

受付番号	662-06-E-4259
試験番号	94259

最 終 報 告 書

13F-AcOHのオオミジンコによる48時間急性遊泳阻害試験

2007 年 5 月 25 日

財団法人化学物質評価研究機構



本文書は正本を正確に転写したものです。

財団法人 化学物質評価研究機構 久留米事業所

2007 年 5 月 28 日

試験責任者

松浦 武

陳 述 書

財団法人化学物質評価研究機構
久留米事業所

試験委託者 ダイキン工業株式会社

試験の表題 13F-AcOHのオオミジンコによる48時間急性遊泳阻害試験

試験番号 94259

上記試験は以下のGLPに従って実施したものです。

- (1) 「新規化学物質等に係る試験を実施する試験施設に関する基準について」（平成15年11月21日、薬食発第1121003号、平成15・11・17製局第3号、環保企発第031121004号）に規定する「新規化学物質等に係る試験を実施する試験施設に関する基準」
- (2) 「OECD Principles of Good Laboratory Practice」(November 26, 1997)

また、本最終報告書は生データを正確に反映しており、試験データが有効であることを確認しています。

2007年5月25日

試験責任者

松浦 武
松 浦 武

信 頼 性 保 証 書

財団法人化学物質評価研究機構
久留米事業所

試験委託者 ダイキン工業株式会社

試験の表題 13F-AcOHのオオミジンコによる48時間急性遊泳阻害試験

試験番号 94259

本最終報告書は、試験の方法、手順が正確に記載され、試験結果は生データを正確に反映していることを保証します。

なお、監査又は査察の結果については、下記の通り試験責任者及び運営管理者に報告しました。

監査又は査察内容	監査又は査察日	報告日 (試験責任者及び運営管理者)
試験計画書草案	2007年4月20日	2007年4月20日
試験計画書	2007年4月20日	2007年4月20日
試験計画書の変更	2007年5月8日	2007年5月8日
暴露開始時, 暴露開始後	2007年4月23日	2007年4月25日
	2007年4月25日	2007年4月25日
生データ、最終報告書草案	2007年5月25日	2007年5月25日
最終報告書	2007年5月25日	2007年5月25日

信頼性保証部門責任者

2007年5月25日

白石圭二

白石圭二

目 次

	頁
表 題	1
試験委託者	1
試験施設	1
試験目的	1
試験法	1
適用 GLP	1
試験日程	2
試資料の保管	2
試験関係者	3
最終報告書の承認	3
要 約	4
1. 被 験 物 質	6
2. 供 試 試 料	7
3. 試験材料と方法	8
4. 試験結果及び考察	13
5. 試験成績の信頼性に影響を及ぼしたと思われる環境要因	14

試験結果の表及び図

- 表1 遊泳阻害率
 表2 観察された症状
 表3 試験液の水質
 表4 オオミジンコに対するEC₅₀
 図1 濃度－遊泳阻害率曲線

付属資料1 試験用水の水質

付属資料2 被験物質濃度の分析方法及び測定結果

付属資料3 検量線及びクロマトグラム

別添資料 予備試験結果

表 題	13F-AcOHのオオミジンコによる48時間急性遊泳阻害試験
試験委託者	ダイキン工業株式会社 (〒566-8585) 大阪府摂津市西一津屋1番1号
試験施設	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
試験目的	13F-AcOHのミジンコ類に対する短期的影響を調べる。
試験法	本試験は以下の試験法に従って行った。 (1)「新規化学物質等に係る試験の方法について」(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)に規定する〈ミジンコ急性遊泳阻害試験〉 (2)「OECD Guidelines for Testing of Chemicals」に定める“ <i>Daphnia</i> sp., Acute Immobilisation Test (Guideline 202, April 13, 2004)”
適用 GLP	本試験は以下の基準を適用した。 (1)「新規化学物質等に係る試験を実施する試験施設に関する基準について」(平成15年11月21日、薬食発第1121003号、平成15・11・17製局第3号、環保企発第031121004号)に規定する「新規化学物質等に係る試験を実施する試験施設に関する基準」 (2)「OECD Principles of Good Laboratory Practice」(November 26, 1997)

試験日程

試験開始日	2007年4月20日
実験開始日	2007年4月23日
実験終了日	2007年4月25日
試験終了日	2007年5月25日

試験資料の保管

(1) 被験物質

供試試料^{*1}を保管用容器に入れ密栓後、化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律（以下「化審法」と記す）第4条第1項若しくは第2項、第4条の2第2項、第3項若しくは第8項、第5条の4第2項、第24条第2項又は第25条の3第2項の規定による通知を受けた後10年間、または品質低下をおこさないで安定に保管しうる期間のいずれか短い方の期間、久留米事業所試料保管室に保管する。保管期間経過後の処置または廃棄に際しては試験委託者と協議の上決定する。

*1 試験番号94258、94259及び94260についての共用保管試料とする。

(2) 生データ、資料等

生データ、試験計画書、試験委託書、被験物質調査票、その他必要な資料等は最終報告書と共に、化審法第4条第1項若しくは第2項、第4条の2第2項、第3項若しくは第8項、第5条の4第2項、第24条第2項又は第25条の3第2項の規定による通知を受けた後10年間、久留米事業所資料保管室に保管する。保管期間経過後の処置は試験委託者と協議の上決定する。

試験関係者

試験責任者

松浦 武所属 試験第四課

生物試験担当者

田中真里子廣尾ゆみか

分析試験担当者

春口寿子鏡山知世井上仁美杉本弘子小野美香

最終報告書の承認

2007年5月25日

試験責任者

松浦 武

松浦 武

要 約

試験の表題

13F-AcOHのオオミジンコによる48時間急性遊泳阻害試験

試験条件

(1) 被 験 物 質	13F-AcOH
(2) 試 験 生 物	オオミジンコ (<i>Daphnia magna</i>)
(3) 暴 露 期 間	48時間
(4) 試 験 濃 度	100、66.7、44.4、29.6及び19.8mg/L (公比1.5) の5濃度区及び対照区
(5) 試 験 生 物 数	20頭/試験区 (5頭/試験容器)
(6) 試 験 用 水	脱塩素水道水
(7) 試 験 方 式	止水式
(8) 試 験 液 の 調 製	供試試料を試験用水に溶解し、フィルターろ過した試験原液を用いて調製
(9) 連 数	4連/試験区
(10) 試 験 液 量	400mL/試験区 (100mL/試験容器)
(11) 水 温	20±1℃
(12) 照 明	室内灯、16時間明/8時間暗
(13) 給 餌	無給餌
(14) エアレーション	なし
(15) 試験液中の被験物質の分析	LC-MS法 (暴露開始時及び終了時) 分析対象：試験最高、最低濃度区及び対照区

試験結果

- | | |
|-------------------------------------|---------------------------|
| (1) 試験液中の被験物質濃度 (対設定濃度) | 暴露開始時 102% |
| | 暴露終了時 96.1及び101% |
| (2) 48時間EC ₅₀ (半数遊泳阻害濃度) | 83.5mg/L |
| | (95%信頼限界 ; 75.3~93.4mg/L) |
| (3) 48時間100%遊泳阻害最低濃度 | >100mg/L |
| (4) 48時間0%遊泳阻害最高濃度 | 44.4mg/L |

[(2)、(3)、(4)は、設定濃度に基づく値]

1. 被験物質

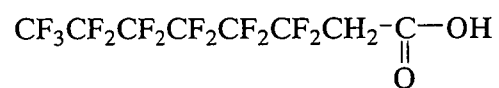
本最終報告書において13F-AcOHは、次の名称等を有するものとする。

1.1 名 称^{*2}

3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8-トリデカフルオロオクタン酸

1.2 構造式等^{*2}

構造式



分子式 $\text{C}_8\text{H}_3\text{F}_{13}\text{O}_2$

分子量 378.09

*2 試験委託者提供資料による。

2. 供試試料

2.1 供給者及びロット番号^{*2}

供給者	ダイキン工業株式会社
ロット番号	S6X01

2.2 純度^{*2}

被験物質	99.4%
不純物	不明成分 0.6%

2.3 被験物質の確認

試験委託者提供の赤外吸収スペクトルと久留米事業所の当該測定スペクトルが一致することを確認した。

2.4 物理化学的性状^{*2}

常温における性状	白色固体
溶解度	ジメチルスルホキシド 可溶
	アセトン 可溶

*2 試験委託者提供資料による。

2.5 保管条件及び保管条件下での安定性確認

保管条件	室温遮光保存
安定性確認	実験開始前及び終了後に被験物質の赤外吸収スペクトルを測定した結果、両スペクトルは一致し、保管条件下で安定であることを確認した。

3. 試験材料と方法

3.1 試験生物

(1) 種

オオミジンコ (*Daphnia magna* Clone A)

(2) 生物種選択の理由

テストガイドラインに推奨されている種類である。

(3) 供給源

英国Sheffield大学（所在地 Sheffield S10 2UQ, United Kingdom）より分譲された *Daphnia magna*(Clone A)の子孫で、久留米事業所で継代飼育している成体より産出された幼体を用いた。幼体を産出する成体は、試験条件と同じ水質（脱塩素水道水）、水温（ $20 \pm 1^\circ\text{C}$ ）及び明暗周期（16時間明／8時間暗）下で14日間以上飼育したものの（24日齢）で成体の生存率が100%の群（ロット）を使用した。継代飼育中はミジンコ1頭当たり *Chlorella vulgaris*を0.1～0.2mgC（有機炭素含量）／日の割合で1日に1回給餌した。また、試験系の再現性を確認するために実施（2007年4月9日～4月11日）した二クロム酸カリウム（和光純薬工業製 試薬特級）の急性遊泳阻害試験の48時間EC₅₀は0.270mg/Lであった。この値は久留米事業所におけるバックグラウンドデータの規定範囲内（平均 $\pm 2 \times$ 標準偏差：0.122～0.350mg/L）であった〔平均 \pm 標準偏差は $0.236 \pm 0.057\text{mg/L}$ （n=58）〕

(4) 幼体の選別

生後24時間以内の幼体を用いた。

(5) 群分け

無作為に抽出を行った。

3.2 試験用水

十分にエアレーションし、温度調節した脱塩素水道水を用いた。定期的に測定した試験用水の水質測定結果を付属資料1に示す。

3.3 試験器具及び装置

(1) 試験器具

試験容器：100mLガラスビーカー

また、ほこりの混入や試験液の蒸散を防ぐため蓋をした。

(2) 試験装置

恒温槽：プラスチック製水槽

加熱・冷却ユニット（佐藤工芸製 HCA250）

3.4 試験条件

(1) 暴露条件

(a) 方式

被験物質を含む試験液へ試験生物を暴露した。

試験は試験液の交換をしない止水式で行った。

(b) 期間

48時間

(c) 試験濃度

試験は100、66.7、44.4、29.6及び19.8mg/L（公比1.5）の5濃度区で行った。試験濃度及び公比は予備試験結果から決定した。試験濃度は純度（99.4%）補正を行った値で表示した。予備試験結果を別添資料に示す。

(d) 対照群

被験物質を含まない試験用水に試験原液と同様の調製処理をした対照区を設けた。

(e) 連数

4連／試験区

(f) 試験生物数

20頭／試験区（5頭／試験容器）

(g) 試験液量

400mL/試験区 (100mL/試験容器)

(2) 環境条件

(a) 水温

20±1℃

(b) 溶存酸素濃度

暴露期間中、試験水温での飽和溶存酸素濃度の60%以上で行った。また、暴露期間中、エアレーションは行わなかった。

(c) pH

試験はpHを調整せずに行った。

(d) 照明

室内灯による16時間明/8時間暗

(e) 給餌

暴露期間中、給餌を行わなかった。

3.5 試験液の調製法

試験原液の調製は純度 (99.4%) 補正して行った。

メノウ乳鉢で微細化した供試試料と試験用水を100mg/L (設定) になるように混合し、約1時間攪拌後、ガラス繊維フィルター (ADVANTEC製 GB-140 孔径0.4μm) で吸引ろ過を行った。その後、吸引ろ過によって低下した溶存酸素濃度を回復させるため、20±1℃の条件下で約1時間攪拌した。この溶液を試験原液とし、調製容器にて試験用水と混合、攪拌して試験液を調製し、各試験容器に分割した。

各試験区の試験原液濃度及び調製量に対する試験原液添加量を次頁に示す。

試験区 (mg/L)	試験原液濃度 (mg/L)	試験原液添加量 (mL/500mL)
対照区	—	—
19.8	100	99.0
29.6		148
44.4		222
66.7		333.5
100		試験原液をそのまま各試験容器に分割した

3.6 観察と測定

(1) 試験生物の状態

暴露開始24及び48時間後に遊泳阻害及び症状を観察した。試験容器を穏やかに動かした後、15秒間一度も泳げない場合を遊泳阻害されたとみなした。

(2) 試験液の状態

試験液の状態を暴露開始時及び終了時に観察した。

(3) 水 質

試験液の溶存酸素濃度、pH及び水温を暴露開始時及び終了時に測定した。暴露開始時は調製容器より別途分取した試験液について測定し、暴露終了時には各試験区につき1試験容器について測定した。溶存酸素濃度は溶存酸素計（YSI Incorporated 製 YSI MODEL 58）、pHはガラス電極式水素イオン濃度計（東亜ディーケーケー 製 HM-21P）、水温は検定済ガラス製棒状温度計で測定した。

(4) 試験液中の被験物質濃度

予備検討において、暴露期間中、試験液中の被験物質濃度が安定であると確認できたため、試験液中の被験物質濃度の測定は試験最高濃度区、最低濃度区及び対照区について行った。被験物質濃度の測定は、暴露開始時及び終了時に行った。暴露開始時の測定用試験液は調製容器より別途分取したものをを用いた。暴露終了時の測定用試験液は各試験区の試験容器の中層からそれぞれ均等量採取し、混合したものをを用いた。被験物質濃度の分析は液体クロマトグラフィー—質量分析法（LC-MS）により行った。被験物質濃度の分析方法及び測定結果を付属資料2、検量線及びクロマトグラムを付属資料3に示す。

(5) 試験用水への溶解度

被験物質の試験用水への溶解度は100mg/L以上であったため、本試験では試験用水への溶解度は測定しなかった。

3.7 EC₅₀^{*3}の算出法

48時間についてはProbit法によりEC₅₀を算出した。また、その95%信頼限界も算出し、算出に用いた回帰直線の傾きも求めた。なお、24時間については本試験濃度範囲で50%以上の遊泳阻害率が得られなかったため、EC₅₀は「>試験最高濃度」と表示した。

結果の算出には設定濃度を用いた。

*3 EC₅₀ (Median Effective Concentration) : 暴露期間において試験生物の50%に影響を与える被験物質濃度を示す。影響の指標は遊泳阻害による。

3.8 有効性基準

- (1) 暴露期間中、対照群のミジンコにおいて、10%を超えて遊泳阻害されたり、水面に浮いたりしてはならない。
- (2) 溶存酸素濃度は暴露期間中、試験水温での飽和溶存酸素濃度の60%以上でなければならない。

3.9 数値の取扱い

数値の丸め方は、JIS Z 8401 : 1999 規則Bに従った。

4. 試験結果及び考察

4.1 遊泳阻害率

48時間における100%遊泳阻害最低濃度は本試験の濃度範囲からは得られなかったため、 $>100\text{mg/L}$ と表示した。0%遊泳阻害最高濃度は 44.4mg/L であった。24及び48時間での遊泳阻害率を表1、濃度－遊泳阻害率曲線を図1に示す。なお、暴露期間中の対照群において水面に浮いた個体はみられず、遊泳阻害率は0%であり、有効性基準（10%を超えない）を満たしていた。

4.2 症状等の観察結果

対照群において、症状は認められなかった。

以下の観察結果は全て対照群との比較に基づくものである。暴露期間中に観察された症状は嗜眠状態、遊泳阻害、過活動及び活動度の低下であった。暴露期間中における症状の観察結果を表2に示す。

4.3 試験液の観察と測定結果

(1) 試験液の状態

暴露開始時は無色透明であった。暴露終了時も同様であった。

(2) 試験液の水質

暴露期間中に測定した溶存酸素濃度は $7.5\sim 8.7\text{mg/L}$ 、pHは $6.8\sim 7.8$ 、水温は $19.6\sim 19.9^\circ\text{C}$ であった。試験液の水質を表3に示す。なお、溶存酸素濃度は有効性基準（試験水温での飽和濃度の60%以上^{*4}）を満たしていた。

*4 19～21℃の飽和溶存酸素濃度： $9.01\sim 8.68\text{mg/L}$ 、JIS K 0102：1998

(3) 試験液中の被験物質濃度

測定した試験液中の被験物質濃度は、暴露開始時では設定値に対して102%、暴露終了時は96.1及び101%であり、設定濃度の $\pm 20\%$ 以内に保たれていた。被験物質濃度の測定結果を付属資料2に示す。

4.4 EC₅₀

13F-AcOHのオオミジンコに対する24時間EC₅₀は $>100\text{mg/L}$ 、48時間EC₅₀は 83.5mg/L （95%信頼限界： $75.3\sim 93.4\text{mg/L}$ ）であった。各時間でのEC₅₀を表4に示す。

4.5 考 察

本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。試験液中の被験物質濃度は設定濃度の±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、本試験は試験法に準じたものであったと判断される。

5. 試験成績の信頼性に影響を及ぼしたと思われる環境要因

当該要因はなかった。

表1 遊泳阻害率

設定濃度 (mg/L)		遊 泳 阻 害 率 (%)			
		24時間		48時間	
		試験容器毎	試験区毎	試験容器毎	試験区毎
対照区	A	0	0	0	0
	B	0		0	
	C	0		0	
	D	0		0	
19.8	A	0	0	0	0
	B	0		0	
	C	0		0	
	D	0		0	
29.6	A	0	0	0	0
	B	0		0	
	C	0		0	
	D	0		0	
44.4	A	0	0	0	0
	B	0		0	
	C	0		0	
	D	0		0	
66.7	A	0	5	0	15
	B	0		0	
	C	20		40	
	D	0		20	
100	A	60	25	80	80
	B	0		100	
	C	40		100	
	D	0		40	

表2 観察された症状

設定濃度 (mg/L)	観察結果	
	24時間	48時間
対照区	—	—
19.8	—	—
29.6	—	—
44.4	—	RA
66.7	IM LETH	IM LETH RA
100	IM LETH RA	HYP IM LETH RA

—は症状が認められなかったことを示す。

症状の略称

- HYP (Hyper active) : 過活動
 IM (Immobilization) : 遊泳阻害
 LETH (Lethargic) : 嗜眠状態
 RA (Reduced activity) : 活動度の低下

表3 試験液の水質

設定濃度 (mg/L)	溶存酸素濃度 (mg/L)		pH		水温 (°C)	
	開始時	終了時	開始時	終了時	開始時	終了時
対照区	8.4	8.6	7.8	7.8	19.7	19.6
19.8	8.3	8.6	7.6	7.8	19.8	19.7
29.6	8.2	8.7	7.4	7.8	19.8	19.7
44.4	8.1	8.7	7.3	7.7	19.9	19.7
66.7	7.9	8.7	7.1	7.7	19.9	19.8
100	7.5	8.7	6.8	7.6	19.9	19.8

表4 オオミジンコに対するEC₅₀

暴露時間	EC ₅₀ (mg/L)	95%信頼限界 (mg/L) (回帰直線の傾き)	EC ₅₀ 算出法
24時間	>100	— (—)	—
48時間	83.5	75.3~93.4 (10.9)	Probit法

—は得られなかったことを示す。

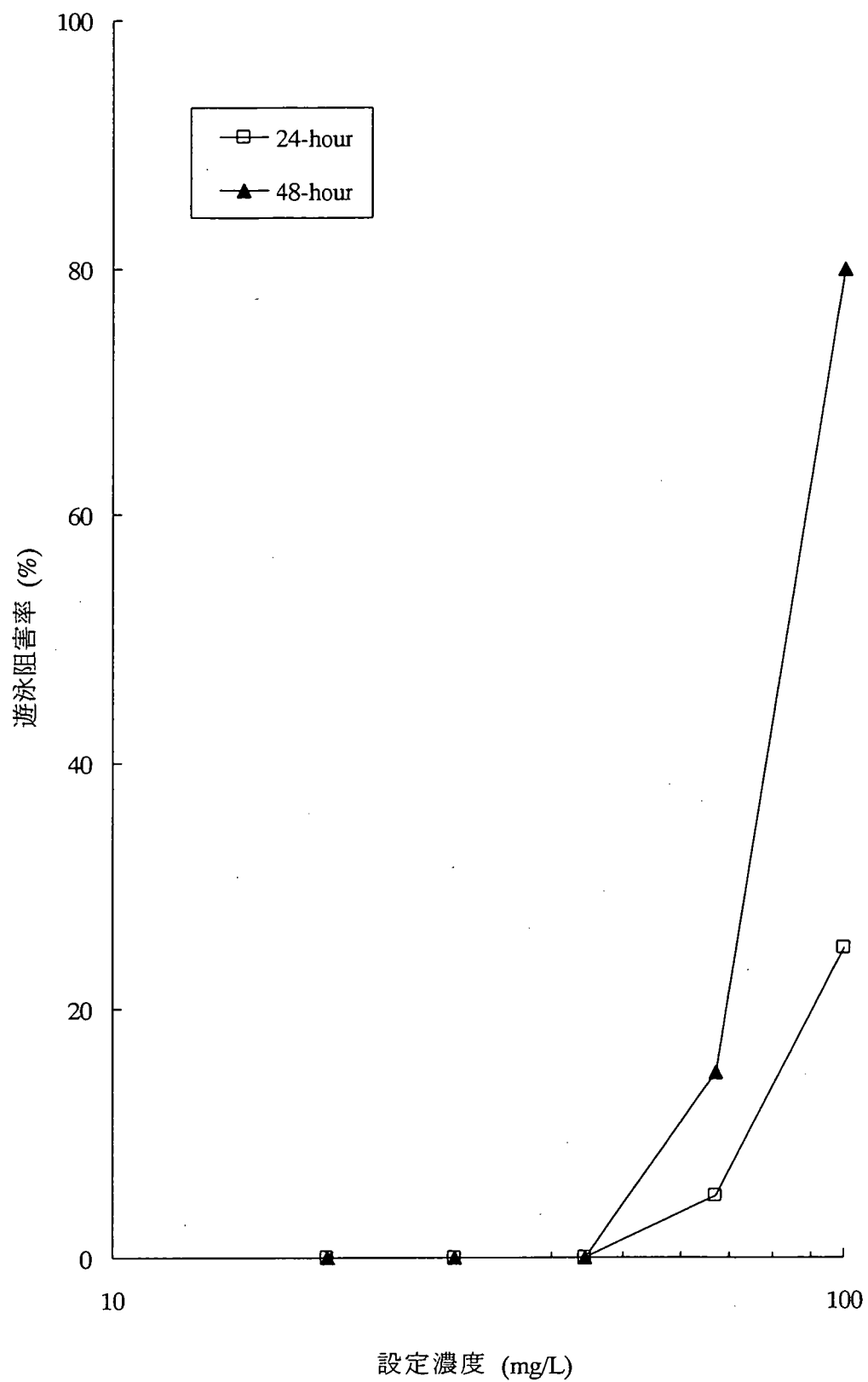


圖1 濃度－游泳阻害率曲線

付属資料1

試験用水の水質

試験用水の水質（採水日：2007年1月9日）

項 目	単 位	検 査 結 果	定 量 下 限
全硬度 (CaCO ₃ として)	mg/L	41.9	0.1
浮遊物質	mg/L	< 1	1
pH値	-	7.9 (22℃)	-
有機体炭素	mg/L	0.2	0.1
化学的酸素要求量	mg/L	0.7	0.5
遊離塩素	mg/L	< 0.02	0.02
アンモニウム態窒素	mg/L	0.01	0.01
全シアン	mg/L	< 0.01	0.01
アルカリ度	mg/L	35	1
電気伝導率	mS/m	18.3	-
有機りん	mg/L	< 0.1	0.1
アルキル水銀	mg/L	< 0.0005	0.0005
総水銀	mg/L	< 0.0005	0.0005
カドミウム	mg/L	< 0.001	0.001
六価クロム	mg/L	< 0.02	0.02
鉛	mg/L	< 0.005	0.005
ヒ素	mg/L	< 0.001	0.001
ホウ素	mg/L	0.08	0.02
フッ素	mg/L	< 0.1	0.1
鉄	mg/L	< 0.01	0.01
銅	mg/L	< 0.005	0.005
コバルト	mg/L	< 0.001	0.001
マンガン	mg/L	< 0.01	0.01
亜鉛	mg/L	< 0.01	0.01
アルミニウム	mg/L	0.033	0.001
ニッケル	mg/L	< 0.001	0.001
銀	mg/L	< 0.0001	0.0001
硫酸イオン	mg/L	3.9	0.1
塩化物イオン	mg/L	16	1
ナトリウム	mg/L	14.3	0.01
カリウム	mg/L	3.7	0.01
カルシウム	mg/L	11.5	0.01
マグネシウム	mg/L	3.2	0.01
1,2-ジクロロプロパン	mg/L	< 0.0001	0.0001
クロロタロニル	mg/L	< 0.0001	0.0001
プロピザミド	mg/L	< 0.0001	0.0001
クロルニトロフェン	mg/L	< 0.0001	0.0001
シマジン	mg/L	< 0.001	0.001
チオベンカルブ	mg/L	< 0.0001	0.0001
ダイアジノン	mg/L	< 0.0001	0.0001
イソキサチオン	mg/L	< 0.0001	0.0001
フェニトロチオン	mg/L	< 0.0001	0.0001
EPN	mg/L	< 0.0001	0.0001
ジクロルボス	mg/L	< 0.0001	0.0001
イプロベンホス	mg/L	< 0.0001	0.0001
PCB	mg/L	< 0.0005	0.0005

付属資料2

被験物質濃度の分析方法及び測定結果

1. 試験液の前処理操作

採取した試験液について、そのまま若しくは脱塩素水道水で適宜希釈して分析試料を調製した。

2. 分析方法

前処理操作を行って得られた分析試料は、下記の定量条件に基づき液体クロマトグラフィー質量分析法（LC-MS）により被験物質の定量を行った。分析試料中の被験物質濃度は、クロマトグラム上のピーク面積を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。得られたクロマトグラム（一例）を付属資料3に示す。

定量条件

機 器	液体クロマトグラフ質量分析計
液体クロマトグラフ	島津製作所製 LC-20A Series
質量分析計	サーモエレクトロン製 TSQ Quantum Discovery型

液体クロマトグラフ条件

カラム	L-column ODS (15cm×2.1mmI.D., 化学物質評価研究機構製)
カラム温度	40℃
溶離液	A (20%) : 水* / ぎ酸 (1000/0.5 V/V) B (80%) : アセトニトリル / ぎ酸 (1000/0.5 V/V)
流量	0.2mL/min
注入量	1μL

質量分析計条件

イオン化法	エレクトロスプレーイオン化法 (ESI)
検出イオン	負イオン
検出法	選択イオンモニタリング (SIM)
測定イオン(m/z)	377
イオンチューブ温度	250℃

* 水道水を超純水装置システムで処理した水

3. 標準溶液の調製

分析試料中の被験物質濃度を求めるための標準溶液の調製は次のように行った。また、標準溶液の調製は純度（99.4%）補正して行った。

メノウ乳鉢で微細化した供試試料100mgを電子分析天びんで正確にはかりとり、アセトニトリルに溶解して994mg/Lの被験物質溶液を調製した。これを脱塩素水道水で希釈して4.97mg/Lの標準溶液を調製した。

4. 検量線の作成

3.の標準溶液の調製と同様にして0.497、2.49、4.97及び9.94mg/Lの標準溶液を調製した。これらを2.の定量条件に従って分析し、得られたそれぞれのクロマトグラム上のピーク面積と被験物質濃度により検量線を作成し、定量性を確認した。作成した検量線を付属資料3に示す。なお、試験液中の被験物質の定量下限値は、定量性が確認された範囲内での最小の標準溶液濃度（0.497mg/L）とした。

5. 測定結果

試験液中の被験物質濃度の測定結果を以下の表に示す。

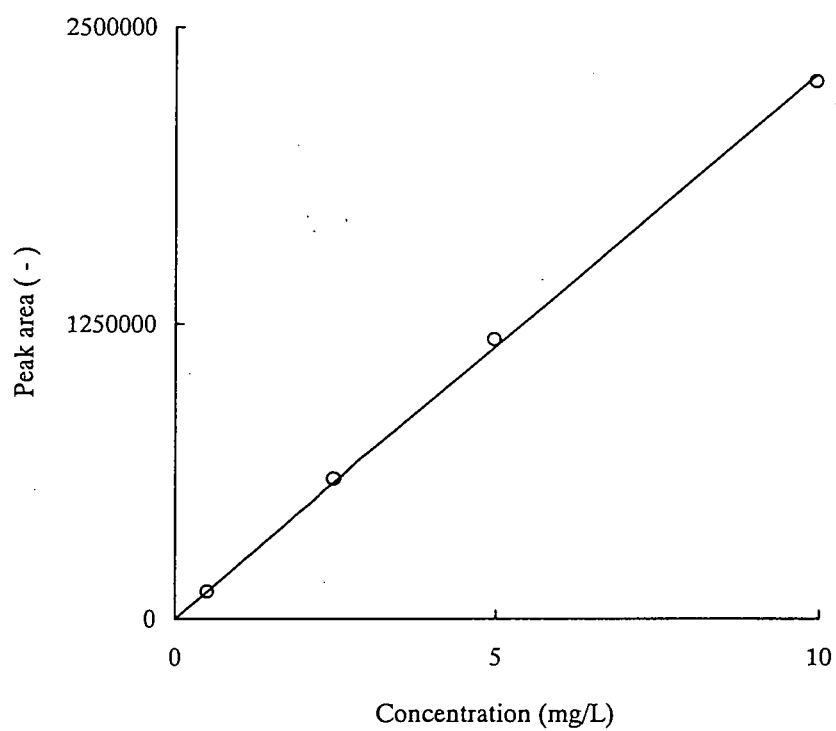
付表2-1 試験液中の被験物質濃度

設定濃度 (mg/L)	測定濃度 (mg/L) (対設定濃度 %)		
	暴露開始時	暴露終了時	幾何平均値
対 照 区	n.d.	n.d.	—
19.8	20.2 (102)	20.0 (101)	20.1 (101)
100	102 (102)	96.1 (96.1)	99.0 (99.0)

n.d. : <0.497mg/L

付属資料3

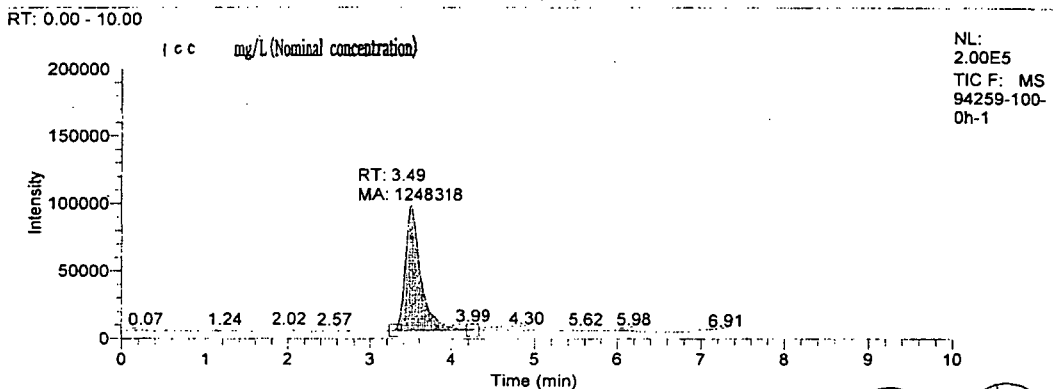
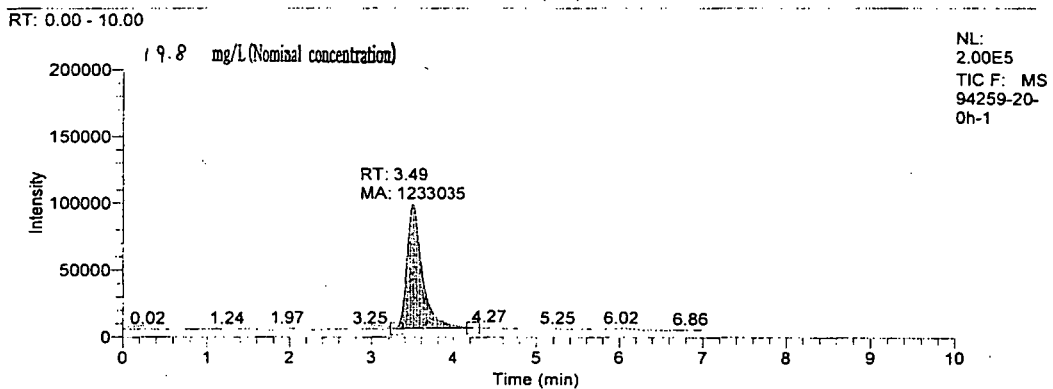
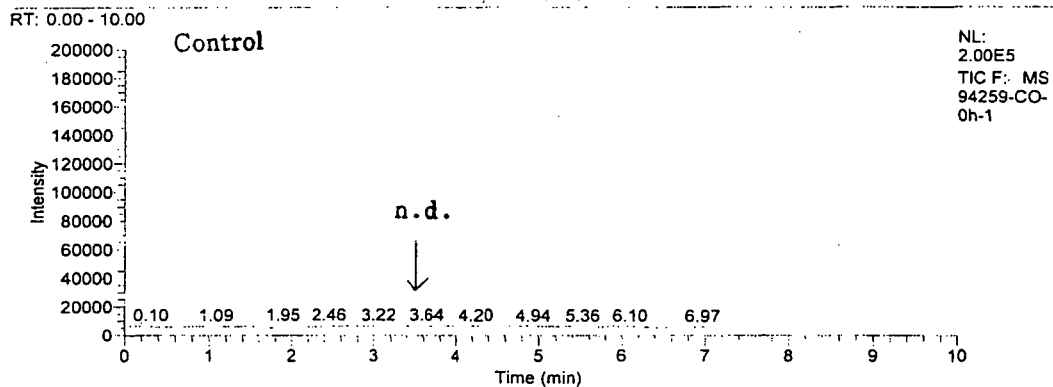
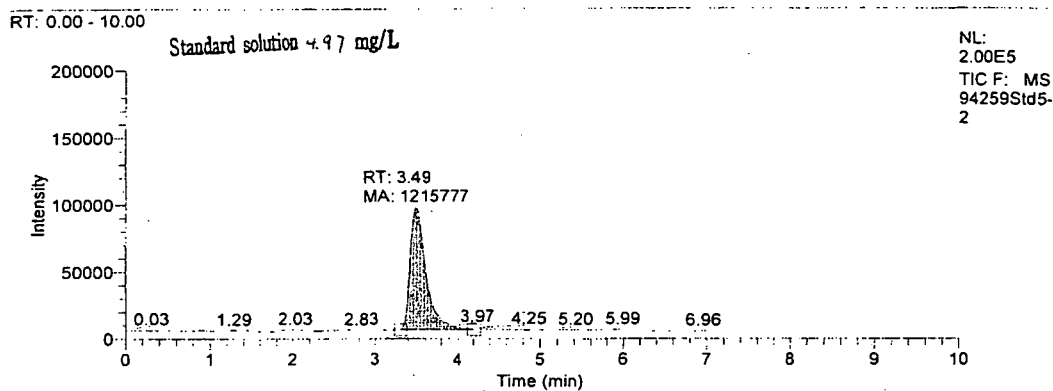
検量線及びクロマトグラム



$$y = 230878x$$
$$r = 1.00$$

Concentration (mg/L)	Peak area (-)
0.497	116006
2.49	591928
4.97	1184766
9.94	2271946

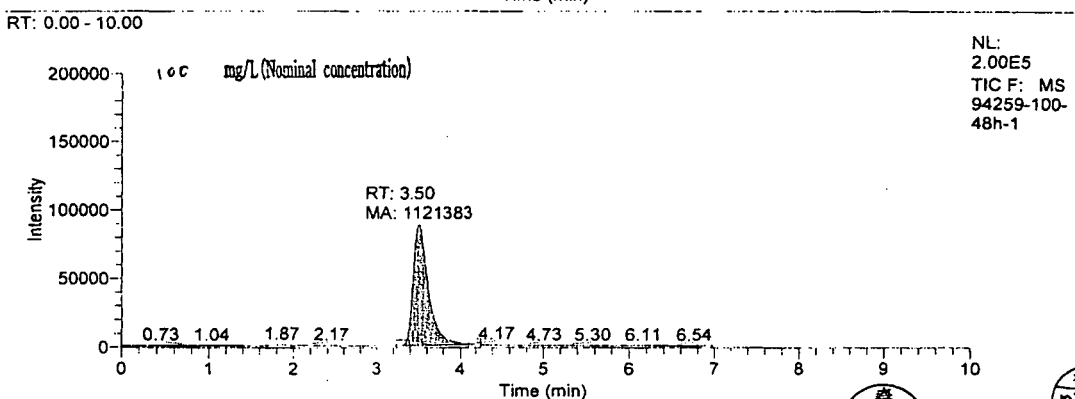
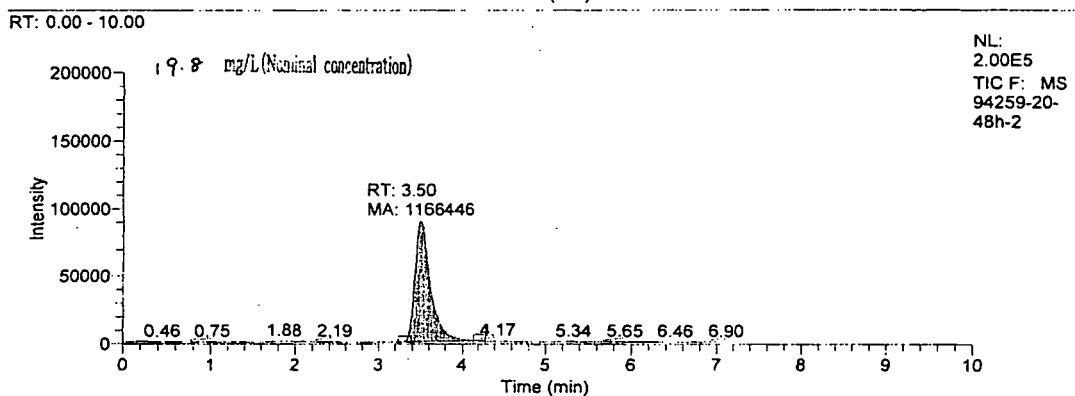
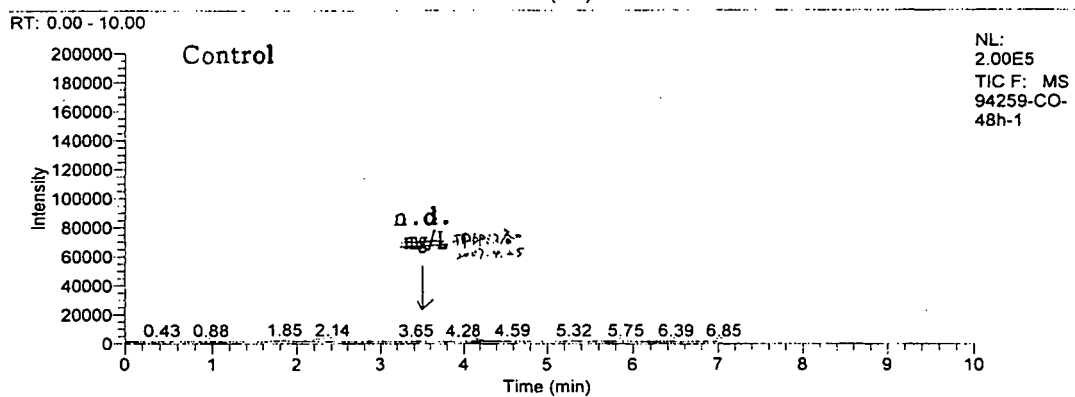
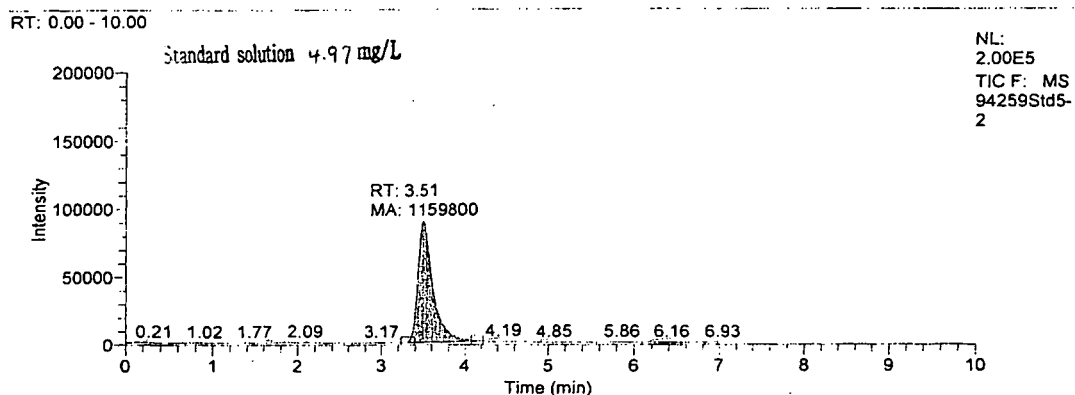
付図3-1 13F-AcOHのLC-MSによる検量線



春
DT.4.23
口

松浦
DT.4.23
武

付図3-2 試験液のLC-MSクロマトグラム (暴露開始時)



付図3-3 試験液のLC-MSクロマトグラム (暴露終了時)

別添資料

予備試験結果

1. 被験物質の試験用水への溶解度

被験物質の水への溶解度が100mg/L以下であることが予想されたため、溶解度測定
の検討を行った。結果を以下に示す。なお、この検討は魚類急性毒性試験（試験番号
94260）において実施したものである。

1) 検 討

(1) 内 容

供試試料と試験用水を100mg/Lになるように混合後、 $24 \pm 1^\circ\text{C}$ の条件下で約48
時間攪拌して、被験物質の溶解性を確認した。

(2) 結 果

ガラス繊維フィルター*（ADVANTEC製 GB-140 孔径 $0.4\mu\text{m}$ ）による吸引
ろ過を行った後、被験物質分析を行った。その結果、被験物質濃度は101mg/L
であった。

* フィルター吸着がないことを確認している。

2) 被験物質の試験用水への溶解度検討結果のまとめ

被験物質の試験用水への溶解度は100mg/L以上と判断されたため、本試験では
溶解度測定は実施しないこととした。

2. 試験生物への影響

1) 予備試験1

(1) 内 容

試験法の上限濃度（100mg/L）になるように供試試料と試験用水を混合し、20±1℃の条件下で約48時間攪拌後、約1時間静置して中層を採取した。この中層液（分散懸濁液）及びガラス繊維フィルター（ADVANTEC製 GB-140 孔径0.4μm）で自然ろ過したろ液を試験原液とし、試験用水で適宜希釈した試験液を調製し、生物を暴露して影響を確認した。なお、試験原液の調製は純度（99.4%）補正して行った。

(2) 結 果

試験原液 含有率 (%)	24 時間		48 時間	
	遊泳阻害率 (%)	その他の症状等	遊泳阻害率 (%)	その他の症状等
1.00(中層液)	0	—	0	—
10.0(中層液)	0	—	0	—
100(中層液)	80	RA ADS	100	ADS
1.00(ろ液)	0	—	0	—
10.0(ろ液)	0	—	0	—
100(ろ液)	0	RA	0	RA

暴露方式：止水式

試験生物数：5 頭／試験区（5 頭／試験容器）

—はその他の症状等が観察されなかったことを示す。

症状等の略称

RA（Reduced activity）：活動度の低下

ADS（Adhesion of the substance）：物質付着

中層液100%含有区において100%の遊泳阻害がみられた。ろ液100%含有区においては活動度の低下がみられたものの、遊泳阻害には至らなかった。ミジンコの体表への供試試料と思われる物質の付着が、ろ液においては観察されなかったことから、中層液においての症状は不溶物としての供試試料による物理的影響が主な原因であると考えられた。そのため、今回の検討からは不溶物を除去した試験液について行うこととした。

2) 被験物質の溶解性の確認1

予備試験1において調製した試験液中には不溶物が存在（目視にて確認）していたが、試験用水への溶解度検討において被験物質は100mg/L以上溶解することが確認されたため、被験物質の溶解性の確認を再度行った。なお、供試試料の形状は粒子径が粗い結晶状であり、そのまま攪拌を行うだけでは十分な溶解濃度が得られないと予想された。そのため、以降の検討では供試試料をメノウ乳鉢で微細化して用いることとした。

(1) 内 容

供試試料と試験用水を混合（設定濃度：100及び120mg/L）し、 $20\pm 1^{\circ}\text{C}$ の条件下で48時間まで攪拌を行い、攪拌3、24及び48時間後の試験液中の被験物質濃度を測定した。なお、試験液の調製は純度（99.4%）補正して行った。

(2) 結 果

設定濃度区 (mg/L)	測定濃度 (mg/L)		
	攪拌3時間後	攪拌24時間後	攪拌48時間後
100	94.8	99.8	98.2
120	122	122	122

3時間の攪拌により試験液中の被験物質濃度は設定濃度付近まで溶解することを確認した。

3) 予備試験2

被験物質の溶解性の確認¹により、設定濃度が得られると確認した3時間攪拌によって調製した試験液中に生物を暴露し、影響を確認することとした。

(1) 内 容

供試試料と試験用水を混合（設定濃度：100 mg/L）し、20±1℃の条件下で約3時間攪拌した。その後、ガラス繊維フィルター*（ADVANTEC製 GB-140 孔径0.4μm）で吸引ろ過して試験液を調製し、生物を暴露した。なお、試験液の調製は純度（99.4%）補正して行った。

(2) 結 果

設定濃度区 (mg/L)	24 時間		48 時間	
	遊泳阻害率 (%)	その他の症状	遊泳阻害率 (%)	その他の症状
100	0	—	90	RA

暴露方式：止水式

試験生物数：10 頭／試験区（5 頭／試験容器）

—はその他の症状が観察されなかったことを示す。

症状の略称

RA（Reduced activity）：活動度の低下

不溶物を除去した試験液においても試験生物に影響がみられた。

4) 予備試験3

(1) 内 容

予備試験2における試験液の調製法と同様の方法で試験原液を調製し、試験用水で適宜希釈して試験液を調製した。この試験液に生物を暴露し、影響を確認すると同時に試験液中の被験物質濃度も確認した。

(2) 結 果

設定濃度区 (mg/L)	24 時間		48 時間	
	遊泳阻害率 (%)	その他の症状	遊泳阻害率 (%)	その他の症状
5.00	0	—	0	—
10.0	0	—	0	—
30.0	0	—	0	RA
100	60	—	70	RA

暴露方式：止水式

試験生物数：10 頭／試験区（5 頭／試験容器）

—はその他の症状が観察されなかったことを示す。

症状の略称

RA (Reduced activity) : 活動度の低下

100mg/L区において70%の遊泳阻害がみられた。30.0mg/L区においては遊泳阻害がみられず活動度の低下が観察されたが、その影響がみられたのは1個体のみであった。10.0mg/L区において遊泳阻害及び症状は観察されなかった。

なお、暴露開始時に測定した溶存酸素濃度は100mg/L区において、20℃における飽和溶存酸素濃度（8.8mg/L）と比較して6.7mg/Lと低く、これはろ過操作（吸引ろ過）による減少と推測された。

設定濃度区 (mg/L)	測定濃度 (mg/L) (対設定濃度 %)		
	暴露開始時	24時間後	暴露終了時 (48時間後)
5.00	4.91 (98.2)	4.85 (97.0)	5.00 (100)
100	99.5 (99.5)	103 (103)	102 (102)

暴露開始時及び終了時ともに設定濃度の±20%以内であり、試験液中の被験物質濃度はほぼ安定であった。

5) 被験物質の溶解性の確認²

より短時間の攪拌で設定濃度付近の溶解濃度が得られるか確認した。

(1) 内 容

供試試料と試験用水を混合（設定濃度：100 mg/L）し、室温で約1時間攪拌した。その後、ガラス繊維フィルター（ADVANTEC製 GB-140 孔径0.4μm）で吸引ろ過して試験液を調製した。なお、試験液の調製は純度（99.4%）補正して行った。

(2) 結 果

設定濃度区 (mg/L)	測定濃度 (mg/L)
100	107

試験液中の被験物質濃度は設定濃度付近であり、室温で攪拌することによって1時間の攪拌でも十分溶解することがわかった。

6) 試験生物への影響（予備試験結果）のまとめ

100%遊泳阻害最低濃度は>100mg/L、0%遊泳阻害最高濃度は30.0mg/Lと予測された。また、暴露期間中、試験液中の被験物質濃度は維持されると推察された。

3. 本試験の実施

1) 試験用水への溶解度測定

被験物質の試験用水への溶解度は100mg/L以上と判断されたため、本試験では試験用水への溶解度は測定しなかった。

2) 本試験

予備試験結果から、本試験は100、66.7、44.4、29.6及び19.8mg/L（公比1.5）の5濃度区及び対照区、止水式により実施した。試験濃度は純度（99.4%）補正を行った値で表示した。試験液の調製については、メノウ乳鉢で微細化した供試試料と試験用水を100mg/L（設定）になるように混合し、約1時間攪拌後、ガラス繊維フィルター（ADVANTEC製 GB-140 孔径0.4 μ m）で吸引ろ過を行った。その後、吸引ろ過によって低下した溶存酸素濃度を回復させるため、 $20\pm 1^{\circ}\text{C}$ の条件下で約1時間攪拌した。この溶液を試験原液とし、調製容器にて試験用水と混合、攪拌して試験液を調製した。また、暴露期間中、試験液中の被験物質濃度が安定であると予想されたため、試験液中の被験物質濃度の測定は試験最高濃度区及び最低濃度区について、暴露開始時及び終了時に行った。