

環境省殿

## 最 終 報 告 書

メチルヒドラジンのオオミジンコ (*Daphnia magna*) に対する急性遊泳阻害試験

(試験番号：A090263)

2010年 3月 2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オオミジンコ (*Daphnia magna*) に対する  
急性遊泳阻害試験

試 験 番 号 : A090263

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 3月 2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

のオオミジンコ (*Daphnia magna*) に対する急性遊泳阻害試験

試験番号 : A090263

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, 環境企発第 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	2月12日	2010年	2月12日
試験計画書	2010年	2月16日	2010年	2月16日
変更書(変更番号: 01)	2010年	2月17日	2010年	2月17日
試験の査察				
試験液の調製	2010年	2月16日	2010年	2月16日
ミジンコの投入	2010年	2月16日	2010年	2月16日
ミジンコの観察	2010年	2月18日	2010年	2月18日
最終報告書監査				
最終報告書草案	2010年	3月2日	2010年	3月2日
最終報告書	2010年	3月2日	2010年	3月2日

信頼性保証部門主担当者 : 2010年 3月 2日

## 試験実施概要

1. 表 題 : メチルヒドラジンのオオミジンコ (*Daphnia magna*) に対する急性遊泳阻害試験  
(試験番号: A090263)
2. 試験目的 : 被験物質のオオミジンコ (*Daphnia magna*) に対する急性遊泳阻害試験を行い, 48 時間の半数遊泳阻害濃度 (EC50) 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, 環保企発第 031121002 号, 最終改正: 平成 18 年 11 月 20 日)
4. 適用 G L P : 「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)
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 2月16日  
                  暴露開始日       2010年 2月16日  
                  暴露終了日       2010年 2月18日  
                  試験終了日       2010年 3月 2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	9
1.4 試験容器および恒温槽等	10
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	13
2.1.4 試験液の調製	13
2.1.5 試験液の分析	13
2.1.6 試験操作	14
2.2 試験結果の評価	15
2.2.1 結果の算出	15
2.2.2 試験の有効性	16
3 結果および考察	17
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	17
3.2 試験環境の測定および観察	17
3.3 試験液中の被験物質濃度	17
3.4 供試生物の観察	17
3.5 半数遊泳阻害濃度 (EC50)	17
3.6 0%阻害最高濃度 (EC0) および 100%阻害最低濃度 (EC100)	17
3.7 試験の有効性	18
Table 1～8	19～23
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 統計結果	42～43

## 要 約

試験委託者： 環境省

表 題： メチルヒドラジンのオオミジンコ (*Daphnia magna*) に対する急性遊泳阻害試験

試験番号： A090263

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。

- 1) 供試生物： オオミジンコ (*Daphnia magna*)
- 2) 試験用水： 脱塩素水道水
- 3) 暴露期間： 48 時間
- 4) 暴露方式： 半止水式 (24 時間後に試験液の全量を交換)
- 5) 供試生物数： 20 頭／試験区 (5 頭／容器)
- 6) 試験温度：  $20 \pm 1^{\circ}\text{C}$
- 7) 照明： 室内光，16 時間明 (800 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	0.80
濃度区 2	1.3
濃度区 3	2.0
濃度区 4	3.2
濃度区 5	5.0

公比 1.6

- 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をもとに算出した。


48 時間 半数遊泳阻害濃度 (EC50)： 0.946 mg/L (95%信頼限界 0.702～1.19 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 <sup>*1</sup>		
別 名	(略称：MMH <sup>*2</sup> )		
C A S 番 号	60-34-4 <sup>*1</sup>		
構 造 式 又 は 示 性 式	$\text{CH}_3\text{---NH---NH}_2$ <div style="text-align: right;"><sup>*3</sup></div>		
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附属資料－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

Elendt M4 medium (OECD Guideline for Testing of Chemicals 202 (2004) “*Daphnia* sp., Acute Immobilisation Test” に記載されている調製水) では試験液中の被験物質濃度の維持が困難であるため、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。測定結果を附属資料－2に示す。通常、硬度は 30～100 mg  $\text{CaCO}_3$  /L, pHは 6.5～8.5 である。暴露開始前に硬度およびpHを測定した結果、それぞれ 58 mg  $\text{CaCO}_3$  /L および 7.9 であり、適正範囲内（硬度 250 mg  $\text{CaCO}_3$  /L 以下, pH 6.0～9.0）であることを確認した。

## 1.3 供試生物

- 1) 一般名： オオミジンコ
- 2) 学名： *Daphnia magna*
- 3) 入手先： 環境庁国立環境研究所（現：独立行政法人国立環境研究所）
- 4) 入手日： 1995年7月18日（以降、当施設にて継代飼育）
- 5) 感受性： 定期的（約6ヶ月毎）に基準物質（重クロム酸カリウム，試薬特級）による急性遊泳阻害試験を行い、オオミジンコの感受性を調べている。  
48時間半数遊泳阻害濃度（48時間 EC50）を以下に示す。

最新の結果：

0.69 mg/L (95%信頼限界：0.55～1.00 mg/L)

暴露期間：2010年1月13日～2010年1月15日

1998 年 6 月以降の結果：

平均値±標準偏差：0.73±0.12 mg/L, n=24

(最小値～最大値：0.57～1.02 mg/L)

6) 生育段階： 24 時間以内齢の幼体 (雌)

7) 供試生物を得るための親ミジンコの飼育条件：

飼育水： Elendt M4 medium で飼育後，脱塩素水道水で 48 時間以上飼育

飼育密度： 1 頭/80 mL (25 頭/2 L) 以下

飼育容器： 2 L ガラス製ビーカー

水温： 20±1℃

溶存酸素濃度： 飽和酸素濃度の 60%以上

pH： 6.0～9.0

照明： 室内光，16 時間明 (800 lux 以下) / 8 時間暗

飼育期間： 最長 28 日間

餌： *Chlorella vulgaris* (単細胞緑藻類)

給餌量： 6 mg C (有機炭素含量) / 2 L / 日

飼育水の交換： 飼育開始後 5 日以内に 1 回，その後は週 3 回交換

幼体除去： 幼体が産出された日に除去

8) 供試生物 (24 時間以内齢の幼体) の採取方法：

暴露開始日に産出された 24 時間以内齢の幼体 (雌) を暴露に用いた。暴露開始日に，親ミジンコについて以下の項目を満たすことを確認した。

週齢： 2～4 週齢 (飼育期間：2010 年 1 月 19 日～2010 年 2 月 16 日)

暴露開始前 2 週間の死亡率：20%以内

異常： 観察されず

最初の幼体産出日 (初産日)：12 日目以内

#### 1.4 試験容器および恒温槽等

1) 試験容器： 100 mL ガラス製ビーカー (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 クールユニット CL-80F 型

4) 水温計： ハンナ製 チェックテンプ

5) 溶存酸素計： 電気化学計器製 DOL-10 型

6) pH 計： 東亜電波工業製 HM-40V 型

7) 硬度測定： ハック製 デジタルタイトレーター

- 8) 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

## 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：       48 時間
- 2) 暴露方式：       半止水式（24 時間後に試験液の全量を交換）
- 3) 試験液量：       100 mL／容器
- 4) 連数：           4 容器／試験区
- 5) 供試生物数：     20 頭／試験区（5 頭／容器）
- 6) 試験温度：        $20\pm 1^{\circ}\text{C}$
- 7) 溶存酸素濃度：   3 mg/L 以上，エアレーションなし
- 8) pH：             6.0～9.0（変動は 1.5 未満），調整なし
- 9) 照明：           室内光，16 時間明（800 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) 以下に設定し, Elendt M4 mediumまたは脱塩素水道水を試験用水として予備試験を実施した。結果を以下に示す。

## 予備試験結果 1

濃度 (mg/L)	48 時間後の 遊泳阻害率(%)	試験液中の被験物質濃度 (設定値に対する割合, %)	
		暴露開始時	暴露開始後 24 時間
対照区	0	N. D.	N. D.
0.10	40	79	6
1.0	100	84	2
10	100	89	4

N. D. : 検出されず

## 予備試験結果 2

濃度 (mg/L)	48 時間後の 遊泳阻害率(%)	試験液中の被験物質濃度 (設定値に対する割合, %)	
		暴露開始時	暴露開始後 24 時間
対照区	0	N. D.	N. D.
0.010	0	96	74
0.050	0	—	—
0.10	0	—	—
0.50	0	102	96

N. D. : 検出されず

## 予備試験結果 3 (濃度測定なし)

濃度 (mg/L)	48 時間後の 遊泳阻害率(%)
対照区	0
0.50	0
1.0	0
5.0	100
10	100

供試生物数 : 10 頭/試験区 (5 頭/容器, 各 2 連)

試験用水 : 予備試験 1 Elendt M4 medium

予備試験 2 および 3 脱塩素水道水

ヒドラジンは、金属類と反応しやすく、また、水中の溶存酸素などにより酸化されやすいと考えられている。暴露開始後24時間の分析において、予備試験1では、被験物質濃度が顕著に減少し、Elendt M4 mediumに含まれる金属との反応が主な原因と考えられた。また、予備試験2では、わずかに減少する傾向が認められ、水中での酸化が主な原因と考えられた。

予備試験1において、予備試験2および3と比較し強い毒性が認められ、主に、変化物に起因するものと推察された。

### 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	0.80
濃度区 2	1.3
濃度区 3	2.0
濃度区 4	3.2
濃度区 5	5.0

公比 1.6

### 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。1試験区につき5つの試験容器に、試験液をそれぞれ 100 mL ずつ入れた。そのうち1つは試験環境測定用容器とした。

### 2.1.5 試験液の分析

試験液の分析を、以下の要領に従って高速液体クロマトグラフ質量分析 (LC/MS) 法により行った。分析方法の詳細を付属資料－4に示す。

分析回数： 2セット (試験液調製時と換水直前または暴露終了時を1セットとした)

試料採取方法： 試験液調製時－各試験区の試験環境測定用容器の試験液の中層を採取

換水直前および暴露終了時－各試験区1試験容器の試験液の中層を採取

### 2.1.6 試験操作

ガラスピペットを用いて供試生物を試験液に投入し、暴露開始とした。試験液の蒸散、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。暴露開始後 24 時間に、新しく調製した試験液にガラスピペットを用いて供試生物を移しかえた（換水）。暴露開始後 48 時間で終了とした。暴露期間中、以下の要領に従って、供試生物の観察、試験環境の測定および観察を行った。

#### 1) 供試生物の観察

頻度：暴露開始後 24 時間（換水前）および 48 時間

項目：遊泳阻害\*<sup>1</sup> 数、その他異常の有無\*<sup>2</sup>

\*<sup>1</sup>：試験容器を穏やかに動かした後、15 秒間泳げない場合、遊泳阻害されたと見なす。

\*<sup>2</sup>：行動や外見の異常（脱色等）が見られたり、水面に浮いたミジンコがあった場合は記録する。

#### 2) 試験環境の測定および観察

回数：2セット

試料：試験液調製時—各試験区の試験環境測定用容器の試験液

換水直前および暴露終了時—各試験区 1 試験容器の試験液

項目：試験液の水温、溶存酸素濃度、pH、外観

## 2.2 試験結果の評価

## 2.2.1 結果の算出

## 1) 算出に用いる被験物質濃度

結果の算出は、被験物質濃度の測定値の時間加重平均値に基づいて行った。平均値の計算方法は以下の通りである。

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

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

$ConcA_n$ : n 期間の初めの測定値  
(暴露 0 時間または暴露 24 時間の測定値)

$ConcB_n$ : n 期間の終わりの測定値  
(暴露 24 または 48 時間の測定値)

( $ConcA_n$  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) 半数遊泳阻害濃度 (EC50) の算出

暴露期間中に、供試生物の 50% を遊泳阻害する被験物質濃度を半数遊泳阻害濃度 (EC50) とする。暴露開始後 24 および 48 時間の各試験区における遊泳阻害率 (%) から、濃度－遊泳阻害率曲線を作成し、以下の方法で EC50 を決定した。

最高濃度区における阻害率	EC50 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%阻害最高濃度 (EC0) および 100%阻害最低濃度 (EC100)

暴露期間中に、全ての供試生物が遊泳阻害を受けない最高濃度区を 0%阻害最高濃度 (EC0) とし、全ての供試生物が遊泳阻害を受ける最低濃度区を 100%阻害最低濃度 (EC100) とする。暴露終了時に、各試験区の遊泳阻害率 (%) から EC0 および EC100 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

以下の条件が満たされた場合、試験は有効とみなした。

- 1) 対照区において、ミジンコが 10%を超えて遊泳阻害されたり、水面に浮いたりしてはならないこと。
- 2) 溶存酸素濃度は、暴露終了時において 3 mg/L 以上であること。

### 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 試験環境の測定および観察

試験液の水溫、溶存酸素濃度、pHの測定結果および外観の観察結果をそれぞれ Table 1, Table 2, Table 3 および Table 4 に示す。

すべての試験区において、水溫は  $20 \pm 1^\circ\text{C}$ 、溶存酸素濃度は 3 mg/L 以上、pHは 6.0～9.0 (変動は 1.5 未満) であり、いずれも試験条件の範囲内であった。試験液の外観は、すべての試験区において暴露期間を通して無色であった。

#### 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 (平均値) は、それぞれ 0.702, 1.19, 1.72, 2.94 および 4.44 mg/L であり、設定値の 80%以上の値が得られた。

#### 3.4 供試生物の観察

各時間における遊泳阻害数および遊泳阻害率を Table 6 に、濃度－遊泳阻害率曲線を Figure 1 に示す。

対照区において、暴露終了時の遊泳阻害率は 0%であり、水面に浮いたミジンコは認められなかった。

濃度区 1～5 の遊泳阻害率は、それぞれ 0, 95, 100, 100 および 100%であった。

#### 3.5 半数遊泳阻害濃度 (EC50)

各時間の EC50 および算出に用いた統計学的手法を Table 7 に、48 時間の EC50 を以下に、統計結果を付属資料－5 に示す。

48 時間 EC50 : 0.946 mg/L (95%信頼限界 0.702～1.19 mg/L, Binomial 法)

#### 3.6 0%阻害最高濃度 (EC0) および 100%阻害最低濃度 (EC100)

暴露終了時における EC0 および EC100 を Table 8 および以下に示す。

48 時間 EC0 : 0.702 mg/L

48 時間 EC100 : 1.72 mg/L

### 3.7 試験の有効性

「3.2 試験環境の測定および観察」および「3.4 供試生物の観察」の結果が試験の有効性の条件をすべて満たしたため、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 Hour New	24 Hours Old	24 Hours New	48 Hours Old
Control	19.8	19.8	19.6	19.8
Conc.1	19.8	19.8	19.6	19.8
Conc.2	19.9	19.8	19.6	19.8
Conc.3	19.8	19.8	19.6	19.9
Conc.4	19.9	19.8	19.7	19.9
Conc.5	19.8	19.8	19.7	19.9
Minimum: 19.6			Maximum: 19.9	

New: New test water freshly prepared

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

Table 2 Dissolved Oxygen Concentrations (D.O.) of Test Water

Test Group	D.O. (mg/L)			
	0 Hour New	24 Hours Old	24 Hours New	48 Hours Old
Control	8.8	8.6	8.8	8.8
Conc.1	8.7	8.7	8.7	8.8
Conc.2	8.8	8.6	8.8	8.8
Conc.3	8.7	8.5	8.7	8.7
Conc.4	8.8	8.5	8.7	8.7
Conc.5	8.8	8.4	8.7	8.6
Minimum: 8.4			Maximum: 8.8	

New: New test water freshly prepared

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

Table 3 pH Values of Test Water

Test Group	pH			
	0 Hour New	24 Hours Old	24 Hours New	48 Hours Old
Control	7.9	8.0	8.1	8.2
Conc.1	8.0	8.0	8.2	8.2
Conc.2	8.0	8.1	8.2	8.2
Conc.3	8.1	8.1	8.3	8.2
Conc.4	8.2	8.2	8.4	8.3
Conc.5	8.3	8.3	8.5	8.4
Minimum: 7.9		Maximum: 8.5		

New: New test water freshly prepared

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

Table 4 Appearances of Test Water

Test Group		Appearance			
		0 Hour New	24 Hours Old	24 Hours New	48 Hours Old
Control	Color	C-	C-	C-	C-
	Suspended solids	S-	S-	S-	S-
	Floating solids	F-	F-	F-	F-
	Precipitation	P-	P-	P-	P-
Conc.1	Color	C-	C-	C-	C-
	Suspended solids	S-	S-	S-	S-
	Floating solids	F-	F-	F-	F-
	Precipitation	P-	P-	P-	P-
Conc.2	Color	C-	C-	C-	C-
	Suspended solids	S-	S-	S-	S-
	Floating solids	F-	F-	F-	F-
	Precipitation	P-	P-	P-	P-
Conc.3	Color	C-	C-	C-	C-
	Suspended solids	S-	S-	S-	S-
	Floating solids	F-	F-	F-	F-
	Precipitation	P-	P-	P-	P-
Conc.4	Color	C-	C-	C-	C-
	Suspended solids	S-	S-	S-	S-
	Floating solids	F-	F-	F-	F-
	Precipitation	P-	P-	P-	P-
Conc.5	Color	C-	C-	C-	C-
	Suspended solids	S-	S-	S-	S-
	Floating solids	F-	F-	F-	F-
	Precipitation	P-	P-	P-	P-

New: New test water freshly prepared

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

C-: Colorless

S-: Not observed (transparent)

F-: Not observed

P-: Not observed

Table 5 Measured Concentrations of the Test Substance in Test Water

(Semi-Static Condition)

Test Group	Nominal Concentration	Measured Concentration (mg/L)				Mean <sup>a</sup>
		0 Hour	24 Hours	24 Hours	48 Hours	
	(mg/L)	New	Old	New	Old	
(Percent of Nominal, %)						
Control	--	<0.002	<0.002	<0.002	<0.002	<0.002
Conc.1	0.80	0.675 (84)	0.729 (91)	0.766 (96)	0.643 (80)	0.702 (88)
Conc.2	1.3	1.24 (95)	1.15 (88)	1.23 (95)	1.14 (88)	1.19 (92)
Conc.3	2.0	1.66 (83)	1.61 (81)	1.93 (97)	1.67 (84)	1.72 (86)
Conc.4	3.2	2.91 (91)	3.05 (95)	3.02 (94)	2.79 (87)	2.94 (92)
Conc.5	5.0	4.44 (89)	4.18 (84)	4.92 (98)	4.24 (85)	4.44 (89)

a: Time-weighted mean

New: New test water freshly prepared

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



Table 6 The Number of Immobilized *Daphnia magna* (Percent Immobility)

Test Group	Nominal Concentration (mg/L)	Mean <sup>a</sup> Measured Concentration (mg/L)	Cumulative Number of Immobilized <i>Daphnia</i> (Percent Immobility)	
			24 Hours	48 Hours
Control	--	--	0 (0)	0 (0)
Conc.1	0.80	0.702	0 (0)	0 (0)
Conc.2	1.3	1.19	0 (0)	19 (95)
Conc.3	2.0	1.72	10 (50)	20 (100)
Conc.4	3.2	2.94	20 (100)	20 (100)
Conc.5	5.0	4.44	20 (100)	20 (100)

a: Time-weighted mean

Table 7 Median Effect Concentration (EC50)

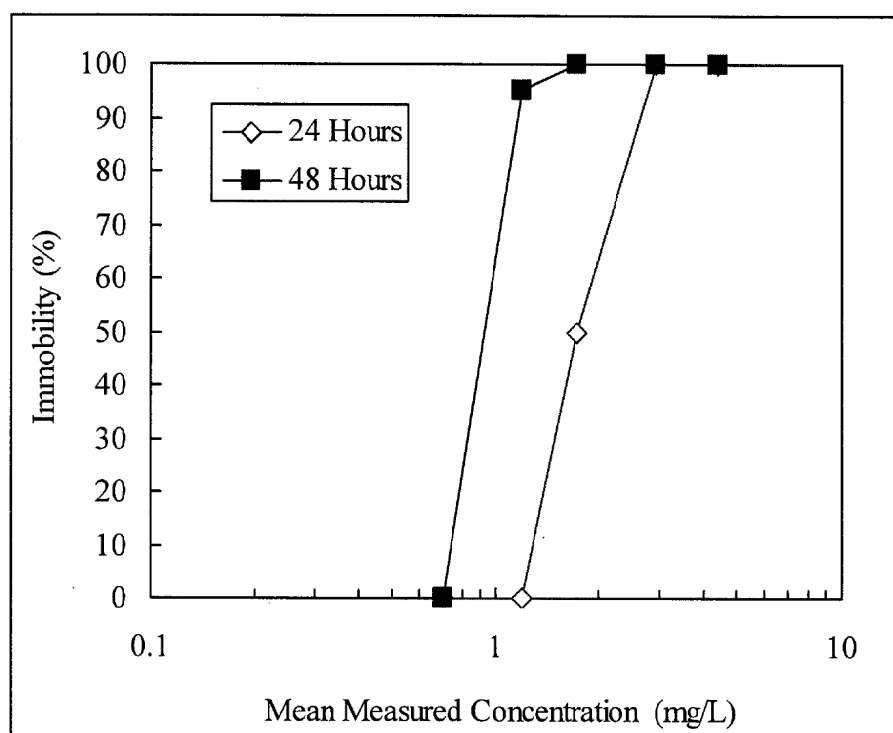
Exposure Period (Hours)	EC50 (mg/L)	95-Percent Confidence Limits (mg/L)	Statistical Method
24	1.72 * <sup>1</sup>	1.19 - 2.94	Binomial
48	0.946 * <sup>1</sup>	0.702 - 1.19	Binomial

\*1: Using the data of Conc.1 - 5

Table 8 Highest Concentration in 0% Immobility (EC0) and Lowest Concentration in 100% Immobility (EC100)

Exposure Period (Hours)	EC0 (mg/L)	EC100 (mg/L)
48	0.702	1.72

Figure 1 Concentration-Immobility 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

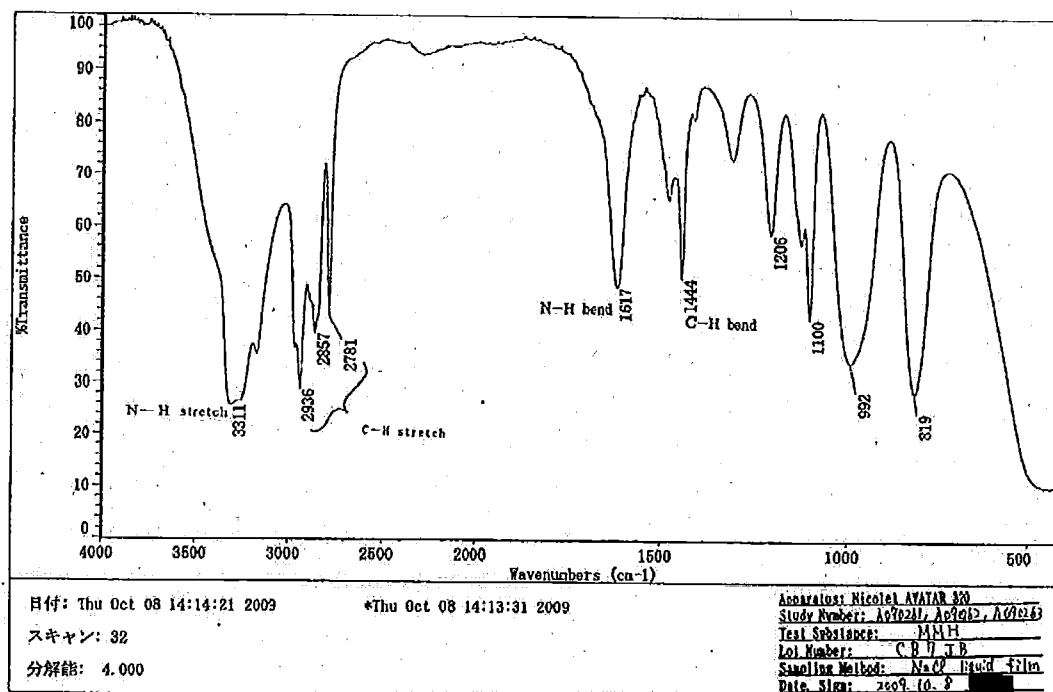
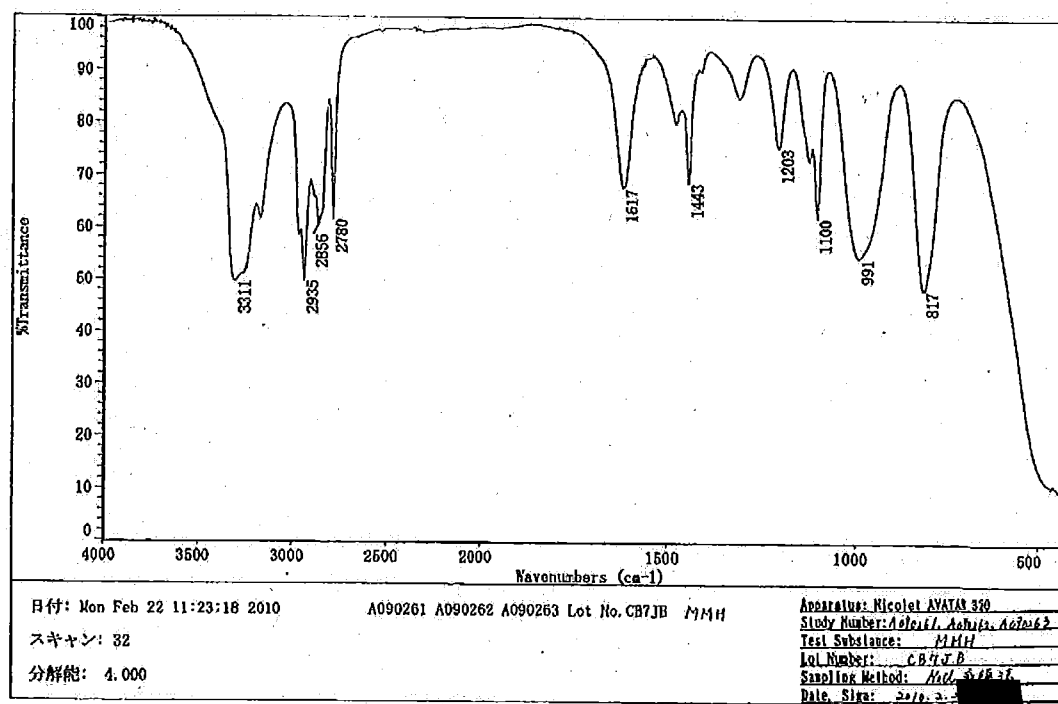


Figure A-1-2 Infrared Absorption Spectrum of the Test Substance after the End of Exposure



## 付属資料－ 2

試験用水の水質

(報告様式-C3C) [1/3]  
第09E05258号[2]

## 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 三菱化学アナライティクス 水くば分析事業所  
〒300-0332 茨城県水戸市元町中央8丁目5番1号  
TEL 029(882)1016 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は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 (ペルオキシ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(i) 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)

第09E05258号[2] [2/3]

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)



第09E05258号[2] [3/3]

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) ジクロロボス (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

被験物質採取量	---->	115	μL	(マイクロピペットで採取) (比重0.87)
溶媒	---->	試験用水		
最終容量	---->	1000	mL	
容器	---->	1000mL	メジウム瓶	
被験物質濃度	---->	100	mg/L	
混合方式	---->	転倒攪拌		
調製頻度	---->	暴露開始前および暴露開始後24時間に調製		

## 2. 試験液の調製

原液を下記の表の通り採取し、試験用水を加え最終容量とする。

対照区は試験用水のみとする。

溶媒	---->	試験用水
最終容量	---->	0.5 L
容器	---->	500 mL メスフラスコ
混合方式	---->	転倒攪拌
濃度公比	---->	1.58

試験区	設定濃度 (mg/L)	原液 (mL)
対照区	—	0
濃度区1	0.80	4.0
濃度区2	1.3	6.5
濃度区3	2.0	10
濃度区4	3.2	16
濃度区5	5.0	25

## 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 シリーズワークステーション (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 : G1379B 型

送液ポンプ : G1312B 型 (ハイパポンプ)

オートサンプラ : G1367C 型

カラムオーブン : G1316B 型

質量選択検出器 (MSD) : G6140A 型

[HPLC 条件]カラム : SHISEIDO 製 PC HILIC 5.0  $\mu$ m 2.0 mm i.d.  $\times$  150 mm

カラムオーブン : 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  $\mu$ L

流速 : 0.4 mL/min

[MSD 条件]

Ionization : Electrospray

Fragmentor : 50 V

Nebulizer : N<sub>2</sub> (30 psig)Drying gas : N<sub>2</sub> (10 L/min, 300°C)

Mode : Positive

SIM (Selected Ion Monitoring) 条件 :

Quant ion  $m/z$  88.10 [M+H+CH<sub>3</sub>CN]<sup>+</sup>

\* 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 を暴露期間中の検出限界とした。

## 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 (精製水で適宜希釈\*) 0.75 mL 採取

| ←アセトニトリル 0.75 mL 添加

混合

|

LC/MS測定

\*: 検量線範囲を超えると予想されたものについて希釈した。

Figure A-4-1 Calibration Curve

## Input Data

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)

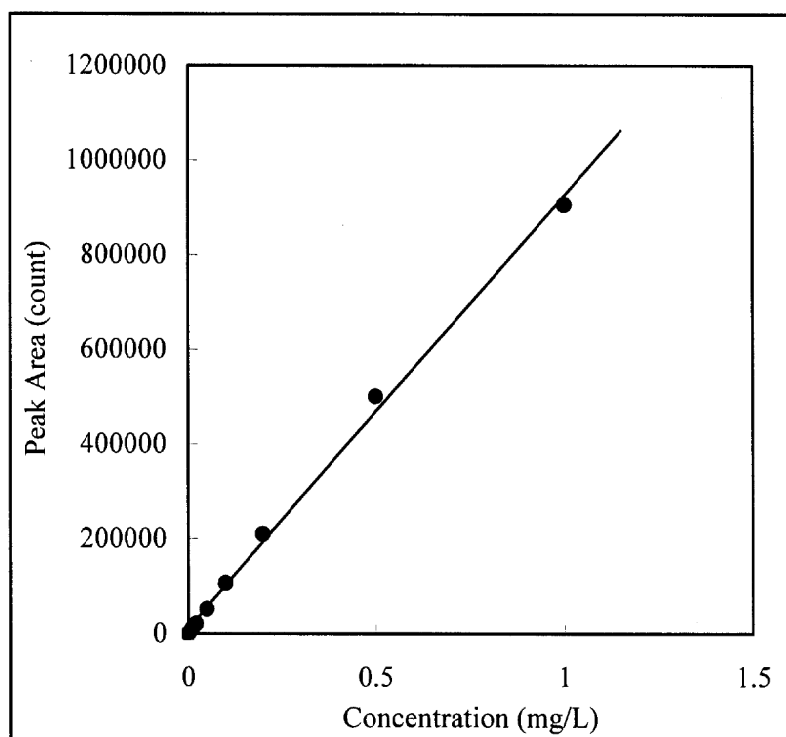
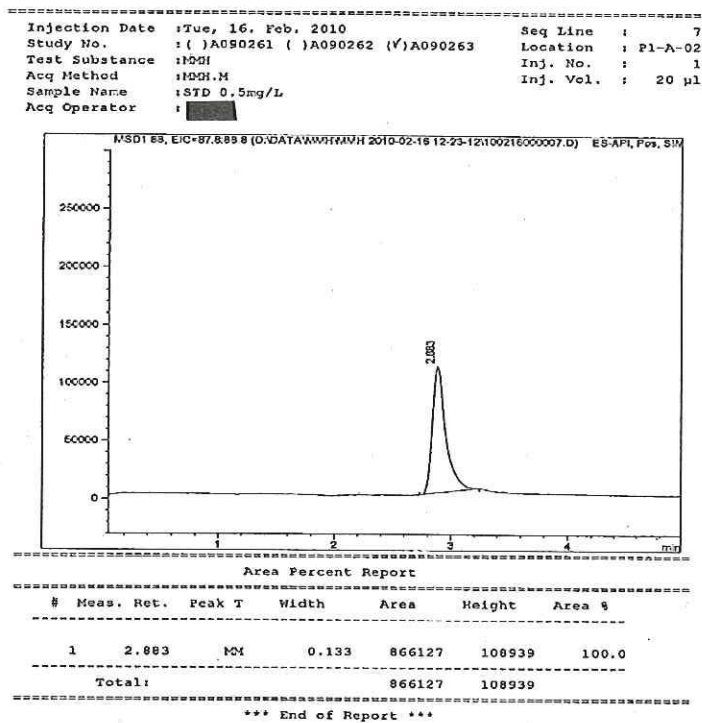




Figure A-4-2 Representative chromatograms

(1) Standard 0.500 mg/L : 0 Hour



(2) Control: 0 Hour - New

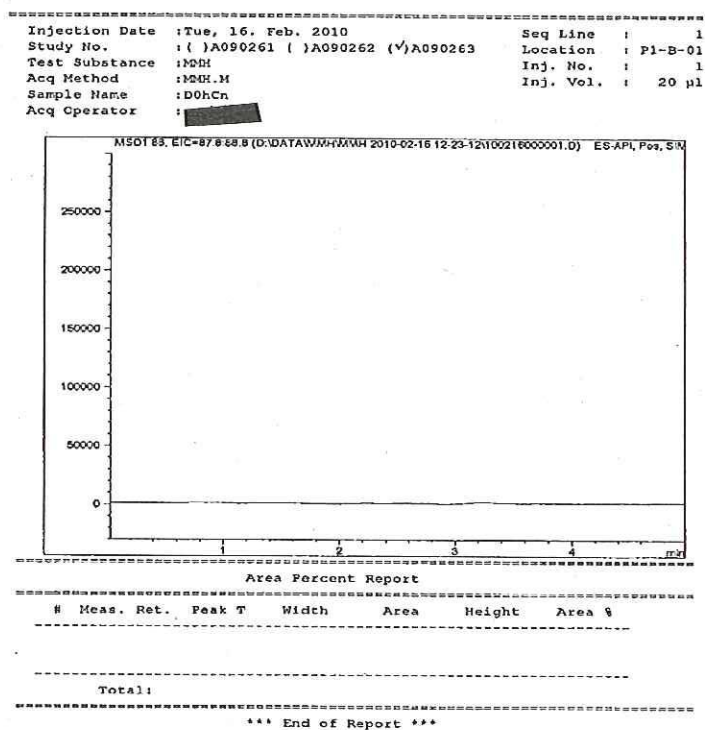


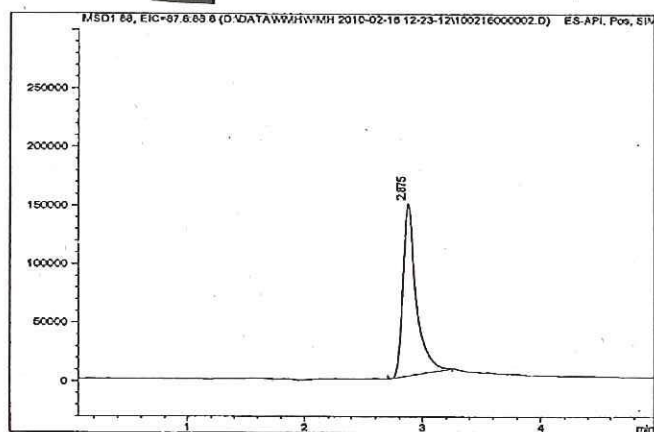
Figure A-4-2 Continued

## (3) Conc. 1 : 0 Hour - New

```

=====
Injection Date : Tue, 16. Feb. 2010          Seq Line : 2
Study No.      : ( ) A090261 ( ) A090262 (V) A090263  Location : P1-B-02
Test Substance : MSH                          Inj. No.  : 1
Acq Method     : MSH.M                      Inj. Vol. : 20 µl
Sample Name    : D0hC1n
Acq Operator   : 
=====

```



Area Percent Report						
#	Meas.	Ret.	Peak T	Width	Area	Height
1	2.875	MSH	0.132	1169917	147964	100.0
Total:				1169917	147964	

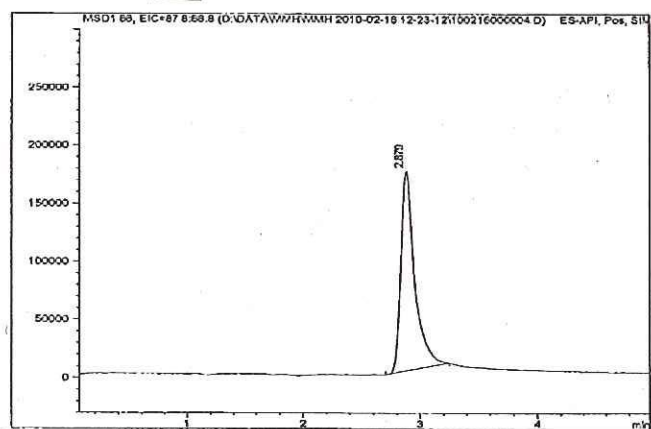
\*\*\* End of Report \*\*\*

## (4) Conc. 3 : 0 Hour - New

```

=====
Injection Date : Tue, 16. Feb. 2010          Seq Line : 4
Study No.      : ( ) A090261 ( ) A090262 (V) A090263  Location : P1-B-04
Test Substance : MSH                          Inj. No.  : 1
Acq Method     : MSH.M                      Inj. Vol. : 20 µl
Sample Name    : D0hC3n
Acq Operator   : 
=====

```

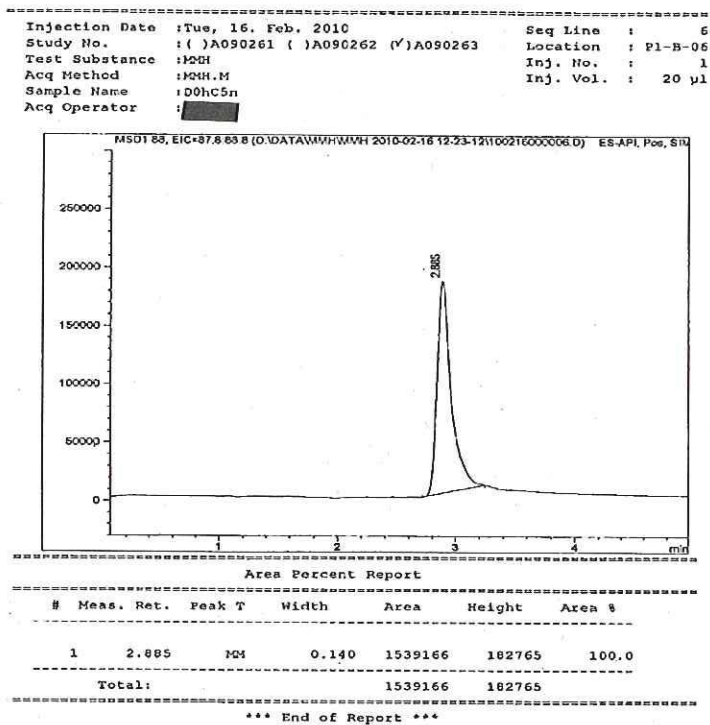


Area Percent Report						
#	Meas.	Ret.	Peak T	Width	Area	Height
1	2.879	MSH	0.139	1438862	172851	100.0
Total:				1438862	172851	

\*\*\* End of Report \*\*\*

Figure A-4-2 Continued

(5) Conc. 5 : 0 Hour - New



(6) Standard 0.500 mg/L : 24 Hours

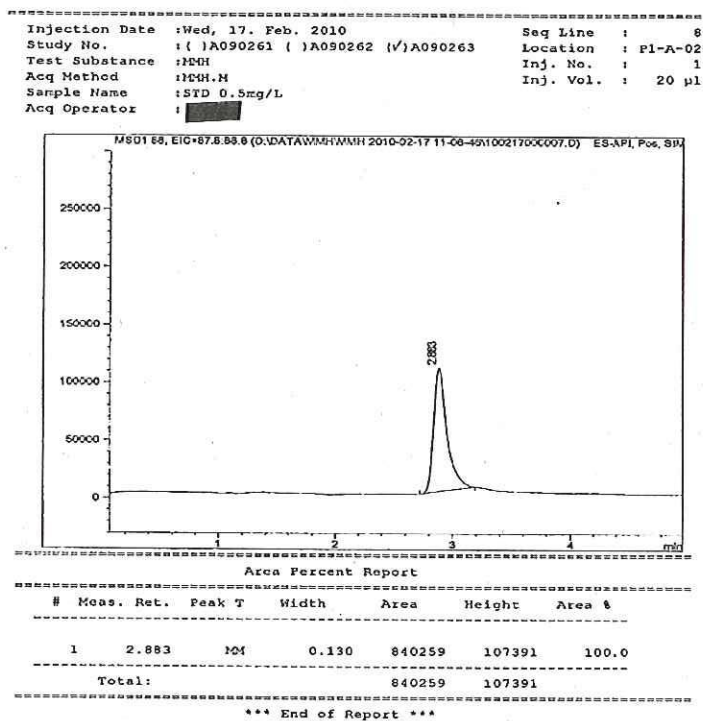


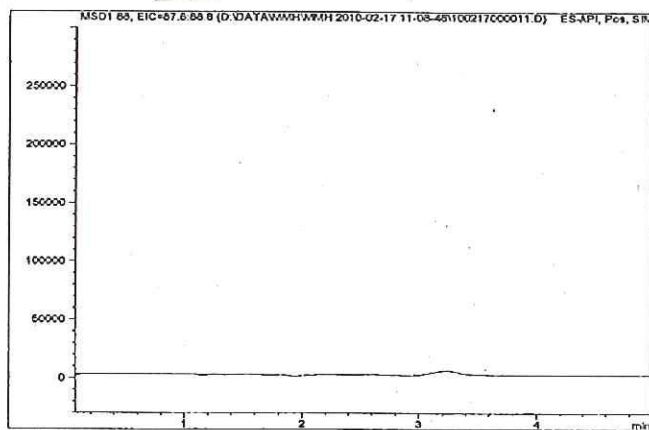
Figure A-4-2 Continued

(7) Control : 24 Hours – Old

```

=====
Injection Date : Wed, 17. Feb. 2010          Seq Line : 12
Study No.      : ( ) A090261 ( ) A090262 (V) A090263  Location  : F1-C-01
Test Substance : M2H                               Inj. No.   : 1
Acq Method     : M2H.M                             Inj. Vol.  : 20 µl
Sample Name    : D24hCo
Acq Operator    : 
=====

```



## Area Percent Report

#	Mean. Ret.	Peak T	Width	Area	Height	Area %
---	------------	--------	-------	------	--------	--------

Total:

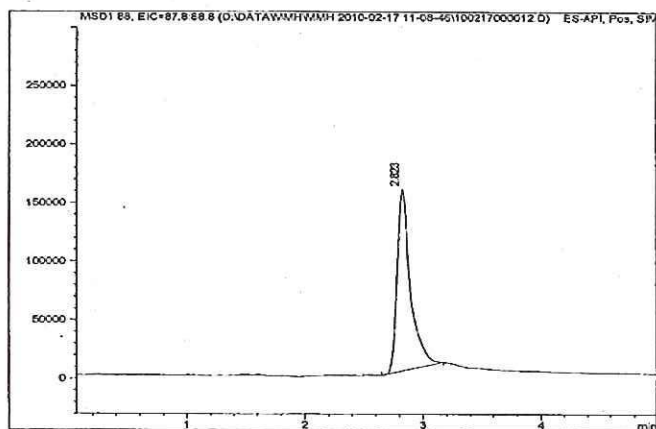
\*\*\* End of Report \*\*\*

(8) Conc. 1 : 24 Hours – Old

```

=====
Injection Date : Wed, 17. Feb. 2010          Seq Line : 13
Study No.      : ( ) A090261 ( ) A090262 (V) A090263  Location  : F1-C-02
Test Substance : M2H                               Inj. No.   : 1
Acq Method     : M2H.M                             Inj. Vol.  : 20 µl
Sample Name    : D24hClo
Acq Operator    : 
=====

```



## Area Percent Report

#	Mean. Ret.	Peak T	Width	Area	Height	Area %
1	2.823	PM	0.131	1224374	155880	100.0

Total:

1224374 155880

\*\*\* End of Report \*\*\*

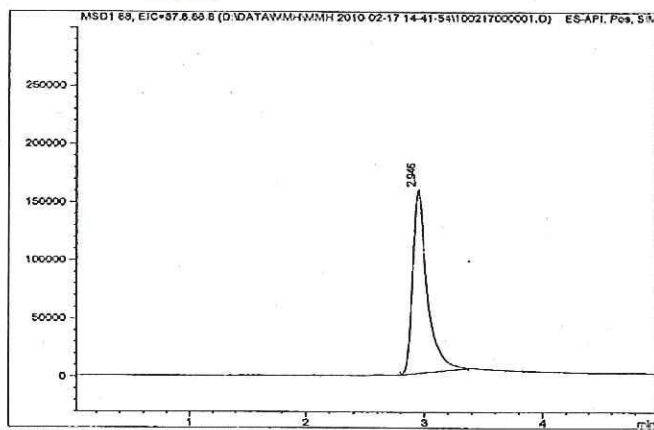
Figure A-4-2 Continued

(9) Conc. 3 : 24 Hours – Old

```

=====
Injection Date : Wed, 17. Feb. 2010                      Seq Line : 1
Study No.      : ( ) A090261 ( ) A090262 (V) A090263      Location  : P1-C-04
Test Substance : M2H                                         Inj. No.   : 1
Acq Method     : M2H.M                                       Inj. Vol.  : 20 µl
Sample Name    : D24hC3o
Acq Operator   : 
=====

```



Area Percent Report						
#	Meas. Ret.	Peak T	Width	Area	Height	Area %
1	2.946	M2H	0.142	1348709	158718	100.0
Total:				1348709	158718	

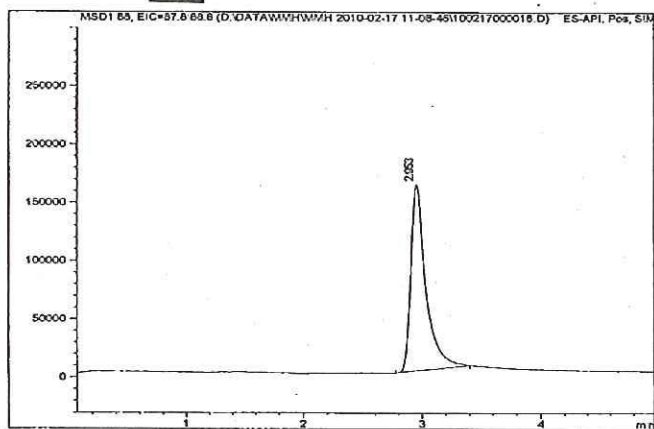
\*\*\* End of Report \*\*\*

(10) Conc. 5 : 24 Hours – Old

```

=====
Injection Date : Wed, 17. Feb. 2010                      Seq Line : 17
Study No.      : ( ) A090261 ( ) A090262 (V) A090263      Location  : P1-C-06
Test Substance : M2H                                         Inj. No.   : 1
Acq Method     : M2H.M                                       Inj. Vol.  : 20 µl
Sample Name    : D24hC5o
Acq Operator   : 
=====

```



Area Percent Report						
#	Meas. Ret.	Peak T	Width	Area	Height	Area %
1	2.953	M2H	0.146	1404341	160435	100.0
Total:				1404341	160435	

\*\*\* End of Report \*\*\*

## 付属資料－ 5

統計結果

Table A-5 Calculation of the EC50 ( 48hr )

---

TOXDAT MULTI-METHOD PROGRAM (BINOMIAL, MOVING AVERAGE AND PROBIT METHODS)					
ミジンコ急性遊泳阻害試験					
Time: 48hr					
Conc. No.	CONC. mg/L	NUMBER EXPOSED	NUMBER IMMOBILIZATION	PERCENT IMMOBILIZATION	BINOMIAL PROB. (%)
Conc. 1	0. 702	20	0	0	9. 53674E-05
Conc. 2	1. 19	20	19	95	0. 002002716
Conc. 3	1. 72	20	20	100	9. 53674E-05
Conc. 4	2. 94	20	20	100	9. 53674E-05
Conc. 5	4. 44	20	20	100	9. 53674E-05

---

THE BINOMIAL TEST SHOWS THAT 0. 702 AND 1. 19 CAN BE  
USED AS STATISCALLY SOUND CONSERVATIVE 95 PERCENT  
CONFIDENCE LIMITS SINCE THE ACTUAL CONFIDENCE LEVEL  
ASSOCIATED WITH THESE LIMITS IS 99. 9979019165039 PERCENT.  
AN APPROXIMATE EC50 FOR THIS SET OF DATA IS 0. 946235353721276

WHEN THERE ARE LESS THAN TWO CONCENTRATIONS AT WHICH THE PERCENT  
IMMOBILIZATION IS BETWEEN 0 AND 100, NEITHER THE MOVING AVERAGE NOR THE  
PROBIT METHOD CAN GIVE ANY STATISTICALLY SOUND RESULTS.

---