

環境省殿

最 終 報 告 書

エチレンジアミン四酢酸の藻類(*Selenastrum capricornutum*)に対する生長阻害試験

(試験番号：第14011号)

2003年3月31日

財団法人 日本食品分析センター 多摩研究所

試験実施概要

1. 表 題：エチレンジアミン四酢酸の藻類(*Selenastrum capricornutum*)に対する生長阻害試験
2. 試験目的：エチレンジアミン四酢酸の藻類(*Selenastrum capricornutum*)に対する生長阻害試験を行い、50%生長阻害濃度(EC₅₀)及び最大無作用濃度(NOEC)を求める。
3. 試験方法：OECD 化学品テストガイドライン No. 201「藻類生長阻害試験」(1984年)に準拠
4. 適用GLP：日本国環境省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長通知「生態影響試験実施に関する基準の改正について」(別添)「生態影響試験実施に関する基準」(環保安第242号, 2001年)
5. 試験委託者：
 - 1) 名称：環境省
 - 2) 住所：〒100-8975 東京都千代田区霞ヶ関1丁目2番2号
 - 3) 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 [REDACTED]
6. 試験受託者：
 - 1) 名称：財団法人 日本食品分析センター
 - 2) 住所：〒151-0062 東京都渋谷区元代々木町52番1号
 - 3) 代表者：[REDACTED]
7. 試験施設：
 - 1) 名称：財団法人 日本食品分析センター 多摩研究所
 - 2) 住所：〒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)
 - 3) 運営管理者：[REDACTED](多摩研究所長)

8. 試験責任者

所 属：環境科学部
氏 名：[REDACTED]

9. 分析担当責任者

所 属：応用試験部 農業試験課
氏 名：[REDACTED]

10. 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 農業試験課
氏 名：[REDACTED] , [REDACTED] , [REDACTED]

11. 試験日程

試験開始日：2002年12月20日

実験開始日：2003年2月21日

実験終了日：2003年2月24日

試験終了日：2003年3月31日

12. 記録及び資料の保管


試験に関する下記の記録及び試資料は、1)については最終報告書作成後10年間または品質低下を起こさずに保存し得る期間のいずれか短い方の期間、2)から5)については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) 被験物質
- 2) 試験計画書
- 3) 生データ及び最終報告書
- 4) 信頼性保証部門の検閲記録
- 5) その他必要なもの

13. 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

氏 名：  2003 年 3 月 31 日 承認

目次

	頁
要 旨	7
1 被験物質	9
1.1 名称, 構造式及び物理化学的性状	9
1.2 供試試料	9
1.3 保管方法及び保管条件下での安定性	10
2 供試生物	10
3 試験方法	10
3.1 試験条件.....	10
3.2 培地	11
3.3 試験容器, 藻類培養試験装置及び機器	11
3.4 試験濃度の設定	11
3.5 試験液の調製	11
3.6 試験液の分析	11
3.7 試験操作	12
4 結果の算出	12
4.1 生長曲線	12
4.2 生長阻害率の算出	12
4.3 結果の算出に用いた試験濃度の決定	13
4.4 50 %生長阻害濃度 (EC_{50}) の算出	13
4.5 最大無作用濃度 (NOEC)	13
4.6 統計的手法.....	14
5 結果及び考察	14
5.1 試験液中の被験物質濃度	14
5.2 試験液の状態	14
5.3 生長曲線	14
5.4 50 %生長阻害濃度 (EC_{50})	14
5.5 最大無作用濃度 (NOEC)	15
5.6 供試生物の観察された影響	15
5.7 試験液の水温及び pH	15
5.8 試験計画書からの逸脱事項.....	15
5.9 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	15
5.10 試験の妥当性	15
5.11 結果の評価と考察.....	16

Table 1～7	17～21
Figure 1～4	22～23
付属資料-1 OECD 培地	24
付属資料-2 予備試験結果	25
付属資料-3 検討試験結果	26～27
付属資料-4 統計処理データ	28～33
付属資料-5 試験液中の被験物質濃度の分析方法	34～41

要 旨

試験委託者

環境省

表 題

エチレンジアミン四酢酸の藻類(*Selenastrum capricornutum*)に対する生長阻害試験

試験番号

第14011号

試験方法

OECD 化学品テストガイドライン No. 201「藻類生長阻害試験」(1984年)に準拠

- 1) 被験物質：エチレンジアミン四酢酸
- 2) 暴露方式：振とう培養(100 r/min)，開放系(通気性シリコン栓)
- 3) 供試生物：*Selenastrum capricornutum*
- 4) 暴露期間：72 時間
- 5) 試験濃度(設定値)：
対照区，0.010，0.032，0.10，0.32，1.0，3.2，10，32 及び 100 mg/l
公比；3.2
- 6) 試験液量：100 ml/容器
- 7) 連 数：3 容器/1 試験区
- 8) 初期細胞濃度： 1×10^4 cells/ml
- 9) 試験温度：22.1～22.5 °C
- 10) 照 明：フラスコ液面付近で 4,100～4,200 lx.(連続照明)
- 11) pH : 4.4～8.0(試験液の pH 調整は行わなかった。)
- 12) 培 地：OECD 化学品テストガイドラインに示されている培地
- 13) 分 析 法：ガスクロマトグラフィー質量分析法

結 果

本試験で用いた OECD 培地にはエチレンジアミン四酢酸二ナトリウム二水和物が含まれているため、培地よりエチレンジアミン四酢酸を除いた改変培地による検討試験を行ったが、通常の培地と比較して著しく生長が阻害される場合があった。よって、本試験では通常の OECD 培地を使用した。最低試験濃度区付近では暴露濃度としての被験物質に対する培地中の成分量の割合が高いため、本試験では測定値を用いて結果を算出することができなかった。よって、以下の値は設定濃度を基に示した。

1) 50 %生長阻害濃度 (EC_{50})

面積法

E_bC_{50} (0-72) : 1.1 mg/l (95 %信頼区間 ; 1.0 ~ 1.2 mg/l) 直線回帰分析法により算出した。

速度法

E_rC_{50} (24-48) : 4.1 mg/l (95 %信頼区間 ; 3.7 ~ 4.5 mg/l) 直線回帰分析法により算出した。

E_rC_{50} (24-72) : 3.3 mg/l (95 %信頼区間 ; 3.1 ~ 3.6 mg/l) 直線回帰分析法により算出した。

2) 最大無作用濃度 (NOEC)

面積法

NOEC_b (0-72) : 0.10 mg/l (Dunnett の多重比較法により算出した。)

速度法

NOEC_r (24-48) : 1.0 mg/l (Dunnett の多重比較法により算出した。)

NOEC_r (24-72) : 0.32 mg/l (Dunnett の多重比較法により算出した。)

1 被験物質

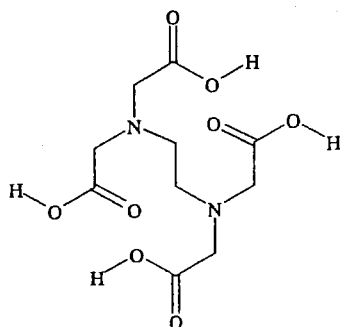
1.1 名称, 構造式及び物理化学的性状

名 称: エチレンジアミン四酢酸

別 名: EDTA, エデト酸¹⁾

CAS No.: 60-00-4

構造式:



分子式: $C_{10}H_{16}N_2O_8$

分子量: 292.25¹⁾

沸点: —

融点: 240 °C (分解)³⁾

水溶解度: 0.51 g/l¹⁾, 0.50 g/l²⁾

比重: 1.651 (25/4 °C)¹⁾

pKa: 1.5, 2.0, 2.68, 6.11, 10.17¹⁾

logPow: -1.97 (計算値)¹⁾

蒸気圧: <1.33 Pa (<0.01 mmHg)¹⁾

均一性: 同一ロットのものを使用した。

安定性: 通常の使用においては安定であるが, 240 °C 以上に加熱すると分解する³⁾。

生分解性: 難分解¹⁾

その他: 重金属イオンと強固な溶解性錯塩を形成する¹⁾。

出典: 1) 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” (1997)

2) Merck & Co., Inc., “The Merck Index”, 11th Ed. (1989)

3) [REDACTED]: “製品安全データシート” (1993)

1.2 供試試料

純 度: 99.9 %

ロット番号: 408C2281

供 給 者: [REDACTED]

供 給 量: 25 g×4本

入 手 日: 2002年12月5日

外 観: 白色結晶, 無臭

1.3 保管方法及び保管条件下での安定性

1) 保管方法

被験物質は当センターの被験物質保管庫(冷蔵庫)に保管した。

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分光光度計により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、試験開始前のスペクトルと変化が認められないことを確認した。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。

2 供試生物

1) 学 名 : *Selenastrum capricornutum*

(現在の学名は *Pseudokirchneriella subcapitata* に変更されている。)

2) 株 番 号 : ATCC22662 株

3) 入 手 等 : American Type Culture Collection より入手(2000 年 9 月 7 日)したものを、当センターにおいて無菌的に継代培養した種である。使用藻類は 6 ヶ月毎に細菌検査を行い、無菌性が確認されたものを使用した。

4) 基準物質による検定の結果 : 基準物質(重クロム酸カリウム, 試薬特級)による 72 時間の 50 % 生長阻害濃度 E_0C_{50} は 0.53 mg/l (2003 年 2 月 7 日)であった。当センターにおける 2000 年 11 月以降の E_0C_{50} 値のバックグラウンドデータ (0.70 ± 0.10 mg/l) と比較した結果、供試生物の感受性は、やや高い状態にあると判断した。

5) 前 培 養 : 試験に供する藻類は試験条件と同じ条件で暴露開始前に 3 日間培養(2003 年 2 月 18 日～2 月 21 日)したものを使用した。前培養終了時に、変形や異常な細胞の出現が無いことを確認した。

なお、前培養終了時の細胞濃度は 343.10×10^4 cells/ml であり、対数増殖期にあると判断した。

3 試験方法

3.1 試験条件

- 1) 暴露方式 : 振とう培養(100 r/min), 開放系(通気性シリコン栓)
- 2) 暴露期間 : 72 時間
- 3) 試験液量 : 100 ml/容器
- 4) 連 数 : 3 容器/1 試験区
- 5) 初期細胞濃度 : 1×10^4 cells/ml
- 6) 試験温度 : 22.1～22.5 °C
- 7) 照 明 : フラスコ液面付近で 4,100～4,200 lx. (連続照明)
- 8) pH : 4.4～8.0 (試験液の pH 調整は行わなかった。)

3.2 培地

前培養及び試験ともにOECD化学品テストガイドラインに示されている培地を用いた。
培地は滅菌したものを使用した。

培地の成分表を付属資料-1に示した。

3.3 試験容器、藻類培養試験装置及び機器

- 1) 試験容器：500 ml 容ガラス製三角フラスコ [株式会社 前田製作所] (容器のサイズ；底面の内径 約10 cm×高さ 約17 cm。試験容器には通気性のシリコン栓をした。)
- 2) 藻類培養試験装置：照射式恒温振とう機 TA-60RL [高崎科学器械株式会社]
- 3) 光学顕微鏡：CK2 [オリンパス光学工業株式会社]
- 4) 粒子計数装置：コールターZ1 [ベックマン・コールター株式会社]
- 5) 粒子計数装置用電解液：ISOTON II [ベックマン・コールター株式会社]
- 6) 血球計算盤：THOMA [エルマ販売株式会社]
- 7) pH 計：HM-14P [東亜ディーケーケー株式会社]
- 8) 温度計：AP-210E [安立計器株式会社]
- 9) 照度計：NT-1332 [N. T. コーポレーション]

3.4 試験濃度の設定

予備試験において、100 mg/lの濃度区では藻類の生長が99 %阻害(I_p)され、0.010 mg/lの濃度区で藻類の生長阻害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3.2で9濃度区(0.010, 0.032, 0.10, 0.32, 1.0, 3.2, 10, 32及び100 mg/l)設定した。

なお、予備試験の結果は付属資料-2に示した。

3.5 試験液の調製

試験液調製時の培地は、調製前に恒温槽内で 23 ± 2 °Cにした。

被験物質を超音波処理により培地に溶解させ被験物質原液(100 mg/l)を調製した。この原液を培地を用いて希釈し、被験物質溶液(10及び1.0 mg/l)を調製した。

これらの原液及び溶液を培地に添加して各濃度区の試験液を調製した。

対照区には、培地のみの無処理の対照区を設けた。

なお、被験物質は純度が99.9 %と高純度であったため、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。

3.6 試験液の分析

試験液中の被験物質濃度の分析は、ガスクロマトグラフィー質量分析計を用いて、全試験区について、暴露開始時(0時間)及び終了時(暴露開始後72時間)に行った。なお、暴露開始時は分析用及び4連分(pH及び水温測定用を含む。)を同時に調製した容器から試験液を50 ml採取して分析用試験液とした。暴露終了時は各試験区のそれぞれ3連の試験容器

から等量ずつ採取し混合した50 mlを分析用試験液とした。暴露終了時の分析に際しては、採取した試験液を遠心分離により、藻体を除去してから行った。

なお、分析方法は付属資料-5に示した。

3.7 試験操作

前培養した藻類の細胞数を計数し、試験液中の細胞濃度が 1×10^4 cells/mlとなるように、前培養液の一定量を試験液の入った容器に添加した。

各試験容器を 23 ± 2 °C の培養装置に設置し試験を開始した。その後、24、48及び72時間に細胞濃度を測定した。なお、細胞濃度の測定は、粒子計数装置により行った。

試験液中の藻類について、暴露開始後、24、48及び72時間に肉眼による色調観察を、さらに72時間には顕微鏡下での細胞形態観察を行った。

試験液調製時の水温及び pH は3容器とは別の予備1容器について測定し各試験区の暴露開始時の水温及び pH とし、終了時には各試験区の3容器のうち1容器について水温及び pH を測定した。暴露期間中、培養装置内の温度、照度を1日1回測定した。

なお、暴露期間中の試験液についてはその状態(外観等)を観察し、記録した。

4 結果の算出

4.1 生長曲線

試験区及び対照区の細胞濃度の平均値を時間に対してプロットし生長曲線を作成した。

4.2 生長阻害率の算出

次に下記の方法(面積法及び速度法)で生長阻害率を算出した。

1) 生長曲線下の面積の比較(面積法)による生長阻害率(I_A)

生長曲線下の面積は次の式により算出した。

$$A = \frac{N_1 - N_0}{2} \times t_1 + \frac{N_1 + N_2 - 2N_0}{2} \times (t_2 - t_1) + \dots + \frac{N_{n-1} + N_n - 2N_0}{2} \times (t_n - t_{n-1})$$

ここで、

A : 生長曲線下の面積

N_0 : 暴露開始時の設定細胞濃度(cells/ml)

N_1 : t_1 時の実測細胞濃度(cells/ml)

N_n : t_n 時の実測細胞濃度(cells/ml)

t_1 : 暴露開始後最初に細胞濃度を測定した時間

t_n : 暴露開始後n回目に細胞濃度を測定した時間

生長曲線下の面積より各試験区における生長の阻害百分率(I_A)を次の式により算出した。

$$I_A = \frac{A_c - A_t}{A_c} \times 100$$

ここで,

A_c : 対照区の生長曲線下の面積

A_i : 各試験区における生長曲線下の面積

2) 生長速度の比較(速度法)による生長阻害率(I_m)

指数増殖している培養での細胞濃度の平均値から平均の生長速度(μ)を次の式より算出した。

$$\mu = \frac{\ln N_n - \ln N_1}{t_n - t_1}$$

ここで,

N_1 : t_1 時の実測細胞濃度(cells/ml)

N_n : t_n 時の実測細胞濃度(cells/ml)

t_1 : 暴露開始後最初に細胞濃度を測定した時間

t_n : 暴露開始後n回目に細胞濃度を測定した時間

平均の生長速度(μ)より各試験区における平均生長速度の低下百分率を次の式により算出した。

$$I_m = \frac{\mu_c - \mu_i}{\mu_c} \times 100$$

ここで,

μ_c : 対照区の平均生長速度

μ_i : 各試験区における平均生長速度

4.3 結果の算出に用いた試験濃度の決定

試験に用いた培地に被験物質と同様の成分が含まれており、測定値をそのまま用いて結果の算出は行えなかったため、結果の算出に用いた試験濃度は設定値とした。

4.4 50 %生長阻害濃度(EC_{50})の算出

4.2で算出した面積法及び速度法による生長阻害率(I_m 値及び I_m 値)を用いて50 %生長阻害濃度(EC_{50})を算出した。

各試験区に対応する阻害率を片対数紙にプロットし、直線性の認められる点を用いて直線回帰分析(最小二乗法)を行い、阻害率50 %との交点から EC_{50} 値を算出した。同時に、その95 %信頼区間を算出した。その際、面積法により求めた場合は $E_b C_{50}$ (0-72)、速度法により求めた場合は $E_r C_{50}$ (24-48)または $E_r C_{50}$ (24-72)と記載した。

4.5 最大無作用濃度(NOEC)

Dunnettの多重比較検定(片側、有意水準: $\alpha=0.05$)により対照区と比較して有意差が認められない最高試験濃度を最大無作用濃度(NOEC)とした。その際、面積法により求めた場合は $NOEC_b$ (0-72)、速度法により求めた場合は $NOEC_r$ (24-48)または $NOEC_r$ (24-72)と記載した。

4.6 統計的手法

本試験結果に使用した統計ソフトを以下に示した。また、統計ソフトの入力値とその出力結果を付属資料-4に示した。

Yukms 統計ライブラリー 生物検定編(ユックムス株式会社)

5 結果及び考察

5.1 試験液中の被験物質濃度

暴露開始時及び終了時(72 時間後)に試験液中の被験物質濃度を測定し、その結果を Table 1 に示した。

暴露開始時及び終了時(72 時間後)の試験液中の測定濃度は、それぞれ 0.08~88.5 mg/l, 0.05~91.5 mg/l (設定濃度: 0.010~100 mg/l)であり、対照区の測定値を差し引くと、それぞれ、0.00~88.4 mg/l, 0.01~91.5 mg/l であった。各濃度区の測定値から対照区を差し引いた値の設定濃度に対する割合は、暴露開始時 88~105 %, 暴露終了時(72 時間後)が 92~125 %であった。ただし、開始時の 0.010 mg/l 濃度区においては、対照区の測定値の設定濃度に対する割合が大きかったため、算出は行わなかった。

本試験で用いた OECD 培地にはエチレンジアミン四酢酸二ナトリウム二水和物が含まれているため、培地よりエチレンジアミン四酢酸を除いた改変培地による検討試験を行ったが、通常の培地と比較して著しく生長が阻害される場合があった。よって、本試験では通常の OECD 培地を使用した。最低試験濃度区付近では暴露濃度としての被験物質に対する培地中の成分量の割合が高いため、本試験では測定値を用いて結果を算出することができなかった。よって、以下の値(50 %生長阻害濃度及び最大無作用濃度)は設定濃度を基に示した。

5.2 試験液の状態

暴露開始時の試験液は無色透明であった。また、72 時間後の試験液は、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。

5.3 生長曲線

暴露期間中の細胞濃度を Table 2 及び生長曲線を Figure 1 に示した。

72 時間後の平均細胞濃度は 0.010 mg/l で 201.60×10^4 cells/ml, 0.032 mg/l で 206.00×10^4 cells/ml, 0.10 mg/l で 193.60×10^4 cells/ml, 0.32 mg/l で 180.53×10^4 cells/ml, 1.0 mg/l で 105.49×10^4 cells/ml, 3.2 mg/l で 21.53×10^4 cells/ml, 10 mg/l で 5.95×10^4 cells/ml, 32 mg/l で 3.61×10^4 cells/ml 及び 100 mg/l で 1.13×10^4 cells/ml であった。

なお、対照区では 199.73×10^4 cells/ml であった。

5.4 50 %生長阻害濃度(EC_{50})

各時間における生長阻害率を Table 3 に、50 %生長阻害濃度(EC_{50})を Table 4 に示した。また、濃度-阻害率のグラフを Figure 2~4 に示した。

以上のことから、以下の結果を得た。

面積法

$E_bC_{50}(0-72)$: 1.1 mg/l (95 %信頼区間 ; 1.0~1.2 mg/l)

直線回帰分析法により算出した。

速度法

$E_rC_{50}(24-48)$: 4.1 mg/l (95 %信頼区間 ; 3.7~4.5 mg/l)

直線回帰分析法により算出した。

$E_rC_{50}(24-72)$: 3.3 mg/l (95 %信頼区間 ; 3.1~3.6 mg/l)

直線回帰分析法により算出した。

5.5 最大無作用濃度 (NOEC)

最大無作用濃度 (NOEC) を Table 5 及び以下に示した。

面積法

NOECb (0-72) : 0.10 mg/l (Dunnett の多重比較法により算出した。)

速度法

NOECr (24-48) : 1.0 mg/l (Dunnett の多重比較法により算出した。)

NOECr (24-72) : 0.32 mg/l (Dunnett の多重比較法により算出した。)

5.6 供試生物の観察された影響

肉眼による色調観察及び顕微鏡下での細胞形態観察の結果、全試験区において色調の異常、細胞の変形及び異常な細胞の出現は観察されなかった。

5.7 試験液の水温及び pH

試験液の水温を Table 6, pH を Table 7 に示した。

暴露期間中の各試験区の水温は 22.1~22.5℃, pH は 4.4~8.0 であり、水温は 23 ± 2 ℃ の範囲で試験環境条件を満たしていた。

5.8 試験計画書からの逸脱事項

なし。

5.9 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。

5.10 試験の妥当性

対照区の暴露開始 72 時間後の平均細胞濃度は、 199.73×10^4 cells/ml であり、暴露開始時の細胞濃度の 16 倍以上に増加したため、本試験の成立が確認された。

5.11 結果の評価と考察

試験液中の被験物質濃度の分析結果から、被験物質濃度は一定に保たれていたことが確認された。よって、暴露期間中の藻類は、ほぼ設定濃度通りの被験物質に連続的に暴露されていたと判断した。

本試験に使用する培地中に被験物質と同様の成分が含まれていたため、エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム二水和物(以下、「 Na_2EDTA 」と略す。)を成分から除いた改変培地による検討試験(付属資料-3)を行ったが、正常な生長が認められない場合があり、 Na_2EDTA を添加しないことにより培地中の金属イオンが不安定となったためと考えた。よって、この改変培地は試験培地として適切ではないと考えられた。従って、本試験においては通常の OECD 培地を使用して試験を実施した。しかし、最低試験濃度区付近では被験物質としての暴露濃度に対する成分量の占める割合が高いことから、本試験では測定値を用いた算出はできなかった。結果の算出には設定濃度を用いたため、結果の解釈に注意が必要であると考えられた。

なお、本試験では 100 mg/l の濃度区において、pH が 4.6 であったことから、pH による影響を調べるために、pH を対照区と同等の値に調整し、検討試験を行った(付属資料-3)。また、本被験物質は水中の金属イオンと錯体を形成する性質を有しており、培地中の硬度成分や必須微量元素との反応により、藻類への取り込みが促進または阻害された可能性があり、これらが試験結果に影響を与える可能性が示唆された。そのため、硬度を 150 mg/l に調整した培地を用いて検討試験を行った(付属資料-3)。その結果、どちらの検討においても 1.0 mg/l 濃度区で阻害率が低くなる結果となった。このことから、pH の調整に使用した水酸化ナトリウムや硬度成分の添加により、増殖が促進し、見かけ上低毒性となったか、または被験物質が低毒性の物質に変化したためと推察した。よって、本試験結果は、被験物質そのものによる直接的な影響を評価した結果では無い可能性があると考えられた。しかし、自然環境中に流出した場合、多くの場合環境水中において錯体となりうる可能性が示唆されるが金属イオンの存在の多少により、生物への影響が変化する可能性が考えられた。

Table 1. Measured Concentration of the Test Substance in the Test Water

Nominal Concentration (mg/l)	Measured Concentration (mg/l) *			
	0 Hour	Percent of Nominal	72 Hours	Percent of Nominal
Control	0.08	—	0.04	—
0.010	0.08	—	0.05	—
	(0.00)		(0.01)	
0.032	0.11	—	0.08	—
	(0.03)	(94)	(0.04)	(125)
0.10	0.17	—	0.13	—
	(0.09)	(90)	(0.09)	(90)
0.32	0.38	119	0.34	106
	(0.30)	(94)	(0.30)	(94)
1.0	1.07	107	1.01	101
	(0.99)	(99)	(0.97)	(97)
3.2	3.44	108	3.55	111
	(3.36)	(105)	(3.51)	(110)
10	9.02	90	9.81	98
	(8.94)	(89)	(9.77)	(98)
32	31.7	99	30.4	95
	(31.6)	(99)	(30.4)	(95)
100	88.5	89	91.5	92
	(88.4)	(88)	(91.5)	(92)

* : Because the test substance was contained in the medium as Disodium Dihydrogen Ethylenediamine Tetraacetate Dihydrate, it was detected in the control. The measured concentrations in each test water were corrected by deducting that in the control, and these values were shown in parentheses.

Table 2. Cells Densities of *Selenastrum capricornutum* during the 72-Hour Exposure

Nominal Concentration (mg/l)	No.	Cells Densities ($\times 10^4$ cells/ml)			
		0 Hour	24 Hours	48 Hours	72 Hours
control	1	1.0	6.34	37.99	204.40
	2	1.0	6.89	43.25	202.40
	3	1.0	6.30	37.33	192.40
	Average	1.0	6.51	39.52	199.73
	SD	0.0	0.33	3.24	6.43
0.010	1	1.0	6.11	35.44	202.50
	2	1.0	6.27	38.09	211.20
	3	1.0	6.69	37.42	191.10
	Average	1.0	6.36	36.98	201.60
	SD	0.0	0.30	1.38	10.08
0.032	1	1.0	5.28	36.51	201.50
	2	1.0	5.79	36.87	223.70
	3	1.0	6.05	33.01	192.80
	Average	1.0	5.71	35.46	206.00
	SD	0.0	0.39	2.13	15.93
0.10	1	1.0	5.95	35.41	190.50
	2	1.0	5.72	31.58	199.40
	3	1.0	5.97	34.96	190.90
	Average	1.0	5.88	33.98	193.60
	SD	0.0	0.14	2.09	5.03
0.32	1	1.0	5.42	30.17	176.60
	2	1.0	5.44	34.27	171.20
	3	1.0	5.17	32.67	193.80
	Average	1.0	5.34	32.37	180.53
	SD	0.0	0.15	2.07	11.80
1.0	1	1.0	4.86	26.95	92.66
	2	1.0	5.03	26.56	110.70
	3	1.0	5.08	25.83	113.10
	Average	1.0	4.99	26.45	105.49
	SD	0.0	0.12	0.57	11.17
3.2	1	1.0	3.92	11.16	21.33
	2	1.0	3.79	11.96	21.42
	3	1.0	3.99	11.53	21.85
	Average	1.0	3.90	11.55	21.53
	SD	0.0	0.10	0.40	0.28
10	1	1.0	3.13	4.17	4.36
	2	1.0	3.29	5.28	5.80
	3	1.0	3.89	5.64	7.69
	Average	1.0	3.44	5.03	5.95
	SD	0.0	0.40	0.77	1.67
32	1	1.0	3.28	3.34	3.61
	2	1.0	2.76	3.33	3.79
	3	1.0	2.90	3.30	3.43
	Average	1.0	2.98	3.32	3.61
	SD	0.0	0.27	0.02	0.18
100	1	1.0	1.60	1.45	1.10
	2	1.0	1.72	1.07	1.18
	3	1.0	1.57	1.35	1.11
	Average	1.0	1.63	1.29	1.13
	SD	0.0	0.08	0.20	0.04

SD = Standard deviation

Table 3. Percentage Inhibition of *Selenastrum capricornutum*

Nominal Concentration (mg/l)	No.	Area Under the Growth Curves		Growth Rate			
		Area A(0-72hr)	Inhibition (%) $I_A(0-72hr)$	Rate $\mu(24-48hr)$	Inhibition (%) $I_\mu(24-48hr)$	Rate $\mu(24-72hr)$	Inhibition (%) $I_\mu(24-72hr)$
Control	1	34,567,200	—	0.074602	—	0.072358	—
	2	35,721,600	—	0.076539	—	0.070420	—
	3	32,959,200	—	0.074135	—	0.071230	—
	Average	34,416,000	—	0.075092	—	0.071336	—
	SD	1,387,393	—	0.001275	—	0.000973	—
0.010	1	33,672,000	2.16	0.073246	2.46	0.072934	-2.24
	2	35,390,400	-2.83	0.075174	-0.11	0.073271	-2.71
	3	32,918,400	4.35	0.071733	4.47	0.069837	2.10
	Average	33,993,600	1.23	0.073384	2.27	0.072014	-0.95
	SD	1,266,991	3.68	0.001725	2.30	0.001893	2.65
0.032	1	33,609,600	2.34	0.080569	-7.29	0.075872	-6.36
	2	36,482,400	-6.00	0.077136	-2.72	0.076129	-6.72
	3	31,910,400	7.28	0.070698	5.85	0.072117	-1.09
	Average	34,000,800	1.21	0.076134	-1.39	0.074706	-4.72
	SD	2,310,968	6.71	0.005011	6.67	0.002246	3.15
0.10	1	32,186,400	6.48	0.074317	1.03	0.072214	-1.23
	2	32,280,000	6.21	0.071190	5.20	0.073986	-3.71
	3	32,131,200	6.64	0.073644	1.93	0.072188	-1.19
	Average	32,199,200	6.44	0.073050	2.72	0.072796	-2.04
	SD	75,221	0.22	0.001646	2.19	0.001031	1.44
0.32	1	29,133,600	15.35	0.071531	4.74	0.072579	-1.74
	2	29,474,400	14.36	0.076687	-2.12	0.071855	-0.73
	3	31,737,600	7.78	0.076816	-2.30	0.075499	-5.84
	Average	30,115,200	12.50**	0.075011	0.11	0.073311	-2.77
	SD	1,415,335	4.11	0.003015	4.01	0.001929	2.71
1.0	1	18,153,600	47.25	0.071373	4.95	0.061415	13.91
	2	20,265,600	41.12	0.069333	7.67	0.064404	9.72
	3	20,390,400	40.75	0.067759	9.77	0.064645	9.38
	Average	19,603,200	43.04**	0.069488	7.46	0.063488	11.00**
	SD	1,256,940	3.65	0.001812	2.42	0.001799	2.52
3.2	1	5,578,800	83.79	0.043594	41.95	0.035292	50.53
	2	5,750,400	83.29	0.047883	36.23	0.036082	49.42
	3	5,746,800	83.30	0.044215	41.12	0.035425	50.34
	Average	5,692,000	83.46**	0.045231	39.77**	0.035600	50.10**
	SD	98,051	0.29	0.002318	3.09	0.000423	0.59
10	1	1,675,200	95.13	0.011953	84.08	0.006905	90.32
	2	2,152,800	93.74	0.019710	73.75	0.011812	83.44
	3	2,610,000	92.42	0.015478	79.39	0.014198	80.10
	Average	2,146,000	93.76**	0.015714	79.07**	0.010972	84.62**
	SD	467,437	1.36	0.003884	5.17	0.003718	5.21
32	1	1,422,000	95.87	0.000755	98.99	0.001997	97.20
	2	1,316,400	96.18	0.007823	89.58	0.006607	90.74
	3	1,299,600	96.22	0.005384	92.83	0.003497	95.10
	Average	1,346,000	96.09**	0.004654	93.80**	0.004034	94.35**
	SD	66,352	0.19	0.003590	4.78	0.002351	3.30
100	1	264,000	99.23	-0.004102	105.46	-0.007806	110.94
	2	211,200	99.39	-0.019778	126.34	-0.007850	111.00
	3	234,000	99.32	-0.006290	108.38	-0.007223	110.13
	Average	236,400	99.31**	-0.010057	113.39**	-0.007626	110.69**
	SD	26,482	0.08	0.008490	11.31	0.000350	0.49

SD = Standard deviation

* $\alpha=0.05$ (significant difference)

** $\alpha=0.01$ (significant difference)

Table 4. Calculated EC₅₀ Values

Based on I _A (0-72hr) value(Areas under the growth curves)		
EbC ₅₀ (0-72) (mg/l)	95-Percent Confidence Limits (mg/l)	Statistical Method
1.1	1.0~1.2	Simple regression
Based on I _B (24-48hr) value(Growth Rates)		
ErC ₅₀ (24-48) (mg/l)	95-Percent Confidence Limits (mg/l)	Statistical Method
4.1	3.7~4.5	Simple regression
Based on I _B (24-72hr) value(Growth Rates)		
ErC ₅₀ (24-72) (mg/l)	95-Percent Confidence Limits (mg/l)	Statistical Method
3.3	3.1~3.6	Simple regression

Table 5. Calculated NOEC

Based on I _A (0-72hr) value(Areas under the growth curves)	
NOECb(0-72) (mg/l)	Statistical Method
0.10	Dunnett's multicomparison test
Based on I _B (24-48hr) value(Growth Rates)	
NOECr(24-48) (mg/l)	Statistical Method
1.0	Dunnett's multicomparison test
Based on I _B (24-72hr) value(Growth Rates)	
NOECr(24-72) (mg/l)	Statistical Method
0.32	Dunnett's multicomparison test

Table 6. Temperature

Nominal Concentration (mg/l)	Temperature(℃)	
	0 Hour	72 Hours
Control	22.5	22.3
0.010	22.4	22.3
0.032	22.3	22.2
0.10	22.4	22.2
0.32	22.5	22.2
1.0	22.4	22.2
3.2	22.5	22.2
10	22.4	22.1
32	22.4	22.4
100	22.4	22.4

Table 7. pH Values

Nominal Concentration (mg/l)	pH	
	0 Hour	72 Hours
Control	8.0	7.2
0.010	7.9	7.6
0.032	8.0	7.6
0.10	8.0	7.6
0.32	7.9	7.6
1.0	7.9	7.7
3.2	7.7	7.7
10	7.4	7.8
32	6.7	7.7
100	4.4	4.6

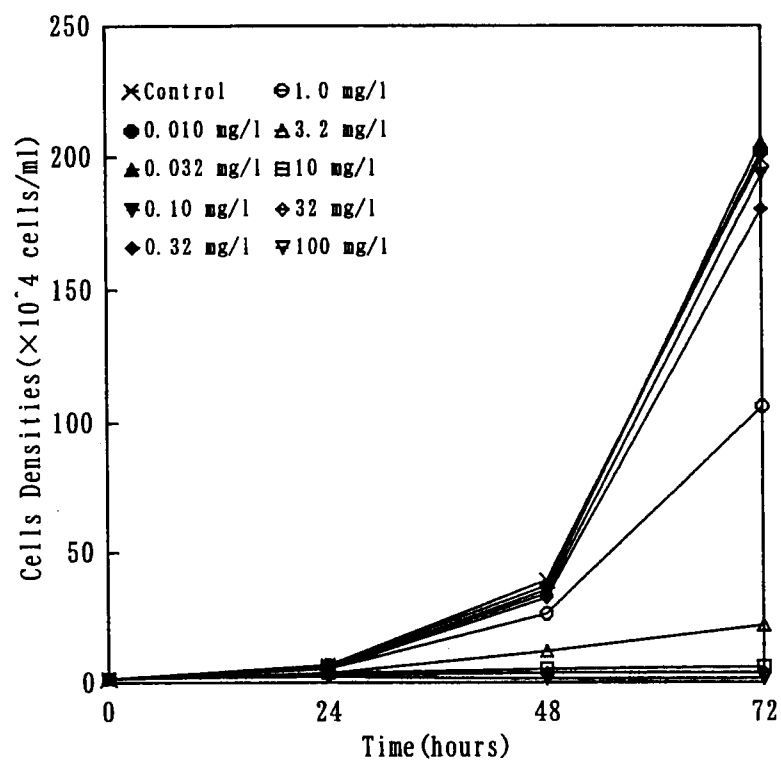


Figure 1. Algal Growth Curve of *Selenastrum capricornutum*
(Mean Cell Densities vs time during the 72-hour exposure)

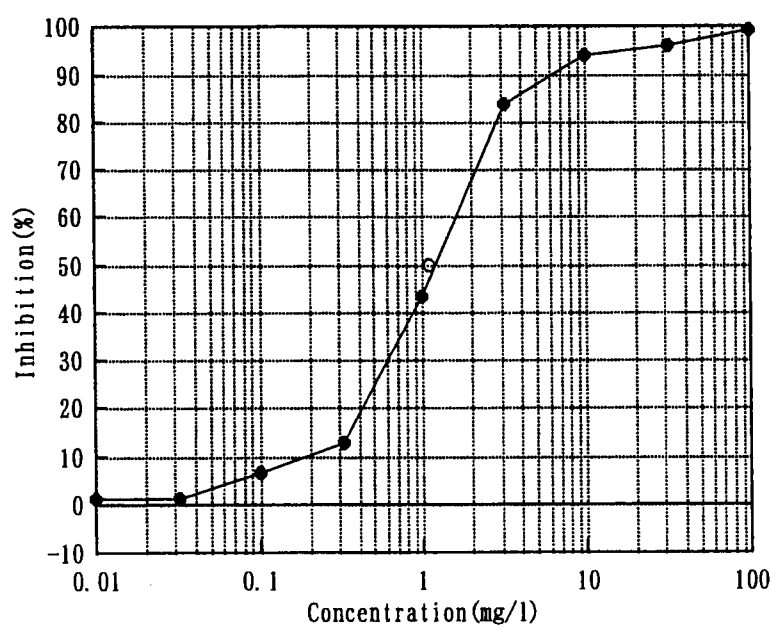


Figure 2. Concentration-Inhibition Curve Based on I_A Values Calculated from the Area
under the Growth Curves

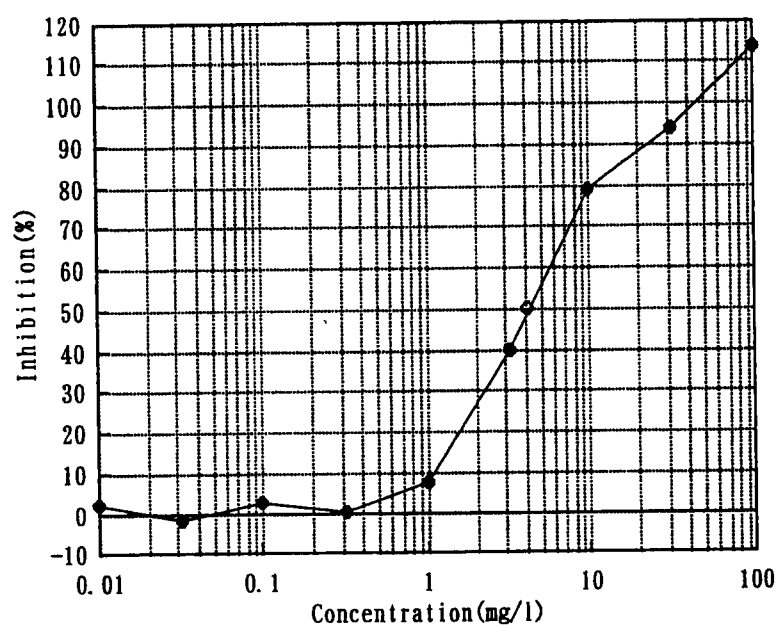


Figure 3. Concentration-Inhibition Curve Based on I_{50} Values Calculated from the Growth Rates (24-48)

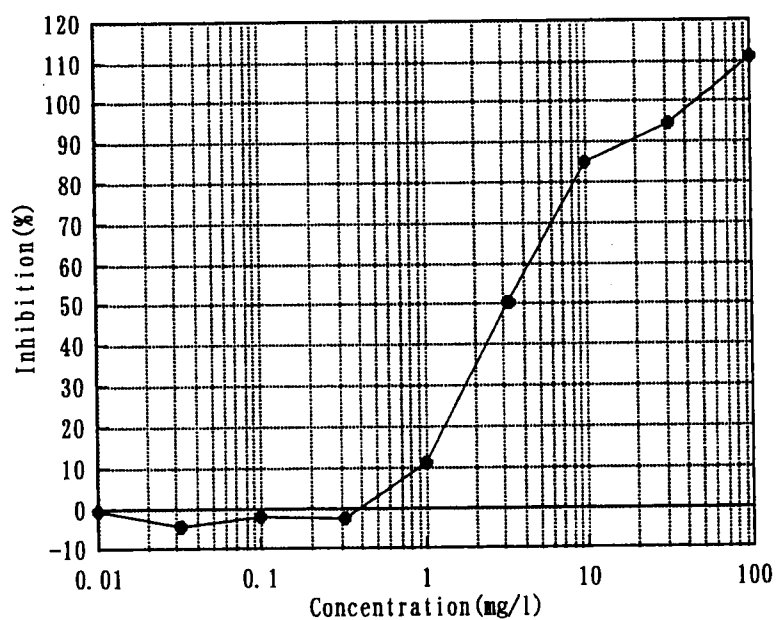


Figure 4. Concentration-Inhibition Curve Based on I_{50} Values Calculated from the Growth Rates (24-72)

付属資料-1 : OECD 培地

Table 1. OECD medium

Nutrient salts	Concentration(mg/l)
NH_4Cl	15
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	12
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	18
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	15
KH_2PO_4	1.6
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.08
$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.1
H_3BO_3	0.185
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.415
ZnCl_2	0.003
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.0015
$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.00001
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.007
NaHCO_3	50

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. Cells Densities and Percentage Inhibition of *Selenastrum capricornutum*
(Range finding test-1)

Nominal Concentration (mg/l)	Cells Densities*($\times 10^4$ cells/ml)				Area under the growth curves Inhibition (%) $I_A(0-72hr)$
	0 Hour	24 Hours	48 Hours	72 Hours	
1.0	1.0	4.57	18.48	76.29	34.9
10	1.0	3.50	5.01	5.66	90.2
100	1.0	1.43	1.39	1.43	98.9
Control	1.0	5.11	25.44	124.17	—

*: Base for the data were the values standardized on the cells densities of each of the three parallels.

Table 2. Cells Densities and Percentage Inhibition of *Selenastrum capricornutum*
(Range finding test-2)

Nominal Concentration (mg/l)	Cells Densities*($\times 10^4$ cells/ml)				Area under the growth curves Inhibition (%) $I_A(0-72hr)$
	0 Hour	24 Hours	48 Hours	72 Hours	
0.0010	1.0	6.42	30.15	199.97	-10.2
0.010	1.0	5.65	36.37	227.37	-25.9
32	1.0	3.00	4.32	4.73	94.1
Control	1.0	5.63	32.27	172.60	—

*: Base for the data were the values standardized on the cells densities of each of the three parallels.

付属資料-3：検討試験結果

エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム二水和物を成分から除いた改変培地による検討試験を3回行い、その結果を Table. 1, 被験物質原液の pH を約 8.0 に調整して行った検討試験を Table 2 及び OECD 培地を硬度 150 mg/l (CaCO₃ として) に改変した培地による検討試験を Table 3 に示した。

Table 1. Cells Densities of *Selenastrum capricornutum*

(Test in modified medium without Na₂EDTA·2H₂O)

Test number	Cells Densities* (×10 ⁴ cells/ml)			
	0 Hour	24 Hours	48 Hours	72 Hours
1	1.0	3.20	11.02	21.93
2	1.0	4.90	30.06	113.87
3	1.0	4.48	35.49	201.97
Control**	1.0	4.81	38.74	208.37

*: Base for the data were the values standardized on the cells densities of each of the three parallels.

** : OECD medium [EDTA·2Na(+)]

Table 2. Cells Densities and Percentage Inhibition of *Selenastrum capricornutum*

(Test in adjustment of pH approximately 8.0 to the stock solution)

Nominal Concentration (mg/l)	Cells Densities* (×10 ⁴ cells/ml)				Area under the growth curves
	0 Hour	24 Hours	48 Hours	72 Hours	Inhibition (%) I _A (0-72hr)
0.010	1.0	3.55	21.94	119.90	2.37
1.0	1.0	3.73	21.84	111.70	7.10
100	1.0	1.90	2.14	2.34	96.81
Control	1.0	3.45	23.15	121.70	—

*: Base for the data were the values standardized on the cells densities of each of the three parallels.

Table 3. Cells Densities and Percentage Inhibition of *Selenastrum capricornutum*
(Test modified with a hardness of approximately 150 mg/l as CaCO₃)

Nominal Concentration (mg/l)	Cells Densities*(×10 ⁴ cells/ml)				Area under the growth curves
	0 Hour	24 Hours	48 Hours	72 Hours	Inhibition (%) I _A (0-72hr)
0.010	1.0	6.59	36.57	197.50	4.00
1.0	1.0	6.73	35.84	204.60	1.96
100	1.0	1.41	1.35	1.33	99.36
Control	1.0	3.45	23.15	121.70	—

*: Base for the data were the values standardized on the cells densities of each of the three parallels.

付属資料-4：統計処理データ

統計ソフトの入力値とその出力結果を以下に示した。

$E_b C_{50}(0-72)$ [Based on $I_A(0-72hr)$ value (Areas under the growth curves)]

試験番号 第14011号
被験物質名 EDTA
生長曲線下の面積の比較による阻害

L:3
C:4

0.32000	15.35	14.36	7.78
1.00000	47.25	41.12	40.75
3.20000	83.79	83.29	83.30

YUKMS 統計ライブラリー II
COMPARISON OF AREAS UNDER THE GROWTH CURVES
EC50 VALUE

Simple regression type 2			Filename : IA-EC. DAT		
Source	Sum of SQR	df	Mean SQR	F-cal	probability
Reg(first)	7560.6454	1	7560.6454	747.6107	0.00000
Reg(higher)	41.8209	1	41.8209	4.1353	0.08823
Intergroup	7602.4663	2	3801.2331	375.8730	0.00000
Residual	60.6785	6	10.1131		
Total	7663.1448	8			
Source	Sum of SQR	df	Mean SQR	F-cal	probability
Reg	7560.6454	1	7560.6454	516.3401	0.00000
Residual	102.4993	7	14.6428		
Total	7663.1448	8			
a-hat					
b-hat confidence limit and Coefficient of corration					
Lower	Estimate	Upper	Coef. of Correlation		
ahat	40.8643	46.0885	51.3126		r+r: 0.986624
bhat	63.6069	70.9947	78.3826		r : 0.99329
Estimated population mean with common regression coefficient by Fillar 2-side					
input Y	Lower 95 percent	X . value	Upper 95 percent		
confidence limit		confidence limit	g criterion		
50	1.038 /	1.138 /	1.248 /	0.010829	

$E_r C_{50}(24-48)$ [Based on $I_n(24-48hr)$ value (Growth Rates)]

'試験番号 第14011号
'被験物質名 EDTA
'平均生長速度の比較による阻害 (24-48)

L:3

C:4

1.00000	4.95	7.67	9.77
3.20000	41.95	36.23	41.12
10.00000	84.08	73.75	79.39

YUKMS 統計ライブラリー II
COMPARISON OF GROWTH RATES
EC50 VALUE (24-48HR)

Simple regresion type 2			Filename : IM48-EC. DAT		
Source	Sum of SQR	df	Mean SQR	F-cal	probability
Reg(first)	7686. 5517	1	7686. 5517	547. 1400	0. 00000
Reg(higher)	29. 9598	1	29. 9598	2. 1326	0. 19450
Intergroup	7716. 5115	2	3858. 2557	274. 6363	0. 00000
Residual	84. 2916	6	14. 0486		
Total	7800. 8031	8			
Source	Sum of SQR	df	Mean SQR	F-cal	probability
Reg	7686. 5517	1	7686. 5517	470. 9427	0. 00000
Residual	114. 2514	7	16. 3216		
Total	7800. 8031	8			
a-hat					
b-hat confidence limit and Coefficient of corration					
Lower	Estimate	Upper	Coef. of Corration		
ahat	-0. 576201	6. 18651	12. 9492	r+r: 0. 985354	
bhat	63. 7835	71. 5834	79. 3833	r : 0. 99265	
Estimated population mean with common regression coefficient by Fillar 2-side					
input Y	Lower 95 percent	X value	Upper 95 percent		
confidence limit		confidence limit	g criterion		
50	3. 722 /	4. 993 /	4. 528 /	0. 011873	

$E_r C_{50}(24-72)$ [Based on $I_m(24-72hr)$ value (Growth Rates)]

試験番号 第14011号
被験物質名 EDTA
平均生長速度の比較による阻害 (24-72)

L:3

C:4

1. 00000	13. 91	9. 72	9. 38
3. 20000	50. 53	49. 42	50. 34
10. 00000	90. 32	83. 44	80. 10

YUKMS 統計ライブラリー II
COMPARISON OF GROWTH RATES
EC50 VALUE (24-72HR)

Simple regresion type 2					Filename : IM72-EC. DAT
Source	Sum of SQR	df	Mean SQR	F-cal	probability
Reg(first)	8132. 2984	1	8132. 2984	720. 2191	0. 00000
Reg(higher)	7. 2645	1	7. 2645	0. 6434	0. 45308
Intergrout	8139. 5629	2	4069. 7814	360. 4313	0. 00000
Residual	67. 7485	6	11. 2914		
Total	8207. 3114	8			
Source	Sum of SQR	df	Mean SQR	F-cal	probability
Reg	8132. 2984	1	8132. 2984	758. 8830	0. 00000
Residual	75. 0130	7	10. 7161		
Total	8207. 3114	8			
a-hat					
b-hat confidence limit and Coefficient of corration					
Lower	Estimate	Upper	Coef. of Corration		
ahat	6. 15234	11. 6321	17. 1118	r*r:	0. 99086
bhat	67. 3096	73. 6298	79. 9499	r :	0. 99542
Estimated population mean with common regression coefficient by Fillar 2-side					
input Y	Lower 95 percent	X value	Upper 95 percent		
confidence limit		confidence limit	g criterion		
50	3. 023	3. 32	3. 577	0. 007368	

NOECb(0-72) [Based on $I_A(0-72hr)$ value (Areas under the growth curves)]

試験番号 第14011号
被験物質名 EDTA
生長曲線下の面積の比較による阻害

M:1
L:3
C:10

Control	S. Control	0.01	0.032	0.1	0.32	1	3.2	10	32	100
3.456720		3.367200	3.360960	2.218640	2.913360	1.815360	0.657880	0.167520	0.142200	0.026400
3.572160		3.539040	3.648240	3.228000	2.947440	2.826560	0.675040	0.215280	0.131640	0.021120
3.295920		3.291840	3.191040	3.213120	3.173760	2.839840	0.674680	0.261000	0.129960	0.023400

YUKMS 統計ライブラリー I
COMPARISON OF AREAS UNDER THE GROWTH CURVES
NOEC

Model: 1 Basic statistic <<Column>>					Filename : IA-NC.DAT		nxt: 0	
No.	1	2	3	4	5			
N	3	3	3	3	3			
Mean	3.44160	3.39936	3.40008	3.21992	3.01152			
Variance	0.01925	0.01605	0.05341	0.00006	0.02003			
S. D.	0.13874	0.12670	0.23110	0.00752	0.14153			
S. E.	0.08010	0.07315	0.13342	0.00434	0.08171			
No.	6	7	8	9	10			
N	3	3	3	3	3			
Mean	1.96032	0.56920	0.21460	0.13460	0.02364			
Variance	0.01580	0.00010	0.00218	0.00004	0.00001			
S. D.	0.12569	0.00981	0.04674	0.00664	0.00265			
S. E.	0.07257	0.00566	0.02699	0.00383	0.00153			
Dunnett : Parametric multiple comparison					1-side			
Comparison	Differ.	Critical	Statistic	Probability	.05 table	.01 table		
mean	value			value	value			
1 vs 2	0.042	0.239237	0.45919	0.763790	2.60075	3.37846		
1 vs 3	0.042	0.239237	0.45136	0.766729	2.60075	3.37846		
1 vs 4	0.222	0.239237	2.40988	0.071814	2.60075	3.37846		
1 vs 5	0.430	0.310777**	4.67540	0.000548	2.60075	3.37846		
1 vs 6	1.481	0.310777**	16.10300	0.000001	2.60075	3.37846		
1 vs 7	2.872	0.310777**	31.22587	0.000001	2.60075	3.37846		
1 vs 8	3.227	0.310777**	35.08072	0.000001	2.60075	3.37846		
1 vs 9	3.307	0.310777**	35.95040	0.000001	2.60075	3.37846		
1 vs 10	3.418	0.310777**	37.15665	0.000001	2.60075	3.37846		

NOECr(24-48) [Based on I_m (24-48hr) value(Growth Rates)]

試験番号 第14011号
試験物質名 EDTA
平均生長速度の比較による阻害 (24-48)

M:1
L:3
C:10

Control	S. Control	0.01	0.032	0.1	0.32	1	3.2	10	32	100
0.074692		0.073248	0.080609	0.074317	0.071631	0.071373	0.043594	0.011963	0.000755	-0.004102
0.076539		0.076174	0.077138	0.071190	0.076687	0.069333	0.047883	0.019710	0.007823	-0.019778
0.074135		0.071733	0.070698	0.073844	0.076816	0.067769	0.044215	0.015478	0.005384	-0.006290

YUKMS 統計ライブラリー I
COMPARISON OF GROWTH RATES
NOEC (24-48HR)

Model: 1 Basic statistic <<Column>> Filename : IM48-NC.DAT next: 0

No.	1	2	3	4	5
N	3	3	3	3	3
Mean	0.07509	0.07338	0.07613	0.07305	0.07501
Variance	0.00000	0.00000	0.00003	0.00000	0.00001
S. D.	0.00127	0.00172	0.00501	0.00165	0.00301
S. E.	0.00074	0.00100	0.00289	0.00095	0.00174

No.	6	7	8	9	10
N	3	3	3	3	3
Mean	0.06949	0.04523	0.01571	0.00465	-0.01006
Variance	0.00000	0.00001	0.00002	0.00001	0.00007
S. D.	0.00181	0.00232	0.00388	0.00359	0.00849
S. E.	0.00105	0.00134	0.00224	0.00207	0.00490

Dunnett : Parametric multiple comparison					1-side	
Comparison	Differ.	Critical	Statistic	Probability	.05 table	.01 table
mean	value			value	value	
1 vs 2	0.002	0.008230	0.53963	0.732489	2.60075	3.37846
1 vs 3	-0.001	0.008230	-0.32938	0.809892	2.60075	3.37846
1 vs 4	0.002	0.008230	0.64517	0.688645	2.60075	3.37846
1 vs 5	0.000	0.008230	0.02549	0.894410	2.60075	3.37846
1 vs 6	0.006	0.008230	1.77078	0.209788	2.60075	3.37846
1 vs 7	0.030	0.010691**	9.43629	0.000001	2.60075	3.37846
1 vs 8	0.059	0.010691**	18.76377	0.000001	2.60075	3.37846
1 vs 9	0.070	0.010691**	22.25867	0.000001	2.60075	3.37846
1 vs 10	0.085	0.010691**	26.90729	0.000001	2.60075	3.37846

NOECr(24-72) [Based on I_n (24-72hr) value(Growth Rates)]

試験番号 第14011号
試験物質名 EDTA
平均生長速度の比較による阻害 (24-72)

M:1
L:3
C:10

Control	S. Control	0.01	0.032	0.1	0.32	1	3.2	10	32	100
0.072358		0.072934	0.075872	0.072214	0.072578	0.061415	0.035292	0.006906	0.001997	-0.007806
0.070420		0.073271	0.076129	0.073986	0.071855	0.064404	0.036082	0.011812	0.005687	-0.007850
0.071230		0.069837	0.072117	0.072188	0.075499	0.064645	0.035425	0.014198	0.003497	-0.007223

YUKMS 統計ライブラリー I
COMPARISON OF GROWTH RATES
NOEC (24-72HR)

Model: 1 Basic statistic <<Column>>			Filename : IM72-NC. DAT		nxt: 0	
No.	1	2	3	4	5	
N	3	3	3	3	3	
Mean	0.07134	0.07201	0.07471	0.07280	0.07331	
Variance	0.00000	0.00000	0.00001	0.00000	0.00000	
S. D.	0.00097	0.00189	0.00225	0.00103	0.00193	
S. E.	0.00056	0.00109	0.00130	0.00060	0.00111	
.....						
No.	6	7	8	9	10	
N	3	3	3	3	3	
Mean	0.06349	0.03560	0.01097	0.00403	-0.00763	
Variance	0.00000	0.00000	0.00001	0.00001	0.00000	
S. D.	0.00180	0.00042	0.00372	0.00235	0.00035	
S. E.	0.00104	0.00024	0.00215	0.00136	0.00020	
.....						
Dunnett : Parametric multiple comparison					1-side	
Comparison	Differ.	Critical	Statistic	Probability	.05 table	.01 table
mean	value			value	value	
1 vs 2	-0.001	0.004099	-0.43023	0.774566	2.60075	3.37846
1 vs 3	-0.003	0.004099	-2.13845	0.116549	2.60075	3.37846
1 vs 4	-0.001	0.004099	-0.92645	0.561131	2.60075	3.37846
1 vs 5	-0.002	0.004099	-1.25325	0.409322	2.60075	3.37846
1 vs 6	0.008	0.005324**	4.97999	0.000276	2.60075	3.37846
1 vs 7	0.036	0.005324**	22.67666	0.000001	2.60075	3.37846
1 vs 8	0.060	0.005324**	38.30447	0.000001	2.60075	3.37846
1 vs 9	0.067	0.005324**	42.70701	0.000001	2.60075	3.37846
1 vs 10	0.079	0.005324**	50.10592	0.000001	2.60075	3.37846

付属資料-5：試験液中の被験物質濃度の分析方法

1 標準品

エチレンジアミン四酢酸二水素二ナトリウム二水和物(), 純度
99.5 %)

2 試薬、試液及び標準溶液の調製

1) 試薬

アセトン, ジクロロメタン：残留農薬試験用

trans-1, 2-シクロヘキサンジアミン-N, N, N', N'-四酢酸一水和物(以下「CyDTA」と略),
水酸化ナトリウム, リン酸二水素カリウム：特級

ポリエチレングリコール 400：1 級

無水硫酸ナトリウム：残留農薬試験用

三ふっ化ほう素メタノール錯体メタノール溶液：ガスクロマトグラフ用

フルオランテン-d₁₀：環境分析用

水(脱イオン水を蒸留したもの)

2) 試液

① 10 mol/l 水酸化ナトリウム溶液

水 100 ml に水酸化ナトリウム 40 g を溶解した。

② 1 mol/l 水酸化ナトリウム溶液

水 90 ml 及び 10 mol/l 水酸化ナトリウム溶液 10 ml を混合した。

③ 1 mol/l リン酸二水素カリウム緩衝液

水 200 ml にリン酸二水素カリウム 27.2 g を溶解し, 10 mol/l 水酸化ナトリウム溶液を加えて pH 7 に調整した。

④ CyDTA 100 mg/l 溶液

CyDTA 10 mg を 1 mol/l 水酸化ナトリウム溶液に溶解し, 100 ml とした。

⑤ フルオランテン-d₁₀ 100 mg/l 溶液

フルオランテン-d₁₀ 10 mg をアセトンに溶解し, 100 ml とした。

⑥ 内標準溶液

フルオランテン-d₁₀ 100 mg/l 溶液 1 ml を室温で窒素ガスを通じて乾固させ,
ジクロロメタン 100 ml に溶解した。

⑦ 0.1 %PEG/DCM 溶液

ポリエチレングリコール 0.1 ml とジクロロメタン 100 ml を混合した。

3) 標準溶液の調製

標準品 25.0 mg を精密に秤り, 水に溶解して 50 ml とした(500 mg/l)。この 2 ml を水で希釈して正確に 20 ml とし標準溶液(1)とした(50 mg/l)。さらに, この 1 ml を水で希釈して 20 ml とし, 標準溶液(2)とした(2.5 mg/l)。さらに, この 2 ml を水で希釈して 20 ml とし, 標準溶液(3)とした(0.25 mg/l)。

標準溶液(3)を 1, 0.5, 0.25, 0.1, 0.05 ml ずつはかり取り, 試料溶液と同様に操作し, このうちの 4 濃度を検量線作成用標準溶液とした。

3 試験培地の前処理

72時間目の試験培地は、約20 mlを100 mlの遠心管に取り2,200 r/minで10分間遠心分離を行ったものを試験培地とした。

4 試料溶液の調製

1) 対照区, 0.010及び0.032 mg/lの試験培地

試験培地の5 mlを10 mlのメスフラスコに正確に量り取り、水で定容した。その2 mlにCyDTA 100 mg/l溶液50 μ lを添加し、100 $^{\circ}$ Cに加熱しながら窒素気流下で乾固した。そこに三ふっ化ほう素メタノール錯体メタノール溶液 1 mlを加えて密栓をし、80 $^{\circ}$ Cで30分間誘導体化反応を行った。

反応終了後、室温まで放冷し、内標準溶液50 μ l及び1 mol/lリン酸二水素カリウム緩衝液(pH 7)3 mlを加え、50 mlの分液漏斗に移した後、ジクロロメタン3 mlを加えて振とう機を用いて5分間激しく振とうした。暫時放置後ジクロロメタン層を分取し、水層にはジクロロメタン3 mlを加え、同様の操作を繰り返した。全ジクロロメタン層を無水硫酸ナトリウム約5 gをのせたガラスろ過器を用いて脱水し、ろ過器上をジクロロメタン3 mlで洗浄した。ろ液及び洗液を5 mlの試験管に合わせ、0.1 %PEG/DCM溶液0.1 mlを添加した後、室温で窒素ガスを通じて1 mlまで濃縮し、定容とした。

2) 0.10 mg/lの試験培地

試験培地の5 mlを20 mlのメスフラスコに正確に量り取り、水で定容した。その2 mlにCyDTA 100 mg/l溶液50 μ lを添加し、100 $^{\circ}$ Cに加熱しながら窒素気流下で乾固した。そこに三ふっ化ほう素メタノール錯体メタノール溶液 1 mlを加えて密栓をし、80 $^{\circ}$ Cで30分間誘導体化反応を行った。

反応終了後、室温まで放冷し、内標準溶液50 μ l及び1 mol/lリン酸二水素カリウム緩衝液(pH 7)3 mlを加え、50 mlの分液漏斗に移した後、ジクロロメタン3 mlを加えて振とう機を用いて5分間激しく振とうした。暫時放置後ジクロロメタン層を分取し、水層にはジクロロメタン3 mlを加え、同様の操作を繰り返した。全ジクロロメタン層を無水硫酸ナトリウム約5 gをのせたガラスろ過器を用いて脱水し、ろ過器上をジクロロメタン3 mlで洗浄した。ろ液及び洗液を5 mlの試験管に合わせ、0.1 %PEG/DCM溶液0.1 mlを添加した後、室温で窒素ガスを通じて1 mlまで濃縮し、定容とした。

3) 0.32 mg/lの試験培地

試験培地の2.5 mlを20 mlのメスフラスコに正確に量り取り、水で定容した。その2 mlにCyDTA 100 mg/l溶液50 μ lを添加し、100 $^{\circ}$ Cに加熱しながら窒素気流下で乾固した。そこに三ふっ化ほう素メタノール錯体メタノール溶液 1 mlを加えて密栓をし、80 $^{\circ}$ Cで30分間誘導体化反応を行った。

反応終了後、室温まで放冷し、内標準溶液50 μ l及び1 mol/lリン酸二水素カリウム緩衝液(pH 7)3 mlを加え、50 mlの分液漏斗に移した後、ジクロロメタン3 mlを加えて振とう機を用いて5分間激しく振とうした。暫時放置後ジクロロメタン層を分取し、水層にはジクロロメタン3 mlを加え、同様の操作を繰り返した。全ジクロロメタン層を無水硫酸ナトリウム約5 gをのせたガラスろ過器を用いて脱水し、ろ過器上をジク

クロロメタン3 mlで洗浄した。ろ液及び洗液を5 mlの試験管に合わせ、0.1 %PEG/DCM溶液0.1 mlを添加した後、室温で窒素ガスを通じて1 mlまで濃縮し、定容とした。

4) 1.0 mg/lの試験培地

試験培地の2.5 mlを50 mlのメスフラスコに正確に量り取り、水で定容した。その2 mlにCyDTA 100 mg/l溶液50 μ lを添加し、100 $^{\circ}$ Cに加熱しながら窒素気流下で乾固した。そこに三ふっ化ほう素メタノール錯体メタノール溶液 1 mlを加えて密栓をし、80 $^{\circ}$ Cで30分間誘導体化反応を行った。

反応終了後、室温まで放冷し、内標準溶液50 μ l及び1 mol/lリン酸二水素カリウム緩衝液(pH 7)3 mlを加え、50 mlの分液漏斗に移した後、ジクロロメタン3 mlを加えて振とう機を用いて5分間激しく振とうした。暫時放置後ジクロロメタン層を分取し、水層にはジクロロメタン3 mlを加え、同様の操作を繰り返した。全ジクロロメタン層を無水硫酸ナトリウム約5 gをのせたガラスろ過器を用いて脱水し、ろ過器上をジクロロメタン3 mlで洗浄した。ろ液及び洗液を5 mlの試験管に合わせ、0.1 %PEG/DCM溶液0.1 mlを添加した後、室温で窒素ガスを通じて1 mlまで濃縮し、定容とした。

5) 3.2 mg/lの試験培地

試験培地の2 mlを100 mlのメスフラスコに正確に量り取り、水で定容した。その2 mlにCyDTA 100 mg/l溶液50 μ lを添加し、100 $^{\circ}$ Cに加熱しながら窒素気流下で乾固した。そこに三ふっ化ほう素メタノール錯体メタノール溶液 1 mlを加えて密栓をし、80 $^{\circ}$ Cで30分間誘導体化反応を行った。

反応終了後、室温まで放冷し、内標準溶液50 μ l及び1 mol/lリン酸二水素カリウム緩衝液(pH 7)3 mlを加え、50 mlの分液漏斗に移した後、ジクロロメタン3 mlを加えて振とう機を用いて5分間激しく振とうした。暫時放置後ジクロロメタン層を分取し、水層にはジクロロメタン3 mlを加え、同様の操作を繰り返した。全ジクロロメタン層を無水硫酸ナトリウム約5 gをのせたガラスろ過器を用いて脱水し、ろ過器上をジクロロメタン3 mlで洗浄した。ろ液及び洗液を5 mlの試験管に合わせ、0.1 %PEG/DCM溶液0.1 mlを添加した後、室温で窒素ガスを通じて1 mlまで濃縮し、定容とした。

6) 10 mg/lの試験培地

試験培地の2 mlを200 mlのメスフラスコに正確に量り取り、水で定容した。その2 mlにCyDTA 100 mg/l溶液50 μ lを添加し、100 $^{\circ}$ Cに加熱しながら窒素気流下で乾固した。そこに三ふっ化ほう素メタノール錯体メタノール溶液 1 mlを加えて密栓をし、80 $^{\circ}$ Cで30分間誘導体化反応を行った。

反応終了後、室温まで放冷し、内標準溶液50 μ l及び1 mol/lリン酸二水素カリウム緩衝液(pH 7)3 mlを加え、50 mlの分液漏斗に移した後、ジクロロメタン3 mlを加えて振とう機を用いて5分間激しく振とうした。暫時放置後ジクロロメタン層を分取し、水層にはジクロロメタン3 mlを加え、同様の操作を繰り返した。全ジクロロメタン層を無水硫酸ナトリウム約5 gをのせたガラスろ過器を用いて脱水し、ろ過器上をジクロロメタン3 mlで洗浄した。ろ液及び洗液を5 mlの試験管に合わせ、0.1 %PEG/DCM溶液0.1 mlを添加した後、室温で窒素ガスを通じて1 mlまで濃縮し、定容とした。

7) 32 mg/lの試験培地

試験培地の2.5 mlを50 mlのメスフラスコに正確に量り取り、水で定容した。その2.5 mlを50 mlのメスフラスコに正確に量り取り、水で定容した(試験培地2.5 mlの1000 ml定容相当)。その2 mlにCyDTA 100 mg/l溶液50 μ lを添加し、100 $^{\circ}$ Cに加熱しながら窒素気流下で乾固した。そこに三ふっ化ほう素メタノール錯体メタノール溶液 1 mlを加えて密栓をし、80 $^{\circ}$ Cで30分間誘導体化反応を行った。

反応終了後、室温まで放冷し、内標準溶液50 μ l及び1 mol/lリン酸二水素カリウム緩衝液(pH 7)3 mlを加え、50 mlの分液漏斗に移した後、ジクロロメタン3 mlを加えて振とう機を用いて5分間激しく振とうした。暫時放置後ジクロロメタン層を分取し、水層にはジクロロメタン3 mlを加え、同様の操作を繰り返した。全ジクロロメタン層を無水硫酸ナトリウム約5 gをのせたガラスろ過器を用いて脱水し、ろ過器上をジクロロメタン3 mlで洗浄した。ろ液及び洗液を5 mlの試験管に合わせ、0.1 %PEG/DCM溶液0.1 mlを添加した後、室温で窒素ガスを通じて1 mlまで濃縮し、定容とした。

8) 100 mg/lの試験培地

試験培地の2.5 mlを100 mlのメスフラスコに正確に量り取り、水で定容した。その2.5 mlを100 mlのメスフラスコに正確に量り取り、水で定容した(試験培地2.5 mlの4000 ml定容相当)。その2 mlにCyDTA 100 mg/l溶液50 μ lを添加し、100 $^{\circ}$ Cに加熱しながら窒素気流下で乾固した。そこに三ふっ化ほう素メタノール錯体メタノール溶液 1 mlを加えて密栓をし、80 $^{\circ}$ Cで30分間誘導体化反応を行った。

反応終了後、室温まで放冷し、内標準溶液50 μ l及び1 mol/lリン酸二水素カリウム緩衝液(pH 7)3 mlを加え、50 mlの分液漏斗に移した後、ジクロロメタン3 mlを加えて振とう機を用いて5分間激しく振とうした。暫時放置後ジクロロメタン層を分取し、水層にはジクロロメタン3 mlを加え、同様の操作を繰り返した。全ジクロロメタン層を無水硫酸ナトリウム約5 gをのせたガラスろ過器を用いて脱水し、ろ過器上をジクロロメタン3 mlで洗浄した。ろ液及び洗液を5 mlの試験管に合わせ、0.1 %PEG/DCM溶液0.1 mlを添加した後、室温で窒素ガスを通じて1 mlまで濃縮し、定容とした。

5 ガスクロマトグラフ-質量分析計操作条件

機種 : HP6890 [Agilent Technologies]

検出器 : MSD・SIMモード HP5973A [Agilent Technologies]

分離管 : DB-5MS (Phenyl Arylene ポリマー化学結合型, 膜厚 0.25 μ m)

内径 0.25 mm×長さ 30 m [Agilent Technologies]

温度 : 分離管 150 $^{\circ}$ C (2分) \rightarrow 15 $^{\circ}$ C/分 \rightarrow 280 $^{\circ}$ C (10分)

注入口 250 $^{\circ}$ C, トランスファーライン 280 $^{\circ}$ C, イオン源 230 $^{\circ}$ C

ガス流量 : キャリヤーガス(ヘリウム) 1.0 ml/分(定流量モード)

設定質量数(m/z) : EDTA=174, CyDTA=402, フルオランテン-d₁₀=212

データ処理装置 : MSDケミステーション, G1701AJ Version A.03.01.J

[Agilent Technologies]

6 定量

2の3)で調製した検量線作成用標準溶液及び4で調製した試料溶液2 µlをガスクロマトグラフー質量分析計に注入した。標準溶液の濃度と内標準物質とのピーク面積比から検量線を作成し、試料溶液から得られた対象物質と内標準物質との面積比から検出量を求めた。次に検出量、試験液採取量等から、試験培地中の被験物質濃度を算出した。

7 検出限界

$$\text{検出限界} : \frac{0.025 \text{ ng}}{1,000} \times \frac{1 \text{ ml} \times 1,000}{2 \text{ µl}} \times \frac{1}{1 \text{ ml}^{*1}} \times 0.785^{*2} = 0.01 \text{ mg/l}$$

$$*1 \quad 1 \text{ ml} = \frac{5 \text{ ml}}{10 \text{ ml}} \times 2 \text{ ml}$$

$$*2 \quad \text{Factor } 0.785 = \frac{\text{被験物質分子量 } 292.3}{\text{標準品分子量 } 372.2}$$

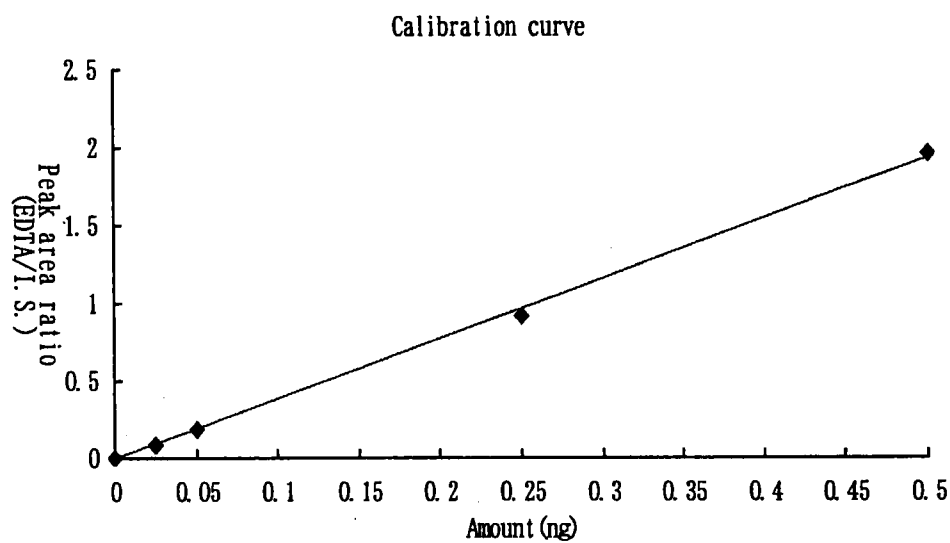
8 添加回収試験

1) 低濃度添加

培地に被験物質を0.1 mg/l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。試験は平行測定3回で実施し、回収率は103.1%, 95.8%, 95.5%(平均98.1%)であった。

2) 高濃度添加

培地に被験物質を100 mg/l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。試験は平行測定3回で実施し、回収率は82.1%, 75.9%, 72.2%(平均76.7%)であった。

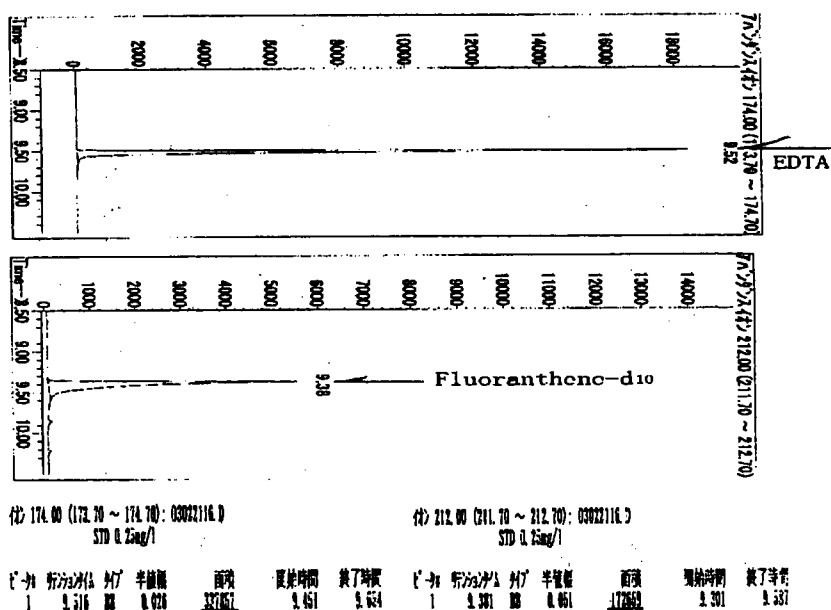


Amount (ng)	Peak area ratio (EDTA/I. S. *)
0.5	1.956787657
0.25	0.915687597
0.05	0.184153241
0.025	0.084043916

*Internal Standard

Figure 1. Calibration curve of EDTA by GC analysis

Standard (0.25 mg/l): 0 hour



Control: 0 hour

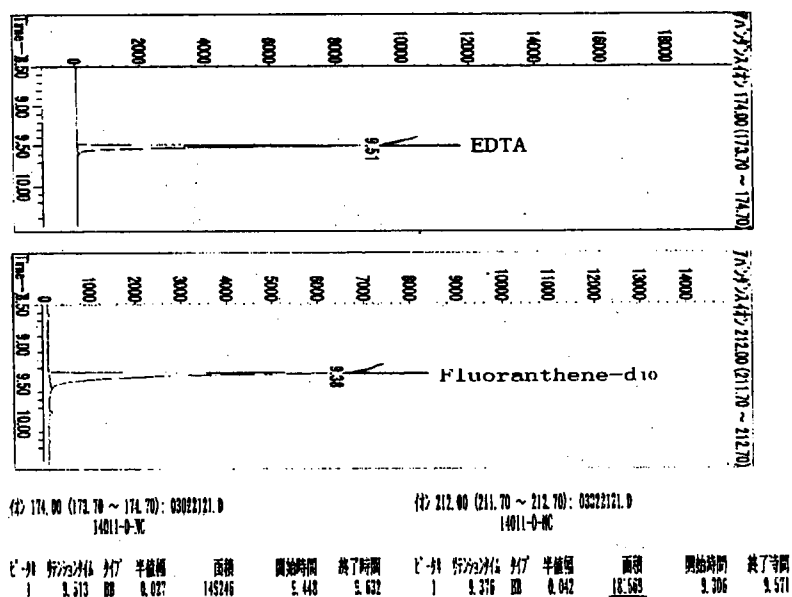
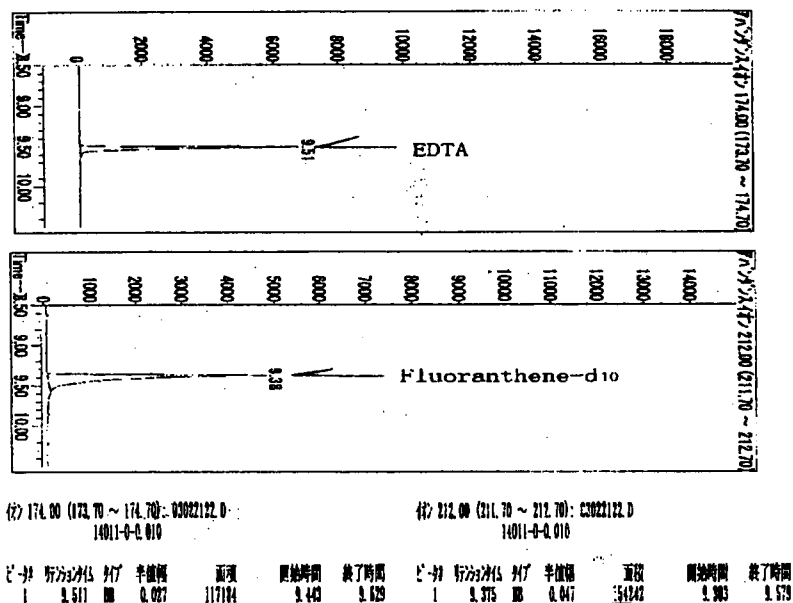


Figure 2-1. Representative chromatograms

Test solution (0.010 mg/l): 0 hour



Test solution (100 mg/l): 0 hour

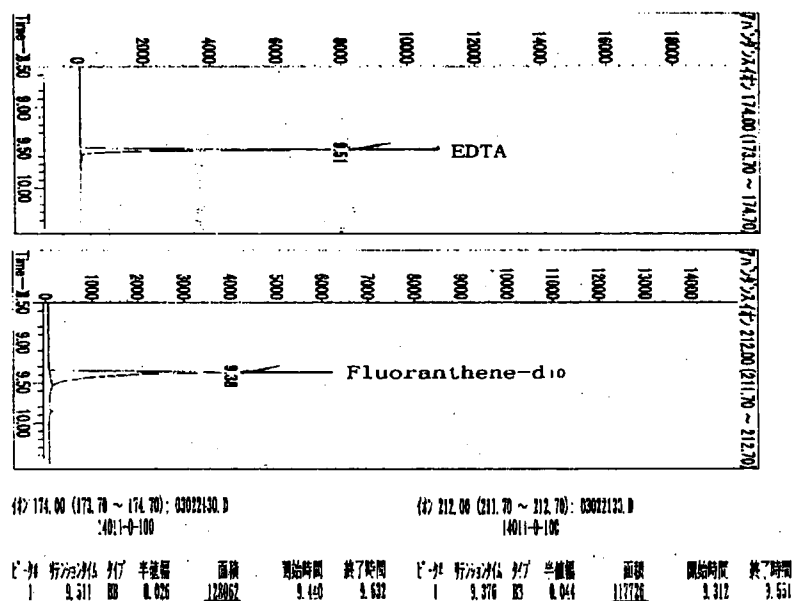


Figure 2-2. Representative chromatograms

陳述書

1 試験委託者
環境省

2 試験番号
第14011号

3 試験の表題
エチレンジアミン四酢酸の藻類(*Selenastrum capricornutum*)に対する生長阻害試験

上記試験は、日本国環境省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長通知「生態影響試験実施に関する基準の改正について」(別添)「生態影響試験実施に関する基準」(環保安第242号, 2001年)を遵守して実施したものです。

2003 年 3 月 31 日

財団法人 日本食品分析センター 多摩研究所

運営管理者



陳述書

1 試験委託者

環境省

2 試験番号

第14011号

3 試験の表題

エチレンジアミン四酢酸の藻類(*Selenastrum capricornutum*)に対する生長阻害試験

上記試験は、日本国環境省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長通知「生態影響試験実施に関する基準の改正について」(別添)「生態影響試験実施に関する基準」(環保安第242号, 2001年)を遵守して実施したものです。

なお、試験実施にあたっては、OECD 化学品テストガイドライン No. 201「藻類生長阻害試験」(1984年)を遵守しました。

2003 年 3 月 31 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14011号

3 試験の表題

エチレンジアミン四酢酸の藻類 (*Selenastrum capricornutum*) に対する
生長阻害試験

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	2002年12月20日	2002年12月20日	2002年12月20日
被験物質の受領	2003年01月08日	2003年01月09日	2003年01月09日
試験計画書	2003年02月21日	2003年02月24日	2003年02月24日
試験の実施	2003年02月21日	2003年02月24日	2003年02月24日
分析の実施, 試薬等 機器, 検体	2003年02月21日	2003年02月24日	2003年02月24日
試験の実施, 試薬等, 機器 被験物質	2003年02月24日	2003年02月25日	2003年02月25日
試験中の保管文書	2003年03月25日	2003年03月25日	2003年03月25日
最終報告書草案及び生データ	2003年03月28日	2003年03月28日	2003年03月28日
最終報告書	2003年03月31日	2003年03月31日	2003年03月31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。

2003 年 3 月 31 日

財団法人 日本食品分析センター 多摩研究所
信頼性保証部門責任者

