

最 終 報 告 書

イソプレン（被験物質番号 K-39）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

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九州試験所

試験委託者 通商産業省

試験の表題 イソプレン（被験物質番号 K-39）のコイにおける濃縮度試験

試験番号 50039

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九州試験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。

監査又は査察日	報告日（運営管理者）	報告日（試験責任者）
昭和63年 2月 5日	昭和63年 2月 5日	昭和63年 2月 5日
昭和63年 2月26日	昭和63年 3月 2日	昭和63年 3月 1日
昭和63年 2月27日	昭和63年 3月 2日	昭和63年 3月 1日
昭和63年 3月 7日	昭和63年 3月 9日	昭和63年 3月 8日
昭和63年 3月 8日	昭和63年 3月 9日	昭和63年 3月 8日
昭和63年 3月23日	昭和63年 3月23日	昭和63年 3月23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。

昭和63年 3 月 23 日
信頼性保証業務担当者

昭和63年 3 月 23 日
信頼性保証責任者

陳 述 書

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

試験委託者 通商産業省

試験の表題 イソブレン (被験物質番号 K-39) のコイにおける濃縮度試験

試験番号 50039

上記試験は、昭和59年3月31日付、環保業第39号、薬発第229号及び59基局第85号による「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」に従って実施したものです。

昭和63年3月23日

運営管理者



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. 最終報告書作成日	3
9. 最終報告書の承認	3
10. 被験物質	4
11. 急性毒性試験	6
12. 濃縮度試験の実施	8
13. 試験結果	18
14. 試資料の保管	20
15. 備 考	20
16. 表の内容	22
17. 図の内容	23

付表及び付図

要 約

1. 試験の表題 イソブレン（被験物質番号 K-39）のコイにおける濃縮度試験

2. 試験条件

2.1 急性毒性試験

- | | |
|-----------|------------------|
| (1) 供試魚 | ヒメダカ |
| (2) ばく露期間 | 48時間 |
| (3) ばく露方法 | 半止水式（8～16時間毎に換水） |

2.2 濃縮度試験

- | | |
|-----------|--------------|
| (1) 供試魚 | コイ |
| (2) 試験濃度 | 第1濃度区 50µg/l |
| | 第2濃度区 5µg/l |
| (3) ばく露期間 | 6週間 |
| (4) ばく露方法 | 連続流水式 |
| (5) 分析方法 | ガスクロマトグラフ法 |

3. 試験結果

- | | |
|---------------|------------------|
| (1) 48時間LC50値 | 46.6µg/l |
| (2) 濃縮倍率 | 第1濃度区 5.0倍 ～14倍 |
| | 第2濃度区 5.6倍以下～20倍 |

4. 被験物質の安定性

被験物質は保管条件下及び試験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 50039

1. 表 題 イソブレン（被験物質番号 K-39）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 被験物質K-39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63年 2月 5日

(2) 試験実施期間

供試魚受入日 昭和62年12月 3日

じゅん化終了日 昭和63年 1月21日

ばく露開始日 昭和63年 2月 8日

ばく露終了日 昭和63年 3月22日

(3) 試験終了日 昭和63年 3月23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

8. 最終報告書作成日

昭和63年 3月23日

作成者

9. 最終報告書の承認

昭和63年 3月23日

試験責任者

氏名

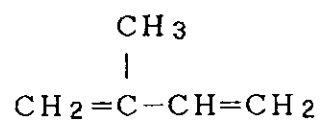
10. 被験物質

本報告書において被験物質K-39は、次の名称及び構造式等を有するものとする。

10.1 名 称 イソブレン

10.2 構造式等

構造式



分子式 C_5H_8

分子量 68.12

10.3 純 度^{*1} 98%以上

*1 添付資料による。

10.4 入手先及びロット番号

(1) 入 手 先 [REDACTED] ([REDACTED] 試薬)

(2) ロット番号 FAU01

10.5 同 定

[REDACTED] 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。

10.6 物理化学的性状

外 観 無色透明液体

比 重^{*1} d_{20}^{20} 0.681

凝固点^{*2} -145.95℃

沸 点^{*3} 34.08℃

蒸気圧^{*4} 760mmHg (32.6℃)

溶解性	水	440mg/ℓ
	ヘキサン	100g/ℓ以上
	クロロホルム	100g/ℓ以上
	酢酸エチル	100g/ℓ以上
	メタノール	100g/ℓ以上

分配係数 (n-オクタノール/水) ^{*5}
 $\log Pow = 2.42$

質量スペクトル (図-14参照)

赤外吸収スペクトル (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。

*2 XXXXXXXXXX (10 Edt.) による。

*3 化学大辞典 (共立出版) による。

*4 化学便覧 (日本化学会編) による。

*5 分解度試験報告書による。

10.7 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-15参照)。

10.8 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。

11. 急性毒性試験

11.1 試験方法

JIS K 0102-1981 の 55 の方法に準じて行った。

11.2 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) 蕃養条件 | | |
| 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、蕃養槽で薬浴後、流水状態で13日間飼育した。 |
| 薬浴 | | 20 mg/lエルバージュ（上野製薬製）溶液及び7 g/l塩化ナトリウム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±2℃の水温の流水状態で7日間以上飼育した。 |
| (5) 体 | 重 | 平均 0.32 g |
| (6) 全 | 長 | 平均 3.3 cm |
| (7) 検 | 定 | 田端健二 ^{*6} の方法に準じ、塩化第二水銀検定合格魚と同一ロット（TFO-880202）のものを試験に供した。 |

*6 用水と廃水, 14, 1297-1303 (1972)

11.3 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（参考資料1参照）。

11.4 試験条件

- | | |
|------------|--|
| (1) 試験水槽 | ガラス製ガロンびん |
| (2) 試験液量 | 3.85ℓ×2/濃度区 |
| (3) 試験水温 | 25±2℃ |
| (4) 溶存酸素濃度 | ばく露開始時 7.8～8.0mg/ℓ
ばく露終了時 4.6～7.2mg/ℓ |
| (5) pH | ばく露開始時 8.2
ばく露終了時 7.6～8.0 |
| (6) 供試魚数 | 10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） |

11.5 原液調製法

(1) 分散剤

N,N-ジメチルホルムアミド

HCO-40

(2) 調製方法

被験物質を30倍量のN,N-ジメチルホルムアミドに溶解し、50倍量のHCO-40と練り合わせ、イオン交換水に溶解して1000mg/ℓの原液を調製した。

11.6 試験の実施

- | | |
|-----------|---------------------------|
| (1) 実施場所 | LC50測定室 |
| (2) 試験実施日 | 昭和63年 3月 7日 ～ 昭和63年 3月11日 |

11.7 48時間LC50値の算出

Doudoroff 法で行った。

11.8 試験結果

48時間LC50値 46.6 mg/l (図-3参照)

12. 濃縮度試験の実施

12.1 供試魚

- | | |
|---------------------------------|---|
| (1) 魚 種 | コイ <u>Cyprinus carpio</u> |
| (2) 供給源 | 杉島養魚場
(住所 〒 866 熊本県八代市郡築一番町 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、
受入槽で薬浴後、流水状態で3日間飼育した。 |
| 薬 浴 | 50 mg/l水産用テラマイシン散(台糖ファイザー製)
溶液及び78/l塩化ナトリウム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±2℃の水温の流水状態で40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 ^{*7} | |
| 体 重 | 平均 26.8 g |
| 体 長 | 平均 9.9 cm |
| 脂質含有率 | 平均 4.8% |

^{*7} ロット(TFC-871203)の測定値

- | | |
|---------|--|
| (6) 餌 料 | |
| 種 類 | コイ用ベレット状配合飼料 |
| 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。 |

12.2 試験用水

11.3に同じ。

12.3 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2ml/分及び試験用水800ml/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 5.6～6.6mg/ℓ（図-12参照）
第2濃度区 5.9～7.0mg/ℓ（図-13参照） |
| (6) 供試魚数 | 12尾/濃度区（ばく露開始時） |
| (7) ばく露期間 | 6週間 |
| (8) 実施場所 | 第2アクアトロン室 |

12.4 原液調製法

11.5と同様な方法で、第1濃度区用の場合20mg/ℓ及び第2濃度区用の場合2mg/ℓの原液を調製した。

12.5 試験濃度

48時間LC50予備値及び被験物質の分析感度を考慮して、

第1濃度区 50μg/ℓ

第2濃度区 5μg/ℓ

に設定した。

12.6 試験水及び供試魚分析

12.6.1 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12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、3、4及び6週の計4回行い、1回当りの分析試料は2尾とした。

12.6.2 分析試料の前処理

(1) 試験水

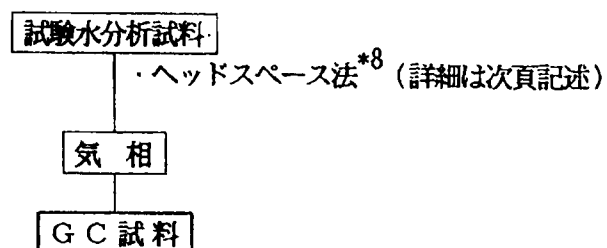
試験水槽から

第1濃度区 5 ml

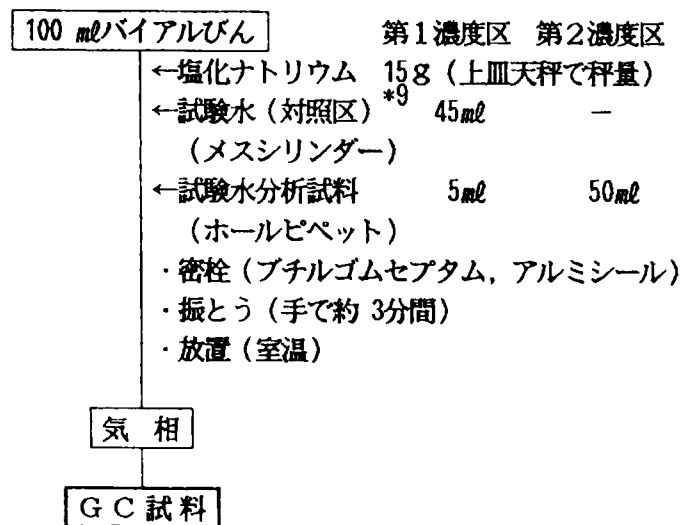
第2濃度区 50 ml

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ガスクロマトグラフ（GC）試料とした。

フロースキーム



*8 ヘッドスペース法の条件

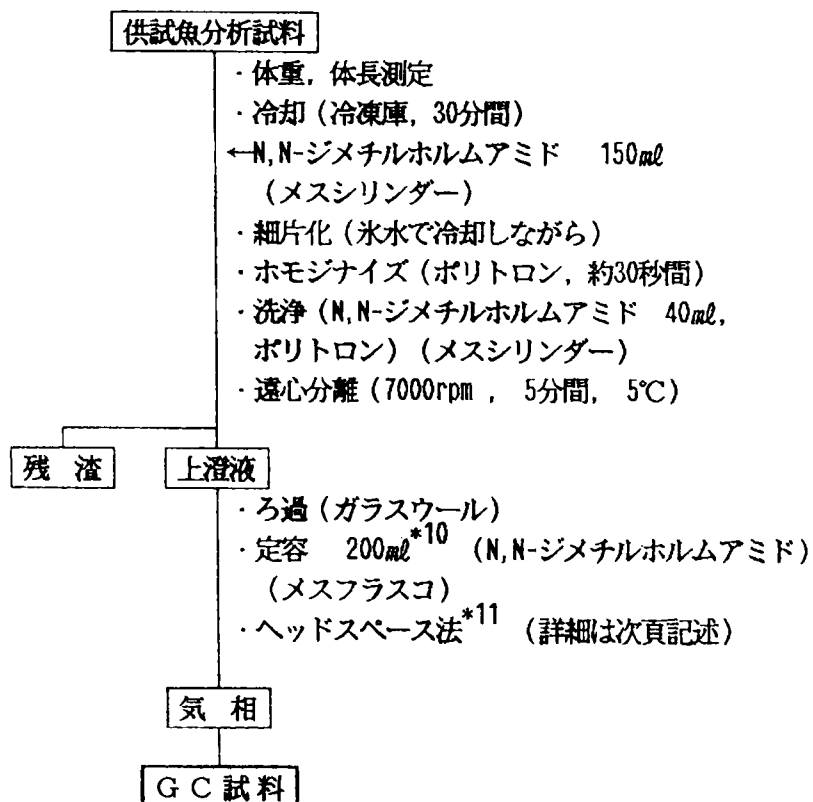


*9 分散剤を含まない対照区の水

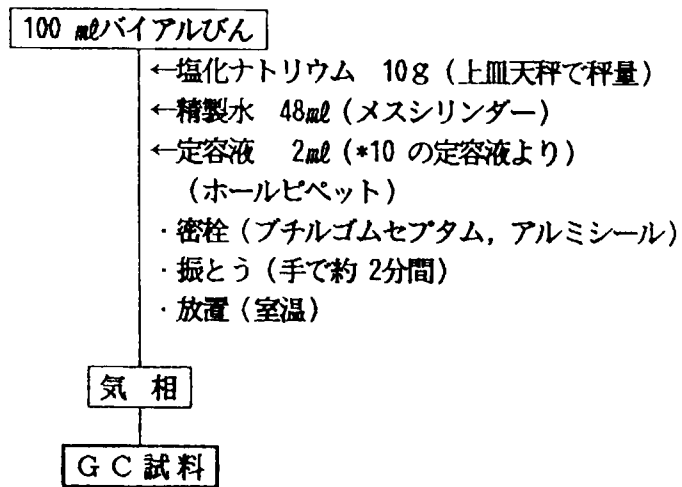
(2) 供試魚

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試料とした。

フロースキーム



*11 ヘッドスペース法の条件



12.6.3 定量分析

12.6.2の前処理を行って得られたGC試料は、以下の条件に基づきガスクロマトグラフ法により定量を行った。最終定容液中の被験物質濃度は、クロマ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（表-4, 5, 図-6, 表-8, 9, 10, 図-9, 10, 11参照）。

(1) 分析機器の定量条件

機 器	ガスクロマトグラフ
カ ラ ム	3m×3mmφ ガラス製
液 相	20% Squalane
担 体	Chromosorb W AW-DMCS
カ ラ ム 温 度	60℃
試料導入部温度	150℃
キャリアガス	窒素
流 量	50ml/min
検 出 器	FID
注 入 量	0.8ml [回収試験 1.0ml (備考15.1参照)]

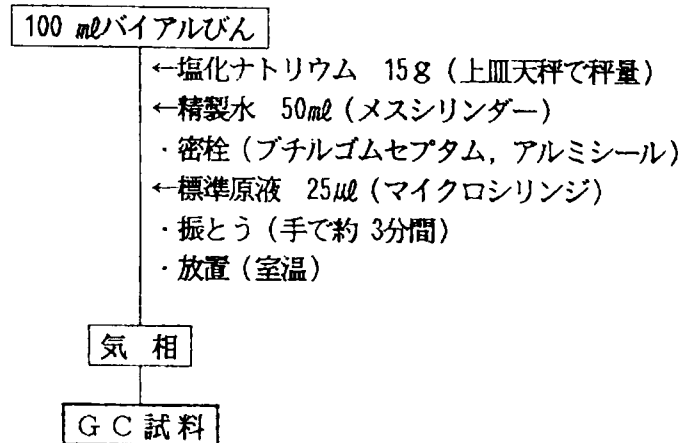
(2) 標準溶液の調製

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。

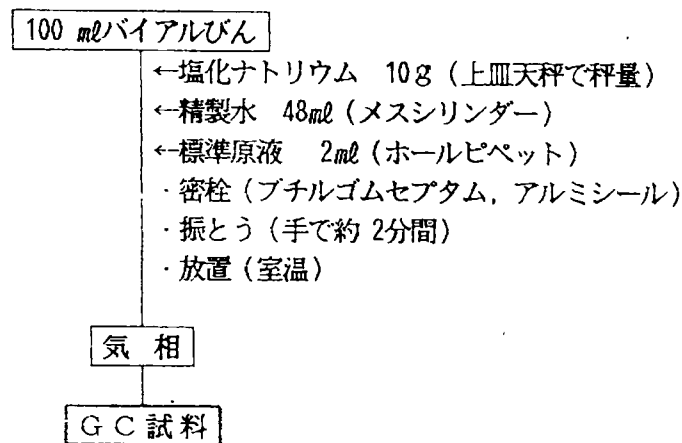
被験物質 147 μg を精秤し、N,N-ジメチルホルムアミドに溶解した 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ をさらに N,N-ジメチルホルムアミドで希釈して、試験水分析 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、供試魚分析 0.15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の標準原液を調製し、以下のフロースキームに従ってヘッドスペース法により標準溶液を調製した。

フロースキーム

・試験水分析



・供試魚分析



(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2.5, 5及び10 μ g/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クロマトグラム上の被験物質ピーク高さと濃度より検量線を作成した。

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15 μ V (被験物質濃度 0.11 μ g/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3, 6及び12 μ g/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クロマトグラム上の被験物質ピーク高さと濃度より検量線を作成した。

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15 μ V (被験物質濃度 0.12 μ g/ml)とした(図-7参照)。

12.6.4 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、試験水(対照区)及び魚体に被験物質分散液を添加及び腹腔内注射し、12.6.2及び12.6.3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クロマトグラム上、被験物質ピーク位置にはピークは認められなかった。分析操作における各2点の回収率及び平均回収率は下記に示すとおりであり、平均回収率を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(表-3, 7, 図-5, 8参照)。

(2) 結果

分析操作における回収率

試験水分析(被験物質250 μ g添加)

95.8%, 91.9% 平均93.8%

供試魚分析(被験物質30000 μ g添加)

85.5%, 85.5% 平均85.5%

12.6.5 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

12.6.3 (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^{*12}はそれぞれ、

第1濃度区 1.2 ng/ml

第2濃度区 0.12 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-11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

12.6.3 (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^{*12}は供試魚体重を30gとしたとき24 ng/gと算出される。

$$*12 \text{ 被験物質検出限界濃度 (ng/ml又はng/g)} = \frac{A}{\frac{B}{100} \times \frac{C \times E}{D}}$$

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。

12.7 濃縮倍率（BCF）の算出

表－11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2ケタに丸めて表示した。

なお、12.6.5 (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	0.6倍
第2濃度区	5.6倍

13. 試験結果

13.1 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 $\mu\text{g}/\text{l}$ ）

	2 週	3 週	4 週	6 週	付 表	付 図
第1濃度区	43.5	42.2	42.7	42.7	表－4	図－6
第2濃度区	4.09	4.10	4.17	4.27	表－5	

13.2 濃縮倍率

濃縮倍率を表－2に示す。

表－2 濃 縮 倍 率

	2 週	3 週	4 週	6 週	付 表	付 図
第1濃度区	12 14	9.8 5.0	12 12	12 9.1	表－8	図－9
第2濃度区	20 19	11 14	5.6以下 15	17 5.6以下	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、6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5.0倍～14倍、第2濃度区において5.6倍以下～20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、設定値の80%以上が保持された。

14. 試資料の保管

14.1 被験物質

保管用被験物質約20gを保管用容器に入れ密栓後、「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。）第32条に定める期間、当試験所試料保管室に保管する。

14.2 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、調査表、資料等は最終報告書と共に、「GLP基準」第32条に定める期間、当試験所資料保管室に保管する。

15. 備 考

15.1 分析機器の定量条件について

本試験スタート時、ガスクロマトグラフの感度が良好となり、注入量を1.0 mlから0.8 mlに変更した。

15.2 試験に使用した機器、装置、特殊器具、試薬等

(1) 試験系（飼育施設）に係わる装置

原液供給用微量定量ポンプ	:	東京理化器械製	型 GMW
溶存酸素測定装置	:	飯島精密工業製	型 552

(2) 分析及び原液調製に使用した機器、装置、特殊器具、試薬
機器

ガスクロマトグラフ : 島津製作所製 型 GC-9A

装置

ホモジナイザー : キネマチカ社製
スターラー : 東洋製作所製
岩城ガラス製
東京理化学器械製
遠心分離機 : 日立製作所製 型 20PR-52

特殊器具

テドラーバッグ : 井内盛栄堂製
バイアルびん : 日本クロマト工業製 型 PV-100
ブチルゴムセプタム : ガスクロ工業製
アルミシール : ガスクロ工業製 Sタイプ
ハンドシールクリンパー : 日本理化学器械製
マイクロシリンジ : 伊藤製作所製 型 MS-50
ガスタイトシリンジ : 伊藤製作所製 型 MS-GAN100

試薬

塩化ナトリウム : 松永化学工業製 試薬一級
N,N-ジメチルホルムアミド : 半井化学薬品製 試薬一級
精製水 : 高杉製薬製
HCO-40 : 日光ケミカルズ製