

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-オンのオオミジンコ (*Daphnia magna*) に対する
急性遊泳阻害試験

(試験番号：NMMP/E97/2060)

平成 9 年 3 月 31 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-オンのオオミジンコ
(*Daphnia magna*)に対する急性遊泳阻害試験

試験番号 : NMMP/E97/2060

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 3 月 31 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-オンのオオミジンコ
(*Daphnia magna*)に対する急性遊泳阻害試験

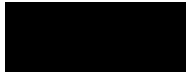
試験番号 : NMMP/E97/2060

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 4 日	平成 9 年 2 月 27 日
試験報告書監査	平成 9 年 3 月 25 日	平成 9 年 3 月 31 日
	平成 9 年 3 月 31 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-オンのオオミジンコ (*Daphnia magna*) に対する急性遊泳阻害試験
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、オオミジンコ (*Daphnia magna*) に対する急性遊泳阻害試験を行い、24 および 48 時間後の 50% 遊泳阻害濃度 (EiC50) 及び最大無作用濃度 (NOECi) 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. 202 「ミジンコ類、急性遊泳阻害試験および繁殖試験」 (1984 年) に準拠した。
4. 適用 GLP : 本試験は環境庁の生態影響試験実施に関する基準に準拠した。
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]	(平成 9 年 3 月 31 日)
試験担当者	[redacted]	(平成 9 年 3 月 31 日)
試験担当者	[redacted]	(平成 9 年 3 月 31 日)
試験担当者	[redacted]	(平成 9 年 3 月 31 日)
試験担当者	[redacted]	(平成 9 年 3 月 31 日)
試験担当者	[redacted]	(平成 9 年 3 月 31 日)
試験担当者	[redacted]	(平成 9 年 3 月 31 日)
試験担当者	[redacted]	(平成 9 年 3 月 31 日)

9. 試験期間：

試験開始日	平成 9 年 1 月 30 日
馴化開始日	平成 9 年 1 月 7 日
曝露期間	平成 9 年 2 月 4 日 ～ 平成 9 年 2 月 6 日
試験終了日	平成 9 年 3 月 31 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、株式会社東レリサーチセンター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 半数遊泳阻害濃度 (EC50)	13
5.4 最大無作用濃度 (NOEC) および 100% 阻害最低濃度	13
5.5 試験水の pH、溶存酸素濃度および水温	13
Table 1～7	14～19
Figure 1	20

付属資料-1 希釈水 (M4調製水)

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-オンのオオミジンコ (*Daphnia magna*) に対する急性遊泳阻害試験

試験番号

NMMP/E 9 7 / 2 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. 202 「ミジンコ類、急性遊泳阻害試験および繁殖試験」 (1984年) に準拠して実施した。

- 1) 被験物質 : 3, 5, 5-トリメチル-2-シクロヘキセン-1-オン
- 2) 暴露方法 : 止水式
- 3) 供試生物 : オオミジンコ (*Daphnia magna*)
- 4) 暴露期間 : 48 時間
- 5) 連数 : 1 濃度区に付き 4 連
- 6) 生物数 : 20 頭 / 1 濃度区 (1 連に付き 5 頭で 1 濃度区 20 頭)
- 7) 試験濃度 : 対照区、41mg/L、75mg/L、134mg/L、241 mg/L、435 mg/L および 782 mg/L (公比 1.8)
- 8) 試験液量 : 100 mL
- 9) 照明 : 室内光、16 時間明 / 8 時間暗
- 10) 試験水温 : 20±1℃

結 果

1) 24 時間暴露後の結果

24 時間半数遊泳阻害濃度 (EiC50) = 312.9mg/L (95%信頼区間 : 261.6mg/L ~ 383.0mg/L)

2) 48 時間暴露後の結果

48 時間半数遊泳阻害濃度 (EiC50) = 224.0mg/L (95%信頼区間 : 134mg/L ~ 435mg/L)

最大無作用濃度 (NOECi) = 134mg/L

100%阻害最低濃度 = 435mg/L

(上記濃度は、全て設定値に基づく値)

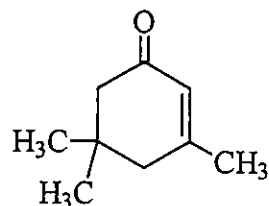
1 被験物質

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

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 : 500 g

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

被験物質は光を遮断した試料保管庫に室温で保管した。

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、被験物質の特性ピークが認められる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フ分析の純度を比較した結果、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

試験には生後24時間以内のオオミジンコ (*Daphnia magna*) の幼体を用いた。

本種は、国立環境研究所より入手したものを、当研究部において継代飼育しているものである。

また、基準物質（重クロム酸カリウム、試薬特級）による急性遊泳阻害試験の結果、48時間 EC_{50} は0.42 mg/Lであった。

供試する幼体を得るためのミジンコの飼育方法

継代中のものから幼体を抱えた肉眼的に健康かつ十分な大きさの雌成体を選別して、別に用意したビーカーに移し、それぞれ翌日産出された幼体を別のビーカーに分けた。この幼体を供試ミジンコの親とし、以下の条件で28日間飼育馴化した。成熟し幼体を産むようになってから、1週間に少なくとも2回以上幼体を除去した。

暴露開始前日に幼体を除去し、翌日産出された幼体を試験に用いた。死亡個体は少なく、休眠卵や雄は全く生じなかった。

飼育水	: 希釈水 (3.2参照)
飼育密度	: 20～50 頭/L 飼育水 (但し、成熟個体の場合は、25頭以下/Lとした)
水温	: $20 \pm 1^{\circ}\text{C}$
照明	: 室内光、16時間明/8時間暗
餌	: <i>Chlorella vulgaris</i>
給餌量	: ミジンコ1頭当たり <i>Chlorella vulgaris</i> を 0.1～0.2 mgC (有機炭素含量)/日の割合で与えた。

3 試験方法

3.1 試験条件

1) 暴露方法	: 止水式
2) 暴露期間	: 48 時間
3) 連数	: 1 濃度区に付き 4 連
4) 生物数	: 20 頭/1 濃度区 (1 連に付き 5 頭で 1 濃度区 20 頭)
5) 試験液量	: 100 mL
6) 試験水温	: $20 \pm 1^{\circ}\text{C}$
7) 照明	: 室内光、16 時間明/8 時間暗
8) 給餌	: 無給餌

3.2 希釈水

OECD テストガイドライン 202 Part II ドラフト(1995 年 8 月)記載のM4 調製水 (付属資料-1 参照) を使用した。従って、希釈水使用時のオルトトリジン法等による、残留塩素の有無の確認、全硬度の測定は行わなかった。

希釈水の pH は 8.0 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 : 100mL 容ガラスビーカー

恒温槽 : 恒温水槽および水循環装置 (ヤマト科学 クーライン CL100)

水温計 : pH 計内蔵温度計

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 (堀場製作所 OM-14)

3.4 試験濃度の設定

本試験に先立って予備試験を実施した結果、48 時間半数遊泳阻害濃度 (48hr-EiC50) は 241mg/L であった。

この結果を参考にして、濃度公比 1.8 で 6 段階の濃度区を設定した (設定値 : 41mg/L、75mg/L、134mg/L、241mg/L、435mg/L および 782mg/L)。

3.5 試験液の調製

- 1) 被験物質 1.0wt% 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) 希釈水のみを対照区を設けた。
- 3) 1 濃度区につき 4 個の試験容器を用意し、各試験容器に試験液を 100mL ずつ入れた。
- 4) 試験液の状態 (外観等) を観察した。無色透明で沈殿等は見られなかった。

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約1.5mLを採取し、HPLCにより分析した。試験水の分析に際しては、試料測定毎に標準溶液（濃度 10.0、50.0、100.0mg/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

試験液の水温、溶存酸素濃度(D.O.)、pHを測定後、供試ミジンコを投入し、その時点を暴露開始時とした。先端を太くしたエッペンドルフピペットを用いて供試ミジンコを投入した。その際、試験液量に対して、ピペット内の飼育水は全量で1%以内を目安とした。48時間まで飼育した。

暴露開始24および48時間後にミジンコの遊泳阻害数の観察を行った。試験容器を穏やかに動かした後、15秒間泳げない場合、遊泳阻害されたと見なした（但し、遊泳とは水中を泳げることを意味し、水底を這って動くものは阻害に含めた。また、正常な遊泳でない場合でも15秒間に1回でも水中を遊泳した場合は、阻害に含めなかった）。

水温、D.O.、pHは、暴露開始時および48時間後に、全濃度区（但し、各1試験容器）の試験液について測定した。

4 結果の算出

各濃度区でのミジンコの遊泳阻害数と供試個体数（20頭）から遊泳阻害率（%）を算出し米国EPA開発TOXDAT MULTI-METHOD Moving average法およびBinomial法により半数遊泳阻害濃度（EiC50）を算出した。また、その95%信頼限界も算出した。

ミジンコが遊泳阻害を受けない最高濃度区を最大無作用濃度（NOECi）とした。

また、全てのミジンコが遊泳阻害を受ける最低濃度を100%阻害最低濃度とした。

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、特に無かった。

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。試験開始時の被験物質濃度は 40.4~765.5mg/L (設定値 41~782mg/L) であり、設定値に対する割合は 97.3~101.9%であった。試験開始後 48 時間の被験物質濃度は 39.5~768.1mg/L (設定値 41~782mg/L) であり、設定値に対する割合は、96.4~98.6%であった。

実測値が設定値の±20%以内であったので、試験結果は全て設定濃度値で表した。

[Table 1(p.14)]

[付属資料-2(p.23)]

5.3 半数遊泳阻害濃度 (EiC50)

3,5,5-トリメチル-2-シクロヘキセン-1-オンに 48 時間暴露したミジンコの遊泳阻害率は 134mg/L 以下の濃度区で 0%、435mg/L 以上の濃度区で 100%であった。対照区の遊泳阻害率は 0%であった。

3,5,5-トリメチル-2-シクロヘキセン-1-オンの設定濃度に基づく 24 時間の半数遊泳阻害濃度(24hr-EiC50)は 312.9mg/L であり、その 95%信頼区間は 261.6mg/L~383.0mg/L であった。(統計的手法: Moving Average 法)

また、48 時間の半数遊泳阻害濃度(48hr-EiC50)は 224.0mg/L であり、その 95%信頼区間は 134mg/L~435mg/L であった。(統計的手法: Binomial 法)

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

[Figure 1(p.20)]

5.4 最大無作用濃度 (NOECi)および 100%阻害最低濃度

3,5,5-トリメチル-2-シクロヘキセン-1-オンに 48 時間暴露したミジンコの最大無作用濃度 (NOECi)は 134mg/L であり、100%阻害最低濃度は 435mg/L であった。

[Table 4(p.16)]

5.5 試験水の pH、溶存酸素濃度および水温

試験期間中の試験水の pH は 7.4~8.0 であった。試験期間中の溶存酸素濃度は 8.17 mg/L~9.50mg/L であり、すべての試験水槽で飽和溶存酸素濃度の 60%以上 (20.0℃の飽和溶存酸素濃度: 8.84mg/L) であった。試験期間中の水温は 20.1℃~20.7℃であった。

[Table 5,6,7(p.17,18,19)]

以上

Table 1. Measured Concentrations of 3,5,5-Trimethyl-2-cyclohexen-1-one During a 48-Hour Exposure of *Daphnia magna* under Static Test Conditions

Nominal Concentration (mg/L)	Measured concentration (mg/L)			Percent of Nominal	
	0 day new	2 day old	Mean	0 day new	2 day old
Control	<0.05	<0.05	----	----	----
41	40.4	39.5	39.9	98.5	96.4
75	73.4	72.2	72.8	97.9	96.3
134	130.4	130.2	130.3	97.3	97.2
241	238.7	237.5	238.1	99.1	98.6
435	443.4	428.6	435.9	101.9	98.5
782	765.5	768.1	766.8	97.9	98.2

new: freshly prepared test solutions

old: test solutions after 48 hours exposure period

Table 2. Mortality or Immobility of *Daphnia magna* Exposed to 3,5,5-Trimethyl-2-cyclohexen-1-one under Static Test Conditions

Nominal Concentration (mg/L)	Cumulative Number of Dead or Immobilized Daphnia (Percent Mortality or Immobility)	
	24 Hour	48 Hour
Control	0 (0)	0 (0)
41	0 (0)	0 (0)
75	0 (0)	0 (0)
134	0 (0)	0 (0)
241	2 (10)	12 (60)
435	19 (95)	20 (100)
782	20 (100)	20 (100)

Table 3. Calculated EiC50 Values for *Daphnia magna* Exposed to 3,5,5-Trimethyl-2-cyclohexen-1-one Based on Nominal Concentrations under Static Test Conditions

Exposure Period (Hour)	EiC50 (mg/L)	95-Percent Confidence Limits (mg/L)			Statistical method
24	312.9	261.6	~	383.0	Moving Average
48	224.0	134	~	435	Binomial

Table 4. Observation of No Observed Effect Concentration (NOEC) and Lowest Concentration in 100% Mortality or Immobility Values

Exposure Period (Hour)	No Observed Effect Concentration (NOEC) (mg/L)	Lowest Concentration in 100% Mortality or Immobility (mg/L)
24	134	782
48	134	435

Table 5. pH Values During a 48-Hour Static Exposure of *Daphnia magna* to
3, 5, 5-Trimethyl-2-cyclohexen-1-one

Nominal Concentration (mg/L)	pH	
	0 Hour new	48 Hour old
Control	8.0	7.4
41	7.9	7.5
75	7.7	7.5
134	7.8	7.5
241	7.9	7.5
435	7.8	7.5
782	8.0	7.5

new: freshly prepared test solutions

old: test solutions after 48 hours exposure period

Table 6. Dissolved Oxygen Concentrations During a 48-Hour Static Exposure of *Daphnia magna* to 3,5,5-Trimethyl-2-cyclohexen-1-one

Nominal Concentration (mg/L)	Dissolved Oxygen Concentration(mg/L)	
	0 Hour new	48 Hour old
Control	9.08	8.19
41	9.17	8.17
75	9.41	8.24
134	9.29	8.54
241	9.50	8.54
435	9.34	8.32
782	9.32	8.37

new: freshly prepared test solutions

old: test solutions after 48 hours exposure period

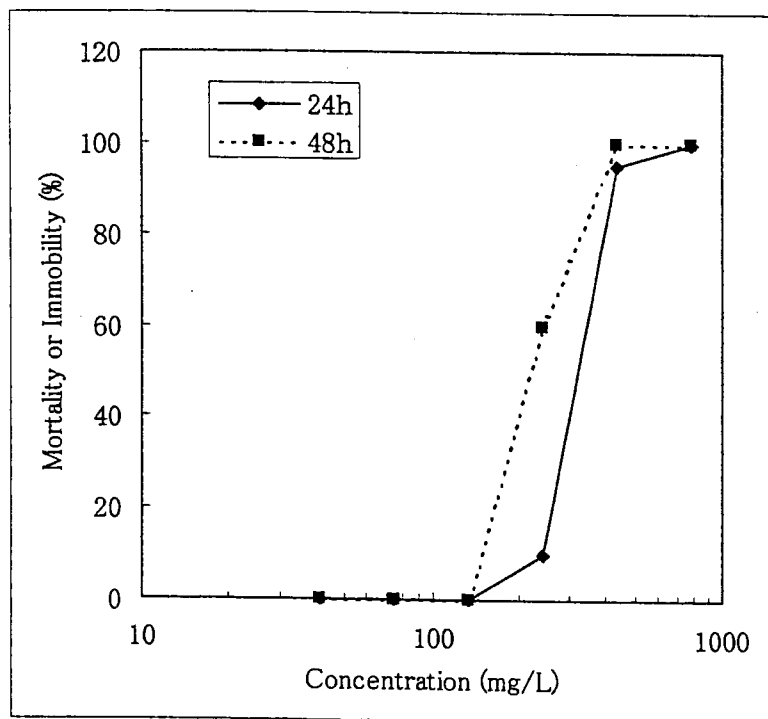
Table 7. Temperature Values During a 48-Hour Static Exposure of *Daphnia magna* to 3, 5, 5-Trimethyl-2-cyclohexen-1-one

Nominal Concentration (mg/L)	Temperature(°C)	
	0 Hour new	48 Hour old
Control	20.5	20.4
41	20.5	20.3
75	20.7	20.4
134	20.5	20.1
241	20.4	20.4
435	20.5	20.4
782	20.3	20.4

new: freshly prepared test solutions

old: test solutions after 48 hours exposure period

Figure 1 Concentration-Response Curve of 3,5,5-Trimethyl-2-cyclohexen-1-one Mortality or Immobility in *Daphnia magna*



付 属 資 料 - 1

希 釈 水 (M4 調 整 水)

(全 1 頁)

M4 medium

Salt and Vitamine	Concentration (mg/L)
H_3BO_3	2.860
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	0.361
$LiCl$	0.306
$RbCl$	0.071
$SrCl_2 \cdot 6H_2O$	0.152
$NaBr$	0.016
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0.063
$CuCl_2 \cdot 2H_2O$	0.017
$ZnCl_2$	0.013
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0.010
KI	0.00325
Na_2SeO_3	0.00219
NH_4VO_3	0.00058
$Na_2EDTA \cdot 2H_2O$	2.5
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0.996
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	123.3
KCl	5.8
$NaHCO_3$	64.8
$NaNO_3$	0.274
KH_2PO_4	0.143
K_2HPO_4	0.184
Thiamine hydrochloride	0.075
Cyanocobalamine (V. B ₁₂)	0.001
D(+) Biotin (V. H)	0.00075
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	293.8
$Na_2SiO_3 \cdot 9H_2O$	2.5

付 属 資 料 - 2

試験液の分析方法

(全 6 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 0.5～1.5mL をバイアル瓶に採取する。

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 、4.6mm ϕ ×150mm

カラム温度 : 40℃

検出波長 : 235nm

注入量 : 2.0 μ L

移動相 : A/B=50/50

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

流量 : 1.0mL/min

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.24)]

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 標準液の回収率は 95.1%であり、25.0mg/L 標準液の回収率は 97.9%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	12.00823
2	1.00	96.80765
3	10.0	926.50433
4	50.0	4538.85547
5	100.0	9044.68457

$$Y (\text{Peak Area}) = 8.7340 + 90.41872 X (\text{Concentration})$$

$$r^2 = 1.0000$$

r^2 : coefficient of correlation

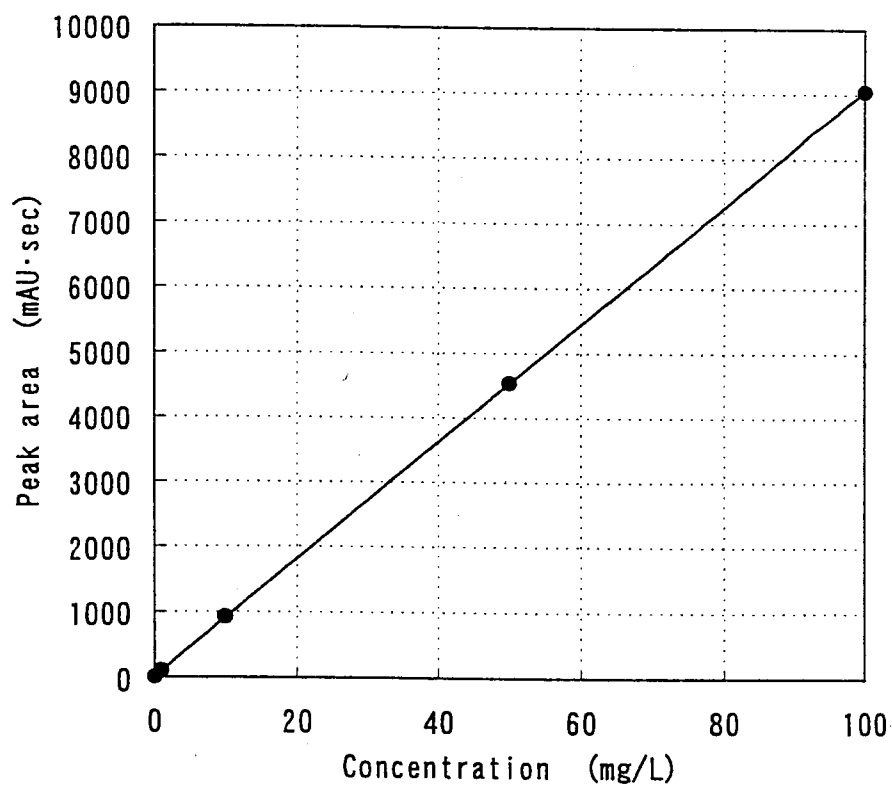
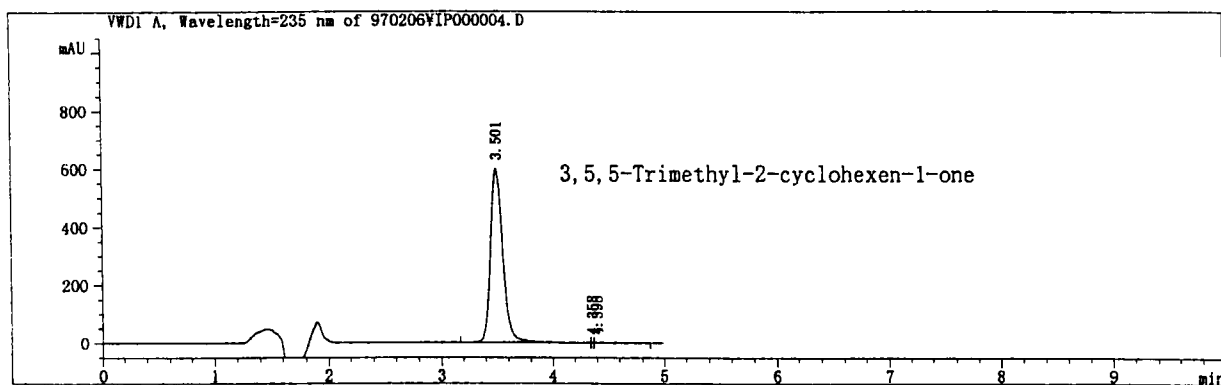
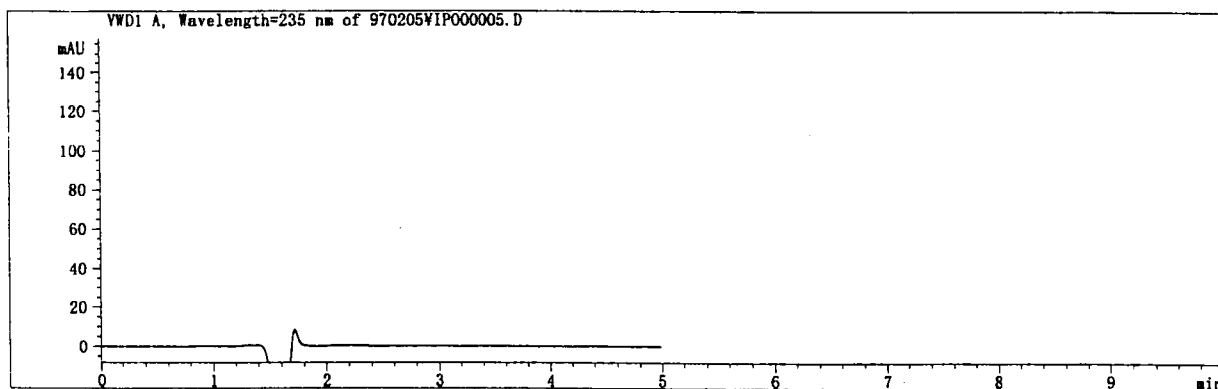


Figure 2 Representative chromatograms

(1) Standard 50.0mg/L



(2) Control ; 0-Hour



(3) Control ; 48-Hour

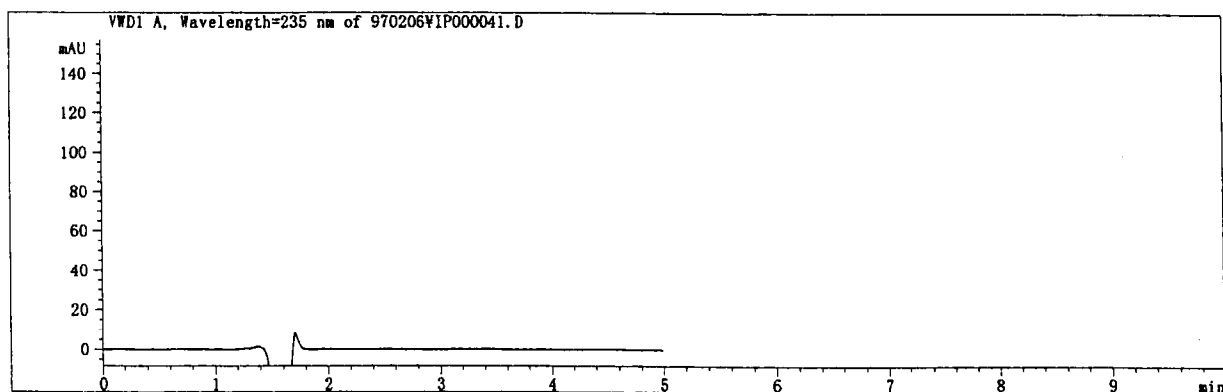
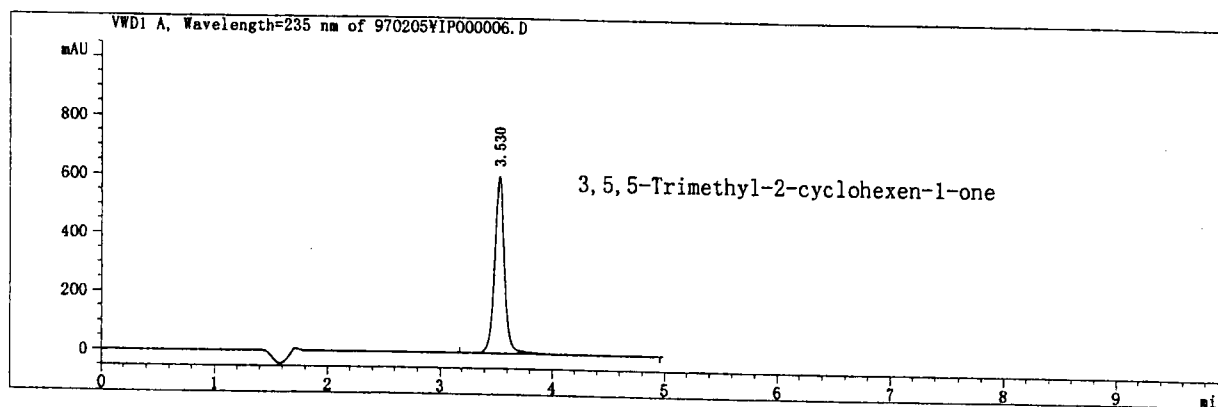


Figure 2 Continued

(4) 41 mg/L nominal; 0-Hour



(5) 41 mg/L nominal; 48-Hour

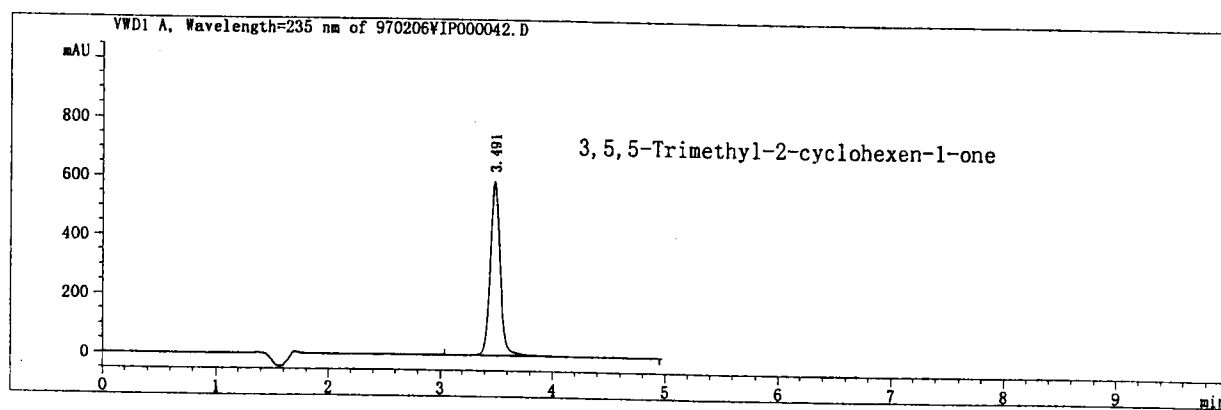
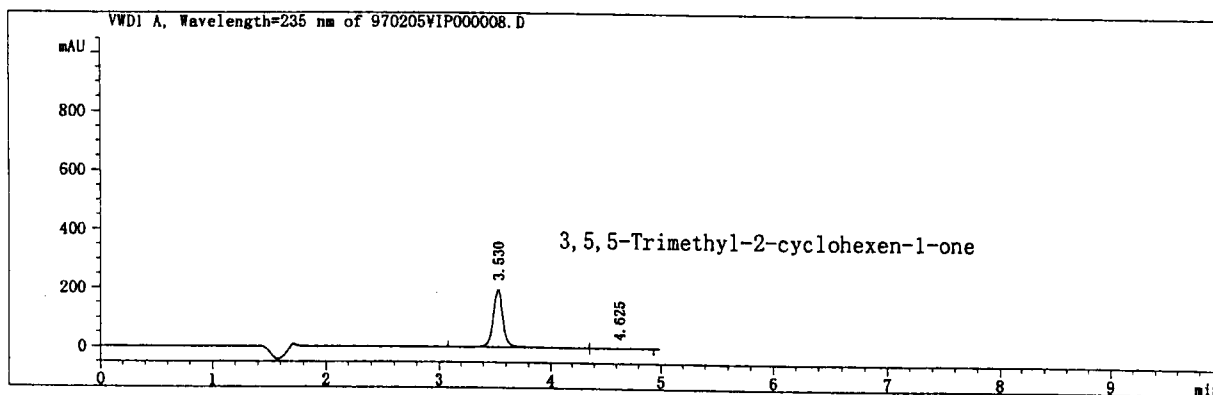


Figure 2 Representative chromatograms

(6) 134mg/L nominal; 0-Hour (diluted to 13.4mg/L)



(7) 134mg/L nominal; 48-Hour (diluted to 13.4mg/L)

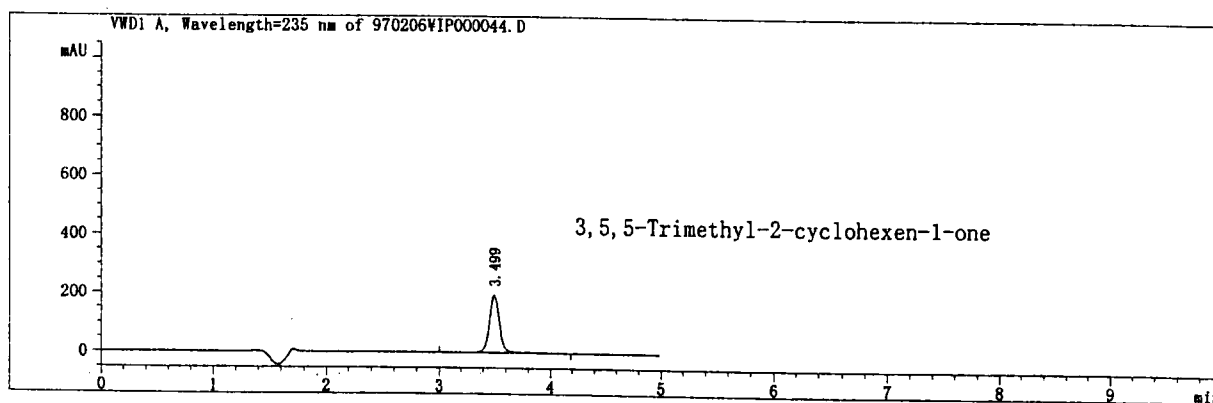
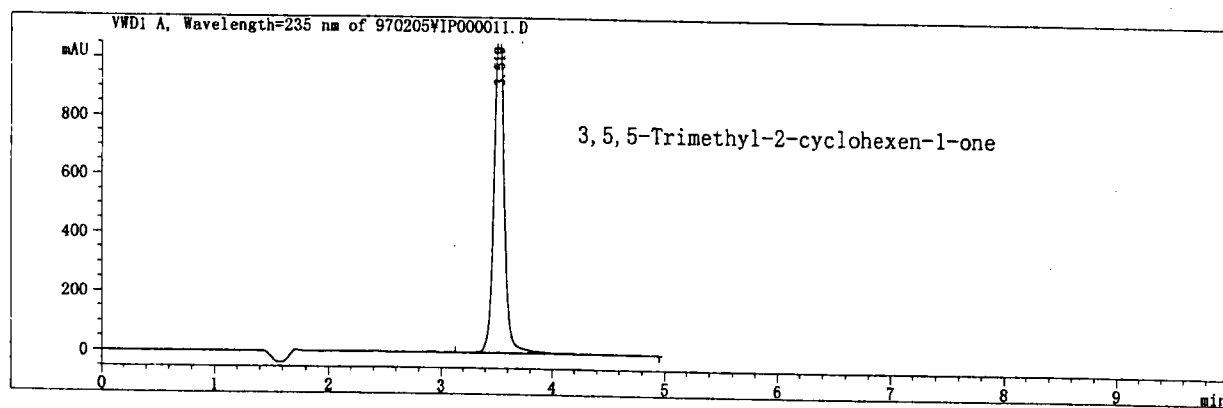


Figure 2 Continued

(7) 782mg/L nominal; 0-Hour (diluted to 78.2mg/L)



(8) 782mg/L nominal; 48-Hour (diluted to 78.2mg/L)

