環境省殿

本写しは原本と相違ありません
㈱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

1, 1－ジクロロエチレンのオオミジンコ（*Daphnia magna*）

に対する急性遊泳阻害試験

（試験番号：Ａ０６００３２）

２００６年　７月２１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 ： 1,1−ジクロロエチレンのオオミジンコ（*Daphnia magna*）に対する急性遊泳阻害試験

試 験 番 号 ： Ａ０６００３２

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。

「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 17 年 4 月 1 日）

２００６年　７月２１日

試験責任者 [redacted]

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：　1,1－ジクロロエチレンのオオミジンコ（*Daphnia magna*）に対する急性遊泳阻害試験

試験番号：　Ａ０６００３２

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及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		
試験計画書	２００６年　５月２２日	２００６年　５月２２日
変更書（変更番号：０１）	２００６年　６月　１日	２００６年　６月　１日
試験の査察		
試験液の調製	２００６年　５月３１日	２００６年　５月３１日
ミジンコの投入	２００６年　５月３１日	２００６年　５月３１日
試験液の分析	２００６年　６月　１日	２００６年　６月　１日
ミジンコの観察	２００６年　６月　２日	２００６年　６月　２日
最終報告書監査	２００６年　７月２１日	２００６年　７月２１日

２００６年　７月２１日
信頼性保証部門担当者 [redacted]

試 験 実 施 概 要

1. 表　　題 ： 1,1－ジクロロエチレンのオオミジンコ（*Daphnia magna*）に対する急性遊泳阻害試験
（試験番号：Ａ０６０００３２）

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（EC50）を求める。

3. 適用ガイドライン ： 「新規化学物質等に係る試験の方法について＜藻類生長阻害試験，ミジンコ急性遊泳阻害試験及び魚類急性毒性試験＞」（平成 15 年 11 月 21 日 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 17 年 4 月 1 日）

4. 適 用 ＧＬＰ ： 「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 17 年 4 月 1 日）

5. 試 験 委 託 者 ： 環境省
東京都千代田区霞ヶ関一丁目２－２

6. 試 験 受 託 者 ： 株式会社三菱化学安全科学研究所
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
神奈川県横浜市青葉区鴨志田町 1000 番地

8. 試 験 責 任 者 ： [redacted]
生態化学研究部

9. 試験担当者：[redacted] [redacted]（２００６年　7月２１日）

（試験実施，分析実施，報告書作成）

[redacted] [redacted]（２００６年　7月２１日）

（試験実施）

10. 試験日程：

試験開始日	２００６年　5月２２日
暴露開始日	２００６年　5月３１日
暴露終了日	２００６年　6月　２日
試験終了日	２００６年　7月２１日

11. 保管：下記の試資料を，株式会社三菱化学安全科学研究所　横浜研究所の試資料保管施設に保管する。ただし，被験物質については揮散性が著しく，正常な保管が困難なため，保管しない。

1) 試験計画書
2) 最終報告書
3) 生データ
4) 対照物質
5) その他必要なもの

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 …… 10

1.3　保管法および安定性の確認 …… 10

2　供試生物 …… 11

3　試験方法 …… 12

3.1　試験条件 …… 12

3.2　希釈水 …… 12

3.3　試験容器および恒温槽等 …… 12

3.4　試験濃度の設定 …… 13

3.5　試験液の調製 …… 14

3.6　試験液の分析 …… 14

3.7　試験操作 …… 14

3.8　結果の算出 …… 15

4　結果および考察 …… 16

4.1　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

4.2　試験液中の被験物質濃度 …… 16

4.3　半数遊泳阻害濃度（EC50） …… 16

4.4　0%阻害最高濃度および 100%阻害最低濃度 …… 16

4.5　試験液の外観および水温，溶存酸素濃度，ｐＨ …… 17

Table 1～8 …… 18～24

Figure 1 …… 25

付属資料－1　赤外吸収スペクトル …… 26～27

付属資料－2　希釈水の組成 …… 28～29

付属資料－3　試験液の調製 …… 30～31

付属資料－4　試験液の分析 …… 32～41

付属資料－5　結果の算出 …… 42～43

要　約

試験委託者

環境省

表題

1,1－ジクロロエチレンのオオミジンコ（*Daphnia magna*）に対する急性遊泳阻害試験

試験番号

Ａ０６００３２

試験方法

本試験は，「新規化学物質等に係る試験の方法について＜藻類生長阻害試験，ミジンコ急性遊泳阻害試験及び魚類急性毒性試験＞」（平成 15 年 11 月 21 日 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 17 年 4 月 1 日）に準拠して実施した。

1) 暴露方式：　半止水式（24時間後に試験液の全量を交換）

2) 暴露期間：　48時間

3) 試験濃度（設定値）：対照区，15.0，22.0，33.0，50.0，75.0 mg/L

公比 1.5

4) 試験液量：　100 mL／容器

5) 連数：　４容器／試験区

6) 供試生物数：　20頭／試験区（５頭／容器）

7) 試験温度：　20±1 ℃

8) 照明：　室内光，16時間明（800 lux 以下）／8時間暗

9) 分析方法：　ガスクロマトグラフィー質量分析（ＧＣ／ＭＳ）

結　　果

1) 試験液中の被験物質濃度

分析の結果，測定値の設定値に対する割合は，試験液調製時において53～69％，その24時間後において42～61％であった。

2) 24時間暴露後の結果

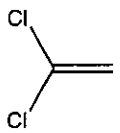
半数遊泳阻害濃度（EC50）：	29.2 mg/L	（95％信頼区間：16.6～47.6 mg/L）
0％阻害最高濃度：	16.6 mg/L	
100％阻害最低濃度：	47.6 mg/L	

3) 48時間暴露後の結果

半数遊泳阻害濃度（EC50）：	15.6 mg/L	（95％信頼区間：14.0～17.3 mg/L）
0％阻害最高濃度：	10.9 mg/L	
100％阻害最低濃度：	47.6 mg/L	

1　被験物質

1.1　名称，構造式および物理化学的性状

被験物質の名称	1,1−ジクロロエチレン		
別名	(略称：ＤＣＥ)		
ＣＡＳ番号	75-35-4		
構造式又は示性式			
分子量	96.94328		
試験に供した物質の純度（％）	99.99%*1		
試験に供した物質のロット番号	02320AD*1		
不純物の名称及び含有率	−		
蒸気圧	6.00E+02 mmHg (25℃)		
対水溶解度	2420 mg/L (25℃)		
1-ｵｸﾀﾉｰﾙ/水分配係数	2.13 (LogKOW)		
融点	-122.5℃		
沸点	31.6℃		
常温における性状	無色透明液体*1		
安定性	−		
溶媒に対する溶解度等	溶媒	溶解度	溶媒中の安定性
	ｱｾﾄﾝ	>1000 mg/L*2	−

上記内容は委託者提供資料による。
ただし*の内容は以下の通り。
*1：供給者提供資料
*2：当社測定値

1. 2　供試試料

供給者：[redacted]

1. 3　保管法および安定性の確認

被験物質は試験期間中，当研究所の試験物質保管用冷蔵庫（保管条件：冷蔵，暗所，窒素封入）内に保管した。試験終了時に，保管した被験物質の赤外吸収スペクトルを測定した。得られたスペクトルは試験開始時に測定したスペクトルと一致したことから，被験物質は保管中安定であったと判断した。赤外吸収スペクトルを付属資料－1に示す。

（装置）フーリエ変換赤外分光分析装置：Nicolet 製 AVATAR 320 型

2　供試生物

1) 一般名：　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±0.14 mg/L，n=16

（最小値～最大値＝0.57～1.02 mg/L）

6) 生育段階：雌の幼体（24時間以内齢）

7) 供試生物を得るための親ミジンコの飼育条件：

飼育水：　Elendt M4（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」（2004）に記載されている調製水）

飼育密度：　１頭／80 mL 飼育水（25頭／2 L）以下

水温：　20±1 ℃

溶存酸素濃度：　飽和濃度の 60%以上

ｐＨ：　6.0～9.0

照明：　室内光，16時間明（800 lux以下）／8時間暗

飼育期間：　2006年 5月10日～2006年 5月31日

暴露開始前２週間の親の死亡率：0%

休眠卵および雄の発生：無し

餌：　*Chlorella vulgaris*（単細胞緑藻類）

給餌量：　0.2 mg C（有機炭素含量）／頭／日

飼育水の交換：　定期的に週３回交換。幼体は毎日除去。

3　試験方法

本試験は，「新規化学物質等に係る試験の方法について＜藻類生長阻害試験，ミジンコ急性遊泳阻害試験及び魚類急性毒性試験＞」（平成 15 年 11 月 21 日 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 17 年 4 月 1 日）に準拠して実施した。

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）
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±１℃
7) 溶存酸素濃度：　飽和濃度の 60％以上。エアレーションなし。
8) ｐＨ：　ｐＨ調整なし
9) 照明：　室内光，16 時間明（800 lux 以下）／8 時間暗
10) 給餌：　無給餌

3.2　希釈水

Elendt M4（2，7）参照）を使用した。組成を付属資料－２に示す。理論的硬度は 250 mg/L（$CaCO_3$ 換算）である。暴露開始時に，硬度（250mg/L 以下，$CaCO_3$ 換算）および ｐＨ（6.0～9.0）が適正範囲内であることを確認した。

3.3　試験容器および恒温槽等

1) 試験容器：　100 mL 容ガラスビーカー（試験液の蒸散，被験物質の揮散防止のために水面をテフロンシートで覆い，さらに試験容器には蓋をした）
2) 恒温槽：　塩ビ製水槽（恒温装置，タイテック製 クールニット CL-80F 型）
3) 水温計：　ハンナ製 チェックテンプ
4) 溶存酸素計：　電気化学計器製 DOL-10 型
5) ｐＨ計：　東亜電波工業製 HM-40V 型
6) 硬度測定キット：　ハック製 HA-DT

7) 電子天秤：　　メトラー製 AG204 型
　　メトラー製 AE163 型
　　メトラー製 AB204-S 型
　　メトラー製 PB3002 型

3.4　試験濃度の設定

試験濃度は，当該被験物質の希釈水に対する溶解度が >1000 mg/L（当社測定値）であるため，試験上限濃度（100 mg/L）以下に設定した。

以下の表に示す予備試験（各２連，10頭／試験区）の結果に基づき，本試験濃度を次のように決定した。

本試験濃度（設定値）：対照区，15.0，22.0，33.0，50.0，75.0 mg/L

公比：1.5

なお，２回の予備試験において暴露開始時の試験液の測定濃度は，それぞれ86.7 mg/L（設定に対して58%，予備試験１），62.6 mg/L（設定に対して83%，予備試験２）であった。本被験物質は，蒸気圧：6×10^{2} mmHg(25℃)，沸点：31.6℃であることから，高い揮散性を有していると考えられる。したがって，設定通りに調製できなかった原因は，揮散による損失と判断した。

予備試験結果１

設定濃度 (mg/L)	暴露開始時の測定濃度 (mg/L)	48時間後の遊泳阻害率 (%)
対照区	-	0
1.50	-	0
15.0	-	0
150	86.7 (58%*)	100**

予備試験結果２

設定濃度 (mg/L)	暴露開始時の測定濃度 (mg/L)	48時間後の遊泳阻害率 (%)
対照区	-	0
7.50	-	0
23.7	-	0
75.0	62.6 (83%*)	100

*設定値に対する割合　　**24時間後に全頭死亡

3.5　試験液の調製

試験液の調製方法を付属資料－３に示す。対照区は希釈水のみとした。調製した試験液を１試験区につき４個の試験容器に各 100 mL 入れた。

なお，調製に用いる原液は用時調製とした。

3.6　試験液の分析

暴露開始時，換水前後および暴露終了時に分析を行った。全試験区の各１試験容器より試験液を採取し分析試料とした。これをガスクロマトグラフィー質量分析（ＧＣ／ＭＳ）により分析した。詳細を付属資料－４に示す。

3.7　試験操作

試験液の水温，溶存酸素濃度，ｐＨ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。その際，ピペット内の飼育水が，全量で試験液量に対して１％以内となるようにした。その後暴露終了時（暴露開始 48 時間後）まで飼育した。

暴露開始後 24 および 48 時間に観察を行い，ミジンコの遊泳阻害数を記録した。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とみなした。

試験液の外観，水温，溶存酸素濃度およびｐＨは，暴露開始時，換水前後および暴露終了時に，全試験区各１試験容器の試験液について記録した。

3.8　結果の算出

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，測定値の平均値（時間加重平均）とした。

平均値の算出方法

$$\overline{mc_n} = \frac{ConcA_n - ConcB_n}{\ln(ConcA_n) - \ln(ConcB_n)}$$

$$\overline{MC} = \frac{\overline{mc_1} + \overline{mc_2} + \cdots + \overline{mc_n}}{n}$$

$\overline{mc_n}$: 各暴露期間の平均測定濃度
$ConcA_n$:試験液調製時の測定濃度
$ConcB_n$:試験液調製後24時間の測定濃度
（$ConcA_n$ と $ConcB_n$ の値が同じ場合は，$\overline{mc_n}=ConcA_n=ConcB_n$ とする。）

$\overline{MC}$: 平均測定濃度

2) 半数遊泳阻害濃度（EC50）の算出

暴露開始後 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（EC50）を決定した。

最高濃度区における阻害率	≧ 50%	< 50%
EC50の決定方法	Probit法，Moving average法，Binomial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。

3) 0%阻害最高濃度および 100%阻害最低濃度の算出

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）および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，暴露開始後24および48時間について可能な限り記録した。

4　結果および考察

4.1　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。

4.2　試験液中の被験物質濃度

試験液中の被験物質濃度の分析結果をTable 1に，代表的なクロマトグラムを付属資料－4に示す。

分析の結果，測定値の設定値に対する割合は，試験液調製時において53～69%，その24時間後において42～61%であった。

4.3　半数遊泳阻害濃度（EC50）

各時間における遊泳阻害率および濃度－遊泳阻害率曲線をそれぞれ Table 2 および Figure 1 に示す。

暴露期間中の遊泳阻害率は，対照区において 0%であった。また，水面に浮いたミジンコは対照区において 0%であり，試験成立条件を満たした。

以上の結果から，半数遊泳阻害濃度(EC50)を Table 3 および以下に，48 時間の算出結果を付属資料－5に示す。

24 時間 EC50：　29.2 mg/L　（ 95%信頼区間：16.6～47.6 mg/L ）

48 時間 EC50：　15.6 mg/L　（ 95%信頼区間：14.0～17.3 mg/L ）

4.4　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 および以下に示す。

24 時間 0%阻害最高濃度：　16.6 mg/L

48 時間 0%阻害最高濃度：　10.9 mg/L

24 時間 100%阻害最低濃度：　47.6 mg/L

48 時間 100%阻害最低濃度：　47.6 mg/L

4.5　試験液の外観および水温，溶存酸素濃度，ｐＨ

試験液の外観を Table 5，水温を Table 6，溶存酸素濃度を Table 7，ｐＨを Table 8 に示す。

すべての試験区において，水温は 20±1℃，溶存酸素濃度は飽和溶存酸素濃度（20.0℃の飽和溶存酸素濃度：8.8mg/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（6.0～9.0）内であった。　以　上

Table 1 Measured Concentration of the Test Substanace in Test Water

(Semi-Static Condition)

Nominal Concentration (mg/L)	Measured Concentration (mg/L) (Percent of Nominal, %)				Mean[a] Measured Concentration (mg/L) (Percent of Nominal, %)
	0 Hour	24 Hours	24 Hours	48 Hours	
	New	Old	New	Old	
Control	<0.0002	<0.0002	<0.0002	<0.0002	–
15.0	8.22 (55)	6.53 (44)	9.40 (63)	7.55 (50)	7.89 (53)
22.0	12.3 (56)	9.22 (42)	12.7 (58)	9.51 (43)	10.9 (50)
33.0	18.2 (55)	14.7 (45)	19.0 (58)	14.7 (45)	16.6 (50)
50.0	26.4 (53)	22.4 (45)	28.3 (57)	24.2 (48)	25.3 (51)
75.0	48.6 (65)	44.6 (59)	52.0 (69)	45.5 (61)	47.6 (63)

a: time weighted mean

New: freshly prepared test solutions

Old: test solutions on 24 hours after preparation of new solutions

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

Nominal Concentration (mg/L)	Mean[a] Measured Concentration (mg/L)	Cumulative Number of Immobilized *Daphnia* (Percent Immobility)	
		24 Hours	48 Hours
Control	—	0 (0)	0 (0)
15.0	7.89	0 (0)	0 (0)
22.0	10.9	0 (0)	0 (0)
33.0	16.6	0 (0)	15 (75)
50.0	25.3	6 (30)	19 (95)
75.0	47.6	20 (100)	20 (100)

a: time weighted mean

Table 3 Calculated EC50 Values

Exposure Period (Hours)	EC50 (mg/L)	95-Percent Confidence Limits (mg/L)	Statistical Method
24	29.2	16.6 — 47.6	Binomial*1
48	15.6	14.0 — 17.3	Probit*1

*1: Using the concentrations of 7.89 – 47.6 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	16.6	47.6
48	10.9	47.6

Table 5 Appearance of Test Solutions

Nominal Concentration (mg/L)	Mean[a] Measured Concentration (mg/L)	Appearance of Test Solutions			
		0 Hour New	24 Hours Old	24 Hours New	48 Hours Old
Control	—	C-	C-	C-	C-
15.0	7.89	C-	C-	C-	C-
22.0	10.9	C-	C-	C-	C-
33.0	16.6	C-	C-	C-	C-
50.0	25.3	C-	C-	C-	C-
75.0	47.6	C-	C-	C-	C-

a: time weighted mean

New: freshly prepared test solutions

Old: test solutions on 24 hours after preparation of new solutions

Color:

C-; colorless

Table 6 Temperature of Test Solutions

Nominal Concentration (mg/L)	Mean[a] Measured Concentration (mg/L)	Temperature (°C)			
		0 Hour New	24 Hours Old	24 Hours New	48 Hours Old
Control	–	20.1	20.1	20.1	20.3
15.0	7.89	20.1	20.2	20.3	20.3
22.0	10.9	20.3	20.3	20.3	20.3
33.0	16.6	20.3	20.3	20.4	20.3
50.0	25.3	20.4	20.3	20.4	20.3
75.0	47.6	20.4	20.3	20.4	20.3

a: time weighted mean

New: freshly prepared test solutions

Old: test solutions on 24 hours after preparation of new solutions

Table 7 Dissolved Oxygen Concentrations in Test Solutions

Nominal Concentration (mg/L)	Mean[a] Measured Concentration (mg/L)	Dissolved Oxygen Concentration (mg/L)			
		0 Hour New	24 Hours Old	24 Hours New	48 Hours Old
Control	–	8.8	8.4	8.7	8.5
15.0	7.89	8.7	8.4	8.6	8.6
22.0	10.9	8.8	8.3	8.6	8.6
33.0	16.6	8.5	8.3	8.4	8.6
50.0	25.3	8.3	8.2	8.3	8.4
75.0	47.6	7.9	8.1	7.8	7.8

a: time weighted mean

New: freshly prepared test solutions

Old: test solutions on 24 hours after preparation of new solutions

Table 8 pH Values of Test Solutions

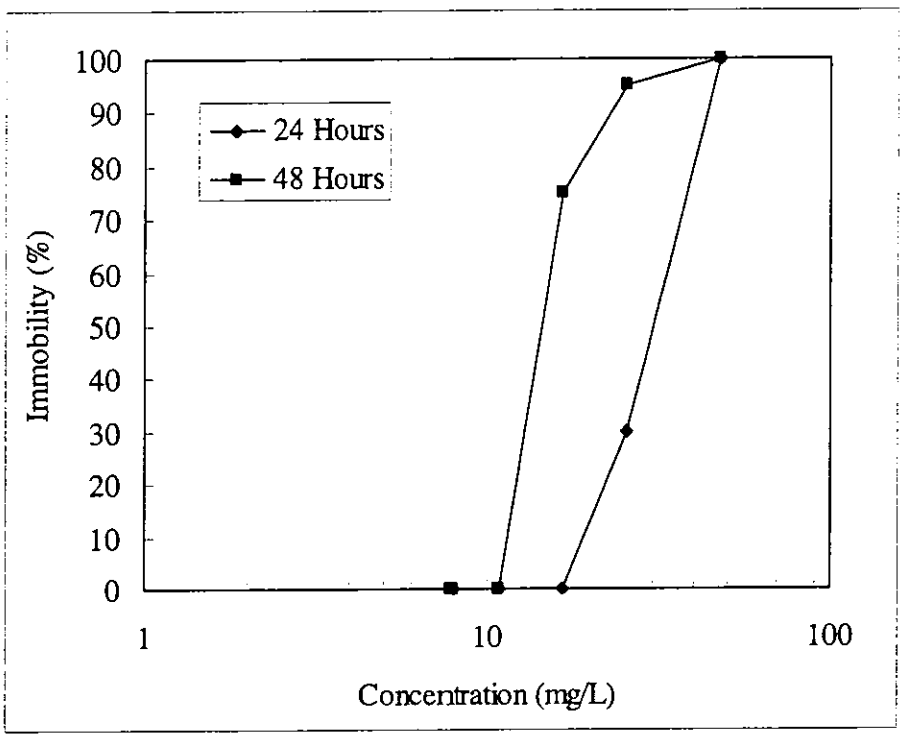
Nominal Concentration (mg/L)	Mean[a] Measured Concentration (mg/L)	pH			
		0 Hour New	24 Hours Old	24 Hours New	48 Hours Old
Control	–	8.3	8.1	8.2	8.1
15.0	7.89	8.2	8.0	8.3	7.9
22.0	10.9	8.0	7.9	8.0	8.0
33.0	16.6	7.9	7.8	7.8	7.9
50.0	25.3	7.7	7.7	7.6	7.6
75.0	47.6	7.6	7.6	7.6	7.4

a: time weighted mean

New: freshly prepared test solutions

Old: test solutions on 24 hours after preparation of new solutions

Figure 1 Concentration-Immobility Curve



付属資料－１

赤外吸収スペクトル

Figure A-1-1 Infrared absorption spectrum of the test substance at the start of the study

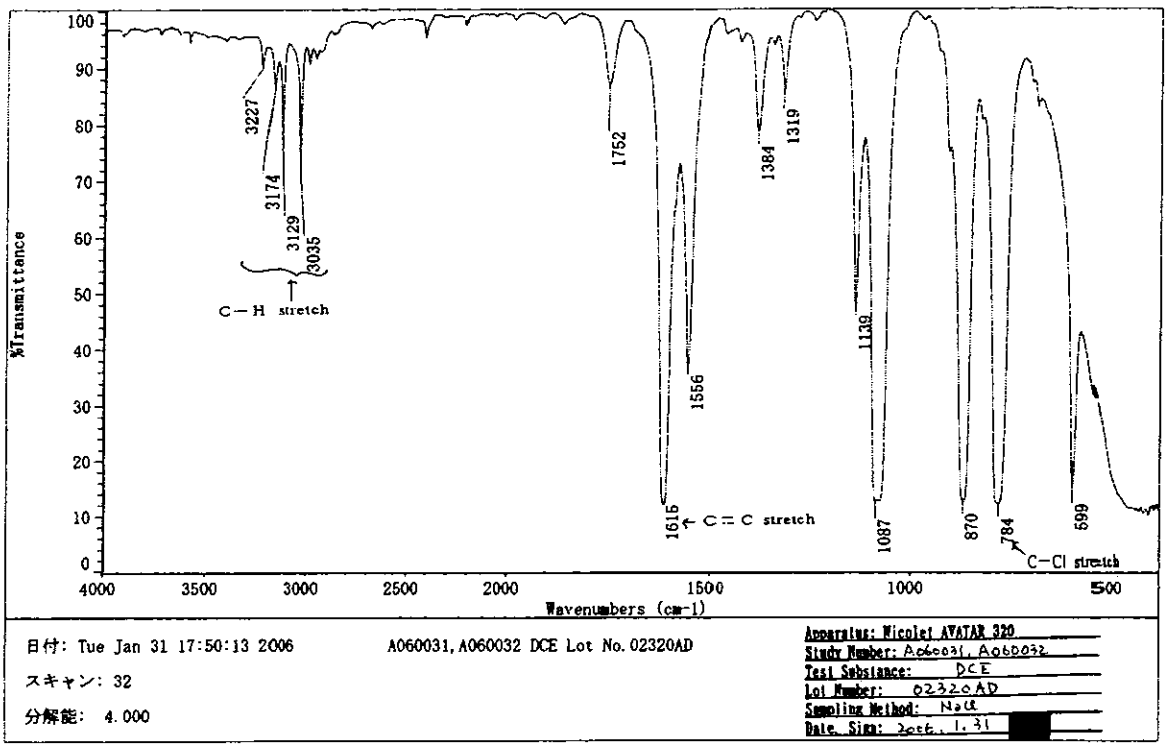
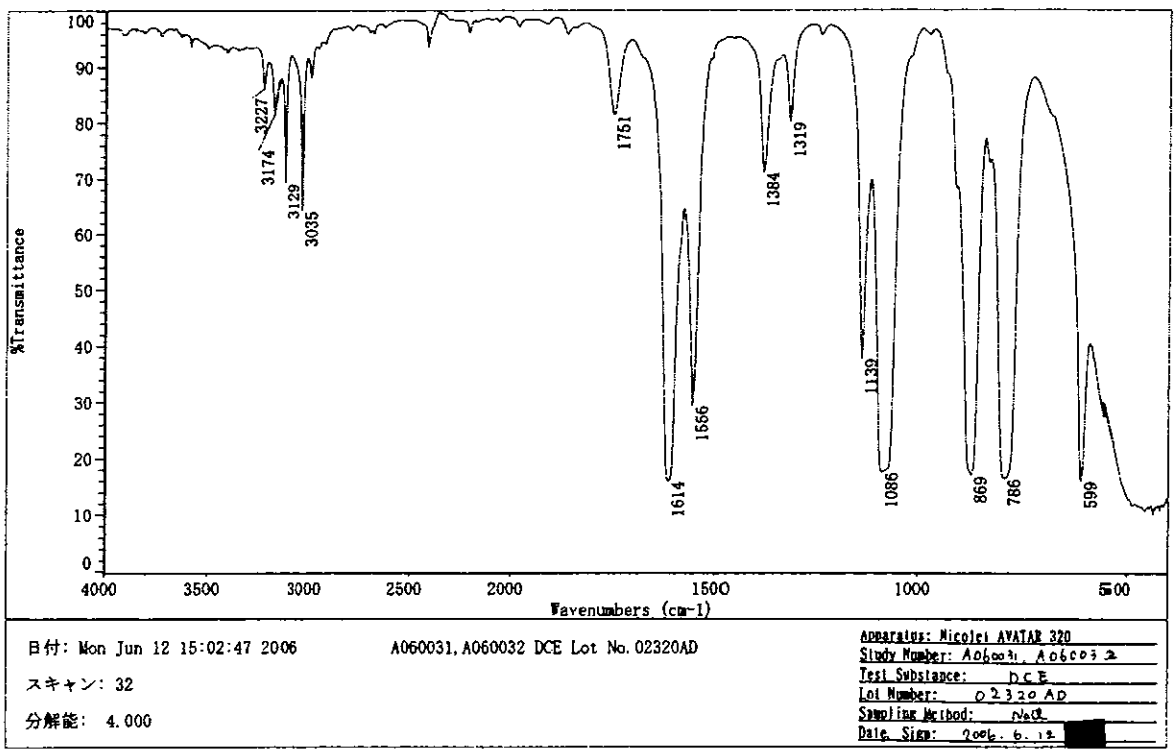


Figure A-1-2 Infrared absorption spectrum of the test substance at the end of the study



付属資料－２

希釈水の組成

Table A-2 Elendt M4 medium recommended by OECD Guideline No.202 used as dilution water

Macro nutrients	Concentration (mg/L)
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	293.8
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	123.3
KCl	5.80
$NaHCO_3$	64.8
$Na_2SiO_3 \cdot 9H_2O$	10.0
$NaNO_3$	0.274
KH_2PO_4	0.143
K_2HPO_4	0.184

Trace elements	Concentration (μg/L)
H_3BO_3	2859.5
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	360.5
LiCl	306.0
RbCl	71.0
$SrCl_2 \cdot 6H_2O$	152.0
NaBr	16.0
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	63.0
$CuCl_2 \cdot 2H_2O$	16.8
$ZnCl_2$	13.0
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	10.0
KI	3.25
Na_2SeO_3	2.19
NH_4VO_3	0.575
$Na_2EDTA \cdot 2H_2O$	2500
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	995.5

Vitamins	Concentration (μg/L)
Thiamine hydrochloride	75.0
Cyanocobalamine (B12)	1.00
Biotine	0.750

付属資料－３

試験液の調製

試験液の調製

1. 準　備

被験物質原液の調製

採取量 ----> 81.1 mg{比重:1.21(20℃)、ﾏｲｸﾛｼﾘﾝｼﾞで67.0μL採取}

溶　媒 ----> 希釈水（十分暴気し20±1℃にしたElendt M4溶液）

最終容量 ----> 1082 mL × 2本

容　器 ----> 三角ﾌﾗｽｺ

濃　度 ----> 75.0 mg/L

混合方式 ----> ｽﾀｰﾗｰ撹拌1分，超音波5分，ｽﾀｰﾗｰ撹拌1分後，密栓

2. 試験液の調製

原液を下記の表の通り採取し，希釈水で希釈して試験液とする。

対照区は希釈水のみとする。

希釈水(最終容量) ----> 0.50 L

容　器 ----> ﾒｽﾌﾗｽｺ

混合方式 ----> 手で転倒撹拌，密栓

濃度公比 ----> 1.50

(以下の濃度表示は，最小桁数に合わせている)

設定試験濃度 mg/L	区No. (略称)		原液 mL
対照区	C	---->	0
15.0	Conc.1	---->	100
22.0	Conc.2	---->	147
33.0	Conc.3	---->	220
50.0	Conc.4	---->	333
75.0	Conc.5	---->	500

付属資料－４

試験液の分析

1　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プラ付き）No.2

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

ﾍｯﾄﾞｽﾍﾟｰｽｻﾝﾌﾟﾗ(HSS)：　Agilent Technologies G1888 型

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

データ処理部：　MSD ｹﾐｽﾃｰｼｮﾝ（Windows xp）

（条件）

[GC 条件]

カラム：　Agilent　HP-AL/S 30m×0.25mm×5μm

キャリアーガス：ヘリウム　1.1mL/min(Constant flow)

オーブン温度：　90℃(2min)→20℃/min→180℃(3min)

注入口温度：　200℃

ＭＳインターフェース温度：180℃

注入条件：　スプリット（ｽﾌﾟﾘｯﾄ比=80:1）

注入量：　1.0mL（HSS ｻﾝﾌﾟﾙﾙｰﾌﾟ容量）

[HSS 条件]

温度条件：　Oven　60℃, LOOP　120℃, Transfer Line　200℃

イベント時間：　GC Cycle Time　18min

Vial Equilibration Time　20min

Pressurization Time　0.2min

Loop Fill Time　0.03min

Loop Equilibration Time　0.2min

Inject Time　1min

バイアルパラメータ：Shake (HIGH)

[MSD 条件]

温度条件：　イオン源 200℃，四重極マス・フィルタ 150℃

SIM (Selected Ion Monitoring) 条件：

Solvent Delay　4min

Filament off　6min

Quant ion　m/z 61.0, m/z 96.0, m/z 98.0 の TIC

2　検量線

アセトンを用い，0，1.00～100 mg/Lの標準溶液を調製した。標準溶液の分析を以下のように行った。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-4-1に示す。

精製水*1　10 mL
＋
標準溶液　0.1 mL
|
混合
|
ＧＣ／ＭＳ測定*2

*1：JIS K 0557 A4グレードの水

*2：測定値は標準溶液濃度の1/100の値となる。

3　検出限界

最小検出ピーク面積を 1000 countに設定し，これに相当する試験液中の被験物質濃度0.0002 mg/Lを検出限界とした。

4　試験液の分析方法

1）試験液を以下のように分析した。代表的なクロマトグラムを Figure A-4-2 (2)，(3)，(4)，(5)，(7)，(8)，(9)，(10)に示す。

精製水*
＋
アセトン　0.1 mL
＋
試験液*
|
混合
|
ＧＣ／ＭＳ測定

*：精製水と試験液の比率を変えることによって被験物質濃度を検量線範囲に入るように希釈する。採取量の合計は 10 mL とする。ただし，対照区は希釈せず，試験液 10 mL（精製水：0 mL）を採取する。

2）標準溶液を「2　検量線」と同様に分析した。代表的なクロマトグラムを Figure A-4-2 (1), (6) に示す。

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。

5　添加回収試験

分析前処理は，「4　試験液の分析方法」に示したように試験液と精製水，アセトンを混合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，回収率による被験物質濃度の補正は行わなかった。

Figure A-4-1 Calibration curve

No.	Concentration (mg/L)	Peak Area (count)
1	0.00	0
2	0.01	92012
3	0.02	184320
4	0.05	478437
5	0.10	934177
6	0.20	1803908
7	0.50	4606498
8	1.00	9237439

Y= 9,227,487X
r= 1.00

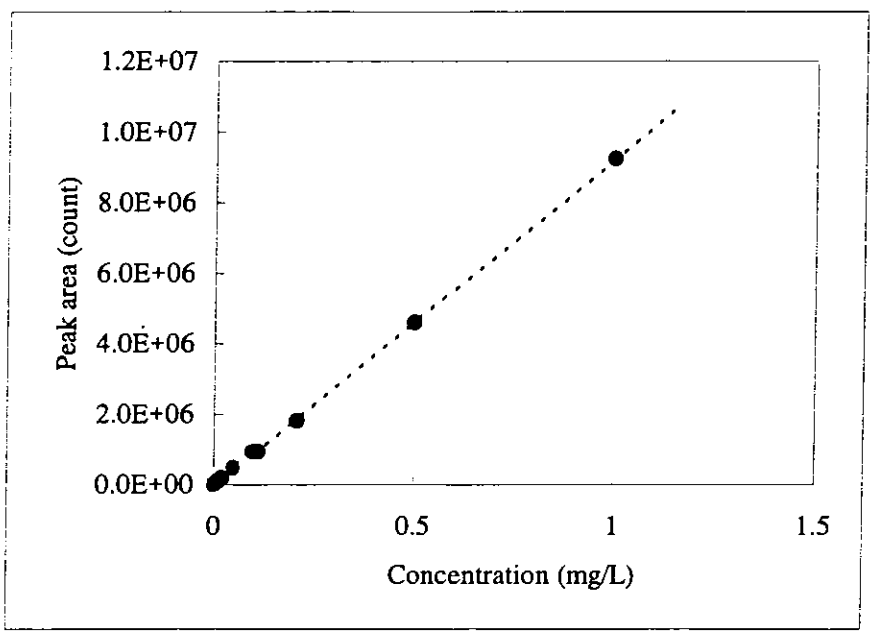
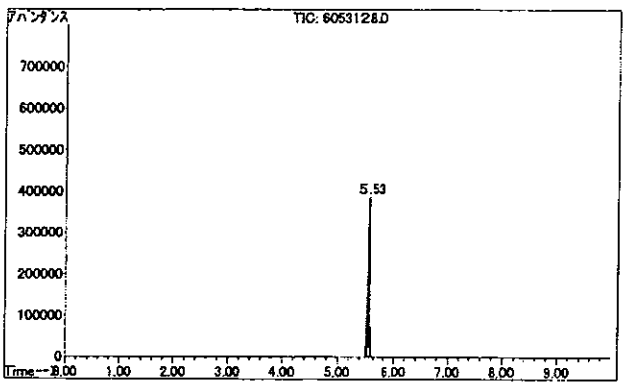


Figure A-4-2 Representative chromatograms

(1) Standard 0.50 mg/L ; 0 Hour

```
Study No.          :A060032
Date               :2006.05.31
Operator           :[redacted]
Sample Information:DCE
Sample Name        :STD 0.5mg/L
Misc Info          :
File Name          :C:¥MSDChem¥1¥DATA¥dce¥6053128.D
Acquired           :31 May 2006  18:13     using AcqMethod DCE
```

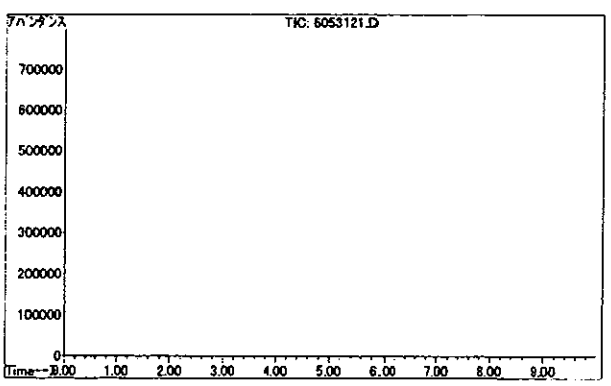


TIC: 6053128.D

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	5.529	M	0.020	4820401	5.495	5.580

(2) Control ; 0 Hour – New

```
Study No.          :A060032
Date               :2006.05.31
Operator           :[redacted]
Sample Information:DCE
Sample Name        :DAPOHC
Misc Info          :
File Name          :C:¥MSDChem¥1¥DATA¥dce¥6053121.D
Acquired           :31 May 2006  16:04     using AcqMethod DCE
```



TIC: 6053121.D

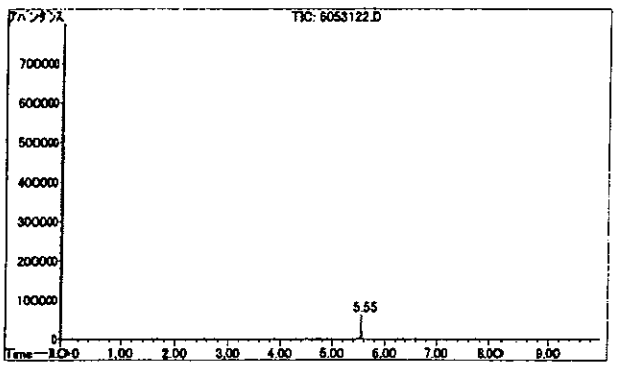
ピーク#	リテンションタイム	タイプ	半値幅	面積	開始時間	終了時間

ピークが検出できません

Figure A-4-2 Continued

(3) 15.0 mg/L nominal ; 0 Hour – New

Study No. :A060032
Date :2006.05.31
Operator :[redacted]
Sample Information:DCE
Sample Name :DAPOHCI
Misc Info :
File Name :C:¥MSDChem¥1¥DATA¥dce¥6053122.D
Acquired :31 May 2006 16:23 using AcqMethod DCE

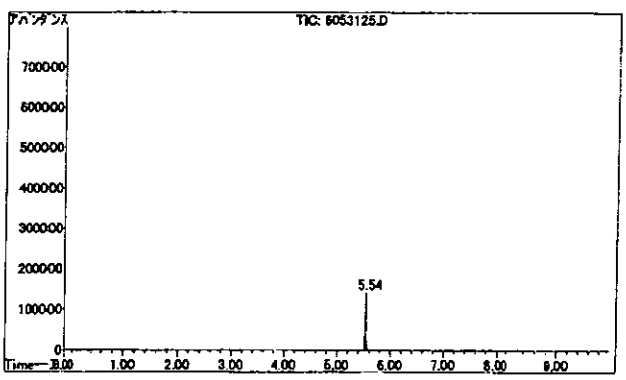


TIC: 6053122.D

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	5.548	M	0.020	777954	5.511	5.609

(4) 33.0 mg/L nominal ; 0 Hour – New

Study No. :A060032
Date :2006.05.31
Operator :[redacted]
Sample Information:DCE
Sample Name :DAPOHC3
Misc Info :
File Name :C:¥MSDChem¥1¥DATA¥dce¥6053125.D
Acquired :31 May 2006 17:18 using AcqMethod DCE



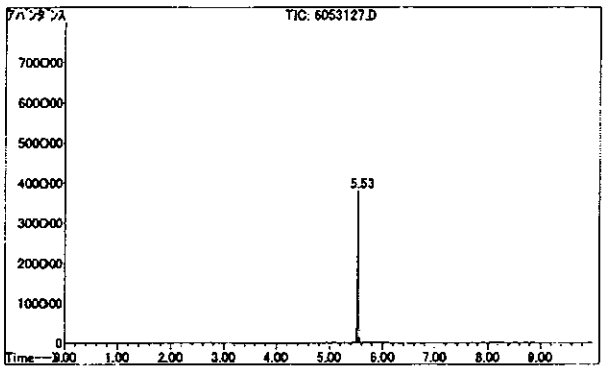
TIC: 6053125.D

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	5.538	M	0.020	1724596	5.506	5.589

Figure A-4-2 Continued

(5) 75.0 mg/L nominal ; 0 Hour – New

```
Study No.          :A060032
Date               :2006.05.31
Operator           :[redacted]
Sample Information:DCE
Sample Name        :DAPOHC5
Misc Info          :
File Name          :C:¥MSDChem¥1¥DATA¥dce¥6053127.D
Acquired           :31 May 2006  17:55     using AcqMethod DCE
```

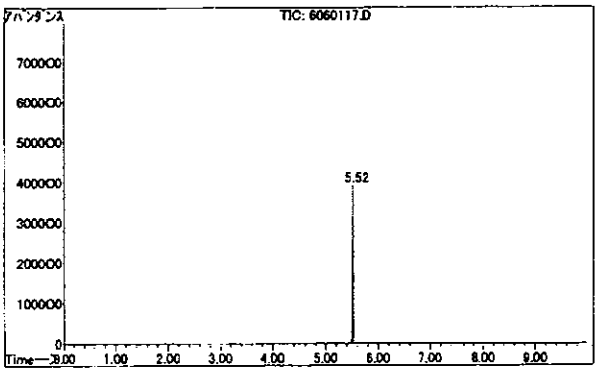


TIC: 6053127.D

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	5.531	M	0.020	4682087	5.497	5.583

(6) Standard 0.50 mg/L ; 24 Hours –Old

```
Study No.          :A060032
Date               :2006.06.01
Operator           :[redacted]
Sample Information:DCE
Sample Name        :STD 0.5mg/L
Misc Info          :
File Name          :C:¥MSDChem¥1¥DATA¥dce¥6060117.D
Acquired           : 1 Jun 2006  21:15     using AcqMethod DCE
```



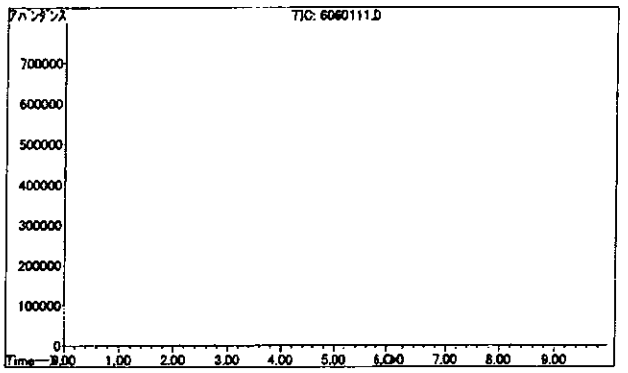
TIC: 6060117.D

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	5.516	M	0.020	4792100	5.480	5.574

Figure A-4-2 Continued

(7) Control ; 24 Hours – Old

Study No. :A060032
Date :2006.06.01
Operator :[redacted]
Sample Information:DCE
Sample Name :DAP24HC-old
Misc Info :
File Name :C:¥MSDChem¥1¥DATA¥dce¥6 060111.D
Acquired : 1 Jun 2006 19:25 using AcqMethod DCE

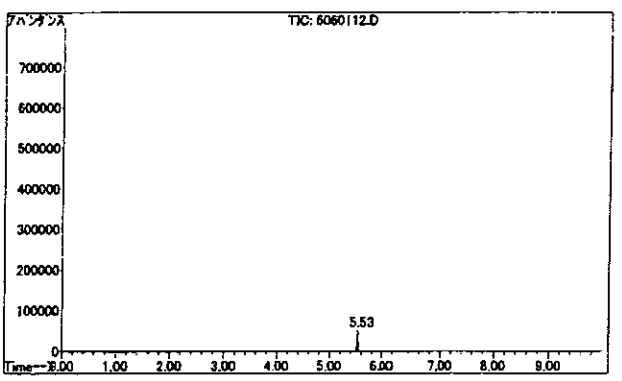


TIC: 6060111.D

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) 15.0 mg/L nominal ; 24 Hours – Old

Study No. :A060032
Date :2006.06.01
Operator :[redacted]
Sample Information:DCE
Sample Name :DAP24HCl-old
Misc Info :
File Name :C:¥MSDChem¥1¥DATA¥dce¥60 60112.D
Acquired : 1 Jun 2006 19:43 using AcqMethod DCE



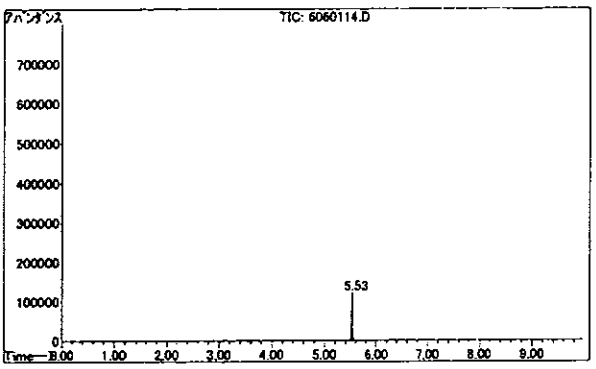
TIC: 6060112.D

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	5.534	M	0.020	646272	5.501	5.587

Figure A-4-2 Continued

(9) 33.0 mg/L nominal ; 24 Hours – Old

Study No. :A060032
Date :2006.06.01
Operator :[redacted]
Sample Information:DCE
Sample Name :DAP24HC3-old
Misc Info :
File Name :C:¥MSDChem¥1¥DATA¥dce¥6060114.D
Acquired : 1 Jun 2006 20:20 using AcqMethod DCE

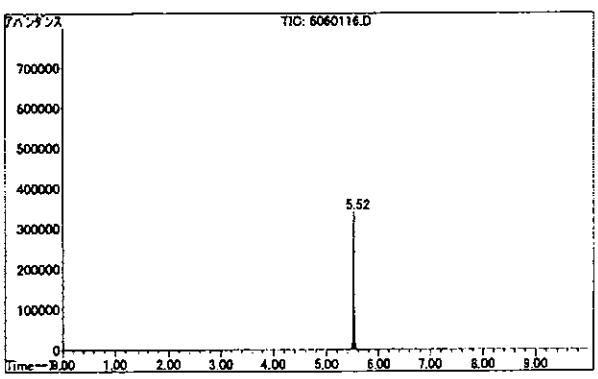


TIC: 6060114.D

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	5.526	M	0.020	1459013	5.490	5.581

(10) 75.0 mg/L nominal ; 24 Hours – Old

Study No. :A060032
Date :2006.06.01
Operator :[redacted]
Sample Information:DCE
Sample Name :DAP24HC5-old
Misc Info :
File Name :C:¥MSDChem¥1¥DATA¥dce¥6060116.D
Acquired : 1 Jun 2006 20:57 using AcqMethod DCE



TIC: 6060116.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	5.519	M	0.020	4270626	5.484	5.573

付属資料－5

結果の算出

Table A-5 Calculation of the EC50 (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	7.89	20	0	0	9.53674E-05
Conc. 2	10.9	20	0	0	9.53674E-05
Conc. 3	16.6	20	15	75	2.069473267
Conc. 4	25.3	20	19	95	0.002002716
Conc. 5	47.6	20	20	100	9.53674E-05

THE BINOMIAL TEST SHOWS THAT 10.9 AND 16.6 CAN BE
USED AS STATISCALLY SOUND CONSERVATIVE 95 PERCENT
CONFIDENCE LIMITS SINCE THE ACTUAL CONFIDENCE LEVEL
ASSOCIATED WITH THESE LIMITS IS 97.9304313659668 PERCENT.
AN APPROXIMATE LC50 FOR THIS SET OF DATA IS 14.8239682857766

>>>>>>>>RESULTS CALCULATED USUNG THE MOVING AVERAGE METHOD

SPAN	G	EC50	95 PERCENT COFIDENCE LIMITS		
4	0.088453338	17.06884201	14.79129031	AND	20.1302444

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

ITERATIONS	G	H	GOODNESS OF FIT PROBABILITY
9	0.168341771	1	0.14862368

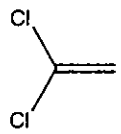
SLOPE = 10.90157647
95 PERCENT CONFIDENCE LIMITS= 6.428717028 AND 15.37443591

EC50 = 15.55553785
95 PERCENT CONFIDENCE LIMITS= 13.99911124 AND 17.31875454

EC1 = 9.51587939
95 PERCENT CONFIDENCE LIMITS= 6.63174934 AND 11.21271071

ミジンコ急性遊泳阻害試験結果報告書

1．一般的事項

被験物質の名称	1,1−ジクロロエチレン		
別名	(略称：ＤＣＥ)		
ＣＡＳ番号	75-35-4		
構造式又は示性式			
分子量	96.94328		
試験に供した物質の純度（％）	99.99%		
試験に供した物質のロット番号	02320AD		
不純物の名称及び含有率	−		
蒸気圧	6.00E+02 mmHg (25℃)		
対水溶解度	2420 mg/L (25℃)		
1-ｵｸﾀﾉｰﾙ/水分配係数	2.13 (LogKOW)		
融点	-122.5℃		
沸点	31.6℃		
常温における性状	無色透明液体		
安定性	−		
溶媒に対する溶解度等	溶媒	溶解度	溶媒中の安定性
	ｱｾﾄﾝ	>1000 mg/L*	−

上記内容は[redacted]提供資料による。
ただし*の内容は以下の通り。
*：当社測定値

2．試験溶液の被験物質濃度の分析方法

項　　目	方　　法
分析方法	各試験液をガスクロマトグラフィー質量分析（ＧＣ／ＭＳ）により分析した。
前処理法	精製水* ＋ アセトン　0.1 mL ＋ 試験液* ｜ 混合 ｜ ＧＣ／ＭＳ測定 *：精製水と試験液の比率を変えることによって被験物質濃度を検量線範囲に入るように希釈する。採取量の合計は 10 mL とする。ただし，対照区は希釈せず，試験液 10 mL（精製水： 0 mL）を採取する。
定量条件	別紙－１参照

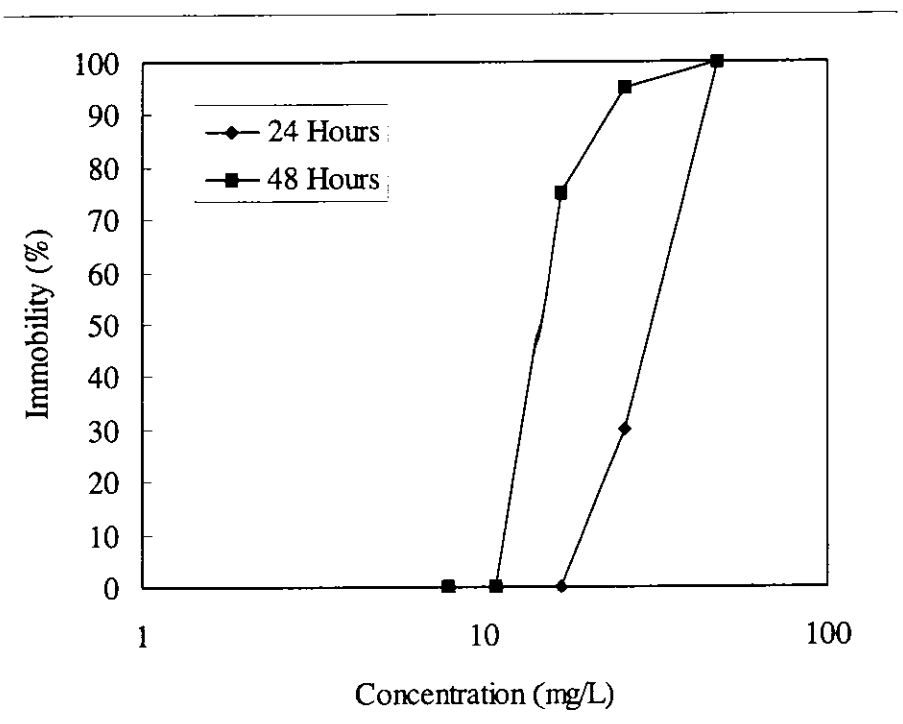
3．試験材料及び方法

項　目			内　容
試験生物	種（学名・系統・時間齢）		オオミジンコ（*Daphnia magna*・24時間以内齢）
	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）
	対照物質への感受性 (EC50) (対照物質名)		48時間 EC50＝0.75±0.14mg/L, n=16 基準物質（重ｸﾛﾑ酸ｶﾘｳﾑ）による
飼育	飼育水の種類		OECD化学品ﾃｽﾄｶﾞｲﾄﾞﾗｲﾝ No.202（2004）に記載されている調製水（Elendt M4）
	環境条件（水温，明暗周期）		20±1 ℃ 16時間明（800 lux以下）/ 8時間暗
試験条件	試験容器		100 mL容ｶﾞﾗｽﾋﾞｰｶｰ（水面をﾃﾌﾛﾝｼｰﾄで覆う）
	試験用水	種類（天然水，脱塩素水道水，人工調製水等）	OECD化学品ﾃｽﾄｶﾞｲﾄﾞﾗｲﾝ No.202（2004）に記載されている調製水（Elendt M4）
		硬度	250mg/L 以下（$CaCO_3$換算）
		pH	6.0～9.0
	暴露期間		2006年 5月31日～2006年 6月 2日
	試験濃度（設定値）		対照区，15.0，22.0，33.0，50.0，75.0 mg/L （公比：1.5）
	供試数		5頭／試験容器
	連数	試験濃度区	4容器
		対照区	4容器
	試験溶液量		100 mL／容器
	助剤	助剤の有無	無し
		種類	－
		濃度	－
		助剤対照区の連数	－
	試験方式（止水，半止水，流水等）		半止水式
	換水又は流水条件		24時間後に試験液の全量を交換
	水温		20±1 ℃
	溶存酸素濃度（DO）		飽和濃度の60％以上 （20.0℃の飽和溶存酸素濃度：8.8mg/L）
	明暗周期		16時間明（800 lux以下）/8時間暗
結果の算出方法	EC50		Probit （Probit法，Moving average法，Binomial法での算出結果から適切と判断されたものを採用）

4．試験結果及び考察

項　目	内容
毒性値	48hEC50＝15.6 mg/L
試験濃度	1. 設定値 (2.)実測値
考察及び特記事項	特になし

5．ミジンコの濃度－遊泳阻害率曲線



6．その他

試験実施施設	名　　称	株式会社三菱化学安全科学研究所 横浜研究所
	所　在　地	神奈川県横浜市青葉区鴨志田町1000番地 電話　045(963)3541 FAX　045(961)6296
試験責任者	職　氏　名	研究員 [redacted]
	経験年数	8年
試験番号	A060032	
試験期間	2006年　5月22日～2006年　7月21日	

作成責任者	所　属	株式会社三菱化学安全科学研究所 横浜研究所
	氏　名	[redacted]

別紙－1　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プラ付き）No.2

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

ﾍｯﾄﾞｽﾍﾟｰｽｻﾝﾌﾟﾗ(HSS)：　Agilent Technologies G1888 型

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

データ処理部：　MSDｹﾐｽﾃｰｼｮﾝ（Windows xp）

（条件）

[GC 条件]

カラム：　Agilent　HP-AL/S 30m×0.25mm×5μm

キャリアーガス：ヘリウム　1.1mL/min(Constant flow)

オーブン温度：　90℃(2min)→20℃/min→180℃(3min)

注入口温度：　200℃

ＭＳインターフェース温度：180℃

注入条件：　スプリット（ｽﾌﾟﾘｯﾄ比=80:1）

注入量：　1.0mL（HSS ｻﾝﾌﾟﾙﾙｰﾌﾟ容量）

[HSS 条件]

温度条件：　Oven　60℃, LOOP　120℃, Transfer Line　200℃

イベント時間：　GC Cycle Time　18min

Vial Equilibration Time　20min

Pressurization Time　0.2min

Loop Fill Time　0.03min

Loop Equilibration Time　0.2min

Inject Time　1min

バイアルパラメータ：Shake (HIGH)

[MSD 条件]

温度条件：　イオン源 200℃, 四重極マス・フィルタ 150℃

SIM (Selected Ion Monitoring) 条件：

Solvent Delay　4min

Filament off　6min

Quant ion　m/z 61.0, m/z 96.0, m/z 98.0 の TIC