

受付番号	662-11-E-5705
試験番号	95705

## 最 終 報 告 書

o-ニトロアニリンのヒメダカを用いる 96 時間急性毒性試験

2012 年 2 月

一般財団法人化学物質評価研究機構

久留米事業所

本文書は正本を正確に転写したものです。

一般財団法人 化学物質評価研究機構 久留米事業所

2012 年 2 月 20 日

試験責任者

## 陳 述 書

一般財団法人化学物質評価研究機構  
久留米事業所

試験委託者 環境省

試験の表題 *o*-ニトロアニリンのヒメダカを用いる 96 時間急性毒性試験

試験番号 95705

上記試験は以下の GLP に従って実施したものである。

- a) 「新規化学物質等に係る試験を実施する試験施設に関する基準について」（平成 23 年 3 月 31 日、薬食発 0331 第 8 号、平成 23・03・29 製局第 6 号、環保企発第 110331010 号）に定める「新規化学物質等に係る試験を実施する試験施設に関する基準」
- b) OECD Principles of Good Laboratory Practice, November 26, 1997

また、本最終報告書は生データを正確に反映しており、試験データが有効であることを確認した。

2012 年 2 月 10 日

試験責任者

## 信 頼 性 保 証 書

一般財団法人化学物質評価研究機構  
久留米事業所

試験委託者 環境省

試験の表題 o-ニトロアニリンのヒメダカを用いる96時間急性毒性試験

試験番号 95705

本最終報告書は、試験の方法、手順が正確に記載され、試験結果は生データを正確に反映していることを保証する。

なお、監査又は査察の結果については、下記の通り試験責任者及び運営管理者に報告した。

監査又は査察内容	監査又は査察日	報告日 (試験責任者及び運営管理者)
試験計画書草案	2011年12月15日	2011年12月15日
試験計画書草案再査察	2011年12月16日	2011年12月16日
試験計画書	2011年12月19日	2011年12月19日
暴露開始時	2011年12月19日	2011年12月20日
暴露開始後	2011年12月22日	2011年12月22日
暴露開始後	2011年12月23日	2011年12月26日
生データ、最終報告書草案	2012年1月23日	2012年1月23日
最終報告書	2012年2月10日	2012年2月10日

2012 年 2 月 10 日

信 頼 性 保 証 部 門 責 任 者

## 目 次

	頁
1. 表 題 .....	6
2. 試験委託者 .....	6
3. 試験施設 .....	6
4. 試験目的 .....	6
5. 試験法 .....	6
6. GLP 基準 .....	6
7. 試験日程 .....	6
8. 試資料の保管 .....	7
9. 試験関係者 .....	7
10. 最終報告書の承認 .....	7
11. 要 約 .....	8
12. 試験材料 .....	9
12.1 被験物質 .....	9
12.2 試験生物 .....	10
13. 試験の実施 .....	11
13.1 試験用水 .....	11
13.2 試験器具及び装置 .....	11
13.3 試験液の調製法 .....	11
13.4 試験条件 .....	11
13.5 観察と測定 .....	11
13.6 $LC_{50}$ の算出法 .....	12
13.7 試験の有効性 .....	12
13.8 数値の取扱い .....	12
14. 試験結果及び考察 .....	12
14.1 死亡率 .....	12
14.2 一般状態等の観察結果 .....	12
14.3 試験生物の大きさ .....	13
14.4 試験液の観察と測定結果 .....	13
14.5 $LC_{50}$ .....	13
14.6 考 察 .....	13
15. 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

## Tables

Table 1	Cumulative mortality.....	14
Table 2	Observed abnormal response.....	15
Table 3-1	Dissolved oxygen concentration of test solutions .....	16
Table 3-2	pH of test solutions.....	16
Table 3-3	Temperature of test solutions.....	17
Table 4	LC <sub>50</sub> to Medaka.....	17

## Figure

Figure 1	Concentration-cumulative mortality curve.....	18
----------	---	----

Appendix 1	試験用水の水質
Appendix 2	被験物質濃度の測定方法及び結果
Appendix 3	検量線及びクロマトグラム
Additional data	予備試験結果

## 1. 表 題

*o*-ニトロアニリンのヒメダカを用いる 96 時間急性毒性試験

## 2. 試験委託者

名 称 環境省  
住 所 〒100-8975 東京都千代田区霞が関 1-2-2

## 3. 試験施設

名 称 一般財団法人化学物質評価研究機構 久留米事業所  
住 所 〒839-0801 福岡県久留米市宮ノ陣三丁目 2 番 7 号

## 4. 試験目的

*o*-ニトロアニリンのヒメダカ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。

## 5. 試験法

- a) 「新規化学物質等に係る試験の方法について」(平成 23 年 3 月 31 日、薬食発 0331 第 7 号、平成 23・03・29 製局第 5 号、環保企発第 110331009 号) に定める「魚類急性毒性試験」
- b) OECD Guidelines for Testing of Chemicals, No.203, July 17, 1992, "Fish, Acute Toxicity Test"

## 6. GLP 基準

- a) 「新規化学物質等に係る試験を実施する試験施設に関する基準について」(平成 23 年 3 月 31 日、薬食発 0331 第 8 号、平成 23・03・29 製局第 6 号、環保企発第 110331010 号) に定める「新規化学物質等に係る試験を実施する試験施設に関する基準」
- b) OECD Principles of Good Laboratory Practice, November 26, 1997

## 7. 試験日程

試 験 開 始 日	2011 年 12 月 16 日
実 験 開 始 日	2011 年 12 月 19 日
実 験 終 了 日	2011 年 12 月 23 日
試 験 終 了 日	2012 年 2 月 10 日

## 8. 試資料の保管

試験計画書（正本）、最終報告書（正本）、生データ、試験委託書、契約書写し及びその他の記録は当試験施設に保管し、被験物質は保管しない。

保管期間は最終報告書提出後 10 年間とする。

保管期間終了後の処置（継続保管、廃棄又は返却）は、試験委託者と協議の上決定する。

## 9. 試験関係者

試験責任者

[REDACTED]

（所属 試験第四課）

試験担当者（生物試験の実施）

[REDACTED]

試験担当者（分析試験の実施）

[REDACTED]

## 10. 最終報告書の承認

2012 年 2 月 10 日

試験責任者

[REDACTED]

## 11. 要 約

試験条件

試験生物	ヒメダカ ( <i>Oryzias latipes</i> )
試験用水	脱塩素水道水
試験区	100、53、28、15、7.7 mg/L (公比 1.9) 及び対照区
試験液の調製	供試試料と試験用水を混合、攪拌して調製した試験原液を用いて調製
暴露方式	止水式
暴露期間	96 時間
連 数	1 連/試験区
試験生物数	7 尾/試験区
試験液量	約 5 L/試験区
水 温	23.7～24.4℃
エアレーション	有り
照 明	室内灯、16 時間明/8 時間暗
給 餌	無給餌
被験物質濃度の測定	HPLC 法 (暴露開始時及び終了時又は全個体死亡確認時)

試験結果

96 時間 LC <sub>50</sub>	42 mg/L (95%信頼限界：29～61 mg/L)
96 時間 100%死亡最低濃度	100 mg/L
96 時間 0%死亡最高濃度	15 mg/L
(上記濃度は、設定濃度に基づく値)	



## 12. 試験材料

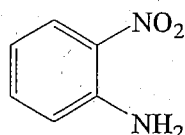
## 12.1 被験物質

## a) 名称等

名 称 *o*-ニトロアニリン  
CAS 番号 88-74-4

## b) 構造式等

構造式

分子式  $C_6H_5NO_2$ 分子量 138.13 <sup>\*1</sup><sup>\*1</sup> 原子量表 (2011) を用いて算出した値

## c) 供試試料

被験物質純度 100.0% (キャピラリーカラム GC) <sup>\*2</sup>

供給者

ロット番号

被験物質は純度 100%として取り扱った。

<sup>\*2</sup> 供給者提供の検査成績書

## d) 物理化学的性状

蒸気圧 4 Pa (20℃) <sup>\*3</sup>対水溶解度 14.9 g/L (30℃) <sup>\*3</sup>

1-オクタノール/水分配係数

 $\log P_{\text{oct}} 1.44/1.83$  <sup>\*4</sup>融 点 73.3℃ <sup>\*2</sup>沸 点 284℃ <sup>\*3\*4\*5</sup>常温における性状 黄みの赤褐色、粉末又は小塊 <sup>\*2</sup>安定性 光により変質する <sup>\*5</sup>

溶媒に対する溶解度等

エタノール、アセトン、ジエチルエーテル及び希塩酸に溶けやすく、水にほとんど溶けない。 <sup>\*5</sup>

比 重 0.9015 (25/4℃) <sup>\*3\*5</sup><sup>\*3</sup> 化学物質総合情報提供システム (CHRIP)<sup>\*4</sup> Kavel verschueren "Handbook of Environmental Data on Organic Chemicals" 4<sup>th</sup> Ed.<sup>\*5</sup> 製造元 ( ) の製品安全データシート

## e) 保管条件

冷暗所保管した。

## f) 被験物質の同一性及び保管条件下における安定性の確認

当試験施設で測定した赤外吸収スペクトルが独立行政法人産業技術総合研究所の有機化合物スペクトルデータベースに記載の赤外吸収スペクトルと一致することを確認した。また、実験開始前及び終了後の赤外吸収スペクトルを比較することにより、保管条件下における被験物質の安定性を確認した。

## g) 取扱い上の注意

手袋、マスク、保護めがね及び白衣を着用し、皮膚、目への接触及び吸入を避けた。  
また、被験物質はひょう量時のみ黄色灯下で取り扱った。

## 12.2 試験生物

種	ヒメダカ ( <i>Oryzias latipes</i> )
生物種選択の理由	テストガイドラインに推奨されている種
供給源	当試験施設 (自家生産)
大きさ	全長 $2.3 \pm 1.2$ cm、5. a) に定める規定値を適用
群分け	無作為抽出
順 化	
ふ化日	2011 年 9 月 5 日 (供試時月齢 ; 3 か月齢)
飼育水	脱塩素水道水
溶存酸素濃度	飽和溶存酸素濃度の 80% 以上
水 温	$24 \pm 1^\circ\text{C}$
明暗周期	室内灯による 16 時間明/8 時間暗
餌 料	こい稚魚育成用配合餌料 2C (日本配合飼料)
給餌量・頻度	魚体重の 3% 量/日を毎日
薬 浴	実施せず
順化期間	23 日間 (2011 年 11 月 26 日～2011 年 12 月 19 日)
供試群の死亡率	0% (供試前 7 日間)
無給餌期間	供試前 24 時間は餌を与えなかった。
試験系の再現性の確認	定期的に基準物質による急性毒性試験を実施 最新のデータを以下に示す。 基準物質：硫酸銅 (II) 五水和物 (和光純薬工業 試薬特級 ロット番号 LAJ5671) 実施期間：2011 年 11 月 28 日～12 月 2 日 96 時間 $\text{LC}_{50}$ : 0.54 mg/L この値は当試験施設におけるバックグラウンドデータの規定範囲内 (平均 $\pm 2 \times$ 標準偏差) であった [平均 $\pm$ 標準偏差 $0.54 \pm 0.20$ mg/L (n=48) ]。以上のデータは全て硫酸銅 (II) 換算で表示した。

### 13. 試験の実施

#### 13.1 試験用水

十分にエアレーションし、温度調節した脱塩素水道水を用いた。定期的に測定した試験用水の水質測定結果を Appendix 1 に示す。なお、水質測定結果は当試験施設の標準操作手順書で規定した基準を満たしていた。

#### 13.2 試験器具及び装置

試験容器	7.8 L 容ガラス製容器（直径 24 cm, 深さ 28 cm）
蓋	透明なプラスチック製の蓋
恒温槽	プラスチック製水槽
	加熱・冷却ユニット HCA 250（佐藤工業）

#### 13.3 試験液の調製法

必要量の供試試料をひょう量後、試験用水と混合し、超音波照射しながら攪拌、溶解させて 500 mg/L の試験原液を調製した。必要量の試験原液を試験容器に入れた試験用水に添加後、攪拌して試験液を調製した。ひょう量は黄色灯下で行った。

#### 13.4 試験条件

暴露方式	止水式（試験液の交換無し）
暴露期間	96 時間
試験濃度	100、53、28、15、7.7 mg/L（公比 1.9） 予備試験結果から試験濃度及び公比を決定した。 予備試験結果を Additional data に示す。
対照区	被験物質を含まない試験用水
連 数	1 連/試験区
試験生物数	7 尾/試験区
試験液量	約 5 L/試験区
水 温	24±1℃
エアレーション	緩やかなエアレーションを実施
pH 調整	無し
照 明	室内灯による 16 時間明/8 時間暗
給 餌	無給餌

#### 13.5 観察と測定

##### a) 試験生物の一般状態

死亡と一般状態を暴露開始 3、24、48、72 及び 96 時間後に観察した。観察可能な動き（吻、鰓蓋の動き等）がなく、ガラス棒で尾柄部に軽く触れ反応がない個体を死亡とみなした。死亡した個体は確認した時点で、速やかにとり除いた。

##### b) 試験生物の全長及び体重

暴露終了後、対照区の試験生物について全長及び体重を測定

##### c) 試験液の状態

暴露開始時及び終了時又は全個体死亡確認時に観察

## d) 試験液の水質

測定項目	溶存酸素濃度、pH 及び水温
測定頻度	暴露開始時及びその後 24 時間ごと
測定方法	試験容器より一部分取した試験液について測定
測定機器	溶存酸素計 YSI MODEL 58 (YSI Incorporated) ポータブル pH 計 HM-21P (東亜ディーケーケー) 検定済ガラス製棒状温度計

## e) 試験液中の被験物質濃度

測定頻度	暴露開始時及び終了時又は全個体死亡確認時
採水方法	試験容器の中層から採取
採水量	約 10 mL (全試験区)
測定方法	Appendix 2 参照

13.6 LC<sub>50</sub> の算出法

24、48 及び 96 時間については Probit 法により算出した。また、それらの 95%信頼限界も算出し、算出に用いた回帰直線の傾きも求めた。72 時間については、Binomial 法により算出した。

LC<sub>50</sub> は、当事業所にて開発したコンピュータプログラム (Microsoft Excel により起動) により算出した。

なお、暴露期間中に測定した試験液中の被験物質濃度が設定濃度の±20%以内であったため、結果の算出には設定濃度を用いることとした。

## 13.7 試験の有効性

- 暴露期間中、対照区における死亡数が 1 尾を超えてはならない。
- 暴露期間中の溶存酸素濃度は、試験水温での飽和溶存酸素濃度の 60%以上でなければならない。

## 13.8 数値の取扱い

数値の丸め方は、JIS Z 8401: 1999 規則 B に従った。

## 14. 試験結果及び考察

## 14.1 死亡率

各時間での累積死亡率を Table 1、濃度－累積死亡率曲線を Figure 1 に示す。

96 時間における 100%死亡最低濃度は 100 mg/L であった。0%死亡最高濃度は 15 mg/L であった。なお、暴露終了時における対照区の死亡数は 0 尾であり、有効性基準 (1 尾を超えない) を満たしていた。

## 14.2 一般状態等の観察結果

暴露期間中における一般状態の観察結果を Table 2 に示す。

対照区において、症状は認められなかった。

以下の観察結果はすべて対照区との比較に基づくものである。暴露期間中に観察された症状は遊泳異常及び外見異常であった。

## 14.3 試験生物の大きさ

[平均値±標準偏差 (n=7)]

全長  $2.4 \pm 0.1$  cm

体重  $0.11 \pm 0.02$  g

## 14.4 試験液の観察と測定結果

## a) 試験液の状態

暴露開始時は全試験濃度区において濃度に依存して黄色澄明であった。暴露終了時あるいは全個体死亡時はともに黄色澄明であった。

対照区では暴露開始時及び終了時ともに無色透明であった。

## b) 試験液の水質

試験液の水質を Table 3-1、3-2 及び 3-3 に示す。

暴露期間中に測定した溶存酸素濃度は 8.1~8.4 mg/L、pH は 7.6~7.9、水温は 23.7~24.4℃であった。なお、溶存酸素濃度は有効性基準（試験水温での飽和濃度\*の 60%以上）を満たしていた。

\* 23~25℃の飽和溶存酸素濃度: 8.39~8.11 mg/L、JIS K 0102: 2008

## c) 試験液中の被験物質濃度

被験物質濃度の測定方法及び結果を Appendix 2、検量線及びクロマトグラムを Appendix 3 に示す。

測定した試験液中の被験物質濃度は、暴露開始時では設定濃度に対して 98~99%、全個体死亡確認時及び暴露終了時は 98~102%であり、設定濃度の±20%以内に維持されていた。

14.5 LC<sub>50</sub>

24 時間ごとの LC<sub>50</sub> を Table 4 に示す。

被験物質のヒメダカに対する 48 時間 LC<sub>50</sub> は 73 mg/L（95%信頼限界：52~100 mg/L）、96 時間 LC<sub>50</sub> は 42 mg/L（95%信頼限界：29~61 mg/L）であった。

## 14.6 考 察

試験は被験物質の試験用水への溶解濃度以下での試験生物に対する LC<sub>50</sub> を求める試験として行った。その結果、96 時間 LC<sub>50</sub> は 42 mg/L であった。試験液中の被験物質濃度は設定濃度の±20%以内に保たれ、また、試験環境条件も適切な範囲内であったことから、試験は試験法に準じたものであったと判断される。

## 15. 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

当該要因はなかった。

Table 1 Cumulative mortality

Nominal concentration (mg/L)	Cumulative mortality (%)				
	3 hours	24 hours	48 hours	72 hours	96 hours
Control	0	0	0	0	0
7.7	0	0	0	0	0
15	0	0	0	0	0
28	0	0	0	0	29
53	0	14	14	43	57
100	0	71	86	100	100

Table 2 Observed abnormal response

Nominal concentration (mg/L)	Category		Observation result of each category (Left column: number, Right column: Symptom detail)									
				3 hours	24 hours	48 hours	72 hours	96 hours				
Control	Death, Critical	D	0		0		0		0		0	
		IS	0		0		0		0		0	
	Abnormal		0		0		0		0		0	
	Normal		7		7		7		7		7	
7.7	Death, Critical	D	0		0		0		0		0	
		IS	0		0		0		0		0	
	Abnormal		0		0		0		0		0	
	Normal		7		7		7		7		7	
15	Death, Critical	D	0		0		0		0		0	
		IS	0		0		0		0		0	
	Abnormal		0		0		0		0		0	
	Normal		7		7		7		7		7	
28	Death, Critical	D	0		0		0		0		2	
		IS	0		0		0		0		0	
	Abnormal		5	ASW (5)	7	ASW (4) ASW+AA (3)	7	ASW (4) ASW+AA (3)	6	ASW (5) ASW+AA (1)	4	ASW (4)
	Normal		2		0		0		1		1	
53	Death, Critical	D	0		1		1		3		4	
		IS	0		0		0		0		0	
	Abnormal		7	ASW (6) ASW+AA (1)	6	ASW (3) ASW+AA (3)	6	ASW (3) ASW+AA (3)	4	ASW (3) ASW+AA (1)	3	ASW (3)
	Normal		0		0		0		0		0	
100	Death, Critical	D	0		5		6		7		7	
		IS	0		0		1		0		0	
	Abnormal		7	ASW (7)	2	ASW (2)	0		0		0	
	Normal		0		0		0		0		0	

Abbreviation of terms (D: Death, IS: Impossible swim, ASW: Abnormal swimming, AA: Abnormal appearance)

Value in parentheses expresses the number of individuals shown the symptom.

Table 3-1 Dissolved oxygen concentration of test solutions

Nominal concentration (mg/L)	At the start	24 hours	48 hours	72 hours	At the end
Control	8.4	8.2	8.2	8.2	8.3
7.7	8.4	8.3	8.3	8.2	8.3
15	8.4	8.3	8.2	8.2	8.3
28	8.4	8.3	8.3	8.3	8.4
53	8.4	8.2	8.3	8.3	8.3
100	8.4	8.1	8.2	8.1	-

Unit : mg/L

- : All test organisms died.

Table 3-2 pH of test solutions

Nominal concentration (mg/L)	At the start	24 hours	48 hours	72 hours	At the end
Control	7.6	7.6	7.7	7.6	7.9
7.7	7.6	7.7	7.8	7.8	7.9
15	7.7	7.8	7.9	7.9	7.9
28	7.7	7.8	7.8	7.9	7.9
53	7.7	7.7	7.7	7.8	7.8
100	7.7	7.8	7.7	7.9	-

- : All test organisms died.



Table 3-3 Temperature of test solutions

Nominal concentration (mg/L)	At the start	24 hours	48 hours	72 hours	At the end
Control	23.8	24.3	24.3	24.3	23.7
7.7	23.9	24.4	24.1	24.3	23.7
15	23.8	24.4	24.2	24.3	23.7
28	23.9	24.4	24.2	24.3	23.7
53	24.0	24.4	24.2	24.4	23.7
100	23.8	24.4	24.3	24.4	-

Unit : °C

- : All test organisms died.

Table 4 LC<sub>50</sub> to Medaka

Exposure duration	LC <sub>50</sub> (mg/L)	95% confidence interval (mg/L) (Slope of the dose-response curve)	Statistical procedure used for determination of LC <sub>50</sub>
24-hour	80	57 – 150 (6.1)	Probit analysis
48-hour	73	52 – 100 (7.8)	Probit analysis
72-hour	56		Binomial test
96-hour	42		Probit analysis

- : Not obtained

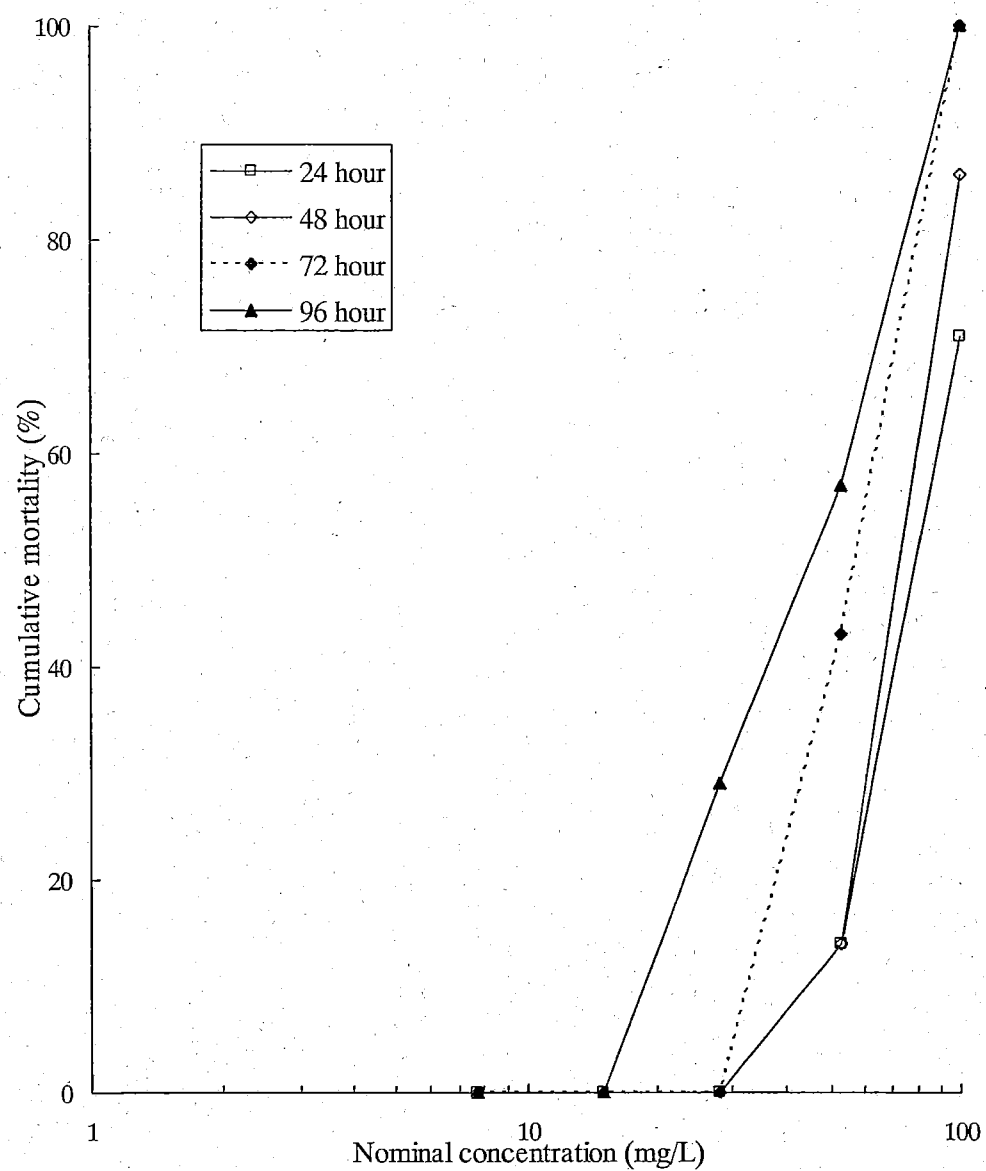


Figure 1 Concentration-cumulative mortality curve.

## Appendix 1

試験用水の水質

Chemical characteristics of dilution water (Sampling on July 12, 2011)

Parameter	Unit	Results	Determination limit
Total hardness (as CaCO <sub>3</sub> )	mg/L	25	5
Suspended solid	mg/L	< 1	1
pH	—	7.5(24°C)	0.1
Total organic carbon	mg/L	0.3	0.3
Chemical oxygen demand	mg/L	0.5	0.5
Residual chlorine	mg/L	< 0.02	0.02
Ammonium ion	mg/L	0.02	0.01
Total cyanide	mg/L	< 0.01	0.01
Alkalinity	mg/L	21	1
Electric conductivity	mS/m	9.9	0.1
Organic phosphorous	mg/L	< 0.1	0.1
Alkylmercury	mg/L	< 0.0005	0.0005
Total mercury	mg/L	< 0.0005	0.0005
Cadmium	mg/L	< 0.001	0.001
Chromium (VI)	mg/L	< 0.005	0.005
Lead	mg/L	< 0.001	0.001
Arsenic	mg/L	< 0.001	0.001
Boron	mg/L	< 0.1	0.1
Fluorine	mg/L	< 0.08	0.08
Iron	mg/L	< 0.03	0.03
Copper	mg/L	< 0.001	0.001
Cobalt	mg/L	< 0.001	0.001
Manganese	mg/L	< 0.005	0.005
Zinc	mg/L	< 0.1	0.1
Aluminum	mg/L	0.02	0.02
Nickel	mg/L	< 0.001	0.001
Sulfate ion	mg/L	9.1	0.1
Chloride ion	mg/L	9.6	0.1
Sodium	mg/L	9.1	0.1
Potassium	mg/L	3.9	0.1
Calcium	mg/L	7.5	0.1
Magnesium	mg/L	1.7	0.1
Silver	mg/L	< 0.0001	0.0001
1,2-dichloropropane	mg/L	< 0.006	0.006
Chlorothalonil	mg/L	< 0.005	0.005
Propyzamide	mg/L	< 0.0008	0.0008
Chlornitrofen	mg/L	< 0.0001	0.0001
Simazine	mg/L	< 0.0003	0.0003
Thiobencarb	mg/L	< 0.002	0.002
Diazinon	mg/L	< 0.0005	0.0005
Isoxathion	mg/L	< 0.0008	0.0008
Fenitrothion	mg/L	< 0.0003	0.0003
EPN	mg/L	< 0.0006	0.0006
Dichlorvos	mg/L	< 0.001	0.001
Iprobenfos	mg/L	< 0.0008	0.0008
PCB	mg/L	< 0.0005	0.0005

## Appendix 2

被験物質濃度の測定方法及び結果

## 1. 分析試料の前処理法

採取した試験液について、最終試料の組成がアセトニトリル/脱塩素水道水 (1/1 v/v) になるように適宜希釈して高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 試料を調製した。

## 2. 被験物質の定量分析

### a) 定量方法

被験物質の定量は 1 濃度の標準溶液を用いた絶対検量線法で行った。

本定量方法の有効性を確認するために、c) の標準溶液と同様に調製した、0.10、0.50、1.0 及び 2.0 mg/L の 4 濃度の標準溶液を用いて検量線を作成した。その結果、クロマトグラム上のピーク面積と濃度により作成した検量線の回帰式が原点を通る直線であったことから有効性が確認された。作成した検量線及び HPLC 試料の分析によって得られたクロマトグラムを Appendix 3 に示す。

分析試料中の被験物質の定量下限値は、定量性が確認された範囲での標準溶液の最低濃度 (0.10 mg/L) とした。よって、試験液中の被験物質の定量下限値は前処理操作を考慮して 1.0 mg/L とした。

### b) 分析条件

機 器	高速液体クロマトグラフ LC-2010A <sub>HT</sub> (紫外可視分光検出器内蔵) (島津製作所)
カラム	L-column2 ODS (150 mm × 2.1 mm I.D., 粒子径 5 µm, 化学物質評価研究機構)
カラム温度	40℃
溶離液	A (60%) : アセトニトリル B (40%) : 超純水
流 量	0.2 mL/min
測定波長	230 nm
注入量	20 µL

### c) 標準溶液の調製及び被験物質濃度の算出

供試試料 50 mg を電子分析天びんで正確にはかりとりアセトニトリルに溶解して 1000 mg/L の被験物質溶液を調製した。これをアセトニトリル/脱塩素水道水 (1/1 v/v) になるように希釈して 10 mg/L の被験物質溶液を調製した。さらにこれをアセトニトリル/脱塩素水道水 (1/1 v/v) で希釈して 1.0 mg/L の標準溶液を調製した。

HPLC 試料中の被験物質濃度は、標準溶液及び HPLC 試料のクロマトグラム上で得られるピーク面積を比較し、比例計算して求めた。

## 3. 測定結果

試験液中の被験物質濃度の測定結果を以下に示す。

Appendix table 2-1 Measured concentrations of test item in test solutions

Nominal concentration (mg/L)	Measured concentration (mg/L) (Percentage of measured concentration versus nominal concentration %)		
	At the start	At the end	Geometric mean
Control	n.d.	n.d.	
7.7	7.6 (99)	7.6 (98)	7.6 (99)
15	15 (99)	15 (100)	15 (99)
28	28 (99)	29 (102)	28 (101)
53	52 (99)	53 (100)	53 (99)
100	98 (98)	99 <sup>a</sup> (99)	98 (98)

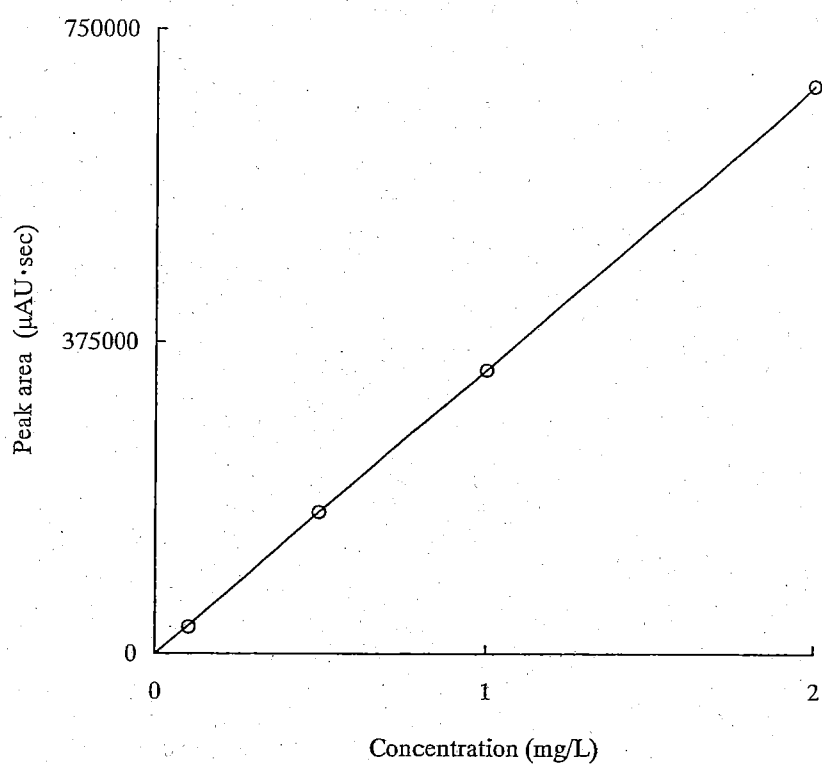
n.d. : <1.0 mg/L

a It indicates the measured value at the time that confirmed all test organisms dead.

## Appendix 3

検量線及びクロマトグラム





$$y = 340596x$$

$$r = 1.00$$

Concentration (mg/L)	Peak area ( $\mu\text{AU}\cdot\text{sec}$ )
0.10	31727
0.50	170120
1.0	340819
2.0	681242

Appendix figure 3-1 Calibration curve of test item for analysis by HPLC.

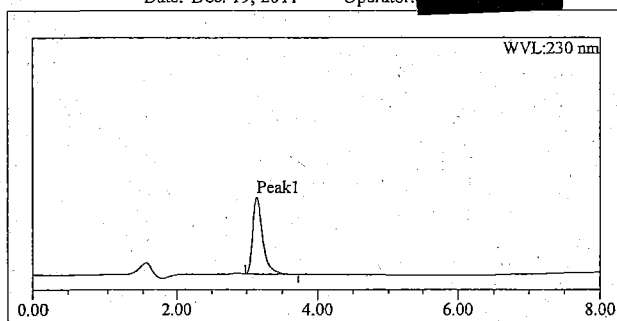
95705

Standard solution 1.0 mg/L

Date: Dec. 19, 2011

Operator: [REDACTED]

95705 111219Std04



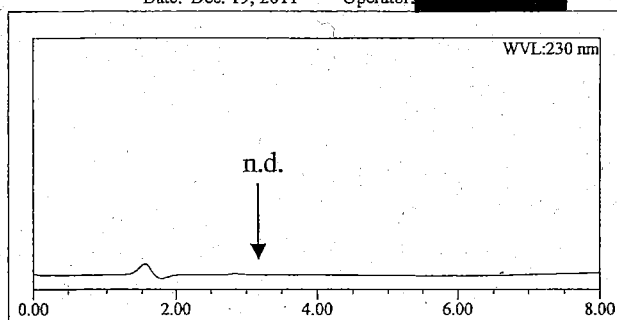
No.	Time (min)	Height (μAU)	Area (μAU·sec)	Area (%)
Peak1	3.14	35629	340454	100.00
Total	-	-	340454	100.00

Control

Date: Dec. 19, 2011

Operator: [REDACTED]

95705 111219 H0hZ



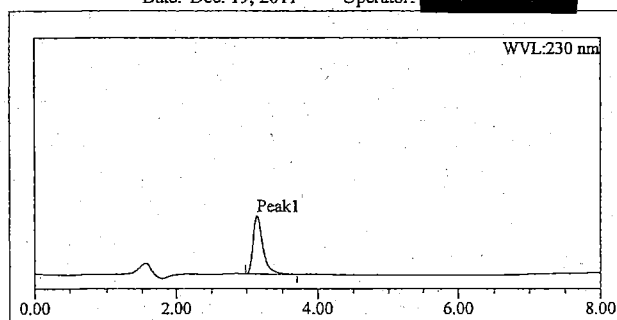
No.	Time (min)	Height (μAU)	Area (μAU·sec)	Area (%)
Peak1	-	-	-	-
Total	-	-	0	0.00

7.7 mg/L exposure level

Date: Dec. 19, 2011

Operator: [REDACTED]

95705 111219 H0hE



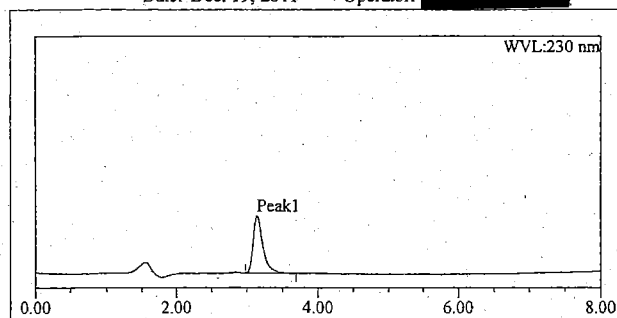
No.	Time (min)	Height (μAU)	Area (μAU·sec)	Area (%)
Peak1	3.14	27228	259224	100.00
Total	-	-	259224	100.00

15 mg/L exposure level

Date: Dec. 19, 2011

Operator: [REDACTED]

95705 111219 H0hD



No.	Time (min)	Height (μAU)	Area (μAU·sec)	Area (%)
Peak1	3.14	26514	251866	100.00
Total	-	-	251866	100.00

Date 2011.12.19

Name [REDACTED]

Appendix figure 3-2-1 HPLC chromatograms at start of exposure.

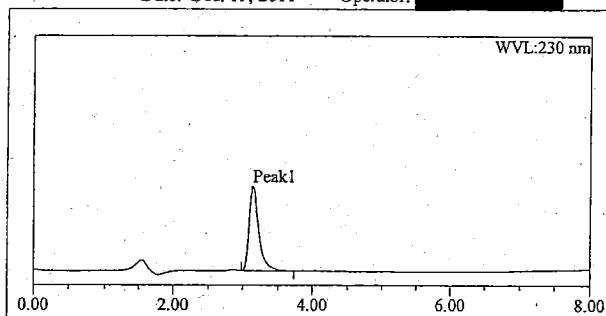
28 mg/L exposure level

95705

Date: Dec. 19, 2011

Operator: [REDACTED]

95705 111219 H0hC



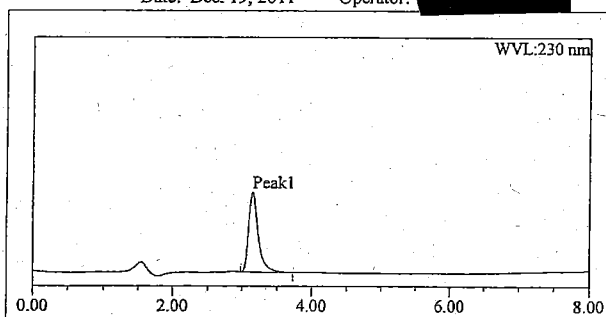
No.	Time (min)	Height (μAU)	Area (μAU-sec)	Area (%)
Peak1	3.14	39646	378064	100.00
Total	-	-	378064	100.00

53 mg/L exposure level

Date: Dec. 19, 2011

Operator: [REDACTED]

95705 111219 H0hB



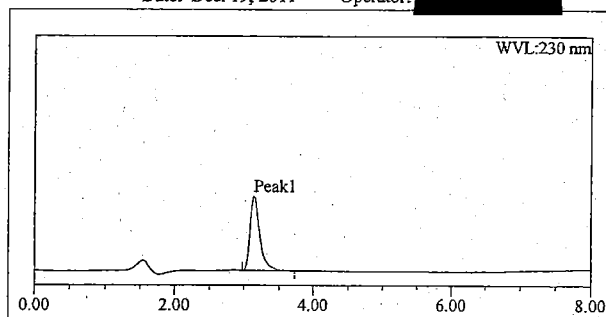
No.	Time (min)	Height (μAU)	Area (μAU-sec)	Area (%)
Peak1	3.15	37522	356140	100.00
Total	-	-	356140	100.00

100 mg/L exposure level

Date: Dec. 19, 2011

Operator: [REDACTED]

95705 111219 H0hA



No.	Time (min)	Height (μAU)	Area (μAU-sec)	Area (%)
Peak1	3.14	35100	335018	100.00
Total	-	-	335018	100.00

Date 2011-12-19 Name [REDACTED]

Appendix figure 3-2-2 HPLC chromatograms at start of exposure.

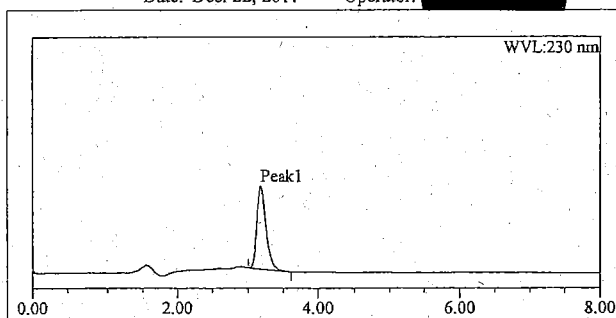
95705

Standard solution 1.0 mg/L

Date: Dec. 22, 2011

Operator: [REDACTED]

95705 111222 Std03



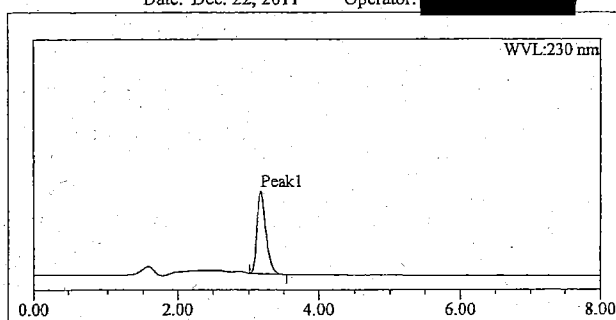
No.	Time (min)	Height (μAU)	Area (μAU·sec)	Area (%)
Peak1	3.17	38518	347598	100.00
Total	-	-	347598	100.00

100 mg/L exposure level\_d

Date: Dec. 22, 2011

Operator: [REDACTED]

95705 111222 H72hA



No.	Time (min)	Height (μAU)	Area (μAU·sec)	Area (%)
Peak1	3.17	38615	342464	100.00
Total	-	-	342464	100.00

Date 2011.12.22

Name [REDACTED]

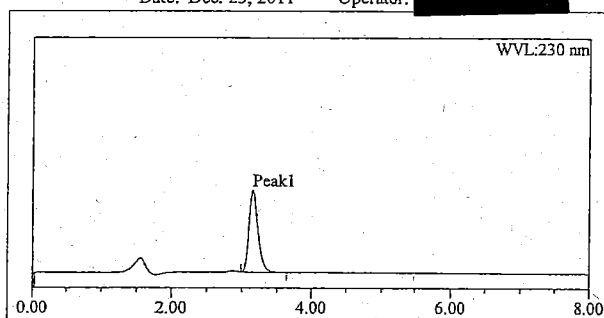
Appendix figure 3-3 HPLC chromatograms at the time that confirmed all test organisms dead.

Standard solution 1.0 mg/L

Date: Dec. 23, 2011

Operator: [REDACTED]

95705 111223Std00



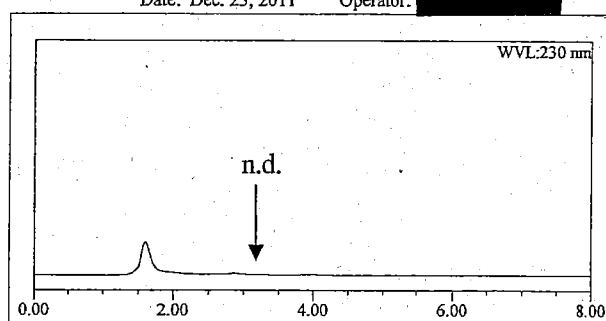
No.	Time (min)	Height (μAU)	Area (μAU-sec)	Area (%)
Peak1	3.15	38184	343929	100.00
Total	-	-	343929	100.00

Control

Date: Dec. 23, 2011

Operator: [REDACTED]

95705 111223 H96hZ



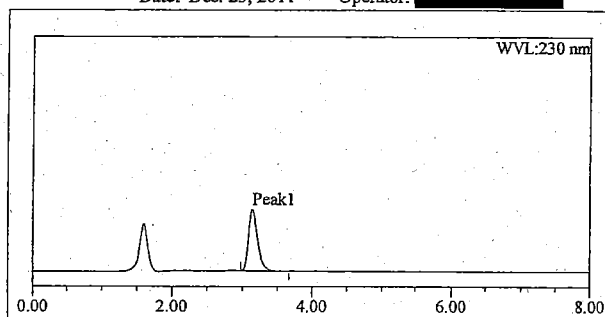
No.	Time (min)	Height (μAU)	Area (μAU-sec)	Area (%)
Peak1	-	-	-	-
Total	-	-	0	0.00

7.7 mg/L exposure level

Date: Dec. 23, 2011

Operator: [REDACTED]

95705 111223 H96hE



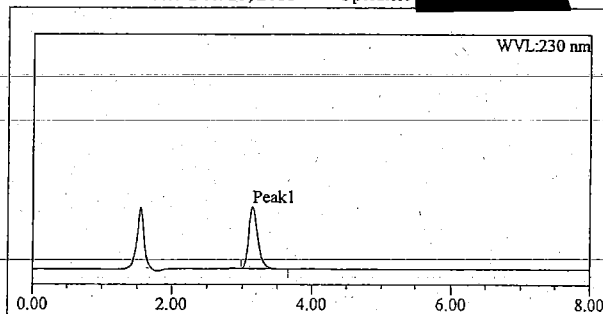
No.	Time (min)	Height (μAU)	Area (μAU-sec)	Area (%)
Peak1	3.14	28882	259905	100.00
Total	-	-	259905	100.00

15 mg/L exposure level

Date: Dec. 23, 2011

Operator: [REDACTED]

95705 111223 H96hD



No.	Time (min)	Height (μAU)	Area (μAU-sec)	Area (%)
Peak1	3.14	28731	258328	100.00
Total	-	-	258328	100.00

Date 2011.12.23

Name [REDACTED]

Appendix figure 3-4-1 HPLC chromatograms at end of exposure.

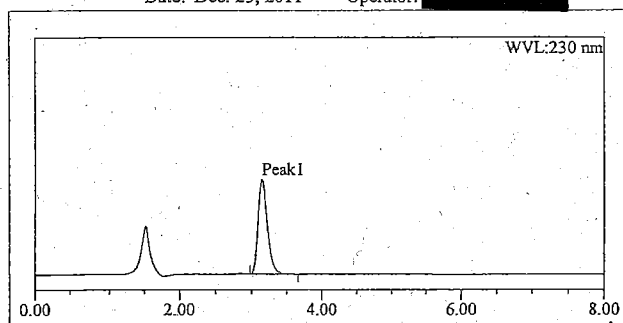
95705

28 mg/L exposure level

Date: Dec. 23, 2011

Operator: [REDACTED]

95705 111223 H96hC



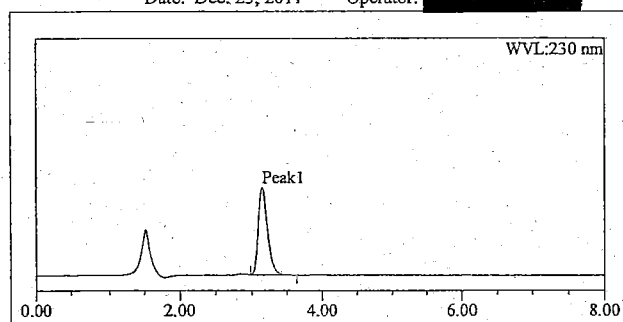
No.	Time (min)	Height ( $\mu$ AU)	Area ( $\mu$ AU-sec)	Area (%)
Peak1	3.14	43762	394448	100.00
Total	-	-	394448	100.00

53 mg/L exposure level

Date: Dec. 23, 2011

Operator: [REDACTED]

95705 111223 H96hB



No.	Time (min)	Height ( $\mu$ AU)	Area ( $\mu$ AU-sec)	Area (%)
Peak1	3.14	40650	364185	100.00
Total	-	-	364185	100.00

Date 2011. 12. 23

Name [REDACTED]

Appendix figure 3-4-2 HPLC chromatograms at end of exposure.

## Additional data

予備試験結果

## 1. 被験物質の試験用水への溶解度

被験物質の試験用水への溶解度は 100 mg/L 以上であった。

## 2. 生物予備試験

## 2.1 予備試験 1

暴露方式 半止水式（48 時間後に換水）  
 生物数/試験液量 2 尾/1 L  
 エアレーション 有り  
 試験液調製法 供試試料と試験用水を混合し、攪拌後、超音波照射して試験液を調製した。

## &lt;試験生物への影響&gt;

設定濃度区 (mg/L)	左：累積死亡率 (%) 右：症状の有無（有：*、無：N）									
	3 時間		24 時間		48 時間		72 時間		96 時間	
3.2	0	N	0	N	0	N	0	N	0	N
10	0	N	0	N	0	N	0	N	0	N
32	0	*	0	*	50	*	50	*	100	-
100	0	*	50	*	100	-	100	-	100	-

- は全個体が死亡したことを示す。

## 2.2 予備試験 2

暴露方式 ①半止水式（48 時間後に換水）、②止水式  
 生物数/試験液量 4 尾/2.7 L  
 エアレーション 有り  
 試験液調製法 供試試料と試験用水を混合し、超音波照射しながら攪拌して 500 mg/L の試験原液を調製した。必要量の試験原液を試験容器に入れた試験用水に添加後、攪拌して試験液を調製した。

## &lt;試験生物への影響&gt;

設定濃度区 (mg/L)	左：累積死亡率 (%) 右：症状の有無（有：*、無：N）									
	3 時間		24 時間		48 時間		72 時間		96 時間	
①5.0	0	N	0	N	0	N	0	N	0	N
②5.0	0	N	0	N	0	N	0	N	0	N
①50	0	*	0	*	25	*	50	*	50	*
②50	0	*	0	*	75	*	100	-	100	-

- は全個体が死亡したことを示す。



＜試験液中の被験物質濃度＞

設定濃度区 (mg/L)	測定濃度 (mg/L) (対設定濃度 %)		
	暴露開始時	48 時間後	96 時間後
①5.0	4.9 (97)	4.9 (98)	
②5.0	4.8 (95)		5.1 (102)
①50	48 (96)	49 (97)	
②50	49 (98)		49* (98)

\* 全個体死亡確認時に測定した値

3. 本試験条件

試験濃度           100、53、28、15、7.7 mg/L (公比 1.9) 及び対照区  
 暴露方式           止水式  
 エアレーション   有り