



受理番号	E04-3518
試験番号	93518

## 最 終 報 告 書

チモールのオオミジンコによる48時間急性遊泳阻害試験

2005 年 9 月 20 日

  
 化学物質評価研究機構  
 久留米事業所  


# 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 チモールのオオミジンコによる48時間急性遊泳阻害試験

試験番号 93518

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 20 日

運営管理者

A large black rectangular redaction box covering the signature and official stamp of the operator.

## 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 チモールのオオミジンコによる48時間急性遊泳阻害試験

試験番号 93518

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20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 チモールのオオミジンコによる 48 時間急性遊泳阻害試験

試験番号 93518

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 (試験責任者及び運営管理者)
試験計画書草案	2005 年 5 月 6 日	2005 年 5 月 6 日
試験計画書	2005 年 5 月 9 日	2005 年 5 月 9 日
暴露開始時	2005 年 5 月 10 日	2005 年 5 月 12 日
暴露開始後	2005 年 5 月 12 日	2005 年 5 月 12 日
生データ、最終報告書草案	2005 年 9 月 9 日	2005 年 9 月 9 日
最終報告書	2005 年 9 月 20 日	2005 年 9 月 20 日

2005 年 9 月 20 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 G L P .....	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    Immobility .....	15
Table 2    Observed abnormal response .....	16
Table 3    Measurement of test solutions .....	16
Table 4    EC50 to <i>Daphnia magna</i> .....	17
Figure	
Figure 1    Concentration-immobility 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

### チモールのオオミジンコによる48時間急性遊泳阻害試験

#### <試験条件>

- ・被験物質：チモール
  - ・試験生物：オオミジンコ(*Daphnia magna*)
  - ・暴露期間：48時間
  - ・試験濃度：8.00、5.71、4.08、2.92及び2.08 mg/L(公比1.4)の5濃度区及び対照区
  - ・試験生物数：20頭／試験区(5頭×4試験容器)
  - ・試験用水：脱塩素水道水
  - ・試験方式：止水式
  - ・試験液の調製：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：400 mL／試験区(100 mL×4試験容器)
  - ・水温：20±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(暴露開始時及び終了時)
- \*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 111及び101%  
暴露終了時 106及び96.1%
- ・48時間EC50(半数遊泳阻害濃度)：4.46 mg/L(95%信頼限界；4.07～4.88 mg/L)
- ・48時間100%遊泳阻害最低濃度：8.00 mg/L
- ・48時間0%遊泳阻害最高濃度：2.92 mg/L  
(上記濃度は、設定濃度に基づく値)

1. 表 題  
チモールのオオミジンコによる48時間急性遊泳阻害試験
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  
被験物質のミジンコ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<ミジンコ急性遊泳阻害試験>  
(2) 「OECD Guidelines for Testing of Chemicals」に定める “*Daphnia* sp., Acute Immobilisation Test (Guideline 202, April 13, 2004)”
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 9 日
  - 2) 実験開始日 2005 年 5 月 10 日
  - 3) 実験終了日 2005 年 5 月 12 日
  - 4) 試験終了日 2005 年 9 月 20 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

所属 試験第四課

生物試験担当者

分析担当者

## 10. 最終報告書の承認

試験責任者

2005 年 9 月 20 日

氏 名

—

## 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。

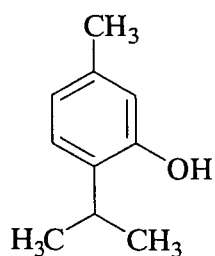
## 11.1 被 験 物 質

## 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 Verschueren "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

オオミジンコ (*Daphnia magna* Clone A)

## (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) 供給源

英国Sheffield大学(所在地 Sheffield S10 2UQ, United Kingdom)より分譲された*Daphnia magna*(Clone A)の子孫で、久留米事業所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( $20\pm 1^{\circ}\text{C}$ )及び明暗周期(16時間明/8時間暗)下で飼育したもの(27日齢)で成体の生存率が100%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*Chlorella vulgaris*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。また、試験系の再現性を確認するために実施(2005年3月7日~3月9日に実施)したニクロム酸カリウム(試薬特級、和光純薬工業製)の急性遊泳阻害試験の48時間EC50は0.200 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: 0.112~0.352 mg/L)であった[平均 $\pm$ 標準偏差は $0.232\pm 0.060$  mg/L( $n=48$ )]。

## (4) 幼体の選別

生後24時間以内の幼体を用いた。

## (5) 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

試験容器: 100 mLガラスビーカー

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。  
試験は試験液の交換をしない止水式で行った。

## ② 期間

48時間

## ③ 試験濃度

試験は8.00、5.71、4.08、2.92及び2.08 mg/L(公比1.4)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

20頭／試験区(5頭×4試験容器)

## ⑥ 試験液量

400 mL／試験区(100 mL×4試験容器)

## (2) 環境条件

## ① 水温

20±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%以上を保つ条件で行った。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30分間超音波照射しながら攪拌して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。調製容器にて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、攪拌して調製し、各試験容器に分割した。

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)	試験原液濃度(mg/L)	試験原液添加量(mL/500 mL)
対照区	—	—
2.08	100 (実測濃度 93.0 mg/L)	11.2
2.92		15.7
4.08		21.94
5.71		30.7
8.00		43.0

## 6) 観察と測定

## (1) 試験生物の状態

暴露開始24及び48時間後に遊泳阻害及び症状を観察した。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。

## (2) 試験液の状態

試験液の状態を暴露開始時及び終了時に観察した。

## (3) 水 質

試験液の溶存酸素濃度、pH及び水温を暴露開始時及び終了時に測定した。暴露開始時は別途分取した試験液について測定し、暴露終了時には各試験区につき4試験容器のうち1試験容器について測定した。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-14P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。

## (4) 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、暴露開始時及び終了時に行った。暴露開始時は別途分取した試験液について測定し、暴露終了時には各試験区につき4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) EC50<sup>\*1</sup>の算出法

Probit法によりEC50を算出した。また、それらの95%信頼限界を算出し、算出に用いた回帰直線の傾きも求めた。なお、暴露期間中に測定した試験液中の被験物質濃度が試験設定濃度の±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。

<sup>\*1</sup> EC50 (Median Effective Concentration)：暴露期間において試験生物の50%に影響を与える被験物質濃度を示す。影響の指標は遊泳阻害による。

## 8) 有効性基準

(1) 暴露期間中、対照群のミジンコにおいて、10%を超えて遊泳阻害されたり、水面に浮いたりしてはならない。

(2) 溶存酸素濃度は暴露期間中、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) 遊泳阻害率

48時間における100%遊泳阻害最低濃度は8.00 mg/L、0%遊泳阻害最高濃度は2.92 mg/Lであった。24及び48時間での遊泳阻害率をTable 1、48時間における濃度－遊泳阻害率曲線をFigure 1に示す。なお、暴露期間中の対照群において水面に浮いた個体はみられず、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。

## 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嗜眠状態、遊泳阻害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) 試験液の観察と測定結果

## (1) 試験液の状態

暴露開始時は全濃度区で無色透明であった。暴露終了時も同様であった。

## (2) 試験液の水質

暴露期間中に測定した溶存酸素濃度は8.9～9.0 mg/L、pHは7.5～7.7、水温は19.9～20.1℃であった。試験液の水質をTable 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<sup>\*2</sup>)を満たしていた。

<sup>\*2</sup> 19～21℃の飽和溶存酸素濃度：9.01～8.68 mg/L、JIS K 0102

## (3) 試験液中の被験物質濃度

測定した8.00及び2.08 mg/L区の試験液中の被験物質濃度は、暴露開始時では設定値に対して111及び101%、暴露終了時は106及び96.1%であり、設定濃度の±20%以内に保たれていた。被験物質濃度の測定結果をAppendix 2に示す。

## 4) EC50

チモールのおオミジンコに対する24時間EC50は5.07 mg/L (95%信頼限界 : 4.64~5.54 mg/L)、48時間EC50は4.46 mg/L (95%信頼限界 : 4.07~4.88 mg/L)であった。各時間でのEC50をTable 4に示す。

## 5) 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EC50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 $\pm 20\%$ 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適切な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. Immobility

Nominal concentration (mg/L)		Immobility (%)			
		24-hour		48-hour	
Control	A	0	0	0	0
	B	0		0	
	C	0		0	
	D	0		0	
2.08	A	0	0	0	0
	B	0		0	
	C	0		0	
	D	0		0	
2.92	A	0	0	0	0
	B	0		0	
	C	0		0	
	D	0		0	
4.08	A	20	15	60	40
	B	20		40	
	C	20		40	
	D	0		20	
5.71	A	60	70	100	85
	B	80		80	
	C	80		80	
	D	60		80	
8.00	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	
	24-hour	48-hour
Control	—	—
2.08	—	—
2.92	—	RA
4.08	IM RA	IM LETH RA
5.71	IM LETH RA	IM LETH RA
8.00	IM LETH	IM LETH

— : Normal (No abnormal response)

Abbreviation of symptoms

IM : Immobilization

LETH : Lethargic

RA : Reduced activity

Table 3. Measurement of test solutions

Nominal concentration (mg/L)	DO <sup>a</sup> (mg/L)		pH		Temperature(°C)	
	At the start	At the end	At the start	At the end	At the start	At the end
Control	9.0	8.9	7.7	7.5	19.9	20.0
2.08	9.0	8.9	7.7	7.5	20.0	20.0
2.92	9.0	8.9	7.7	7.5	20.0	20.0
4.08	9.0	8.9	7.7	7.5	20.1	20.0
5.71	9.0	8.9	7.7	7.6	20.0	20.0
8.00	9.0	8.9	7.7	7.6	20.0	20.0

<sup>a</sup> Dissolved oxygen concentration

Table 4. EC50 to *Daphnia magna*

Exposure duration	EC50 (mg/L)	95% confidence intervals(mg/L) (Slope of the dose-response curve)	Statistical procedure used for determination of EC50
24-hour	5.07	4.64 to 5.54 (11.9)	Probit analysis
48-hour	4.46	4.07 to 4.88 (11.0)	Probit analysis

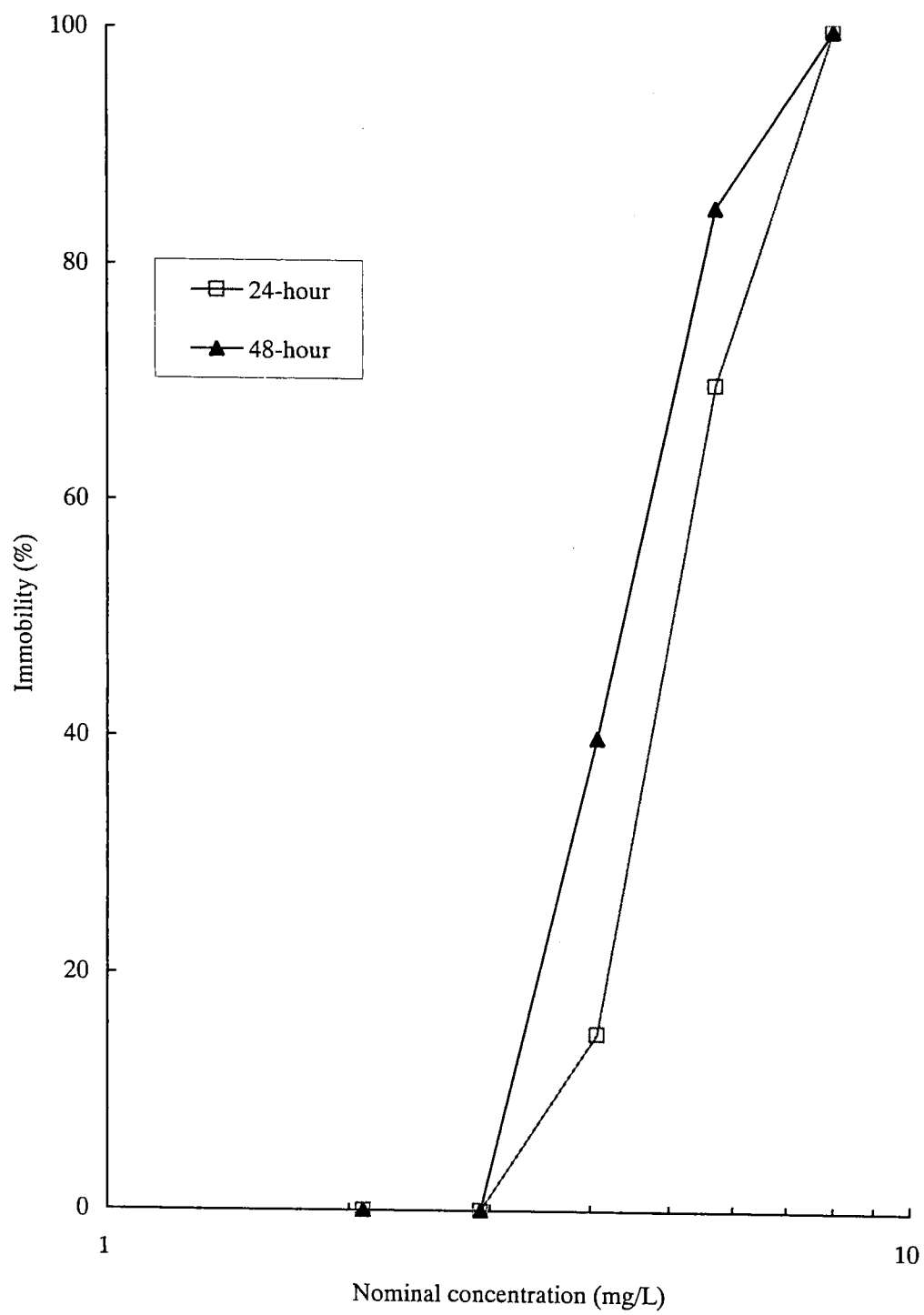


Figure 1. Concentration-immobility curve

## Appendix 1

Water quality of dilution water

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

Parameter	Unit	Results	Lower limit of determination
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
Chloronitrofen	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
システム	島津製作所製 SCL-10Avp
ポンプ	島津製作所製 LC-10AD
検出器	島津製作所製 SPD-10A
オートインジェクター	島津製作所製 SIL-10A
カラムオーブン	島津製作所製 CTO-10A
ワイドゲッター	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

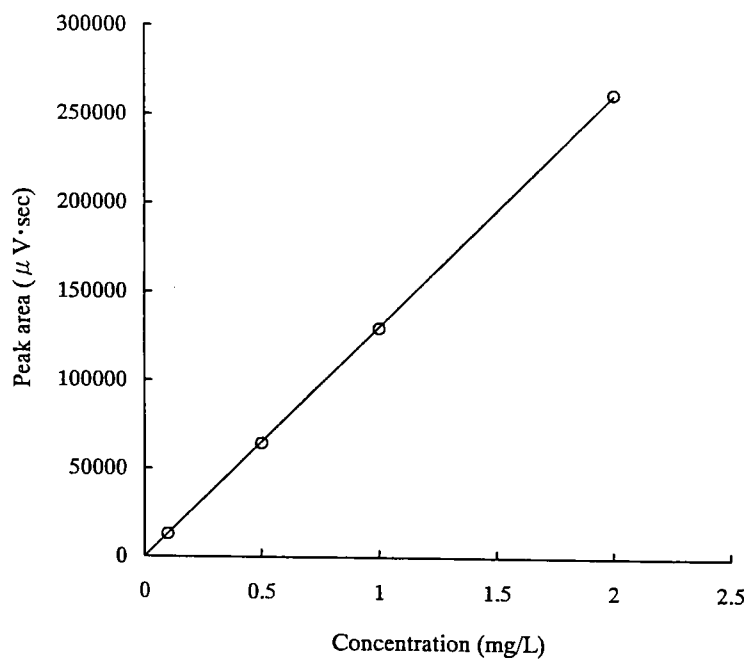
Nominal concentration (mg/L)	Measured concentration(mg/L) (Percentage of nominal concentration)		
	At the start	At the end	Mean <sup>a</sup>
Control	n.d.	n.d.	—
2.08	2.11 (101)	2.00 (96.1)	2.05 (98.7)
8.00	8.90 (111)	8.50 (106)	8.70 (109)

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

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

## Appendix 3

### Calibration curve and chromatogram



$$y = 130584x$$

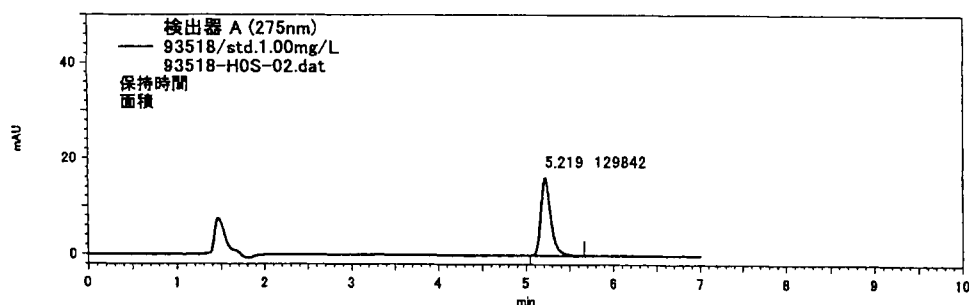
$$r = 1.00$$

Concentration (mg/L)	Peak area ( $\mu$ V · sec)
0.100	12765
0.500	64545
1.00	129740
2.00	261792

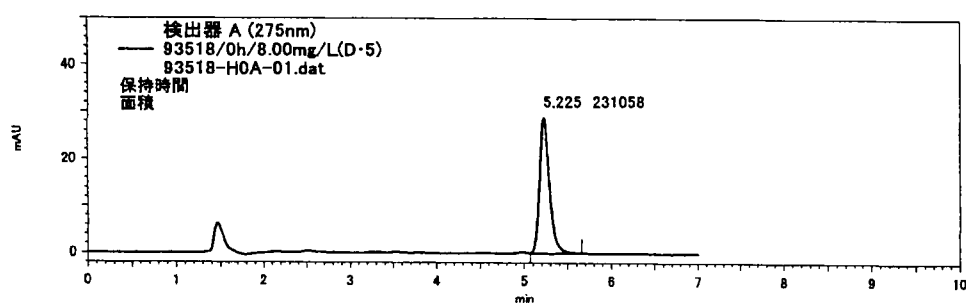
Appendix figure 3-1. Calibration curve of thymol for analysis by HPLC.

試験番号 93518

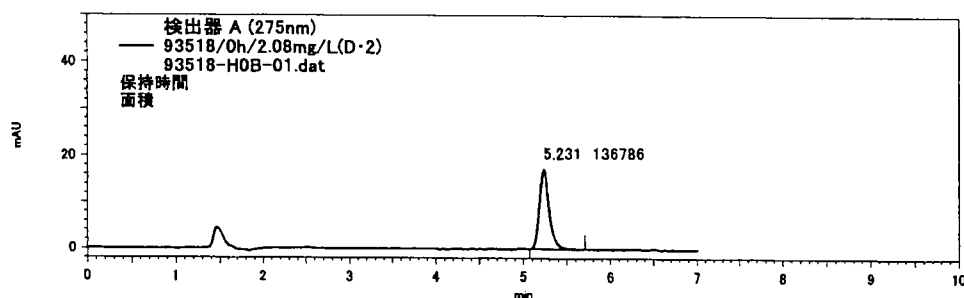
Standard solution 1.00 mg/L



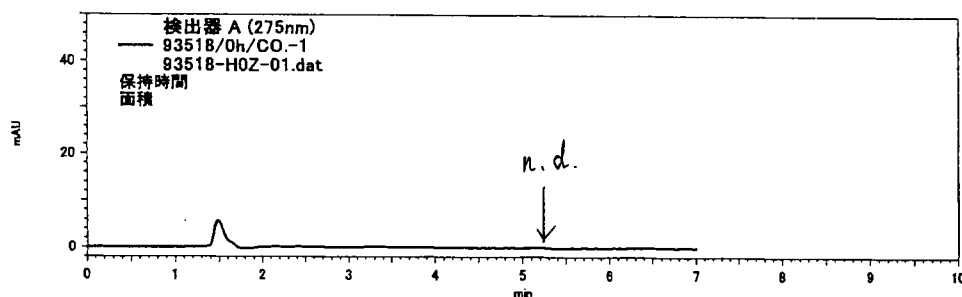
8.00 mg/L (Nominal concentration)



2.08 mg/L (Nominal concentration)



Control

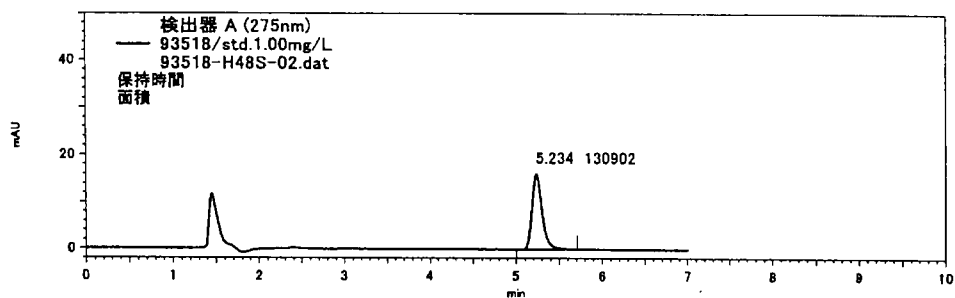


2005.5.10

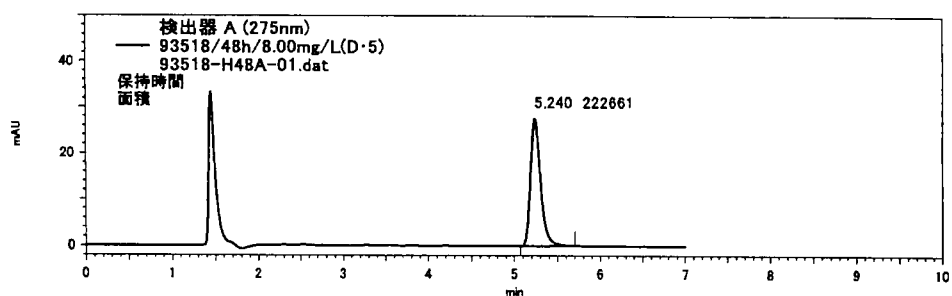
Appendix figure 3-2. HPLC chromatogram at the start of the exposure.

試験番号 93518

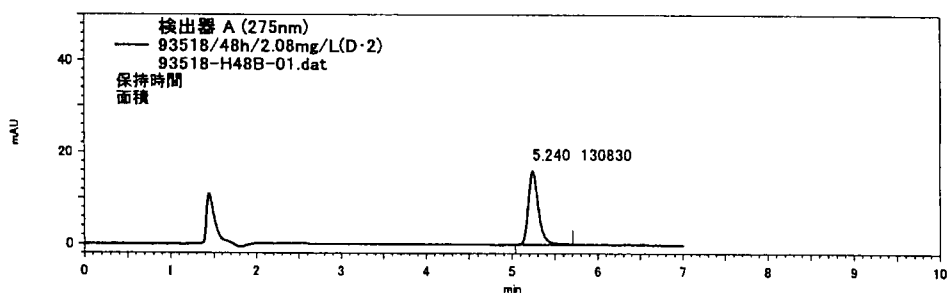
Standard solution 1.00 mg/L



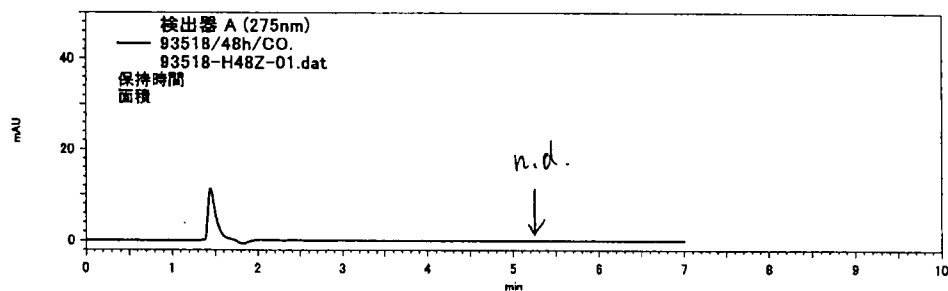
8.00 mg/L (Nominal concentration)



2.08 mg/L (Nominal concentration)



Control



2005.5.12

Appendix figure 3-3. HPLC chromatogram at the end of the exposure.

## Additional data

Results of preliminary tests

## 予備試験結果

### ＜生物への影響＞

#### 予備試験-1

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
1.20	0	—	0	—
2.04	0	—	0	—
3.46	0	—	0	RA
5.88	20	RA	30	RA
10.0	100	—	100	—

暴露方式：止水式

試験生物：10 頭／区(2 連／区)

#### 予備試験-2

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
1.98	0	—	0	—
2.96	0	—	0	—
4.44	0	—	0	RA
6.67	100	—	100	—
10.0	100	—	100	—

暴露方式：止水式

試験生物：5 頭／区(1 連／区)

#### 予備試験の試験条件等(共通の部分)

試験液調製法：試験用水と被験物質を混合後、約 30 分間超音波照射しながら攪拌して調製した試験原液を用いて調製した。試験原液調製は純度補正を実施しなかった。

—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

<試験液中の被験物質濃度>

設 定 濃 度 (mg/L)	測定濃度 (mg/L) (対設定濃度 %)		
	暴露開始時	24時間後	暴露終了時
1.98	1.90 (95.9)	1.78 (89.8)	1.73 (87.2)
10.0	9.91 (99.1)	9.55 (95.5)	9.16 (91.6)

予備試験-2 と併行して実施