

試験報告書

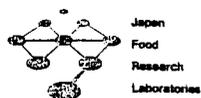
プロピレングリコールの藻類 (*Selenastrum capricornutum*) に対する生長阻害試験

(試験番号：第07011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藻類 (*Selenastrum capricornutum*) に対する
生長阻害試験

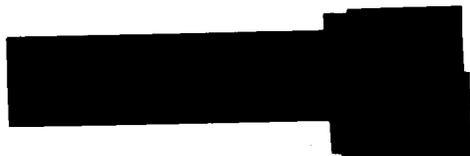
試験番号： 第07011号

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藻類 (*Selenastrum capricornutum*) に対する
生長阻害試験

試験番号： 第07011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 培地 | 5 |
| 3.3 試験培養器, 藻類培養試験装置及び機器等 | 5 |
| 3.4 試験濃度の設定 | 5 |
| 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 | 6 |
| 4.1 藻類生長曲線 | 6 |
| 4.2 藻類生長阻害濃度の算出 | 6 |
| 4.3 無影響濃度 (NOEC) の算出 | 8 |
| 5 結果及び考察 | 8 |
| 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 | 8 |
| 5.2 試験水中の被験物質濃度 | 8 |
| 5.3 藻類生長曲線 | 8 |
| 5.4 半数影響濃度 (EC50) 及び無影響濃度 (NOEC) | 8 |
| 5.5 温度及びpH | 8 |
| Table 1~7 | 9~15 |
| Figure 1 | 16 |
| 付属資料-1 | 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藻類 (*Selenastrum capricornutum*) に対する生長阻害試験

2. 試験目的

プロピレングリコールについて、藻類 (*Selenastrum capricornutum*) に対する生長阻害試験を行い、生長阻害濃度 (EC50) 及び無影響濃度 (NOEC) を求める。

3. 適用ガイドライン

本試験は、OECD化学用品テストガイドライン 201「藻類生長阻害試験」(1984年)に準拠して実施する。

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52-1

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 7 年 12 月 11 日～平成 7 年 12 月 14 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藻類 (*Selenastrum capricornutum*) に対する生長阻害試験

試験番号

第07011号

試験方法

本試験は、OECD化学品テストガイドライン 201「藻類生長阻害試験」(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) 培養方式：振とう培養法 (100rpm)
- 3) 供試生物種：*Selenastrum capricornutum* (ATCC22662)
- 4) 温 度：23±2℃
- 5) 曝露期間：72時間
- 6) 試験水量：100ml (OECD培地)
- 7) 連 数：3連+分析用試験培養器 (計4本)
- 8) 初期細胞濃度：約 1×10^4 cells/ml
- 9) 照 明：4,000 lx以上 (連続照明)
- 10) 試験濃度：対照区及び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, 終了時)

結 果

- 1) 生長曲線下の面積の比較による生長阻害濃度
EbC50 (0-72h) = 1,000mg/L以上
無影響濃度 (NOEC) = 1,000mg/L
- 2) 生長速度の比較による生長阻害濃度
ErC50 (24-48h) = 1,000mg/L以上
無影響濃度 (NOEC) = 1,000mg/L
ErC50 (24-72h) = 1,000mg/L以上
無影響濃度 (NOEC) = 1,000mg/L
(上記濃度は、全て設定値に基づく値)

2 供試生物

試験には、単細胞緑藻類である *Selenastrum capricornutum* を用いた。

本種は、American Type Culture Collectionより入手した ATCC22662株を、多摩研究所において無菌的に継代培養しているものである。

基準物質（重クロム酸カリウム，試薬特級）による72時間の生長阻害濃度（EbC50）は、0.87mg/Lであった。

前培養

試験に供する藻類は試験条件と同じ条件で曝露開始前に3日間培養したものを使用した。

3 試験方法

3.1 試験条件

- 1) 培養方式：振とう培養法（100rpm）
- 2) 温度：23±2℃
- 3) 曝露期間：72時間
- 4) 初期細胞濃度：約 1×10^4 cells/ml
- 5) 試験水量：100ml（OECD培地）
- 6) 連数：3連＋分析用試験培養器（計4本）
- 7) 照明：4,000 lx以上（連続照明）

3.2 試験培地

前培養及び試験ともにOECD化学品テストガイドラインに示されている培地を用いた。

[Table 1 (p.9)]

3.3 試験培養器，藻類培養試験装置及び機器

- 1) 試験培養器：通気性のシリコン栓付300ml容ガラス製三角フラスコ
- 2) 藻類培養試験装置：光照射式恒温器 LX-3200F（タイテック株式会社）
- 3) 光学顕微鏡：倒立顕微鏡 CK2（オリンパス光学工業株式会社）
- 4) pH計：HM-11P（東亜電波工業株式会社）
- 5) 血球計算盤：THOMAの血球計算盤（萱垣医理科工業株式会社）

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、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の濃度区のみで限度試験を行った。

3.5 試験水の調製

被験物質を試験培地で溶解させた被験物質原液及び溶液を調製し、試験培地に添加して試験水を調製した。なお、対照区は試験培地のみとした。

3.6 試験水の分析

曝露開始時は分析用試験培養器より試験水を20ml、72時間後は各濃度区3連の試験培養器より各7mlを等量混合（計21ml）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-1に示した。

3.7 試験操作

前培養した藻類の細胞濃度を測定し、試験水中の細胞濃度が約 1×10^4 cells/mlとなるように、前培養液の一定量を試験水の入った試験培養器に添加した。

各濃度区の分析用試験培養器のpHを測定し、各試験培養器を $23 \pm 2^\circ\text{C}$ の培養試験装置に設置して曝露を開始した。

曝露開始後24、48及び72時間目に細胞濃度を測定した。細胞濃度の測定は各試験培養器より試験水4mlを採取し、THOMAの血球計算盤により計測した。

試験水調製時のpHは4本調製したうちの予備1本について測定して各濃度区の曝露開始時のpHとし、終了時には3連全て測定した。試験期間中、培養装置内の温度、照度を1日1回測定した。

4 結果の算出

4.1 藻類生長曲線

濃度区及び対照区の細胞濃度の平均値を時間に対してプロットし生長曲線を作成した。

4.2 藻類生長阻害濃度の算出

4.2.1 生長曲線下の面積の比較による生長阻害濃度（EbC50）

1) 生長曲線下の面積は次の式により算出した。

$$A = \frac{N_1 - N_0}{2} \times t_1 + \frac{N_1 + N_2 - 2N_0}{2} \times (t_2 - t_1) + \dots + \frac{N_{n-1} + N_n - 2N_0}{2} \times (t_n - t_{n-1})$$

A : 生長曲線下の面積

N_0 : 曝露開始時の設定細胞濃度 (cells/ml)

N_1 : t_1 時の実測細胞濃度 (cells/ml)

N_n : t_n 時の実測細胞濃度 (cells/ml)

t_1 : 曝露開始後最初に細胞濃度を測定した時間

t_n : 曝露開始後n回目に細胞濃度を測定した時間

- 2) 生長曲線下の面積より各濃度区における生長の阻害百分率 (I_A) を次の式により算出した。

$$I_A = \frac{A_c - A_t}{A_c} \times 100$$

A_c : 対照区の生長曲線下の面積

A_t : 各濃度区における生長曲線下の面積

- 3) 各濃度区に対応する I_A 値を片対数紙にプロットし直線回帰分析を行った後、Y切片からEbC50 (0-72h) 及びその95%信頼区間を算出した。

4.2.2 生長速度の比較による生長阻害濃度 (ErC50)

- 1) 指数増殖している培養での細胞濃度の平均値から平均の生長速度 (μ) を次の式により算出した。

$$\mu = \frac{\ln N_n - \ln N_1}{t_n - t_1}$$

N_1 : t_1 時の実測細胞濃度 (cells/ml)

N_n : t_n 時の実測細胞濃度 (cells/ml)

t_1 : 曝露開始後最初に細胞濃度を測定した時間

t_n : 曝露開始後n回目に細胞濃度を測定した時間

- 2) 平均の生長速度 (μ) より各濃度区における平均生長速度の低下百分率を次の式により算出した。

$$I_m = \frac{\mu_c - \mu_t}{\mu_c} \times 100$$

μ_c : 対照区の平均生長速度

μ_t : 各濃度区における平均生長速度

- 3) 各濃度区に対応する I_m 値を片対数紙にプロットし直線回帰分析を行った後、Y切片からErC50 (24-48h), ErC50 (24-72h) 及びその95%信頼区間を算出した。

4.3 無影響濃度（NOEC）の算出

t 検定（片側，有意水準0.05）により対照区と比較して有意差が認められない最高試験濃度を無影響濃度（NOEC）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

曝露開始時の被験物質濃度は1,010mg/L（設定値1,000mg/L）であり，曝露終了時の被験物質濃度は976mg/L（設定値1,000mg/L）であった。設定値に対する割合は98～101%であった。

[Table 2 (p.10) , 付属資料-1]

5.3 藻類生長曲線

曝露終了時の細胞濃度は1,000mg/L濃度区で 88.7×10^4 cells/mlであった。また，対照区における細胞濃度は 84.3×10^4 cells/mlであり，試験成立条件である16倍以上の増殖の基準を満たした。

[Table 3 (p.11) , Figure 1 (p.16)]

5.4 半数影響濃度（EC50）及び無影響濃度（NOEC）

1) 生長曲線下の面積の比較による生長阻害濃度（EbC50）

EbC50（0-72h）は1,000mg/L以上であった。対照区と比較して有意差が認められない最高試験濃度（無影響濃度（NOEC））は1,000mg/Lであった。

[Table 4, 5 (p.12, 13)]

2) 生長速度の比較による生長阻害濃度（ErC50）

ErC50（24-48h）及びErC50（24-72h）は，共に1,000mg/L以上であった。対照区と比較して有意差が認められない最高試験濃度（無影響濃度：NOEC）は，共に1,000mg/Lであった。

[Table 4, 5 (p.12, 13)]

5.5 温度及びpH

72時間の曝露期間中の藻類培養試験装置内の温度は22.8～24.1℃であり，その平均温度は 23.6 ± 0.5 ℃であった。試験水のpHは曝露開始時が8.0であり，曝露終了時が8.3～9.0であった。

[Table 6, 7 (p.14, 15)]

以 上

Table 1. OECD medium

| Nutrient salts | Concentration (mg/L) |
|-------------------------|----------------------|
| H_3BO_3 | 0.185 |
| $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ | 0.415 |
| $ZnCl_2$ | 0.003 |
| $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ | 0.08 |
| $Na_2EDTA \cdot 2H_2O$ | 0.1 |
| $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ | 0.0015 |
| $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ | 0.007 |
| $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ | 0.00001 |
| $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ | 18 |
| NH_4Cl | 15 |
| KH_2PO_4 | 1.6 |
| $NaHCO_3$ | 50 |
| $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ | 12 |
| $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ | 15 |

Table 2. Measured Concentrations of Propylene glycol During a 72-Hour Exposure to *Selenastrum capricornutum*

| Nominal Concentration (mg/L) | Measured Concentration (mg/L) | | | Percent of Nominal |
|------------------------------------|-------------------------------|----------|-------------------|--------------------------|
| | 0 hour | 72 hours | Geometric Mean | |
| Control | < 1.0 | < 1.0 | ---- | ---- |
| 1,000 | 1,010 | 976 | 993 | 99 |

Table 3. Cell Density of *Selenastrum capricornutum*

| Nominal Concentration (mg/L) | No. | Cell Density ($\times 10^4$ cells/ml) | | | |
|------------------------------------|---------|--|----------|----------|----------|
| | | 0 hour | 24 hours | 48 hours | 72 hours |
| Control | 1 | 1.0 | 6.4 | 33.6 | 91.0 |
| | 2 | 1.0 | 7.4 | 32.8 | 80.4 |
| | 3 | 1.0 | 7.0 | 33.8 | 81.4 |
| | Average | 1.0 | 6.9 | 33.4 | 84.3 |
| | S. D. | 0.0 | 0.41 | 0.43 | 4.78 |
| 1,000 | 1 | 1.0 | 7.2 | 30.8 | 82.2 |
| | 2 | 1.0 | 8.0 | 36.2 | 95.4 |
| | 3 | 1.0 | 7.6 | 36.4 | 88.4 |
| | Average | 1.0 | 7.6 | 34.5 | 88.7 |
| | S. D. | 0.0 | 0.33 | 2.59 | 5.39 |

Each value represents the mean of three sample counts.

Table 4. Growth Inhibition of *Selenastrum capricornutum*

| Concentration | | Area | Inhibition (%) | Rate | Inhibition (%) | Rate | Inhibition (%) |
|---------------|---------|--------------|---------------------------|-------------------|----------------------------|-------------------|----------------------------|
| mg/L | No. | A (0-72h) | I _A (0-72h) | μ (24-48h) | I _m (24-48h) | μ (24-72h) | I _m (24-72h) |
| Control | 1 | 19,920,000 | ---- | 0.069093 | ---- | 0.055303 | ---- |
| | 2 | 18,696,000 | ---- | 0.062040 | ---- | 0.049699 | ---- |
| | 3 | 18,960,000 | ---- | 0.065606 | ---- | 0.051114 | ---- |
| | Average | 19,192,000 | ---- | 0.065580 | ---- | 0.052039 | ---- |
| 1,000 | 1 | 18,384,000 | 4.21 | 0.060560 | 7.65 | 0.050731 | 2.51 |
| | 2 | 21,456,000 | -11.80 | 0.062901 | 4.09 | 0.051638 | 0.77 |
| | 3 | 20,568,000 | -7.17 | 0.065268 | 0.48 | 0.051119 | 1.77 |
| | Average | 20,136,000 | -4.92 | 0.062910 | 4.07 | 0.051163 | 1.68 |

Table 5. Calculated EC50 and NOEC

Based on I_A value

| | Concentration (mg/L) | 95-Percent Confidence Limits (mg/L) |
|---------------|-------------------------|---|
| EbC50 (0-72h) | > 1,000 | not calculated |
| NOECb (0-72h) | 1,000 | ---- |

Based on I_m value

| | Concentration (mg/L) | 95-Percent Confidence Limits (mg/L) |
|----------------|-------------------------|---|
| ErC50 (24-48h) | > 1,000 | not calculated |
| NOECr (24-48h) | 1,000 | ---- |
| ErC50 (24-72h) | > 1,000 | not calculated |
| NOECr (24-72h) | 1,000 | ---- |

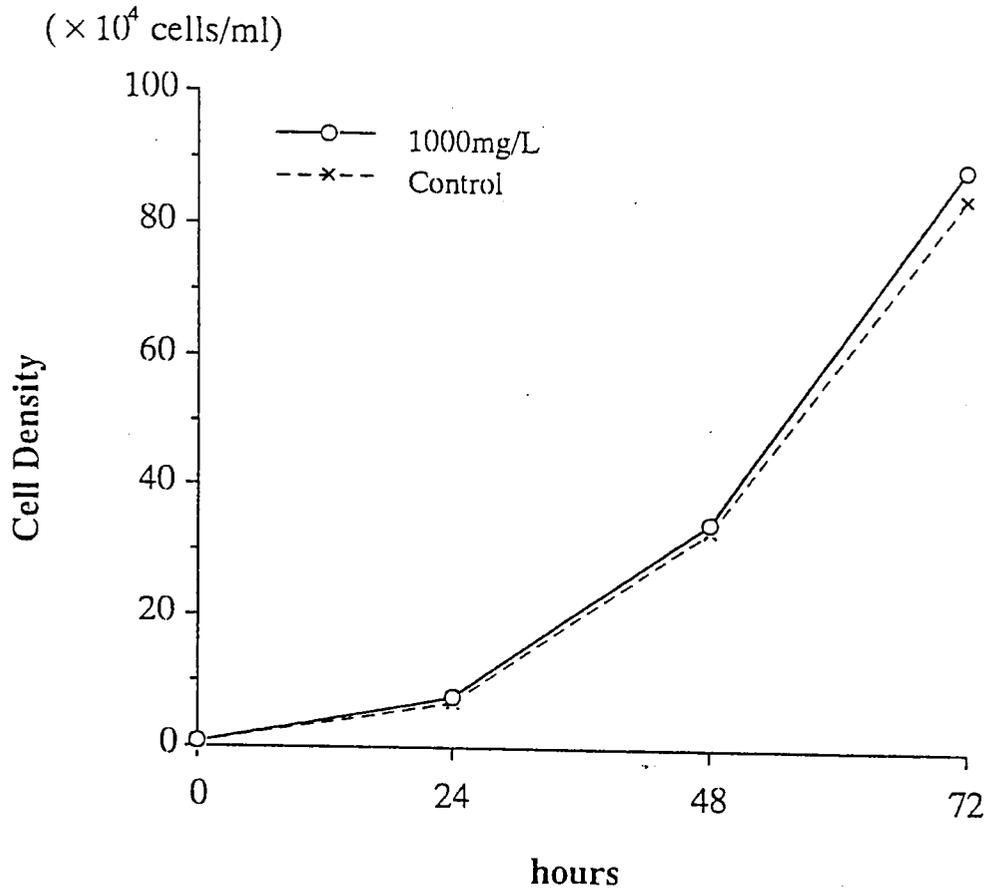
Table 6. Daily Temperature in the Incubation Chamber During a 72-Hour Exposure

| Exposure Period (hours) | Temperature (°C) |
|----------------------------|---------------------|
| 0 | 22.8 |
| 24 | 23.7 |
| 48 | 23.6 |
| 72 | 24.1 |
| Average | 23.6 |

Table 7. pH Values at 0-Hour and 72-Hour Exposure

| Nominal Concentration (mg/L) | No. | pH | |
|------------------------------------|-----|--------|----------|
| | | 0 hour | 72 hours |
| Control | 1 | 8.1 | 7.8 |
| | 2 | ---- | 8.5 |
| | 3 | ---- | 8.4 |
| 1,000 | 1 | 8.0 | 8.3 |
| | 2 | ---- | 9.0 |
| | 3 | ---- | 8.9 |

Figure 1. Algal Growth Curve of *Selenastrum capricornutum*



付 属 資 料 一 1

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1,000mg/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102.1%, 100.7%, 101.1%（平均101.3%）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 |

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

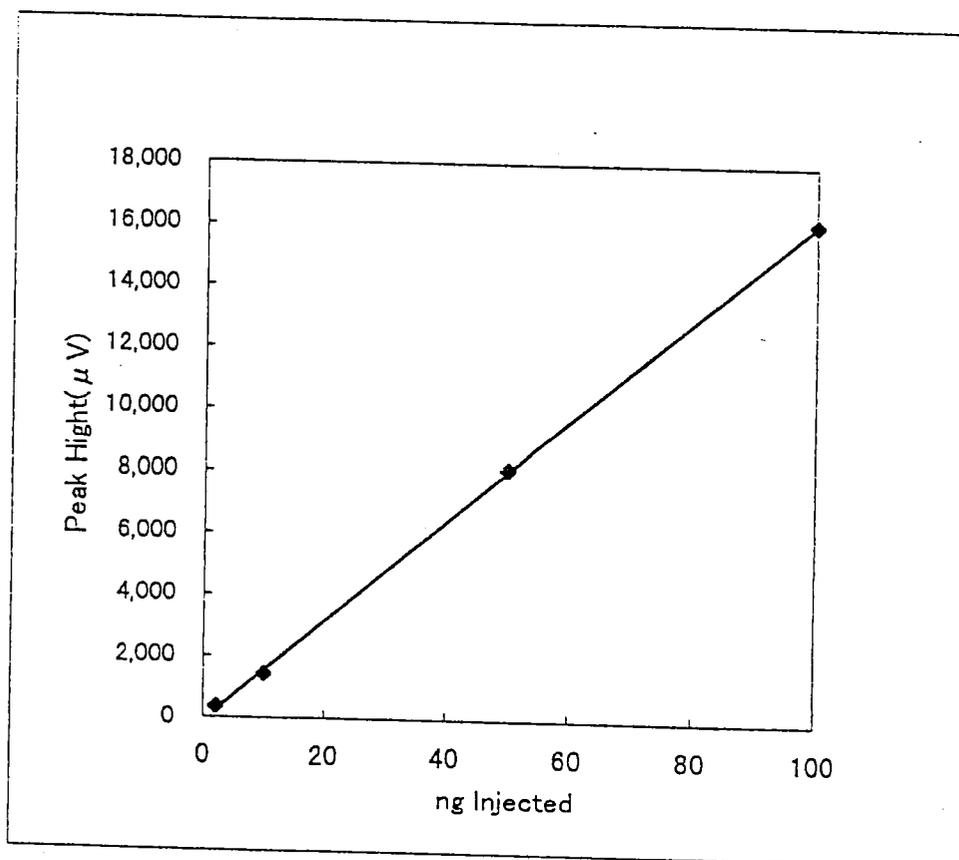
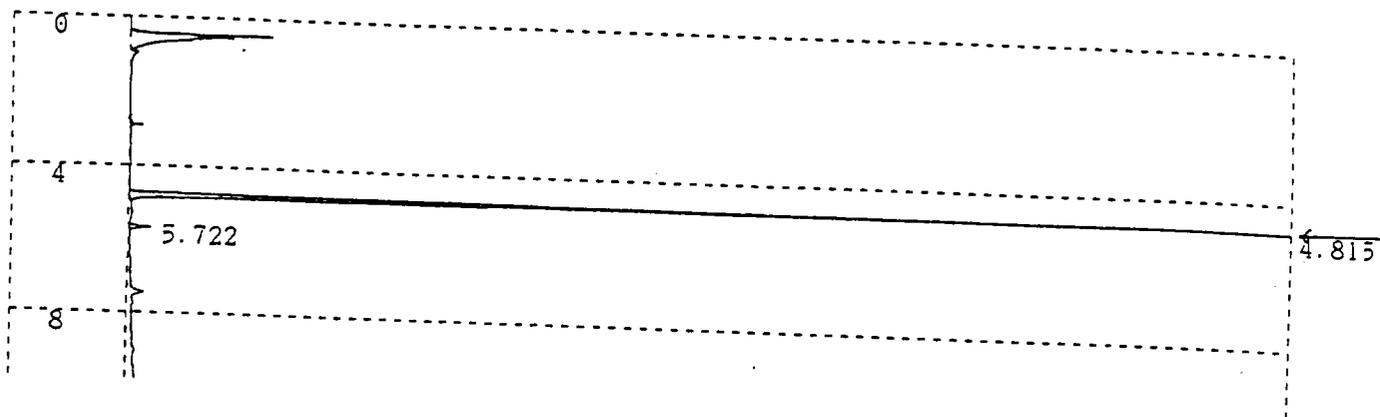


Figure 2 Representative chromatograms

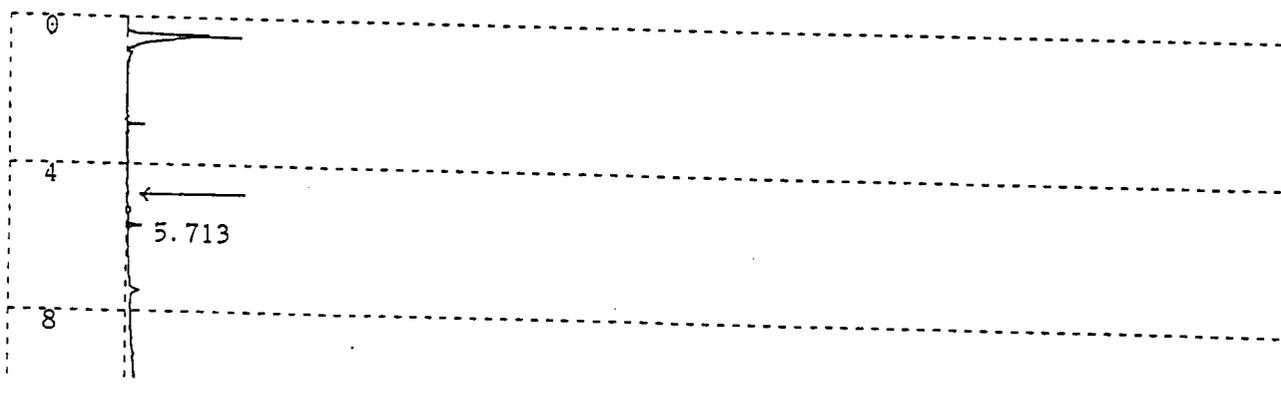
1) Standard (50mg/L) ; 0 hour



** 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' dt' v' G |
| TOTAL | | | 63511 | 16433 | | | 0 | |

2) Control ; 0 hour

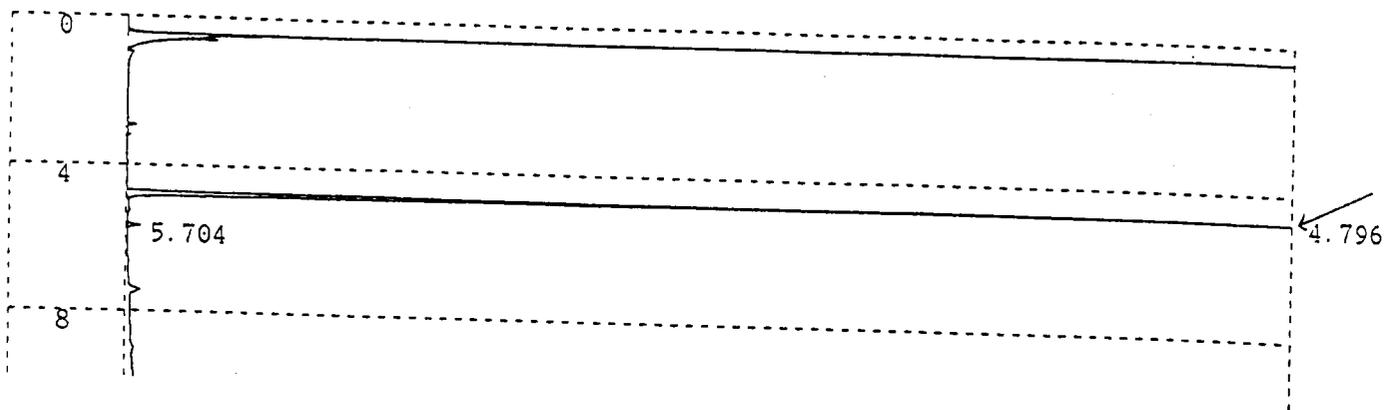


** 定量計算結果 **

| CH | PKNO | TIME | AREA | HEIGHT | MK | IDNO | CONC | NAME |
|-------|------|-------|------|--------|----|------|------|------|
| 1 | 3 | 5.713 | 770 | 181 | | | | |
| TOTAL | | | 770 | 181 | | | 0 | |

Figure 2 Representative chromatograms

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

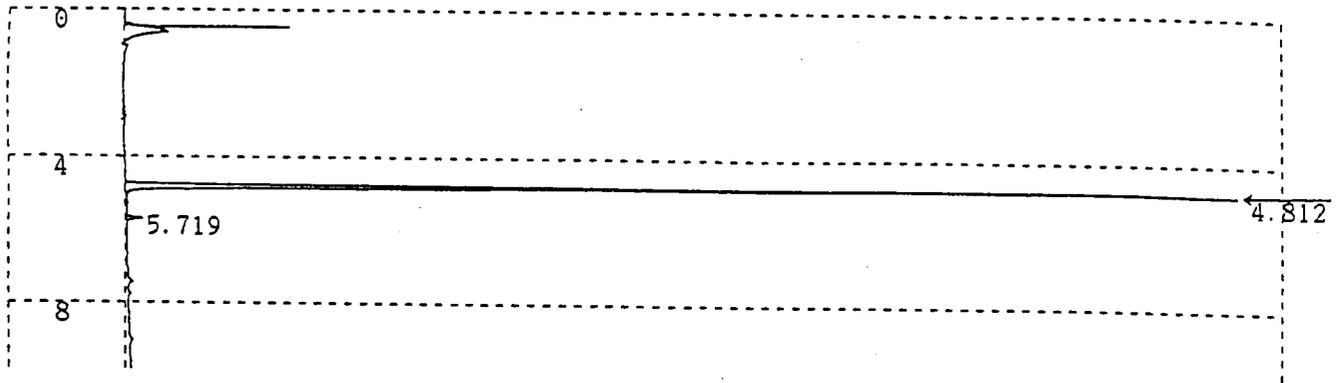


** 定量計算結果 **

| CH | PKNO | TIME | AREA | HEIGHT | MK | IDNO | CONC | NAME |
|-------|------|-------|-------|--------|----|------|------|------|
| 1 | 3 | 4.796 | 63284 | 16404 | | 1 | | |
| | 5 | 5.704 | 793 | 187 | | | | |
| TOTAL | | | 64077 | 16592 | | | 0 | |

Figure 2 Representative chromatograms

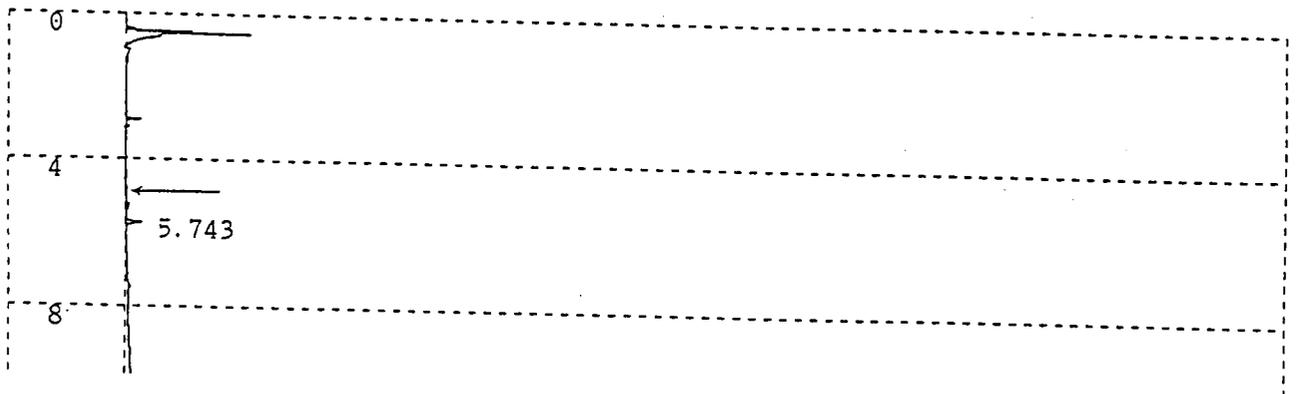
1) Standard (50mg/L) ; 72 hrs



** 定量計算結果 **

| CH | PKNO | TIME | AREA | HEIGHT | MK | IDNO | CONC | NAME |
|-------|------|-------|-------|--------|----|------|------|-----------|
| 1 | 1 | 4.812 | 63038 | 15372 | | 1 | | 7'at'ly G |
| | 2 | 5.719 | 1053 | 231 | | | | |
| TOTAL | | | 64091 | 15603 | | | 0 | |

2) Control ; 72 hrs

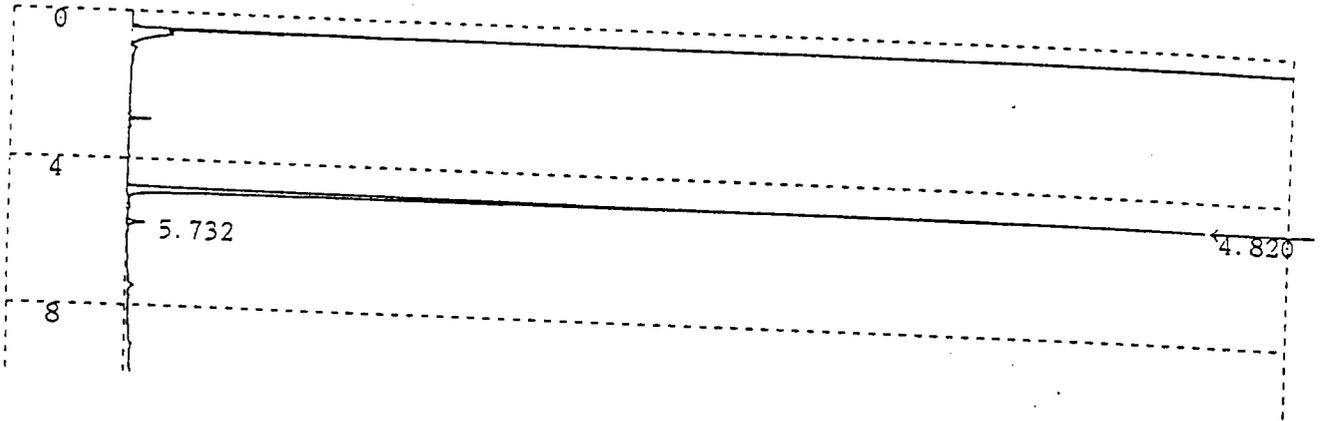


** 定量計算結果 **

| CH | PKNO | TIME | AREA | HEIGHT | MK | IDNO | CONC | NAME |
|-------|------|-------|------|--------|----|------|------|------|
| 1 | 5 | 5.743 | 940 | 208 | | | | |
| TOTAL | | | 940 | 208 | | | 0 | |

Figure 2 Representative chromatograms

3) test solution (1000mg/L) : 72 hrs



** 定量計算結果 **

| CH | PKNO | TIME | AREA | HEIGHT | MK | IDNO | CONC | NAME |
|-------|------|-------|-------|--------|----|------|------|-------------|
| 1 | 2 | 4.82 | 62306 | 14846 | | 1 | | |
| | 3 | 5.732 | 1020 | 217 | | | | 7' 0t' 17 G |
| TOTAL | | | 63326 | 15063 | | | 0 | |