

# 最 終 報 告 書

## 微生物等による K-1672 の分解度試験

試験番号：JCL048102

作成日：2005 年 2 月 21 日

試験委託者：財団法人 化学物質評価研究機構

試験受託者：株式会社日本医学臨床検査研究所  
バイオアッセイ事業部

## 目 次

目 次.....	2
要 約.....	4
1 表題.....	5
2 試験番号.....	5
3 試験目的.....	5
4 試験法.....	5
5 試験委託者.....	5
6 試験施設.....	5
7 試験責任者の氏名及び所属.....	5
8 試験担当者の氏名及び所属.....	5
9 試験期間.....	5
10 被験物質.....	6
11 対照物質.....	8
12 活性汚泥の調製.....	8
13 主な試薬.....	9
14 主な機器・装置.....	9
15 分解度試験の実施.....	10
16 分解度の算出方法.....	13
17 数値の取扱い.....	14
18 試験条件の成立基準.....	14
19 良分解性の判定基準.....	14
20 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.....	14
21 試験結果.....	15
22 試資料の保管.....	17
23 最終報告書の訂正.....	18
24 GLP基準への適合.....	18
25 最終報告書の承認.....	18

添付資料.....	19
Figure 1 Infrared absorption spectra of the test substance for identification in the testing facility	20
Figure 2 Mass spectra of the test substance for identification in the testing facility .....	20
Figure 3 Infrared absorption spectra of the test substance for stability test under storage conditions .....	22
Table 1 pH of the solutions in test bottles .....	23
Table 2 Intra-assay precision of calibration curve for the test substance .....	23
Figure 4 Calibration curve for the test substance.....	24
Table 3 Calculating table for percentage biodegradation .....	25
Table 4 Contents of test bottle.....	28
Figure 5 BOD Chart.....	29
Figure 6 Calibration curve for dissolve organic carbon.....	30
Table 5 Analysis of residual amount of dissolve organic carbon by TOC .....	31
Table 6 Percentage biodegradation by dissolve organic carbon.....	32
Figure 7 Calibration curve for analysis of residual amount of the test substance by HPLC.....	33
Table 7 Analysis of residual amount of the test substance by HPLC.....	34
Table 8 Analysis of residual amount of the test substance and the metabolites by HPLC.....	35
Figure 8 HPLC chromatograms of the test substance.....	36
Figure 9 HPLC chromatograms of the test substance and the metabolites under different analysis condition .....	37
Appendix 1 Analysis of the test substance and the metabolites by HPLC .....	38
Appendix 2 Analysis of the test substance and the metabolites by LC/MS (Positive ion mode) ..	39
Appendix 2 Figure 1 Mass spectrum of the metabolite (a) .....	40
Appendix 3 Analysis of the test substance and the metabolites by LC/MS (Negative ion mode)	41
Appendix 3 Figure 1 Mass spectrum of the metabolite (b) .....	42

## 要 約

### 1. 表題

微生物等による K-1672 の分解度試験

### 2. 試験内容

- (1) 試験方法：「新規化学物質等に係る試験の方法について」(平成 15 年 11 月 21 日、薬食発第 1121002 号、平成 15・11・13 製局第 2 号、環保企発第 031121002 号)の微生物等による化学物質の分解度試験、また、「OECD Test Guideline 301C・修正 MITI 試験(I)」において規定されている生分解性試験法
- (2) 実験期間：28 日間、2004 年 11 月 30 日～2004 年 12 月 28 日
- (3) 汚泥の種類：財団法人 化学物質評価研究機構より購入した標準活性汚泥
- (4) 被験物質濃度：100 mg/L
- (5) 汚泥の懸濁物質濃度：4992 mg/L
- (6) pH 調整：無し

### 3. 試験結果

方 法	分 解 度 (%)			
	培養瓶 No.2	培養瓶 No.3	培養瓶 No.4	平均値
酸素消費量による結果	3.8	0.3	0.6	1.6
高速液体クロマトグラフによる結果	40.7	33.2	32.2	35.4
全有機体炭素分析計による結果*	40.1	34.1	33.2	35.8

\*： 実験終了時における試験液中の溶存有機体炭素濃度から「消失率」を算出し、理論値(100%)に対する有機体物質残留率(%)として示した。

### 4. 結論

酸素消費量(BOD)から求めた分解度の平均値が 1.6%、高速液体クロマトグラフ(HPLC)による分解度の平均値が 35.4%であった。

HPLC クロマトグラムに分解生成物を確認したが、BOD による分解度が 1.6% (平均値)であった。

また、実験終了時の試験液には 35.8% (平均値)の溶存有機体炭素が残留しており、この結果と HPLC による分解度の 35.4% (平均値)と非常に一致していた。これより、被験物質の一部が水溶性の高い分解生成物であることが示唆された。

以上のことから、本被験物質及びその分解生成物は生分解を受けない物質であると考えられる。

## 1 表題

微生物等による K-1672 の分解度試験

## 2 試験番号

JCL048102

## 3 試験目的

「新規化学物質に係る試験並びに第一種監視化学物質及び第二種監視化学物質に係る有害性の調査の項目等を定める省令」(平成 15 年 11 月 21 日、厚生労働省、経済産業省、環境省令第 3 号) 第 2 条 1 項に基づき、微生物等による K-1672 の分解度試験を行い、K-1672 の生分解性の知見を得ることを目的とした。

## 4 試験法

「新規化学物質等に係る試験の方法について」(平成 15 年 11 月 21 日、薬食発第 1121002 号、平成 15・11・13 製局第 2 号、環保企発第 031121002 号)の微生物等による化学物質の分解度試験、また、「OECD Test Guideline 301C・修正 MITI 試験(I)」において規定されている生分解性試験法によった。

## 5 試験委託者

名称： 財団法人 化学物質評価研究機構

所在地： 〒839-0801 福岡県久留米市宮ノ陣三丁目2番7号

## 6 試験施設

名称： 株式会社日本医学臨床検査研究所 バイオアッセイ事業部 西脇ラボ

所在地： 〒677-0032 兵庫県西脇市中畑町 17-18

## 7 試験責任者の氏名及び所属

■■■■■■■■■■ (バイオアッセイ事業部 西脇ラボ)

## 8 試験担当者の氏名及び所属

物理・化学系試験担当者： ■■■■■■■■■■ (バイオアッセイ事業部 西脇ラボ)

生物系試験担当者： ■■■■■■■■■■ (バイオアッセイ事業部 西脇ラボ)

生物系試験担当者： ■■■■■■■■■■ (バイオアッセイ事業部 西脇ラボ)

## 9 試験期間

試験開始日

2004 年 11 月 11 日

分解度試験実験期間	自	2004 年 11 月 16 日
	至	2004 年 11 月 30 日
分解度試験再実験期間	自	2004 年 11 月 30 日
	至	2004 年 12 月 28 日
試験終了日		2005 年 2 月 21 日

試験日程表

日付	実施内容
2004.11.11	試験開始
2004.11.11～	被験物質の測定開始 ・被験物質の同定 ・被験物質の保管条件下での安定性確認 (実験開始前) ・高速液体クロマトグラフによる分析法検討
2004.11.15	閉鎖系酸素消費量測定装置作動
2004.11.16～	実験開始
2004.11.30	実験中止 (試験条件不成立のため)
2004.11.30	閉鎖系酸素消費量測定装置作動
2004.11.30～	再実験開始
2004.12.28	再実験終了 ・閉鎖系酸素消費量測定装置停止
2004.12.28～	・試験液の分析開始 ・被験物質の保管条件下での安定性確認 (実験終了後)
2005. 2. 2	最終報告書草案作成開始
2005. 2.16	最終報告書作成開始
2005. 2.21	最終報告書作成 試験終了

## 10 被験物質

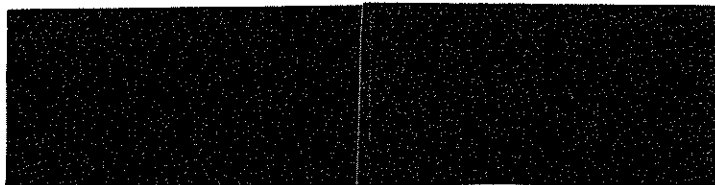
## 10.1 名称等

化学名： *N*-(3, 4, 5, 6-テトラヒドロフタルイミド)メチル-D, L-シス,  
 トランス-クリサンテメート  
 一般名： テトラメトリン  
 略称： K-1672  
 CAS No.： 7696-12-0

## 10.2 提供者及びロット番号

提供者：

ロット番号：

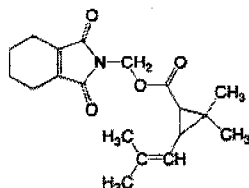


11868 (10 mg × 10 本)

上記の 3 ロット(合計 49 本)を一つに合わせて、1 ロットとして  
使用した。

### 10.3 構造式、分子式及び分子量

構造式：



分子式：  $C_{19}H_{25}NO_4$

分子量： 331.41

### 10.4 純度等

純度： 98.6% (測定値)

「K-1672 の純度測定試験(試験番号：JCL048127)」の測定結果を引用した。

不純物の名称及び含量： 不明物； 1.4%

### 10.5 物理化学的性状

外観： 無色結晶性粉末

融点：  $60 - 80^{\circ}\text{C}$

蒸気圧： 10Pa ( $20^{\circ}\text{C}$ )

密度：  $1.11 \text{ g/cm}^3$

溶解性： 水； 4.6 mg/L ( $30^{\circ}\text{C}$ )

メタノール； 53 g/kg

ヘキサン； 20 g/kg

### 10.6 同定

10.6.1 実験開始前に赤外吸収スペクトルにより、被験物質の同定を行った[チャートを Figure 1 (p.20)に示す]。

被験物質の赤外吸収スペクトルを測定したところ、 $\alpha$ ,  $\beta$ -不飽和ケトンの  $\text{C}=\text{O}$  伸縮振動による  $1725 - 1705 \text{ cm}^{-1}$  付近の吸収が見られた。

10.6.2 高速液体クロマトグラフィー質量分析計によりマスペクトルを測定し、被験物質の同定を行った[チャートを Figure 2 (p.20, 21)に示す]。

被験物質のマスペクトルを測定したところ、フラグメントイオンピーク  $m/z$  332  $[\text{M} + \text{H}]^+$  が得られた。

以上の結果から、被験物質は試験委託者提示資料の記載の物質と同一物質であると推定された。

## 10.7 被験物質の保管条件及び保管条件下での安定性確認

### 10.7.1 保管条件

冷蔵

### 10.7.2 保管条件下での安定性確認

実験開始前及び実験終了後に被験物質の赤外吸収スペクトルを測定し、被験物質の保管条件下での安定性を確認した。

赤外吸収スペクトルについて比較したところ、被験物質は  $1725 - 1705 \text{ cm}^{-1}$  付近の吸収を特徴として、全般的にほぼ同様のスペクトルが得られた[チャートを Figure 3 (p.22)に示す]。

以上の結果より被験物質は実験期間中保管条件下で安定であった。

## 11 対照物質

### 11.1 名称

IUPAC 名: Benzenamine

慣用名: アニリン(Aniline)点試験用

### 11.2 購入先及びロット番号

購入先: 和光純薬工業株式会社

ロット番号: ASH9804

## 12 活性汚泥の調製

### 12.1 標準活性汚泥の入手

2004 年 10 月 14 日に財団法人 化学物質評価研究機構より標準活性汚泥を購入した。

また、再実験用として 2004 年 11 月 25 日に財団法人 化学物質評価研究機構より標準活性汚泥を新たに購入した。

### 12.2 培養

12.1 の標準活性汚泥を活性汚泥自動培養装置により 23.5 時間曝気した。曝気を 30 分間止めたのち、全量の約 3 分の 1 の量 (約 330 mL) の上澄液を除去し、これと等量の 0.1% 合成下水(注 1)を加えて再び曝気した。

この操作を原則として毎日 1 回繰り返した。培養温度は、 $25 \pm 2^\circ\text{C}$  とした。

(注 1) 10% 合成下水原液(3.3 mL)と純水(330 mL)を添加して 0.1% 合成下水とした。10% 合成下水原液の調製は、グルコース、ペプトン、りん酸二水素カリウム各々 20 g を純水 150 mL に溶解し、水酸化ナトリウム水溶液で pH を  $7.0 \pm 1.0$  に調整した後、200 mL に定容して行った。

### 12.3 管理

培養段階での管理は次の項目を点検し、所要の調整を行った。

分解度試験実験開始日(2004 年 11 月 30 日)の測定結果を以下に示す。

- (1) 温度:  $25.1^\circ\text{C}$
- (2) 溶存酸素濃度:  $6.1 \text{ mg/L}$

- (3) 活性汚泥の沈殿率： 32%
- (4) pH： 7.6
- (5) 上澄液の外観： やや混濁
- (6) 懸濁物質濃度： 4992 mg/L
- (7) 活性汚泥の生物相： フロックは厚みがあり、凝集していた。後生動物はロタリア属、原生動物は主に繊毛虫類がみられ、糸状菌も存在していた。

## 13 主な試薬

試薬名	等級	メーカー
グルコース	JIS S	和光純薬工業
ペプトン	—	DIFCO LABORATORIES
りん酸二水素カリウム	JIS S	和光純薬工業
水酸化ナトリウム	JIS S	和光純薬工業
りん酸水素二カリウム	JIS S	和光純薬工業
りん酸水素二ナトリウム	JIS S	和光純薬工業
塩化アンモニウム	JIS S	和光純薬工業
硫酸マグネシウム	JIS S	和光純薬工業
塩化カルシウム	JIS S	和光純薬工業
塩化第二鉄	特級	和光純薬工業
フタル酸水素カリウム	JIS S	和光純薬工業
炭酸水素ナトリウム	JIS S	和光純薬工業
炭酸ナトリウム	JIS S	和光純薬工業
四塩化炭素	油分（赤外栓吸収）測定用	和光純薬工業
アセトニトリル	高速液体クロマトグラフ用	和光純薬工業
メタノール	高速液体クロマトグラフ用	和光純薬工業
酢酸アンモニウム	特級	和光純薬工業
超純水(以下「純水」と記す)	—	超純水製造装置により製造
酢酸アンモニウム	JIS S	和光純薬工業

## 14 主な機器・装置

機器・装置名	型式	メーカー
高速液体クロマトグラフ (以下「HPLC」と略す)	LC-10A システム (27 号機)	島津製作所
全有機体炭素計 (以下「TOC 計」と略す)	TOC-VCSH	島津製作所
高速液体クロマトグラフ— 質量分析計 (以下「LC/MS/MS」と略す)	TSQ システム-5	サーモエレクトロン

赤外分光光度計	FTIR-8400	島津製作所
活性汚泥自動定量培養装置	5560	宮本製作所
閉鎖系酸素消費量測定装置	OM-2001A (2 号機)	大倉電気
pH メーター	F-14 (1 号機)	堀場製作所
電子分析天秤	BP 110S	ザルトリウス
電子上皿天秤	L610	ザルトリウス
電子分析天秤	MC210P	ザルトリウス
ザルトリウスプリンタ	YDP 03-OCE (1 号機)	ザルトリウス
エッペンドルフピペット	4810	エッペンドルフ
エッペンドルフピペット	4910	エッペンドルフ
卓上型低温遠心機	H-103NR (1 号機)	KOKUSAN
超純水製造装置	MILLI-Q Elix システム (3 号機)	ミリポア

## 15 分解度試験の実施

### 15.1 試験の準備

15.1.1 活性汚泥の懸濁物質濃度を測定し、標準活性汚泥入手時の濃度の $\pm 1000$  mg/L 以内であることを確認した。

#### 15.1.2 基礎培養基の調製

JIS K0102-1998 の 21 で定められた A 液、B 液、C 液及び D 液それぞれ 6 mL に純水を加え 2.0 L とした。

#### 15.1.3 試験液の調製

次の培養瓶を準備し、これらを試験温度に調整した。

- (1) 純水 300 mL に被験物質 30.0 mg を添加した培養瓶：培養瓶 No.1 (純水 + 被験物質)
- (2) 基礎培養基 300 mL に被験物質 30.0 mg を添加した培養瓶：  
培養瓶 No.2, 3 及び 4 (汚泥 + 被験物質)
- (3) 基礎培養基 300 mL にアニリン 30.0 mg を添加した培養瓶：  
培養瓶 No.5 (汚泥 + 対照物質)
- (4) 基礎培養基 300 mL のみ対照空試験用の培養瓶：培養瓶 No.6 (汚泥)

### 15.2 活性汚泥の接種

培養瓶 No.2, 3, 4, 5 及び 6 の試験容器に、JIS K0102-1998 の 14.1 で定められた懸濁物質濃度が 30 mg/L になるように活性汚泥 1.804 mL を接種した。また、No.2, 3 及び 4 について、接種前に溶液の pH 調整は行わなかった。

なお、活性汚泥は合成下水を添加してから 21 時間 50 分後のものを使用した。

### 15.3 試験条件等

閉鎖系酸素消費量測定装置を用い  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  で十分攪拌しながら、28 日間培養し、酸素消費量の変化を経時的に測定した。実験終了後、残留する被験物質を分析に供

し、その量を測定した。

#### 15.4 観察・測定等

閉鎖系酸素消費量測定装置の作動状態、培養瓶内の色の変化、恒温槽内の温度を原則として毎日チェックし、7 及び 14 日目のアニリンの分解度を酸素消費量から算出した。また、実験開始前及び実験終了時に培養瓶内容物の pH を測定した。

分解度試験実験期間中における閉鎖系酸素消費量測定装置の恒温槽内の温度は  $24.3 - 25.7^{\circ}\text{C}$  と  $25.0 \pm 1.0^{\circ}\text{C}$  の範囲内に保たれており、装置は正常に作動していた。

対照物質を添加した培養瓶 No.5 において、実験開始後 3 日目頃より微生物の増殖による濁りを確認した。

pH の測定結果を Table 1(p.23)に示す。

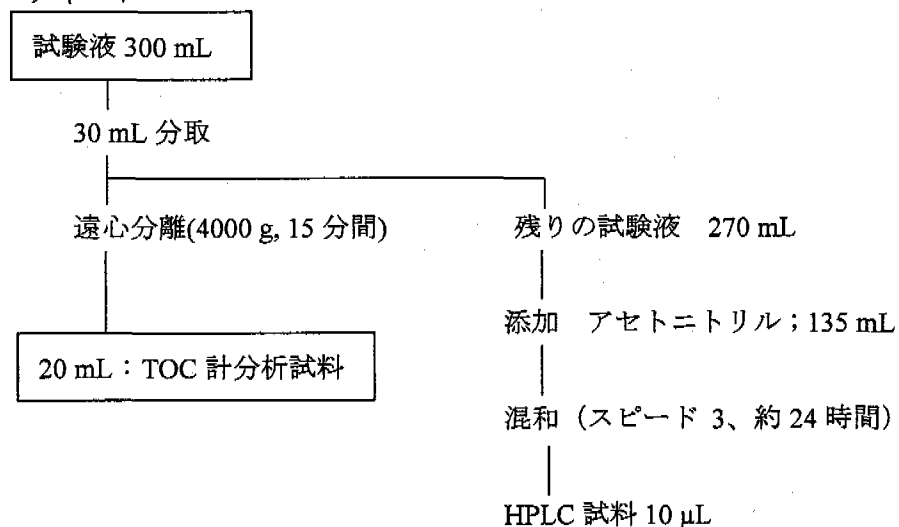
#### 15.5 試験液の分析(直接定量)

実験終了後、TOC 計及び HPLC により被験物質の分析を行った。

##### 15.5.1 試験液の前処理

実験終了後、閉鎖系酸素消費量測定装置内の培養瓶 No.1, 2, 3, 4 及び 6 の内容物を以下のフローチャートに従って前処理を行い、TOC 計及び HPLC 分析の分析試料とした。

前処理フローチャート



##### 15.5.2 TOC 計による溶存有機体炭素の分析方法

###### (1) 機器の分析条件

###### ・使用分析機器

TOC 計 : TOC-VCSH

###### ・測定条件

全炭素(以下「TC」と略す)燃焼管温度 :  $680^{\circ}\text{C}$

流量 :  $150 \text{ mL/min}$

試料注入量 :  $50 \mu\text{L}$

## (2) TC 及び IC 標準溶液の調製

「JIS K 0102-1998 の 22 有機体炭素(TOC)」に基づいて TC 標準溶液(0.1 mgC/mL)及び IC 標準溶液(0.1 mgC/mL)を調製した。

## (3) 検量線の作成

TC 及び IC について各々検量線を作成した。

検量線作成用試料は、TC, IC とも 100 mg/L(高濃度)と 0 mg/L(低濃度)の 2 濃度とし、ピーク面積により検量線を作成した。

## (4) 定量方法(濃度算出)

各分析試料について TC 及び IC 濃度を求め、次式により溶存有機体炭素(DOC)濃度を算出した。

$$TC - IC = DOC$$

## (5) 各分析試料について 3 回測定とし、理由がわからず他の値よりかけはなれた値がある場合は、再測定を行った。

## (6) 再測定を含む測定データに異常が見られなかったので、平均値より分解度を算出した。

## 15.5.3 HPLC による残留被験物質の分析方法

## (1) 機器の分析条件

## ・使用分析機器

高速液体クロマトグラフ：	LC-10A システム
ポンプ：	LC-10AD
システムコントローラー：	SCL-10A
オートサンプラー：	SIL-10A <sub>XL</sub>
カラムオープン：	CTO-10AC
検出器 (UV/VIS)：	SPD-10A
サンプルクーラー：	SAMPLE COOLER
データ処理装置：	C-R7A plus

## ・測定条件

分析カラム：	Inertsil ODS-3 (4.6 mm I.D.×250 mm) (GL サイエンス)
移動相：	アセトニトリル／20 mmol/L 酢酸アンモニウム水溶液 = 7 : 3 (v/v)
流速：	1.0 mL/min
カラム温度：	40°C
サンプル設定温度：	25°C
検出波長 (UV)：	230 nm
試料注入量：	10 µL

## (2) 被験物質標準溶液の調製

被験物質 6.0 mg を精秤してアセトニトリルで溶解させた後、25 mL に定容し、

240 mg/L 標準原液を調製した。この標準原液をアセトニトリルで希釈し、12, 48, 96, 144, 192 mg/L の標準溶液を調製した。各標準溶液 150  $\mu$ L を試験管に分取し、純水 300  $\mu$ L を加えて混和し、4, 16, 32, 48, 64, 80 mg/L の検量線作成試料を調製した。

(3) 測定試料の調製

15.5.1 試験液の前処理に従って調製された HPLC 試料を測定試料とした。

(4) 定量方法 (濃度算出)

本被験物質は cis 体と trans 体を含む物質であるため、二つのピークの合計値を定量に用いた。二つのピークの同定は保持時間により行い、定量は被験物質の合計ピーク面積による直接定量法によって行った。すなわち、合計ピーク面積値(y)と標準溶液濃度(x)との関係を用いて最小二乗法 (重み: 1/y) により検量線式を求めた。

$$y = ax + b$$

x: 標準溶液濃度  
y: 合計ピーク面積値  
a: 検量線の傾き  
b: y 軸切片

検量線式から被験物質濃度を算出する式:

濃度(mg/L) =  $1/a \times \text{合計ピーク面積値} - b/a \times [(270 + 135) / 270]$ を作成し、培養瓶中の被験物質濃度を求めた。

- (5) K-1672 標準溶液から調製した検量線作成試料の範囲 4 – 80 mg/L において、合計ピーク面積値より求めた併行精度(CV)は 0.2 – 0.6%と良好であり、合計ピーク面積値の平均値から求めた検量線式の直線性は  $r = 0.999699$  で良好な結果が得られた[Table 2 (p.23), Figure 4 (p.24)]。

以上の結果から、本分析条件は K-1672 濃度の測定方法として十分信頼できるものであると考えられた。

- (6) 各分析試料について 1 回測定とし、それより分解度を算出した。  
(7) 実験終了時の試験液に分解生成物のピークを確認したため、LC/MS/MS を用いて分解生成物の構造を類推した[Appendix 2, 3 (p.39 – 42)]。

## 16 分解度の算出方法

### 16.1 酸素消費量から分解度(%)を算出する方法

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

BOD: 被験物質の生物学的酸素消費量(測定値: mg)

B: 基礎培養基に活性汚泥を接種したものの酸素消費量(測定値: mg)

TOD: 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消費量

(計算値: mg)

## 16.2 残留有機体炭素から分解度(%)を算出する方法

$$\text{分解度}(\%) = [\text{DOCb} - (\text{DOCa} - \text{DOCd})] / \text{DOCb} \times 100$$

DOCa: 実験終了後の溶存有機体炭素残留量(測定値: mg)

DOCb: 純水に被験物質のみを添加した空試験における溶存有機体炭素残留量  
(測定値: mg)

DOCd: 基礎培養基に活性汚泥を接種したものの溶存有機体炭素残留量  
(測定値: mg)

## 16.3 HPLC 分析から分解度(%)を算出する方法

$$\text{分解度}(\%) = [(Sb - Sa) / Sb] \times 100$$

Sa: 実験終了後の被験物質の残留量(測定値: mg)

Sb: 純水に被験物質のみを添加した空試験における被験物質の残留量  
(測定値: mg)

## 17 数値の取扱い

## 17.1 数値の記載

分解度は小数点以下2桁目を丸めて1桁まで記載した。

## 17.2 数値の丸め方

JIS Z8401 で定められた方法に準じた(規則 B: 四捨五入)。

## 18 試験条件の成立基準

18.1 酸素消費量から求めた培養瓶 No.5(アニリン)の分解度が7日後に40%以上、14日後に65%以上の場合は、この試験は有効とする。

18.2 実験終了時における被験物質の分解度の最大値と最小値の差が20%未満である場合は、この試験は有効とする。

## 19 良分解性の判定基準

19.1 3つの試験容器のうち2つ以上でBODによる分解度が60%以上であり、かつ3つの平均が60%以上であること。

19.2 19.1にあわせて、HPLC等による直接分析法により分解生成物が生成していないことが確認されること。

## 20 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

本試験において実験を2回実施した。

1回目の実験(2004.11.16~2004.11.30)では14日目の対照物質(アニリン)の分解性が59.6%で、基準である65%以上とならなかったため、試験を無効とした。

新たに受け入れた標準活性汚泥(2004.11.25)を用いて2回目の実験(2004.11.30~

2004.12.28)を実施したところ、14 日目の対照物質 (アニリン) の分解性が 70.0%となり、基準値を満たしていた。

これより、2 回目実施した試験を採用したことから、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はないと判断した。

## 21 試験結果

### 21.1 結果の要約

方 法	分 解 度 (%)			
	培養瓶 No.2	培養瓶 No.3	培養瓶 No.4	平均値
酸素消費量による結果	3.8	0.3	0.6	1.6
高速液体クロマトグラフによる結果	40.7	33.2	32.2	35.4
全有機体炭素分析計による結果*	40.1	34.1	33.2	35.8

\*: 実験終了時における試験液中の溶存有機体炭素濃度から「消失率」を算出し、理論値(100%)に対する有機体物質残留率(%)として示した。

### 21.2 試験条件の確認

酸素消費量(BOD)から求めた分解度の平均値が 1.6%、高速液体クロマトグラフ (HPLC) による分解度の平均値が 35.4%であった。

酸素消費量から求めた培養瓶 No.5 のアニリンの分解度が 7 日後に 64.9%、14 日後 70.0%であった。また、酸素消費量及び高速液体クロマトグラフによる分解度は最大値と最小値の差が 20%未満であった。

これらの結果から、本試験は試験条件を満たしていることを確認した。

### 21.3 試験計画書に従わなかったこと

実験終了後、試験液中に残留する分解生成物を確認するため、HPLC 条件を変更し測定を行った[詳細は Appendix 1 (p.38)を参照]。また、これらの分解生成物を推定するため、LC/MS/MS を用いてマススペクトルの測定を行った[詳細は Appendix 2, 3 (p.39 - 42)を参照]。

### 21.4 考察及び結論

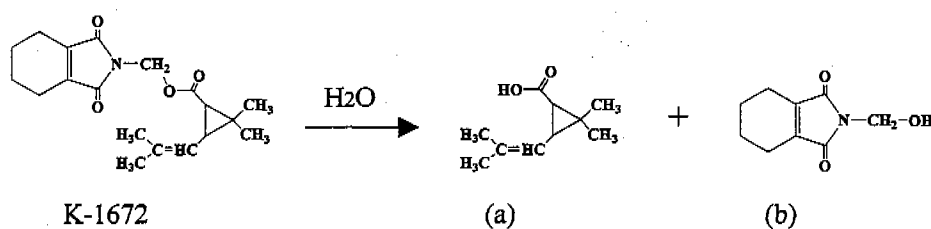
- (1) 実験終了時に HPLC を用いて被験物質を測定したところ、添加した被験物質の理論値に対して 32.2 - 40.7%が消失していた。また、同時に HPLC クロマトグラムに分解生成物と思われるピークを確認した[Figure 8 (p.36)]。BOD による分解度が 1.6% (平均値)であったことから、水中における化学変化により生成された物質であると推察した。
- (2) HPLC 条件を変更し残留物質の分離及び検出されたピークの合計面積値を算出したところ、試験系 (汚泥 + 被験物質)で 84.3 - 96.0%となった[Table 8 (p.35)]。これより、被験物質が分解物として残留していると考えられた[Figure 9 (p.37), Appendix 1 (p.38)]。

(3) 実験終了時の試験液には溶存有機体炭素（物質）として 35.8% (平均値) が残留しており、HPLC による分解度の 35.4% (平均値) とよく一致していた。これより、被験物質の一部が水溶性の高い分解生成物となり、試験液に残留していることが示唆された [Table 6 (p.32)]。

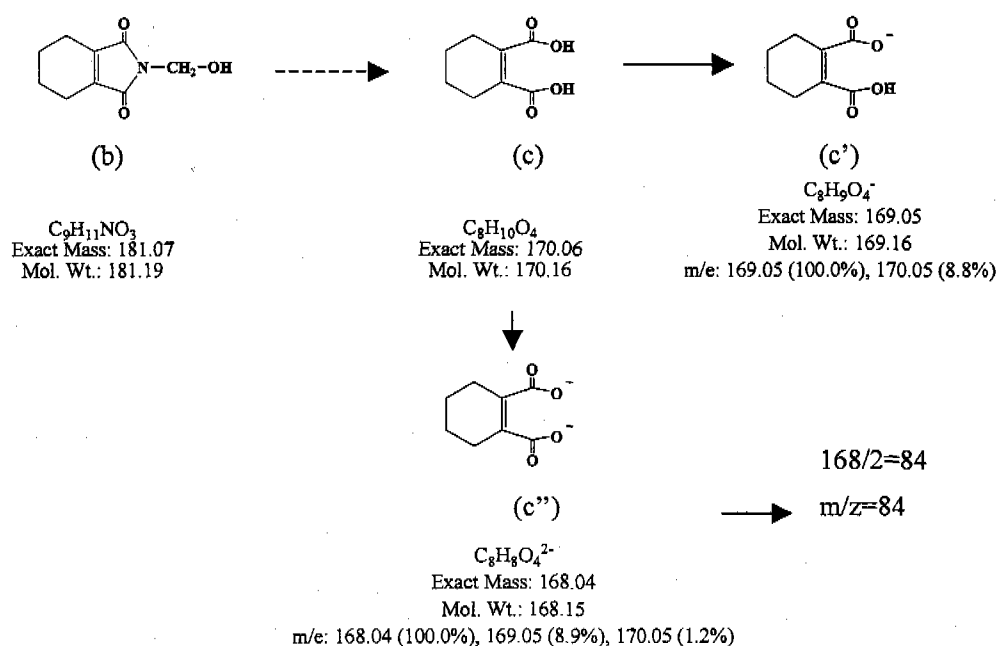
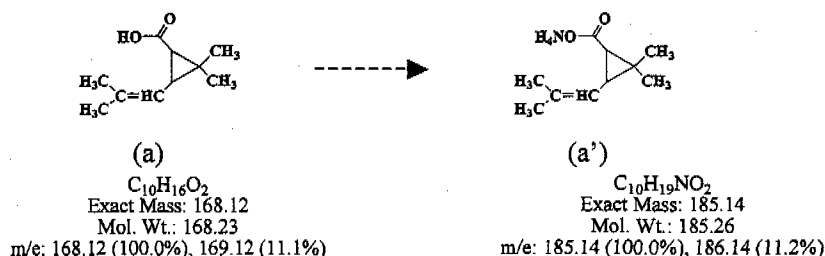
(4) 被験物質の予想分解生成物(a)及び(b)を以下に示した。

これらの予想分解生成物をターゲットとして、LC/MS/MS を用いて分解生成物のマススペクトルを測定し、予想していた分解生成物のマススペクトルが得られた [Appendix 2, 3 (p.39 – 42)]。また、LC 条件が異なるため溶出順序が逆転したが、分解生成物(a)の cis 体と trans 体が存在していることも確認した。

i) 加水分解により生成される予想分解生成物



ii) 予想分解生成物のイオン化物質



- (5) 本被験物質は水中で加水分解を受けて、分解生成物(a)及び(b)となるが、いずれの物質も生分解を受けない物質であると考えられる。

## 21.5 測定結果

- (1) BOD による測定結果を Table 3, 4 (p.25 – 28)及び Figure 5 (p.29)に示す。
- (2) TOC による残留有機体炭素の測定結果を Table 5, 6 (p.31, 32)及び Figure 6 (p.30)に示す。
- (3) HPLC による残留被験物質の測定結果を Table 7 (p.34)及び Figure 7 (p.33)に示す。  
また、その分析チャートを Figure 8 (p.36)に示す。
- (4) HPLC による合計ピーク面積の結果を Table 8 (p.35)に示す。  
また、その分析チャートを Figure 9 (p.37)に示す。
- (5) 被験物質の同定に用いた LC/MS の分析条件及び分析結果を Appendix 2 (p.39)及び Appendix 3 (p.41)に示す。また、そのスペクトルを Appendix 2 Figure 1 (p.40)及び Appendix 3 Figure 1 (p.42)に示す。

## 22 試資料の保管

記録及び試資料の保管は、「新規化学物質に係る試験並びに第一種監視化学物質及び第二種監視化学物質に係る有害性の調査の項目等を定める省令」第4条並びに「第三種監視化学物質に係る有害性の調査の項目等を定める省令」第2条に規定する「新規化学物質等に係る試験を実施する試験施設に関する基準」第11章に準じ、当該試験施設の試資料保管施設にて、次に掲げる期間保管するものとする。

但し、当該試験施設が業務を停止し、かつ、法的な継承者を持たない場合は、その試資料は当該試験の委託者である財団法人 化学物質評価研究機構の保管施設に移管されるものとする。

### 22.1 生データ、資料等

生データ、資料等について「化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律」(昭和48年法律第117号。以下「化審法」という)第4条第1項若しくは第2項、第4条の2第2項、第3項若しくは第8項、第5条の4第2項、第24条第2項又は第25条の3第2項の規定による通知を受けた後10年間とする。

- ・主計画表
- ・試験計画書、生データ及び最終報告書
- ・信頼性保証部門によって実施された監査又は査察の記録
- ・職員の資格、訓練、経験及び職務分掌の記録
- ・機器類の保守点検及び校正の記録及び報告書
- ・コンピュータ化されたシステムの有効性確認の記録
- ・全標準操作手順書の経時的ファイル
- ・環境モニター記録

## 22.2 被験物質、対照物質その他の試料

被験物質、対照物質その他の試料及び標本については、「化審法」第4条第1項若しくは第2項、第4条の2第2項、第3項若しくは第8項、第5条の4第2項、第24条第2項又は第25条の3第2項の規定による通知を受けた後10年間又は品質低下をおこさないで安定に保存しうる期間のいずれか短い方の期間とする。

## 23 最終報告書の訂正

最終報告書を訂正する場合には、試験責任者は訂正の事項、理由及び内容を「最終報告書訂正書」(様式.16)に明記し、試験委託者に提出する。また、その写しを信頼性保証部門担当者に提出する。「最終報告書訂正書」(様式.16)は当該試験施設及び試験委託者において最終報告書とともに保管される。

## 24 GLP 基準への適合

本試験は「新規化学物質に係る試験を実施する試験施設に関する基準について」(薬食発第1121003号、平成15・11・17製局第3号、環保企発第031121004号、平成15年11月21日)に基づいて実施されたものである。

## 25 最終報告書の承認

2005年1月21日

試験責任者 〃

信頼性保証証明書

(最終報告書)

本最終報告書が、試験計画書及び標準操作手順書に従って実施され、  
得られた試験の生データを正確に反映していることを保証致します。

試験の種類 : 化学物質 GLP (分解度試験)  
 試験委託者 : 財団法人 化学物質評価研究機構  
 試験施設 : 株式会社日本医学臨床検査研究所 バイオアッセイ事業部 西脇ラボ  
 試験表題 : 微生物等による K-1672 の分解度試験  
 試験番号 : JCL048102  
 試験責任者 : XXXXXXXXXX  
 試験期間 : 2004年11月11日 ~ 2005年2月21日

監査及び査察対象	監査及び査察日		報告日
	運営管理者		試験責任者
試験計画書	: 2004 年 11 月 11 日	2004 年 11 月 11 日	2004 年 11 月 11 日
試験計画書変更書-1	: 2004 年 11 月 15 日	2004 年 11 月 15 日	2004 年 11 月 15 日
試験計画書変更書-2	: 2004 年 11 月 30 日	2004 年 11 月 30 日	2004 年 11 月 30 日
試験計画書変更書-3	: 2005 年 1 月 12 日	2005 年 1 月 12 日	2005 年 1 月 12 日
試験計画書変更書-4	: 2005 年 2 月 10 日	2005 年 2 月 10 日	2005 年 2 月 10 日
試験計画書変更書-5	: 2005 年 2 月 17 日	2005 年 2 月 17 日	2005 年 2 月 17 日
分解度試験実験開始日	: 2004 年 11 月 16 日	2004 年 11 月 16 日	2004 年 11 月 16 日
分解度試験再実験開始日	: 2004 年 11 月 30 日	2004 年 11 月 30 日	2004 年 11 月 30 日
分解度試験再実験終了日	: 2004 年 12 月 28 日	2004 年 12 月 28 日	2004 年 12 月 28 日
瓶内容物の分析	: 2004 年 12 月 28 日	2004 年 12 月 28 日	2004 年 12 月 28 日
最終報告書草案	: 2005 年 2 月 16 日	2005 年 2 月 16 日	2005 年 2 月 16 日
最終報告書草案(再監査)	: 2005 年 2 月 17 日	2005 年 2 月 17 日	2005 年 2 月 17 日
最終報告書	: 2005 年 2 月 21 日	2005 年 2 月 21 日	2005 年 2 月 21 日

株式会社日本医学臨床検査研究所  
 バイオアッセイ事業部

2005 年 2 月 21 日

信頼性保証部門責任者: XXXXXXXXXX

## 複 写 証 明 書

株式会社日本医学臨床検査研究所  
バイオアッセイ事業部 西脇ラボ

試験表題 : 微生物等による K-1672 の分解度試験

試験番号 : JCL048102

試験責任者 : 

試験委託者 : 財団法人 化学物質評価研究機構  
〒839-0801 福岡県久留米市宮ノ陣三丁目2番7号

これは、上記試験の最終報告書(正本)から正確に  
複写されたものであることを証明します。

2005年 2月21日

運営管理者 : 