

環境庁殿

最 終 報 告 書

o-アニシジンのヒメダカ(*Oryzias latipes*)に対する延長毒性試験－14日間

(試験番号：91750)

1997 年 3 月 28 日作成

財団法人 化学品検査協会
化学品安全センター 久留米研究所

陳 述 書

財団法人 化学品検査協会
化学品安全センター 久留米研究所

試験委託者： 環境庁

表 題： o-アニシジンのヒメダカ(*Oryzias latipes*)に対する延長毒性試験－14日
間

試験番号： 91750

上記試験は契約書別添2「生態影響試験実施に関する基準」(平成7年9月26日)に
準拠したものである。

1997年 3月 28日

運営管理者



信 頼 性 保 証 書

財団法人 化学 品 検 査 協 会
 化学 品 安 全 セ ン タ ー 久 留 米 研 究 所

試験委託者： 環境庁

表 題： o-アニシジンのヒメダカ(*Oryzias latipes*)に対する延長毒性試験
 -14日間

試験番号： 91750

本試験は試験計画書及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。

監査又は査察内容	実施日	報告日(運営管理者)	報告日(試験責任者)
試験計画書監査	1997年 2月 5日	1997年 2月 5日	1997年 2月 5日
試験実施状況査察	1997年 2月14日	1997年 2月27日	1997年 2月26日
試験実施状況査察	1997年 2月21日	1997年 2月27日	1997年 2月26日
最終報告書監査	1997年 3月28日	1997年 3月28日	1997年 3月28日

1997年 3月28日

信頼性保証部門責任者

試験実施概要

1 表 題

o-アニシジンのヒメダカ(*Oryzias latipes*)に対する延長毒性試験－14日間

2 試験目的

o-アニシジンについて、ヒメダカ(*Oryzias latipes*)に対する延長毒性試験－14日間を行いヒメダカに対する致死、その他の観察される影響の閾値及び最大無作用濃度(NOEC)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.204「魚類延長毒性試験－14日間」(1984年)に準拠した。

4 適用GLP

本試験は契約書別添 2「生態影響試験実施に関する基準」(平成 7 年 9 月 26 日)に準拠した。

5 試験委託者

名 称： 環境庁

住 所： (〒100)東京都千代田区霞が関 1-2-2

6 試験受託者

名 称： 財団法人 化学品検査協会

住 所： (〒136)東京都江東区亀戸 5-6-21

7 試験施設

名 称： 化学品安全センター 久留米研究所

住 所： (〒830)福岡県久留米市中央町 19-14

運営管理者： XXXXXXXXXX

8 試験関係者

試験責任者

[REDACTED]

試験担当者

生物試験担当

[REDACTED]

分析担当

[REDACTED]

データ処理担当

[REDACTED]

試験資料管理部門責任者

[REDACTED]

9 最終報告書の承認

1997年3月28日

試験責任者

氏名

[REDACTED]

10 試験期間

試験開始日

1997年2月5日

試験終了日

1997年3月28日

暴露期間

1997年2月14日～1997年2月28日

11 保管

試験計画書、生データ、記録文書、最終報告書及び被験物質は、最終報告書作成後10年間、財団法人 化学品検査協会 化学品安全センター 久留米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	1
1 被 験 物 質	2
1.1 名称、構造式及び物理化学的性状	2
1.2 被験物質の確認及び保管条件下での安定性	3
2 試 験 生 物	3
3 試 験 方 法	4
3.1 試 験 条 件	4
3.2 希 積 水	4
3.3 試験装置、試験容器及び恒温槽等	4
3.4 試験濃度の設定	5
3.5 試験液の調製	5
3.6 試験液の分析	5
3.7 試 験 操 作	6
3.8 数値の取扱い	6
4 結果の算出	7
4.1 最小致死濃度及び最小作用濃度	7
4.2 最大無作用濃度(NOEC)	7
4.3 半数致死濃度(LC50)の算出	7
5 結果及び考察	8
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	8
5.2 試験液中の被験物質濃度	8
5.3 最小致死濃度、最小作用濃度	8
5.4 半数致死濃度(LC50)	8
5.5 毒性症状及び摂餌状況	8
5.6 暴露終了時における試験生物の生存個体重量	8
5.7 最大無作用濃度	9
5.8 試験液の水溫、溶存酸素濃度及びpH	9
5.9 試験液の状態	9
Table 1～8	10～18
Figure 1	19
付属資料－1 希積水の水質	
付属資料－2 試験液の分析方法及び分析チャート	

要 旨

試験委託者

環境庁

表 題

o-アニシジンのヒメダカ(*Oryzias latipes*)に対する延長毒性試験－14日間

試験番号

91750

試験方法

本試験は、OECD 化学品テストガイドライン No.204 「魚類延長毒性試験－14日間」(1984年)に準拠して実施した。

- 1) 被験物質： o-アニシジン
- 2) 試験生物： ヒメダカ(*Oryzias latipes*)
- 3) 生物数： 10尾／1試験区
- 4) 暴露期間： 14日間
- 5) 暴露方式： 流水式(連続的に試験液を供給する方式)
- 6) 試験濃度： 100、50.0、25.0、12.5、6.25 mg/L(公比：2.0)及び対照区
- 7) 連 数： 1試験区につき1連
- 8) 試験液量： 1容器(1連)につき1.8 L
- 9) 試験水温： 24±1℃
- 10) 照 明： 室内光、16時間明／8時間暗
- 11) エレクション： なし
- 12) 試験液中の被験物質の分析： 高速液体クロマトグラフィー(HPLC)
(0日目、7日目及び14日目)

結 果

- 1) 14日間の最小致死濃度 = 100 mg/L
- 2) 14日間の最小作用濃度 = 50.0 mg/L
- 3) 14日間の最大無作用濃度 (NOEC) = 25.0 mg/L
- 4) 7日間の半数致死濃度 (LC50) > 100 mg/L
- 5) 14日間の半数致死濃度 (LC50) > 100 mg/L
(上記濃度は、全て設定値に基づく値)

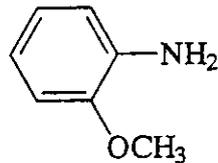
1 被験物質

本報告書においてo-アニシジンは、次の名称及び品質等を有するものとする。
被験物質に関する情報については供給者提供の添付資料等によった。

1.1 名称、構造式及び物理化学的性状

- 1) 名 称： o-アニシジン
(CAS番号 90-04-0)

- 2) 構造式：



- 3) 分子式： C_7H_9NO
 4) 分子量： 123.15
 5) 外 観： 赤褐色澄明の液体 #1
 6) 安定性： 不明
 7) 1-オクタノール/水分配係数(logP)： $\log Kow=0.95$ #3
 8) pKa : 4.52 (25°C) #3
 9) 水への溶解度： 1.4×10^4 mg/L (25°C) #3
 10) 蒸気圧： < 0.1 mmHg (30°C) #2
 11) 純度及び不純物： 含量 99.7% (毛管カラムGC) #1
 12) ロット番号： LEJ5225
 13) 供給者： XXXXXXXXXX
 14) 供給量： 150 mL (25 mL×6本)
 15) 入手日： 1997年1月30日

情報源

- #1： 供給者提供の添付資料
 #2： 環境庁化学物質研究会編「環境化学物質要覧」(丸善)1988.
 #3： Hazardous Substances Data Bank(HSDB), U.S. National Library of Medicine (1995).

1.2 被験物質の確認及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、被験物質の特性と矛盾が認められないことを確認した。暴露終了後にも同様にスペクトルを測定し、暴露開始前に測定したスペクトルと比較した結果、スペクトルに変化は無かったことより被験物質は当研究所の冷蔵庫に保管中は安定であったと判断された。

2 試験生物

試験に使用したヒメダカ(*Oryzias latipes*)を下記に示した。開始時の試験生物の体長(被鱗体長)2.0±0.5 cmであった。

- 1) 一般名： ヒメダカ
- 2) 学名： *Oryzias latipes*
- 3) 体長： 1.9 cm (1.8~2.1 cm), n=10
- 4) 体重： 0.11 g (0.079~0.15 g), n=10
- 5) ロット番号： LNR-961228
- 6) 購入先： 中島養魚場(〒869-01 熊本県玉名郡長洲町大明神)
- 7) 購入日： 1996年12月27日

順化

試験条件と同条件(水質、温度等)で12日間以上、飼育順化した。順化開始時にエルバージュ(上野製薬製)を用いて止水状態で24時間薬浴を行った。餌は市販のテトラミン(テトラベルケ社)を与えた。暴露開始の24時間前からは給餌しなかった。試験には健康で肉眼的に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、和光純薬工業株式会社〕の96時間LC50は0.945 mg/Lであった。

3 試験方法

3.1 試験条件

- 1) 暴露方式： 被験物質を含む試験液へ試験生物を暴露する薬浴方式を用いた。試験は流水式で行った。
- 2) 暴露期間： 14日間
- 3) 連 数： 1試験区につき1連
- 4) 生物数： 10尾/1試験区
- 5) 試験液量： 1容器(1連)につき1.8 L
- 6) 流水量： 25.0 mL/min.
- 7) 換水率： 約20回/日
- 8) 試験水温： 24±1℃
- 9) 照 明： 室内光、16時間明/8時間暗
- 10) 給 餌： テトラミン(テトラベルケ社)を毎日魚体重の2%与えた。
- 11) イレ-ション： なし

3.2 希 釈 水

脱塩素水道水(久留米市水道水を活性炭処理し、残留塩素等を除去したもので、充分通気した)を使用した。希釈水の主な水質として、硬度は55.6 mg/L(CaCO₃換算)、pHは7.7であった。残留塩素については1日に1回オルトトリジン法により残留塩素濃度が0.02 mg/L以下であることを確認した。

[付属資料-1]

3.3 試験装置、試験容器及び恒温槽等

- 1) 試験容器： 3.0 L容のガラス製容器(直径16 cm、深さ17 cm)を用いた。容器側面に排水用の穴をあげ、内容積が約1.8 Lとなるようにした。
- 2) 恒温槽： 加温冷却機によって試験容器内の水温を24±1℃に維持する恒温槽を用いた。
- 3) 希釈装置： 試験原液から必要な濃度段階に希釈された試験液を連続的に供給するものを用いた。
- 4) 定量ポンプ： ガラス微量定量ポンプGMW-A型(東京理化器械株式会社)
- 5) 水温計： 検定済ガラス製棒状温度計
- 6) pH計： ガラス電極式水素イオン濃度計 HM-11P 型(東亜電波工業)
- 7) 溶存酸素計： 溶存酸素計51B型(Yellow Springs Instrument Co., Inc.)

3.4 試験濃度の設定

魚類急性毒性試験の結果である96-h LC50値(196 mg/L)及び本試験に先立ち行った予備試験の結果から、試験濃度は100 mg/Lを最高濃度として公比2.0で5濃度区(100、50.0、25.0、12.5及び6.25 mg/L)を設定した。対照には希釈水のみを対照区を設けた。

3.5 試験液の調製

必要量の被験物質を希釈水に溶解させ、10,000 mg/Lの被験物質溶液を調製した。この被験物質溶液を適宜希釈して、各濃度区毎に試験原液を調製した(100 mg/L区：1,000 mg/L、50.0 mg/L区：500 mg/L、25.0 mg/L区：250 mg/L、12.5 mg/L区：125 mg/L、6.25 mg/L区：62.5 mg/L)。試験液は試験原液と希釈水を一定流量(試験原液：2.5 mL/分、希釈水：22.5 mL/分)で混合して調製した。試験原液の流量は定量ポンプを用い、希釈水の流量はキャピラリー管を用いて調節した。

3.6 試験液の分析

暴露開始時(0日目)、7日目及び暴露終了時(14日目)に各試験容器の中層より試験液を採取した後、そのまま若しくは希釈してHPLCにより分析した。試験液の分析に際しては、標準溶液(濃度5.00 mg/L)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

暴露開始時に試験生物と同水槽で順化した魚10尾の重量及び被鱗体長を測定し、被鱗体長で 2.0 ± 0.5 cmであることを確認した。試験液の被験物質濃度が安定した後、各試験区の試験液の水温、溶存酸素濃度、pHを測定後、試験容器中に試験生物を1試験区当り10尾投入した。

暴露開始後、週2回各試験区の試験液の水温、溶存酸素濃度、pHを測定した。

暴露期間中、餌は1日当たり個体重量の約2%を与えた。死亡により個体数が減少した場合は、その分給餌量を減らした。

暴露開始後、毎日死亡個体数を記録するとともに観察された一般的症例或いは特異的症例(背曲がり、出血、体色変化、粘液の分泌等)を記録した。一般的症例と定義を下記に示した*。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。暴露終了時には全ての生存個体の重量及び被鱗体長を測定記録した。

* 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。

摂餌量低下： 軽度の症状の一つで、対照区の魚と比較して餌の食べ残しがあること。

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。

3.8 数値の取扱い

数値の丸め方は、JIS Z 8202-1985 参考 3 規則 B によった。

4 結果の算出

得られたデータを基に以下の3項目の結果を算出した。結果の算出には、被験物質濃度の測定濃度が設定値の±20%以内であったので設定濃度を用いた。

4.1 最小致死濃度及び最小作用濃度

試験において死亡個体が観察された濃度区の最も低い濃度を最小致死濃度とした。

試験において試験生物に致死以外の他の作用が観察された濃度区の最も低い濃度を最小作用濃度とした。

4.2 最大無作用濃度(NOEC)

暴露終了時における生存個体の重量について、Bartlett法による等分散検定を行った後、各濃度区と対照群との有意差の有無を一元配置分散分析により調べた。この生存個体の重量有意差検定結果及び試験生物の死亡率や観察された症状等も含めてNOECを評価した。

4.3 半数致死濃度(LC50)の算出

試験最高濃度で50%以上の死亡率が得られなかったため、7及び14日における半数致死濃度(LC50)は試験最高濃度以上と表した。

5 結果及び考察

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

該当する要因はなかった。

5.2 試験液中の被験物質濃度

暴露開始時(0日目)、7日目及び暴露終了時(14日目)に試験液中の被験物質濃度を測定した。被験物質の測定濃度の設定値に対する割合は、暴露開始時で89.8～95.6%、7日目で94.7～97.9%、暴露終了時で89.3～97.2%であり、いずれもほぼ設定濃度に保たれていた。

[Table 1(p.10), 付属資料-2]

5.3 最小致死濃度、最小作用濃度

試験において死亡個体が観察された濃度区の最も低い濃度(最小致死濃度)は100 mg/Lであった。

試験において試験生物に致死以外の他の作用が観察された濃度区の最も低い濃度(最小作用濃度)は50.0 mg/Lであった。

(上記濃度は、全て設定濃度を示す)

[Table 2,4(p.11,13,14)]

5.4 半数致死濃度(LC50)

7日間及び14日間の設定濃度に基づく半数致死濃度(LC50)は共に>100 mg/Lであった。

[Table 3(p.12), Figure 1(p.19)]

5.5 毒性症状及び摂餌状況

毒性症状として100 mg/L区及び50.0 mg/L区において体色明化が観察された。対照区では暴露期間中に症状は観察されなかった。

ヒメダカの摂餌活動は100 mg/Lの濃度区において低下が認められた。その他の濃度区では摂餌低下はみられなかった。

(上記濃度は、全て設定濃度を示す)

[Table 4(p.13,14)]

5.6 暴露終了時における試験生物の生存個体重量

o-アニシジンに14日間暴露したヒメダカの生存個体重量は、すべての濃度区において対照区と比較して有意差は認められなかった。

($p=0.05$ 、統計的方法：一元配置分散分析)

[Table 5(p.15)]

5.7 最大無作用濃度

死亡個体が観察されない濃度区の最も高い濃度は50.0 mg/L、毒性症状が観察されない最高濃度は25.0 mg/L、摂餌状況に異常が認められない最高濃度は50.0 mg/L、試験生物の生存個体重量に関して対照区と比較して有意な差が認められない最高濃度は100 mg/Lであった。これらの濃度で最も低い濃度である25.0 mg/Lを最大無作用濃度(NOEC) と判断した。

(上記濃度は、全て設定濃度を示す)

[Table 2,4,5(p.11,13~15)]

5.8 試験液の水溫、溶存酸素濃度及びpH

14日間の暴露期間中の水溫は23.9~24.3℃であり、全ての試験区において24±1℃であった。暴露期間中の溶存酸素濃度は8.0~8.3 mg/Lであり、全ての試験区において飽和溶存酸素濃度の60%以上であった。暴露期間中のpHは7.1~7.6であった。

(24.0℃の飽和溶存酸素濃度：8.25 mg/L)

[Table 6,7,8(p.16~18)]

5.9 試験液の状態

暴露開始時には無色透明であり、その状態は暴露終了時まで変わらなかった。

以上

Table 1. Concentrations of *o*-anisidine in prolonged toxicity test (14-day) using orange killifish (*Oryzias latipes*) under flow-through test conditions

Nominal concentration (mg/L)	Measured concentration (mg/L) (Percent of nominal)			
	0-day	7-day	14-day	Mean ^{a)}
Control	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
6.25	5.82 (93.2)	6.10 (97.5)	6.07 (97.2)	6.00 (96.0)
12.5	11.4 (90.9)	11.8 (94.7)	11.2 (89.3)	11.5 (91.6)
25.0	23.9 (95.6)	24.0 (96.1)	23.5 (94.0)	23.8 (95.2)
50.0	44.9 (89.8)	48.9 (97.9)	46.7 (93.3)	46.8 (93.7)
100	92.2 (92.2)	96.9 (96.9)	97.0 (97.0)	95.4 (95.4)

n.d. : < 0.200 mg/L

a) The values are expressed as arithmetic means calculated by the following equation:

$$(C_0 + C_7 + C_{14}) / 3$$

where

C_0 : the measured concentration at 0-day

C_7 : the measured concentration at 7-day

C_{14} : the measured concentration at 14-day

Table 2. Mortality of orange killifish (*Oryzias latipes*) exposed to *o*-anisidine under flow-through test conditions

Nominal concentration (mg/L)	Cumulative number of dead fish (Percent mortality)						
	1-day	2-day	3-day	4-day	5-day	6-day	7-day
Control	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
6.25	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
12.5	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
25.0	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
50.0	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
100	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)

Table 2. (continued)

Nominal concentration (mg/L)	Cumulative number of dead fish (Percent mortality)						
	8-day	9-day	10-day	11-day	12-day	13-day	14-day
Control	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
6.25	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
12.5	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
25.0	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
50.0	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
100	1 (10)	1 (10)	1 (10)	1 (10)	1 (10)	1 (10)	1 (10)

Table 3. Calculated LC50 values for orange killifish (*Oryzias latipes*) exposed to *o*-anisidine based on nominal concentrations

Exposure time (day)	LC50 (mg/L)	95-Percent confidence limits (mg/L)	Statistical method
7	>100	-	-
14	>100	-	-

Table 4. Toxic symptoms observed in orange killifish (*Oryzias latipes*) during exposure to *o*-anisidine under flow-through test conditions

Nominal concentration (mg/L)	Symptoms						
	1-day	2-day	3-day	4-day	5-day	6-day	7-day
Control	-	-	-	-	-	-	-
6.25	-	-	-	-	-	-	-
12.5	-	-	-	-	-	-	-
25.0	-	-	-	-	-	-	-
50.0	-	-	-	-	LT(7)	LT(7)	LT(7)
100	-	-	-	-	LT(10)	LT(10)	LT(10)

The values in parentheses express the number of fish showing the symptom.

LT : Light body color
- : no symptom

Table 4. (continued)

Nominal concentration (mg/L)	Symptoms						
	8-day	9-day	10-day	11-day	12-day	13-day	14-day
Control	-	-	-	-	-	-	-
6.25	-	-	-	-	-	-	-
12.5	-	-	-	-	-	-	-
25.0	-	-	-	-	-	-	-
50.0	LT(7)	LT(7)	LT(7)	LT(7)	LT(7)	LT(7)	LT(7)
100.	LT(9) RFA(2)	LT(9) RFA(1)	LT(9) RFA(2)	LT(9) RFA(2)	LT(9) RFA(2)	LT(9) RFA(2)	LT(9)

The values in parentheses express the number of fish showing the symptom.

LT : Light body color
RFA : Reduced feeding activity
- : no symptom

Table 5. Individual weight (g) of survival organisms at the end of exposure

No.	Nominal concentration (mg/L)					
	Control	6.25	12.5	25.0	50.0	100
1	0.115	0.0910	0.133	0.151	0.111	0.111
2	0.125	0.134	0.110	0.127	0.112	0.149
3	0.138	0.138	0.0895	0.135	0.114	0.141
4	0.146	0.154	0.128	0.150	0.139	0.127
5	0.103	0.132	0.132	0.122	0.140	0.102
6	0.122	0.125	0.111	0.109	0.112	0.119
7	0.121	0.153	0.113	0.139	0.137	0.0917
8	0.105	0.110	0.128	0.125	0.125	0.0886
9	0.113	0.124	0.101	0.118	0.136	0.140
10	0.110	0.129	0.140	0.0955	0.0950	-
Mean	0.120	0.129	0.119	0.127	0.122	0.119
S.D.	0.0138	0.0186	0.0162	0.0174	0.0154	0.0222

Table 6. Temperature of test solutions during 14-day flow-through exposure of orange killifish (*Oryzias latipes*) to *o*-anisidine

Nominal concentration (mg/L)	Temperature (°C)				
	0-day	3-day	7-day	10-day	14-day
Control	24.1	24.2	24.1	23.9	24.2
6.25	24.1	24.3	24.2	24.0	24.3
12.5	24.1	24.3	24.3	24.1	24.3
25.0	24.1	24.3	24.3	24.1	24.2
50.0	24.2	24.3	24.3	24.0	24.3
100	24.1	24.3	24.3	24.0	24.3

Table 7. Dissolved oxygen concentrations of test solutions during 14-day flow-through exposure of orange killifish (*Oryzias latipes*) to *o*-anisidine

Nominal concentration (mg/L)	Dissolved oxygen concentration (mg/L)				
	0-day	3-day	7-day	10-day	14-day
Control	8.3	8.0	8.2	8.1	8.0
6.25	8.2	8.0	8.2	8.1	8.0
12.5	8.2	8.0	8.2	8.1	8.0
25.0	8.3	8.0	8.2	8.1	8.0
50.0	8.3	8.0	8.2	8.1	8.0
100	8.3	8.0	8.2	8.1	8.0

Table 8. pH values of test solutions during 14-day flow-through exposure of orange killifish (*Oryzias latipes*) to *o*-anisidine

Nominal concentration (mg/L)	pH				
	0-day	3-day	7-day	10-day	14-day
Control	7.1	7.1	7.6	7.4	7.1
6.25	7.3	7.1	7.5	7.5	7.1
12.5	7.4	7.2	7.5	7.5	7.2
25.0	7.5	7.2	7.4	7.5	7.2
50.0	7.5	7.2	7.4	7.5	7.2
100	7.6	7.3	7.4	7.5	7.3

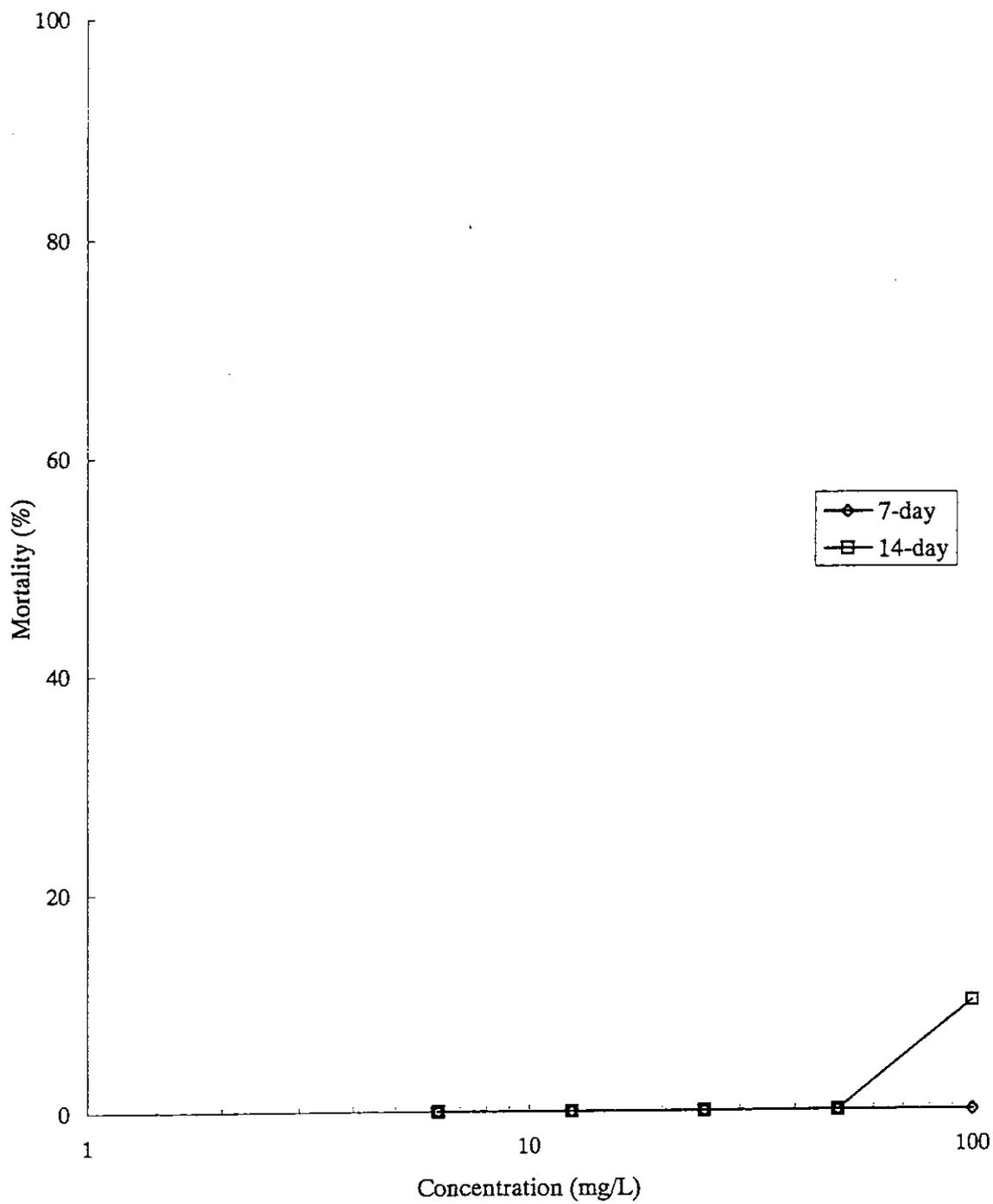


Figure 1. Concentration - toxicity curve of *o*-anisidine in orange killifish (*Oryzias latipes*).

付属資料-1

希釈水の水質

(全2頁)

Appendix 1. Water quality of dilution water

Parameter	Concentration		Lower limit of detection
	1997.Feb.4		
pH		7.7	
COD	(mg/L)	0.2	
Coliform group bacteria		0	
	(MPN/100mL)		
Total phosphorus	(mg/L)	0.007	
Total mercury	(mg/L)	N.D.	0.0005
Copper	(mg/L)	N.D.	0.005
Cadmium	(mg/L)	N.D.	0.005
Zinc	(mg/L)	N.D.	0.01
Lead	(mg/L)	N.D.	0.005
Aluminium	(mg/L)	N.D.	0.1
Nickel	(mg/L)	N.D.	0.01
Total chromium	(mg/L)	N.D.	0.02
Manganese	(mg/L)	N.D.	0.01
Tin	(mg/L)	N.D.	0.5
Iron	(mg/L)	0.05	0.01
Cyanide	(mg/L)	N.D.	0.1
Free chlorine	(mg/L)	N.D.	0.01
Bromide ion	(mg/L)	N.D.	0.1
Fluoride	(mg/L)	N.D.	0.15
Sulfide ion	(mg/L)	N.D.	0.1
Ammonia nitrogen	(mg/L)	N.D.	0.01
Arsenic	(mg/L)	N.D.	0.002
Selenium	(mg/L)	N.D.	0.002
Evaporation residue	(mg/L)	120	
Electric conductivity	(μ s/cm)	171	
Total hardness (as CaCO ₃)		55.6	
	(mg/L)		
Alkalinity	(mg/L)	37.5	
Sodium	(mg/L)	14.9	
Potassium	(mg/L)	3.76	
Calcium	(mg/L)	14.8	
Magnesium	(mg/L)	4.52	

Appendix 1. (continued)

Parameter	Concentration 1997.Feb.4	Lower limit of detection
1,2-Dichloropropane (mg/L)	N.D.	0.006
Diazinon (mg/L)	N.D.	0.0005
Isoxathion (mg/L)	N.D.	0.0008
Fenitrothion (MEP) (mg/L)	N.D.	0.0003
Isoprothiolane (mg/L)	N.D.	0.004
Oxine copper (mg/L)	N.D.	0.004
Chlorothalonil (TPN) (mg/L)	N.D.	0.004
Propyzamide (mg/L)	N.D.	0.0008
EPN (mg/L)	N.D.	0.0006
Dichlorvos (DDVP) (mg/L)	N.D.	0.001
Fenobucarb (BPMC) (mg/L)	N.D.	0.002
Iprobenfos (IBP) (mg/L)	N.D.	0.0008
Chlornitrofen (CNP) (mg/L)	N.D.	0.0005
Thiram (mg/L)	N.D.	0.0006
Simazine (CAT) (mg/L)	N.D.	0.0003
Thiobencarb (mg/L)	N.D.	0.002
PCB (mg/L)	N.D.	0.0005

N.D. : not detected

付属資料-2

試験液の分析方法及び分析チャート

(全 10 頁)

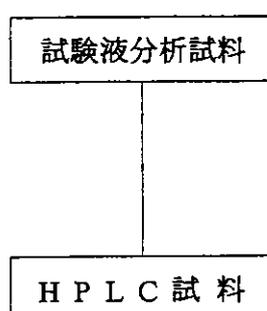
試 験 名 : 魚類延長毒性試験
被験物質物質名 : o-アニシジン

1) 試験液の分析方法

(1) 試験液の前処理操作

混合した溶液はそのまま若しくは希釈水で希釈して、以下のフロースキームに従い高速液体クロマトグラフィー(HPLC)によって分析した。

フロースキーム



HPLC試料中の被験物質濃度は、クロマトグラム上の被験物質のピーク面積を濃度既知の標準溶液のピーク面積と比較し、比例計算して求めた。

(2) 被験物質溶液の調製

被験物質100 mgを正確にはかりとり、アセトニトリルに溶解して1,000 mg/Lの被験物質溶液を調製した。これをアセトニトリルで希釈して100 mg/Lの被験物質溶液を調製した。

(3) 標準溶液の調製

分析試料中の被験物質濃度を求めるための標準溶液の調製は次のようにして行った。100 mg/Lの被験物質溶液を希釈水で希釈して5.00 mg/Lの標準溶液を調製した。

2) HPLCの分析条件

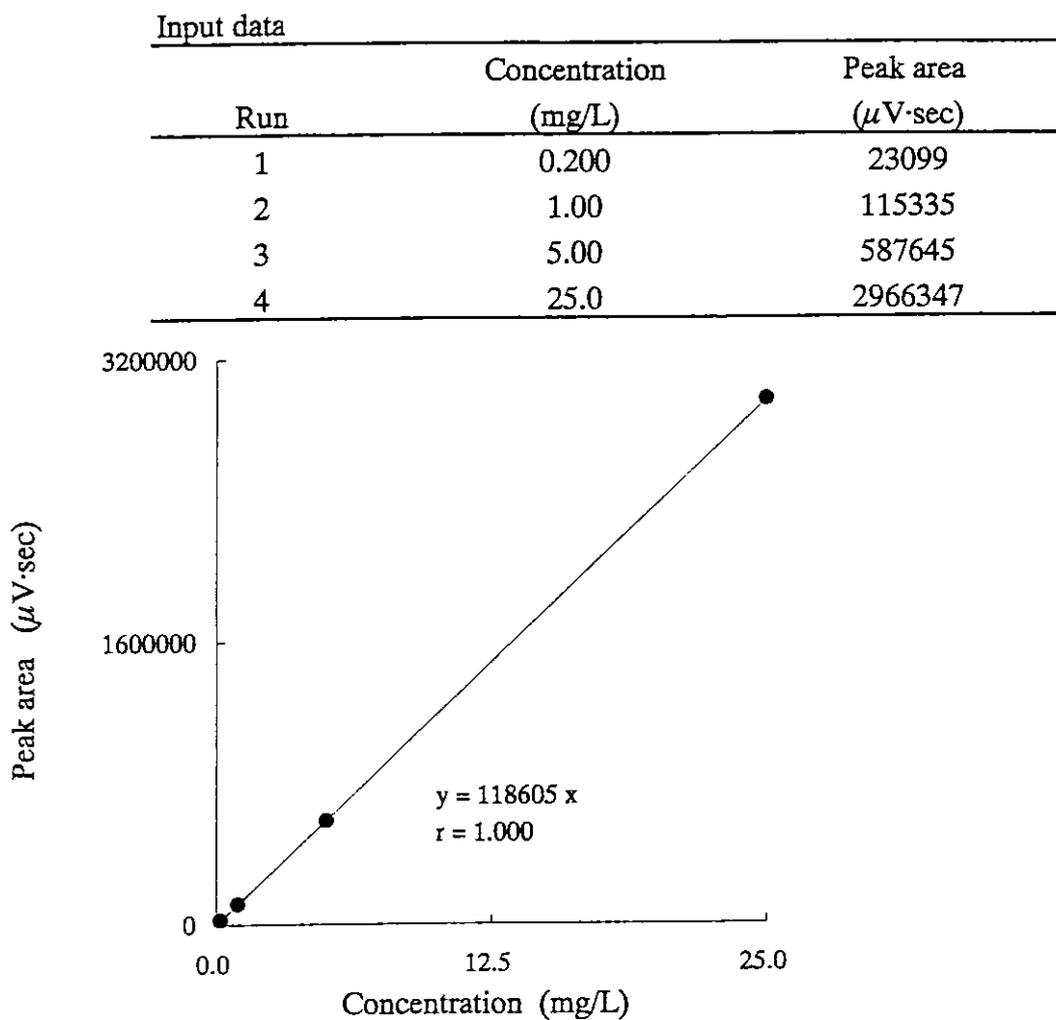
機 器	高速液体クロマトグラフ
ポ ン プ	島津製作所製 LC-10AD
検 出 器	島津製作所製 SPD-10A
オートインジェクター	島津製作所製 SIL-10A
カ ラ ム	L-column ODS (化学品検査協会製) 15 cm×4.6 mm φ ステンレス製
カラム温度	40℃
溶 離 液	7セトトリル/5 mmol/Lりん酸緩衝液 (pH6.9) 30/70 (V/V)
流 量	1.0 mL/min
測 定 流 量	280 nm
注 入 量	100 μL
感 度	
検 出 器	1 AU/1 V
記 録 計	ATTEN 2 ⁵

3) 検量線の作成

(3)の標準溶液の調製と同様にして0.20、1.00及び5.00 mg/Lの標準溶液を調製した。また、1,000 mg/Lの被験物質溶液より25.0 mg/Lの標準溶液を調製した。これらを分析機器の定量条件に従って分析し、得られたそれぞれのクロマトグラム上のピーク面積と濃度により、検量線を作成した。

Content of figure

- Figure 1. Calibration curve of *o*-anisidine by HPLC analysis.
- Figure 2-1. Example of chromatogram.
(standard solution of 5.00 mg/L, 0-day)
- Figure 2-2. Example of chromatogram.
(test solution of 25.0 mg/L as nominal concentration, 0-day)
- Figure 2-3. Example of chromatogram.
(test solution of control, 0-day)
- Figure 2-4. Example of chromatogram.
(standard solution of 5.00 mg/L, 14-day)
- Figure 2-5. Example of chromatogram.
(test solution of 25.0 mg/L as nominal concentration, 14-day)
- Figure 2-6. Example of chromatogram.
(test solution of control, 14-day)

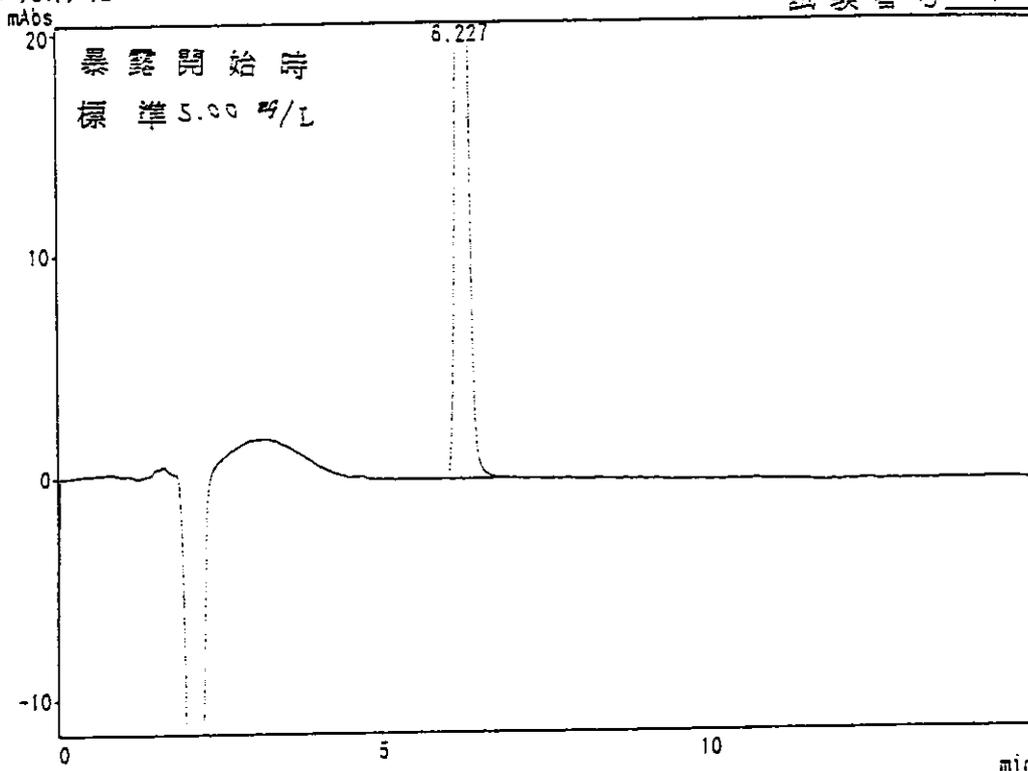
Figure 1. Calibration curve of *o*-anisidine by HPLC analysis.

CLASS-LC10 システム番号=2 Ch=1 レポート番号=19 データ=1750HQS.012 97/02/14 12:45:44
 サンプル : 7ニシツン/std.
 ID : 500m
 サンプル量 : 100
 タイプ : 標準試料
 検出器 : SPD-10A シングル
 サンプル名 : XXXXXXXXXX
 サンプル名 : ANI-1.M01

1997.2.14

*** クロマトグラム ***

試験番号 91750



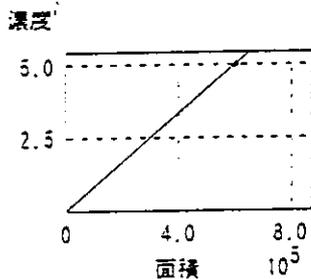
*** ヒストグラム ***

PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	6.227	600246	58346	SV R	1		o-7ニシツン

*** キャリブレーション結果 ***

IDNO	成分名	時間	濃度	F1	F2
1	o-7ニシツン	6.26	5	8.329912e-006	

** 検量線 **



IDNO: 1
 NAME: o-7ニシツン
 TIME: 6.26

濃度	面積
(1) 5	600246
(1) F1	F2
(1) 8.32991e-006	0

r2 = 1

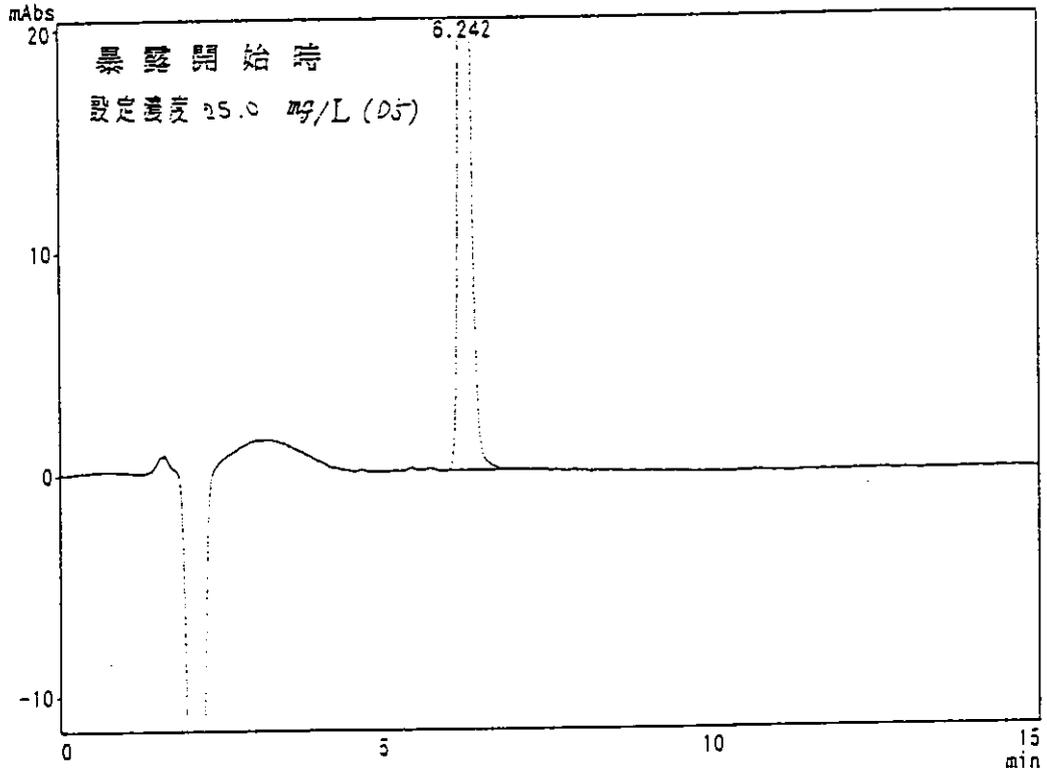
Figure 2-1. Example of chromatogram.
 (standard solution of 5.00 mg/L, 0-day)

CLASS-LC10 システム番号=2 Ch=1 レポート番号=22 テンプレート=1750H0C.D11 97/02/14 13:37:12
 テンプレート : ANI/F3/0h
 ID : 25/5
 サンプル量 : 20
 タイプ : 未知試料
 検出器 : SPD-10A シングル
 オペレーター名 :
 メソッド名 : ANI-1.M01

1997.2.14

試験番号 91750

*** クロマトグラム ***



*** ヒストグラム ***

PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	6.242	573878	57508	SV R	1	23.9018	o-7ニシリン
		573878	57508			23.9018	

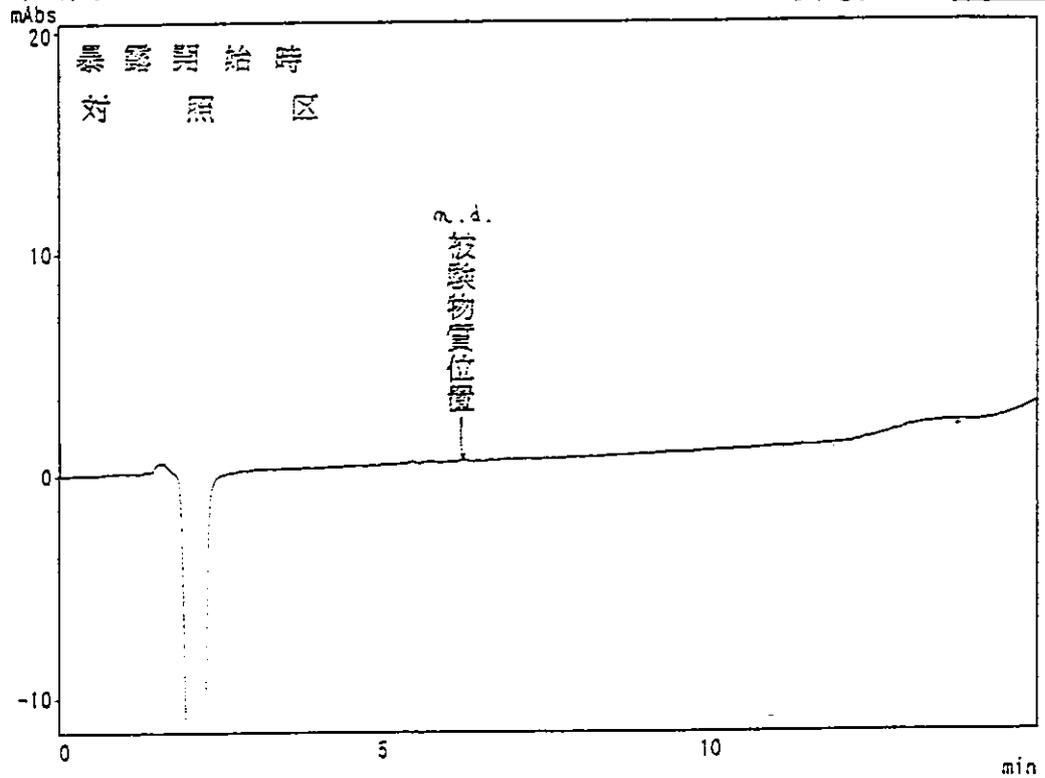
Figure 2-2. Example of chromatogram.
 (test solution of 25.0 mg/L as nominal concentration, 0-day)

CLASS-LC10 システム番号=2 Ch=1 レポート番号=17 データ=1750H0Z.D11 97/02/14 12:11:26
サンプル : ANI/F5/0h
ID : 対照区
サンプル量 : 100
タイプ : 未知試料
検出器 : SPD-10A シングル
オペレータ名 :
サンプル名 : ANI-1.M01

1997. 2. 14

試験番号 91750

*** クロマトグラム ***



*** ピークレポート ***
!! ピークがありません !!

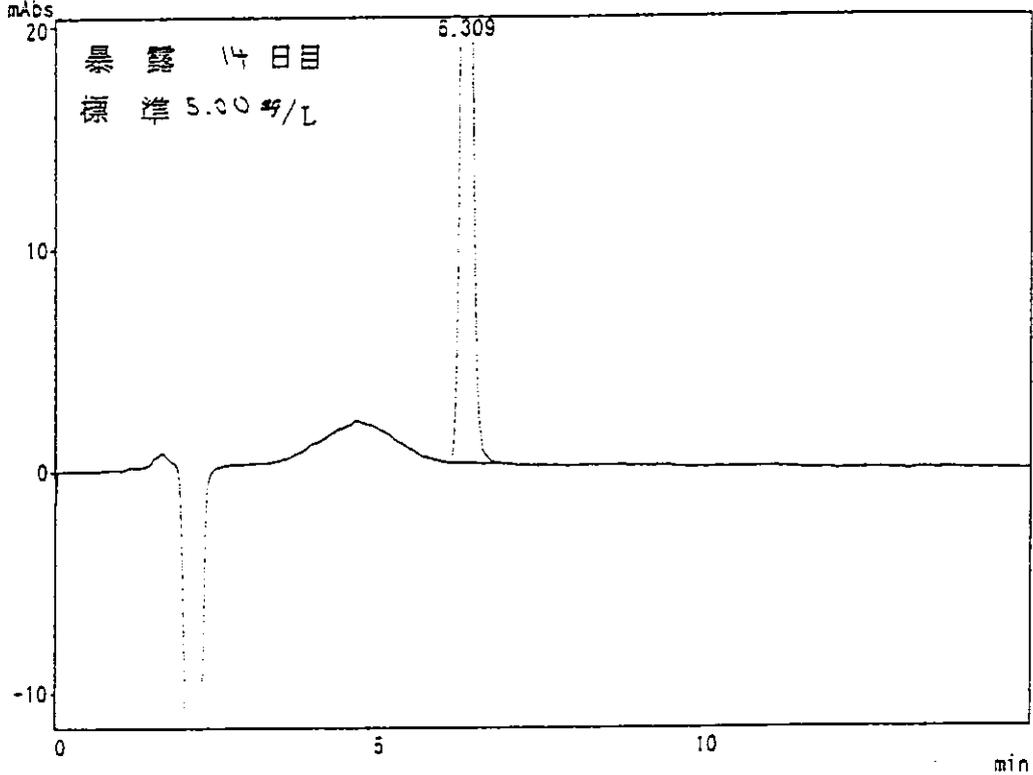
Figure 2-3. Example of chromatogram.
(test solution of control, 0-day)

CLASS-LC10 システム番号=2 Ch=1 レポート番号=70 テータ=1750H14S.D12 97/02/28 14:57:40
 サンプル : 7ニシジン/std.
 ID : 5ppm
 サンプル量 : 100
 タイプ : 標準試料
 検出器 : SPD-10A シックル
 サンプル名 :
 メソッド名 : ANI-1.M01

97.2.28

試験番号 91750

*** クロマトグラム ***



*** ヒートマップ ***

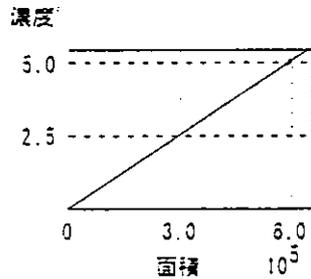
PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	6.309	588934	58784	R	1		o-7ニシジン

*** キャリブレーション結果 ***

** ID テーブル **

IDNO	成分名	時間	濃度	F1	F2
1	o-7ニシジン	6.31	5	8.489918e-006	

** 検量線 **



IDNO: 1
 NAME: o-7ニシジン
 TIME: 6.31

濃度 面積
 (1) 5 588934

F1 F2
 (1) 8.48992e-006 0

r2 = 1

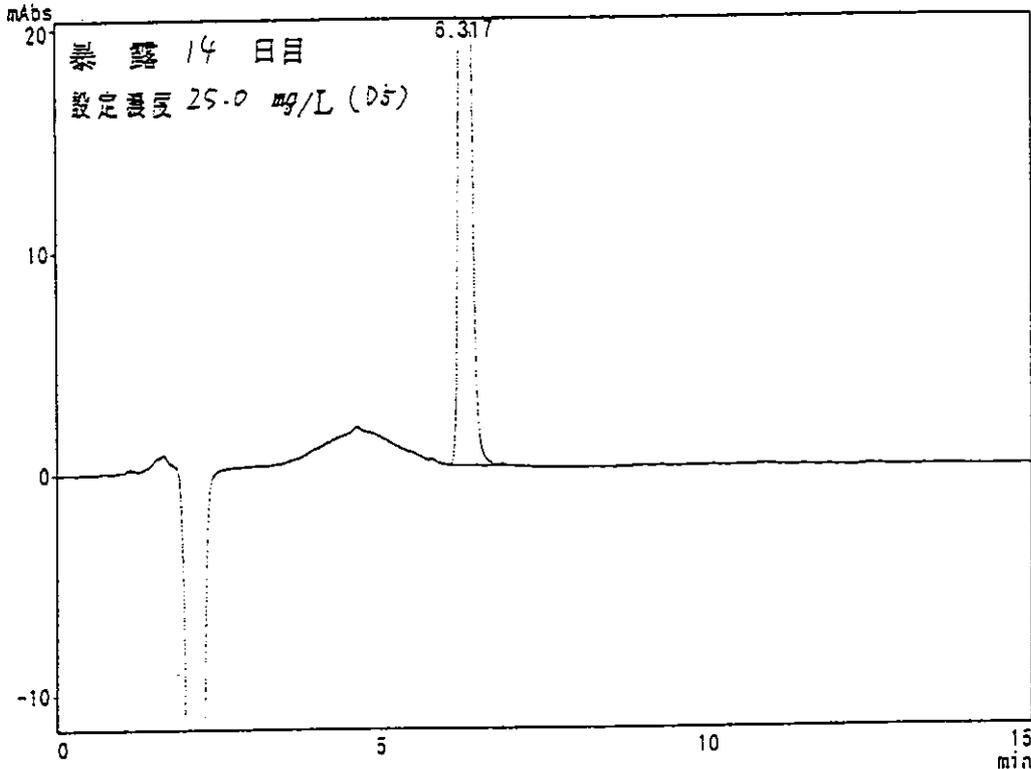
Figure 2-4. Example of chromatogram.
 (standard solution of 5.00 mg/L, 14-day)

CLASS-LC10 システム番号=2 Ch=1 レポート番号=92 日付=97/02/28 15:49:05
 サンプル : ANI/F3/14d
 ID : 25/5
 サンプル量 : 20
 タイトル : 未知試料
 検出器 : SPD-10A シンク
 オペレータ名 :
 メソッド名 : ANI-1.M01

1997.2.28

試験番号 9/750

*** クロマトグラム ***



*** ピークレポート ***

PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	6.317	553795	55714	S	R	23.5084	o-7ニシリン

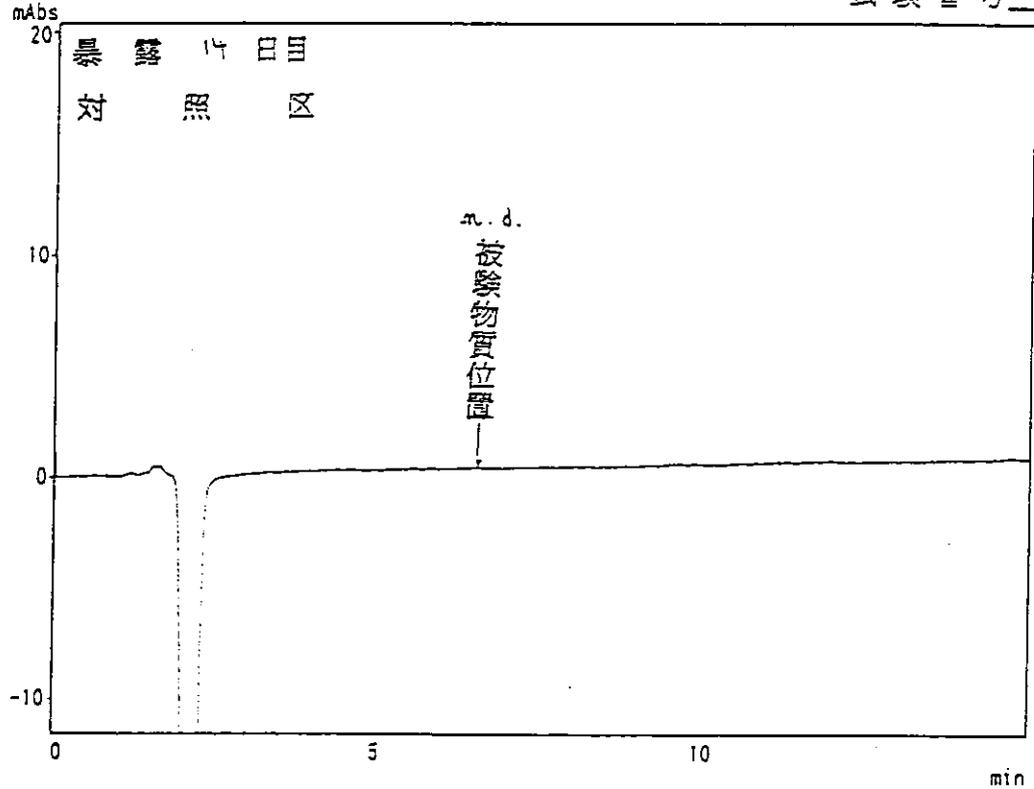
Figure 2-5. Example of chromatogram.
 (test solution of 25.0 mg/L as nominal concentration, 14-day)

CLASS-LC10 システム番号=2 Ch=1 レポート番号=55 データ=1750H14Z.D11 97/02/28 14:23:22
サンプル : ANI/F6/14d
ID : 対照区
サンプル量 : 100
タイプ : 未知試料
検出器 : SPD-10A シングル
オペレータ名 : XXXXXXXXXX
レポート名 : ANI-1.M01

197.2.23

*** クロマトグラム ***

試験番号 9175



*** ヒートアップ ***
!! ヒートがありません !!

Figure 2-6. Example of chromatogram.
(test solution of control, 14-day)