CERI

| 受付番号 | 662-06-E-4260 |
|---|---|
| 試験番号 | 94260 |

# 最 終 報 告 書

13F-AcOHのヒメダカによる96時間急性毒性試験

2007 年 5 月 25 日

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。
財団法人 化学物質評価研究機構 久留米事業所
2007 年 5 月 25 日
試験責任者

# 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　　ダイキン工業株式会社

試験の表題　　13F-AcOHのヒメダカによる96時間急性毒性試験

試 験 番 号　　94260

上記試験は以下のGLP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。

2007年5月25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　　ダイキン工業株式会社

試験の表題　　13F-AcOHのヒメダカによる96時間急性毒性試験

試験番号　　94260

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 | 2007 年 4 月 20 日 | 2007 年 4 月 20 日 |
| 試験計画書 | 2007 年 4 月 20 日 | 2007 年 4 月 20 日 |
| 暴露開始時，暴露開始後 | 2007 年 4 月 23 日 | 2007 年 4 月 27 日 |
| | 2007 年 4 月 27 日 | 2007 年 4 月 27 日 |
| 生データ、最終報告書草案 | 2007 年 5 月 25 日 | 2007 年 5 月 25 日 |
| 最終報告書 | 2007 年 5 月 25 日 | 2007 年 5 月 25 日 |

2007 年 5 月 25 日

信頼性保証部門責任者

# 目　　次


| | | 頁 |
|---|---|---|
| | 表　　題 | 1 |
| | 試験委託者 | 1 |
| | 試験施設 | 1 |
| | 試験目的 | 1 |
| | 試　験　法 | 1 |
| | 適用GLP | 1 |
| | 試験日程 | 2 |
| | 試資料の保管 | 2 |
| | 試験関係者 | 3 |
| | 最終報告書の承認 | 3 |
| | 要　　約 | 4 |
| 1. | 被験物質 | 5 |
| 2. | 供試試料 | 6 |
| 3. | 試験材料と方法 | 7 |
| 4. | 試験結果及び考察 | 11 |
| 5. | 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 | 12 |

試験結果の表

表1　累積死亡率

表2　観察された症状

表3-1　試験液の溶存酸素濃度

表3-2　試験液のpH

表3-3　試験液の水温

表4　ヒメダカに対する$LC_{50}$

付属資料1　試験用水の水質

付属資料2　被験物質濃度の分析方法及び測定結果

付属資料3　検量線及びクロマトグラム

別添資料　予備試験結果

| | |
|---|---|
| 表　　題 | 13F-AcOHのヒメダカによる96時間急性毒性試験 |
| 試験委託者 | ダイキン工業株式会社<br>（〒566-8585）大阪府摂津市西一津屋1番1号 |
| 試験施設 | 財団法人化学物質評価研究機構　久留米事業所<br>（〒839-0801）福岡県久留米市宮ノ陣三丁目2番7号 |
| 試験目的 | 13F-AcOHの魚類に対する短期的影響を調べる。 |
| 試験法 | 本試験は以下の試験法に従って行った。<br>(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、環保企発第031121002号）に規定する〈魚類急性毒性試験〉<br>(2)「OECD Guidelines for Testing of Chemicals」に定める “Fish, Acute Toxicity Test (Guideline 203, 1992)” |
| 適用GLP | 本試験は以下の基準を適用した。<br>(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」<br>(2)「OECD Principles of Good Laboratory Practice」(November 26, 1997) |

試験日程

| | |
|---|---|
| 試験開始日 | 2007年4月20日 |
| 実験開始日 | 2007年4月23日 |
| 実験終了日 | 2007年4月27日 |
| 試験終了日 | 2007年5月25日 |

試資料の保管

(1) 被験物質

供試試料*1を保管用容器に入れ密栓後、化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律（以下「化審法」と記す）第4条第1項若しくは第2項、第4条の2第2項、第3項若しくは第8項、第5条の4第2項、第24条第2項又は第25条の3第2項の規定による通知を受けた後10年間、または品質低下をおこさないで安定に保管しうる期間のいずれか短い方の期間、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または廃棄に際しては試験委託者と協議の上決定する。

*1　試験番号94258、94259及び94260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、試験委託書、被験物質調査票、その他必要な資料等は最終報告書と共に、化審法第4条第1項若しくは第2項、第4条の2第2項、第3項若しくは第8項、第5条の4第2項、第24条第2項又は第25条の3第2項の規定による通知を受けた後10年間、久留米事業所資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。

試験関係者

試 験 責 任 者

生 物 試 験 担 当 者

分 析 試 験 担 当 者

最終報告書の承認

2007年 5 月 25日

試 験 責 任 者

# 要　　約

試験の表題

13F-AcOHのヒメダカによる96時間急性毒性試験

試験条件

| | |
|---|---|
| (1) 被験物質 | 13F-AcOH |
| (2) 試験生物 | ヒメダカ（*Oryzias latipes*） |
| (3) 暴露期間 | 96時間 |
| (4) 試験濃度 | 100、76.9、59.2、45.5及び35.0mg/L（公比1.3）の5濃度区及び対照区 |
| (5) 連数 | 1連／試験区 |
| (6) 試験生物数 | 10尾／試験区 |
| (7) 試験用水 | 脱塩素水道水 |
| (8) 試験方式 | 半止水式（48時間後に換水） |
| (9) 試験液の調製 | 供試試料と試験用水を混合、撹拌して調製 |
| (10) 試験液量 | 約5L／試験区 |
| (11) 水温 | 24±1℃ |
| (12) 照明 | 室内灯、16時間明／8時間暗 |
| (13) 給餌 | 無給餌 |
| (14) エアレーション | あり |
| (15) 試験液中の被験物質の分析 | LC-MS法（暴露開始時、換水前後及び暴露終了時）<br>分析対象：試験最高、最低濃度区及び対照区 |

試験結果

| | |
|---|---|
| (1) 試験液中の被験物質濃度（対設濃度） | 暴露開始時及び換水後　93.8～98.3%<br>換水前及び暴露終了時　93.6～103% |
| (2) 96時間$LC_{50}$（半数致死濃度） | ＞100mg/L |
| (3) 96時間100%死亡最低濃度 | ＞100mg/L |
| (4) 96時間0%死亡最高濃度 | 100mg/L |

[(2)、(3)、(4)は、設定濃度に基づく値]

1. 被験物質

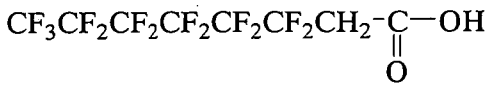
本最終報告書において13F-AcOHは、次の名称等を有するものとする。

1.1 名　　称[*2]

3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,8-トリデカフルオロオクタン酸

1.2 構造式等[*2]

構造式



分子式　　$C_8H_3F_{13}O_2$

分子量　　378.09

*2　試験委託者提供資料による。

## 2. 供試試料

### 2.1 供給者及びロット番号*2

| | |
|---|---|
| 供給者 | ダイキン工業株式会社 |
| ロット番号 | S6X01 |

### 2.2 純度*2

| | |
|---|---|
| 被験物質 | 99.4% |
| 不純物 | 不明成分 0.6% |

### 2.3 被験物質の確認

試験委託者提供の赤外吸収スペクトルと久留米事業所の当該測定スペクトルが一致することを確認した。

### 2.4 物理化学的性状*2

| | | |
|---|---|---|
| 常温における性状 | 白色固体 | |
| 溶解度 | ジメチルスルホキシド | 可溶 |
| | アセトン | 可溶 |

*2 試験委託者提供資料による。

### 2.5 保管条件及び保管条件下での安定性確認

| | |
|---|---|
| 保管条件 | 室温遮光保存 |
| 安定性確認 | 実験開始前及び終了後に被験物質の赤外吸収スペクトルを測定した結果、両スペクトルは一致し、保管条件下で安定であることを確認した。 |

## 3. 試験材料と方法

### 3.1 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±1.2cm

生物の大きさについては試験法(1)に定める規定値を適用した。

(4) 供 給 源

財団法人化学物質評価研究機構　久留米事業所

（〒839-0801 福岡県久留米市宮ノ陣三丁目2番7号）

(5) 試験生物の順化

2006年10月28日にふ化したヒメダカを、試験条件と同じ水質（脱塩素水道水）、水温（24±1℃）及び明暗周期（16時間明／8時間暗）下において24日間（2007年3月30日～2007年4月23日）流水条件で順化し、試験に使用した。供試前7日間の死亡率は0%であった。供試時における生物の月齢は5ヶ月であった。なお、生物への薬浴は実施しなかった。餌はコイ用配合餌料（2C）を与え、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（2007年2月5日～2月9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$LC_{50}$は0.639mg/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±2×標準偏差：0.116～0.980mg/L）であった［平均±標準偏差は0.548±0.216mg/L（n=37）］。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。

3.2 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。定期的に測定した試験用水の水質測定結果を付属資料1に示す。

3.3 試験器具及び装置

(1) 試 験 器 具

試 験 容 器：7.8L容のガラス製容器（直径24cm、深さ28cm）

また、ほこりの混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

加熱・冷却ユニット（佐藤工芸製 HCA250）

3.4 試 験 条 件

(1) 暴 露 条 件

(a) 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。

(b) 期 間

96時間

(c) 試 験 濃 度

試験は100、76.9、59.2、45.5及び35.0mg/L（公比1.3）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。試験濃度は純度（99.4%）補正を行った値で表示した。予備試験結果を別添資料に示す。

(d) 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。

(e) 連 数

1連／試験区

(f) 試験生物数

10尾／試験区

(g) 試 験 液 量

約5L／試験区

(2) 環 境 条 件

(a) 水　　温

24±1℃

(b) 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、緩やかなエアレーションを行った。

(c) pH

試験はpHを調整せずに行った。

(d) 照　　明

室内灯による16時間明／8時間暗

(e) 給　　餌

暴露期間中、給餌を行わなかった。

3.5　試験液の調製法

試験液の調製は純度（99.4%）補正して行った。

メノウ乳鉢で微細化した供試試料と試験用水を三角フラスコで混合し、約1時間撹拌して調製した。各試験区の調製量に対する供試試料添加量を以下に示す。

| 試験区（mg/L） | 供試試料添加量（g/5.1L） |
|---|---|
| 対照区 | — |
| 35.0 | 0.1796 |
| 45.5 | 0.2335 |
| 59.2 | 0.3037 |
| 76.9 | 0.3946 |
| 100 | 0.5131 |

3.6　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。

(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。

(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。溶存酸素濃度は溶存酸素計（YSI Incorporated製　YSI MODEL 58）、pHはガラス電極式水素イオン濃度計（東亜ディーケーケー製　HM-21P）、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、最低濃度区及び対照区について行った。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。暴露開始時及び換水後の測定用試験液は、調製容器より別途分取したものを用いた。換水前及び暴露終了時の測定用試験液は各試験区の試験容器の中層からそれぞれ採取したものを用いた。被験物質濃度の分析は液体クロマトグラフィー－質量分析法（LC-MS）により行った。被験物質濃度の分析方法及び測定結果を付属資料2、検量線及びクロマトグラムを付属資料3に示す。

(6) 試験用水への溶解度

被験物質の試験用水への溶解度は100mg/L以上であったため、本試験では試験用水への溶解度は測定しなかった。

3.7 $LC_{50}$[*3]の算出法

試験濃度範囲で50%以上の死亡率が得られなかったため、$LC_{50}$は「＞試験最高濃度」と表示した。

結果の算出には設定濃度を用いた。

*3 $LC_{50}$（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。

3.8 有効性基準

(1) 暴露期間中、対照群における死亡率は10%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。

3.9 数値の取扱い

数値の丸め方は、JIS Z 8401：1999 規則Bに従った。

4. 試験結果及び考察

4.1 死 亡 率

暴露期間中、試験濃度範囲において試験生物の死亡は認められなかった。各時間での累積死亡率を表1に示す。なお、暴露終了時における対照群の死亡率は0%であり、有効性基準（10%を超えない）を満たしていた。

4.2 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、試験濃度範囲において試験生物に症状は認められなかった。暴露期間中における症状の観察結果を表2に示す。

4.3 試験生物の大きさ［平均値±標準偏差（n=10）］

全長 2.9±0.19cm

体重 0.19±0.032g

4.4　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った。換水前も同様であった。

(2) 試験液の水質

暴露期間中に測定した溶存酸素濃度は7.8～8.8mg/L、pHは6.5～7.8、水温は23.3～23.9℃であった。試験液の水質を表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[*4]）を満たしていた。

*4　23～25℃の飽和溶存酸素濃度：8.39～8.11mg/L、JIS K 0102：1998

(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93.8～98.3%、換水前及び暴露終了時は93.6～103%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付属資料2に示す。

4.5　$LC_{50}$

13F-AcOHのヒメダカに対する48及び96時間$LC_{50}$は共に＞100mg/Lであった。各時間での$LC_{50}$を表4に示す。

4.6　考　　察

本試験は試験法上限濃度（100mg/L）以下での試験生物に対する$LC_{50}$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。

5. 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。

表1　累積死亡率

| 設定濃度 (mg/L) | 累積死亡率 (%) | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | 3時間 | 24時間 | 48時間 | 72時間 | 96時間 |
| 対照区 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 35.0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 45.5 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 59.2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 76.9 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 100 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

表2　観察された症状

| 設定濃度 (mg/L) | 観察結果（左：症状を示した個体数／全生存数、右：症状の詳細） | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 3時間 | | 24時間 | | 48時間 | | 72時間 | | 96時間 | |
| 対照区 | 0/10 | N | 0/10 | N | 0/10 | N | 0/10 | N | 0/10 | N |
| 35.0 | 0/10 | N | 0/10 | N | 0/10 | N | 0/10 | N | 0/10 | N |
| 45.5 | 0/10 | N | 0/10 | N | 0/10 | N | 0/10 | N | 0/10 | N |
| 59.2 | 0/10 | N | 0/10 | N | 0/10 | N | 0/10 | N | 0/10 | N |
| 76.9 | 0/10 | N | 0/10 | N | 0/10 | N | 0/10 | N | 0/10 | N |
| 100 | 0/10 | N | 0/10 | N | 0/10 | N | 0/10 | N | 0/10 | N |

Nは症状が認められなかったことを示す。

表3-1　試験液の溶存酸素濃度

| 設定濃度 (mg/L) | 0時間 | 24時間 | 48時間 | | 72時間 | 96時間 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | 開始時 | | 換水前 | 換水後 | | 終了時 |
| 対照区 | 8.7 | 8.6 | 8.4 | 8.8 | 8.3 | 8.2 |
| 35.0 | 8.6 | 8.3 | 8.0 | 8.5 | 7.9 | 7.9 |
| 45.5 | 8.6 | 8.4 | 8.0 | 8.5 | 7.8 | 8.0 |
| 59.2 | 8.6 | 8.2 | 7.9 | 8.5 | 7.8 | 7.9 |
| 76.9 | 8.6 | 8.3 | 8.0 | 8.5 | 8.1 | 8.2 |
| 100 | 8.6 | 8.1 | 8.0 | 8.5 | 8.0 | 7.9 |

単位：mg/L

表3-2　試験液のpH

| 設定濃度 (mg/L) | 0時間 | 24時間 | 48時間 | | 72時間 | 96時間 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | 開始時 | | 換水前 | 換水後 | | 終了時 |
| 対照区 | 7.8 | 7.8 | 7.8 | 7.8 | 7.8 | 7.6 |
| 35.0 | 7.2 | 7.7 | 7.6 | 7.0 | 7.6 | 7.5 |
| 45.5 | 7.1 | 7.7 | 7.6 | 6.9 | 7.6 | 7.6 |
| 59.2 | 7.0 | 7.6 | 7.5 | 6.8 | 7.5 | 7.5 |
| 76.9 | 6.9 | 7.6 | 7.6 | 6.7 | 7.6 | 7.6 |
| 100 | 6.7 | 7.5 | 7.5 | 6.5 | 7.5 | 7.4 |

表3-3　試験液の水温

| 設定濃度 (mg/L) | 0時間 | 24時間 | 48時間 | | 72時間 | 96時間 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | 開始時 | | 換水前 | 換水後 | | 終了時 |
| 対照区 | 23.3 | 23.9 | 23.9 | 23.3 | 23.7 | 23.8 |
| 35.0 | 23.8 | 23.9 | 23.9 | 23.9 | 23.7 | 23.8 |
| 45.5 | 23.8 | 23.9 | 23.9 | 23.9 | 23.7 | 23.8 |
| 59.2 | 23.8 | 23.9 | 23.9 | 23.9 | 23.7 | 23.8 |
| 76.9 | 23.9 | 23.9 | 23.9 | 23.9 | 23.7 | 23.8 |
| 100 | 23.9 | 23.9 | 23.9 | 23.9 | 23.7 | 23.8 |

単位：℃

表4　ヒメダカに対する$LC_{50}$

| 暴露時間 | $LC_{50}$ (mg/L) | 95%信頼限界 (mg/L) (回帰直線の傾き) | $LC_{50}$算出法 |
|---|---|---|---|
| 24時間 | ＞100 | －<br>(－) | － |
| 48時間 | ＞100 | －<br>(－) | － |
| 72時間 | ＞100 | －<br>(－) | － |
| 96時間 | ＞100 | －<br>(－) | － |

－は得られなかったことを示す。

# 付属資料1

試験用水の水質

試験用水の水質（採水日：2007年1月9日）

| 項　　目 | 単位 | 検査結果 | 定量下限 |
|---|---|---|---|
| 全硬度（$CaCO_3$として） | mg/L | 41.9 | 0.1 |
| 浮遊物質 | mg/L | < 1 | 1 |
| pH値 | − | 7.9（22℃） | − |
| 有機体炭素 | mg/L | 0.2 | 0.1 |
| 化学的酸素要求量 | mg/L | 0.7 | 0.5 |
| 遊離塩素 | mg/L | < 0.02 | 0.02 |
| アンモニウム態窒素 | mg/L | 0.01 | 0.01 |
| 全シアン | mg/L | < 0.01 | 0.01 |
| アルカリ度 | mg/L | 35 | 1 |
| 電気伝導率 | mS/m | 18.3 | − |
| 有機りん | mg/L | < 0.1 | 0.1 |
| アルキル水銀 | mg/L | < 0.0005 | 0.0005 |
| 総水銀 | mg/L | < 0.0005 | 0.0005 |
| カドミウム | mg/L | < 0.001 | 0.001 |
| 六価クロム | mg/L | < 0.02 | 0.02 |
| 鉛 | mg/L | < 0.005 | 0.005 |
| ヒ素 | mg/L | < 0.001 | 0.001 |
| ホウ素 | mg/L | 0.08 | 0.02 |
| フッ素 | mg/L | < 0.1 | 0.1 |
| 鉄 | mg/L | < 0.01 | 0.01 |
| 銅 | mg/L | < 0.005 | 0.005 |
| コバルト | mg/L | < 0.001 | 0.001 |
| マンガン | mg/L | < 0.01 | 0.01 |
| 亜鉛 | mg/L | < 0.01 | 0.01 |
| アルミニウム | mg/L | 0.033 | 0.001 |
| ニッケル | mg/L | < 0.001 | 0.001 |
| 銀 | mg/L | < 0.0001 | 0.0001 |
| 硫酸イオン | mg/L | 3.9 | 0.1 |
| 塩化物イオン | mg/L | 16 | 1 |
| ナトリウム | mg/L | 14.3 | 0.01 |
| カリウム | mg/L | 3.7 | 0.01 |
| カルシウム | mg/L | 11.5 | 0.01 |
| マグネシウム | mg/L | 3.2 | 0.01 |
| 1,2-ジクロロプロパン | mg/L | < 0.0001 | 0.0001 |
| クロロタロニル | mg/L | < 0.0001 | 0.0001 |
| プロピザミド | mg/L | < 0.0001 | 0.0001 |
| クロルニトロフェン | mg/L | < 0.0001 | 0.0001 |
| シマジン | mg/L | < 0.001 | 0.001 |
| チオベンカルブ | mg/L | < 0.0001 | 0.0001 |
| ダイアジノン | mg/L | < 0.0001 | 0.0001 |
| イソキサチオン | mg/L | < 0.0001 | 0.0001 |
| フェニトロチオン | mg/L | < 0.0001 | 0.0001 |
| EPN | mg/L | < 0.0001 | 0.0001 |
| ジクロルボス | mg/L | < 0.0001 | 0.0001 |
| イプロベンホス | mg/L | < 0.0001 | 0.0001 |
| PCB | mg/L | < 0.0005 | 0.0005 |

# 付属資料2

被験物質濃度の分析方法及び測定結果

1. 試験液の前処理操作

採取した試験液について、ガラス繊維フィルター（ADVANTEC製　GB-140　孔径0.4μm）による吸引ろ過*1を行った後、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を調製した。

*1　約50mLの試験液でフィルターを洗浄後、試験液を吸引ろ過

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液体クロマトグラフィー－質量分析法（LC-MS）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）を付属資料3に示す。

定量条件

| | |
|---|---|
| 機器 | 液体クロマトグラフー質量分析計 |
| 液体クロマトグラフ | 島津製作所製　LC-20A Series |
| 質量分析計 | サーモエレクトロン製　TSQ Quantum Discovery型 |

液体クロマトグラフ条件

| | |
|---|---|
| カラム | L-column ODS<br>（15cm×2.1mmI.D.，化学物質評価研究機構製） |
| カラム温度 | 40℃ |
| 溶離液 | A（20%）：水*2／ぎ酸（1000/0.5 V/V）<br>B（80%）：アセトニトリル／ぎ酸（1000/0.5 V/V） |
| 流量 | 0.2mL/min |
| 注入量 | 1μL |

*2　水道水を超純水装置システムで処理した水

質量分析計条件

| | |
|---|---|
| イオン化法 | エレクトロスプレーイオン化法（ESI） |
| 検出イオン | 負イオン |
| 検出法 | 選択イオンモニタリング（SIM） |
| 測定イオン(m/z) | 377 |
| イオンチューブ温度 | 250℃ |

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。また、標準溶液の調製は純度（99.4%）補正して行った。

メノウ乳鉢で微細化した供試試料100mg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994mg/Lの被験物質溶液を調製した。これを脱塩素水道水で希釈して4.97mg/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0.497、2.49、4.97及び9.94mg/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。作成した検量線を付属資料3に示す。なお、試験液中の被験物質の定量下限値は、定量性が確認された範囲内での最小の標準溶液濃度（0.497mg/L）とした。

5. 測 定 結 果

試験液中の被験物質濃度の測定結果を以下の表に示す。

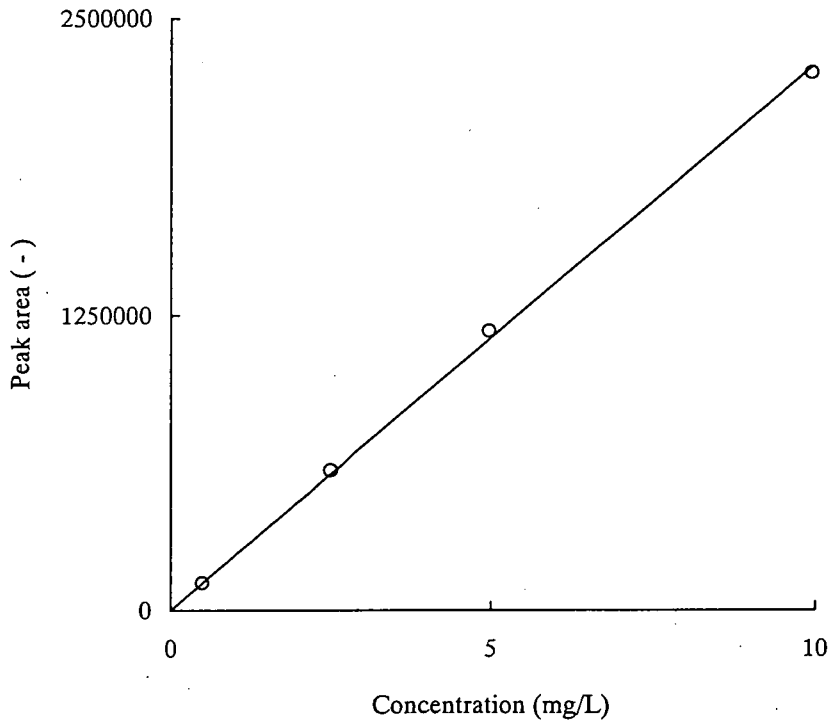
付表2-1　試験液中の被験物質濃度

| 設定濃度 (mg/L) | 測定濃度 (mg/L) (対設定濃度 %) | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | 暴露開始時 | 48時間 | | 暴露終了時 | 幾何平均値 |
| | | 換水前 | 換水後 | | |
| 対 照 区 | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | — |
| 35.0 | 32.8<br>(93.8) | 32.8<br>(93.6) | 33.3<br>(95.2) | 35.3<br>(101) | 33.5<br>(95.8) |
| 100 | 98.3<br>(98.3) | 103<br>(103) | 94.6<br>(94.6) | 100<br>(100) | 98.9<br>(98.9) |

n.d. : ＜0.497mg/L

# 付属資料3

検量線及びクロマトグラム

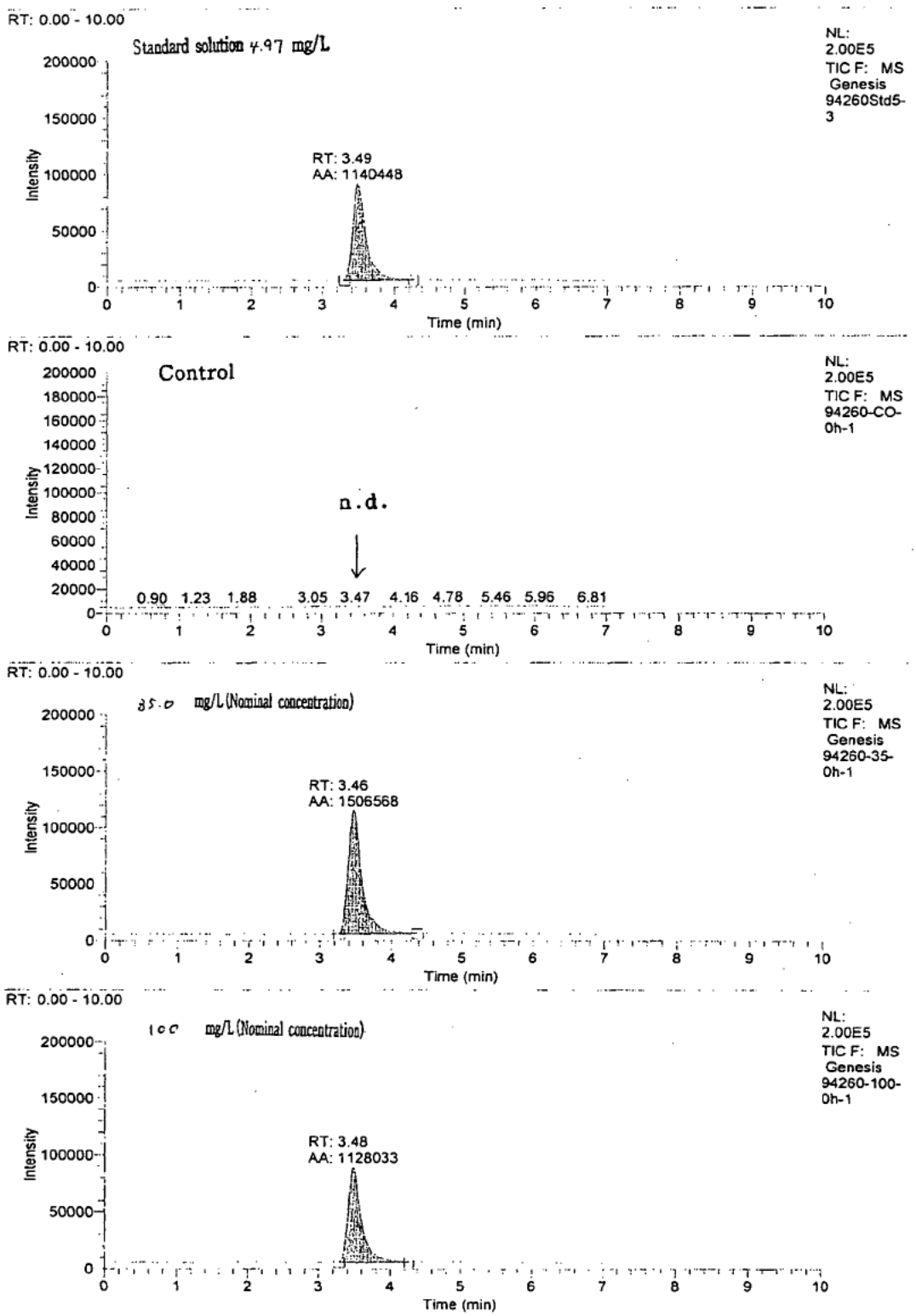



y = 230878x
r = 1.00

| Concentration (mg/L) | Peak area ( - ) |
|---|---|
| 0.497 | 116006 |
| 2.49 | 591928 |
| 4.97 | 1184766 |
| 9.94 | 2271946 |

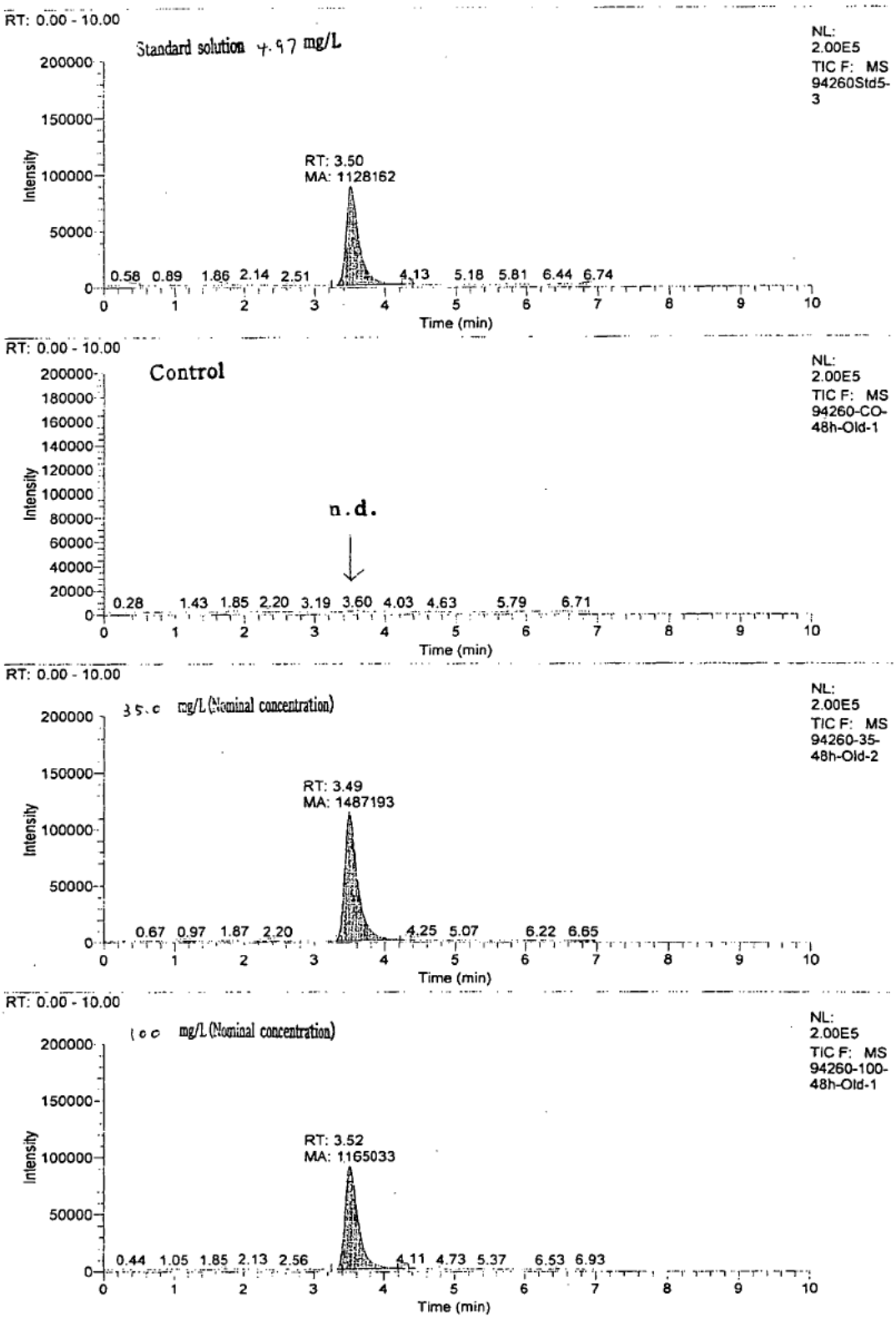
付図3-1　13F-AcOHのLC-MSによる検量線

94260




付図3-2　試験液のLC-MSクロマトグラム（暴露開始時）

94260




付図3-3　試験液のLC-MSクロマトグラム（暴露48時間後換水前）

# 別添資料

予備試験結果

1. 被験物質の試験用水への溶解度

被験物質の水への溶解度が100mg/L以下であることが予想されたため、溶解度測定の検討を行った。結果を以下に示す。

1) 検　　討

(1) 内　　容

供試試料と試験用水を100mg/Lになるように混合後、24±1℃の条件下で約48時間撹拌して、被験物質の溶解性を確認した。

(2) 結　　果

ガラス繊維フィルター*（ADVANTEC製　GB-140　孔径0.4μm）による吸引ろ過を行った後、被験物質分析を行った。その結果、被験物質濃度は101mg/Lであった。

*　フィルター吸着がないことを確認した。

2) 被験物質の試験用水への溶解度検討結果のまとめ

被験物質の試験用水への溶解度は100mg/L以上と判断されたため、本試験では溶解度測定は実施しなかった。

2. 試験生物への影響

1) 予備試験1

(1) 内　　容

100mg/L試験液調製時に、若干の不溶物がみられたため、溶解度として試験法の試験上限濃度（100mg/L）になるように、110mg/Lの試験液を調製することとした。試験用水に供試試料を添加し、マグネティックスターラーで約1時間撹拌したものを試験液とした。その後生物を暴露し影響の有無を確認した。また、被験物質濃度も測定した。

(2) 結　　果

| 設定濃度区 (mg/L) | 左：累積死亡率（%）右：症状の観察（症状有り：＊、無し：N） | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 3時間 | | 24時間 | | 48時間 | | 72時間 | | 96時間 | |
| 対照区 | 0 | N | 0 | N | 0 | N | 0 | N | 0 | N |
| 110 | 0 | N | 0 | ＊ | 10 | N | 10 | N | 10 | N |

暴 露 方 式：半止水式（換水1回／2日）

生物数／試験液量：10尾／5L

エアレーション：有り

＜試験液中の被験物質濃度＞

| 設定濃度区 (mg/L) | 測定濃度（mg/L）（対設定値%） | | |
|---|---|---|---|
| | 暴露開始時 | 24時間後 | 48時間後 |
| 対照区 | n.d. | n.d. | n.d. |
| 110 | 112 (102) | 107 (97.1) | 113 (103) |

n.d.：<0.497mg/L

予備試験1において調製した試験液中には不溶物が存在（目視にて確認）していたが、試験用水への溶解度検討において被験物質は100mg/L以上溶解することが確認された。なお、供試試料の形状は粒子径が粗い結晶状であり、そのまま撹拌を行うだけでは十分な溶解濃度が得られないと予想された。そのため、以降の検討では供試試料をメノウ乳鉢で微細化して用いることとした。

2) 予備試験2

(1) 内　　容

予備試験1より、110mg/Lで死亡がみられたため、影響のみられない濃度区を設定した。さらに、試験液調製時の撹拌時間及び撹拌方法の違いにより、開始時の濃度に差がでるか否かの検討も同時に行った。

試験用水に必要量の供試試料を添加し、ガラス棒で撹拌したものを試験液とした。その後生物を暴露し影響の有無を確認した。また、被験物質濃度も測定した。

(2) 結果

| 設定濃度区 (mg/L) | 左：累積死亡率（%）右：症状の観察（症状有り：＊、無し：N） | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 3時間 | | 24時間 | | 48時間 | | 72時間 | | 96時間 | |
| 35.0 | 0 | N | 0 | N | 0 | N | 0 | N | 0 | N |
| 100 | 20 | ＊ | 40 | ＊ | 60 | N | 60 | N | 60 | N |

暴 露 方 式：半止水式（換水1回／2日）

生物数／試験液量：5尾／約2.5L

エアレーション：有り

＜試験液中の被験物質濃度＞

| 設定濃度区 (mg/L) | 測定濃度（mg/L）（対設定値%） | | |
|---|---|---|---|
| | 暴露開始時 | 24時間後 | 48時間後 |
| 35.0 | 30.1 (86.0) | 36.8 (105) | 38.1 (109) |
| 100 | 65.2 (65.2) | | 107 (107) |

試験液は、ガラス棒で撹拌しただけでは設定濃度に達しなかったため、濃度区ごとにマグネティックスターラーで約1時間撹拌して調製することとした。試験液は、エアレーション実施下で48時間安定であることが確認された。

3) 試験生物への影響（予備試験結果）のまとめ

100%死亡最低濃度は＞100mg/L、0%死亡最高濃度は35.0mg/Lと予測された。また、暴露期間中、試験液中の被験物質濃度は維持されると推察された。

3. 本試験の実施

1) 試験用水への溶解度測定

被験物質の試験用水への溶解度は100mg/L以上と判断されたため、本試験では試験用水への溶解度は測定しなかった。

2) 本 試 験

予備試験の結果から、本試験は100、76.9、59.2、45.5及び35.0mg/L（公比1.3）の5濃度区で行った。換水頻度は1回／2日とし、暴露期間中、緩やかなエアレーションを実施した。また、暴露期間中、試験液中の被験物質濃度が安定であると予想されたため、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、暴露開始時、換水前後及び暴露終了時に行った。