

|      |          |
|------|----------|
| 受理番号 | E04-3519 |
| 試験番号 | 93519    |

## 最 終 報 告 書

チモールのヒメダカによる96時間急性毒性試験

2005 年 9 月 21 日

  
 化学物質評価研究機構  
 不特定事業所  


# 陳 述 書

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 チモールのヒメダカによる96時間急性毒性試験

試験番号 93519

本最終報告書(写し)は、原本を正確にコピーしたものです。

2005年 9月29日

運営管理者

[Redacted signature block]

## 陳 述 書

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 チモールのヒメダカによる96時間急性毒性試験

試験番号 93519

上記試験は以下の基準に従って実施したものです。

- (1) 「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)に規定する「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」
- (2) 「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ています。

2005 年 9 月 2 / 日

試験責任者

## 信 頼 性 保 証 書

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 チモールのヒメダカによる 96 時間急性毒性試験

試験番号 93519

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します。

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ました。

| 監査又は査察内容     | 監査又は査察日         | 報告日<br>(試験責任者及び運営管理者) |
|--------------|-----------------|-----------------------|
| 試験計画書草案      | 2005 年 5 月 13 日 | 2005 年 5 月 13 日       |
| 試験計画書        | 2005 年 5 月 13 日 | 2005 年 5 月 13 日       |
| 暴露開始時        | 2005 年 5 月 16 日 | 2005 年 5 月 23 日       |
| 暴露開始後        | 2005 年 5 月 20 日 | 2005 年 5 月 23 日       |
| 生データ、最終報告書草案 | 2005 年 9 月 14 日 | 2005 年 9 月 14 日       |
| 最終報告書        | 2005 年 9 月 21 日 | 2005 年 9 月 21 日       |

2005 年 9 月 21 日

信頼性保証部門責任者

## 目 次

|   | 頁  |
|---|----|
| 要 約 .....   | 5  |
| 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. 適用 GLP .....   | 6  |
| 7. 試験日程 .....   | 6  |
| 8. 試験資料の保管 .....  | 7  |
| 9. 試験関係者 .....  | 7  |
| 10. 最終報告書の承認 .....  | 7  |
| 11. 被験物質 .....  | 8  |
| 12. 試験材料と方法 .....   | 10 |
| 13. 試験結果及び考察 .....  | 13 |
| 14. 試験成績の信頼性に影響を及ぼしたと思われる事項 .....   | 14 |
| Tables  |    |
| Table 1 Cumulative mortality .....  | 15 |
| Table 2 Observed abnormal response .....  | 15 |
| Table 3-1 Dissolved oxygen concentration of test solutions .....                        | 16 |
| Table 3-2 pH of test solutions .....  | 16 |
| Table 3-3 Water temperature of test solutions .....                                     | 17 |
| Table 4 LC50 to Medaka .....  | 17 |
| Figure  |    |
| Figure 1 Concentration-cumulative mortality curve .....                                 | 18 |
| Appendix 1 Water quality of dilution water  |    |
| Appendix 2 Method of analysis and result of measurement of test substance concentration |    |
| Appendix 3 Calibration curve and chromatogram   |    |
| Additional data Results of preliminary tests  |    |

## 要 約

## チモールのヒメダカによる96時間急性毒性試験

## ＜試験条件＞

- ・被験物質：チモール
- ・試験生物：ヒメダカ(*Oryzias latipes*)
- ・暴露期間：96時間
- ・試験濃度：10.0、7.14、5.10、3.64(公比1.4)及び0.911 mg/L(公比4.0)の5濃度区及び対照区
- ・試験生物数：8尾／試験区(4尾×2試験容器)
- ・試験用水：脱塩素水道水
- ・試験方式：半止水式(換水頻度；1回／2日)
- ・試験液の調製：超音波照射により供試試料を試験用水に溶解した試験原液を用いて調製
- ・試験液量：5.0 L／試験区(2.5 L×2試験容器)
- ・水温：24±1℃
- ・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：なし
- ・試験液中の被験物質濃度の分析\*：HPLC法(暴露開始時、換水前後及び暴露終了時)  
\*試験最高濃度区及び最低濃度区について行った。

## ＜結果＞

- ・試験液中の被験物質濃度(対設定値)：暴露開始時及び換水後 83.8～102%  
換水前及び暴露終了時 92.0～99.3%
- ・96時間LC50(半数致死濃度)：4.67 mg/L(95%信頼限界；3.89～5.53 mg/L)
- ・96時間100%死亡最低濃度：7.14 mg/L
- ・96時間0%死亡最高濃度：0.911 mg/L  
(上記濃度は、設定濃度に基づく値)

1. 表 題  
チモールのヒメダカによる96時間急性毒性試験
2. 試験委託者  
名 称 環境省  
所 在 地 (〒100-8975)東京都千代田区霞が関 1-2-2
3. 試験施設  
名 称 財団法人 化学物質評価研究機構 久留米事業所  
所 在 地 (〒839-0801)福岡県久留米市宮ノ陣三丁目2番7号  
TEL (0942) 34-1500
4. 試験目的  
被験物質の魚類に対する短期的影響を調べる。
5. 試験法  
本試験は以下の試験法に従って行った。  
(1) 「新規化学物質等に係る試験の方法について」(平成15年11月21日、薬食発第1121002号、平成15・11・13製局第2号、環境企発第031121002号)に規定する<魚類急性毒性試験>  
(2) 「OECD Guidelines for Testing of Chemicals」に定める “Fish, Acute Toxicity Test (Guideline 203, 1992)”
6. 適用GLP  
本試験は以下の基準を適用した。  
(1) 「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、環境企発第031121004号)に規定する「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」  
(2) 「OECD Principles of Good Laboratory Practice」(November 26, 1997)
7. 試験日程
  - 1) 試験開始日 2005 年 5 月 13 日
  - 2) 実験開始日 2005 年 5 月 16 日
  - 3) 実験終了日 2005 年 5 月 20 日
  - 4) 試験終了日 2005 年 9 月 21 日

## 8. 試資料の保管

## 1) 被験物質

供試試料\*を保管用容器に入れ密栓後、最終報告書作成後10年間、久留米事業所試料保管室に保管する。保管期間経過後の処置は試験委託者と協議の上決定する。ただし、保管中に品質が著しく変化する物質の保管期間は、その品質が保管に耐えうる期間とし、廃棄に際しては試験委託者の承認を得る。

\* 試験番号93517、93518、93519及び93520についての共用保管試料とする。

## 2) 生データ、資料等

生データ、試験計画書、その他必要な資料等は最終報告書と共に、最終報告書作成後10年間、久留米事業所資料保管室に保管する。保管期間終了後の取扱いについては、保管期間終了前に試験委託者と協議する。

## 9. 試験関係者

試験責任者

[REDACTED]

所属 試験第四課

生物試験担当者

[REDACTED]、[REDACTED]、[REDACTED]

分析担当者

[REDACTED]、[REDACTED]、[REDACTED]

## 10. 最終報告書の承認

試験責任者

2005 年 9 月 21 日

氏 名

[REDACTED]  
[REDACTED]

## 11. 被 験 物 質

最終報告書においてチモールは次の名称などを有するものとする。供給者提供資料等による被験物質及び供試試料情報を以下に示す。

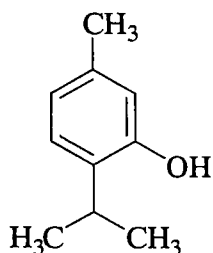
## 11.1 被 験 物 質

## 1) 名 称

チモール

## 2) 構 造 式 等

## (1) 構 造 式



## (2) 分 子 式

 $C_{10}H_{14}O$ 

## (3) 分 子 量

150.22<sup>\*5</sup>

## (4) C A S 番 号

89-83-8

## 3) 物 理 化 学 的 性 質 等

## (1) 外 観

白色微細結晶<sup>\*1</sup>

## (2) 融 点

51.4℃<sup>\*1</sup>

## (3) 沸 点

233.5℃<sup>\*2,\*3</sup>

## (4) 蒸 気 圧

1 mmHg at 64℃<sup>\*2</sup>、2.5 hPa at 50℃<sup>\*2</sup>、10 mmHg at 107℃<sup>\*2</sup>、100 mmHg at 164℃<sup>\*2</sup>

## (5) 比 重

0.969 at 20/4℃<sup>\*2</sup>

## (6) 溶 解 度

水 1 g/L<sup>\*4</sup>

エタノール、クロロホルム、ジエチルエーテル、オリーブ油、氷酢酸に溶解<sup>\*4</sup>

- (7) 分配係数  
3.30(計算値)<sup>\*2</sup>
- (8) 安定性  
光によって変化する。<sup>\*3</sup>

## 11.2 供試試料

- 1) ロット番号  
CEH0126<sup>\*1</sup>
- 2) 純度  
100.0%(毛管カラムGC)<sup>\*1</sup>

## 情報源

- \*1：供給者提供の添付資料( [REDACTED] 検査成績書より)
- \*2：Karel Verschuere "Handbook of Environmental Data on Organic Chemicals" 4<sup>th</sup> Ed.
- \*3：化学大辞典編集委員会編「化学大辞典」(共立出版) 1960.
- \*4：Richardson, M.L. et al "The Dictionary of Substances and their Effects" Royal Society of Chemistry, 1993.
- \*5：日本化学会 原子量表(2003)を用いて算出した値

- 3) 入手先  
(独)国立環境研究所 化学物質環境リスク研究センター(供給者： [REDACTED])
- 4) 被験物質の確認  
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、被験物質の特性が認められることを確認した。
- 5) 保管条件及び保管条件下での安定性の確認
- (1) 保管条件  
試験中の被験物質は室温暗所で保管した。
- (2) 安定性の確認  
実験開始前及び終了後に測定した被験物質の赤外吸収スペクトルに変化がなかったことから、実験期間中の被験物質が安定であったことを確認した。

## 12. 試験材料と方法

## 1) 試験生物

## (1) 種

ヒメダカ(*Oryzias latipes*)

## (2) 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類である。

## (3) 大 き さ

全長 $2.3 \pm 1.2$  cm

生物の大きさについては5.(1)に定める規定値を適用した。

## (4) 購 入 先

中島養魚場(〒869-0123 熊本県玉名郡長洲町大字長洲 2029)

## (5) 試験生物の順化

生物は供試32日前に入手した。その後試験条件と同じ水質(脱塩素水道水)、水温( $24 \pm 1^\circ\text{C}$ )及び明暗周期(16時間明／8時間暗)下で30日間流水条件で順化し、供試前7日間の死亡率は0.38%であった。供試時における生物の月齢は約10ヶ月であった。なお、生物は入手時及び順化開始時に杆状テトラサイクリン(水産用OTC散10%「第一」BL)及びNaClによる薬浴を実施した。給餌はコイ用配合餌料(2C)を2～4%与え、供試24時間前から給餌は行わなかった。順化期間中に測定した飼育水の溶存酸素濃度は飽和濃度の80%以上を維持していた。試験系の再現性を確認するために実施(2005年5月9日～5月13日に実施)した硫酸銅(Ⅱ)五水和物(試薬特級、和光純薬工業製)の96時間LC50は0.396 mg/Lであった。この値は久留米事業所におけるバックグラウンドデータの規定範囲内(平均 $\pm 2 \times$ 標準偏差:  $0.111 \sim 1.02$  mg/L)であった[平均 $\pm$ 標準偏差は $0.568 \pm 0.228$  mg/L( $n=31$ )]。以上のデータは全て硫酸銅(Ⅱ)換算で表示した。

## (6) 群 分 け

無作為に抽出を行った。

## 2) 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。使用時に、残留塩素濃度が0.02 mg/L以下であることを確認した。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。

## 3) 試験器具及び装置

## (1) 試験器具

3.0 L容のガラス製容器(直径16 cm、深さ17 cm)

また、ゴミの進入や試験液の蒸散を防ぐため蓋をした。

## (2) 試験装置

恒 温 槽: プラスチック製水槽

加温冷却ユニット(HCA250型、佐藤工業製)

## 4) 試験条件

## (1) 暴露条件

## ① 方式

被験物質を含む試験液へ試験生物を暴露した。

試験は暴露開始48時間後に試験液の全量を交換する半止水式で行った。

## ② 期間

96時間

## ③ 試験濃度

試験は10.0、7.14、5.10、3.64(公比1.4)及び0.911 mg/L(公比4.0)の5濃度区で行った。試験濃度及び公比は予備試験結果から決定した。予備試験結果をAdditional dataに示す。なお、被験物質の純度は100.0%であるため純度補正は行わなかった。

## ④ 対照群

被験物質を含まない試験用水のみの対照区を設けた。

## ⑤ 試験生物数

8尾/試験区(4尾×2試験容器)

## ⑥ 試験液量

5.0 L/試験区(2.5 L×2試験容器)

## (2) 環境条件

## ① 水温

24±1℃

## ② 溶存酸素濃度

暴露期間中、試験水温での飽和溶存酸素濃度の60%以上で行った。また、暴露期間中、エアレーションは行わなかった。

## ③ pH

試験はpHを調整せずに行った。

## ④ 照明

室内灯による16時間明/8時間暗

## ⑤ 給餌

暴露期間中、給餌を行わなかった。

## 5) 試験液の調製法

被験物質の純度が100.0%であるため、試験原液調製時に純度補正は行わなかった。

供試試料を必要量秤量し、試験用水と混合後約10分間超音波照射後攪拌して100 mg/Lの試験原液を調製した。この試験原液の被験物質濃度を測定し、その結果を実際の試験原液濃度とした。試験原液濃度より算出した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た。

試験原液の実測濃度及び各試験区の調製量に対する試験原液添加量を以下に示す。

| 試験区(mg/L) | 試験原液測定濃度(mg/L) | 試験原液添加量(mL/2.5 L) |
|-----------|----------------|-------------------|
| 対照区       | —              | —                 |
| 0.911     | 91.6           | 24.86             |
| 3.64      |                | 99.34             |
| 5.10      |                | 139.19            |
| 7.14      |                | 194.87            |
| 10.0      |                | 272.93            |

## 6) 観察と測定

## (1) 試験生物の状態

死亡と症状を暴露開始3、24、48、72及び96時間後に観察した。観察可能な動き(吻、鰓蓋の動き等)がなく、ガラス棒で尾柄部に軽く触れ反応がない個体を死亡とみなした。死亡した個体は確認した時点で、速やかにとり除いた。

## (2) 試験生物の全長、体重

暴露終了後、対照区の試験生物について全長、体重を測定した。

## (3) 試験液の状態

試験液の状態を暴露開始時及び換水前(48時間後)に観察した。

また、換水前までに全個体が死亡した濃度区については、全個体死亡を確認した時点で観察した。

## (4) 水 質

試験液の溶存酸素濃度、pH及び水温を暴露開始時、換水前後及び暴露終了時に測定した。24及び72時間後の水質も測定した。また、全個体が死亡した濃度区(7.14及び10.0 mg/L区)については、全個体死亡を確認した時点(96及び24時間後)で測定した。溶存酸素濃度は溶存酸素計(YSI MODEL 58、Yellow Springs Instruments製)、pHはガラス電極式水素イオン濃度計(HM-21P型、東亜ディーケーケー製)、水温は検定済ガラス製棒状温度計で測定した。

## (5) 試験液中の被験物質濃度

予備検討において、暴露期間中、試験液中の被験物質濃度が安定であると確認できたため、試験液中の被験物質濃度の測定は試験最高濃度区及び最低濃度区について行った。被験物質濃度の測定は、暴露開始時、換水前後及び暴露終了時に行った。また、全個体が死亡した濃度区については、全個体死亡を確認した時点で測定した。測定用試験液は、各試験容器の中層から均等量採取したものを混合して用いた。被験物質濃度の分析は高速液体クロマトグラフィー(HPLC)により行った。被験物質濃度の分析方法及び測定結果をAppendix 2、検量線及びクロマトグラムをAppendix 3に示す。

## 7) LC50\*の算出法

24時間についてはBinomial法、48、72及び96時間についてはProbit法によりLC50を算出した。また、それらの95%信頼限界を算出し、48、72及び96時間については算出に用いた回帰直線の傾きも求めた。なお、結果の算出には設定濃度を用いた。

\* LC50 (Median Lethal Concentration) : 暴露期間において試験生物の50%を死亡させる被験物質濃度を示す。

## 8) 有効性基準

(1) 暴露期間中、対照群における死亡数は1尾を超えてはならない。

(2) 暴露期間中の溶存酸素濃度は、試験水温での飽和溶存酸素濃度の60%以上でなければならない。

## 9) 数値の取扱い

数値の丸め方は、JIS Z 8401 規則Bによった。

## 13. 試験結果及び考察

## 1) 死亡率

96時間における100%死亡最低濃度は7.14 mg/Lであった。0%死亡最高濃度は0.911 mg/Lであった。各時間での累積死亡率をTable 1、濃度－累積死亡率曲線をFigure 1に示す。なお、暴露終了時までに対照群で死亡は認められず、有効性基準(1尾を超えない)を満たしていた。

## 2) 症状等の観察結果

対照群において、症状は認められなかった。

以下の観察結果は全て対照群との比較に基づくものである。暴露期間中に観察された症状は表層集中、平衡喪失、嗜眠状態及び活動度の低下であった。暴露期間中における症状の観察結果をTable 2に示す。

## 3) 大きさ[平均値±標準偏差(n=8)]

全長 2.7±0.089 cm

体重 0.18±0.012 g

#### 4) 試験液の観察と測定結果

##### (1) 試験液の状態

暴露開始時は無色透明であり、その状態は換水前(あるいは全個体死亡時)まで変わらなかった。

対照群では暴露開始時及び換水前ともに無色透明であった。

##### (2) 試験液の水質

暴露期間中に測定した溶存酸素濃度は6.3～8.7 mg/L、pHは7.1～7.7、水温は23.9～24.8℃であった。試験液の水質をTable 3-1、3-2及び3-3に示す。なお、溶存酸素濃度は有効性基準(試験水温での飽和濃度の60%以上\*)を満たしていた。

\* 23～25℃の飽和溶存酸素濃度：8.39～8.11 mg/L(JIS K 0102)

##### (3) 試験液中の被験物質濃度

測定した試験液中の被験物質濃度は、暴露開始時及び換水後では設定値に対して83.8～102%、換水前及び暴露終了時では92.0～99.3%であり、設定濃度の±20%以内に維持されていた。被験物質濃度の測定結果をAppendix 2に示す。

#### 5) LC50

チモールのヒメダカに対する48時間LC50は5.95 mg/L (95%信頼限界：4.89～7.21 mg/L)、96時間LC50は4.67 mg/L (95%信頼限界：3.89～5.53 mg/L)であった。24時間毎のLC50、95%信頼限界、95%信頼限界における回帰線の傾き及びLC50算出法をTable 4に示す。

#### 7) 考 察

本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LC50を求める試験として行った。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、本試験は試験法に準じたものであったと判断される。

#### 14. 試験成績の信頼性に影響を及ぼしたと思われる事項 当該事項はなかった。

Table 1. Cumulative mortality

| Nominal concentration (mg/L) | Cumulative mortality (%) |         |         |         |         |
|------------------------------|--------------------------|---------|---------|---------|---------|
|                              | 3-hour                   | 24-hour | 48-hour | 72-hour | 96-hour |
| Control                      | 0                        | 0       | 0       | 0       | 0       |
| 0.911                        | 0                        | 0       | 0       | 0       | 0       |
| 3.64                         | 0                        | 12.5    | 12.5    | 12.5    | 12.5    |
| 5.10                         | 0                        | 0       | 12.5    | 50      | 62.5    |
| 7.14                         | 0                        | 25      | 75      | 75      | 100     |
| 10.0                         | 0                        | 100     | 100     | 100     | 100     |

Table 2. Observed abnormal response

| Nominal concentration (mg/L) | Observed abnormal response<br>(Left column: Number of affected fish/Total survival number, Right column: Symptom detail) |                                    |         |                                    |         |                          |         |                                    |         |                                     |
|------------------------------|--|------------------------------------|---------|------------------------------------|---------|--------------------------|---------|------------------------------------|---------|-------------------------------------|
|                              | 3-hour   |                                    | 24-hour |                                    | 48-hour |                          | 72-hour |                                    | 96-hour |                                     |
| Control                      | 0/8  | —                                  | 0/8     | —                                  | 0/8     | —                        | 0/8     | —                                  | 0/8     | —                                   |
| 0.911                        | 0/8  | —                                  | 0/8     | —                                  | 0/8     | —                        | 0/8     | —                                  | 0/8     | —                                   |
| 3.64                         | 3/8  | AS(3)                              | 2/7     | AS(2)                              | 2/7     | AS(2)                    | 3/7     | AS(2)<br>CLE(1)<br>RA(1)           | 5/7     | AS(2)<br>CLE(1)<br>PLE(1)<br>RA(4)  |
| 5.10                         | 5/8  | AS(3)<br>CLE(1)<br>PLE(1)<br>RA(3) | 8/8     | AS(8)<br>CLE (1)<br>PLE(1)         | 7/7     | AS(7)<br>CLE(3)<br>RA(3) | 4/4     | AS(4)<br>CLE(3)<br>PLE(1)<br>RA(4) | 3/3     | AS(2)<br>CLE (1)<br>PLE(2)<br>RA(3) |
| 7.14                         | 8/8  | AS(3)<br>CLE(6)<br>PLE(2)<br>RA(8) | 6/6     | AS(2)<br>CLE(5)<br>PLE(1)<br>RA(6) | 2/2     | CLE(2)<br>RA(2)          | 2/2     | CLE(1)<br>LETH(1)<br>RA(1)         |         |                                     |
| 10.0                         | 8/8  | CLE(7)<br>LETH(1)<br>RA(7)         |         |                                    |         |                          |         |                                    |         |                                     |

— : Normal (No abnormal response)

Value in parentheses expresses the number of individuals shown the symptom.

Blank expresses all test organisms expired.

Abbreviation of symptoms

AS : At the surface

CLE : Complete loss of equilibrium

LETH : Lethargic

PLE : Partial loss of equilibrium

RA : Reduced activity

Table 3-1. Dissolved oxygen concentration of test solutions

| Nominal concentration (mg/L) | 0-hour       | 24-hour          | 48-hour            |                   | 72-hour | 96-hour          |
|------------------------------|--------------|------------------|--------------------|-------------------|---------|------------------|
|                              | At the start |                  | Before the renewal | After the renewal |         | At the end       |
| Control                      | 8.5          | 7.2              | 7.2                | 8.7               | 7.9     | 7.0              |
| 0.911                        | 8.5          | 7.2              | 7.2                | 8.7               | 8.0     | 7.1              |
| 3.64                         | 8.6          | 7.3              | 7.2                | 8.7               | 7.6     | 6.4              |
| 5.10                         | 8.6          | 7.3              | 7.2                | 8.7               | 7.9     | 7.4              |
| 7.14                         | 8.5          | 6.7              | 6.3                | 8.6               | 8.0     | 8.3 <sup>a</sup> |
| 10.0                         | 8.5          | 7.2 <sup>a</sup> |                    |                   |         |                  |

Unit : mg/L

Blank expresses all test organisms expired.

<sup>a</sup> Value at the time that confirmed all test organisms dead

Table 3-2. pH of test solutions

| Nominal concentration (mg/L) | 0-hour       | 24-hour          | 48-hour            |                   | 72-hour | 96-hour          |
|------------------------------|--------------|------------------|--------------------|-------------------|---------|------------------|
|                              | At the start |                  | Before the renewal | After the renewal |         | At the end       |
| Control                      | 7.5          | 7.2              | 7.1                | 7.5               | 7.1     | 7.1              |
| 0.911                        | 7.5          | 7.2              | 7.2                | 7.6               | 7.2     | 7.2              |
| 3.64                         | 7.5          | 7.2              | 7.2                | 7.6               | 7.2     | 7.1              |
| 5.10                         | 7.6          | 7.2              | 7.2                | 7.7               | 7.2     | 7.3              |
| 7.14                         | 7.6          | 7.2              | 7.2                | 7.7               | 7.3     | 7.4 <sup>a</sup> |
| 10.0                         | 7.6          | 7.2 <sup>a</sup> |                    |                   |         |                  |

Blank expresses all test organisms expired.

<sup>a</sup> Value at the time that confirmed all test organisms dead

Table 3-3. Water temperature of test solutions

| Nominal concentration (mg/L) | 0-hour       | 24-hour           | 48-hour            |                   | 72-hour | 96-hour           |
|------------------------------|--------------|-------------------|--------------------|-------------------|---------|-------------------|
|                              | At the start |                   | Before the renewal | After the renewal |         | At the end        |
| Control                      | 24.0         | 24.6              | 24.7               | 24.3              | 24.8    | 24.6              |
| 0.911                        | 23.9         | 24.6              | 24.7               | 24.3              | 24.7    | 24.6              |
| 3.64                         | 23.9         | 24.6              | 24.7               | 24.0              | 24.7    | 24.6              |
| 5.10                         | 23.9         | 24.6              | 24.7               | 24.0              | 24.7    | 24.6              |
| 7.14                         | 23.9         | 24.6              | 24.7               | 24.0              | 24.8    | 24.3 <sup>a</sup> |
| 10.0                         | 23.9         | 24.5 <sup>a</sup> |                    |                   |         |                   |

Unit : °C

Blank expresses all test organisms expired.

<sup>a</sup> Value at the time that confirmed all test organisms dead

Table 4. LC50 to Medaka

| Exposure duration | LC50(mg/L) | 95% confidence intervals(mg/L)<br>(Slope of the dose-response curve) | Statistical procedure used for determination of LC50 |
|-------------------|------------|--|--|
| 24-hour           | 7.14       | 0.911 to 10.0<br>(-)   | Binomial test  |
| 48-hour           | 5.95       | 4.89 to 7.21<br>(8.03)   | Probit analysis                                      |
| 72-hour           | 5.29       | 4.17 to 6.44<br>(7.03)   | Probit analysis                                      |
| 96-hour           | 4.67       | 3.89 to 5.53<br>(11.7)   | Probit analysis                                      |

— Not obtained

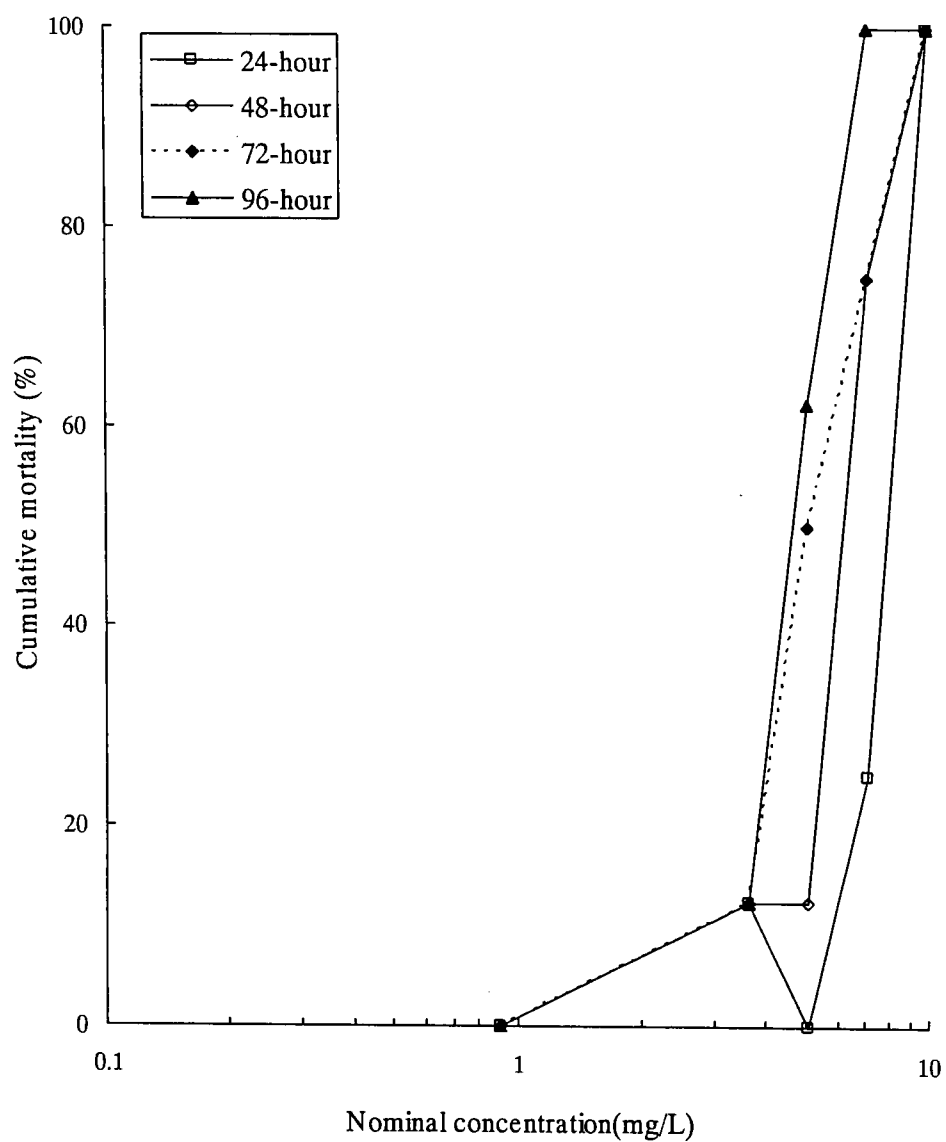


Figure 1. Concentration-cumulative mortality curve

## Appendix 1

Water quality of dilution water

Water quality of dilution water (Sampling on January 5, 2005)

| Parameter              | Unit | Results      | Lower limit of detection |
|------------------------|------|--------------|--------------------------|
| Ca, Mg etc. (Hardness) | mg/L | 38.8         | 0.1                      |
| Suspended substance    | mg/L | <1           | 1                        |
| pH                     | —    | 7.3(22°C)    | —                        |
| Organic carbon         | mg/L | 0.3          | 0.1                      |
| Chemical oxygen demand | mg/L | 0.9          | 0.5                      |
| Free chlorine          | mg/L | not detected | 0.01                     |
| Ammonium nitrogen      | mg/L | not detected | 0.01                     |
| Cyanide                | mg/L | not detected | 0.01                     |
| Alkalinity             | mg/L | 36           | 1                        |
| Electric conductivity  | mS/m | 15.8         | —                        |
| Organic phosphorous    | mg/L | not detected | 0.1                      |
| Alkyl mercury          | mg/L | not detected | 0.0005                   |
| Mercury                | mg/L | not detected | 0.0005                   |
| Cadmium                | mg/L | not detected | 0.001                    |
| Hexavalent chromium    | mg/L | not detected | 0.02                     |
| Lead                   | mg/L | not detected | 0.005                    |
| Arsenicum              | mg/L | not detected | 0.001                    |
| Boron                  | mg/L | not detected | 0.02                     |
| Fluorine               | mg/L | not detected | 0.1                      |
| Iron                   | mg/L | not detected | 0.01                     |
| Copper                 | mg/L | not detected | 0.005                    |
| Cobalt                 | mg/L | not detected | 0.001                    |
| Manganese              | mg/L | not detected | 0.01                     |
| Zinc                   | mg/L | not detected | 0.01                     |
| Aluminum               | mg/L | not detected | 0.001                    |
| Nickel                 | mg/L | not detected | 0.001                    |
| Silver                 | mg/L | not detected | 0.0001                   |
| Sulfate ion            | mg/L | 17.7         | 0.1                      |
| Chloride ion           | mg/L | 15           | 1                        |
| Sodium                 | mg/L | 13.5         | 0.01                     |
| Potassium              | mg/L | 3.3          | 0.01                     |
| Calcium                | mg/L | 11.0         | 0.01                     |
| Magnesium              | mg/L | 2.8          | 0.01                     |
| 1,2-dichloropropane    | mg/L | not detected | 0.0001                   |
| Chlorothalonil         | mg/L | not detected | 0.0001                   |
| Propyzamide            | mg/L | not detected | 0.0001                   |
| Chlornitrofen          | mg/L | not detected | 0.0001                   |
| Simazine               | mg/L | not detected | 0.001                    |
| Thiobencarb            | mg/L | not detected | 0.0001                   |
| Diazinon               | mg/L | not detected | 0.0001                   |
| Isoxathion             | mg/L | not detected | 0.0001                   |
| Fenitrothion           | mg/L | not detected | 0.0001                   |
| EPN                    | mg/L | not detected | 0.0001                   |
| Dichlorvos             | mg/L | not detected | 0.0001                   |
| Iprobenfos             | mg/L | not detected | 0.0001                   |
| PCB                    | mg/L | not detected | 0.0005                   |

## Appendix 2

Method of analysis and result of measurement of test substance concentration

## 1. 被験物質濃度の分析方法

### 1) 試験液の前処理操作

採取した試験液は、そのまま若しくは脱塩素水道水で適宜希釈して分析試料とした。

### 2) 分析方法

前処理操作を行って得られた分析試料は、下記の定量条件に基づき高速液体クロマトグラフィー(HPLC)により被験物質の定量を行った。分析試料中の被験物質濃度はクロマトグラム上のピーク面積を濃度既知の標準溶液のピーク面積と比較し比例計算して求めた。得られたクロマトグラム(一例)をAppendix 3に示す。

#### 分析機器の定量条件

|            |                            |
|------------|----------------------------|
| 機 器        | 高速液体クロマトグラフ                |
| ポンプ        | 島津製作所製 SCL-10Avp           |
| 検出器        | 島津製作所製 LC-10AD             |
| オートインジェクター | 島津製作所製 SPD-10A             |
| カラム        | 島津製作所製 SIL-10A             |
|            | 島津製作所製 CTO-10A             |
|            | 島津製作所製 DGU-14A             |
| カラム        | L-column ODS (化学物質評価研究機構製) |
|            | 15 cm×4.6 mm I.D.          |
| カラム温度      | 40℃                        |
| 溶離液        | アセトニトリル/水* 6/4(v/v)        |
| 流量         | 1.0 mL/min                 |
| 測定波長       | 275 nm                     |
| 注入量        | 100 μL                     |
| 感度         |                            |
| 検出器        | 0.5 AU/1 V                 |

\* 水道水を超純水装置システムを用いて処理した水

### 3) 標準溶液の調製

分析試料中の被験物質濃度を求めるための標準溶液の調製は次のように行った。なお、被験物質の純度が100.0%であるため、純度補正は行わなかった。

供試試料50.0 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1,000 mg/Lの被験物質溶液を調製した。これをアセトニトリルで希釈して200 mg/Lの被験物質溶液を調製した。続いてこれを脱塩素水道水で希釈して10.0 mg/Lの被験物質溶液を調製した。さらにこれを脱塩素水道水で希釈して1.00 mg/Lの標準溶液を調製した。

### 4) 検量線の作成

3)の標準溶液の調製と同様にして0.100、0.500、1.00及び2.00 mg/Lの標準溶液を調製した。これらを2)の定量条件に従って分析し、得られたそれぞれのクロマトグラム上のピーク面積と被験物質濃度により検量線を作成し、定量性を確認した。作成した検量線をAppendix 3に示す。なお、試験液中の被験物質の定量下限は、定量性が確認された範囲内での最小の標準溶液濃度(0.100 mg/L)とした。

## 5) ブランク試験

## (1) 方 法

1)の試験液の前処理操作と同じ操作により、被験物質を加えない試験用水について、ブランク試験を行った。ブランク試験は、2点について実施した。

## (2) 結 果

(1)の方法により測定した結果、ブランク試験においてクロマトグラム上の被験物質位置にはピークは認められなかった。

## 2. 測 定 結 果

試験液中の被験物質濃度の測定結果を次頁に示す。

Appendix table 2-1. Measured concentrations of test substance in test solutions

| Nominal concentration (mg/L) | Measured concentration(mg/L)<br>(Percentage of nominal concentration) |                             |                   |                 |                   |
|------------------------------|---|-----------------------------|-------------------|-----------------|-------------------|
|                              | At the start  | 48-hour                     |                   | At the end      | Mean <sup>a</sup> |
|                              |   | Before the renewal          | After the renewal |                 |                   |
| Control                      | n.d.  | n.d.                        | n.d.              | n.d.            | —                 |
| 0.911                        | 0.850<br>(93.3)   | 0.903<br>(99.1)             | 0.763<br>(83.8)   | 0.838<br>(92.0) | 0.837<br>(91.9)   |
| 10.0                         | 10.2<br>(102)   | 9.93 <sup>b</sup><br>(99.3) |                   |                 | 10.0<br>(100)     |

n.d. : Not detected (<0.100 mg/L)

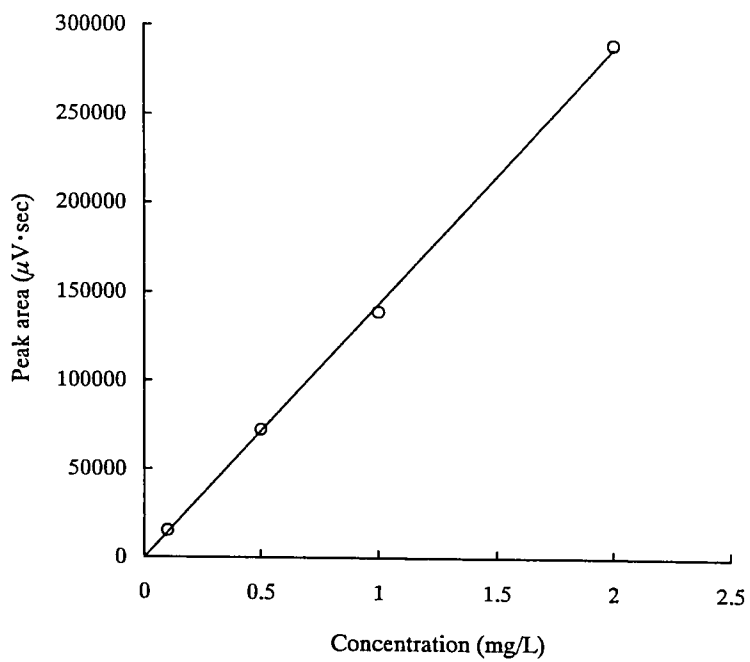
Blank shows no measurement because all test organisms died.

<sup>a</sup> The values are expressed as geometric means.

<sup>b</sup> Value at the time that confirmed all test organisms dead

## Appendix 3

Calibration curve and chromatogram



$$y = 143526x$$

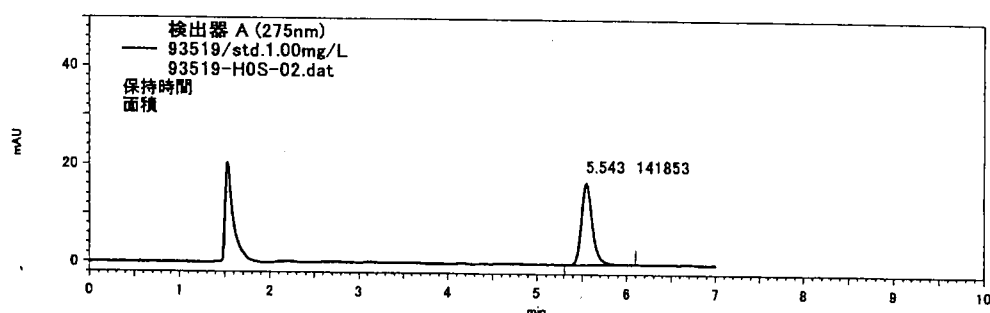
$$r = 1.00$$

| Concentration<br>(mg/L) | Peak area<br>( $\mu\text{V}\cdot\text{sec}$ ) |
|-------------------------|---|
| 0.100                   | 15131   |
| 0.500                   | 72348   |
| 1.00                    | 139107  |
| 2.00                    | 289077  |

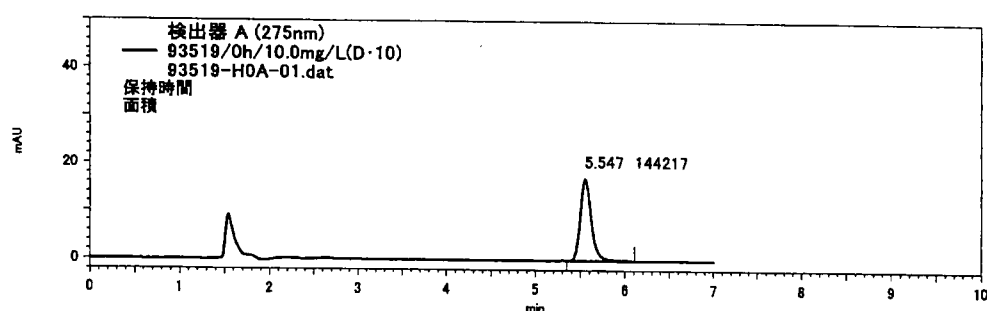
Appendix figure 3-1. Calibration curve of thymol for analysis by HPLC.

試験番号 93519

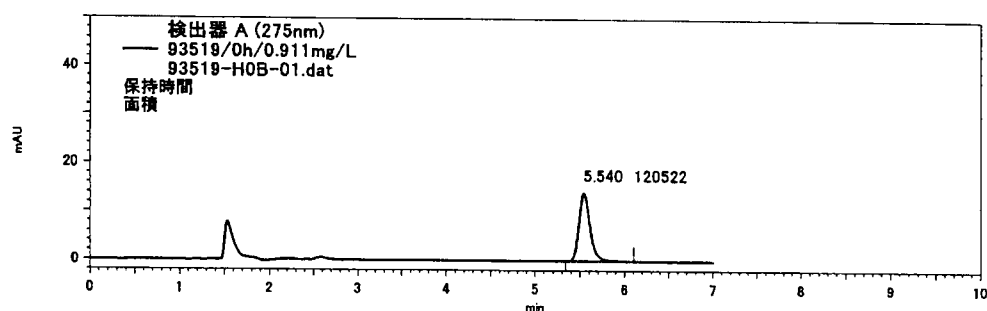
Standard solution 1.00 mg/L



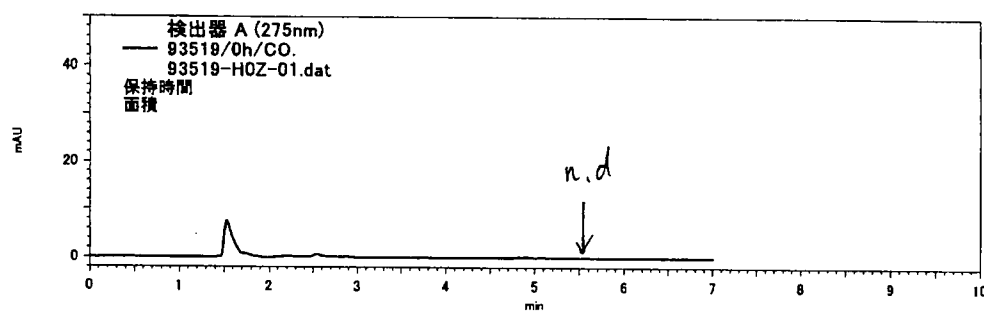
10.0 mg/L (Nominal concentration)



0.911 mg/L (Nominal concentration)



Control

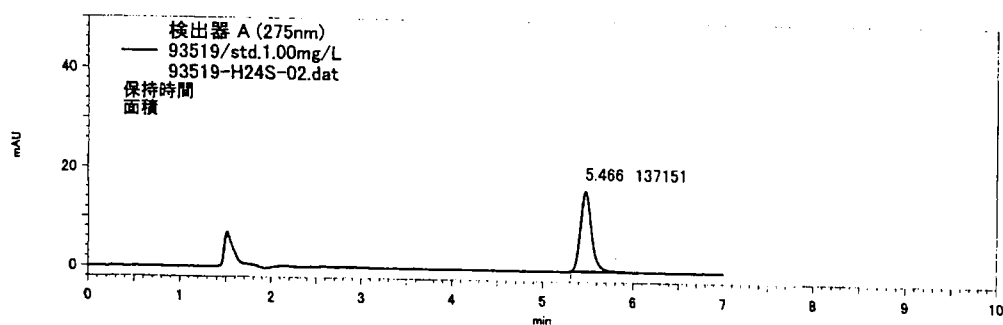


2005.5.16

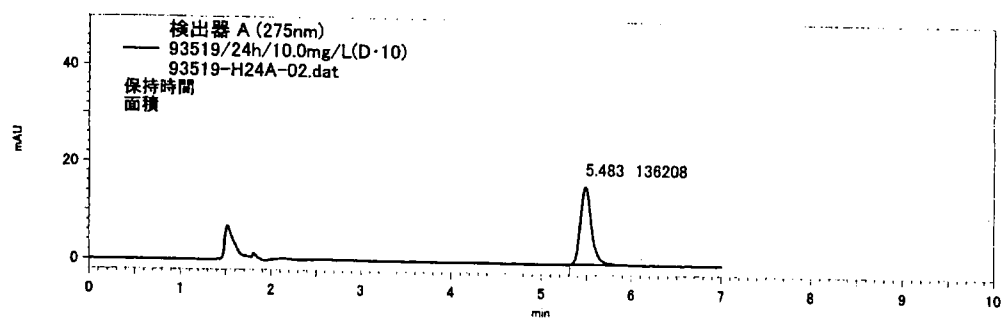
Appendix figure 3-2. HPLC chromatogram at the start of the exposure.

Standard solution 1.00 mg/L

試験番号 93519



10.0 mg/L (Nominal concentration)

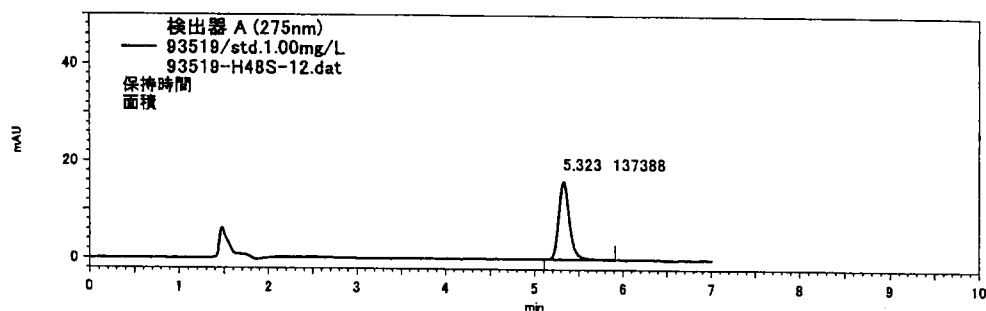


2005.5.17

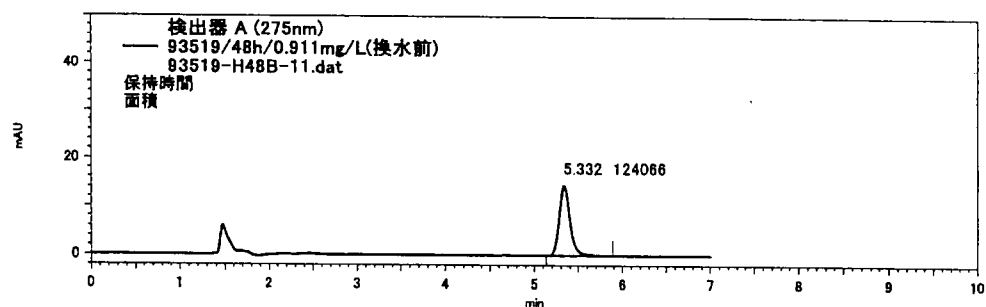
Appendix figure 3-3. HPLC chromatogram at 24 hours after the exposure.

試験番号 93519

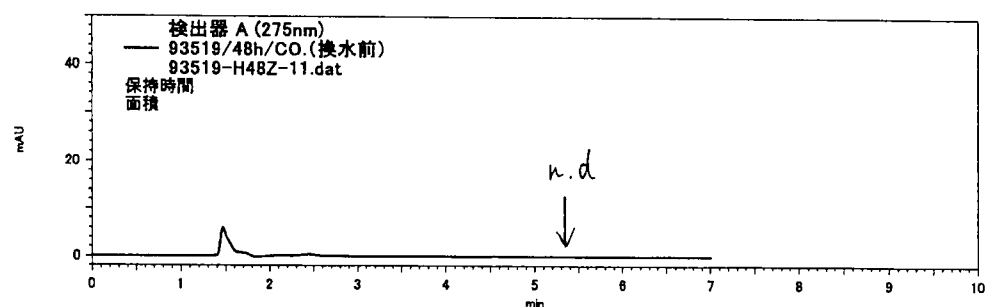
Standard solution 1.00 mg/L



0.911 mg/L (Nominal concentration)



Control



2005.5.18

Appendix figure 3-4. HPLC chromatogram at 48 hours after the exposure (before the renewal).

## Additional data

Results of preliminary tests

## 予備試験結果

### ＜生物への影響＞

| 試験区<br>(mg/L) | 左：累積死亡率(%)      右：症状の観察（症状有り：*、無し：-） |   |       |   |       |   |       |   |       |   |
|---------------|--------------------------------------|---|-------|---|-------|---|-------|---|-------|---|
|               | 3 時間                                 |   | 24 時間 |   | 48 時間 |   | 72 時間 |   | 96 時間 |   |
| 対照区           | 0                                    | - | 0     | - | 0     | - | 0     | - | 0     | - |
| 1.00          | 0                                    | - | 0     | - | 0     | - | 0     | - | 0     | - |
| 2.60          | 0                                    | - | 0     | - | 0     | - | 0     | - | 0     | * |
| 5.10          | 0                                    | - | 0     | * | 0     | * | 0     | * | 0     | * |
| 10.0          | 0                                    | * | 50    | * | 100   |   | 100   |   | 100   |   |

空欄は全個体が死亡したことを示す。

暴 露 方 式：半止水式(換水 1 回/2 日)

生物数/試験液量：2 尾/1L

エアレーション：なし

試験液調製法：試験原液を試験用水に添加して調製した。

| 試験区<br>(mg/L) | 左：累積死亡率(%)      右：症状の観察（症状有り：*、無し：-） |   |       |   |       |   |       |   |       |   |
|---------------|--------------------------------------|---|-------|---|-------|---|-------|---|-------|---|
|               | 3 時間                                 |   | 24 時間 |   | 48 時間 |   | 72 時間 |   | 96 時間 |   |
| 対照区           | 0                                    | - | 0     | - | 0     | - | 0     | - | 0     | - |
| 1.00          | 0                                    | - | 0     | - | 0     | - | 0     | - | 0     | - |
| 2.00          | 0                                    | - | 0     | - | 0     | - | 0     | * | 0     | * |

暴 露 方 式：半止水式(換水 1 回/2 日)

生物数/試験液量：4 尾/2.5L

エアレーション：なし

試験液調製法：試験原液を試験用水に濃度を補正した後、添加して調製した。

### ＜試験液中の被験物質濃度＞

| 設 定 濃 度<br>(mg/L) | 対設定濃度 % |        |        |
|-------------------|---------|--------|--------|
|                   | 暴露開始時   | 24 時間後 | 48 時間後 |
| 1.00              | 98.0    | 94.8   | 93.3   |
| 2.00              | 99.7    | 93.5   | 91.3   |

### ＜試験原液濃度＞

| 設 定 濃 度<br>(mg/L) | 対設定濃度 % |        |
|-------------------|---------|--------|
|                   | 暴露開始時   | 48 時間後 |
| 100               | 94.4    | 96.0   |