

受付番号	662-10-E-5281
試験番号	95281

最 終 報 告 書

トリクロロニトロメタンの *Pseudokirchneriella subcapitata* を用いる藻類生長阻害試験

2011 年 3 月

一般財団法人化学物質評価研究機構

化学物質評価研究機構

本文書は正本を正確に転写したものです。	
一般財団法人 化学物質評価研究機構 久留米事業所	
2011 年 3 月 22 日	
試験責任者	

陳 述 書

一般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 トリクロロニトロメタンの *Pseudokirchneriella subcapitata* を用いる藻類生長
阻害試験

試験番号 95281

上記試験は以下の GLP に従って実施したものである。

- a) 「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」（平成 15 年 11 月 21 日、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 20 年 7 月 4 日 最終改正）に定める「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」
- b) OECD Principles of Good Laboratory Practice, November 26, 1997

また、本最終報告書は生データを正確に反映しており、試験データが有効であることを確認した。

2011 年 3 月 18 日

試験責任者

信 頼 性 保 証 書

一般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 トリクロロニトロメタンの *Pseudokirchneriella subcapitata* を用いる藻類生長
阻害試験

試験番号 95281

本最終報告書は、試験の方法、手順が正確に記載され、試験結果は生データを正確に反映していることを保証する。

なお、監査又は査察の結果については、下記の通り試験責任者及び運営管理者に報告した。

監査又は査察内容	監査又は査察日	報告日 (試験責任者及び運営管理者)
試験計画書草案	2011 年 1 月 21 日	2011 年 1 月 21 日
試験計画書	2011 年 1 月 24 日	2011 年 1 月 24 日
暴露開始時、暴露開始後	2011 年 1 月 25 日	2011 年 1 月 28 日
	2011 年 1 月 28 日	2011 年 1 月 28 日
生データ、最終報告書草案	2011 年 3 月 18 日	2011 年 3 月 18 日
最終報告書	2011 年 3 月 18 日	2011 年 3 月 18 日

2011 年 3 月 18 日

信頼性保証部門責任者

目 次

	頁
1. 表 題	6
2. 試験委託者.....	6
3. 試験施設	6
4. 試験目的	6
5. 試験法	6
6. GLP 基準	6
7. 試験日程	6
8. 試資料の保管.....	7
9. 試験関係者.....	7
10. 最終報告書の承認.....	7
11. 要 約	8
12. 試験材料	9
12.1 被験物質	9
12.2 試験生物	10
13. 試験の実施.....	10
13.1 培 地	10
13.2 試験器具及び装置	11
13.3 試験液の調製法	11
13.4 試験条件	11
13.5 観察と測定	11
13.6 結果の算出	12
13.7 試験の有効性	13
13.8 数値の取扱い	13
14. 試験結果及び考察.....	13
14.1 試験液の観察と測定結果	13
14.2 E_rC_{50}	14
14.3 各試験区での生長曲線、細胞観察結果及び NOEC.....	14
14.4 試験の有効性	14
14.5 考 察	15
15. 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

Tables

Table 1	pH of test solutions	16
Table 2	Culture temperature and light intensity in incubator	16
Table 3	Value of biomass at each time	17
Table 4	Growth rate and growth inhibition	18
Table 5	E_rC_{50} and NOEC	19
Table 6	Result of statistical analysis.....	19
Table 7	Variation of growth rates in control	19

Figures

Figure 1	Concentration-response curve.....	20
Figure 2	Growth curve	21

Appendix 1 被験物質濃度の測定方法及び結果

Appendix 2 検量線及びクロマトグラム

Additional data 予備試験結果

1. 表 題

トリクロロニトロメタンの *Pseudokirchneriella subcapitata* を用いる藻類生長阻害試験

2. 試験委託者

名 称 環境省

住 所 〒100-8975 東京都千代田区霞が関 1-2-2

3. 試験施設

名 称 一般財団法人化学物質評価研究機構 久留米事業所

住 所 〒839-0801 福岡県久留米市宮ノ陣三丁目 2 番 7 号

4. 試験目的

トリクロロニトロメタンの *Pseudokirchneriella subcapitata* に対する生長阻害試験を行い、0-72 時間の 50%生長阻害濃度 (EC₅₀) 及び最大無影響濃度 (NOEC) を求める。

5. 試験法

- a) 「新規化学物質等に係る試験の方法について」(平成 15 年 11 月 21 日、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 18 年 11 月 20 日 最終改正) に定める「藻類生長阻害試験」
- b) OECD Guidelines for Testing of Chemicals, No.201, March 23, 2006, "Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test"
- c) OECD Guidance Document, No.23, September 2000, "Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures"

6. GLP 基準

- a) 「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」(平成 15 年 11 月 21 日、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 20 年 7 月 4 日 最終改正) に定める「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」
- b) OECD Principles of Good Laboratory Practice, November 26, 1997

7. 試験日程

試 験 開 始 日	2011 年 1 月 24 日
実 験 開 始 日	2011 年 1 月 25 日
実 験 終 了 日	2011 年 1 月 28 日
試 験 終 了 日	2011 年 3 月 18 日

8. 試資料の保管

試験計画書（正本）、最終報告書（正本）、生データ、契約書の写し及びその他の記録は当試験施設に保管する。なお、被験物質は保管しない。

保管期間は最終報告書提出後 10 年間とする。

保管期間終了後の処置（継続保管、廃棄又は返却）は、試験委託者と協議の上決定する。

9. 試験関係者

試験責任者

(所属 試験第四課)

試験担当者（生物試験の実施）

試験担当者（分析試験の実施）

10. 最終報告書の承認

2011年 3 月 18日

試験責任者

11. 要 約

試験条件

試験生物	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>
試験区	0.0032、0.0010、0.00032、0.00010、0.000032 mg/L (公比 $\sqrt{10}$) の 5 濃度区 [測定濃度として 0.00030、0.000097、0.000054、 0.000048、0.000015 (参考値) mg/L] 及び対照区
試験液の調製	培地を満たした三角フラスコ内に必要量の供試試料を水面下に 添加後、攪拌して試験原液を調製し、培地と混合、攪拌して 試験液を調製
暴露方式	旋回振とう培養 (約 100 回/分)
暴露期間	72 時間
連 数	6 連/対照区 3 連/試験濃度区 (別途分析用試験容器を 24 時間用、48 時間用にそれぞれ 1 連 設けた。)
試験液量	600 mL/対照区 (100 mL/試験容器) 300 mL/試験濃度区 (100 mL/試験容器) (別途分析用試験容器を 24 時間用、48 時間用にそれぞれ 1 容器 設けた。)
培養温度	21.6～21.8°C
光強度	94～98 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$
生物量の測定	細胞濃度
被験物質濃度の測定	GC-MS 法 (暴露開始時、暴露開始後 24 時間、48 時間及び暴露 終了時)

試験結果

EC ₅₀ (E _r C ₅₀)	0.000078mg/L (95%信頼限界:0.000073～0.000083 mg/L)
NOEC (生長速度 0-3d)	0.000015 (参考値) mg/L

[上記濃度は、測定濃度の幾何平均値及び測定濃度の幾何平均値と公比 ($\sqrt{10}$) から
算出した参考値に基づく値]

12. 試験材料

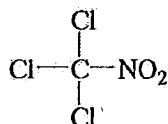
12.1 被験物質

a) 名称等

名 称	トリクロロニトロメタン
別 名	クロロピクリン
CAS 番号	76-06-2

b) 構造式等

構造式

分子式 CCl_3NO_2 分子量 164.38^{*1}

*1 原子量表 (2010) を用いて算出した値

c) 純度等

被験物質純度 99.9%^{*2}不純物 水分 18 ppm^{*2}

供給者

ロット番号

被験物質は純度 100%として取り扱った。

*2 供給者提供の検査成績書

d) 物理化学的性状

蒸気圧 24 mmHg (25°C) ^{*4}対水溶解度 0.1621 g/100 mL (25°C) ^{*4}

1-オクタノール/水分配係数

log Pow = 2.09^{*4}融 点 -64°C ^{*3,4}沸 点 112°C (757 mmHg) ^{*4}常温における性状 わずかに油状、無色液体^{*3}

安定性 酸に安定、アルカリに不安定。

加熱や光の影響下で分解して、有害ヒュームのニトロシルクロリドとホスゲン、窒素酸化物を発生する。^{*3}

溶媒に対する溶解度等

ベンゼン、アルコール、二硫化炭素と混和、エーテルに可溶^{*3}比 重 d_4^{20} 1.6558^{*4}

*3 クロロピクリン工業会の製品安全データシート

*4 化学物質総合情報提供システム (CHRIP)

e) 保管条件

容器を密閉し換気の良い場所で施錠して室温暗所保管した。

f) 供試試料の同一性及び保管条件下における安定性の確認

入手した供試試料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。また、実験開始前及び終了後の赤外吸収スペクトルを比較することにより、保管条件下における供試試料の安定性を確認した。

g) 取扱い上の注意

手袋、マスク、保護めがねあるいは呼吸器保護具及び白衣を着用し、皮膚、目への接触及び吸入を避けた。

また、被験物質は揮発性を有するため、局所排気装置又は安全キャビネット内で取り扱った。

12.2 試験生物

種	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>
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
入手源	American Type Culture Collection
入手株番号	ATCC 22662
入手日	1995 年 6 月 30 日
入手後の管理	久留米事業所で無菌的に継代培養
試験系の再現性の確認	定期的に基準物質による藻類生長阻害試験を実施

最新のデータを以下に示す。

基準物質：二クロム酸カリウム

(和光純薬工業 試薬特級 ロット番号 ALP5310)

実施期間；2010 年 12 月 14 日～12 月 17 日

E_rC_{50} (0-3d) : 0.93 mg/L

この値は久留米事業所におけるバックグラウンドデータの規定範囲内 (平均 $\pm 2 \times$ 標準偏差) であった [平均 \pm 標準偏差 : 0.94 \pm 0.18 mg/L (n=17)] 。

13. 試験の実施

13.1 培地

前培養及び試験ともに精製水で調製した OECD 培地 (OECD TG 201 ; March 23, 2006) を用いた。

Component	mg/L	Component	mg/L
H ₃ BO ₃	0.185	CuCl ₂ ·2H ₂ O	0.00001
MnCl ₂ ·4H ₂ O	0.415	CaCl ₂ ·2H ₂ O	18.0
ZnCl ₂	0.00300	NH ₄ Cl	15.0
FeCl ₃ ·6H ₂ O	0.0640	KH ₂ PO ₄	1.60
Na ₂ EDTA·2H ₂ O	0.100	NaHCO ₃	50.0
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.00150	MgCl ₂ ·6H ₂ O	12.0
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.00700	MgSO ₄ ·7H ₂ O	15.0

13.2 試験器具及び装置

試験容器	500 mL 容ガラス製三角フラスコ（密閉容器）
培養装置	連続振とう培養、温度及び照明の制御が可能な装置 （光照射式恒温振とう培養器、ユーエスアイ）

13.3 試験液の調製法

供試試料の添加は、比重を基に算出した密度（ 1.6558 g/cm^3 ）換算による容量添加で行った。この操作は安全キャビネット内で行った。

培地を入れた調製容器内に供試試料をプッシュボタン式液体用微量体積計（Eppendorf）により 10 mg/L （設定）になるように水面下に添加後、気相がないように密栓した。その後、マグネティックスターラーで約 1 時間攪拌して溶解させたものを同様の攪拌処理を行った培地で希釈して 0.10 mg/L （設定）の試験原液を調製した。調製容器にて必要量の試験原液と攪拌処理を行った培地を混合、攪拌して試験液を調製し、各試験容器に分注した。

13.4 試験条件

暴露方式	旋回振とう培養（約 100 回/分）
暴露期間	72 時間
試験濃度	0.0032 、 0.0010 、 0.00032 、 0.00010 、 0.000032 mg/L （公比 $\sqrt{10}$ ） 予備試験結果から試験濃度及び公比を決定した。 予備試験結果を Additional data に示す。
対照区	被験物質を含まない攪拌処理（約 1 時間）を行った培地
連 数	6 連/対照区 3 連/試験濃度区 （別途分析用試験容器を 24 時間用、48 時間用にそれぞれ 1 連設けた。）
試験液量	600 mL /対照区（ 100 mL /試験容器） 300 mL /試験濃度区（ 100 mL /試験容器） （別途分析用試験容器を 24 時間用、48 時間用にそれぞれ 1 容器設けた。）
暴露開始時の細胞数	3 日間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 $0.50 \times 10^4 \text{ cells/mL}$ になるように試験液に接種した。
試験操作	無菌操作により実施した。
温 度	$21 \sim 24^\circ\text{C}$ （ $\pm 2^\circ\text{C}$ の変動幅）
照 明	設定値 $90 \mu\text{E/m}^2/\text{s}$ （設定値の $\pm 20\%$ 以内、平均値 $\pm 15\%$ の変動幅） $400 \sim 700 \text{ nm}$ のスペクトル幅をもつ蛍光灯による連続照明

13.5 観察と測定

a) 藻類の生長等

測定項目	生物量（細胞濃度）
測定頻度	暴露開始後 24 時間ごと（試験液のバックグラウンドを測定しブランク補正を実施）
細胞観察	暴露終了時に各試験区につき 1 試験容器

測定機器 コールターカウンター Z1 (ベックマン・コールター)
 生物顕微鏡 BX41 (オリンパス)

b) 試験液の状態

暴露開始時及び終了時に観察

c) 試験液の水質及び暴露環境

pH 調製容器より別途分取して測定 (暴露開始時)
 各試験区につき 1 試験容器を測定 (暴露終了時)

培養装置内温度

暴露期間中 1 日 1 回測定

光強度 培養装置内で暴露期間中 1 日 1 回測定

測定機器 ポータブル pH 計 HM-21P (東亜ディーケーケー)

検定済ガラス製棒状温度計

光量子計 LI-250A (LI-COR)

d) 試験液中の被験物質濃度

測定頻度 暴露開始時、暴露開始後 24 時間、48 時間及び暴露終了時

採水方法 調製容器より別途分取 (暴露開始時)
 各試験区の分析用試験容器から採取 (暴露開始後 24 時間及び 48 時間)
 各試験区の試験容器から均等量採取し混合 (暴露終了時)

採水量 約 50～120 mL (全試験区)

測定方法 Appendix 1 参照

13.6 結果の算出

結果の算出には暴露期間中に測定した試験液中の被験物質濃度の幾何平均値を用いた。被験物質濃度が暴露期間を通じて定量下限値を下回った濃度区は、分析可能であった試験最低濃度区 (0.00010 mg/L 区) での結果と公比から算出した濃度を参考値として代用した。

a) 阻害率の算定法

各試験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。この曲線を用い、生長速度を比較して阻害率を算出した。

生長速度の比較

指数関数的に増殖しているときの生長速度は次式に従って計算した。

$$\mu_{i-j} = \frac{\ln N_j - \ln N_i}{t_j - t_i}$$

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。

N_i = t_i 時の実測細胞濃度 (cells/mL)。試験開始時 (t_0) の細胞濃度は設定値を用いた。

N_j = t_j 時の実測細胞濃度 (cells/mL)

t_i = 暴露開始後 i 回目に細胞濃度を測定した時間 (d)

t_j = 暴露開始後 j 回目に細胞濃度を測定した時間 (d)

EC₅₀の算出においては、暴露開始時から72時間後までの暴露期間を通じた生長速度を求めた。対照区については、試験の有効性を調べるために1日ごとの生長速度も求めた。

試験濃度区における阻害百分率 (I_{μ}) は対照区の平均生長速度 (μ_c) と試験濃度区での生長速度 (μ_T) との間の差として次のように計算した。

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

b) EC₅₀の算出法

各試験濃度区に対応する阻害率を片対数グラフにプロットし、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を算出した。生長速度により求めたEC₅₀はEC₅₀と記載した。

EC₅₀は、当事業所にて開発したコンピュータプログラム（Microsoft Excelにより起動）を用いて算出した。

c) NOECの評価

生長速度について、Bartlett法による等分散検定を行った後、各試験濃度区と対照区との有意差の有無を一元配置分散分析及びDunnettの多重比較法により求めた。有意差検定は、当事業所にて開発したコンピュータプログラム（Microsoft Excelにより起動）を用いて実施した。有意差検定結果及び細胞観察結果より、NOECを評価した。

13.7 試験の有効性

- a) 対照区における藻類の生長は72時間後に16倍以上でなければならない。
- b) 対照区における毎日の生長速度の平均変動係数が暴露期間を通じて35%を超えてはならない。
- c) 対照区における繰り返し間の生長速度の変動係数が7%を超えてはならない。

13.8 数値の取扱い

数値の丸め方は、JIS Z 8401：1999 規則Bに従った。

14. 試験結果及び考察

以下の本文中における試験濃度は、設定濃度（0.0032、0.0010、0.00032、0.00010、0.000032 mg/L）における測定濃度の幾何平均値 [0.00030、0.000097、0.000054、0.000048、0.000015（参考値）mg/L] で示す。

14.1 試験液の観察と測定結果

a) 試験液の状態

試験濃度区では暴露開始時は無色透明であった。暴露終了時には0.00030 mg/L区では状態は変わらず、細胞の増殖により0.000097 mg/L区でごく薄い緑色、0.000054 mg/L区で薄い緑色、その他の試験濃度区では緑色を呈していた。

対照区では暴露開始時は無色透明であり、暴露終了時には細胞の増殖により緑色を呈していた。

b) 試験液の水質及び暴露環境

試験液の pH を Table 1、培養装置内温度及び光強度を Table 2 に示す。

試験液の pH は 7.8～9.7 であった。対照区の pH の変動幅が試験法の規定（通常の場合、1.5 以上変動してはならない）を超えていた。培養装置内温度は 21.6～21.8℃、光強度は 94～98 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ であった。

c) 試験液中の被験物質濃度

被験物質濃度の測定方法及び結果を Appendix 1、検量線及びクロマトグラムを Appendix 2 に示す。

測定した試験液中の被験物質濃度は暴露開始時では定量下限値未満 ($<0.00010 \text{ mg/L}$) ～0.0029 mg/L 、暴露開始後 24 時間では定量下限値未満 ($<0.00010 \text{ mg/L}$) ～0.00069 mg/L 、暴露開始後 48 時間では定量下限値未満 ($<0.00010 \text{ mg/L}$) ～0.00010 mg/L 、暴露終了時では全て定量下限値未満 ($<0.00010 \text{ mg/L}$) であった。

14.2 E_rC_{50}

各時間での生物量を Table 3、生長速度及び生長阻害率を Table 4、 E_rC_{50} を Table 5 に示す。また、濃度－生長阻害率曲線を Figure 1 に示す。

生長速度によって算出した被験物質の E_rC_{50} は 0.000078 mg/L (95%信頼限界：0.000073～0.000083 mg/L) であった。

14.3 各試験区での生長曲線、細胞観察結果及び NOEC

NOEC を Table 5、有意差検定結果を Table 6、生長曲線を Figure 2 に示す。

0.00030 mg/L 区では暴露期間を通して生長は著しく抑えられていた。0.000097 mg/L 区では暴露開始後 48 時間後までは生長は著しく抑えられていたが、その後生長が認められた。0.000054 及び 0.000048 mg/L 区では阻害が認められたものの対数増殖を示した。0.000015 (参考値) mg/L 区では対照区とほぼ同様の生長を示した。

以下の細胞観察結果は全て対照区との比較に基づくものである。0.00030 及び 0.000097 mg/L 区において膨張している細胞が多数みられ、また一部細胞の凝集が観察された。0.000054 mg/L 区でも膨張している細胞がやや多く観察された。その他の試験濃度区では対照区と同様であった。対照区では異常がみられなかった。

生長速度について有意差検定を行った結果、0.000054 及び 0.000048 mg/L 区において統計学的な有意差が認められた。有意差検定結果及び上記細胞観察結果より、生長速度における NOEC は 0.000015 (参考値) mg/L であった。

14.4 試験の有効性

a) 対照区における生長

対照区における供試藻類の生長は暴露終了時まで対数増殖を示した (Figure 2 参照)。暴露終了時には初期生物量の 50 倍以上 (Table 3 参照) に増殖し、有効性基準 (16 倍以上の増殖) を満たしていた。

b) 対照区における日間生長速度

対照区における日間生長速度の平均変動係数は 24% (Table 7 参照) であり、有効性基準 (35%を超えてはならない) を満たしていた。

c) 対照区における繰り返し間の生長速度

対照区における繰り返し間の生長速度の変動係数は 3.2% (Table 7 参照) であり、有効性基準 (7%を超えてはならない) を満たしていた。

14.5 考 察

試験は被験物質の培地への溶解濃度以下での試験生物の生長に対する影響を調べる試験として行った。その結果、 E_rC_{50} は 0.000078 mg/L、NOEC は 0.000015 (参考値) mg/L であった。被験物質は暴露期間中、著しい濃度低下が認められた。予備試験結果より、濃度低下の要因としては被験物質の揮発 (試験容器中のヘッドスペースへの揮発) に加えて藻体関与している可能性が示唆された (Additional data 参照)。被験物質の生物への影響は暴露期間中経時的に徐々に減少していく傾向が認められたため、暴露期間中に測定された被験物質濃度の幾何平均値にて試験濃度を算出した。なお、設定濃度 0.000032 mg/L 区においては、試験液中の被験物質濃度が非常に低く暴露開始時より定量が困難であったため、定量可能であった最低試験濃度区 (0.00010 mg/L 区) における幾何平均濃度 (0.000048 mg/L) と公比 ($\sqrt{10}$) より算出した参考値を評価に用いた。

試験環境条件に関しては、暴露終了時に全試験区で pH の上昇が認められ、対照区については試験法の規定を超えていた。pH は藻類の増殖に相関して高くなっていた。これは揮発性物質の試験では密閉式の試験容器を使用することから、外部とのガス交換が不可能となったためと思われる。pH 以外の試験環境条件は適切な範囲内であり、試験は試験法に準じたものであったと判断される。

15. 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 pH of test solutions

Measured concentration ^a (mg/L)	pH	
	At the start	At the end
Control	7.8	9.4
0.000015 (reference value)	7.8	9.7
0.000048	7.9	9.4
0.000054	7.9	8.5
0.000097	7.9	8.2
0.00030	7.9	8.0

a Geometric mean of the measured concentrations
(also expressed as measured concentration in the following
tables and figures)

Table 2 Culture temperature and light intensity in incubator

Time	At the start	1-day	2-day	At the end
Culture temperature (°C)	21.8	21.8	21.6	21.8
Light intensity ($\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$)	98	94	98	95

Table 3 Value of biomass at each time

Measured concentration (mg/L)	No.	Cell concentration ($\times 10^4$ cells/mL)			
		0 hour ^b	24 hours	48 hours	72 hours
Control	A	0.50	1.5	8.7	25 ^c
	B	0.50	2.0	12	27
	C	0.50	1.8	11	31
	D	0.50	2.3	11	34
	E	0.50	2.0	11	34
	F	0.50	2.0	10	34
	Mean	0.50	2.0	11	31
	S.D.	0	0.25	1.0	3.9
0.000015 (reference value)	A	0.50	1.8	8.9	27
	B	0.50	2.0	12	26
	C	0.50	1.5	11	27
	Mean	0.50	1.7	11	27
	S.D.	0	0.24	1.6	0.48
0.000048	A	0.50	1.5	7.2	23
	B	0.50	1.7	7.7	21
	C	0.50	1.7	7.8	24
	Mean	0.50	1.6	7.6	23
	S.D.	0	0.11	0.35	1.5
0.000054	A	0.50	0.92	2.7	10
	B	0.50	1.2	3.0	11
	C	0.50	1.2	2.3	8.7
	Mean	0.50	1.1	2.7	10
	S.D.	0	0.16	0.33	1.4
0.000097	A	0.50	0.85	1.0	2.0
	B	0.50	0.75	0.93	2.0
	C	0.50	0.82	0.94	1.9
	Mean	0.50	0.80	0.96	2.0
	S.D.	0	0.052	0.048	0.073
0.00030	A	0.50	0.79	0.84	0.90
	B	0.50	0.76	0.81	0.79
	C	0.50	0.75	0.80	0.95
	Mean	0.50	0.77	0.82	0.88
	S.D.	0	0.019	0.019	0.082

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

c The minimum cell growth in control (biomass at the end of exposure / biomass at the start of exposure)

$$25 / 0.5 = 50$$

Table 4 Growth rate and growth inhibition

Measured concentration (mg/L)	No.	Growth rate (0-3d)	Inhibition rate (%)
Control	A	1.31	-
	B	1.33	-
	C	1.37	-
	D	1.41	-
	E	1.40	-
	F	1.40	-
	Mean	1.37	-
	S.D.	0.0433	-
0.000015 (reference value)	A	1.32	3.4
	B	1.32	3.7
	C	1.33	2.8
	Mean	1.33	3.3
	S.D.	0.00595	0.43
0.000048	A	1.28	6.7
	B	1.25	8.9
	C	1.29	5.8
	Mean	1.27	7.1
	S.D.	0.0220	1.6
0.000054	A	1.01	27
	B	1.04	24
	C	0.951	31
	Mean	1.00	27
	S.D.	0.0468	3.4
0.000097	A	0.457	67
	B	0.469	66
	C	0.444	68
	Mean	0.457	67
	S.D.	0.0124	0.91
0.00030	A	0.194	86
	B	0.151	89
	C	0.213	84
	Mean	0.186	86
	S.D.	0.0318	2.3

Table 5 E_rC_{50} and NOEC

E_rC_{50} (mg/L)	NOEC (mg/L)
0.000078 (0.000073 to 0.000083)	0.000015 (reference value)

Values in parentheses express 95% confidence interval.

Table 6 Result of statistical analysis

Measured concentration (mg/L)	Statistical analysis	Statistical procedure
0.000015 (reference value)	n.s.	Bartlett's test One-way ANOVA Dunnett's multiple comparison test
0.000048	**	
0.000054	**	
0.000097	-	
0.00030	-	

n.s. : No significant difference

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

- : The data in the exposure level was not used for the statistical analysis since the concentration was greater than E_rC_{50} .

Table 7 Variation of growth rates in control

< Variation for section-by-section specific growth rates in the controls >

Control No.	Mean	Standard deviation	Coefficient of variation (%)	
A	1.31	0.365	28	24 (Mean)
B	1.33	0.466	35	
C	1.37	0.368	27	
D	1.41	0.250	18	
E	1.40	0.301	21	
F	1.40	0.218	16	

< Variation of average specific growth rates in replicate controls >

	0-3day
Mean	1.37
Standard deviation	0.0433
Coefficient of variation (%)	3.2

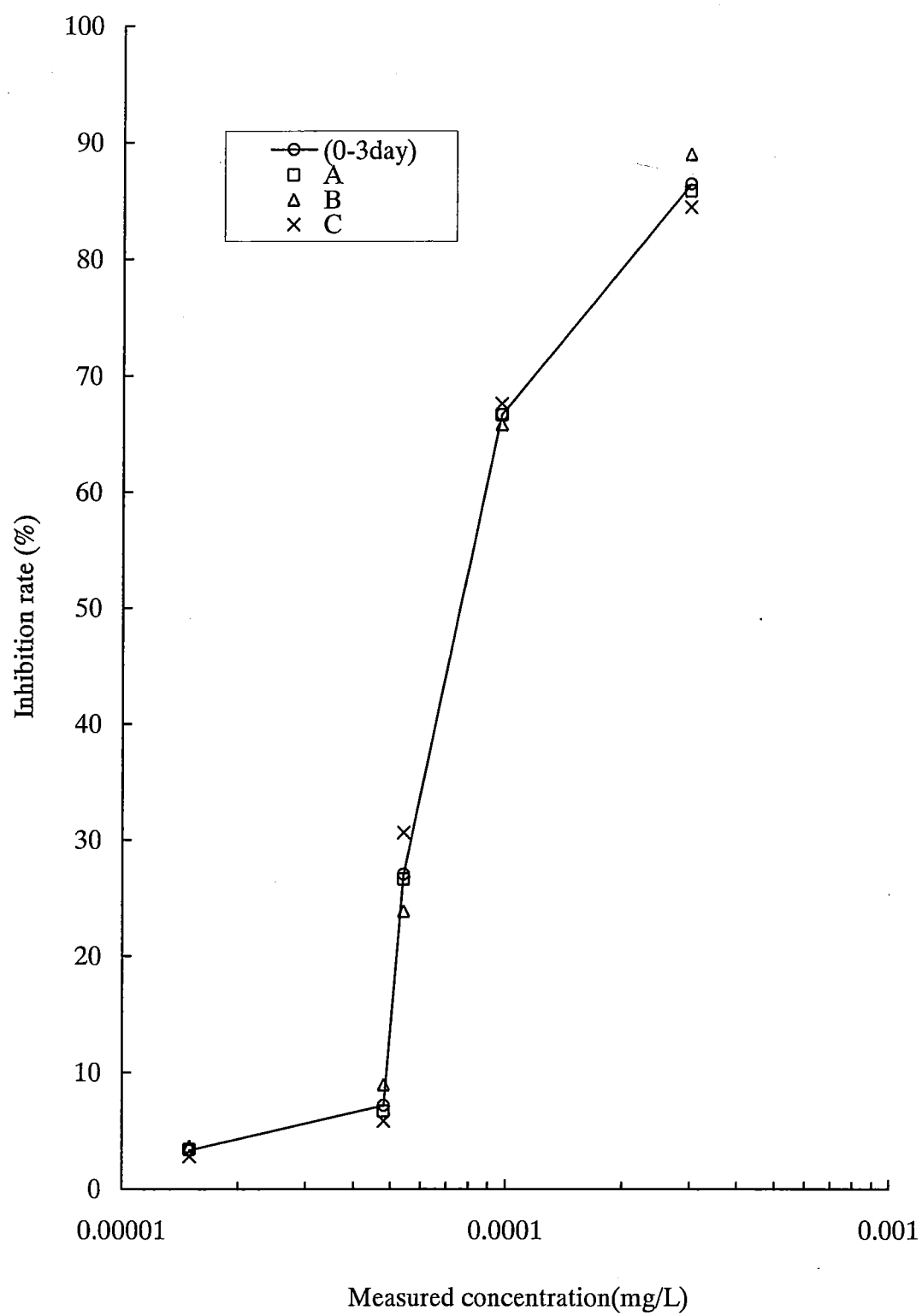


Figure 1 Concentration-response curve.

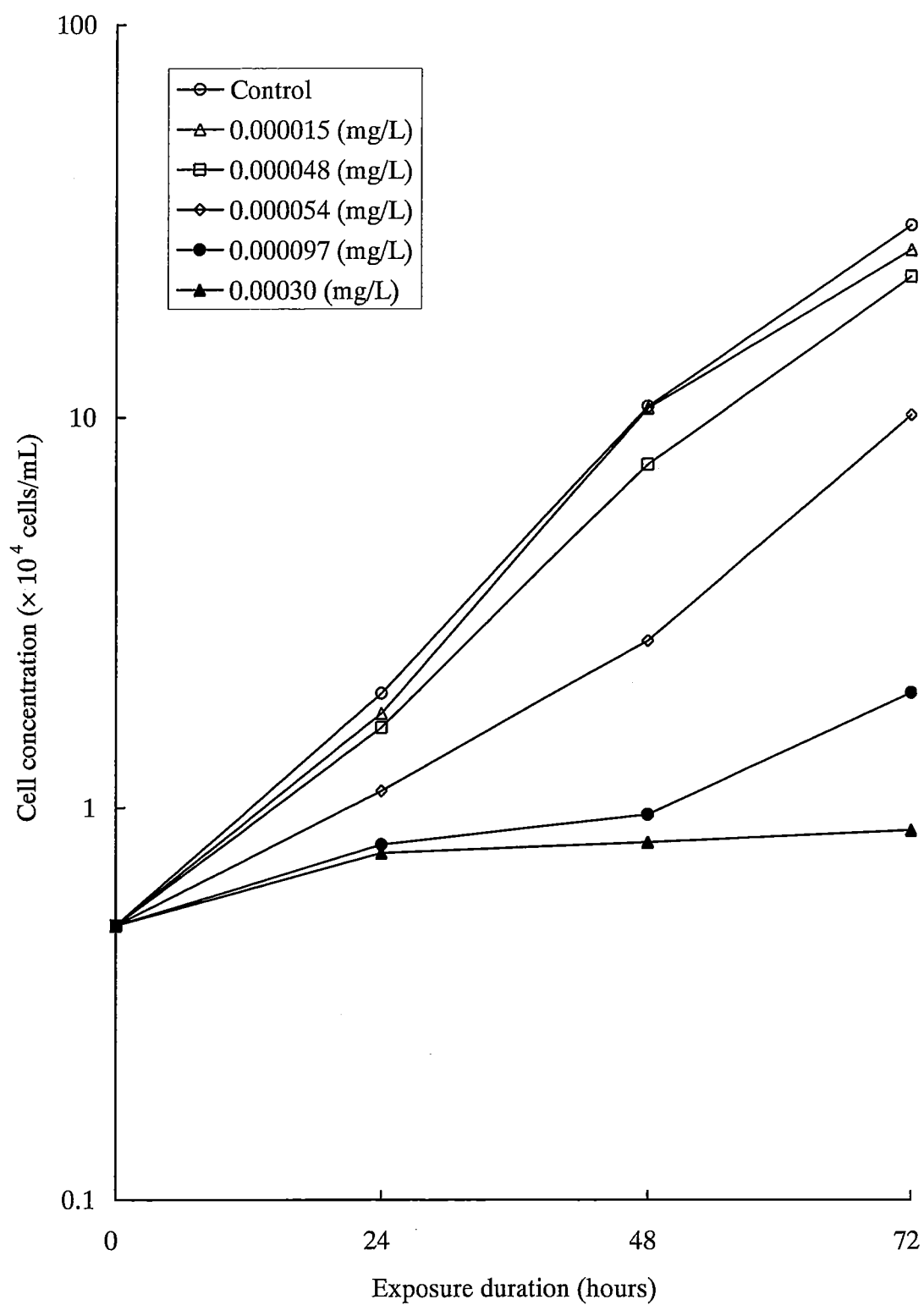


Figure 2 Growth curve.

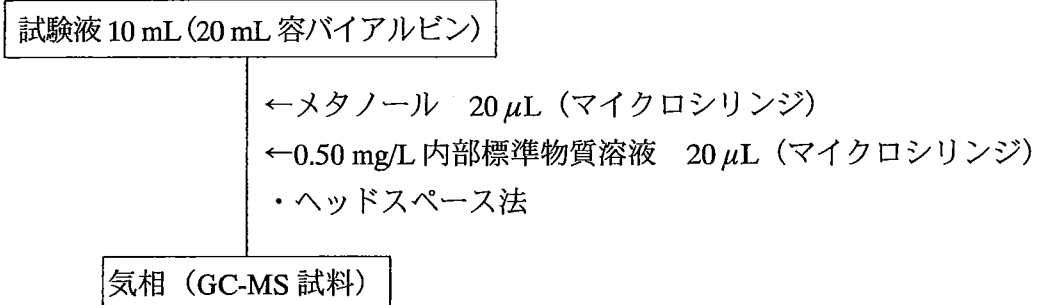
Appendix 1

被験物質濃度の測定方法及び結果

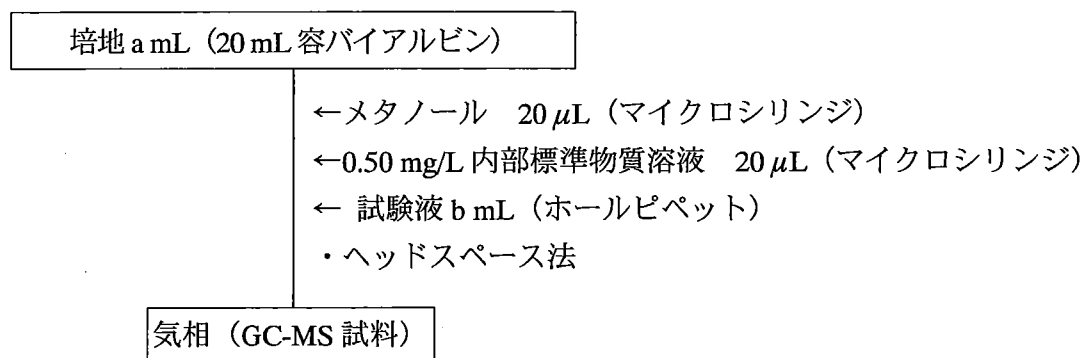
1. 試験液の前処理操作

採取した試験液について、以下のフロースキーム①、②に従って前処理操作を行い、ガスクロマトグラフィー質量分析法（GC-MS）試料を調製した。なお、フロースキーム②は $a + b = 10 \text{ mL}$ になるように調製した。

フロースキーム①（対照区、0.000032、0.00010、0.00032 及び 0.0010 mg/L 区）



フロースキーム② (0.0032 mg/L 区)



2. 被験物質濃度の測定

GC-MS 試料中の被験物質濃度は、クロマトグラム上で得られた GC-MS 試料の被験物質 (m/z 117、119 のトータルイオンカレント) と内部標準物質のピーク面積比を、濃度既知の標準試料の被験物質と内部標準物質の絶対量比とピーク面積比で作成した検量線の回帰式に代入して求めた。得られたクロマトグラム (一例) を Appendix 2 に示す。

定量条件

機 器

ガスクロマトグラフー質量分析計

GCMS-QP2010 (島津製作所)

ヘッドスペース条件

加圧時間 3.0 min
 保温時間 20 min
 注入時間 0.12 min
 オープン温度 60℃
 ニードル温度 100℃
 トランスファ温度 150℃
 ヘッドスペースキャリアガス

100.0 kPa

ガスクロマトグラフ条件

カラム Inert Cap 624
 (60 m × 0.32 mm I.D., 膜厚 1.80 μm, ジーエルサイエンス)
 カラム温度 80℃ (3.0 min) → 140℃ (3.0 min)
 昇温速度 15℃/min
 試料導入部温度 150℃
 キャリアガス ヘリウム

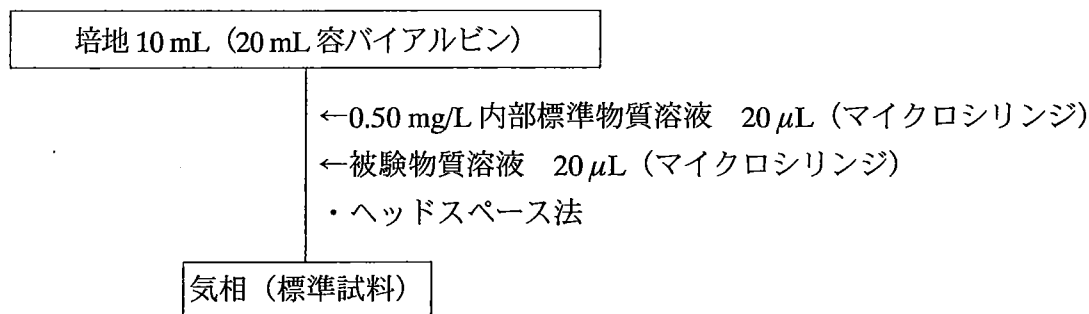
質量分析計条件

イオン化法 電子イオン化法 (EI)
 検出法 選択イオンモニタリング (SIM)
 測定イオン (m/z) 被験物質 117、119
 内部標準物質 96
 イオン源温度 200℃
 イオン化エネルギー 70 eV
 インタフェース温度 260℃

3. 標準試料の調製

供試試料 100 mg を正確にはかりとり、メタノールに溶解して 2000 mg/L の被験物質溶液を調製した。これをメタノールで希釈して 0.050、0.25、0.50 及び 1.0 mg/L の被験物質溶液を調製した。これらの被験物質溶液を以下のフロースキームに従って前処理操作を行い、0.00010、0.00050、0.0010 及び 0.0020 mg/L の標準試料を調製した。

フロースキーム



4. 内部標準物質溶液の調製

1000 mg/L フルオロベンゼン標準原液（関東化学 水質試験用 ロット番号 208U1494）をメタノールで希釈して 0.50 mg/L の内部標準物質溶液を調製した。

5. 検量線の作成

3.の標準試料を 2.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被験物質と内部標準物質のピーク面積比と、標準試料中の被験物質と内部標準物質の絶対量比により、測定日毎に検量線を作成した。作成した検量線（一例）を Appendix 2 に示す。なお、試験液中の被験物質の定量下限値は、定量性が確認された範囲での標準溶液の最低濃度（0.00010 mg/L）とした。

6. 検出下限値の算出

検量線の最低濃度である 0.00010 mg/L の標準溶液を 2. の定量条件に従って n=5 で分析した。得られたそれぞれのクロマトグラム上の被験物質と内部標準物質のピーク面積比より検出下限値を算出した。その結果を以下に示す。

濃度 (mg/L)	被験物質の ピーク面積値	内部標準物質の ピーク面積値	項 目	被 験 物 質 の ピーク 面積値/内部標準物質 のピーク面積値
0.00010	1500	45365	ピーク面積比	0.0330651
0.00010	1476	44869		0.0328958
0.00010	1012	33706		0.0300243
0.00010	1220	41653		0.0292896
0.00010	1246	42365		0.0294111
			ピーク面積比（平均値） R	0.0309372
			ピーク面積比の標準偏差 σ	0.0018869
			濃度 C (mg/L)	0.00010
			検出下限値 (mg/L)	0.000018

$$\text{検出下限値} = 3 \times \frac{\sigma \times C}{R}$$

C：濃度

R：ピーク面積比（平均値）

σ：ピーク面積比の標準偏差

7. 測定結果

試験液中の被験物質濃度の測定結果を以下に示す。

Appendix table 1-1 Measured concentrations of test item in test solutions

Nominal concentration (mg/L)	Measured concentration (mg/L) (Percentage of measured concentration versus that at the start %)				
	At the start	24 hours	48 hours	At the end	Geometric mean
Control	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
0.000032	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
0.00010	0.00011	n.d. ^a	n.d. ^a	n.d. ^b	0.000048
0.00032	0.00022	n.d. ^a	n.d. ^a	n.d. ^b	0.000054
0.0010	0.00061	0.00017 (29)	n.d. ^a	n.d. ^b	0.000097
0.0032	0.0029	0.00069 (24)	0.00010 (3.5)	n.d. ^a	0.00030

n.d. : < 0.00010 mg/L

- a In accordance with OECD Guidance Document No.23, half the determination limit of the test item (0.000050 mg/L) was adopted for the calculation of geometric mean, because the test item was detected but not quantified.
- b In accordance with OECD Guidance Document No.23, the detection limit (0.000018 mg/L) was adopted for the calculation of the geometric mean, because the test item was not detected.

The geometric mean is calculated by the following expression:

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

where

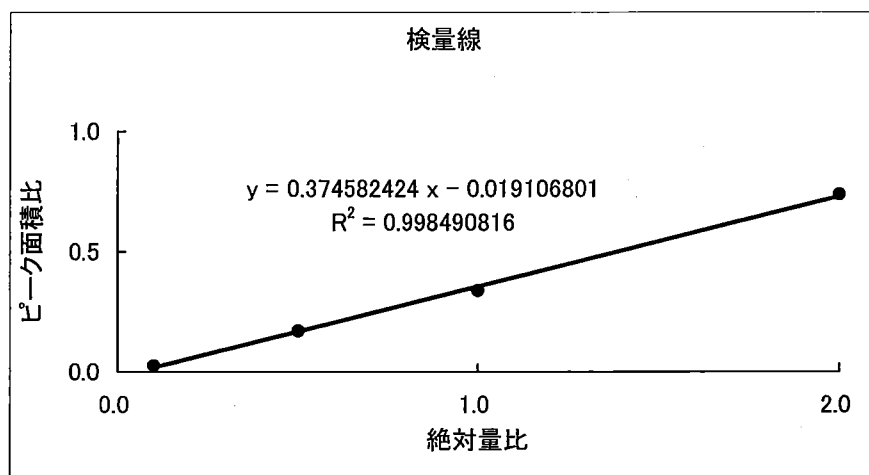
t_1 = at the start < t_2 < ... t_n = at the end

conc_1 = concentration at the start, conc_2 , ..., conc_n = concentration at the end

Appendix 2

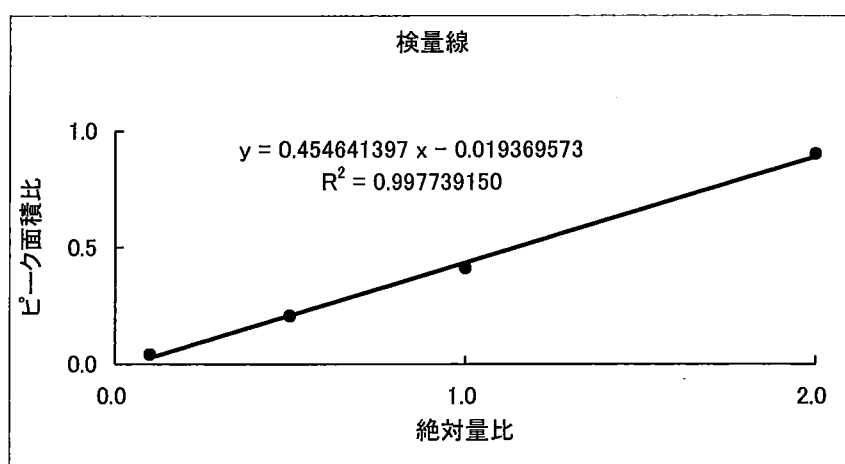
検量線及びクロマトグラム





Std.濃度 (mg/L)	被験物質含有量 (μ g)	内部標準物質含有量 (μ g)	絶対量比	被験物質 ピーク面積値	内部標準物質 ピーク面積値	ピーク面積比
Solvent Blank	—	0.010	—	—	45621	—
0.00010	0.0010	0.010	0.10	1056	41013	0.025748
0.00050	0.0050	0.010	0.50	6870	40293	0.170501
0.0010	0.010	0.010	1.0	13770	40746	0.337947
0.0020	0.020	0.010	2.0	30545	41396	0.737873

Appendix figure 2-1-1 Calibration curve of test item for analysis by GC-MS at start of exposure.

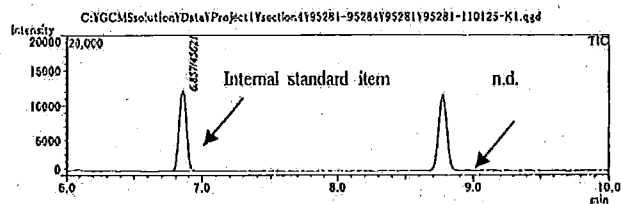


Std.濃度 (mg/L)	被験物質含有量 (μ g)	内部標準物質含有量 (μ g)	絶対量比	被験物質 ピーク面積値	内部標準物質 ピーク面積値	ピーク面積比
Solvent Blank	—	0.010	—	—	50105	—
0.00010	0.0010	0.010	0.10	1535	37668	0.040751
0.00050	0.0050	0.010	0.50	8543	41577	0.205474
0.0010	0.010	0.010	1.0	16969	41273	0.411140
0.0020	0.020	0.010	2.0	39646	43960	0.901865

Appendix figure 2-1-2 Calibration curve of test item for analysis by GC-MS at end of exposure.

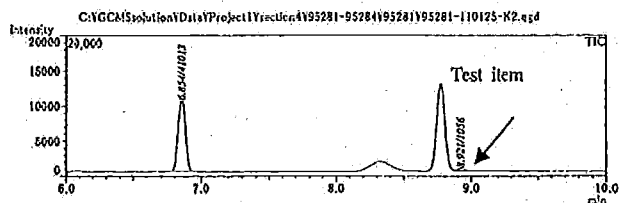
Solvent Blank

File name: C:\GCMSolution\YData\Project1\Ysection4\95281-95284\95281\95281-110125-K1.qgd



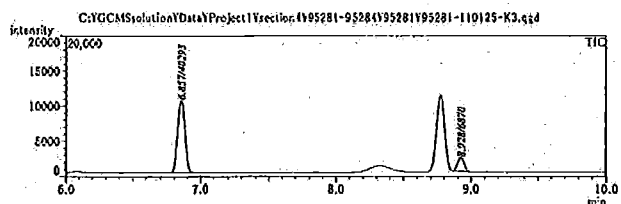
Standard solution 0.00010 mg/L

File name: C:\GCMSolution\YData\Project1\Ysection4\95281-95284\95281\95281-110125-K2.qgd



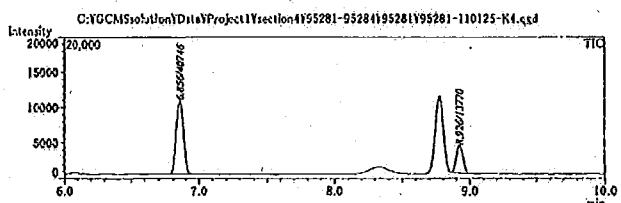
Standard solution 0.00050 mg/L

File name: C:\GCMSolution\YData\Project1\Ysection4\95281-95284\95281\95281-110125-K3.qgd



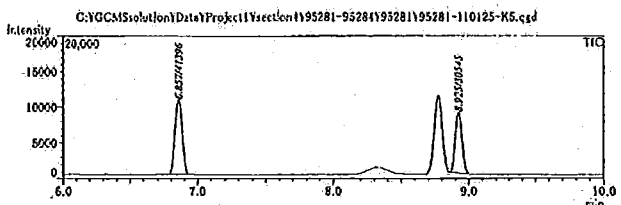
Standard solution 0.0010 mg/L

File name: C:\GCMSolution\YData\Project1\Ysection4\95281-95284\95281\95281-110125-K4.qgd



Standard solution 0.0020 mg/L

File name: C:\GCMSolution\YData\Project1\Ysection4\95281-95284\95281\95281-110125-K5.qgd



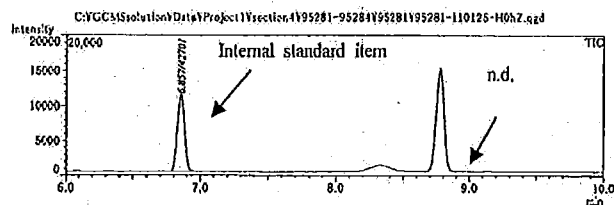
Date: 2011. 1. 25

Name: [REDACTED]

Appendix figure 2-2-1 GC-MS chromatograms at start of exposure.

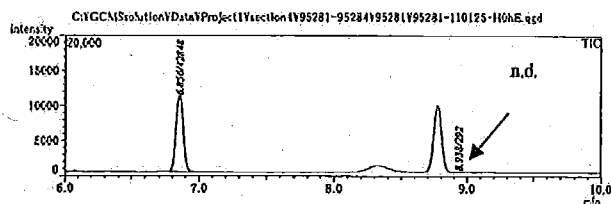
Control

File name: C:\GCMSolution\YData\Project1\Ysection4\95281-95284\95281\95281-110125-H0hZ.qgd



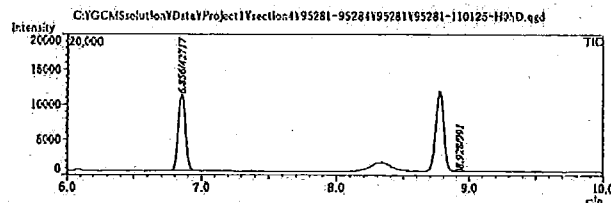
0.000032 mg/L exposure level

File name: C:\GCMSolution\YData\Project1\Ysection4\95281-95284\95281\95281-110125-H0hE.qgd



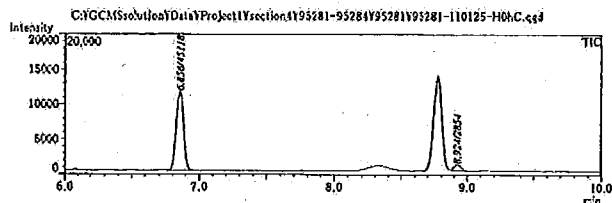
0.00010 mg/L exposure level

File name: C:\GCMSolution\YData\Project1\Ysection4\95281-95284\95281\95281-110125-H0hD.qgd



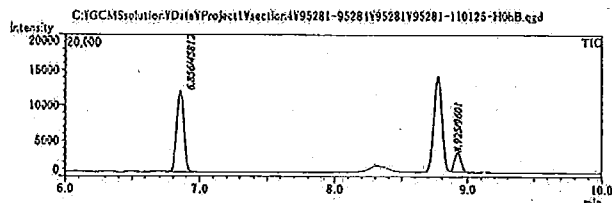
0.00032 mg/L exposure level

File name: C:\GCMSolution\YData\Project1\Ysection4\95281-95284\95281\95281-110125-H0hC.qgd



0.0010 mg/L exposure level

File name: C:\GCMSolution\YData\Project1\Ysection4\95281-95284\95281\95281-110125-H0hB.qgd



Date: 2011.1.25

Name: [REDACTED]

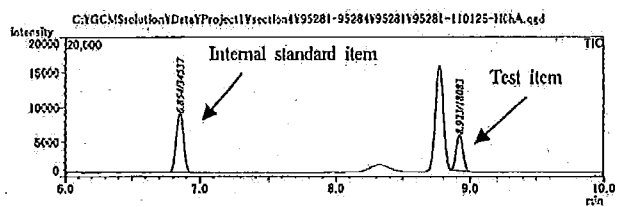
Appendix figure 2-2-2 GC-MS chromatograms at start of exposure.

95281

95281

0.0032 mg/L exposure level

File name: C:\GCMSolution\YData\Project1\Ysection4\95281-95284\95281\95281-110125-H0hA.qgd



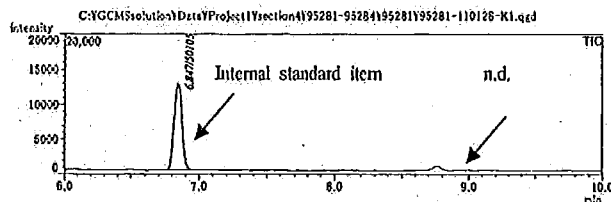
Date : 2011.1.25

Name :

Appendix figure 2-2-3 GC-MS chromatogram at start of exposure.

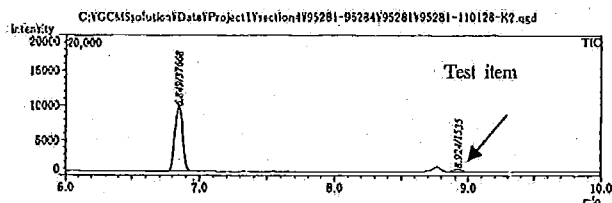
Solvent Blank

File name: C:\GCMSolution\YData\Project1\Ysection4\95281-95284\95281\95281-110128-K1.qgd



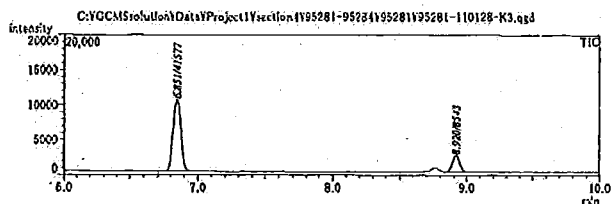
Standard solution 0.00010 mg/L

File name: C:\GCMSolution\YData\Project1\Ysection4\95281-95284\95281\95281-110128-K2.qgd



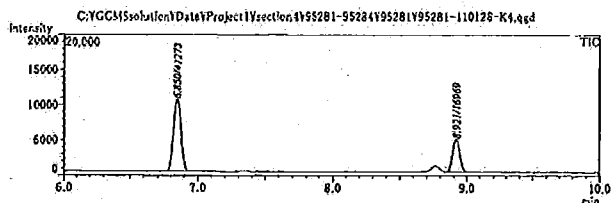
Standard solution 0.00050 mg/L

File name: C:\GCMSolution\YData\Project1\Ysection4\95281-95284\95281\95281-110128-K3.qgd



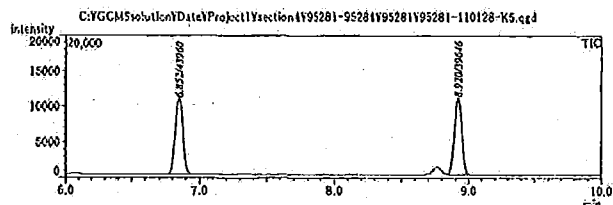
Standard solution 0.0010 mg/L

File name: C:\GCMSolution\YData\Project1\Ysection4\95281-95284\95281\95281-110128-K4.qgd



Standard solution 0.0020 mg/L

File name: C:\GCMSolution\YData\Project1\Ysection4\95281-95284\95281\95281-110128-K5.qgd



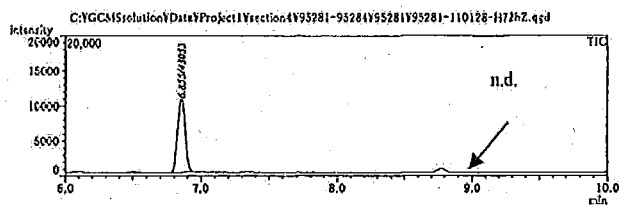
Date : 2011. 6. 28

Name :

Appendix figure 2-3-1 GC-MS chromatograms at end of exposure.

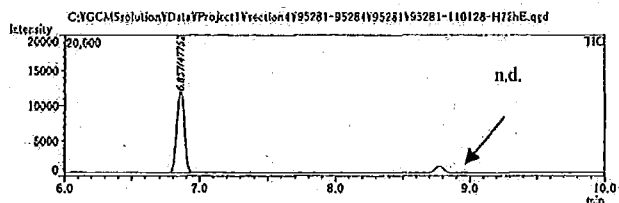
Control

File name: C:\GCMSolution\YData\Project1\Ysection4\95281-95284\95281\95281-110128-H72hZ.qgd



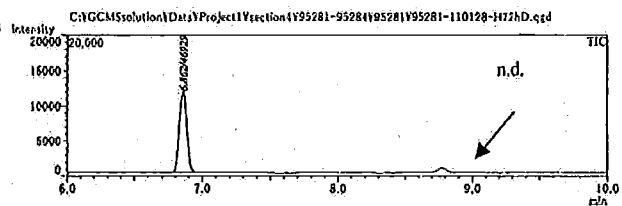
0.00032 mg/L exposure level

File name: C:\GCMSolution\YData\Project1\Ysection4\95281-95284\95281\95281-110128-H72hE.qgd



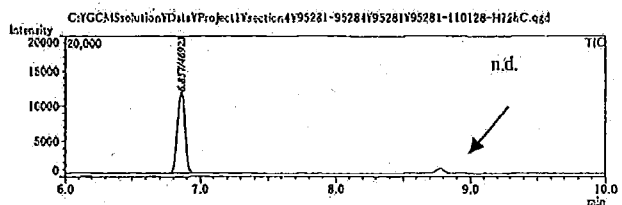
0.00010 mg/L exposure level

File name: C:\GCMSolution\YData\Project1\Ysection4\95281-95284\95281\95281-110128-H72hD.qgd



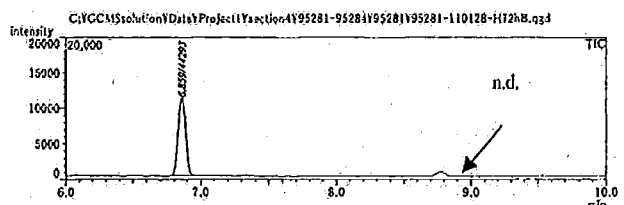
0.00032 mg/L exposure level

File name: C:\GCMSolution\YData\Project1\Ysection4\95281-95284\95281\95281-110128-H72hC.qgd



0.0010 mg/L exposure level

File name: C:\GCMSolution\YData\Project1\Ysection4\95281-95284\95281\95281-110128-H72hB.qgd



Date: 2011.1.28

Name: [REDACTED]

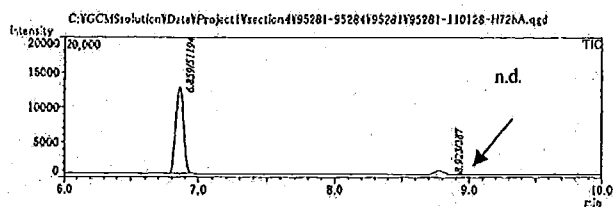
Appendix figure 2-3-2 GC-MS chromatograms at end of exposure.

95281

95281

0.0032 mg/L exposure level

File name: C:\GCMSsolution\Data\Project1\Section4\95281-95284\95281\95281-110128-H72hA.qgd



Date : 2011.11.28

Name :

Appendix figure 2-3-3 GC-MS chromatogram at end of exposure.

Additional data

予備試験結果

1. 被験物質の水への溶解度

被験物質の水への溶解度は目視で 100 mg/L 以上と判断された。

2. 生物予備試験

連 数 2 連又は 1 連/試験区

測定法 細胞計数法

試験液調製法 10 mg/L になるように供試試料を密度 [1.6558 g/cm³ (20°C)] 換算による容量添加し、1 時間攪拌して溶解させた溶液を培地で希釈して 0.10 mg/L (設定) の試験原液を調製した。この試験原液を培地で適宜希釈して試験液を調製した。なお、被験物質は揮発性が認められたため、試験容器は揮発性物質用密閉容器を使用した。

分 析 試験液中の被験物質濃度の測定を行った。藻体への被験物質の取り込み等の有無を確認するために藻体を添加しない試験液についても測定した。

<試験生物への影響 1>

設定濃度区 (mg/L)	生長速度 (0-3d) に基づく 生長阻害率 (%)
0.0000010	-4.4
0.000010	-2.3
0.00010	2.2
0.0010	72
0.010	89

<試験生物への影響 2>

設定濃度区 (mg/L)	生長速度 (0-3d) に基づく 生長阻害率 (%)
0.000032	7.1
0.00010	7.2
0.00032	36
0.0010	67
0.0032	80

＜試験液中の被験物質濃度＞

(試験生物への影響 1)

設定濃度区 (mg/L)	測定濃度 (mg/L) (対開始時濃度%)	
	暴露開始時	暴露終了時
0.00010	0.000082*	n.d.
0.00010 (藻体なし)		0.000080* (98)
0.0010	0.00050	n.d.
0.0010 (藻体なし)		0.00043 (85)
0.010	0.0063	0.0011 (17)
0.010 (藻体なし)		0.0043 (68)

(試験生物への影響 2)

設定濃度区 (mg/L)	測定濃度 (mg/L) (対設定濃度%)	
	暴露開始時	暴露終了時
0.00010	0.000091* (91)	n.d.
0.00032	0.00023 (72)	n.d.
0.0010	0.00060 (60)	n.d.
0.0032	0.0027 (84)	n.d.

n.d. <0.00010 mg/L

* 定量下限値未満のため参考値とする。

藻体関与による濃度低下: あり

3. 本試験条件

試験濃度	0.0032、0.0010、0.00032、0.00010、0.000032 mg/L (公比 $\sqrt{10}$)
濃度分析	暴露開始時、暴露開始後 24 時間、48 時間及び暴露終了時
試験容器	密閉容器