

環境省殿

最 終 報 告 書

エチレンジアミン四酢酸のヒメダカ (*Oryzias latipes*) に対する急性毒性試験

(試験番号：第14014号)

2003年3月31日

財団法人 日本食品分析センター 多摩研究所

試験実施概要

1. 表 題：エチレンジアミン四酢酸のヒメダカ (*Oryzias latipes*) に対する急性毒性試験
2. 試験目的：エチレンジアミン四酢酸のヒメダカ (*Oryzias latipes*) に対する急性毒性試験を行い、96時間の半数致死濃度 (LC₅₀) を求める。
3. 試験方法：OECD 化学品テストガイドライン No. 203「魚類急性毒性試験」(1992年) に準拠
4. 適用GLP：日本国環境省総合環境政策局環境保健部環境安全課環境リスク評価室長通知「生態影響試験実施に関する基準の改正について」(別添)「生態影響試験実施に関する基準」(環保安第242号, 2001年)
5. 試験委託者：
 - 1) 名 称：環境省
 - 2) 住 所：〒100-8975 東京都千代田区霞ヶ関1丁目2番2号
 - 3) 委託責任者：総合環境政策局環境保健部環境安全課環境リスク評価室
室長補佐 [REDACTED]
6. 試験受託者：
 - 1) 名 称：財団法人 日本食品分析センター
 - 2) 住 所：〒151-0062 東京都渋谷区元代々木町52番1号
 - 3) 代 表 者：[REDACTED]
7. 試験施設：
 - 1) 名 称：財団法人 日本食品分析センター 多摩研究所
 - 2) 住 所：〒206-0025 東京都多摩市永山6丁目11番10号
〒206-0025 東京都多摩市永山6丁目21番6号(別館)
 - 3) 運営管理者：[REDACTED](多摩研究所長)

8. 試験責任者

所 属：環境科学部

氏 名：[REDACTED]

9. 分析担当責任者

所 属：応用試験部 農薬試験課

氏 名：[REDACTED]

10. 試験担当者

生物系

所 属：環境科学部 環境生物安全課

氏 名：[REDACTED] , [REDACTED] , [REDACTED]

分析系

所 属：応用試験部 農薬試験課

氏 名：[REDACTED] , [REDACTED] , [REDACTED]

11. 試験日程

試験開始日：2002年12月20日

実験開始日：2003年1月21日

実験終了日：2003年1月25日

試験終了日：2003年3月31日

12. 記録及び資料の保管

試験に関する下記の記録及び試資料は、1)については最終報告書作成後10年間または品質低
を起こさずに保存し得る期間のいずれか短い方の期間、2)から5)については10年間、財団法人
日本食品分析センター多摩研究所資料保管施設に保管する。その後の保管については試験委託者と
別途協議の上、定める。

- 1) 被験物質
- 2) 試験計画書
- 3) 生データ及び最終報告書
- 4) 信頼性保証部門の検閲記録
- 5) その他必要なもの

13. 最終報告書の承認

試験責任者

所 属： 財団法人 日本食品分析センター 多摩研究所 環境科学部

氏 名：   2003 年 3 月 3 / 日 承認

目次

	頁
要 旨	7
1 被験物質	8
1.1 名称, 構造式及び物理化学的性状	8
1.2 供試試料	8
1.3 保管方法及び保管条件下での安定性	9
2 供試生物	9
3 試験方法	10
3.1 試験条件.....	10
3.2 希釈水	10
3.3 試験容器及び恒温槽等	10
3.4 試験濃度の設定	10
3.5 試験液の調製	11
3.6 試験液の分析	11
3.7 試験操作	11
4 結果の算出	11
4.1 結果の算出に用いた試験濃度の決定	11
4.2 半数致死濃度(LC ₅₀)の算出	12
4.3 0 %死亡最高濃度及び100 %死亡最低濃度	12
4.4 統計的手法.....	12
5 結果及び考察	12
5.1 試験液中の被験物質濃度	12
5.2 試験液の状態	12
5.3 半数致死濃度(LC ₅₀)	12
5.4 0 %死亡最高濃度及び100 %死亡最低濃度	13
5.5 毒性症状	13
5.6 試験液の水温, 溶存酸素濃度及び pH	13
5.7 試験計画書からの逸脱事項.....	13
5.8 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
5.9 試験の妥当性	13
5.10 結果の評価と考察.....	13

Table 1～8	15～19
Figure 1	19
付属資料-1	希积水の水質	20
付属資料-2	予備試験結果	21
付属資料-3	検討試験結果	22
付属資料-4	統計処理データ	23
付属資料-5	試験液中の被験物質濃度の分析方法	25～30

要 旨

試験委託者

環境省

表 題

エチレンジアミン四酢酸のヒメダカ (*Oryzias latipes*) に対する急性毒性試験

試験番号

第14014号

試験方法

OECD 化学品テストガイドライン No. 203「魚類急性毒性試験」(1992 年)に準拠

- 1) 被験物質：エチレンジアミン四酢酸
- 2) 暴露方式：半止水式(24 時間毎全量換水)
- 3) 供試生物：ヒメダカ (*Oryzias latipes*)
- 4) 暴露期間：96 時間
- 5) 試験濃度(設定値)：
 対照区, 32, 42, 56, 75 及び 100 mg/l
 公比：1.3
- 6) 試験液量：4.0 l/容器
- 7) 連 数：1 容器/1 試験区
- 8) 供試生物数：10 尾/試験区
- 9) 試験温度：23.5～24.7 °C
- 10) 溶存酸素濃度：7.4～9.5 mg/l(暴露期間中, エアレーションは行わなかった。)
- 11) pH : 4.2～8.1 (試験液の pH 調整は行わなかった。)
- 12) 照 明：室内光, 16 時間明期/8 時間暗期
- 13) 給 餌：無給餌
- 14) 希 釈 水：水道水(東京都多摩市)を脱塩素したもの
- 15) 分 析 法：ガスクロマトグラフィー質量分析法

結 果

以下の値は測定値(算術平均)を基に示した。

- 1) 96 時間の半数致死濃度(LC₅₀) : 74 mg/l
 Binominal 法により算出した。
- 2) 0 %死亡最高濃度 : 56 mg/l
- 3) 100 %死亡最低濃度 : 98 mg/l

1 被験物質

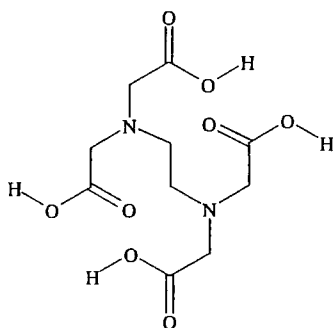
1.1 名称, 構造式及び物理化学的性状

名称: エチレンジアミン四酢酸

別名: EDTA, エデト酸¹⁾

CAS No.: 60-00-4

構造式:



分子式: $C_{10}H_{16}N_2O_8$

分子量: 292.25¹⁾

沸点: —

融点: 240 °C (分解)³⁾

水溶解度: 0.51 g/l¹⁾, 0.50 g/l²⁾

比重: 1.651 (25/4 °C)¹⁾

pKa: 1.5, 2.0, 2.68, 6.11, 10.17¹⁾

logPow: -1.97 (計算値)¹⁾

蒸気圧: <1.33 Pa (<0.01 mmHg)¹⁾

均一性: 同一ロットのものを使用した。

安定性: 通常の使用においては安定であるが, 240 °C 以上に加熱すると分解する³⁾。

生分解性: 難分解¹⁾

その他: 重金属イオンと強固な溶解性錯塩を形成する¹⁾。

出典: 1) 財団法人 化学物質評価研究機構: “既存化学物質安全性(ハザード) 評価シート” (1997)

2) Merck & Co., Inc., “The Merck Index”, 11th Ed. (1989)

3) [REDACTED]: “製品安全データシート” (1993)

1.2 供試試料

純度: 99.9 %

ロット番号: 408C2281

供給者: [REDACTED]

供給量: 25 g×4本

入手日: 2002年12月5日

外觀: 白色結晶, 無臭

1.3 保管方法及び保管条件下での安定性

1) 保管方法

被験物質は当センターの被験物質保管庫(冷蔵庫)に保管した。

2) 被験物質の確認及び保管条件下の安定性

入手した被験物質について赤外分光光度計により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。また、試験終了時にも同様にスペクトルを測定し、試験開始前のスペクトルと変化が認められないことを確認した。その結果、被験物質は保管条件下において安定であったと判断された。

2 供試生物

1) 和 名：ヒメダカ

2) 学 名：*Oryzias latipes*

3) 被鱗体長：1.9 cm(1.8～2.0 cm)，n=10

4) 体 重：0.11 g(0.10～0.12 g)，n=10

5) 入 手 等：自家繁殖(1997年1月29日，滝沢養魚場[埼玉県鴻巣市]より入手)

6) 基準物質による検定の結果：基準物質(硫酸銅(Ⅱ)五水和物，試薬特級)による96時間の半数致死濃度(LC₅₀)は0.64 mg/l(2003年1月6日)であった。当センターにおける1999年4月以降のLC₅₀値のバックグラウンドデータ(0.67±0.13 mg/l)と比較した結果，供試生物の感受性は，通常の状態にあると判断した。

7) 順 化：試験条件と同条件(水質，温度等)で12日間(2003年1月9日～1月21日)，順化飼育した。試験には順化飼育を行っている群から，健康で肉眼的に正常な個体をランダムに選別して使用した。

なお，暴露開始前7日間の死亡率は0%であった。また，畜養及び順化飼育を通して，薬浴等による処置は行わなかった。

順化飼育条件

① 飼 育 水：希釈水(3.2 参照)

② 飼育方法：循環ろ過式

③ 飼育水槽：50 l 容角形ガラス製水槽

④ 水 温：24.1～24.6 °C

⑤ 照 明：室内光，16時間明期/8時間暗期

⑥ 餌 料：市販配合飼料(テトラミン；テトラベルケ社)

⑦ 給 餌：体重の2.7%/日(暴露開始の24時間前からは無給餌とした。)

3 試験方法

3.1 試験条件

- 1) 暴露方式：半止水式(24時間毎全量換水)
- 2) 暴露期間：96時間
- 3) 試験液量：4.0 l/容器
- 4) 連 数：1 容器/1 試験区
- 5) 供試生物数：10 尾/試験区
- 6) 試験温度：23.5～24.7℃
- 7) 溶存酸素濃度：7.4～9.5 mg/l(暴露期間中、エアレーションは行わなかった。)
- 8) pH : 4.2～8.1(試験液のpH調整は行わなかった。)
- 9) 照 明：室内光, 16時間明期/8時間暗期
- 10) 給 餌：無給餌

3.2 希釈水

脱塩素水[水道水(東京都多摩市)を活性炭処理し、残留塩素等を除去した後、充分通気したもの。]を使用した。脱塩素水使用時には、残留塩素が無いことを確認した。硬度は 47 mg/l(CaCO_3 換算), pHは7.7であった。

希釈水の定期的な水質測定結果は付属資料-1に示した。

3.3 試験容器及び恒温槽等

- 1) 試験容器：5 l 容ガラス容器(容器のサイズ；内径 約 24 cm×高さ 約 13 cm)を用いた。試験容器にはゴミの侵入や試験液の蒸散を防ぐ意味で蓋をした。
- 2) 恒 温 室：21.84R-5510[日立冷熱株式会社]
- 3) 水 温 計：AP-210E[安立計器株式会社]
- 4) 溶存酸素計：DO-14P[東亜ディーケーケー株式会社]
- 5) pH 計：HM-14P[東亜ディーケーケー株式会社]
- 6) 塩素比色計：OT-I 型[理研光学株式会社]

3.4 試験濃度の設定

予備試験において、100 mg/lの濃度区ではヒメダカが50%死亡し、32 mg/lの濃度区では死亡が観察されなかったことに基づき、本試験では、100 mg/l以下の濃度を公比1.3で5濃度区(32, 42, 56, 75及び100 mg/l)設定した。

なお、予備試験の結果は付属資料-2に示した。

3.5 試験液の調製

試験液調製時の希釈水は、調製前に暴気を行い、恒温室内で 24 ± 1 ℃にした。

被験物質を超音波処理により希釈水に直接溶解させ、各濃度区の試験液を調製した。

対照区には、希釈水のみが無処理の対照区を設けた。

なお、被験物質は純度が 99.9%と高純度であったため、純度を考慮せず秤取した。よって、設定した試験濃度は、供試試料の濃度として示した。また、試験液は用時調製とした。

3.6 試験液の分析

試験液中の被験物質濃度の分析は、ガスクロマトグラフ質量分析計を用いて、全試験区について暴露開始時(0時間)及び試験液換水前(暴露開始24時間後)の2回行い、その算術平均値を求めた。なお、暴露開始時は試験容器から試験液を50 ml採取して分析用試験液とした。また、試験液換水前(暴露開始24時間後)も同様に採取した。

なお、分析方法は付属資料-5に示した。

3.7 試験操作

暴露開始時に供試生物と同水槽で順化した魚 10 尾の体重及び被鱗体長を測定した。

試験液の水温、溶存酸素濃度及び pH を測定後、試験液中に供試魚を 1 試験区当たり 10 尾投入した。水温、溶存酸素濃度及び pH は暴露開始時、24 時間毎の換水前後及び終了時に測定した。暴露期間中給餌は行わなかった。

暴露開始後 24, 48, 72 及び 96 時間後に死亡個体数を記録するとともに観察された毒性の徴候あるいは異常を記録した。一般的に記載する症例と定義を下記に示した^{*}。その他特異的症例(背曲がり、出血、体色変化、粘液の分泌等)が観察された場合には、その旨を記載した。死亡個体を発見した場合は、水質の悪化が起こらないよう速やかに取り除いた。

なお、暴露期間中の試験液についてはその状態(外観等)を観察し、記録した。

^{*}一般的症例と定義

死 亡： 刺激を与えた場合に反応の認められないもの。

異常呼吸： 対照区の魚と比較して鰓蓋の動きが異なるもの。

異常遊泳： 明らかに対照区の魚と異なる遊泳をしたもの。動作の緩慢、過敏、痙攣、反転等。

遊泳不能： 底部または水面で動いてはいるものの、水中を遊泳することが不可能なもの。横転、仮死を含む。

4 結果の算出

4.1 結果の算出に用いた試験濃度の決定

結果の算出に用いた試験濃度は測定値(算術平均)とした。

4.2 半数致死濃度 (LC_{50}) の算出

各試験区での死亡数と供試生物数(10尾)から死亡率(%)を算出し、Binominal法により半数致死濃度 (LC_{50}) を算出した。また、濃度－死亡率のグラフを記載した。

4.3 0 %死亡最高濃度及び100 %死亡最低濃度

死亡率が0 %である最高濃度及び死亡率が100 %である最低濃度を記録した。

4.4 統計的手法

本試験結果に使用した統計ソフトを以下に示した。また、統計ソフトの入力値とその出力結果を付属資料-4に示した。

TOXDAT MULTI-METHOD PROGRAM(EPA/600/4-85/013)

5 結果及び考察

5.1 試験液中の被験物質濃度

暴露開始時及び24時間後の換水前に試験液中の被験物質濃度を測定し、その結果をTable 1に示した。

暴露開始時及び24時間後の換水前の試験液中の測定濃度は、それぞれ26～98 mg/l, 26～97 mg/l (設定濃度: 32～100 mg/l)であり、設定濃度に対する割合は、暴露開始時及び24時間後の換水前共に81～100 %であった。

各濃度区の設定濃度に対する測定濃度の算術平均値は32 mg/lで26 mg/l, 42 mg/lで41 mg/l, 56 mg/lで56 mg/l, 75 mg/lで74 mg/l及び100 mg/lで98 mg/lであり、測定濃度は設定濃度の±20 %以内を維持できた。よって、本被験物質は試験液中で安定であったと考えられた。

以上のことから、以下の値(半数致死濃度, 0 %死亡最高濃度, 100 %死亡最低濃度, 毒性症状の現れる濃度)は測定値から算出した算術平均値を基に示した。

5.2 試験液の状態

暴露開始時の試験液は無色透明であった。また、24時間後の換水前の試験液は、全ての濃度区において開始時と比較して変化が認められなかった。

5.3 半数致死濃度 (LC_{50})

各時間における死亡率をTable 2に、半数致死濃度 (LC_{50}) をTable 3に示した。また、濃度－死亡率のグラフをFigure 1に示した。

96時間後の各濃度区の死亡率は対照区, 26 mg/l, 41 mg/l及び56 mg/lで0 %, 74 mg/lで50 %及び98 mg/lで100 %であった。

以上のことから、以下の結果を得た。

96時間 LC_{50} : 74 mg/l

Binominal 法により算出した。

5.4 0 %死亡最高濃度及び100 %死亡最低濃度

96 時間後の 0 %死亡最高濃度及び100 %死亡最低濃度を Table 4 及び以下に示した。

96 時間後の 0 %死亡最高濃度：56 mg/l

96 時間後の 100 %死亡最低濃度：98 mg/l

5.5 毒性症状

観察された毒性症状を Table 5 及び以下に示した。

異常な行動及び外観は、対照区、26 mg/l、41 mg/l 及び 56 mg/l では観察されなかったが、74 mg/l 及び 98 mg/l で水面浮上、不活発、横転及び異常遊泳が観察された。

なお、98 mg/l では暴露開始 48 時間後に供試生物が全死亡したため、それ以降の観察はできなかった。

5.6 試験液の水温、溶存酸素濃度及び pH

試験液の水温を Table 6、溶存酸素濃度を Table 7、pH を Table 8 に示した。

暴露期間中の各試験区の水温は 23.5～24.7℃、溶存酸素濃度は 7.4～9.5 mg/l であり、水温は 24±1℃、溶存酸素濃度は飽和濃度の 60 %以上の範囲で試験環境条件を満たしていた。

なお、pH は 4.2～8.1 であり、6.0～8.5 の範囲を外れたが、これは被験物質に起因するものであった。

5.7 試験計画書からの逸脱事項

なし。

5.8 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

なし。

5.9 試験の妥当性

暴露終了時に対照区の死亡率が 0 %であり、各試験区の溶存酸素濃度も飽和濃度の 60 %以上であったため、本試験の成立が確認された。

5.10 結果の評価と考察

試験液中の被験物質濃度の分析結果から、被験物質濃度は一定に保たれていたことが確認された。よって、暴露期間中の供試生物は、ほぼ設定濃度通りの被験物質に連続的に暴露されていたと判断した。しかし、本被験物質は水中の金属イオンと錯体を形成する性質を有していることから、本被験物質そのものによる直接的な影響を評価した結果では無い可能性があると考えられた。

なお、本試験では pH が試験環境条件を外れた濃度区があったことから、pH を対照区と同等の値に調整し、検討試験を行った(付属資料-3)。その結果、100 mg/l 濃度区において影響が認められなかったことから、本試験では pH による供試生物への影響が非常に大きかったと判

断された。また、各時間毎の濃度－死亡率の関係がほとんど一致しており、0%死亡最高濃度と100%死亡最低濃度の間隔が狭いことから、本被験物質の供試生物に対する用量反応性は鋭敏であり、結果の収束性が早いものであると考えられた。

本被験物質は難分解性物質であり、自然環境中に流出した場合には、その地域に生息する生物に対して、長期間の暴露影響を及ぼす可能性が高いと推察された。また、キレート作用を有することから、環境水の水質が異なることによって、生物への影響が変化する可能性も考えられた。よって、本試験より得られた急性毒性に関する情報のみから、その影響を推察するには注意が必要であり、亜急性または慢性的な暴露試験によって長期的な暴露による影響を確認する必要があると考えられた。

Table 1. Measured Concentration of the Test Substance in the Test Water

(Semi-Static Condition)					
Nominal Concentration (mg/l)	Measured Concentration (mg/l)				Mean ^a Measured Concentration (mg/l)
	0 Hour (New)	Percent of Nominal	24 Hours (Old)	Percent of Nominal	
Control	< 1	—	< 1	—	—
32	26	81	26	81	26
42	42	100	39	93	41
56	55	98	56	100	56
75	73	97	74	99	74
100	98	98	97	97	98

a : Arithmetic Mean

New : Freshly prepared test solution

Old : Test solution after 24 hours exposure

Table 2. The Numbers of Dead Fish (Percent Mortality)

Nominal Concentration (mg/l)	Mean ^a Measured Concentration (mg/l)	Cumulative Mortality(Percent Mortality)			
		24 Hours	48 Hours	72 Hours	96 Hours
Control	—	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
32	26	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
42	41	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
56	56	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
75	74	0(0)	0(0)	3(30)	5(50)
100	98	0(0)	10(100)	10(100)	10(100)

a : Arithmetic Mean

Table 3. Calculated LC₅₀ Values

Exposure Period (Hours)	LC ₅₀ (mg/l)	95-Percent Confidence Limits (mg/l)	Statistical Method
24	> 98	—	—
48	85	—	Binomial
72	79	—	Binomial
96	74	—	Binomial

Table 4. Observation of the Highest Concentration in 0 % Mortality
and the Lowest Concentration in 100 % Mortality

Exposure Period (Hours)	Highest Concentration in 0 % Mortality (mg/l)	Lowest Concentration in 100 % Mortality (mg/l)
24	98	> 98
48	74	98
72	56	98
96	56	98

Table 5. Observed Toxicological Abnormalities

Nominal Concentration (mg/l)	Mean ^a Measured Concentration (mg/l)	Abnormalities			
		24 Hours	48 Hours	72 Hours	96 Hours
Control	—	n. a. d. (10)	n. a. d. (10)	n. a. d. (10)	n. a. d. (10)
32	26	n. a. d. (10)	n. a. d. (10)	n. a. d. (10)	n. a. d. (10)
42	41	n. a. d. (10)	n. a. d. (10)	n. a. d. (10)	n. a. d. (10)
56	56	n. a. d. (10)	n. a. d. (10)	n. a. d. (10)	n. a. d. (10)
75	74	s. s. (1) le. (1) n. a. d. (8)	e. s. (1) s. s. (2) le. (3) l. l. (1) n. a. d. (4)	e. s. (2) le. (3) l. l. (3) n. a. d. (1)	s. s. (1) l. l. (2) n. a. d. (2)
100	98	e. s. (2) s. s. (4) le. (1) l. l. (1) n. a. d. (3)

a : Arithmetic Mean

n. a. d. : No abnormalities are detected.

e. s. : Erratic swimming

le. : Lethargy

l. l. : Lying laterally

s. s. : Surface slicks

... : All fish were dead at this observation time.

() : Number of fish observed

Table 6. Temperature

(Semi-Static Condition)

Nominal Concentration (mg/l)	Mean ^a Measured Concentration (mg/l)	Temperature (°C)							
		0 Hour	24 Hours		48 Hours		72 Hours		96 Hours
		New	Old	New	Old	New	Old	New	Old
Control	---	24.1	23.5	23.6	24.7	24.2	23.5	24.1	24.7
32	26	24.1	23.5	24.6	24.5	24.6	24.0	24.0	23.9
42	41	24.1	23.8	24.6	24.6	24.6	24.1	24.0	24.1
56	56	24.1	24.2	24.4	24.6	24.6	24.1	23.9	24.3
75	74	24.1	23.9	24.4	24.6	24.6	24.1	24.0	24.4
100	98	24.0	23.9	24.4	24.5	—	—	—	—

a : Arithmetic Mean

New : Freshly prepared test solution

Old : Test solution after 24 hours exposure

— : Not measured because all fish were dead at this observation time.

Table 7. Dissolved Oxygen Concentration

(Semi-Static Condition)

Nominal Concentration (mg/l)	Mean ^a Measured Concentration (mg/l)	Dissolved Oxygen Concentration (mg/l)							
		0 Hour	24 Hours		48 Hours		72 Hours		96 Hours
		New	Old	New	Old	New	Old	New	Old
Control	---	9.4	7.8	9.2	7.4	8.4	7.7	8.9	8.0
32	26	9.4	7.9	8.7	8.3	8.7	7.4	8.7	7.7
42	41	9.4	7.5	8.7	7.8	8.7	7.4	8.7	7.8
56	56	9.5	7.7	8.7	7.7	8.8	7.5	8.7	7.6
75	74	9.5	7.9	8.7	8.0	8.8	7.8	8.6	7.9
100	98	9.5	8.0	8.8	8.4	—	—	—	—

a : Arithmetic Mean

New : Freshly prepared test solution

Old : Test solution after 24 hours exposure

— : Not measured because all fish were dead at this observation time.

Table 8. pH Values

(Semi-Static Condition)

Nominal Concentration (mg/l)	Mean ^a Measured Concentration (mg/l)	pH							
		0 Hour	24 Hours		48 Hours		72 Hours		96 Hours
		New	Old	New	Old	New	Old	New	Old
Control	---	8.1	7.9	8.0	7.8	8.0	7.8	8.0	7.8
32	26	7.0	7.3	6.8	7.6	6.8	7.1	6.8	7.6
42	41	6.5	6.9	6.5	7.2	6.5	6.8	6.3	7.3
56	56	5.3	5.8	5.2	5.7	5.3	5.3	5.4	6.0
75	74	4.7	4.6	4.6	4.7	4.6	4.6	4.6	4.7
100	98	4.3	4.3	4.2	4.3	—	—	—	—

a : Arithmetic Mean

New : Freshly prepared test solution

Old : Test solution after 24 hours exposure

— : Not measured because all fish were dead at this observation time.

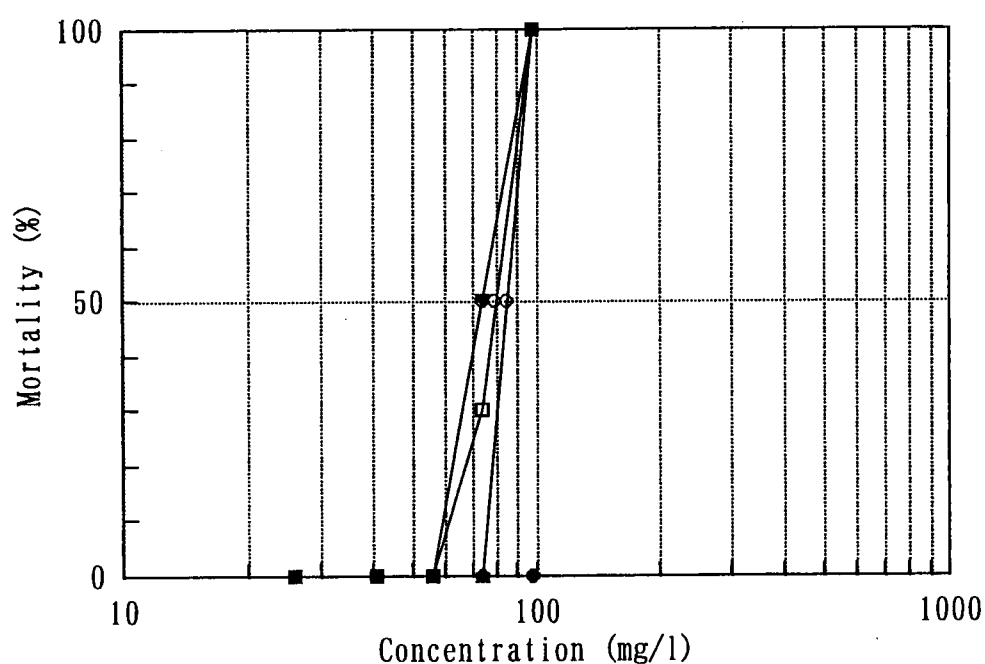


Figure 1. Concentration-Mortality Curve

◆ 24 hr. ★ 48 hr. □ 72 hr. ▼ 96 hr. ○ LC50

付属資料-1：希釈水の水質

Quality of Test Water

Parameter	Concentration	Parameter	Concentration
pH Value	7.6(22℃)	Iprobenfos (IBP)	< 0.0005 mg/l
Coliform Group	Not Detected	Chlornitrofen(CNP)	< 0.00001 mg/l
Total residue	120 mg/l	Chemical oxygen demand(COD- _{Cr})	< 10 mg/l
Phenols	< 0.005 mg/l	Biochemical oxygen demand	< 1 mg/l
Total hardness(as CaCO ₃)	61 mg/l	Suspended solids	< 1 mg/l
Nitrate and Nitrite	1.3 mg/l	Phosphorus	< 0.01 mg/l
Fluoride	< 0.10 mg/l	Bromide ion	< 0.5 mg/l
Dichloromethane	< 0.001 mg/l	Sulfide ion(S ²⁻)	< 0.01 mg/l
Carbon tetrachloride	< 0.0002 mg/l	Electricconductivity(25℃)	19 mS/m
1,2-Dichloroethane	< 0.0002 mg/l	Alkalinity(CaCO ₃)	41 mg/l
1,1-Dichloroethylene	< 0.001 mg/l	Total organic carbon(TOC)	0.6 mg/l
Cis-1,2-Dichloroethylene	< 0.001 mg/l	Ammonium nitrogen(NH ₃ -N)	< 0.04 mg/l
1,1,1-Trichloroethane	< 0.001 mg/l	PCB	< 0.0005 mg/l
1,1,2-Trichloroethane	< 0.0005 mg/l	Mercury	< 0.0001 mg/l
Trichloroethylene	< 0.001 mg/l	Cadmium	< 0.001 mg/l
Tetrachloroethylene	< 0.001 mg/l	Cyanide	< 0.005 mg/l
1,3-Dichloropropene	< 0.0002 mg/l	Lead	< 0.005 mg/l
Benzene	< 0.001 mg/l	Chromium(VI)	< 0.005 mg/l
Chloroform	< 0.001 mg/l	Arsenic	< 0.001 mg/l
Thiram	< 0.0005 mg/l	Selenium	< 0.001 mg/l
Simazine(CAT)	< 0.0002 mg/l	Nickel	0.001 mg/l
Thiobencarb	< 0.001 mg/l	Copper	0.02 mg/l
Isoxathion	< 0.0005 mg/l	Zinc	0.012 mg/l
Diazinon	< 0.0005 mg/l	Aluminum	< 0.05 mg/l
Fenitrothion(MEP)	< 0.0002 mg/l	Manganese	< 0.005 mg/l
Isoprothiolane	< 0.001 mg/l	Iron	< 0.03 mg/l
Chlorothalonil(TPN)	< 0.001 mg/l	Tin	< 0.1 mg/l
Propyzamide	< 0.0005 mg/l	Sodium	11 mg/l
EPN	< 0.0005 mg/l	Potassium	1.8 mg/l
Dichlorvos(DDVP)	< 0.001 mg/l	Calcium	19 mg/l
Fenobucarb(BPMC)	< 0.001 mg/l	Magnesium	3.1 mg/l

Date: January 7, 2003

付属資料-2：予備試験結果

予備試験結果を Table 1 及び 2 に示した。

Table 1. The Numbers of Dead Fish (Percent Mortality)

Nominal Concentration (mg/l)	(Range finding test) Cumulative Mortality (Percent Mortality)			
	24 Hours	48 Hours	72 Hours	96 Hours
32	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
100	0 (0)	0 (0)	0 (0)	5 (50)
Control	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)

Table 2. Observed Toxicological Abnormalities

Nominal Concentration (mg/l)	(Range finding test)			
	24 Hours	48 Hours	72 Hours	96 Hours
32	n. a. d.	n. a. d.	n. a. d.	n. a. d.
100	s. s. n. a. d.	le. , s. s. n. a. d.	e. s. , le. , l. l. , s. s. n. a. d.	le. , n. a. d.
Control	n. a. d.	n. a. d.	n. a. d.	n. a. d.

n. a. d. : No abnormalities are detected.

e. s. : Erratic swimming

s. s. : Surface slicks

le. : Lethargy

l. l. : Lying laterally

付属資料-3：検討試験結果

本試験では、被験物質の影響により試験液中の pH が 6.0～8.5 の範囲を外れたため、水酸化ナトリウムを用いて pH が試験環境条件内となるように調整した試験液で、検討試験を行った。

検討試験結果を Table 1 及び 2 に示した。

Table 1. The Numbers of Dead Fish (Percent Mortality)
(the second test)

Nominal Concentration (mg/l)	Cumulative Mortality(Percent Mortality)			
	24 Hours	48 Hours	72 Hours	96 Hours
32	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
56	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
100	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
Control	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)

Table 2. Observed Toxicological Abnormalities
(the second test)

Nominal Concentration (mg/l)	24 Hours	48 Hours	72 Hours	96 Hours
32	n. a. d. (10)	n. a. d. (10)	n. a. d. (10)	n. a. d. (10)
56	n. a. d. (10)	n. a. d. (10)	n. a. d. (10)	n. a. d. (10)
100	n. a. d. (10)	n. a. d. (10)	n. a. d. (10)	n. a. d. (10)
Control	n. a. d. (10)	n. a. d. (10)	n. a. d. (10)	n. a. d. (10)

n. a. d. : No abnormalities are detected.

() : Number of fish observed

付属資料-4：統計処理データ

統計ソフトの出力結果を以下に示した。

LC₅₀ after 48 hours exposure

試験番号 第14014号
依頼者名 環境省
被験物質名 EDTA
入力者名 XXXXXXXXXX
入力年月日 03/01/26
魚種 ヒメダカ
観察時間 48

CONC. mg/l	NUMBER EXPOSED	NUMBER DEAD	PERCENT DEAD	BINOMIAL PROB. (%)
98	10	10	100	.09765625
74	10	0	0	.09765625
56	10	0	0	.09765625
41	10	0	0	.09765625
26	10	0	0	.09765625

THE BINOMIAL TEST SHOWS THAT 74 AND 98 CAN BE USED AS STATISTICALLY SOUND CONSERVATIVE 95 PERCENT CONFIDENCE LIMITS SINCE THE ACTUAL CONFIDENCE LEVEL ASSOCIATED WITH THESE LIMITS IS 99.8046875 PERCENT.

AN APPROXIMATE LC50 FOR THIS SET OF DATA IS 85.168612797722

WHEN THERE ARE LESS THAN TWO CONCENTRATIONS AT WHICH THE PERCENT DEAD IS BETWEEN 0 AND 100, NEITHER THE MOVING AVERAGE NOR THE PROBIT METHOD CAN GIVE ANY STATISTICALLY SOUND RESULTS.

LC₅₀ after 72 hours exposure

試験番号 第14014号
依頼者名 環境省
被験物質名 EDTA
入力者名 XXXXXXXXXX
入力年月日 03/01/26
魚種 ヒメダカ
観察時間 72

CONC. mg/l	NUMBER EXPOSED	NUMBER DEAD	PERCENT DEAD	BINOMIAL PROB. (%)
98	10	10	100	.09765625
74	10	3	30	17.1875
56	10	0	0	.09765625
41	10	0	0	.09765625
26	10	0	0	.09765625

THE BINOMIAL TEST SHOWS THAT 56 AND 98 CAN BE USED AS STATISTICALLY SOUND CONSERVATIVE 95 PERCENT CONFIDENCE LIMITS SINCE THE ACTUAL CONFIDENCE LEVEL ASSOCIATED WITH THESE LIMITS IS 99.8046875 PERCENT.

AN APPROXIMATE LC50 FOR THIS SET OF DATA IS 78.800688921007

WHEN THERE ARE LESS THAN TWO CONCENTRATIONS AT WHICH THE PERCENT DEAD IS BETWEEN 0 AND 100, NEITHER THE MOVING AVERAGE NOR THE PROBIT METHOD CAN GIVE ANY STATISTICALLY SOUND RESULTS.

LC₅₀ after 96 hours exposure

試験番号	第14014号
依頼者名	環境省
被験物質名	EDTA
入力者名	
入力年月日	03/01/26
魚種	ヒメダカ
観察時間	96

CONC. mg/l	NUMBER EXPOSED	NUMBER DEAD	PERCENT DEAD	BINOMIAL PROB. (%)
98	10	10	100	.09765625
74	10	5	50	62.3046875
56	10	0	0	.09765625
41	10	0	0	.09765625
26	10	0	0	.09765625

THE BINOMIAL TEST SHOWS THAT 56 AND 98 CAN BE USED AS STATISTICALLY SOUND CONSERVATIVE 95 PERCENT CONFIDENCE LIMITS SINCE THE ACTUAL CONFIDENCE LEVEL ASSOCIATED WITH THESE LIMITS IS 99.8046875 PERCENT.

AN APPROXIMATE LC50 FOR THIS SET OF DATA IS 74

WHEN THERE ARE LESS THAN TWO CONCENTRATIONS AT WHICH THE PERCENT DEAD IS BETWEEN 0 AND 100, NEITHER THE MOVING AVERAGE NOR THE PROBIT METHOD CAN GIVE ANY STATISTICALLY SOUND RESULTS.

付属資料-5：試験液中の被験物質濃度の分析方法

1 標準品

エチレンジアミン四酢酸二水素二ナトリウム二水和物(), 純度99.5 %)

2 試薬、試液及び標準溶液の調製

1) 試薬

アセトン, ジクロロメタン：残留農薬試験用

trans-1, 2-シクロヘキサンジアミン-N, N, N', N'-四酢酸一水和物(以下「CyDTA」と略),

水酸化ナトリウム, リン酸二水素カリウム：特級

ポリエチレングリコール 400：1 級

無水硫酸ナトリウム：残留農薬試験用

三ふっ化ほう素メタノール錯体メタノール溶液：ガスクロマトグラフ用

フルオランテン-d₁₀：環境分析用

水(脱イオン水を蒸留したもの)

2) 試液

① 10 mol/l 水酸化ナトリウム溶液

水 100 ml に水酸化ナトリウム 40 g を溶解した。

② 1 mol/l 水酸化ナトリウム溶液

水 90 ml 及び 10 mol/l 水酸化ナトリウム溶液 10 ml を混合した。

③ 1 mol/l リン酸二水素カリウム緩衝液

水 200 ml にリン酸二水素カリウム 27.2 g を溶解し, 10 mol/l 水酸化ナトリウム溶液を加えて pH 7 に調整した。

④ CyDTA 100 mg/l 溶液

CyDTA 10 mg を 1 mol/l 水酸化ナトリウム溶液に溶解し, 100 ml とした。

⑤ フルオランテン-d₁₀ 100 mg/l 溶液

フルオランテン-d₁₀ 10 mg をアセトンに溶解し, 100 ml とした。

⑥ 内標準溶液

フルオランテン-d₁₀ 100 mg/l 溶液 1 ml を室温で窒素ガスを通じて乾固させ, ジクロロメタン 100 ml に溶解した。

⑦ 0.1 %PEG/DCM 溶液

ポリエチレングリコール 0.1 ml とジクロロメタン 100 ml を混合した。

3) 標準溶液の調製

標準品 25.0 mg を精密に秤り, 水に溶解して 50 ml とした(500 mg/l)。この 2 ml を水で希釈して正確に 20 ml とし標準溶液(1)とした(50 mg/l)。

標準溶液(1)を 2, 1, 0.5, 0.25 及び 0.05 ml ずつはかり取り, 試料溶液と同様に操作し, そのうちの 4 濃度を検量線作成用標準溶液とした。

3 試料溶液の調製

1) 対照区及び32 mg/lの試験液

試験液の2 mlにCyDTA 100 mg/l溶液50 μ lを添加し、100 $^{\circ}$ Cに加熱しながら窒素気流下で乾固した。そこに三ふっ化ほう素メタノール錯体メタノール溶液 1 mlを加えて密栓をし、80 $^{\circ}$ Cで30分間誘導体化反応を行った。

反応終了後、室温まで放冷し、内標準溶液0.2 ml及び1 mol/lリン酸二水素カリウム緩衝液(pH 7)3 mlを加え、50 mlの分液漏斗に移した後、ジクロロメタン3 mlを加えて振とう機を用いて5分間激しく振とうした。暫時放置後ジクロロメタン層を分取し、水層にはジクロロメタン3 mlを加え、同様の操作を繰り返した。全ジクロロメタン層を無水硫酸ナトリウム約5 gをのせたガラスろ過器を用いて脱水し、ろ過器上をジクロロメタン3 mlで洗浄した。ろ液及び洗液を5 mlの試験管に合わせ、0.1 %PEG/DCM溶液0.5 mlを添加した後、室温で窒素ガスを通じて5 mlまで濃縮し、定容とした。

2) 42及び56 mg/lの試験液

試験液の5 mlを10 mlのメスフラスコに正確に量り取り、水で定容した。その2 mlにCyDTA 100 mg/l溶液50 μ lを添加し、100 $^{\circ}$ Cに加熱しながら窒素気流下で乾固した。そこに三ふっ化ほう素メタノール錯体メタノール溶液1 mlを加えて密栓をし、80 $^{\circ}$ Cで30分間誘導体化反応を行った。

反応終了後、室温まで放冷し、内標準溶液0.2 ml及び1 mol/lリン酸二水素カリウム緩衝液(pH 7)3 mlを加え、50 mlの分液漏斗に移した後、ジクロロメタン3 mlを加えて振とう機を用いて5分間激しく振とうした。暫時放置後ジクロロメタン層を分取し、水層にはジクロロメタン3 mlを加え、同様の操作を繰り返した。全ジクロロメタン層を無水硫酸ナトリウム約5 gをのせたガラスろ過器を用いて脱水し、ろ過器上をジクロロメタン3 mlで洗浄した。ろ液及び洗液を5 mlの試験管に合わせ、0.1 %PEG/DCM溶液0.5 mlを添加した後、室温で窒素ガスを通じて5 mlまで濃縮し、定容とした。

3) 75及び100 mg/lの試験液

試験液の5 mlを20 mlのメスフラスコに正確に量り取り、水で定容した。その2 mlにCyDTA 100 mg/l溶液50 μ lを添加し、100 $^{\circ}$ Cに加熱しながら窒素気流下で乾固した。そこに三ふっ化ほう素メタノール錯体メタノール溶液1 mlを加えて密栓をし、80 $^{\circ}$ Cで30分間誘導体化反応を行った。

反応終了後、室温まで放冷し、内標準溶液0.2 ml及び1 mol/lリン酸二水素カリウム緩衝液(pH 7)3 mlを加え、50 mlの分液漏斗に移した後、ジクロロメタン3 mlを加えて振とう機を用いて5分間激しく振とうした。暫時放置後ジクロロメタン層を分取し、水層にはジクロロメタン3 mlを加え、同様の操作を繰り返した。全ジクロロメタン層を無水硫酸ナトリウム約5 gをのせたガラスろ過器を用いて脱水し、ろ過器上をジクロロメタン3 mlで洗浄した。ろ液及び洗液を5 mlの試験管に合わせ、0.1 %PEG/DCM溶液0.5 mlを添加した後、室温で窒素ガスを通じて5 mlまで濃縮し、定容とした。

4 ガスクロマトグラフ-質量分析計操作条件

機種：HP6890 [Agilent Technologies]

検出器：MSD・SIMモード HP5973A [Agilent Technologies]

分離管：DB-5MS (Phenyl Arylene ポリマー化学結合型, 膜厚 0.25 μm)

内径 0.25 mm×長さ 30 m [Agilent Technologies]

温度：分離管 150 ℃ (2分)→15 ℃/分→280 ℃ (10分)

注入口 250 ℃, トランスファーライン 250 ℃, イオン源 230 ℃

ガス流量：キャリアガス(ヘリウム) 1.0 ml/分(定流量モード)

設定質量数(m/z)：EDTA=174, CyDTA=402, フルオランテン-d₁₀=212

データ処理装置：MSDケミステーション, G1701AJ Version A.03.01.J

[Agilent Technologies]

5 定量

2の3)で調製した検量線作成用標準溶液及び3で調製した試料溶液2 μlをガスクロマトグラフ-質量分析計に注入した。標準溶液の濃度と内標準物質とのピーク面積比から検量線を作成し、試料溶液から得られた対象物質と内標準物質との面積比から検出量を求めた。次に検出量、試験液採取量等から、試験液中の被験物質濃度を算出した。

6 検出限界

$$\text{検出限界} : \frac{1 \text{ ng}}{1,000} \times \frac{5 \text{ ml} \times 1,000}{2 \text{ μl}} \times \frac{1}{2 \text{ ml}} \times 0.785^* = 1 \text{ mg/l}$$

$$* \text{ Factor } 0.785 = \frac{\text{被験物質分子量 } 292.3}{\text{標準品分子量 } 372.2}$$

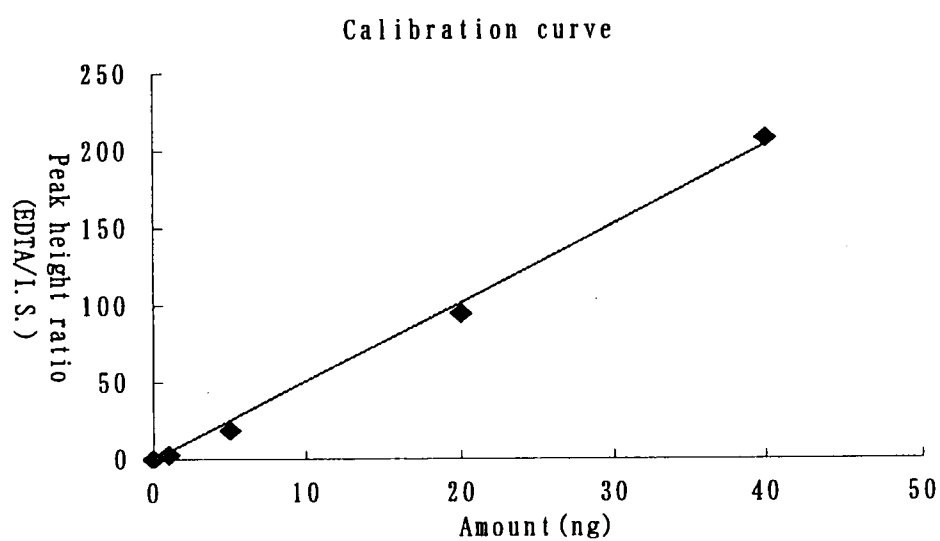
7 添加回収試験

1) 低濃度添加

希釈水に被験物質を30 mg/lになるように添加し、この溶液を用いて添加回収試験を行った。試験は平行測定3回で実施し、回収率は104.7 %, 104.2 %, 103.4 % (平均104.1 %)であった。

2) 高濃度添加

希釈水に被験物質を100 mg/lになるように添加し、この溶液を用いて添加回収試験を行った。試験は平行測定3回で実施し、回収率は106.7 %, 106.6 %, 106.4 % (平均106.6 %)であった。

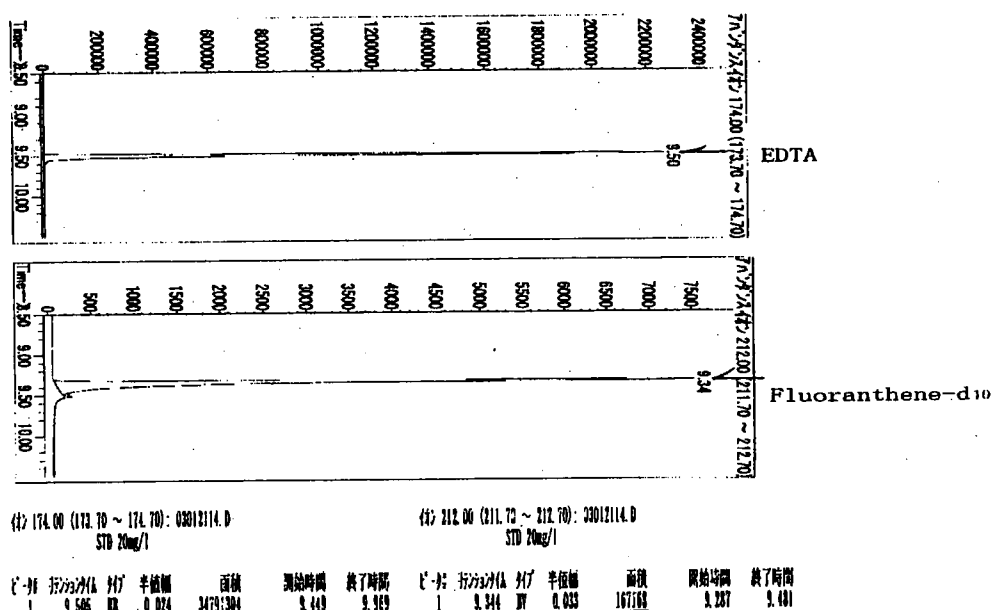


Amount (ng)	Peak area ratio (EDTA/I. S. *)
40	208.1217936
20	94.89963391
5	18.77989409
1	2.889795309

*Internal Standard

Figure 1. Calibration curve of EDTA by GC analysis

Standard (20 mg/l): 0 hour



Control: 0 hour

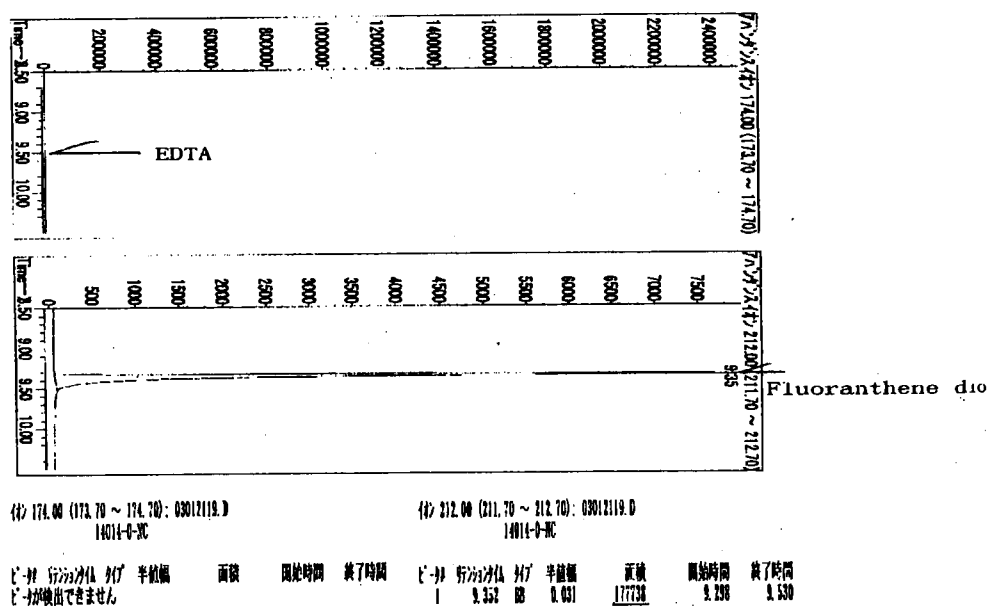
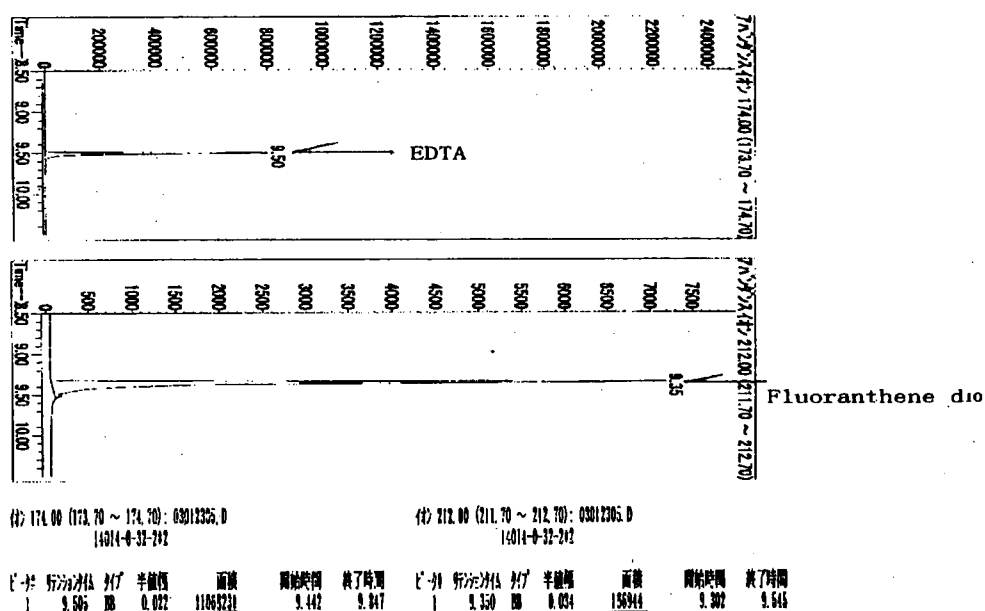


Figure 2-1. Representative chromatograms

Test solution (32 mg/l): 0 hour



Test solution (100 mg/l): 0 hour

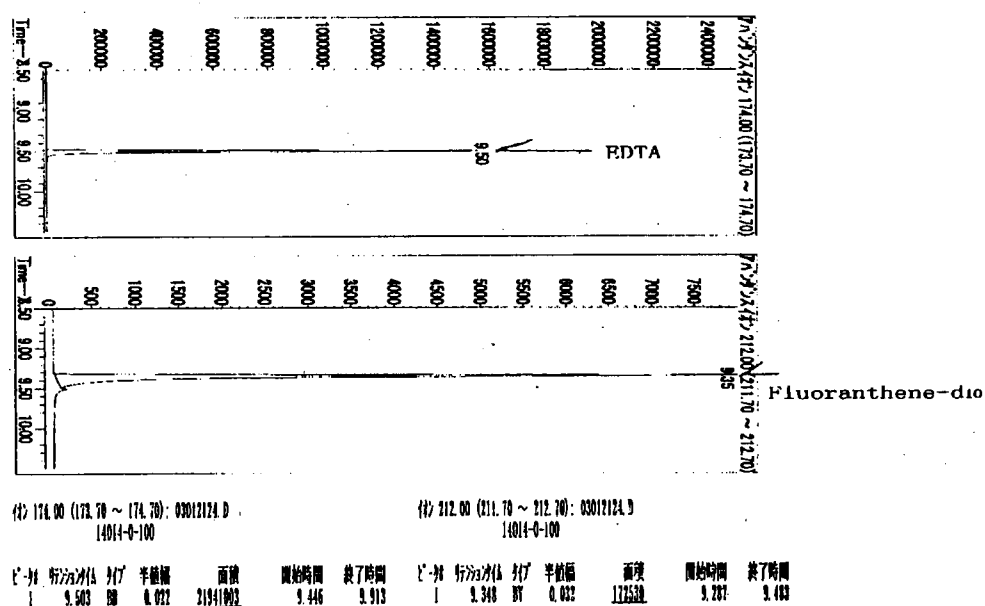


Figure 2-2. Representative chromatograms

陳述書

1 試験委託者

環境省

2 試験番号

第14014号

3 試験の表題

エチレンジアミン四酢酸のヒメダカ(*Oryzias latipes*)に対する急性毒性試験

上記試験は、日本国環境省総合環境政策局環境保健部環境安全課環境リスク評価室長通知「生態影響試験実施に関する基準の改正について」(別添)「生態影響試験実施に関する基準」(環保安第242号, 2001年)を遵守して実施したものです。

2003 年 3 月 31 日

財団法人 日本食品分析センター 多摩研究所

運営管理者



陳述書

1 試験委託者

環境省

2 試験番号

第14014号

3 試験の表題

エチレンジアミン四酢酸のヒメダカ (*Oryzias latipes*) に対する急性毒性試験

上記試験は、日本国環境省総合環境政策局環境保健部環境安全課環境リスク評価室長通知「生態影響試験実施に関する基準の改正について」（別添）「生態影響試験実施に関する基準」（環保安第242号，2001年）を遵守して実施したものです。

なお，試験実施にあたっては，OECD 化学品テストガイドライン No. 203「魚類急性毒性試験」（1992年）を遵守しました。

2003 年 3 月 31 日

財団法人 日本食品分析センター 多摩研究所

試験責任者



信頼性保証書

1 試験委託者

環境省

2 試験番号

第14014号

3 試験の表題

エチレンジアミン四酢酸のヒメダカ (*Oryzias latipes*) に対する急性毒性試験

4 検閲

本試験の検閲は，財団法人 日本食品分析センター 多摩研究所 信頼性保証部門の
標準操作手順書に従い，以下のとおり実施した。

検 閲 内 容	検閲実施日	試験責任者への 報告年月日	運営管理者への 報告年月日
試験計画書	2002年12月20日	2002年12月20日	2002年12月20日
被験物質の受領	2003年01月17日	2003年01月20日	2003年01月20日
試験計画書	2003年01月21日	2003年01月22日	2003年01月22日
試験の実施，試薬等	2003年01月21日	2003年01月22日	2003年01月22日
分析の実施，試薬等 機器，検体	2003年01月21日	2003年01月22日	2003年01月22日
試験の実施，機器	2003年01月22日	2003年01月22日	2003年01月22日
試験の実施	2003年01月24日	2003年01月24日	2003年01月24日
被験物質	2003年01月27日	2003年01月27日	2003年01月27日
試験中の保管文書	2003年03月25日	2003年03月25日	2003年03月25日
最終報告書草案及び生データ	2003年03月28日	2003年03月28日	2003年03月28日
最終報告書	2003年03月31日	2003年03月31日	2003年03月31日

上記検閲の結果，本試験最終報告書は試験に用いた方法が正確に記載され，報告結果は
試験の生データを正確に反映していることを確認した。

2003 年 3 月 31 日

財団法人 日本食品分析センター 多摩研究所
信頼性保証部門責任者

