

受理番号	E03-3192
試験番号	93192

## 最 終 報 告 書

*p*-(フェニルアソ)アニリンのヒメダカによる96時間急性毒性試験

2004 年 10 月 29 日

化学物質環境研究機構

残留農薬部

# 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 *p*-(フェニルアゾ)アニリンのヒメダカによる96時間急性毒性試験

試験番号 93192

本最終報告書(写し)は、原本を正確にコピーしたものです。

2004 年 11 月 1 日

運営管理者

[Redacted Signature]

## 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 *p*-(フェニルアソ)アニリンのヒメダカによる96時間急性毒性試験

試験番号 93192

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)に従って実施したものです。

2004年10月29日

試験責任者

[Redacted Signature]

[Redacted Stamp]

## 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 *p*-(フェニルアゾ)アニリンのヒメダカによる96時間急性毒性試験

試験番号 93192

上記試験は財団法人化学物質評価研究機構久留米事業所の信頼性保証部門が監査又は査察を実施しており、監査又は査察を行った内容、日付並びに試験責任者及び運営管理者に報告を行った日付は以下の通りです。

監査又は査察内容	監査又は査察日	報告日（試験責任者）	報告日（運営管理者）
試験計画書	2004年7月30日	2004年7月30日	2004年7月30日
試験実施状況	2004年8月2日	2004年8月6日	2004年8月6日
	2004年8月6日	2004年8月6日	2004年8月6日
生データ及び最終報告書	2004年10月29日	2004年10月29日	2004年10月29日

本最終報告書は、試験の方法が正確に記載されており、内容が試験計画書及び標準操作手順書に従い、かつ、生データを正確に反映していることを保証します。

2004年10月29日

信頼性保証部門責任者

## 目 次

要 約	1
1. 表 題	2
2. 試験委託者	2
3. 試験施設	2
4. 試験目的	2
5. 試験方法	2
6. 適用GLP	2
7. 試験日程	2
8. 試験関係者	2
9. 最終報告書の承認	3
10. 記録及び試資料の保管	3
11. 被験物質	4
12. 試験材料と方法	5
13. 試験結果	9
14. 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	10
Table 1～5	11～14
Figure 1	15
Appendix 1 (Water quality of dilution water)	
Appendix 2 (Calibration curve and chromatogram)	
Appendix 3 (Statistical method for LC50 calculation)	
別添資料 予備試験結果	

## 要 約

*p*-(フェニルアゾ)アニリンの96時間急性毒性試験をヒメダカ(*Oryzias latipes*)を用いて実施した。

試験は、1試験区10尾を用い、5濃度区[設定濃度:0.600、0.400、0.267、0.178及び0.119 mg/L(公比1.5)]及び対照区、暴露期間96時間、水温24±1℃、試験液を連続的に供給する流水式で暴露を行った。

その結果、試験液中の被験物質濃度は、暴露開始時では設定濃度に対して98.4～103%、終了時では98.0～102%あった。試験結果は測定濃度の時間加重平均(前述の設定濃度を測定濃度の時間加重平均値表示にした場合、0.608、0.401、0.269、0.179及び0.117 mg/L)に基づいて算出した

その結果、*p*-(フェニルアゾ)アニリンの48時間LC50(半数致死濃度)は>0.608 mg/L、96時間LC50は0.354 mg/Lであった。

96時間における100%死亡最低濃度は0.608 mg/L、0%死亡最高濃度は0.269 mg/Lであった。また、本試験でのNOEC(最大無影響濃度)は0.179 mg/Lであった。

試験番号：93192

## 1. 表 題

*p*-(フェニルアゾ)アニリンのヒメダカによる96時間急性毒性試験

## 2. 試験委託者

名 称 環境省

所 在 地 (〒100-8975)東京都千代田区霞ヶ関 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 (〒830-0023)福岡県久留米市中央町 19-14  
TEL(0942) 34-1500

## 4. 試験目的

被験物質の魚類に対する短期的影響を調べる。

## 5. 試験方法

段階的な濃度に調製した被験物質を含む試験液にヒメダカを96時間暴露した。  
この間、死亡したヒメダカの数調べ、その結果から96時間LC50\*を求めた。

試験は「OECD Guidelines for Testing of Chemicals, Section 2: Effects on Biotic Systems, 203 “Fish, Acute Toxicity Test”, 1992」及び「OECD Guidance Document 23 “Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures”」に準じて行った。

\* 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。

## 6. 適用GLP

この試験は、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)に適合して行った。

## 7. 試験日程

1) 試験開始日 2004 年 7 月 30 日

2) 実験開始日 2004 年 8 月 2 日

3) 実験終了日 2004 年 8 月 6 日

4) 試験終了日 2004 年 10 月 29 日

## 8. 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



9. 最終報告書の承認  
試験責任者

2004年10月29日

氏名 

10. 記録及び試資料の保管

1) 被験物質

供試試料約5 g\*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93189、93190、93191及び93192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。



## 11. 被 験 物 質

被験物質に関する情報を以下に示す。供試試料に関する情報については供給者資料等によった。

## 1) 名 称

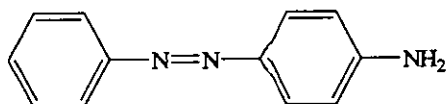
*p*-(フェニルアゾ)アニリン

## 2) C A S 番 号

60-09-3

## 3) 構 造 式 等

## (1) 構 造 式



## (2) 分 子 式

$C_{12}H_{11}N_3$

## (3) 分 子 量

197.24<sup>\*2</sup>

## 4) 物理化学的性質等

## (1) 融 点

124.3℃<sup>\*1</sup>

## (2) 沸 点

>360℃<sup>\*2</sup>

## (3) 分配係数

logPow=2.98 (calculated)<sup>\*2</sup>

情 報 源

\*1: 供給者提供の添付資料

\*2: [REDACTED]

## 5) 供試試料に関する情報

## (1) 純 度

99.0%

## (2) ロット番号

PKH7121

## (3) 供 給 者

[REDACTED]

## (4) 供 給 量

25 g

(5) 入 手 日  
2003年12月26日

(6) 外 観  
だいたい色粉末

6) 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たことを確認した。

7) 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  
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  
被鱗体長  $2.0 \pm 0.5$  cm

(4) 購 入 先  
中島養魚場(〒869-0123 熊本県玉名郡長洲町大字長洲 2029)

(5) 試験生物の順化  
生物は供試83日前に入手した。その後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)下で11日間流水条件で順化し、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約4ヶ月であった。なお、生物は入手時及び順化開始時に水産用エルバージュ(10%顆粒)及びNaClによる薬浴を実施した。給餌はコイ用配合餌料(2C)を1日当り魚体重の約2%量を与え、供試24時間前から給餌は行わなかった。試験系の再現性を確認するために実施(2004年8月2日～8月6日に実施)した硫酸銅(Ⅱ)五水和物(試薬特級、和光純薬工業株式会社)の96時間LC50は $0.452 \text{ mg/L}$ 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:  $0.0964 \sim 1.05 \text{ mg/L}$ )であった[平均 $\pm$ 標準偏差は $0.572 \pm 0.238 \text{ mg/L}$ ( $n=27$ )]。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。

## 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。使用時には、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

3.0 L容のガラス製容器(直径16 cm、深さ17 cm) の約1.8 Lの位置に排水管を取り付けたもの

## (2) 試験装置

加熱冷却装置によって試験容器内の水温を $24\pm 1^{\circ}\text{C}$ に維持可能なもの

## (3) 攪拌器

試験液調製の際、試験用水を攪拌するために使用  
EYELA MAZELA Z (東京理化器械株式会社製)

## (4) 流水装置

## ①希釈装置

定量ポンプにより一定流量に調節された試験原液及び試験用水を混合し、連続的に試験液を供給できるもの

## ②定量ポンプ

必要量の試験原液及び試験用水を連続的に送液できるもの  
GLASS PUMP GMW-8A (東京理化器械株式会社製)

## 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。  
試験は連続的に試験液を供給する流水式(換水率：24回/日)で行った。

## ②期間

96時間

## ③試験濃度

試験は5濃度区[0.600、0.400、0.267、0.178及び0.119 mg/L(公比1.5)]で行った。  
試験濃度及び公比は予備試験の結果から決定した。試験濃度は純度補正を行った値で表示した。予備試験結果は別添資料に示す。

## 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

10尾／試験区(5尾×2試験容器)

## ⑥試験液量

約3.6 L／試験区(約1.8 L×2試験容器)

## (2) 環境条件

①水 温  
24±1℃

②照 明  
室内灯による16時間明/8時間暗の明暗周期

③給 餌  
暴露期間中、給餌を行わなかった。

④エアレーション  
暴露期間中、エアレーションを行わなかった。

## 5) 試験液の調製法

試験原液の調製は純度(99.0%)補正して行った。必要量の被験物質を秤量し、試験用水に溶解させて20.0 mg/Lの試験原液を調製した。試験原液と希釈水を一定流量で混合して、試験液を調製した。20.0 mg/L試験原液は室温で72時間まで安定であることを確認しているため、72時間以内(実際は24及び48時間間隔)に試験原液を交換した。試験液のpH調整は実施しなかった。

## 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。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。死亡した個体は確認した時点で、速やかにとり除いた。

## (2) 試験生物の被鱗体長、体重

暴露終了後、対照区の試験生物について被鱗体長、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終了時に観察した。

## (4) 水 質

試験液の溶存酸素濃度、pH及び水温を暴露開始時及びその後24時間毎に測定した。また、全個体が死亡した濃度区については、全個体死亡を確認した時点で測定した。溶存酸素濃度は溶存酸素計58型(Yellow Springs Instrument CO., Inc.)、pHはガラス電極式水素イオン濃度計HM-21P型(東亜ディーケーケー)、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

## ①採水と分析回数

被験物質濃度の測定は暴露開始時及び暴露終了時に行った。なお、試験最高濃度では生物が全滅したが、全滅したのは暴露96時間後であったため、他の試験区と同様に終了時に測定を行った。測定用試験液は、各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。

## ②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、分析試料とした。

## ③分析方法

前処理操作を行って得られる分析試料は、以下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。最終試料溶液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の一部をAppendix 2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
ポ ン プ	島津製作所製 LC-10AD
検 出 器	島津製作所製 SPD-10AV
オートインジェクター	島津製作所製 SIL-10A <sub>XL</sub>
カラムオープン	島津製作所製 CTO-10AC
カ ラ ム	L-column ODS (化学物質評価研究機構製) 15 cm×4.6 mmφ
カラム温度	40℃
溶 離 液	アセトニトリル/蒸留水 65/35(v/v)
流 量	1.0 mL/min
測 定 波 長	382 nm
注 入 量	200 μL
感 度	
検 出 器	0.5 AU/1 V

## ④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(99.0%)補正して行った。

被験物質20.2 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50.0 mg/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5.00 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0.250 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0.0250 mg/Lの標準溶液を調製した。

## ⑤検量線の作成

④の標準溶液の調製と同様にして0.00250、0.0125、0.0250及び0.0500 mg/Lの標準溶液を調製した。これらを③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た。本試験の分析に用いた検量線をAppendix 2に示す。

なお、試験液中の被験物質の検出下限は検量線の濃度及びピーク面積値を用いて回帰分析を行い、得られた数値をもとにして算出された濃度(0.000698 mg/L)とした。

## 7) 結果の処理

結果の算出には測定濃度の算術平均値を用いた。

## (1) LC50の算出法

72時間についてはProbit法、96時間についてはBinomial法により算出した。また、それらの95%信頼限界も算出した。24及び48時間については試験濃度で50%以上の死亡率が得られなかったため、LC50は「>試験最高濃度」と表示した。なお、各観察時におけるLC50算出に用いた濃度区はTable 2に示す。

## (2) NOEC(最大無影響濃度)の評価

暴露期間中、対照群と比較して何ら影響が認められない最高濃度区をNOEC(No Observed Effect Concentration)とした。

## 8) 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

設定濃度と測定濃度の算術平均値の対比表を以下に示す。

設定濃度 (mg/L)	測定濃度の算術平均値 (mg/L)
0.119	0.117
0.178	0.179
0.267	0.269
0.400	0.401
0.600	0.608

以降の本文中の濃度区表示は測定濃度の算術平均値で示す。

## 1) LC50

被験物質のヒメダカに対する48時間LC50は>0.608 mg/L、96時間LC50は0.354 mg/Lであった。各時間でのLC50をTable 1に示す。なお、各時間のLC50算出に用いた濃度区をTable 2に記載した。

## 2) NOEC

暴露期間中に観察された症状及び死亡率の結果から、被験物質のヒメダカに対するNOECは0.179 mg/Lであった。

## 3) 死亡率

96時間における100%死亡最低濃度は0.608 mg/L、0%死亡最高濃度は0.269 mg/Lであった。各時間での累積死亡率をTable 2、濃度－死亡率曲線をFigure 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) 症状等の観察結果

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表層集中、平衡喪失、出血、過敏、過活動及び活動度の低下であった。対照群では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Table 3に示す。

## 5) 試験生物の被鱗体長、体重 [平均値±標準偏差(n=10)、(最小～最大)]

被鱗体長 2.1±0.13 cm (1.9～2.4 cm)

体 重 0.18±0.029 g (0.14～0.24 g)

## 6) 試験液の観察と測定結果

## (1) 試験液の状態

暴露開始時は黄色澄明であり、その色調は濃度依存的であった。その状態は終了時まで変わらなかった。

## (2) 試験液の水質

暴露期間中に測定した溶存酸素濃度は7.9～8.4 mg/L、pHは7.6～7.7、水温は23.3～23.8℃であった。試験液の水質をTable 4-1、4-2及び4-3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\*)を満たしていた。

\* 23～25℃の飽和溶存酸素濃度：8.39～8.11 mg/L(JIS K 0102)

## (3) 試験液中の被験物質濃度

試験液中の被験物質濃度は、暴露開始時では設定濃度に対して98.4～103%、終了時では98.0～102%であった。被験物質濃度の測定結果をTable 5に示す。また、分析チャートの一例をAppendix 2に示す。

## 14. 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。

Table 1. LC50 to Medaka

Exposure duration	LC50 (mg/L)
24 hours	> 0.608
48 hours	> 0.608
72 hours	0.494 (0.426 - 0.573)
96 hours	0.354 (0.269 - 0.608)

In parentheses are 95% confidence limits.

Table 2. Cumulative mortality

Measured concentration (mg/L)	Cumulative mortality (%)				
	3 hours	24 hours	48 hours	72 hours	96 hours
Control	0	0	0	0	0
0.117	0	0	0	0	0
0.179	0	0	0	0	0
0.269	0	0	0	0*	0*
0.401	0	0	0*	10*	80*
0.608	0	0	30*	90*	100*

\* The results were used for the LC50 calculation in each observation time.



Table 3. Observed abnormal response

Measured concentration (mg/L)	Observed abnormal response				
	3 hours	24 hours	48 hours	72 hours	96 hours
Control	—	—	—	—	—
0.117	—	—	—	—	—
0.179	—	—	—	—	—
0.269	—	—	—	HEM	AS HEM HYP PLE
0.401	—	—	—	AS HEM HYP PLE RA	AS HEM PLE RA
0.608	—	—	AS HEM HYP	AS HEM HS PLE RA	

— : Normal (No abnormal response)

Blank expresses all test organisms expired.

Abbreviation of symptoms

AS : At the surface

HEM : Hemorrhage

HS : Hypersensitive

HYP : Hyperactive

PLE : Partial loss of equilibrium

RA : Reduced activity

Table 4-1. Dissolved oxygen concentration of test solutions

Measured concentration (mg/L)	0 hour At the start	24 hours	48 hours	72 hours	96 hours At the end
Control	8.1	8.3	8.0	8.2	8.1
0.117	8.1	8.3	8.0	8.2	8.2
0.179	8.1	8.4	8.0	8.1	8.2
0.269	8.2	8.3	8.0	8.1	8.2
0.401	8.1	8.3	8.0	8.1	8.3
0.608	8.1	8.2	7.9	8.2	8.4*

Unit : mg/L

\* indicates the measured value at the time that confirmed all test organisms dead.

Table 4-2. pH of test solutions

Measured concentration (mg/L)	0 hour At the start	24 hours	48 hours	72 hours	96 hours At the end
Control	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6
0.117	7.7	7.7	7.7	7.7	7.7
0.179	7.7	7.7	7.7	7.7	7.7
0.269	7.7	7.7	7.7	7.7	7.7
0.401	7.7	7.7	7.7	7.7	7.7
0.608	7.7	7.7	7.6	7.7	7.7*

\* indicates the measured value at the time that confirmed all test organisms dead.

Table 4-3. Water temperature of test solutions

Measured concentration (mg/L)	0 hour At the start	24 hours	48 hours	72 hours	96 hours At the end
Control	23.8	23.4	23.8	23.3	23.4
0.117	23.8	23.4	23.8	23.3	23.3
0.179	23.8	23.4	23.8	23.3	23.3
0.269	23.8	23.4	23.8	23.3	23.3
0.401	23.8	23.4	23.8	23.3	23.3
0.608	23.8	23.4	23.8	23.3	23.3*

Unit : °C

\* indicates the measured value at the time that confirmed all test organisms dead.

Table 5. Measured concentration of test substance in test solutions

Nominal concentration (mg/L)	Measured concentration (mg/L)		
	0 hour	96 hours	Mean*
	At the start	At the end	
Control	n.d.	n.d.	—
0.119	0.117 (98.4)	0.117 (98.0)	0.117 (98.2)
0.178	0.183 (103)	0.176 (99.0)	0.179 (101)
0.267	0.276 (103)	0.263 (98.3)	0.269 (101)
0.400	0.394 (98.5)	0.408 (102)	0.401 (100)
0.600	0.601 (100)	0.614 (102)	0.608 (101)

Values in parentheses show percentage of nominal concentration.

n.d. : Not detected (<0.000698 mg/L)

\* indicates arithmetic mean of each measured value.

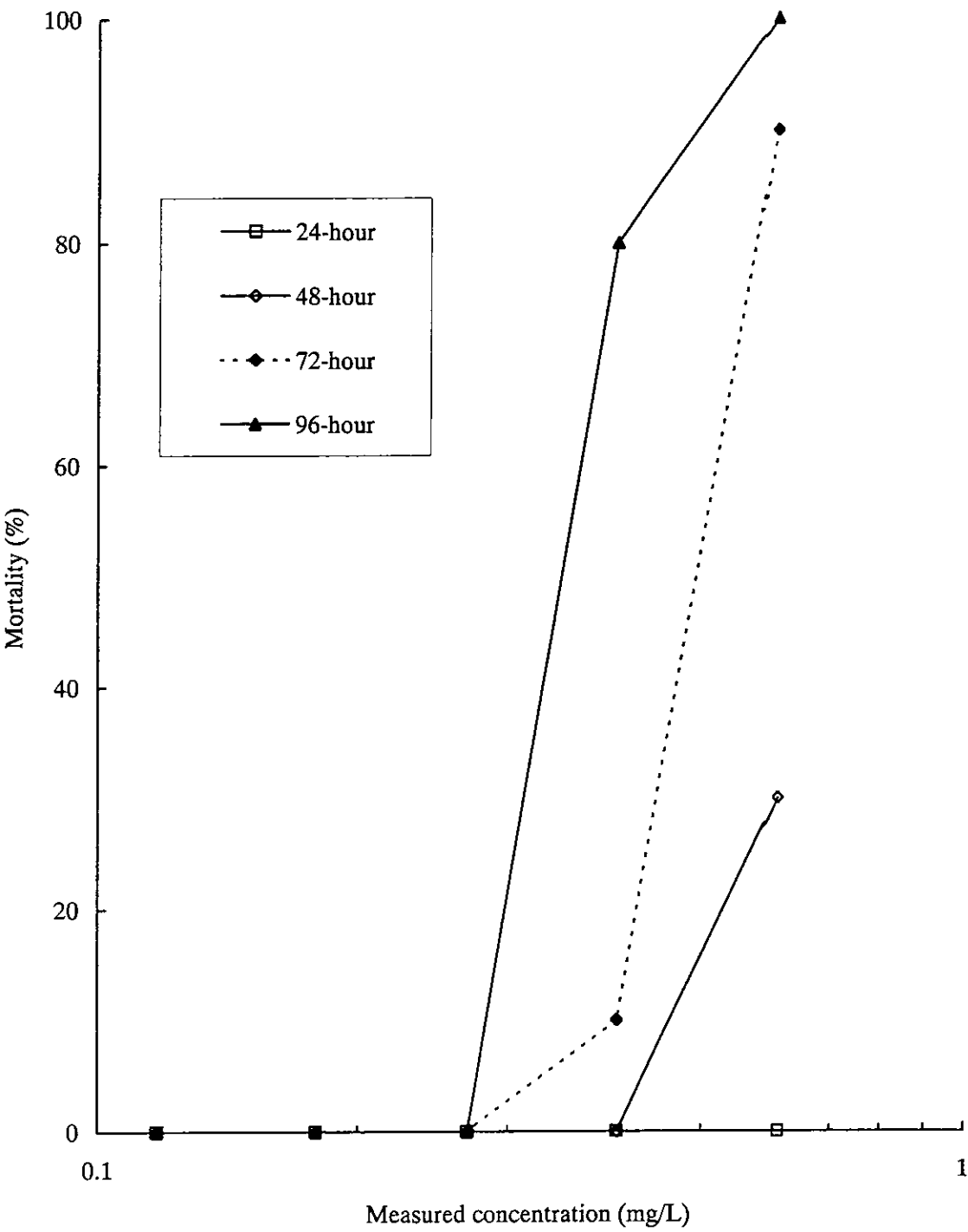


Figure 1. Concentration-mortality curve

## Appendix 1

Water quality of dilution water

(one page)

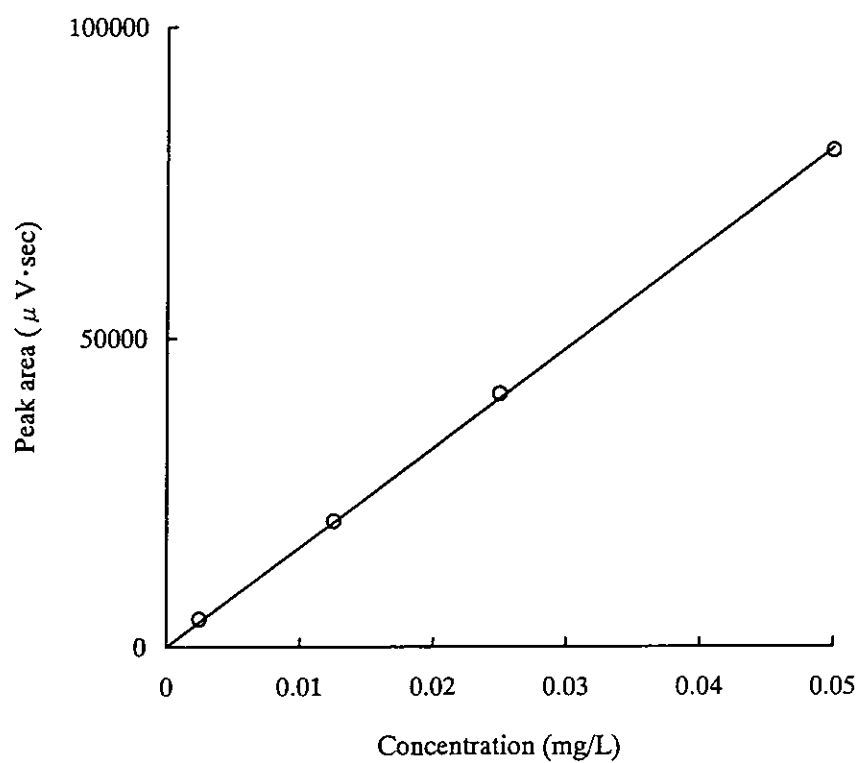
Water quality of dilution water (Sampling on July 8, 2004)

Parameter	Unit	Results	Lower limit of detection
Ca, Mg etc. (Hardness)	mg/L	41.2	0.1
Suspended substance	mg/L	< 1	1
pH	—	7.6 (23°C)	—
Organic carbon	mg/L	not detected	0.1
Chemical oxygen demand	mg/L	0.7	0.5
Free chlorine	mg/L	not detected	0.01
Ammonium nitrogen	mg/L	0.01	0.01
Cyanide	mg/L	not detected	0.01
Alkalinity	mg/L	35	1
Electric conductivity	mS/m	16.7	—
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	0.04	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	0.048	0.001
Nickel	mg/L	not detected	0.001
Silver	mg/L	not detected	0.0001
Sulfate ion	mg/L	13.2	0.1
Chloride ion	mg/L	18	1
Sodium	mg/L	14	0.01
Potassium	mg/L	3.50	0.01
Calcium	mg/L	11.5	0.01
Magnesium	mg/L	3.0	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
Chlornitrofen	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

Calibration curve and chromatogram

(three pages)



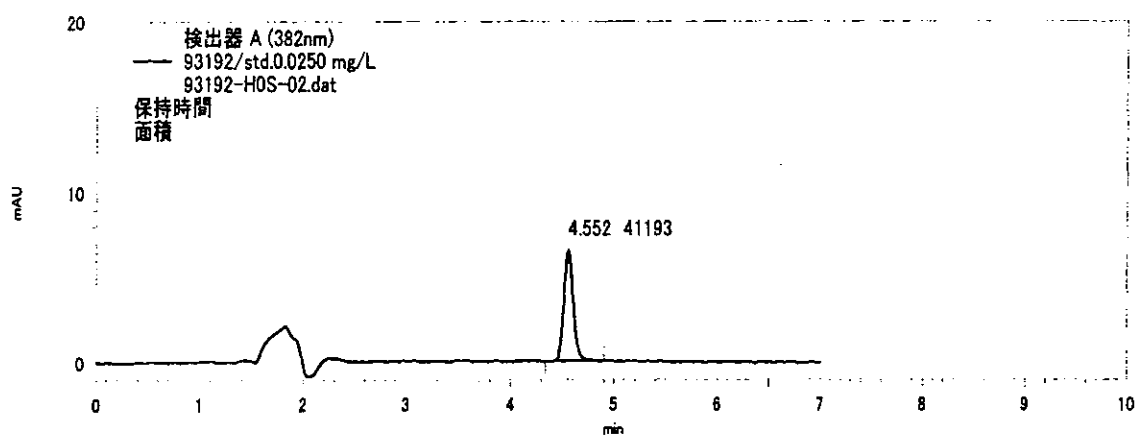
$$y = 1610576x$$

$$r = 1.00$$

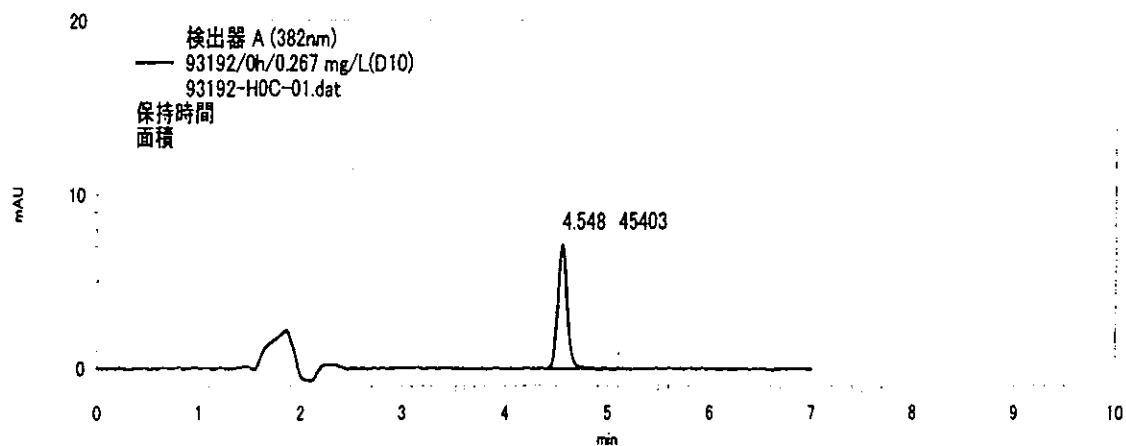
Concentration (mg/L)	Peak area ( $\mu$ V·sec)
0.00250	4457
0.0125	20328
0.0250	40959
0.0500	80111

Appendix 2-1 Calibration curve of *p*-phenylazoaniline by HPLC analysis.

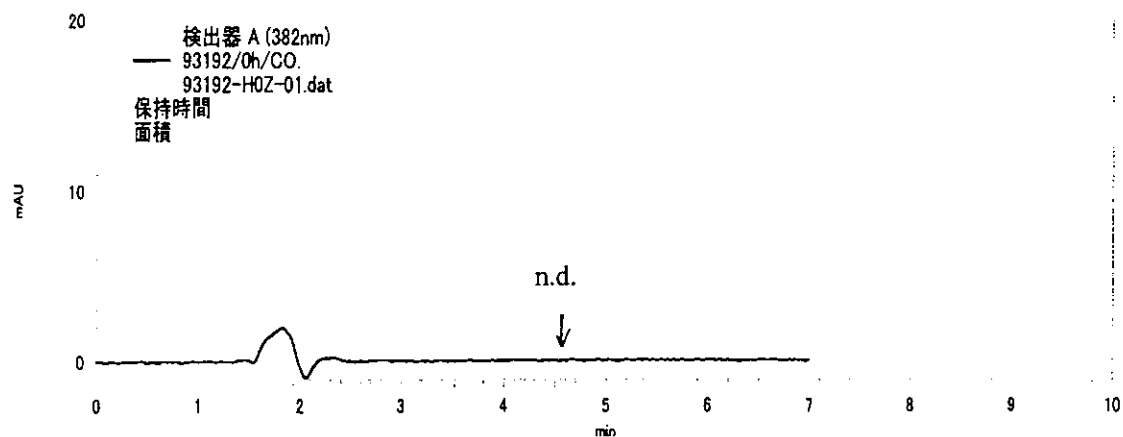




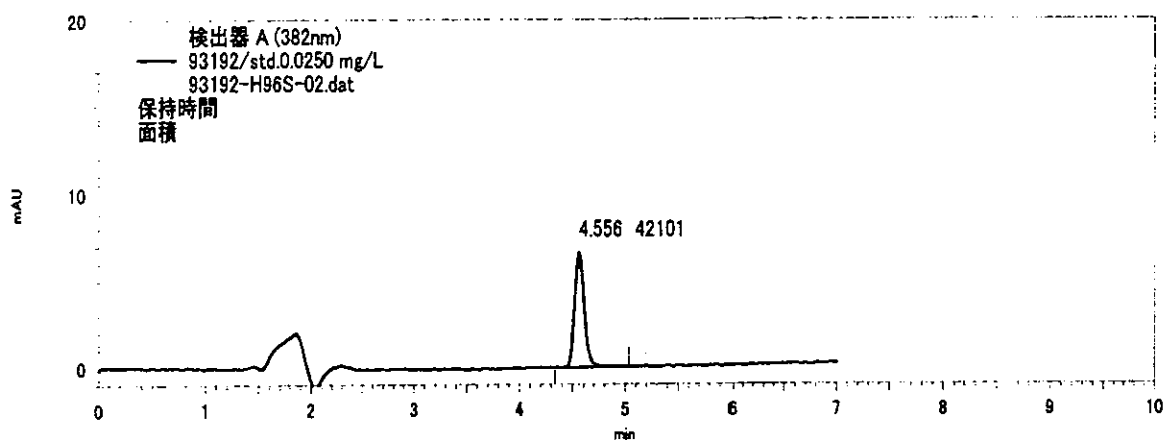
Appendix 2-2 HPLC chromatogram of 0.0250 mg/L standard solution at the start of the exposure.



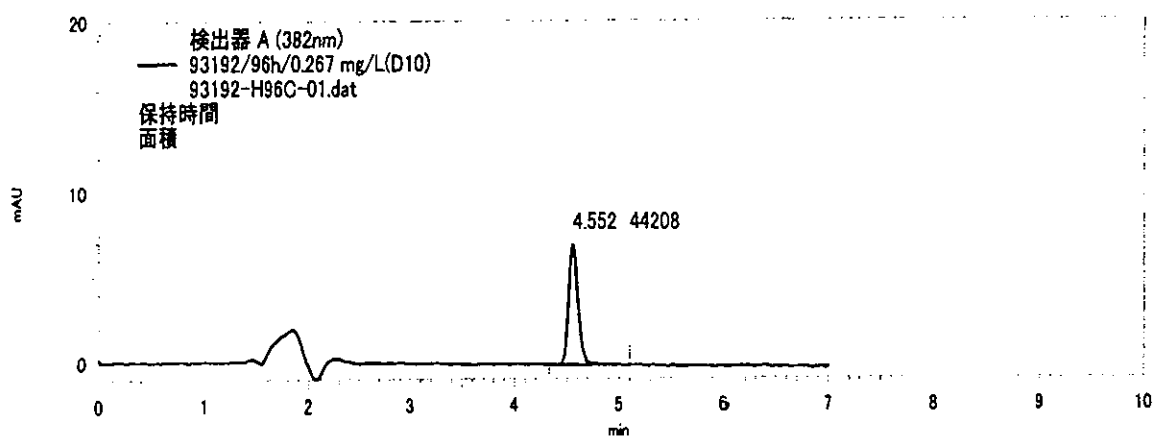
Appendix 2-3 HPLC chromatogram of 0.267 mg/L (nominal concentration) at the start of the exposure.



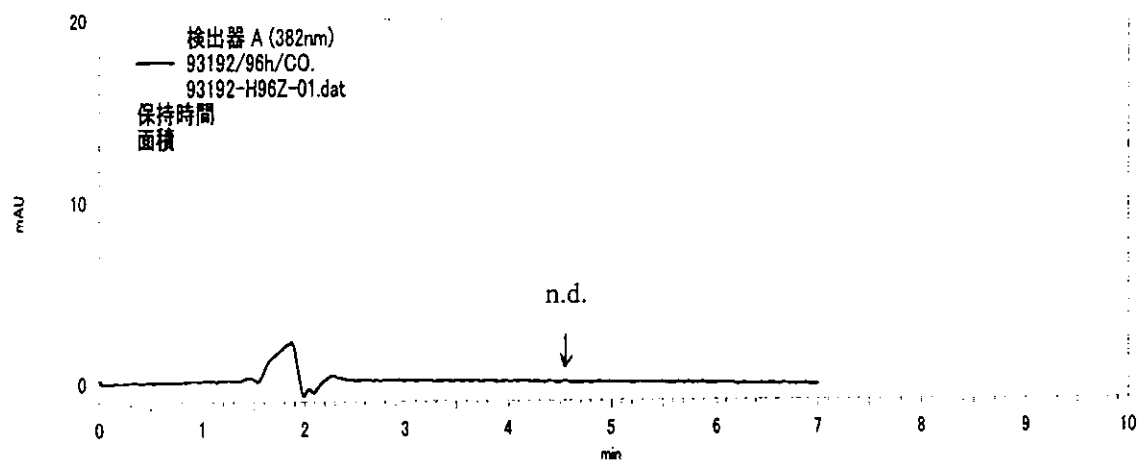
Appendix 2-4 HPLC chromatogram of control at the start of the exposure.



Appendix 2-5 HPLC chromatogram of 0.0250 mg/L standard solution at the end of exposure.



Appendix 2-6 HPLC chromatogram of 0.267 mg/L (nominal concentration) at the end of exposure.



Appendix 2-7 HPLC chromatogram of control at the end of exposure.

## Appendix 3

Statistical method for LC50 calculation

(two pages)

(Ver.97/9)

傾き	切片
14.1796	9.34572
14.1966	9.35039

Xavg=	-0.307
yAvg=	4.99153

$S_{xx} =$	0.05692
$S_{yy} =$	11.4724
$S_{xy} =$	0.80804

傾き	切片
14.1966	9.35039

X2Ca	0.0009	0.97605
X2(5%)	3.84146	**
T(5%)		2.57058

LC 50 (mg/L)	95%信頼限界		算出方法
	X-95	X+ 95	
0.494	0.426	0.573	Probit
More N			Moving average
0.494	0.401	0.608	Binomial

試驗責任者:

96-hLC50

[illegible]

傾き	切片
0.78168	4.02491
1.70278	2.88776

Xavg=	#DIV/0!
vAvg=	#DIV/0!

Sxx=	#DIV/0!
Syy=	#DIV/0!
Sxy=	#DIV/0!

傾き	切片
#DIV/0!	#DIV/0!

X2CaI	#DIV/0!	#DIV/0!
X2(5%)	3.84146	#DIV/0!
T(5%)		2.57058

LC 50 (mg/L)	95%信賴限界		算出方法
	X-95	X+95	
More N			Probit
More N			Moving average
0.354	0.269	0.608	Binomial

別添資料

*p*-(フェニルアゾ)アニリンのヒメダカによる96時間急性毒性試験  
予備試験結果

(全1頁)

## 予備試験結果

## ＜生物への影響＞

設定濃度 (mg/L)	左：累積死亡率(%)      右：症状の有無(*有、一無)									
	3 時間		24 時間		48 時間		72 時間		96 時間	
0.0375	0	—	0	—	0	—	0	—	0	—
0.0750	0	—	0	—	0	—	0	—	0	—
0.150	0	—	0	—	0	—	0	—	0	—
0.300	0	—	0	—	0	—	0	*	20	—
0.600	0	—	0	—	0	*	100		100	

暴露方式：流水式(換水率 24 回/日)

試験生物数/試験液量：5 尾/1.8 L

試験液調製法：試験原液と希釈水を一定流量で混合して調製した

## ＜試験液中の被験物質濃度＞

設定濃度 (mg/L)	対設定濃度 (%)	
	暴露開始時	暴露終了時
0.0375	102	100
0.300	94.8	93.7
0.600	90.3	94.3

## ＜試験原液の安定性試験＞

設定濃度 (mg/L)	対設定濃度 (%)			
	調製時	24 時間後	72 時間後	7 日後
10.0	91.6	94.3	97.2	94.4