法では、秤量精度の観点から低濃度区の試験液の調製が困難であったため、助剤としてDMFを用いて試験原液を調製することとした。 ・試験液中の被験物質濃度は測定濃度の平均値を採用した。 ・試験の有効性については基準値を満たしており、本試験はガイドラインに準じて適切に行われたと判断した。

5. 魚類の濃度-死亡率曲線

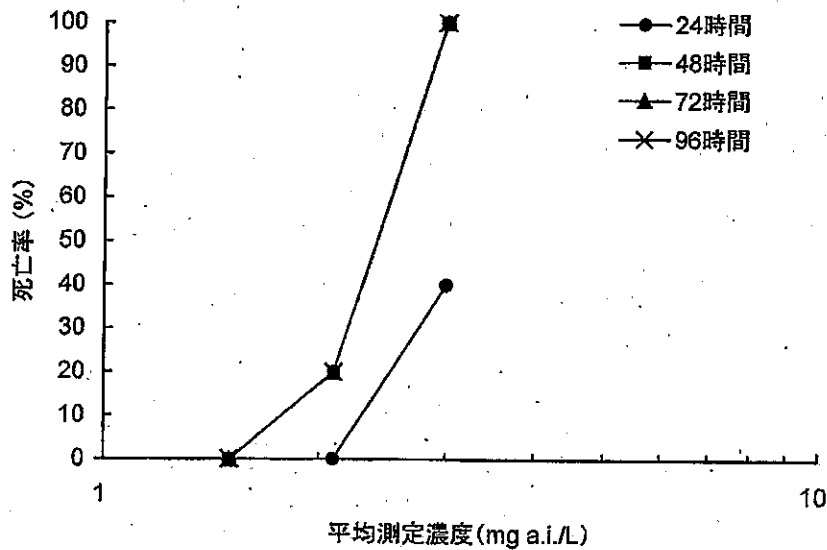


表 1. 2, 5-ジメチルヘキサ-2, 4-ジエンの試験液中濃度

設定濃度 (mg a.i./L)	測定濃度 (mg a.i./L)				平均値
	0 時間	24 時間	72 時間	96 時間	
	新	旧	新	旧	
無処理対照区	<0.050	<0.050	<0.050	<0.050	—
助剤対照区	<0.050	<0.050	<0.050	<0.050	—
1.0	0.93 [93]	0.95 [95]	0.99 [99]	0.99 [99]	0.97 [97]
1.5	1.5 [100]	1.4 [93]	1.5 [100]	1.5 [100]	1.5 [100]
2.2	1.9 [86]	1.9 [86]	2.2 [100]	2.2 [100]	2.1 [95]
3.2	3.1 [97]	3.1 [97]	— [—]	— [—]	3.1 [97]

新: 調製時

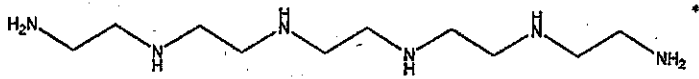
旧: 調製 24 時間後

[]: 設定濃度に対する割合 (%)

—: 全個体死亡のため分析せず

藻類生長阻害試験結果報告書

1. 一般的事項

被験物質の名称	ペンタエチレンヘキサミン ^{*1}		
別名	(略称：PEHA) ^{*2}		
CAS番号	4067-16-7 ^{*1}		
構造式又は示性式			
分子量	232.376 ^{*3}		
試験に供した物質の純度(%)	83.5 (with HClO ₄)		
試験に供した物質のロット番号	08124MD		
不純物の名称及び含有率	—		
蒸気圧	—		
対水溶解度	—		
1-オクタノール/水分配係数	—		
融点	—		
沸点	—		
常温における性状	黄色粘性液体		
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
	—	—	—

上記内容は Sigma-Aldrich Corporation 提供資料による。ただし * の内容は以下の通り。

*1 環境省提供資料による。

*2 当施設にて決定。

*3 JSTの有機化合物辞書DB「日本化学物質辞書」検索サービス (<http://nikkajweb.jst.go.jp>) による。

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質量分析 (LC/MS) 法
前処理法	<p>暴露開始時</p> <p>分析用に用意した試験液を培地で 0.05 mg/L または 0.2 mg/L 付近に適宜希釈し、下記の方法で 400 倍または 100 倍濃縮して分析した。</p> <p>800 mL (対照区, 濃度区 1 および濃度区 2) または 200 mL (濃度区 3~6) 採取</p> <p>←試験液の 1/50 容の 0.5 mol/L ヘプタフルオロ酪酸を添加 エムポアディスク C18, 47 mm (予めアセトン約 5 mL, 精製水約 50 mL でコンディショニングしたもの) に減圧下で通水 (通過液は廃棄)</p> <p>↓</p> <p>アセトン 20 mL で溶出</p> <p>↓</p> <p>ロータリーエバポレータ^{*1}で濃縮・乾固 (浴温約 45°C)</p> <p>↓</p> <p>精製水 2 mL に溶解</p> <p>↓</p> <p>0.3 mL 採取 (適宜希釈^{*2})</p> <p>←0.5 mol/L ヘプタフルオロ酪酸 0.3 mL 添加 混合</p> <p>↓</p> <p>分析試料</p> <p>↓</p> <p>LC/MS測定</p> <p>^{*1}: 柴田科学機械工業製 RE-111型 ヤマト科学製 RE-400型</p> <p>^{*2}: 濃縮操作後, 検量線範囲を超えると予想されるものは精製水で希釈</p> <p>暴露開始後 72時間</p> <p>分析試料採取用容器から試験培養液を採取</p> <p>↓</p> <p>遠心分離^{*1}</p> <p>↓</p> <p>上澄み採取</p> <p>↓</p> <p>必要に応じて培地を添加し適宜希釈</p> <p>↓</p> <p>800 mL (対照区および濃度区 3) または 200 mL (濃度区 4~6) 採取</p> <p>←試験培養液の 1/50 容の 0.5 mol/L ヘプタフルオロ酪酸を添加</p>

	<p>エムポアディスク C18, 47 mm (予めアセトン約 5 mL, 精製水約 50 mL でコンディショニングしたもの) に減圧下で通水 (通過液は廃棄)</p> <p> </p> <p>アセトン 20 mL で溶出</p> <p> </p> <p>ロータリーエバポレータ*2 で濃縮・乾固 (浴温約 45°C)</p> <p> </p> <p>精製水 2 mL に溶解</p> <p> </p> <p>0.3 mL 採取 (適宜希釈*3)</p> <p> ←0.5 mol/L ヘプタフルオロ酪酸 0.3 mL 添加</p> <p>混合</p> <p> </p> <p>分析試料</p> <p> </p> <p>LC/MS測定</p> <p>*1 : 3000 rpm, 10 分間, 装置 : 日立工機製 CR21E 型</p> <p>*2 : 柴田科学機械工業製 RE-111 型 ヤマト科学製 RE-400型</p> <p>*3 : 濃縮操作後, 検量線範囲を超えると予想されるものは精製水で希釈</p>
定量条件	別紙-1 参照

3. 試験材料及び方法

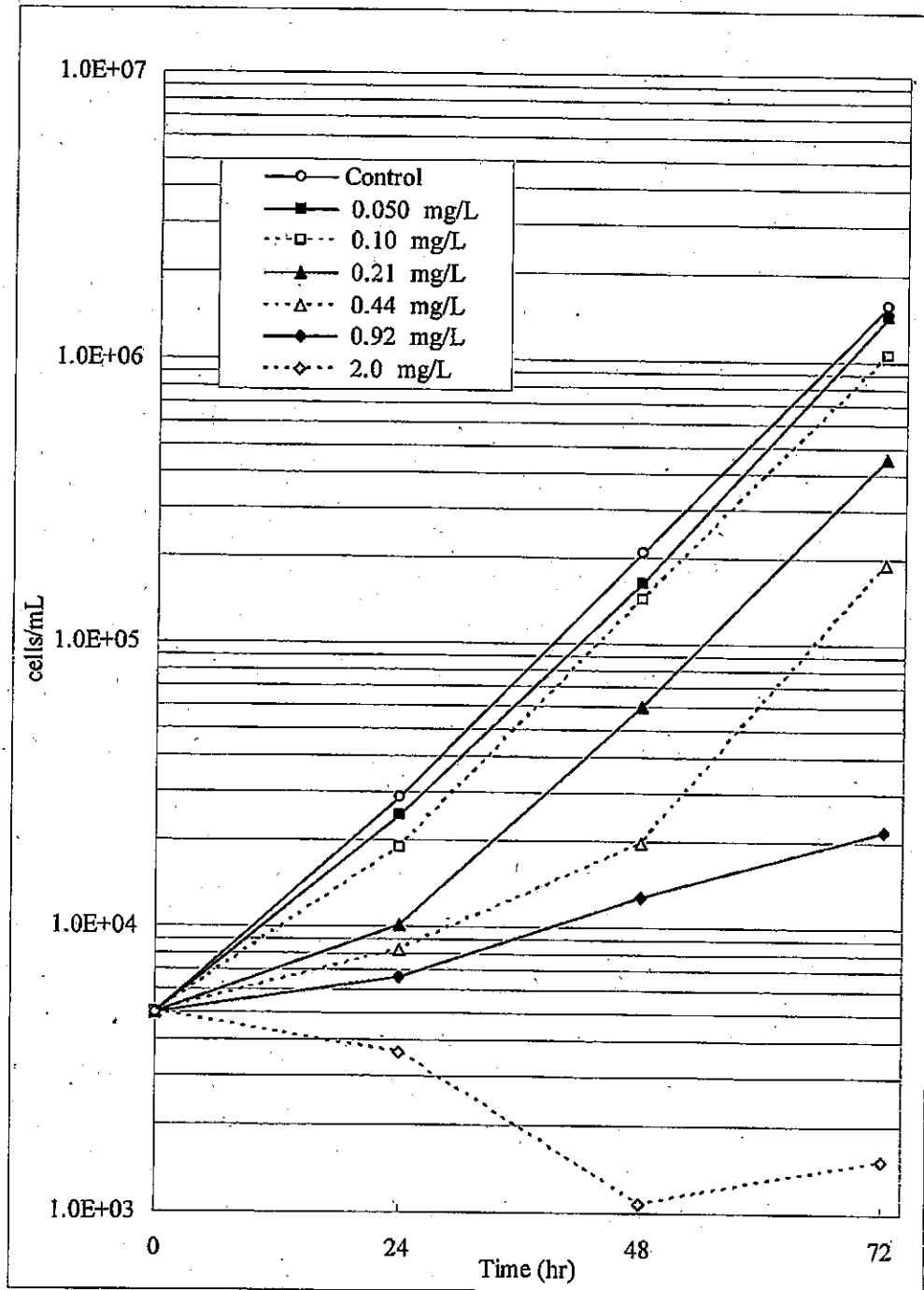
項 目		内 容	
試験生物	種 (学名・株名)	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> ATCC22662	
	入手先	American Type Culture Collection	
	対照物質への感受性 (EC50) (対照物質名)	72時間 ErC50 = 0.823 ± 0.0871 mg/L, n=18 重クロム酸カリウム, 試薬特級	
前培養	前培養の期間	2009年 3月13日 ~ 2009年 3月16日	
	培地名	試験ガイドライン推奨培地	
	環境条件 (水温, 光強度)	22°C, 65~75 μE/m ² /s	
試験条件	試験容器	300 mLガラス製三角フラスコ (IWAKI製) (通気性シリコン栓付)	
	培地名	試験ガイドライン推奨培地	
	暴露期間	2009年 3月16日~2009年 3月19日	
	試験濃度 (設定値)	対照区, 0.050, 0.10, 0.21, 0.44, 0.92, 2.0 mg/L 公比: 2.1	
	初期細胞濃度	5×10 ³ cells / mL	
	連数	試験濃度区	3 容器
		対照区	6 容器
	試験溶液量	100 mL/容器	
	助剤	助剤の有無	無
		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)	止水式 (開放系), 振とう培養 (100 rpm)	
	水温または培養温度	22°C (暴露期間中の変動範囲は±2°C以内)	
照明 (光強度, 時間等)	65~75 μE/m ² /s 白色蛍光灯で連続照射 (液面付近)		
結果の 算出方法	速度法	ErC50(0-72h) : 直線回帰分析 NOECr(0-72h) : Williamsの多重比較検定	

4. 試験結果及び考察

項目	内容
毒性値	<p>暴露開始時の測定値により算出した結果</p> <p>ErC50(0-72h) : 0.508 mg/L (95%信頼区間：算出不可)</p> <p>NOECr(0-72h) : 0.0863 mg/L</p> <p>〔純度換算値〕</p> <p>ErC50(0-72h) : 0.424 mg/L (95%信頼区間：算出不可)</p> <p>NOECr(0-72h) : 0.0721 mg/L</p>
試験濃度	1. 設定値 ②. 実測値
考察及び特記事項	<p>暴露開始時の被験物質濃度は、全ての濃度区において設定値の80%以上であった。暴露開始後72時間では、0.050および0.10 mg/L濃度区（濃度区1および2）は分析しなかった。また、21 mg/L濃度区（濃度区3）が0.030 mg/L（検出限界）未満、0.44および0.92 mg/L濃度区（濃度区4および5）が、それぞれ0.112および0.317 mg/Lであり、被験物質濃度の減少が認められた。一方、2.0 mg/L濃度区（濃度区6）は、2.03 mg/Lであり、暴露期間中、濃度を維持した。主な減少理由としては、試験培養液中で正に荷電している被験物質の負に荷電している藻類への吸着が推察された。</p> <p>上記毒性値の算出には、暴露開始時の測定値を用いた。また、時間加重平均値により算出した結果、ErC50(0-72h)=0.300 mg/L (95%信頼区間：算出不可)であり、純度換算値では、ErC50(0-72h)=0.251 mg/L (95%信頼区間：算出不可)であった。</p>

5. 藻類の生長曲線および濃度-生長阻害率曲線

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



Value in legend is given in the nominal concentration.

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

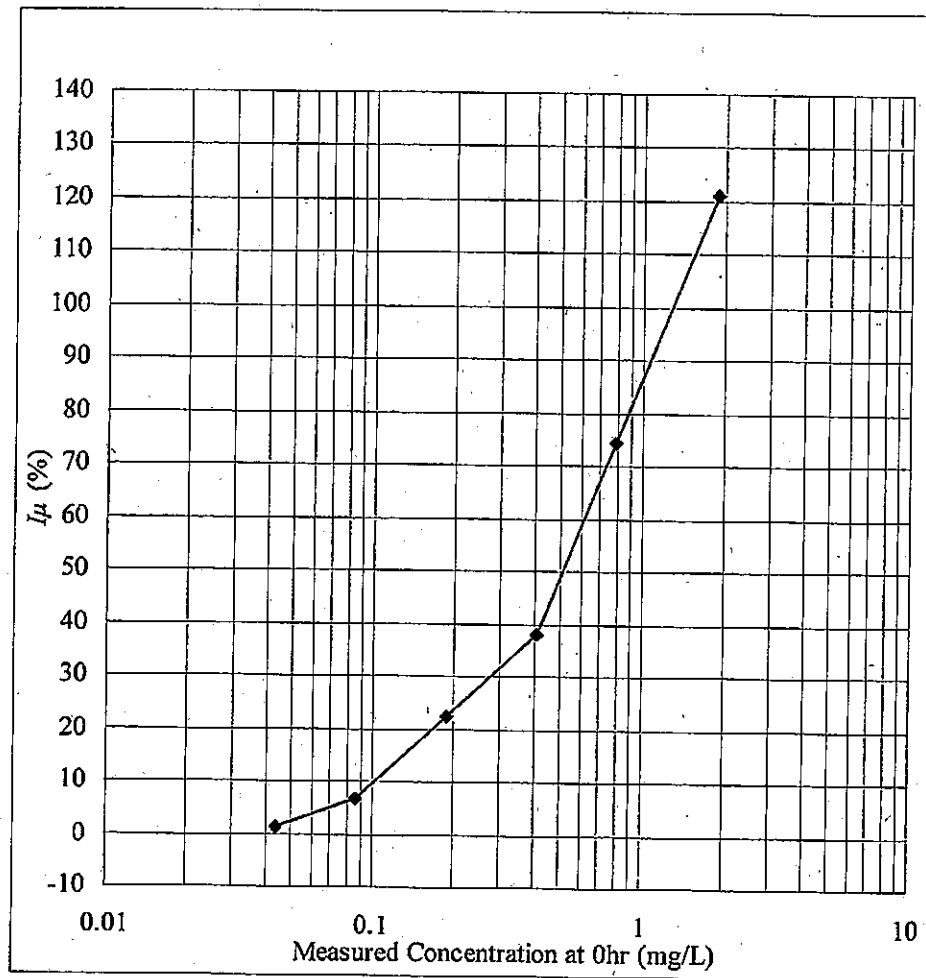


Table 4 Measured Concentration of the Test Substance in Test Cultures

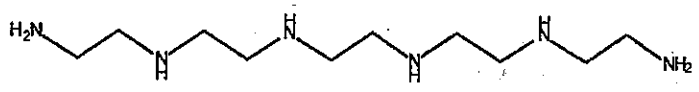
Test Group	Nominal Concentration (mg/L)	Measured Concentration (mg/L) (Percent of Nominal)		Mean ^a Measured Concentration (mg/L) (Percent of Nominal)
		0 Hour	72 Hours	
Control	--	<0.03	<0.03	---
Conc.1	0.050	0.0434	--*	---
		(87)	--	---
Conc.2	0.10	0.0863	--*	---
		(86)	--	---
Conc.3	0.21	0.188	<0.03	---
		(90)	--	---
Conc.4	0.44	0.406	0.112	0.228
		(92)	(25)	(52)
Conc.5	0.92	0.795	0.317	0.520
		(86)	(34)	(57)
Conc.6	2.0	1.87	2.03	1.95
		(94)	(102)	(98)

a : Time weighted mean

* : Not analyzed

ミジンコ急性遊泳阻害試験結果報告書

1. 一般的事項

被験物質の名称	ペンタエチレンヘキサミン ^{*1}		
別名	(略称：PEHA ^{*2})		
CAS番号	4067-16-7 ^{*1}		
構造式又は示性式	 ^{*3}		
分子量	232.376 ^{*3}		
試験に供した物質の純度(%)	83.5 (with HClO ₄)		
試験に供した物質のロット番号	08124MD		
不純物の名称及び含有率	—		
蒸気圧	—		
対水溶解度	—		
1-オクタノール/水分配係数	—		
融点	—		
沸点	—		
常温における性状	黄色粘性液体		
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
	—	—	—

上記内容は Sigma-Aldrich Corporation 提供資料による。ただし * の内容は以下の通り。

*1 環境省提供資料による。

*2 株式会社三菱化学安全科学研究所にて決定。

*3 JSTの有機化合物辞書DB「日本化学物質辞書」検索サービス
(<http://nikkajweb.jst.go.jp>) による。

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質量分析 (LC/MS) 法
前処理法	<p>試験液を以下のいずれかの方法で分析した。</p> <p>①試験濃度 (測定値) が 8.00 mg/L 以上になると予想された場合 (濃縮操作なし)</p> <p>試験液 0.3 mL 採取 ←0.5 mol/L ヘプタフルオロ酪酸 0.3 mL 添加 混合 LC/MS測定</p> <p>②試験濃度 (測定値) が 8.00 mg/L 未満になると予想された場合 (濃縮操作あり)</p> <p>試験液 9~100 mL 採取 2個連結した Sep-Pak plus Accell CM (予めメタノール約 5 mL, 精製水*1 約 5 mL でコンディショニングしたもの) に減圧下で通水 (通過液は廃棄) 2%ギ酸水溶液 2.5~5 mL で溶出 0.3 mL 採取 (適宜希釈*2) ←0.5 mol/L ヘプタフルオロ酪酸 0.3 mL 添加 混合 LC/MS測定</p> <p>*1: JIS K0557 A4 グレードの水 *2: 濃縮操作後, 検量線範囲を超えると予想されたものは精製水で希釈</p>
定量条件	別紙-1 参照

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)	オオミジンコ (<i>Daphnia magna</i> ・24 時間以内齢)	
	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)	
	対照物質への感受性 (EC50) (対照物質名)	48 時間 EC50=0.74±0.13 mg/L, n=21 重カルシウム酸カリウム, 試薬特級	
飼育	飼育水の種類	Elendt M4 medium (OECD Guideline for Testing of Chemicals 202 (2004) “ <i>Daphnia</i> sp., Acute Immobilisation Test” に記載されている調製水) で飼育後, 脱塩素水道水で 48 時間以上飼育	
	環境条件 (水温, 明暗周期)	20±1 °C 16 時間明 (800 lux以下) / 8 時間暗	
試験条件	試験容器		100 mL ガラス製ビーカー (蓋：テフロンシート)
	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 CaCO ₃ /L 以下
		pH	調整なし：対照区, 濃度区 1～5 (変動は 1.5 未満) 調整あり：濃度区 6～10, pHを対照区と同等に調整 (6.0～9.0, 変動は1.5未満)
	暴露期間		2008 年 11 月 26 日～2008 年 11 月 28 日
	試験濃度 (設定値)		pH調整なし：対照区, 1.5, 2.9, 5.5, 10, 20 mg/L (公比 1.9) pH調整あり：1.5, 2.9, 5.5, 10, 20 mg/L (公比 1.9)
	供試数		20 頭/試験区
	連数	試験濃度区	4 容器
		対照区	4 容器
	試験溶液量		100 mL/容器
	助剤	助剤の有無	無
		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±1 °C	
溶存酸素濃度 (DO)		3 mg/L 以上	
明暗周期		16 時間明 (800 lux以下) / 8 時間暗	

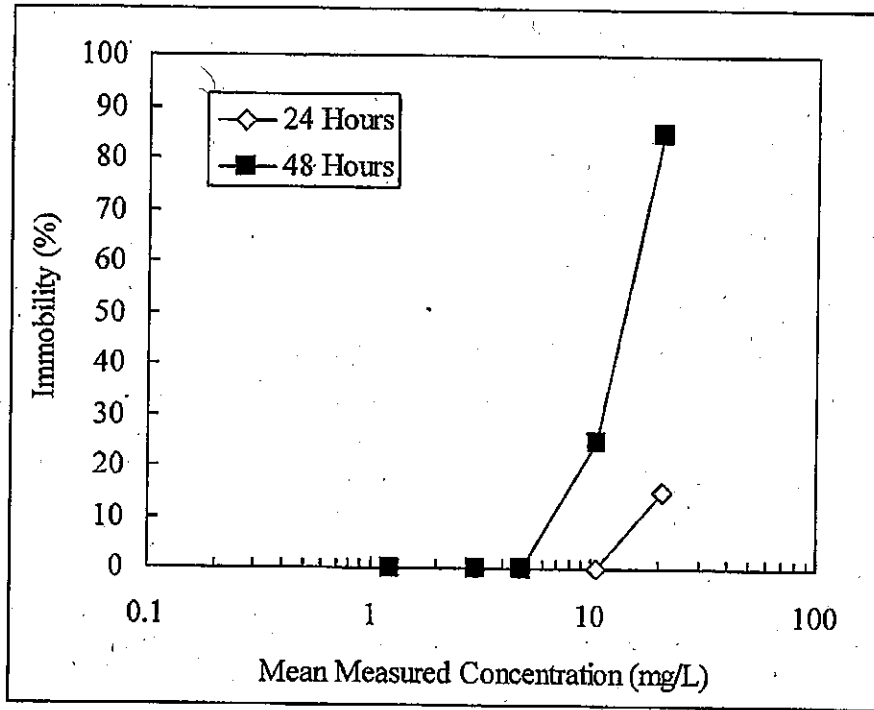
結果の算出方法	EC50	pH調整なし：Probit法 (Probit法, Moving average法, Binomial法での算出結果から適切と判断されたものを採用) pH調整あり：Binomial法 (Probit法, Moving average法, Binomial法での算出結果から適切と判断されたものを採用)
---------	------	--

4. 試験結果及び考察

項目	内容
毒性値	pH調整なし：48hEC50 = 13.8 mg/L [純度換算値：11.5 mg/L] pH調整あり：48hEC50 = 9.57 mg/L [純度換算値：7.99 mg/L]
試験濃度	1. 設定値 (2.) 実測値
考察及び特記事項	被験物質に起因するpHの変動が予測されたため、pHを調整する試験区も設けた。また、純度による被験物質濃度の補正を行わず試験を実施し、それで得られた結果と、その結果を純度換算した結果とを合わせて記載した。

5. ミジンの濃度-遊泳阻害率曲線

1) 濃度区1~5 (pH調整なし) :



2) 濃度区6~10 (pH調整あり) :

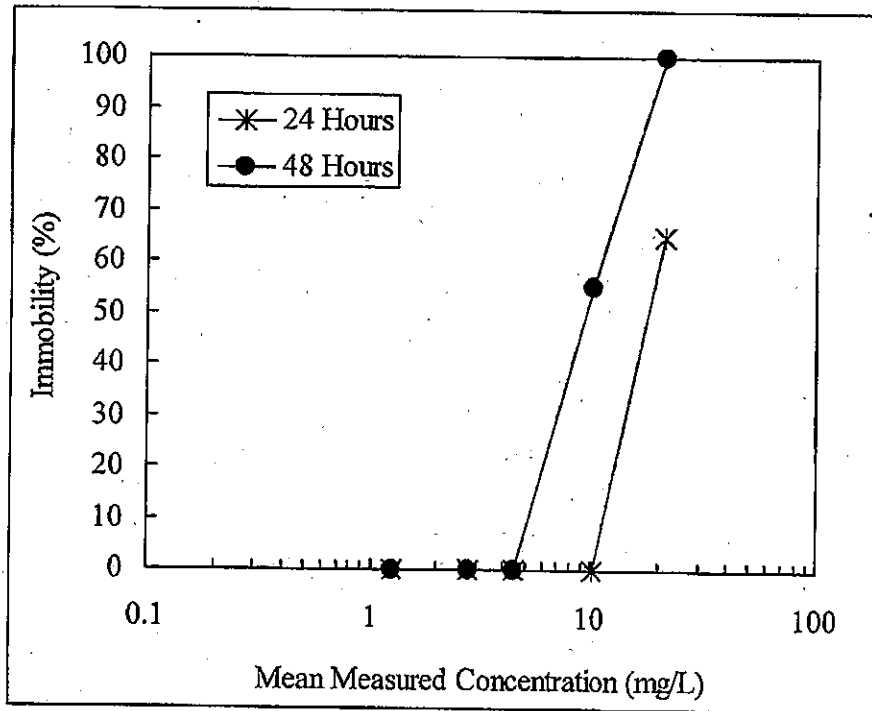


Table 5 Measured Concentrations of the Test Substance in Test Solutions

(Static Condition)

Test Group	Nominal Concentration (mg/L)	Measured Concentration (mg/L)		
		0 Hour New	48 Hours Old	Mean ^a
		(Percent of Nominal, %)		
Control	--	<0.5	<0.5	--
Conc.1	1.5	1.24 (83)	1.22 (81)	1.23 (82)
Conc.2	2.9	3.10 (107)	2.91 (100)	3.00 (103)
Conc.3	5.5	5.12 (93)	4.62 (84)	4.87 (89)
Conc.4	10	9.65 (97)	11.4 (114)	10.5 (105)
Conc.5	20	19.5 (98)	22.1 (111)	20.8 (104)
Conc.6	1.5	1.21 (81)	1.29 (86)	1.25 (83)
Conc.7	2.9	2.90 (100)	2.63 (91)	2.76 (95)
Conc.8	5.5	4.43 (81)	4.45 (81)	4.44 (81)
Conc.9	10	9.19 (92)	11.1 (111)	10.1 (101)
Conc.10	20	20.0 (100)	22.6 (113)	21.3 (107)

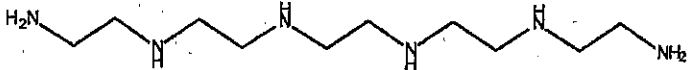
a: Time-weighted mean

New: New test water freshly prepared

Old: Old test water at the end of the exposure

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	ペンタエチレンヘキサミン ^{*1}		
別名	(略称：PEHA ^{*2})		
CAS番号	4067-16-7 ^{*1}		
構造式又は示性式			
分子量	232.376 ^{*3}		
試験に供した物質の純度(%)	83.5 (with HClO ₄)		
試験に供した物質のロット番号	08124MD		
不純物の名称及び含有率	—		
蒸気圧	—		
対水溶解度	—		
1-オクタノール/水分配係数	—		
融点	—		
沸点	—		
常温における性状	黄色粘性液体		
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
	—	—	—

上記内容はSigma-Aldrich Corporation 提供資料による。ただし *の内容は以下の通り。

*1 環境省提供資料による。

*2 株式会社三菱化学安全科学研究所にて決定。

*3 JSTの有機化合物辞書DB「日本化学物質辞書」検索サービス (<http://nikkajweb.jst.go.jp>) による。

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質量分析 (LC/MS) 法
前処理法	試験液を以下の方法で分析した。 試験液 (適宜希釈*) 0.3 mL 採取 ←0.5 mol/L ヘプタフルオロ酪酸 0.3 mL 添加 混合 LC/MS測定 *1: 検量線範囲を超えると予想されたものは精製水で希釈
定量条件	別紙-1 参照

3. 試験材料及び方法

項 目		内 容	
試験生物	種 (和名・学名・系統)	ヒメダカ (<i>Oryzias latipes</i>)	
	入手先	北村養鯉場 (熊本県八代市郡築 12 番町 388 番地)	
	大きさ (体長, 体重) ・月齢	全長: 2.97 cm (2.58~3.52* cm), n=10 *: 1 尾のみ推奨全長を超えたが, 試験結果には影響を及ぼさないと判断した。 体重: 0.205 g (0.113~0.406 g), n=10 年齢: 孵化後 1 年以内	
	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) = 0.35 mg/L (無水物換算値) 硫酸銅 (II) 五水和物	
じゅん化	じゅん化期間	2008 年 11 月 28 日 ~ 2008 年 12 月 15 日	
	飼育水の種類	脱塩素水道水	
	じゅん化前の薬浴の有無	有 (塩事業センター製 食塩)	
	じゅん化方式 (止水, 半止水, 流水等)	流水式 (供試魚 1 g あたり 1 L / 日 以上)	
	環境条件 (水温, 明暗周期)	24 ± 1°C 16 時間明 (1000 lux 以下) / 8 時間暗	
	飼料 (種類・量・頻度等)	テトラ社製 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	5 L ガラス製水槽 (蓋: 透明塩ビ板)	
	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	52 mg CaCO ₃ /L
		pH	7.5
	暴露期間	2008 年 12 月 15 日 ~ 2008 年 12 月 19 日	
	試験濃度 (設定値)	pH 調整無し: 対照区, 200, 420, 890, 1900, 4000 mg/L (公比 2.1) pH 調整有り: 20, 42, 89, 190, 400 mg/L (公比 2.1)	
	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, 流水等)	半止水式	
	換水又は流水条件	48 時間後に試験液の全量を交換	
	水温	24 ± 1°C	
溶存酸素濃度 (DO)	飽和酸素濃度の 60% 以上		
明暗周期	16 時間明 (1000 lux 以下) / 8 時間暗		

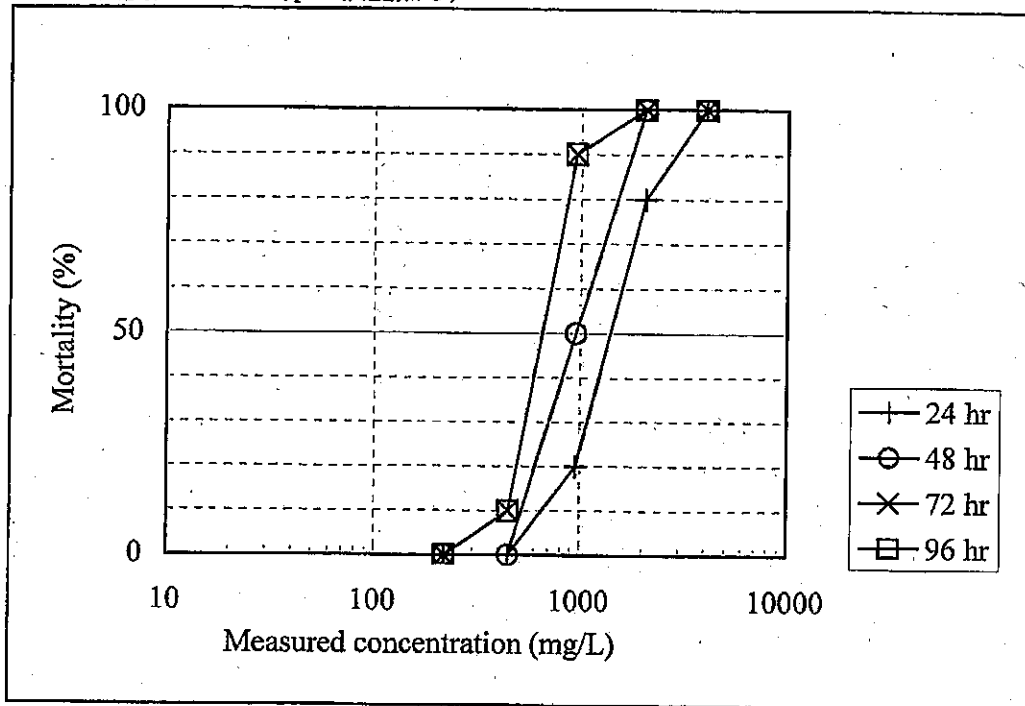
結果の 算出方法	LC50	pH調整無し：Probit法 pH調整有り：Probit法 (Probit法, Moving average法, Binomial法での算出 結果から適切と判断されたものを採用)
-------------	------	--

4. 試験結果及び考察

項目	内容
毒性値	pH調整無し：96hLC50 = 653 mg/L [純度換算値：545 mg/L] pH調整有り：96hLC50 = 254 mg/L [純度換算値：212 mg/L]
試験濃度	1. 設定値 ②. 実測値
考察及び 特記事項	被験物質に起因するpHの変動が予測されたため、pHを調整しない通常の試験に加え、pHを調整する試験も実施し、両条件下で毒性を評価した。試験液のpHは7.4~10.9であり、濃度区1~5 (pH調整無し) では被験物質に起因したpHの変動が認められ、濃度区6~10 (pH調整有り) では対照区と同等のpHであった。 また、純度による被験物質濃度の補正を行わず試験を実施し、それで得られた結果と、その結果を元に純度換算した値とを合わせて記載した。

5. 魚類の濃度-死亡率曲線

1) 濃度区1~5 (pH調整無し)



2) 濃度区6~10 (pH調整有り)

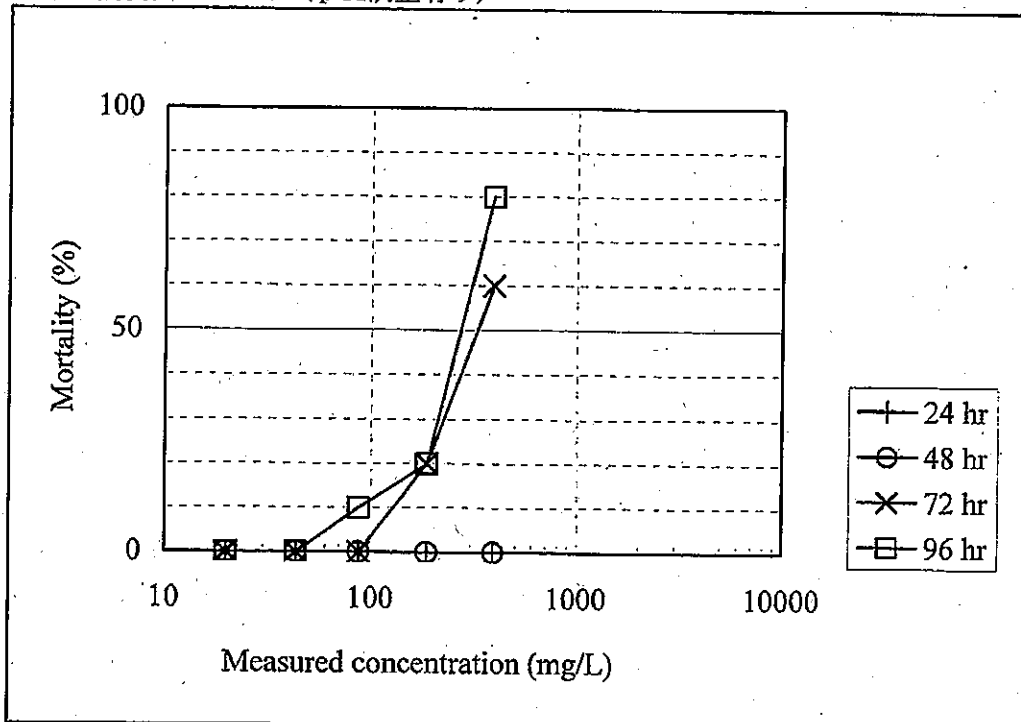


Table 5 Measured Concentrations of the Test Substance in Test Water

Test group	Nominal conc. (mg/L)	Measured concentration (mg/L)						
		0 hr	24 hr	48 hr		72 hr	96 hr	Mean
				Old	New			
Control		<4		<4	<4		<4	
Conc.1	200	215		225 (105%)	207		232 (112%)	220 [110%]
Conc.2	420	438		443 (101%)	452		457 (101%)	447 [106%]
Conc.3	890	906		1010 (111%)	927		978 (106%)	955 [107%]
Conc.4	1900	2030		2100 (103%)	--		--	2060 [108%]
Conc.5	4000	4030	4050 (100%)	--	--		--	4040 [101%]
Conc.6	20	17.6		20.2 (115%)	20.6		21.6 (105%)	20.0 [100%]
Conc.7	42	38.2		47.1 (123%)	42.9		46.0 (107%)	43.5 [104%]
Conc.8	89	76.4		87.7 (115%)	91.8		93.4 (102%)	87.3 [98%]
Conc.9	190	167		183 (110%)	197		198 (101%)	186 [98%]
Conc.10	400	350		392 (112%)	392		423 (108%)	389 [97%]

New: New test water freshly prepared

Old: Old test water immediately prior to renewal

(): Percent of initial concentration, 0hr or 48hr New

Mean: Time weighted mean

[]: Percent of Nominal

--: Not measured because all fish were dead.