

最 終 報 告 書

アクリル酸のヒメダカに対する急性毒性試験
(試験番号：第16034号)

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

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. 試験生物の生死, 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 %致死濃度 (LC_{50})	11
8.3. 0 %死亡最高濃度及び 100 %死亡最低濃度	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 %致死濃度 (LC_{50})	12
9.3. 0 %死亡最高濃度及び 100 %死亡最低濃度	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 mortality rates	15
Table 3. LC_{50} values	15
Table 4. Maximum conc. of 0 % mortality and minimum conc. of 100 % mortality	16
Table 5. Observed toxicological abnormalities in behavior and appearance	17
Table 6. Temperature of test solution	18
Table 7. Dissolved oxygen concentration of test solution	18
Table 8. pH values of test solution	19
Figure 1. Concentration-mortality curve	19
付属資料-1: 試験用水の水質	20
付属資料-2: 予備試験結果	22
付属資料-3: 追加試験結果	23
付属資料-4: 統計処理データ	25
付属資料-5: 試験溶液中の被験物質濃度の分析方法	27

要 旨

表 題

アクリル酸のヒメダカに対する急性毒性試験

試験目的

アクリル酸のヒメダカに対する96時間急性毒性試験を実施し、50 %致死濃度 (LC₅₀) を求め、ヒメダカ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, VI 魚類急性毒性試験に準拠した。

- 1) 被験物質：アクリル酸
- 2) 試験生物：ヒメダカ (*Oryzias latipes*)
- 3) 暴露方式：半止水式 (24時間ごと全量換水)
- 4) 暴露期間：96時間
- 5) 試験濃度 (設定値)：対照区, 32, 42, 56, 75及び100 mg/l (公比1.3)
- 6) 試験個体数：10尾/試験区
- 7) 試験溶液量：4 l (収容密度；0.14 g/l)
- 8) 試験水温：23.2～24.6 ℃
- 9) 溶存酸素濃度：7.0～8.3 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 : 4.3～8.2 (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 (東京都多摩市) 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 %致死濃度 (LC_{50}) :
96時間後 ; 62 mg/l [Binominal法]
- 2) 0 %死亡最高濃度 :
96時間後 ; 43 mg/l
- 3) 100 %死亡最低濃度 :
96時間後 ; 75 mg/l

表 題：アクリル酸のヒメダカに対する急性毒性試験

試験番号：第16034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]

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16日

実験終了日：2005年5月20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

アクリル酸のヒメダカに対する96時間急性毒性試験を実施し、50 %致死濃度 (LC₅₀) を求め、ヒメダカ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, VI 魚類急性毒性試験に準拠した。

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。

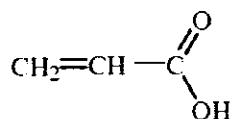
4.1. 名称, 構造式及び物理化学的性状

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*: C₃H₄O₂

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：[REDACTED]
 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ヒメダカで、6ヶ月ごとの基準物質(硫酸銅(Ⅱ)五水和物、試験薬特級、純度99.5 %以上 [関東化学株式会社])による生物検定においてLC₅₀の確認されたものを用いた。

なお、基準物質による96時間後のLC₅₀は0.57 mg/l (2004年10月18日)であった。また、当センターにおけるLC₅₀のバックグラウンドデータ (0.75 ± 0.22 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：*Oryzias latipes*
- 2) 全長：2.2 cm (1.9～2.3 cm) (n=10)
- 3) 体重：0.05 g (0.04～0.06 g) (n=10)
- 4) 入手等：滝沢養魚場 [埼玉県鴻巣市] (1997年1月29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、生後4ヶ月齢の個体を使用した。
- 5) 順化：試験用水と同一の水質、水温及び明暗周期で18日間 (2005年4月28日～5月16日) 飼育した。ただし、暴露開始前24時間は給餌を行わなかった。試験には順化飼育を行っている群から、外観に異常が無い個体をランダムに選別したものを用いた。また、選別した試験生物のうちの10尾について全長及び体重の測定

を行った。暴露開始前7日間の死亡率は0 %であった。なお、飼育期間中、薬浴等による処置は行わなかった。

[順化飼育条件]

- ①飼育水：水道水(東京都多摩市)を活性炭処理し、残留塩素等を除去したもの。
- ②飼育方法：循環ろ過式
- ③飼育水槽：50 l容のガラス製水槽を設置し、約250個体を収容した。
- ④水温：24.0～24.2℃
- ⑤照明：室内光，16時間明/8時間暗
- ⑥餌料：市販配合飼料(テトラミン[テトラベルケ社])
- ⑦給餌：体重の3%/日となるように，1日2回の頻度で毎日与えた。

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時間ごと全量換水)
- ②暴露期間：96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，換水には柔らかいナイロン製のネットを使用した。
- ④試験個体数：10尾/試験区
- ⑤試験溶液量：4 l(収容密度；0.14 g/l)
- ⑥試験水温：23.2～24.6℃
- 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)：7.0～8.3 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：4.3～8.2 (pHの調整は行わなかった。)

6.2. 試験用水

水道水(東京都多摩市)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24℃で十分通気しながら保管した。

使用条件は総硬度10～250 mgCaCO₃/l及びpH 6.0～8.5とした。また，一般的な水質測定を定期的 to 実施した。

試験に使用した試験用水の総硬度は50～52 mgCaCO₃/l，pHは7.6～8.0であった。また，一般的な水質測定を定期的 to 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：5 l容ガラス製容器 (容器のサイズ；内径 約24 cm×高さ 約13 cm)を用いる。

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：2L 84R-5510 [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の濃度区ではヒメダカが100 %死亡し、32 mg/l以下の濃度区では死亡及び異常な行動や外観等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5濃度区 (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24 °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 (4,000 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. 試験生物の生死、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、3, 6, 24, 48, 72及び96時間後に試験生物の生死、症状等の観察を行った。観察可能な動きがなく、尾柄部に触れて反応が無い個体を死亡とみなした。観察時に死亡個体を取り除き、死亡尾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、24時間後の換水前、48時間後の換水後、72時間後の換水前の計4回行った。なお、暴露開始時及び48時間後の換水後は試験容器中層から試験溶液を50 ml採取して分析用試験溶液とした。また、24時間後及び72時間後の換水前も同様に採取した。

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、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 %致死濃度 (LC₅₀)

各試験区の死亡数と試験生物数(10尾)から、死亡率(%)を算出し、Binominal法を用いてLC₅₀を算出した。また、濃度－死亡率のグラフを作成した。

8.3. 0 %死亡最高濃度及び100 %死亡最低濃度

それぞれ、死亡率が0 %である最高濃度及び死亡率が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、48時間後の換水後、72時間後の換水前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、24及び72時間換水前の試験溶液で99～101 %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32 mg/lで32.1 mg/l、42 mg/lで42.7 mg/l、56 mg/lで56.7 mg/l、75 mg/lで75.4 mg/l及び100 mg/lで102 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 %致死濃度 (LC_{50})

96時間後の累積死亡率は、対照区、32.1及び42.7 mg/lで0 %, 56.7 mg/lで20 %, 75.4 及び102 mg/lで100 %であった。

24, 48, 72及び96時間後の LC_{50} は、65 mg/l, 63 mg/l, 62 mg/l及び62 mg/lであった。

各時間における累積死亡率をTable 2に、50 %致死濃度 (LC_{50}) をTable 3に示した。また、濃度－死亡率のグラフをFigure 1に示した。

9. 3. 0 %死亡最高濃度及び 100 %死亡最低濃度

96時間後の0 %死亡最高濃度は43 mg/l, 100 %死亡最低濃度は75 mg/lであった。0 %死亡最高濃度及び100 %死亡最低濃度を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、対照区、32.1及び42.7 mg/lでは観察されなかったが、56.7 mg/lで異常遊泳及び不活発が、75.4 mg/lで異常遊泳、不活発、水面浮上及び鼻上げが観察された。

なお、102 mg/lでは試験生物が3時間後に全死亡したため観察はできなかった。

3, 6, 24, 48, 72及び96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23.2～24.6 °C, 溶存酸素濃度は7.0～8.3 mg/l, pHは4.3～8.2であった。

暴露期間中の各試験区の水温は24 °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4.3～8.2であり、6.0～8.5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24.2～24.8 °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死亡率が0 %であり、各試験区の溶存酸素濃度も試験水温での飽和溶存酸素濃度の60 %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42.7～102 mg/l濃度区において、試験溶液中のpHが試験環境条件(6.0～8.5)の範囲を外れ、同濃度区において試験生物の致死等が観察された。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、致死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 Old	48 Hours New	72 Hours Old	Mean* of measured concentration (mg/l)
32	32.2	32.1 (100)	31.9	31.7 (99)	32.1
42	42.6	42.8 (100)	42.8	43.0 (100)	42.7
56	56.7	56.7 (100)	56.8	57.1 (101)	56.7
75	75.4	75.5 (100)	—	—	75.4
100	103	102 (99)	—	—	102
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 48 hours(New) (%)

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

Table 2. Cumulative mortality rates

Nominal conc. (mg/l)	Mean* of measured conc. (mg/l)	(%)					
		3 Hours	6 Hours	24 Hours	48 Hours	72 Hours	96 Hours
32	32.1	0	0	0	0	0	0
42	42.7	0	0	0	0	0	0
56	56.7	0	0	0	10	20	20
75	75.4	50	70	100	100	100	100
100	102	100	100	100	100	100	100
Control	---	0	0	0	0	0	0

*: geometric mean

Table 3. LC₅₀ values

Exposure period (Hours)	LC ₅₀ (mg/l)	95 % confidence limits (mg/l)	Statistical method
24	65	—	Binominal
48	63	—	Binominal
72	62	—	Binominal
96	62	—	Binominal

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

Exposure period (Hours)	Maximum concentration of 0 % mortality (mg/l)	Minimum concentration of 100 % mortality (mg/l)
24	57	75
48	43	75
72	43	75
96	43	75

Table 5. Observed toxicological abnormalities in behavior and appearance

Nominal conc. (mg/l)	Mean* of measured conc. (mg/l)	Abnormalities in behavior and appearance					
		3 Hours	6 Hours	24 Hours	48 Hours	72 Hours	96 Hours
32	32.1	n. a. d (10)	n. a. d (10)	n. a. d (10)	n. a. d (10)	n. a. d (10)	n. a. d (10)
42	42.7	n. a. d (10)	n. a. d (10)	n. a. d (10)	n. a. d (10)	n. a. d (10)	n. a. d (10)
56	56.7	n. a. d (10)	n. a. d (10)	n. a. d (7) e. s (1), le (2)	n. a. d (8) e. s (1)	n. a. d (7) e. s (1)	n. a. d (8)
75	75.4	e. s (3) le (1), su (1)	e. s (1) s. s (1), su (1)	—	—	—	—
100	102	—	—	—	—	—	—
Control	---	n. a. d (10)	n. a. d (10)	n. a. d (10)	n. a. d (10)	n. a. d (10)	n. a. d (10)

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

n. a. d : no abnormalities are detected

e. s : erratic swimming

le : lethargy

s. s : surface slicks

su : surfacing

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

Table 6. Temperature of test solution

(°C)									
Nominal conc. (mg/l)	Mean* of measured conc. (mg/l)	0 Hour	24 Hours		48 Hours		72 Hours		96 Hours
			Old	New	Old	New	Old	New	
32	32.1	23.2	24.3	23.2	24.4	23.5	24.6	23.9	24.3
42	42.7	23.2	24.1	23.2	24.4	23.7	24.5	24.0	24.3
56	56.7	23.2	24.4	23.4	24.1	23.8	24.6	23.8	24.3
75	75.4	23.3	24.6	—	—	—	—	—	—
100	102	23.2	24.4	—	—	—	—	—	—
Control	---	23.3	24.5	23.7	24.3	23.8	24.5	23.9	24.4

*: geometric mean

New: freshly prepared test solution

Old: test solution after 24 hours exposure

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

Table 7. Dissolved oxygen concentration of test solution

(mg/l)									
Nominal conc. (mg/l)	Mean* of measured conc. (mg/l)	0 Hour	24 Hours		48 Hours		72 Hours		96 Hours
			Old	New	Old	New	Old	New	
32	32.1	8.3	7.0	8.3	7.0	8.0	7.3	8.1	7.5
42	42.7	8.3	7.3	8.2	7.1	8.0	7.4	8.1	7.6
56	56.7	8.3	7.2	8.2	7.4	8.0	7.5	8.1	7.9
75	75.4	8.3	7.8	—	—	—	—	—	—
100	102	8.2	8.0	—	—	—	—	—	—
Control	---	8.3	7.4	8.2	7.1	8.0	7.3	8.1	7.7

*: geometric mean

New: freshly prepared test solution

Old: test solution after 24 hours exposure

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

Table 8. pH values of test solution

Nominal conc. (mg/l)	Mean* of measured conc. (mg/l)	0 Hour	24 Hours		48 Hours		72 Hours		96 Hours
			Old	New	Old	New	Old	New	
32	32.1	6.3	6.7	6.3	7.1	6.9	6.7	6.3	7.1
42	42.7	5.8	6.5	5.8	6.5	6.3	6.4	5.8	6.3
56	56.7	5.0	5.2	5.0	5.4	5.5	5.0	5.0	5.2
75	75.4	4.6	4.6	—	—	—	—	—	—
100	102	4.3	4.3	—	—	—	—	—	—
Control	---	7.9	7.6	7.9	7.8	8.2	7.5	8.0	7.8

*: geometric mean

New: freshly prepared test solution

Old: test solution after 24 hours exposure

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

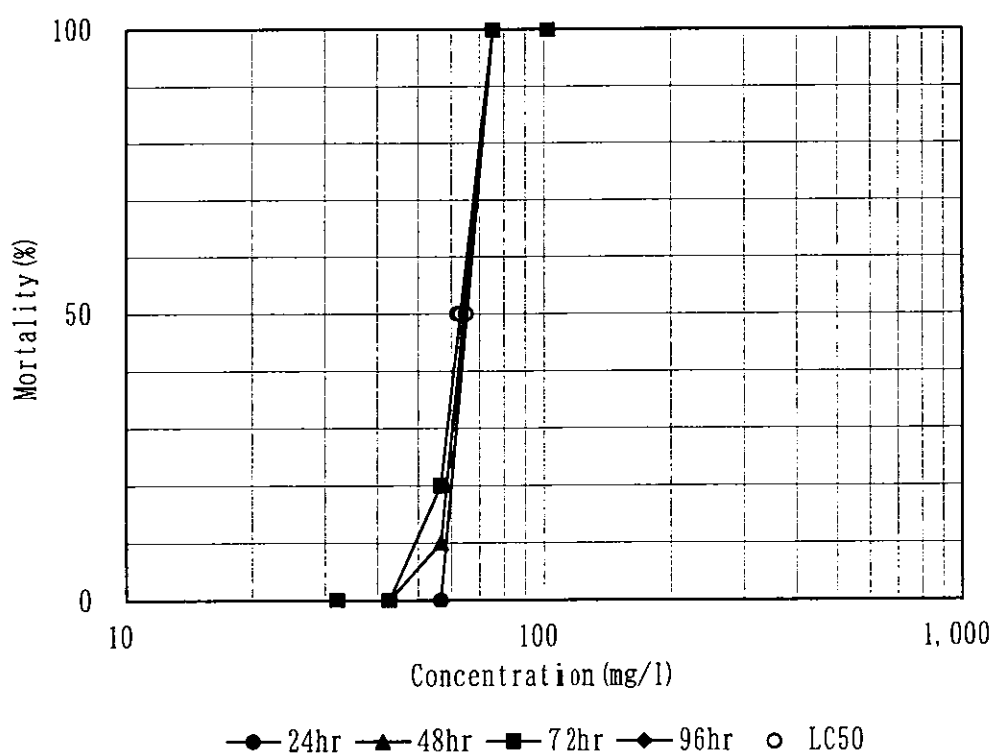


Figure 1. Concentration-mortality curve

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	7.4 (19 °C)	—
Coliform bacteria	Negative/100 ml	—
Evaporation residue	120 mg/l	—
Phenols (as phenol)	Not detected	0.005 mg/l
Hardness (CaCO ₃)	60 mg/l	—
Nitrate nitrogen and nitrite nitrogen	1.7 mg/l	—
Fluorine and its compounds	Not detected	0.10 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
cis -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	Not detected	0.001 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	Not detected	0.01 mg/l
Bromide ion	Not detected	0.5 mg/l
Sulfide ion (S^{2-})	Not detected	0.01 mg/l
Electric conductivity (25 °C)	19 mS/m	—
Alkalinity (as $CaCO_3$)	47 mg/l	—
Total organic carbon (TOC)	Not detected	0.3 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	0.002 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	0.006 mg/l	—
Aluminum	Not detected	0.05 mg/l
Manganese	Not detected	0.005 mg/l
Iron	0.03 mg/l	—
Tin	Not detected	0.1 mg/l
Sodium	13 mg/l	—
Potassium	2.0 mg/l	—
Calcium	18 mg/l	—
Magnesium	3.9 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及び2に示した。

Table 1. Cumulative mortality rates

Nominal concentration (mg/l)				
	24 Hours	48 Hours	72 Hours	96 Hours
10	0	0	0	0
32	0	0	0	0
100	100	100	100	100
Control	0	0	0	0

Table 2. Observed toxicological abnormalities in behavior and appearance

Nominal conc. (mg/l)	Abnormalities in behavior and appearance			
	24 Hours	48 Hours	72 Hours	96 Hours
10	n. a. d (10)	n. a. d (10)	n. a. d (10)	n. a. d (10)
32	n. a. d (10)	n. a. d (10)	n. a. d (10)	n. a. d (10)
100	—	—	—	—
Control	n. a. d (10)	n. a. d (10)	n. a. d (10)	n. a. d (10)

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

n. a. d : no abnormalities are detected

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

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 42.7～102 mg/l 濃度区において、試験溶液中の pH が試験環境条件 (6.0～8.5) の範囲を外れ、同濃度区において試験生物の致死等が観察された。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 mortality rates

Nominal conc. (mg/l)	(%)			
	24 Hours	48 Hours	72 Hours	96 Hours
32	0	0	0	0
42	0	0	0	0
56	0	0	0	0
75	0	0	0	0
100	0	0	0	0
Control	0	0	0	0

Table 2. LC₅₀ values

Exposure period (Hours)	LC ₅₀ (mg/l)	95 % confidence limits (mg/l)	Statistical method
24	> 100	—	—
48	> 100	—	—
72	> 100	—	—
96	> 100	—	—

Table 3. Observed toxicological abnormalities in behavior and appearance

Nominal conc. (mg/l)	Abnormalities in behavior and appearance			
	24 Hours	48 Hours	72 Hours	96 Hours
32	n. a. d (10)	n. a. d (10)	n. a. d (10)	n. a. d (10)
42	n. a. d (10)	n. a. d (10)	n. a. d (10)	n. a. d (10)
56	n. a. d (10)	n. a. d (10)	n. a. d (10)	n. a. d (10)
75	n. a. d (10)	n. a. d (10)	n. a. d (10)	n. a. d (10)
100	n. a. d (10)	n. a. d (10)	n. a. d (10)	n. a. d (10)
Control	n. a. d (10)	n. a. d (10)	n. a. d (10)	n. a. d (10)

() : 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。

LC₅₀ after 24 and 48 hours exposure

試験番号 第16034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 05/05/20
 試験生物 ヒメダカ
 観察時間 24

CONC. mg/l	NUMBER EXPOSED	NUMBER DEAD	PERCENT DEAD	BINOMIAL PROB. (%)
102	10	10	100	.0976563
75.40000000000001	10	10	100	.0976563
56.7	10	0	0	.0976563
42.7	10	0	0	.0976563
32.1	10	0	0	.0976563

.0976563

THE BINOMIAL TEST SHOWS THAT 56.7 AND 75.40000000000001 CAN BE USED AS STATISTICALLY SOUND CONSERVATIVE 95 PERCENT CONFIDENCE LIMITS SINCE THE ACTUAL CONFIDENCE LEVEL ASSOCIATED WITH THESE LIMITS IS 99.8046875 PERCENT.

AN APPROXIMATE LC50 FOR THIS SET OF DATA IS 65.38487418719648

WHEN THERE ARE LESS THAN TWO CONCENTRATIONS AT WHICH THE PERCENT DEAD IS BETWEEN 0 AND 100, NEITHER THE MOVING AVERAGE NOR THE PROBIT METHOD CAN GIVE ANY STATISTICALLY SOUND RESULTS.

試験番号 第16034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 05/05/20
 試験生物 ヒメダカ
 観察時間 48

CONC. mg/l	NUMBER EXPOSED	NUMBER DEAD	PERCENT DEAD	BINOMIAL PROB. (%)
102	10	10	100	.0976563
75.40000000000001	10	10	100	.0976563
56.7	10	1	10	1.07422
42.7	10	0	0	.0976563
32.1	10	0	0	.0976563

.0976563

THE BINOMIAL TEST SHOWS THAT 56.7 AND 75.40000000000001 CAN BE USED AS STATISTICALLY SOUND CONSERVATIVE 95 PERCENT CONFIDENCE LIMITS SINCE THE ACTUAL CONFIDENCE LEVEL ASSOCIATED WITH THESE LIMITS IS 98.828125 PERCENT.

AN APPROXIMATE LC50 FOR THIS SET OF DATA IS 63.44889887149224

WHEN THERE ARE LESS THAN TWO CONCENTRATIONS AT WHICH THE PERCENT DEAD IS BETWEEN 0 AND 100, NEITHER THE MOVING AVERAGE NOR THE PROBIT METHOD CAN GIVE ANY STATISTICALLY SOUND RESULTS.

LC₅₀ after 72 and 96 hours exposure

試験番号 第16034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 05/05/20
 試験生物 ヒメダカ
 観察時間 72

CONC. mg/l	NUMBER EXPOSED	NUMBER DEAD	PERCENT DEAD	BINOMIAL PROB. (%)
102	10	10	100	.0976563
75.40000000000001	10	10	100	.0976563
56.7	10	2	20	5.46875
42.7	10	0	0	.0976563
32.1	10	0	0	.0976563

5/20 99.25

THE BINOMIAL TEST SHOWS THAT 42.7 AND 75.40000000000001 CAN BE USED AS STATISTICALLY SOUND CONSERVATIVE 95 PERCENT CONFIDENCE LIMITS SINCE THE ACTUAL CONFIDENCE LEVEL ASSOCIATED WITH THESE LIMITS IS 99.8046875 PERCENT.

AN APPROXIMATE LC50 FOR THIS SET OF DATA IS 62.82190035971228

WHEN THERE ARE LESS THAN TWO CONCENTRATIONS AT WHICH THE PERCENT DEAD IS BETWEEN 0 AND 100, NEITHER THE MOVING AVERAGE NOR THE PROBIT METHOD CAN GIVE ANY STATISTICALLY SOUND RESULTS.

試験番号 第16034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 05/05/20
 試験生物 ヒメダカ
 観察時間 96

CONC. mg/l	NUMBER EXPOSED	NUMBER DEAD	PERCENT DEAD	BINOMIAL PROB. (%)
102	10	10	100	.0976563
75.40000000000001	10	10	100	.0976563
56.7	10	2	20	5.46875
42.7	10	0	0	.0976563
32.1	10	0	0	.0976563

5/20 99.25

THE BINOMIAL TEST SHOWS THAT 42.7 AND 75.40000000000001 CAN BE USED AS STATISTICALLY SOUND CONSERVATIVE 95 PERCENT CONFIDENCE LIMITS SINCE THE ACTUAL CONFIDENCE LEVEL ASSOCIATED WITH THESE LIMITS IS 99.8046875 PERCENT.

AN APPROXIMATE LC50 FOR THIS SET OF DATA IS 62.82190035971228

WHEN THERE ARE LESS THAN TWO CONCENTRATIONS AT WHICH THE PERCENT DEAD IS BETWEEN 0 AND 100, NEITHER THE MOVING AVERAGE NOR THE PROBIT METHOD CAN GIVE ANY STATISTICALLY SOUND RESULTS.

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）

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)
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，φ4.6 mm×25 cm [財団法人 化学物質評価研究機構]

カラム温度：40 ℃

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 μ 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 μ l	10 ng	0.5 mg/l

* 試験溶液を試料溶液とした。

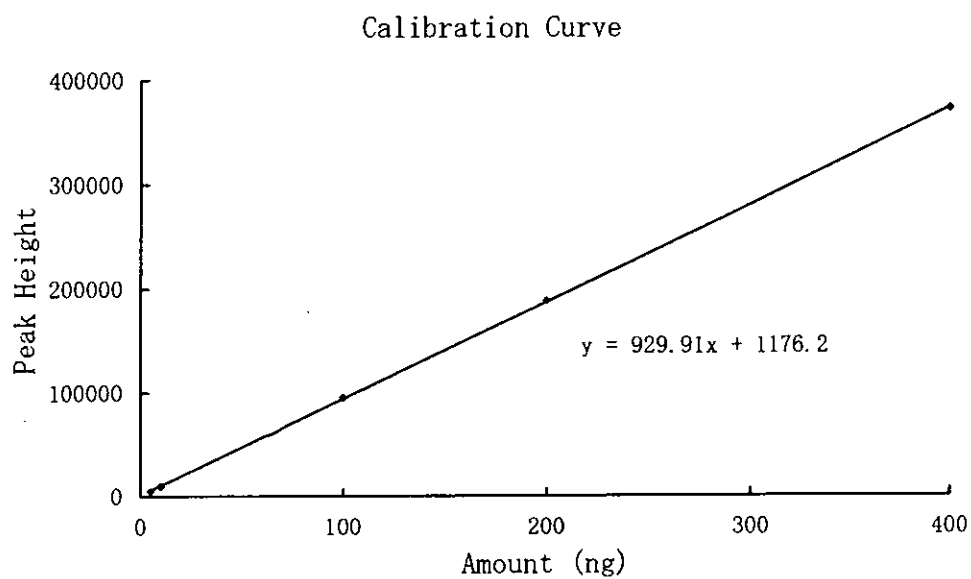
7. 添加回収試験

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78.2 %, 77.4 %, 76.8 % (平均 77.5 %)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96.5 %, 96.2 %, 96.6 % (平均 96.4 %)であった。

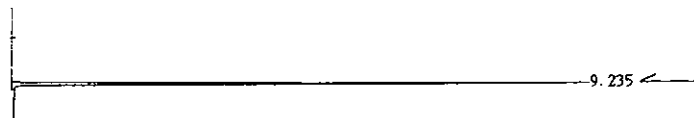


Amount (ng)	Peak height (μ V)
400	372112
200	188651
100	95415
10	9738
5	4850

Figure 1. Calibration curve of Acrylic acid by HPLC analysis

Standard (20 mg/l): 0 hour

CHROMATOPAC C-R7A CH=1 REPORT No.=238 7071=2:050516.C01 05/05/16 20:07:32

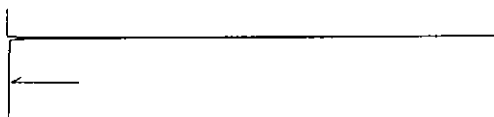


** 定量計算結果 **

CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	1	9.235	3690474	372112			100	
TOTAL			3690474	372112			100	

Control: 0 hour

CHROMATOPAC C-R7A CH=1 REPORT No.=243 7071=2:050516.C06 05/05/16 21:34:04

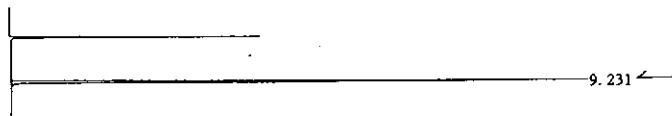


** 定量計算結果 ** 注意 19-有 CALERROR: 1

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

Test solution (32 mg/l): 0 hour

CHROMATOPAC C-R7A CH=1 REPORT No.=244 7071=2:050516.C07 05/05/16 21:51:24

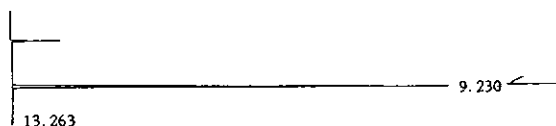


** 定量計算結果 **

CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	1	9.231	2972864	300940			100	
TOTAL			2972864	300940			100	

Test solution (100 mg/l): 0 hour

CHROMATOPAC C-R7A CH=1 REPORT No.=248 7071=2:050516.C11 05/05/16 23:00:42



** 定量計算結果 **

CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	1	9.23	1897304	192700			99.1608	
	2	13.263	16057	548			9.8392	
TOTAL			1913361	1.93248			100	

Figure 2-1. Representative chromatograms

Standard (20 mg/l): 24 hours

CHROMATOPAC C-R7A CH=1 REPORT No.=288 1071=2:050517.C02 05/05/17 10:54:50



** 定量計算結果 **

CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	1	9.265	3673919	<u>368944</u>			99.3855	
	2	13.505	22715	776			0.6145	
TOTAL			3696633	369720			100	

Control: 24 hours old*

CHROMATOPAC C-R7A CH=1 REPORT No.=293 1071=2:050517.C07 05/05/17 12:21:20

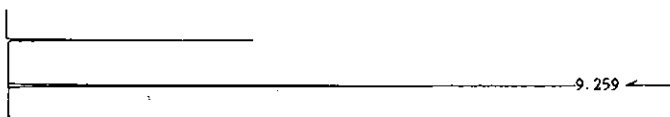


** 定量計算結果 ** 注意 17-有 CALERROR: 1

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

Test solution (32 mg/l): 24 hours old*

CHROMATOPAC C-R7A CH=1 REPORT No.=294 1071=2:050517.C08 05/05/17 12:38:38

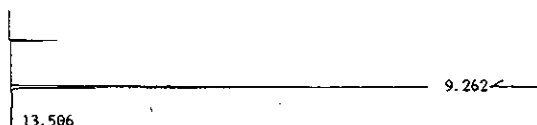


** 定量計算結果 **

CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	1	9.259	2955948	<u>297209</u>			100	
TOTAL			2955948	297209			100	

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

CHROMATOPAC C-R7A CH=1 REPORT No.=298 1071=2:050517.C12 05/05/17 13:47:54



** 定量計算結果 **

CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	1	9.262	1881043	<u>189992</u>			99.2537	
	2	13.506	14144	582			0.7463	
TOTAL			1895187	190494			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16034号

3 試験の表題

アクリル酸のヒメダカに対する急性毒性試験

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16034号

3 試験の表題

アクリル酸のヒメダカに対する急性毒性試験

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21日	2005年03月21日	2005年03月21日
試験計画書	2005年05月16日	2005年05月16日	2005年05月16日
被験物質の受領	2005年05月16日	2005年05月17日	2005年05月17日
試験の実施, 試薬等	2005年05月16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
試験の実施, 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, 被験物質	2005年05月20日	2005年05月20日	2005年05月20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： アクリル酸のヒメダカに対する急性毒性試験

試験番号： 第 16034 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

