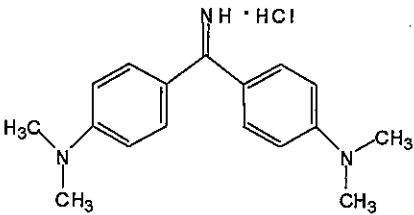


藻類生長阻害試験結果報告書

1. 一般的事項

新規化学物質等の名称 (IUPAC 命名法による)	ベイシック エロー-2		
別 名	p-オーラミン 塩酸テトラメチルジアミノベンゾフェノンイミド		
C A S 番 号	2465-27-2		
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	303.84		
試験に供した新規 化学物質の純度 (%)	94.0 % (無水物換算 88.7 %)		
試験に供した新規 化学物質のロット番号	Z5M7906		
不純物の名称及び含有率	不明		
蒸 気 圧	1.29×10^{-6} mm Hg (25°C)		
対 水 溶 解 度	1×10^4 mg/L		
1-オクタノール/水分配係数	2.98		
融 点	267°C		
沸 点	不明		
常温における性状	黄色～黄金色のりん片状結晶または粉末		
安 定 性	常温で安定		
溶媒に対する溶解度等	溶媒	溶解度	溶媒中の安定性
	エタノール	解け難い	不明

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>ベイスック エロー-2 の試験溶液の一定量を、UV-VIS 検出器を備えた高速液体クロマトグラフ (HPLC) に注入し、クロマトグラムと同時にピーク面積 (カウント数) をデータ処理装置から求める。このピーク面積を用い、標準液の検量線から試験溶液中の被験物質の濃度を求める。</p> <p>[分析手順]</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 定量条件で HPLC を作動し、装置を安定させる。 2. 検量線を作成する。 3. 前処理を行った試験溶液を HPLC に注入してクロマトグラムと同時にピーク面積を得る。 4. 検量線により濃度を求め、希釈率を補正し、試験溶液の被験物質濃度を算出する。
前処理法	<p>試験液分析の前処理：</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 試験液中に薬体がある場合には遠心により除去する。 2. 試験溶液を正確に量りとり、同量の溶離液を加えて混合する。 3. 0.01 mg/L 未満の試験溶液はジクロロメタンで抽出し、ロータリーエバポレーターで減圧濃縮を行った後測定する。
定量条件	<p>分析に用いた機器：</p> <p>高速液体クロマトグラフ (LC10AD 型 島津製作所) UV-VIS 検出器 (SPD-10A 型 島津製作所)</p> <p>測定条件：</p> <p>分離カラム : L-column, 250×4.6φ 恒温槽温度 : 40℃ 溶離液 : アセトニトリル/0.05 N NaCl/酢酸：純水(1:1)=6/2/2 流量 : 0.8 mL/min 検出波長 : 可視 435 nm 注入量 : 50 μL</p>

3. 試験材料及び方法

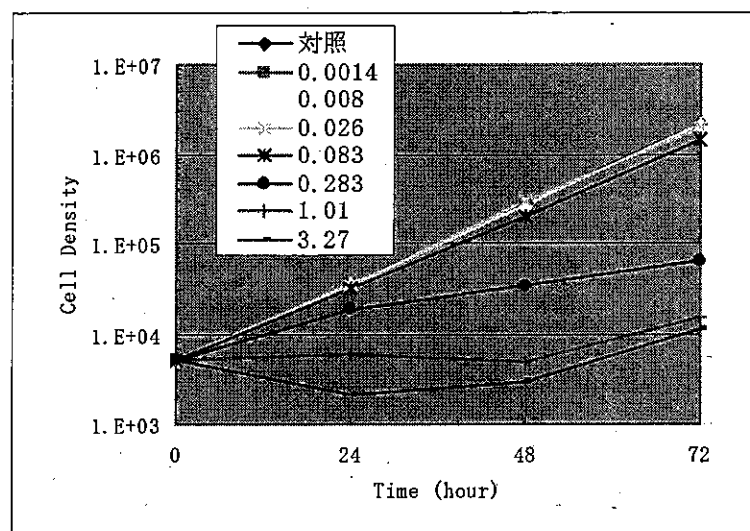
項目		内容	
試験生物	種 (学名・株名)	学名 : <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> 株名 : ATCC 22662 株	
	入手先	American Type Culture Collection	
	対照物質への感受性 (EC ₅₀) (対照物質名)	1.06 mg/L (E _r C ₅₀) (これまでの値 E _r C ₅₀ mean=0.88 mg/L, S.D. = 0.04, n=4) 重クロム酸カリウム、試薬特級	
前培養	前培養の期間	2006年1月28日~2006年1月31日	
	培地名	OECD 培地	
	環境条件 (温度、光強度)	23±2°C、60~120 μE/m ² /s	
試験条件	試験容器	300 mL 容ガラス製三角フラスコ シリコン栓付き	
	培地名	OECD 培地	
	暴露期間	2006年1月31日~2006年2月3日	
	試験濃度 (設定値)	対照区, 0.0032, 0.010, 0.032, 0.10, 0.32, 1.0, 3.2 mg/L (公比3.2)	
	初期細胞濃度	0.5 × 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/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 (100 rpm)	
	水温又は培養温度	培養温度 : 23.0~23.2°C	
照明 (光強度・時間等)	平均 69 (66~78) μE/m ² /s・連続照射		
結果の算出 方法	速度法	Logit 法、Dunnett 法	
	面積法	Logit 法、Dunnett 法	

4. 試験結果及び考察

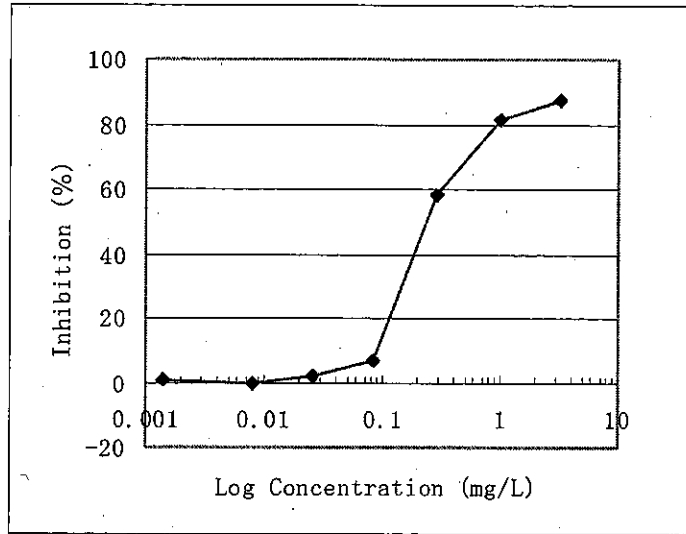
項目	内容
毒性値	$0-72hE_{1/2}C_{50} = 0.34 \text{ mg/L}$
	$0-72hE_bC_{50} = 0.093 \text{ mg/L}$
	NOEC (速度法) = 0.026 mg/L
	NOEC (面積法) = 0.026 mg/L
試験濃度	1. 設定値 2. 実測値
考察及び特記事項	<p>被験物質の水溶解性が高く、溶解限度については、試験温度における 48 時間のフラスコ攪拌法により、100 mg/L が十分に溶解することを目視、ならびに HPLC 分析により確認した。</p> <p>試験時は、濃厚な試験原液を調製し、その所定量を試験培地に添加することにより各濃度の試験溶液を調製した。暴露期間中において、被験物質の濃度減少が推察されたため、48 時間目にも分析を追加し、測定値の時間加重平均値を採用した。なお、藻体への被験物質の吸着が認められたため、藻体を添加しないフラスコを追加して分析した値を採用した。</p> <p>試験の有効性については、テストガイドラインから逸脱した点もなく、試験の有効性基準を満たしたことから、有効であると判断した。</p>

5. 藻類生長曲線及び濃度－生長阻害率曲線

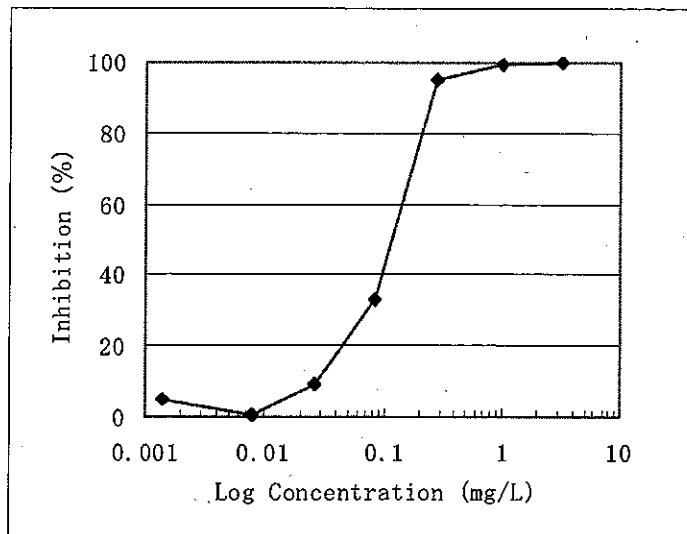
藻類の生長曲線



被験物質濃度—生長阻害率曲線（速度法）

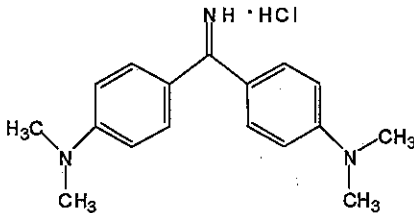


被験物質濃度—生長阻害率曲線（面積法）



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)	ベイシック エロー-2		
別 名	p-オーラミン 塩酸テトラメチルジアミノベンゾフェノンイミド		
C A S 番 号	2465-27-2		
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	303.84		
試験に供した新規 化学物質の純度 (%)	94.0 % (無水物換算 88.7 %)		
試験に供した新規 化学物質のロット番号	Z5M7906		
不純物の名称及び含有率	不明		
蒸 気 圧	1.29×10^{-6} mm Hg (25°C)		
対 水 溶 解 度	1×10^4 mg/L		
1-オクタノール/水分配係数	2.98		
融 点	267°C		
沸 点	不明		
常温における性状	黄色～黄金色のりん片状結晶または粉末		
安 定 性	常温で安定		
溶媒に対する溶解度等	溶媒	溶解度	溶媒中の安定性
	エタノール	解け難い	不明

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>ベシック エロー-2の試験溶液の一定量を、UV-VIS 検出器を備えた高速液体クロマトグラフ (HPLC) に注入し、クロマトグラムと同時にピーク面積 (カウント数) をデータ処理装置から求める。このピーク面積を用い、標準液の検量線から試験溶液中の被験物質の濃度を求める。</p> <p>[分析手順]</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 定量条件で HPLC を作動し、装置を安定させる。 2. 検量線を作成する。 3. 前処理を行った試験溶液を HPLC に注入してクロマトグラムと同時にピーク面積を得る。 4. 検量線により濃度を求め、希釈率を補正し、試験溶液の被験物質濃度を算出する。
前処理法	<p>試験液分析の前処理：</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 試験溶液を正確に量りとり、同量の溶離液を加えて混合する。
定量条件	<p>分析に用いた機器：</p> <p>高速液体クロマトグラフ (LC10AD 型 島津製作所)</p> <p>UV-VIS 検出器 (SPD-10A 型 島津製作所)</p> <p>測定条件：</p> <p>分離カラム : L-column, 250×4.6φ</p> <p>恒温槽温度 : 40℃</p> <p>溶離液 : アセトニトリル/0.05 N NaCl/酢酸:純水 (1:1)=6/2/2</p> <p>流量 : 0.8 mL/min</p> <p>検出波長 : 可視 435 nm</p> <p>注入量 : 10 μL</p>

3. 試験材料及び方法

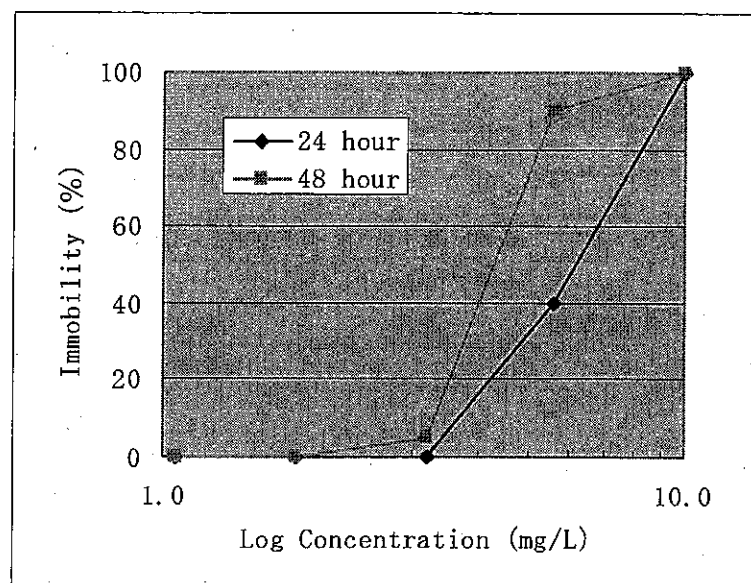
項目		内容	
試験生物	種 (学名・系統・時間齢)	学名 : <i>Daphnia magna</i> 系統 : 当施設で継代飼育 時間齢 : 生後 24 時間以内齢	
	入手先	環境省国立環境研究所	
	対照物質への感受性 (EC ₅₀) (対照物質名)	1.05 mg/L (これまでの EC ₅₀ mean=0.88 mg/L、S.D.=0.22 mg/L、n=15) 重クロム酸カリウム、試薬特級	
飼育	飼育水の種類	Elendt M4 人工調製水	
	環境条件 (水温、明暗周期)	20±1℃、16 時間明/8 時間暗	
試験条件	試験容器		100 mL ガラス製ビーカー
	試験用水	種類	Elendt M4 人工調製水
		硬度	247 mg/L (CaCO ₃ 換算値)
		pH	8.0
	暴露期間		2006 年 1 月 25 日～2006 年 1 月 27 日
	試験濃度 (設定値)		対照区, 1.0, 1.8, 3.2, 5.6, 10 mg/L (公比 1.8)
	供試数		20 頭/試験区
	連数	試験濃度区	4 連
		対照区	4 連
	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		止水式
換水又は流水条件		該当しない	
水温		20.0～20.2℃	
結果の算出 方法	EC ₅₀	Logit 法	

4. 試験結果及び考察

項目	内容
毒性値	48hEC ₅₀ = 4.6 mg/L
試験濃度	1. 設定値 2. 実測値
考察及び特記事項	<p>被験物質の水溶解性が高く、溶解限度については、試験温度における48時間のフラスコ攪拌法により、100 mg/Lが十分に溶解することを目視、ならびにHPLC分析により確認した。</p> <p>試験時は、濃厚な試験原液を調製し、その所定量を試験用水に添加することにより各濃度の試験溶液を調製した。暴露期間中の被験物質濃度の変動の主因は分析の測定誤差によると考えられたため、算術平均値を採用した。</p> <p>試験の有効性については、化審法テストガイドラインから逸脱した点もなく、また試験の有効性基準を満たしたことから、有効であると判断した。</p>

5. ミジンコの濃度-遊泳阻害率曲線

被験物質濃度-遊泳阻害率曲線



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)	ベイシック エロー-2		
別名	p-オーラミン 塩酸テトラメチルジアミノベンゾフェノンイミド		
C A S 番号	2465-27-2		
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)			
分子重量	303.84		
試験に供した新規 化学物質の純度 (%)	94.0 % (無水物換算 88.7 %)		
試験に供した新規 化学物質のロット番号	Z5M7906		
不純物の名称及び含有率	不明		
蒸気圧	1.29×10^{-6} mm Hg (25°C)		
対水溶解度	1×10^4 mg/L		
1-オクタノール/水分配係数	2.98		
融点	267°C		
沸点	不明		
常温における性状	黄色～黄金色のりん片状結晶または粉末		
安定性	常温で安定		
溶媒に対する溶解度等	溶媒	溶解度	溶媒中の安定性
	エタノール	解け難い	不明

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>ベシック エロー-2 の試験溶液の一定量を、UV-VIS 検出器を備えた高速液体クロマトグラフ (HPLC) に注入し、クロマトグラムと同時にピーク面積 (カウント数) をデータ処理装置から求める。このピーク面積を用い、標準液の検量線から試験溶液中の被験物質の濃度を求める。</p> <p>[分析手順]</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 定量条件で HPLC を作動し、装置を安定させる。 2. 検量線を作成する。 3. 前処理を行った試験溶液を HPLC に注入してクロマトグラムと同時にピーク面積を得る。 4. 検量線により濃度を求め、希釈率を補正し、試験溶液の被験物質濃度を算出する。
前処理法	<p>試験液分析の前処理：</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 試験溶液を正確に量りとり、同量の溶離液を加えて混合する。
定量条件	<p>分析に用いた機器：</p> <p>高速液体クロマトグラフ (LC10AD 型 島津製作所)</p> <p>UV-VIS 検出器 (SPD-10A 型 島津製作所)</p> <p>測定条件：</p> <p>分離カラム : L-column, 250×4.6φ</p> <p>恒温槽温度 : 40℃</p> <p>溶離液 : アセトニトリル/0.05 N NaCl/酢酸:純水 (1:1)=6/2/2</p> <p>流量 : 0.8 mL/min</p> <p>検出波長 : 可視 435 nm</p> <p>注入量 : 10 μL</p>

3. 試験材料及び方法

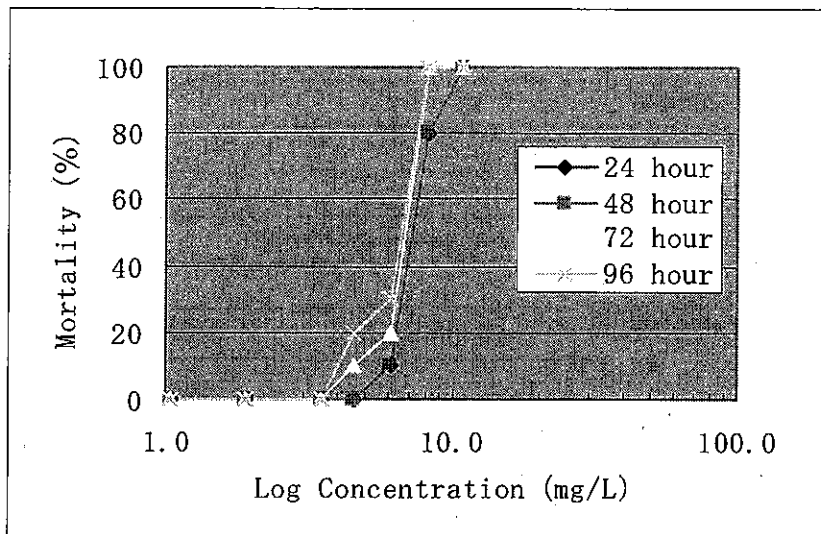
項目		内容	
試験生物	種 (和名・学名・系統)	和名：ヒメダカ 学名： <i>Oryzias latipes</i>	
	入手先	三協ラボサービスから入手したものを自家繁殖	
	対照物質への感受性 (LC ₅₀)、 (対照物質名)	0.33 mg/L (無水物換算) (これまでの LC ₅₀ mean=0.31 mg/L, S. D. =0.11 mg/L, n=21) 硫酸銅 (II) 五水和物、試薬特級	
じゅん化	じゅん化期間	2005年11月8日～2006年1月30日	
	飼育水の種類	脱塩素水	
	じゅん化前の薬浴の有無	無	
	環境条件 (水温、明暗周期)	24±1℃、16時間明/8時間暗	
	餌料 (種類・量・頻度)	テトラミン (テトラ社)・体重の2%/日	
試験条件	試験容器		3 L ガラス製ビーカー
	試験用水	種類	脱塩素水
		硬度	30 mg/L (CaCO ₃ 換算値)
		pH	7.8
	暴露期間		2006年1月30日～2006年2月3日
	試験濃度 (設定値)		対照区, 1.0, 1.8, 3.2, 4.2, 5.6, 7.5, 10 mg/L (変則公比)
	供試数		10尾/試験容器
	試験溶液量		3 L/試験容器
	助剤	助剤の有無	無
		種類	—
		濃度	—
	試験方式		半止水式
	換水又は流水条件		48時間目で試験液の全量を換水
	水温		23.7～24.1℃
	溶存酸素濃度 (DO)		飽和濃度の60%以上 (6.1～8.0 mg/L)
明暗周期		16時間明/8時間暗	
結果の算出方法	LC ₅₀	Probit法	

4. 試験結果及び考察

項目	内容
毒性値	96hLC ₅₀ = 6.0 mg/L
試験濃度	1. 設定値 2. 実測値
考察及び特記事項	<p>被験物質の水溶解性が高く、溶解限度については、試験温度における48時間のフラスコ攪拌法により、100 mg/Lが十分に溶解することを目視、ならびにHPLC分析により確認した。</p> <p>試験時は、濃厚な試験原液を調製し、その所定量を試験用水に添加することにより各濃度の試験溶液を調製した。暴露期間中の被験物質濃度の変動の主因は分析の測定誤差によると考えられたため、算術平均値を採用した。</p> <p>試験の有効性については、化審法テストガイドラインから逸脱した点もなく、また試験の有効性基準を満たしたことから、有効であると判断した。</p>

5. 魚類の濃度－死亡率曲線

被験物質濃度－死亡率曲線



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)	t-ブチル-p-ヒドロキシアニソール		
別名 (略称)	B 6		
CAS 番号	25013-16-5		
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>CC(C)(C)c1ccc(O)cc1OC</chem> $C_{11}H_{16}O_2$		
分子量	180.25		
試験に供した新規化学物質の純度(%)	99.6%		
試験に供した新規化学物質のロット番号	CEF1912		
不純物の名称及び含有率(%)	—		
蒸気圧	—		
対水溶解度	殆ど不溶		
1-オクタール/水分配係数	—		
融点	64.2°C		
沸点	—		
常温における性状	殆ど白色結晶～結晶性粉末		
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
	エタノール	易溶	—
	アセトン	易溶	—
	プロピレングリコール	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	高速液体クロマトグラフィー
前処理法	<p>実験開始時は試験液調製時の予備の1本を分析試料とし、被験物質濃度を測定した。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ものを分析試料とし被験物質濃度を測定した。</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25 µLを注入した。</p> <p>ただし、3.2及び10.0 mg/Lの回収率算出用試料は OECD 培地で2及び10倍に希釈し分析試料とした。また、3.28及び10.50 mg/Lの試験液は OECD 培地で2及び10倍に希釈し分析試料とした。</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(-0.4100 × 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 25 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 μ m) (GLサイエンス)
	移動相 :	アセトニトリル/純水 = 6 : 4 (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 :	25 μ L	

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(0-72): 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3月10日~2006年3月13日	
	培地名	OECD 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 一通気性のシリコン栓	
	培地名	OECD 培地	
	暴露期間	2006年3月13日~2006年3月16日	
	試験濃度 (設定値)	0.10, 0.32, 1.02, 3.28, 10.50 mg/L (公比: 3.2)	
	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	