

環境庁殿

## 試 験 報 告 書

トリクロロエチレンのヒメダカ (*Oryzias latipes*) に対する延長毒性試験－21日間

(試験番号：5 B 4 5 5 G)

1996年 3月29日作成

株式会社三菱化学安全科学研究所

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

修正番号：01

## 試験報告書 修正書

試験委託者：環境省

表題：トリクロロエチレンのヒメダカ (*Oryzias latipes*) に対する  
延長毒性試験－21日間

試験番号：5B455G

### 修正内容

修正箇所：13頁、3.5 試験液の調製、表中の定容量の値

修正前：1000

修正後：500

### 理由

記載ミス

---

試験実施施設：株式会社三菱化学安全科学研究所 横浜研究所

2002年 3月 8日 作成 試験責任者

2002年 3月 8日 確認 信頼性保証業務担当者

2002年 3月 8日 承認 運営管理者

# 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： 環境庁

表題： トリクロロエチレンのヒメダカ (*Oryzias latipes*) に対する  
延長毒性試験－21日間

試験番号： 5 B 4 5 5 G

本試験は環境庁のGLP規則に従って実施したものである。

1996年 3月29日

運営管理者

## 信 頼 性 保 証 証 明

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： 環境庁

表題： トリクロロエチレンのヒメダカ (*Oryzias latipes*) に対する  
延長毒性試験－21日間

試験番号： 5 B 4 5 5 G

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通り確認した。

### 記

	実施日	運営管理者および 試験責任者への報告日
試験実施状況査察	1996年 2月 5日	1996年 2月 5日
	1996年 2月26日	1996年 2月26日
試験報告書監査	1996年 3月29日	1996年 3月29日

1996年 3月29日

信頼性保証担当者：

[Redacted Signature Block]

## 試験実施概要

1. 表題： トリクロロエチレンのヒメダカ (*Oryzias latipes*) に対する  
延長毒性試験－21日間
2. 試験目的： トリクロロエチレンについて、ヒメダカ (*Oryzias latipes*) に対する延長毒  
性試験－21日間を行いヒメダカに対する致死、その他の観察される影響の  
閾値および最大無作用濃度 (NOEC) を求める。
3. 適用ガイドライン： 本試験は、OECD 化学品テストガイドライン No. 204「魚類延長毒性試験－  
14日間」(1984年) に準拠して実施した。
4. 適用GLP： 本試験は環境庁のGLP規則に準拠した。
5. 試験委託者  
名称： 環境庁  
住所： 〒100 東京都千代田区霞ヶ関一丁目2-2  
委託担当者： 環境庁企画調整局環境保健部環境安全課保健専門官 XXXXXXXXXX
6. 試験受託者：  
名称： 株式会社三菱化学安全科学研究所  
所在地： 〒105 東京都港区芝二丁目1-30
7. 試験施設：  
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： 〒227 神奈川県横浜市青葉区鴨志田町1000番地

8. 試験関係者：

試験責任者 [redacted] [redacted] (1996年 3月29日)

試験担当者 [redacted] [redacted] (1996年 3月29日)

[redacted] [redacted] (1996年 3月29日)

分析担当者 [redacted] [redacted] (1996年 3月29日)

9. 試験期間： 試験開始日 1995年10月23日  
試験終了日 1996年 3月29日  
暴露期間 1996年 2月 5日～1996年 2月26日

10. 保管：

試験計画書，生データ，記録文書，試験報告書および被験物質は，試験報告書作成後  
10年間，株式会社三菱化学安全科学研究所 横浜研究所の保管施設に保管する。その後  
の保管については試験委託者と協議のうえ決定する。

# 目 次

頁

要 旨	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	11
3 試験方法	11
3.1 試験条件	11
3.2 希釈水	12
3.3 試験装置, 試験容器および恒温槽等	12
3.4 試験濃度の設定	12
3.5 試験液の調製	12
3.6 試験液の分析	13
3.7 試験操作	13
4 結果の算出	14
4.1 最小致死濃度, 最小作用濃度, 最大無作用濃度	14
4.2 半数致死濃度 (LC50) の算出	14
5 結果および考察	15
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	15
5.2 試験液中の被験物質濃度	15
5.3 半数致死濃度 (LC50)	15
5.4 毒性症状および摂餌状況	15
5.5 供試魚の体重および体長	15
5.6 最小致死濃度, 最小作用濃度	16
5.7 最大無作用濃度	16
5.8 試験液の水溫, 溶存酸素濃度および pH	16
Table 1~9	17~27
Figure 1	28
付属資料-1 希釈水の水質	29~30
付属資料-2 試験液の分析方法	31~40

## 要 旨

### 試験委託者

環境庁

### 表 題

トリクロロエチレンのヒメダカ (*Oryzias latipes*) に対する延長毒性試験－21日間

### 試験番号

5 B 4 5 5 G

### 試験方法

本試験は、OECD 化学品テストガイドライン No. 204 「魚類延長毒性試験－14日間」(1984年) に準拠して実施した。

- 1) 被験物質： トリクロロエチレン
- 2) 暴露方式： 流水式 (定量ポンプを用いる連続希釈装置を使用)
- 3) 供試生物： ヒメダカ (*Oryzias latipes*)
- 4) 暴露期間： 21日間
- 5) 試験濃度 (設定値)： 対照区, 助剤対照区, 0.19, 0.50, 1.26, 3.16, 7.94  
および20.37mg/L (公比: 2.5)  
助剤最高濃度: 97.8mg/L, 2-メトキシエタノールおよびHCO-30使用, 助剤濃度等比
- 6) 試験液量: 35L/日 (24.55mL/min, 5.0L容ガラスビーカー使用)
- 7) 連数: 1 容器/濃度区
- 8) 供試生物数: 20尾/濃度区
- 9) 照明: 16時間明/8時間暗
- 10) 試験温度: 24±1℃
- 11) 試験液の分析: GC法

### 結 果

- 1) 試験液中の被験物質濃度: 試験区で設定濃度の±20%を越える分析結果があったため, 以下の値は測定濃度の算術平均値を基に示した。
- 2) 7日間の半数致死濃度 (LC50): >20mg/L
- 3) 14日間の半数致死濃度 (LC50): >20mg/L
- 4) 21日間の半数致死濃度 (LC50): >20mg/L
- 5) 21日間の最小致死濃度: 20mg/L



6) 21日間の最小作用濃度： 6.4mg/L

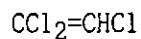
7) 21日間の最大無作用濃度 (NOEC)： 2.7mg/L

## 1 被験物質

### 1.1 名称、構造式および物理化学的性状

名称： トリクロロエチレン

構造式：



分子式：  $\text{C}_2\text{HCl}_3$

分子量\*1： 131.39

水への溶解度\*2： 1100 ppm (25 °C) , 160 ppm (25 °C)

蒸気圧\*2： 60 mmHg (20 °C)

融点\*2： -86.4 °C

沸点\*2： 86.7 °C

密度\*1： 1.464 g/mL (20 °C)

\*1:供給者提供資料

\*2:環境化学物質要覧—環境庁環境化学物質研究会編，丸善（昭和63年）

### 1.2 供試試料

純度\*1： 99.9 %

水分\*1： 0.002 %

不揮発物\*1： 0.001 %以下

ロット番号\*1： ESL3504

供給者：

供給量\*1： 500 mL

入手日： 1995年10月2日

外観\*1： 無色澄明液体

\*1: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

被験物質は当研究所の冷蔵庫に保管した。

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、被験物質の構造と矛盾が認められないことを確認した。試験終了時にも同様に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無かったことより被験物質は保管中安定であったと判断された。

## 2 供試生物

- 1) 一般名： ヒメダカ
- 2) 学名： *Oryzias latipes*
- 3) 被鱗体長： 2.1 cm (1.9~2.2cm), n=10
- 4) 体重： 0.18 g (0.12~0.25g), n=10
- 5) 供給源： 新倉養魚場 (神奈川県伊勢原市下谷1217)
- 6) 入手日： 1995年10月25日

### 馴化

試験条件と同条件 (水質, 温度等) で45日間, 飼育馴化した。餌は市販のテトラミン<sup>®</sup>を与えた。暴露開始の24時間前からは給餌しなかった。試験には肉眼的に健康で正常な個体を使用した。暴露開始前7日間の死亡率は5%以下であった。また, 基準物質 (硫酸銅 (II) 五水和物, 試薬特級) による96時間の半数致死濃度 (LC50) は0.88mg/Lであった。この供試魚は暴露開始の45日前に疾病予防処置としてエルバージュ<sup>®</sup>により薬浴を行った。薬浴は流水条件下で行い有効濃度に暴露された時間は約4時間であった。

エルバージュ<sup>®</sup>: 有効成分, ニフルチン酸ナトリウム 上野製薬(株)

## 3 試験方法

### 3.1 試験条件

- 1) 暴露方式： 流水式 (定量ポンプを用いる連続希釈装置を使用, 被験物質の水中からの揮発を防止するため水面をテフロンシートで覆った)
- 2) 暴露期間： 21日間
- 3) 試験液量： 35L/日 (24.55mL/min, 5.0L容ガラスビーカー使用)
- 4) 連数： 1容器/濃度区
- 5) 供試生物数： 20尾/濃度区
- 6) エアレーション： 無し
- 7) 試験温度： 24±1℃
- 8) 照明： 16時間明/8時間暗
- 9) 給餌： 市販のテトラミンを毎日魚体重の2%与えた

### 3.2 希釈水

脱塩素水（横浜市水道水を活性炭処理し、残留塩素等を除去した後、充分通気したもの）を使用した。希釈水の硬度は50mg/L（CaCO<sub>3</sub>換算）、pHは7.9であった。

[付属資料-1]

### 3.3 試験装置、試験容器および恒温槽等

流水式試験装置： 流水式試験装置は試験水槽（5.0L容ガラスビーカー、180 mm φ × 270 mm）に約12 cmの排水用のガラスサイホンを取り付け24℃の恒温水槽に設置した。これに下記に示した定量ポンプにより希釈水を24.5 mL/min、ストック溶液を0.05 mL/minの流速で供給した。合計流量は24.55 mL/minとなり試験水槽の換水率は約7回/日となった。

#### 1) 希釈水ポンプ

モーター（駆動部）： Cole-Parmer製 MASTERFLEX<sup>®</sup> 7543-30

ポンプヘッド： Cole-Parmer Inst. Co. MASTERFLEX<sup>®</sup> 7016-20

チューブ： Cole-Parmer Inst. Co. MASTERFLEX<sup>®</sup> Silicone 6400-16

#### 2) ストック溶液ポンプ

日本精密科学製 ミニカルポンプ SP-D-2501(S)

#### 3) 試験容器： 5.0L 容ガラスビーカー

#### 4) 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）

#### 5) 水温計： 横河電機製 2455 02

#### 6) pH計： 東亜電波製 HM-40V

#### 7) 溶存酸素計： 電気化学計器 DOL-10

### 3.4 試験濃度の設定

急性毒性試験の結果をもとに濃度範囲を決定した。試験の最高濃度は96時間-LC50付近の濃度とした。96時間-LC50は38 mg/Lであったことより、0.19, 0.50, 1.26, 3.16, 7.94および20.37mg/L（公比：2.5）の6濃度区を設定した。

### 3.5 試験液の調製

被験物質10000mgに2-メキセタノールを10.0g添加し溶解した。この溶液に分散助剤（HCO-30）を38.0g添加し良く混合した後、純水で1000mLに定容した（被験物質濃度：10000 mg/L）。助剤原液は2-メキセタノールを30.0gと分散助剤（HCO-30）を114.0gをよく混合した後、純水で3000mLに定容して調製した。被験物質原液と助剤原液の下記に示した量を採取し、希釈水で

500mLに定容としストック溶液とした。助剤対照区のストック溶液は2-メキセタノールを30.0gと分散助剤（HC0-30）を114.0g添加し良く混合した後、純水で3000mLに定容とした。

試験濃度 mg/L	被験物質原液 添加量, mL	助剤原液 添加量, mL	定容量 mL	ストック溶液濃度 mg/L
対照区	0	0	1000	0
助剤対照区	0	3000	3000	0
0.19	4.75	495	1000	95
0.50	12.25	488	1000	245
1.26	31	469	1000	620
3.16	77.5	423	1000	1550
7.94	195	305	1000	3900
20.37	500	0	1000	10000

### 3.6 試験液の分析

開始時（0日）、7日、14日および21日に各試験水槽より試験液5.0mLを採取しヘキサンで抽出後、GCで分析した。試験液の分析に際しては、試料測定毎に標準溶液の測定を行い、そのピーク面積比から定量した。詳細は付属資料-2に示した。

### 3.7 試験操作

暴露開始時に供試魚と同水槽で馴養した魚10尾の重量および被鱗体長を測定し、被鱗体長で  $2.0 \pm 0.5$  cmであることを確認した。各試験水槽の試験液の水温、溶存酸素濃度、pHを測定後、試験水槽中に供試魚を1濃度区当り20尾投入した。

暴露開始後、最低週2回各試験水槽の試験液の水温、溶存酸素濃度、pHを測定した。

暴露期間中、餌は一日当たり個体重量の約2%を与えた。死亡により個体数が減少した場合は、その分給餌量を減らした。

暴露開始後、最低週3回死亡個体\*数を記録した。死亡個体を発見した場合水質の悪化が起こらないよう速やかに取り除き重量および被鱗体長を測定し記録した。また、最低週3回、観察された毒性の徴候或いは異常（例：外部刺激への反応異常、平衡感覚喪失、遊泳異常、呼吸機能の異常、体色変化、背曲がり、出血等）および摂餌状況を記録した。暴露終了時には全ての生存魚の重量および被鱗体長を測定記録した。

\*：ステンレス製ピンセットの先で尾部に軽く触れ反応がない個体を死亡とみなした

500mLに定容としストック溶液とした。助剤対照区のストック溶液は2-メチルエタノールを30.0gと分散助剤（HC0-30）を114.0g添加し良く混合した後、純水で3000mLに定容とした。

試験濃度 mg/L	被験物質原液 添加量, mL	助剤原液 添加量, mL	定容量 mL	ストック溶液濃度 mg/L
対照区	0	0	500	0
助剤対照区	0	3000	3000	0
0.19	4.75	495	500	95
0.50	12.25	488	500	245
1.26	31	469	500	620
3.16	77.5	423	500	1550
7.94	195	305	500	3900
20.37	500	0	500	10000

### 3.6 試験液の分析

開始時（0日）、7日、14日および21日に各試験水槽より試験液5.0mLを採取しヘキサンで抽出後、GCで分析した。試験液の分析に際しては、試料測定毎に標準溶液の測定を行い、そのピーク面積比から定量した。詳細は付属資料-2に示した。

### 3.7 試験操作

暴露開始時に供試魚と同水槽で馴養した魚10尾の重量および被鱗体長を測定し、被鱗体長で  $2.0 \pm 0.5$  cmであることを確認した。各試験水槽の試験液の水温、溶存酸素濃度、pHを測定後、試験水槽中に供試魚を1濃度区当たり20尾投入した。

暴露開始後、最低週2回各試験水槽の試験液の水温、溶存酸素濃度、pHを測定した。

暴露期間中、餌は一日当たり個体重量の約2%を与えた。死亡により個体数が減少した場合は、その分給餌量を減らした。

暴露開始後、最低週3回死亡個体\*数を記録した。死亡個体を発見した場合水質の悪化が起こらないよう速やかに取り除き重量および被鱗体長を測定し記録した。また、最低週3回、観察された毒性の徴候或いは異常（例：外部刺激への反応異常、平衡感覚喪失、遊泳異常、呼吸機能の異常、体色変化、背曲がり、出血等）および摂餌状況を記録した。暴露終了時には全ての生存魚の重量および被鱗体長を測定記録した。

\*：ステンレス製ピンセットの先で尾部に軽く触れ反応がない個体を死亡とみなした

#### 4 結果の算出

##### 4.1 最小致死濃度，最小作用濃度，最大無作用濃度

死亡個体が観察された試験区の最も低い濃度を最小致死濃度とした。

試験魚に致死以外の作用が観察された試験区の最も低い濃度を最小作用濃度とした。

致死やその他の作用が統計的な有意差で認められない最高試験濃度区を最大無作用濃度 (NOEC) とした。

##### 4.2 半数致死濃度 (LC50) の算出

試験期間中に死亡率が50%を越える濃度区が無かったため半数致死濃度 (LC50) の算出は行えなかった。



## 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

該当する事象は無かった。

### 5.2 試験液中の被験物質濃度

試験開始時、7日後、14日後および21日後に試験液中の被験物質濃度を測定した。試験開始時の濃度は0.21～22.30mg/L（設定値0.19～20.37mg/L）であり、試験期間中の平均値は0.20～19.66mg/Lであった。試験区で設定濃度の±20%を越える分析結果があったため、以下の値は測定濃度の算術平均値を基に示した。

[Table 1(p.17), 付属資料－2]

### 5.3 半数致死濃度 (LC50)

試験期間中に死亡率が50%を越える濃度区が無かったため半数致死濃度 (LC50)の算出は行えなかった。したがって、被験物質の7日、14日および21日の半数致死濃度 (LC50) は>20mg/L（測定濃度）であった。

[Table 2～3(p.18～19), Figure 1(p.28)]

### 5.4 毒性症状および摂餌状況

毒性症状として7.94mg/L（測定濃度：6.4mg/L）以上の濃度区で活動低下、表層遊泳が観察された。対照区および助剤対照区では異常な症状は観察されなかった。

20.37mg/L（測定濃度：20mg/L）の濃度区で摂餌量の低下が認められた。

[Table 4(p.20)]

### 5.5 供試魚の体重および体長

体重および体長はすべての濃度区で対照区と比較して有意な差は認められなかった。（ $\alpha$  =0.05, 統計的方法：Dunnettの多重比較, 両側検定）

[Table 5～6(p.21～24)]

#### 5.6 最小致死濃度，最小作用濃度

最小致死濃度は20.37mg/L（測定濃度：20mg/L）であった。

最小作用濃度は7.94mg/L（測定濃度：6.4mg/L）であった。

[Table 2(p.18), Table 4(p.20)]

#### 5.7 最大無作用濃度

致死，毒性症状，摂餌状況の異常，体重および体長に有意差の認められない最も高い濃度区は3.16mg/L（測定濃度：2.7mg/L）であり，この濃度が最大無作用濃度（NOEC）と判断された。

[Table 2～6(p.17～24)]

#### 5.8 試験液の水温，溶存酸素濃度およびpH

試験期間中の水温はすべての濃度区で $24 \pm 1^{\circ}\text{C}$ であった。溶存酸素濃度は5.6～8.2 mg/Lであり，すべての濃度区で飽和溶存酸素濃度の60%以上であった。pHは7.1～7.9であった。

（24.0℃の飽和溶存酸素濃度：8.25mg/L）

[Table 7～9(p.25～27)]

以 上

Table 1. Measured Concentrations of the Test Substance During a 21-Day Exposure

Nominal Concentration mg/L	Measured Concentration, mg/L (Percent of Nominal)				Mean Measured Concentration mg/L
	0 Day	7 Day	14 Day	21 Day	
Control	<0.004	<0.004	<0.004	<0.004	----
Solvent Control	<0.004	<0.004	<0.004	<0.004	----
0.19	0.21 (111)	0.17 (89)	0.17 (89)	0.25 (132)	0.20 (105)
0.50	0.53 (106)	0.40 (80)	0.42 (84)	0.57 (114)	0.48 (96)
1.26	1.20 (95)	0.88 (70)	0.85 (67)	1.46 (116)	1.10 (87)
3.16	3.21 (102)	2.45 (78)	2.46 (78)	2.47 (78)	2.65 (84)
7.94	7.29 (92)	6.49 (82)	6.32 (80)	5.50 (69)	6.40 (81)
20.37	22.30 (109)	18.16 (89)	16.88 (83)	21.31 (105)	19.66 (97)

Table 2. Mortality of Orange killifish (Oryzias latipes) Exposed to the Test Substance

Nominal Concentration mg/L	Cumulative Number of Dead (Percent Mortality)																	
	2 days		4 days		7 days		9 days		11 days		14 days		16 days		18 days		21 days	
Control	0	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)
Solvent Control	0	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)
0.19	0	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)
0.50	0	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)
1.26	0	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)
3.16	0	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)
7.94	0	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)
20.37	0	(0)	0	(0)	0	(0)	2	(10)	3	(15)	4	(20)	5	(25)	5	(25)	5	(25)

Table 3. Calculated LC50 Values

Exposure Period (Days)	LC50 (mg/L)	95-Percent Confidence Limits (mg/L)	Statistical Method
7	>20	-- ~ --	--
14	>20	-- ~ --	--
21	>20	-- ~ --	--

Table 4. Symptoms of Toxicity Observed in Orange killifish (*Oryzias latipes*)

Nominal Concentration mg/L	Symptoms								
	2 Days	4 Days	7 Days	9 Days	11 Days	14 Days	16 Days	18 Days	21 Days
Control	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Solvent Control	N	N	N	N	N	N	N	N	N
0.19	N	N	N	N	N	N	N	N	N
0.50	N	N	N	N	N	N	N	N	N
1.26	N	N	N	N	N	N	N	N	N
3.16	N	N	N	N	N	N	N	N	N
7.94	N	N	Su-1	N	N	N	N	N	N
20.37	Su-4	Su-5	Su-3	Su-3 RA-5	Su-1	RA-3	RA-3	RA-3	N

N : No toxicological symptom was observed

--: All fish were dead at this observation time

Su: Surfacing                      RA: Reduced activity

Table 5. Fish Weight (g)

Nominal Concentration (mg/L)							
Cont.	Sol. Cont.	0.19	0.50	1.26	3.16	7.94	20.37
No. 1	No. 2	No. 3	No. 4	No. 5	No. 6	No. 7	No. 8
0.15	0.20	0.16	0.21	0.24	0.09	0.15	0.13
0.17	0.21	0.15	0.30	0.16	0.12	0.15	0.10
0.15	0.15	0.23	0.24	0.18	0.15	0.23	0.20
0.15	0.27	0.24	0.21	0.11	0.13	0.15	0.21
0.20	0.21	0.14	0.16	0.24	0.17	0.13	0.16
0.15	0.24	0.17	0.14	0.20	0.12	0.23	0.15
0.30	0.24	0.22	0.19	0.20	0.14	0.18	0.17
0.27	0.19	0.16	0.20	0.19	0.30	0.22	0.12
0.23	0.19	0.23	0.15	0.10	0.23	0.24	0.18
0.15	0.20	0.16	0.22	0.26	0.15	0.18	0.12
0.16	0.15	0.26	0.26	0.14	0.19	0.20	0.18
0.13	0.16	0.26	0.12	0.31	0.22	0.24	0.19
0.17	0.19	0.15	0.23	0.22	0.23	0.14	0.21
0.18	0.15	0.19	0.09	0.14	0.09	0.09	0.27
0.28	0.20	0.24	0.26	0.11	0.14	0.18	0.10
0.15	0.18	0.13	0.24	0.17	0.18	0.15	0.19
0.24	0.20	0.15	0.13	0.19	0.16	0.15	0.10
0.15	0.33	0.18	0.18	0.15	0.21	0.16	0.24
0.19	0.19	0.26	0.21	0.16	0.12	0.15	0.21
0.15	0.19	0.23	0.16	0.23	0.19	0.26	0.11

Basic statistic

File : 5B455-W.DAT

No.	1	2	3	4	5
N	20	20	20	20	20
Mean	0.186	0.202	0.1955	0.195	0.185
Variance	0.00256	0.00185	0.00205	0.00288	0.00296
S.D.	0.05062	0.04299	0.04524	0.05366	0.05443
S.E.	0.01132	0.00961	0.01012	0.012	0.01217

No.	6	7	8
N	20	20	20
Mean	0.1665	0.179	0.167
Variance	0.00281	0.00203	0.00246
S.D.	0.05304	0.04506	0.04964
S.E.	0.01186	0.01008	0.0111

Table 5. Fish Weight (g) (Continued)

Dunnett multiple comparison procedure			2-side
			*:5% **:1% Significant Level
Comparison	Differ. mean	Dunnett Critical val.	
1 vs 2	0.016	0.041355	
1 vs 3	0.0095	0.041355	
1 vs 4	0.009	0.041355	
1 vs 5	0.001	0.041355	
1 vs 6	0.0195	0.041355	
1 vs 7	0.007	0.041355	
1 vs 8	0.019	0.041355	



Table 6. Fish Length (cm)

		Nominal Concentration (mg/L)					
Cont.	Sol. Cont.	0.19	0.50	1.26	3.16	7.94	20.37
No. 1	No. 2	No. 3	No. 4	No. 5	No. 6	No. 7	No. 8
2.0	2.0	1.9	2.0	2.2	1.6	1.9	2.0
2.1	2.3	2.0	2.5	1.9	1.9	1.9	2.1
2.0	2.0	2.1	2.3	2.2	1.9	2.4	2.1
2.0	2.3	2.2	2.1	1.8	1.8	1.9	2.5
2.3	2.1	1.9	2.1	2.2	2.0	1.8	2.2
1.9	2.1	2.1	1.9	2.5	1.8	2.2	2.0
2.5	2.2	2.2	2.2	2.3	1.9	2.2	2.0
2.4	2.2	2.1	2.0	2.2	2.4	2.2	1.9
2.3	2.0	2.3	2.0	1.8	2.3	2.3	2.3
1.9	2.0	2.3	2.2	2.2	1.9	2.0	1.8
1.9	1.9	2.2	2.2	1.9	2.0	2.0	2.0
1.9	1.9	2.5	1.9	2.6	2.2	2.2	2.1
2.1	2.0	2.0	2.2	2.2	2.0	2.0	2.0
2.0	1.8	2.1	1.9	1.9	2.2	1.7	2.4
2.3	2.0	2.3	2.3	1.8	2.3	2.1	1.9
2.1	2.2	2.0	2.3	2.0	1.7	1.9	2.1
2.3	1.9	2.0	1.9	2.0	2.0	2.0	1.7
2.1	2.3	2.4	2.0	1.9	2.1	2.0	2.2
2.3	2.1	2.3	2.3	1.9	1.9	1.9	2.1
2.0	2.1	1.8	2.0	2.1	2.0	2.2	1.9

## Basic statistic

File : 5B455-L.DAT

No.	1	2	3	4	5
N	20	20	20	20	20
Mean	2.12	2.07	2.135	2.115	2.08
Variance	0.03432	0.02116	0.03292	0.02976	0.05221
S.D.	0.18525	0.14546	0.18144	0.17252	0.2285
S.E.	0.04142	0.03253	0.04057	0.03858	0.05109

No.	6	7	8
N	20	20	20
Mean	1.995	2.04	2.065
Variance	0.04261	0.032	0.03713
S.D.	0.20641	0.17889	0.1927
S.E.	0.04615	0.04	0.04309

Table 6. Fish Length (cm) (Continued)

Dunnett multiple comparison procedure			2-side
			*:5% **:1% Significant Level
Comparison	Differ. mean	Dunnett Critical val.	
1 vs 2	0.05	0.156864	
1 vs 3	0.015	0.156864	
1 vs 4	0.005	0.156864	
1 vs 5	0.04	0.156864	
1 vs 6	0.125	0.156864	
1 vs 7	0.08	0.156864	
1 vs 8	0.055	0.156864	

Table 7. Temperature Values

Nominal Concentration mg/L	Temperature, °C									
	0 Day	2 Days	4 Days	7 Days	9 Days	11 Days	14 Days	16 Days	18 Days	21 Days
Control	24.6	24.5	24.3	24.3	24.9	24.2	23.5	23.6	24.0	24.1
Solvent Control	24.4	24.6	24.3	24.2	24.8	24.1	23.5	23.5	24.0	24.0
0.19	24.6	24.5	24.4	24.1	24.9	24.0	23.5	23.5	23.9	23.9
0.50	24.7	24.6	24.6	24.2	24.9	24.1	23.6	23.6	24.2	24.1
1.26	24.5	24.5	24.5	24.2	24.6	24.1	23.6	23.5	23.9	23.9
3.16	24.7	24.6	24.6	24.2	24.8	24.2	23.5	23.6	24.5	24.2
7.94	24.4	24.6	24.5	24.2	24.2	24.0	23.4	23.5	23.9	23.9
20.37	23.4	24.6	24.6	24.3	24.8	24.1	23.5	23.5	24.1	24.1

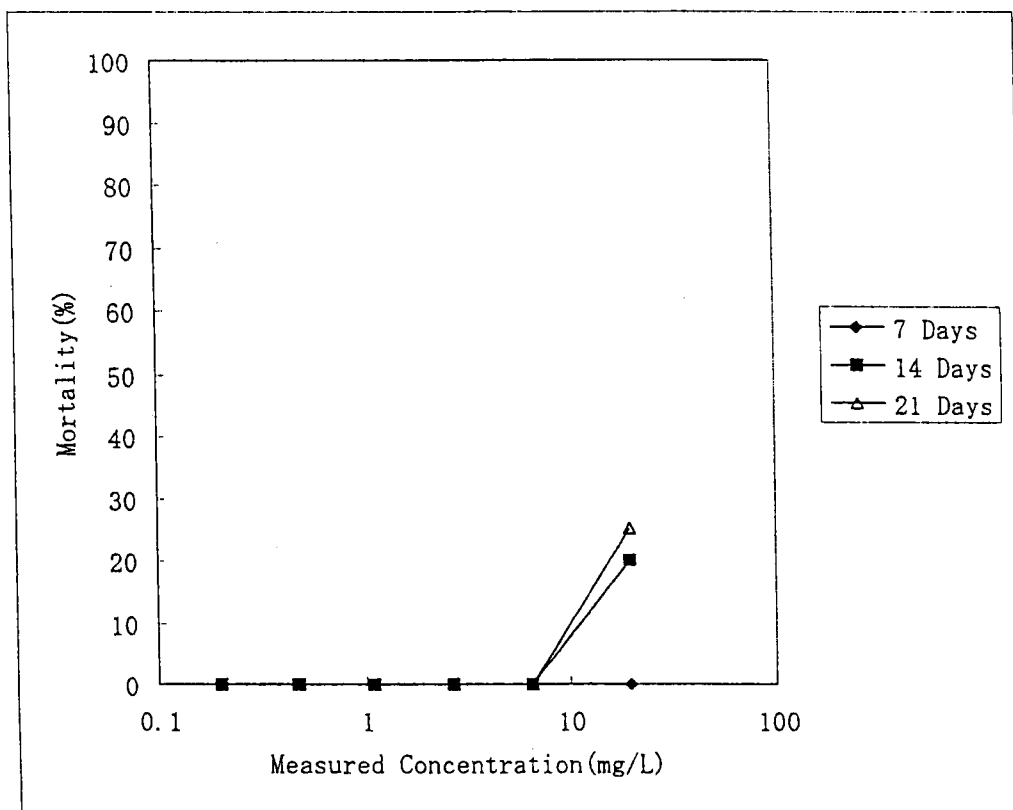
Table 8. Dissolved Oxygen Concentrations

Nominal Concentration mg/L	Dissolved Oxygen Concentration mg-O <sub>2</sub> /L									
	0 Day	2 Days	4 Days	7 Days	9 Days	11 Days	14 Days	16 Days	18 Days	21 Days
Control	8.1	7.3	7.5	7.5	7.4	7.2	7.7	7.6	7.3	7.6
Solvent Control	8.0	7.1	6.7	7.1	6.7	6.0	6.0	6.0	6.0	7.0
0.19	8.0	6.8	6.7	6.9	7.0	6.0	6.1	6.0	6.0	5.9
0.50	8.2	7.0	6.6	6.9	6.1	6.0	6.4	6.5	6.0	5.6
1.26	8.0	7.1	6.6	6.7	6.5	6.1	6.4	6.6	6.0	5.8
3.16	8.1	7.1	6.6	6.7	6.0	5.9	6.1	6.3	6.0	5.9
7.94	8.1	7.3	6.4	6.6	6.5	6.4	6.0	6.0	6.0	5.6
20.37	8.1	7.2	6.6	6.3	5.6	5.9	5.9	6.2	5.9	5.9

Table 9. pH Values

Nominal Concentration mg/L	pH									
	0 Day	2 Days	4 Days	7 Days	9 Days	11 Days	14 Days	16 Days	18 Days	21 Days
Control	7.8	7.7	7.6	7.6	7.5	7.5	7.6	7.5	7.4	7.5
Solvent Control	7.8	7.7	7.5	7.5	7.4	7.3	7.3	7.3	7.2	7.1
0.19	7.8	7.7	7.5	7.5	7.5	7.3	7.4	7.3	7.3	7.1
0.50	7.8	7.7	7.5	7.5	7.4	7.3	7.4	7.4	7.3	7.2
1.26	7.9	7.8	7.5	7.5	7.4	7.3	7.4	7.4	7.3	7.3
3.16	7.8	7.7	7.6	7.5	7.4	7.2	7.4	7.3	7.3	7.5
7.94	7.8	7.7	7.5	7.6	7.4	7.3	7.4	7.3	7.3	7.3
20.37	7.9	7.7	7.5	7.5	7.3	7.3	7.4	7.3	7.2	7.3

Figure 1 Concentration-Response Curve



## 付属資料－ 1

希积水の水質

Water Quality of Dilution Water

Parameter	Concentration
COD	<1 mg/L
Total phosphorus	<0.01 mg/L
pH	7.9 (22°C)
Coliform group bacteria	N. D.
Mercury	<0.0001 mg/L
Copper	<0.001 mg/L
Cadmium	<0.001 mg/L
Zinc	0.02 mg/L
Lead	<0.01 mg/L
Aluminium	0.05 mg/L
Nickel	<0.01 mg/L
Chromium	<0.01 mg/L
Manganese	<0.1 mg/L
Tin	<0.1 mg/L
Iron	<0.1 mg/L
Cyanide	<0.001 mg/L
Free chlorine	0.01 mg/L
Bromide ion	<0.1 mg/L
Fluoride	<0.1 mg/L
Sulfide ion	<0.03 mg/L
Ammonium ion	<0.1 mg/L
Arsenic	<0.01 mg/L
Selenium	<0.01 mg/L
Evaporation residue	110 mg/L
Electric conductivity	140 $\mu$ S/cm
Total hardness (as CaCO <sub>3</sub> )	50 mg/L
Alkalinity	40 mg/L
Sodium	6.6 mg/L
Potassium	1.2 mg/L
Calcium	7.8 mg/L
Magnesium	3.6 mg/L

measured date: November 24, 1995



## 付属資料－2

### 試験液の分析方法

## 試験液の分析方法

### 1 試験液の分析方法

- (1) 各試験容器より試験液5.0mLを10mL容ガラス沈殿管に採取  
↓
- (2) 各分析試料に n-ヘキサン 2.0mLを加え振とう  
大洋科学製ソックスレーカーSR-II (10分間, 速度目盛7)  
↓
- (3) 遠心分離機で水層とヘキサン層を分離  
日立製CR5B (3000rpm, 10分間)  
↓
- (4) ヘキサン層をバスマルベットで採取し, 定容容器 (メスボトル又はメスフラスコ)に採取  
↓
- (5) (2)～(4)の操作をもう一度くり返し, ヘキサンで定容  
↓
- (6) (5)の定容液をGC測定用バイアルに約1～2mL採取  
↓
- (7) GC測定

#### ・ヘキサンによる定容量

試験液設定濃度 (mg/L)	定容量 (mL)			
	0day	7days	14days	21days
対照	5.0	5.0	5.0	5.0
助剤対照	5.0	5.0	5.0	5.0
0.10	5.0	5.0	5.0	5.0
0.25	5.0	5.0	5.0	5.0
0.63	5.0	5.0	10.0	5.0
1.59	5.0	10.0	25.0	10.0
3.97	25.0	25.0	25.0	10.0
10.18	50.0	50.0	50.0	25.0

(裝置)

(条件)

### 3 検量線

被験物質の1000mg/L n-ヘキサン溶液を調製し、順次、n-ヘキサンで希釈し0, 0.2, 0.5, 1.0, 2.0, 5.0, 10.0, 20.0mg/Lの標準溶液を調製した。この標準溶液を、GCに注入しピーク面積を測定した。横軸に濃度を (mg/L) , 縦軸にピーク面積 (count表示) をとり、検量線を作成した。検量線はほぼ原点を通る直線となり、最小二乗法による直線回帰式の相関係数は1.000と良好であった。

#### 4 定量限界

最小検出ピーク面積を1000countに設定し、これに相当する試験液中の被験物質濃度0.004mg/Lを定量限界とした。

## 5 添加回收試験

被験物質の5.0mg/L 試験溶液を調製し、この溶液を「1 試験液の分析方法」に従って分析した。2 回行った添加回収試験の平均値は79%であった。試料の分析結果は、この添加回収率で補正した値を用いた。

Figure A-2-1 Calibration Curve of the Test Substance by GC Analysis

No.	Concentration (mg/L)	Peak Area (count)
0	0.00	0
1	0.20	64120
2	0.50	162533
3	1.00	322789
4	2.00	657058
5	5.00	1644111
6	10.00	3357648
7	20.00	6793521

$$Y = -17,500 + 339,600 X$$

$$r = 0.99997$$

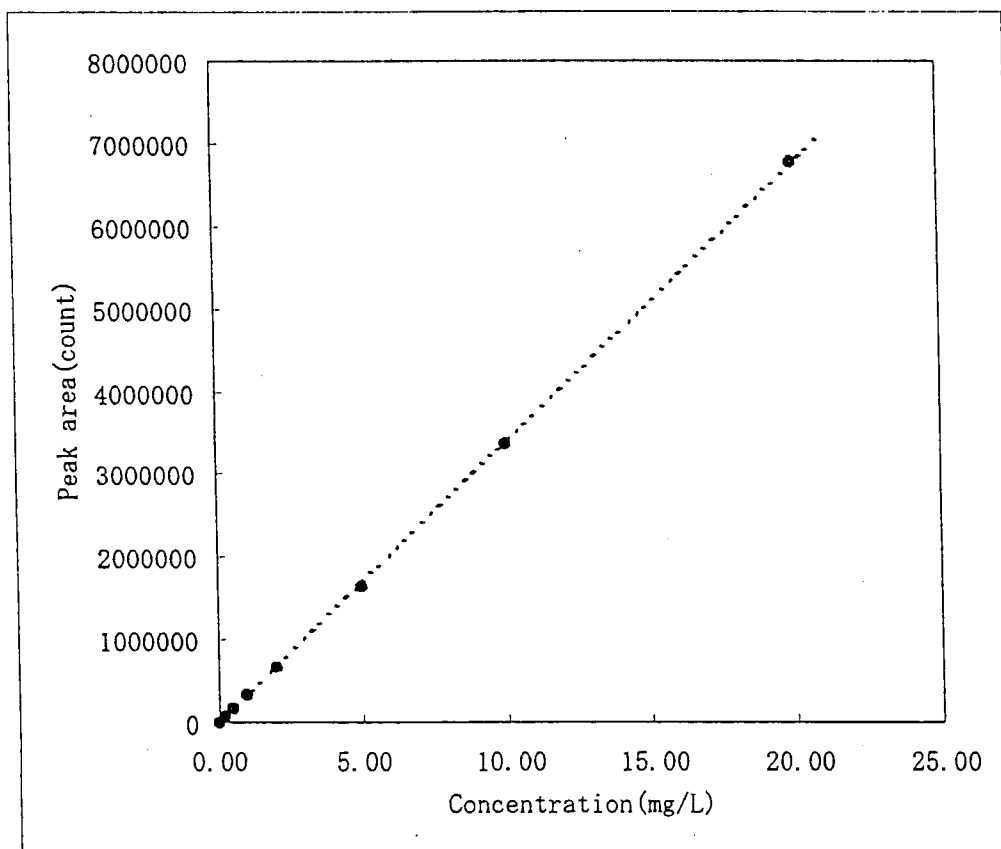
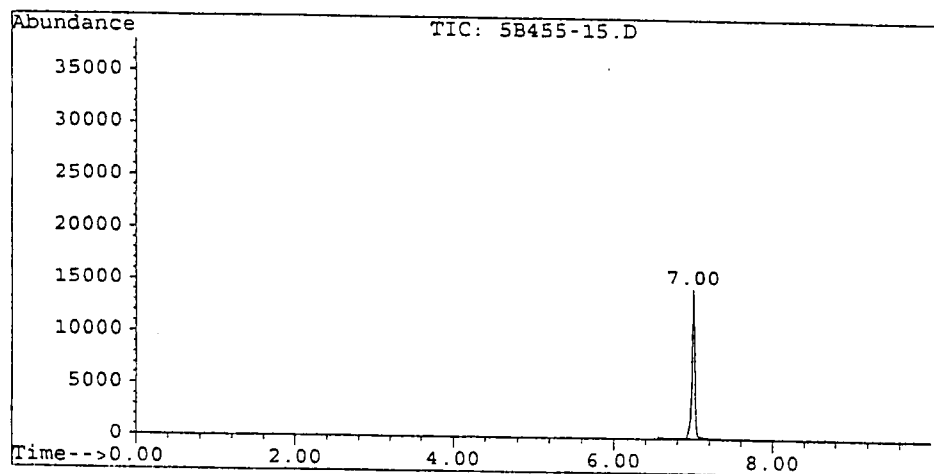


Figure A-2-2 Representative chromatograms

(1) Standard 1.0mg/L

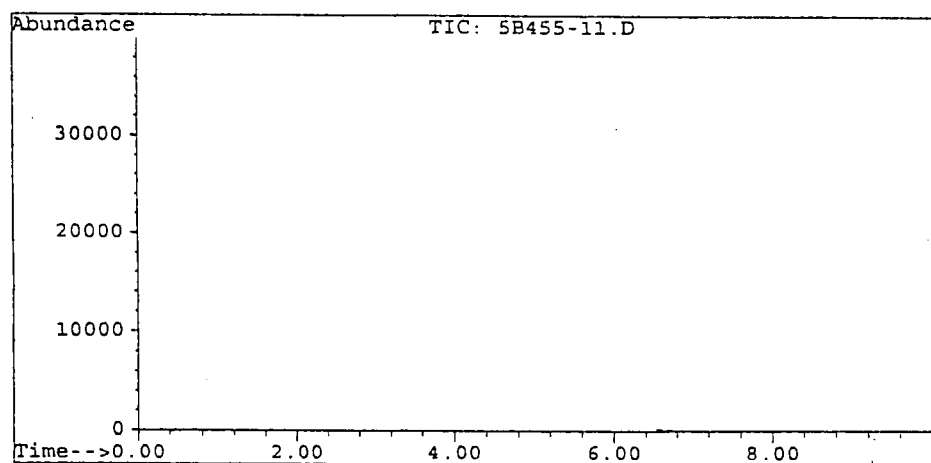


TIC: 5B455-15.D

E-95 std 1.0ppm

Peak#	Ret Time	Type	Width	Area	Start Time	End Time
1	7.000	M	0.048	411876	6.875	7.196

(2) Control ; Day 0



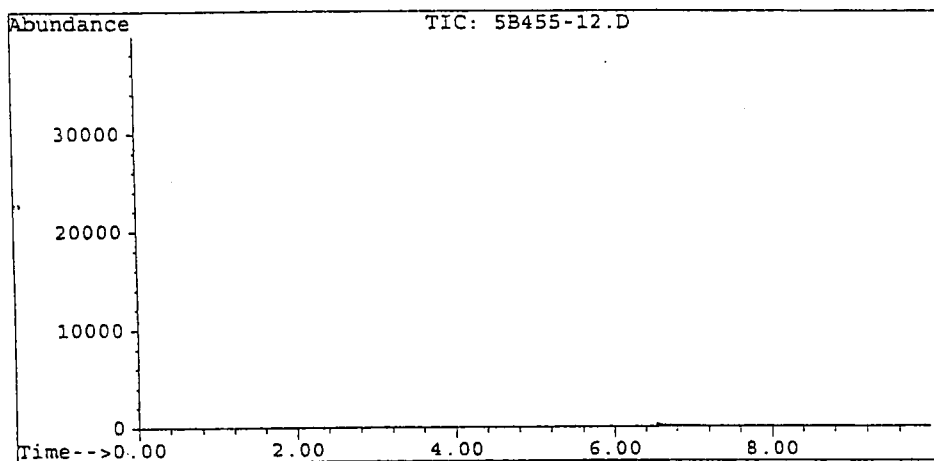
TIC: 5B455-11.D

Control 0hr

Peak#	Ret Time	Type	Width	Area	Start Time	End Time
No peaks detected						

Figure A-2-2 Continued

(3) Solvent Control ; Day 0

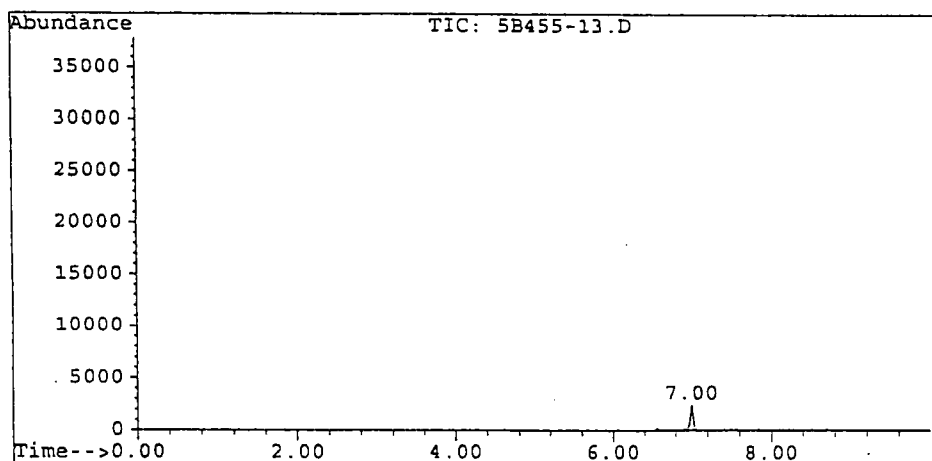


TIC: 5B455-12.D

Solvent Control 0hr

Peak#	Ret Time	Type	Width	Area	Start Time	End Time
No peaks detected						

(4) 0.19mg/L nominal; Day 0



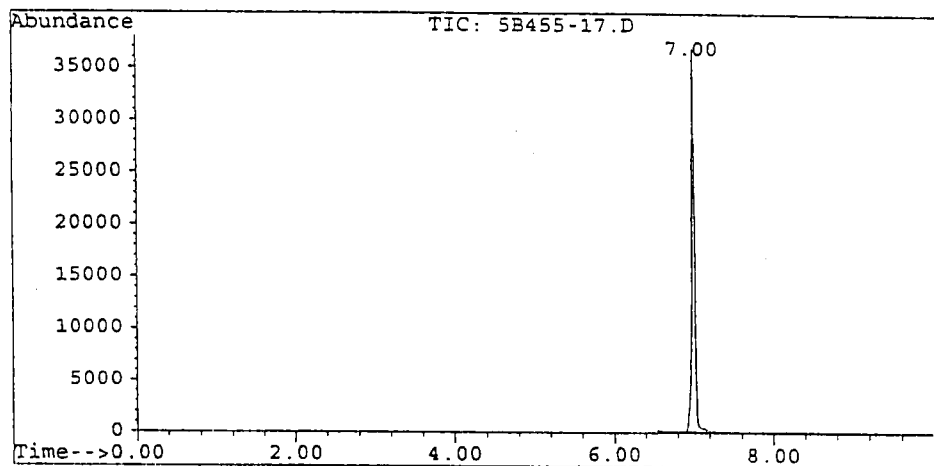
TIC: 5B455-13.D

conc-1 0.193ppm 0hr

Peak#	Ret Time	Type	Width	Area	Start Time	End Time
1	7.000	M	0.047	67395	6.893	7.190

Figure A-2-2 Continued

(5) 3.16mg/L nominal; Day 0

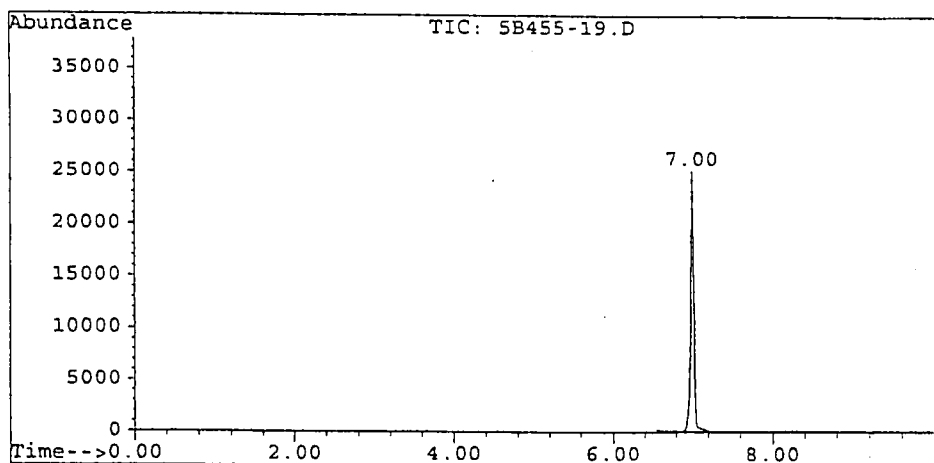


TIC: 5B455-17.D

conc-4 3.157ppm 0hr

Peak#	Ret Time	Type	Width	Area	Start Time	End Time
1	7.001	M	0.047	1044485	6.885	7.217

(6) 20.37mg/L nominal; Day 0



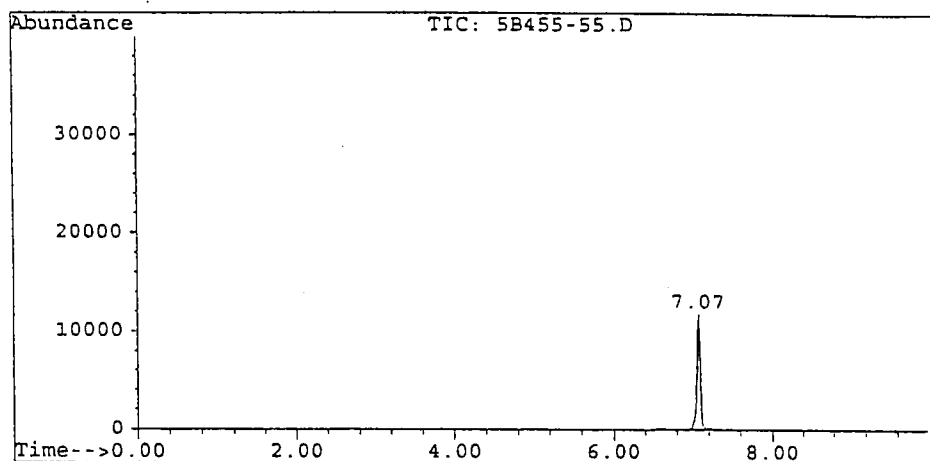
TIC: 5B455-19.D

conc-6 20.367ppm 0h

Peak#	Ret Time	Type	Width	Area	Start Time	End Time
1	7.000	M	0.048	725583	6.892	7.205

Figure A-2-2 Continued

(7) Standard 1.0mg/L; Day 21

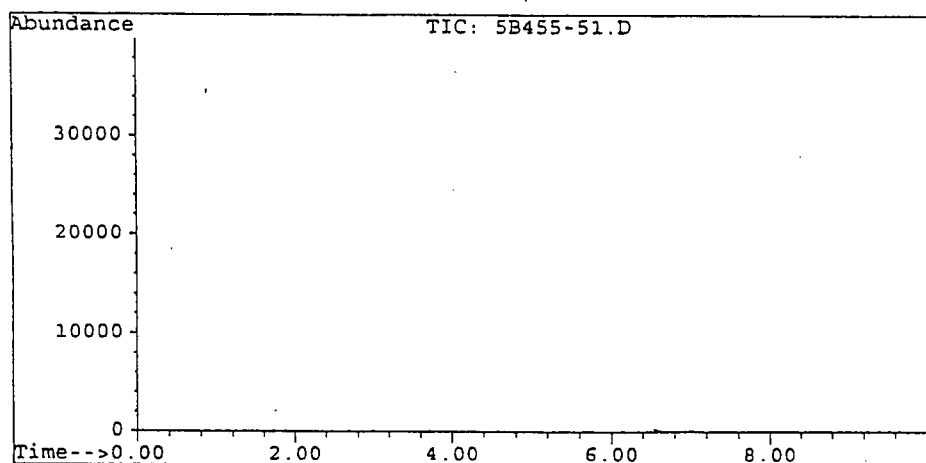


TIC: 5B455-55.D

E-95 std 1.0ppm

Peak#	Ret Time	Type	Width	Area	Start Time	End Time
1	7.073	M	0.048	339367	6.957	7.259

(8) Control ; Day 21



TIC: 5B455-51.D

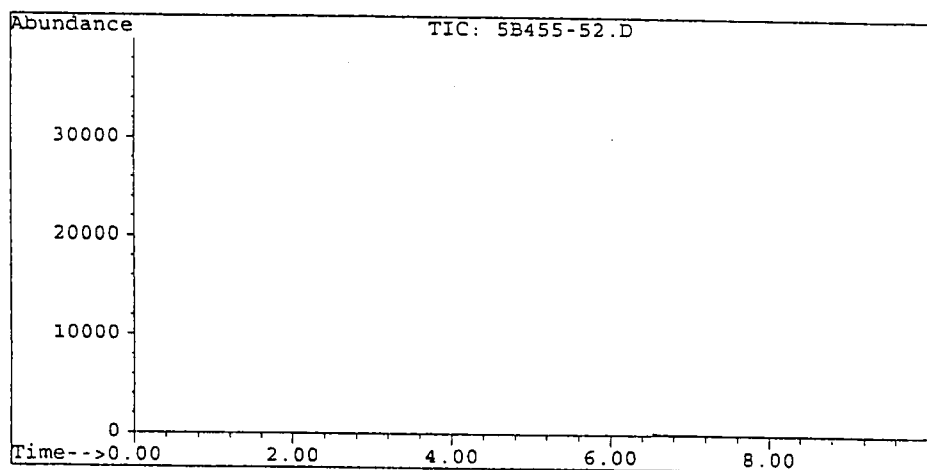
Control 3weeks

Peak#	Ret Time	Type	Width	Area	Start Time	End Time
No peaks detected						



Figure A-2-2 Continued

(9) Solvent Control ; Day 21

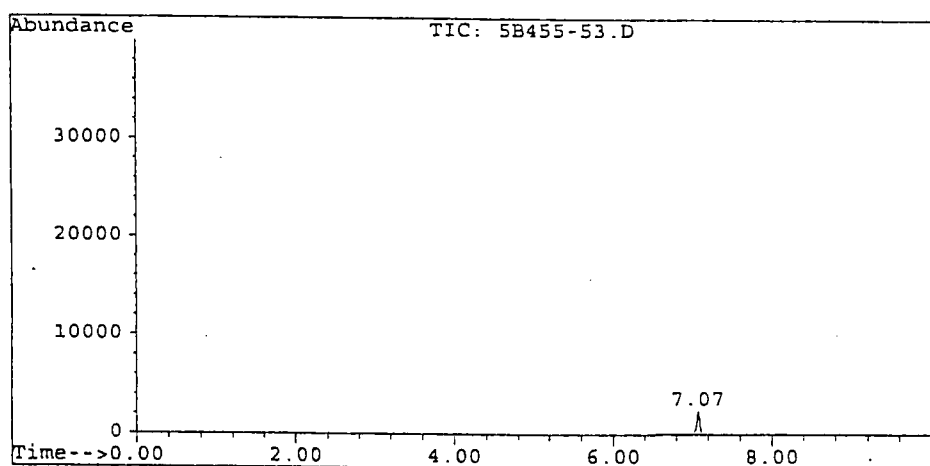


TIC: 5B455-52.D

Solvent Control 3weeks

Peak#	Ret Time	Type	Width	Area	Start Time	End Time
No peaks detected						

(10) 0.19mg/L nominal; Day 21



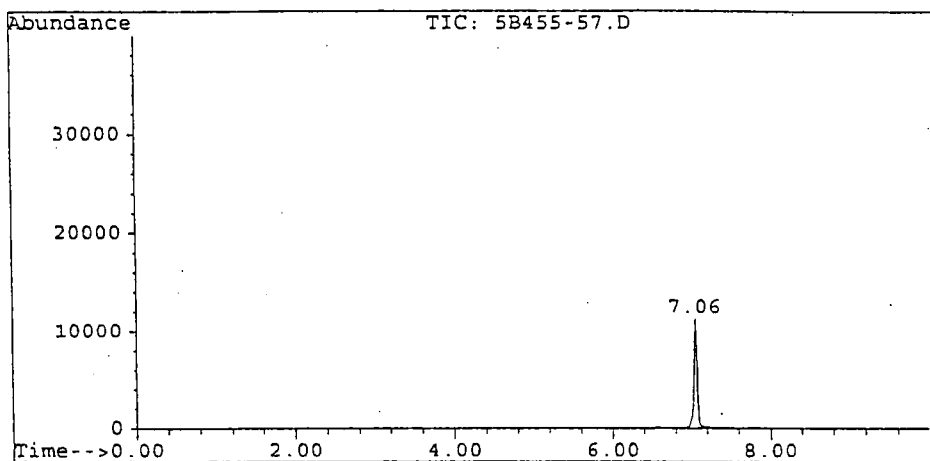
TIC: 5B455-53.D

conc-1 0.193ppm 3weeks

Peak#	Ret Time	Type	Width	Area	Start Time	End Time
1	7.073	M	0.048	68062	6.960	7.253

Figure A-2-2 Continued

(11) 3.16mg/L nominal; Day 21

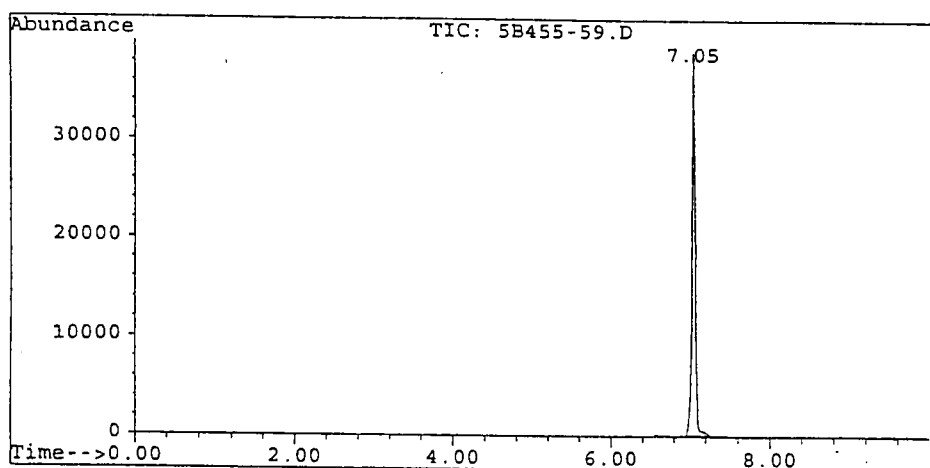


TIC: 5B455-57.D

conc-4 3.157ppm 3weeks

Peak#	Ret Time	Type	Width	Area	Start Time	End Time
1	7.055	M	0.049	331081	6.930	7.248

(12) 20.37mg/L nominal; Day 21



TIC: 5B455-59.D

conc-6 20.367ppm 3weeks

Peak#	Ret Time	Type	Width	Area	Start Time	End Time
1	7.053	M	0.049	1142528	6.938	7.271