

環境省殿

## 最 終 報 告 書

2,3-ジメチルアニリンのオオミジンコ (*Daphnia magna*) に対する急性遊泳阻害試験

(試験番号：第15042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：2,3-ジメチルアニリンのオオミジンコ (*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 ( $EC_{50}$ ) 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 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10日

実験終了日：2004年2月12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：   2008年 3月 31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 (EiC <sub>50</sub> ) 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 (EiC <sub>50</sub> ) .....     | 13 |
| 5.4 0 %阻害最高濃度及び 100 %阻害最低濃度 .....           | 13 |
| 5.5 試験液の水溫, 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    | 統計処理データ .....          | 20    |
| 付属資料-4    | 試験液中の被験物質濃度の分析方法 ..... | 21～25 |

## 要 旨

### 試験委託者

環境省

### 表 題

2,3-ジメチルアニリンのオオミジンコ (*Daphnia magna*) に対する急性遊泳阻害試験

### 試験番号

第15042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: 2,3-ジメチルアニリン
- 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, 1.0, 1.8, 3.2, 5.6, 10, 18 及び 32 mg/l  
公比; 1.8
- 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: 19.3~20.8 °C
- 10) 溶存酸素濃度: 8.6~9.0 mg/l (暴露期間中, エアレーションは行わなかった。)
- 11) pH : 7.7~7.8 (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: 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) 半数遊泳阻害濃度 ( $EC_{50}$ )  
24 時間後 : 20 mg/l (95 %信頼区間 ; 14~34 mg/l) Probit 法により算出した  
48 時間後 : 8.9 mg/l (95 %信頼区間 ; 7.0~12 mg/l) Probit 法により算出した。
- 2) 0 %阻害最高濃度  
24 時間後 : 1.7 mg/l  
48 時間後 : 1.7 mg/l
- 3) 100 %阻害最低濃度  
24 時間後 : 31 mg/l 以上  
48 時間後 : 31 mg/l



1 被験物質

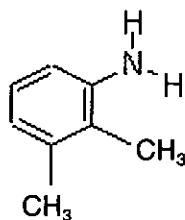
1.1 名称, 構造式及び物理化学的性状

名称: 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：オオミジンコ

#### 2) 学名：*Daphnia magna*

#### 3) 入手等：自家繁殖(2003年3月7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時間の半泳阻害濃度(EiC<sub>50</sub>)は0.47 mg/l(2003年11月10日)であった。当センターにおける1995年12月以降のEiC<sub>50</sub>値のバックグラウンドデータ(0.55±0.15 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、別に用意したピーカーに移し、翌日、産出された幼体を別のピーカーに分けた。この幼体を供試生物の親とし、以下の条件で21日間(2004年1月20日～2月10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(21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、親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2%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：1l容ガラス製ピーカー

##### ④ 飼育密度：開始時～5日後；35頭/l飼育水、6日後～21日後；25頭/l飼育水

##### ⑤ 水温：19.8～20.7℃

##### 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 ; 0.08～0.10 mgC (有機体炭素) /頭/日  
15日後～21日後 ; 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：19.3～20.8℃
- 7) 溶存酸素濃度：8.6～9.0 mg/l (暴露期間中、エアレーションは行わなかった。)
- 8) pH : 7.7～7.8 (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) を充分通気し, 残留塩素等を除去したもの。] 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 75 mg/l ( $\text{CaCO}_3$  換算), pH は 7.3 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-4410 [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：D0-14P [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

予備試験の結果から, 10 mg/l 濃度区ではミジンコの遊泳が 80 % 阻害され, 1.0 mg/l 濃度区では全く阻害が認められなかったことに基づき, 本試験では, 32 mg/l 以下の濃度を公比 1.8 で 7 濃度区 (1.0, 1.8, 3.2, 5.6, 10, 18 及び 32 mg/l) を設定した。

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 $20 \pm 1$ ℃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99.2%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)及び暴露終了時(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、分析方法は付属資料-4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、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、Probit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。それらの95%信頼区間も算出した。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及び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、統計ソフトの出力結果を付属資料-3に示した。

Eco-Tox Statics version 2.2

### 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(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(48時間後)の試験液中の測定濃度は、それぞれ 0.99~32.4 mg/l, 0.83~29.9 mg/l (設定濃度: 1.0~32 mg/l) であり、設定濃度に対する割合は、暴露開始時が 99~102 %, 暴露終了時(48時間後)が 83~100 %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 1.0 mg/l で 0.91 mg/l, 1.8 mg/l で 1.73 mg/l, 3.2 mg/l で 3.14 mg/l, 5.6 mg/l で 5.65 mg/l, 10 mg/l で 9.53 mg/l, 18 mg/l で 17.8 mg/l 及び 32 mg/l で 31.2 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 (EiC<sub>50</sub>)

各時間における遊泳阻害率を Table 2 に、半数遊泳阻害濃度 (EiC<sub>50</sub>) 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, 0.91 mg/l 及び 1.73 mg/l で 0 %, 3.14 mg/l で 10 %, 5.65 mg/l 及び 9.53 mg/l で 15 %, 17.8 mg/l で 40 %, 31.2 mg/l で 75 %であった。また 48 時間後の各濃度区の遊泳阻害率は対照区, 0.91 mg/l 及び 1.73 mg/l で 0 %, 3.14 mg/l で 10 %, 5.65 mg/l で 25 %, 9.53 mg/l で 50 %, 17.8 mg/l で 85 %, 31.2 mg/l で 100 %であった。

以上のことから、以下の結果を得た。

半数遊泳阻害濃度 (EiC<sub>50</sub>) :

24 時間後 ; 20 mg/l (95 %信頼区間 ; 14~34 mg/l) Probit 法により算出した。

48 時間後 ; 8.9 mg/l (95 %信頼区間 ; 7.0~12 mg/l) Probit 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 ; 1.7 mg/l, 48 時間後 ; 1.7 mg/l

100 %阻害最低濃度 : 24 時間後 ; 31 mg/l 以上, 48 時間後 ; 31 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 19.3～20.8℃、溶存酸素濃度は 8.6～9.0 mg/l、pH は 7.7～7.8 であり、水温は  $20 \pm 1$ ℃、溶存酸素濃度は 3 mg/l 以上、pH は 6.0～9.0 の範囲で試験環境条件を満たしていた。

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遊泳阻害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。

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  
(Static Condition)

| Nominal<br>Concentration<br>(mg/l) | Measured Concentration (mg/l) |                       |          |                       | Mean <sup>a</sup> Measured<br>Concentration<br>(mg/l) |
|------------------------------------|-------------------------------|-----------------------|----------|-----------------------|---|
|                                    | 0 Hour                        | Percent of<br>Nominal | 48 Hours | Percent of<br>Nominal |   |
| Control                            | < 0.05                        | —                     | < 0.05   | —                     | —   |
| 1.0                                | 0.99                          | 99                    | 0.83     | 83                    | 0.91  |
| 1.8                                | 1.80                          | 100                   | 1.66     | 92                    | 1.73  |
| 3.2                                | 3.22                          | 101                   | 3.06     | 96                    | 3.14  |
| 5.6                                | 5.67                          | 101                   | 5.62     | 100                   | 5.65  |
| 10                                 | 10.0                          | 100                   | 9.05     | 91                    | 9.53  |
| 18                                 | 18.4                          | 102                   | 17.1     | 95                    | 17.8  |
| 32                                 | 32.4                          | 101                   | 29.9     | 93                    | 31.2  |

a : Arithmetic Mean

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

| Nominal<br>Concentration<br>(mg/l) | Mean <sup>a</sup> Measured<br>Concentration<br>(mg/l) | Cumulative Number of Immobilized <i>Daphnia</i><br>(Percent Immobility) |          |
|------------------------------------|---|---|----------|
|                                    |   | 24 Hours  | 48 Hours |
| Control                            | < 0.05  | 0 ( 0)  | 0 ( 0)   |
| 1.0                                | 0.91  | 0 ( 0)  | 0 ( 0)   |
| 1.8                                | 1.73  | 0 ( 0)  | 0 ( 0)   |
| 3.2                                | 3.14  | 2 ( 10)   | 2 ( 10)  |
| 5.6                                | 5.65  | 3 ( 15)   | 5 ( 25)  |
| 10                                 | 9.53  | 3 ( 15)   | 10 ( 50) |
| 18                                 | 17.8  | 8 ( 40)   | 17 ( 85) |
| 32                                 | 31.2  | 15 ( 75)  | 20 (100) |

a : Arithmetic Mean

Table 3. Calculated  $EC_{50}$  Values

| Exposure Period<br>(Hours) | $EC_{50}$ (mg/l) | 95-Percent<br>Confidence Limits (mg/l) | Statistical Method |
|----------------------------|------------------|--|--------------------|
| 24                         | 20               | 14~34                                  | Probit             |
| 48                         | 8.9              | 7.0~12                                 | Probit             |

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

| Exposure Period<br>(Hours) | Highest Concentration in<br>0 % Immobility<br>(mg/l) | Lowest Concentration in<br>100 % Immobility<br>(mg/l) |
|----------------------------|--|---|
| 24                         | 1.7  | >31   |
| 48                         | 1.7  | 31  |

Table 5. Temperature

(Static Condition)

| Nominal<br>Concentration<br>(mg/l) | Mean <sup>a</sup> Measured<br>Concentration<br>(mg/l) | Temperature (°C) |          |
|------------------------------------|---|------------------|----------|
|                                    |   | 0 Hour           | 48 Hours |
| Control                            | < 0.05  | 20.5             | 19.3     |
| 1.0                                | 0.91  | 19.3             | 20.2     |
| 1.8                                | 1.73  | 19.4             | 20.4     |
| 3.2                                | 3.14  | 19.6             | 20.5     |
| 5.6                                | 5.65  | 19.6             | 20.8     |
| 10                                 | 9.53  | 19.8             | 20.7     |
| 18                                 | 17.8  | 19.9             | 20.7     |
| 32                                 | 31.2  | 19.6             | 20.7     |

a : Arithmetic Mean

Table 6. Dissolved Oxygen Concentration

(Static Condition)

| Nominal<br>Concentration<br>(mg/l) | Mean <sup>a</sup> Measured<br>Concentration<br>(mg/l) | Dissolved Oxygen<br>Concentration (mg/l) |          |
|------------------------------------|---|--|----------|
|                                    |   | 0 Hour                                   | 48 Hours |
| Control                            | < 0.05  | 8.9                                      | 8.9      |
| 1.0                                | 0.91  | 8.8                                      | 8.8      |
| 1.8                                | 1.73  | 8.8                                      | 8.6      |
| 3.2                                | 3.14  | 8.9                                      | 8.7      |
| 5.6                                | 5.65  | 8.9                                      | 8.6      |
| 10                                 | 9.53  | 9.0                                      | 8.7      |
| 18                                 | 17.8  | 8.8                                      | 8.7      |
| 32                                 | 31.2  | 8.8                                      | 8.7      |

a : Arithmetic Mean



Table 7. pH Values

| Nominal<br>Concentration<br>(mg/l) | Mean <sup>a</sup> Measured<br>Concentration<br>(mg/l) | (Static Condition)<br>pH |          |
|------------------------------------|---|--------------------------|----------|
|                                    |   | 0 Hour                   | 48 Hours |
| Control                            | < 0.05  | 7.8                      | 7.7      |
| 1.0                                | 0.91  | 7.7                      | 7.7      |
| 1.8                                | 1.73  | 7.7                      | 7.7      |
| 3.2                                | 3.14  | 7.8                      | 7.7      |
| 5.6                                | 5.65  | 7.8                      | 7.7      |
| 10                                 | 9.53  | 7.8                      | 7.7      |
| 18                                 | 17.8  | 7.8                      | 7.7      |
| 32                                 | 31.2  | 7.8                      | 7.7      |

a : Arithmetic Mean

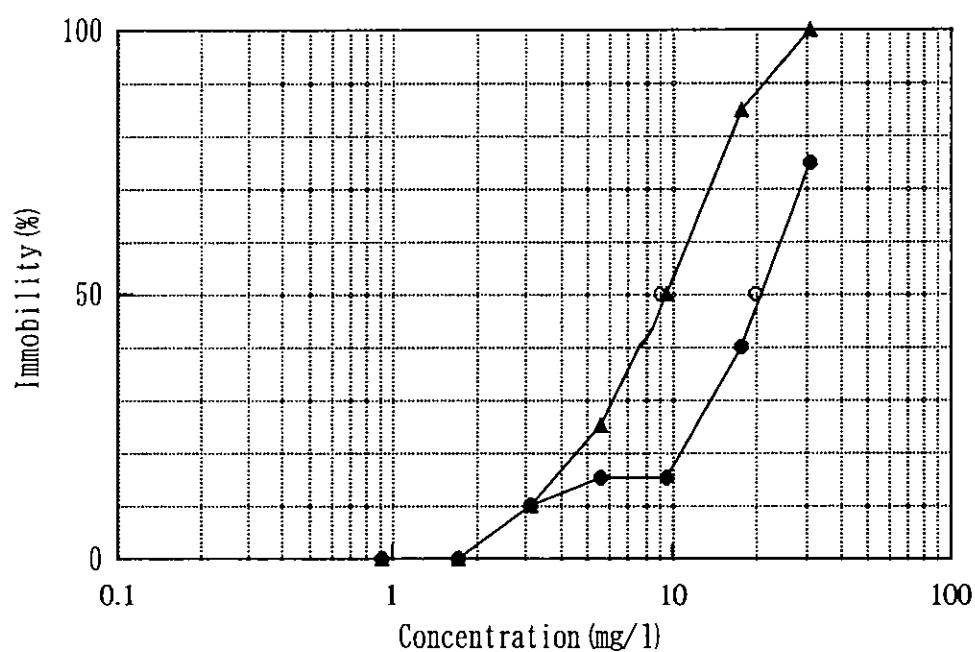


Figure 1. Concentration-Response (Immobility) Curve

◆ 24hr. ▲ 48hr. ○ EiC50

付属資料-1：希釈水の水質

Quality of Test Water

| Parameter                                 | Concentration | Parameter                                   | Concentration  |
|---|---------------|---|----------------|
| pH Value                                  | 8.0 (17℃)     | Iprobenfos (IBP)                            | < 0.0005 mg/l  |
| Coliform Group                            | Not Detected  | Chlornitrofen (CNP)                         | < 0.00001 mg/l |
| Total residue                             | 200 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> )    | 74 mg/l       | Suspended solids                            | < 1 mg/l       |
| NO <sub>3</sub> -N and NO <sub>2</sub> -N | < 0.2 mg/l    | Phosphorus                                  | < 0.01 mg/l    |
| Fluorine                                  | 0.15 mg/l     | Bromide ion                                 | < 0.5 mg/l     |
| Dichloromethane                           | < 0.001 mg/l  | Sulfide ion (S <sup>2-</sup> )              | < 0.01 mg/l    |
| Carbon tetrachloride                      | < 0.0002 mg/l | Electricconductivity (25℃)                  | 32 mS/m        |
| 1,2-Dichloroethane                        | < 0.0002 mg/l | Alkalinity (CaCO <sub>3</sub> )             | 48 mg/l        |
| 1,1-Dichloroethylene                      | < 0.001 mg/l  | Total organic carbon (TOC)                  | 1.6 mg/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                                      | 31 mg/l        |
| EPN                                       | < 0.0005 mg/l | Potassium                                   | 6.1 mg/l       |
| Dichlorvos (DDVP)                         | < 0.001 mg/l  | Calcium                                     | 17 mg/l        |
| Fenobucarb (BPMC)                         | < 0.001 mg/l  | Magnesium                                   | 7.6 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 に示した。

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

| Nominal Concentration<br>(mg/l) | Cumulative Number of Immobilized <i>Daphnia</i><br>(Percent Immobility) |          |
|---------------------------------|---|----------|
|                                 | 24 Hours  | 48 Hours |
| 1.0                             | 0 ( 0)  | 0 ( 0)   |
| 3.2                             | 0 ( 0)  | 5 ( 25)  |
| 10                              | 10 ( 50)  | 16 ( 80) |
| Control                         | 0 ( 0)  | 0 ( 0)   |

付属資料-3：統計処理データ

統計ソフトの出力結果を以下に示した。

EC<sub>50</sub> after 24 and 48 hours exposure

ミジンコ 急性遊泳阻害試験 EC50, LC50 の推定結果(要約)

DMA 更新日：2004/02/19

| ----- プロビット法 ----- |          |               |           |               |
|--------------------|----------|---------------|-----------|---------------|
|                    | ---- 24h | Effect ----   | ---- 48h  | Effect ----   |
| mg/L               | 入力 ( % ) | 推定 ( % )      | 入力 ( % )  | 推定 ( % )      |
| 0.91               | 0 ( 0 )  | --- ( - ) 0   | 0 ( 0 )   | -- ( - )      |
| 1.73               | 0 ( 0 )  | -- ( - ) 0    | 0 ( 0 )   | -- ( - )      |
| 3.14               | 2 (10 )  | 1.0667 (5.33) | 2 (10 )   | 1.5923 (7.96) |
| 5.65               | 3 (15 )  | 2.7147 (13.5) | 5 (25 )   | 5.3779 (26.8) |
| 9.53               | 3 (15 )  | 5.2050 (26.0) | 10 (50 )  | 10.703 (53.5) |
| 17.8               | 8 (40 )  | 9.2328 (46.1) | 17 (85 )  | 16.476 (82.3) |
| 31.2               | 15 (75 ) | 13.067 (65.3) | 20 (100 ) | -- ( - )      |

| Y=A+BX | 係数(標準誤差)        | 係数(標準誤差)        |
|--------|-----------------|-----------------|
| A ;    | -2.613 (.5101 ) | -2.949 (.6024 ) |
| B ;    | 2.0133 (.4476 ) | 3.1025 (.6418 ) |

回帰式の適合度の検定  $\chi^2$  検定値 (P:0.05)=右側

|               |                    |                   |
|---------------|--------------------|-------------------|
| 逸脱度 $\chi^2$  | 3.3241 < 7.8147 OK | .3400 < 5.9915 OK |
| ピアソン $\chi^2$ | 3.2904 < 7.8147 OK | .3435 < 5.9915 OK |
| AIC           | 103.55             | 84.470            |

推定 ECx

|             |                       |                       |
|-------------|-----------------------|-----------------------|
| EC10 (mg/L) | 4.58900               | 3.44808               |
| 95%Range    | 2.90706 < * < 4.54527 | 2.52061 < * < 3.38197 |
| EC20 (mg/L) | 7.58976               | 4.77942               |
| 95%Range    | 5.02472 < * < 9.10575 | 3.58394 < * < 5.19635 |
| EC50 (mg/L) | 19.8726               | 8.92579               |
| 95%Range    | 14.3143 < * < 34.4031 | 7.02723 < * < 11.8179 |
| EC80 (mg/L) | 52.0333               | 16.6693               |
| 95%Range    | 40.7785 < * < 129.981 | 13.7786 < * < 26.8774 |
| EC90 (mg/L) | 86.0581               | 23.1055               |
| 95%Range    | 70.4839 < * < 260.397 | 19.5912 < * < 41.2969 |

付属資料-4：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<br>採取量 (ml) | 定容量<br>(ml) | 分取量<br>(ml) | 最終液量<br>(ml) |
|-----------------------------|-----------------|-------------|-------------|--------------|
| 対照区並びに<br>1.0及び1.8 mg/lの試験液 | 2               | 20          | —           | —            |
| 3.2 mg/lの試験液                | 2               | 20          | 5           | 10           |
| 5.6 mg/lの試験液                | 2               | 20          | 2           | 10           |
| 10及び18 mg/lの試験液             | 2               | 20          | 2           | 20           |
| 32 mg/lの試験液                 | 2               | 20          | 2.5         | 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、試験水中の2,3-ジメチルアニリンを算出した。

6. 検出限界

$$\text{検出限界} : \frac{0.2 \text{ ng}}{1,000} \times \frac{20 \text{ ml} \times 1,000}{40 \mu\text{l}} \times \frac{1}{2 \text{ ml}} = 0.05 \text{ mg/l}$$

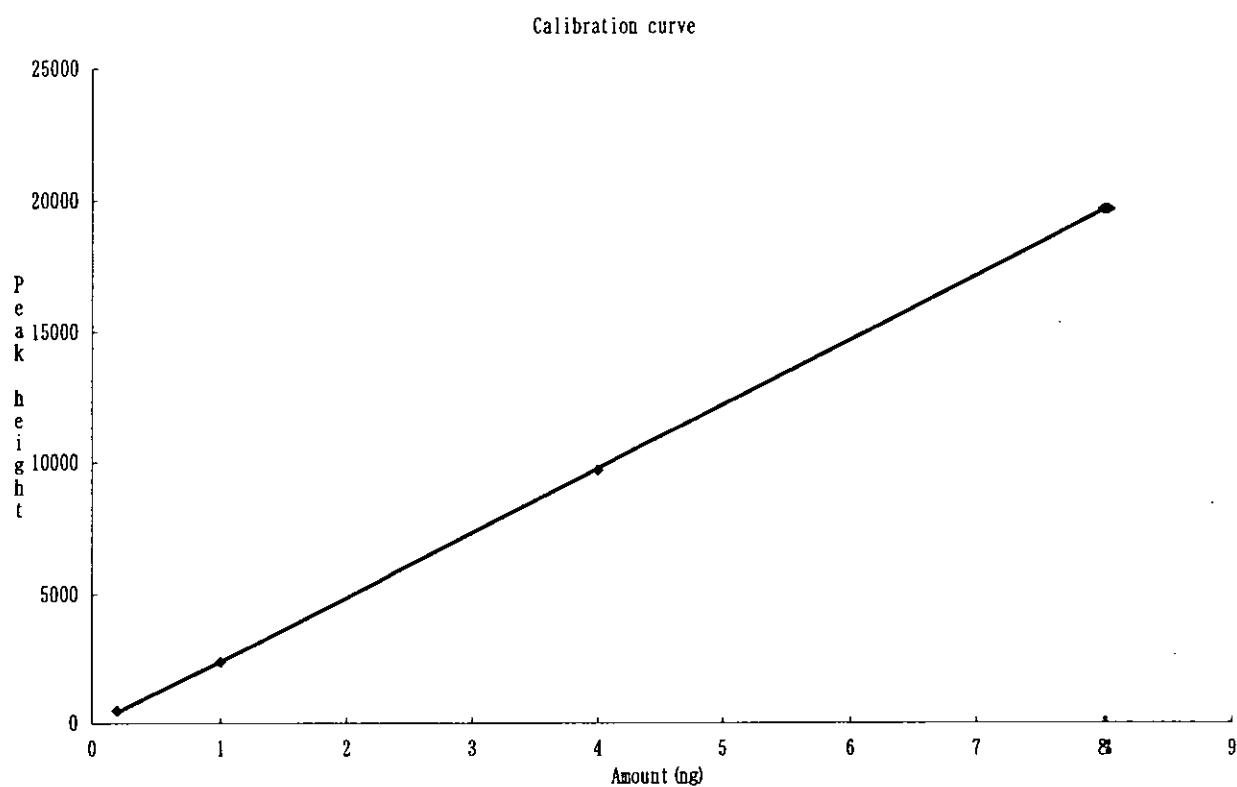
7. 添加回収試験

7.1 低濃度添加

希釈水に被験物質を1.0 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100.0 %, 99.3 %, 99.1 % (平均99.5 %)であった。

7.2 高濃度添加

希釈水に被験物質を40 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100.4 %, 100.0 %, 99.8 % (平均100.1 %)であった。

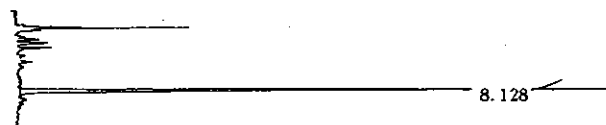


| Amount (ng) | Peak height (μV) |
|-------------|------------------|
| 8           | 19,645           |
| 4           | 9,710            |
| 1           | 2,387            |
| 0.2         | 480              |

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.=22 クロマト=2:15042.C01 04/02/10 19:30:49



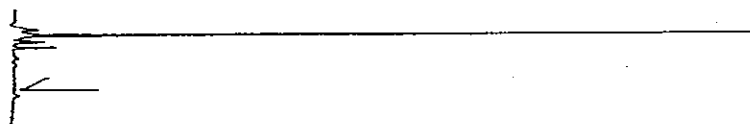
\*\* 定量計算結果 \*\*

| CH    | PKNO | TIME  | AREA   | HEIGHT | MK | IDNO | CONC | NAME |
|-------|------|-------|--------|--------|----|------|------|------|
| 1     | 1    | 8.128 | 245657 | 19645  |    |      | 100  |      |
| TOTAL |      |       | 245657 | 19645  |    |      | 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.=26 クロマト=2:15042.C05 04/02/10 20:28:50

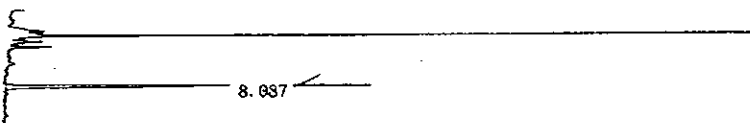


\*\* 定量計算結果 \*\*

| CH    | PKNO | TIME  | AREA | HEIGHT | MK | IDNO | CONC | NAME |
|-------|------|-------|------|--------|----|------|------|------|
| 1     | 1    | 8.128 | 0    | 0      |    |      | 0    |      |
| TOTAL |      |       | 0    | 0      |    |      | 0    |      |

Test solution (1.0 mg/l): 0 hour

CHROMATOPAC C-R4A CH=1 REPORT No.=27 クロマト=2:15042.C06 04/02/10 20:50:20

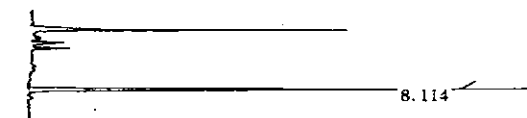


\*\* 定量計算結果 \*\*

| CH    | PKNO | TIME  | AREA   | HEIGHT | MK | IDNO | CONC | NAME |
|-------|------|-------|--------|--------|----|------|------|------|
| 1     | 1    | 8.087 | 125789 | 9663   |    |      | 100  |      |
| TOTAL |      |       | 125789 | 9663   |    |      | 100  |      |

Test solution (32 mg/l): 0 hour

CHROMATOPAC C-R4A CH=1 REPORT No.=33 クロマト=2:15042.C12 04/02/10 22:59:23



\*\* 定量計算結果 \*\*

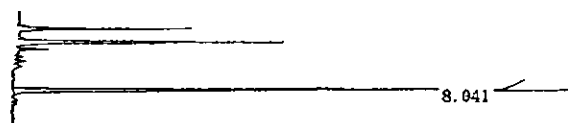
| CH    | PKNO | TIME  | AREA   | HEIGHT | MK | IDNO | CONC | NAME |
|-------|------|-------|--------|--------|----|------|------|------|
| 1     | 1    | 8.114 | 199232 | 15888  |    |      | 100  |      |
| TOTAL |      |       | 199232 | 15888  |    |      | 100  |      |

Figure 2-1. Representative chromatograms



Standard (0.2 mg/l): 48 hours

CHROMATOPAC C-R4A CH=1 REPORT No.=59 クロマト=2:15042.C14 04/02/12 16:35:38



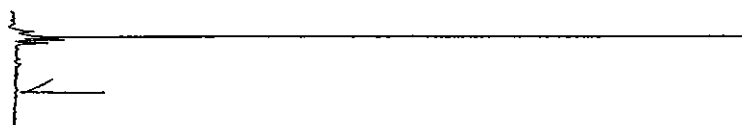
\*\* 定量計算結果 \*\*

| CH    | PKNO | TIME  | AREA   | HEIGHT | MK | IDNO | CONC | NAME |
|-------|------|-------|--------|--------|----|------|------|------|
| 1     | 1    | 8.041 | 230189 | 18719  |    |      | 100  |      |
| TOTAL |      |       | 230189 | 18719  |    |      | 100  |      |

Control: 48 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.=63 クロマト=2:15042.C18 04/02/12 17:33:39

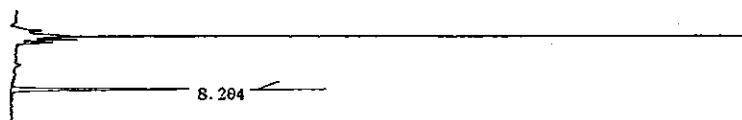


\*\* 定量計算結果 \*\* 注意 13-有 CALERROR: 1

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

Test solution (1.0 mg/l): 48 hours old\*

CHROMATOPAC C-R4A CH=1 REPORT No.=64 クロマト=2:15042.C19 04/02/12 17:55:12

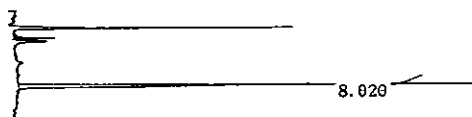


\*\* 定量計算結果 \*\*

| CH    | PKNO | TIME  | AREA   | HEIGHT | MK | IDNO | CONC | NAME |
|-------|------|-------|--------|--------|----|------|------|------|
| 1     | 1    | 8.204 | 105438 | 7682   | S  |      | 100  |      |
| TOTAL |      |       | 105438 | 7682   |    |      | 100  |      |

Test solution (32 mg/l): 48 hours old\*

CHROMATOPAC C-R4A CH=1 REPORT No.=70 クロマト=2:15042.C25 04/02/12 20:04:10



\*\* 定量計算結果 \*\*

| CH    | PKNO | TIME | AREA   | HEIGHT | MK | IDNO | CONC | NAME |
|-------|------|------|--------|--------|----|------|------|------|
| 1     | 1    | 8.02 | 171948 | 13937  |    |      | 100  |      |
| TOTAL |      |      | 171948 | 13937  |    |      | 100  |      |

\* old: Test solution after 48 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15042号

3 試験の表題

2,3-ジメチルアニリンのオオミジンコ (*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。

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15042号

3 試験の表題

2,3-ジメチルアニリンのオオミジンコ (*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<br>報告年月日 | 運営管理者への<br>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27日 | 2004年01月27日      | 2004年01月27日      |
| 試験計画書              | 2004年02月10日 | 2004年02月11日      | 2004年02月11日      |
| 試験の実施, 試薬等, 機器     | 2004年02月10日 | 2004年02月11日      | 2004年02月11日      |
| 分析の実施, 試薬等, 機器, 検体 | 2004年02月10日 | 2004年02月11日      | 2004年02月11日      |
| 試験の実施              | 2004年02月11日 | 2004年02月11日      | 2004年02月11日      |
| 試験の実施, 被験物質        | 2004年02月12日 | 2004年02月12日      | 2004年02月12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

