

最終報告書

2, 3-ジクロロニトロベンゼン (被験物質番号 K-1072) の
コイにおける濃縮度試験

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 通商産業省

試験の表題 2, 3-ジクロロニトロベンゼン (被験物質番号 K-1072) の
コイにおける濃縮度試験

試験番号 51072

● 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5年1月6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 通商産業省

試験の表題 2, 3-ジクロロニトロベンゼン (被験物質番号 K-1072)
のコイにおける濃縮度試験

試験番号 51072

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。

監査又は査察日	報告日 (運営管理者)	報告日 (試験責任者)
平成 4年10月28日	平成 4年10月28日	平成 4年10月28日
平成 4年11月10日	平成 4年11月11日	平成 4年11月11日
平成 4年11月10日	平成 4年11月12日	平成 4年11月12日
平成 4年11月11日	平成 4年11月12日	平成 4年11月12日
平成 4年11月26日	平成 4年11月27日	平成 4年11月27日
平成 5年 1月 6日	平成 5年 1月 6日	平成 5年 1月 6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 5年 1月 6日
信頼性保証業務担当者

平成 5年 1月 6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. 優良試験所基準への適合	2
7. 試験期間	3
8. 試験関係者	3
9. 最終報告書作成日	3
10. 最終報告書の承認	3
11. 被験物質	4
12. 急性毒性試験	5
13. 濃縮度試験の実施	8
14. 試験結果	17
15. 試資料の保管	18
16. 備 考	18
17. 表 の 内 容	20
18. 図 の 内 容	21
付表及び付図	

要 約

1. 試験の表題

2, 3-ジクロロニトロベンゼン (被験物質番号 K-1072) 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 0.1 mg/l
第2濃度区 0.01 mg/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 | 高速液体クロマトグラフィー |

3. 試験結果

- | | |
|---------------|------------------------------|
| (1) 48時間LC50値 | 11.3 mg/l |
| (2) 濃縮倍率 | 第1濃度区 43~75倍
第2濃度区 45~83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 51072

1. 表 題 2, 3-ジクロロニトロベンゼン (被験物質番号 K-1072) 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) 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) 福岡県久留米市中央町19-14
TEL (0942) 34-1500
運営管理者 [REDACTED]
4. 試験目的 被験物質K-1072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'305C. Bioaccumulation : Degree of Bioconcentration in Fish'による。
6. 優良試験所基準への適合 「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)に適合して行った。

7. 試験期間

- (1) 試験開始日 平成 4年10月28日
- (2) ばく露開始日 平成 4年10月29日
- (3) ばく露終了日 平成 4年12月10日
- (4) 試験終了日 平成 4年12月24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

試験資料管理部門責任者

9. 最終報告書作成日

平成 4年12月24日

作成者

10. 最終報告書の承認

平成 4年12月24日

試験責任者

氏名

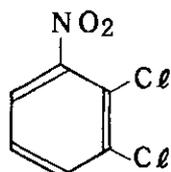
11. 被験物質

本報告書において被験物質K-1072は、次の名称及び構造式等を有するものとする。

11.1 名 称 2, 3-ジクロロニトロベンゼン

11.2 構造式等

構造式



分子式 $C_6 H_3 Cl_2 NO_2$

分子量 192.00

11.3 純 度^{*1} 99%以上

*1 [REDACTED] 添付資料による。

11.4 入手先、商品名、等級及びロット番号

(1) 入 手 先 [REDACTED]

(2) 商 品 名 [REDACTED]

(3) 等 級 [REDACTED]

(4) ロット番号 FBU01

11.5 被験物質の確認

[REDACTED]に記載の赤外吸収スペクトルと当研究所の当該測定スペクトルとが一致することを確認した(図-15参照)。また、質量スペクトル(図-16参照)及び核磁気共鳴スペクトル(図-17参照)についても測定を行い、構造を確認した。

11.6 保管条件及び保管条件下での安定性

- (1) 保管条件 冷暗所
- (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（図-15参照）、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。

11.7 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。

12. 急性毒性試験

12.1 試験方法

「工場排水試験方法」魚類による急性毒試験（JIS K 0102-1986 の 71.）の方法に準じて行った。

12.2 供試魚

- (1) 魚種 ヒメダカ Oryzias latipes
- (2) 供給源 中島養魚場
(住所 〒 869-01 熊本県玉名郡長洲町大明神)
- (3) 蕃養条件
期間等 魚の入手時に目視観察をして異状のあるものを除去し、蕃養槽で薬浴後、流水状態で3日間飼育した。
薬浴 20mg/lエルバージュ（上野製薬製）溶液及び7g/l塩化ナトリウム溶液を用いて止水状態で24時間薬浴を行った。
- (4) じゅん化条件 じゅん化槽でじゅん化し、その間異状のあるものは除去し、最終的には25±2℃の水温の流水状態で20日間飼育した。
- (5) 体重 平均 0.32g
- (6) 全長 平均 3.3 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-921016）のものを試験に供した。

*2 用水と廃水 14.1297-1303 (1972)

12.3 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) 分析及び水質確認

当研究所にて水温、pH及び溶存酸素は連続測定を行った。また、全硬度、蒸発残留物、化学的酸素要求量、遊離塩素及びアンモニア態窒素並びに有機リン、シアンイオン、重金属等の有害物質は6ヶ月に1回定期的に分析した。試験用水を試験に供する場合、分析した項目が全硬度、蒸発残留物については「水道法に基づく水質基準」（昭和53年 8月31日 厚生省令第56号）、その他のものについては「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）に記載されている濃度以下であることを確認した（参考資料1参照）。

12.4 試験条件

- | | |
|------------|--|
| (1) 試験水槽 | 円型ガラス製水槽 |
| (2) 試験液量 | 4ℓ / 濃度区 |
| (3) 試験水温 | 25 ± 2℃ |
| (4) 溶存酸素濃度 | ばく露開始時 7.8 ~ 7.9 mg/ℓ
ばく露終了時 6.6 ~ 7.1 mg/ℓ |
| (5) pH | ばく露開始時 8.0 ~ 8.1
ばく露終了時 7.8 ~ 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） |

12.5 原液調製法

(1) 分散剤

HCO-40

(2) 調製方法

被験物質と20倍量のHCO-40を良く練り合わせ、イオン交換水に溶解し、1000mg/lの原液を調製した。

12.6 試験の実施

(1) 実施場所 115LC50室

(2) 試験実施日 平成4年11月9日～平成4年11月11日

12.7 48時間LC50値の算出

Doudoroff法で行った。

12.8 試験結果

48時間LC50値 11.3mg/l (図-3参照)

13. 濃縮度試験の実施

13.1 供試魚

- | | |
|---------------------------------|---|
| (1) 魚 種 | コイ <u>Cyprinus carpio</u> |
| (2) 供給源 | 杉島養魚場
(住所 〒 866 熊本県八代市郡築一番町 123-2)
供試魚受入日 平成 4年 9月 8日 |
| (3) 蓄養条件
期間等 | 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1日間飼育した。 |
| 薬浴 | 50 mg/l水産用テラマイシン散 (台糖ファイザー製)
溶液及び7 g/l塩化ナトリウム溶液を用いて止水状態で
24時間薬浴を行った。 |
| (4) じゅん化条件 | じゅん化槽でじゅん化し、その間異状のあるものは除去
し、最終的には25±2℃の水温の流水状態で25日間
飼育した。さらに試験水槽へ移し、同温度の流水状態で
19日間飼育した。
じゅん化終了日 平成 4年10月 9日 |
| (5) ばく露開始時の体重、体長等 ^{*3} | |
| 体 重 | 平均 22.0 g |
| 体 長 | 平均 9.3 cm |
| 脂質含有率 | 平均 3.9% |

*3 ロット (TFC-920908) の測定値

- | | |
|---------|--|
| (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。 |

13.2 試験用水

12.3に同じ。

13.3 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容ガラス製水槽 |
| (3) 試験水量 | 原液2ml/分及び試験用水800ml/分の割合で
1155ℓ/日を試験水槽に供した。 |
| (4) 試験温度 | 25±2℃ |
| (5) 溶存酸素濃度 | 第1濃度区 5.5~7.5mg/l (図-11参照)
第2濃度区 5.2~7.7mg/l (図-12参照)
対照区 6.9~7.9mg/l (図-13参照) |
| (6) 供試魚数 | 第1及び第2濃度区 15尾(ばく露開始時)
対照区 5尾(ばく露開始時) |
| (7) ばく露期間 | 6週間 |
| (8) 実施場所 | 213アクアトロン室 |

13.4 原液調製法

(1) 分散剤

12.5の(1)に同じ。

(2) 調製方法

・第1濃度区

被験物質1gをHCO-40 20gと練り合わせ、イオン交換水に溶解し、ガラス製原液タンクにて25ℓに定容して40mg/lとした。

・第2濃度区

被験物質0.1gをHCO-40 2gと練り合わせ、イオン交換水に溶解し、ガラス製原液タンクにて25ℓに定容して4mg/lとした。

・対照区

HCO-40 20gをイオン交換水に溶解し、ガラス製原液タンクにて25ℓに定容した。

以上を試験水槽に供給した。

13.5 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 0.1 mg/l

第2濃度区 0.01 mg/l

に設定した。同時に、空試験として対照区を設定した。

13.6 試験水及び供試魚分析

13.6.1 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。

13.6.2 分析試料の前処理

(1) 試験水

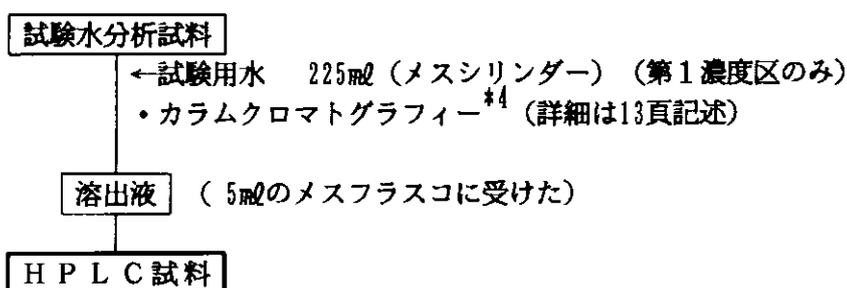
試験水槽から

第1濃度区 25ml

第2濃度区 250ml

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、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 試料とした。

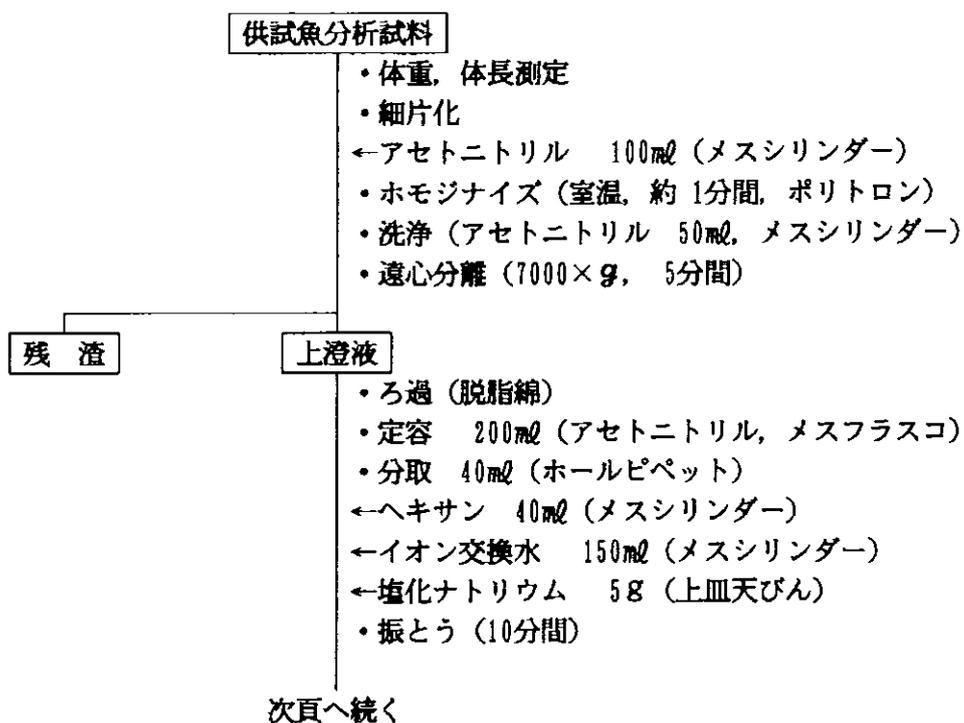
フロースキーム



(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、HPLC試料とした。

フロースキーム



*4 カラムクロマトグラフの条件

セップパック C_{18} × 4個
(精製水約20mlで洗浄)

負荷法 試料液全量を負荷した後、さらに精製水20mlで洗い込みながら負荷した。

溶出液 アセトニトリル

第1溶出液 5ml

被験物質は第1溶出液で溶出した。

*5 カラムクロマトグラフの条件

セップパック 中性アルミナ
(ヘキサン約10mlで洗浄)

負荷法 試料液全量をヘキサン10mlで洗い込みながら負荷した。

溶出法 第1溶出液 ジクロロメタン/アセトニトリル(9/1 V/V) 10ml

被験物質は第1溶出液で溶出した。

13.6.3 定量分析

13.6.2の前処理を行って得られたHPLC試料は、以下の条件に基づき高速液体クロマトグラフィーにより定量を行った。供試魚分析の定量はHPLC試料を適宜希釈し、直線性の確認された濃度範囲になるように被験物質濃度を調整した。最終定容液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(表-4, 5, 図-6, 表-8, 9, 10, 図-8, 9, 10参照)。

(1) 分析機器の定量条件

機 器	高速液体クロマトグラフ
カラム	COSMOSIL 5C ₁₈ -AR 25cm×4.6mmφ ステンレス製
溶 離 液	アセトニトリル/精製水(7/3 V/V)
流 量	1.0ml/min
測 定 波 長	215nm (図-14参照)
注 入 量	10μl
感 度	
記 録 計	ATTEN 2 ²

(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50.0mgを精密にひょう量し、アセトニトリルに溶解して1000μg/mlの標準原液を調製した。これをアセトニトリルで希釈して0.5μg/mlの標準溶液とした。

(3) 検量線の作成

(2)の標準溶液調製法と同様にして0.25、0.5及び1.0μg/ml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。

検量線より被験物質ピーク面積の検出下限はノイズレベルを考慮して200μV・sec(被験物質濃度0.013μg/ml)とした(図-4参照)。

13.6.4 回収試験及びブランク試験

(1) 方法

前述した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分散液を添加し、13.6.2及び13.6.3の操作に準じて回収試験を行った。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、回収試験の場合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。この結果、ブランク試験においてクロマトグラム上、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（表-3, 7, 図-5, 7参照）。

(2) 結果

分析操作における回収率

試験水分析（被験物質2.5 μg 添加）
92.3%, 95.5% 平均93.9%
供試魚分析（被験物質30 μg 添加）
78.1%, 76.2% 平均77.2%

13.6.5 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

表-6の計算式に従って計算し、計算結果はJIS Z 8401-1961の方法を用いて有効数字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

13.6.3 (3)の検量線作成で求めた被験物質の検出下限より、試験水中の被験物質の定量下限濃度^{*6}はそれぞれ、

第1濃度区 0.0027 $\mu\text{g}/\text{ml}$

第2濃度区 0.00027 $\mu\text{g}/\text{ml}$

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

表-11の計算式に従って計算し、計算結果は JIS Z 8401-1961の方法を用いて有効数字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

13.6.3 (3)の検量線作成で求めた被験物質の検出下限より、供試魚中の被験物質の定量下限濃度^{*6}は供試魚体重を30gとしたとき0.028 μ g/gと算出される。

$$*6 \text{ 被験物質定量下限濃度 } (\mu\text{g/ml 又は } \mu\text{g/g}) = \frac{A}{\frac{B}{100} \times \frac{C \times E}{D}}$$

- A : 検量線上検出下限濃度 (μ g/ml)
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 JIS Z 8401-1961の方法を用いて有効数字2ケタに丸めた。

13.7 濃縮倍率 (BCF) の算出

表-11の計算式に従って計算し、計算結果は JIS Z 8401-1961の方法を用いて有効数字2ケタに丸めて表示した。

なお、13.6.5 (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	0.3倍
第2濃度区	3.0倍

13.8 数値の取扱い

数値を平均する場合、平均は算術平均とした。数値の丸め方は JIS Z 8401-1961に従った。

14. 試験結果

14.1 試験水中の被験物質濃度

試験水中の被験物質濃度を表-1に示す。

表-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 mg/l)

	2 週	3 週	4 週	6 週	付 表	付 図
第1濃度区	0.0925	0.0930	0.0940	0.0945	表-4	図-6
第2濃度区	0.00942	0.00923	0.00932	0.00920	表-5	

14.2 濃縮倍率

濃縮倍率を表-2に示す。

表-2 濃 縮 倍 率

	2 週	3 週	4 週	6 週	付 表	付 図
第1濃度区	66	53	43	51	表-8	図-8
	74	75	63	65		
第2濃度区	48	67	54	74	表-9	図-9
	57	83	45	56		

表-2の濃縮倍率とばく露期間との相関を図-1及び図-2に示した。これらの図より、6週後には十分平衡に達していると考えられる。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43~75倍、第2濃度区において45~83倍であり、両濃度区における濃縮性の程度はほぼ同じと考えられる。

供試魚は外観観察等の結果、異常は認められなかった。

15. 試資料の保管

15.1 被験物質

保管用被験物質約20gを保管用容器に入れ密栓後、「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」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。）第32条に定める期間、当研究所試料保管室に保管する。

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、調査表、資料等は最終報告書と共に、「GLP基準」第32条に定める期間、当研究所資料保管室に保管する。

16. 備考

16.1 試験に使用した機器、装置、特殊器具、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	:	飯島精密工業製	型	552

(2) 分析及び原液調製に使用した機器、装置、特殊器具、試薬
機器

高速液体クロマトグラフ (機器No LC-67)

ポンプ : 日立製作所製 型 L-6000

検出器 : 日立製作所製 型 L-4000

装置

ロータリーエバポレーター : 東京理化工機製 型 N-1

振とう機 : 入江商会製 TS式

ホモジナイザー : キネマチカ社製 型 PT-10

高速遠心分離機 : 日立製作所製 型 20PR-52

特殊器具

セップパック C₁₈ : 日本ミリポア・リミテッド製

セップパック 中性アルミナ : 日本ミリポア・リミテッド製

試薬

アセトニトリル : 和光純薬工業製 HPLC用

ヘキサン : 片山化学工業製 残留農薬分析用

塩化ナトリウム : マナック製 試薬一級

無水硫酸ナトリウム : 片山化学工業製 試薬一級

ジクロロメタン : キシダ化学製 試薬一級

HCO-40 : 日光ケミカルズ製

精製水 : 高杉製薬製 日本薬局方