

環境省殿

最 終 報 告 書

メチルヒドラジンのヒメダカ (*Oryzias latipes*) に
対する急性毒性試験

(試験番号：A090262)

2010年 2月24日

三菱化学メディエンス株式会社

陳 述 書

三菱化学メディエンス株式会社 メディケム事業本部

安科研事業部 横浜研究センター

試 験 委 託 者 : 環境省

表 題 : メチルヒドラジンのヒメダカ (*Oryzias latipes*) に
対する急性毒性試験

試 験 番 号 : A090262

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GLPに従って実施したものである。

「新規化学物質等に係る試験を実施する試験施設に関する基準について」（平成15年11月21日 薬食発第1121003号、平成15・11・17製局第3号、環保企発第031121004号、最終改正：平成20年7月4日）

2010年 2月24日

試験責任者



信 頼 性 保 証 書

三菱化学メディエンス株式会社 メディケム事業本部

安科研事業部 横浜研究センター

試験委託者 : 環境省

表 題 : メチルヒドラジン
のヒメダカ (*Oryzias latipes*) に対する急性毒性試験

試験番号 : A090262

(本試験は下記のGLPに従って実施され、最終報告書が生データを反映していることを保証する。

「新規化学物質等に係る試験を実施する試験施設に関する基準について」
(平成15年11月21日 薬食発第 1121003号, 平成15・11・17製局第3号, 環企発第 031121004号, 最終改正:平成20年7月4日)

監査および査察の実施事項, 実施日および報告日を以下に示す。

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		
試験計画書草案	2010年 1月29日	2010年 1月29日
試験計画書	2010年 1月29日	2010年 1月29日
変更書(変更番号:01)	2010年 2月17日	2010年 2月18日
試験の査察		
試験液の調製	2010年 2月 1日	2010年 2月 1日
魚の投入	2010年 2月 1日	2010年 2月 1日
試験液の分析	2010年 2月 1日	2010年 2月 1日
魚の観察	2010年 2月 5日	2010年 2月 5日
最終報告書監査		
最終報告書草案	2010年 2月17日	2010年 2月18日
最終報告書	2010年 2月24日	2010年 2月24日

信頼性保証部門主担当者 : 2010年 2月24日 

試験実施概要

1. 表 題 : メチルヒドラジンのヒメダカ (*Oryzias latipes*) に対する急性毒性試験
(試験番号: A090262)
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 : 「新規化学物質等に係る試験の方法について<藻類生長阻害試験, ミジンコ急性遊泳阻害試験及び魚類急性毒性試験>」(平成15年11月21日 薬食発第1121002号, 平成15・11・13製局第2号, 環企発第031121002号, 最終改正:平成18年11月20日)
4. 適用GLP : 「新規化学物質等に係る試験を実施する試験施設に関する基準について」(平成15年11月21日 薬食発第1121003号, 平成15・11・17製局第3号, 環企発第031121004号, 最終改正:平成20年7月4日)
5. 試験委託者 : 環境省
東京都千代田区霞が関一丁目2番2号
6. 試験受託者 : 三菱化学メディエンス株式会社
東京都港区芝浦四丁目2番8号
7. 試験施設 : 三菱化学メディエンス株式会社 メディケム事業本部
安科研事業部 横浜研究センター
神奈川県横浜市青葉区鴨志田町1000番地
8. 試験責任者 : XXXXXXXXXX
生態影響評価グループ

9. 試験担当者 : 
(試験実施)


(分析実施)

10. 試験日程 : 試験開始日 2010年 1月29日
暴露開始日 2010年 2月 1日
暴露終了日 2010年 2月 5日
試験終了日 2010年 2月24日

11. 保管 : 下記の試資料は、当施設の試資料保管施設に保管する。

- 1) 試験計画書
- 2) 最終報告書
- 3) 生データ
- 4) 対照物質
- 5) その他必要なもの

目 次

	頁
要約	7
1 材料	8
1.1 被験物質	8
1.1.1 名称, 構造式および物理化学的性状	8
1.1.2 供試試料	9
1.1.3 保管法および安定性の確認	9
1.2 試験用水	9
1.3 供試生物	10
1.4 試験容器および恒温槽等	11
2 方法	11
2.1 試験方法	11
2.1.1 試験条件	11
2.1.2 予備試験結果	12
2.1.3 試験濃度の設定	12
2.1.4 試験液の調製	12
2.1.5 試験液の分析	13
2.1.6 試験操作	13
2.2 試験結果の評価	14
2.2.1 結果の算出	14
2.2.2 試験の有効性	15
3 結果および考察	16
3.1 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	16
3.2 試験液の水質および外観	16
3.3 試験液中の被験物質濃度	16
3.4 供試魚の観察	16
3.5 半数致死濃度 (LC50)	16
3.6 0%死亡最高濃度 (LC0) および 100%死亡最低濃度 (LC100)	16
3.7 試験の有効性	16
Table 1~8	17~23
Figure 1	24
付属資料-1 赤外吸収スペクトル	25~26
付属資料-2 試験用水の水質	27~30
付属資料-3 試験液の調製	31~32
付属資料-4 試験液の分析	33~41
付属資料-5 結果の算出	42~43

要 約

試験委託者： 環境省

表題： メチルヒドラジンのヒメダカ (*Oryzias latipes*) に対する急性毒性試験

試験番号： A090262

試験方法： 本試験は「新規化学物質等に係る試験の方法について〈藻類生長阻害試験，ミジンコ急性遊泳阻害試験及び魚類急性毒性試験〉」（平成15年11月21日薬食発第1121002号，平成15・11・13製局第2号，環保企発第031121002号，最終改正：平成18年11月20日）に準拠して実施した。

- 1) 供試生物： ヒメダカ (*Oryzias latipes*)
- 2) 試験用水： 脱塩素水道水
- 3) 暴露期間： 96時間
- 4) 暴露方式： 半止水式 (24時間毎に試験液の全量を交換)
- 5) 供試生物数： 10尾/試験区
- 6) 水温： 24±1℃
- 7) 照明： 室内光，16時間明 (1000 lux 以下) / 8時間暗
- 8) 試験濃度 (設定値)：

試験区	濃度 (mg/L)
対照区	—
濃度区1	0.10
濃度区2	0.18
濃度区3	0.32
濃度区4	0.56
濃度区5	1.0

公比：1.8

- 9) 分析方法： 高速液体クロマトグラフ質量分析 (LC/MS) 法

結果：

以下の結果は，被験物質濃度の測定値の時間加重平均値を用いて算出した。

96時間半数致死濃度 (LC50)： 0.375 mg/L (95%信頼限界 0.304 ~ 0.462 mg/L)

1 材料

1.1 被験物質

1.1.1 名称, 構造式および物理化学的性状

被験物質の名称	メチルヒドラジン ^{*1}		
別名	(略称: MMH ^{*2})		
C A S 番号	60-34-4 ^{*1}		
構造式又は示性式	$\text{CH}_3\text{—NH—NH}_2$ ^{*3}		
分子量	46.07		
試験に供した物質の純度 (%)	99.8 (GC)		
試験に供した物質のロット番号	■■■■		
不純物の名称及び含有率	—		
蒸気圧	6.6 kPa/ 25℃		
対水溶解度	混和		
1-オクタノール/水分配係数	-1.05		
融点	-52 ℃		
沸点	87 ℃		
常温における性状	アンモニア臭を有する無色～微黄色透明液体		
安定性	強い還元剤であり, 酸化剤と激しく反応し, 火災や爆発の危険性がある。また, 塩基であり, 強酸と激しく反応する。空気中の湿度や水を吸収して白煙を生じる。		
溶媒に対する溶解度等	溶媒	溶解度	溶媒中の安定性
	エーテル	可溶	—
	炭化水素系溶剤	可溶	—

上記内容は供給者提供資料による。ただし * の内容は以下の通り。

*1 試験委託者提供資料による。

*2 当施設にて決定。

*3 独立行政法人 製品評価技術基盤機構 既存化学物質安全性点検データ (<http://www.safe.nite.go.jp>) による。

1.1.2 供試試料

供給者： XXXXXXXXXX

1.1.3 保管法および安定性の確認

被験物質は試験期間中、当施設の試験物質保管用冷蔵庫（保管条件：冷蔵，暗所，窒素充填）内に保管した。

実験終了後に、保管した被験物質の赤外吸収スペクトルを測定した。得られたスペクトルは実験開始前に測定したスペクトルと一致したことから、被験物質は保管中安定であったと判断した。赤外吸収スペクトルを付属資料-1に示す。

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

1.2 試験用水

横浜市水道水を活性炭ろ過およびチオ硫酸ナトリウム添加により脱塩素処理した水（脱塩素水道水）を使用した。定期的（約6ヶ月毎）に株式会社三菱化学アナリティックに依頼して水質を測定している。測定結果を付属資料-2に示す。

1.3 供試生物

1) 一般名： ヒメダカ

2) 学名： *Oryzias latipes*

3) 入手先： 自家繁殖

4) 採卵開始日： 2009年6月30日

5) ロット番号： 09-H-0630B

6) 大きさ： 全長： 推奨全長： 2.3 ± 1.2 cm

実測値： 平均値 2.17 cm (1.90~2.43 cm) , n=10

体重： 実測値： 平均値 0.069 g (0.045~0.108 g) , n=10

(暴露終了時の対照区の生存魚について全長および体重を測定)

7) 感受性： ロット毎に基準物質(硫酸銅(Ⅱ)五水和物, 試薬特級)による急性毒性試験を行い, 供試魚の感受性を調べている。

96時間半数致死濃度(96時間LC50, 無水物換算値)を以下に示す。

当該ロットの96時間LC50(急性毒性試験実施日2009年8月31日)

0.33 mg/L (95%信頼限界 0.18 ~ 0.50 mg/L)

当施設における過去のロットの96時間LC50(1995年以降, n=54)

平均値 ± 標準偏差： 0.83 ± 0.27 mg/L

最小値 ~ 最大値： 0.35 ~ 1.5 mg/L

8) 年齢： 孵化後1年以内

9) じゅん化前の薬浴： 有り(三栄製薬製 ニューグリーンF)

10) じゅん化期間： 2010年1月14日 ~ 2010年2月1日

11) じゅん化条件：

飼育水： 試験用水

飼育方式： 流水式(供試魚1gあたり1L/日以上)

水温： 24 ± 1 °C

溶存酸素濃度： 飽和酸素濃度の80%以上

pH： 6.0~8.5

照明： 室内光, 16時間明(1000 lux以下) / 8時間暗

餌の種類： テトラ社製 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)

じゅん化期間中の薬浴： 無し

暴露開始前7日間の死亡率： 5%未満

1.4 試験容器および恒温槽等

- 1) 試験容器： 5 L ガラス製水槽（蓋：テフロンシート）
- 2) 恒温槽： 塩ビ製水槽
- 3) 恒温循環器： タイテック製 クールニット CL-80R 型
- 4) 温度計： 横河メータ&インスツルメンツ製 TX1001 型
- 5) マルチ水質計（溶存酸素濃度，pH測定用）： 東亜ディーケーケー製 MM-60R 型
- 6) 電子天秤： メトラー製 AG204 型
メトラー製 AE163 型
メトラー製 AB204-S 型
メトラー製 PB3002 型
メトラー製 AB204 型

2 方法

2.1 試験方法

本試験は「新規化学物質等に係る試験の方法について<藻類生長阻害試験，ミジンコ急性遊泳阻害試験及び魚類急性毒性試験>」（平成 15 年 11 月 21 日 薬食発第 1121002 号，平成 15・11・13 製局第 2 号，環境企発第 031121002 号，最終改正：平成 18 年 11 月 20 日）に準拠して実施した。

2.1.1 試験条件

- 1) 暴露期間： 96 時間
- 2) 暴露方式： 半止水式（24 時間毎に試験液の全量を交換）
- 3) 試験液量： 5.0 L/容器（ここから水質測定用および分析用サンプルを採取，供試魚 1 g あたり 1 L 以上を確保）
- 4) 連数： 1 容器/試験区
- 5) 供試魚数： 10 尾/試験区
- 6) 水温： 24±1℃
- 7) 溶存酸素濃度： 飽和酸素濃度の 60%以上（エアレーション無し）
- 8) pH： 調整無し
- 9) 照明： 室内光，16 時間明（1000 lux 以下）/8 時間暗
- 10) 給餌： 無給餌

2.1.2 予備試験結果

被験物質の試験用水に対する溶解度は >1000 mg/L (当施設測定値) であった。試験濃度を試験ガイドライン上限濃度 (100 mg/L) 以下とし、予備試験を実施した。結果を以下に示す。

予備試験結果 1回目

魚類に対する 96 時間半数致死濃度は、2.58 mg/L (グッピー, 淡水; 独立行政法人 製品評価技術基盤機構, 有害性評価書, Ver.1.0, No.213) との報告があるため、これを参考に予備試験を実施した。

濃度 (mg/L)	96 時間の死亡率 (%)	生存魚の異常
0.50	80	有
0.75	80	有
5.0	100	--
7.5	100	--

供試魚数 : 5 尾 / 試験区

予備試験結果 2回目

濃度 (mg/L)	96 時間の死亡率 (%)	生存魚の異常
0.050	0	無
0.10	0	無
1.0	100	--

供試魚数 : 5 尾 / 試験区

2.1.3 試験濃度の設定

2.1.2 に示した予備試験の結果に基づき、試験濃度を次のように決定した。

試験区	濃度 (mg/L)
対照区	—
濃度区 1	0.10
濃度区 2	0.18
濃度区 3	0.32
濃度区 4	0.56
濃度区 5	1.0

公比 : 1.8

2.1.4 試験液の調製

試験液は、付属資料-3 に示す方法に従って調製した。

2.1.5 試験液の分析

調製時の試験液と換水直前（または暴露終了時）の試験液を1セットとし、暴露開始時（0時間）と24時間、72時間と96時間の2セットについて分析を行った。各試験区より試験液を採取し、高速液体クロマトグラフ質量分析（LC/MS）法により分析した。詳細を付属資料-4に示す。

2.1.6 試験操作

調製した試験液に、じゅん化した供試魚をランダム発生表に従い無作為に投入し、暴露を開始した。試験液の蒸散や被験物質の揮散防止のために水面をテフロンシートで覆った。下記の項目について測定、観察を行った。換水については、新しく調製した試験液に魚を移すことにより行った。

1) 試験液の水質測定および外観観察

試験液の水温、溶存酸素濃度、pHの測定および外観の観察を毎日行った。換水がある場合は、換水直前の試験液と調製時の試験液について、ともに測定、観察を行った。

2) 魚の観察

暴露3, 24, 48, 72 および96時間に魚の様子を観察した。死亡魚を発見した場合は、水質の悪化が起こらないよう速やかに取り除いた。

症状の分類と定義

死亡：観察可能な動き（例えば、鰓蓋の動き等）がなく、尾柄部に触れて反応がない状態

重篤：

遊泳不能：鰓蓋のみが動いているが、遊泳等の運動が停止、または極度の異常を示している状態

異常：

遊泳異常：正常ではない遊泳行動を示す状態 — 不活発、過活発、表層遊泳、平衡失調、方向不定遊泳、痙攣等

外見異常：正常ではない外見を示す状態 — 体色明化、体色暗化、出血、びらん、粘液異常、立鱗、脱鱗、鰭欠損、背曲がり、眼球異常等

呼吸異常：正常ではない鰓蓋の動きを示す状態 — 増加、減少、不規則等

正常：遊泳行動、外見等に異常が見られない状態

2.2 試験結果の評価

2.2.1 結果の算出

1) 結果の算出に用いる被験物質濃度

測定値の時間加重平均値を用いて結果を算出した。

$$Area = \frac{ConcA_n - ConcB_n}{\ln(ConcA_n) - \ln(ConcB_n)} \times Hours$$

$$\overline{MC} = \frac{Total Areas}{Total Hours}$$

$ConcA_n$: n 期間の初めの測定値 (試験液調製時)

$ConcB_n$: n 期間の終わりの測定値 (換水直前または暴露終了時)

($ConcA_n$ と $ConcB_n$ の値が同じ場合は、 $Area = ConcA_n \times Hours$ とする。)

\overline{MC} : 時間加重平均値

2) 半数致死濃度 (LC50) の算出

暴露期間中に供試魚の 50%が死亡する被験物質濃度を半数致死濃度 (LC50) とする。各被験物質濃度の死亡率から以下の方法により、暴露 24, 48, 72 および 96 時間における LC50 を決定した。

最高濃度区における死亡率	LC50 の決定方法
$\geq 50\%$	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%信頼限界を算出。
$< 50\%$	推定される濃度領域とする。

3) 0%死亡最高濃度 (LC0) および 100%死亡最低濃度 (LC100)

死亡魚が観察されない最高濃度区を 0%死亡最高濃度 (LC0) , 全ての魚が死亡した最低濃度区を 100%死亡最低濃度 (LC100) とする。暴露 96 時間における LC0 および LC100 を可能な限り決定した。

4) 統計学的手法

試験結果の算出に用いた統計学的手法は、結果とともに示した。

2.2.2 試験の有効性

- 1) 対照区の死亡率が暴露終了時に10%を超えないこと
- 2) 溶存酸素濃度が暴露期間中少なくとも飽和酸素濃度の60%以上を維持していること

3 結果および考察

3.1 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。

3.2 試験液の水質および外観

試験液の水温を Table 1, 溶存酸素濃度を Table 2, pH を Table 3, 外観を Table 4 に示す。水温は 23.2~23.6°C, 溶存酸素濃度は 6.8~8.5 mg/L, pH は 7.2~7.8 であった。外観は全ての試験区で無色であった。

3.3 試験液中の被験物質濃度

試験液中の被験物質濃度の分析結果を Table 5 に, 代表的なクロマトグラムを付属資料-4 に示す。

濃度区 1~5 の測定値の平均値はそれぞれ 0.0894, 0.160, 0.271, 0.465, 0.800 mg/L であり, 設定値の 80%以上の値が得られた。また, 暴露期間中の濃度減少はみられなかった。

3.4 供試魚の観察

各時間における供試魚の観察結果を Table 6 に, 濃度-死亡率曲線を Figure 1 に示す。

異常(遊泳異常)が濃度区 3~5 で, 死亡が濃度区 3~5 で観察された。暴露 96 時間における死亡率は, 対照区で 0%, 濃度区 1~5 でそれぞれ 0, 0, 10, 80, 100%であった。

3.5 半数致死濃度 (LC50)

各時間における LC50 を Table 7 に, 暴露 96 時間における LC50 を以下に, その算出結果を付属資料-5 に示す。

96 時間 LC50 : 0.375 mg/L (95%信頼限界 0.304 ~ 0.462 mg/L, Probit 法)

3.6 0%死亡最高濃度 (LC0) および 100%死亡最低濃度 (LC100)

暴露 96 時間における LC0 および LC100 を Table 8 および以下に示す。

96 時間 LC0 : 0.160 mg/L

96 時間 LC100 : 0.800 mg/L

3.7 試験の有効性

「3.2 試験液の水質および外観」および「3.4 供試魚の観察」の結果が試験の有効性の条件を全て満たしたため, 試験は有効であるとみなした。

以上

Table 1 Temperatures of Test Water

Test group	Temperature (°C)							
	0 hr	24 hr		48 hr		72 hr		96 hr
	New	Old	New	Old	New	Old	New	Old
Control	23.6	23.4	23.3	23.3	23.3	23.4	23.3	23.4
Conc.1	23.6	23.4	23.2	23.3	23.3	23.4	23.3	23.4
Conc.2	23.6	23.4	23.3	23.3	23.3	23.4	23.3	23.4
Conc.3	23.6	23.4	23.3	23.3	23.3	23.4	23.3	23.4
Conc.4	23.6	23.5	23.3	23.4	23.4	23.5	23.4	23.4
Conc.5	23.6	23.5	23.3	23.4	23.4	23.5	23.4	23.5

Minimum: 23.2

Maximum: 23.6

New: New test water freshly prepared

Old: Old test water immediately prior to renewal or at the end of exposure

Table 2 Dissolved Oxygen Concentrations in Test Water

Test group	Dissolved oxygen concentration (mg/L)							
	0 hr	24 hr		48 hr		72 hr		96 hr
	New	Old	New	Old	New	Old	New	Old
Control	8.4	7.0	8.2	7.1	8.3	6.9	8.2	7.1
Conc.1	8.4	6.8	8.2	7.0	8.2	7.0	8.1	7.0
Conc.2	8.4	6.9	8.3	7.1	8.3	7.0	8.2	7.2
Conc.3	8.4	7.0	8.2	7.2	8.2	7.1	8.1	7.4
Conc.4	8.5	7.0	8.2	7.1	8.2	7.4	8.0	7.7
Conc.5	8.4	6.9	8.2	7.5	8.2	7.7	8.0	7.9

Minimum: 6.8

Maximum: 8.5

New: New test water freshly prepared

Old: Old test water immediately prior to renewal or at the end of exposure

Table 3 pH Values of Test Water

Test group	pH							
	0 hr	24 hr		48 hr		72 hr		96 hr
	New	Old	New	Old	New	Old	New	Old
Control	7.4	7.2	7.5	7.3	7.5	7.3	7.5	7.4
Conc.1	7.6	7.3	7.5	7.3	7.6	7.4	7.6	7.4
Conc.2	7.6	7.3	7.6	7.3	7.6	7.4	7.6	7.5
Conc.3	7.6	7.4	7.6	7.4	7.6	7.4	7.6	7.5
Conc.4	7.6	7.4	7.7	7.4	7.7	7.5	7.7	7.6
Conc.5	7.7	7.4	7.7	7.6	7.7	7.7	7.7	7.8

Minimum: 7.2

Maximum: 7.8

New: New test water freshly prepared

Old: Old test water immediately prior to renewal or at the end of exposure

Table 4 Appearances of Test Water

Test group	Appearance							
	0 hr	24 hr		48 hr		72 hr		96 hr
	New	Old	New	Old	New	Old	New	Old
Control	C-, S-, F-, P-							
Conc.1	C-, S-, F-, P-							
Conc.2	C-, S-, F-, P-							
Conc.3	C-, S-, F-, P-							
Conc.4	C-, S-, F-, P-							
Conc.5	C-, S-, F-, P-							

New: New test water freshly prepared

Old: Old test water immediately prior to renewal or at the end of exposure

Color

C-: Colorless

Suspended solids

S-: Not observed (transparent)

Floating solids

F-: Not observed

Precipitations

P-: Not observed

Table 5 Measured Concentrations of the Test Substance in Test Water

Test group	Nominal conc. (mg/L)	Measured concentration (mg/L)				
		0 hr New	24 hr Old	72 hr New	96 hr Old	Mean
Control		<0.002	<0.002	<0.002	<0.002	
Conc.1	0.10	0.0850 → 0.0822 (97%)	0.0974 → 0.0931 (96%)			0.0894 [89%]
Conc.2	0.18	0.158 → 0.154 (97%)	0.176 → 0.154 (88%)			0.160 [89%]
Conc.3	0.32	0.257 → 0.262 (102%)	0.291 → 0.276 (95%)			0.271 [85%]
Conc.4	0.56	0.479 → 0.462 (96%)	0.470 → 0.449 (96%)			0.465 [83%]
Conc.5	1.0	0.801 → 0.801 (100%)	0.800 → 0.799 (100%)			0.800 [80%]

New: New test water freshly prepared

Old: Old test water immediately prior to renewal or at the end of exposure
(Percent of New)

Mean: Time weighted mean
[Percent of Nominal]

The test water for analysis were sampled at two renewal sets of four during 96-hour exposure.

Table 6 Observation of Fish

Control

Symptoms	3 hr		24 hr		48 hr		72 hr		96 hr	
	N	Detail	N	Detail	N	Detail	N	Detail	N	Detail
Death (cumulative)	0		0		0		0		0	
Critical	0	--	0	--	0	--	0	--	0	--
Abnormal	0	--	0	--	0	--	0	--	0	--
Normal	10		10		10		10		10	
Total	10		10		10		10		10	

Conc.1 Nominal concentration: 0.10 mg/L
Mean measured concentration: 0.0894 mg/L

Symptoms	3 hr		24 hr		48 hr		72 hr		96 hr	
	N	Detail	N	Detail	N	Detail	N	Detail	N	Detail
Death (cumulative)	0		0		0		0		0	
Critical	0	--	0	--	0	--	0	--	0	--
Abnormal	0	--	0	--	0	--	0	--	0	--
Normal	10		10		10		10		10	
Total	10		10		10		10		10	

Conc.2 Nominal concentration: 0.18 mg/L
Mean measured concentration: 0.160 mg/L

Symptoms	3 hr		24 hr		48 hr		72 hr		96 hr	
	N	Detail	N	Detail	N	Detail	N	Detail	N	Detail
Death (cumulative)	0		0		0		0		0	
Critical	0	--	0	--	0	--	0	--	0	--
Abnormal	0	--	0	--	0	--	0	--	0	--
Normal	10		10		10		10		10	
Total	10		10		10		10		10	

N: Number of fish showing corresponding symptoms

Table 6 Observation of Fish (Continued)

Conc.3 Nominal concentration: 0.32 mg/L
 Mean measured concentration: 0.271 mg/L

Symptoms	3 hr		24 hr		48 hr		72 hr		96 hr	
	N	Detail	N	Detail	N	Detail	N	Detail	N	Detail
Death (cumulative)	0		0		0		1		1	
Critical	0	--	0	--	0	--	0	--	0	--
Abnormal	0	--	0	--	0	--	2	AS 2	4	AS 4
Normal	10		10		10		7		5	
Total	10		10		10		10		10	

Conc.4 Nominal concentration: 0.56 mg/L
 Mean measured concentration: 0.465 mg/L

Symptoms	3 hr		24 hr		48 hr		72 hr		96 hr	
	N	Detail	N	Detail	N	Detail	N	Detail	N	Detail
Death (cumulative)	0		0		3		6		8	
Critical	0	--	0	--	0	--	0	--	0	--
Abnormal	0	--	0	--	1	AS 1	4	AS 4	2	AS 2
Normal	10		10		6		0		0	
Total	10		10		10		10		10	

Conc.5 Nominal concentration: 1.0 mg/L
 Mean measured concentration: 0.800 mg/L

Symptoms	3 hr		24 hr		48 hr		72 hr		96 hr	
	N	Detail	N	Detail	N	Detail	N	Detail	N	Detail
Death (cumulative)	0		1		9		9		10	
Critical	0	--	0	--	0	--	0	--	0	--
Abnormal	0	--	2	AS 2	1	AS 1	1	AS 1	0	--
Normal	10		7		0		0		0	
Total	10		10		10		10		10	

N: Number of fish showing corresponding symptoms

AS: Abnormal swimming

Table 7 Median Lethal Concentrations (LC50)

Exposure period (hr)	LC50 (mg/L)	95-Percent confidence limits (mg/L)	Statistical method
24	> 0.800 *	--	--
48	0.549 **	0.440 - 0.690	Probit
72	0.445 **	0.348 - 0.579	Probit
96	0.375 **	0.304 - 0.462	Probit

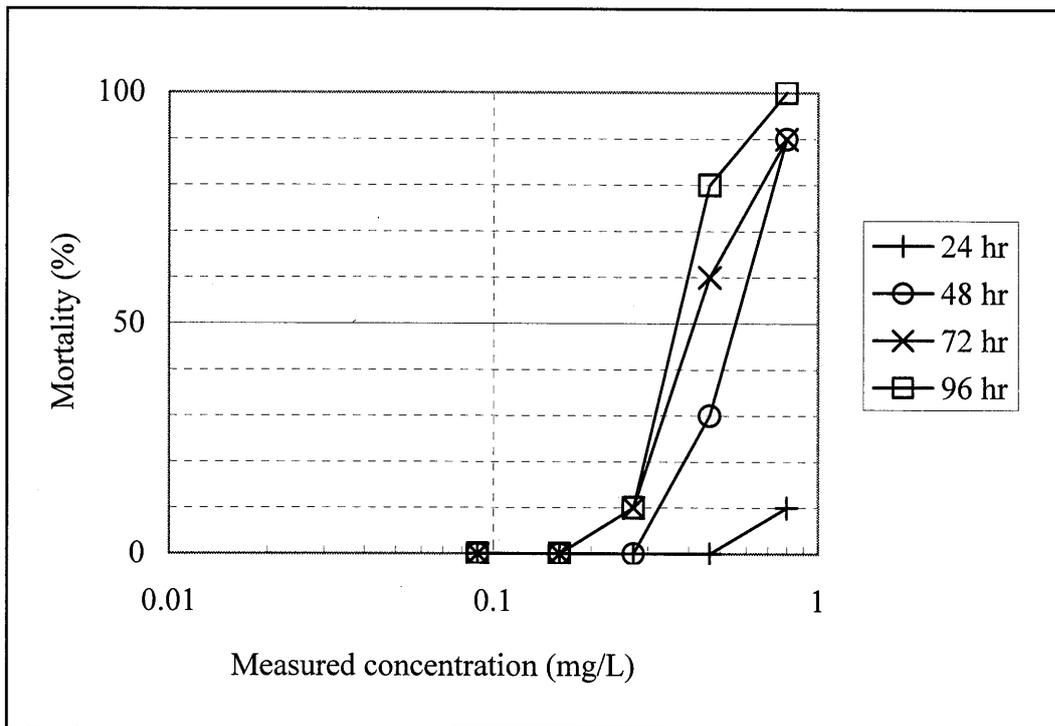
* : The LC50 value and its 95% confidence limits could not be determined by statistical method because the mortality of fish at the maximum concentration level was less than 50%. Therefore, the LC50 value is given in estimated concentration range.

** : Using the data of Conc.1 – 5

Table 8 Highest Concentration in 0% Mortality (LC0) and Lowest Concentration in 100% Mortality (LC100)

Exposure period (hr)	LC0 (mg/L)	LC100 (mg/L)
96	0.160	0.800

Figure 1 Concentration-Mortality Curve



付属資料－1

赤外吸収スペクトル

Figure A-1-1 Infrared Absorption Spectrum of the Test Substance before the Start of Exposure

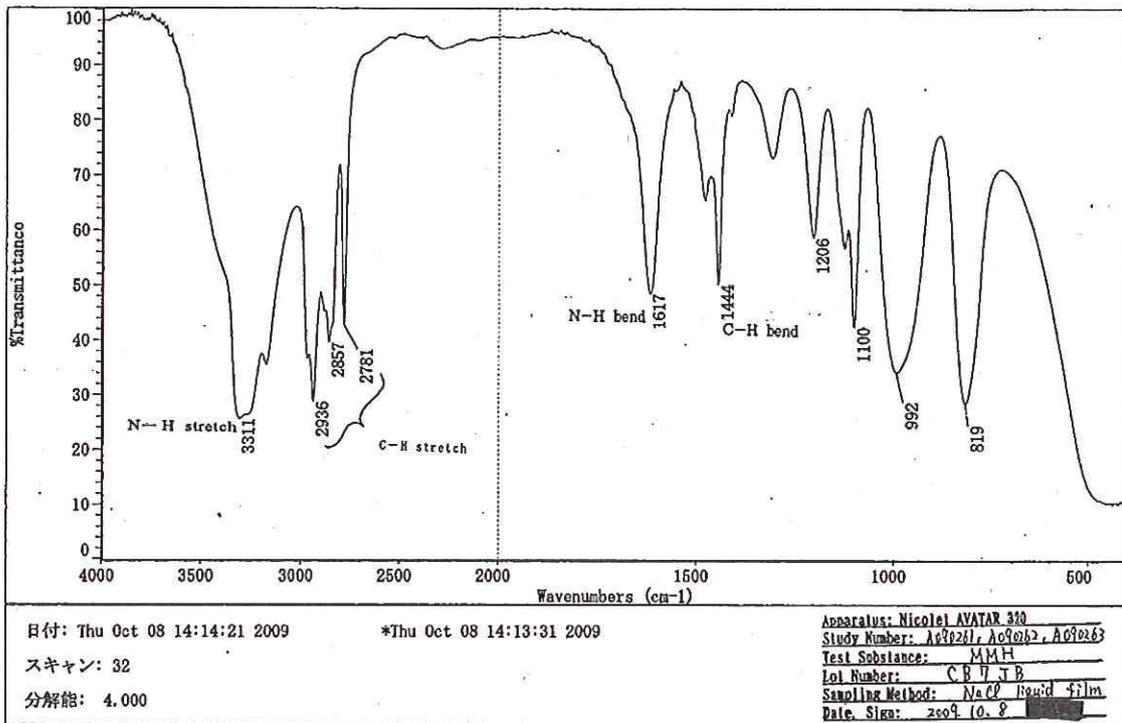
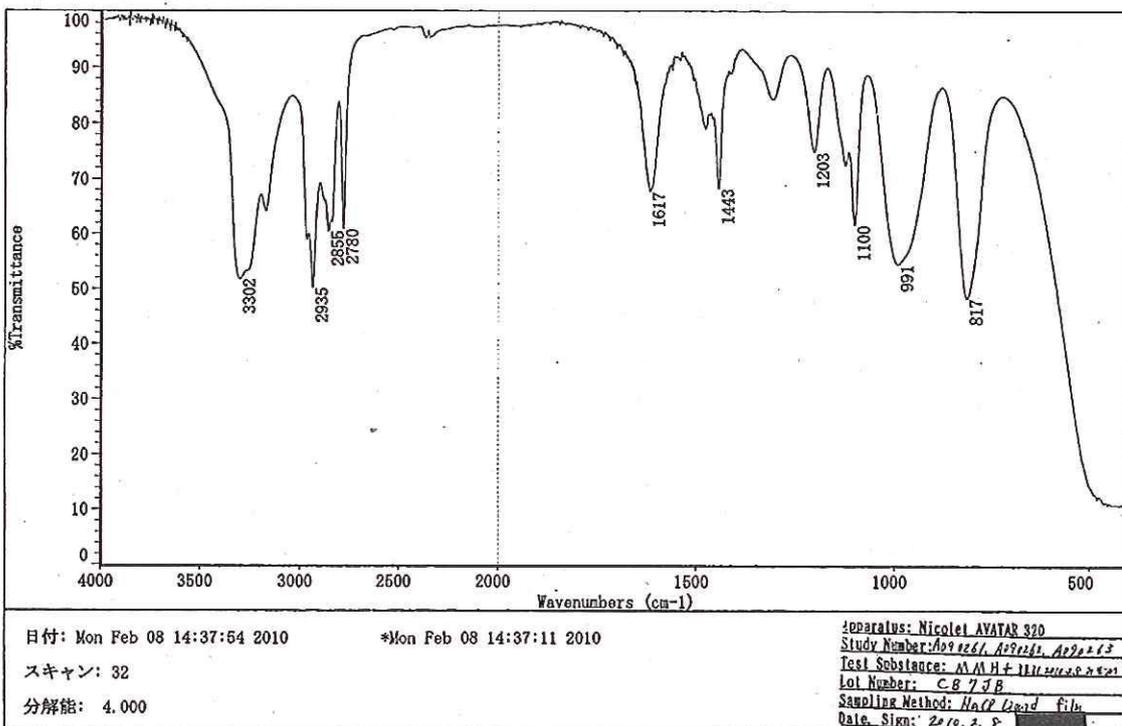


Figure A-1-2 Infrared Absorption Spectrum of the Test Substance after the End of Exposure



付属資料－ 2

試験用水の水質

測定分析結果報告書

三菱化学メディエンス 株式会社
横浜研究センター 殿

報告年月日 平成21年9月4日

計量証明事業(濃度)登録茨城県第5号
計量証明事業(音圧)登録茨城県第8号
計量証明事業(振動)登録茨城県第3号
作業環境測定事業登録茨城県第12号株式会社 三菱化学アプライドテクノロジーズ 分析事業所
〒300-0332 茨城県稲敷郡藤代町中央8丁目5番1号
TEL. 029(887)5381 FAX 029(887)5381

御依頼を受けました試料についての分析の結果を次のとおり報告致します。

件名	水質分析		
試料名	B12棟 生物飼育水(脱塩素水道水)	受付年月日	平成21年8月18日
採取日時	平成21年8月18日 16時10分	試料採取	弊方

注：貴方採取の場合の採取日時をご依頼者の申し出により記入いたしました。

分析の対象 [単位]	分析結果	基準値等	分析の方法
Suspended substance (SS) 懸濁物質(SS) [mg/L]	N. D. (< 1.0)	—	JIS.K.0102.14.1 (濾過重量法)
Total Organic Carbon (TOC) 有機体炭素(TOC) [mg/L]	0.3	—	JIS.K.0102.22 (燃焼酸化赤外線式分析法)
Biochemical Oxygen Demand (BOD) 有機物(BOD) [mg/L]	< 0.5	—	JIS.K.0102.21,32.3 (隔膜電極法)
Chemical Oxygen Demand (COD) 有機物(COD) [mg/L]	0.6	—	JIS.K.0102.17 (酸性過マンガン酸-滴定法)
Total Phosphorus 全りん [mg/L]	N. D. (< 0.02)	—	JIS.K.0102.46.3.1 (ペルオキソニ硫酸カリウム分解法)
pH 水素イオン濃度 [-/(℃)]	7.6 (23.0)	—	JIS.K.0102.12.1 (ガラス電極法)
Coliform Group 大腸菌群数 [MPN/100mL]	0	—	S46環告59別表2-1(1) 備考4(最確数法)
Total Mercury 総水銀 [mg/L]	N. D. (< 0.00005)	—	S46環告59号付表1 (還元気化原子吸光法)
Copper 銅 [mg/L]	N. D. (< 0.005)	—	JIS.K.0102.52.5 (ICP質量分析法)
Cadmium カドミウム [mg/L]	N. D. (< 0.001)	—	JIS.K.0102.55.4 (ICP質量分析法)
Zinc 亜鉛 [mg/L]	N. D. (< 0.01)	—	JIS.K.0102.53.4 (ICP質量分析法)
Lead 鉛 [mg/L]	N. D. (< 0.001)	—	JIS.K.0102.54.4 (ICP質量分析法)
Aluminium アルミニウム [mg/L]	0.02	—	JIS.K.0102.58.4 (ICP発光分析法)
Nickel ニッケル [mg/L]	N. D. (< 0.01)	—	JIS.K.0102.59.3 (ICP発光分析法)

分析の対象 [単位]	分析結果	基準値等	分析の方法
Hexavalent Chromium 六価クロム [mg/L]	N. D. (< 0.005)	—	JIS.K.0102.65.2.1 (ジフェニルカルバジド吸光法)
Manganese マンガン [mg/L]	N. D. (< 0.01)	—	JIS.K.0102.56.5 (ICP質量分析法)
Tin すず [mg/L]	N. D. (< 0.03)	—	JIS.K.0102.63.3 (ICP発光分析法)
Silver 銀 [mg/L]	N. D. (< 0.01)	—	JIS.K.0102.準拠 (ICP発光分析法)
Cobalt コバルト [mg/L]	N. D. (< 0.01)	—	JIS.K.0102.60.3 (ICP発光分析法)
Iron 鉄 [mg/L]	N. D. (< 0.04)	—	JIS.K.0102.57.4 (ICP発光分析法)
Total Cyanide 全シアン [mg/L]	N. D. (< 0.001)	—	JIS.K.0102.38.1,38.3 (4ピリジンカルボン酸吸光法)
Residual Chlorine 残留塩素 [mg/L]	N. D. (< 0.1)	—	JIS.K.0102.33.2 (DPD比色法)
Bromic ion 臭化物イオン [mg/L]	N. D. (< 0.5)	—	JIS.K.0102.37.2 (イオンクロマトグラフ法)
Fluorine ふっ素 [mg/L]	N. D. (< 0.1)	—	JIS.K.0102.34.1 (ALC-La吸光光度法)
Hydrogen Sulfide 硫化水素 [mg/L]	N. D. (< 0.002)	—	S47年環告第9号別表第2 (ガスクロマトグラフ法)
Ammonium nitrogen アンモニア態窒素 [mg/L]	N. D. (< 0.2)	—	JIS.K.0102.42.2 (インドフェノール青吸光光度法)
Nitrite nitrogen 亜硝酸態窒素 [mg/L]	N. D. (< 0.1)	—	JIS.K.0102.43.1.1 (ナフチルエチレンジアミン法)
Arsenic 砒素 [mg/L]	N. D. (< 0.001)	—	JIS.K.0102.61.4 (ICP質量分析法)
Surface-active agents (anionic) 陰イオン界面活性剤 [mg/L]	N. D. (< 0.02)	—	JIS.K.0102.30.1.1 (メチレンブルー吸光光度法)
Selenium セレン [mg/L]	N. D. (< 0.001)	—	JIS.K.0102.67.4 (ICP質量分析法)
Total Residue 全蒸発残留物 [mg/L]	120	—	JIS.K.0102.14.2 (蒸発乾固-重量法)
Conductivity 電気伝導率 [mS/m]	13	—	JIS.K.0102.13 (電気伝導率計法)
Hardness 全硬度 [mgCaCO3/L]	45	—	JIS.K.0102.50.3,51.3 (ICP発光分析法)
Alkalinity (pH4.8) 酸消費量 (pH4.8) [mgCaCO3/L]	24	—	JIS.K.0102.15.1 (滴定法)
Sodium ナトリウム [mg/L]	6.2	—	JIS.K.0102.48.2 (フレイム原子吸光法)
Potassium カリウム [mg/L]	1.0	—	JIS.K.0102.49.2 (フレイム原子吸光法)
Calcium カルシウム [mg/L]	13	—	JIS.K.0102.50.3 (ICP発光分析法)
Magnesium マグネシウム [mg/L]	3.1	—	JIS.K.0102.51.3 (ICP発光分析法)
Oil (n-Hexane extracts) 油分(ノルマルヘキサン抽出物質) [mg/L]	N. D. (< 0.5)	—	JIS.K.0102.24.2 (ヘキサン抽出重量法)

分析の対象 [単位]	分析結果	基準値等	分析の方法
Oil (Oily film/observation) 油分(油膜・外観) [-]	Not recognized	-	JIS.K.0102.8 (外観観察法)
Phenols フェノール類 [mg/L]	N.D. (<0.005)	-	JIS.K.0102.28.1 (吸光光度法)
Polychlorinated Biphenyl (PCB) ポリ塩化ビフェニル(PCB) [mg/L]	N.D. (<0.0005)	-	S46環告59号付表3 (ガスクロマトグラフ法)
Thiram チウラム [mg/L]	N.D. (<0.0006)	-	S46環告59号付表4 (HPLC-UV法)
Simazine シマジン [mg/L]	N.D. (<0.0003)	-	S46環告59号付表5 (GC-NPD法)
Thiobencarb チオベンカルブ [mg/L]	N.D. (<0.002)	-	S46環告59号付表5 (GC-NPD法)
Isoxathion イソキサチオン [mg/L]	N.D. (<0.001)	-	H5環水規121号付表1 (GC-MS法)
Diazinon ダイアジノン [mg/L]	N.D. (<0.001)	-	H5環水規121号付表1 (GC-MS法)
Fenitrothion (MEP) フェントロチオン(MEP) [mg/L]	N.D. (<0.001)	-	H5環水規121号付表1 (GC-MS法)
Isoprothiolane イソプロチオラン [mg/L]	N.D. (<0.001)	-	H5環水規121号付表1 (GC-MS法)
Oxine-copper オキシン銅 [mg/L]	N.D. (<0.001)	-	H5環水規121号付表2 (HPLC法)
Chlorothalonil (TPN) クロロタロニル (TPN) [mg/L]	N.D. (<0.001)	-	H5環水規121号付表1 (GC-MS法)
Propyzamide プロピザミド [mg/L]	N.D. (<0.001)	-	H5環水規121号付表1 (GC-MS法)
EPN EPN [mg/L]	N.D. (<0.001)	-	H5環水規121号付表1 (GC-MS法)
Dichlorovos (DDVP) ジクロルボス (DDVP) [mg/L]	N.D. (<0.001)	-	H5環水規121号付表1 (GC-MS法)
Fenobucarb (BPMC) フェノブカルブ (BPMC) [mg/L]	N.D. (<0.001)	-	H5環水規121号付表1 (GC-MS法)
Iprobenfos (IBP) イプロベンホス (IBP) [mg/L]	N.D. (<0.001)	-	H5環水規121号付表1 (GC-MS法)
Chloronitofen (CNP) クロロニトロフェン (CNP) [mg/L]	N.D. (<0.001)	-	H5環水規121号付表1 (GC-MS法)
- 以下余白 -			
[備考] 水産用水基準(2005)			

付属資料－3

試験液の調製

試験液の調製

1. 準備

被験物質原液の調製	比重:	0.87
被験物質採取量	---->	115 μ L (マイクロピペットで採取)
溶媒	---->	脱塩素水道水
最終容量	---->	1000 mL
容器	---->	シーム瓶
被験物質濃度	---->	100 mg/L
混合方式	---->	転倒攪拌
調製頻度	---->	用時調製

2. 試験液の調製

原液を下記の表の通り採取し、脱塩素水道水で希釈して試験液とする。
対照区は脱塩素水道水のみとする。

溶媒	---->	脱塩素水道水
最終容量	---->	5.0 L
容器	---->	5Lガラス製水槽
混合方式	---->	ガラス棒で攪拌
濃度公比	---->	1.78

試験区	設定濃度 (mg/L)	原液 (mL)
対照区	—	----> 0
濃度区1	0.10	----> 5.0
濃度区2	0.18	----> 9.0
濃度区3	0.32	----> 16.0
濃度区4	0.56	----> 28.0
濃度区5	1.0	----> 50.0

付属資料－ 4

試験液の分析

1. 高速液体クロマトグラフ質量分析 (LC/MS) 計 測定条件

装置

高速・高分離液体クロマトグラフ質量分析計 SL-HT システム No.1
 ワークステーション： Agilent 1200 シリーズ*ケミステーション (Windows XP)
 高速・高分離液体クロマトグラフ (RRLC) : Agilent Technologies 1200 型
 デガッサ： G 1 3 7 9 B 型
 送液ポンプ： G 1 3 1 2 B 型 (ハイパンプ)
 オートサンプラ： G 1 3 6 7 C 型
 カラムオープン： G 1 3 1 6 B 型
 質量選択検出器 (MSD) : G 6 1 4 0 A 型

[HPLC 条件]

カラム： SHISEIDO製 PC HILIC 5.0 μ m 2.0 mm i. d. \times 150 mm
 カラムオープン： 40°C
 溶離液： A液 20 mM キ`酸アンモニウム水*溶液：キ`酸 (1000 : 1, v/v)
 B液 アセトリル
 A液 25%, B液 75%
 ストップタイム： 5 min
 試料注入量： 20 μ L
 流速： 0.4 mL/min

[MSD 条件]

Ionization: Electrospray
 Fragmentor: 50 V
 Nebulizer: N₂ (30 psig)
 Drying gas: N₂ (10 L/min, 300°C)
 Mode: Positive
 SIM (Selected Ion Monitoring) 条件：
 Quant ion m/z 88.10 [M+H+CH₃CN]⁺

* 精製水：JIS K0557 A4 グレードの水

2. 検量線の作成と試験液中の被験物質濃度の定量

- 1) 被験物質を精製水で溶解，希釈し，0，0.0100～1.00 mg/L の標準溶液を調製した。
- 2) 標準溶液を以下のように分析した。

標準溶液 0.75 mL 採取

| ←アセトニトリル 0.75 mL 添加

混合

|

LC/MS測定

- 3) 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 (Figure A-4-1)。最小二乗法により直線回帰式 $Y=a+bX$ を求めた。相関係数は 0.999 となり，直線性の基準 (0.995 以上) を満たした。また，切片 a の 95%信頼区間が原点を含むことから，検量線は原点を通過する直線とみなせた。そこで，試験液中の被験物質濃度の定量は，各分析時に測定した標準溶液 (用時調製) のピーク面積との比較で行った。
- 4) 検量線の最低濃度に対し 1/5 で視覚的に分析可能と思われる被験物質濃度 0.002 mg/L を検出限界とした。

3. 試験液の分析方法

試験液を以下のように分析した。代表的なクロマトグラムを Figure A-4-2 に示す。

試験液 0.75 mL 採取

| ←アセトニトリル 0.75 mL 添加

混合

|

LC/MS測定

Figure A-4-1 Calibration Curve

No.	Concentration X (mg/L)	Peak Area Y (count)
1	0	0
2	0.0100	10226
3	0.0200	20948
4	0.0500	52451
5	0.100	106501
6	0.200	210195
7	0.500	500931
8	1.00	906233

$$Y = a + b \times X$$

$$a = 1.097E+04$$

$$b = 9.147E+05$$

$$r = 0.999$$

$$-8.593E+03 < a < 3.054E+04$$

(95-Percent Confidence Limits)

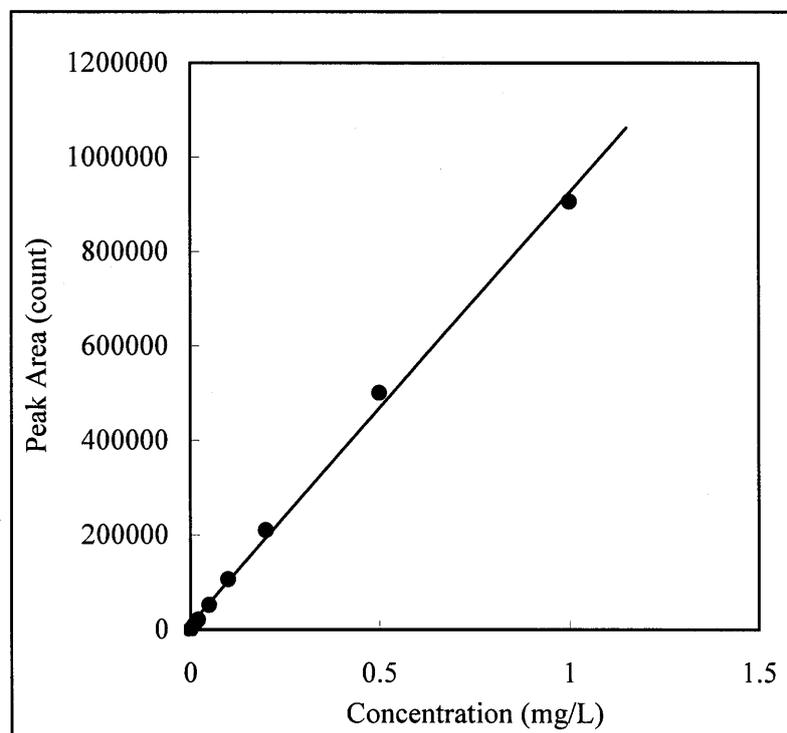
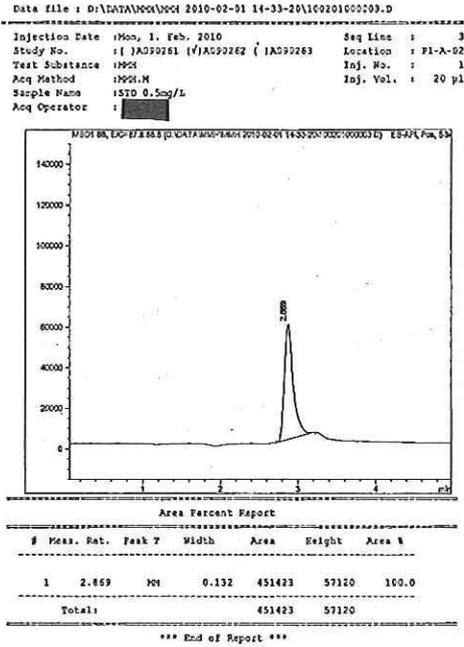


Figure A-4-2 Representative chromatograms

(1) Standard 0.500 mg/L, 0 hour



(2) Control, 0 hour (new)

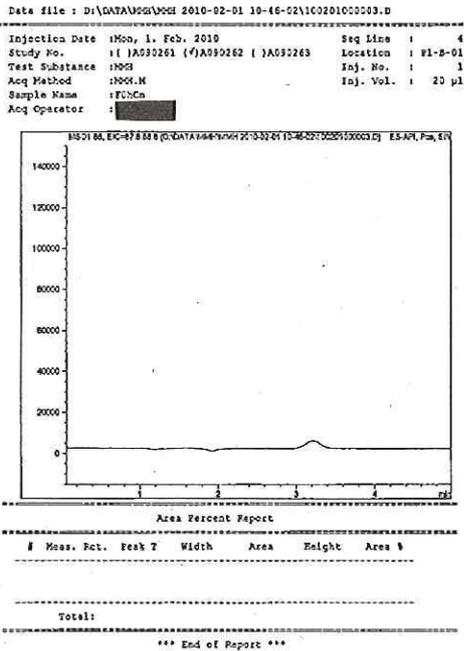
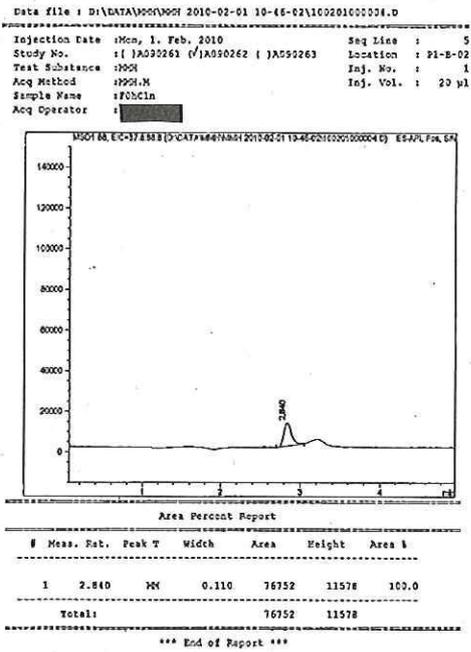


Figure A-4-2 Continued

(3) Conc.1, 0 hour (new)



(4) Conc.3, 0 hour (new)

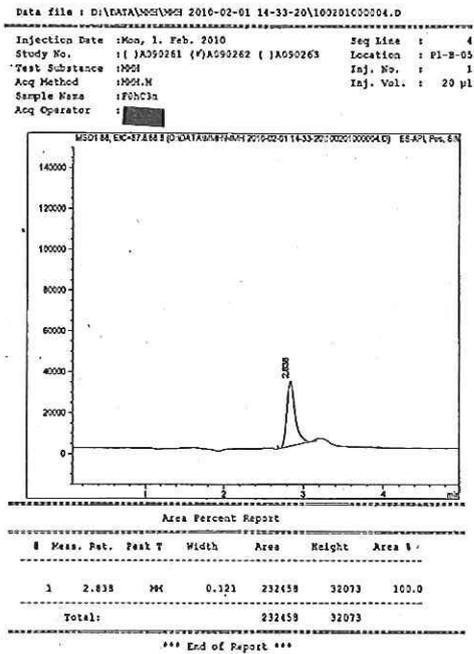
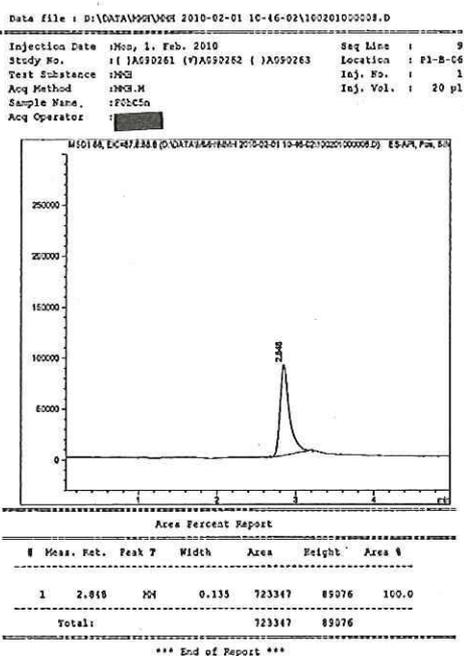


Figure A-4-2 Continued

(5) Conc.5, 0 hour (new)



(6) Standard 0.500 mg/L, 24 hours

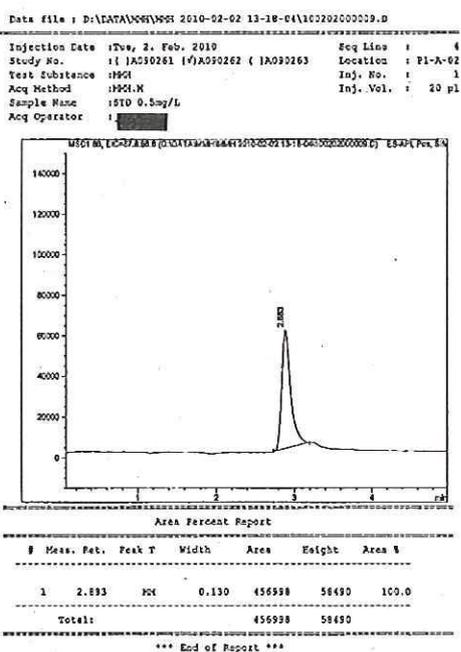
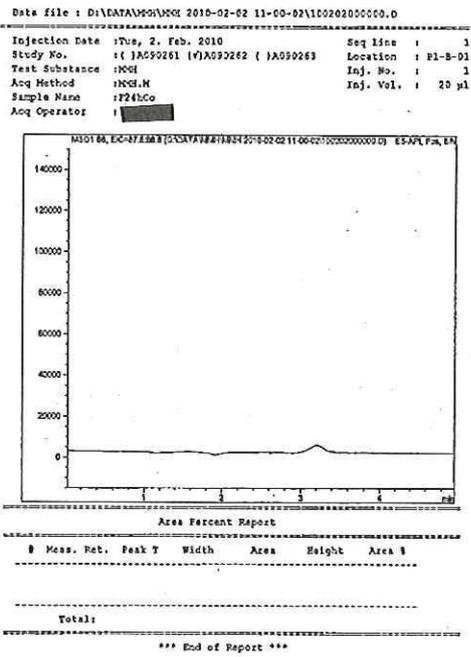


Figure A-4-2 Continued

(7) Control, 24 hours (old)



(8) Conc.1, 24 hours (old)

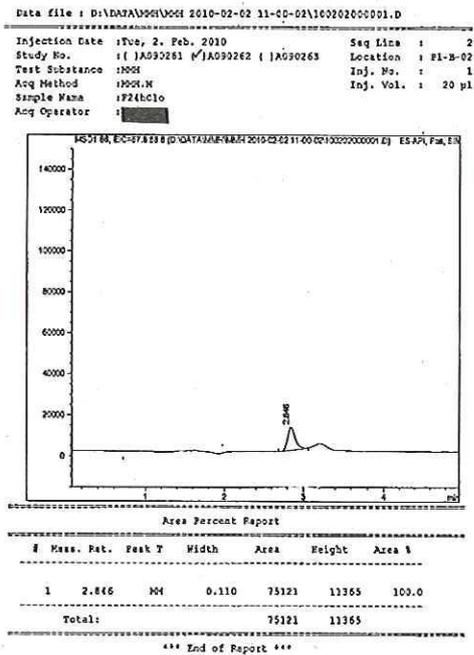
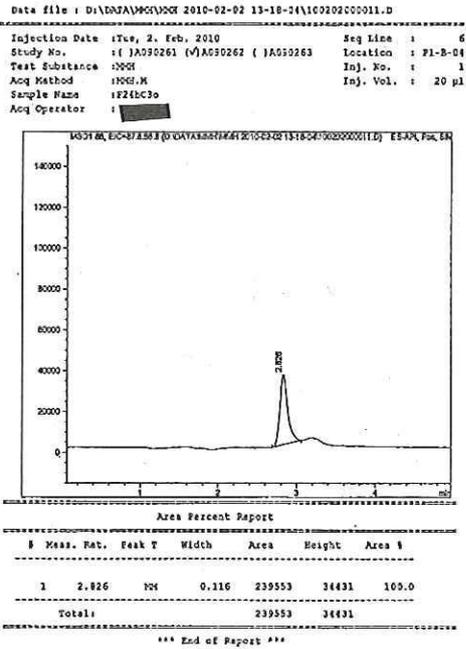
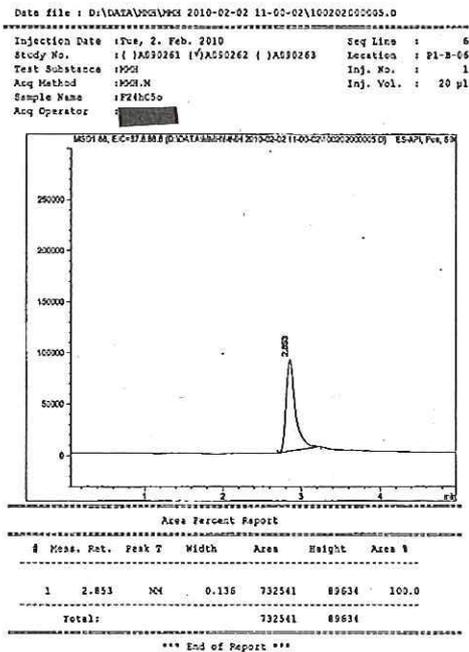


Figure A-4-2 Continued

(9) Conc.3, 24 hours (old)



(10) Conc.5, 24 hours (old)



付属資料－5

結果の算出

Table A-5 Calculation of the 96hr LC50

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. (%)
Conc. 1	0.0894	10	0	0	0.09765625
Conc. 2	0.16	10	0	0	0.09765625
Conc. 3	0.271	10	1	10	1.07421875
Conc. 4	0.465	10	8	80	5.46875
Conc. 5	0.8	10	10	100	0.09765625

THE BINOMIAL TEST SHOWS THAT 0.271 AND 0.8 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 0.371969115700911

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

SPAN	G	LC50	95 PERCENT CONFIDENCE LIMITS	
3	0.113956358	0.374866188	0.304098017	AND 0.468621258

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

ITERATIONS	G	H	GOODNESS OF FIT PROBABILITY	
7	0.349342016	1	0.999339883	

SLOPE = 9.215810478
95 PERCENT CONFIDENCE LIMITS= 3.768790779 AND 14.66283018

LC50 = 0.375037328
95 PERCENT CONFIDENCE LIMITS= 0.303798821 AND 0.462181897

LC1 = 0.209699034
95 PERCENT CONFIDENCE LIMITS= 0.08675436 AND 0.271042705