

環境庁殿

試 験 報 告 書

フタル酸ジ-n-ブチルのヒメダカ (*Oryzias latipes*) に対する急性毒性試験

(試験番号: PRO/N04/0100)

平成 8年 7月31日作成

株式会社東レリサーチセンター

陳 述 書

株式会社東レリサーチセンター
名古屋研究部

試験委託者： 環境庁

表題： フタル酸ジ-n-ブチルのヒメダカ (*Oryzias latipes*) に対する急性毒性試験

試験番号： PRO/N04/0100

上記試験は環境庁のGLP規則に従って実施したものである。

平成 8 年 7 月 31 日

運営管理者

[Redacted Signature]

信頼性保証証明

株式会社東レリサーチセンター
名古屋研究部

試験委託者： 環境庁

表題： フタル酸ジ-n-ブチルのヒメダカ (*Oryzias latipes*) に対する急性毒性試験

試験番号： PRO/N04/0100

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	平成 7 年 12 月 18 日 および 8 年 2 月 5 日	平成 8 年 1 月 17 日 および 8 年 2 月 16 日
試験報告書監査	平成 8 年 4 月 15 日 16	平成 8 年 4 月 16 日
	平成 8 年 7 月 31 日	

信頼性保証担当者：

試験実施概要

1. 表題： フタル酸ジ-n-ブチルのヒメダカ (*Oryzias latipes*) に対する急性毒性試験
2. 試験目的： フタル酸ジ-n-ブチルについて、ヒメダカ (*Oryzias latipes*) に対する急性毒性試験を行い、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
委託責任者： 企画調整局環境保健部環境安全課 保健専門官 XXXXXXXXXX
6. 試験受託者：
名称： 株式会社東レリサーチセンター
所在地： (〒103) 東京都千代田区日本橋室町3-1-8 都ビル内
7. 試験施設：
名称： 株式会社東レリサーチセンター 名古屋研究部
所在地： (〒455) 愛知県名古屋市港区大江町9-1

8. 試験関係者：

試験責任者	[redacted]	(平成 8 年 7 月 3 / 日)
試験担当者	[redacted]	(平成 8 年 7 月 3 / 日)
試験担当者	[redacted]	(平成 8 年 7 月 3 / 日)
試験担当者	[redacted]	(平成 8 年 7 月 3 / 日)
試験担当者	[redacted]	(平成 8 年 7 月 3 / 日)
試験担当者	[redacted]	(平成 8 年 7 月 3 / 日)

9. 試験期間： 試験開始日 平成 7 年 12 月 1 日
試験終了日 平成 8 年 7 月 31 日
曝露期間 平成 8 年 1 月 3 日 ~ 平成 8 年 1 月 7 日

10. 保管：

試験計画書、生データ、記録文書および試験報告書は、試験報告書作成後 10 年間、名古屋研究部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 保管方法および保管条件下の安定性の確認	8
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 試験水中の被験物質濃度	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 試験水の水温、溶存酸素濃度およびpH	14
Table 1～8	15～22
Figure 1	23
付属資料－1 希釈水の水質	
付属資料－2 試験液の分析方法	

要 旨

試験委託者

環境庁

表 題

フタル酸ジ-n-ブチルのヒメダカ (*Oryzias latipes*) に対する急性毒性試験

試験番号

PRO/N04/0100

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。

被験物質： フタル酸ジ-n-ブチル

方式： 流水式(定量ポンプを用いる連続希釈装置を使用) 換水率 10 回/日

供試生物： ヒメダカ (*Oryzias latipes*)

試験濃度(設定値)： 対照区、 助剤対照区 (71.6mg/L)、 1.01 mg/L、 1.58 mg/L、
2.74 mg/L、 4.49 mg/L、 および 7.16 mg/L

曝露期間： 96時間

試験液量： 3.0L

生物数： 10尾/濃度区

照明： 16時間明/8時間暗

イレージョン： なし

温度： 24±1℃

結 果

試験の結果、フタル酸ジ-n-ブチルの測定濃度に基づく96時間の半数致死濃度(LC50)は 2.75mg/Lであり、その95%信頼区間は 2.13mg/L~3.55mg/Lであった。

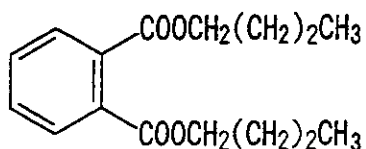
1 被験物質

1.1 名称、構造式および物理化学的性状

名 称 : フタル酸ジ-n-ブチル

識別符号 : NB

構造式 :



分子式 : $C_{16}H_{22}O_4$

分子量 : 278.35

1-オクタノール/水分配係数 (log P) : 4.900

水溶性 : 100~400 ppm (20~25℃)

蒸気圧 : 0.100~1.100 mmHg (89.0~150.0℃)

融点 : -35℃

沸点 : 340℃

代謝性 : フタル酸ジエチルヘキシルと異なり、速やかにフタル酸モノブチルになる。

(上記の数値は、MSDSのフタル酸ジブチルの値を引用した)

1.2 供試試料

購入先 : XXXXXXXXXX

入手先 : XXXXXXXXXX

入手日 : 平成7年11月16日

ロット番号 : FGA01

供給量 : 25 g入り2本

外観 : 無色透明 液体

純度及び不純物 : 98.0%以上

1.3 保管方法及び保管条件下の安定性の確認

1) 保管方法

被験物質は試料保管庫に室温で光を遮断して保管した。

2) 被験物質の確認及び保管条件下の安定性

入手した被験物質について赤外吸収スペクトルおよびNMR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結果、スペクトルに変化は無かった。

従って、被験物質は当研究部の試料保管庫に保管中は安定であったと判断した。

2 供試生物

試験に使用したヒメダカ (*Oryzias latipes*) を下記に示した。供試魚の体長 (被鱗体長) は 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: 2.2 cm (2.1~2.3cm), n=10
- 4) 体重: 0.15 g (0.11~0.20g), n=10
- 5) ロット番号: 951019
- 6) 購入先: 三輪養魚場
- 7) 購入日: 平成7年10月19日

馴化

試験条件と同じ水を供給して試験施設内の飼育装置により試験条件 (水質、温度等) で76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2.6%であった。また、供試魚の基準物質 (硫酸銅 (II) 五水和物、試薬特級) による急性毒性試験の結果、96時間LC50は0.60mg/Lであった。

3 試験方法

3.1 試験条件

- 1) 方式: 流水式 (定量ポンプを用いる連続希釈装置を使用) 換水率 10 回/日
- 2) 温度: $24 \pm 1^\circ\text{C}$
- 3) 曝露期間: 96時間
- 4) 生物数: 10尾/濃度区
- 5) 試験液量: 3.0L
- 6) 連数: 1濃度区につき1連
- 7) 給餌: 無給餌
- 8) エアレーション: 無し
- 9) 照明: 16時間明/8時間暗

3.2 希釈水

愛知用水（河川水を簡単に処理して工業、農業用水として供給されている）を工場内で沈殿・ろ過処理した水をさらに、実験室でトレビーノ（東レ(株)製 浄水器：中空糸膜および活性炭）を通して用いた。

希釈水の主な水質として、硬度が19.7mg/L (CaCO₃換算)、pHが7.0であった。

[付属資料-1]

3.3 試験容器および恒温槽等

流水式試験装置：定量ポンプを用いる連続希釈装置

試験容器： 3L容ガラスビーカー

恒温槽： 水槽、恒温水循環装置 クールライン（ヤマト科学 CL100型）

水温計： 熱電対温度計 データロガー（ティアンドディ TR-71型）

およびpHメーター内蔵温度計

pH計： pHメーター（堀場製作所 カスタニーLAB pHメーターF-22）

溶存酸素計： DO METER （堀場製作所 OM-14）

3.4 試験濃度の設定

予備試験の結果、48時間-半数致死濃度(LC50)は 2.07 mg/L、0%死亡最高濃度 0.93 mg/L 以下および100%死亡最低濃度 5.18 mg/L であった。

この結果を参考にして、本試験では 1.01 mg/L、1.58 mg/L、2.74 mg/L、4.49 mg/L、7.16 mg/L の5濃度区を設定した。

3.5 試験液の調製

フタル酸ジ-n-ブチル 1.00gを秤量し、10倍量の硬化ヒマシ油 HCO-50と蒸留水約 500 mLを加えて60～70℃に温め、ホモジナイザーで微分散させた。1L メスフラスコで定容し、フタル酸ジ-n-ブチル 0.1wt%原液を調製した。

原液 54～365mL を分取し、それぞれ1L メスフラスコで定容して試験液連続希釈装置の供給液とした。

3.6 試験液の分析

試験開始時および24時間毎に各試験水槽より試験水1.0mLを採取し、HPLCにより分析した。試験水の分析に際しては、試料測定毎に標準溶液（濃度1.0, 5.0 mg/L）の測定を行い、検量線から求めた測定値の正確度を確認した。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。暴露期間中給餌は行わなかった。

各試験水槽の試験液のpH、溶存酸素濃度、水温を測定後、試験水槽中に供試魚を1濃度区当り10尾投入した。pH、溶存酸素濃度、水温は暴露期間中毎日1回測定した。

暴露開始後、24、48、72及び96時間後に死亡個体* 数を記録するとともに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。

*：ガラス棒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

各濃度区での死亡数と供試個体数（10尾）から死亡率（％）を算出し、Probit 法により半数致死濃度（LC50）を算出した。また、その95％信頼限界も算出した。

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

フタル酸ジ-n-ブチル はヒメダカを入れた水中で分解され、1.31mg/L が24時間後に 0.66mg/L になる（予備試験結果）ことが判明した。設定濃度を維持するために流水式で 10回/日の換水を行ったが、それでも暴露試験液中のフタル酸ジ-n-ブチル は設定濃度の 80%を下回った。

従って、半数致死濃度（LC50）等の計算には24時間毎に測定したフタル酸ジ-n-ブチル 濃度の算術平均値を用いた。

5.2 試験水中の被験物質濃度

試験開始時および24時間毎に供給液および試験水中の被験物質濃度を測定した。試験開始時から96時間後の暴露試験液中の被験物質濃度は 0.48～6.37mg/L であった。設定濃度に対する暴露濃度の割合は 47.5～89.0%であった。

[Table 1(p.15), 付属資料-2]

5.3 半数致死濃度（LC50）

フタル酸ジ-n-ブチルに96時間暴露したヒメダカの死亡率は1.92 mg/L（測定濃度）以下の濃度区で 0～10%、3.94 mg/L（測定濃度）以上の濃度区で 90～100%であった。対照区の死亡率は 0%であった。フタル酸ジ-n-ブチルの測定濃度に基づく96時間の半数致死濃度（LC50）は 2.75 mg/Lであり、その95%信頼区間は 2.13mg/L～3.55mg/L であった。

（有意水準 5%、統計的手法：吉岡義正教授 Probit法）

[Table 2(p.16), Figure 1(p.23)]

[Table 3(p.17)]

5.4 0%死亡最高濃度および100%死亡最低濃度

フタル酸ジ-n-ブチルに96時間暴露したヒメダカの 0%死亡最高濃度は 1.03mg/L（測定濃度）であり、100%死亡最低濃度は 6.20mg/L（測定濃度）であった。

[Table 4(p.18), Figure 1(p.23)]

5.5 毒性症状

毒性症状として 3.94mg/L（測定濃度）の濃度区において平衡感覚喪失、遊泳異常、呼吸機能の異常が観察された。対照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.19)]

5.6 試験水の水温、溶存酸素濃度およびpH

試験期間中のpHは7.2～7.8であった。試験期間中の溶存酸素濃度は8.1～10.7 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。10℃以下の水を恒温水槽により24±1℃に昇温して用いたため、溶存酸素濃度が過飽和状態になったと思われる。

(24.0℃の飽和溶存酸素濃度：8.25mg/L)

96時間の試験期間中の水温は23.5～24.5℃であった。

[Table 6(p.20)]

[Table 7(p.21)]

[Table 8(p.22)]

Table 1. Measured Concentrations of Di-n-butyl Phthalate During a 96-Hour Exposure of Orange killifish (Oryzias latipes) under Flow-through Test Conditions

Nominal Concentration (mg/L)	Measured Concentration (mg/L)						Percent of Nominal
	0 Hour	24 Hour	48 Hour	72 Hour	96 Hour	Mean	
Control	< 0.05	----	----	----	< 0.05	----	----
Dispersant Control	< 0.05	----	----	----	< 0.05	----	----
1.01	0.86	0.69	0.48	0.53	0.53	0.62	61.4
1.58	1.29	1.06	0.96	0.95	0.89	1.03	65.2
2.74	2.43	2.11	1.65	1.72	1.71	1.92	70.1
4.49	4.01	3.75	3.99	3.97	3.98	3.94	87.8
7.16	6.37	6.03	-----a	-----a	-----a	6.20	86.6

^a No measurement was made because all Orange killifish were dead at this observation time.

Table 2. Mortality of Orange killifish (*Oryzias latipes*) Exposed to Di-n-butyl Phthalate under Flow-through Test Conditions

Nominal Concentration (mg/L)	Cumulative Number of Dead (Percent Mortality)			
	24 Hour	48 Hour	72 Hour	96 Hour
Control	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Dispersant Control	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
1.01	1 (10)	1 (10)	1 (10)	1 (10)
1.58	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
2.74	1 (10)	1 (10)	1 (10)	1 (10)
4.49	4 (40)	9 (90)	9 (90)	9 (90)
7.16	10 (100)	10 (100)	10 (100)	10 (100)

Table 3. Calculated LC50 Values for Orange killifish (Oryzias latipes) Exposed to Di-n-butyl Phthalate Based on Measured Concentrations under Flow-through Test Conditions

Exposure Period (Hour)	LC50 (mg/L)	95-Percent Confidence Limits (mg/L)	Statistical Method
24	3.41	2.44 ~ 5.20	Probit
48	2.75	2.13 ~ 3.55	Probit
72	2.75	2.13 ~ 3.55	Probit
96	2.75	2.13 ~ 3.55	Probit

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

Exposure Period (Hour)	Highest Concentration in 0% Mortality (mg/L)	Lowest Concentration in 100% Mortality (mg/L)
24	1.03	6.20
48	1.03	6.20
72	1.03	6.20
96	1.03	6.20

Table 5. Symptoms of Toxicity Observed in Orange killifish (Oryzias latipes)
Exposed to Di-n-butyl Phthalate under Flow-through Test Conditions

Nominal Concentration (mg/L)	Symptoms			
	24 Hour	48 Hour	72 Hour	96 Hour
Control	0	0	0	0
Dispersant Control	0	0	0	0
1.01	0	0	0	0
1.58	0	0	0	0
2.74	0	0	0	0
4.49	2	0	0	0
7.16	0	0	0	0

Table 6. pH Values During a 96-Hour Flow-through Exposure of Orange killifish (*Oryzias latipes*) to Di-n-butyl Phthalate

Nominal Concentration (mg/L)	pH				
	0 Hour	24 Hour	48 Hour	72 Hour	96 Hour
Control	7.6	7.6	7.8	7.7	7.4
Dispersant Control	7.5	7.5	7.7	7.6	7.4
1.01	7.5	7.3	7.5	7.4	7.2
1.58	7.3	7.3	7.4	7.5	7.2
2.74	7.3	7.2	7.4	7.5	7.2
4.49	7.2	7.2	7.4	7.5	7.2
7.16	7.2	7.4	----a	----a	----a

^a No measurement was made because all Orange killifish were dead at this observation time.

Table 7. Dissolved Oxygen Concentrations During a 96-Hour Flow-through Exposure of Orange killifish (Oryzias latipes) to Di-n-butyl Phthalate

Nominal Concentration (mg/L)	Dissolved Oxygen Concentration (mg/L)				
	0 Hour	24 Hour	48 Hour	72 Hour	96 Hour
Control	9.2	9.8	9.6	10.7	9.2
Dispersant Control	8.8	9.2	8.6	9.8	8.6
1.01	8.9	9.1	8.7	9.9	8.7
1.58	8.8	9.4	8.6	9.7	8.1
2.74	8.8	8.9	8.4	9.6	8.4
4.49	8.8	9.2	10.6	10.2	8.7
7.16	8.9	8.9	----a	----a	----a

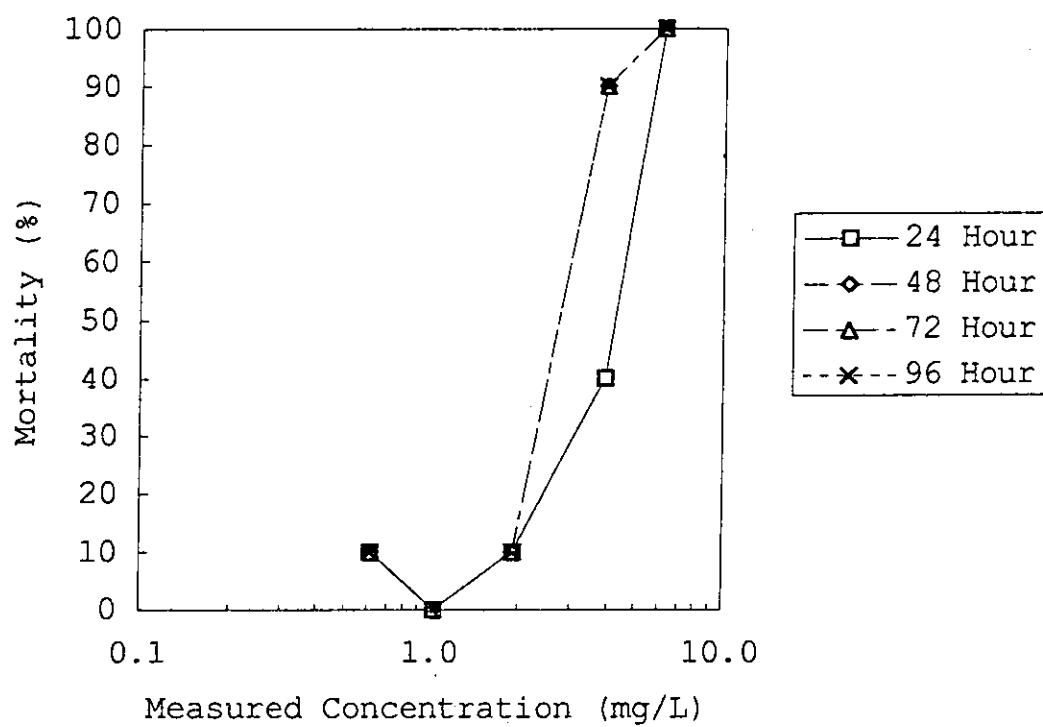
^a No measurement was made because all Orange killifish were dead at this observation time.

Table 8. Temperature Values During a 96-Hour Flow-through Exposure of Orange killifish (Oryzias latipes) to Di-n-butyl Phthalate

Nominal Concentration (mg/L)	Temperature (°C)				
	0 Hour	24 Hour	48 Hour	72 Hour	96 Hour
Control	23.7	24.5	24.2	23.5	23.5
Dispersant Control	23.8	24.2	24.0	23.8	23.8
1.01	23.6	23.9	23.7	23.5	23.6
1.58	23.7	24.0	23.9	23.8	23.9
2.74	23.7	24.1	23.8	23.8	23.9
4.49	23.7	24.0	24.0	23.9	23.9
7.16	23.9	----a	----a	----a	----a

^a No measurement was made because all Orange killifish were dead at this observation time.

Figure 1 Concentration-Response Curve of Di-n-butyl Phthalate
Mortality in Orange killifish



付属資料－ 1

希釈水の水質

(全 1 頁)

Water Quality of Dilution Water

Parameter	Concentration
BOD	0.8 mg/L
COD	0.6 mg/L
Mercury	<0.003 mg/L
Copper	<0.005 mg/L
Cadmium	<0.02 mg/L
Zinc	<0.03 mg/L
Lead	<0.2 mg/L
Chromium	<0.05 mg/L
Iron	<0.005 mg/L
Free chlorine	<0.05 mg/L
Fluoride	<0.05 mg/L
Ammonium ion	<0.1 mg/L
Arsenic	<0.001 mg/L
Evaporation residue	48.0 mg/L
Electric conductivity	8.9 mS/m
Total hardness (as CaCO ₃)	19.7 mg/L
Alkalinity	14.9 mg/L
Total organophosphorus compounds	<0.1 mg/L
Herbicide Simazin	<0.0003 mg/L
Herbicide Thiobencarb	<0.002 mg/L
Fungicide Thiuram	<0.0006 mg/L

付属資料－ 2

試験液の分析方法

(全 7 頁)

試験液の分析方法

1 試験液の分析方法

各試験水槽より試験水 0.5～1.5mL をバイアルに採取した。

測定濃度が 20mg/L を越える場合は予め移動相で希釈した。

HPLCのオートサンプラーにセットして一定量を自動注入した。

検量線から被験物質濃度を求めた。

2 高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 測定条件

カラム : C18 5 μ m, 4.6mm ϕ ×150mm

カラム温度 : 40℃

移動相 : 水/アセトニトリル=13/87

流量 : 1.0mL/min

注入量 : 20～100 μ L

3 検量線

標準原液を希釈して定量限界付近から予想測定濃度が含まれる5ポイント以上の標準液を用意し、検量線を求め、傾きと直線性を確認した。

測定日毎に標準溶液(2ポイント以上)の測定を行い、相対誤差10%以内であればこの検量線により定量する。相対誤差10%を越えた場合は検量線を作成し直す。

[Figure 1(p.28)]

4 添加回収試験

助剤対照液に標準原液もしくはこれを希釈して調製した標準液の一定量を添加して回収率を求めた。

フタル酸ジ-n-ブチル 1.05mg/Lの回収率は 102.3%、10.76mg/Lの回収率は 99.4%であった。

Figure 1. Calibration Curve of Di-n-butyl Phthalate by HPLC Analysis

Input Data

No	Concentration (mg/L)	Peak Area (mAU·sec)
1	0	0
2	0.2	0.85613
3	1.0	4.14233
4	2.0	8.21019
5	5.0	20.33646
6	10.0	40.66641

$$Y(\text{Peak Area}) = 4.06860 X(\text{Concentration})$$

$$\gamma = 1.000$$

γ : coefficient of correlation

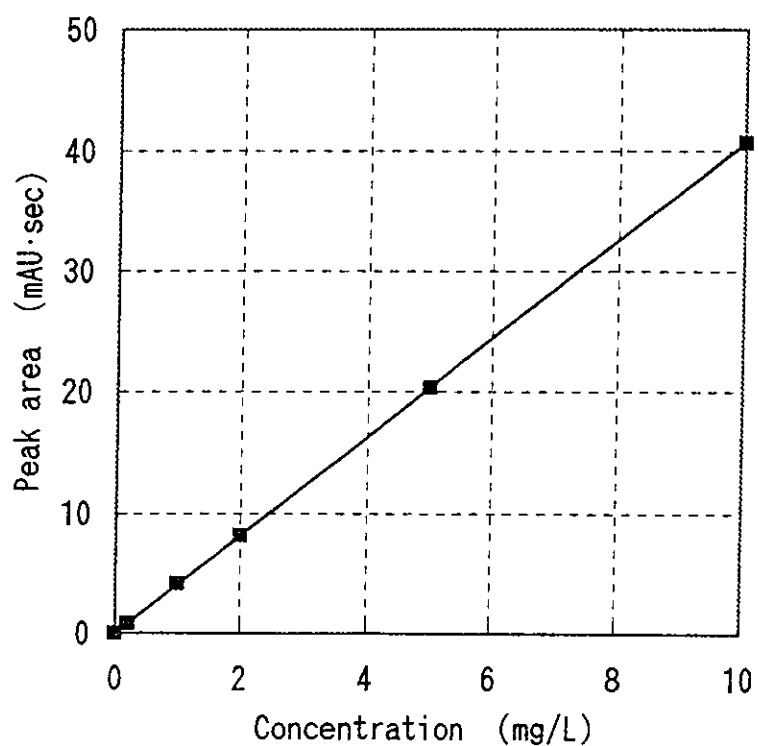


Figure 2. Representative chromatograms

(1) Standard 1.06mg/L

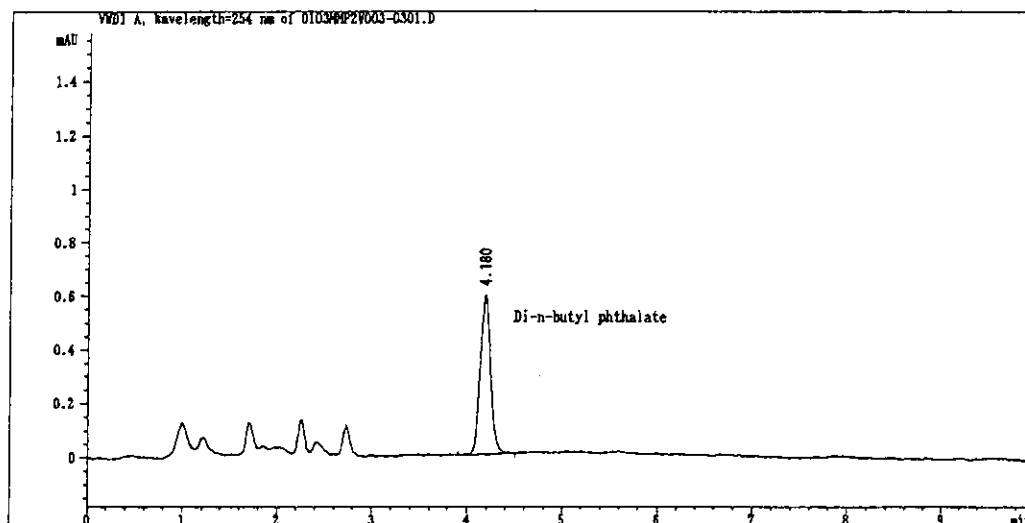
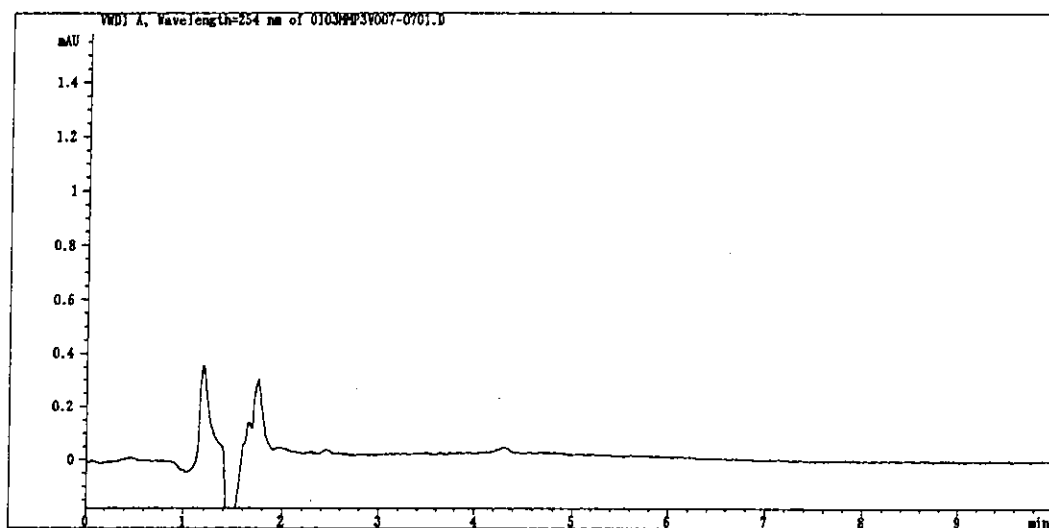


Figure 2. Continued

(2) Control ; Day 0



(3) Dispersant Control ; Day 0

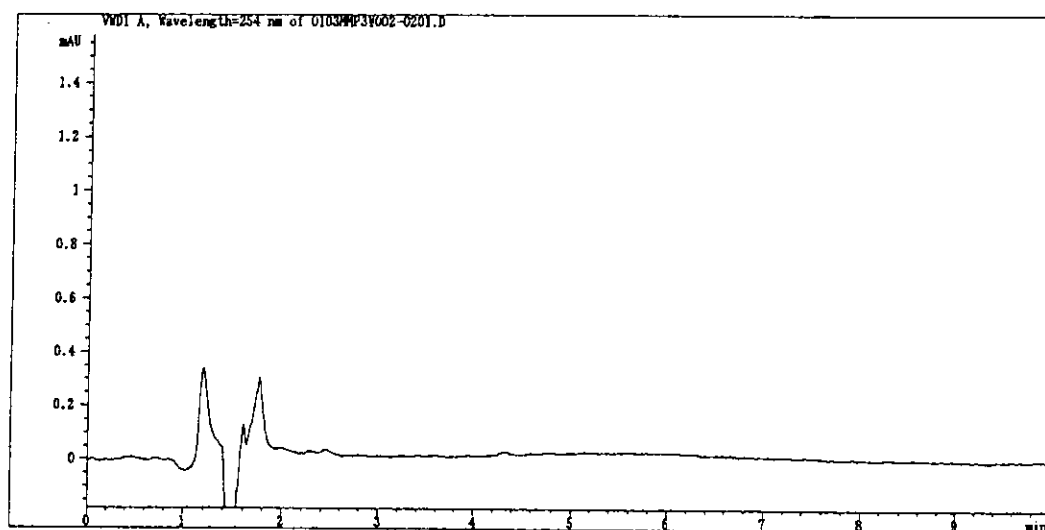
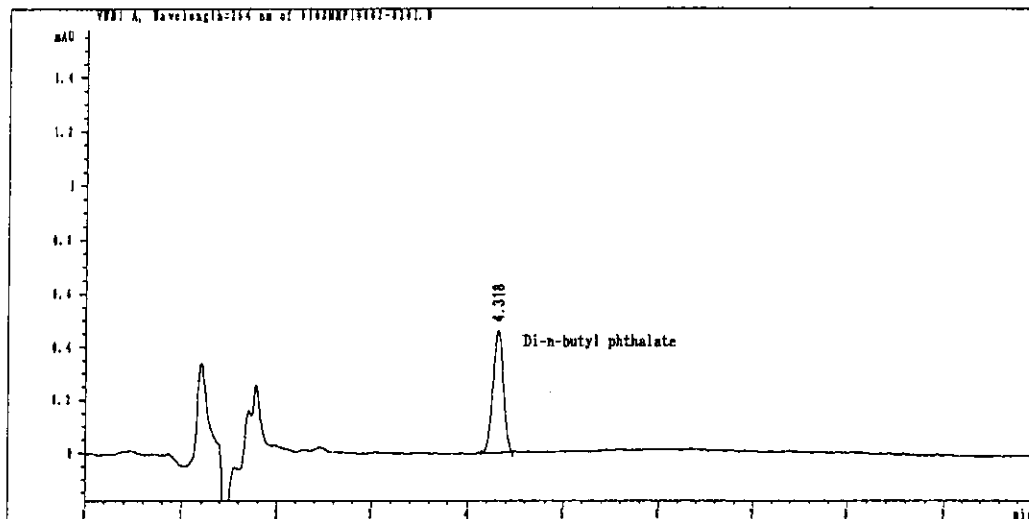


Figure 2. Continued

(4) 1.01 mg/L nominal; Day 0



(5) 1.01 mg/L nominal; Day 21

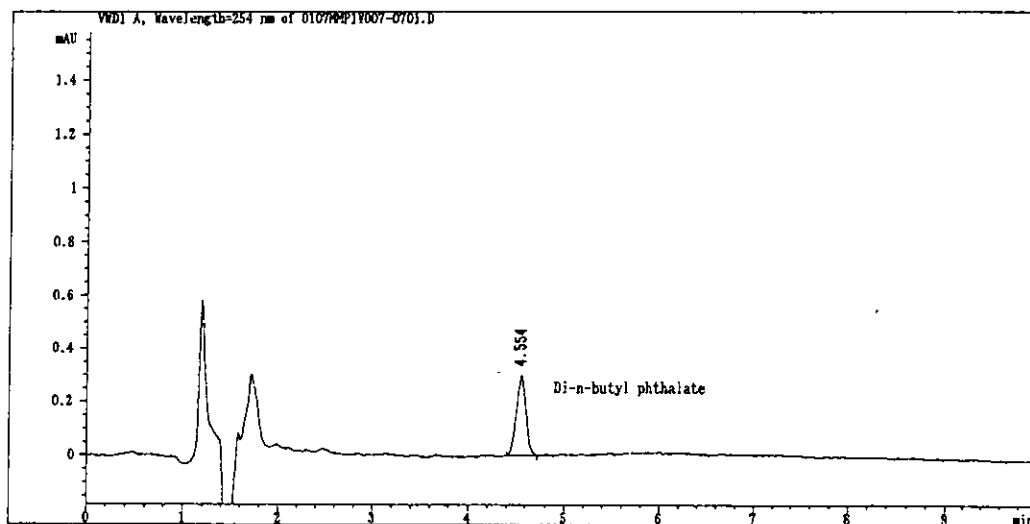
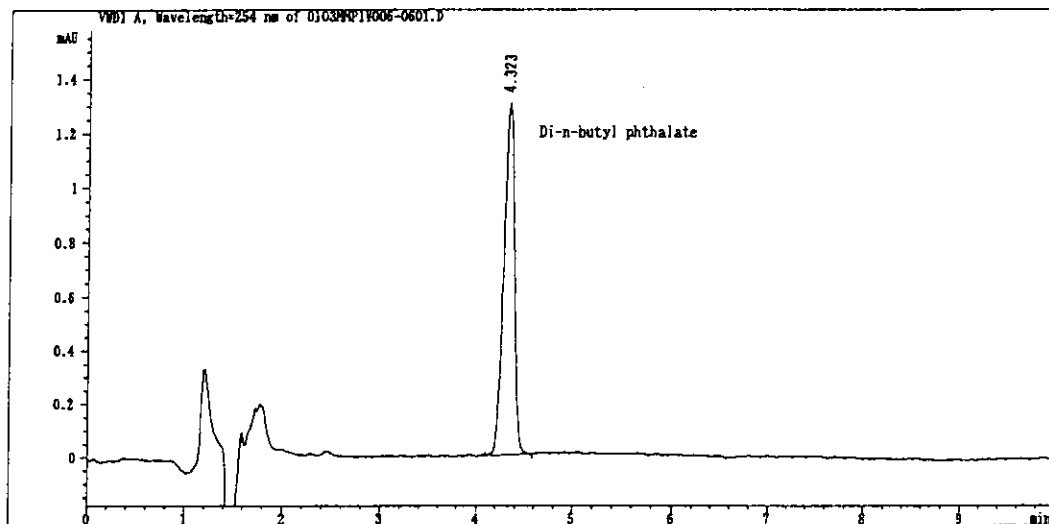


Figure 2. Continued

(6) 2.74 mg/L nominal; Day 0



(7) 2.74 mg/L nominal; Day 21

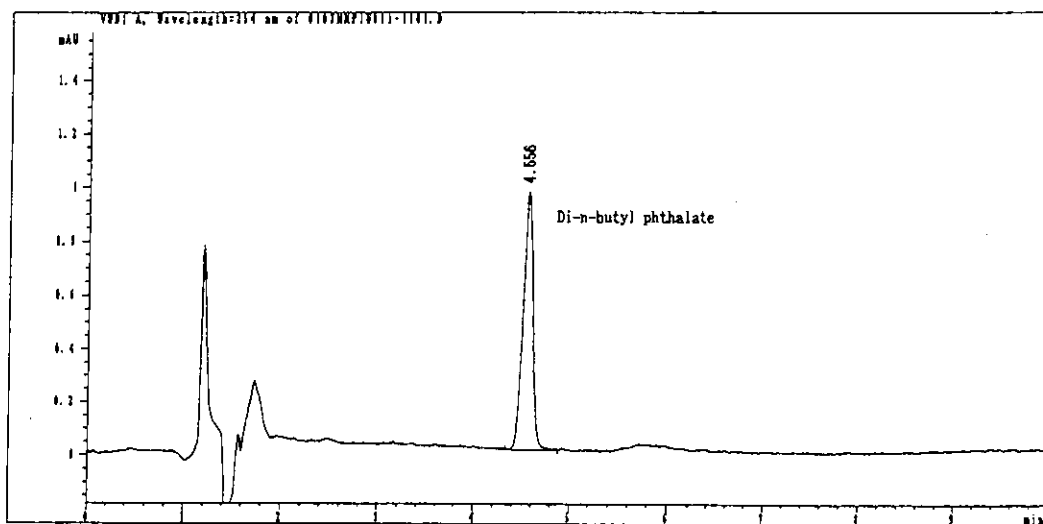


Figure 2. Continued

(8) 7.16 mg/L nominal; Day 0

