

試験報告書

プロピレングリコールのヒメダカ (*Oryzias latipes*) に対する急性毒性試験

(試験番号：第07014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

多摩研究所

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ヒメダカ (*Oryzias latipes*) に対する
急性毒性試験

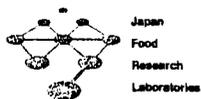
試験番号： 第07014号

上記試験は、環境庁GLP「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ヒメダカ (*Oryzias latipes*) に対する
急性毒性試験

試験番号： 第07014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

印

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 試験水槽及び恒温室等	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 ヒメダカの死亡数及び死亡率	7
5.4 半数致死濃度 (LC50)	7
5.5 0%死亡最高濃度及び100%死亡最低濃度	7
5.6 毒性症状	7
5.7 試験水のpH, 溶存酸素濃度及び水温	8
Table 1~8	9~15
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ヒメダカ (*Oryzias latipes*) に対する急性毒性試験

2. 試験目的

プロピレングリコールについて、ヒメダカ (*Oryzias latipes*) に対する急性毒性試験を行い、半数致死濃度 (LC50) 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 203「魚類急性毒性試験」(1992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)

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 7 年 12 月 12 日～平成 7 年 12 月 16 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ヒメダカ (*Oryzias latipes*) に対する急性毒性試験

試験番号

第07014号

試験方法

本試験は、OECD化学品テストガイドライン 203「魚類急性毒性試験」(1992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) 曝露方式：半止水式(24時間毎に全量換水)
- 3) 供試生物：ヒメダカ (*Oryzias latipes*)
- 4) 温 度：24±1℃
- 5) 曝露期間：96時間
- 6) 試験水量：3L
- 7) 連 数：1濃度区 1連
- 8) 生物数：10尾/濃度区
- 9) 照 明：16時間明/8時間暗
- 10) エアレーション：無し
- 11) 試験濃度：対照区及び100mg/L
- 12) 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

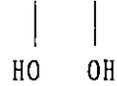
- 1) 96時間の半数致死濃度(LC50) = 100mg/L以上
- 2) 0%死亡最高濃度 = 100mg/L
- 3) 100%死亡最低濃度 = 100mg/L以上
(上記濃度は、全て設定値に基づく値)

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: $\text{CH}_3\text{CH}_2-\text{CH}_2$



分子式: $\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_2$

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

試験に使用したヒメダカ (*Oryzias latipes*) を下記に示した。供試魚の体長 (被鱗体長) は 2.0 ± 0.5 cm であった。

供試魚の基準物質 (硫酸銅 (II) 五水和物, 試薬特級) による急性毒性試験の96時間LC50値は, 1.3mg/L であった。

- 1) 一般名 : ヒメダカ
- 2) 学名 : *Oryzias latipes*
- 3) 体長 : 2.1cm (2.0~2.3cm), n=10
- 4) 体重 : 0.16g (0.13~0.21g), n=10
- 5) ロット番号 : 1995/10/25
- 6) 購入先 : 滝沢養魚場 (埼玉県鴻巣市郷地747)
- 7) 購入日 : 1995年10月25日

順化

試験条件と同条件 (水質, 温度等) で12日間以上, 順化飼育した。

餌は市販のテトラミンを与え, 曝露開始の24時間前からは給餌をしなかった。また, 試験には健康で肉眼的に正常な個体を使用した。なお, 曝露開始前7日間の死亡率は5%以下であった。

3 試験方法

3.1 試験条件

- 1) 曝露方式 : 半止水式 (24時間毎に全量換水)
- 2) 温度 : 24 ± 1 °C
- 3) 曝露期間 : 96時間
- 4) 生物数 : 10尾 / 濃度区
- 5) 試験水量 : 3L
- 6) 連数 : 1濃度区 1連
- 7) 給餌 : 無給餌
- 8) エアレーション : 無し
- 9) 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82mg/L (CaCO₃換算) であった。

3.3 試験水槽及び恒温室等

- 1) 試験水槽：5L容丸形ガラス製水槽
- 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：D0-14P（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1、10及び100mg/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100mg/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時間後に各試験水槽より試験水を20ml採取し、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

曝露開始時に順化水槽より任意に10尾を採取し、体重及び被鱗体長を測定した。なお、曝露期間中給餌は行わなかった。

各試験水槽の試験水のpH、溶存酸素濃度及び水温を測定後、試験水槽中に供試魚を1濃度区当り10尾投入した。被験物質が酸素を消費するために、24時間毎に供試魚を新しい試験水に移しかえ、96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。

曝露開始後、24、48、72及び96時間後に死亡個体数*を記録するとともに、観察された毒性の徴候或いは異常（例：外部刺激への反応異常、平衡感覚喪失、遊泳異常、呼吸機能の異常、体色変化、背曲がり、出血等）を記録した。また、死亡個体を発見した場合、水質の悪化が起こらないよう速やかに取り除いた。

*：ステンレス製ピンセットの先で尾部に軽く触れ反応がない個体を死亡とみなした。

4 結果の算出

各濃度区での死亡数と供試個体数（10尾）から死亡率（%）及び半数致死濃度（LC50）を算出した。

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88mg/L（設定値100mg/L）であり、試験開始後24時間の被験物質濃度は82mg/L（設定値100mg/L）であった。設定値に対する割合は82～88%であった。

[Table 1 (p. 9), 付属資料-2]

5.3 ヒメダカの死亡数及び死亡率

プロピレングリコールの曝露終了時の死亡数及び死亡率は100mg/L濃度区（設定濃度）において0尾（0%）であった。なお、対照区は0%であり、試験成立条件である10%以下の基準を満たした。

[Table 2 (p. 10)]

5.4 半数致死濃度（LC50）

プロピレングリコールの設定濃度に基づく96時間の半数致死濃度（LC50）は100mg/L以上であった。

[Table 3 (p. 11)]

5.5 0%死亡最高濃度及び100%死亡最低濃度

プロピレングリコールに96時間曝露したヒメダカの0%死亡最高濃度は100mg/L（設定濃度）であり、100%死亡最低濃度は100mg/L以上（設定濃度）であった。

[Table 4 (p. 11)]

5.6 毒性症状

濃度区を対照区と比較して観察を行った結果、曝露期間中に毒性症状は観察されなかった。なお、対照区では曝露期間中に異常な症状は観察されなかった。

[Table 5 (p. 12)]

5.7 試験水のpH, 溶存酸素濃度及び水温

曝露期間中のpHは7.1~7.9, 溶存酸素濃度は6.9~8.8mg/Lであり, すべての試験水槽で飽和溶存酸素濃度の60%以上であった(24.0℃の飽和溶存酸素濃度: 8.3mg/L)。また, 水温は23.7~24.4℃であった。

[Table 6~8 (p.13~15)]

以 上

Table 1. Measured Concentrations of Propylene glycol During a 96-hour Exposure of Orange killifish (*Oryzias latipes*) 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	---	---
100	88	82	85	85

new : freshly prepared test solutions

old : test solutions after 24 hours exposure period

Table 2. Mortality of Orange killifish (*Oryzias latipes*) Exposed to Propylene glycol under Semi-Static Test Conditions

Nominal Concentration (mg/L)	Cumulative Number of Dead (Percent Mortality)			
	24 hours	48 hours	72 hours	96 hours
Control	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
100	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)

Table 3. Calculated LC50 Values for Orange killifish (*Oryzias latipes*) Exposed to Propylene glycol Based on Nominal Concentrations under Semi-Static Test Conditions

Exposure Period (hours)	LC50 (mg/L)	95-Percent	
		Confidence Limits (mg/L)	Statistical Method
24	> 100	not calculated	----
48	> 100	not calculated	----
72	> 100	not calculated	----
96	> 100	not calculated	----

Table 4. Observation of Highest Concentration in 0% Mortality and Lowest Concentration in 100% Mortality Values

Exposure Period (hours)	Highest Concentration in	Lowest Concentration in
	0% Mortality (mg/L)	100% Mortality (mg/L)
24	100	> 100
48	100	> 100
72	100	> 100
96	100	> 100

Table 5. Symptoms of Observed in Orange killifish (*Oryzias latipes*)
Exposed to Propylene glycol under Semi-Static Test Conditions

Nominal Concentration (mg/L)	Symptoms			
	24 hours	48 hours	72 hours	96 hours
Control	n. a. d.	n. a. d.	n. a. d.	n. a. d.
100	n. a. d.	n. a. d.	n. a. d.	n. a. d.

n. a. d. : No abnormalities are detected

Table 6. pH Values During a 96-hour Semi-Static Exposure of Orange killifish (*Oryzias latipes*) to Propylene glycol

Nominal Concentration (mg/L)		pH				
		0 hour	24 hours	48 hours	72 hours	96 hours
Control	new	7.8	7.8	7.6	7.5	---
	old	---	7.2	7.6	7.4	7.5
100	new	7.8	7.9	7.6	7.6	---
	old	---	7.4	7.3	7.4	7.1

new : freshly prepared test solutions

old : test solutions after 24 hours exposure period

Table 7. Dissolved Oxygen Concentrations During a 96-hour Semi-Static Exposure of Orange killifish (*Oryzias latipes*) to Propylene glycol

Nominal Concentration (mg/L)		Dissolved Oxygen Concentrations (mg/L)				
		0 hour	24 hours	48 hours	72 hours	96 hours
Control	new	8.4	8.6	8.5	8.3	---
	old	---	7.1	7.7	7.2	7.1
100	new	8.4	8.8	8.6	8.3	---
	old	---	6.3	6.3	6.9	7.0

new : freshly prepared test solutions

old : test solutions after 24 hours exposure period

Table 8. Temperature Values During a 96-hour Semi-Static Exposure of Orange killifish (*Oryzias latipes*) to Propylene glycol

Nominal Concentration (mg/L)		Temperature (°C)				
		0 hour	24 hours	48 hours	72 hours	96 hours
Control	new	23.8	24.2	24.0	24.0	----
	old	----	24.0	24.3	24.3	24.2
100	new	23.7	24.0	24.1	24.0	----
	old	----	23.9	24.4	24.1	23.9

new : freshly prepared test solutions

old : test solutions after 24 hours exposure period

付 属 資 料 一 1

希 积 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 一 二

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) 100mg/L濃度区の試験水

試験水5mlを正確に量り、水を用いて50ml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100mg/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87.1%, 92.4%, 84.6%（平均88.0%）であった。

Figure 1 Calibration Curve of Propylene glycol by GC analysis

Input data		
No.	ng Injected	Peak Hight μV
1	2	357
2	10	1,425
3	50	8,126
4	100	16,155

$$Y(\text{Peak Hight}) = -60.31 + 162.3718 \times (\text{ng Injected})$$

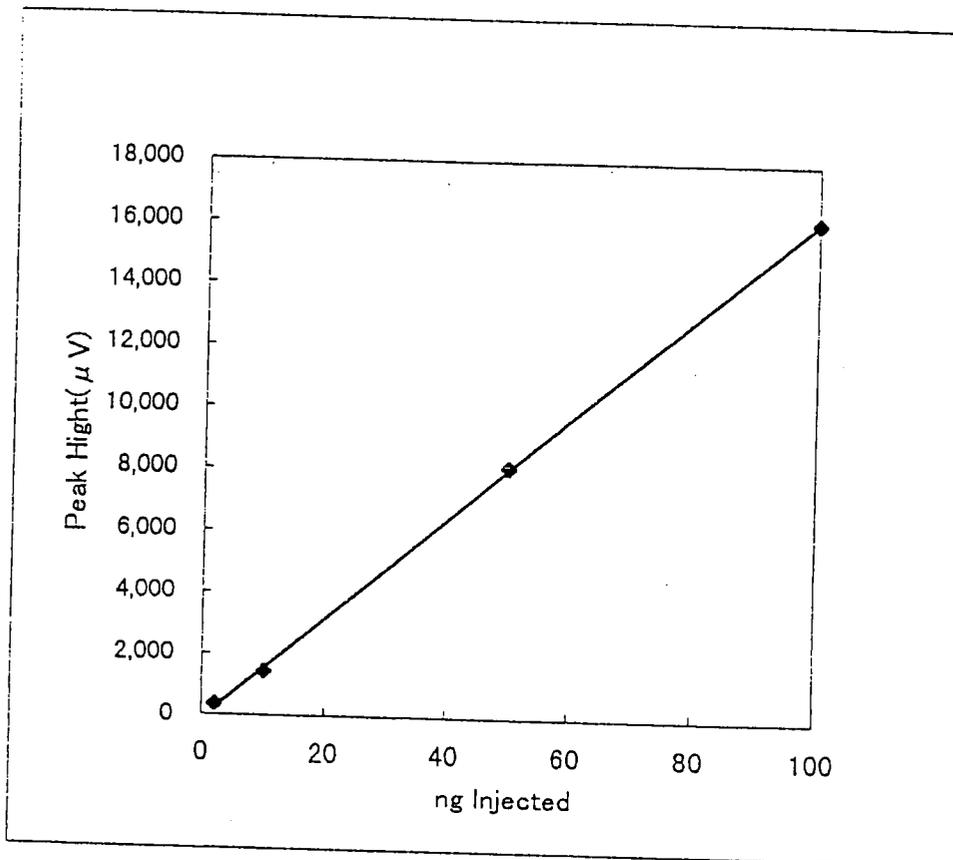
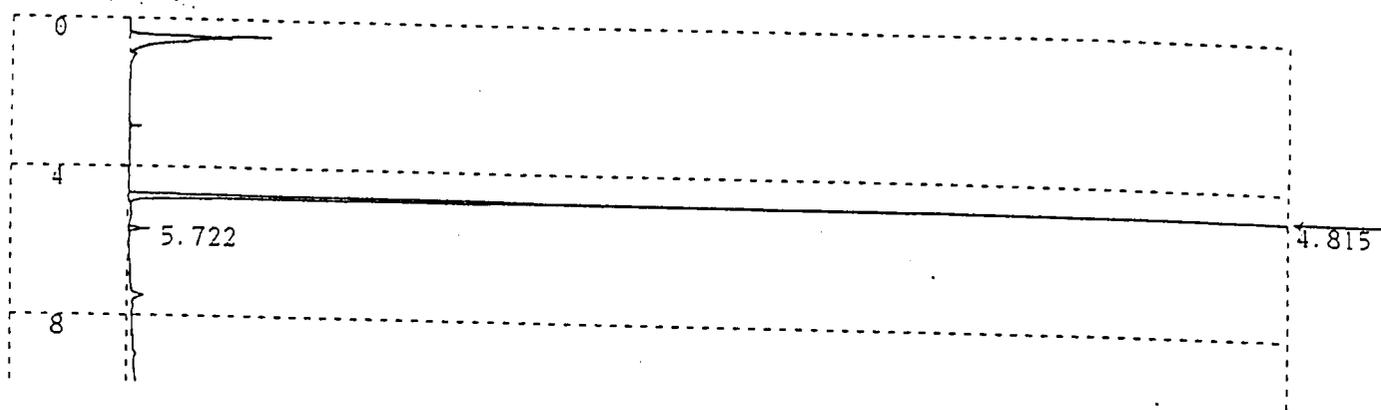


Figure 2 Representative chromatograms

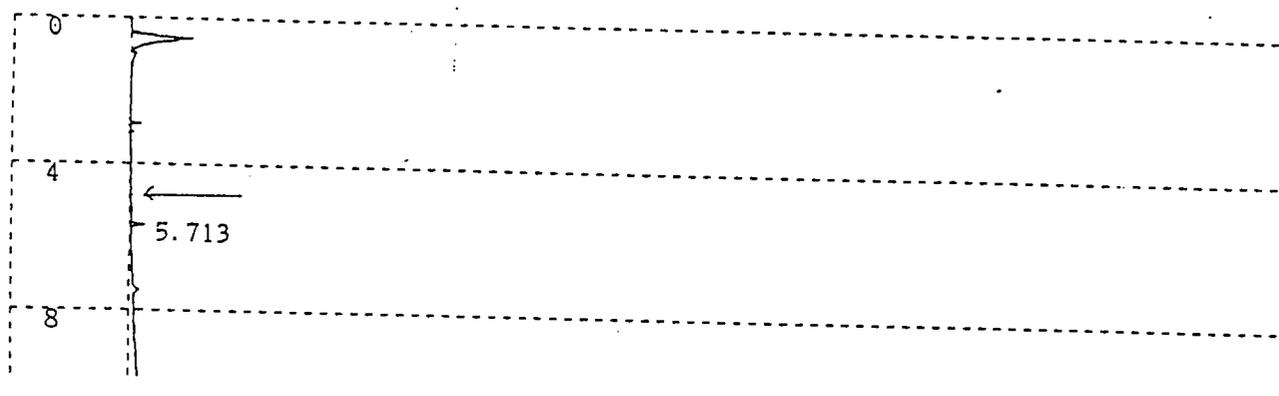
1) Standard (50mg/L) ; 0 hour



** 定量計算結果 **

CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	2	4.815	62352	16155		1		
	3	5.722	1159	278				7.0pt.17 G
TOTAL			63511	16433			0	

2) Control ; 0 hour

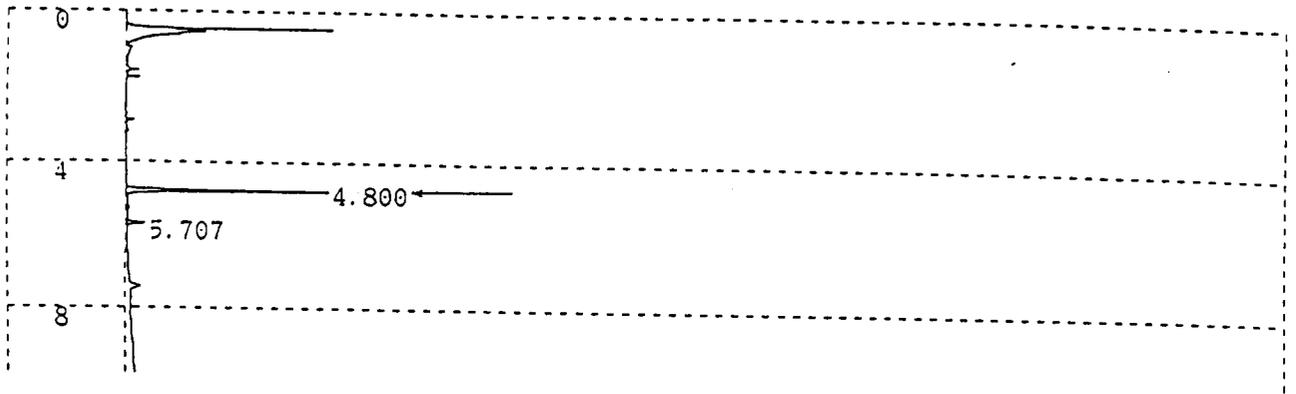


** 定量計算結果 **

CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	1	5.713	748	177				
TOTAL			748	177			0	

Figure 2 Representative chromatograms

3) test solution (100mg/L); 0 hour

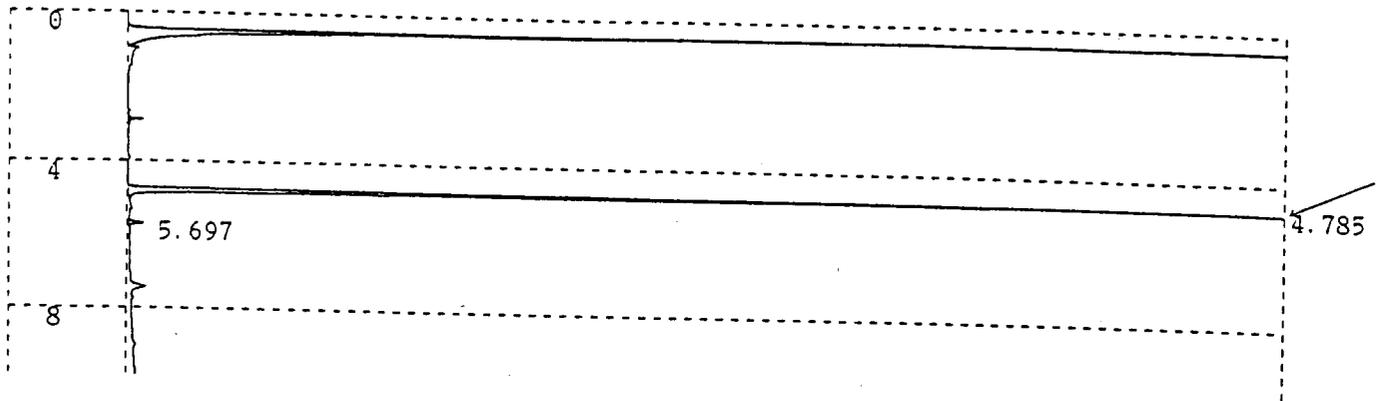


** 定量計算結果 **

CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	2	4.8	11001	2790		1		
	4	5.707	969	227				7*0t*ly G
TOTAL			11970	3018			0	

Figure 2 Representative chromatograms

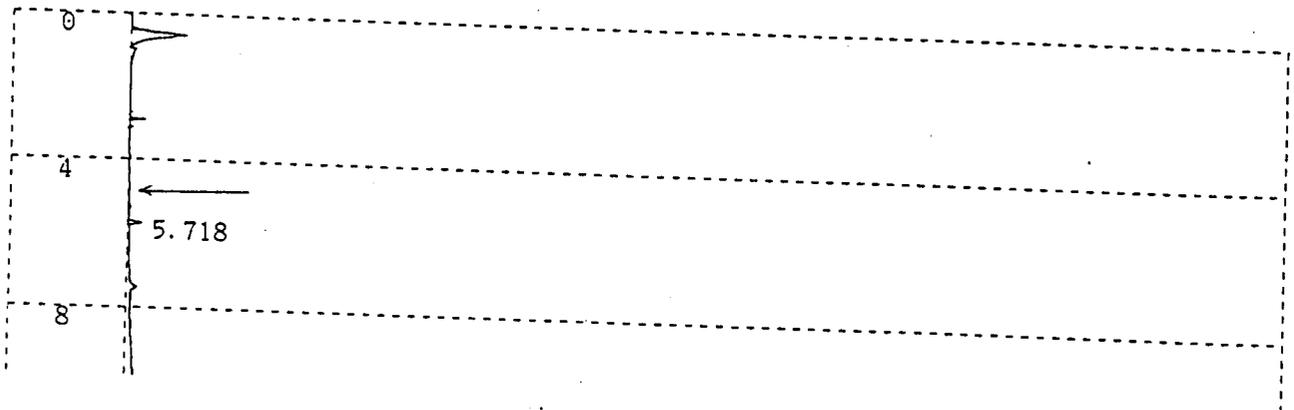
1) Standard (50mg/L) ; 24 hrs



** 定量計算結果 **

CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	2	4.785	61064	15957		1		
	4	5.697	844	192				7'at'ly G
TOTAL			61908	16150			0	

2) Control ; 24 hrs

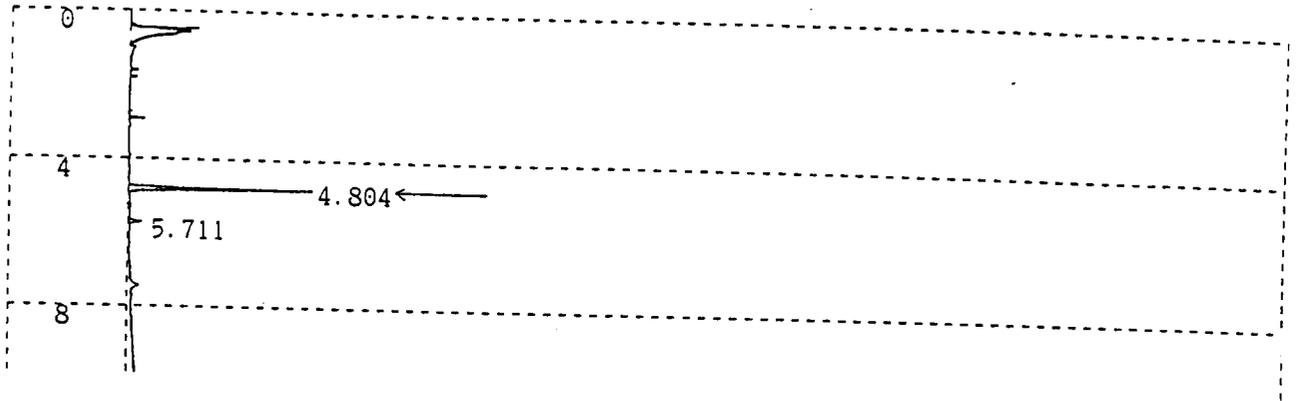


** 定量計算結果 **

CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	3	5.718	770	177				
TOTAL			770	177			0	

Figure 2 Representative chromatograms

3) test solution (100mg/L); 24 hrs



** 定量計算結果 **

CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	2	4.804	10157	2552		1		
	3	5.711	734	168				
TOTAL			10890	2721			0	