

既存化学物質の生態影響に関する情報

平成21年10月23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
4-1531	31127-54-5	2, 3, 4, 4' - テトラヒドロキシベンゾフェノン	1
5-1037 5-1038	108-80-5	イソシアヌル酸	19
3-407	89-63-4	4 - クロロ - 2 - ニトロアニリン	32
9-920	101-20-2	3, 4, 4' - トリクロロジフェニル尿素	48
3-2230	108-87-2	メチルシクロヘキサン	60
3-2232	111-78-4	1, 5 - シクロオクタジエン	77
2-28	764-13-6	2, 5 - ジメチルヘキサ - 2, 4 - ジエン	99
2-164	4067-16-7	ペンタエチレンヘキサミン	116

要 約

試験委託者

環境省

表題

2,3,4,4'-テトラヒドロキシベンゾフェノンの藻類 (*Pseudokirchneriella subcapitata*) に対する生長阻害試験

試験番号

A050372

試験方法

本試験は「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18年11月20日)に準拠して実施した。

- 1) 培養方式: 止水式(開放系), 振とう培養(100 rpm)
- 2) 暴露期間: 72時間
- 3) 試験濃度(設定値):
対照区, 0.500, 1.00, 2.20, 4.60, 9.60, 20.0 mg/L
公比: 2.1
- 4) 試験液量: 100 mL/容器
- 5) 連数: 6 容器/対照区, 3 容器/濃度区
- 6) 初期生物量: 前培養した藻類 5×10^3 cells/mL
(指数増殖期(72時間培養)の藻類乾燥重量: 1.8×10^{-8} mg/cells, n=3)
- 7) 試験温度: 23 ± 2 °C
- 8) 照明: $75 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ (装置中央プラスチック液面付近) で連続照明
(装置内変動: $\pm 20\%$ 以内)
- 9) 分析法: 高速液体クロマトグラフィー質量分析(LC/MS)

結 果

1) 試験液および試験培養液中の被験物質濃度

暴露開始時の試験液，暴露開始 24，48 および 72 時間後の試験培養液中の被験物質濃度を LC/MS により測定した。その結果，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 23～76%，暴露終了時の試験培養液において 0.02～5%であった。試験培養液の色調は，調製直後から経時的に黄色から茶褐色に変化した。また，LC/MSクロマトグラム上には，被験物質のピーク面積の減少に伴って増加する 2本の新たなピークが出現した。以上より，被験物質は培地中で急速に分解し，変化物が生成することが推察された。この濃度減少は被験物質の性質によるものであり，避けられないと判断した。

2) 阻害濃度の算出

通常，被験物質が暴露期間中に濃度減少する場合，阻害濃度の算出には測定値の時間加重平均値を用いる。しかしながら，暴露期間中に生成された変化物は被験物質類似の構造を有し，被験物質と同様に生長阻害を示すことが推察された。この場合，被験物質濃度の時間加重平均値を用いた阻害濃度では毒性を正しく評価できないと判断した。また，生長阻害を被験物質または変化物のそれぞれに区別して評価することは困難である。そこで，変化物を含めた被験物質濃度が暴露期間中維持されていることが示唆されたため，暴露開始時の測定値を被験物質と変化物をあわせた濃度であるとみなし，阻害濃度の算出に用いた。以下に A) 測定値の時間加重平均値および，B) 暴露開始時の測定値を用い，算出した阻害濃度を併記した。

A) 測定値の平均値（時間加重平均）から算出した阻害濃度

生長速度の比較による阻害濃度

半数生長阻害濃度 ErC50 (0-72h) : 0.540 mg/L (95%信頼区間：算出不可)

最大無影響濃度 NOECr (0-72h) : 0.195 mg/L

生長曲線下面積の比較による阻害濃度

半数生長阻害濃度 EbC50 (0-72h) : 0.338 mg/L (95%信頼区間：0.333～0.342 mg/L)

最大無影響濃度 NOECb (0-72h) : 0.195 mg/L

収量の比較による阻害濃度

半数生長阻害濃度 EyC50 (0-72h) : 0.336 mg/L (95%信頼区間：0.288～0.393 mg/L)

最大無影響濃度 NOECy (0-72h) : 0.195 mg/L

B) 暴露開始時から算出した阻害濃度

生長速度の比較による阻害濃度

半数生長阻害濃度 ErC50(0-72h) : 6.36 mg/L (95%信頼区間 : 3.35~12.1 mg/L)

最大無影響濃度 NOECr(0-72h) : 1.07 mg/L

生長曲線下面積の比較による阻害濃度

半数生長阻害濃度 EbC50(0-72h) : 2.66 mg/L (95%信頼区間 : 2.05~3.43 mg/L)

最大無影響濃度 NOECb(0-72h) : 1.07 mg/L

収量の比較による阻害濃度

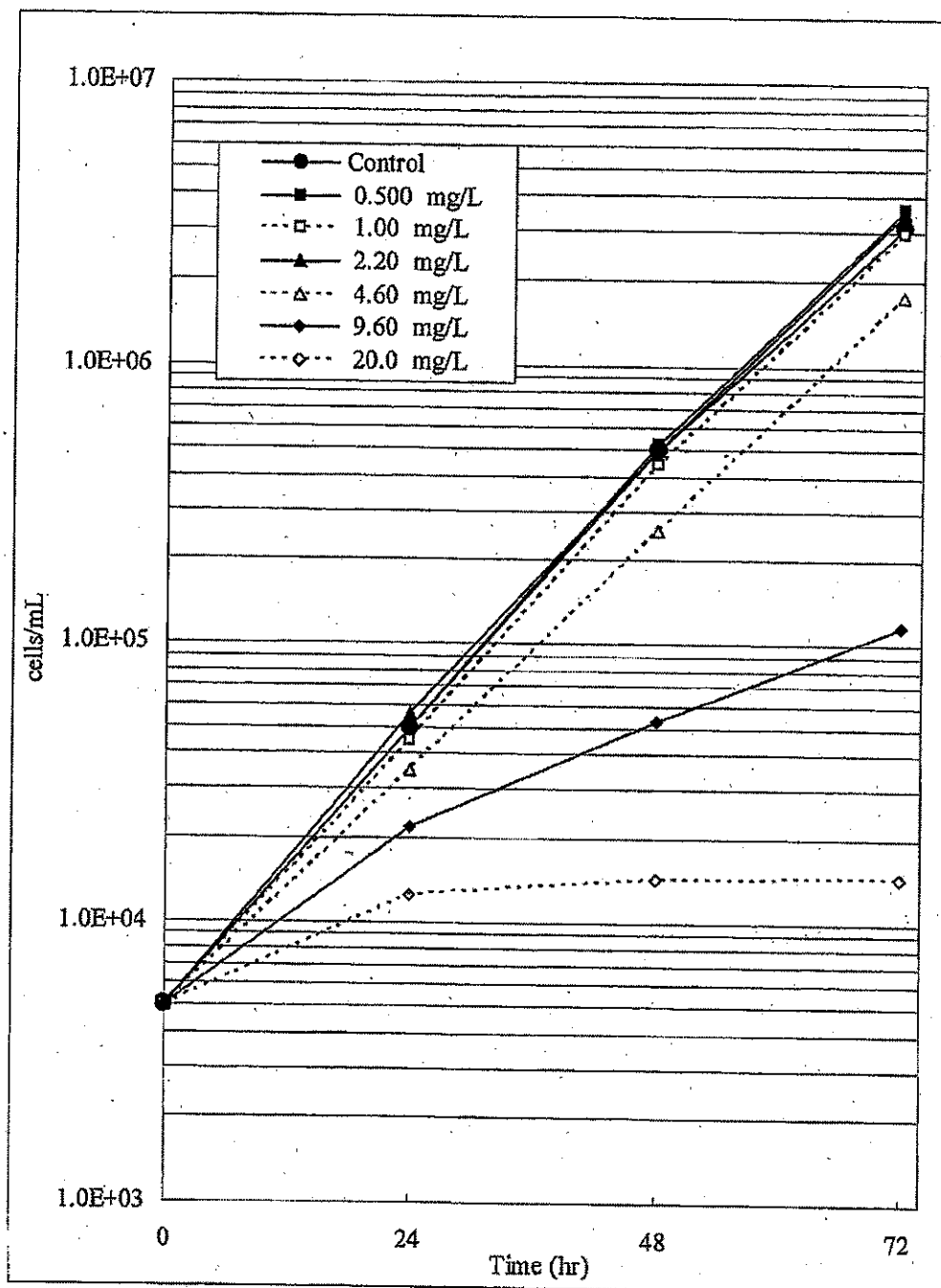
半数生長阻害濃度 EyC50(0-72h) : 2.64 mg/L (95%信頼区間 : 2.59~2.68 mg/L)

最大無影響濃度 NOECy(0-72h) : 1.07 mg/L

3) 藻類の形態観察

暴露終了時の顕微鏡下での細胞形態観察の結果、全濃度区において細胞形態の変化（収縮、膨張、破裂等）や細胞凝集は認められず、また、対照区との相違もなかった。

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



Values in legend are given in the nominal concentration.

Figure 5 Concentration-Inhibition Curve Based on I_{μ} values Calculated from the Growth Rates and Measured Concentration at the Beginning of Exposure

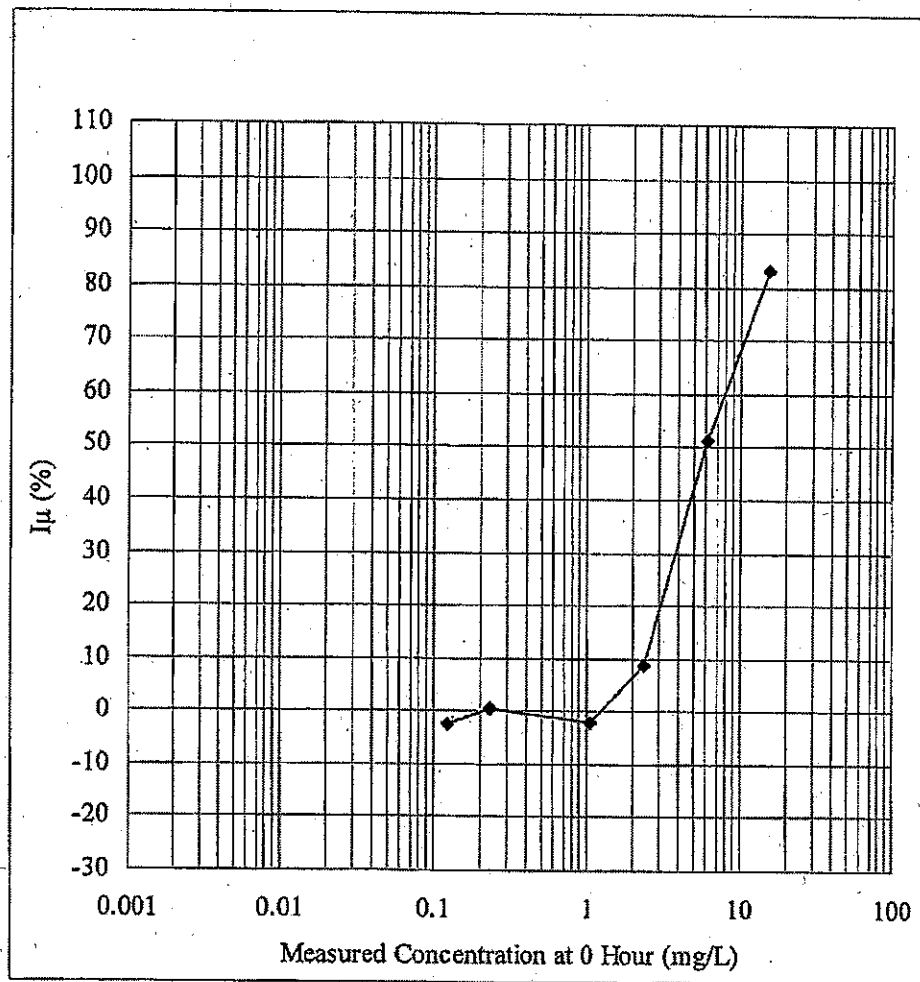


Table 1. Measured Concentration of the Test Substance in Test Cultures

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	<0.0006	<0.0006	<0.0006	<0.0006	---
0.500	0.121 (24)	0.0390 (8)	0.0371 (7)	0.0216 (4)	0.0464 (9)
1.00	0.232 (23)	0.0658 (7)	0.0628 (6)	0.0450 (5)	0.0832 (8)
2.20	1.07 (49)	0.107 (5)	0.0824 (4)	0.0610 (3)	0.195 (9)
4.60	2.34 (51)	0.134 (3)	0.0868 (2)	0.0688 (1)	0.319 (7)
9.60	6.10 (64)	0.124 (1)	0.0456 (0.5)	0.0198 (0.2)	0.548 (6)
20.0	15.2 (76)	0.102 (0.5)	0.0183 (0.1)	0.0048 (0.02)	1.03 (5)

a : time weighted mean

要 約

試験委託者

環境省

表題

2,3,4,4'-テトラヒドロキシベンゾフェノンのオオミジンコ (*Daphnia magna*) に対する急性遊泳阻害試験

試験番号

A050373

試験方法

本試験は、「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)に準拠して実施した。

- 1) 暴露方式: 半止水式 (24時間後に試験液の全量を交換)
- 2) 暴露期間: 48時間
- 3) 試験濃度 (設定値): 対照区, 10.0, 18.0, 32.0, 56.0, 100 mg/L
公比 1.8
- 4) 試験液量: 100 mL/容器
- 5) 連数: 4 容器/試験区
- 6) 供試生物数: 20頭/試験区 (5頭/容器)
- 7) 試験温度: 20±1 °C
- 8) 照明: 室内光, 16時間明 (800 lux 以下) /8時間暗
- 9) 分析方法: 高速液体クロマトグラフィー (HPLC)

結 果

1) 試験液中の被験物質濃度

分析の結果、測定値の設定値に対する割合は、試験液調製時において69~85%、その24時間後において21~57%であった。濃度減少の主な原因は、試験液中での被験物質の変化が考えられた。試験液は、調製直後から色調が経時的に変化し、HPLCクロマトグラム上に被験物質のピーク面積の減少に伴って増加する新たなピークが出現した。これより、被験物質は試験液中で急速に分解し、変化物が生成することが推察された。この濃度減少は被験物質の性質によるものであり、避けられないと判断した。

2) 24時間暴露後の結果

半数遊泳阻害濃度 (EC50) :	45.7 mg/L	(95%信頼区間 : 32.8~63.7 mg/L)
0%阻害最高濃度 :	32.8 mg/L	
100%阻害最低濃度 :	63.7 mg/L	

3) 48時間暴露後の結果

半数遊泳阻害濃度 (EC50) :	39.2 mg/L	(95%信頼区間 : 32.8~63.7 mg/L)
0%阻害最高濃度 :	16.3 mg/L	
100%阻害最低濃度 :	63.7 mg/L	

Figure 1 Concentration-Immobility Curve

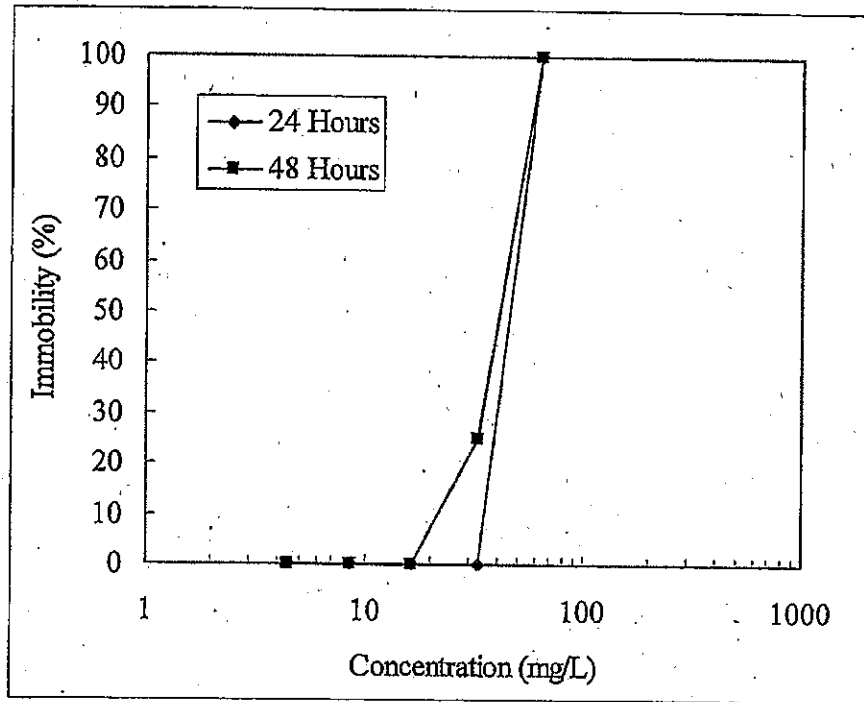


Table 1 Measured Concentration of the Test Substance in Test Water

(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	24 Hours	24 Hours	48 Hours	
	New	Old	New	Old	
Control	<0.03	<0.03	<0.03	<0.03	--
10.0	8.08 (81)	2.38 (24)	7.33 (73)	2.10 (21)	4.42 (44)
18.0	14.6 (81)	5.16 (29)	12.8 (71)	4.50 (25)	8.51 (47)
32.0	25.6 (80)	11.3 (35)	22.1 (69)	9.70 (30)	16.3 (51)
56.0	47.5 (85)	24.0 (43)	42.7 (76)	21.9 (39)	32.8 (59)
100	83.9 (84)	56.5 (57)	74.1 (74)	44.6 (45)	63.7 (64)

a: time weighted mean

New: freshly prepared test solutions

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

要 約

試験委託者

環境省

表題

2,3,4,4'-テトラヒドロキシベンゾフェノンのオオミジンコ (*Daphnia magna*) に対する
繁殖試験

試験番号

A050374

試験方法

本試験は、OECD Guideline for Testing of Chemicals 211 (1998) “*Daphnia magna*
Reproduction Test” に準拠して実施した。

- 1) 暴露方式 : 半止水式 (毎日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 : 21日間
- 3) 試験濃度 (設定値) : 対照区, 0.700, 2.20, 7.00, 22.0, 70.0 mg/L
公比 : 3.2
- 4) 試験液量 : 80 mL/容器
- 5) 連数 : 10容器/試験区
- 6) 供試生物数 : 10頭/試験区 (1頭/容器)
- 7) 試験温度 : 20±1℃
- 8) 照明 : 室内光, 16時間明 (800 lux以下) / 8時間暗
- 9) 分析法 : 高速液体クロマトグラフィー質量分析 (LC/MS)

結 果

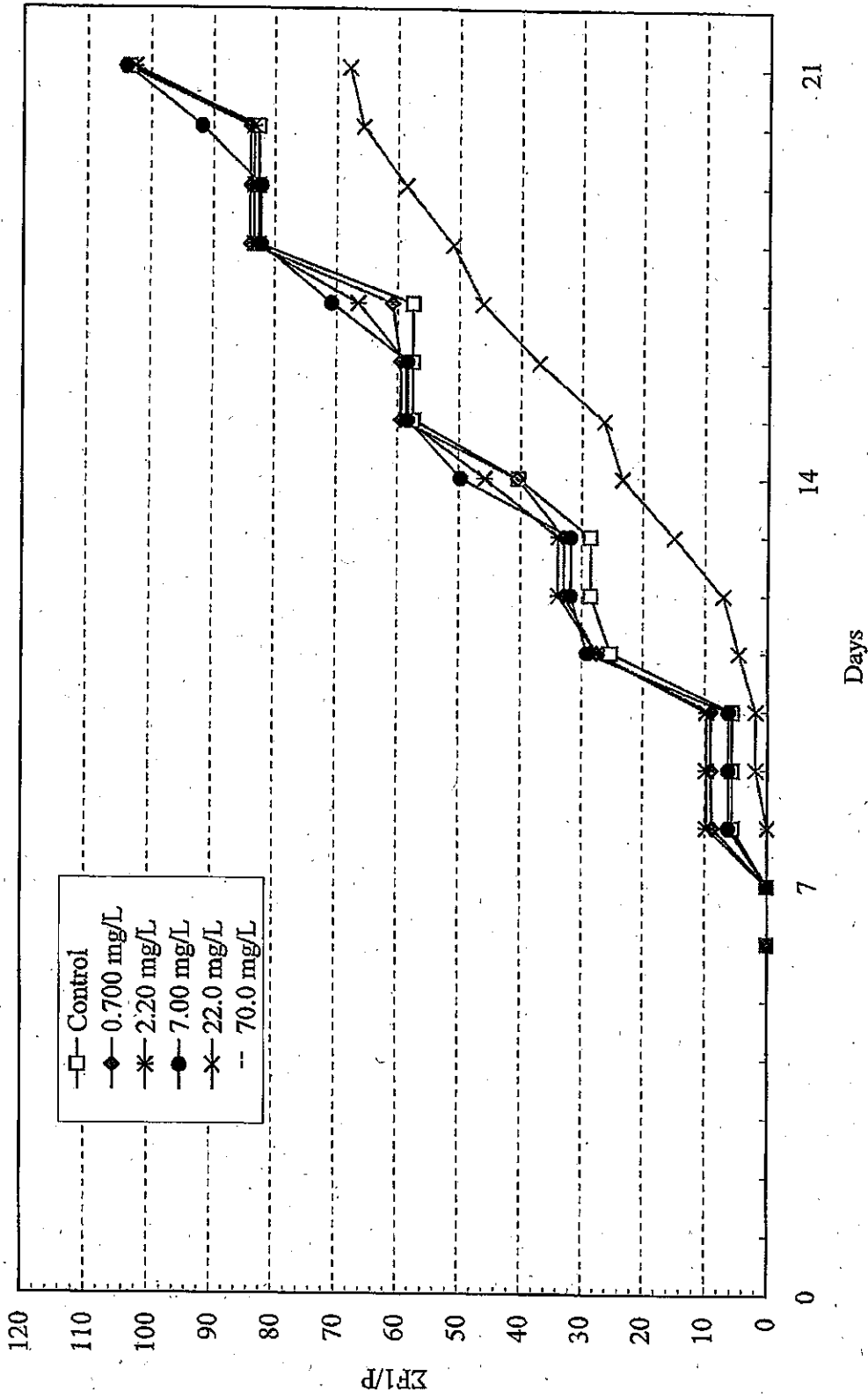
1) 試験液中の被験物質濃度

分析の結果、測定値の設定値に対する割合は、試験液調製時において 59~78%、試験液調製後 24 時間において 33~50%であった。LC/MSクロマトグラム上には被験物質のピーク面積の減少に伴って増加する新たなピークが出現した。また、高濃度区では試験液調製直後から色調が経時的に変化したことから、被験物質は試験液中で急速に分解し、変化物が生成することが推察された。この濃度減少は被験物質の性質によるもので避けられないと判断した。

2) 21日間暴露後の結果

	(mg/L)	95%信頼区間 (mg/L)
親ミジンコの半数致死濃度 (LC50)	> 11.5	算出不可
50%繁殖阻害濃度 (EC50)	> 11.5	算出不可
最大無作用濃度 (NOEC)	3.65	—
最小作用濃度 (LOEC)	11.5	—

Figure 2 Time Course of ΣF1/P for Each Concentration Level



Values in legend are given in the nominal concentration.

--: All parental *Daphnia* were dead during a 21-days testing period.

Table 1-1 Measured Concentration of the Test Substance in Test Water during a 21-day Exposure Period (*Daphnia* Reproduction Inhibition Test under the Semi-Static Test Condition)

Nominal Concentration (mg/L)	Date	Measured Concentration (mg/L)						TWM ^{#1} (mg/L)	% of Nominal
		5	6	12	13	20	21		
Control		<0.0009	<0.0009	<0.0009	<0.0009	<0.0009	<0.0009	<0.0009	
0.700		0.544	0.260	0.412	0.229	0.491	0.267	0.356	51
2.20		1.68	0.813	1.31	0.872	1.63	0.887	1.15	52
7.00		4.96	2.62	4.44	2.78	5.24	3.47	3.65	52
22.0		15.1	8.91	14.5	8.21	16.3	10.5	11.5	52
70.0		*	*	*	*	*	*	*	*

Table 1-2 Measured Concentration as a Percentage of Nominal

Nominal Concentration (mg/L)	Date	Measured Concentration as a Percentage of Nominal					
		5	6	12	13	20	21
0.700		78	37	59	33	70	38
2.20		76	37	60	40	74	40
7.00		71	37	63	40	75	50
22.0		69	41	66	37	74	48
70.0		*	*	*	*	*	*

New: Freshly prepared test solution

Old: Old test solution before renewal

*1: Time-weighted mean measured concentration during 21 days.

*: No measurement was made because all parental *Daphnia* were dead.

	Concentration (mg/L)		% of Nominal	
	Min.	Max.	Min.	Max.
New	0.412	~	59	~
Old	0.229	~	33	~

要 約

試験委託者

環境省

表 題

2,3,4,4'-テトラヒドロキシベンゾフェノンのヒメダカ (*Oryzias latipes*) に対する
急性毒性試験

試験番号

A050375

試験方法

本試験は「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18年11月20日) およびに準拠して実施した。

- 1) 暴露方式 : 半止水式 (24時間毎に試験液の全量を交換) 透明塩ビ板で蓋をした
- 2) 暴露期間 : 96時間
- 3) 試験濃度 : 対照区, 10.0, 18.0, 32.0, 56.0, 100 mg/L
(設定値) 公比: 1.8
- 4) 試験液量 : 5.0 L/容器
- 5) 連 数 : 1 容器/試験区
- 6) 供試生物数 : 10尾/試験区
- 7) 試験温度 : 24±1 °C
- 8) 照 明 : 室内光, 16時間明 (1000 lux以下) /8時間暗
- 9) 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、試験液調製時において75~83%、24時間後において7~36%であった。調製24時間後の試験液の色調が変化したこと、クロマトグラム上に分解物と思われるピークが出現したことから、濃度減少の主な原因は被験物質の試験液中での変化が考えられた。

- 2) 96時間暴露後の半数致死濃度 (LC50) : 35.7 mg/L (95%信頼区間 : 24.4~52.2 mg/L)
- 3) 96時間暴露後の0%死亡最高濃度 : 24.4 mg/L
- 4) 96時間暴露後の100%死亡最低濃度 : 52.2 mg/L

Figure 1 Concentration-Mortality Curve

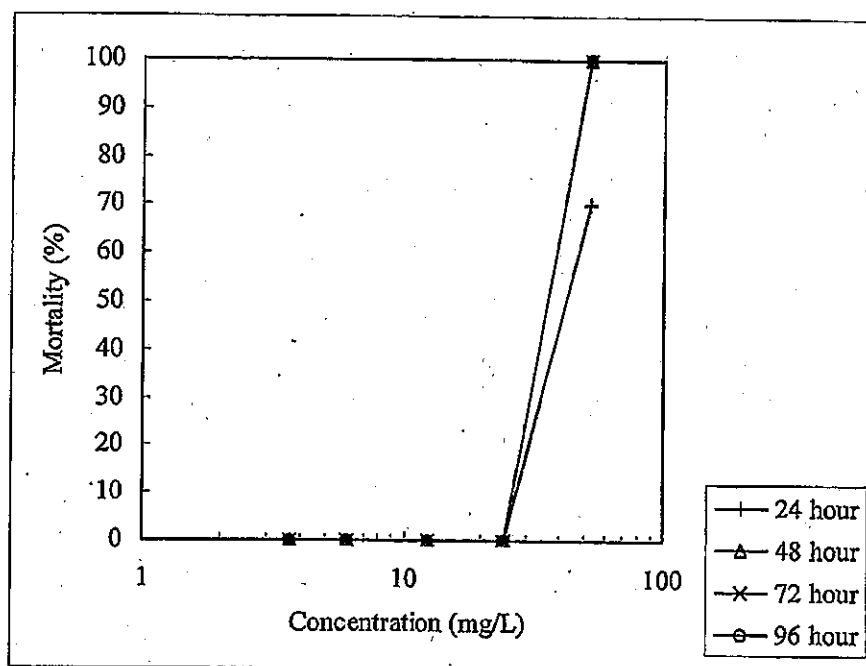


Table 1 Measured Concentration of the Test Substance in Test Water

Nominal Concentration (mg/L)	Measured Concentration, mg/L (Percent of Nominal)				(Semi-Static Condition)
					Mean ^a Measured Concentration
	0 Hour (new)	24 Hours (old)	24 Hours (new)	48 Hours (old)	(mg/L)
Control	<0.03	<0.03	<0.03	<0.03	---
10.0	7.82 (78)	2.34 (23)	7.53 (75)	0.74 (7)	3.73 (37)
18.0	14.4 (80)	2.37 (13)	13.7 (76)	1.48 (8)	6.08 (34)
32.0	24.9 (78)	5.70 (18)	24.9 (78)	4.21 (13)	12.3 (38)
56.0	45.1 (81)	11.0 (20)	46.5 (83)	11.1 (20)	24.4 (44)
100	82.3 (82)	36.3 (36)	83.1 (83)	24.9 (25)	52.2 (52)

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.

要 旨

試験委託者

環境庁

表 題

イソシアヌル酸の藻類 (*Selenastrum capricornutum*) に対する生長阻害試験

試験番号

ET9701-1

試験方法

本試験は、OECD 化学品テストガイドライン No. 201 「藻類生長阻害試験」 (1984年) に準拠して実施した。

- 1) 被験物質: イソシアヌル酸
- 2) 供試生物種: S. C. (ATCC 22662)
- 3) 培養方式: 振とう培養 (100rpm)
- 4) 暴露期間: 72時間
- 5) 連数: 1濃度区につき3連
- 6) 初期細胞濃度: 1×10^4 cells/mL
- 7) 試験液量: 100 mL (OECD培地)
- 8) 温度: 23 ± 2 °C
- 9) 照明: 4000~5000lux (連続照明)
- 10) 試験濃度 (設定): 対照区, 62.5 mg/L, 125.0 mg/L, 250.0 mg/L, 500.0 mg/L および 1000.0 mg/L
- 11) 試験液中の被験物質の分析: HPLC法 (暴露開始時, 終了時)

結 果

1) 生長曲線下の面積の比較による生長阻害濃度 (片対数紙による)

$$E_b C_{50} (0-72h) = 620.0 \text{ mg/L}$$

$$\text{無影響濃度 (NOEC)} = 62.5 \text{ mg/L}$$

2) 生長速度の比較による生長阻害濃度 (片対数紙による)

$$E_r C_{50} (24-48h) = 780.0 \text{ mg/L}$$

$$\text{無影響濃度 (NOEC)} = 250.0 \text{ mg/L}$$

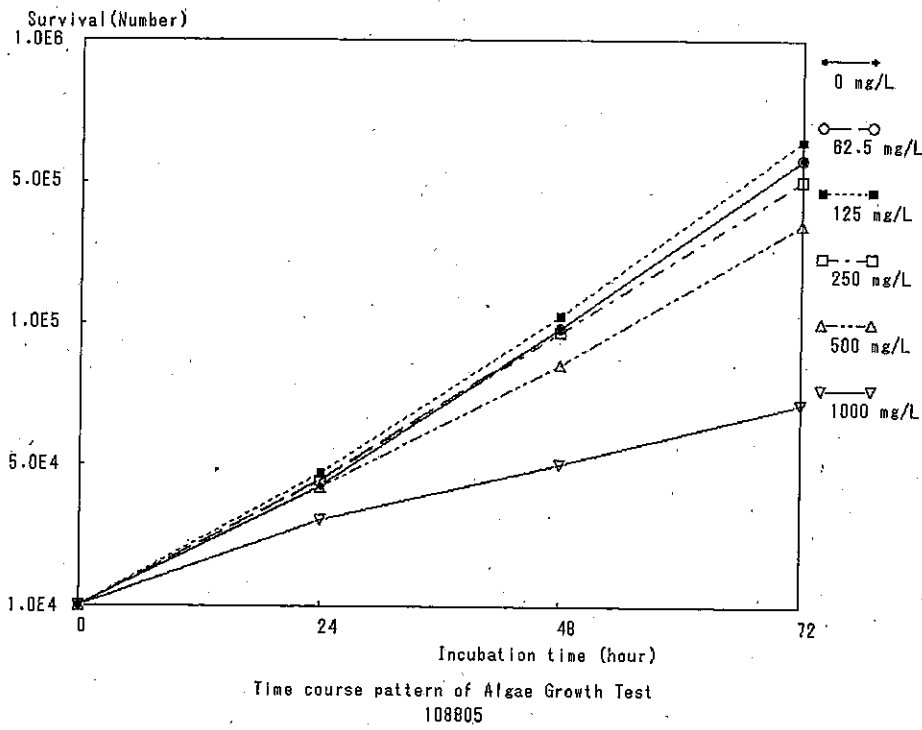
$$E_r C_{50} (24-72h) = 800.0 \text{ mg/L}$$

$$\text{無影響濃度 (NOEC)} = 125.0 \text{ mg/L}$$

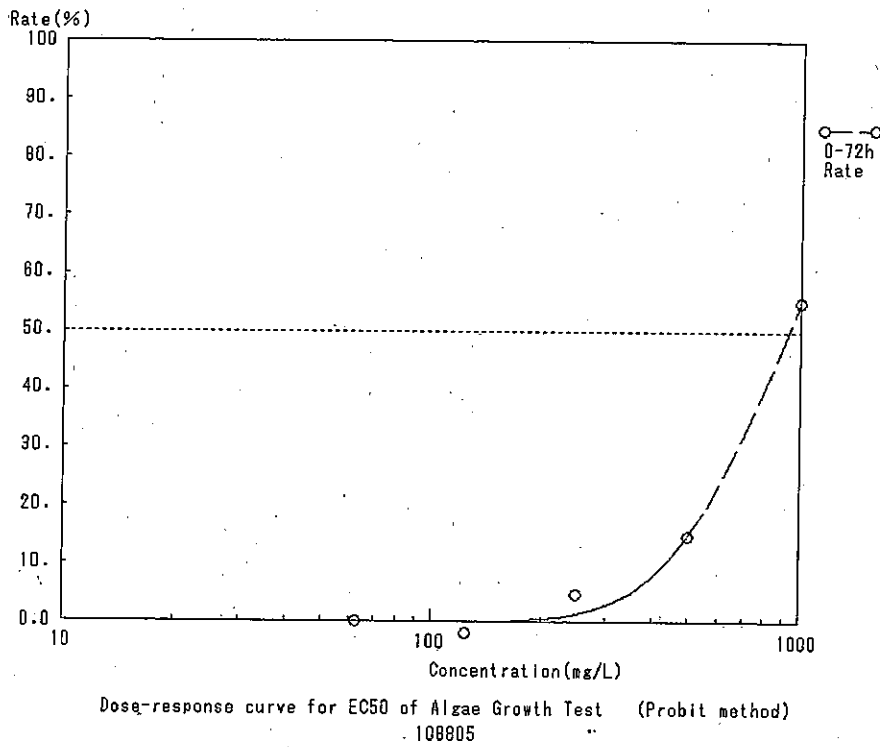
(上記濃度は、全て設定値に基づく値)

イソシアヌル酸 (Cas. 108-80-5)

① 生長曲線



② 阻害率曲線



③ 毒性値

72hEC50 (設定値に基づく) = 950mg/L

72hNOEC (設定値に基づく) = 250mg/L

Table 2. Measured Concentrations During a 72-Hour Exposure to *Selenastrum capricornutum*

Nominal Concentrations mg/L	Measured Concentration (mg/L)			
	0 Hour	Percent of Nominal	72 Hour	Percent of Nominal
Cont.	-	-	-	-
62.5	61.2	97.9	62.5	100.0
125.0	130.4	104.3	125.0	100.0
250.0	259.4	103.8	250.9	100.4
500.0	522.3	104.5	503.1	100.6
1000.0	999.5	100.0	1014.5	101.5

要 旨

試験委託者

環境庁

表 題

イソシアヌル酸のオオミジンコ (*Daphnia magna*) に対する急性遊泳阻害試験

試験番号

ET9701-2

試験方法

本試験は、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) に準拠して実施した。

- 1) 被験物質： イソシアヌル酸
- 2) 供試生物： オオミジンコ (*Daphnia magna*)
- 3) 暴露方法： 止水式
- 4) 暴露期間： 48時間
- 5) 連数： 1濃度区につき4連
- 6) 生物数： 20頭/1濃度区 (1連につき5頭で1濃度区20頭)
- 7) 試験液量： 100 mL
- 8) 試験水温： 20±1℃
- 9) 照明： 室内光, 16時間明/8時間暗
- 10) 給餌： 無給餌
- 11) 試験濃度： 対照区, 100, 180, 320, 580, および1000mg/L
- 12) 試験液中の被験物質濃度の分析： HPLC法 (暴露開始時, 暴露終了時)

結 果

- 1) 24時間暴露後の結果
24時間半数遊泳阻害濃度 (E1C50) = 1000mg/L 以上
最大無作用濃度 (NOECi) = 1000mg/L 以上
- 2) 48時間暴露後の結果
48時間半数遊泳阻害濃度 (E1C50) = 1000mg/L
最大無作用濃度 (NOECi) = 580mg/L
(上記濃度は、全て設定値に基づく値)

Figure 1 Concentration-Response Curve of Isocyanuric Acid
Mortality or Immobility in *Daphnia magna*

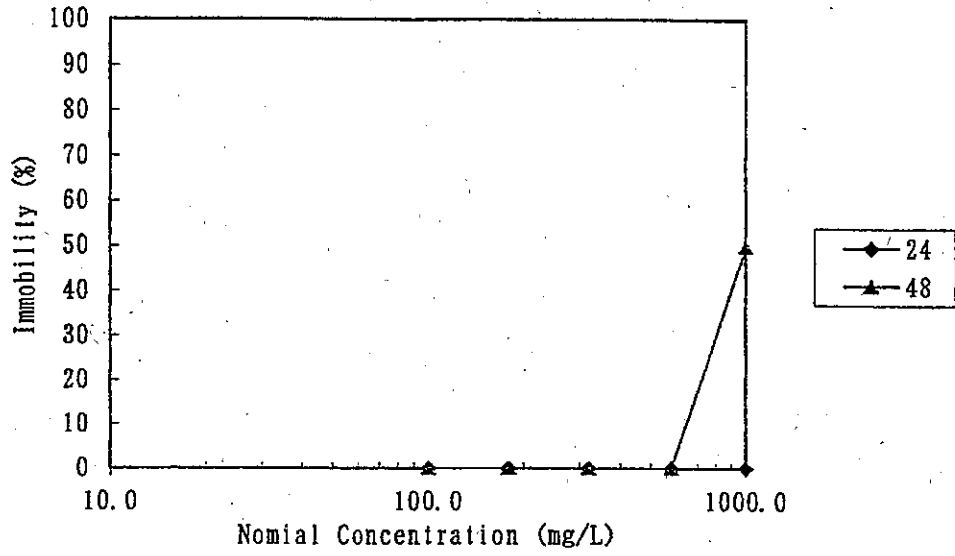


Table 1. Measured Concentrations of Isocyanuric Acid 48-Hour Exposure of *Daphnia magna* under Semi-Static Test Conditions

Nominal Concentration mg/L	Measured Concentration (mg/L)			Percent of Nominal	
	0 Hour	48 Hour	Mean	0 Hour	48 Hour
Control	N. D. *	N. D. *	---	---	---
100.0	99.2	99.5	99.4	99.2	99.5
180.0	185.1	185.9	185.5	102.8	103.3
320.0	324.3	329.7	327.0	101.3	103.0
580.0	584.8	589.4	587.1	100.8	101.6
1000.0	997.5	1011.6	1004.6	99.8	101.2

*: Not Detectable

要 旨

試験委託者

環境庁

表 題

イソシアヌル酸のオオミジンコ (*Daphnia magna*) に対する繁殖阻害試験

試験番号

ET9701-3

試験方法

本試験は、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) に準拠して実施した。

- 1) 被験物質： イソシアヌル酸
- 2) 供試生物： オオミジンコ (*Daphnia magna*)
- 3) 暴露方法： 半止水式 (週に3回、試験液の全量を交換)
- 4) 暴露期間： 21日間
- 5) 連数： 1濃度区につき4連
- 6) 生物数： 40頭/1濃度区 (1連につき10頭で1濃度区40頭)
- 7) 試験液量： 500 mL
- 8) 試験水温： 20±1℃
- 9) 照明： 室内光、16時間明/8時間暗
- 10) 給餌量： ミジンコ1頭当たり、藻類を0.1~0.2mgC (有機炭素含量) /日
- 11) 試験濃度： 対照区、1.00, 3.20, 10.00, 32.00 および100.00mg/L (公比3.2)
- 12) 試験液中の被験物質濃度の分析： HPLC法 (0時間と48時間、0時間と72時間)

結 果

- 1) 14日間の親ミジンコの50%致死濃度 (LC50)
=12.39mg/L (95%信頼区間：7.99mg/L~19.61mg/L) (Probit法)
21日間の親ミジンコの50%致死濃度 (LC50)
=9.55mg/L (95%信頼区間：6.22mg/L~14.52mg/L) (Probit法)
- 2) 14日間の親ミジンコの50%繁殖阻害濃度 (ErC50)
=9.36mg/L (95%信頼区間：1.32mg/L~42.77mg/L) (Probit法)

21日間の親ミジンコの50%繁殖阻害濃度 (ErC50)

=65.86mg/L (95%信頼区間 :54.47mg/L~82.70mg/L)

(Moving Average 法)

3) 最大無作用濃度 (NOECr) = 32.00 mg/L

4) 対照区と有意差の認められる最低濃度 (LOECr) = 100.00 mg/L

(上記濃度は、全て設定値に基づく値)

Table 4 Mean Cumulative Numbers of Juveniles Produced per Adult (\bar{TF})

Conc. (mg/L)	Days										
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
cont.	-	-	-	0.00	-	0.00	-	0.00	-	10.83	-
1.00	-	-	-	0.00	-	0.00	-	0.00	-	9.98	-
3.20	-	-	-	0.00	-	0.00	-	0.89	-	10.99	-
10.00	-	-	-	0.00	-	0.00	-	0.00	-	5.48	-
32.00	-	-	-	0.00	-	0.00	-	0.00	-	5.18	-
100.00	-	-	-	0.00	-	0.00	-	0.00	-	0.00	-

Conc. (mg/L)	Days										
	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
cont.	-	31.76	-	31.79	-	38.91	39.39	-	48.92	48.92	50.66
1.00	-	27.74	-	27.74	-	37.65	37.69	-	47.54	47.54	53.87
3.20	-	28.03	-	28.42	-	40.22	40.90	-	59.69	59.69	71.76
10.00	-	12.89	-	14.09	-	20.48	22.27	-	37.35	37.55	46.14
32.00	-	11.86	-	11.86	-	20.34	20.80	-	47.52	47.52	59.61
100.00	-	0.00	-	0.00	-	0.25	0.38	-	5.63	5.63	14.63

-:幼体の測定を行っていない為、データ無し。

Figure 2 Mean Cumulative Numbers of Juveniles Produced per Adult (\bar{TF}) during 21 days

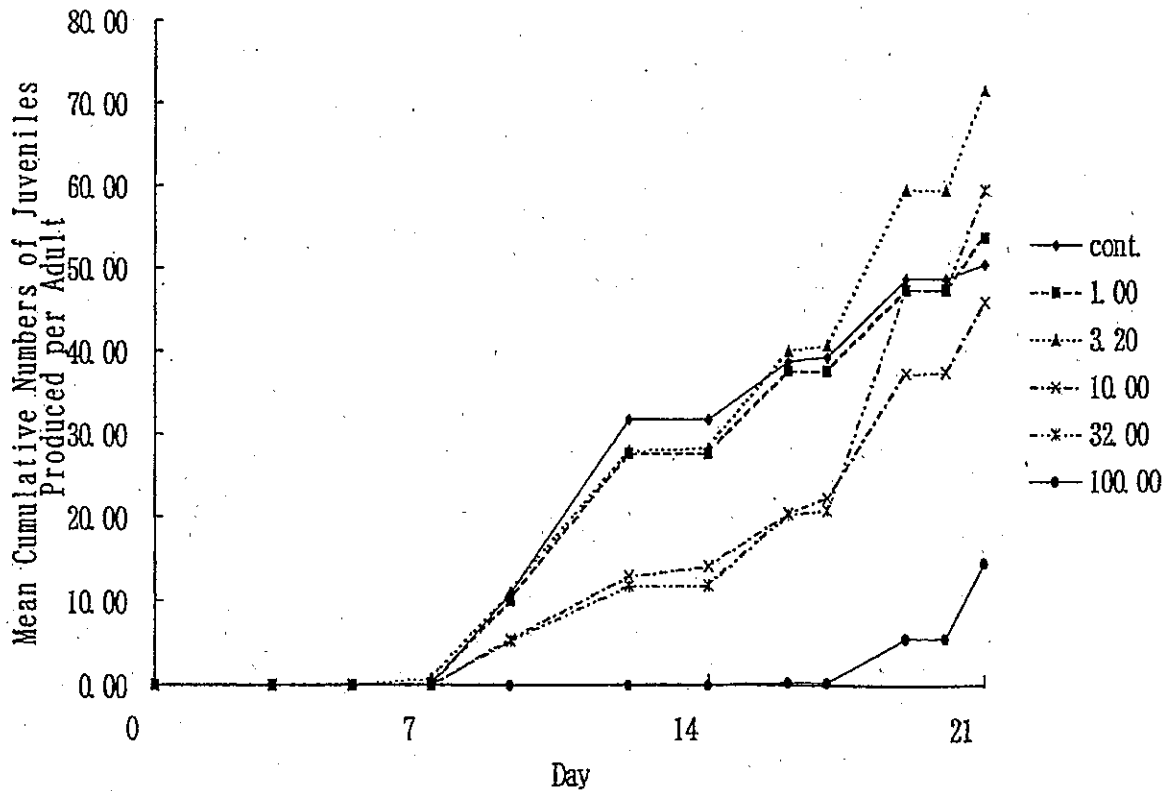


Table 1. Measured Concentrations of Isocyanuric Acid during a 21-day Exposure of *Daphnia magna* under Semi-Static Test Conditions

0-3 days

Nominal Concentrations mg/L	Measured Concentration(mg/L)		Percent of Nominal	
	0 day new	3 days old	0 day new	3 days old
cont.	-	-	-	-
1.00	0.95	0.97	95.0	97.0
3.20	3.09	3.19	96.6	99.7
10.00	10.34	10.24	103.4	102.4
32.00	31.98	32.29	99.9	100.9
100.00	98.81	99.98	98.8	100.0

19-21 days

Nominal Concentrations mg/L	Measured Concentration(mg/L)		Percent of Nominal	
	19 days new	21 days old	19 days new	21 days old
cont.	-	-	-	-
1.00	0.97	0.95	97.0	95.0
3.20	3.10	3.11	96.9	97.2
10.00	10.03	10.11	100.3	101.1
32.00	32.05	31.99	100.2	100.0
100.00	99.83	99.96	99.8	100.0

new: freshly test solution

old: test solutions 2days or 3days after freshly prepared

要 旨

試験委託者

環境庁

表 題

イソシアヌル酸のヒメダカ (*Oryzias latipes*) に対する急性毒性試験

試験番号

ET9701-4

試験方法

本試験は、OECD 化学品テストガイドライン No. 203 「魚類毒性試験」 (1992年) に準拠して実施した。

- 1) 被験物質： イソシアヌル酸
- 2) 供試生物： ヒメダカ (*Oryzias latipes*)
- 3) 暴露方式： 半止水式 (48時間毎に換水)
- 4) 暴露期間： 96時間
- 5) 連数： 1濃度区につき1連
- 6) 生物数： 10尾/濃度区
- 7) 試験液量： 3.0 L
- 8) 温度： 24±1℃
- 9) 照明： 室内光、16時間明/8時間暗
- 10) 給餌： 無給餌
- 11) エレクション： あり
- 12) 試験濃度： 対照区, 6.25, 12.50, 25.00, 50.00 および 100.00mg/L
- 13) 試験液中の被験物質濃度の分析： HPLC法 (暴露開始時, 48時間)

結 果

試験の結果、イソシアヌル酸の設定濃度に基づく96時間の半数致死濃度 (LC50) は >100.00mg/Lであった。

Figure 1 Concentration-Response Curve of Isocyanuric Acid
Mortality in Orange killifish

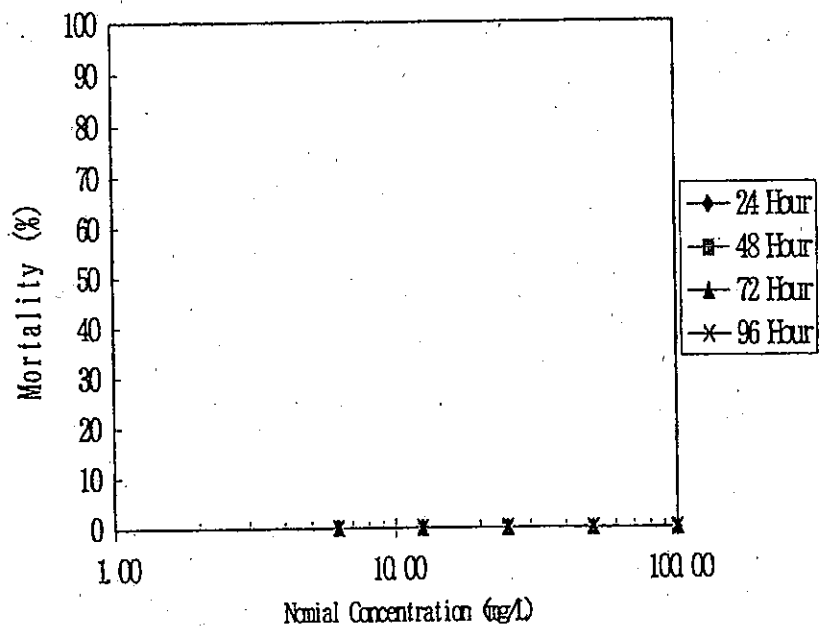


Table 1. Measured Concentrations of Isocyanuric Acid During a 96-Hour Exposure of Orange killifish (*Oryzias latipes*) under Semi-Static Test Conditions

Nominal Concentration mg/L	Measured Concentration (mg/L)			Percent of Nominal	
	0 Hour new	48 Hour old	Mean	0 Hour new	48 Hour old
Control	N. D. *	N. D. *	---	---	---
6.25	6.17	6.30	6.24	98.7	100.8
12.50	12.88	12.88	12.88	103.0	103.0
25.00	25.50	25.37	25.44	102.0	101.5
50.00	50.47	50.85	50.66	100.9	101.7
100.00	99.45	100.45	99.95	99.5	100.5

new: freshly prepared test solutions

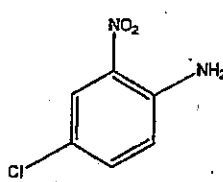
old: test solutions after 48 hours exposure period

*: Not Detectable

[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)	4-クロロ-2-ニトロアニリン		
別名	—		
C A S 番号	89-63-4		
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	172.57		
試験に供した新規化学物質の純度(%)	99.9		
試験に供した新規化学物質のロット番号	GJ01		
不純物の名称及び含有率	不明		
蒸気圧	不明		
対水溶解度	不明		
1-オクタノール/水分配係数	不明		
融点	118°C		
沸点	不明		
常温における性状	橙色結晶性粉末		
安定性	不明		
溶媒に対する溶解度等	溶媒	溶解度	溶媒中の安定性
	エーテル	可溶	—
	酢酸	可溶	—
	メタノール	微溶	—

2. 試験液の被験物質濃度の分析法

項目	方法
分析方法	<p>被験物質濃度が 0.05 mg a.i./L 相当量となるように試験液を超純水で希釈したものを HPLC に注入し、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 4-クロロ-2-ニトロアニリン濃度 × 希釈倍率</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: 30 mL/試験区 (うち、遠心分離後の上澄み液から 20 mL/試験区を採取し分析に供した。) サンプリング法: 暴露開始時は試験液調製後、各試験容器に分注する前に 30 mL ずつ採取した。終了時は各連の中層から 10 mL ずつ (無処理対照区のみ 5 mL ずつ) 採取し、試験区毎に混合した。</p>
前処理法	<p>試験液中の藻体を遠心分離 (50 mL 容ガラス製試験管使用、1750 G、10 分) により除去した。上清部分を必要に応じて超純水にて希釈した。</p>
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: 超純水: アセトニトリル = 50:50 流量: 1.0 mL/min 波長: UV 230 nm 感度: 1 AU/V 注入量: 100.0 μL 定量限界: 0.050 mg a.i./L 平均回収率: 0.05 mg a.i./L (101%)、50 mg a.i./L (100%)</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 _r C ₅₀ : 0.63 mg/L 重クロム酸カリウム(関東化学(株)製、試薬特級)	
前培養	前培養の期間	3 日間 2009 年 1 月 16 日~2009 年 1 月 20 日	
	培地名	OECD 培地	
	環境条件(水温、光強度)	21±2°C 62~65 μE/m ² /s	
試験条件	試験容器	300mL 容ガラス製三角フラスコおよび通気性シリコン栓	
	培地名	OECD 培地	
	暴露期間	本試験: 2009年1月20日~2009年1月23日	
	試験濃度(設定値)	1.0、2.2、4.6、10 および 22 mg a.i./L 公比 2.2(=√[3]{10})	
	初期生物量	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/試験容器
	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)		振とう培養(100 rpm)
水温又は培養温度		実測値: 20.1~21.4°C	
照明(光強度・時間等)		実測値: 63~74 μE/m ² /s	
結果の算出方法	速度法	E _r C ₅₀ : Logit 法 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 ₁ C ₅₀ : 8.5 mg a.i./L 0-72h NOEC _r : 2.1 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"> 被験物質の溶解に時間を要するため、室温で約 22 時間スターラー攪拌して試験原液を調製した。 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

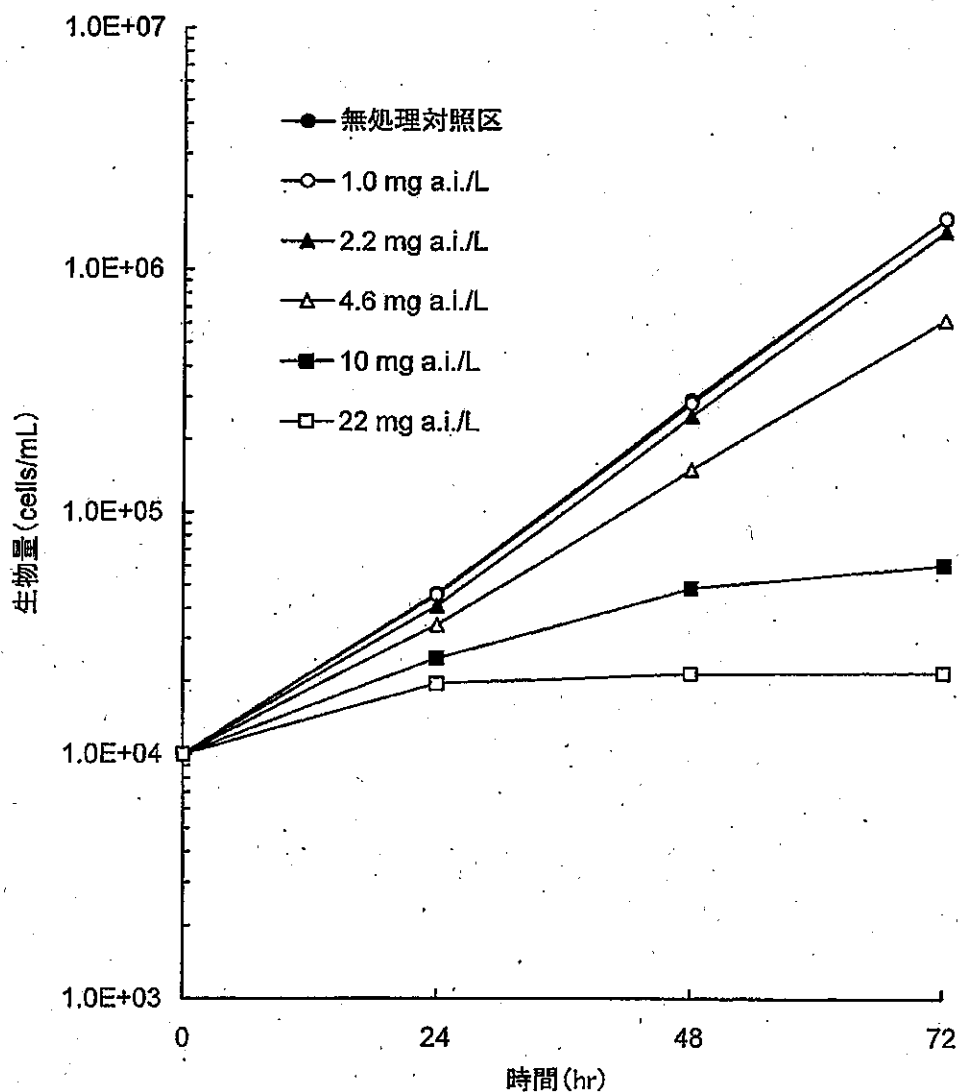


図 1. 藻類の生長曲線

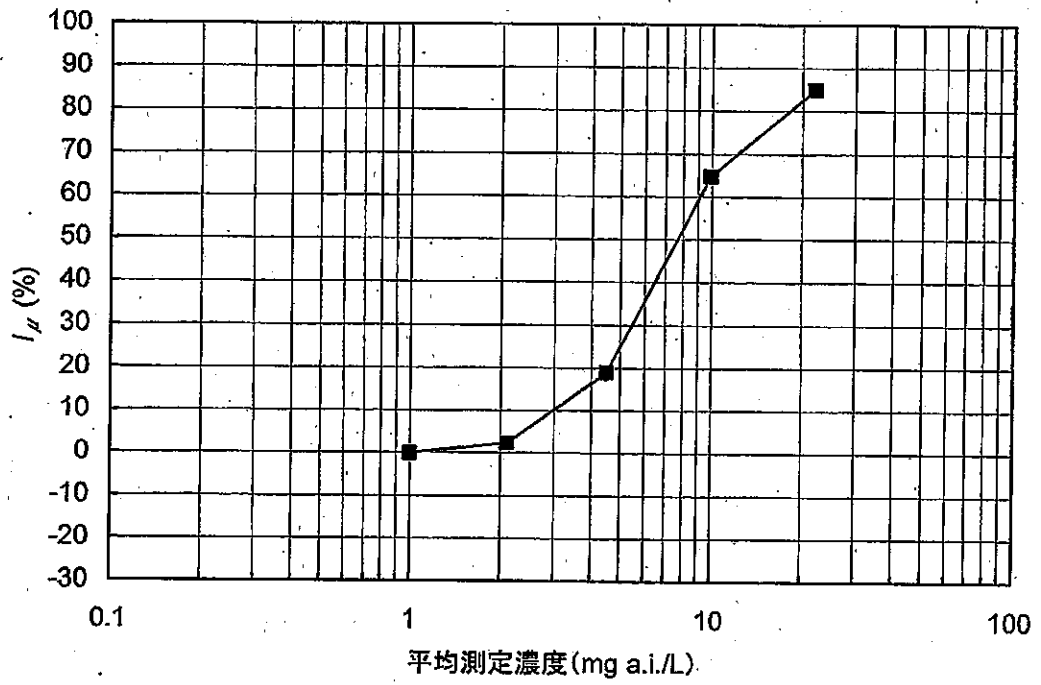


図2. 4-クロロ-2-ニトロアニリンに暴露された藻類(*P. subcapitata*)の濃度-阻害率曲線

表 1. 4-クロロ-2-ニトロアニリンの試験液中濃度

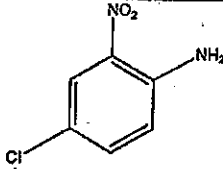
設定濃度 (mg a.i./L)	測定濃度 (mg a.i./L)		
	0 時間	72 時間	平均値
無処理対照区	<0.050	<0.050	—
1.0	1.0 [100]	1.0 [100]	1.0 [100]
2.2	2.2 [100]	2.1 [95]	2.1 [95]
4.6	4.6 [100]	4.5 [98]	4.5 [98]
10	9.9 [99]	10 [100]	9.9 [99]
22	22 [100]	22 [100]	22 [100]

[]: 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	4-クロロ-2-ニトロアニリン		
別名	—		
C A S 番号	89-63-4		
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)			
分子量	172.57		
試験に供した新規化学物質の純度 (%)	99.9		
試験に供した新規化学物質のロット番号	GJ01		
不純物の名称及び含有率	不明		
蒸気圧	不明		
対水溶解度	不明		
1-オクタノール/水分配係数	不明		
融点	118°C		
沸点	不明		
常温における性状	橙色結晶性粉末		
安定性	不明		
溶媒に対する溶解度等	溶媒	溶解度	溶媒中の安定性
	エーテル	可溶	—
	酢酸	可溶	—
	メノール	微溶	—

2. 試験溶液の被験物質濃度の分析方法

項目	方法
<p>分析方法</p>	<p>被験物質濃度が 0.05 mg a.i./L 相当量となるように試験液を超純水で希釈したものを HPLC に注入し、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 4-クロロ-2-ニトロアニリン濃度 × 希釈倍率</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: 20 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 (暴露終了時は 4 連の各試験容器から等量採取し混和後、20 mL を採取)</p>
<p>前処理法</p>	<p>必要に応じて超純水にて希釈した。</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: 超純水: アセトニトリル = 50:50 流量: 1.0 mL/min 波長: UV 230 nm 感度: 1 AU/V 注入量: 100.0 μL 定量限界: 0.050 mg a.i./L 平均回収率: 0.05 mg a.i./L (101%)、50 mg a.i./L (100%)</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 容ガラス製ビーカー
	試験用水	種類	人工調製水 Elendt M4
		硬度	250 mg/L(CaCO ₃ 換算)
		pH	8.2
	暴露期間		本試験: 2009 年 1 月 20 日~2009 年 1 月 22 日
	試験濃度(設定値)		0.50, 1.0, 2.0, 4.0, 8.0 mg a.i./L(公比 2.0)
	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		100 mL/試験容器
	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		—
	水温		19.7~19.8°C(実測値)
溶存酸素濃度(DO)		8.3~8.8 mg/L(実測値)	
明暗周期		16 時間明/8 時間暗 室内光(685~997 lux、実測値)	
結果の算出 方法	EC ₅₀	Moving average 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"> 被験物質の溶解に時間を要するため、20℃で一晩スターラー攪拌して試験原液を調製した。 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. ミジンコの濃度-遊泳阻害率曲線

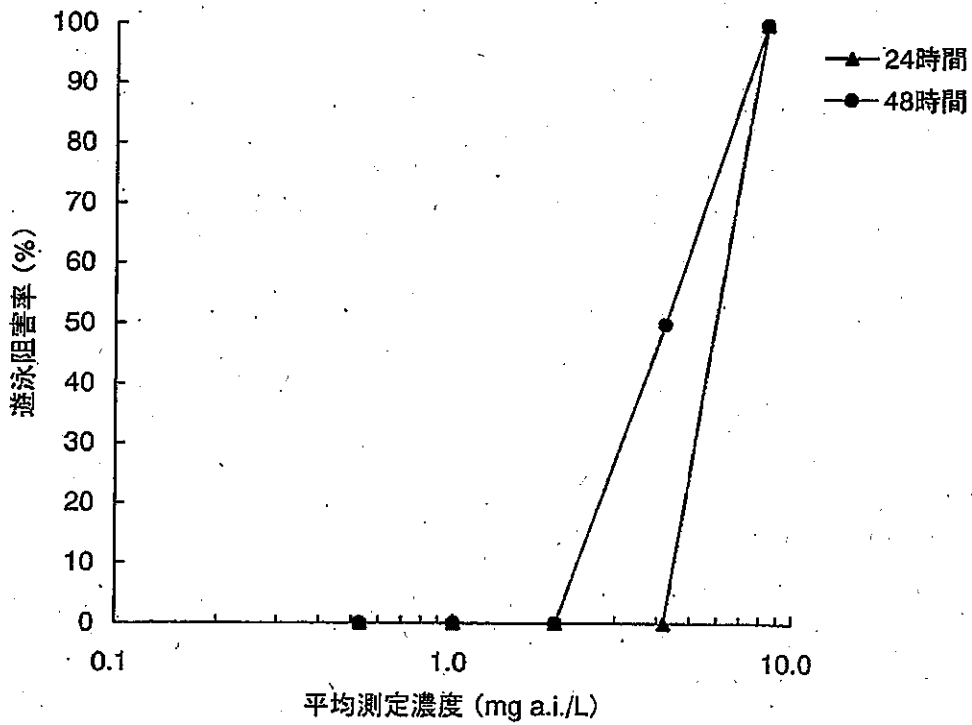


表 1. 4-クロロ-2-ニトロアニリンの試験液中濃度

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	—
0.50	0.54 [108]	0.53 [106]	0.53 [106]
1.0	1.1 [110]	1.0 [100]	1.0 [100]
2.0	2.0 [100]	2.1 [105]	2.0 [100]
4.0	4.3 [108]	4.2 [105]	4.2 [105]
8.0	8.4 [105]	8.3 [104]	8.3 [104]

[]: 設定に対する割合(%)

表 2. 4-クロロ-2-ニトロアニリンに暴露されたオオミジンコの中毒症状および累積遊泳阻害数(率)

設定濃度 (mg a.i./L)	累積遊泳阻害数および遊泳阻害率(%)		中毒症状	
	24 時間	48 時間	24 時間	48 時間
無処理対照区	0 (0)	0 (0)	異常なし	異常なし
0.50 [0.53]	0 (0)	0 (0)	A	A
1.0 [1.0]	0 (0)	0 (0)	A	A,B
2.0 [2.0]	0 (0)	0 (0)	A,B	B
4.0 [4.2]	0 (0)	10 (50)	B	B,C
8.0 [8.3]	20 (100)	20 (100)	C	C

[]: 平均測定濃度

A: 無処理対照区と同様

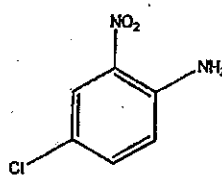
B: 異常遊泳(自発的遊泳減少)

C: 遊泳阻害(試験容器を軽く振とうした後、15 秒間全く水中を遊泳しない状態)

[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)	4-クロロ-2-ニトロアニリン		
別名	—		
C A S 番号	89-63-4		
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)			
分子量	172.57		
試験に供した新規化学物質の純度(%)	99.9		
試験に供した新規化学物質のロット番号	GJ01		
不純物の名称及び含有率	不明		
蒸気圧	不明		
対水溶解度	不明		
1-オクタノール/水分配係数	不明		
融点	118°C		
沸点	不明		
常温における性状	橙色結晶性粉末		
安定性	不明		
溶媒に対する溶解度等	溶媒	溶解度	溶媒中の安定性
	エーテル	可溶	—
	酢酸	可溶	—
	メノール	微溶	—

2. 試験溶液の被験物質濃度の分析方法

項目	方法
分析手法	<p>被験物質濃度が0.050 mg a.i./L相当量となるように試験液を超純水で希釈したものをHPLCに注入し、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</p> <p>サンプリング： 全試験区</p> <p>頻度： 暴露開始時および終了時</p> <p>サンプリング量： 20 mL</p> <p>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>
前処理法	<p>必要に応じて超純水にて希釈した。</p>
定量条件	<p>装置(HPLC)： L-7000 システム 日立製作所製</p> <p>データ処理装置： D-7000 日立製作所製</p> <p>カラム： L-column ODS (5 μm, 4.6 mm I.D×150 mm)</p> <p>カラム温度： 40°C</p> <p>移動相： 超純水：アセトニトリル=50:50</p> <p>流量： 1.0 mL/min</p> <p>波長： UV 230 nm</p> <p>感度： 1 AU/V</p> <p>注入量： 100.0 μL</p> <p>定量限界： 0.050 mg a.i./L</p> <p>平均回収率： 0.05 mg a.i./L(101%)、50 mg a.i./L(100%)</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(2.3~2.8 cm), n=20 体重: 0.14 g(0.12~0.17 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 LC50: 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	84日間 2008年10月27日~2009年1月19日	
	飼育水の種類	脱塩素水道水	
	じゅん化前の薬浴の有無	なし	
	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2%/日	
試験条件	試験容器		5 L 容総ガラス製水槽
	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	7.8
	暴露期間		2009年1月19日~2009年1月23日
	試験濃度(設定値)		4.6, 6.8, 10, 15, 22 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		5 L
	助剤	助剤の有無	なし
		種類	—
		濃度	—
	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		23±2°C
	溶存酸素濃度(DO)		6.9~8.4 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 = 17 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"> ・被験物質の溶解に時間を要するため、メカニカルスターラーで約24時間、23℃下で攪拌して試験原液を調製した。 ・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

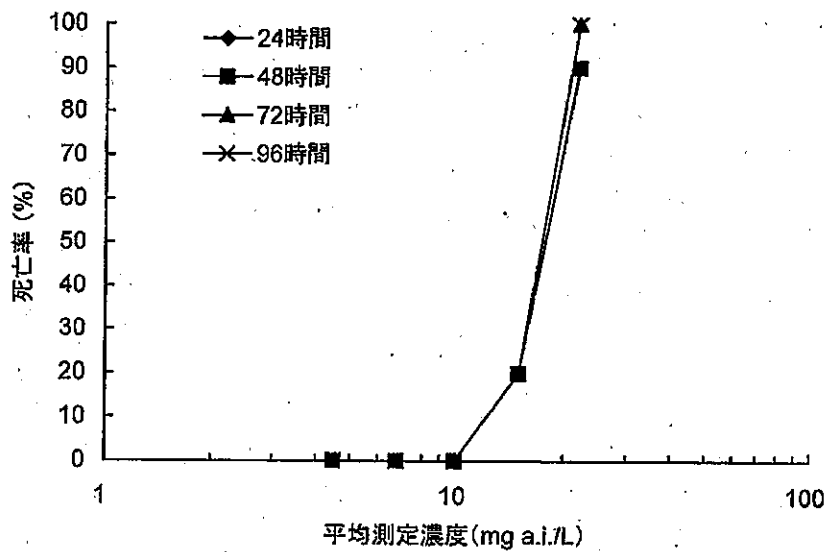


表 1. 4-クロロ-2-ニトロアニリンの試験液中濃度

設定濃度 (mg a.i./L)	測定濃度 (mg a.i./L)		
	0 時間	96 時間	平均値
無処理対照区	<0.050	<0.050	—
4.6	4.7 [102]	4.4 [96]	4.5 [98]
6.8	7.0 [103]	6.6 [97]	6.8 [100]
10	10 [100]	9.8 [98]	9.9 [99]
15	15 [100]	15 [100]	15 [100]
22	23 [105]	22 [100]	22 [100]

[]: 設定濃度に対する割合 (%)

要 旨

試験委託者 環境省

表 題 3, 4, 4' -トリクロロジフェニル尿素の藻類 (*Pseudokirchneriella subcapitata*) に対する生長阻害試験

試験番号 No. 2007-生49

試験法ガイドライン

本試験は、厚生労働省医薬食品局長、経済産業省製造産業局長、環境省総合環境政策局長連名通知「新規化学物質等に係る試験の方法について」(薬食発第 1121002 号、平成15・11・13 製局第 2 号、環保企発第 031121002 号、平成15年11月21日、平成18年11月20日一部最終改正)に従って実施した。

- 1) 被験物質 : 3, 4, 4' -トリクロロジフェニル尿素
- 2) 暴露方式 : 止水式、振とう培養 (100 rpm)
- 3) 供試生物 : *Pseudokirchneriella subcapitata* (ATCC 22662)
- 4) 暴露期間 : 72 時間
- 5) 試験濃度(設定値) : 対照区, 0.0013, 0.0028, 0.0060, 0.013, 0.028, 0.060, 0.13 mg/L
公比; 2.2,
- 6) 試験溶液量 : 100 mL (OECD 培地) / 容器
- 7) 連数 : 3 容器/濃度区、6 容器/対照区
- 8) 初期生物量 : 0.5 mg/L 以下(細胞濃度として 0.5×10^4 cells/mL)
- 9) 試験温度 : 23 ± 2 °C
- 10) 照明 : $60 \sim 120 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ (フラスコ液面付近) で連続照明
- 11) pH : 試験溶液の pH 調整は行わなかった
- 12) 分析法 : HPLC 法

結 果

1) 試験溶液中の被験物質濃度

被験物質の藻体への吸着が認められたことから、暴露試験においては、別途、藻体を接種しない区（藻体未接種区）を設けた。暴露期間中には、藻体未接種区でも高濃度区で被験物質の濃度低下がみられた。これは、培地中の NaHCO_3 の分解によって被験物質の溶解度が低下したために析出が起こり、容器への付着や沈降が生じたことによると推測される。

従って、各影響濃度（50 % 生長阻害濃度、最大無作用濃度）の算出に当たっては、藻体未接種区の暴露開始時、24 時間後、48 時間後および暴露終了時の測定値の幾何平均値を採用した。

2) 生長速度の比較による阻害濃度

50 % 生長阻害濃度 E_rC_{50}

: 0.046 mg/L (95 % 信頼限界 0.041 ~ 0.052 mg/L), Probit

最大無作用濃度 NOEC (Rate 0-72 hr)

: 0.0014 mg/L

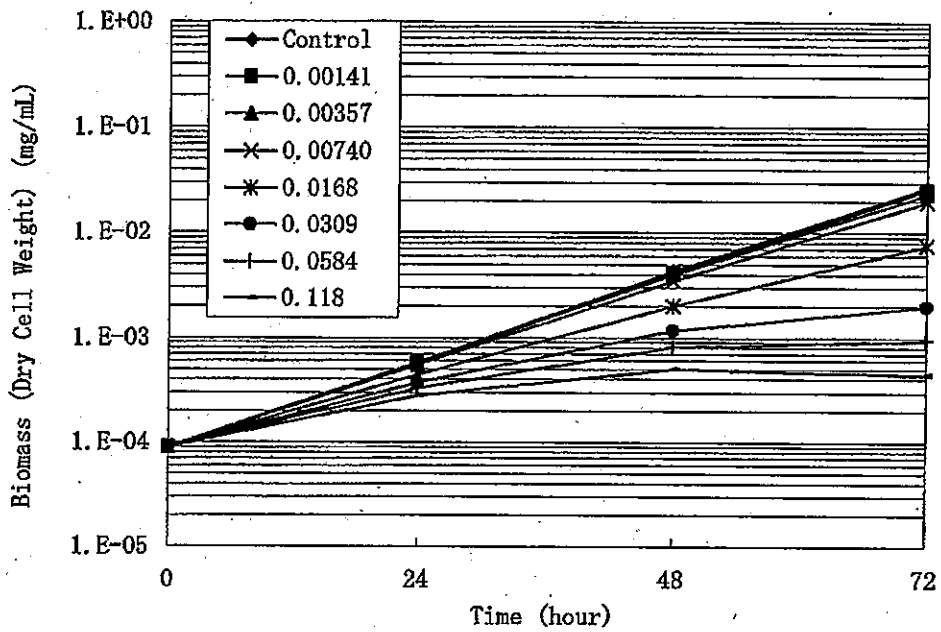


Figure 1. Algal Growth Curve of *Pseudokirchneriella subcapitata* (Biomass vs Time during the 72 hours Exposure)

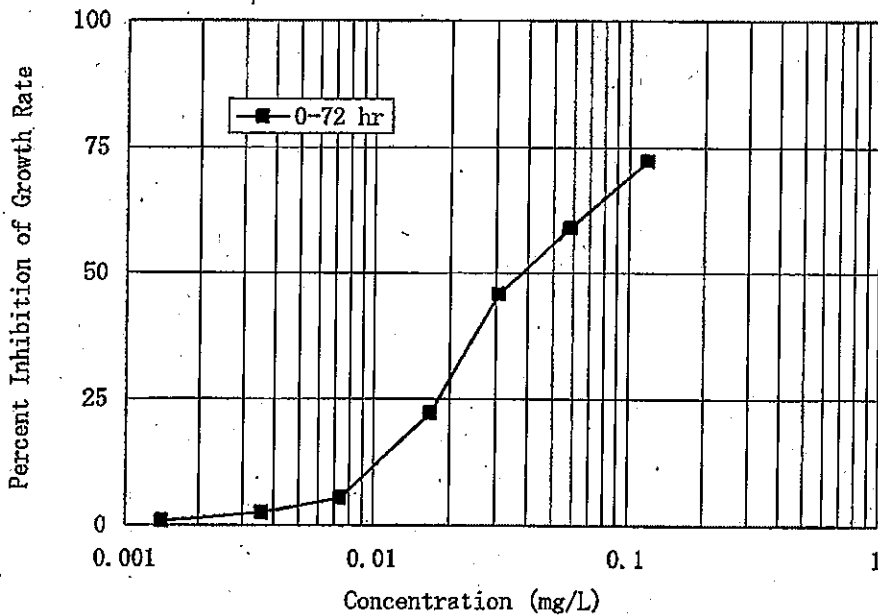


Figure 2. Concentration-Inhibition curve Based on %I Values Calculated from the Growth Curves

Table 1-1. Measured Concentration of the Test Substance in Test Water with Algae Inoculation

Nominal Concentration (mg/L)	Measured Concentration (mg/L)			Mean ^a Measured Concentration (mg/L)
	0 Hour	24 Hours	48 Hours	
Control	<0.0005 (-)	<0.0005 (-)	<0.0005 (-)	<0.0005 (-)
0.0013	0.00141 (108)	0.00142 (109)	0.00089 (68)	[0.00024] (18)
0.0028	0.00351 (125)	0.00331 (118)	0.00243 (87)	0.00078 (28)
0.0060	0.00771 (129)	0.00653 (109)	0.00518 (86)	0.00201 (34)
0.013	0.0149 (115)	0.0155 (119)	0.0131 (101)	0.00869 (67)
0.028	0.0374 (134)	0.0224 (80)	0.0202 (72)	0.0189 (68)
0.060	0.0628 (105)	0.0302 (50)	0.0281 (47)	0.0260 (43)
0.13	0.139 (107)	0.0467 (36)	0.0425 (33)	0.0379 (29)
^a : Geometric mean	- : Not calculated			
⟨⟩ : Mean measured concentration partially including the data below the lower limit of determination	[] : < Lower limit of determination			

Table 1-2. Measured Concentration of the Test Substance in Test Water without Algae Inoculation

Nominal Concentration (mg/L)	Measured Concentration (mg/L)			Mean ^a Measured Concentration (mg/L)
	0 Hour	24 Hours	48 Hours	
Control	<0.0005* (-)	<0.0005 (-)	<0.0005 (-)	<0.0005 (-)
0.0013	0.00141* (108)	0.00137 (105)	0.00148 (114)	0.00134 (103)
0.0028	0.00351* (125)	0.00351 (125)	0.00364 (130)	0.00361 (129)
0.0060	0.00771* (129)	0.00732 (122)	0.00747 (125)	0.00714 (119)
0.013	0.0149* (115)	0.0179 (138)	0.0165 (127)	0.0171 (132)
0.028	0.0374* (134)	0.0300 (107)	0.0294 (105)	0.0301 (108)
0.060	0.0628* (105)	0.0605 (101)	0.0580 (97)	0.0512 (86)
0.13	0.139* (107)	0.126 (97)	0.113 (87)	0.0943 (73)
^a : Geometric mean	- : Not calculated			
* : Use the data of Measured Concentration (0 Hours) in Table 1-1.				

要 旨

試験委託者 環境省

表題 3, 4, 4'-トリクロロジフェニル尿素のオオミジンコ (*Daphnia magna*)
に対する急性遊泳阻害試験

試験番号 No. 2007-生50

試験法ガイドライン

本試験は、厚生労働省医薬食品局長、経済産業省製造産業局長、環境省総合環境政策局長連名通知「新規化学物質等に係る試験の方法について」(薬食発第 1121002 号、平成 15・11・13 製局第 2 号、環保企発第 031121002 号、平成 15 年 11 月 21 日、平成 18 年 11 月 20 日一部最終改正)に従って実施した。

- 1) 被験物質 : 3, 4, 4'-トリクロロジフェニル尿素
- 2) 暴露方式 : 止水式
- 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(設定値) : 対照区, 0.0071, 0.010, 0.014, 0.019, 0.027,
0.037 mg/L
公比; 1.4
- 6) 試験溶液量 : 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±1 °C
- 10) 照明 : 室内光、16 時間明/8 時間暗
- 11) 給餌 : 無給餌
- 12) pH : 試験溶液の pH 調整は行わなかった
- 13) 分析法 : HPLC 法

結 果

1) 試験溶液中の被験物質濃度

暴露期間中における被験物質濃度の変動は、分析誤差が主な原因と考えられたことから、各影響濃度（50 % 遊泳阻害濃度、0 % 遊泳阻害最高濃度、100 % 遊泳阻害最低濃度）の算出に当たっては、暴露開始時および暴露終了時の測定値の算術平均値を採用した。

2) 24 時間暴露後の結果

50 % 遊泳阻害濃度 (EC ₅₀)	: 0.021 mg/L
	(95 % 信頼限界 : 0.020 ~ 0.023 mg/L), Probit
0 % 阻害最高濃度	: 0.015 mg/L
100 % 阻害最低濃度	: >0.028 mg/L

3) 48 時間暴露後の結果

50 % 遊泳阻害濃度 (EC ₅₀)	: 0.016 mg/L
	(95 % 信頼限界 : 0.014 ~ 0.017 mg/L), Probit
0 % 阻害最高濃度	: 0.0080 mg/L
100 % 阻害最低濃度	: 0.028 mg/L

Table 8. Total Hardness(as CaCO₃)

Nominal Concentration (mg/L)	Mean ^a Measured Concentration (mg/L)	Total Hardness(as CaCO ₃), mg/L	
		0 Hour new	48 Hours old
Control	-	253	257
0.0071	0.00579	253	260
0.010	0.00802	257	255
0.014	0.0107	254	254
0.019	0.0152	254	256
0.027	0.0211	252	252
0.037	0.0283	254	260

new : Freshly prepared test solutions

old : Test solutions after 48 hours exposure

a : Arithmetic mean

- : Not calculated

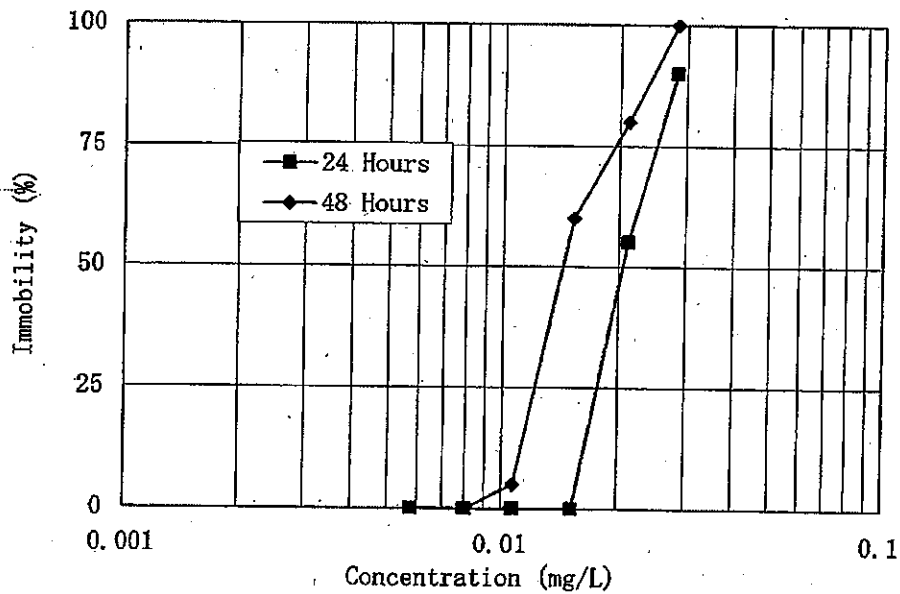


Figure 1. Concentration-Response (Immobility) Curves

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

Nominal Concentration (mg/L)	Measured Concentration (mg/L) (Percent of Nominal)				Mean ^a Measured Concentration (mg/L)
	0 Hour		48 Hours		
	New		old		
Control	<0.0005	(-)	<0.0005	(-)	-
0.0071	0.00619	(87)	0.00539	(76)	0.00579
0.010	0.00850	(85)	0.00754	(75)	0.00802
0.014	0.0108	(77)	0.0105	(75)	0.0107
0.019	0.0156	(82)	0.0148	(78)	0.0152
0.027	0.0215	(80)	0.0207	(77)	0.0211
0.037	0.0288	(78)	0.0278	(75)	0.0283

new : Freshly prepared test solutions
old : Test solutions after 48 hours exposure
a : Arithmetic mean
- : Not calculated

Table 2. The Numbers of Immobile *Daphnia*
(Static Condition)

Nominal Concentration (mg/L)	Mean ^a Measured Concentration (mg/L)	Number of <i>Daphnia</i>	Cumulative Numbers of Immobilized <i>Daphnia</i> (Percent Immobility)										
			24 Hours					48 Hours					
			1	2	3	4	Total	1	2	3	4	Total	
Control	-	20	0	0	0	0	0(0)	0	0	0	0	0	0(0)
0.0071	0.00579	20	0	0	0	0	0(0)	0	0	0	0	0	0(0)
0.010	0.00802	20	0	0	0	0	0(0)	0	0	0	0	0	0(0)
0.014	0.0107	20	0	0	0	0	0(0)	0	0	0	1	1	1(5)
0.019	0.0152	20	0	0	0	0	0(0)	4	3	3	2	12	12(60)
0.027	0.0211	20	3	3	4	1	11(55)	3	5	4	4	16	16(80)
0.037	0.0283	20	4	5	5	4	18(90)	5	5	5	5	20	20(100)

a : Arithmetic mean
- : Not calculated

要 旨

試験委託者 環境省

表 題 3, 4, 4'-トリクロロジフェニル尿素のヒメダカ (*Oryzias latipes*) に対する急性毒性試験

試験番号 No. 2007-生51

試験法ガイドライン

本試験は、厚生労働省医薬食品局長、経済産業省製造産業局長、環境省総合環境政策局長連名通知「新規化学物質等に係る試験の方法について」(薬食発第 1121002 号、平成 15・11・13 製局第 2 号、環保企発第 031121002 号、平成 15 年 11 月 21 日、平成 18 年 11 月 20 日一部最終改正)に従って実施した。

- 1) 被験物質 : 3, 4, 4'-トリクロロジフェニル尿素
- 2) 暴露方式 : 半止水式 (24 時間毎に試験溶液の全量を交換)
- 3) 供試生物 : ヒメダカ (*Oryzias latipes*)
- 4) 暴露期間 : 96 時間 (120 時間まで観察を延長)
- 5) 試験濃度 (設定値) : 対照区, 0.033 mg/L [限度試験]
- 6) 試験溶液量 : 5 L/容器
- 7) 連数 : 1 容器/試験区
- 8) 供試生物数 : 10 尾/試験区
- 9) 試験温度 : 24±1 °C
- 10) 照明 : 室内光、16 時間明/8 時間暗
- 11) 給餌 : 無給餌
- 12) 通気 : なし
- 13) pH : 試験溶液の pH 調整は行わなかった。
- 14) 分析法 : HPLC 法

結 果

1) 試験溶液中の被験物質濃度

被験物質のヒメダカへの吸着が認められたことから、ヒメダカ未投入区の実測濃度を採用した。また、暴露期間中の被験物質濃度の変動は、分析誤差によると考えられたことから、各影響濃度（50 % 死亡濃度、0 % 死亡最高濃度、100 % 死亡最低濃度および最大無作用濃度）の算出に当たっては、暴露期間中の実測濃度の算術平均値を採用した。

2) 50 % 死亡濃度 (LC₅₀)

被験物質が難水溶性物質であり、予備試験の結果、96 時間においても毒性症状が観察されなかったことから、本試験においては、観察期間を 120 時間まで延長し、96 時間までの結果と合わせて表記した。

24 時間 50 % 死亡濃度 (LC₅₀) : > 0.031 mg/L

48 時間 50 % 死亡濃度 (LC₅₀) : > 0.031 mg/L

72 時間 50 % 死亡濃度 (LC₅₀) : > 0.031 mg/L

96 時間 50 % 死亡濃度 (LC₅₀) : > 0.031 mg/L

120 時間 50 % 死亡濃度 (LC₅₀) : > 0.033 mg/L

Table 2. The Numbers of Dead Fish (Mortality)

Nominal Concentration (mg/L)	Mean ^a Measured Concentration (mg/L)	Cumulative Mortality (Percent Mortality)				(Semi-Static Condition)	
		24 Hours	48 Hours	72 Hours	96 Hours	120 Hours	
Control	-	0/10 (0)	0/10 (0)	0/10 (0)	0/10 (0)	0/10 (0)	0/10 (0)
0.033	0.0313	0/10 (0)	0/10 (0)	0/10 (0)	0/10 (0)	0/10 (0)	0/10 (0)

a : Arithmetic mean (0-96 Hour) without fish

- : Not calculated (< Lower limit of determination)

Table 3. Calculated LC₅₀ Values

Exposure Period (Hours)	LC ₅₀ (mg/L)	95 % Confidence Limits (mg/L)	Statistical Method
24	>0.031 ^a	-	-
48	>0.031 ^a	-	-
72	>0.031 ^a	-	-
96	>0.031 ^a	-	-
120	>0.033 ^b	-	-

- : Not calculated

a : Arithmetic mean (0-96 Hour) without fish

b : Arithmetic mean (0-120 Hour) without fish

Table 1. Measured Concentration of the Test Substance in Test Water

Nominal Concentration (mg/L)	Measured Concentration, mg/L (Percent of Nominal)				Mean Measured Concentration (mg/L)
	0 Hour	24 Hours	48 Hours	72 Hours	
	new	old	new	old	
Control	<0.0005 (-)	<0.0005 (-)	<0.0005 (-)	<0.0005 (-)	-
0.033	0.0304 (92)	0.0179 (54)	0.0342 (104)	0.0195 (59)	0.0249 ^a
0.033 [*]	- (-)	0.0310 [*] (94)	- (-)	0.0297 [*] (90)	0.0313 ^b

Nominal Concentration (mg/L)	Measured Concentration, mg/L (Percent of Nominal)		Mean Measured Concentration (mg/L)
	96 Hours	120 Hours	
	new	old	
Control	<0.0005 (-)	<0.0005 (-)	-
0.033	0.0384 (116)	0.0308 (93)	0.0281 ^c
0.033 [*]	- (-)	0.0356 [*] (108)	0.0332 ^d

* : Without fish

new : Freshly prepared test solutions

old : Test solutions after 24 hours exposure

a : Time-weighted mean (0-24-48-72 Hour)

b : Arithmetic mean (0-24-48-72 Hour)

c : Time-weighted mean (0-24-48-72-96-120 Hour)

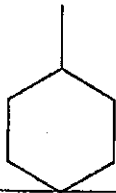
d : Arithmetic mean (0-24-48-72-96-120 Hour)

- : Not calculated

-- : Not measured (The concentration from the vessel with the fish is adapted.)

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	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	ガスクロマトグラフ質量分析 (GC/MS) 法
前処理法	<p>暴露開始時:各試験区毎に藻類を添加していない予備容器の中層より 10 mLずつ採取</p> <p>試験液 10 mL (精製水で適宜希釈*) + アセトン 0.1 mL 混合 分析試料 GC/MS測定</p> <p>暴露開始後 24, 48および 72時間:各試験区毎に藻類を添加した予備 容器の中層より10 mLずつ採取</p> <p>試験培養液 10 mL (精製水で適宜希釈*) + アセトン 0.1 mL 混合 分析試料 GC/MS測定</p> <p>* 検量線範囲を超えるものについて適宜希釈した。</p>
定量条件	別紙-1 参照

3. 試験材料及び方法

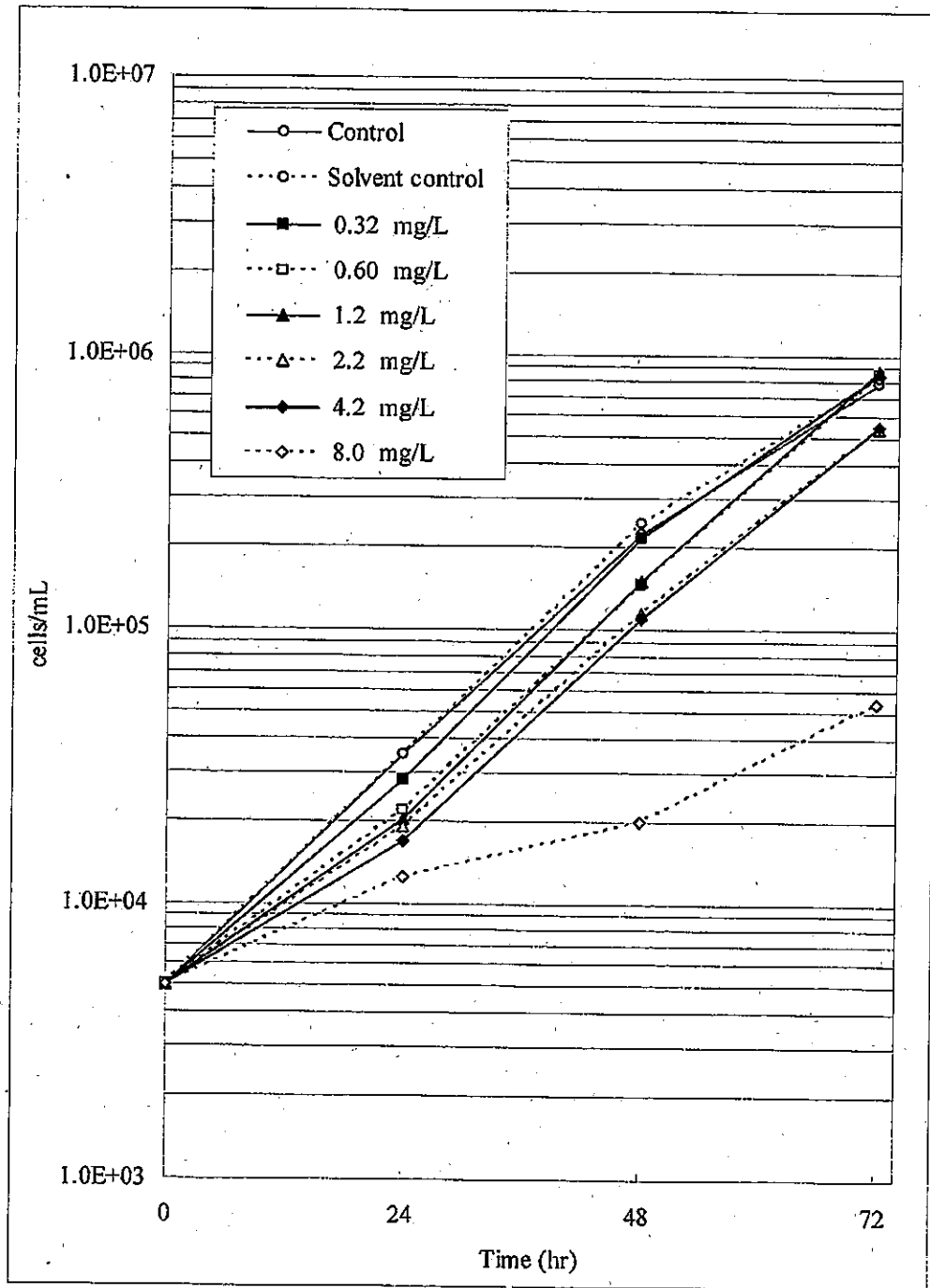
項目	内容		
試験生物	種 (学名・株名)	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> ATCC22662	
	入手先	American Type Culture Collection	
	対照物質への感受性 (EC50) (対照物質名)	72時間 ErC50 = 0.822 ± 0.0898 mg/L, n=17 重クロム酸カリウム, 試薬特級	
前培養	前培養の期間	2008年10月24日 ~ 2008年10月27日	
	培地名	試験ガイドライン推奨培地	
	環境条件 (水温, 光強度)	22°C, 60~65 μE/m ² /s	
試験条件	試験容器	500 mLガラス製共栓付き三角フラスコ (IWAKI製) (ヘッドスペース容量: 当社測定値 490 mL)	
	培地名	試験ガイドライン推奨培地	
	暴露期間	2008年10月27日~2008年10月30日	
	試験濃度 (設定値)	対照区, 助剤対照区, 0.32, 0.60, 1.2, 2.2, 4.2, 8.0 mg/L	
	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	有
		種類	アセトン
		濃度	100 mg/L
		助剤対照区の連数	6 容器
	培養方式 (振とう培養, 静置培養, 連続培養等)	止水式 (密閉系), 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)	60~65 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	ErC50 (0-72h) = 0.336 mg/L NOECr (0-72h) = 0.0666 mg/L
試験濃度	1. 設定値 ② 実測値
考察及び 特記事項	被験物質濃度は、暴露開始時の試験液において低濃度区側から 0.184, 0.434, 0.912, 1.63, 2.61, 4.39 mg/L, 暴露開始後 72 時間の試験培養液において 0.00146, 0.00205, 0.00543, 0.0120, 0.0227, 0.0362 mg/L であった。濃度減少の主な原因は、試験液または試験培養液からの被験物質の揮発が考えられた。

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.

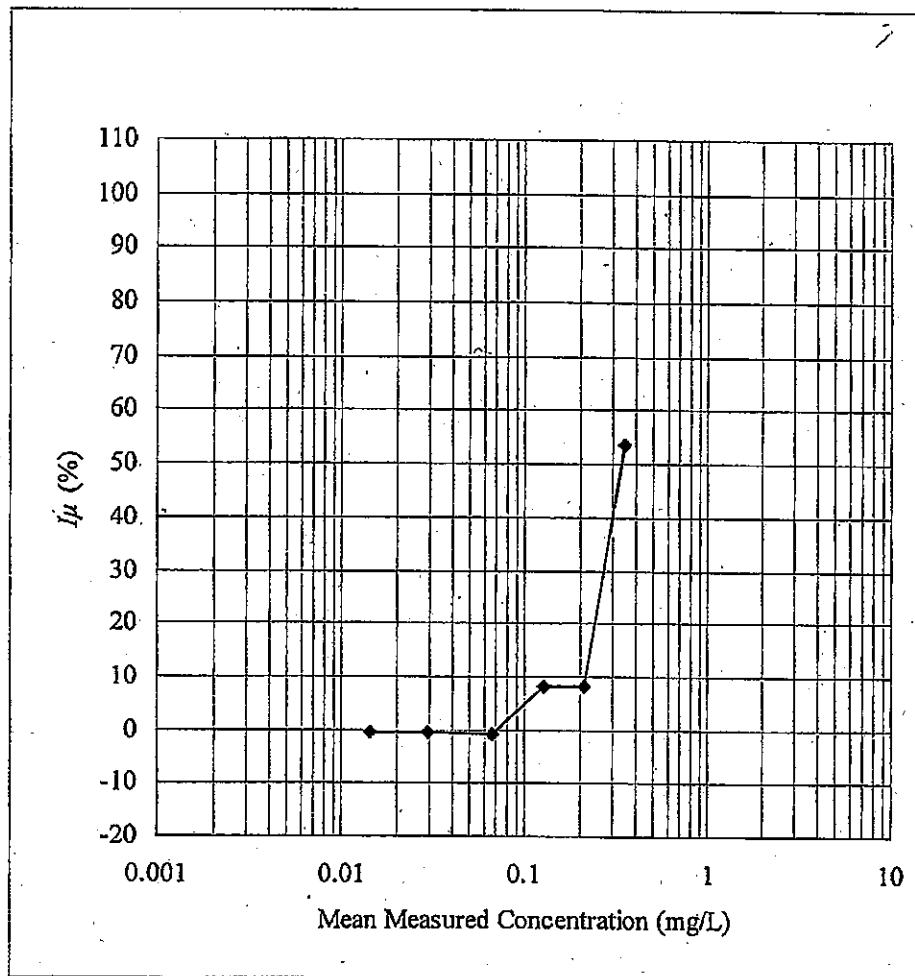
Figure 2 Concentration-Inhibition Curve Based on I_{μ} values Calculated from the Growth Rates

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	24 Hours	48 Hours	72 Hours	
Control	--	--*	n.d.	n.d.	n.d.	---
Solvent control	--	--*	n.d.	n.d.	n.d.	---
Conc.1	0.32	0.184 (58)	0.00183 (0.6)	0.00173 (0.5)	0.00146 (0.5)	0.0143 (4.5)
Conc.2	0.60	0.434 (72)	0.00256 (0.4)	0.00256 (0.4)	0.00205 (0.3)	0.0296 (4.9)
Conc.3	1.2	0.912 (76)	0.00715 (0.6)	0.00677 (0.6)	0.00543 (0.5)	0.0666 (5.6)
Conc.4	2.2	1.63 (74)	0.0169 (0.8)	0.0170 (0.8)	0.0120 (0.5)	0.128 (5.8)
Conc.5	4.2	2.61 (62)	0.0295 (0.7)	0.0315 (0.8)	0.0227 (0.5)	0.211 (5.0)
Conc.6	8.0	4.39 (55)	0.0483 (0.6)	0.0472 (0.6)	0.0362 (0.5)	0.351 (4.4)

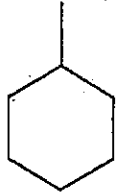
a : Time weighted mean

n.d.: Not detected (<0.0001 mg/L)

* : Trace of the test substance was detected. The concentration of the control and solvent control were 0.0005 and 0.0009 mg/L, respectively.

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	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℃		
対水溶解度	不溶 (14.0 mg/L 25℃)		
1-オクタノール/水分配係数	3.61		
融点	-127℃		
沸点	100℃		
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資料による。ただし * の内容は以下の通り。

*1 環境省資料による。

*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://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 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		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

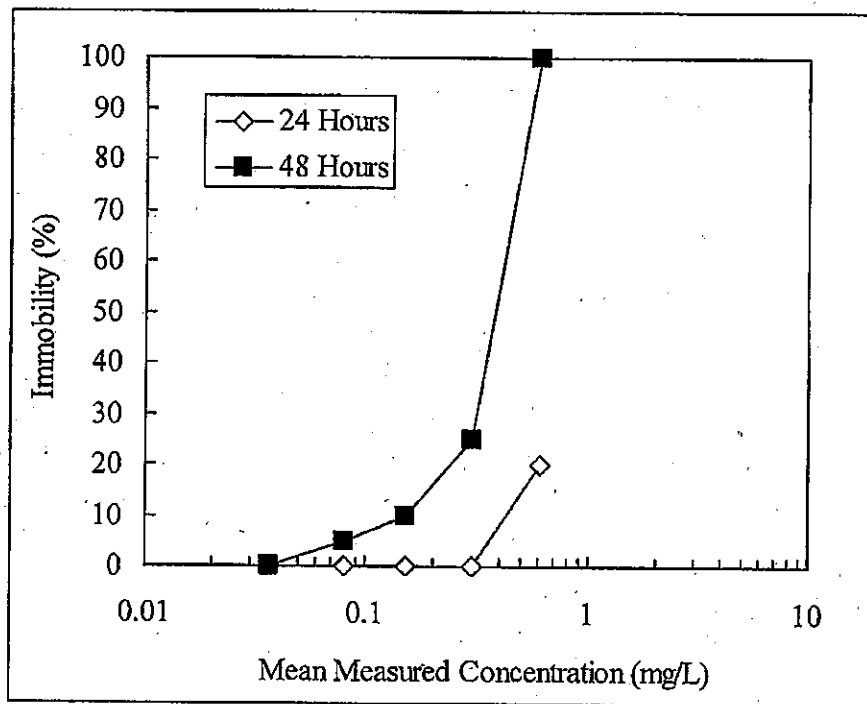


Table 5 Measured Concentrations of the Test Substance in Test Solutions

(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)

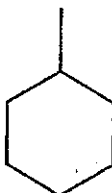
a: Time-weighted mean

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

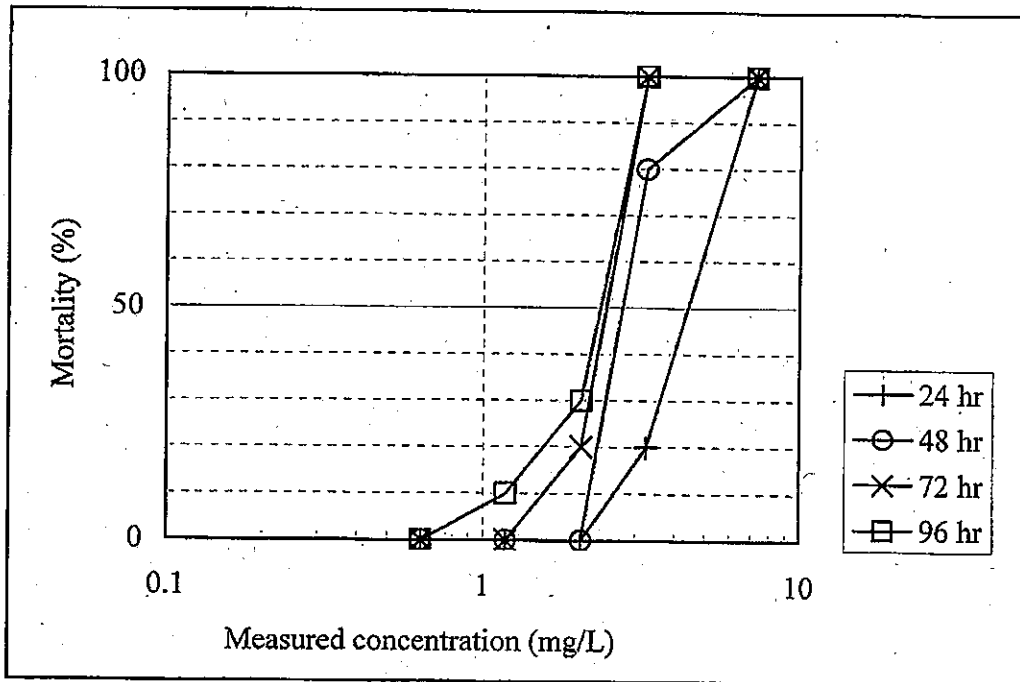


Table 5 Measured Concentrations of the Test Substance in Test Water

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)] A --> C[←クロロホルム 8 mL (メスシリンダー)] A --> D[・振とう (10 分間)] B --> E[水層] C --> F[クロロホルム層] D --> F F --> G[・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] F --> H[・定容 10 mL (クロロホルム, メスフラスコ)] G --> I[GC 試料] H --> I </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	①10 $^{\circ}$ C/min ②50 $^{\circ}$ C/min
	カラム流量	200 $^{\circ}$ C
	水素	ヘリウム
	空気	カラム流量 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

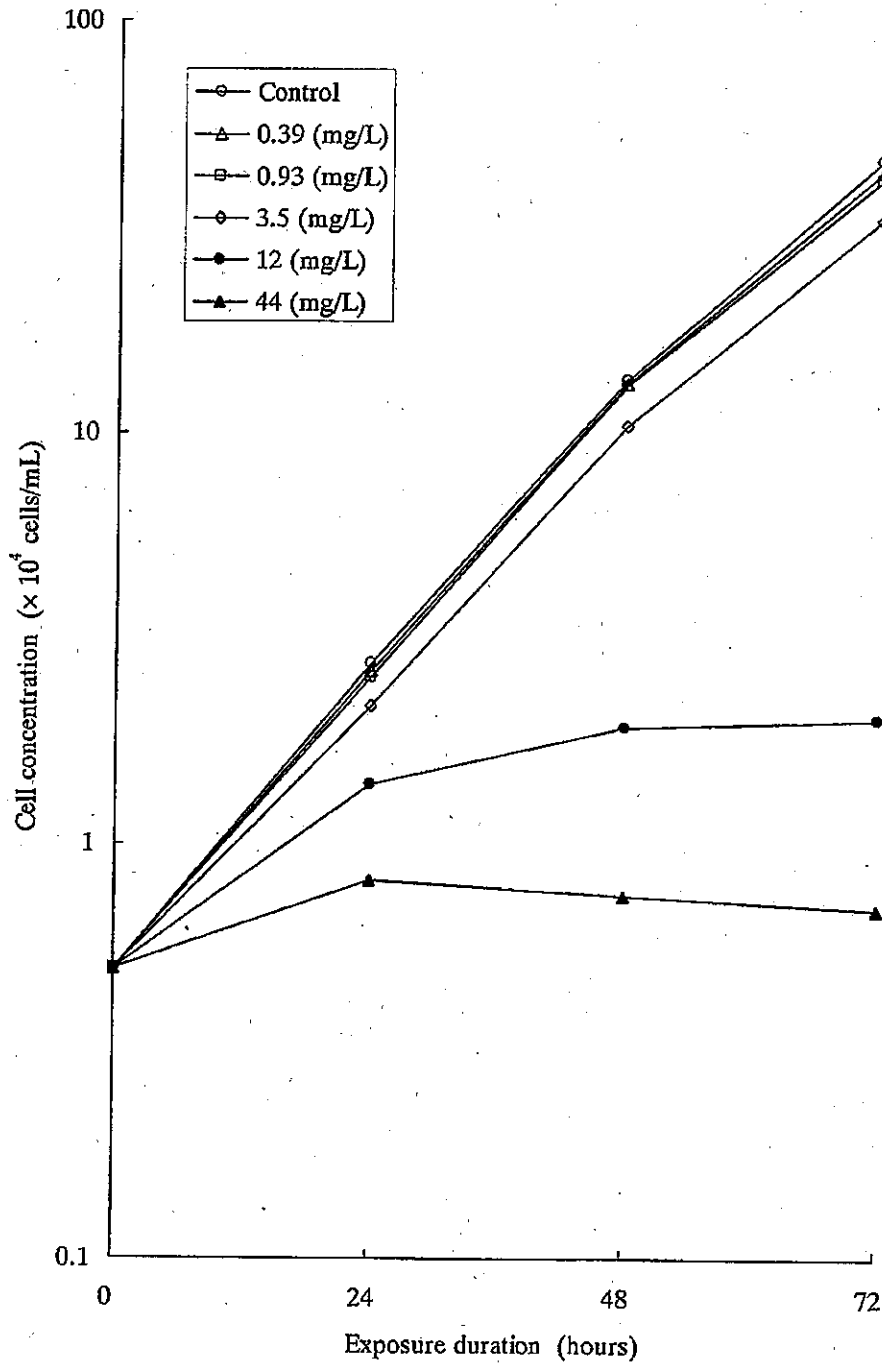
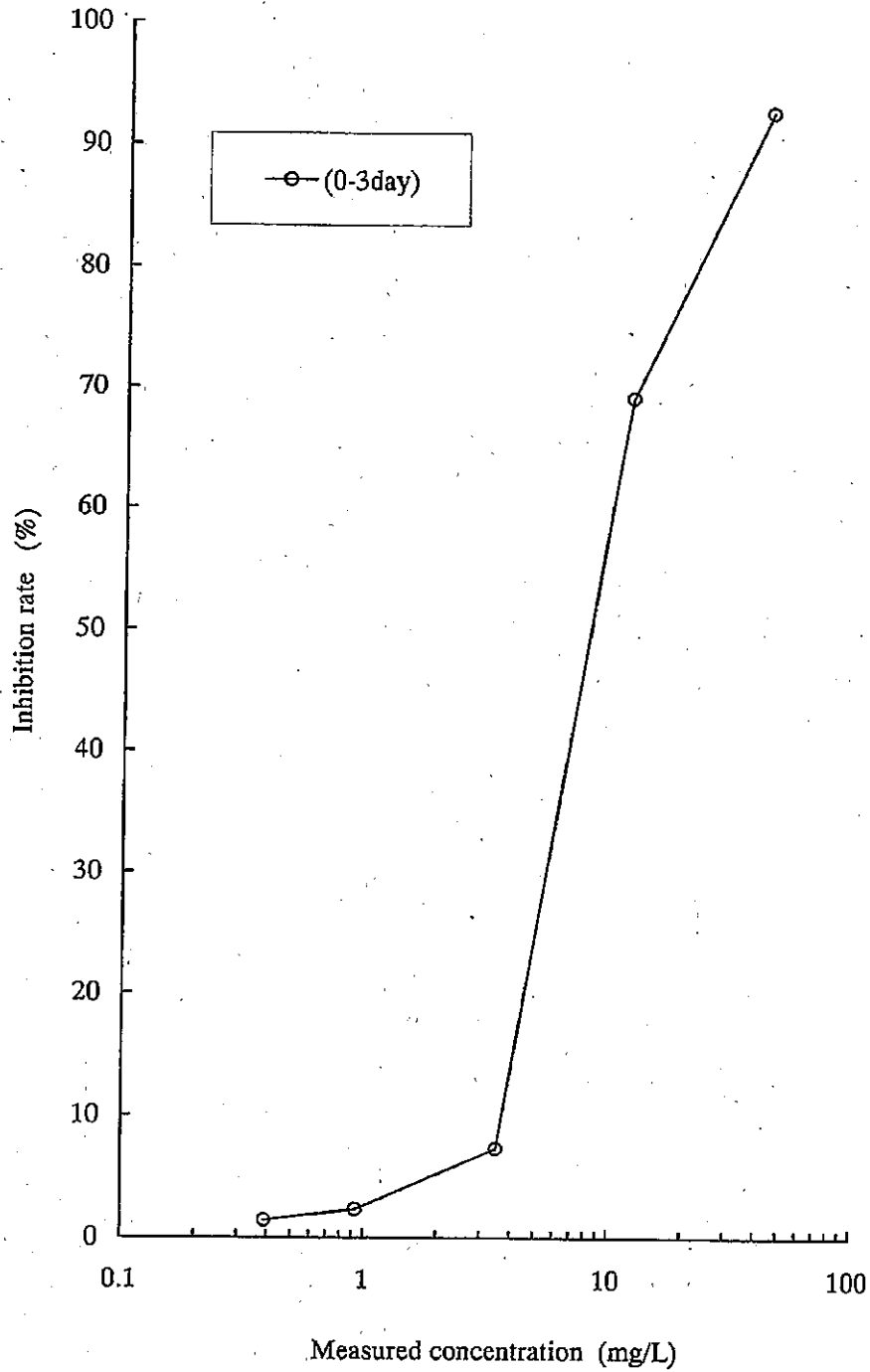


図2 藻類の濃度-生長阻害率曲線 (生長速度)



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 :

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

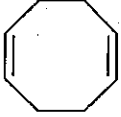
where

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

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

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)	1,5-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、換水前後及び暴露終了時 ・採取量：約 150 mL (全試験区) ・採取方法：暴露開始時及び換水後；調製容器より別途分取した。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* 100 mL] --> B[←塩化ナトリウム 30 g (電子上皿天びん)] A --> C[←クロロホルム 8 mL (メスシリンダー)] A --> D[・振とう (10 分間)] B --> E[水層] C --> F[クロロホルム層] D --> F F --> G[・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] F --> H[・定容 10 mL (クロロホルム, メスフラスコ)] G --> I[GC 試料] H --> I </pre> <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°C (1 min) $\xrightarrow{\textcircled{1}}$ 100°C (0 min) $\xrightarrow{\textcircled{2}}$ 200°C (0 min)
	昇 温 速 度	$\textcircled{1}$ 10°C/min $\textcircled{2}$ 50°C/min
	試料導入部温度	200°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
	パーシ流量	20 mL/min
	パーシ時間	2 min
	検 出 器	
	検出器温度	200°C
検出器感度	レンジ 2 ⁰	
平均回収率 : 94%		
定量下限値 : 0.053 mg/L		

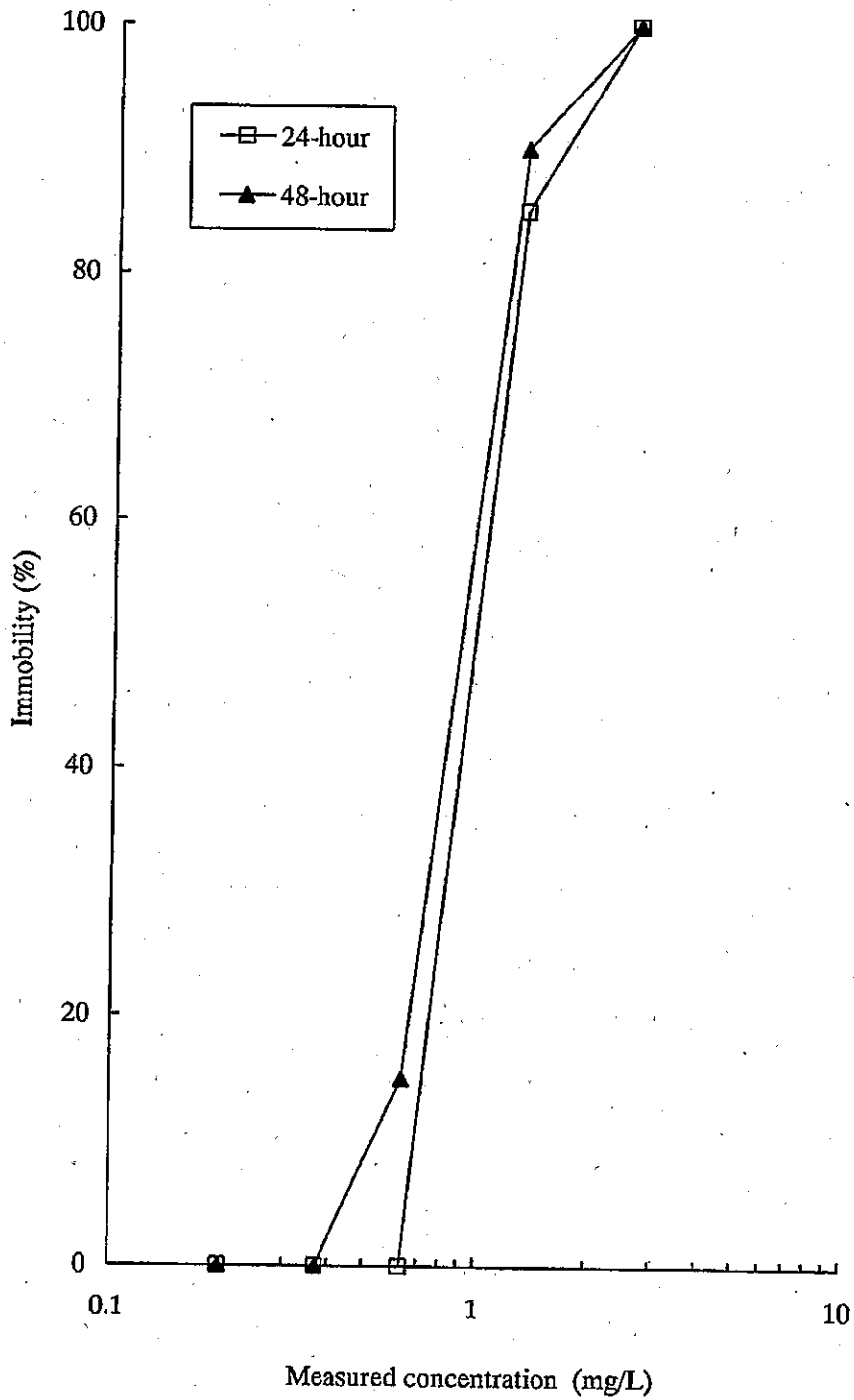
3. 試験材料及び方法

項 目		内 容	
試験生物	種 (学名・株名)	オオミジンコ (<i>Daphnia magna</i> Clone A)	
	入手先	英国 Sheffield 大学 (所在地 Sheffield S10 2UQ, United Kingdom)	
	対照物質への感受性 (EC ₅₀) (対照物質名)	48hEC ₅₀ : 0.31 mg/L ニクロム酸カリウム (和光純薬工業製 試薬特級)	
飼 育	飼育水の種類	脱塩素水道水	
	環境条件 (水温、明暗周期)	20±1℃ 16 時間明/8 時間暗 (室内灯)	
試験条件	試験容器	腰高シャーレ (内径 8.0 cm、深さ 5.0 cm) ガラス製の蓋を設置	
	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 16 日～2008 年 12 月 18 日	
	試験濃度 (設定値)	5 濃度区 [試験原液の含有率が 4.0、2.0、1.0、0.50 及び 0.25% (公比 2.0)]	
	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	約 250 mL/試験容器	
	助剤	助剤の有無	無
		種類	—
		濃度	—
		助剤対照区の連数	—
	試験方式	半止水式、密閉系	
	換水又は流水条件	暴露開始 24 時間後に試験液の全量を交換	
水温	20±1℃		
溶存酸素濃度 (DO)	8.7 mg/L		
明暗周期	16 時間明/8 時間暗 (室内灯)		
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	48hEC ₅₀ : 0.87 mg/L (95%信頼限界 : 0.75~1.0 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 (20±1℃) : 87 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 : 嗜眠状態、遊泳阻害及び活動度の低下</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 EC₅₀ を求める試験として行った。その結果、被験物質のオオミジンコに対する 48 時間 EC₅₀ は 0.87 mg/L であった。試験液中の被験物質濃度は調製濃度のほぼ±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. ミジンコの濃度-遊泳阻害曲線



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

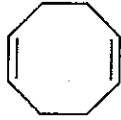
Stock solution content (%)	Measured concentration (mg/L) (Compared to concentration at each preparation ^a %)				
	At the start	24 hours		At the end	Geometric mean
		Before the renewal	After the renewal		
Control	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
0.25	0.21	0.19 (91)	0.20	0.20 (99)	0.20
0.50	0.35	0.32 (91)	0.42	0.40 (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) $\xrightarrow{\text{①}}$ 100 $^{\circ}$ C (0 min) $\xrightarrow{\text{②}}$ 200 $^{\circ}$ C (0 min)
	昇 温 速 度	①10 $^{\circ}$ C/min ②50 $^{\circ}$ 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	

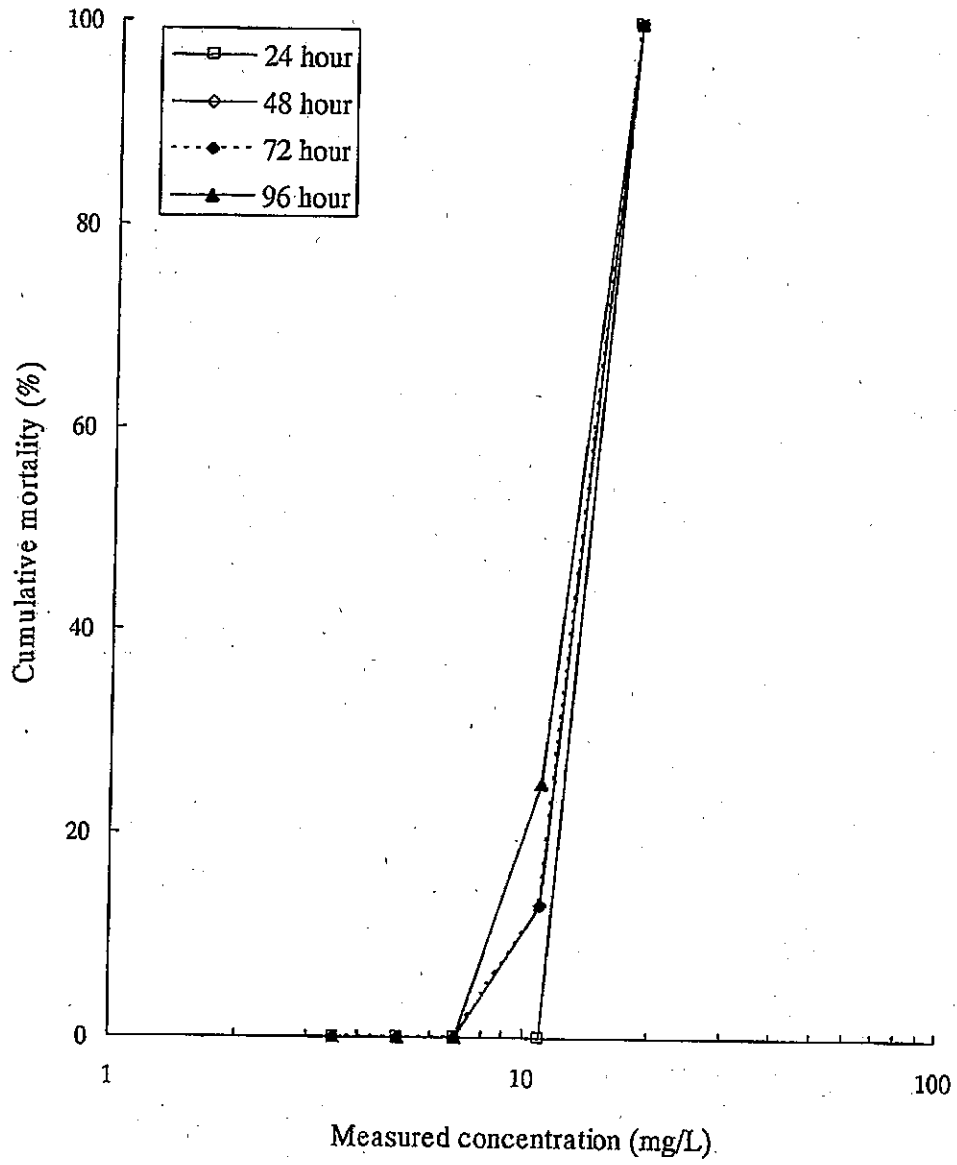
3. 試験材料及び方法

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

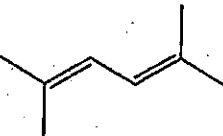
^b : It indicates the measured value at the time that confirmed all test organisms dead.

- : 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

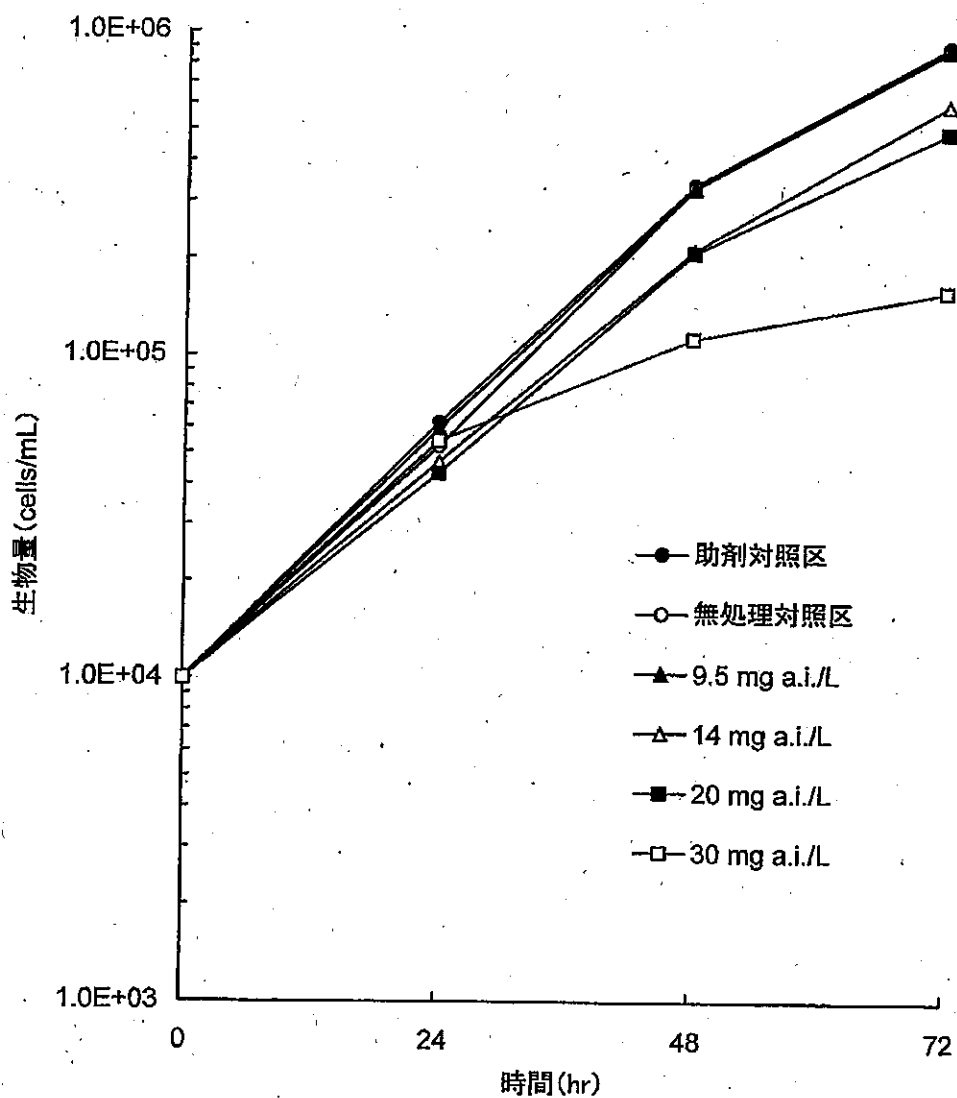


図 1. 藻類の生長曲線

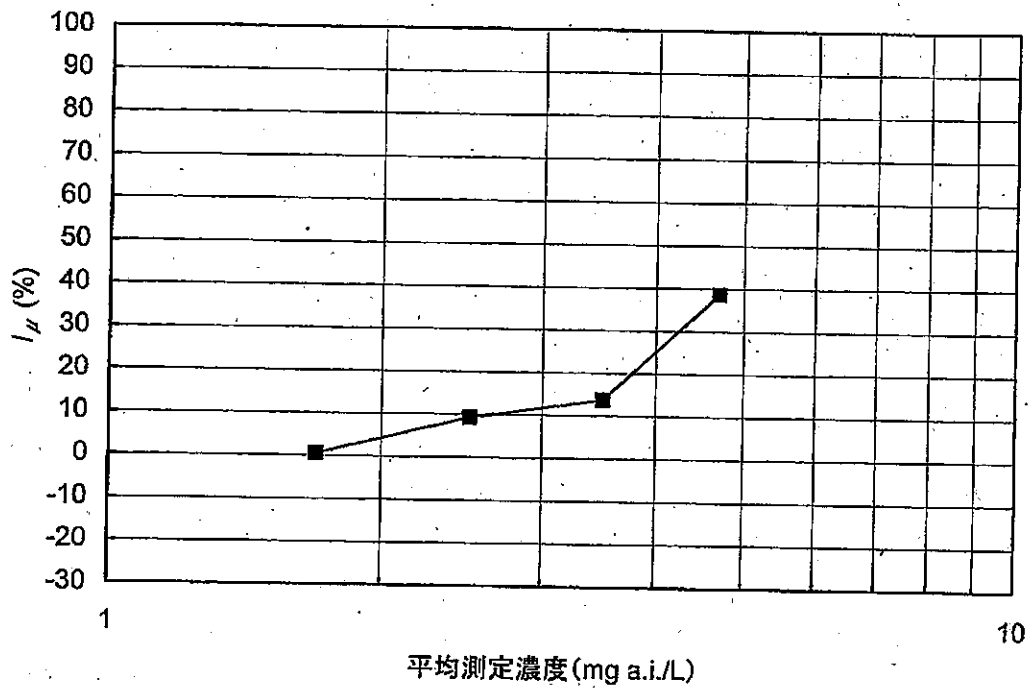


図2. 2,5-ジメチルヘキサ-2,4-ジエンに暴露された藻類(*P. subcapitata*)の濃度-阻害率曲線

表 1. 2,5-ジメチルヘキサ-2,4-ジエンの試験液中濃度

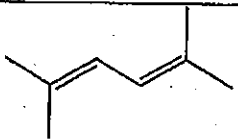
設定濃度 (mg a.i./L)	測定濃度(mg a.i./L)				
	0 時間	24 時間	48 時間	72 時間	平均値
助剤対照区	<0.050	<0.050	<0.050	<0.050	—
無処理対照区	<0.050	<0.050	<0.050	<0.050	—
9.5	8.8 [93]	1.2 [13]	1.0 [11]	0.87 [9.2]	1.7 [18]
14	14 [100]	1.5 [11]	1.6 [11]	1.2 [8.6]	2.5 [18]
20	18 [90]	2.2 [11]	1.8 [9.0]	2.0 [10]	3.5 [18]
30	22 [73]	3.3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

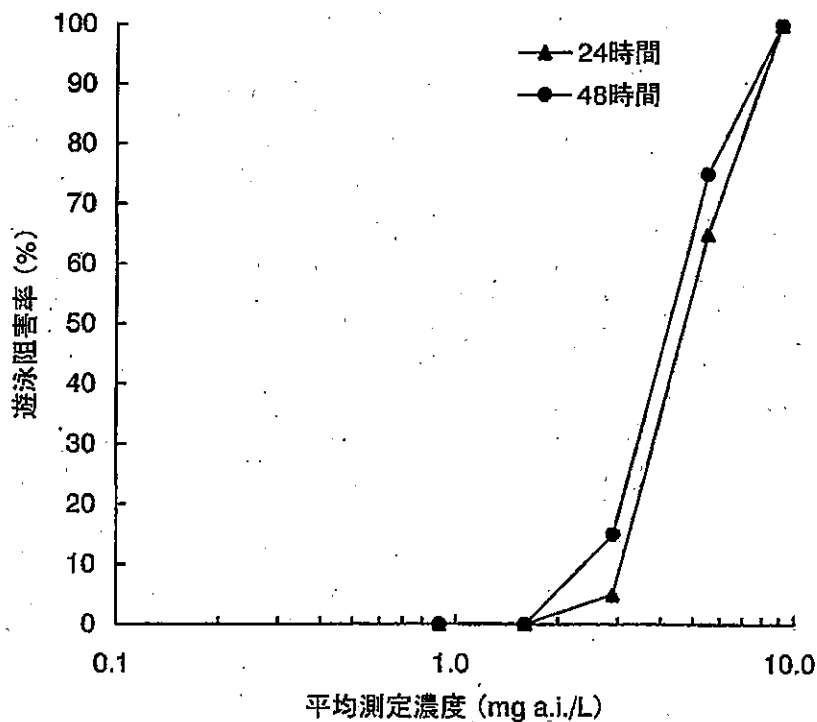


表 1. 2,5-ジメチルヘキサ-2,4-ジエンの試験液中濃度

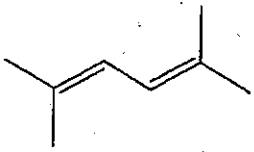
設定濃度 (mg a.i./L)	測定濃度 (mg a.i./L)		
	0 時間	48 時間	平均値
無処理対照区	<0.050	<0.050	—
助剤対照区	<0.050	<0.050	—
1.0	0.98 [98]	0.82 [82]	0.90 [90]
1.8	1.7 [94]	1.5 [83]	1.6 [89]
3.2	3.0 [94]	2.9 [91]	2.9 [91]
5.6	5.9 [105]	5.1 [91]	5.5 [98]
10	9.5 [95]	8.7 [87]	9.1 [91]

[]: 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, 4.6mmI.D×150mm) カラム温度: 40°C 移動相: メタノール:水=90:10 流量: 1.0mL/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

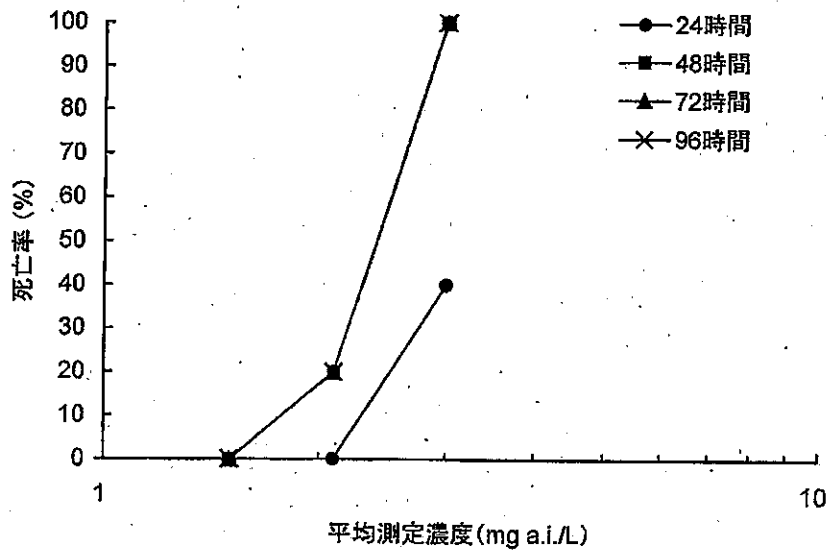


表 1. 2, 5-ジメチルヘキサ-2, 4-ジエンの試験液中濃度

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

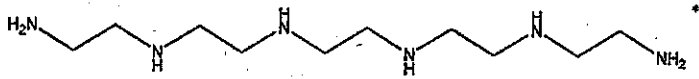
旧: 調製 24 時間後

[]: 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>
<p>定量条件</p>	<p>別紙-1 参照</p>

3. 試験材料及び方法

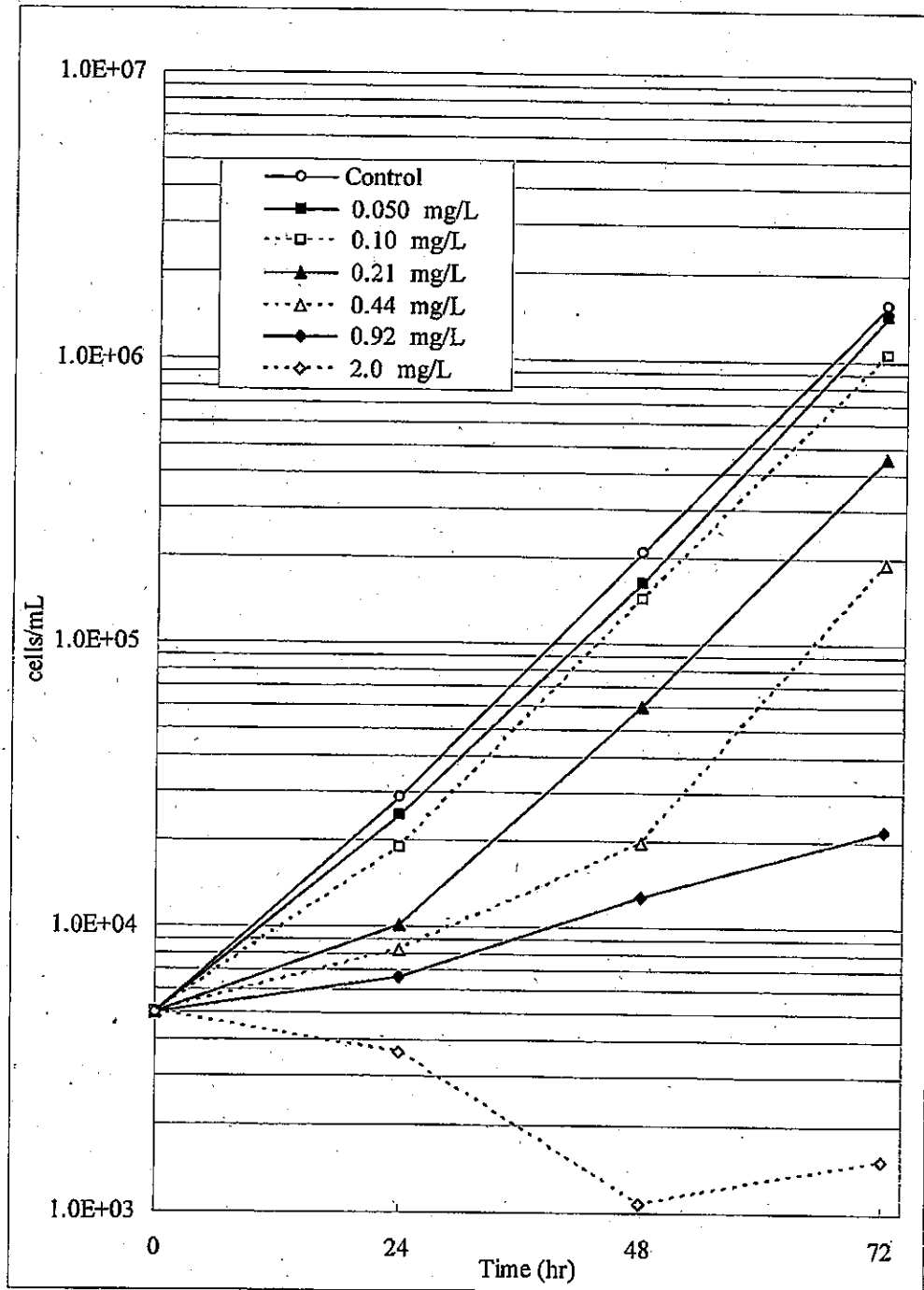
項目	内容		
試験生物	種 (学名・株名)	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> ATCC22662	
	入手先	American Type Culture Collection	
	対照物質への感受性 (EC50) (対照物質名)	72時間 ErC50 = 0.823 ± 0.0871 mg/L, n=18 重クロム酸カリウム, 試薬特級	
前培養	前培養の期間	2009年 3月13日 ~ 2009年 3月16日	
	培地名	試験ガイドライン推奨培地	
	環境条件 (水温, 光強度)	22°C, 65~75 μE/m ² /s	
試験条件	試験容器	300 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	暴露開始時の測定値により算出した結果 ErC50(0-72h) : 0.508 mg/L (95%信頼区間：算出不可) NOECr(0-72h) : 0.0863 mg/L (純度換算値) ErC50(0-72h) : 0.424 mg/L (95%信頼区間：算出不可) NOECr(0-72h) : 0.0721 mg/L
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

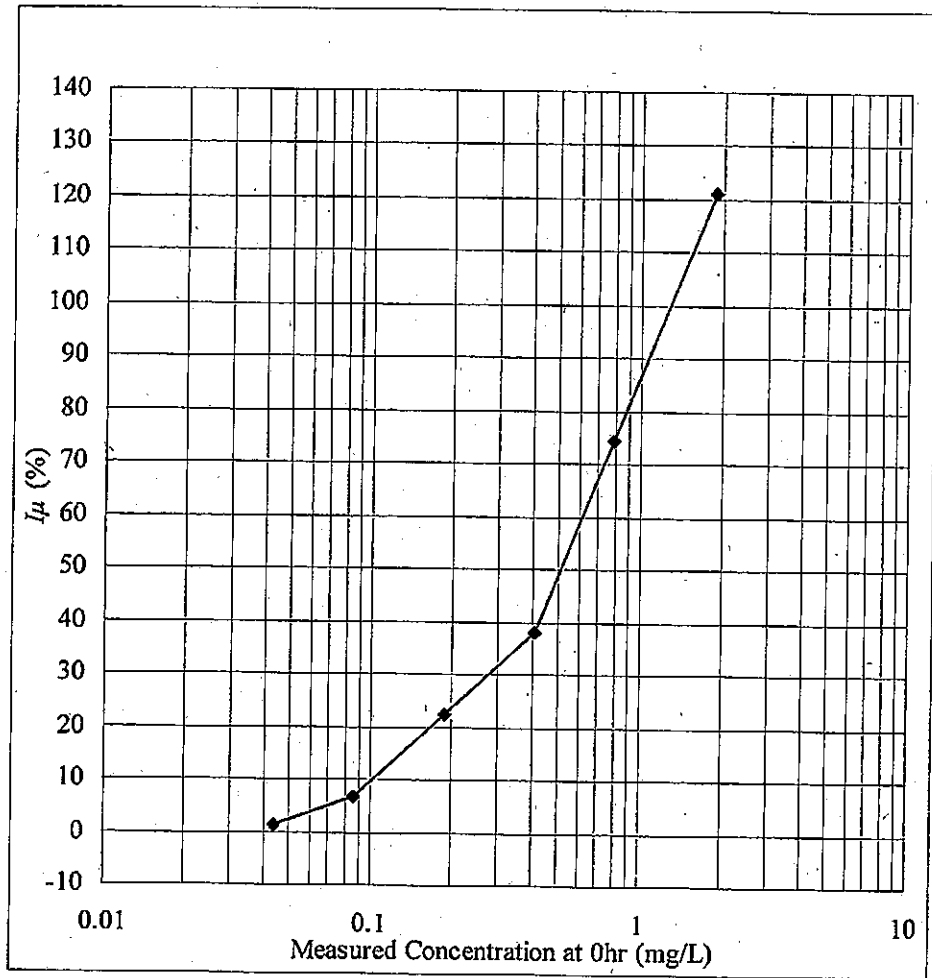


Table 4 Measured Concentration of the Test Substance in Test Cultures

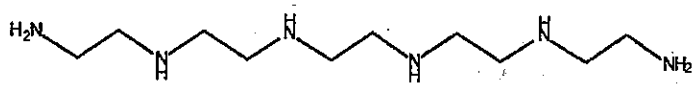
Test Group	Nominal Concentration (mg/L)	Measured Concentration (mg/L) (Percent of Nominal)		Mean ^a Measured Concentration (mg/L) (Percent of Nominal)
		0 Hour	72 Hours	
Control	--	<0.03	<0.03	---
Conc.1	0.050	0.0434	--*	---
		(87)	--	---
Conc.2	0.10	0.0863	--*	---
		(86)	--	---
Conc.3	0.21	0.188	<0.03	---
		(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, 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	

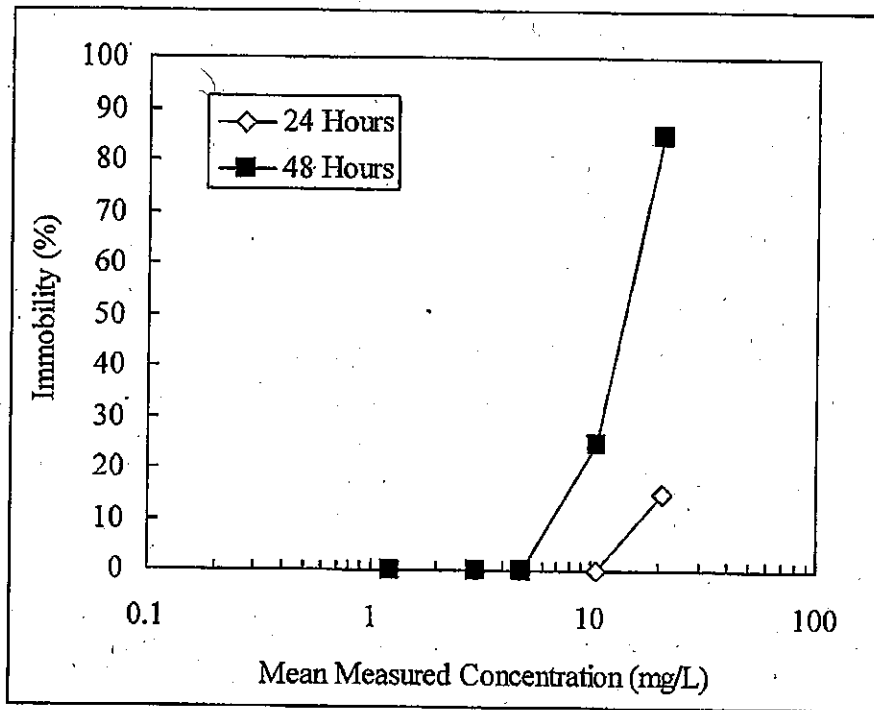
結果の算出方法	EC50	pH調整なし：Probit法 (Probit法, Moving average法, Binomial法での算出結果から適切と判断されたものを採用) pH調整あり：Binomial法 (Probit法, Moving average法, Binomial法での算出結果から適切と判断されたものを採用)
---------	------	--

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. ミジノコの濃度-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) :

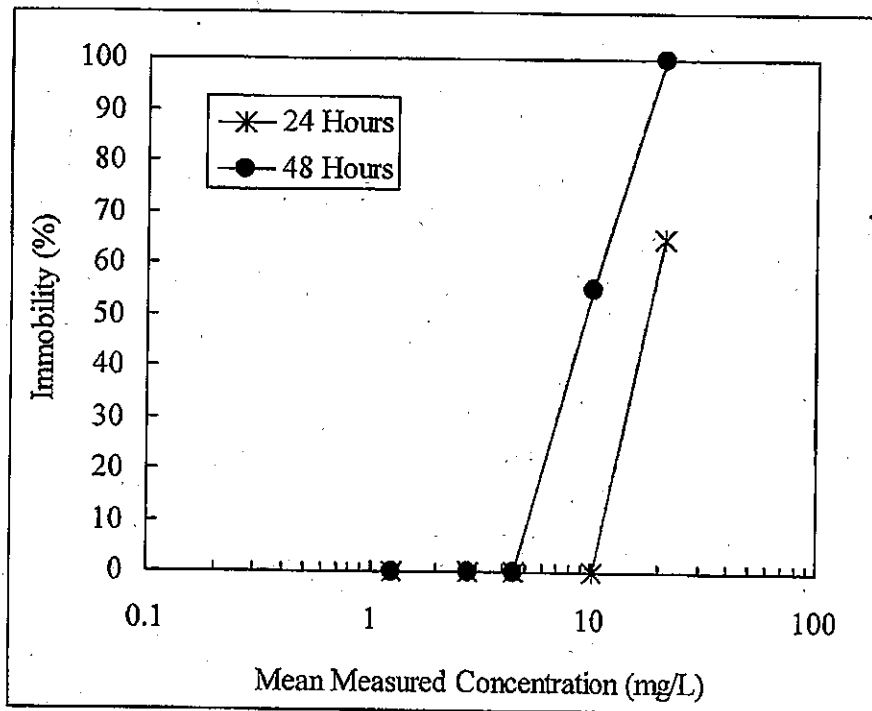


Table 5 Measured Concentrations of the Test Substance in Test Solutions

(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)

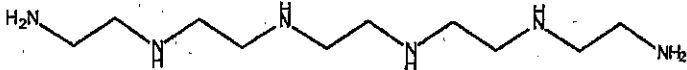
a: Time-weighted mean

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
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

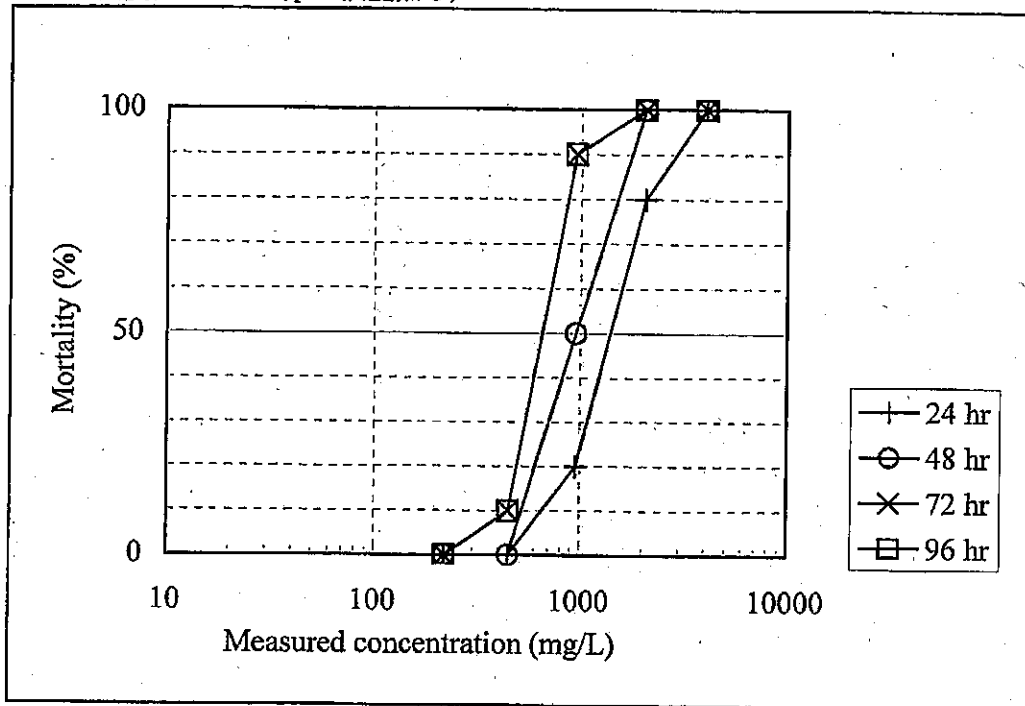
結果の 算出方法	LC50	pH調整無し：Probit法 pH調整有り：Probit法 (Probit法, Moving average法, Binomial法での算出 結果から適切と判断されたものを採用)
-------------	------	--

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)

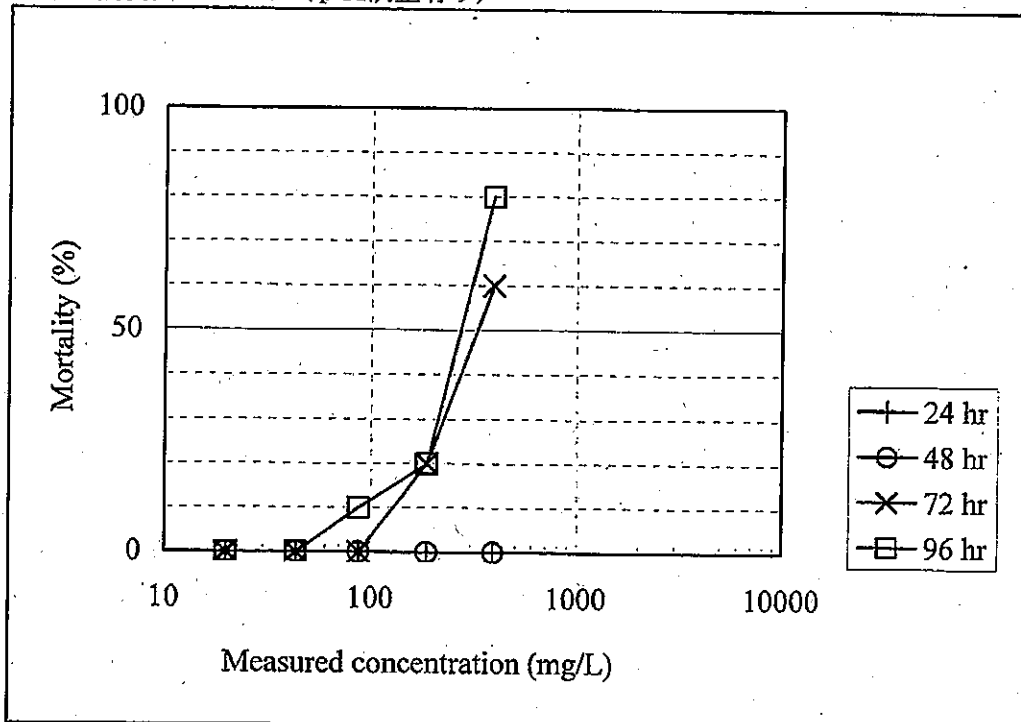


Table 5 Measured Concentrations of the Test Substance in Test Water

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.