

最 終 報 告 書

5-エチリデン-2-ノルボルネン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九州試験所

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. 試験期間 | 3 |
| 7. 試験関係者 | 3 |
| 8. 最終報告書の承認 | 3 |
| 9. 被験物質 | 4 |
| 10. 急性毒性試験 | 6 |
| 11. 濃縮度試験の実施 | 8 |
| 12. 試験結果 | 16 |
| 13. 試資料の保管 | 17 |
| 14. 備 考 | 17 |
| 15. 表の内容 | 19 |
| 16. 図の内容 | 20 |
| 付表及び付図 | |

最終報告書

試験番号 50834

1. 表 題 5-エチリデン-2-ノルボルネン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九州試験所
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 5-エチリデン-2-ノルボルネン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〉による。

6. 試験期間

(1) 試験開始日 昭和60年 8月10日

(2) 試験実施期間

供試魚受入日 昭和60年 6月 3日

じゅん化終了日 昭和60年 6月25日

ばく露開始日 昭和60年 8月12日

ばく露終了日 昭和60年10月 7日

(3) 試験終了日 昭和60年 月 日

7. 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

試資料管理責任者

最終報告書作成者

昭和60年11月 7日

8. 最終報告書の承認

昭和 年 月 日

試験責任者

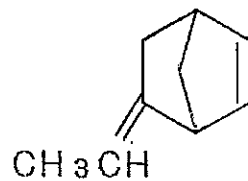
氏名 _____ ㊟

9. 被験物質

9.1 名 称 5-エチリデン-2-ノルボルネン
(被験物質番号 K-834)

9.2 構造式等

構造式



分子式 C₉ H₁₂

分子量 120.19

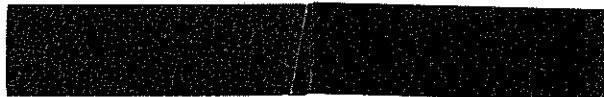
9.3 純 度^{*1} 99%以上

*1 添付資料による。

9.4 入手先及びロット番号

(1) 入 手 先

(2) ロット番号



9.5 同 定

ALDRICH LIBRARY に記載の赤外吸収スペクトルと当試験所の当該測定スペクトルとが一致することを確認した。

9.6 物理化学的性状

外 観 無色透明液体
比 重^{*1} d_{20}^{20} 0.898

| | | |
|-----|---------------------|----------------------|
| 溶解性 | 水 | 8.9mg/l (GC-MS による。) |
| | ヘキサン | 10 g/l以上 |
| | クロロホルム | 10 g/l以上 |
| | 酢酸エチル | 10 g/l以上 |
| | メタノール | 10 g/l以上 |
| | テトラヒドロフラン(THF) | 10 g/l以上 |
| | N,N-ジメチルホルムアミド(DMF) | 10 g/l以上 |

分配係数 (n-オクタノール/水)
 $\log Pow = 3.82$ (OECD法による。)

質量スペクトル (図-13参照)
赤外吸収スペクトル (図-14参照)
紫外吸収スペクトル (図-15参照)
核磁気共鳴スペクトル (図-16参照)

^{*1} 添付資料による。

9.7 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、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(図-14参照)。

9.8 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。

10. 急性毒性試験

10.1 試験方法

JIS K 0102-1981 の 55 の方法に準じて行った。

10.2 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 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、 蓄養槽で薬浴して流水状態で12日間飼育した。 |
| 薬 浴 | 20mg/lエルバージュ（上野製薬製）水溶液及び7g/l 塩化ナトリウム水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 $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ の水温の流水状態で7日間以 上飼育した。 |
| (5) 体 重 | 平均 0.22g |
| (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-850328）のものを試験に供し た。 |

^{*2} 用水と廃水, 14, 1297-1303 (1972)

10.3 試験用水

(1) 種類

九州試験所敷地内で揚水した地下水

(2) 分析及び水質確認

当試験所にて水温、pH及び溶存酸素は連続測定を行った。また、化学的酸素要求量、全硬度、蒸発残留物、塩素イオン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回定期的に分析している。試験に供した用水は、分析した項目が水産環境水質基準（社団法人 日本水産資源保護協会 昭和47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。

10.4 試験条件

- | | |
|------------|--------------------------------------|
| (1) 試験水槽 | ガラス製ガロンビン |
| (2) 試験液量 | 3.85ℓ／濃度区 |
| (3) 試験水温 | 25±2℃ |
| (4) 溶存酸素濃度 | ばく露開始時 7.9mg/ℓ ばく露終了時 6.2～7.1mg/ℓ |
| (5) pH | ばく露開始時 7.2～7.9 ばく露終了時 7.1～7.7 |
| (6) 供試魚数 | 5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） |

10.5 原液調製法

(1) 分散剤

ポリオキシエチレン（20）ソルビタンモノオレエート

(2) 調製方法

被験物質と20倍量のポリオキシエチレン（20）ソルビタンモノオレエートを混合させた後、イオン交換水を加えて攪拌し、1000mg/ℓの原液を調製した。

10.6 試験の実施

- (1) 実施場所 LC50測定室
(2) 試験実施日 昭和60年 5月20日 ~ 昭和60年 5月22日

10.7 試験結果

48時間LC50値 9.21mg/l (図-3参照)

11. 濃縮度試験の実施

11.1 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1番 123-2)
(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1日間飼育してその間に薬浴を行った。
薬浴 50mg/l水産用テラマイシン散(台糖ファイザー製)水
溶液及び7g/l塩化ナトリウム水溶液を用いて止水状態
で15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 $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ の水温の流水状態で19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
7日間以上飼育した。
(5) ばく露開始時の体重、体長等^{*3}
体重 平均 21.2g
体長 平均 9.2cm
脂質含有率 平均 4.3%

*3 ロットの測定値

- (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。

11.2 試験用水

10.3に同じ。

11.3 試験及び環境条件

- | | |
|-------------|--|
| (1) 試験水供給方法 | 当試験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（揮発性化学物質用試験水槽） |
| (3) 試験水量 | 原液 2 ml/分及び試験用水 800 ml/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 3.9～6.0 mg/ℓ（図-11参照） 第2濃度区 3.5～6.2 mg/ℓ（図-12参照） |
| (6) 供試魚数 | 20尾/濃度区（ばく露開始時） |
| (7) ばく露期間 | 8週間 |
| (8) 実施場所 | 第2アクアトロン室 |

11.4 原液調製法

10.5と同様な方法で、第1濃度区用の場合 40 mg/ℓ及び第2濃度区用の場合 4 mg/ℓの原液を調製した。

11.5 試験濃度

48時間 LC50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。

11.6 試験水及び供試魚分析

11.6.1 分析回数

試験水分析は両濃度区ともばく露期間中、毎週2回計16回行い、1回当りの分析試料は1点とした。また、供試魚分析は両濃度区ともばく露開始後、2、4、6及び8週の計4回行い、1回当りの分析試料は2尾とした。

11.6.2 分析試料の前処理

(1) 試験水

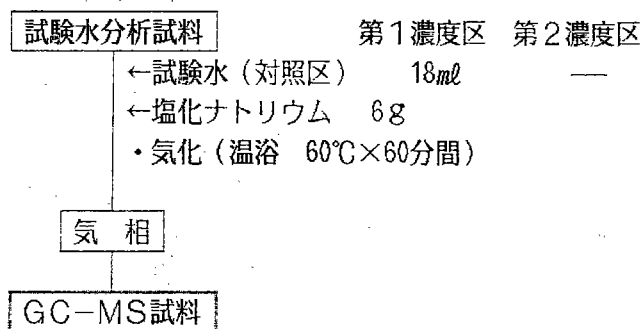
試験水槽から

第1濃度区 2ml

第2濃度区 20ml

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、ヘッドスペース法^{*4}にて気相をGC-MS試料とした。

フロースキーム

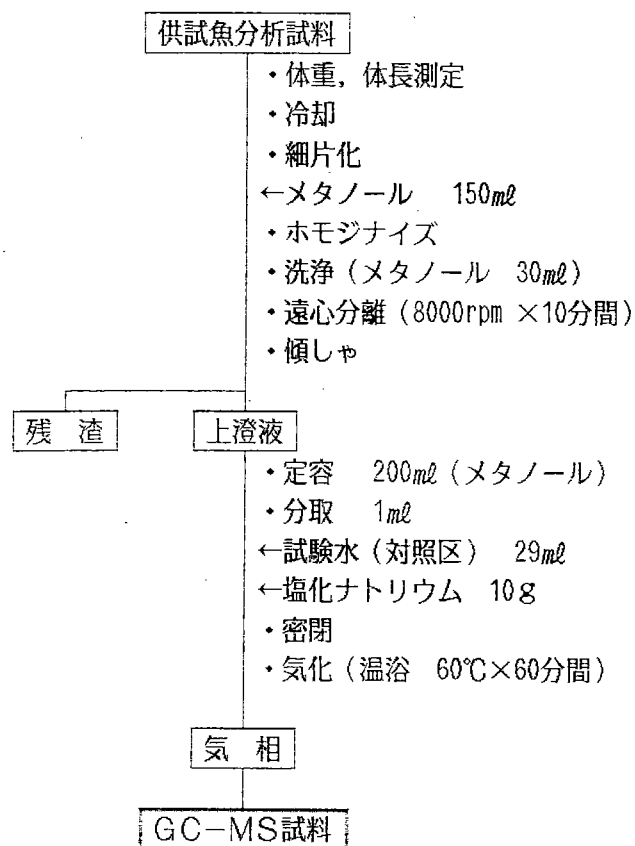


*4 セプタムにはテフロンシリコンディスク使用

(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、ヘッドスペース法にて気相をGC-MS試料とした。

フロースキーム



11.6.3 定量分析

11.6.2の前処理を行って得られたGC-MS試料は、以下の条件に基づきガスクロマトグラフィー質量分析法により定量を行った。供試魚分析の定量はメタノール抽出液を適宜希釈し、ヘッドスペース法により直線性の確認された濃度範囲になるよう被験物質濃度を調製した。最終定容液中の被験物質濃度は、マスフラグメントグラム上の被験物質のピーク高さを濃度既知の標準溶液のピーク高さと比較し、比例計算して求めた（図-6，表-4，5，図-9，10，表-8，9参照）。

(1) 分析機器の定量条件

| 機 器 | ガスクロマトグラフィー質量分析計 |
|----------------|--------------------------|
| <u>GC条件</u> | |
| カラム | 3m×3mmφ ガラス製 |
| 液相担体 | 5% OV-17 クロモソルブW (HP) |
| カラム温度 | 140℃ |
| 試料導入部温度 | 200℃ |
| キャリアガス | ヘリウム |
| 流量 | 40ml/min |
| 注入量 | 200μl |
| <u>質量分析計条件</u> | |
| セパレーター温度 | 280℃ |
| イオン化電圧 | 70eV |
| イオン源温度 | 250℃ |
| 測定 m/z | 120 |

(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0.1gにポリオキシエチレン(20)ソルビタンモノオレエート2gを混和させ、イオン交換水に溶解し、1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の分散液100 ml を調製した。

(試験水分析)

バイアルびんに試験水(対照区)19 ml 、塩化ナトリウム6g、200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 分散液1 ml を入れてヘッドスペース法標準10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ とした。

(供試魚分析)

バイアルびんに試験水(対照区)28 ml 、メタノール1 ml 、塩化ナトリウム10g、75 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 分散液1 ml を入れてヘッドスペース法標準2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ とした。

(3) 検量線の作成

(試験水分析)

(2)の標準溶液調製法と同様にして5、10及び20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の標準溶液を調製し、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フラグメントグラム上の被験物質ピーク高さから検量線を作成した。

検量線より被験物質ピーク高さの測定限界値はノイズレベルを考慮して100(被験物質濃度 0.46 $\mu\text{g}/\text{ml}$)とした(図-4参照)。

(供試魚分析)

(2)の標準溶液調製法と同様にして1.25、2.5及び5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の標準溶液を調製し、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フラグメントグラム上の被験物質ピーク高さから検量線を作成した。

検量線より被験物質ピーク高さの測定限界値はノイズレベルを考慮して100(被験物質濃度 0.11 $\mu\text{g}/\text{ml}$)とした(図-7参照)。

11.6.4 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、被験物質分散液を試験水（対照区）に添加及び魚体腹腔内に注射し、11.6.2及び11.6.3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試験水（対照区）及び魚体について、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マスフラグメントグラム上、被験物質ピーク位置にはピークは認められなかった。回収率は回収試験で得られた2点の値の平均値とした（図-5, 8, 表-3, 7参照）。分析操作における回収率は以下のとおりであり、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。

(2) 結 果

分析操作における回収率

試験水分析（被験物質0.2 μ g添加）

92.5%

供試魚分析（被験物質15 μ g添加）

88.2%

11.6.5 分析試料中の被験物質濃度の算出及び検出限界

(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検出限界濃度

11.6.3 (3)の検量線作成で求めた被験物質の測定限界値より、試験水中の被験物質の検出限界濃度^{*5}はそれぞれ、

第1濃度区 4.9 ng/ml

第2濃度区 0.49 ng/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-10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検出限界濃度

11.6.3 (3)の検量線作成で求めた被験物質の測定限界値より、供試魚中の被験物質の検出限界濃度^{*5}は供試魚体重を30gとしたとき25ng/gと算出される。

$$*5 \text{ 被験物質検出限界濃度 (ng/ml又はng/g)} = \frac{A}{\frac{B}{100} \times \frac{C \times E}{D}}$$

A : 検量線上測定限界濃度 (ng/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。

11.7 濃縮倍率 (BCF) の算出

表-10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10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、11.6.5 (4)で求めた供試魚中の被験物質検出限界濃度より、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 0.2倍

第2濃度区 2.6倍

12. 試験結果

12.1 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 $\mu\text{g}/\ell$ ）

| | 2 週 | 4 週 | 6 週 | 8 週 | 付 表 | 付 図 |
|-------|------|------|------|------|-----|-----|
| 第1濃度区 | 105 | 105 | 103 | 103 | 表-4 | 図-6 |
| 第2濃度区 | 9.71 | 9.72 | 9.79 | 9.80 | 表-5 | |

12.2 濃縮倍率

濃縮倍率を表-2に示す。

表-2 濃 縮 倍 率

| | 2 週 | 4 週 | 6 週 | 8 週 | 付 表 | 付 図 |
|-------|------------|------------|-----------|----------|-----|------|
| 第1濃度区 | 160 153 | 125 70 | 86 104 | 70 99 | 表-8 | 図-9 |
| 第2濃度区 | 61 97 | 121 119 | 159 86 | 81 75 | 表-9 | 図-10 |

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、8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70～160倍、第2濃度区において61～159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。

また、試験水中の平均被験物質濃度は表-1に示されるように、ほぼ設定値を維持できた。