

環境庁殿

試 験 報 告 書

2-メチル-2-プロペンアミドのヒメダカ(*Oryzias latipes*)に対する急性毒性試験

(試験番号: NMMP/E99/4020)

平成12年12月11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：環境庁

表題：2-メチル-2-プロペンアミドのヒメダカ (*Oryzias latipes*) に対する急性毒性試験

試験番号：NMMP/E99/4020

上記試験は環境庁のGLP規則に従って実施したものである。

平成12年12月22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 : 環境庁

表題 : 2-メチル-2-プロペンアミドのヒメダカ (*Oryzias latipes*) に対する急性毒性試験

試験番号 : NMMP/E99/4020

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12年 2月16日	平成12年 2月16日
試験報告書監査	平成12年 4月13日	平成12年 7月10日

平成12年12月22日

信頼性保証業務担当者

試験実施概要

1. 表題 :2-メチル-2-プロペンアミドのヒメダカ (*Oryzias latipes*) に対する急性毒性試験
2. 試験目的 :2-メチル-2-プロペンアミドについて、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 No.203「魚類毒性試験」(1992 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 :〒100-8975 東京都千代田区霞が関1-2-2
委託責任者 :企画調整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 12 年 12 月 21 日)

試験担当者   (平成 12 年 12 月 21 日)

試験担当者   (平成 12 年 12 月 21 日)

試験担当者   (平成 12 年 12 月 21 日)

試験担当者   (平成 12 年 12 月 21 日)

試験担当者   (平成 12 年 12 月 21 日)

試験担当者   (平成 12 年 12 月 21 日)

9. 試験期間: 試験開始日 平成 11 年 11 月 16 日
 曝露期間 平成 12 年 2 月 14 日 ～ 平成 12 年 2 月 18 日
 試験終了日 平成 12 年 12 月 21 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)東レ
 ササニシチ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)	<p>10. 保管:</p> <p>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。</p>	<p>10. 保管:</p> <p>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ブズに保管する。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。</p>	2002 年 7 月	<p>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ブズを利用する。</p>

Ⅲ. 署名, 承認

変更届作成日 : 2002 年 07 月 11 日

試験責任者(変更届作成者)

: [redacted] (2002 年 07 月 11 日)

QAU 担当者 確認 :

[redacted] (2002 年 07 月 11 日)

運営管理者 承認 :

[redacted] (2002 年 07 月 11 日)

試験委託者: 環境省

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

承認 : [redacted] (2002 年 8 月 5 日)

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	10
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 試験水中の被験物質濃度	12
5.3 半数致死濃度 (LC50)	12
5.4 0%死亡最高濃度および 100%死亡最低濃度	12
5.5 毒性症状	12
5.6 試験水のpH、溶存酸素濃度および水温	12
Table 1～8	13～19
Figure 1	20
付属資料－1 希釈水の水質	
付属資料－2 試験液の分析方法	

要 旨

試験委託者

環境庁

表 題

2-メチル-2-プロペンアミドのヒメダカ (*Oryzias latipes*) に対する急性毒性試験

試験番号

NMMP/E99/4020

試験方法

本試験は、OECD 化学品テストガイドライン No.203「魚類毒性試験」(1992年)に準拠して実施した。

被験物質	: 2-メチル-2-プロペンアミド
方式	: 半止水式(24時間毎に換水)
供試生物	: ヒメダカ (<i>Oryzias latipes</i>)
試験濃度	: 対照区および100mg/L(設定濃度)
曝露期間	: 96 時間
試験液量	: 3.0L
生物数	: 10 尾/濃度区
照明	: 室内光、16 時間明/8 時間暗
エアレーション	: なし
温度	: 24±1℃

結 果

試験の結果、2-メチル-2-プロペンアミドの設定濃度に基づく96時間の半数致死濃度(LC50)は >100 mg/Lであった。

1 被験物質

1.1 名称、構造式および物理化学的性状

名 称	:2-メチル-2-プロペンアミド 別名:メタクリルアミド、識別符号:MP、CAS:79-39-0
構造式	: $\text{CH}_2=\text{C}(\text{CH}_3)\text{CONH}_2$
分子式	: $\text{C}_4\text{H}_7\text{NO}$
分子量	:85.11
融点	:109℃
沸点	:215℃
水への溶解度	:41g/100g (30℃)

[上記の数値は、次のデータベースおよび「11290の化学商品」化学工業日報社から引用した]

ECDIN:Environmental Chemicals Data Information Network

1.2 供試試料

純度	:98%以上
ロット番号	:D12358J
供給者	: XXXXXXXXXX
供給量	:25g×2本
入手日	:平成11年9月17日
外観	:白色粉末

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庫に室温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ガス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。

- 1) 一般名 : ヒメダカ
- 2) 学名 : *Oryzias latipes*
- 3) 体長 : 2.12 cm (1.87~2.29cm)、n=10
- 4) 体重 : 0.1392 g (0.0913~0.1855g)、n=10
- 5) ロット番号 : M受 000119
- 6) 購入先 : 愛知県弥富地区養魚場
- 7) 購入日 : 平成12年1月19日

馴化

試験条件と同条件(水質、温度等)で12日間以上、飼育馴化した。餌は市販のテトラミンを与えた。暴露開始の24時間前からは給餌しなかった。試験には健康で肉眼的に正常な個体を使用した。暴露開始前7日間の死亡率は 0.0% であった。また、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結果、96時間LC50は 0.59mg/L であった。

3 試験方法

3.1 試験条件

- 1) 方式 : 半止水式(24時間毎に換水)
- 2) 温度 : 24 ± 1 °C
- 3) 曝露期間 : 96 時間
- 4) 生物数 : 10 尾/濃度区
- 5) 試験液量 : 3.0L
- 6) 連数 : 1濃度区につき1連
- 7) 給餌 : なし
- 8) エアレーション : なし
- 9) 照明 : 室内光、16 時間明/8 時間暗

3.2 希釈水

名古屋市水道水を活性炭に通し脱塩素して用いた。

希釈水の水質として、硬度が 41.0mg/L (CaCO₃ 換算)、pHが6.8であった。

[付属資料－1(p.21)]

3.3 試験容器および恒温槽等

試験容器 : 3L容ガラスビーカー

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)

pH計 : 堀場製作所 カスタニーLAB pHメーター F-22

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)

溶存酸素計 : 東亜電波 DOメーター DO-14P

3.4 試験濃度の設定

予備試験の結果、96 時間半数致死濃度(LC50)は 100mg/L 以上であり、0%死亡最高濃度および 100%死亡最低濃度ともに 100mg/L 以上であった。この結果から、100mg/L の1濃度区を設定し、限度試験とした。

3.5 試験液の調製

- 1) 被験物質 3000.0mg/L 水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) 希釈水のための対照区を設けた。
- 3) 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 24 時間後に各試験水槽より試験水(1.0～1.5mL)を採取し、ガスクロマトグラフ法により分析した。試験水の分析に際しては、試料測定日毎に標準溶液100.0mg/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.23)に示した。

3.7 試験操作

暴露開始時に供試魚と同水槽で馴養した魚 10 尾の重量および被鱗体長を測定した。暴露期間中給餌は行わなかった。

各試験水槽の試験液の pH、溶存酸素濃度、水温を測定後、試験水槽中に供試魚を 1 濃度区当たり 10 尾投入した。pH、溶存酸素濃度、水温は暴露期間中毎日 1 回測定した。

暴露開始後、24、48、72 および 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を記録した。記載する症例と定義は下記* に従った。その他特異的症例(背曲がり、出血、体色変化、粘液の分泌等)については観察された場合に別途具体的に記載する。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く。

*一般的症例と定義

死亡 : 刺激を与えた場合に反応の認められないもの。

異常呼吸 : 対照区の魚と比較して鰓蓋の動きが異なるもの。

異常遊泳 : 明らかに対照区の魚と異なる遊泳をしたもの。動作の緩慢、過敏、痙攣、反転等

遊泳不能 : 底部または水面で動いてはいるものの、水中を遊泳することが不可能なもの。

横転、仮死を含む。

4 結果の算出

限度試験のため、半数致死濃度 (LC50) は算出できない。濃度区での死亡数と供試個体数 (10 尾) から死亡率 (%) を算出し、濃度区の死亡率が 50% 未満であれば、96 時間半数致死濃度 (LC50) は濃度区の濃度以上とした。

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 試験水中の被験物質濃度

試験開始時および 24 時間後に試験水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 90.5mg/L であり、試験開始後 24 時間の被験物質濃度は 94.4mg/L であった。設定濃度 (100.0mg/L) に対する実測濃度の割合は 90.5～94.4% であった。実測濃度が設定濃度の ±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.14), 付属資料-2(p.23)]

5.3 半数致死濃度 (LC50)

2-メチル-2-プロペンアミドに 96 時間暴露したヒメダカの死亡率は濃度区 100mg/L で 0% であった。対照区の死亡率は 0% であった。

限度試験であり、2-メチル-2-プロペンアミドの 96 時間の半数致死濃度 (LC50) は >100 mg/L であった。

[Table 2(p.14), Table 3(p.14), Figure 1(p.20)]

5.4 0% 死亡最高濃度および 100% 死亡最低濃度

2-メチル-2-プロペンアミドに 96 時間暴露したヒメダカの 0% 死亡最高濃度は >100mg/L であり、100% 死亡最低濃度も >100mg/L であった。

[Table 4(p.15)]

5.5 毒性症状

毒性症状は、対照区および 100mg/L の濃度区で試験期間中に異常な症状は観察されなかった。

[Table 5(p.16)]

5.6 試験水の pH、溶存酸素濃度および水温

96 時間の試験期間中の pH は 6.9～7.0 であった。試験期間中の溶存酸素濃度は 6.4～11.3mg/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: 8.25mg/L)。96 時間の試験期間中の水温は 23.1～23.8℃ であった。

[Table 6(p.17), Table 7(p.18), Table 8(p.19)]

以上

Table 1. Measured Concentrations of 2-Methyl-2-propenamide During a 96-Hour Exposure of Medaka (*Oryzias latipes*) under Semi-Static Test Conditions

Nominal Concentration (mg/L)	Measured Concentration (mg/L)			Percent of Nominal	
	0 Hour new	24 Hour old	Geometric Mean	0 Hour new	24 Hour old
Control	<0.5	<0.5	-	-	-
100	90.5	94.4	92.4	90.5	94.4

new : freshly prepared test solutions

old : test solutions after 24 hours exposure period

Table 2. Mortality of Medaka (*Oryzias latipes*) Exposed to 2-Methyl-2-propenamide under Semi-Static Test Conditions

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

Table 3. Calculated LC50 Values for Medaka (*Oryzias latipes*) Exposed to 2-Methyl-2-propenamide Based on Nominal Concentrations under Semi-Static Test Conditions

Exposure Period (Hour)	LC50 (mg/L)	95-Percent Confidence Limits (mg/L)	Statistical Method
24	>100	—	—
48	>100	—	—
72	>100	—	—
96	>100	—	—

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

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

Table 5. Symptoms of Toxicity Observed in Medaka (*Oryzias latipes*) Exposed to 2-Methyl-2-propenamide under Semi-Static Test Conditions

Nominal Concentration (mg/L)	Symptoms			
	24 Hour	48 Hour	72 Hour	96 Hour
Control	0	0	0	0
100.0	0	0	0	0

0 : normal

A : abnormal respiration

B : abnormal swimming behaviour

C : loss of equilibrium or swimming ability

D : other symptoms

(n) : numbers of fish

Table 6. pH Values During a 96-Hour Semi-Static Exposure of Medaka (*Oryzias latipes*) to 2-Methyl-2-propenamide

Nominal Concentration (mg/L)		pH				
		0 Hour	24 Hour	48 Hour	72 Hour	96 Hour
Control	new	7.0	6.9	7.0	7.0	–
	old	–	6.9	7.0	6.9	6.9
100	new	7.0	7.0	7.0	7.0	–
	old	–	6.9	7.0	6.9	7.0

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 Medaka (*Oryzias latipes*) to 2-Methyl-2-propenamide

Nominal Concentration		Dissolved Oxygen Concentration(mg/L)				
(mg/L)		0 Hour	24 Hour	48 Hour	72 Hour	96 Hour
Control	new	11.0	11.0	11.3	10.8	–
	old	–	6.4	6.5	6.8	6.7
100	new	11.0	10.9	11.3	10.8	–
	old	–	6.7	6.6	6.9	6.8

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 Medaka (*Oryzias latipes*) to 2-Methyl-2-propenamide

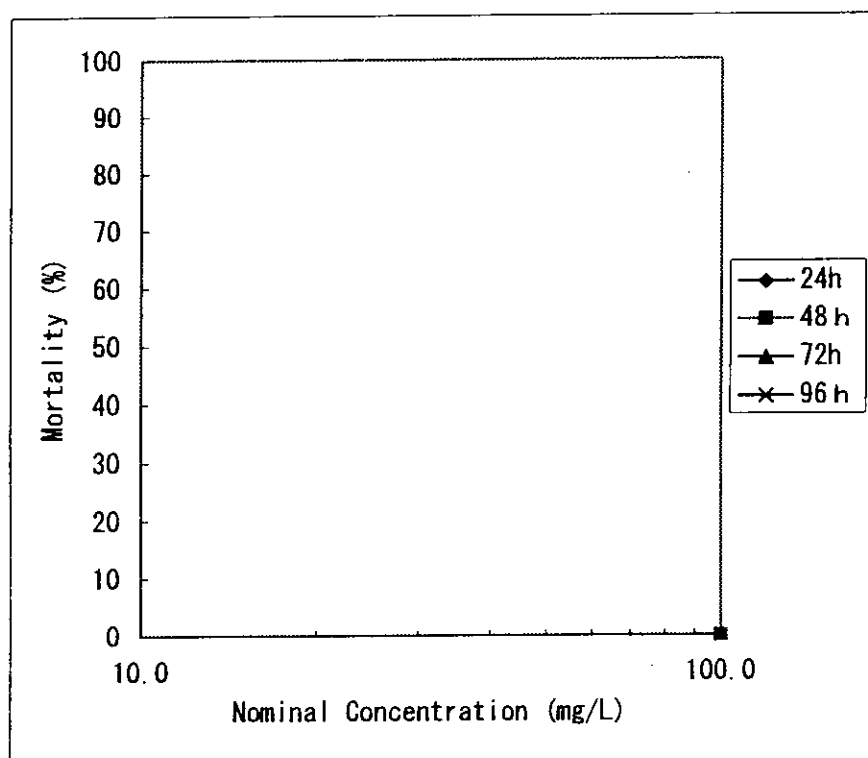
Nominal Concentration		Temperature(°C)				
(mg/L)		0 Hour	24 Hour	48 Hour	72 Hour	96 Hour
Control	new	23.1	23.8	23.7	23.8	-
	old	-	23.7	23.7	23.6	23.6
100	new	23.2	23.8	23.7	23.8	-
	old	-	23.8	23.7	23.8	23.6

new : freshly prepared test solutions

old : test solutions after 24 hours exposure period

Figure 1. Concentration-Response Curve of 2-Methyl-2-propenamide

Mortality in Medaka



付属資料－1

希釈水の水質

(全1頁)

Water Quality of Dilution Water

Parameter	Concentration
BOD	<0.5 mg/L
COD	0.8 mg/L
pH	6.8
Coliform group bacteria	N.D.
Mercury	<0.003 mg/L
Copper	<0.005 mg/L
Cadmium	<0.02 mg/L
Zinc	<0.03 mg/L
Lead	<0.2 mg/L
Chromium	<0.05 mg/L
Iron	0.01 mg/L
Free chlorine	<0.05 mg/L
Fluoride	<0.05 mg/L
Ammonium ion	<0.1 mg/L
Arsenic	<0.001 mg/L
Evaporation residue	37 mg/L
Electric conductivity	7.1 mS/m
Total hardness (as CaCO ₃)	41.0 mg/L
Alkalinity	10.0 mg/L
Total organophosphorus compounds	<0.001 mg/L
Simazin	<0.0003 mg/L
Herbicide Thiobencarb	<0.002 mg/L
Fungicide Thiuram	<0.0006 mg/L

付属資料－2
試験液の分析方法
(全6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 1.0～1.5mL をバイアル瓶に採取する。

採取した試験液の設定濃度が 100mg/L を越える場合は、蒸留水で 100mg/L 以下に希釈する。

GC 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 ガスクロマトグラフィー (GC) 測定条件

カラム : TC-FFAP、0.53mmID × 15m

カラム温度 : 130℃

検出器 : FID

検出器温度 : 220℃

注入口温度 : 220℃

注入量 : 1 μL

キャリアガス : He

流量 : 20mL/min (室温)

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.25)]

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

希釈水に標準原液もしくはこれを希釈して調製した標準液の一定量を添加して回収率を求めた。

2-メチル-2-プロペンアミド 20.0mg/L の回収率は94.0%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.26～p.28)]

Figure 1 Calibration Curve of 2-Methyl-2-propenamide by GC Analysis

Input Data

No.	Concentration	Peak Area
	(mg/L)	(μ V·sec)
1	5.0	1642
2	10.0	3315
3	20.0	7153
4	50.0	18129
5	100.0	37245

$$X(\text{Concentration}) = 0.002704 \times Y(\text{Peak Area})$$

$$r^2 = 0.9996$$

r^2 : Coefficient of correlation

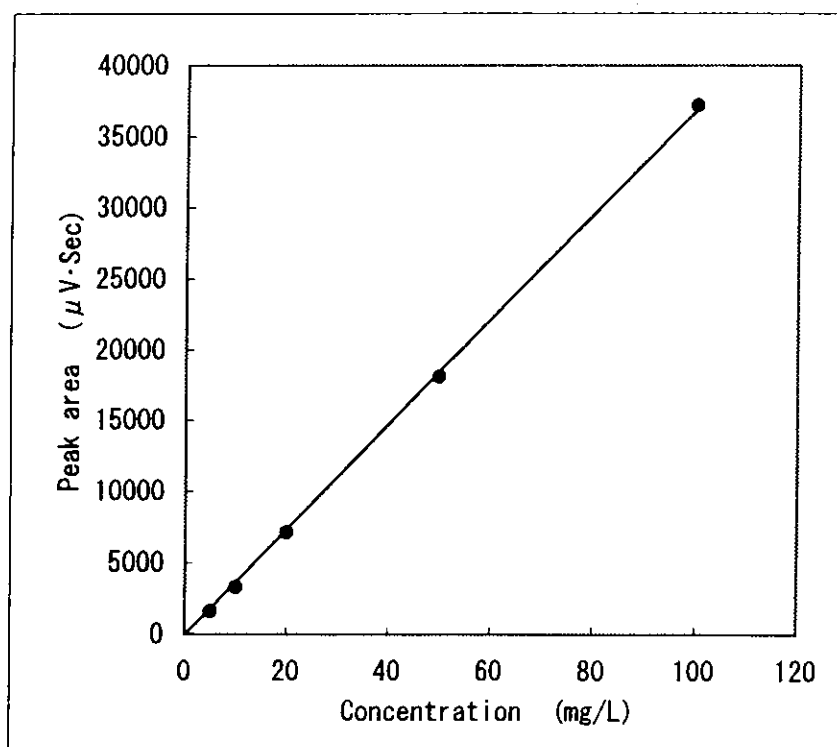
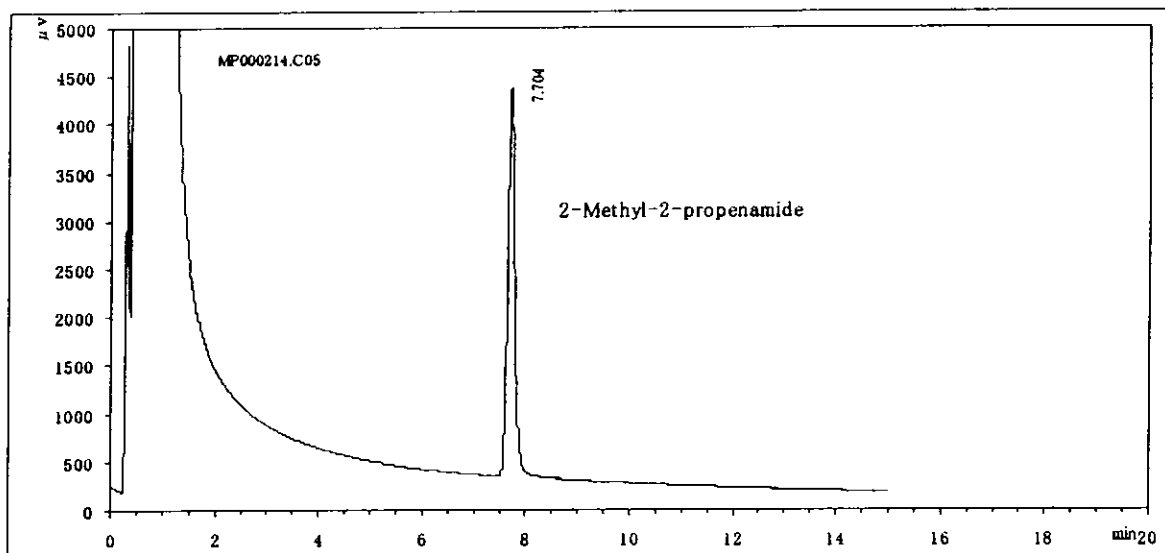


Figure 2 Representative chromatograms

(1) Standard 50.0 mg/L ; 0-hour



(2) Standard 50.0 mg/L ; 24-hour

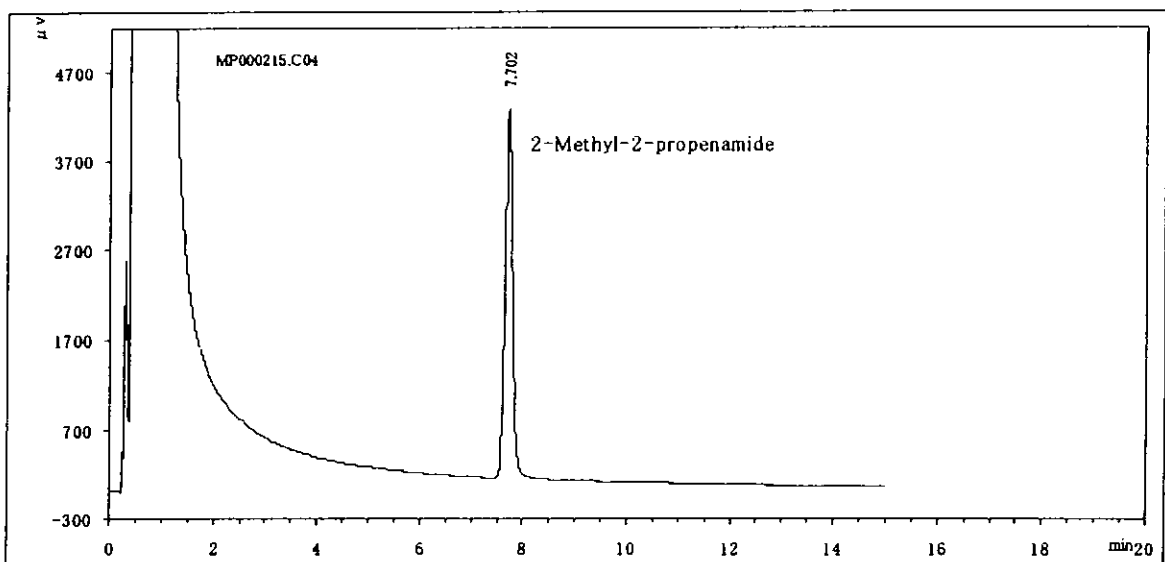
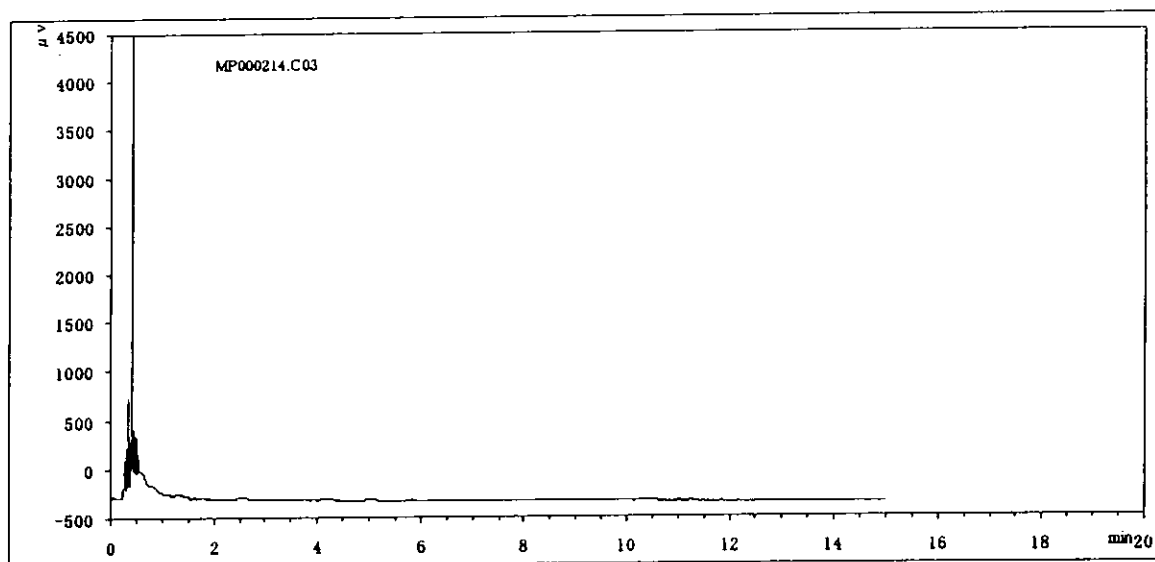


Figure 2 Continued

(3) Control ; 0-hour



(4) Control ; 24-hour

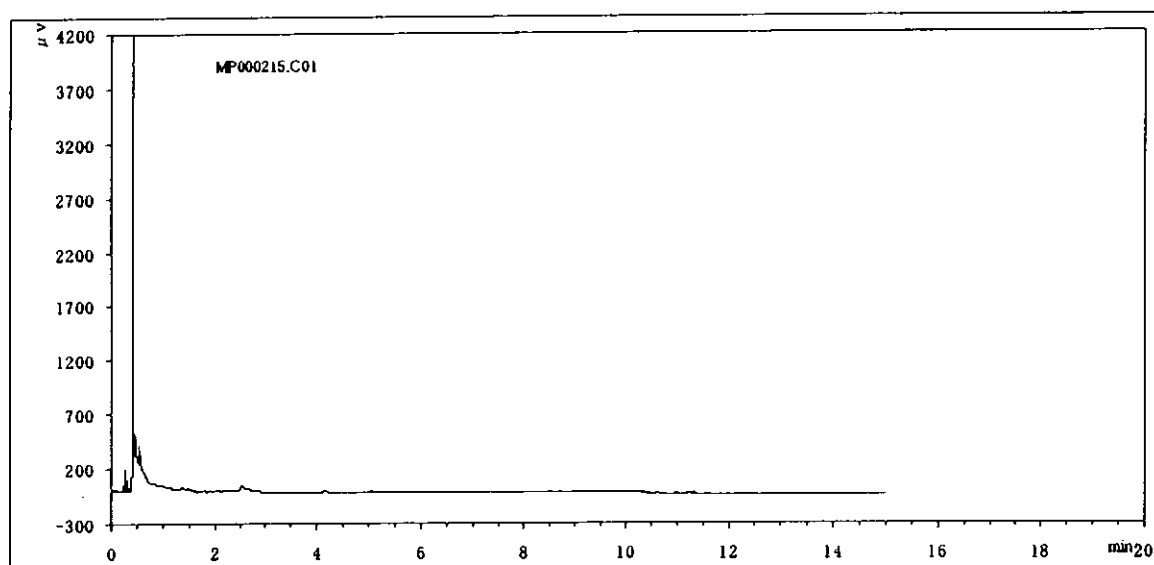
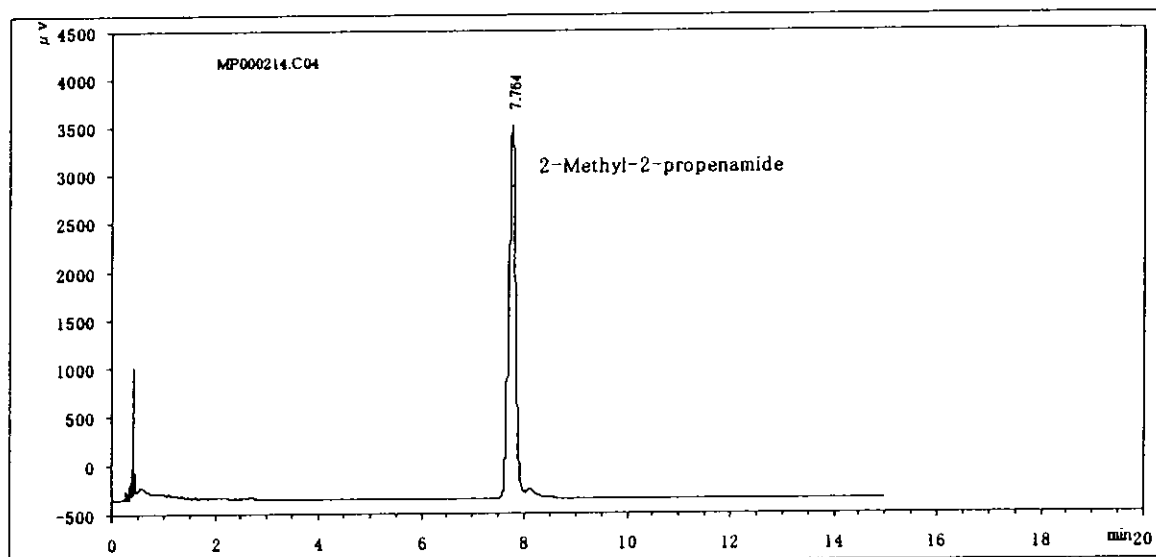


Figure 2 Continued

(5) 100.0 mg/L nominal; 0-hour



(6) 100.0 mg/L nominal; 72-hour

