

環境省殿

## 最 終 報 告 書

2,3-ジメチルアニリンのヒメダカ (*Oryzias latipes*) に対する急性毒性試験

(試験番号：第15044号)

2004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：2,3-ジメチルアニリンのヒメダカ (*Oryzias latipes*) に対する急性毒性試験
2. 試験目的：2,3-ジメチルアニリンのヒメダカ (*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 (LC<sub>50</sub>) 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 環境生物安全課  
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]

分析系

所 属：応用試験部 農薬試験課  
氏 名：[REDACTED]

11. 試験日程

試験開始日：2003年12月1日

実験開始日：2004年2月23日

実験終了日：2004年2月27日

試験終了日：2004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 環境生物安全課

氏 名：   2004年 3月 31日 承認

## 目次

	頁
要 旨	6
1 被験物質	7
1.1 名称, 構造式及び物理化学的性状	7
1.2 供試試料	7
1.3 保管方法及び保管条件下での安定性	8
2 供試生物	8
3 試験方法	9
3.1 試験条件	9
3.2 希釈水	9
3.3 試験容器及び恒温槽等	9
3.4 試験濃度の設定	9
3.5 試験液の調製	10
3.6 試験液の分析	10
3.7 試験操作	10
4 結果の算出	10
4.1 結果の算出に用いた試験濃度の決定	10
4.2 半数致死濃度 (LC <sub>50</sub> ) の算出	11
4.3 0 %死亡最高濃度及び 100 %死亡最低濃度	11
5 結果及び考察	11
5.1 試験液中の被験物質濃度	11
5.2 試験液の状態	11
5.3 半数致死濃度 (LC <sub>50</sub> )	11
5.4 0 %死亡最高濃度及び 100 %死亡最低濃度	11
5.5 毒性症状	12
5.6 試験液の水温, 溶存酸素濃度及び pH	12
5.7 試験計画書からの逸脱事項	12
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	12
5.9 試験の妥当性	12
5.10 結果の評価と考察	12
Table 1~8	13~17
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 試験液中の被験物質濃度の分析方法	20~24

## 要 旨

### 試験委託者

環境省

### 表 題

2,3-ジメチルアニリンのヒメダカ (*Oryzias latipes*) に対する急性毒性試験

### 試験番号

第15044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：2,3-ジメチルアニリン
- 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, 通気対照区, 10, 13, 18, 24, 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：23.0～24.8℃
- 10) 溶存酸素濃度：7.6～9.5 mg/l (溶存酸素濃度の維持が困難であったため, 暴露期間中エアレーションを行った。[通気量：約 15 ml/分])
- 11) pH : 7.5～8.0 (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：高速液体クロマトグラフ法

### 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 ( $LC_{50}$ )：94 mg/l 以上
- 2) 0 % 死亡最高濃度：71 mg/l
- 3) 100 % 死亡最低濃度：94 mg/l 以上

## 1 被験物質

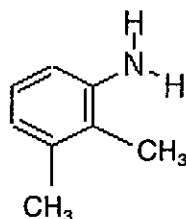
### 1.1 名称, 構造式及び物理化学的性状

名称: 2,3-ジメチルアニリン

別名: o-キシリジン<sup>1)</sup>, 2,3-キシリジン<sup>1)</sup>, 2,3-ジメチルフェニルアミン<sup>1)</sup>  
2,3-アミノジメチルベンゼン<sup>1)</sup>

CAS No.: 87-59-2

構造式:



分子式:  $C_8H_{11}N$

分子量: 121.2<sup>1)</sup>

沸点: 221~222 °C<sup>2)</sup>

融点: 2.5 °C<sup>1)</sup>, <-15 °C<sup>2)</sup>

水溶解度: 微溶<sup>1)</sup>, 水に難溶<sup>2)</sup>

比重: —

pKa: —

logPow: 2.21<sup>1)</sup>

蒸気圧: 0.1 mmHg (25 °C)<sup>1)</sup>

その他: 難分解性<sup>2)</sup>

出典:

1) 浦野 紘平: "PRTR・MSDS対象化学物質の毒性ランクと物性情報", 第1版, 496 (2001)  
化学工業日報社

2) [REDACTED]

### 1.2 供試試料

純度: 99.2 %

ロット番号: SEE4863

供給者: [REDACTED]

受領量: 25 ml×4本

受領日: 2003年11月28日

外観: 暗赤色澄明の液体

### 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) 被験体長：2.3 cm (2.1~2.4 cm), n=10

#### 4) 体 重：0.08 g (0.07~0.08 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(LC<sub>50</sub>)は0.66 mg/l(2003年11月10日)であった。当センターにおける1995年11月以降のLC<sub>50</sub>値のバックグラウンドデータ(0.76±0.22 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24日間(2004年1月30日~2月23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：90 l容角形ガラス製水槽

#### ④ 水 温：24.6~24.8℃

#### 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：体重の約3.5%/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：23.0～24.8℃
- 7) 溶存酸素濃度：7.6～9.5 mg/l (溶存酸素濃度の維持が困難であったため、暴露期間中エアレーションを行った。[通気量：約15 ml/分])
- 8) pH : 7.5～8.0 (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69 mg/l (CaCO<sub>3</sub>換算)、pHは7.8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-210[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30 %死亡し、10 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9濃度区(10, 13, 18, 24, 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、調製前に恒温室内で $24\pm 1$ ℃にした。

被験物質を超音波処理により希釈水に溶解させ被験物質原液及び溶液を調製した。

この被験物質原液及び溶液を希釈水に添加して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と、エアレーションを行なった通気対照区を設けた。

なお、被験物質は純度が 99.2%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、被験物質原液及び溶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、高速液体クロマトグラフを用いて、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、試験液換水前も同様に採取した。

なお、分析方法は付属資料-3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 尾の体重及び被験体長を測定した。

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<sup>\*</sup>。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。

#### <sup>\*</sup>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

最高試験濃度区 (100 mg/l) において、累積死亡率が50 %未満であったため、 $LC_{50}$ の算出は行わなかった。

#### 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。

### 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9.5~95.7 mg/l, 9.3~93.1 mg/l (設定濃度: 10~100 mg/l) であり、設定濃度に対する割合は、暴露開始時が95~99 %, 24時間後の換水前が93~95 %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10 mg/l で9.4 mg/l, 13 mg/l で12.6 mg/l, 18 mg/l で17.5 mg/l, 24 mg/l で23.0 mg/l, 32 mg/l で30.6 mg/l, 42 mg/l で39.9 mg/l, 56 mg/l で53.0 mg/l, 75 mg/l で71.4 mg/l 及び100 mg/l で94.4 mg/l であり、測定濃度は設定濃度の $\pm 20$  %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。

96時間後の各濃度区の死亡率は対照区, 通気対照区, 9.4 mg/l, 12.6 mg/l, 17.5 mg/l, 23.0 mg/l, 30.6 mg/l, 39.9 mg/l, 53.0 mg/l 及び71.4 mg/l で0 %, 94.4 mg/l で20 %であった。

以上のことから、以下の結果を得た。

96時間  $LC_{50}$ : 94 mg/l 以上

#### 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: 71 mg/l

96時間後の 100 %死亡最低濃度: 94 mg/l 以上

#### 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、通気対照区、9.4 mg/l、12.6 mg/l 及び 17.5 mg/l では観察されなかったが、23.0 mg/l、30.6 mg/l、39.9 mg/l 及び 53.0 mg/l で不活発及び水面浮上、71.4 mg/l で体色の変化、不活発及び水面浮上、94.4 mg/l で異常遊泳、不活発、水面浮上及び横転が観察された。

#### 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 23.0～24.8 °C、溶存酸素濃度は 7.6～9.5 mg/l、pH は 7.5～8.0 であり、水温は  $24 \pm 1$  °C、溶存酸素濃度は飽和濃度の 60 % 以上、pH は 6.0～8.5 の範囲で試験環境条件を満たしていた。

#### 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。

本試験は 24 mg/l から最高試験濃度区 (100 mg/l) における広い範囲で暴露期間中に毒性の徴候等が認められたが、最高試験濃度区で半数致死濃度に至らなかったことから、被験物質の試験生物に対する急性毒性的な影響は、比較的弱いものであり、死亡に至る影響には長期的な暴露期間が必要となると推察された。

本被験物質は水溶解度が高く、難分解性物質であることから、自然環境中に流出した場合には、水系への拡散が早く、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。したがって、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 <sup>a</sup> Measured Concentration (mg/l)
	0 Hour (New)	Percent of Nominal	24 Hours (Old)	Percent of Nominal	
Control	< 0.5	—	< 0.5	—	—
Aeration Control	< 0.5	—	< 0.5	—	—
10	9.5	95	9.3	93	9.4
13	12.8	98	12.3	95	12.6
18	17.8	99	17.1	95	17.5
24	23.2	97	22.8	95	23.0
32	31.3	98	29.8	93	30.6
42	40.7	97	39.1	93	39.9
56	53.7	96	52.3	93	53.0
75	72.7	97	70.0	93	71.4
100	95.7	96	93.1	93	94.4

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 <sup>a</sup> 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)
Aeration Control	—	0 ( 0)	0 ( 0)	0 ( 0)	0 ( 0)
10	9.4	0 ( 0)	0 ( 0)	0 ( 0)	0 ( 0)
13	12.6	0 ( 0)	0 ( 0)	0 ( 0)	0 ( 0)
18	17.5	0 ( 0)	0 ( 0)	0 ( 0)	0 ( 0)
24	23.0	0 ( 0)	0 ( 0)	0 ( 0)	0 ( 0)
32	30.6	0 ( 0)	0 ( 0)	0 ( 0)	0 ( 0)
42	39.9	0 ( 0)	0 ( 0)	0 ( 0)	0 ( 0)
56	53.0	0 ( 0)	0 ( 0)	0 ( 0)	0 ( 0)
75	71.4	0 ( 0)	0 ( 0)	0 ( 0)	0 ( 0)
100	94.4	0 ( 0)	0 ( 0)	2 ( 20)	2 ( 20)

a : Arithmetic Mean

Table 3. Calculated LC<sub>50</sub> Values

Exposure Period (Hours)	LC <sub>50</sub> (mg/l)	95-Percent Confidence Limits (mg/l)	Statistical Method
24	> 94	—	—
48	> 94	—	—
72	> 94	—	—
96	> 94	—	—

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	94	> 94
48	94	> 94
72	71	> 94
96	71	> 94

Table 5. Observed Toxicological Abnormalities

Nominal Concentration (mg/l)	Mean* 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)
Aeration Control	—	n. a. d. (10)	n. a. d. (10)	n. a. d. (10)	n. a. d. (10)
10	9.4	n. a. d. (10)	n. a. d. (10)	n. a. d. (10)	n. a. d. (10)
13	12.6	n. a. d. (10)	n. a. d. (10)	n. a. d. (10)	n. a. d. (10)
18	17.5	n. a. d. (10)	n. a. d. (10)	n. a. d. (10)	n. a. d. (10)
24	23.0	n. a. d. (9) s. s (1)	n. a. d. (10)	n. a. d. (10)	n. a. d. (9) le (1)
32	30.6	n. a. d. (8) le (2)	n. a. d. (8) le (2)	n. a. d. (9) le (1)	n. a. d. (7) le (3)
42	39.9	n. a. d. (4) s. s (2), le (4)	n. a. d. (6) s. s (2), le (2)	n. a. d. (6) s. s (1), le (3)	n. a. d. (4) s. s (1), le (5)
56	53.0	n. a. d. (2) s. s (6), le (2)	n. a. d. (3) s. s (2), le (5)	n. a. d. (8) le (2)	n. a. d. (3) s. s (4), le (3)
75	71.4	n. a. d. (2) s. s (4), le (4)	s. s (4), le (6)	n. a. d. (5) s. s (2), le (3)	n. a. d. (3), dc (1) s. s (4), le (2)
100	94.4	n. a. d. (3), s. s (3) le (1), l. l (3)	n. a. d. (5), s. s (2) le (1), l. l (2)	n. a. d. (5), e. s (1) s. s (1), l. l (1)	e. s (4), le (2) l. l (2)

a : Arithmetic Mean

n. a. d : no abnormalities are detected

dc : discoloration

e. s : erratic swimming

le : lethargy

l. l : lying laterally

s. s : surface slicks

( ) : Number of fish observed

Table 6. Temperature

(Semi-Static Condition)

Nominal Concentration (mg/l)	Mean <sup>a</sup> 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	---	24.2	23.7	23.9	24.7	24.4	24.7	24.2	24.8
Aeration Control	---	24.1	23.8	23.9	23.1	24.4	24.7	24.2	24.8
10	9.4	24.2	23.4	23.2	23.4	24.2	23.8	24.1	23.1
13	12.6	24.3	23.4	23.2	23.5	24.1	23.6	24.2	23.1
18	17.5	24.2	23.5	23.2	23.9	24.1	23.5	24.1	23.2
24	23.0	24.2	23.4	23.2	23.9	24.1	24.2	24.1	23.1
32	30.6	24.2	23.4	23.2	24.2	24.1	23.3	24.1	23.2
42	39.9	24.2	23.3	23.2	23.9	24.1	23.3	24.1	23.0
56	53.0	24.2	23.4	23.2	23.9	24.1	24.0	24.1	23.1
75	71.4	24.2	23.3	23.2	23.6	24.1	24.0	24.1	23.1
100	94.4	24.2	23.4	23.1	23.5	24.1	23.7	24.0	23.0

a : Arithmetic Mean

New : Freshly prepared test solution

Old : Test solution after 24 hours exposure

Table 7. Dissolved Oxygen Concentration

(Semi-Static Condition)

Nominal Concentration (mg/l)	Mean <sup>a</sup> 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	---	9.0	8.0	9.0	8.2	9.2	7.7	8.6	7.9
Aeration Control	---	9.0	8.9	8.9	8.9	9.1	8.4	8.5	8.4
10	9.4	8.8	8.7	9.0	8.2	9.5	7.8	9.3	8.2
13	12.6	8.7	8.7	8.9	8.1	9.5	7.8	9.2	7.6
18	17.5	8.7	8.7	8.9	8.0	9.4	7.8	9.2	7.6
24	23.0	8.7	8.6	8.9	8.2	9.3	7.8	9.1	7.8
32	30.6	8.7	8.5	9.0	8.1	9.4	7.9	9.1	7.9
42	39.9	8.7	8.7	8.9	8.1	9.3	8.0	9.1	8.0
56	53.0	8.7	8.8	8.9	8.3	9.3	8.1	9.0	7.9
75	71.4	8.6	8.6	8.8	8.1	9.2	7.8	9.0	8.1
100	94.4	8.6	8.6	8.8	8.1	9.2	7.8	9.0	8.1

a : Arithmetic Mean

New : Freshly prepared test solution

Old : Test solution after 24 hours exposure



Table 8. pH Values

(Semi-Static Condition)

Nominal Concentration (mg/l)	Mean <sup>a</sup> Measured Concentration (mg/l)	pH							
		0 Hour	24 Hours		48 Hours		72 Hours		96 Hours
		New	Old	New	Old	New	Old	New	Old
Control	---	7.8	7.6	7.9	7.6	7.8	7.7	7.9	7.6
Aeration Control	---	7.8	7.8	7.9	7.7	7.9	7.7	7.9	7.7
10	9.4	7.9	7.7	7.8	7.7	7.8	7.8	7.9	7.6
13	12.6	7.9	7.7	7.9	7.7	7.8	7.7	7.9	7.5
18	17.5	7.9	7.8	8.0	7.6	7.7	7.7	7.9	7.6
24	23.0	7.9	7.8	8.0	7.6	7.8	7.7	7.9	7.6
32	30.6	7.9	7.8	7.9	7.7	7.8	7.7	8.0	7.6
42	39.9	7.9	7.8	8.0	7.7	7.8	7.7	7.9	7.7
56	53.0	7.9	7.8	8.0	7.7	7.8	7.7	7.9	7.7
75	71.4	7.9	7.8	8.0	7.7	7.8	7.7	8.0	7.7
100	94.4	8.0	7.8	8.0	7.7	7.8	7.7	7.9	7.8

a : Arithmetic Mean

New : Freshly prepared test solution

Old : Test solution after 24 hours exposure

付属資料-1：希釈水の水質

Quality of Test Water

Parameter	Concentration	Parameter	Concentration
pH Value	7.9 (16 °C)	Iprobenfos (IBP)	< 0.0005 mg/l
Coliform Group	Not Detected	Chlornitrofen (CNP)	< 0.00001 mg/l
Total residue	97 mg/l	Chemical oxygen demand (COD <sub>Cr</sub> )	< 10 mg/l
Phenols	< 0.005 mg/l	Biochemical oxygen demand	< 1 mg/l
Total hardness (as CaCO <sub>3</sub> )	51 mg/l	Suspended solids	< 1 mg/l
NO <sub>3</sub> -N and NO <sub>2</sub> -N	1.0 mg/l	Phosphorus	< 0.01 mg/l
Fluorine	< 0.10 mg/l	Bromide ion	< 0.5 mg/l
Dichloromethane	0.004 mg/l	Sulfide ion (S <sup>2-</sup> )	< 0.01 mg/l
Carbon tetrachloride	< 0.0002 mg/l	Electricconductivity (25°C)	15 mS/m
1,2-Dichloroethane	< 0.0002 mg/l	Alkalinity (CaCO <sub>3</sub> )	39 mg/l
1,1-Dichloroethylene	< 0.001 mg/l	Total organic carbon (TOC)	< 0.3mg/l
Cis-1,2-Dichloroethylene	< 0.001 mg/l	Ammonium nitrogen (NH <sub>3</sub> -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	< 0.001 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	< 0.01 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	8.0 mg/l
EPN	< 0.0005 mg/l	Potassium	1.4 mg/l
Dichlorvos (DDVP)	< 0.001 mg/l	Calcium	15 mg/l
Fenobucarb (BPMC)	< 0.001 mg/l	Magnesium	2.9 mg/l

Date: December 5, 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
10	0 ( 0)	0 ( 0)	0 ( 0)	0 ( 0)
100	0 ( 0)	1 ( 10)	2 ( 20)	3 ( 30)
Aeration 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
10	n. a. d.	n. a. d.	n. a. d.	n. a. d.
100	le, l. l	le, l. l s. s	le, l. l s. s	le, s. s
Aeration Control	n. a. d.	n. a. d.	n. a. d.	n. a. d.

n. a. d : no abnormalities are detected

le : lethargy

l. l : lying laterally

s. s : surface slicks

### 付属資料-3：試験液中の被験物質濃度の分析方法

#### 1. 標準品

被験物質を使用した。

#### 2. 試薬，試液及び標準溶液の調製

##### 2.1 試薬

アセトニトリル：高速液体クロマトグラフ用

水：活性炭フィルター，逆浸透膜及びイオン交換樹脂で精製したもの

##### 2.2 試液

アセトニトリル-水 (1:1 V/V)：アセトニトリル500 ml及び水500 mlを混合した。

アセトニトリル-水 (6:4 V/V)：アセトニトリル600 ml及び水400 mlを混合した。

##### 2.3 標準溶液の調製

標準品約25 mgを精密に量り取りアセトニトリルに溶解して50 mlとし，これを標準原液とした。この標準原液をアセトニトリルで希釈して40 mg/l溶液を調製し，この一定量を取り同量の水を混合した後，アセトニトリル-水 (1:1 V/V) で適宜希釈して0.005，0.025，0.1及び0.2 mg/lの標準溶液を調製した。

#### 3. 試料溶液の調製

##### 3.1 試験液分析法

試験液をメスフラスコに正確に量り取り，同量のアセトニトリルを混合した後，アセトニトリル-水 (1:1 V/V) で定容した。各試験液の数量関係は3.2に記載した。

##### 3.2 数量関係の一覧表

試験液	試験液 採取量 (ml)	定容量 (ml)	分取量 (ml)	最終液量 (ml)
対照区及び通気対照区の試験液	2	200	—	—
10, 13及び18 mg/lの試験液	2	20	2	20
24, 32及び42 mg/lの試験液	2	50	2	20
56及び75 mg/lの試験液	2	50	2.5	50
100 mg/lの試験液	2	50	2	50

4. 分析機器操作条件

高速液体クロマトグラフ操作条件

ポンプ：LC-10AD [株式会社 島津製作所]

検出器：紫外分光光度計 SPD-10A [株式会社 島津製作所]

カラム：Inertsil Ph,  $\phi 4.6 \text{ mm} \times 25 \text{ cm}$  [ジーエルサイエンス株式会社]

カラム温度：40  $^{\circ}\text{C}$

移動相：アセトニトリル-水 (6:4 V/V)

流量：1.0 ml/min

測定波長：205 nm

データ処理装置：C-R4A [株式会社 島津製作所]

5. 定量

2.3で調製した標準溶液及び3.で調製した試料溶液40  $\mu\text{l}$ を4.の高速液体クロマトグラフに注入した。標準品の重量とピーク高から検量線を作成し、試験液中の2,3-ジメチルアニリン濃度を算出した。

6. 検出限界

$$\text{検出限界} : \frac{0.2 \text{ ng}}{1,000} \times \frac{200 \text{ ml} \times 1,000}{40 \mu\text{l}} \times \frac{1}{2 \text{ ml}} = 0.5 \text{ mg/l}$$

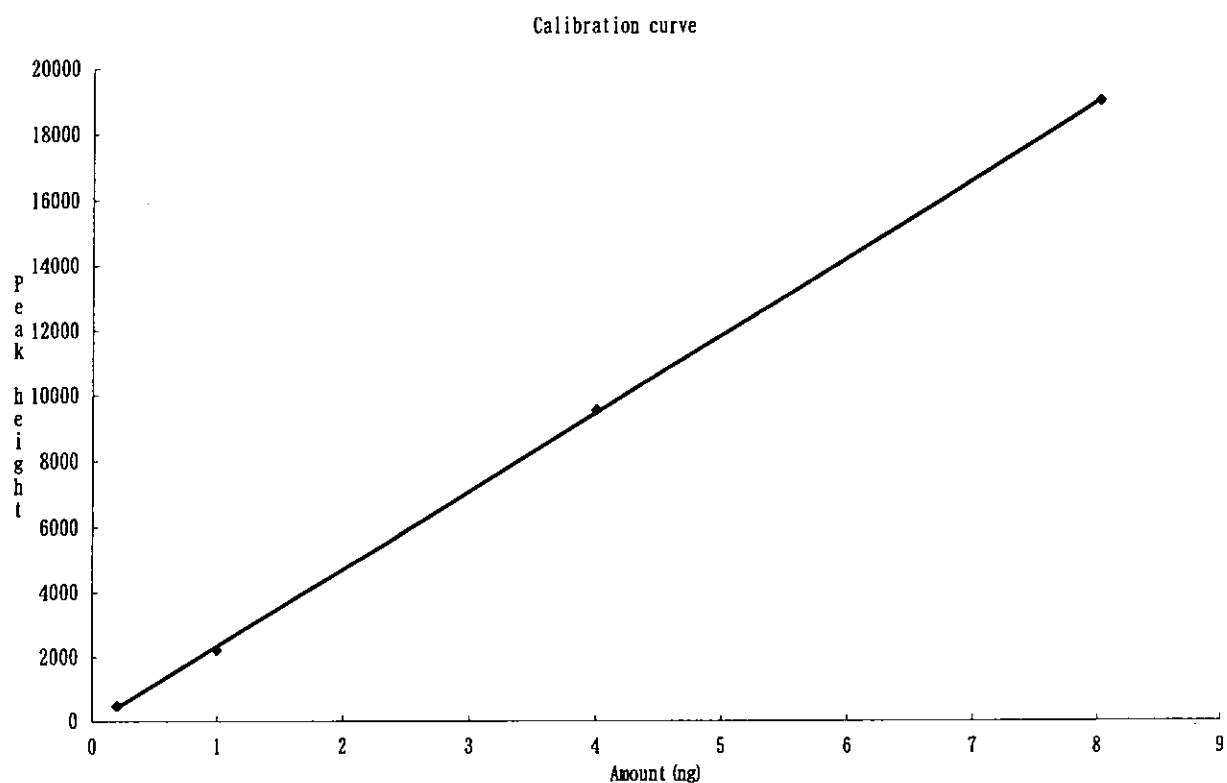
7. 添加回収試験

7.1 低濃度添加

希釈水に被験物質を10 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。試験は併行測定3回で実施し、回収率は97.2 %, 97.1 %, 96.1 % (平均96.8 %)であった。

7.2 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。試験は併行測定3回で実施し、回収率は97.1 %, 96.3 %, 96.3 % (平均96.6 %)であった。

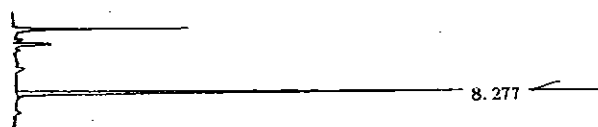


Amount (ng)	Peak height (μV)
8	18,981
4	9,546
1	2,222
0.2	476

Figure 1. Calibration curve of 2,3-dimethylaniline by HPLC analysis

Standard (0.2 mg/l): 0 hour

CHROMATOPAC C-R4A CH=1 REPORT No.=71 クロマト=2:15044.C01 04/02/23 14:46:01

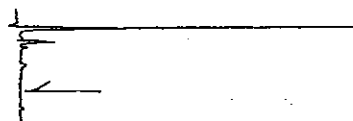


\*\* 定量計算結果 \*\*

CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	1	8.277	238649	18981			100	
TOTAL			238649	18981			100	

Control: 0 hour

\*波形処理/計算エラー\* Ch=1, 1: 生ピークがありません。  
CHROMATOPAC C-R4A CH=1 REPORT No.=75 クロマト=2:15044.C05 04/02/23 15:44:03

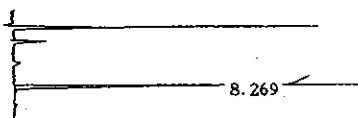


\*\* 定量計算結果 \*\*

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

Test solution (10 mg/l): 0 hour

CHROMATOPAC C-R4A CH=1 REPORT No.=77 クロマト=2:15044.C07 04/02/23 16:27:04

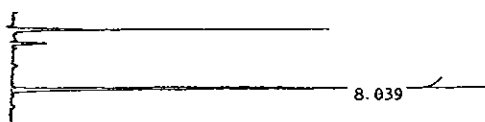


\*\* 定量計算結果 \*\*

CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	1	8.269	112053	8985			100	
TOTAL			112053	8985			100	

Test solution (100 mg/l): 0 hour

CHROMATOPAC C-R1A CH=1 REPORT No.=85 クロマト=2:15044.C15 04/02/23 19:19:13



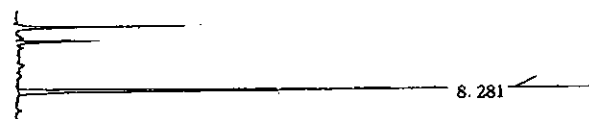
\*\* 定量計算結果 \*\*

CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	1	8.039	182096	14530	S		100	
TOTAL			182096	14530			100	

Figure 2-1. Representative chromatograms

Standard (0.2 mg/l): 24 hours

CHROMATOPAC C-R4A CH=1 REPORT No.=107 クロマト=2:15044.C18 04/02/24 14:03:12



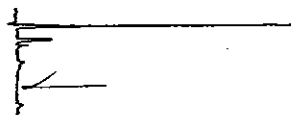
\*\* 定量計算結果 \*\*

CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	1	8.281	233259	18526			100	
TOTAL			233259	18526			100	

Control: 24 hours old\*

\*波形処理/計算エラー\* Ch=1, 1: 生ピークがありません。

CHROMATOPAC C-R4A CH=1 REPORT No.=111 クロマト=2:15044.C22 04/02/24 15:01:15

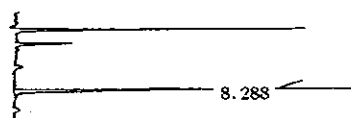


\*\* 定量計算結果 \*\*

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

Test solution (10 mg/l): 24 hours old\*

CHROMATOPAC C-R4A CH=1 REPORT No.=113 クロマト=2:15044.C24 04/02/24 15:44:16



\*\* 定量計算結果 \*\*

CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	1	8.288	108547	8598			100	
TOTAL			108547	8598			100	

Test solution (100 mg/l): 24 hours old\*

CHROMATOPAC C-R4A CH=1 REPORT No.=121 クロマト=2:15044.C32 04/02/24 18:36:26



\*\* 定量計算結果 \*\*

CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	1	8.31	175863	13823			100	
TOTAL			175863	13823			100	

\* old: Test solution after 24 hours exposure

Figure 2-2. Representative chromatograms



## 陳述書

1 試験委託者

環境省

2 試験番号

第15044号

3 試験の表題

2,3-ジメチルアニリンのヒメダカ (*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。

2004 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15044号

3 試験の表題

2,3-ジメチルアニリンのヒメダカ (*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	2003年12月01日	2003年12月02日	2003年12月02日
被験物質の受領	2003年12月01日	2003年12月02日	2003年12月02日
試験計画書	2004年01月19日	2004年01月19日	2004年01月19日
試験計画書	2004年02月23日	2004年02月23日	2004年02月23日
試験の実施, 試薬等, 機器	2004年02月23日	2004年02月24日	2004年02月24日
分析の実施, 試薬等, 機器, 検体	2004年02月23日	2004年02月24日	2004年02月24日
試験の実施	2004年02月25日	2004年02月26日	2004年02月26日
試験の実施, 被験物質	2004年02月27日	2004年02月27日	2004年02月27日
試験中の保管文書	2004年03月29日	2004年03月29日	2004年03月29日
最終報告書草案及び生データ	2004年03月29日	2004年03月29日	2004年03月29日
最終報告書	2004年03月31日	2004年03月31日	2004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。

2004 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

