

環境庁殿

## 試 験 報 告 書

パルミチン酸のオオミジンコ(*Daphnia magna*)に対する繁殖阻害試験

(試験番号:NMMP/E99/3010)

平成12年12月11日作成

株式会社 東レリサーチセンター



# 最終報告書変更届

(変更届番号:NMMP/E99/3011)

(株)東レリサーチセンター 名古屋研究部において作成した最終報告書の内容に変更を生じたので変更届を作成する.

—記—

## I. 変更する最終報告書

平成11年度生態影響試験 最終報告書

試験番号 :NMMP/E99/3010

試験名 :パルミチン酸のオオミジンコ(*Daphnia magna*)に対する繁殖阻害試験

試験責任者 :株式会社 東レリサーチセンター 名古屋研究部 [REDACTED]

運営管理者 :株式会社 東レリサーチセンター 名古屋研究部 [REDACTED]

試験委託者 :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  
室長補佐 [REDACTED]

## II. 変更項目, 変更時期及び変更理由

2頁に記載.

## III. 署名, 承認

3頁に記載.



## Ⅱ. 変更項目, 変更時期及び変更理由

頁(行)	変更前	変更後	変更時期	変更理由
p.24 Table 7 脚注	*1 : Indicates a significant difference by <u>Dunnett multiple comparison</u> procedure, Two-sided test.	*1 : Indicates a significant difference by <u>F&amp;t-test</u> procedure, Two-sided test.	2002 年 2 月	入力ミス



Ⅲ. 署名, 承認

変更届作成日 : 2002 年 2 月 8 日

試験責任者(変更届作成者)

: [redacted] [redacted] (2002 年 2 月 8 日)

QAU 担当者 確認 : [redacted] [redacted] (2002 年 2 月 8 日)

運営管理者 承認 : [redacted] [redacted] (2002 年 02 月 08 日)

試験委託者: 環境省

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

承認 : [redacted] [redacted] (2002 年 2 月 18 日)



# 陳 述 書

株式会社 東レリサーチセンター  
名古屋研究部

試験委託者 : 環境庁

表題 : パルミチン酸のオオミジンコ(*Daphnia magna*)に対する繁殖阻害試験

試験番号 : NMMP/E99/3010

上記試験は環境庁のGLP規則に従って実施したものである。

平成 / 2 年 / 2 月 22 日

運営管理者



## 信 頼 性 保 証 証 明

株式会社 東レリサーチセンター  
名古屋研究部

試験委託者 : 環境庁

表題 : パルミチン酸のオオミジンコ(*Daphnia magna*)に対する繁殖阻害試験

試験番号 : NMMP/E99/3010

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通り確認した。

## 記

	実施日	運営管理者および 試験責任者への報告日
試験実施状況査察	平成 12 年 4 月 17 日	平成 12 年 4 月 17 日
試験報告書監査	平成 12 年 7 月 19 日	平成 12 年 10 月 24 日

平成 12 年 12 月 22 日

信頼性保証業務担当者














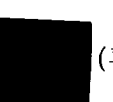

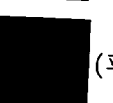


## 試験実施概要

1. 表題 : パルミチン酸のオオミジンコ(*Daphnia magna*)に対する繁殖阻害試験
2. 試験目的 : パルミチン酸について、オオミジンコ(*Daphnia magna*)に対する繁殖阻害試験を行い、21 日間の最小作用濃度(LOEC)と最大無作用濃度(NOEC)を求め、可能な限り 50%繁殖阻害濃度(ErC50)も求める。
3. 適用ガイドライン : 本試験は、OECD 化学品テストガイドライン No.211「オオミジンコ繁殖試験」(1998年)に準拠して実施した。
4. 適用GLP : 本試験は環境庁のGLP規則に準拠した。
5. 試験委託者
- 名称 : 環境庁
- 住所 : (〒100-8975) 東京都千代田区霞が関一丁目2-2
- 委託責任者 : 企画調整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
- 名称 : 株式会社 東レリサーチセンター
- 所在地 : (〒103-0022) 東京都中央区日本橋室町3-1-8 都ビル内
7. 試験施設
- 名称 : 株式会社 東レリサーチセンター 名古屋研究部
- 所在地 : (〒455-8502) 愛知県名古屋市港区大江町9-1



## 8. 試験関係者:

試験責任者			(平成 12 年 12 月 2 / 日)
試験担当者			(平成 12 年 12 月 2 / 日)
試験担当者			(平成 12 年 12 月 2 / 日)
試験担当者			(平成 12 年 12 月 2 / 日)
試験担当者			(平成 12 年 12 月 2 / 日)
試験担当者			(平成 12 年 12 月 2 / 日)
試験担当者			(平成 12 年 12 月 2 / 日)
試験担当者			(平成 12 年 12 月 2 / 日)

9. 試験期間:      試験開始日      平成 11 年 11 月 16 日  
                          暴露期間      平成 12 年 4 月 11 日 ～ 平成 12 年 5 月 2 日  
                          試験終了日      平成 12 年 12 月 2 / 日

## 10. 保管:

~~試験計画書、生データ、記録文書および試験報告書は、試験報告書作成後10年間、株式会社東レリサーチセンター名古屋研究部の保管施設に保管する。その後の保管については試験委託者と協議のうえ決定する。~~ 訂正



## Ⅱ. 変更項目, 変更時期及び変更理由

頁(行)	変更前	変更後	変更時期	変更理由
P.5 (下から4行)	10. 保管: 試験計画書、生データ、記録文書および試験報告書は、試験報告書作成後10年間、株式会社 東レリサーチセンター名古屋研究部の保管施設に保管する。その後の保管については試験委託者と協議のうえ決定する。	10. 保管: 試験計画書、生データ、記録文書および試験報告書は、試験報告書作成後10年間、株式会社 東レリサーチセンター名古屋研究部の保管施設あるいは当社研究部の査察・監査のもとに外部保管施設である株式会社ワンビシアーカイブズに保管する。その後の保管については試験委託者と協議のうえ決定する。	2002 年 7 月	今後、当研究部試資料保管施設の保管容量が不足するため、外部保管施設である株式会社ワンビシアーカイブズを利用する。



III. 署名, 承認

変更届作成日 : 2002 年 07 月 11 日

試験責任者(変更届作成者)

: [redacted] (2002 年 07 月 11 日)

QAU 担当者 確認 : [redacted] (2002 年 07 月 11 日)

運営管理者 承認 : [redacted] (2002 年 07 月 11 日)

試験委託者: 環境省

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

承認 : [redacted] (2002 年 8 月 5 日)



## 目 次

	頁
要 旨 .....	7
1 被験物質 .....	9
1.1 名称、構造式および物理化学的性状 .....	9
1.2 供試試料 .....	9
1.3 被験物質の確認、保管方法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 .....	10
3.1 試験条件 .....	10
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 .....	11
3.5 試験液の調製 .....	11
3.6 試験液の分析 .....	12
3.7 試験操作 .....	12
4 結果の算出 .....	13
4.1 親ミジンコの半数致死濃度 (LC50) の算出 .....	13
4.2 50%繁殖阻害濃度 (ErC50) の算出 .....	13
4.3 最大無作用濃度 (NOECr) および最小作用濃度 (LOECr) .....	13
5 結果および考察 .....	14
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 .....	14
5.2 試験液中の被験物質濃度 .....	14
5.3 ミジンコの観察結果 .....	14
5.4 親ミジンコの半数致死濃度 (LC50) .....	15
5.5 50%繁殖阻害濃度 (ErC50) .....	15
5.6 累積産仔数に及ぼす最大無作用濃度 (NOECr) および最小作用濃度 (LOECr) .....	15
5.7 試験液の水温、溶存酸素濃度およびpH .....	15
Table 1-1～11 .....	16～28
Figure 1,2 .....	19,22
付属資料－1 希釈水 (M4 調製水) .....	29
付属資料－2 試験液の分析方法 .....	31
付属資料－3 ミジンコの観察結果 .....	38



## 要 旨

試験委託者

環境庁

表 題パルミチン酸のオオミジンコ (*Daphnia magna*)に対する繁殖阻害試験試験番号

NMMP/E99/3010

試験方法

本試験は、OECD 化学品テストガイドライン No.211「オオミジンコ繁殖試験」(1998年)に準拠して実施した。

- 1) 被験物質 : パルミチン酸
- 2) 暴露方法 : 半止水式(週に3回、試験液の全量を交換)
- 3) 供試生物 : オオミジンコ (*Daphnia magna*)
- 4) 暴露期間 : 21 日間
- 5) 試験濃度 : 対照区、助剤対照区、10.0mg/L (設定濃度)  
(助剤 HCO-50、100mg/L)
- 6) 試験液量 : 1容器(連)につき 80 mL
- 7) 連数 : 10 容器(連)／濃度区
- 8) 供試生物数 : 10 頭／濃度区(1連につき 1 頭)
- 9) 試験水温 : 20±1℃
- 10) 照明 : 室内光、16 時間明／8 時間暗
- 11) 被験物質の分析 : ガスクロマトグラフ分析



## 結 果

### 1) 試験液中の被験物質濃度

実測濃度が設定濃度の±20%を外れたので結果の算出には実測濃度の時間加重平均値を用いた。

- 2) 21 日間の親ミジンコの半数 致死濃度 (LC50) = >5.8mg/L
- 3) 21 日間の 50% 繁殖阻害濃度 (ErC50) = >5.8mg/L
- 4) 21 日間の最大無作用濃度 (NOECr) = >5.8mg/L
- 5) 21 日間の最小作用濃度 (LOECr) = >5.8mg/L

(上記濃度は、実測濃度の時間加重平均値に基づく値)



## 1 被験物質

## 1.1 名称、構造式および物理化学的性状

名 称 : パルミチン酸

別名 : ヘキサデカン酸、識別符号: PA、CAS No.57-10-3

構造式 :  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COOH}$

分子式 :  $\text{C}_{16}\text{H}_{32}\text{O}_2$

分子量 : 256.43

融点 :  $63^\circ\text{C}$

沸点 :  $351^\circ\text{C}$

水への溶解度 :  $0.82\text{mg/L}(25^\circ\text{C})$

1-オクタノール/水 分配係数(logP) : 5.64

[上記の数値は、次のデータベースなどから引用した]

TOXNET : National Library of Medicine (Toxicology Data Network)

ICSC : International Chemical Safety Cards

ECDIN : Environmental Chemicals Data Information Network

## 1.2 供試試料

純度 : 95.0%以上

ロット番号 : C99714L

供給者 : XXXXXXXXXX

供給量 :  $25\text{g} \times 2\text{本}$

入手日 : 平成11年9月17日

外観 : 白色結晶

## 1.3 被験物質の確認、保管方法および保管条件下での安定性

## 1) 保管方法

被験物質は光を遮断した試料保管庫に室温で保管した。

## 2) 被験物質の確認および保管条件下での安定性

入手した被験物質について赤外吸収スペクトル、NMRスペクトルの測定およびガスクロマトグラフ分析を行い、被験物質の構造と矛盾が認められないことおよび純度を確認した。試験終了時にも同様に測定・分析し、試験開始前に測定・分析したスペクトルおよびクロマトグラムと比較した結果、変化は無かった。

従って、被験物質は当研究部の試料保管庫に保管中は安定であったと判断された。



## 2 供試生物

試験には生後24時間以内のオオミジンコ(*Daphnia magna*)の幼体を用いた。

本種は、平成7年11月15日に国立環境研究所より入手したものを、当研究部において継代飼育しているものである。また、基準物質(重クロム酸カリウム、試薬特級)による48時間の半数遊泳阻害濃度(EiC50)は 0.60mg/Lであった。

### 供試する幼体を得るためのミジンコの飼育方法

継代中のものから幼体を抱えた肉眼的に健康かつ十分な大きさの雌成体を選別して、別に用意したビーカーに移し、翌日に産出された幼体を別のビーカーに分けた。この幼体(平成12年3月16日生まれ)を供試ミジンコの親とし、以下の条件で飼育した。成熟し幼体を産むようになったら、1週間に少なくとも2回以上幼体を除去した。3週目に入り暴露開始前日に、その前26日間の死亡率が0%で休眠卵や雄が発生しなかったバッチから、育房内に幼体を持つ雌成体を選別し、翌日(24時間以内)産出された幼体を試験に用いた(平成12年4月11日暴露開始)。

飼育水 : 希釈水 (3.2参照)

飼育密度 : 20~50 頭/L 飼育水(但し、成熟個体の場合は、25頭以下/Lとした)

水温 :  $20 \pm 1^{\circ}\text{C}$

照明 : 室内光、16時間明/8時間暗

餌 : *Chlorella vulgaris*

(藻類培養液を遠心操作により、人工軟水\*に置換して給餌した)

\* 蒸留水 1L 当たり、 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  26.1mg、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  17.7mg、 $\text{K}_2\text{SO}_4$  1.1mg、 $\text{NaHCO}_3$  25.0mg を溶解して調製する。

給餌量 : ミジンコ1頭当たり0.1~0.2 mgC(有機炭素含量)/日

## 3 試験方法

### 3.1 試験条件

1) 暴露方法 : 暴露は半止水式で行い、週に3回、試験液を全量交換した。

2) 暴露期間 : 21 日間

3) 試験液量 : 1 容器につき 80 mL

4) 連数 : 10 容器(連)/濃度区

5) 生物数 : 10 頭/濃度区(1連につき 1 頭)

6) 試験温度 :  $20 \pm 1^{\circ}\text{C}$

7) 照明 : 室内光、16 時間明(1200 lux 以下)/8 時間暗



- 8) 餌 : *Chlorella vulgaris*  
 9) 給餌量 : ミジンコ1頭当たり 0.1~0.2 mgC(有機炭素含量)/日

### 3.2 希釈水

OECD 改訂ガイドライン No.211 オオミジンコ繁殖阻害試験—1998年9月採択に記載してある調整水を用いた。希釈水の全硬度は246mg/L( $\text{CaCO}_3$  換算)、pHは 7.5であった。

[付属資料-1 (p.29)]

### 3.3 試験容器および恒温槽等

- 試験容器 : 100mL容、ガラス容器  
 恒温槽 : 恒温水槽および水循環装置(ヤマト科学 クールライン CL100)  
 水温計 : pH計内蔵温度計(堀場製作所 カスタニーLAB pHメーター F-22)  
 pH計 : 堀場製作所 カスタニーLAB pHメーター F-22  
 溶存酸素計 : 堀場製作所 DOメーター OM-14  
 電気伝導率計 : 全硬度測定(東亜電波 ポータブル電気伝導率計 CM-14P)

### 3.4 試験濃度の設定

オオミジンコに対する48時間急性遊泳阻害試験の結果を参考に、10.0mg/Lの1濃度で限度試験とした。

(対照区、助剤対照区、10.0mg/L)

### 3.5 試験液の調製

- 1) 試験開始前に調製した被験物質500mg/L原液(助剤HCO-50 100mg/L)を換水毎に希釈水に添加し、設定濃度の試験液を必要量調製した。
- 2) 希釈水のみ対照区およびHCO-50を100mg/L加えた助剤対照区を設けた。
- 3) 1濃度区につき10個の試験容器を用意し、各試験容器に試験液を80mLずつ入れた。
- 4) 試験液の状態(外観等)を記録した。少し白濁したが沈殿等は見られなかった。



### 3.6 試験液の分析

全濃度区(但し、各1試験容器)について、暴露期間中に3回(調製時および換水前で1回)、即ち試験開始時(0日目)、8日目および15日目の試験液調製時とそれぞれの2日後(換水前)に各ビーカーより試験液1~2mLを採取し、ガスクロマトグラフ分析により被験物質濃度を分析した。試験液の分析に際しては、測定日に標準溶液の測定を行い、検量係数を求めて被験物質濃度を測定した。

詳細は付属資料-2(p.31)に示した。

### 3.7 試験操作

試験液の水温、溶存酸素濃度(D.O.)、pHおよび全硬度を測定後、先端を太くしたピペッターを用いて供試ミジンコを投入し、その時点を暴露開始時とした。その際、ピペッター内の飼育水が全量で試験液量に対して、1%以内となるようにした。その後、換水毎にミジンコを新しい試験液に移しかえ、21日後まで飼育した。暴露期間中は毎日一定量の給餌を行った(3.1参照)。

#### ・ミジンコの観察 :

(親ミジンコ) 生死、遊泳状態および外観の異常の有無を毎日観察して、記録した。計数後の死亡個体は取り除いた。

(産出幼体) 最初の産仔から毎日幼体の生存数を計数し、計数後の幼体は取り除いた。死亡幼体、墮胎卵および休眠卵の発生等については、その有無を毎日観察し記録した。最初の幼体産出日を、初産日として記録した。

・水質測定 : 水温、溶存酸素濃度(D.O.)、pHおよび全硬度を、全濃度区(但し、各1試験容器)について、暴露期間中に3回(調製時および換水前で1回)、換水前後に測定した。



#### 4 結果の算出

##### 4.1 親ミジンコの半数致死濃度(LC50)の算出

濃度区での親ミジンコの死亡数と供試個体数(10頭)を用いて、親ミジンコの死亡率を求めた。限度試験のため、濃度区において死亡率が50%未満の場合は21日間の半数致死濃度(LC50)は濃度区以上とした。

##### 4.2 50%繁殖阻害濃度(ErC50)の算出

濃度区での生存親1頭当たりの平均累積産仔数(生存幼体)を用いて、21日間の繁殖阻害率を求めた。限度試験のため、濃度区において繁殖阻害率が50%未満の場合は21日間の50%繁殖阻害濃度(ErC50)は濃度区以上とした。

##### 4.3 最大無作用濃度(NOECr)および最小作用濃度(LOECr)

濃度区での生存親1頭当たりの平均累積産仔数(生存幼体)を算出した。対照区と濃度区について、F&t-testにより比較した。対照区と濃度区に有意な差が認められない場合は対照区と有意差の認められない最高濃度(最大無作用濃度: NOECr)および有意差の認められる最低濃度(最小作用濃度: LOECr)はいずれも濃度区以上とした。

F&t-testにはYukms StatLight#3 2群の比較を用いた。



## 5 結果および考察

### 5.1 試験成績の信頼性に影響を及ぼしたと思われる環境要因

なし。

### 5.2 試験液中の被験物質濃度

暴露開始時(0日目)、8日目、15日目の試験液調製時の被験物質濃度は4.2～9.3mg/L(設定濃度10.0mg/L)であり、設定濃度に対する割合は42.0～93.0%であった。また、それらの2日後の換水前の濃度は1.9～6.7mg/Lであり、設定濃度に対する割合は19.0～67.0%であった。

[Table 1-1(p.16), Table 1-2(p.17), 付属資料-2(p.31)]

実測濃度が設定濃度の±20%を外れたので、結果の算出には実測濃度の時間加重平均値を用いた。

### 5.3 ミジンコの観察結果

#### 親ミジンコの死亡数および死亡率

対照区および助剤対照区での親ミジンコの死亡率は、暴露終了時で対照区が0%、助剤対照区が10%であり、試験成立条件である20%以下の基準を満たした。

濃度区(5.8mg/L)における暴露終了時の親ミジンコの死亡数は3頭、死亡率は30%であった。

[Table 2-1, 2-2(p.18), Figure 1(p.19), 付属資料-3(p.38)]

#### 初産日

対照区での親ミジンコの初産日は暴露開始8～15日後であり、助剤対照区での親ミジンコの初産日は暴露開始11～14日後であった。濃度区(5.8mg/L)では、親ミジンコの初産日は暴露開始11～14日後であった。

[Table 3(p.20)]

#### 平均累積産仔数

対照区および助剤対照区の21日間暴露での生存親ミジンコ1頭当たりの平均累積産仔数は80.9頭および64.2頭であり、試験成立条件である平均累積産仔数60頭以上の基準を満たした。

21日間暴露での生存親ミジンコ1頭当たりの平均累積産仔数は濃度区(5.8mg/L)で66.9頭であった。

[Table 4(p.21), Figure 2(p.22), 付属資料-3(p.38)]



### 休眠卵の発生等

対照区、助剤対照区および全濃度区において、休眠卵等は全く生じなかった。

#### 5.4 親ミジンコの半数致死濃度(LC50)

21 日間暴露の親ミジンコの半数致死濃度(LC50)は $>5.8\text{mg/L}$ であった。

[Table 2-1, 2-2 (p.18), Table 5 (p.23)]

#### 5.5 50%繁殖阻害濃度(ErC50)

21 日間暴露の 50%繁殖阻害濃度(ErC50)は $>5.8\text{mg/L}$ であった。

[Table 6 (p.23)]

#### 5.6 累積産仔数に及ぼす最大無作用濃度(NOECr)および最小作用濃度(LOECr)

親ミジンコ1頭あたりの累積産仔数に及ぼす 21 日間暴露の最大無作用濃度(NOECr)、最小作用濃度(LOECr)はいずれも  $>5.8\text{mg/L}$  であった。

[Table 7 (p.24)]

#### 5.7 試験液の水温、溶存酸素濃度およびpH

21 日間の暴露期間中の水温は $19.7\sim 20.8^{\circ}\text{C}$ であり、設定範囲内( $20^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ )であった。

溶存酸素濃度は $7.8\sim 9.2\text{mg/L}$ であり、すべての濃度区で飽和溶存酸素濃度の 60%以上が維持された( $20.0^{\circ}\text{C}$ の飽和溶存酸素濃度: $8.84\text{mg/L}$ )。

pHは $7.0\sim 7.6$ であり、変動は 1.5 以内であった。

全硬度は $242\sim 252\text{mg/L}$ ( $\text{CaCO}_3$ 換算)であり、設定範囲内( $140\text{mg/L}$ ( $\text{CaCO}_3$ 換算)以上)であった。

[Table 8(p.25), Table 9(p.26), Table 10(p.27), Table 11(p.28)]

以上のことから、水温、溶存酸素濃度、pHおよび全硬度については、ミジンコの生育条件として適切な範囲であったと思われる。

以 上



Table 1-1 Measured Concentrations of Palmitic acid during a 21-day Exposure of *Daphnia magna* under Semi-Static Test Conditions

Nominal Concentration (mg/L)	Measured Concentration (mg/L)		Percent of Nominal	
	0 day new	2 day old	0 day new	2 day old
Control	<0.8	<0.8	–	–
Dispersant Control	<0.8	<0.8	–	–
10.0	9.1	6.7	91.0	67.0

Nominal Concentration (mg/L)	Measured Concentration (mg/L)		Percent of Nominal	
	8 day new	10 day old	8 day new	10 day old
Control	<0.8	<0.8	–	–
Dispersant Control	<0.8	<0.8	–	–
10.0	4.2	1.9	42.0	19.0

Nominal Concentration (mg/L)	Measured Concentration (mg/L)		Percent of Nominal	
	15 day new	17 day old	15 day new	17 day old
Control	<0.8	<0.8	–	–
Dispersant Control	<0.8	<0.8	–	–
10.0	9.3	4.4	93.0	44.0

new :freshly prepared test solutions

old :test solutions after 2 days exposure



Table 1-2 Time-weighted Means of Measured Concentrations of Palmitic acid during a 21-day Exposure of *Daphnia magna* under Semi-Static Test Conditions

Nominal Concentration (mg/L)	Time-weighted Mean (mg/L)	Percent of Nominal (%)
Control	–	–
Dispersant Control	–	–
10.0	5.8	58.0

$$\text{Time-weighted Mean} = \frac{\text{Total Area}}{\text{Total Days}}$$

$$\text{Area} = \frac{\text{Conc0} - \text{Conc1}}{\text{Ln}(\text{Conc0}) - \text{Ln}(\text{Conc1})} \times \text{Days}$$

*Conc0* is the measured concentration at the start of each renewal period.

*Conc1* is the measured concentration at the end of each renewal period.

*Days* is the number of days in the renewal period.



Table 2-1 Cumulative Numbers of Dead Parental *Daphnia*

Measured Concentration		Days																				
(mg/L)	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
Control	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Dispersant	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1
Control	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	3	3	3	3	3
5.8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	3	3	3	3	3

Table 2-2 Mortality (%) of Parental *Daphnia*

Measured Concentration (mg/L)	Days					
	1	2	4	7	14	21
Control	0	0	0	0	0	0
Dispersant Control	0	0	0	0	0	10
5.8	0	0	0	0	10	30



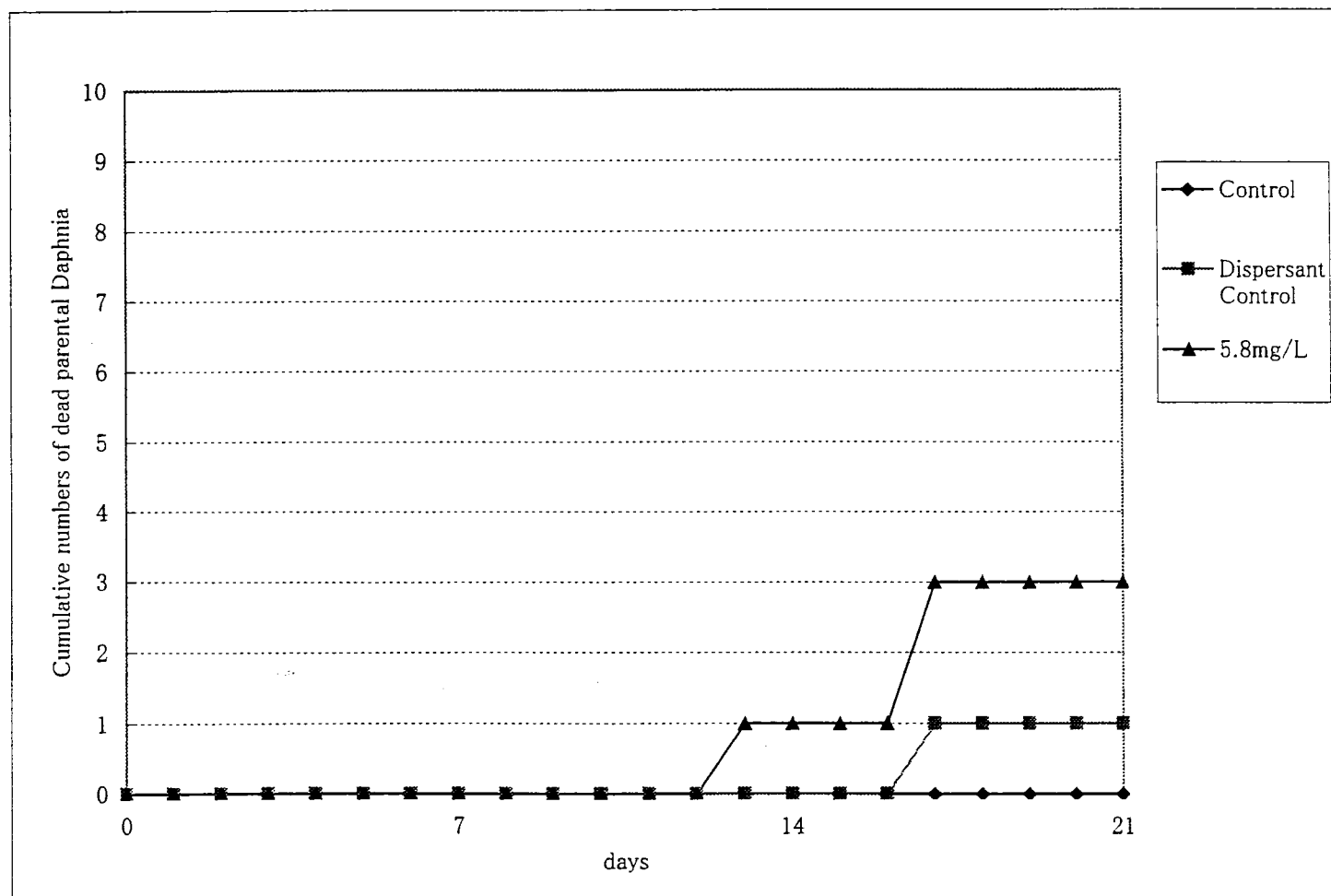
Figure 1 Cumulative Numbers of Dead Parental *Daphnia*



Table 3 Time (day) to First Brood Production

Vessel No.	Control	Dispersant Control	Measured concentration (mg/L)
			5.8
1	8	11	14
2	14	14	14
3	14	11	14
4	14	14	–
5	12	12	13
6	15	12	14
7	14	14	14
8	8	14	14
9	9	11	14
10	15	14	11
Mean	12.3	12.7	13.6



Table 4 Mean Cumulative Numbers of Juveniles Produced per Adult ( $\Sigma F1/P$ )

Measured Concentration (mg/L)	Days																				
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
Control	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	1.4	1.4	2.6	3.1	4.6	14.1	17.1	20.4	41.0	46.4	51.2	75.6	80.9
Dispersant Control	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.6	3.6	3.6	18.8	18.9	24.7	37.9	37.9	48.8	59.1	64.2
5.8	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.6	1.6	1.6	12.7	12.7	12.7	29.7	34.1	34.1	63.4	66.9



Figure 2 Mean Cumulative Numbers of Juveniles Produced per Adult ( $\Sigma F1/P$ ) during 21 days

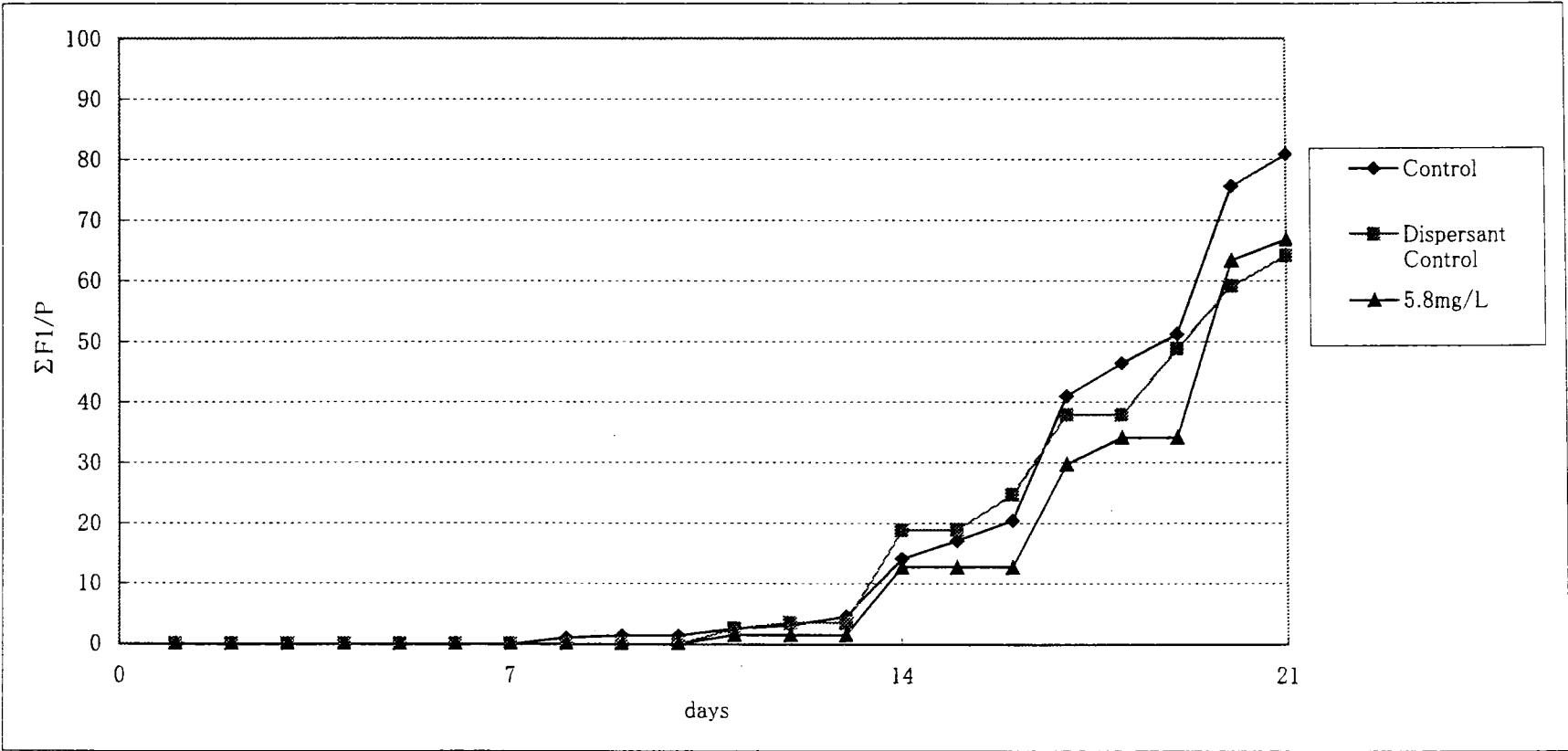




Table 5. Calculated LC50 Value for Parental *Daphnia*

Exposure Period (day)	LC50 (mg/L)	95 % Confidence Limits (mg/L)	Statistical Method
21	>5.8	—	—

Table 6. Calculated ErC50 Value for Inhibition of Reproduction

Exposure Period (day)	ErC50 (mg/L)	95 % Confidence Limits (mg/L)	Statistical Method
21	>5.8	—	—



Table 7 Cumulative Numbers of Juveniles Produced per Adult Alive for 21 Days

Vessel No.	Control	Dispersant Control	Measured Concentration (mg/L)
			5.8
1	96	95	59
2	85	74	70
3	90	28	—
4	77	79	—
5	47	85	—
6	32	48	101
7	94	74	54
8	100	45	64
9	100	—	66
10	88	50	54
Mean	80.9	64.2	66.9
S.D.	23.2	22.2	16.2
Inhibition rate(%)		20.6	17.4
Significant difference*1			

— : Were not calculated because the parental *Daphnia* was dead during a 21-days testing period.

\*1 : Indicates a significant difference by ~~Dunnnett multiple-comparison~~  
procedure, Two-sided test. F & t - test 正

\* : Indicates a significant difference ( $\alpha=0.05$ ) from the control.

\*\* : Indicates a significant difference ( $\alpha=0.01$ ) from the control.



Table 8 Temperature Values during a 21-day *Daphnia* Reproduction Inhibition Test (Semi-Static Test)

Measured Concentration (mg/L)	Temperature(°C)					
	0 day new	2 day old	8 day new	10 day old	15 day new	17 day old
Control	20.4	20.8	20.4	19.9	20.1	20.3
Dispersant Control	20.3	20.6	20.4	19.8	20.2	20.1
5.8	20.3	20.5	20.4	19.7	20.1	20.0

new : freshly prepared test solutions

old : test solutions after 2 days exposure



Table 9 Dissolved Oxygen Concentration (D.O.) during a 21-day *Daphnia* Reproduction Inhibition Test (Semi-Static Test)

Measured Concentration (mg/L)	Dissolved Oxygen Concentration (mg/L)					
	0 day new	2 day old	8 day new	10 day old	15 day new	17 day old
Control	8.4	8.1	8.5	8.3	9.2	8.0
Dispersant Control	8.6	8.2	8.7	7.8	9.0	8.0
5.8	8.6	8.2	8.7	7.9	8.9	7.8

new : freshly prepared test solutions

old : test solutions after 2 days exposure



Table 10    pH during a 21-day *Daphnia* Reproduction Inhibition Test (Semi-Static Test)

Measured Concentration (mg/L)	pH					
	0 day new	2 day old	8 day new	10 day old	15 day new	17 day old
Control	7.5	7.0	7.4	7.3	7.3	7.4
Dispersant Control	7.6	7.2	7.5	7.5	7.6	7.4
5.8	7.5	7.2	7.5	7.5	7.6	7.5

new : freshly prepared test solutions

old : test solutions after 2 days exposure



Table 11 Total Hardness(as CaCO<sub>3</sub>) during a 21-day *Daphnia* Reproduction Inhibition Test (Semi-Static Test)

Measured Concentration (mg/L)	Total Hardness(as CaCO <sub>3</sub> ,mg/L)					
	0 day new	2 day old	8 day new	10 day old	15 day new	17 day old
Control	246	245	249	250	249	252
Dispersant Control	247	245	250	249	249	250
5.8	243	242	250	249	244	246

new : freshly prepared test solutions

old : test solutions after 2 days exposure



## 付 属 資 料 - 1

希釈水(M4 調製水)

(全 1 頁)



## Appendix 1 M4 medium

Salts and Vitamines	Concentration (mg/L)
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	2.860
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0.361
LiCl	0.306
RbCl	0.071
SrCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.152
NaBr	0.016
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.063
CuCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.017
ZnCl <sub>2</sub>	0.013
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.010
KI	0.00325
Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub>	0.00219
NH <sub>4</sub> VO <sub>3</sub>	0.00058
Na <sub>2</sub> EDTA·2H <sub>2</sub> O	2.5
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.996
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	123.3
KCl	5.8
NaHCO <sub>3</sub>	64.8
NaNO <sub>3</sub>	0.274
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.143
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.184
Thiamine hydrochloride	0.075
Cyanocobalamine(V.B <sub>12</sub> )	0.001
D(+)Biotin(V.H)	0.00075
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	293.8
Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub> ·9H <sub>2</sub> O	10.0



## 付 属 資 料 - 2

試験液の分析方法

(全8頁)



## 試験液の分析方法

### 1 試験液の分析方法

各試験容器より試験液2.0mLを凍結乾燥し、BF<sub>3</sub>メタノール溶液およびn-ヘプタンを加えて攪拌する。飽和食塩水を加えてn-ヘプタン相をバイアル瓶に採取する。

GCのオートサンプラーにセットして一定量を自動注入する。

検量線から被験物質濃度を求める。

### 2 ガスクロマトグラフィー(パージ&トラップ法)測定条件

カラム : TC-17、0.53mmID×15m

カラム温度 : 150℃

検出器 : FID

検出器温度 : 250℃

注入口温度 : 250℃

注入量 : 1  $\mu$  L

キャリアガス : He

流量 : 20mL/min(室温)

### 3 検量線

標準原液を希釈して、定量限界付近から予想測定濃度が含まれる6ポイントの標準液を測定し、直線性を確認した。 [ Figure 1(p.33)]

測定日毎に標準溶液の測定を行い、この検量線により定量した。

### 4 添加回収試験

パルミチン酸 50mg/L標準液の回収率は109.8%であった。

### 5 クロマトグラム

代表的ないくつかのクロマトグラムを示した。

[ Figure 2(p.34~p.37)]



## Appendix 2

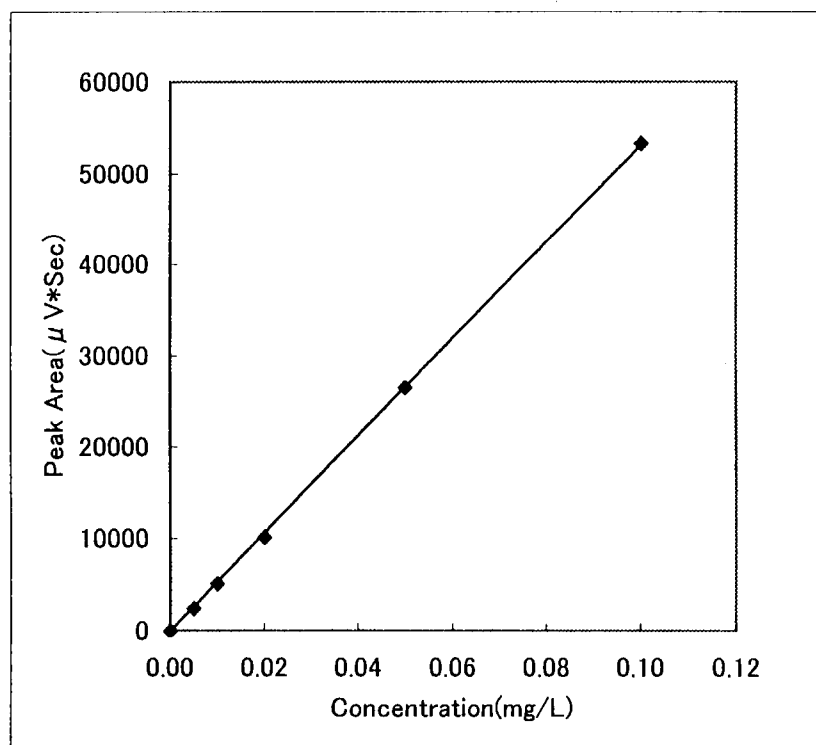
Figure 1 Calibration Curve of Palmitic acid by GC Analysis

Input Data		
No.	Concentration (mg/L)	Peak Area ( $\mu$ V $\cdot$ sec)
1	0.005	2500
2	0.010	5119
3	0.020	10153
4	0.050	26562
5	0.100	53396

$$X(\text{Concentration}) = Y(\text{Peak Area}) / 0.001878$$

$$r^2 = 0.9998$$

$r^2$ :coefficient of correlation

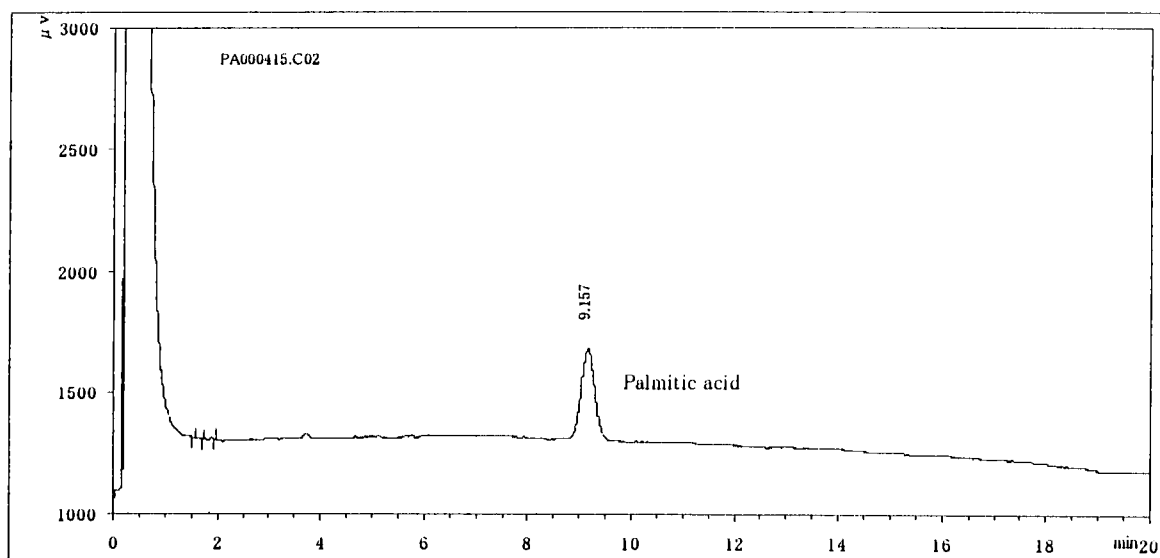




## Appendix 2

Figure 2 Representative Chromatograms

(1) Standard 10.0 mg/L

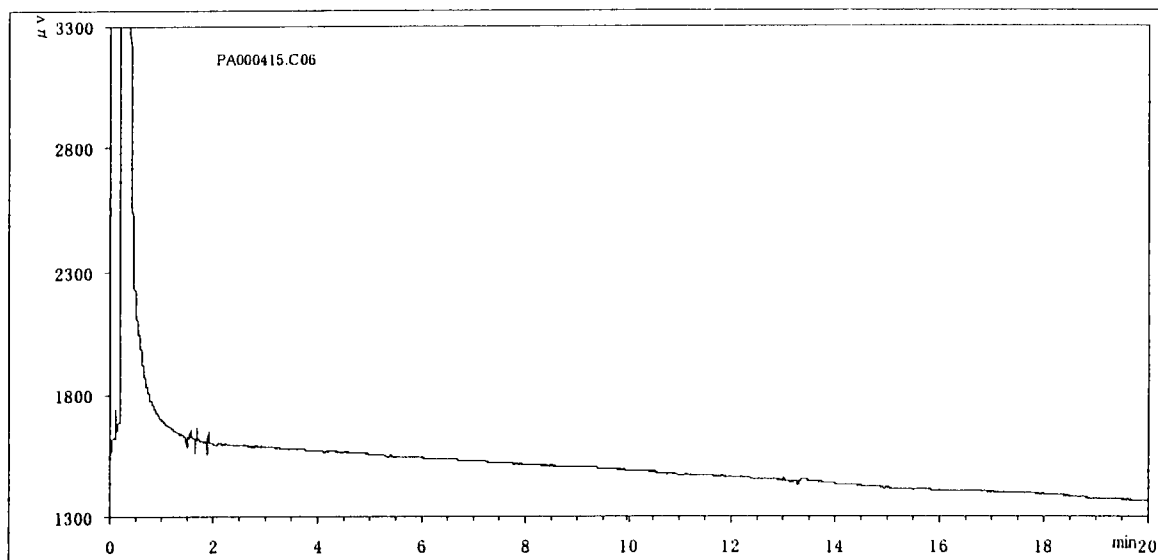




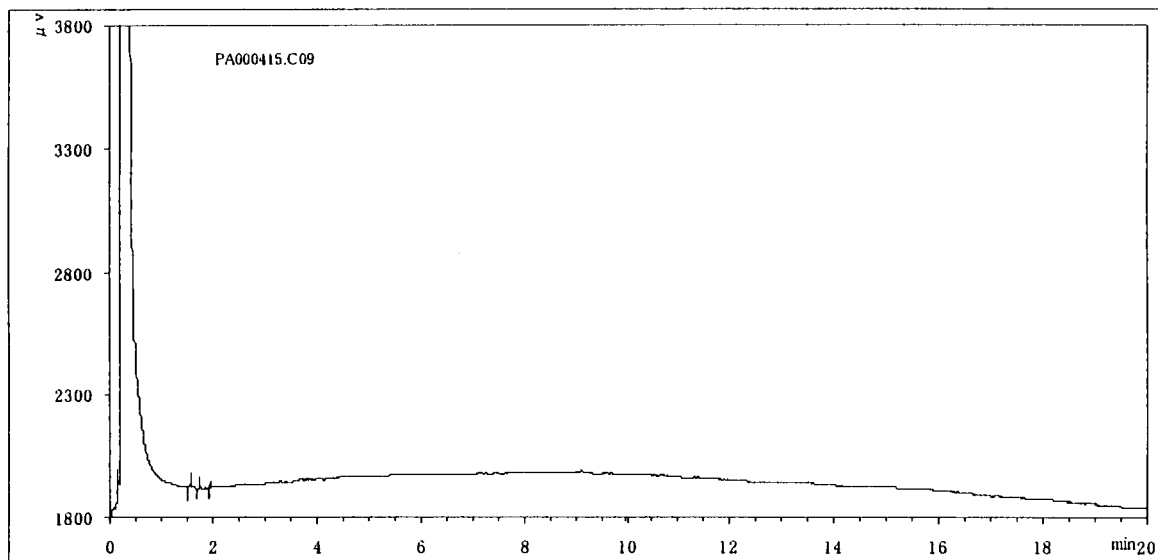
## Appendix 2

Figure 2 Continued

(2) Control ; Day 0 (new)



(3) Control ; Day 2 (old)

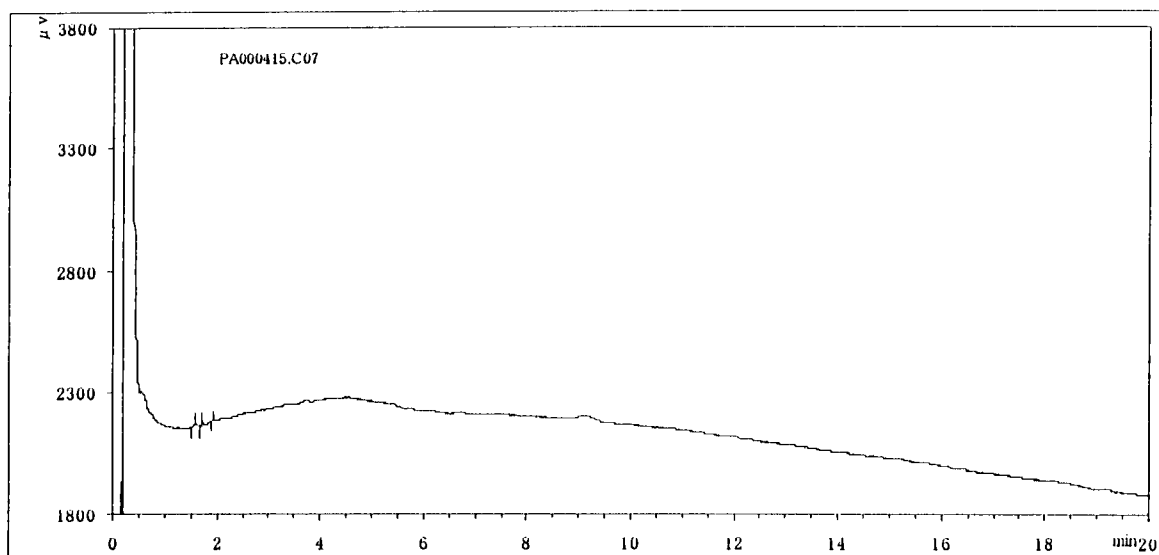




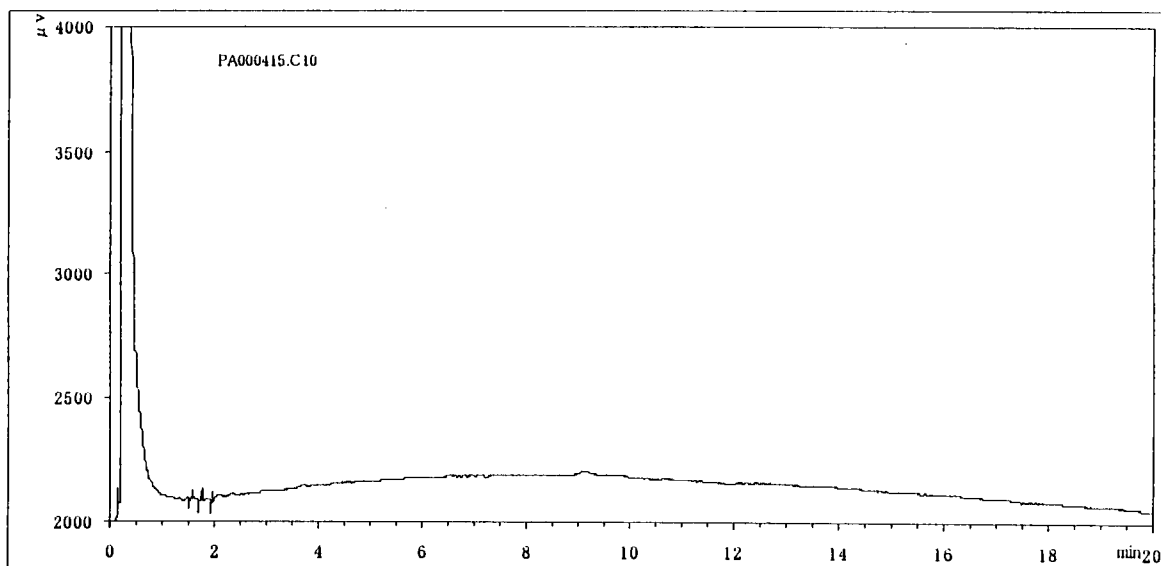
## Appendix 2

Figure 2 Continued

(4) Dispersant Control ; Day 0 (new)



(5) Dispersant Control ; Day 2 (old)

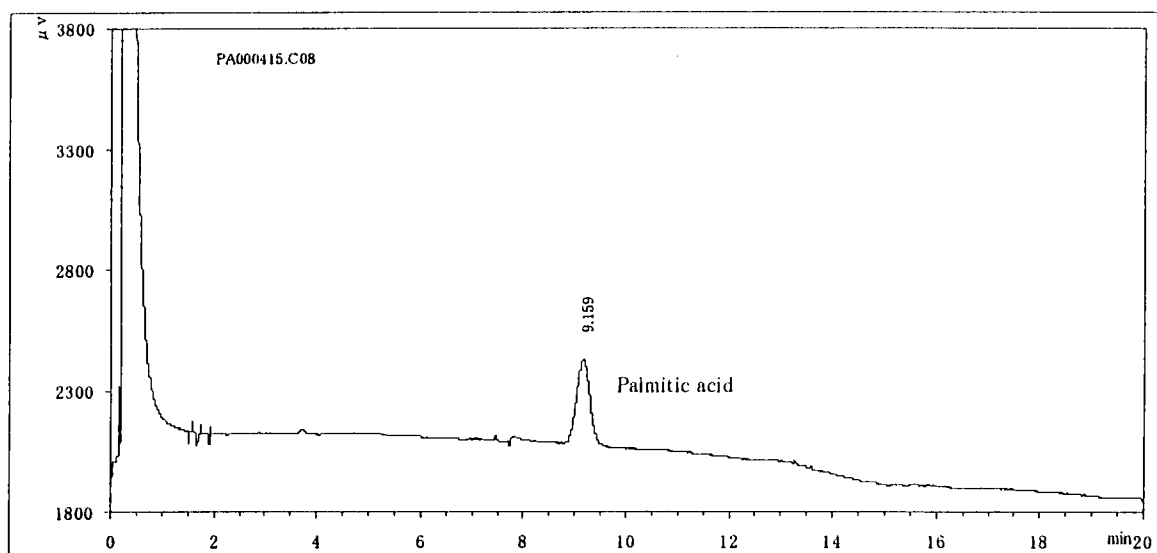




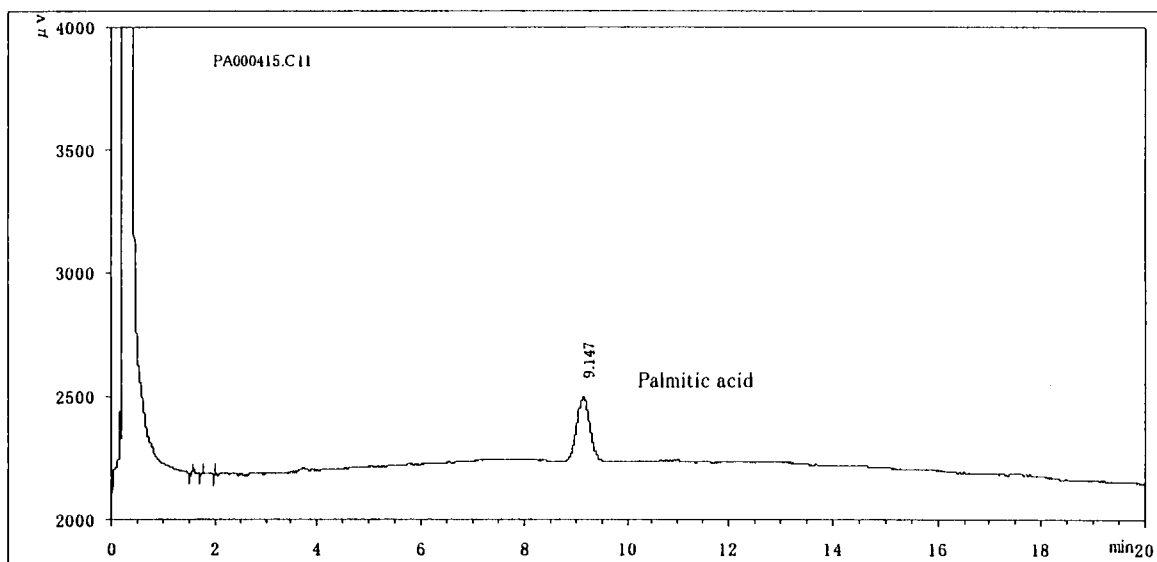
## Appendix 2

Figure 2 Continued

(6) 10.0 mg/L nominal; Day 0 (new)



(7) 10.0 mg/L nominal; Day 2 (old)





付 属 資 料 - 3

ミジンコの観察結果  
(全8頁)



付 属 資 料 - 3

ミジンコの観察結果

(全8頁)

3

誤記 訂正

2008.05.27





## Appendix 3-1 Result of Reproduction Test

( Test Chemical: Palmitic acid )  
 ( Chemical Conc.: 0.0 mg/L, Dispersant conc.: 0.0 mg/L )

Rep. No.	Counts	Time																					Total	
		4/12	4/13	4/14	4/15	4/16	4/17	4/18	4/19	4/20	4/21	4/22	4/23	4/24	4/25	4/26	4/27	4/28	4/29	4/30	5/1	5/2		
		1d	2d	3d	4d	5d	6d	7d	8d	9d	10d	11d	12d	13d	14d	15d	16d	17d	18d	19d	20d	21d		
1	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	—	
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	9	0	0	0	0	16	0	0	30	0	0	41	0	—	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	9	9	9	9	9	25	25	25	55	55	55	96	96	96	
2	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	—	
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	12	0	0	28	0	0	45	0	—	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	12	12	12	40	40	40	85	85	85	
3	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	—	
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	16	0	0	21	0	0	53	0	—	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	16	16	16	37	37	37	90	90	90	
4	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	—	
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	19	0	0	41	0	0	0	17	—	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	19	19	19	60	60	60	60	77	77	
5	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	—	
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	0	11	0	0	11	0	0	20	0	—	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	5	16	16	16	27	27	27	47	47	47	
6	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	—	
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	12	0	0	20	0	0	0	—	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	12	12	12	32	32	32	32	32	
7	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	—	
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	11	0	0	38	0	0	45	0	—	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	11	11	11	49	49	49	94	94	94	
8	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	—	
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	12	0	0	10	0	0	37	0	0	40	0	—
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	13	13	13	23	23	23	60	60	60	100	100	100
9	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	—	
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0	0	15	0	0	33	0	0	48	0	0	—
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	4	4	4	4	19	19	19	52	52	52	100	100	100	100
10	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	—	
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	18	0	0	34	0	0	36	—	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	18	18	18	52	52	52	88	88	
The time (days) to first brood:			1;	8 days,			2;	14 days,			3;	14 days,			4;	14 days,			5;	12 days,				
			6;	15 days,			7;	14 days,			8;	8 days,			9;	9 days,			10;	15 days,				



## Appendix 3-2 Result of Reproduction Test

( Test Chemical: Palmitic acid )  
 ( Chemical Conc.: 0.0 mg/L, Dispersant conc.: 100.0 mg/L )

Rep. No.	Counts	Time																					Total
		4/12	4/13	4/14	4/15	4/16	4/17	4/18	4/19	4/20	4/21	4/22	4/23	4/24	4/25	4/26	4/27	4/28	4/29	4/30	5/1	5/2	
		1d	2d	3d	4d	5d	6d	7d	8d	9d	10d	11d	12d	13d	14d	15d	16d	17d	18d	19d	20d	21d	
1	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	--
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0	0	16	0	0	25	0	0	14	0	0	40	0	--
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	0	16	16	16	41	41	41	55	55	55	95	95	95
2	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	--
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	23	0	0	19	0	32	0	0	--
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	23	23	23	42	42	74	74	74	74
3	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	--
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7	0	0	4	0	0	3	0	0	0	14	--
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	0	7	7	7	11	11	11	14	14	14	14	28	28
4	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	--
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	17	0	29	0	0	30	3	0	--
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	17	17	46	46	46	76	79	79	79
5	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	--
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7	0	15	0	0	24	0	0	39	0	--
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7	7	22	22	22	46	46	46	85	85	85
6	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	--
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	12	1	0	14	0	0	0	19	--
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	14	15	15	29	29	29	29	48	48
7	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	--
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	15	0	23	0	0	36	0	0	--
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	15	15	38	38	38	74	74	74	74
8	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	--
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8	0	0	26	0	0	11	0	--
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8	8	8	34	34	34	45	45	45
9	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	--	--	--	--
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	0	0	14	0	0	14	0	--	--	--	--
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	5	5	19	19	19	33	33	--	--	--	--
10	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	--
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	18	0	0	19	0	0	0	13	--
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	18	18	18	37	37	37	37	50	50
The time (days) to first brood:			1;	11 days,			2;	14 days,			3;	11 days,			4;	14 days,			5;	12 days,			
			6;	12 days,			7;	14 days,			8;	14 days,			9;	11 days,			10;	14 days,			



Appendix 3-3 Result of Reproduction Test

( Test Chemical: Palmitic acid )  
( Chemical Conc.: 5.8 mg/L, Dispersant conc.: 100.0 mg/L)

Rep. No.	Counts	Time																					Total
		4/12	4/13	4/14	4/15	4/16	4/17	4/18	4/19	4/20	4/21	4/22	4/23	4/24	4/25	4/26	4/27	4/28	4/29	4/30	5/1	5/2	
		1d	2d	3d	4d	5d	6d	7d	8d	9d	10d	11d	12d	13d	14d	15d	16d	17d	18d	19d	20d	21d	
1	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	—
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	18	0	0	17	0	0	0	24	—
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	18	18	18	35	35	35	35	59	59
2	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	—
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9	0	0	13	0	0	48	0	—
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9	9	9	22	22	22	70	70	70
3	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	—	—	—	—	—
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	16	0	0	19	—	—	—	—	—
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	16	16	16	35	—	—	—	—	—
4	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	—	—	—	—	—	—	—	—	—
5	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	—	—	—	—	—
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	18	15	0	0	7	—	—	—	—	—
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	18	33	33	33	40	—	—	—	—	—
6	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	—
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8	0	0	24	31	0	38	0	—
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8	8	8	32	63	63	101	101	101
7	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	—
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	15	0	0	14	0	0	25	0	—
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	15	15	15	29	29	29	54	54	54
8	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	—
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6	0	0	11	0	0	47	0	—
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6	6	6	17	17	17	64	64	64
9	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	—
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	12	0	0	31	0	0	23	0	—
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	12	12	12	43	43	43	66	66	66
10	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	—
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0	0	11	0	0	10	0	0	9	0	0	24	0	—
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	0	11	11	11	21	21	21	30	30	30	54	54	54
The time (days) to first brood:			1;	14 days,		2;	14 days,		3;	14 days,		4;	— days,		5;	13 days,							
			6;	14 days,		7;	14 days,		8;	14 days,		9;	14 days,		10;	11 days,							