

環境省 殿

最 終 報 告 書

2-メチルプロパン-2-オールのおオミジンコ (*Daphnia magna*) に対する
急性遊泳阻害試験

(試験番号: No. 2009-生25)

2010年 3月29日作成

株式会社ニアル分析センター

陳 述 書

株式会社 クレハ分析センター

試験委託者： 環境省

表題 ： 2-メチルプロパン-2-オールのおオミジンコ (*Daphnia magna*) に対する
急性遊泳阻害試験

試験番号 ： No. 2009-生25

本試験は、

厚生労働省医薬食品局長、経済産業省製造産業局長、環境省総合環境政策局長連名通知「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」（薬食発第 1121003 号、平成15・11・17 製局第 3 号、環保企発第 031121004 号、平成15年11月21日、平成20年7月4日改正）

厚生労働省医薬食品局長、経済産業省製造産業局長、環境省総合環境政策局長連名通知「新規化学物質等に係る試験の方法について」（薬食発第 1121002 号、平成15・11・13 製局第 2 号、環保企発第 031121002 号、平成15年11月21日、平成18年11月20日改正）

に従って実施した。

本報告書の試験データの正確性および有効性について確認した。

2010年 3月29日

試験責任者



2010年 3月29日

確認： 運営管理者



信 頼 性 保 証 書

株式会社 クレハ分析センター

試験委託者： 環境省

表題 ： 2-メチルプロパン-2-オールのおオミジンコ (*Daphnia magna*) に対する
急性遊泳阻害試験

試験番号 ： No. 2009-生25

記

	監査, 査察実施日	報告日	
		運営管理者	試験責任者
試験計画書の監査	2010年 2月22日	2010年 2月22日	2010年 2月22日
実験状況の監査, 査察	2010年 3月 9日	2010年 3月 9日	2010年 3月 9日
	2010年 3月11日	2010年 3月11日	2010年 3月11日
実験終了後の監査	2010年 3月23日	2010年 3月23日	2010年 3月23日
組織体制の監査	2010年 2月15日	2010年 2月15日	2010年 2月15日
施設・設備の査察 試験用機器等 施設, 設備等 試験系	2010年 2月12日	2010年 2月12日	2010年 2月12日
最終報告書の監査	2010年 3月29日	2010年 3月29日	2010年 3月29日

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確認した。

2010年 3月29日

信頼性保証部門責任者 ：

試験実施概要

1. 表題 : 2-メチルプロパン-2-オールのおオミジンコ (*Daphnia magna*) に対する急性遊泳阻害試験

2. 試験目的 : おオミジンコ (*Daphnia magna*) を被験物質に 48 時間暴露し、対照区に対する遊泳阻害率を測定することにより、ミジンコの遊泳に対する被験物質の毒性を明らかにする。

3. 試験法ガイドライン :

本試験は、厚生労働省医薬食品局長、経済産業省製造産業局長、環境省総合環境政策局長連名通知「新規化学物質等に係る試験の方法について」(薬食発第 1121002 号、平成15・11・13 製局第 2 号、環保企発第 031121002 号、平成15年11月21日、平成18年11月20日改正)に従って実施した。

4. 適用GLP : 本試験は、厚生労働省医薬食品局長、経済産業省製造産業局長、環境省総合環境政策局長連名通知「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」(薬食発第 1121003 号、平成15・11・17 製局第 3 号、環保企発第 031121004 号、平成15年11月21日、平成20年7月4日改正)に従って実施した。

5. 試験委託者

名称 : 環境省

所在地 : 〒100-8975 東京都千代田区霞が関一丁目2-2

6. 試験受託者

名称 : 株式会社 クレハ分析センター

本社所在地 : 〒974-8232 福島県いわき市錦町落合16番地

代表者 : XXXXXXXXXX

7. 試験施設

実施施設名 : 株式会社 クレハ分析センター

所在地 : 〒974-8232 福島県いわき市錦町落合16番地

8. 試験関係者 :

試験責任者	■■■■■	(生物試験室)
試験担当者	■■■■■	(生物試験担当者)
	■■■■■	(生物試験担当者)
	■■■■■	(濃度分析責任者)
	■■■■■	(濃度分析担当者)

9. 試験期間 :

試験開始日	2010年 2月22日
実験開始日	2010年 2月24日
(暴露期間	2010年 3月 9日~2010年 3月11日)
実験終了日	2010年 3月16日
試験終了日	2010年 3月29日

目 次

	頁
要 旨	1
1 被験物質	3
1.1 名称、構造式および物理化学的性状.....	3
1.2 供試試料	3
1.3 被験物質の保管方法および保管条件下での安定性.....	4
2 供試生物	4
2.1 供試生物	4
2.2 感受性確認	4
2.3 試験に用いる幼体を得るための親ミジンコの飼育方法と供試幼体の基準.....	4
3 試験方法	5
3.1 試験条件	5
3.2 試験用水	6
3.3 試験容器および恒温槽等.....	6
3.4 被験物質の溶解性確認.....	6
3.5 試験濃度の設定.....	6
3.6 試験溶液の調製.....	7
3.7 被験物質濃度等の測定.....	7
3.8 試験操作	7
4 結果の算出	8
4.1 遊泳阻害濃度算出に用いる被験物質濃度の決定.....	8
4.2 50 % 遊泳阻害濃度 (EC ₅₀) の算出	8
4.3 0 % 遊泳阻害最高濃度および 100 % 遊泳阻害最低濃度.....	8
5 結果および考察	8
5.1 試験成績の信頼性に影響をおよぼしたと思われる環境要因.....	8
5.2 試験用水に対する被験物質の溶解性.....	8
5.3 試験溶液中の被験物質濃度.....	9
5.4 50 % 遊泳阻害濃度 (EC ₅₀)	9
5.5 0 % 遊泳阻害最高濃度および 100 % 遊泳阻害最低濃度.....	9
5.6 試験溶液の水溫、溶存酸素濃度、pH および硬度.....	10
5.7 試験計画書からの逸脱の有無.....	10
6 保管	10
Table 1 ～ 8	11
付属資料－1 試験用水の水質.....	14
付属資料－2 予備試験の結果.....	16
付属資料－3 試験溶液の分析法.....	18

要 旨

試験委託者 環境省

表 題 2-メチルプロパン-2-オールのおオミジンコ (*Daphnia magna*) に対する急性遊泳阻害試験

試験番号 No. 2009-生25

試験法ガイドライン

本試験は、厚生労働省医薬食品局長、経済産業省製造産業局長、環境省総合環境政策局長連名通知「新規化学物質等に係る試験の方法について」(薬食発第 1121002 号、平成 15・11・13 製局第 2 号、環境企発第 031121002 号、平成 15 年 11 月 21 日、平成 18 年 11 月 20 日改正)に従って実施した。

- 1) 被験物質 : 2-メチルプロパン-2-オール
- 2) 暴露方式 : 止水式(密閉系)
- 3) 供試生物 : おオミジンコ (*Daphnia magna*)
- 4) 暴露期間 : 48 時間
- 5) 試験濃度(設定値) : 対照区, 100 mg/L の限度試験。ただし、確実に 100 mg/L 以上を維持するため 120 mg/L 区も追加した。
- 6) 試験溶液量 : 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±1 °C
- 10) 照明 : 室内光、16 時間明/8 時間暗
- 11) 給餌 : 無給餌
- 12) pH : 試験溶液の pH 調整は行わなかった
- 13) 分析法 : GC 法

結 果

100 mg/L での限度試験を行った。ただし、確実に 100 mg/L 以上を維持できる区として 120 mg/L 区も追加した。

1) 試験溶液中の被験物質濃度

暴露期間中の被験物質濃度の減少は、揮発によるものが主因と考えられた。従って、各影響濃度（50 % 遊泳阻害濃度、0 % 遊泳阻害最高濃度、100 % 遊泳阻害最低濃度）の算出に当たっては、100 mg/L 以上を維持していた 120 mg/L 区の測定値を用い、暴露開始時および暴露終了時の測定値の幾何平均値を採用した。

2) 24 時間暴露後の結果

50 % 遊泳阻害濃度 (EC ₅₀)	: >110 mg/L
0 % 遊泳阻害最高濃度	: 110 mg/L
100 % 遊泳阻害最低濃度	: >110 mg/L

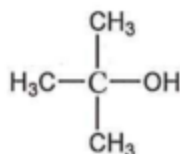
3) 48 時間暴露後の結果

50 % 遊泳阻害濃度 (EC ₅₀)	: >110 mg/L
0 % 遊泳阻害最高濃度	: 110 mg/L
100 % 遊泳阻害最低濃度	: >110 mg/L

1 被験物質

1.1 名称、構造式および物理化学的性状

化学物質等の名称 : 2-メチルプロパン-2-オール
一般名^{**}, ^{***} : tert-ブタノール
CAS番号^{*}, ^{**} : 75-65-0
構造式 :



分子式^{*} : C₄H₁₀O
分子量^{*} : 74.12
蒸気圧^{*} : 40.7 mmHg (25°C)
水溶解度^{*} : 1×10⁶ mg/l. (25°C)
ヘンリー定数^{*} : 9.05×10⁻⁶ atm・m³/mole (25°C)
酸解離定数(pKa)^{*} : 19.2 (25°C)
1-オクタノール/水分配係数^{*} : 0.35
融点^{*} : 25.4°C
沸点^{*} : 82.4°C
外観^{**} : 白色の塊
安定性^{**} : 酸化剤、金属との接触を避ける。
溶媒に対する溶解性^{**} : 水、アルコール、エーテルに易溶

1.2 供試試料

入手先 : XXXXXXXXXX
入手量 : 25 mL×5本 (同一ロット)
ロット番号^{***} : XXXXXXXXXX
純度^{***} : 99.9 % (GC)
不純物の名称および含有率^{***} : 記載なし
性状^{**}, ^{***} : 常温で澄明液体、又は白色の塊
入手日 : 2010年1月14日

[出典]

* : SRC PhysProp Database
** : XXXXXXXXXX「製品安全データシート 製品名: tert-Butanol」
(作成・改定日 2009年07月21日)
*** : XXXXXXXXXX「試験成績書 製品名: tert-Butanol」(製品コード: XXXXXXXXXX 2010年01月13日)

1.3 被験物質の保管方法および保管条件下での安定性

1) 保管方法

被験物質保管用冷蔵庫において、遮光・密閉保管した。

2) 被験物質の確認および保管条件下の安定性

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、公的データ*との比較により、被験物質の特性が認められることを確認し、更に官能基のリストと照合して同一性を確認した。

実験終了後にも同様に赤外吸収スペクトルを測定し、試験開始前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から、被験物質は実験期間中安定であったと判断した。

*：独立行政法人 産業技術総合研究所「有機化合物スペクトルデータベース(SDBS)」

2 供試生物

2.1 供試生物

試験には、オオミジンコ (*Daphnia magna*) の雌の幼体 (24 時間齢以内) を用いた。本種は、独立行政法人国立環境研究所より 1997 年 2 月 5 日に入手したものを、当施設において継代飼育しているものである。

2.2 感受性確認

直近の基準物質〔重クロム酸カリウム (二クロム酸カリウム) 試薬特級〕による 48 時間 50 % 遊泳阻害濃度 (EC_{50}) は 0.75 mg/L [暴露期間 ; 2009 年 10 月 13 日～10 月 15 日] であった。

当施設における 1999 年 10 月以降の EC_{50} 値は $\bar{X} = 0.85$ mg/L、S.D. = 0.19 mg/L、 $n = 23$ (M4 人工調製水) であった。

2.3 試験に用いる幼体を得るための親ミジンコの飼育方法と供試幼体の基準

孵化した 24 時間齢以内の幼体を 3 ～ 4 週間飼育したものの中から、育房内に卵を抱えた肉眼的に健康かつ十分な大きさの雌成体を選別し、別に用意したピーカーに移した。翌日、産まれた幼体を供試ミジンコの親とし、次頁に記載する条件で最長で 4 週間飼育した。飼育期間中は産まれた幼体数を毎日確認し、産まれた幼体はその日のうちに除去した。

暴露開始前日 (飼育開始 20 日) に仔ミジンコを分離した。翌日、孵化した 24 時間齢以内の幼体を試験に用いた。

飼育中の親については、2 頭以上の死亡、死産の発生、休眠卵や雄の発生、初産日の遅れ、および体の変色等の何らかのストレスを受けた症状は認められなかった。また、初産幼体は試験に使用しなかった。同一の試験においては、全て同じバッチに産まれた幼体を用いた。

親世代の飼育方法、状態、日齢等は下記の通りであった。

- 1) 飼育水 : 試験に用いる試験用水(3.2 項参照)で飼育した。
飼育水は 3 回/週の頻度で、原則として月、水、金曜日に換水した。
- 2) 飼育密度 : 30 頭/ 2 L 飼育水
- 3) 水温 : $20 \pm 1^{\circ}\text{C}$
- 4) 照明 : 室内光、16 時間明/8 時間暗
- 5) 餌 : 当施設で培養した単細胞緑藻類 (*Chlorella vulgaris*) の培養液を遠心分離操作により分離し、飼育水に置換して与えた。
- 6) 給餌量 : ミジンコ 1 頭当たり次の量の藻類を毎日与えた。
0 ~ 10 日 : 0.15 mgC (有機炭素含量) /日
11 ~ 20 日 : 0.18 mgC (有機炭素含量) /日
21 ~ 28 日 : 0.20 mgC (有機炭素含量) /日
- 7) 容器 : 2 L のガラス製のピーカーを用い、試験容器と同様にゴミの混入等を防止するため蓋をした。
- 8) じゅん化期間 : 2010 年 2 月 16 日 ~ 2010 年 3 月 9 日(21 日齢)
暴露開始前 2 週間の親の死亡率は 3 % であり、休眠卵および雄の発生は認められなかった。

3 試験方法

以下の条件で試験を行った。

3.1 試験条件

- 1) 暴露方式 : 止水式 (密閉系)
- 2) 暴露期間 : 48 時間
- 3) 試験溶液量 : 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°C で設定し、経時的および各試験容器間の変動範囲は $\pm 1^{\circ}\text{C}$ 以内とする
- 7) 照明 : 室内光、16 時間明/8 時間暗
- 8) 給餌 : 給餌は行わない

- 9) pH : 試験溶液の pH 調整は行わない。暴露期間中の pH は 6.0 ～ 9.0 の範囲とし、1.5 以内の変動とする。
- 10) 溶存酸素濃度 : 暴露期間中、通気は行わない。暴露期間中の溶存酸素濃度は 3 mg/L 以上を維持する。

3.2 試験用水

Elendt M4 人工調製水 [OECD GUIDELINES FOR THE TESTING OF CHEMICALS 202: *Daphnia* sp., Acute Immobilisation Test (Adopted 13 April 2004) に記載してある人工調製水] を使用した。成分表を付属資料-1 に示した。

暴露開始時における試験用水の硬度は 252 mg/L (CaCO₃換算)、pH は 8.0 であった。

3.3 試験容器および恒温槽等

- 1) 試験容器 : 110 mL 容ガラス製スクリュ管瓶を用い、密栓した。
(ヘットスペース : 10 mL)
- 2) 恒温槽 : 恒温室
- 3) 水温計 : ガラス製水銀温度計
- 4) 溶存酸素計 : B-505 (飯島電子工業)
- 5) pH 計 : HM-30 V (東亜ディーケーケー)
- 6) ICP(硬度分析用) : IRIS Advantage/AP (サーモエレクトロン)

3.4 被験物質の溶解性確認

被験物質の試験用水に対する溶解性は、フラスコ攪拌法で確認した。

被験物質の水溶解度の文献値が 1×10^6 mg/L (25 °C) であることから、試験用水を用いて 500 mg/L 溶液を調製後、密閉状態でマグネチックスターラーを用いて試験温度 (20 °C) で 30 分間攪拌し、目視により溶解した状態であることを確認した。

この調製液をろ過しない場合と、試験温度で 0.2 μm 親水性 PTFE タイプメンブランフィルター (商品名 : H020A090C, メーカー : ADVANTEC) を用いて加圧ろ過したろ液中の被験物質濃度を GC 法により測定した。

3.5 試験濃度の設定

公比 $10^{1/2}$ (約 3.2) で 3 段階 (10 ～ 100 mg/L の範囲) の濃度設定による予備試験を行った結果 (付属資料-2)、48 時間遊泳阻害率は 10 mg/L 区で 0 %、32 mg/L 区で 0 %、100 mg/L 区 (暴露開始時と 48 時間後の被験物質濃度の算術平均値 : 97.1 mg/L) で 0 % であった。

この結果を基に、本試験においては 100 mg/L 区 (通常の限度試験濃度) と確実に

100 mg/L 以上を維持できると考えられた 120 mg/L 区、および対照区を設定した。

3.6 試験溶液の調製

試験溶液は用時調製とした。

500 mg の被験物質を 1 L メスフラスコに秤り入れ、試験用水で 1 L とした。これをマグネチックスターラーを用いて試験温度（20 ℃）で 30 分間攪拌し、500 mg/L の試験原液とした（無色透明）。

次に、500 mg/L の試験原液 200 および 240 mL をそれぞれ 1 L メスフラスコに採り、試験用水で 1 L とし、100 および 120 mg/L 区の試験溶液を調製した（全て無色透明）。

対照区には被験物質を加えない試験用水を用いた。

3.7 被験物質濃度等の測定

1) 被験物質濃度の測定

暴露開始時には調製した各試験溶液について、暴露終了時には各試験容器の中層より等量を採取し混合した試験溶液について、GC 法により被験物質濃度を測定した。試験溶液の分析に際しては、標準溶液の測定を行い、そのピーク面積（カウント数）から定量した。

詳細な分析法は付属資料-3「試験溶液の分析法」（測定条件、検出限界値および定量下限値、添加回収率、保存安定性、検量線）に示した。

2) 試験環境の測定

全試験区（ただし、各試験区 1 容器）の試験溶液について、暴露開始時、24 時間後および暴露終了時に、溶存酸素濃度と pH および水温を測定した。試験水温の変動を監視するために、別に設けた試験容器および周囲の大気等の温度を暴露期間中に継続して測定し記録した。

また、暴露開始時および暴露終了時に、全試験区の試験溶液（各試験区 1 容器）について、ICP 法により Ca、Mg 濃度を測定し、その値より各試験溶液の全硬度を算出した。

3.8 試験操作

試験溶液の水温、溶存酸素濃度、pH を測定後、供試ミジンコを投入し、その時点暴露開始時とした。

供試ミジンコの投入には先端が比較的広口に加工したガラスピペットを用い、投入の際のピペット内の飼育水は、試験溶液量に対して、全量で 1 % 以内とした。

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 秒間の観察期間中に泳がなかった場合は遊泳阻害されたとみなした（ただし、遊泳とは第二触角を使い、水中で自分の体を動かす、もしくは自立的に移動することをいい、水底を這って動くものは遊泳阻害に含めた。水面で動くものについては、水滴を落とす等の操作でミジンコを強制的に水中に沈めると遊泳するが、再び浮上した場合には遊泳阻害に含めた。また、正常な遊泳でない場合でも 15 秒間の観察中に 1 回でも水中を遊泳した場合は、阻害に含めなかった）。

遊泳阻害以外の行動や外見の異常は無かった。

4 結果の算出

4.1 遊泳阻害濃度算出に用いる被験物質濃度の決定

暴露期間中の被験物質濃度の減少は、揮発によるものが主因と考えられた。従って、各影響濃度（50 % 遊泳阻害濃度、0 % 遊泳阻害最高濃度、100 % 遊泳阻害最低濃度）の算出に当たっては、暴露開始時および暴露終了時の測定値の幾何平均値を採用した。

4.2 50 % 遊泳阻害濃度（EC₅₀）の算出

各試験区のミジンコの遊泳阻害数と供試個体数（20 頭）から、観察時間毎に遊泳阻害率（%）を求めた。いずれの濃度区でも遊泳阻害は認められなかった。また、100 mg/L 以上を維持できたのが 120 mg/L 区であったことから、EC₅₀ 値は 120 mg/L 区の測定濃度の幾何平均値より大とした。

4.3 0 % 遊泳阻害最高濃度および 100 % 遊泳阻害最低濃度

ミジンコが遊泳阻害を受けない最高濃度を 0 % 遊泳阻害最高濃度とし、全てのミジンコが遊泳阻害を受ける最低濃度を 100 % 遊泳阻害最低濃度とした。

5 結果および考察

5.1 試験成績の信頼性に影響をおよぼしたと思われる環境要因

認められなかった。

5.2 試験用水に対する被験物質の溶解性

フラスコ攪拌法により調製した 500 mg/L 溶液が溶解した状態であることを目視で

確認した。この調製液をろ過しない場合と、調製液を試験温度で 0.2 μ m 親水性 PTFE タイプメンブランフィルター（商品名：H020A090C，メーカー：ADVANTEC）を用いて加圧ろ過したろ液中の被験物質濃度を GC 法により測定した。その結果、被験物質濃度は、ろ過しない場合は 461 mg/L (n = 1) で、加圧ろ過した場合は 479 mg/L (n = 1) であった。測定値は設定濃度の 90 % 以上で、加圧ろ過前後の測定値が近接した値であることから、水溶解度の文献値も考え合わせた上で、この調製液は溶解していると考えられた。

5.3 試験溶液中の被験物質濃度

暴露開始時および暴露終了時に試験溶液中の被験物質濃度を測定した。その結果を Table 1 に示した。

各濃度区の設定値に対する被験物質濃度の割合は、暴露開始時では 100 mg/L 区で 91 %、120 mg/L 区で 93 % であった。試験期間中の濃度維持率は 100 mg/L 区で 99 %、120 mg/L 区で 94 % であり、被験物質濃度のわずかな減少は揮発によるものが主因と考えられた。

5.4 50 % 遊泳阻害濃度 (EC₅₀)

各観察時における遊泳阻害率を Table 2 に、50 % 遊泳阻害濃度 (EC₅₀) を Table 3 に示した。

なお、48 時間暴露の対照区の遊泳阻害率は 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。

結論を以下に示した。

24 時間 50 % 遊泳阻害濃度 (EC₅₀) : >110 mg/L

48 時間 50 % 遊泳阻害濃度 (EC₅₀) : >110 mg/L

5.5 0 % 遊泳阻害最高濃度および 100 % 遊泳阻害最低濃度

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

24 時間 0 % 遊泳阻害最高濃度 : 110 mg/L

48 時間 0 % 遊泳阻害最高濃度 : 110 mg/L

24 時間 100 % 遊泳阻害最低濃度 : >110 mg/L

48 時間 100 % 遊泳阻害最低濃度 : >110 mg/L

5.6 試験溶液の水温、溶存酸素濃度、pH および硬度

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

48 時間の暴露期間中の水温は 20.0 ～ 20.2 °C の範囲内であり、変動は 1 °C 以内であった。試験水温の変動を連続的に監視するために別に設けた試験容器と、周囲の大気温度は共に 20 ± 1 °C の範囲内であった。

溶存酸素濃度は 8.6 ～ 8.7 mg/L の範囲内であり、すべての試験区で飽和溶存酸素濃度の 60 % 以上が維持され（20.0 °C の飽和溶存酸素濃度：8.84 mg/L）、試験成立条件（3 mg/L 以上）を満たした。

pH は 7.9 ～ 8.0 の範囲内であり、変動はいずれも 1.5 以内であった。

硬度は 252 ～ 254 mg/L の範囲内であった。

5.7 試験計画書からの逸脱の有無

被験物質溶液を調製する際、試験計画書では遮光して攪拌することとしているが、実際の溶液調製では遮光せずに行っていた。しかしながら、予備的検討において被験物質に光分解性は認められなかったことから、本逸脱は試験結果に影響を及ぼさなかったと考えられた。

6 保管

試験に関する下記の記録および試資料は、当施設の資料保管施設に保管する。

- 1) 主計画表
- 2) 試験計画書、生データおよび最終報告書
- 3) 信頼性保証部門によって実施された監査または査察の記録
- 4) 職員の資格、訓練、経験および職務分掌の記録
- 5) 機器類の保守点検および校正の記録および報告書
- 6) コンピュータ化されたシステムの有効性確認の記録
- 7) 全標準操作手順書の経時的ファイル
- 8) 環境モニター記録
- 9) 被験物質、対照物質
- 10) その他の資料

以 上

Table 1. Measured Concentrations of the Substance in Test Solution
(Static Condition, Closed System)

Nominal Concentration (mg/L)	Measured Concentration, mg/L (Percent of Nominal)				Mean ^a Measured Concentration (mg/L)
	0 Hour		48 Hours		
	new		old		
Control	<2	(-)	<2	(-)	-
100	90.6	(91)	89.3	(89)	89.9
120	111	(93)	104	(87)	107

new : Freshly prepared test solutions

old : Test solutions after 48 hours exposure

a : Geometric mean

Table 2. The Numbers of Immobile *Daphnia*
(Static Condition, Closed System)

Nominal Concentration (mg/L)	Mean ^a Measured Concentration (mg/L)	Number of <i>Daphnia</i>	Cumulative Numbers of Immobilized <i>Daphnia</i> (Percent Immobility)									
			24 Hours					48 Hours				
			1	2	3	4	Total	1	2	3	4	Total
Control	-	20	0	0	0	0	0(0)	0	0	0	0	0(0)
100	89.9	20	0	0	0	0	0(0)	0	0	0	0	0(0)
120	107	20	0	0	0	0	0(0)	0	0	0	0	0(0)

a : Geometric mean

Table 3. Calculated EC₅₀ Values

Exposure Period (Hours)	EC ₅₀ (mg/L)	95 % Confidence Limits (mg/L)	Statistical Method
24	>110	-	-
48	>110	-	-

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	110	>110
48	110	>110

Table 5. Temperature

(Static Condition, Closed System)				
Nominal Concentration (mg/L)	Mean ^a Measured Concentration (mg/L)	Temperature, °C		
		0 Hour new	24 Hours	48 Hours old
Control	–	20.0	20.0	20.1
100	89.9	20.0	20.0	20.2
120	107	20.0	20.0	20.2
new : Freshly prepared test solutions				
old : Test solutions after 48 hours exposure				
a : Geometric mean				

Table 6. Dissolved Oxygen Concentrations

(Static Condition, Closed System)				
Nominal Concentration (mg/L)	Mean ^a Measured Concentration (mg/L)	Dissolved Oxygen Concentration, mg/L		
		0 Hour new	24 Hours	48 Hours old
Control	–	8.7	8.6	8.6
100	89.9	8.7	8.6	8.6
120	107	8.7	8.6	8.6
new : Freshly prepared test solutions				
old : Test solutions after 48 hours exposure				
a : Geometric mean				

Table 7. pH Values

(Static Condition, Closed System)				
Nominal Concentration (mg/L)	Mean ^a Measured Concentration (mg/L)	pH		
		0 Hour new	24 Hours	48 Hours old
Control	–	8.0	8.0	7.9
100	89.9	8.0	8.0	7.9
120	107	8.0	8.0	7.9
new : Freshly prepared test solutions				
old : Test solutions after 48 hours exposure				
a : Geometric mean				

Table 8. Total Hardness (as CaCO_3)

Nominal Concentration (mg/L)	Mean ^a Measured Concentration (mg/L)	(Static Condition, Closed System)	
		Total Hardness (as CaCO_3), mg/L	
		0 Hour new	48 Hours old
Control	–	252	254
100	89.9	253	253
120	107	252	253

new : Freshly prepared test solutions

old : Test solutions after 48 hours exposure

a : Geometric mean

付 属 資 料 ー 1

試 験 用 水 の 水 質

Table A-1 Elendt M4 Medium Recommended by OECD Guideline No.202
Used as Dilution Water

Macro nutrients	Concentration	Unit
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	293.8	mg /L
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	123.3	mg /L
KCl	5.80	mg /L
NaHCO_3	64.8	mg /L
$\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$	10.0	mg /L
NaNO_3	0.274	mg /L
KH_2PO_4	0.143	mg /L
K_2HPO_4	0.184	mg /L
Trace elements	Concentration	Unit
H_3BO_3	2.8595	mg /L
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.3605	mg /L
LiCl	0.3060	mg /L
RbCl	0.0710	mg /L
$\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.152	mg /L
NaBr	0.0160	mg /L
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.0630	mg /L
$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.01675	mg /L
ZnCl_2	0.0130	mg /L
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.0100	mg /L
KI	3.25	$\mu\text{g/L}$
Na_2SeO_3	2.19	$\mu\text{g/L}$
NH_4VO_3	0.575	$\mu\text{g/L}$
$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	2.50	mg /L
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.9955	mg /L
Vitamines	Concentration	Unit
Thiamine hydrochloride	75.0	$\mu\text{g/L}$
Cyanocobalamine (B_{12})	1.00	$\mu\text{g/L}$
Biotine	0.750	$\mu\text{g/L}$

付 属 資 料 ー 2

予 備 試 験 の 結 果

Table B-1. The Numbers of Immobile *Daphnia*
(Range Finding Test)

Nominal Concentration (mg/L)	(Static Condition, Closed System)			
	Cumulative Numbers of Immobilized <i>Daphnia</i> ^a (Percent Immobility)			
	24 Hours		48 Hours	
Control	0/20	(0)	0/20	(0)
10	0/20	(0)	0/20	(0)
32	0/20	(0)	0/20	(0)
100	0/20	(0)	0/20	(0)

a : Number of immobilized *Daphnia* / Number of applied *Daphnia*

Table B-2. Measured Concentration of the Substance in Test Solution
(Range Finding Test)

Nominal Concentration (mg/L)	(Static Condition, Closed System)			
	Measured Concentration (mg/L) (Percent of Nominal)			
	0 Hour new		48 Hours old	
Control	<2	(-)	<2	(-)
10	8.93	(89)	9.00	(90)
32	28.9	(90)	31.2	(98)
100	95.2	(95)	99.0	(99)

new : Freshly prepared test solutions

old : Test solutions after 48 hours exposure

付 属 資 料 ― 3

試 験 溶 液 の 分 析 法

2-メチルプロパン-2-オール分析法

1. 分析方法

(1) 分析法の概要

検量線の濃度範囲に入るように試験溶液を希釈後、その一定量を、FID 検出器を備えたガスクロマトグラフ (GC) に注入し、クロマトグラムと同時にピーク面積 (カウント数) をデータ処理装置から求める。このピーク面積を用い、標準液の検量線から試験溶液中の被験物質の濃度を求め、希釈倍率で換算し、試験溶液中の被験物質の濃度を算出する。

(2) 装置および器具

a) ガスクロマトグラフ	: GC-14A 型 (FID 付)	島津製作所
b) 分離カラム	: 10% PEG-6000 shimalite TPA 60/80 mesh glass 製 3 m×3.2 mmφ	ジーエルサイエンス
c) データ処理装置	: C-R5A 型	島津製作所
d) 化学天秤	: AE-166 型	メトラー
e) マイクロシリンジ	: 10 μ L	イトー
f) メスシリンダー	: 容量 1000 mL	柴田科学
g) メスフラスコ	: 容量 20, 100 mL	柴田科学
h) ホールピペット	: 容量 1, 2 mL	柴田科学
i) コマゴメピペット	: 容量 5 mL	柴田科学

(3) 試薬

- a) 2-メチルプロパン-2-オール : 純度 99.9 %, XXXXXXXXXX
b) 純水 : 純水製造装置で調製

(4) 試薬の調製

a) 被験物質標準原液 (1000 mg/L)

被験物質約 100 mg を 100 mL メスフラスコに 0.1 mg の桁まで精秤する。これに純水を加えて溶解し 100 mL とする。秤量した質量から、純度換算を行った上、正確な被験物質の濃度を算出する。

(5) 操作

〔前処理〕

必要に応じ検量線の被験物質濃度範囲内に入るように試験溶液を純水で希釈する。

〔測定操作〕

- a) 「2. GC 測定条件」に記載する分析条件で GC を作動し、装置を安定させる。
- b) 「3. 検量線の作成」に記載する方法で検量線の標準液を調製する。
- c) 検量線の標準液、必要に応じて希釈した試料の溶液の $1\ \mu\text{L}$ を GC に注入してクロマトグラムおよびピーク面積（カウント数）を得る。
- d) 検量線により濃度を求め、希釈率で換算し試験溶液の被験物質濃度を算出する。

2. GC 測定条件

- (1) 分離カラム : 10 % PEG-6000, 3 m×3.2 mmφ shimalite TPA 60/80 mesh
- (2) 恒温槽温度 : 70 °C
- (3) キャリヤーガス : 窒素
- (4) 流量 : 40 mL/min
- (5) 検出器 : FID
- (6) 注入量 : $1\ \mu\text{L}$

3. 検量線の作成

- (1) 被験物質標準原液 (1011 mg/L) 1 mL、2 mL をそれぞれ 20 mL メスフラスコに正確に分取し、純水で 20 mL とし、50.55 mg/L、101.1 mg/L 標準液を調製する。
101.1 mg/L 標準液から 2.0 mL を 20 mL メスフラスコに正確に分取して、純水で 20 mL とし、10.11 mg/L 標準液を調製する。
- (2) 各標準液について $1\ \mu\text{L}$ を GC に注入し、データ処理装置からクロマトグラムおよびピーク面積（カウント数）を得る。被験物質濃度を横軸にピーク面積を縦軸にとり検量線を作成する。この時の回帰式の寄与率 (R^2) も算出する。

表 1 検量線に使用したデータ例

No.	被験物質濃度 (mg/L)	ピーク面積 ($\mu\text{V} \cdot \text{sec}$)
1	0	0
2	10.11	10942
3	50.55	57844
4	101.1	118137

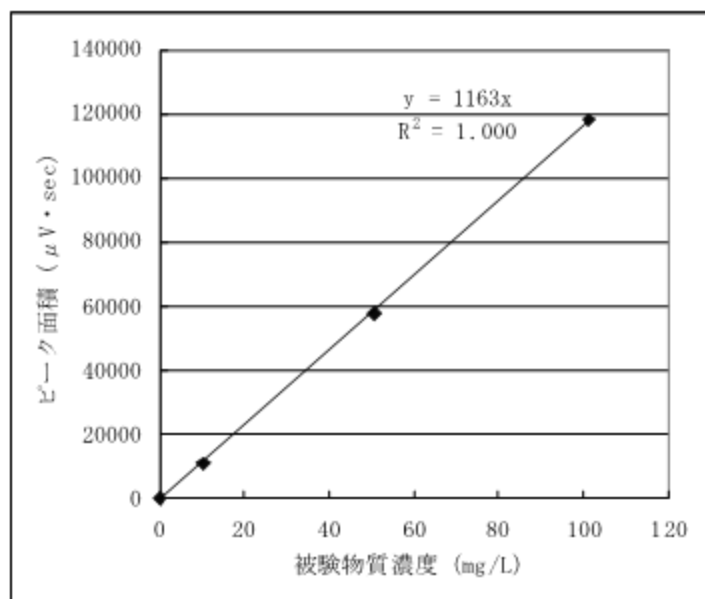


図 1 検量線例

4. 添加回収率

被験物質標準原液 (1048 mg/L) 2 mL を 20 mL メスフラスコに正確に分取し、純水で 20 mL とし、104.8 mg/L 標準液を調製する。

標準原液および標準液の 2 mL を 20 mL メスフラスコに正確に分取し、M4 水で 20 mL とし、濃度が 104.8 mg/L、10.48 mg/L の溶液を調製する。これらの溶液について、回収率を算出した。

結果を表 2 に示す。回収率は 94 ~ 102 % であった。

表 2 添加回収率

試料濃度 (mg/L)	n	測定値 (mg/L)	測定値平均 (mg/L)	回収率 (%)
10.48	1	9.787	9.80	94
	2	9.805		
104.8	1	107.3	107	102
	2	106.7		

5. 保存安定性

「4. 添加回収率」で調製した 2 濃度の試料溶液 (9.80 mg/L、107 mg/L) を、密閉・遮光条件において冷蔵庫内(約 4 °C)で 3 日間保存し、試料溶液の安定性を確認した。

結果を表 3 に示す。3 日間冷蔵庫内保存溶液の濃度維持率は 103 ～ 105 % であった。

表 3 保存安定性

開始時測定値 (mg/L)	3 日後			
	n	測定値 (mg/L)	測定値平均 (mg/L)	濃度維持率 (%)
9.80	1	10.29	10.1	103
	2	10.00		
107	1	108.8	112	105
	2	114.9		

6. 定量下限値および検出限界

被験物質濃度 11.38 mg/L の標準液 1 μ L を GC に 7 回注入し、得られた測定値の標準偏差値の 10 倍を定量下限値、3 倍を検出限界値とした。

結果を表 4 に示す。定量下限値は 2 mg/L、検出限界値は 0.5 mg/L であった。

測定値の平均値と標準液濃度にみられた濃度差は、標準液の調製時に被験物質の揮発により生じた調製誤差が原因と考えられた。

表 4 定量下限値および検出限界値の算出データ

n	測定値 (mg/L)
1	10.45
2	10.45
3	10.33
4	10.35
5	10.20
6	10.08
7	10.57
平均値	10.35
標準偏差 (σ_{n-1})	0.1654

$$\text{定量下限値} = 0.1654 \times 10 = 1.654 \approx 2 \text{ mg/L}$$

$$\text{検出限界値} = 0.1654 \times 3 = 0.4962 \approx 0.5 \text{ mg/L}$$