

環境庁殿

## 試 験 報 告 書

N-ニトロソジフェニルアミンの藻類  
(*Selenastrum capricornutum*) に対する生長阻害試験

(試験番号：6 B 6 8 2 G)

1997年3月31日作成

株式会社三菱化学安全科学研究所

# 陳 述 書

株式会社三菱化学安全科学研究所  
横浜研究所

試験委託者： 環境庁

表題： N-ニトロソジフェニルアミンの藻類 (*Selenastrum capricornutum*) に対する  
生長阻害試験

試験番号： 6 B 6 8 2 G

本試験は環境庁のG L P規則に従って実施したものである。

1 9 9 7 年 3 月 3 1 日

運営管理者



## 信頼性保証証明

株式会社三菱化学安全科学研究所  
横浜研究所

試験委託者： 環境庁

表題： N-ニトロソジフェニルアミンの藻類 (*Selenastrum capricornutum*) に対する生長阻害試験

試験番号： 6 B 6 8 2 G

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下記の通り確認した。

### 記

	実施日	運営管理者および 試験責任者への報告日
試験実施状況査察	1997年 2月17日	1997年 2月17日
	1997年 2月20日	1997年 2月20日
試験報告書監査	1997年 3月31日	1997年 3月31日

1997年 3月31日

信頼性保証担当者：

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]  
[Redacted]  
[Redacted]

## 試験実施概要

1. 表題： N-ニトロソジフェニルアミンの藻類 (*Selenastrum capricornutum*) に対する生長阻害試験
2. 試験目的： N-ニトロソジフェニルアミンについて、藻類 (*Selenastrum capricornutum*) に対する生長阻害試験を72時間行い、50%生長阻害濃度 (EC50) および無影響濃度 (NOEC) を求める。
3. 適用ガイドライン：本試験は、OECD 化学品テストガイドライン No.201「藻類生長阻害試験」(1984年) に準拠して実施した。
4. 適用GLP：本試験は環境庁のGLP規則に準拠した。
5. 試験委託者  
名称： 環境庁  
住所： 〒100 東京都千代田区霞ヶ関一丁目2-2  
委託担当者： 環境庁企画調整局環境保健部環境安全課保健専門官 XXXXXXXXXX
6. 試験受託者：  
名称： 株式会社三菱化学安全科学研究所  
所在地： 〒105 東京都港区芝二丁目1-30
7. 試験施設：  
名称： 株式会社三菱化学安全科学研究所 横浜研究所  
所在地： 〒227 神奈川県横浜市青葉区鴨志田町1000番地

8. 試験関係者：

試験責任者

[REDACTED]

(1997年3月31日)

試験担当者

[REDACTED]

(1997年3月31日)

分析担当者

[REDACTED]

(1997年3月31日)

9. 試験期間： 試験開始日 1997年 1月16日  
試験終了日 1997年 3月31日  
暴露期間 1997年 2月17日～1997年 2月20日

10. 保管：

試験に関する下記の記録及び試資料は，試験報告書作成後10年間，当研究所試資料保管施設に保管する。その後の保管については別途協議の上，定める。

- 1) 試験計画書，同変更の記録
- 2) 試験報告書
- 3) 生データ
- 4) 信頼性保証業務担当者の監査・査察記録
- 5) 被験物質
- 6) その他必要なもの

# 目 次

	頁
要 旨 .....	7
1 被験物質 .....	9
1.1 名称, 構造式および物理化学的性状 .....	9
1.2 供試試料 .....	9
1.3 被験物質の確認および保管条件下での安定性 .....	10
2 供試生物 .....	10
3 試験方法 .....	10
3.1 試験条件 .....	10
3.2 培地 .....	10
3.3 試験容器, 藻類培養試験装置および機器等 .....	11
3.4 試験濃度の設定 .....	11
3.5 試験液の調製 .....	12
3.6 試験液の分析 .....	12
3.7 試験操作 .....	12
4 結果の算出 .....	13
4.1 藻類生長曲線 .....	13
4.2 藻類生長阻害率の算出 .....	13
4.3 50%生長阻害濃度 (EC50) の算出 .....	14
4.4 無影響濃度 (NOEC) .....	14
5 結果および考察 .....	15
5.1 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
5.2 試験液中の被験物質濃度 .....	15
5.3 藻類生長曲線 .....	15
5.4 50%生長阻害濃度 (EC50) および無影響濃度 (NOEC) .....	15
5.5 温度およびpH .....	16
6 試験計画書からの逸脱事項 .....	16
Table 1~7 .....	17~24
Figure 1~3 .....	25~27
付属資料-1 試験液の分析方法 .....	28~36

## 要 旨

### 試験委託者

環境庁

### 表 題

N-ニトロソジフェニルアミンの藻類 (*Selenastrum capricornutum*) に対する生長阻害試験

### 試験番号

6 B 6 8 2 G

### 試験方法

本試験は、OECD 化学品テストガイドライン No.201「藻類生長阻害試験」(1984年)に準拠して実施した。

- 1)被験物質: N-ニトロソジフェニルアミン
- 2)暴露方式: 止水式, 振とう培養 (100rpm)
- 3)供試生物: *Selenastrum capricornutum* (ATCC22662)
- 4)暴露期間: 72時間
- 5)試験濃度 (設定値): 対照区, 助剤対照区, 0.520, 0.800, 1.20, 1.80, 2.60, 4.00 mg/L (公比: 1.5, 助剤濃度一定: 32mg/L, ジメチルホルムジートおよび HCO-30使用)
- 6)試験液量: 100 mL (OECD培地)
- 7)連数: 3 容器/濃度区
- 8)初期細胞濃度:  $1 \times 10^4$  cells/mL
- 9)試験温度:  $23 \pm 2$  °C
- 10)照明: 4000~5000 lux (連続照明)
- 11)被験物質の分析: HPLC法

## 結 果

### 1) 試験液中の被験物質濃度

各試験液の濃度は開始時において設定の±20%以内であったため、下記の生長阻害濃度の算出には設定値を採用した。

また、暴露72時間後の設定値に対する割合は3~53%であった。低濃度区ほど減少率が大きく、被験物質の溶出時間約3.8分前後に分解物と思われる2本のピークが認められた。被験物質は光分解しやすいことから、本試験における被験物質濃度の減少原因は、主に光分解によるものと思われる。

### 2) 生長曲線下面積の比較による阻害濃度

50%生長阻害濃度 EbC50(0-72) : 2.37 mg/L (95%信頼区間 : 1.81~3.09 mg/L)  
無影響濃度 NOECb(0-72) : <0.520 mg/L (但し、NOECbはこの濃度近辺にあるものと考えられる。)

### 3) 生長速度の比較による阻害濃度

50%生長阻害濃度 ErC50(24-48) : >4.00 mg/L  
無影響濃度 NOECr(24-48) : 2.60 mg/L  
50%生長阻害濃度 ErC50(24-72) : >4.00 mg/L  
無影響濃度 NOECr(24-72) : 1.80 mg/L

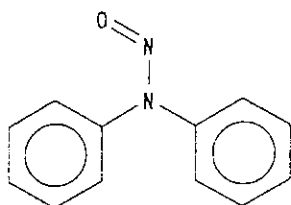


## 1 被験物質

### 1.1 名称、構造式および物理化学的性状

名 称： N-ニトロソジフェニルアミン  
(略称 NDPA, 識別符号 6B682G)

構造式：



分子式：  $C_{11}H_{10}N_2O$

分子量<sup>\*1</sup>： 198.22

融点<sup>\*2</sup>： 66.5°C

水溶解度<sup>\*2</sup>： 不溶

1-オクタノール／水分配係数 (logP)： 2.38<sup>\*1</sup>, 3.13<sup>\*3</sup>

光分解性<sup>\*2</sup>： 低濃度で光分解性有り

\*1:供給者提供資料

\*2:化学物質分析法開発調査報告書総覧（上巻），環境庁環境保健部保健調査室編（平成3年）

\*3:

### 1.2 供試試料

純度<sup>\*1</sup>： >98%（当社測定値）

ロット番号<sup>\*1</sup>： CAG0075

供給者：

供給量<sup>\*1</sup>： 100g (25gx4)

入手日： 1996年12月25日

外観<sup>\*1</sup>： 暗黄褐色結晶～結晶性粉末

\*1:供給者提供資料

### 1.3 被験物質の確認および保管条件下での安定性

被験物質は当研究所の冷蔵庫に保管した。

入手した被験物質の赤外吸収スペクトルを測定し、被験物質の構造と矛盾が認められないことを確認した。試験終了時にも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より被験物質は保管中安定であったと判断された。

## 2 供試生物

試験には、単細胞緑藻類である *Selenastrum capricornutum* を用いた。

本種は、1996年6月20日に American Type Culture Collectionより入手した ATCC22662株を当研究所において無菌的に継代培養しているものである。基準物質（重クロム酸カリウム，試薬特級）による72時間の生長阻害濃度（EbC50）は、0.41 mg/L（直線回帰分析）であった。

### 前培養

試験に供する藻類は試験条件と同じ条件で暴露開始前に3日間前培養した。

## 3 試験方法

### 3.1 試験条件

- |           |                                       |
|-----------|---------------------------------------|
| 1)暴露方式：   | 止水式，振とう培養（100rpm）                     |
| 2)暴露期間：   | 72時間                                  |
| 3)試験液量：   | 100 mL（OECD培地）                        |
| 4)連数：     | 3 容器／濃度区                              |
| 5)初期細胞濃度： | $1 \times 10^4$ cells/mL              |
| 6)試験温度：   | $23 \pm 2$ °C                         |
| 7)照明：     | 4000～5000 lux（±20%の変動内，フラスコ液面付近）で連続照明 |

### 3.2 培地

前培養および試験ともにOECD化学品テストガイドラインに示されている培地を用いた。

[Table 1 (p.17)]

### 3.3 試験容器，藻類培養試験装置および機器等

- 1)試験容器： 300 mL容ガラス製三角フラスコ（通気性のシリコン栓付）
- 2)藻類培養試験装置： 伊藤製作所製 AGP-150RL型
- 3)光学顕微鏡： オリンパス光学製 FHT型
- 4)粒子計数装置： 東亜医用電子製 CDA-500型
- 5)粒子計数装置用電解液： 東亜医用電子製 セルパック
- 6)pHメーター： オリオン製 卓上pH計／イオン計 900A型
- 7)温度計： Tasco Japan Co. Ltd. TNA-120型
- 8)照度計： トプコン製 IM-2D型

### 3.4 試験濃度の設定

本試験の実施に先立ち，予備試験を対照区，助剤対照区および5段階の濃度区（0.20，0.50，1.3，3.2，8.0 mg/L，各1連）で実施した。その結果を以下の表に示した。

予備試験結果

濃度 (mg/L)	対照区に対する 72時間後の生長率 (%)	助剤対照区に対する 72時間後の生長率 (%)
対照区	100	--
助剤対照区	116	100
0.20	115	99
0.50	113	97
1.3	60	52
3.2	11	9
8.0	5	4

以上の結果から，本試験における濃度を対照区，助剤対照区および 0.520，0.800，1.20，1.80，2.60，4.00 mg/L（公比：1.5，各3連）の6段階の濃度区とした。

### 3.5 試験液の調製

被験物質を40mg精秤し、ジメチルスルオキシド 240 mgに溶解後、分散助剤（HCO-30）を80 mg加え混合した。これを培地で希釈し、100 mLに定容とし、被験物質濃度 400 mg/Lの添加原液を調製した。同時に被験物質を含まない助剤原液 3200 mg/L（ジメチルスルオキシド 2400 mg/L, HCO-30 800 mg/L）を調製した。

各試験容器に 100mL の培地を入れ、被験物質添加原液および助剤原液の添加量分を除去後、被験物質添加原液を等比級数的に添加し、被験物質濃度 0.520, 0.800, 1.20, 1.80, 2.60, 4.00 mg/L の試験液を調製した。同時に各濃度区の助剤濃度が一定（32 mg/L）となるように助剤原液を加えた。対照区には培地のみを、助剤対照区には助剤のみを含むもの（助剤濃度：32 mg/L）を調製した。

### 3.6 試験液の分析

暴露開始時（0hr）および終了時（72hr）に、各濃度区3連の試験容器より試験液を2.0 mLずつ、採取して混合した。開始時には、このうち 0.75 mLを分析試料とし、終了時には藻類を遠心分離（3000rpm, 10分間）し、上澄み液 0.75 mLを分析試料とした。

各分析試料にアセトニトリルを等量加え、混合後、HPLCにより分析した。各試験液の被験物質濃度は標準溶液のピーク面積との比から定量した。詳細は付属資料-1に示した。

### 3.7 試験操作

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 $1 \times 10^4$  cells/mLとなるように、前培養液の一定量を試験液の入った容器に添加した。

各試験容器を $23 \pm 2$  °Cの培養装置に設置し試験を開始し、24, 48および72時間に細胞濃度を測定した。細胞濃度は各試験容器より試験液1.0mLを採取し、電解液（セパパック）9.0mLと混合した後、粒子計数装置(CDA-500)により計測した。

試験液調製時の pH は3連とは別に調製した予備1本について測定し、各濃度区の暴露開始時の pH とし、終了時には3連のうち1本（No 1）を測定した。試験期間中、培養装置内の温度、照度を少なくとも1日1回測定した。

#### 4 結果の算出

##### 4.1 藻類生長曲線

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。

##### 4.2 藻類生長阻害率の算出

下記の方法（面積法および速度法）で生長阻害率を算出した。

###### 1) 生長曲線下の面積の比較（面積法）による生長阻害率（ $I_A$ ）

生長曲線下の面積は次の式により算出した。

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

ここで、

$A$  : 生長曲線下の面積

$N_0$  : 暴露開始時の設定細胞濃度 (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

$t_n$  : 暴露開始後  $n$  回目に細胞濃度を測定した時間

生長曲線下の面積より各濃度区における生長の阻害百分率（ $I_A$ ）を次の式により算出した。

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

ここで、

$A_c$  : 対照区（または助剤対照区）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

###### 2) 生長速度の比較（速度法）による生長阻害率（ $I_m$ ）

指数増殖している培養での細胞濃度の平均値から平均の生長速度（ $\mu$ ）を次の式より算出した。

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

ここで、

$N_1$  :  $t_1$ 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

$t_n$  : 暴露開始後  $n$  回目に細胞濃度を測定した時間

平均の生長速度（ $\mu$ ）より各濃度区における平均生長速度の低下百分率を次の式により算出した。

$$I_m = \frac{\mu_c - \mu_t}{\mu_c} \times 100$$

ここで、

$\mu_c$ ：対照区（または助剤対照区）の平均生長速度

$\mu_t$ ：各濃度区における平均生長速度

#### 4.3 50%生長阻害濃度（EC50）の算出

4.2で算出した面積法および速度法による藻類生長阻害率（IA値およびIm値，助剤対照区との比較に基づく）を用いて50%生長阻害濃度（EC50）を算出した。

各濃度区に対応する阻害率を片対数紙にプロットし，直線性の認められる点を用いて直線回帰分析（最小二乗法）を行い，阻害率50%との交点からEC50値（および可能な限りその95%信頼区間）を算出した。その際，面積法により求めた場合はEbC50（0-72），速度法により求めた場合はErC50（24-48）またはErC50（24-72）とした。

#### 4.4 無影響濃度（NOEC）

Bartlettの等分散検定（ $\alpha=0.01$ ）を行い等分散性を確認後，一元配置分散分析（1-way ANOVA， $\alpha=0.05$ ）および Williamsおよび Dunnettの多重比較検定（ $\alpha=0.05$ ，両側）を行い，助剤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無影響濃度（NOEC）とした。その際，面積法により求めた場合はNOECb（0-72），速度法により求めた場合は NOECr（24-48）または NOECr（24-72）とした。なお，Williamsおよび Dunnettの検定結果から，試験結果と矛盾がなく，かつ影響度が強く現れる方の結果を採用した。

以上の統計解析には Yukms ソフトウェア Statlight「#4 多群の比較」（Yukms Corp., 東京）を用いた。

## 5 結果および考察

### 5.1 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

該当する事象はなかった。

### 5.2 試験液中の被験物質濃度

暴露開始時の被験物質濃度は 0.528~4.51 mg/L (設定値 0.520~4.00 mg/L) であり, 設定値に対する割合は99~113 %であった。開始時における濃度が設定の±20%以内であったため, 各影響濃度の算出には設定値を採用した。

暴露72時間の被験物質濃度は 0.015~2.11 mg/Lであり, 設定値に対する割合は3~53 %であった。低濃度区ほど減少率が大きく, 被験物質の溶出時間約3.8分前後に分解物と思われる2本のピークが認められた。被験物質は光分解しやすいことから, 本試験における被験物質濃度の減少原因は, 主に光分解によるものと思われる。

[Table 2 (p.18), 付属資料-1]

### 5.3 藻類生長曲線

対照区および助剤対照区における細胞濃度は72時間の培養でそれぞれ 平均 222倍, 239倍増加し, 試験条件下で正常な生長を示した。また, 0.520 mg/L区で 198倍, 0.800 mg/L区で 201倍, 1.20 mg/L区で 198倍, 1.80 mg/L区で 169倍, 2.60 mg/L区で 118倍, 4.00 mg/L区で 38倍の生長を示した。

[Table 3 (p.19,20), Figure 1 (p.25)]

### 5.4 50%生長阻害濃度 (EC50) および無影響濃度 (NOEC)

#### 1) 生長曲線下面積の比較による阻害濃度

Ebc50 (0-72) は 2.37 mg/Lであり, その95%信頼区間は 1.81~3.09 mg/Lであった。

NOECb (0-72) は <0.520 mg/Lであった。予備試験結果からは, 0.50 mg/Lの濃度で3%阻害であったため, 本試験でも0.520 mg/Lで有意とならないと考えたが, 本試験では17.3%阻害で有意となった。しかしながら, NOECbはこの濃度近辺にあるものと考えられる。

[Table 4,5 (p. 21,22,23), Figure 2 (p.26)]

#### 2) 生長速度の比較による阻害濃度

ErC50 (24-48) およびErC50 (24-72) は, いずれも >4.00 mg/Lであった。速度法では最大濃度区でも生長阻害率が50%以下であったからである。

NOECr (24-48) および NOECr (24-72) は, それぞれ 2.60 mg/L, 1.80 mg/Lであった。

[Table 4,5 (p. 21,22,23), Figure 3 (p.27)]

### 5.5 温度およびpH

72時間の暴露期間中の藻類培養試験器内の温度は 22.3～23.3℃であり、設定範囲内であった。  
試験液のpHは暴露開始時が 7.8～8.0であり、試験終了時が 7.6～8.5であった。

[Table 6,7 (p.24)]

### 6. 試験計画書からの逸脱事項

該当する事象はなかった。

以 上



Table 1 OECD medium

Nutrient salts	Concentration (mg/L)
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0.185
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0.415
ZnCl <sub>2</sub>	0.003
FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.08
Na <sub>2</sub> EDTA·2H <sub>2</sub> O	0.1
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.0015
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.007
CuCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.00001
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	18
NH <sub>4</sub> Cl	15
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.6
NaHCO <sub>3</sub>	50
MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	12
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	15

Table 2. Measured Concentrations during a 72-Hour Exposure

Nominal Concentration (mg/L)	Measured Concentration(mg/L)			
	0 Hour	Percent of Nominal	72 Hour	Percent of Nominal
Control	<0.007	--	<0.007	--
Solvent Control.	<0.007	--	<0.007	--
0.520	0.528	102	0.015	3
0.800	0.829	104	0.100	13
1.20	1.26	105	0.265	22
1.80	1.99	111	0.637	35
2.60	2.57	99	1.13	43
4.00	4.51	113	2.11	53

Table 3. Cell Density of *Selenastrum capricornutum*

Nominal Concentration mg/L	Vessel No.	Cell Density (cells/mL)			
		0	24	48	72
Control	1	10000	55300	369300	2489000
	2	10000	52500	377000	2081000
	3	10000	55800	305000	2080000
	Average	10000	54500	350400	2216700
	SD	0	1800	39500	235800
Solvent.cont.	1	10000	56800	384900	2635000
	2	10000	53100	351000	2295000
	3	10000	43500	332800	2227000
	Average	10000	51100	356200	2385700
	SD	0	6900	26400	218600
0.520	1	10000	47800	311300	2106000
	2	10000	40600	298800	2038000
	3	10000	38500	270400	1808000
	Average	10000	42300	293500	1984000
	SD	0	4900	21000	156200
0.800	1	10000	43500	303900	2073000
	2	10000	40500	235600	2057000
	3	10000	38700	241000	1900000
	Average	10000	40900	260200	2010000
	SD	0	2400	38000	95600
1.20	1	10000	41500	284100	1973000
	2	10000	39600	265500	2009000
	3	10000	35700	245100	1971000
	Average	10000	38900	264900	1984300
	SD	0	3000	19500	21400
1.80	1	10000	37700	256900	1761000
	2	10000	32200	240200	1730000
	3	10000	32000	214600	1588000
	Average	10000	34000	237200	1693000
	SD	0	3200	21300	92200

Table 3. Cell Density of *Selenastrum capricornutum* (continued)

Nominal Concentration mg/L	Vessel No.	Cell Density (cells/mL)			
		0	24	48	72
2.60	1	10000	32400	190100	1247000
	2	10000	27000	180900	1210000
	3	10000	26300	162900	1087000
	Average	10000	28600	178000	1181300
	SD	0	3300	13800	83800
4.00	1	10000	23000	107700	400500
	2	10000	20500	104600	443900
	3	10000	18400	97800	308000
	Average	10000	20600	103400	384100
	SD	0	2300	5100	69400

SD= Standard deviation

Table 4. Growth Inhibition of *Selenastrum capricornutum*

Nominal Conc. (Measured Conc.) *1		Area*2	Inhibition (%) *5	Rate*3	Inhibition (%) *5	Rate*4	Inhibition (%) *5
mg/L	No.	A(0-72h)	I A(0-72h)	$\mu$ (24-48h)	I m(24-48h)	$\mu$ (24-72h)	I m(24-72h)
Control	1	39458000		0.0791		0.0793	
	2	34680000		0.0821		0.0767	
	3	33019000		0.0708		0.0754	
	Average	35719000	-	0.0773	-	0.0771	-
	SD	3343000		0.0059		0.0020	
Solvent cont.	1	41621000		0.0797		0.0799	
	2	36638000		0.0787		0.0785	
	3	35155000		0.0848		0.0820	
	Average	37805000	-	0.0811	-	0.0801	-
	SD	3387000		0.0033		0.0018	
0.520 (0.528)	1	33290000		0.0781		0.0789	
	2	32002000		0.0832		0.0816	
	3	28510000		0.0812		0.0802	
	Average	31267000	17.3**	0.0808	0.4	0.0802	-0.1
	SD	2473000		0.0026		0.0014	
0.800 (0.829)	1	32614000		0.0810		0.0805	
	2	30710000		0.0734		0.0818	
	3	28913000		0.0762		0.0811	
	Average	30746000	18.7**	0.0769	5.2	0.0811	-1.2
	SD	1851000		0.0038		0.0007	
1.20 (1.26)	1	30890000		0.0802		0.0805	
	2	30830000		0.0793		0.0818	
	3	29791000		0.0803		0.0836	
	Average	30504000	19.3**	0.0799	1.5	0.0820	-2.4
	SD	618000		0.0006		0.0016	
1.80 (1.99)	1	27602000		0.0800		0.0801	
	2	26698000		0.0837		0.0830	
	3	24374000		0.0793		0.0813	
	Average	26225000	30.6**	0.0810	0.1	0.0815	-1.7
	SD	1665000		0.0024		0.0015	

Table 4. Growth Inhibition of *Selenastrum capricornutum* (continued)

Nominal Conc. (Measured Conc.) *1		Area*2	Inhibition (%) *5	Rate*3	Inhibition (%) *5	Rate*4	Inhibition (%) *5
mg/L	No.	A(0-72h)	IA(0-72h)	$\mu$ (24-48h)	I <sub>m</sub> (24-48h)	$\mu$ (24-72h)	I <sub>m</sub> (24-72h)
2.60 (2.57)	1	19704000		0.0737		0.0760	
	2	18910000		0.0793		0.0792	
	3	16985000		0.0760		0.0775	
	Average	18533000	51.0**	0.0763	5.9	0.0776	3.1*
	SD	1398000		0.0028		0.0016	
4.00 (4.51)	1	7343000		0.0643		0.0595	
	2	7729000		0.0679		0.0641	
	3	5885000		0.0696		0.0587	
	Average	6986000	81.5**	0.0673	17.0**	0.0608	24.1**
	SD	973000		0.0027		0.0029	

\*1 Values in parentheses are the measured concentration at 0-hour.

\*2 Area under the growth curves (0-72h)

\*3 Growth rates (24-48h)

\*4 Growth rates (24-72h)

\*5 Values are the inhibition rates based on the solvent control.

SD Standard deviation

\* Indicates a significant difference ( $\alpha=0.05$ ) from the solvent control.

\*\* Indicates a significant difference ( $\alpha=0.01$ ) from the solvent control.

Table 5. Calculated EC50 and NOEC

Based on  $I_A$  (0-72h) value (Areas under growth curve)

EbC50 (0-72) (mg/L)	95-Percent Confidence Limits (mg/L)	NOECb (0-72) (mg/L)
2.37 *1	1.81 — 3.09*1	<0.520

Based on  $I_m$  (24-48h) value (Growth rates)

ErC50 (24-48) (mg/L)	95-Percent Confidence Limits (mg/L)	NOECr (24-48) (mg/L)
>4.00 *2	--*2	2.60

Based on  $I_m$  (24-72h) value (Growth rates)

ErC50 (24-72) (mg/L)	95-Percent Confidence Limits (mg/L)	NOECr (24-72) (mg/L)
>4.00 *3	--*3	1.80

The EC50 values and associated 95% confidence limits were determined by least squares linear regression analysis of the logarithm of nominal test concentration against the inhibition rates based on the solvent control.

- \*1 using the concentrations of 1.20, 1.80, 2.60 and 4.00 mg/L in the regression analysis
- \*2,\*3 could not be determined because the inhibition rates at the maximum concentration level were less than 50%.
- not calculated

The NOEC values were determined by an analysis of varians (ANOVA) and Williams' t-test, subsequent to Bartlett's test for homogeneity of variances. Statistical analyses were performed using Yukms Statlight #4 software (Yukms Corp., Tokyo) and all tests of significance were at  $\alpha=0.05$ , except Bartlett's test, which was at  $\alpha=0.01$ .

Table 6. Temperature in the Incubation Chamber during a 72-Hour Exposure

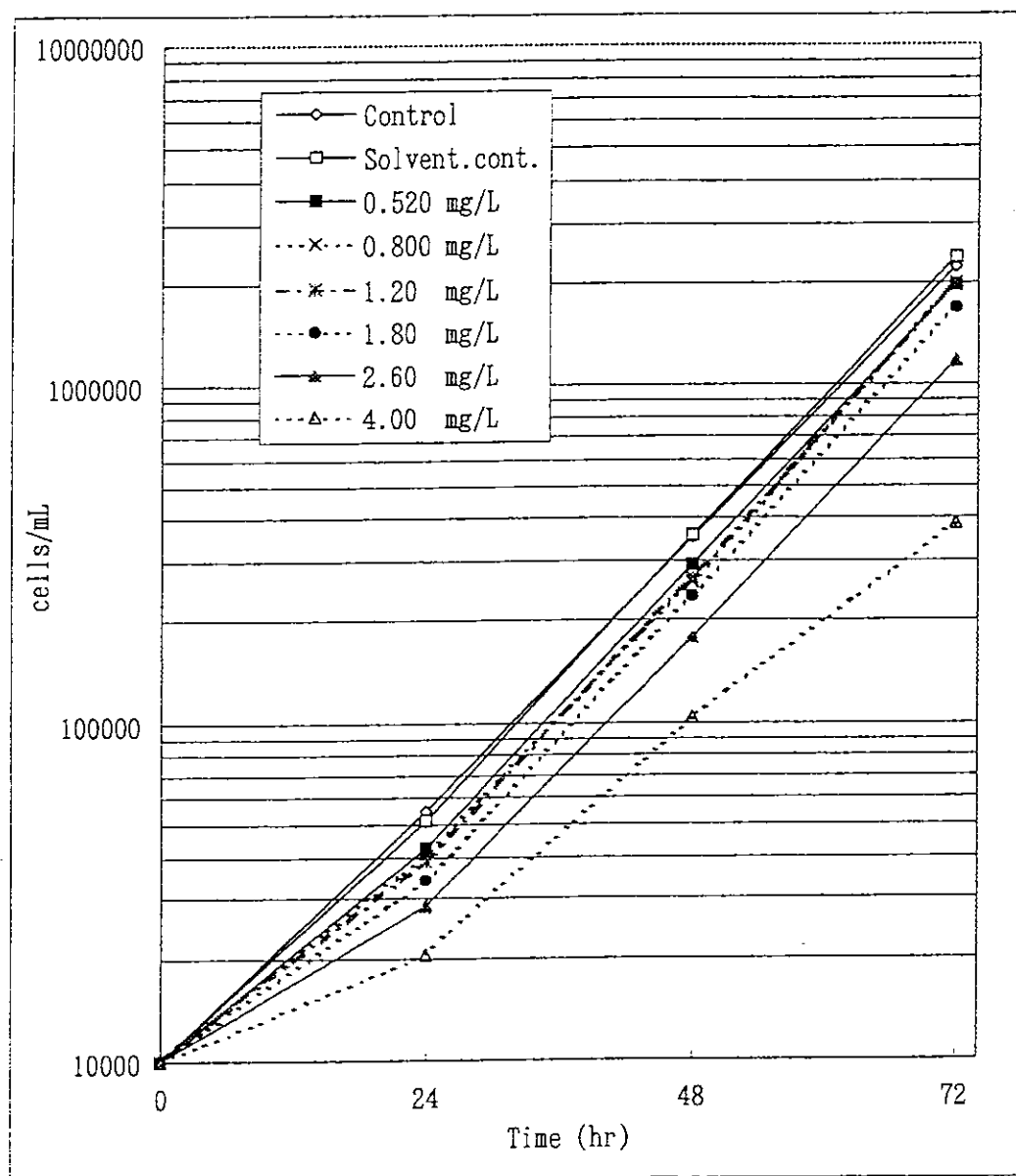
Exposure Period (Hours)	Temperature (°C)
0	22.3
24	22.4
48	23.3
72	23.2

Table 7. pH Values at 0-Hour and 72-Hour Exposure

Nominal Concentration mg/L	Vessel No.	pH	
		0 Hour	72 Hour
Control	1	7.9	8.2
Solvent control	1	7.8	7.8
0.520	1	8.0	8.4
0.800	1	7.9	8.5
1.20	1	8.0	7.9
1.80	1	8.0	8.1
2.60	1	8.0	7.9
4.00	1	7.8	7.6



Figure 1 Algal Growth Curve of *Selenastrum capricornutum*  
(Mean cell counts vs time for 72-hour exposure)



Values in legend are given in the nominal concentration.

Figure 2 Concentration-Inhibition Curve Based on  $I_A$  Values Calculated from the Area under the Growth Curves

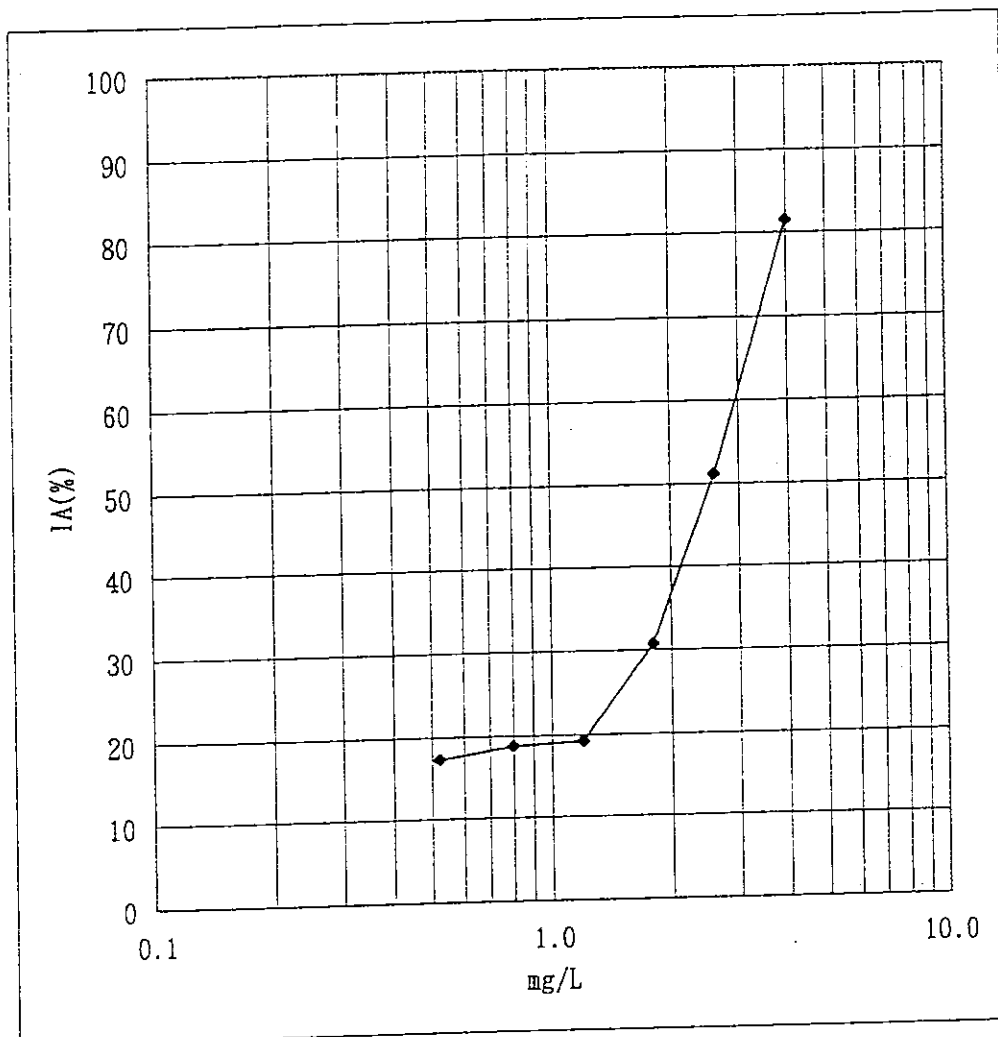
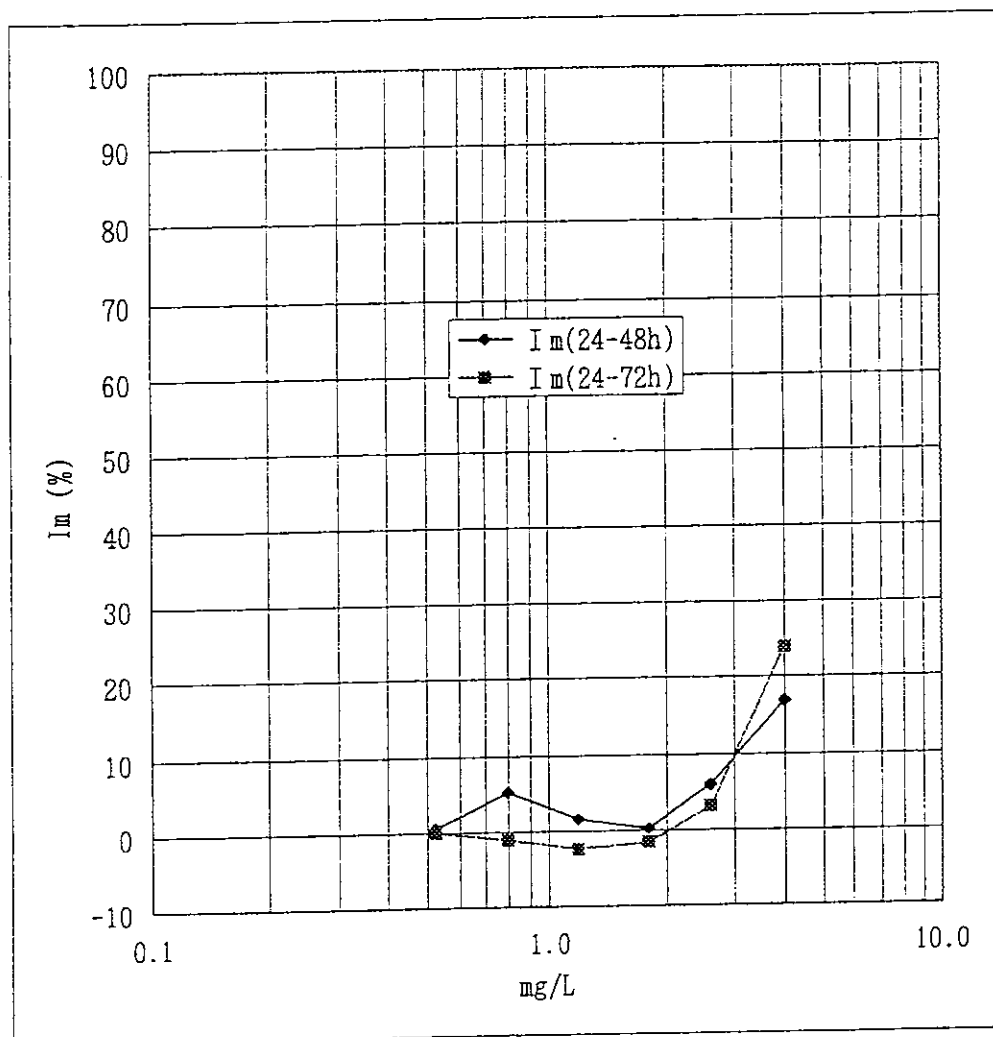


Figure 3 Concentration-Inhibition Curve of Based on  $I_m$  values Calculated from the Growth Rates



## 付属資料－1

### 試験液の分析方法

## 試験液の分析方法

### 1 試験液の分析方法

- 1) 各3連の試験容器より試験液 2.0mLずつを10mL容ガラス沈殿管に採取混合した。  
暴露開始時はこのうち 0.75mLを分析試料とした。  
暴露終了時は藻類を遠心分離機 (10分間, 3000 rpm)で分離し上澄み液 0.75mL  
を分析試料とした。 日立製CR 5 B (SOP/INS/430)
- 2) 各分析試料をHPLC測定用バイアルに直接 0.75mL採取し、アトニトリルを 0.75mL加  
え攪はんしたものをHPLC測定試料とした。

標準液 (アトニトリル溶液) はHPLC測定用バイアルに直接 0.75mL採取し、これに0.75  
mLの水を加え攪はんしたものをHPLC測定試料とした。

## 2 高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 測定条件

### (装置)

高速液体クロマトグラフ:	日立製作所製 L-7000 型 (No. 1)
ワークステーション:	Windows NT 及び D-7000 型 HPLC システムマネージャ
パソコン:	COMPAQ PROLINEA 590, ディスプレイ; 171FS
プリンター:	キャノン製 LASER SHOT LBP-A404F
ポンプ:	L-7100 型 (2 台)
カラムオーブン:	L-7300 型
オートサンプラ:	L-7200 型
検出器:	L-7400 型
データ処理装置:	D-7000 型

### (条件)

カラム:	Inertsil ODS-2, 5 $\mu$ m, 4.6 x150 mm (GL Sciences Inc.)
溶離液:	Acetonitrile 70 %, Water 30 %
流速:	1.0 mL/min
測定波長:	220 nm
試料注入量:	50 $\mu$ L (但し, 検量線は 50 $\mu$ L)

## 3 検量線

被験物質の 1000 mg/L アセトニトリル溶液を調製し, アセトニトリルで順次希釈し 0, 0.010, 0.020, 0.050, 0.10, 0.20, 0.50, 1.0, 2.0, 5.0, 10, 20, 50 mg/L の標準溶液を調製した。この標準溶液を一定量採取し水で等量希釈したものを HPLC 測定した。横軸に濃度を (mg/L), 縦軸にピーク面積 (count 表示) をとり, 検量線を作成した。検量線はほぼ原点を通る直線となり, 最小二乗法による直線回帰式の相関係数は 1.000 と良好であった。

## 4 定量限界

最小検出ピーク面積を 500 count に設定し, これに相当する試験液中の被験物質濃度 0.007 mg/L を定量限界とした。

## 5 添加回収試験

HPLC 直接注入法のため添加回収試験は実施しなかった。

Figure A-1-1 Calibration Curve by HPLC Analysis

Input Data

No.	Concentration (mg/L)	Peak Area (count)
0	0	0
1	0.01	592
2	0.02	1280
3	0.05	3427
4	0.10	7436
5	0.20	14477
6	0.50	39466
7	1.00	81845
8	2.00	160827
9	5.00	418117
10	10.00	833704
11	20.00	1701386
12	50.00	4251140

$$Y = -3,570 + 85,100 X$$

$$r = 1.000$$

(Injection volume: 50  $\mu$ L)

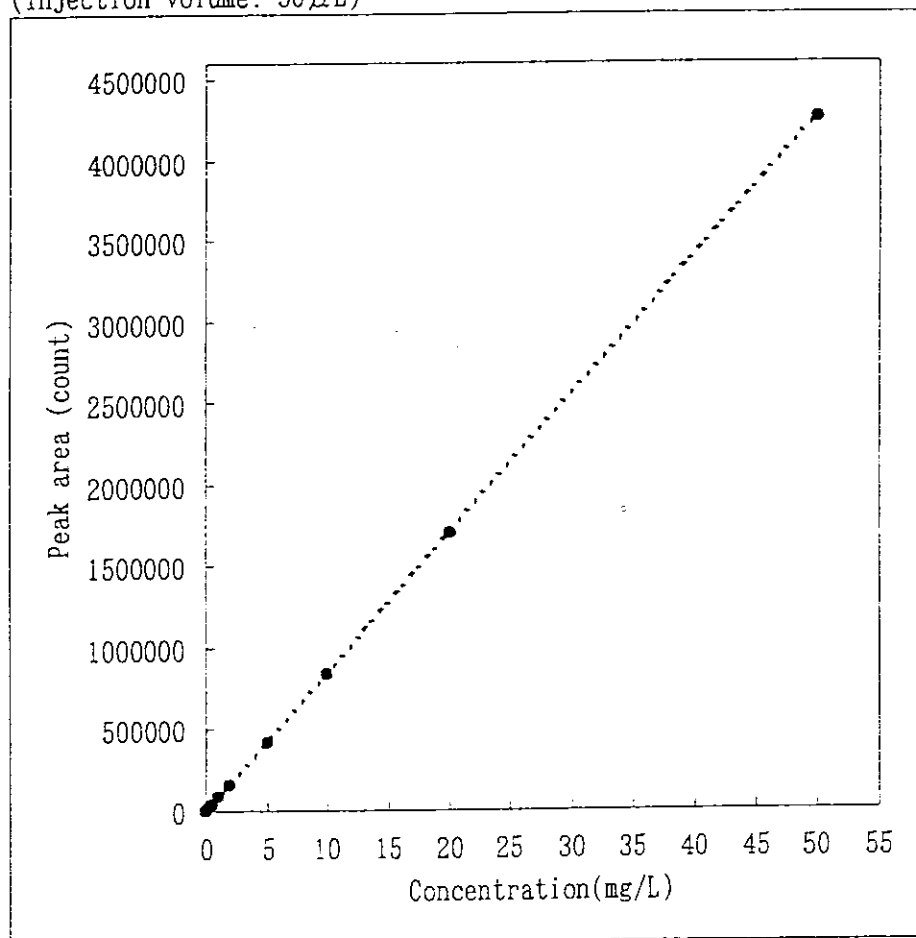
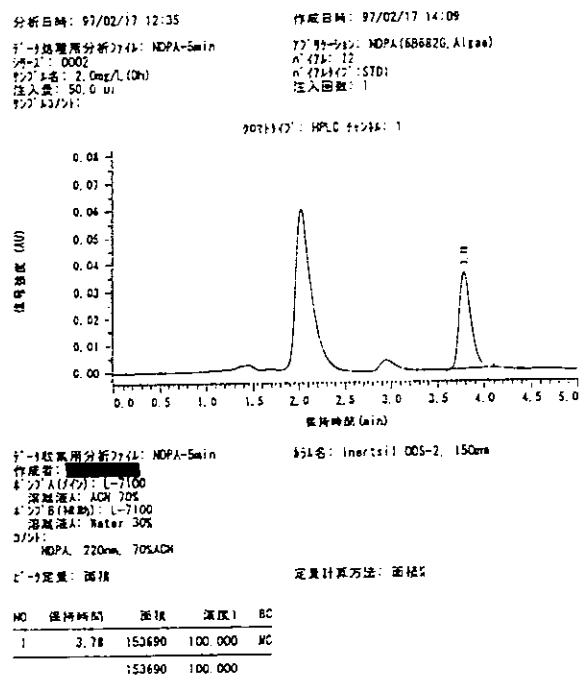


Figure A-1-2 Representative chromatograms

(1) Standard 2.00 mg/L ; 0 hr



(2) Solvent Control ; 0 hr

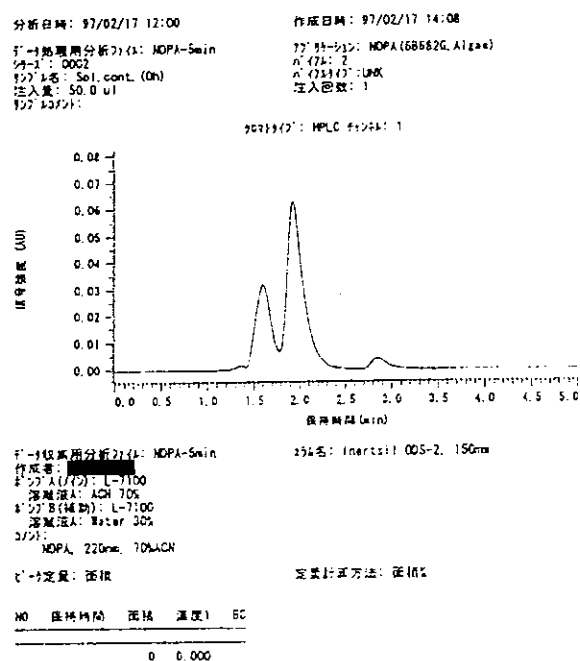
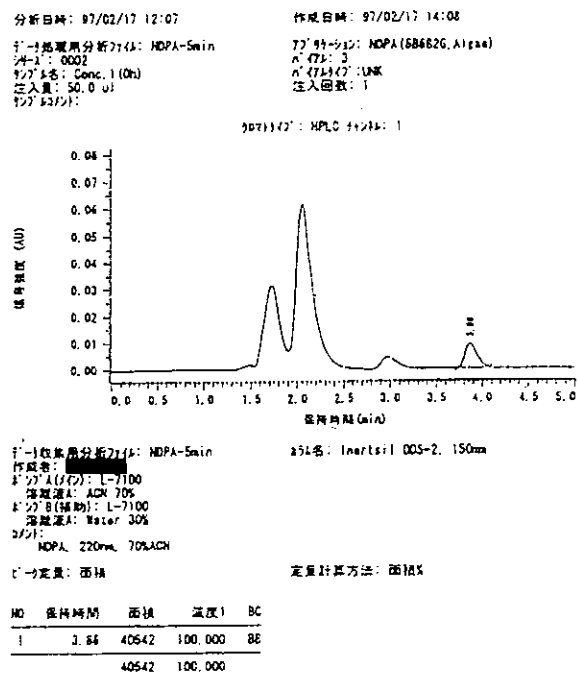




Figure A-1-2 Continued

(3) 0.520 mg/L nominal ; 0 hr



(4) 1.80 mg/L nominal ; 0 hr

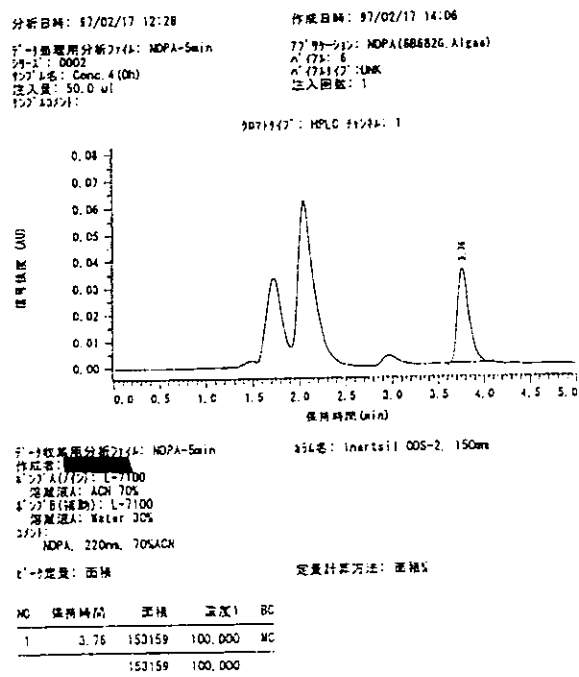
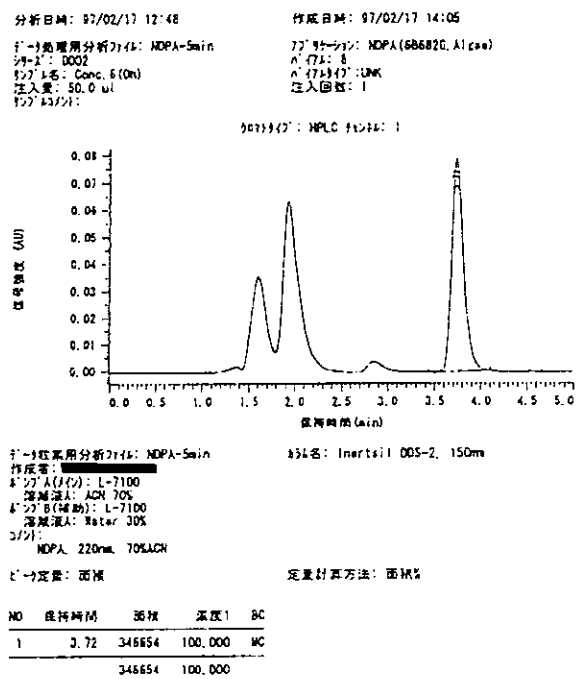


Figure A-1-2 Continued

(5) 4.00 mg/L nominal ; 0 hr



(6) Standard 2.00 mg/L ; 72 hr

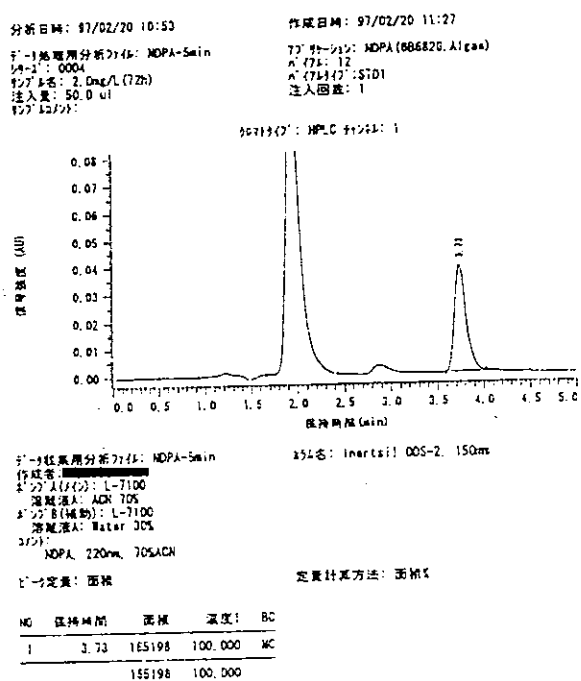
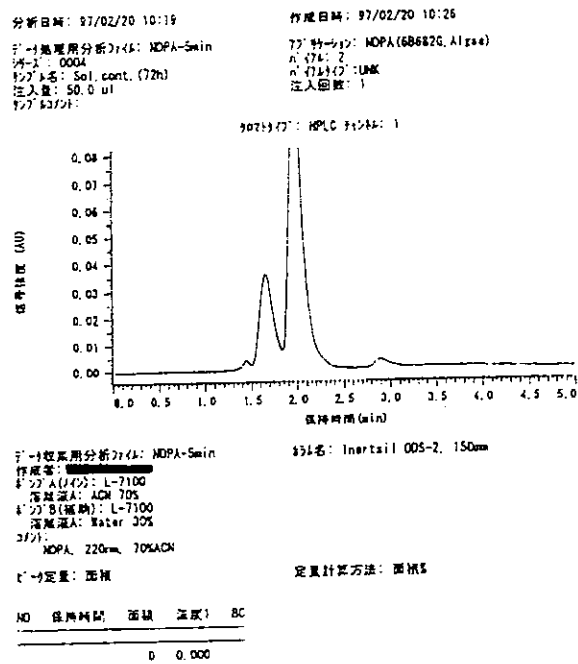


Figure A-1-2 Continued

(7) Solvent Control ; 72 hr



(8) 0.520 mg/L nominal ; 72 hr

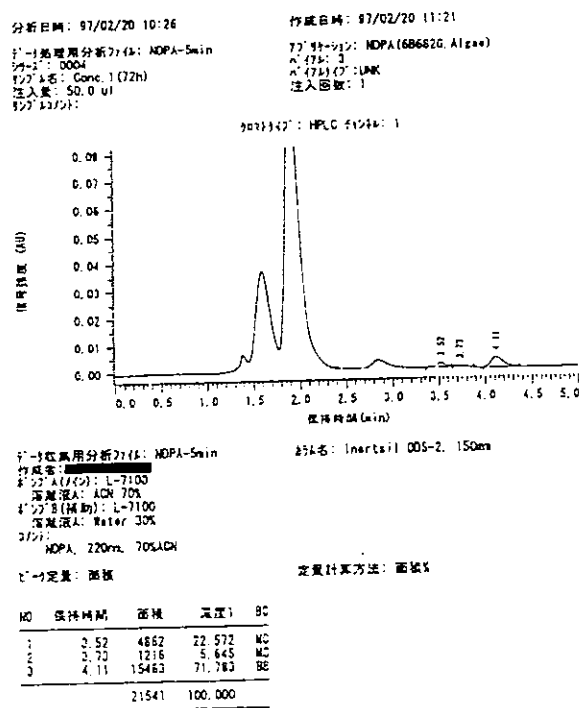
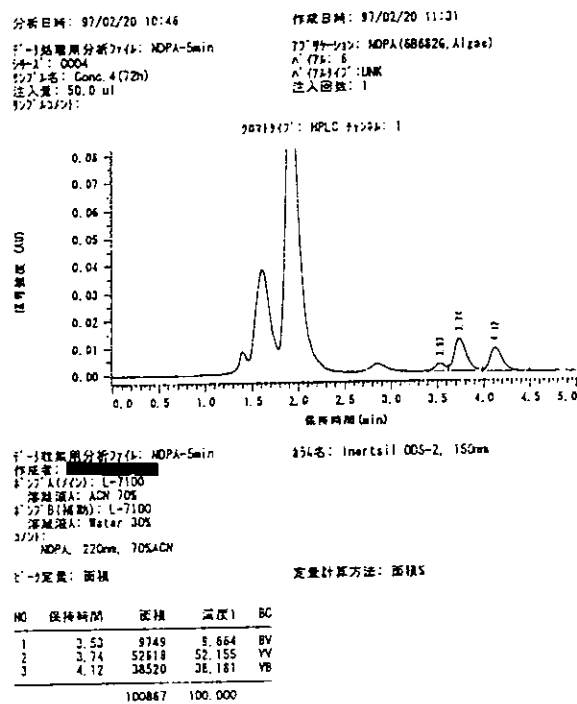


Figure A-1-2 Continued

(9) 1.80 mg/L nominal ; 72 hr



(10) 4.00 mg/L nominal ; 72 hr

