

受理番号	E03-3189
試験番号	93189

最 終 報 告 書

p-(フェニルアゾ)アニリンの*Pseudokirchneriella subcapitata*による藻類生長阻害試験

2004 年 12 月 21 日

化学物質評価研究機構
水質環境部
水質評価課

陳 述 書

財団法人 化学物質評価研究機構
久留米事業所

試験委託者 環境省

試験の表題 *p*-(フェニルアゾ)アニリンの*Pseudokirchneriella subcapitata*による藻類
生長阻害試験

試験番号 93189

本最終報告書(写し)は、原本を正確にコピーしたものです。

2004年12月2/日

運営管理者

[Redacted Signature]

陳 述 書

財団法人 化学物質評価研究機構
久留米事業所

試験委託者 環境省

試験の表題 *p*-(フェニルアゾ)アニリンの*Pseudokirchneriella subcapitata*による藻類
生長阻害試験

試験番号 93189

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)に従って実施したものです。

2004年12月21日

試験責任者

信 頼 性 保 証 書

財団法人 化学物質評価研究機構
久留米事業所

試験委託者 環境省

試験の表題 *p*-(フェニルアゾ)アニリンの*Pseudokirchneriella subcapitata*による藻類
生長阻害試験

試験番号 93189

上記試験は財団法人化学物質評価研究機構久留米事業所の信頼性保証部門が監査又は査察を実施しており、監査又は査察を行った内容、日付並びに試験責任者及び運営管理者に報告を行った日付は以下の通りです。

監査又は査察内容	監査又は査察日	報告日（試験責任者）	報告日（運営管理者）
試験計画書	2004年7月21日	2004年7月21日	2004年7月21日
	2004年10月28日	2004年10月28日	2004年10月28日
試験実施状況	2004年7月21日	2004年7月23日	2004年7月23日
	2004年7月22日	2004年7月23日	2004年7月23日
	2004年7月23日	2004年7月23日	2004年7月23日
生データ及び最終報告書	2004年12月21日	2004年12月21日	2004年12月21日

本最終報告書は、試験の方法が正確に記載されており、内容が試験計画書及び標準操作手順書に従い、かつ、生データを正確に反映していることを保証します。

2004年12月21日

信頼性保証部門責任者



目 次

	頁
要 約	1
1. 表 題	2
2. 試験委託者	2
3. 試験施設	2
4. 試験目的	2
5. 試験方法	2
6. 適用 G L P	2
7. 試験日程	2
8. 試験関係者	3
9. 最終報告書の承認	3
10. 記録及び試資料の保管	3
11. 被 験 物 質	4
12. 試験材料と方法	5
13. 試験結果	10
14. 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	11
Table 1～7	12～16
Figure 1～3	17～19
Appendix 1(Composition of OECD medium)	
Appendix 2(Calibration curve and chromatogram)	
Appendix 3 (Statistical method for EC50 and NOEC calculation)	
別添資料 予備試験結果	

要 約

p-(フェニルアゾ)アニリンの藻類生長阻害試験を *Pseudokirchneriella subcapitata* を用いて実施した。

試験は、5濃度区[10.0、2.50、0.625、0.156及び0.0391 mg/L(公比4.0)]及び対照区、暴露時間72時間、培養温度23±2℃、蛍光灯による照明(液面付近での光強度60～120 $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$ 、連続照明)、旋回振とう培養(約100回/分)で行った。藻類の生長は細胞濃度によって調べた。

その結果、試験液中の被験物質濃度は、暴露開始時では設定濃度に対して95.4～98.3%、暴露終了時では77.9～95.2%であった。試験結果は測定濃度の時間加重平均値(前述の設定濃度を測定濃度表示にした場合9.60、2.31、0.548、0.136及び0.0355 mg/L)に基づいて算出した。

生長曲線下面積、24-48時間及び24-72時間生長速度によって算出した p -(フェニルアゾ)アニリンの $E_b\text{C}_{50}(0-72\text{h})$ 、 $E_r\text{C}_{50}(24-48\text{h})$ 及び $E_r\text{C}_{50}(24-72\text{h})$ はそれぞれ1.24、2.93及び>9.60 mg/Lであった。また、生長曲線下面積及び24-48時間生長速度での最大無影響濃度(NOEC)はそれぞれ0.136及び0.548 mg/Lであった。24-72時間生長速度でのNOECは統計学的有意差検定では ≥ 9.60 mg/Lであったが、9.60 mg/Lでは明らかな影響があったと考えられるため、2.31 mg/LをNOECと評価した。

試験番号：93189

1. 表 題

p-(フェニルアゾ)アニリンの*Pseudokirchneriella subcapitata*による藻類生長阻害試験
2. 試験委託者

名 称	環境省
所 在 地	(〒100-8975)東京都千代田区霞が関 1-2-2
3. 試験施設

名 称	財団法人 化学物質評価研究機構 久留米事業所
所 在 地	(〒830-0023)福岡県久留米市中央町 19-14 TEL(0942) 34-1500
4. 試験目的

被験物質の藻類の生長に対する影響を調べる。
5. 試験方法

段階的な濃度に調製した被験物質を含む試験液に供試藻類を入れ72時間培養した。対照群に対する生長阻害率等の結果からEC50*¹及びNOEC*²を求めた。

試験は「OECD Guidelines for Testing of Chemicals, Section 2 : Effects on Biotic Systems, 201 “Alga, Growth Inhibition Test” , 1984」及び「OECD Guidance Document 23 “Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures”」に準じて行った。

*¹ EC50(Median Effective Concentration)：暴露期間において試験生物の生長を50% 阻害する被験物質濃度を示す。

*² NOEC(No Observed Effect Concentration)：暴露期間において試験生物の生長に影響が認められない試験最高濃度を示す。
6. 適用GLP

この試験は、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)に適合して行った。
7. 試験日程
 - 1) 試験開始日 2004 年 7 月 21 日
 - 2) 実験開始日 2004 年 7 月 22 日
 - 3) 実験終了日 2004 年 7 月 25 日
 - 4) 試験終了日 2004 年 12 月 21 日

8. 試験関係者

試験責任者

所属 試験第四課

生物試験担当者

分析担当者

9. 最終報告書の承認

試験責任者

2004 年 12 月 21 日

氏 名

10. 試資料の保管

1) 被験物質

供試試料約5 g*を保管用容器に入れ密栓後、最終報告書作成後10年間、久留米事業所試料保管室に保管する。保管期間経過後の処置は試験委託者と協議の上決定する。ただし、保管中に品質が著しく変化する物質の保管期間は、その品質が保管に耐えうる期間とし、廃棄に際しては試験委託者の承認を得る。

* 試験番号93189、93190、93191及び93192についての共用保管試料とする。

2) 生データ、資料等

生データ、試験計画書、その他必要な資料等は最終報告書と共に、最終報告書作成後10年間、久留米事業所資料保管室に保管する。保管期間終了後の取扱いについては、保管期間終了前に試験委託者と協議する。

11. 被 験 物 質

被験物質に関する情報を以下に示す。供試試料に関する情報については供給者資料等によった。

1) 名 称

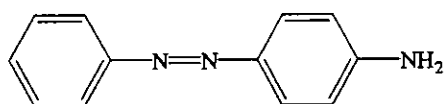
p-(フェニルアゾ)アニリン

2) CAS 番号

60-09-3

3) 構造式等

(1) 構造式



(2) 分子式

$C_{12}H_{11}N_3$

(3) 分子量

197.24^{*2}

4) 物理化学的性質等

(1) 融 点

124.3℃^{*1}

(2) 沸 点

>360℃^{*2}

(3) 分配係数

logPow=2.98 (calculated)^{*2}

情 報 源

*1: 供給者提供の添付資料

*2:

5) 供試試料に関する情報

(1) 純 度

99.0%

(2) ロット番号

PKH7121

(3) 供 給 者

(4) 供 給 量

25 g

(5) 入 手 日
2003年12月26日

(6) 外 観
だいたい色粉末

6) 被験物質の確認

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。

7) 保管条件及び保管条件下での安定性の確認

(1) 保 管 条 件

試験中の被験物質は室温暗所で保管した。

(2) 安定性の確認

実験開始前及び終了後に測定した被験物質の赤外吸収スペクトルに変化がなかったことから、実験期間中の被験物質が安定で会ったことを確認した。

12. 試験材料と方法

1) 試 験 生 物

(1) 種

Pseudokirchneriella subcapitata (ATCC 22662)
(旧学名*Selenastrum capricornutum*)

(2) 生物種選択の理由

テストガイドラインに推奨されている種類である。

(3) 供 給 源

American Type Culture Collection (12301 Parklawn Drive Rockville, Maryland 20852-1776 U.S.A.) より 1995 年 6 月 30 日に購入した *Pseudokirchneriella subcapitata* で久留米事業所で継代培養しているものを用いた。また、試験系の再現性を確認するために実施した試験生物による基準物質(二クロム酸カリウム、試薬特級、和光純薬工業株式会社)の生長曲線下面積を指標とした72時間EC50は0.349 mg/Lであり、この値は久留米事業所での同指標における基準物質の規定範囲内(平均 $\pm 2 \times$ 標準偏差: 0.280~0.471 mg/L)であった[平均 \pm 標準偏差は0.375 \pm 0.048 mg/L(n=31)]。

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(OECD推奨培地)を用いた。培地の組成をAppendix 1に示す。培地は滅菌したものを用いた。

3) 試験器具及び装置

(1) 試験器具

試験容器：滅菌した500 mL三角フラスコ(シリコセン®付)

(2) 試験装置

培養装置：温度維持、連続照明及び連続振とう培養が可能で、一定の光強度を維持可能な装置を用いた。

4) 試験条件

(1) 暴露条件

①方式

被験物質を含む試験液へ試験生物を暴露する薬浴方式を用い、旋回振とう培養(約100回/分)を行った。

②期間

72時間

③試験濃度

試験は、5濃度区[10.0、2.50、0.625、0.156及び0.0391 mg/L(公比4.0)]で行った。試験濃度及び公比は予備試験結果から決定した。試験濃度は純度(99.0%)補正を行った値で表示した。予備試験結果は別添資料に示す。

④連数

3連/試験区

⑤対照群

試験原液と同じ処理を行った被験物質を含まない培地のみの対照区を設けた。

⑥暴露開始時の細胞数

保存培養から前培養用培地に植えつぎ、対数増殖期の細胞を含んだ藻類培養液を 10^4 cells/mLになるように試験液に接種した。

⑦試験操作

無菌操作により実施した。

⑧試験液量

300 mL/試験区(100 mL×3試験容器)

(2) 環境条件

①水温

$23 \pm 2^\circ\text{C}$

②照明

400～700 nmのスペクトル幅をもつ蛍光灯を用い、液面付近での光強度を $60 \sim 120 \mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$ *(変動幅 $\pm 20\%$)とする連続照明

* $120 \mu\text{E}/\text{m}^2\text{s} = 0.72 \times 10^{20} \text{ photons}/\text{m}^2\text{s}$

5) 試験液の調製法

試験原液の調製は純度(99.0%)補正して行った。

必要量の被験物質を秤量し、約2時間攪拌することにより培地に溶解して20.0 mg/Lの試験原液を調製し、0.45 μ mメンブレンフィルター(ミリポア製)で濾過滅菌した。試験原液は調製時に濃度測定を行い、測定濃度に応じて添加量の補正を行った。

濃度区毎に必要な量の試験原液を分取し、試験液調製容器中で試験原液と同じ処理を行った培地と混合後攪拌して、各試験容器に分割した。

6) 観察と測定

(1) 藻類の生長等

暴露開始後24時間毎に72時間まで細胞濃度を粒子計数装置(コールターカウンター Z1型、バックマン・コールター)により計数した。また、暴露終了時には各試験区に付き1試験容器について細胞の状態を生物顕微鏡(BX41、オリンパス株式会社製)を用いて観察した。

(2) 水質及び暴露環境

試験液のpHを暴露開始時及び終了時に測定した。暴露開始時は水質測定用に調製容器より分取した試験液について測定し、暴露終了時には各試験区に付き3連のうち1試験容器を測定した。培養装置内の温度、光強度を暴露期間中1日1回測定した。pHはガラス電極式水素イオン濃度計HM-14P型(東亜ディーケーケー)、温度は検定済ガラス製棒状温度計、光強度はポータブル光量子計QSL-100(Biospherical Instruments Inc.)で測定した。

(3) 試験液の状態

試験液の状態を暴露開始時及び終了時に観察した。

(4) 試験液中の被験物質濃度

①採水と分析回数

被験物質濃度の測定は暴露開始時及び終了時に行った。暴露開始時の測定用試験液は水質測定用に調製した容器から、暴露終了時の測定用試験液は各試験区の3試験容器から試験液をそれぞれ等量採取し混合後、遠心分離(3,000 rpm、10分間)により藻体を除去してから行った。

②試験液の前処理操作

採取した試験液は、そのまま若しくは培地で適宜希釈し、分析試料とした。

③分析方法

前処理操作を行って得られた分析試料は、次頁の定量条件に基づき高速液体クロマトグラフィー(HPLC)により被験物質の定量を行った。最終試料溶液中の被験物質濃度はクロマトグラム上の被験物質のピーク面積を濃度既知の標準溶液のピーク面積と比較し、比例計算して求めた。得られたクロマトグラムの一部をAppendix 2に示す。

分析機器の定量条件

機 器	高速液体クロマトグラフ
ポ ン プ	島津製作所製 LC-10AD
検 出 器	島津製作所製 SPD-10AV
オートインジェクター	島津製作所製 SIL-10A _{XL}
カ ラ ム	L-column ODS 15 cm×4.6 mmφ ステンレス製
カラム温度	40℃
溶 離 液	アセトニトリル/蒸留水 65/35(v/v)
流 量	1.0 mL/min
測 定 波 長	382 nm
注 入 量	200 μL
感 度	
検 出 器	0.5 AU/1 V

④標準溶液の調製

分析試料中の被験物質濃度を求めるための標準溶液の調製は次のように行った。また、標準溶液の調製は純度(99.0%)補正して行った。

供試試料20.2 mgを電子分析天びんで正確にはかりとり、アセトニトリルに溶解して1,000 mg/Lの被験物質溶液を調製した。これをアセトニトリルで希釈して50.0 mg/Lの被験物質溶液を調製した。これを培地で希釈して5.00 mg/Lの被験物質溶液を調製した。続いてこれを培地で希釈して0.250 mg/Lの被験物質溶液を調製した。さらにこれを培地で希釈して0.0250 mg/Lの標準溶液とした。

⑤検量線の作成

④の標準溶液の調製と同様にして0.00250、0.0125、0.0250及び0.0500 mg/Lの標準溶液を調製した。これらを③の定量条件に従って分析し、得られたそれぞれのクロマトグラム上のピーク面積と被験物質濃度により検量線を作成した。本試験の分析に用いた検量線をAppendix 2に示す。

なお、試験液中の被験物質の検出下限は検量線の濃度及びピーク面積値を用いて回帰分析を行い、得られた数値をもとにして算出された濃度(0.000871 mg/L)とした。

7) 結果の算出

結果の算出には測定濃度の時間加重平均値を用いた。

(1) 濃度－阻害率の算定法

各試験区と対照群の細胞数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。この曲線を用い、生長曲線下面積及び生長速度を比較して各濃度区での阻害率を算出した。

① 生長曲線下面積の比較(面積法)

生長曲線下面積を次式に従って計算した。

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

ここで

A = 生長曲線下面積

N_0 = 暴露開始時(t_0)の設定細胞数(cells/mL)

N_1 = t_1 時に測定した細胞数(cells/mL)

N_n = t_n 時に測定した細胞数(cells/mL)

t_1 = 暴露開始後最初に細胞数を測定した時間

t_n = 暴露開始後 n 回目に細胞数を測定した時間

各濃度区における阻害百分率(I_A)は対照群の生長曲線下面積(A_c)と各被験物質濃度での生長曲線下面積(A_t)との間の差として次のように計算した。

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

② 生長速度の比較(速度法)

生長曲線から2測定時(t_1 , t_n)でのそれぞれの細胞濃度(N_1 , N_n)から平均の生長速度(μ)を次式に従って計算した。 t_1 と t_n は、各々24時間と48時間及び24時間と72時間を用いた。

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

各濃度区における阻害百分率(I_μ)は対照群の生長速度(μ_c)と各被験物質濃度での生長速度(μ_t)との間の差として次のように計算した。

$$I_\mu = \frac{\mu_c - \mu_t}{\mu_c} \times 100$$

(2) EC50の算出法

各濃度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EC50(可能な場合その95%信頼限界)を算出した。その際、面積法により求めた場合は $E_bC50(0-72h)$ 、速度法により求めた場合は $E_rC50(24-48h)$ 又は $E_rC50(24-72h)$ と記載した。なお、EC50算出に用いた濃度区は面積法では0.136～9.60 mg/L区、速度法(24-48h)では0.548～9.60 mg/L区、速度法(24-72h)では2.31及び9.60 mg/L区(全て測定濃度の時間加重平均値で表示)であった。EC50算出時の入力データ及びそれらの出力結果をAppendix 3に示す。

(3) 最大無影響濃度(NOEC)の算出

生長曲線下面積、24-48時間及び24-72時間生長速度について、Bartlett法による等分散検定を行った後、各濃度群と対照群との有意差の有無を生長曲線下面積についてはKruskal-Wallisの順位検定及びDunnnettの多重比較法(ノンパラメトリック)、24-48時間生長速度については一元配置分散分析及びDunnnettの多重比較法、24-72時間生長速度についてはKruskal-Wallisの順位検定により求めた。ただし、各指標におけるEC50より高い濃度区は有意差検定には使用しなかった。統計的有意差検定における入力データ及びそれらの出力結果をAppendix 3に示す。

8) 数値の取扱い

数値の丸め方は、JIS Z 8401 規則Bによった。

13. 試験結果

設定濃度と測定濃度の時間加重平均値の対比表を以下に示す。

設定濃度 (mg/L)	測定濃度の時間加重平均値 (mg/L)
0.0391	0.0355
0.156	0.136
0.625	0.548
2.50	2.31
10.0	9.60

以下の本文中の濃度区表示は測定濃度の時間加重平均値で示す。

1) EC50

生長曲線下面積、24-48時間及び24-72時間生長速度によって算出した p -(フェニルアゾ)アニリンの E_0 C50(0-72h)、 E_1 C50(24-48h)及び E_2 C50(24-72h)はそれぞれ1.24、2.93及び>9.60 mg/Lであった。各指標でのEC50をTable 1、生長阻害率をTable 2、各時間での細胞数をTable 3に示す。また、各指標における濃度－生長阻害率曲線をFigure 1及びFigure 2に示す。

2) 各試験区での生長曲線、細胞観察結果及びNOEC

対照群における供試藻類の生長は暴露終了時までほぼ対数増殖を示した。暴露終了時には初期細胞数の61.9倍以上に増殖し、有効性基準(16倍以上の増殖)を満たしていた。

9.60 mg/L区では暴露後48時間まで生長は著しく抑えられていたものの、72時間には顕著な増殖を示した。2.31 mg/L区では暴露後48時間まで阻害が認められたものの緩やかな対数増殖を示し、72時間には顕著な増殖を示した。0.548 mg/L区ではやや阻害が認められたものの、対照群に近い増殖傾向を示した。0.0355及び0.136 mg/L区では対照群に近い生長を示した。

以下の細胞観察結果は全て対照群との比較に基づくものである。9.60 mg/L区において膨張している細胞が多くみられた。その他の濃度区では対照群と同様であった。

有意差検定結果及び上記細胞観察結果より、生長曲線下面積及び24-48時間生長速度におけるNOECは0.136及び0.548 mg/Lであった。24-72時間生長速度でのNOECは統計学的有意差検定では ≥ 9.60 mg/Lであったが、9.60 mg/L区では3連で32.6～61.6%の阻害率が認められたため影響ありと判断し、2.31 mg/LをNOECとした。NOECをTable 1、有意差検定結果をTable 4、生長曲線をFigure 3に示す。

- 3) 試験液の観察と測定結果
 - (1) 試験液の状態

調製時は濃度に相関して黄色澄明であった。暴露終了時には9.60 mg/L区では黄色澄明、0.548及び2.31 mg/L区では濃度相関的に黄色、細胞の増殖により0.0355及び0.136 mg/L区では緑色を呈していた。
 - (2) 試験液の水質及び暴露環境

試験液のpHは暴露開始時では7.8～7.9、暴露終了時では7.6～7.7であった。培養装置内の温度は23.7～23.9℃、光強度は109～112 $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$ であった。試験液のpHの測定結果をTable 5、培養装置内の温度及び光強度の測定結果をTable 6に示す。
 - (3) 試験液中の被験物質濃度

試験液の被験物質濃度は暴露開始時では設定濃度に対して95.4～98.3%、暴露終了時では77.9～95.2%であった。測定した被験物質濃度をTable 7に示す。また、クロマトグラムの一例をAppendix 2に示す。
14. 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
当該要因はなかった。

Table 1. EC50 and NOEC on each endpoint

Endpoint	EC50 (mg/L)	NOEC (mg/L)
Area under growth curve	1.24 (0.625 – 2.45)	0.136
Growth rate from 24- to 48-hour	2.93	0.548
Growth rate from 24- to 72-hour	>9.60	2.31

In parentheses are 95% confidence intervals.

Table 2. Growth inhibition of *Pseudokirchneriella subcapitata* during 72-hour exposure

Measured concentration (mg/L)		Area under growth curve ($\times 10^4$)	I_A (%)	Growth rate (24- to 48-h)	I_μ (%)	Growth rate (24- to 72-h)	I_μ (%)
Control	1	1700	—	0.0701	—	0.0534	—
	2	1480	—	0.0684	—	0.0507	—
	3	1570	—	0.0692	—	0.0532	—
	Mean	1590	—	0.0693	—	0.0524	—
0.0355	1	1480	6.57	0.0673	2.82	0.0508	3.02
	2	1480	6.53	0.0692	0.122	0.0508	3.06
	3	1480	6.48	0.0694	-0.227	0.0519	1.01
	Mean	1480	6.52	0.0686	0.904	0.0512	2.36
0.136	1	1520	4.17	0.0697	-0.714	0.0513	2.13
	2	1540	2.81	0.0686	0.984	0.0530	-1.05
	3	1410	10.8	0.0680	1.86	0.0495	5.66
	Mean	1490	5.93	0.0688	0.710	0.0513	2.24
0.548	1	1360	14.5	0.0687	0.842	0.0520	0.862
	2	1160	27.1	0.0633	8.58	0.0520	0.754
	3	1100	30.3	0.0624	9.92	0.0472	9.97
	Mean	1210	24.0	0.0648	6.45	0.0504	3.86
2.31	1	526	66.8	0.0425	38.6	0.0509	2.99
	2	510	67.8	0.0414	40.2	0.0502	4.25
	3	534	66.3	0.0453	34.6	0.0501	4.54
	Mean	523	67.0	0.0431	37.8	0.0504	3.93
9.60	1	45.6	97.1	0.00275	96.0	0.0201	61.6
	2	75.5	95.2	0.0134	80.7	0.0315	39.9
	3	91.9	94.2	0.0135	80.5	0.0354	32.6
	Mean	71.0	95.5	0.00988	85.7	0.0290	44.7

Table 3. Value of cell concentration at each time

Measured concentration (mg/L)		Cell concentration ($\times 10^4$ cells/mL)			
		0 hour*	24 hours	48 hours	72 hours
Control	1	1.00	5.70	30.7	74.0
	2	1.00	5.42	28.0	61.9
	3	1.00	5.36	28.2	68.7
	Mean	1.00	5.49	29.0	68.2
	S.D.	0	0.184	1.51	6.07
0.0355	1	1.00	5.46	27.4	62.7
	2	1.00	5.36	28.2	61.4
	3	1.00	5.21	27.6	63.0
	Mean	1.00	5.34	27.7	62.4
	S.D.	0	0.122	0.387	0.805
0.136	1	1.00	5.39	28.8	63.3
	2	1.00	5.32	27.6	67.6
	3	1.00	5.35	27.3	57.5
	Mean	1.00	5.35	27.9	62.8
	S.D.	0	0.0376	0.763	5.10
0.548	1	1.00	4.81	25.0	58.4
	2	1.00	4.35	19.9	52.9
	3	1.00	4.72	21.1	45.5
	Mean	1.00	4.63	22.0	52.2
	S.D.	0	0.245	2.69	6.46
2.31	1	1.00	2.57	7.12	29.5
	2	1.00	2.57	6.93	28.6
	3	1.00	2.61	7.73	28.8
	Mean	1.00	2.58	7.26	28.9
	S.D.	0	0.0232	0.416	0.484
9.60	1	1.00	1.30	1.39	3.42
	2	1.00	1.22	1.67	5.52
	3	1.00	1.24	1.71	6.76
	Mean	1.00	1.25	1.59	5.23
	S.D.	0	0.0444	0.176	1.69

* The value based on the measured value of pre-culture

Table 4. Result of statistical analysis

Measured concentration (mg/L)	Endpoint		
	Area under growth curve	Growth rate(24-48 h)	Growth rate(24-72 h)
0.0355	—	—	—
0.136	—	—	—
0.548	*	—	—
2.31		* *	—
9.60			—
Statistical procedure	Bartlett's test. Kruskal-Wallis test. Multiple comparison method (Dunnett non-parametric).	Bartlett's test. One-way ANOVA. Multiple comparison method (Dunnett).	Bartlett's test. Kruskal-Wallis test.

* : significant difference ($p < 0.05$)

* * : significant difference ($p < 0.01$)

— : no significant difference

Blank column expresses that the data in the exposure level were not used for the statistical analysis since the concentration was greater than EC50.

NOEC of growth rate(24-72 h) determined statistically was 9.60 mg/L but it was considered that there was obvious effect (inhibition) at this level, so 2.31 mg/L was estimated for NOEC, at which there was no effect.

Table 5. pH of test solution at the start and the end

Measured concentration (mg/L)	pH	
	At the start	At the end
Control	7.9	7.7
0.0355	7.9	7.7
0.136	7.8	7.7
0.548	7.8	7.6
2.31	7.9	7.6
9.60	7.9	7.6

Table 6. Temperature and light intensity in incubator

Time	At the start	1-day	2-day	At the end
Temperature(°C)	23.9	23.8	23.8	23.7
Light intensity(μ E/m ² s)	111	109	112	112

Table 7. Measured concentration of test substance in test solution

Nominal concentration (mg/L)	Measured concentration (mg/L)		
	At the start	At the end	Mean*
Control	n.d.	n.d.	—
0.0391	0.0384 (98.3)	0.0326 (83.4)	0.0355 (90.7)
0.156	0.150 (96.2)	0.123 (79.1)	0.136 (87.3)
0.625	0.615 (98.3)	0.487 (77.9)	0.548 (87.7)
2.50	2.38 (95.4)	2.24 (89.4)	2.31 (92.4)
10.0	9.68 (96.8)	9.52 (95.2)	9.60 (96.0)

Values in parentheses show percentage of nominal concentration.

n.d. : Not detected(<0.000871 mg/L)

* The values are expressed as time-weighted means calculated by the following equation:

$$[72(C_0 - C_{72}) / (\ln C_0 - \ln C_{72})] / 72$$

where

C_0 : the measured concentration at the start

C_{72} : the measured concentration at the end

$\ln C_0$: the natural logarithm of C_0

$\ln C_{72}$: the natural logarithm of C_{72} .

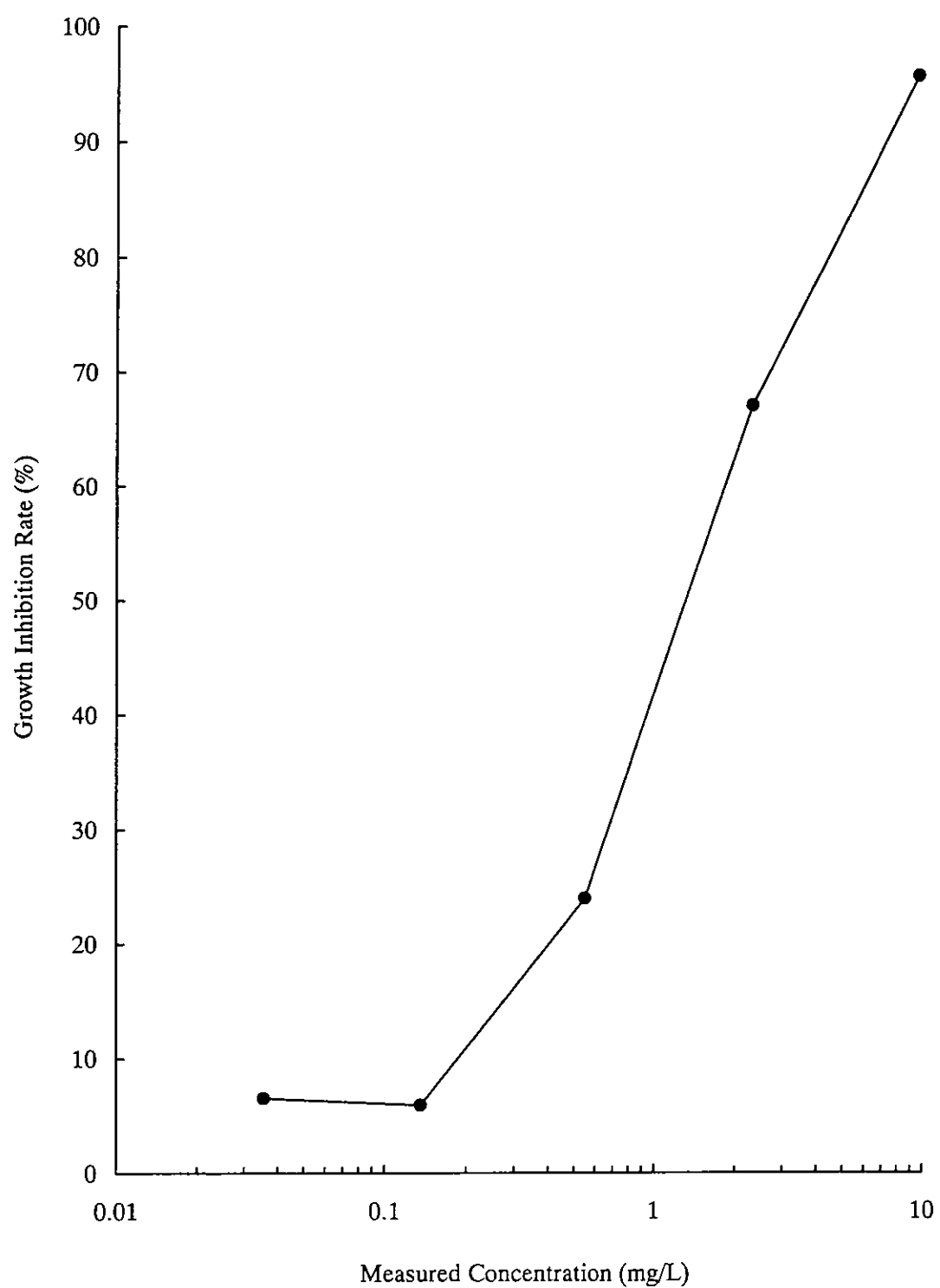


Figure 1. Concentration-response curve based on parameter of area under growth curve.

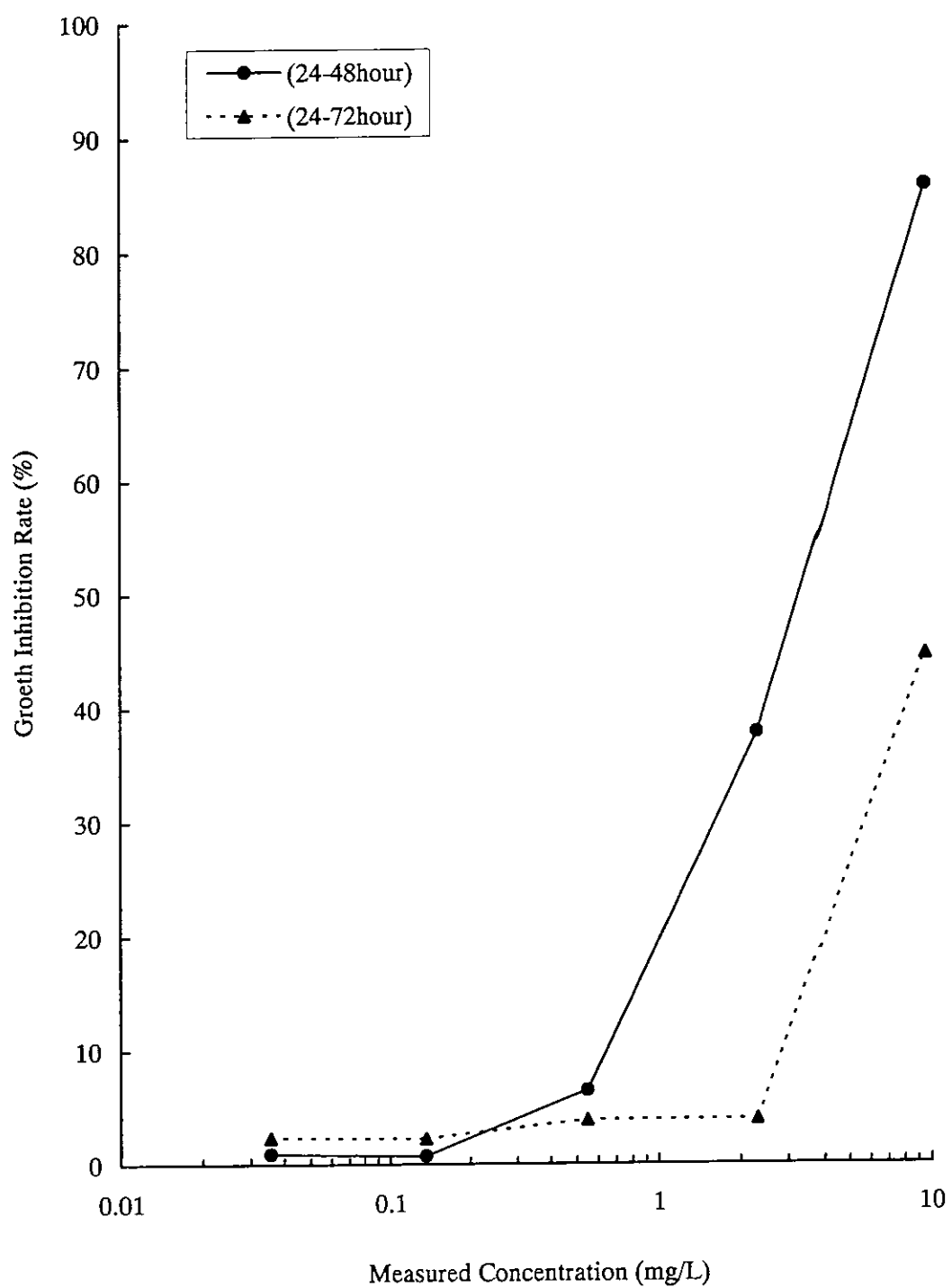


Figure 2. Concentration-response curve based on parameter of growth rate.

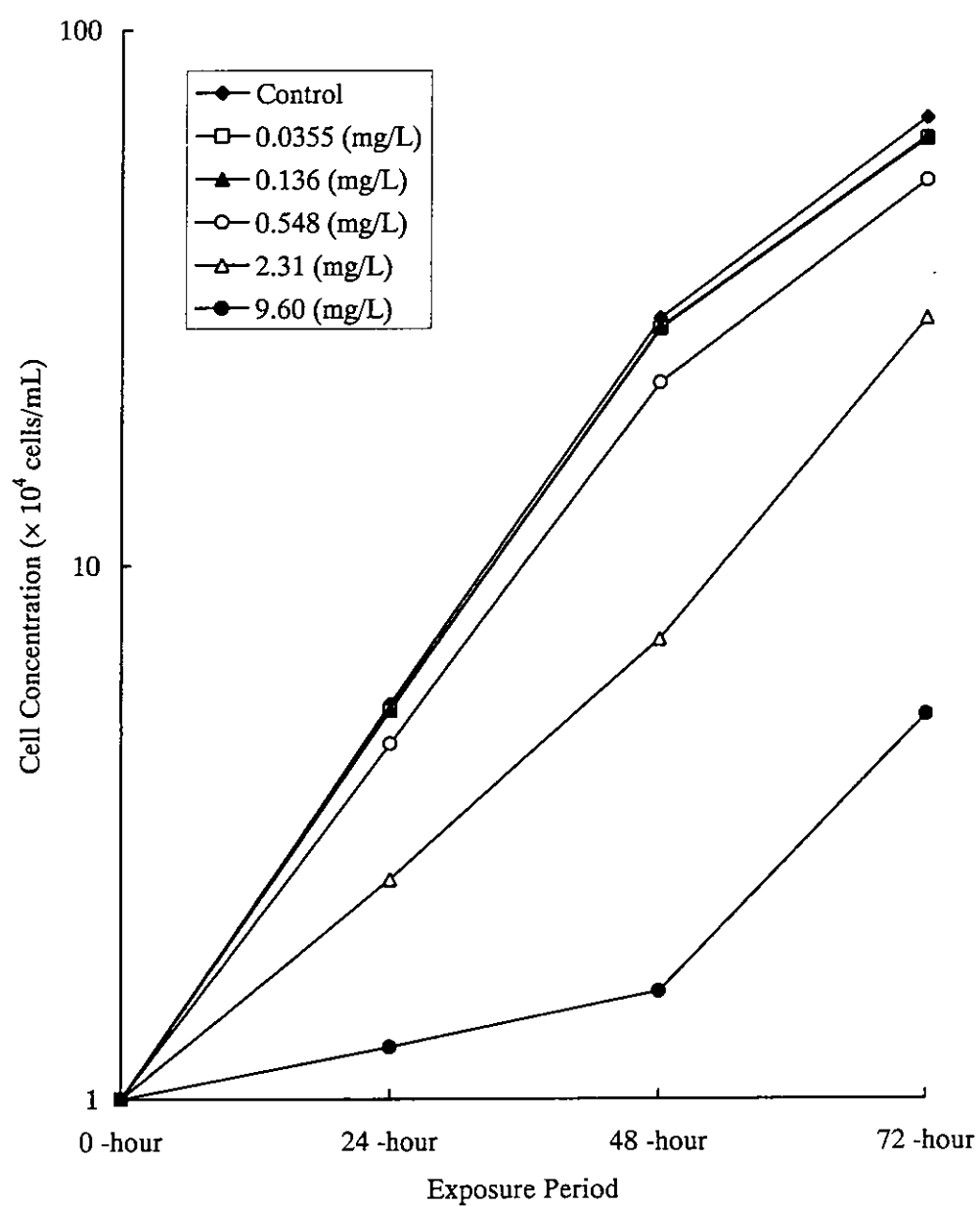


Figure 3. Growth curve of *Pseudokirchneriella subcapitata* in each exposure level.

Appendix 1

Composition of OECD medium
(one page)

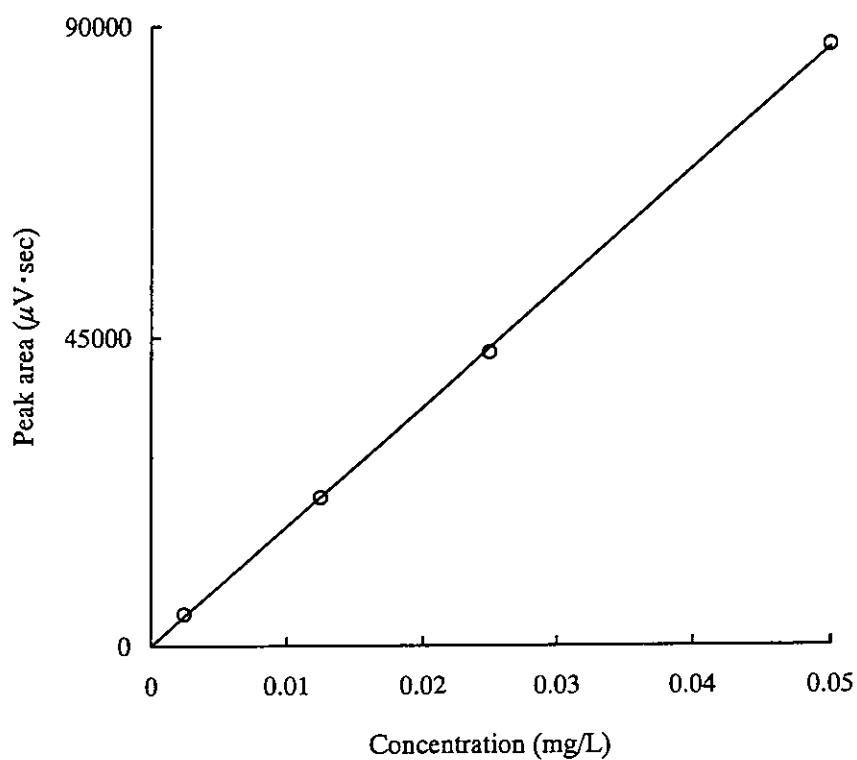
Composition of OECD medium

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

The constituents mentioned above are filled up to 1 litre with purified water, where the unit of pH is approximately 8.

Appendix 2

Calibration curve and chromatogram
(three pages)

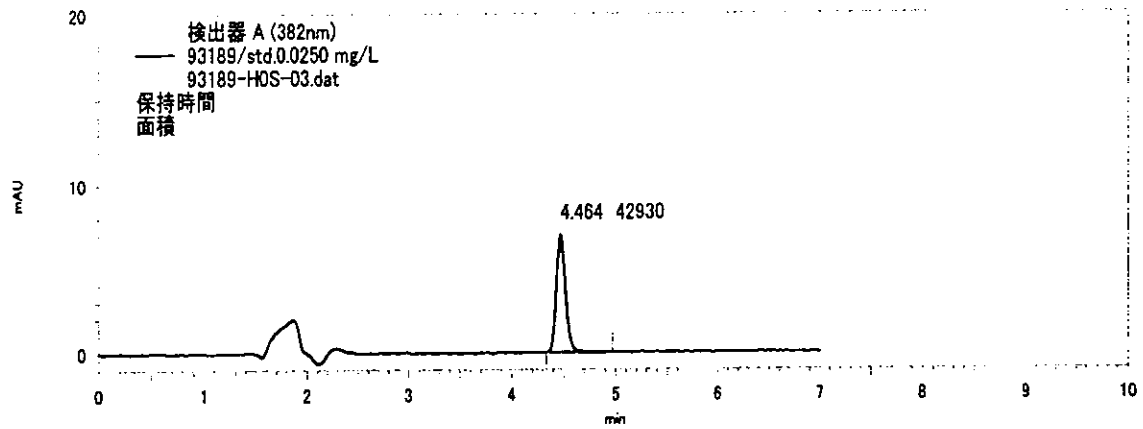


$$y = 1735959x$$

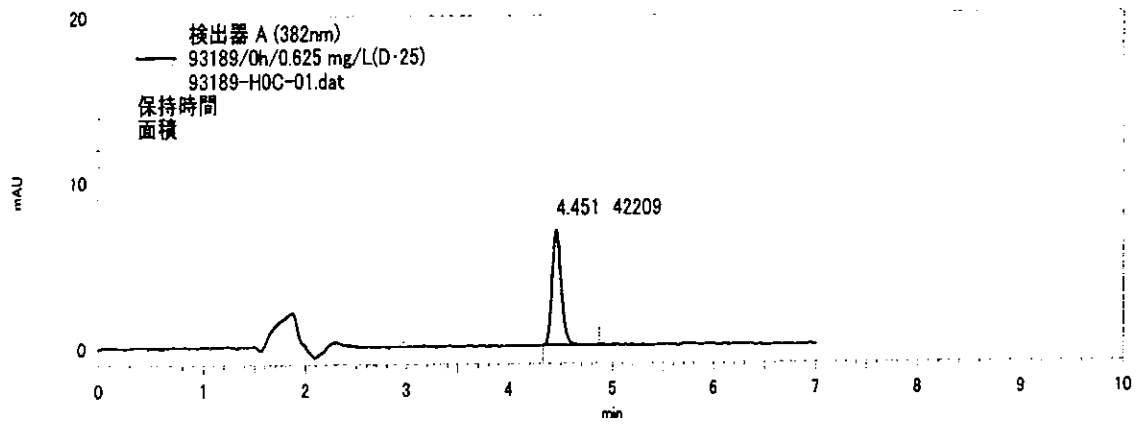
$$r = 1.00$$

Concentration (mg/L)	Peak area ($\mu\text{V}\cdot\text{sec}$)
0.00250	4636
0.0125	21602
0.0250	42734
0.0500	87140

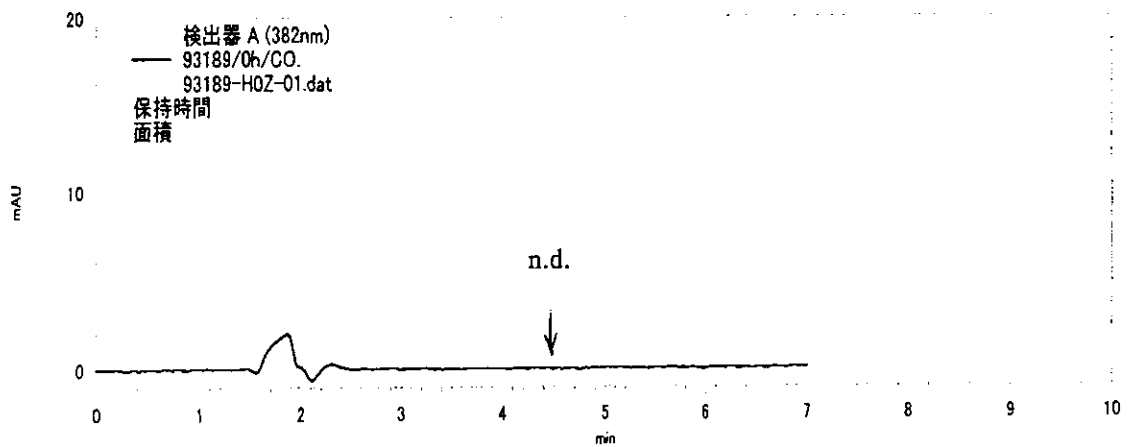
Appendix 2-1 Calibration curve of *p*-phenylazoaniline by HPLC analysis.



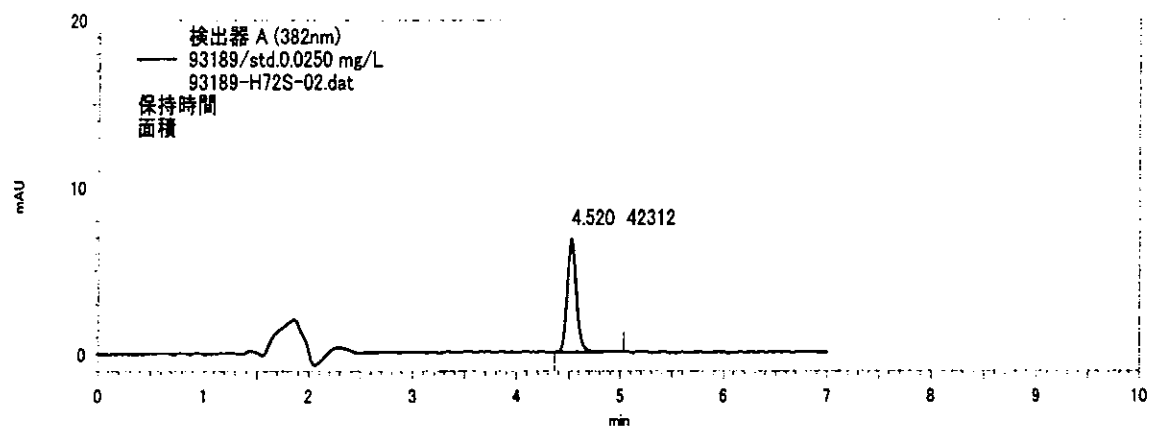
Appendix 2-2 HPLC chromatogram of 0.0250 mg/L standard solution at the start of the exposure.



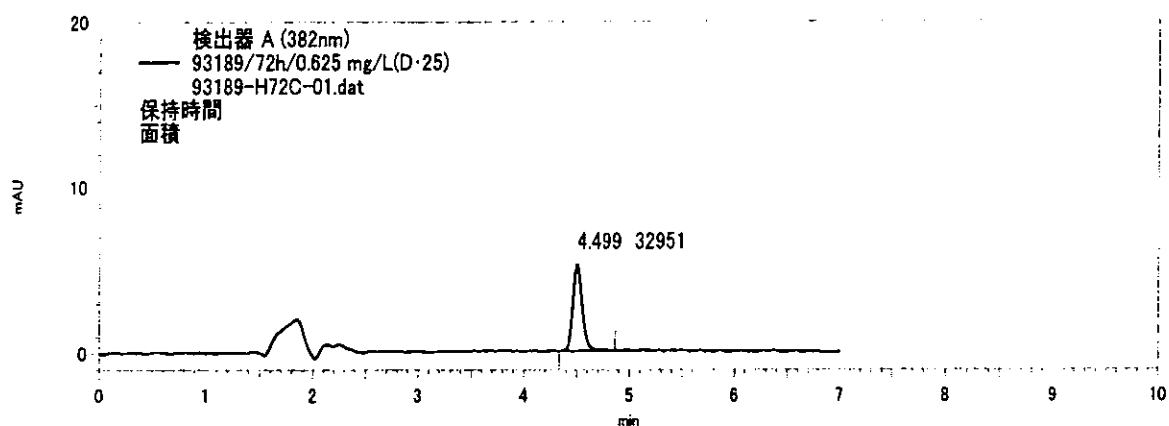
Appendix 2-3 HPLC chromatogram of 0.625 mg/L (nominal concentration) at the start of the exposure.



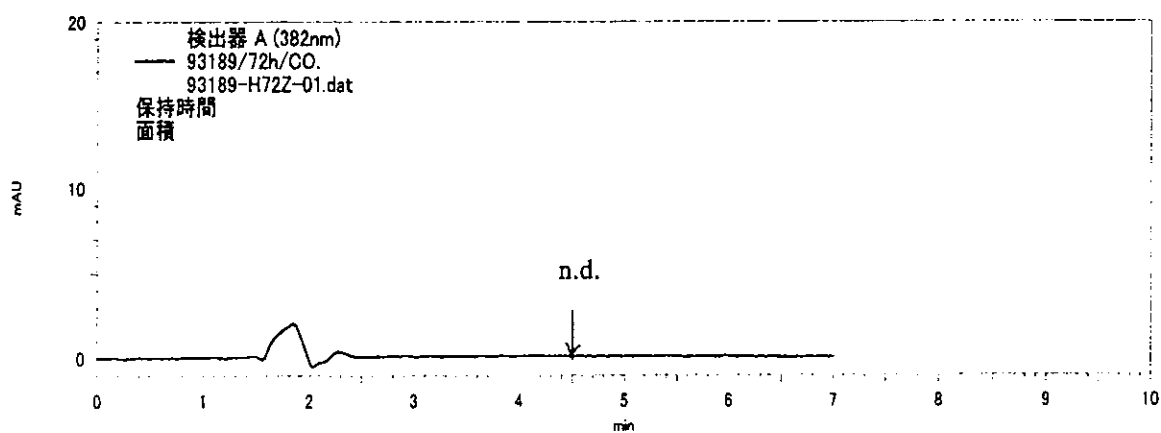
Appendix 2-4 HPLC chromatogram of control at the start of the exposure.



Appendix 2-5 HPLC chromatogram of 0.0250 mg/L standard solution at the end of the exposure.



Appendix 2-6 HPLC chromatogram of 0.625 mg/L (nominal concentration) at the end of the exposure.



Appendix 2-7 HPLC chromatogram of control at the end of the exposure.

Appendix 3

Statistical method for EC50 and NOEC calculation
(four pages)

生長曲線下面積による阻害率算出

(0 ~ 72 h)

濃度 (mg/L)	阻害率 (%)	検定結果	NOEC
-	-	-	0.136
0.0355	6.523978731		0.0355
0.136	5.926334819		0.136
0.548	23.96809673	*	0
2.31	66.98464566	-	0
9.6	95.52028184	-	0
			0
			0

濃度 (mg/L)	X:Log(濃度)	Y:阻害率 (%)	X2	Y2	XY	
0.0355						
0.136	-0.866461092	5.926334819	0.75075482	35.1214444	-5.1349385	*
0.548	-0.261219442	23.96809673	0.0682356	574.469661	-6.2609328	*
2.31	0.36361198	66.98464566	0.13221367	4486.94275	24.3564196	*
9.6	0.982271233	95.52028184	0.96485678	9124.12424	93.826825	*
合計	0.21820268	192.399359	1.91606087	14220.6581	106.787373	

採用濃度数	XAvg	YAvg	Sxx	Syy	Sxy
4	0.05455067	48.09983976	1.90415776	4966.27976	96.2918593

傾き	切片	要因	SS	Df	Ms
50.56926538	45.34125245	L: (直線回帰)	4869.40859	1	4869.40859
28.86888169		R: (残差)	96.871172	2	48.435586
72.26964908		Y: (全体)	4966.27976	3	
		Fcal	100.533698	**	
		F(5%)	18.5127647		

Y	EC	95%lower	95%Upper
	50	35.00550042	64.9944996
Log(濃度)	0.092126067	-0.20438802	0.38864015
濃度	1.236306257	0.624614382	2.44703485
結果	1.236306257		

比生長速度による阻害率算出
(24~48h)

濃度(mg/L)	阻害率(%)	検定結果	NOEC
-	-		0.548
0.0355	0.903543185		0.0355
0.136	0.70992421		0.136
0.548	6.448042445		0.548
2.31	37.80289354	**	0
9.6	85.73892232	-	0
			0
			0

濃度(mg/L)	X:Log(濃度)	Y:阻害率(%)	X2	Y2	XY	
0.0355						
0.136						
0.548	-0.261219442	6.448042445	0.0682356	41.5772514	-1.684354	*
2.31	0.36361198	37.80289354	0.13221367	1429.05876	13.745585	*
9.6	0.982271233	85.73892232	0.96485678	7351.1628	84.2188769	*
合計	1.084663771	129.9898583	1.16530604	8821.79881	96.2801079	

採用濃度数	XAvg	YAvg	Sxx	Syy	Sxy
3	0.36155459	43.32995277	0.77314088	3189.34439	49.2816779

傾き	切片	要因	SS	Df	Ms
63.74217076	20.28367832	L:(直線回帰)	3141.32113	1	3141.32113
-36.39850256		R:(残差)	48.023264	1	48.023264
163.8828441		Y:(全体)	3189.34439	2	
		Fcal		65.412487	
		F(5%)		161.446224	

	EC	95%lower	95%Upper
Y	50	-	-
Log(濃度)	0.466195633	-	-
濃度	2.925469896	-	-
結果	2.925469896		

比生長速度による阻害率算出
(24~72h)

濃度(mg/L)	阻害率(%)	検定結果	NOEC
-	-		9.6
0.0355	2.362630467		0.0355
0.136	2.244650359		0.136
0.548	3.861707432		0.548
2.31	3.928812564		2.31
9.6	44.6719483		9.6
			0
			0

濃度(mg/L)	X:Log(濃度)	Y:阻害率(%)	X2	Y2	XY	
0.0355						
0.136						
0.548						
2.31	0.36361198	3.928812564	0.13221367	15.4355682	1.42856331	*
9.6	0.982271233	44.6719483	0.96485678	1995.58297	43.8799697	*
合計	1.345883213	48.60076087	1.09707045	2011.01853	45.3085331	

採用濃度数	XAvg	YAvg	Sxx	Syy	Sxy
2	0.672941606	24.30038043	0.19136964	830.001555	12.603059

傾き	切片	要因	SS	Df	Ms
65.85715082	-20.01763644	L:(直線回帰)	830.001555	1	830.001555
#NUM!		R:(残差)	1.0232E-12	0	#DIV/0!
#NUM!		Y:(全体)	830.001555	1	
		Fcal		#DIV/0!	#DIV/0!
		F(5%)		#NUM!	

	EC	95%lower	95%Upper
Y	50	#DIV/0!	#DIV/0!
Log(濃度)	1.063174394	-	-
濃度	11.56576581	-	-
結果	>9.6		

生長曲線下面積

バートレットの検定 有意である

クラスカルワルツの検定 有意である

ダンネットの検定

群名	平均	標準偏差	検定結果	棄却限界値
Control	1585.493	109.4437		0
0.0355	1482.055	0.749769		6.918212
0.136	1491.531	67.86457		6.918212
0.548	1205.48	132.8554 *		6.918212

—

—

生長速度(24-48h)

バートレットの検定 有意でない

一元配置の分散分析 有意である

ダンネットの検定

群名	平均	標準偏差	検定結果	棄却限界値
Control	0.069251	0.000873		0
0.0355	0.068625	0.001153		0.00453
0.136	0.068759	0.000907		0.00453
0.548	0.064786	0.003394		0.00453
2.31	0.043072	0.001999 **		0.006082

—

生長速度(24-72h)

バートレットの検定 有意である

クラスカルワルツの検定 有意でない

群名	平均	標準偏差	検定結果	棄却限界値
Control	0.052434	0.001477		
0.0355	0.051196	0.000614		
0.136	0.051257	0.001761		
0.548	0.05041	0.002773		
2.31	0.050374	0.000431		
9.6	0.029011	0.007917		

別添資料

p-(フェニルアゾ)アニリンの*Pseudokirchneriella subcapitata*による藻類生長阻害試験

予備試験結果
(全1頁)

予備試験結果

＜生物への影響＞

設定濃度区 (mg/L)	阻 害 率 (%)		
	生長曲線下面積	生長速度(24-48h)	生長速度(24-72h)
0.0400	-1.29	0.847	-0.908
0.126	6.80	0.548	-0.441
0.625	30.8	10.6	20.0
1.25	44.0	19.4	22.3
2.50	77.7	51.7	38.7
5.00	97.8	90.8	93.7
10.0	98.9	96.3	98.5

＜試験液中の被験物質濃度＞

設定濃度(mg/L)	開始時(mg/L)	終了時(72時間後) (mg/L)
0.625	0.540 (86.3)	0.411 (65.7)
10.0	8.52 (85.2)	8.59 (85.9)

()内は対設定濃度(%)を示す。