


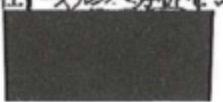
環境省 殿

最 終 報 告 書

2-メチルプロパン-2-オールの藻類 (*Pseudokirchneriella subcapitata*)
に対する生長阻害試験

(試験番号: No. 2009-生24)

2010年 3月30日作成

株式会社  分析センター


陳 述 書

株式会社 クレハ分析センター

試験委託者： 環境省

表題 ： 2-メチルプロパン-2-オールの藻類
(*Pseudokirchneriella subcapitata*) に対する生長阻害試験

試験番号 ： No. 2009-生24

本試験は、

厚生労働省医薬食品局長、経済産業省製造産業局長、環境省総合環境政策局長連名通知「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について」(薬食発第 1121003 号、平成15・11・17 製局第 3 号、環保企発第 031121004 号、平成15年11月21日、平成20年7月4日改正)

厚生労働省医薬食品局長、経済産業省製造産業局長、環境省総合環境政策局長連名通知「新規化学物質等に係る試験の方法について」(薬食発第 1121002 号、平成15・11・13 製局第 2 号、環保企発第 031121002 号、平成15年11月21日、平成18年11月20日改正)

OECD GUIDELINES FOR THE TESTING OF CHEMICALS 201: Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test (Adopted 23 March 2006)

に従って実施した。

本報告書の試験データの正確性および有効性について確認した。

2010年 3月30日

試験責任者



2010年 3月30日

確認： 運営管理者



信 頼 性 保 証 書

株式会社 クレハ分析センター

試験委託者： 環境省

表題 ： 2-メチルプロパン-2-オールの藻類
(*Pseudokirchneriella subcapitata*) に対する生長阻害試験

試験番号 ： No. 2009-生24

記

	監査, 査察実施日	報告日	
		運営管理者	試験責任者
試験計画書の監査	2010年 2月22日	2010年 2月22日	2010年 2月22日
実験状況の監査, 査察	2010年 3月16日	2010年 3月16日	2010年 3月16日
	2010年 3月19日	2010年 3月19日	2010年 3月19日
実験終了後の監査	2010年 3月24日	2010年 3月24日	2010年 3月24日
組織体制の監査	2010年 2月15日	2010年 2月15日	2010年 2月15日
施設・設備の査察 試験用機器等 施設, 設備等 試験系	2010年 2月12日	2010年 2月12日	2010年 2月12日
最終報告書の監査	2010年 3月30日	2010年 3月30日	2010年 3月30日

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確認した。

2010年 3月30日

信頼性保証部門責任者 ：  

試験実施概要

1. 表題 : 2-メチルプロパン-2-オール(2-メチルブタノール)の藻類 (*Pseudokirchneriella subcapitata*) に対する生長阻害試験

2. 試験目的 : 指数増殖期の藻類 (*Pseudokirchneriella subcapitata*) を被験物質に暴露し、対照区に対する生長阻害率を測定することにより、藻類の生長に対する被験物質の毒性を明らかにする。

3. 試験法ガイドライン :

本試験は、

厚生労働省医薬食品局長、経済産業省製造産業局長、環境省総合環境政策局長連名通知「新規化学物質等に係る試験の方法について」(薬食発第 1121002 号、平成15・11・13 製局第 2 号、環保企発第 031121002 号、平成15年11月21日、平成18年11月20日改正)

OECD GUIDELINES FOR THE TESTING OF CHEMICALS 201: Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test (Adopted 23 March 2006)

に従って実施した。

4. 適用GLP :

本試験は、

厚生労働省医薬食品局長、経済産業省製造産業局長、環境省総合環境政策局長連名通知「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について」(薬食発第 1121003 号、平成15・11・17 製局第 3 号、環保企発第 031121004 号、平成15年11月21日、平成20年7月4日改正)

に従って実施した。

5. 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一丁目 2-2

6. 試験受託者

名称 : 株式会社 クレハ分析センター
本社所在地 : 〒974-8232 福島県いわき市錦町落合16番地
代表者 : [REDACTED]

7. 試験施設

実施施設名 : 株式会社 クレハ分析センター
所在地 : 〒974-8232 福島県いわき市錦町落合16番地

8. 試験関係者 :

試験責任者	[REDACTED]	(生物試験室)
試験担当者	[REDACTED]	(生物試験担当者)
	[REDACTED]	(生物試験担当者)
	[REDACTED]	(生物試験担当者)
	[REDACTED]	(濃度分析責任者)
	[REDACTED]	(濃度分析担当者)

9. 試験期間 :

試験開始日	2010年 2月22日
実験開始日	2010年 2月24日
(暴露期間	2010年 3月16日～2010年 3月19日)
実験終了日	2010年 3月23日
試験終了日	2010年 3月30日

目 次

	頁
要 旨	1
1 被験物質	3
1.1 名称、構造式および物理化学的性状.....	3
1.2 供試試料	3
1.3 被験物質の保管方法および保管条件下の安定性.....	4
2 供試生物	4
2.1 供試生物	4
2.2 感受性確認	4
2.3 前培養	4
3 試験方法	5
3.1 試験条件	5
3.2 培地	5
3.3 試験容器および機器.....	5
3.4 被験物質の溶解性確認.....	6
3.5 試験濃度の設定.....	6
3.6 試験溶液の調製.....	6
3.7 被験物質濃度等の測定.....	7
3.8 試験操作	7
4 結果の算出	8
4.1 阻害濃度算出に用いる被験物質濃度の決定.....	8
4.2 生長曲線	8
4.3 生長速度の算出.....	8
4.4 50 % 生長阻害濃度 (E_rC_{50}) の算出.....	9
4.5 最大無作用濃度 (NOEC).....	9
4.6 統計的手法	9
5 結果および考察	9
5.1 試験成績の信頼性に影響をおよぼしたと思われる環境要因.....	9
5.2 培地に対する被験物質の溶解性.....	9
5.3 試験溶液中の被験物質濃度.....	10
5.4 生長曲線	10
5.5 50 % 生長阻害濃度 (E_rC_{50}) の算出.....	12
5.6 最大無作用濃度 (NOEC).....	12
5.7 温度、光強度および pH.....	12
5.8 試験計画書からの逸脱の有無.....	13
6. 保管	13
Table 1 ～6	14
Figure 1	17
付属資料－1 OECD培地.....	18
付属資料－2 予備試験の結果.....	20
付属資料－3 試験溶液の分析法.....	22
付属資料－4 統計解析結果.....	27

要 旨

試験委託者 環境省

表題 2-メチルプロパン-2-オールの変類 (*Pseudokirchneriella subcapitata*) に対する生長阻害試験

試験番号 No. 2009-生24

試験法ガイドライン

本試験は、

厚生労働省医薬食品局長、経済産業省製造産業局長、環境省総合環境政策局長連名通知「新規化学物質等に係る試験の方法について」(薬食発第 1121002 号、平成15・11・13 製局第 2 号、環境企発第 031121002 号、平成15年11月21日、平成18年11月20日改正)

OECD GUIDELINES FOR THE TESTING OF CHEMICALS 201: Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test (Adopted 23 March 2006)

に従って実施した。

- | | |
|--------------|---|
| 1) 被験物質 | : 2-メチルプロパン-2-オール |
| 2) 暴露方式 | : 止水式、振とう培養 (100 rpm) (密閉系) |
| 3) 供試生物 | : <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> (ATCC 22662) |
| 4) 暴露期間 | : 72 時間 |
| 5) 試験濃度(設定値) | : 対照区, 120 mg/L (限度試験) |
| 6) 試験溶液量 | : 100 mL (OECD 培地) / 容器 |
| 7) 連数 | : 6 容器/濃度区、6 容器/対照区 |
| 8) 初期生物量 | : 0.5 mg/L 以下(細胞濃度として 0.5×10^4 cells/mL) |
| 9) 試験温度 | : 23 ± 2 °C |
| 10) 照明 | : 60 ~ 120 μ E/m ² /s (フラスコ液面付近) で連続照明 |
| 11) pH | : 試験溶液の pH 調整は行わなかった |
| 12) 分析法 | : GC 法 |

結 果

1) 試験溶液中の被験物質濃度

暴露期間中の被験物質濃度の軽微な減少は、密閉系を採用したものの被験物質の揮発によるものが主因と考えられた。従って、各影響濃度（50 % 生長阻害濃度、最大無作用濃度）の算出に当たっては、48 時間は暴露開始時と 48 時間後の測定値の幾何平均値、72 時間は暴露開始時、48 時間後および暴露終了時の測定値の幾何平均値を採用した。

2) 生長速度の比較による阻害濃度

密閉系において試験を実施したため、72 時間の暴露終了時においては、日毎の変動係数の成立条件を満たさなかったため、暴露 48 時間の結果を採用した。

48 時間の各影響濃度

50 % 生長阻害濃度 (E_xC_{50}) : >110 mg/L
最大無作用濃度 (NOEC) : 110 mg/L

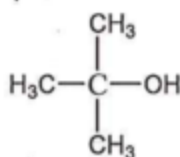
72 時間の各影響濃度 (参考)

50 % 生長阻害濃度 (E_xC_{50}) : >110 mg/L
最大無作用濃度 (NOEC) : 110 mg/L

1 被験物質

1.1 名称、構造式および物理化学的性状

化学物質等の名称 : 2-メチルプロパン-2-オール
一般名^{**}, ^{***} : tert-ブタノール
CAS番号^{*}, ^{**} : 75-65-0
構造式 :



分子式^{*} : C₄H₁₀O
分子量^{*} : 74.12
蒸気圧^{*} : 40.7 mmHg (25°C)
水溶解度^{*} : 1×10⁶ mg/L (25°C)
ヘンリー定数^{*} : 9.05×10⁻⁶ atm·m³/mole (25°C)
酸解離定数(pKa)^{*} : 19.2 (25°C)
1-オクタノール/水分配係数^{*} : 0.35
融点^{*} : 25.4°C
沸点^{*} : 82.4°C
外観^{**} : 白色の塊
安定性^{**} : 酸化剤、金属との接触を避ける。
溶媒に対する溶解性^{**} : 水、アルコール、エーテルに易溶

1.2 供試試料

入手先 : XXXXXXXXXX
入手量 : 25 mL×5本 (同一ロット)
ロット番号^{***} : XXXXXXXXXX
純度^{***} : 99.9 % (GC)
不純物の名称および含有率^{***} : 記載なし
性状^{**}, ^{***} : 常温で澄明液体、又は白色の塊
入手日 : 2010年1月14日

〔出典〕

* : SRC PhysProp Database

** : XXXXXXXXXX「製品安全データシート 製品名: tert-Butanol」
(作成・改定日 2009年07月21日)

*** : XXXXXXXXXX「試験成績書 製品名: tert-Butanol」(製品コード : XXXXXXXXXX 2010年01月13日)

1.3 被験物質の保管方法および保管条件下の安定性

1) 保管方法

被験物質保管用冷蔵庫において、遮光・密閉保管した。

2) 被験物質の確認およ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を測定し、公的データ*との比較により、被験物質の特性が認められることを確認し、さらに官能基のリストと照合して同一性を確認した。

実験終了後にも同様に赤外吸収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比較した。その結果、スペクトルに変化はなかったことから、被験物質は実験期間中安定であったと判断した。

* : 独立行政法人 産業技術総合研究所「有機化合物スペクトルデータベース (SDBS)」

2 供試生物

2.1 供試生物

試験には、単細胞緑藻類である *Pseudokirchneriella subcapitata* (旧名 ; *Selenastrum capricornutum*) を用いた。

本種は、American Type Culture Collectionより 1997年11月13日に入手した ATCC 22662株を、当施設においてC 培地を用いて無菌的に継代培養しているものである。使用藻類は 6 ヶ月ごとに細菌の有無を検査して無菌状態であることを確認した。

2.2 感受性確認

直近の基準物質 (3, 5-ジクロロフェノール 99 %) による 72 時間 50 % 藻類生長阻害濃度 (E_rC_{50}) は 1.8 mg/L (暴露期間 2009年11月24日～11月27日) であった。

当施設における 2007年12月以降から直近前までの E_rC_{50} 値は $\bar{X} = 2.1$ mg/L、S. D. = 0.26 mg/L、n= 6 であった。

2.3 前培養

藻類を試験条件にじゅん化させ、試験に用いる指数増殖期の前培養液を得るため、暴露開始前に 3 日間 (2010年 3月13日～ 3月16日) 試験と同条件で前培養を行った。この間、藻類は指数増殖することを確認している。前培養液に接種する藻類の生物量は 0.5 mg/L 以下 (細胞数として 0.5×10^4 cells/mL) に調整し、暴露開始時に指数増殖期になる様にした。変形や異常な細胞の出現は認められなかった。

3 試験方法

以下の条件で試験を行った。試験容器は滅菌したものを使用し、その他の器具の滅菌を行った。また、藻類の接種等の操作は無菌条件下で行った。

3.1 試験条件

- 1) 暴露方式 : 止水式（密閉系）
〔理由：100 mg/L 溶液の23℃での48時間後の濃度維持率が開放系で83 %（密閉系で96 %）であり、72時間後に濃度維持率が80 %を下回ることが懸念されたため〕
振とう培養（100 rpm）
- 2) 暴露期間 : 72 時間
- 3) 試験溶液量 : 100 mL（OECD 培地、3.2 参照）／容器
- 4) 連数 : 対照区、濃度区とも 6 容器／区
- 5) 初期生物量 : 0.5 mg/L 以下（細胞数として 0.5×10^4 cells/mL）
- 6) 試験温度 : 23℃で設定し、経時的変動範囲は $\pm 2^\circ\text{C}$ 以内とする。
- 7) 照明 : 60 ～ 120 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ （フラスコ液面付近）で連続照明（白色または昼光色の蛍光灯を用い、連続的かつ均一に照射する。）
当施設の光強度の実績値はおよそ 66 ～ 79 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ である。
- 8) pH : 試験溶液の pH 調整は行わない。

3.2 培地

前培養および試験ともに OECD GUIDELINES FOR THE TESTING OF CHEMICALS 201, Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test (Adopted 23 March 2006) において推奨される培地を用いた。成分表を付属資料－1「OECD培地」に示した。 NaHCO_3 を除く成分を先に混合の上、大気との平衡状態とし、0.22 μm PVDF 製メンブランフィルター（商品名：Vacuum Driven Disposable Filtration System, メーカー：Asahi Techno Glass Corporation）を用いて減圧してろ過滅菌した。これに 0.20 μm ポリエチレン製メンブランフィルター（商品名：Disposable Sterile Syringe Filter, code 2062-025 メーカー：Asahi Glass. Co., Ltd.）を用いて加圧してろ過滅菌した炭酸水素ナトリウム 成分を添加した。

3.3 試験容器および機器

- 1) 試験容器 : 共栓付 300 mL 容ガラス製三角フラスコ（柴田科学）
（ヘッドスペース：250 mL）を用い、密栓した。
- 2) 藻類培養試験装置 : 藻類培養試験器 GT-40S （宮本理研工業）

- | | | |
|-------------|------------------|-------------|
| 3) 光学顕微鏡 | : 生物顕微鏡 BHS | (オリンパス光学工業) |
| 4) 細胞濃度計数装置 | : 粒子測定装置 F-520P | (Sysmex) |
| | 粒子分布解析装置 PDA-500 | (Sysmex) |
| 5) pH 計 | : HM-30V | (東亜ディーケーケー) |
| 6) 温度計 | : ガラス製水銀温度計 | |
| 7) 照度計 | : ANA-F9 型 | (柴田科学) |

3.4 被験物質の溶解性確認

被験物質の培地に対する溶解性は、フラスコ攪拌法で確認した。

被験物質の水溶解度の文献値が 1×10^6 mg/L (25℃) であることから、培地を用いて被験物質濃度が 500 mg/L 溶液を調製後、マグネチックスターラーを用いて試験温度 (23℃) で 30 分間攪拌し、目視により溶解した状態であることを確認した。

この調製液をろ過しない場合と、試験温度で 0.2 μ m 親水性 PTFE タイプメンブランフィルター (商品名: H020A090C, メーカー: ADVANTEC) を用いて加圧ろ過したろ液中の被験物質濃度を GC 法により測定した。

3.5 試験濃度の設定

予備的検討において揮発によると思われる被験物質の濃度減少が認められたため、被験物質濃度を確実に 100 mg/L 以上に維持するために最高濃度区を 120 mg/L に設定し、公比 $10^{1/2}$ (約 3.2) で 3 段階 (12 ~ 120 mg/L) の濃度設定による予備試験を行った。その結果 (付属資料-2)、72 時間生長阻害率が 12 mg/L 区で 3.8 %、38 mg/L 区で 2.4 %、120 mg/L 区で 2.8 % であり、48 時間生長阻害率は 12 mg/L 区で 2.8 %、38 mg/L 区で 0.9 %、120 mg/L 区で 2.2 % であった。また、120 mg/L 区の被験物質の濃度は、暴露開始時に 112 mg/L、72 時間後には 108 mg/L まで減少した。

この結果を基に、本試験においても確実に 100 mg/L 以上に維持するため、120 mg/L 区および対照区の限度試験とした。

3.6 試験溶液の調製

試験溶液は用時調製とした。

500 mg の被験物質を 1 L メスフラスコに秤り入れ、培地成分の NaHCO_3 を加えない培地で 1 L とした。これをマグネチックスターラーを用いて試験温度 (23℃) で 30 分間攪拌した。この溶液を 0.2 μ m 親水性 PTFE タイプメンブランフィルター (H020A090C, ADVANTEC) を用いて減圧でろ過滅菌後、この溶液の 0.9 L にろ過滅菌済

みの NaHCO_3 水溶液 (50 g/L) 0.9 mL を添加し、500 mg/L の試験原液とした (無色透明)。

120 mg/L 区の試験溶液は、500 mg/L の試験原液から 24 mL を 76 mL の滅菌済み培地の入った 300 mL 三角フラスコに加えて調製した (無色透明)。

対照区には被験物質を加えない滅菌済み培地を用いた。

3.7 被験物質濃度等の測定

1) 被験物質濃度の測定

暴露開始時には調製した試験溶液より採取したものについて、48 時間後には予備 1 容器について、暴露終了時には、対照区および濃度区は各 6 容器より試験溶液を等量ずつ採取し混合したものについて、GC 法により被験物質濃度を測定した。その際、測定用に採取した溶液は、揮発による濃度減少を避けるため、遠心分離による藻体除去を行わずに GC 法による測定を行った。試験溶液の分析に際しては、標準溶液の測定を行い、そのピーク面積 (カウント数) から定量した。

詳細は付属資料-3「試験溶液の分析法」(測定条件、検量線、添加回収率、保存安定性、定量下限値、検出限界値等) に示した。

2) 試験環境の測定

暴露期間中、培養装置内の温度ならびにフラスコ液面の照度を 1 日 1 回測定した。

照度計を用いて測定した照度 (Lx) は、測定値に係数 0.013 を乗ずることにより $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ 単位に換算した。

pH は暴露開始時および終了時に測定した。暴露開始時の pH は、予備用として別の容器に調製した試験溶液について測定し、48 時間後には予備 1 容器について、暴露終了時の pH は全ての容器の試験溶液について測定した。

3.8 試験操作

前培養した藻類の細胞数を計数し、 23 ± 2 °C に調整した試験溶液中に生物量 0.5 mg/L 以下 (細胞濃度として 0.5×10^4 cells/mL, 対照区の日毎の変動係数を試験成立条件内に、また暴露開始時と暴露終了時の pH 変動範囲をできるだけ小さくするため) となるように、前培養液を添加した。

各試験容器を 23 ± 2 °C に調整された培養装置に設置して暴露開始とし、24、48 および 72 時間後に細胞濃度を測定した。すなわち各試験容器より試験溶液の一定量 (24 時間後は 2 mL、48、72 時間後は 1 mL) を採取し、セルパック (専用の希釈

液)を用いて希釈(細胞数に応じて4倍、10倍、50倍に希釈)した溶液について行い、滅菌した培地を同様に希釈した溶液の測定値をブランクとして差し引いて細胞濃度を求めた。

生物量の測定は、暴露終了時に対照区の各フラスコ培養液(約90 mL)より、フラスコごとに培養液の全量もしくは一部を採り、減圧ろ過により0.22 µm メンブランフィルター上に藻体を集めた。このフィルターを65℃で24時間乾燥させ、それを23℃で2時間静置冷却した後に乾燥重量を測定した。この値と培地のみを通したメンブランフィルターに同じ処理をして測定した重量を差し引いて、藻体の乾燥重量を求めた。

24、48、72時間後には顕微鏡下で細胞の形態観察も行った。

4 結果の算出

4.1 阻害濃度算出に用いる被験物質濃度の決定

暴露期間中の被験物質濃度の軽微な減少は被験物質の揮発によるものが主因と考えられた。従って影響濃度(50% 生長阻害濃度および最大無作用濃度)の算出に当たっては幾何平均値を採用し、72時間の平均値は暴露開始時、48時間後および暴露終了時、48時間の平均値は暴露開始時、48時間後の測定値を用いた。

4.2 生長曲線

1) 生物量の算出

暴露終了時に測定した対照区の6試験容器の各細胞濃度($x: \times 10^4$ cells/mL)と、その後に求めたそれぞれの単位容積あたりの乾燥重量($y: \text{mg/mL}$)から算出した回帰式($y=0.0003489x$, $r^2=0.808$)を基に、暴露期間に測定した各試験区の細胞濃度を生物量(乾燥重量)に換算した。

2) 生長曲線

被験物質濃度と生長阻害率の関係は、生長速度の比較について計算した。暴露期間と、被験物質の各濃度区と対照区の生物量の変化の関係を表にした。各濃度区と対照区の生物量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。この時、対照区の生長曲線が暴露期間を通じて指数増殖期にあることを確認した。

4.3 生長速度の算出

指数関数的に増殖している時の個別の試験容器ごとの生長速度は次のようにして計算した。

$$\mu_{t-j} = \frac{\ln X_j - \ln X_i}{t_j - t_i}$$

ここで、

μ_{i-j} = t_i 時から t_j 時までの期間の生長速度。日当たり (d^{-1}) で表す。

X_i = t_i 時の生物量。暴露開始時 (t_0) の生物量については設定値を用いる。

X_j = t_j 時の生物量

t_i = 暴露開始後 i 回目に生物量を測定した時間 (d)

t_j = 暴露開始後 j 回目に生物量を測定した時間 (d)

4.4 50 % 生長阻害濃度 (E_rC_{50}) の算出

1) 生長阻害率の算出

各濃度区における個別の試験容器ごとの生長阻害率 (I_{i-j}) は、対照区の生長速度の平均値 (μ_c) と個別の試験容器ごとの生長速度 (μ_{i-j}) から、次の式により計算した。

なお、当報告書ではこの生長阻害率に 100 を乗じて % 表示とした。

$$I_{i-j} = \frac{\mu_c - \mu_{i-j}}{\mu_c}$$

2) 50 % 生長阻害濃度 (E_rC_{50}) の算出

速度法による試験容器ごとの生長阻害率 (I_{i-j}) は全て 50 % 未満であったことから、50 % 生長阻害濃度 (E_rC_{50}) は試験溶液の実測値の幾何平均値より大とした。

4.5 最大無作用濃度 (NOEC)

個別の試験容器ごとの生長速度を基に、試験濃度区と対照区について t -検定を行った結果、有意差が認められないことを確認し、この濃度区の実測濃度 (平均値) を最大無作用濃度 (NOEC) とした。

4.6 統計的手法

統計ソフトは Microsoft Excel ver. 2003 を用い、入力値とその出力結果を付属資料-4 「統計解析結果」に添付した。

5 結果および考察

5.1 試験成績の信頼性に影響をおよぼしたと思われる環境要因

認められなかった。

5.2 培地に対する被験物質の溶解性

フラスコ攪拌法により調製した 500 mg/L 溶液が溶解した状態であることを目視で確認した。この調製液をろ過しない場合と溶液を試験温度で 0.2 μ m 親水性PTFEタ

イプメンブランフィルター（商品名：H020A090C，メーカー：ADVANTEC）を用いて加圧ろ過したろ液中の被験物質濃度を GC 法により測定した。その結果、被験物質濃度は、ろ過しない場合が 466 mg/L (n = 1)、加圧ろ過した場合が 455 mg/L (n = 1)であり、測定値が近接していることからこの調製液は溶解していると考えられた。

5.3 試験溶液中の被験物質濃度

暴露開始時および暴露終了時に、試験溶液中の被験物質濃度を GC 法により測定した。その結果を Table 1 に示した。

被験物質濃度は、暴露開始時において設定値の 93 % であった。暴露期間中の変動も軽微な減少傾向にあり、被験物質の揮発によるものが主因と考えられた。そのため影響濃度（最大無影響濃度）の算出に当たっては、暴露開始時から各測定時点での測定値を用いた幾何平均値を採用した。

幾何平均値は以下の式により算出した。

$$\text{anti log} \left(\frac{1}{2(t_n - t_1)} \sum_{i=1}^{n-1} [(\log(\text{conc}_i) + \log(\text{conc}_{i+1})) \cdot (t_{i+1} - t_i)] \right)$$

5.4 生長曲線

暴露期間中の生物量 (mg/mL) を Table 2 に、生長曲線を Figure 1 に示した。

試験の有効性確認のためのパラメーターを Table 2 の値より求めた結果、以下の通りとなった。対照区の毎日の生長速度の変動係数が 0 - 72 時間では 35 % を超え、試験の有効性を満たさなかったが、0 - 48 時間では 35 % 未満であり、試験の有効性を満たしたことから、試験結果は 0 - 48 時間を採用した。

1) 生長曲線

① 対照区の生物量は 48, 72 時間培養の平均値で、それぞれ暴露開始時の 56, 97 倍に増加した（試験成立条件：少なくとも 16 倍に増加）。

② 対照区の毎日の生長速度の変動係数（全容器の変動係数の平均値）（試験成立条件：35 % を超えない）。

0 - 48 h: 1.5 %

0 - 72 h: 55.6 %

毎日の生長速度の変動係数が 0-72 h で試験成立条件の 35 % を超えたのは密閉系による試験の影響と考えられた。

③ 対照区の繰り返し間の生長速度の変動係数（試験成立条件：7 % を超えない）。

0 - 48 h: 1.3 %

0 - 72 h: 1.5 %

表. 試験の有効性確認のためのパラメーター (Table 2 より算出)

(1) 0-48 時間

算出区間の生長速度が 2 点のため、変動係数の算出に用いた標準偏差は便宜的に算出したにすぎないものの、35 % の基準と比較した場合には明らかに小さい値と考えられ、0-48 時間の藻類生長は概ね一定であったと判断した。

n	平均生長速度	区間生長速度		毎日の生長速度の変動係数 CV (%)
	0-48 hr	0-24 hr	24-48 hr	
1	1.9667	1.9110	2.0224	4.0
2	2.0352	2.0412	2.0292	0.4
3	2.0152	2.0281	2.0022	0.9
4	2.0386	2.0592	2.0180	1.4
5	1.9998	2.0255	1.9742	1.8
6	2.0178	2.0096	2.0261	0.6
平均	2.0122	2.0124	2.0120	1.5
標準偏差	0.0264		平均値 (%)	1.5
繰り返しの生長速度の変動係数 (%)	1.3			

(2) 0-72 時間

n	平均生長速度	区間生長速度			毎日の生長速度の変動係数 CV (%)
	0-72 hr	0-24 hr	24-48 hr	48-72 hr	
1	1.4931	1.9110	2.0224	0.5460	55.1
2	1.5054	2.0412	2.0292	0.4457	61.0
3	1.5214	2.0281	2.0022	0.5338	56.2
4	1.5269	2.0592	2.0180	0.5035	58.1
5	1.5458	2.0255	1.9742	0.6378	50.9
6	1.5503	2.0096	2.0261	0.6153	52.2
平均	1.5238	2.0124	2.0120	0.5470	55.6
標準偏差	0.0223		変動係数の平均値 (%)		55.6
繰り返しの生長速度の変動係数 (%)	1.5				

2) 細胞形態観察

24, 48, 72 時間後の観察において、対照区および濃度区に細胞の形態異常は観察されなかった。

5.5 50 % 生長阻害濃度 (E_rC_{50}) の算出

濃度区における各容器での生長阻害率を Table 3 に示した。

各容器での生長阻害率 (I_{i-j}) は全て 50 % 未満であったことから、50 % 生長阻害濃度 (E_rC_{50}) は試験溶液の実測値の幾何平均値より大とした。試験の有効性を満たした 0 - 48 時間の結果を採用し、有効性を満たせなかった 0 - 72 時間の結果は参考データとして付記した。結果を以下に示した。

生長阻害率の比較による 50 % 生長阻害濃度 (E_rC_{50})

50 % 生長阻害濃度 E_rC_{50} (0-48 hr) : >110 mg/L

[50 % 生長阻害濃度 E_rC_{50} (0-72 hr) : >110 mg/L(参考データ)]

5.6 最大無作用濃度 (NOEC)

最大無作用濃度 (NOEC) を Table 4 に示した。

Microsoft Excel 2003 により、対照区と濃度区での生長速度について t- 検定を行った結果、有意差が認められなかったことから、NOEC は試験濃度とした (付属資料-4)。試験の有効性を満たした 0 - 48 時間の結果を採用し、有効性を満たさなかった 0 - 72 時間の結果は参考データとして付記した。結果を以下に示した。

生長速度の比較による最大無作用濃度

最大無作用濃度 NOEC(0-48 hr) : 110 mg/L

[最大無作用濃度 NOEC(0-72 hr) : 110 mg/L(参考データ)]

5.7 温度、光強度および pH

藻類培養試験器内の温度、光強度および回転数を Table 5、試験溶液の pH を Table 6 に示した。

72 時間の暴露期間中の藻類培養試験器内の温度は 23.0 ~ 23.1 °C の範囲内であり、変動は 2 °C 以内であった。回転数は 100 rpm で一定であった。

光強度は平均 68 $\mu E/m^2/s$ (66 ~ 79 $\mu E/m^2/s$ の範囲内) であった。

試験溶液の pH は、対照区では暴露開始時に 7.9、48 時間後に 9.1、暴露終了時に 10.4 であり、その変動は 48 時間後では 1.5 以内であったが、暴露終了時には 1.5 を超えた。pH の上昇は密閉系における試験によると考えられた。濃度区では、暴露開始時には 8.0、暴露終了時には 10.4 であった。

5.8 試験計画書からの逸脱の有無

被験物質溶液を調製する際、試験計画書では遮光して攪拌することとしているが、実際の溶液調製では遮光せずに行っていた。しかしながら、予備的検討において被験物質に光分解性は認められなかったことから、本逸脱は試験結果に影響を及ぼさなかったと考えられた。

また、被験物質濃度の測定において、試験計画書では試験溶液を遠心分離し、藻体を除去してから行うこととしているが、実際の測定時には遠心分離中の揮発による濃度減少を避けるため、藻体を除去せずに測定を行った。試験中の測定値をみると、暴開始時と終了時の、藻体量が異なる場合でも測定値は近接しており、藻体による影響はないと考えられた。測定機器にも藻体の混入による支障はなかったことから、本逸脱は試験結果に影響を及ぼさなかったと考えられた。

6. 保管

試験に関する下記の記録および試資料は、当施設の資料保管施設に保管する。

- 1) 主計画表
- 2) 試験計画書、生データおよび最終報告書
- 3) 信頼性保証部門によって実施された監査または査察の記録
- 4) 職員の資格、訓練、経験および職務分掌の記録
- 5) 機器類の保守点検および校正の記録および報告書
- 6) コンピュータ化されたシステムの有効性確認の記録
- 7) 全標準操作手順書の経時的ファイル
- 8) 環境モニター記録
- 9) 被験物質、対照物質
- 10) その他の資料

以 上

Table 1. Measured Concentration of the Test Substance in Test Solution
(Closed System)

Nominal Concentration (mg/L)	Measured Concentration, mg/L (Percent of Nominal)						Mean ^a Measured Concentration (mg/L)	
	0 Hour		48 Hours		72 Hours		0-48 Hour	0-72 Hour
Control	<2	(-)	<2	(-)	<2	(-)	-	-
120	111	(93)	110	(92)	105	(88)	110	109

a : Geometric mean

Table 2. Calculated Biomass (Dry Cell Weight) of *Pseudokirchneriella subcapitata* during the 72 hours Exposure
(Closed System)

Nominal Concentration (Mean ^a Measured Concentration) (mg/L)	Vessel No.	Calculated Biomass [(Dry Cell Weight) (mg/mL)]			
		0 Hour	24 Hours	48 Hours	72 Hours
Control (-)	1	0.00017	0.00118	0.00891	0.01538
	2	0.00017	0.00134	0.01022	0.01596
	3	0.00017	0.00133	0.00982	0.01675
	4	0.00017	0.00137	0.01029	0.01702
	5	0.00017	0.00132	0.00952	0.01802
	6	0.00017	0.00130	0.00987	0.01826
	Average	0.00017	0.00131	0.00977	0.01690
120 (110)	SD	0.00000	0.00007	0.00051	0.00113
	1	0.00017	0.00133	0.00905	0.01643
	2	0.00017	0.00138	0.00994	0.01626
	3	0.00017	0.00140	0.01050	0.01741
	4	0.00017	0.00130	0.00935	0.01708
	5	0.00017	0.00125	0.00874	0.01654
	6	0.00017	0.00137	0.00916	0.01687
	Average	0.00017	0.00134	0.00946	0.01676
	SD	0.00000	0.00006	0.00065	0.00043

SD : Standard deviation

a : Geometric mean (0-48 hr)

Values are calculated without any rounding off during the calculation on the work sheet, and are written in five decimal places.

Table 3. Percent Growth Inhibition in Biomass of *Pseudokirchneriella subcapitata*
(Closed System)

Nominal Concentration (Mean ^a Measured Concentration) mg/L	Vessel No.	Growth Rate in Biomass			
		Rate		Inhibition (%) ¹	
		μ_{0-48}	μ_{0-72}	I_{0-48}	I_{0-72}
Control (-)	1	1.9667	1.4931		
	2	2.0352	1.5054		
	3	2.0152	1.5214		
	4	2.0386	1.5269		
	5	1.9998	1.5458		
	6	2.0178	1.5503		
	Average	2.0122	1.5238		
	SD	0.0264	0.0223		
120 (110)	1	1.9745	1.5151	1.88	0.57
	2	2.0214	1.5115	-0.45	0.81
	3	2.0487	1.5343	-1.81	-0.69
	4	1.9906	1.5279	1.08	-0.27
	5	1.9568	1.5172	2.75	0.43
	6	1.9802	1.5238	1.59	0.00
	Average	1.9954 N. S.	1.5216 N. S.	0.84	0.14
	SD	0.0337	0.0086		

1 : Values are the percent inhibition relative to the control.

SD : Standard deviation a : Geometric mean (0-48 hr)

N. S. : No significant difference

Table 4. Calculated E_rC_{50} and NOEC
(1) 0-48 Hour(Adopted)

		95 % Confidence Limits	Statistical Method
E_rC_{50} *	>110 mg/L	-	-
NOEC **	110 mg/L	-	-

* : Based on I_{0-48} value (Inhibition of growth rates)

** : Based on μ_{0-48} (Growth Rates)

(2) 0-72 Hour(Reference, Not Adopted)

		95 % Confidence Limits	Statistical Method
E_rC_{50} *	>110 mg/L	-	-
NOEC **	110 mg/L	-	-

* : Based on I_{0-72} value (Inhibition of growth rates)

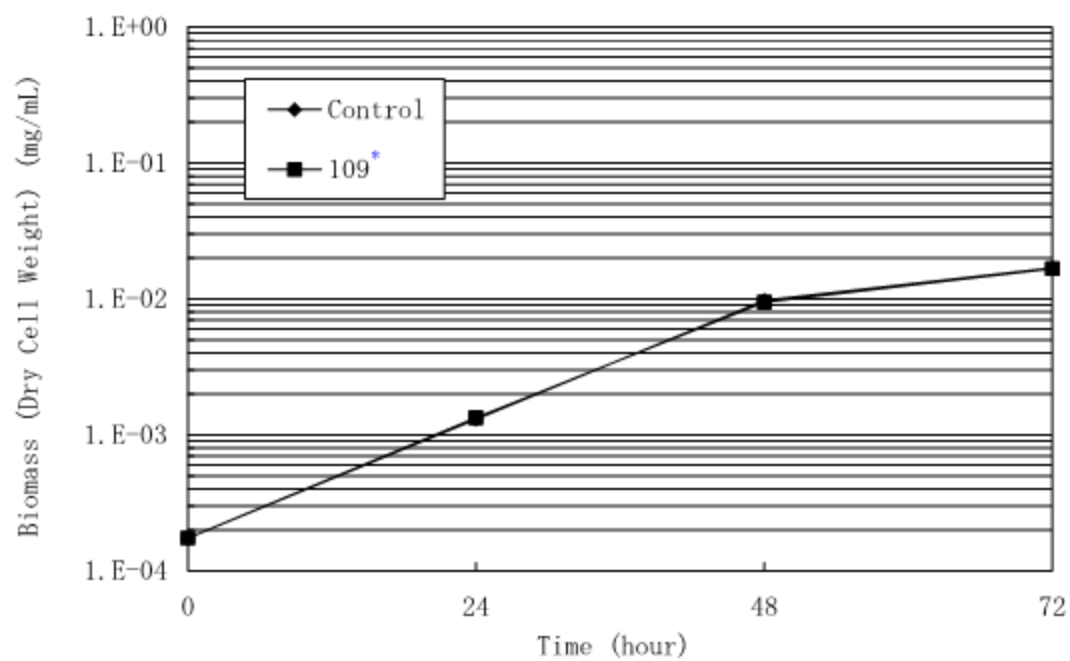
** : Based on μ_{0-72} value (Growth rates)

Table 5. Daily Temperature and Light Intensity at the Incubation

Exposure Period (Hours)	Temperature (°C)	Light Intensity* ($\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$)		Revolution (rpm)
		Range of Measured Intensity	Average	
0	23.0	66 ~ 79	68	100
24	23.0	66 ~ 79	68	100
48	23.1	66 ~ 79	68	100
72	23.0	66 ~ 79	68	100
* : Calibrated from light-measuring instruments in Lx (factor : 0.013)				

Table 6. pH Values

(Closed System)					
Nominal Concentration (mg/L)	Mean ^a Measured Concentration (mg/L)	pH			
		0 Hour	48 Hours	72 Hours	
Control	-	1	7.9	9.1	10.4
		2			10.4
		3			10.4
		4			10.4
		5			10.4
		6			10.4
120	110	1	8.0	9.2	10.4
		2			10.4
		3			10.4
		4			10.4
		5			10.4
		6			10.4
a : Geometric mean (0-48 hr)					



* : Geometric mean (0-72 hr)
 [Geometric mean (0-48 hr) is 110 mg/L]

Figure 1. Algal Growth Curve of *Pseudokirchneriella subcapitata*
 (Biomass vs Time during the 72 hours Exposure)

付 属 資 料 ー 1

OECD 培 地

Table A-1. OECD medium

Nutrient salts	Concentration (mg/L)
H ₃ B ₃ O ₃	0.185
MnCl ₂ •4H ₂ O	0.415
ZnCl ₂	0.003
FeCl ₃ •6H ₂ O	0.064
Na ₂ EDTA•2H ₂ O	0.1
CoCl ₂ •6H ₂ O	0.0015
Na ₂ MoO ₄ •2H ₂ O	0.007
CuCl ₂ •2H ₂ O	0.00001
CaCl ₂ •2H ₂ O	18
NH ₄ Cl	15
KH ₂ PO ₄	1.6
NaHCO ₃	50
MgCl ₂ •6H ₂ O	12
MgSO ₄ •7H ₂ O	15

付 属 資 料 － 2

予 備 試 験 の 結 果

Table B-1. Calculated Biomass (Dry Cell Weight) of *Pseudokirchneriella subcapitata* during the 72 hours Exposure

(Range Finding Test, Closed System)

Nominal Concentration (mg/L)	Calculated Biomass[Dry Cell Weight (mg/mL)]			
	0 Hour	24 Hours	48 Hours	72 Hours
Control	0.00021	0.00126	0.00939	0.01742
12	0.00021	0.00113	0.00846	0.01472
38	0.00021	0.00117	0.00906	0.01563
120	0.00021	0.00118	0.00864	0.01538

Table B-2. Percent Growth Inhibition of *Pseudokirchneriella subcapitata*

(Range Finding Test, Closed System)

Nominal Concentration (mg/L)	Growth rate			
	Rate		Inhibition (%)	
	μ (0-48 hr)	μ (0-72 hr)	$I\mu$ (0-48 hr)*	$I\mu$ (0-72 hr)*
Control	1.9062	1.4767	0.00	0.00
12	1.8539	1.4206	2.75	3.80
38	1.8882	1.4407	0.94	2.44
120	1.8648	1.4353	2.17	2.80

* : Values are the percent inhibition relative to the control

Table B-3. Measured Concentration of the Test Substance in Test Solution

(Range Finding Test, Closed System)

Nominal Concentration (mg/L)	Measured Concentration, mg/L (Percent of Nominal)					
	0 Hour		48 Hours		72 Hours	
Control	<2	(-)	<2	(-)	<2	(-)
12	10.4	(87)	9.76	(81)	10.2	(85)
38	33.6	(88)	33.4	(88)	34.0	(89)
120	111	(93)	109	(91)	108	(90)

付 属 資 料 ― 3

試 験 溶 液 の 分 析 法

2-メチルプロパン-2-オール分析法

1. 分析方法

(1) 分析法の概要

検量線の濃度範囲に入るように試験溶液を希釈後、その一定量を、FID 検出器を備えたガスクロマトグラフ (GC) に注入し、クロマトグラムと同時にピーク面積 (カウント数) をデータ処理装置から求める。このピーク面積を用い、標準液の検量線から試験溶液中の被験物質の濃度を求め、希釈倍率で換算し、試験溶液中の被験物質の濃度を算出する。

(2) 装置および器具

a) ガスクロマトグラフ	: GC-14A 型 (FID 付)	島津製作所
b) 分離カラム	: 10% PEG-6000 shimalite TPA 60/80 mesh glass 製 3 m×3.2 mmφ	ジーエルサイエンス
c) データ処理装置	: C-R5A 型	島津製作所
d) 化学天秤	: AE-166 型	メトラー
e) マイクロシリンジ	: 10 μL	イトー
f) メスシリンダー	: 容量 1000 mL	柴田科学
g) メスフラスコ	: 容量 20, 100 mL	柴田科学
h) ホールピペット	: 容量 1, 2 mL	柴田科学
i) コマゴメピペット	: 容量 5 mL	柴田科学

(3) 試薬

- a) 2-メチルプロパン-2-オール : 純度 99.9 %、XXXXXXXXXX
b) 純水 : 純水製造装置で調製

(4) 試薬の調製

a) 被験物質標準原液 (1000 mg/L)

被験物質約 100 mg を 100 mL メスフラスコに 0.1 mg の桁まで精秤する。これに純水を加えて溶解し 100 mL とする。秤量した質量から、純度換算を行った上、正確な被験物質の濃度を算出する。

(5) 操作

〔前処理〕

必要に応じ検量線の被験物質濃度範囲内に入るように試験溶液を純水で希釈する。

〔測定操作〕

- a) 「2. GC 測定条件」に記載する分析条件で GC を作動し、装置を安定させる。
- b) 「3. 検量線の作成」に記載する方法で検量線の標準液を調製する。
- c) 検量線の標準液、必要に応じて希釈した試料の溶液をの 1 μ L を GC に注入してクロマトグラムおよびピーク面積（カウント数）を得る。
- d) 検量線により濃度を求め、希釈率で換算し試験溶液の被験物質濃度を算出する。

2. GC 測定条件

- | | |
|-------------|--|
| (1) 分離カラム | : 10 % PEG-6000, 3 m \times 3.2 mm ϕ shimalite TPA 60/80 mesh |
| (2) 恒温槽温度 | : 70 $^{\circ}$ C |
| (3) キャリヤーガス | : 窒素 |
| (4) 流量 | : 40 mL/min |
| (5) 検出器 | : FID |
| (6) 注入量 | : 1 μ L |

3. 検量線の作成

- (1) 被験物質標準原液（1059 mg/L）1 mL、2 mL をそれぞれ 20 mL メスフラスコに正確に分取し、純水で 20 mL とし、52.95 mg/L、105.9 mg/L 標準液を調製する。
105.9 mg/L 標準液から 2.0 mL を 20 mL メスフラスコに正確に分取して、純水で 20 mL とし、10.59 mg/L 標準液を調製する。
- (2) 各標準液について 1 μ L を GC に注入し、データ処理装置からクロマトグラムおよびピーク面積（カウント数）を得る。被験物質濃度を横軸にピーク面積を縦軸にとり検量線を作成する。この時の回帰式の寄与率（ R^2 ）も算出する。

表1 検量線に使用したデータ例

No.	被験物質濃度 (mg/L)	ピーク面積 ($\mu\text{V} \cdot \text{sec}$)
1	0	0
2	10.59	11330
3	52.95	58171
4	105.9	115905

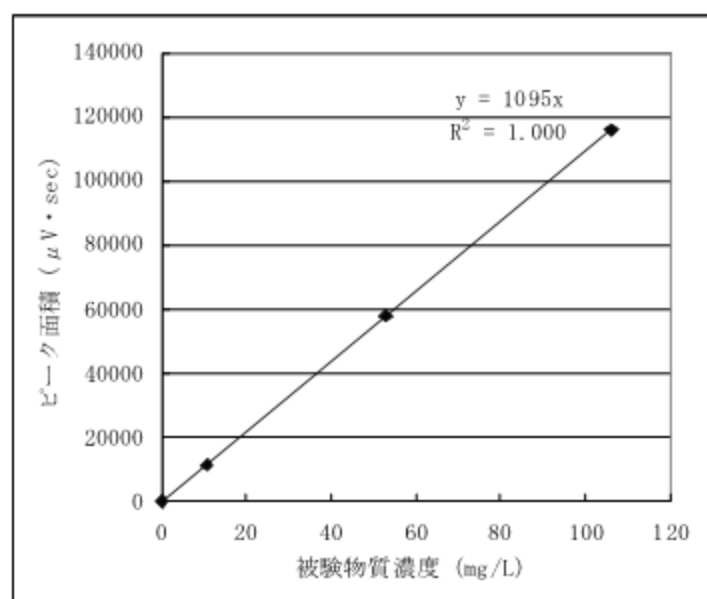


図1 検量線例

4. 添加回収率

被験物質標準原液 (1048 mg/L) 2 mL を 20 mL メスフラスコに正確に分取し、純水で 20 mL とし、104.8 mg/L 標準液を調製する。

標準原液および標準液の 2 mL を 20 mL メスフラスコに正確に分取し、培地で 20 mL とし、濃度が 104.8 mg/L、10.48 mg/L の溶液を調製する。これらの溶液について、回収率を算出した。

結果を表2 に示す。回収率は 94 ～ 104 % であった。

表2 添加回収率

試料濃度 (mg/L)	n	測定値 (mg/L)	測定値平均 (mg/L)	回収率 (%)
10.48	1	9.901	9.82	94
	2	9.742		
104.8	1	109.6	109	104
	2	108.9		

5. 保存安定性

「4. 添加回収率」で調製した2 濃度の試料溶液（9.82 mg/L、109 mg/L）を、密閉・遮光条件において冷蔵庫内（約 4 ℃）で 3日間保存し、試料溶液の安定性を確認した。結果を表3 に示す。3日間冷蔵庫内保存溶液の濃度維持率は 95 ～ 108 %であった。

表3 保存安定性

開始時測定値 (mg/L)	3 日後			
	n	測定値 (mg/L)	測定値平均 (mg/L)	濃度維持率 (%)
9.82	1	10.66	10.6	108
	2	10.48		
109	1	101.7	103	95
	2	104.9		

6. 定量下限値および検出限界

被験物質濃度 11.38 mg/Lの標準液 1 μ L を GC に 7 回注入し、得られた測定値の標準偏差値の 10 倍を定量下限値、3 倍を検出限界値とした。

結果を表4 に示す。定量下限値は 2 mg/L、検出限界値は 0.5 mg/L であった。

測定値の平均値と標準液濃度にみられた濃度差は、標準液の調製時に被験物質の揮発により生じた調製誤差が原因と考えられた。

表4 定量下限値および検出限界値の算出データ

n	測定値 (mg/L)
1	10.45
2	10.45
3	10.33
4	10.35
5	10.20
6	10.08
7	10.57
平均値	10.35
標準偏差 (σ_{n-1})	0.1654

定量下限値 = $0.1654 \times 10 = 1.654 \approx 2 \text{ mg/L}$

検出限界値 = $0.1654 \times 3 = 0.4962 \approx 0.5 \text{ mg/L}$

付 属 資 料 ー 4

統 計 解 析 結 果

Microsoft Excel による統計解析

対照区と濃度区の生長速度の差の検定

0-48 hr

入力データ

変数 1	変数 2
対照区	120 mg/L 区
1.9667	1.9745
2.0352	2.0214
2.0152	2.0487
2.0386	1.9906
1.9998	1.9568
2.0178	1.9802
平均	2.0122
標準偏差	0.0264

0-72 hr

入力データ

変数 1	変数 2
対照区	120 mg/L 区
1.4931	1.5151
1.5054	1.5115
1.5214	1.5343
1.5269	1.5279
1.5458	1.5172
1.5503	1.5238
平均	1.5238
標準偏差	0.0223

F-検定：2 標本を使った分散の検定

	変数 1	変数 2
平均	2.0122	1.9954
分散	0.00070	0.00114
観測数	6	6
自由度	5	5
観測された分散比	0.6131	
P(F<=f) 片側	0.3022	
F 境界値 片側	0.1980	

F-検定：2 標本を使った分散の検定

	変数 1	変数 2
平均	1.5238	1.5216
分散	0.00050	0.00007
観測数	6	6
自由度	5	5
観測された分散比	6.7014	
P(F<=f) 片側	0.0285	
F 境界値 片側	5.0503	

t-検定：等分散を仮定した 2 標本による検定

	変数 1	変数 2
平均	2.0122	1.9954
分散	0.00070	0.00114
観測数	6	6
プールされた分散	0.00092	
仮説平均との差異	0	
自由度	10	
t	0.9643	
P(T<=t) 片側	0.1788	
t 境界値 片側	1.8125	
P(T<=t) 両側	0.3576	
t 境界値 両側	2.2281	

t-検定：分散が等しくないと仮定した 2 標本による検定

	変数 1	変数 2
平均	1.5238	1.5216
分散	0.00050	0.00007
観測数	6	6
仮説平均との差異	0	
自由度	6	
t	0.2236	
P(T<=t) 片側	0.4152	
t 境界値 片側	1.9432	
P(T<=t) 両側	0.8305	
t 境界値 両側	2.4469	