

最終報告書

エチレンジアミン四酢酸（被験物質番号 K-92）のコイにおける濃縮度試験

財団法人 化学品安全協会
化学品安全センター 環境化学研究所

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 エチレンジアミン四酢酸（被験物質番号 K-92）のコイにおける濃縮度試験

試験番号 50092

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 6 年 11 月 22 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 エチレンジアミン四酢酸（被験物質番号 K-92）のコイに
おける濃縮度試験

試験番号 50092

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 6年 6月 6日	平成 6年 6月 6日	平成 6年 6月 6日
平成 6年 6月 23日	平成 6年 6月 28日	平成 6年 6月 28日
平成 6年 7月 5日	平成 6年 7月 8日	平成 6年 7月 7日
平成 6年 7月 8日	平成 6年 8月 10日	平成 6年 8月 10日
平成 6年 7月 11日	平成 6年 8月 10日	平成 6年 8月 10日
平成 6年 11月 22日	平成 6年 11月 22日	平成 6年 11月 22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 6年 11月 22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	6
13. 濃縮度試験の実施	8
14. 試験結果	16
15. 考 察	18
16. 試資料の保管	19
17. 備 考	19
18. 表及び図の内容	20

付表及び付図

要 約

1. 試験の表題

エチレンジアミン四酢酸（被験物質番号 K-92）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（24時間目に換水） |

2.2 濃縮度試験

- | | |
|-----------|--------------------------------|
| (1) 供試魚 | コイ |
| (2) 試験濃度 | 第1濃度区 2.0mg/L
第2濃度区 0.2mg/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 | 163mg/L |
| (2) 濃縮倍率 | 第1濃度区 2.7倍以下～12倍
第2濃度区 27倍以下～123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 50092

1. 表 題 エチレンジアミン四酢酸（被験物質番号 K-92）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 XXXXXXXXXX
4. 試験目的 K-92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. 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」（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 6年 6月 6日

(2) ばく露開始日 平成 6年 6月 9日

(3) ばく露終了日 平成 6年 7月 21日

(4) 試験終了日 平成 6年 9月 26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 6年 9月 26日

作成者

10. 最終報告書の承認

平成 6年 9月 26日

試験責任者

氏名

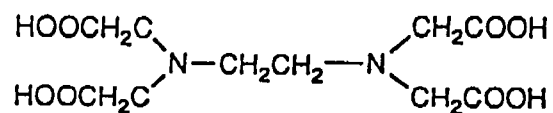
11. 被 験 物 質

本報告書においてK-92は、次の名称及び構造式等を有するものとする。

11.1 名 称 エチレンジアミン四酢酸

11.2 構造式等

構造式



分子式 $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_8$

分子量 292.25

11.3 純 度^{*1} 99.9%

11.4 入手先、商品名、等級及びロット番号^{*1}

(1) 入 手 先 [REDACTED]

(2) 商 品 名 [REDACTED]

(3) 等 級 [REDACTED]

(4) ロット番号 GB01

*1 入手先添付資料による。

11.5 被験物質の確認

赤外吸収スペクトル（図－１４参照）及び質量スペクトル（図－１５参照）により構造を確認した。核磁気共鳴スペクトルによる確認は、被験物質の溶媒に対する溶解性が悪いため行わなかった。

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－１４参照）、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 0102-1993 の 71.）の方法に準じて行った。

12.2 供試魚

- | | | |
|------------|---|---|
| (1) 魚 | 種 | ヒメダカ <u>Oryzias latipes</u> |
| (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) 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、蓄養槽で薬浴後、流水状態で88日間飼育した。 |
| (4) じゅん化条件 | | 蓄養後、じゅん化水槽へ搬入し薬浴した後、じゅん化を行った。その間異状のあるものは除去し、 25 ± 2 ℃の水温の流水状態で7日間飼育した。その後、再度選別及び薬浴を実施した後、流水状態で31日間飼育した。 |
| (5) 体重 | | 平均 0.20 g |
| (6) 全長 | | 平均 2.9 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-940523)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) 水質確認

当研究所にて6ヶ月に1回定期的に参考資料1に示す項目について測定又は分析を行った。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56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 Guideline for Testing of Chemicals 210, Fish, Early-life Stage Toxicity Test」に記載されている濃度以下であることを確認した。

12.4 試験条件

- | | |
|------------|--|
| (1) 試験水槽 | 円型ガラス製水槽 |
| (2) 試験液量 | 4 L / 濃度区 |
| (3) 試験水温 | 25 ± 2℃ |
| (4) 溶存酸素濃度 | ばく露開始時 7.2 ~ 7.6 mg/L
ばく露終了時 6.2 ~ 7.2 mg/L |
| (5) pH | ばく露開始時 2.7 ~ 4.7
ばく露終了時 2.8 ~ 5.9 |
| (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 (24時間目に換水) |

12.5 原液調製法

被験物質をイオン交換水に加温溶解し、被験物質濃度 500 mg/L の原液を調製した。

12.6 試験の実施

- | | |
|-----------|---------------------------|
| (1) 実施場所 | 115 LC50室 |
| (2) 試験実施日 | 平成 6年 7月 4日 ~ 平成 6年 7月 6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 163 mg/L (図-3 参照)

13. 濃縮度試験の実施

13.1 供試魚

- (1) 魚 種 コイ Cyprinus carpio
- (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 6年 2月 1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41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55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23日間飼育した。
じゅん化終了日 平成 6年 5月16日
- (5) ばく露開始前の体重、体長等
- | | | |
|-------|----|--------|
| 体 重 | 平均 | 22.7 g |
| 体 長 | 平均 | 9.5 cm |
| 脂質含有率 | 平均 | 4.0 % |
- ロット TFC-940201-I の測定値
測定日 平成 6年 5月16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。 |

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 | 70 L 容ガラス製水槽 |
| (3) 試験水量 | 原液 2 mL/分及び試験用水 400 mL/分の割合で
579 L/日を試験水槽に供した。 |
| (4) 試験温度 | 25 ± 2 °C |
| (5) 溶存酸素濃度 | 第1濃度区 7.2 ~ 7.8 mg/L (図-10 参照)
第2濃度区 6.3 ~ 7.6 mg/L (図-11 参照)
対照区 7.2 ~ 7.7 mg/L (図-12 参照) |
| (6) 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) |
| (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

・第1濃度区

被験物質をイオン交換水に加温溶解し、ガラス製原液タンク中の被験物質濃度を 400 mg/L とした。

・第2濃度区

被験物質をイオン交換水に加温溶解し、ガラス製原液タンク中の被験物質濃度を 40 mg/L とした。

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 2.0 mg/L

第2濃度区 0.2 mg/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。

13.6 試験水及び供試魚分析

被験物質は本体での分析が困難であったため、被験物質と鉄との錯体を高速液体クロマトグラフィーにより定量した。以後、クロマトグラム上のピークは被験物質として表記した。なお、濃度は被験物質濃度で表示した。

13.6.1 分析回数

試験水中の被験物質分析は第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、供試魚中の被験物質分析は第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

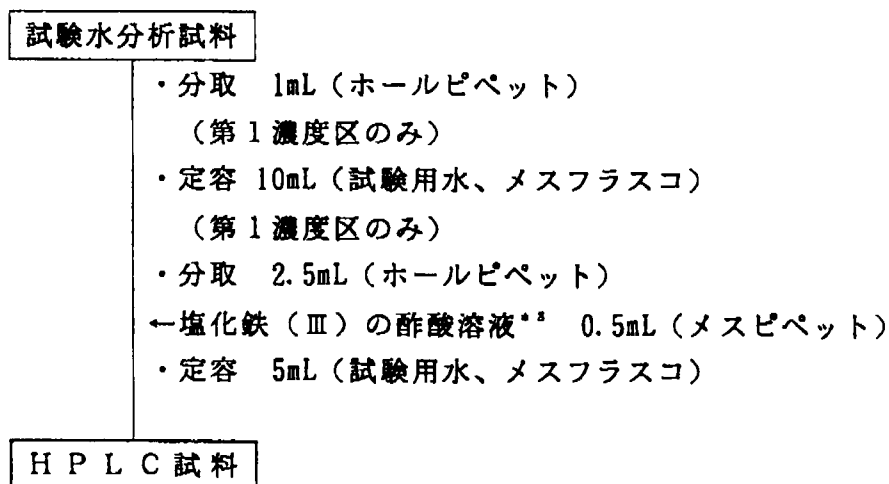
試験水槽から

第1濃度区 約10mL

第2濃度区 約10mL

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



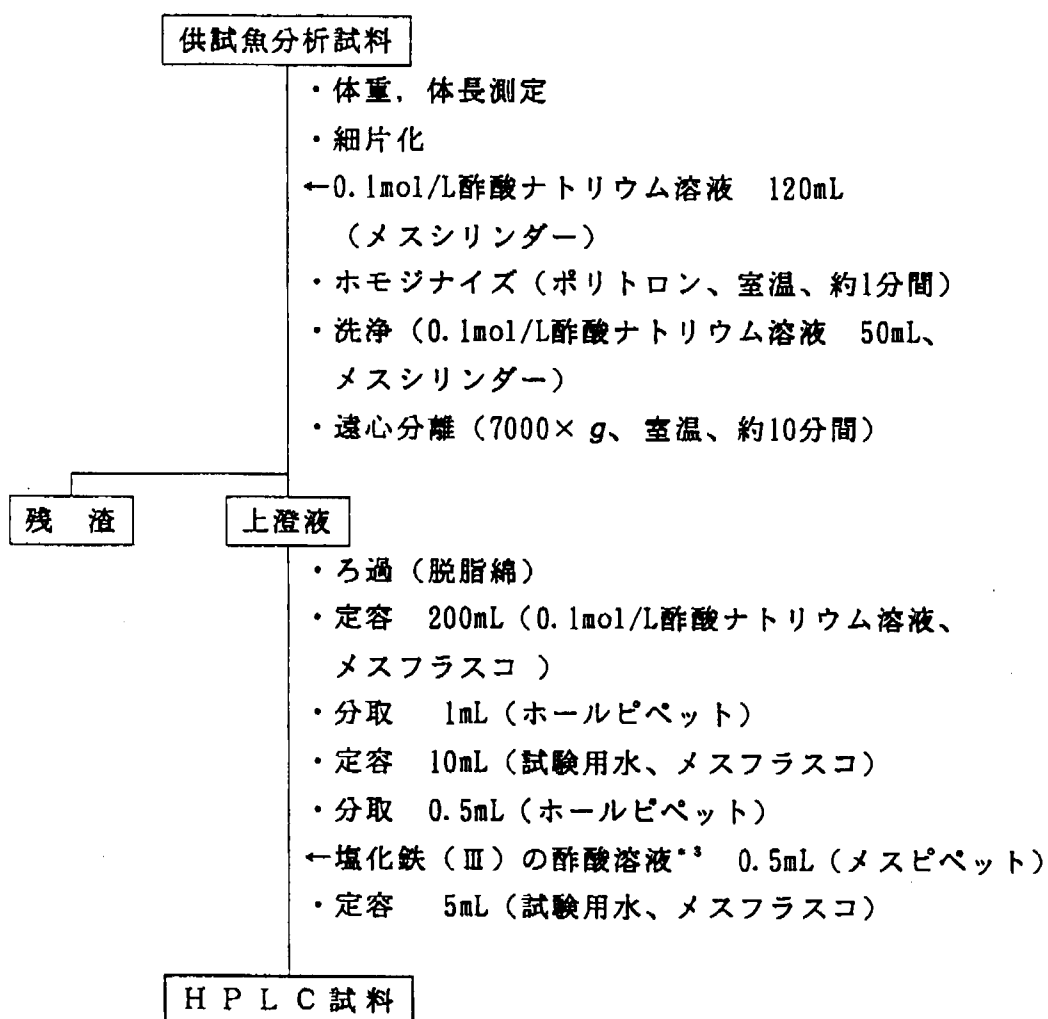
*3 塩化第二鉄 175mgを30mLの酢酸に溶解した後、水*4で100mLに定容した溶液。

*4 水道水をミリーXQを用いて処理した水。

(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



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、下記の定量条件に基づき被験物質を分析した。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-3、4、図-5、表-6、7、8、図-7、8、9参照）。

(1) 定量条件

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-10AV
カ ラ ム	L-column ODS 15cm×4.6mmφ ステンレス製
溶 離 液	10mmol/L酢酸緩衝液(pH 4.0)*5 (15mmol/L水酸化テトラ- <i>n</i> -ブチルアンモニウム含有)
流 量	1.0mL/min
測 定 波 長	254nm (図-13参照)
注 入 量	100μL
感 度	
検 出 器	4AU/V
記 録 計	レンジ 1.5mV

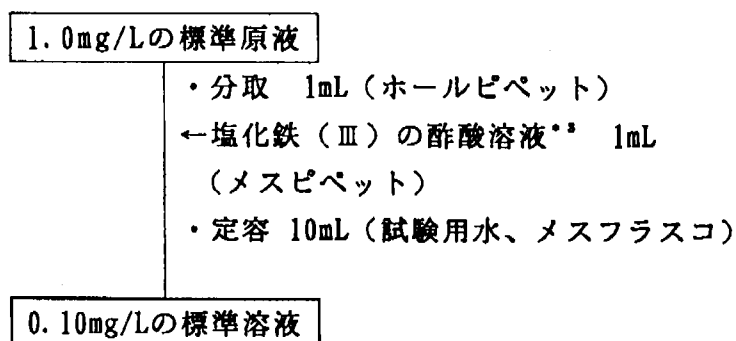
*5 酢酸ナトリウム溶液を酢酸(1+5)でpH 4.0に調整したもの。

(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 0.1 g を精密にはかりとり、水[※]に加温溶解して 500 mg/L の被験物質溶液を調製した。これを水[※]で希釈して 1.0 mg/L の標準原液を調製し、以下のフロースキームにより前処理を行い、0.10 mg/L の標準溶液を調製した。

フロースキーム



(3) 検量線の作成

(2) の標準溶液調製法と同様にして 0.050、0.10 及び 0.20 mg/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。

ピーク面積の検出下限はノイズレベルを考慮して $200 \mu\text{V} \cdot \text{sec}$ (被験物質濃度 0.0064 mg/L) 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

前述した前処理における供試魚からの被験物質の回収率を求めるため、魚体ホモジネートに被験物質原液を添加し、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、各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-5，図-6参照）。

(2) 結 果

供試魚分析操作における回収率（被験物質 3 mg添加）

82.2%，85.1% 平均83.6%

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-3, 4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

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 0.13 mg/L

第2濃度区 0.013 mg/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

表-6, 7, 8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

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5.1 µg/gと算出される。

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

A : 検量線上検出下限濃度 (mg/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。

13.7 濃縮倍率（BCF）の算出

表－6，7，8の計算式に従って計算し、計算結果は1倍以上100倍未満は有効数字2ケタ、100倍以上は有効数字3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	2.7倍
第2濃度区	27倍

13.8 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。

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	1.89	1.91	1.92	1.92	表－3	図－5
第2濃度区	0.192	0.189	0.189	0.189	表－4	

試験水中の平均被験物質濃度は表－1に示すように、設定値の約95%以上が保持された。

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	5.5	2.7以下	12	7.1	表-6	図-7
	5.3	2.7以下	9.5	5.3		
第 2 濃 度 区	27 以下	27 以下	78	64	表-7	図-8
	27 以下	27 以下	123	44		

被験物質のコイに対する濃縮性の程度は、表-2に示すように濃縮倍率で
第1濃度区：2.7倍以下～12倍、第2濃度区：27倍以下～123倍で
あった。また、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。

14.3 供試魚の外観観察等

供試魚は外観観察等の結果、異常は認められなかった。

15. 考 察

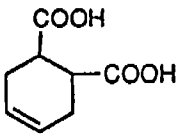
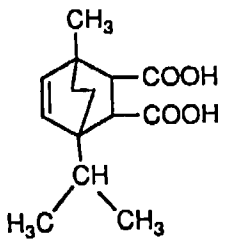

被験物質のコイに対する濃縮倍率は、第1濃度区：2.7倍以下～12倍、第2濃度区：27倍以下～123倍であり、いずれも低倍率ではあるが、濃度依存が認められた。しかし、第2濃度区においても、最高倍率123倍であり、算出可能な濃縮倍率が27倍であることを考慮すると、供試魚中のブランク量の変動により、被験物質絶対量の変動し、第2濃度区の濃縮倍率が見かけ上高くなったと考えられる。

また、被験物質は水に500mg/L程度溶解するが、有機溶媒には溶解せず、1-オクタノールと水との間の分配係数の観点からも、被験物質の濃縮性は低いと思われる。

さらに、これまで濃縮度試験を行ったジカルボン酸類は、以下に示すようにいずれも低濃縮であった。

これらの結果より、本試験結果では見かけ上濃度依存が認められるが、さらに試験濃度を下げても濃縮倍率は同程度であり、被験物質の濃縮性は低いと考えられる。

ジカルボン酸類の濃縮性

被験物質番号	名 称	構 造 式	濃 縮 倍 率
K-263	4-シクロヘキセン-1,2-ジカルボン酸		第1濃度区 ≤0.2 第2濃度区 ≤2.0
K-738	1-イソプロピル-4-メチルビシクロ[2.2.1]オクタ-5-エン-2,3-ジカルボン酸		第1濃度区 ≤0.3～0.5 第2濃度区 ≤3.1
K-770	n-オクタデセニルコハク酸	$\text{C}_{18}\text{H}_{35}-\underset{\text{CH}_2-\text{COOH}}{\text{CH}}-\text{COOH}$	第1濃度区 ≤0.1～0.4 第2濃度区 ≤1.3～2.0
K-828	メチル-5-ノルボルネン-2,3-ジカルボン酸		第1濃度区 ≤0.5 第2濃度区 ≤5.5

16. 試資料の保管

16.1 被験物質

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

16.2 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、「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。

17. 備 考

17.1 試験に使用した機器、装置、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	:	東京理化学器械製	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、試薬

装置・機器

高速液体クロマトグラフ	:	12 頁参照	
天 び ん	:	ザルトリウス社製	型 1702MP8
		島津製作所製	型 AEX-200B
		研精工業製	型 FA-2000

装置

ホモジナイザー（ポリトロン）	:	キネマチカ社製	型 PT10-35
遠心分離機	:	日立工機製	型 20PR-52

試薬

塩化鉄（Ⅲ）	:	和光純薬工業製	試薬特級
酢酸	:	和光純薬工業製	試薬特級
酢酸ナトリウム	:	和光純薬工業製	試薬特級
水酸化テトラ－n－ブチルアンモニウム	:	ナカライテスク製	試薬特級