

環境省殿

最 終 報 告 書

エチレンジアミン四酢酸のオオミジンコ(*Daphnia magna*)に対する急性遊泳阻害試験

(試験番号：第14012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オオミジンコ (*Daphnia magna*) に対する急性遊泳阻害試験
2. 試験目的：エチレンジアミン四酢酸のオオミジンコ (*Daphnia magna*) に対する急性遊泳阻害試験を行い、24 及び 48 時間の半数遊泳阻害濃度 (EC₅₀) を求める。
3. 試験方法：OECD 化学品テストガイドライン No. 202 「ミジンコ類、急性遊泳阻害試験及び繁殖試験」(1984 年) に準拠
ただし、2002 年度にテストガイドラインが改訂され近々公表される事になっている。
本試験方法は改訂版の内容を一部取り入れた。
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8日

実験終了日：2003年1月10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年間または品質低下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：

[REDACTED]

2003 年 3 月 21 日 承認

目次

	頁
要 旨	7
1 被験物質	9
1.1 名称, 構造式及び物理化学的性状	9
1.2 供試試料	9
1.3 保管方法及び保管条件下での安定性	10
2 供試生物	10
3 試験方法	11
3.1 試験条件.....	11
3.2 希釈水	11
3.3 試験容器及び恒温槽等	11
3.4 試験濃度の設定	11
3.5 試験液の調製	12
3.6 試験液の分析	12
3.7 試験操作	12
4 結果の算出	12
4.1 結果の算出に用いた試験濃度の決定	12
4.2 半数遊泳阻害濃度 (EC_{50}) の算出	12
4.3 0 %阻害最高濃度及び 100 %阻害最低濃度.....	12
4.4 統計的手法.....	13
5 結果及び考察	13
5.1 試験液中の被験物質濃度	13
5.2 試験液の状態	13
5.3 半数遊泳阻害濃度 (EC_{50})	13
5.4 0 %阻害最高濃度及び 100 %阻害最低濃度	13
5.5 試験液の水温, 溶存酸素濃度及び pH	14
5.6 試験計画書からの逸脱事項.....	14
5.7 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	14
5.8 試験の妥当性	14
5.9 結果の評価と考察.....	14

Table 1～7	15～17
Figure 1	17
付属資料-1 希釈水の水質	18
付属資料-2 予備試験結果	19
付属資料-3 検討試験結果	20
付属資料-4 統計処理データ	21
付属資料-5 試験液中の被験物質濃度の分析方法	22～27

要 旨

試験委託者

環境省

表 題

エチレンジアミン四酢酸のオオミジンコ (*Daphnia magna*) に対する急性遊泳阻害試験

試験番号

第14012号

試験方法

OECD 化学品テストガイドライン No. 202 「ミジンコ類 急性遊泳阻害試験及び繁殖試験」(1984年)に準拠(ただし、2002 年度にテストガイドラインが改訂され近々公表される事になっている。本試験方法は改訂版の内容を一部取り入れた。)

- 1) 被験物質：エチレンジアミン四酢酸
- 2) 暴露方式：止水式
- 3) 供試生物：オオミジンコ (*Daphnia magna*)
- 4) 暴露期間：48 時間
- 5) 試験濃度(設定値)：
 対照区, 56, 75 及び 100 mg/l
 公比 ; 1.3
- 6) 試験液量：100 ml/容器
- 7) 連 数：4 容器/1 試験区
- 8) 供試生物数：20 頭/試験区
- 9) 試験温度：19.2～20.0 °C
- 10) 溶存酸素濃度：9.1～9.4 mg/l (暴露期間中, エアレーションは行わなかった。)
- 11) pH : 4.6～7.9 (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(茨城県つくば市)を脱塩素したもの
- 15) 分 析 法：ガスクロマトグラフー質量分析法

結 果

以下の値は測定値(算術平均)を基に示した。

1) 半数遊泳阻害濃度 (EC_{50})

24 時間後 : 57 mg/l (Binominal 法により算出した。)

48 時間後 : 57 mg/l (Binominal 法により算出した。)

2) 0 %阻害最高濃度

24 時間後 : 49 mg/l

48 時間後 : 49 mg/l

3) 100 %阻害最低濃度

24 時間後 : 66 mg/l

48 時間後 : 66 mg/l

1 被験物質

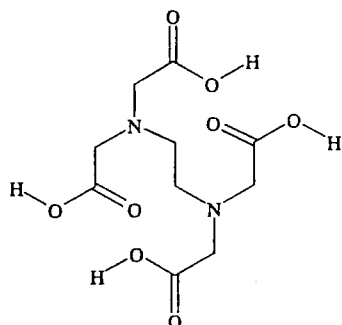
1.1 名称, 構造式及び物理化学的性状

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 観: 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：オオミジンコ

2) 学 名：*Daphnia magna*

3) 入 手 等：自家繁殖(1998年6月23日、国立環境研究所より入手)

4) 基準物質による検定の結果：基準物質(重クロム酸カリウム、試薬特級)による48時間の半遊泳障害濃度(EiC₅₀)は0.75 mg/l(2003年1月8日)であった。 当センターにおける1998年10月以降のEiC₅₀値のバックグラウンドデータ(0.60±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。

5) 試験使用の齢：雌の幼体(生後24時間以内齢)

6) 供試する幼体を得るためのミジンコの飼育方法：

継代中のものから幼体を抱えた肉眼的に健康かつ十分な大きさの雌成体を選別し、別に用意したビーカーに移し、翌日、産出された幼体を別のビーカーに分けた。この幼体を供試生物の親とし、以下の条件で17日間(2002年12月22日～2003年1月8日)飼育した。成熟し幼体を産むようになったら1週間に3回幼体を除去した。暴露開始前日に育苗内に幼体を持つ雌成体を選別し、翌日(24時間以内)、親ミジンコ(17日齢)より産出された幼体を試験に用いた。

試験には、産出された幼体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。産仔が初産の場合や親ミジンコの死亡が多い容器は使用しなかった。なお、飼育期間中、ミジンコの成育は良好で、産出幼体の死産、墮胎卵、休眠卵及び雄の発生は認められなかった。飼育密度を35頭から25頭/l飼育水に変更した以降の親ミジンコの死亡率は1%であった。

親ミジンコの飼育条件

① 飼 育 水：希釈水(3.2参照)

② 飼育方法：半止水式(週3回全量換水を行った。)

③ 飼育容器：1 l 容ガラス製ビーカー

④ 飼育密度：開始時～4日後；35頭/l飼育水，5日後～17日後；25頭/l飼育水

⑤ 水 温：19.1～20.6℃

⑥ 照 明：室内光，16時間明期/8時間暗期

- ⑦ 餌 料：単細胞緑藻類(*Chlorella vulgaris*)
(藻類培養液を遠心操作により、希釈水に置換して給餌した。)
- ⑧ 給 餌：開始時～7日後 ; 0.01～0.06 mgC(有機体炭素)/頭/日
8日後～14日後 ; 0.06～0.08 mgC(有機体炭素)/頭/日
15日後～17日後 ; 0.08～0.10 mgC(有機体炭素)/頭/日

3 試験方法

3.1 試験条件

- 1) 暴露方式：止水式
- 2) 暴露期間：48時間
- 3) 試験液量：100 ml/容器
- 4) 連 数：4容器/1試験区
- 5) 供試生物数：20頭/試験区
- 6) 試験温度：19.2～20.0℃
- 7) 溶存酸素濃度：9.1～9.4 mg/l(暴露期間中、エアレーションは行わなかった。)
- 8) pH : 4.6～7.9(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(茨城県つくば市)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85 mg/l(CaCO₃換算)，pHは7.2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：100 ml 容ガラス製ビーカー(容器のサイズ；内径 約5 cm×高さ 約7 cm)を用い、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-4410[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、56 mg/lの濃度区ではミジンコの遊泳阻害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3濃度区(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 20 ± 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、希釈水のための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ー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)及び暴露終了時(24又は48時間後)の2回行い、その算術平均値を求めた。暴露開始時は分析用及び4連分を同時に調製した容器から試験液を50 ml採取して分析用試験液とした。また、暴露終了時(24又は48時間後)は各試験区のそれぞれ4連の各試験容器から等量ずつ採取し混合した50 mlをそれぞれ分析用試験液とした。

なお、分析方法の詳細は付属資料-5に示した。

3.7 試験操作

試験液の水温、溶存酸素濃度、pHを測定後、供試生物を投入し、その時点を暴露開始時とした。先端が比較的広口のガラスピペットを用いて供試生物を投入した。その際、試験液量に対して、ピペット内の希釈水は全量で1%以内を目安とした。

暴露開始24及び48時間後にミジンコの遊泳阻害数の観察を行った。試験容器を穏やかに動かした後、15秒間泳げない場合、遊泳阻害されたと見なした。

水温、溶存酸素濃度及びpHは、暴露開始時は同一容器で調製した試験液について測定し、終了時は全試験区各1試験容器の試験液について測定した。暴露期間中給餌は行わなかった。

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。

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 半数遊泳阻害濃度(EC_{50})の算出

各試験区でのミジンコの遊泳阻害数と供試生物数(20頭)から遊泳阻害率(%)を算出し、Binominal法により、24及び48時間の半数遊泳阻害濃度(EC_{50})を算出した。また、濃度－遊泳阻害率のグラフを記載した。

4.3 0%阻害最高濃度及び100%阻害最低濃度

ミジンコが遊泳阻害を受けない最高試験区(0%阻害最高濃度)及び全てのミジンコが遊泳阻害を受ける最低濃度(100%阻害最低濃度)を24および48時間後に記録した。

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

暴露開始時及び暴露終了時(24又は48時間後)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。

暴露開始時及び暴露終了時(24又は48時間後)の試験液中の測定濃度は、それぞれ47~92 mg/l, 50~93 mg/l(設定濃度:56~100 mg/l)であり、設定濃度に対する割合は、暴露開始時が84~92%, 暴露終了時(24又は48時間後)が87~93%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56 mg/lで49 mg/l, 75 mg/lで66 mg/l及び100 mg/lで93 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(半数遊泳阻害濃度, 0%阻害最高濃度, 100%阻害最低濃度)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、暴露終了時(24又は48時間後)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 半数遊泳阻害濃度(EC_{50})

各時間における遊泳阻害率をTable 2に、半数遊泳阻害濃度(EC_{50})をTable 3に示した。また、濃度-遊泳阻害率のグラフをFigure 1に示した。

24時間後の各濃度区の遊泳阻害率は対照区及び49 mg/lで0%, 66 mg/l及び93 mg/lで100%であった。48時間後の各濃度区の遊泳阻害率は49 mg/lで0%及び66 mg/lで100%であった。

以上のことから、以下の結果を得た。

24時間 EC_{50} : 57 mg/l

Binomial法により算出した。

48時間 EC_{50} : 57 mg/l

Binomial法により算出した。

5.4 0%阻害最高濃度及び100%阻害最低濃度

24及び48時間後の0%阻害最高濃度及び100%阻害最低濃度をTable 4及び以下に示した。

0%阻害最高濃度: 24時間後; 49 mg/l, 48時間後; 49 mg/l

100%阻害最低濃度: 24時間後; 66 mg/l, 48時間後; 66 mg/l

5.5 試験液の水温、溶存酸素濃度及び pH

試験液の水温を Table 5、溶存酸素濃度を Table 6、pH を Table 7 に示した。

暴露期間中の各試験区の水温は 19.2～20.0℃、溶存酸素濃度は 9.1～9.4 mg/l であり、水温は 20±1℃、溶存酸素濃度は 3 mg/l 以上の範囲で試験環境条件を満たしていた。なお、pH は 4.6～7.9 であり、6.0～9.0 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。

5.6 試験計画書からの逸脱事項

なし。

5.7 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。

5.8 試験の妥当性

暴露終了時に対照区の死亡率及びミジンコの水面に浮く率が 0% であり、各試験区の溶存酸素濃度も 3 mg/l 以上であったため、本試験の成立が確認された。

5.9 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 75 mg/l 以上の濃度区において、pH が 6 以下となり、試験環境条件を外れたことから、pH を対照区と同等の値に調整し、検討試験を行った(付属試料-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－阻害率の関係がほとんど一致しており、0% 阻害最高濃度と 100% 阻害最低濃度の間隔が狭いことから、本被験物質、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
(Static Condition)

Nominal Concentration (mg/l)	Measured Concentration (mg/l)				Mean ^a Measured Concentration (mg/l)
	0 Hour	Percent of Nominal	48 Hours	Percent of Nominal	
Control	< 1	—	< 1	—	—
56	47	84	50	89	49
75	67	89	65	87	66
100	92	92	93 ^d	93	93

a : Arithmetic Mean

d : measured concentration after 24 hours because all *Daphnia magna* were dead at this period.

Table 2. The Numbers of Immobile *Daphnia magna* (Percent Immobility)

Nominal Concentration (mg/l)	Mean ^a Measured Concentration (mg/l)	Cumulative Number of Immobilized <i>Daphnia</i> (Percent Immobility)	
		24 Hours	48 Hours
Control	—	0 (0)	0 (0)
56	49	0 (0)	0 (0)
75	66	20 (100)	20 (100)
100	93	20 (100)	20 (100)

a : Arithmetic Mean

Table 3. Calculated EC_{50} Values

Exposure Period (Hours)	EC_{50} (mg/l)	95-Percent Confidence Limits (mg/l)	Statistical Method
24	57	—	Binomial
48	57	—	Binomial

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

Exposure Period (Hours)	Highest Concentration in 0 % Immobility (mg/l)	Lowest Concentration in 100 % Immobility (mg/l)
24	49	66
48	49	66

Table 5. Temperature

(Static Condition)			
Nominal Concentration (mg/l)	Mean ^a Measured Concentration (mg/l)	Temperature (°C)	
		0 Hour	48 Hours
Control	—	19.6	19.4
56	49	20.0	19.2
75	66	20.0	19.4
100	93	20.0	19.2 ^d

a : Arithmetic Mean

d : Temperature after 24hours because all *Daphnia magna* were dead at this period.

Table 6. Dissolved Oxygen Concentration

(Static Condition)			
Nominal Concentration (mg/l)	Mean ^a Measured Concentration (mg/l)	Dissolved Oxygen Concentration (mg/l)	
		0 Hour	48 Hours
Control	—	9.4	9.2
56	49	9.1	9.3
75	66	9.2	9.2
100	93	9.2	9.2 ^d

a : Arithmetic Mean

d : Dissolved oxygen concentration after 24hours because all *Daphnia magna* were dead at this period.

Table 7. pH Values

Nominal Concentration (mg/l)	Mean ^a Measured Concentration (mg/l)	(Static Condition) pH	
		0 Hour	48 Hours
Control	—	7.9	7.8
56	49	6.1	7.7
75	66	5.2	5.3
100	93	4.6	4.6 ^d

a : Arithmetic Mean

d : pH after 24hours because all *Daphnia magna* were dead at this period.

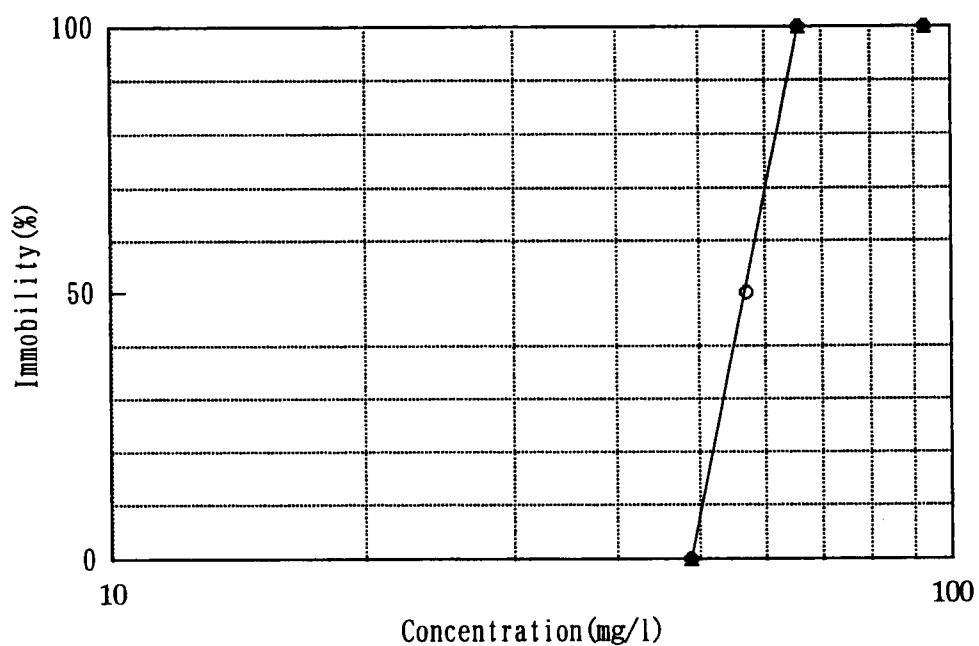


Figure 1. Concentration-Response (Immobility) Curve

◆ 24hr. ▲ 48hr. ○ EC50

付属資料-1：希釈水の水質

Quality of Test Water

Parameter	Concentration	Parameter	Concentration
pH Value	7.7(20℃)	Iprobenfos (IBP)	< 0.0005 mg/l
Coliform Group	Not Detected	Chlornitrofen (CNP)	< 0.00001 mg/l
Total residue	220 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)	85 mg/l	Suspended solids	< 1 mg/l
Nitrate and Nitrite	0.7 mg/l	Phosphorus	< 0.01 mg/l
Fluoride	0.13 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	Electric conductivity (25℃)	37 mS/m
1, 2-Dichloroethane	< 0.0002 mg/l	Alkalinity (CaCO ₃)	49 mg/l
1, 1-Dichloroethylene	< 0.001 mg/l	Total organic carbon (TOC)	1.9 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	< 0.005 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	35 mg/l
EPN	< 0.0005 mg/l	Potassium	7.0 mg/l
Dichlorvos (DDVP)	< 0.001 mg/l	Calcium	21 mg/l
Fenobucarb (BPMC)	< 0.001 mg/l	Magnesium	8.2 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 に示した。

Table 1. The Numbers of Immobile *Daphnia magna* (Percent Immobility)
(Range finding test)

Nominal Concentration (mg/l)	Cumulative Number of Immobilized <i>Daphnia</i> (Percent Immobility)	
	24 Hours	48 Hours
5.6	0(0)	0(0)
32	0(0)	0(0)
56	0(0)	0(0)
Control	0(0)	0(0)

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 6.0～9.0 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 に示した。

Table 1. The Numbers of Immobile *Daphnia magna* (Percent Immobility)
(the second test)

Nominal Concentration (mg/l)	Cumulative Number of Immobilized <i>Daphnia</i> (Percent Immobility)	
	24 Hours	48 Hours
Control	0 (0)	0 (0)
56	0 (0)	0 (0)
75	0 (0)	0 (0)
100	0 (0)	0 (0)

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。

EC₅₀ after 24 hours exposure

検体番号 第14012号
依頼者名 環境省
検体名 EDTA
入力者名
入力年月日 03/01/20
供試生物 ミジンコ
観察時間 24

CONC. mg/l	NUMBER EXPOSED	NUMBER EFFECT	PERCENT EFFECT	BINOMIAL PROB. (%)
93	20	20	100	9.5367431640625E-05
66	20	20	100	9.5367431640625E-05
49	20	0	0	9.5367431640625E-05

THE BINOMIAL TEST SHOWS THAT 49AND 66 CAN BE
USED AS STATISTICALLY SOUND CONSERVATIVE 95 PERCENT
CONFIDENCE LIMITS SINCE THE ACTUAL CONFIDENCE LEVEL
ASSOCIATED WITH THESE LIMITS IS 99.9998092651367 PERCENT.

AN APPROXIMATE EC50 FOR THIS SET OF DATA IS 50.858280487064

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

EC₅₀ after 48 hours exposure

検体番号 第14012号
依頼者名 環境省
検体名 EDTA
入力者名
入力年月日 03/01/20
供試生物 ミジンコ
観察時間 48

CONC. mg/l	NUMBER EXPOSED	NUMBER EFFECT	PERCENT EFFECT	BINOMIAL PROB. (%)
93	20	20	100	9.5367431640625E-05
66	20	20	100	9.5367431640625E-05
49	20	0	0	9.5367431640625E-05

THE BINOMIAL TEST SHOWS THAT 49AND 66 CAN BE
USED AS STATISTICALLY SOUND CONSERVATIVE 95 PERCENT
CONFIDENCE LIMITS SINCE THE ACTUAL CONFIDENCE LEVEL
ASSOCIATED WITH THESE LIMITS IS 99.9998092651367 PERCENT.

AN APPROXIMATE EC50 FOR THIS SET OF DATA IS 50.858280487064

WHEN THERE ARE LESS THAN TWO CONCENTRATIONS AT WHICH THE PERCENT
EFFECT 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, このうちの 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) 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CyD⁺ 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-35MS(35 %フェニルポリシロキサン化学結合型, 膜厚 0.25 μm)
内径 0.25 mm×長さ 30 m [Agilent Technologies]

温度：分離管 150 °C(2分)→15 °C/分→280 °C(5分)

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

ガス流量：キャリアーガス(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

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

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

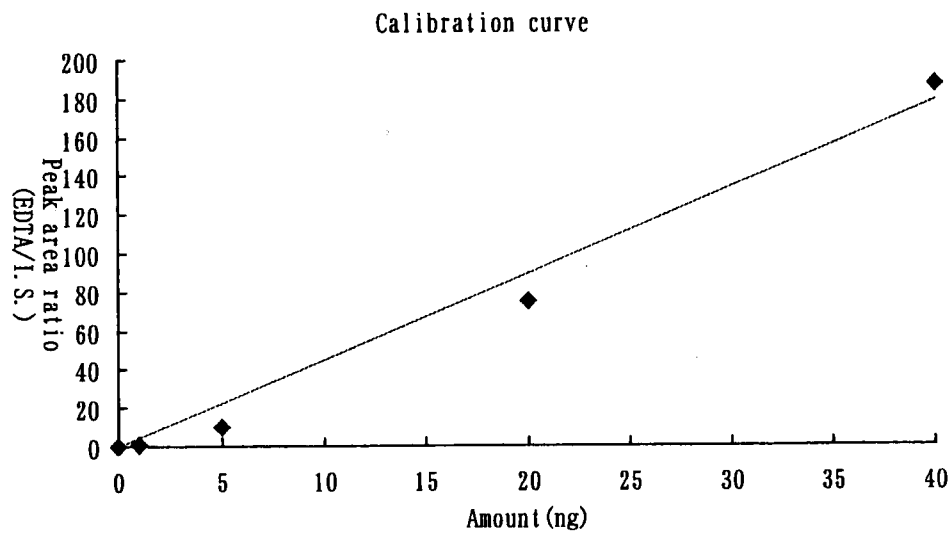
7 添加回収試験

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102.0 %, 97.0 %, 94.7 %(平均97.9 %)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95.3 %, 91.5 %, 91.0 %(平均92.6 %)であった。

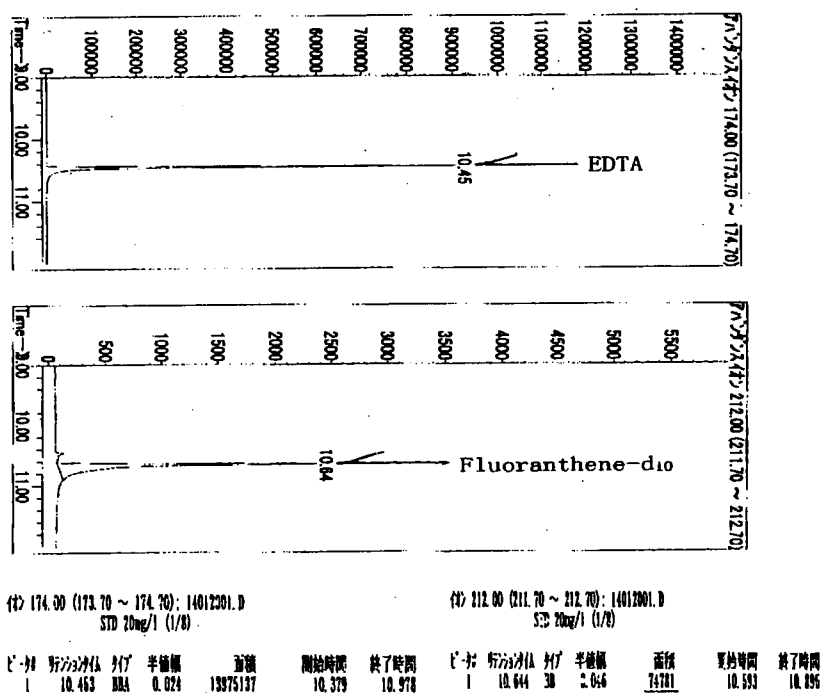


Amount (ng)	Peak area ratio (EDTA/I. S. *)
40	186.8808521
20	74.90716563
5	10.38286327
1	1.028920172

*Internal Standard

Figure 1. Calibration curve of EDTA by GC analysis

Standard (20 mg/l): 0 hour



Control: 0 hour

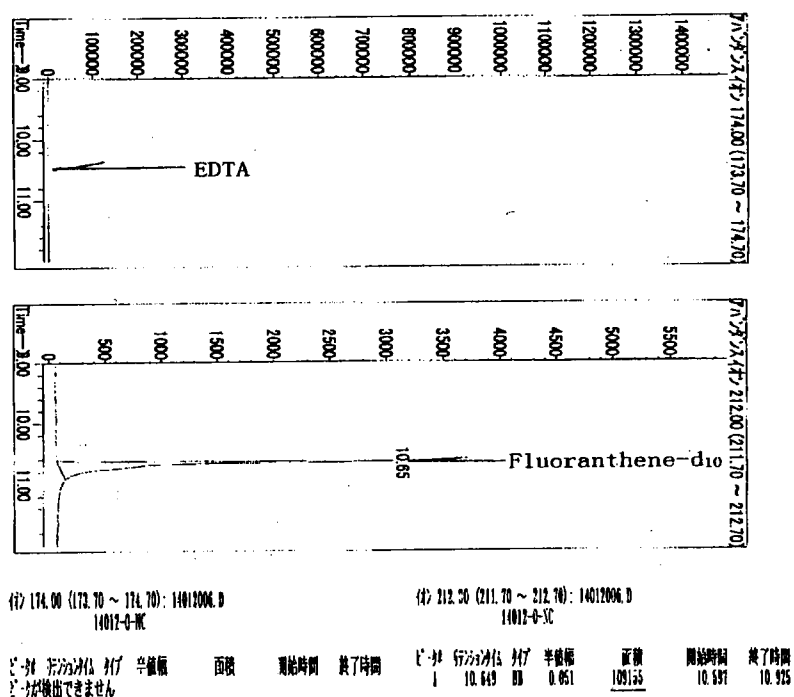
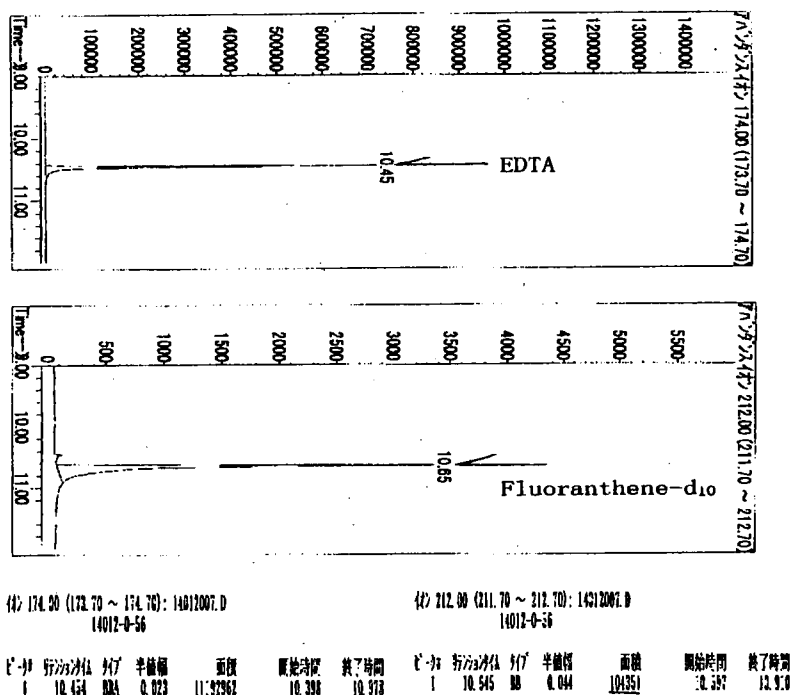


Figure 2-1. Representative chromatograms

Test solution (56 mg/l): 0 hour



Test solution (100 mg/l): 0 hour

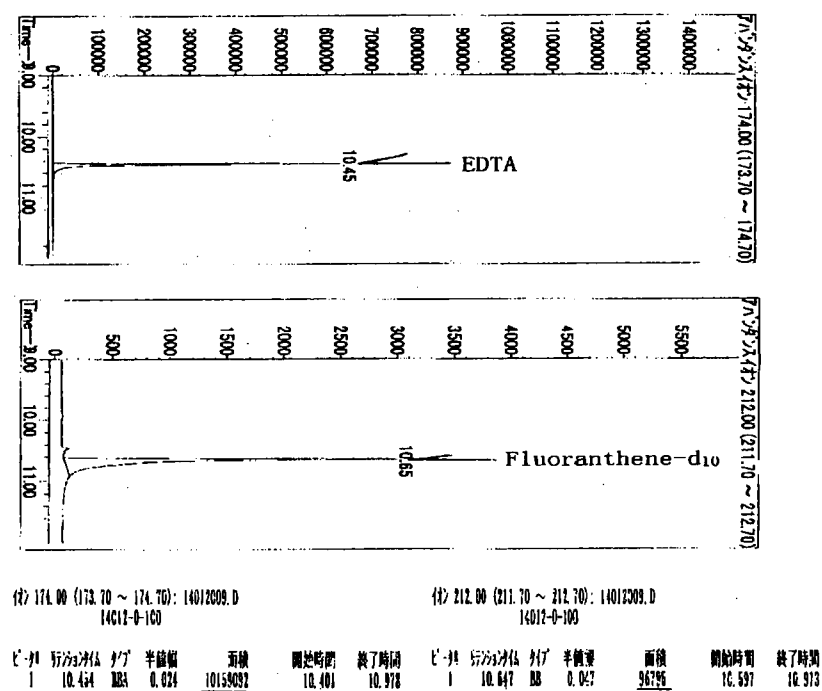


Figure 2-2. Representative chromatograms

陳述書

1 試験委託者

環境省

2 試験番号

第14012号

3 試験の表題

エチレンジアミン四酢酸のオオミジンコ (*Daphnia magna*) に対する急性遊泳阻害試験

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. 202「ミジンコ類，急性遊泳阻害試験及び繁殖試験」（1984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



陳述書

1 試験委託者

環境省

2 試験番号

第14012号

3 試験の表題

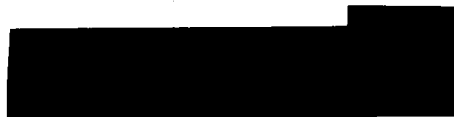
エチレンジアミン四酢酸のオオミジンコ (*Daphnia magna*) に対する急性遊泳阻害試験

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



信頼性保証書

1 試験委託者

環境省

2 試験番号

第14012号

3 試験の表題

エチレンジアミン四酢酸のオオミジンコ (*Daphnia magna*) に対する急性遊泳阻害試験

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
試験計画書	2003年01月08日	2003年01月08日	2003年01月08日
被験物質の受領	2003年01月08日	2003年01月08日	2003年01月08日
試験の実施，試薬等，機器	2003年01月08日	2003年01月08日	2003年01月08日
分析の実施，試薬等 機器，検体	2003年01月08日	2003年01月08日	2003年01月08日
試験の実施，被験物質	2003年01月10日	2003年01月10日	2003年01月10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3 / 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

