

最 終 報 告 書

オートルイジン（被験物質番号 K-184）の微生物による分解度試験

財団法人 化学品検査協会
化学品安全センター 化学物質研究所

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 オートルイジン（被験物質番号 K-184）の微生物による分解度試験

試験番号 20184Ⅱ

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5月29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 オートルイジン（被験物質番号 K-184）の微生物による分解度試験

試験番号 20184Ⅱ

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 3月16日	平成10年 3月16日	平成10年 3月16日
試験実施状況	平成10年 3月19日	平成10年 3月23日	平成10年 3月20日
	平成10年 4月 2日	平成10年 4月22日	平成10年 4月22日
	平成10年 4月16日	平成10年 4月22日	平成10年 4月22日
生データ及び最終報告書	平成10年 5月29日	平成10年 5月29日	平成10年 5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 5月29日

信頼性保証部門責任者

[Redacted Signature]

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. 活性汚泥の調製	6
12. 分解度試験の実施	7
13. 試験条件の確認	14
14. 試験結果	14
15. 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	17
16. 試資料の保管	17
17. 備 考	17
18. 表及び図の内容	18

付表及び付図

要 約

1. 試験の表題

o-トリイジン（被験物質番号 K-184）の微生物による分解度試験

2. 分解度試験

2.1 試験条件

- (1) 被験物質濃度 100 mg/L
- (2) 活性汚泥濃度 30 mg/L（懸濁物質濃度として）
- (3) 試験液量 300 mL
- (4) 試験液培養温度 $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$
- (5) 試験液培養期間 28日間

2.2 測定及び分析

- (1) 閉鎖系酸素消費量測定装置による生物化学的酸素要求量（BOD）の測定
- (2) 全有機炭素分析法（TOC）による溶存有機炭素の分析
- (3) 高速液体クロマトグラフィー（HPLC）による被験物質の分析

3. 試験結果


(1) BODによる分解度	5 %,	4 %,	5 %	平均	5 %
(2) TOCによる分解度	1 %,	0 %,	1 %	平均	1 %
(3) HPLCによる分解度	1 %,	0 %,	0 %	平均	0 %

4. 被験物質の安定性

被験物質は保管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 20184Ⅱ

1. 表 題 オートルイジン（被験物質番号 K-184）の微生物による分解度試験
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 
4. 試験目的 K-184の微生物による分解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〈微生物等による化学物質の分解度試験〉及び「OECD Guidelines for Testing of Chemicals」(July 17, 1992)に定める "Ready Biodegradability : 301C, Modified MITI Test (I)" 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 3月16日

(2) 試験液培養開始日 平成10年 3月19日

(3) 試験液培養終了日 平成10年 4月16日

(4) 試験終了日 平成10年 5月14日

8. 試験関係者

試験責任者

試験担当者

活性汚泥管理責任者

試験資料管理部門責任者

9. 最終報告書の作成

平成10年 5月 14日

試験責任者

氏名

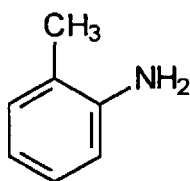
10. 被 験 物 質

本報告書においてK-184は、次の名称及び構造式等を有するものとする。

10.1 名 称 o-トルイジン

10.2 構造式等

構造式



分子式 C₇H₉N

分子量 107.15

10.3 純 度^{*1}

(1) 被 験 物 質 99.9%

(2) 不 純 物 水分 0.08%

被験物質濃度は不純物の含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 [REDACTED]

(2) 商 品 名 [REDACTED]

(3) 等 級 [REDACTED]

(4) ロット番号 WTG 9210

*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. 5 参照)。また、質量スペクトル (Fig. 6 参照) 及び核磁気共鳴スペクトル (Reference 1 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 試験液培養開始前及び培養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. 5 参照)。

11. 活性汚泥の調製

11.1 汚泥の採集場所及び時期

(1) 場 所 以下の全国10ヵ所から採集した。

伏古川処理場（北海道札幌市）	鹿島処理場（茨城県鹿島郡）
中浜処理場（大阪府大阪市）	落合処理場（東京都新宿区）
北上川（宮城県石巻市）	信濃川（新潟県西蒲原郡）
吉野川（徳島県徳島市）	琵琶湖（滋賀県大津市）
広島湾（広島県広島市）	洞海湾（福岡県北九州市）

(2) 時 期 平成 9 年 1 2 月

11.2 採集方法

(1) 都 市 下 水 下水処理場の返送汚泥

(2) 河川、湖沼及び海 表層水及び大気と接触している波打際の表土

11.3 新旧汚泥の混合

上記で採集してきた各地の汚泥混合液のろ液 5 L と、約 3 ヶ月間培養した活性汚泥*²のろ液 5 L とを混合して 10 L とし、pH を 7.0 ± 1.0 に調整して培養槽でばっ気*³した。

*2 上記で採集した各地の汚泥混合液のろ液 10 L を、下記 11.4 に従って培養した活性汚泥。

*3 屋外空気をプレフィルターに通し、ばっ気に用いた。

11.4 培 養

培養槽へのばっ気を約 30 分間止めた後、全量の約 1/3 量の上澄液を除去した。

これと等量の脱塩素水を加えて再びばっ気し、上澄交換液部の濃度が 0.1% になるように合成下水*⁴を加えた。この操作を毎日 1 回繰り返し、培養して活性汚泥とした。培養温度は 25 ± 2 °C とした。

*4 グルコース、ペプトン、りん酸二水素カリウムをそれぞれ 5 (W/V) % になるように脱塩素水に溶解し、水酸化ナトリウムで pH を 7.0 ± 1.0 に調整したものをを用いた。

11.5 管理及び使用

培養中、上澄液の外観及び活性汚泥の生成状態を観察するとともに、活性汚泥の沈でん性、pH、温度及び溶存酸素濃度を測定し記録した。活性汚泥の生物相は適宜光学顕微鏡を用いて観察し、異常のないことを確認した上で試験に供した。

11.6 活性汚泥の活性度の点検及び使用開始日

(1) 活性汚泥の活性度の点検

標準物質を用いて活性汚泥使用開始前に活性度を点検した。また、旧活性汚泥との関連性に留意した。

(2) 活性汚泥使用開始日 平成10年 1月20日

12. 分解度試験の実施

12.1 試験の準備

(1) 活性汚泥の懸濁物質濃度の測定

測定方法 「工場排水試験方法、懸濁物質」(JIS K 0102-1993 の 14.1) に準じて行った。

測定実施日 平成10年 3月16日

測定結果 活性汚泥の懸濁物質濃度は5700mg/Lであった。

(2) 基礎培養基の調製

「工場排水試験方法、生物化学的酸素消費量」(JIS K 0102-1993 の 21.) で定められたA液、B液、C液及びD液それぞれ3mLに精製水(高杉製薬製 日本薬局方)を加えて1Lとする割合で混合し、pHを7.0に調整した。

(3) 基準物質

アニリン(昭和化学製 試薬特級 ロット番号 SH-2842Y)を用いた。

12.2 試験液の調製

試験容器を6個用意し、試験液を下記の方法で調製した。

これらの試験液について、12.3の条件で培養を行った。

(1) 被験物質及びアニリンの添加

(a) (水+被験物質)系(1個, 試験容器②)

試験容器に精製水300mLを入れ、被験物質濃度が100mg/Lになるようにマイクロシリンジで30.0 μ L [添加量29.9mg=30.0 μ L \times 0.998g/cm³(密度)] 分取して添加した。

(b) (汚泥+被験物質)系(3個, 試験容器③④⑤)

試験容器に基礎培養基(300mL-活性汚泥添加液量(mL))を入れ、被験物質濃度が100mg/Lになるようにマイクロシリンジで30.0 μ L [添加量29.9mg=30.0 μ L \times 0.998g/cm³(密度)] 分取して添加した。

(c) (汚泥+アニリン)系(1個, 試験容器①)

試験容器に基礎培養基(300mL-活性汚泥添加液量(mL))を入れ、アニリン濃度が100mg/Lになるようにマイクロシリンジで29.5 μ L [添加量30mg=29.5 μ L \times 1.022g/cm³(密度)] 分取して添加した。

(d) 汚泥ブランク系(1個, 試験容器⑥)

試験容器に基礎培養基(300mL-活性汚泥添加液量(mL))を入れた。

(2) 活性汚泥の接種

(b),(c)及び(d)の試験液に11. の条件で調製した活性汚泥を懸濁物質濃度として30mg/Lになるように接種した。

12.3 試験液培養装置及び環境条件

(1) 試験液培養装置

閉鎖系酸素消費量測定装置

(旭テクネイオン製 クーロメーター, データ処理装置)

試験容器 300 mL用培養瓶

炭酸ガス吸収剤 ソーダライム, Na₂O

(和光純薬工業製 二酸化炭素吸収用)

撈拌方法 マグネチックスターラーによる回転撈拌

(2) 環境条件

試験液培養温度 25 ± 1 °C

試験液培養期間 28日間

実施場所 511クーロ室

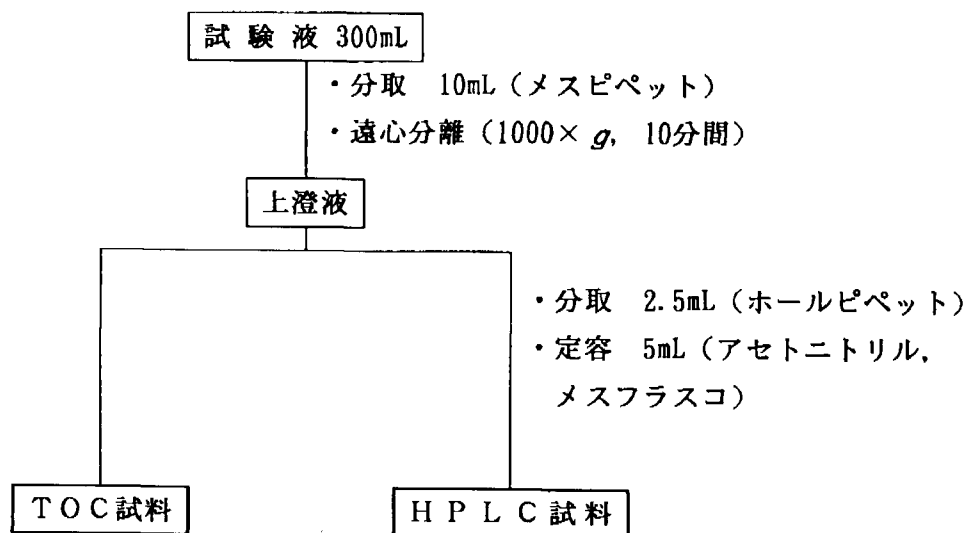
12.4 試験液の分析

培養期間終了後、試験液中に残留している溶存有機炭素及び被験物質について分析した。なお、（水＋被験物質）系及び（汚泥＋被験物質）系の試験液のpHを測定した。

12.4.1 試験液の前処理

試験液培養期間終了後、（水＋被験物質）系、（汚泥＋被験物質）系及び汚泥ブランク系の試験液について以下のフロースキームに従って前処理操作を行い、溶存有機炭素（DOC）を分析するための全有機炭素分析法（TOC）試料とし、被験物質を分析するための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



12.4.2 定量分析

(1) 全有機炭素分析法による溶存有機炭素の分析

前処理を行って得られたT O C試料について、下記の定量条件に基づきD O Cを分析した。

試験液のD O C濃度は、全有機炭素計内のデータ処理装置により、T O C標準溶液80.0mgC/Lのピーク面積を測定して検量線を設定し、T O C試料のD O Cを測定して求めた（Table-2 参照）。なお、T O C標準溶液はフタル酸水素カリウム（和光純薬工業製 等級 試薬特級）を精製水に溶解して調製した。

定量下限濃度はD O C濃度1.0mgC/Lとした。

定量条件

機	器	全有機炭素計
		島津製作所製 T O C - 5 0 0 0
T C 炉 温 度		6 8 0 °C
流 量		1 5 0 mL/min
注 入 量		3 3 μ L
感 度		レンジ 5

(2) 高速液体クロマトグラフィーによる被験物質の分析

前処理を行って得られたHPLC試料について、下記の定量条件に基づき分析した。HPLC試料中の被験物質の濃度は標準溶液60.0mg/L及びHPLC試料の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- 3、Fig. 3 参照)。

ピーク面積の定量下限は、ノイズレベルを考慮して30000 $\mu V \cdot sec$ (被験物質濃度0.85mg/L) とした。

(a) 定量条件

機 器	高速液体クロマトグラフ
ポンプ	日立製作所製 L-7100
検出器	日立製作所製 L-7400
カラムオーブン	日立製作所製 L-7300
カラム	L-column ODS 15cm×4.6mm I.D. ステンレス製
カラム温度	30℃
溶 離 液	アセトニトリル/5mmol/Lりん酸水素二 ナトリウム*5 (1/1 V/V)
流 量	1.0mL/min
測定波長	240nm (Fig. 4 参照)
注 入 量	10 μL
検出器出力	1V/AU

*5 りん酸 (1+20) でpH 7.0に調整。

(b) 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200mgを正確にはかりとり、アセトニトリルに溶解して10g/Lの被験物質溶液を調製した。これをアセトニトリル/精製水(1/1 V/V)で希釈して60.0mg/Lの標準溶液とした。

(c) 検量線の作成

(b)の標準溶液の調製と同様にして15.0、30.0及び60.0mg/Lの標準溶液を調製した。これらを(a)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 (Fig. 2 参照)。

12.5 分解度の算出

被験物質の分解度は下記の式に基づき算出し、小数点以下1ケタ目を丸めて整数位で表示した。

(1) BODによる分解度

$$\text{分解度 (\%)} = \frac{\text{BOD} - \text{B}}{\text{TOD}} \times 100$$

BOD : (汚泥+被験物質)系の生物化学的酸素要求量
(測定値) (mg)

B : 汚泥ブランク系の生物化学的酸素要求量
(測定値) (mg)

TOD*6 : 被験物質が完全に酸化された場合に必要とされる
理論的酸素要求量(計算値) (mg)

*6 純度100%として計算した。

(2) TOCによる分解度

$$\text{分解度 (\%)} = \frac{\text{DOC}_w - \text{DOC}_s}{\text{DOC}_w} \times 100$$

DOC_s : (汚泥+被験物質)系における溶存有機炭素の残留量
(測定値) (mgC)

DOC_w : (水+被験物質)系における溶存有機炭素の残留量
(測定値) (mgC)

(3) HPLCによる分解度

$$\text{分解度 (\%)} = \frac{S_w - S_s}{S_w} \times 100$$

S_s : (汚泥+被験物質)系における被験物質の残留量
(測定値) (mg)

S_w : (水+被験物質)系における被験物質の残留量
(測定値) (mg)

12.6 数値の取扱い

数値の丸め方は、JIS Z 8202-1985 参考3規則Bに従った。

13. 試験条件の確認

BODから求めたアニリンの7日及び14日後の分解度はそれぞれ46%及び82%であることから、本試験の試験条件が有効であることを確認した（Table-1、Fig. 1 参照）。

14. 試験結果

14.1 試験液の状況

試験液の状況は下記のとおりであった。

	試 験 液	状 況	p H
培養開始時	（水 + 被験物質）系	不溶物が認められた。	—
	（汚泥 + 被験物質）系	汚泥以外の不溶物が認められた。	—
培養終了時	（水 + 被験物質）系	不溶物は認められなかった。	② 7.2
	（汚泥 + 被験物質）系	汚泥以外の不溶物は認められなかった。 汚泥の増殖は認められなかった。	③ 7.2 ④ 7.5 ⑤ 7.2

14.2 試験液の分析結果

28日後の分析結果は下記のとおりであった。

		(水+被験物質)系	(汚泥+被験物質)系			理論量	Table	Fig.
		②	③	④	⑤			
B O D ^{*7}	mg	0.8	4.6	3.7	4.7	91.5	1	1
DOC残留量 及び残留率	mgC	23.3	23.1	23.3	23.1	23.5	2	—
	%	99	98	99	98	—		
被験物質残留 量及び残留率 (HPLC)	mg	29.0	28.8	29.3	29.4	29.9	3	3
	%	97	96	98	98	—		

*7 (汚泥+被験物質)系は、汚泥ブランク系の値を差し引いて表示した。

14.3 分解度

28日後の分解度は下記のとおりであった。

	分解度 (%)				Table
	③	④	⑤	平均	
BODによる結果	5	4	5	5	1
TOCによる結果	1	0	1	1	2
HPLCによる結果	1	0	0	0	3

14.4 考 察

K-184の分解度に関する文献調査結果

試 験 条 件				試験結果	参考文献
試料濃度	植 種 源	温 度	期 間	分解度 (%)	
100mg/L	海 水	30℃	3日間	6, 0, 4, 0	1
100mg/L	河川水	30℃	3日間	18, 23, 12, 16	

K-184の分解度に関する内外の文献を調査したところ、上記の様なデータが得られ、難分解性であると考察されている。これらの結果は本試験とほぼ一致していた。

参考文献

1. 梅田弘志, 中野武, 奥野年秀 : 化学物質の水中微生物分解性試験について, 兵庫県公害研究所研究報告書第17号(1985)

15. 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。

16. 試資料の保管

16.1 被験物質

被験物質約 5 g を保管用容器に入れ密栓後、安定に保存しうる期間、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、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。

17. 備 考

17.1 試験に使用した主要な装置・機器

閉鎖系酸素消費量測定装置	:	9 頁参照	
全有機炭素計	:	11 頁参照	
高速液体クロマトグラフ	:	12 頁参照	
紫外可視分光光度計	:	島津製作所製	UV-2200A
フーリエ変換赤外分光光度計	:	島津製作所製	FTIR-8200PC
ガスクロマトグラフ-質量分析計	:		
	:	日本電子製	JMS-DX303
電子分析天びん	:	ザルトリウス社製	BP210S
	:	ザルトリウス社製	1702MP8
pH 計	:	東亜電波工業製	HM-50S
遠心分離機	:	島津製作所製	CST 060LF

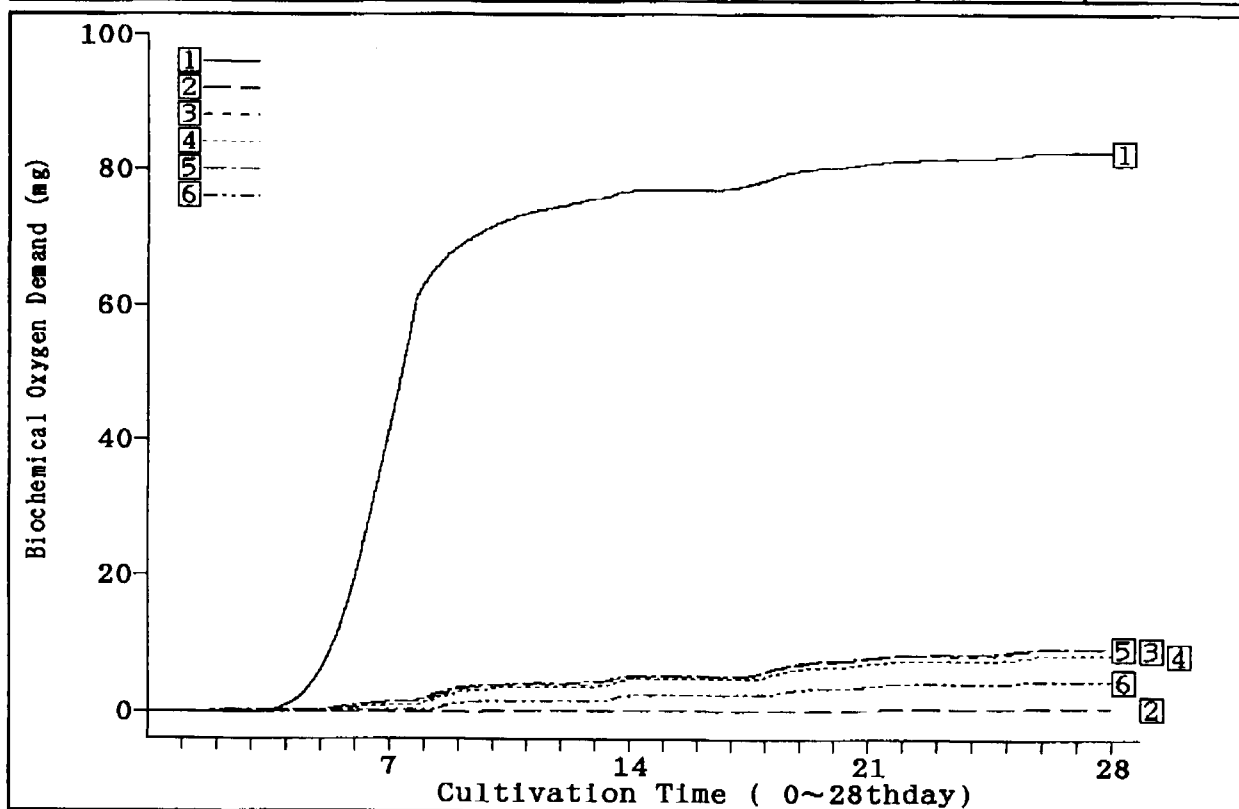
17.2 分析に使用した試薬

アセトニトリル	:	和光純薬工業製	HPLC 用
りん酸水素二ナトリウム	:	和光純薬工業製	試薬特級
りん酸	:	和光純薬工業製	試薬特級

Fig.1 Chart of BOD

Test No.	20184II	(Test substance	K-184)
Apparatus	No. CM-34			
Cultivating conditions:				
Concentration				
Test substance	100 (mg/ℓ)			
Reference substance(aniline)	100 (mg/ℓ)			
Activated sludge	30 (mg/ℓ)			
Temperature	25 ± 1° C			
Duration	28days (Mar.19~Apr.16,1998)			
Note:	Regular test	Regular condition		

Vessel no.	Sample description	B O D (mg)			
		7thday	14thday	21stday	28thday
①	Sludge + Aniline	42.1	76.8	80.9	82.6
②	Water + Test substance	0.0	0.3	0.4	0.8
③	Sludge + Test substance	1.5	5.2	7.9	9.3
④	Sludge + Test substance	1.2	4.9	7.2	8.4
⑤	Sludge + Test substance	1.6	5.4	8.1	9.4
⑥	Control blank [B]	0.4	2.4	3.9	4.7



1998.04.16 Name