



試験報告書

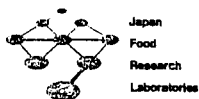
プロピレングリコールのオオミジンコ (*Daphnia magna*) に対する急性遊泳阻害試験

(試験番号：第07012号)

平成8年3月29日作成

財団法人日本食品分析センター

化学部
分析課
試験係



陳 述 書

試験委託者： 環境庁

試験の表題： プロピレングリコ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： 第 0 7 0 1 2 号

上記試験は、環境庁 G L P 「生態影響試験実施に関する基準」を遵守して実施したものである。

1996 年 3 月 29 日

(財) 日本食品分析センター 多摩研究所

運営管理者

信 頼 性 保 証 証 明 書

試験委託者： 環境庁

試験の表題： プロピレングリコ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： 第 0 7 0 1 2 号

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用いた方法、手順が正確に記載されており、試験結果は試験の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	試験責任者及び 運営管理者への報告日
査察実施期間	1995年11月 7日 ～1996年 3月29日	1995年11月 7日 ～1996年 3月29日
試験報告書監査	1996年 3月29日	1996年 3月29日

1996 年 3 月 29 日

(財) 日本食品分析センター 多摩研究所

信頼性保証責任者



目 次

	頁
試験概要	1
要 旨	3
1 被験物質	4
1.1 名称，構造式及び物理化学的性状	4
1.2 供試試料	4
1.3 被験物質の確認及び保管条件下での安定性	4
2 供試生物	5
3 試験方法	5
3.1 試験条件	5
3.2 希釈水	5
3.3 試験容器及び恒温室等	6
3.4 試験濃度の設定	6
3.5 試験水の調製	6
3.6 試験水の分析	6
3.7 試験操作	6
4 結果の算出	7
5 結果及び考察	7
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	7
5.2 試験水中の被験物質濃度	7
5.3 ミジンコの遊泳阻害数及び遊泳阻害率	7
5.4 半数遊泳阻害濃度（EiC50）	7
5.5 最大無作用濃度（NOECi）及び100%阻害最低濃度	7
5.6 試験水のpH，溶存酸素濃度及び水温	8
Table 1～7	9～14
付属資料－1	希釈水の水質
付属資料－2	試験水の分析方法

試験概要

1. 表題

プロピレングリコ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

プロピレングリコールについて、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 (EC50) 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 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

本試験は環境庁GLP「生態影響試験実施に関する基準」に従い実施した。

5. 試験委託者

名 称：環境庁

住 所：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 日本食品分析センター

所在地：東京都渋谷区元代々木町5-2-1

7. 試験施設：

名 称：財団法人 日本食品分析センター 多摩研究所

所在地：東京都多摩市永山6-11-10

8. 試験関係者

試験責任者

[Redacted Name]

(平成 8 年 3 月 29 日)

生物系試験担当者

[Redacted Name]

(平成 8 年 3 月 29 日)

[Redacted Name]

(平成 8 年 3 月 29 日)

[Redacted Name]

(平成 8 年 3 月 29 日)

[Redacted Name]

(平成 8 年 3 月 29 日)

理化学系試験担当者

[Redacted Name]

(平成 8 年 3 月 29 日)

[Redacted Name]

(平成 8 年 3 月 29 日)

9. 試験期間

試験開始日：平成7年11月 7日

試験終了日：平成8年 3月29日

曝露期間：平成8年 1月10日～平成8年 1月31日

10. 保管

試験計画書，生データ，記録文書及び試験報告書は，試験報告書作成後10年間，財団法人 日本食品分析センター 多摩研究所 資料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。

要 旨

試験委託者

環境庁

表 題

プロピレングリコ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

第 0 7 0 1 2 号

試験方法

本試験は、OECD化学品テストガイドライン 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：プロピレングリコール
- 2) 曝露方法：半止水式(24時間後に全量換水)
- 3) 供試生物：オオミジンコ (*Daphnia magna*)
- 4) 試験水温： $20 \pm 1^{\circ}\text{C}$
- 5) 曝露期間：48時間
- 6) 試験水量：100ml
- 7) 連 数：1濃度区 4連
- 8) 生 物 数：20頭/1濃度区(1連 5頭, 1濃度区 20頭)
- 9) 照 明：16時間明/8時間暗
- 10) 試験濃度：対照区, 1,000mg/L
- 11) 試験水中の被験物質の分析：ガスクロマトグラフ法(曝露開始時, 換水前)

結 果

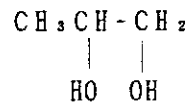
- 1) 24時間曝露後の半数遊泳阻害濃度
 $\text{EiC50 (24hr)} = 1,000\text{mg/L}$ 以上
- 2) 48時間曝露後の半数遊泳阻害濃度
 $\text{EiC50 (48hr)} = 1,000\text{mg/L}$ 以上
- 3) 最大無作用濃度 (NOECi) = 1,000mg/L
- 4) 100%阻害最低濃度 = 1,000mg/L以上
(上記濃度は、全て設定値に基づく値)

1 被験物質

1.1 名称，構造式及び物理化学的性状

名 称：プロピレングリコール

構造式：



分子式：C₃H₈O₂

分子量：76.10

安定性：—

P_{ow}：-1.41~-0.30

pKa：—

水への溶解度：可溶

蒸気圧：0.2mmHg（20℃）

1.2 供試試料

購入先：[REDACTED]

入手先：[REDACTED]

入手日：平成7年11月 1日

ロット番号：703S1954

外 観：無色液体

純 度：99.5%以上

1.3 被験物質の確認及び保管条件下での安定性

被験物質は財団法人 日本食品分析センター 多摩研究所の被験物質保管庫（室温）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，被験物質の構造と矛盾が認められないことを確認した。試験終了時にも同様にスペクトルを測定し，試験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。よって，被験物質は多摩研究所の被験物質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、多摩研究所において継代飼育しているものである。

供試ミジンコにおける基準物質（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48時間 EC_{50} 値は 0.52mg/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、別に用意した容器に移した。翌日、産出された幼体を順化用容器（1L容ガラス製ビーカー）に分け、この幼体を供試ミジンコの親とし、以下の条件で2～4週間飼育した。成熟し幼体を産むようになったら1週間に3回幼体を除去した。2～4週間後、曝露開始前日に順化用容器から幼体を除去し、翌日（24時間以内）産出された幼体を試験に用いた。なお、ミジンコの異常が認められた容器，死亡個体の多い容器，休眠卵や雄が生じた容器のミジンコは使用しなかった。

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：*Chlorella vulgaris*

給餌：ミジンコ1頭当たり $0.1\sim 0.2\text{mgC}$ （有機体炭素含量）／日の割合で与えた。

3 試験方法

3.1 試験条件

- 1) 曝露方法：半止水式（24時間後に全量換水）
- 2) 温度： $20\pm 1^{\circ}\text{C}$
- 3) 曝露期間：48時間
- 4) 生物数：20頭/1濃度区（1連 5頭，1濃度区 20頭）
- 5) 試験水量：100ml
- 6) 連数：1濃度区 4連
- 7) 給餌：無給餌
- 8) 照明：16時間明／8時間暗

3.2 希釈水

希釈水は脱塩素水（東京都水道水を活性炭処理し，残留塩素を除去したもので，充分通気した。）を使用した。なお，定期測定による希釈水の水質結果を付属資料-1に示した。

試験に使用した希釈水のpH及び硬度はそれぞれ7.7及び 87mg/L （ CaCO_3 換算）であった。

3.3 試験容器及び恒温室等

- 1) 試験容器：100ml容ガラス製ビーカー
- 2) 恒温室：ER-35VS（日立冷熱株式会社）
- 3) 温度計：AP-210（安立計器株式会社）
- 4) pH計：HM-11P（東亜電波工業株式会社）
- 5) 溶存酸素計：DO-14P（東亜電波工業株式会社）

3.4 試験濃度の設定

本試験の実施に先立ち、公比10で10, 100及び1,000mg/Lの濃度区を設定し、予備試験を行い、本試験の濃度段階を決定した。

本試験は1,000mg/Lの濃度区で限度試験を行った。

3.5 試験水の調製

被験物質を水で溶解させた被験物質原液及び溶液を調製し、希釈水に添加して試験水を調製した。なお、対照区は希釈水のみとした。

3.6 試験水の分析

曝露開始時及び24時間後に各濃度区（1濃度 4連）の試験容器より各5mlを等量混合（計20ml）し、分析用試験水とした。

試験水は、速やかにガスクロマトグラフを用いて分析した。試験水の分析に際しては、標準溶液のピーク高を用いて検量線を作成し、試験水より得られたピーク高から試験水中の被験物質濃度を算出した。なお、詳細は付属資料-2に示した。

3.7 試験操作

曝露開始時に順化用容器から24時間以内の幼体を採取し、供試ミジンコとした。

試験水のpH、溶存酸素濃度（DO）及び水温を測定後、供試ミジンコを先端が比較的広口のガラスピペットを用いて各試験容器に5頭ずつ（1濃度区当たり20頭）投入した。その際、試験水量に対して、ピペット内の飼育水は全量で1%以内を目安とした。24時間後にミジンコを新しい試験水に移しかえ、48時間曝露した。また、換水前後及び終了時にpH、溶存酸素濃度及び水温を測定した（全濃度区、各1試験容器）。

曝露開始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秒間泳げない場合は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。）。

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（%）及び半数致死濃度（ EC_{50} ）を算出した。

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（ $NOEC_i$ ）とし、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なし。

5.2 試験水中の被験物質濃度

曝露開始時及び24時間後に試験水中の被験物質濃度を測定した。曝露開始時の被験物質濃度は $1,070\text{mg/L}$ （設定値 $1,000\text{mg/L}$ ）であり、試験開始後24時間の被験物質濃度は $1,030\text{mg/L}$ （設定値 $1,000\text{mg/L}$ ）であった。設定値に対する割合は105%であった。

[Table 1 (p.9), 付属資料-2]

5.3 ミジンコの遊泳阻害数及び遊泳阻害率

プロピレングリコールにおける曝露終了時の遊泳阻害数及び遊泳阻害率は、 $1,000\text{mg/L}$ 濃度区（設定濃度）以下で0頭（0%）であった。なお、対照区におけるミジンコが水面に浮く率は0%、遊泳阻害率は0%であり、試験成立条件である10%以下の基準を共に満たした。

[Table 2 (p.10)]

5.4 半数遊泳阻害濃度（ EC_{50} ）

プロピレングリコールの設定濃度に基づく24時間の半数遊泳阻害濃度（ EC_{50} ）は $1,000\text{mg/L}$ 以上であり、また、48時間の半数遊泳阻害濃度（ EC_{50} ）は $1,000\text{mg/L}$ 以上であった。

[Table 3 (p.11)]

5.5 最大無作用濃度（ $NOEC_i$ ）及び100%阻害最低濃度

プロピレングリコールに48時間曝露したミジンコの最大無作用濃度（ $NOEC_i$ ）は $1,000\text{mg/L}$ （設定濃度）であり、100%阻害最低濃度は $1,000\text{mg/L}$ （設定濃度）以上であった。

[Table 4 (p.11)]

5.6 試験水のpH、溶存酸素濃度及び水温

曝露期間中のpHは7.7～7.8であり、溶存酸素濃度は7.7～9.2mg/Lであり、すべての試験容器で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：8.8mg/L) また、水温は19.0～20.4℃であった。

[Table 5～7 (p.12～14)]

以 上

Table 1. Measured Concentrations of Propylene glycol During a 48-hour Exposure of *Daphnia magna* under Semi-Static Test Conditions

Nominal Concentration (mg/L)	Measured Concentration (mg/L)			Percent of Nominal
	0 hour new	24 hours old	Geometric Mean	
Control	< 1	< 1	-----	---
1,000	1,070	1,030	1,050	105

new : freshly prepared test solutions

old : test solutions after 24 hours exposure period

Table 2. Mortality or Immobility of *Daphnia magna* Exposed to Propylene glycol under Semi-Static Test Conditions

Nominal Concentration (mg/L)	Cumulative Number of Dead or Immobilized <i>Daphnia magna</i> (Percent Mortality or Immobility)	
	24 hours	48 hours
Control	0 (0)	0 (0)
1,000	0 (0)	0 (0)

Table 3. Calculated EiC50 Values for *Daphnia magna* Exposed to Propylene glycol
Based on Nominal Concentrations under Semi-Static Test Conditions

Exposure Period (hours)	EiC50 (mg/L)	95-Percent Confidence Limits (mg/L)	Statistical Method
24	> 1,000	not calculated	----
48	> 1,000	not calculated	----

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

Exposure Period (hours)	No Observed Effect Concentration (NOEC) (mg/L)	Lowest Concentration in 100% Mortality or Immobility (mg/L)
24	1,000	> 1,000
48	1,000	> 1,000

Table 5. pH Values During a 48-hour Semi-Static Exposure of *Daphnia magna* to Propylene glycol

Nominal Concentration (mg/L)		pH		
		0 hour	24 hours	48 hours
Control	new	7.9	7.5	---
	old	---	7.7	7.8
1,000	new	7.8	7.7	---
	old	---	7.6	7.6

new : freshly prepared test solutions

old : test solutions after 24 hours exposure period

Table 6. Dissolved Oxygen Concentrations During a 48-hour Semi-Static Exposure of *Daphnia magna* to Propylene glycol

Nominal Concentration (mg/L)		Dissolved Oxygen Concentrations (mg/L)		
		0 hour	24 hours	48 hours
Control	new	9.2	9.3	---
	old	---	8.8	8.3
1,000	new	9.2	9.1	---
	old	---	8.4	7.7

new : freshly prepared test solutions

old : test solutions after 24 hours exposure period

Table 7. Temperature Values During a 48-hour Semi-Static Exposure of *Daphnia magna* to Propylene glycol

Nominal Concentration (mg/L)		Temperature (℃)		
		0 hour	24 hours	48 hours
Control	new	19.9	20.2	----
	old	----	20.3	20.7
1,000	new	19.6	19.0	----
	old	----	20.1	20.4

new : freshly prepared test solutions

old : test solutions after 24 hours exposure period

付 属 資 料 ― 1

希 釈 水 の 水 質
(全 1 頁)

Water Quality of Dilution Water

Parameter	Concentration
COD	1.4 mg/L
Phosphorus	< 0.01 mg/L
pH	7.7(22°C)
Coliform organisms	ND
Mercury	< 0.0001 mg/L
Copper	< 0.01 mg/L
Cadmium	< 0.001 mg/L
Zinc	0.010 mg/L
Lead	< 0.005 mg/L
Aluminium	< 0.05 mg/L
Nickel	0.003 mg/L
Chromium(VI)	< 0.005 mg/L
Manganese	< 0.005 mg/L
Tin	< 0.1 mg/L
Iron	< 0.03 mg/L
Cyanide	< 0.1 mg/L
Free residual chlorine	< 0.01 mg/L
Bromide	< 0.5 mg/L
Fluoride	0.14 mg/L
Sulfide	< 0.01 mg/L
Ammonium	0.05 mg/L
Arsenic	< 0.001 mg/L
Selenium	< 0.001 mg/L
Total residue	190 mg/L
Electric conductivity	290 μ S/cm
Total hardness (as CaCO ₃)	86 mg/L
Alkalinity	41 mg/L
Sodium	18 mg/L
Potassium	3.1 mg/L
Calcium	26 mg/L
Magnesium	5.2 mg/L
PCB	< 0.0005 mg/L
Organophosphate	< 0.02 mg/L

Date : November 13, 1995

付 属 資 料 ー 2

試験水の分析方法
(全6頁)

試験水の分析方法

1 試験方法

① 試料溶液の調製

a) 1,000mg/L濃度区の試験水

試験水5mlを正確に量り、水を用いて100mlに定容し、これを試料溶液とした。

b) 対照区の試験水

そのまま試料溶液とした。

② 標準溶液の調製

標準品約0.05gを精密に量りとり、水に溶解して50mlに定容し、これを標準原液とした。この標準原液を水を用いて適宜希釈し、1, 5, 25, 50 μ g/mlの標準溶液を調製した。

③ 定量

①及び②で調製した試料溶液及び標準溶液各々2 μ lを正確に量り、ガスクロマトグラフに注入しプロピレングリコール含量を測定した。

2 ガスクロマトグラフ操作条件

機 種：GC-14A（島津製作所）

検 出 器：FID

カ ラ ム：DB-WAX, ϕ 0.53mm \times 20m, 膜厚 1.0 μ m

温 度：注入口・検出器 250 $^{\circ}$ C

：カラム100 $^{\circ}$ C（1min保持） \rightarrow 5 $^{\circ}$ C/min \rightarrow 150 $^{\circ}$ C

導 入 系：スプリットレス

ガス圧力：キャリアーガス He 0.7kg/cm², 水素 0.6kg/cm², 空気 0.5kg/cm²

データ処理装置：クロマトパック C-R4A（島津製作所）

3 検量線

1で調製した標準溶液2 μ lをガスクロマトグラフに注入し、ピーク高とプロピレングリコールの注入量から検量線を作成した。

4 添加回収試験

対照区の試験水に濃度が1000mg/Lになるようにプロピレングリコールを添加し、この溶液を用いて添加回収試験を行った。試験は平行測定 3回で実施し、回収率は104.5%, 99.0%, 102.0%（平均101.8%）であった。

Figure 1 Calibration Curve of Propylene glycol by GC analysis

Input data		
No.	ng Injected	Peak Hight μV
1	2	400
2	10	1,788
3	50	8,872
4	100	17,347

$$Y(\text{Peak Hight}) = 88.16 + 173.1750 \times (\text{ng Injected})$$

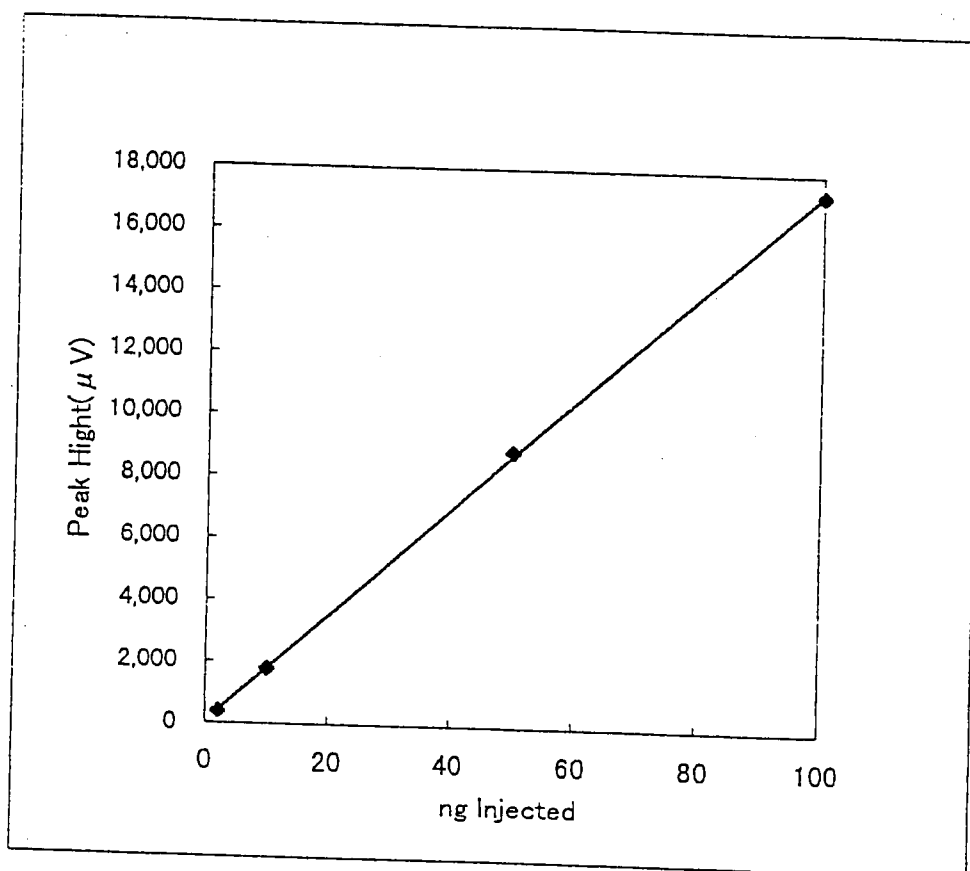
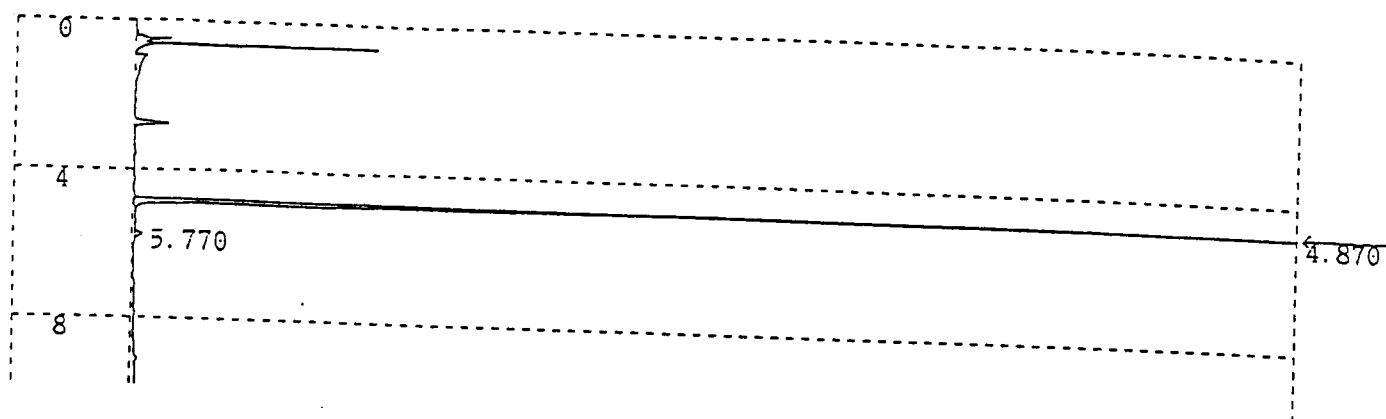


Figure 2 Representative chromatograms

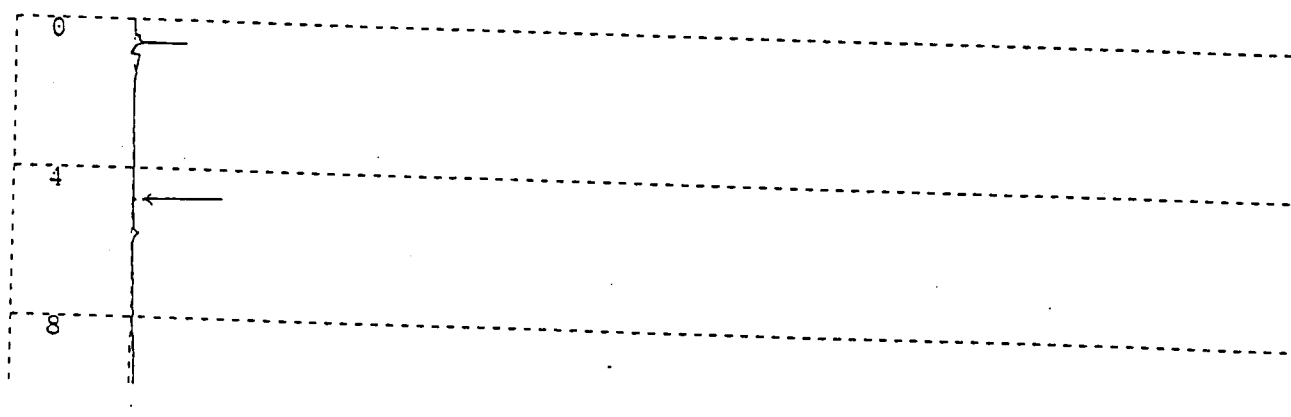
1) Standard (50mg/L) ; 0 hour



** 定量計算結果 **

CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	1	4.87	58742	17347		1		ア・ロ・レ・グ
TOTAL			58742	17347			0	

2) Control ; 0 hour

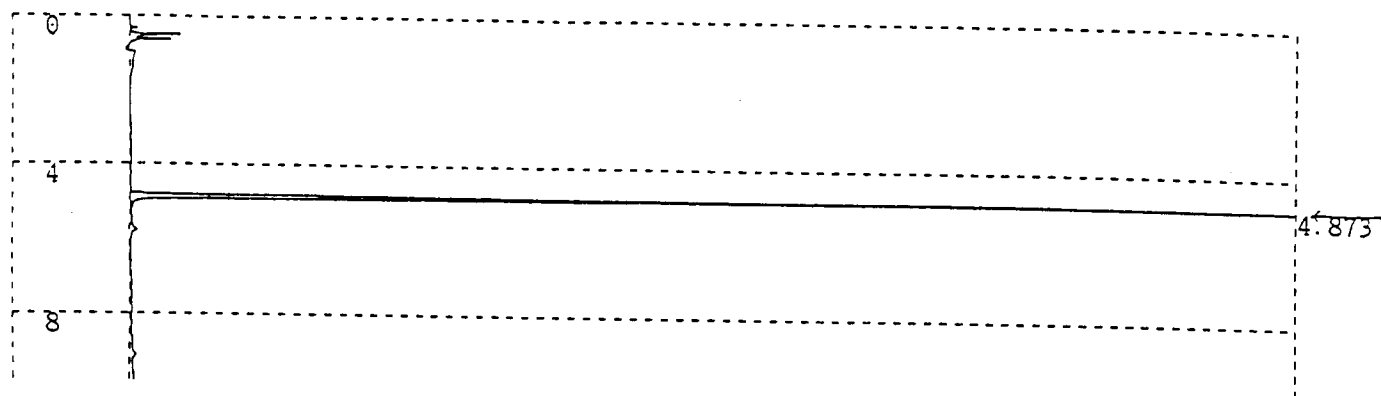


** 定量計算結果 **

CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
TOTAL			0	0			0	

Figure 2 Representative chromatograms

3) test solution (1000mg/L) ; 0 hour

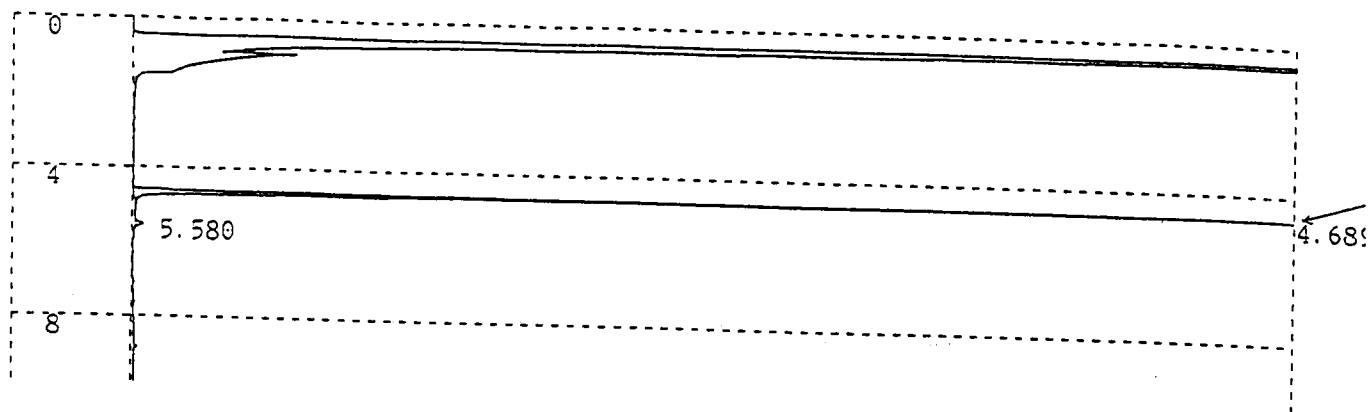


** 定量計算結果 **

CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	1	4.873	62802	18463		1		7-ロビ-ルG
TOTAL			62802	18463			0	

Figure 2 Representative chromatograms

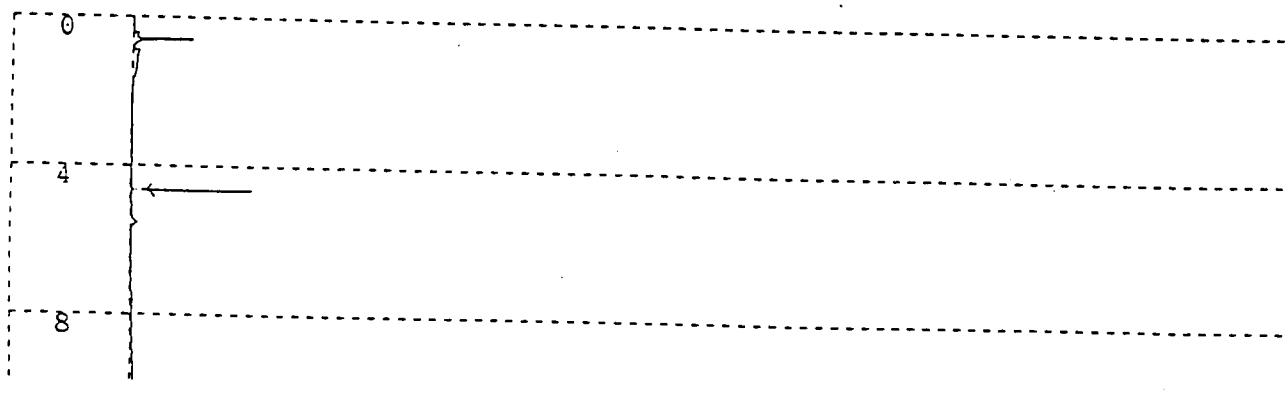
1) Standard (50mg/L) ; 24 hrs



** 定量計算結果 **

CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	1	4.689	60948	17569		1		
	2	5.58	760	108				7'0t'ly G
TOTAL			61708	17677			0	

2) Control ; 24 hrs

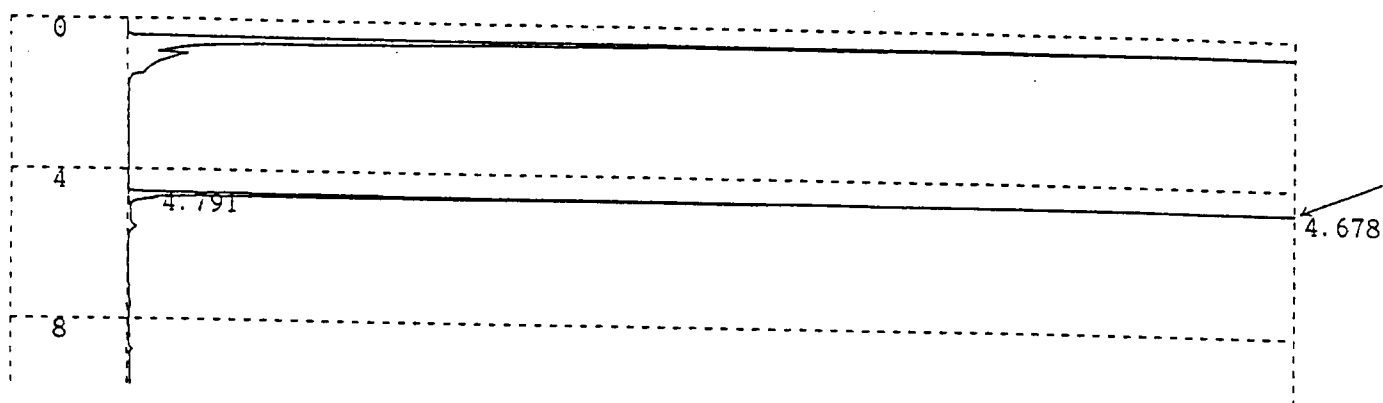


** 定量計算結果 **

CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
TOTAL			0	0			0	

Figure 2 Representative chromatograms

3) test solution (1000mg/L) ; 24 hrs



** 定量計算結果 **

CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	1	4.678	61753	18102	S	1		7'ロビ'ル G
	2	4.791	339	126	T	1		7'ロビ'ル G
TOTAL			62093	18227			0	