

環境省殿

試 験 報 告 書

サリチル酸のオオミジンコ(*Daphnia magna*)に対する急性遊泳阻害試験

(試験番号:NMMP/E00/2010)

平成13年12月1日作成

株式会社 東レリサーチセンター

陳 述 書

株式会社 東レリサーチセンター
名古屋研究部

試験委託者 : 環境省

表題 : サリチル酸のオオミジンコ(*Daphnia magna*)に対する急性遊泳阻害試験

試験番号 : NMMP/E00/2010

上記試験は環境省のGLP規則に従って実施したものである。

平成 13 年 12 月 07 日

運営管理者

信 頼 性 保 証 証 明

株式会社 東レリサーチセンター
名古屋研究部

試験委託者 : 環境省

表題 : サリチル酸のオオミジンコ(*Daphnia magna*)に対する急性遊泳阻害試験

試験番号 : NMMP/E00/2010

本試験は試験計画書およ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。

記

	実施日	運営管理者および 試験責任者への報告日
試験実施状況査察	平成13年4月4日	平成13年4月24日
試験報告書監査	平成13年11月9日	平成13年11月9日

平成13年12月7日












信頼性保証業務担当者

試験実施概要

1. 表題 : サリチル酸のオオミジンコ(*Daphnia magna*)に対する急性遊泳阻害試験
2. 試験目的 : サリチル酸について、オオミジンコ(*Daphnia magna*)に対する急性遊泳阻害試験を行い、24 および 48 時間後の半数遊泳阻害濃度 (EC50) および最大無作用濃度 (NOEC) 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 No.202「ミジンコ類、急性遊泳阻害試験および繁殖試験」(1984 年) に準拠した。
4. 適用GLP : 本試験は環境省のGLP規則に準拠した。
5. 試験委託者
 - 名称 : 環境省
 - 住所 : (〒100-8975) 東京都千代田区霞が関1-2-2
 - 委託責任者 : 総合環境政策局環境保健部環境安全課環境リスク評価室 室長補佐 XXXXXXXXXX
6. 試験受託者
 - 名称 : 株式会社 東レリサーチセンター
 - 所在地 : (〒103-0022) 東京都中央区日本橋室町3-1-8 都ビル内
7. 試験施設
 - 名称 : 株式会社 東レリサーチセンター 名古屋研究部
 - 所在地 : (〒455-8502) 愛知県名古屋市港区大江町9-1

8. 試験関係者:

試験責任者			(平成 13 年 12 月 7 日)
試験担当者			(平成 13 年 12 月 6 日)
試験担当者			(平成 13 年 12 月 6 日)
試験担当者			(平成 13 年 12 月 6 日)
試験担当者			(平成 13 年 12 月 6 日)
試験担当者			(平成 13 年 12 月 6 日)

9. 試験期間: 試験開始日 平成 12 年 12 月 12 日
 暴露期間 平成 13 年 4 月 4 日 ～ 平成 13 年 4 月 6 日
 試験終了日 平成 13 年 12 月 7 日

10. 保管:

~~試験計画書、生データ、記録文書および試験報告書は、試験報告書作成後10年間、株式会社
 東レリサーチセンター名古屋研究部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。~~ 訂正

Ⅱ. 変更項目, 変更時期及び変更理由

頁(行)	変更前	変更後	変更時期	変更理由
P.5 (下から4行)	10. 保管: 試験計画書、生データ、記録文書および試験報告書は、試験報告書作成後10年間、株式会社 東レリサーチセンター名古屋研究部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。	10. 保管: 試験計画書、生データ、記録文書および試験報告書は、試験報告書作成後10年間、株式会社 東レリサーチセンター名古屋研究部の保管施設あるいは当社研究部の査察・監査のもとに外部保管施設である株式会社ワンビシアーカイズに保管する。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。	2002 年 7 月	今後、当研究部試資料保管施設の保管容量が不足するため、外部保管施設である株式会社ワンビシアーカイズを利用する。

目 次

	頁
要 旨	7
1 被験物質	8
1.1 名称、構造式および物理化学的性状.....	8
1.2 供試試料	8
1.3 被験物質の確認、保管方法および保管条件下での安定性.....	8
2 供試生物	9
3 試験方法	9
3.1 試験条件	9
3.2 希釈水	10
3.3 試験容器および恒温槽等	10
3.4 試験濃度の設定	10
3.5 試験液の調製.....	10
3.6 試験液の分析.....	11
3.7 試験操作	11
4 結果の算出.....	11
5 結果および考察.....	12
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	12
5.2 試験液中の被験物質濃度.....	12
5.3 半数遊泳阻害濃度 (EiC50)	12
5.4 最大無作用濃度 (NOECi)および 100%阻害最低濃度	12
5.5 試験液のpH、溶存酸素濃度および水温	12
Table 1～7.....	13～18
Figure 1.....	19
付属資料-1 希釈水(M4 調整水).....	20
付属資料-2 試験液の分析方法	22

要 旨

試験委託者

環境省

表 題サリチル酸のオオミジンコ (*Daphnia magna*)に対する急性遊泳阻害試験試験番号

NMMP/E00/2010

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、急性遊泳阻害試験および繁殖試験」(1984年)に準拠して実施した。

- 1) 被験物質 : サリチル酸
- 2) 暴露方法 : 止水式
- 3) 供試生物 : オオミジンコ (*Daphnia magna*)
- 4) 暴露期間 : 48 時間
- 5) 連数 : 1濃度区につき4連
- 6) 生物数 : 20 頭/1濃度区(1連につき5頭で1濃度区 20 頭)
- 7) 試験濃度 : 対照区、5.29mg/L、9.53mg/L、17.1mg/L、30.9mg/L、55.6mg/L および
100.0mg/L (公比 1.8)(設定濃度)
- 8) 試験液量 : 100 mL
- 9) 照明 : 室内光、16 時間明/8 時間暗
- 10) 試験水温 : 20±1℃

結 果

1) 24 時間暴露後の結果

24 時間半数遊泳阻害濃度(EiC50)=>100mg/L

2) 48 時間暴露後の結果

48 時間半数遊泳阻害濃度(EiC50)=76.8mg/L(95%信頼区間: 63.7mg/L~99.0mg/L)

最大無作用濃度(NOECi)=17.1mg/L

100%阻害最低濃度=>100mg/L

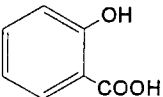
(上記濃度は、全て設定濃度に基づく値)

1 被験物質

1.1 名称、構造式および物理化学的性状

名 称 : サリチル酸

別名: 2-ヒドロキシ安息香酸、識別符号: SCA、CAS: 69-72-7

構造式 : 

分子式 : $C_7H_6O_3$

分子量 : 138.12

融点 : 158°C

沸点 : 211°C / 20mmHg

水への溶解度 : 2240mg/L(25°C)

1-オクタノール／水 分配係数(logP) : 2.26

pKa : 2.97

蒸気圧 : 8.2E-5 mmHg(25°C)

[上記の数値は、次のデータベースから引用した]

TOXNET : National Library of Medicine (Toxicology Data Network)

ICSC : International Chemical Safety Cards

SRC : SRC PhysProp Database (Syracuse Research Corporation)

1.2 供試試料

純度 : 99.8%

ロット番号 : GI01

供給者 : XXXXXXXXXX

供給量 : 25g×4本

入手日 : 平成12年10月16日

外観 : 白色針状結晶

1.3 被験物質の確認、保管方法および保管条件下での安定性

1) 保管方法

被験物質は試料保管冷蔵庫で光を遮断して保管した。

2) 被験物質の確認および保管条件下での安定性

入手した被験物質について赤外吸収スペクトル、NMRスペクトルの測定および高速液体クロマトグラフ分析を行い、被験物質の構造と矛盾が認められないことおよび純度を確認した。試験終了時にも同様に測定・分析し、試験開始前に測定・分析した結果と比較したところ、差は認められなかった。従って、被験物質は当研究部の試料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、当研究部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)による急性遊泳阻害試験の結果、48時間 EC_{50} は0.81 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て、別に用意したビーカーに移し、それぞれ翌日産出された幼体を別のビーカーに分けた。この幼体を供試ミジンコの親とし、以下の条件で20日間飼育馴化した。成熟し幼体を産むようになってから、1週間に少なくとも2回以上幼体を除去した。暴露開始前日に幼体を除去し、翌日(24時間以内)に産出された幼体を試験に用いた。死亡個体は少なく、休眠卵や雄は全く生じなかった。

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*

(藻類培養液を遠心操作により、人工軟水*に置換して給餌した)

* 蒸留水 1L 当たり、 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 26.1mg、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 17.7mg、 K_2SO_4 1.1mg、 NaHCO_3 25.0mg を溶解して調製する。

給餌量 : ミジンコ1頭当たり 0.1~0.2 mgC(有機炭素含量)/日

3 試験方法

3.1 試験条件

- 1) 暴露方法 : 止水式
- 2) 暴露期間 : 48 時間
- 3) 連数 : 1濃度区に付き4連
- 4) 生物数 : 20 頭/1濃度区(1連に付き5頭で1濃度区 20 頭)
- 5) 試験水量 : 100 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

OECD 改訂ガイドライン No.211 オオミジンコ繁殖阻害試験－1998 年 9 月採択に記載してある M4調整水を用いた。従って、希釈水使用時のオルトトリジン法等による、残留塩素の有無の確認は行わなかった。希釈水の硬度は255mg/L(CaCO_3 換算)、pHは 8.0であった。

[付属資料－1 (p.20)]

3.3 試験容器および恒温槽等

試験容器 : 100mL容、ガラス容器

恒温槽 : 恒温水槽および水循環装置(ヤマト科学 クールライン CL100)

水温計 : pH計内蔵温度計(堀場製作所 カスタニー-LAB pHメーター F-22)

pH計 : 堀場製作所 カスタニー-LAB pHメーター F-22

溶存酸素計 : 堀場製作所 DOメーター OM-14

3.4 試験濃度の設定

本試験に先立って予備試験を実施した結果、48 時間半数遊泳阻害濃度(48hr-EiC50)は 32mg/L 付近と推定された。

この結果を参考にして、濃度公比 1.8で6段階の濃度区を設定して試験した。

(設定濃度: 5.29mg/L、9.53mg/L、17.1mg/L、30.9mg/L、55.6mg/L および100.0mg/L)

3.5 試験液の調製

- 1) 被験物質 2500mg/L 溶液を希釈水に添加し、設定濃度の試験液を必要量調製した。
- 2) 希釈水のみを対照区を設けた。
- 3) 1濃度区につき4個の試験容器を用意し、各試験容器に試験液を 100mL ずつ入れた。
- 4) 試験液の状態(外観等)を観察した。無色透明で沈殿等は見られなかった。

3.6 試験液の分析

試験開始時および48時間後に各試験容器より試験液約1.5mLを採取し、高速液体クロマトグラフ法により分析した。試験液の分析に際しては、試料測定日毎に標準溶液(濃度 2.0mg/L)の測定を行い、検量係数を求めて被験物質濃度を測定した。

詳細は付属資料-2(p.22)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、供試ミジンコを投入し、その時点を暴露開始時とした。先端を太くしたピペッターを用いて供試ミジンコを投入した。その際、試験液量に対して、ピペッター内の飼育水は全量で1%以内を目安とした。48時間まで飼育した。

暴露開始24および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)。

水温、溶存酸素濃度、pHは、暴露開始時および暴露終了時に全濃度区(但し、各1試験容器)の試験液について測定した。

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(%)を算出し、米国EPAで開発されたTOXDAT Multi-Method Programの計算式によるProbit法により半数遊泳阻害濃度(EiC50)を算出した。また、その95%信頼限界も算出した。

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(NOECi)とした。

また、全てのミジンコが遊泳阻害を受ける最低濃度区を100%阻害最低濃度とした。

5 結果および考察

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 試験液中の被験物質濃度

試験開始時および 48 時間後に試験液中の被験物質濃度を測定した。試験開始時の被験物質濃度は 5.2～95.8mg/L(設定濃度 5.3～100.0mg/L)であり、設定濃度に対する割合は95.8～97.7%であった。試験開始後 48 時間の被験物質濃度は4.9～94.8mg/L(設定濃度5.3～100.0 mg/L)であり、設定濃度に対する割合は、91.2～95.5%であった。

実測値が設定濃度の±20%以内であったので試験結果の算出には設定濃度を用いた。

[Table 1(p.13)、付属資料-2(p.22)]

5.3 半数遊泳阻害濃度(EiC50)

サリチル酸に 48 時間暴露したミジンコの遊泳阻害率は最低濃度区5.3mg/L で 0%、最高濃度区100.0mg/L で 80%であった。対照区の遊泳阻害率は 0%であった。

[Table 2(p.14)、Figure 1(p.19)]

サリチル酸の 24 時間半数遊泳阻害濃度(24hr-EiC50)は>100mg/L であった。

また、48 時間半数遊泳阻害濃度(48hr-EiC50)は 76.8mg/L であり、その 95%信頼区間は 63.7mg/L～99.0mg/L であった。

[Table 3(p.15)]

5.4 最大無作用濃度 (NOECi)および 100%阻害最低濃度

サリチル酸に 48 時間暴露したミジンコの最大無作用濃度 (NOECi)は 17.1mg/L であり、100%阻害最低濃度は>100mg/L であった。

[Table 4(p.15)]

5.5 試験液のpH、溶存酸素濃度および水温

試験期間中の試験液のpHは 5.4～7.6であった。試験期間中の溶存酸素濃度は8.1～8.9 mg/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(20.0℃の飽和溶存酸素濃度: 8.84mg/L)であった。試験期間中の水温は20.1～20.7℃であった。

[Table 5(p.16)、Table 6(p.17)、Table 7(p.18)]

以上

Table 1. Measured Concentrations of Salicylic acid During a 48-Hour Exposure of *Daphnia magna* under Static Test Conditions

Nominal Concentration (mg/L)	Measured Concentration (mg/L)			Percent of Nominal	
	0 Hour new	48 Hour old	Geometric Mean	0 Hour new	48 Hour old
Control	<0.004	<0.004	–	–	–
5.3	5.2	4.9	5.0	98.1	92.5
9.5	9.2	8.9	9.0	96.8	93.7
17.1	16.7	15.6	16.1	97.7	91.2
30.9	29.9	29.5	29.7	96.8	95.5
55.6	53.8	53.0	53.4	96.8	95.3
100.0	95.8	94.8	95.3	95.8	94.8

new : freshly prepared test solutions

old : test solutions after 48 hours exposure period

Table 2. Mortality or Immobility of *Daphnia magna* Exposed to Salicylic acid under Static Test Conditions

Nominal Concentration (mg/L)	Cumulative Numbers of Dead or Immobilized <i>Daphnia</i> (Percent Mortality or Immobility)	
	24 Hour	48 Hour
Control	0 (0)	0 (0)
5.3	0 (0)	0 (0)
9.5	0 (0)	0 (0)
17.1	0 (0)	0 (0)
30.9	0 (0)	1 (5)
55.6	0 (0)	2 (10)
100.0	0 (0)	16 (80)

Table 3. Calculated EiC50 Values for *Daphnia magna* Exposed to Salicylic acid Based on Nominal Concentrations under Static Test Conditions

Exposure Period (Hour)	EiC50 (mg/L)	95-Percent Confidence Limits (mg/L)			Statistical Method
24	>100	—	~	—	—
48	76.8	63.7	~	99.0	Probit

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

Exposure Period (Hour)	No Observed Effect Concentration (NOEC) (mg/L)	Lowest Concentration in 100% Mortality or Immobility (mg/L)
24	>100	>100
48	17.1	>100

Table 5. pH Values During a 48-Hour Static Exposure of *Daphnia magna* to Salicylic acid

Nominal Concentration (mg/L)	pH	
	0 Hour new	48 Hour old
Control	7.3	7.5
5.3	7.3	7.5
9.5	7.3	7.6
17.1	7.1	7.6
30.9	6.8	7.5
55.6	6.4	7.5
100.0	5.4	7.4

new : freshly prepared test solutions

old : test solutions after 48 hours exposure period

Table 6. Dissolved Oxygen Concentrations During a 48-Hour Static Exposure of *Daphnia magna* to Salicylic acid

Nominal Concentration (mg/L)	Dissolved Oxygen Concentration (mg/L)	
	0 Hour new	48 Hour old
Control	8.2	8.1
5.3	8.4	8.4
9.5	8.5	8.5
17.1	8.9	8.8
30.9	8.9	8.8
55.6	8.8	8.6
100.0	8.9	8.8

new : freshly prepared test solutions

old : test solutions after 48 hours exposure period

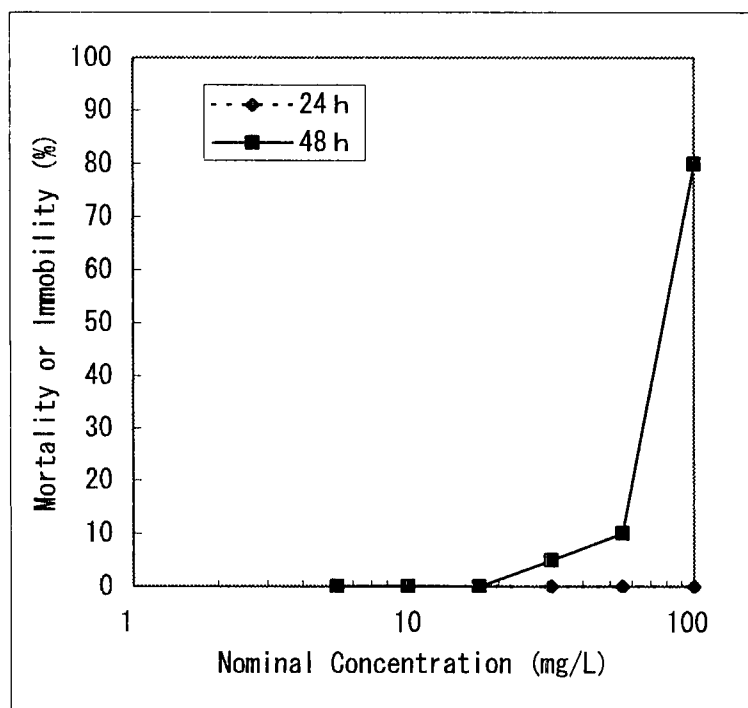
Table 7. Temperature Values During a 48-Hour Static Exposure of *Daphnia magna* to Salicylic acid

Nominal Concentration (mg/L)	Temperature(°C)	
	0 Hour new	48 Hour old
Control	20.4	20.5
5.3	20.5	20.3
9.5	20.6	20.3
17.1	20.6	20.1
30.9	20.7	20.1
55.6	20.7	20.3
100.0	20.6	20.2

new : freshly prepared test solutions

old : test solutions after 48 hours exposure period

Figure 1 Concentration-Response Curve of Salicylic acid

Mortality or Immobility in *Daphnia magna*

付 属 資 料 - 1

希釈水(M4 調製水)

(全 1 頁)

M4 medium

Salt and Vitamine	Concentration (mg/L)
H_3BO_3	2.860
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.361
LiCl	0.306
RbCl	0.071
$\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.152
NaBr	0.016
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.063
$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.017
ZnCl_2	0.013
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.010
KI	0.00325
Na_2SeO_3	0.00219
NH_4VO_3	0.00058
$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	2.5
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.996
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	123.3
KCl	5.8
NaHCO_3	64.8
NaNO_3	0.274
KH_2PO_4	0.143
K_2HPO_4	0.184
Thiamine hydrochloride	0.075
Cyanocobalamine(V.B ₁₂)	0.001
D(+)Biotin(V.H)	0.00075
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	293.8
$\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$	10.0

付 属 資 料 - 2

試験液の分析方法

(全 7 頁)

試験液の分析方法

1 試験液の分析方法

各試験容器より試験液 1.0～2.0 mL をバイアル瓶に採取する。

試験液の濃度が 2.0mg/L を越える場合は、蒸留水で 2.0mg/L 以内に希釈する。

高速液体クロマトグラフのオートサンプラーにセットして一定量を自動注入する。

検量線から被験物質濃度を求める。

2 高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 測定条件

カラム : Mightysil RP-18、2.0mm ϕ \times 100mm

カラム温度 : 40℃

検出波長 : 306nm

注入量 : 20 μ L

移動相 : 10%酢酸/アセトニトリル=75/25

流量 : 0.2mL/min

3 検量線

標準原液を希釈して、定量限界付近から予想測定濃度が含まれる5ポイントの標準液を測定し、直線性を確認した。 [Figure 1(p.24)]

測定日毎に標準溶液(1ポイント)の測定を行い、この検量線により定量した。

4 添加回収試験

希釈水に標準液の一定量を添加して、回収率を求めた。

サリチル酸 1.0mg/L の回収率は101.7%であった。

5 クロマトグラム

代表的ないくつかのクロマトグラムを示した。

[Figure 2(p.25～p.29)]

Figure 1 Calibration Curve of Salicylic acid by HPLC Analysis

Input Data

No.	Concentration (mg/L)	Peak Area (mAU·sec)
1	0.01	1.645
2	0.05	5.700
3	0.10	11.320
4	1.00	120.517
5	2.00	240.004

$$X(\text{Concentration}) = Y(\text{Peak Area}) / 120.089$$

$$r^2 = 1.0000$$

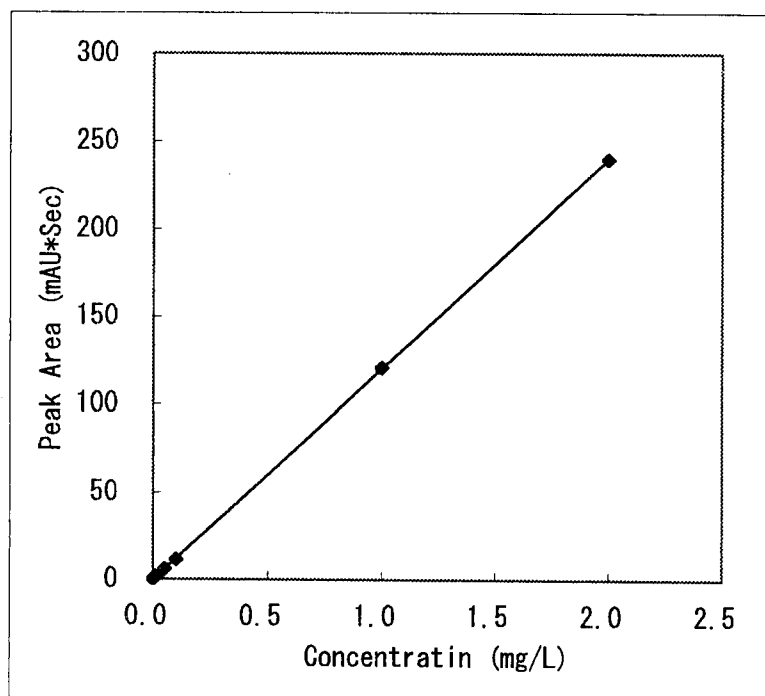
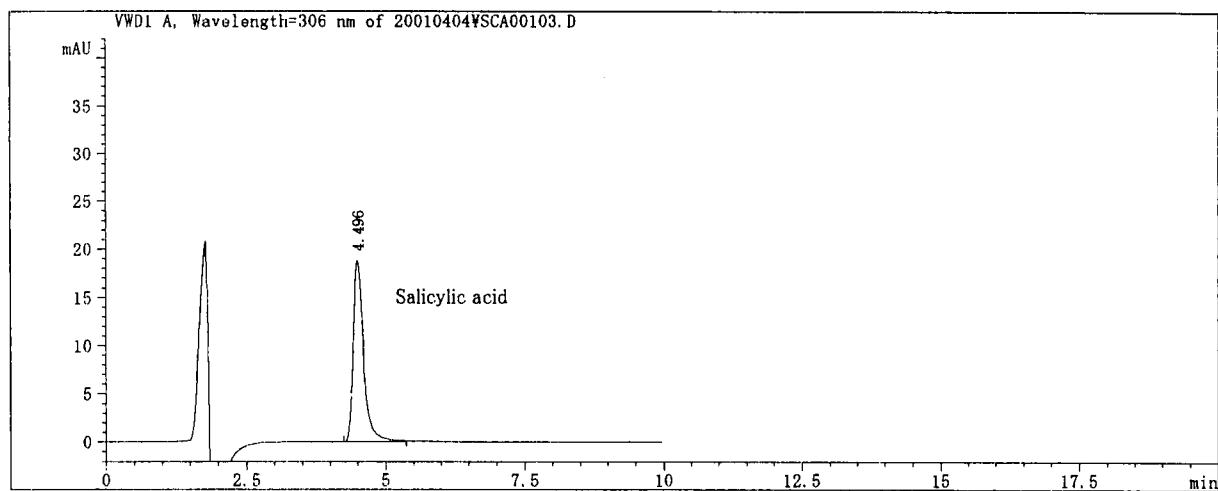
 r^2 : coefficient of correlation


Figure 2 Representative chromatograms

(1) Standard 2.0 mg/L; 0-Hour



(2) Standard 2.0 mg/L; 48-Hour

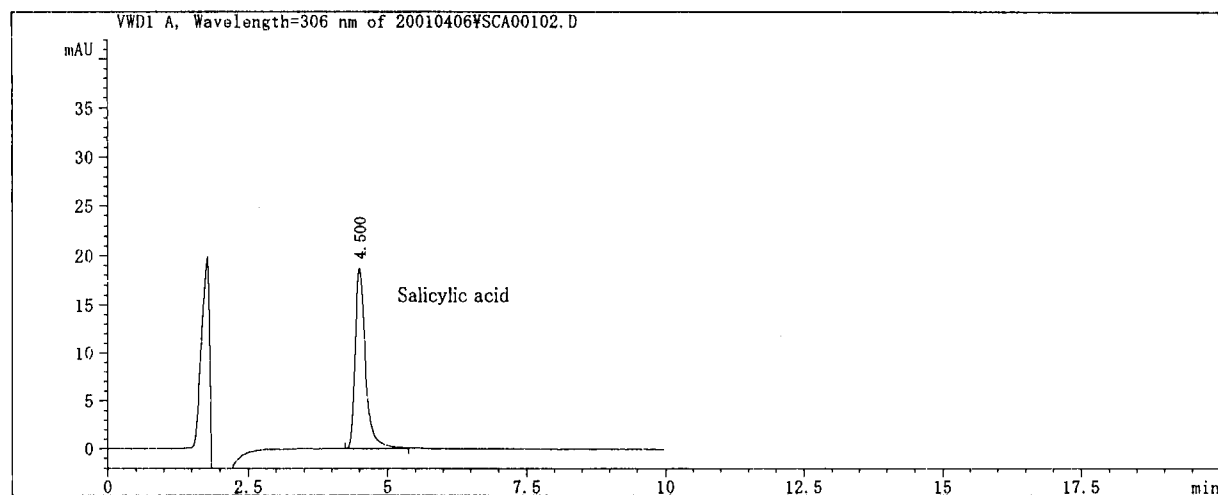
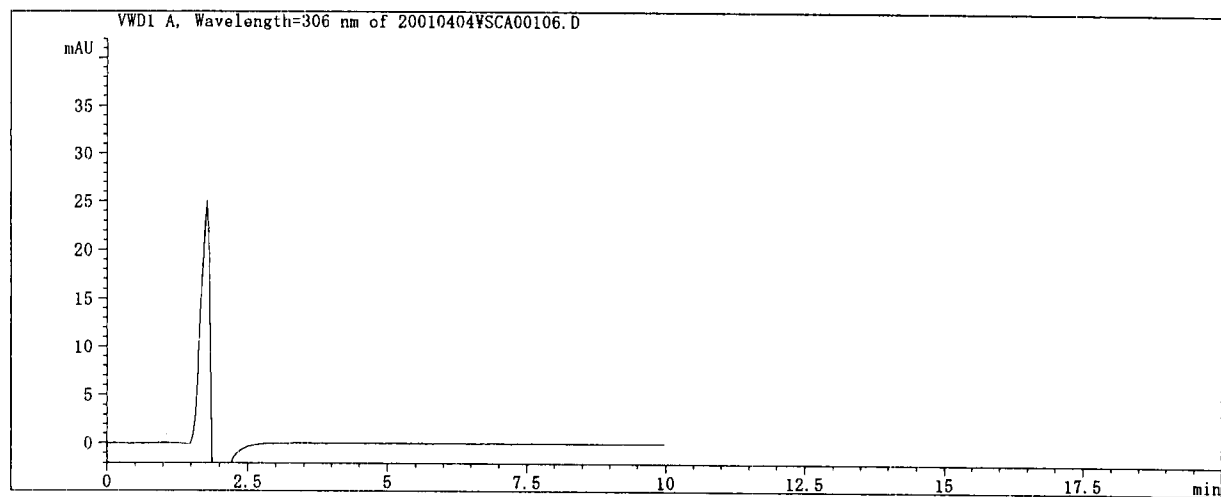


Figure 2 Continued

(3) Control ; 0-Hour



(4) Control ; 48-Hour

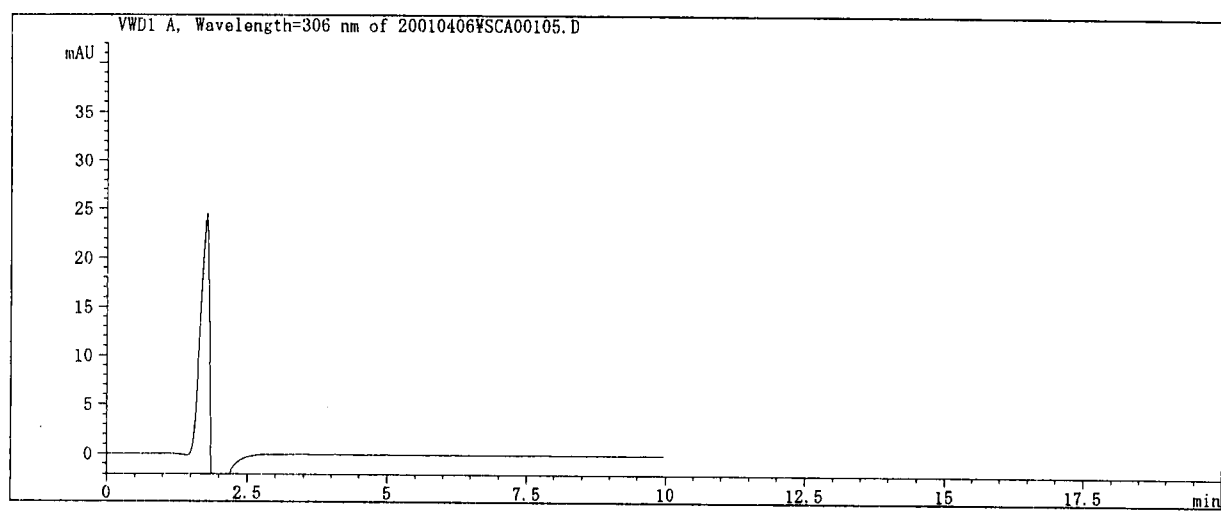
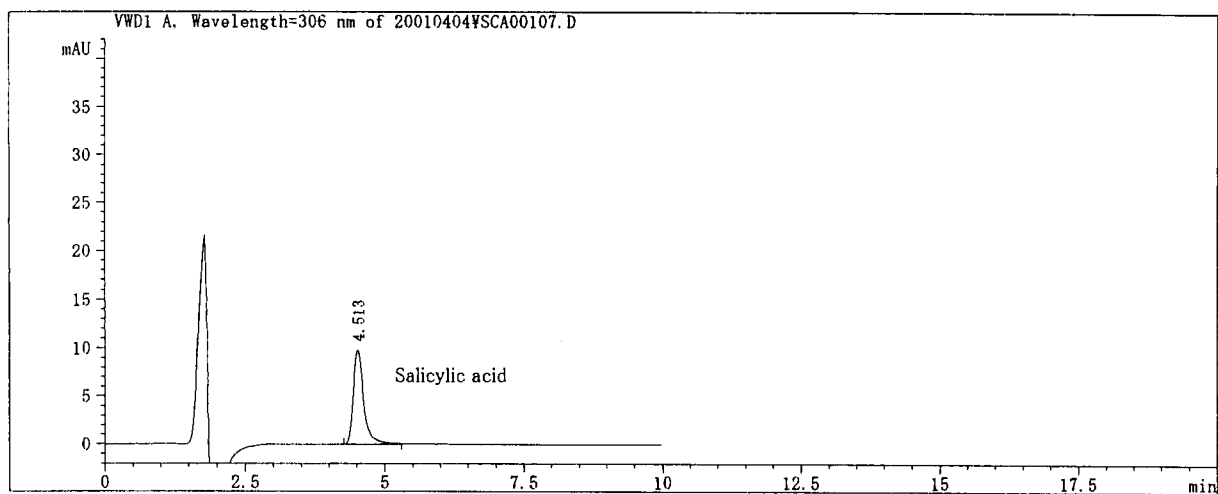


Figure 2 Continued

(5) 5.3 mg/L nominal; 0-Hour (diluted to 1.1 mg/L)



(6) 5.3 mg/L nominal; 48-Hour (diluted to 1.1 mg/L)

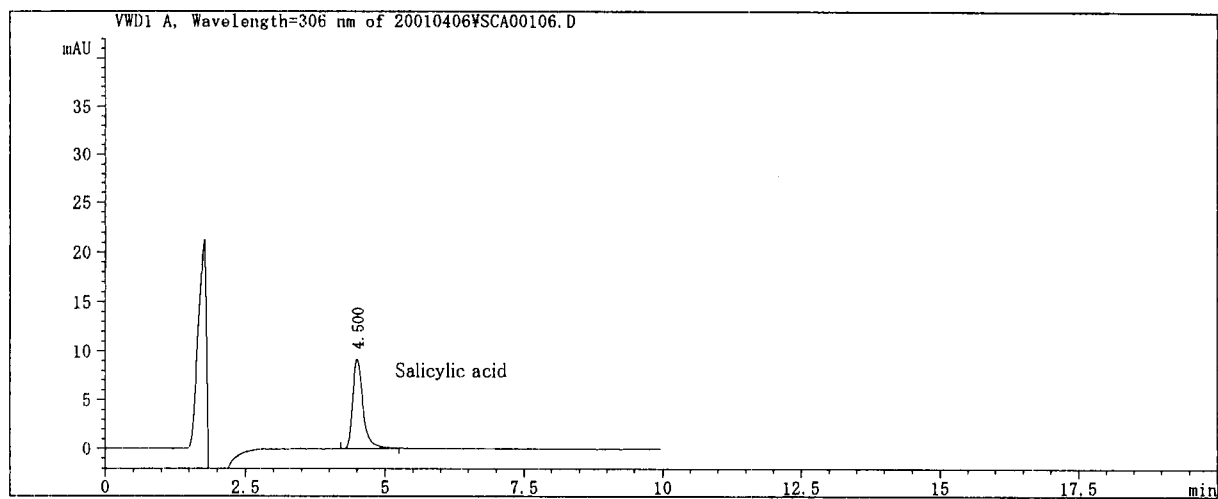
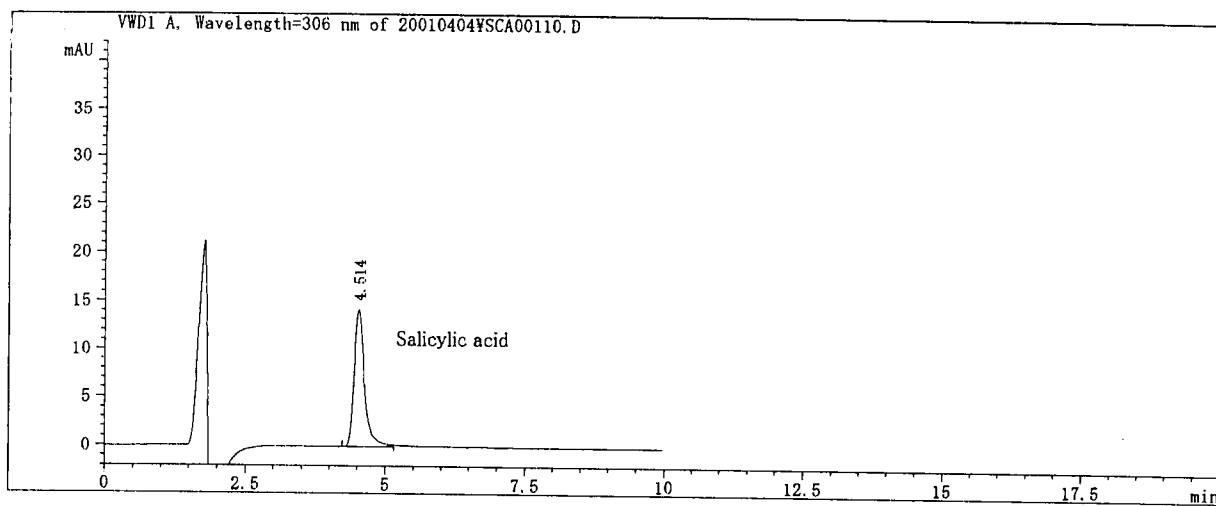


Figure 2 Continued

(7) 30.9 mg/L nominal; 0-Hour (diluted to 1.5 mg/L)



(8) 30.9 mg/L nominal; 48-Hour (diluted to 1.5 mg/L)

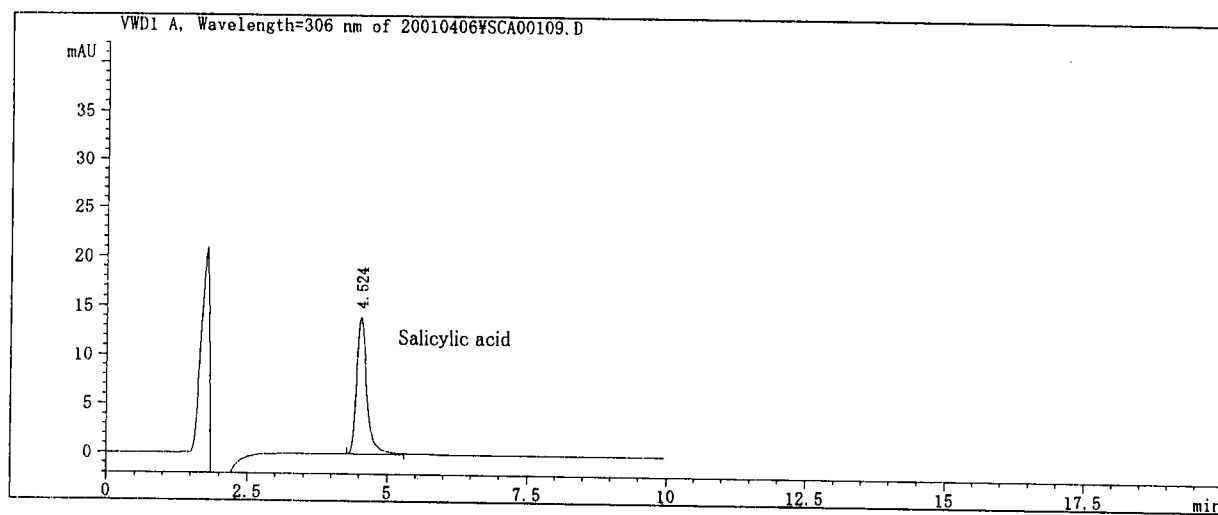
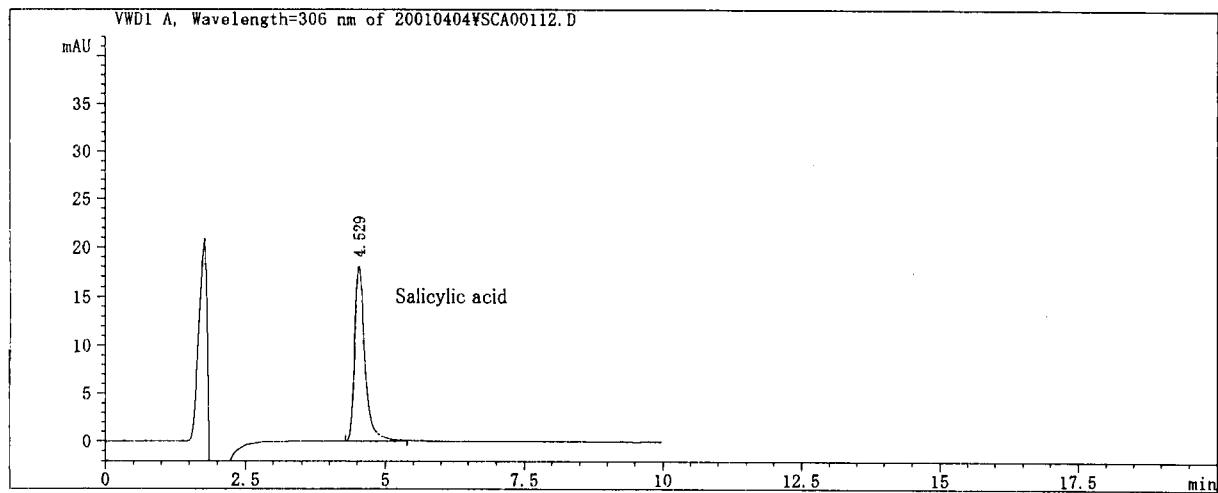


Figure 2 Continued

(11) 100.0 mg/L nominal; 0-Hour (diluted to 2.0 mg/L)



(12) 100.0 mg/L nominal; 48-Hour (diluted to 2.0 mg/L)

