

受付番号	662-06-E-4230
試験番号	94230

最 終 報 告 書

13F-OLEのオオミジンコによる48時間急性遊泳阻害試験

2007 年 9 月 10 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 9 月 11 日

試験責任者

穴井 真紀子

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-OLE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 94230

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。

試験責任者

2007年9月10日

穴井真紀子

穴井真紀子

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-OLE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 94230

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8月10日	2007年8月10日
試験計画書	2007年8月13日	2007年8月13日
試験計画書の変更	2007年8月31日	2007年8月31日
溶解度測定	2007年8月22日	2007年8月23日
	2007年8月23日	2007年8月23日
暴露開始時、暴露開始後	2007年8月20日	2007年8月24日
	2007年8月22日	2007年8月24日
	2007年8月24日	2007年8月24日
生データ、最終報告書草案	2007年9月7日	2007年9月7日
最終報告書	2007年9月11日	2007年9月11日

2007年9月11日

信頼性保証部門責任者

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
試験資料の保管	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	12
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	13

試験結果の表

表1 遊泳阻害率

表2 観察された症状

表3-1 試験液の溶存酸素濃度

表3-2 試験液のpH

表3-3 試験液の水温

表4 オオミジンコに対するEC₅₀

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

付属資料4 試験用水への溶解度

別添資料 予備試験結果

表 題	13F-OLE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-OLE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及びガイダンス文書に従って行った。 (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)” (3)「OECD Guidance Document 23 “Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures”」(September 2000)
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8月13日
実験開始日	2007年8月22日
溶解度測定開始日	2007年8月22日
生物暴露開始日	2007年8月22日
実験終了日	2007年8月24日
溶解度測定終了日	2007年8月24日
生物暴露終了日	2007年8月24日
試験終了日	2007年9月10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94229、94230及び94231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

穴井真紀子所属 試験第四課

生物試験担当者

田中真里子穴井真紀子廣尾ゆみか

分析試験担当者

東 純 治杉本弘子鏡山知世井上仁美福井 瞳安藤浩美

最終報告書の承認

2007年9月10日

試験責任者

穴井真紀子

穴井真紀子

要 約

試験の表題

13F-OLE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-OLE
(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	被験物質分散懸濁液（設定添加濃度：100mg/L）の中層採取液及び対照区
(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	半止水式（24時間後に換水）、密閉系
(8) 試 験 液 の 調 製	供試試料を100mg/L（設定）になるように添加後、密栓し、約48時間攪拌した被験物質分散懸濁液を約1時間静置して採取した中層液を用いて調製
(9) 連 数	4連／試験区
(10) 試 験 液 量	約1000mL／試験区（約250mL／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	GC-MS法（暴露開始時、換水前後及び暴露終了時）

試験結果

(1) 試験用水への溶解度 (20±1℃)	0.0606mg/L
(2) 試験液中の被験物質濃度 (対調製時濃度)	暴露開始時及び換水後 0.0623及び0.0970mg/L 換水前及び暴露終了時 0.0629及び0.0704mg/L (101及び72.6%)
(3) 48時間EC ₅₀ (半数遊泳阻害濃度)	>0.0719mg/L

[(3)は、測定濃度の幾何平均値に基づく値]

結論

本試験は、被験物質の試験用水への溶解度付近における試験生物への影響の有無を確認するための限度試験として実施した。その結果、試験液調製時における被験物質濃度は溶解度付近であり、その条件下で試験生物に何ら影響はみられなかったことから、被験物質は溶解度付近の濃度において試験生物に対して急性的な影響を及ぼさないと判断された。

1. 被験物質

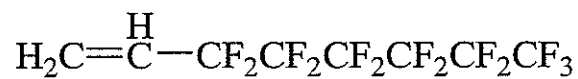
本最終報告書において13F-OLEは、次の名称等を有するものとする。

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-1-エン

1.2 構造式等*2

構造式



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

分子量 346.09

CAS番号 25291-17-2

*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	061122HM

2.2 純度^{*2}

被験物質	99.8%
不純物	不明成分 0.2%

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	無色透明液体	
沸点	106°C (760mmHg)	
密度	1.560g/cm ³ (20°C)	
溶解度	水	不溶
	ジメチルスルホキシド	不溶
	アセトン	可溶(任意に混合)

*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	室温暗所保存
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（21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6月26日～6月28日）したニクロム酸カリウム（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0.296mg/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：0.124～0.350mg/L）であった〔平均 \pm 標準偏差は $0.237 \pm 0.057\text{mg/L}$ （n=59）〕

(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：腰高シャーレ（内径8.0cm、深さ5.0cm）

また、ほこりの混入や試験液の揮発を防ぐためガラス製の蓋をし、密閉した。

(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。

試験は暴露開始24時間後に試験液の全量を交換する密閉系の半止水式で行った。

(b) 期間

48時間

(c) 試験濃度

予備試験の結果から試験用水への溶解度付近で試験生物に対して無影響と予測されたため、本試験では約48時間攪拌して調製した被験物質分散懸濁液（設定添加濃度：100mg/L）の中層採取液のみの限度試験を行った。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液と同様の攪拌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

約1000mL／試験区（約250mL／試験容器）

(2) 環境条件

(a) 水温

20±1℃

(b) 溶存酸素濃度

試験は暴露期間を通して溶存酸素濃度として3mg/L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

試験液のpH調整は行わなかった。

(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

調製時に純度補正は行わなかった。また、供試試料は密度 [1.560g/cm³ (20℃)] を用いて容量による添加を行った。

三角フラスコ内に試験用水を満たし、供試試料をプッシュボタン式液体用微量体積計（Eppendorf社製）により100mg/L（設定）になるように水面下で添加後、直ちに気相が無いように密栓した。その後、20±1℃の条件下でマグネティックスターラーにより約48時間緩やかに攪拌して被験物質分散懸濁液を調製した。攪拌停止後、約1時間静置して採取した中層液を試験液とし、各試験容器に分割後、直ちにガラス製の蓋により気相が無いように密閉した。

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換水前（24時間後）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、換水前後及び暴露終了時に（調製時及びその24時間後を1セットとして2セット）測定した。調製時は調製容器より別途分取した試験液について測定し、その24時間後は各試験区につき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

被験物質濃度の測定は、暴露開始時、換水前後及び暴露終了時に（調製時及びその24時間後を1セットとして2セット）行った。調製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。その24時間後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ガスクロマトグラフィー質量分析法（GC-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未満と予想されたため、本試験では試験用水への溶解度を測定した。溶解度測定の詳細及び測定結果を付属資料4に示す。

3.7 EC₅₀^{*3}の算出法

試験濃度で50%以上の遊泳阻害率が得られなかったため、EC₅₀は「>試験濃度」と表示した。

なお、結果の算出には試験濃度として暴露期間中に測定した試験液中の被験物質測定濃度の幾何平均値を用いた。

*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) 暴露期間中において対照群の遊泳阻害率が10%を超えてはならない。
- (2) 暴露期間中において10%を超える対照群のミジンコが脱色、水面に浮いているなどの異常な症状、行動を示してはならない。
- (3) 溶存酸素濃度は暴露終了時において、3mg/L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

暴露期間中、試験濃度において試験生物の遊泳阻害は認められなかった。24及び48時間での遊泳阻害率を表1に示す。なお、暴露期間中の対照群において異常な症状や行動（脱色、水面に浮くなど）を示した個体はみられず、遊泳阻害率は0%であり、ともに有効性基準（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、試験濃度において試験生物に症状は認められなかった。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。換水前も同様であった。

(2) 試験液の水質

暴露期間中に測定した溶存酸素濃度は8.2～8.3mg/L、pHは7.8～7.9、水温は19.9～20.0℃であった。試験液の水質を表3-1、3-2及び3-3に示す。なお、溶存酸素濃度は有効性基準（暴露終了時において3mg/L以上）を満たしていた。

(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、暴露開始時及び換水後では0.0623及び0.0970mg/L、換水前及び暴露終了時は0.0629及び0.0704mg/Lであり、調製時に対してそれぞれ101及び72.6%であった。被験物質濃度の測定結果を付属資料2に示す。

4.4 EC₅₀

13F-OLEのオオミジンコに対する24及び48時間EC₅₀は>0.0719mg/L（測定濃度の幾何平均値）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度付近における試験生物への影響の有無を確認する限度試験として行った。その結果、試験液調製時における被験物質濃度は溶解度付近であった。暴露終了時には被験物質濃度が低下したが、本試験では濃度維持のために半止水式（24時間後に換水）を選択しているため、溶解度付近の試験として適切であったと判断した。その条件下で試験生物に何ら影響はみられなかったことから、被験物質は溶解度付近の濃度において試験生物に対して急性的な影響を及ぼさないと判断された。

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

測定濃度* (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	
0.0719	A	0	0	0	0
	B	0		0	
	C	0		0	
	D	0		0	

*4 測定濃度の幾何平均値（以下測定濃度と表示する。）

表2 観察された症状

測定濃度 (mg/L)	観 察 結 果	
	24時間	48時間
対照区	—	—
0.0719	—	—

—は症状が認められなかったことを示す。

表3-1 試験液の溶存酸素濃度

測定濃度 (mg/L)	開始時	24時間後		終了時
		換水前	換水後	
対照区	8.3	8.2	8.2	8.2
0.0719	8.3	8.2	8.2	8.2

単位：mg/L

表3-2 試験液のpH

測定濃度 (mg/L)	開始時	24時間後		終了時
		換水前	換水後	
対照区	7.9	7.9	7.9	7.8
0.0719	7.9	7.9	7.9	7.8

表3-3 試験液の水温

測定濃度 (mg/L)	開始時	24時間後		終了時
		換水前	換水後	
対照区	19.9	19.9	19.9	20.0
0.0719	20.0	19.9	19.9	20.0

単位：℃

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	>0.0719	— (—)	—
48時間	>0.0719	— (—)	—

—は得られなかったことを示す。

付属資料1

試験用水の水質

試験用水の水質（採水日：2007年7月2日）

項目	単位	検査結果	定量下限
全硬度 (CaCO ₃ として)	mg/L	37.0	0.1
浮遊物質	mg/L	< 1	1
pH値	—	7.7 (24℃)	—
有機体炭素	mg/L	< 0.1	0.1
化学的酸素要求量	mg/L	< 0.5	0.5
遊離塩素	mg/L	< 0.02	0.02
アンモニウム態窒素	mg/L	0.02	0.01
全シアン	mg/L	< 0.01	0.01
アルカリ度	mg/L	29	1
電気伝導率	mS/m	15.5	—
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	0.04	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	< 0.005	0.005
アルミニウム	mg/L	0.051	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	12.9	0.1
塩化物イオン	mg/L	15	1
ナトリウム	mg/L	13.1	0.01
カリウム	mg/L	3.6	0.01
カルシウム	mg/L	10.3	0.01
マグネシウム	mg/L	2.8	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

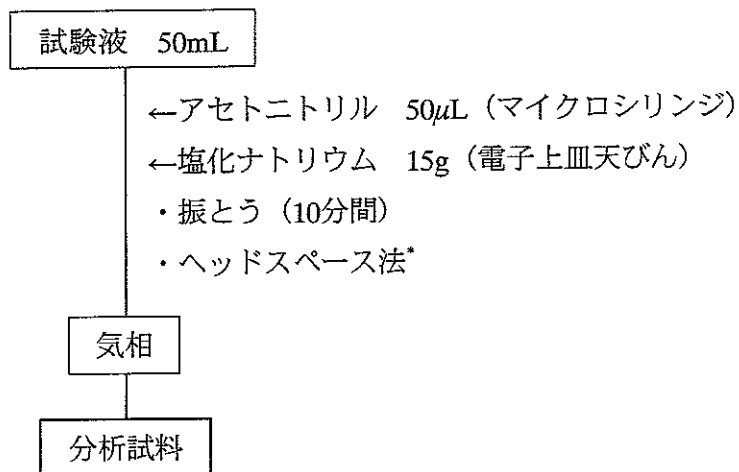
付属資料2

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、以下のフロースキームにより前処理操作を行い、分析試料を調製した。

フロースキーム



- * ヘッドスペース法条件
容器：125mL容バイアルビン
加温：70 $^{\circ}$ C、20分間以上

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ガスクロマトグラフィー質量分析法（GC-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試料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	ガスクロマトグラフ質量分析計
ガスクロマトグラフ	Agilent製 6890 Series Plus ⁺
質量分析計	Agilent製 5973N MSD

ガスクロマトグラフ条件

カ ラ ム	HP-PONA 膜厚 0.5 μ m (Agilent Technologies製) 50m \times 0.2mmI.D. フェーズドシリカ製
カラム温度	40 $^{\circ}$ C (2min) $\xrightarrow{\text{①}}$ 70 $^{\circ}$ C (0min) $\xrightarrow{\text{②}}$ 150 $^{\circ}$ C (0.1min)
昇温速度	①15 $^{\circ}$ C/min ②30 $^{\circ}$ C/min
キャリアガス	ヘリウム
全流量	24.1mL/min
試料導入部温度	150 $^{\circ}$ C
注 入 量	0.1mL
導 入 モード	スプリット
スプリット比	13:1
圧 力	40kPa

質量分析計条件

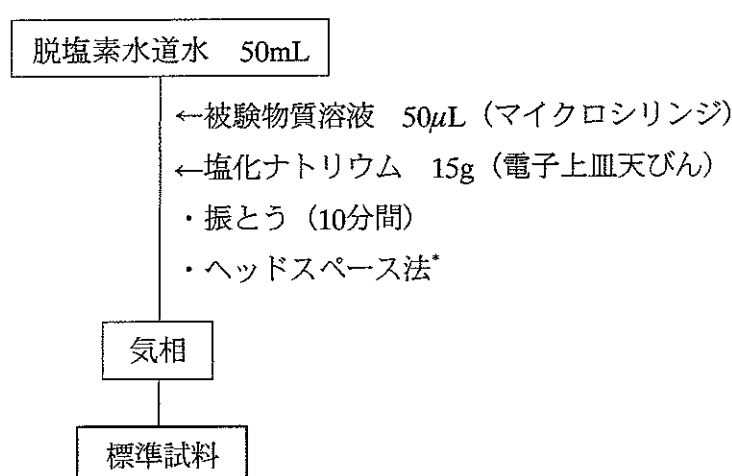
イオン化法	電子イオン化法 (EI)
検 出 法	選択イオンモニタリング (SIM)
測定イオン(m/z)	77
イオン源温度	230 $^{\circ}$ C
MS四重極温度	150 $^{\circ}$ C
イオン化エネルギー	69.9eV
トランスファーライン温度	200 $^{\circ}$ C

3. 標準試料の調製

分析試料中の被験物質濃度を求めるための標準試料の調製は次のように行った。また、標準試料の調製は純度（99.8%）補正して行った。

供試試料100.2mg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1000mg/Lの被験物質溶液を調製した。これをアセトニトリルで希釈して200mg/Lの被験物質溶液を調製した。これを以下のフロースキームにより前処理操作を行い、0.200mg/Lの標準試料を調製した。

フロースキーム



4. 検量線の作成

3.と同様にして20.0、100、200及び400mg/Lの被験物質溶液を調製した。これらの被験物質溶液について3.のフロースキームにより前処理操作を行い、0.0200、0.100、0.200及び0.400mg/Lの標準試料を調製した。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、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試料濃度（0.0200mg/L）とした。よって、試験液中の被験物質の定量下限値は前処理操作を考慮し0.0200mg/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。

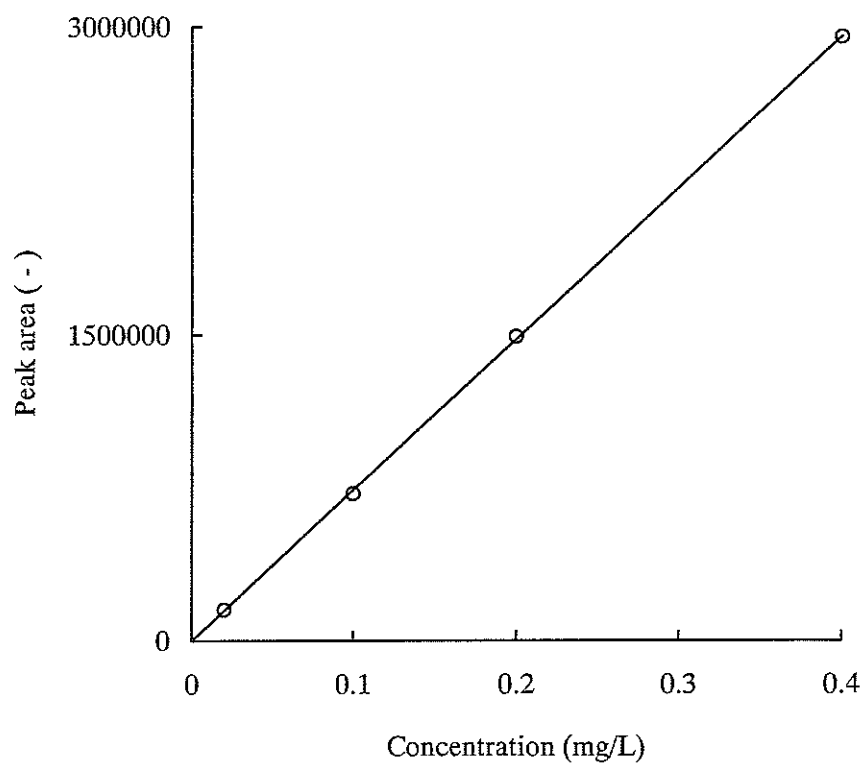
付表2-1 試験液中の被験物質濃度

設定添加濃度 (mg/L)	測定濃度 (mg/L) (対調製時濃度%)				
	暴露開始時	24時間後		暴露終了時	幾何平均値
		換水前	換水後		
対照区	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
100	0.0623	0.0629 (101)	0.0970	0.0704 (72.6)	0.0719

n.d. : <0.0200mg/L

付属資料3

検量線及びクロマトグラム



$$y = 7379807x$$

$$r = 1.00$$

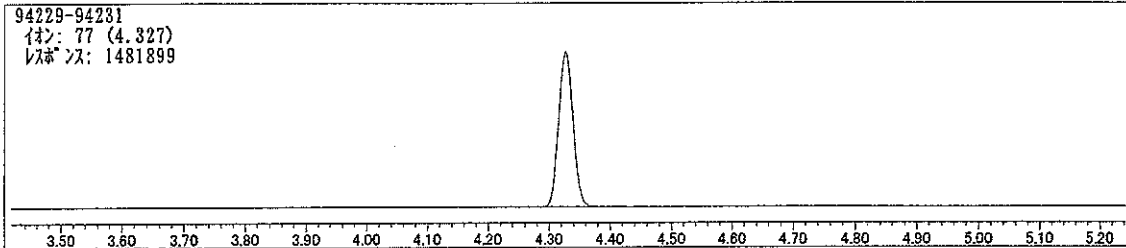
Concentration (mg/L)	Peak area (-)
0.0200	151365
0.100	719864
0.200	1489138
0.400	2949675

付図3-1 13F-OLEのGC-MSによる検量線

Standard sample 0.200mg/L

データファイル : C:\MSDCHEM\1\DATA\94229\070822\0822S01.D バイール : 1
 測定日 : 22 Aug 2007 13:33 オペレータ :
 サンプル : Standard sample 0.200mg/L 装置 : Instrumen
 一般情報 : 希釈率 : 1.00
 サンプル量 : 0.00
 MS 積分パラメータ : autoint1.e
 定量メソッド : C:\MSDCHEM\1\METHODS\94231 (B).M (ケミステーション インテグレーション)

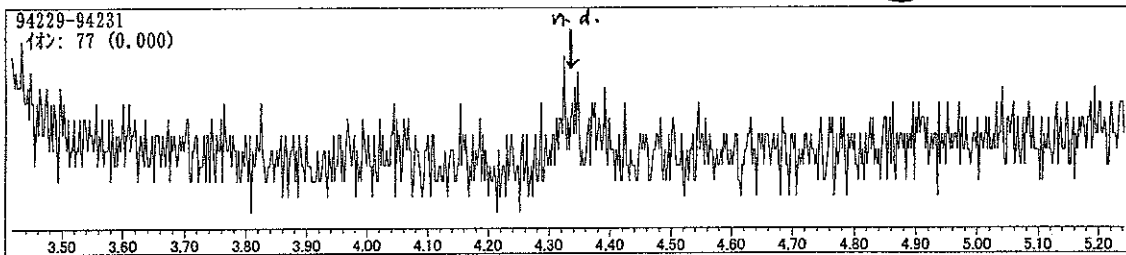
94230



Control

データファイル : C:\MSDCHEM\1\DATA\94229\070822\30H0HZ.D バイール : 1
 測定日 : 22 Aug 2007 13:45 オペレータ :
 サンプル : 94230 本試験 0h Control 装置 : Instrumen
 一般情報 : 希釈率 : 1.00
 サンプル量 : 0.00
 MS 積分パラメータ : autoint1.e
 定量メソッド : C:\MSDCHEM\1\METHODS\94231 (B).M (ケミステーション インテグレーション)

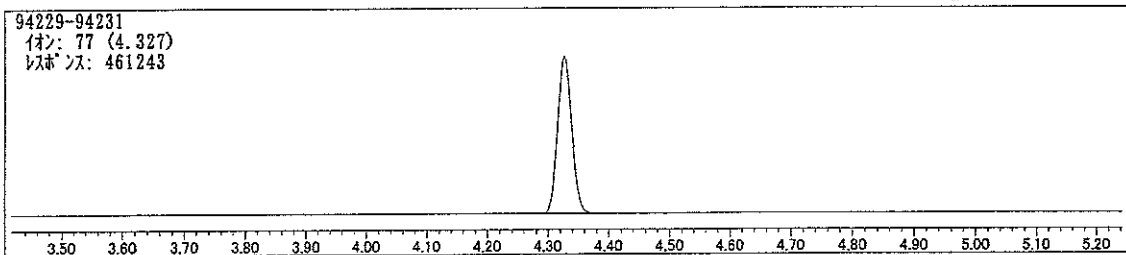
94230



100mg/L (Nominal concentration)

データファイル : C:\MSDCHEM\1\DATA\94229\070822\30H0HA.D バイール : 1
 測定日 : 22 Aug 2007 13:56 オペレータ :
 サンプル : 94230 本試験 0h 100mg/L 装置 : Instrumen
 一般情報 : 希釈率 : 1.00
 サンプル量 : 0.00
 MS 積分パラメータ : autoint1.e
 定量メソッド : C:\MSDCHEM\1\METHODS\94231 (B).M (ケミステーション インテグレーション)

94230

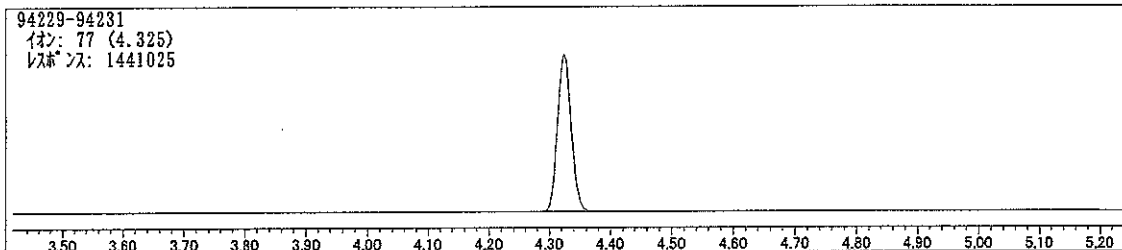


付図3-2 試験液のGC-MSクロマトグラム (暴露開始時)

Standard sample 0.200mg/L

データファイル : C:\MSDCHEM\1\DATA\94229\070823\0823S01.D バイブル : 1
 測定日 : 23 Aug 2007 12:17 オペレータ :
 サンプル : Standard sample 0.200mg/L 装置 : Instrumen
 一般情報 : 希釈率 : 1.00
 サンプルアmount : 0.00
 MS 積分パラメータ : autoint1.e
 定量メソッド : C:\MSDCHEM\1\METHODS\94231(B).M (ケミステーション インテグレーション)

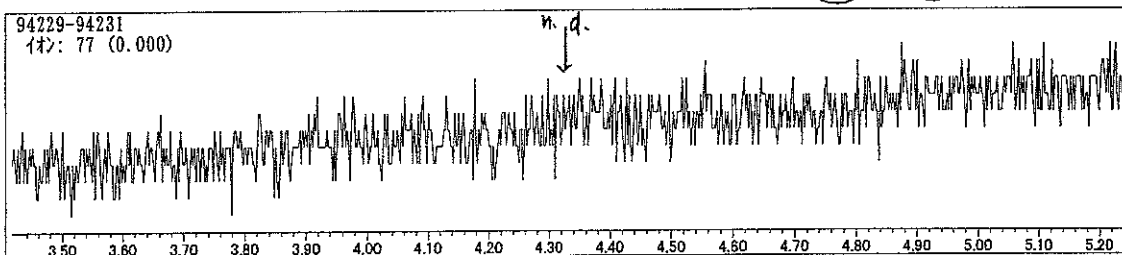
94230



Control

データファイル : C:\MSDCHEM\1\DATA\94229\070823\30H24HZ0.D バイブル : 1
 測定日 : 23 Aug 2007 12:28 オペレータ :
 サンプル : 94230 本試験 24h Control 換水前 装置 : Instrumen
 一般情報 : 希釈率 : 1.00
 サンプルアmount : 0.00
 MS 積分パラメータ : autoint1.e
 定量メソッド : C:\MSDCHEM\1\METHODS\94231(B).M (ケミステーション インテグレーション)

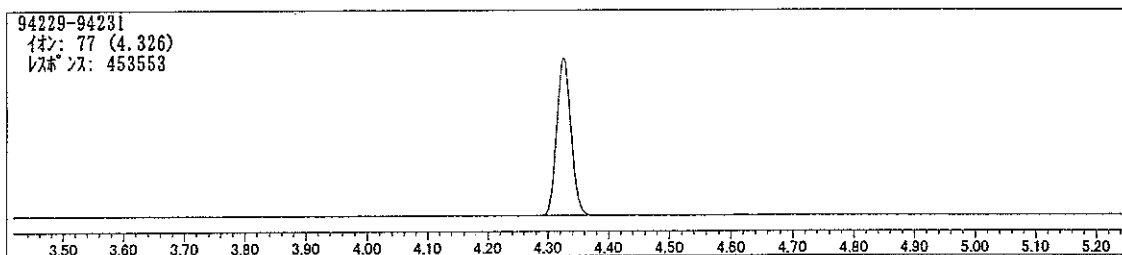
94230



100mg/L (Nominal concentration)

データファイル : C:\MSDCHEM\1\DATA\94229\070823\30H24HA0.D バイブル : 1
 測定日 : 23 Aug 2007 12:39 オペレータ :
 サンプル : 94230 本試験 24h 100mg/L 換水前 装置 : Instrumen
 一般情報 : 希釈率 : 1.00
 サンプルアmount : 0.00
 MS 積分パラメータ : autoint1.e
 定量メソッド : C:\MSDCHEM\1\METHODS\94231(B).M (ケミステーション インテグレーション)

94230



付図3-3 試験液のGC-MSクロマトグラム (暴露24時間後換水前)

付属資料4

試験用水への溶解度

1. 表 題

試験用水への溶解度

2. 試験目的

生態毒性試験における被験物質の試験用水への溶解度を測定する。

3. 試験の概要

被験物質と試験用水を混合し、生態毒性試験と同様の温度条件下で24及び48時間攪拌後、静置して試験液の中層を分析に用いた。

4. 試験の実施

4.1 試験装置及び器具

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）

攪 拌 装 置：マグネティックスターラー

容 器：改良型ガラス製容器（全容量 約600mL）

4.2 試験条件

(1) 試験温度：20±1℃

(2) 分析回数：2回（攪拌24及び48時間後）

(3) 試験用水：脱塩素水道水

(4) 試験連数：24時間用 n=3（試料-1、試料-2及び試料-3とする）

48時間用 n=3（試料-4、試料-5及び試料-6とする）

4.3 試験操作

(1) 供試試料と試験用水を約100mg/L*になるように改良型ガラス製容器にて混合し、気相のないように密閉して試験液とした。

* 供試試料の密度1.560g/cm³を用いて添加容量（38.5μL）を算出し、添加した。

(2) 試験温度に設定された恒温槽中で、マグネティックスターラーにより緩やかに攪拌した。

(3) 攪拌24及び48時間後に試験液の攪拌を停止させ、恒温槽中にて約1時間静置した。

(4) 静置後、被験物質の定量分析を行った。

4.4 試験液の分析

(1) 試験液の前処理操作

改良型ガラス製容器の分取口から、シリンジで試験液の中層を慎重に採取した。採取した液について付属資料2の1.試験液の前処理操作のフロースキームにより前処理操作を行い、分析試料を調製した。

(2) 分析方法

付属資料2の2.分析方法参照。

4.5 標準試料の調製

付属資料2の3.標準試料の調製参照。

4.6 検量線の作成

付属資料2の4.検量線の作成参照。

5. 試験結果

測定結果より、攪拌24時間後より48時間後で高い測定値が得られたため、試験用水への溶解度としては、攪拌48時間後の測定値を採用するのが妥当であると判断した。よって、被験物質の試験用水への溶解度は0.0606mg/Lとした。測定結果を以下の表に示す。

付表4-1 攪拌24時間後測定値

試料名	測定値 (mg/L)	算術平均値 (mg/L)
試料-1	0.0540	0.0456
試料-2	0.0232	
試料-3	0.0597	

付表4-2 攪拌48時間後測定値

試料名	測定値 (mg/L)	算術平均値 (mg/L)
試料-4	0.0414	0.0606
試料-5	0.0606	
試料-6	0.0799	

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

被験物質の試験用水への溶解度が 100mg/L 未満であることが予想されたため、溶解度測定を検討を行った。なお、溶解度測定予備試験 1 は魚類急性毒性試験（試験番号：94231）にて実施したものである。

1) 溶解度測定予備試験 1

(1) 内 容

被験物質はその構造より揮発性を有していることが疑われたため、改良型ガラス製容器に約 100mg/L 相当になるように供試試料と試験用水（脱塩素水道水）を混合して気相のないように密閉し、試験条件下（ $24 \pm 1^\circ\text{C}$ ）にて 24 及び 48 時間緩やかに攪拌した。遠心分離を行うことで被験物質濃度が低下することなどから、不溶物除去は攪拌を緩やかに約 1 時間静置後に中層液を採取することで行った。採取した中層液は前処理操作を行い、ガスクロマトグラフィー—質量分析法（GC-MS）により濃度分析を実施した。なお、48 時間攪拌については設定添加濃度約 10mg/L 相当の試料も分析した。

(2) 結 果

設定添加濃度 (mg/L)	測定濃度 (mg/L)	
	攪拌 24 時間後	攪拌 48 時間後
約 100 (試料-1)	0.0934	—
約 100 (試料-2)	0.129	—
約 100 (試料-3)	—	0.0949
約 100 (試料-4)	—	0.135
約 10 (試料-5)	—	0.0791

測定値に大きなばらつきはなく、0.1mg/L 付近であった。

2) 溶解度測定予備試験 2

(1) 内 容

予備試験 1 と同様に改良型ガラス製容器に約 100mg/L 相当になるように供試試料と試験用水（脱塩素水道水）を混合して気相のないように密閉し、ミジンコ遊泳阻害試験の条件下（ $20 \pm 1^\circ\text{C}$ ）にて 24 及び 48 時間攪拌した。不溶物除去は攪拌を緩やかに約 1 時間静置後に中層液を採取することで行った。採取した中層液は前処理操作を行い、GC-MS により濃度分析を実施した。

(2) 結 果

設定添加濃度 (mg/L)	測定濃度 (mg/L)	
	攪拌 24 時間後	攪拌 48 時間後
約 100 (試料-1)	0.0666	—
約 100 (試料-2)	0.0737	—
約 100 (試料-3)	—	0.105
約 100 (試料-4)	—	0.0603

被験物質の試験用水への溶解度は、0.1mg/L 付近であった。

3) 溶解度測定予備試験のまとめ

溶解度測定予備試験の結果より、被験物質の試験用水への溶解度は 0.1mg/L 付近と考えられた。被験物質は遠心分離を行うことで被験物質濃度が低下することなどから、緩やかに攪拌し約 1 時間静置後に中層液を採取することで不溶物を除去した。設定添加濃度に 10 倍（約 10 及び 100mg/L）の差をつけても測定値に大きな差はみられないことから、不溶物は除去されたものと考えられた。

以上の結果より、本試験では改良型ガラス製容器を使用することとし、穏やかに攪拌した後、約 1 時間静置して中層液を採取することで不溶物除去を行うこととした。

2. 試験生物への影響

1) 予 備 試 験

(1) 内 容

三角フラスコ内に試験用水を満し、供試試料をプッシュボタン式液体用微量体積計（Eppendorf社製）により100mg/L相当になるように水面下で添加後、直ちに気相が無いように密栓した。その後、20±1℃の条件下でマグネティックスターラーにより約48時間緩やかに攪拌して被験物質分散懸濁液を調製し、約1時間静置して中層を採取した。この中層採取液を試験液とし、密閉系で止水式及び半止水式（24時間後に換水）にて生物を暴露して影響を確認した。また、同時に試験液中の被験物質濃度の測定を行った。なお、供試試料は密度 [1.560g/cm³ (20℃)] を用いて容量による添加を行った。

(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(止水)	0	—	0	—
100(半止水)	0	—	0	—

試験生物数：10 頭／試験区（5 頭／試験容器）、密閉系
—はその他の症状が観察されなかったことを示す。

設定濃度区 (mg/L)	測定濃度 (mg/L) (対開始時濃度 %)		
	暴露開始時	24時間後	暴露終了時 (48時間後)
100	0.108	0.102 (94.3)	0.0926 (85.4)

止水式及び半止水式とも生物への影響は何ら認められなかった。

暴露開始時の被験物質濃度は溶解度付近であったが、経時的に若干の濃度低下が認められた。

2) 試験生物への影響（予備試験結果）のまとめ

試験法での上限濃度（100 mg/L）になるように供試試料と試験用水を混合後、約48時間攪拌して調製した被験物質分散懸濁液の中層採取液において試験生物に影響は認められなかった。本被験物質は揮発性が予測されたため、密閉系にて検討を行ったが、試験液中の被験物質濃度については若干の減少傾向が認められたため、半止水式にて試験を行うこととした。

3. 本試験の実施

1) 試験用水への溶解度測定

溶解度測定予備試験結果から、試験用水への溶解度測定は、約100mg/Lとなるように供試試料と試験用水を混合後、気相のないように密閉して $20\pm 1^{\circ}\text{C}$ の条件下で24及び48時間緩やかに攪拌した試験液を用いて実施した。不溶物除去としては、遠心分離やフィルターろ過等の手法は使用せず、攪拌停止後試験液を約1時間静置し中層液を採取することにより不溶物を取り除くこととし、この試験液について被験物質濃度分析を行った。

2) 本試験

予備試験の結果から試験用水への溶解度付近で無影響と予測されたため、本試験では試験法での上限濃度（100mg/L）を設定濃度とし、約48時間攪拌して調製した被験物質分散懸濁液の中層採取液及び対照区のみで密閉系にて試験を行った。試験液の調製については、三角フラスコ内に試験用水を満たし、供試試料をプッシュボタン式液体用微量体積計により100mg/L（設定）になるように添加（密度換算による容量添加）後、直ちに気相が無いように密栓し、その後、 $20\pm 1^{\circ}\text{C}$ の条件下でマグネティックスターラーにより約48時間攪拌して被験物質分散懸濁液を調製した。攪拌停止後、約1時間静置して採取した中層液を試験液とした。なお、調製時に純度補正は行わなかった。被験物質濃度の測定は、暴露開始時、換水前後及び暴露終了時に行った。