

受付番号	662-11-E-5704
試験番号	95704

## 最 終 報 告 書

*o*-ニトロアニリンのオオミジンコを用いる 48 時間急性遊泳阻害試験

2012 年 2 月

一般財団法人化学物質評価研究機構

久留米事業所

本文書は正本を正確に転写したものです。  
 一般財団法人 化学物質評価研究機構 久留米事業所  
 2012 年 2 月 20 日  
 試験責任者

## 陳 述 書

一般財団法人化学物質評価研究機構  
久留米事業所

試験委託者 環境省

試験の表題 *o*-ニトロアニリンのオオミジンコを用いる 48 時間急性遊泳阻害試験

試験番号 95704

上記試験は以下の GLP に従って実施したものである。

- a) 「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 23 年 3 月 31 日、薬食発 0331 第 8 号、平成 23・03・29 製局第 6 号、環保企発第 110331010 号）に定める「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」
- b) OECD Principles of Good Laboratory Practice, November 26, 1997

また、本最終報告書は生データを正確に反映しており、試験データが有効であることを確認した。

2012 年 2 月 10 日

試験責任者



## 信 頼 性 保 証 書

一般財団法人化学物質評価研究機構  
久留米事業所

試験委託者 環境省

試験の表題 o-ニトロアニリンのオオミジンコを用いる48時間急性遊泳阻害試験

試験番号 95704

本最終報告書は、試験の方法、手順が正確に記載され、試験結果は生データを正確に反映していることを保証する。

なお、監査又は査察の結果については、下記の通り試験責任者及び運営管理者に報告した。

監査又は査察内容	監査又は査察日	報告日 (試験責任者及び運営管理者)
試験計画書草案	2011年12月15日	2011年12月15日
試験計画書	2011年12月16日	2011年12月16日
暴露開始時	2011年12月19日	2011年12月19日
暴露開始後	2011年12月21日	2011年12月22日
生データ、最終報告書草案	2012年1月23日	2012年1月23日
最終報告書	2012年2月10日	2012年2月10日

2012 年 2 月 10 日

信頼性保証部門責任者

## 目 次

	頁
1. 表 題 .....	6
2. 試験委託者 .....	6
3. 試験施設 .....	6
4. 試験目的 .....	6
5. 試験法 .....	6
6. GLP 基準 .....	6
7. 試験日程 .....	6
8. 試資料の保管 .....	7
9. 試験関係者 .....	7
10. 最終報告書の承認 .....	7
11. 要 約 .....	8
12. 試験材料 .....	9
12.1 被験物質 .....	9
12.2 試験生物 .....	10
13. 試験の実施 .....	11
13.1 試験用水 .....	11
13.2 試験器具及び装置 .....	11
13.3 試験液の調製法 .....	11
13.4 試験条件 .....	11
13.5 観察と測定 .....	11
13.6 $EC_{50}$ の算出法 .....	12
13.7 試験の有効性 .....	12
13.8 数値の取扱い .....	12
14. 試験結果及び考察 .....	12
14.1 遊泳阻害率 .....	12
14.2 一般状態の観察 .....	13
14.3 試験液の観察と測定 .....	13
14.4 $EC_{50}$ .....	13
14.5 考 察 .....	13
15. 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 .....	13

## Tables

Table 1	Immobility .....	14
Table 2	Observed abnormal response .....	15
Table 3	Condition of test solutions .....	15
Table 4	EC <sub>50</sub> to <i>Daphnia magna</i> .....	16

## Figure

Figure 1	Concentration-immobility curve .....	17
----------	--------------------------------------	----

Appendix 1	試験用水の水質
Appendix 2	被験物質濃度の測定方法及び結果
Appendix 3	検量線及びクロマトグラム
Additional data	予備試験結果

## 1. 表 題

*o*-ニトロアニリンのオオミジンコを用いる 48 時間急性遊泳阻害試験

## 2. 試験委託者

名 称 環境省

住 所 〒100-8975 東京都千代田区霞が関 1-2-2

## 3. 試験施設

名 称 一般財団法人化学物質評価研究機構 久留米事業所

住 所 〒839-0801 福岡県久留米市宮ノ陣三丁目 2 番 7 号

## 4. 試験目的

*o*-ニトロアニリンのオオミジンコに対する急性遊泳阻害試験を行い、48 時間の半数遊泳阻害濃度 (EC<sub>50</sub>) を求める。

## 5. 試験法

- a) 「新規化学物質等に係る試験の方法について」(平成 23 年 3 月 31 日、薬食発 0331 第 7 号、平成 23・03・29 製局第 5 号、環保企発第 110331009 号) に定める「ミジンコ急性遊泳阻害試験」
- b) OECD Guidelines for Testing of Chemicals, No.202, April 13, 2004, "*Daphnia* sp., Acute Immobilisation Test"

## 6. GLP 基準

- a) 「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 23 年 3 月 31 日、薬食発 0331 第 8 号、平成 23・03・29 製局第 6 号、環保企発第 110331010 号) に定める「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」
- b) OECD Principles of Good Laboratory Practice, November 26, 1997

## 7. 試験日程

試 験 開 始 日	2011 年 12 月 16 日
実 験 開 始 日	2011 年 12 月 19 日
実 験 終 了 日	2011 年 12 月 21 日
試 験 終 了 日	2012 年 2 月 10 日

## 8. 試資料の保管

試験計画書（正本）、最終報告書（正本）、生データ、試験委託書、契約書写し及びその他の記録は当試験施設に保管し、被験物質は保管しない。

保管期間は最終報告書提出後 10 年間とする。

保管期間終了後の処置（継続保管、廃棄又は返却）は、試験委託者と協議の上決定する。

## 9. 試験関係者

試験責任者

■■■■■■■■■■

（所属 試験第四課）

試験担当者（生物試験の実施）

■■■■■■■■■■

試験担当者（分析試験の実施）

■■■■■■■■■■

## 10. 最終報告書の承認

2012 年 2 月 10 日

試験責任者

■■■■■■■■■■

## 11. 要 約

試験条件

試験生物	オオミジンコ ( <i>Daphnia magna</i> )
試験用水	脱塩素水道水
試験区	40、24、14、8.1、4.8 mg/L (公比 1.7) の 5 濃度区及び対照区
試験液の調製	供試試料と試験用水を混合、攪拌して調製した試験原液を用いて調製
暴露方式	止水式
暴露期間	48 時間
連 数	4 連/試験区
試験生物数	20 頭/試験区 (5 頭/試験容器)
試験液量	400 mL/試験区 (100 mL/試験容器)
水 温	19.7~19.8℃
照 明	室内灯、16 時間明/8 時間暗
給 餌	無給餌
エアレーション	無し
被験物質濃度の測定	HPLC 法 (暴露開始時及び終了時)

試験結果

48 時間 EC <sub>50</sub>	10 mg/L
48 時間 100%遊泳阻害最低濃度	14 mg/L
48 時間 0%遊泳阻害最高濃度	4.8 mg/L
(上記濃度は、設定濃度に基づく値)	



## 12. 試験材料

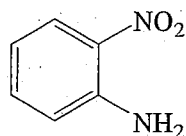
## 12.1 被験物質

## a) 名称等

名 称 *o*-ニトロアニリン  
CAS 番号 88-74-4

## b) 構造式等

構造式

分子式  $C_6H_6N_2O_2$ 分子量 138.13 <sup>\*1</sup><sup>\*1</sup> 原子量表 (2011) を用いて算出した値

## c) 供試試料

被験物質純度 100.0% (キャピラリーカラム GC) <sup>\*2</sup>

供給者

ロット番号

被験物質は純度 100%として取り扱った。

<sup>\*2</sup> 供給者提供の検査成績書

## d) 物理化学的性状

蒸気圧 4 Pa (20°C) <sup>\*3</sup>対水溶解度 14.9 g/L (30°C) <sup>\*3</sup>

1-オクタノール/水分配係数

 $\log P_{\text{oct}} 1.44/1.83$  <sup>\*4</sup>融 点 73.3°C <sup>\*2</sup>沸 点 284°C <sup>\*3\*4\*5</sup>常温における性状 黄みの赤褐色、粉末又は小塊 <sup>\*2</sup>安定性 光により変質する <sup>\*5</sup>

溶媒に対する溶解度等

エタノール、アセトン、ジエチルエーテル及び希塩酸に溶解やすく、水にほとんど溶けない。 <sup>\*5</sup>

比 重 0.9015 (25/4°C) <sup>\*3\*5</sup><sup>\*3</sup> 化学物質総合情報提供システム (CHRIP)<sup>\*4</sup> Kavel verschueren "Handbook of Environmental Data on Organic Chemicals" 4<sup>th</sup> Ed.<sup>\*5</sup> 製造元 ( ) の製品安全データシート

## e) 保管条件

冷暗所保管した。

## f) 被験物質の同一性及び保管条件下における安定性の確認

当試験施設において測定した赤外吸収スペクトルが独立行政法人産業技術総合研究所の有機化合物スペクトルデータベースに記載の赤外吸収スペクトルと一致することを確認した。また、実験開始前及び終了後の赤外吸収スペクトルを比較することにより、保管条件下における被験物質の安定性を確認した。

## g) 取扱い上の注意

手袋、マスク、保護めがね及び白衣を着用し、皮膚、目への接触及び吸入を避けた。  
また、被験物質はひょう量時のみ黄色灯下で取り扱った。

## 12.2 試験生物

種	オオミジンコ ( <i>Daphnia magna</i> Clone A)
生物種選択の理由	テストガイドラインに推奨されている種
入手源	英国 Sheffield 大学(所在地 Sheffield S10 2UQ, United Kingdom)
入手日	1990 年 7 月 9 日
順 化	当試験施設で継代飼育している成体より産出された幼体を用いた。幼体を産出する成体は、試験条件と同じ水質(脱塩素水道水)、水温 (20±1℃) 及び明暗周期 (16 時間明/8 時間暗) 下で 14 日間以上飼育したもの (26 日齢) で成体の生存率が 90%の群 (ロット) を使用した。継代飼育中はミジンコ 1 頭当たり <i>Chlorella vulgaris</i> を 0.1~0.2 mgC (有機炭素含量) /日の割合で 1 日に 1 回給餌した。
幼体の選別	生後 24 時間以内の幼体
群分け	無作為抽出
試験系の再現性の確認	定期的に基準物質による急性遊泳阻害試験を実施 最新のデータを以下に示す。 基準物質：二クロム酸カリウム (和光純薬工業 試薬特級 ロット番号 HLH7646) 実施期間：2011 年 10 月 26 日~10 月 28 日 48 時間 EC <sub>50</sub> : 0.28 mg/L この値は当試験施設におけるバックグラウンドデータの規定範囲内 (平均±2×標準偏差) であった [平均±標準偏差 : 0.24±0.06 mg/L (n=77) ] 。

### 13. 試験の実施

#### 13.1 試験用水

十分にエアレーションし、温度調節した脱塩素水道水を用いた。定期的に測定した試験用水の水質測定結果を Appendix 1 に示す。なお、水質測定結果は当試験施設の標準操作手順書で規定した基準を満たしていた。

#### 13.2 試験器具及び装置

試験容器	100 mL ガラス製ビーカー
蓋	透明なプラスチック製の蓋
恒温槽	プラスチック製水槽
	加熱・冷却ユニット HCA 250 (佐藤工業)

#### 13.3 試験液の調製法

必要量の供試試料をひょう量し、試験用水と混合、攪拌し溶解して 40 mg/L の試験原液を調製した。目視にて不溶物が認められたため、超音波照射した。調製容器にて試験原液をそのまま若しくは必要量の試験原液と試験用水を混合、攪拌して試験液を調製し、各試験容器に分割した。ひょう量は黄色灯下で行った。

#### 13.4 試験条件

暴露方式	止水式 (試験液の交換無し)
暴露期間	48 時間
試験濃度	40、24、14、8.1、4.8 mg/L (公比 1.7) 予備試験結果から試験濃度及び公比を決定した。 予備試験結果は Additional data に示す。
対照区	被験物質を含まない試験用水
連 数	4 連/試験区
試験生物数	20 頭/試験区 (5 頭/試験容器)
試験液量	400 mL/試験区 (100 mL/試験容器)
水 温	20±1℃
溶存酸素濃度	3 mg/L 以上 (エアレーション無し)
pH 調整	無し
照 明	室内灯による 16 時間明/8 時間暗
給 餌	無給餌

#### 13.5 観察と測定

##### a) 試験生物の一般状態

暴露開始 24 及び 48 時間後に遊泳阻害及び行動や外見の異常を観察した。試験容器を穏やかに動かした後、15 秒間一度も泳げない場合を遊泳阻害されたとみなした。

##### b) 試験液の状態

暴露開始時及び終了時に観察

## c) 試験液の水質

測定項目	溶存酸素濃度、pH 及び水温
測定頻度	暴露開始時及び終了時
測定方法	調製容器より別途分取した試験液について測定（暴露開始時） 各試験区につき 1 試験容器について測定（暴露終了時）
測定機器	溶存酸素計 YSI MODEL 58 (YSI Incorporated) ポータブル pH 計 HM-21P (東亜ディーケーケー) 検定済ガラス製棒状温度計

## d) 試験液中の被験物質濃度

測定頻度	暴露開始時及び終了時
採水方法	調製容器より別途分取（暴露開始時） 各試験容器の中層から均等量採取し、混合（暴露終了時）
採水量	約 10 mL（全試験区）
測定方法	Appendix 2 参照

13.6 EC<sub>50</sub> の算出法

Binomial 法により EC<sub>50</sub> を算出した。

EC<sub>50</sub> は、当事業所にて開発したコンピュータプログラム（Microsoft Excel により起動）により算出した。

なお、暴露期間中に測定した試験液中の被験物質濃度が設定濃度の±20%以内であったため、結果の算出には設定濃度を用いることとした。

## 13.7 試験の有効性

- 暴露期間中において対照区の遊泳阻害率が 10%を超えてはならない。
- 暴露期間中において 10%を超える対照区のミジンコが脱色、水面に浮いているなどの異常な症状、行動を示してはならない。
- 溶存酸素濃度は暴露終了時において、3 mg/L 以上でなければならない。

## 13.8 数値の取扱い

数値の丸め方は、JIS Z 8401 : 1999 規則 B に従った。

## 14. 試験結果及び考察

## 14.1 遊泳阻害率

暴露開始 24 及び 48 時間後での遊泳阻害率を Table 1、濃度－遊泳阻害率曲線を Figure 1 に示す。

暴露 48 時間における 100%遊泳阻害最低濃度は 14 mg/L、0%遊泳阻害最高濃度は 4.8 mg/L であった。なお、対照区の遊泳阻害率は 0%であり、有効性基準（10%を超えない）を満たしていた。

#### 14.2 一般状態の観察

暴露期間中における一般状態の観察結果を Table 2 に示す。

暴露期間中に嗜眠状態、遊泳阻害及び活動度の低下が観察された。なお、暴露期間中の対照区において異常な行動や外見（脱色、水面に浮くなど）を示した個体はみられず、有効性基準（10%を超えない）を満たしていた。

#### 14.3 試験液の観察と測定

##### a) 試験液の状態

暴露開始時は全試験濃度区において濃度に依存して黄色澄明であり、暴露終了時も同様であった。

対照区では暴露開始時及び終了時ともに無色透明であった。

##### b) 試験液の水質

試験液の水質を Table 3 に示す。

暴露期間中に測定した溶存酸素濃度は 8.9 mg/L、pH は 7.7～8.0 及び水温は 19.7～19.8℃であった。なお、溶存酸素濃度は有効性基準（暴露終了時において 3 mg/L 以上）を満たしていた。

##### c) 試験液中の被験物質濃度

被験物質濃度の測定方法及び結果を Appendix 2、検量線及びクロマトグラムを Appendix 3 に示す。

測定した試験液中の被験物質濃度は、暴露開始時で 4.8～41 mg/L（設定濃度に対して 99～103%）、暴露終了時で 4.8～41 mg/L（設定濃度に対して 99～104%）であり、設定濃度の±20%以内に保たれていた。

#### 14.4 EC<sub>50</sub>

各時間での EC<sub>50</sub> を Table 4 に示す。

被験物質のオオミジンコに対する 24 時間 EC<sub>50</sub> は 11 mg/L、48 時間 EC<sub>50</sub> は 10 mg/L であった。

#### 14.5 考 察

試験は被験物質の試験用水への溶解濃度以下での試験生物に対する EC<sub>50</sub> を求める試験として行った。その結果、48 時間 EC<sub>50</sub> は 10 mg/L であった。試験液中の被験物質濃度は設定濃度の±20%以内に保たれ、また、試験環境条件も適切な範囲内であったことから、試験は試験法に準じたものであったと判断される。

#### 15. 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

当該要因はなかった。

Table 1 Immobility

Nominal concentration (mg/L)		Immobility (%)			
		24 hours		48 hours	
		Replicate	Test level	Replicate	Test level
Control	A	0	0	0	0
	B	0		0	
	C	0		0	
	D	0		0	
4.8	A	0	0	0	0
	B	0		0	
	C	0		0	
	D	0		0	
8.1	A	0	0	20	10
	B	0		0	
	C	0		20	
	D	0		0	
14	A	100	100	100	100
	B	100		100	
	C	100		100	
	D	100		100	
24	A	100	100	100	100
	B	100		100	
	C	100		100	
	D	100		100	
40	A	100	100	100	100
	B	100		100	
	C	100		100	
	D	100		100	

Table 2 Observed abnormal response

Nominal concentration (mg/L)	Observed abnormal response (Number of affected test organism)			
	24 hours		48 hours	
	Immobilisation	Other symptom	Immobilisation	Other symptom
Control	-	-	-	-
4.8	-	-	-	-
8.1	-	RA(1)	IM(2)	RA(2)
14	IM(20) LETH(8)	-	IM(20) LETH(11)	-
24	IM(20) LETH(20)	-	IM(20) LETH(20)	-
40	IM(20) LETH(20)	-	IM(20) LETH(20)	-

- : Normal (No abnormal response)

Abbreviation of symptoms

IM : Immobilization

LETH : Lethargic

RA : Reduced activity

Table 3 Condition of test solutions

Nominal concentration (mg/L)	Dissolved oxygen concentration (mg/L)		pH		Temperature (°C)	
	At the start	At the end	At the start	At the end	At the start	At the end
Control	8.9	8.9	7.9	7.7	19.7	19.8
4.8	8.9	8.9	8.0	7.8	19.7	19.8
8.1	8.9	8.9	8.0	7.9	19.7	19.8
14	8.9	8.9	8.0	7.9	19.7	19.8
24	8.9	8.9	8.0	7.9	19.7	19.8
40	8.9	8.9	8.0	7.9	19.7	19.8

Table 4 EC<sub>50</sub> to *Daphnia magna*

Exposure duration	EC <sub>50</sub> (mg/L)	95% confidence interval (mg/L) (Slope of the dose-response curve)	Statistical procedure used for determination of EC <sub>50</sub>
24-hour	11		Binomial test
48-hour	10		Binomial test



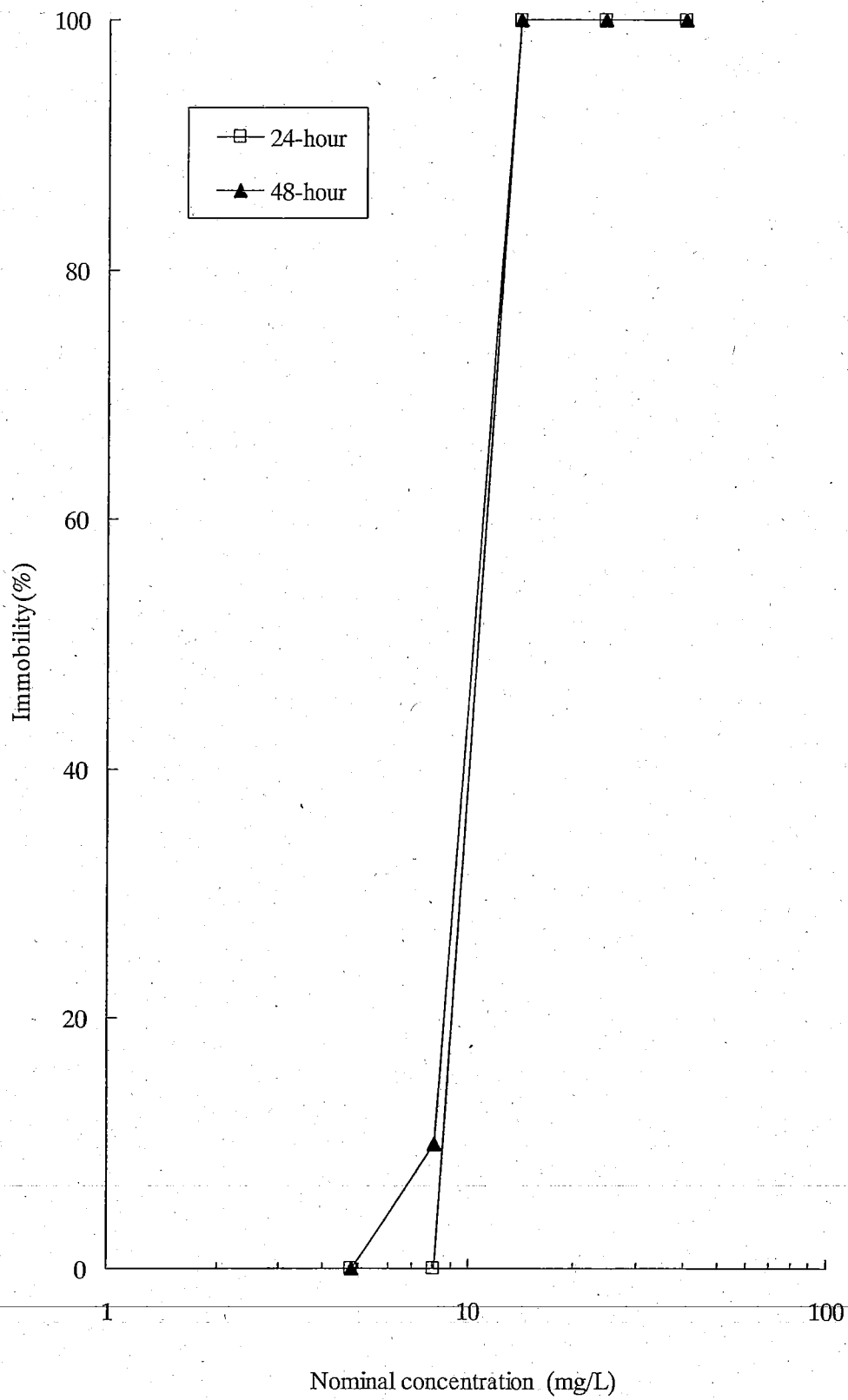


Figure 1 Concentration-immobility curve.

## Appendix 1

試験用水の水質

Chemical characteristics of dilution water (Sampling on July 12, 2011)

Parameter	Unit	Results	Determination limit
Total hardness (as CaCO <sub>3</sub> )	mg/L	25	5
Suspended solid	mg/L	< 1	1
pH	—	7.5(24°C)	0.1
Total organic carbon	mg/L	0.3	0.3
Chemical oxygen demand	mg/L	0.5	0.5
Residual chlorine	mg/L	< 0.02	0.02
Ammonium ion	mg/L	0.02	0.01
Total cyanide	mg/L	< 0.01	0.01
Alkalinity	mg/L	21	1
Electric conductivity	mS/m	9.9	0.1
Organic phosphorous	mg/L	< 0.1	0.1
Alkylmercury	mg/L	< 0.0005	0.0005
Total mercury	mg/L	< 0.0005	0.0005
Cadmium	mg/L	< 0.001	0.001
Chromium (VI)	mg/L	< 0.005	0.005
Lead	mg/L	< 0.001	0.001
Arsenic	mg/L	< 0.001	0.001
Boron	mg/L	< 0.1	0.1
Fluorine	mg/L	< 0.08	0.08
Iron	mg/L	< 0.03	0.03
Copper	mg/L	< 0.001	0.001
Cobalt	mg/L	< 0.001	0.001
Manganese	mg/L	< 0.005	0.005
Zinc	mg/L	< 0.1	0.1
Aluminum	mg/L	0.02	0.02
Nickel	mg/L	< 0.001	0.001
Sulfate ion	mg/L	9.1	0.1
Chloride ion	mg/L	9.6	0.1
Sodium	mg/L	9.1	0.1
Potassium	mg/L	3.9	0.1
Calcium	mg/L	7.5	0.1
Magnesium	mg/L	1.7	0.1
Silver	mg/L	< 0.0001	0.0001
1,2-dichloropropane	mg/L	< 0.006	0.006
Chlorothalonil	mg/L	< 0.005	0.005
Propyzamide	mg/L	< 0.0008	0.0008
Chlornitrofen	mg/L	< 0.0001	0.0001
Simazine	mg/L	< 0.0003	0.0003
Thiobencarb	mg/L	< 0.002	0.002
Diazinon	mg/L	< 0.0005	0.0005
Isoxathion	mg/L	< 0.0008	0.0008
Fenitrothion	mg/L	< 0.0003	0.0003
EPN	mg/L	< 0.0006	0.0006
Dichlorvos	mg/L	< 0.001	0.001
Iprobenfos	mg/L	< 0.0008	0.0008
PCB	mg/L	< 0.0005	0.0005

## Appendix 2

被験物質濃度の測定方法及び結果

## 1. 分析試料の前処理法

採取した試験液について、最終試料の組成がアセトニトリル/脱塩素水道水 (1/1 v/v) になるように適宜希釈して高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 試料を調製した。

## 2. 被験物質の定量分析

## a) 定量方法

被験物質の定量は 1 濃度の標準溶液を用いた絶対検量線法で行った。

本定量方法の有効性を確認するために、c) の標準溶液と同様に調製した、0.10、0.50、1.0 及び 2.0 mg/L の 4 濃度の標準溶液を用いて検量線を作成した。その結果、クロマトグラム上のピーク面積と濃度により作成した検量線の回帰式が原点を通る直線であったことから有効性が確認された。作成した検量線及び HPLC 試料の分析によって得られたクロマトグラムを Appendix 3 に示す。

分析試料中の被験物質の定量下限値は、定量性が確認された範囲での標準溶液の最低濃度 (0.10 mg/L) とした。よって、試験液中の被験物質の定量下限値は前処理操作を考慮して 0.50 mg/L とした。

## b) 分析条件

機 器	高速液体クロマトグラフ LC-2010AHT (紫外可視分光検出器内蔵) (島津製作所)
カラム	L-column2 ODS (150 mm × 2.1 mm I.D., 粒子径 5 µm, 化学物質評価研究機構)
カラム温度	40°C
溶離液	A (60%) : アセトニトリル B (40%) : 超純水
流 量	0.2 mL/min
測定波長	230 nm
注入量	20 µL

## c) 標準溶液の調製及び被験物質濃度の算出

供試試料 50 mg を電子分析天びんで正確にはかりとり、アセトニトリルに溶解して 1000 mg/L の被験物質溶液を調製した。これをアセトニトリル/脱塩素水道水 (1/1 v/v) になるように希釈して 10 mg/L の被験物質溶液を調製した。さらにこれをアセトニトリル/脱塩素水道水 (1/1 v/v) で希釈して 1.0 mg/L の標準溶液を調製した。

HPLC 試料中の被験物質濃度は、標準溶液及び HPLC 試料のクロマトグラム上で得られるピーク面積を比較し、比例計算して求めた。

## 3. 測定結果

試験液中の被験物質濃度の測定結果を以下に示す。

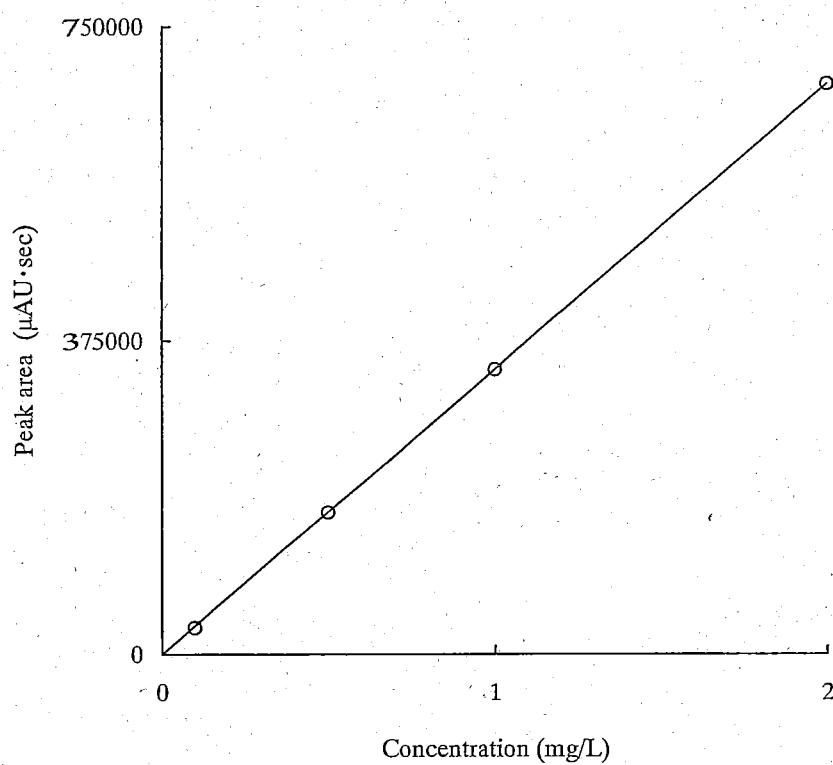
Appendix table 2-1 Measured concentrations of test item in test solutions

Nominal concentration (mg/L)	Measured concentration (mg/L) (Percentage of measured concentration versus nominal concentration %)		
	At the start	At the end	Geometric mean
Control	n.d.	n.d.	
4.8	4.8 (99)	4.8 (99)	4.8 (99)
8.1	8.3 (102)	8.2 (101)	8.2 (102)
14	14 (102)	15 (104)	14 (103)
24	25 (103)	24 (101)	24 (102)
40	41 (102)	41 (103)	41 (102)

n.d. : <0.50 mg/L

## Appendix 3

検量線及びクロマトグラム



$$y = 340596x$$

$$r = 1.00$$

Concentration (mg/L)	Peak area ( $\mu\text{AU}\cdot\text{sec}$ )
0.10	31727
0.50	170120
1.0	340819
2.0	681242

Appendix figure 3-1 Calibration curve of test item for analysis by HPLC.



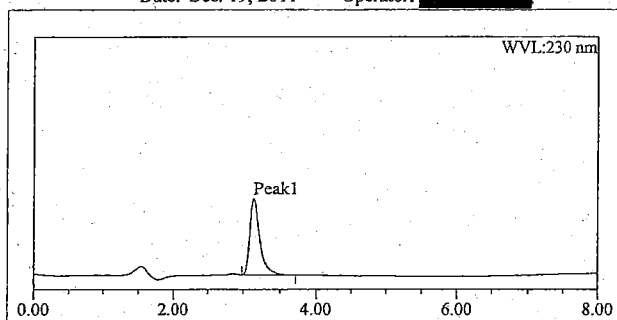
95704

Standard solution 1.0 mg/L

Date: Dec. 19, 2011

Operator: [REDACTED]

95704 111219 Std06



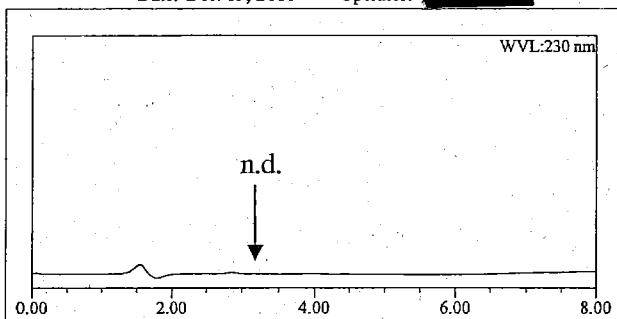
No.	Time (min)	Height (μAU)	Area (μAU·sec)	Area (%)
Peak1	3.14	35481	340603	100.00
Total	-	-	340603	100.00

Control

Date: Dec. 19, 2011

Operator: [REDACTED]

95704 111219 H0hZ



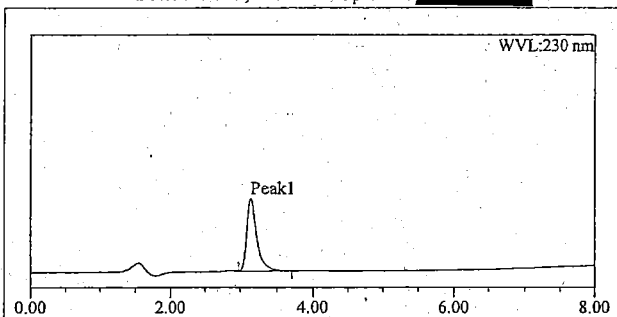
No.	Time (min)	Height (μAU)	Area (μAU·sec)	Area (%)
Peak1	-	-	-	-
Total	-	-	0	0.00

4.8 mg/L exposure level

Date: Dec. 19, 2011

Operator: [REDACTED]

95704 111219 H0hE



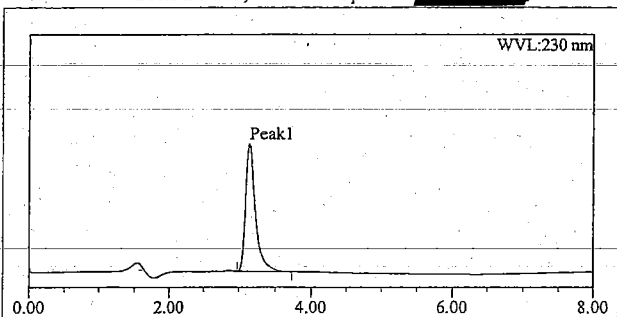
No.	Time (min)	Height (μAU)	Area (μAU·sec)	Area (%)
Peak1	3.14	33737	325047	100.00
Total	-	-	325047	100.00

8.1 mg/L exposure level

Date: Dec. 19, 2011

Operator: [REDACTED]

95704 111219 H0hD



No.	Time (min)	Height (μAU)	Area (μAU·sec)	Area (%)
Peak1	3.15	59219	565535	100.00
Total	-	-	565535	100.00

Date 2011.12.19

Name [REDACTED]

Appendix figure 3-2-1 HPLC chromatograms at start of exposure.

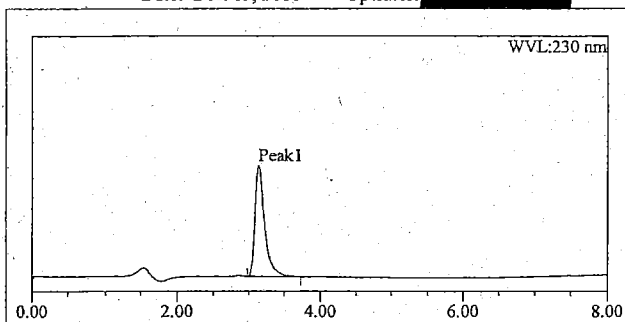
95704

14 mg/L exposure level

Date: Dec. 19, 2011

Operator: [REDACTED]

95704 111219 H0hC



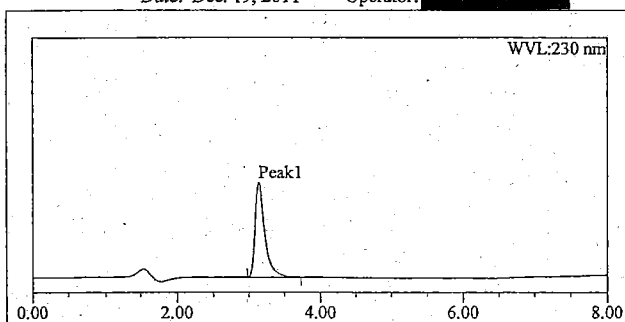
No.	Time (min)	Height (μAU)	Area (μAU·sec)	Area (%)
Peak1	3.15	50880	485587	100.00
Total	-	-	485587	100.00

24 mg/L exposure level

Date: Dec. 19, 2011

Operator: [REDACTED]

95704 111219 H0hB



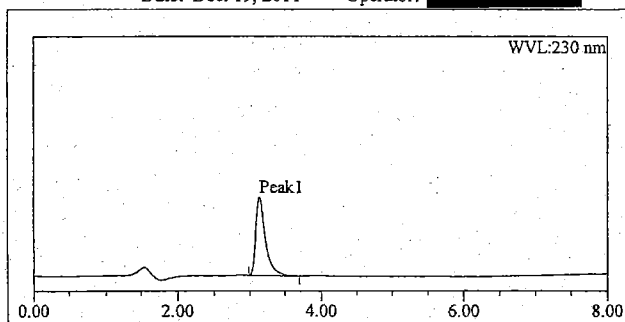
No.	Time (min)	Height (μAU)	Area (μAU·sec)	Area (%)
Peak1	3.14	43617	419203	100.00
Total	-	-	419203	100.00

40 mg/L exposure level

Date: Dec. 19, 2011

Operator: [REDACTED]

95704 111219 H0hA



No.	Time (min)	Height (μAU)	Area (μAU·sec)	Area (%)
Peak1	3.15	36167	346660	100.00
Total	-	-	346660	100.00

Date 2011.12.19

Name [REDACTED]

Appendix figure 3-2-2 HPLC chromatograms at start of exposure.

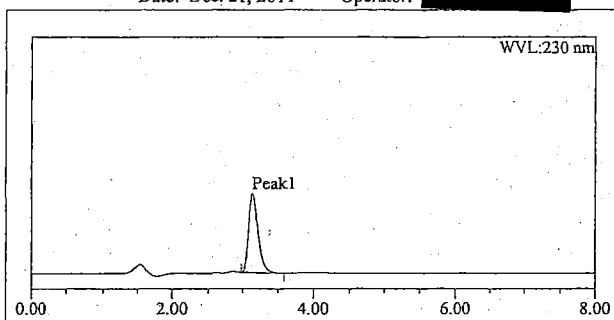
95704

Standard solution 1.0 mg/L

Date: Dec. 21, 2011

Operator: [REDACTED]

95704 111221Std02



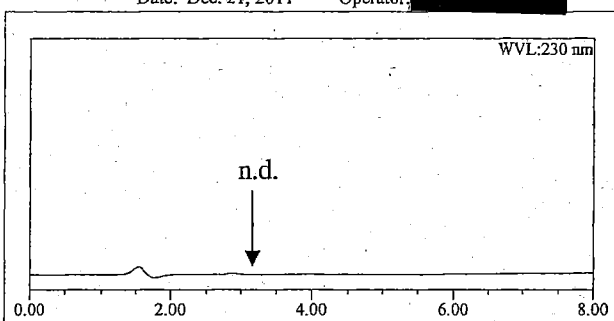
No.	Time (min)	Height (μAU)	Area (μAU-sec)	Area (%)
Peak1	3.14	36804	343044	100.00
Total	-	-	343044	100.00

Control

Date: Dec. 21, 2011

Operator: [REDACTED]

95704 111221 H48hZ



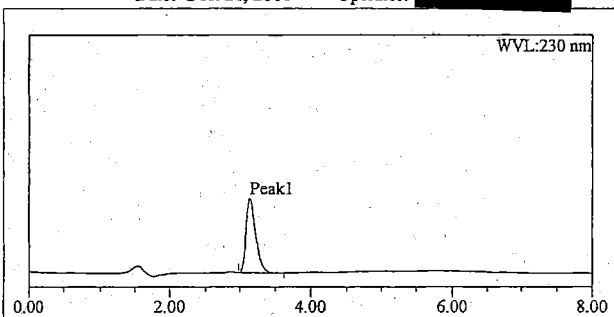
No.	Time (min)	Height (μAU)	Area (μAU-sec)	Area (%)
Peak1	-	-	-	-
Total	-	-	0	0.00

4.8 mg/L exposure level

Date: Dec. 21, 2011

Operator: [REDACTED]

95704 111221 H48hE



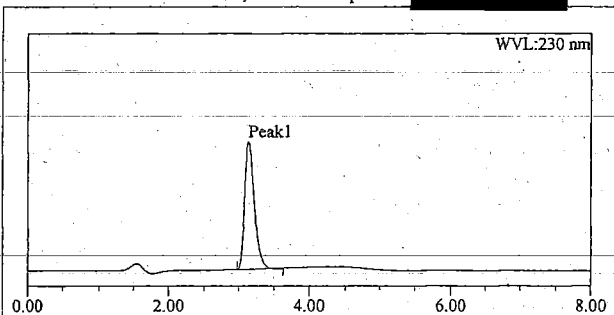
No.	Time (min)	Height (μAU)	Area (μAU-sec)	Area (%)
Peak1	3.14	34626	326875	100.00
Total	-	-	326875	100.00

8.1 mg/L exposure level

Date: Dec. 21, 2011

Operator: [REDACTED]

95704 111221 H48hD



No.	Time (min)	Height (μAU)	Area (μAU-sec)	Area (%)
Peak1	3.14	59175	559887	100.00
Total	-	-	559887	100.00

Date 2011.12.21

Name [REDACTED]

Appendix figure 3-3-1 HPLC chromatograms at end of exposure.

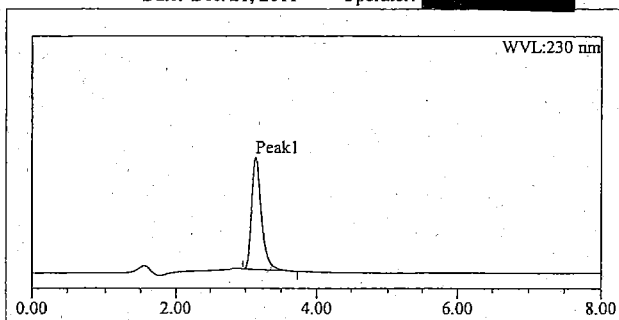
95704

14 mg/L exposure level

Date: Dec. 21, 2011

Operator: [REDACTED]

95704 111221 H48hC



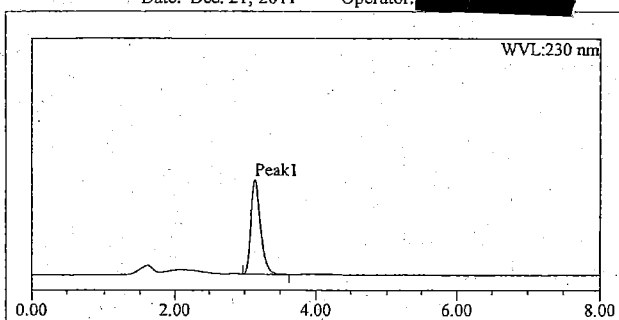
No.	Time (min)	Height (μAU)	Area (μAU·sec)	Area (%)
Peak1	3.14	51922	500565	100.00
Total	-	-	500565	100.00

24 mg/L exposure level

Date: Dec. 21, 2011

Operator: [REDACTED]

95704 111221 H48hB



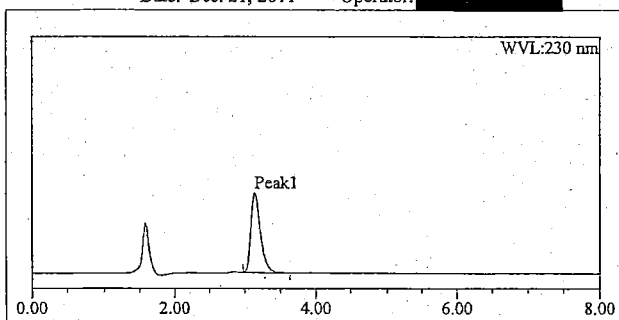
No.	Time (min)	Height (μAU)	Area (μAU·sec)	Area (%)
Peak1	3.14	43784	414404	100.00
Total	-	-	414404	100.00

40 mg/L exposure level

Date: Dec. 21, 2011

Operator: [REDACTED]

95704 111221 H48hA



No.	Time (min)	Height (μAU)	Area (μAU·sec)	Area (%)
Peak1	3.14	37271	351753	100.00
Total	-	-	351753	100.00

Date 2011.12.21

Name [REDACTED]

Appendix figure 3-3-2 HPLC chromatograms at end of exposure.

## Additional data

予備試験結果

## 1. 被験物質の試験用水への溶解度

被験物質の試験用水への溶解度は 100 mg/L 以上であった。

## 2. 生物予備試験

暴露方式 止水式

試験生物数 10 頭/試験区 (5 頭/試験容器)

試験液調製法 供試試料と試験用水を混合、攪拌し、超音波照射により溶解して 40 mg/L の試験原液を調製した。調製容器にて試験原液をそのまま若しくは試験用水を混合、攪拌して試験液を調製した。

分析 試験液中の被験物質濃度の測定を行った。

## &lt;試験生物への影響&gt;

試験濃度区 (mg/L)	24 時間		48 時間	
	遊泳阻害率 (%)	その他の症状	遊泳阻害率 (%)	その他の症状
1.0	0	—	0	—
5.0	0	—	0	RA
10	10	RA	60	RA
40	100	—	100	—

—はその他の症状が観察されなかったことを示す。

症状の略称

RA (Reduced activity) : 活動度の低下

## &lt;試験液中の被験物質濃度&gt;

試験濃度区 (mg/L)	測定濃度 (mg/L) (対設定濃度%)	
	暴露開始時	暴露終了時 (48 時間後)
1.0	0.97 (97)	0.96 (96)
40	37 (94)	37 (93)

## 3. 本試験条件

試験濃度 40、24、14、8.1、4.8 mg/L (公比 1.7) 及び対照区

暴露方式 止水式