

環境省殿

本写しは原本と相違ありません

(株)三菱化学安全科学研究所
横浜研究所 運営管理者

最 終 報 告 書

ヘキサデシルトリメチルアンモニウムブロミドのヒメダカ (*Oryzias latipes*)
に対する急性毒性試験

(試験番号：A030432-4)

2005年 4月26日

株式会社三菱化学安全科学研究所

陳 述 書

株式会社三菱化学安全科学研究所

横浜研究所

試 験 委 託 者 : 環境省

表 題 : ヘキサデシルトリメチルアンモニウムブロミドのヒメダカ
(*Oryzias latipes*) に対する急性毒性試験

試 験 番 号 : A 0 3 0 4 3 2 - 4

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、本報告書はその結果を正しく記載したものである。

また、本試験は下記のG L Pに従って実施したものである。

日本国環境省総合環境政策局環境保健部環境安全課環境リスク評価室長通知
「生態影響試験実施に関する基準の改正について」（別添）「生態影響試験実施に関する基準」（環保安第 242 号，2001 年）

2 0 0 5 年 4 月 2 6 日

試験責任者



信 頼 性 保 証 書

株式会社三菱化学安全科学研究所

横浜研究所

試 験 委 託 者 : 環境省

表 題 : ヘキサデシルトリメチルアンモニウムブロミドのヒメダカ
(*Oryzias latipes*) に対する急性毒性試験

試 験 番 号 : A030432-4

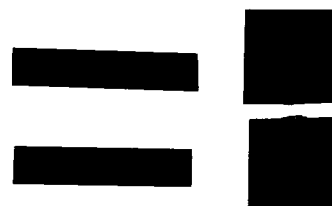
本試験は試験計画書および標準操作手順書に従って実施され、本報告書には
試験に使用した方法、手順が正確に記載されており、試験結果は生データを正
確に反映していることを、下記の査察および監査実施により確認した。

記

実 施 事 項	実 施 日	運営管理者および 試験責任者への報告日
試験計画書監査		
試験計画書	2005年 2月18日	2005年 2月18日
試験の査察		
試験液の調製	2005年 2月21日	2005年 2月21日
魚の投入	2005年 2月21日	2005年 2月21日
魚の観察	2005年 2月25日	2005年 2月25日
最終報告書監査	2005年 4月26日	2005年 4月26日

2005年 4月26日

信頼性保証部門担当者



試験実施概要

1. 表 題 : ヘキサデシルトリメチルアンモニウムブロミドのヒメダカ (*Oryzias latipes*) に対する急性毒性試験
(試験番号 : A 0 3 0 4 3 2 - 4)
2. 試 験 目 的 : 被験物質のヒメダカ (*Oryzias latipes*) に対する急性毒性試験を行い、96 時間の半数致死濃度 (LC50) を求める。
3. 適用ガイドライン : OECD 化学品テストガイドライン No. 203 「魚類急性毒性試験」 (1992 年)
4. 適 用 G L P : 日本国環境省総合環境政策局環境保健部環境安全課環境リスク評価室長通知「生態影響試験実施に関する基準の改正について」 (別添) 「生態影響試験実施に関する基準」
(環保安第 242 号, 2001 年)
5. 試 験 委 託 者 : 環境省
〒100-8975 東京都千代田区霞が関一丁目 2 - 2
委託責任者 総合環境政策局環境保健部環境安全課
環境リスク評価室 室長補佐 XXXXXXXXXX
6. 試 験 受 託 者 : 株式会社三菱化学安全科学研究所
〒105-0014 東京都港区芝二丁目 1 番 30 号
7. 試 験 施 設 : 株式会社三菱化学安全科学研究所 横浜研究所
〒227-0033 神奈川県横浜市青葉区鴨志田町 1000 番地

8. 試験責任者 : [redacted]
環境化学Cグループ

9. 試験担当者 : [redacted] [redacted] (2005年 4月26日)
(試験実施)

[redacted] [redacted] (2005年 4月26日)
(試験実施)

[redacted] [redacted] (2005年 4月26日)
(試験実施)

[redacted] [redacted] (2005年 4月26日)
(試験実施, 報告書作成)

[redacted] [redacted] (2005年 4月26日)
(分析実施)

10. 試験日程 : 試験開始日 2005年 2月18日
実験開始日 2005年 2月21日
実験終了日 2005年 2月25日
試験終了日 2005年 4月26日

11. 保管 : 試験計画書, 生データ, 被験物質, 記録文書および最終報告書は, 横浜研究所の保管施設に保管する。
保管期間は, 最終報告書作成後10年間とし, 以後の保管は試験委託者と協議の上, 決定する。
ただし, 被験物質については, 最終報告書作成後10年間または品質低下をおこさないで安定に保存しうる期間のいずれか短い方の期間とする。

目 次

	頁
要 約	7
1 被験物質	8
1.1 名称, 構造式および物理化学的性状	8
1.2 供試試料	8
1.3 被験物質の確認および保管条件下での安定性	9
2 供試生物	10
3 試験方法	11
3.1 試験条件	11
3.2 希釈水	11
3.3 試験容器および恒温槽等	11
3.4 試験濃度の設定	12
3.5 試験液の調製	12
3.6 試験液の分析	13
3.7 試験操作	13
4 結果の算出	14
4.1 半数致死濃度算出に用いる被験物質濃度の決定	14
4.2 半数致死濃度 (LC50) の算出	14
4.3 0%死亡最高濃度および100%死亡最低濃度	14
5 結果および考察	15
5.1 試験成績の信頼性に影響を及ぼしたと思われる環境要因	15
5.2 試験液中の被験物質濃度	15
5.3 半数致死濃度 (LC50)	15
5.4 0%死亡最高濃度および100%死亡最低濃度	15
5.5 毒性症状	15
5.6 試験液の水温, 溶存酸素濃度およびpH	16
5.7 試験計画書からの逸脱事項	16
Table 1～8	17～23
Figure 1	24
付属資料－1 希釈水の水質	25～26
付属資料－2 試験液の調製	27～28
付属資料－3 試験液の分析	29～38
付属資料－4 結果の算出	39～40

要 約

試 験 委 託 者 : 環境省

表 題 : ヘキサデシルトリメチルアンモニウムブロミドのヒメダカ (*Oryzias latipes*) に対する急性毒性試験

試 験 番 号 : A 0 3 0 4 3 2 - 4

試 験 方 法 :

- 1) 適用ガイドライン: OECD 化学品テストガイドライン No. 203 「魚類急性毒性試験」
(1992年)
- 2) 暴 露 方 式 : 半止水式 (24時間毎に試験液の全量を交換)
水面をテフロンシートで被覆
- 3) 供 試 生 物 : ヒメダカ (*Oryzias latipes*)
- 4) 暴 露 期 間 : 96時間
- 5) 試 験 濃 度 : 対照区, 0.100, 0.150, 0.220, 0.330, 0.500 mg/L
(設定値) 公比: 1.5
- 6) 試 験 液 量 : 5.0 L/容器
- 7) 連 数 : 1 容器/試験区
- 8) 供 試 生 物 数 : 10尾/試験区
- 9) 試 験 温 度 : 24±1 °C
- 10) 照 明 : 室内光, 16時間明 (1000 lux以下) / 8時間暗
- 11) 分 析 法 : 高速液体クロマトグラフィー質量分析 (LC/MS)

試 験 結 果 :

1) 試験液中の被験物質濃度

試験液の分析の結果, 測定値の設定値に対する割合は, 暴露開始時において93~101%, 24時間後において91~100%であった。

2) 96時間暴露後の半数致死濃度(LC50): 0.278 mg/L (95%信頼区間: 0.227 ~ 0.356 mg/L)

1 被験物質

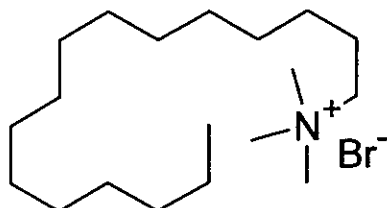
1.1 名称, 構造式および物理化学的性状

名 称 : ヘキサデシルトリメチルアンモニウムブロミド (略称 CETAB)

別 名 : 臭化セチルトリメチルアンモニウム

CAS No. : 57-09-0

構造式 :



分子式 : $C_{19}H_{42}BrN$

分子量*1 : 364.45

融点*1 : 240°C

水溶解度*1,*2 : 水に易溶*1

> 1000mg/L*2 (精製水*3, 目視判定)

*1: 供給者提供資料

*2: 当社測定値

*3: JIS K0557 A4グレードの水, ヤマト科学製 超純水製造装置 WR600A

1.2 供試試料

純度*1 : 100%

ロット番号*1 : PKH1090

供給者 : XXXXXXXXXX

受領量*1 : 25g

受領日 : 2004年 1月22日

外観*1 : 白色粉末

*1: 供給者提供資料

1.3 被験物質の確認および保管条件下での安定性

試験開始前に、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、被験物質の特性が認められることを確認した。

試験期間中、被験物質は当研究所の試験物質保管用冷蔵庫（保管条件：冷蔵，暗所，窒素封入）内に保管した。また，試験終了時にも赤外吸収スペクトルを測定し，試験開始時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は安定であったと判断された。

（装置）フーリエ変換赤外分光分析装置：Nicolet製 AVATAR 320型

2 供試生物

- 1) 和 名 : ヒメダカ
2) 学 名 : *Oryzias latipes*
3) 入手先 : 三京水産株式会社 (東京都新宿区市谷田町一丁目1番地)
4) 入手日 : 2004年11月 5日
5) ムット番号 : 04-H-1105
6) 被鱗体長 : 平均 2.15 cm (1.98 ~ 2.32 cm) , n=10
7) 体 重 : 平均 0.153 g (0.123~0.187 g) , n=10
8) 感受性 : 基準物質 (硫酸銅 (II) 五水和物, 試薬特級) による96時間半数致死濃度 (LC50) = 0.88 mg/L (95%信頼区間 : 0.63~1.2 mg/L)

この値は、以下に示した当研究所におけるLC50値 (1995年以降, n=28) にほぼ一致する (全て無水物換算値)。

平均値 ± 標準偏差 = 0.90 ± 0.28 mg/L

最小値 ~ 最大値 = 0.44 ~ 1.5 mg/L

- 9) 年 齢 : 孵化後 1 年以内
10) じゅん化期間 : 2005年 1月27日~2005年 2月21日
暴露開始前 7 日間の死亡率は 5%未満で、試験には肉眼的に健康で正常な個体を使用した。じゅん化期間中は薬浴は行わなかった (暴露開始前 14 日間のじゅん化条件は以下に示す)。

11) じゅん化条件 :

- 飼育水 : 希釈水 (3.2 参照)
飼育方式 : 流水式 (飼育密度 : 1.0 g/L/日以下)
水温 : 24±1 °C
溶存酸素濃度 : 飽和濃度の 80%以上
pH : 6.5~8.5
照明 : 室内光, 16 時間明 (1000 lux 以下) / 8 時間暗
餌の種類 : テトラベルケ社テトラミン
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 時間毎に試験液の全量を交換）
- 2) 暴露期間： 96 時間
- 3) 試験液量： 5.0 L／容器
(試験液 1.0 L 当たり供試魚重量が 1.0 g を超えないようにした)
- 4) 連数： 1 容器／試験区
- 5) 供試生物数： 10 尾／試験区
- 6) 試験温度： 24 ± 1 °C
- 7) 溶存酸素濃度： 飽和濃度の 60% 以上に維持した（エアレーションなし）
- 8) pH： 試験液の pH 調整は行わなかった
- 9) 照明： 室内光，16 時間明（1000 lux 以下）／8 時間暗
- 10) 給餌： 無給餌

3.2 希釈水

希釈水として、横浜市水道水を活性炭処理することにより残留塩素等を除去し、充分通気、 24 ± 2 °C に温度制御した脱塩素水道水を使用した。希釈水水質測定結果を付属資料－1 に示す。使用時には残留塩素が無いことを確認した。魚飼育水として適正な水質であると判断した。

3.3 試験容器および恒温槽等

- 1) 試験容器： 5.0 L 容ガラス製水槽（水面をテフロンシートで覆う）
- 2) 恒温槽： 塩ビ製水槽（恒温装置，タイテック製 ケルニット CL-80F 型）
- 3) pH/DO/温度計： 堀場製作所製 D-55 型 No. 1
- 4) 電子天秤：
メトラー製 AG204 型
メトラー製 AE163 型
メトラー製 PB3002 型
メトラー製 AB204 型

3.4 試験濃度の設定

以下の表に示す予備試験（各1連，5尾／3 L／試験区）結果に基づき，本試験濃度を次のように決定した。

本試験濃度： 対照区，0.100，0.150，0.220，0.330，0.500 mg/L

公比：1.5

予備試験結果（1回目）

濃度 (mg/L)	96時間の死亡率(%)
0.0500	0
0.200	0
1.00	100

予備試験結果（2回目）

濃度 (mg/L)	96時間の死亡率(%)
0.100	0
0.500	100

3.5 試験液の調製

付属資料－2に示すように，被験物質原液を調製し，希釈水で希釈混合することにより，試験液を調製した。被験物質原液は，用時調製とした。

試験液調製時の希釈水は，調製前に恒温槽内で 24 ± 1 °Cにした。

対照区は希釈水のみとした。

調製時の試験液の状態（外観）は全試験区において無色であった。

3.6 試験液の分析

暴露開始時および24時間後（換水前）に各試験容器より試験液（濃度区は検量線範囲に入るように希釈水で希釈した液）0.75 mLを採取し、メタノールを等量添加し混合後、LC/MSにより分析した。各試験液の被験物質濃度は、標準溶液のピーク面積との比から定量し、幾何平均値を求めた。詳細は付属資料－3に示す。

3.7 試験操作

暴露開始時に供試魚と同水槽でじゅん化した魚10尾の被鱗体長および体重を測定し、被鱗体長が 2.0 ± 0.5 cmであることを確認した。

試験液の水温、溶存酸素濃度、pHを測定後、試験液中に供試魚を1試験区当り10尾投入した。水温、溶存酸素濃度、pHは暴露期間中少なくとも毎日1回（換水前後も含む）測定した。暴露期間中給餌は行わなかった。

暴露開始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あるいは異常を記録した。一般的に記載する症例と定義を以下に示す*。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

4.1 半数致死濃度算出に用いる被験物質濃度の決定

半数致死濃度の算出に用いる被験物質濃度は、測定値（平均）とした。

4.2 半数致死濃度（LC50）の算出

暴露開始 24, 48, 72 および 96 時間後の各試験区における、ヒメダカの死亡数と供試個体数（10 尾）から死亡率（%）を求め、以下の方法で半数致死濃度（LC50）を決定した。

最高濃度区における死亡率	≥ 50%	< 50%
LC50の決定方法	Probit 法, Moving average 法, Binomial法 での算出結果から適切と判断されたものを採用。 可能な限り 95%信頼区間を算出。	推定される濃度領域を記載する。
濃度－死亡率曲線の記載	記載する。	記載する。

4.3 0%死亡最高濃度および100%死亡最低濃度

死亡率が 0%である最高濃度および死亡率が 100%である最低濃度を可能な限り記録した。

また、0%死亡最高濃度とは、死亡個体が観察されない試験最高濃度、100%死亡最低濃度とは全ての個体が死亡した試験最低濃度とした。

5 結果および考察

5.1 試験成績の信頼性に影響を及ぼしたと思われる環境要因

該当する事象はなかった。

5.2 試験液中の被験物質濃度

暴露開始時および24時間後（換水前）に試験液中の被験物質濃度を測定した。その結果を Table 1に、代表的なクロマトグラムを付属資料－3に示す。

試験液の分析（3.6参照）の結果、測定値の設定値に対する割合は、暴露開始時において93～101%，24時間後において91～100%であった。なお、以下の結果（半数致死濃度，0%死亡最高濃度，100%死亡最低濃度）には測定値を用いた。

5.3 半数致死濃度（LC50）

各時間における死亡率を Table 2に、濃度－死亡率曲線を Figure 1に示す。

暴露96時間の対照区の死亡率は 0%であり、試験成立条件を満たした。

以上の結果に基づき算出された半数致死濃度（LC50）を Table 3 および以下に、96 時間の算出結果を付属資料－4に示す。

96時間 LC50： 0.278 mg/L（95%信頼区間：0.227 ～ 0.356 mg/L）

5.4 0%死亡最高濃度および100%死亡最低濃度

0%死亡最高濃度および100%死亡最低濃度を Table 4および暴露96時間における各濃度を以下に示す。

0%死亡最高濃度： 0.214 mg/L

100%死亡最低濃度： 0.496 mg/L

5.5 毒性症状

観察された毒性症状を Table 5に示す。

対照区，0.100 mg/Lの濃度区では暴露期間中に異常な症状は観察されなかった。

0.150 mg/L，0.220 mg/L，0.330 mg/Lの濃度区では異常遊泳（動作の緩慢）が観察された。

0.500 mg/Lの濃度区では観察時点で全魚死亡のため観察は不可能であった。

5.6 試験液の水温，溶存酸素濃度およびpH

試験液の水温を Table 6，溶存酸素濃度を Table 7，pHを Table 8に示す。

水温はすべての試験区で 24 ± 1 ℃で，溶存酸素濃度はすべての試験区で飽和溶存酸素濃度（24.0℃の飽和溶存酸素濃度：8.25 mg/L）の60%以上であり，いずれも試験基準を満たした。pHはヒメダカの飼育環境として適正範囲（6.0～8.5）内であった。

5.7 試験計画書からの逸脱事項

該当する事象はなかった。

以 上

Table 1 Measured Concentration of the Test Substance in Test Water
(Semi-Static Condition)

Nominal Concentration (mg/L)	Measured Concentration (mg/L) (Percent of Nominal)		Mean ^a Measured Concentration (mg/L)
	0 Hour (new)	24 Hours (old)	
Control	<0.00007	<0.00007	----
0.100	0.0965 (97)	0.0907 (91)	0.0936 (94)
0.150	0.151 (101)	0.149 (99)	0.150 (100)
0.220	0.210 (95)	0.219 (100)	0.214 (97)
0.330	0.307 (93)	0.311 (94)	0.309 (94)
0.500	0.498 (100)	0.494 (99)	0.496 (99)

a : geometric mean

new : freshly prepared test solutions

old : test solutions after 24 hours exposure

Table 2 Mortality of the Medaka (*Oryzias latipes*) Exposed to the Test Substance

Nominal Concentration (mg/L)	Mean ^a Measured Concentration (mg/L)	Cumulative Mortality (Percent Mortality)			
		24 Hours	48 Hours	72 Hours	96 Hours
Control	----	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
0.100	0.0936	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
0.150	0.150	1 (10)	1 (10)	1 (10)	1 (10)
0.220	0.214	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
0.330	0.309	5 (50)	9 (90)	9 (90)	9 (90)
0.500	0.496	10 (100)	10 (100)	10 (100)	10 (100)

a : geometric mean

Table 3 Calculated LC50 Values

Exposure Period (Hours)	LC50 (mg/L)	95-Percent Confidence Limits (mg/L)	Statistical Method
24	0.309 *	0.214 - 0.496	Binomial
48	0.278 *	0.227 - 0.356	Moving average
72	0.278 *	0.227 - 0.356	Moving average
96	0.278 *	0.227 - 0.356	Moving average

* : Using the concentrations of 0.0936 - 0.496 mg/L

Table 4 Observation of the Highest Concentration in 0% Mortality and the Lowest Concentration in 100% Mortality

Exposure Period (Hours)	Highest Concentration in 0% Mortality (mg/L)	Lowest Concentration in 100% Mortality (mg/L)
24	0.214	0.496
48	0.214	0.496
72	0.214	0.496
96	0.214	0.496

Table 5 Observed Toxicological Symptoms

Nominal Concentration (mg/L)	Mean ^a Measured Concentration (mg/L)	Symptoms (Symptom-number of fish)			
		24 Hours	48 Hours	72 Hours	96 Hours
Control	----	N	N	N	N
0.100	0.0936	N	N	N	N
0.150	0.150	N	N	N	ASR-2
0.220	0.214	ASR-2	ASR-2	ASR-5	ASR-5
0.330	0.309	ASR-5	ASR-1	ASR-1	ASR-1
0.500	0.496	--	--	--	--

a : geometric mean

N : No toxicological symptom was observed.

ASR : abnormal swimming (reduced activity)

-- : No observation was made because all fish were dead at this observation time.

Table 6 Temperature

Nominal Concentration (mg/L)	Mean ^a Measured Concentration (mg/L)	Temperature (°C)							
		0 Hour	24 Hours		48 Hours		72 Hours		96 Hours
		new	old	new	old	new	old	new	old
Control	----	23.8	23.7	23.7	23.8	23.8	23.8	23.7	23.8
0.100	0.0936	23.7	23.7	23.7	23.9	23.8	23.8	23.6	23.9
0.150	0.150	23.7	23.8	23.7	23.9	23.8	23.9	23.6	24.0
0.220	0.214	23.7	23.8	23.7	23.9	23.8	23.9	23.6	24.0
0.330	0.309	23.8	23.8	23.7	24.0	23.8	24.0	23.6	24.1
0.500	0.496	23.8	--	--	--	--	--	--	--

minimum:23.6

maximum:24.1

a : geometric mean

new : freshly prepared test solutions

old : test solutions after 24 hours exposure

-- : No measurement was made because all fish were dead at this observation time.

Table 7 Dissolved Oxygen Concentrations

Nominal Concentration (mg/L)	Mean ^a Measured Concentration (mg/L)	Dissolved Oxygen Concentration (mg/L)							
		0 Hour	24 Hours		48 Hours		72 Hours		96 Hours
		new	old	new	old	new	old	new	old
Control	----	8.3	5.5	8.3	5.4	8.3	5.5	8.3	6.0
0.100	0.0936	8.3	5.4	8.3	5.3	8.3	5.6	8.3	5.8
0.150	0.150	8.3	5.9	8.3	6.0	8.3	6.3	8.3	6.3
0.220	0.214	8.3	5.7	8.3	5.7	8.3	5.8	8.3	6.0
0.330	0.309	8.3	5.5	8.3	6.8	8.3	7.9	8.3	7.5
0.500	0.496	8.3	--	--	--	--	--	--	--

minimum:5.3

maximum:8.3

a : geometric mean

new : freshly prepared test solutions

old : test solutions after 24 hours exposure

-- : No measurement was made because all fish were dead at this observation time.

Table 8 pH Values

Nominal Concentration (mg/L)	Mean ^a Measured Concentration (mg/L)	pH							
		0 Hour	24 Hours		48 Hours		72 Hours		96 Hours
		new	old	new	old	new	old	new	old
Control	----	7.3	7.0	7.3	7.0	7.3	7.0	7.3	7.0
0.100	0.0936	7.3	6.9	7.3	6.9	7.3	7.0	7.3	7.0
0.150	0.150	7.3	6.9	7.4	7.0	7.3	7.0	7.4	7.1
0.220	0.214	7.3	6.9	7.4	7.0	7.3	7.0	7.4	7.0
0.330	0.309	7.3	6.9	7.4	7.0	7.3	7.1	7.4	7.1
0.500	0.496	7.3	--	--	--	--	--	--	--

minimum:6.9

maximum:7.4

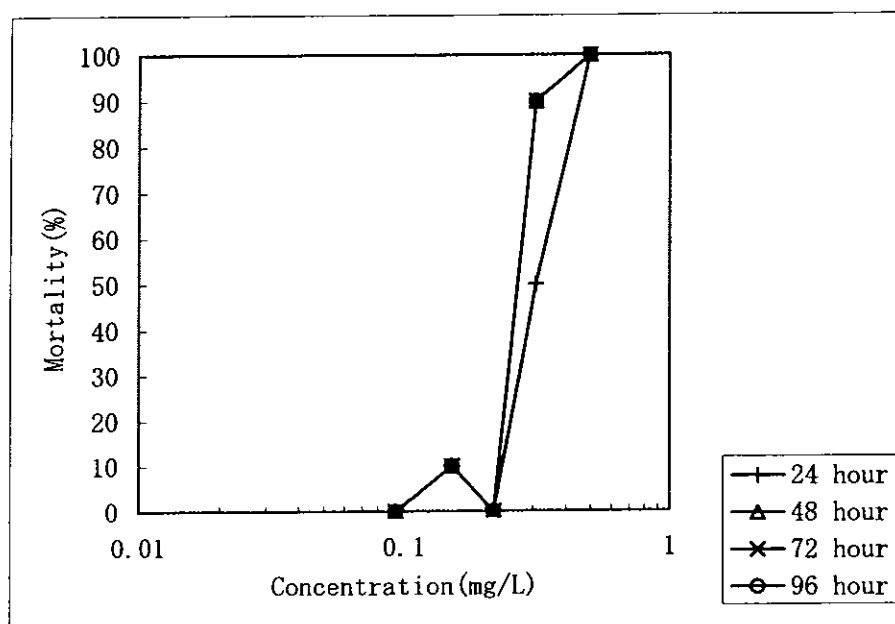
a : geometric mean

new : freshly prepared test solutions

old : test solutions after 24 hours exposure

-- : No measurement was made because all fish were dead at this observation time.

Figure 1 Concentration-Mortality Curve



付属資料－ 1

希积水の水質

Table A-1 Dilution water quality

Parameter	Concentration	
BOD	<1.0	mg/L
COD	1.3	mg/L
pH	7.4	(25°C)
Coliform group bacteria	N.D.	
Oil	N.D.	
Cadmium	<0.001	mg/L
Cyanide	N.D.	
Lead	<0.01	mg/L
Chromium	<0.005	mg/L
Arsenic	<0.005	mg/L
Mercury	<0.0001	mg/L
Free chlorine	<0.02	mg/L
Bromide	<0.1	mg/L
Fluoride	<0.08	mg/L
Sulfide	<0.03	mg/L
Total ammonium	<0.1	mg/L
Copper	<0.005	mg/L
Zinc	<0.01	mg/L
Aluminum	0.05	mg/L
Tin	<0.1	mg/L
Manganese	<0.1	mg/L
Iron	<0.1	mg/L
Nickel	<0.01	mg/L
Total phosphorus	<0.01	mg/L
Selenium	<0.005	mg/L
Phenol	<0.002	mg/L
Anionic surfactant	<0.02	mg/L
Evaporation residue	92	mg/L
Electric conductivity	109	μS/cm
Total hardness (as CaCO ₃)	40	mg/L
Alkalinity	31	mg/L
Sodium	6.2	mg/L
Potassium	<1.0	mg/L
Calcium	12	mg/L
Magnesium	2.9	mg/L

sampling date: August 2, 2004

付属資料－ 2

試験液の調製

1. 準備

① 被験物質原液の調製

採取量	→	50	mg
溶媒	→	精製水	
最終容量	→	500	mL
容器	→	メスフラスコ	500mL
濃度	→	100	mg/L
混合方式	→	スターラー攪拌 15分, 超音波5分	

2. 試験液の調製

①の原液を下記の表の通り採取し, 試験用水で希釈して試験液とする。

試験用水(最終容量)	→	5.0	L
容器	→	5.0L容ガラス水槽	
混合方式	→	ガラス棒で攪拌	
濃度公比	→	1.5	

(以下の濃度表示は, 最小桁数に合わせている)

設定試験濃度 mg/L	区No. (略称)	①原液 mL
対照区	C	0
0.100	Conc.1	5.00
0.150	Conc.2	7.50
0.220	Conc.3	11.00
0.330	Conc.4	16.50
0.500	Conc.5	25.00

付属資料－ 3

試験液の分析

1 試験液の分析方法

1) 各試験液（濃度区は検量線範囲に入るように希釈水で希釈した液） 0.75 mLを測定用バイアルに採取し、メタノールを等量添加し混合後、LC/MSにより分析した。代表的なクロマトグラムをFigure A-3-2(2), (3), (4), (5), (7), (8), (9), (10)に示した。

2) メタノールで調製した標準溶液 0.75 mLを測定用バイアルに採取し、精製水を等量添加し混合後、LC/MSにより分析した。クロマトグラムをFigure A-3-2 (1), (6)に示した。

3) 各試験液の被験物質濃度は、各分析時に測定した標準溶液のピーク面積を用いて、一点検量法により定量した。

なお、暴露開始前に試験濃度範囲の全域にわたって検量線を作成し、直線性を確認している。（「3 検量線」参照）

2 高速液体クロマトグラフィー質量分析 (LC/MS) 測定条件

(装置)

高速液体クロマトグラフ質量分析計 Agilent 1100 型 No.3

ワークステーション: Agilent 1100 シリーズ^{*} (Windows NT)

高速液体クロマトグラフ (HPLC) : Agilent Technologies 1100 型

デガッサ : G 1 3 7 9 A 型

送液ポンプ : G 1 3 1 2 A 型 (ハイパポンプ^{*})

オートサンプラ : G 1 3 1 3 A 型

カラムオーブン : G 1 3 1 6 A 型

質量選択検出器 (MSD) : G 1 9 4 6 D 型

(条件)

[HPLC 条件]

カラム : GL Sciences 製 Inertsil ODS-3 5 μ m 3.0mm i.d. \times 150mm

カラムオーブン : 40 $^{\circ}$ C

溶離液 : A 液 0.5mM IPC-PFFA-5^{*} 水溶液 *: Nonafluorovaleric Acid

B 液 メタノール

0.00min A 液 20%, B 液 80%

0.75min A 液 5%, B 液 95%

7.00min A 液 5%, B 液 95%

7.01min A 液 20%, B 液 80%

試料注入量 : 5 μ L

流速 : 0.4 mL/min

[MSD 条件] API-ES (Atmospheric Pressure Ionization - Electrospray) で分析

Ionization : Electrospray

Fragmentor : 75 V

Nebulizer : N₂ (30 psi)

Drying gas : N₂ (10 L/min, 300 $^{\circ}$ C)

Mode : Positive

SIM (Selected Ion Monitoring) 条件 :

Start Time = 0 min

Quant ion = m/z 284.50

3 検量線

メタノールを用い, 0, 0.005 ~ 0.050 mg/L の標準溶液を調製した。この標準溶液を一定量採取し等量の精製水で希釈したものを LC/MS で測定した。横軸に濃度 (mg/L) を, 縦軸にピーク面積 (count) をとり, 検量線を作成した。検量線の最小二乗法による直線回帰式の相関係数は, 1.00 と良好であった。作成した検量線を Figure A-3-1 に示した。

4 検出限界

最小検出ピーク面積を1000 countに設定し、これに相当する試験液中の被験物質濃度 0.00007 mg/Lを検出限界とした。

5 添加回収試験

分析前処理は「1 試験液の分析方法」に示したように、試験液とメタノールを混合する操作だけであるので、添加回収試験の必要はなかった。したがって、回収率の補正は行わなかった。

Figure A-3-1 Calibration curve

Input Data		
No.	Concentration (mg/L)	Peak Area (count)
1	0	0
2	0.005	84802
3	0.010	175369
4	0.020	348653
5	0.050	850887

$$Y = 17,089,293X$$

$$r = 1.00$$

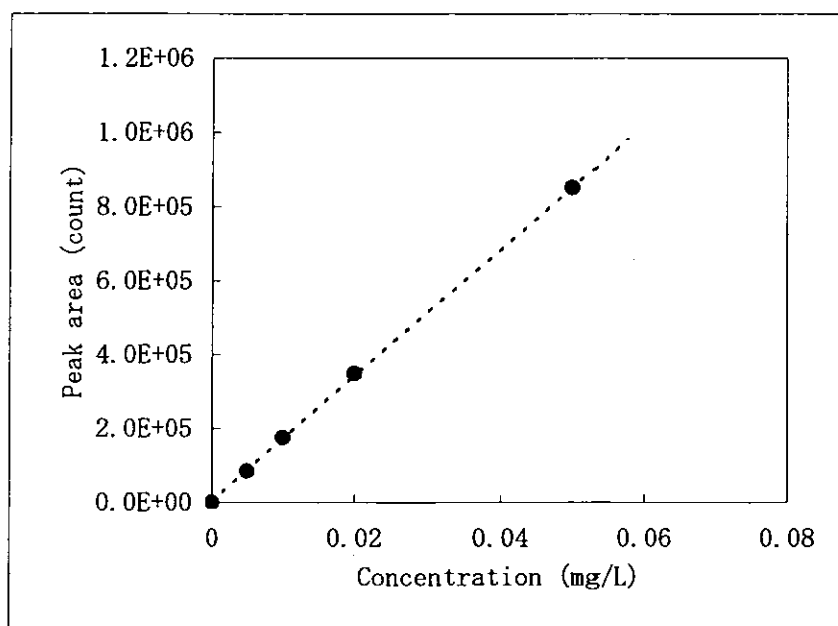


Figure A-3-2 Representative chromatograms

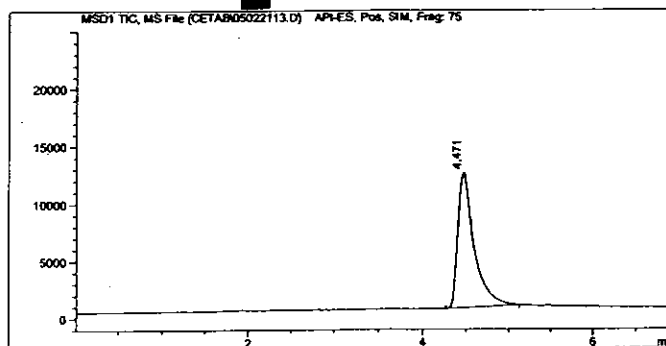
(1) Standard 0.010 mg/L ; 0 Hour

Data file : C:\HPCHEM\1\DATA\CETAB\05022113.D

```

=====
Injection Date : Mon, 21. Feb. 2005      Seq Line : 13
Study No.      : A030432-4              Location  : Vial 1
Test Substance : CETAB                  Inj. No.  : 1
Sample Name    : STD 0.01mg/L           Inj. Vol.  : 5 µl
Acq. Method    : CETAB.M
Acq Operator   : ██████████
=====

```



Area Percent Report

#	Meas. Ret.	Peak T	Width	Area	Height	Area %
1	4.471	MM	0.219	155611	11841	100.0
Total:				155611	11841	

*** End of Report ***

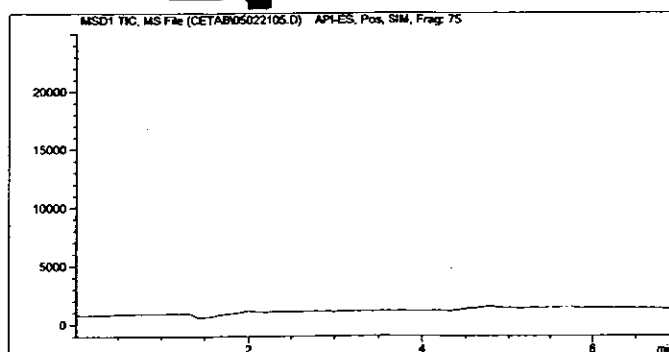
(2) Control ; 0 Hour

Data file : C:\HPCHEM\1\DATA\CETAB\05022105.D

```

=====
Injection Date : Mon, 21. Feb. 2005      Seq Line : 5
Study No.      : A030432-4              Location  : Vial 11
Test Substance : CETAB                  Inj. No.  : 1
Sample Name    : FISOHC                 Inj. Vol.  : 5 µl
Acq. Method    : CETAB.M
Acq Operator   : ██████████
=====

```



Area Percent Report

#	Meas. Ret.	Peak T	Width	Area	Height	Area %
Total:						

*** End of Report ***

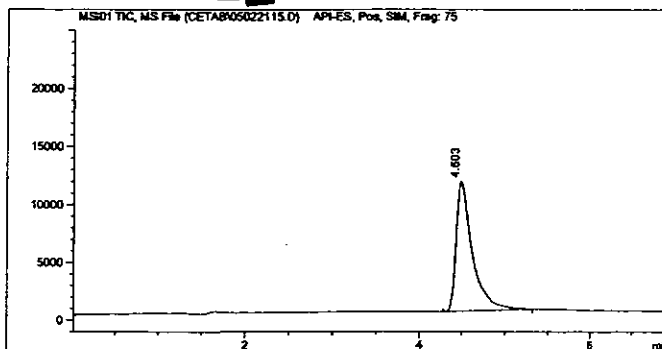
Figure A-3-2 Continued

(3) 0.100 mg/L nominal ; 0 Hour

Data file : C:\HPCHEM\1\DATA\CETAB\05022115.D

```

=====
Injection Date : Mon, 21. Feb. 2005      Seq Line   :      15
Study No.      : A030432-4              Location    : Vial 12
Test Substance : CETAB                  Inj. No.    :      1
Sample Name    : FIS0hc1                Inj. Vol.   :      5 µl
Acq. Method    : CETAB.M
Acq Operator   : ██████████
=====
  
```



Area Percent Report						
#	Meas.	Ret. Peak T	Width	Area	Height	Area %
1	4.503	MM	0.221	150157	11307	100.0
Total:				150157	11307	

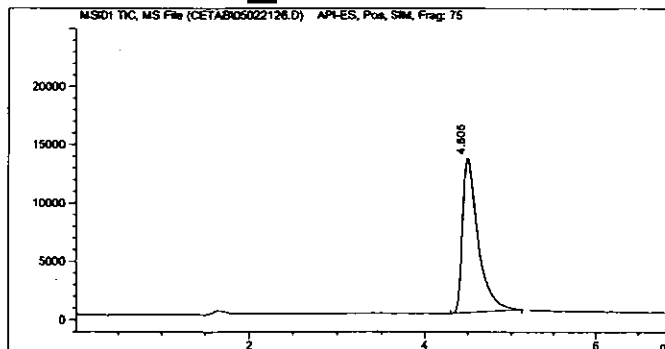
*** End of Report ***

(4) 0.220 mg/L nominal ; 0 Hour

Data file : C:\HPCHEM\1\DATA\CETAB\05022126.D

```

=====
Injection Date : Mon, 21. Feb. 2005      Seq Line   :      1
Study No.      : A030432-4              Location    : Vial 14
Test Substance : CETAB                  Inj. No.    :      1
Sample Name    : FIS0hc3                Inj. Vol.   :      5 µl
Acq. Method    : CETAB.M
Acq Operator   : ██████████
=====
  
```



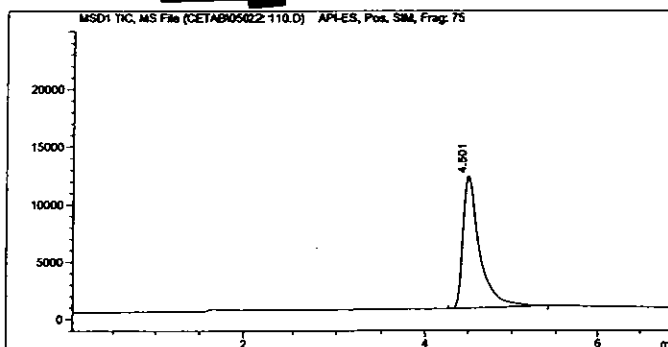
Area Percent Report						
#	Meas.	Ret. Peak T	Width	Area	Height	Area %
1	4.505	MM	0.206	163758	13274	100.0
Total:				163758	13274	

*** End of Report ***

Figure A-3-2 Continued
(5) 0.500 mg/L nominal ; 0 Hour

Data file : C:\HPCHEM\1\DATA\CETAB\050 22110.D

```
=====
Injection Date : Mon, 21, Feb, 2005      Seq Line : 10
Study No.      : A030432-4              Location  : Vial 16
Test Substance : CETAB                   Inj. No.   : 1
Sample Name    : FIS0bc5                 Inj. Vol.  : 5 µl
Acq. Method    : CETAB.M
Acq Operator   : ██████████
=====
```



Area Percent Report

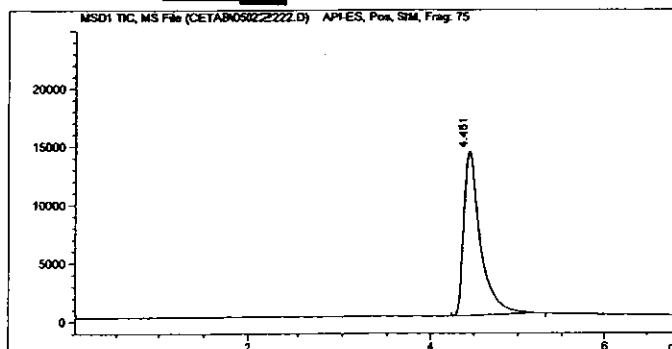
#	Meas. Ret.	Peak T	Width	Area	Height	Area %
1	4.501	MM	0.224	155045	11532	100.0
Total:				155045	11532	

*** End of Report ***

(6) Standard 0.010 mg/L ; 24 Hours

Data file : C:\HPCHEM\1\DATA\CETAB\050 22222.D

```
=====
Injection Date : Tue, 22, Feb, 2005      Seq Line : 22
Study No.      : A030432-4              Location  : Vial 11
Test Substance : CETAB                   Inj. No.   : 1
Sample Name    : STD 0.01mg/L           Inj. Vol.  : 5 µl
Acq. Method    : CETAB.M
Acq Operator   : ██████████
=====
```



Area Percent Report

#	Meas. Ret.	Peak T	Width	Area	Height	Area %
1	4.451	MM	0.219	185584	14116	100.0
Total:				185584	14116	

*** End of Report ***

Figure A-3-2 Continued

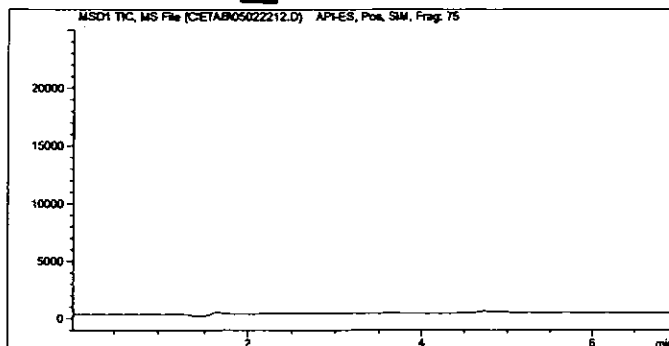
(7) Control ; 24 Hours

Data file : C:\HPCHEM\1\DATA\CETAB\05022212.D

```

=====
Injection Date : Tue, 22. Feb. 2005      Seq Line :      12
Study No.      : A030432-4              Location  : Vial 1
Test Substance : CETAB                  Inj. No.  :      1
Sample Name    : FIS24hC                Inj. Vol. :      5 µl
Acq. Method    : CETAB.M
Acq Operator   : ██████████
=====

```



```

=====
Area Percent Report
=====
# Meas. Ret. Peak T Width Area Height Area %
=====
Total:
=====
*** End of Report ***
=====

```

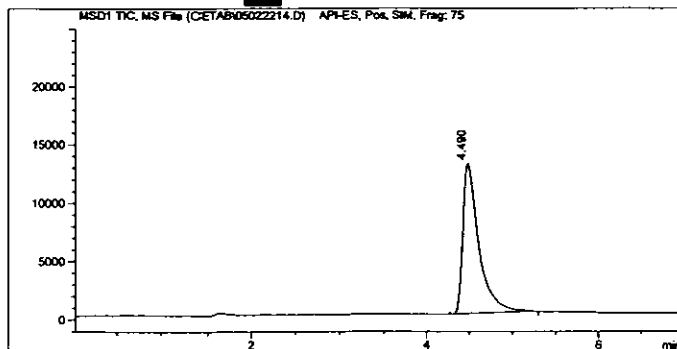
(8) 0.100 mg/L nominal ; 24 Hours

Data file : C:\HPCHEM\1\DATA\CETAB\05022214.D

```

=====
Injection Date : Tue, 22. Feb. 2005      Seq Line :      14
Study No.      : A030432-4              Location  : Vial 2
Test Substance : CETAB                  Inj. No.  :      1
Sample Name    : FIS24hC1              Inj. Vol. :      5 µl
Acq. Method    : CETAB.M
Acq Operator   : ██████████
=====

```



```

=====
Area Percent Report
=====
# Meas. Ret. Peak T Width Area Height Area %
=====
1 4.490 MM 0.217 168408 12935 100.0
Total: 168408 12935
=====
*** End of Report ***
=====

```

Figure A-3-2 Continued

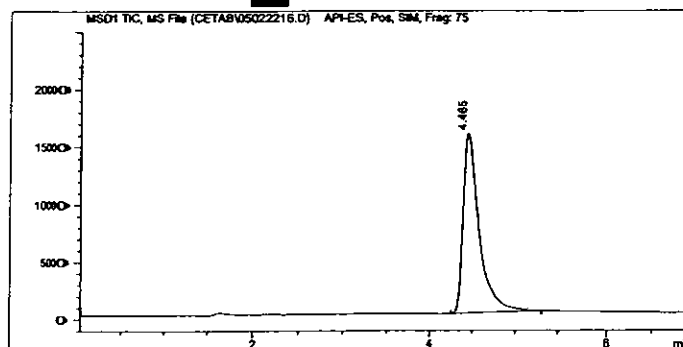
(9) 0.220 mg/L nominal ; 24 Hours

Data file : C:\HPCHEM\1\DATA\CETAB\05022216.D

```

=====
Injection Date : Tue, 22. Feb. 2005      Seq Line : 16
Study No.      : A030432-4              Location  : Vial #
Test Substance : CETAB                  Inj. No.  : 1
Sample Name    : FIS24hC3               Inj. Vol. : 5 µl
Acq. Method    : CETAB.M
Acq Operator   : ██████████
=====

```



Area Percent Report						
#	Meas.	Ret.	Peak T	Width	Area	Height
1	4.465	MM	0.216	203046	15663	100.0
Total:				203046	15663	

*** End of Report ***

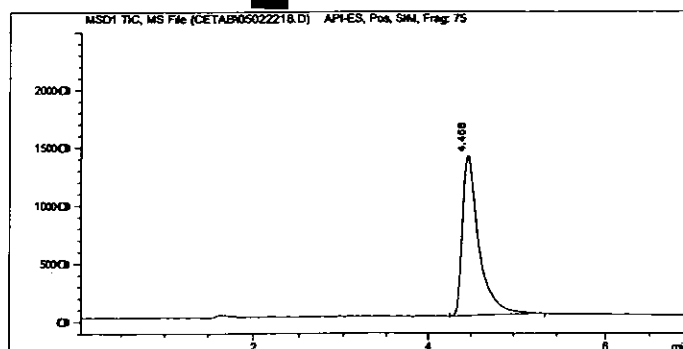
(10) 0.500 mg/L nominal ; 24 Hours

Data file : C:\HPCHEM\1\DATA\CETAB\05022218.D

```

=====
Injection Date : Tue, 22. Feb. 2005      Seq Line : 18
Study No.      : A030432-4              Location  : Vial #
Test Substance : CETAB                  Inj. No.  : 1
Sample Name    : FIS24hC3               Inj. Vol. : 5 µl
Acq. Method    : CETAB.M
Acq Operator   : ██████████
=====

```



Area Percent Report						
#	Meas.	Ret.	Peak T	Width	Area	Height
1	4.468	MM	0.221	183450	13812	100.0
Total:				183450	13812	

*** End of Report ***

付属資料－ 4

結果の算出

Table A-4 Calculation of the LC50 (Representative, 96hr.)

TOXDAT MULTI-METHOD PROGRAM (BINOMIAL, MOVING AVERAGE AND PROBIT METHODS)					
魚類急性毒性試験					
Time: 96hr					
Conc. No.	CONC. mg/L	NUMBER EXPOSED	NUMBER DEAD	PERCENT DEAD	BINOMIAL PROB. (%)
Control	0	10	0	0	—
Conc. 1	0.0936	10	0	0	0.09765625
Conc. 2	0.15	10	1	10	1.07421875
Conc. 3	0.214	10	0	0	0.09765625
Conc. 4	0.309	10	9	90	1.07421875
Conc. 5	0.496	10	10	100	0.09765625

THE BINOMIAL TEST SHOWS THAT 0.214 AND 0.309 CAN BE
USED AS STATISTICALLY SOUND CONSERVATIVE 95 PERCENT
CONFIDENCE LIMITS SINCE THE ACTUAL CONFIDENCE LEVEL
ASSOCIATED WITH THESE LIMITS IS 98.828125 PERCENT.
AN APPROXIMATE LC50 FOR THIS SET OF DATA IS 0.267307813561211

>>>>>>>RESULTS CALCULATED USING THE MOVING AVERAGE METHOD

SPAN	G	LC50	95 PERCENT CONFIDENCE LIMITS
3	0.201959423	0.278252831	0.226822401 AND 0.355814771

>>>>>>>RESULTS CALCULATED USING THE PROBIT METHOD

ITERATIONS	G	H	GOODNESS OF FIT PROBABILITY
9	2.330497807	2.881904765	0.034391718

SINCE THE PROBABILITY IS LESS THAN 0.05, RESULTS CALCULATED
USING THE PROBIT METHOD PROBABLY SHOULD NOT BE USED.

SLOPE =	9.465909843		
95 PERCENT CONFIDENCE LIMITS=		-4.98471789	AND 23.91653757

LC50 =	0.253579885		
95 PERCENT CONFIDENCE LIMITS		0	AND + INFINITY

LC1 =	0.143981759		
95 PERCENT CONFIDENCE LIMITS=		0	AND 0.220487007