

最終報告書

フェニルエチルモノ又はジクロリド〔(2-クロロエチル)ベンゼン(被験物質番号 K-1310)にて試験実施〕のコイにおける濃縮度試験

財団法人 化学工業安全協会
化学品安全調査会 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 通商産業省

試験の表題 フェニルエチルモノ又はジクロリド〔(2-クロロエチル)ベンゼン
(被験物質番号 K-1310)にて試験実施〕のコイにおける濃縮度
試験

試験番号 51310

上記試験は、「新規化学物質に係る試験及び指定化学物質に係る有害性の調査の項目等を定める命令第4条に規定する試験施設について」(環保業第39号、薬発第229号、59基局第85号、昭和59年3月31日、昭和63年11月18日改正)に定める「新規化学物質に係る試験及び指定化学物質に係る有害性の調査の項目等を定める命令第4条に規定する試験施設に関する基準」及び「OECD Principles of Good Laboratory Practice」(May 12, 1981)に従って実施したものです。

平成10年7月29日

運営管理者

[Redacted Signature]

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 通商産業省

試験の表題 フェニルエチルモノ又はジクロリド〔(2-クロロエチル)ベンゼン(被験物質番号
K-1310)にて試験実施〕のコイにおける濃縮度試験

試験番号 51310

上記試験は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信頼性保証部門が監査及び
査察を実施しており、監査又は査察を行った内容、日付並びに運営管理者及び試験責任者に報告を
行った日付は以下の通りです。

監査又は査察内容	監査又は査察日	報告日(運営管理者)	報告日(試験責任者)
試験計画書	平成10年 4月 9日	平成10年 4月 9日	平成10年 4月 9日
試験実施状況	平成10年 4月22日	平成10年 4月24日	平成10年 4月24日
	平成10年 5月14日	平成10年 5月22日	平成10年 5月22日
	平成10年 5月20日	平成10年 5月22日	平成10年 5月22日
	平成10年 6月 8日	平成10年 6月18日	平成10年 6月16日
生データ及び最終報告書	平成10年 7月29日	平成10年 7月29日	平成10年 7月29日

本最終報告書は、試験の方法が正確に記載されており、内容が試験計画及び標準操作手順に従い、
かつ、生データを正確に反映していることを保証します。

平成10年 7月29日

信頼性保証部門責任者



目 次

	頁
要 約	1
1. 表 題	2
2. 試験委託者	2
3. 試験施設	2
4. 試験目的	2
5. 試験方法	2
6. 適用する優良試験所基準	2
7. 試験期間	3
8. 試験関係者	3
9. 最終報告書の作成	3
10. 被験物質	4
11. 急性毒性試験	6
12. 濃縮度試験の実施	8
13. 試験結果	1 6
14. 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	1 7
15. 試資料の保管	1 7
16. 備 考	1 8
17. 表及び図の内容	1 9

付表及び付図

要 約

1. 試験の表題

フェニルエチルモノ又はジクロリド〔(2-クロロエチル)ベンゼン(被験物質
番号 K-1310)にて試験実施〕のコイにおける濃縮度試験

2. 試験条件

2.1 急性毒性試験

- | | |
|-----------|------------------|
| (1) 供 試 魚 | ヒメダカ |
| (2) ばく露期間 | 48時間 |
| (3) ばく露方法 | 半止水式(8~16時間毎に換水) |

2.2 濃縮度試験

- | | |
|-----------|-----------------------------------------------------------------|
| (1) 供 試 魚 | コイ |
| (2) 試験濃度 | 第1濃度区 100 $\mu\text{g/L}$
第2濃度区 10 $\mu\text{g/L}$ |
| (3) ばく露期間 | 6週間 |
| (4) ばく露方法 | 連続流水式 |
| (5) 分析方法 | ガスクロマトグラフィー質量分析法 |

3. 試験結果

- | | |
|---------------|----------------------------------------|
| (1) 48時間LC50値 | 24.9 mg/L |
| (2) 濃縮倍率 | 第1濃度区 46~74倍
第2濃度区 24~73倍 |

4. 被験物質の安定性

被験物質は保管条件下及び試験条件下で安定であることを確認した。

最 終 報 告 書

試験番号 51310

1. 表 題 フェニルエチルモノ又はジクロリド〔(2-クロロエチル)ベンゼン(被験物質番号 K-1310)にて試験実施]のコイにおける濃縮度試験
2. 試験委託者 名 称 通商産業省
住 所 (〒100-8901)東京都千代田区霞が関一丁目3番1号
3. 試験施設 名 称 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
住 所 (〒830-0023)福岡県久留米市中央町19-14
TEL (0942)34-1500
運営管理者 XXXXXXXXXX
4. 試験目的 K-1310のコイにおける濃縮性の程度について知見を得る。
5. 試験方法 「新規化学物質に係る試験の方法について」(環保業第5号、薬発第615号、49基局第392号、昭和49年7月13日)に規定する〈魚介類の体内における化学物質の濃縮度試験〉及び「OECD Guidelines for Testing of Chemicals」(May 12, 1981)に定める"Bioaccumulation : 305C, Degree of Bioconcentration in Fish"に準拠した。
6. 適用する優良試験所基準 「新規化学物質に係る試験及び指定化学物質に係る有害性の調査の項目等を定める命令第4条に規定する試験施設について」(環保業第39号、薬発第229号、59基局第85号、昭和59年3月31日、昭和63年11月18日改正)に定める「新規化学物質に係る試験及び指定化学物質に係る有害性の調査の項目等を定める命令第4条に規定する試験施設に関する基準」(以下「GLP基準」という。)及び「OECD Principles of Good Laboratory Practice」(May 12, 1981)に適合して行った。

7. 試験期間

(1) 試験開始日 平成10年 4月 9日

(2) ばく露開始日 平成10年 4月27日

(3) ばく露終了日 平成10年 6月 8日

(4) 試験終了日 平成10年 7月16日

8. 試験関係者

試験責任者

試験担当者

飼育管理責任者

急性毒性試験担当者

試資料管理部門責任者

9. 最終報告書の作成

平成10年7月16日

試験責任者

氏名

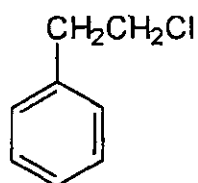
10. 被 験 物 質

本報告書においてK-1310は、次の名称及び構造式等を有するものとする。

10.1 名 称 (2-クロロエチル) ベンゼン

10.2 構造式等

構造式



分子式 C_8H_9Cl

分子量 140.61

10.3 純 度^{*1}

被 験 物 質 99.5%

被験物質濃度は不純物の含有量を補正せずに表示した。

10.4 入手先、商品名、等級及びロット番号^{*1}

(1) 入 手 先

(2) 商 品 名

(3) 等 級

(4) ロット番号 FGD01

*1 入手先添付資料による。

10.5 被験物質の確認

に記載の赤外吸収スペクトルと当研究所において測定したスペクトルが一致することを確認した (Fig. 1 4 参照)。また、質量スペクトル (Fig. 1 5 参照) 及び核磁気共鳴スペクトル (Fig. 1 6 参照) についても測定を行い、構造を確認した。

10.6 保管条件及び保管条件下での安定性

(1) 保管条件 冷蔵保存

(2) 安定性確認 ばく露開始前及び終了後に被験物質の赤外吸収スペクトルを測定した結果、両スペクトルは一致し、保管条件下で安定であることを確認した (Fig. 1 4 参照)。

10.7 試験条件下での安定性

ばく露開始前に予備検討を行い、試験条件下で安定であることを確認した。

11. 急性毒性試験

11.1 試験方法

「工場排水試験方法、魚類による急性毒性試験」(JIS K 0102-1993 の 71.)の方法に準じて行った。

11.2 供試魚

- | | | |
|---------|---|--------------------------------------------------------------------|
| (1) 魚 | 種 | ヒメダカ <u>Oryzias latipes</u> |
| (2) 供 | 給 | 源 |
| | | (住所 〒 869-0123 熊本県玉名郡長洲町大字長洲 2029) |
| (3) 蓄 | 養 | 条 |
| | | 件 |
| (4) じゅん | 化 | 条 |
| | | 件 |
| (5) 体 | 重 | 平均 0.25 g |
| (6) 全 | 長 | 平均 3.0 cm |
| (7) 検 | 定 | 田端健二 ^{*2} の方法に準じ、塩化第二水銀検定合格魚と同一ロット(TFO-971224)のものを試験に供した。 |

*2 用水と廃水, 14, 1297-1303 (1972)

11.3 試験用水

(1) 種類

久留米研究所敷地内で揚水した地下水

(2) 水質確認

当研究所にて平成10年2月5日に採水し、測定又は分析を行った結果をReference 1に示す(測定頻度1回/6ヶ月)。各項目の測定又は分析値は「水道法に基づく水質基準」(平成4年12月21日改正 厚生省令第69号)、「水産用水基準」(社団法人 日本水産資源保護協会 昭和58年3月)又は「OECD Guidelines for Testing of Chemicals 210, Fish, Early-life Stage Toxicity Test」(July 17, 1992)に記載されている濃度以下であることを確認した。

11.4 試験条件

- | | |
|------------|------------------------------------------|
| (1) 試験水槽 | ガラス製ガロンびん |
| (2) 試験液量 | 3.85 L × 2 / 濃度区 |
| (3) 試験温度 | 25 ± 2 °C |
| (4) 溶存酸素濃度 | ばく露開始時 8.1 mg/L
ばく露終了時 5.2 ~ 7.6 mg/L |
| (5) pH | ばく露開始時 7.8 ~ 8.0
ばく露終了時 7.7 ~ 7.9 |
| (6) 供試魚数 | 10尾 / 濃度区 |
| (7) ばく露期間 | 48時間 |
| (8) ばく露方法 | 半止水式 (8 ~ 16時間毎に換水) |

11.5 原液調製法

(1) 分散剤

HCO-40

(2) 調製方法

被験物質とその10倍量のHCO-40をはかりとり練り合わせた後、イオン交換水に溶解して被験物質濃度として1000 mg/Lの原液を調製した。

11.6 試験の実施

- | | |
|-----------|---------------------------|
| (1) 実施場所 | 214 LC50室 |
| (2) 試験実施日 | 平成10年 4月21日 ~ 平成10年 4月23日 |

11.7 48時間LC50値の算出

Doudoroff法で行った。

11.8 試験結果

被験物質の48時間LC50値 24.9 mg/L (Fig. 3 参照)

12. 濃縮度試験の実施

12.1 供試魚

- | | | |
|---------|-------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| (1) 魚 | 種 | コイ <u>Cyprinus carpio</u> |
| (2) 供 | 給 | 源 |
| | | 杉島養魚場 |
| | | (住所 〒 866-0024 熊本県八代市郡築一番町 123-2) |
| | | 供試魚受入日 平成10年 1月16日 |
| (3) 蓄 | 養 | 条 件 |
| | | 魚の入手時に目視観察をして異状のあるものを除去し、
受入槽で薬浴後、流水状態で46日間飼育した。 |
| (4) じゅん | 化 | 条 件 |
| | | 蓄養後、寄生虫駆除の薬浴を行った後、じゅん化水槽へ
搬入し、再度薬浴した後、じゅん化を行った。その間
異状のあるものは除去し、 $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ の水温の流水状態
で24日間飼育した。さらに試験水槽へ移し、薬浴後、
同温度の流水状態で27日間飼育した。 |
| (5) ばく露 | 開始前 | の体重、体長等 |
| | 体 | 重 |
| | 平均 | 24.2 g |
| | 体 | 長 |
| | 平均 | 9.9 cm |
| | 脂質含有率 | 平均 3.6 % |
| | ロット | TFC-980116 の測定値 |
| | 測定日 | 平成10年 3月30日 |
| (6) 餌 | 料 | |
| | 種 | 類 |
| | | コイ用ペレット状配合飼料 |
| | 製 | 造 |
| | 元 | 日本配合飼料株式会社 |
| | 給 | 餌 |
| | 方 | 法 |
| | | 供試魚体重の約2%相当量を1日2回に分けて給餌した。
ただし、供試魚の採取前日は給餌を止めた。 |

12.2 試験用水

11.3に同じ。

12.3 試験及び環境条件

- | | | | |
|-------------|------------------------------------------------|-------------|--------------|
| (1) 試験水供給方法 | 当研究所組立流水式装置を用いた。 | | |
| (2) 試験水槽 | 100L容ガラス製揮発性物質用試験水槽 | | |
| (3) 試験水量 | 原液2mL/分及び試験用水1600mL/分の割合で
2307L/日を試験水槽に供した。 | | |
| (4) 原液タンク | 10L容テドラーバック（冷蔵庫中で冷却）
25L容ガラス製びん（対照区） | | |
| (5) 試験温度 | 25±2℃ | | |
| (6) 溶存酸素濃度 | 第1濃度区 | 6.6～7.2mg/L | (Fig. 11 参照) |
| | 第2濃度区 | 6.7～7.3mg/L | (Fig. 12 参照) |
| | 対照区 | 7.4～7.8mg/L | (Fig. 13 参照) |
| (7) 供試魚数 | 第1及び第2濃度区 | 11尾（ばく露開始時） | |
| | 対照区 | 5尾（ばく露開始時） | |
| (8) ばく露期間 | 6週間 | | |
| (9) 実施場所 | 213アクアトロン室 | | |

12.4 原液調製法

(1) 分散剤

11.5の(1)に同じ。

(2) 調製方法

・第1濃度区

11.5の(2)と同様にして被験物質濃度として1000mg/Lの溶液を調製し、これをイオン交換水で希釈して被験物質濃度として80mg/Lの原液を調製した。

・第2濃度区

11.5の(2)と同様にして被験物質濃度として1000mg/Lの溶液を調製し、これをイオン交換水で希釈して被験物質濃度として8mg/Lの原液を調製した。

・対照区

HCO-40をはかりとり、イオン交換水に溶解してHCO-40濃度として800mg/Lの原液を調製した。

12.5 試験濃度

48時間LC50予備値及び被験物質の分析感度を考慮して、

第1濃度区 100 $\mu\text{g/L}$

第2濃度区 10 $\mu\text{g/L}$

に被験物質濃度を設定した。同時に、空試験として対照区を設定した。

12.6 観察、測定等

- | | |
|------------|------------------------------------|
| (1) 供試魚の観察 | 供試魚の健康状態等を1日に2回目視観察した。 |
| (2) 試験水量 | メスシリンダーを用いて1日に1回測定記録した。 |
| (3) 試験温度 | アルコール温度計を用いて1日に1回測定記録した。 |
| (4) 溶存酸素濃度 | 溶存酸素計を用いて1週間に2回測定記録した。 |
| (5) その他 | 試験期間中は、コイの排泄物、水槽壁の汚れ等を1日に1回程度除去した。 |

12.7 試験水及び供試魚中の被験物質分析

12.7.1 分析回数

試験水分析は第1、第2濃度区ともばく露期間中、毎週2回計12回行い、1回当りの分析試料は1点とした。また、供試魚分析は第1、第2濃度区ともばく露開始後、2、3、4及び6週の計4回行い、1回当りの分析試料は2尾とした。対照区はばく露開始前及びばく露終了時に行い、1回当りの分析試料は2尾とした。

12.7.2 分析試料の前処理

(1) 試験水

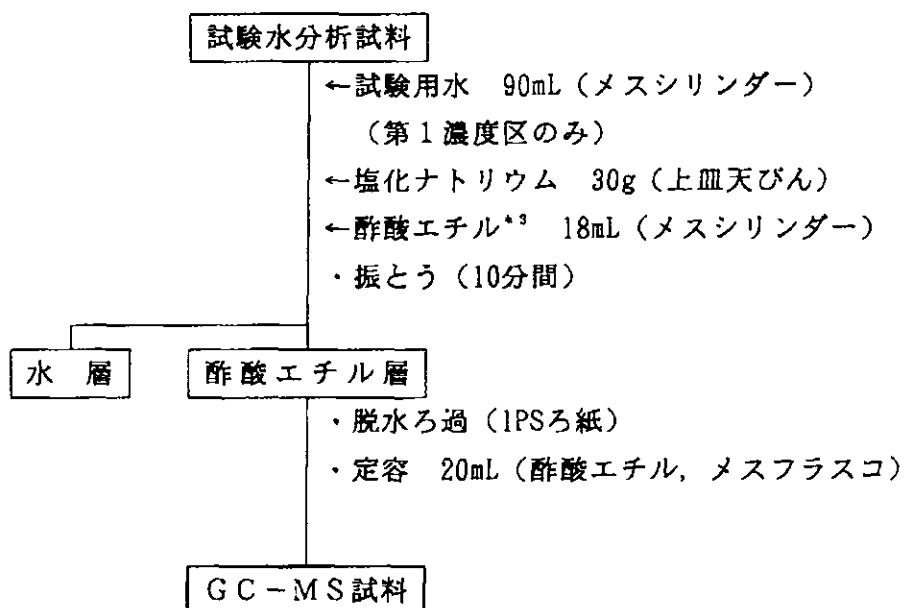
試験水槽から

第1濃度区 10mL

第2濃度区 100mL

を採取し、以下のフロースキームに従って前処理操作を行い、ガスクロマトグラフィー質量分析法（GC-MS）試料とした。

フロースキーム

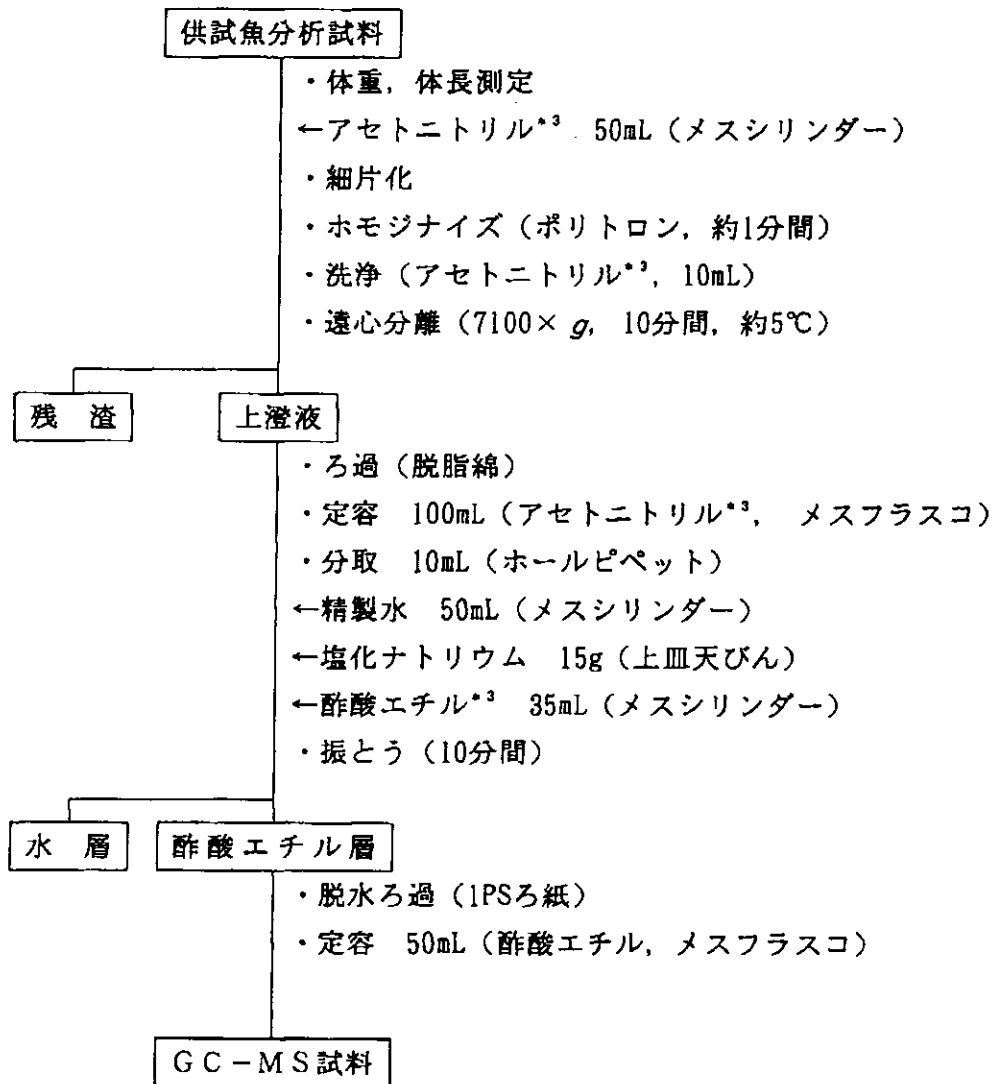


*3 冷却したものを使用した。

(2) 供 試 魚

試験水槽から供試魚を採取し、以下のフロースキームに従って前処理操作を行い、GC-MS試料とした。

フロースキーム



*3 冷却したものを使用した。

12.7.3 被験物質の定量分析

12.7.2の前処理を行って得られたGC-MS試料について、下記の定量条件に基づきガスクロマトグラフ-質量分析計により被験物質を分析した。供試魚中の被験物質の定量はGC-MS試料を適宜希釈し、検量線の濃度範囲になるように被験物質濃度を調整した。GC-MS試料中の被験物質濃度は、標準溶液及びGC-MS試料のマスクロマトグラム上で得られたピーク面積を比較し、比例計算して求めた（Table-4, 5、Fig. 6、Table-7, 8, 9、Fig. 8, 9, 10参照）。

(1) 定量条件

機	器	ガスクロマトグラフ-質量分析計
		島津製作所製 QP-5000
<u>ガスクロマトグラフ条件</u>		
カラム		30m×0.25mm I.D. フューズドシリカ製
液相		HP-5MS
膜厚		0.25µm
カラム温度		50℃(2min) → 170℃
昇温速度		20℃/min
試料導入部温度		250℃
インターフェース温度		250℃
キャリアーガス		ヘリウム
総流量		40mL/min
カラムヘッド圧		70kPa
注入方法		スプリットレス
サンプルリンス時間		2.0min
注入量		1µL
<u>質量分析計条件</u>		
イオン化電圧		70eV
測定 m/z		140

(2) 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行った。

被験物質100mgを正確にはかりとり、酢酸エチルに溶解して1000mg/Lの被験物質溶液を調製した。これを酢酸エチルで希釈して50.0µg/Lの標準溶液とした。

(3) 検量線の作成

(2)の標準溶液の調製と同様にして25.0、50.0及び100 $\mu\text{g/L}$ の標準溶液を調製した。これらを(1)の定量条件に従って分析し、得られたそれぞれのマスキ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。

ピーク面積の定量下限は、ノイズレベルを考慮して500 (被験物質濃度1.8 $\mu\text{g/L}$) とした (Fig. 4 参照)。

12.7.4 回収試験及びブランク試験

(1) 方法

12.7.2の試験水及び供試魚分析操作における被験物質の回収率を求めるため、回収試験用試験水及び魚体ホモジネートに被験物質原液を添加し、回収試験を行った。また、被験物質を加えない回収試験用試験水及び魚体ホモジネートについて、回収試験と同じ操作によりブランク試験を行った。回収試験及びブランク試験は、2点について測定した。

(2) 結果

(1)の方法により測定した結果、ブランク試験においてマスキロマトグラム上、被験物質ピーク位置にはピークは認められなかった。分析操作における各2点の回収率及び平均回収率は下記に示すとおりであり、平均回収率を分析試料中の被験物質濃度を求める場合の補正值とした (Table-3, 6、Fig. 5, 7 参照)。

分析操作における回収率

試験水分析 (被験物質1 μg 添加)

88.7%, 89.1% 平均88.9%

供試魚分析 (被験物質30 μg 添加)

81.2%, 80.5% 平均80.9%

12.7.5 分析試料中の被験物質濃度の算出及び定量下限

(1) 試験水分析試料中の被験物質濃度の算出

Table-4, 5の計算式に従って計算し、計算結果は有効数字3ケタに丸めて表示した。

(2) 試験水中の被験物質の定量下限濃度

12.7.3(3)の検量線作成で求めた被験物質の定量下限より、試験水中の被験物質の定量下限濃度*4はそれぞれ、

第1濃度区 4.0 $\mu\text{g/L}$

第2濃度区 0.40 $\mu\text{g/L}$

と算出される。

(3) 供試魚分析試料中の被験物質濃度の算出

Table-7, 8, 9の計算式に従って計算し、計算結果は有効数字3ケタに丸めて表示した。

(4) 供試魚中の被験物質の定量下限濃度

12.7.3(3)の検量線作成で求めた被験物質の定量下限より、供試魚中の被験物質の定量下限濃度*4は供試魚体重を30gとしたとき37ng/gと算出される。

$$\text{*4 被験物質定量下限濃度 (}\mu\text{g/L又はng/g)} = \frac{A}{\frac{B}{100} \times \frac{C \times E}{D}}$$

A : 検量線上定量下限濃度 ($\mu\text{g/L}$)

B : 回収率 (%)

C : 試験水採取量 (mL) 又は供試魚体重 (g)

D : 最終液量 (mL)

E : 分取比

計算結果は有効数字2ケタに丸めた。

12.8 濃縮倍率（BCF）の算出

Table-7, 8, 9の計算式に従って計算し、計算結果は有効数字2ケタに丸めて表示した。

なお、12.7.5(4)で求めた供試魚中の被験物質定量下限濃度より、下記の倍率を越えて濃縮されたとき濃縮倍率の算出が可能となる。

第1濃度区 0.4倍

第2濃度区 3.8倍

12.9 数値の取扱い

数値の丸め方は、JIS Z 8202-1985 参考3規則Bの方法に従った。

13. 試験結果

13.1 試験水中の被験物質濃度

試験水中の被験物質濃度をTable-1に示す。

試験水中の平均被験物質濃度はTable-1に示されるように、設定値の90%以上が保持された。

Table-1 試験水中の被験物質濃度（ばく露開始時からの測定値の平均値）
（単位 $\mu\text{g/L}$ ）

濃度区	2 週	3 週	4 週	6 週	Table	Fig.
1	91.5	93.2	94.1	95.0	4	6
2	9.26	9.46	9.60	9.64	5	

13.2 濃縮倍率

濃縮倍率をTable-2に示す。

Table-2の濃縮倍率とばく露期間との相関をFig. 1及びFig. 2に示した。また、被験物質のコイに対する濃縮性の程度は、濃縮倍率で第1濃度区において46～74倍、第2濃度区において24～73倍であった。

Table-2 濃 縮 倍 率

濃度区	2 週	3 週	4 週	6 週	Table	Fig.
1	58	54	55	50	7	8
	46	49	74	72		
2	45	69	48	54	8	9
	35	73	24	52		

13.3 供試魚の外観観察等

異状は認められなかった。

14. 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。

15. 試資料の保管

15.1 被験物質

同一ロットの被験物質が分解度試験終了後にすでに保管されているため、本試験終了後には保管しない。

15.2 生データ、資料等

試験により得られた分析結果、測定結果、観察結果、その他試験ノート等最終報告書の作成に用いた生データ、試験計画書、指示書、資料等は最終報告書と共に、試験委託者から通知を受けるまでの期間、当研究所資料保管室に保管する。

16. 備 考

16.1 試験に使用した主要な装置・機器、試薬等

(1) 試験系（飼育施設）に係わる装置

原液供給用微量定量ポンプ	:	東京理化器械製	型 GMW
溶存酸素測定装置	:	飯島電子工業製	型 F-102

(2) 分析及び原液調製に使用した装置・機器、試薬

装置・機器

ガスクロマトグラファー質量分析計	:	13頁参照	
電子分析天びん	:	島津製作所製	型 AEX-200B
		ザルトリウス社製	型 1702MP8
電子上皿天びん	:	ザルトリウス社製	型 1404MP8
振とう機	:	タイテック製	型 SR-2W
ホモジナイザー（ポリトロン）	:	キネマチカ社製	型 PT3100
遠心分離機	:	久保田製作所製	型 6900

試薬

アセトニトリル	:	和光純薬工業製	HPLC用
精製水	:	高杉製薬製	日本薬局方
酢酸エチル	:	関東化学製	試薬一級
塩化ナトリウム	:	マナック製	試薬一級
HCO-40	:	日光ケミカルズ製	

(3) 被験物質の構造確認に使用した装置・機器

フーリエ変換赤外分光光度計	:	島津製作所製	型 FTIR-8200PC
ガスクロマトグラファー質量分析計	:	日本電子製	型 JMS-DX303
超電導フーリエ変換核磁気共鳴装置	:	日立製作所製	型 R-3000