

最 終 報 告 書

アクリル酸の*Pseudokirchneriella subcapitata*に対する生長阻害試験
(試験番号：第16031号)

2005年6月10日

財団法人 日本食品分析センター 多摩研究所

目 次

	頁
要 旨	3
1 試験目的	7
2 試験法ガイドライン	7
3 試験実施基準	7
4 被験物質	7
4.1. 名称, 構造式及び物理化学的性状	7
4.2. 供試試料	8
4.3. 被験物質の保管方法及び保管条件下での安定性	8
4.4. 取り扱い上の注意	8
5 試験生物	8
6 試験方法	9
6.1. 暴露条件及び環境条件	9
6.2. 試験培地	9
6.3. 試験容器及び培養装置等	9
6.4. 試験濃度の設定	10
6.5. 試験溶液の調製	10
7 観察及び測定方法	10
7.1. 細胞濃度の測定及び細胞の観察	10
7.2. 被験物質濃度の測定	10
7.3. 試験環境の測定	10
7.4. 試験溶液の状態観察	11
8 結果の処理法	11
8.1. 結果の算出に用いた試験濃度の決定	11
8.2. 生長曲線	11
8.3. 生長阻害率	11
8.4. 50 %生長阻害濃度 (EC_{50})	12
8.5. 最大無作用濃度 (NOEC)	12
8.6. 統計的手法	12
9 結果及び考察	13
9.1. 試験溶液中の被験物質濃度	13
9.2. 50 %生長阻害濃度 (EC_{50})	13
9.3. 最大無作用濃度 (NOEC)	13
9.4. 細胞濃度及び平均値	13
9.5. 生長曲線	13
9.6. 濃度と生長阻害率	13
9.7. 試験生物の観察された影響	13
9.8. 試験環境の測定	14

9. 9.	試験溶液の状態観察	14
9. 10.	試験計画書からの逸脱事項	14
9. 11.	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	14
9. 12.	試験の有効性	14
9. 13.	結果の評価と考察	14
	Table 1. Measured concentration of the test Substance in the test solution	15
	Table 2. EC ₅₀ values	16
	Table 3. NOEC	16
	Table 4-1. Cell concentration and average	17
	Table 4-2. Cell concentration and average	18
	Table 5-1. Percentage inhibition	19
	Table 5-2. Percentage inhibition	20
	Table 6. Temperature and pH values of test solution	21
	Table 7. Light intensity in culturing apparatus	21
	Figure 1. Growth Curve	22
	Figure 2. Concentration-inhibition curve (rate)	23
	Figure 3. Concentration-inhibition curve (area)	23
	付属資料-1: OECD 培地	24
	付属資料-2: 予備試験結果	25
	付属資料-3: 統計処理データ	26
	付属資料-4: 試験溶液中の被験物質濃度の分析方法	28
	付属資料-5: 収量法による試験結果	33

要 旨

表 題

アクリル酸の*Pseudokirchneriella subcapitata*に対する生長阻害試験

試験目的

アクリル酸の*Pseudokirchneriella subcapitata*に対する72時間生長阻害試験を実施し、50 % 生長阻害濃度 (EC₅₀) 及び最大無作用濃度 (NOEC) を求め、*Pseudokirchneriella subcapitata*の生長に対するアクリル酸の毒性を明らかにすることを目的とする。

試験方法

本試験は「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, 環境企発第031121002号)」, 別添 藻類生長阻害試験, ミジンコ急性遊泳阻害試験及び魚類急性毒性試験, IV 藻類生長阻害試験に準拠した。

- 1) 被験物質：アクリル酸
- 2) 試験生物：*Pseudokirchneriella subcapitata* (ATCC22662株)
- 3) 暴露方式：振とう培養法 (100 r/min)
- 4) 暴露期間：72時間
- 5) 試験濃度 (設定値)：対照区, 0.0032, 0.010, 0.032, 0.10, 0.32, 1.0, 3.2及び10 mg/l (公比3.2)
- 6) 初期細胞濃度：約 1×10^4 cells/ml
- 7) 連 数：3連/1試験区 (ただし, 対照区は6連とした。)
- 8) 試験溶液量：100 ml/1連
- 9) 試験水温：22.2～24.2 ℃
- 10) 照 明：90～95 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ (白色の蛍光灯を用い, 連続的かつ均一に照射した。)
- 11) pH：7.3～8.2 (試験溶液のpH調整は行わなかった。)
- 12) 培 地：OECD化学品テストガイドライン201 Alga, Growth Inhibition Test (1984) に示された培地を使用した。試験培地は, 水酸化ナトリウム溶液を用いてpHを8.3に調整し, 滅菌を行った。
- 13) 分 析 法：高速液体クロマトグラフ法

結 果

結果の算出は、試験溶液中の被験物質濃度の測定値から、幾何平均により求めた平均測定濃度を用いて行った。

1) 50 %生長阻害濃度 (EC_{50}) :

速度法

ErC_{50} (0-72hr) ; 0.75 mg/l (95 %信頼限界 : 0.69~0.82 mg/l) [直線回帰分析法]

面積法

EbC_{50} (0-72hr) ; 0.16 mg/l (95 %信頼限界 : 0.14~0.19 mg/l) [直線回帰分析法]

2) 最大無作用濃度 (NOEC) :

速度法

NOEC (速度法0-72hr) : 0.030 mg/l [Dunnettの多重比較検定]

面積法

NOEC (面積法0-72hr) : 0.0090 mg/l [Dunnettの多重比較検定]

表 題：アクリル酸の*Pseudokirchneriella subcapitata*に対する生長阻害試験

試験番号：第16031号

試験委託者

名 称：環境省

所 在 地：〒100-8975 東京都千代田区霞ヶ関1丁目2番2号

試験受託者

名 称：財団法人 日本食品分析センター

所 在 地：〒151-0062 東京都渋谷区元代々木町52番1号

試験施設

名 称：財団法人 日本食品分析センター 多摩研究所

所 在 地：〒206-0025 東京都多摩市永山6丁目11番10号

〒206-0025 東京都多摩市永山6丁目21番6号(別館)

試験責任者

所 属：環境科学部 環境生物安全課

氏 名：[REDACTED]

分析担当責任者

所 属：応用試験部 農薬試験課

氏 名：[REDACTED]

試験担当者

生物系

所 属：環境科学部 環境生物安全課

氏 名：[REDACTED] , [REDACTED] , [REDACTED] , [REDACTED]

分析系

所 属：応用試験部 農薬試験課

氏 名：[REDACTED] , [REDACTED] , [REDACTED]

試験日程

試験開始日：2005年3月1日

実験開始日：2005年5月23日

実験終了日：2005年5月26日

試験終了日：2005年6月10日

記録及び試資料の保管

試験に関する下記の記録及び資料は10年間、財団法人 日本食品分析センター多摩研究所資料保管施設に保管する。その後の保管については試験委託者と別途協議の上、定める。

- 1) 試験計画書
- 2) 生データ及び最終報告書
- 3) 信頼性保証部門の検閲記録
- 4) その他必要なもの

最終報告書の承認

試験責任者

所 属： 財団法人 日本食品分析センター 多摩研究所 環境科学部 環境生物安全課

氏 名：



1 試験目的

アクリル酸の*Pseudokirchneriella subcapitata*に対する72時間生長阻害試験を実施し、50%生長阻害濃度(EC₅₀)及び最大無作用濃度(NOEC)を求め、*Pseudokirchneriella subcapitata*の生長に対するアクリル酸の毒性を明らかにすることを目的とする。

2 試験法ガイドライン

本試験は「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, 環境企発第031121002号)」, 別添 藻類生長阻害試験, ミジンコ急性遊泳阻害試験及び魚類急性毒性試験, IV 藻類生長阻害試験に準拠した。

3 試験実施基準

「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」(平成15年11月21日薬食発第1121003号, 平成15・11・17製局第3号, 環境企発第031121004号)を遵守した。

4 被験物質

被験物質に関する情報を以下に示した。以下の情報は、供給者提供資料に拠った。

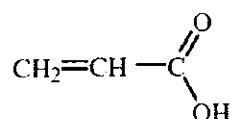
4.1. 名称, 構造式及び物理化学的性状

名 称: アクリル酸

別 名: 2-プロペン酸*, エチレンカルボン酸*

CAS 番号: 79-10-7

化学構造式*:



化学式*: C₃H₄O₂

分子量: 72.06

沸 点: 141.0 °C

融 点: 13 °C

比 重: 1.055 (20/4 °C)

密 度: -

蒸気圧: 10 mmHg (39 °C)

溶解度: 水, アルコール, エーテルに混和

n-オクタノール/水分配係数(log Pow): 0.35*

解離定数 pKa: -

常温における性状: 白色～ほとんど白色の塊, 又は融解時, 無色～ほとんど無色, 澄明

安定性: 重合防止剤が添加されているが, 加熱, 直射日光, 過酸化物, 鉄錆などによって重合が起こることがある。

* 供給者提供資料から得ることができなかった情報については、以下を参考に記載した。

- ・ <http://www.k-erc.pref.kanagawa.jp/kisnet/menu.asp> 神奈川県化学物質安全情報提供システム(kis-net)
- ・ 財団法人 化学物質評価研究機構: “既存化学物質安全性(ハザード)評価シート”

4. 2. 供試試料

入手先：[REDACTED]

入手年月日：2005 年 1 月 27 日

入手量：85.6 g (風袋含む)

ロット番号：KLG1797

純 度：99.7 %

不純物の名称及び含有量：安定剤(重合防止剤)としてヒドロキノンモノメチルエーテルを
約 0.02 %含有

有効期限：－

4. 3. 被験物質の保管方法及び保管条件下での安定性

①保管方法

被験物質は室温暗所に保管した。

②被験物質の確認及び保管条件下の安定性 (GLP対象外として実施)

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。また、試験終了時にも同様にスペクトルを測定し、試験開始前に測定したスペクトルとの比較により、保管中の安定性を確認した。その結果、被験物質は保管条件下において安定であったと判断された。

4. 4. 取り扱い上の注意

被験物質の取り扱いにおいては、保護具等を着用の上、人体への吸入、摂取、接触等がないよう十分注意して取り扱った。

5 試験生物

試験生物として下記に示した藻類で、入手後に基準物質(二クロム酸カリウム、試薬特級、純度99.5 %以上[和光純薬工業株式会社])による生物検定において EC_{50} の確認されたものを用いた。

なお、基準物質による72時間後の ErC_{50} は1.0 mg/l (2005年4月11日)であった。また、当センターにおける ErC_{50} のバックグラウンドデータ(1.1 ± 0.20 mg/l)と比較した結果、試験生物の感受性は、通常の状態にあると判断した。

1) 学 名：*Pseudokirchneriella subcapitata*

2) 株 番 号：ATCC22662株

3) 入手等：American Type Culture Collection (2004年12月16日)より入手したものを、当センターにおいて無菌的に継代培養した種である。試験には、入手後に細菌検査を行い、無菌性が確認されたものを使用した。

4) 前 培 養：試験に用いる藻類は、培地と同一の水質、水温及び光条件で暴露開始前3日間(2005年5月20日～5月23日)培養した。なお、前培養終了時の細胞濃度は 208.10×10^4 cells/mlであり、指数増殖期にあると判断した。また、前培養終了時に、変形や異常な細胞の出現が無いことを確認した。

[前培養条件]

- ①培地：OECD培地 [付属資料-1]
- ②培養方式：振とう培養法 (100 r/min)
- ③培養期間：3日間
- ④培養容器：300 ml容ガラス製三角フラスコ (通気性シリコ栓付) に培地100 mlを添加し，
保存培養器から藻体を接種した。
- ⑤培養装置内の温度：22.9～23.1℃
- ⑥照明：90～95 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ (白色の蛍光灯を用い，連続的かつ均一に照射した。)

6 試験方法

6.1. 暴露条件及び環境条件

- ①暴露方式：振とう培養法 (100 r/min)
- ②暴露期間：72時間
- ③初期細胞濃度：約 1×10^4 cells/ml
- ④連数：3連/1試験区 (ただし，対照区は6連とした。)
- ⑤試験溶液量：100 ml/1連
- ⑥試験水温：22.2～24.2℃
- ⑦照明：90～95 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ (白色の蛍光灯を用い，連続的かつ均一に照射した。)
- ⑧試験溶液のpH：7.3～8.2 (pHの調整は行わなかった。)

6.2. 試験培地

OECD化学品テストガイドライン201 Alga, Growth Inhibition Test (1984) に示された培地を使用した。試験培地は，水酸化ナトリウム溶液を用いてpHを8.3に調整し，滅菌を行った。

試験培地の成分表を付属資料-1に示した。

6.3. 試験容器及び培養装置等

- ①試験容器：300 ml容ガラス製三角フラスコ [通気性シリコ栓付] (容器のサイズ；底面の内径 約8 cm×高さ 約15 cm) を用いた。
- ②培養装置：光照射式恒温振とう器，TA-60RL [高崎科学器械株式会社]
- ③粒子計数装置：コールターZ1 [ベックマン・コールター株式会社]
- ④血球計算盤：エルマ血球計算盤 (THOMA) [エルマ販売株式会社]
- ⑤光学顕微鏡：CK2 [オリンパス光学工業株式会社]
- ⑥温度計：AP-210 [安立計器株式会社]
- ⑦pH計：HM-21P [東亜ディーケーケー株式会社]
- ⑧光量子計：QMSS型 [株式会社 藤原製作所]

6.4. 試験濃度の設定

予備試験 (GLP対象外として実施) の結果から、10 mg/lの濃度区では藻類の生長阻害率 (I_{μ}) が90 %であり、0.0032 mg/lの濃度区では-2 %であったため、本試験では、10 mg/l以下の濃度を公比3.2で8濃度区 (0.0032, 0.010, 0.032, 0.10, 0.32, 1.0, 3.2及び10mg/l) を設定した。

また、予備試験の結果を付属資料-2に示した。

6.5. 試験溶液の調製

試験溶液調製時の試験培地は、調製前に23℃±2℃にした。

被験物質を超音波処理により試験培地に溶解させ被験物質原液 (1,000 mg/l) 及び溶液 (100, 10 及び 1.0 mg/l) を調製した。これらの被験物質原液及び溶液を試験培地に無菌操作により添加して各濃度区の試験溶液を調製した。

対照区には、試験培地のみの無処理の対照区を設けた。

なお、被験物質は純度が99.7 %であったため、純度を考慮せず秤取した。よって、設定した試験濃度は、供試試料の濃度として示した。また、被験物質原液及び溶液は用時調製とした。

7 観察及び測定方法

7.1. 細胞濃度の測定及び細胞の観察

暴露開始 (試験生物を試験溶液の入った試験容器に接種した時点) から、24, 48及び72時間後に各試験区の細胞濃度を直接定量法 (粒子計数装置) により測定した。滅菌した試験培地を粒子計数装置のバックグラウンドとし、細胞濃度は各試験容器の粒子計数値からブランク値を減じて算出した。また、暴露終了時に細胞の変形や異常な細胞の出現について光学顕微鏡下で観察した。

7.2. 被験物質濃度の測定

試験溶液中の被験物質の分析は、高速液体クロマトグラフを用いて、全試験区について暴露開始時及び終了時の計2回行った。なお、暴露開始時は3連分 (対照区は6連分) を同時に調製した容器から試験溶液を200 ml採取して分析用試験溶液とした。また、暴露終了時は各試験区の3連 (対照区は6連分) の試験容器から等量ずつ採取し混合した200 mlをそれぞれ分析用試験溶液とした。分析は藻体除去後に行なった。

なお、分析方法は付属資料-4に示した。

7.3. 試験環境の測定

各試験区の水質として、水温及びpHを暴露開始時及び終了時に測定した。

なお、暴露開始時は3連分 (対照区は6連分) を同時に調製した容器について測定した。また、暴露終了時は各試験区の1容器について測定した。

暴露期間中、各試験区のpHが1.5以上変動しないことを確認した。なお、試験水温の変動を監視するために、培養装置内の温度を暴露期間中に継続して測定した。培養装置内の光量を1日1回測定した。

7.4. 試験溶液の状態観察

暴露開始時及び暴露終了時の試験溶液について、その色調や結晶の析出、沈殿物等の有無について状態観察を行った。

8 結果の処理法

8.1. 結果の算出に用いた試験濃度の決定

結果の算出は、試験溶液中の被験物質濃度の測定値から、幾何平均により求めた平均測定濃度を用いて行った。

8.2. 生長曲線

各試験区の細胞濃度の平均値を時間に対してプロットし、生長曲線を作成した。このとき、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。

8.3. 生長阻害率

①対照区との生長速度の比較(速度法)により生長阻害率(I_{μ})を算出した。

細胞濃度の平均の生長速度を次式により算出した。

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

μ_{i-j} : t_i 時から t_j 時までの期間の生長速度

N_i : t_i 時の実測細胞濃度(cells/ml)。暴露開始時(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(hr)

t_j : 暴露開始後*j*回目に細胞濃度を測定した時間(hr)

各濃度区における生長(速度)阻害率(I_{μ})は、次式により算出した。

$$I_{\mu}(\%) = \frac{\mu_c - \mu_r}{\mu_c} \times 100$$

μ_c : 対照区の平均生長速度

μ_r : 各濃度区における平均生長速度

②対照区との生長曲線下の面積の比較(面積法)により生長阻害率(I_A)を算出した。

生長曲線下の面積を次式により算出した。

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

A : 生長曲線下の面積

N_0 : 暴露開始時(t_0)の設定細胞濃度(cells/ml)

N_1 : t_1 時の実測細胞濃度(cells/ml)

N_n : t_n 時の実測細胞濃度(cells/ml)

t_1 : 暴露開始後最初に細胞濃度を測定した時間(hr)

t_n : 暴露開始後 n 回目に細胞濃度を測定した時間(hr)

各濃度区における生長(面積)阻害率(I_A)は、次式により算出した。

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

A_c : 対照区の生長曲線下の面積

A_t : 各濃度区における生長曲線下の面積

8. 4. 50 %生長阻害濃度(EC_{50})

面積法又は速度法により算出される生長阻害率(%)を用いて直線回帰分析法により、 EC_{50} を算出した。また、それらの95 %信頼限界も算出し、算出に用いた回帰直線の傾きを求めた。なお、速度法で算出した EC_{50} を ErC_{50} (0-72hr)、面積法で算出した EC_{50} を EbC_{50} (0-72hr)とした。また、濃度-生長阻害率のグラフを作成した。

8. 5. 最大無作用濃度(NOEC)

Dunnettの多重比較検定(片側, 有意水準: $\alpha=0.05$)により、対照区と比較して有意差が認められない最高試験濃度を求めた。なお、速度法で算出したNOECをNOEC(速度法0-72hr)、面積法で算出したNOECをNOEC(面積法0-72hr)とした。

8. 6. 統計的手法

結果の算出には、統計ソフト「StatLight 2000(ユックムス株式会社)」を使用した。また、その入力値及び出力結果を付属資料-3に示した。

9 結果及び考察

9.1. 試験溶液中の被験物質濃度

全試験区について暴露開始時及び暴露終了時に試験溶液中の被験物質濃度を測定した。
各濃度区の測定濃度の初期濃度に対する割合は、暴露終了時の試験溶液で80～100%であった。

また、各濃度区の幾何平均により求めた平均測定濃度は0.0032 mg/lで0.003 mg/l, 0.010 mg/lで0.009 mg/l, 0.032 mg/lで0.030 mg/l, 0.10 mg/lで0.095 mg/l, 0.32 mg/lで0.324 mg/l, 1.0 mg/lで0.997 mg/l, 3.2 mg/lで3.32 mg/l及び10 mg/lで10.1 mg/lであった。

暴露期間中の試験溶液の被験物質濃度をTable 1に示した。

9.2. 50%生長阻害濃度 (EC₅₀)

ErC₅₀ (0-72hr) は0.75 mg/l (95%信頼限界; 0.69～0.82 mg/l [回帰直線の傾き; 45.0]) 及びEbC₅₀ (0-72hr) は0.16 mg/l (95%信頼限界; 0.14～0.19 mg/l [回帰直線の傾き; 52.1]) であった。

50%生長阻害濃度 (EC₅₀) をTable 2に示した。

9.3. 最大無作用濃度 (NOEC)

NOEC (速度法0-72hr) は0.030 mg/l及びNOEC (面積法0-72hr) は0.009 mg/lであった。

最大無作用濃度 (NOEC) をTable 3に示した。

9.4. 細胞濃度及び平均値

72時間後の平均細胞濃度は、0.003 mg/lで70.97×10⁴ cells/ml, 0.009 mg/lで72.40×10⁴ cells/ml, 0.030 mg/lで61.60×10⁴ cells/ml, 0.095 mg/lで48.03×10⁴ cells/ml, 0.324 mg/lで17.01×10⁴ cells/ml, 0.997 mg/lで5.75×10⁴ cells/ml, 3.32 mg/lで2.66×10⁴ cells/ml及び10.1 mg/lで2.10×10⁴ cells/mlであった。

なお、対照区では69.54×10⁴ cells/mlであった。

暴露期間中の各試験区の細胞濃度及び平均値をTable 4-1～2に示した。

9.5. 生長曲線

各試験区の生長曲線をFigure 1に示した。

9.6. 濃度と生長阻害率

濃度－生長阻害率をTable 5-1～2及びFigure 2及び3に示した。

9.7. 試験生物の観察された影響

全試験区において細胞の変形や異常な細胞の出現は観察されなかった。

9. 8. 試験環境の測定

暴露期間中の各試験区の水温は22.2～24.2℃、pHは7.3～8.2であった。また、培養装置内の光量は90～95 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ であった。

暴露期間中の各試験区の水温は23℃ \pm 2℃の範囲で試験環境条件を満たしていた。

また、暴露期間中の培養装置内の温度は21.0～24.2℃であったことから、各試験区の試験水温は継続的に試験環境条件を満たしていたことが確認された。

暴露期間中の各試験区の試験溶液の水温及びpHをTable 6、培養装置内の光量をTable 7に示した。

9. 9. 試験溶液の状態観察

暴露開始時の試験溶液は全ての濃度区で無色透明であり、被験物質は試験溶液中に溶解していることが目視にて確認された。また、暴露終了時の試験溶液は、全ての濃度区において開始時と比較して変化が認められなかった。

9. 10. 試験計画書からの逸脱事項

なし。

9. 11. 試験成績の信頼性に影響を及ぼしたと思われる環境要因

なし。

9. 12. 試験の有効性

対照区の暴露終了時の平均細胞濃度は 69.54×10^4 cells/ml、暴露期間中の対照区の毎日の生長速度の変動係数は17%、また、対照区の繰り返し間の生長速度の変動係数は2.3%であった。対照区の細胞濃度は、暴露終了時において、暴露開始時における初期細胞濃度の16倍以上に増加し、対照区の毎日の生長速度の変動係数が暴露期間を通じて35%以内であり、対照区の繰り返し間の生長速度の変動係数が15%以内であったことから、本試験の成立が確認された。

9. 13. 結果の評価と考察

本試験において、各濃度区の測定濃度の初期濃度に対する割合は、80%以上を保っていたことから、試験溶液中の被験物質濃度は暴露期間中、十分に維持されていたと判断された。

Table 1. Measured concentration of the test Substance in the test solution

Nominal concentration (mg/l)	0 Hour	72 Hours	Mean* of measured concentration (mg/l)
0.0032	0.003	0.003 (100)	0.003
0.010	0.010	0.008 (80)	0.009
0.032	0.033	0.028 (85)	0.030
0.10	0.100	0.091 (91)	0.095
0.32	0.328	0.321 (98)	0.324
1.0	1.00	0.994 (99)	0.997
3.2	3.34	3.31 (99)	3.32
10	10.1	10.1 (100)	10.1
Control	< 0.002	< 0.002	---

*: geometric mean

(): rate to the concentration at 0 hour (%)

Table 2. EC_{50} values

(mg/l)	
ErC_{50} (0-72hr)	EbC_{50} (0-72hr)
0.75* (0.69~0.82)	0.16* (0.14~0.19)

*: Linear regression analysis

(): 95 % confidence limits

Table 3. NOEC

(mg/l)	
NOEC (rate 0-72hr)	NOEC (area 0-72hr)
0.030*	0.0090*

*: Dunnett multiple comparison test (one side, significant: $\alpha=0.05$)

Table 4-1. Cell concentration and average

Nominal conc. (mg/l)	Mean* of measured conc. (mg/l)	Cell concentration ($\times 10^4$ cells/ml)				
		0 Hours	24 Hours	48 Hours	72 Hours	
0.0032	0.003	1	1.0	3.77	19.04	68.16
		2	1.0	3.84	20.51	78.75
		3	1.0	4.02	18.97	66.01
		Average	—	3.88	19.51	70.97
		S. D.	—	0.13	0.87	6.82
0.010	0.009	1	1.0	3.69	19.48	72.51
		2	1.0	3.40	20.18	74.51
		3	1.0	3.87	20.12	70.17
		Average	—	3.65	19.93	72.40
		S. D.	—	0.24	0.39	2.17
0.032	0.030	1	1.0	3.43	17.69	63.61
		2	1.0	3.31	17.45	61.71
		3	1.0	3.70	17.20	59.49
		Average	—	3.48	17.45	61.60
		S. D.	—	0.20	0.25	2.06
0.10	0.095	1	1.0	3.59	14.92	47.28
		2	1.0	3.73	15.02	48.24
		3	1.0	3.30	14.81	48.58
		Average	—	3.54	14.92	48.03
		S. D.	—	0.22	0.11	0.67
0.32	0.324	1	1.0	2.51	7.06	17.33
		2	1.0	2.49	7.20	18.45
		3	1.0	2.66	6.82	15.24
		Average	—	2.55	7.03	17.01
		S. D.	—	0.09	0.19	1.63
1.0	0.997	1	1.0	2.25	4.05	6.15
		2	1.0	2.23	3.83	5.47
		3	1.0	2.21	3.79	5.62
		Average	—	2.23	3.89	5.75
		S. D.	—	0.02	0.14	0.36

*: geometric mean

S. D. : Standard deviation

Table 4-2. Cell concentration and average

Nominal conc. (mg/l)	Mean* of measured conc. (mg/l)	Cell concentration($\times 10^4$ cells/ml)				
		0 Hours	24 Hours	48 Hours	72 Hours	
3.2	3.32	1	1.0	1.89	2.52	2.78
		2	1.0	1.87	2.56	2.72
		3	1.0	1.75	2.47	2.47
		Average	—	1.84	2.52	2.66
		S. D.	—	0.08	0.05	0.16
10	10.1	1	1.0	1.64	1.99	2.14
		2	1.0	1.63	2.06	2.07
		3	1.0	1.64	1.96	2.09
		Average	—	1.64	2.00	2.10
		S. D.	—	0.01	0.05	0.04
Control		1	1.0	4.06	21.26	71.55
		2	1.0	3.99	21.10	69.71
		3	1.0	4.09	21.33	64.07
		4	1.0	3.90	20.40	59.76
		5	1.0	3.99	21.92	74.86
		6	1.0	4.17	22.23	77.31
		Average	—	4.03	21.37	69.54
		S. D.	—	0.09	0.64	6.61

*: geometric mean

S. D. : Standard deviation

Table 5-1. Percentage inhibition

Nominal conc. (mg/l)	Mean ^a of measured conc. (mg/l)	Growth rate		Area under the growth curve		
		Rate μ (0-72 hr)	Inhibition (%) I_{μ} (0-72 hr)	Area A (0-72 hr)	Inhibition (%) I_A (0-72 hr)	
0.0032	0.003	1	0.05863	0.4	13,053,600	5.7
		2	0.06064	-3.0	14,694,000	-6.1
		3	0.05819	1.1	12,838,800	7.3
		Average	0.05915	-0.5	13,528,800	2.3
		S. D.	0.00131	2.2	1,014,800	7.3
0.010	0.009	1	0.05949	-1.1	13,662,000	1.3
		2	0.05987	-1.7	14,000,400	-1.1
		3	0.05904	-0.3	13,578,000	1.9
		Average	0.05947	-1.0	13,746,800	0.7
		S. D.	0.00042	0.7	223,600	1.6
0.032	0.030	1	0.05767	2.0	12,102,000	12.6
		2	0.05725	2.7	11,787,600	14.8
		3	0.05674	3.6	11,554,800	16.5
		Average	0.05722	2.8	11,814,800	14.6**
		S. D.	0.00047	0.8	274,600	2.0
0.10	0.095	1	0.05355	9.0	9,516,000	31.3
		2	0.05383	8.5	9,688,800	30.0
		3	0.05393	8.4	9,576,000	30.8
		Average	0.05377	8.6**	9,593,600	30.7**
		S. D.	0.00020	0.3	87,700	0.7
0.32	0.324	1	0.03961	32.7	3,776,400	72.7
		2	0.04048	31.2	3,939,600	71.5
		3	0.03783	35.7	3,504,000	74.7
		Average	0.03931	33.2**	3,740,000	73.0**
		S. D.	0.00135	2.3	220,100	1.6
1.0	0.997	1	0.02522	57.2	1,650,000	88.1
		2	0.02360	59.9	1,510,800	89.1
		3	0.02397	59.3	1,514,400	89.1
		Average	0.02426	58.8**	1,558,400	88.8**
		S. D.	0.00085	1.4	79,300	0.6

a: geometric mean

S. D. : Standard deviation

**: Significant ($\alpha=0.01$)

Table 5-2. Percentage inhibition

Nominal conc. (mg/l)	Mean ^a of measured conc. (mg/l)	Growth rate		Area under the growth curve		
		Rate μ (0-72 hr)	Inhibition (%) I_{μ} (0-72 hr)	Area A (0-72 hr)	Inhibition (%) I_A (0-72 hr)	
3.2	3.32	1	0.01420	75.9	792,000	94.3
		2	0.01389	76.4	789,600	94.3
		3	0.01255	78.7	709,200	94.9
		Average	0.01355	77.0**	763,600	94.5**
		S. D.	0.00088	1.5	47,100	0.3
10	10.1	1	0.01056	82.1	528,000	96.2
		2	0.01010	82.8	534,000	96.1
		3	0.01023	82.6	514,800	96.3
		Average	0.01030	82.5**	525,600	96.2**
		S. D.	0.00024	0.4	9,800	0.1
Control		1	0.05931	—	14,062,800	—
		2	0.05894	—	13,786,800	—
		3	0.05777	—	13,189,200	—
		4	0.05681	—	12,403,200	—
		5	0.05993	—	14,601,600	—
		6	0.06038	—	15,013,200	—
		Average	0.05886	—	13,842,800	—
		S. D.	0.00135	—	948,300	—

a: geometric mean

S. D.: Standard deviation

**: Significant ($\alpha=0.01$)

Table 6. Temperature and pH values of test solution

Nominal conc. (mg/l)	Mean ^a of measured conc. (mg/l)	Temperature (°C)		pH	
		0 hours	72 hours	0 hours	72 hours
0.0032	0.003	23.6	22.6	8.2	7.9
0.010	0.009	23.6	22.3	8.2	7.9
0.032	0.030	23.5	22.5	8.2	7.9
0.10	0.095	23.5	22.2	8.2	7.9
0.32	0.324	23.5	23.0	8.2	7.9
1.0	0.997	23.3	22.8	8.2	7.9
3.2	3.32	23.7	22.7	7.8	7.9
10	10.1	23.7	22.8	7.3	7.7
Control		24.2	22.9	8.2	7.9

a: geometric mean

Table 7. Light intensity in culturing apparatus

Time (Hour)	Light intensity ($\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$)
0	90
24	95
48	95
72	95

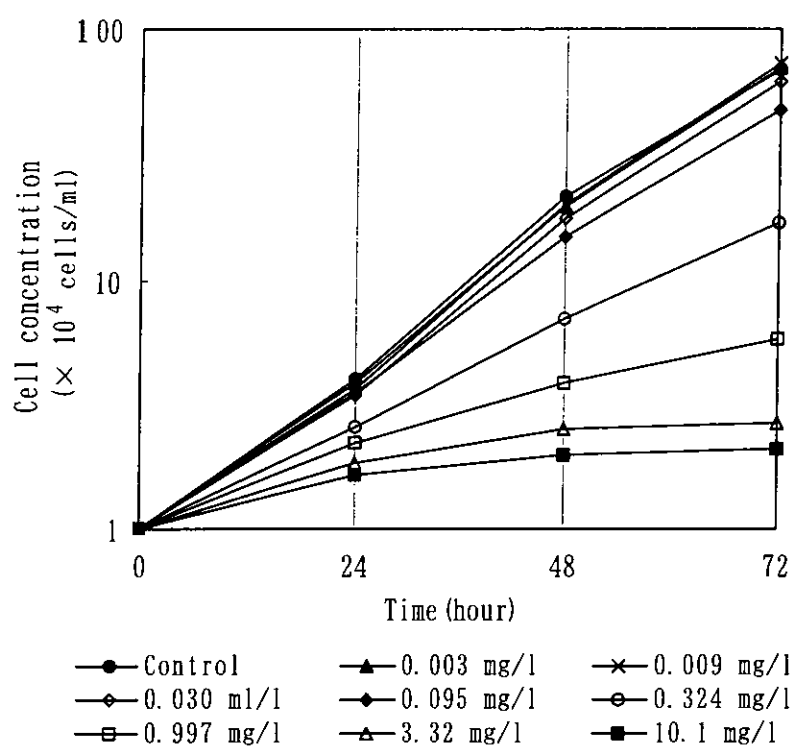


Figure 1. Growth Curve

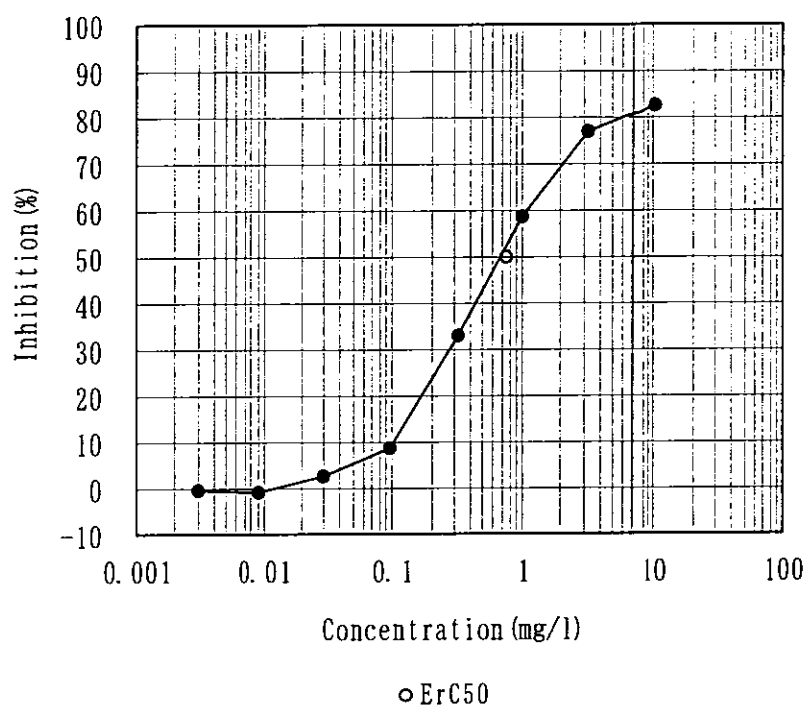


Figure 2. Concentration-inhibition curve (rate)
(Based on I_{μ} Values Calculated from the Growth Rates [0-72hr])

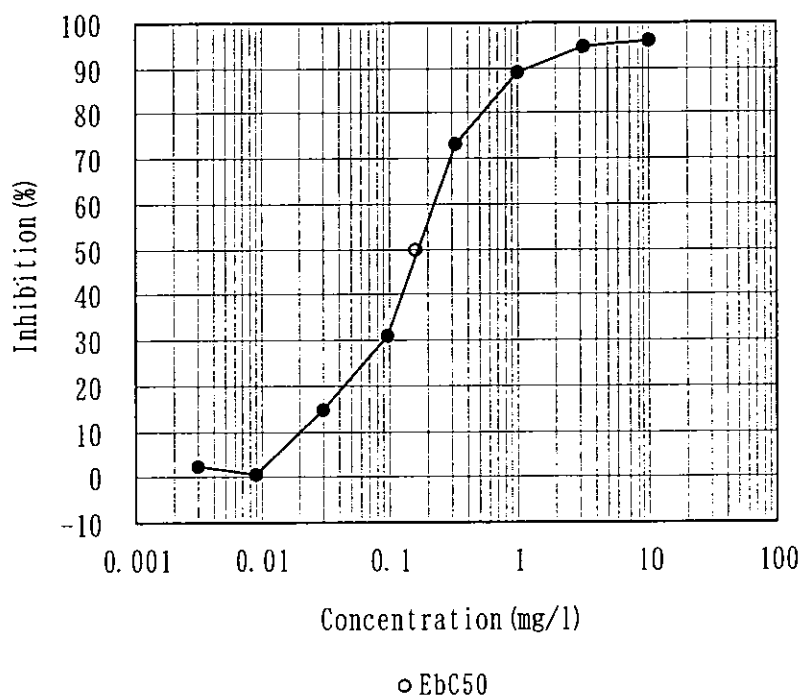


Figure 3. Concentration-inhibition curve (area)
(Based on I_A Values Calculated from the Area under the Growth Curves [0-72hr])

付属資料-1 : OECD 培地

Table 1. OECD medium

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

付属資料-2 : 予備試験結果

予備試験結果をTable 1に示した。

Table 1. Cell Concentration and Percentage Inhibition

					(Range finding test)
Nominal Concentration (mg/l)	Cell Concentration* (×10 ⁴ cells/ml)				Inhibition (%) I _μ (0-72hr)
	0 Hour	24 Hours	48 Hours	72 Hours	
0.0032	1.0	--	—	77.84	-2
0.010	1.0	—	—	71.91	0
0.032	1.0	—	—	74.28	-1
0.32	1.0	—	—	14.64	37
10	1.0	—	—	1.54	90
Control	1.0	—	—	71.98	—

* : Average of the three parallels

— : Determination of cell concentrations was not performed because it was the range finding test.

付属資料-3：統計処理データ

統計ソフトの出力結果を以下に示した。

ErC₅₀ (0-72hr) [Linear regression analysis]

対照区との比較 <生長速度 0-72hr>

[試験結果]

試験濃度	xi	n1	n2	n3	Σ yij
0.09500	-1.02228	9.0	8.5	8.4	25.90
0.32400	-0.48945	32.7	31.2	35.7	99.60
0.99700	-0.00130	57.2	59.9	59.3	176.40
3.32000	0.52114	75.9	76.4	78.7	231.00
平均: X	-0.24797			平均: Y	44.40833
Σ xi	-0.99190			Σ Σ yij	532.90

[分散分析表]

変動因	偏差平方和	自由度	平均平方和	分散比	F(f ₁ , f ₂ , 0.05)	有意差性
回帰	7.976.774	1	7.976.774	3.325.966	5.318	有意である
直線性からのはずれ	47.668	2	23.834	9.938	4.459	有意である
用量間	8,024.443	3	2,674.814	1,115.280	4.066	有意である
誤差	19.187	8	2.398			
合計	8,043.629	11				

[回帰式と係数信頼区間]

回帰式	45.04828 X + 55.57916
相関係数	0.99584

係数信頼区間	下限	算出値	上限
切片a	53.41314	55.57916	57.74518
傾きb	42.04089	45.04828	48.05587

[EC50値とその信頼区間]

95%信頼限界(下限)	EC50	95%信頼限界(上限)
0.69925	0.75789	0.82927

EbC₅₀ (0-72hr) [Linear regression analysis]

対照区との比較 <生長曲線下の面積>

[試験結果]

試験濃度	xi	n1	n2	n3	Σ yij
0.03000	-1.52288	12.6	14.8	16.5	43.90
0.09500	-1.02228	31.3	30.0	30.8	92.10
0.32400	-0.48945	72.7	71.5	74.7	218.90
0.99700	-0.00130	88.1	89.1	89.1	266.30
平均: X	-0.75898			平均: Y	51.76667
Σ xi	-3.03591			Σ Σ yij	621.20

[分散分析表]

変動因	偏差平方和	自由度	平均平方和	分散比	F(f ₁ , f ₂ , 0.05)	有意差性
回帰	10,567.977	1	10,567.977	5,871.099	5.318	有意である
直線性からのはずれ	355.409	2	177.705	98.725	4.459	有意である
用量間	10,923.387	3	3,641.129	2,022.849	4.066	有意である
誤差	14.400	8	1.800			
合計	10,937.787	11				

[回帰式と係数信頼区間]

回帰式	52.06352 X + 91.28177
相関係数	0.98295

係数信頼区間	下限	算出値	上限
切片a	83.49775	91.28177	99.08579
傾きb	44.96144	52.06352	59.16560

[EC50値とその信頼区間]

95%信頼限界(下限)	EC50	95%信頼限界(上限)
0.13647	0.16718	0.19738

NOEC (rate 0-72hr) [Dunnett multiple comparison test]

生長速度(0-72hr):対照区

入力データ								
対照区	0.00300	0.00900	0.03000	0.09500	0.32400	0.99700	3.32000	10.10000
0.05931	0.05863	0.05949	0.05767	0.05355	0.03981	0.02522	0.01420	0.01058
0.05894	0.06064	0.05987	0.05725	0.05383	0.04048	0.02360	0.01389	0.01010
0.05777	0.05819	0.05904	0.05674	0.05393	0.03783	0.02397	0.01255	0.01023
0.05681 *	*	*	*	*	*	*	*	*
0.05993 *	*	*	*	*	*	*	*	*
0.06038 *	*	*	*	*	*	*	*	*

出力データ								
<2005/5/30>								
Group	Samples	Mean	S.E.	S.D.	Variance			
1	6	0.0589	0.0005	0.0013	0.0000			
2	3	0.0592	0.0008	0.0013	0.0000			
3	3	0.0595	0.0002	0.0004	0.0000			
4	3	0.0572	0.0003	0.0005	0.0000			
5	3	0.0538	0.0001	0.0002	0.0000			
6	3	0.0393	0.0008	0.0014	0.0000			
7	3	0.0243	0.0005	0.0008	0.0000			
8	3	0.0135	0.0005	0.0009	0.0000			
9	3	0.0103	0.0001	0.0002	0.0000			
Method	vs	Side	Stat.	0.0500	0.0100	0.0010 Prob.		
Dunnett	1 vs 2	1	0.4292	2.5504	3.3176	999.9900	0.8331	
Dunnett	1 vs 3	1	0.8826	2.5504	3.3176	999.9900	0.6414	
Dunnett	1 vs 4	1	2.3879	2.5504	3.3176	999.9900	0.0829	
Dunnett	1 vs 5	1	7.3594	2.5504	3.3176	999.9900	0.0000	**
Dunnett	1 vs 6	1	28.2850	2.5504	3.3176	999.9900	0.0000	**
Dunnett	1 vs 7	1	50.0498	2.5504	3.3176	999.9900	0.0000	**
Dunnett	1 vs 8	1	65.5548	2.5504	3.3176	999.9900	0.0000	**
Dunnett	1 vs 9	1	70.2569	2.5504	3.3176	999.9900	0.0000	**

NOEC (area 0-72hr) [Dunnett multiple comparison test]

生長曲線下の面積(0-72hr):対照区

入力データ								
対照区	0.00300	0.00900	0.03000	0.09500	0.32400	0.99700	3.32000	10.10000
1.40628	1.30536	1.36620	1.21020	0.95160	0.37784	0.16500	0.07920	0.05280
1.37888	1.46940	1.40004	1.17876	0.96888	0.39396	0.15108	0.07896	0.05340
1.31892	1.28388	1.35780	1.15548	0.95760	0.35040	0.15144	0.07092	0.05148
1.24032 *	*	*	*	*	*	*	*	*
1.46016 *	*	*	*	*	*	*	*	*
1.50132 *	*	*	*	*	*	*	*	*

出力データ								
<2005/5/30>								
Group	Samples	Mean	S.E.	S.D.	Variance			
1	6	1.3843	0.0387	0.0948	0.0090			
2	3	1.3529	0.0586	0.1015	0.0103			
3	3	1.3747	0.0129	0.0224	0.0005			
4	3	1.1815	0.0159	0.0275	0.0008			
5	3	0.9594	0.0051	0.0088	0.0001			
6	3	0.3740	0.0127	0.0220	0.0005			
7	3	0.1558	0.0046	0.0079	0.0001			
8	3	0.0784	0.0027	0.0047	0.0000			
9	3	0.0526	0.0006	0.0010	0.0000			
Method	vs	Side	Stat.	0.0500	0.0100	0.0010 Prob.		
Dunnett	1 vs 2	1	0.7726	2.5504	3.3176	999.9900	0.6938	
Dunnett	1 vs 3	1	0.2362	2.5504	3.3176	999.9900	0.8903	
Dunnett	1 vs 4	1	4.9902	2.5504	3.3176	999.9900	0.0002	**
Dunnett	1 vs 5	1	10.4558	2.5504	3.3176	999.9900	0.0000	**
Dunnett	1 vs 6	1	24.8594	2.5504	3.3176	999.9900	0.0000	**
Dunnett	1 vs 7	1	30.2275	2.5504	3.3176	999.9900	0.0000	**
Dunnett	1 vs 8	1	32.1832	2.5504	3.3176	999.9900	0.0000	**
Dunnett	1 vs 9	1	32.7688	2.5504	3.3176	999.9900	0.0000	**

付属資料-4：試験溶液中の被験物質濃度の分析方法

1. 標準品

被験物質を使用した。

2. 試薬、試液及び標準溶液の調製

2.1. 試薬

メタノール：高速液体クロマトグラフ用

リン酸：特級（純度85 %以上）

塩化アンモニウム：特級

水：活性炭フィルター、逆浸透膜及びイオン交換樹脂で精製したもの

陰イオン交換ミニカラム (Varian製, Bond Elut LRC-SAX, 充填量500 mg)

2.2. 試液

水-メタノール-リン酸 (900:100:1 V/V/V)：水900 ml, メタノール100 ml及びリン酸1 mlを混合した。

1 mol/l塩化アンモニウム溶液：塩化アンモニウム26.7 gを水500 mlに溶解した。

0.5 mol/l塩化アンモニウム溶液：塩化アンモニウム26.7 gを水1000 mlに溶解した。

2.3. 標準溶液の調製

標準品約25 mgを精密に量り取り水に溶解して50 mlとし、これを標準原液とした。この標準原液を水で希釈して40 mg/l溶液を調製し、この一定量を取り0.5 mol/l塩化アンモニウム溶液で適宜希釈して0.005, 0.01, 0.1, 0.25及び0.5 mg/lの標準溶液を調製した。

3. 試験培地の前処理

暴露終了時の試験培地は、約60 mlを100 mlの遠心管に取り2,200 r/minで10分間遠心分離を行った上澄み液を分析に供した。

4. 試料溶液の調製

4.1. 試験培地分析法 (被験物質の0.32, 1.0, 3.2, 及び10 mg/lの試験培地)

試験培地をメスフラスコに正確に取り、同量の1 mol/l塩化アンモニウム溶液を混合した後、0.5 mol/l塩化アンモニウム溶液で定容した。各試験培地の数量関係は4.3に記載した。

4.2. 試験培地分析法 (対照区並びに被験物質の0.0032, 0.010, 0.032 及び0.10 mg/lの試験培地)

陰イオン交換ミニカラムをミニカラム吸引装置に固定し、メタノール、水各5 mlを順次流下させ洗浄した。

試験培地を正確に取り、陰イオン交換ミニカラムに移し流下させた。ついで0.5 mol/l塩化アンモニウム溶液10 mlを流下させアクリル酸を溶出させ、10 mlのメスフラスコに受けて定容とした。各試験培地の数量関係は4.3に記載した。

4.3. 数量関係の一覧表

試験培地	試験培地 採取量 (ml)	定容量 (ml)	分取量 (ml)	最終液量 (ml)
対照区並びに 0.0032, 0.010及び0.032 mg/lの試験培地	50	10	—	—
0.10 mg/lの試験培地	50	10	5	10
0.32及び1.0 mg/lの試験培地	10	25	—	—
3.2 mg/lの試験培地	10	100	—	—
10 mg/lの試験培地	10	50	2	10

5. 分析機器操作条件

高速液体クロマトグラフ操作条件

ポンプ：LC-10AD [株式会社 島津製作所]

検出器：紫外可視分光光度計 SPD-10AV [株式会社 島津製作所]

カラム：L-column ODS, ϕ 4.6 mm \times 25 cm [財団法人 化学物質評価研究機構]カラム温度：40 $^{\circ}$ C

移動相：水-メタノール-リン酸 (900:100:1 V/V/V)

流量：0.8 ml/min

測定波長：210 nm

データ処理装置：C-R7A [株式会社 島津製作所]

6. 定量

2.3で調製した標準溶液及び4.で調製した試料溶液40 μ lを5.の高速液体クロマトグラフに注入した。標準品の重量とピーク高から検量線を作成し、試験培地中のアクリル酸濃度を算出した。

7. 定量限界

試験培地採取量	定容量	注入量	定量限界相当量	定量限界
50 ml	10 ml	40 μ l	0.4 ng	0.002 mg/l

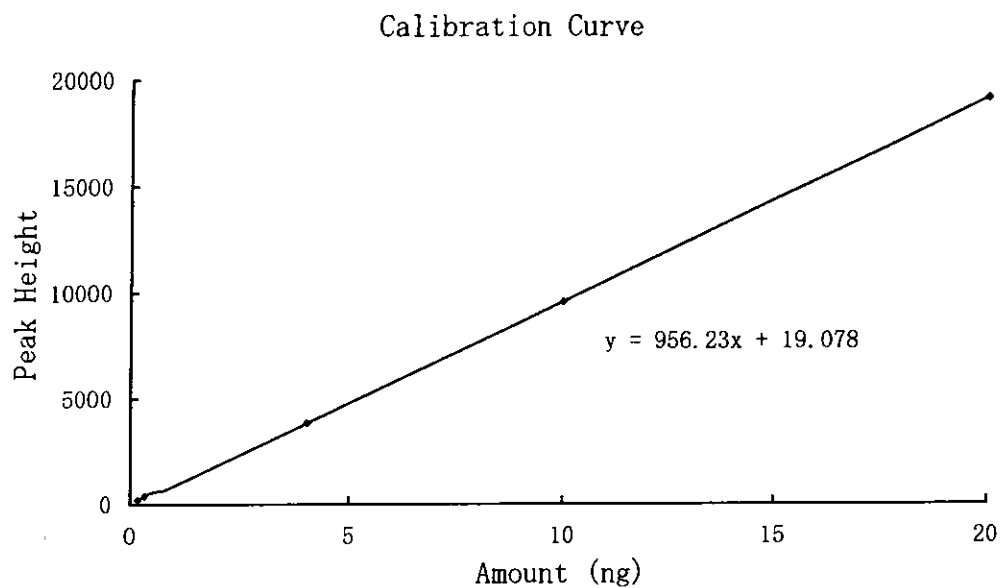
8. 添加回収試験

8.1. 低濃度添加

培地に被験物質を0.002 mg/lの濃度になるように添加し、この溶液を用いて添加回収試験を行った。試験は併行測定3回で実施し、回収率は97.5 %, 96.1 %, 98.3 % (平均 97.3 %)であった。

8.2. 高濃度添加

培地に被験物質を12.5 mg/lの濃度になるように添加し、この溶液を用いて添加回収試験を行った。試験は併行測定3回で実施し、回収率は98.1 %, 98.1 %, 98.0 % (平均 98.1 %)であった。

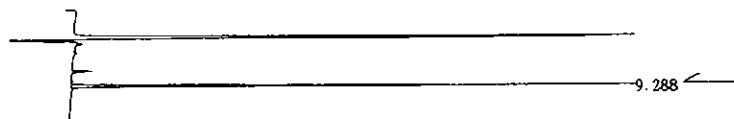


Amount (ng)	Peak height (μ V)
20	19145
10	9573
4	3859
0. 4	400
0. 2	204

Figure 1. Calibration curve of Acrylic acid by HPLC analysis

Standard (0.5 mg/l): 0 hour

CHROMATOPAC C-R7A CH=1 REPORT No.=4 7071=2:050523.C02 05/05/23 18:46:40



** 定量計算結果 **

CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	1	9.288	190893	19145			100	
TOTAL			190893	19145			100	

Control: 0 hour

CHROMATOPAC C-R7A CH=1 REPORT No.=9 7071=2:050523.C07 05/05/23 20:14:20



** 定量計算結果 **

CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	1	11.07	8316	697			100	
TOTAL			8316	697			100	

Test solution (0.0032 mg/l): 0 hour

CHROMATOPAC C-R7A CH=1 REPORT No.=10 7071=2:050523.C08 05/05/23 20:31:52



** 定量計算結果 **

CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	1	9.284	6421	652			39.6384	
	2	11.067	9778	811			60.3616	
TOTAL			16198	1463			100	

Test solution (10 mg/l): 0 hour

CHROMATOPAC C-R7A CH=1 REPORT No.=17 7071=2:050523.C15 05/05/23 22:34:38



** 定量計算結果 **

CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	1	9.28	153151	15470			100	
TOTAL			153151	15470			100	

Figure 2-1. Representative chromatograms

Standard (0.5 mg/l): 72 hours

CHROMATOPAC C-R7A CH=1 REPORT No.=82 7071=2:050526.C02 05/05/26 20:10:16

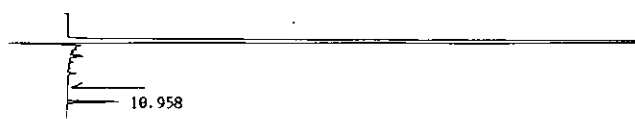


** 定量計算結果 **

CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	1	9.231	190373	19246			100	
TOTAL			190373	19246			100	

Control: 72 hours

CHROMATOPAC C-R7A CH=1 REPORT No.=87 7071=2:050526.C07 05/05/26 21:37:56



** 定量計算結果 **

CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	1	10.958	17819	1440			100	
TOTAL			17819	1440			100	

Test solution (0.0032 mg/l): 72 hours

CHROMATOPAC C-R7A CH=1 REPORT No.=88 7071=2:050526.C08 05/05/26 21:55:28

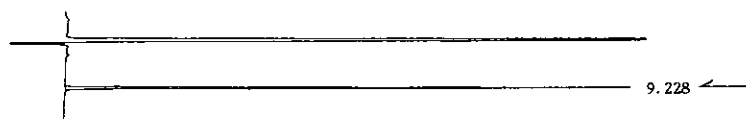


** 定量計算結果 **

CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	1	9.228	5165	538			26.1793	
	2	10.958	14564	1197			73.8207	
TOTAL			19728	1735			100	

Test solution (10 mg/l): 72 hours

CHROMATOPAC C-R7A CH=1 REPORT No.=95 7071=2:050526.C15 05/05/26 23:58:14



** 定量計算結果 **

CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	1	9.228	154302	15613			100	
TOTAL			154302	15613			100	

Figure 2-2. Representative chromatograms

付属資料-5：収量法による試験結果

直接定量法 (粒子計数装置) により測定した細胞濃度から藻体重量を求め、収量法によって 50 % 生長阻害濃度 (EC_{50}) 及び最大無作用濃度 (NOEC) を算出した。算出方法及び試験結果を以下に示した。

1. 算出方法

1.1. 藻体重量の算出

藻類懸濁液を重量既知のガラス繊維ろ紙 (GS25 [東洋濾紙株式会社]) でろ過し、120℃で2時間乾燥後、重量を測定して溶液中の藻体の乾燥重量を求め、これを藻体重量 (mg/l) とした。細胞濃度の異なる溶液について同様の操作を行い、直線回帰により細胞濃度 ($\times 10^4$ cells/ml) と藻体重量 (mg/l) の関係を求めた。得られた回帰直線を用いて、細胞濃度から藻体重量を算出した。

1.2. 生長曲線

1.1で求めた各試験区の藻体重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。

1.3. 生長阻害率

対照区との生長速度の比較により生長阻害率 (I_{μ}) を算出した。

藻体重量の平均の生長速度を次式により算出した。

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

μ_{i-j} : t_i 時から t_j 時までの期間の生長速度

N_i : t_i 時の藻体重量 (mg/l)

N_j : t_j 時の藻体重量 (mg/l)

t_i : 暴露開始後*i*回目に藻体重量を測定した時間 (hr)

t_j : 暴露開始後*j*回目に藻体重量を測定した時間 (hr)

各濃度区における生長阻害率 (I_{μ}) は、次式により算出した。

$$I_{\mu} (\%) = \frac{\mu_c - \mu_r}{\mu_c} \times 100$$

μ_c : 対照区の平均生長速度

μ_r : 各濃度区における平均生長速度

1.4. 50 %生長阻害濃度 (EC_{50})

1.3で算出した生長阻害率 (%) を用いて直線回帰分析法により、 EC_{50} を算出した。また、95 %信頼限界も算出し、算出に用いた回帰直線の傾きを求めた。なお、収量法で算出した EC_{50} を $E_y C_{50}$ (0-72hr) とした。また、濃度－生長阻害率のグラフを作成した。

1. 5. 最大無作用濃度 (NOEC)

Dunnettの多重比較検定(片側, 有意水準: $\alpha=0.05$)により, 対照区と比較して有意差が認められない最高試験濃度を求めた。なお, 収量法で算出したNOECをNOEC(収量法0-72hr)とした。

1. 6. 統計的手法

結果の算出には, 統計ソフト「StatLight 2000(ユックムス株式会社)」を使用した。

2. 試験結果

2. 1. 50 %生長阻害濃度 (EC_{50})

$E_{yC_{50}}$ (0-72hr) は0.73 mg/l (95 %信頼限界; 0.67~0.79 mg/l [回帰直線の傾き; 45.5]) であった。

50 %生長阻害濃度 (EC_{50}) をTable 1に示した。

2. 2. 最大無作用濃度 (NOEC)

NOEC(収量法0-72hr) は0.03 mg/lであった。

最大無作用濃度 (NOEC) をTable 2に示した。

2. 3. 藻体重量の算出式

藻体重量の算出式を以下に示した。また, 細胞濃度と藻体重量の関係をFigure 1に示した。

$$\text{藻体重量 (mg/l)} = \text{細胞濃度 } (\times 10^4 \text{ cells/ml}) \times 0.1752 + 0.0117$$

2. 4. 藻体重量及び平均値

暴露期間中の各試験区の藻体重量及び平均値をTable 3-1~2に示した。

2. 5. 生長曲線

各試験区の生長曲線をFigure 2に示した。

2. 6. 濃度と生長阻害率

濃度-生長阻害率をTable 4-1~2及びFigure 3に示した。

Table 1. EC_{50} values

EC_{50} (0-72hr)
0.73*
(0.67~0.79)

* : Linear regression analysis

() : 95 % confidence limits

Table 2. NOEC

NOEC (yield 0-72hr)
0.03*

* : Dunnett multiple comparison test (one side, significant: $\alpha=0.05$)

Table 3-1. Biomass and average

Nominal conc. (mg/l)	Mean ^a of measured conc. (mg/l)		Biomass (mg/l)			
			0 Hours	24 Hours	48 Hours	72 Hours
0.0032	0.003	1	0.19	0.67	3.35	11.95
		2	0.19	0.68	3.61	13.81
		3	0.19	0.72	3.34	11.58
		Average	—	0.69	3.43	12.45
		S. D.	—	0.02	0.15	1.19
0.010	0.009	1	0.19	0.66	3.42	12.72
		2	0.19	0.61	3.55	13.07
		3	0.19	0.69	3.54	12.31
		Average	—	0.65	3.50	12.70
		S. D.	—	0.04	0.07	0.38
0.032	0.030	1	0.19	0.61	3.11	11.16
		2	0.19	0.59	3.07	10.82
		3	0.19	0.66	3.03	10.43
		Average	—	0.62	3.07	10.80
		S. D.	—	0.03	0.04	0.36
0.10	0.095	1	0.19	0.64	2.63	8.30
		2	0.19	0.67	2.64	8.46
		3	0.19	0.59	2.61	8.52
		Average	—	0.63	2.63	8.43
		S. D.	—	0.04	0.02	0.12
0.32	0.324	1	0.19	0.45	1.25	3.05
		2	0.19	0.45	1.27	3.24
		3	0.19	0.48	1.21	2.68
		Average	—	0.46	1.24	2.99
		S. D.	—	0.02	0.03	0.29
1.0	0.997	1	0.19	0.41	0.72	1.09
		2	0.19	0.40	0.68	0.97
		3	0.19	0.40	0.68	1.00
		Average	—	0.40	0.69	1.02
		S. D.	—	0.00	0.02	0.06

a: geometric mean

S. D. : Standard deviation

Table 3-2. Biomass and average

Nominal conc. (mg/l)	Mean ^a of measured conc. (mg/l)	Biomass (mg/l)				
		0 Hours	24 Hours	48 Hours	72 Hours	
3.2	3.32	1	0.19	0.34	0.45	0.50
		2	0.19	0.34	0.46	0.49
		3	0.19	0.32	0.44	0.44
		Average	—	0.33	0.45	0.48
		S. D.	—	0.01	0.01	0.03
10	10.1	1	0.19	0.30	0.36	0.39
		2	0.19	0.30	0.37	0.37
		3	0.19	0.30	0.36	0.38
		Average	—	0.30	0.36	0.38
		S. D.	—	0.00	0.01	0.01
Control	—	1	0.19	0.72	3.74	12.55
		2	0.19	0.71	3.71	12.22
		3	0.19	0.73	3.75	11.24
		4	0.19	0.69	3.59	10.48
		5	0.19	0.71	3.85	13.13
		6	0.19	0.74	3.91	13.56
		Average	—	0.72	3.76	12.20
		S. D.	—	0.02	0.11	1.16

a: geometric mean

S. D. : Standard deviation

Table 4-1. Percentage inhibition obtained by biomass

Nominal conc. (mg/l)	Mean ^a of measured conc. (mg/l)	Yield	
		Rate μ (0-72 hr)	Inhibition (%) I_{μ} (0-72 hr)
0.0032	0.003	1	0.05752
		2	0.05952
		3	0.05707
		Average	0.05804
		S. D.	0.00130
0.010	0.009	1	0.05838
		2	0.05876
		3	0.05792
		Average	0.05835
		S. D.	0.00042
0.032	0.030	1	0.05656
		2	0.05614
		3	0.05563
		Average	0.05611
		S. D.	0.00047
0.10	0.095	1	0.05245
		2	0.05272
		3	0.05282
		Average	0.05266
		S. D.	0.00019
0.32	0.324	1	0.03854
		2	0.03941
		3	0.03676
		Average	0.03824
		S. D.	0.00135

a: geometric mean

S. D. : Standard deviation

**: Significant ($\alpha=0.01$)

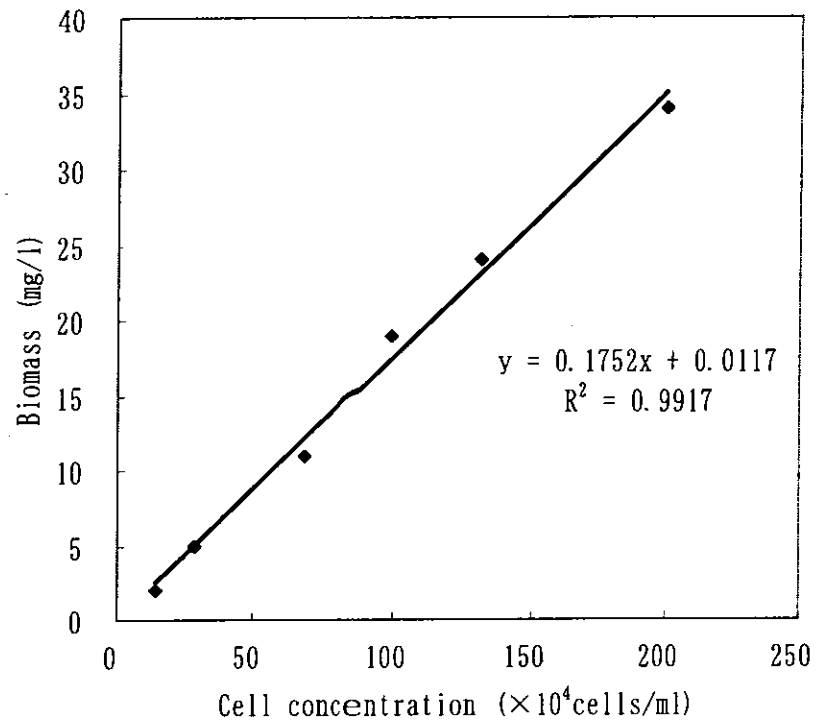
Table 4-2. Percentage inhibition obtained by biomass

Nominal conc. (mg/l)	Mean ^a of measured conc. (mg/l)	Yield		
		Rate μ (0-72 hr)	Inhibition (%) I_{μ} (0-72 hr)	
1.0	0.997	1	0.02425	58.0
		2	0.02264	60.8
		3	0.02301	60.1
		Average	0.02330	59.6**
		S. D.	0.00084	1.5
3.2	3.32	1	0.01340	76.8
		2	0.01310	77.3
		3	0.01180	79.6
		Average	0.01277	77.9**
		S. D.	0.00085	1.5
10	10.1	1	0.00986	82.9
		2	0.00941	83.7
		3	0.00954	83.5
		Average	0.00960	83.4**
		S. D.	0.00023	0.4
Control	—	1	0.05819	—
		2	0.05783	—
		3	0.05666	—
		4	0.05569	—
		5	0.05882	—
		6	0.05927	—
		Average	0.05774	—
	S. D.	0.00135	—	

a: geometric mean

S. D. : Standard deviation

**: Significant ($\alpha=0.01$)



Cell conc. ($\times 10^4$ cells/ml)	Biomass (mg/l)
14.25	2
28.32	5
68.88	11
98.94	19
131.60	24
199.90	34

Figure 1. Cell concentration-biomass curve

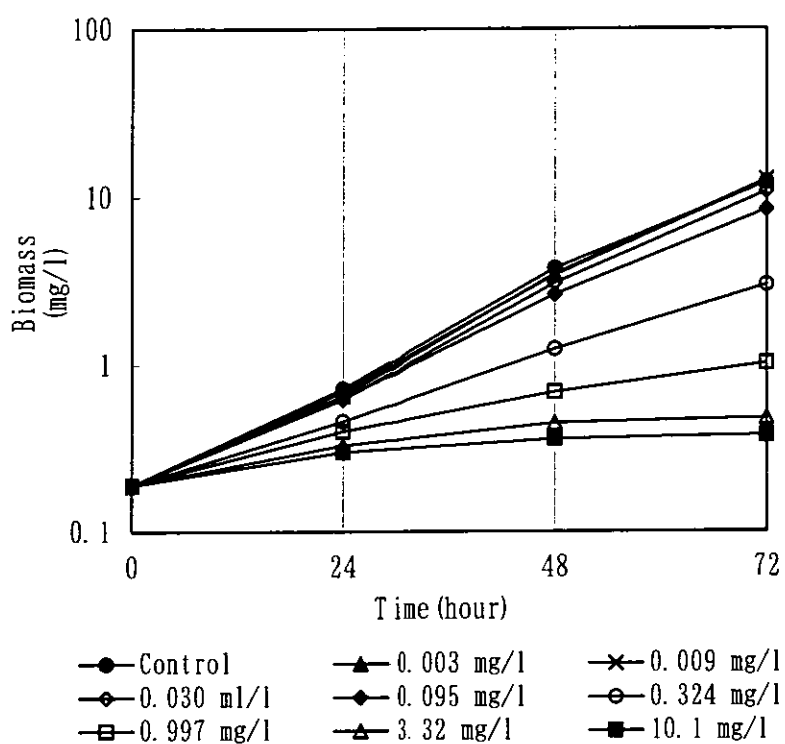


Figure 2. Growth curve

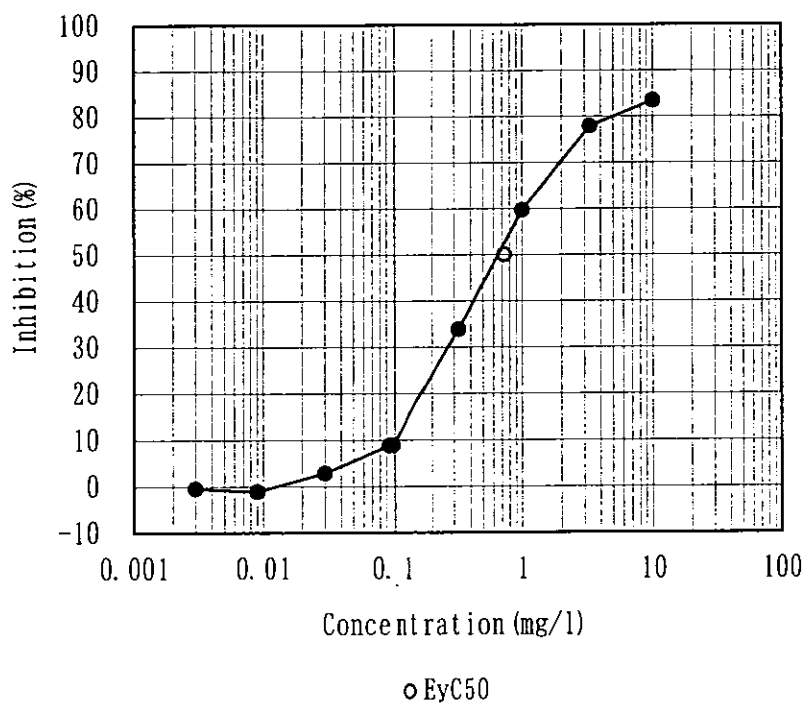


Figure 3. Biomass-inhibition curve
(Based on I_{μ} Values Calculated from the Growth Rates (0-72hr))

陳述書

1 試験委託者

環境省

2 試験番号

第16031号

3 試験の表題

アクリル酸の *Pseudokirchneriella subcapitata* に対する生長阻害試験

上記試験は、「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, 環境企発第031121002号)」に基づき実施したものです。

なお, 試験実施にあたっては, 「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」(平成15年11月21日薬食発第1121003号, 平成15・11・17製局第3号, 環境企発第031121004号) を遵守しました。

2005 年 6 月 10 日

財団法人 日本食品分析センター 多摩研究所

試験責任者



信頼性保証書

1 試験委託者

環境省

2 試験番号

第16031号

3 試験の表題

アクリル酸の*Pseudokirchneriella subcapitata*に対する生長阻害試験

4 検閲

本試験の検閲は、財団法人 日本食品分析センター 多摩研究所 信頼性保証部門の標準操作手順書に従い、以下のとおり実施した。

検 閲 内 容	検閲実施日	試験責任者への 報告年月日	運営管理者への 報告年月日
試験計画書	2005年03月01日	2005年03月01日	2005年03月01日
試験計画書	2005年03月14日	2005年03月14日	2005年03月14日
試験計画書	2005年05月18日	2005年05月18日	2005年05月18日
試験計画書	2005年05月23日	2005年05月23日	2005年05月23日
被験物質の受領	2005年05月23日	2005年05月24日	2005年05月24日
試験の実施	2005年05月23日	2005年05月24日	2005年05月24日
分析の実施, 検体, 試薬等, 機器	2005年05月23日	2005年05月24日	2005年05月24日
試験の実施, 試薬等 機器	2005年05月25日	2005年05月25日	2005年05月25日
試験の実施, 被験物質	2005年05月26日	2005年05月26日	2005年05月26日
試験中の保管文書	2005年06月06日	2005年06月06日	2005年06月06日
最終報告書草案及び生データ	2005年06月07日	2005年06月07日	2005年06月07日
最終報告書	2005年06月10日	2005年06月10日	2005年06月10日

上記検閲の結果、本試験最終報告書は試験に用いた方法が正確に記載され、報告結果は試験の生データを正確に反映していることを確認した。

2005 年 6 月 10 日

財団法人 日本食品分析センター 多摩研究所
信頼性保証部門担当者



証明書

最終報告書表題： アクリル酸の*Pseudokirchneriella subcapitata*に対する生長阻害試験

試験番号： 第 16031 号

本報告書は、上記最終報告書の正確な写しであることを証明致します。

2005 年 6 月 10 日

財団法人 日本食品分析センター 多摩研究所

試験責任者

