

環境庁殿

試 験 報 告 書

フタル酸ジ-*i*-ブチルのオオミジンコ (*Daphnia magna*)に対する急性遊泳阻害試験

(試験番号：PRO/N02/0201)

平成 8年 7月31日作成

株式会社東レリサーチセンター

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： フタル酸ジ-*i*-ブチルのオオミジンコ (*Daphnia magna*)に対する
急性遊泳阻害試験

試験番号： PRO/N02/0201

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 8 年 4 月 10 日	平成 8 年 4 月 11 日
試験報告書監査	平成 8 年 5 月 17 日	平成 8 年 5 月 20 日

平成 8 年 7 月 31 日

信頼性保証担当者：  

試験実施概要

1. 表題： フタル酸ジ-*i*-ブチルのオオミジンコ (*Daphnia magna*)に対する急性遊泳阻害試験
2. 試験目的： フタル酸ジ-*i*-ブチルについて、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50%遊泳阻害濃度 (EC50) 及び最大無作用濃度 (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
委託責任者： 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： 株式会社東レリサーチセンター
所在地： (〒103) 東京都千代田区日本橋室町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
所在地： (〒455) 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	[Redacted]	(平成 8 年 7 月 31 日)
試験担当者	[Redacted]	(平成 8 年 7 月 31 日)
試験担当者	[Redacted]	(平成 8 年 7 月 31 日)
試験担当者	[Redacted]	(平成 8 年 7 月 31 日)
試験担当者	[Redacted]	(平成 8 年 7 月 31 日)
試験担当者	[Redacted]	(平成 8 年 7 月 31 日)
試験担当者	[Redacted]	(平成 8 年 7 月 31 日)
試験担当者	[Redacted]	(平成 8 年 7 月 31 日)

9. 試験期間：

馴化開始日	平成 8 年 3 月 20 日
試験開始日	平成 8 年 3 月 28 日
試験終了日	平成 8 年 7 月 31 日
曝露期間	平成 8 年 4 月 9 日 ~ 平成 8 年 4 月 11 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。

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 保管方法および保管条件下の安定性の確認	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 試験水中の被験物質濃度	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 試験水の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

フタル酸ジ-*i*-ブチルのオオミジンコ (*Daphnia magna*)に対する急性遊泳阻害試験

試験番号

PRO/NO2/0201

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： フタル酸ジ-*i*-ブチル
- 2)暴露方法： 半止水式(24時間後に試験液の全量を交換)
- 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, 助剤対照区(86.0mg/L), 3.28mg/L, 5.25mg/L, 8.40mg/L,
(設定値) 13.44mg/L および 21.50mg/L (公比 1.6)
- 8)試験液量： 100 mL
- 9)照明： 16時間明/8時間暗
- 10)試験水温： 20±1°C

結 果

1)24時間暴露後の結果

24時間半数遊泳阻害濃度(EiC50)=9.85mg/L (95%信頼区間 : 8.55mg/L~11.32mg/L)

(有意水準5%、統計的手法：吉岡義正教授 Probit 法)

2)48時間暴露後の結果

48時間半数遊泳阻害濃度(EiC50)=6.71mg/L (95%信頼区間 : 5.90mg/L~7.64mg/L)

最大無作用濃度(NOECi)=5.25mg/L

(有意水準5%、統計的手法：F & t-test, Yukums 統計ライブラリ-I 統計解析編)

100%阻害最低濃度=13.44mg/L

(上記濃度は、全て設定値に基づく値)

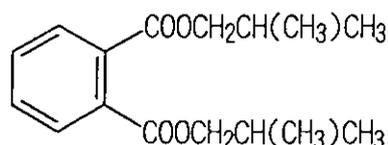
1 被験物質

1.1 名称、構造式および物理化学的性状

名称：フタル酸ジ-*i*-ブチル

識別符号：IB

構造式：



分子式： $C_{16}H_{22}O_4$

分子量：278.35

1-オクタノール/水分配係数 (log P)：4.110

水溶性：400 ppm (25°C)

蒸気圧：0.100~1.100 (mmHg) (89.0~150.0°C)

融点：-64°C

沸点：340°C

(上記の数値は、MSDSのフタル酸ジ-*i*-ブチルの値を引用した)

1.2 供試試料

購入先：██████████

入手先：██████████

入手日：平成8年3月11日

ロット番号：GA01

供給量：25g入り2本

外観：無色透明 液体

純度及び不純物：99.0%以上

1.3 保管方法及び保管条件下の安定性の確認

1) 保管方法

被験物質は光を遮断した試料保管庫に室温で保管した。

2) 被験物質の確認及び保管条件下の安定性

入手した被験物質について、赤外吸収スペクトル測定とNMRスペクトル測定およびガスクロマトグラフ分析を行い、被験物質の特性ピークが認められる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、試験開始前に測定したスペクトルおよびガスクロマトグラフと比較した結果、変化は無かった。

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した。

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）による急性遊泳阻害試験の結果、48時間 EC_{50} は 0.16mg/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前日に選別して、別に用意したビーカーに移し、それぞれ当日(平成8年3月20日および同年3月22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18~20日間飼育した。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(平成8年4月9日)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±1°C
照明:	室内光、16時間明/8時間暗
餌:	<i>Chlorella vulgaris</i>
給餌量:	ミジンコ1頭当たり <i>Chlorella vulgaris</i> を 0.1~0.2 mgC(有機炭素含量)/日の割合で与えた。

3 試験方法

3.1 試験条件

- 1)暴露方法: 暴露は半止水式で行い、24時間後に試験液の全量を交換した。
- 2)暴露期間: 48時間
- 3)連数: 1濃度区につき4連
- 4)生物数: 20頭/1濃度区 (1連につき5頭で1濃度区20頭)
- 5)試験液量: 100 mL
- 6)試験水温: 20±1°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

愛知用水（河川水を簡単に処理して工業、農業用水として供給されている）を工場内で沈殿・ろ過処理した水を、さらに実験室でトレビーノ（東レ(株)製 浄水器：中空系膜および活性炭）を通して用いた。

試験開始時にオルトトリジン法により、希釈水中残留塩素が0.05mg/L以下であることを確認した。

希釈水の主な水質として、硬度が 16.2mg/L(CaCO₃換算)、pHが 6.95であった。

[付属資料-1]

3.3 試験容器および恒温槽等

試験容器： 100mL容ガラスビーカー

恒温槽： ローテンプレインキュベータ（東京理化 EYELA LTI-1000-ED）

水温計： 熱電対温度計 データロガー（ティアンドディ TR-71型）

および pHメーター内蔵温度計

pH計： pHメーター（堀場製作所 カスタニーLAB pHメーター F-22）

溶存酸素計： DO METER（堀場製作所 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、24時間半数遊泳阻害濃度（EiC50(24h)）は 10.02mg/L、48時間半数遊泳阻害濃度（EiC50(48h)）は 11.68mg/L であると推定した。

この予備試験結果に基づき、対照区、助剤対照区に加えて、濃度公比 1.6で5段階の濃度区を設定した（設定：3.28mg/L、5.25mg/L、8.40mg/L、13.44mg/L、および 21.50mg/L）。

3.5 試験液の調製

- 1) 被験物質 0.1wt%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) 被験物質 0.1wt%溶液の調製は、供試ミジンコに対して毒性の低い分散剤である硬化ヒマシ油 HCO-50を用い、ホモジナイザーで蒸留水に分散させて調製した。
- 3) 試験液中の助剤濃度は、各濃度区毎に被験物質濃度の 4.0 倍の濃度になるよう調製した。
- 4) 希釈水のみ対照区に加え、試験濃度区の最高濃度に添加されている量と同濃度の助剤を添加した助剤対照区を設けた。
- 5) 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。

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1.5mLを採取し、HPLCにより分析した。試験水の分析に際しては、試料測定毎に標準溶液（濃度 4.0, 10.0mg/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、供試ミジンコを投入し、その時点を暴露開始時とした。先端が比較的広口のガラスピペット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、ピペット内の飼育水は全量で1%以内を目安とした。24時間後にミジンコを新しい試験液に移しかえ、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、D.O.、pHは、暴露開始時、24時間および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

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、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。

統計的手法（等分散性検定および平均値の差の検定）により対照区と比較して有意差（5%水準）が認められない最高試験濃度を最大無作用濃度（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

試験成績の信頼性に影響を及ぼした要因は、特に無いと考えられる。

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 3.14~21.33mg/L (設定値 3.28~21.50mg/L) であり、設定値に対する割合は 95.7~99.2%であった。試験開始後24時間の被験物質濃度は2.97~19.85mg/L (設定値 3.28~21.50mg/L) であり、設定値に対する割合は、85.8~92.3%であった。

[Table 1(p.13), 付属資料-2]

5.3 半数遊泳阻害濃度 (EiC50)

フタル酸ジ-*i*-ブチルに48時間暴露したミジンコの遊泳阻害率は 3.28mg/L (設定濃度) 濃度区で 5%、13.44mg/L (設定濃度) 以上の濃度区で 100%であった。対照区の遊泳阻害率は 5%であった。

フタル酸ジ-*i*-ブチルの設定濃度に基づく24時間の半数遊泳阻害濃度(24h EiC50)は 9.85mg/Lであり、その95%信頼区間は 8.55mg/L~11.32mg/L であった。また、48時間の半数遊泳阻害濃度(48h EiC50)は 6.71mg/Lであり、その95%信頼区間は 5.90mg/L~7.64mg/L であった。

(有意水準 5%、統計的手法：吉岡義正教授 Probit法)

[Table 2,3(p.14,15), Figure 1(p.19)]

5.4 最大無作用濃度 (NOECi)および 100%阻害最低濃度

フタル酸ジ-*i*-ブチルに48時間暴露したミジンコの最大無作用濃度 (NOECi)は 5.25mg/L (設定濃度) であり、100%阻害最低濃度は 13.44mg/L (設定濃度) であった。

(有意水準 5%、統計的手法：F & t-test, Yukums 統計ライブラリ-I 統計解析編)

[Table 4(p.15)]

5.5 試験水の pH、溶存酸素濃度および水温

試験期間中の試験水の pHは 7.2~7.6であった。試験期間中の溶存酸素濃度は 8.1~9.3 mg/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 (20.0°Cの飽和溶存酸素濃度：8.84mg/L)。48時間の試験期間中の水温は 19.4~20.1°Cであった。

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

以上

Table 1. Measured Concentrations of Di-i-butyl Phthalate During a 48-Hour Exposure of *Daphnia magna* under Semi-Static Test Conditions

Nominal Concentration (mg/L)	Measured Concentration(mg/L)			Percent of Nominal
	0 Hour new	24 Hour old	Mean	
Control	< 0.05	< 0.05	----	----
Dispersant Control	< 0.05	< 0.05	----	----
3.28	3.14	2.97	3.05	93.0
5.25	5.08	4.67	4.87	92.8
8.40	8.10	7.21	7.64	91.0
13.44	13.01	11.99	12.49	92.9
21.50	21.33	19.85	20.58	95.7

new: freshly prepared test solutions

old: test solutions after 24 hours exposure period

$$\text{Mean: } \frac{\text{Conc } 0 - \text{Conc } 1}{\ln(\text{Conc } 0) - \ln(\text{Conc } 1)}$$

Conc 0 is the measured concentration at the start of each renewal period.

Conc 1 is the measured concentration at the end of each renewal period.

Table 2. Mortality or Immobility of *Daphnia magna* Exposed to Di-i-butyl Phthalate under Semi-Static Test Conditions

Nominal Concentration (mg/L)	Cumulative Number of Dead or Immobilized <i>Daphnia</i> (Percent Mortality or Immobility)	
	24 Hour	48 Hour
Control	0 (0)	1 (5)
Dispersant Control	0 (0)	0 (0)
3.28	0 (0)	1 (5)
5.25	1 (5)	2 (10)
8.40	6 (30)	16 (80)
13.44	16 (80)	20 (100)
21.50	20 (100)	20 (100)

Table 3. Calculated EiC50 Values for *Daphnia magna* Exposed to Di-i-butyl Phthalate Based on Nominal Concentrations under Semi-Static Test Conditions

Exposure Period (Hour)	EiC50 (mg/L)	95-Percent Confidence Limits (mg/L)	Statistical Method
24	9.85	8.55 ~ 11.32	Probit
48	6.71	5.90 ~ 7.64	Probit

These concentrations are based on the nominal concentrations.

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	8.40	21.50
48	5.25	13.44

These concentrations are based on the nominal concentrations.

Table 5. pH Values During a 48-Hour Semi-Static Exposure of *Daphnia magna* to Di-*i*-butyl Phthalate

Nominal Concentration (mg/L)		pH		
		0 Hour	24 Hour	48 Hour
Control	new	7.3	7.4	
	old		7.3	7.6
Dispersant Control	new	7.3	7.3	
	old		7.4	7.6
3.28	new	7.3	7.4	
	old		7.5	7.6
5.25	new	7.3	7.2	
	old		7.5	7.6
8.40	new	7.3	7.2	
	old		7.5	7.6
13.44	new	7.3	7.2	
	old		7.5	7.6
21.50	new	7.4	----a	
	old		7.5	----a

new: freshly prepared test solutions

old: test solutions after 24 hours exposure period

^a No measurement was made because all *Daphnia magna* were dead at this observation time.

Table 6. Dissolved Oxygen Concentrations During a 48-Hour Semi-Static Exposure of *Daphnia magna* to Di-i-butyl Phthalate

Nominal Concentration (mg/L)		Dissolved Oxygen Concentration (mg/L)		
		0 Hour	24 Hour	48 Hour
Control	new	8.6	9.1	
	old		8.3	8.4
Dispersant Control	new	8.5	9.1	
	old		8.2	8.3
3.28	new	8.6	9.2	
	old		8.2	8.2
5.25	new	8.4	9.3	
	old		8.3	8.2
8.40	new	8.3	9.2	
	old		8.1	8.1
13.44	new	8.7	9.3	
	old		8.1	8.2
21.50	new	9.1	----a	
	old		8.2	----a

new: freshly prepared test solutions

old: test solutions after 24 hours exposure period

^a No measurement was made because all *Daphnia magna* were dead at this observation time.

Table 7. Temperature Values During a 48-Hour Semi-Static Exposure of *Daphnia magna* to Di-i-butyl Phthalate

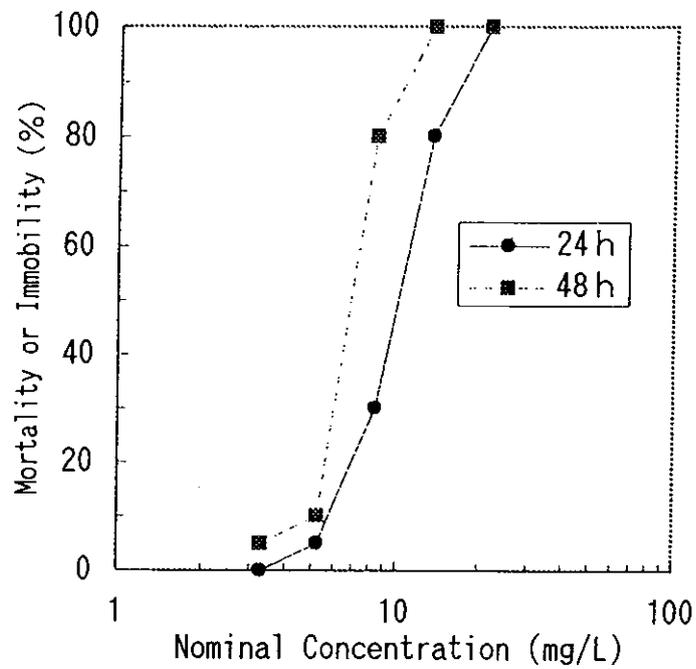
Nominal Concentration (mg/L)		Temperature, °C		
		0 Hour	24 Hour	48 Hour
Control	new	19.4	20.1	
	old		20.0	19.6
Dispersant Control	new	19.6	20.1	
	old		20.0	19.8
3.28	new	19.6	20.0	
	old		20.0	19.8
5.25	new	19.7	20.0	
	old		20.0	19.9
8.40	new	19.7	20.0	
	old		20.1	19.9
13.44	new	19.7	20.0	
	old		20.1	19.9
21.50	new	19.7	----a	
	old		20.1	----a

new: freshly prepared test solutions

old: test solutions after 24 hours exposure period

^a No measurement was made because all *Daphnia magna* were dead at this observation time.

Figure 1 Concentration-Response Curve of Di-i-butyl Phthalate
Mortality or Immobility in *Daphnia magna*



付属資料－ 1

希积水の水質

(全 1 頁)

Water Quality of Dilution Water

Parameter	Concentration
BOD	0.8 mg/L
COD	<0.6 mg/L
pH	6.95
Coliform group bacteria	N.D.
Mercury	<0.00005mg/L
Copper	<0.001 mg/L
Cadmium	<0.001 mg/L
Zinc	0.006 mg/L
Lead	<0.005 mg/L
Chromium	<0.01 mg/L
Iron	0.005 mg/L
Free chlorine	<0.0 mg/L
Fluoride	<0.05 mg/L
Ammonium ion	<0.1 mg/L
Arsenic	<0.01 mg/L
Evaporation residue	52.0 mg/L
Electric conductivity	4.23 mS/m
Total hardness (as CaCO ₃)	16.2 mg/L
Alkalinity	18.8 mg/L
Total organophosphorus compounds	<0.1 mg/L
Herbicide 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7頁)

試験液の分析方法

1 試験液の分析方法

各試験水槽より試験水 0.5～1.5 mL をバイアル瓶に採取する。

測定濃度が20 mg/L を越える場合は予め移動相で希釈する。

HPLC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	: C18 5 μ m ϕ , 4.6 mm ϕ ×150 mm
カラム温度	: 40 $^{\circ}$ C
注入量	: 20 μ L
移動相	: 水/アセトニトリル=13/87
流量	: 1.0 mL/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ポイント以上の標準液を測定し、直線性を確認した。 [Figure 1(p.24)]

測定日毎に標準溶液 (2ポイント以上) の測定を行い、この検量線により定量する。

4 添加回収試験

助剤対照液に標準液の一定量を添加して、回収率を求めた。

フタル酸ジイソブチル 1.004mg/L標準液の回収率は102.8%であり、10.04mg/L標準液の回収率は100.3%であった。

Figure 1 Calibration Curve of Di-i-butyl Phthalate by HPLC Analysis

Input Data		
No	Concentration (mg/L)	Peak Area (mAU·sec)
1	0.5	3.75882
2	1.0	5.34610
3	4.0	17.37597
4	10.0	43.05056
5	20.0	84.75312

$$Y(\text{Peak Area}) = 1.28375 + 4.15353 X(\text{Concentration})$$

$$\gamma = 0.99995$$

γ : coefficient of correlation

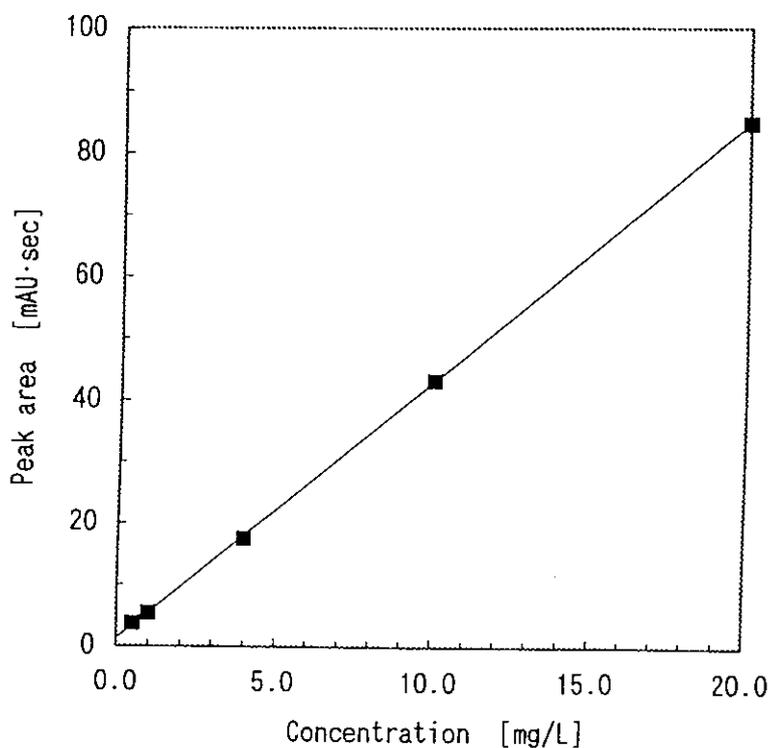


Figure 2 Representative chromatograms

(1) Standard 4.0mg/L

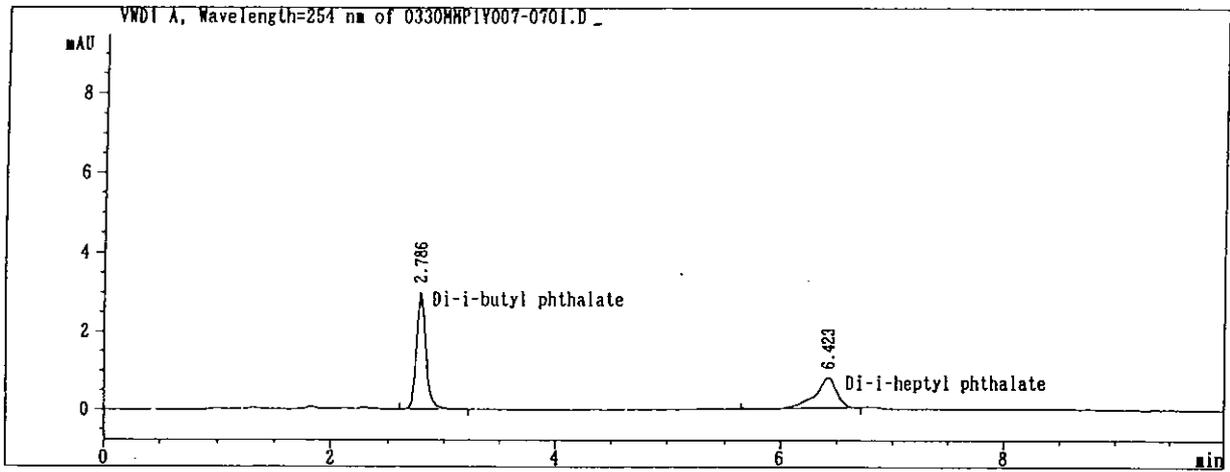
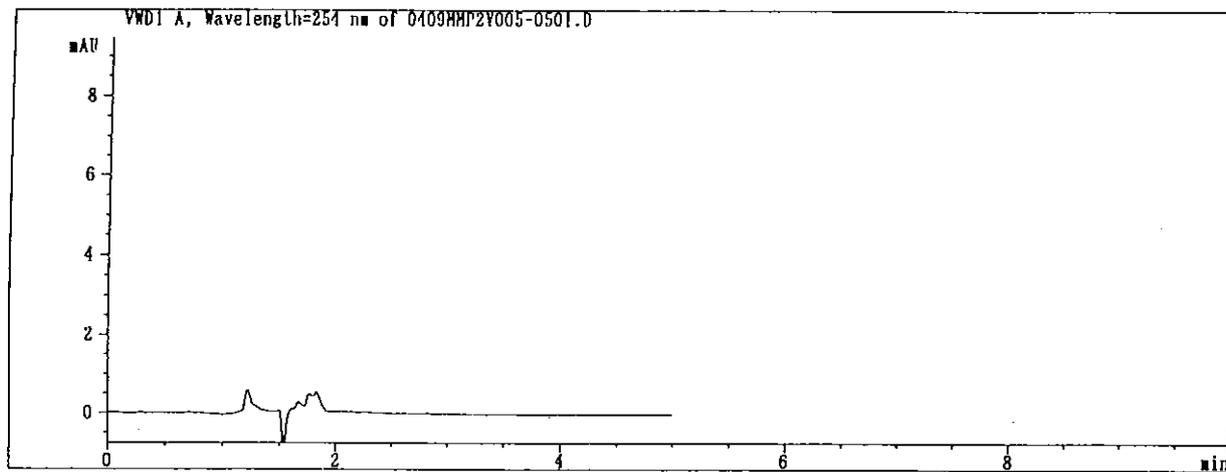


Figure 2 Continued

(2) Control ; 0-Hour



(3) Dispersant control ; 0-Hour

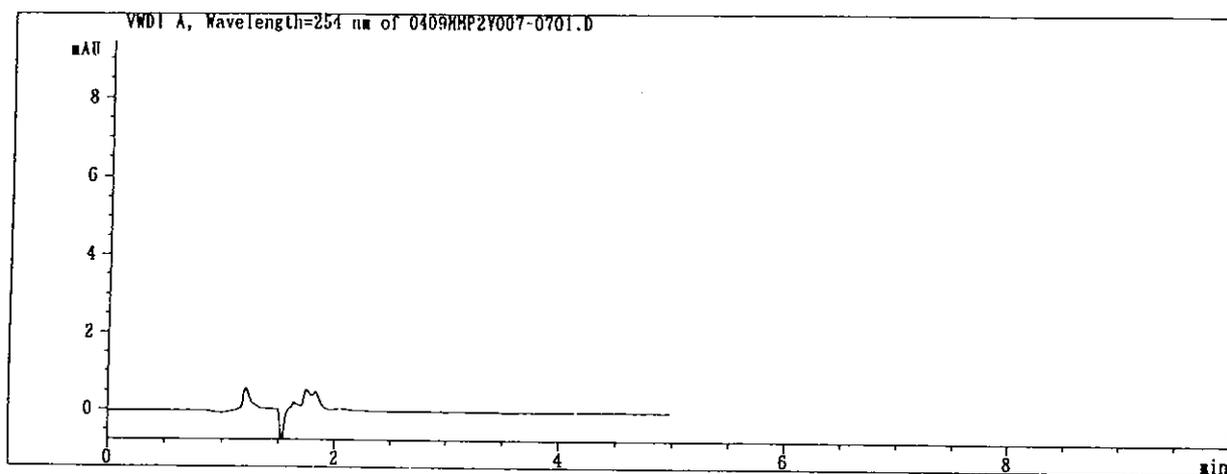
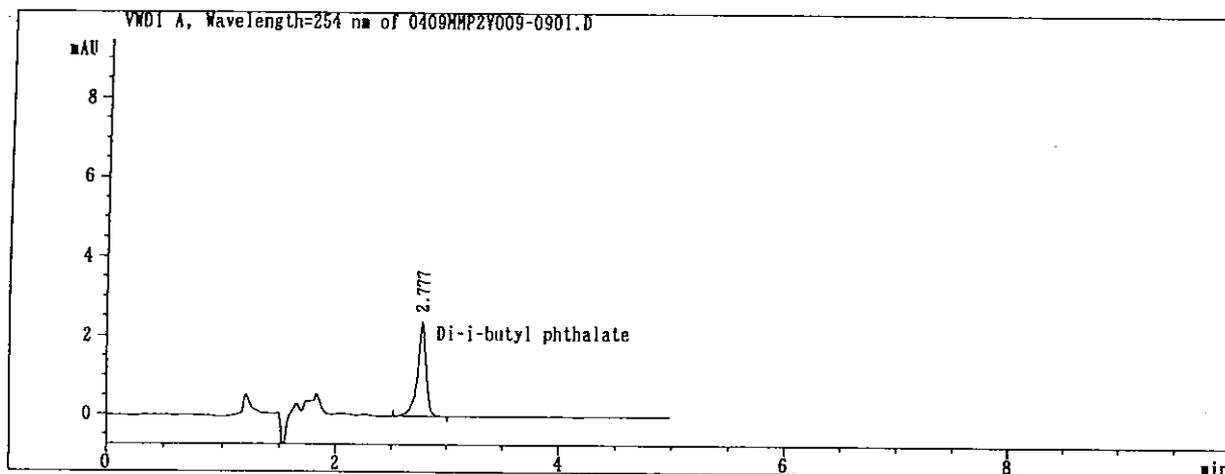


Figure 2 Continued

(4) 3.28mg/L nominal; 0-Hour



(5) 3.28mg/L nominal; 24-Hour

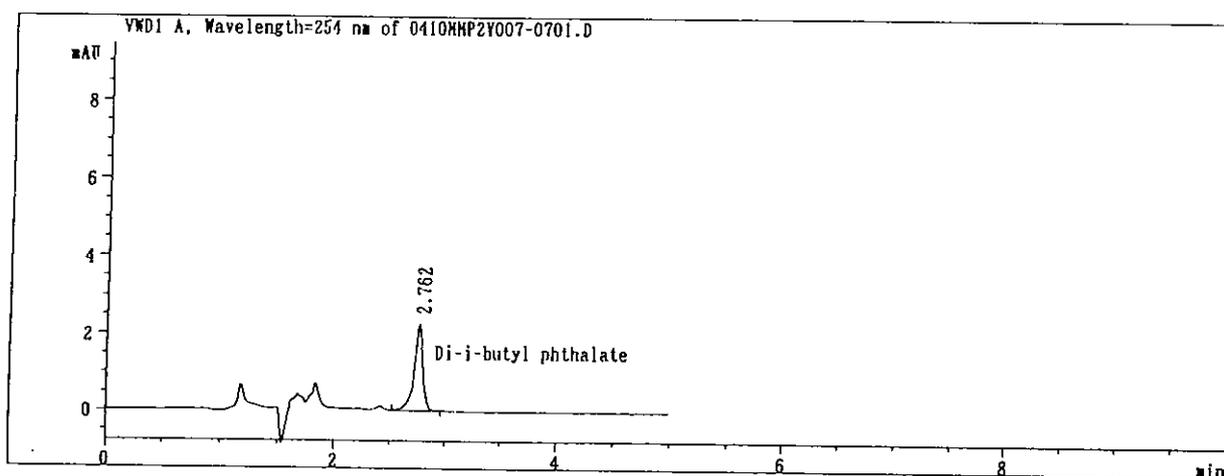
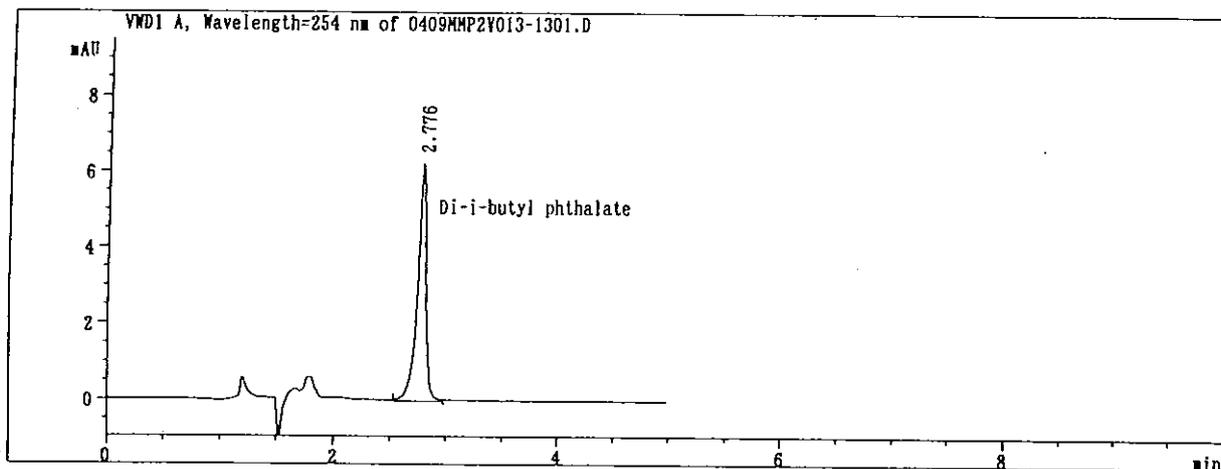


Figure 2 Representative chromatograms

(6) 8.40mg/L nominal; 0-Hour



(7) 8.40mg/L nominal; 24-Hour

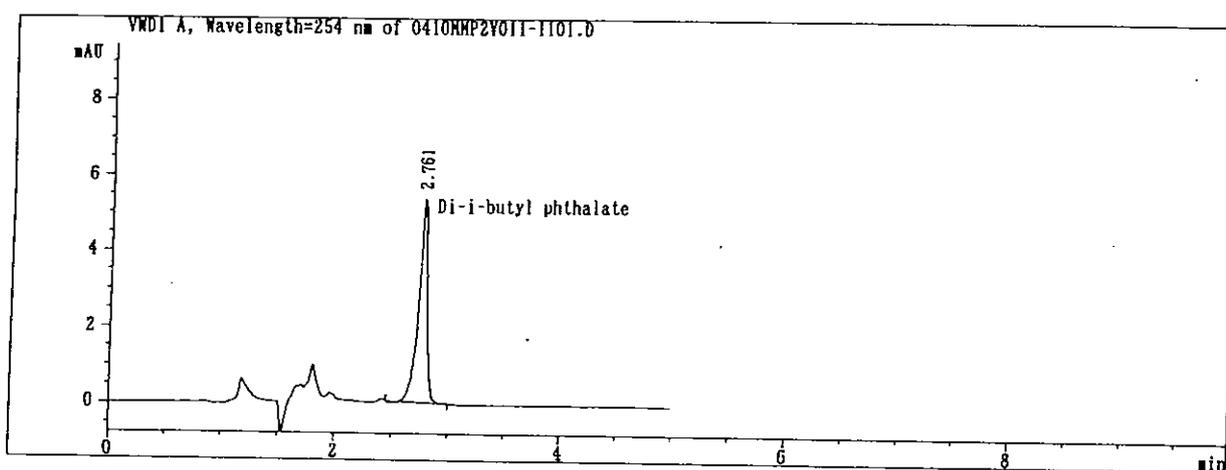
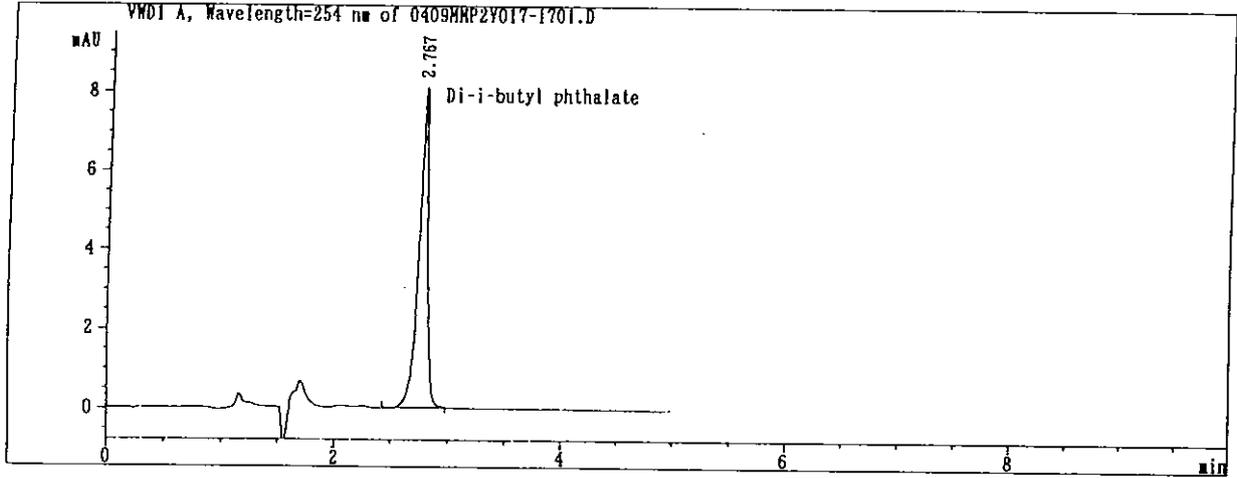


Figure 2 Continued

(8) 21.50mg/L nominal; 0-Hour



(9) 21.50mg/L nominal; 24-Hour

