

環境省 殿

最 終 報 告 書

クロロホルムのヒメダカ (*Oryzias latipes*) に対する急性毒性試験


(試験番号: No. 2006-生70)

2008年 9月 3日作成

株式会社  センター

原本と相違ないことを証明する。

2008 年 9 月 22日

試験責任者 

試験計画書修正書

試験名：クロロホルムのヒメダカ (*Oryzias latipes*) に対する急性毒性試験

試験番号：No. ~~2-0-0-5~~ 一生 70

2006 7.4 登録済

該当するページ：7 ページ

修正する項目等：3.5 試験濃度の設定 2) 本試験

修正前の内容

本試験での濃度は、予備試験での 96 時間-LC₅₀ を含み、公比を原則 1.8 で等比級数的に 5 段階以上の濃度を設定する。その際、全てのヒメダカを死に至らしめる濃度と、全く死なない濃度が各々 1 濃度、一部が死亡する濃度が 3 濃度含まれるように努力する。一部が死亡する濃度が全く含まれない場合は、50 %死亡濃度近辺で公比を狭めるなどの変則公比を採用することがある。

予備試験の結果、試験上限濃度で影響が認められなかった場合は、本試験ではその濃度のみの限度試験とする。ただし、限度試験において、暴露終了時まで、1 尾以上の死亡が観察された場合は正規の試験を行う。限度試験である場合は、報告書に明記する。

修正後の内容

本試験での設定濃度は、公比 1.4 とし、27, 37, 52, 72, 100 mg/L および対照区とする。

修正の理由：

予備試験の結果より、本試験の濃度設定ができたため。

試験責任者氏名：

承認月日 2007 年 7 月 4 日

運営管理者氏名：

確認月日 2007 年 7 月 4 日

原本と相違ないことを証明する。

2007 年 7 月 4 日

試験責任者

試験計画書修正書

試験名：クロロホルムのヒメダカ (*Oryzias latipes*) に対する急性毒性試験

試験番号：No. 2006-生70

該当するページ：2ページ

修正する項目等：試験実施概要 6 試験受託者 3)代表者

修正前の内容

3)代表者

修正後の内容

3)代表者

修正の理由：

代表者交代のため。

該当するページ：4ページ

修正する項目等：1 被験物質 1.2 名称、供試試料

修正前の内容

密度：1.480 g/ml

修正後の内容

密度：1.486 g/ml

原本と相違ないことを証明する。

2008 年 8 月 26 日

修正の理由：

誤記のため。

試験責任者

試験責任者氏名：

承認月日 2008 年 8 月 26 日

運営管理者氏名：

確認月日 2008 年 8 月 26 日

陳 述 書

株式会社 クレハ分析センター

試験委託者： 環境省

表題： クロロホルムのヒメダカ(*Oryzias latipes*)に対する急性毒性試験

試験番号： No. 2006-生70

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を実施する試験施設に関する基準について」(薬食発第 11
21003 号、平成15・11・17 製局第 3 号、環保企発第 031121004 号、平成 15 年 11
月 21 日、平成 17 年 4 月 1 日最終改正)

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。

本報告書の試験データの正確性および有効性について確認した。

2008年 9月 3日

試験責任者



2008年 9月 3日

確認： 運営管理者



信 頼 性 保 証 書

株式会社 クレハ分析センター

試験委託者： 環境省

表題： クロロホルムのヒメダカ (*Oryzias latipes*) に対する急性毒性試験

試験番号： No. 2006-生70

記

	監査, 査察実施日	報 告 日	
		運 営 管 理 者	試 験 責 任 者
試験計画書の監査	2007年 3月12日	2007年 3月12日	2007年 3月12日
実験状況の監査, 査察	2007年 7月 9日	2007年 7月 9日	2007年 7月 9日
	2007年 7月13日	2007年 7月13日	2007年 7月13日
実験終了後の監査	2007年 8月 1日	2007年 8月 1日	2007年 8月 1日
組織体制の監査	2007年 2月15日	2007年 2月15日	2007年 2月15日
施設・設備の査察 試験用機器等 施設, 設備等 試 験 系	2007年 2月15日	2007年 2月15日	2007年 2月15日
試験報告書の監査	2008年 9月 3日	2008年 9月 3日	2008年 9月 3日

本試験は試験計画書および標準操作手順書に従って実施され、本報告書には試験に使用した方法、手順が正確に記載されており、試験結果は生データを正確に反映していることを確認した。

2008年 9月 3日

信頼性保証担当者：



試験実施概要

1. 表題 : クロロホルムのヒメダカ (*Oryzias latipes*) に対する急性毒性試験
2. 試験目的 : ヒメダカ (*Oryzias latipes*) を被験物質に 96 時間暴露し、死亡率を測定することにより、ヒメダカに対する被験物質の毒性を明らかにする。

3. 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)に準拠して実施した。

4. 適用 G L P : 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を実施する試験施設に関する基準について」(薬食発第 1121003 号、平成 15・11・17 製局第 3 号、環保企発第 031121004 号、平成 15 年 11 月 21 日、平成 17 年 4 月 1 日最終改正)に準拠した。

5. 試験委託者

名称 : 環境省
所在地 : 〒100-8975 東京都千代田区霞が関一丁目 2-2

6. 試験受託者

名称 : 株式会社 クレハ分析センター
本社所在地 : 〒974-8232 福島県いわき市錦町落合 1 6 番地
代表者 : XXXXXXXXXX

7. 試験施設

実施施設名 : 株式会社 クレハ分析センター
所在地 : 〒974-8232 福島県いわき市錦町落合 1 6 番地

8. 試験関係者：

試験責任者 [redacted] (生物試験室)

試験担当者 [redacted] (生物試験担当者)

[redacted] (生物試験担当者)

[redacted] (濃度分析責任者)

[redacted] (濃度分析担当者)

9. 試験期間： 試験開始日 2007年 3月12日

暴露期間 2007年 7月 9日 ～ 2007年 7月13日

試験終了日 2008年 9月 3日

目 次

	頁
要 旨.....	1
1 被験物質.....	3
1.1 名称、構造式および物理化学的性状.....	3
1.2 供試試料.....	3
1.3 被験物質の確認と保管方法および保管条件下での安定性.....	4
2 供試生物.....	4
3 試験方法.....	5
3.1 試験条件.....	5
3.2 試験用水.....	5
3.3 試験容器および恒温槽等.....	5
3.4 被験物質の溶解性確認.....	5
3.5 試験濃度の設定.....	6
3.6 試験溶液の調製（用時調製）.....	6
3.7 試験溶液中の被験物質濃度分析.....	6
3.8 試験操作.....	6
4 結果の算出.....	7
5 結果および考察.....	7
5.1 試験成績の信頼性に影響をおよぼしたと思われる環境要因.....	7
5.2 試験用水に対する被験物質の溶解性.....	7
5.3 試験溶液中の被験物質濃度.....	8
5.4 50 %死亡濃度 (LC ₅₀).....	8
5.5 0 %死亡最高濃度、100 %死亡最低濃度および最大無影響濃度.....	8
5.6 毒性症状.....	9
5.7 試験溶液の水温、溶存酸素濃度およびp H.....	10
5.8 試験計画書からの逸脱の有無.....	10
6 保管.....	10
Table 1～8.....	11
Figure 1.....	15
付属資料－1（試験用水の水質）.....	16
付属資料－2（予備試験の結果）.....	18
付属資料－3（試験溶液の分析法）.....	20

要 旨

試験委託者 環境省

表 題 クロロホルムのヒメダカ(*Oryzias latipes*)に対する急性毒性試験

試験番号 No. 2006-生70

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)に準拠して実施した。

- | | |
|---------------|--|
| 1) 被験物質 | : クロロホルム |
| 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 (<i>Oryzias latipes</i>) |
| 4) 暴露期間 | : 96 時間 |
| 5) 試験濃度 (設定値) | : 対照区, 27, 37, 52, 72, 100 mg/L
公比; 1.4 |
| 6) 試験溶液量 | : 5 L/容器 (密閉容器) |
| 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 調整は行わない |
| 14) 分析法 | : GC/MS 法 |

結 果

1) 試験溶液中の被験物質濃度

被験物質が揮散性を有するため、試験溶液調製中の濃度減少を増仕込みで補い、密閉系容器を用い 24 時間換水を行うことで暴露期間中の揮散による濃度減少対策とした。

被験物質濃度の変動は、試験溶液の調製直後は調製中の揮散程度の違いによる変動、暴露期間中は揮散による濃度減少の可能性もあるものの、分析誤差による影響が大きいと考えられた。そのため、暴露開始時と 24 時間換水前、および 72 時間換水後と暴露終了時の算術平均値を求め、各影響濃度を算出した。

2) 50 % 死亡濃度

24 時間 50 % 死亡濃度 (LC_{50}) : >106 mg/L

48 時間 50 % 死亡濃度 (LC_{50}) : >106 mg/L

72 時間 50 % 死亡濃度 (LC_{50}) : >106 mg/L

96 時間 50 % 死亡濃度 (LC_{50}) : >106 mg/L

1 被験物質

1.1 名称、構造式および物理化学的性状

化学物質等の名称	: クロロホルム
CAS番号*	: 67-66-3
分子式	: CHCl_3
分子量*	: 119.38
蒸気圧*	: 197 mmHg (25°C)
対水溶解度*	: 7950 mg/L (25°C)
ヘンリー定数*	: 0.00367 atm・m ³ /mole (24°C)
pKa解離定数	: 不明
1-オクタノール/水分配係数*	: 1.97
融点*	: -63.6°C
沸点*	: 61.1°C
外観**	: 無色透明の液体
安定性**	: 安定。(安定剤を含まないクロロホルムは、空気、水分、 光等で徐々に分解する) 水と長時間共存すると加水分解して塩酸を生成する。
溶媒に対する溶解性**	: アルコール、ベンゼンと混和

1.2 供試試料

入手先	: [REDACTED]
入手量	: 500 mL× 2本 (同一ロット)
ロット番号**	: DPE2886
密度**	: 1.486 g/mL (20 °C)
純度***	: 99.4 % (mass/mass)
不純物の名称および含有率**	: 水分 0.002 % (mass/mass) 、エタノール 0.60 % (mass/ mas) 、その他不明
外観**	: 無色澄明の液体
入手日	: 2007年 1月31日

[出典]

* : SRC PhysProp Database

** : [REDACTED]「製品安全データシート」(改訂日2006年12月21日、MSDS No. JW030260)

*** : [REDACTED]「検査成績書」(2007年 1月31日、Code No. 038-02606、成績書発行番号 9270558)

1.3 被験物質の確認と保管方法および保管条件下での安定性

被験物質は当施設の冷蔵庫に遮光・密閉保管した。

入手した被験物質について赤外吸収スペクトルを測定し、被験物質の構造と矛盾が認められないことを確認した。実験終了時にも赤外吸収スペクトルを測定し、実験開始前に測定したスペクトルと比較した。その結果、スペクトルに変化はなかったことより被験物質は保管中安定であったと判断された。

2 供試生物

- 1) 和名 : ヒメダカ
- 2) 学名 : *Oryzias latipes*
- 3) 全長 : 平均 2.6 cm (2.4 ~ 3.0 cm), n=10
- 4) 体重 : 平均 0.15 g (0.08 ~ 0.24 g), n=10
- 5) 入手先 : 自家繁殖
- 6) ロット番号 : FJ06A7
- 7) 感受性の確認 : 基準物質(硫酸銅(Ⅱ)五水和物, 試薬特級)による本ロットの 96 時間 50 %死亡濃度(LC₅₀)は 0.40 mg/L(無水物換算)(暴露期間: 2007 年 6 月 11 日 ~ 2007 年 6 月 15 日)
当施設における 1997 年 12 月以降の LC₅₀は \bar{X} = 0.29 mg/L、S.D. = 0.10 mg/L、n = 28 であった。
- 8) じゅん化期間 : 2007 年 5 月 18 日 ~ 2007 年 7 月 9 日(12 ヶ月齢)
じゅん化期間中の連続した 7 日間の死亡率は 0.5 %で、試験には肉眼的に健康で正常な個体を使用した。(じゅん化条件を以下に示す。)

じゅん化条件

- 1) 飼育水 : 試験用水 (3.2 項を参照)
- 2) 飼育方法 : 流水式
- 3) 水温 : 24 ± 1 °C
- 4) 照明 : 室内光、16 時間明/8 時間暗
- 5) 餌 : テトラミン (メーカー: ㈱テトラ社)
- 6) 給餌量 : 魚体重の約 2 %/日 (暴露開始の 24 時間前からは無給餌)

3 試験方法

3.1 試験条件

- 1) 暴露方式 : 半止水式 (24 時間毎に試験溶液の全量を交換)
- 2) 暴露期間 : 96 時間
- 3) 試験溶液量 : 5 L/容器
- 4) 連数 : 1 容器/試験区
- 5) 供試生物数 : 10 尾/試験区
- 6) 通気 : なし
- 7) 試験温度 : 24 ± 1 °C
- 8) 照明 : 室内光、16 時間明/8 時間暗
- 9) 給餌 : 無給餌
- 10) pH : 試験溶液の pH 調整は行わない

3.2 試験用水

脱塩素水 (給水施設の水を活性炭処理で残留塩素等を除去した後、空気による通気処理を行ったもの) を使用した。使用前に充分通気し、残留塩素が 0.01 mg/L 以下であることを確認した。試験用水の主な水質は、硬度が 35 mg/L (CaCO₃ 換算)、pH が 8.0 であった (暴露開始時)。

また、2007 年 2 月 22 日の試験用水の分析結果を付属資料-1 に示した。

3.3 試験容器および恒温槽等

- 1) 試験容器 : 5 L 容ネジロ瓶 (密閉容器)
- 2) 恒温槽 : 恒温器 ラボサーモ LH-2000 (アドバンテック東洋)
- 3) 水温計 : ガラス製水銀温度計
- 4) 溶存酸素計 : B-505 (飯島電子工業)
- 5) pH 計 : HM-30 V (東亜電波工業)

3.4 被験物質の溶解性確認

被験物質の対水溶解度が 7950 mg/L (25°C) であることから、実験開始前に、被験物質の試験用水に対する溶解性を調べるため、1000 mg/L 調製液を試験温度において 30 分攪拌後、目視により溶解性を確認した。さらに、溶液をガラス製遠心管に分取、1870 G で 15

分間、遠心分離し〔被験物質の密度 1.486 g/mL (20 °C)〕、上澄みの溶液を 10 倍希釈後 GC/MS 法により測定した。

3.5 試験濃度の設定

公比 1.8 での予備試験の結果(付属資料-2)、96 時間死亡率が 56 mg/L区で 0 %、100 mg/L区で 20 %であったことを基に、本試験は、公比 1.4 で、27, 37, 52, 72, 100 mg/L 区および対照区を設定した。

3.6 試験溶液の調製 (用時調製)

マイクロシリンジを用い、被験物質 1550 μ L(密度 1.486 g/mLの換算で 2294 mg)を 2284 mLの試験用水中(揮発による減少対策として 2 Lネジ口瓶を使用し、ロ一杯の状態)に注入し、密閉してマグネチックスターラで 60 分間攪拌後、1000 mg/Lの試験原液とした(無色透明)。試験原液の 175, 240, 335, 470, 650 mLを各 5 L容ネジ口瓶に入れ、試験用水で 5 Lに定量し、各濃度区の試験溶液とした(全て無色透明)。予備的な検討において、試験溶液調製時に被験物質の揮散によって約 20 %の濃度低下が認められたため、調製時の誤差も配慮して設定濃度に対して 1.3 倍の濃度に増仕込みを行った。(設定濃度が 27, 37, 52, 72, 100 mg/Lに対し、仕込濃度は 35, 48, 67, 94, 130 mg/Lになる様にした。)

対照区には被験物質を加えない試験用水を用いた。

3.7 試験溶液中の被験物質濃度分析

暴露開始時、24 時間換水前、72 時間換水後および暴露終了時に試験容器の中層より試験溶液をヘッドスペースが生じないように 110 mL ガラス製スクリュ管瓶一杯に採取し密栓した。この試験溶液について、GC/MS 法により分析し、試験溶液中の被験物質濃度を測定した。試験溶液の分析に際しては、標準溶液の測定を行い、そのピーク強度から定量した。

詳細は付属資料-3 試験溶液の分析法(測定条件、検量線、添加回収率、保存安定性、定量下限値、検出限界値等)に示した。

3.8 試験操作

供試魚は乱数を用いて各試験区に無作為に割り付け、試験容器中に 1 試験区当たり 10 尾投入し、2 日間の容器じゅん化を行った。

暴露開始前に、供試魚と同水槽でじゅん養した魚 10 尾の体重および全長を測定した後、魚網を用いて供試魚を投入し、その時点を暴露開始時とした。

水温、溶存酸素濃度、pHは暴露開始時および24時間毎に測定（換水時には換水前後にも測定）した。暴露期間中給餌は行わなかった。

暴露開始時、3、6、24、48、72 および 96 時間後に死亡個体数を記録するとともに、観察された毒性の徴候或いは異常の有無を記録した。

死亡個体を発見した場合は、水質の悪化が起こらないよう速やかに取り除いた。

一般的に記載する症例と定義*を以下に示した。

*一般的症例と定義

死亡：刺激を与えた場合に反応の認められないもの。

異常呼吸：対照区の魚と比較して鰓蓋の動きが異なるもの。

異常遊泳：明らかに対照区の魚と異なる遊泳をしたもの。動作の緩慢、過敏、痙攣、反転等。

遊泳不能：底部または水面で動いてはいるものの、水中を遊泳することが不可能なもの。横転、仮死を含む。

4 結果の算出

各濃度区の死亡個体数と供試個体数（10尾）から死亡率を求め、50%死亡濃度（ LC_{50} ）を算出した。また、死亡率が0%の死亡最高濃度、死亡率が100%の死亡最低濃度および被験物質による影響が認められなかった最高濃度（最大無影響濃度）を算出した。

5 結果および考察

5.1 試験成績の信頼性に影響をおよぼしたと思われる環境要因

認められなかった。

5.2 試験用水に対する被験物質の溶解性

フラスコ攪拌法により、1000 mg/L の被験物質が試験用水に溶解することを目視により確認した。

この溶液を遠心分離後、上澄を10倍希釈した溶液について濃度を測定した結果、81.9 mg/L であった。（操作中の揮散や分析誤差の影響もあったと考えられた。）

5.3 試験溶液中の被験物質濃度

暴露開始時、24 時間換水前、72 時間換水後および暴露終了時に試験溶液中の被験物質濃度を測定した。その結果を Table 1 に示した。

被験物質が揮散性を有するため、試験溶液調製中の濃度減少を増仕込みで補い、密閉系容器を用い 24 時間換水を行うことで暴露期間中の揮散による濃度減少対策とした。

被験物質濃度の変動は、試験溶液の調製直後は調製中の揮散程度の違いによる変動、暴露期間中は揮散による濃度減少の可能性もあるものの、分析誤差による影響が大きいと考えられた。そのため、暴露開始時と 24 時間換水前、および 72 時間換水後と暴露終了時の測定値の算術平均値を求め、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影響濃度)を算出した。

5.4 50 %死亡濃度 (LC_{50})

各時間における死亡率および 50 %死亡濃度 (LC_{50}) を Table 2 および Table 3 に示した。

対照区の死亡率は 0 %であり、試験成立条件を満たした。

入力に用いた観察点は対照区を含む全試験区で、結論を以下に示した。

24 時間 50 %死亡濃度(LC_{50}) : >106 mg/L

48 時間 50 %死亡濃度(LC_{50}) : >106 mg/L

72 時間 50 %死亡濃度(LC_{50}) : >106 mg/L

96 時間 50 %死亡濃度(LC_{50}) : >106 mg/L

5.5 0 %死亡最高濃度、100 %死亡最低濃度および最大無影響濃度

0 %死亡最高濃度、100 %死亡最低濃度および最大無影響濃度を Table 4 および以下に示した。

96 時間 0 %死亡最高濃度 : 54 mg/L

96 時間 100 %死亡最低濃度 : >106 mg/L

96 時間 最大無影響濃度 : 43 mg/L

5.6 毒性症状

暴露期間中に生存魚について観察された毒性症状を Table 5 に示した。

暴露開始直後：対照区および 27, 37 mg/L区で毒性症状は観察されなかった(死亡 0 尾)。52 mg/L区で 3 尾に上層遊泳[AS](死亡 0 尾)、72 mg/L区で 4 尾に上層遊泳(死亡 0 尾)、100 mg/L区で 4 尾に上層遊泳(死亡 0 尾)。

3 時間後：対照区および 27, 37 mg/L区で毒性症状は観察されなかった(死亡 0 尾)。52 mg/L区で 2 尾に上層遊泳(死亡 0 尾)、72 mg/L区で 10 尾に上層遊泳(死亡 0 尾)、100 mg/L区で 10 尾に上層遊泳(死亡 0 尾)。

6 時間後：対照区および 27, 37 mg/L区で毒性症状は観察されなかった(死亡 0 尾)。52 mg/L区で 2 尾に上層遊泳(死亡 0 尾)、72 mg/L区で 10 尾に上層遊泳(死亡 0 尾)、100 mg/L区で 10 尾に上層遊泳(死亡 0 尾)。

24 時間後：対照区および 27, 37 mg/L区で毒性症状は観察されなかった(死亡 0 尾)。52 mg/L区で 1 尾に上層遊泳(死亡 0 尾)、72 mg/L区で 10 尾に上層遊泳(死亡 0 尾)、100 mg/L区で 10 尾に上層遊泳(死亡 0 尾)。

48 時間後：対照区および 27, 37 mg/L区で毒性症状は観察されなかった(死亡 0 尾)。52 mg/L区で 1 尾に上層遊泳(死亡 0 尾)、72 mg/L区で 3 尾に上層遊泳(死亡 1 尾)、100 mg/L区で 10 尾に上層遊泳(死亡 0 尾)。

72 時間後：対照区および 27, 37, 52 mg/L区で毒性症状は観察されなかった(死亡 0 尾)。72 mg/L区で 7 尾に上層遊泳(死亡 1 尾)、100 mg/L区で 8 尾に上層遊泳(死亡 2 尾)。

96 時間後：対照区および 27, 37, 52 mg/L区で毒性症状は観察されなかった(死亡 0 尾)。72 mg/L区で 5 尾に上層遊泳(死亡 1 尾)、100 mg/L区で 6 尾に上層遊泳、1 尾に平衡失調[AS](死亡 4 尾)。

の毒性症状が観察された。{[]表示および観察尾数は Table 5 参照}

5.7 試験溶液の水温、溶存酸素濃度およびpH

試験溶液の水温を Table 6、溶存酸素濃度を Table 7、pHを Table 8 に示した。

96 時間の暴露期間中の水温は 24.0 °C で一定であった。溶存酸素濃度は 7.3 ～ 8.2 mg/L の範囲であり、すべての試験区で飽和溶存酸素濃度の60%以上が維持され(24.0 °C の飽和溶存酸素濃度 : 8.25 mg/L)、試験成立条件を満たした。pHは 7.5 ～ 8.0 の範囲で、暴露期間中の同一容器内の変動は 1.0 以内であった。

5.8 試験計画書からの逸脱の有無

試験計画書からの逸脱はなかった。

6 保管

試験に関する下記の記録および試資料は、当施設の資料保管施設に保管する。

- 1) 主計画表
- 2) 試験計画書、生データおよび最終報告書
- 3) 信頼性保証部門によって実施された監査または査察の記録
- 4) 職員の資格、訓練、経験および職務分掌の記録
- 5) 機器類の保守点検および校正の記録および報告書
- 6) コンピュータ化されたシステムの有効性確認の記録
- 7) 全標準操作手順書の経時的ファイル
- 8) 環境モニター記録
- 9) 被験物質、対照物質
- 10) その他の資料

以上

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

Nominal Concentration (mg/L)	(Semi-Static Condition)							
	Measured Concentration, mg/L (Percent of Nominal)							
	0 Hour	24 Hours	72 Hours	96 Hours	Mean ^a Measured Concentration (mg/L)			
	new	old	new	old				
Control	<0.003 (-)	<0.003 (-)	<0.003 (-)	<0.003 (-)	(-)			
27	34.0 (126)	21.6 (80)	26.4 (98)	27.1 (100)	27.3			
37	53.3 (144)	39.7 (107)	43.3 (117)	37.4 (101)	43.4			
52	68.7 (132)	53.6 (103)	51.5 (99)	43.2 (83)	54.3			
72	95.0 (132)	70.9 (98)	76.6 (106)	77.3 (107)	80.0			
100	128 (128)	102 (102)	108 (108)	86.0 (86)	106			

new: Freshly prepared test solutions

old: Test solutions after 24 hours exposure

a: Arithmetic mean

-: Not calculated

Table 2. The Numbers of Dead Fish (Mortality)

Nominal Concentration (mg/L)	Mean ^a Measured Concentration (mg/L)	Cumulative Mortality (Percent Mortality)			
		24 Hours	48 Hours	72 Hours	96 Hours
Control	—	0/10(0)	0/10(0)	0/10(0)	0/10(0)
27	27.3	0/10(0)	0/10(0)	0/10(0)	0/10(0)
37	43.4	0/10(0)	0/10(0)	0/10(0)	0/10(0)
52	54.3	0/10(0)	0/10(0)	0/10(0)	0/10(0)
72	80.0	0/10(0)	1/10(10)	1/10(10)	1/10(10)
100	106	0/10(0)	0/10(0)	2/10(20)	4/10(40)

a: Arithmetic mean

-: Not calculated

Table 3. Calculated LC₅₀ Values

Exposure Period (Hours)	LC ₅₀ (mg/L)	95 % Confidence Limits (mg/L)	Statistical Method
24	>106	—	—
48	>106	—	—
72	>106	—	—
96	>106	—	—

—: Not calculated

Table 4. The Highest Concentration in 0% Mortality, the Lowest Concentration in 100% Mortality and No Observed Effect Concentration

Exposure Period (Hours)	Highest Concentration in 0 % Mortality (mg/L)	Lowest Concentration in 100 % Mortality (mg/L)	No Observed Effect Concentration (mg/L)
24	>106	>106	43
48	54	>106	43
72	54	>106	54
96	54	>106	54

Table 5. Observed Toxic Symptoms

Nominal Concentration (mg/L)	Mean ^a Measured Concentration (mg/L)	Symptoms						
		Observation Time						
		0 Hour	3 Hours	6 Hours	24 Hours	48 Hours	72 Hours	96 Hours
Control	—	N	N	N	N	N	N	N
27	27.3	N	N	N	N	N	N	N
37	43.4	N	N	N	N	N	N	N
52	54.3	AS(3)	AS(2)	AS(2)	AS(1)	AS(1)	N	N
72	80.0	AS(4)	AS(10)	AS(10)	AS(10)	AS(3)	AS(7)	AS(5)
100	106	AS(4)	AS(10)	AS(10)	AS(10)	AS(10)	AS(8)	AS(7)

In case of fish indicated several symptoms, the number of affected fish was reported by every symptom

N: No toxic symptom was observed

AS: Abnormal swimming

—: Not calculated

a: Arithmetic mean

Table 6. Temperature

Nominal Concentration (mg/L)	Mean ^a Measured Concentration (mg/L)	(Semi-Static Condition)							
		Temperature, °C							
		0	24		48		72		96
		Hour new	old	new	old	new	old	new	old
Control	—	24.0	24.0	24.0	24.0	24.0	24.0	24.0	24.0
27	27.3	24.0	24.0	24.0	24.0	24.0	24.0	24.0	24.0
37	43.4	24.0	24.0	24.0	24.0	24.0	24.0	24.0	24.0
52	54.3	24.0	24.0	24.0	24.0	24.0	24.0	24.0	24.0
72	80.0	24.0	24.0	24.0	24.0	24.0	24.0	24.0	24.0
100	106	24.0	24.0	24.0	24.0	24.0	24.0	24.0	24.0

new: Freshly prepared test solutions

old: Test solutions after 24 hours exposure

—: Not calculated

a: Arithmetic mean

Table 7. Dissolved Oxygen Concentrations

Nominal Concentration (mg/L)	Mean ^a Measured Concentration (mg/L)	(Semi-Static Condition)							
		Dissolved Oxygen Concentration, mg/L							
		0	24		48		72		96
		Hour new	old	new	old	new	old	new	old
Control	—	8.2	7.7	8.2	7.7	8.2	7.6	8.2	7.4
27	27.3	8.2	7.7	8.2	7.7	8.2	7.6	8.2	7.5
37	43.4	8.2	7.6	8.2	7.7	8.2	7.6	8.2	7.4
52	54.3	8.2	7.6	8.2	7.6	8.2	7.6	8.2	7.5
72	80.0	8.2	7.6	8.2	7.6	8.2	7.5	8.2	7.3
100	106	8.2	7.5	8.2	7.7	8.2	7.6	8.2	7.4

new: Freshly prepared test solutions

old: Test solutions after 24 hours exposure

—: Not calculated

a: Arithmetic mean

Table 8. pH Values

Nominal Concentration (mg/L)	Mean ^a Measured Concentration (mg/L)	(Semi-Static Condition)							
		pH							
		0	24		48		72		96
		Hour new	old	new	old	new	old	new	old
Control	—	8.0	7.6	7.9	7.7	7.9	7.7	7.9	7.6
27	27.3	8.0	7.6	7.9	7.7	8.0	7.7	8.0	7.6
37	43.4	8.0	7.5	7.9	7.7	8.0	7.7	8.0	7.6
52	54.3	8.0	7.5	7.9	7.7	8.0	7.7	8.0	7.6
72	80.0	8.0	7.5	7.9	7.6	8.0	7.7	8.0	7.6
100	106	8.0	7.5	7.9	7.6	8.0	7.7	8.0	7.6

new: Freshly prepared test solutions

old: Test solutions after 24 hours exposure

—: Not calculated

a: Arithmetic mean

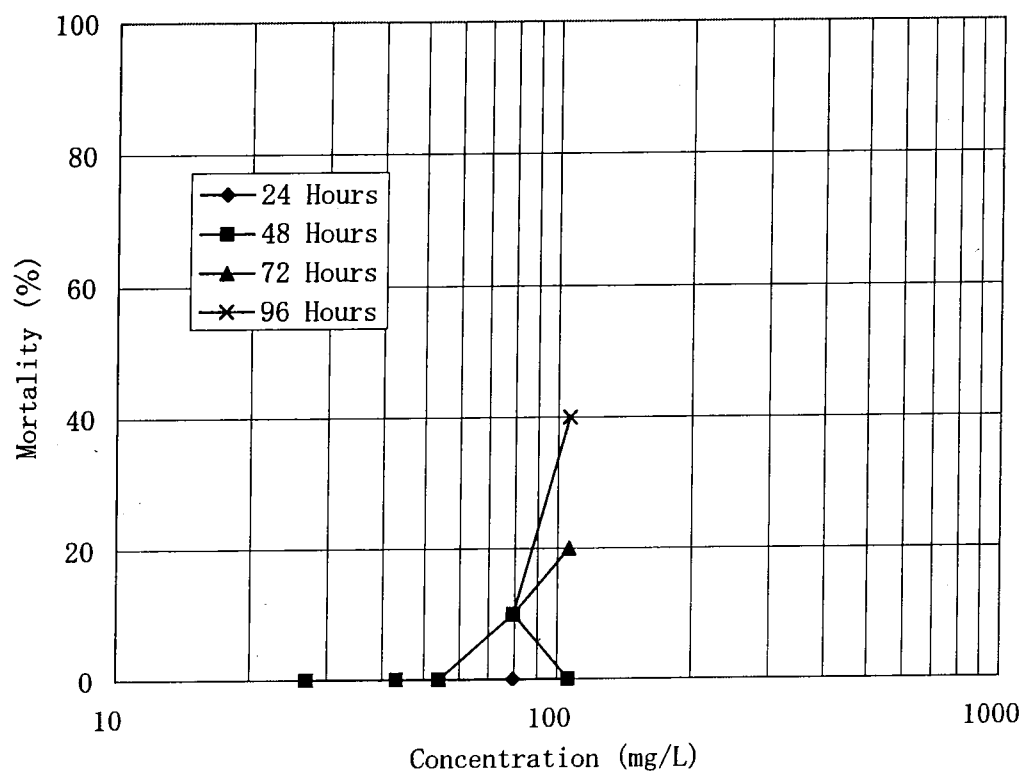


Figure 1. Concentration—Response (Mortality) Curve

付属資料－ 1

試験用水の水質

Table A-1 Water Quality of Dilution Water

Parameter	Concentration
BOD	<0.5 mg/L
COD	<0.5 mg/L
Total phosphorus	<0.003 mg/L
pH	7.3 (21.5 °C)
Coliform group bacteria	N.D.
Mercury	<0.0005 mg/L
Copper	<0.01 mg/L
Cadmium	<0.002 mg/L
Zinc	<0.01 mg/L
Lead	<0.005 mg/L
Aluminium	<0.02 mg/L
Nickel	<0.005 mg/L
Chromium	<0.05 mg/L
Manganese	<0.02 mg/L
Tin	<0.1 mg/L
Iron	<0.1 mg/L
Cyanide	<0.1 mg/L
Free chlorine	<0.05 mg/L
Bromide	<0.2 mg/L
Fluoride	0.05 mg/L
Sulfide	<0.5 mg/L
Total ammonium	<0.03 mg/L
Arsenic	<0.005 mg/L
Selenium	<0.005 mg/L
Evaporation residue	68 mg/L
Electric conductivity	7.7 mS/m
Total hardness (as CaCO ₃)	27 mg/L
Alkalinity	24 mg/L
Sodium	4.8 mg/L
Potassium	1.1 mg/L
Calcium	8.1 mg/L
Magnesium	1.8 mg/L

Date of measurement: Feb. 22, 2007

付属資料－ 2

予備試験の結果

Table B-1. The Numbers of Dead Fish (Mortality)
(Range Finding Test)

Nominal Concentration (mg/L)	Cumulative Mortality (Percent Mortality)			
	24 Hours	48 Hours	72 Hours	96 Hours
Control	0/5(0)	0/5(0)	0/5(0)	0/5(0)
32	0/5(0)	0/5(0)	0/5(0)	0/5(0)
56	0/5(0)	0/5(0)	0/5(0)	0/5(0)
100	0/5(0)	0/5(0)	1/5(20)	1/5(20)

Table B-2. Measured Concentration of the Test Substance in Test Water

Nominal Concentration (mg/L)	(Semi-Static Condition)			
	Measured Concentration, mg/L (Percent of Nominal)			
	0 Hour new	24 Hours old	72 Hours new	96 Hours old
Control	<0.003 (-)	<0.003 (-)	<0.003 (-)	<0.003 (-)
32	18.3 (57)	20.6 (64)	31.8 (99)	23.7 (74)
56	37.6 (67)	43.9 (78)	48.9 (87)	46.7 (83)
100	106 (106)	92.0 (92)	95.3 (95)	97.8 (98)

付属資料－ 3

試験溶液の分析法

クロロホルム分析法

1. 分析方法

(1) 分析法の概要

希釈した試験溶液ならびに内部標準物質を、一定量の空間を残した状態でバイアルに入れ、密閉状態として 60 ℃で静置することにより、被験物質と標準物質を気相に揮散させる。この気相の一定量をガスクロマトグラフ質量分析計（GC/MS）に注入し、選択イオン検出法により、内標準物質に対する検出イオンの面積比を算出し、被験物質の濃度を求め、希釈倍率を基に試験溶液の被験物質濃度を算出する。

(2) 装置および器具

a) GC/MS	: G5000 M7200	日立製作所
b) 分離カラム	: AQUATIC (60 m × 0.25 mm φ 膜厚 1.0 μm)	
c) 分析用上皿電子天秤	: EB-6300 型	ジールサイエンス 島津製作所
d) 恒温槽	: IP-280	Pasolina
e) メスフラスコ	: 容量 10 mL	柴田科学
f) ホールピペット	: 容量 1 mL, 2 mL, 5 mL, 10 mL	柴田科学
g) メスピペット	: 容量 10 mL	柴田科学
h) バイアル	: 13 mL	ジールサイエンス
i) バイアル用栓	: 径 19 mm、テフロン被膜	ジールサイエンス
j) アルミニウムキャップ	: 径 20 mm	ジールサイエンス
k) ガスタイトシリンジ	: 500 μL	ジールサイエンス
l) マイクロシリンジ	: 容量 10, 50, 100, 250 μL	ジールサイエンス

(3) 試薬

a) 揮発性有機化合物標準液

: クロロホルム 1 mg/mL (水質試験用)
Lot-YPH9075

b) 4-ブロモフルオロベンゼン標準液

: 1 mg/mL 水質試験用、Lot-JSF9260 和光純薬

c) 塩化ナトリウム

: 試薬特級 和光純薬

d) 蒸留水

: 高速液体クロマトグラフ用 関東化学

e) メタノール

: 試薬特級 和光純薬

(4) 試薬の調製

a) 内部標準原液 (100mg/L)

濃度 1 mg/mL の 4-ブロモフルオロベンゼン標準液 1.0 mL を 10 mL メスフラ

スコに正確に量り取り、メタノールで定容し、100 mg/L の内標準物質原液を調製する。

(5) 操作

〔前処理〕

- a) 試験溶液を検量線の濃度範囲になるように希釈する（1000 ～ 2000 倍）。
- b) 塩化ナトリウム 3 g をバイアルに加える。
- c) 希釈した試験溶液 10 mL を静かにバイアルに入れ、メタノール 2 μ L（検量線作成時の被験物質標準液のブランク）ならびに 100 mg/L 内部標準原液 2 μ L を添加する。
- d) 直ちにバイアル用の栓、その上にアルミニウムキャップを被せ、アルミニウムキャップ締め器を用いて密閉状態に固定する。
- e) 試料と同時に、「3. 検量線の作成（2）」の方法で検量線のバイアルを作製する。
- f) バイアルを振り混ぜ塩化ナトリウムを溶解した後、 $60 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ の恒温槽内に 30 分間静置する。被験物質ならびに内部標準物質を気相部に揮散させることで、GC/MS に注入する前処理とする。

〔GC/MS 操作〕

- a) 2 に記載する分析条件で GC/MS を作動し、装置を安定させる。
- b) 前処理を行ったバイアルの気相より、ガスタイトシリンジを用いて 500 μ L を採取し、直ちに GC/MS に注入する。
- c) クロロホルムおよび 4-ブロモフルオロベンゼンの保持時間に一致していることを確認し、保持時間に相当する位置のそれぞれの選択イオンの指示値を読み取る。
- d) 検出されたクロロホルムおよび 4-ブロモフルオロベンゼンの指示値の比を求め、検量線からクロロホルムの濃度を算出する。
- e) 検量線から求めた濃度に希釈倍率を換算し、試験溶液の被験物質濃度を算出する。

2. GC/MS の測定条件

- (1) 分離管 : AQUATIC (60 m \times 0.25 mm ϕ 膜厚 1.0 μ m)
- (2) 分離管温度 : 180°C 10 min Hold \sim 210°C ($10^{\circ}\text{C}/\text{min}$)

- (3) キャリアガス : ヘリウム、線速度 20 cm/s
 (4) イオン源温度 : 100°C
 (5) イオン化方式 : 電子衝撃法
 (6) 注入量 : 500 μ L
 (7) 測定イオン : クロロホルム $m/z=83$
 4-ブロモフルオロベンゼン $m/z=174$

3. 検量線の作成

- (1) 被験物質濃度として 1 mg/mL の揮発性有機化合物標準液 0.40, 2.0, 4.0 mL をそれぞれ 10 mL メスフラスコに正確に量り取り、メタノールで定容することで、40, 200, 400 mg/L の被験物質標準液を調製する(用時調製)。
- (2) 13 mL バイアルに、塩化ナトリウムを 3 g および蒸留水 10 mL を量り入れた後、密封する。40, 200, 400 mg/L の被験物質標準液よりそれぞれ 2 μ L を正確に注入し、0.0080, 0.040, 0.080 mg/L の被験物質濃度とする。さらに各バイアルに内部標準原液 (100 mg/L) それぞれ 2 μ L を注入し、内標準物質濃度を 0.020 mg/L で一定とする。この調製法により、検量線の各標準液を調製する。
- (3) バイアルを振り混ぜ塩化ナトリウムを溶解した後、 $60 \pm 0.5^\circ\text{C}$ の恒温槽内に 30 分間静置する。
- (4) 標準液 (バイアル) の気相から 500 μ L を採取し、直ちに GC/MS に注入し、測定を開始する。測定終了後クロマトグラムと同時にピーク面積を得る。被験物質濃度を横軸に、内標準物質に対する被験物質の信号強度比 (面積) を縦軸にとり検量線を作成する。この時の回帰式の相関係数も算出する。

表 1 検量線に使用したデータ例

No.	標準液		信号強度比 (面積)		
	被験物質 (mg/L)	内標準物質 (mg/L)	被験物質 (counts)	内標準物質 (counts)	信号比 (被験物質/内標準物質)
1	0	0.020	0	13.5362	0
2	0.0080	0.020	3.12279	10.3218	0.30254
3	0.040	0.020	25.9967	12.1116	2.14643
4	0.080	0.020	58.8121	13.0445	4.50857

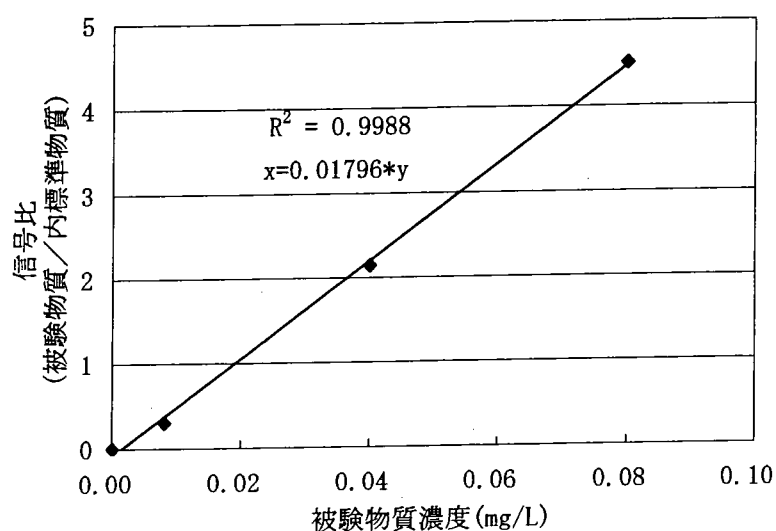


図1 検量線例

4. 添加回収率

揮発性有機化合物標準液（クロロホルム 1 mg/L）の 10 μ L、100 μ L、1.0 mL、10 mL を、密閉状態として 100 mL の試験用水に添加し、濃度が 0.10、1.0、10、100 mg/L における回収率を算出した。

結果を表 2 に示す。平均回収率は 101 ~ 108 %であった。

表 2 添加回収率

試料濃度 (mg/L)	n	測定値 (mg/L)	測定値平均 (mg/L)	回収率 (%)
0.10	1	0.1069	0.105	105
	2	0.1028		
1.0	1	1.119	1.08	108
	2	1.049		
10	1	10.05	10.1	101
	2	10.15		
100	1	105.3	103	103
	2	99.99		

5. 保存安定性

4 の添加回収で調製した 4 濃度の試料溶液（0.105、1.08、10.1、103 mg/L）を、密閉・遮光条件下で 1 日間室温で保存し、試料溶液の安定性を確認した。

結果を表 3 に示す。1 日間室温保存液の濃度維持率は 86 ~ 100 %であった。

表 3 保存安定性

開始時測定値 (mg/L)	1 日後			
	n	測定値 (mg/L)	測定値平均 (mg/L)	濃度維持率 (%)
0.105	1	0.09623	0.0976	93
	2	0.09889		
1.08	1	0.9401	0.932	86
	2	0.9238		
10.1	1	10.27	10.1	100
	2	9.898		
103	1	97.67	97.5	95
	2	97.41		

6. 定量下限値および検出限界値

被験物質濃度 0.0040 mg/L の試料液 10 mL を入れたバイアルの気相 500 μ L を GC/MS に 7 回注入し、得られた測定値の標準偏差値の 10 倍を定量下限値、3 倍を検出限界値とした。

結果を表 4 に示す。定量下限値は 0.003 mg/L、検出限界値は 0.0007 mg/L であった。なお 1000 倍希釈時の定量下限値は 3.0 mg/L、検出限界値は 0.7 mg/L となる。

表 4 定量下限値および検出限界値の算出データ

n	測定値 (mg/L)
1	0.00379
2	0.00397
3	0.00379
4	0.00408
5	0.00373
6	0.00386
7	0.00434
平均値	0.00394
標準偏差 (σ_{n-1})	0.00021

定量下限値 = $0.00021 \times 10 \rightleftharpoons 0.003 \text{ mg/L}$

検出限界値 = $0.00021 \times 3 \rightleftharpoons 0.0007 \text{ mg/L}$

試験溶液を 1000 倍希釈した場合

定量下限値 = $0.00021 \times 10 \times 1000 \rightleftharpoons 3.0 \text{ mg/L}$

検出限界値 = $0.00021 \times 3 \times 1000 \rightleftharpoons 0.7 \text{ mg/L}$

魚類急性毒性試験結果報告書

1. 一般的事項

化学物質等の名称 (IUPAC 命名法による)	クロロホルム		
別名	—		
C A S 番 号	67-66-3		
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)	CHCl_3		
分子 量	119.38		
試験に供した 化学物質の純度 (%)	99.4 % (mass/mass)		
試験に供した 化学物質のロット番号	DPE2886		
不純物の名称及び含有率	水分 0.002 % (mass/mass) エタノール 0.60 % (mass/mass) (安定剤) その他不明		
蒸 気 圧	197 mmHg (25℃)		
対 水 溶 解 度	7950 mg/L (25℃)		
ヘ ン リ ー 定 数	0.00367 atm·m ³ /mole (24℃)		
p K a 解 離 定 数	不明		
1-オクタノール/水分配係数	1.97		
融 点	-63.6℃		
沸 点	61.1℃		
常 温 に お け る 性 状	無色透明の液体		
安 定 性	安定。ただし安定剤を含まないクロロホルムは、空気、水分、 光等で徐々に分解する。 水と長時間共存すると加水分解して塩酸を生成する。		
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 ベンゼン	混和	不明

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>希釈した試験溶液ならびに内部標準物質を、一定量の空間を残した状態でバイアルに入れ、密閉状態として 60 ℃で静置することにより、被験物質と標準物質を気相に揮散させる。この気相の一定量をガスクロマトグラフ質量分析計 (GC/MS) に注入し、選択イオン検出法により、内標準物質に対する検出イオンの面積比を算出し、試験溶液中の被験物質の濃度を算出する。</p> <p>〔分析手順〕</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 分析条件で GC/MS を作動し、装置を安定させる。 2. 検量線を作成する。 3. 前処理を行ったバイアルの気相より、ガスタイトシリンジを用いて 500 μL を採取し、直ちに GC/MS に注入する。 4. 検量線から求めた濃度に希釈倍率を換算し、試験溶液の被験物質濃度を算出する。
前処理法	<p>試験液分析の前処理：</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 検量線の濃度範囲に合わせ、試験溶液を純水で希釈する。 2. バイアルに塩化ナトリウムと希釈した試験溶液と内部標準原液を一定量加える。 3. 直ちにアルミニウムキャップで密栓し、バイアルを振り混ぜて塩化ナトリウムを溶解させる。 4. 60 ℃の恒温槽内に 30 分静置し、被験物質と内部標準物質を揮散させる。
定量条件	<p>分析に用いた機器：</p> <p>ガスクロマトグラフ質量分析計 (G5000 M7200 日立製作所)</p> <p>測定条件：</p> <p>分離カラム : AQUATIC (60 m \times 0.25 mm ϕ 膜厚 1.0 μm)</p> <p>分離管温度 : 180℃ 10 min Hold\sim210℃ (10℃/min)</p> <p>キャリアガス : ヘリウム、線速度 20 cm/s</p> <p>イオン源温度 : 100℃</p> <p>イオン化方式 : 電子衝撃法</p> <p>注入量 : 500 μL</p> <p>測定イオン : クロロホルム ; m/z=83</p> <p>4-ブロモフルオロベンゼン (内部標準物質)</p> <p>; m/z=174</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）		和名：ヒメダカ 学名： <i>Oryzias latipes</i>
	入手先		三協ラボサービスから入手したものを自家繁殖
	対照物質への感受性 （LC ₅₀ ） （対照物質名）		0.40 mg/L（無水物換算）（これまでの LC ₅₀ mean=0.29 mg/L、S. D.=0.10 mg/L、n=28） 硫酸銅（Ⅱ）五水和物、試薬特級
じゅん化	じゅん化期間		2007 年 5 月 18 日～2007 年 7 月 9 日
	飼育水の種類		脱塩素水
	じゅん化前の薬浴の有無		無
	環境条件（水温、明暗周期）		24±1℃、16 時間明／8 時間暗
	餌料（種類・量・頻度）		テトラミン（テトラ社）・体重の約 2％／日・毎日
試験条件	試験容器		5 L 容ネジ口瓶（密閉容器）
	試験用水	種類	脱塩素水
		硬度	35 mg/L（CaCO ₃ 換算値）
		pH	7.9 ～ 8.0
	暴露期間		2007 年 7 月 9 日～2007 年 7 月 13 日
	試験濃度（設定値）		対照区，27，37，52，72，100 mg/L（公比 1.4）
	供試数		10 尾／試験区
	試験溶液量		5 L／試験容器
	助剤	助剤の有無	無
		種類	—
		濃度	—
	試験方式		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		24.0℃で一定
	溶存酸素濃度（DO）		7.3 ～ 8.2 mg/L〔飽和濃度の 60％（5.0 mg/L）以上〕
明暗周期		16 時間明／8 時間暗	
結果の算出 方法	LC ₅₀		試験最高濃度以上

4. 試験結果及び考察

項 目	内 容
毒性値	96hLC ₅₀ > 106 mg/L
試験濃度	1. 設定値 ②. 実測値
考察及び特記事項	<p>被験物質の対水溶解度を基に、フラスコ攪拌法により、被験物質 (1000 mg/L 相当) が試験用水に溶解することを目視により確認し、さらにこの溶液を遠心分離後、上澄液を 10 倍希釈した溶液の分析値が 81.9 mg/L であることを確認した。</p> <p>被験物質の揮散性が著しいため、試験溶液調製中の濃度減少を増仕込みで補った。また、密閉系容器を用い 24 時間換水を行うことで暴露期間中の揮散による濃度減少対策とした。</p> <p>被験物質濃度の変動は、試験溶液の調製直後は調製時の揮散程度の違いによる変動、暴露期間中は揮散による濃度減少の可能性もあるものの、分析誤差による影響が大きいと考えられた。そのため、暴露開始時と 24 時間換水前、および 72 時間換水後と暴露終了時の算術平均値を求め、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影響濃度) を算出した。</p> <p>試験については、テストガイドラインから逸脱した点もなく、試験の有効性基準をみたしたことから、有効であると判断した。</p>

5. 魚類の被験物質濃度－死亡率曲線

