

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
[Redacted]

最 終 報 告 書

四塩化炭素のヒメダカ (*Oryzias latipes*)
に対する急性毒性試験

(試験番号：A020366-4)

2003年 9月30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 : 四塩化炭素のヒメダカ (*Oryzias latipes*) に対する
急性毒性試験

試 験 番 号 : A020366-4

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GLP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)

2003年 9月30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 : 四塩化炭素のヒメダカ (*Oryzias latipes*) に対する
急性毒性試験

試 験 番 号 : A020366-4

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	2003年 6月16日	2003年 6月16日
試験の査察	試験液の調製	2003年 8月19日
	魚の投入	2003年 8月19日
	魚の観察	2003年 8月22日
最終報告書監査	2003年 9月30日	2003年 9月30日
	2003年 9月30日	
	信頼性保証部門担当者	 
		 

試験実施概要

1. 表 題 : 四塩化炭素のヒメダカ (*Oryzias latipes*) に対する急性毒性試験
(試験番号: A020366-4)
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GLP : 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]

生態科学研究部

(2003年 9月 1日付, グループ再編により名称変更)

(分析実施)

9. 試験担当者： [redacted]

(2003年 9月30日)

(試験実施, 報告書作成)

[redacted]

(2003年 9月30日)

(試験実施)

[redacted]

(2003年 9月30日)

(試験実施)

[redacted]

(2003年 9月30日)

(試験実施)

10. 試験日程：

試験開始日 2003年 6月16日

実験開始日 2003年 8月19日

実験終了日 2003年 8月23日

試験終了日 2003年 9月30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 試験液の水溫, 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 試験液の分析	27~36
付属資料-3 結果の算出	37~38

要 約

試 験 委 託 者 : 環境省

表 題 : 四塩化炭素のヒメダカ (*Oryzias latipes*) に対する急性毒性試験

試 験 番 号 : A020366-4

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, 5.00, 7.80, 12.0, 19.0, 30.0 mg/L
(設定値) 公比: 1.6
- 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 : ガスクロマトグラフィー質量分析計 (GC/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42~49%,
24時間後において42~46%であった。

2) 96時間暴露後の半数致死濃度(LC50): 7.61 mg/L (95%信頼区間: 5.47 ~ 14.1 mg/L)

1 被験物質

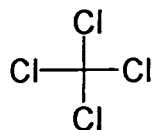
1.1 名称, 構造式および物理化学的性状

名称: 四塩化炭素 (略称 CCL₄)

別名: テトラクロロメタン

CAS No: 56-23-5

構造式:



分子式: CCl₄

分子量^{*1}: 153.82

沸点^{*1}: 76.8℃

融点^{*1}: -23℃

水溶解度^{*1}: 不溶 (0.08 g/100 mL水, 20℃)

比重^{*1}: 1.597 (20/20℃)

その他^{*1}: 甘い刺激臭, クロロホルム様

*1: 供給者提供資料

1.2 供試試料

純度^{*1}: 99.9% (GC)

ロット番号^{*1}: XXXXXXXXXX

供給者: XXXXXXXXXX

受領量^{*1}: 500 mL

受領日: 2002年11月 7日

外観^{*1}: 無色澄明液体

*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デシケータ（保管条件：室温，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。

2 供試生物

- 1) 和 名 : ヒメダカ
2) 学 名 : *Oryzias latipes*
3) 入手先 : 自家繁殖
4) 採卵開始日 : 2002年11月13日
5) マット番号 : 02-H-1113B
6) 被鱗体長 : 平均 1.74 cm (1.52 ~ 1.98 cm) , n=10
7) 体 重 : 平均 0.077 g (0.045 ~ 0.133 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) = 0.69 mg/L (95%信頼区間 : 0.50 ~ 0.95 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=24) にほぼ一致する (全て無水物換算値)。

平均値 ± 標準偏差 = 0.93 ± 0.29 mg/L

最小値 ~ 最大値 = 0.44 ~ 1.5 mg/L

- 9) 年 齢 : 孵化後約 1 年
10) じゅん化期間 : 2003年 7月18日 ~ 2003年 8月19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

脱塩素水 (横浜市水道水を活性炭処理し, 残留塩素等を除去したもので, 充分通気したもの) を希釈水として使用した。希釈水水質測定結果を付属資料-1 に示した。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 容ガラスビーカー (水面をテフロンシート製蓋で覆う)
- 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) 水温計： 横河電機製 2455 02 型 No.4
- 4) 溶存酸素計： 電気化学計器製 DOL-10 型 No.2
- 5) pH 計： 東亜電波工業製 HM-40V 型 No.1

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／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，5.00，7.80，12.0，19.0，30.0 mg/L

公比：1.6

予備試験結果（1 回目）

濃度 (mg/L)	96時間の死亡率(%)
10.0	100
32.0	100
100	100

予備試験結果（2 回目）

濃度 (mg/L)	96時間の死亡率(%)
1.00	0

3.5 試験液の調製

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。

以下の表の通りに，被験物質原液を調製した。

		被験物質原液
調製方法	被験物質採取量	400 mg (被験物質を 250 μ L 採取*)
	定容液	希釈水
	定容量	4000 mL
	溶解方法	超音波による機械的溶解 (10 分間)
	被験物質濃度	100 mg/L
調製頻度		換水毎

*：密度より算出

試験液は，各濃度に応じた量の被験物質原液を採取し，希釈水で5.0 Lに定容した。

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透明であった。

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 1 mLを採取し、精製水 9 mLとアセトン100 μ Lを添加し混合後、GC/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-2に示した。

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した*。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	Binomial 法，Moving average 法，Probit 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, 代表的なクロマトグラムを付属資料-2 に示した。

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42～49%、24時間後において42～46%であった。被験物質は揮発性であるため、調製時に損失はするものの、試験液の水面を覆うことにより、暴露期間中の濃度は比較的安定であった。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に示した。

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-3 に示した。

96時間 LC50： 7.61 mg/L (95%信頼区間： 5.47 ～ 14.1 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した。

0%死亡最高濃度 : 5.47 mg/L

100%死亡最低濃度 : 14.1 mg/L

5.5 毒性症状

観察された毒性症状を Table 5に示した。

対照区、5.00 ～ 12.0 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。

19.0 mg/Lの濃度区では異常遊泳（動作の緩慢）、表層遊泳および遊泳不能が観察された。

30.0 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に示した。

水温はすべての試験区で 24 ± 1 °C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 °C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	<0.002	<0.002	----
5.00	2.12 (42)	2.12 (42)	2.12 (42)
7.80	3.45 (44)	3.34 (43)	3.39 (43)
12.0	5.72 (48)	5.23 (44)	5.47 (46)
19.0	9.37 (49)	8.36 (44)	8.85 (47)
30.0	14.3 (48)	13.9 (46)	14.1 (47)

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)
5.00	2.12	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
7.80	3.39	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
12.0	5.47	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
19.0	8.85	3 (30)	5 (50)	8 (80)	8 (80)
30.0	14.1	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	9.84 *	5.47 - 14.1	Binomial
48	8.85 *	5.47 - 14.1	Binomial
72	7.61 *	5.47 - 14.1	Binomial
96	7.61 *	5.47 - 14.1	Binomial

* : Using the concentrations of 5.47 - 14.1 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	5.47	14.1
48	5.47	14.1
72	5.47	14.1
96	5.47	14.1

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
5.00	2.12	N	N	N	N
7.80	3.39	N	N	N	N
12.0	5.47	N	N	N	N
19.0	8.85	ASR-2	ASR-2 (SUR-1)	N	ASR-1 AP-1
30.0	14.1	—	—	—	—

a: geometric mean

N: No toxicological symptom was observed

ASR: abnormal swimming (reduced activity)

SUR: surfacing

AP: paralyzation

—: 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	23.9	23.7	23.6	23.9	23.8	23.8	23.7
5.00	2.12	23.9	23.9	23.7	23.6	23.8	23.7	23.9	23.6
7.80	3.39	23.9	23.8	23.7	23.6	23.8	23.7	23.9	23.7
12.0	5.47	23.9	23.9	23.6	23.6	23.8	23.7	23.9	23.7
19.0	8.85	23.9	23.9	23.6	23.6	23.8	23.7	24.1	23.7
30.0	14.1	23.9	--	--	--	--	--	--	--

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	6.6	8.4	6.4	8.6	6.4	8.4	6.8
5.00	2.12	8.4	6.6	8.4	6.8	8.6	6.9	8.2	7.1
7.80	3.39	8.3	6.9	8.4	6.9	8.6	6.9	8.3	7.1
12.0	5.47	8.2	6.8	8.4	6.7	8.6	6.8	8.4	6.9
19.0	8.85	8.3	6.9	8.4	7.1	8.6	7.5	8.3	7.6
30.0	14.1	8.2	---	---	---	---	---	---	---

minimum:6.4

maximum:8.6

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	----	7.6	7.1	7.5	7.3	7.8	7.3	6.9	7.4
5.00	2.12	7.6	7.1	7.6	7.3	7.8	7.3	7.5	7.4
7.80	3.39	7.7	7.2	7.5	7.3	7.7	7.3	7.6	7.4
12.0	5.47	7.6	7.2	7.5	7.3	7.7	7.3	7.5	7.4
19.0	8.85	7.5	7.2	7.5	7.2	7.6	7.3	7.5	7.4
30.0	14.1	7.4	—	—	—	—	—	—	—

minimum:6.9

maximum:7.8

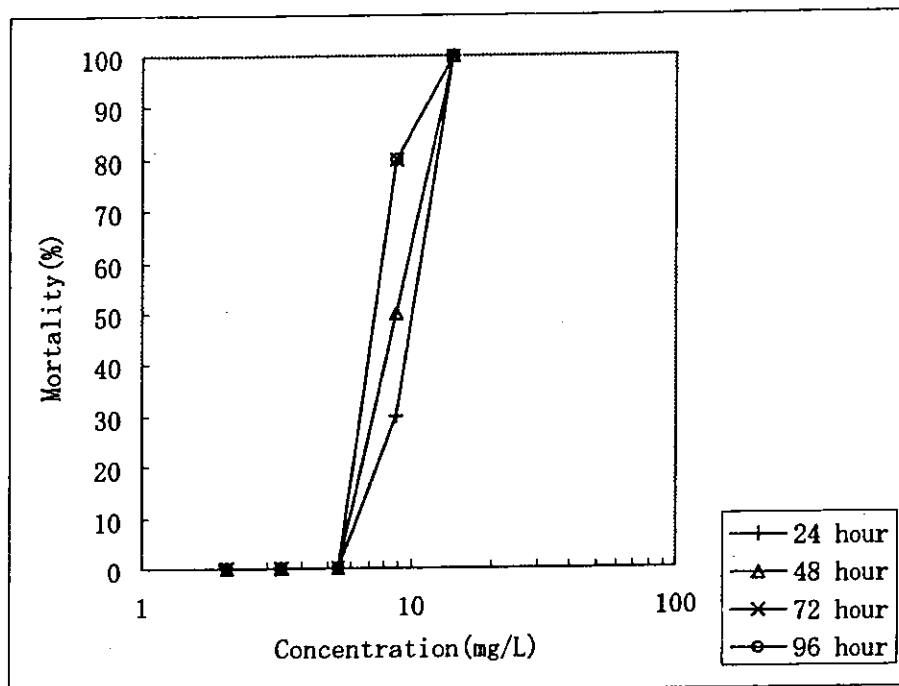
a: geometric mean

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	mg/L
COD	1.0	mg/L
pH	7.6	(21°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	0.01	mg/L
Bromide	<0.1	mg/L
Fluoride	0.13	mg/L
Sulfide	<0.03	mg/L
Total ammonium	<0.05	mg/L
Copper	<0.005	mg/L
Zinc	<0.01	mg/L
Aluminum	0.046	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	130	mg/L
Electric conductivity	170	μ S/cm
Total hardness (as CaCO ₃)	73	mg/L
Alkalinity	43	mg/L
Sodium	10	mg/L
Potassium	1.3	mg/L
Calcium	16	mg/L
Magnesium	5.4	mg/L

sampling date: February 10, 2003

付属資料－ 2

試験液の分析

1 試験液の分析方法

1) 各試験液 1 mLを採取し、精製水 9 mLとアセトン100 μ Lを添加し混合後、GC/MSにより分析した。代表的なクロマトグラムをFigure A-2-2(2), (3), (4), (5), (7), (8), (9), (10)に示した。

2) 精製水 10 mLを測定用バイアルに採取し、アセトンで調製した標準溶液 100 μ Lを添加し混合後、GC/MSにより分析した。クロマトグラムをFigure A-2-2(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 ガスクロマトグラフィー質量分析 (GC/MS) 測定条件 (装置)

ガスクロマトグラフ質量分析計 (ヘッドスペースサンブラ付き) No.1

ガスクロマトグラフ (GC) : Agilent Technologies 6890 型

ヘッドスペースサンブラ (HSS) : Agilent Technologies 7694 型

質量選択検出器 (MSD) : Agilent Technologies 5973N 型

データ処理部 : ケミステーション (Windows NT)

(条件)

[GC 条件]

カラム : J&W DB-1701 60 m×0.25 mm×1.0 μm

キャリアーガス : ヘリウム 1.0 mL/min (Constant flow)

オーブン温度 : 100°C (3 min.) → 20°C/min. → 240°C (2 min.)

注入口温度 : 250°C

MS インターフェース温度 : 200°C

注入条件 : スプリット (スプリット比=50:1)

注入量 : 3.0 mL (HSS サンプルループ容量)

[HSS 条件]

温度条件 : Oven=60°C, LOOP=120°C, Transfer Line=200°C

イベント時間 : GC Cycle Time=20 分

Vial Equilibration Time=20 分

Pressurization Time=0.2 分

Loop Fill Time=0.03 分

Loop Equilibration Time=0.2 分

Inject Time=0.2 分

バイアルパラメータ : Shake=2

[MSD 条件]

温度条件 : イオン源=230°C, 四重極マス・フィルタ=150°C

SIM (Selected Ion Monitoring) 条件 :

Solvent Delay=6 min.

Quant ion=116.9 m/z

Qualify ion=118.9 m/z

3 検量線

アセトンを用い、0, 1.00~500 mg/L の標準溶液を調製した。この標準溶液 100 μL を採取し 10 mL の精製水に添加したもの (100 倍希釈) を GC/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-2-1 に示した。

4 検出限界

最小検出ピーク面積を 10000 count に設定し、これに相当する試験液中の被験物質濃度 0.002 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、試験液採取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-2-1 Calibration curve

No.	Concentration (mg/L)	Peak Area (count)
1	0	0
2	0.0100	633105
3	0.0200	1183236
4	0.0500	2498099
5	0.100	5195287
6	0.200	10044964
7	0.500	23925278
8	1.00	48827941
9	2.00	97553159
10	5.00	239415714

$$Y = 48,036,791X$$

$$r = 1.00$$

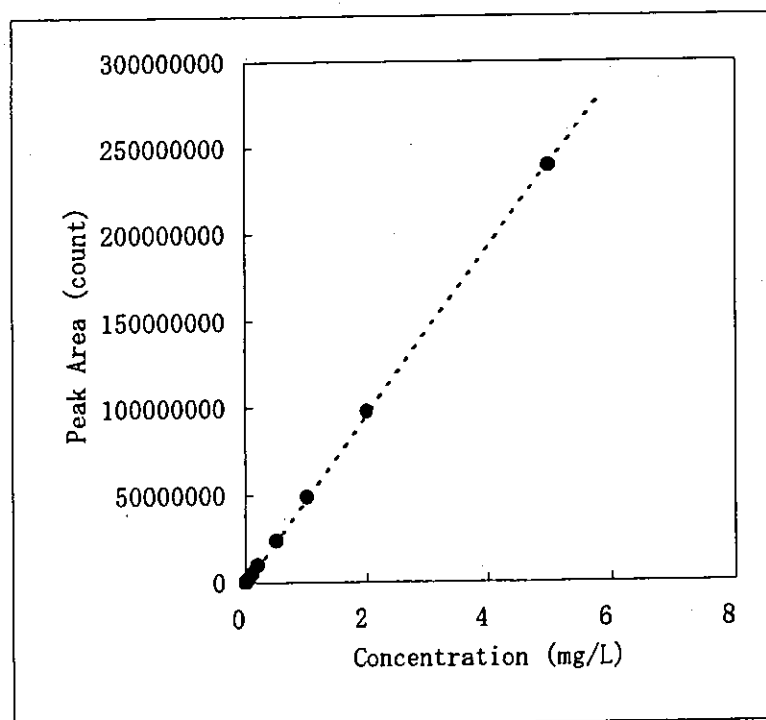
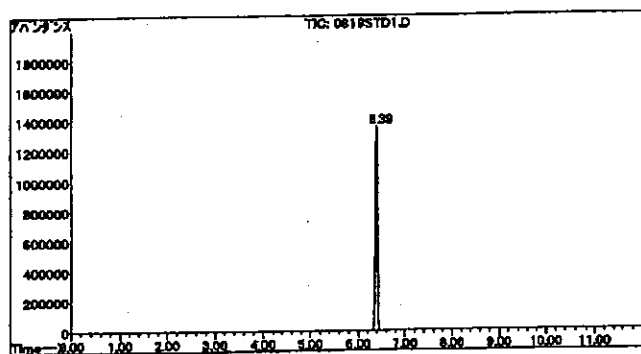


Figure A-2-2 Representative chromatograms

(1) Standard 1.00 mg/L ; 0 Hour

Study No. : A020366-4
 Date : 2003. 08. 19
 Operator :
 Sample Information: CCL4
 Sample Name : std 1mg/L
 Misc Info :
 File Name : C:\MSDCHEM\1\DATA\A020366\0819STD1.D
 Acquired : 19 Aug 2003 12:37 using AcqMethod A020366

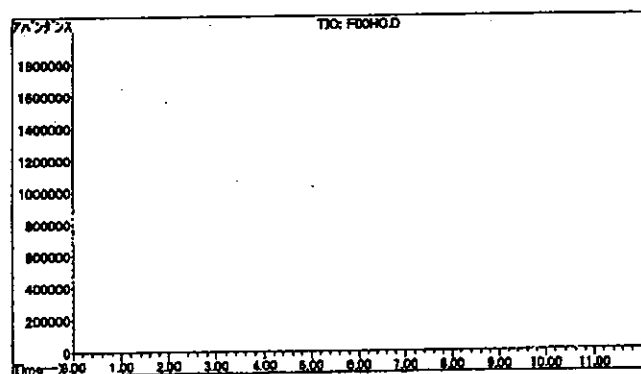


TIC: 0819STD1.D

ピーク	リテンションタイム	タイプ	半値幅	面積	開始時間	終了時間
1	6.388	M	0.070	56816202	6.291	6.496

(2) Control ; 0 Hour

Study No. : A020366-4
 Date : 2003. 08. 19
 Operator :
 Sample Information: CCL4
 Sample Name : Fish 0hr Control
 Misc Info :
 File Name : C:\MSDCHEM\1\DATA\A020366\F00HC.D
 Acquired : 19 Aug 2003 14:50 using AcqMethod A020366



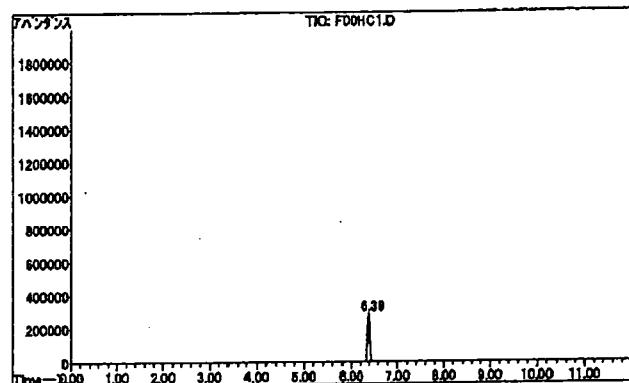
TIC: F00HC.D

ピーク	リテンションタイム	タイプ	半値幅	面積	開始時間	終了時間
ピークが検出できません						

Figure A-2-2 Continued

(3) 5.00 mg/L nominal ; 0 Hour

Study No. : A020366-4
 Date : 2003.08.19
 Operator :
 Sample Information: CCL4
 Sample Name : Fish 0hr Conc. 1
 Misc Info :
 File Name : C:\MSDCHEM\1\DATA\A020366\F00HC1.D
 Acquired : 19 Aug 2003 15:11 using AcoMethod A020366

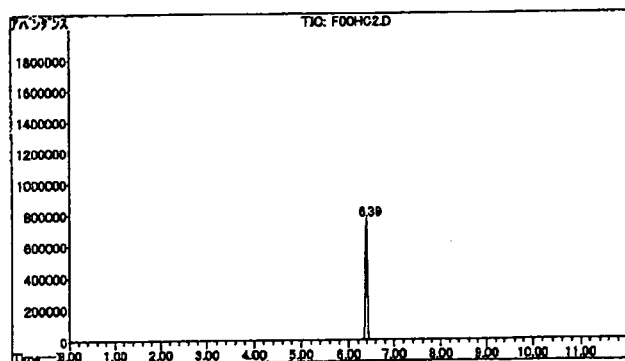


TIC: F00HC1.D

ピーク	リテンションタイム	タイプ	半値幅	面積	開始時間	終了時間
1	6.387	M	0.069	1202663	6.295	6.496

(4) 12.0 mg/L nominal ; 0 Hour

Study No. : A020366-4
 Date : 2003.08.19
 Operator :
 Sample Information: CCL4
 Sample Name : Fish 0hr Conc. X 3 投入 2003.8.19
 Misc Info :
 File Name : C:\MSDCHEM\1\DATA\A020366\F00HC2.D
 Acquired : 19 Aug 2003 15:33 using AcoMethod A020366



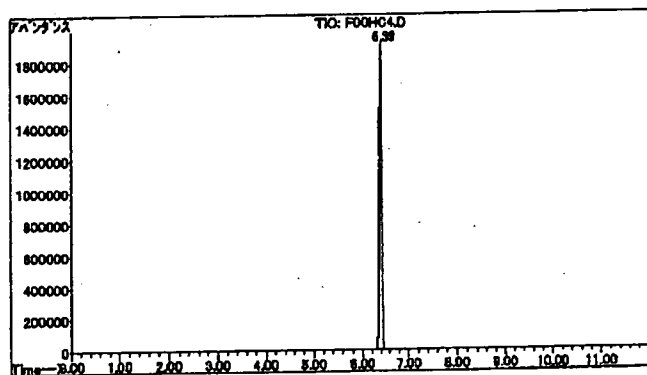
TIC: F00HC2.D

ピーク	リテンションタイム	タイプ	半値幅	面積	開始時間	終了時間
1	6.389	M	0.070	32502945	6.294	6.497

Figure A-2-2 Continued

(5) 30.0 mg/L nominal ; 0 Hour

Study No. : A020366-4
 Date : 2003. 08. 19
 Operator :
 Sample Information: CCL4
 Sample Name : Fish 0hr Conc. X5 投入 2003. 8. 19
 Misc Info :
 File Name : C:\MSDCHEM\1\DATA\A020366\F00HC4.D
 Acquired : 19 Aug 2003 16:16 using AcqMethod A020366

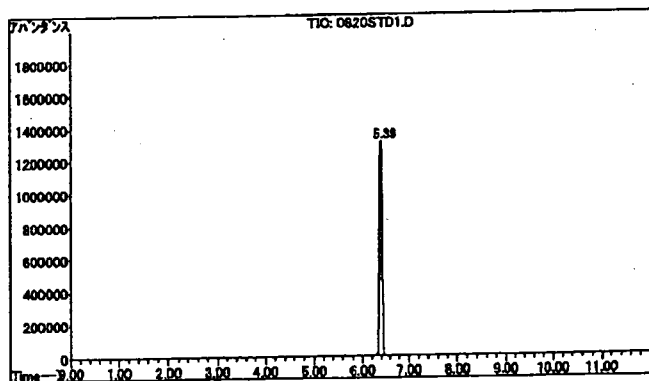


TIC: F00HC4.D

ピーク	リテンションタイム	タイプ	半値幅	面積	開始時間	終了時間
1	6.387	M	0.071	81372759	6.294	6.498

(6) Standard 1.00 mg/L ; 24 Hours

Study No. : A020366-4
 Date : 2003. 08. 20
 Operator :
 Sample Information: CCL4
 Sample Name : std 1mg/L
 Misc Info :
 File Name : C:\MSDCHEM\1\DATA\A020366\0820STD1.D
 Acquired : 20 Aug 2003 11:11 using AcqMethod A020366



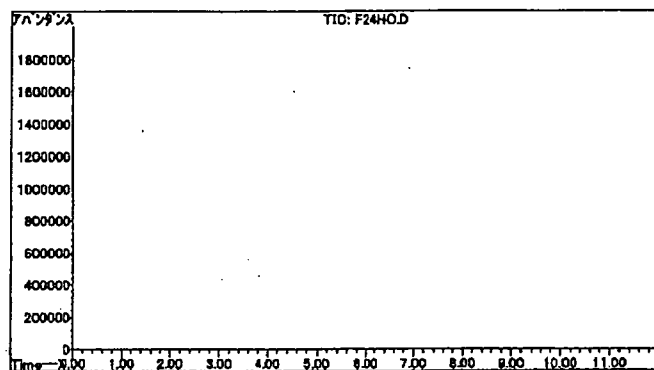
TIC: 0820STD1.D

ピーク	リテンションタイム	タイプ	半値幅	面積	開始時間	終了時間
1	6.388	M	0.069	54623316	6.291	6.492

Figure A-2-2 Continued

(7) Control ; 24 Hours

Study No. : A020366-4
 Date : 2003. 08. 20
 Operator :
 Sample Information: CCL4
 Sample Name : Fish 24hr Control
 Misc Info :
 File Name : C:\MSDCHEM\1\DATA\A020366\F24HC.D
 Acquired : 20 Aug 2003 11:32 using AcqMethod A020366

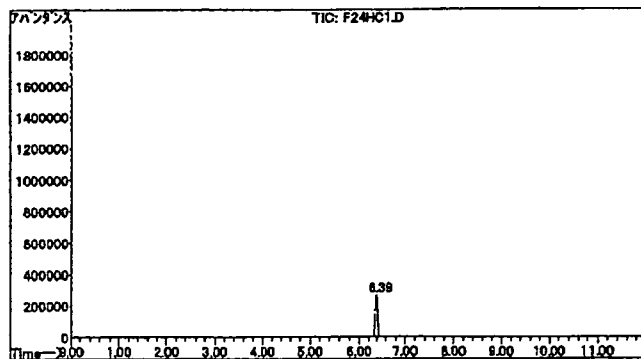


TIC: F24HC.D

ピーク	リテンションタイム	タイプ	半値幅	面積	開始時間	終了時間
ピークが検出できません						

(8) 5.00 mg/L nominal ; 24 Hours

Study No. : A020366-4
 Date : 2003. 08. 20
 Operator :
 Sample Information: CCL4
 Sample Name : Fish 24hr Conc. 1
 Misc Info :
 File Name : C:\MSDCHEM\1\DATA\A020366\F24HC1.D
 Acquired : 20 Aug 2003 12:37 using AcqMethod A020366



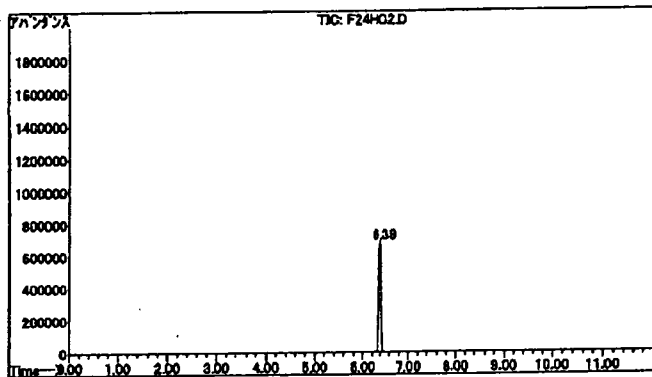
TIC: F24HC1.D

ピーク	リテンションタイム	タイプ	半値幅	面積	開始時間	終了時間
1	6.386	M	0.071	11603007	6.295	6.491

Figure A-2-2 Continued

(9) 12.0 mg/L nominal ; 24 Hours

Study No. : A020366-4
 Date : 2003. 08. 20
 Operator :
 Sample Information: CCL4
 Sample Name : Fish 24hr Conc. 12.0 mg/L
 Misc Info :
 File Name : C:\MSDCHEM\1\DATA\A020366\F24HC2.D
 Acquired : 20 Aug 2003 12:59 using AcqMethod A020366

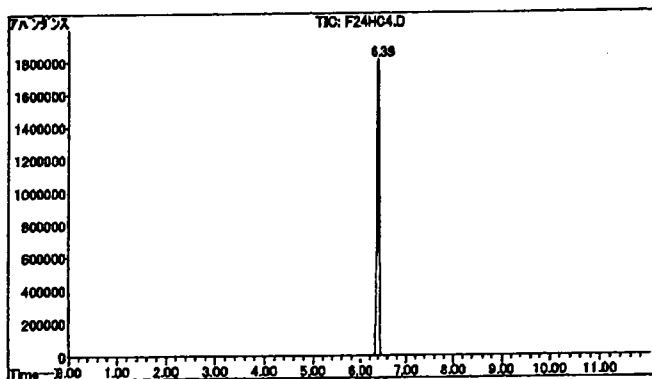


TIC: F24HC2.D

ピーク	リテンションタイム	タイプ	半値幅	面積	開始時間	終了時間
1	6.390	M	0.069	28594122	6.293	6.498

(10) 30.0 mg/L nominal ; 24 Hours

Study No. : A020366-4
 Date : 2003. 08. 20
 Operator :
 Sample Information: CCL4
 Sample Name : Fish 24hr Conc. 30.0 mg/L
 Misc Info :
 File Name : C:\MSDCHEM\1\DATA\A020366\F24HC4.D
 Acquired : 20 Aug 2003 13:42 using AcqMethod A020366



TIC: F24HC4.D

ピーク	リテンションタイム	タイプ	半値幅	面積	開始時間	終了時間
1	6.387	M	0.070	75822123	6.294	6.490

付属資料－ 3

結果の算出

Table A-3 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. 3	5.47	10	0	0	0.09765625
Conc. 4	8.85	10	8	80	5.46875
Conc. 5	14.1	10	10	100	0.09765625

THE BINOMIAL TEST SHOWS THAT 5.47 AND 14.1 CAN BE USED AS STATISTICALLY SOUND CONSERVATIVE 95 PERCENT CONFIDENCE LIMITS SINCE THE ACTUAL CONFIDENCE LEVEL ASSOCIATED WITH THESE LIMITS IS 99.8046875 PERCENT. AN APPROXIMATE LC50 FOR THIS SET OF DATA IS 7.60631942255391

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