

受付番号	662-10-E-5277
試験番号	95277

## 最 終 報 告 書

トリメチルアミンの *Pseudokirchneriella subcapitata* を用いる藻類生長阻害試験

2011 年 2 月

一般財団法人化学物質評価研究機構

久留米事業所

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 4 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 トリメチルアミンの *Pseudokirchneriella subcapitata* を用いる藻類生長阻害試験

試験番号 95277

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 2 月 28 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 トリメチルアミンの *Pseudokirchneriella subcapitata* による藻類生長阻害試験

試験番号 95277

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	2010 年 12 月 2 日	2010 年 12 月 2 日
試験計画書	2010 年 12 月 3 日	2010 年 12 月 3 日
暴露開始時、暴露開始後	2010 年 12 月 7 日	2010 年 12 月 13 日
	2010 年 12 月 10 日	2010 年 12 月 13 日
生データ、最終報告書草案	2011 年 1 月 20 日	2011 年 1 月 20 日
最終報告書	2011 年 2 月 28 日	2011 年 2 月 28 日

2011 年 2 月 28 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. 試験資料の保管 .....	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 供試試料 .....	9
12.3 試験生物 .....	11
13. 試験の実施 .....	11
13.1 培 地 .....	11
13.2 試験器具及び装置 .....	11
13.3 試験液の調製法 .....	12
13.4 試験条件 .....	12
13.5 観察と測定 .....	12
13.6 結果の算出 .....	13
13.7 試験の有効性 .....	14
13.8 数値の取扱い .....	14
14. 試験結果及び考察 .....	14
14.1 試験液の観察と測定結果 .....	14
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 .....	15
14.4 試験の有効性 .....	15
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

トリメチルアミンの *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

トリメチルアミン塩酸塩を用いて *Pseudokirchneriella subcapitata* に対する生長阻害試験を行い、トリメチルアミンの *Pseudokirchneriella subcapitata* に対する 0-72 時間の 50% 生長阻害濃度 ( $EC_{50}$ ) 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"

## 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	2010 年 12 月 3 日
実 験 開 始 日	2010 年 12 月 7 日
実 験 終 了 日	2010 年 12 月 10 日
試 験 終 了 日	2011 年 2 月 28 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、供試試料は保管しない。

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

[Redacted]

(所属 試験第四課)

試験担当者（生物試験の実施）

[Redacted]

[Redacted]

試験担当者（分析試験の実施）

[Redacted]

## 10. 最終報告書の承認

2011年 2月 28日

試験責任者

[Redacted]

## 11. 要 約

試験条件

試験生物	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>
試験区	被験物質濃度として 100、56、31、17、9.5 mg/L（公比 1.8）の 5 濃度区 及び対照区
試験液の調製	供試試料を培地に溶解した試験原液を用いて調製
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
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）
培養温度	21.8°C
照 明	96～99 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$
生物量の測定	細胞濃度
被験物質濃度の測定	HPLC 法（暴露開始時及び終了時）

試験結果

EC <sub>50</sub> (E <sub>r</sub> C <sub>50</sub> )	>100 mg/L
NOEC（生長速度 0-3d）	56 mg/L
（上記濃度は、設定濃度に基づく値）	

## 12. 試験材料

## 12.1 被験物質

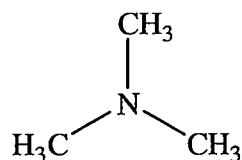
## a) 名称等

名 称 トリメチルアミン

CAS 番号 75-50-3

## b) 構造式等

構造式



分子式  $\text{C}_3\text{H}_9\text{N}$

分子量 59.11<sup>\*1</sup>

<sup>\*1</sup> 原子量表 (2010) を用いて算出した値

## c) 物理化学的性状

蒸気圧 187 kPa (20°C)<sup>\*2</sup>

対水溶解度 890 g/L (30°C)<sup>\*2</sup>

1-オクタノール/水分配係数 (log Pow)

0.16<sup>\*2\*3</sup>

融 点 -117.08°C<sup>\*2</sup>

沸 点 2.87°C<sup>\*2</sup>

溶媒に対する溶解度等

溶 媒	溶解度	溶媒中の安定性
ジエチルエーテル	溶解 <sup>*3</sup>	-
ベンゼン	溶解 <sup>*3</sup>	-
トルエン	溶解 <sup>*3</sup>	-
クロロホルム	溶解 <sup>*3</sup>	-

比 重  $d^{-5} 0.662$ <sup>\*3</sup>

<sup>\*2</sup> 化学物質総合情報提供システム (CHRIP)

<sup>\*3</sup> Richardson, M.L. et al "The Dictionary of Substances and their Effects" The Royal Society of Chemistry, 1993.

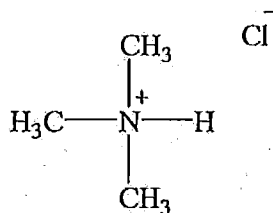
## 12.2 供試試料

## a) 名称等

名 称 トリメチルアミン塩酸塩

CAS 番号 593-81-7

b) 構造式等  
構造式



分子式  $\text{C}_3\text{H}_{10}\text{ClN}$

分子量 95.57<sup>\*1</sup>

\*1 原子量表 (2010) を用いて算出した値

c) 純度等

純度 98.4%<sup>\*4</sup>

不純物 水分 2.6%<sup>\*4</sup>

供給者

ロット番号

純度は 100% として取り扱った。

\*4 供給者提供の試験成績書

d) 物理化学的性状

蒸気圧  $1.66 \times 10^{-6} \text{ mmHg (25}^\circ\text{C)}$ <sup>\*2</sup>

対水溶解度 易溶<sup>\*7</sup>

1-オクタノール/水分配係数 (log Pow)

<-3.4<sup>\*5</sup> (実測値)

融点  $200^\circ\text{C}$ <sup>\*2</sup> (焼結又は昇華)

沸点  $277 \sim 278^\circ\text{C}$ <sup>\*2</sup> (分解)

常温における性状 形状：結晶～粉末、色：白色～ほとんど白色<sup>\*6</sup>

溶媒に対する溶解度等

溶 媒	溶解度	溶媒中の安定性
エタノール	易溶 <sup>*7</sup>	-
クロロホルム	可溶 <sup>*7</sup>	-
エーテル	不溶 <sup>*7</sup>	-

比 重  $1.03 (20^\circ\text{C})$ <sup>\*5</sup>

\*2 化学物質総合情報提供システム (CHRIP)

\*5 Karel Verschueren "Handbook of Environmental Data on Organic Chemicals" 4<sup>th</sup> Ed.

\*6 製造元 [redacted] の製品安全データシート

\*7 化学大辞典編集委員会編「化学大辞典」(共立出版)1960.

e) 保管条件

窒素封入し、デシケーター中で冷暗所保管した。

## 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、供試試料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被験物質の安定性を確認した。

## g) 取扱い上の注意

手袋、マスク、保護めがね及び白衣を着用し、皮膚、目への接触及び吸入を避けた。

## 12.3 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 5 月 31 日～6 月 3 日 $E_rC_{50}$ (0-3d) : 0.83 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:0.95 $\pm$ 0.19 mg/L (n=15)]。

## 13. 試験の実施

試験はトリメチルアミン塩酸塩を用いて実施し、濃度はトリメチルアミン濃度で表示した。

## 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 <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0.185	CuCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.00001
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0.415	CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	18.0
ZnCl <sub>2</sub>	0.00300	NH <sub>4</sub> Cl	15.0
FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.0640	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.60
Na <sub>2</sub> EDTA·2H <sub>2</sub> O	0.100	NaHCO <sub>3</sub>	50.0
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.00150	MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	12.0
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.00700	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> 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 (通気性のシリコセン®付)
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

## 13.3 試験液の調製法

必要量の供試試料を秤量 [ $C_3H_9N/C_3H_{10}ClN=59.11/95.57$  (61.85%) で換算] し、培地に溶解させ、100 mg/L の試験原液を調製した。調製容器内で必要量の試験原液と培地を混合し、攪拌して試験液を調製し、各試験容器に分割した。

## 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	100、56、31、17、9.5 mg/L (公比 1.8) 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培地
連 数	6 連/対照区 3 連/試験濃度区
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)
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 $0.75 \times 10^4$ 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	21~24°C ( $\pm 2^\circ\text{C}$ の変動幅)
照 明	設定値 90 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ (設定値の $\pm 20\%$ 以内、平均値 $\pm 15\%$ の変動幅) 400~700 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 時間ごとに測定 (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少なくとも 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 (トリメチルアミン濃度)

測定頻度	暴露開始時及び終了時
採水方法	調製容器より別途分取 (暴露開始時) 各試験区の試験容器から均等量採取し混合 (暴露終了時)
藻体除去	遠心分離 (3000 rpm, 10 分間) (暴露終了時のみ実施)
採水量	約 10 mL (全試験区)
測定方法	Appendix 1 参照

### 13.6 結果の算出

暴露期間中に測定した試験液中の被験物質濃度が設定濃度の $\pm 20\%$ 以内であったため、結果の算出には設定濃度を用いることとした。

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

$\mu_{i-j}$  =  $t_i$  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)

$EC_{50}$  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 ( $I_\mu$ ) は対照区の平均生長速度 ( $\mu_c$ ) と試験濃度区での生長速度 ( $\mu_T$ ) 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)  $EC_{50}$  の算出法

試験濃度範囲で 50%以上の阻害率が得られなかったため、 $EC_{50}$  は「>試験最高濃度」と表示した。生長速度により求めた  $EC_{50}$  は  $E_rC_{50}$  と記載した。

## 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

## 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。暴露終了時には細胞の増殖により 100 mg/L 区ですこし薄い緑色、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 7.8~8.1 であった。培養装置内温度は 21.8℃、光強度は 96~99  $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$  であった。

## c) 試験液中の被験物質濃度 (トリメチルアミン濃度)

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 9.2~98 mg/L、暴露終了時では 8.9~96 mg/L であった。また、設定濃度に対してそれぞれ 97~98%及び 94~96%であり、設定濃度の $\pm 20\%$ 以内に保たれていた。

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  $>100 \text{ mg/L}$  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。

100 mg/L 区では阻害が認められたものの対数増殖を示した。その他の試験濃度区では対照区と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。全ての試験濃度区で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、100 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 56 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 109 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 16% (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 0.98% (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

被験物質 (トリメチルアミン) は常温でガスであり、取り扱いが困難であることから、試験委託者と協議の上、試験実施上の操作性などを考慮して供試試料としてトリメチルアミン塩酸塩を用い、トリメチルアミン濃度に換算して評価した。

試験は試験法での上限濃度 (100 mg/L) 以下での試験生物に対する影響を求める試験として行った。その結果、 $E_1C_{50}$  は >100 mg/L、NOEC は 56 mg/L であった。試験液中の被験物質濃度は設定濃度の ±20% 以内に維持され、また、試験環境条件も適切な範囲内であったことから、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

Nominal concentration (mg/L)	pH	
	At the start	At the end
Control	7.9	8.0
9.5	7.9	8.1
17	7.9	8.1
31	7.9	8.1
56	7.8	8.1
100	7.8	8.1

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	21.8	21.8
Light intensity ( $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ )	99	98	96	99

Table 3 Value of biomass at each time

Nominal concentration (mg/L)	No.	Cell concentration ( $\times 10^4$ cells/mL)			
		0 hour <sup>a</sup>	24 hours	48 hours	72 hours
Control	A	0.75	2.2	16	85
	B	0.75	3.0	18	82 <sup>b</sup>
	C	0.75	2.9	16	88
	D	0.75	2.6	15	83
	E	0.75	2.6	15	90
	F	0.75	3.1	17	92
	Mean	0.75	2.8	16	87
	S.D.	0	0.33	1.0	4.1
9.5	A	0.75	2.7	16	86
	B	0.75	2.9	18	85
	C	0.75	2.3	13	75
	Mean	0.75	2.6	16	82
	S.D.	0	0.32	2.4	6.0
17	A	0.75	3.0	18	88
	B	0.75	2.5	16	71
	C	0.75	2.6	15	82
	Mean	0.75	2.7	16	80
	S.D.	0	0.24	1.5	8.6
31	A	0.75	3.0	18	89
	B	0.75	2.1	13	71
	C	0.75	2.4	16	100
	Mean	0.75	2.5	15	88
	S.D.	0	0.47	2.6	17
56	A	0.75	2.5	16	77
	B	0.75	2.3	15	77
	C	0.75	2.3	15	81
	Mean	0.75	2.4	15	78
	S.D.	0	0.12	0.65	2.4
100	A	0.75	1.7	9.8	45
	B	0.75	1.6	9.2	44
	C	0.75	1.7	9.0	47
	Mean	0.75	1.7	9.3	45
	S.D.	0	0.047	0.38	1.6

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

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

$$82 / 0.75 = 109$$

Table 4 Growth rate and growth inhibition

Nominal concentration (mg/L)	No.	Growth rate (0-3d)	Inhibition rate (%)
Control	A	1.58	-
	B	1.57	-
	C	1.59	-
	D	1.57	-
	E	1.60	-
	F	1.60	-
	Mean S.D.	1.58 0.0156	- -
9.5	A	1.58	0.043
	B	1.58	0.37
	C	1.54	2.9
	Mean S.D.	1.57 0.0248	1.1 1.6
17	A	1.59	-0.28
	B	1.52	4.2
	C	1.56	1.3
	Mean S.D.	1.56 0.0363	1.7 2.3
31	A	1.59	-0.67
	B	1.51	4.3
	C	1.64	-3.8
	Mean S.D.	1.58 0.0645	-0.040 4.1
56	A	1.54	2.6
	B	1.54	2.4
	C	1.56	1.4
	Mean S.D.	1.55 0.0102	2.1 0.64
100	A	1.36	14
	B	1.35	14
	C	1.38	13
	Mean S.D.	1.36 0.0117	14 0.74

Table 5  $E_rC_{50}$  and NOEC

$E_rC_{50}$ (mg/L)	NOEC (mg/L)
>100	56

Table 6 Result of statistical analysis

Nominal concentration (mg/L)	Statistical analysis	Statistical procedure
9.5	n.s.	Bartlett's test One-way ANOVA Dunnett's multiple comparison test
17	n.s.	
31	n.s.	
56	n.s.	
100	**	

n.s. : No significant difference

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

Table 7 Variation of growth rates in control

&lt; Variation for section-by-section specific growth rates in the controls &gt;

Control No.	Mean	Standard deviation	Coefficient of variation (%)	
A	1.58	0.450	29	16 (Mean)
B	1.57	0.190	12	
C	1.59	0.204	13	
D	1.57	0.270	17	
E	1.60	0.296	19	
F	1.60	0.150	9.4	

&lt; Variation of average specific growth rates in replicate controls &gt;

	0-3day
Mean	1.58
Standard deviation	0.0156
Coefficient of variation (%)	0.98

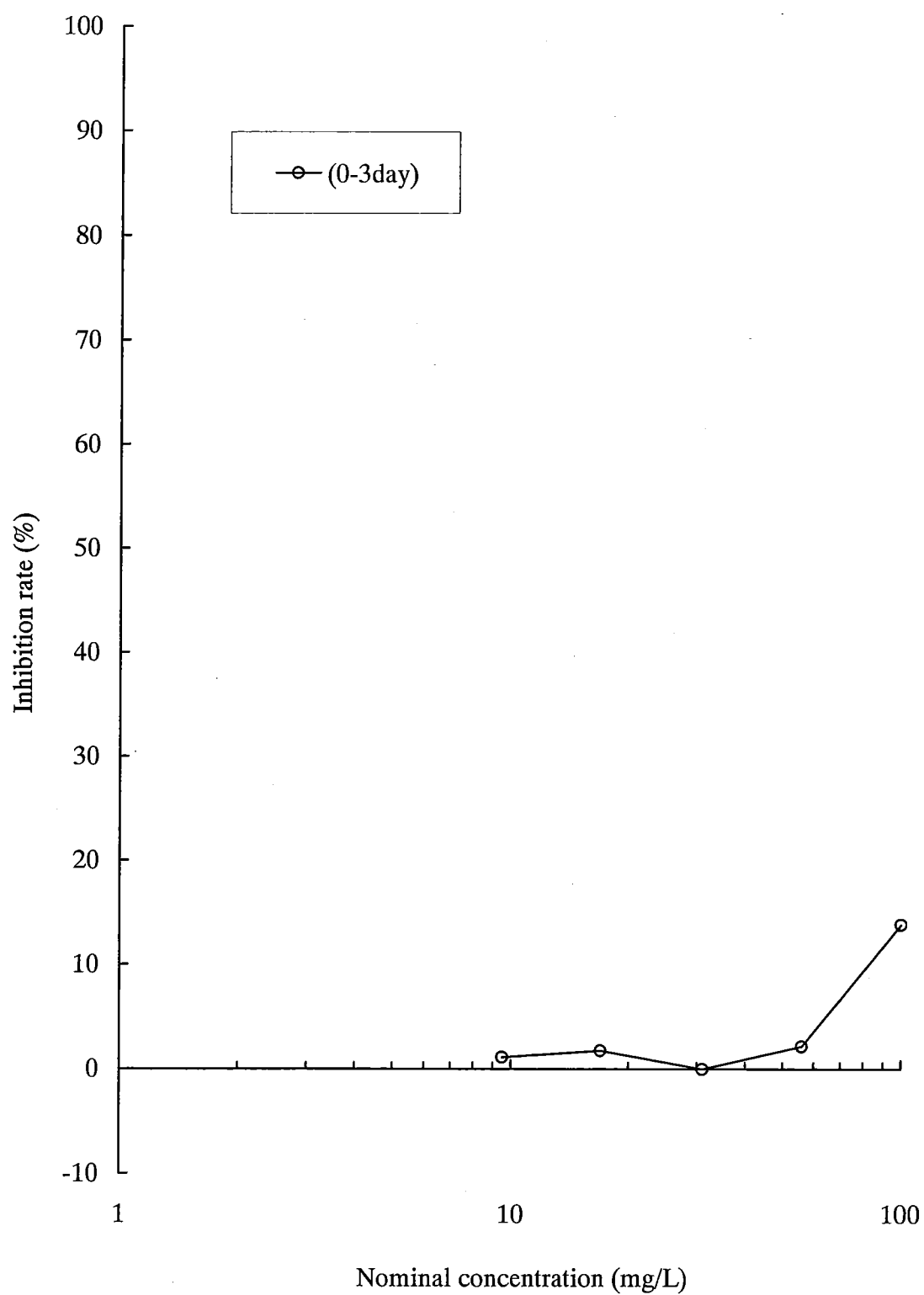


Figure 1 Concentration-response curve.

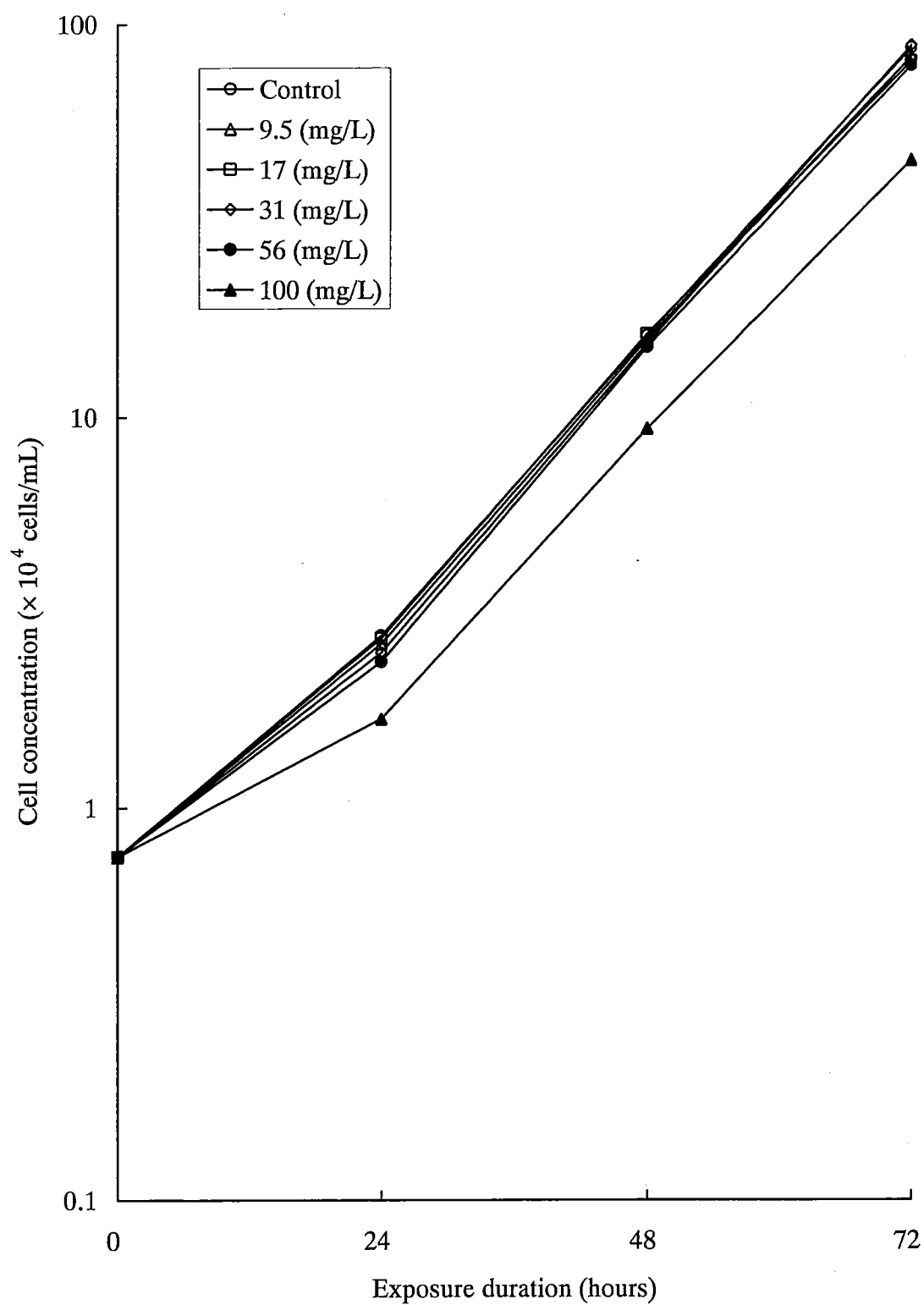


Figure 2 Growth curve.

## 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、そのまま若しくは培地で適宜希釈して高速液体クロマトグラフィー（HPLC）試料を調製した。

## 2. 被験物質濃度の測定

HPLC 試料中の被験物質濃度は、クロマトグラム上で得られた濃度既知の標準溶液のピーク面積と HPLC 試料のピーク面積とを比較し、比例計算して求めた。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	高速液体クロマトグラフ	
ポンプ	LC-20AD <sub>SP</sub>	（島津製作所）
電気伝導度検出器	CDD-10A <sub>SP</sub>	（島津製作所）
カラムオープン	CTO-20A <sub>CSP</sub>	（島津製作所）
オートインジェクター	SIL-20A	（島津製作所）
システムコントローラー	SCL-10A <sub>VP</sub>	（島津製作所）
デガッサー	DGU-20A <sub>3</sub>	（島津製作所）
カラム	Shim-pack IC-C4（150 mm × 4.6 mm I.D., 島津製作所）	
カラム温度	40°C	
溶離液	2.5 mmol/L しゅう酸溶液	
流 量	1.0 mL/min	
注入量	100 μL	

## 3. 標準溶液の調製

供試試料 162 mg を正確にはかりとり、超純水に溶解して 1000 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 100 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 10 mg/L の標準溶液を調製した。

なお、供試試料の秤量は被験物質含有率 61.85% で換算（ $C_3H_9N/C_3H_{10}ClN=59.11/95.57$ ）して行った。

## 4. 検量線の作成

供試試料 165mg を正確にはかりとり、超純水に溶解して 1000 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 1.0、5.1、10 及び 20 mg/L の標準溶液を調製した。これらを 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ピーク面積と被験物質濃度により検量線を作成した。作成した検量線を 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（1.0 mg/L）とした。

## 5. 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。

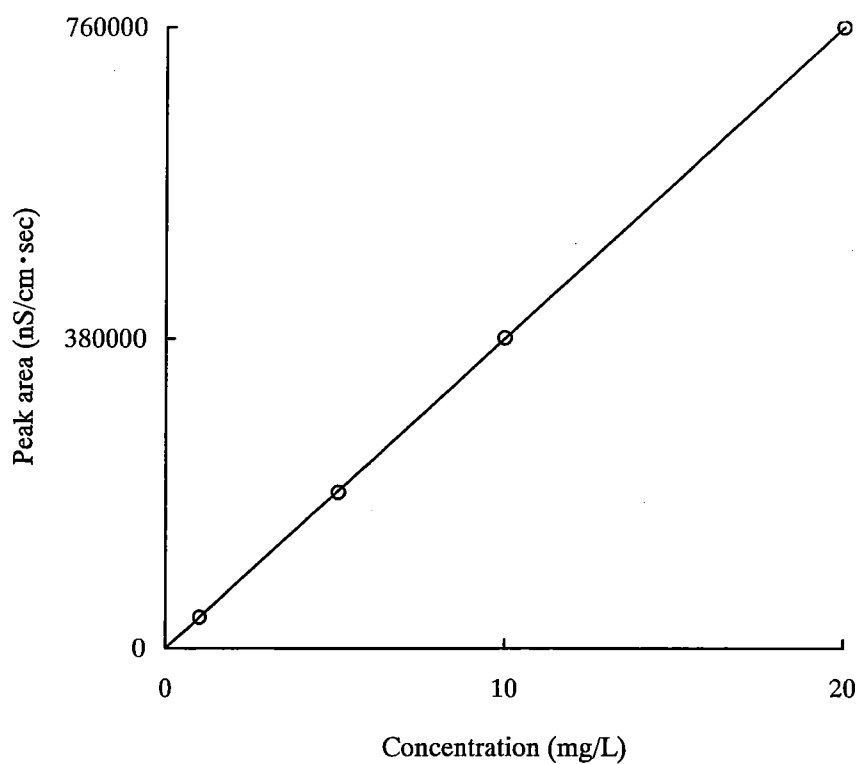
Appendix table 1-1 Measured concentrations of test item in test solutions

Nominal Concentration (mg/L)	Measured concentration (mg/L) (Percentage of measured concentration versus nominal concentration %)		
	At the start	At the end	Geometric mean
Control	n.d.	n.d.	
9.5	9.2 (97)	8.9 (94)	9.1 (95)
17	17 (98)	16 (95)	16 (96)
31	30 (98)	29 (94)	30 (96)
56	55 (98)	54 (96)	54 (97)
100	98 (98)	96 (96)	97 (97)

n.d. : < 1.0 mg/L

## Appendix 2

検量線及びクロマトグラム



$$y = 37974x$$

$$r = 1.00$$

Concentration (mg/L)	Peak area (nS/cm·sec)
1.0	37933
5.1	191413
10	380733
20	759551

Appendix figure 2-1 Calibration curve of trimethylamine for analysis by HPLC.

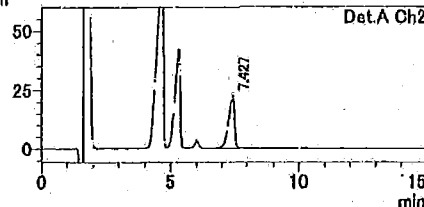
Study No. 95277

サンプル名 : Standard solution 10 mg/L  
データファイル : 95277-101207-S01.lcd

ピークテーブル D:\4課\95277\_95280\101207\95277-101207-S01.lcd

ピーク#	保持時間	面積	高さ
1	7.427	371807	22399

D:\4課\95277\_95280\101207\95277-101207-S01.lcd  
uS/cm

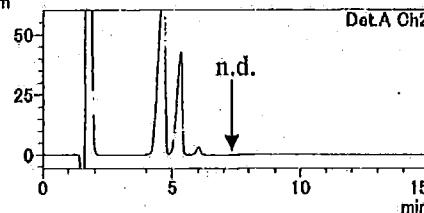


サンプル名 : Control blank  
データファイル : 95277-101207-H0hZ.lcd

ピークテーブル D:\4課\95277\_95280\101207\95277-101207-H0hZ.lcd

ピーク#	保持時間	面積	高さ
1	0.000	0	0

D:\4課\95277\_95280\101207\95277-101207-H0hZ.lcd  
uS/cm

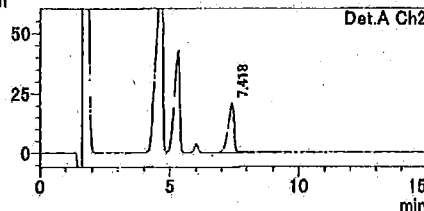


サンプル名 : 9.5 mg/L exposure level  
データファイル : 95277-101207-H0hE.lcd

ピークテーブル D:\4課\95277\_95280\101207\95277-101207-H0hE.lcd

ピーク#	保持時間	面積	高さ
1	7.418	343113	20805

D:\4課\95277\_95280\101207\95277-101207-H0hE.lcd  
uS/cm

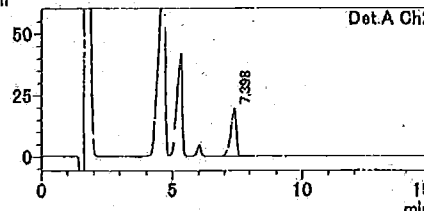


サンプル名 : 17 mg/L exposure level  
データファイル : 95277-101207-H0hD.lcd

ピークテーブル D:\4課\95277\_95280\101207\95277-101207-H0hD.lcd

ピーク#	保持時間	面積	高さ
1	7.398	308539	19349

D:\4課\95277\_95280\101207\95277-101207-H0hD.lcd  
uS/cm

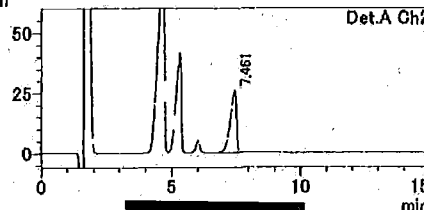


サンプル名 : 31 mg/L exposure level  
データファイル : 95277-101207-H0hC.lcd

ピークテーブル D:\4課\95277\_95280\101207\95277-101207-H0hC.lcd

ピーク#	保持時間	面積	高さ
1	7.401	449529	25887

D:\4課\95277\_95280\101207\95277-101207-H0hC.lcd  
uS/cm



Date: 2010.12.7

Name: [REDACTED]

Appendix figure 2-2-1 HPLC chromatograms at start of exposure.

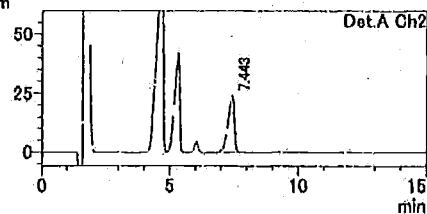
Study No. 95277

サンプル名 : 56 mg/L exposure level  
 データファイル : 95277-101207-H0hB.lcd

ピークテーブル D:\X\95277\_95280\101207\95277-101207-H0hB.lcd

ピーク#	保持時間	面積	高さ
1	7.443	407543	23915

D:\X\95277\_95280\101207\95277-101207-H0hB.lcd  
 uS/cm

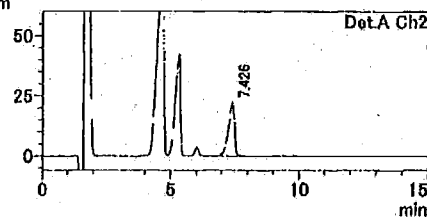


サンプル名 : 100 mg/L exposure level  
 データファイル : 95277-101207-H0hA.lcd

ピークテーブル D:\X\95277\_95280\101207\95277-101207-H0hA.lcd

ピーク#	保持時間	面積	高さ
1	7.426	365617	22113

D:\X\95277\_95280\101207\95277-101207-H0hA.lcd  
 uS/cm



Date: 2010.12.7

Name: [REDACTED]

Appendix figure 2-2-2 HPLC chromatograms at start of exposure.

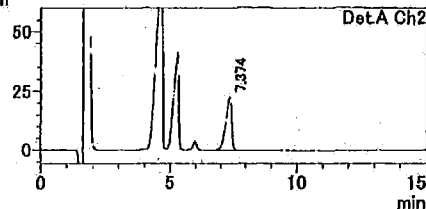
Study No. 95277

サンプル名 : Standard solution 10 mg/L  
データファイル : 95277-101210-S01.lcd

ピークテーブル D:\Y4課\95277\_95280\101210\95277-101210-S01.lcd

検出器A	ピーク#	保持時間	面積	高さ
	1	7.374	373781	22399

D:\Y4課\95277\_95280\101210\95277-101210-S01.lcd  
uS/cm

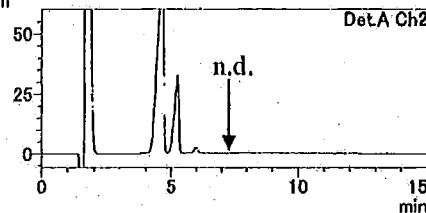


サンプル名 : Control blank  
データファイル : 95277-101210-H72hZ.lcd

ピークテーブル D:\Y4課\95277\_95280\101210\95277-101210-H72hZ.lcd

検出器A	ピーク#	保持時間	面積	高さ
	1	0.000	0	0

D:\Y4課\95277\_95280\101210\95277-101210-H72hZ.lcd  
uS/cm

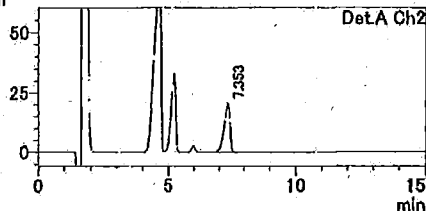


サンプル名 : 9.5 mg/L exposure level  
データファイル : 95277-101210-H72hE.lcd

ピークテーブル D:\Y4課\95277\_95280\101210\95277-101210-H72hE.lcd

検出器A	ピーク#	保持時間	面積	高さ
	1	7.353	332218	20399

D:\Y4課\95277\_95280\101210\95277-101210-H72hE.lcd  
uS/cm

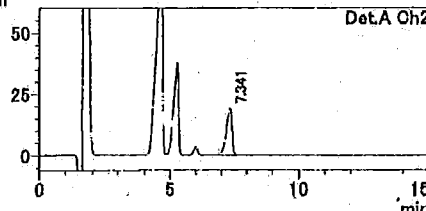


サンプル名 : 17 mg/L exposure level  
データファイル : 95277-101210-H72hD.lcd

ピークテーブル D:\Y4課\95277\_95280\101210\95277-101210-H72hD.lcd

検出器A	ピーク#	保持時間	面積	高さ
	1	7.341	302232	18912

D:\Y4課\95277\_95280\101210\95277-101210-H72hD.lcd  
uS/cm

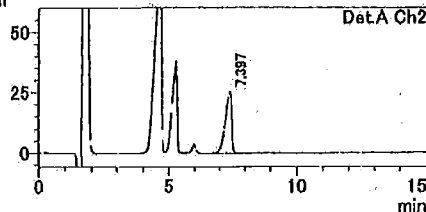


サンプル名 : 31 mg/L exposure level  
データファイル : 95277-101210-H72hC.lcd

ピークテーブル D:\Y4課\95277\_95280\101210\95277-101210-H72hC.lcd

検出器A	ピーク#	保持時間	面積	高さ
	1	7.397	434662	25299

D:\Y4課\95277\_95280\101210\95277-101210-H72hC.lcd  
uS/cm



Date: 2010.12.10

Name: [REDACTED]

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

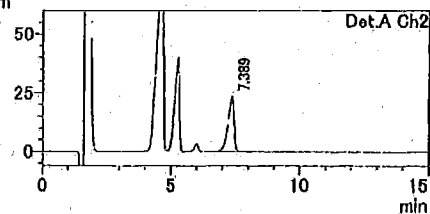
Study No. 95277

サンプル名 : 56 mg/L exposure level  
 データファイル : 95277-101210-H72hB.lcd

ピークテーブル D:\Y95277\_95280\101210\Y95277-101210-H72hB.lcd

ピーク#	保持時間	面積	高さ
1	7.389	400382	23556

D:\Y4課\Y95277\_95280\101210\Y95277-101210-H72hB.lcd  
 uS/cm

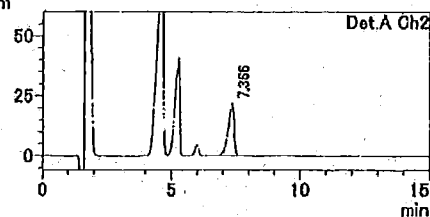


サンプル名 : 100 mg/L exposure level  
 データファイル : 95277-101210-H72hA.lcd

ピークテーブル D:\Y95277\_95280\101210\Y95277-101210-H72hA.lcd

ピーク#	保持時間	面積	高さ
1	7.366	357214	21724

D:\Y4課\Y95277\_95280\101210\Y95277-101210-H72hA.lcd  
 uS/cm



Date: 2010.12.10 Name: [REDACTED]

Appendix figure 2-3-2 HPLC chromatograms at end of exposure.

## Additional data



予備試験結果

## 1. 供試試料の培地への溶解度

供試試料の培地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 供試試料を培地に溶解させて調製した試験原液を用いて調製した。

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。

## &lt;試験生物への影響&gt;

設定濃度区 (mg/L)	生長速度 (0-3d) に基づく 生長阻害率 (%)
1.0	1.3
10	-0.0079
32	-0.96
100	49
10*	-2.0
100*	7.4

\* 別日にて試験実施（被験物質濃度分析未実施）

## &lt;試験液中の被験物質濃度&gt;

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
1.0	1.0 (100)	0.99 (99)
1.0 (藻体なし)		1.0 (102)
100	100 (102)	100 (102)
100 (藻体なし)		100 (101)

藻体吸着: なし

## 3. 本試験条件

試験濃度 100、56、31、17、9.5 mg/L (公比 1.8)