

環境省殿

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
[Redacted]
[Redacted]

最 終 報 告 書

クロロ酢酸のヒメダカ (*Oryzias latipes*)
に対する急性毒性試験

(試験番号：A050074)

2005年11月25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 : クロロ酢酸のヒメダカ (*Oryzias latipes*)
に対する急性毒性試験

試 験 番 号 : A050074

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」

(薬食発第 1121003 号, 平成 15・11・17 製局第 3 号, 環境企発第 031121004
号, 2003)

2005年11月25日

試験責任者





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 : クロロ酢酸のヒメダカ (*Oryzias latipes*) に対する急性毒性試験

試 験 番 号 : A050074

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、下記の査察およ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	2005年 8月22日	2005年 8月22日
試験液の査察		
試験液の調製	2005年 8月29日	2005年 8月29日
魚の投入	2005年 8月29日	2005年 8月29日
魚の観察	2005年 9月 2日	2005年 9月 2日
最終報告書監査	2005年11月25日	2005年11月25日

2005年11月25日

信頼性保証部門担当者



試験実施概要

1. 表 題 : クロロ酢酸のヒメダカ (*Oryzias latipes*)
に対する急性毒性試験
(試験番号: A050074)
2. 試験目的 : 被験物質のヒメダカ (*Oryzias latipes*) に対する急性毒性試験を行い、96 時間の半数致死濃度 (LC50) 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>」
(薬食発第 1121002 号, 平成 15・11・13 製局第 2 号, 環境企発第 031121002 号, 2003)
4. 適用 G L P : 「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, 環境企発第 031121004 号, 2003)
5. 試験委託者 : 環境省
東京都千代田区霞が関一丁目 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 : XXXXXXXXXX
環境科学 C グループ

9. 試験担当者： [redacted] [redacted] (2005年11月25日)
(試験実施)

[redacted] [redacted] (2005年11月25日)
(試験実施)

[redacted] [redacted] (2005年11月25日)
(試験実施, 報告書作成)

[redacted] [redacted] (2005年11月25日)
(試験実施)

[redacted] [redacted] (2005年11月25日)
(分析実施)

[redacted] (休職中)
(試験実施)

10. 試験日程： 試験開始日 2005年 8月22日
実験開始日 2005年 8月29日
実験終了日 2005年 9月 2日
試験終了日 2005年11月25日

11. 保管： 下記の試資料は、(株)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。

- 1) 試験計画書
- 2) 最終報告書
- 3) 生データ
- 4) 被験物質
- 5) 対照物質
- 6) 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	13
3.4 試験濃度の設定	13
3.5 試験液の調製	13
3.6 試験液の分析	13
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 半数致死濃度 (LC50)	16
4.4 0%死亡最高濃度および100%死亡最低濃度	16
4.5 毒性症状	16
4.6 試験液の外観および水温, 溶存酸素濃度, pH	17
Table 1~9	18~25
Figure 1	26
付属資料-1 赤外吸収スペクトル	27~28
付属資料-2 希釈水の水質	29~30
付属資料-3 試験液の調製	31~32
付属資料-4 試験液の分析	33~41
付属資料-5 結果の算出	42~43
付属資料-6 追加試験 (試験液の pH調整あり)	44~63

要 約

試験委託者

環境省

表 題

クロロ酢酸のヒメダカ (*Oryzias latipes*) に対する急性毒性試験

試験番号

A050074

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>」(薬食発第1121002号, 平成15・11・13製局第2号, 環保企発第031121002号, 2003)に準拠して実施した。

なお, 被験物質の濃度により試験液のpHは顕著に変化するため, pHの変化による被験物質の毒性への影響が懸念される。そこで, pHを調整した試験液を用いた追加試験を行った。

- 1) 暴露方式 : 半止水式 (24時間毎に試験液の全量を交換)
水面をテフロンシートで被覆
- 2) 暴露期間 : 96時間
- 3) 試験濃度 : 対照区, 20.0, 30.0, 45.0, 67.0, 100 mg/L
(設定値) 公比 : 1.5
- 4) 試験液量 : 5.0 L/容器
- 5) 連 数 : 1 容器/試験区
- 6) 供試生物数 : 10尾/試験区
- 7) 試験温度 : 24±1 °C
- 8) 照 明 : 室内光, 16時間明 (1000 lux以下) / 8時間暗
- 9) 分 析 法 : 高速液体クロマトグラフィー (HPLC)

試験結果：

1) 試験液中の被験物質濃度

試験液の分析の結果、測定値の設定値に対する割合は、試験液調製時において94～101%、24時間後において95～101%であった。また、追加試験（pH調整あり）では、試験液調製時において98～103%、その24時間後において97～101%であった。

2) 試験液のpH

pHは、対照区および20.0～30.0 mg/L区ではヒメダカの飼育環境として適正範囲（6.0～8.5）内であったが、45.0 mg/L区においては5.5～5.9、67.0 mg/L区においては3.9～4.6、100 mg/L区においては3.2であり、被験物質の濃度により大きく変化した。pHを調整した追加試験では、すべての試験区においてヒメダカの飼育環境として適正範囲（6.0～8.5）内であった。

3) 96時間暴露後の半数致死濃度(LC50) : 71.7 mg/L (95%信頼区間 : 43.5 ～ 99.1 mg/L)
追加試験（pH調整あり）
96時間暴露後の半数致死濃度(LC50) : 72.5 mg/L (95%信頼区間 : 44.1 ～ 98.9 mg/L)

4) 96時間暴露後の0%死亡最高濃度 : 43.5 mg/L
追加試験（pH調整あり）
96時間暴露後の0%死亡最高濃度 : 44.1 mg/L

5) 96時間暴露後の100%死亡最低濃度 : 99.1 mg/L
追加試験（pH調整あり）
96時間暴露後の100%死亡最低濃度 : 98.9 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	クロロ酢酸		
別 名	モノクロロ酢酸（略称：CAA）		
構造式又は示性式 （いずれも不明の場合は、その製法の概要）	<div>$\begin{array}{c} \text{H} \quad \text{O} \\ \quad \\ \text{Cl}-\text{C}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{H} \end{array}$</div>		
試験に供した物質の純度	100.0%	試験に供した物質の Lot No.	610C2140
不純物の名称及び濃度	—		
C A S 番号	79-11-8	蒸 気 圧	1 hPa (20℃)
分 子 量	94.50*	分配係数	—
融 点	62.8℃	常温における性状	無色結晶。
沸 点	189℃		
安 定 性	通常条件で安定		
溶媒に対する溶解度等	溶 媒	溶 解 度	溶媒中の安定性
	水	45% (20℃)	—
	エタノール	可溶	—
	クロロホルム	可溶	—

上記内容は供給者提供資料による。

ただし，*の内容は以下の通り。

*：当社計算値

1.2 供試試料

供給者： XXXXXXXXXX

1.3 保管法および安定性の確認

被験物質は試験期間中、当研究所内の試験物質保管用冷蔵庫（保管条件：冷蔵，暗所）内に保管した。試験終了時，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) 和 名 : ヒメダカ
2) 学 名 : *Oryzias latipes*
3) 入手先 : 綱島フィッシング (神奈川県横浜市港北区綱島西五丁目18番1号)
4) 入手日 : 2005年 6月29日
5) ロット番号 : 05-H-0629
6) 全 長 : 平均 2.33 cm (2.12 ~ 2.52 cm) , n=10
7) 体 重 : 平均 0.068 g (0.054 ~ 0.079 g) , n=10
8) 感受性 : 基準物質 (硫酸銅 (II) 五水和物, 試薬特級) による96時間半数致死濃度 (LC50) = 0.52 mg/L (95%信頼区間 : 0.35 ~ 0.73 mg/L)

以下に当研究所におけるLC50値 (1995年以降, n=31) を示す (全て無水物換算値)。

平均値 ± 標準偏差 = 0.88 ± 0.28 mg/L

最小値 ~ 最大値 = 0.44 ~ 1.5 mg/L

- 9) 年 齢 : 孵化後約半年
10) じゅん化期間 : 2005年 8月 8日 ~ 2005年 8月29日
暴露開始前 7 日間の死亡率は 5%未満で, 試験には肉眼的に健康で正常な個体を使用した。じゅん化期間中は薬浴は行わなかった (暴露開始前 14 日間のじゅん化条件は以下に示す)。

11) じゅん化条件 :

- 飼育水 : 希釈水 (3.2 参照)
飼育方式 : 流水式 (飼育密度 : 1.0 g/L/日以下)
水温 : 24 ± 1 °C
溶存酸素濃度 : 飽和濃度の 80%以上
pH : 6.5 ~ 8.5
照明 : 室内光, 16 時間明 (1000 lux 以下) / 8 時間暗
餌の種類 : テトラベルケ社テトラミン
給餌量 : 魚体重の約2% / 日 (暴露開始の24時間前からは無給餌)

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>」（薬食発第1121002号，平成15・11・13製局第2号，環保企発第031121002号，2003）に準拠して実施した。

なお，被験物質の濃度により試験液のpHは顕著に変化するため，pHの変化による被験物質の毒性への影響が懸念される。そこで，pHを調整した試験液を用いた追加試験を行った。詳細を付属資料－6に示す。

3.1 試験条件

- 1) 暴露方式： 半止水式（24時間毎に試験液の全量を交換）
- 2) 暴露期間： 96 時間
- 3) 試験液量： 5.0 L／容器
(試験液 1.0 L 当たり供試魚重量が 1.0 g を超えないようにした)
- 4) 連数： 1 容器／試験区
- 5) 供試生物数： 10 尾／試験区
- 6) 試験温度： 24±1 ℃
- 7) 溶存酸素濃度： 飽和濃度の 60% 以上に維持した（エアレーションなし）
- 8) pH： 試験液の pH 調整は行わなかった。ただし，被験物質の濃度により試験液の pH は顕著に変化する。また，pH を 6～8.5 に調整した追加試験を実施した。
- 9) 照明： 室内光，16 時間明（1000 lux 以下）／8 時間暗
- 10) 給餌： 無給餌

3.2 希釈水

希釈水として，横浜市水道水を活性炭処理することにより残留塩素等を除去し，充分通気，24±2℃に温度制御した脱塩素水道水を使用した。脱塩素水道水は，水産用水基準（昭和58年）に示された測定項目等計35項目について，定期的（約6ヶ月毎）に測定している。測定結果については付属資料－2に示す。硬度は通常 30～100 mg/L（CaCO₃換算），pHは6.5～8.5である。使用時には残留塩素が無いことを確認した。魚飼育水として適正な水質であると判断した。

3.3 試験容器および恒温槽等

- 1) 試験容器： 5.0 L 容ガラス製水槽（水面をテフロンシート製蓋で被覆）
- 2) 恒温槽： 塩ビ製水槽（恒温装置，タイテック製 ケルニット CL-80F 型）
- 3) pH/DO/温度計：堀場製作所製 D-55 型
- 4) 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
メトラー製 AB204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）のため，試験上限濃度の 100 mg/L以下とした。

以下の表に示す予備試験（各1連，5尾／3 L／試験区）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，20.0，30.0，45.0，67.0，100 mg/L
（公比：1.5）

予備試験結果

濃度 (mg/L)	96時間の死亡率(%)	毒性症状
10.0	0	無
30.0	0	有
100	100	—

—：全魚死亡のため，観察不適

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。被験物質原液は用時調製とした。

対照区は希釈水のみとした。

3.6 試験液の分析

暴露期間中に2セット（暴露開始時と24 時間後の換水前，48 時間後の換水後と72 時間後の換水前）分析を行った。全試験区各試験容器より各試験液を採取し分析試料とした。これを高速液体クロマトグラフィー（HPLC）により分析した。

詳細を付属資料－4に示す。

3.7 試験操作

暴露開始時に供試魚と同水槽でじゅん化した魚10尾の重量および全長を測定し、全長で 2.3 ± 1.2 cmであることを確認した。

試験液の外観を記録し、水温、溶存酸素濃度、pHを測定後、試験液中に供試魚を1試験区当り10尾無作為に（ランダム発生表に従い）投入した。試験液の外観の記録および水温、溶存酸素濃度、pHの測定は暴露期間中少なくとも毎日1回（換水前後も含む）行った。暴露期間中給餌は行わなかった。

暴露開始24、48、72および96時間後に死亡個体数を記録するとともに観察された毒性の徴候あるいは異常を記録した。一般的に記載する症例と定義を以下に示す*。死亡個体を発見した場合は、水質の悪化が起こらないよう速やかに取り除いた。

*一般的症例と定義

死亡： 刺激を与えた場合に反応の認められないもの。

異常呼吸： 対照区の魚と比較して鰓蓋の動きが異なるもの。

異常遊泳： 明らかに対照区の魚と異なる遊泳をしたもの。動作の緩慢、過敏、痙攣、反転等。

遊泳不能： 底部または水面で動いてはいるものの、水中を遊泳することが不可能なもの。横転、仮死を含む。

3.8 結果の算出

1) 半数致死濃度算出に用いる被験物質濃度の決定

以下の式より実測濃度の平均値（時間加重平均値）を算出し、半数致死濃度算出に用いた。

（時間加重平均）

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

$$\overline{MC} = \frac{\overline{mc}_1 + \overline{mc}_2 + \cdots + \overline{mc}_n}{n}$$

\overline{mc}_n : 各暴露期間の平均測定濃度

$ConcA_n$: 暴露開始時又は換水後の測定濃度

$ConcB_n$: 暴露終了時又は換水前の測定濃度

（ $ConcA_n$ 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) 半数致死濃度（LC50）の算出

暴露開始 24, 48, 72 および 96 時間後の各試験区における、死亡数と供試個体数（10 尾）から死亡率（%）を求め、以下の方法で半数致死濃度（LC50）を決定した。

最高濃度区における死亡率	≥ 50%	< 50%
LC50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－死亡率曲線の記載	記載する。	原則として記載する。

3) 0%死亡最高濃度および100%死亡最低濃度

暴露開始後 24, 48, 72 および 96 時間の観察結果より、各時間における 0%死亡最高濃度および100%死亡最低濃度を可能な限り記録した。

なお、0%死亡最高濃度とは、死亡個体が観察されない試験最高濃度、100%死亡最低濃度とは全ての個体が死亡した試験最低濃度とした。

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。

試験液の分析の結果、測定値の設定値に対する割合は、試験液調製時において94～101%、24時間後において95～101%であった。

4.3 半数致死濃度 (LC50)

各時間における累積死亡率を Table 2に、濃度－死亡率曲線を Figure 1に示す。

暴露96時間の対照区の死亡率は 0%であり、試験成立条件を満たした。

以上の結果に基づき算出された半数致死濃度 (LC50) を Table 3 に、96 時間 LC50 の算出結果を付属資料－5および以下に示す。

96時間 LC50 : 71.7 mg/L (95%信頼区間 : 43.5 ～ 99.1 mg/L)

4.4 0%死亡最高濃度および100%死亡最低濃度

各時間における0%死亡最高濃度および100%死亡最低濃度を Table 4に、また暴露96時間における結果を以下に示す。

96時間の0%死亡最高濃度 : 43.5 mg/L

96時間の100%死亡最低濃度 : 99.1 mg/L

4.5 毒性症状

観察された毒性症状を Table 5に示す。

対照区、20.0 mg/L、30.0 mg/L および 45.0 mg/Lの濃度区では暴露期間中に異常な症状は観察されなかった。67.0 mg/Lの濃度区では暴露24時間目に1個体で遊泳不能が観察されたが、その後その個体は死亡した。100 mg/Lの濃度区では暴露24時間目の観察時点で全魚死亡していた。

4.6 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 6，水温を Table 7，溶存酸素濃度を Table 8，pHを Table 9に示す。

試験液の外観は，全ての試験区で暴露期間を通じて無色であった。

水温はすべての試験区で 24 ± 1 °Cで，溶存酸素濃度はすべての試験区で飽和溶存酸素濃度（24.0 °Cの飽和溶存酸素濃度：8.25 mg/L）の60%以上であり，いずれも試験基準を満たした。pHは，対照区および 20.0～30.0 mg/L区ではヒメダカの飼育環境として適正範囲（6.0～8.5）内であったが，45.0 mg/L区においては5.5～5.9，67.0 mg/L区においては3.9～4.6，100 mg/L区においては3.2であり，被験物質の濃度により大きく変化した。

以 上

Table 1 Measured Concentration of the Test Substance in Test Water

(Semi-Static Condition)					
Nominal Concentration (mg/L)	Measured Concentration (mg/L) (Percent of Nominal)				Mean ^a Measured Concentration (mg/L)
	0 Hour (new)	24 Hours (old)	48 Hours (new)	72 Hours (old)	
Control	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2	---
20.0	19.5 (98)	19.3 (97)	19.0 (95)	19.2 (96)	19.2 (96)
30.0	30.2 (101)	30.2 (101)	29.3 (98)	29.5 (98)	29.8 (99)
45.0	44.6 (99)	43.9 (98)	42.5 (94)	42.9 (95)	43.5 (97)
67.0	66.5 (99)	65.8 (98)	63.7 (95)	64.4 (96)	65.1 (97)
100	98.6 (99)	99.7 (100)	-- --	-- --	99.1 (99)

a : time weighted mean

new : freshly prepared test solutions

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

The test water for analysis was sampled at two renewal sets of four during 96-hour exposure.

--: No measurement was made because all fish were dead at this observation time.

Table 2 Mortality of the Medaka (*Oryzias latipes*) Exposed to the Test Substance

Nominal Concentration (mg/L)	Mean ^a Measured Concentration (mg/L)	Cumulative Mortality (Percent Mortality)			
		24 Hours	48 Hours	72 Hours	96 Hours
Control	---	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
20.0	19.2	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
30.0	29.8	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
45.0	43.5	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
67.0	65.1	1 (10)	3 (30)	3 (30)	3 (30)
100	99.1	10 (100)	10 (100)	10 (100)	10 (100)

a: time weighted mean

Table 3 Calculated LC50 Values

Exposure Period (Hours)	LC50 (mg/L)	95-Percent Confidence Limits (mg/L)	Statistical Method
24	76.8 *	65.1 - 99.1	Binomial
48	71.7 *	43.5 - 99.1	Binomial
72	71.7 *	43.5 - 99.1	Binomial
96	71.7 *	43.5 - 99.1	Binomial

* : Using the concentrations of 19.2 – 99.1 mg/L

Table 4 Highest Concentration in 0% Mortality and the Lowest Concentration in 100% Mortality

Exposure Period (Hours)	Highest Concentration in 0% Mortality (mg/L)	Lowest Concentration in 100% Mortality (mg/L)
24	43.5	99.1
48	43.5	99.1
72	43.5	99.1
96	43.5	99.1

Table 5 Observed Toxicological Symptoms

Nominal Concentration (mg/L)	Mean ^a Measured Concentration (mg/L)	Symptoms (Symptom-number of fish)			
		24 Hours	48 Hours	72 Hours	96 Hours
Control	----	N	N	N	N
20.0	19.2	N	N	N	N
30.0	29.8	N	N	N	N
45.0	43.5	N	N	N	N
67.0	65.1	AP-1	N	N	N
100	99.1	--	--	--	--

a : time weighted mean

N : No toxicological symptom was observed.

AP: paralyzation

--: No observation was made because all fish were dead at this observation time.

Table 6 Appearance of Test Solutions

Nominal Concentration (mg/L)	Mean ^a Measured Concentration (mg/L)	Appearance of Test Solutions							
		0 Hour	24 Hours		48 Hours		72 Hours		96 Hours
		new	old	new	old	new	old	new	old
Control	----	C-	C-	C-	C-	C-	C-	C-	C-
20.0	19.2	C-	C-	C-	C-	C-	C-	C-	C-
30.0	29.8	C-	C-	C-	C-	C-	C-	C-	C-
45.0	43.5	C-	C-	C-	C-	C-	C-	C-	C-
67.0	65.1	C-	C-	C-	C-	C-	C-	C-	C-
100	99.1	C-	--	--	--	--	--	--	--

a : time weighted mean

new : freshly prepared test solutions

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

-- : No observation was made because all fish were dead at this observation time.

Color

C- : Colorless

Table 7 Temperature of Test Solutions

Nominal Concentration (mg/L)	Mean ^a Measured Concentration (mg/L)	Temperature (°C)							
		0 Hour	24 Hours		48 Hours		72 Hours		96 Hours
		new	old	new	old	new	old	new	old
Control	---	23.9	24.0	23.9	23.9	23.8	23.9	23.9	24.0
20.0	19.2	23.9	24.0	23.9	24.0	23.8	23.9	23.9	23.9
30.0	29.8	23.9	23.9	23.9	23.9	23.8	23.8	23.9	23.9
45.0	43.5	23.9	23.9	23.8	23.9	23.8	23.9	23.8	23.8
67.0	65.1	23.9	23.9	23.7	23.9	23.8	23.9	23.8	23.8
100	99.1	23.9	--	--	--	--	--	--	--

minimum:23.7
maximum:24.0

a : time weighted mean

new : freshly prepared test solutions

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

-- : No measurement was made because all fish were dead at this observation time.

Table 8 Dissolved Oxygen Concentrations in Test Solutions

Nominal Concentration (mg/L)	Mean ^a Measured Concentration (mg/L)	Dissolved Oxygen Concentration (mg/L)							
		0 Hour	24 Hours		48 Hours		72 Hours		96 Hours
		new	old	new	old	new	old	new	old
Control	---	8.3	6.7	8.3	6.8	8.3	7.0	8.3	7.0
20.0	19.2	8.3	6.4	8.2	6.6	8.3	6.7	8.3	6.8
30.0	29.8	8.3	6.7	8.3	6.9	8.3	7.0	8.3	7.2
45.0	43.5	8.2	6.5	8.3	6.7	8.3	6.8	8.3	6.9
67.0	65.1	8.3	6.7	8.2	7.1	8.3	7.3	8.3	7.5
100	99.1	8.3	--	--	--	--	--	--	--

minimum:6.4
maximum:8.3

a : time weighted mean

new : freshly prepared test solutions

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

-- : No measurement was made because all fish were dead at this observation time.

Table 9 pH Values of Test Solutions

Nominal Concentration (mg/L)	Mean ^a Measured Concentration (mg/L)	pH							
		0 Hour	24 Hours		48 Hours		72 Hours		96 Hours
		new	old	new	old	new	old	new	old
Control	----	7.4	6.9	7.3	7.0	7.5	7.0	7.5	7.0
20.0	19.2	6.6	6.4	6.5	6.5	6.6	6.5	6.6	6.5
30.0	29.8	6.2	6.1	6.2	6.2	6.3	6.3	6.3	6.2
45.0	43.5	5.5	5.6	5.5	5.7	5.8	5.9	5.8	5.8
67.0	65.1	3.9	4.0	3.9	4.1	4.4	4.5	4.5	4.6
100	99.1	3.2	--	--	--	--	--	--	--

minimum:3.2
maximum:7.5

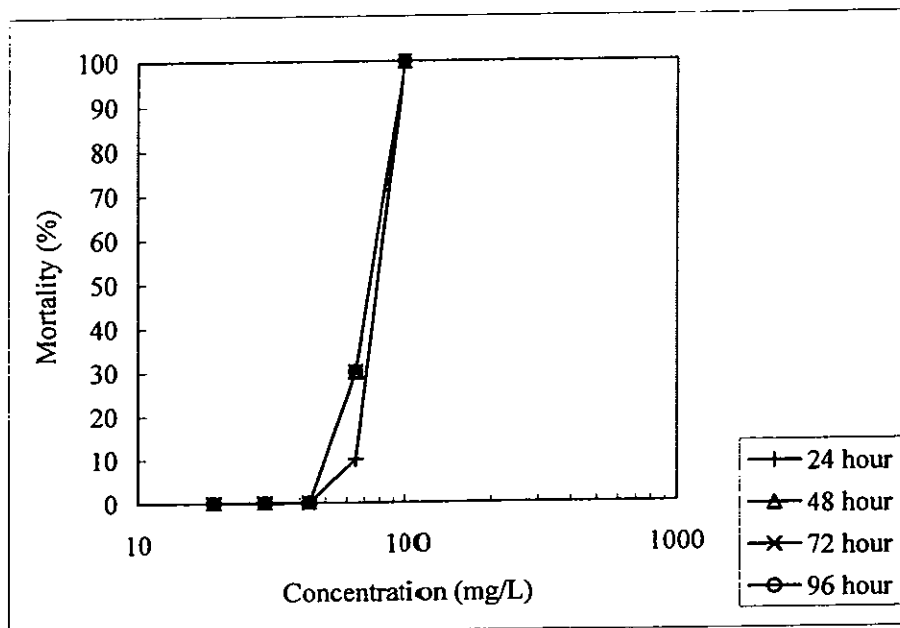
a : time weighted mean

new : freshly prepared test solutions

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

-- : No measurement was made because all fish were dead at this observation time.

Figure 1 Concentration-Mortality 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

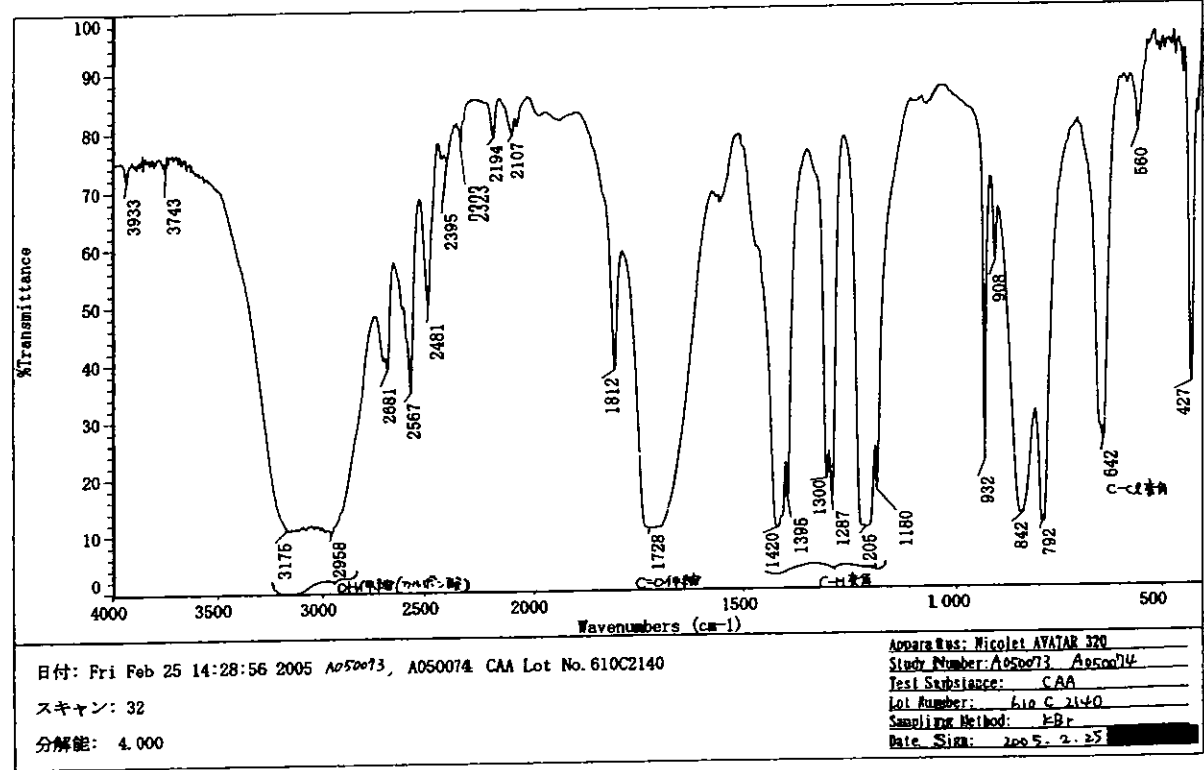
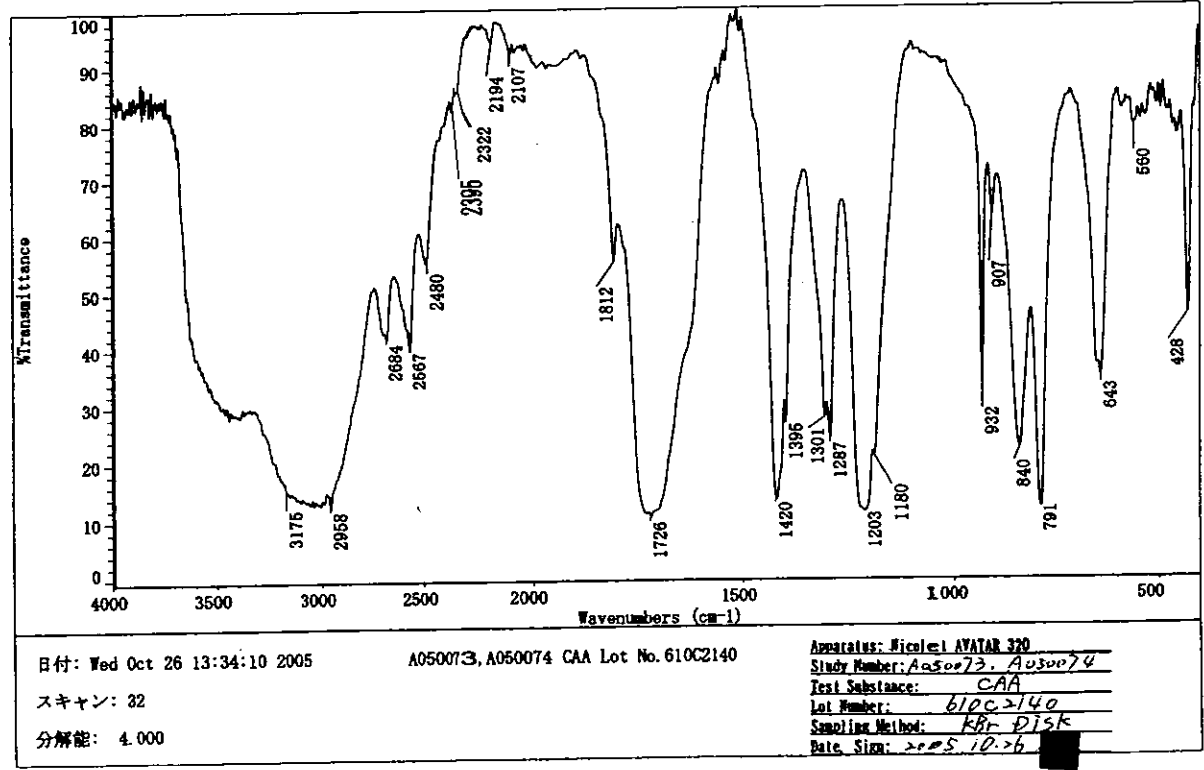


Figure A-1-2 Infrared absorption spectrum of the test substance at the end of the study



付属資料－ 2

希釈水の水質

Table A-2 Dilution Water Quality

Parameter	Concentration	
BOD	<2.0	mg/L
COD	<3.0	mg/L
pH	7.8	(18°C)
Coliform group bacteria	N.D.	
Oil	N.D.	
Cadmium	<0.01	mg/L
Cyanide	N.D.	
Lead	<0.1	mg/L
Chromium	<0.05	mg/L
Arsenic	<0.05	mg/L
Mercury	<0.0005	mg/L
Free chlorine	<0.02	mg/L
Bromide	<1.0	mg/L
Fluoride	<1.5	mg/L
Sulfide	<0.3	mg/L
Total ammonium	<1.0	mg/L
Copper	<0.005	mg/L
Zinc	<0.1	mg/L
Aluminum	<0.1	mg/L
Tin	<1.0	mg/L
Manganese	<1.0	mg/L
Iron	<1.0	mg/L
Nickel	<0.1	mg/L
Total phosphorus	<0.1	mg/L
Selenium	<0.001	mg/L
Phenol	<0.002	mg/L
Anionic surfactant	<0.02	mg/L
Evaporation residue	110	mg/L
Electric conductivity	155	µS/cm
Total hardness (as CaCO ₃)	55	mg/L
Alkalinity	44	mg/L
Sodium	8.4	mg/L
Potassium	1.4	mg/L
Calcium	14	mg/L
Magnesium	4.2	mg/L

sampling date: February 14, 2005

付属資料－ 3

試験液の調製

試験液の調製

1. 準備

① 被験物質原液 I の調製

採取量	→	500	mg	× 3本
溶媒	→	希釈水		
最終容量	→	5000	mL	× 3本
容器	→	メジュームびん		
濃度	→	100	mg/L	
混合方式	→	スターラー攪拌 1分		

2. 試験液の調製

①の原液 I を下記の表の通り採取し、試験用水で希釈して試験液とする。

試験用水 (最終容量)	→	5.0	L
容器	→	5.0L 容ガラス水槽	
混合方式	→	ガラス棒で攪拌	
濃度公比	→	1.5	

(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)	①原液 I mL
対照区	C	→ 0
20.0	Conc.1	→ 1000
30.0	Conc.2	→ 1500
45.0	Conc.3	→ 2250
67.0	Conc.4	→ 3350
100.0	Conc.5	→ 5000

付属資料－４

試験液の分析

1 高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 測定条件

(装置)

高速液体クロマトグラフ : ヒューレットパッカート製 HP-1100型 (No.1)

ワークステーション : HPケミステーション

デガッサー : G1322A型

送液ポンプ : G1312A型

オートサンプラ : G1313A型

カラムオープン : G1316A型

紫外可視分光検出器 : G1314A型

(条件)

カラム : SHISEIDO 製 CAPCELL PAK C18 MG 5 μ m 4.6mm i.d. \times 250mm

溶離液 : A液 : 0.1% リン酸水*溶液

B液 : アセトニトリル

A液/B液=80/20

流速 : 1.0 mL/min.

測定波長 : 210 nm

試料注入量 : 20 μ L

カラムオープン温度 : 40 $^{\circ}$ C

* : JIS K0557 A4 グレードの水

2 検量線

精製水を用い、0, 10~200 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。

標準溶液 1.50 mL 採取

|

HPLC測定

3 検出限界

最小検出ピーク面積を0.1countに設定し、これに相当する試験液中の被験物質濃度0.2 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。

分析試料

| (精製水で適宜希釈*)

1.50 mL 採取

|

HPLC測定

* 検量線範囲を超えるものについて適宜希釈した。

- 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」に示すように、試験液を採取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	0.0
2	10	7.0
3	20	14.2
4	50	36.6
5	100	73.0
6	200	145.0

$Y = 0.726X$
 $r = 1.00$

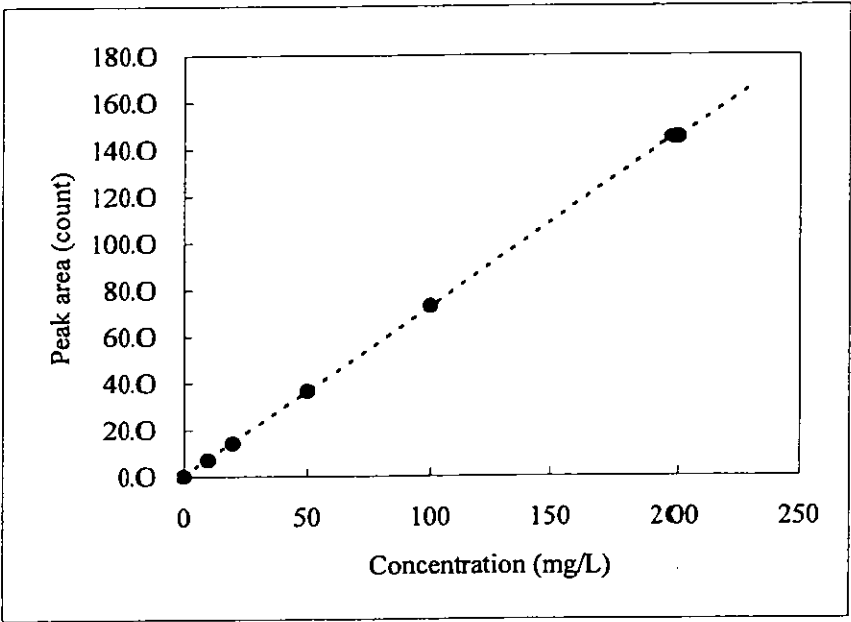
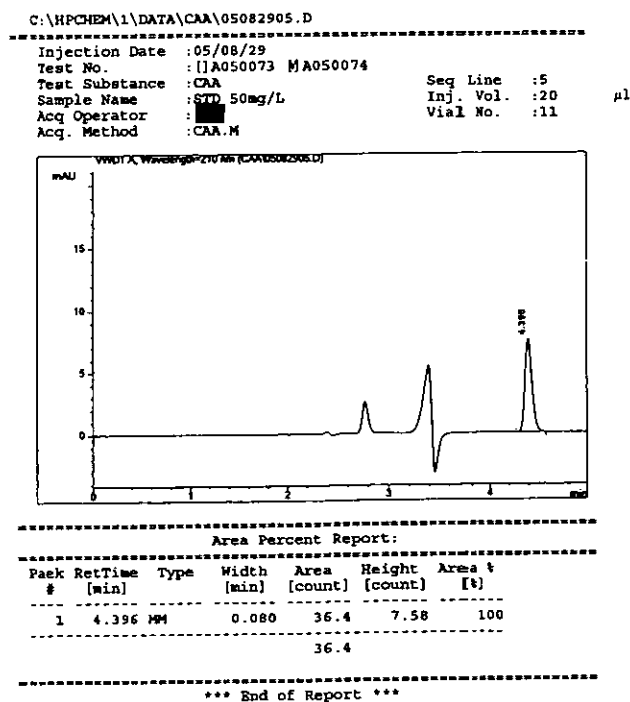


Figure A-4-2 Representative chromatograms

(1) Standard 50.0 mg/L ; 0 Hour



(2) Control ; 0 Hour

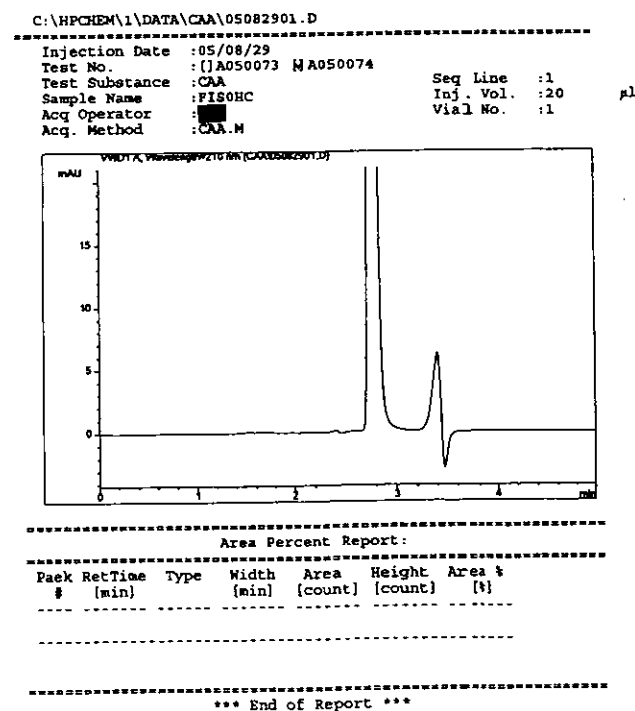


Figure A-4-2

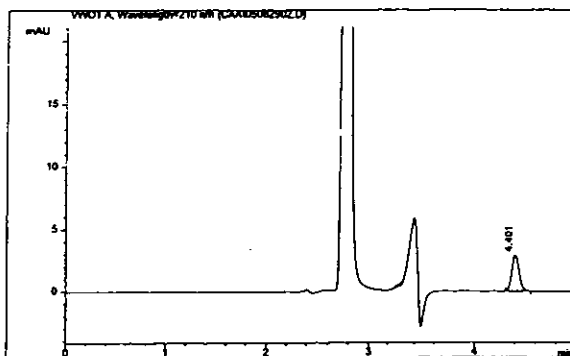
Continued

(3) 20.0 mg/L nominal ; 0 Hour

C:\HPCHEM\1\DATA\CAA\05082902.D

```

-----
Injection Date : 05/08/29
Test No.       : (I)A050073 (N)A050074
Test Substance : CAA                               Seq Line : 2
Sample Name    : FTS0HCL                           Inj. Vol.  : 20    µl
Acq Operator   : [REDACTED]                       Vial No.   : 2
Acq. Method    : CAA.M
  
```



Area Percent Report:

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [count]	Height [count]	Area %
1	4.401	PM	0.080	14.2	2.95	100

14.2

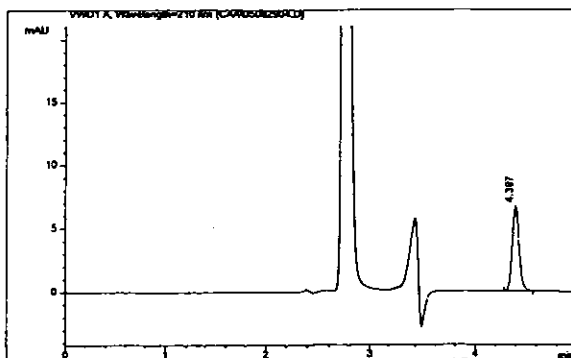
*** End of Report ***

(4) 45.0 mg/L nominal ; 0 Hour

C:\HPCHEM\1\DATA\CAA\05082904.D

```

-----
Injection Date : 05/08/29
Test No.       : (I)A050073 (N)A050074
Test Substance : CAA                               Seq Line : 4
Sample Name    : FTS0HCL                           Inj. Vol.  : 20    µl
Acq Operator   : [REDACTED]                       Vial No.   : 4
Acq. Method    : CAA.M
  
```



Area Percent Report:

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [count]	Height [count]	Area %
1	4.397	PM	0.080	32.5	6.73	100

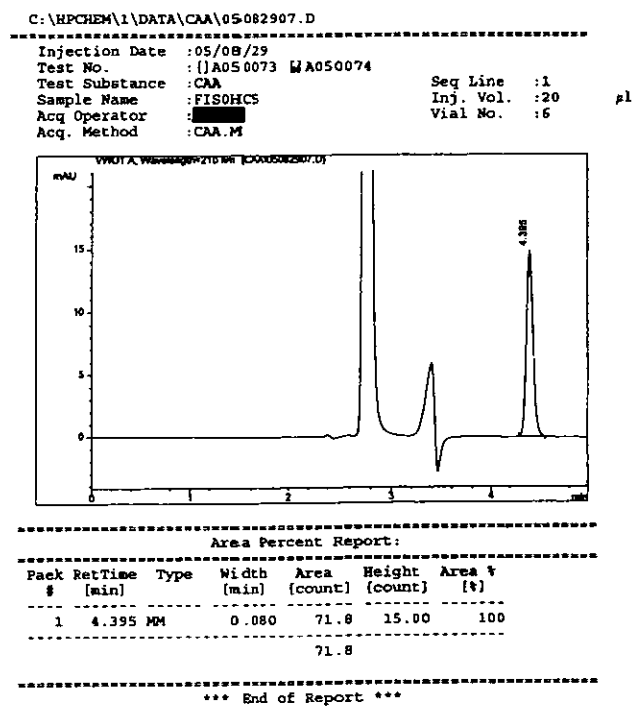
32.5

*** End of Report ***

Figure A-4-2

Continued

(5) 100 mg/L nominal ; 0 Hour



(6) Standard 50.0 mg/L ; 24 Hours

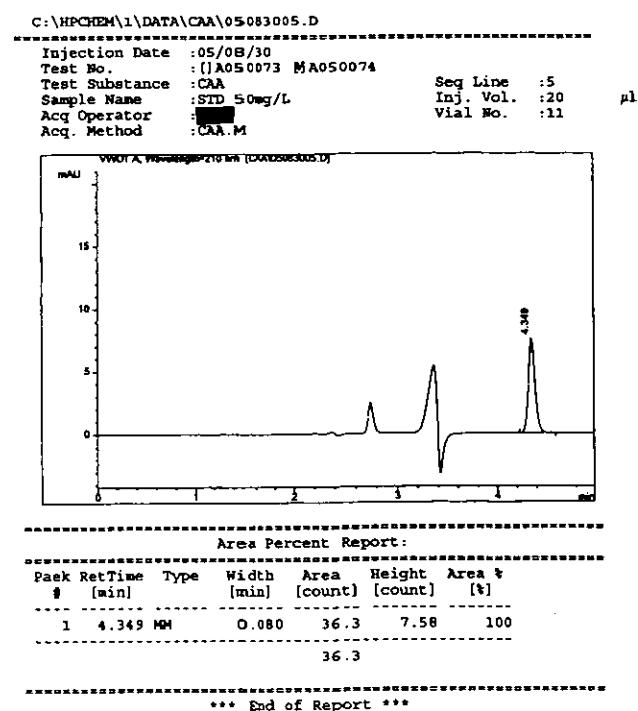


Figure A-4-2

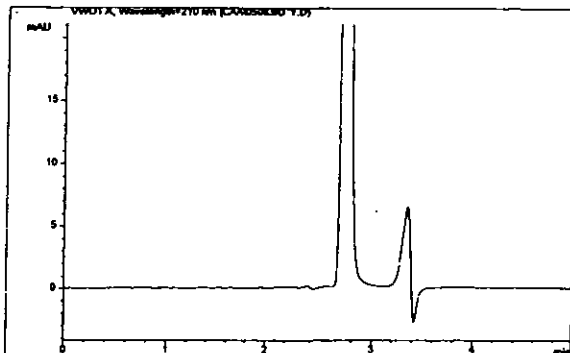
Continued

(7) Control ; 24 Hours

C:\HPCHEM\1\DATA\CAA\05083001.D

```

-----
Injection Date : 05/08/30
Test No.       : {}A050073  W A050074
Test Substance : CAA
Sample Name    : ETS24HC
Acq Operator   : 
Acq. Method    : CAA.M
Seq Line       : 1
Inj. Vol.      : 20    µl
Vial No.       : 1
  
```



Area Percent Report:

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [count]	Height [count]	Area %
--------	---------------	------	-------------	--------------	----------------	--------

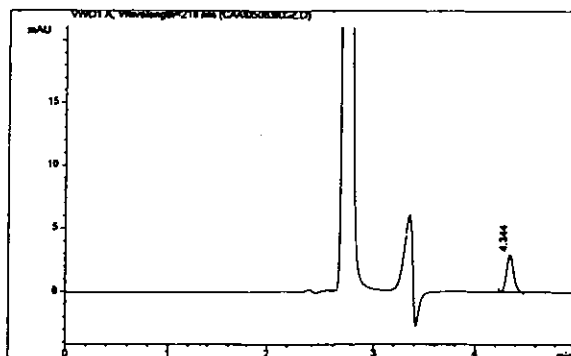
*** End of Report ***

(8) 20.0 mg/L nominal ; 24 Hours

C:\HPCHEM\1\DATA\CAA\05083002.D

```

-----
Injection Date : 05/08/30
Test No.       : {}A050073  W A050074
Test Substance : CAA
Sample Name    : ETS24HCL
Acq Operator   : 
Acq. Method    : CAA.M
Seq Line       : 2
Inj. Vol.      : 20    µl
Vial No.       : 2
  
```



Area Percent Report:

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [count]	Height [count]	Area %
1	4.344	PM	0.079	14.0	2.95	100

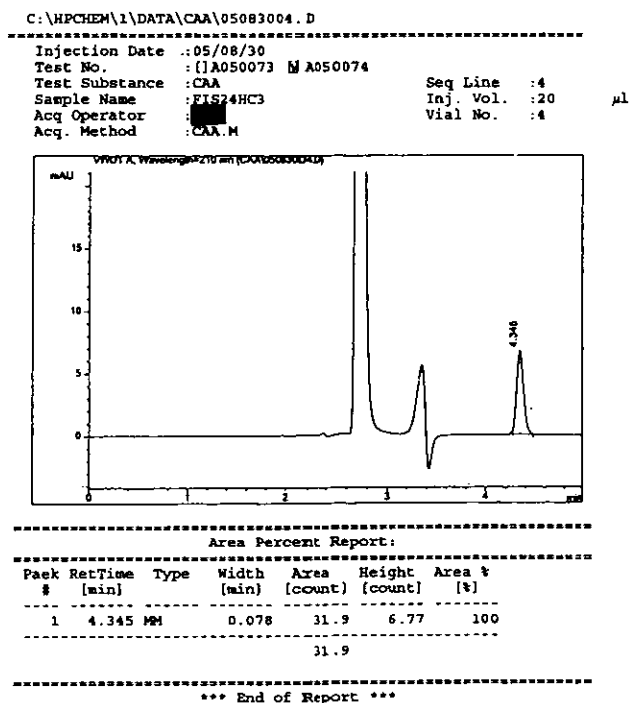
14.0

*** End of Report ***

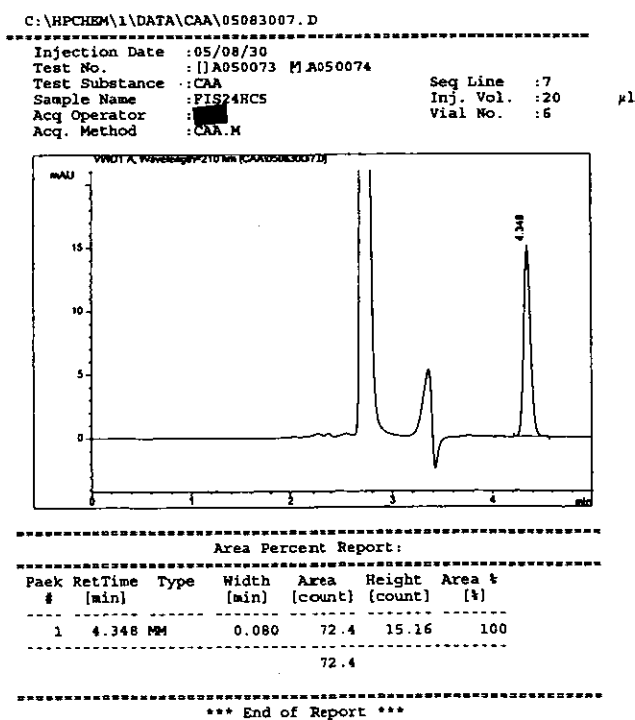
Figure A-4-2

Continued

(9) 45.0 mg/L nominal ; 24 Hours



(10) 100 mg/L nominal ; 24 Hours



付属資料－ 5

結果の算出

Table A-5 Calculation of the 96 hr LC50

TOXDAT MULTI-METHOD PROGRAM (BINOMIAL, MOVING AVERAGE AND PROBIT METHODS)					
魚類急性毒性試験 Time: 96hr					
Conc. No.	CONC. mg/L	NUMBER EXPOSED	NUMBER DEAD	PERCENT DEAD	BINOMIAL PROB. (%)
Control	0	10	0	0	----
Conc. 1	19.2	10	0	0	0.09765625
Conc. 2	29.8	10	0	0	0.09765625
Conc. 3	43.5	10	0	0	0.09765625
Conc. 4	65.1	10	3	30	17.1875
Conc. 5	99.1	10	10	100	0.09765625

THE BINOMIAL TEST SHOWS THAT 43.5 AND 99.1 CAN BE
 USED AS STATISTICALLY SOUND CONSERVATIVE 95 PERCENT
 CONFIDENCE LIMITS SINCE THE ACTUAL CONFIDENCE LEVEL
 ASSOCIATED WITH THESE LIMITS IS 99.8046875 PERCENT.
 AN APPROXIMATE LC50 FOR THIS SET OF DATA IS 71.6538677564376

WHEN THERE ARE LESS THAN TWO CONCENTRATIONS AT WHICH THE PERCENT
 DEAD IS BETWEEN 0 AND 100, NEITHER THE MOVING AVERAGE NOR THE
 PROBIT METHOD CAN GIVE ANY STATISTICALLY SOUND RESULTS.

付属資料－ 6

追加試験

(試験液のpH調整あり)

本試験では、被験物質に起因するpHの変動による毒性値への影響が懸念されたため、被験物質原液のpHを調整した追加試験を同時に実施した。詳細を以下に示す。なお、供試生物、試験条件、希釈水、試験容器および恒温槽等、試験液の分析、試験操作、結果の算出については、本文と同様に実施した。

1 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）のため、試験上限濃度の 100 mg/L以下とした。

以下の表に示す予備試験（各 1 連、5 尾/3 L 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：対照区、20.0, 30.0, 45.0, 67.0, 100 mg/L

（公比：1.5）

予備試験結果（1回目）

濃度 (mg/L)	96時間の死亡率(%)	毒性症状
100	100	有

予備試験結果（2回目）

濃度 (mg/L)	96時間の死亡率(%)	毒性症状
10.0	0	無
30.0	0	無

2 試験液の調製

試験液の調製方法を以下に示す。1 mol/L 水酸化ナトリウムを用いて被験物質原液の pH を希釈水と同等となるように調整した。被験物質原液は用時調製とした。

対照区は希釈水のみとした。

試験液の調整

1. 準備

① 被験物質原液の調製

採取量	→	500	mg	× 3本
溶媒	→	希釈水		
最終容量	→	5000	mL	× 3本
容器	→	5L容ビーカー		
濃度	→	100	mg/L	
混合方式	→	スターラー攪拌 1分, 1 mol/L-NaOHを用いてpHを6.0~8.5に調整した後、5000 mLとする。		

2. 試験液の調製

①の原液 I を下記の表の通り採取し、試験用水で希釈して試験液とする。

希釈水(最終容量)	→	5.0	L
容器	→	5.0 L容ガラス水槽	

(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)	①原液 (mL)
対照区	C	→ 0
20.0	Conc.1	→ 1000
30.0	Conc.2	→ 1500
45.0	Conc.3	→ 2250
67.0	Conc.4	→ 3350
100.0	Conc.5	→ 5000

3 結果および考察

3.1 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。

3.2 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 A-6-1に、代表的なクロマトグラムをFigure A-6-2に示す。

試験液の分析の結果、測定値の設定値に対する割合は、試験液調製時において 98～103%、その 24 時間後において 97～101%であった。

3.3 半数致死濃度 (LC50)

各時間における累積死亡率をTable A-6-2に、濃度－死亡率曲線を Figure A-6-1に示す。

暴露96時間の対照区の死亡率は 0%であり、試験成立条件を満たした。

以上の結果に基づき算出された半数致死濃度 (LC50) を Table A-6-3 に、96 時間 LC50 の算出結果を Table A-6-10 および以下に示す。

96時間 LC50 : 72.5 mg/L (95%信頼区間 : 44.1 ~ 98.9 mg/L)

3.4 0%死亡最高濃度および100%死亡最低濃度

各時間における0%死亡最高濃度および100%死亡最低濃度を Table A-6-4に、また暴露96時間における結果を以下に示す。

96時間の0%死亡最高濃度 : 44.1 mg/L

96時間の100%死亡最低濃度 : 98.9 mg/L

3.5 毒性症状

観察された毒性症状を Table A-6-5に示す。

対照区, 20.0 mg/L, 30.0 mg/L, 45.0 mg/L および 67.0 mg/L の濃度区では暴露期間中に異常な症状は観察されなかった。100 mg/L の濃度区では、暴露 48 時間目に 1 個体で遊泳不能が観察されたが、その後その個体は死亡した。

3.6 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 A-6-6，水温を Table A-6-7，溶存酸素濃度を Table A-6-8，pH を Table A-6-9 に示す。

試験液の外観は，全ての試験区で暴露期間を通じて無色であった。

水温はすべての試験区で 24 ± 1 °Cで，溶存酸素濃度はすべての試験区で飽和溶存酸素濃度（24.0 °Cの飽和溶存酸素濃度：8.25 mg/L）の60%以上であり，いずれも試験基準を満たした。pHはヒメダカの飼育環境として適正範囲（6.0～8.5）内であった。

以 上

Table A-6-1 Measured Concentration of the Test Substance in Test Water

(Semi-Static Condition)					
Nominal Concentration (mg/L)	Measured Concentration (mg/L)				Mean ^a Measured Concentration (mg/L)
	(Percent of Nominal)				
	0 Hour (new)	24 Hours (old)	48 Hours (new)	72 Hours (old)	
Control	<0.2	<0.2	<0.2	<0.2	—
20.0	19.8	19.9	20.0	20.2	20.0
	(99)	(100)	(100)	(101)	(100)
30.0	30.8	30.4	30.0	30.4	30.4
	(103)	(101)	(100)	(101)	(101)
45.0	44.3	44.4	44.1	43.8	44.1
	(98)	(99)	(98)	(97)	(98)
67.0	65.9	66.3	66.0	66.3	66.1
	(98)	(99)	(99)	(99)	(99)
100	98.9	98.9	99.0	98.4	98.9
	(99)	(99)	(99)	(98)	(99)

a : time weighted mean

new : freshly prepared test solutions

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

The test water for analysis was sampled at two renewal sets of four during 96-hour exposure.

Table A-6-2 Mortality of the Medaka (*Oryzias latipes*) Exposed to the Test Substance

Nominal Concentration (mg/L)	Mean ^a Measured Concentration (mg/L)	Cumulative Mortality (Percent Mortality)							
		24 Hours		48 Hours		72 Hours		96 Hours	
Control	----	0	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)
20.0	20.0	0	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)
30.0	30.4	0	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)
45.0	44.1	0	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)
67.0	66.1	0	(0)	0	(0)	1	(10)	3	(30)
100	98.9	0	(0)	2	(20)	7	(70)	10	(100)

a: time weighted mean

Table A-6-3 Calculated LC50 Values

Exposure Period (Hours)	LC50 (mg/L)	95-Percent Confidence Limits (mg/L)			Statistical Method
24	>98.9	-	-	-	-
48	>98.9	-	-	-	-
72	88.0 *	74.4	-	112	Probit
96	72.5 *	44.1	-	98.9	Binomial

* : Using the concentrations of 20.0 – 98.9 mg/L

- - : Could not be determined

The LC50 value and its 95% confidence limits could not be determined by statistical method because the mortality at the maximum concentration level was less than 50%.

Table A-6-4 Highest Concentration in 0% Mortality and the Lowest Concentration in 100% Mortality Value

Exposure Period (Hours)	Highest Concentration in 0% Mortality (mg/L)	Lowest Concentration in 100% Mortality (mg/L)
24	>98.9	>98.9
48	66.1	>98.9
72	44.1	>98.9
96	44.1	98.9

Table A-6-5 Observed Toxicological Symptoms

Nominal Concentration (mg/L)	Mean ^a Measured Concentration (mg/L)	Symptoms (Symptom-number of fish)			
		24 Hours	48 Hours	72 Hours	96 Hours
Control	---	N	N	N	N
20.0	20.0	N	N	N	N
30.0	30.4	N	N	N	N
45.0	44.1	N	N	N	N
67.0	66.1	N	N	N	N
100	98.9	N	ASR-1	N	--

a : time weighted mean

N : No toxicological symptom was observed.

ASR: abnormal swimming (reduced activity)

--: No observation was made because all fish were dead at this observation time.

Table A-6-6 Appearance of Test Solutions

Nominal Concentration (mg/L)	Mean ^a Measured Concentration (mg/L)	Appearance of Test Solutions							
		0 Hour	24 Hours		48 Hours		72 Hours		96 Hours
		new	old	new	old	new	old	new	old
Control	----	C-	C-	C-	C-	C-	C-	C-	C-
20.0	20.0	C-	C-	C-	C-	C-	C-	C-	C-
30.0	30.4	C-	C-	C-	C-	C-	C-	C-	C-
45.0	44.1	C-	C-	C-	C-	C-	C-	C-	C-
67.0	66.1	C-	C-	C-	C-	C-	C-	C-	C-
100	98.9	C-	C-	C-	C-	C-	C-	C-	--

a : time weighted mean

new : freshly prepared test solutions

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

-- : No observation was made because all fish were dead at this observation time.

Color

C- : Colorless

Table A-6-7 Temperature of Test Solutions

Nominal Concentration (mg/L)	Mean ^a Measured Concentration (mg/L)	Temperature (°C)							
		0 Hour	24 Hours		48 Hours		72 Hours		96 Hours
		new	old	new	old	new	old	new	old
Control	----	23.7	23.7	23.6	23.9	23.9	23.9	23.9	24.0
20.0	20.0	23.6	23.7	23.6	24.0	23.9	23.9	23.9	23.9
30.0	30.4	23.6	23.8	23.6	24.0	23.9	24.0	23.9	23.9
45.0	44.1	23.6	23.9	23.6	24.1	23.9	24.0	23.8	24.0
67.0	66.1	23.6	23.9	23.5	24.0	23.9	24.1	23.8	24.0
100	98.9	23.5	24.0	23.5	24.2	23.8	24.2	23.8	--

minimum:23.5
maximum:24.2

a : time weighted mean

new : freshly prepared test solutions

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

-- : No measurement was made because all fish were dead at this observation time.

Table A-6-8 Dissolved Oxygen Concentrations in Test Solutions

Nominal Concentration (mg/L)	Mean ^a Measured Concentration (mg/L)	Dissolved Oxygen Concentration (mg/L)							
		0 Hour	24 Hours		48 Hours		72 Hours		96 Hours
		new	old	new	old	new	old	new	old
Control	----	8.3	6.3	8.3	6.6	8.3	6.6	8.3	6.8
20.0	20.0	8.3	6.3	8.3	6.6	8.3	6.7	8.3	6.9
30.0	30.4	8.3	6.3	8.3	6.7	8.3	6.7	8.3	6.8
45.0	44.1	8.3	6.4	8.3	6.7	8.3	6.7	8.3	6.9
67.0	66.1	8.3	6.4	8.3	6.5	8.3	6.5	8.3	6.9
100	98.9	8.3	6.3	8.3	6.6	8.2	7.3	8.3	--

minimum:6.3
maximum:8.3

a : time weighted mean

new : freshly prepared test solutions

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

-- : No measurement was made because all fish were dead at this observation time.

Table A-6-9 pH Values of Test Solutions

Nominal Concentration (mg/L)	Mean ^a Measured Concentration (mg/L)	pH							
		0 Hour	24 Hours		48 Hours		72 Hours		96 Hours
		new	old	new	old	new	old	new	old
Control	----	7.4	6.9	7.3	7.1	7.5	7.0	7.4	6.8
20.0	20.0	7.4	6.8	7.3	7.0	7.5	7.0	7.4	6.9
30.0	30.4	7.4	6.8	7.3	7.0	7.4	7.0	7.4	7.0
45.0	44.1	7.4	6.9	7.3	7.0	7.4	7.0	7.3	7.0
67.0	66.1	7.4	7.0	7.3	7.0	7.4	7.0	7.3	7.0
100	98.9	7.4	6.9	7.3	7.0	7.3	7.0	7.2	--

minimum:6.8
maximum:7.5

a : time weighted mean

new : freshly prepared test solutions

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

-- : No measurement was made because all fish were dead at this observation time.

Table A-6-10 Calculation of the 96 hr LC50

TOXDAT MULTI-METHOD PROGRAM (BINOMIAL, MOVING AVERAGE AND PROBIT METHODS)					
魚類急性毒性試験					
Time: 96hr					
Conc. No.	CONC. mg/L	NUMBER EXPOSED	NUMBER DEAD	PERCENT DEAD	BINOMIAL PROB. (%)
Control	0	10	0	0	-----
Conc. 1	20	10	0	0	0.09765625
Conc. 2	30.4	10	0	0	0.09765625
Conc. 3	44.1	10	0	0	0.09765625
Conc. 4	66.1	10	3	30	17.1875
Conc. 5	98.9	10	10	100	0.09765625

THE BINOMIAL TEST SHOWS THAT 44.1 AND 98.9 CAN BE
 USED AS STATISTICALLY SOUND CONSERVATIVE 95 PERCENT
 CONFIDENCE LIMITS SINCE THE ACTUAL CONFIDENCE LEVEL
 ASSOCIATED WITH THESE LIMITS IS 99.8046875 PERCENT.
 AN APPROXIMATE LC50 FOR THIS SET OF DATA IS 72.4683770332058

WHEN THERE ARE LESS THAN TWO CONCENTRATIONS AT WHICH THE PERCENT
 DEAD IS BETWEEN 0 AND 100, NEITHER THE MOVING AVERAGE NOR THE
 PROBIT METHOD CAN GIVE ANY STATISTICALLY SOUND RESULTS.

Figure A-6-1 Concentration-Mortality Curve

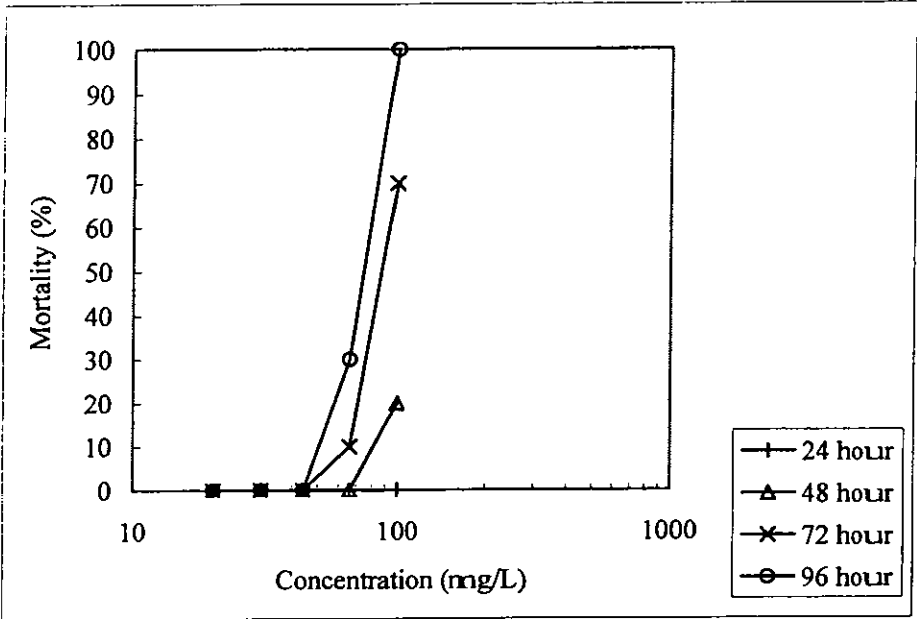
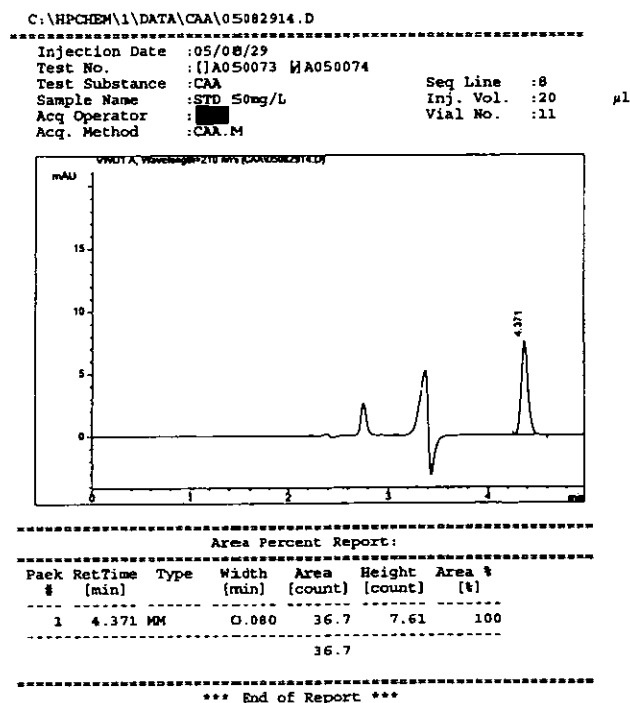


Figure A-6-2 Representative chromatograms

(1) Standard 50.0 mg/L ; 0 Hour



(2) Control ; 0 Hour

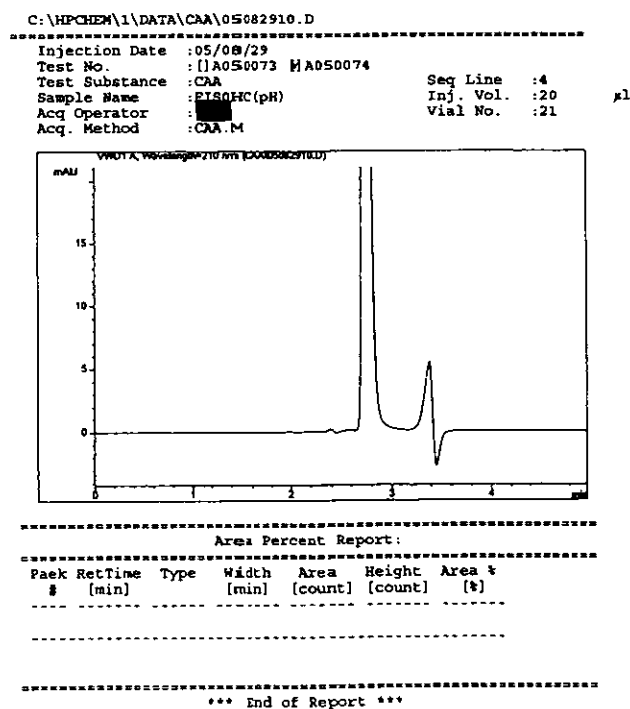
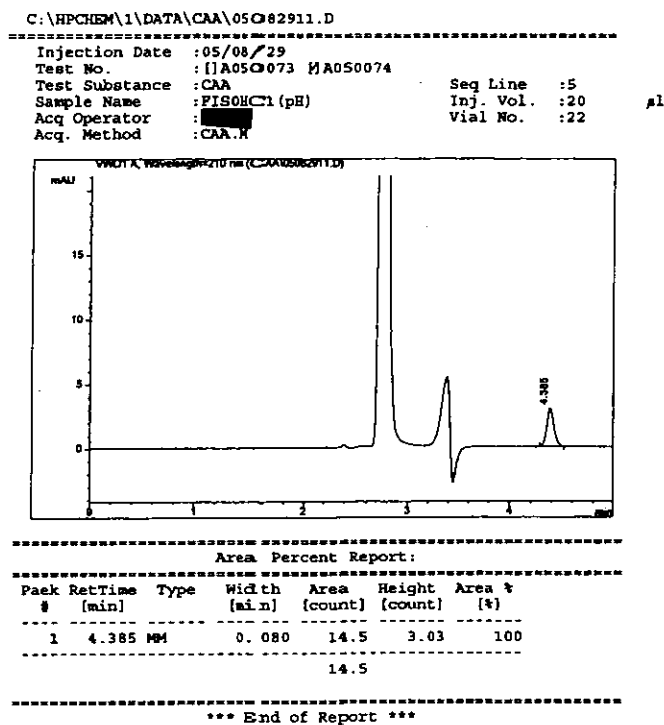


Figure A-6-2

Continued

(3) 20.0 mg/L nominal ; 0 Hour



(4) 45.0 mg/L nominal ; 0 Hour

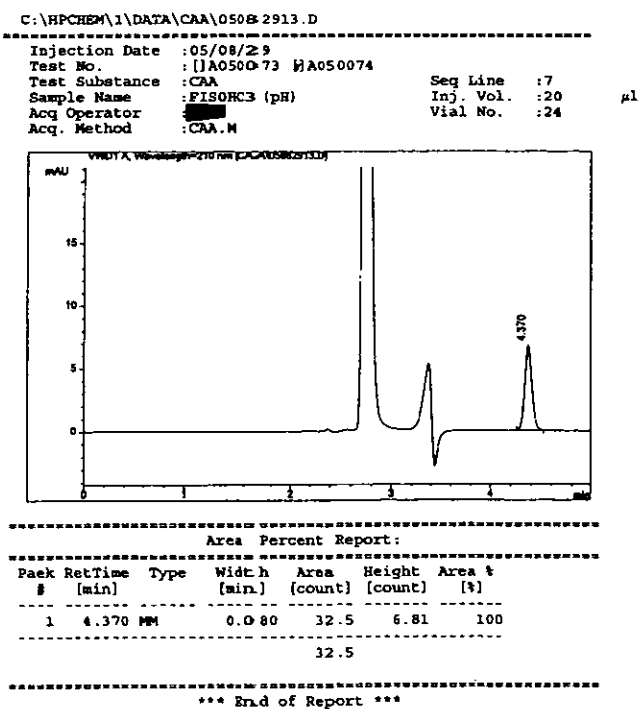
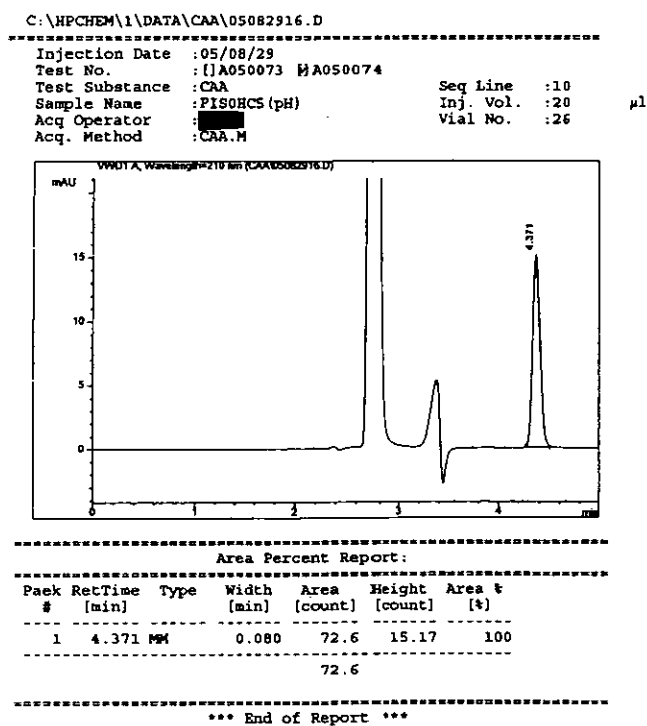


Figure A-6-2

Continued

(5) 100 mg/L nominal ; 0 Hour



(6) Standard 50.0 mg/L ; 24 Hours

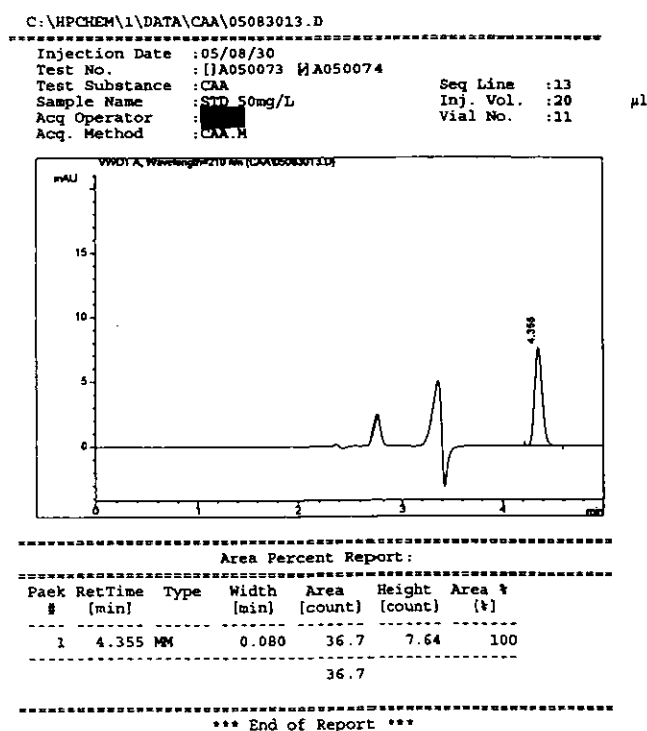


Figure A-6-2

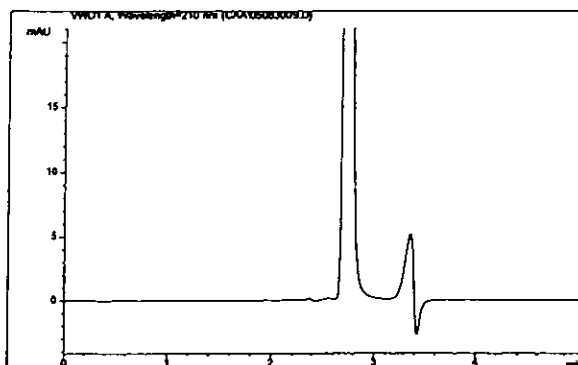
Continued

(7) Control ; 24 Hours

C:\HPCHEM\1\DATA\CAA\05083009.D

```

-----
Injection Date : 05/08/30
Test No.       : [ ]A050073 [X]A050074
Test Substance : CAA                               Seq Line   : 9
Sample Name    : FIS24HC(pH)                       Inj. Vol.    : 20      µl
Acq Operator   : [REDACTED]                         Vial No.     : 21
Acq. Method    : CAA.M
  
```



Area Percent Report:

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [count]	Height [count]	Area %
--------	---------------	------	-------------	--------------	----------------	--------

*** End of Report ***

(8) 20.0 mg/L nominal ; 24 Hours

C:\HPCHEM\1\DATA\CAA\05083010.D

```

-----
Injection Date : 05/08/30
Test No.       : [ ]A050073 [X]A050074
Test Substance : CAA                               Seq Line   : 10
Sample Name    : FIS24HCl (pH)                     Inj. Vol.    : 20      µl
Acq Operator   : [REDACTED]                         Vial No.     : 22
Acq. Method    : CAA.M
  
```



Area Percent Report:

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [count]	Height [count]	Area %
1	4.356 MM		0.080	14.6	3.06	100

14.6

*** End of Report ***

Figure A-6-2

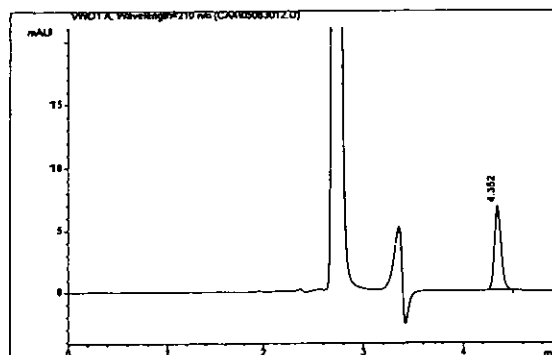
Continued

(9) 45.0 mg/L nominal ; 24 Hours

C:\HPCHEM\1\DATA\CAA\05083012.D

Injection Date : 05/08/30
 Test No. : ([)A050073 M A050074
 Test Substance : CAA
 Sample Name : FIS24HC3 (pH)
 Acq. Operator : XXXXXXXXXX
 Acq. Method : CAA.M

Seq Line : 12
 Inj. Vol. : 20 μ l
 Vial No. : 24



Area Percent Report:

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [count]	Height [count]	Area %
1	4.352	MM	0.079	32.6	6.84	100

32.6

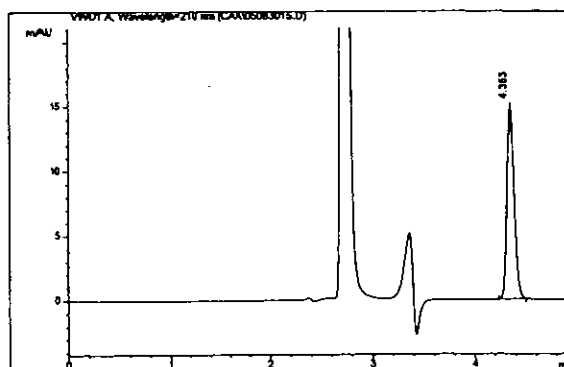
*** End of Report ***

(10) 100 mg/L nominal ; 24 Hours

C:\HPCHEM\1\DATA\CAA\05083015.D

Injection Date : 05/08/30
 Test No. : ([)A050073 M A050074
 Test Substance : CAA
 Sample Name : FIS24HCS (pH)
 Acq. Operator : XXXXXXXXXX
 Acq. Method : CAA.M

Seq Line : 15
 Inj. Vol. : 20 μ l
 Vial No. : 26



Area Percent Report:

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [count]	Height [count]	Area %
1	4.353	MM	0.079	72.6	15.23	100

72.6

*** End of Report ***