

最終報告書

試験名

tert-ブチルニヒドロペルオキシドのヒメダカに対する急性毒性試験

著 者



試験終了日

2010 年 3 月 29 日

試験施設

(株) 日曹分析センター (略称 NCAS) 小田原事業所
〒250-0216 神奈川県小田原市高田 345

試験委託者

環境省 総合環境政策局 環境保健部 企画課 化学物質審査室
〒100-8975 東京都千代田区霞が関 1-2-2

試験番号

NCAS 09-254

GLP 適合陳述書

試験番号： NCAS 09-254

試験名： tert-ブチル=ヒドロペルオキシドのヒメダカに対する急性毒性試験

この試験は「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）に従って実施した。

この試験はこの最終報告書に述べられた方法により行われ、この最終報告書は試験実施により得られた生データを正確に反映したものである。

試験責任者：

[Redacted Signature]

2010 年 3 月 29 日

(株) 日曹分析センター 小田原事業所

信頼性保証書

試験番号： NCAS 09-254

試験名： tert-ブチル＝ヒドロペルオキシドのヒメダカに対する急性毒性試験

上記試験の信頼性保証の監査又は査察を適用 GLP および信頼性保証部門 (QAU) の SOP に基づいて実施した。監査又は査察の結果は、以下の日付で試験責任者および運営管理者に報告した。

監査又は査察項目	日付 (月/日/年)		
	監査又は査察日	報告日	
		試験責任者	運営管理者
試験計画書	3/15/2010	3/15/2010	3/15/2010
実験操作			
・ 被験物質の確認	3/15/2010	3/16/2010	3/16/2010
・ 試験溶液の調製	3/15/2010	3/16/2010	3/16/2010
・ 試験溶液への暴露	3/15/2010	3/16/2010	3/16/2010
・ 試験溶液の採取と処理	3/15/2010	3/16/2010	3/16/2010
・ 標準溶液の調製	3/15/2010	3/16/2010	3/16/2010
・ GC 分析	3/15-16/2010	3/16/2010	3/16/2010
・ 魚の入手と管理	3/16/2010	3/16/2010	3/16/2010
・ 魚の観察	3/16/2010	3/16/2010	3/16/2010
生データ	3/25-26/2010	3/26/2010	3/26/2010
報告書草案	3/25-26/2010	3/26/2010	3/26/2010
最終報告書	3/29/2010	3/29/2010	3/29/2010

QAU は、この試験が試験計画書および SOP に従って行われ、報告された方法や手段が実際に使われたものであり、結果は記録されたデータを正確に反映していることを確認した。

QAU 責任者



(株) 日曹分析センター

2010年3月29日

試験情報

試験番号 : NCAS 09-254
試験名 : tert-ブチル=ヒドロペルオキシドのヒメダカに対する急性毒性試験
報告書番号 : NCAS 09-254

試験委託者 : 環境省 総合環境政策局 環境保健部 企画課 化学物質審査室
〒100-8975 東京都千代田区霞が関 1-2-2
TEL. 03-5521-8253 FAX 03-3581-3370

試験施設 : (株) 日曹分析センター 小田原事業所
〒250-0216 神奈川県小田原市高田 345
TEL. 0465-42-8253 FAX 0465-42-3581

試験責任者 : XXXXXXXXXX
実験従事者 : XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX (供試生物の管理)
XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX (試験溶液の調製)
XXXXXXXXXXXX (観察)
XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX (水質測定)
XXXXXXXX (濃度分析)

試験開始日 : 2010 年 3 月 15 日
実験開始日 : 2010 年 3 月 15 日
暴露期間 : 2010 年 3 月 15 日～2010 年 3 月 19 日
実験終了日 : 2010 年 3 月 23 日
試験終了日 : 2010 年 3 月 29 日

データ要求/試験ガイドライン : 厚生労働省医薬食品局長、経済産業省製造産業局長及び環境省総合環境政策局長通知「新規化学物質等に係る試験の方法について」(平成 15 年 11 月 21 日付け薬食発第 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 日付に記載された魚類急性毒性試験

試資料保管 : 本試験に関する全ての文書は、当試験施設の資料室に試験終了後 10 年間保管する。その後の保管場所は試験委託者と協議して決定する。また、被験物質および基準物質は、当試験施設に試験終了後少なくとも 10 年間またはその品質が評価に耐え得る期間のいずれか短い方の期間保管する。

SOP および試験計画書からの逸脱 : 1 件

試験計画書には、『死亡した個体は観察時に取り除く。換水時以外の観察時に死亡を発見した場合も栓を外して取り除き、元どおり栓をする(この場合、各容器の試験条件を同一とするために死亡がいなかった容器についても栓を開けて、試験魚を観察し、元どおり栓をする)。』と規定されていたが、

48 時間の換水後、約 3 時間後に 70 mg/L 区に 1 例の死亡が観察された。死亡個体は発見時に取り除いたが、換水後約 3 時間と短時間であったことから、試験条件に影響はないと判断し、他の容器の栓は開けなかった。70 mg/L 区における 96 時間後の tert-ブチル=ヒドロペルオキシドの濃度は減少していなかったこと、pH および溶存酸素濃度も他の容器と大きな違いは認められなかったことから、試験結果への影響はなかったと判断した。

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：無し

目 次

表紙.....	1
GLP 適合陳述書.....	2
信頼性保証書.....	3
試験情報.....	4
目 次.....	6
概 要.....	8
緒 言.....	8
実験材料および方法.....	8
1. 被験物質	8
2. 被験物質の確認および安定性の確認	9
3. 試薬および機器	9
4. 供試生物	10
5. 順化.....	10
6. 急性毒性試験	10
結 果.....	13
1. 被験物質の確認および安定性の確認	13
2. 試験溶液中の被験物質濃度の分析法確認.....	13
3. 試験溶液中の被験物質濃度	14
4. 被験物質濃度と死亡率	14
5. LC ₅₀ 、0%死亡最高濃度および 100%死亡最低濃度.....	14
6. 供試魚の観察結果.....	14
7. 試験溶液の観察結果.....	15
8. 試験溶液の水溫、pH および溶存酸素濃度	15
結 論	15
表および図	16
表 1 繰り返し精度の測定結果	16
表 2 試験溶液中の被験物質濃度.....	16
表 3 死亡数および死亡率.....	17
表 4 LC ₅₀ 、0%死亡最高濃度および 100%死亡最低濃度	17
表 5 供試魚の観察結果	18
表 6 試験溶液の観察結果.....	18
表 7 試験溶液の水溫	19
表 8 試験溶液の pH	19
表 9 試験溶液の溶存酸素濃度	20
図 1 tert-ブチル=ヒドロペルオキシドの核磁気共鳴スペクトル（重クロロホルム）	20
図 2 被験物質の核磁気共鳴スペクトル（暴露開始前、 ¹ H NMR、重水）	21
図 3 被験物質の核磁気共鳴スペクトル（暴露終了後、 ¹ H NMR、重水）	21
図 4 検量線の一例.....	22

図 5 標準溶液 (104 mg/L) の GC クロマトグラム	22
図 6 試験溶液 (設定濃度 100 mg/L 試験溶液) の GC クロマトグラム	23
図 7 暴露開始時の対照区の GC クロマトグラム	23
図 8 暴露開始時の 100 mg/L 区の GC クロマトグラム	24
図 9 暴露 48 時間後 (換水前) の 100 mg/L 区の GC クロマトグラム	24
図 10 被験物質濃度と死亡率	25
図 11 各濃度区の暴露時間と死亡率	25

概 要

tert-ブチル=ヒドロペルオキシド (TBHP) のヒメダカに対する 96 時間急性毒性試験を[半止水式 (48 時間換水)、密閉系]で実施した。被験物質として 66.0%水溶液を用いた。本報告書では特に明記しない限り、被験物質濃度として TBHP としての濃度を示す。試験溶液の濃度分析の結果、設定濃度に対する変動が±20%未満であったため、設定濃度 25.0、35.0、50.0、70.0 および 100 mg/L を暴露期間中の被験物質濃度として半数致死濃度 (LC₅₀) を算出した。暴露 24、48、72 および 96 時間後の LC₅₀、0%死亡最高濃度および 100%死亡最低濃度を以下に示す (LC₅₀は作図法により算出したため、95%信頼限界は求められなかった)。

暴露時間	LC ₅₀ (mg/L)	0%死亡最高濃度 (mg/L)	100%死亡最低濃度 (mg/L)
24 時間	> 100*	35.0	> 100
48 時間	96	35.0	> 100
72 時間	94	35.0	> 100
96 時間	94	25.0	> 100

*最高濃度においても 50%以下の死亡率であったため、24 時間後の LC₅₀ は、> 100 mg/L と判定した。

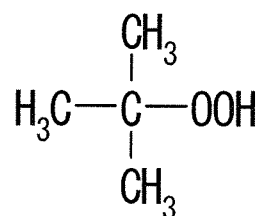
緒 言

tert-ブチル=ヒドロペルオキシドを含む試験溶液にヒメダカを 96 時間暴露し、半数致死濃度 (LC₅₀) を求めるため、厚生労働省医薬食品局長、経済産業省製造産業局長及び環境省総合環境政策局長通知「新規化学物質等に係る試験の方法について」(平成 15 年 11 月 21 日付け薬食発第 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 日付けに記載された魚類急性毒性試験に従って試験を実施した。

実験材料および方法

1. 被験物質

名 称 : *tert*-ブチル=ヒドロペルオキシド (TBHP)
 製 品 名 : *tert*-Butyl Hydroperoxide (70%水溶液)
 化 学 名 : *tert*-Butyl hydroperoxide (IUPAC) 構造式 :
 CAS No. : 75-91-2



分子式: $C_4H_{10}O_2$
分子量: 90.12
ロット番号: XXXXXXXXXX
NCAS 検索番号: STD-1149
純度: TBHP: 66.0% (XXXXXXXXXX の試験成績書による)、その他: 水
本報告書では、特に明記しない限り、被験物質濃度として tert-ブチル=ヒドロペルオキシドの濃度を示す。
外観: 透明液体
入手先: XXXXXXXXXX
入手量: 100 g
入手日: 2010 年 1 月 14 日
保存状態: ポリプロピレン製容器に入れ冷蔵保存
有効期限: 2013 年 1 月 14 日(当施設内基準; 購入後 3 年)
水溶解度: 水に可溶、 ≥ 10 g/100 mL at 22 °C (MSDS より)
ヘンリー定数: 1.60×10^{-5} atm·m³/mole

2. 被験物質の確認および安定性の確認

暴露開始前に被験物質の核磁気共鳴スペクトルを測定 (¹H NMR、重水) し、The Aldrich Library of ¹³C and ¹H FT NMR Spectra EDITION I に収載されたスペクトルとの比較により被験物質を確認した。

暴露終了後にも同様に被験物質の核磁気共鳴スペクトルを測定し、暴露開始前に測定したスペクトルと一致することを確認、保存時の安定性を確認した。

3. 試薬および機器

硬度測定キット: ドロップテスト WAD-TH (共立理化学研究所)

脱塩素水道水 (上水): 原水は小田原市水道水であり、活性炭処理し、残留塩素等を除去したものを継続的にエアポンプで暴気して使用した。この水の水質は、水産用水 3 級の基準に適合することを確認 (報告書番号 NCAS 09-064NG、試料採取日 2009 年 12 月 8 日) した。また、暴露前に全硬度を測定し、CaCO₃ 換算で 40~100 mg/L の範囲内であることを確認した。

イオン交換水: バーンステッド型蒸留水製造装置 (いすゞ製作所) で蒸留した水を超純水製造装置 トレピュア LV-08 (東レ) で精製した水

天秤: AG285 (メトラ)、BX3200H (島津製作所)

ドラフト: 卓上ドラフト (アズワン)

溶存酸素計: OM-51 (堀場製作所)

pH 計: F-23、D-51 (堀場製作所)

温度計: 標準温度計 (測定範囲 0-50°C、最少目盛 0.1°C、(株)安藤計器製工所)

残留塩素計: DCT-300 (タクミナ)

投込式恒温装置: NTT-1200 (東京理化学機器株式会社)

サーモレコーダー: SK-L200T (佐藤計量器製作所)

核磁気共鳴装置: JNM-ECA500 (日本電子株式会社)

遠心分離機: KN-70 (久保田製作所)

遠沈管および試験管：10 mL ガラス製共栓付試験管

ガスクロマトグラフ (GC)：Agilent Technologies

GC 装置； Agilent 6890GC

データ処理装置； Agilent Chem Station

4. 供試生物

一般名：メダカ〔試験にはヒメダカを用いた〕

学名：*Oryzias latipes*

入手先：北村養鯉場（2010 年 2 月 16 日に入手）

生年月：2009 年 9 月

全長および体重の平均：2.2 cm (2.0～2.3 cm)、0.082 g (0.05～0.11 g)：暴露開始時に無作為に選出した 10 尾の平均値および範囲

5. 順化

ヒメダカは 2010 年 2 月 16 日に入荷し、当日 6 時間のエルバージュおよび塩による薬浴を行った。蓄養後、以下の条件で 14 日間（2010 年 3 月 1 日～3 月 15 日）順化した。順化期間中の死亡率は 0.6%であった。

当施設における基準物質（硫酸銅（Ⅱ））によるヒメダカ急性毒性試験の 96 時間 LC₅₀ の背景データ：0.69 ～ 2.0 mg/L（2008 年 8 月～2009 年 5 月、n=4）である。

飼育水：脱塩素水道水

飼育容器：100 L ガラス製水槽

水温：22.0～23.1℃

溶存酸素濃度：95～99%

pH：7.4～7.9

照明：蛍光灯、16 時間明／8 時間暗

餌：メダカのえさ（テトラジャパン製）

給餌量：1 日 1 回魚体重の 1.2～1.5%相当の割合で毎日与えた。暴露開始約 28 時間前からは無給餌とした。

飼育方式：流水式

使用実験施設：A6 室

6. 急性毒性試験

6.1 試験条件

暴露方式：半止水式（48 時間換水）、密閉系

暴露期間：96 時間

試験容器：3 L ガラス製試薬びん

試験溶液量：約 3 L /試験容器

連数：1 試験容器/区

供試生物数：7 尾/区

試験用水：脱塩素水道水（残留塩素濃度は 0.01 mg/L 以下、全硬度は 65 mg/L (CaCO₃ 換算) であった)

エアレーション： 実施しなかった。
 試験温度： 22.8～22.9℃
 暴露期間中の恒温水槽内の水温；22.9～23.1℃
 pH： 7.5～8.1
 溶存酸素濃度： 飽和濃度の 84～95%
 照 明： 蛍光灯、16 時間明/8 時間暗
 給 餌： 暴露開始約 28 時間前から無給餌
 使用実験施設： A8 室

6.2 試験濃度および暴露方式の設定根拠

TBHP は揮発性を有すると考えられたため（ヘンリー一定数： $1.60 \times 10^{-5} \text{ atm} \cdot \text{m}^3/\text{mole}$ ）、密閉システムの半止水式で予備試験（試験計画書番号 NCAS 09-251NG）を行った結果、原体の試験上限濃度である設定濃度 100 mg/L において 2/7 の死亡が観察された。また、100 mg/L 区の実測濃度は、調製時および 24 時間後でそれぞれ設定濃度の 90%以上であり、密閉容器中での減少はほとんど認められなかった。

これらのことから、100 mg/L を最高濃度にして合計 5 濃度（100、70.0、50.0、35.0 および 25.0 mg/L）を設けた（公比 約 1.4）。尚、脱塩素水道水による対照区を設けた。

6.3 試験溶液の調製

暴露開始時および 48 時間に試験溶液を調製した。被験物質を秤量し、脱塩素水道水で洗いこみながらそれぞれ 5000 mL 容メスフラスコに入れ、脱塩素水道水で定容して各濃度の試験溶液を調製した。暴露開始時、24 時間後、48 時間後（換水時）、72 時間後および暴露終了時に試験溶液の状態（外観等）を記録した。

暴露開始時	被験物質質量 (mg) *	189.0	264.6	379.8	529.3	759.0
	試験溶液濃度 (mg/L)	24.9	34.9	50.1	69.9	100
暴露 48 時間	被験物質質量 (mg) *	189.4	265.0	378.6	530.3	757.9
	試験溶液濃度 (mg/L)	25.0	35.0	50.0	70.0	100

*66.0%水溶液としての量

6.4 試験溶液中の被験物質濃度の測定

6.4.1 GC 条件

検 出 器： FID
 カ ラ ム： Nukol 25327、30 m×0.53 mm i.d. 0.5 μm、SUPELCO
 カラム温度： 初期温度 40℃（保持時間 0.5 分）
 40℃ → 200℃（昇温速度 10℃/分）
 最終温度 200℃（保持時間 1.0 分）
 注 入 法： スプリットレス
 注入口温度： 240℃
 検出器温度： 250℃

キャリアガス： ヘリウム 5.0 mL/min (Constant Flow)
 検出器ガス： 水素 40 mL/min、空気 450 mL/min
 メークアップガス： ヘリウム 20 mL/min (メークアップ+カラム流量)
 注 入 量： 2.0 μ L

6.4.2 標準溶液の調製および検量線の作成

暴露開始時、48 および 96 時間に被験物質を秤量し、イオン交換水で洗いこみながら 100 mL 容メスフラスコに入れ、定容して標準溶液を調製した。この溶液をイオン交換水で希釈し、以下のように各濃度の標準溶液を調製した。

暴露期間	被験物質量 (mg) *	標準溶液濃度 (mg/L)			
暴露開始時	15.82	10.4	20.8	52.0	104
暴露 48 時間	15.42	10.2	20.4	51.0	102
暴露 96 時間	15.64	10.3	20.6	51.5	103

*66.0%水溶液としての量

これらの標準溶液 2.0 μ L を第 6.4.1 項に示した GC に 1 回注入して分析した。被験物質濃度を横軸に、ピーク面積を縦軸にとり、最小二乗法により検量線を作成した。検量線の作成には Microsoft® Excel 2003 を使用した。検量線作成に用いる標準溶液は用時調製とした。

6.4.3 試験溶液中の被験物質濃度の測定

測定は暴露開始時および暴露 48 時間後の換水前、暴露 48 時間の換水後および暴露終了時に行った。設定濃度 100 mg/L 区は、あらかじめ脱塩素水道水を 5.0 mL 入れた遠沈管に 5.0 mL を採取し、それ以外の濃度区の試験溶液は、試験容器から 10.0 mL を遠沈管にそれぞれ採取した。この溶液を遠心分離 (3000 rpm、10 分間) して、得られた上澄み液を 6.4.1 項に示した GC 条件で 1 回測定した。得られたピーク面積から検量線を用いて被験物質濃度を求めた。

6.5 試験溶液中の被験物質濃度の分析法確認

6.5.1 検量線の妥当性の確認

検量線の回帰式および相関係数の二乗 (r^2) を求めるとともに、回帰式より逆算して定量値を求め、真度を算出した。相関係数の二乗 (r^2) が 0.98 以上、真度の変動が $\pm 20\%$ 以内の場合、検量線が妥当であると判断した。

6.5.2 繰り返し精度の確認

抽出等の操作が行われていないため添加回収試験は行わずに、分析法の繰り返し精度の確認を実施した。暴露開始前に設定濃度 100 mg/L 区は、あらかじめ脱塩素水道水を 5.0 mL 入れた遠沈管に 5.0 mL の試験溶液を、設定濃度 25 mg/L 区は 10.0 mL の試験溶液をそれぞれ遠沈管に採取 ($n=3$) し、それぞれ 6.4.3 項と同様の操作を行い、被験物質濃度を算出した。得られた 3 連の被験物質濃度の変動係数が 10% 以内の場合、妥当な分析法と判断した。

6.6 試験操作

各試験容器に試験溶液を満水状態になるように入れ、試験溶液の水温、溶存酸素濃度および pH を測定後、各試験容器中に供試魚を 7 尾投入後、栓をして密封した（試験容器内にはほとんど気泡が残らない状態とした）。対照区（1 個の試験容器）は脱塩素水道水を入れて同様に密封した。水温、溶存酸素濃度および pH は、暴露開始時、換水前後、96 時間後に測定した。暴露期間中給餌は行わなかった。水温の変動を監視するために、試験容器を浸漬した水槽中の水温を暴露期間中サーモレコーダーで継続して測定した。

暴露開始直後、3、6、24、48（換水前後）、72 および 96 時間後に供試魚の観察を行い、死亡数および観察された異常等を記録した。死亡した個体は、水質の悪化を防ぐために発見時に取り除いた。試験溶液は 6.3 項に従って 48 時間後に調製し、生存個体を移した。

6.7 半数致死濃度（LC₅₀）の算出

各濃度区での暴露 48、72 および 96 時間後の死亡数と供試個体数（7 尾）から死亡率（%）を算出し、Probit 法（重みつき最小二乗法、Yukms ソフトウェア Statlight「#8 回帰分析」（Yukms Corp., 東京））により半数致死濃度（LC₅₀）および 95%信頼限界を算出した。暴露 24 時間後は、半数以上の死亡が認められなかったため、範囲を求めるにとどめた。

6.8 0%死亡最高濃度および 100%死亡最低濃度

24、48、72 および 96 時間後の死亡率が 0%である最高濃度および死亡率が 100%である最低濃度を求めた。

結 果

1. 被験物質の確認および安定性の確認

The Aldrich Library of¹³C and ¹H FT NMR Spectra, Edition I に収載されている tert-ブチル=ヒドロペルオキシドの核磁気共鳴スペクトルを図 1 に、暴露開始前に測定した被験物質の核磁気共鳴スペクトル（¹H NMR、重水）を図 2 に、暴露終了後に測定した被験物質の核磁気共鳴スペクトルを図 3 に示す。

収載されているスペクトルと測定したスペクトルが一致したことより（両者の溶媒が異なることからケミカルシフトが若干異なるが〔1.14 ppm が TBHP の・CH₃、4.67 ppm が水のシグナルである〕、構造上の問題はないと判断された）、被験物質が tert-ブチル=ヒドロペルオキシドであることを確認した。

暴露開始前に測定したスペクトルと暴露終了後に測定したスペクトルが一致したことから、保存中は安定であったと判断した。

2. 試験溶液中の被験物質濃度の分析法確認

2.1 検量線の妥当性の確認

被験物質の検量線の一例を図 4 に示す。分析法確認および暴露期間中の被験物質の濃度測定時において、検量線の相関係数の二乗は 0.98 以上であり、真度はいずれも 100±20%以内となったことから、検量線は妥当であると判断した。

2.2 繰り返し精度の確認

繰り返し精度の測定結果を表 1 に、標準溶液 (104 mg/L) および試験溶液 (設定濃度 100 mg/L) の代表的な GC クロマトグラムをそれぞれ図 5 および 6 に示す。繰り返し精度の確認において、設定濃度 24.9 mg/L 試験溶液中の被験物質濃度の平均は 25.6 mg/L、変動係数 1.04% であった。設定濃度 100 mg/L 試験溶液中の被験物質濃度の平均は 108 mg/L、変動係数 1.42% であった。いずれの試験溶液も得られた 3 連の被験物質濃度の変動係数が 10% 以内であった。

暴露開始時の対照区の GC クロマトグラムを図 7 に示す。対照区の GC クロマトグラムにおいて被験物質の検出位置に定量を妨害するようなピークは認められなかった。

これらの結果より、本分析法は試験溶液中の被験物質濃度を測定する方法として妥当であると判断した。

3. 試験溶液中の被験物質濃度

試験溶液中の被験物質濃度の測定結果を表 2 に、暴露開始時および暴露 48 時間後 (換水前) の設定濃度 100 mg/L 濃度区の GC クロマトグラムをそれぞれ図 8 および 9 に示す。

試験溶液中の被験物質濃度は、暴露開始時および 48 時間の換水後においては設定濃度の 95.2~114%、48 時間後の換水前および暴露終了時においては設定濃度の 91.2~104% であった。被験物質の測定濃度は、いずれも設定濃度に対する変動が ±20% 未満であった。暴露開始時と 48 時間後の設定濃度 (実際の秤量値を基にした濃度) は若干異なったが、その差はごくわずかであることから、100、70.0、50.0、35.0 および 25.0 mg/L を被験物質濃度とした。

4. 被験物質濃度と死亡率

各試験区の死亡数および死亡率を表 3 に示す。また、被験物質濃度と死亡率を図 10 に、各濃度区の暴露時間と死亡率を図 11 に示す。

対照区および 25.0 mg/L 区では、いずれの暴露時間においても死亡率は 0% であった。35.0 mg/L 区の死亡率は、暴露 72 時間で 0% であったが、暴露 96 時間後で 14% (1 例の死亡) であった。50.0 mg/L 区の死亡率は 6 時間後で 0% であったが、24 時間後に 14%、96 時間後に 29% (2 例の死亡) となった。70.0 mg/L 区の死亡率は、48 時間後で 0% であったが、72 時間後に 14% となった。100 mg/L 区の死亡率は、6 時間後で 0% であったが、24 時間後に 29%、48 時間後に 57% (4 例の死亡) となった。

5. LC₅₀、0% 死亡最高濃度および 100% 死亡最低濃度

LC₅₀ の算出結果を 0% 死亡最高濃度および 100% 死亡最低濃度とともに表 4 に示す。

暴露 48、72 および 96 時間後の半数致死濃度は、それぞれ 96、94 および 94 mg/L と算出された。95% 信頼限界は作図法により算出したため、求められなかった。暴露 24 時間後は、50% 以上の死亡が認められなかったため、> 100 mg/L とした。

6. 供試魚の観察結果

供試魚の観察結果を表 5 に示す。

対照区および 25.0 mg/L 区では、いずれの暴露時間においても異常は観察されなかった。35.0、50.0、70.0 および 100 mg/L 区において 4 項で示した死亡以外、特記すべき症状は観察されなかった。

7. 試験溶液の観察結果

試験溶液の観察結果を表 6 に示す。暴露期間中、濁りおよび沈殿は観察されず、色調は全ての濃度区において無色透明であった。

8. 試験溶液の水温、pH および溶存酸素濃度

試験溶液の水温、pH および溶存酸素濃度をそれぞれ表 7、表 8 および表 9 に示す。暴露期間中、試験溶液の水温は 22.8～22.9℃であり、pH は 7.5～8.1 であった。また、溶存酸素濃度は 84～95%であり、飽和濃度の 60%以上が維持された。

結 論

tert-ブチル=ヒドロペルオキシドのヒメダカに対する 96 時間急性毒性試験を[半止水式 (48 時間換水)、密閉系]で実施した。設定濃度 25.0、35.0、50.0、70.0 および 100.0 mg/L を暴露期間中の被験物質濃度として半数致死濃度 (LC₅₀) を算出した。暴露 24、48、72 および 96 時間後の LC₅₀、0%死亡最高濃度および 100%死亡最低濃度を以下に示す (LC₅₀ は作図法により算出したため、95%信頼限界は求められなかった)。

暴露時間	LC ₅₀ (mg/L)	0%死亡最高濃度 (mg/L)	100%死亡最低濃度 (mg/L)
24 時間	> 100*	35.0	> 100
48 時間	96	35.0	> 100
72 時間	94	35.0	> 100
96 時間	94	25.0	> 100

*最高濃度においても 50%以下の死亡率であったため、24 時間後の LC₅₀ は、> 100 mg/L と判定した。

表 1 繰り返し精度の測定結果

設定濃度 (mg/L)	測定濃度 (mg/L)			平均濃度 (mg/L)	変動係数 (%)
24.9	25.9	25.4	25.5	25.6	1.04
100	106	109	108	108	1.42

表 2 試験溶液中の被験物質濃度

設定濃度 (mg/L)		各暴露時間の被験物質濃度 (mg/L)			
0 時間	48 時間	0 時間	48 時間 (換水前)	48 時間 (換水後)	96 時間
対照区	対照区	検出されず	検出されず	検出されず	検出されず
24.9	25.0	24.6 (98.8)	23.3 (93.6)	23.8 (95.2)	22.8 (91.2)
34.9	35.0	37.4 (107)	32.5 (93.1)	36.3 (104)	34.6 (98.9)
50.1	50.0	57.2 (114)	51.6 (103)	53.2 (106)	49.8 (99.6)
69.9	70.0	74.2 (106)	72.8 (104)	73.8 (105)	68.7 (98.1)
100	100	108 (108)	100 (100)	103 (103)	94.4 (94.4)

() 内は設定濃度に対する割合 (%)

表 3 死亡数および死亡率

被験物質濃度 (mg/L)	累積死亡数 (死亡率 (%))					
	3時間	6時間	24時間	48時間	72時間	96時間
対照区	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
25.0	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
35.0	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (14)
50.0	0 (0)	0 (0)	1 (14)	1 (14)	1 (14)	2 (29)
70.0	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (14)	1 (14)
100	0 (0)	0 (0)	2 (29)	4 (57)	4 (57)	4 (57)

表 4 LC₅₀、0%死亡最高濃度および 100%死亡最低濃度
(LC₅₀ は作図法により算出したため、95%信頼限界は求められなかった)

暴露時間	LC ₅₀ (mg/L)	0%死亡最高濃度 (mg/L)	100%死亡最低濃度 (mg/L)
24 時間	> 100*	35.0	> 100
48 時間	96	35.0	> 100
72 時間	94	35.0	> 100
96 時間	94	25.0	> 100

*最高設定濃度においても 50%以下の死亡率であったため、24 時間後の LC₅₀ は、> 100 mg/L と判定した。

表 5 供試魚の観察結果

被験物質濃度 (mg/L)	各暴露時間における観察結果*							
	0時間	3時間	6時間	24時間	48時間 (換水前)	48時間 (換水後)	72時間	96時間
対照区	N-7	N-7	N-7	N-7	N-7	N-7	N-7	N-7
25.0	N-7	N-7	N-7	N-7	N-7	N-7	N-7	N-7
35.0	N-7	N-7	N-7	N-7	N-7	N-7	N-7	N-6 D-1
50.0	N-7	N-7	N-7	N-6 D-1	N-6	N-6	N-6	N-5 D-1
70.0	N-7	N-7	N-7	N-7	N-7	N-7	N-6 D-1	N-6
100	N-7	N-7	N-7	N-5 D-2	N-3 D-2	N-3	N-3	N-3

* N : 異常無し、D : 死亡

表 6 試験溶液の観察結果

被験物質濃度 (mg/L)	各暴露時間における観察結果					
	0時間	24時間	48時間 (換水前)	48時間 (換水後)	72時間	96時間
対照区	無色透明	無色透明	無色透明	無色透明	無色透明	無色透明
25.0	無色透明	無色透明	無色透明	無色透明	無色透明	無色透明
35.0	無色透明	無色透明	無色透明	無色透明	無色透明	無色透明
50.0	無色透明	無色透明	無色透明	無色透明	無色透明	無色透明
70.0	無色透明	無色透明	無色透明	無色透明	無色透明	無色透明
100	無色透明	無色透明	無色透明	無色透明	無色透明	無色透明

表 7 試験溶液の水温

被験物質濃度 (mg/L)	各暴露時間における水温 (°C)			
	0時間	48時間 (換水前)	48時間 (換水後)	96時間
対照区	22.9	22.9	22.9	22.8
25.0	22.9	22.9	22.8	22.8
35.0	22.9	22.9	22.8	22.8
50.0	22.9	22.9	22.8	22.8
70.0	22.9	22.9	22.8	22.8
100	22.9	22.9	22.8	22.8

表 8 試験溶液の pH

被験物質濃度 (mg/L)	各暴露時間におけるpH			
	0時間	48時間 (換水前)	48時間 (換水後)	96時間
対照区	7.9	7.6	8.0	7.5
25.0	8.1	7.5	8.0	7.5
35.0	8.0	7.6	8.0	7.5
50.0	8.0	7.7	8.0	7.6
70.0	8.0	7.6	8.0	7.6
100	7.9	7.6	8.0	7.7

表 9 試験溶液の溶存酸素濃度

被験物質濃度 (mg/L)	各暴露時間における溶存酸素濃度 (%)			
	0時間	48時間 (換水前)	48時間 (換水後)	96時間
対照区	90 (7.6)	86 (7.2)	92 (7.7)	84 (7.0)
25.0	92 (7.7)	85 (7.1)	94 (7.9)	86 (7.2)
35.0	89 (7.5)	85 (7.1)	94 (7.9)	85 (7.1)
50.0	89 (7.5)	86 (7.2)	95 (8.0)	84 (7.0)
70.0	89 (7.5)	87 (7.3)	95 (8.0)	84 (7.0)
100	89 (7.5)	87 (7.3)	94 (7.9)	86 (7.2)

() 内は、mg/L を示す。

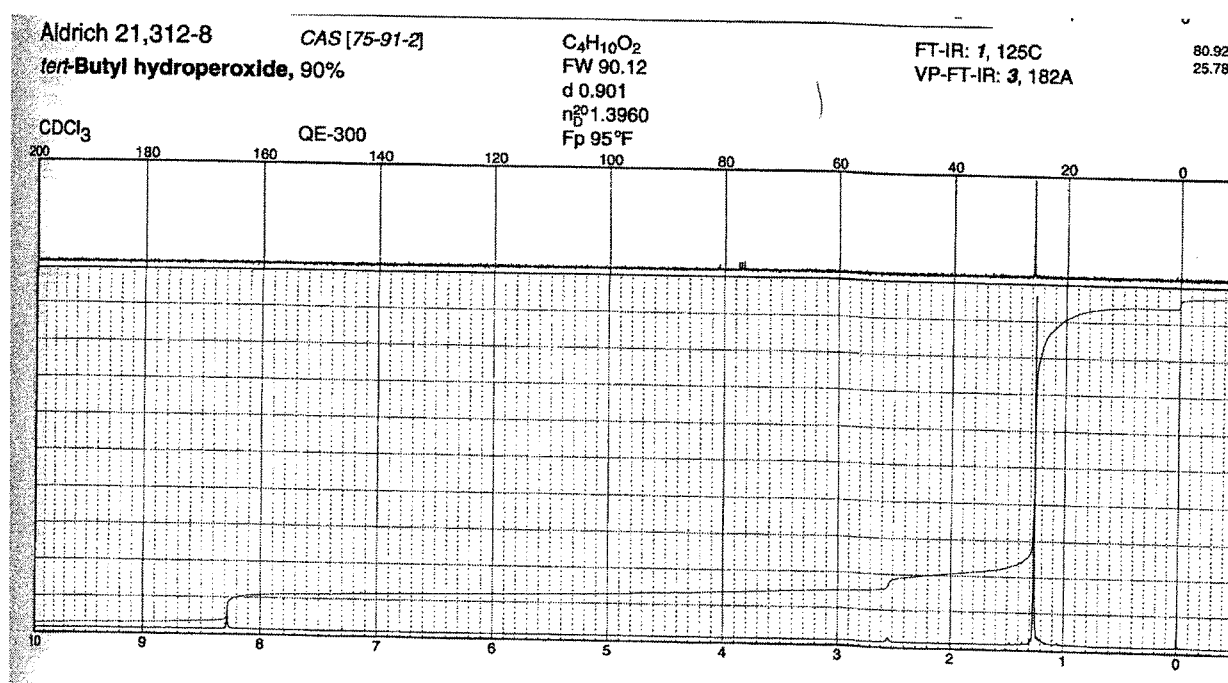
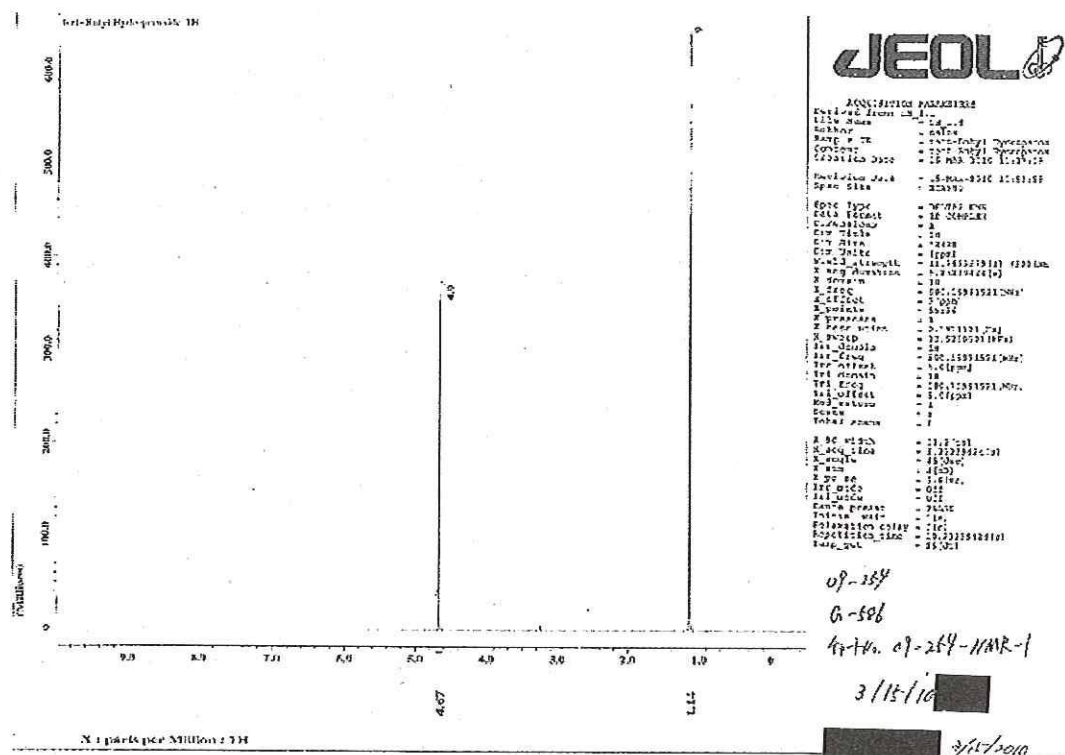
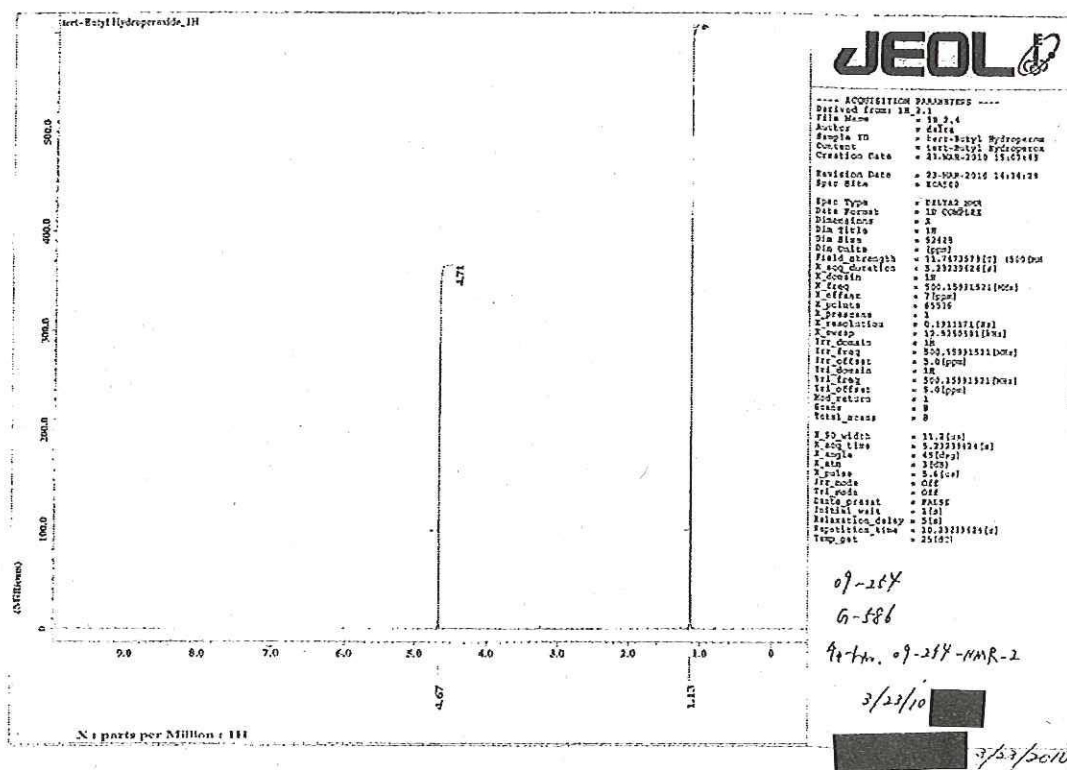


図 1 *tert*-ブチル=ヒドロペルオキシドの核磁気共鳴スペクトル (重クロロホルム)
(The Aldrich Library of ^{13}C and 1H FT NMR Spectra EDITION I より抜粋)

図2 被験物質の核磁気共鳴スペクトル (暴露開始前、 ^1H NMR、重水)図3 被験物質の核磁気共鳴スペクトル (暴露終了後、 ^1H NMR、重水)

tert-ブチルヒドロペルオキシドの検量線

濃度 (mg/L)	ピーク面 積	定量値 (mg/L)	真度 (%)
104	849	104	100
52.0	325	52.1	100
20.8	93.8	20.6	99.0
10.4	34.0	10.6	102

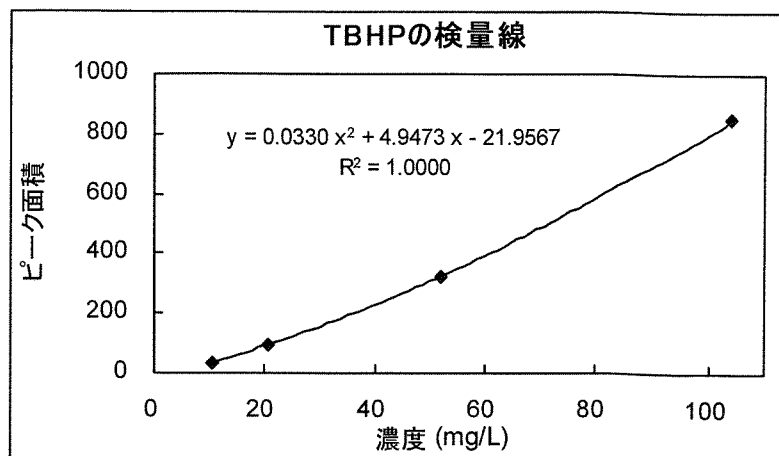
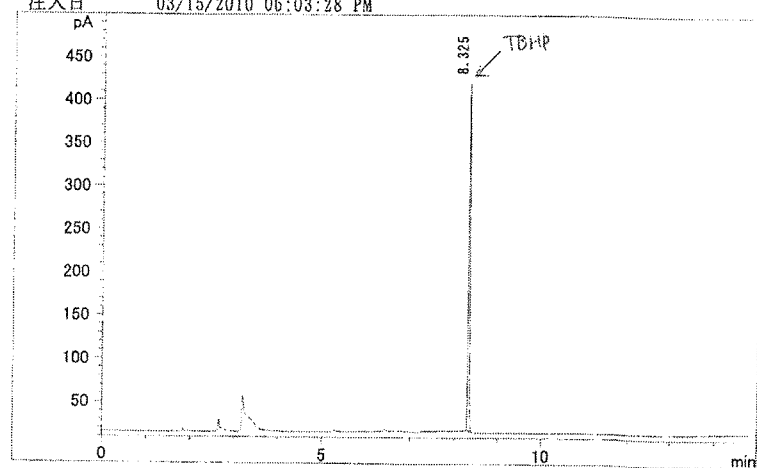


図 4 検量線の一例

サンプル名: STD-100
 分析メソッド: TBHP.M
 データファイル: C:\YHPCHEM\Y1\DATA\Y09-254\Y03150001.D
 注入日: 03/15/2010 06:03:28 PM



<積分結果>

#	Time (min.)	面積 (pA*s)	面積 %
1	8.33	848.91699	100.0 ← TBHP
2	0.00	0.00000	0.0

図 5 標準溶液 (104 mg/L) の GC クロマトグラム

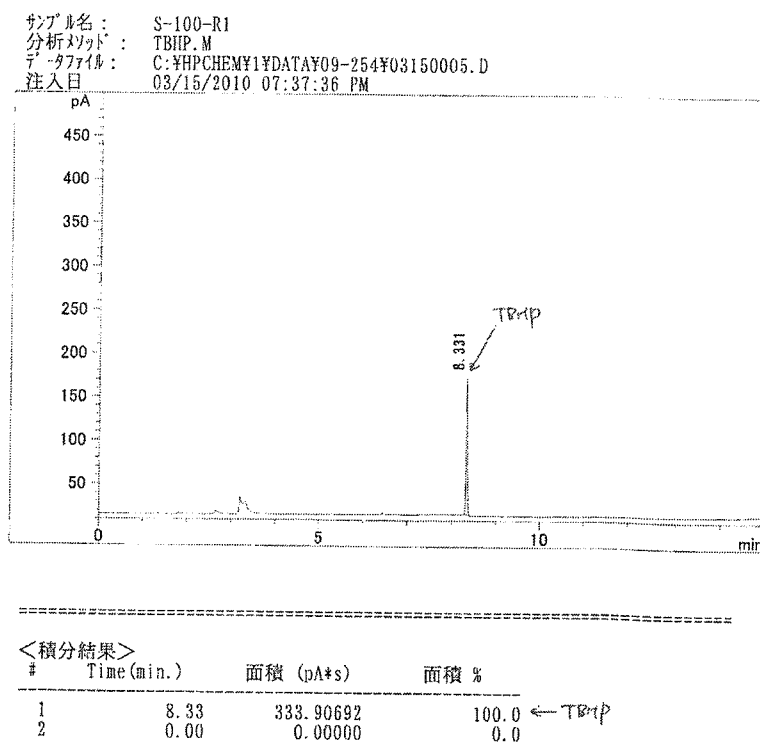


図 6 試験溶液（設定濃度 100 mg/L 試験溶液）の GC クロマトグラム

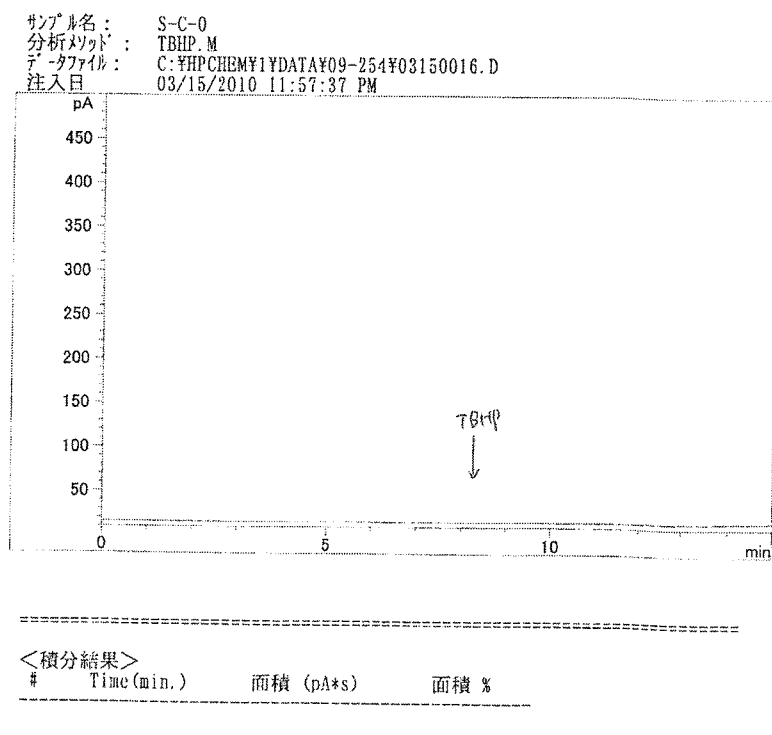
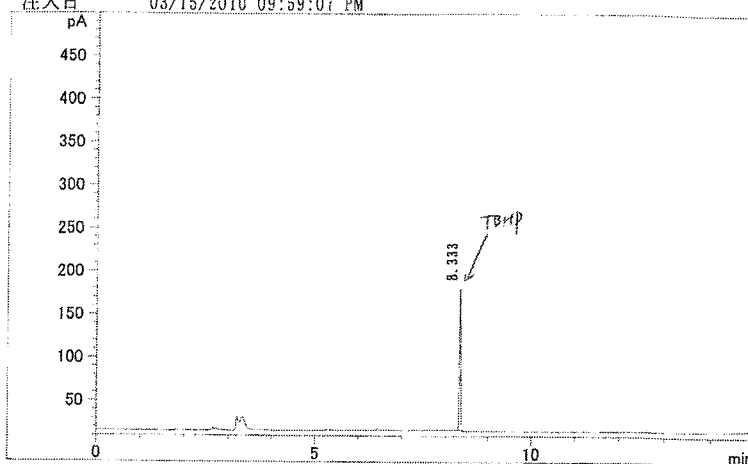


図 7 暴露開始時の対照区の GC クロマトグラム

サンプル名: S-100-0
 分析メソッド: TBHP.M
 データファイル: C:\YHPCHEM\1\DATA\09-254\03150011.D
 注入日: 03/15/2010 09:59:07 PM

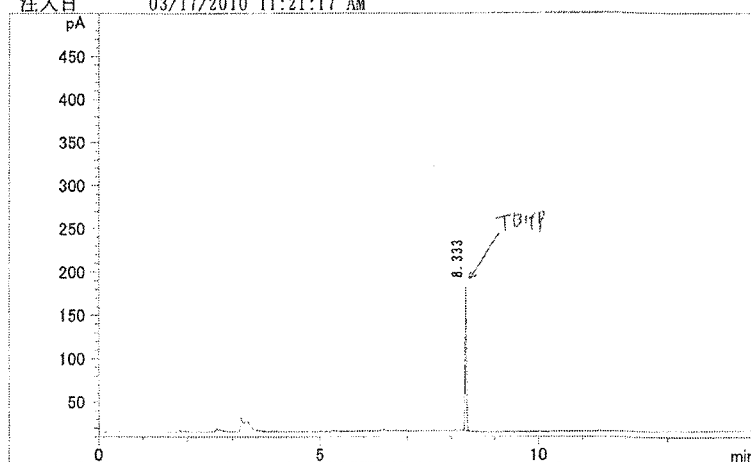


<積分結果>

#	Time (min.)	面積 (pA*s)	面積 %
1	8.33	342.32510	100.0 ← TBHP
2	0.00	0.00000	0.0

図 8 暴露開始時の 100 mg/L 区の GC クロマトグラム

サンプル名: S-100-48
 分析メソッド: TBHP.M
 データファイル: C:\YHPCHEM\1\DATA\09-254\03170005.D
 注入日: 03/17/2010 11:21:17 AM



<積分結果>

#	Time (min.)	面積 (pA*s)	面積 %
1	8.33	351.03479	100.0 ← TBHP
2	0.00	0.00000	0.0

図 9 暴露 48 時間後 (換水前) の 100 mg/L 区の GC クロマトグラム

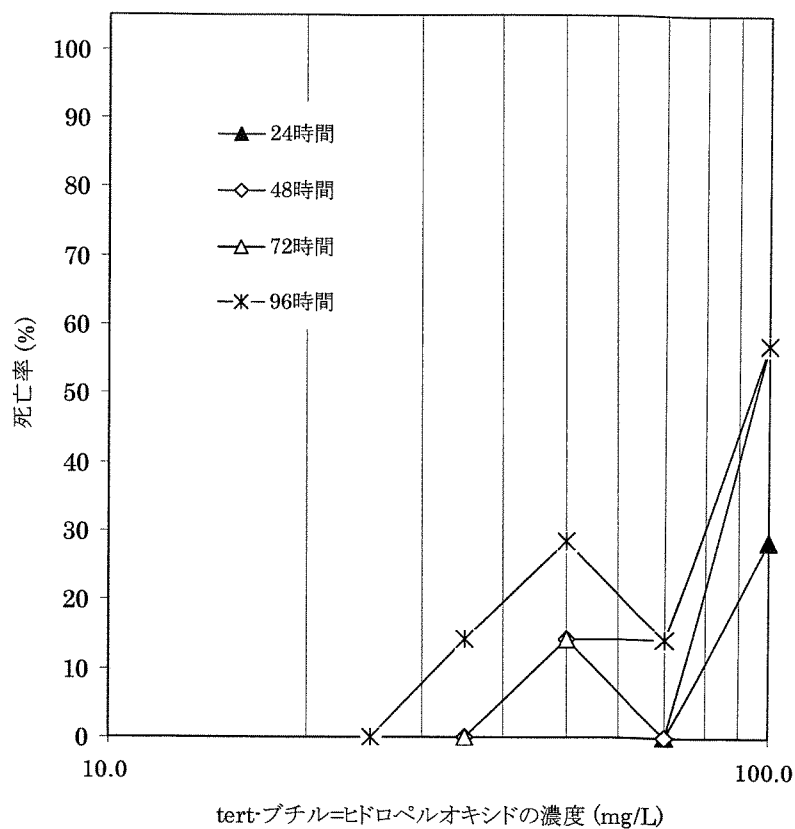


図 10 被験物質濃度と死亡率

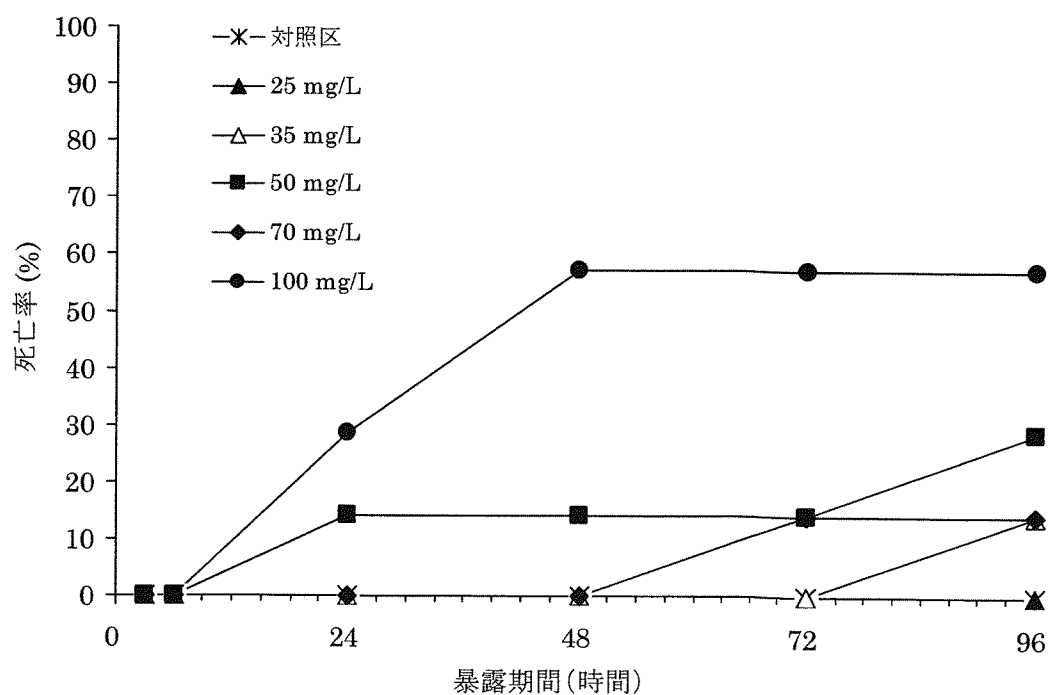


図 11 各濃度区の暴露時間と死亡率