

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	ガスクロマトグラフ質量分析 (GC/MS) 法
前処理法	試験液 10 mL + アセトン 0.1 mL 混合 GC/MS測定
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=20 重カドミウム, 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)	
	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		
	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)	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)
		硬度	250 mg CaCO ₃ /L 以下
		pH	6.0~9.0
	暴露期間		2008 年 7 月 1 日~2008 年 7 月 3 日
	試験濃度 (設定値)		対照区, 助剤対照区, 0.050, 0.10, 0.20, 0.40, 0.80 mg/L (公比 2.0)
	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	有
		種類	アセトン
		濃度	100 μL/L
		助剤対照区の連数	4 容器
	試験方式 (止水, 半止水, 流水等)		半止水式
	換水又は流水条件		24 時間後に試験液の全量を交換
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	Moving average 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	48hEC50 = 0.326 mg/L
試験濃度	1. 設定値 2. 実測値
考察及び特記事項	濃度区1~5の測定値(平均値)は、それぞれ 0.037, 0.080, 0.153, 0.298 および 0.603 mg/L であり、経時的に濃度減少が認められた。濃度減少の主な原因は、水中からの揮散が考えられた。

5. ミジノコの濃度-遊泳阻害率曲線

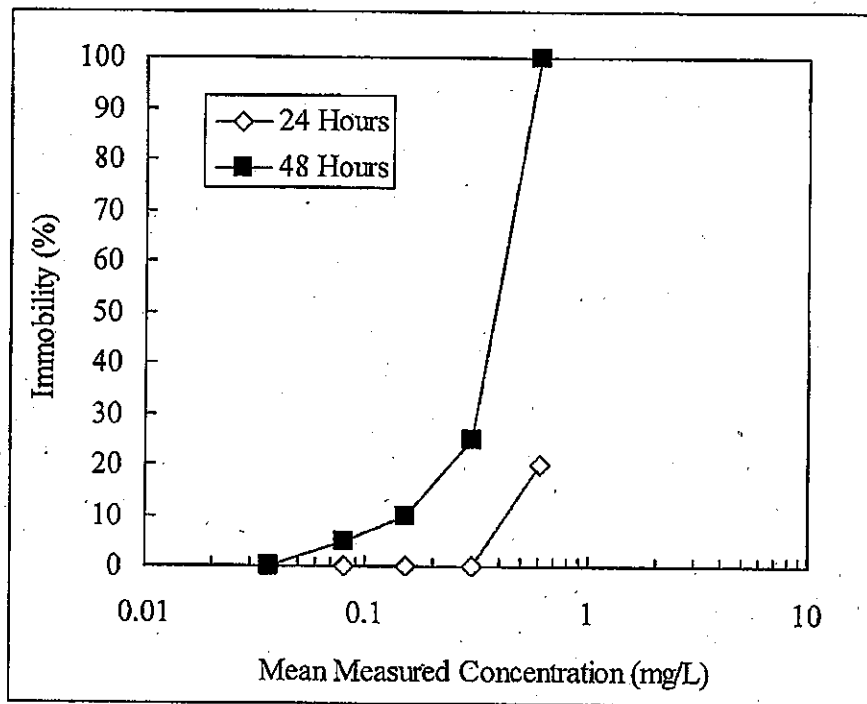


Table 5 Measured Concentrations of the Test Substance in Test Solutions

(Semi-Static Condition)

Test Group	Nominal Concentration (mg/L)	Measured Concentration (mg/L)				Mean ^a
		0 Hour New	24 Hours Old	24 Hours New	48 Hours Old	
		(Percent of Nominal, %)				
Control	--	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	--
Solvent Control	--	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	--
Conc.1	0.050	0.039 (78)	0.034 (68)	0.041 (82)	0.033 (66)	0.037 (74)
Conc.2	0.10	0.087 (87)	0.068 (68)	0.091 (91)	0.075 (75)	0.080 (80)
Conc.3	0.20	0.172 (86)	0.135 (68)	0.170 (85)	0.138 (69)	0.153 (77)
Conc.4	0.40	0.332 (83)	0.258 (65)	0.330 (83)	0.278 (70)	0.298 (75)
Conc.5	0.80	0.669 (84)	0.535 (67)	0.669 (84)	0.547 (68)	0.603 (75)

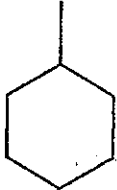
a: Time-weighted mean

New: New test water freshly prepared

Old: Old test water immediately prior to renewal or 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	メチルシクロヘキサン ^{*1}		
別名	(略称：MCH) ^{*2}		
C A S 番号	108-87-2 ^{*1}		
構造式又は示性式	 ^{*3}		
分子量	98.189 ^{*3}		
試験に供した物質の純度(%)	99.8 (GC)		
試験に供した物質のロット番号	GI01		
不純物の名称及び含有率	—		
蒸気圧	5.73 kPa/25°C		
対水溶解度	不溶 (14.0 mg/L 25°C)		
1-オクタノール/水分配係数	3.61		
融点	-127°C		
沸点	100°C		
常温における性状	無色透明液体		
安定性	引火性が強く、燃焼しやすい。蒸気は地面あるいは床に沿って移動することがあり、遠距離引火の可能性がある。蒸気は空気と混合して爆発性の混合ガスを形成する危険性がある。		
溶媒に対する溶解度等	溶媒	溶解度	溶媒中の安定性
	アルコール	可溶	—
	エーテル	可溶	—
	アセトン	可溶	—
	ベンゼン	可溶	—

上記内容は東京化成工業株式会社提供資料による。

*1 は環境省提供資料による。

*2 は株式会社三菱化学安全科学研究所にて決定

*3 は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://nikkajiweb.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	ガスクロマトグラフ質量分析 (GC/MS) 法
前処理法	試験液 (精製水*1 で適宜希釈*2) 10 mL + アセトン 0.1 mL 混合 GC/MS測定 *1 : JIS K0557 A4 グレードの水 *2 : 検量線範囲を超えると予想されたものについて適宜希釈した。
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	自家繁殖	
	大きさ (体長, 体重) ・月齢	全長: 2.08 cm (1.80~2.47 cm), n=10 体重: 0.078 g (0.045~0.141 g), n=10 年齢: 孵化後半年以内	
	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)=0.44 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6月26日~2008年7月7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, 上野製薬製 エルバージュ, 三栄製薬製 ニューグリーンF)	
	じゅん化方式(止水, 半止水, 流水等)	流水式(飼育密度 1.0 g/L/日以下)	
	環境条件 (水温, 明暗周期)	24±1℃ 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: 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	52 mg CaCO ₃ /L
		pH	7.6
	暴露期間		2008年7月7日~2008年7月11日
	試験濃度(設定値)		対照区, 助剤対照区, 2.0, 3.6, 6.3, 11, 20 mg/L (公比: 1.8)
	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	有
		種類	アセトン
		濃度	100 μL/L
	試験方式(止水, 半止水, 流水等)		半止水式
	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)		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	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	96hLC50=2.07 mg/L
試験濃度	1. 設定値 (2.) 実測値
考察及び特記事項	濃度区 1~5 の測定値の平均値は、それぞれ 0.638, 1.18, 2.04, 3.26, 7.26 mg/L であった。調製時の試験液で設定値よりも大幅に低くなった。これは調製時に被験物質が揮散したためと考えられた。

5. 魚類の濃度-死亡率曲線

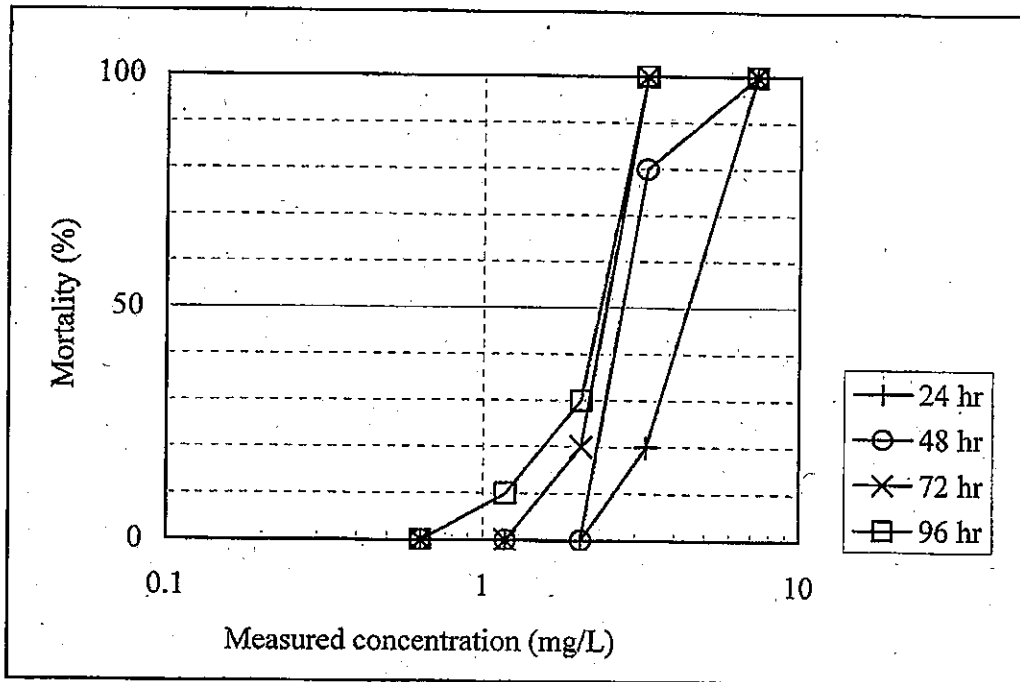


Table 5 Measured Concentrations of the Test Substance in Test Water

Test group	Nominal conc. (mg/L)	Measured concentration (mg/L)					Mean
			0 - 24 hr	24 - 48 hr	48 - 72 hr	72 - 96 hr	
Control		New	<0.004	<0.004	<0.004	<0.004	
		Old	<0.004	<0.004	<0.004	<0.004	
Solvent control		New	<0.004	<0.004	<0.004	<0.004	
		Old	<0.004	<0.004	<0.004	<0.004	
Conc.1	2.0	New	0.583	0.660	0.645	0.718	0.638 [32%]
		Old	0.478 (82%)	0.661 (100%)	0.651 (101%)	0.714 (99%)	
Conc.2	3.6	New	1.13	1.28	1.17	1.32	1.18 [33%]
		Old	0.926 (82%)	1.21 (95%)	1.15 (98%)	1.25 (95%)	
Conc.3	6.3	New	1.89	2.18	2.03	2.27	2.04 [32%]
		Old	1.58 (84%)	2.13 (98%)	2.00 (99%)	2.25 (99%)	
Conc.4	11	New	3.13	3.61	3.39	--	3.26 [30%]
		Old	2.62 (84%)	3.49 (97%)	3.31 (98%)	--	
Conc.5	20	New	7.23	--	--	--	7.26 [36%]
		Old	7.29 (101%)	--	--	--	

New: New test water freshly prepared

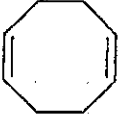
Old: Old test water immediately prior to renewal or at the end of the exposure
(Percent of New)

Mean: Time weighted mean
[Percent of Nominal]

--: Not measured because all fish were dead.

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)	1,5-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、暴露開始後24時間、48時間及び暴露終了時 ・採取量：約10～120mL（全試験区） ・採取方法：暴露開始時；調製容器より別途分取した。 暴露開始後24時間及び48時間； 分析試料用試験容器からそれぞれ均等量採取し混合した。 暴露終了時；各試験区の生長量測定用試験容器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* 100 mL] --> B[←塩化ナトリウム 30 g (電子上皿天びん) ←クロロホルム 8 mL (メスシリンダー) ・振とう (10 分間)] B --> C[水層] B --> D[クロロホルム層] D --> E[・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 10 mL (クロロホルム, メスフラスコ)] E --> F[GC 試料] </pre> <p>* そのまま若しくは培地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
	検 出 器	Agilent Technologies 製 Agilent 7890A
	カ ラ ム	水素炎イオン化検出器 (FID)
	カラム温度	HP-5MS 膜厚 0.25 μ m (Agilent Technologies 製)
	昇温速度	30 m \times 0.25 mm I.D. フューズドシリカ製
	試料導入部温度	60 $^{\circ}$ C (1 min) $\xrightarrow{\textcircled{1}}$ 100 $^{\circ}$ C (0 min) $\xrightarrow{\textcircled{2}}$ 200 $^{\circ}$ C (0 min)
	キャリアガス	$\textcircled{1}$ 10 $^{\circ}$ C/min $\textcircled{2}$ 50 $^{\circ}$ C/min
	カラム流量	200 $^{\circ}$ C
	水素	ヘリウム
	空気	1 mL/min
	注入量	40 mL/min
	導入モード	450 mL/min
	スプリット比	1 μ L
	パーシ流量	スプリット
	パーシ時間	5:1
	検 出 器	20 mL/min
	検出器温度	2 min
検出器感度	200 $^{\circ}$ C	
	レンジ 2 $^{\circ}$	
	平均回収率 : 96%	
	定量下限値 : 0.052 mg/L	

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> (ATCC 22662)	
	入手先	American Type Culture Collection	
	対照物質への感受性 (EC ₅₀) (対照物質名)	EC ₅₀ (E _c C ₅₀) : 0.72 mg/L ニクロム酸カリウム (和光純薬工業製 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)	21~24℃ (±2℃の変動幅) 60~120 μE/m ² /s (平均値±15%の変動幅)	
試 験 条 件	試験容器	滅菌した 500 mL容ガラス製三角フラスコ (密閉容器)	
	培地名	OECD 培地	
	暴露期間	2008年12月16日~2008年12月19日	
	試験濃度 (設定値)	5濃度区 [試験原液の含有率が 100、 32、10、3.2 及び 1.0% (公比√10)]	
	初期細胞濃度	約 0.5×10 ⁴ cells/mL	
	連 数	濃度区	3 連 (別途分析用試験容器を 24 時間用、48 時間用にそれぞれ 1 または 2 容器設けた。)
		対照区	6 連 (別途分析用試験容器を 24 時間用、48 時間用にそれぞれ 1 または 2 容器設けた。)
	試験溶液量	300 mL/濃度区 (100 mL/試験容器) 600 mL/対照区 (100 mL/試験容器)、 (別途分析用試験容器を 24 時間用、48 時間 用にそれぞれ 1 または 2 容器設けた。)	
	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)	旋回振とう培養 (約 100 回/分)	
水温又は培養温度	23.2~23.4℃		
照明 (光強度・時間等)	93~96 μE/m ² /s 72 時間連続照明		
結 果 の 算 出 方 法	生長速度 (0-3d)	EC ₅₀ (E _c C ₅₀)	最小二乗法
		NOEC	細胞観察結果及び有意差検定結果 (Bartlett 法、Kruskal-Wallis の順位和検 定、Mann-Whitney の U 検定) に基づき 評価した。

4.試験結果及び考察

項 目	内 容
毒 性 値	EC ₅₀ (E ₁ C ₅₀) : 8.2 mg/L (95%信頼限界 : 算出不可) NOEC (生長速度 0-3d) : 0.93 mg/L
試 験 濃 度	測定濃度の幾何平均値
考 察 及 び 特 記 事 項	<ul style="list-style-type: none"> ・培地への溶解度 (23±1℃) : 70 mg/L (予備試験での測定値) ・試験液の調製法 : 供試試料を 100 mg/L (設定) になるように培地に添加後、密栓し約 24 時間攪拌した。その後、約 1 時間静置して採取した中層を試験原液とし、培地で適宜希釈して調製した。 ・細胞形状の異常等 : 44 mg/L 区において膨張した細胞が多くみられた。 <p>本試験は被験物質の培地への溶解濃度以下での試験生物の生長に対する影響を調べる試験として行った。その結果、E₁C₅₀ 及び NOEC は 8.2 及び 0.93 mg/L であった。被験物質は、暴露期間中、濃度低下が認められたが、揮発性物質の藻類生長阻害試験における限界性 (試験容器中のヘッドスペースへの揮発) と推測される。</p> <p>試験環境条件に関しては、対照区の pH の変動幅が試験法の規定を超える上昇が認められた。これは、揮発性物質の藻類生長阻害試験における限界性 (密閉系の試験容器のため外部とのガス交換が不可能) と判断される。pH 以外の試験環境条件は適切な範囲内であり、本試験は試験法に準じたものであったと判断される。</p> <p>試験の有効性 (対照区)</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ 暴露終了時には初期細胞数の 84 倍以上に増殖 ・ 日間の生長速度の平均変動係数 : 17% ・ 繰り返し間の生長速度の変動係数 : 2.0% <p>いずれも有効性基準を満たしていた。</p>

5.藻類の生長曲線

図1 藻類の生長曲線

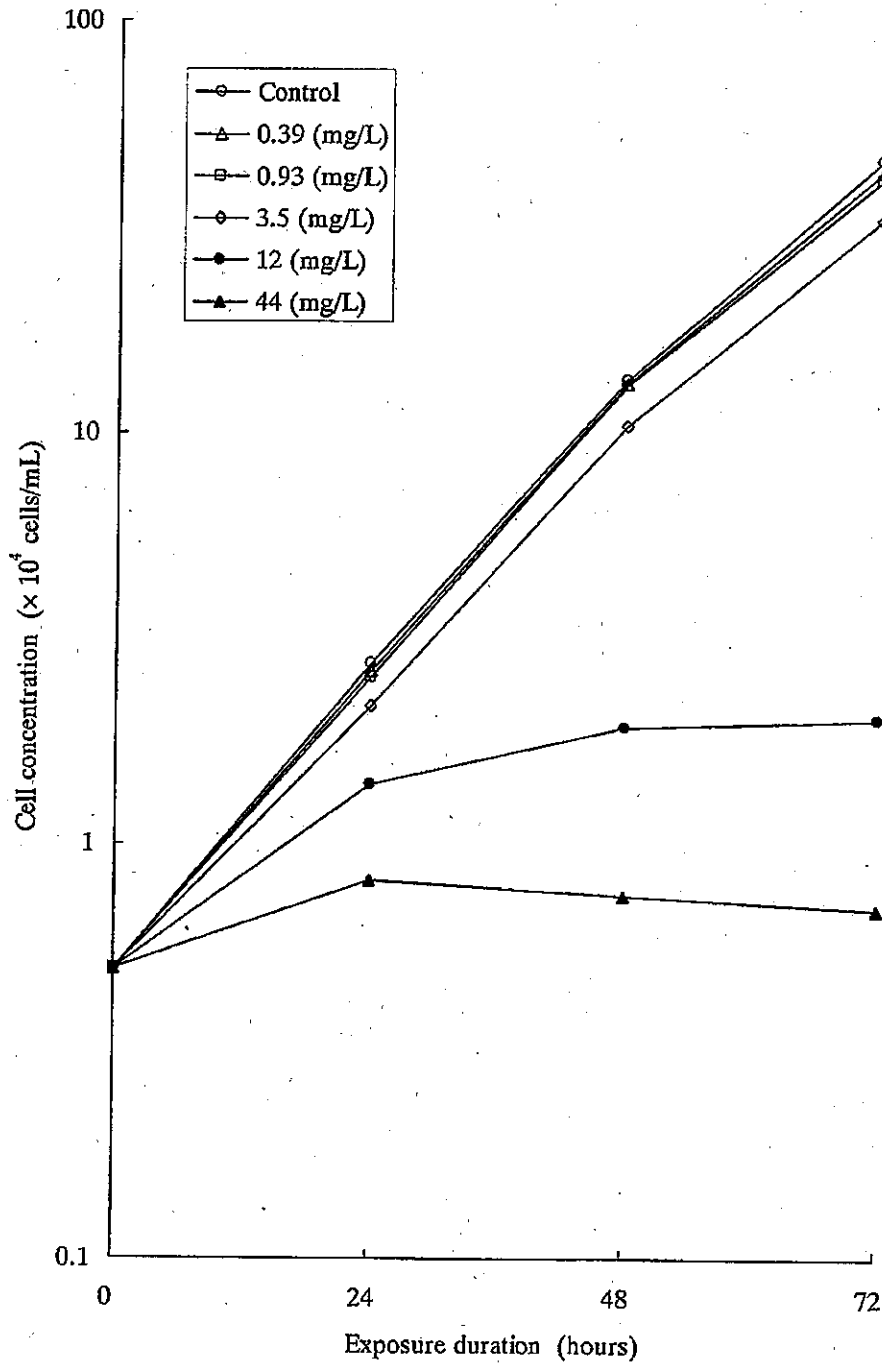
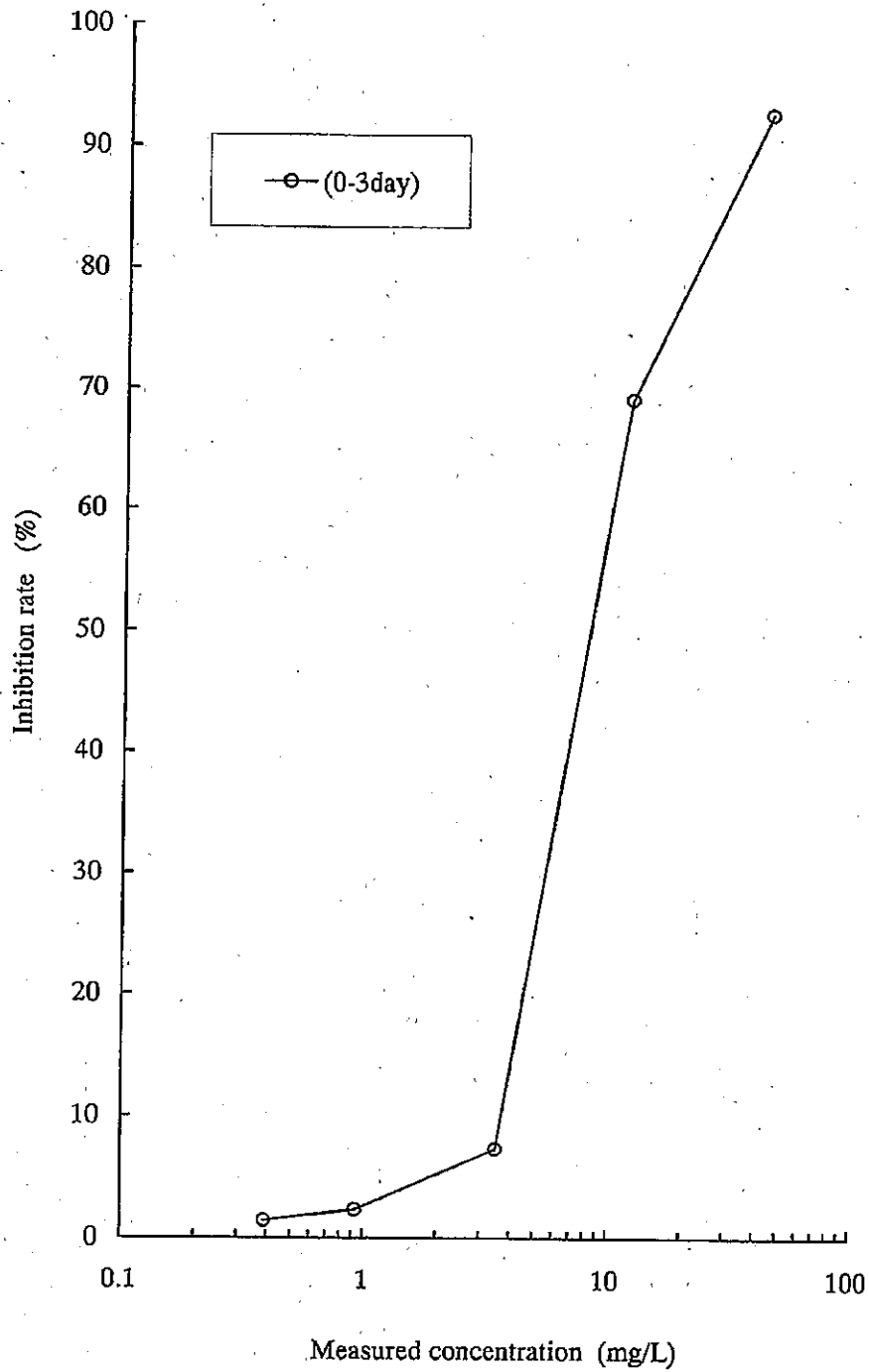


図2 藻類の濃度-生長阻害率曲線 (生長速度)



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

Stock solution content (%)	Measured concentration (mg/L) (Compared to concentration at the start %)				
	At the start	24 hours	48 hours	At the end	Geometric mean
Control	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
1.0	0.63	0.38 (59)	0.36 (57)	0.28 (44)	0.39
3.2	1.5	0.85 (56)	0.89 (59)	0.77 (51)	0.93
10	5.8	3.5 (60)	3.0 (51)	2.8 (47)	3.5
32	19	12 (61)	11 (60)	11 (56)	12
100	73	41 (56)	39 (54)	38 (52)	44

n.d. : Not determined (<0.052 mg/L)

The values are expressed as geometric means calculated by the following equation :

$$\text{antilog} \left(\frac{1}{2(t_n - t_1)} \sum_{i=1}^{n-1} [(\log(\text{conc}_i) + \log(\text{conc}_{i+1})) \cdot (t_{i+1} - t_i)] \right)$$

where

t_1 = initial time < t_2 < ... < t_n = final time.

conc_1 = initial concentration, $\text{conc}_2, \dots, \text{conc}_n$ = final concentration.