

受付番号	662-06-E-4231
試験番号	94231

最終報告書

13F-OLEのヒメダカによる96時間急性毒性試験

2007年9月19日

財団法人化学物質評価研究機構



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9月20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-OLEのヒメダカによる96時間急性毒性試験

試験番号 94231

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9月19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-OLEのヒメダカによる96時間急性毒性試験

試験番号 94231

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	2007年8月15日	2007年8月15日
試験計画書	2007年8月15日	2007年8月15日
試験計画書の変更	2007年9月11日	2007年9月11日
溶解度測定	2007年8月20日	2007年8月23日
	2007年8月21日	2007年8月23日
暴露開始時、暴露開始後	2007年8月20日	2007年8月24日
	2007年8月24日	2007年8月24日
生データ、最終報告書草案	2007年9月18日	2007年9月18日
最終報告書	2007年9月19日	2007年9月19日

2007年9月19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	6
2. 供試試料	7
3. 試験材料と方法	8
4. 試験結果及び考察	12
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	13

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LC₅₀

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

付属資料4 試験用水への溶解度

別添資料 予備試験結果

表 題	13F-OLE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 (〒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 (〒839-0801) 福岡県久留米市宮ノ陣三丁目2番7号
試験目的	13F-OLE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及びガイダンス文書に従って行った。 (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、環保企発第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)” (3)「OECD Guidance Document 23 “Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures”」(September 2000)
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)

試験日程

試験開始日	2007年8月15日
実験開始日	2007年8月20日
溶解度測定開始日	2007年8月20日
生物暴露開始日	2007年8月20日
実験終了日	2007年8月24日
溶解度測定終了日	2007年8月22日
生物暴露終了日	2007年8月24日
試験終了日	2007年9月19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94229、94230及び94231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9月19日

試験責任者

要 約

試験の表題

13F-OLE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-OLE
(2) 試 験 生 物	ヒメダカ (<i>Oryzias latipes</i>)
(3) 暴 露 期 間	96時間
(4) 試 験 濃 度	被験物質分散懸濁液（設定添加濃度：100mg/L）の 中層採取液及び対照区
(5) 連 数	2連／試験区
(6) 試 験 生 物 数	10尾／試験区（5尾／試験容器）
(7) 試 験 用 水	脱塩素水道水
(8) 試 験 方 式	密閉系の半止水式（24時間毎に換水）
(9) 試 験 液 の 調 製	供試試料を100mg/L（設定）になるように添加後、密 栓し、約48時間攪拌した被験物質分散懸濁液を約1時 間静置して採取した中層液を用いて調製
(10) 試 験 液 量	約6L／試験区（約3L／試験容器）
(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	なし
(15) 試験液中の被験物質の分析	GC-MS法（暴露開始時、換水前後及び暴露終了時）

試験結果

(1) 試験用水への溶解度 (24±1℃)	0.101mg/L	
(2) 試験液中の被験物質濃度 (対調製時濃度)	暴露開始時及び換水後	0.0805~0.329mg/L
	換水前及び暴露終了時	0.0666~0.168 mg/L (41.2~95.4%)
(3) 96時間LC ₅₀ (半数致死濃度)	>0.117mg/L	

[(3)は、測定濃度の幾何平均値に基づく値]

結 論

本試験は、被験物質の試験用水への溶解度付近における試験生物への影響の有無を確認するための限度試験として実施した。その結果、試験液調製時における被験物質濃度は溶解度付近であり、その条件下で試験生物に何ら影響はみられなかったことから、被験物質は溶解度付近の濃度において試験生物に対して急性的な影響を及ぼさないと判断された。

1. 被験物質

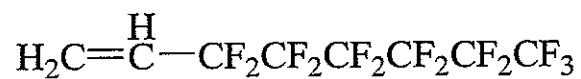
本最終報告書において13F-OLEは、次の名称等を有するものとする。

1.1 名称^{*2}

3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8-トリデカフルオロ-オクタ-1-エン

1.2 構造式等^{*2}

構造式



分子式 C₈H₃F₁₃

分子量 346.09

CAS番号 25291-17-2

*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	061122HM

2.2 純度*2

被験物質	99.8%
不純物	不明成分 0.2%

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	無色透明液体	
沸点	106°C (760mmHg)	
密度	1.560g/cm ³ (20°C)	
溶解度	水	不溶
	ジメチルスルホキシド	不溶
	アセトン	可溶(任意に混合)

*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	室温暗所保存
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 ± 1.2 cm

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

2007年3月27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（ $24 \pm 1^\circ\text{C}$ ）及び明暗周期（16時間明／8時間暗）下において27日間（2007年7月24日～2007年8月20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4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5月21日～5月25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 0.445mg/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： $0.124 \sim 0.978\text{mg/L}$ ）であった〔平均 \pm 標準偏差は $0.551 \pm 0.214\text{mg/L}$ （ $n=38$ ）〕。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：3L容のガラス製容器（直径16cm、深さ17cm）

また、ほこりの混入や試験液の揮発を防ぐためガラス製の蓋をし、密閉にした。

(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24時間毎に試験液の全量を交換する密閉系の半止水式で行った。

(b) 期間

96時間

(c) 試験濃度

予備試験の結果から試験用水への溶解度付近で試験生物に対して無影響と予測されたため、本試験では約48時間攪拌して調製した被験物質分散懸濁液（設定添加濃度：100mg/L）の中層採取液のみの限度試験で行った。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を攪拌処理したものを対照区とした。

(e) 連数

2連／試験区

- (f) 試験生物数
10尾／試験区 (5尾／試験容器)
- (g) 試験液量
約6L／試験区 (約3L／試験容器)

(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、エアレーションは行わなかった。
- (c) pH
試験液のpH調整は行わなかった。
- (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

調製時に純度補正は行わなかった。また、供試試料は密度 [1.560g/cm³(20℃)] を用いて容量による添加を行った。

三角フラスコ内に試験用水を満たし、供試試料をプッシュボタン式液体用微量体積計 (Eppendorf社製) により100mg/L (設定) になるように水面下で添加後、直ちに気相が無いように密栓した。その後、マグネティックスターラーにより約48時間緩やかに攪拌した。攪拌停止後、24±1℃の条件下で約1時間静置して採取した中層液を試験液とし、各試験容器に分割後、直ちにガラス製の蓋により気相が無いように密閉した。

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（物、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（24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。暴露開始時及び換水後（調製時）は調製容器より別途分取した試験液について測定し、換水前及び暴露終了時は各試験区につき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 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

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。測定用試験液は、暴露開始時及び換水後（調製時）は調製容器より別途分取した試験液について測定し、換水前及び暴露終了時は各試験区の試験容器の中層からそれぞれ均等量採取し、混合したものをを用いた。被験物質濃度の分析はガスクロマトグラフィー質量分析法（GC-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未満と予想されたため、本試験では試験用水への溶解度を測定した。溶解度測定の詳細及び測定結果を付属資料4に示す。

3.7 LC₅₀^{*3}の算出法

試験濃度で50%以上の死亡率が得られなかったため、LC₅₀は「>試験濃度」と表示した。

なお、結果の算出には試験濃度として暴露期間中に測定した試験液中の被験物質測定濃度の幾何平均値を用いた。

*3 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。

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 2.4±0.11cm
体重 0.11±0.013g

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6.8～8.4mg/L、pHは7.5～7.8、水温は24.0～24.7℃であった。試験液の水質を表3-1、表3-2及び表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0.0805～0.329mg/L、換水前及び暴露終了時は0.0666～0.168mg/L（調製時に対して41.2～95.4%）であった。被験物質濃度の測定結果を付属資料2に示す。

4.5 LC₅₀

13F-OLEのヒメダカに対する48及び96時間LC₅₀は共に>0.117mg/Lであった。各時間でのLC₅₀を表4に示す。

4.6 考 察

本試験は被験物質の試験用水への溶解度付近における試験生物への影響の有無を確認する限度試験として行った。その結果、試験液調製時における被験物質濃度は溶解度付近であったが、調製24時間後には被験物質濃度が低下した。本試験では濃度維持のために半止水式（24時間後に換水）を選択したため、溶解度付近の試験として適切であったと判断した。その他、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た。

この条件下で試験生物に何ら影響がみられなかったことから、被験物質は溶解度付近の濃度において試験生物に対して急性的な影響を及ぼさないと判断された。

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

測定濃度*5 (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
0.117	0	0	0	0	0

*5 測定濃度の幾何平均値（以下測定濃度と表示する。）

表2 観察された症状

測定濃度 (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
0.117	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

測定濃度 (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	換水前	換水後	換水前	換水後	終了時
対照区	8.2	7.8	8.4	8.0	8.2	7.1	8.1	7.0
0.117	8.0	7.4	8.1	7.9	8.2	6.9	8.0	6.8

単位：mg/L

表3-2 試験液のpH

測定濃度 (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	換水前	換水後	換水前	換水後	終了時
対照区	7.8	7.5	7.7	7.5	7.8	7.6	7.7	7.5
0.117	7.8	7.5	7.8	7.5	7.8	7.6	7.8	7.5

表3-3 試験液の水温

測定濃度 (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	換水前	換水後	換水前	換水後	終了時
対照区	24.2	24.0	24.1	24.1	24.3	24.0	24.6	24.1
0.117	24.7	24.0	24.1	24.0	24.0	24.1	24.5	24.0

単位：℃

表4 ヒメダカに対するLC₅₀

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	>0.117	— (—)	—
48時間	>0.117	— (—)	—
72時間	>0.117	— (—)	—
96時間	>0.117	— (—)	—

—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7月2日)

項目	単位	検査結果	定量下限
全硬度 (CaCO ₃ として)	mg/L	37.0	0.1
浮遊物質	mg/L	< 1	1
pH値	—	7.7 (24℃)	—
有機体炭素	mg/L	< 0.1	0.1
化学的酸素要求量	mg/L	< 0.5	0.5
遊離塩素	mg/L	< 0.02	0.02
アンモニウム態窒素	mg/L	0.02	0.01
全シアン	mg/L	< 0.01	0.01
アルカリ度	mg/L	29	1
電気伝導率	mS/m	15.5	—
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	0.04	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	< 0.005	0.005
アルミニウム	mg/L	0.051	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	12.9	0.1
塩化物イオン	mg/L	15	1
ナトリウム	mg/L	13.1	0.01
カリウム	mg/L	3.6	0.01
カルシウム	mg/L	10.3	0.01
マグネシウム	mg/L	2.8	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

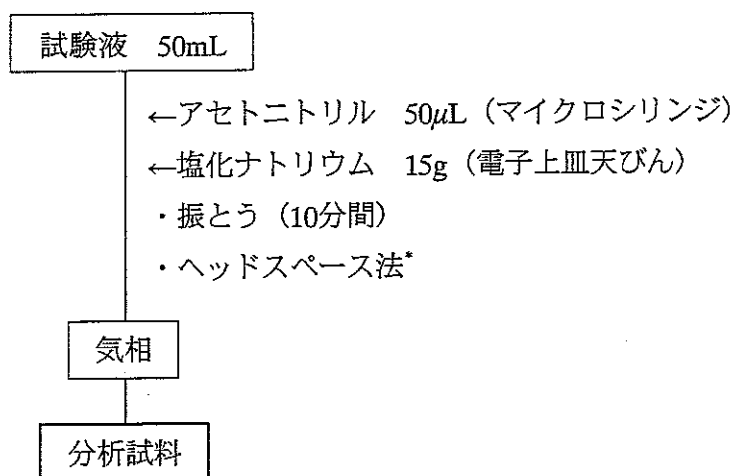
付属資料2

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、以下のフロースキームにより前処理操作を行い、分析試料を調製した。

フロースキーム



- * ヘッドスペース法条件
容器：125mL容パイアルビン
加温：70 $^{\circ}$ C、20分間以上

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ガスクロマトグラフィー質量分析法（GC-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試料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	ガスクロマトグラフ質量分析計
ガスクロマトグラフ	Agilent製 6890 Series Plus ⁺
質量分析計	Agilent製 5973N MSD

ガスクロマトグラフ条件

カラム	HP-PONA 膜厚 0.5 μ m (Agilent Technologies製) 50m \times 0.2mmI.D. フェーズドシリカ製
カラム温度	40 $^{\circ}$ C (2min) $\xrightarrow{\text{①}}$ 70 $^{\circ}$ C (0min) $\xrightarrow{\text{②}}$ 150 $^{\circ}$ C (0.1min)
昇温速度	①15 $^{\circ}$ C/min ②30 $^{\circ}$ C/min
キャリアガス	ヘリウム
全流量	24.1mL/min
試料導入部温度	150 $^{\circ}$ C
注 入 量	0.1mL
導 入 モード	スプリット
スプリット比	13:1
圧 力	40kPa

質量分析計条件

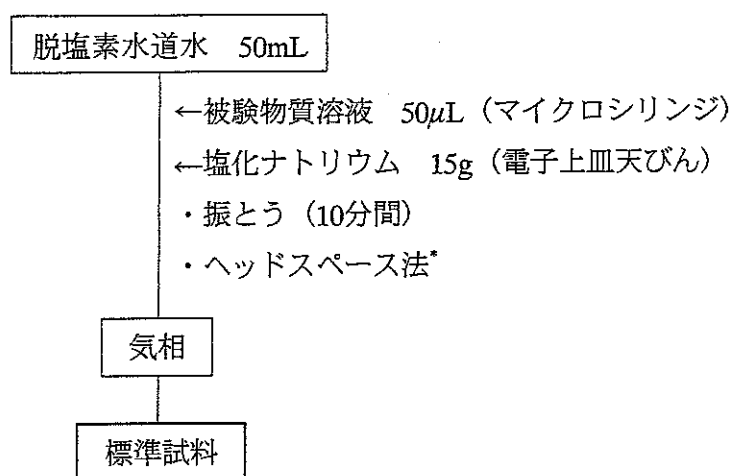
イオン化法	電子イオン化法 (EI)
検 出 法	選択イオンモニタリング (SIM)
測定イオン(m/z)	77
イオン源温度	230 $^{\circ}$ C
MS四重極温度	150 $^{\circ}$ C
イオン化エネルギー	69.9eV
トランスファーライン温度	200 $^{\circ}$ C

3. 標準試料の調製

分析試料中の被験物質濃度を求めるための標準試料の調製は次のように行った。また、標準試料の調製は純度（99.8%）補正して行った。

供試試料100.2mg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1000mg/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200mg/Lの被験物質溶液を調製した。これを以下のフロースキームにより前処理操作を行い、0.200mg/Lの標準試料を調製した。

フロースキーム



4. 検量線の作成

3.と同様にして20.0、100、200及び400mg/Lの被験物質溶液を調製した。これらの被験物質溶液について3.のフロースキームにより前処理操作を行い、0.0200、0.100、0.200及び0.400mg/Lの標準試料を調製した。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、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試料濃度（0.0200mg/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0.0200mg/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。

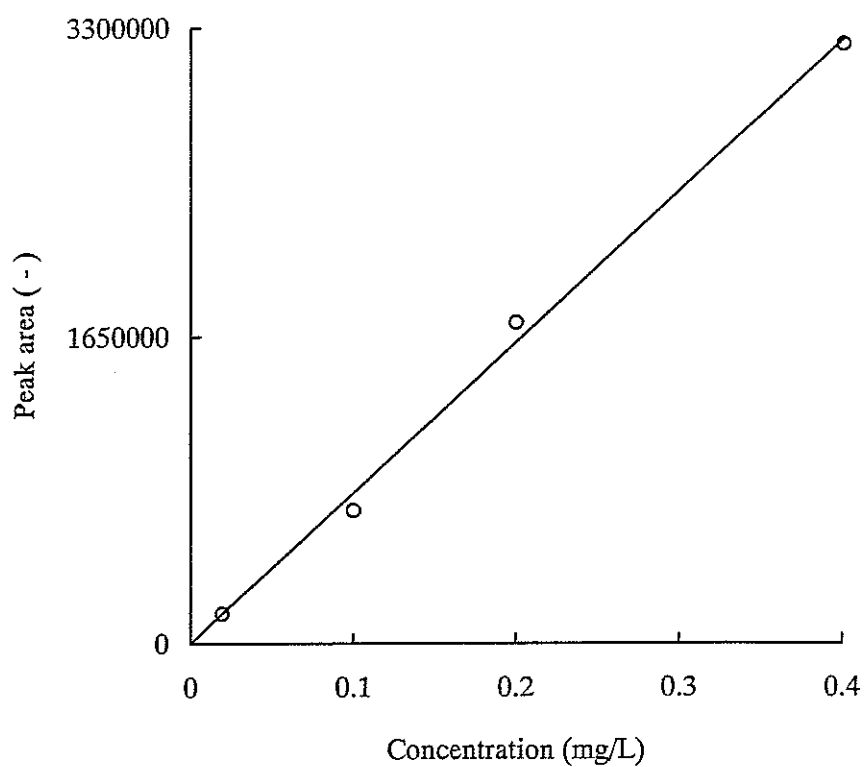
付表2-1 試験液中の被験物質濃度

設定添加 濃度 (mg/L)	測定濃度 (mg/L) (対調製時%)								幾何 平均値
	暴露 開始時	24時間		48時間		72時間		暴露 終了時	
		換水前	換水後	換水前	換水後	換水前	換水後		
対照区	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
100	0.329	0.168 (51.1)	0.213	0.0880 (41.2)	0.0831	0.0666 (80.2)	0.0805	0.0768 (95.4)	0.117

n.d. : <0.0200mg/L

付属資料3

検量線及びクロマトグラム



$$y = 8095886x$$
$$r = 0.998$$

Concentration (mg/L)	Peak area (-)
0.0200	159249
0.100	717033
0.200	1723007
0.400	3209712

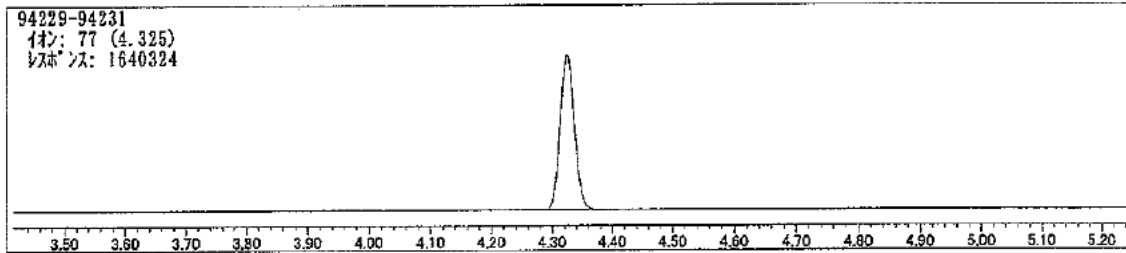
付図3-1 13F-OLEのGC-MSによる検量線

Standard sample 0.200mg/L

データファイル : C:\MSDCHEM\1\DATA\94229\070820\0820S02.D バイタ : 1
 測定日 : 20 Aug 2007 16:53 検体 :
 サンプル : Standard sample 0.200mg/L 装置 : Instrumen
 一般情報 : 希釈率 : 1.00
 サンプルアmount : 0.00

MS積分パラメータ : autoint1.e
 定量メソッド : C:\MSDCHEM\1\METHODS\94231(B).M (ケミステーション インテグレーション)

94231

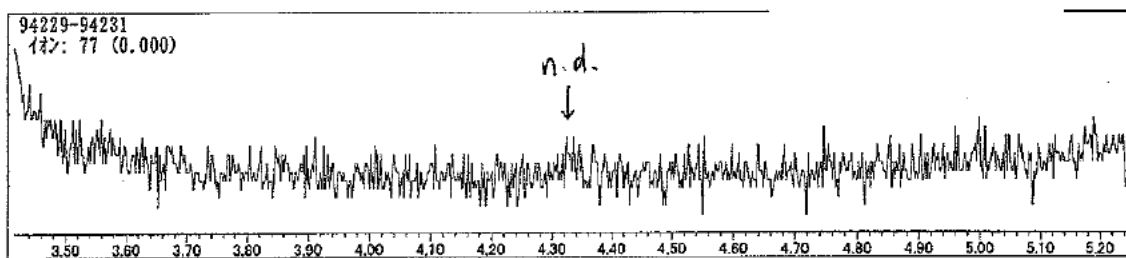


Control

データファイル : C:\MSDCHEM\1\DATA\94229\070820\31HOHZ.D バイタ : 1
 測定日 : 20 Aug 2007 16:31 検体 :
 サンプル : 94231 本試験0h Control 装置 : Instrumen
 一般情報 : 希釈率 : 1.00
 サンプルアmount : 0.00

MS積分パラメータ : autoint1.e
 定量メソッド : C:\MSDCHEM\1\METHODS\94231(B).M (ケミステーション インテグレーション)

94231

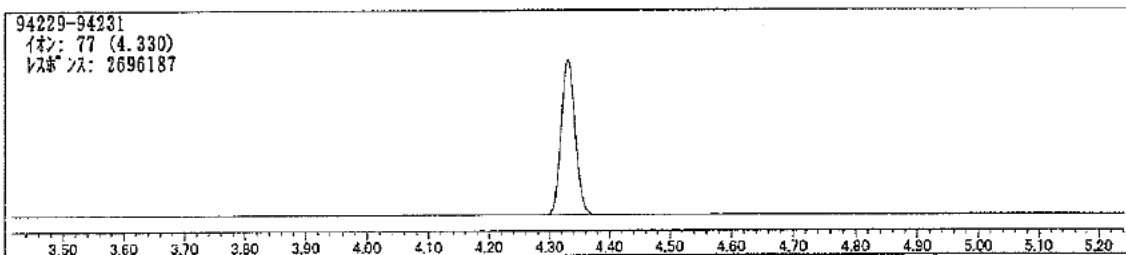


100mg/L (Nominal concentration)

データファイル : C:\MSDCHEM\1\DATA\94229\070820\31HOHA.D バイタ : 1
 測定日 : 20 Aug 2007 16:42 検体 :
 サンプル : 94231 本試験0h 100mg/L 装置 : Instrumen
 一般情報 : 希釈率 : 1.00
 サンプルアmount : 0.00

MS積分パラメータ : autoint1.e
 定量メソッド : C:\MSDCHEM\1\METHODS\94231(B).M (ケミステーション インテグレーション)

94231

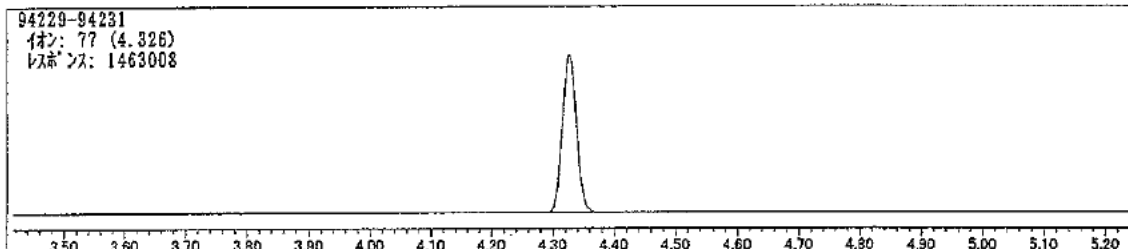


付図3-2 試験液のGC-MSクロマトグラム (暴露開始時)

Standard sample 0.200mg/L

データファイル : C:\MSDCHEM\1\FDATA\94229\070821\0821S01.D バイブル : 1
 測定日 : 21 Aug 2007 14:56 バイブル :
 サンプル : Standard sample 0.200mg/L 装置 : Instrumen
 一般情報 : 希釈率 : 1.00
 サンプルアmount : 0.00
 MS 積分パラメータ : autoint1.e
 定量メソッド : C:\MSDCHEM\1\FMETHODS\94231(B).M (ケミステーション インテグレート)

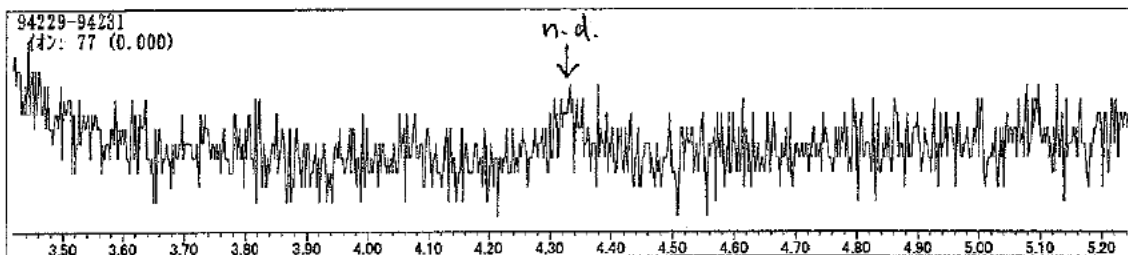
94231



Control

データファイル : C:\MSDCHEM\1\FDATA\94229\070821\31H24HZ0.D バイブル : 1
 測定日 : 21 Aug 2007 15:07 バイブル :
 サンプル : 94231 本試験 24h Control 換水前 装置 : Instrumen
 一般情報 : 希釈率 : 1.00
 サンプルアmount : 0.00
 MS 積分パラメータ : autoint1.e
 定量メソッド : C:\MSDCHEM\1\FMETHODS\94231(B).M (ケミステーション インテグレート)

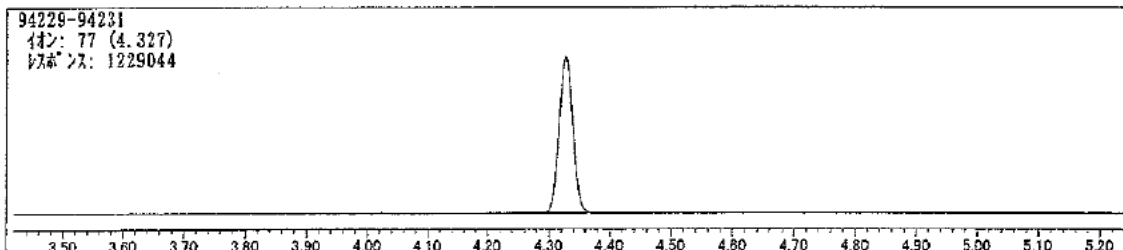
94231



100mg/L (Nominal concentration)

データファイル : C:\MSDCHEM\1\FDATA\94229\070821\31H24HA0.D バイブル : 1
 測定日 : 21 Aug 2007 15:18 バイブル :
 サンプル : 94231 本試験 24h 100mg/L 換水前 装置 : Instrumen
 一般情報 : 希釈率 : 1.00
 サンプルアmount : 0.00
 MS 積分パラメータ : autoint1.e
 定量メソッド : C:\MSDCHEM\1\FMETHODS\94231(B).M (ケミステーション インテグレート)

94231



付図3-3 試験液のGC-MSクロマトグラム (暴露24時間後換水前)

付属資料4

試験用水への溶解度

1. 表 題

試験用水への溶解度

2. 試験目的

生態毒性試験における被験物質の試験用水への溶解度を測定する。

3. 試験の概要

被験物質と試験用水を混合し、生態毒性試験と同様の温度条件下で24及び48時間攪拌後、静置して試験液の中層を分析に用いた。

4. 試験の実施

4.1 試験装置及び器具

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）

攪 拌 装 置：マグネティックスターラー

容 器：改良型ガラス製容器（全内容量 約600mL）

4.2 試験条件

(1) 試験温度：24±1℃

(2) 分析回数：2回（攪拌24及び48時間後）

(3) 試験用水：脱塩素水道水

(4) 試験連数：24時間用 n=3（試料-1、試料-2及び試料-3とする）

48時間用 n=3（試料-4、試料-5及び試料-6とする）

4.3 試験操作

- (1) 供試試料と試験用水を約100mg/L*になるように改良型ガラス製容器にて混合し、気相のないように密閉して試験液とした。

* 供試試料の密度1.560g/cm³を用いて添加容量（38.5μL）を算出し、添加した。

- (2) 試験温度に設定された恒温槽中で、マグネティックスターラーにより緩やかに攪拌した。
- (3) 攪拌24及び48時間後に試験液の攪拌を停止させ、恒温槽中にて約1時間静置した。
- (4) 静置後、被験物質の定量分析を行った。

4.4 試験液の分析

(1) 試験液の前処理操作

改良型ガラス製容器の分取口から、シリンジで試験液の中層を慎重に採取した。採取した液について付属資料2の1.試験液の前処理操作のフロースキームにより前処理操作を行い、分析試料を調製した。

(2) 分析方法

付属資料2の2.分析方法参照。

4.5 標準試料の調製

付属資料2の3.標準試料の調製参照。

4.6 検量線の作成

付属資料2の4.検量線の作成参照。

5. 試験結果

測定結果より、攪拌24時間後より48時間後で高い測定値が得られたため、試験用水への溶解度としては、攪拌48時間後の測定値を採用するのが妥当であると判断した。よって、被験物質の試験用水への溶解度は0.101mg/Lとした。測定結果を以下の表に示す。

付表4-1 攪拌24時間後測定値

試料名	測定値 (mg/L)	算術平均値 (mg/L)
試料-1	0.107	0.0927
試料-2	0.0815	
試料-3	0.0896	

付表4-2 攪拌48時間後測定値

試料名	測定値 (mg/L)	算術平均値 (mg/L)
試料-4	0.104	0.101
試料-5	0.0987	
試料-6	0.101	

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

被験物質の試験用水への溶解度が100mg/L未満であることが予想されたため、溶解度測定を検討を行った。

1) 溶解度測定予備試験

(1) 内 容

被験物質はその構造より揮発性を有していることが疑われたため、改良型ガラス製容器に約100mg/L相当になるように供試試料と試験用水（脱塩素水道水）を混合して気相がないように密閉し、試験条件下（ $24 \pm 1^\circ\text{C}$ ）にて24及び48時間攪拌した。遠心分離を行うことで被験物質濃度が低下することなどから、不溶物除去は攪拌を緩やかにを行い約1時間静置後に中層液を採取することで行った。採取した中層液は前処理操作を行い、ガスクロマトグラフィー質量分析法（GC-MS）により濃度分析を実施した。なお、48時間攪拌については設定添加濃度約10mg/L相当の試料も分析した。

(2) 結 果

設定添加濃度 (mg/L)	測定濃度 (mg/L)	
	攪拌24時間後	攪拌48時間後
約100 (試料-1)	0.0934	—
約100 (試料-2)	0.129	—
約100 (試料-3)	—	0.0949
約100 (試料-4)	—	0.135
約10 (試料-5)	—	0.0791

測定値に大きなばらつきはなく、0.1mg/L付近であった。また、設定添加濃度約10及び100mg/L間で大きな濃度差はみられなかった。

(3) 溶解度検討のまとめ

溶解度測定予備試験の結果より、被験物質の試験用水への溶解度は0.1mg/L付近と考えられた。被験物質は遠心分離を行うことで被験物質濃度が低下することなどから、緩やかに攪拌し約1時間静置後に中層液を採取することで不溶物を除去したが、設定添加濃度に10倍（約10及び100mg/L）の差をつけても測定値に大きな差はみられないことから、不溶物は除去されたものと考えられた。

以上の結果より、本試験では改良型ガラス製容器を使用することとし、穏やかに攪拌した後、約1時間静置して中層液を採取することで不溶物除去を行うこととした。

2. 試験生物への影響

1) 予備試験1

(1) 内 容

三角フラスコ内に試験用水を満たし、供試試料をプッシュボタン式液体用微量体積計（Eppendorf社製）により100mg/L（設定）になるように添加後、直ちに気相が無いように密栓した。その後マグネティックスターラーにより約48時間攪拌して調製した被験物質分散懸濁液を試験液とした。本被験物質は揮発性が疑われるため、生物の暴露は密閉系で行い影響を確認した。なお、供試試料は密度 $[1.560\text{g}/\text{cm}^3 (20^\circ\text{C})]$ を用いて容量による添加を行った。

(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：-)									
	3時間		24時間		48時間		72時間		96時間	
対照区	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-
100	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-

暴露方式：半止水式（換水1回/1日）

生物数/試験液量：2尾/約1L

エアレーション：なし

試験生物に影響はみられなかった。

2) 予備試験2

(1) 内 容

予備試験1と同様の方法で調製した被験物質分散懸濁液を $24 \pm 1^\circ\text{C}$ の条件下で約1時間静置し、採取した中層採取液を試験液とした。その試験液に生物を入れた状態での被験物質濃度の安定性の確認を実施した。

(2) 結 果

<試験液中の被験物質濃度>

設定濃度 (mg/L)	測定濃度 (mg/L) (対開始時濃度%)	
	暴露開始時	24時間後
対照区	n.d.	n.d.
100	0.325	0.134 (41.2)

n.d.: <0.0200mg/L

試験液中の被験物質濃度は24時間後に減少した。

3) 試験生物への影響（予備試験結果）のまとめ

試験法の上限濃度（100mg/L）になるように、供試試料と試験用水を混合、攪拌して調製した被験物質分散懸濁液の中層採取液において試験生物に影響は認められなかった。被験物質は揮発性が予測されたため、密閉系にて検討を行ったが、試験液中の被験物質濃度については減少傾向が認められた。

3. 本試験の設定

1) 試験用水への溶解度測定

溶解度測定予備試験結果から、試験用水への溶解度測定は、約100mg/Lとなるように供試試料と試験用水を混合後、気相のないように密閉して $24 \pm 1^\circ\text{C}$ の条件下で24及び48時間緩やかに攪拌した試験液を用いて実施した。不溶物除去としては、遠心分離やフィルターろ過等の手法は使用せず、攪拌停止後試験液を約1時間静置し中層液を採取することにより不溶物を取り除くこととし、この試験液について被験物質濃度分析を行った。

2) 本 試 験

本試験では試験法での試験上限濃度（100mg/L）を設定濃度とし、約24時間攪拌して調製した被験物質飽和液及び対照区のみで試験を行った。換水頻度は1回/1日、密閉系で暴露を行った。試験液の調製については、三角フラスコ内に試験用水を満たし、供試試料をプッシュボタン式液体用微量体積計により100mg/L（設定）になるよう水面下で添加（密度換算による容量添加）後、直ちに気相が無いように密栓した。その後、マグネティックスターラーにより約48時間攪拌した。攪拌停止後、 $24 \pm 1^\circ\text{C}$ の条件下で約1時間静置して採取した中層液を試験液とした。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。