

環境庁殿

試 験 報 告 書

3, 5, 5-トリメチル-2-シクロヘキセン-1-オンのヒメダカ (*Oryzias latipes*) に対する急性毒性
試験

(試験番号：NMMP／E97／4060)

平成 9年 6月30日作成

株式会社東レリサーチセンター

陳 述 書

株式会社東レリサーチセンター
名古屋研究部

試験委託者 : 環境庁

表題 : 3,5,5-トリメチル-2-シクロヘキセン-1-オンのヒメダカ (*Oryzias latipes*) に対する急性毒性試験

試験番号 : NMMP/E97/4060

上記試験は環境庁のGLP規則に従って実施したものである。

平成 9 年 6 月 30 日

運営管理者

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

信 頼 性 保 証 証 明

株式会社東レリサーチセンター
名古屋研究部

試験委託者 : 環境庁

表題 : 3,5,5-トリメチル-2-シクロヘキセン-1-オンのヒメダカ (*Oryzias latipes*) に対する急性毒性試験

試験番号 : NMMP/E97/4060

本試験は試験計画書および標準操作手順書に従って実施され、本報告書には試験に使用した方法、手順が正確に記載されており、試験結果は生データを正確に反映していることを下記の通り確認した。

記

実施日

運営管理者および
試験責任者への報告日

試験実施状況査察 平成 9 年 2 月 6 日

平成 9 年 2 月 27 日

試験報告書監査 平成 9 年 6 月 18 日


平成 9 年 6 月 30 日

平成 9 年 6 月 30 日

信頼性保証担当者 :



試験実施概要

1. 表題 : 3,5,5-トリメチル-2-シクロヘキセン-1-オンのヒメダカ (*Oryzias latipes*) に対する急性毒性試験
2. 試験目的 : 3,5,5-トリメチル-2-シクロヘキセン-1-オンについて、ヒメダカ (*Oryzias latipes*) に対する急性毒性試験を行い、半数致死濃度 (LC50) を求める。
3. 適用ガイドライン : 本試験は、OECD 化学品テストガイドライン No. 203 「魚類毒性試験」 (1992 年) に準拠した。
4. 適用 G L P : 本試験は環境庁の G L P 規則に準拠した。
5. 試験委託者
名称 : 環境庁
住所 : (〒100) 東京都千代田区霞が関 1-2-2
委託担当者 : 企画調整局環境保健部環境安全課 保健専門官 
6. 試験受託者 :
名称 : 株式会社東レリサーチセンター
所在地 : (〒103) 東京都千代田区日本橋室町 3-1-8 都ビル内
7. 試験施設 :
名称 : 株式会社東レリサーチセンター 名古屋研究部
所在地 : (〒455) 愛知県名古屋市港区大江町 9-1

8. 試験関係者：

試験責任者	[redacted]	[redacted]	(平成 9 年 6 月 30 日)
試験担当者	[redacted]	[redacted]	(平成 9 年 6 月 30 日)
試験担当者	[redacted]	[redacted]	(平成 9 年 6 月 30 日)
試験担当者	[redacted]	[redacted]	(平成 9 年 6 月 30 日)
試験担当者	[redacted]	[redacted]	(平成 9 年 6 月 30 日)
試験担当者	[redacted]	[redacted]	(平成 9 年 6 月 30 日)
試験担当者	[redacted]	[redacted]	(平成 9 年 6 月 30 日)
試験担当者	[redacted]	[redacted]	(平成 9 年 6 月 30 日)
試験担当者	[redacted]	[redacted]	(平成 9 年 6 月 30 日)

9. 試験期間：

試験開始日 平成 9 年 2 月 4 日

曝露期間 平成 9 年 2 月 6 日 ～ 平成 9 年 2 月 10 日

試験終了日 平成 9 年 6 月 30 日

10. 保管：

試験計画書、生データ、記録文書および試験報告書は、試験報告書作成後 10 年間、名古屋研究部の保管施設に保管する。その後の保管については試験委託者と協議のうえ決定する。

目 次

要 旨	7
1 被験物質	8
1.1 名称、構造式および物理化学的性状	8
1.2 供試試料	8
1.3 保管方法及び保管条件下の安定性の確認	8
2 供試生物	10
3 試験方法	10
3.1 試験条件	10
3.2 希釈水	11
3.3 試験容器および恒温槽等	11
3.4 試験濃度の設定	11
3.5 試験液の調製	11
3.6 試験液の分析	12
3.7 試験操作	12
4 結果の算出	12
5 結果および考察	13
5.1 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	13
5.2 試験水中の被験物質濃度	13
5.3 半数致死濃度 (LC50)	13
5.4 0%死亡最高濃度および 100%死亡最低濃度	13
5.5 毒性症状	13
5.6 試験水の水温、溶存酸素濃度および pH	13
Table 1～8	14～20

付属資料－1 希釈水の水質

付属資料－2 試験液の分析方法

要 旨

試験委託者

環境庁

表 題

3,5,5-トリメチル-2-シクロヘキセン-1-オンのヒメダカ (*Oryzias latipes*) に対する急性毒性試験

試験番号

NMMP/E 9 7 / 4 0 6 0

試験方法

本試験は、OECD 化学品テストガイドライン No. 203「魚類毒性試験」(1992年)に準拠して実施した。

被験物質 : 3,5,5-トリメチル-2-シクロヘキセン-1-オン

方式 : 半止水式(48時間換水)

供試生物 : ヒメダカ (*Oryzias latipes*)

試験濃度 : 対照区および100.0 mg/L

曝露期間 : 96 時間

試験液量 : 3.0L

生物数 : 10 尾/濃度区

照明 : 室内光、16 時間明/8 時間暗

エアレーション : なし

温度 : 24±1℃

結 果

試験の結果、3,5,5-トリメチル-2-シクロヘキセン-1-オンの設定濃度に基づく 96 時間の半数致死濃度 (LC50) は 100mg/L 以上であった。

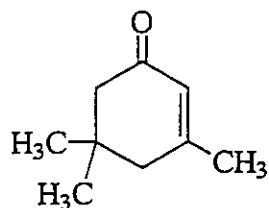
1 被験物質

1.1 名称、構造式および物理化学的性状

名 称 : 3,5,5-トリメチル-2-シクロヘキセン-1-オン

識別符号 : I P

構造式 :



分子式 : $C_9H_{14}O$

分子量 : 138.21

1-オクタノール／水分配係数 (log P) : 1.70

水溶性 : 12000 ppm (20℃)

融点 : -8.10℃

沸点 : 214.0～215.2℃

水への溶解度 : 微溶 (1.2%/20℃)

蒸気圧 (mmHg) : 0.380～1.000 (20.0～38.0℃)

生化学的性質 : 濃縮性なし～低い

(上記の数値はMSDSから引用した)

1.2 供試試料

購入先 : XXXXXXXXXX

入手先 : XXXXXXXXXX

入手日 : 平成8年12月26日

ロット番号 : FGD 01

供給量 : 500ml

外観 : 無色透明 液体

純度 : 97.0%以上

1.3 保管方法及び保管条件下の安定性の確認

1) 保管方法

被験物質は試料保管庫に室温で光を遮断して保管した。

2) 被験物質の確認及び保管条件下の安定性

入手した被験物質について赤外吸収スペクトル測定、NMRスペクトル測定および高速液体クロマトグラフ分析を行い、被験物質の構造と矛盾が認められないことおよび純度を確認した。

試験終了時にも同様に測定・分析し、試験開始前に測定したスペクトルおよび高速液体クロマトグラムと比較した結果、変化は無かった。

従って、被験物質は当研究部の試料保管庫に保管中は安定であったと判断された。

2 供試生物

試験に使用したヒメダカ (*Oryzias latipes*) を下記に示した。供試魚の体長 (被鱗体長) は 2.0 ± 0.5 cm であった。

- 1) 一般名 : ヒメダカ
- 2) 学名 : *Oryzias latipes*
- 3) 体長 : 1.83 cm (1.62~2.14cm)、n=10
- 4) 体重 : 0.0915 g (0.0615~0.1565g)、n=10
- 5) ロット番号 : M961205
- 6) 購入先 : 六乙養魚場
- 7) 購入日 : 平成8年12月5日

馴化

試験条件と同条件下 (水質、温度等) で 14日間、馴化した。餌は市販のテトラミンを与えた。暴露開始の 24 時間前からは給餌しなかった。試験には健康で肉眼的に正常な個体を使用した。暴露開始前 7 日間の死亡率は 0% であった。また、供試魚の基準物質 (硫酸銅 (Ⅱ) 五水和物、試薬特級) による急性毒性試験の結果、96 時間 LC50 は 0.26mg/L であった。

3 試験方法

3.1 試験条件

- 1) 方式 : 半止水式 (48時間換水)
- 2) 温度 : $24 \pm 1^\circ\text{C}$
- 3) 曝露期間 : 96 時間
- 4) 生物数 : 10 尾/濃度区
- 5) 試験液量 : 3.0L
- 6) 連数 : 1 濃度区につき 1 連
- 7) 給餌 : なし
- 8) エアレーション : なし
- 9) 照明 : 室内光、16 時間明/8 時間暗

3.2 希釈水

名古屋市水道水を活性炭に通し脱塩素して用いた。

希釈水の主な水質として、硬度が 21.8mg/L (CaCO₃換算)、pHが6.8であった。

[付属資料－1 (p. 21)]

3.3 試験容器および恒温槽等

試験容器 : 3L容ガラスビーカー

恒温槽 : 水槽、恒温水循環装置 クールライン (ヤマト科学 CL100型)

水温計 : クールラインおよびpHメーター内蔵温度計

pH計 : pHメーター (堀場製作所 カスタニーLAB pHメーターF-22)

溶存酸素計 : DO METER (東亜電波 DO-14P)

3.4 試験濃度の設定

予備試験の結果、96時間半数致死濃度 (LC50) は100mg/L以上、0%死亡最高濃度および100%死亡最低濃度についても100 mg/L以上であった。この結果を参考にして、本試験では100mg/L だけの限度試験とした。

3.5 試験液の調製

- 1) 被験物質 0.1wt%水溶液を希釈水に添加し、設定濃度の試験液を必要量調製した。
- 2) 希釈水のための対照区を設けた。
- 3) 試験液の状態 (外観等) を観察した。無色透明で沈殿等はみられなかった。

3.6 試験液の分析

試験開始時および48時間後に各試験水槽より試験水1.0mLを採取し、高速液体クロマトグラフ分析した。試験水の分析に際しては、試料測定日毎に標準溶液（濃度10.0, 50.0, 100.0 mg/L）の測定を行い、検量係数を求めて被験物質濃度を測定した。

詳細は付属資料－2 (p. 23)に示した。

3.7 試験操作

暴露開始時に供試魚と同水槽で馴養した魚10尾の重量および被鱗体長を測定した。暴露期間中給餌は行わなかった。

各試験水槽の試験液のpH、溶存酸素濃度、水温を測定後、試験水槽中に供試魚を1濃度区当り10尾投入した。pH、溶存酸素濃度、水温は暴露期間中毎日1回測定した。

暴露開始後、24、48、72及び96時間後に死亡個体数を記録するとともに観察された毒性の徴候或いは異常を記録した。記載する症例と定義は下記*に従った。その他特異的症例（背曲がり、出血、体色変化、粘液の分泌等）については観察された場合に別途具体的に記載する。死亡個体を発見した場合、水質の悪化が起こらないよう速やかに取り除く。

*一般的症例と定義

死亡：刺激を与えた場合に反応の認められないもの。

異常呼吸：対照区の魚と比較して鰓蓋の動きが異なるもの。

異常遊泳：明らかに対照区の魚と異なる遊泳をしたもの。動作の緩慢、過敏、痙攣、反転等

遊泳不能：底部または水面で動いてはいるものの、水中を遊泳することが不可能なもの。横転、仮死を含む。

4 結果の算出

限度試験のため、死亡率が50%未満であることを確認し、96時間半数致死濃度（LC50）は試験区の濃度以上とした。

5 結果および考察

5.1 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

試験成績の信頼性に影響を及ぼした要因は、無かった。

5.2 試験水中の被験物質濃度

試験開始時および48時間後に試験水中の被験物質濃度を測定した。試験開始時から48時間後の暴露試験液中の被験物質の濃度は95.2～97.4mg/Lであった。設定濃度に対する実測濃度の割合は 95.2～97.4%であった。

実測濃度が設定濃度の±20%以内であったので試験結果はすべて設定濃度で表した。

[Table 1(p.14), 付属資料-2 (P.23)]

5.3 半数致死濃度 (LC50)

3,5,5-トリメチル-2-シクロヘキセン-1-オンに96時間暴露したヒメダカの死亡率は100.0mg/Lの濃度区で 0%であった。対照区の死亡率は 0%であった。

3,5,5-トリメチル-2-シクロヘキセン-1-オンの測定濃度に基づく 96 時間の半数致死濃度 (LC50) は 100mg/L 以上であった。

[Table 2 (p.15), Table 3 (p.16)]

5.4 0%死亡最高濃度および100%死亡最低濃度

3,5,5-トリメチル-2-シクロヘキセン-1-オンに96時間暴露したヒメダカの 0%死亡最高濃度は 100mg/L以上であり、100%死亡最低濃度も 100mg/L以上であった。

[Table 4(p.16)]

5.5 毒性症状

対照区および100mg/Lの濃度区ともに試験期間中に異常な症状は観察されなかった。

[Table 5(p.17)]

5.6 試験水の水温、溶存酸素濃度およびpH

試験期間中のpHは6.3～6.7であった。試験期間中の溶存酸素濃度は5.60～10.7mg/Lであり、すべての試験水槽で飽和溶存酸素濃度（24.0℃の飽和溶存酸素濃度：8.25mg/L）の60%以上であった。

96時間の試験期間中の水温は23.5～23.7℃ であった。

[Table 6(p.18)] [Table 7(p.19)] [Table 8(p.20)]

以上

Table 1. Measured Concentrations of 3,5,5-Trimethyl-2-cyclohexen-1-one During a 96-Hour Exposure of Orange killifish (*Oryzias latipes*) under Semi-Static Test Conditions

Nominal Concentration (mg/L)	Measured concentration (mg/L)			Percent of Nominal	
	0 Hour new	48 Hour old	Geometric Mean	0 Hour new	48 Hour old
Control	<0.05	<0.05	----	----	----
100	97.4	95.2	96.3	97.4	95.2

new: freshly prepared test solutions

old: test solutions after 48 hours exposure period

Table 2. Mortality of Orange killifish (*Oryzias latipes*) Exposed to 3,5,5-Trimethyl-2-cyclohexen-1-one under Semi-Static Test Conditions

Nominal Concentration	Cumulative Number of Dead (Percent Mortality)				
	(mg/L)	24 Hour	48 Hour	72 Hour	96 Hour
Control		0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
100		0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)

Table 3. Calculated LC50 Values for Orange killifish (*Oryzias latipes*) Exposed to 3,5,5-Trimethyl-2-cyclohexen-1-one Based on Nominal Concentrations under Semi-Static Test Conditions

Exposure Period (Hour)	LC50 (mg/L)	95-Percent Confidence Limits (mg/L)	Statistical method
24	>100	—	—
48	>100	—	—
72	>100	—	—
96	>100	—	—

Table 4. Observation of Highest Concentration in 0 % Mortality and Lowest Concentration in 100% Mortality Values

Exposure Period (Hour)	Highest Concentration* in 0% Mortality (mg/L)	Lowest Concentration* in 100% Mortality (mg/L)
24	>100	>100
48	>100	>100
72	>100	>100
96	>100	>100

Table 5. Symptoms of Toxicity Observed in Orange killifish (*Oryzias latipes*) Exposed to 3,5,5-Trimethyl-2-cyclohexen-1-one under Semi-Static Test Conditions

Nominal Concentration (mg/L)	Symptoms			
	24 Hour	48 Hour	72 Hour	96 Hour
Control	0	0	0	0
100	0	0	0	0

0 : normal
 B : abnormal respiration
 C : abnormal swimming behaviour
 D : loss of equilibrium or swimming ability
 E : other symptoms
 (n) : number of fish

Table 6. pH Values During a 96-Hour Semi-Static Exposure of Orange killifish (*Oryzias latipes*) to 3,5,5-Trimethyl-2-cyclohexen-1-one

Nominal Concentration		pH				
(mg/L)		0 Hour	24 Hour	48 Hour	72 Hour	96 Hour
Control	new	6.6	----	6.7	----	----
	old	----	6.3	6.7	6.5	6.5
100	new	6.6	----	6.7	----	----
	old	----	6.4	6.7	6.6	6.6

new: freshly prepared test solutions

old: test solutions after 24 or 48 hours exposure period

Table 7. Dissolved Oxygen Concentrations During a 96-Hour Semi-Static Exposure of Orange killifish (*Oryzias latipes*) to 3,5,5-Trimethyl-2-cyclohexen-1-one

Nominal Concentration		Dissolved Oxygen Concentration(mg/L)				
(mg/L)		0 Hour	24 Hour	48 Hour	72 Hour	96 Hour
Control	new	10.6	----	10.7	----	----
	old	----	6.26	5.60	7.10	5.99
100	new	10.5	----	10.4	----	----
	old	----	6.67	5.83	7.15	5.96

new: freshly prepared test solutions

old: test solutions after 24 or 48 hours exposure period

Table 8. Temperature Values During a 96-Hour Semi-Static Exposure of Orange killifish (*Oryzias latipes*) to 3,5,5-Trimethyl-2-cyclohexen-1-one

Nominal Concentration		Temperature(°C)				
(mg/L)		0 Hour	24 Hour	48 Hour	72 Hour	96 Hour
Control	new	23.5	----	23.5	----	----
	old	----	23.6	23.6	23.7	23.7
100	new	23.5	----	23.6	----	----
	old	----	23.5	23.6	23.7	23.7

new: freshly prepared test solutions

old: test solutions after 24 or 48 hours exposure period

付属資料－ 1

希釈水の水質

(全 1 頁)

Water Quality of Dilution Water

Parameter	Concentration
BOD	<0.5 mg/L
COD	0.9 mg/L
pH	6.8
Coliform group bacteria	N.D.
Mercury	<0.00005 mg/L
Copper	0.001 mg/L
Cadmium	<0.005 mg/L
Zinc	0.006 mg/L
Lead	<0.005 mg/L
Chromium	<0.005 mg/L
Iron	<0.01 mg/L
Free chlorine	<0.05 mg/L
Fluoride	<0.02 mg/L
Ammonium ion	<0.1 mg/L
Arsenic	<0.005 mg/L
Evaporation residue	65.5 mg/L
Electric conductivity	8.41 mS/m
Total hardness (as CaCO ₃)	21.8 mg/L
Alkalinity	18.3 mg/L
Total organophosphorus compounds	<0.001 mg/L
Simazin	<0.0003 mg/L
Herbicide Thiobencarb	<0.002 mg/L
Fungicide Thiuram	<0.0006 mg/L

付属資料－ 2

試験液の分析方法
(全5頁)

試験液の分析方法

1 試験液の分析方法

各試験水槽より試験水 0.5～1.5 mL をバイアル瓶に採取する。

採取した試験液の設定濃度が100 mg/Lを越える場合は100 mg/L以下に希釈した。

HPLCのオートサンプラーにセットして一定量を自動注入する。

検量線から被験物質濃度を求める。

2 高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 測定条件

カラム : C18 5 μ m ϕ 、4.6 mm ϕ \times 150 mm

カラム温度 : 40℃

注入量 : 20 μ L

移動相 : A ; 水/アセトニトリル/酢酸=84.5/15/0.5

B ; 水/アセトニトリル/酢酸=9.5/90/0.5

A/B=50/50

流量 : 1.0 mL/min

検出波長 : 235 nm

3 検量線

標準原液を希釈して、定量限界付近から予想測定濃度が含まれる5ポイントの標準液を測定し、直線性を確認した。 [Figure 1(p.25)]

測定日毎に標準溶液 (3ポイント以上) の測定を行い、この検量線により定量した。

4 添加回収試験

希釈水に標準原液もしくはこれを希釈して調製した標準液の一定量を添加して回収率を求めた。

3,5,5-トリメチル-2-シクロヘキセン-1-オン 10.0mg/Lの回収率は97.3%、25.0mg/Lの回収率は96.0%であった。

Figure 1 Calibration Curve of 3,5,5-Trimethyl-2-cyclohexen-1-one by HPLC Analysis

Input Data

No.	Concentration (mg/L)	Peak Area (mAU·sec)
1	0.10	12.0082
2	1.00	96.8077
3	10.0	926.5043
4	50.0	4538.8555
5	100.0	9044.6846

$$Y (\text{Peak Area}) = 8.73399 + 90.41872 X (\text{Concentration})$$

$$r^2 = 1.0000$$

r^2 : Coefficient of correlation

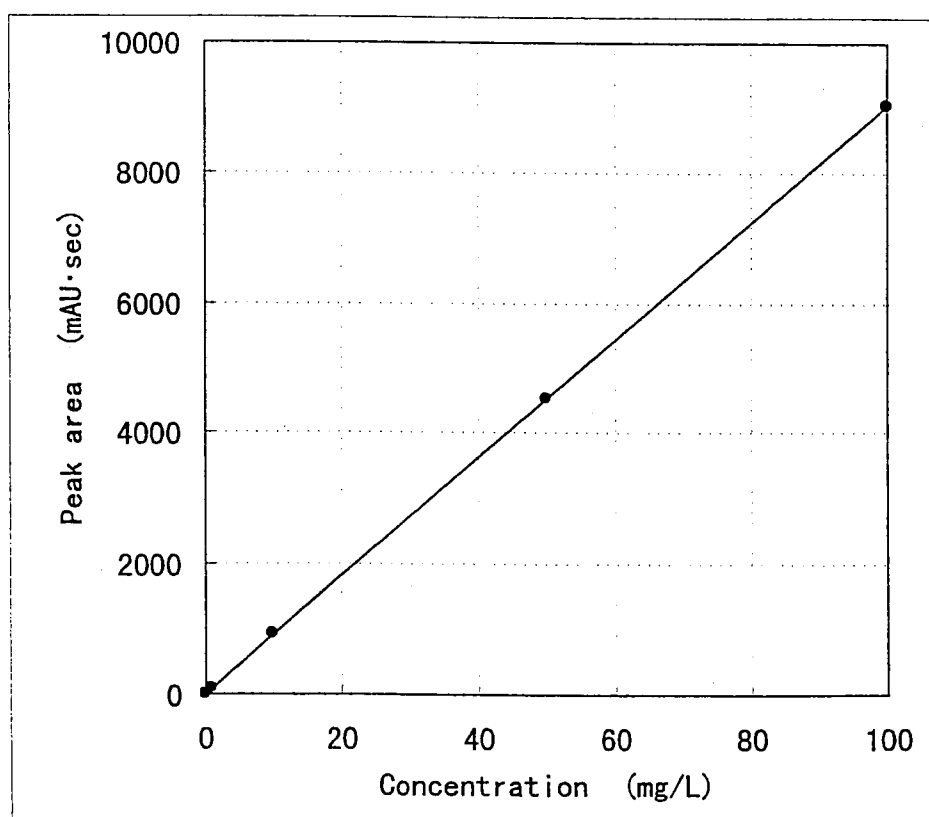
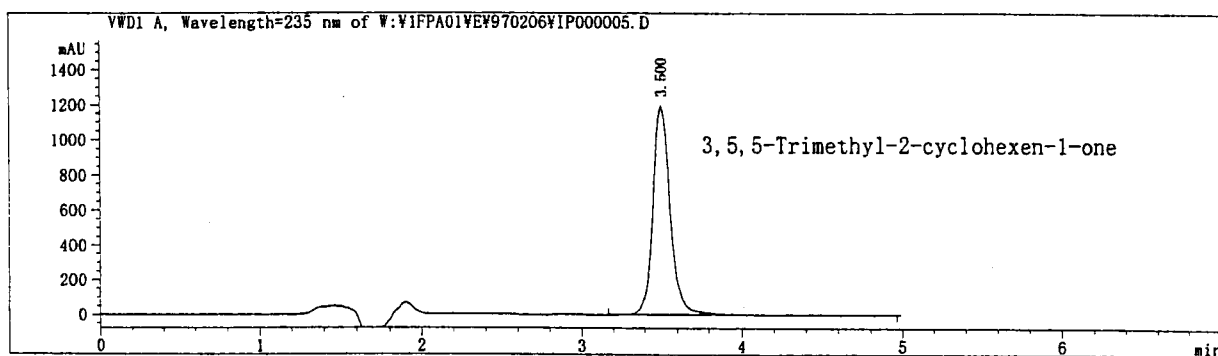


Figure 2 Representative chromatograms

(1) Standard 100.0mg/L ; 0-hour



(2) Standard 100.0mg/L ; 48-hour

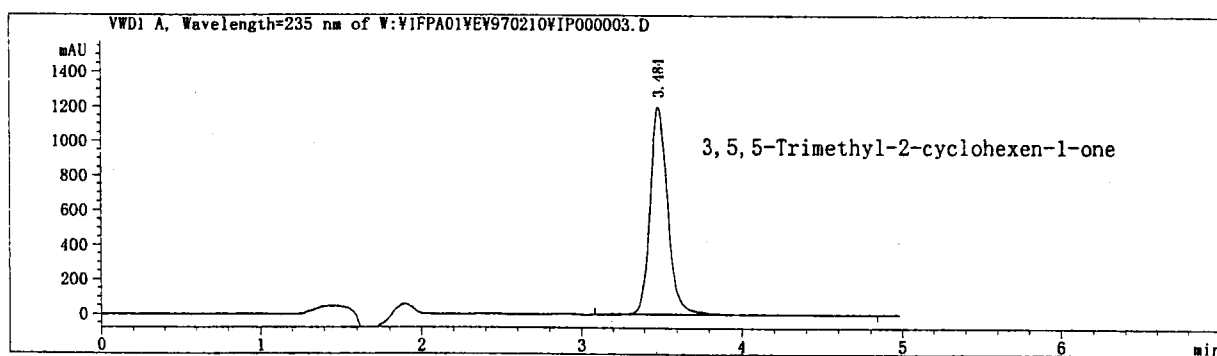
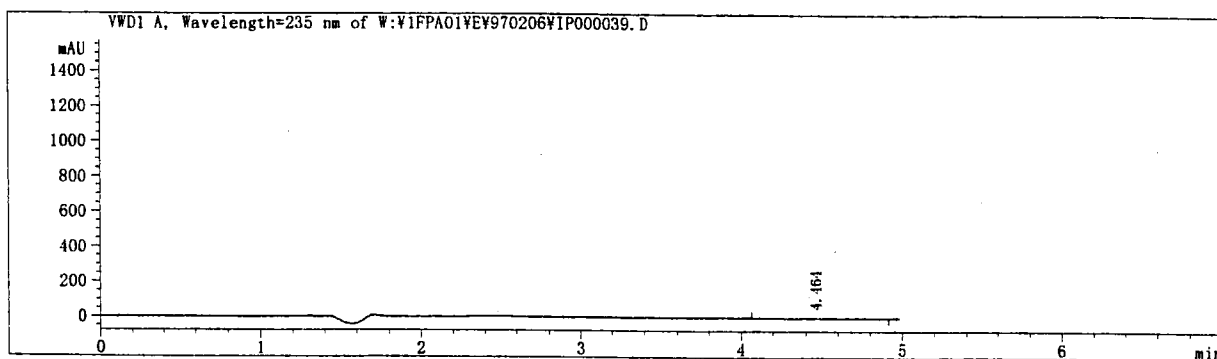


Figure 2 Continued

(3) Control ; 0-hour



(4) Control ; 48-hour

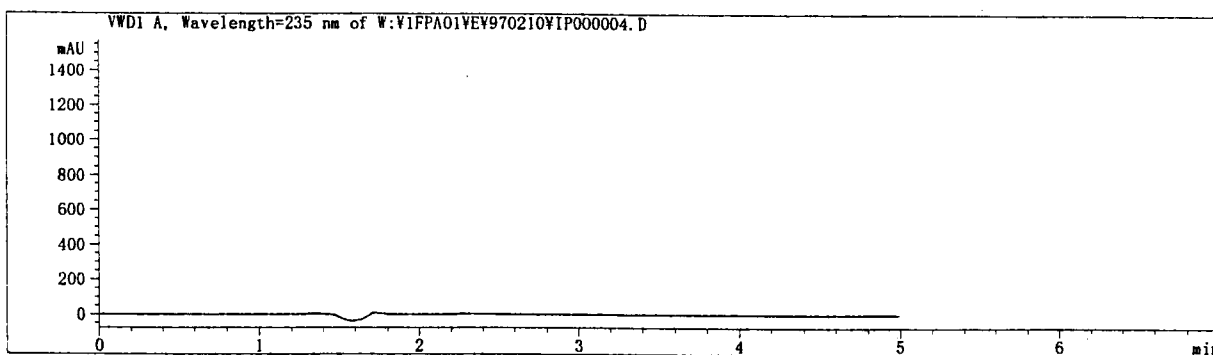
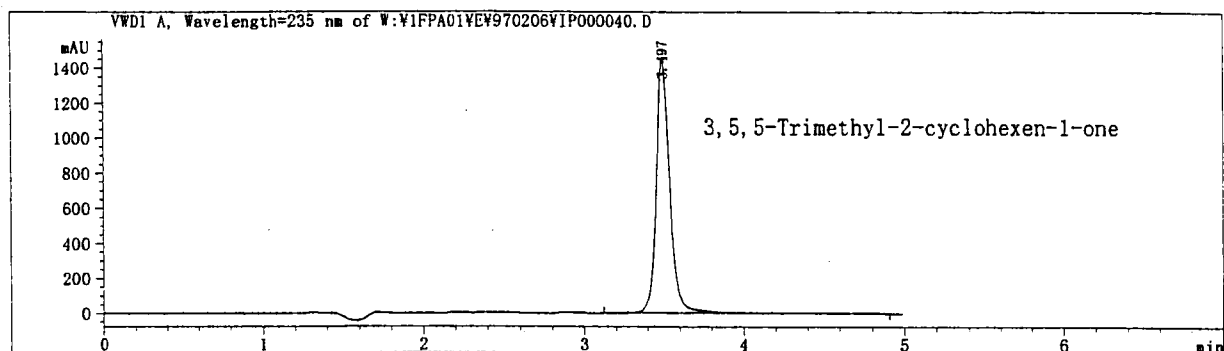


Figure 2 Continued

(5) 100.0mg nominal; 0-hour



(6) 100.0mg/L nominal; 48-hour

