

## 既存化学物質の生態影響に関する情報

平成22年12月17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
2-224	75-91-2	tert - ブチル = ヒドロペルオキシド	1
4-19	92-69-3	p - フェニルフェノール	18
3-78	95-75-0	3, 4 - ジクロロトルエン	30
3-1232	122-57-6 937-53-1 1896-62-4	ベンザルアセトン	43
3-78	19398-61-9	2, 5 - ジクロロトルエン	59

## 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)	tert-ブチル=ヒドロペルオキシド		
別 名	tert-Butyl Hydroperoxide (70%水溶液)		
C. A. S. 番 号	75-91-2		
構造式又は示性式 (いずれも不明な場合は、 その製法の概要)	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\   \\ \text{H}_3\text{C}-\text{C}-\text{OOH} \\   \\ \text{CH}_3 \end{array}$		
分 子 量	90.12		
試験に供した新規 化学物質の純度 (%)	66.0%		
試験に供した新規 化学物質のロット番号	GI26E		
不 純 物 の 名 称 及 び 含 有 率	その他 水 (入手先 [東京化成工業] からの情報)		
蒸 気 圧	38.1(mmHg, 25°C)(MPBPVP v1.43)		
対 水 溶 解 度	70%以上		
1-オクタノール/水分配係数	情報なし		
融 点	情報なし		
沸 点	情報なし		
常温における性状	透明液体		
安 定 性	情報なし		
溶媒に対する溶解度等	溶媒	溶解度	溶媒中の安定性
	OECD 培地	≥ 100 mg/L(23°C)	情報なし

[備 考] 物理化学的性状は、可能な限り記入すること。

1. 「蒸気圧」の欄には、被験物質の蒸気圧を記入すること。
2. 「安定性」の欄には、温度、光等に対する安定性を記入すること。
3. 「溶媒に対する溶解度等」の欄には、被験物質の溶媒に対する溶解度及びその溶媒中での安定性を記入すること。

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ィー (GC)
前処理法	試験溶液を採取してよく混合し、遠心分離 (3000 rpm、10 分間) を行った。得られた上澄み液を GC により分析した。
定量条件	GC 条件 カラム : Nukol 25327 (F.T. 0.5 μm)、0.53 mm I.D. × 30 m (SUPELCO) カラム温度 : 初期温度 40°C (0.5 分間保持) 40°C - 200°C (昇温速度 ; 10°C/min) 最終温度 200°C (1 分間保持) 注入口温度 : 240°C 検出器 : FID 検出器温度 : 250°C 注入量 : 2.0 μL 注入方法 : スプリットレス キャリアーガス : ヘリウム 5.0 mL/min (コンスタントフロー) 検出器ガス : 水素 40 mL/min、空気 450 mL/min メークアップガス : ヘリウム 20 mL/min (メークアップ+カラム流量)

[備考]

1. 「分析方法」の欄には、実測した分析法を具体的に記入すること。
2. 「前処理法」の欄には、分析を行う前に実施した処理の概要を記入すること。藻類においては細胞の分離手法を明記すること。
3. 「定量条件」の欄には、分析に用いた機器や温度・溶離液等の分析の条件を記入すること。

### 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> (NIES-35 株)	
	入手先	国立環境研究所より2008年7月3日に入手し、当事業所において継代培養したもの	
	対照物質への感受性 (EC <sub>50</sub> ) (対照物質名)	対照物質名：重クロム酸カリウム (試薬特級、和光純薬工業) 72時間 ErC <sub>50</sub> の背景データ：1.4 (n=1、2009年6月実施)	
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)	23.0°C、81~84 µE/m <sup>2</sup> /s (フラスコ液面付近) で連続照明	
試験条件	試験容器	アルミキャップ付 300 mL ガラス製三角フラスコ (密閉無し)	
	培地名	OECD 培地	
	暴露期間	2010年3月20日~2010年3月23日	
	試験濃度 (設定値)	0.0854、0.188、0.414、0.910、2.00、4.40 mg/L (公比 2.2) および対照区	
	初期生物量	5,000 cells/mL (計算値)	
	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	無し
		種類	—
		濃度	—
		助剤対照区の連数	—
	培養方式 (振とう培養、静置培養、連続培養等)	止水式 (開放系)、振とう培養 (100 rpm)	
水温または培養温度	培養機内温度：22.9~23.1°C		
照明 (光強度・時間等)	60~77 µE/m <sup>2</sup> /s (フラスコ液面付近) で連続照明		
結果の算出方法	速度法 ErC <sub>50</sub> ：Probit 法(重みつき最小二乗法) NOECr：Bartlett test、1-way ANOVA および Dunnett 法		

#### [備考]

- 「対照物質への感受性」の欄には、試験生物の感受性検定の結果を記入 (対照物質を明記した上で EC<sub>50</sub> を記入) すること。
- 「試験濃度 (設定値)」の欄には、試験に用いた被験物質の濃度をすべて掲げ、その公比も記入すること。
- 「試験条件」の「試験容器」の欄には、材質及び容量を記入すること。なお、被験物質が揮発性を有する場合は「密閉の有無」を記載すること。
- 「結果の算出方法」の欄には、毒性値 (EC<sub>50</sub> 及び NOEC) の算出に用いた統計解析手法 (例えば、probit 法、ANOVA 等) を記入すること。

4. 試験結果及び考察

項目	内容
毒性値	0-72 h ErC <sub>50</sub> = 1.1 mg/L NOEC (速度法) = 0.137 mg/L
試験濃度	1. 設定値      ② 実測値
考察及び特記事項	<p>被験物質は揮発性を有すると考えられたため（ヘンリー定数：<math>1.60 \times 10^{-5}</math> atm m<sup>3</sup>/mole）、予備試験結果をもとに密閉系で1回目実験を行ったが、試験成立条件（対照区繰り返し間の生長速度の変動係数）を満たさなかった。被験物質は低濃度で毒性を示す結果が得られたため、NOECr 決定を優先し、定量下限（0.5 mg/L）を下回る濃度を含む 0.0854、0.188、0.414、0.910、2.00 および 4.40 mg/L の6濃度（公比2.2）を設定濃度とした開放系で2回目実験を行った。</p> <p>被験物質濃度を測定した結果、暴露終了時の測定濃度が設定濃度に対し 20%以上変動した濃度区が認められ、低濃度区では藻類への吸着が考えられた。OECD Guidance Document No.23 および OECD Test Guideline No.201 パラグラフ 40 に従い、定量下限以下での被験物質濃度（推定値）の算出および平均濃度の算出を行い、これを暴露期間中の被験物質濃度として結果を算出した。</p> <p>暴露 72 時間において、試験の有効性の基準（対照区での増加率および生長速度の変動係数）は全て満たした。</p>

[備考]

- 「試験濃度」の欄には、毒性値（EC<sub>50</sub> 及び NOEC）を算出するために用いた濃度が「設定値」か、あるいは「実測値」かを明記すること。
- 「考察及び特記事項」の欄には、被験物質の物理的・化学的特性を踏まえて、毒性値の特徴や試験の有効性に関して考察すること。また、試験における異常な事項や本試験法から逸脱した事項等については、試験結果への影響等を記載すること。

5. 藻類の生長曲線及び濃度—生長阻害率曲線

暴露期間中の①生長曲線及び②各試験濃度での生長阻害率を示した図を添付すること。

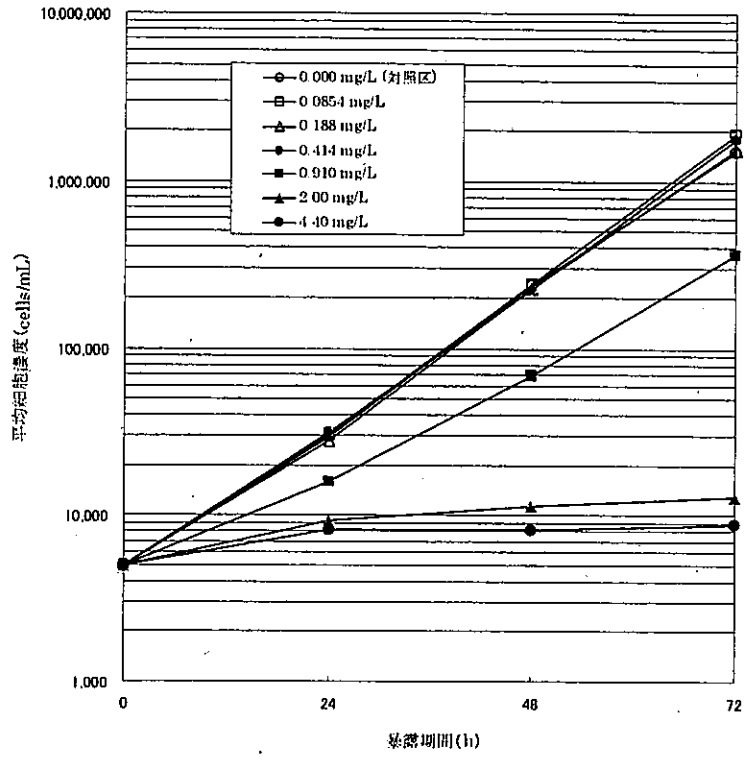


図1 藻類の生長曲線

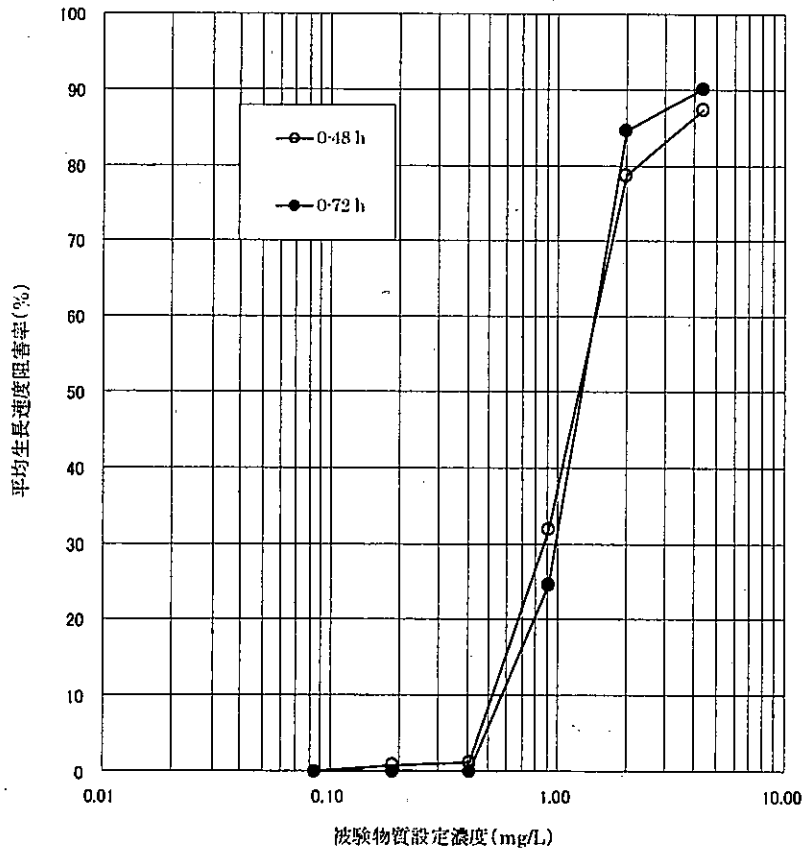


図2 藻類の濃度—生長阻害率曲線 (生長速度)

表 1 試験溶液中の被験物質濃度

設定濃度 (mg/L)	測定濃度 (mg/L)				
	暴露開始時	暴露 24 時間	暴露 48 時間	暴露 72 時間	0-72 時間 平均測定濃度
対照区	< 0.505	< 0.500	< 0.500	< 0.510	—
0.0854	< 0.505	< 0.500	< 0.500	< 0.510	—
0.188	< 0.505 <sup>a</sup>	< 0.500	< 0.500	< 0.510	—
0.414	< 0.505 <sup>b</sup>	< 0.500 <sup>a</sup>	< 0.500	< 0.510 <sup>c</sup>	0.137 <sup>e</sup> (33.1)
0.910	0.870 (95.6)	0.834 (91.6)	0.734 (80.7)	< 0.510 <sup>d</sup>	0.661 <sup>f</sup> (72.6)
2.00	2.06 (103)	2.00 (100)	1.90 (95.0)	1.60 (80.0)	1.90 (95.0)
4.40	4.87 (111)	4.18 (95.0)	3.77 (85.7)	3.33 (75.7)	3.99 (90.7)

( ) 内の値は設定濃度に対する割合 (%)

- a: ピーク検出したが定量下限以下。
- b: ピーク検出したが定量下限以下。設定濃度 (0.414 mg/L) を平均測定濃度の算出に代用した。
- c: ピーク不検出。72 時間生物量と被験物質濃度減少率の回帰式より求めた推定濃度 (0.0455 mg/L) を平均測定濃度の算出に代用した。
- d: ピーク不検出。検量線の最小濃度の 1/2 濃度 (0.255 mg/L) を平均測定濃度の算出に代用した。
- e: 暴露開始時および 72 時間後における濃度をもとに平均測定濃度 (推定値) を算出した。
- f: 各暴露時間における濃度をもとに平均測定濃度 (推定値) を算出した。

<平均測定濃度の算出方法>

(OECD Guidance Document No.23より)

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

Where:  $t_1$  = initial time <  $t_2$  < ... <  $t_n$  = final time  
 $\text{conc}_1$  = 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)	tert-ブチル=ヒドロペルオキシド		
別 名	tert-Butyl Hydroperoxide (70%水溶液)		
C A S 番 号	75-91-2		
構造式又は示性式 (いずれも不明な場合は、 その製法の概要)	$  \begin{array}{c}  \text{CH}_3 \\    \\  \text{H}_3\text{C}-\text{C}-\text{OOH} \\    \\  \text{CH}_3  \end{array}  $		
分 子 量	90.12		
試験に供した 化学物質の純度 (%)	66.0%		
試験に供した化学物質 のロット番号	GI26E		
不純物の名称及び含有率	情報なし		
蒸 気 圧	38.1 mmHg, 25°C (MPBPVP v1.43)		
対 水 溶 解 度	70%以上		
1-オクタン-1/水分配係数	情報なし		
融 点	情報なし		
沸 点	情報なし		
常温における性状	透明液体		
安 定 性	情報なし		
溶媒に対する溶解度等	溶媒	溶解度	溶媒中の安定性
	情報なし	情報なし	情報なし

[備考] 物理化学的性状は、可能な限り記入すること。

1. 「蒸気圧」の欄には、被験物質の蒸気圧を記入すること。
2. 「安定性」の欄には、温度、光等に対する安定性を記入すること。
3. 「溶媒に対する溶解度等」の欄には、被験物質の溶媒に対する溶解度及びその溶媒中での安定性を記入すること。



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ィー (GC)
前処理法	試験溶液を採取してよく混合し、遠心分離 (3000 rpm、10 分間) を行い、得られた上澄み液を GC により分析した。
定量条件	<p>GC 条件</p> <p>カラム : Nukol 25327 (F.T. 0.5 μm)、0.53 mm I.D. × 30 m (SUPELCO)</p> <p>カラム温度 : 初期温度 40°C (0.5 分間保持)  40°C - 200°C (昇温速度 ; 10°C/min)  最終温度 200°C (1 分間保持)</p> <p>注入口温度 : 240°C</p> <p>検出器 : FID</p> <p>検出器温度 : 250°C</p> <p>注入量 : 2.0 μL</p> <p>注入方法 : スプリットレス</p> <p>キャリアーガス : ヘリウム 5.0 mL/min (コンスタントフロー)</p> <p>検出器ガス : 水素 40 mL/min、空気 450 mL/min</p> <p>メイクアップガス : ヘリウム 20 mL/min (メイクアップ+カラム流量)</p>

[備考]

1. 「分析方法」の欄には、実測した分析法を具体的に記入すること。
2. 「前処理法」の欄には、分析を行う前に実施した処理の概要を記入すること。藻類においては細胞の分離手法を明記すること。
3. 「定量条件」の欄には、分析に用いた機器や温度・溶離液等の分析の条件を記入すること。

### 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)	<i>Daphnia magna</i> 、24 時間齢未満	
	入手先	国立環境研究所より 2008 年 6 月 20 日に入手したものを当事業所において継代したもの	
	対照物質への感受性 (EC <sub>50</sub> ) (対照物質名)	対照物質名：重クロム酸カリウム (試薬特級、和光純薬工業) 48 時間 EC <sub>50</sub> の背景データ：0.21~0.24 mg/L (n=3、2008 年 7 月~2009 年 9 月)	
飼育	飼育水の種類	脱塩素水道水 (上水)	
	環境条件 (水温、明暗周期)	19.8~19.9 °C、16 時間明/8 時間暗	
試験条件	試験容器		100 mL 容ガラス製ふらん瓶 (密閉有り)
	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 (上水)
		硬度	60 mg/L (CaCO <sub>3</sub> 換算)
		pH	7.7~7.9
	暴露期間		2010 年 3 月 16 日~2010 年 3 月 18 日
	試験濃度 (設定値)		10.0、15.0、22.5、33.8、50.6 mg/L (公比 1.5) および対照区
	供試数		20 頭 (5 頭/試験容器)
	連数	試験濃度区	4 連
		対照区	4 連
	試験溶液量		100 mL/試験容器
	助剤	助剤の有無	無し
		種類	—
		濃度	—
		助剤対照区の連数	—
	試験方法 (止水、半止水、流水等)		止水式 (密閉系)
	換水又は流水条件		なし
	水温		19.6~20.1°C
溶存酸素濃度 (DO)		7.2~8.8 mg/L	
明暗周期		16 時間明/8 時間暗	
結果の算出方法	EC <sub>50</sub>	作図法	

#### [備考]

- 「対照物質への感受性」の欄には、試験生物の感受性検定の結果を記入 (対照物質を明記した上で EC<sub>50</sub> を記入) すること。
- 「試験濃度 (設定値)」の欄には、試験に用いた被験物質の濃度をすべて掲げ、その公比も記入すること。
- 「試験条件」の「試験容器」の欄には、材質及び容量を記入すること。なお、被験物質が揮発性を有する場合は「密封の有無」を記載すること。
- 「結果の算出方法」の欄には、毒性値 (EC<sub>50</sub>) の算出に用いた統計解析手法 (例えば、probit 法等) を記入すること。

4. 試験結果及び考察

項目	内容
毒性値	48h EC <sub>50</sub> = 14 mg/L
試験濃度	① 設定値 2. 実測値
考察及び特記事項	<p>予備検討（報告書番号 NCAS 09-251NG）の結果、設定濃度 10.0、40.0 および 80.0 mg/L でそれぞれ 0、100 および 100% の遊泳阻害が認められた。①被験物質は揮発性を有していると考えられること（ヘンリー定数：<math>1.60 \times 10^{-5}</math> atm m<sup>3</sup>/mole）、②臭気があること、③同じ被験物質を使用した藻類予備試験では揮散が懸念されたことから、試験方法は止水式の密閉系とした。</p> <p>試験溶液中の被験物質濃度を測定した結果、設定濃度に対する変動が±20%未満であったため、設定濃度を暴露期間中の被験物質濃度として EC<sub>50</sub> を算出した。</p> <p>対照区のみジンコについて、暴露 24 時間後に遊泳阻害が 1 頭認められたが（遊泳阻害率 5%）、試験成立条件の基準内（対照区の遊泳阻害率は 10% を超えないこと）であった。また、暴露終了時において、溶存酸素濃度は対照区も含めた全ての試験区で規定の 3 mg/L 以上であり、試験は有効とみなされた。</p>

[備考]

1. 「毒性値」の欄には、48 時間での遊泳阻害における EC<sub>50</sub> を記入すること。
2. 「試験濃度」の欄には、毒性値（EC<sub>50</sub>）を算出するために用いた濃度が「設定値」か、あるいは「実測値」かを明記すること。
3. 「考察及び特記事項」の欄には、被験物質の物理的・化学的特性を踏まえて、毒性値の特徴や試験の有効性に関して考察すること。また、試験における異常な事項や本試験法から逸脱した事項等については、試験結果への影響等を記載すること。

5. ミジンの濃度 — 遊泳阻害率曲線

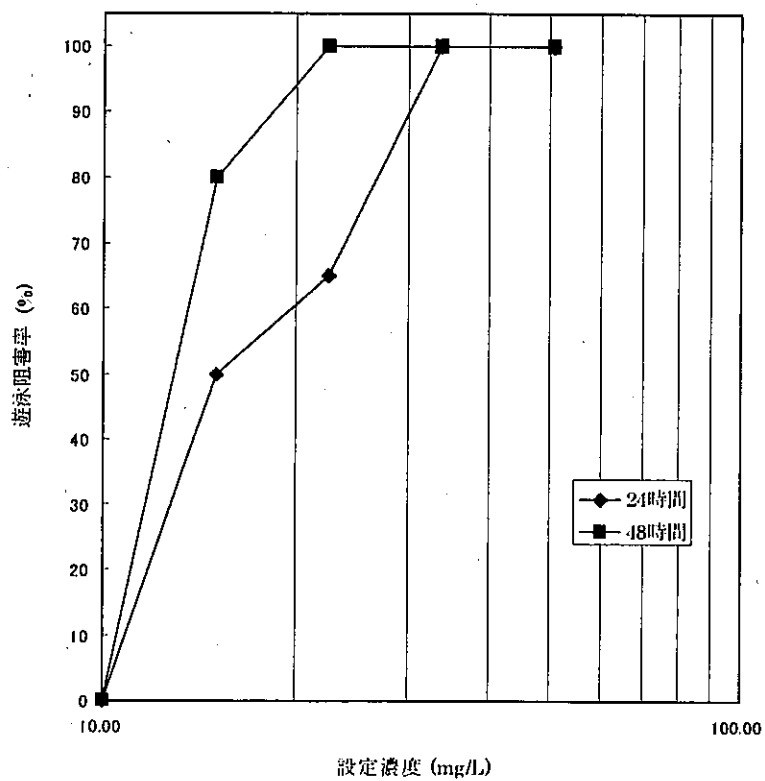


表 1 繰り返し精度の確認

設定濃度 (mg/L)	測定濃度 (mg/L)	平均濃度 (mg/L)	変動係数 (%)
10.0	9.98、9.98、9.98	9.98	0.00
50.6	51.0、53.2、53.0	52.4	2.33

表 2 試験溶液中の被験物質濃度

設定濃度 (mg/L)	測定濃度 (mg/L)	
	暴露開始時	暴露終了時
対照区	検出されず	検出されず
10.0	10.1 (101)	9.26 (92.6)
15.0	14.9 (99.3)	14.1 (94.0)
22.5	20.7 (92.0)	20.7 (92.0)
33.8	34.5 (102)	31.8 (94.1)
50.6	53.2 (105)	48.2 (95.3)

( ) 内の値は設定濃度に対する割合 (%) を示す。

## 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)	tert-ブチル=ヒドロペルオキシド		
別 名	tert-Butyl Hydroperoxide (70%水溶液)		
C A S 番 号	75-91-2		
構造式又は示性式 (いずれも不明な場合は、 その製法の概要)	$  \begin{array}{c}  \text{CH}_3 \\    \\  \text{H}_3\text{C}-\text{C}-\text{OOH} \\    \\  \text{CH}_3  \end{array}  $		
分 子 量	90.12		
試験に供した 化学物質の純度 (%)	66.0%		
試験に供した化学物質 のロット番号	GI26E		
不純物の名称 及び含有率	情報なし		
蒸 気 圧	38.1 mmHg、25°C (MPBPVP v1.43)		
対 水 溶 解 度	70%以上		
1-オクタール/水分配係数	情報なし		
融 点	情報なし		
沸 点	情報なし		
常温における性状	透明液体		
安 定 性	情報なし		
溶媒に対する溶解度等	溶媒	溶解度	溶媒中の安定性
	情報なし	情報なし	情報なし

[備考] 物理化学的性状は、可能な限り記入すること。

1. 「蒸気圧」の欄には、被験物質の蒸気圧を記入すること。
2. 「安定性」の欄には、温度、光等に対する安定性を記入すること。
3. 「溶媒に対する溶解度等」の欄には、被験物質の溶媒に対する溶解度及びその溶媒中での安定性を記入すること。

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ィー (GC)
前処理法	試験溶液を採取してよく混合し、遠心分離 (3000 rpm、10 分間) を行い、得られた上澄み液を GC により分析した。
定量条件	GC 条件 カラム : Nukol 25327 (F.T. 0.5 $\mu$ m)、0.53 mm I.D. $\times$ 30 m (SUPELCO) カラム温度 : 初期温度 40°C (0.5 分間保持) 40°C - 200°C (昇温速度 : 10°C/min) 最終温度 200°C (1 分間保持) 注入口温度 : 240°C 検出器 : FID 検出器温度 : 250°C 注入量 : 2.0 $\mu$ L 注入方法 : スプリットレス キャリアーガス : ヘリウム 5.0 mL/min (コンスタントフロー) 検出器ガス : 水素 40 mL/min、空気 450 mL/min メークアップガス : ヘリウム 20 mL/min (メークアップ+カラム流量)

[備考]

1. 「分析方法」の欄には、実測した分析法を具体的に記入すること。
2. 「前処理法」の欄には、分析を行う前に実施した処理の概要を記入すること。藻類においては細胞の分離手法を明記すること。
3. 「定量条件」の欄には、分析に用いた機器や温度・溶離液等の分析の条件を記入すること。

### 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	
	大きさ (体長、体重) ・月齢	2.2 cm(全長)、0.082 g・5ヶ月齢	
	対照物質への感受性 (LC <sub>50</sub> ) (対照物質名)	96 時間 LC <sub>50</sub> の背景データ : 0.69 ~ 2.0 mg/L (硫酸銅 (II))	
じゅん化	じゅん化期間	14 日間 (2010 年 3 月 1 日 ~ 3 月 15 日)	
	飼育水の種類	脱塩素水道水 (上水)	
	じゅん化前の薬浴の有無	あり (エルバージュ <sup>®</sup> 、塩)	
	じゅん化方式 (止水、半止水、流水等)	流水式	
	環境条件 (水温、明暗周期)	22.0~23.1℃、16 時間明/8 時間暗	
	餌料 (種類・量・頻度等)	メダカのエサ (テトラジャパン製) 魚体重の 1.2~1.5%相当量・1 日 1 回	
試験条件	試験容器		3 L ガラス製試験びん、共栓付
	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 (上水)
		硬度	65 mg/L
		pH	7.5~8.1
	曝露期間		2010 年 3 月 15 日 ~ 2010 年 3 月 19 日
	試験濃度 (設定値)		25.0、35.0、50.0、70.0、100 mg/L (公比 1.4) および対照区
	供試数		7 尾/試験容器
	試験溶液量		約 3 L
	助剤	助剤の有無	無し
		種類	—
		濃度	—
	試験方法 (止水、半止水、流水等)		半止水式 (密閉系)
	換水または流水条件		48 時間換水
	水温		22.8~22.9℃
	溶存酸素濃度 (DO)		7.0~8.0 mg/L
明暗周期		16 時間明/8 時間暗	
結果の算出方法	LC <sub>50</sub>	作図法	

#### [備考]

- 「対照物質への感受性」の欄には、試験生物の感受性検定の結果を記入 (対照物質を明記した上で LC<sub>50</sub> を記入) すること。
- 「じゅん化」の「じゅん化前の薬浴の有無」の欄には、じゅん化前に行った薬浴の有無を記入し、薬浴を実施した場合は薬剤の種類も記載すること
- 「試験濃度 (設定値)」の欄には、試験に用いた被験物質の濃度をすべて掲げ、その公比も記入すること。
- 「試験条件」の「試験容器」の欄には、材質及び容量を記入すること。なお、被験物質が揮発性を有する場合は「密封の有無」を記載すること。
- 「結果の算出方法」の欄には、毒性値の (LC<sub>50</sub>) 算出に用いた統計解析手法 (例えば、probit 法等) を記入すること。



#### 4. 試験結果及び考察

項目	内容
毒性値	96hLC <sub>50</sub> = 94 mg/L
試験濃度	1. 設定値 2. 実測値
考察及び特記事項	予備検討(報告書番号 NCAS 09-251NG)の結果、設定濃度 100 mg/L 区で 29% の死亡が認められた。被験物質は高い揮発性を有しているため(ヘンリー定数: $1.60 \times 10^{-5}$ atm m <sup>3</sup> /mole)、密閉系の半止水系(48 時間換水)で試験を行った。設定濃度 25.0、35.0、50.0、70.0 および 100 mg/L を暴露期間中の被験物質濃度として半数致死濃度(LC <sub>50</sub> )を算出した。対照区では、全ての暴露時間において死亡は観察されなかった。暴露期間中、溶存酸素濃度は 84~95% であり、飽和濃度の 60% 以上が維持された。

#### [備考]

- 「毒性値」の欄には、96 時間での LC<sub>50</sub> を記入すること。
- 「試験濃度」の欄には、毒性値(LC<sub>50</sub>)を算出するために用いた濃度が「設定値」か、あるいは「実測値」かを明記すること。
- 「考察及び特記事項」の欄には、被験物質の物理的・化学的特性を踏まえて、毒性値の特徴や試験の有効性に関して考察すること。また、試験における異常な事項や本試験法から逸脱した事項等については、試験結果への影響等を記載すること。

#### 5. 魚類の濃度 — 死亡率曲線

曝露期間中における各試験濃度での魚類に対する死亡率を示した図を添付すること。

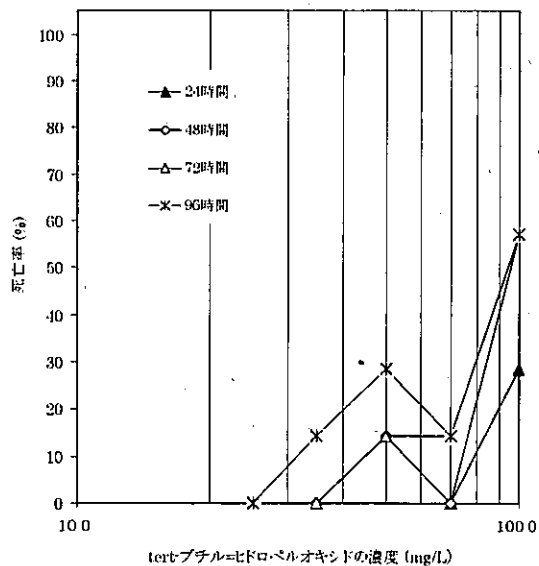


表 1 繰り返し精度の測定結果

設定濃度 (mg/L)	測定濃度 (mg/L)			平均濃度 (mg/L)	変動係数 (%)
24.9	25.9	25.4	25.5	25.6	1.04
100	106	109	108	108	1.42

表 2 試験溶液中の被験物質濃度

設定濃度 (mg/L)		各暴露時間の被験物質濃度 (mg/L)			
0 時間	48 時間	0 時間	48 時間 (換水前)	48 時間 (換水後)	96 時間
対照区	対照区	検出されず	検出されず	検出されず	検出されず
24.9	25.0	24.6 (98.8)	23.3 (93.6)	23.8 (95.2)	22.8 (91.2)
34.9	35.0	37.4 (107)	32.5 (93.1)	36.3 (104)	34.6 (98.9)
50.1	50.0	57.2 (114)	51.6 (103)	53.2 (106)	49.8 (99.6)
69.9	70.0	74.2 (106)	72.8 (104)	73.8 (105)	68.7 (98.1)
100	100	108 (108)	100 (100)	103 (103)	94.4 (94.4)

( ) 内は設定濃度に対する割合 (%)

## 要 旨

試験委託者 環境省

表 題 p-フェニルフェノールの藻類 (*Pseudokirchneriella subcapitata*)  
に対する生長阻害試験

試験番号 No. 2008-生33

### 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日改正)

OECD GUIDELINES FOR THE TESTING OF CHEMICALS 201 :Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test (Adopted 23 March 2006)

に従って実施した。

- 1) 被験物質 : p-フェニルフェノール
- 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, 0.014, 0.044, 0.14, 0.44, 1.4, 2.5, 4.4, 7.8 mg/L  
公比 ;  $10^{1/4}$  (約 1.8)。ただし、0.014 ~ 1.4 mg/L の間は  $10^{1/2}$  (約 3.2) の変則公比。
- 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  $0.5 \times 10^4$  cells/mL)
- 9) 試験温度 :  $23 \pm 2$  °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

暴露期間中に 0.044 ~ 2.5 mg/L 区で被験物質濃度の減少がみられた。0.044 mg/L 区を除くこれらの濃度区では新たな化合物の生成が認められ、この化合物は被験物質を基に、藻体により形成された何らかの変化体（以下、変化体と記載する）であると推察された。また、この変化体の生成が被験物質の濃度減少と関連すると推察された。藻体未接種区にはこのような現象は見られず、一部を除いて濃度減少はわずかであった。

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、被験物質濃度の減少がみられたことから、暴露開始時、24 時間、48 時間および暴露終了時の測定値の幾何平均値を採用した。ただし、変化体の毒性は小さいと推察したものの、系内に存在していることを考慮し、暴露開始時と藻体未接種区の暴露終了時の測定値の幾何平均値を基に算出した  $E_rC_{50}$  ならびに NOEC も併記した。

### 2) 生長速度の比較による阻害濃度

50 % 生長阻害濃度  $E_rC_{50}$  :

① 暴露開始時、24 時間、48 時間および暴露終了時の測定値の幾何平均値を基にした算出値

50 % 生長阻害濃度  $E_rC_{50}$  : 2.4 mg/L (95 % 信頼限界 : 2.3 ~ 2.5 mg/L) ,  
Probit

最大無作用濃度 NOEC : 0.013 mg/L , Dunnett

② 暴露開始時と、藻体未接種区の暴露終了時の測定値の幾何平均値を基にした算出値

50 % 生長阻害濃度  $E_rC_{50}$  : 2.5 mg/L (95 % 信頼限界 : 2.4 ~ 2.6 mg/L) ,  
Probit

最大無作用濃度 NOEC : 0.013 mg/L , Dunnett

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

Nominal Concentration (mg/L)	Measured Concentration, mg/L (Percent of Nominal)				Mean <sup>a</sup> Measured Concentration (mg/L)	
	0 Hour	24 Hours	48 Hours	72 Hours	0-24-48-72 Hour With Algae	0-72 Hour Without Algae
Control	<0.03 (-)	<0.03 (-)	<0.03 (-)	<0.03 (-)	-	-
0.014	0.0127 <sup>c</sup> (91)	0.0127 <sup>c</sup> (91)	0.0126 <sup>c</sup> (90)	0.0129 <sup>c</sup> (92)	0.0126	0.0128
0.044	0.0419 <sup>c</sup> (95)	0.0414 <sup>c</sup> (94)	0.0411 <sup>c</sup> (93)	0.0382 <sup>c</sup> (87)	0.0408	0.0416
0.14	0.136 (97)	0.142 (101)	0.132 (94)	0.118 (84)	0.133	0.136
0.44	0.429 (98)	0.422 (96)	0.399 (91)	0.296 (67)	0.391	0.431
1.4	1.35 (96)	1.36 (97)	1.28 (91)	0.913 (65)	1.25	1.36
2.5	2.49 (100)	2.39 (96)	2.25 (90)	1.96 (78)	2.28	2.41
4.4	4.20 (96)	4.18 (95)	4.18 (95)	4.16 (95)	4.18	4.26
7.9	7.57 (96)	7.56 (96)	7.45 (94)	7.63 (97)	7.54	7.58

a : Geometric mean

b : Concentration of changed substance

= (The height of changed substance) / (The height of the test substance) × (Measured concentration of the test substance in test solution)

c : In this case (0.05 mg/L > measured concentration), the lower limit of determination was 0.006 mg/L

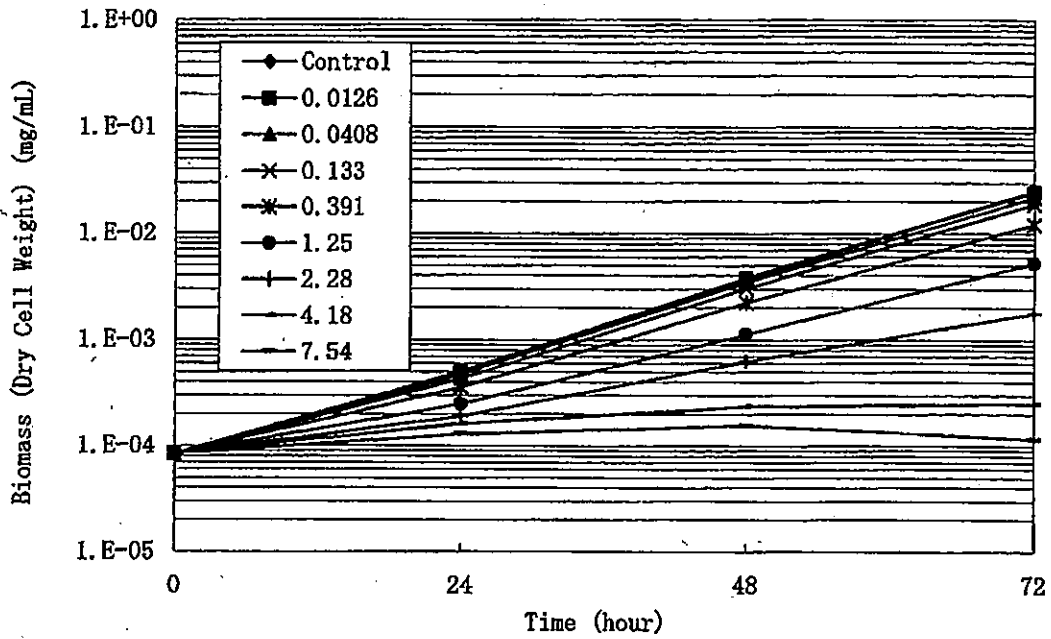


Figure 1. Algal Growth Curve of *Pseudokirchneriella subcapitata* (Biomass vs Time during the 72 hours Exposure)

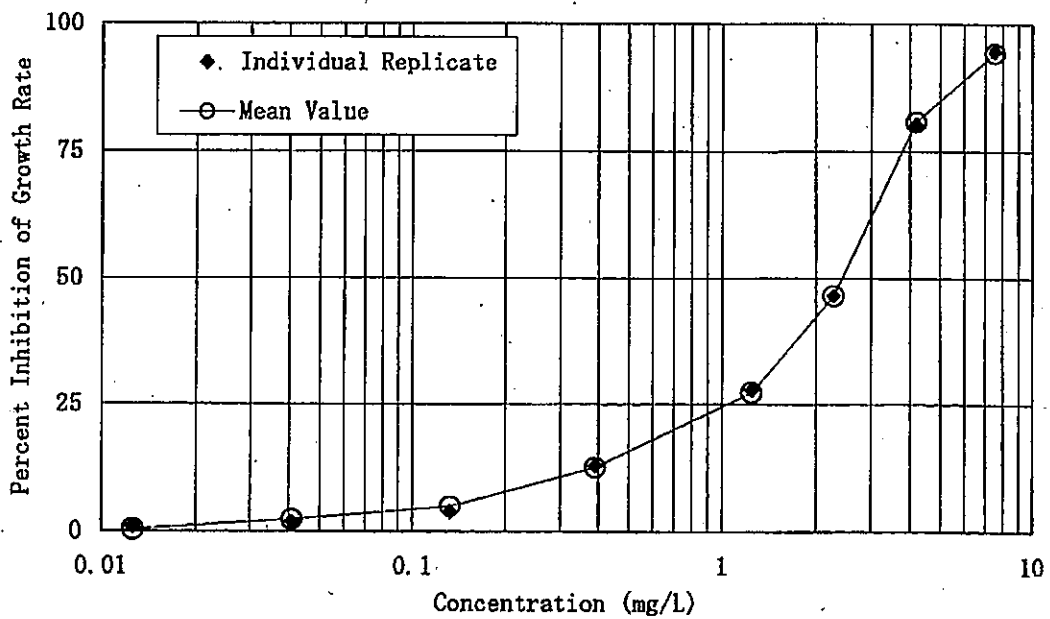


Figure 2. Concentration-Inhibition curve Based on  $I_{0-72}$  Values Calculated from the Growth Curves

## 要 旨

試験委託者 環境省

表 題 p-フェニルフェノールのオオミジンコ (*Daphnia magna*) に対する  
急性遊泳阻害試験

試験番号 No. 2008-生34

### 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 日改正)に従って実施した。

- 1) 被験物質 : p-フェニルフェノール
- 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, 0.86, 1.3, 1.9, 2.7, 4.0, 5.9, 8.6 mg/L  
公比;  $10^{1/6}$  (約 1.5)
- 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 :  $20 \pm 1$  °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

暴露期間中の被験物質濃度の軽微な変動は、分析誤差によるものと考えられた。従って、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 <sub>50</sub> )	:	5.7 mg/L	
			(95 % 信頼限界 : 5.1 ~ 6.4 mg/L) , Probit
0 % 遊泳阻害最高濃度	:	2.6 mg/L	
100 % 遊泳阻害最低濃度	:	>8.3 mg/L	

### 3) 48 時間暴露後の結果

50 % 遊泳阻害濃度 (EC <sub>50</sub> )	:	3.9 mg/L	
			(95 % 信頼限界 : 3.4 ~ 4.4 mg/L) , Probit
0 % 遊泳阻害最高濃度	:	1.8 mg/L	
100 % 遊泳阻害最低濃度	:	8.3 mg/L	



Table 1. Measured Concentrations of the Substance in Test Solution  
(Static Condition)

Nominal Concentration (mg/L)	Measured Concentration, mg/L (Percent of Nominal)				Mean <sup>a</sup> Measured Concentration (mg/L)
	0 Hour new		48 Hours old		
		(-)		(-)	
Control	<0.03	(-)	<0.03	(-)	-
0.86	0.801	(93)	0.813	(95)	0.807
1.3	1.26	(97)	1.29	(99)	1.28
1.9	1.81	(95)	1.84	(97)	1.83
2.7	2.56	(95)	2.66	(99)	2.61
4.0	3.77	(94)	3.93	(98)	3.85
5.9	5.46	(93)	5.69	(96)	5.58
8.6	8.26	(96)	8.40	(98)	8.33

new : Freshly prepared test solutions  
old : Test solutions after 48 hours exposure  
a : Arithmetic mean

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

Nominal Concentration (mg/L)	Mean <sup>a</sup> 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)
0.86	0.807	20	0	0	0	0	0(0)	0	0	0	0	0(0)
1.3	1.28	20	0	0	0	0	0(0)	0	0	0	0	0(0)
1.9	1.83	20	0	0	0	0	0(0)	0	0	0	0	0(0)
2.7	2.61	20	0	0	0	0	0(0)	0	1	0	0	1(5)
4.0	3.85	20	1	1	0	0	2(10)	5	4	2	2	13(65)
5.9	5.58	20	3	3	1	1	8(40)	4	4	4	4	16(80)
8.6	8.33	20	5	4	5	5	19(95)	5	5	5	5	20(100)

a : Arithmetic mean

Table 8. Total Hardness (as CaCO<sub>3</sub>)

Nominal Concentration (mg/L)	Mean <sup>a</sup> Measured Concentration (mg/L)	(Static Condition)	
		Total Hardness (as CaCO <sub>3</sub> ), mg/L	
		0 Hour new	48 Hours old
Control	-	253	255
0.86	0.807	250	256
1.3	1.28	253	257
1.9	1.83	254	255
2.7	2.61	254	257
4.0	3.85	253	254
5.9	5.58	252	254
8.6	8.33	252	257

new : Freshly prepared test solutions  
 old : Test solutions after 48 hours exposure  
 a : Arithmetic mean

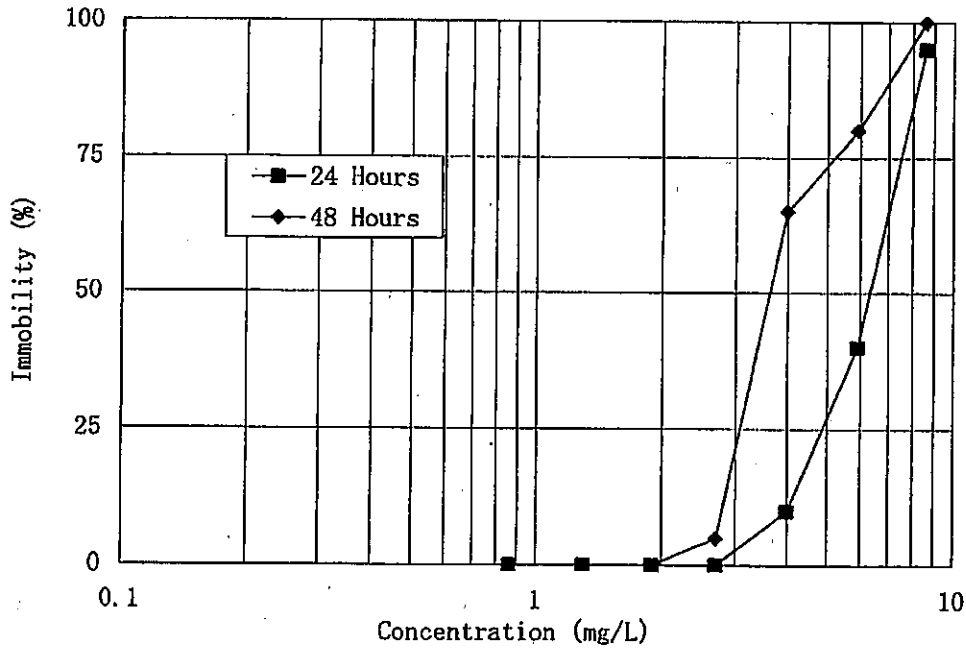


Figure 1. Concentration-Response (Immobility) Curves

## 要 旨

試験委託者 環境省

表 題 p-フェニルフェノールのヒメダカ(*Oryzias latipes*)に対する  
急性毒性試験

試験番号 No. 2008-生35

### 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日改正)に従って実施した。

- 1) 被験物質 : p-フェニルフェノール
- 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
- 5) 試験濃度 (設定値) : 対照区, 1.0, 1.4, 1.8, 2.4, 3.2, 4.3, 5.7 mg/L  
公比;  $10^{1/8}$  (約 1.3)
- 6) 試験溶液量 : 3.0 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 :  $24 \pm 1$  °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

予備試験の結果、ヒメダカへの吸着が主因と考えられる被験物質濃度の減少が認められたため、24 時間ごとに試験溶液の全量を交換することとし、ヒメダカ未投入区を設けた。

本試験では、暴露開始時から 24 時間後、72 時間換水後から 96 時間後の各々の期間において、ヒメダカを投入した濃度区に濃度減少が認められた。ヒメダカ未投入区の濃度変動は軽微であり、分析誤差が主因と考えられたことから、ヒメダカを投入した濃度区の濃度減少はヒメダカへの吸着が主因であると判断した。

以上より、各影響濃度（50 % 死亡濃度 ( $LC_{50}$ )、0 % 死亡最高濃度、100 % 死亡最低濃度および最大無作用濃度）の算出にあたっては、ヒメダカを投入した濃度区の暴露開始時と 72 時間換水後の測定値の算術平均値を採用した。

### 2) 50 % 死亡濃度 ( $LC_{50}$ )

24 時間 50 % 死亡濃度 ( $LC_{50}$ ) :  
5.1 mg/L (95 % 信頼限界 4.4 ~ 6.1 mg/L), Binomial  
(4.35) (6.09)

48 時間 50 % 死亡濃度 ( $LC_{50}$ ) :  
4.3 mg/L (95 % 信頼限界 3.8 ~ 5.0 mg/L), Probit

72 時間 50 % 死亡濃度 ( $LC_{50}$ ) :  
3.5 mg/L (95 % 信頼限界 3.1 ~ 4.0 mg/L), Probit

96 時間 50 % 死亡濃度 ( $LC_{50}$ ) :  
3.4 mg/L (95 % 信頼限界 3.0 ~ 3.9 mg/L), Probit

### 3) 0 % 死亡最高濃度、100 % 死亡最低濃度および最大無作用濃度

0 % 死亡最高濃度 : 2.5 mg/L

100 % 死亡最低濃度 : 6.1 mg/L

最大無作用濃度 : 1.9 mg/L

Table 1. Measured Concentrations of the Test Substance in Test Solution  
(Semi-Static Condition)

Nominal Concentration (mg/L)	Measured Concentration, mg/L (Percent of Nominal)				Mean <sup>a</sup> Measured Concentration (mg/L)	Concentration Ratio (%) (old/new)	
	0 Hour new	24 Hours old	72 Hours new	96 Hours old		24 Hr/0 Hr	96 Hr/72 Hr
Control	<0.03 (-)	<0.03 (-)	<0.03 (-)	<0.03 (-)	-	-	-
1.0	1.07 (107)	0.874 (87)	0.970 (97)	0.832 (83)	1.02	82	86
1.4	1.52 (109)	1.18 (84)	1.39 (99)	1.17 (84)	1.46	78	84
1.8	1.97 (109)	1.57 (87)	1.78 (99)	1.54 (86)	1.88	80	87
2.4	2.61 (109)	2.17 (90)	2.29 (95)	2.05 (85)	2.45	83	90
3.2	3.42 (107)	2.88 (90)	3.21 (100)	3.10 (97)	3.32	84	97
4.3	4.55 (106)	3.98 (93)	4.15 (97)	4.18 (97)	4.35	87	101
5.7	6.09 (107)	5.59 (98)	NM (-)	NM (-)	6.09	92	-

new : Freshly prepared test solutions  
old : Test solutions after 24 hours exposure  
NM : Not measured (all fish were dead)  
a : Arithmetic mean of new solutions (0 hour and 72 hours)

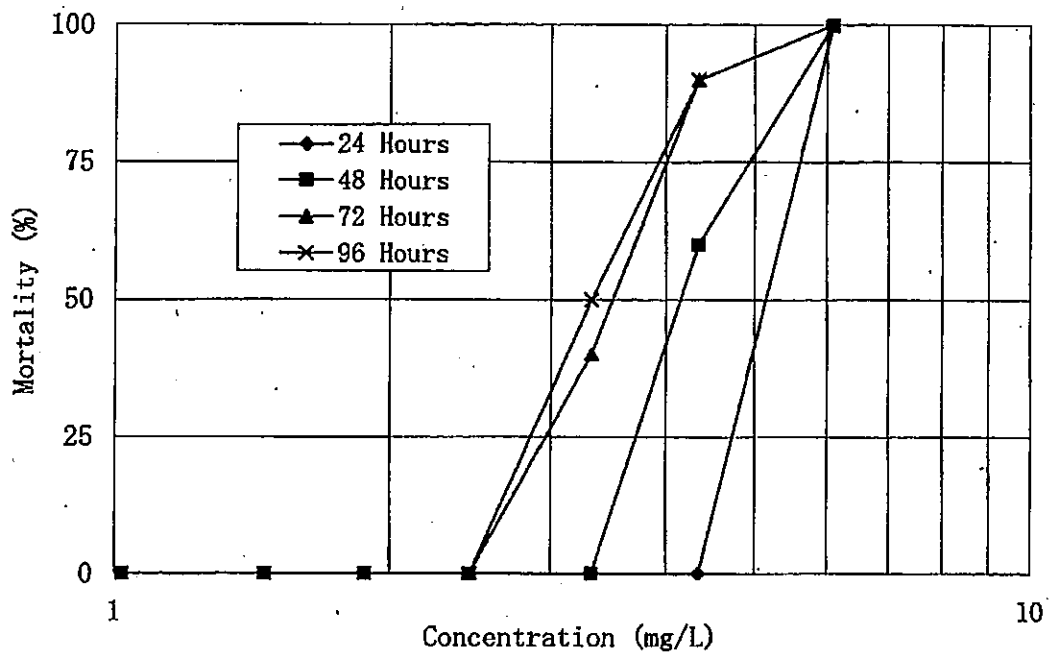


Figure 1. Concentration-Response (Mortality) Curves

## 要 旨

試験委託者 環境省

表 題 3, 4-ジクロロトルエンの藻類 (*Pseudokirchneriella subcapitata*) に対する生長阻害試験

試験番号 No. 2009-生12

### 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 日改正)

OECD GUIDELINES FOR THE TESTING OF CHEMICALS 201 : Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test (Adopted 23 March 2006)

に従って実施した。

- 1) 被験物質 : 3, 4-ジクロロトルエン
- 2) 暴露方式 : 止水式、振とう培養 (100 rpm) (密閉系)
- 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, 0.17, 0.37, 0.79, 1.2, 1.7, 2.5 mg/L  
公比;  $10^{1/6}$  (約 1.5) ただし 0.17 ~ 0.79 mg/L 区間は公比  $10^{1/3}$  (約 2.2) の変則公比
- 6) 試験溶体量 : 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  $0.5 \times 10^4$  cells/mL)
- 9) 試験温度 :  $23 \pm 2$  °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

予備的な検討において当該被験物質については揮発性が認められたことから、暴露期間中の濃度維持を目的に密閉系を採用し、予備試験において当該被験物質の藻体に対する吸着が認められたことから、全ての濃度区で藻体を接種しない区を設けた。

### 1) 試験溶液中の被験物質濃度

暴露期間中の被験物質濃度の減少は、密閉系を採用したものの揮発があったこと、並びに藻体への吸着が原因と考えられた。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、藻体未接種区の測定値を採用し、その24 時間ごとの暴露期間中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

密閉系において試験を実施したことから、72 時間の暴露終了時においては、日毎の変動係数の成立条件を満たさなかったため、藻類生長に直線性があると考えた暴露 48 時間の結果を採用した。

#### ① 48 時間の各影響濃度（採用）

50 % 生長阻害濃度	:	1.4 mg/L
$E_1C_{50}(0-48 \text{ hr})$		(95 %信頼限界 : 1.4 ~ 1.5 mg/L) , Logit
最大無作用濃度	:	0.23 mg/L
NOEC(0-48 hr)		

#### ② 72 時間の各影響濃度（参考）

50 % 生長阻害濃度	:	1.6 mg/L
$E_1C_{50}(0-72 \text{ hr})$		(95 %信頼限界 : 1.5 ~ 1.7 mg/L) , Logit
最大無作用濃度	:	0.22 mg/L
NOEC(0-72 hr)		



Table 1.1 Measured Concentration of the Test Substance in Test Solution (With algae inoculation)

Nominal Concentration (mg/L)	Measured Concentration, mg/L (Percent of Nominal)			Mean <sup>a</sup> Measured Concentration (mg/L)
	0 Hour	24 Hours	72 Hours	
Control	<0.009 (-)	<0.009 (-)	<0.009 (-)	-
0.17	0.0952 (56)	0.0887 (52)	0.0669 (39)	0.0910
0.37	0.249 (67)	0.210 (57)	0.186 (50)	0.220
0.79	0.532 (67)	0.482 (61)	0.367 (46)	0.489
1.2	0.820 (68)	0.687 (57)	0.562 (47)	0.712
1.7	1.17 (69)	1.05 (62)	0.839 (49)	1.06
2.5	1.90 (76)	1.60 (64)	1.31 (52)	1.65
a : Geometric mean				1.57

Table 1.2 Measured Concentration of the Test Substance in Test Solution (Without algae inoculation)

Nominal Concentration (mg/L)	Measured Concentration, mg/L (Percent of Nominal)			Mean <sup>a</sup> Measured Concentration (mg/L)
	0 Hour	24 Hours	72 Hours	
Control	<0.009 (-)	<0.009 (-)	<0.009 (-)	-
0.17	0.0952 (56)	0.0920 (54)	0.0931 (55)	0.0921
0.37	0.249 (67)	0.230 (62)	0.165 (45)	0.233
0.79	0.532 (67)	0.465 (59)	0.424 (54)	0.478
1.2	0.820 (68)	0.709 (59)	0.644 (54)	0.729
1.7	1.17 (69)	1.00 (59)	0.910 (54)	1.04
2.5	1.90 (76)	1.65 (66)	1.49 (60)	1.69
a : Geometric mean				1.63

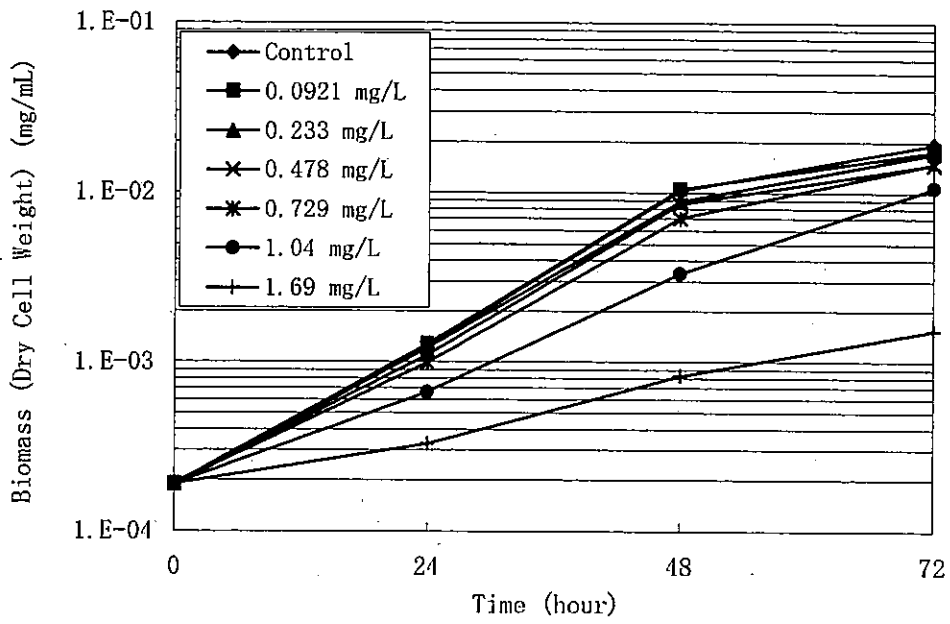


Figure 1. Algal Growth Curve of *Pseudokirchneriella subcapitata* (Biomass vs Time during the 72 hours Exposure)

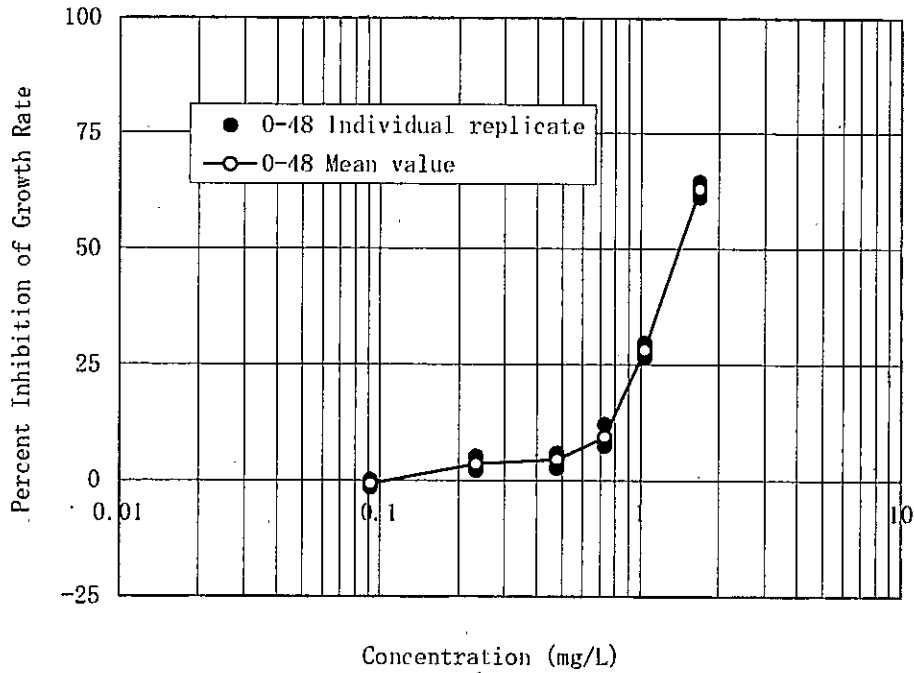


Figure 2.1 Concentration-Inhibition curve Based on  $I_{0-48}$  Values Calculated from the Growth Curves

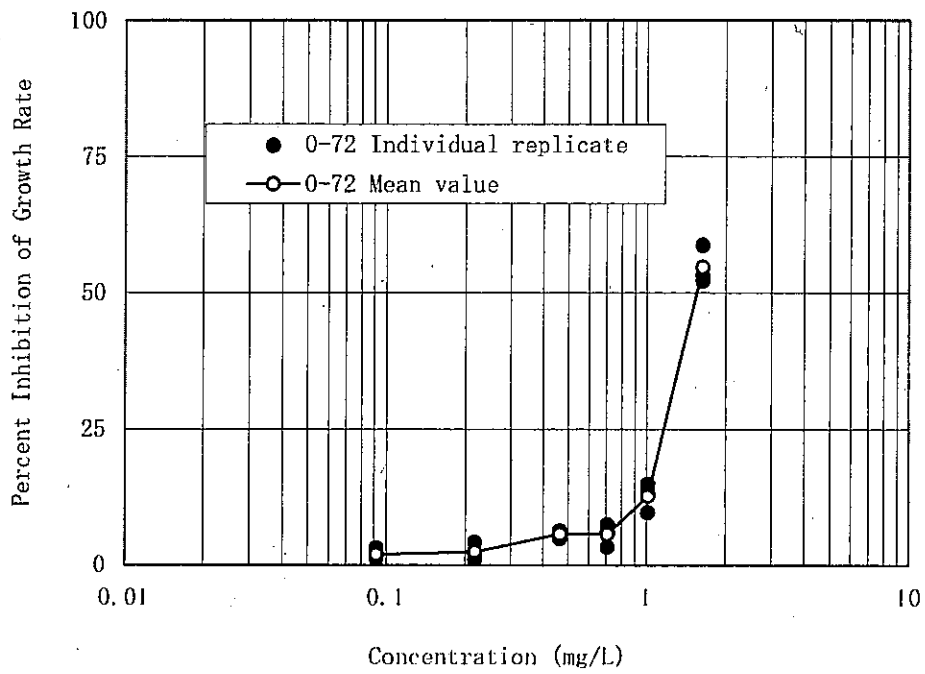


Figure 2.2 Concentration-Inhibition curve Based on  $I_{0-72}$  Values Calculated from the Growth Curves

## 要 旨

試験委託者 環境省

表 題 3, 4-ジクロロトルエンのオオミジンコ (*Daphnia magna*) に対する  
急性遊泳阻害試験

試験番号 No. 2009-生13

### 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 日改正)に従って実施した。

- 1) 被験物質 : 3, 4-ジクロロトルエン
- 2) 暴露方式 : 止水式(密閉系)
- 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, 0.39, 0.70, 0.91, 1.3, 1.7, 2.2, 3.9 mg/L  
公比 ;  $10^{1/8}$  (約 1.3)  
ただし、0.39 mg/L と 0.70 mg/L および 2.2 mg/L と 3.9 mg/L の間は公比  $10^{1/4}$  (約 1.8) の変則公比
- 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 :  $20 \pm 1$  °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

暴露期間中の被験物質濃度の減少は、揮発によるものが主因と考えられた。従って、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幾何平均値を採用した。

### 2) 24 時間暴露後の結果

50 % 遊泳阻害濃度 (EC <sub>50</sub> )	: 1.6 mg/L
	(95 % 信頼限界 : 1.4 ~ 1.7 mg/L) , Probit
0 % 遊泳阻害最高濃度	: 0.99 mg/L
100 % 遊泳阻害最低濃度	: 4.2 mg/L

### 3) 48 時間暴露後の結果

50 % 遊泳阻害濃度 (EC <sub>50</sub> )	: 1.4 mg/L
	(95 % 信頼限界 : 1.3 ~ 1.5 mg/L) , Probit
0 % 遊泳阻害最高濃度	: 0.99 mg/L
100 % 遊泳阻害最低濃度	: 2.4 mg/L

Table 1. Measured Concentrations of the Substance in Test Solution  
(Static Condition, Closed System)

Nominal Concentration (mg/L)	Measured Concentration, mg/L (Percent of Nominal)				Mean <sup>a</sup> Measured Concentration (mg/L)
	0 Hour new		48 Hours old		
	Control	<0.009	( - )	<0.009	
0.39	0.454	(116)	0.389	(100)	0.420
0.70	0.811	(116)	0.719	(103)	0.764
0.91	1.06	(116)	0.922	(101)	0.989
1.3	1.48	(114)	1.29	( 99)	1.38
1.7	1.97	(116)	1.70	(100)	1.83
2.2	2.57	(117)	2.22	(101)	2.39
3.9	4.50	(115)	3.85	( 99)	4.16

new : Freshly prepared test solutions  
old : Test solutions after 48 hours exposure  
a : Geometric mean

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

Nominal Concentration (mg/L)	Mean <sup>a</sup> 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)
0.39	0.420	20	0	0	0	0	0( 0)	0	0	0	0	0( 0)
0.70	0.764	20	0	0	0	0	0( 0)	0	0	0	0	0( 0)
0.91	0.989	20	0	0	0	0	0( 0)	0	0	0	0	0( 0)
1.3	1.38	20	2	1	1	2	6( 30)	3	3	2	3	11( 55)
1.7	1.83	20	3	3	5	4	15( 75)	5	4	4	4	17( 85)
2.2	2.39	20	4	5	5	5	19( 95)	5	5	5	5	20(100)
3.9	4.16	20	5	5	5	5	20(100)	5	5	5	5	20(100)

a : Geometric mean

Table 8. Total Hardness(as CaCO<sub>3</sub>)

(Static Condition, Closed System)

Nominal Concentration (mg/L)	Mean <sup>a</sup> Measured Concentration (mg/L)	Total Hardness (as CaCO <sub>3</sub> ), mg/L	
		0 Hour new	48 Hours old
Control	-	247	248
0.39	0.420	250	250
0.70	0.764	250	249
0.91	0.989	248	251
1.3	1.38	250	250
1.7	1.83	250	251
2.2	2.39	249	252
3.9	4.16	248	248

new : Freshly prepared test solutions

old : Test solutions after 48 hours exposure

a : Geometric mean

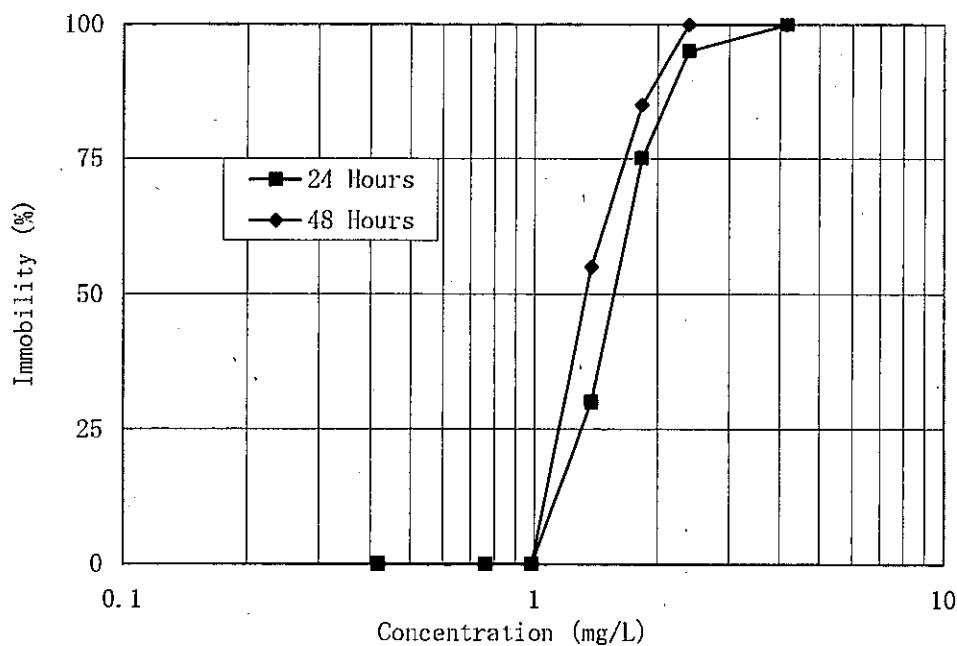


Figure 1. Concentration-Response (Immobility) Curves

## 要 旨

試験委託者 環境省

表 題 3, 4-ジクロロトルエンのヒメダカ (*Oryzias latipes*) に対する  
急性毒性試験

試験番号 No. 2009-生14

### 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日改正）に従って実施した。

- 1) 被験物質 : 3, 4-ジクロロトルエン
- 2) 暴露方式 : 半止水式 (24 時間毎に試験溶液の全量を交換) (密閉系)
- 3) 供試生物 : ヒメダカ (*Oryzias latipes*)
- 4) 暴露期間 : 96 時間
- 5) 試験濃度 (設定値) : 対照区, 0.47, 1.0, 2.2, 3.0, 3.9, 5.2, 7.0 mg/L  
公比 ;  $10^{1/8}$  (約 1.3) ただし、0.47 - 2.2 mg/L の間は  
公比  $10^{1/3}$  (約 2.2) の変則公比
- 6) 試験溶液量 : 5.0 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 :  $24 \pm 1$  °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

暴露期間中の被験物質濃度の減少はヒメダカへの吸着が主因と考えられた。従って、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）の算出にあたっては、暴露開始時および 72 時間換水後（それぞれ調製直後の試験溶液濃度）の算術平均値を採用した。

### 2) 50 % 死亡濃度 (LC<sub>50</sub>)

24 時間 50 % 死亡濃度 (LC<sub>50</sub>) : >8.1 mg/L

48 時間 50 % 死亡濃度 (LC<sub>50</sub>) : 7.0 mg/L  
(95 % 信頼限界 6.0 ~ 8.1 mg/L) , Binomial

72 時間 50 % 死亡濃度 (LC<sub>50</sub>) : 4.9 mg/L  
(95 % 信頼限界 4.2 ~ 5.7 mg/L) , Probit

96 時間 50 % 死亡濃度 (LC<sub>50</sub>) : 4.3 mg/L  
(95 % 信頼限界 3.8 ~ 5.0 mg/L) , Probit

### 3) 0 % 死亡最高濃度、100 % 死亡最低濃度および最大無作用濃度

0 % 死亡最高濃度 : 2.4 mg/L

100 % 死亡最低濃度 : 6.0 mg/L

最大無作用濃度 : <0.62 mg/L

Table 1. Measured Concentrations of the Test Substance in Test Solution (Semi-Static Condition, Closed System)

Nominal Concentration (mg/L)	Measured Concentration, mg/L (Percent of Nominal)				Mean <sup>a</sup> Measured Concentration (mg/L)
	0 Hour new	24 Hours old	72 Hours new	96 Hours old	
Control	<0.009 (-)	<0.009 (-)	<0.009 (-)	<0.009 (-)	-
0.47	0.676 (144)	0.481 (102)	0.555 (118)	0.545 (116)	0.616
1.0	1.08 (108)	0.798 (80)	1.06 (106)	1.04 (104)	1.07
2.2	2.42 (110)	1.68 (76)	2.39 (109)	2.26 (103)	2.41
3.0	3.31 (110)	2.53 (84)	3.35 (112)	3.42 (114)	3.33
3.9	4.21 (108)	2.80 (72)	4.10 (105)	4.01 (103)	4.16
5.2	5.74 (110)	4.03 (78)	6.27 (121)	6.42 (123)	6.01
7.0	8.08 (115)	4.94 (71)	D	D	8.08

new : Freshly prepared test solutions  
old : Test solutions after 24 hours exposure  
a : Arithmetic mean of 0 hour and 72 hour's freshly prepared test solutions  
D : All fish were dead at this observation time

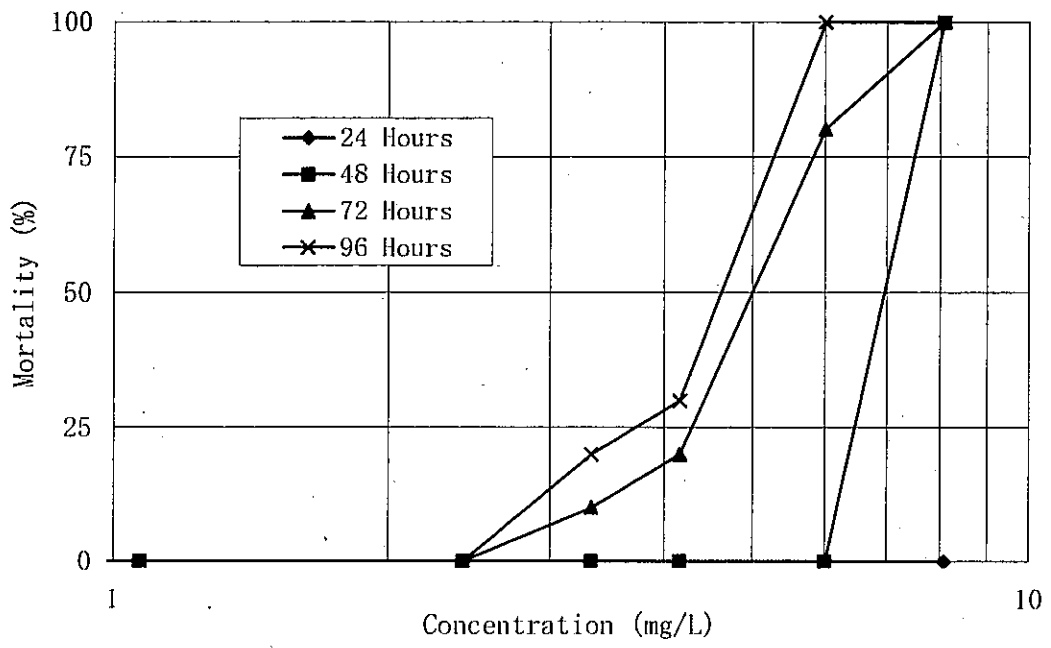
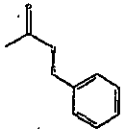


Figure 1. Concentration-Response (Mortality) Curves

[様式7]

藻類生長阻害試験結果報告書

1. 一般的事項

新規化学物質等の名称 (IUPAC 命名法による)	(E)-4-phenylbut-3-en-2-one		
別名	ベンザルアセトン、メチルスチリルケトン、4-フェニル-3-ブテン-2-オン、ベンジリデンアセトン		
C A S 番号	122-57-6		
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	146.19		
試験に供した新規化学物質の 純度 (%)	99.9% (毛管カラム GC)		
試験に供した新規 化学物質のロット番号	和光純薬工業株式会社製 ロット: TSH4967		
不純物の名称 及び含有率	不明		
蒸気圧	1.33Pa/25°C, 0.1hPa (20°C)		
対水溶解度	水に微溶, 0.13% (20°C), 1,350mg/L (推定値)		
1-オクタノール/水分配係数	2.07		
融点	40°C, 37-41°C, 38-41°C, 41.5°C		
沸点	261-262°C		
常温における性状	うすい黄色の結晶塊、塊又は融解時液体、固体は薄い黄色、融解時は黄色～黄褐色の澄明、液体又は固体、黄色		
安定性	引火性が強く、燃焼しやすい。光に暴露すると徐々に着色する。光により変質する、通常条件で安定である。		
溶媒に対する溶解度等	溶媒	溶解度	溶液中の安定性
	エーテル ベンゼン クロロホルム エタノール アセトン メタノール	可溶 可溶 可溶 可溶 ≥20 g/L ≥20 g/L	不明 不明 不明 不明 不明 不明

【備考】物理化学的性状は、可能な限り記入すること。

- 「蒸気圧」の欄には、被験物質の蒸気圧を記入すること。
- 「安定性」の欄には、温度、光等に対する安定性を記入すること。
- 「溶媒に対する溶解度等」の欄には、被験物質の溶媒に対する溶解度及びその溶媒中での安定性を記入すること。

2. 試験溶液の被験物質濃度の分析方法

項目	方法																																				
分析法	<p>【分析方法】 高速液体クロマトグラフィー (HPLC 分析計)</p> <p>【採取した試験区】 全試験区</p> <p>【分析試料の採取頻度】 暴露開始時、24、48 時間後及び暴露終了時 (72 時間後)</p> <p>【試験液の採取方法】 暴露開始時は、調製した試験液の余り 0.6mL をマイクロピペットで 1.5mL 容 HPLC 用バイアルに採取して前処理後、分析試料とした。24 時間目以降の試験液は、同一試験区の各容器から試験液を 2.5mL 容マイクロピペットで 1.5mL ずつ採取して、10mL 容ガラス遠心管に入れて混合し、細胞の分離・前処理後に分析試料とした。</p> <p>【検量線の調製】 0、0.1、0.5、1.0、5.0、10.0、25.0 及び 50.0mg/L の標準溶液を調製して、一定量採取し、HPLC で測定した。</p>																																				
前処理法	<p>【細胞の分離】 10mL 容試験管に採取した試験液を遠心分離器で 10 分間、<math>1,700 \times g</math> で遠心分離し、藻類を沈殿させた。</p> <p>【前処理】 新試験液については、各試験液の入った 1.5 mL 容 HPLC 用バイアルにメタノール 0.9mL を加えてよく混合した。</p> <p>24 時間目以降は、藻類を沈殿させた試験液からマイクロピペットで試験液を 0.6mL 採取して 1.5mL 容 HPLC 用バイアルに入れ、メタノール 0.9mL を加えてよく混合した。</p>																																				
定量化条件	<p>【測定機器】</p> <table border="0"> <tr> <td>高速液体クロマトグラフ</td> <td>: Agilent HP-1100 型</td> <td>Agilent HP-1200 型</td> </tr> <tr> <td>ワークステーション</td> <td>: HP ケミステーション</td> <td></td> </tr> <tr> <td>オペレーションシステム</td> <td>: Windows 2000</td> <td>Windows XP</td> </tr> <tr> <td>デガッサー</td> <td>: G1322A 型</td> <td>G1322A 型</td> </tr> <tr> <td>送液ポンプ</td> <td>: G1312A 型</td> <td>G1311A 型</td> </tr> <tr> <td>オートサンプラー</td> <td>: G1329A 型</td> <td>G1329A 型</td> </tr> <tr> <td>カラムオープン</td> <td>: G1316A 型</td> <td>G1316A 型</td> </tr> <tr> <td>紫外線可視分光検出器</td> <td>: G1315B 型</td> <td>G1315D 型</td> </tr> </table> <p>暴露開始時及び24時間目は『HP-1100』、48時間目以降は『HP-1200』を使用した。</p> <p>【分析条件】</p> <table border="0"> <tr> <td>カラム</td> <td>: Mightysil RP-18 GP、150-2.0 (5<math>\mu</math>m)、関東化学(株)</td> </tr> <tr> <td>カラムオープン</td> <td>: 40℃</td> </tr> <tr> <td>溶離液</td> <td>: CH<sub>3</sub>OH : H<sub>2</sub>O=60 : 40</td> </tr> <tr> <td>流速</td> <td>: 0.2mL/min</td> </tr> <tr> <td>測定波長</td> <td>: 300nm (バンド幅: 8nm)</td> </tr> <tr> <td>試料注入量</td> <td>: 2<math>\mu</math>L</td> </tr> </table> <p>【検出下限値及び定量下限値】</p> <p>検出下限値 : 0.0039mg/L</p>	高速液体クロマトグラフ	: Agilent HP-1100 型	Agilent HP-1200 型	ワークステーション	: HP ケミステーション		オペレーションシステム	: Windows 2000	Windows XP	デガッサー	: G1322A 型	G1322A 型	送液ポンプ	: G1312A 型	G1311A 型	オートサンプラー	: G1329A 型	G1329A 型	カラムオープン	: G1316A 型	G1316A 型	紫外線可視分光検出器	: G1315B 型	G1315D 型	カラム	: Mightysil RP-18 GP、150-2.0 (5 $\mu$ m)、関東化学(株)	カラムオープン	: 40℃	溶離液	: CH <sub>3</sub> OH : H <sub>2</sub> O=60 : 40	流速	: 0.2mL/min	測定波長	: 300nm (バンド幅: 8nm)	試料注入量	: 2 $\mu$ L
高速液体クロマトグラフ	: Agilent HP-1100 型	Agilent HP-1200 型																																			
ワークステーション	: HP ケミステーション																																				
オペレーションシステム	: Windows 2000	Windows XP																																			
デガッサー	: G1322A 型	G1322A 型																																			
送液ポンプ	: G1312A 型	G1311A 型																																			
オートサンプラー	: G1329A 型	G1329A 型																																			
カラムオープン	: G1316A 型	G1316A 型																																			
紫外線可視分光検出器	: G1315B 型	G1315D 型																																			
カラム	: Mightysil RP-18 GP、150-2.0 (5 $\mu$ m)、関東化学(株)																																				
カラムオープン	: 40℃																																				
溶離液	: CH <sub>3</sub> OH : H <sub>2</sub> O=60 : 40																																				
流速	: 0.2mL/min																																				
測定波長	: 300nm (バンド幅: 8nm)																																				
試料注入量	: 2 $\mu$ L																																				

定 量 条 件	定量下限値 : 0.012mg/L
	<p>【回収率及び補正】</p> <p>分析前処理が試験液とメタノールを混合する操作だけであるため、添加回収試験は実施しなかった。また、これに伴い、回収率の補正も実施しなかった。</p>

【備考】

1. 「分析方法」の欄には、実測した分析法を具体的に記入すること。
2. 「前処理法」の欄には、分析を行う前に実施した処理の概要を記入すること。藻類においては細胞の分離手法を明記すること。
3. 「定量条件」の欄には、分析に用いた機器や温度・溶離液等の分析の条件を記入すること。

### 3. 試験材料及び方法

項目		内容	
試験方法		化審法TG(2006)	
試験生物	種(学名・株名)	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	
	入手先	American Type Culture Collection	
	対照物質への感受性 (EC <sub>50</sub> ) (対照物質名)	ErC50(0-72h)=1.21 mg/L 95%信頼区間:算出不可 対照物質 ニクロム酸カリウム	
前培養	前培養の期間	2009年9月25~28日の3日間	
	培地名	化審法ガイドライン推奨培地	
	環境条件(水温、光強度)	水温:23℃(設定) 光強度:67.50~70.44 μmol・m <sup>-2</sup> ・s <sup>-1</sup> (測定値)	
試験条件	試験容器	試験容器:ガラス製300mL容三角フラスコ 蓋:通気性シリコン製栓	
	培地名	化審法ガイドライン推奨培地	
	暴露期間	2009年9月28日~2009年10月1日	
	試験濃度(設定値)	0.250, 0.430, 0.720, 1.23, 2.09 mg/L(公比)1.7	
	初期生物量	細胞数として1.0×10 <sup>4</sup> cells/mL	
	連数	試験濃度区	3
		対照区	6
	試験溶液量	100mL	
	助剤	助剤の有無	使用しない
		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(100rpm)	
水温又は培養温度	23℃(設定値)		
照明(光強度・時間等)	連続照明:66.19~67.50 μmol・m <sup>-2</sup> ・s <sup>-1</sup> (測定値)		
結果の算出 方法	速度法	最小二乗法 影響濃度は、初期実測濃度を用いて算出した	

[備考]

- 「対照物質への感受性」の欄には、試験生物の感受性検定の結果を記入(対照物質を明記した上で EC<sub>50</sub> を記入)すること。
- 「試験濃度(設定値)」の欄には、試験に用いた被験物質の濃度をすべて掲げ、その公比も記入すること。
- 「試験条件」の「試験容器」の欄には、材質及び容量を記入すること。なお、被験物質が揮発性を有す

る場合は「密閉の有無」を記載すること。

4. 「結果の算出方法」の欄には、毒性値 ( $EC_{50}$  及び NOEC) の算出に用いた統計解析手法 (例えば、probit 法、ANOVA 等) を記入すること。



#### 4. 試験結果及び考察

項目	内容
毒性値	0-72hErC <sub>50</sub> = 0.553mg/L NOEC (速度法) = 0.202mg/L
試験濃度	1. 設定値 2. 実測値
考察及び特記事項	試験と同時に実施した被験物質溶液の安定性に関する検討結果より、暴露期間中における濃度減少は主として藻体への吸着が原因であると判断し、影響濃度の算出に初期実測濃度を用いた。試験における異常な事項や本試験法から逸脱した事項はなかった。

【備考】

1. 「試験濃度」の欄には、毒性値 (EC<sub>50</sub> 及び NOEC) を算出するために用いた濃度が「設定値」か、あるいは「実測値」かを明記すること。
2. 「考察及び特記事項」の欄には、被験物質の物理的・化学的特性を踏まえて、毒性値の特徴や試験の有効性に関して考察すること。また、試験における異常な事項や本試験法から逸脱した事項等については、試験結果への影響等を記載すること。

5. 藻類の生長曲線及び濃度－生長阻害率曲線

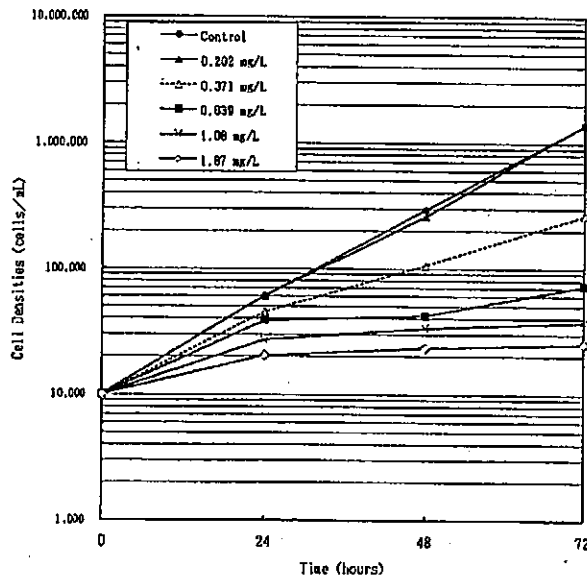


Figure 1. Algal Growth Curve of *Pseudokirchneriella subcapitata* at several concentrations.

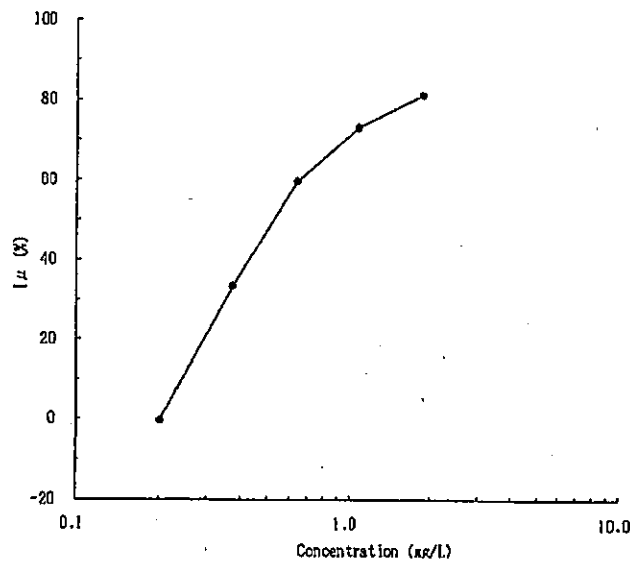


Figure 2. Concentration-Inhibition Curve Based on Group Means of  $I_m$  Values Calculated from the Growth Rate.