

環境庁殿

試 験 報 告 書

2,2'-アゾビス (2-メチルプロパニトリル) のヒメダカ (*Oryzias latipes*) に対する
延長毒性試験－14日間

(試験番号：EFP96001)

平成 9 年 6 月 30 日作成

住化テクノス株式会社

最終報告書修正書

試験番号：EFP96001

修正書番号：1

表題：2, 2-アゾビス(2-メチルプロパニトリル)のヒメダカ (*Oryzias latipes*) に対する延長毒性試験

試験施設：住化テクノサービス株式会社

修正内容：

- 1) 12ページ、5.2、3行目の被験物質の設定値に対する割合を以下の通り修正した。

修正前：94～100%

修正後：96～100%

- 2) 13ページ、5.6、6行目の被験物質名を以下の通り修正した。

修正前：2, 2-アゾビス(メチルプロパニトリル)

修正後：2, 2-アゾビス(2-メチルプロパニトリル)

修正理由：

- 1) 2) 記載に誤りがあったため。

試験責任者

2002年4月18日

信頼性保証書

本修正事項は、当社の信頼性保証部門によって下記の監査を受けている

項 目	監査日	報告日	
	QAU	試験責任者	運営管理者
草 稿	2002年4月18日		
最終版	2002年4月18日	2002年4月18日	2002年4月18日

信頼性保証責任者：

2002年4月18日

陳 述 書

住化テクノス株式会社

試験委託者： 環境庁

表題： 2,2'-アゾビス (2-メチルプロパニトリル) のヒメダカ (*Oryzias latipes*) に
対する延長毒性試験－14日間

試験番号： EFP96001

上記試験は環境庁の「生態影響試験実施に関する基準」に従って実施したものである。

平成 9 年 6 月 30 日

運営管理者



信頼性保証証明書

試験表題： 2,2'-アジビス(2-メチルプロピオニトリル)のヒメダカ(*Oryzias latipes*)に対する
延長毒性試験－14日間
試験番号： EFP96001

本最終報告書の試験は、当施設の信頼性保証部門に関する標準操作手順書に従って下記の
査察を受けている。

査察項目	査察日	報告日	
	QAU	試験責任者	運営管理者
試験計画書	平成9年3月6日 平成9年3月28日	平成9年3月7日 平成9年3月28日	平成9年3月7日 平成9年3月28日
試験査察	平成9年3月12日	平成9年3月17日	平成9年3月17日
最終報告書	平成9年5月12日 平成9年6月30日	平成9年5月13日 平成9年6月30日	平成9年6月30日

本試験は適正に実施されており、本最終報告書は試験した方法、手順が正確に記録され、
かつ、試験の生データを正確に反映していることを認めます。

平成 9 年 6 月 30 日
住化テクノス株式会社
信頼性保証責任者



試験実施概要

1. 表題： 2,2'-アゾビス (2-メチルプロパニトリル) のヒメダカ (*Oryzias latipes*) に対する延長毒性試験－14日間
2. 試験目的： 2,2'-アゾビス (2-メチルプロパニトリル) について、ヒメダカ (*Oryzias latipes*) に対する延長毒性試験－14日間を行いヒメダカに対する致死、その他の観察される影響の閾値および最大無作用濃度 (NOEC) を求める。
3. 適用ガイドライン： 本試験は、OECD 化学品テストガイドライン No. 204「魚類延長毒性試験－14日間」 (1984年) に準拠して実施した。
4. 適用GLP： 本試験は環境庁の「生態影響試験実施に関する基準」に準拠した。
5. 試験委託者
名称： 環境庁
住所： 〒100 東京都千代田区霞が関1丁目2番2号
試験委託担当者： XXXXXXXXXX
6. 試験受託者：
名称： 住化テクノス株式会社
所在地： 〒665 兵庫県宝塚市高司4丁目2番1号
7. 試験施設：
名称： 住化テクノス株式会社
所在地： 〒665 兵庫県宝塚市高司4丁目2番1号

8. 試験関係者：

試験責任者



(平成 9 年 6 月 30 日)

試験担当者



(平成 9 年 6 月 30 日)

9. 試験期間： 試験開始日

平成 9 年 3 月 7 日

試験終了日

平成 9 年 6 月 30 日

暴露期間

平成 9 年 3 月 12 日～平成 9 年 3 月 26 日

10. 保管：

試験計画書、生データ、記録文書および試験報告書は、試験報告書作成後10年間、住化テクノス株式会社の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協議のうえ決定する。

目 次

	頁
要 旨	7
1. 被験物質	8
1.1 名称、構造式および物理化学的性状	8
1.2 供試試料	8
1.3 被験物質の確認および保管条件下での安定性	8
2. 供試生物	9
3. 試験方法	9
3.1 試験条件	9
3.2 希釈水	10
3.3 試験装置、試験容器および恒温槽等	10
3.4 試験濃度の設定	10
3.5 試験液の調製	10
3.6 試験液の分析	11
3.7 試験操作	11
4. 結果の算出	12
4.1 最小致死濃度、最小作用濃度、最大無作用濃度	12
4.2 半数致死濃度 (LC50) の算出	12
5. 結果および考察	12
5.1 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
5.2 試験液の被験物質濃度	12
5.3 最小致死濃度および最小作用濃度	12
5.4 半数致死濃度 (LC50)	13
5.5 毒性症状および摂餌状況	13
5.6 供試魚の体重および体長	13
5.7 最大無作用濃度	13
5.8 試験液の水温、溶存酸素濃度およびpH	13
Table 1～9	14～23
Figure 1	24
付属資料－1 希釈水の水質	25
付属資料－2 試験液の分析方法	27

要 旨

試験委託者

環境庁

表 題

2,2'-アゾビス (2-メチルプロパニトリル) のヒメダカ (*Oryzias latipes*) に対する延長毒性試験－14日間

試験番号

EFP96001

試験方法

本試験は、OECD 化学品テストガイドライン No. 204「魚類延長毒性試験－14日間」(1984年)に準拠して実施した。

- 1) 被験物質： 2,2'-アゾビス (2-メチルプロパニトリル)
- 2) 方式： 流水式 (定量ポンプを用いる連続希釈装置を使用)
- 3) 供試生物： ヒメダカ (*Oryzias latipes*)
- 4) 試験濃度： 対照区、助剤対照区 (助剤濃度:100mg/L)、1.0、1.8、3.2、5.6 および 10mg/L (濃度公比:1.8)
- 5) 暴露期間： 14日間
- 6) 試験液量： 5.0 L
- 7) 生物数： 10尾/試験区
- 8) 照明： 16時間明/8時間暗 (室内光)
- 9) エアレーション： なし
- 10) 温度： 24±2℃
- 11) 試験液中の被験物質の分析： HPLC法

結 果

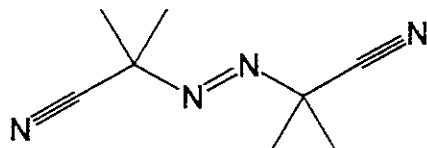
- 1) 14日間の最小致死濃度=10mg/L 以上
- 2) 14日間の最小作用濃度=10mg/L 以上
- 3) 14日間の最大無作用濃度 (NOEC) =10mg/L
- 4) 7日間の半数致死濃度 (LC50) =10mg/L 以上
- 5) 14日間の半数致死濃度 (LC50) =10mg/L 以上
(上記濃度は、全て設定値に基づく値)

1. 被験物質

1.1 名称、構造式および物理化学的性状

名 称： 2,2'-アゾビス (2-メチルプロパニトリル)
(CAS 番号：78-67-1、略称：AMP、識別番号：96E-3)

構造式：



分子式： $C_8H_{12}N_4$

分子量： 164.21

1.2 供試試料

購入先： XXXXXXXXXX

入手日： 平成 8 年 12 月 20 日

ロット番号： DLE7785

外 観： 白色結晶性粉末

純 度： 99.3%

1.3 被験物質の確認および保管条件下での安定性

被験物質は当社の冷蔵庫に保管した。

入手した被験物質について I R スペクトルを測定し、被験物質の構造と矛盾が認められないことを確認した。暴露終了後にも同様にスペクトルを測定し、暴露開始前に測定したスペクトルと比較した結果、スペクトルに変化は認められなかったことより被験物質は当社の冷蔵庫に保管中は安定であったと判断された。

2. 供試生物

試験に使用したヒメダカ (*Oryzias latipes*) を下記に示した。供試魚の体長（被鱗体長）は 2.0 ± 0.5 cm であった。

- 1) 一般名： ヒメダカ
- 2) 学名： *Oryzias latipes*
- 3) 被鱗体長： 2.1cm (2.0~2.3cm), n=10
- 4) 体重： 0.14g (0.10~0.21g), n=10
- 5) ロット番号： K-961113
- 6) 購入先： 滋賀県南郷水産センター
- 7) 購入日： 平成 8 年 11 月 13 日

馴化

試験条件と同条件（水質、温度等）で12日間以上、飼育馴化した。餌は市販のテトラミンステーブルフードを与えた。暴露開始の24時間前からは給餌しなかった。試験には健康で肉眼的に正常な個体を使用した。暴露開始前7日間の死亡率は5%未満であった。また、供試魚の基準物質（硫酸銅（Ⅱ）五水和物：試薬特級、Lot No. SKM2884、和光純薬工業（株））による急性毒性試験の結果、96時間 LC50は5.7mg/L であった。

3. 試験方法

3.1 試験条件

- 1) 方式： 流水式（定量ポンプを用いる連続希釈装置を使用、試験液交換率5.2回／日）
- 2) 暴露期間： 14日間
- 3) 連数： 1 試験区に付き 1 連
- 4) 生物数： 10尾／試験区
- 5) 試験液量： 5.0 L
- 6) 温度： $24 \pm 2^\circ\text{C}$
- 7) 照明： 16時間明／8時間暗（室内光）
- 8) 給餌： 市販のテトラミンステーブルフードを毎日、暴露開始時の魚体重の2%与えた（生存魚数によって調整）
- 9) エアレーション： なし

3.2 希釈水

脱塩素水（宝塚市水道水を活性炭処理し、残留塩素等を除去したもので、充分通気した）を使用した。希釈水の主な水質として、硬度が63.1mg/L（CaCO₃換算）、pHが8.1であった。

[付属資料－1]

3.3 試験装置、試験容器および恒温槽等

流水式試験装置：試験原液送液ポンプとしてシリンジ式微量定量注入ポンプ（JP-V-W 型 古江サイエンス㈱製）、希釈水送液ポンプとしてローラーポンプ（RP-MRF 型 古江サイエンス㈱製）を用い、双方の送液を混合槽（300mL 容ガラス製枝付三角フラスコ）中でスターラーを用いて攪拌し、所定濃度の試験液を得る装置を使用した。得られた試験液は試験水槽へ流入させ、サイホン管により排出した。

試験容器： 5.0L 容総ガラス製水槽（内寸約 21×16×23cm）

恒温槽： FRP製恒温槽（内寸 298.5×78.5×27.0cm、温水・冷水で水温制御）

水温計： 電子温度計（PC-2200 ㈱佐藤計量器製作所）

pH計： F-15（堀場製作所製）

溶存酸素計： 58型（YSI製）

3.4 試験濃度の設定

当被験物質のヒメダカに対する急性毒性試験の結果、96時間のLC50値が10mg/L*以上（住化テクノス報告番号：EFA96001）であったため、試験最高濃度を10mg/Lとした。また、最低濃度を1.0mg/Lに設定し、14日間の暴露期間中中毒症状が発現しないことが確保されるよう配慮した。濃度公比は1.8とし、1.0, 1.8, 3.2, 5.6および10mg/Lの5濃度を本試験濃度として採用した。

*最大助剤濃度(100mg/L)における、均一分散可能な当該被験物質の最大濃度

3.5 試験液の調製

試験液は流水式試験装置により、各試験濃度に対応する試験原液を希釈水で連続希釈することにより得た。

試験原液は濃度区毎に必要な量の被験物質を個別秤量し、これに溶解助剤としてジメチルホルムアミド（以下、助剤と略す）を加えてよく混和後、10L容密閉容器（テドラー®バッグ）中で希釈水と混和し、設定の10倍濃度の原液を10L調製した。各試験原液は、設定流量1.8mL/分で送液し（助剤対照区は、助剤のみの水溶液）、一方希釈水は設定流量16.2mL/分で送液し、所定濃度の試験液を調製した。対照区は、希釈水のみを18mL/分で送液した。

試験液中の助剤濃度は、全て100mg/Lとした。また、調製された試験原液および試験液に白濁や沈殿は認められなかった。試験原液は、2日～3日毎に交換した。

なお、暴露開始時の試験液は電子天秤を用いて被験物質を秤量し、これに助剤を添加しよく混和した後、希釈水で1000mLに定容し均一な試験原液を調製した。この原液を希釈水で適宜希釈し、設定濃度1.0, 1.8, 3.2, 5.6および10mg/Lの試験液を調製した。

3.6 試験液の分析

全試験区について暴露開始時(0日)、7日および14日に試験液を採取し、フィルター濾過後、HPLCにより分析した。試験液の分析に際しては、試料のピーク面積から絶対検量線法により定量した。詳細は付属資料-2に示した。なお、実際の物理化学的試験は側住化分析センターで実施した。

3.7 試験操作

暴露開始時に供試魚と同水槽で馴化した魚10尾の重量および被鱗体長を測定し、被鱗体長で 2.0 ± 0.5 cmであることを確認した。各試験区のpH、溶存酸素濃度、水温を測定後、試験水槽中に供試魚を1試験区当り10尾投入した。

暴露開始後、週3回各試験区の水温、pH、溶存酸素濃度を測定した。

暴露期間中、餌は一日あたり個体重量の2%を与えた。死亡により個体数が減少した場合は、その分給餌量を減らした。

暴露開始後、毎日死亡個体数および毒性症状の観察は、下記の定義に従って実施した。死亡個体を発見した場合水質の悪化が起こらないよう速やかに取り除いた。

暴露終了時には全ての生存魚の重量および被鱗体長を測定記録した。

一般的症例と定義

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。

摂餌量の低下： 対照区の魚と比較して餌の残しがあること。

死亡： 刺激を与えた場合に反応の認められないもの。

4. 結果の算出

4.1 最小致死濃度、最小作用濃度、最大無作用濃度

試験において被験物質の影響により死亡個体が観察された濃度区の最も低い濃度を最小致死濃度とした。

試験において供試魚に致死以外の他の作用も観察された濃度区の最も低い濃度を最小作用濃度とした。

致死やその他の作用が認められない最高試験濃度区を最大無作用濃度（NOEC）とした。

4.2 半数致死濃度（LC50）の算出

暴露7日および14日における半数致死濃度（LC50）は死亡数の関係により、統計手法（Binomial 法、Moving average 法および Probit 法）による算出はできなかった。

5. 結果および考察

5.1 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

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は特に認められなかった。

5.2 試験液の被験物質濃度

暴露開始時、7日後および14日後に試験液中の被験物質濃度を測定した。暴露期間中の平均被験物質濃度は1～1, 1.7, 3.2, 5.6および9.9mg/L（設定値は各々1.0, 1.8, 3.2, 5.6および10mg/L）であり、設定濃度に対する割合は94～100%であった。このため、以下の濃度は設定濃度で示す。

訂正

[Table 1(p.14), 付属資料-2]

5.3 最小致死濃度および最小作用濃度

暴露期間中10mg/L 区において暴露 9日目に 1尾死亡が認められたが、その前後供試魚に毒性症状が認められなかったことから、この死亡は被験物質の影響によらないと判断される。従って、被験物質の影響によると思われる死亡個体が観察された最も低い濃度（最小致死濃度）は均一分散可能な最大濃度10mg/L 以上と判断される。

試験において、供試魚に毒性症状は観察されなかった。このため、供試魚に致死以外の他の作用が観察された濃度区の最も低い濃度（最小作用濃度）は、均一分散可能な最大濃度 10mg/L 以上であった。

[Tables 2 & 4 (p.15 17 & 18), Figure 1 (p.24)]

5.4 半数致死濃度 (LC50)

7日および14日の半数致死濃度 (LC50) は、均一分散可能な最大濃度10mg/L 以上であった。

[Table 3 (p.16), Figure 1 (p.24)]

5.5 毒性症状および摂餌状況

均一分散可能な最大濃度 10mg/L においても、毒性症状および摂餌低下は認められなかった。

[Table 4 (p.17 & 18)]

5.6 供試魚の体重および体長

(2-メチルプロパニトリル) **訂正**
2,2'-アゾビス(2-メチルプロパニトリル)に14日間暴露したヒメダカの体重および体長は、いずれの濃度区においても対照区と比較して、有意な差は認められなかった ($\alpha=0.05$ 、統計的方法: Dunnett 1-side)。

[Tables 5 & 6 (p.19 & 20)]

5.7 最大無作用濃度

死亡率、毒性症状、摂餌状況および体重・体長は 10mg/L においても対照区と比較して差が認められなかった。このため、最大無作用濃度 (NOEC) は 10mg/L 以上と判断した。

[Tables 2, 4, 5 & 6 (p. 15, 17, 18, 19 & 20)]

5.8 試験液の水温、溶存酸素濃度およびpH

14日の暴露期間中の水温は23.4~24.1℃であり、基準 (24±2℃) を満たしていた。暴露期間中のpHは7.7~8.0であった。暴露期間中の溶存酸素濃度は7.1~8.0mg/L であり、すべての試験区において飽和溶存酸素濃度の60%以上であった (24.0℃の飽和溶存酸素濃度: 8.25mg/L)。

[Tables 7, 8 & 9 (p.21, 22 & 23)]

以上

Table 1. Measured Concentrations of 2,2'-Azobis(2-methylpropanitrile) during a 14-Day Exposure of Orange Killifish (*Oryzias latipes*) under Flow-Through Test Conditions

Nominal Concentration mg/L	Measured Concentration, mg/L (Percent of Nominal)			
	0 Day	7 Day	14 Day	Mean
Control	<1	<1	<1	---
Solvent Control	<1	<1	<1	---
1.0	<1 (-)	<1 (-)	1 (100)	<1, 1 (-, 100)
1.8	1.8 (99)	1.6 (91)	1.8 (98)	1.7 (96)
3.2	3.1 (97)	3.2 (99)	3.3 (100)	3.2 (99)
5.6	5.5 (98)	5.6 (99)	5.7 (100)	5.6 (100)
10	9.5 (95)	10 (100)	10 (100)	9.9 (99)

Table 2. Mortality of Orange Killifish (*Oryzias latipes*) Exposed to 2,2'-Azobis(2-methylpropanitrile) under Flow-Through Test Conditions

Nominal Concentration mg/L	Cumulative Number of Dead (Percent Mortality)						
	1 Day	2 Day	3 Day	4 Day	5 Day	6 Day	7 Day
Control	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Solvent Control	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
1.0	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
1.8	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
3.2	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
5.6	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
10	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)

Nominal Concentration mg/L	Cumulative Number of Dead (Percent Mortality)						
	8 Day	9 Day	10 Day	11 Day	12 Day	13 Day	14 Day
Control	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Solvent Control	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
1.0	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
1.8	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
3.2	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
5.6	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
10	0 ()	1 (10)	1 (10)	1 (10)	1 (10)	1 (10)	1 (10)

Table 3. Calculated LC50 Values for Orange Killifish (*Oryzias latipes*) Exposed to 2,2'-Azobis(2-methylpropanitrile) Based on Nominal Concentrations under Flow-Through Test Conditions

Exposure Period (Day)	LC50 (mg/L)	95-Percent Confidence Limits (mg/L)	Statistical Method
7	>10	---	---
14	>10	---	---

Table 4. Symptoms of Toxicity Observed in Orange Killifish (*Oryzias latipes*) Exposed to 2,2'-Azobis(2-methylpropanitrile) under Flow-Through Test Conditions

Nominal Concentration mg/L	Symptoms						
	1 Day	2 Day	3 Day	4 Day	5 Day	6 Day	7 Day
Control	A:10	A:10	A:10	A:10	A:10	A:10	A:10
Solvent Control	A:10	A:10	A:10	A:10	A:10	A:10	A:10
1.0	A:10	A:10	A:10	A:10	A:10	A:10	A:10
1.8	A:10	A:10	A:10	A:10	A:10	A:10	A:10
3.2	A:10	A:10	A:10	A:10	A:10	A:10	A:10
5.6	A:10	A:10	A:10	A:10	A:10	A:10	A:10
10	A:10	A:10	A:10	A:10	A:10	A:10	A:10

A: normal, B: abnormal respiration, C: abnormal swimming, D: inverted, E: feeding behavior (reduced)

Table 4. Symptoms of Toxicity Observed in Orange Killifish (*Oryzias latipes*) Exposed to 2,2'-Azobis(2-methylpropanitrile) under Flow-Through Test Conditions

Nominal Concentration mg/L	Symptoms						
	8 Day	9 Day	10 Day	11 Day	12 Day	13 Day	14 Day
Control	A:10	A:10	A:10	A:10	A:10	A:10	A:10
Solvent Control	A:10	A:10	A:10	A:10	A:10	A:10	A:10
1.0	A:10	A:10	A:10	A:10	A:10	A:10	A:10
1.8	A:10	A:10	A:10	A:10	A:10	A:10	A:10
3.2	A:10	A:10	A:10	A:10	A:10	A:10	A:10
5.6	A:10	A:10	A:10	A:10	A:10	A:10	A:10
10	A:10	A:9	A:9	A:9	A:9	A:9	A:9

A: normal, B: abnormal respiration, C: abnormal swimming, D: inverted, E: feeding behavior (reduced)

Table 5. Fish Weight (g)

No.	Nominal Concentration (mg/L)							before exp.
	Control	Solvent Control	1.0	1.8	3.2	5.6	10	
1	0.13	0.16	0.18	0.21	0.19	0.11	0.10	0.21
2	0.15	0.13	0.16	0.19	0.12	0.14	0.12	0.15
3	0.19	0.11	0.12	0.12	0.20	0.19	0.13	0.17
4	0.21	0.22	0.20	0.18	0.20	0.10	0.19	0.13
5	0.16	0.14	0.21	0.17	0.21	0.15	0.19	0.11
6	0.11	0.10	0.15	0.14	0.17	0.18	0.21	0.16
7	0.10	0.13	0.17	0.12	0.18	0.19	0.21	0.12
8	0.12	0.19	0.14	0.16	0.20	0.12	0.14	0.10
9	0.11	0.11	0.10	0.13	0.14	0.21	0.17	0.11
10	0.22	0.17	0.13	0.18	0.13	0.20	-	0.16
Mean	0.15	0.15	0.16	0.16	0.17	0.16	0.16	0.14
S. D.	0.04	0.04	0.04	0.03	0.03	0.04	0.04	0.03

Table 7. pH Values during a 14-Day Flow-Through Exposure of Orange Killifish (*Oryzias latipes*) to 2,2'-Azobis(2-methylpropanitrile)

Nominal Concentration mg/L	pH						
	0 Day	2 Day	5 Day	7 Day	9 Day	12 Day	14 Day
Control	7.8	8.0	7.7	7.9	7.8	7.7	7.8
Solvent Control	8.0	8.0	7.9	8.0	7.9	7.9	7.9
1.0	8.0	8.0	7.9	8.0	7.9	7.9	7.9
1.8	8.0	8.0	7.9	8.0	7.9	7.9	7.9
3.2	8.0	8.0	7.9	8.0	7.9	8.0	7.9
5.6	8.0	8.0	7.9	8.0	7.9	8.0	7.9
10	8.0	8.0	7.9	8.0	7.9	7.9	7.9

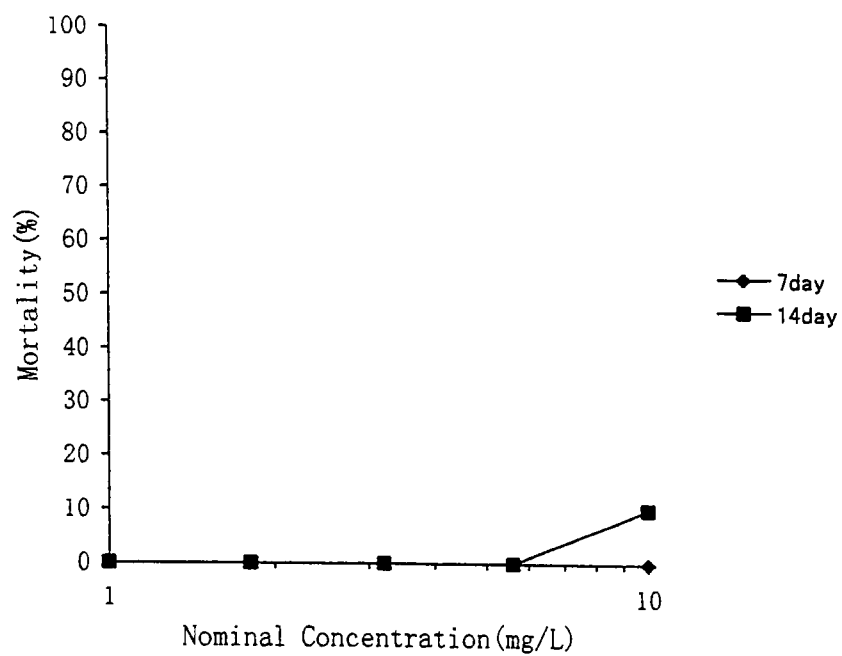
Table 8. Dissolved Oxygen Concentrations during a 14-Day Flow-Through Exposure of Orange Killifish (*Oryzias latipes*) to 2,2'-Azobis(2-methylpropanitrile)

Nominal Concentration mg/L	Dissolved Oxygen Concentration mg/L						
	0 Day	2 Day	5 Day	7 Day	9 Day	12 Day	14 Day
Control	7.9	7.6	7.1	7.1	7.1	7.2	7.3
Solvent Control	7.9	7.6	7.3	7.6	7.3	7.1	7.6
1.0	8.0	7.6	7.3	7.5	7.3	7.3	7.4
1.8	7.8	7.5	7.3	7.5	7.3	7.3	7.5
3.2	7.9	7.6	7.4	7.6	7.4	7.3	7.5
5.6	7.9	7.4	7.3	7.5	7.2	7.2	7.4
10	8.0	7.4	7.3	7.5	7.2	7.4	7.4

Table 9. Temperature Values during a 14-Day Flow-Through Exposure of Orange Killifish (*Oryzias latipes*) to 2,2'-Azobis(2-methylpropanitrile)

Nominal Concentration mg/L	Temperature, °C						
	0 Day	2 Day	5 Day	7 Day	10 Day	12 Day	14 Day
Control	23.7	23.4	23.6	23.4	23.5	23.7	23.6
Solvent Control	23.7	23.4	23.6	23.5	23.5	23.6	23.6
1.0	24.1	23.4	23.6	23.7	23.6	23.7	23.6
1.8	24.0	23.6	23.7	24.0	23.5	23.6	23.5
3.2	23.9	23.5	23.7	23.8	23.7	23.6	23.5
5.6	24.0	23.6	23.7	23.7	23.6	23.6	23.5
10	24.1	23.7	23.7	23.8	23.6	23.5	23.5

Figure 1. Concentration-Response Curve of 2,2'-Azobis(2-methylpropanitrile) Mortality in Orange Killifish (*Oryzias latipes*)



付属資料－ 1

希积水の水質

(全 1 頁)

Water Quality of Dilution Water

Parameter	Concentration
COD	<1 mg/L
Phosphorus	0.01 mg/L
pH	8.1 (15.0°C)
E. coli	N. D.
Total mercury	<0.0005 mg/L
Copper	<0.01 mg/L
Cadmium	<0.001 mg/L
Zinc	<0.01 mg/L
Lead	<0.005 mg/L
Aluminum	<0.02 mg/L
Nickel	<0.02 mg/L
Total chromium	<0.02 mg/L
Soluble manganese	<0.005 mg/L
Tin	<0.03 mg/L
Soluble iron	<0.03 mg/L
Cyanide	N. D (<0.01 mg/L)
Free chlorine	0.01 mg/L
Bromide ion	0.5 mg/L
Fluoride	0.29 mg/L
Sulfide ion	<0.1 mg/L
Ammonium ion	<0.1 mg/L
Arsenic	<0.001 mg/L
Selenium	<0.001 mg/L
Evaporated residue	230 mg/L
Electro conductivity	38 mS/m
Total hardness	63.1 mg/L
M-alkalinity	59 mg/L
Sodium	54 mg/L
Potassium	3.6 mg/L
Calcium	6.6 mg/L
Magnesium	3.9 mg/L
Total chlorinated pesticides	<0.001 mg/L
Total organophosphorus pesticides	<0.001 mg/L
PCB	<0.0005 mg/L

Date: Nov. 8, 1996

付属資料－ 2

試験液の分析方法

(全 18 頁)

試験結果報告書

表題: 2,2'-アゾビス(2-メチルプロパニトリル)のヒメダカ (*Oryzias latipes*) に対する延長毒性試験 - 14日間 (物理・化学系)

(試験番号: EFP96001)

1997年3月28日

運営管理者

大阪事業所 所長

株式会社 住化分析センター
大阪事業所

ESOP/REC/011 RS-01

陳 述 書

試験委託者 :

名 称 住化テクノス株式会社
住 所 兵庫県宝塚市高司4丁目2番1号

試験の表題 : 2,2'-77°ビス(2-メチル°ロハ°ニトリル)のヒメダカ (*Oryzias latipes*) に対する
延長毒性試験ー14日間 (物理・化学系)

試験番号 : EFP96001

上記試験は、環境庁の「生態影響試験実施に関する基準」に従って実施したものであり、
提出した資料は原本と相違ありません。

1997 年 3 月 28 日

(所属)

株式会社 住化分析センター
大阪事業所 所長

(氏名)

運営管理者

監査・査察報告書 (951025)

試験の表題: 2,2'-アゾビス(2-メチルプロピリル)のヒメダカ (*Oryzias latipes*) に対する
延長毒性試験-14日間 (物理・化学系)

試験番号: EFP96001

本最終報告書の試験は、当施設の信頼性保証部門に関する標準操作手順書に従って
下記の監査・査察を受けている。

QAU 監査・査察日	運営管理者および 試験責任者への報告日	監査・査察 項目
1997年 3月10日	1997年 3月10日	試験計画書
1997年 3月11日	1997年 3月11日	試験操作
1997年 3月12日	1997年 3月12日	試験操作
1997年 3月27日	1997年 3月27日	最終報告書 (草稿)
1997年 3月28日	1997年 3月28日	最終報告書

本試験は適正に実施されており、本最終報告書は試験で使用した方法、手順が正確
に記録され、かつ試験の生データを正確に反映していることを認めます。

1997年 3月28日

株式会社 住化分析センター 大阪事業所

QA責任者

ESOP/QAU/001 RS-11

試験番号：EFP96001

表題： 2,2'-アゾビス(2-メチルプロピオン)のヒメダカ (*Oryzias latipes*) に対する延長毒性試験－14日間 (物理・化学系)

試験委託者

名 称 住化テクノス株式会社
住 所 兵庫県宝塚市高司4丁目2番1号

試験期間

自： 1997年 3 月 0 日
至： 1997年 3 月 28 日

試験施設

名 称 株式会社 住化分析センター 大阪事業所
住 所 〒665 兵庫県宝塚市高司4丁目2番1号

試験責任者

  1997 年 3 月 28 日

試験担当責任者

  1997 年 3 月 28 日

試験担当者

  1997 年 3 月 28 日

最終報告書作成者

  1997 年 3 月 28 日

運営管理者

  1997 年 3 月 28 日

目 次

1. 要約
2. 緒言
3. 試験物質、試薬および装置
4. 試験の実施
 - (1) 用いた試験方法
 - (2) 試験装置
 - (3) 試験液の分析
5. 試験結果
 - (1) 添加回収試験結果
 - (2) 試験液測定結果
6. 試験成績の信頼性に及ぼしたと思われる環境要因
7. SOPまたは試験計画書からの逸脱
8. 資料の保管
9. 添付資料

1. 要約

生態影響試験「2,2'-アゾビス (2-メチルプロパニトリル) のヒメダカに対する延長毒性試験—14日間 (試験番号: EFP96001)」時の試験液 (試料) 中の被験物質濃度を測定した。

2. 緒言

試料中の被験物質濃度を高速液体クロマトグラフにて測定した。

3. 試験物質、試薬および装置

2,2'-アゾビス (2-メチルプロパニトリル) 標準品:

より提供された純度既知の被験物質

Lot. No. : DLE7785

純 度 : 99.3%

アセトニトリル:	高速液体クロマトグラフ用	関東化学株式会社製
蒸留水:	高速液体クロマトグラフ用	関東化学株式会社製
フィルター:	DISMIC-13HP (PTFE 0.45 μ m)	ADVANTEC
高速液体クロマトグラフ用ポンプ:	LC-5A	株式会社島津製作所製
紫外分光光度計検出器:	SPD-6A	株式会社島津製作所製
自動注入装置:	KMT-60A-II型	株式会社協和精密製作所製
データ処理装置:	C-R4	株式会社島津製作所製
天秤:	AT-250	メトラー社製

4. 試験の実施

(1) 用いた試験方法

試験液をフィルターに通し、高速液体クロマトグラフにて定量した。

(2) 試験装置

高速液体クロマトグラフ操作条件

カラム: Sumipax ODS A-212
(粒径 5 μ m, 内径 6 mm, 長さ 15 cm)
移動相: アセトニトリル/水 = 2/3 (V/V)
カラム温度: 室温
流量: 1.0 mL/min
保持時間: 約 12.5 分
測定波長: 205 nm
注入量: 50 μ L

(3) 試験液の分析

1) 検量線の作成

2,2'-アゾビス(2-メチルプロパニトリル)標準品約 30 mg を精密に秤り取り 30 mL 容メスフラスコに入れ、アセトニリルを加えて溶かし、定容とした。この液より一定量を採取し、蒸留水で希釈し、約 1, 5, 10, 20 mg/L の標準溶液を調製した。

4. (2) の条件に調整した高速液体クロマトグラフに注入し、それぞれの標準溶液のピーク面積と標準品の重量から検量線を作成し、最小自乗法により回帰直線式を求めた。

なお、検量線のバラツキの許容範囲は相関係数が、0.95 以上であることとした。

2) 試料の分析

a. 試料は、15 mL 容遠沈管に満たした状態で試験委託者より受け取った。

b. a. を被験物質の濃度が 1~20 mg/L になるように蒸留水で希釈し、フィルターに通したのち、4. (2) の測定条件にて絶対検量線法で濃度を求めた。

感度確認のため、測定終了後に標準溶液を注入し、感度変化のないことを確認した。

3) 検出限界

検出限界 = 1 mg/L

5. 試験結果

(1) 添加回収試験結果

検出限界の 10 倍濃度 (10 mg/L) における回収試験を行ったところ、以下の結果が得られた。なお、変動係数は 10 % 以内であった。

設定濃度 mg/L	回収率 %	平均回収率 %
10.08	99.16	96.94
	97.85	
	93.82	

(2) 試験液測定結果

設定濃度 mg/L	測定値 mg/L		
	0 日	7 日	14 日
対照区	<1	<1	<1
助剤対照区	<1	<1	<1
1.0	<1	<1	1.038
1.8	1.778	1.632	1.770
3.2	3.098	3.156	3.287
5.6	5.491	5.565	5.713
10	9.517	10.11	10.12

6. 試験成績の信頼性に及ぼしたと思われる環境要因

試験成績の信頼性に及ぼしたと思われる環境要因は特に認められなかった。

7. SOPまたは試験計画書からの逸脱

SOPまたは試験計画書からの逸脱は特に認められなかった。

8. 資料の保管

試験計画書、生データ、資料、最終報告書は、試験報告書作成後10年間、当社施設の資料保管室に保管する。その後の保管については試験委託者と協議のうえ決定する。

9. 添付資料

検量線

標準溶液のクロマトグラム

試料のクロマトグラム

Figure 1 Typical Calibration Curve of 2,2'-Azobis(2-methylpropanitrile)
by HPLC Analysis

Input Data

No.	Weight (n g)	Peak Area ($\mu v \cdot sec$)
1	50.20	4109
2	251.0	21944
3	502.0	44354
4	1004	88805

$$Y(\text{Peak Area}) = -321.0 + 88.81 X (\text{Weight})$$

$$r = 1.000$$

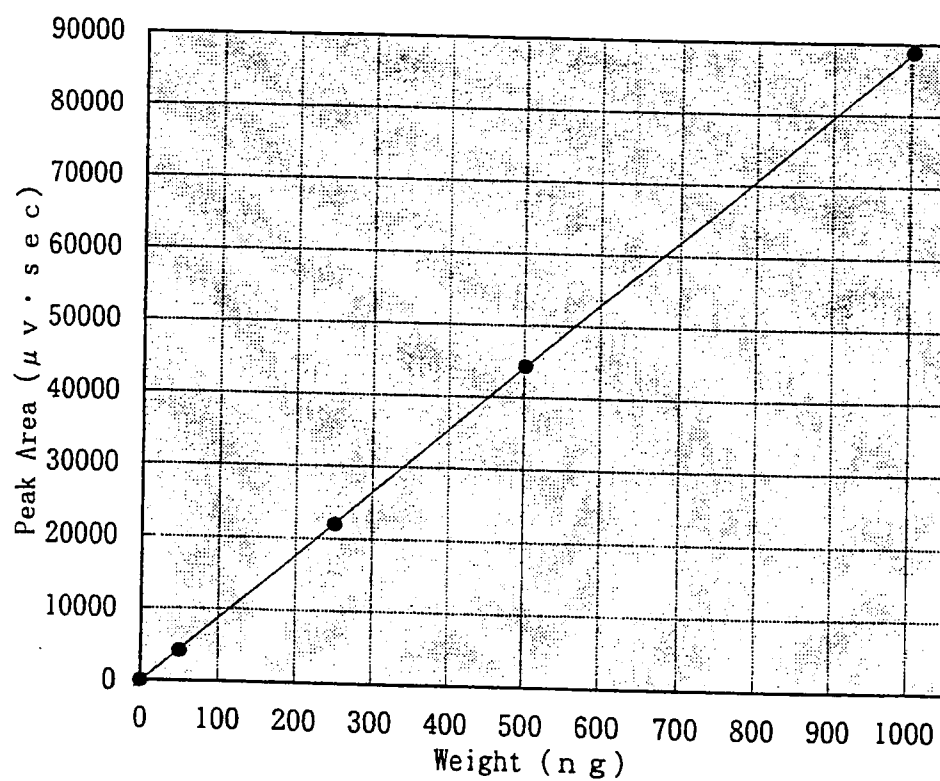


Figure 2 Representative Chromatograms

(1) Standard 10.04 mg/L

CHROMATOPAC C-R4A CH=1 REPORT No.=14 クロマト=2:970312.C03 97/03/12 15:44:45

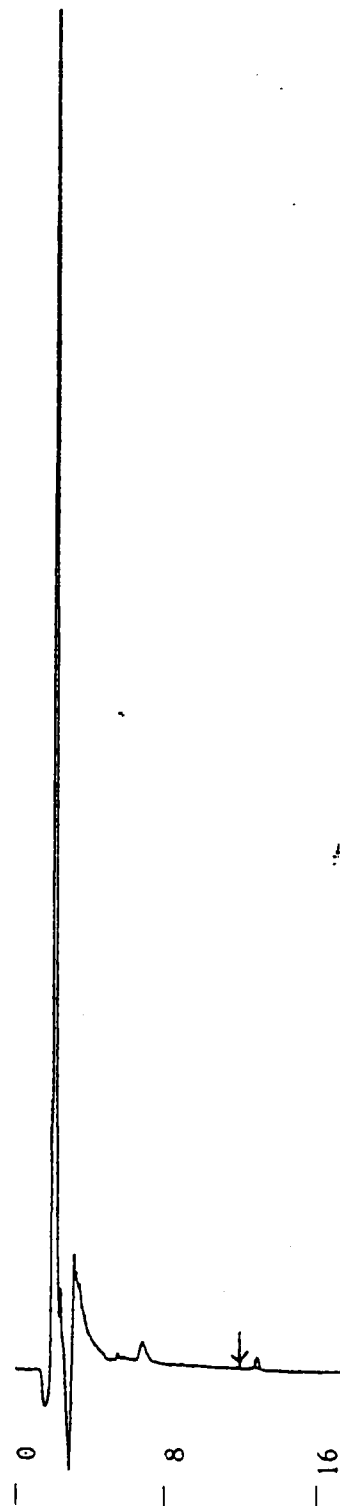


** 定量計算結果 **

CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	1	12.202	44354	3087			100	
TOTAL			44354	3087			100	

(2) Control; Day 0

CHROMATOPAC C-R4A CH=1 REPORT No.=16 クロマト=2:970312.C05 97/03/12 16:25:40



** 定量計算結果 **

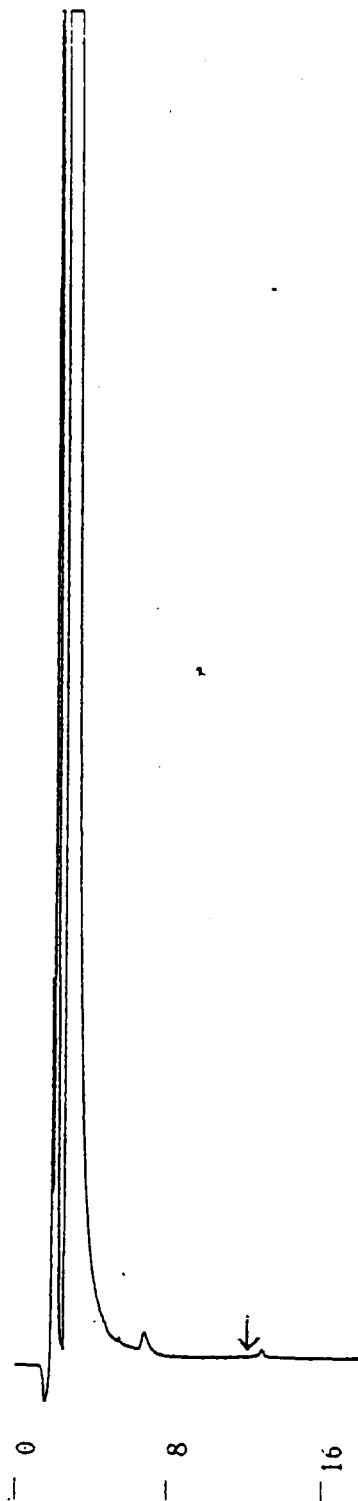
CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	1	12.947	781	63			100	
TOTAL			781	63			100	

Figure 2 Continued

(3) Solvent Control; Day 0

(4) 1.0mg/L nominal; Day 0

CHROMATOPAC C-R4A CH=1 REPORT No.=17 クロマト=2:970312.C06 97/03/12 16:46:07

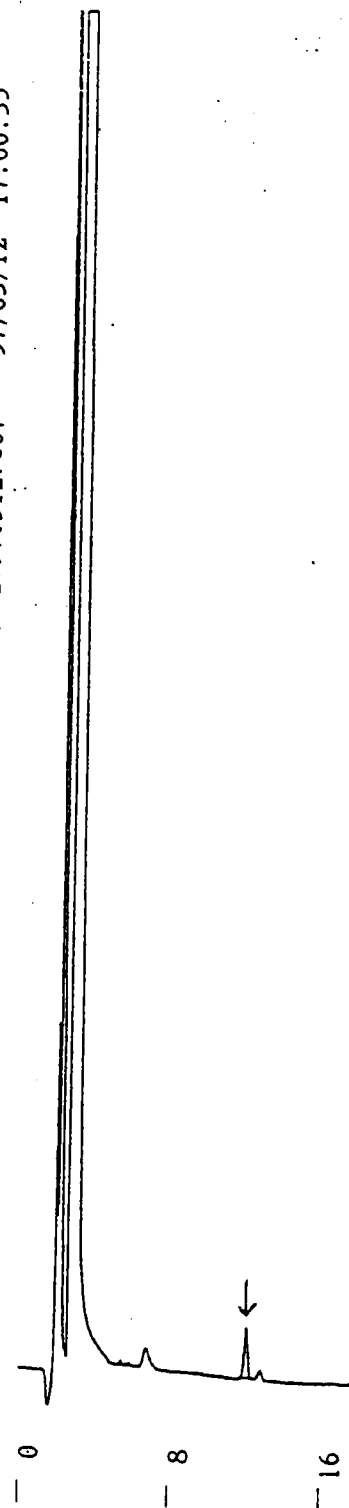


** 定量計算結果 ** 注意 17-有 CALERROR: 1

CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
			0	0			0	

TOTAL

CHROMATOPAC C-R4A CH=1 REPORT No.=18 クロマト=2:970312.C07 97/03/12 17:06:35



** 定量計算結果 **

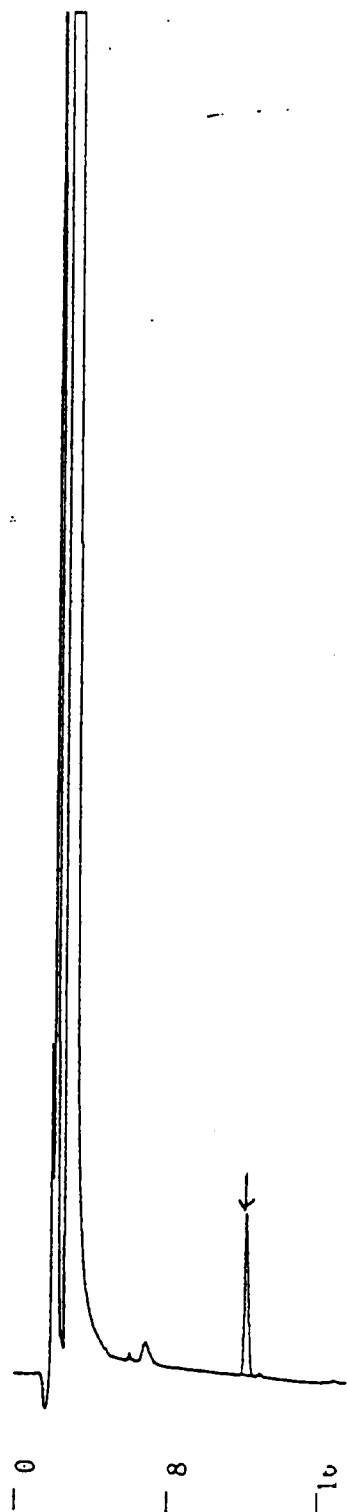
CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	1	12.101	4113	295			100	

TOTAL

(5) 3.2 mg/L nominal; Day 0

(6) 10mg/L nominal; Day 0

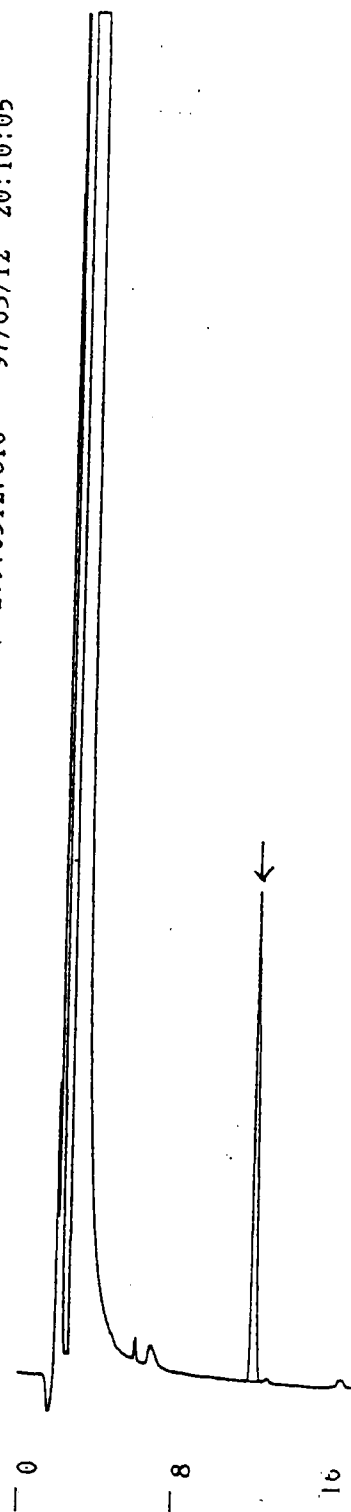
CHROMATOPAC G-R4A CH=1 REPORT No.=25 クロマト=2:970312.C14 97/03/12 19:29:10



** 定量計算結果 **

CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	1	12.246	13434	947			100	
TOTAL			13434	947			100	

CHROMATOPAC C-R4A CH=1 REPORT No.=27 クロマト=2:970312.C16 97/03/12 20:10:05



** 定量計算結果 **

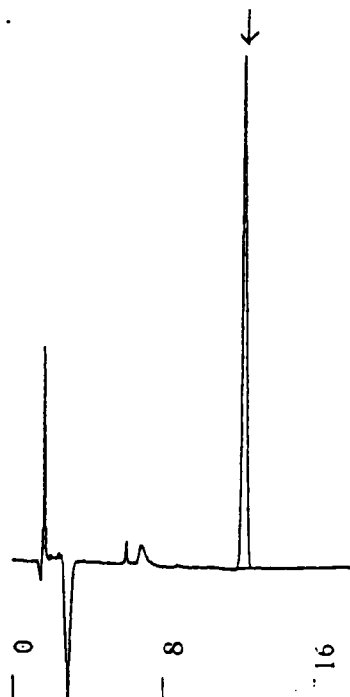
CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	1	12.309	41938	2885			100	
TOTAL			41938	2885			100	

Figure 2 Continued

(7) Standard 10.04 mg/L

(8) Control; Day 7

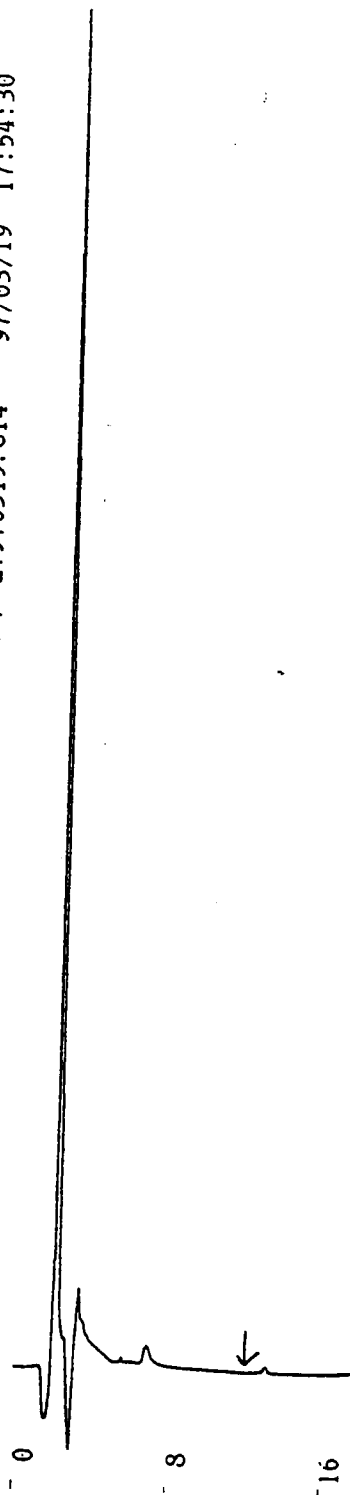
CHROMATOPAC C-R4A CH=1 REPORT No.=99 クロマト=2:970319.C12 97/03/19 17:13:36



** 定量計算結果 **

CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	1	12.278	44203	3026			100	
TOTAL			44203	3026			100	

CHROMATOPAC C-R4A CH=1 REPORT No.=101 クロマト=2:970319.C14 97/03/19 17:54:30



** 定量計算結果 **

注意: 17-有 CALERROR: 1

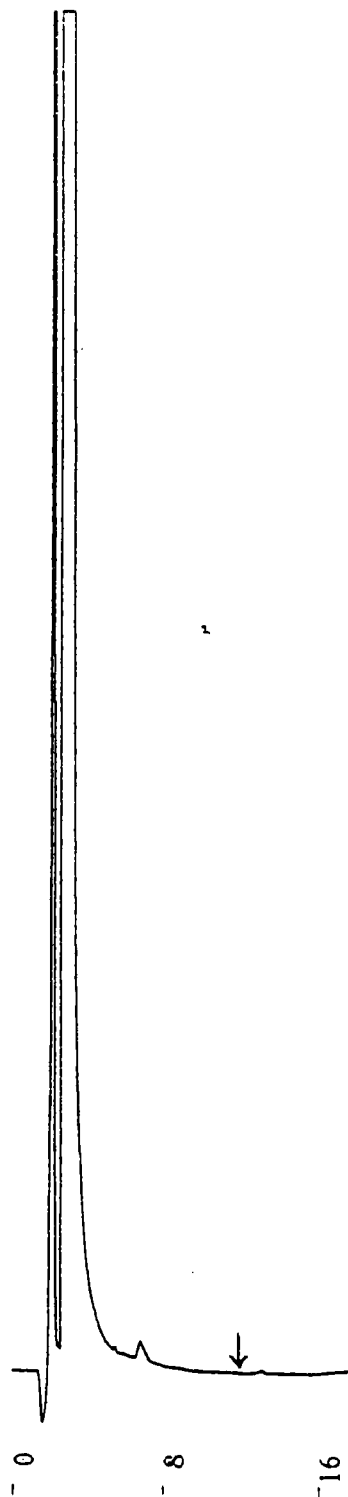
CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	1	12.278	0	0			0	
TOTAL			0	0			0	

Figure 2 Continued

(9) Solvent Control; Day 7

(10) 1.0mg/L nominal; Day 7

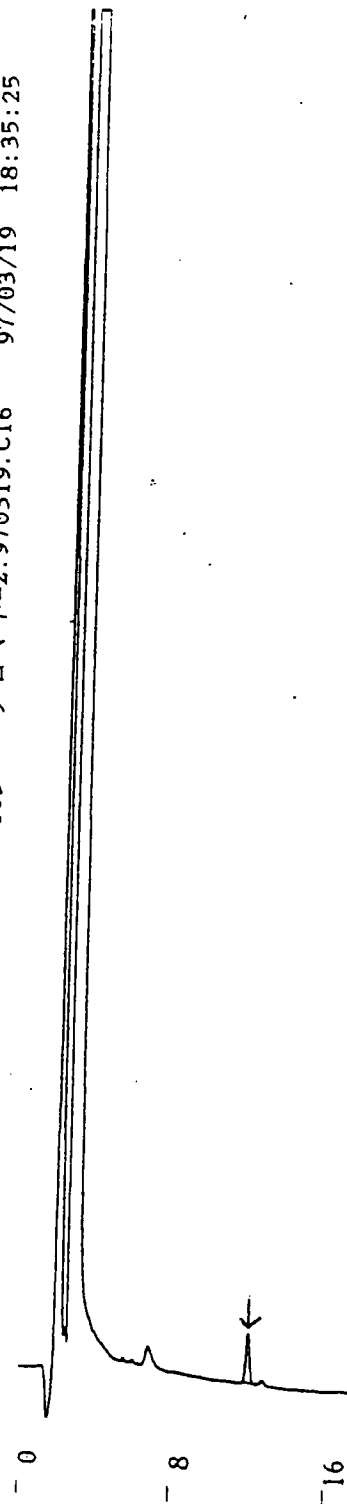
CHROMATOPAC C-R4A CH=1 REPORT No.=102 クロマト=2:970319.C15 97/03/19 18:14:58



** 定量計算結果 ** 注意 17-有 CALERROR: 1

CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
TOTAL			0	0			0	

CHROMATOPAC C-R4A CH=1 REPORT No.=103 クロマト=2:970319.C16 97/03/19 18:35:25

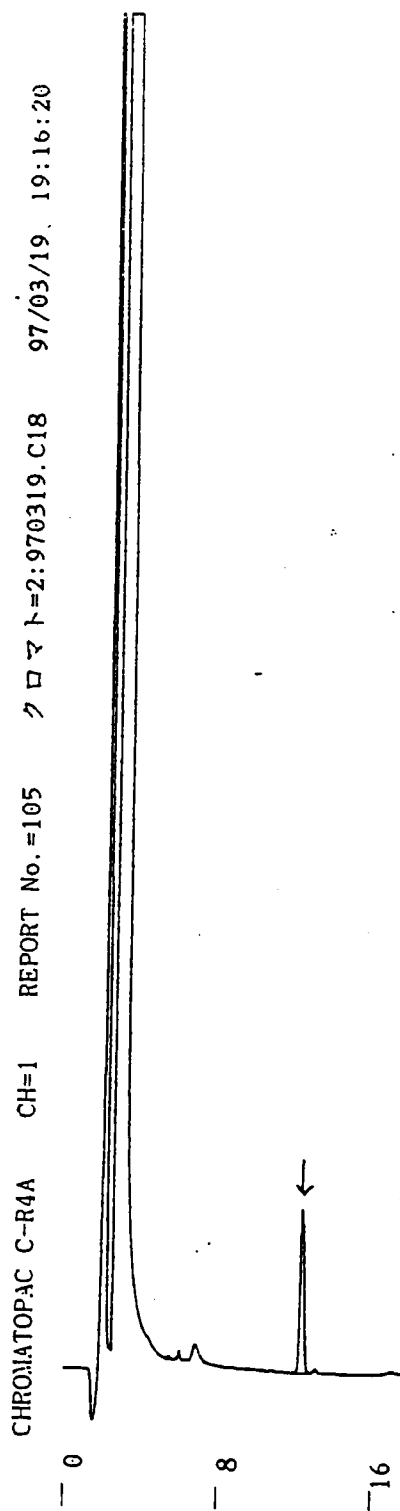


** 定量計算結果 **

CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	1	12.091	3942	290			100	
TOTAL			3942	290			100	

Figure 2 Continued

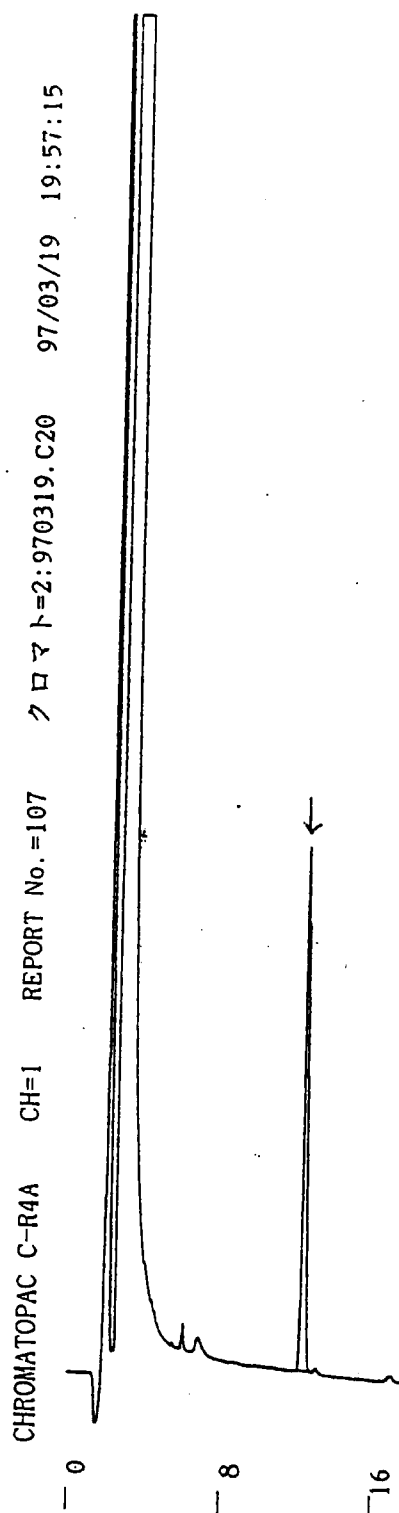
(11) 3.2mg/L nominal; Day 7



** 定量計算結果 **

CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	1	12.344	13910	959			100	
TOTAL			13910	959			100	

(12) 10mg/L nominal; Day 7



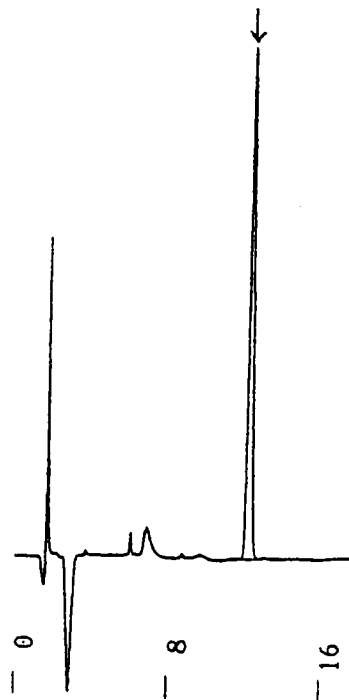
** 定量計算結果 **

CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	1	12.333	44620	3079			100	
TOTAL			44620	3079			100	

Figure 2 Continued

(13) Standard 10.06 mg/L

CHROMATOPAC C-R4A CH=1 REPORT No.=146 クロマト=2:970326.C04 97/03/26 11:18:00

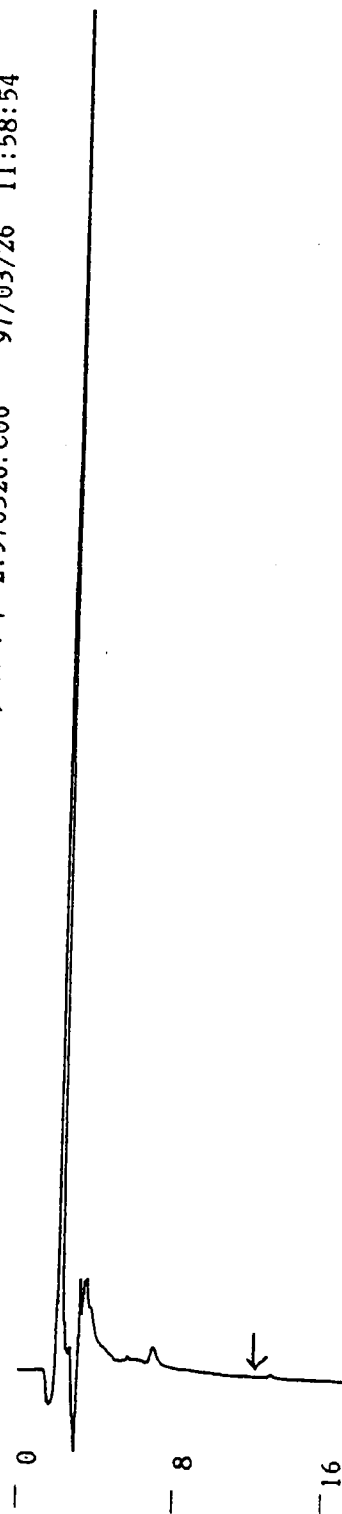


** 定量計算結果 **

CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	1	12.277	43478	3006			100	
TOTAL			43478	3006			100	

(14) Control; Day 14

CHROMATOPAC C-R4A CH=1 REPORT No.=148 クロマト=2:970326.C06 97/03/26 11:58:54



** 定量計算結果 ** 注意: 1.7-有 CALERROR: 1

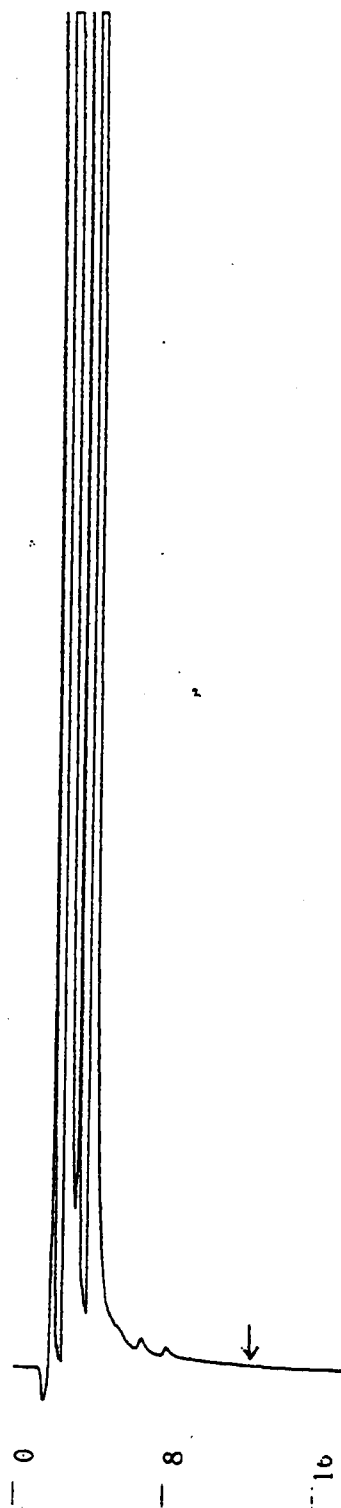
CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
			0	0			0	
TOTAL			0	0			0	

Figure 2 Continued

(15) Solvent Control; Day 14

(16) 1.0 mg/L nominal; Day 14

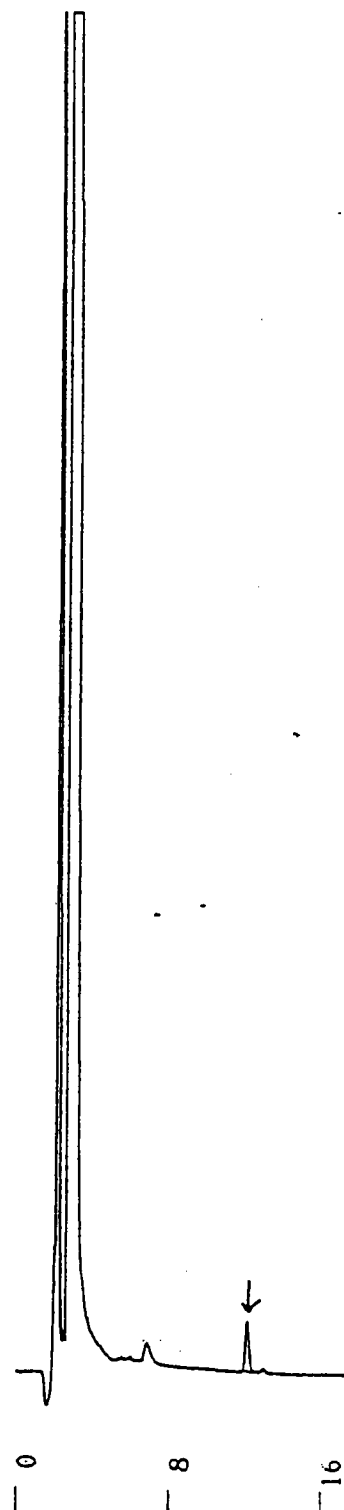
CHROMATOPAC C-R4A CH=1 REPORT No.=149 クロマト=2:970326.C07 97/03/26 12:19:24



** 定量計算結果 ** 注意 17-有 CALERROR: 1

CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
			0	0			0	
TOTAL								

CHROMATOPAC C-R4A CH=1 REPORT No.=150 クロマト=2:970326.C08 97/03/26 12:39:51



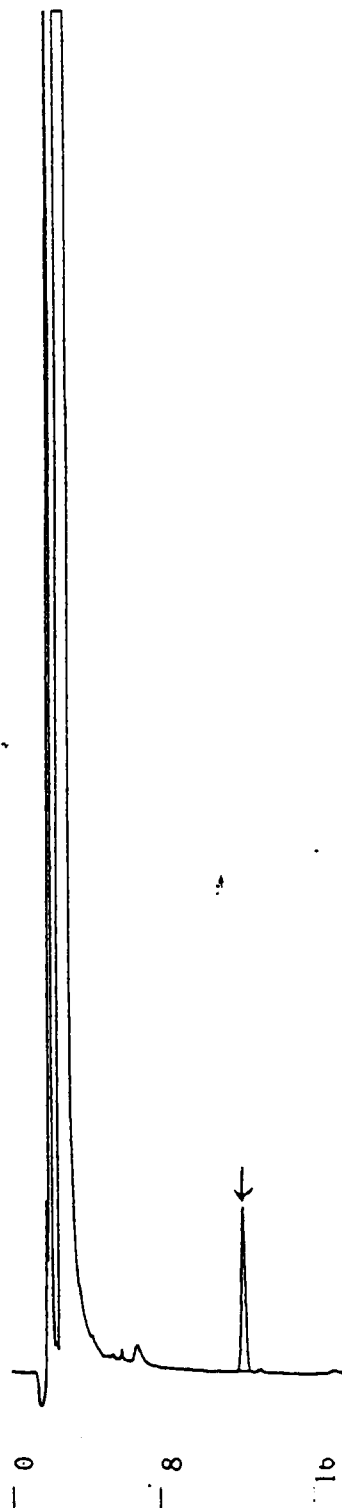
** 定量計算結果 **

CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	1	12.169	4122	291			100	
TOTAL			4122	291			100	

Figure 2 Continued

(17) 3.2 mg/L nominal; Day 14

CHROMATOPAC C-R4A CH=1 REPORT No.=152 クロマト=2:970326.C10 97/03/26 13:20:46

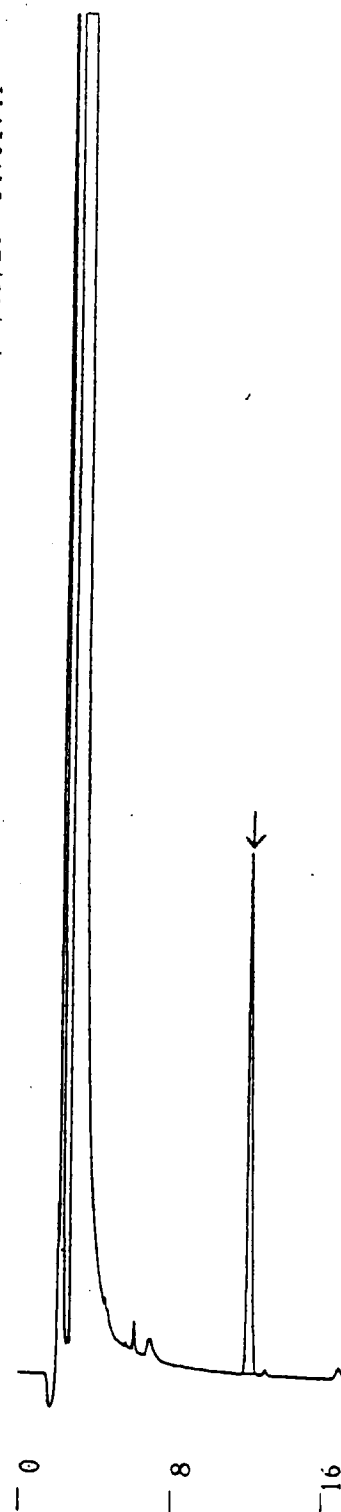


** 定量計算結果 **

CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	1	12.405	13985	967			100	
TOTAL			13985	967			100	

(18) 10 mg/L nominal; Day 14

CHROMATOPAC C-R4A CH=1 REPORT No.=154 クロマト=2:970326.C12 97/03/26 14:01:41



** 定量計算結果 **

CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	1	12.169	43933	3057			100	
TOTAL			43933	3057			100	