

環境庁殿

試 験 報 告 書

ジメチルホルムアミドのヒメダカ (*Oryzias latipes*) に対する急性毒性試験

(試験番号：5 B 4 8 0 G)

1996年 3月29日作成

株式会社三菱化学安全科学研究所

陳 述 書

株式会社三菱化学安全科学研究所
横浜研究所

試験委託者： 環境庁

表題： ジメチルホルムアミドのヒメダカ (*Oryzias latipes*) に対する急性毒性試験

試験番号： 5 B 4 8 0 G

本試験は環境庁のG L P規則に従って実施したものである。

1996年 3月29日

運営管理者

[Redacted]

[Redacted]

信頼性保証証明

株式会社三菱化学安全科学研究所
横浜研究所

試験委託者： 環境庁

表題： ジメチルホルムアミドのヒメダカ (*Oryzias latipes*) に対する急性毒性試験

試験番号： 5 B 4 8 0 G

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下記の通り確認した。

記

	実施日	運営管理者および 試験責任者への報告日
試験実施状況査察	1996年 2月 5日	1996年 2月 5日
	1996年 2月 9日	1996年 2月 9日
試験報告書監査	1996年 3月29日	1996年 3月29日

1996年 3月29日

信頼性保証担当者：

[Redacted]

[Redacted]


[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

試験実施概要

1. 表題： ジメチルホルムアミドのヒメダカ (*Oryzias latipes*) に対する急性毒性試験
2. 試験目的： ジメチルホルムアミドについて、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. 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. 203「魚類毒性試験」(1992年) に準拠した。
4. 適用GLP： 本試験は環境庁のGLP規則に準拠した。
5. 試験委託者
名称： 環境庁
住所： 〒100 東京都千代田区霞ヶ関一丁目2-2
委託担当者： 環境庁企画調整局環境保健部環境安全課保健専門官 
6. 試験受託者：
名称： 株式会社三菱化学安全科学研究所
所在地： 〒105 東京都港区芝二丁目1-30
7. 試験施設：
名称： 株式会社三菱化学安全科学研究所 横浜研究所
所在地： 〒227 神奈川県横浜市青葉区鴨志田町1000番地

8. 試験関係者：

試験責任者 [redacted] [redacted] (1996年 3月29日)

試験担当者 [redacted] [redacted] (1996年 3月29日)

[redacted] [redacted] (1996年 3月29日)

分析担当者 [redacted] [redacted] (1996年 3月29日)

9. 試験期間： 試験開始日 1995年10月23日
試験終了日 1996年 3月29日
暴露期間 1996年 2月 5日～1996年 2月 9日

10. 保管：

試験計画書，生データ，記録文書，試験報告書および被験物質は，試験報告書作成後10年間，株式会社三菱化学安全科学研究所 横浜研究所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	9
2 供試生物	10
3 試験方法	10
3.1 試験条件	10
3.2 希釈水	11
3.3 試験容器および恒温槽等	11
3.4 試験濃度の設定	11
3.5 試験液の調製	11
3.6 試験液の分析	12
3.7 試験操作	12
4 結果の算出	12
5 結果および考察	13
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	13
5.2 試験液中の被験物質濃度	13
5.3 半数致死濃度 (LC50)	13
5.4 0%死亡最高濃度および100%死亡最低濃度	13
5.5 毒性症状	13
5.6 試験液の水温, 溶存酸素濃度およびpH	14
Table 1~8	15~21
Figure 1	22
付属資料-1 希釈水の水質	23~24
付属資料-2 試験液の分析方法	25~34

要 旨

試験委託者

環境庁

表 題

ジメチルホルムアミドのヒメダカ (*Oryzias latipes*) に対する急性毒性試験

試験番号

5 B 4 8 0 G

試験方法

本試験は、OECD 化学品テストガイドライン No. 203「魚類毒性試験」(1992年)に準拠して実施した。

- 1) 被験物質： ジメチルホルムアミド
- 2) 暴露方式： 半止水式 (24時間毎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)： 対照区および100 mg/L (限度試験)
(助剤は使用しなかった)
- 6) 試験液量： 5.0L
- 7) 連数： 1 容器/濃度区
- 8) 供試生物数： 10尾/濃度区
- 9) 試験温度： 24±1℃
- 10) 照明： 16時間明/8時間暗
- 11) 被験物質の分析： GC法

結 果

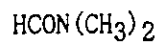
- 1) 試験液中の被験物質濃度：測定濃度の設定濃度に対する割合は±20%以内であった。したがって、結果の算出は設定濃度に基づいて行った。
- 2) 96時間の半数致死濃度 (LC50)：>100mg/L

1 被験物質

1.1 名称、構造式および物理化学的性状

名称： ジメチルホルムアミド

構造式：



分子式： $\text{C}_3\text{H}_7\text{NO}$

分子量*1： 73.09

log Pow*2： -0.87~-0.59

水への溶解度*2： 可溶

蒸気圧*2： 3.7 mmHg (25 °C) , 2.7 mmHg (20 °C)

密度*1： 0.948 g/mL (20 °C)

融点*2： -61 °C

沸点*2： 153 °C

*1:供給者提供資料

*2:環境化学物質要覧－環境庁環境化学物質研究会編，丸善（昭和63年）

1.2 供試試料

純度*1： 100.0 %

水分*1： 0.09 %

不揮発物*1： 0.005 %以下

ロット番号*1： SKJ4874

供給者：

供給量*1： 500 mL

入手日： 1995年10月9日

外観*1： 無色澄明液体

水溶状*1： 澄明

エタノール溶状*1： 澄明

*1:供給者提供資料

1.3 被験物質の確認および保管条件下での安定性

被験物質は当研究所の冷蔵庫に保管した。

入手した被験物質について赤外吸収スペクトルを測定し、被験物質の構造と矛盾が認められないことを確認した。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無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) 一般名： ヒメダカ
- 2) 学名： *Oryzias latipes*
- 3) 被鱗体長： 2.1 cm (1.9~2.4cm), n=10
- 4) 体重： 0.18 g (0.12~0.25g), n=10
- 5) 供給源： 新倉養魚場 (神奈川県伊勢原市下谷1217)
- 6) 入手日： 1995年10月25日

馴化

試験条件と同条件 (水質, 温度等) で45日間, 飼育馴化した。餌は市販のテトラミンを与えた。暴露開始の24時間前からは給餌しなかった。試験には肉眼的に健康で正常な個体を使用した。暴露開始前7日間の死亡率は5%以下であった。また, 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 (LC50) は0.88mg/Lであった。この供試魚は暴露開始の45日前に疾病予防処置としてエルバージュ®により薬浴を行った。薬浴は流水条件下で行い有効濃度に暴露された時間は約4時間であった。

エルバージュ®: 有効成分, ニフルチレン酸ナトリウム 上野製薬㈱

3 試験方法

3.1 試験条件

- 1) 暴露方式： 半止水式 (24時間毎に換水, 水中の溶存酸素濃度を飽和値の60%以上に維持するため)
- 2) 暴露期間： 96時間
- 3) 試験液量： 5.0L
- 4) 連数： 1 容器/濃度区
- 5) 供試生物数： 10尾/濃度区
- 6) エアレーション： 無し
- 7) 試験温度： $24 \pm 1^{\circ}\text{C}$
- 8) 照明： 16 時間明/8 時間暗
- 9) 給餌： 無給餌

3.2 希釈水

脱塩素水（横浜市水道水を活性炭処理し，残留塩素等を除去した後，充分通気したもの）を使用した。希釈水の硬度は50mg/L（CaCO₃換算），pHは7.9であった。

[付属資料－1]

3.3 試験容器および恒温槽等

- 1) 試験容器： 5.0 L容ガラスビーカー
- 2) 恒温槽： 塩ビ製水槽（恒温装置，タイテック製 クールニットCL-80F型）
- 3) 水温計： 横河電機製 2455 02型
- 4) pH計： 東亜電波製 HM-40V型
- 5) 溶存酸素計： 電気化学計器 DOL-10型

3.4 試験濃度の設定

本試験の実施に先立ち，対照区および1000mg/Lの濃度区（各1連，5尾／濃度区）を設定し予備試験を行った。その結果，96時間の死亡率は1000mg/L区で0%であった。

したがって，96時間LC50は100mg/L以上と判断されたことより本試験は100mg/Lの限度試験とした。

3.5 試験液の調製

被験物質500mgを希釈水で5.0Lに定容とし試験液とした。対照区には希釈水を用いた。

3.6 試験液の分析

試験開始時および24時間後に各試験水槽より試験液約2.0mLを測定容器に採取しGCで分析した。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、そのピーク面積比から定量した。詳細は付属資料-2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尾の重量および被鱗体長を測定した。

各試験水槽の試験液の水溫、溶存酸素濃度、pHを測定後、試験水槽中に供試魚を1濃度区当り10尾投入した。水溫、溶存酸素濃度、pHは試験開始時および24時間毎の換水前後に測定した。暴露期間中給餌は行わなかった。

暴露開始後、24、48、72及び96時間後に死亡個体数*および観察された毒性の徴候或いは異常（例：外部刺激への反応異常、平衡感覚喪失、遊泳異常、呼吸機能の異常、体色変化、背曲がり、出血等）を記録した。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。

*：ステンレス製ピンセットの先で尾部に軽く触れ反応がない個体を死亡とみなした。

4 結果の算出

100mg/Lの限度試験のため半数致死濃度（LC50）の算出は行えなかった。

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

該当する事象は無かった。

5.2 試験液中の被験物質濃度

試験開始時および24時間後に試験液中の被験物質濃度を測定した。試験開始時の濃度は106mg/L（設定値100mg/L）であり、24時間後の濃度は102mg/Lであった。測定濃度の設定濃度に対する割合は±20%以内であった。したがって、結果の算出は設定濃度に基づいて行った。

[Table 1(p.15), 付属資料－2]

5.3 半数致死濃度（LC50）

100mg/Lの限度試験のため半数致死濃度（LC50）の算出は行えなかった。被験物質に96時間暴露したヒメダカの死亡率は100mg/Lで0%であった。したがって、96時間の半数致死濃度（LC50）は>100mg/Lと判断した。対照区の死亡率は0%であった。

[Table 2～3(p.16～17), Figure 1(p.22)]

5.4 0%死亡最高濃度および100%死亡最低濃度

100mg/Lの限度試験のため、この濃度以上の試験は行わなかった。したがって、ヒメダカの0%死亡最高濃度は>100mg/Lであり、100%死亡最低濃度は>100mg/Lであった。

[Table 4(p.17)]

5.5 毒性症状

対照区および100mg/L区では試験期間中に異常な症状は観察されなかった。

[Table 5(p.18)]

5.6 試験液の水温，溶存酸素濃度およびpH

試験期間中の水温はすべての濃度区で $24 \pm 1^\circ\text{C}$ であった。溶存酸素濃度は $6.5 \sim 8.5 \text{ mg/L}$ であり，すべての試験水槽で飽和溶存酸素濃度の60%以上であった。pHは $7.4 \sim 8.0$ であった。

(24.0°C の飽和溶存酸素濃度： 8.25 mg/L)

[Table 6～8(p. 19～21)]

以 上

Table 1. Measured Concentration of the Test Substance During a 96-Hour Exposure

Nominal Concentration mg/L	Measured Concentration, mg/L (Percent of Nominal)		Mean ^a Measured Concentration mg/L
	0 Hr	24 Hr	
Control	<12	<12	----
100	106	102	104
	(106)	(102)	(104)

a: geometric mean

new: freshly prepared test solutions

old: test solutions after 24 hours exposure period

Table 2. Mortality of the Orange killifish (Oryzias latipes) Exposed to the Test Substance

Nominal Concentration mg/L	Cumulative Number of Dead (Percent Mortality)							
	24 Hours		48 Hours		72 Hours		96 Hours	
Control	0	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)
100	0	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)

Table 3. Calculated LC50 Values

Exposure Period (Hours)	LC50 (mg/L)	95-Percent Confidence Limits (mg/L)	Statistical Method
24	>100	-- ~ --	--
48	>100	-- ~ --	--
72	>100	-- ~ --	--
96	>100	-- ~ --	--

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

Exposure Period (Hours)	Highest Concentration in 0% Mortality (mg/L)	Lowest Concentration in 100% Mortality (mg/L)
24	100	--
48	100	--
72	100	--
96	100	--

Table 5. Symptoms of Toxicity Observed in the Orange killifish (Oryzias latipes)

Nominal Concentration mg/L	Symptoms			
	24 Hours	48 Hours	72 Hours	96 Hours
Control	N	N	N	N
100	N	N	N	N

N : No toxicological symptom was observed

Table 6. Temperature Values

Nominal Concentration mg/L	Temperature, °C							
	0 Hour	24 Hours		48 Hours		72 Hours		96 Hours
	new	old	new	old	new	old	new	old
Control	23.7	23.8	23.5	23.7	23.4	23.6	23.3	23.7
100.0	24.0	24.2	23.6	23.9	23.4	23.4	23.4	23.4

new: freshly prepared test solutions

old: test solutions after 24 hours exposure period

Table 7. Dissolved Oxygen Concentrations

Nominal 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	8.4	6.8	8.5	7.0	8.3	6.7	8.3	6.5
100.0	8.4	7.0	8.5	7.4	8.3	6.9	8.2	6.8

new: freshly prepared test solutions

old: test solutions after 24 hours exposure period

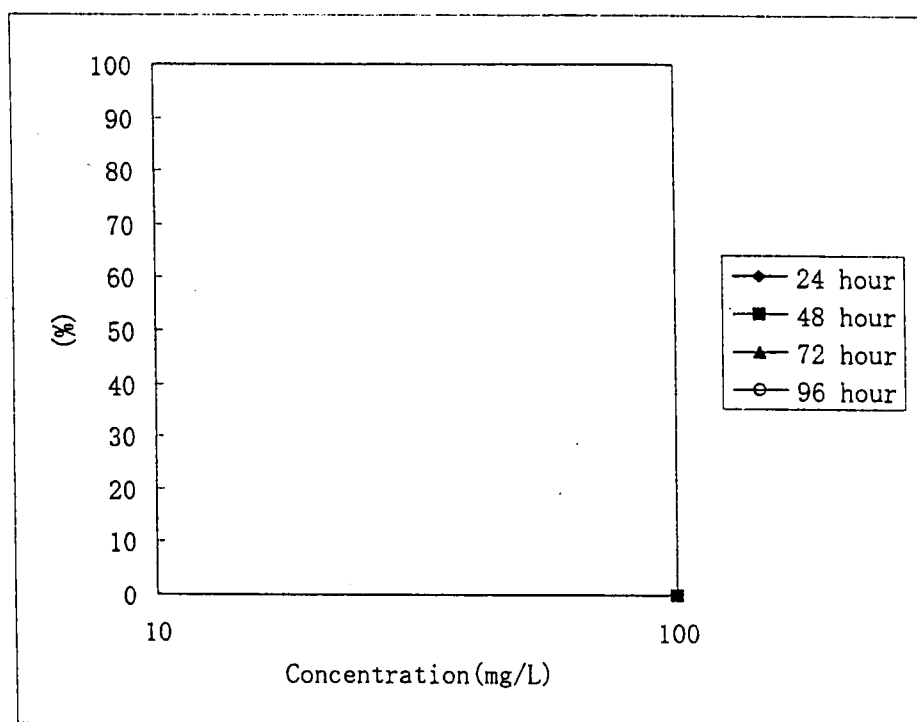
Table 8. pH Values

Nominal 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	7.4	7.7	7.6	7.9	7.5	7.8	7.4
100.0	7.8	7.5	7.9	7.7	8.0	7.5	7.8	7.5

new: freshly prepared test solutions

old: test solutions after 24 hours exposure period

Figure 1 Concentration-Response Curve



付属資料－ 1

希釈水の水質

Water Quality of Dilution Water

Parameter	Concentration
COD	<1 mg/L
Total phosphorus	<0.01 mg/L
pH	7.9 (22°C)
Coliform group bacteria	N. D.
Mercury	<0.0001 mg/L
Copper	<0.001 mg/L
Cadmium	<0.001 mg/L
Zinc	0.02 mg/L
Lead	<0.01 mg/L
Aluminium	0.05 mg/L
Nickel	<0.01 mg/L
Chromium	<0.01 mg/L
Manganese	<0.1 mg/L
Tin	<0.1 mg/L
Iron	<0.1 mg/L
Cyanide	<0.001 mg/L
Free chlorine	0.01 mg/L
Bromide ion	<0.1 mg/L
Fluoride	<0.1 mg/L
Sulfide ion	<0.03 mg/L
Ammonium ion	<0.1 mg/L
Arsenic	<0.01 mg/L
Selenium	<0.01 mg/L
Evaporation residue	110 mg/L
Electric conductivity	140 μ S/cm
Total hardness (as CaCO ₃)	50 mg/L
Alkalinity	40 mg/L
Sodium	6.6 mg/L
Potassium	1.2 mg/L
Calcium	7.8 mg/L
Magnesium	3.6 mg/L

measured date: November 24, 1995

付属資料－ 2

試験液の分析方法

試験液の分析方法

1 試験液の分析方法

(1) 各試験容器より試験液約2.0mLを測定容器に採取

↓

(2) GCで測定

2 ガスクロマトグラフィー (GC) 測定条件

(装置)

ガスクロマトグラフ： HEWLETT PACKARD HP 5890 SERIES II
オートサンプラ： HEWLETT PACKARD 7673
検出器： FID (Flame Ionization Detector)
データ処理装置： HEWLETT PACKARD GC-AED-MS ChemStation

(条件)

カラム： HP FFAP 25m×0.20mm×0.33 μ m
キャリアーガス： ヘリウム 1.0mL/min
オープン温度： 40°C (1.0min) → 12°C/min → 140°C (0.7min)
注入口温度： 140°C
検出器温度： 230°C
注入方法： Split Split Ratio: 30/1
注入量： 1.0 μ L

3 検量線

被験物質の1000mg/L 水溶液を調製し、順次、水で希釈し0, 50, 100, 200, 500, 1000mg/Lの標準溶液を調製した。この標準溶液を、GCに注入しピーク面積を測定した。横軸に濃度を (mg/L) , 縦軸にピーク面積 (count) をとり、検量線を作成した。検量線はほぼ原点を通る直線となり、最小二乗法による直線回帰式の相関係数は1.00000と良好であった。

4 定量限界

最小検出ピーク面積を20countに設定し、これに相当する試験液中の被験物質濃度12mg/Lを定量限界とした。

5 添加回収試験

試験液の分析は、「1 試験液の分析方法」に示したように試験液を直接GCで分析する操作だけであるので添加回収試験の必要は無かった。したがって、回収率の補正は行っていない。

Figure A-2-1 Calibration Curve of the Test Substance by GC Analysis

No.	Concentration (mg/L)	Peak Area (count)
1	0	0.00
2	50.0	93.31
3	100.0	189.70
3	200.0	385.80
4	500.0	960.44
5	1000.0	1927.00

$$Y = -1.779 + 1.928 X$$

$$r = 1.00000$$

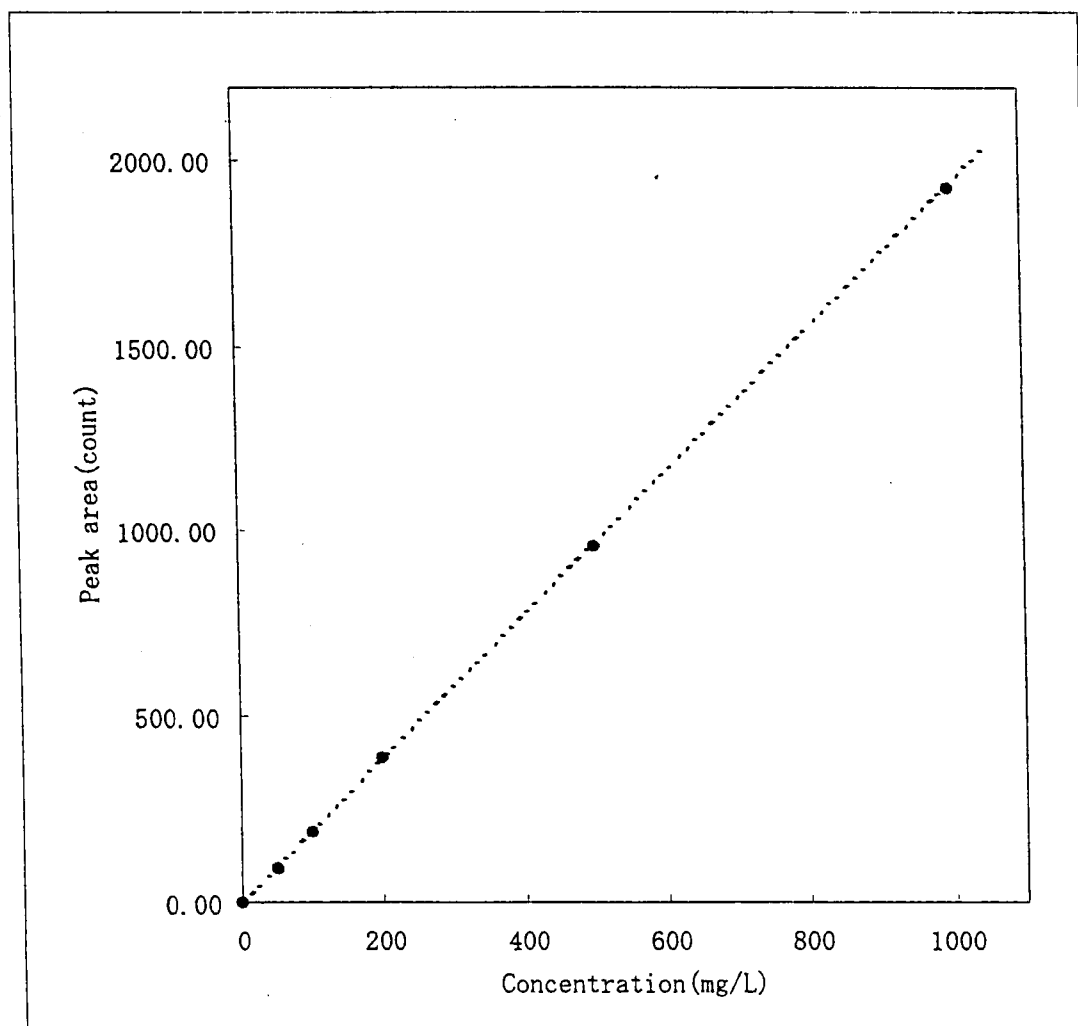
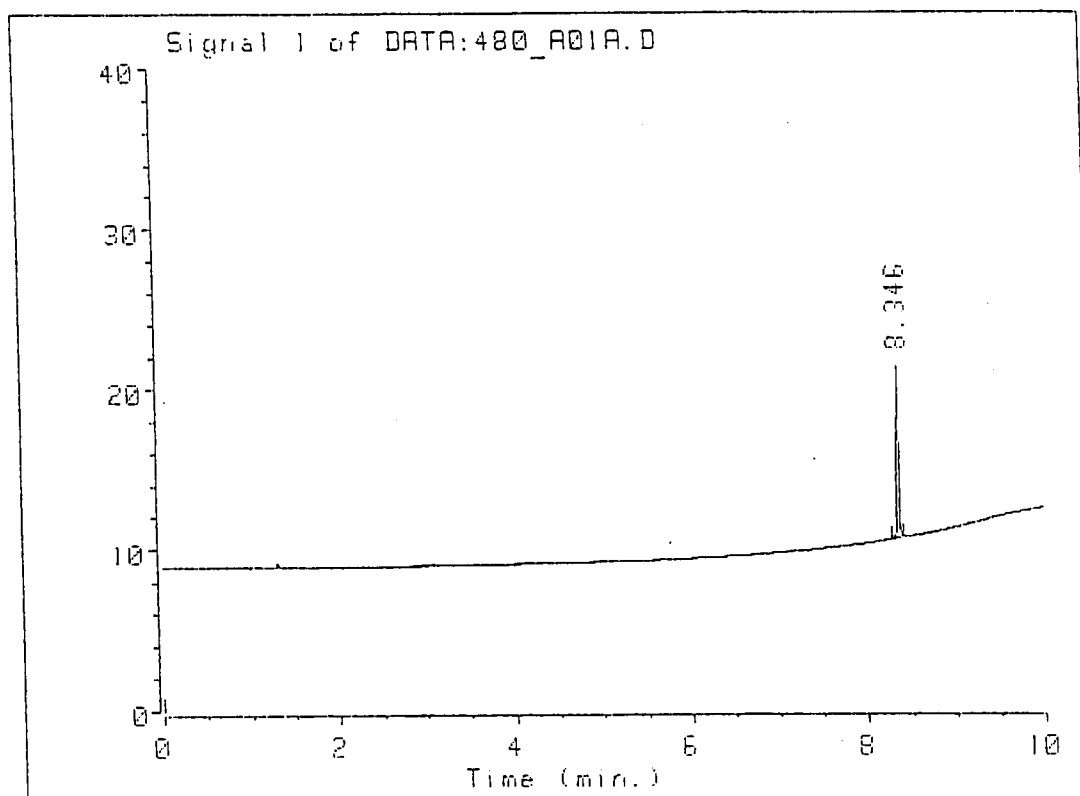


Figure A-2-2 Representative chromatograms

(1) Standard 100mg/L; 0 hour

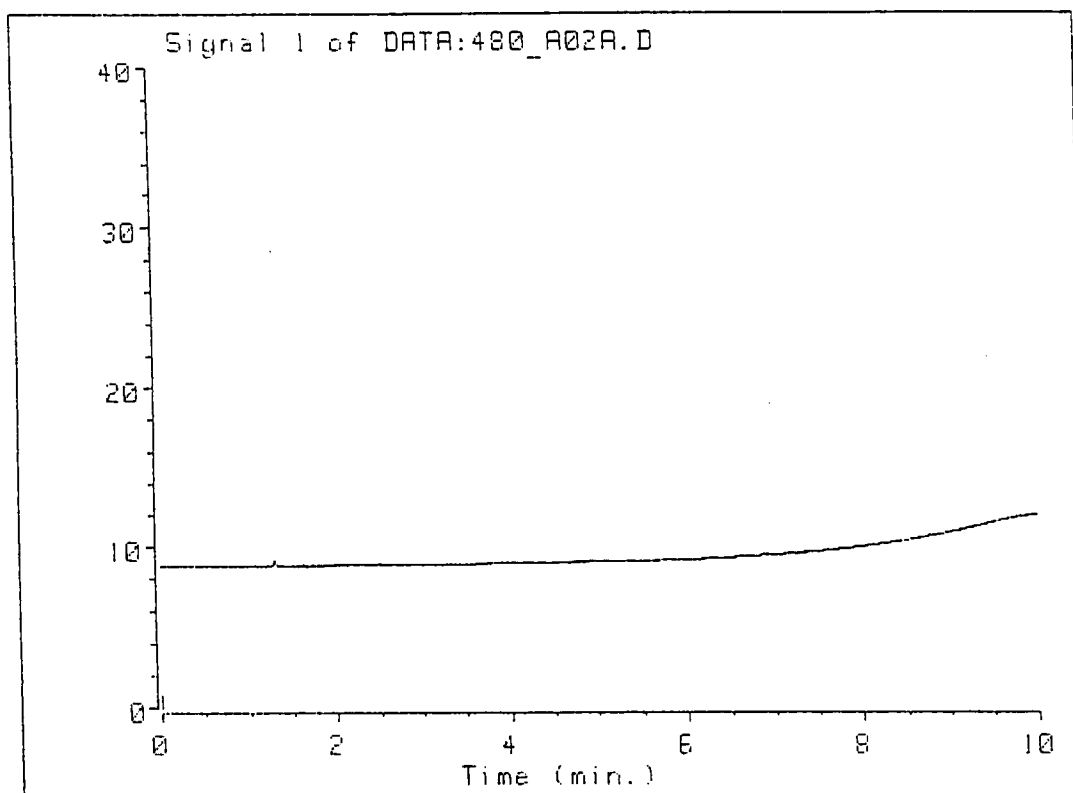


Signal 1 of DATA:480_A01A.D
DATA:480_A01A.D

PK#	RT	Time	Type	Width	Area	StartTime	EndTime	Symmetry	Height
1	8.346	BB		0.025	169.68	8.280	8.413	0.8049	10.81

Figure A-2-2 Representative chromatograms

(2) Control ; 0 hour

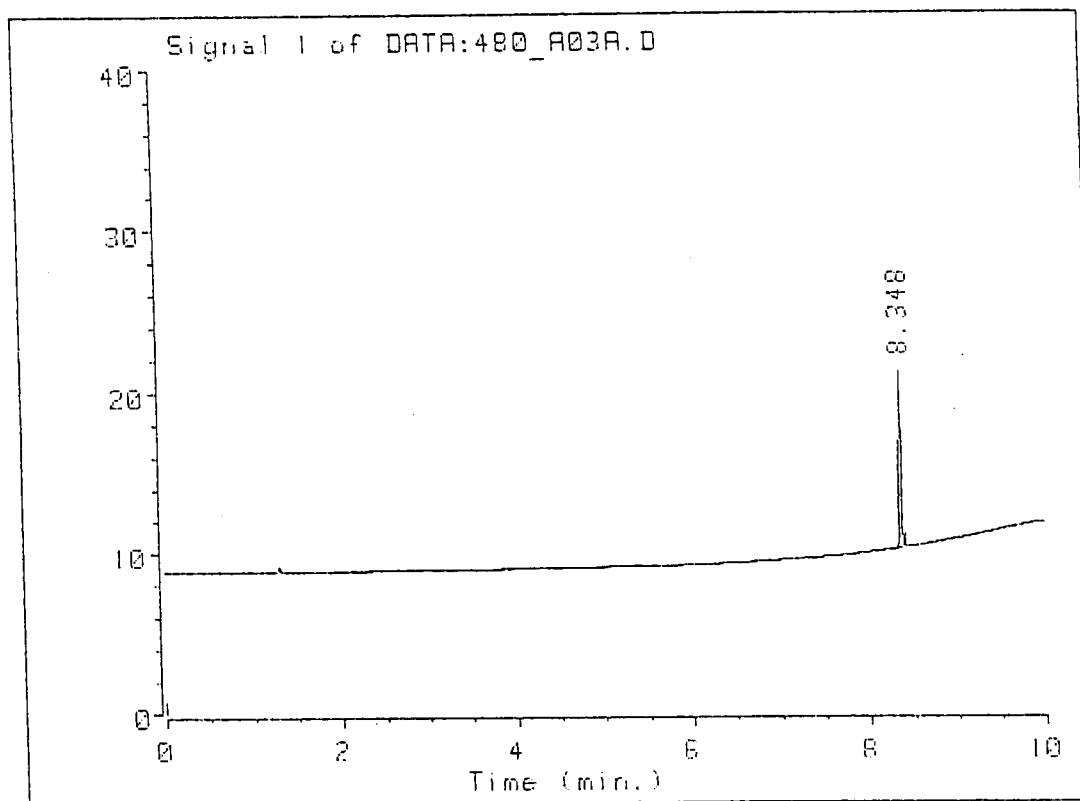


Signal 1 of DATA:480_A02A.D
DATA:480_A02A.D

No peaks detected

Figure A-2-2 Continued

(3) 100mg/L nominal; 0 hour

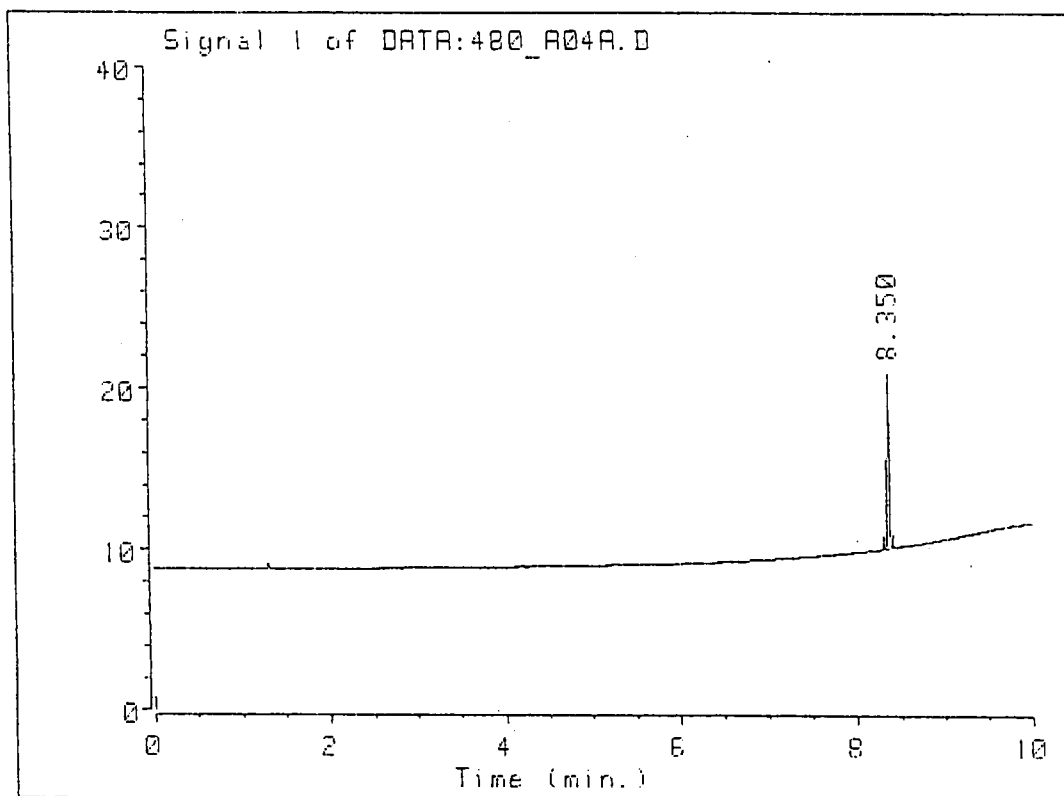


Signal 1 of DATA:480_A03A.D
DATA:480_A03A.D

PK#	RT	Time	Type	Width	Area	StartTime	EndTime	Symmetry	Height
1	8.348	BB		0.026	180.02	8.307	8.417	0.7932	11.10

Figure A-2-2 Continued

(4) Standard 100mg/L; 24 hour

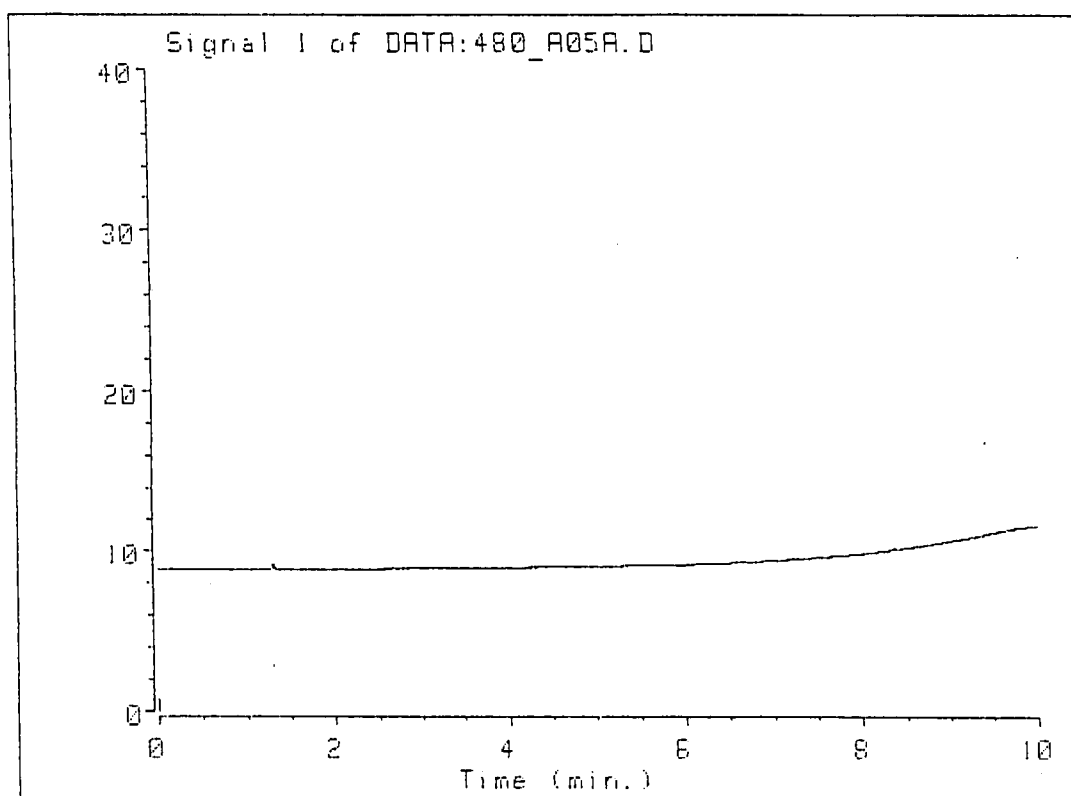


Signal 1 of DATA:480_A04A.D
DATA:480_A04A.D

PK#	Rt	Time	Type	Width	Area	StartTime	EndTime	Symmetry	Height
1	8.350	BB		0.025	172.09	8.300	8.413	0.8332	10.81

Figure A-2-2 Continued

(5) Control ; 24 hour

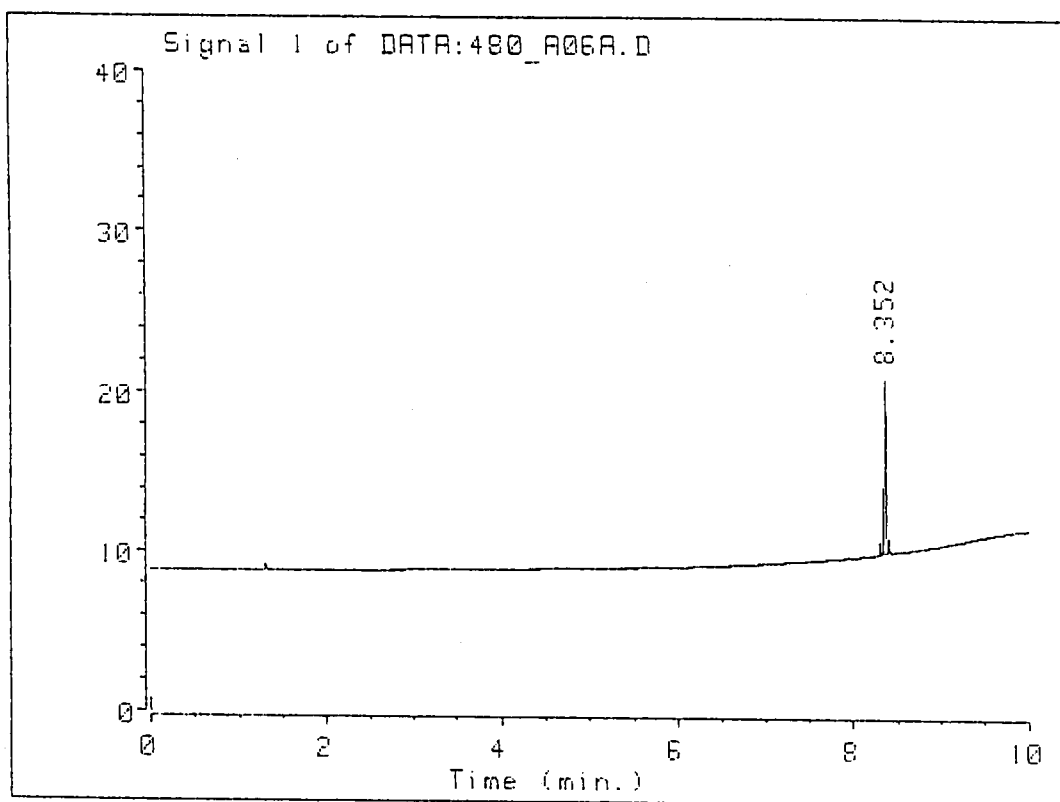


Signal 1 of DATA:480_A05A.D
DATA:480_A05A.D

No peaks detected

Figure A-2-2 Continued

(6) 100mg/L nominal; 24 hour



Signal 1 of DATA:480_A06A.D
DATA:480_A06A.D

PK#	Rt	Time	Type	Width	Area	StartTime	EndTime	Symmetry	Height
1	8.352	BB	0.025	175.15	8.303	8.420	0.8070	11.00	