

# 最 終 報 告 書

アクリル酸のオオミジンコに対する急性遊泳阻害試験  
(試験番号：第16032号)

2005年6月10日

財団法人 日本環境分析センター 多摩研究所

## 目 次

頁

要 旨	3
1 試験目的	7
2 試験法ガイドライン	7
3 試験実施基準	7
4 被験物質	7
4.1. 名称, 構造式及び物理化学的性状	7
4.2. 供試試料	8
4.3. 被験物質の保管方法及び保管条件下での安定性	8
4.4. 取り扱い上の注意	8
5 試験生物	8
6 試験方法	9
6.1. 暴露条件及び環境条件	9
6.2. 試験用水	9
6.3. 試験容器及び恒温室等	10
6.4. 試験濃度の設定	10
6.5. 試験溶液の調製	10
7 観察及び測定方法	10
7.1. 試験生物の遊泳阻害, 症状等の観察	10
7.2. 被験物質濃度の測定	10
7.3. 試験環境の測定	11
7.4. 試験溶液の状態観察	11
8 結果の処理法	11
8.1. 結果の算出に用いた試験濃度の決定	11
8.2. 50 %遊泳阻害濃度 ( $EC_{50}$ )	11
8.3. 0 %遊泳阻害最高濃度及び 100 %遊泳阻害最低濃度	11
8.4. 統計的手法	11
9 結果及び考察	11
9.1. 試験溶液中の被験物質濃度	11
9.2. 50 %遊泳阻害濃度 ( $EC_{50}$ )	12
9.3. 0 %遊泳阻害最高濃度及び 100 %遊泳阻害最低濃度	12
9.4. 試験生物の症状等の観察	12
9.5. 試験環境の測定	12
9.6. 試験溶液の状態観察	12
9.7. 試験計画書からの逸脱事項	12
9.8. 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
9.9. 試験の有効性	13
9.10. 結果の評価と考察	13

Table 1. Measured concentration of the test substance in the test solution .....	14
Table 2. Cumulative immobility rates .....	15
Table 3. EC <sub>50</sub> values .....	15
Table 4. Maximum conc. of 0 % immobility and minimum conc. of 100 % immobility .....	16
Table 5. Observed toxicological abnormalities in behavior and appearance .....	16
Table 6. Temperature of test solution .....	17
Table 7. Dissolved oxygen concentration of test solution .....	18
Table 8. pH values of test solution .....	19
Figure 1. Concentration-immobility curve .....	20
付属資料-1：試験用水の水質 .....	21
付属資料-2：予備試験結果 .....	23
付属資料-3：追加試験結果 .....	24
付属資料-4：統計処理データ .....	26
付属資料-5：試験溶液中の被験物質濃度の分析方法 .....	28

## 要 旨

## 表 題

アクリル酸のオオミジンコに対する急性遊泳阻害試験

## 試験目的

アクリル酸のオオミジンコに対する48時間急性遊泳阻害試験を実施し、50 %遊泳阻害濃度 ( $EC_{50}$ ) を求め、オオミジンコの遊泳に対するアクリル酸の毒性を明らかにすることを目的とする。

## 試験方法

本試験は「新規化学物質等に係る試験の方法について(平成15年11月21日薬食発第1121002号, 平成15・11・13製局第2号, 環境企発第031121002号)」, 別添 藻類生長阻害試験, ミジンコ急性遊泳阻害試験及び魚類急性毒性試験, V ミジンコ急性遊泳阻害試験に準拠した。

- 1) 被験物質：アクリル酸
- 2) 試験生物：オオミジンコ (*Daphnia magna*)
- 3) 暴露方式：半止水式(24時間後全量換水)
- 4) 暴露期間：48時間
- 5) 試験濃度(設定値)：対照区, 18, 24, 32, 42, 56, 75及び100 mg/l(公比1.3)
- 6) 試験個体数：20頭/試験区(5頭4連)
- 7) 試験溶液量：100 ml/1連
- 8) 試験水温：19.0～19.8 ℃
- 9) 溶存酸素濃度：8.5～9.1 mg/l(暴露期間中, 飽和溶存酸素濃度の60 %を維持した。また, エアレーションは実施しなかった。)
- 10) pH : 4.5～8.0(試験溶液のpH調整は行わなかった。)
- 11) 照 明：室内光, 16時間明/8時間暗
- 12) 給 餌：無給餌
- 13) 試験用水：水道水(つくば市水道水)を活性炭処理し, 残留塩素等を除去した後, 十分通気した脱塩素水
- 14) 分 析 法：高速液体クロマトグラフ法

結 果

結果の算出は、試験溶液中の被験物質濃度の測定値から、幾何平均により求めた平均測定濃度を用いて行った。

- 1) 50 %遊泳阻害濃度 ( $EC_{50}$ ) :  
24時間後 ; 59 mg/l (95 %信頼限界 ; 55~63 mg/l) [Probit法]  
48時間後 ; 47 mg/l (95 %信頼限界 ; 44~51 mg/l) [Probit法]
- 2) 0 %遊泳阻害最高濃度 :  
24時間後 ; 33 mg/l  
48時間後 ; 25 mg/l
- 3) 100 %遊泳阻害最低濃度 :  
24時間後 ; 76 mg/l  
48時間後 ; 76 mg/l

表 題：アクリル酸のオオミジンコに対する急性遊泳阻害試験

試験番号：第16032号

試験委託者

名 称：環境省

所 在 地：〒100-8975 東京都千代田区霞ヶ関1丁目2番2号

試験受託者

名 称：財団法人 日本食品分析センター

所 在 地：〒151-0062 東京都渋谷区元代々木町52番1号

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：〒206-0025 東京都多摩市永山6丁目11番10号

〒206-0025 東京都多摩市永山6丁目21番6号(別館)

試験責任者

所 属：環境科学部 環境生物安全課

氏 名：[REDACTED]

分析担当責任者

所 属：応用試験部 農薬試験課

氏 名：[REDACTED]

試験担当者

生物系

所 属：環境科学部 環境生物安全課

氏 名：[REDACTED] , [REDACTED] , [REDACTED] , [REDACTED]

分析系

所 属：応用試験部 農薬試験課

氏 名：[REDACTED] , [REDACTED] , [REDACTED]

試験日程

試験開始日：2005年3月1日

実験開始日：2005年5月17日

実験終了日：2005年5月19日

試験終了日：2005年6月10日

記録及び試資料の保管

試験に関する下記の記録及び資料は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別途協議の上、定める。

- 1) 試験計画書
- 2) 生データ及び最終報告書
- 3) 信頼性保証部門の検閲記録
- 4) その他必要なもの

---

最終報告書の承認

試験責任者

所 属： 財団法人 日本食品分析センター 多摩研究所 環境科学部 環境生物安全課

氏 名：



## 1 試験目的

アクリル酸のオオミジンコに対する48時間急性遊泳阻害試験を実施し、50 %遊泳阻害濃度 (EC<sub>50</sub>) を求め、オオミジンコの遊泳に対するアクリル酸の毒性を明らかにすることを目的とする。

## 2 試験法ガイドライン

本試験は「新規化学物質等に係る試験の方法について(平成15年11月21日薬食発第1121002号, 平成15・11・13製局第2号, 環境企発第031121002号)」, 別添 藻類生長阻害試験, ミジンコ急性遊泳阻害試験及び魚類急性毒性試験, V ミジンコ急性遊泳阻害試験に準拠した。

## 3 試験実施基準

「新規化学物質等に係る試験を実施する試験施設に関する基準」(平成15年11月21日薬食発第1121003号, 平成15・11・17製局第3号, 環境企発第031121004号) を遵守した。

## 4 被験物質

被験物質に関する情報を以下に示した。以下の情報は、供給者提供資料に拠った。

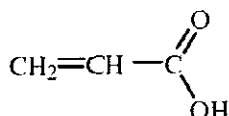
## 4.1. 名称, 構造式及び物理化学的性状

名 称: アクリル酸

別 名: 2-プロペン酸\*, エチレンカルボン酸\*

CAS 番号: 79-10-7

化学構造式\*:



化学式\*: C<sub>3</sub>H<sub>4</sub>O<sub>2</sub>

分子量: 72.06

沸 点: 141.0 °C

融 点: 13 °C

比 重: 1.055 (20/4 °C)

密 度: -

蒸気圧: 10 mmHg (39 °C)

溶解度: 水, アルコール, エーテルに混和

n-オクタノール/水分配係数 (log Pow): 0.35\*

解離定数 pKa: -

常温における性状: 白色～ほとんど白色の塊, 又は融解時, 無色～ほとんど無色, 澄明

安定性: 重合防止剤が添加されているが, 加熱, 直射日光, 過酸化物, 鉄錆などによって重合が起こることがある。

\* 供給者提供資料から得ることができなかった情報については、以下を参考に記載した。

- ・ <http://www.k-erc.pref.kanagawa.jp/kisnet/menu.asp> 神奈川県化学物質安全情報提供システム (kis-net)
- ・ 財団法人 化学物質評価研究機構: “既存化学物質安全性 (ハザード) 評価シート”



#### 4.2. 供試試料

入手先：

入手年月日：2005年1月27日

入手量：85.6 g (風袋含む)

ロット番号：KLG1797

純度：99.7 %

不純物の名称及び含有量：安定剤(重合防止剤)としてヒドロキノンモノメチルエーテルを  
約0.02 %含有

有効期限：－

#### 4.3. 被験物質の保管方法及び保管条件下での安定性

##### ①保管方法

被験物質は室温暗所に保管した。

##### ②被験物質の確認及び保管条件下の安定性 (GLP対象外として実施)

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、被験物質の特性が認められることを確認した。また、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の比較により、保管中の安定性を確認した。その結果、被験物質は保管条件下において安定であったと判断された。

#### 4.4. 取り扱い上の注意

被験物質の取り扱いにおいては、保護具等を着用の上、人体への吸入、摂取、接触等がないよう十分注意して取り扱った。

#### 5 試験生物

試験生物として下記に示したオオミジンコで、6ヶ月ごとの基準物質(ニクロム酸カリウム、試薬特級、純度99.5 %以上[和光純薬工業株式会社])による生物検定において $EC_{50}$ の確認されたものを用いた。

なお、基準物質による48時間後の $EC_{50}$ は0.53 mg/l (2004年10月18日)であった。また、当センターにおける $EC_{50}$ のバックグラウンドデータ(0.55 ± 0.14 mg/l)と比較した結果、試験生物の感受性は、通常の状態にあると判断した。

1) 学名：*Daphnia magna*

2) 入手等：独立行政法人 国立環境研究所(2003年3月7日)より入手したものを、当センターにおいて自家繁殖した種である。試験には、暴露開始時に生後24時間齢未満となる個体(以下「幼体」という。)を使用した。

3) 飼育等：試験生物を得るための親世代のミジンコ(以下「親ミジンコ」という。)は、試験用水と同一の水質、水温及び明暗周期で飼育(2005年4月22日～5月17日)した。なお、幼体を得るための親ミジンコには、健康で繁殖盛んな生後3週齢のものを用いた。試験には、産出された幼体から健康で肉眼的に正常な個体をランダムに選別したものを用いた。親ミジンコの暴露開始前7日間の死亡率は0 %で

あった。また、雄の出現、初産までの期間の遅延(初産;生後9~10日後)、産出幼体の死産、墮胎卵、休眠卵、変色は認められなかった。

[親ミジンコの飼育条件]

- ①飼育水：水道水(茨城県つくば市)を活性炭処理し、残留塩素等を除去したもの。
- ②飼育方法：半止水式(週3回全量換水を行った。)
- ③飼育水槽：1 l容ガラス製ビーカーに35個体を収容した。飼育開始から約1週間後に生育が良好な個体を選別し、25頭とした。
- ④水 温：19.7~20.8℃
- ⑤照 明：室内光、16時間明/8時間暗
- ⑥餌 料：*Chlorella vulgaris* / *Scenedesmus subspicatus* (1:1) 混液
- ⑦給 餌：1日1回の頻度でミジンコ1頭当たり0.01~0.12 mgC(有機体炭素)与えた。ただし、給餌量は成長の状態や飼育密度に応じて加減した。

## 6 試験方法

### 6.1. 暴露条件及び環境条件

- ①暴露方式：半止水式(24時間後全量換水)
- ②暴露期間：48時間
- ③換水方法：新たに用意した試験容器に試験溶液を調製し、その試験溶液中へ旧試験溶液から試験生物を移し変えることによって換水を行った。なお、換水には先端を焼いて丸めたガラス製駒込ピペット(太口)を使用した。
- ④試験個体数：20頭/試験区(5頭4連)
- ⑤試験溶液量：100 ml/1連
- ⑥試験水温：19.0~19.8℃
- ⑦照 明：室内光、16時間明/8時間暗
- ⑧給 餌：無給餌
- ⑨溶存酸素濃度(暴気)：8.5~9.1 mg/l(暴露期間中、飽和溶存酸素濃度の60%を維持した。また、エアレーションは実施しなかった。)
- ⑩試験溶液のpH：4.5~8.0(pHの調整は行わなかった。)

### 6.2. 試験用水

水道水(つくば市水道水)を活性炭処理し、残留塩素等を除去した後、十分通気した脱塩素水を使用した。脱塩素水使用時には、残留塩素が無いことを確認した。なお、試験用水は使用前日に調製し、市販のポリエチレン製容器に貯留後、約20℃で十分通気しながら保管した。

使用条件は総硬度10~250 mgCaCO<sub>3</sub>/l及びpH 6.0~9.0とした。また、一般的な水質測定を定期的に実施した。

試験に使用した試験用水の総硬度は71 mgCaCO<sub>3</sub>/l、pHは7.9であった。また、一般的な水質測定を定期的に実施した結果を付属資料-1に示した。

### 6.3. 試験容器及び恒温室等

- ①試験容器：100 ml容ガラス製ビーカー（容器のサイズ；内径 約5 cm×高さ 約7 cm）を用いた。試験容器にはゴミの侵入や試験溶液の蒸散を防ぐ意味で緩く蓋をした。
- ②恒温室：21.84R-4410 [日立冷熱株式会社]
- ③温度計：AP-210 [安立計器株式会社]
- ④pH計：HM-21P [東亜ディーケーケー株式会社]
- ⑤溶存酸素計：D0-24P [東亜ディーケーケー株式会社]
- ⑥残留塩素比色測定器：OT-I 型 [理研光学株式会社]
- ⑦活性炭フィルター：PF Carbon Cartridge [オルガノ株式会社]

### 6.4. 試験濃度の設定

予備試験 (GLP対象外として実施) の結果から、100 mg/lの濃度区ではミジンコの遊泳が100 %阻害され、10 mg/lの濃度区では全く阻害が認められなかったことに基づき、本試験では、100 mg/l以下の濃度を公比1.3で7濃度区 (18, 24, 32, 42, 56, 75及び100 mg/l) を設定した。

また、予備試験の結果を付属資料-2に示した。

### 6.5. 試験溶液の調製

試験溶液調製時の試験用水は、調製前に20 °C ±1 °Cにした。

被験物質を超音波処理により試験用水に溶解させ被験物質原液 (1,000 mg/l) を調製した。この被験物質原液を試験用水に添加して各濃度区の試験溶液を調製した。

対照区には、試験用水のみの無処理の対照区を設けた。

なお、被験物質は純度が99.7 %であったため、純度を考慮せず秤取した。よって、設定した試験濃度は、供試試料の濃度として示した。また、被験物質原液は用時調製とした。

## 7 観察及び測定方法

### 7.1. 試験生物の遊泳阻害、症状等の観察

暴露開始 (試験生物を試験溶液の入った試験容器に投入した時点) から、24及び48時間後に試験生物の遊泳阻害等の観察を行った。試験容器を穏やかに動かした後、15秒間泳げないものを遊泳阻害とみなした。観察時に遊泳阻害数を記録するとともに異常な行動や外観等について記録した。

### 7.2. 被験物質濃度の測定

試験溶液中の被験物質の分析は、高速液体クロマトグラフを用いて、全試験区について暴露開始時、換水前後及び暴露終了時の計4回行った。なお、暴露開始時及び換水後は4連分を同時に調製した試験容器から試験溶液を50 ml採取して分析用試験溶液とした。また、換水前及び暴露終了時は各試験区のそれぞれ4連の試験容器から等量ずつ採取し混合した50 mlをそれぞれ分析用試験溶液とした。

なお、分析方法は付属資料-5に示した。

### 7. 3. 試験環境の測定

各試験区の水質として、水温、溶存酸素濃度及びpHを暴露開始時、換水前後及び終了時に測定した。

なお、暴露開始時及び換水後は4連分を同時に調製した容器について測定した。また、換水前及び暴露終了時は各試験区の1容器について測定した。

暴露期間中、各試験区のpHが1.5以上変動しないことを確認した。なお、試験水温の変動を監視するために、恒温室内の温度を暴露期間中に継続して測定した。

### 7. 4. 試験溶液の状態観察

暴露開始時及び 24 時間後換水前の試験溶液について、その色調や結晶の析出、沈殿物等の有無について状態観察を行った。

## 8 結果の処理法

### 8. 1. 結果の算出に用いた試験濃度の決定

結果の算出は、試験溶液中の被験物質濃度の測定値から、幾何平均により求めた平均測定濃度を用いて行った。

### 8. 2. 50 %遊泳阻害濃度 ( $EC_{50}$ )

各試験区の遊泳阻害数と試験生物数(20頭)から、遊泳阻害率(%)を算出し、Probit法を用いて $EC_{50}$ を算出した。また、それらの95 %信頼限界も算出し、算出に用いた回帰直線の傾きを求めた。また、濃度－遊泳阻害率のグラフを作成した。

### 8. 3. 0 %遊泳阻害最高濃度及び 100 %遊泳阻害最低濃度

それぞれ、遊泳阻害率が0 %である最高濃度及び遊泳阻害率が100 %である最低濃度を記録した。

### 8. 4. 統計的手法

結果の算出には、統計ソフト「TOXDAT MULTI-METHOD PROGRAM(EPA/600/4-85/013)」を使用した。また、その入力値及び出力結果を付属資料-4に示した。

## 9 結果及び考察

### 9. 1. 試験溶液中の被験物質濃度

全試験区について暴露開始時、24時間後の換水前後及び暴露終了時に試験溶液中の被験物質濃度を測定した。

各濃度区の測定濃度の初期濃度に対する割合は、換水前及び暴露終了時の試験溶液で100～101 %であった。

また、各濃度区の幾何平均により求めた平均測定濃度は18 mg/lで18.2 mg/l, 24 mg/lで24.7 mg/l, 32 mg/lで32.7 mg/l, 42 mg/lで42.9 mg/l, 56 mg/lで57.0 mg/l, 75 mg/lで75.8 mg/l及び100 mg/lで100 mg/lであった。

暴露期間中の試験溶液の被験物質濃度をTable 1に示した。

## 9.2. 50 %遊泳阻害濃度 ( $EC_{50}$ )

48時間後の累積遊泳阻害率は、対照区、18.2及び24.7 mg/lで0 %, 32.7 mg/lで5 %, 42.9 mg/lで15 %, 57.0 mg/lで95 %, 75.8及び100 mg/lで100 %であった。

24及び48時間後の $EC_{50}$ は、59 mg/l (95 %信頼限界 ; 55~63 mg/l [回帰直線の傾き ; 15.9]) 及び47 mg/l (95 %信頼限界 ; 44~51 mg/l [回帰直線の傾き ; 15.1]) であった。

各時間における累積遊泳阻害率をTable 2に、50 %遊泳阻害濃度 ( $EC_{50}$ ) をTable 3に示した。また、濃度－遊泳阻害率のグラフをFigure 1に示した。

## 9.3. 0 %遊泳阻害最高濃度及び 100 %遊泳阻害最低濃度

24時間後の0 %遊泳阻害最高濃度は33 mg/l、100 %遊泳阻害最低濃度は76 mg/lであった。また、48時間後の0 %遊泳阻害最高濃度は25 mg/l、100 %遊泳阻害最低濃度は76 mg/lであった。0 %遊泳阻害最高濃度及び100 %遊泳阻害最低濃度をTable 4に示した。

## 9.4. 試験生物の症状等の観察

各濃度区における試験生物の行動及び外観について対照区と比較した。異常な行動及び外観は、観察されなかった。

24及び48時間後の試験生物の症状等をTable 5に示した。

## 9.5. 試験環境の測定

暴露期間中の各試験区の水温は19.0~19.8 °C、溶存酸素濃度は8.5~9.1 mg/l、pHは4.5~8.0であった。

暴露期間中の各試験区の水温は20 °C ± 1 °C、溶存酸素濃度は試験水温での飽和溶存酸素濃度の60 %以上で試験環境条件を満たしていた。

なお、pHは4.5~8.0であり、6.0~9.0の範囲を外れたが、これは被験物質に起因するものであった。

また、暴露期間中の恒温室内の温度は19.0~21.0 °Cであったことから、各試験区の試験水温は継続的に試験環境条件を満たしていたことが確認された。

暴露期間中の各試験区の試験溶液の水温をTable 6、溶存酸素濃度をTable 7、pHをTable 8に示した。

## 9.6. 試験溶液の状態観察

暴露開始時の試験溶液は全ての濃度区で無色透明であり、被験物質は試験溶液中に溶解していることが目視にて確認された。また、24時間後の換水前の試験溶液は、全ての濃度区において開始時と比較して変化が認められなかった。

## 9.7. 試験計画書からの逸脱事項

なし。

9. 8. 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。

9. 9. 試験の有効性

暴露終了時に対照区の遊泳阻害率が0 %であり、暴露期間中、ミジンコが水面に浮いておらず、各試験区の溶存酸素濃度も暴露終了時において3 mg/l以上であったことから、本試験の成立が確認された。

9. 10. 結果の評価と考察

本試験において、各濃度区の測定濃度の初期濃度に対する割合は、80 %以上を保っていたことから、試験溶液中の被験物質濃度は暴露期間中、十分に維持されていたと判断された。

本試験では、被験物質の影響により57.0～100 mg/l濃度区において、試験溶液中のpHが試験環境条件(6.0～9.0)の範囲を外れ、同濃度区において試験生物の遊泳阻害が観察された。検討において、pHの調整による濃度変化が無く、被験物質の沈殿が起こらないことが確認できたことから、pHを被験物質添加前の試験用水のpHに調整して追加試験(GLP対象外として実施[付属資料-3])を行った。その結果、100 mg/l濃度区において、遊泳阻害等の影響が認められなかったことから、本試験ではpHによる試験生物への影響が大きかったと判断された。

Table 1. Measured concentration of the test substance in the test solution

(Semi-static condition)

Nominal concentration (mg/l)	0 Hour	24 Hours		48 Hours	Mean* of measured concentration (mg/l)
		Old	New		
18	18.1	18.2 (101)	18.2	18.2 (100)	18.2
24	24.6	24.7 (100)	24.8	24.9 (100)	24.7
32	32.4	32.7 (101)	32.7	32.9 (101)	32.7
42	42.8	42.9 (100)	42.7	43.1 (101)	42.9
56	57.0	57.1 (100)	56.9	57.2 (101)	57.0
75	75.8	75.8 (100)	—	—	75.8
100	100	100 (100)	—	—	100
Control	< 0.5	< 0.5	< 0.5	< 0.5	---

\*: geometric mean

New: freshly prepared test solution

Old: test solution after 24 hours exposure

( ): rate to the concentration at 0 hour or 24 hours (New) (%)

—: All test organisms were immobilized at this observation time.

Table 2. Cumulative immobility rates

(%)			
Nominal concentration (mg/l)	Mean* of measured concentration (mg/l)	24 Hours	48 Hours
18	18.2	0	0
24	24.7	0	0
32	32.7	0	5
42	42.9	5	15
56	57.0	30	95
75	75.8	100	100
100	100	100	100
Control	---	0	0

\*: geometric mean

Table 3. EC<sub>50</sub> values

Exposure period (Hours)	EC <sub>50</sub> (mg/l)	95 % confidence limits (mg/l)	Statistical method
24	59	55~63	Probit
48	47	44~51	Probit



Table 4. Maximum conc. of 0 % immobility and minimum conc. of 100 % immobility

Exposure period (Hours)	Maximum concentration of 0 % immobility (mg/l)	Minimum concentration of 100 % immobility (mg/l)
24	33	76
48	25	76

Table 5. Observed toxicological abnormalities in behavior and appearance

Nominal concentration (mg/l)	Mean* of measured concentration (mg/l)	Abnormalities in behavior and appearance	
		24 Hours	48 Hours
18	18.2	n. a. d (20)	n. a. d (20)
24	24.7	n. a. d (20)	n. a. d (20)
32	32.7	n. a. d (20)	n. a. d (19)
42	42.9	n. a. d (19)	n. a. d (17)
56	57.0	n. a. d (14)	n. a. d (1)
75	75.8	—	—
100	100	—	—
Control	---	n. a. d (20)	n. a. d (20)

\*: geometric mean, ( ): The number of test organisms that shows the symptom

n. a. d: no abnormalities are detected

—: All test organisms were immobilized at this observation time.

Table 6. Temperature of test solution

(℃)

Nominal concentration (mg/l)	Mean* of measured concentration (mg/l)	0 Hour	24 Hours		48 Hours
			Old	New	
18	18.2	19.1	19.7	19.3	19.5
24	24.7	19.3	19.6	19.0	19.4
32	32.7	19.2	19.7	19.0	19.5
42	42.9	19.1	19.8	19.0	19.3
56	57.0	19.1	19.8	19.1	19.4
75	75.8	19.2	19.7	—	—
100	100	19.3	19.7	—	—
Control	---	19.1	19.7	19.8	19.6

\*: geometric mean

New: freshly prepared test solution

Old: test solution after 24 hours exposure

—: All test organisms were immobilized at this observation time.

Table 7. Dissolved oxygen concentration of test solution

Nominal concentration (mg/l)	Mean* of measured concentration (mg/l)	(mg/l)			
		0 Hour	24 Hours		48 Hours
			Old	New	
18	18.2	8.8	9.0	9.0	8.5
24	24.7	8.8	8.9	8.9	8.6
32	32.7	8.9	8.9	8.9	8.6
42	42.9	8.8	8.9	9.0	8.7
56	57.0	8.8	8.9	9.1	8.7
75	75.8	8.9	9.0	—	—
100	100	8.9	8.9	—	—
Control	---	8.9	9.0	9.0	8.5

\*: geometric mean

New: freshly prepared test solution

Old: test solution after 24 hours exposure

—: All test organisms were immobilized at this observation time.

Table 8. pH values of test solution

Nominal concentration (mg/l)	Mean* of measured concentration (mg/l)	0 Hour	24 Hours		48 Hours
			Old	New	
18	18.2	6.9	7.7	6.8	7.5
24	24.7	6.8	7.5	6.7	7.3
32	32.7	6.6	7.3	6.5	7.1
42	42.9	6.3	7.2	6.1	7.1
56	57.0	5.6	6.1	5.5	6.2
75	75.8	4.8	4.8	—	—
100	100	4.5	4.5	—	—
Control	---	7.9	7.9	7.9	8.0

\*: geometric mean

New: freshly prepared test solution

Old: test solution after 24 hours exposure

—: All test organisms were immobilized at this observation time.

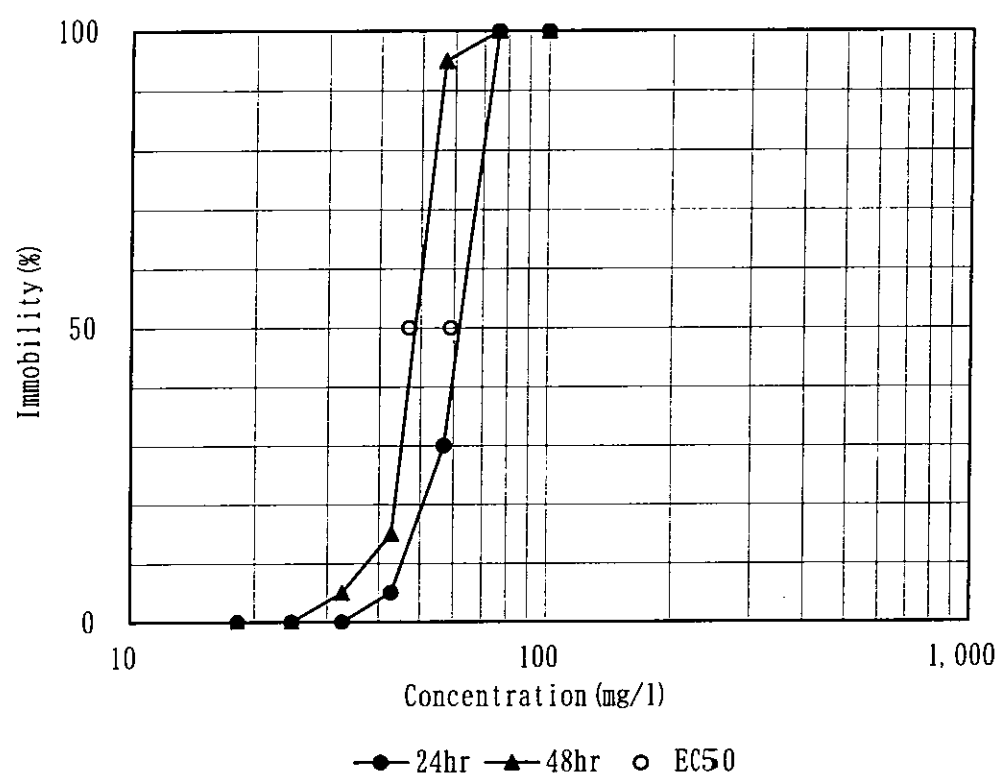


Figure 1. Concentration-immobility curve

## 付属資料-1：試験用水の水質

## Quality of test water (1/2)

Test item	Result	Minimum limit of determination
pH value	7.2 (20 ℃)	—
Coliform bacteria	Negative/100 ml	—
Evaporation residue	150 mg/l	—
Phenols (as phenol)	Not detected	0.005 mg/l
Hardness (CaCO <sub>3</sub> )	64 mg/l	—
Nitrate nitrogen and nitrite nitrogen	0.8 mg/l	—
Fluorine and its compounds	0.11 mg/l	—
Dichloromethane	Not detected	0.001 mg/l
Carbon tetrachloride	Not detected	0.0002 mg/l
1,2-Dichloroethane	Not detected	0.0002 mg/l
1,1-Dichloroethylene	Not detected	0.001 mg/l
<i>cis</i> -1,2-Dichloroethylene	Not detected	0.001 mg/l
1,1,1-Trichloroethane	Not detected	0.001 mg/l
1,1,2-Trichloroethane	Not detected	0.0005 mg/l
Trichloroethylene	Not detected	0.001 mg/l
Tetrachloroethylene	Not detected	0.001 mg/l
1,3-Dichloropropene	Not detected	0.0002 mg/l
Benzene	Not detected	0.001 mg/l
Chloroform	0.014 mg/l	—
Thiram	Not detected	0.0002 mg/l
Simazine	Not detected	0.00001 mg/l
Thiobencarb	Not detected	0.00002 mg/l
Isoxathion	Not detected	0.00001 mg/l
Diazinon	Not detected	0.00002 mg/l
Fenitrothion	Not detected	0.00001 mg/l
Isoprothiolane	Not detected	0.00001 mg/l
Chlorothalonil	Not detected	0.00001 mg/l
Propyzamide	Not detected	0.00001 mg/l
EPN	Not detected	0.00005 mg/l
Dichlorvos	Not detected	0.00005 mg/l
Fenobucarb	Not detected	0.00001 mg/l
Iprobenfos	Not detected	0.00005 mg/l
Chlornitrofen	Not detected	0.0001 mg/l

## Quality of test water (2/2)

Test item	Result	Minimum limit of determination
Chemical oxygen demand (COD-Cr)	< 10 mg/l	—
Biochemical oxygen demand	< 1 mg/l	—
Suspended solids	< 1 mg/l	—
Phosphorus	0.03 mg/l	—
Bromide ion	Not detected	0.5 mg/l
Sulfide ion ( $S^{2-}$ )	Not detected	0.01 mg/l
Electric conductivity (25 °C)	25 mS/m	—
Alkalinity (as $CaCO_3$ )	36 mg/l	—
Total organic carbon (TOC)	0.9 mg/l	—
Ammonium nitrogen ( $NH_3-N$ )	Not detected	0.04 mg/l
Polychlorobiphenyl	Not detected	0.0005 mg/l
Mercury	Not detected	0.0001 mg/l
Cadmium	Not detected	0.001 mg/l
Cyanide ion and cyanogen chloride	Not detected	0.001 mg/l
Lead	Not detected	0.001 mg/l
Chromium (VI)	Not detected	0.005 mg/l
Arsenic	Not detected	0.01 mg/l
Selenium	Not detected	0.01 mg/l
Nickel	Not detected	0.001 mg/l
Copper	Not detected	0.01 mg/l
Zinc	Not detected	0.005 mg/l
Aluminum	Not detected	0.05 mg/l
Manganese	Not detected	0.005 mg/l
Iron	Not detected	0.03 mg/l
Tin	Not detected	0.1 mg/l
Sodium	20 mg/l	—
Potassium	5.3 mg/l	—
Calcium	16 mg/l	—
Magnesium	6.2 mg/l	—

Sampling date: December 21, 2004

## 付属資料-2：予備試験結果

予備試験結果をTable 1に示した。

Table 1. Cumulative immobility rates

(%)		
Nominal concentration (mg/l)	24 Hours	48 Hours
10	0	0
32	0	5
100	100	100
Control	0	0



## 付属資料-3：追加試験結果

本試験では、被験物質の影響により 57.0～100 mg/l 濃度区において、試験溶液中の pH が試験環境条件 (6.0～9.0) の範囲を外れ、同濃度区において試験生物の遊泳阻害が観察された。検討において、pH の調整による濃度変化が無く、被験物質の沈殿が起こらないことが確認できたことから、pH を被験物質添加前の試験用水の pH に調整して追加試験 (GLP 対象外として実施) を行い、その結果を Table 1～3 に示した。

Table 1. Cumulative immobility rates

Nominal concentration (mg/l)	(%)	
	24 Hours	48 Hours
24	0	0
32	0	0
42	0	0
56	0	0
75	0	0
100	0	0
Control	0	0

Table 2. EC<sub>50</sub> values

Exposure period (Hours)	EC <sub>50</sub> (mg/l)	95 % confidence limits (mg/l)	Statistical method
24	> 100	—	—
48	> 100	—	—

Table 3. Observed toxicological abnormalities in behavior and appearance

Nominal concentration (mg/l)	Abnormalities in behavior and appearance	
	24 Hours	48 Hours
24	n. a. d (20)	n. a. d (20)
32	n. a. d (20)	n. a. d (20)
42	n. a. d (20)	n. a. d (20)
56	n. a. d (20)	n. a. d (20)
75	n. a. d (20)	n. a. d (20)
100	n. a. d (20)	n. a. d (20)
Control	n. a. d (20)	n. a. d (20)

( ) : The number of test organisms that shows the symptom

n. a. d : no abnormalities are detected

## 付属資料-4: 統計処理データ

統計ソフトの出力結果を以下に示した。

EC<sub>50</sub> after 24 and 48 hours exposure

試験番号 第16032号  
 試験委託者名 環境省  
 被験物質名 アクリル酸  
 入力者名 XXXXXXXXXX  
 入力年月日 05/05/24  
 試験生物 ミジンコ  
 観察時間 24

CONC. mg/l	NUMBER EXPOSED	NUMBER EFFECT	PERCENT EFFECT	BINOMIAL PROB. (%)
100	20	20	100	9.53674E-005
75.8	20	20	100	9.53674E-005
57.	20	6	30	5.76591
42.9	20	1	5	.00200272
32.7	20	0	0	9.53674E-005
24.7	20	0	0	9.53674E-005
18.2	20	0	0	9.53674E-005

THE BINOMIAL TEST SHOWS THAT 42.9 AND 75.8 CAN BE  
 USED AS STATISTICALLY SOUND CONSERVATIVE 95 PERCENT  
 CONFIDENCE LIMITS SINCE THE ACTUAL CONFIDENCE LEVEL  
 ASSOCIATED WITH THESE LIMITS IS 99.99790191650391 PERCENT.

AN APPROXIMATE EC50 FOR THIS SET OF DATA IS 60.7693990007711

-----RESULTS CALCULATED USING THE MOVING AVERAGE METHOD-----

SPAN = 4  
 G = .05135020293181656  
 EC50 = 57.51846162182485  
 95 PERCENT CONFIDENCE LIMITS = 52.80000379074182 62.71309417303541

-----RESULTS CALCULATED USING THE PROBIT METHOD-----

ITERATIONS = 9  
 G = .1734515755988746  
 H = 1  
 GOODNESS OF FIT PROBABILITY = .6002434344348711  
 SLOPE = 15.90958416358999  
 95 PERCENT CONFIDENCE LIMITS = 9.283637234515403 AND 22.53553109266458  
 EC50 = 58.84218832220659 57.51846162182485  
 95 PERCENT CONFIDENCE LIMITS = 54.79348276298828 AND 63.29090688894421  
 EC1 = 42.01753622394303  
 95 PERCENT CONFIDENCE LIMITS = 32.5500472594838 AND 47.09092754510392

試験番号	第16032号
試験委託者名	環境省
被験物質名	アクリル酸
入力者名	██████
入力年月日	05/05/24
試験生物	ミジンコ
観察時間	48

CONC. mg/l	NUMBER EXPOSED	NUMBER EFFECT	PERCENT EFFECT	BINOMIAL PROB. (%)
100	20	20	100	9.53674E-005
75.8	20	20	100	9.53674E-005
57	20	19	95	.00200272
42.9	20	3	15	.128841
32.7	20	1	5	.00200272
24.7	20	0	0	9.53674E-005
18.2	20	0	0	9.53674E-005

THE BINOMIAL TEST SHOWS THAT 42.9 AND 57 CAN BE  
USED AS STATISTICALLY SOUND CONSERVATIVE 95 PERCENT  
CONFIDENCE LIMITS SINCE THE ACTUAL CONFIDENCE LEVEL  
ASSOCIATED WITH THESE LIMITS IS 99.86915588378906 PERCENT.

AN APPROXIMATE EC50 FOR THIS SET OF DATA IS 48.25105535172909

-----RESULTS CALCULATED USING THE MOVING AVERAGE METHOD-----  
SPAN = 6  
G = .05135020027790652  
EC50 = 46.516640397023  
95 PERCENT CONFIDENCE LIMITS = 41.79959516134188 52.19872594711157

-----RESULTS CALCULATED USING THE PROBIT METHOD-----  
ITERATIONS = 9  
G = .1565933639907622  
H = 1  
GOODNESS OF FIT PROBABILITY = .3081864925914364  
SLOPE = 15.06243060117396  
95 PERCENT CONFIDENCE LIMITS = 9.101943727713604 AND 21.02291747463431  
EC50 = 46.82767814872884  
95 PERCENT CONFIDENCE LIMITS = 43.62035787078688 AND 50.83558012340887  
EC1 = 32.88157385733899  
95 PERCENT CONFIDENCE LIMITS = 25.6904871184234 AND 36.91465369763532

## 付属資料-5：試験溶液中の被験物質濃度の分析方法

## 1. 標準品

被験物質を使用した。

## 2. 試薬、試液及び標準溶液の調製

## 2.1. 試薬

メタノール：高速液体クロマトグラフ用

リン酸：特級(純度85 %以上)

水：活性炭フィルター、逆浸透膜及びイオン交換樹脂で精製したもの

## 2.2. 試液

水-メタノール-リン酸 (900:100:1 V/V/V)：水900 ml, メタノール100 ml及びリン酸1 mlを混合した。

## 2.3. 標準溶液の調製

標準品約25 mgを精密に量り取り水に溶解して50 mlとし、これを標準原液とした。この標準原液を水で希釈して40 mg/l溶液を調製し、この一定量を取り水で適宜希釈して0.25, 0.5, 5, 10及び20 mg/lの標準溶液を調製した。

## 3. 試料溶液の調製

## 3.1. 試験溶液分析法(対照区並びに被験物質の18 mg/lの試験溶液)

試験溶液を試料溶液とした。

## 3.2. 試験溶液分析法(被験物質の24, 32, 42, 56, 75及び100 mg/lの試験溶液)

試験溶液をメスフラスコに正確にとり、水で定容した。各試験溶液の数量関係は3.3に記載した。

## 3.3. 数量関係の一覧表

試験溶液	試験溶液採取量 (ml)	定容量(ml)
24, 32 mg/lの試験溶液	10	20
42, 56及び75 mg/lの試験溶液	10	50
100 mg/lの試験溶液	10	100

## 4. 分析機器操作条件

## 高速液体クロマトグラフ操作条件

ポンプ：LC-10AD [株式会社 島津製作所]

検出器：紫外可視分光光度計 SPD-10AV [株式会社 島津製作所]

カラム：L-column ODS,  $\phi$ 4.6 mm×25 cm [財団法人 化学物質評価研究機構]

カラム温度：40 °C

移動相：水-メタノール-リン酸 (900:100:1 V/V/V)

流量：0.8 ml/min

測定波長：210 nm

データ処理装置：C-R7A [株式会社 島津製作所]

## 5. 定量

2.3で調製した標準溶液及び3.で調製した試料溶液20  $\mu$ lを4.の高速液体クロマトグラフに注入した。標準品の重量とピーク高から検量線を作成し、試験溶液中のアクリル酸濃度を算出した。

## 6. 定量限界

試験溶液採取量	定容量	注入量	定量限界相当量	定量限界
*	*	20 $\mu$ l	10 ng	0.5 mg/l

\* 試験溶液を試料溶液とした。

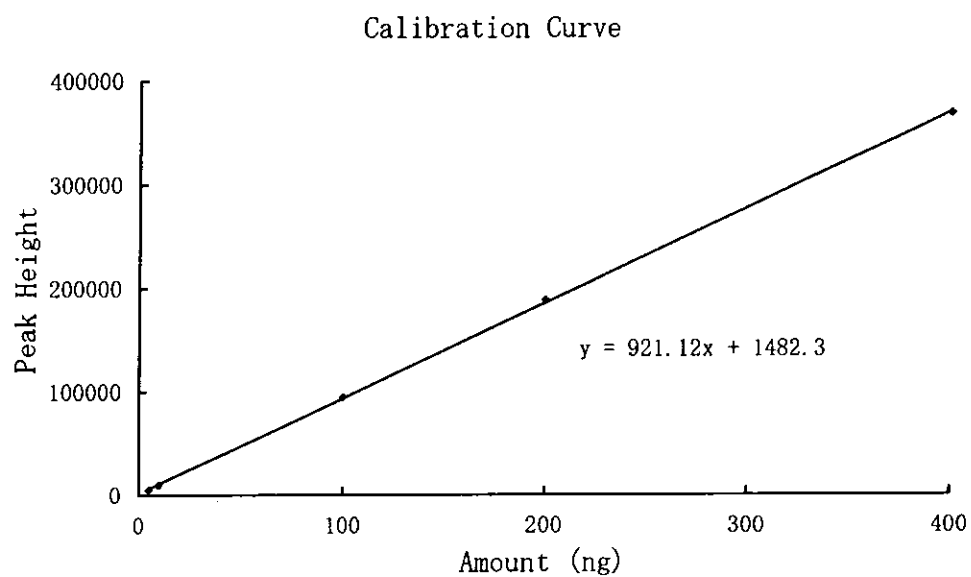
## 7. 添加回収試験

## 7.1. 低濃度添加

試験用水に被験物質を0.5 mg/lの濃度になるように添加し、この溶液を用いて添加回収試験を行った。試験は併行測定3回で実施し、回収率は76.1 %, 74.5 %, 73.8 % (平均74.8 %)であった。

## 7.2. 高濃度添加

試験用水に被験物質を125 mg/lの濃度になるように添加し、この溶液を用いて添加回収試験を行った。試験は併行測定3回で実施し、回収率は95.2 %, 95.4 %, 95.3 % (平均95.3 %)であった。



Amount (ng)	Peak height ( $\mu$ V)
400	368294
200	188501
100	94718
10	9665
5	4835

Figure 1. Calibration curve of Acrylic acid by HPLC analysis

Standard (20 mg/l): 0 hour

CHROMATOPAC C-R7A CH=1 REPORT No.=317 7071=2:050517.C16 05/05/17 15:50:36

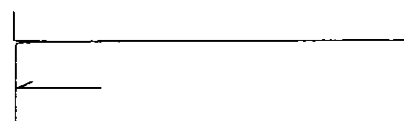


定量計算結果 \*\*

CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	1	9.26	3675073	368294			100	
TOTAL			3675073	368294			100	

Control: 0 hour

CHROMATOPAC C-R7A CH=1 REPORT No.=322 7071=2:050517.C21 05/05/17 17:17:04

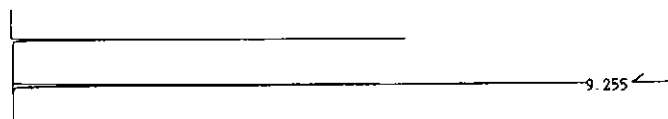


\*\* 定量計算結果 \*\*

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

Test solution (18 mg/l): 0 hour

CHROMATOPAC C-R7A CH=1 REPORT No.=323 7071=2:050517.C22 05/05/17 17:34:22

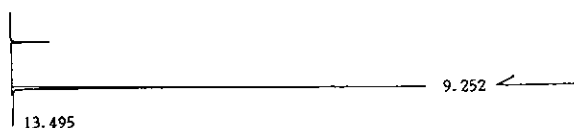


\*\* 定量計算結果 \*\*

CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	1	9.255	3331658	335177			100	
TOTAL			3331658	335177			100	

Test solution (100 mg/l): 0 hour

CHROMATOPAC C-R7A CH=1 REPORT No.=329 7071=2:050517.C28 05/05/17 19:18:14



\*\* 定量計算結果 \*\*

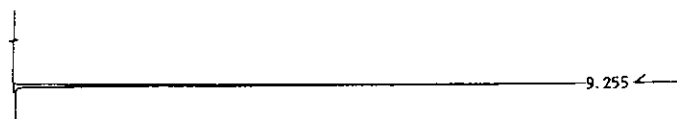
CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	1	9.252	1841993	185971			99.168	
	2	13.495	15455	539			8.832	
TOTAL			1857448	186510			100	

Figure 2-1. Representative chromatograms



Standard (20 mg/l): 24 hours

CHROMATOPAC C-R7A CH=1 REPORT No.=353 7071=2:050518.C12 05/05/18 16:02:46



\*\* 定量計算結果 \*\*

CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	WK	IDNO	CONC	NAME
1	1	9.255	3669398	367874			100	
TOTAL			3669398	367874			100	

Control: 24 hours old\*

CHROMATOPAC C-R7A CH=1 REPORT No.=358 7071=2:050518.C17 05/05/18 17:29:20

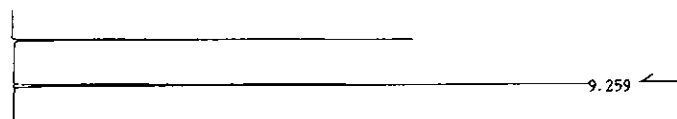


\* 定量計算結果 \*\* 注意 17-有 CALERROR: 1

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

Test solution (18 mg/l): 24 hours old\*

CHROMATOPAC C-R7A CH=1 REPORT No.=359 7071=2:050518.C18 05/05/18 17:46:38



\*\* 定量計算結果 \*\*

CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	WK	IDNO	CONC	NAME
1	1	9.259	3359080	336966			100	
TOTAL			3359080	336966			100	

Test solution (100 mg/l): 24 hours old\*

CHROMATOPAC C-R7A CH=1 REPORT No.=365 7071=2:050518.C24 05/05/18 19:30:34



\*\* 定量計算結果 \*\*

CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	WK	IDNO	CONC	NAME
1	1	9.257	1839070	185439			99.1471	
	2	13.407	15820	554			0.8529	
TOTAL			1854890	185993			100	

\* old: Test solution after 24 hours exposure

Figure 2-2. Representative chromatograms

## 陳述書

1 試験委託者

環境省

2 試験番号

第16032号

3 試験の表題

アクリル酸のオオミジンコに対する急性遊泳阻害試験

上記試験は、「新規化学物質等に係る試験の方法について(平成15年11月21日薬食発第1121002号, 平成15・11・13製局第2号, 環保企発第031121002号)」に基づき実施したものです。

なお, 試験実施にあたっては, 「新規化学物質等に係る試験を実施する試験施設に関する基準」(平成15年11月21日薬食発第1121003号, 平成15・11・17製局第3号, 環保企発第031121004号) を遵守しました。

2005年 6月 10日

財団法人 日本食品分析センター 多摩研究所

試験責任者



## 信頼性保証書

1 試験委託者

環境省

2 試験番号

第16032号

3 試験の表題

アクリル酸のオオミジンコに対する急性遊泳阻害試験

4 検閲

本試験の検閲は、財団法人 日本食品分析センター 多摩研究所 信頼性保証部門の標準操作手順書に従い、以下のとおり実施した。

検 閲 内 容	検閲実施日	試験責任者への 報告年月日	運営管理者への 報告年月日
試験計画書	2005年03月01日	2005年03月01日	2005年03月01日
試験計画書	2005年03月22日	2005年03月22日	2005年03月22日
被験物質の受領	2005年05月17日	2005年05月17日	2005年05月17日
試験計画書，試験の実施， 試薬等，機器	2005年05月17日	2005年05月17日	2005年05月17日
分析の実施，検体，試薬等， 機器	2005年05月17日	2005年05月17日	2005年05月17日
試験計画書	2005年05月18日	2005年05月18日	2005年05月18日
試験の実施	2005年05月18日	2005年05月18日	2005年05月18日
試験の実施，被験物質	2005年05月19日	2005年05月19日	2005年05月19日
試験中の保管文書	2005年06月06日	2005年06月06日	2005年06月06日
最終報告書草案及び生データ	2005年06月07日	2005年06月07日	2005年06月07日
最終報告書	2005年06月10日	2005年06月10日	2005年06月10日

上記検閲の結果，本試験最終報告書は試験に用いた方法が正確に記載され，報告結果は試験の生データを正確に反映していることを確認した。

2005 年 6 月 10 日

財団法人 日本食品分析センター 多摩研究所  
信頼性保証部門担当者



## 証明書

最終報告書表題： アクリル酸のオオミジンコに対する急性遊泳阻害試験

試験番号： 第 16032 号

本報告書は、上記最終報告書の正確な写しであることを証明致します。

2005 年 6 月 10 日

財団法人 日本食品分析センター 多摩研究所

試験責任者

