


環境省殿

試 験 報 告 書

2, 6-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：No. 2002-生22)

2003年 5月26日作成

株式会社 ター

原本と相違ないことを証明する。

2003年5月26日

試験責任者 

陳 述 書

株式会社 クレハ分析センター

試験委託者： 環境省

表題： 2, 6-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： No. 2002-生22

適用GLP： 本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ある。

2003年 5月26日

承認 試験責任者

確認 運営管理者

[Redacted Signature]

[Redacted Signature]

[Redacted Stamp]

信 頼 性 保 証 書

株式会社 クレハ分析センター

試験委託者： 環境省

表題： 2, 6-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： No. 2002-生22

記

	監査, 査察実施日	報 告 日	
		運 営 管 理 者	試 験 責 任 者
試験計画書の監査	2002年12月20日	2002年12月20日	2002年12月20日
実験状況の監査, 査察	2003年 1月20日	2003年 1月20日	2003年 1月20日
	2003年 1月24日	2003年 1月24日	2003年 1月24日
実験終了後の監査	2003年 2月 3日	2003年 2月 4日	2003年 2月 4日
組織体制の監査	2003年 1月30日	2003年 1月30日	2003年 1月30日
施設・設備の査察			
試験用機器等	2003年 1月30日	2003年 1月30日	2003年 1月30日
施設, 設備等	2003年 1月30日	2003年 1月30日	2003年 1月30日
試 験 系	2003年 1月30日	2003年 1月30日	2003年 1月30日
試験報告書の監査	2003年 5月26日	2003年 5月26日	2003年 5月26日

本試験は試験計画書および標準操作手順書に従って実施され、本報告書には試験に使用した方法、手順が正確に記載されており、試験結果は生データを正確に反映していることを上記の通り確認した。

2003年 5月26日

信頼性保証担当者：



試験実施概要

1. 表題： 2, 6-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： 被験物質のヒメダカ (*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 (LC50) を求める。
3. 試験方法： 本試験は、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) に準拠した。
4. 適用GLP： 本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ある。
5. 試験委託者
名称： 環境省
住所： 〒100-8975 東京都千代田区霞が関一丁目2-2
委託担当者： 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：
名称： 株式会社 クレハ分析センター
本社所在地： 〒974-8232 福島県いわき市錦町落合16番地
代表者： [REDACTED]
7. 試験施設：
実施施設名： 株式会社 クレハ分析センター
所在地： 〒974-8232 福島県いわき市錦町落合16番地

8. 試験関係者：

試験責任者	■■■■■	(生物試験部)	■■■■■	(2003年 5月 26日)
試験担当者	■■■■■	(生物試験担当者)	■■■■■	(2003年 5月 26日)
	■■■■■	(生物試験担当者)	■■■■■	(2003年 5月 26日)
	■■■■■	(生物試験担当者)	■■■■■	(2003年 5月 26日)
	■■■■■	(生物試験担当者)	■■■■■	(2003年 5月 26日)
	■■■■■	(生物試験担当者)	■■■■■	(2003年 5月 26日)
	■■■■■	(濃度分析責任者)	■■■■■	(2003年 5月 26日)
	■■■■■	(濃度分析担当者)	■■■■■	(2003年 5月 26日)

9. 試験期間：	試験開始日	2002年12月20日
	試験終了日	2003年 5月 26日
	暴露期間	2003年 1月20日～2003年 1月24日

10. 保管：

試験に関する下記の記録および試料は、試験報告書作成後10年間、当施設資料保管施設に保管する。その後の保管については別途協議の上定める。

- 1) 主計画表
- 2) 試験計画書、生データ及び最終報告書
- 3) 信頼性保証部門によって実施された監査又は査察の記録
- 4) 機器類の保守点検及び校正の記録及び報告書
- 5) 職員の資格、訓練、経験及び職務分掌の記録
- 6) 全標準操作手順書の経時的ファイル
- 7) 環境モニター記録
- 8) 被験物質、対照物質、その他の試料並びに標本

目 次

	頁
要 旨	1
1 被験物質	2
1.1 名称, 構造式および物理化学的性状	2
1.2 供試試料	2
1.3 被験物質の確認および保管条件下での安定性	2
2 供試生物	3
3 試験方法	4
3.1 試験条件	4
3.2 希釈水	4
3.3 試験容器および恒温槽等	4
3.4 試験濃度の設定	4
3.5 試験液の調製(用時調製)	5
3.6 試験液の分析	5
3.7 試験操作	5
4 結果の算出	6
5 結果および考察	6
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	6
5.2 試験液中の被験物質濃度	6
5.3 半数致死濃度 (LC50)	6
5.4 0%死亡最高濃度および100%死亡最低濃度	6
5.5 毒性症状	6
5.6 試験液の水温, 溶存酸素濃度およびpH	7
Table 1~8	8~10
付属資料-1 希釈水の水質	11, 12
付属資料-2 予備試験の結果	13, 14
付属資料-3 試験液の分析法	15~18

要 旨

試験委託者 環境省

表 題 2, 6-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 No. 2002-生22

試験方法

本試験は、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) に準拠して実施した。

- 1) 被験物質: 2, 6-ジメチルアニリン
- 2) 暴露方式: 半止水式 (48時間目に試験液の全量を交換)
- 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, 100 mg/L (限度試験)
- 6) 試験液量: 3 L/容器
- 7) 連数: 1 容器/試験区
- 8) 供試生物数: 10 尾/試験区
- 9) 試験温度: 24±1 °C
- 10) 照明: 室内光、16 時間明/8 時間暗
- 11) 分析法: HPLC法

結 果

- 1) 試験液中の被験物質濃度: 被験物質の濃度は換水前後の測定値を用いて幾何平均値を求め、各影響濃度を算出した。

- 2) 96 時間の半数致死濃度 (LC50) : >97.9 mg/L

1 被験物質

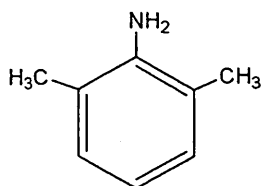
1.1 名称, 構造式および物理化学的性状*

名 称: 2, 6-ジメチルアニリン

別 名: 2, 6-キシリジン

CAS No.: 87-62-7

構造式:



分子式: $C_8H_{11}N$

分子量: 121.18

沸点: 216 °C

融点: 11.2 °C

水溶解度: 微溶(脱塩素水に 1000 mg/L 溶けることを当施設で確認した)

比重: 0.980 (20/4°C)

logP: データなし

*: [REDACTED]
[REDACTED]

1.2 供試試料

純度: 99 %

ロット番号: [REDACTED]

供給者: [REDACTED]

受領量: 25 mL 3 本

受領日: 2002年10月4日

外観: 油状液体 ([REDACTED]より)

1.3 被験物質の確認および保管条件下での安定性

被験物質は当施設の冷蔵庫に保管した。

入手した被験物質の赤外吸収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。実験終了時にも赤外吸収スペクトルを測定し、実験開始前に測定したスペクトルと比較した。その結果、スペクトルに変化はなかったことより被験物質は保管中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) 被鱗体長 : 2.11 cm (1.95 ~ 2.25 cm), n=10
- 4) 体重 : 0.13 g (0.09 ~ 0.21 g), n=10
- 5) 入手先 : 自家繁殖
- 6) ロット番号 : FJ02A4
- 7) 感受性の確認 : 基準物質(硫酸銅(Ⅱ)五水和物, 試薬特級)による96時間半数致死濃度(LC50)
= 0.27 mg/L (無水物換算) (当施設における1997年12月以降の LC50 は 0.07
~ 0.51 mg/L、n=12の範囲にある)。
- 8) 馴化期間 : 2002年12月15日 ~ 2003年 1月20日 (9ヶ月齢)
暴露開始前 7 日間の死亡率は 2%で、試験には肉眼的に健康で正常な個体を使用した。(馴化条件を以下に示す。)

馴化条件

- 1) 飼育水 : 希釈水 (3.2 参照)
- 2) 飼育方法 : 流水式
- 3) 水温 : 24±1 °C
- 4) 照明 : 室内光、16 時間明 / 8 時間暗
- 5) 餌 : テトラミン
- 6) 給餌量 : 魚体重の約 2% / 日 (暴露開始の 24 時間前からは無給餌)

3 試験方法

3.1 試験条件

- 1) 暴露方式： 半止水式 (48 時間目に試験液の全量を換水)
- 2) 暴露期間： 96 時間
- 3) 試験液量： 3 L
- 4) 連数： 1 容器/試験区
- 5) 供試生物数： 10 尾/試験区
- 6) エアレーション： なし
- 7) 試験温度： 24 ± 1 °C
- 8) 照明： 室内光、16 時間明/8 時間暗
- 9) 給餌： 無給餌
- 10) pH： 試験液の pH 調整は行わない

3.2 希釈水

脱塩素水 (給水施設の水を活性炭処理で残留塩素等を除去した後、空気による曝気処理を行ったもの) を使用した。希釈水の主な水質として、硬度が 28 mg/L (CaCO_3 換算)、pH が 7.8 であった (暴露開始時)。魚飼育水として適性な水質であると判断した。

また、2002 年 9 月 2 日の希釈水の分析結果を [付属資料-1] に示した。

3.3 試験容器および恒温槽等

- 1) 試験容器： 3 L 容ガラス製ビーカー
- 2) 恒温槽： アドバンテック東洋 恒温器 ラボサーモ (LH-2000)
- 3) 水温計： ガラス製水銀温度計
- 4) 溶存酸素計： 飯島電子工業 (B-505)
- 5) pH 計： 東亜電波工業 (HM-30 V)

3.4 試験濃度の設定

予備試験の結果 (付属資料-2) を基に、100 mg/L および対照区を設定した。(限度試験)

3.5 試験液の調製(用時調製)

500mL メスフラスコに 2,6-ジメチルアニリン 500 mg を量りとり、希釈水で定容し 1000 mg/L の試験原液を調製した(わずかに赤褐色)。その所定量を 3 L メスフラスコに入れ希釈水で定容し、100mg/L 試験液を調製した(無色透明)。

対照区は 2,6-ジメチルアニリンを加えない希釈水を用いた。

3.6 試験液の分析

開始時および 48 時間後に試験区の容器より試験液 10mL を採取し、HPLC 法により被験物質の濃度を分析した。試験液の分析に際しては、試料測定毎に標準溶液の測定を行い、そのピーク面積から定量した。

詳細は付属資料-3 (測定条件, 検量線, 添加回収, 定量下限・検出限界等) に示した。

3.7 試験操作

暴露開始時に供試魚と同水槽で馴養した魚 10 尾の体重および被験体長を測定した。

各試験容器の試験液の水温、溶存酸素濃度、pH を測定後、試験液中に供試魚を 1 試験区当り 10 尾投入した。水温、溶存酸素濃度、pH は暴露開始時および 24 時間毎(換水前後)に測定した。暴露期間中給餌は行わなかった。

暴露開始、24、48、72 および 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或いは異常の有無を記録した。一般的に記載する症例と定義を下記に示した*。

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。

*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

濃度 100 mg/L の限度試験であり、96 時間で全数生存していたことから、半数致死濃度(LC50)を 97.9 mg/L(幾何平均濃度)以上とした。

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

認められなかった。

5.2 試験液中の被験物質濃度

暴露開始時および 48 時間後に試験液中の被験物質濃度を測定した。その結果を Table 1に示した。

被験物質の濃度は換水前後の測定値を用いて幾何平均値を求め、各影響濃度を算出した。

5.3 半数致死濃度 (LC50)

各時間における死亡率および半数致死濃度 (LC50) をそれぞれ Table 2 および Table 3に示した。

対照区の死亡率は 0%であり、試験成立条件を満たした。濃度 100 mg/L の限度試験であり、96 時間で全数生存していたことから、半数致死濃度(LC50)を 97.9 mg/L(幾何平均濃度)以上とした。

96時間 LC50 : >97.9 mg/L

5.4 0%死亡最高濃度および100%死亡最低濃度

0%死亡最高濃度および 100%死亡最低濃度を Table 4 および以下に示した。

96 時間 0%死亡最高濃度 : 97.9 mg/L mg/L

96 時間 100%死亡最低濃度 : >97.9 mg/L mg/L

5.5 毒性症状

観察された毒性症状を Table 5 に示した。

暴露開始 3 時間目頃より異常遊泳(上層遊泳)が4 尾、24 時間目に 5 尾、48, 72 時間目に各 9 尾、96 時間目に 7 尾見られた。

対照区では暴露期間中に異常な症状は観察されなかった。

5.6 試験液の水温、溶存酸素濃度および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。

96 時間の暴露期間中の水温は 24 ℃で一定であった。溶存酸素濃度は 5.5 ～ 8.2 mg/L の範囲内であり、すべての試験区で飽和溶存酸素濃度の 60%以上が維持された（24.0 ℃の飽和溶存酸素濃度：8.25mg/L）。pHは 7.2 ～ 7.9 の範囲内であり、変動は 1 以下であった。

以上のことから、水温、溶存酸素濃度およびpHについては、ヒメダカの生育条件として適切な範囲であったと思われる。

以 上

Table 1. Measured Concentration of the Test Substance in Test Water

Nominal Concentration (mg/L)	(Semi-Static Condition)		Mean ^a Measured Concentration (mg/L)
	Measured Concentration, mg/L (Percent of Nominal)		
	0 Hour new	48 Hours old	
Control	< 0.01	< 0.01	----
100	101 (101)	94.9 (95)	97.9

a: Geometric mean
 new: Freshly prepared test solutions
 old: Test solutions after 48 hours exposure

Table 2. The Numbers of Dead Fish (Mortality)

Nominal Concentration (mg/L)	Mean ^a 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)
100	97.9	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)

a: Geometric mean

Table 3. Calculated LC50 Values

Exposure Period (Hours)	LC50 (mg/L)	95 % Confidence Limits (mg/L)	Statistical Method
24	>97.9	—	—
48	>97.9	—	—
72	>97.9	—	—
96	>97.9	—	—

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	97.9	>97.9
48	97.9	>97.9
72	97.9	>97.9
96	97.9	>97.9

Table 5. Observed Toxicological Symptoms

Nominal Concentration (mg/L)	Mean ^a Measured Concentration (mg/L)	Symptoms			
		24 Hours	48 Hours	72 Hours	96 Hours
Control	----	N	N	N	N
100	97.9	AS (5)	AS (9)	AS (9)	AS (7)

a : Geometric mean

N : No toxicological symptom was observed

AS: Abnormal swimming

Table 6. Temperature

Nominal Concentration (mg/L)	(Semi-Static Condition)					
	Temperature, °C					
	0 Hour	24 Hours	48 Hours		72 Hours	96 Hours
	new	old	old	new	old	old
Control	24.0	24.0	24.0	24.0	24.0	24.0
100	24.0	24.0	24.0	24.0	24.0	24.0

new: Freshly prepared test solutions

old: Test solutions after 24 and 48 hours exposure

Table 7. Dissolved Oxygen Concentrations

Nominal Concentration (mg/L)	(Semi-Static Condition)					
	Dissolved Oxygen Concentration, mg/L					
	0 Hour	24 Hours	48 Hours		72 Hours	96 Hours
	new	old	old	new	old	old
Control	8.2	6.2	5.5	8.2	6.5	5.6
100	8.2	6.8	6.9	8.2	7.2	6.6

new: Freshly prepared test solutions

old: Test solutions after 24 and 48 hours exposure

Table 8. pH Values

Nominal Concentration (mg/L)	(Semi-Static Condition)					
	pH					
	0 Hour	24 Hours	48 Hours		72 Hours	96 Hours
	new	old	old	new	old	old
Control	7.8	7.4	7.2	7.8	7.5	7.3
100	7.9	7.5	7.5	7.9	7.6	7.5

new: Freshly prepared test solutions

old: Test solutions after 24 and 48 hours exposure

付属資料－ 1

希积水の水質

Table A-1 Water Quality of Dilution Water

Parameter	Concentration
COD	<0.7 mg/L
Total phosphorus	<0.003 mg/L
pH	7.0 (25 °C)
Coliform group bacteria	N.D.
Mercury	<0.0005 mg/L
Copper	<0.01 mg/L
Cadmium	<0.002 mg/L
Zinc	<0.01 mg/L
Lead	<0.005 mg/L
Aluminium	0.06 mg/L
Nickel	<0.005 mg/L
Chromium	<0.05 mg/L
Manganese	<0.02 mg/L
Tin	<0.1 mg/L
Iron	<0.1 mg/L
Cyanide	<0.1 mg/L
Free chlorine	<0.05 mg/L
Bromide	<0.2 mg/L
Fluoride	<0.01 mg/L
Sulfide	<0.5 mg/L
Total ammonium	<0.03 mg/L
Arsenic	<0.005 mg/L
Selenium	<0.005 mg/L
Evaporation residue	52 mg/L
Electric conductivity	9.3 mS/m
Total hardness (as CaCO ₃)	30.5 mg/L
Alkalinity	27.2 mg/L
Sodium	5.4 mg/L
Potassium	1.5 mg/L
Calcium	8.8 mg/L
Magnesium	2.0 mg/L

Date of measurement: Sept. 2, 2002

付属資料－ 2

予備試験の結果

Table 1. The Numbers of Dead Fish (Mortality)

(Range finding test)				
Nominal Concentration (mg/L)	Cumulative Mortality (Percent Mortality)			
	24 Hours	48 Hours	72 Hours	96 Hours
Control	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
1	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
10	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
100	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)

付属資料－ 3

試験液の分析法

2,6-ジメチルアニリンの分析法

1 分析方法

(1) 分析法の概要

試験液または希釈した試験液の一定量を、UV 検出器を備えた HPLC に注入し、クロマトグラムと同時にピーク面積（カウント数）をデータ処理装置から求める。このピーク面積を用い、予め作成した検量線から試験液中の 2,6-ジメチルアニリンの濃度を求める。

(2) 試薬及び装置

アセトニトリル	: 試薬 HPLC 用	和光純薬(株)
りん酸二水素カリウム	: 試薬特級	関東化学(株)
純水	: 超純水製造装置 GS-200	アドバンテック(株)
2,6-ジメチルアニリン	: 試薬特級	■■■■■■■■■■
	Lot No. WAQ5400 min 99%	
メスフラスコ	: 容量 100mL、50mL、20mL	
マイクロピペット	: 容量 500 μ L、1000 μ L	
HPLC	: L-6000	(株)日立製作所
検出器 (UV)	: L-7420	(株)日立製作所
インテグレーター	: D-7500	(株)日立製作所
恒温槽	: 556	GLサイエンス(株)
マイクロシリンジ	: 容量 50 μ L	(株)伊藤製作所

(3) 操作

- ① 2 に記載する分析条件で HPLC を作動し、装置を安定させる。
- ② 3 に記載する方法で検量線の作成を行う。
- ③ 試験液を使用する検量線の濃度範囲内に入るように純水で希釈し、検量線を作成した条件の HPLC に 30 μ L を注入、クロマトグラムと同時にピーク面積を得る。
- ④ 検量線により測定時の濃度を求め、希釈率を補正して、試験液の 2,6-ジメチルアニリン濃度を算出する。

2 HPLCの測定条件

分離管	: Mightysil RP-18GP 150 mm × 4.6 mm (5 μm)	関東化学工業 (株)
検出波長	: UV 210 nm	
温度	: 40℃	
移動相	: 25mmol KH ₂ PO ₄ :アセトニトリル (50 : 50 V/V)	
流量	: 1.0 mL/min	
感度	: AUX RANGE : 0.5	
保持時間	: 4.2 min	
試料量	: 30 μL	

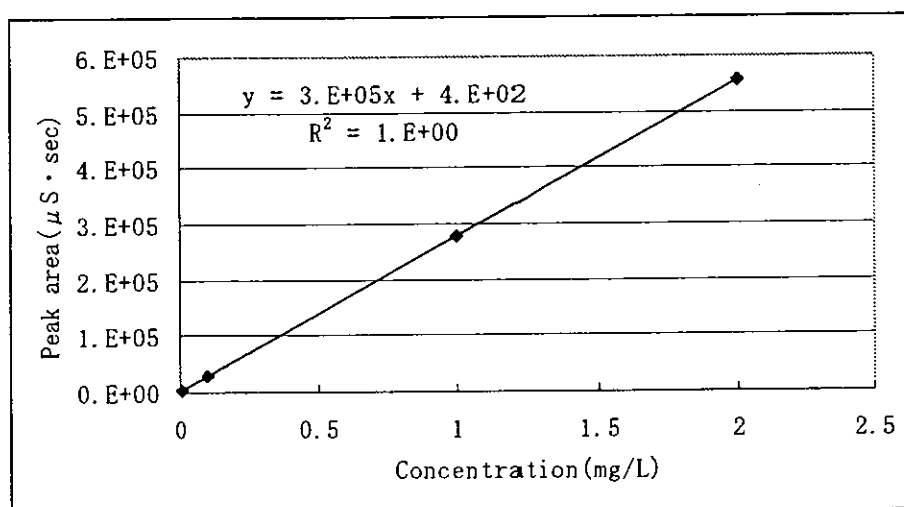
3 検量線

2,6-ジメチルアニリンの標準原液 (100mg/L) に純水を加えて希釈し、0.01, 0.1, 1.0, 2.0mg/L の標準溶液を調製する。この溶液 30 μL を HPLC に注入し、クロマトグラムを画かせピーク面積を記録させる。ピークの面積を縦軸に、濃度を横軸にとり検量線を作成する。

Table 1. 検量線データ例

No	Concentration (mg / L)	Peak Area (μS・sec)
1	0.01	2700
2	0.1	28269
3	1.0	278505
4	2.0	554834

Figure 1 Calibration Curve of 2,6-Dimethylaniline by HPLC Analysis



4 添加回収率

標準原液（200mg/L）に純水を加えて希釈し、0.10 と 1.04mg/L の試料溶液を調製し繰り返し測定により添加回収率を求めた。

結果を Table-2 に示す。平均回収率は 99.0～99.7 %であった。

Table 2. 添加回収率の測定結果

試料溶液 No.	試料濃度 (mg/L)	測定値 (mg/L)	回収率 (%)	平均回収率 (%)	変動係数 (%)
1	0.10	0.100	100.0	99.0	1.01
		0.099	99.0		
		0.098	98.0		
2	1.04	1.04	100.0	99.7	0.58
		1.03	99.0		
		1.04	100.0		

5 定量下限値および検出限界値

2,6-ジメチルアニリン濃度 0.01 mg/L 溶液を HPLC に 7 回注入し、得られた結果の標準偏差値の 10 倍を定量下限値、3 倍を検出限界値とした。

Table 3. 定量下限値および検出限界値の算出データ

No.	測定値 (mg/L)
1	0.010
2	0.010
3	0.009
4	0.010
5	0.010
6	0.009
7	0.009
平均値	0.010
標準偏差 (σ_{n-1})	0.0005

$$\text{定量下限値} = 0.0005 \times 10 \rightleftharpoons 0.01 \text{ mg/L}$$

$$\text{検出限界値} = 0.0005 \times 3 \rightleftharpoons 0.002 \text{ mg/L}$$