

環境庁殿

最 終 報 告 書

2-プロパノールのオオミジンコ(*Daphnia magna*)に対する急性遊泳阻害試験

(試験番号：91917)

1998 年 2 月 17 日作成

財団法人 化学工業検査協会
化学品安全センター 化学工業研究所

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 久留米研究所

試験委託者： 環境庁

表 題： 2-プロパノールのオオミジンコ(*Daphnia magna*)に対する
急性遊泳阻害試験

試験番号： 91917

本試験は試験計画書及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。

監査又は査察内容	実施日	報告日(運営管理者)	報告日(試験責任者)
試験計画書監査	1997年12月22日	1997年12月22日	1997年12月22日
試験実施状況査察	1998年 1月12日	1998年 1月19日	1998年 1月19日
試験実施状況査察	1998年 1月14日	1998年 1月19日	1998年 1月19日
最終報告書監査	1998年 2月17日	1998年 2月17日	1998年 2月17日

1998年 2月17日

信頼性保証部門責任者



陳 述 書

財団法人 化 学 品 検 査 協 会
化学品安全センター 久留米研究所

試験委託者： 環境庁

表 題： 2-プロパノールのオオミジンコ(*Daphnia magna*)に対する
急性遊泳阻害試験

試験番号： 91917

上記試験は契約書別添 2「生態影響試験実施に関する基準」(平成 7 年 9 月 26 日)に
準拠したものである。

1998 年 2 月 17 日

運営管理者



試験実施概要

1 表 題

2-プロパノールのオオミジンコ(*Daphnia magna*)に対する急性遊泳阻害試験

2 試験目的

2-プロパノールについて、オオミジンコ(*Daphnia magna*)に対する急性遊泳阻害試験を行い、24及び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 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、急性遊泳阻害試験及び繁殖試験」(1984年)に準拠した。

4 適用GLP

本試験は契約書別添 2「生態影響試験実施に関する基準」(平成 7 年 9 月 26 日)に準拠した。

5 試験委託者

名 称： 環境庁

住 所： (〒100-0013)東京都千代田区霞が関 1-2-2

6 試験受託者

名 称： 財団法人 化学品検査協会

住 所： (〒136-0071)東京都江東区亀戸 5-6-21

7 試験施設

名 称： 化学品安全センター 久留米研究所

住 所： (〒830-0023)福岡県久留米市中央町 19-14

運営管理者： XXXXXXXXXX

8 試験関係者

試験責任者

[REDACTED]

試験担当者

生物試験担当

[REDACTED]

分析担当

[REDACTED]

試験資料管理部門責任者

[REDACTED]

9 最終報告書の作成

1998年 2月 17日

試験責任者

氏名

[REDACTED]

10 試験期間

試験開始日

1997年 12月 22日

試験終了日

1998年 2月 17日

暴露期間

1998年 1月 12日 ~ 1998年 1月 14日

11 保 管

試験計画書、生データ、記録文書、最終報告書及び被験物質は、最終報告書作成後10年間、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

	頁
要 旨	1
1 被 験 物 質	2
1.1 名称、構造式及び物理化学的性状	2
1.2 被験物質の確認及び保管条件下での安定性	3
2 試 験 生 物	3
3 試 験 方 法	4
3.1 試 験 条 件	4
3.2 希 釈 水	4
3.3 試験容器及び恒温槽等	4
3.4 試験濃度の設定	4
3.5 試験液の調製	5
3.6 試験液の分析	5
3.7 試 験 操 作	5
3.8 数値の取扱い	5
4 結果の算出	5
5 結果及び考察	6
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	6
5.2 試験液中の被験物質濃度	6
5.3 半数遊泳阻害濃度(EiC50)	6
5.4 最大無作用濃度(NOECi)	6
5.5 試験液の水温、溶存酸素濃度及びpH	6
5.6 試験液の状態	6
Table 1～7	7～9
Figure 1	10

付属資料－1 希釈水の水質

付属資料－2 試験液の分析方法及び分析チャート

要 旨

試験委託者

環境庁

表 題2-プロパノールのオオミジンコ(*Daphnia magna*)に対する急性遊泳阻害試験試験番号

91917

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、急性遊泳阻害試験及び繁殖試験」(1984年)に準拠して実施した。

- 1) 被験物質： 2-プロパノール
- 2) 試験生物： オオミジンコ(*Daphnia magna*)
- 3) 生物数： 20頭／1試験区(1連につき5頭で1試験区20頭)
- 4) 暴露期間： 48時間
- 5) 暴露方式： 止水式
- 6) 試験濃度： 1,000 mg/L及び対照区
- 7) 連 数： 1試験区につき4連
- 8) 試験液量： 1容器(1連)につき約250 mL
- 9) 試験水温： 20±1℃
- 10) 照 明： 室内光、16時間明／8時間暗
- 11) 試験液中の被験物質の分析： ガスクロマトグラフィー(GC)
(暴露開始時、暴露終了時)

結 果

- 1) 24時間暴露後の結果
24 時間半数遊泳阻害濃度(EiC50)
> 1,000 mg/L
- 2) 48時間暴露後の結果
48 時間半数遊泳阻害濃度(EiC50)
> 1,000 mg/L
最大無作用濃度(NOECi)
≥ 1,000 mg/L

(上記濃度は、全て設定値に基づく値)

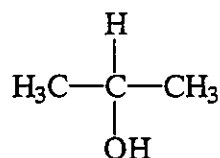
1 被 験 物 質

本報告書において2-プロパノールは、次の名称及び品質等を有するものとする。被験物質に関する情報については供給者提供の添付資料等によった。

1.1 名称、構造式及び物理化学的性状

- 1) 名 称： 2-プロパノール
(CAS番号 67-63-0)

- 2) 構 造 式：



- 3) 分 子 式： $\text{C}_3\text{H}_8\text{O}$
 4) 分 子 量： 60.10
 5) 外 観： 無色澄明の液体 ^{*1}
 6) 安 定 性： 不明
 7) 1-オクタノール／水分配係数(logP)： 0.05 ^{*2}
 8) pKa： 不明
 9) 水への溶解度： 10%以上 ^{*3}
 10) 蒸 気 圧： 33 mmHg (20℃) ^{*2}
 11) 密 度： 0.786 g/mL (20℃) ^{*1}
 12) 純度及び不純物： 100.0% (GC) ^{*1}
 水分 0.01% ^{*1}
 不揮発物 0.001%以下 ^{*1}
 酸 ($\text{C}_2\text{H}_5\text{COOH}$ として) 0.002%以下 ^{*1}
 13) ロット番号： TPL7310
 14) 供 給 者： XXXXXXXXXX

情 報 源

- *1： 供給者提供の添付資料
 *2： 化学物質安全情報研究会編「化学物質安全性データブック」(オーム社) 1994.
 *3： Hazardous Substances Data Bank(HSDB), U.S. National Library of Medicine (1995).

1.2 被験物質の確認及び保管条件下での安定性

被験物質は当研究所の冷蔵庫に保管した。

入手した被験物質について赤外吸収スペクトルを測定し、被験物質の特性と矛盾が認められないことを確認した。暴露終了後にも同様にスペクトルを測定し、暴露開始前に測定したスペクトルと比較した結果、スペクトルに変化は無かったことより被験物質は当研究所の冷蔵庫に保管中は安定であったと判断された。

2 試験生物

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

本種は、英国Sheffield大学(所在地；Sheffield S10 2UQ, United Kingdom)より分譲されたものを、当研究所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、和光純薬工業株式会社)の48時間EiC50は0.141 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

継代飼育している2～4週令のミジンコを試験生物の親とした。成熟し幼体を生むようになったら少なくとも、試験前日に幼体を除去した。但し、死亡個体の多いバッチ、休眠卵や雄が生じたバッチのミジンコは使用しなかった。

- 1) 飼育水： 希釈水(3.2参照)
- 2) 飼育密度： 10～30頭／800 mL飼育水
- 3) 水温： 20±1℃
- 4) 照明： 室内光、16時間明／8時間暗
- 5) 餌： 単細胞緑藻類(*Chlorella vulgaris*)
藻類培養液を遠心操作により、希釈水に置換して給餌した。
- 6) 給餌量： ミジンコ1頭当たり*Chlorella vulgaris*を0.1～0.2 mgC(有機炭素含量)／日の割合で与えた。この範囲でミジンコの成育段階に応じて段階的に餌の量を変えて与えた。

3 試験方法

3.1 試験条件

- 1) 暴露方式： 被験物質を含む試験液へ試験生物を暴露する薬浴方式を用いた。試験は密閉式で、暴露期間中、試験液の交換をしない止水式で行った。
- 2) 暴露期間： 48時間
- 3) 連 数： 1試験区に付き4連
- 4) 生物数： 20頭/1試験区(1連に付き5頭で1試験区20頭)
- 5) 試験液量： 1容器(1連)に付き約250 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

脱塩素水道水(久留米市水道水を活性炭処理し、残留塩素等を除去したもので、充分通気した)を使用した。希釈水の主な水質として、硬度は 40.5 mg/L (CaCO_3 換算)、pHは7.6であった。希釈水使用時にはオルトトリジン法によって残留塩素濃度が 0.02 mg/L 以下であることを確認した。

[付属資料-1]

3.3 試験容器及び恒温槽等

- 1) 試験容器： 250 mL容腰高シャーレに時計皿を用いて密閉容器とした。
- 2) 恒温槽： 加温冷却機によって試験容器内の水温を $20\pm 1^{\circ}\text{C}$ に維持する恒温槽を用いた。
- 3) 水温計： 検定済みガラス製棒状温度計
- 4) pH計： ガラス電極式水素イオン濃度計 HM-14P 型(東亜電波工業)
- 5) 溶存酸素計： 溶存酸素計58型(Yellow Springs Instrument Co., Inc.)

3.4 試験濃度の設定

本試験に先立って行った予備試験の結果では $1,000\text{ mg/L}$ で0%遊泳阻害であったので、試験濃度は $1,000\text{ mg/L}$ のみを設定した。対照には希釈水のみに対照区を設けた。

3.5 試験液の調製

必要量の被験物質を希釈水に添加し〔密度(0.786 g/mL)換算し、容量で添加〕、マグネティックスターラーを用いて攪拌を行い、希釈水に溶解させて調製し、各試験容器に分割した。

3.6 試験液の分析

暴露開始時及び暴露終了時(48時間後)に各試験区の4容器の中層より試験液を等量採取して混合した後、GCにより分析した。試験液の分析に際しては、標準溶液(濃度49.9 mg/L)の測定を行い、そのピーク面積比から定量した。詳細は付属資料-2に示した。

3.7 試験操作

試験液の水温、溶存酸素濃度、pHを測定後、試験生物を投入し、その時点を暴露開始時とした。先端が比較的広口のガラスピペットを用いて試験生物を投入した。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。

暴露開始24及び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、遊泳阻害されたとみなした(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。水面で動くものについては水滴を落とす等の操作でミジンコを強制的に水中に沈めると遊泳することもあるが、再び浮上する場合は遊泳阻害に含めた。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、溶存酸素濃度、pHは、暴露開始時及び暴露終了時(48時間後)に、全試験区(但し、各1試験容器)の試験液について測定した。

3.8 数値の取扱い

数値の丸め方は、JIS Z 8202-1985 参考 3 規則 B によった。

4 結果の算出

濃度区の遊泳阻害数と供試個体数(20頭)から遊泳阻害率(%)を算出した。

なお、被験物質の測定濃度が設定値の±20%以内であったので、結果の算出には設定濃度を用いた。

5 結果及び考察

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

該当する要因はなかった。

5.2 試験液中の被験物質濃度

暴露開始時及び暴露終了時(48時間後)に試験液中の被験物質濃度を測定した。被験物質の測定濃度の設定値に対する割合は、暴露開始時で101%、暴露終了時で97.0%であり、いずれもほぼ設定濃度に保たれていた。

[Table 1(p.7), 付属資料-2]

5.3 半数遊泳阻害濃度(EiC50)

2-プロパノールの設定濃度に基づく24及び48時間の半数遊泳阻害濃度(EiC50)は共に> 1,000 mg/Lであった。

[Table 3(p.8), Figure 1(p.10)]

5.4 最大無作用濃度(NOECi)

2-プロパノールに48時間暴露したミジンコの遊泳阻害における最大無作用濃度(NOECi)は、 $\geq 1,000$ mg/L(設定濃度)であった。

[Table 4(p.8), Figure 1(p.10)]

5.5 試験液の水温、溶存酸素濃度及びpH

暴露期間中に測定した水温は20.3～20.5℃であった。溶存酸素濃度は8.3～8.7 mg/Lであり、飽和溶存酸素濃度の60%以上であった(20.0℃の飽和溶存酸素濃度：8.84 mg/L)。pHは7.5～7.6であった。

[Table 5～7(p.9)]

5.6 試験液の状態

調製時の試験液は無色透明で、その状態は暴露終了時まで変わらなかった。

以 上

Table 1. Concentrations of 2-propanol acute immobilization test using *Daphnia magna* under static conditions

Nominal concentration (mg/L)	Measured concentration (mg/L) (Percentage of nominal)		
	0-hour ^{a)}	48-hour ^{b)}	Mean ^{c)}
Control	n.d.	n.d.	n.d.
1,000	1,010 (101)	970 (97.0)	989 (98.9)

n.d. : < 12.5 mg/L

a) fresh solutions

b) expired solutions

c) The values are expressed as time-weighted means calculated by the following equation:

$$(C_0 - C_{48}) / (\ln C_0 - \ln C_{48})$$

where

C_0 : the measured concentration at 0-hour

C_{48} : the measured concentration at 48-hour

$\ln C_0$: the natural logarithm of C_0

$\ln C_{48}$: the natural logarithm of C_{48} .

Table 2. Immobility of *Daphnia magna* exposed to 2-propanol

Nominal concentration (mg/L)	Cumulative number of Immobilized <i>Daphnia</i> (Percent immobility)	
	24-hour	48-hour
Control	0 (0)	0 (0)
1,000	0 (0)	0 (0)

Table 3. Calculated EiC50 values for *Daphnia magna* exposed to 2-propanol based on nominal concentrations

Exposure time (hour)	EiC50 (mg/L)	95-Percent confidence limits (mg/L)	Statistical method
24	> 1,000	-	-
48	> 1,000	-	-

Table 4. No observed effect concentration (NOECi) of 2-propanol and lowest concentration in 100% immobility based on nominal concentrations

Exposure time (hour)	No observed effect concentration (NOECi) (mg/L)	Lowest concentration in 100% immobility (mg/L)
24	≥ 1,000	-
48	≥ 1,000	-

Table 5. Temperature of test solutions during 48-hour static exposure of *Daphnia magna* to 2-propanol

Nominal concentration (mg/L)		Temperature (°C)	
		0-hour	48-hour
Control	new	20.3	
	old		20.5
1,000	new	20.3	
	old		20.5

new : freshly prepared test solutions

old : test solutions after 48 hours exposure

Table 6. Dissolved oxygen concentrations of test solutions during 48-hour static exposure of *Daphnia magna* to 2-propanol

Nominal concentration (mg/L)		Dissolved oxygen concentration (mg/L)	
		0-hour	48-hour
Control	new	8.7	
	old		8.5
1,000	new	8.7	
	old		8.3

new : freshly prepared test solutions

old : test solutions after 48 hours exposure

Table 7. pH values of test solutions during 48-hour static exposure of *Daphnia magna* 2-propanol

Nominal concentration (mg/L)		pH	
		0-hour	48-hour
Control	new	7.6	
	old		7.5
1,000	new	7.6	
	old		7.5

new : freshly prepared test solutions

old : test solutions after 48 hours exposure

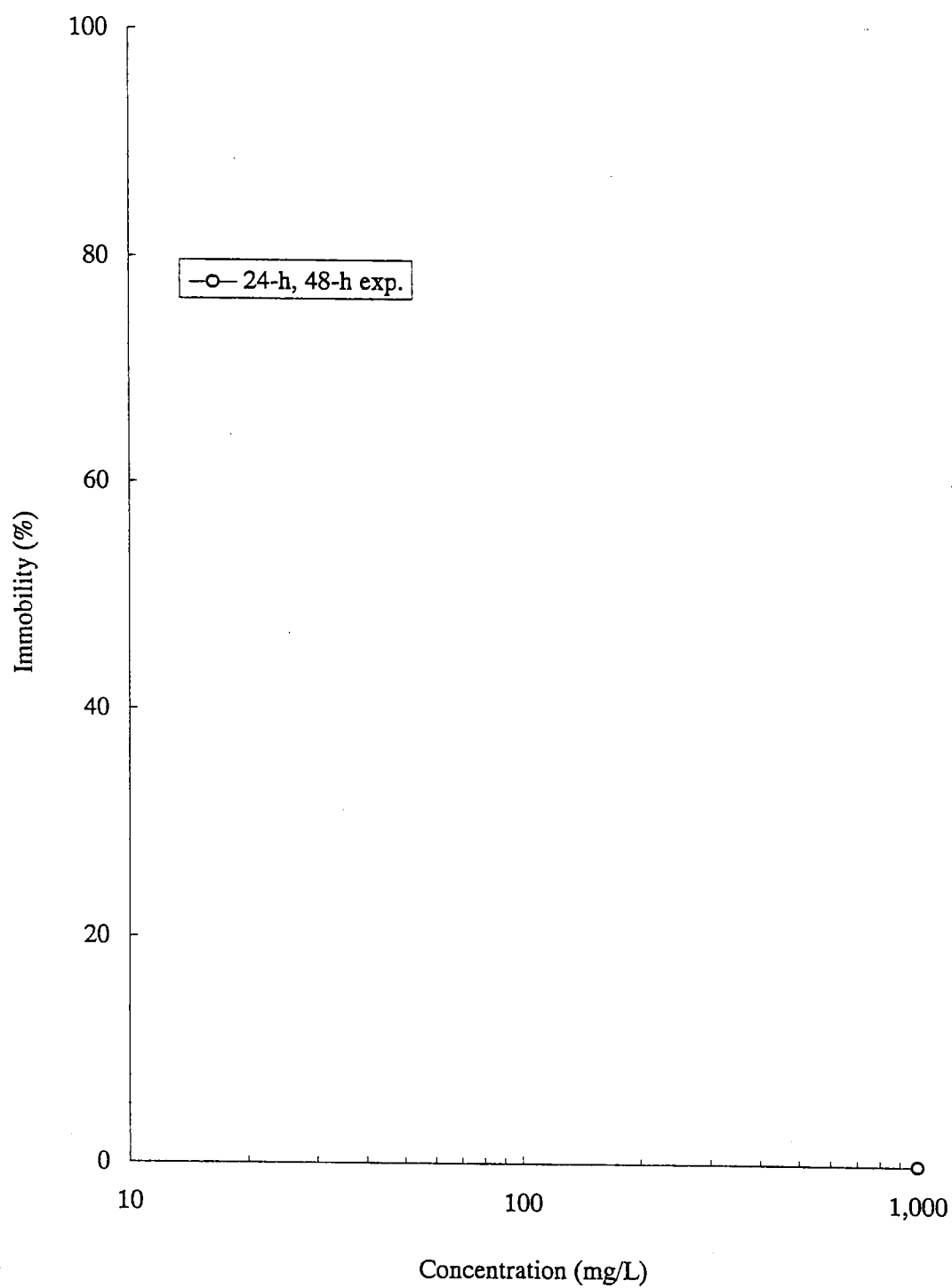


Figure 1. Concentration - toxicity curve of 2-propanol in *Daphnia magna*.

付属資料－1

希釈水の水質

(全 2 頁)

Appendix 1. Water quality of dilution water

Parameter	Concentration	Lower limit
	1997.Aug.21	of detection
pH	7.6	
COD (mg/L)	<0.5	
Coliform group bacteria (MPN/100mL)	0	
Total phosphorus (mg/L)	0.004	
Total mercury (mg/L)	n.d.	0.0005
Copper (mg/L)	n.d.	0.005
Cadmium (mg/L)	n.d.	0.005
Zinc (mg/L)	n.d.	0.01
Lead (mg/L)	n.d.	0.005
Aluminium (mg/L)	n.d.	0.1
Nickel (mg/L)	n.d.	0.01
Total chromium (mg/L)	n.d.	0.02
Manganese (mg/L)	n.d.	0.01
Tin (mg/L)	n.d.	0.5
Iron (mg/L)	0.03	0.01
Cyanide (mg/L)	n.d.	0.1
Free chlorine (mg/L)	n.d.	0.01
Bromide ion (mg/L)	n.d.	0.1
Fluoride (mg/L)	n.d.	0.15
Sulfide ion (mg/L)	n.d.	0.1
Ammonia nitrogen (mg/L)	n.d.	0.01
Arsenic (mg/L)	n.d.	0.002
Selenium (mg/L)	n.d.	0.002
Evaporation residue (mg/L)	116	
Electric conductivity (μs/cm)	148	
Total hardness (as CaCO ₃) (mg/L)	40.5	
Alkalinity (mg/L)	29.0	
Sodium (mg/L)	10.2	
Potassium (mg/L)	2.92	
Calcium (mg/L)	10.4	
Magnesium (mg/L)	3.52	

Appendix 1. (continued)

Parameter		Concentration	Lower limit of detection
		1997.Aug.21	
1,2-Dichloropropane	(mg/L)	n.d.	0.006
Diazinon	(mg/L)	n.d.	0.0005
Isoxathion	(mg/L)	n.d.	0.0008
Fenitrothion (MEP)	(mg/L)	n.d.	0.0003
Isoprothiolane	(mg/L)	n.d.	0.004
Oxine copper	(mg/L)	n.d.	0.004
Chlorothalonil (TPN)	(mg/L)	n.d.	0.004
Propyzamide	(mg/L)	n.d.	0.0008
EPN	(mg/L)	n.d.	0.0006
Dichlorvos (DDVP)	(mg/L)	n.d.	0.001
Fenobucarb (BPMC)	(mg/L)	n.d.	0.002
Iprobenfos (IBP)	(mg/L)	n.d.	0.0008
Chlornitrofen (CNP)	(mg/L)	n.d.	0.0005
Thiram	(mg/L)	n.d.	0.0006
Simazine (CAT)	(mg/L)	n.d.	0.0003
Thiobencarb	(mg/L)	n.d.	0.002
PCB	(mg/L)	n.d.	0.0005

n.d. : not detected

付属資料－2

試験液の分析方法及び分析チャート

(全 6 頁)

試 験 名 : ミジンコ急性遊泳阻害試験

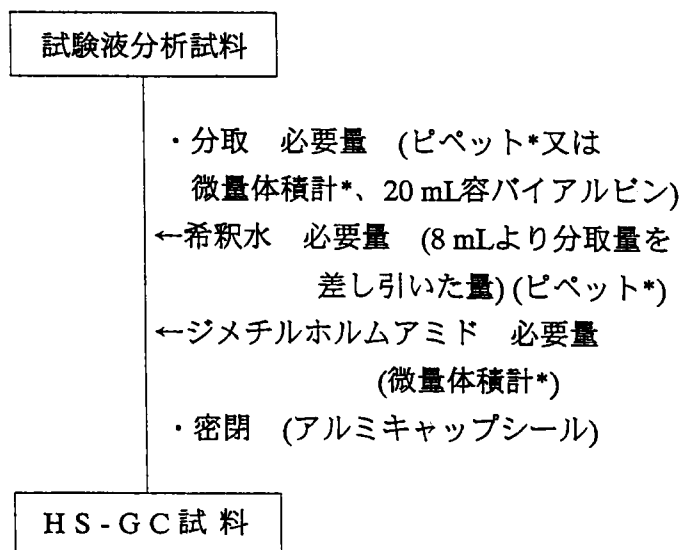
被験物質物質名 : 2-プロパノール

1) 試験液の分析方法

(1) 試験液の前処理操作

混合した溶液は、以下のフロースキームに従いヘッドスペース-ガスクロマトグラフィー(HS-GC)によって分析した。

フロースキーム



* エッペンドルフ社製

HS-GC試料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。

(2) 被験物質溶液の調製

被験物質127 μL [99.8 mg=127 μL ×0.786 g/mL(密度)]をマイクロシリンジで分取し、ジメチルホルムアミド(DMF)に溶解して3,990 mg/Lの被験物質溶液を調製した。

(3) 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して行った。20 mL容バイアルビンに希釈水8 mLを添加し、これに3,990 mg/Lの被験物質溶液を100 μL 、更にDMF含有量が2.5%になるようにDMFを添加した後、直ちにアルミキャップシールを行い、49.9 mg/Lの標準溶液とした。

2) 定量条件

ヘッドスペース オートサンプラー条件

機 器	PERKIN ELMER Head Space Sampler HS40 PERKIN ELMER製
サンプル加熱温度	90℃
ニードル温度	140℃
トランスファー温度	150℃
注 入 時 間	0.08分
加 熱 時 間	30分

ガスクロマトグラフ条件

機 器	ガスクロマトグラフ HEWLETT PACKARD製 HP 5890 Series- II
検 出 器	水素炎イオン化検出器 (FID)
カ ラ ム	50 m×0.25 mm
液 相	NeutraBond-1 膜厚 1.5 μm
カラム温度	40℃ (1 min)→170℃ (1 min)
昇 温 速 度	10℃/min
試料導入部温度	200℃
検 出 器 温 度	250℃
スプリット比	1 : 75
キャリアーガス	ヘリウム 150 kpa
水 素	2.2 Kg/cm ²
空 気	2.8 Kg/cm ²
感 度	
検 出 器	レンジ 2 ⁰ , 1 V/FS
記 録 計	ATTEN 2 ⁶

3) 検量線の作成

(3)の標準溶液の調製と同様にして12.5、25.0、49.9及び99.8 mg/Lの標準溶液を調製した。これらを分析機器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。

Content of figure

- Figure 1. Calibration curve of 2-propanol by GC analysis.
- Figure 2-1. Example of chromatogram.
(standard solution of 49.9 mg/L, 0-hour)
- Figure 2-2. Example of chromatogram.
(fresh test solution of 1,000 mg/L as nominal concentration,
0-hour)
- Figure 2-3. Example of chromatogram.
(fresh test solution of control, 0-hour)
- Figure 2-4. Example of chromatogram.
(standard solution of 49.9 mg/L, 48-hour)
- Figure 2-5. Example of chromatogram.
(expired test solution of 1,000 mg/L as nominal concentration,
48-hour)
- Figure 2-6. Example of chromatogram.
(expired test solution of control, 48-hour)

Input data		
Run	Concentration (mg/L)	Peak area ($\mu\text{V}\cdot\text{sec}$)
1	12.5	17464
2	25.0	34100
3	49.9	68493
4	99.8	140072

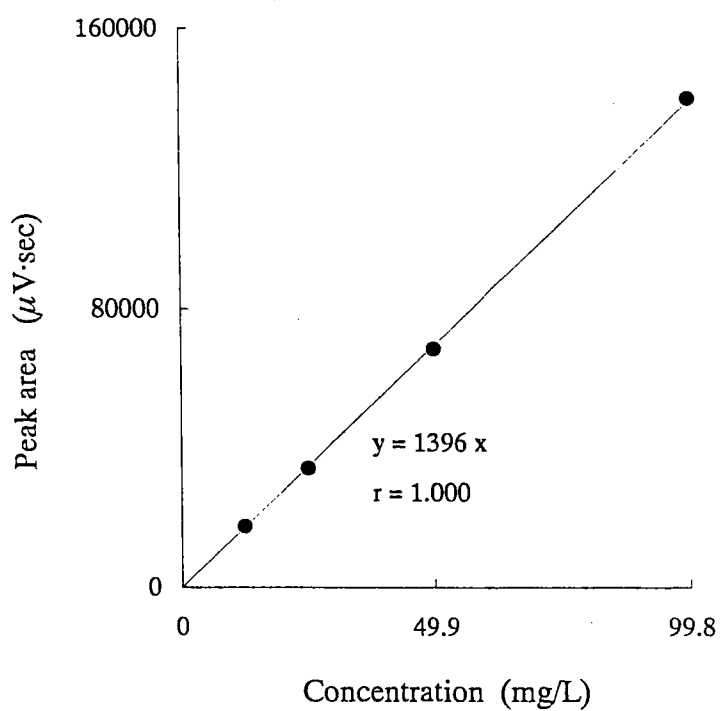


Figure 1. Calibration curve of 2-propanol by GC analysis.

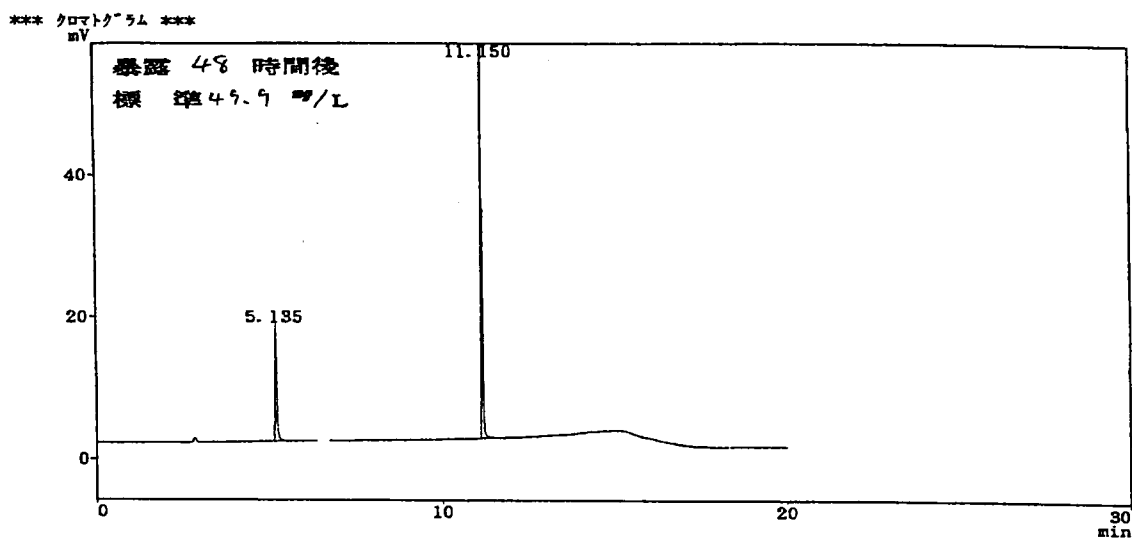


Figure 2-4. Example of chromatogram.
(standard solution of 49.9 mg/L, 48-hour)

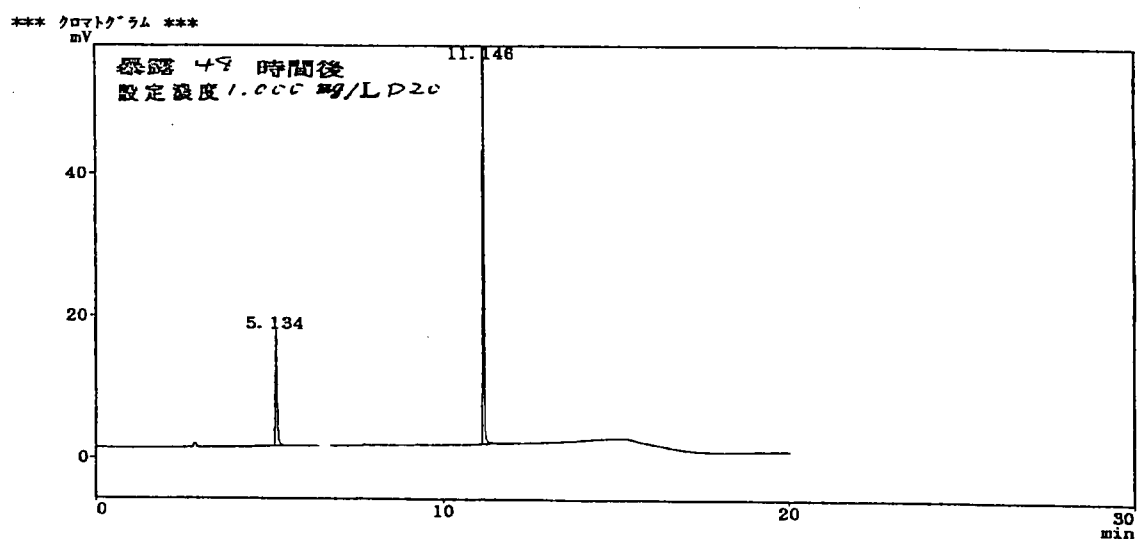


Figure 2-5. Example of chromatogram.
(expired test solution of 1,000 mg/L as nominal concentration, 48-hour)

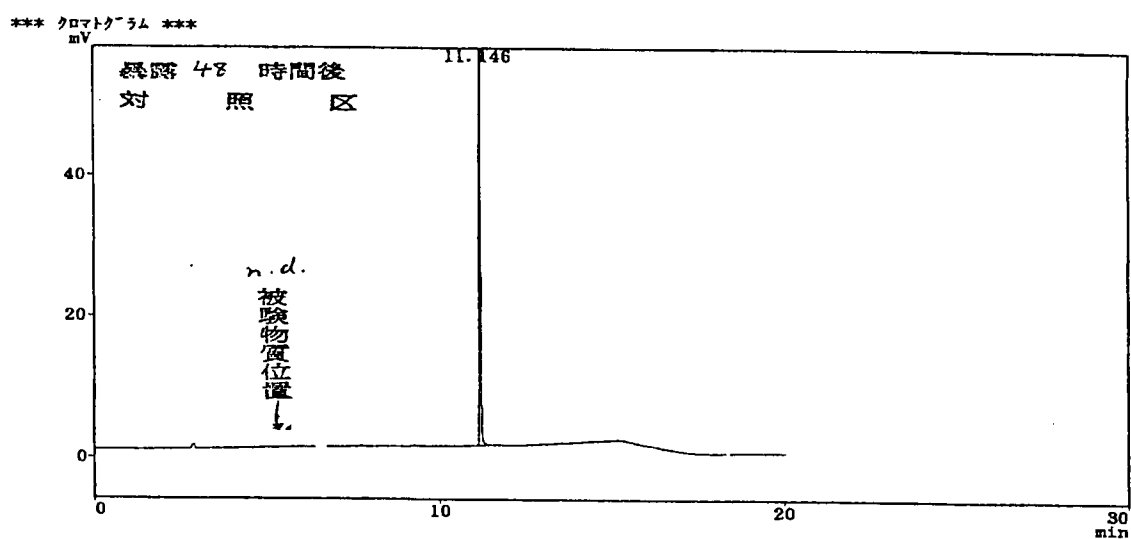


Figure 2-6. Example of chromatogram.
(expired test solution of control, 48-hour)

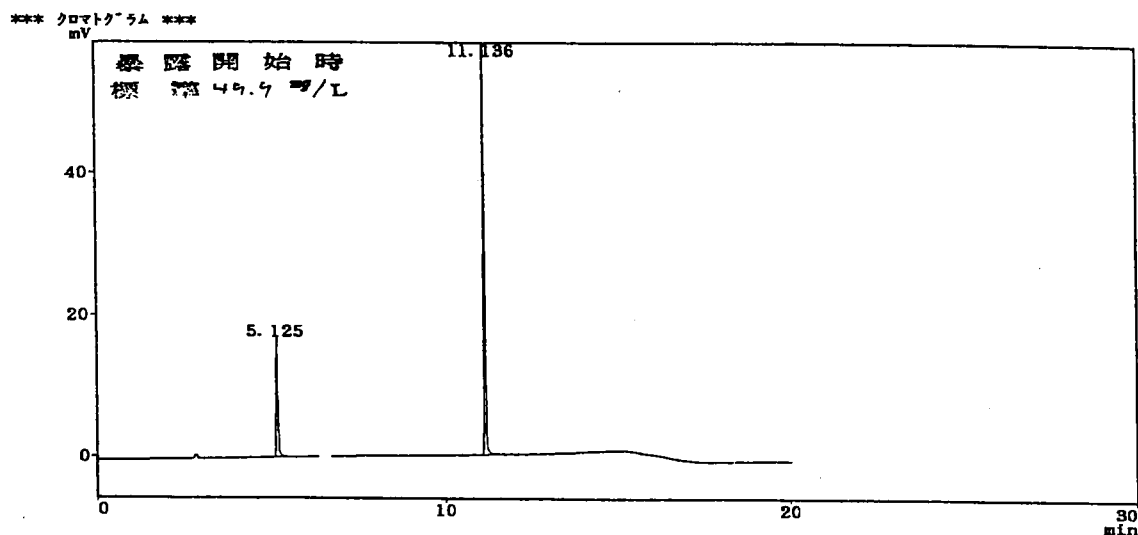


Figure 2-1. Example of chromatogram.
(standard solution of 49.9 mg/L, 0-hour)

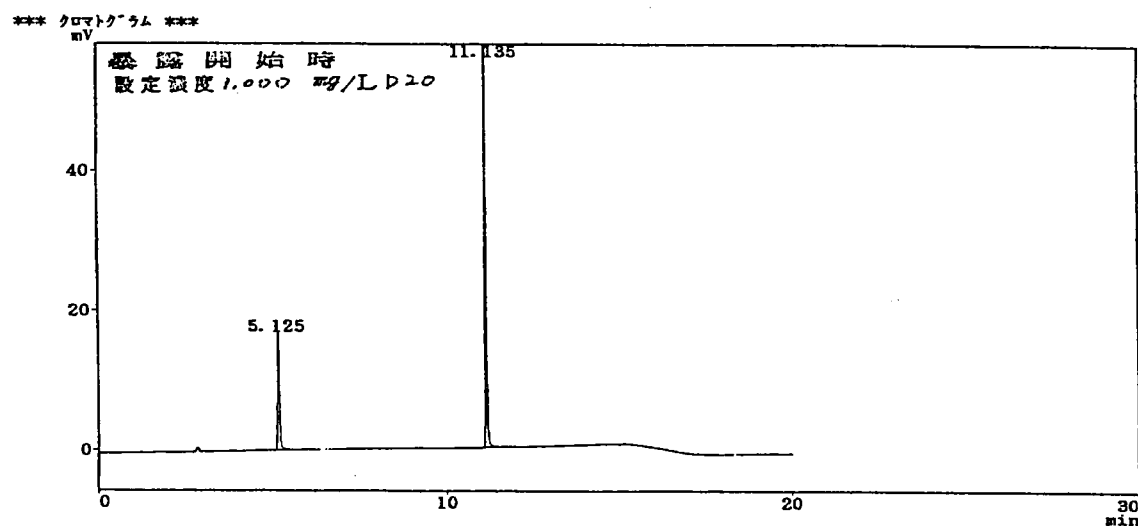


Figure 2-2. Example of chromatogram.
(fresh test solution of 1,000 mg/L as nominal concentration, 0-hour)

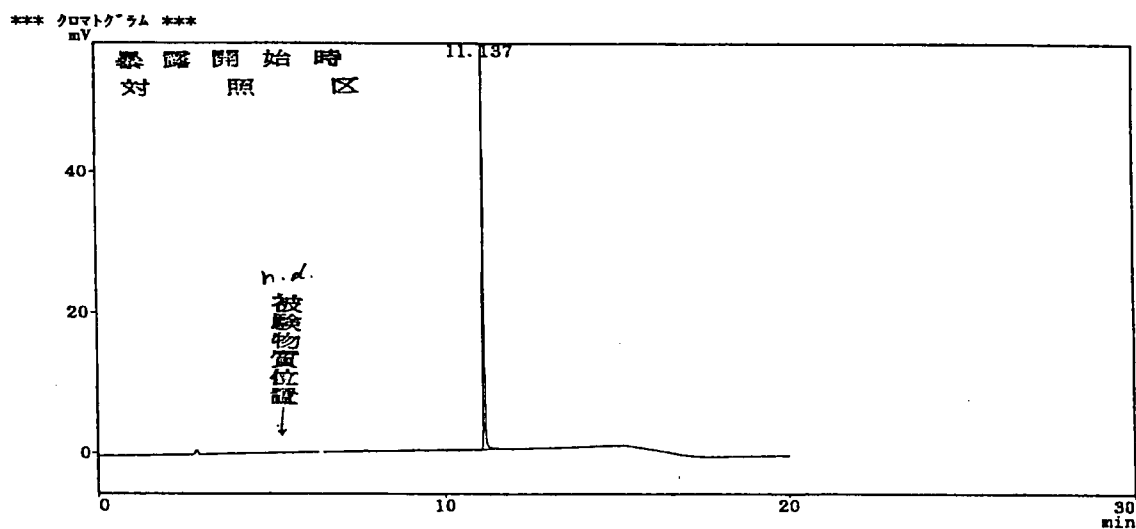


Figure 2-3. Example of chromatogram.
(fresh test solution of control, 0-hour)