

最終報告書

試験名

tert-ブチル=ヒドロペルオキシドのオオミジンコに対する急性遊泳阻害試験

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 09-253

GLP 適合陳述書

試験番号： NCAS 09-253

試験名： tert-ブチル=ヒドロペルオキシドのオオミジンコに対する急性遊泳阻害試験

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

[Redacted Stamp]
(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 09-253

試験名： tert-ブチル=ヒドロペルオキシドのオオミジンコに対する急性遊泳阻害試験

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			
・ ミジンコの入手、飼育と継代	3/17/2010	3/18/2010	3/18/2010
・ 試験溶液の調製	3/16, 17/2010	3/18/2010	3/18/2010
・ 試験溶液への暴露	3/16, 17/2010	3/18/2010	3/18/2010
・ ミジンコの観察 (24 時間後)	3/17/2010	3/18/2010	3/18/2010
・ ミジンコの観察 (48 時間後)	3/18/2010	3/18/2010	3/18/2010
・ 分析試料の採取および処理	3/16, 17/2010	3/18/2010	3/18/2010
・ 濃度分析	3/16, 17/2010	3/18/2010	3/18/2010
生データ	3/24-26/2010	3/26/2010	3/26/2010
報告書草案	3/24-26/2010	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 09-253
 試験名 : tert-ブチル=ヒドロペルオキシドのオオミジンコに対する急性遊泳阻害試験
 報告書番号 : NCAS 09-253

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 0465-42-5268 FAX 0465-42-3586

試験責任者 : XXXXXXXXXX
 試験従事者 : XXXXXXXXXX (試験溶液調製、暴露、観察、水質測定)
 XXXXXXXXXX (被験物質の濃度分析)
 XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX (生物の維持管理)

試験開始日 : 2010 年 3 月 15 日
 実験開始日 : 2010 年 3 月 16 日
 暴露期間 : 2010 年 3 月 16 日～2010 年 3 月 18 日
 実験終了日 : 2010 年 3 月 18 日
 試験終了日 : 2010 年 3 月 29 日

適用試験ガイドライン :

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 日付に記載されたミジンコ急性遊泳阻害試験

試験資料保管 : 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 : 無し

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
概 要	7
緒 言	7
実験材料および方法	7
1. 被験物質	7
2. 被験物質の確認	8
3. 被験物質の安定性の確認	8
4. 被験物質の溶解性の確認	8
5. 試薬および機器	8
6. 供試生物	9
7. 急性遊泳阻害試験	10
結 果	13
1. 被験物質の確認	13
2. 被験物質の安定性の確認	13
3. 試験溶液中の被験物質濃度の分析法確認試験	13
4. 試験溶液中の被験物質濃度	13
5. 遊泳阻害率	14
6. EC ₅₀ および 95%信頼限界	14
7. 試験溶液の観察結果	14
8. 試験溶液の水温、pH および溶存酸素濃度	14
9. 試験の成立条件	14
結 論	15
表および図	16
表 1 繰り返し精度の確認	16
表 2 試験溶液中の被験物質濃度	16
表 3 遊泳阻害数および遊泳阻害率	17
表 4 EC ₅₀ および 95%信頼限界	17
表 5 試験溶液の観察結果	17
表 6 試験溶液の水温、pH および溶存酸素濃度	18
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）	18
図 2 被験物質の核磁気共鳴スペクトル（暴露開始前、重水、試験番号 NCAS 09-254）	19
図 3 被験物質の核磁気共鳴スペクトル（暴露終了後、重水、試験番号 NCAS 09-254）	19
図 4 検量線の一例	20
図 5 標準溶液の GC クロマトグラム（52.0 mg/L、暴露開始時）	20
図 6 繰り返し精度の確認（設定濃度 50.6 mg/L）における GC クロマトグラムの一例	21
図 7 暴露開始時の対照区の GC クロマトグラム	21
図 8 暴露開始時の 50.6 mg/L 区の GC クロマトグラム	22

目 次（続き）

図 9 暴露終了時の 50.6 mg/L 区の GC クロマトグラム	22
図 10 被験物質濃度と遊泳阻害率	23

概 要

tert-ブチル=ヒドロペルオキシド（略名：TBHP）のオオミジンコに対する 48 時間暴露における急性遊泳阻害試験（止水式、密閉系）を実施した。被験物質には 70%水溶液（TBHP 純度：66.0%）を供試し、濃度は特に明記しない限り TBHP としての数値を表記した。設定濃度 10.0、15.0、22.5、33.8 および 50.6 mg/L の試験溶液中の被験物質濃度は、暴露開始時において設定濃度の 92.0～105%、暴露終了時において設定濃度の 92.0～95.3%であった。設定濃度に対する変動が±20%未満であったため、設定濃度を暴露期間中の被験物質濃度として半数遊泳阻害濃度（EC₅₀）を算出した。

暴露 24 および 48 時間の EC₅₀ およびその 95%信頼限界を以下に示す。

暴露時間	EC ₅₀ (mg/L)	95%信頼限界 (mg/L)
24 時間	17*	15～20
48 時間	14**	作図法のため算出せず

* : Probit 法

** : 作図法

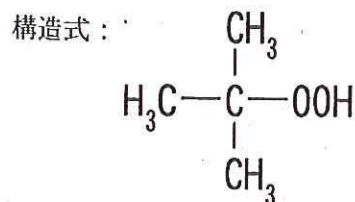
緒 言

tert-ブチル=ヒドロペルオキシドを含む試験溶液にオオミジンコを 48 時間暴露し、半数遊泳阻害濃度（EC₅₀）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 日付に記載されたミジンコ急性遊泳阻害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
 製 品 名： tert-Butyl Hydroperoxide (70%水溶液)
 化 学 名： tert-Butyl hydroperoxide (IUPAC)
 CAS No.： 75-91-2
 分 子 式： C₄H₁₀O₂
 分 子 量： 90.12
 ロット番号： XXXXXXXXXX
 NCAS 検索番号： STD-1149
 純 度： 66.0% (XXXXXXXXXX の試験成績書による)



その他 水 () からの情報

外 観 : 透明液体

入 手 先 :

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 ; 有機試薬は購入後 3 年)

水溶解度 : 水に可溶 (MSDS より)

ヘンリー定数 : $1.60 \times 10^{-5} \text{ atm m}^3/\text{mole}$ (HENRYWIN v3.20)

危険有害性の要約 : 有機過酸化物。皮膚刺激。重篤な薬傷・眼の損傷。使用に際して保護手袋およびマスクを使用すること (MSDS より)。秤量は卓上ドラフトを備えた天秤を用いる等、局所排気機能のある場所で行うこと。

2. 被験物質の確認

暴露開始前に核磁気共鳴スペクトル (^1H NMR、重水) を測定し、The Aldrich Library of ^{13}C and ^1H FT NMR Spectra EDITION I に収載されているスペクトル (重クロロホルム) との比較により被験物質を確認した。

この被験物質の確認は、同じ被験物質を使用した試験番号 NCAS 09-254 「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」 で実施した結果により代用した。

3. 被験物質の安定性の確認

暴露終了後に被験物質の核磁気共鳴スペクトル (^1H NMR、重水) 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し、保存時の安定性を確認した。

この被験物質の安定性の確認は、同じ被験物質を使用した試験番号 NCAS 09-254 「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」 で実施した結果により代用した。

4. 被験物質の溶解性の確認

被験物質は 70% 水溶液であるため、溶解性の確認は行なわなかった。

5. 試薬および機器

脱塩素水道水 (上水) : 小田原市水道水を活性炭処理し、残留塩素等を除去したものを試験前に継続的にエアープンプで十分に暴気して使用した。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した (試験番号 NCAS 09-064NG、(財) 千葉県薬剤師会検査センター分析試験結果書、検体番号 D9C-8079、試料採取日 2009 年 12 月 8 日)。また、実験前に全硬度を測定し、 CaCO_3 換算で 60 ~ 65 mg/L であり、残留塩素濃度は < 0.01 mg/L 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 WDA-15S (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

硬度測定キット : ドロップテスト WAD-TH (共立理化学研究所)

天 秤 : AG285、AE240 (メトラ)

ドラフト : 卓上ドラフト (アズワン)

投込式恒温装置： BF200（ヤマト科学）、NTT-1200（東京理化工機（株））
クールエース： LTC-450、LTC-450N（アズワン）
サーモレコーダー： SK-L200T（佐藤計量器製作所）
溶存酸素計： OM-51（堀場製作所）
pH 計： 720A（サーモフィッシャーサイエンティフィック）、D-51（堀場製作所）
照 度 計： LX-1330D（カスタム）
温 度 計： 標準温度計（測定範囲 0-50℃、最少目盛 0.1℃、安藤計器製工所）
残留塩素計： デジタル残留塩素テスターDCT-200、DCT-300（タクミナ）
実体顕微鏡： SZX16（オリンパス）
遠心分離機： KN-70（久保田製作所）
マイクロピペット： eppendorf Research V（エッペンドルフ）
遠沈管： 10 mL 共栓付ガラス製試験管
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

6. 供試生物

6.1 供試生物

一 般 名： オオミジンコ
学 名： *Daphnia magna*
入 手 先： 国立環境研究所（茨城県つくば市小野川 16-2、2008 年 6 月 20 日入手）
成長段階： 17～18 日齢の親から産まれた幼体（24 時間齢未満）
感 受 性： 当施設における基準物質（重クロム酸カリウム；試薬特級、和光純薬工業）による 48 時間 EC₅₀ 背景データ；0.21～0.24 mg/L（n=3、2008 年 7 月～2009 年 9 月）

6.2 供試生物を得るための親ミジンコの飼育条件

継代中のミジンコについて、駒込ピペットを用いて成体のみとし、翌日までに産まれた幼体を別の容器に分けた。この幼体（2010 年 2 月 26 日生まれ）を供試生物の親とし飼育した。幼体の産出開始後は 1 週間に 2 回以上の割合で幼体を間引きした。暴露前日に抱卵した成体のみとし、その後産まれた幼体（24 時間齢未満）を試験に用いた（2010 年 3 月 16 日、暴露開始）。この飼育期間中、親ミジンコの死亡率は 0%で、休眠卵もしくは雄の発生等の異常は認められなかった。なお、暴露開始 2 日前に死亡幼体が数頭認められたが、翌日および暴露当日に産まれた幼体は全て正常であった。よって、その死亡は偶発と判断し、この親ミジンコから産まれた幼体を供試することに問題は無いと判断した。

飼 育 水： 脱塩素水道水
飼育密度： 20 頭（飼育開始時投入）／1 L 飼育水
飼育容器： 1 L ガラス製容器
水 温： 19.8～19.9℃
pH： 7.4～8.1
全硬度： 60～65 mg/L（CaCO₃ 換算）

溶存酸素濃度： 7.4～8.8 mg/L（飽和濃度の 83%以上）
照 明： 蛍光灯（650～810 Lux）、16 時間明／8 時間暗
餌： 単細胞緑藻類（*Chlorella vulgaris*、生クロレラ V12、クロレラ工業）
給 餌 量： ミジンコ 1 頭当たり 0.1～0.2 mg-C（有機炭素量相当）／日の割合で与えた。幼体産出前は、摂食可能な適当量を与えた。
飼育水の交換： 週 1 回以上
使用実験施設： B6 室

7. 急性遊泳阻害試験

7.1 試験条件

暴露方式： 止水式（密閉システム）
暴露期間： 48 時間
試験容器： 100 mL 容ガラス製ふらん瓶
試験溶体量： 1 容器につき 100 mL 以上
連 数： 4 容器／濃度区
供試生物数： 20 頭／濃度区（1 容器につき 5 頭で 1 濃度区 20 頭）
試験用水： 脱塩素水道水
試験温度： 19.6～20.1℃（試験溶液温度：投込式恒温装置を設置した恒温水槽に浸漬）
20.1～20.4℃（暴露期間中の恒温水槽内の水温）
pH： 7.7～7.9
溶存酸素濃度： 7.2～8.8 mg/L（飽和濃度に対して 82%以上）
照 明： 蛍光灯（520～900 Lux）、16 時間明／8 時間暗
給 餌： 無給餌
使用実験施設： B2 室

7.2 試験濃度および暴露方式の設定根拠

被験物質は揮発性を有していると考えられたため（ヘンリー一定数： $1.60 \times 10^{-5} \text{ atm m}^3/\text{mole}$ ）、密閉系にて予備試験（試験計画書番号 NCAS 09-251NG）を行った結果、設定濃度 10.0、40.0 および 80.0 mg/L でそれぞれ 0、100 および 100%の遊泳阻害が認められた。また、100 mg/L 溶液の安定性（光分解、揮発性の有無）を検討した結果、調製時および 24 時間後の実測濃度は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、設定濃度 10.0、15.0、22.5、33.8 および 50.6 mg/L の 5 濃度（公比 1.5）で試験を実施した。また暴露方式は、①臭気があること、②同じ被験物質を使用した藻類予備試験では揮散が懸念されたことから、密閉系に統一した。

7.3 試験溶液の調製

被験物質 306.7 mg (tert-ブチル=ヒドロペルオキシドとして 202.4 mg [純度 66.0%で補正]) を秤量後、200 mL 容メスフラスコに移し、脱塩素水道水で溶解、定容し 1012 mg/L の試験原液を調製した。この溶液の 9.88、14.8、22.2、33.4 および 50.0 mL をそれぞれ 1000 mL 容メスフラスコに分取し、脱塩素水道水で定容して 10.0、15.0、22.5、33.8 および 50.6 mg/L の試験溶液を調製した。

調製した各試験溶液をそれぞれ 4 個の試験容器に各 100 mL 以上入れた（栓をしたときに

気泡が入らない量)。対照区として、4 個の試験容器に各 100 mL 以上の脱塩素水道水を入れて使用した。

7.4 試験溶液中の被験物質濃度の測定

7.4.1 GC 条件

カラム： Nukol 25327 (F.T. 0.5 μm)、0.53 mm I.D. \times 30 m (SUPELCO)
 カラム温度： 初期温度 40 $^{\circ}\text{C}$ (0.5 分間保持)
 40 $^{\circ}\text{C}$ –200 $^{\circ}\text{C}$ (昇温速度；10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$)
 最終温度 200 $^{\circ}\text{C}$ (1 分間保持)
 注入口温度： 240 $^{\circ}\text{C}$
 検出器： FID
 検出器温度： 250 $^{\circ}\text{C}$
 注入量： 2.0 μL
 注入方法： スプリットレス
 キャリアーガス： ヘリウム 5.0 mL/min (コンスタントフロー)
 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)

7.4.2 標準溶液の調製および検量線の作成

下表の通り、暴露開始時および終了時に標準溶液を調製した。被験物質を秤量後、100 mL 容メスフラスコに入れ、イオン交換水で溶解、定容して約 100 mg/L (tert-ブチル=ヒドロペルオキシドとしての濃度、純度 66.0%で補正) の標準原液を調製した。この原液をイオン交換水で希釈し、各濃度の標準溶液を調製した。

	被験物質質量 (mg)	標準溶液濃度* (mg/L)			
暴露開始時	15.7	5.20	10.4	20.8	52.0
暴露終了時	15.4	5.10	10.2	20.4	51.0

*純度 66.0%で補正した値

調製した標準溶液の 2.0 μL を 7.4.1 項の条件の 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。回帰式は二次曲線を採用した。

7.4.3 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終了時に行った。暴露開始時の測定は、各試験溶液を調製した残りからそれぞれ 10.0 mL を遠沈管に採取し、試料溶液とした。暴露終了時の測定は、各濃度区 4 連の試験溶液の各 2.5 mL を容器の中層より遠沈管に採取後、混合して 10.0 mL として試料溶液とした。

これらの試料溶液を遠心分離 (3000 rpm、10 分間) したのち、得られた上澄み液を第 7.4.1 項に示した GC 条件で分析した。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。なお、測定濃度が検量線範囲の上限を超える 50.6 mg/L の試験溶液は、遠心分離した上澄み液を更に脱塩素水道水で 2 倍希釈して分析した。

暴露開始時および暴露終了時の被験物質濃度について、設定濃度に対する変動が±20%未満であったため、設定濃度を暴露期間中の被験物質濃度とした。

対照区についても同様の操作を行い、GC クロマトグラムの被験物質の検出位置に、定量を妨害するようなピークがないことを確認した。

7.5 試験溶液中の被験物質濃度の分析法確認試験

7.5.1 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±20%以内の場合、検量線が妥当であると判断した。

7.5.2 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 10.0 mg/L 区および 50.6 mg/L 区の試験溶液の残りから 10.0 mL を遠沈管に採取 ($n=3$) し、それぞれ第 7.4.3 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。

7.6 試験操作

試験容器に試験溶液を入れた後、直ちに供試ミジンコを投入し、その時点を暴露開始時とした。ミジンコ投入後、すべてのミジンコが容器の口の部分にいないことを確認した後に栓をした。栓をした後、試験溶液がカラーの部分に残っていること、容器内に気泡がないことを確認した。

暴露開始 24 および 48 時間後にミジンコの遊泳阻害の有無、行動や外見の異常の有無を観察した。試験容器を穏やかに動かした後、15 秒間全く水中を遊泳しない場合を遊泳阻害と判定した。

暴露開始時、24 時間後および 48 時間後に試験溶液の状態（外観等）を記録した。

暴露開始時および終了時に、水温、溶存酸素濃度および pH を測定した。暴露開始時の測定は、4 連の試験溶液の他に 1 容器を別途調製し測定した。終了時の測定は、各試験区と対照区のそれぞれ 1 試験容器について行った。水温の変動を監視するために、試験容器を浸漬した恒温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。

7.7 半数遊泳阻害濃度 (EC_{50}) の算出

各濃度区でのミジンコの遊泳阻害数と供試個体数から遊泳阻害率 (%) を算出し、Yukms ソフトウェア Statlight「#8 回帰分析」(Yukms Corp., 東京) の Probit 法（重みつき最小二乗法）により EC_{50} および 95% 信頼限界を算出した。Probit 法による算出が出来ない場合は、作図法により EC_{50} を算出した。尚、 EC_{50} および 95% 信頼限界値の有効数字の桁数は 2 桁とした。また算出には Microsoft® Excel 2003 を使用した。

結 果

1. 被験物質の確認

The Aldrich Library of ^{13}C 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（重クロロホルム）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、試験番号 NCAS 09-254 にて実施）を図 2 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 $-\text{CH}_3$ 、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。

2. 被験物質の安定性の確認

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（ ^1H NMR、重水、試験番号 NCAS 09-254 にて実施）を図 3 に示す。

暴露開始前および暴露終了後で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。

3. 試験溶液中の被験物質濃度の分析法確認試験

3.1 検量線の直線性の確認

被験物質の検量線の一例を図 4 に、標準溶液の GC クロマトグラムの一例（52.0 mg/L、暴露開始時）を図 5 に示す。

検量線の相関係数の二乗は 0.9999（暴露開始時および暴露終了時）であり、真度の変動はいずれも $\pm 20\%$ 以内であった。これより検量線は妥当と判断した。

3.2 繰り返し精度の確認

繰り返し精度の確認結果を表 1 に示す。また、繰り返し精度の確認（設定濃度 50.6 mg/L 溶液）における代表的な GC クロマトグラムを図 6 に示す。また、暴露開始時の対照区の GC クロマトグラムを図 7 に示す。

得られた 3 連の被験物質濃度の変動係数はいずれも 10% 以内であった。また、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。

4. 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、暴露開始時および終了時における 50.6 mg/L 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、暴露開始時が設定濃度の 92.0～105%、暴露終了時は設定濃度の 92.0～95.3% であった。暴露期間中、密閉容器内での被験物質濃度の低下は小さかった。

5. 遊泳阻害率

各試験区の遊泳阻害数および遊泳阻害率を表 3 に、被験物質濃度と遊泳阻害率を図 10 に示す。

10.0、15.0、22.5、33.8 および 50.6 mg/L の順に、暴露 24 時間後の遊泳阻害率は 0、50、65、100 および 100%であった。暴露 48 時間後の遊泳阻害率は、0、80、100、100 および 100%であった。

対照区において、暴露 24 時間後に遊泳阻害が 1 頭認められた。肉眼観察により遊泳阻害と判定したが、脱皮殻との見誤りでないことを確認するため顕微鏡観察を行なった。その結果、脱皮途中での死亡であったことが推定された。その他 19 頭において、暴露期間中に異常は認められなかった。

6. EC₅₀ および 95%信頼限界

EC₅₀ およびその 95%信頼限界を表 4 に示す。

暴露 24 時間の EC₅₀ は、Probit 法（重みつき最小二乗法）により 17 mg/L と算出された。95%信頼限界は 15~20 mg/L であった。

暴露 48 時間の EC₅₀ は、作図法により 14 mg/L と算出された。95%信頼限界は算出しなかった。

7. 試験溶液の観察結果

試験溶液の観察結果を表 5 に示す。

暴露期間中の試験溶液は、対照区も含めすべ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表 6 に示す。

暴露期間中、試験溶液の水温は 19.6~20.1℃、pH は 7.7~7.9 であった。溶存酸素濃度は、暴露開始時は 8.5~8.8 mg/L（飽和濃度に対して 96%以上）、暴露終了時は 7.2~7.9 mg/L（飽和濃度に対して 82%以上）であり、規定の 3.0 mg/L 以上の溶存酸素濃度が維持された。

9. 試験の成立条件

以下のような場合はなかったので、試験は成立した。

- ・対照区において、10%を超える遊泳阻害が生じた場合
- ・溶存酸素濃度が、暴露終了時において 3 mg/L 未満の場合

結 論

tert-ブチル=ヒドロペルオキシド（略名：TBHP）のオオミジンコに対する 48 時間暴露における急性遊泳阻害試験（止水式、密閉系）を実施した。被験物質には 70%水溶液（TBHP 純度：66.0%）を供試し、濃度は特に明記しない限り TBHP としての数値を表記した。設定濃度 10.0、15.0、22.5、33.8 および 50.6 mg/L の試験溶液中の被験物質濃度は、暴露開始時において設定濃度の 92.0～105%、暴露終了時において設定濃度の 92.0～95.3%であった。設定濃度に対する変動が±20%未満であったため、設定濃度を暴露期間中の被験物質濃度として半数遊泳阻害濃度（EC₅₀）を算出した。

暴露 24 および 48 時間の EC₅₀ およびその 95%信頼限界を以下に示す。

暴露時間	EC ₅₀ (mg/L)	95%信頼限界 (mg/L)
24 時間	17*	15～20
48 時間	14**	作図法のため算出せず

* : Probit 法

** : 作図法

表 1 繰り返し精度の確認

設定濃度 (mg/L)	測定濃度 (mg/L)	平均濃度 (mg/L)	変動係数 (%)
10.0	9.98、9.98、9.98	9.98	0.00
50.6	51.0、53.2、53.0	52.4	2.33

表 2 試験溶液中の被験物質濃度

設定濃度 (mg/L)	測定濃度 (mg/L)	
	暴露開始時	暴露終了時
対照区	検出されず	検出されず
10.0	10.1 (101)	9.26 (92.6)
15.0	14.9 (99.3)	14.1 (94.0)
22.5	20.7 (92.0)	20.7 (92.0)
33.8	34.5 (102)	31.8 (94.1)
50.6	53.2 (105)	48.2 (95.3)

() 内の値は設定濃度に対する割合 (%) を示す。

表 3 遊泳阻害数および遊泳阻害率

被験物質 設定濃度 (mg/L)	遊泳阻害数 (遊泳阻害率 (%))	
	24時間	48時間
対照区	1 (5)	1 (5)
10.0	0 (0)	0 (0)
15.0	10 (50)	16 (80)
22.5	13 (65)	20 (100)
33.8	20 (100)	20 (100)
50.6	20 (100)	20 (100)

表 4 EC₅₀ および 95%信頼限界

暴露時間	EC ₅₀ (mg/L)	95%信頼限界 (mg/L)
24 時間	17*	15~20
48 時間	14**	作図法のため算出せず

* : Probit 法

** : 作図法

表 5 試験溶液の観察結果

被験物質 設定濃度 (mg/L)	各暴露時間における観察結果		
	0時間	24時間	48時間
対照区	無色透明	無色透明	無色透明
10.0	無色透明	無色透明	無色透明
15.0	無色透明	無色透明	無色透明
22.5	無色透明	無色透明	無色透明
33.8	無色透明	無色透明	無色透明
50.6	無色透明	無色透明	無色透明

表 6 試験溶液の水温、pH および溶存酸素濃度

被験物質 設定濃度 (mg/L)	水温 (°C)		pH		溶存酸素濃度* (mg/L)	
	0時間	48時間	0時間	48時間	0時間	48時間
対照区	19.6	20.1	7.8	7.8	8.6 (97)	7.2 (82)
10.0	19.7	20.0	7.8	7.7	8.8 (99)	7.6 (86)
15.0	19.6	20.0	7.8	7.8	8.6 (97)	7.5 (85)
22.5	19.7	20.0	7.9	7.8	8.5 (96)	7.5 (85)
33.8	19.6	20.0	7.8	7.8	8.7 (98)	7.8 (89)
50.6	19.6	20.0	7.9	7.8	8.7 (98)	7.9 (90)

*飽和濃度に対する百分率を () 内に示す。

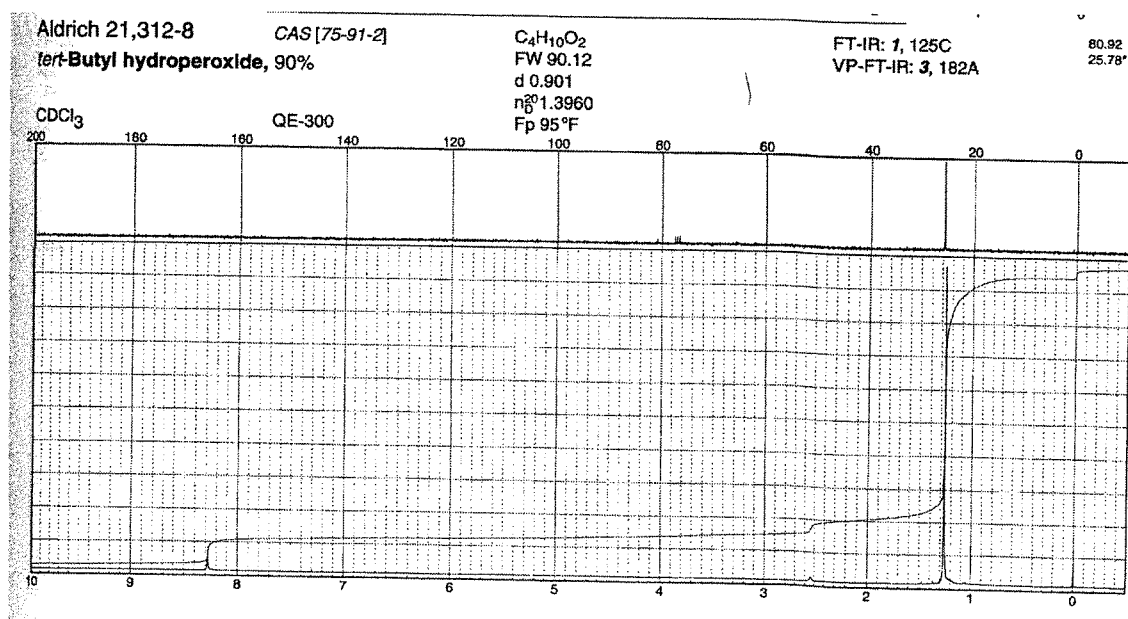


図 1 tert-ブチル=ヒドロペルオキシドの核磁気共鳴スペクトル (重クロロホルム)
(The Aldrich Library of ^{13}C and ^1H FT NMR Spectra EDITION I に収載)

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	真度(%)
52.0	347	100
20.8	105	100
10.4	38.9	97.1
5.20	13.1	104

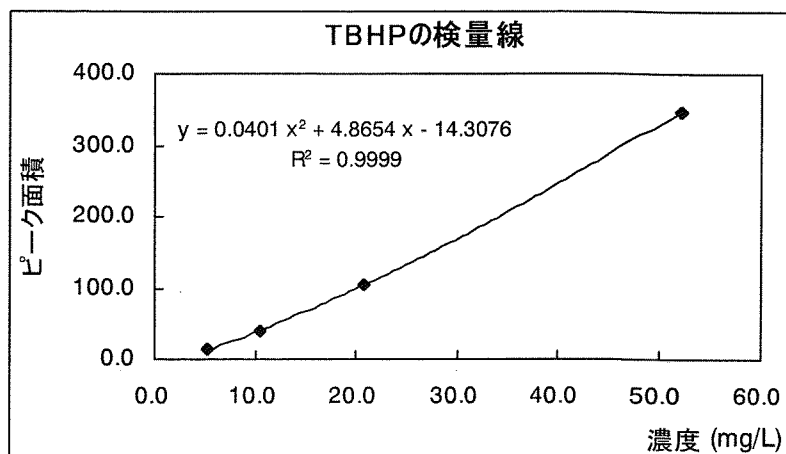
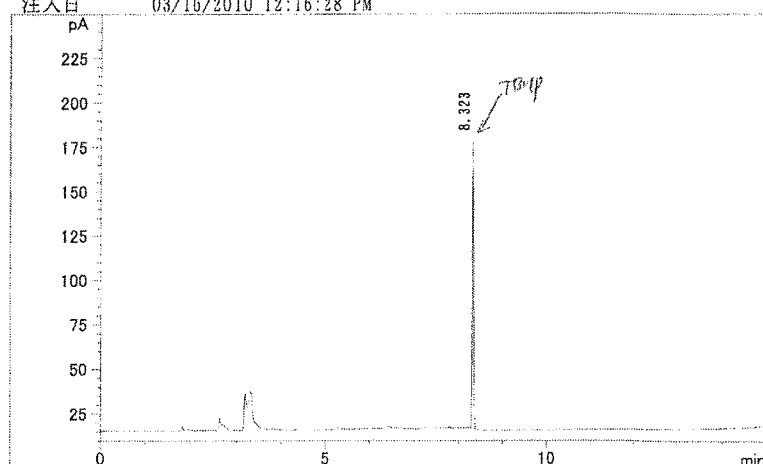


図 4 検量線の一例

サンプル名: STD-50
 分析メソッド: TBHP.M
 データファイル: C:\HPLC\DATA\09-253\03160001.D
 注入日: 03/16/2010 12:16:28 PM

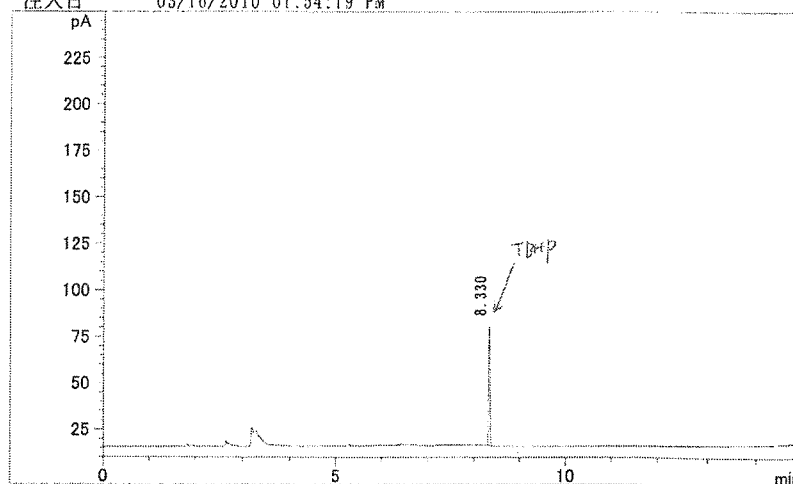


<積分結果>

#	Time (min.)	面積 (pA*s)	面積 %
1	8.32	347.42606	100.0
2	0.00	0.00000	0.0

図 5 標準溶液の GC クロマトグラム (52.0 mg/L、暴露開始時)

サンプル名: O-50.6-R1
 分析ロット: TBHP.M
 データファイル: C:\HPCHEM\1\DATA\09-253\03160005.D
 注入日: 03/16/2010 01:54:19 PM

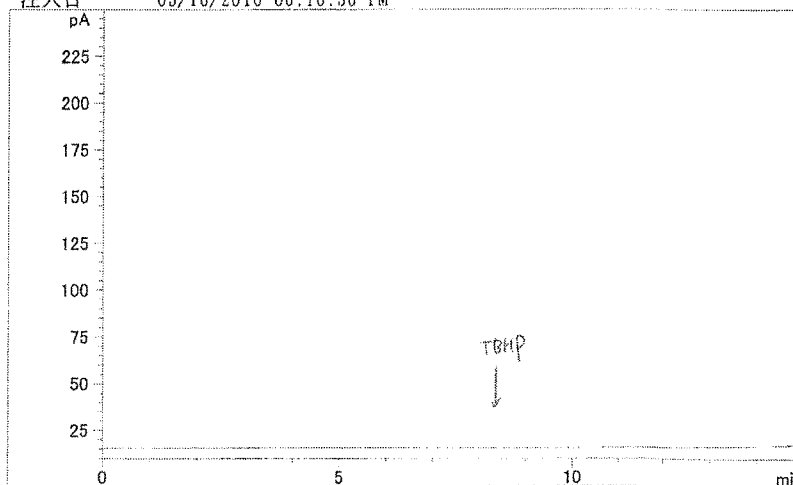


<積分結果>

#	Time(min.)	面積 (pA*s)	面積 %
1	8.33	136.35039	100.0 ← TBHP
2	0.00	0.00000	0.0

図6 繰り返し精度の確認（設定濃度 50.6 mg/L）における GC クロマトグラムの一例

サンプル名: O-C-0
 分析ロット: TBHP.M
 データファイル: C:\HPCHEM\1\DATA\09-253\03160016.D
 注入日: 03/16/2010 06:16:36 PM

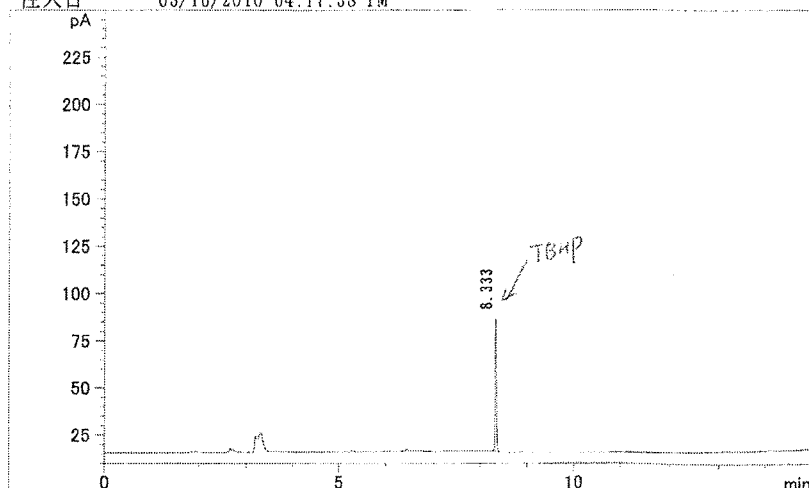


<積分結果>

#	Time(min.)	面積 (pA*s)	面積 %
---	------------	-----------	------

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: 0-50.6-0
 分析キット: TBHP.M
 データファイル: C:\YHPCHEM\Y1\DATA\09-253\Y03160011.D
 注入日: 03/16/2010 04:17:38 PM

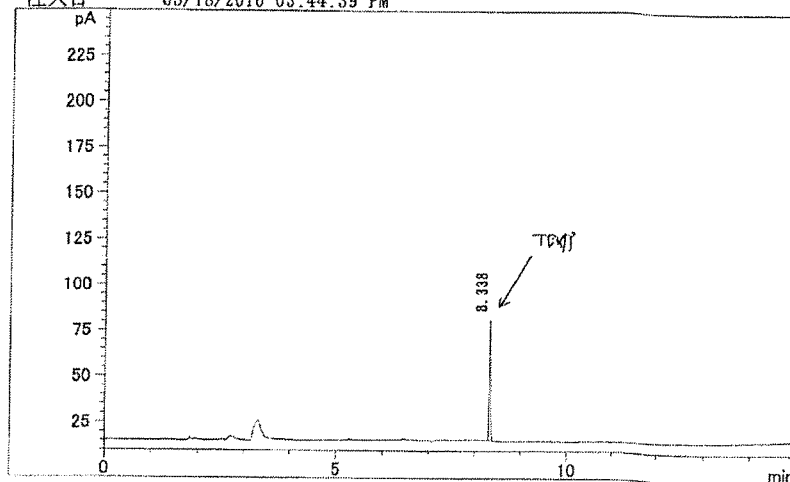


<積分結果>

#	Time (min.)	面積 (pA*s)	面積 %
1	8.33	144.18759	100.0 ← TBHP
2	0.00	0.00000	0.0

図 8 暴露開始時の 50.6 mg/L 区の GC クロマトグラム

サンプル名: 0-50.6-48
 分析キット: TBHP.M
 データファイル: C:\YHPCHEM\Y1\DATA\09-253\Y03180005.D
 注入日: 03/18/2010 03:44:39 PM



<積分結果>

#	Time (min.)	面積 (pA*s)	面積 %
1	8.34	132.65076	100.0 ← TBHP
2	0.00	0.00000	0.0

図 9 暴露終了時の 50.6 mg/L 区の GC クロマトグラム

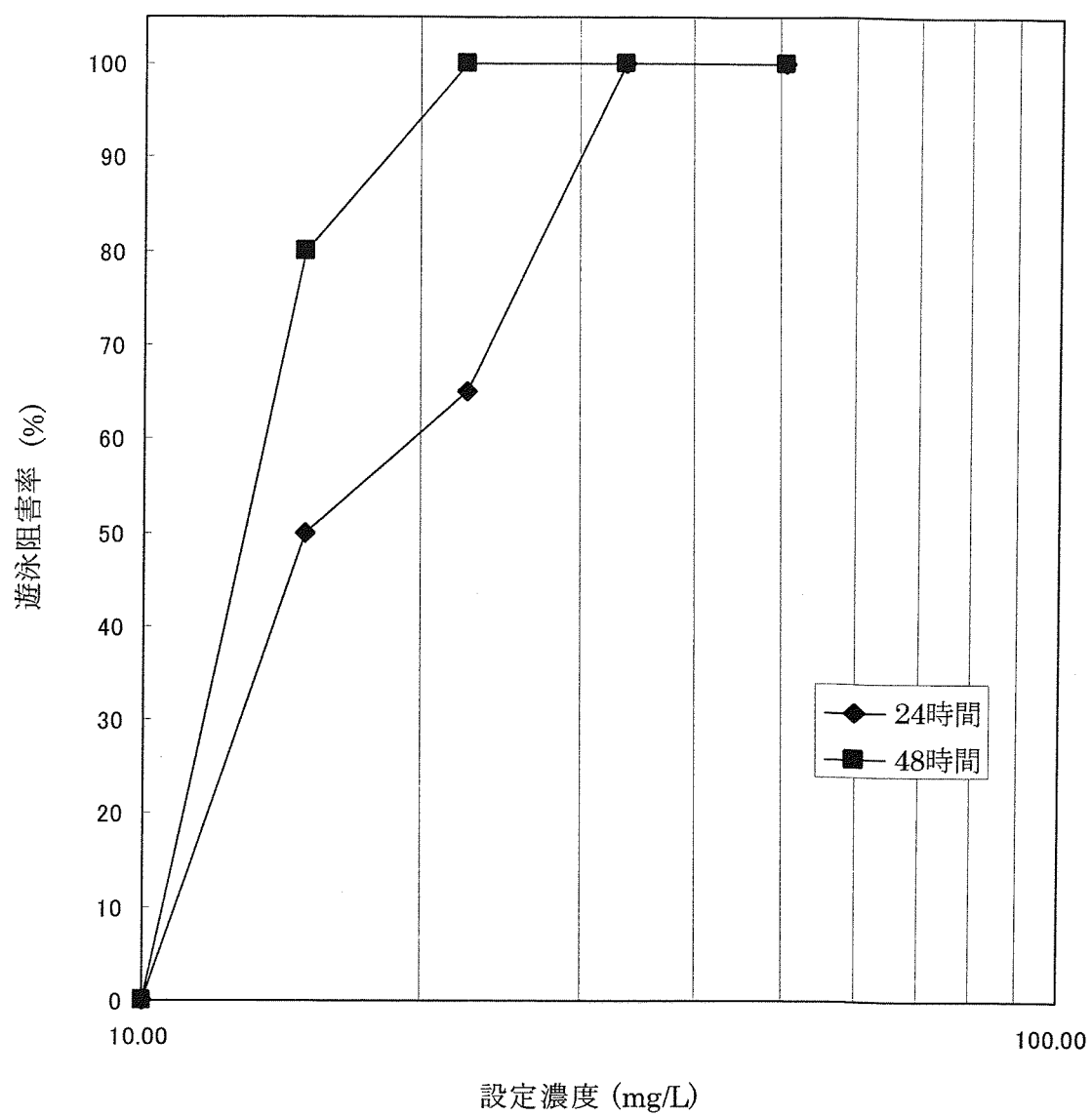


図 10 被験物質濃度と遊泳阻害率