

環境省殿

本写しは原本と相違ありません

(株)三菱化学安全科学研究所  
横浜研究所 運営管理者

## 最 終 報 告 書

四塩化炭素の

オオミジンコ (*Daphnia magna*) に対する急性遊泳阻害試験

(試験番号 : A020366-2)

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 : 四塩化炭素のオオミジンコ (*Daphnia magna*) に対する  
急性遊泳阻害試験

試 験 番 号 : A020366-2

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 : 四塩化炭素のオオミジンコ (*Daphnia magna*) に対する  
急性遊泳阻害試験

試 験 番 号 : A020366-2

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 7月16日	2003年 7月16日
	ジンの投入	2003年 7月16日	2003年 7月16日
	ジンの観察	2003年 7月18日	2003年 7月18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

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

## 試験実施概要

1. 表 題 : 四塩化炭素のオオミジンコ (*Daphnia magna*) に対する急性遊泳阻害試験  
(試験番号: A020366-2)
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, 24 および 48 時間の半数遊泳阻害濃度 (EiC50) 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.202 「ミジンコ類, 急性遊泳阻害試験および繁殖試験」 (1984 年)  
(ただし, 同改訂案「ミジンコ類, 急性遊泳阻害試験」 (2002 年) \*の内容を一部採用。)  
\*:OECD Guideline for Testing of Chemicals, Revised Proposal for Updating Guideline 202, ENV/JM/TG(2002)3/REV1(2002)
4. 適用 G L P : 日本国環境省総合環境政策局環境保健部環境安全課環境リスク評価室長通知「生態影響試験実施に関する基準の改正について」 (別添) 「生態影響試験実施に関する基準」 (環保安第 242 号, 2001 年)
5. 試験委託者 : 環境省  
〒100-8975 東京都千代田区霞が関一丁目 2-2  
委託責任者 総合環境政策局環境保健部環境安全課  
環境リスク評価室 室長補佐 XXXXXXXXXX
6. 試験受託者 : 株式会社三菱化学安全科学研究所  
〒105-0014 東京都港区芝二丁目 1 番 30 号
7. 試験施設 : 株式会社三菱化学安全科学研究所 横浜研究所  
〒227-0033 神奈川県横浜市青葉区鴨志田町 1000 番地

8. 試験責任者： [redacted]

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)

9. 試験担当者： [redacted] [redacted] (2003年 9月30日)  
(試験実施)

[redacted] [redacted] (2003年 9月30日)  
(試験実施, 報告書作成)

[redacted] [redacted] (2003年 9月30日)  
(試験実施)

[redacted] [redacted] (2003年 9月30日)  
(試験実施)

[redacted] [redacted] (2003年 9月30日)  
(試験実施)

[redacted] [redacted] (2003年 9月30日)  
(分析実施)

10. 試験日程： 試験開始日 2003年 6月16日  
実験開始日 2003年 7月16日  
実験終了日 2003年 7月18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	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 被験物質の確認および保管条件下での安定性	10
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	13
3.6 試験液の分析	14
3.7 試験操作	14
4 結果の算出	15
4.1 阻害濃度算出に用いる被験物質濃度の決定	15
4.2 半数遊泳阻害濃度 (EiC50) の算出	15
4.3 0%阻害最高濃度および100%阻害最低濃度	15
5 結果および考察	16
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	16
5.2 試験液中の被験物質濃度	16
5.3 半数遊泳阻害濃度 (EiC50)	16
5.4 0%阻害最高濃度および100%阻害最低濃度	16
5.5 試験液の水温, 溶存酸素濃度, pHおよび硬度	17
5.6 試験計画書からの逸脱事項	17
Table 1～8	18～24
Figure 1	25
付属資料－1 希釈水の組成	26～27
付属資料－2 試験液の分析	28～37
付属資料－3 結果の算出	38～39

## 要 約

試 験 委 託 者 : 環境省

表 題 : 四塩化炭素のオオミジンコ (*Daphnia magna*) に対する  
急性遊泳阻害試験

試 験 番 号 : A020366-2

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. 202 「ミジンコ類, 急性遊泳阻害試験および繁殖試験」 (1984年)
- 2) 暴 露 方 式 : 半止水式 (24時間後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 : オオミジンコ (*Daphnia magna*)
- 4) 暴 露 期 間 : 48時間
- 5) 試 験 濃 度 : 対照区, 9.90, 14.9, 22.8, 33.7, 49.5 mg/L  
(設定値) 公比: 1.5
- 6) 試 験 液 量 : 100 mL/容器
- 7) 連 数 : 4 容器/試験区
- 8) 供 試 生 物 数 : 20頭/試験区 (5頭/容器)
- 9) 試 験 温 度 :  $20 \pm 1^{\circ}\text{C}$
- 10) 照 明 : 室内光, 16時間明 (800 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 (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 50～59%，換水前において 42～48%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。

### 2) 24時間暴露後の結果

	(mg/L)	95%信頼区間 (mg/L)
半数遊泳阻害濃度 (EiC50)	13.0	11.1 ～ 17.3
0%阻害最高濃度	6.84	—
100%阻害最低濃度	17.3	—

### 3) 48時間暴露後の結果

	(mg/L)	95%信頼区間 (mg/L)
半数遊泳阻害濃度 (EiC50)	8.09	7.18 ～ 9.04
0%阻害最高濃度	< 4.92	—
100%阻害最低濃度	11.1	—



## 1 被験物質

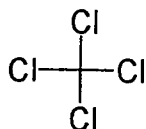
### 1.1 名称, 構造式および物理化学的性状

名 称 : 四塩化炭素 (略称 CCL<sub>4</sub>)

別 名 : テトラクロロメタン

CAS No. : 56-23-5

構造式 :



分子式 : CCl<sub>4</sub>

分子量\*<sup>1</sup> : 153.82

沸点\*<sup>1</sup> : 76.8℃

融点\*<sup>1</sup> : -23℃

水溶解度\*<sup>1</sup> : 不溶 (0.08g/100mL水, 20℃)

比重\*<sup>1</sup> : 1.597 (20/20℃)

その他\*<sup>1</sup> : 甘い刺激臭, クロロホルム様

\*<sup>1</sup>: 供給者提供資料

### 1.2 供試試料

純度\*<sup>1</sup> : 99.9% (GC)

ロット番号\*<sup>1</sup> : XXXXXXXXXX

供給者 : XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX

受領量\*<sup>1</sup> : 500mL

受領日 : 2002年11月 7日

外観\*<sup>1</sup> : 無色澄明液体

\*<sup>1</sup>: 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： 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
- 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，供試生物の感受性を調べている。1998年6月以降の48時間の半数遊泳阻害濃度（EC50）は、以下の通りである。

平均値±標準偏差=0.75±0.17 mg/L, n=11  
(最小値～最大値=0.57～1.02 mg/L)

- 6) 生育段階： 雌の幼体（24時間以内令）
- 7) 供試生物を得るための親ミジンコの飼育条件：
  - 飼育水： 希釈水（3.2 参照）
  - 飼育密度： 1頭/80mL（25頭/2L）以下
  - 飼育容器： 2L ガラス製容器
  - 水温： 20±1℃
  - 溶存酸素濃度： 飽和濃度の60%以上
  - pH： 6.7～8.5
  - 照明： 室内光，16時間明（800 lux以下）/8時間暗
  - 飼育期間： 2003年 6月25日～2003年 7月16日
  - 暴露開始前2週間の親の死亡率： < 5%
  - 休眠卵および雄の発生： 無し
  - 餌の種類： *Chlorella vulgaris*（単細胞緑藻類）  
（藻類培養液を遠心分離し，希釈水に置換して使用）
  - 給餌量： 0.2 mg C（有機炭素含量）/頭/日
  - 飼育水の交換： 定期的に（3回/週）交換。幼体は極力，毎日除去。

### 3 試験方法

#### 3.1 試験条件

- 1) 暴露方式： 半止水式（24時間後に試験液の全量を交換）  
水面をテフロンシートで被覆
- 2) 暴露期間： 48時間
- 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： 飽和濃度の60%以上
- 8) pH： 試験液のpH調整は行わなかった
- 9) 硬度： 約 250mg/L ( $\text{CaCO}_3$ 換算)
- 10) 照明： 室内光，16時間明（800 lux以下）／8時間暗
- 11) 給餌： 無給餌

#### 3.2 希釈水

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」に記載してある調製水，Elendt M4 を用いた。組成を付属資料－1 に示した。

#### 3.3 試験容器および恒温槽等

- 1) 試験容器： 100mL容ガラスピーカー（試験容器には蓋をし，水面をテフロンシートで覆った）
- 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. 1
- 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
- 6) 硬度測定キット： 共立理化学研究所製 WAD-TH

### 3.4 試験濃度の設定

以下の表に示す予備試験（各2連，10頭／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，9.90，14.9，22.8，33.7，49.5 mg/L

（公比：1.5）

#### 予備試験結果

濃度 (mg/L)	遊泳阻害率 (%)	
	24時間後	48時間後
助剤対照区	0	0
0.0100	0	0
0.100	0	0
1.00	0	0
10.0	0	0

濃度 (mg/L)	遊泳阻害率 (%)	
	24時間後	48時間後
対照区	0	0
16.0	0	0
51.0	100	100
160	100	100

### 3.5 試験液の調製

試験液調製時の希釈水は、調製前に暴気を行い、恒温槽内で  $20 \pm 1^\circ\text{C}$  とした。

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	99.0 mg (被験物質を $62 \mu\text{L}$ 採取*)
	定容液	希釈水
	定容量	1000 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	99.0 mg/L
調製頻度		用時調製
保管条件等		--
上記条件下での安定性		--

\* : 比重より算出

試験液は、試験濃度に応じた量の被験物質原液を採取し、希釈水で 500 mL に定容した。

1 濃度につき 4 個の試験容器に各 100 mL 入れた。

対照区は希釈水のみとした。

調製時の試験液の状態 (外観) は対照区および 9.90~22.8mg/L 区において無色透明、

33.7 および 49.5mg/L 区においては淡黄色透明であった。

### 3.6 試験液の分析

暴露開始時および換水前（暴露開始24時間後）に全試験区各1試験容器より試験液 1 mLを採取し、精製水 9mLとアセトン 100 $\mu$ 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

試験液の水温、溶存酸素濃度、pHおよび硬度を測定後、ガラスピペット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。ミジンコ投入の際、試験液量に対するピペット内の飼育水が全量で1%以内となるようにした。

暴露開始 24 および 48 時間後にミジンコの遊泳阻害数の観察を行った。試験容器を穏やかに動かした後、15 秒間泳げない場合は遊泳阻害されたとみなした。

水温、溶存酸素濃度、pHおよび硬度は、暴露開始時および換水前（暴露開始 24 時間後）に、全試験区各1試験容器の試験液について測定した。

#### 4 結果の算出

##### 4.1 阻害濃度算出に用いる被験物質濃度の決定

阻害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 半数遊泳阻害濃度（EiC50）の算出

24および48時間の各試験区における、ミジンコの遊泳阻害数と供試個体数（20頭）から遊泳阻害率（％）を求め、以下の方法で半数遊泳阻害濃度（EiC50）を決定した。

最高濃度区における阻害率	≥ 50%	< 50%
EiC50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－遊泳阻害率曲線の記載	記載する。	記載する。

##### 4.3 0%阻害最高濃度および100%阻害最低濃度

ミジンコが遊泳阻害を受けない最高濃度区（0%阻害最高濃度）を24および48時間について可能な限り記録した。同様に、全てのミジンコが遊泳阻害を受ける最低濃度区（100%阻害最低濃度）を記録した。

## 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

暴露開始時および換水前（暴露開始24時間後）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 50～59%，換水前において 42～48%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。

### 5.3 半数遊泳阻害濃度 (EiC50)

各時間における遊泳阻害率を Table 2 に、濃度－遊泳阻害率曲線を Figure 1 に示した。

暴露期間中の対照区における遊泳阻害率は0%，水面に浮いたミジンコは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遊泳阻害濃度 (EiC50) を Table 3 および以下に、48 時間の算出結果を付属資料－3 に示した

24 時間 EiC50 : 13.0 mg/L (95%信頼区間 : 11.1 ～ 17.3 mg/L)

48 時間 EiC50 : 8.09 mg/L (95%信頼区間 : 7.18 ～ 9.04 mg/L)

### 5.4 0%阻害最高濃度および100%阻害最低濃度

0%阻害最高濃度および100%阻害最低濃度を Table 4 および以下に示した。

24 時間 0%阻害最高濃度 : 6.84 mg/L

24 時間 100%阻害最低濃度 : 17.3 mg/L

48 時間 0%阻害最高濃度 : < 4.92 mg/L

48 時間 100%阻害最低濃度 : 11.1 mg/L



#### 5.5 試験液の水温，溶存酸素濃度，pHおよび硬度

試験液の水温を Table 5，溶存酸素濃度を Table 6，pHを Table 7，硬度を Table 8に示した。

水温はすべての試験区で $20 \pm 1^{\circ}\text{C}$ で，溶存酸素濃度はすべての試験区で飽和溶存酸素濃度（ $20.0^{\circ}\text{C}$ の飽和溶存酸素濃度：8.8 mg/L）の60%以上であり，いずれも試験基準を満たした。pHはミジンコの飼育環境として適正範囲（6.0～8.5）内であった。また，硬度も適正範囲内（約250mg/L）と判断した。

#### 5.6 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)				Geometric Mean During 24 Hours (mg/L)
	0 Hour New	Percent of Nominal	24 Hours Old	Percent of Nominal	
Control	< 0.003	—	< 0.003	—	—
9.90	5.53	56	4.38	44	4.92
14.9	7.44	50	6.28	42	6.84
22.8	12.8	56	9.70	43	11.1
33.7	18.6	55	16.0	47	17.3
49.5	29.2	59	23.8	48	26.4

New: freshly prepared test solutions

Old: test solutions after 24 hours exposure

Table 2      The Number of Immobilized *Daphnia magna* (Percent Immobility)

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)
9.90	4.92	0 ( 0)	1 ( 5)
14.9	6.84	0 ( 0)	2 ( 10)
22.8	11.1	3 ( 15)	20 (100)
33.7	17.3	20 (100)	20 (100)
49.5	26.4	20 (100)	20 (100)

a: geometric mean

Table 3      Calculated EiC50 Values

Exposure Period (Hours)	EiC50 (mg/L)	95-Percent Confidence Limits (mg/L)	Statistical Method
24	13.0*	11.1 - 17.3	Binomial
48	8.09*	7.18 - 9.04	Moving average

\*: Using the concentrations of 4.92 - 26.4 mg/L

Table 4      Highest Concentration in 0% Immobility and Lowest Concentration in 100% Immobility

Exposure Period (Hours)	Highest Concentration in 0% Immobility (mg/L)	Lowest Concentration in 100% Immobility (mg/L)
24	6.84	17.3
48	< 4.92	11.1

Table 5      Temperature

Nominal Concentration (mg/L)	Mean <sup>a</sup> Measured Concentration (mg/L)	Temperature (°C)	
		0 Hour New	24 Hours Old
Control	--	20.0	19.9
9.90	4.92	20.2	19.9
14.9	6.84	20.2	20.0
22.8	11.1	20.2	20.2
33.7	17.3	20.3	20.2
49.5	26.4	20.3	20.0

a: geometric mean

New: freshly prepared test solutions

Old: test solutions after 24 hours exposure

Table 6      Dissolved Oxygen Concentrations

Nominal Concentration (mg/L)	Mean <sup>a</sup> Measured Concentration (mg/L)	Dissolved Oxygen Concentration (mg/L)	
		0 Hour New	24 Hours Old
Control	--	8.8	8.7
9.90	4.92	8.7	8.7
14.9	6.84	8.6	8.7
22.8	11.1	8.7	8.7
33.7	17.3	8.5	8.5
49.5	26.4	8.3	8.5

a: geometric mean

New: freshly prepared test solutions

Old: test solutions after 24 hours exposure

Table 7      pH Values

Nominal Concentration (mg/L)	Mean <sup>a</sup> Measured Concentration (mg/L)	pH	
		0 Hour New	24 Hours Old
Control	--	8.4	8.2
9.90	4.92	8.3	8.1
14.9	6.84	8.2	8.1
22.8	11.1	8.1	8.0
33.7	17.3	8.1	8.0
49.5	26.4	8.0	7.9

a: geometric mean

New: freshly prepared test solutions

Old: test solutions after 24 hours exposure

Table 8 Total Hardness (as CaCO<sub>3</sub>)

Nominal Concentration (mg/L)	Mean <sup>a</sup> Measured Concentration (mg/L)	Total Hardness (as CaCO <sub>3</sub> , mg/L) <sup>b</sup>	
		0 Hour New	24 Hours Old
Control	---	265	265
9.90	4.92	260	265
14.9	6.84	265	265
22.8	11.1	265	265
33.7	17.3	265	265
49.5	26.4	260	260

a: geometric mean

b: These values were determined by a total hardness measurement kit.

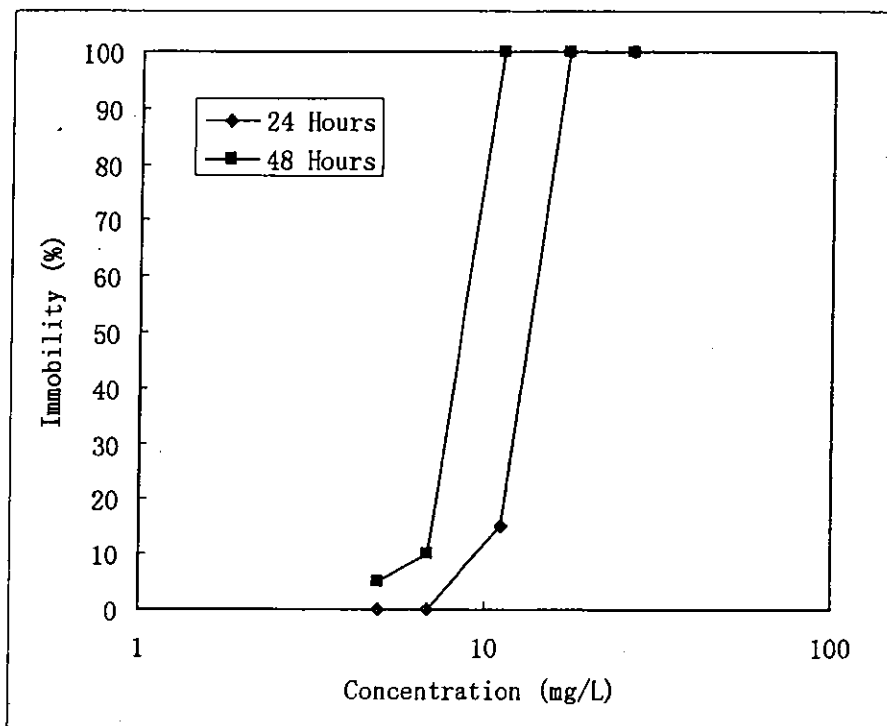
The same lot of this kit showed approximately 5 ~ 15 mg/L higher value than the theoretical standard value.

New: freshly prepared test solutions

Old: test solutions after 24 hours exposure



Figure 1 Concentration-Immobility Curve



## 付属資料－ 1

希釈水の組成

Table A-1 Elendt M4 medium recommended by OECD Guideline No.211  
used as dilution water

Macro nutrients	Concentration (mg/L)
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	293.8
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	123.3
KCl	5.80
$\text{NaHCO}_3$	64.8
$\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$	10.0
$\text{NaNO}_3$	0.274
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0.143
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	0.184

Trace elements	Concentration ( $\mu\text{g/L}$ )
$\text{H}_3\text{BO}_3$	2859.5
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	360.5
LiCl	306.0
RbCl	71.0
$\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	152.0
NaBr	16.0
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	63.0
$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	16.8
$\text{ZnCl}_2$	13.0
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	10.0
KI	3.25
$\text{Na}_2\text{SeO}_3$	2.19
$\text{NH}_4\text{VO}_3$	0.575
$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	2500
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	995.5

Vitamines	Concentration ( $\mu\text{g/L}$ )
Thiamine hydrochloride	75.0
Cyanocobalamine(B12)	1.00
Biotine	0.750

## 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を測定用バイアルに採取し、精製水 9mLとアセトン 100  $\mu$ 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 10mL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  $\mu$ 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 (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 : ゲミステーション (Windows NT)

### (条件)

#### [GC 条件]

カラム : J&W DB-1701 60m×0.25mm×1.0μm

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

オープン温度 : 100°C (3min) → 20°C/min → 240°C (2min)

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 : 3.0mL (HSS サンプラー容量)

#### [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=6min

Quant ion=116.9m/z

Qualify ion=118.9m/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 100μL を採取し 10mL 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 0.003 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

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

$$r = 1.00$$

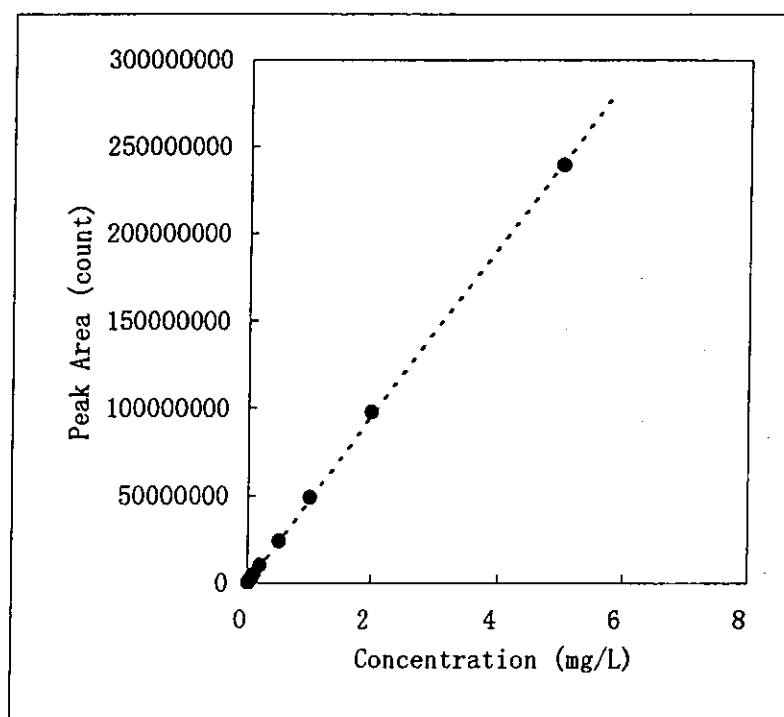
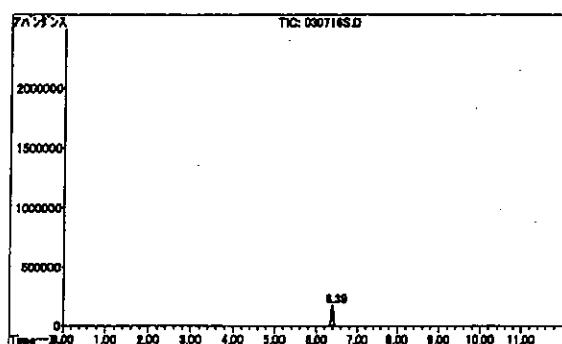




Figure A-2-2 Representative chromatograms

(1) Standard 0.200 mg/L ; 0 Hour

Study No. : A020366-2  
 Date : 2003. 07. 16  
 Operator :   
 Sample Information: CCL4  
 Sample Name : std 0.2mg/L  
 Misc Info :  
 File Name : C:\MSDCHEM\1\DATA\A020366\030716S.D  
 Acquired : 16 Jul 2003 11:44 using AcqMethod A020366

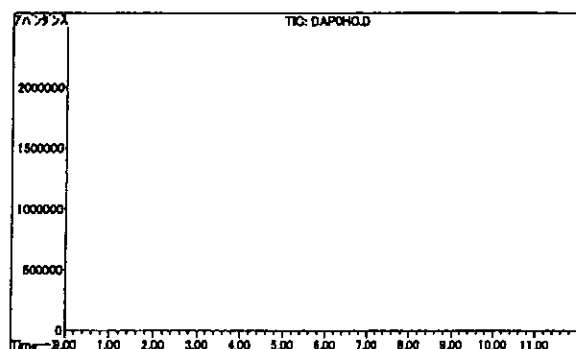


TIC: 030716S.D

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	0.067	7130372	6.299	6.490

(2) Control ; 0 Hour

Study No. : A020366-2  
 Date : 2003. 07. 16  
 Operator :   
 Sample Information: CCL4  
 Sample Name : Dap. 0h Control  
 Misc Info :  
 File Name : C:\MSDCHEM\1\DATA\A020366\0DAP0HC.D  
 Acquired : 16 Jul 2003 12:05 using AcqMethod A020366



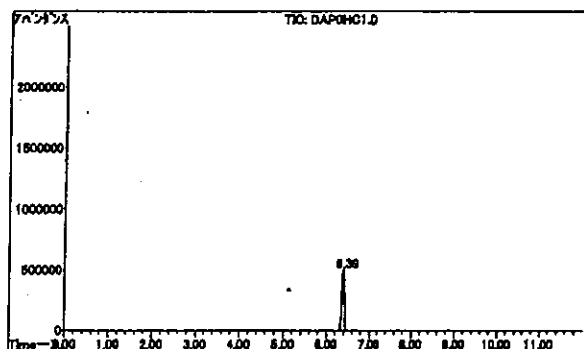
TIC: DAP0HC.D

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) 9.90 mg/L nominal ; 0 Hour

Study No. : A020366-2  
 Date : 2003. 07. 16  
 Operator :   
 Sample Information: CCL4  
 Sample Name : Dep. 0h Conc. 1  
 Misc Info :  
 File Name : C:\MSDCHEM\1\DATA\A020366\DAPOHC1.D  
 Acquired : 16 Jul 2003 12:27 using AcqMethod A020366

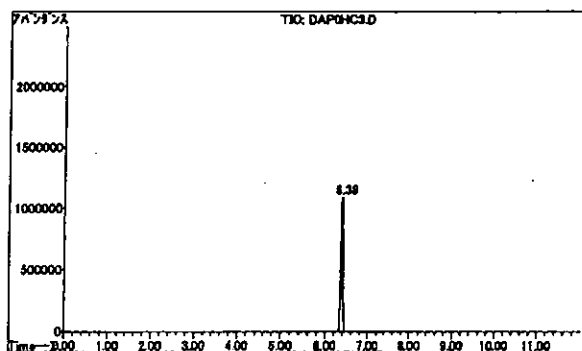


TIC: DAPOHC1.D

ピーク	リテンション	タイプ	半値幅	面積	開始時間	終了時間
1	6.391	M	0.066	18701047	6.306	6.488

(4) 22.8 mg/L nominal ; 0 Hour

Study No. : A020366-2  
 Date : 2003. 07. 16  
 Operator :   
 Sample Information: CCL4  
 Sample Name : Dep. 0h Conc. 3  
 Misc Info :  
 File Name : C:\MSDCHEM\1\DATA\A020366\DAPOHC3.D  
 Acquired : 16 Jul 2003 13:10 using AcqMethod A020366



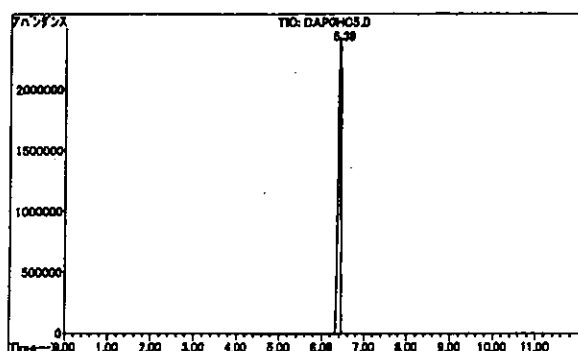
TIC: DAPOHC3.D

ピーク	リテンション	タイプ	半値幅	面積	開始時間	終了時間
1	6.393	M	0.070	45758287	6.298	6.496

Figure A-2-2 Continued

(5) 49.5 mg/L nominal ; 0 Hour

Study No. : A020366-2  
 Date : 2003. 07. 16  
 Operator :   
 Sample Information: CCL4  
 Sample Name : Dep. On Conc. 5  
 Misc Info :  
 File Name : C:\MSDCHEM\1\DATA\A020366\0A0PHCS.D  
 Acquired : 16 Jul 2003 13:53 using AcqMethod A020366

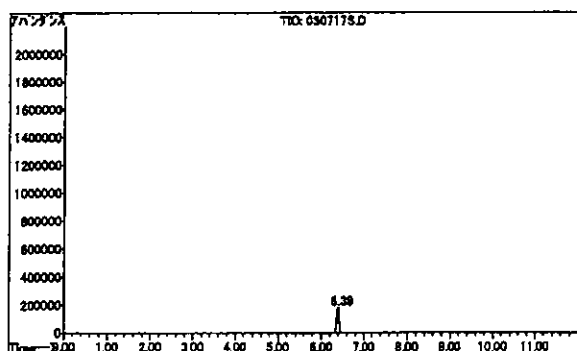


TIC: DAP0HCS.D

ピーク	リテンション	タイプ	半値幅	面積	開始時間	終了時間
1	6.390	M	0.072	104154376	6.296	6.497

(6) Standard 0.200 mg/L ; 24 Hours

Study No. : A020366-2  
 Date : 2003. 07. 17  
 Operator :   
 Sample Information: CCL4  
 Sample Name : std 0.2mg/L  
 Misc Info :  
 File Name : C:\MSDCHEM\1\DATA\A020366\030717S.D  
 Acquired : 17 Jul 2003 12:27 using AcqMethod A020366



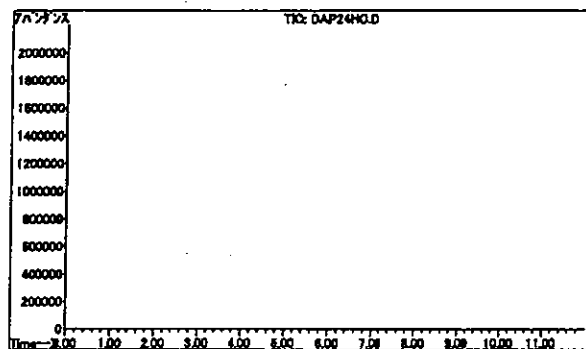
TIC: 030717S.D

ピーク	リテンション	タイプ	半値幅	面積	開始時間	終了時間
1	6.392	M	0.071	7600255	6.294	6.483

Figure A-2-2 Continued

(7) Control ; 24 Hours

Study No. : A020366-2  
 Date : 2003. 07. 17  
 Operator :   
 Sample Information: CCL4  
 Sample Name : Dep. 24h Control  
 Misc Info :  
 File Name : C:\MSDCHEM\1\DATA\A020366\0AP24HC.D  
 Acquired : 17 Jul 2003 12:48 using AcqMethod A020366

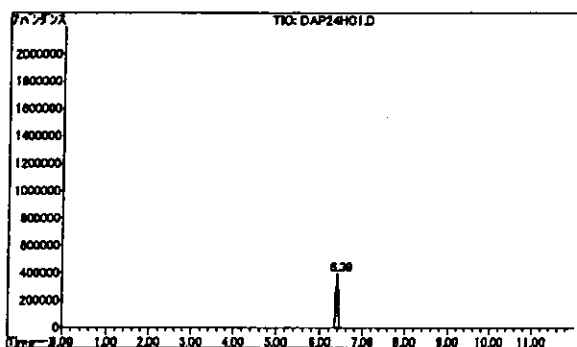


TIC: DAP24HC.D

ピーク 9.90分 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) 9.90 mg/L nominal ; 24 Hours

Study No. : A020366-2  
 Date : 2003. 07. 17  
 Operator :   
 Sample Information: CCL4  
 Sample Name : Dep. 24h Conc. 1  
 Misc Info :  
 File Name : C:\MSDCHEM\1\DATA\A020366\0AP24HC1.D  
 Acquired : 17 Jul 2003 13:10 using AcqMethod A020366



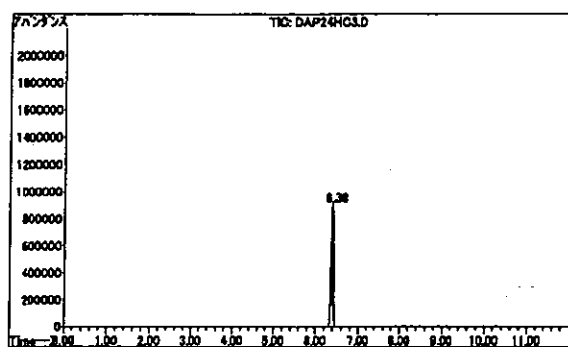
TIC: DAP24HC1.D

ピーク 9.90分 タイプ 半値幅 面積 開始時間 終了時間  
 1 6.382 M 0.070 16649003 6.286 6.489

Figure A-2-2 Continued

(9) 22.8 mg/L nominal ; 24 Hours

Study No. : A020366-2  
 Date : 2003.07.17  
 Operator :   
 Sample Information: CCL4  
 Sample Name : Dep. 24h Conc. 3  
 Misc Info :  
 File Name : C:\MSDCHEM\1\DATA\A020366\DP24HC3.D  
 Acquired : 17 Jul 2003 13:53 using AcqMethod A020366

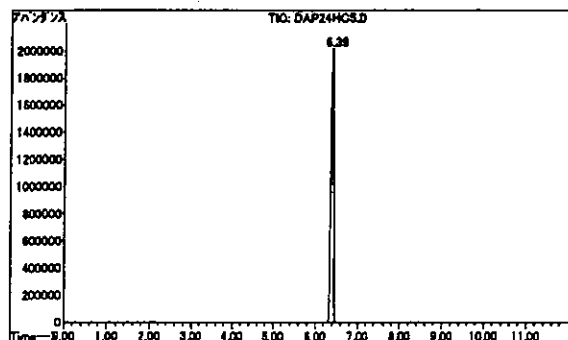


TIC: DAP24HC3.D

ピーク	リテンション	タイプ	半値幅	面積	開始時間	終了時間
1	6.391	M	0.068	36865713	6.303	6.484

(10) 49.5 mg/L nominal ; 24 Hours

Study No. : A020366-2  
 Date : 2003.07.17  
 Operator :   
 Sample Information: CCL4  
 Sample Name : Dep. 24h Conc. 5  
 Misc Info :  
 File Name : C:\MSDCHEM\1\DATA\A020366\DP24HC5.D  
 Acquired : 17 Jul 2003 14:36 using AcqMethod A020366



TIC: DAP24HC5.D

ピーク	リテンション	タイプ	半値幅	面積	開始時間	終了時間
1	6.390	M	0.075	90549043	6.299	6.488

### 付属資料一 3

結果の算出

Table A-4 Calculation of the EiC50 (Representative, 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 DEAD	PERCENT DEAD	BINOMIAL PROB. (%)
Control	0	20	0	0	----
Conc. 1	4.92	20	1	5	0.002002716
Conc. 2	6.84	20	2	10	0.020122528
Conc. 3	11.1	20	20	100	9.53674E-05
Conc. 4	17.3	20	20	100	9.53674E-05
Conc. 5	26.4	20	20	100	9.53674E-05

THE BINOMIAL TEST SHOWS THAT 6.84 AND 11.1 CAN BE  
USED AS STATISTICALLY SOUND CONSERVATIVE 95 PERCENT  
CONFIDENCE LIMITS SINCE THE ACTUAL CONFIDENCE LEVEL  
ASSOCIATED WITH THESE LIMITS IS 99.9797821044922 PERCENT.  
AN APPROXIMATE LC50 FOR THIS SET OF DATA IS 8.26794471332176

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

~~EiC50~~ ~~LC50~~ ~~7.918~~  
 SPAN G ~~LC50~~ 95 PERCENT CONFIDENCE LIMITS  
 3 0.053842033 8.093956377 7.183886399 AND 9.036396957

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

ITERATIONS G H GOODNESS OF FIT PROBABILITY  
 10 1.279193935 2.919701719 0.032671245

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

SLOPE = 12.1264203  
 95 PERCENT CONFIDENCE LIMITS= -1.58873762 AND 25.84157821

LC50 = 7.912938883  
 95 PERCENT CONFIDENCE LIMITS 0 AND + INFINITY

LC1 = 5.0869806  
 95 PERCENT CONFIDENCE LIMITS= 0 AND 6.809309283