

環境庁殿

試 験 報 告 書

アセトニトリルのオオミジンコ (*Daphnia magna*) に対する急性遊泳阻害試験

(試験番号：5 B 4 7 6 G)

1996年3月29日作成

株式会社三菱化学安全科学研究所

陳 述 書

株式会社三菱化学安全科学研究所
横浜研究所

試験委託者： 環境庁

表題： アセトニトリルのオオミジンコ (*Daphnia magna*) に対する
急性遊泳阻害試験

試験番号： 5 B 4 7 6 G

本試験は環境庁の G L P 規則に従って実施したものである。

1 9 9 6 年 3 月 2 9 日

運営管理者

[Redacted Signature]

[Redacted Stamp]

信頼性保証証明

株式会社三菱化学安全科学研究所
横浜研究所

試験委託者： 環境庁

表題： アセトニトリルのオオミジンコ (*Daphnia magna*) に対する
急性遊泳阻害試験

試験番号： 5 B 4 7 6 G

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	1996年 1月16日	1996年 1月16日
	1996年 1月18日	1996年 1月18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

信頼性保証担当者：

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]








[Redacted]

[Redacted]

試験実施概要

1. 表題： アセトニトリルのオオミジンコ (*Daphnia magna*) に対する急性遊泳阻害試験
2. 試験目的： アセトニトリルについて、オオミジンコ (*Daphnia magna*) に対する急性遊泳阻害試験を行い、24および48時間後の半数遊泳阻害濃度 (EiC50) 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 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： 本試験は環境庁のGLP規則に準拠した。
5. 試験委託者
名称： 環境庁
住所： 〒100 東京都千代田区霞ヶ関一丁目2-2
委託担当者： 環境庁企画調整局環境保健部環境安全課保健専門官 XXXXXXXXXX
6. 試験受託者：
名称： 株式会社三菱化学安全科学研究所
所在地： 〒105 東京都港区芝二丁目1-30
7. 試験施設：
名称： 株式会社三菱化学安全科学研究所 横浜研究所
所在地： 〒227 神奈川県横浜市青葉区鴨志田町1-000番地

8. 試験関係者：

試験責任者	 	(1996年3月29日)
試験担当者	 	(1996年3月29日)
	 	(1996年3月29日)
	 	(1996年3月29日)
分析担当者	 	(1996年3月29日)

9. 試験期間： 試験開始日 1995年10月23日
試験終了日 1996年 3月29日
暴露期間 1996年 1月16日～1996年 1月18日

10. 保管：

試験計画書，生データ，記録文書，試験報告書および被験物質は，試験報告書作成後10年間，株式会社三菱化学安全科学研究所 横浜研究所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。

目 次

	頁
要 旨	7
1 被験物質	9
1.1 名称, 構造式および物理化学的性状	9
1.2 供試試料	9
1.3 被験物質の確認および保管条件下での安定性	10
2 供試生物	10
3 試験方法	11
3.1 試験条件	11
3.2 希釈水	11
3.3 試験容器および恒温槽等	11
3.4 試験濃度の設定	12
3.5 試験液の調製	12
3.6 試験液の分析	12
3.7 試験操作	12
4 結果の算出	13
5 結果および考察	13
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	13
5.2 試験液中の被験物質濃度	13
5.3 半数遊泳阻害濃度 (EiC50)	13
5.4 最大無作用濃度 (NOECi)および100%阻害最低濃度	14
5.5 試験液の水温, 溶存酸素濃度およびpH	14
Table 1～7	15～18
付属資料－1 希釈水の水質	19～20
付属資料－2 試験液の分析方法	21～27

要 旨

試験委託者

環境庁

表 題

アセトニトリルのオオミジンコ (*Daphnia magna*) に対する急性遊泳阻害試験

試験番号

5 B 4 7 6 G

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： アセトニトリル
- 2) 暴露方式： 半止水式 (24時間後に試験液の全量を交換，密閉容器)
- 3) 供試生物： オオミジンコ (*Daphnia magna*)
- 4) 暴露期間： 48時間
- 5) 試験濃度： 対照区，1000 mg/L (設定値)
- 6) 試験液量： 125 mL
- 7) 連数： 4 容器／濃度区
- 8) 供試生物数： 20頭／濃度区 (1 連につき 5 頭で 1 濃度区20頭)
- 9) 試験温度： 20±1℃
- 10) 照明： 16時間明／8時間暗
- 11) 被験物質の分析： G C 法

結 果

1) 試験液中の被験物質濃度

暴露開始時および 24 時間後に測定した被験物質の全実測濃度が、設定値の±20%以内であったので、各影響濃度の算出には設定値を採用した。

2) 24 時間暴露後の結果

半数遊泳阻害濃度 (EiC50) : >1000 mg/L

最大無作用濃度 (NOECi) : >1000 mg/L

100%阻害最低濃度 : >1000 mg/L

3) 48 時間暴露後の結果

半数遊泳阻害濃度 (EiC50) : >1000 mg/L

最大無作用濃度 (NOECi) : >1000 mg/L

100%阻害最低濃度 : >1000 mg/L

1 被験物質

1.1 名称, 構造式および物理化学的性状

名称: アセトニトリル
構造式: CH_3CN
分子式: $\text{C}_2\text{H}_3\text{N}$
分子量*1: 41.05
log Pow*2: -0.34
水への溶解度*2: 可溶
蒸気圧*2: 88.81 mmHg (25 °C)
比重*1: 0.783
融点*2: -45 °C
沸点*2: 81.6 °C (760mmHg)

*1: 供給者提供資料

*2: 昭和63年度環境庁委託「化学物質要覧作成調査(1)」, 日本環境協会
(平成元年)

1.2 供試試料

純度*1: 100.0 % (GC)
ロット番号*1: ESH3487
供給者: XXXXXXXXXX
供給量*1: 500 mL
入手日: 1995年10月9日
外観*1: 無色澄明液体
水溶状*1: 澄明
水分*1: 0.01 %
不揮発物*1: 0.01 %以下

*1: 供給者提供資料

1.3 被験物質の確認および保管条件下での安定性

被験物質は当研究所の冷蔵庫に保管した。

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。その結果、スペクトルに変化は無かったことより被験物質は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時間令以内のオオミジンコ (*Daphnia magna*) の幼体を用いた。

本種は、1995年7月18日に国立環境研究所より入手したものを、当研究所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48時間の半数遊泳阻害濃度 (EiC50) は 0.14 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、別に用意したビーカーに移し、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3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2回幼体を除去した。暴露開始前日に、その前2週間の死亡率が5%以内で休眠卵や雄が発生しなかったバッチから、育苗内に幼体を持つ雌成体を選別し、翌日（24時間以内）産出された幼体を試験に用いた。

1) 飼育水: 希釈水 (3.2参照)

2) 飼育密度: 幼体時 100 頭/3L 飼育水
成熟個体 45 頭/3L 飼育水

3) 水温: 20±1℃

4) 照明: 室内光, 16時間明/8時間暗

5) 餌: *Chlorella vulgaris*

6) 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) 暴露方式： 半止水式 (24 時間後に試験液の全量を交換, 密閉容器)
- 2) 暴露期間： 48 時間
- 3) 試験液量： 125 mL (密閉容器内を試験液で満たした。)
- 4) 連数： 4 容器／濃度区
- 5) 供試生物数： 20 頭／濃度区 (1 連につき 5 頭で 1 濃度区 20 頭)
- 6) 試験温度： $20 \pm 1^{\circ}\text{C}$
- 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

脱塩素水 (横浜市水道水を活性炭処理し, 残留塩素等を除去した後, 充分通気したもの) を使用した。希釈水の硬度は 50 mg/L (CaCO_3 換算), pH は 7.9 であった。

[付属資料-1]

3.3 試験容器および恒温槽等

- 1) 試験容器： 100mL 容共栓付き三角フラスコ (液量 125 mL まで可能)
- 2) 恒温槽： PVC 製水槽 (恒温装置 TAITEC 製 COOLNIT CL-80F 型)
- 3) 水温計： 横河電機製 2455 02 型
- 4) pH 計： 東亜電波工業製 HM-40V 型
- 5) 溶存酸素計： 電気化学計器製 DOL-10 型

3.4 試験濃度の設定

本試験の実施に先立ち、対照区および1000 mg/Lの濃度区（各1連、5頭/1濃度区）を設定し予備試験を行った。

その結果、何れの濃度区も暴露開始48時間後の遊泳阻害率は0%であった。

この結果に基づき、本試験においては1000 mg/L（試験上限濃度）の1濃度を設定することとした。

3.5 試験液の調製

被験物質を1000mg採取し希釈水に溶解後、1.0 Lに定容とし被験物質濃度1000 mg/Lの試験液を調製した。対照区として希釈水を用いた。

3.6 試験液の分析

試験開始時および24時間後に各試験水槽より試験液5.0 mLを採取し、各試料の一定量を直接GCに注入する方法により分析した。試験液の分析に際しては、試料測定毎に標準液（濃度1000 mg/L）の測定を行い、そのピーク面積比から定量した。詳細は付属資料-2に示した。

3.7 試験操作

試験液の水温、溶存酸素濃度（D.O.）、pHを測定後、ガラスピペットを用いて供試ミジンコを投入し、その時点を暴露開始時とした。その際、ピペット内の飼育水が、全量で試験液量に対して1%以内となるようにした。24時間後にミジンコを新しい試験液に移しかえ、暴露開始48時間後まで飼育した。

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）。

水温、D.O.およびpHは、暴露開始時、24および48時間後に、全濃度区（但し、各1試験容器、換水前後）の試験液について測定した。

4 結果の算出

通常、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（%）を求め、Probit 法により半数遊泳阻害濃度（ EiC_{50} ）を算出するが、今回は最高濃度においても阻害が認められなかったため、算出不可能であった。

また、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

該当する事象は無かった。

5.2 試験液中の被験物質濃度

暴露開始時の被験物質実測濃度は 1014 mg/L（設定値 1000 mg/L）であり、設定値に対する割合は 101%であった。

暴露開始24時間後の被験物質実測濃度は948 mg/L（設定値 1000 mg/L）であり、設定値に対する割合は 95%であった。

したがって、実測濃度が設定値の±20%以内であったため、各影響濃度の算出には設定値を採用した。

[Table 1(p.15), 付属資料－2]

5.3 半数遊泳阻害濃度（ EiC_{50} ）

暴露開始 24, 48 時間後の遊泳阻害率は何れも対照区で 0 %, 1000 mg/L 区で 0 %であった。

また、対照区において水面に浮いたミジンコは、全く観察されなかった。

したがって、24, 48 時間後の半数遊泳阻害濃度（ EiC_{50} ）は何れも > 1000 mg/L と推察された。

[Table 2(p.16), Table 3(p.17)]

5.4 最大無作用濃度 (NOECi) および 100% 阻害最低濃度

24 および 48 時間暴露の最大無作用濃度 (NOECi) は何れも > 1000 mg/L であり, 100% 阻害最低濃度も何れも > 1000 mg/L と推察された。

[Table 4(p. 17)]

5.5 試験液の水温, 溶存酸素濃度および pH

暴露期間中の試験液の水温は 19.8~20.7°C, pH は 8.0~8.1 であった。

また, 試験液中の溶存酸素濃度は 8.2~8.7 mg/L であり, 全ての試験液で飽和溶存酸素濃度の 60% 以上が維持された。(20°C 水中の飽和溶存酸素濃度: 8.8 mg/L)

[Table 5(p. 18), Table 6(p. 18), Table 7(p. 18)]

以 上

Table 1 Measured Concentrations of the Test Substance under Semi-Static Test Conditions during a 48-Hour *Daphnia magna* Immobilization Test

Nominal Concentration mg/L	Measured concentration(mg/L)			
	0 Hour new	Percent of Nominal	24 Hour old	Percent of Nominal
Control	< 9	--	< 9	--
1000	1014	101	948	95

new: freshly prepared test solutions

old: test solutions after 24 hours exposure period

Table 2 The Numbers of Immobile *Daphnia magna* Exposed to the Test Substance under
Semi-Static Test Conditions

Nominal Concentration mg/L	Cumulative Number of Immobilized <u>Daphnia</u> (Percent Immobility)	
	24 Hour	48 Hour
Control	0 (0)	0 (0)
1000	0 (0)	0 (0)

Table 3 Calculated EiC50 Values Based on Nominal Concentrations

Exposure Period (Hour)	EiC50 (mg/L)	95-Percent Confidence Limits (mg/L)	Statistical Method
24	> 1000	-- ~ --	--
48	> 1000	-- ~ --	--

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

Exposure Period (Hour)	No Observed Effect Concentration (NOEC) (mg/L)	Lowest Concentration in 100% Immobility (mg/L)
24	> 1000	> 1000
48	> 1000	> 1000

Table 5 Temperature Values under a 48-Hour Semi-Static Condition

Nominal Concentration mg/L	Temperature, °C			
	0 Hour New	24 Hour Old	24 Hour New	48 Hour Old
Control	20.7	19.9	20.3	19.8
1000	20.5	19.9	20.4	19.9

New: freshly prepared test solutions

Old: test solutions after 24 hours exposure period

Table 6 Dissolved Oxygen Concentrations under a 48-Hour Semi-Static Condition

Nominal Concentration mg/L	Dissolved Oxygen Concentration, mg/L			
	0 Hour New	24 Hour Old	24 Hour New	48 Hour Old
Control	8.7	8.5	8.3	8.2
1000	8.7	8.3	8.7	8.2

New: freshly prepared test solutions

Old: test solutions after 24 hours exposure period

Table 7 pH Values under a 48-Hour Semi-Static Condition

Nominal Concentration mg/L	pH			
	0 Hour New	24 Hour Old	24 Hour New	48 Hour Old
Control	8.1	8.0	8.1	8.0
1000	8.1	8.1	8.1	8.1

New: freshly prepared test solutions

Old: test solutions after 24 hours exposure period

付属資料－ 1

希釈水の水質

Water Quality of Dilution Water

Parameter	Concentration
COD	<1 mg/L
Total phosphorus	<0.01 mg/L
pH	7.9 (22°C)
Coliform group bacteria	N.D.
Mercury	<0.0001 mg/L
Copper	<0.001 mg/L
Cadmium	<0.001 mg/L
Zinc	0.02 mg/L
Lead	<0.01 mg/L
Aluminium	0.05 mg/L
Nickel	<0.01 mg/L
Chromium	<0.01 mg/L
Manganese	<0.1 mg/L
Tin	<0.1 mg/L
Iron	<0.1 mg/L
Cyanide	<0.001 mg/L
Free chlorine	0.01 mg/L
Bromide ion	<0.1 mg/L
Fluoride	<0.1 mg/L
Sulfide ion	<0.03 mg/L
Ammonium ion	<0.1 mg/L
Arsenic	<0.01 mg/L
Selenium	<0.01 mg/L
Evaporation residue	110 mg/L
Electric conductivity	140 μ S/cm
Total hardness (as CaCO ₃)	50 mg/L
Alkalinity	40 mg/L
Sodium	6.6 mg/L
Potassium	1.2 mg/L
Calcium	7.8 mg/L
Magnesium	3.6 mg/L

measured date: November 24, 1995

付属資料－ 2

試験液の分析方法

試験液の分析方法

1 試験液の分析方法

各分析試料を直接GCに注入する方法により分析した。各試験液の被験物質濃度は標準溶液のピーク面積との比から定量した。

2 ガスクロマトグラフィー (GC) 測定条件

(装置)

ガスクロマトグラフ:	HEWLETT PACKARD製 5890A SERIES II型
オートサンプラ:	HEWLETT PACKARD製 7673型
検出器:	FID (Flame Ionization Detector)
データ処理装置:	HEWLETT PACKARD製 GC-AED-MS ChemStation

(条件)

カラム:	HP FFAP 25mx0.20mmx0.33 μ m
キャリアガス:	ヘリウム 1.0 mL/min
オーブン温度:	Initial temp. 50°C Initial time 2.0 min Rate 10°C/min Final temp. 110°C Final time 0 min
注入口温度:	150°C
検出器温度:	220°C
検出器条件:	水素 30 mL/min 空気 400 mL/min メイクアップガス 窒素 30 mL/min
注入方法:	Split (Split Ratio; 30:1)
注入量:	1.0 μ L

3 検量線

被験物質の10000mg/L 水溶液を調製し、順次、水で希釈し 50, 100, 200, 500, 1000 mg/Lの標準溶液を調製した。この標準溶液を直接GCに注入することにより測定した。横軸に濃度を (mg/L) , 縦軸にピーク面積 (count表示) をとり、検量線を作成した。検量線はほぼ原点を通る直線となり、最小二乗法による直線回帰式の相関係数は0.99996と良好であった。

4 定量限界

最小検出ピーク面積を 20 countに設定し、これに相当する試験液中の被験物質濃度 9 mg/Lを定量限界とした。

5 添加回収試験

GC直接注入法のため添加回収試験は実施しなかった。

Figure A-2-1 Calibration Curve by HPLC Analysis

Input Data		
No.	Concentration (mg/L)	Peak Area (count)
0	0	0
1	50.0	120.81
2	100.0	240.45
3	200.0	482.79
4	500.0	1200.70
5	1000.0	2357.60

$$Y = 6.275 + 2.359 X$$

$$r = 0.99996$$

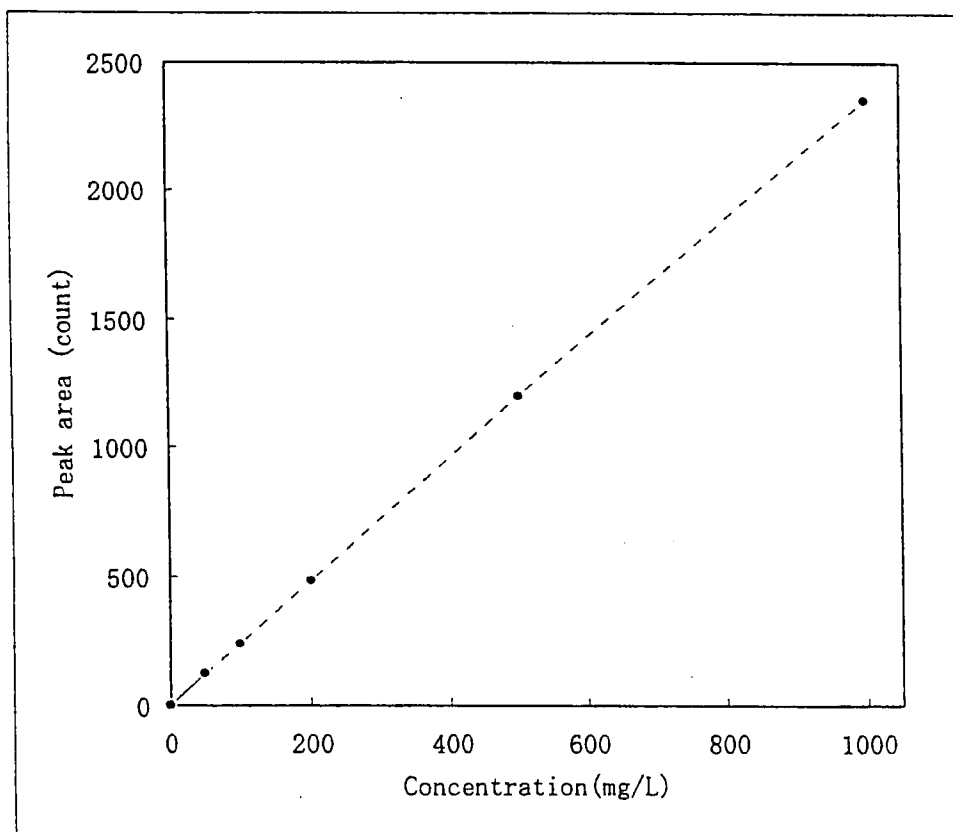
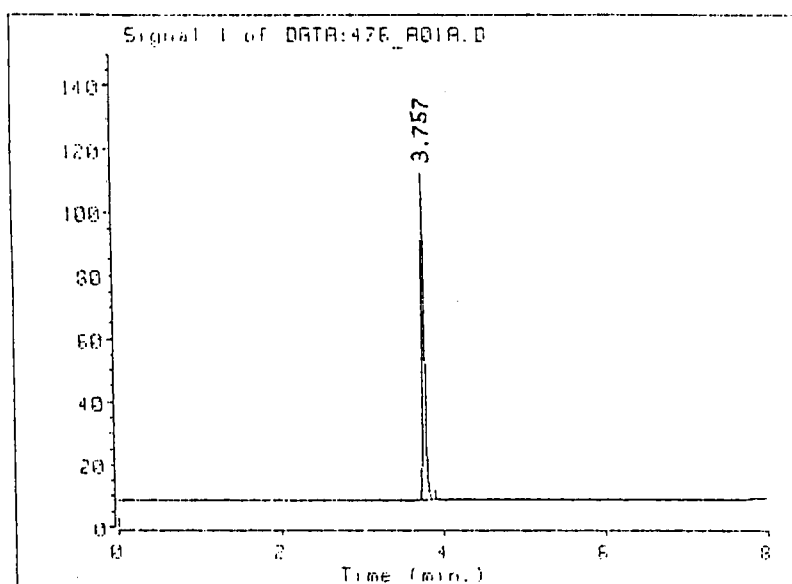


Figure A-2-2 Representative chromatograms

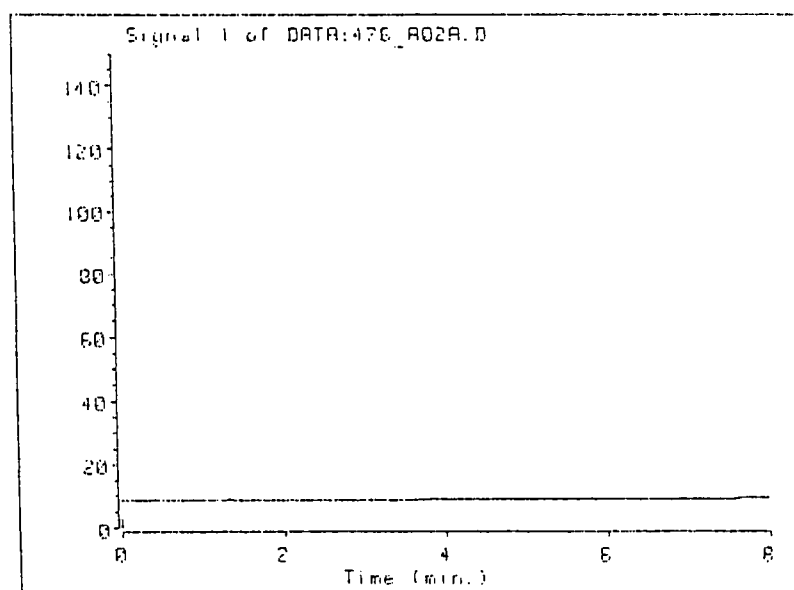
(1) Standard 1000 mg/L ; 0 hr



Signal 1 of DATA:476_A01A.D
DATA:476_A01A.D

PK#	RT	Type	Width	Area	StartTime	EndTime	Symmetry	Height
1	3.757	00	0.035	2342.7	3.703	3.803	0.6659	104.07

(2) Control ; 0 hr

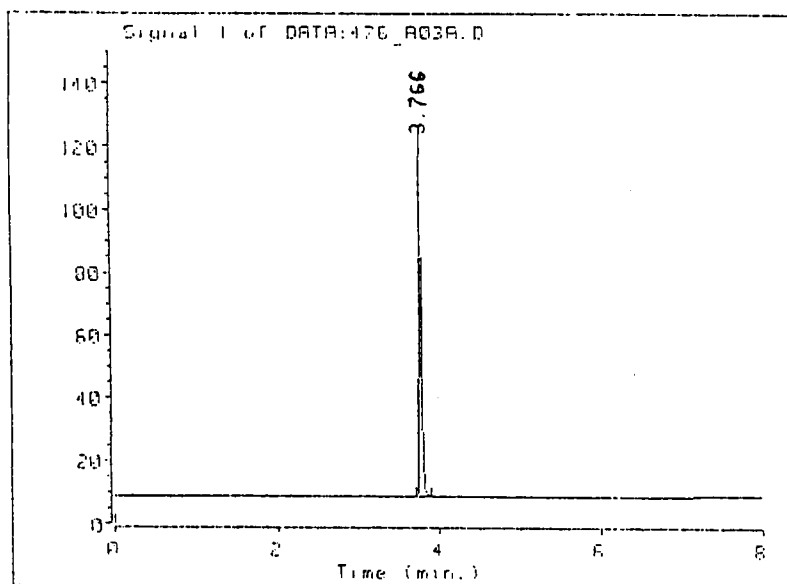


Signal 1 of DATA:476_A02A.D
DATA:476_A02A.D

No peaks detected

Figure A-2-2 Continued

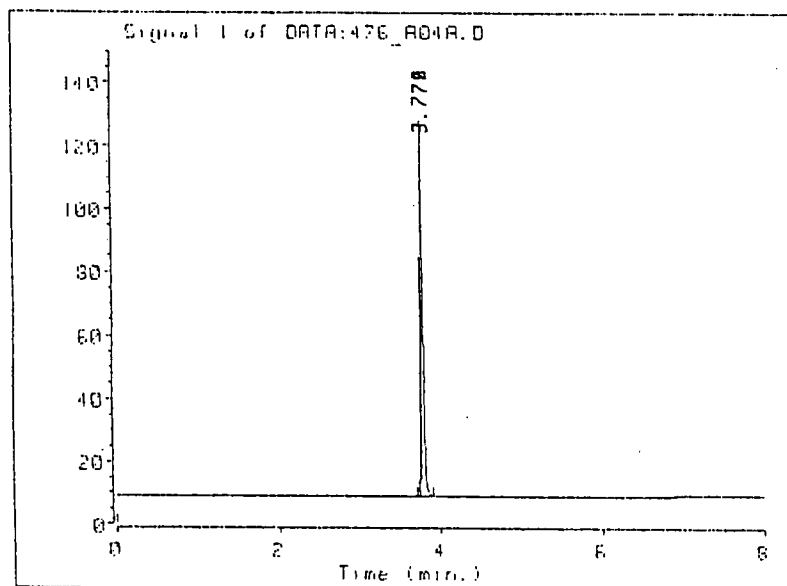
(3) 1000 mg/L nominal ; 0 hr



Signal 1 of DATA:476_A03A.D
DATA:476_A03A.D

PK	RT	Type	Width	Area	StartTime	EndTime	Symmetry	Height
1	3.766	DD	0.031	2374.4	3.710	3.890	0.7515	118.06

(4) Standard 1000 mg/L ; 24 hr

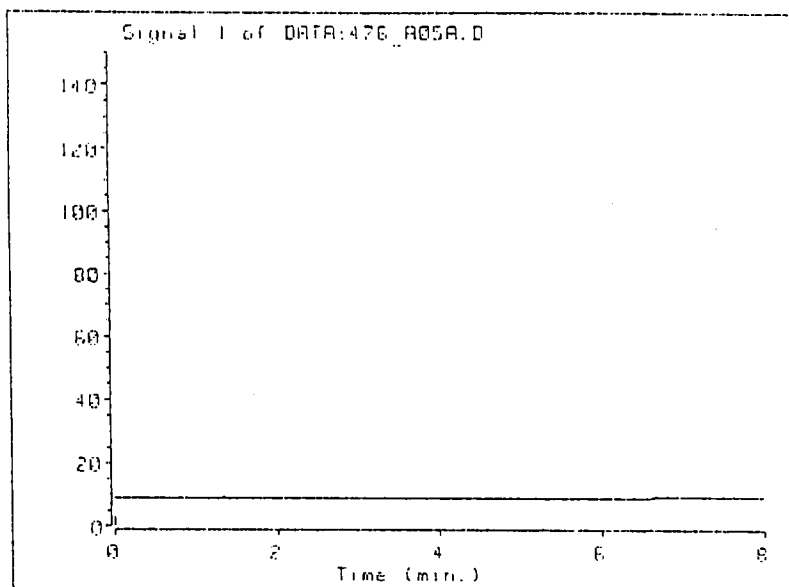


Signal 1 of DATA:476_A04A.D
DATA:476_A04A.D

PK	RT	Type	Width	Area	StartTime	EndTime	Symmetry	Height
1	3.778	DD	0.031	2418.5	3.710	3.900	0.7424	119.76

Figure A-2-2 Continued

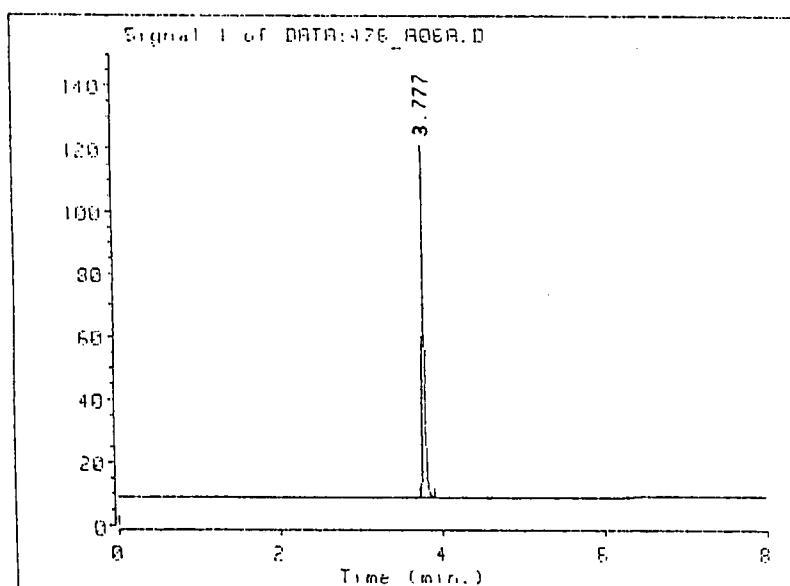
(5) Control ; 24 hr



Signal 1 of DATA:476_A05A.D
DATA:476_A05A.D

No peaks detected

(6) 1000 mg/L nominal ; 24 hr



Signal 1 of DATA:476_A06A.D
DATA:476_A06A.D

PL	RT	Type	Width	Area	StartTime	EndTime	Symmetry	Height
1	3.777	BD	0.031	2292.0	3.720	3.903	0.7274	112.35