

3. 試験材料及び方法

項目		内容	
試験方法			
試験生物	種(学名・株名)	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> ATCC22662 株	
	入手先	American Type Culture Collection	
	対照物質への感受性 (EC ₅₀) (対照物質名)	0-72h E _r C ₅₀ : 0.63 mg/L 重クロム酸カリウム(関東化学(株)製、試薬特級)	
前培養	前培養の期間	3 日間 2009 年 1 月 16 日~2009 年 1 月 20 日	
	培地名	OECD 培地	
	環境条件(水温、光強度)	21±2°C 62~65 μE/m ² /s	
試験条件	試験容器	300mL 容ガラス製三角フラスコおよび通気性シリコン栓	
	培地名	OECD 培地	
	暴露期間	本試験: 2009年1月20日~2009年1月23日	
	試験濃度(設定値)	1.0、2.2、4.6、10 および 22 mg a.i./L 公比 2.2(=√[3]{10})	
	初期生物量	1×10 ⁴ cells/mL	
	連数	試験濃度区	3 連
		対照区	6 連
	試験溶液量		100 mL/試験容器
	助剤	助剤の有無	無
		種類	—
		濃度	—
		助剤対照区の連数	—
	培養方式(振とう培養、 静置培養、連続培養等)		振とう培養(100 rpm)
水温又は培養温度		実測値: 20.1~21.4°C	
照明(光強度・時間等)		実測値: 63~74 μE/m ² /s	
結果の算出方法	速度法	E _r C ₅₀ : Logit 法 NOEC _r : 多重比較検定(Dunnett, α=0.05)	

4. 試験結果及び考察

項目	内容
毒性値	0-72h E ₁ C ₅₀ : 8.5 mg a.i./L 0-72h NOEC _r : 2.1 mg a.i./L
試験濃度	実測値
考察及び特記事項	<ul style="list-style-type: none"> 被験物質の溶解に時間を要するため、室温で約 22 時間スターラー攪拌して試験原液を調製した。 試験液中の被験物質濃度は測定濃度の平均値を採用した。 試験の有効性については基準値を全て満たしており、本試験はガイドラインに準じて適切に行われたと判断した。

5. 藻類の生長曲線および濃度－生長阻害曲線

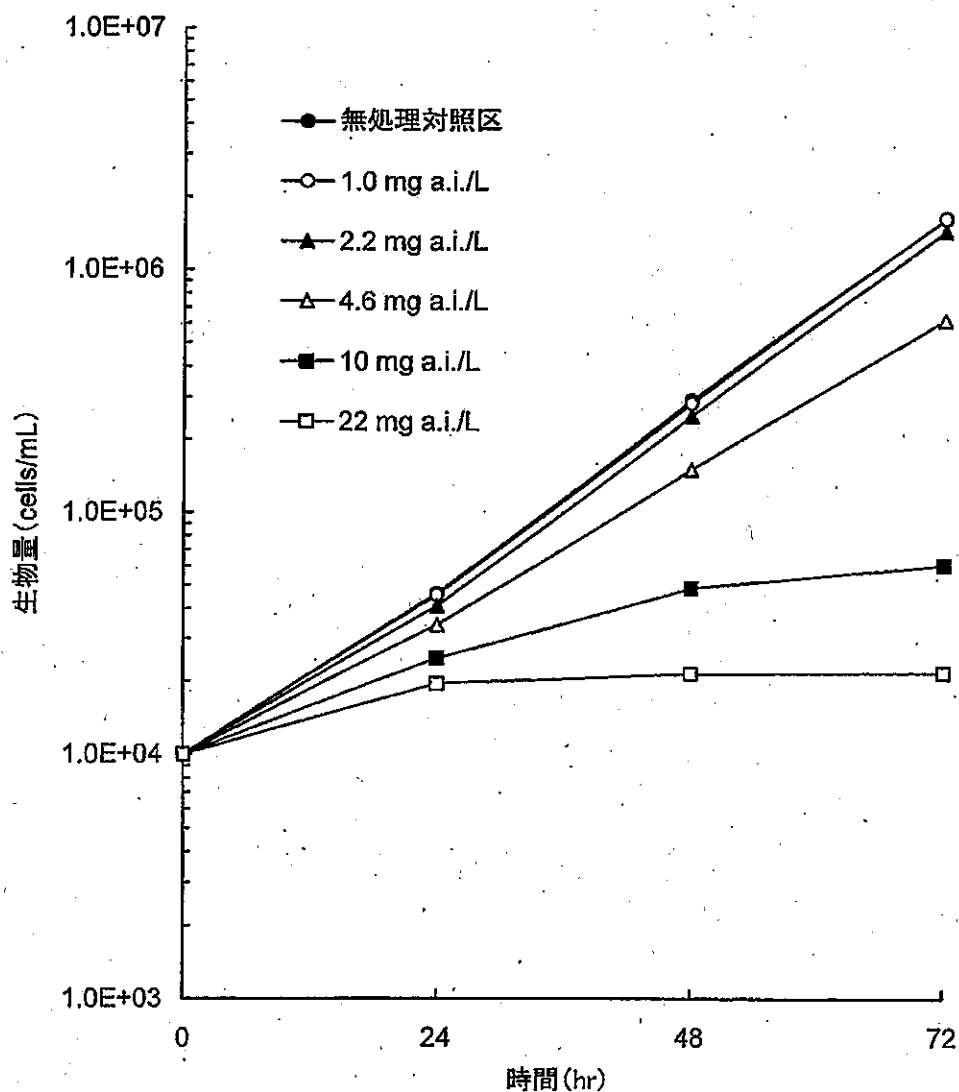


図 1. 藻類の生長曲線

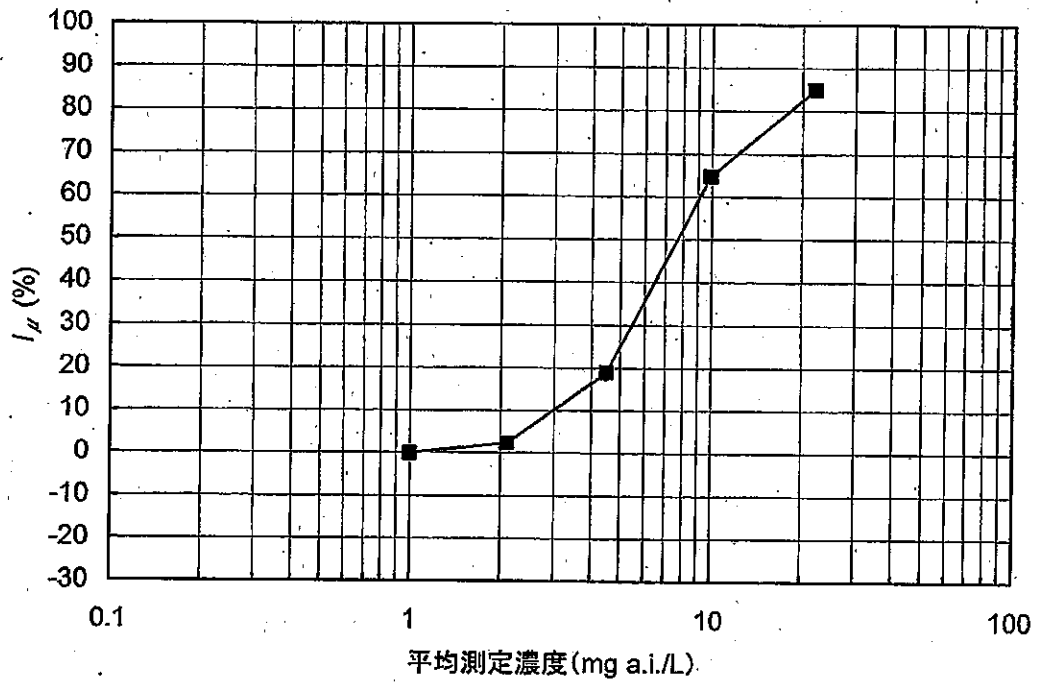


図2. 4-クロロ-2-ニトロアニリンに暴露された藻類(*P. subcapitata*)の濃度-阻害率曲線

表 1. 4-クロロ-2-ニトロアニリンの試験液中濃度

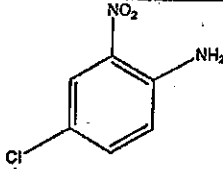
設定濃度 (mg a.i./L)	測定濃度 (mg a.i./L)		
	0 時間	72 時間	平均値
無処理対照区	<0.050	<0.050	—
1.0	1.0 [100]	1.0 [100]	1.0 [100]
2.2	2.2 [100]	2.1 [95]	2.1 [95]
4.6	4.6 [100]	4.5 [98]	4.5 [98]
10	9.9 [99]	10 [100]	9.9 [99]
22	22 [100]	22 [100]	22 [100]

[]: 設定に対する割合 (%)

[様式 8]

ミジンコ急性遊泳阻害試験結果報告書

1. 一般的事項

新規化学物質等の名称	4-クロロ-2-ニトロアニリン		
別名	—		
C A S 番号	89-63-4		
構造式又は示性式 (いずれも不明な場合は、 その製法の概要)			
分子量	172.57		
試験に供した新規化学物質の純度(%)	99.9		
試験に供した新規化学物質のロット番号	GJ01		
不純物の名称及び含有率	不明		
蒸気圧	不明		
対水溶解度	不明		
1-オクタノール/水分配係数	不明		
融点	118°C		
沸点	不明		
常温における性状	橙色結晶性粉末		
安定性	不明		
溶媒に対する溶解度等	溶媒	溶解度	溶媒中の安定性
	エーテル	可溶	—
	酢酸	可溶	—
	メノール	微溶	—

2. 試験溶液の被験物質濃度の分析方法

項目	方法
分析方法	<p>被験物質濃度が 0.05 mg a.i./L 相当量となるように試験液を超純水で希釈したものを HPLC に注入し、被験物質を定量した。以下の式により被験物質濃度を算出した。</p> <p>濃度 (mg a.i./L) = 分析試料溶液の 4-クロロ-2-ニトロアニリン濃度 × 希釈倍率</p> <p>サンプリング: 全試験区 頻度: 暴露開始時および終了時 サンプリング量: 20 mL サンプリング法: 試験液を攪拌することなく中層から採取 (暴露終了時は 4 連の各試験容器から等量採取し混和後、20 mL を採取)</p>
前処理法	必要に応じて超純水にて希釈した。
定量条件	<p>装置 (HPLC): L-7000 システム 日立製作所製 データ処理装置: D-7000 日立製作所製 カラム: L-column ODS (5 μm, 4.6 mm I.D × 150 mm) カラム温度: 40°C 移動相: 超純水: アセトニトリル = 50:50 流量: 1.0 mL/min 波長: UV 230 nm 感度: 1 AU/V 注入量: 100.0 μL 定量限界: 0.050 mg a.i./L 平均回収率: 0.05 mg a.i./L (101%)、50 mg a.i./L (100%)</p>

3. 試験材料及び方法

項目		内容	
試験生物	種(和名・系統・時間齢)	オオミジンコ(<i>Daphnia magna</i>) 24 時間未満齢	
	入手先	独立行政法人 国立環境研究所 (元環境庁国立環境研究所)	
	対照物質への感受性 (EC ₅₀) (対照物質名)	48 時間 EC ₅₀ =0.89 mg/L. 重クロム酸カリウム(関東化学㈱製、試薬特級)	
飼育	飼育水の種類	人工調製水 Elendt M4	
	環境条件(水温、明暗周期)	水温: 20±1°C 明暗周期: 16 時間明/8 時間暗(室内光)	
試験条件	試験容器		100 mL 容ガラス製ビーカー
	試験用水	種類	人工調製水 Elendt M4
		硬度	250 mg/L(CaCO ₃ 換算)
		pH	8.2
	暴露期間		本試験: 2009 年 1 月 20 日~2009 年 1 月 22 日
	試験濃度(設定値)		0.50, 1.0, 2.0, 4.0, 8.0 mg a.i./L(公比 2.0)
	供試数		20 頭/試験区(5 頭/容器×4 連)
	連数	試験濃度区	4 連
		対照区	4 連
	試験溶液量		100 mL/試験容器
	助剤	助剤の有無	無
		種類	—
		濃度	—
		助剤対照区の連数	—
	試験方式		止水式
	換水又は流水条件		—
	水温		19.7~19.8°C(実測値)
溶存酸素濃度(DO)		8.3~8.8 mg/L(実測値)	
明暗周期		16 時間明/8 時間暗 室内光(685~997 lux、実測値)	
結果の算出 方法	EC ₅₀	Moving average 法	

4. 試験結果及び考察

項目	内容
毒性値	48 時間 $EC_{50} = 4.2 \text{ mg a.i./L}$
試験濃度	実測値
考察及び特記事項	<ul style="list-style-type: none"> 被験物質の溶解に時間を要するため、20°Cで一晩スターラー攪拌して試験原液を調製した。 試験液中の被験物質濃度は測定濃度の平均値を採用した。 試験の有効性については基準値を満たしており、本試験はガイドラインに準じて適切に行われたと判断した。

5. ミジンコの濃度-遊泳阻害率曲線

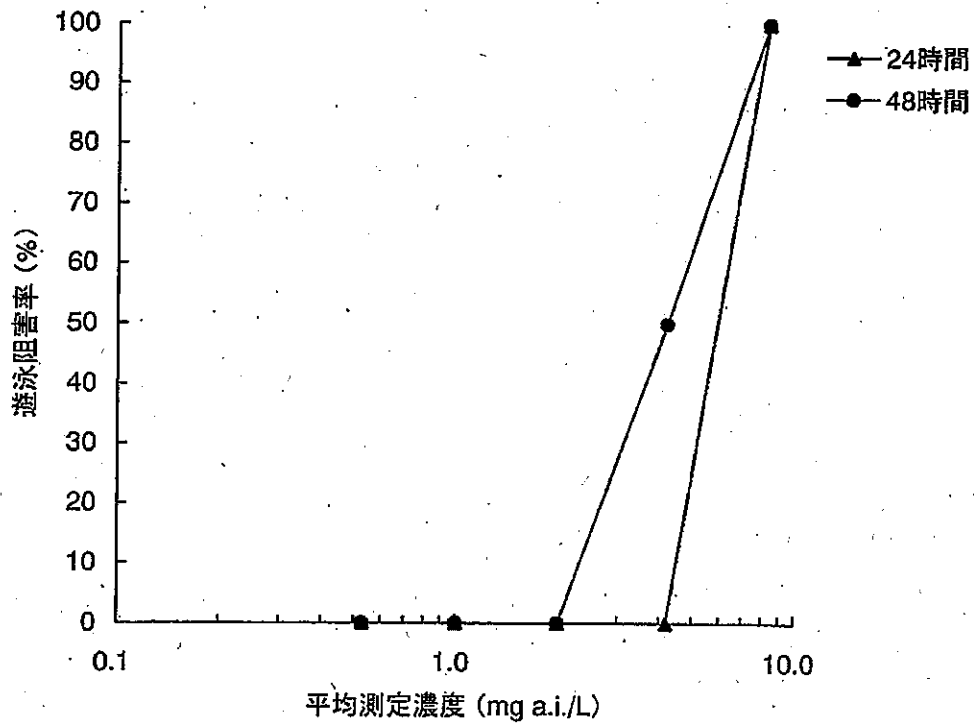


表 1. 4-クロロ-2-ニトロアニリンの試験液中濃度

設定濃度 (mg a.i./L)	測定濃度 (mg a.i./L)		
	0 時間	48 時間	平均値
無処理対照区	<0.050	<0.050	—
0.50	0.54 [108]	0.53 [106]	0.53 [106]
1.0	1.1 [110]	1.0 [100]	1.0 [100]
2.0	2.0 [100]	2.1 [105]	2.0 [100]
4.0	4.3 [108]	4.2 [105]	4.2 [105]
8.0	8.4 [105]	8.3 [104]	8.3 [104]

[]: 設定に対する割合(%)

表 2. 4-クロロ-2-ニトロアニリンに暴露されたオオミジンコの中毒症状および累積遊泳阻害数(率)

設定濃度 (mg a.i./L)	累積遊泳阻害数および遊泳阻害率(%)		中毒症状	
	24 時間	48 時間	24 時間	48 時間
無処理対照区	0 (0)	0 (0)	異常なし	異常なし
0.50 [0.53]	0 (0)	0 (0)	A	A
1.0 [1.0]	0 (0)	0 (0)	A	A,B
2.0 [2.0]	0 (0)	0 (0)	A,B	B
4.0 [4.2]	0 (0)	10 (50)	B	B,C
8.0 [8.3]	20 (100)	20 (100)	C	C

[]: 平均測定濃度

A: 無処理対照区と同様

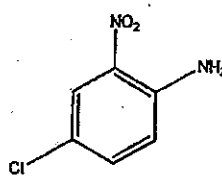
B: 異常遊泳(自発的遊泳減少)

C: 遊泳阻害(試験容器を軽く振とうした後、15 秒間全く水中を遊泳しない状態)

[様式9]

魚類急性毒性試験結果報告書

1. 一般的事項

新規化学物質等の名称 (IUPAC命名法による)	4-クロロ-2-ニトロアニリン		
別名	—		
C A S 番号	89-63-4		
構造式又は示性式 (いずれも不明な場合は、その製法の概要)			
分子量	172.57		
試験に供した新規化学物質の純度(%)	99.9		
試験に供した新規化学物質のロット番号	GJ01		
不純物の名称及び含有率	不明		
蒸気圧	不明		
対水溶解度	不明		
1-オクタノール/水分配係数	不明		
融点	118°C		
沸点	不明		
常温における性状	橙色結晶性粉末		
安定性	不明		
溶媒に対する溶解度等	溶媒	溶解度	溶媒中の安定性
	エーテル	可溶	—
	酢酸	可溶	—
	メノール	微溶	—

2. 試験溶液の被験物質濃度の分析方法

項目	方法
分析手法	<p>被験物質濃度が0.050 mg a.i./L相当量となるように試験液を超純水で希釈したものをHPLCに注入し、被験物質を定量した。以下の式により被験物質濃度を算出した。</p> <p>濃度(mg a.i./L)=分析試料溶液の被験物質濃度×希釈倍率</p> <p>サンプリング: 全試験区</p> <p>頻度: 暴露開始時および終了時</p> <p>サンプリング量: 20 mL</p> <p>サンプリング法: 試験液を攪拌することなく中層から採取</p>
前処理法	必要に応じて超純水にて希釈した。
定量条件	<p>装置(HPLC): L-7000 システム 日立製作所製</p> <p>データ処理装置: D-7000 日立製作所製</p> <p>カラム: L-column ODS (5 μm, 4.6 mm I.D×150 mm)</p> <p>カラム温度: 40°C</p> <p>移動相: 超純水:アセトニトリル=50:50</p> <p>流量: 1.0 mL/min</p> <p>波長: UV 230 nm</p> <p>感度: 1 AU/V</p> <p>注入量: 100.0 μL</p> <p>定量限界: 0.050 mg a.i./L</p> <p>平均回収率: 0.05 mg a.i./L(101%)、50 mg a.i./L(100%)</p>

3. 試験材料及び方法

項 目		内 容		
試験生物	種(和名・学名・系統)	メダカ (<i>Oryzias latipes</i>)		
	入手先	自家繁殖		
	大きさ(全長、体重)・月齢	全長: 2.5 cm (2.3~2.8 cm), n=20 体重: 0.14 g (0.12~0.17 g), n=20 齢: 成魚		
	対照物質への感受性 (LC ₅₀) (対照物質名)	96 時間 LC ₅₀ : 0.99 mg/L 硫酸銅(Ⅱ)五水和物(関東化学(株)製 試薬特級)		
じゅん化	じゅん化期間	84日間 2008年10月27日~2009年1月19日		
	飼育水の種類	脱塩素水道水		
	じゅん化前の薬浴の有無	なし		
	じゅん化方式(止水、半止水、流水等)	流水循環濾過式		
	環境条件(水温、明暗周期)	23±2°C、16 時間明/8 時間暗		
	餌料(種類・量・頻度等)	テトラミン®・体重の 2%/日		
試験条件	試験容器		5 L 容総ガラス製水槽	
	試験用水	種類(天然水、脱塩素水道水、人工調製水等)		脱塩素水道水
		硬度		50 mg (CaCO ₃)/L
		pH		7.8
	暴露期間		2009年1月19日~2009年1月23日	
	試験濃度(設定値)		4.6, 6.8, 10, 15, 22 mg a.i./L 公比: 1.5(=√10)	
	供試数		10尾/試験容器	
	試験溶液量		5 L	
	助剤	助剤の有無		なし
		種類		—
		濃度		—
	試験方式(止水、半止水、流水等)		止水式	
	換水又は流水条件		—	
	水温		23±2°C	
	溶存酸素濃度(DO)		6.9~8.4 mg/L	
	明暗周期		16時間明/8時間暗	
結果の算出 方法	LC ₅₀	Moving average法		

4. 試験結果及び考察

項目	内容
毒性値	96h-LC ₅₀ = 17 mg a.i./L
試験濃度	実測値
考察及び特記事項	<ul style="list-style-type: none"> ・被験物質の溶解に時間を要するため、メカニカルスターラーで約24時間、23℃下で攪拌して試験原液を調製した。 ・試験液中の被験物質濃度は測定濃度の平均値を採用した。 ・試験の有効性については基準値を満たしており、本試験はガイドラインに準じて適切に行われたと判断した。

5. 魚類の濃度－死亡率曲線

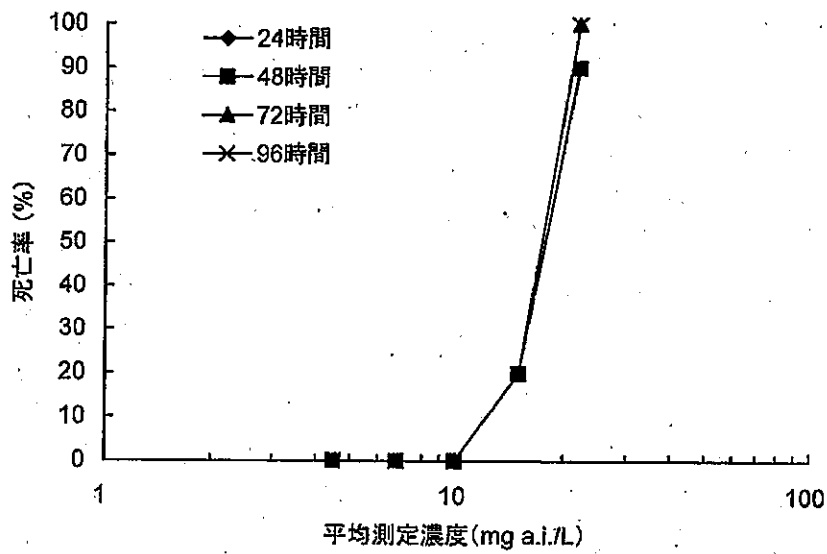


表 1. 4-クロロ-2-ニトロアニリンの試験液中濃度

設定濃度 (mg a.i./L)	測定濃度 (mg a.i./L)		
	0 時間	96 時間	平均値
無処理対照区	<0.050	<0.050	—
4.6	4.7 [102]	4.4 [96]	4.5 [98]
6.8	7.0 [103]	6.6 [97]	6.8 [100]
10	10 [100]	9.8 [98]	9.9 [99]
15	15 [100]	15 [100]	15 [100]
22	23 [105]	22 [100]	22 [100]

[]: 設定濃度に対する割合 (%)

要 旨

試験委託者 環境省

表 題 3, 4, 4' - トリクロロジフェニル尿素の藻類 (*Pseudokirchneriella subcapitata*) に対する生長阻害試験

試験番号 No. 2007-生49

試験法ガイドライン

本試験は、厚生労働省医薬食品局長、経済産業省製造産業局長、環境省総合環境政策局長連名通知「新規化学物質等に係る試験の方法について」(薬食発第 1121002 号、平成15・11・13 製局第 2 号、環保企発第 031121002 号、平成15年11月21日、平成18年11月20日一部最終改正)に従って実施した。

- 1) 被験物質 : 3, 4, 4' - トリクロロジフェニル尿素
- 2) 暴露方式 : 止水式、振とう培養 (100 rpm)
- 3) 供試生物 : *Pseudokirchneriella subcapitata* (ATCC 22662)
- 4) 暴露期間 : 72 時間
- 5) 試験濃度(設定値) : 対照区, 0.0013, 0.0028, 0.0060, 0.013, 0.028, 0.060, 0.13 mg/L
公比; 2.2,
- 6) 試験溶液量 : 100 mL (OECD 培地) / 容器
- 7) 連数 : 3 容器 / 濃度区、6 容器 / 対照区
- 8) 初期生物量 : 0.5 mg/L 以下 (細胞濃度として 0.5×10^4 cells/mL)
- 9) 試験温度 : 23 ± 2 °C
- 10) 照明 : $60 \sim 120 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ (フラスコ液面付近) で連続照明
- 11) pH : 試験溶液の pH 調整は行わなかった
- 12) 分析法 : HPLC 法

結 果

1) 試験溶液中の被験物質濃度

被験物質の藻体への吸着が認められたことから、暴露試験においては、別途、藻体を接種しない区（藻体未接種区）を設けた。暴露期間中には、藻体未接種区でも高濃度区で被験物質の濃度低下がみられた。これは、培地中の NaHCO_3 の分解によって被験物質の溶解度が低下したために析出が起こり、容器への付着や沈降が生じたことによると推測される。

従って、各影響濃度（50 % 生長阻害濃度、最大無作用濃度）の算出に当たっては、藻体未接種区の暴露開始時、24 時間後、48 時間後および暴露終了時の測定値の幾何平均値を採用した。

2) 生長速度の比較による阻害濃度

50 % 生長阻害濃度 E_rC_{50}

: 0.046 mg/L (95 % 信頼限界 0.041 ~ 0.052 mg/L), Probit

最大無作用濃度 NOEC (Rate 0-72 hr)

: 0.0014 mg/L

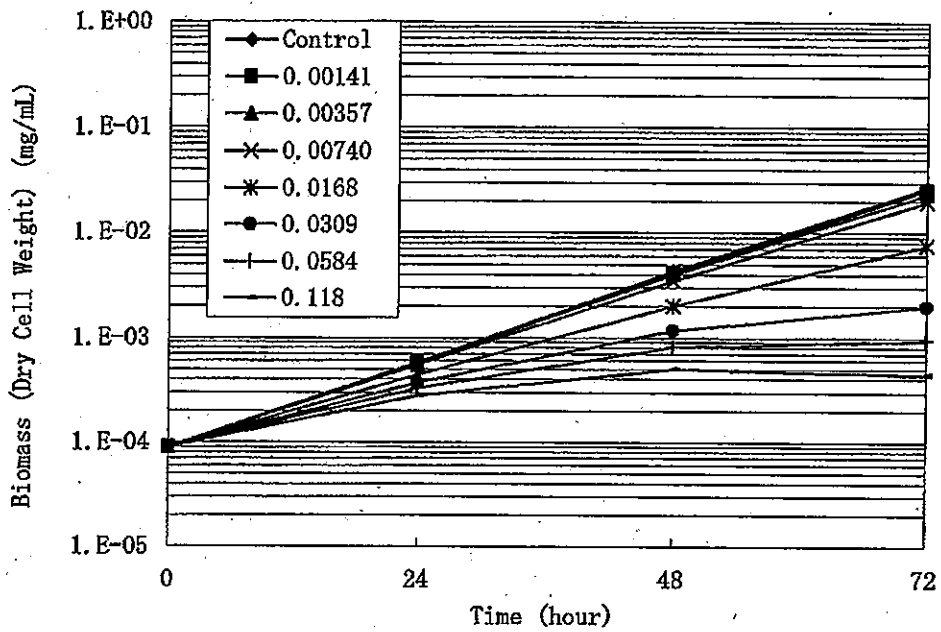


Figure 1. Algal Growth Curve of *Pseudokirchneriella subcapitata* (Biomass vs Time during the 72 hours Exposure)

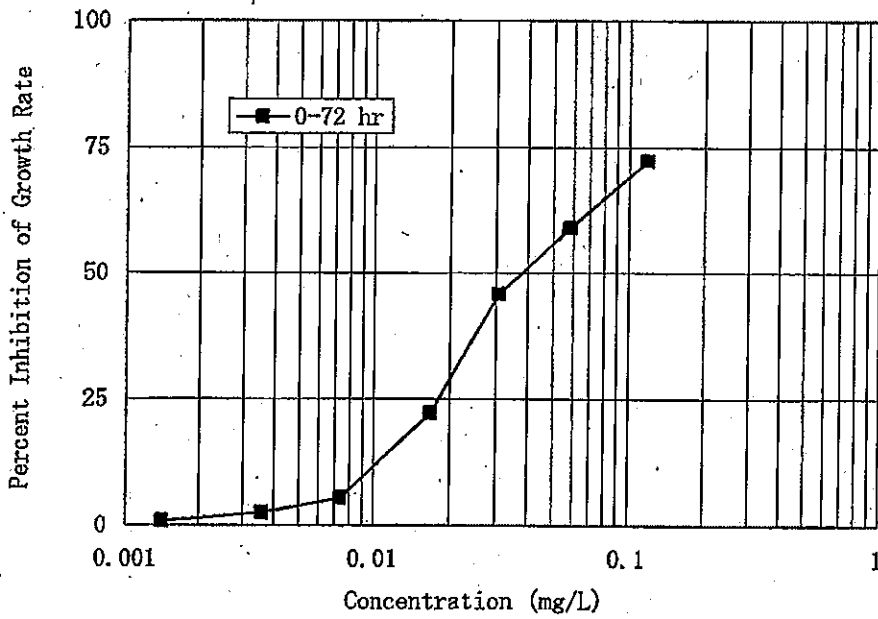


Figure 2. Concentration-Inhibition curve Based on %I Values Calculated from the Growth Curves