

# 最 終 報 告 書

メチルスチリルケトン（被験物質番号 K-498）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久留米研究所

陳 述 書

財団法人 化学品検査協会  
化学品安全センター久留米研究所

試験委託者 通商産業省

試験の表題 メチルスチリルケトン（被験物質番号 K-498）のコイにおける濃縮度試験

試験番号 50498

上記試験は、「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ついて」（環保業第39号、薬発第229号、59基局第85号、昭和59年3月31日、昭和63年11月18日改正）に定める「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」及び「OECD Principles of Good Laboratory Practice」(May 12, 1981)に従って実施したものです。

平成 6 年 2 月 24 日

運営管理者



## 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久留米研究所

試験委託者 通商産業省

試験の表題 メチルスチリルケトン（被験物質番号 K-498）のコイにおける濃縮度試験

試験番号 50498

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久留米研究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）
平成 5年12月21日	平成 5年12月21日	平成 5年12月21日
平成 6年 1月11日	平成 6年 1月13日	平成 6年 1月12日
平成 6年 1月18日	平成 6年 1月19日	平成 6年 1月19日
平成 6年 1月20日	平成 6年 1月21日	平成 6年 1月21日
平成 6年 1月21日	平成 6年 1月21日	平成 6年 1月21日
平成 6年 2月24日	平成 6年 2月24日	平成 6年 2月24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。

平成 6年 2月24日

信頼性保証部門責任者

## 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. 優良試験所基準への適合 .....	2
7. 試験期間 .....	3
8. 試験関係者 .....	3
9. 最終報告書作成日 .....	3
10. 最終報告書の承認 .....	3
11. 被験物質 .....	4
12. 急性毒性試験 .....	6
13. 濃縮度試験の実施 .....	8
14. 試験結果 .....	15
15. 試資料の保管 .....	16
16. 備 考 .....	17
17. 表及び図の内容 .....	18

付表及び付図

## 要 約

### 1. 試験の表題

メチルスチリルケトン（被験物質番号 K-498）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 0.1 mg/L<br>第2濃度区 0.01 mg/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  | 高速液体クロマトグラフィー                     |

### 3. 試験結果

- |               |                              |
|---------------|------------------------------|
| (1) 48時間LC50値 | 9.80 mg/L                    |
| (2) 濃縮倍率      | 第1濃度区 1.7倍以下<br>第2濃度区 1.8倍以下 |

### 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。



7. 試験期間

(1) 試験開始日 平成 5年12月21日  
(2) ばく露開始日 平成 5年12月23日  
(3) ばく露終了日 平成 6年 2月 3日  
(4) 試験終了日 平成 6年 2月15日

8. 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

\_\_\_\_\_

試験資料管理部門責任者

\_\_\_\_\_

9. 最終報告書作成日

平成 6年 2月15日

作成者

\_\_\_\_\_

10. 最終報告書の承認

平成 6年 2月15日

試験責任者

氏名

\_\_\_\_\_



#### 11.5 被験物質の確認

に記載の赤外吸収スペクトルと当研究所の当該測定スペクトルが一致することを確認した（図-15参照）。また、質量スペクトル（図-16参照）及び核磁気共鳴スペクトル（図-17参照）についても測定を行い、構造を確認した。

#### 11.6 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（図-15参照）、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。

#### 11.7 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。

#### 12.4 試験条件

- |            |  |
|------------|--|
| (1) 試験水槽   | 円型ガラス製水槽                                 |
| (2) 試験液量   | 4 L / 濃度区                                |
| (3) 試験水温   | 25 ± 2 °C                                |
| (4) 溶存酸素濃度 | ばく露開始時 7.1 mg/L<br>ばく露終了時 6.0 ~ 6.8 mg/L |
| (5) pH     | ばく露開始時 7.7 ~ 7.8<br>ばく露終了時 7.7 ~ 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)                      |

#### 12.5 原液調製法

(1) 分散剤

HCO-40

(2) 調製方法

被験物質とその10倍量のHCO-40をアセトンに溶解し、アセトンを留去した後イオン交換水に溶解して1000 mg/Lの原液を調製した。

#### 12.6 試験の実施

- |           |                           |
|-----------|---------------------------|
| (1) 実施場所  | 115 LC50室                 |
| (2) 試験実施日 | 平成 6年 1月17日 ~ 平成 6年 1月19日 |

#### 12.7 48時間LC50値の算出

Doudoroff法で行った。

#### 12.8 試験結果

48時間LC50値 9.80 mg/L (図-3参照)

### 13. 濃縮度試験の実施

#### 13.1 供試魚

- (1) 魚 種 コイ Cyprinus carpio
- (2) 供給源 杉島養魚場  
(住所 〒 866 熊本県八代市郡築一番町 123-2)  
供試魚受入日 平成 5年10月19日
- (3) 蓄養条件 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7日間飼育した。
- (4) じゅん化条件 蓄養後、寄生虫駆除の薬浴を行った後、じゅん化水槽へ  
搬入し、再度薬浴した後、じゅん化を行った。その間  
異状のあるものは除去し、 $25 \pm 2$  °Cの水温の流水状態  
で26日間飼育した。さらに試験水槽へ移し、薬浴後、  
同温度の流水状態で26日間飼育した。  
じゅん化終了日 平成 5年11月26日
- (5) ばく露開始前の体重、体長等
- |       |    |        |
|-------|----|--------|
| 体 重   | 平均 | 22.4 g |
| 体 長   | 平均 | 9.4 cm |
| 脂質含有率 | 平均 | 3.5 %  |
- ロット TFC-931019 の測定値  
測定日 平成 5年11月25日
- (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。<br>ただし、供試魚の採取前日は給餌を止めた。 |

#### 13.2 試験用水

12.3に同じ。

### 13.3 試験及び環境条件

- |             |   |
|-------------|---|
| (1) 試験水供給方法 | 当研究所組立流水式装置を用いた。  |
| (2) 試験水槽    | 70 L容ガラス製水槽   |
| (3) 試験水量    | 原液2 mL/分及び試験用水1000 mL/分の割合で<br>1443 L/日を試験水槽に供した。   |
| (4) 試験温度    | 25 ± 2 °C   |
| (5) 溶存酸素濃度  | 第1濃度区 7.2 ~ 7.7 mg/L (図-11参照)<br>第2濃度区 7.2 ~ 7.9 mg/L (図-12参照)<br>対照区 7.3 ~ 7.8 mg/L (図-13参照) |
| (6) 供試魚数    | 第1及び第2濃度区 11尾(ばく露開始時)<br>対照区 5尾(ばく露開始時)   |
| (7) ばく露期間   | 6週間   |
| (8) 実施場所    | 213アクアトロン室  |

### 13.4 原液調製法

#### (1) 分散剤

12.5の(1)と同じ。

#### (2) 調製方法

##### ・第1濃度区

被験物質とその10倍量のHCO-40をアセトンに溶解し、アセトンを留去した後イオン交換水に溶解して50 mg/Lの原液を調製した。

##### ・第2濃度区

被験物質とその10倍量のHCO-40をアセトンに溶解し、アセトンを留去した後イオン交換水に溶解して5 mg/Lの原液を調製した。

##### ・対照区

HCO-40 12.5 gをイオン交換水に溶解し25 Lに定容した。

以上を25 L容のガラス製原液タンクより試験水槽に供給した。

### 13.5 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 0.1 mg/L

第2濃度区 0.01 mg/L

に被験物質濃度を設定した。同時に、空試験として対照区を設定した。

## 13.6 試験水及び供試魚分析

### 13.6.1 分析回数

試験水中の被験物質分析は第1、第2濃度区ともばく露期間中、毎週2回計12回行い、1回当たりの分析試料は1点とした。また、供試魚中の被験物質分析は第1、第2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回当たりの分析試料は2尾とした。対照区はばく露開始前及びばく露終了時に行い、1回当たりの分析試料は2尾とした。

### 13.6.2 分析試料の前処理

#### (1) 試験水

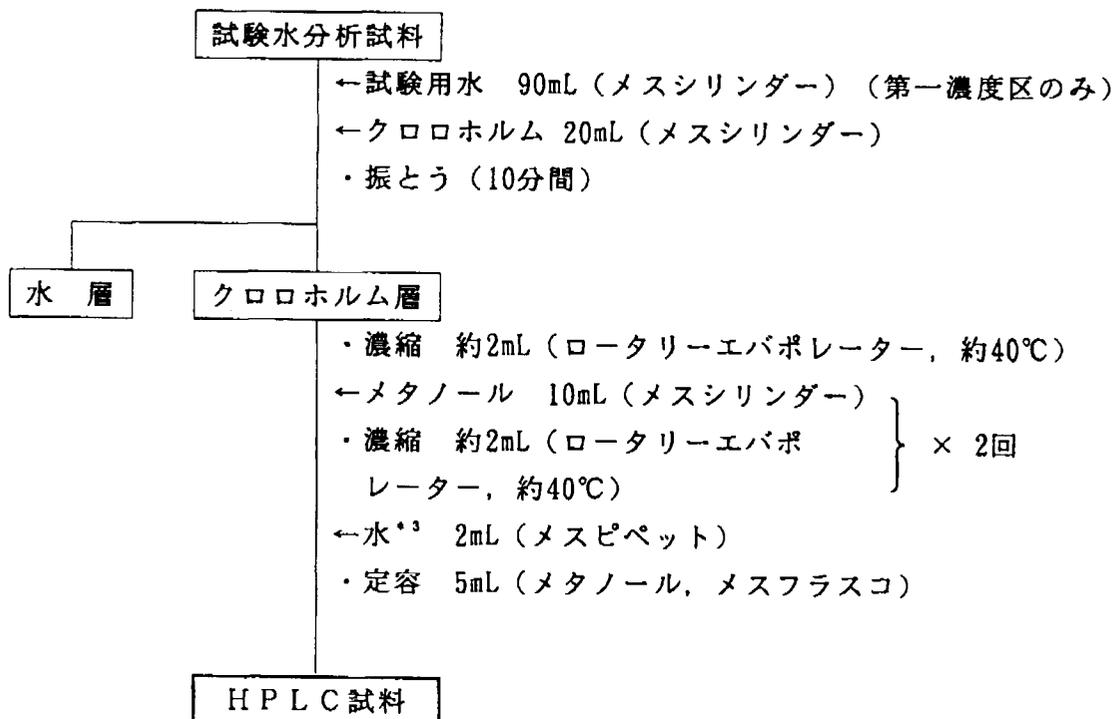
試験水槽から

第1濃度区 10 mL

第2濃度区 100 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、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）試料とした。

フロースキーム

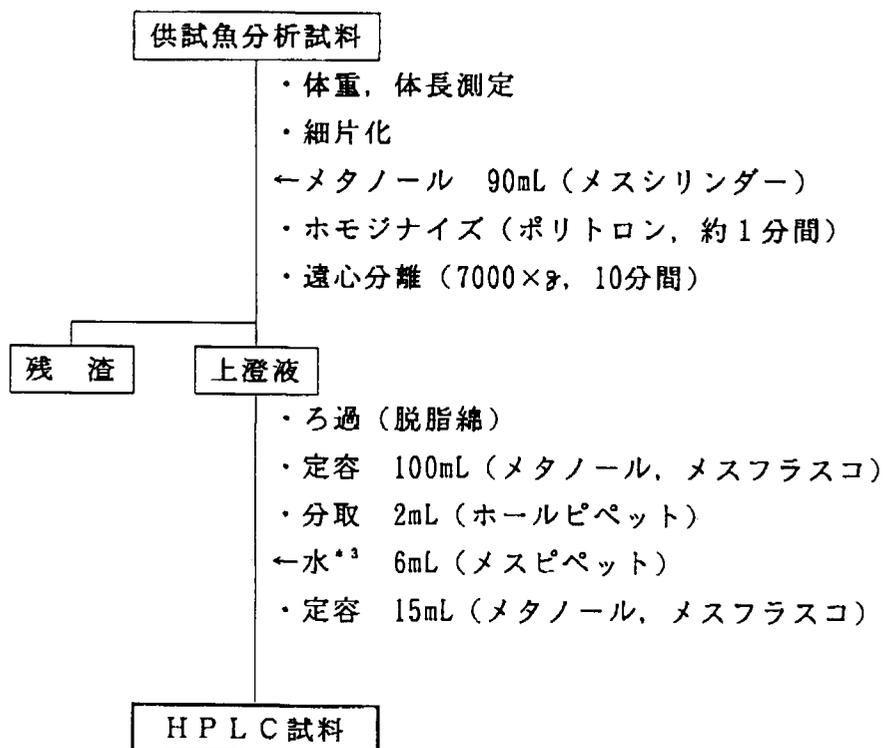


\*3 水道水をミリーXQを用いて処理した水。

## (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、HPLC試料とした。

### フロースキーム



### 13.6.3 定量分析

13.6.2の前処理を行って得られたHPLC試料は、下記の定量条件に基づき被験物質を分析した。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面積を濃度既知の標準溶液のピーク面積と比較し、比例計算して求めた(表-4, 5, 図-6, 表-7, 8, 9, 図-8, 9, 10参照)。

#### (1) 定量条件

機 器	高速液体クロマトグラフ
ポンプ	島津製作所製 LC-6A
検出器	島津製作所製 SPD-6A
カラム	TSK gel ODS-80TM 15cm×4.6mmφ ステンレス製
溶 離 液	メタノール/水 <sup>3</sup> (6/4 V/V)
流 量	1.0 mL/min
測定波長	280 nm (図-14参照)
注 入 量	50 μL
感 度	
記録計	レンジ 10 mV

#### (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100 mgを精密にはかりとり、メタノールに溶解して1000 mg/Lの標準原液を調製した。これをメタノールで希釈して10 mg/L溶液とし、さらにメタノール/水<sup>3</sup>(6/4 V/V)で希釈して0.2 mg/Lの標準溶液とした。

#### (3) 検量線の作成

(2)の標準溶液調製法と同様にして0.1、0.2及び0.4 mg/Lの標準溶液を調製した。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ピーク面積と濃度により検量線を作成した。

ピーク面積の検出下限はノイズレベルを考慮して600 μV·sec (被験物質濃度 0.0040 mg/L)とした(図-4参照)。

#### 13.6.4 回収試験及びブランク試験

##### (1) 方法

前述した前処理における試験水及び供試魚からの被験物質の回収率を求め  
るため、回収試験用試験水及び魚体ホモジネートに被験物質原液を添加し、  
13.6.2及び13.6.3の操作に準じて回収試験を行った。また、被験物質を加え  
ない回収試験用試験水及び魚体ホモジネートについて、回収試験と同じ操作  
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、各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, 6, 図-5, 7参照）。

##### (2) 結果

分析操作における回収率

試験水分析（被験物質 1  $\mu$ g 添加）

87.9%, 86.3% 平均 87.1%

供試魚分析（被験物質 150  $\mu$ g 添加）

68.0%, 70.7% 平均 69.4%

### 13.6.5 分析試料中の被験物質濃度の算出及び定量下限

#### (1) 試験水分析試料中の被験物質濃度の算出

表-4, 5の計算式に従って計算し、計算結果は有効数字3ケタに丸めて表示した。

#### (2) 試験水中の被験物質の定量下限濃度

13.6.3(3)の検量線作成で求めた被験物質の検出下限より、試験水中の被験物質の定量下限濃度\*4はそれぞれ、

第1濃度区 0.0023 mg/L

第2濃度区 0.00023 mg/L

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

濃縮性が認められる場合、表-7, 8, 9の計算式に従って計算するが、被験物質の測定値は定量下限以下であった。

#### (4) 供試魚中の被験物質の定量下限濃度

13.6.3(3)の検量線作成で求めた被験物質の検出下限より、供試魚中の被験物質の定量下限濃度\*4は供試魚体重を30gとしたとき0.14 µg/gと算出される。

$$*4 \text{ 被験物質定量下限濃度 (mg/L又は } \mu\text{g/g)} = \frac{A}{\frac{B}{100}} \times \frac{C \times E}{D}$$

A : 検量線上検出下限濃度 (mg/L)

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

計算結果は有効数字2ケタに丸めた。

### 13.7 濃縮倍率（BCF）の算出

供試魚分析において、被験物質の測定値は定量下限以下であった。

なお、13.6.5 (4)で求めた供試魚中の被験物質定量下限濃度より、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	1.7倍
第2濃度区	1.8倍

### 13.8 数値の取扱い

数値の丸め方は、JIS Z 8202-1985 参考3 規則B の方法に従った。

## 14. 試験結果

### 14.1 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 mg/L)

	2週	3週	4週	6週	付表	付図
第1濃度区	0.0775	0.0794	0.0796	0.0831	表-4	図-6
第2濃度区	0.00735	0.00757	0.00755	0.00786	表-5	

試験水中の平均被験物質濃度は表-1に示すように、設定値の約75%以上が保持された。

## 14.2 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	1.7以下 1.7以下	1.7以下 1.7以下	1.7以下 1.7以下	1.7以下 1.7以下	表-7	図-8
第 2 濃 度 区	18 以下 18 以下	18 以下 18 以下	18 以下 18 以下	18 以下 18 以下	表-8	図-9

被験物質のコイに対する濃縮性の程度は、表-2に示すように濃縮倍率で第1濃度区：1.7倍以下、第2濃度区：18倍以下であった。また、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。

## 14.3 供試魚の外観観察等

供試魚は外観観察等の結果、異常は認められなかった。

## 15. 試資料の保管

### 15.1 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、「GLP基準」第32条に定める期間、当研究所試料保管室に保管する。

### 15.2 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、指示書、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、当研究所資料保管室に保管する。

## 16. 備 考

### 16.1 試験に使用した機器、装置、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 : 東京理化学器械製 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、試薬

##### 装置・機器

高速液体クロマトグラフ : 12頁参照

天 び ん : ザルトリウス社製 型 1702MP8

: ザルトリウス社製 型 1216MP

##### 装置

ロータリーエバポレーター : 東京理化学器械製 型 N-1

振とう機 : 入江商会製 TS式

大洋科学工業製 型 SR-II W

ホモジナイザー : キネマチカ社製 型 PT10-35

遠心分離機 : 日立工機製 型 20PR-52

##### 試薬

クロロホルム : キシダ化学製 試薬特級

メタノール : 和光純薬工業製 HPLC用

アセトン : 和光純薬工業製 試薬一級

HCO-40 : 日光ケミカルズ製