

環境省 殿

## 最 終 報 告 書

クロロホルムのヒメダカ (*Oryzias latipes*)  
に対する初期生活段階毒性試験

(試験番号：No. 2006-生71)

2008年 9月22日作成

株式会社  分析センター  


原本と相違ないことを証明する。

2008年9月24日

試験責任者 

Z400-0040 様式 1

試験計画書修正書

試験名：クロロホルムのヒメダカ (*Oryzias latipes*) に対する初期生活段階毒性試験

試験番号：No. 2006-生71

該当するページ：6ページ

修正する項目等：2 供試生物 2.3 供試する胚を得るための親魚の蓄養方法

修正前の内容

給餌量 : 目安として体重の約 2%/日。(1日2回に分けて給餌。ただし休日は1日1回とする)

修正後の内容

給餌量 : 目安として体重の約 3~6%/日。(1日2回に分けて給餌。ただし休日は1日1回とする)

修正の理由：

約 2%/日の給餌量では産卵数が少なく、十分な産卵状態にするために給餌量を多くすることで対応した。

試験責任者氏名：



承認月日 2007年 6月25日

運営管理者氏名：



確認月日 2007年 6月25日

**原本と相違ないことを証明する。**

2007年6月25日

試験責任者



Z400-0040 様式 1

## 試験計画書修正書

試験名：クロロホルムのヒメダカ (*Oryzias latipes*) に対する初期生活段階毒性試験

試験番号：No. 2006-生71

該当するページ：9ページ

修正する項目等：3.8 試験操作 1)観察

### 修正前の内容

仔稚魚：形態異常と行動異常の有無を週2回観察し、異常が見られた場合はその数と内容を具体的に記録する。

### 修正後の内容

仔稚魚：形態異常と行動異常の有無を毎日観察し、異常が見られた場合はその数と内容を具体的に記録する。

### 修正の理由：

観察もれのないようにするため。

試験責任者氏名：

■■■■■

■■■■■

承認月日 2007年 6月29日

運営管理者氏名：

■■■■■

■■■■■

確認月日 2007年 6月29日

原本と相違ないことを証明する。

2007年6月29日

試験責任者

■■■■■

Z400-0040 様式 1

## 試験計画書修正書

試験名：クロロホルムのヒメダカ (*Oryzias latipes*) に対する初期生活段階毒性試験

試験番号：No. ~~2005~~ 生 7 1

2006 7.4 投入

該当するページ：8 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

予備試験の結果を基に本試験の濃度を設定する。本試験での試験濃度は、急性毒性試験での  $LC_{50}$  値あるいは 10 mg/L のどちらか低い方の値を上限濃度とし、公比を原則として 3.2 以下で 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。また、試験最低濃度は、ヒメダカの体長・体重ならびに遊泳や形態異常を全く起こさない濃度とする。

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。

### 修正後の内容

本試験での設定濃度は、公比 2.2 とし、0.22, 0.46, 1.0, 2.2, 4.6, 10 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



Z400-0040 様式 1

## 試験計画書修正書

試験名：クロロホルムのヒメダカ (*Oryzias latipes*) に対する初期生活段階毒性試験

試験番号：No. 2006-生71

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

修正の理由：

誤記のため。

原本と相違ないことを証明する。

2008 年 8 月 26 日

試験責任者

---

該当するページ：10ページ

修正する項目等：試験不成立条件

修正前の内容

- ・ 対照区でのふ化後の死亡率が暴露終了時で 20 %を超えた場合
- ・ 暴露期間を通じて溶存酸素濃度が飽和濃度の 60 %以上維持されない場合
- ・ 暴露期間中、水温は常に試験水槽間あるいは連続した日の間で $\pm 1.5^{\circ}\text{C}$ を超えた場合

修正後の内容

- ・ 対照区でのふ化後の死亡率が暴露終了時で 20 %を超えた場合
- ・ 暴露期間を通じて溶存酸素濃度が飽和濃度の 60 %以上維持されない場合
- ・ 暴露期間中、水温は常に試験水槽間あるいは連続した日の間で $\pm 1.5^{\circ}\text{C}$ を超えた場合
- ・ 暴露期間中の被験物質濃度が、測定値の平均値に対して $\pm 20\%$ の範囲を超えた場合  
(下線の文を追記)

修正の理由：

OECD化学品テストガイドライン No. 210「魚類の初期生活段階毒性試験」(1992年)からの転記漏れ

---

該当するページ：11ページ

修正する項目等：4.3 最大無影響濃度(NOEC)と最小影響濃度(LOEC)

修正前の内容

記載なし

修正後の内容

統計ソフトは原則としてEcotox ver. 2.2を用いるが、性能の都合上、やむを得ない場合はStatLight<sup>#04</sup> (Yukms)を用いる。

(下線の文を追記)

修正の理由：

Ecotox ver. 2.2は欠損値を含むデータの解析ができないが、StatLight<sup>#04</sup> (Yukms)は解析可能のため。

---

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*) に対する初期生活段階毒性試験

試験番号 : No. 2006-生71

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日改正）

OECD化学品テストガイドライン No.210「魚類の初期生活段階毒性試験」(1992年)

に準拠した。

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22日

試験責任者



2008年 9月22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*) に対する初期生活段階毒性試験

試験番号 : No. 2006-生71

## 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 5日	2007年 7月 5日	2007年 7月 5日
	2007年 7月12日	2007年 7月12日	2007年 7月12日
	2007年 7月19日	2007年 7月19日	2007年 7月19日
	2007年 7月26日	2007年 7月26日	2007年 7月26日
	2007年 8月 2日	2007年 8月 2日	2007年 8月 2日
	2007年 8月 9日	2007年 8月 9日	2007年 8月 9日
	2007年 8月14日	2007年 8月16日	2007年 8月14日
実験終了後の監査	2007年11月15日	2007年11月15日	2007年11月15日
組織体制の監査	2007年 7月31日	2007年 7月31日	2007年 7月31日
施設・設備の査察 試験用機器等 施設、設備等 試験系	2007年 7月31日	2007年 7月31日	2007年 7月31日
試験報告書の監査	2008年 9月22日	2008年 9月22日	2008年 9月22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22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*) に対する初期生活段階毒性試験
2. 試験目的 : 被験物質のヒメダカ (*Oryzias latipes*) に対する初期生活段階毒性試験を、ふ化後30日間行い、50%死亡濃度(LC<sub>50</sub>)および最大無影響濃度(NOEC)、最小影響濃度(LOEC)を求める。
3. 試験法ガイドライン :  
本試験は、OECD化学品テストガイドライン No.210「魚類の初期生活段階毒性試験」(1992年)に準拠して実施した。
4. 適用GLP : 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16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16番地

8. 試験関係者：

試験責任者 [redacted] (所属 生物試験室)

試験担当者 [redacted] (生物試験担当)

[redacted] (生物試験担当)

[redacted] (濃度分析責任者)

[redacted] (濃度分析担当)

9. 試験期間： 試験開始日 2007年 3月12日

暴露期間 2007年 7月 5日～2007年 8月14日

試験終了日 2008年 9月22日

# 目 次

	頁
要 旨	1
1 被験物質	4
1.1 名称、構造式および物理化学的性状	4
1.2 供試試料	4
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	5
2 供試生物	5
3 試験方法	6
3.1 試験条件	6
3.2 試験用水	7
3.3 試験容器および恒温槽等	7
3.4 被験物質の溶解性確認	7
3.5 試験濃度の設定（予備試験）	8
3.6 試験溶液の調製	9
3.7 試験溶液中の被験物質濃度分析	9
3.8 試験操作	10
4 結果の算出	12
5 結果および考察	13
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	13
5.2 試験用水に対する被験物質の溶解性	13
5.3 試験溶液中の被験物質濃度	14
5.4 暴露期間	15
5.5 ふ化所要日数	15
5.6 胚の累積ふ化（死亡）数	15
5.7 ふ化稚魚の累積死亡数（率）	16
5.8 全暴露期間の累積死亡数（率）	17
5.9 暴露終了時の全長・体重	18
5.10 毒性症状（行動、形態、残餌量における）	19
5.11 結論	20
5.12 試験溶液の水温、溶存酸素濃度およびpH	20
5.13 逸脱事項	21
6 保管	22

Table 1 ~ 13 .....	23
Figure 1 ~ 4 .....	37
付属資料-1 (試験用水の水質) .....	39
付属資料-2 (流水式試験装置の略図) .....	41
付属資料-3 (予備試験の結果) .....	44
付属資料-4 (暴露終了時ヒメダカ生長調査) .....	46
付属資料-5 (試験溶液の分析法) .....	50
付属資料-6 (統計解析結果) .....	57
(1) ふ化所要日数の検定 .....	58
(2) 胚の死亡率検定 .....	61
(3) ふ化後稚魚の死亡率検定 .....	64
(4) 暴露全期間の死亡率検定 .....	65
(5) 全長の検定 .....	68
(6) 生体重の検定 .....	70
(7) 乾燥体重の検定 .....	72
(8) 摂餌量の検定 .....	74

## 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*) に対する初期生活段階毒性試験

試験番号 No. 2006-生71

### 試験方法ガイドライン

本試験は、OECD化学品テストガイドライン No. 210「魚類の初期生活段階毒性試験」(1992年)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 : 流水式
- 3) 試験溶液流量 : [対照区] 試験用水 17.4 mL/分(15.6 ~ 19.1 mL/分)  
[濃度区] 試験用水 16.3 mL/分(14.7 ~ 17.9 mL/分)  
原液 1.0 mL/分(4.6 ~ 5.6 mL/ 5分)  
いずれの区も換水回数が5回相当/日
- 4) 供試生物 : ヒメダカ (*Oryzias latipes*)
- 5) 暴露期間 : 40日間(対照区のふ化率が90%に達した時点から30日)
- 6) 試験濃度 : 対照区, 0.22, 0.46, 1.0, 2.2, 4.6, 10 mg/L  
公比 ; 2.2
- 7) 試験溶液量 : 5 L/容器
- 8) 連数 : 3 容器/試験区
- 9) 供試生物数 : 60 卵/試験区 (20 卵/容器)
- 10) 試験温度 : 24±1.5 °C
- 11) 照明 : 室内光 16 時間明/8 時間暗
- 12) 給餌 : ふ化後はブラインシュリンプふ化幼生
- 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

当該被験物質は揮散性が著しく、予備的な検討において、一次原液調製から流水式試験装置の試験水槽までに約 50 %まで濃度低下が認められたことから、試験水槽の濃度が 2 倍となるように設定し、試験溶液を調製した（増し仕込み）。

原液交換から次の日の原液交換までの間で試験水槽内の濃度減少（日内変動）はないものの、暴露期間中の被験物質濃度は、測定値の平均値に対し ±20 %の変動範囲を超え、試験成立条件を満たさなかった。分析誤差等もあるものの、被験物質の揮散性に起因する変動が主原因と考えられ、これ以上の試験手順や装置上の対策は困難であった。なお、暴露期間中に装置上のトラブルによる一時的な被験物質濃度の変動も見られたが、試験結果におよぼす影響は小さいと判断した。

条件は完全には満たさなかったものの、以上の理由により試験成立と判断し、流水式試験のため影響濃度の算出には暴露期間中の全測定値の算術平均値を採用した。

### 2) 最小影響濃度 (LOEC) および最大無影響濃度 (NOEC)

40 日間の暴露期間（ふ化後 30 日間）における最小影響濃度 (LOEC) は、体長、体重の測定結果より 4.6 mg/L（実測濃度 5.7 mg/L）、最大無影響濃度 (NOEC) は、全ての評価項目において影響が認められなかった 2.2 mg/L（実測濃度 2.6 mg/L）と判断した。

#### ① まとめ

最小影響濃度 (LOEC)	:	5.7 mg/L
最大無影響濃度 (NOEC)	:	2.6 mg/L

#### ② 各項目に対する影響

以下に各影響濃度の算出結果を示した。

##### a. ふ化所要日数

最小影響濃度 (LOEC)	:	> 11 mg/L
最大無影響濃度 (NOEC)	:	11 mg/L

b. 発生時の胚の累積死亡率

50 %死亡濃度 (LC<sub>50</sub>) : > 11 mg/L

最小影響濃度 (LOEC) : > 11 mg/L

最大無影響濃度 (NOEC) : 11 mg/L

c. ふ化後の稚魚の累積死亡率

50 %死亡濃度 (LC<sub>50</sub>) : > 11 mg/L

最小影響濃度 (LOEC) : > 11 mg/L

最大無影響濃度 (NOEC) : 11 mg/L

d. 全暴露期間

(a) 累積死亡率

50 %死亡濃度 (LC<sub>50</sub>) : > 11 mg/L

最小影響濃度 (LOEC) : > 11 mg/L

最大無影響濃度 (NOEC) : 11 mg/L

(b) 全長・体重測定

a) 全長

最小影響濃度 (LOEC) : 5.7 mg/L

最大無影響濃度 (NOEC) : 2.6 mg/L

b) 生体重

最小影響濃度 (LOEC) : 5.7 mg/L

最大無影響濃度 (NOEC) : 2.6 mg/L

c) 乾燥体重

最小影響濃度 (LOEC) : 5.7 mg/L

最大無影響濃度 (NOEC) : 2.6 mg/L

e. 観察時（胚ならびにふ化稚魚）の行動・形態異常

最小影響濃度 (LOEC) : > 11 mg/L

最大無影響濃度 (NOEC) : 11 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	: $\text{CHCl}_3$
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 <sup>3</sup> /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、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	: ██████████
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/mass)、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

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

\*\*\* : ██████████「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の比較をした。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) 入手先 : 自家繁殖
- 4) ロット番号 : FJ06A4 (親ヒメダカ)
- 5) 感受性の確認 : 親ヒメダカの基準物質(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(LC<sub>50</sub>)は 0.21 mg/L(無水物換算)(暴露期間 2007 年 2 月 12 日 ~ 2007 年 2 月 16 日)  
当施設における 1997 年 12 月以降の LC<sub>50</sub> は  $\bar{X}$  = 0.30 mg/L、  
S. D. = 0.10 mg/L、n = 25 であった。
- 6) 親魚の蓄養期間 : 2007 年 1 月 26 日 ~ 2007 年 7 月 5 日 (採卵日)
- 7) 親魚の蓄養方法 : 継代中のヒメダカから月齢 9 ヶ月 (暴露開始時の月齢 15 ヶ月) の肉眼的に健康かつ十分な大きさの雄・雌の成魚をそれぞれ 15、35 尾選別し、水槽 (36×56×12 cm) に移し、下記の条件で飼育した。残餌や排泄物および産卵した卵を、毎日、取り除いた。
  - ① 飼育水 : 試験に用いる試験用水(3.2 参照)
  - ② 水量 : 20 L
  - ③ 飼育方式 : 流水式
  - ④ 飼育密度 : 2.5 尾/L 飼育水
  - ⑤ 水温 : 24±1.5℃
  - ⑥ 照明 : 室内光、16 時間明/8 時間暗 (照明点灯 7 時)

- ⑦ 餌 : テトラミン
- ⑧ 給餌量 : 目安として体重の約 3 ~ 6 %/日 (1 日 2 回に分けて給餌。ただし休日は 1 日 1 回)

8) 供試胚の採取方法 :

暴露開始の前日に水槽の底に卵が残っていないことを確認し、暴露開始日に水槽のヒメダカを別の容器に移し、水槽の底に産卵された受精卵を採取した。受精卵をネットに入れ、脱塩素水の流水下で軽く手もみして個々にほぐすと共に良く洗浄した。更に全数を実体顕微鏡で観察し、遅くとも桑実期の受精卵を選別した。未受精卵および異常の胚は使用しなかった。

3 試験方法

3.1 試験条件

- 1) 暴露方式 : 流水式
- 2) 暴露期間 : 40 日 (対照区のふ化率が 90 %に達した時点から 30 日)
- 3) 試験溶液量 : 5 L/容器
- 4) 換水回数 : [対照区] 試験用水 17.4 mL/分 (15.6 ~ 19.1 mL/分)  
[濃度区] 試験用水 16.3 mL/分 (14.7 ~ 17.9 mL/分)  
原液 1.0 mL/分 (4.6 ~ 5.6 mL/ 5 分)  
いずれの区も換水回数が 5 回相当/日
- 5) 連数 : 3 容器/試験区
- 6) 供試生物数 : 60 卵/試験区 (20 卵/容器)
- 7) 通気 : なし
- 8) 試験温度 : 24±1.5℃
- 9) 照明 : 室内光 16 時間明/8 時間暗
- 10) 給餌 : ふ化後はヒメダカの匹数に合わせてブラインシュリンプふ化幼生を所定量給餌
- 11) 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もの）を使用した。

脱塩素水は、週に1回オルトトリジン法により残留塩素濃度が0.01 mg/L以下であることを確認した。暴露開始時ならびに終了時における試験用水の主な水質は、硬度がそれぞれ36 mg/L、32 mg/L（CaCO<sub>3</sub>換算）、pHがそれぞれ7.5で一定、7.2～7.3であった。

また、2007年8月29日の試験用水の分析結果を付属資料-1（試験用水の水質）に示した。

### 3.3 試験容器および恒温槽等

流水式試験装置を用いて試験を実施した〔付属資料-2（試験装置の略図）参照〕。

- 1) 試験容器 : 5 L容ガラス水槽（フタ付き容器を用い揮発防止策を講じた。）
- 2) ふ化用容器 : ガラス管（内径45 mm、高さ85 mm。底部に30メッシュのプランクトンネットを貼ったもの）、1分間に50 mmの上下運動を8回行う
- 3) 恒温槽 : 循環式低温恒温水槽 TRL-101FEP （トーマス科学器械）
- 4) 水温計 : ガラス製水銀温度計
- 5) 溶存酸素計 : B-505 （飯島電子工業）
- 6) pH計 : HM-30V （東亜電波工業）
- 7) 定量ポンプ : ローラーポンプ RP-MVH （古江サイエンス）
- 8) 送液定量ポンプ : SMP-23S （東京理化器械）

### 3.4 被験物質の溶解性確認

被験物質の対水溶解度の文献値が7950 mg/L（25℃）であることから、実験開始前に一次原液の調製濃度1000 mg/Lが試験用水に溶解することを確認した。試験方法は、2 Lネジロビンに試験用水2.332 Lを入れ（揮発防止対策として口一杯とした）、マイクロシリンジを用いてクロロホルム1550 μL（2300 mg）を注入し、試験温度（24℃）で、マグネチックスターラーで60分間攪拌後、目視により溶解性を確認した（設定濃度990 mg/L）。当該被験物質の密度が1.486 g/mL（20℃）と水に

比較して高く、攪拌状態においても早い段階で沈降することから、攪拌後に溶液を10分程度静置し、中層の溶液をヘッドスペース-GC/MS法で測定した。

### 3.5 試験濃度の設定 (予備試験)

本試験の設定濃度を決定するため、予備試験として、ふ化4日後の稚魚を用い、24時間換水条件で、毎日給餌を行いながら、96時間の急性毒性試験を行った。設定濃度は、ガイドラインの上限濃度10 mg/Lを基準とし、公比3.2で、1.0, 3.2, 10 mg/L区ならびに対照区とした(1.3倍の増し仕込みを行った)。

その結果、暴露終了時における累積死亡率は全濃度区について0%であり、毒性症状も認められなかった〔付属資料-3 (予備試験の結果)〕。これより、本試験は公比2.2とし0.22, 0.46, 1.0, 2.2, 4.6, 10 mg/L区および対照区を設定した。

#### 予備試験条件

- |         |   |  |
|---------|---|--|
| 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 | : | 1 L/試験容器                                   |
| ④ 連数    | : | 1試験容器/試験区                                  |
| ⑤ 供試生物  | : | ヒメダカふ化稚魚 (ふ化4日後)                           |
| ⑥ 供試生物数 | : | 10尾/試験区                                    |
| ⑦ 通気    | : | なし   |
| ⑧ 試験温度  | : | 24±1.5℃                                    |
| ⑨ 照明    | : | 室内光 16時間明/8時間暗                             |
| ⑩ 給餌    | : | ヒメダカの尾数に合わせてブラインシュリンプふ化幼生を所定量(200個体/尾/日)給餌 |
| ⑪ pH    | : | 試験溶液のpH調整は行わない                             |
| ⑫ 試験用水  | : | 脱塩素水                                       |
| ⑬ 試験容器  | : | 1 Lネジロビン (密閉容器)                            |
| ⑭ 恒温槽   | : | 循環式低温恒温水槽 TRL-101FEP (トーマス科学器械)            |

### 3.6 試験溶液の調製

一次原液から試験水槽までの間に、揮散による約 50 %の濃度低下があったことから、濃度を 2 倍として二次原液の調製を行った（増し仕込み）。

#### 1) 原液調製

5 L ネジロビンに試験用水 6.0 L（ロ一杯）を入れ、マイクロシリンジを用いてクロロホルム 4.0 mL（5944 mg）を注入し、密閉後、マグネチックスターラーで 60 分間攪拌（さらに 10 分間静止）することで、設定濃度 990 mg/L の一次原液を調製した（無色透明）。

この一次原液 37.5, 80, 170, 375, 800, 1700 mL をそれぞれ 5 L 褐色ネジロビンに入れ、試験用水で 5 L に定容し、密閉後、攪拌し、7.4, 16, 34, 74, 160, 340 mg/L の二次原液を調製した。

#### 2) 流量管理

流水式試験装置において、該当する試験濃度の二次原液を 1.0 mL/分（4.6 ～ 5.6 mL/ 5 分）、試験用水を 16.3 mL/分（14.7 ～ 17.9 mL/分）の流量で、密閉式の混合装置により混合し、計算値で 0.43, 0.92, 2.0, 4.3, 9.2, 20 mg/L となるように各試験濃度区の 3 試験水槽それぞれに流した。一次原液調製から約 50 %の濃度低下があるため、試験水槽の濃度は、0.22, 0.46, 1.0, 2.2, 4.6, 10 mg/L となる。

一次原液の調製、各濃度の二次原液の調製を毎日行い、調製した二次原液は直ちに使用した。

対照区には被験物質を加えない試験用水を 17.4 mL/分（15.6 ～ 19.1 mL/分）の流量で流した。

### 3.7 試験溶液中の被験物質濃度分析

#### 1) 被験物質濃度の測定

試験溶液中の被験物質濃度の分析は、ヘッドスペース-GC/MS法（付属資料—5を参照）を用い、全試験区について暴露開始時、各週に 2 回、および暴露終了時に行った。なお、被験物質の揮散による日内変動（二次原液の交換直後

から翌日の交換までの水槽内の濃度変動)を調べるため、各サンプリングを、原則として、朝、晩、夕の順番で行った。

分析に供する試験溶液は、各試験区の3水槽からそれぞれ等量を、ヘッドスペースが生じないように110 mL容スクリー管一杯に採取した。

試験溶液の分析に際しては、測定日毎に標準溶液の測定を行い、内標準物質との面積比から定量した。

詳細は付属資料-5 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。

## 2) 試験環境の測定

暴露期間中、流水式試験装置内の4ヶ所のモニター試験水槽(循環式恒温槽から恒温水が流入する場所に近い水槽 No.11 と No.21、流出する場所に近い水槽 No.1 と No.12 [付属資料-2 (試験装置の略図) 図2 参照] の水温を毎日測定し、全ての試験水槽について、水温、溶存酸素濃度、pHを週1回測定した。暴露開始時と終了時に、試験用水の硬度を測定した。

## 3.8 試験操作

試験は流水式試験装置 [付属資料-2 (試験装置の略図) 参照] を用いて行った。被験物質が揮散性を有していることから、各試験水槽にはフタをして揮散防止を図った。

暴露開始時には、「2 供試生物」で示した方法により採取した受精卵を実体顕微鏡下で観察し、未受精卵および異常な卵を除き、正常な受精卵を用いた。

各試験水槽の試験溶液の水温、溶存酸素濃度、pHを測定後、試験水槽中のふ化容器(50 mmの上下運動を1分間に8回)に受精卵を1容器当たり20個投入し、暴露開始とした。

ふ化直後より、ブラインシュリンプふ化幼生を、ヒメダカの稚魚1尾当たり以下の給餌量になるよう、平日は昼夕2回に分け、休日は昼1回にして与えた。

	ふ化日 ～	1週目 ～	2週目 ～	3週目 ～	4週目～ 30日
ブラインシュリンプふ化幼生給餌量(個体/尾/日)	400	800	1600	3200	5400

## 1) 観察

ふ化と生存に関する観察は 1 日 1 回行い、その数を記録した。死亡した胚、仔稚魚は観察後速やかに取り除いた。残餌の有無などから摂取量の多少を記録した。

胚 : 発生過程において、暴露開始、胚の発眼の有無は毎日、発生異常の有無については 2 日に 1 回観察を行った。発生異常がみられた場合は数とその状態を具体的に記録した。

仔稚魚 : 形態異常と行動異常の有無を毎日観察し、異常がみられた場合はその数と内容を具体的に記録した。

一般的に記載する症例と定義を下記に示す\*。その他特異的症例については、観察された場合に別途具体的にその旨を記載した。

### \*一般的症例と定義

ふ化 : 卵膜によって保護され、自ら泳げるまでに発生を成し遂げた胚が、その卵膜を破って外液に脱出する。

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。

## 2) 各生育段階における観察項目および異常の記録

試験水槽内の 20 個体について、行動（遊泳）異常、あるいは形態異常の個体数を、- (0) , + (1~5) , ++ (6~10) , +++ (11~15) , ++++ (16~20) のランク付けにより記録した。

発育段階	胚	仔魚	稚魚	終了時
観察事項	発生段階 生死	生死 行動 <sup>①</sup> 形態 <sup>②</sup>	生死 行動 <sup>③</sup> 形態 <sup>④</sup> 摂餌量	全長 <sup>⑤</sup> 体重 <sup>⑤</sup> 形態

- ① ふ化直後は水槽の底で停止、壁面で休止、泳ぎ出しの行動をとる。従って、水面近くへの移動行動は異常。
- ② この時期には、背骨の曲がりなどが観察できる。
- ③ 遊泳が正常であるかどうか、摂餌行動が見られるかどうか。
- ④ 外観は成魚に近くなっているので、この時期にはヒレの欠損の有無、形状異常等が観察できる。
- ⑤ 終了時には、試験水槽毎に生存魚の全長、生体重を測定した後、乾燥重量（60℃、24時間）を測定した。

#### 4 結果の算出

以下の方法で算出された、50%死亡濃度（LC<sub>50</sub>）等の結果に、行動や形態観察の結果も含め、最大無影響濃度（NOEC）および最小影響濃度（LOEC）を総合的に判断した。

##### 1) ふ化所要日数

各試験区での観察されたふ化所要日数の平均値を算出し、最大無影響濃度（NOEC）および最小影響濃度（LOEC）を求めた。なお、統計ソフトは StatLight<sup>#04</sup>（Yukms）を用いた。

##### 2) 累積死亡率

胚発生時、全暴露期間については供試個体数（60個）、ふ化稚魚の期間は各試験区のふ化数を基に、各期間に観察された死亡数より累積死亡率（%）を算出した。

##### 3) 50%死亡濃度（LC<sub>50</sub>）

暴露終了時に、試験最高濃度区である 10 mg/L 区においても、ふ化稚魚の累積死亡率が 3.4%であったことからその分析値 11 mg/L 以上とした。

##### 4) 死亡率の最大無影響濃度（NOEC）および最小影響濃度（LOEC）

各濃度区と対照区の死亡率の有意差の有無により最大無影響濃度（NOEC）および最小影響濃度（LOEC）を算出した。統計ソフトは EcoTox ver. 2.2 や StatLight<sup>#04</sup>

(Yukms) を用いた。

#### 5) 暴露終了時の全長・体重

暴露終了時の全ての生存稚魚について、全長ならびに生体重、乾燥体重を測定し、各濃度区と対照区との有意差の有無を統計手法により求めた。統計ソフトは StatLight<sup>#04</sup> (Yukms) を用いた。

#### 6) 摂餌量

ふ化開始 15 日目から 30 日（暴露終了時）まで、給餌の翌日に水槽底面の残った餌量を 4 段階（「無」、「少」、「中」、「多」）で観察した。なお、観察における「無」、「少」、「中」、「多」の 4 段階を 0、1、2、3 に置き換え、各濃度区と対照区との有意差の有無を統計手法により求めた。統計ソフトは StatLight<sup>#04</sup> (Yukms) を用いた。

### 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

##### 1) 暴露期間中の被験物質濃度の変動

(5.3 試験溶液中の被験物質濃度参照)

##### 2) 被験物質濃度の上昇

(5.13 逸脱事項参照)

#### 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一次原液調製時の被験物質調製濃度 1000 mg/L が試験用水に溶解していることを目視により確認した。また、10 分静置した（不溶解分が沈殿）時の分析値は 997、1010、1034 mg/L (n=3) で平均 1014 mg/L であった。

### 5.3 試験溶液中の被験物質濃度

#### 1) 測定結果および平均値の算出方法

暴露開始時、暴露期間中（2回/週）、暴露終了時に、各試験区の被験物質濃度を測定した結果を Table 1 に示した。

被験物質は揮散性が著しく、予備的な検討結果を基に試験装置の密閉化対策を行った。

被験物質の揮散に起因する試験水槽内の日内変動（二次原液の交換直後から翌日の交換までの試験水槽の被験物質濃度減少）はなかったものの、暴露期間中に測定値の平均値  $\pm 20\%$  の幅を超える変動が認められた。この原因は、当該被験物質が揮散性を有するため、一次原液調製から試験水槽まで約  $50\%$  が減少するものの、その揮散程度が日毎の操作に要する時間や、試験装置等の密閉時間により異なってしまうことが考えられた。さらにサンプリングから分析の間における揮散や分析時の誤差もあると考えられた。

本来は、この変動の幅は試験成立条件を満たさないものの、被験物質の揮散性に由来し、これ以上の試験溶液の調製や試験水槽までの装置上の対策も難しいと考え、試験成立と判断した。

以上より、影響濃度を算出する平均値は、揮散が影響した暴露期間中の変動はあったものの試験容器内の日内の濃度減少はないと判断し、流水式試験のため算術平均値を採用した。

#### 2) 異常による濃度変動

暴露 32 日目において、二次原液を希釈する脱塩素水の供給量が低下したことが原因による、被験物質の濃度上昇が認められた。

しかし、最大無影響濃度となる  $2.2 \text{ mg/L}$  区ならびに最小影響濃度の  $4.6 \text{ mg/L}$  区の平均値算出において、32 日目の分析値を入れた場合、入れない場合、それぞれ  $2.61 \text{ mg/L}$ ,  $2.56 \text{ mg/L}$  ならびに  $5.65 \text{ mg/L}$ ,  $5.58 \text{ mg/L}$  となり、影響は小さかった。暴露期間中の平均値の算出は、32 日目の分析値を入れて算出した。

#### 5.4 暴露期間

暴露期間は、対照区のふ化率が 90 %となった日（暴露開始 10 日目）をふ化日とし、暴露開始から 40 日間とした（ふ化後 30 日間）。

#### 5.5 ふ化所要日数

各試験区に供試した胚 60 個について、ふ化が観察された日と、そのふ化数を Table 2 に、累積ふ化数の推移を Figure 1 に示した。

##### 1) 結果

暴露開始 9 日から 10 日の間に 90 %以上のふ化が観察され、対照区の平均ふ化所要日数は 9.6 日であった。対照区を含め、各水槽でふ化が遅れる胚が数個あったが、当施設のヒメダカのふ化において通常観察される現象である。

##### 2) 最大無影響濃度 (NOEC) および最小影響濃度 (LOEC)

0.22 ~10 mg/L 区の平均ふ化所要日数は 9.0 ~ 9.3 日で、対照区の 9.6 日とほぼ同等であり、被験物質による影響はなかったと判断した。なお統計解析は適切と考えられる結果ではなかった。

以上よりふ化所要日数における、最小影響濃度 (LOEC) は 11 mg/L 以上、最大無影響濃度 (NOEC) は 11 mg/L とした。

ふ化所要日数	最小影響濃度 (LOEC) :	> 11 mg/L
	最大無影響濃度 (NOEC) :	11 mg/L

#### 5.6 胚の累積死亡数(率)

各試験区における胚のふ化時の累積死亡数(率)を算出した結果を Table 4、50 %死亡濃度 (LC<sub>50</sub>) を算出した結果を Table 7-(a)、濃度-死亡率のグラフを Figure 3 に示した。

なお、対照区における全供試卵 60 個のふ化数は、58 個（ふ化率 97 %）であった (Table 3)。

##### 1) 50 %死亡濃度 (LC<sub>50</sub>)

試験最高濃度区の 10 mg/L 区（実測濃度 11 mg/L）においても胚の累積死亡率が 1.7 %であったことから、50 %死亡濃度 (LC<sub>50</sub>) は 11 mg/L 以上とした



1～3尾)で、対照区の5.2%(死亡数3尾)に対して、有意差が認められなかった(Table 5)。

10 mg/L区(実測濃度11 mg/L)以下では影響がないと判断し、以下の結論を得た。

ふ化稚魚の累積死亡率 最小影響濃度 (LOEC) : > 11 mg/L  
最大無影響濃度 (NOEC) : 11 mg/L

#### 5.8 全暴露期間の累積死亡数(率)

累積死亡率の推移をFigure 2に、累積死亡数と死亡率を算出した結果をTable 6、50%死亡濃度(LC<sub>50</sub>)を算出した結果をTable 7-(c)、濃度-死亡率のグラフをFigure 3に示した。

なお、対照区においては、供試した60卵の全暴露期間における累積死亡率は8.3%(死亡数は5個体)であった(Table 6)。

##### 1) 50%死亡濃度(LC<sub>50</sub>)

全暴露期間における累積死亡率は、10 mg/L区(実測濃度11 mg/L)においても5.0%(死亡数3個体)で、50%未満であった。

以上の結果より、50%死亡濃度(LC<sub>50</sub>)を以下に示した[Table 7-(c)]。

全暴露期間 50%死亡濃度(LC<sub>50</sub>) : > 11 mg/L

##### 2) 最大無影響濃度(NOEC)および最小影響濃度(LOEC)

試験濃度区における累積死亡率は、10 mg/L区(実測濃度11 mg/L)においても5.0%(死亡数3個体)、0.22～4.6 mg/L区においても3.3～12%(死亡数2～7個体)で、対照区の8.3%(死亡数5個体)に対して、有意差が認められなかった(Table 6)。

10 mg/L区(実測濃度11 mg/L)以下では影響がないと判断し、以下の結論を得た(Table 5)。

全暴露期間の累積死亡率 最小影響濃度 (LOEC) : > 11 mg/L  
最大無影響濃度 (NOEC) : 11 mg/L

## 5.9 暴露終了時の全長・体重

暴露終了時の生存稚魚全てについて、全長ならびに生体重、乾燥体重の調査結果を Table 8 に示した〔測定値は付属資料－4（暴露終了時ヒメダカ成長調査）参照〕。

### 1) 全長

全長の最小影響濃度 (LOEC) は、対照区の  $21.1 \pm 1.2$  mm (平均±標準偏差、 $n=55$ ) に対し、 $20.1 \pm 1.6$  mm ( $n=57$ ) で有意差 ( $p < 0.01$ ) が認められた 4.6 mg/L 区 (実測濃度 5.7 mg/L) と判断した〔Table 8、付属資料－6 (統計解析結果)〕。

平均全長が  $21.0 \pm 1.3$  mm ( $n=57$ ) で、対照区に対して有意差が認められなかった 2.2 mg/L 区 (実測濃度 2.6 mg/L) を最大無影響濃度 (NOEC) と判断し、以下の結論を得た。

全長	最小影響濃度 (LOEC) :	5.7 mg/L
	最大無影響濃度 (NOEC) :	2.6 mg/L

### 2) 生体重

生体重の最小影響濃度 (LOEC) は、対照区の  $100.8 \pm 18.6$  mg (平均±標準偏差、 $n=55$ ) に対し、 $83.1 \pm 15.9$  mg ( $n=57$ ) と被験物質による影響と考えられる 82 %の成長にとどまり、有意差 ( $p < 0.01$ ) が認められた 4.6 mg/L 区 (実測濃度 5.7 mg/L) と判断した〔Table 8、付属資料－6 (統計解析結果)〕。

平均生体重が  $97.7 \pm 19.4$  mg ( $n=57$ ) で、対照区に対して有意差が認められなかった 2.2 mg/L 区 (実測濃度 2.6 mg/L) を最大無影響濃度 (NOEC) と判断し、以下の結論を得た。

生体重	最小影響濃度 (LOEC) :	5.7 mg/L
	最大無影響濃度 (NOEC) :	2.6 mg/L

### 3) 乾燥体重

乾燥体重の最小影響濃度 (LOEC) は、対照区の  $26.9 \pm 6.1$  mg (平均±標準偏差、 $n=55$ ) に対し、 $22.8 \pm 4.7$  mg ( $n=57$ ) で、被験物質による影響と考えられる 85 %の成長にとどまり、有意差 ( $p < 0.01$ ) も認められた 4.6 mg/L 区 (実測濃度 5.7 mg/L) と判断した [Table 8、付属資料-6 (統計解析結果)]。

乾燥体重が  $26.7 \pm 5.5$  mg ( $n=57$ ) で、対照区に対して有意差が認められなかった 2.2 mg/L 区 (実測濃度 2.6 mg/L) を最大無影響濃度 (NOEC) と考え、以下の結論を得た。

乾燥体重	最小影響濃度 (LOEC)	: 5.7 mg/L
	最大無影響濃度 (NOEC)	: 2.6 mg/L

### 5.10 毒性症状 (行動、形態、残餌量における)

暴露期間中における胚の発生段階の形態観察、ふ化直後からの稚魚の行動、形態、暴露終了時における生存魚の実体顕微鏡による形態観察の結果を Table 9 に示した。また、残餌量の観察結果を Figure 4、Table 10 に示した。

#### 1) 胚発生段階の異常

胚の発生時に 2 日に 1 回、実体顕微鏡による胚の発眼の有無および発生異常について観察を行った。

その結果、対照区ならびに試験最高濃度の 10 mg/L (実測濃度 11 mg/L) 区を含む全ての濃度区において、被験物質の影響によると考えられる形態異常は観察されなかった。

胚発生段階の異常	最小影響濃度 (LOEC)	: > 11 mg/L
	最大無影響濃度 (NOEC)	: 11 mg/L

#### 2) 稚魚の行動、形態観察

ふ化直後から暴露終了時まで、稚魚の行動や形態異常の観察を行った。

その結果、対照区ならびに試験最高濃度の 10 mg/L (実測濃度 11 mg/L) 区を含む全ての濃度区で、稚魚の形態および行動には異常は観察されなかったことから以下の結論を得た。

稚魚の行動、形態観察 最小影響濃度 (LOEC) : > 11 mg/L  
最大無影響濃度 (NOEC) : 11 mg/L

### 3) 摂餌量 (残餌量) の観察

摂餌量は、稚魚に与えたブラインシュリンプふ化幼生について、ふ化開始 15 日目から 30 日 (暴露終了時) までの翌日に水槽底面の残った量を、「無」、「少」、「中」、「多」の 4 段階で観察した結果を Figure 4 に示した。

摂餌量の最小影響濃度 (LOEC) は、対照区での残餌量の「少」の発生頻度が 63 %程度に対し、29 %程度で、有意差 ( $p < 0.01$ ) が認められた 10 mg/L 区 (実測濃度 11 mg/L) と判断した [付属資料-6 (統計解析結果)]。

残餌量の「少」の発生頻度が 48 %程度で、対照区に対して有意差が認められなかった 4.6 mg/L 区 (実測濃度 5.7 mg/L) を最大無影響濃度 (NOEC) と考え、以下の結論を得た。

摂餌量の観察 最小影響濃度 (LOEC) : 11 mg/L  
最大無影響濃度 (NOEC) : 5.7 mg/L

### 4) 暴露終了時の形態観察

暴露終了時に、対照区ならびに 0.22~10 mg/L 区の生存稚魚について、各試験区で 5 尾をランダムに選択し実体顕微鏡により観察した結果、全試験区で形態的な異常が観察されなかったことから、以下の結論を得た。

暴露終了時の形態観察 最小影響濃度 (LOEC) : > 11 mg/L  
最大無影響濃度 (NOEC) : 11 mg/L

## 5.11 結論

以上の結果を総合的にまとめ、40 日間の暴露期間 (ふ化後 30 日間) における最小影響濃度 (LOEC) は、体長、体重の測定結果で影響が認められた 4.6 mg/L (実測濃度 5.7 mg/L)、最大無影響濃度 (NOEC) は、全ての評価項目で影響が認められなかった 2.2 mg/L (実測濃度 2.6 mg/L) と判断した。

## 5.12 試験溶液の水温、溶存酸素濃度および pH

暴露期間中の環境測定では、水温について、週に 1 回全ての試験水槽を測定した結果を Table 11-(a)に、毎日、装置内のモニター水槽 [恒温水のそれぞれ 2ヶ所の

出口と入り口。付属資料—2（試験装置の略図）参照〕の水槽を測定した結果を Table 11-(b)に示した。試験溶液の溶存酸素濃度、pHについて週1回測定した結果をそれぞれ、Table 12、Table 13に示した。

1) 水温、溶存酸素濃度（試験成立条件）

暴露期間中の水温は 24.3～25.0℃の範囲内であり、水槽間ならびに連続した日の間で 24℃の設定温度に対して ±1.5℃の範囲内であることから、試験成立条件を満たした。

暴露期間中の溶存酸素濃度は 5.8～8.0 mg/L の範囲内であり、暴露期間を通じて全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℃の飽和溶存酸素濃度：8.25 mg/L）、試験成立条件を満たした。

2) pH

暴露期間中の pH は 7.1～7.6 の範囲内であり、水槽間ならびに連続した日の間で変動は 1.5 以下であった。

以上より、試験環境については問題ない範囲であったと判断した。

### 5.13 逸脱事項

1) 暴露期間中の被験物質濃度の変動

（5.3 試験溶液中の被験物質濃度参照）

2) 被験物質濃度の上昇

暴露 32 日目の朝に、二次原液の希釈に使用される脱塩素水が流水式試験装置上部のクッションタンクより、十分に供給されていないことを試験担当者が発見した。直ちに試験原液の供給ポンプを停止して、2 時間程度脱塩素水のみを流した後通常の供給系に戻した。当日は被験物質の濃度の測定日であったため試料を採取し分析した結果、通常の変動幅よりも高いと考えられる濃度上昇〔顕著であった 10 mg/L 区で 17.7 mg/L。この値を除いた暴露期間中の平均値は 10.7 mg/L〕が確認された。

原因は、施設内の全体の使用量が増えた結果、クッションタンクに供給される脱塩素水量が低下したことが考えられた。

その直後の分析は行っていないものの、前日には供給系の異常はなく、当日の夕方には安定した供給へ戻したことから、少なくとも分析時よりも濃度が上

昇することはなかったと考えられた。

影響濃度を算出する濃度区の平均値に対し大きな変化がなかったこともあり、この上昇した濃度も採用し暴露期間中の平均濃度を算出した。

## 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  
(Flow-through Condition)

Nominal Concentration (mg/L)	Measured Concentration (mg/L) (Percent of Nominal)											
	0 Day 9:30		4 Days 23:00		7 Days 16:00		12 Days 9:30		14 Days 23:30		18 Days 16:00	
Control	<0.003	( - )	<0.003	( - )	<0.003	( - )	<0.003	( - )	<0.003	( - )	<0.003	( - )
0.22	0.234	(106)	0.179	( 81)	0.212	( 96)	0.162	( 74)	0.126	( 57)	0.160	( 73)
0.46	0.513	(112)	0.604	(131)	0.610	(133)	0.398	( 87)	0.365	( 79)	0.369	( 80)
1.0	1.02	(102)	1.31	(131)	1.41	(141)	1.07	(107)	1.10	(110)	1.33	(133)
2.2	1.90	( 86)	2.75	(125)	2.52	(115)	2.95	(134)	3.32	(151)	3.30	(150)
4.6	5.42	(118)	6.71	(146)	5.90	(128)	6.48	(141)	6.46	(140)	6.70	(146)
10	13.6	(136)	10.3	(103)	10.9	(109)	9.11	( 91)	9.70	( 97)	12.9	(129)

Nominal Concentration (mg/L)	Measured Concentration (mg/L) (Percent of Nominal)										Mean <sup>a</sup> Measured Concentration (mg/L)		
	21 Days 9:00		25 Days 23:30		28 Days 16:00		32 Days* 9:00		35 Days 23:30			40 Days 9:00	
Control	<0.003	( - )	<0.003	( - )	<0.003	( - )	<0.003	( - )	<0.003	( - )	<0.003	( - )	-
0.22	0.171	( 78)	0.171	( 78)	0.161	( 73)	0.424	(193)	0.328	(149)	0.178	( 81)	0.209 ( 95)
0.46	0.384	( 83)	0.349	( 76)	0.405	( 88)	0.819	(178)	0.507	(110)	0.327	( 71)	0.471 (102)
1.0	1.28	(128)	0.913	( 91)	1.09	(109)	1.70	(170)	1.44	(144)	1.04	(104)	1.23 (123)
2.2	3.32	(151)	1.24	( 56)	1.77	( 80)	3.16	(144)	2.92	(133)	2.21	(100)	2.61 (119)
4.6	6.73	(146)	3.23	( 70)	3.74	( 81)	6.36	(138)	6.07	(132)	3.98	( 87)	5.65 (123)
10	11.5	(115)	10.1	(101)	10.2	(102)	17.7	(177)	10.2	(102)	9.68	( 97)	11.3 (113)

a : Arithmetic mean

- : Not calculated

\* : The rise of concentration was due to the trouble of dilution water feeding.

This measured concentration is included for calculation of mean measured concentration.

Table 2 The Haching Day

Nominal Concentration (Mean <sup>a</sup> easured Concentration) (mg/L)	Vessel No.	The Haching Day and Numbers								Hatching Day	
		0 - 8	9	10	11	12	13	14	15 - 23	Mean (S. D.)	Beginning to End
Control ( - )	1	0	8	11	0	1	0	0	0	9.6 (0.8)	9 - 12
	2	0	8	7	1	2	0	0	0		
	3	0	13	7	0	0	0	0	0		
0.22 (0.209)	1	0	15	4	1	0	0	0	0	9.2 (0.5)	9 - 11
	2	0	17	3	0	0	0	0	0		
	3	0	15	5	0	0	0	0	0		
0.46 (0.471)	1	0	14	6	0	0	0	0	0	9.3 (0.5)	9 - 11
	2	0	17	2	1	0	0	0	0		
	3	0	15	5	0	0	0	0	0		
1.0 (1.23)	1	0	13	3	1	0	1	0	0	9.2 (0.7)	9 - 13
	2	0	18	2	0	0	0	0	0		
	3	0	16	2	0	0	0	0	0		
2.2 (2.61)	1	0	19	1	0	0	0	0	0	9.0 (0.2)	9 - 10
	2	0	19	0	0	0	0	0	0		
	3	0	18	1	0	0	0	0	0		
4.6 (5.65)	1	0	15	5	0	0	0	0	0	9.2 (0.5)	9 - 12
	2	0	15	4	0	0	0	0	0		
	3	0	16	2	0	1	0	0	0		
10 (11.3)	1	0	14	4	0	0	1	1	0	9.3 (1.0)	9 - 14
	2	0	20	0	0	0	0	0	0		
	3	0	15	3	0	0	1	0	0		

a : Arithmetic mean  
 - : Not calculated  
 S. D. : Standard deviation

Table 3 Observed Number of Hatching Success and Post-hatch Success

Nominal Concentration (Mean <sup>a</sup> Measured Concentration) (mg/L)	Vessel No.	Applied Embryos	Hatching Success		Post-hatch Success	
			Number	(Percent) * <sup>1</sup>	Number	(Percent) * <sup>2</sup>
Control ( - )	1	20	20	(100)	19	( 95)
	2	20	18	( 90)	17	( 94)
	3	20	20	(100)	19	( 95)
	Total	60	58	( 97)	55	( 95) <sup>*3</sup>
0.22 (0.209)	1	20	20	(100)	18	( 90)
	2	20	20	(100)	20	(100)
	3	20	20	(100)	19	( 95)
	Total	60	60	(100)	57	( 95)
0.46 (0.471)	1	20	20	(100)	20	(100)
	2	20	20	(100)	19	( 95)
	3	20	20	(100)	19	( 95)
	Total	60	60	(100)	58	( 97)
1.0 (1.23)	1	20	18	( 90)	16	( 89)
	2	20	20	(100)	19	( 95)
	3	20	18	( 90)	18	(100)
	Total	60	56	( 93)	53	( 95)
2.2 (2.61)	1	20	20	(100)	19	( 95)
	2	20	19	( 95)	19	(100)
	3	20	19	( 95)	19	(100)
	Total	60	58	( 97)	57	( 98)
4.6 (5.65)	1	20	20	(100)	20	(100)
	2	20	19	( 95)	18	( 95)
	3	20	19	( 95)	19	(100)
	Total	60	58	( 97)	57	( 98)
10 (11.3)	1	20	20	(100)	20	(100)
	2	20	20	(100)	19	( 95)
	3	20	19	( 95)	18	( 95)
	Total	60	59	( 98)	57	( 97)

a : Arithmetic mean

- : Not calculated

\*1 : Percent of applied embryos

\*2 : Percent of hatching success fish

\*3 : Survival criterion (Post-hatch success : more than 80 %)

Table 4 Cumulative Mortality of Embryos

Nominal Concentration (Mean <sup>a</sup> Measured Concentration) (mg/L)	Vessel No.	Applied Embryos	Cumulative Mortality		Cumulative Percent Mortality	
			Number	Mean (S. D.)	Percent	Mean (S. D.)
Control ( - )	1	20	0	0.7 (1.2)	0	3.3 (5.8)
	2	20	2		10	
	3	20	0		0	
	Total	60	2	-	-	-
0.22 (0.209)	1	20	0	0.0 (0.0)	0	0.0 <sup>N.S.</sup> (0.0)
	2	20	0		0	
	3	20	0		0	
	Total	60	0	-	-	-
0.46 (0.471)	1	20	0	0.0 (0.0)	0	0.0 <sup>N.S.</sup> (0.0)
	2	20	0		0	
	3	20	0		0	
	Total	60	0	-	-	-
1.0 (1.23)	1	20	2	1.3 (1.2)	10	6.7 <sup>N.S.</sup> (5.8)
	2	20	0		0	
	3	20	2		10	
	Total	60	4	-	-	-
2.2 (2.61)	1	20	0	0.7 (0.6)	0	3.3 <sup>N.S.</sup> (2.9)
	2	20	1		5	
	3	20	1		5	
	Total	60	2	-	-	-
4.6 (5.65)	1	20	0	0.7 (0.6)	0	3.3 <sup>N.S.</sup> (2.9)
	2	20	1		5	
	3	20	1		5	
	Total	60	2	-	-	-
10 (11.3)	1	20	0	0.3 (0.6)	0	1.7 <sup>N.S.</sup> (2.9)
	2	20	0		0	
	3	20	1		5	
	Total	60	1	-	-	-

a : Arithmetic mean

- : Not calculated

S.D. : Standard deviation

N.S. : Not significant difference ( $p > 0.05$ ) by Dunnett's multicomparison test

Table 5 Cumulative Mortality of Fish after Hatching

Nominal Concentration (Mean <sup>a</sup> Measured Concentration) (mg/L)	Vessel No.	Hatched Embryos	Cumulative Mortality		Cumulative Percent Mortality	
			Number	Mean (S. D.)	Percent	Mean (S. D.)
Control ( - )	1	20	1	1.0	5.0	5.2
	2	18	1	(0.0)	5.6	(0.3)
	3	20	1		5.0	
	Total	58	3	-	-	-
0.22 (0.209)	1	20	2	1.0	10.0	5.0 <sup>N.S.</sup>
	2	20	0	(1.0)	0.0	(5.0)
	3	20	1		5.0	
	Total	60	3	-	-	-
0.46 (0.471)	1	20	0	0.7	0.0	3.3 <sup>N.S.</sup>
	2	20	1	(0.6)	5.0	(2.9)
	3	20	1		5.0	
	Total	60	2	-	-	-
1.0 (1.23)	1	18	2	1.0	11.1	5.4 <sup>N.S.</sup>
	2	20	1	(1.0)	5.0	(5.6)
	3	18	0		0.0	
	Total	56	3	-	-	-
2.2 (2.61)	1	20	1	0.3	5.0	1.7 <sup>N.S.</sup>
	2	19	0	(0.6)	0.0	(2.9)
	3	19	0		0.0	
	Total	58	1	-	-	-
4.6 (5.65)	1	20	0	0.3	0.0	1.8 <sup>N.S.</sup>
	2	19	1	(0.6)	5.3	(3.1)
	3	19	0		0.0	
	Total	58	1	-	-	-
10 (11.3)	1	20	0	0.7	0.0	3.4 <sup>N.S.</sup>
	2	20	1	(0.6)	5.0	(3.0)
	3	19	1		5.3	
	Total	59	2	-	-	-

a : Arithmetic mean

- : Not calculated

S.D. : Standard deviation

N.S. : Not significant difference ( $p > 0.05$ ) by Dunnett's multicomparison test

Table 6 Cumulative Mortality of Overall Period (Embryos and Fish)

Nominal Concentration (Mean <sup>a</sup> Measured Concentration) (mg/L)	Vessel No.	Applied Embryos	Cumulative Mortality		Cumulative Percent Mortality	
			Number	Mean (S. D.)	Percent	Mean (S. D.)
Control ( - )	1	20	1	1.7 (1.2)	5	8.3 (5.8)
	2	20	3		15	
	3	20	1		5	
	Total	60	5	-	-	-
0.22 (0.209)	1	20	2	1.0 (1.0)	10	5.0 <sup>N.S.</sup> (5.0)
	2	20	0		0	
	3	20	1		5	
	Total	60	3	-	-	-
0.46 (0.471)	1	20	0	0.7 (0.6)	0	3.3 <sup>N.S.</sup> (2.9)
	2	20	1		5	
	3	20	1		5	
	Total	60	2	-	-	-
1.0 (1.23)	1	20	4	2.3 (1.5)	20	11.7 <sup>N.S.</sup> (7.6)
	2	20	1		5	
	3	20	2		10	
	Total	60	7	-	-	-
2.2 (2.61)	1	20	1	1.0 (0.0)	5	5.0 <sup>N.S.</sup> (0.0)
	2	20	1		5	
	3	20	1		5	
	Total	60	3	-	-	-
4.6 (5.65)	1	20	0	1.0 (1.0)	0	5.0 <sup>N.S.</sup> (5.0)
	2	20	2		10	
	3	20	1		5	
	Total	60	3	-	-	-
10 (11.3)	1	20	0	1.0 (1.0)	0	5.0 <sup>N.S.</sup> (5.0)
	2	20	1		5	
	3	20	2		10	
	Total	60	3	-	-	-

a : Arithmetic mean

- : Not calculated

S.D. : Standard deviation

N.S. : Not significant difference ( $p > 0.05$ ) by Dunnett's multicomparison test

Table 7 LC<sub>50</sub> value

(a) Embryonic Development Stage (Before Hatching)

Exposure Period (Day)	LC <sub>50</sub> (mg/L)	95 % Confidence Limit (mg/L)	Statistic Method
Almost 10	> 11	-	-

(b) Larval and Juvenile Stages (After Hatching)

Exposure Period (Day)	LC <sub>50</sub> (mg/L)	95 % Confidence Limit (mg/L)	Statistic Method
10 to 40	> 11	-	-

(c) Overall Period (Embryo and Fish)

Exposure Period (Day)	LC <sub>50</sub> (mg/L)	95 % Confidence Limit (mg/L)	Statistic Method
40	> 11	-	-

- : Not applicable or not calculated

Table 8 Total Length and Weight of Tested Fish at the End of the Test

Nominal Concentration (Mean <sup>a</sup> Measured Concentration) (mg/L)	Vessel No.	Number of Fish	Total Length (mm)			Fresh Weight (mg)			Dry Weight (mg)		
			Mean (S. D.)		Percent of Control	Mean (S. D.)		Percent of Control	Mean (S. D.)		Percent of Control
			Every Vessel	Total		Every Vessel	Total		Every Vessel	Total	
Control (-)	1	19	21.3 (1.4)	21.1 (1.2)	100	102.4 (22.0)	100.8 (18.6)	100	26.9 (6.9)	26.9 (6.1)	100
	2	17	20.9 (1.4)			96.0 (19.5)			25.4 (7.1)		
	3	19	21.2 (0.8)			103.4 (13.6)			28.2 (3.6)		
0.22 (0.209)	1	18	21.4 (1.1)	21.3 (1.5)	101	102.0 (17.7)	102.1 (20.4)	101	27.1 (5.2)	27.1 (5.8)	101
	2	20	21.6 (1.3)			107.1 (19.8)			28.6 (5.5)		
	3	19	20.8 (1.7)			96.9 (23.1)			25.6 (6.5)		
0.46 (0.471)	1	20	21.1 (1.4)	21.4 (1.1)	101	102.9 (19.5)	105.0 (16.0)	104	27.6 (5.3)	28.2 (4.5)	105
	2	19	21.2 (0.8)			100.2 (11.3)			27.0 (3.3)		
	3	19	21.8 (0.9)			112.0 (14.2)			30.1 (4.0)		
1.0 (1.23)	1	16	20.6 (2.5)	21.1 (1.8)	100	97.9 (26.6)	101.6 (22.7)	101	27.1 (7.9)	27.9 (6.7)	104
	2	19	21.3 (1.4)			104.4 (20.0)			28.2 (5.9)		
	3	18	21.2 (1.5)			102.1 (22.6)			28.3 (6.8)		
2.2 (2.61)	1	19	21.5 (1.3)	21.0 (1.3)	100	105.7 (22.0)	97.7 (19.4)	97	28.4 (6.0)	26.7 (5.5)	99
	2	19	21.4 (0.7)			100.6 (12.5)			28.2 (3.9)		
	3	19	20.2 (1.4)			86.9 (18.2)			23.6 (5.2)		
4.6 (5.65)	1	20	19.7 (2.5)	20.1** (1.6)	95	79.4 (21.1)	83.1** (15.9)	82	21.8 (6.3)	22.8** (4.7)	85
	2	18	20.1 (1.0)			80.3 (11.4)			22.2 (3.5)		
	3	19	20.6 (0.8)			89.9 (11.0)			24.5 (3.3)		
10 (11.3)	1	20	18.7 (0.8)	19.2** (1.2)	91	62.1 (9.7)	67.5** (12.8)	67	16.4 (3.0)	17.9** (3.8)	67
	2	19	19.1 (1.4)			68.9 (13.4)			18.1 (4.2)		
	3	18	19.7 (1.2)			72.0 (13.7)			19.4 (3.7)		

- : Not calculated

a : Arithmetic mean

S. D. : Standard deviation

\*\* : Significant difference (p<0.01) to the control by Dunnett's multicomparison test

Table 9 Observed Toxic Symptoms

Nominal Concentration (Mean <sup>a</sup> Measured Concentration) (mg/L)	Observation Time and Symptoms		
	Stage of Embryonic Development	Larval and Juvenile Stages	End of the Test
	Microscopic Morphological Observation	Appearance, Behavior	Microscopic Morphological Observation
Control ( - )	N	N	N
0.22 (0.209)	N	N	N
0.46 (0.471)	N	N	N
1.0 (1.23)	N	N	N
2.2 (2.61)	N	N	N
4.6 (5.65)	N	N	N
10 (11.3)	N	N	N

- : Not calculated  
 a : Arithmetic mean  
 N : No toxic symptom was observed

Table 10 Observation of Remaining of Feeding

Nominal Concentration (Mean Measured Concentration) (mg/L)	Vessel No.	Mean of Score <sup>a</sup> (S.D.)	
		Every Vessel	Total
Control ( - )	1	1.4 (0.5)	1.4 (0.5)
	2	1.4 (0.5)	
	3	1.3 (0.5)	
0.22 (0.209)	1	1.3 (0.5)	1.4 <sup>N.S.</sup> (0.5)
	2	1.4 (0.5)	
	3	1.4 (0.5)	
0.46 (0.471)	1	1.4 (0.5)	1.4 <sup>N.S.</sup> (0.3)
	2	1.4 (0.5)	
	3	1.4 (0.5)	
1.0 (1.23)	1	1.4 (0.5)	1.4 <sup>N.S.</sup> (0.4)
	2	1.4 (0.5)	
	3	1.4 (0.5)	
2.2 (2.61)	1	1.3 (0.5)	1.4 <sup>N.S.</sup> (0.6)
	2	1.5 (0.5)	
	3	1.5 (0.5)	
4.6 (5.65)	1	1.6 (0.6)	1.6 <sup>N.S.</sup> (0.6)
	2	1.6 (0.6)	
	3	1.6 (0.6)	
10 (11.3)	1	1.8 (0.5)	1.8 <sup>**</sup> (0.6)
	2	1.8 (0.6)	
	3	1.8 (0.6)	

a : Arithmetic mean of score of remaining of feeding

0; no remaining

1; little remaining

2; middle remaining

3; much remaining

S.D.: Standard deviation

\*\* : Significant difference ( $p < 0.01$ ) to the control by Dunnett's multicomparison test

N.S.: Not significant difference by Dunnett's multicomparison test

Table 11 Water Temperature  
(a) Every Vessel of Once Weekly  
(Flow-through Condition)

Nominal Concentration (Mean <sup>a</sup> Measured Concentration) (mg/L)	No.	Vessel No.	Water Temperature °C						
			0 Day	8 Days	15 Days	22 Days	29 Days	36 Days	40 Days
Control ( - )	1	1	24.6	24.7	24.6	24.6	24.6	24.8	24.5
	2	11	24.6	24.7	24.6	24.6	24.6	24.8	24.5
	3	12	24.8	24.7	24.6	24.6	24.7	24.8	24.6
0.22 (0.209)	1	2	24.7	24.7	24.6	24.6	24.6	24.8	24.5
	2	3	24.7	24.7	24.6	24.6	24.6	24.8	24.5
	3	4	24.7	24.7	24.6	24.7	24.6	24.8	24.5
0.46 (0.471)	1	5	24.7	24.7	24.6	24.7	24.6	24.8	24.5
	2	6	24.7	24.7	24.6	24.7	24.6	24.8	24.5
	3	7	24.7	24.7	24.6	24.6	24.6	24.8	24.5
1.0 (1.23)	1	8	24.7	24.7	24.6	24.6	24.6	24.8	24.5
	2	9	24.7	24.7	24.6	24.6	24.6	24.8	24.5
	3	10	24.7	24.7	24.6	24.6	24.6	24.8	24.5
2.2 (2.61)	1	13	24.8	24.7	24.6	24.7	24.7	24.8	24.6
	2	14	24.8	24.7	24.6	24.7	24.7	24.9	24.6
	3	15	24.8	24.8	24.6	24.8	24.7	24.9	24.6
4.6 (5.65)	1	16	24.8	24.8	24.7	24.8	24.7	24.9	24.6
	2	17	24.8	24.8	24.7	24.8	24.7	24.9	24.6
	3	18	24.8	24.8	24.7	24.8	24.7	24.9	24.6
10 (11.3)	1	19	24.8	24.8	24.8	24.8	24.7	24.9	24.6
	2	20	24.8	24.8	24.8	24.8	24.7	24.9	24.6
	3	21	24.8	24.8	24.8	24.8	24.8	24.9	24.7

- : Not calculated  
a : Arithmetic mean

(b) Every Day of Monitored Vessels (Water Temperature)  
(Flow-through Condition)

Vessels near Circulation Water on the ELS Device	Vessel No.	Day and Water Temperature °C										
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Near Water Intake 1	11	24.6	24.6	24.6	24.6	24.8	24.7	24.6	24.6	24.7	24.5	24.4
Near Water Outlet 1	1	24.6	24.6	24.6	24.4	24.7	24.7	24.6	24.6	24.7	24.5	24.4
Near Water Intake 2	21	24.8	24.8	24.8	24.7	24.9	24.8	24.7	24.6	24.8	24.6	24.6
Near Water Outlet 2	12	24.8	24.6	24.7	24.6	24.8	24.7	24.6	24.6	24.7	24.6	24.4
Vessels near Circulation Water on the ELS Device	Vessel No.	Day and Water Temperature °C										
		11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
Near Water Intake 1	11	24.6	24.5	24.6	24.4	24.6	24.6	24.6	24.6	24.6	24.8	24.7
Near Water Outlet 1	1	24.6	24.4	24.6	24.4	24.6	24.6	24.6	24.6	24.5	24.8	24.6
Near Water Intake 2	21	24.7	24.6	24.7	24.6	24.8	24.7	24.8	24.8	24.7	25.0	24.8
Near Water Outlet 2	12	24.6	24.5	24.6	23.4	24.6	24.6	24.7	24.7	24.6	24.8	24.6
Vessels near Circulation Water on the ELS Device	Vessel No.	Day and Water Temperature °C										
		22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32
Near Water Intake 1	11	24.6	24.6	24.6	24.6	24.6	24.6	24.6	24.6	24.4	24.6	24.6
Near Water Outlet 1	1	24.6	24.6	24.6	24.6	24.5	24.5	24.6	24.6	24.6	24.6	24.6
Near Water Intake 2	21	24.8	24.8	24.7	24.8	24.7	24.8	24.8	24.8	24.4	24.8	24.7
Near Water Outlet 2	12	24.6	24.6	24.6	24.6	24.6	24.6	24.7	24.7	24.4	24.7	24.6
Vessels near Circulation Water on the ELS Device	Vessel No.	Day and Water Temperature °C										
		33	34	35	36	37	38	39	40			
Near Water Intake 1	11	24.6	24.5	24.6	24.8	24.5	24.4	24.4	24.5			
Near Water Outlet 1	1	24.6	24.5	24.6	24.8	24.4	24.4	24.3	24.5			
Near Water Intake 2	21	24.8	24.6	24.7	24.9	24.6	24.6	24.6	24.7			
Near Water Outlet 2	12	24.7	24.6	24.6	24.8	24.5	24.5	24.4	24.6			

Table 12 Dissolved Oxygen Concentration  
(Flow-through Condition)

Nominal Concentration (Mean <sup>a</sup> Measured Concentration) (mg/L)	No.	Vessel No.	Dissolved Oxygen Concentration mg/L						
			0 Day	8 Days	15 Days	22 Days	29 Days	36 Days	40 Days
Control ( - )	1	1	8.0	7.8	7.7	7.2	6.9	6.3	6.5
	2	11	7.9	7.9	7.7	6.9	6.9	6.4	6.4
	3	12	7.9	7.7	7.5	7.2	6.9	6.4	6.4
0.22 (0.209)	1	2	8.0	7.6	7.5	7.0	7.0	6.4	6.6
	2	3	7.9	7.8	7.5	7.0	6.9	6.3	6.1
	3	4	7.9	7.7	7.5	7.0	7.0	6.4	6.4
0.46 (0.471)	1	5	7.8	7.7	7.6	7.0	6.9	6.4	6.2
	2	6	7.8	7.8	7.6	7.1	6.8	6.3	6.3
	3	7	7.9	7.7	7.6	7.2	7.0	6.0	6.5
1.0 (1.23)	1	8	7.9	7.7	7.6	6.9	6.9	5.8	6.4
	2	9	7.8	7.6	7.6	7.1	6.8	6.0	6.0
	3	10	7.9	7.6	7.5	7.1	6.8	6.1	6.3
2.2 (2.61)	1	13	7.8	7.7	7.5	7.0	6.8	6.2	6.4
	2	14	7.9	7.7	7.6	7.0	6.9	6.2	6.3
	3	15	7.9	7.6	7.5	6.9	6.7	6.2	6.3
4.6 (5.65)	1	16	7.8	7.6	7.5	6.9	6.7	6.0	5.8
	2	17	7.8	7.7	7.5	7.0	6.8	6.0	6.0
	3	18	7.8	7.7	7.4	7.1	6.8	5.9	5.8
10 (11.3)	1	19	7.8	7.7	7.5	6.9	6.8	5.9	6.1
	2	20	7.8	7.6	7.4	7.1	6.7	6.0	6.1
	3	21	7.8	7.6	7.4	6.9	6.8	5.9	6.0

— : Not calculated  
a : Arithmetic mean

Table 13 pH  
(Flow-through Condition)

Nominal Concentration (Mean <sup>a</sup> Measured Concentration) (mg/L)	No.	Vessel No.	pH						
			0 Day	8 Days	15 Days	22 Days	29 Days	36 Days	40 Days
Control ( - )	1	1	7.5	7.6	7.3	7.1	7.1	7.1	7.2
	2	11	7.5	7.5	7.4	7.1	7.1	7.1	7.3
	3	12	7.5	7.6	7.3	7.1	7.1	7.1	7.3
0.22 (0.209)	1	2	7.5	7.6	7.3	7.2	7.1	7.1	7.3
	2	3	7.5	7.5	7.3	7.1	7.1	7.1	7.3
	3	4	7.5	7.6	7.3	7.2	7.2	7.1	7.3
0.46 (0.471)	1	5	7.5	7.5	7.3	7.1	7.2	7.1	7.3
	2	6	7.5	7.6	7.3	7.1	7.1	7.1	7.3
	3	7	7.5	7.6	7.4	7.2	7.1	7.1	7.3
1.0 (1.23)	1	8	7.5	7.6	7.3	7.1	7.1	7.1	7.3
	2	9	7.5	7.6	7.3	7.2	7.1	7.1	7.3
	3	10	7.5	7.6	7.4	7.2	7.1	7.1	7.3
2.2 (2.61)	1	13	7.5	7.6	7.4	7.1	7.1	7.2	7.3
	2	14	7.5	7.6	7.3	7.1	7.1	7.1	7.3
	3	15	7.5	7.6	7.3	7.1	7.1	7.2	7.3
4.6 (5.65)	1	16	7.5	7.6	7.3	7.1	7.1	7.1	7.2
	2	17	7.5	7.6	7.3	7.1	7.1	7.1	7.3
	3	18	7.5	7.6	7.3	7.1	7.1	7.1	7.2
10 (11.3)	1	19	7.5	7.6	7.3	7.1	7.1	7.1	7.3
	2	20	7.5	7.6	7.3	7.1	7.1	7.1	7.3
	3	21	7.5	7.6	7.3	7.1	7.1	7.1	7.3

— : Not calculated

a : Arithmetic mean

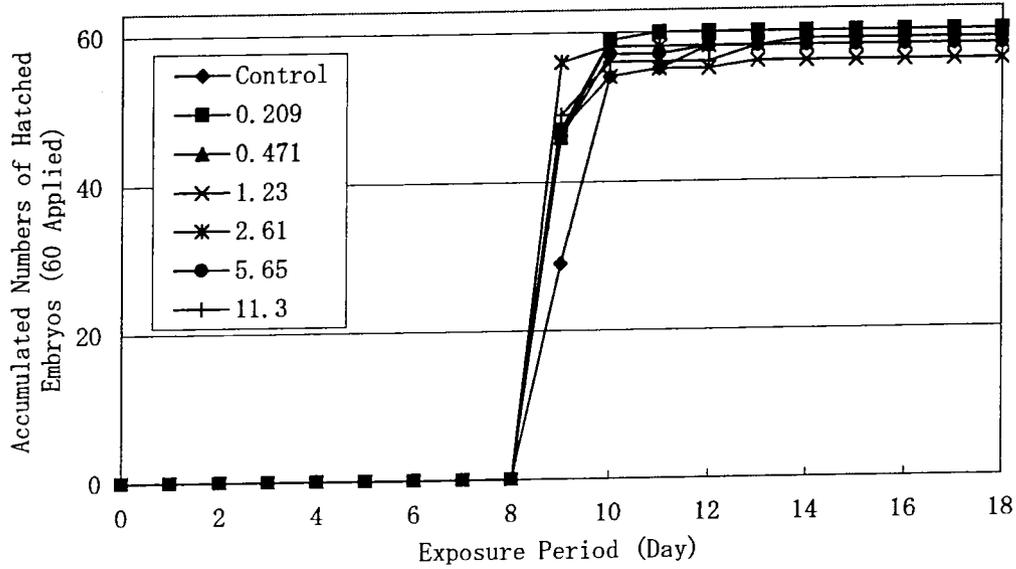


Figure 1 Accumulated Numbers of Hatched Embryos

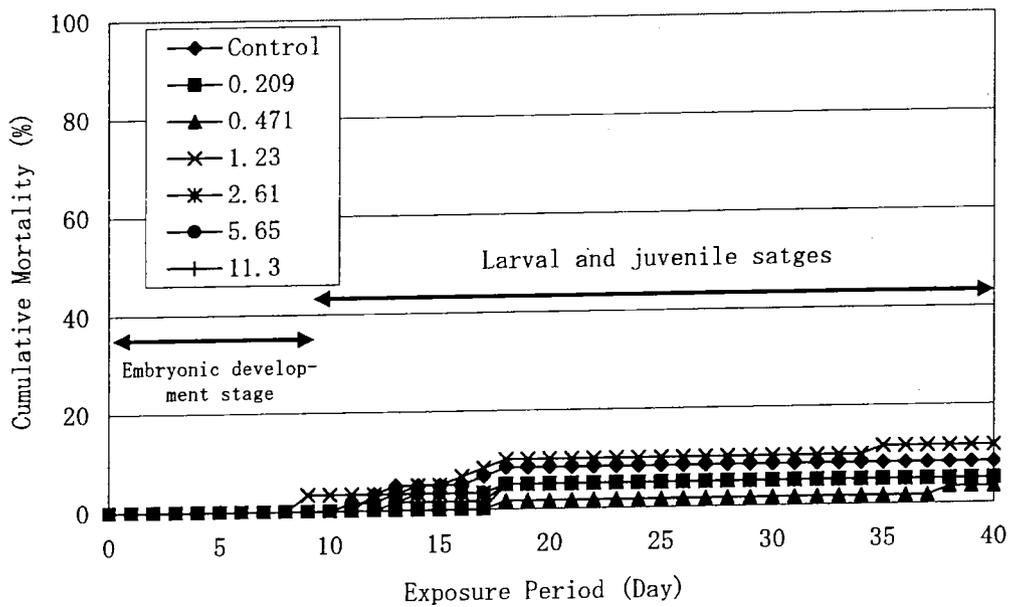


Figure 2 Cumulative Mortality of Overall Period (Embryo and Fish)

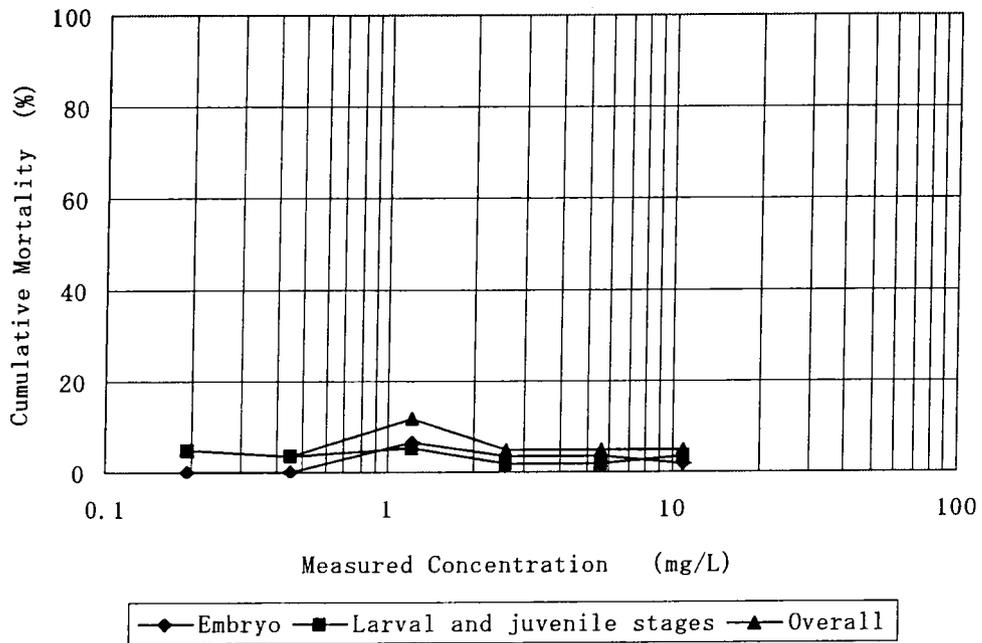


Figure 3 Concentration-Response (Mortality) Curve

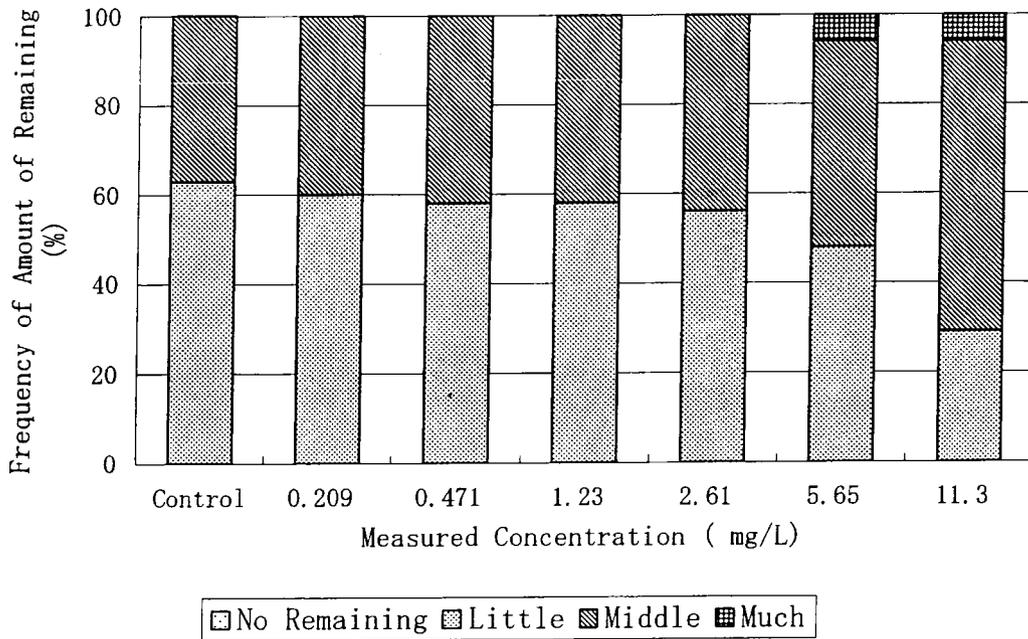


Figure 4 Observation of Remaining of Feeding (15-30 day after hatching)

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	1.0 mg/L
Total phosphorus	<0.003 mg/L
pH	7.4 (23.7 °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	0.03 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	0.06 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	91 mg/L
Electric conductivity	10.2 mS/m
Total hardness (as CaCO <sub>3</sub> )	33 mg/L
Alkalinity	29 mg/L
Sodium	5.5 mg/L
Potassium	1.5 mg/L
Calcium	10.0 mg/L
Magnesium	2.1 mg/L

Date of measurement: Aug. 29, 2007

## 付属資料－２

流水式試験装置の略図

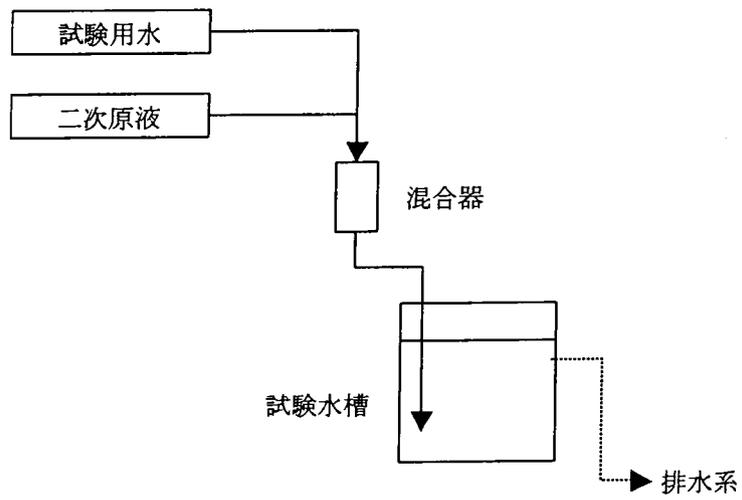


図 1. 流水式試験装置における試験溶液の流れ

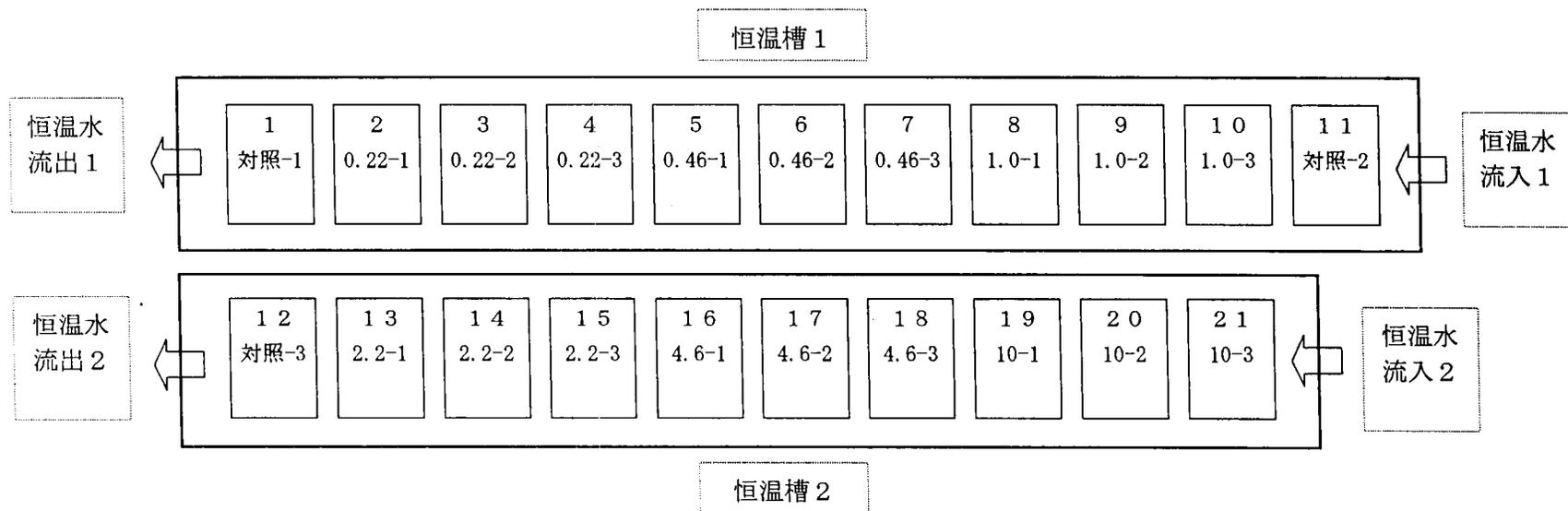


図 2. 流水式試験装置の水槽番号と試験濃度区の配置

## 付属資料－ 3

予備試験の結果

Table B-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 new	24 Hours old	72 Hours new	96 Hours old
Control	<0.003 ( - )	<0.003 ( - )	<0.003 ( - )	<0.003 ( - )
1.0	1.08 (108)	0.750 ( 75)	1.00 (100)	0.799 ( 80)
3.2	1.68 ( 53)	0.753 ( 24)	0.317* ( 10)	1.86 ( 58)
10	7.81 ( 78)	2.73 ( 27)	4.49 ( 45)	4.25 ( 43)

\* : Considered to be analytical mistake

Table B-2 The Numbers of Dead Fish (Mortality)  
(Range Finding Test)

Nominal Concentration (mg/L)	(Semi-Static Condition)			
	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)
1.0	0/10 ( 0)	0/10 ( 0)	0/10 ( 0)	0/10 ( 0)
3.2	0/10 ( 0)	0/10 ( 0)	0/10 ( 0)	0/10 ( 0)
10	0/10 ( 0)	0/10 ( 0)	0/10 ( 0)	0/10 ( 0)

Table B-3 Observed Toxic Symptoms  
(Range Finding Test)

Nominal Concentration (mg/L)	(Semi-Static Condition)			
	Observed Toxic Symptom			
	24 Hours	48 Hours	72 Hours	96 hours
Control	N	N	N	N
1.0	N	N	N	N
3.2	N	N	N	N
10	N	N	N	N

N : No toxic symptoms was observed

## 付属資料－４

暴露終了時ヒメダカ成長調査  
(全長、生体重、乾燥体重の個体値)

1) 全長測定値 (mm)

水槽	魚数	試験区 (mg/L)						
		対照区	0.22	0.46	1.0	2.2	4.6	10
1	1	23.3	22.1	15.5	21.8	20.9	10.3	18.7
	2	21.9	21.5	22.0	21.0	22.4	19.7	17.5
	3	21.9	21.0	22.1	23.0	21.6	20.1	17.9
	4	23.1	19.9	21.4	20.7	22.9	20.0	18.8
	5	22.0	21.5	22.3	22.1	22.6	20.8	18.9
	6	18.0	19.3	21.1	20.8	18.9	20.0	19.6
	7	21.6	21.9	21.0	21.5	21.2	20.0	18.9
	8	21.1	21.5	21.1	21.2	19.9	21.7	19.4
	9	22.9	22.3	20.3	19.7	22.0	17.6	17.7
	10	19.3	22.8	20.6	20.6	20.7	20.3	19.4
	11	21.1	21.8	20.6	21.3	20.2	20.4	19.1
	12	21.6	21.2	22.2	15.6	21.8	20.8	18.9
	13	21.2	22.4	20.7	21.3	21.0	18.4	19.5
	14	18.6	22.2	21.9	23.0	20.1	20.7	18.7
	15	21.8	22.3	21.6	22.5	20.7	21.3	19.1
	16	20.1	21.8	21.6	13.9	22.3	20.2	17.8
	17	21.7	18.5	21.1	—	20.9	20.7	19.9
	18	20.6	20.5	21.4	—	23.7	19.6	18.4
	19	22.5	—	22.0	—	23.9	18.9	16.8
	20	—	—	21.3	—	—	22.3	19.0
2	1	17.6	20.9	21.8	22.5	22.4	19.8	18.5
	2	21.5	24.1	21.9	20.4	20.0	21.3	20.0
	3	20.2	22.8	22.2	21.4	21.7	20.3	20.2
	4	23.3	21.7	20.0	20.1	21.8	20.2	15.0
	5	21.7	23.1	21.6	21.8	21.6	17.4	21.0
	6	21.6	23.0	20.2	23.0	22.3	19.7	18.7
	7	19.8	22.3	20.2	21.6	21.0	21.3	20.2
	8	20.2	21.6	21.6	21.7	21.4	20.4	18.6
	9	22.6	20.7	21.0	21.8	20.9	21.3	18.4
	10	22.3	20.6	21.4	21.2	21.8	18.6	19.7
	11	21.2	18.6	21.7	18.6	21.1	20.5	19.5
	12	21.0	22.0	21.7	22.2	21.7	20.7	19.6
	13	21.3	21.4	20.9	22.5	20.6	19.6	20.0
	14	20.7	22.3	20.8	22.2	22.3	20.0	17.5
	15	21.3	22.2	20.9	20.4	21.1	19.5	19.6
	16	18.6	22.2	20.7	23.5	20.3	20.2	19.5
	17	19.7	21.4	22.7	19.7	22.2	20.3	20.5
	18	—	19.5	21.7	18.6	20.7	20.2	19.3
	19	—	19.6	20.2	21.8	20.8	—	17.9
	20	—	22.5	—	—	—	—	—
3	1	20.4	22.4	21.4	16.0	20.4	20.7	19.6
	2	20.6	22.0	24.2	22.0	22.2	20.4	17.7
	3	21.7	20.6	21.7	21.3	21.4	20.0	21.5
	4	22.3	21.4	21.3	22.3	19.9	21.1	20.7
	5	22.4	21.6	21.7	21.6	19.8	21.1	21.3
	6	20.9	15.7	21.8	22.3	21.7	21.4	19.8
	7	20.9	21.3	22.3	22.5	21.3	18.5	19.9
	8	20.3	18.6	22.1	22.4	21.8	20.5	18.0
	9	21.4	22.0	21.4	21.0	16.7	20.5	20.3
	10	21.6	19.5	22.7	21.5	19.2	21.4	20.4
	11	21.9	22.0	20.6	21.1	20.6	20.4	19.8
	12	20.3	22.1	20.8	21.0	21.1	21.8	21.5
	13	20.8	21.3	21.4	19.9	19.3	22.1	19.9
	14	22.0	20.5	23.0	22.8	18.1	20.4	18.5
	15	22.2	20.8	20.9	20.1	20.8	20.3	18.9
	16	20.0	18.0	21.1	22.1	19.7	20.9	18.7
	17	21.0	21.0	22.5	20.6	20.0	20.7	20.8
	18	20.6	22.0	21.7	21.5	20.0	19.8	17.9
	19	21.7	22.2	20.7	—	19.2	19.3	—
	20	—	—	—	—	—	—	—

— : 死亡

2) 生体重測定値 (mg/尾)

水槽	魚数	試験区 (mg/L)						
		对照区	0.22	0.46	1.0	2.2	4.6	10
1	1	110.8	111.9	33.7	113.8	109.5	11.1	54.7
	2	109.6	108.2	114.3	105.2	120.7	76.9	54.8
	3	123.1	99.8	117.1	133.2	105.1	88.7	46.7
	4	138.2	73.9	102.2	99.3	119.3	79.2	66.2
	5	91.2	107.7	124.2	111.3	111.1	81.5	58.9
	6	55.4	68.8	104.1	109.8	65.8	71.6	77.9
	7	104.5	105.5	108.6	106.4	107.9	71.5	68.4
	8	106.9	105.6	109.7	79.2	78.4	106.7	76.5
	9	113.0	114.5	90.4	76.3	119.7	51.6	53.2
	10	73.7	117.5	88.6	86.9	103.8	80.9	68.8
	11	106.5	105.8	92.1	101.6	85.4	94.8	74.5
	12	107.1	98.6	118.0	75.6	130.8	96.4	60.7
	13	99.8	121.4	88.9	106.1	84.5	61.7	73.3
	14	59.4	111.4	114.2	133.0	88.5	95.3	59.9
	15	113.0	116.3	109.9	107.0	86.2	102.0	63.8
	16	90.6	120.8	101.3	21.6	123.0	82.3	49.3
	17	109.3	63.4	96.4	—	87.2	91.6	66.1
	18	94.6	85.1	117.1	—	155.2	82.4	60.1
	19	138.7	—	115.3	—	126.3	67.9	44.2
	20	—	—	112.1	—	—	93.0	63.4
2	1	75.7	94.9	110.5	119.1	117.4	72.1	64.7
	2	104.0	139.8	112.7	89.8	75.3	92.8	67.3
	3	84.4	118.8	121.7	89.1	120.7	85.8	72.0
	4	131.9	129.6	88.8	93.9	100.3	88.9	24.8
	5	121.2	128.3	98.9	103.9	112.8	44.5	87.2
	6	108.4	128.7	83.3	122.4	108.6	71.0	66.7
	7	69.5	121.0	87.4	102.3	92.1	95.2	73.9
	8	75.9	111.0	105.2	107.4	95.7	80.4	67.1
	9	116.9	90.7	94.5	105.9	90.3	82.9	64.5
	10	109.3	90.0	108.2	114.1	95.1	70.8	79.2
	11	102.8	61.5	97.4	74.1	92.6	86.3	74.2
	12	96.7	110.0	103.6	129.5	114.2	86.2	68.6
	13	109.4	101.9	102.6	114.7	93.2	82.9	84.1
	14	90.3	114.3	92.2	123.0	108.7	84.4	57.0
	15	90.6	104.9	91.3	89.9	106.7	76.1	75.5
	16	60.6	121.0	92.6	139.6	90.7	76.5	75.1
	17	84.3	102.2	119.0	84.4	117.3	80.0	79.6
	18	—	76.8	108.4	61.0	93.7	88.4	70.5
	19	—	82.9	84.7	119.4	86.2	—	56.3
	20	—	113.1	—	—	—	—	—
3	1	98.5	123.7	105.5	32.1	88.8	91.9	73.9
	2	88.4	114.9	144.1	112.2	113.8	82.5	52.2
	3	111.2	94.6	122.9	111.0	100.0	83.9	83.5
	4	121.9	101.2	104.9	116.1	85.3	100.9	76.3
	5	115.7	104.5	103.1	104.6	68.3	93.4	86.2
	6	89.0	27.9	119.0	115.5	112.0	91.9	71.1
	7	105.1	106.3	122.7	118.1	114.2	63.3	71.2
	8	92.2	75.8	113.9	114.6	112.8	86.0	56.3
	9	105.7	116.2	101.5	107.7	49.3	87.4	93.6
	10	107.8	69.6	117.3	98.6	78.4	93.2	76.9
	11	98.5	104.7	97.2	96.1	86.9	82.7	75.4
	12	82.2	106.4	89.2	100.2	92.7	109.8	95.8
	13	106.7	109.2	121.2	81.8	68.1	114.5	70.2
	14	128.1	91.7	137.9	133.9	65.1	83.6	57.0
	15	118.6	98.9	105.0	80.9	92.7	87.4	61.7
	16	76.4	67.6	97.9	128.5	78.3	96.9	60.4
	17	106.6	95.8	119.5	92.0	82.4	86.4	84.4
	18	111.8	109.1	106.0	93.5	89.4	87.4	49.8
	19	100.9	123.4	98.3	—	72.6	84.1	—
	20	—	—	—	—	—	—	—

— : 死亡

3) 乾燥体重測定値 (mg/尾)

水槽	魚数	試験区 (mg/L)						
		対照区	0.22	0.46	1.0	2.2	4.6	10
1	1	30.3	31.9	8.2	32.2	24.8	1.3	15.2
	2	31.6	31.0	31.2	28.3	34.0	22.5	13.6
	3	33.4	25.4	30.5	36.9	28.2	24.1	11.9
	4	38.7	18.1	28.1	29.5	34.5	21.2	17.6
	5	23.8	26.8	31.0	32.2	30.3	20.9	14.4
	6	10.7	17.1	27.3	31.4	18.2	19.9	20.6
	7	25.9	29.4	28.1	30.4	28.9	19.8	17.7
	8	27.5	27.3	27.7	21.1	20.6	31.1	19.5
	9	28.6	28.9	26.1	19.5	31.0	14.1	13.6
	10	18.2	32.1	23.6	23.8	28.4	20.9	19.2
	11	28.2	27.8	24.7	28.4	24.4	26.1	21.6
	12	28.2	27.2	33.4	19.7	35.2	26.3	16.2
	13	25.9	33.1	24.5	30.7	23.7	16.9	20.4
	14	14.4	31.3	30.9	36.6	22.4	27.4	14.5
	15	30.7	30.4	29.8	27.1	23.2	28.1	17.5
	16	23.2	30.5	27.4	5.1	33.7	22.6	11.8
	17	30.1	16.9	25.5	—	23.1	25.2	17.1
	18	24.6	22.2	32.1	—	40.8	22.9	16.5
	19	36.5	—	31.5	—	34.6	18.9	11.3
	20	—	—	29.9	—	—	26.2	17.3
2	1	9.9	25.5	29.6	31.5	33.6	19.7	12.1
	2	27.3	36.5	22.7	24.7	20.7	25.7	17.6
	3	23.6	30.6	34.4	21.8	35.8	24.7	20.2
	4	36.2	29.5	23.1	26.2	27.4	23.3	6.1
	5	32.7	32.8	27.8	29.2	30.8	11.4	23.9
	6	30.0	36.5	23.5	34.2	31.0	18.4	18.0
	7	17.6	33.5	24.6	27.7	25.9	27.0	19.0
	8	18.9	29.1	28.9	28.8	27.6	22.8	18.4
	9	33.0	22.3	23.9	30.2	25.8	22.7	15.9
	10	32.1	24.8	29.8	29.6	26.6	19.9	22.1
	11	28.2	15.9	26.1	18.8	26.4	23.7	20.6
	12	25.7	31.0	28.7	35.5	32.5	24.1	19.1
	13	30.9	28.7	28.7	33.3	23.5	23.5	22.7
	14	23.9	31.3	24.6	31.1	30.4	22.8	14.5
	15	24.1	28.3	25.6	25.9	30.7	20.6	20.7
	16	14.6	34.7	25.3	37.9	25.3	21.1	20.4
	17	22.3	28.4	32.5	21.8	32.2	22.4	20.8
	18	—	19.3	29.2	15.0	25.1	25.0	17.9
	19	—	22.2	23.2	32.6	24.3	—	14.2
	20	—	30.1	—	—	—	—	—
3	1	23.1	34.1	29.5	6.0	23.6	25.6	20.0
	2	25.5	31.1	39.1	31.7	30.2	22.7	13.9
	3	31.5	23.6	32.5	28.8	27.9	22.5	22.9
	4	32.1	26.4	28.0	32.5	22.0	28.5	20.9
	5	31.6	27.7	28.7	29.6	18.7	26.0	23.2
	6	24.4	6.5	30.7	33.9	28.9	24.7	19.0
	7	28.3	29.1	35.0	32.1	31.6	16.3	18.7
	8	26.3	19.4	32.4	33.4	32.2	24.2	14.5
	9	29.4	30.5	28.6	30.8	12.4	23.6	24.7
	10	28.8	18.5	32.2	27.0	23.3	25.5	21.4
	11	27.9	27.4	27.6	27.7	23.4	21.8	20.2
	12	23.5	26.5	24.3	28.1	25.1	29.5	25.2
	13	29.7	28.9	32.7	22.4	17.8	31.3	19.1
	14	33.2	24.9	36.4	35.8	17.5	23.0	16.3
	15	32.6	26.2	27.7	22.8	25.5	24.7	16.7
	16	20.0	16.3	26.2	35.2	21.0	27.3	16.3
	17	30.2	27.3	30.8	26.0	21.9	24.2	23.1
	18	30.0	29.0	25.5	26.0	25.3	24.2	13.2
	19	27.6	32.5	24.5	—	20.6	20.5	—
	20	—	—	—	—	—	—	—

— : 死亡

## 付属資料－ 5

### 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 °C 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より濃度を求め、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)	ジールサイエンス
c) 分析用上皿電子天秤	: EB-6300 型	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 μL, 50 μL, 100 μL, 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-プ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 (100 mg/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 の内部標準原液を調製する。

#### (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 (10 ~ 500 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  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ 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求める。

- 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 × 0.25 mmφ 膜厚 1.0 μm)
- (2) 分離管温度 : 180°C 10 min Hold ~ 210°C (10°C/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 μL
- (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  $m/z=176$  または 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 μL をそれぞれ正確に注入し、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 μL を注入し、内部標準物質濃度を 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 μL 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。この時の回帰式の寄与率も算出する。

表 1 検量線に使用したデータ例

No.	濃度		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	11.1348	0
2	0.0080	0.020	3.27722	12.5075	0.26202
3	0.040	0.020	27.4317	15.0479	1.82296
4	0.080	0.020	79.4073	21.6304	3.6711

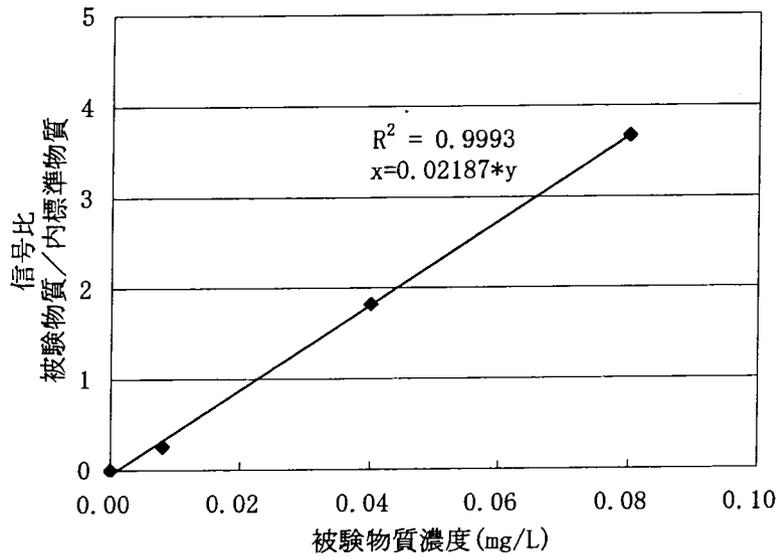


図 1 検量線例

#### 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/mL) の 10  $\mu$ L, 100  $\mu$ 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  $\mu$ 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。

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( $\sigma_{n-1}$ )	0.00021

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

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

試験溶液の希釈

対照区は 1 倍希釈  $0.003 \times 1 = 0.003 \text{ mg/L}$

最低濃度は 10 倍希釈  $0.003 \times 10 = 0.03 \text{ mg/L}$

## 付属資料－6

### 統計解析結果

(1) ふ化所要日数の検定

① ふ化所要日数観察結果

水槽	魚数	試験区 (mg/L)						
		対照区	0.22	0.46	1.0	2.2	4.6	10
1	1	9	9	9	9	9	9	9
	2	9	9	9	9	9	9	9
	3	9	9	9	9	9	9	9
	4	9	9	9	9	9	9	9
	5	9	9	9	9	9	9	9
	6	9	9	9	9	9	9	9
	7	9	9	9	9	9	9	9
	8	9	9	9	9	9	9	9
	9	10	9	9	9	9	9	9
	10	10	9	9	9	9	9	9
	11	10	9	9	9	9	9	9
	12	10	9	9	9	9	9	9
	13	10	9	9	9	9	9	9
	14	10	9	9	10	9	9	9
	15	10	9	10	10	9	9	10
	16	10	10	10	10	9	10	10
	17	10	10	10	11	9	10	10
	18	10	10	10	13	9	10	10
	19	10	10	10	-	9	10	13
	20	12	11	10	-	10	10	14
2	1	9	9	9	9	9	9	9
	2	9	9	9	9	9	9	9
	3	9	9	9	9	9	9	9
	4	9	9	9	9	9	9	9
	5	9	9	9	9	9	9	9
	6	9	9	9	9	9	9	9
	7	9	9	9	9	9	9	9
	8	9	9	9	9	9	9	9
	9	10	9	9	9	9	9	9
	10	10	9	9	9	9	9	9
	11	10	9	9	9	9	9	9
	12	10	9	9	9	9	9	9
	13	10	9	9	9	9	9	9
	14	10	9	9	9	9	9	9
	15	10	9	9	9	9	9	9
	16	11	9	9	9	9	10	9
	17	12	9	9	9	9	10	9
	18	12	10	10	9	9	10	9
	19	-	10	10	10	9	10	9
	20	-	10	11	10	-	-	9
3	1	9	9	9	9	9	9	9
	2	9	9	9	9	9	9	9
	3	9	9	9	9	9	9	9
	4	9	9	9	9	9	9	9
	5	9	9	9	9	9	9	9
	6	9	9	9	9	9	9	9
	7	9	9	9	9	9	9	9
	8	9	9	9	9	9	9	9
	9	9	9	9	9	9	9	9
	10	9	9	9	9	9	9	9
	11	9	9	9	9	9	9	9
	12	9	9	9	9	9	9	9
	13	9	9	9	9	9	9	9
	14	10	9	9	9	9	9	9
	15	10	9	9	9	9	9	9
	16	10	10	10	9	9	9	10
	17	10	10	10	10	9	10	10
	18	10	10	10	10	9	10	10
	19	10	10	10	-	10	12	13
	20	10	10	10	-	-	-	-

② Bartlett 等分散性 (ふ化所要日数)

Group	Samples	Mean	S.E.	S.D.	Variance			
1	58	9.621	0.101	0.768	0.590			
2	60	9.233	0.060	0.465	0.216			
3	60	9.250	0.061	0.474	0.225			
4	56	9.232	0.088	0.660	0.436			
5	58	9.034	0.024	0.184	0.034			
6	58	9.241	0.071	0.540	0.292			
7	59	9.339	0.129	0.993	0.987			
Method	vs	Side	Stat.	0.0500	0.0100	0.0010	Prob.	
Bartlett test		0	145.397	12.592	16.812	22.458	0.000	

③ 参考：等分散性を仮定した場合の検定結果 (ふ化所要日数)

---

Group	Samples	Mean	S.E.	S.D.	Variance			
1	58	9.621	0.101	0.768	0.590			
2	60	9.233	0.060	0.465	0.216			
3	60	9.250	0.061	0.474	0.225			
4	56	9.232	0.088	0.660	0.436			
5	58	9.034	0.024	0.184	0.034			
6	58	9.241	0.071	0.540	0.292			
7	59	9.339	0.129	0.993	0.987			
Method	vs	Side	Stat.	0.05	0.01	0.001	Prob.	
1-way ANOVA		0	4.553	2.121	2.847	3.830	0.000	
SS	DF	MS	Fcal.	Prob.	0.05	0.01	0.001	
11	6	1.805	4.553	0.000	2.121	2.847	3.830	
159	402	0.396						
170	408							

④ Kruskal-Wallis の順位検定 (ふ化所要日数)

---

Group	Samples	Mean	S.E.	S.D.	Variance			
1	58	9.621	0.101	0.768	0.590			
2	60	9.233	0.060	0.465	0.216			
3	60	9.250	0.061	0.474	0.225			
4	56	9.232	0.088	0.660	0.436			
5	58	9.034	0.024	0.184	0.034			
6	58	9.241	0.071	0.540	0.292			
7	59	9.339	0.129	0.993	0.987			
Method	vs	Side	Stat.	0.05	0.01	0.001	Prob.	
Kruskal-Wallis		0	39.988	12.592	16.812	22.458	0.000	

⑤ ノンパラメトリック Dunnett 検定 (ふ化所要日数)

Group	Samples	Mean	S. E.	S. D.	Variance
1	58	9.621	0.101	0.768	0.590
2	60	9.233	0.060	0.465	0.216
3	60	9.250	0.061	0.474	0.225
4	56	9.232	0.088	0.660	0.436
5	58	9.034	0.024	0.184	0.034
6	58	9.241	0.071	0.540	0.292
7	59	9.339	0.129	0.993	0.987

Method	vs	Side	Stat.	0.0500	0.0100	0.001	Prob.
Dunnett	1 vs 2	2	3.751	2.565	3.106	999.990	0.001
Dunnett	1 vs 3	2	3.539	2.565	3.106	999.990	0.002
Dunnett	1 vs 4	2	4.329	2.565	3.106	999.990	0.000
Dunnett	1 vs 5	2	6.060	2.565	3.106	999.990	0.000
Dunnett	1 vs 6	2	3.837	2.565	3.106	999.990	0.001
Dunnett	1 vs 7	2	4.218	2.565	3.106	999.990	0.000



●● 13d NOEC 生存量の推定結果の書き出し =====> \* =5%で有意, \*\* =1%で有意 ●●  
 2006-生 71 クロロホルム ELS ふ化  
 魚類 急性毒性試験 生物量は 1 を掛けてある

◎ NOEC 計算用元データ -----

濃度 mg/L	0	0.209	0.471	1.23	2.61	5.65	11.3	平均
1	20	20	20	18	20	20	20	
2	18	20	20	20	19	19	20	
3	20	20	20	18	19	19	19	
平均	19.3333	20	20	18.6666	19.3333	19.3333	19.6666	19.4761
標準偏差	1.1547	0	0	1.1547	.5774	.5774	.5774	

◎ 各濃度区の対照平均に対する相対量 -----

濃度 mg/L	0	0.209	0.471	1.23	2.61	5.65	11.3
1	103.45	103.45	103.45	93.10	103.45	103.45	103.45
2	93.10	103.45	103.45	103.45	98.28	98.28	103.45
3	103.45	103.45	103.45	93.10	98.28	98.28	98.28
平均	100	103.44	103.44	96.551	100	100	101.72

◎ パートレットの等分散性の検定 -----

$\chi^2$  二乗検定値 (p;0.05)=12.591 (p;0.01)=16.811 自由度= 6  
 計算値(-3.033) <= 12.591 5%の危険率で等分散性を認める。

◎ 一元配置分散分析 (全ての濃度区の平均数に差がないとみなせるか) -----

要因	平方和	自由度	平均平方	検定値(F)
処理	3.904762	6	0.6507936	1.242425
誤差	7.33333	14	0.5238093	
全体	11.23809	20		

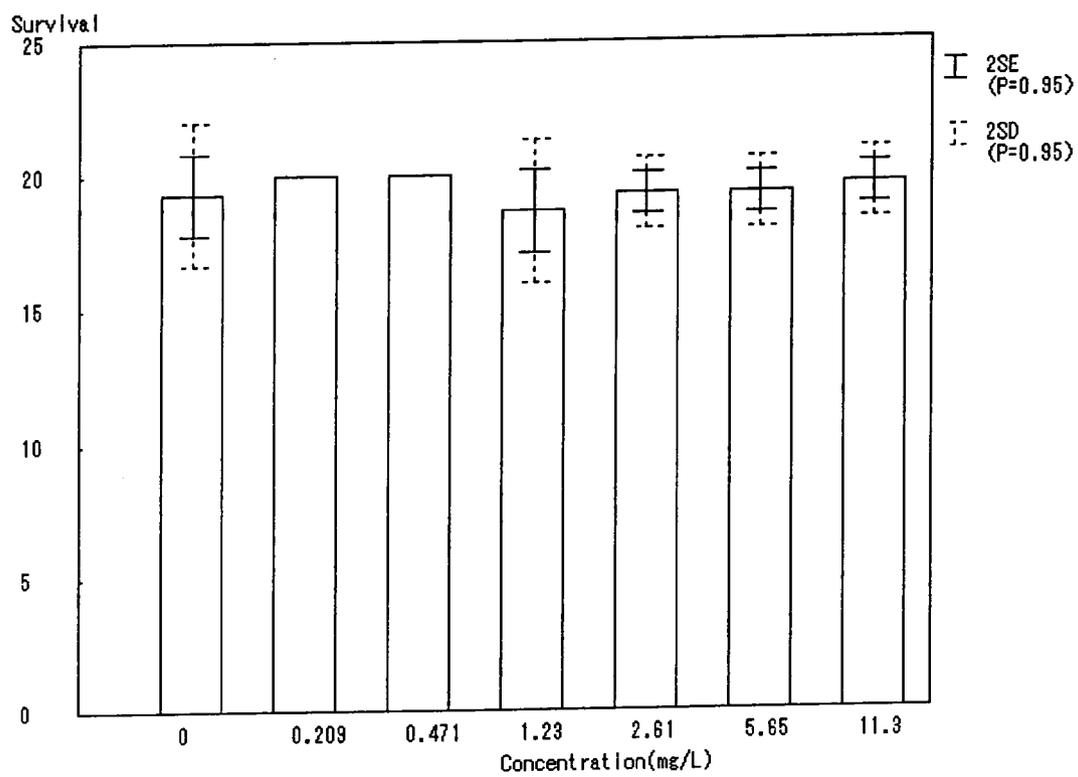
F検定基準値 (p:0.05)=2.8477 (p:0.01)=4.4558 自由度= 6 : 14  
 計算値(1.242) < 2.8477

危険率5%で「濃度間に差がない」仮説を棄却しない。  
 即ち、濃度区間に差がないとみなす。

- Dunnett 検定の前処理として分散分析が必要であるかについては, ---
- 「必要でない/してはいけない」という意見がある。 ---
- そこで、分散分析の結果に拘らず、Dunnett の検定結果を示す。 ---

◎ Dunnett 型の検定 (どの濃度区が対照に比べて差があるかを特定する) -----

濃度 mg/L	0	0.209	0.471	1.23	2.61	5.65	11.3
計算値	-	1.1282	1.1282	1.1282	0	0	.5641
Dunnett 確率		0.7389	0.7389	0.7389	1.0000	1.0000	0.9817



Dose-response curve for LC50 of Fish Acute Toxicity Test  
 2006-生71クロロホルムELSふ化 (NOEC) 13d NOEC(グラフ)

(3) ふ化後稚魚の死亡率検定

① ふ化後稚魚の死亡率結果

水槽	試験区(mg/L)とふ化後稚魚死亡率(%)						
	対照区	0.209	0.471	1.23	2.61	5.65	11.3
1	5.0	10.0	0.0	11.1	5.0	0.0	0.0
2	5.6	0.0	5.0	5.0	0.0	5.3	5.0
3	5.0	5.0	5.0	0.0	0.0	0.0	5.3

② Bartlett 等分散性 (ふ化後稚魚の死亡率)

Group	Samples	Mean	S. E.	S. D.	Variance				
	1	3	5.2000	0.2000	0.3464	0.1200			
	2	3	5.0000	2.8868	5.0000	25.0000			
	3	3	3.3333	1.6667	2.8868	8.3333			
	4	3	5.3667	3.2095	5.5591	30.9033			
	5	3	1.6667	1.6667	2.8868	8.3333			
	6	3	1.7667	1.7667	3.0600	9.3633			
	7	3	3.4333	1.7188	2.9771	8.8633			
Method	vs	Side	Stat.	0.05	0.01	0.001 Prob.			
Bartlett test			0	7.9960	12.5916	16.8119	22.4577	0.2384	

③ パラメトリック Dunnett 検定 (ふ化後稚魚の死亡率)

Group	Samples	Mean	S. E.	S. D.	Variance				
	1	3	5.2000	0.2000	0.3464	0.1200			
	2	3	5.0000	2.8868	5.0000	25.0000			
	3	3	3.3333	1.6667	2.8868	8.3333			
	4	3	5.3667	3.2095	5.5591	30.9033			
	5	3	1.6667	1.6667	2.8868	8.3333			
	6	3	1.7667	1.7667	3.0600	9.3633			
	7	3	3.4333	1.7188	2.9771	8.8633			
Method	vs	Side	Stat.	0.05	0.01	0.001 Prob.			
Dunnett	1 vs 2		2	0.0680	2.9124	3.7633	999.9900	1.0000	
Dunnett	1 vs 3		2	0.6344	2.9124	3.7633	999.9900	0.9685	
Dunnett	1 vs 4		2	0.0566	2.9124	3.7633	999.9900	1.0000	
Dunnett	1 vs 5		2	1.2008	2.9124	3.7633	999.9900	0.6916	
Dunnett	1 vs 6		2	1.1668	2.9124	3.7633	999.9900	0.7139	
Dunnett	1 vs 7		2	0.6004	2.9124	3.7633	999.9900	0.9755	



●● 40d NOEC 生存量の推定結果の書き出し =====> \* =5%で有意, \*\*=1%で有意 ●●  
 2006-生 71 クロロホルム ELS  
 魚類 急性毒性試験 生物量は 1 を掛けてある

◎ NOEC 計算用元データ

濃度 mg/L	0	0.209	0.471	1.23	2.61	5.65	11.3	平均
1	19	18	20	16	19	20	20	
2	17	20	19	19	19	18	19	
3	19	19	19	18	19	19	18	
平均	18.3333	19	19.3333	17.6666	19	19	19	18.7619
標準偏差	1.1547	1	.5774	1.5275	0	1	1	

◎ 各濃度区の対照平均に対する相対量

濃度 mg/L	0	0.209	0.471	1.23	2.61	5.65	11.3
1	103.64	98.18	109.09	87.27	103.64	109.09	109.09
2	92.73	109.09	103.64	103.64	103.64	98.18	103.64
3	103.64	103.64	103.64	98.18	103.64	103.64	98.18
平均	100	103.63	105.45	96.363	103.63	103.63	103.63

◎ バートレットの等分散性の検定

$\chi^2$  乗検定値 (p;0.05)=12.591 (p;0.01)=16.811 自由度= 6  
 計算値(-6.109) <= 12.591 5%の危険率で等分散性を認める。

◎ 一元配置分散分析 (全ての濃度区の平均数に差がないとみなせるか)

要因	平方和	自由度	平均平方	検定値(F)
処理	5.809524	6	0.968254	0.9682541
誤差	14	14	0.9999999	
全体	19.80952	20		

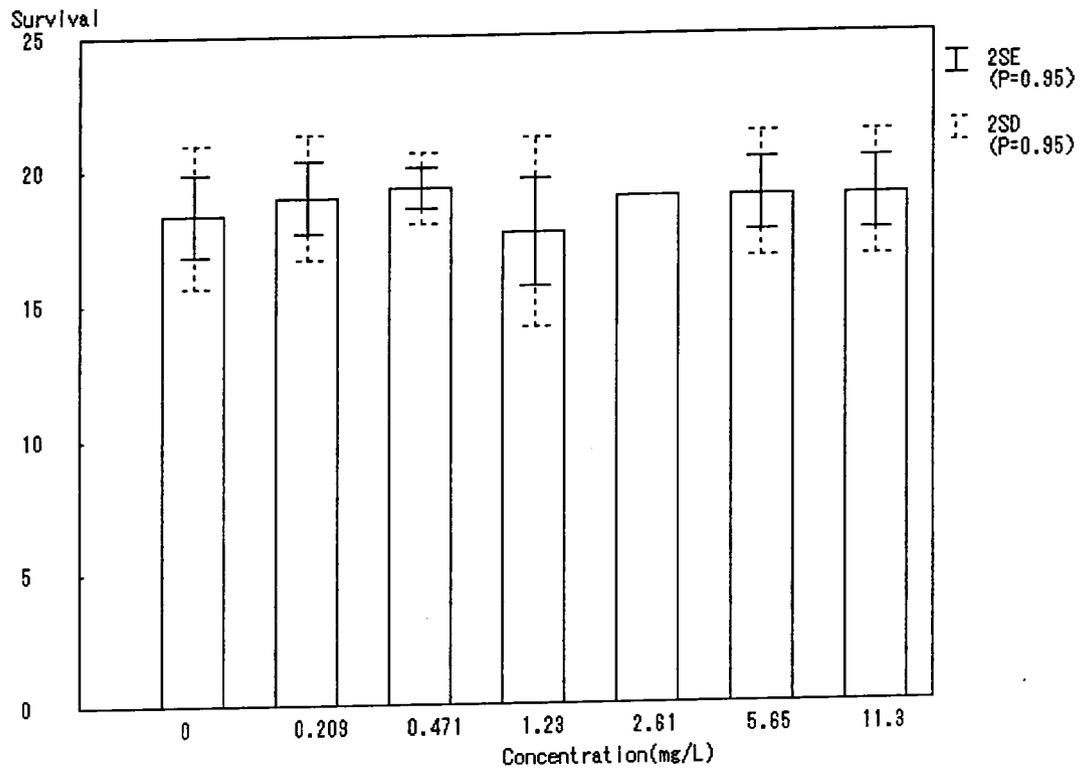
F検定基準値 (p:0.05)=2.8477 (p:0.01)=4.4558 自由度= 6 : 14  
 計算値(.968) < 2.8477

危険率5%で「濃度間に差がない」仮説を棄却しない。  
 即ち、濃度区間に差がないとみなす。

- Dunnett 検定の前処理として分散分析が必要であるかについては、 ---
- 「必要でない/してはいけない」という意見がある。 ---
- そこで、分散分析の結果に拘らず、Dunnett の検定結果を示す。 ---

◎ Dunnett 型の検定 (どの濃度区が対照に比べて差があるかを特定する)

濃度 mg/L	0	0.209	0.471	1.23	2.61	5.65	11.3
計算値	-	.8165	1.2247	.8165	.8165	.8165	.8165
Dunnett 確率		0.9102	0.6757	0.9102	0.9102	0.9102	0.9102



Dose-response curve for LC50 of Fish Acute Toxicity Test  
 2006-生71クロロホルムELS (NOEC) 40d NOEC(グラフ)

(5) 全長の検定

① Bartlett 等分散性 (全長)

---

Group	Samples	Mean	S. E.	S. D.	Variance			
	1	55	21.1255	0.1658	1.2296	1.5119		
	2	57	21.2632	0.1921	1.4503	2.1034		
	3	58	21.3500	0.1443	1.0988	1.2075		
	4	53	21.0755	0.2486	1.8099	3.2757		
	5	57	20.9930	0.1700	1.2831	1.6464		
	6	57	20.1123	0.2173	1.6407	2.6918		
	7	57	19.1737	0.1587	1.1983	1.4359		

Method	vs	Side	Stat.	0.05	0.01	0.001	Prob.
Bartlett test			0 21.9821	12.5916	16.8119	22.4577	0.00122

② 参考：等分散性を仮定した場合の検定結果 (全長)

分散分析：一元配置

---

Group	Samples	Mean	S. E.	S. D.	Variance			
	1	55	21.1255	0.1658	1.2296	1.5119		
	2	57	21.2632	0.1921	1.4503	2.1034		
	3	58	21.3500	0.1443	1.0988	1.2075		
	4	53	21.0755	0.2486	1.8099	3.2757		
	5	57	20.9930	0.1700	1.2831	1.6464		
	6	57	20.1123	0.2173	1.6407	2.6918		
	7	57	19.1737	0.1587	1.1983	1.4359		

Method	vs	Side	Stat.	0.05	0.01	0.001	Prob.
1-way ANOVA			0 18.3830	2.1220	2.8488	3.8334	6.18E-18

SS	DF	MS	Fcal.	Prob.	0.05	0.01	0.001
217	6	36.1935	18.3830	0.0000	2.1220	2.8488	3.8334
762	387	1.9689					
979	393						

③ Kruskal-Wallis の順位検定 (全長)

---

Group	Samples	Mean	S. E.	S. D.	Variance			
	1	55	21.1255	0.1658	1.2296	1.5119		
	2	57	21.2632	0.1921	1.4503	2.1034		
	3	58	21.3500	0.1443	1.0988	1.2075		
	4	53	21.0755	0.2486	1.8099	3.2757		
	5	57	20.9930	0.1700	1.2831	1.6464		
	6	57	20.1123	0.2173	1.6407	2.6918		
	7	57	19.1737	0.1587	1.1983	1.4359		

Method	vs	Side	Stat.	0.05	0.01	0.001	Prob.
Kruskal-Wallis tes			0 114.1021	12.5916	16.8119	22.4577	2.81691E-22

④ ノンパラメトリック Dunnett 検定 (全長)

Group	Samples	Mean	S. E.	S. D.	Variance			
1	55	21.125	0.166	1.230	1.512			
2	57	21.263	0.192	1.450	2.103			
3	58	21.350	0.144	1.099	1.207			
4	53	21.075	0.249	1.810	3.276			
5	57	20.993	0.170	1.283	1.646			
6	57	20.112	0.217	1.641	2.692			
7	57	19.174	0.159	1.198	1.436			

Method	vs	Side	Stat.	0.05	0.01	0.001	Prob.
Dunnett	1 vs 2	2	0.933	2.565	3.106	999.990	0.861
Dunnett	1 vs 3	2	0.988	2.565	3.106	999.990	0.829
Dunnett	1 vs 4	2	0.569	2.565	3.106	999.990	0.984
Dunnett	1 vs 5	2	0.661	2.565	3.106	999.990	0.968
Dunnett	1 vs 6	2	3.964	2.565	3.106	999.990	0.000
Dunnett	1 vs 7	2	7.073	2.565	3.106	999.990	0.000

⑤ 参考：等分散性を仮定した場合の検定結果 (全長)  
パラメトリック Dunnett 検定

Group	Samples	Mean	S. E.	S. D.	Variance			
1	55	21.125	0.166	1.230	1.512			
2	57	21.263	0.192	1.450	2.103			
3	58	21.350	0.144	1.099	1.207			
4	53	21.075	0.249	1.810	3.276			
5	57	20.993	0.170	1.283	1.646			
6	57	20.112	0.217	1.641	2.692			
7	57	19.174	0.159	1.198	1.436			

Method	vs	Side	Stat.	0.05	0.01	0.001	Prob.
Dunnett	1 vs 2	2	0.519	2.577	3.129	999.990	0.990
Dunnett	1 vs 3	2	0.850	2.577	3.129	999.990	0.901
Dunnett	1 vs 4	2	0.185	2.577	3.129	999.990	1.000
Dunnett	1 vs 5	2	0.499	2.577	3.129	999.990	0.992
Dunnett	1 vs 6	2	3.820	2.577	3.129	999.990	0.001
Dunnett	1 vs 7	2	7.359	2.577	3.129	999.990	0.000

(6) 生体重の検定

① Bartlett 等分散性 (生体重)

---

Group	Samples	Mean	S. E.	S. D.	Variance			
1	55	100.7745	2.5068	18.5912	345.6338			
2	57	102.0895	2.7059	20.4289	417.3417			
3	58	104.9741	2.1034	16.0190	256.6072			
4	53	101.6453	3.1208	22.7197	516.1829			
5	57	97.7386	2.5689	19.3947	376.1560			
6	57	83.1491	2.1062	15.9015	252.8590			
7	57	67.4667	1.6961	12.8054	163.9787			

Method	vs	Side	Stat.	0.05	0.01	0.001 Prob.
Bartlett tes		0	22.6224	12.5916	16.8119	22.4577 0.0009333

② 参考：等分散性を仮定した場合の検定結果 (生体重)

分散分析：一元配置

---

Group	Samples	Mean	S. E.	S. D.	Variance			
1	55	100.775	2.507	18.591	345.634			
2	57	102.089	2.706	20.429	417.342			
3	58	104.974	2.103	16.019	256.607			
4	53	101.645	3.121	22.720	516.183			
5	57	97.739	2.569	19.395	376.156			
6	57	83.149	2.106	15.902	252.859			
7	57	67.467	1.696	12.805	163.979			

Method	vs	Side	Stat.	0.05	0.01	0.001	Prob.
1-way ANOVA		0	32.257	2.122	2.849	3.833	0.000

SS	DF	MS	Fcal.	Prob.	0.05	0.01	0.001
63,970	6	10,661.595	32.257	0.000	2.122	2.849	3.833
127,911	387	330.520					
191,881	393						

③ Kruskal-Wallis の順位検定 (生体重)

---

Group	Samples	Mean	S. E.	S. D.	Variance			
1	55	100.7745	2.5068	18.5912	345.6338			
2	57	102.0895	2.7059	20.4289	417.3417			
3	58	104.9741	2.1034	16.0190	256.6072			
4	53	101.6453	3.1208	22.7197	516.1829			
5	57	97.7386	2.5689	19.3947	376.1560			
6	57	83.1491	2.1062	15.9015	252.8590			
7	57	67.4667	1.6961	12.8054	163.9787			

Method	vs	Side	Stat.	0.05	0.01	0.001 Prob.
Kruskal-Wallis tes		0	144.3071	12.5916	16.8119	22.4577 1.23491E-28

④ ノンパラメトリック Dunnett 検定 (生体重)

Group	Samples	Mean	S. E.	S. D.	Variance				
	1	55	100.7745	2.5068	18.5912	345.6338			
	2	57	102.0895	2.7059	20.4289	417.3417			
	3	58	104.9741	2.1034	16.0190	256.6072			
	4	53	101.6453	3.1208	22.7197	516.1829			
	5	57	97.7386	2.5689	19.3947	376.1560			
	6	57	83.1491	2.1062	15.9015	252.8590			
	7	57	67.4667	1.6961	12.8054	163.9787			
Method	vs	Side	Stat.	0.05	0.01	0.001 Prob.			
Dunnett	1 vs 2		2	0.6013	2.5647	3.1064	999.9900	0.9795	
Dunnett	1 vs 3		2	1.2464	2.5647	3.1064	999.9900	0.6499	
Dunnett	1 vs 4		2	0.4908	2.5647	3.1064	999.9900	0.9927	
Dunnett	1 vs 5		2	0.8617	2.5647	3.1064	999.9900	0.8976	
Dunnett	1 vs 6		2	4.6056	2.5647	3.1064	999.9900	2.4343E-05	
Dunnett	1 vs 7		2	8.0544	2.5647	3.1064	999.9900	5.54991E-08	

⑤ 参考：等分散性を仮定した場合の検定結果 (生体重)  
パラメトリック Dunnett 検定

Group	Samples	Mean	S. E.	S. D.	Variance				
	1	55	100.7745	2.5068	18.5912	345.6338			
	2	57	102.0895	2.7059	20.4289	417.3417			
	3	58	104.9741	2.1034	16.0190	256.6072			
	4	53	101.6453	3.1208	22.7197	516.1829			
	5	57	97.7386	2.5689	19.3947	376.1560			
	6	57	83.1491	2.1062	15.9015	252.8590			
	7	57	67.4667	1.6961	12.8054	163.9787			
Method	vs	Side	Stat.	0.05	0.01	0.001 Prob.			
Dunnett	1 vs 2		2	0.3827	2.5771	3.1286	999.9900	0.9980	
Dunnett	1 vs 3		2	1.2273	2.5771	3.1286	999.9900	0.6615	
Dunnett	1 vs 4		2	0.2488	2.5771	3.1286	999.9900	0.9998	
Dunnett	1 vs 5		2	0.8835	2.5771	3.1286	999.9900	0.8850	
Dunnett	1 vs 6		2	5.1292	2.5771	3.1286	999.9900	4.16875E-06	
Dunnett	1 vs 7		2	9.6930	2.5771	3.1286	999.9900	1.44762E-06	

(7) 乾燥体重の検定

① Bartlett 等分散性 (乾燥体重)

---

Group	Samples	Mean	S. E.	S. D.	Variance			
	1	55	26.8582	0.8171	6.0595	36.7173		
	2	57	27.0930	0.7693	5.8082	33.7349		
	3	58	28.2086	0.5872	4.4723	20.0015		
	4	53	27.8962	0.9252	6.7354	45.3650		
	5	57	26.7456	0.7267	5.4864	30.1004		
	6	57	22.8298	0.6248	4.7173	22.2532		
	7	57	17.9123	0.5036	3.8019	14.4547		

Method	vs	Side	Stat.	0.05	0.01	0.001 Prob.
Bartlett tes		0	24.4248	12.5916	16.8119	22.4577 0.0004361

② 参考：等分散性を仮定した場合の検定結果 (乾燥体重)  
分散分析：一元配置

---

Group	Samples	Mean	S. E.	S. D.	Variance			
	1	55	26.858	0.817	6.059	36.717		
	2	57	27.093	0.769	5.808	33.735		
	3	58	28.209	0.587	4.472	20.002		
	4	53	27.896	0.925	6.735	45.365		
	5	57	26.746	0.727	5.486	30.100		
	6	57	22.830	0.625	4.717	22.253		
	7	57	17.912	0.504	3.802	14.455		

Method	vs	Side	Stat.	0.05	0.01	0.001	Prob.
1-way ANOVA		0	27.525	2.122	2.849	3.833	0.000

SS	DF	MS	Fcal.	Prob.	0.05	0.01	0.001
4,742	6	790.341	27.525	0.000	2.122	2.849	3.833
11,112	387	28.714					
15,854	393						

③ Kruskal-Wallis の順位検定 (乾燥体重)

---

Group	Samples	Mean	S. E.	S. D.	Variance			
	1	55	26.8582	0.8171	6.0595	36.7173		
	2	57	27.0930	0.7693	5.8082	33.7349		
	3	58	28.2086	0.5872	4.4723	20.0015		
	4	53	27.8962	0.9252	6.7354	45.3650		
	5	57	26.7456	0.7267	5.4864	30.1004		
	6	57	22.8298	0.6248	4.7173	22.2532		
	7	57	17.9123	0.5036	3.8019	14.4547		

Method	vs	Side	Stat.	0.05	0.01	0.001 Prob.
Kruskal-Wallis tes		0	131.6241	12.5916	16.8119	22.4577 5.84759E-26

④ ノンパラメトリック Dunnett 検定 (乾燥体重)

Group	Samples	Mean	S. E.	S. D.	Variance			
1	55	26.8582	0.8171	6.0595	36.7173			
2	57	27.0930	0.7693	5.8082	33.7349			
3	58	28.2086	0.5872	4.4723	20.0015			
4	53	27.8962	0.9252	6.7354	45.3650			
5	57	26.7456	0.7267	5.4864	30.1004			
6	57	22.8298	0.6248	4.7173	22.2532			
7	57	17.9123	0.5036	3.8019	14.4547			
Method	vs	Side	Stat.	0.05	0.01	0.001 Prob.		
Dunnett	1 vs 2		2	0.2691	2.5647	3.1064	999.9900	0.9997
Dunnett	1 vs 3		2	1.1159	2.5647	3.1064	999.9900	0.7447
Dunnett	1 vs 4		2	1.0741	2.5647	3.1064	999.9900	0.7736
Dunnett	1 vs 5		2	0.4624	2.5647	3.1064	999.9900	0.9947
Dunnett	1 vs 6		2	3.9806	2.5647	3.1064	999.9900	0.00039773
Dunnett	1 vs 7		2	7.7421	2.5647	3.1064	999.9900	5.5499E-08

⑤ 参考：等分散性を仮定した場合の検定結果 (乾燥体重)  
パラメトリック Dunnett 検定

Group	Samples	Mean	S. E.	S. D.	Variance			
1	55	26.8582	0.8171	6.0595	36.7173			
2	57	27.0930	0.7693	5.8082	33.7349			
3	58	28.2086	0.5872	4.4723	20.0015			
4	53	27.8962	0.9252	6.7354	45.3650			
5	57	26.7456	0.7267	5.4864	30.1004			
6	57	22.8298	0.6248	4.7173	22.2532			
7	57	17.9123	0.5036	3.8019	14.4547			
Method	vs	Side	Stat.	0.05	0.01	0.001 Prob.		
Dunnett	1 vs 2		2	0.2318	2.5771	3.1286	999.9900	0.9999
Dunnett	1 vs 3		2	1.3390	2.5771	3.1286	999.9900	0.5788
Dunnett	1 vs 4		2	1.0064	2.5771	3.1286	999.9900	0.8152
Dunnett	1 vs 5		2	0.1111	2.5771	3.1286	999.9900	1.0000
Dunnett	1 vs 6		2	3.9773	2.5771	3.1286	999.9900	0.00047896
Dunnett	1 vs 7		2	8.8326	2.5771	3.1286	999.9900	1.4476E-06

## (8) 摂餌量の検定

## ① 残餌量観察結果

水槽	日目	試験区 (mg/L)						
		対照区	0.22	0.46	1.0	2.2	4.6	10
1	15	2	2	2	2	2	2	2
	16	1	1	1	1	1	1	1
	17	2	2	2	2	2	2	2
	18	1	1	1	1	1	1	1
	19	2	2	2	2	2	2	2
	20	1	1	1	1	1	1	2
	21	1	1	1	1	1	1	1
	22	2	2	2	2	2	2	2
	23	1	1	1	1	1	1	1
	24	1	1	1	1	1	2	2
	25	2	1	2	2	1	2	2
	26	2	2	2	2	2	2	2
	27	1	1	1	1	1	1	2
	28	1	1	1	1	1	1	2
29	2	1	2	2	1	3	3	
30	1	1	1	1	1	1	2	
2	15	2	2	2	2	2	2	2
	16	1	1	1	1	1	1	1
	17	2	2	2	2	2	2	2
	18	1	1	1	1	1	1	1
	19	2	2	2	2	2	2	2
	20	1	1	1	1	1	1	1
	21	1	1	1	1	1	1	1
	22	2	2	2	2	2	2	2
	23	1	1	1	1	1	1	1
	24	1	1	1	1	2	2	2
	25	1	2	2	2	2	2	2
	26	2	2	2	2	2	2	2
	27	1	1	1	1	1	1	2
	28	1	1	1	1	1	1	2
29	2	2	2	2	2	3	3	
30	1	1	1	1	1	1	2	
3	15	2	2	2	2	2	2	2
	16	1	1	1	1	1	1	1
	17	2	2	2	2	2	2	2
	18	1	1	1	1	1	1	1
	19	2	2	2	2	2	2	2
	20	1	1	1	1	1	1	1
	21	1	1	1	1	1	1	1
	22	2	2	2	2	2	2	2
	23	1	1	1	1	1	1	1
	24	1	1	1	1	2	2	2
	25	1	2	2	1	2	2	2
	26	2	2	2	2	2	2	2
	27	1	1	1	1	1	1	2
	28	1	1	1	1	1	1	2
29	1	2	1	2	2	3	3	
30	1	1	1	1	1	2	2	
無	0	0	0	0	0	0	0	
少	1	30	29	28	28	27	23	14
中	2	18	19	20	20	21	22	31
多	3	0	0	0	0	0	3	3
計		48	48	48	48	48	48	48

② Bartlett 等分散性 (摂餌量)

Group	Samples	Mean	S. E.	S. D.	Variance			
1	48	1.3750	0.0706	0.4892	0.2394			
2	48	1.3958	0.0713	0.4942	0.2442			
3	48	1.4167	0.0719	0.4982	0.2482			
4	48	1.4167	0.0719	0.4982	0.2482			
5	48	1.4375	0.0724	0.5013	0.2513			
6	48	1.5833	0.0885	0.6131	0.3759			
7	48	1.7708	0.0801	0.5550	0.3081			
Method	vs	Side	Stat.	0.0500	0.0100	0.0010	Prob.	
Bartlett test		0	4.2424	12.5916	16.8119	22.4577	0.6439	

③ パラメトリック Dunnett 検定 (摂餌量)

Group	Samples	Mean	S. E.	S. D.	Variance			
1	48	1.3750	0.0706	0.4892	0.2394			
2	48	1.3958	0.0713	0.4942	0.2442			
3	48	1.4167	0.0719	0.4982	0.2482			
4	48	1.4167	0.0719	0.4982	0.2482			
5	48	1.4375	0.0724	0.5013	0.2513			
6	48	1.5833	0.0885	0.6131	0.3759			
7	48	1.7708	0.0801	0.5550	0.3081			
Method	vs	Side	Stat.	0.0500	0.0100	0.0010	Prob.	
Dunnett	1 vs 2	2	0.1951	2.5792	3.1325	999.9900	1.0000	
Dunnett	1 vs 3	2	0.3902	2.5792	3.1325	999.9900	0.9978	
Dunnett	1 vs 4	2	0.3902	2.5792	3.1325	999.9900	0.9978	
Dunnett	1 vs 5	2	0.5853	2.5792	3.1325	999.9900	0.9819	
Dunnett	1 vs 6	2	1.9512	2.5792	3.1325	999.9900	0.2134	
Dunnett	1 vs 7	2	3.7072	2.5792	3.1325	999.9900	0.0014	

魚類初期生活段階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 <sub>3</sub>		
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°C)		
対水溶解度	7950 mg/L (25°C)		
ヘンリー一定数	0.00367 atm・m <sup>3</sup> /mole (24°C)		
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°C		
沸点	61.1°C		
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 °C 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"> <li>1. 分析条件で GC/MS を作動し、装置を安定させる。</li> <li>2. 検量線を作成する。</li> <li>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 <math>\mu</math>L を採取し、直ちに GC/MS に注入する。</li> <li>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。</li> </ol>
前処理法	<p>試験液分析の前処理：</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>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。</li> <li>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。</li> <li>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。</li> <li>4. 60 °C 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。</li> </ol>
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 <math>\times</math> 0.25 mm <math>\phi</math> 膜厚 1.0 <math>\mu</math>m)</p> <p>分離管温度 : 180°C 10 min Hold <math>\sim</math> 210°C (10°C/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°C</p> <p>イオン化方式 : 電子衝撃法</p> <p>注入量 : 500 <math>\mu</math>L</p> <p>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 (内部標準物質) ; 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	
	親メダカの対照物質への感受性 (LC <sub>50</sub> ) (対照物質名)	0.21 mg/L(無水物換算) (これまでのLC <sub>50</sub> mean=0.30 mg/L、S. D.=0.10 mg/L、n=25) 硫酸銅 (II) 五水和物、試薬特級	
親のじゅん化	親魚の蓄養期間	2007年1月26日～2007年7月5日(15ヶ月齢)	
	親魚の畜養期間中の薬浴の有無	無	
	環境条件 (水温、明暗周期)	24±1.5℃、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3～6%/日・毎日	
試験条件	試験容器	5 L 容ガラス水槽 (フタ付き容器を用い揮発防止策)	
	試験用水	種類	脱塩素水
		硬度	32～36 mg/L (CaCO <sub>3</sub> 換算値)
		pH	7.1～7.6
	暴露期間	2007年7月5日～2007年8月14日	
	試験濃度 (設定値)	対照区, 0.22, 0.46, 1.0, 2.2, 4.6, 10 mg/L (設定値) (公比2.2)	
	試験溶液流量	対照区	試験用水 17.4 mL/分
		濃度区	原液 1.0 mL/分、試験用水 16.3 mL/分
	供試生物数	60 卵/試験区 (20 卵/試験水槽)	
	連数	3 試験水槽/試験区	
	給餌	ふ化後はヒメダカの成長によりブラインシュリンプふ化幼生 (400～5400 個体/匹/日) を毎日給餌	
	助剤の有無	無	
	試験方式	流水式	
換水又は流水条件	換水回数が5回相当/日		
水温	24.5～24.9℃		

	溶存酸素濃度 (DO)	5.8 ~ 8.0 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 <sub>50</sub> LOEC NOEC	試験最高濃度以上 DUNNETT 法 (全長、生体重、乾燥体重) DUNNETT 法 (全長、生体重、乾燥体重)

#### 4. 試験結果及び考察

項目	内容
毒性値	LC <sub>50</sub> : >11 mg/L (全暴露期間の累積死亡率) LOEC : 5.7 mg/L NOEC : 2.6 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、さらにこの溶液の分析値が 1014 mg/L であることを確認した。</p> <p>本試験時には同方法で 990 mg/L の一次原液を調製し、これを希釈して調製した各濃度の二次原液と試験用水を一定割合で混合し、流水式試験装置に流すことで各濃度の試験溶液とした。</p> <p>被験物質の揮散性が著しいため、試験濃度が試験水槽内での実測濃度となるよう各二次原液を 50% 高い濃度で調製し (増し仕込み)、試験溶液調製時や試験時には容器や試験水槽にフタをして揮散防止を図った。</p> <p>原液交換から次の日の原液交換までの間で試験水槽内の濃度減少 (日内変動) はないものの、暴露期間中には測定値の平均値に対し ±20 % の変動範囲を超える測定値があり、試験成立条件を満たさなかった。分析誤差等もあるものの、被験物質の揮散性に起因する変動が主原因と考えられ、これ以上の試験手順や装置上の対策は困難であった。</p> <p>試験成立条件は完全には満たさなかったものの、以上の理由により試験成立と判断し、流水式試験で日内変動もなかったことから、影響濃度の算出には暴露期間中の全測定値の算術平均値を採用した。</p>

5. 魚類の累積死亡率等

図1 全暴露期間の累積死亡率

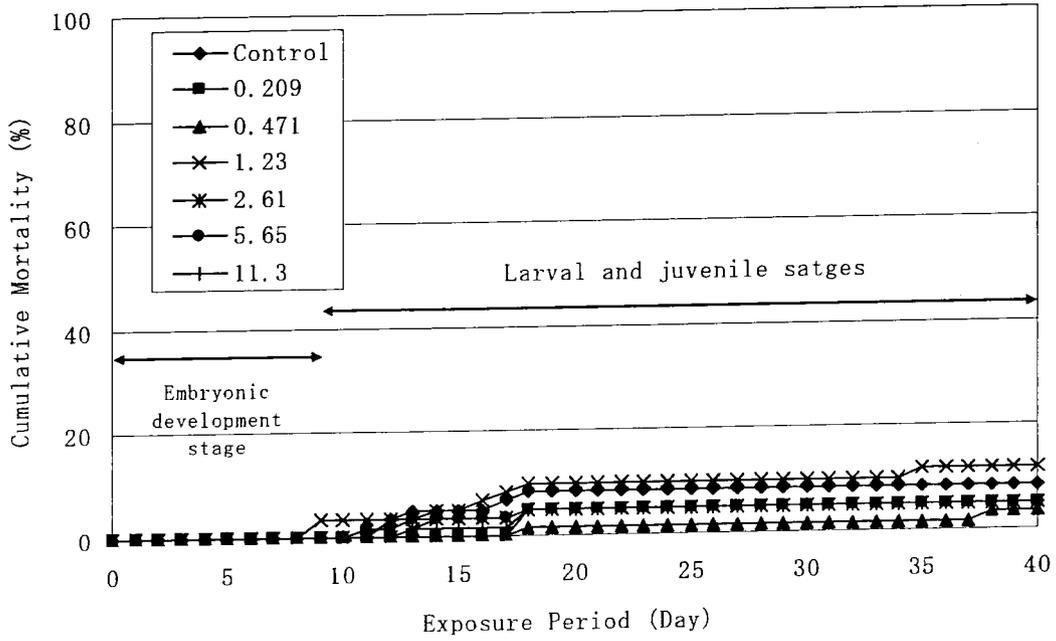


図2 被験物質濃度-死亡率曲線

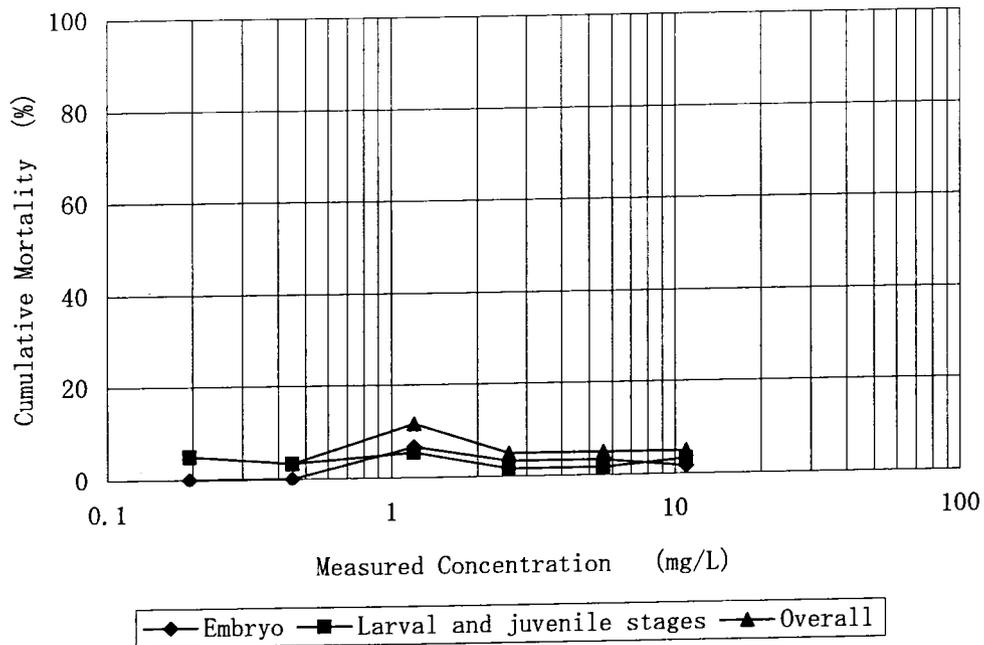
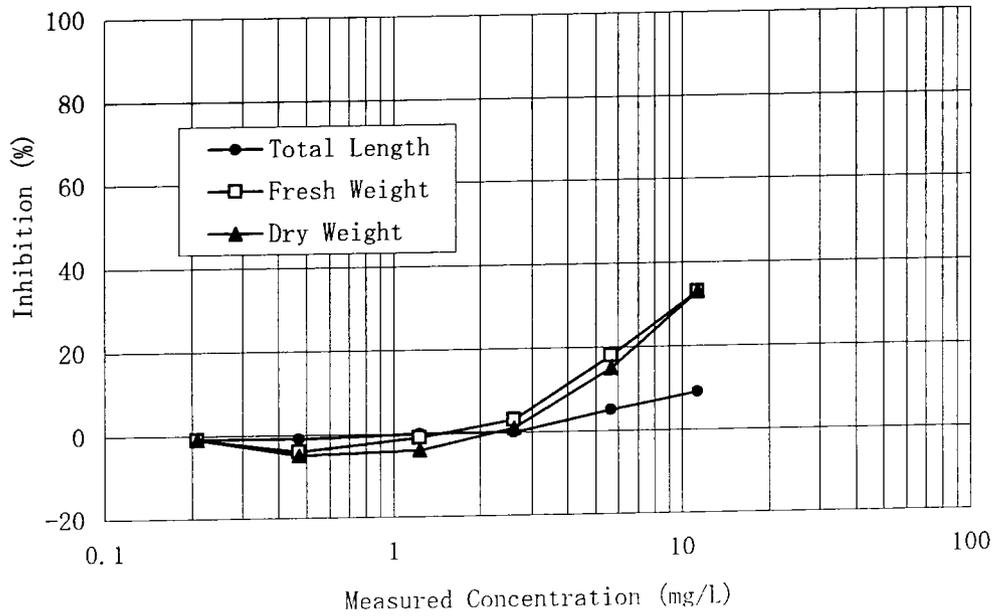


図-3 被験物質濃度-成長抑制率曲線



6. その他

試験実施施設	名称	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16番地	電話 0246-63-6755 FAX 0246-62-3753
試験責任者	職氏名	生物試験室 [REDACTED]	
	経験年数	約5年	
試験番号	No. 2006-生71		
試験期間	2007年 3月12日 から 2008年 9月22日 まで		

作成責任者：生物試験室 [REDACTED]