

環境庁殿

## 最 終 報 告 書

Di- $\alpha$ -cumyl peroxideの藻類(*Selenastrum capricornutum*)に対する生長阻害試験

(試験番号：92176)

2000 年 3 月 31 日作成

化学物質評価研究機構  
残留果実研究所

陳 述 書

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： 環境庁

表 題： Di- $\alpha$ -cumyl peroxideの藻類(*Selenastrum capricornutum*)に対する生長阻害  
試験

試験番号： 92176

本試験は環境庁のGLP規則に従って実施したものである。

2000年 3 月 31 日

運営管理者

A large black rectangular redaction box covering the signature area of the document.

## 信 頼 性 保 証 書

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： 環境庁

表 題： Di- $\alpha$ -cumyl peroxideの藻類(*Selenastrum capricornutum*)に対する生長阻害  
試験

試験番号： 92176

本試験は試験計画書及び標準操作手順書に従って実施され、本最終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。

監査又は査察内容	実施日	報告日(試験責任者)	報告日(運営管理者)
試験計画書監査	1999 年 12 月 7 日	1999 年 12 月 7 日	1999 年 12 月 7 日
試験実施状況査察	2000 年 2 月 15 日	2000 年 2 月 21 日	2000 年 2 月 24 日
試験実施状況査察	2000 年 2 月 18 日	2000 年 2 月 21 日	2000 年 2 月 24 日
最終報告書監査	2000 年 3 月 31 日	2000 年 3 月 31 日	2000 年 3 月 31 日

2000 年 3 月 31 日

信頼性保証業務担当者



## 試験実施概要

### 1 表 題

Di- $\alpha$ -cumyl peroxideの藻類(*Selenastrum capricornutum*)に対する生長阻害試験

### 2 試験目的

Di- $\alpha$ -cumyl peroxideについて、藻類(*Selenastrum capricornutum*)に対する生長阻害試験を行い、50%生長阻害濃度(EC50)及び最大無作用濃度(NOEC)を求める。

### 3 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。

### 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： (〒100-8975)東京都千代田区霞が関 1-2-2

試験委託責任者： 企画調整局環境保健部環境安全課環境リスク評価室  
室長補佐 [REDACTED]

### 6 試験受託者

名 称： 財団法人 化学物質評価研究機構

住 所： (〒112-0004)東京都文京区後楽 1-4-25

### 7 試験施設

名 称： 財団法人 化学物質評価研究機構

実施施設名： 久留米事業所

住 所： (〒830-0023)福岡県久留米市中央町 19-14

運営管理者： [REDACTED]

8 試験関係者

試験責任者

[REDACTED]

試験担当者

生物試験担当

[REDACTED]

分 析 担 当

[REDACTED]

9 最終報告書の作成

2000 年 3 月 31 日

試験責任者

氏名

[REDACTED]

[REDACTED]

10 試験日程

試験開始日

1999 年 12 月 7 日

試験終了日

2000 年 3 月 31 日

暴露期間

2000 年 2 月 15 日 ～ 2000 年 2 月 18 日

11 記録及び試資料の保管

試験に関する下記の記録及び試資料は、最終報告書作成後10年間、久留米事業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試験委託者と協議の上定める。

- 1) 試験計画書、同変更等の記録
- 2) 最終報告書
- 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 .....	1
1 被 験 物 質 .....	3
1.1 名称、構造式及び物理化学的性状 .....	3
1.2 供 試 試 料 .....	3
1.3 被験物質の確認及び保管条件下での安定性 .....	4
2 試 験 生 物 .....	4
3 試 験 方 法 .....	4
3.1 試 験 条 件 .....	4
3.2 培 地 .....	4
3.3 試験容器、藻類培養試験装置及び機器 .....	5
3.4 試験濃度の設定 .....	5
3.5 試験液の調製 .....	5
3.6 被験物質の分析 .....	5
3.7 試 験 操 作 .....	6
3.8 数値の取扱い .....	6
4 結果の算出 .....	6
4.1 藻類生長曲線 .....	6
4.2 藻類生長阻害率の算出 .....	6
4.3 50%生長阻害濃度(EC50)の算出 .....	7
4.4 最大無作用濃度(NOEC)の算出 .....	8
5 結果及び考察 .....	8
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 .....	8
5.2 試験液中の被験物質濃度 .....	8
5.3 藻類生長曲線 .....	8
5.4 50%生長阻害濃度(EC50)及び最大無作用濃度(NOEC) .....	8
5.5 暴露終了時における細胞の状態 .....	9
5.6 温度、pH及び照度 .....	9
5.7 試験液の状態 .....	9
Table 1～7 .....	10～15
Figure 1～3 .....	16,17
付属資料－1 OECD培地	
付属資料－2 試験液の分析方法及び分析チャート	

## 要 旨

試験委託者

環境庁

表 題

Di- $\alpha$ -cumyl peroxideの藻類(*Selenastrum capricornutum*)に対する生長阻害試験

試験番号

92176

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 : Di- $\alpha$ -cumyl peroxide
- 2) 試 験 生 物 : *Selenastrum capricornutum* (ATCC 22662株)
- 3) 初期細胞濃度 :  $1 \times 10^4$  細胞/mL
- 4) 暴 露 期 間 : 72時間
- 5) 培 養 方 式 : 振とう培養 (100 rpm)
- 6) 試 験 濃 度 : 20.0、8.00、3.20、1.28、0.512 mg/L(公比 : 2.5)、対照区及び助剤対照区
- 7) 連 数 : 1試験区に付き3連
- 8) 試 験 液 量 : 1試験容器(1連)に付き100 mL
- 9) 試 験 水 温 :  $23 \pm 2^\circ\text{C}$
- 10) 照 明 : 4,000~5,000 lux (連続照明)
- 11) 試験液中の被験物質の分析 : 高速液体クロマトグラフィー (HPLC)  
(暴露開始時、暴露終了時)

結 果

1) 試験液中の被験物質濃度

被験物質の測定濃度が開始時において設定の $\pm 20\%$ 以内であったため、下記の生長阻害濃度の算出には設定濃度を採用した。

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) : >20.0 mg/L

最大無作用濃度 NOECr(0-72) : 3.20 mg/L

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) : >20.0 mg/L

最大無作用濃度 NOECr(24-48) : 8.00 mg/L

50%生長阻害濃度 ErC50(24-72) : >20.0 mg/L

最大無作用濃度 NOECr(24-72) : 8.00 mg/L



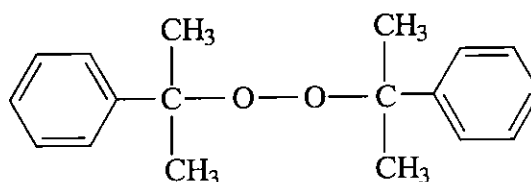
## 1 被験物質

本最終報告書においてDi- $\alpha$ -cumyl peroxideは、次の名称及び品質等を有するものとする。供試試料に関する情報については供給者提供の添付資料等によった。

## 1.1 名称、構造式及び物理化学的性状

- 1) 名称： Di- $\alpha$ -cumyl peroxide  
(CAS番号 80-43-3)

- 2) 構造式：



- 3) 分子式：  $C_{18}H_{22}O_2$   
 4) 分子量： 270.37  
 5) 沸点： 不明  
 6) 融点：  $39\sim 41^{\circ}C^{*}$   
 7) 比重( $d_{20}^{20}$ )： 1.02<sup>\*</sup>  
 8) 安定性： 不明  
 9) 1-オクタノール／水分配係数(logP)： 不明  
 10) pKa： 不明  
 11) 水への溶解度：  $<1\text{ g/L}(23^{\circ}C)^{*}$   
 12) 蒸気圧： 不明

情報源

\*： Richardson, M. L. et al “The Dictionary of Substances and their Effects”  
Royal Society of Chemistry, 1993.

## 1.2 供試試料

- 1) 純度： 98%  
 2) ロット番号： 12603PS  
 3) 供給者： XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX  
 4) 供給量： 100 g  
 5) 入手日： 1999 年 12 月 17 日  
 6) 外観： 白色結晶性薄片

### 1.3 被験物質の確認及び保管条件下での安定性

被験物質は久留米事業所の冷蔵庫に保管した。

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。暴露終了後にも同様にスペクトルを測定し、暴露開始前に測定したスペクトルと比較した結果、スペクトルに変化は無かった。

以上の結果から、被験物質は暴露終了時まで安定であったと確認された。

## 2 試験生物

- 1) 学 名 : *Selenastrum capricornutum*
- 2) 入 手 先 : American Type Culture Collection
- 3) 入手株番号 : ATCC 22662株
- 4) 入 手 日 : 1995 年 6 月 30 日
- 5) 入手後の管理 : AAPまたはOECD培地を用い無菌的に継代培養
- 6) 感受性の確認 : 基準物質(二クロム酸カリウム、試薬特級、和光純薬工業株式会社)による72時間50%藻類生長阻害濃度(EbC50)=0.328 mg/L[久留米事業所における1995年12月以降のEiC50 : 0.295 ~0.386 mg/L(n=11)の範囲にある。]
- 7) 前 培 養 : 前培養期間 ; 2000 年 2 月 12 日 ~ 2000 年 2 月 15 日  
この間、藻類は対数増殖した。(環境条件は試験と同様)

## 3 試験方法

### 3.1 試験条件

- 1) 培養方式 : 振とう培養 (100 rpm)
- 2) 暴露期間 : 72時間
- 3) 連 数 : 1試験区に付き3連
- 4) 試験液量 : 1試験容器(1連)に付き100 mL(OECD培地、3.2参照)
- 5) 試験水温 : 23±2℃
- 6) 照 明 : 4,000~5,000 lux (連続照明)
- 7) pH : 暴露期間中、pHの調整は行わなかった。
- 8) 初期細胞濃度 :  $1 \times 10^4$  細胞/mL

### 3.2 培 地

前培養及び試験ともに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。成分表を付属資料-1に示した。

### 3.3 試験容器、藻類培養試験装置及び機器

- 1) 試験容器： 500 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： 温度維持及び連続振とう培養が可能で、連続照明及び一定の照度を保てる装置 (TB-C-50RT型 高崎科学器械)を用いた。
- 3) 光学顕微鏡： システム顕微鏡 BHS (オリンパス光学工業)
- 4) 粒子計数装置： コールターカウンター Z1型 (コールター)
- 5) pH計： ガラス電極式水素イオン濃度計 HM-14P型 (東亜電波工業)
- 6) 電解液： アイソトン II (コールター)
- 7) 温度計： 検定済ガラス製棒状温度計
- 8) 照度計： 照度計 SLX-1,330型 (三商)

### 3.4 試験濃度の設定

本試験に先立って行った予備試験の結果及び助剤使用量から算出した試験上限濃度から、試験濃度は20.0 mg/Lを最高濃度として公比2.5で5濃度区(20.0、8.00、3.20、1.28及び0.512 mg/L)を設定した。対照には培地のみの対照区と濃度区と同一濃度(100 mg/L)のHCO-40(硬化ヒマシ油 日光ケミカルズ製)を含む助剤対照区を設けた。

### 3.5 試験液の調製

必要量の被験物質と被験物質の5倍量のHCO-40をアセトンで溶解させ、ロータリーエバポレーターでアセトンを留去後、培地に分散させて1,000 mg/Lの試験原液を調製し、0.45 $\mu$ mメンブランフィルターで濾過滅菌した。試験液は、各濃度区毎に必要な量の試験原液と培地を混合して調製した。また、各濃度区の助剤濃度が100 mg/Lとなるように、同様な方法で調製し濾過滅菌した5,000 mg/LのHCO-40溶液を必要量添加した。

### 3.6 被験物質の分析

暴露開始時(0時間)には試験液分析用及び水質測定用にあらかじめ別途調製した試験容器(試験液)から一部を採取しHPLCにより分析した。暴露開始後72時間には各試験区の3試験容器より試験液を等量採取して混合した後、遠心分離(3,000 rpmで10分間)をして藻体を除去し、その上澄液を分析に供した。試験液中の被験物質の分析に際しては、標準溶液(濃度0.250 mg/L)の測定を行い、そのピーク面積比から定量した。詳細は付属資料-2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 $1 \times 10^4$ 細胞/mLとなるように、前培養液の一定量を試験液の入った試験容器に添加した。

各試験容器を $23 \pm 2^\circ\text{C}$ の培養装置に設置して試験を開始し、24、48及び72時間に細胞濃度を測定した。細胞濃度の測定は各試験容器より試験液を少量採取し、電解液(アイソトンII)で適宜希釈後、コールターカウンターにより計測した。また、暴露終了時には同鏡下で各試験区の細胞の状態を観察した。

暴露開始時のpHは水質測定用にあらかじめ別途調製した試験容器(試験液)について測定して各試験区のpHとした。暴露終了時には各試験区の3連のうち1試験容器を測定した。暴露期間中、培養装置内の温度、照度を1日1回測定した。

### 3.8 数値の取扱い

数値の丸め方は、JIS Z 8202-1985 参考 3 規則 B によった。

## 4 結果の算出

得られたデータを基に以下の3項目の結果を算出した。なお、暴露開始時の被験物質の測定濃度が設定の $\pm 20\%$ 以内であったので、結果の算出には設定濃度を用いた。

### 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(片対数グラフ)。

### 4.2 藻類生長阻害率の算出

次に下記の方法(面積法及び速度法)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、

$A_c$  : 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( $I_\mu$ )

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阻害百分率( $I_\mu$ )を次の式により算出した。

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

ここで、

$\mu_c$  : 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で算出した面積法及び速度法による藻類生長阻害率( $I_A$ 値及び $I_\mu$ 値)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(及び可能な限りその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 $E_bC50(0-72)$ 、速度法により求めた場合は $E_rC50(24-48)$ 又は $E_rC50(24-72)$ とした。

#### 4.4 最大無作用濃度(NOEC)の算出

各試験容器毎の生長曲線下面積及び生長速度について、一元配置分散分析及びDunnettの多重比較法により有意差の検定を行い、助剤対照区と比較して有意差(5%水準)が認められない最高濃度を最大無作用濃度(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)又はNOECr(24-72)とした。

### 5 結果及び考察

#### 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

該当する要因はなかった。

#### 5.2 試験液中の被験物質濃度

暴露開始時及び暴露終了時(暴露開始後72時間)に試験液中の被験物質濃度を測定した。その結果をTable 1に示した。

被験物質の測定濃度の設定に対する割合は、暴露開始時で81.3～90.8%、暴露終了時で48.0～61.2%であった。

#### 5.3 藻類生長曲線

暴露期間中の細胞濃度をTable 2及び生長曲線をFigure 1に示した。

対照区及び助剤対照区における細胞濃度は暴露終了時まで平均115倍及び119倍に増殖した。これは本試験条件下で正常な生長したことを示す。各濃度区の生長は助剤対照区と比較して以下のとおりであった。20.0及び8.00 mg/L区では阻害がみられ、助剤対照区に比べて生長量も少なかったが、対数的な生長を示しその過程は助剤対照区のものと同様であった。3.20、1.28及び0.512 mg/L区では助剤対照区とほぼ同じ生長を示した。

#### 5.4 50%生長阻害濃度(EC50)及び最大無作用濃度(NOEC)

各濃度区における生長阻害率をTable 3に、50%生長阻害濃度(EC50)及び最大無作用濃度(NOEC)をTable 4に、濃度－阻害率曲線をFigure 2及びFigure 3に示した。以上の結果から、以下の結論を得た。

##### 1) 生長曲線下面積の比較による生長阻害濃度

EbC50 (0-72) : >20.0mg/L

NOECb(0-72) : 3.20 mg/L

2) 生長速度の比較による生長阻害濃度

ErC50 (24-48) : >20.0 mg/L

NOECr(24-48) : 8.00 mg/L

ErC50 (24-72) : >20.0 mg/L

NOECr(24-72) : 8.00 mg/L

5.5 暴露終了時における細胞の状態

暴露終了時において全濃度区で正常な細胞が観察された。

5.6 温度、照度及びpH

培養装置内の温度及び照度をTable 5及びTable 6に、試験液のpHをTable 7に示した。

暴露期間中の藻類培養装置内の温度は21.0～22.5℃、照度は4,300～4,500 luxであった。試験液のpHは暴露開始時では7.7～7.8であり、暴露終了時は8.3～10.4であった。

以上のことから、温度、照度及びpHについては、藻類の試験環境として適正範囲であったと考えられる。

5.7 試験液の状態

全濃度区とも調製時の試験液は無色透明であり、暴露終了時では細胞増殖のため緑色を呈していた。

以 上

Table 1. Concentrations of di- $\alpha$ -cumyl peroxide in growth inhibition test using *Selenastrum capricornutum*

Nominal concentration (mg/L)	Measured concentration (mg/L) (Percentage of nominal)		
	0-hour <sup>a)</sup>	72-hour <sup>b)</sup>	Mean <sup>c)</sup>
Control	n.d.	n.d.	n.d.
Solvent control	n.d.	n.d.	n.d.
0.512	0.465 (90.8)	0.258 (50.4)	0.351 (68.6)
1.28	1.11 (86.6)	0.615 (48.0)	0.838 (65.5)
3.20	2.68 (83.8)	1.68 (52.7)	2.15 (67.0)
8.00	6.51 (81.3)	4.53 (56.6)	5.46 (68.2)
20.0	17.2 (86.2)	12.2 (61.2)	14.6 (73.0)

n.d. :  $< 0.0500$  mg/L

a) initial

b) final

c) The values are expressed as time-weighted means calculated by the following equation:

$$(C_0 - C_{72}) / (\ln C_0 - \ln C_{72})$$

where

$C_0$  : the measured concentration at 0-hour

$C_{72}$  : the measured concentration at 72-hour

$\ln C_0$  : the natural logarithm of  $C_0$

$\ln C_{72}$  : the natural logarithm of  $C_{72}$ .



Table 2. Cell density of *Selenastrum capricornutum* during 72-hour exposure to di-  $\alpha$  -cumyl peroxide

Nominal concentration (mg/L)	Cell density ( $\times 10^4$ cells/mL)				
	No.	0-hour	24-hour	48-hour	72-hour
Control	1	1.00	5.67	30.0	113
	2	1.00	5.97	34.7	116
	3	1.00	5.66	32.1	116
	Average	1.00	5.77	32.3	115
	S.D.	0	0.179	2.38	1.67
Solvent control	1	1.00	5.76	33.8	114
	2	1.00	5.80	37.3	118
	3	1.00	5.31	36.3	124
	Average	1.00	5.63	35.8	119
	S.D.	0	0.270	1.81	5.25
0.512	1	1.00	5.94	35.1	115
	2	1.00	6.20	42.5	124
	3	1.00	5.60	36.2	125
	Average	1.00	5.91	38.0	121
	S.D.	0	0.298	4.00	5.73
1.28	1	1.00	6.03	39.1	121
	2	1.00	5.92	39.6	126
	3	1.00	5.95	38.6	138
	Average	1.00	5.96	39.1	128
	S.D.	0	0.0592	0.537	8.59
3.20	1	1.00	6.17	31.4	118
	2	1.00	5.84	34.8	118
	3	1.00	6.30	28.5	128
	Average	1.00	6.10	31.6	121
	S.D.	0	0.241	3.13	5.70
8.00	1	1.00	5.46	28.4	90.9
	2	1.00	5.64	29.7	110
	3	1.00	5.16	30.5	107
	Average	1.00	5.42	29.5	103
	S.D.	0	0.243	1.04	10.4
20.0	1	1.00	5.19	22.7	94.6
	2	1.00	5.49	24.4	82.6
	3	1.00	4.80	22.6	83.5
	Average	1.00	5.16	23.2	86.9
	S.D.	0	0.344	1.02	6.67

Table 3. Growth inhibition of *Selenastrum capricornutum* during 72-hour exposure to di-  $\alpha$  -cumyl peroxide

Nominal Concentration (mg/L)	No.	Area ( $\times 10^4$ ) A(0-72h)	Inhibition (%) $I_A(0-72h)$	Rate $\mu(24-48h)$	Inhibition (%) $I\mu(24-48h)$	Rate $\mu(24-72h)$	Inhibition (%) $I\mu(24-72h)$
Control	1	2150	8.95	0.0694	9.97	0.0623	1.98
	2	2300	2.33	0.0734	4.84	0.0617	2.85
	3	2230	5.30	0.0724	6.11	0.0628	1.08
	Average	2230	5.52	0.0717	6.97	0.0623	1.97
Solvent control	1	2260	-	0.0737	-	0.0622	-
	2	2390	-	0.0776	-	0.0627	-
	3	2430	-	0.0800	-	0.0657	-
	Average	2360		0.0771		0.0635	
0.512	1	2300	2.45	0.0740	3.97	0.0617	2.95
	2	2600	-10.3	0.0803	-4.14	0.0625	1.67
	3	2440	-3.54	0.0778	-0.918	0.0647	-1.79
	Average	2450	-3.78	0.0774	-0.362	0.0629	0.943
1.28	1	2480	-4.99	0.0779	-1.02	0.0625	1.63
	2	2550	-8.16	0.0793	-2.82	0.0638	-0.420
	3	2660	-12.9	0.0779	-1.05	0.0655	-3.09
	Average	2560	-8.69	0.0783	-1.63	0.0639	-0.628
3.20	1	2250	4.45	0.0678	12.1	0.0614	3.31
	2	2330	1.29	0.0744	3.55	0.0626	1.46
	3	2310	2.18	0.0629	18.4	0.0627	1.37
	Average	2300	2.64	0.0683	11.3	0.0622	2.05
8.00	1	1840	21.8	0.0688	10.8	0.0586	7.76
	2	2110	10.4	0.0693	10.1	0.0620	2.46
	3	2080	11.9	0.0740	3.95	0.0632	0.574
	Average	2010	14.7	0.0707	8.30	0.0612	3.60
20.0	1	1740	26.0	0.0615	20.2	0.0605	4.79
	2	1650	30.1	0.0622	19.4	0.0565	11.1
	3	1600	32.2	0.0645	16.4	0.0595	6.35
	Average	1660	29.4	0.0627	18.6	0.0588	7.40

Table 4. Calculated EC50 and NOEC of di-  $\alpha$  -cumyl peroxide in *Selenastrum capricornutum*

Based on $I_A$ value		
	Di- $\alpha$ -cumyl peroxide (mg/L)	95-Percent confidence limits (mg/L)
EbC50(0-72h)	>20.0	
NOECb(0-72h)	3.20	
Based on $I_\mu$ value		
	Di- $\alpha$ -cumyl peroxide (mg/L)	95-Percent confidence limits (mg/L)
ErC50(24-48h)	>20.0	
NOECr(24-48h)	8.00	
ErC50(24-72h)	>20.0	
NOECr(24-72h)	8.00	

Table 5. Temperature in the incubation chamber during 72-hour exposure to di-  $\alpha$  -cumyl peroxide

Exposure time (day)	Temperature (°C)
0	22.5
1	22.0
2	22.3
3	21.0
Average	22.0

Table 6. Light intensity in the incubation chamber during 72-hour exposure to di-  $\alpha$  -cumyl peroxide

Exposure time (day)	Light intensity (lux)
0	4,500
1	4,400
2	4,400
3	4,300
Average	4,400

Table 7. pH values of test solutions at 0-hour and 72-hour exposure to di-  $\alpha$  -cumyl peroxide

Nominal concentration (mg/L)	pH	
	0-hour	72-hour
Control	7.7	9.3
Solvent control	7.7	10.3
0.512	7.7	10.4
1.28	7.7	10.2
3.20	7.7	9.3
8.00	7.8	9.4
20.0	7.8	8.3

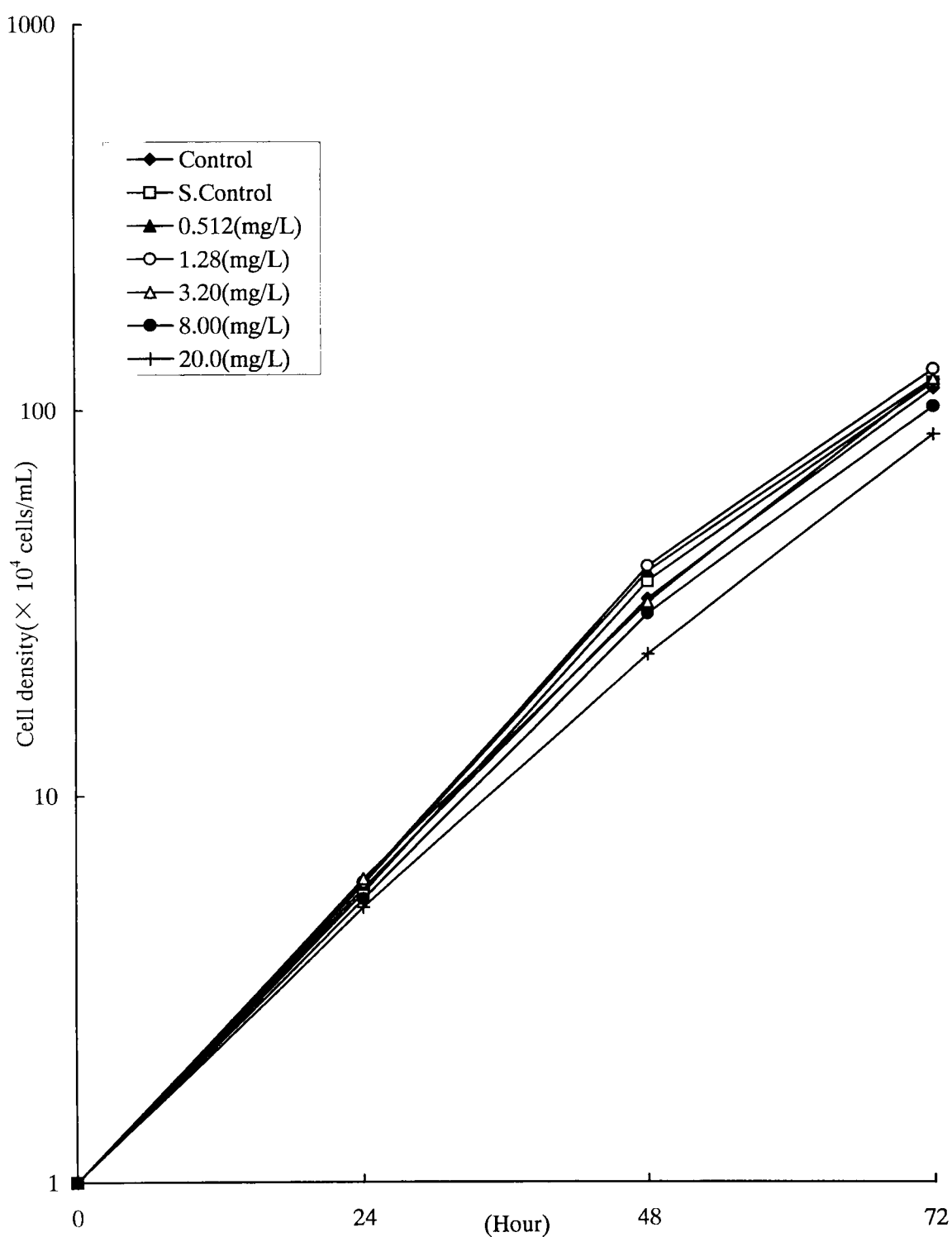


Figure 1. Growth curve of *Selenastrum capricornutum* during 72-hour exposure to di- $\alpha$ -cumyl peroxide.

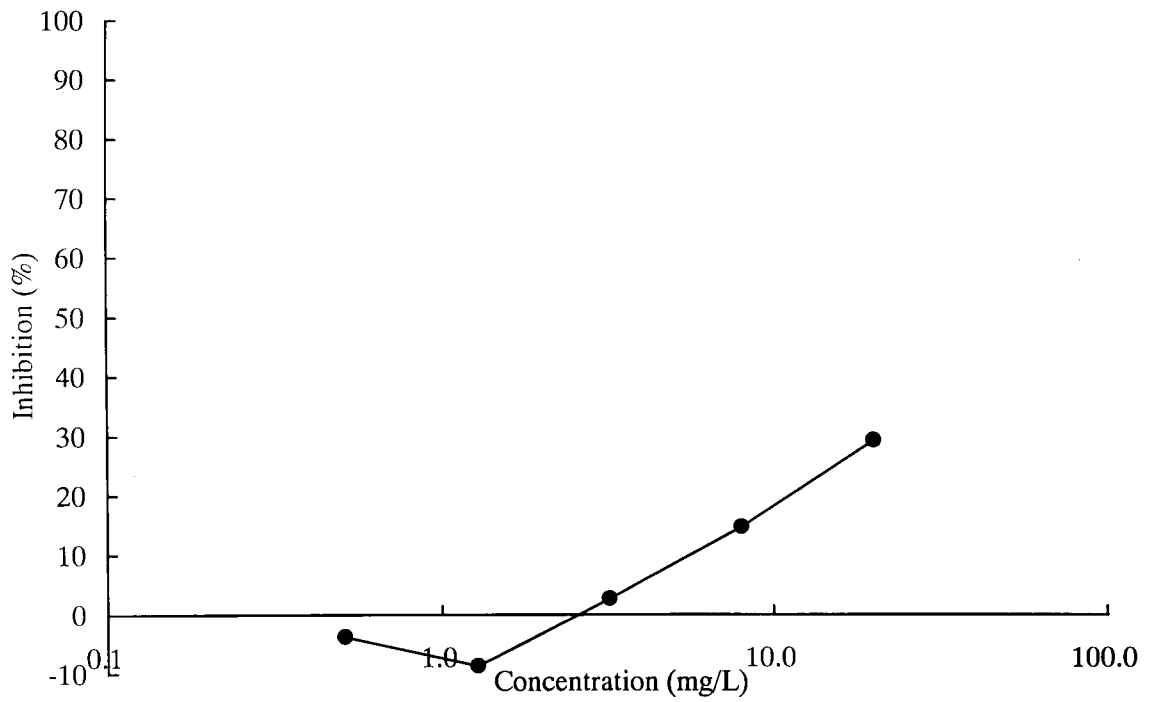


Figure 2. Concentration-Inhibition curve of di-  $\alpha$  -cumyl peroxide in *Selenastrum capricornutum* based on  $I_A$  value.

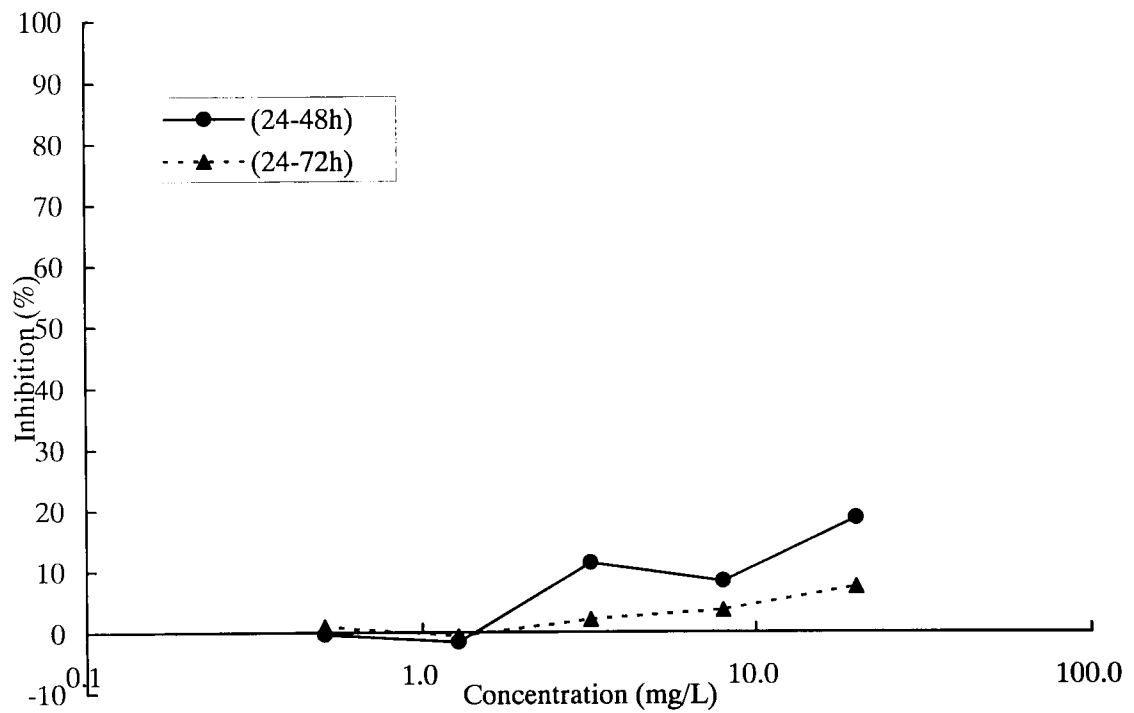


Figure 3. Concentration-Inhibition curve of di-  $\alpha$  -cumyl peroxide in *Selenastrum capricornutum* based on  $I_\mu$  value.

## 付属資料－1

OECD培地

(全1頁)



## Appendix 1. OECD medium

Nutrient salts	Concentration (mg/L)
$\text{H}_3\text{BO}_3$	0.185
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.415
$\text{ZnCl}_2$	0.003
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.08
$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.1
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.0015
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.007
$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.00001
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	18
$\text{NH}_4\text{Cl}$	15
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	1.6
$\text{NaHCO}_3$	50
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	12
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	15

## 付属資料－2

試験液の分析方法及び分析チャート

(全 5 頁)

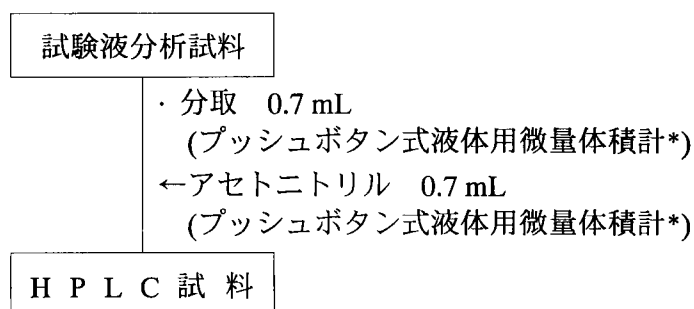
試 験 名 : 藻類生長阻害試験  
被 験 物 質 名 : Di- $\alpha$ -cumyl peroxide

# 1) 試験液の分析方法

## (1) 試験液の前処理操作

採取した溶液はそのまま若しくは培地で希釈して試験液分析試料とし、以下のフロースキームに従い高速液体クロマトグラフィー(HPLC)によって分析した。

フロースキーム



\* エッペンドルフ社製

HPLC試料中の被験物質濃度は、クロマトグラム上の被験物質のピーク面積を濃度既知の標準溶液のピーク面積と比較し、比例計算して求めた。

## (2) 被験物質溶液の調製

被験物質100 mgを電子分析天びんで正確にはかりとり、アセトニトリルに溶解して1,000 mg/Lの被験物質溶液を調製した。これをアセトニトリルで希釈して10.0 mg/Lの被験物質溶液を調製した。

## (3) 標準溶液の調製

分析試料中の被験物質濃度を求めるための標準溶液の調製は次のようにして行った。10.0 mg/Lの被験物質溶液をアセトニトリル/培地 1/1(v/v)になるように希釈して0.250 mg/Lの標準溶液とした。

## 2) 定量条件

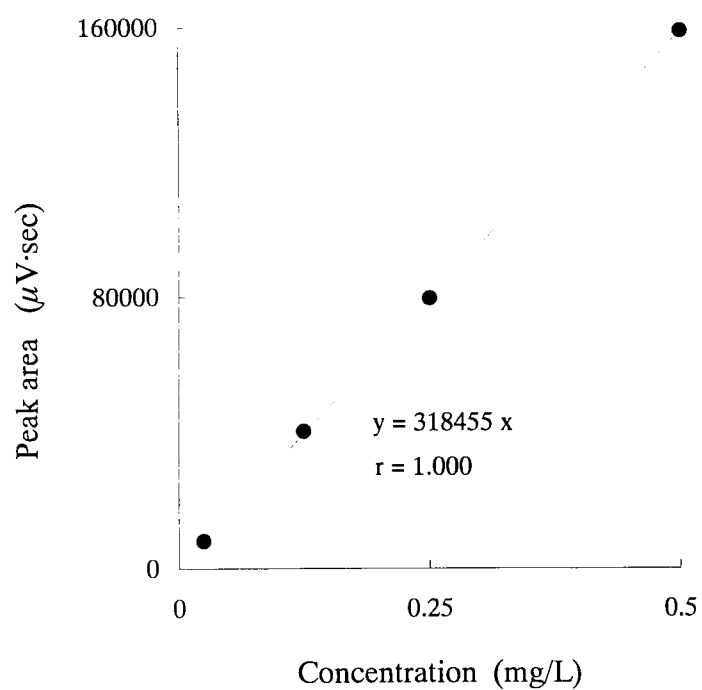
機	器	高速液体クロマトグラフ
ポ	ン	島津製作所製 LC-10AD
検	出	島津製作所製 SPD-10AV
オートインジ	ェクタ-	島津製作所製 SIL-10A <sub>XL</sub>
カ	ラ	L-column ODS
	ム	15 cm×4.6 mmφ ステンレス製
カ	ラ	40℃
溶	離	アセトニトリル/蒸留水 9/1 (v/v)
流	量	1.0 mL/min
測	定	210 nm
注	入	100 μL
感	度	
検	出	1 AU/1 V
記	録	ATTEN 2 <sup>5</sup>

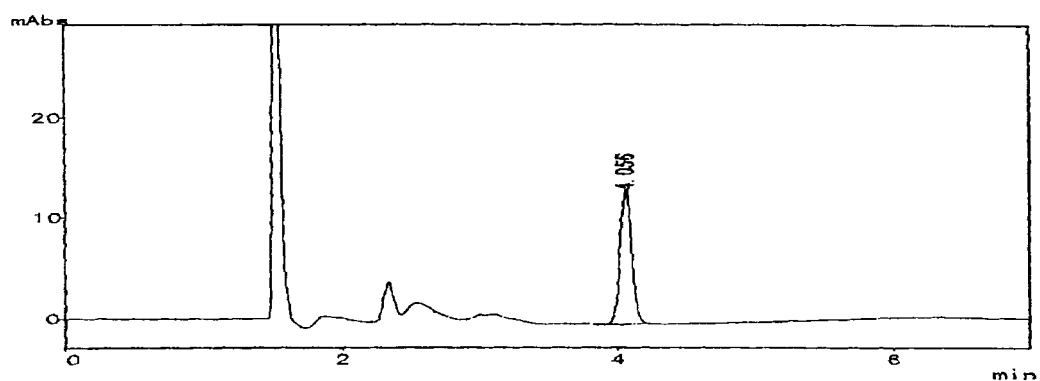
## 3) 検量線の作成

1)(3)の標準溶液の調製と同様にして0.0250、0.125、0.250及び0.500 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濃度により、検量線を作成した。

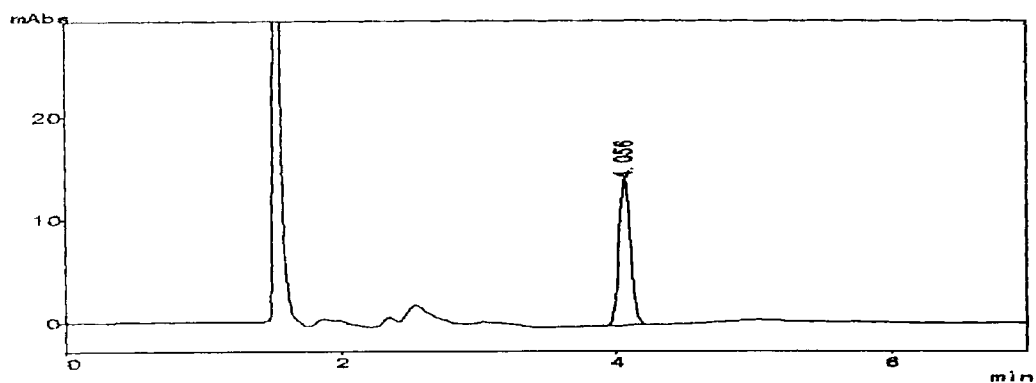
Input data

Run	Concentration (mg/L)	Peak area ( $\mu\text{V}\cdot\text{sec}$ )
1	0.0250	7905
2	0.125	40470
3	0.250	79431
4	0.500	159156

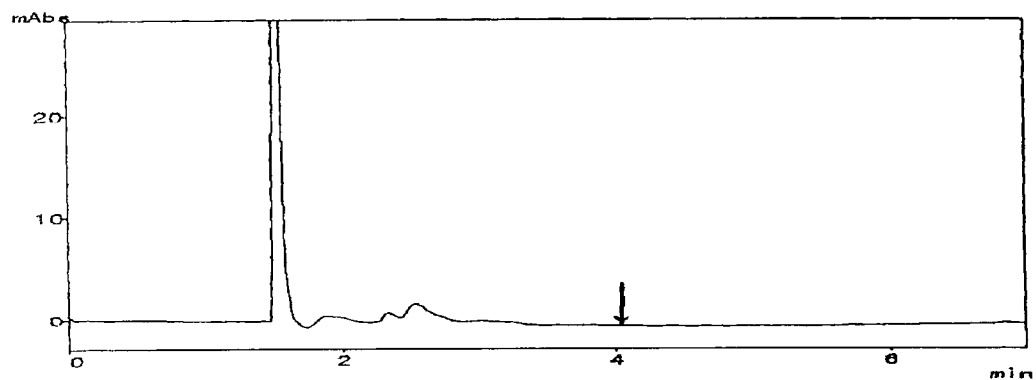
Appendix 2-1. Calibration curve of di- $\alpha$ -cumyl peroxide by HPLC analysis.



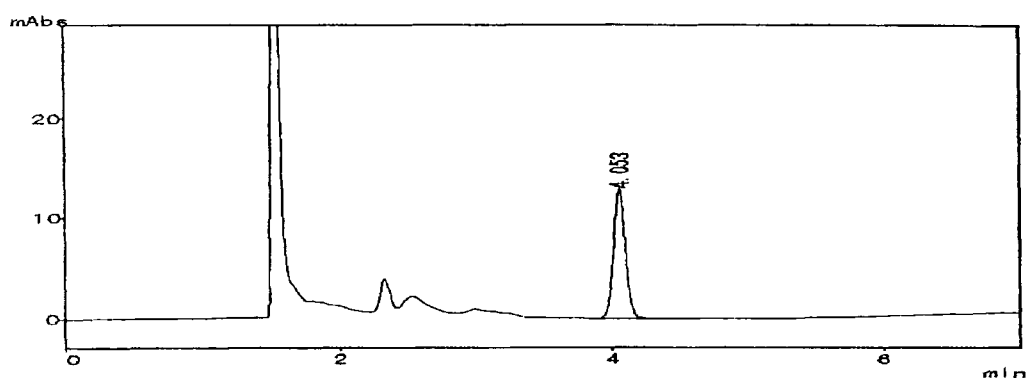
Appendix 2-2. Representative HPLC chromatogram of 0.250 mg/L di- $\alpha$ -cumyl peroxide standard at 0-hour.



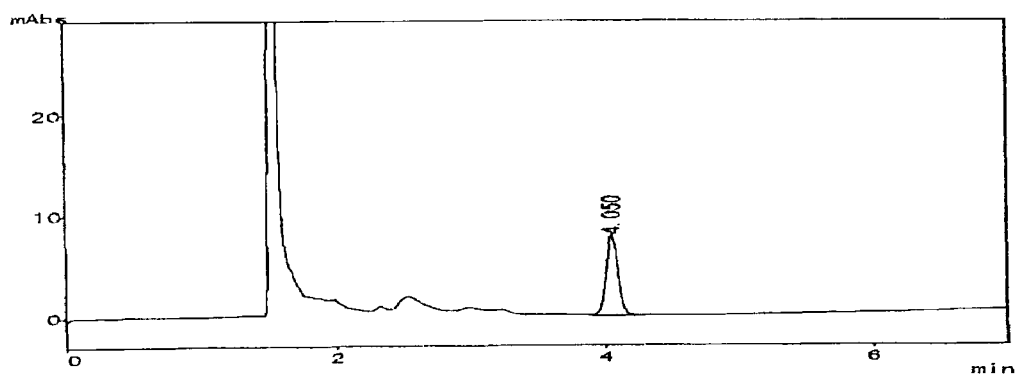
Appendix 2-3. Representative HPLC chromatogram of di- $\alpha$ -cumyl peroxide in 3.20 mg/L test solution at 0-hour.



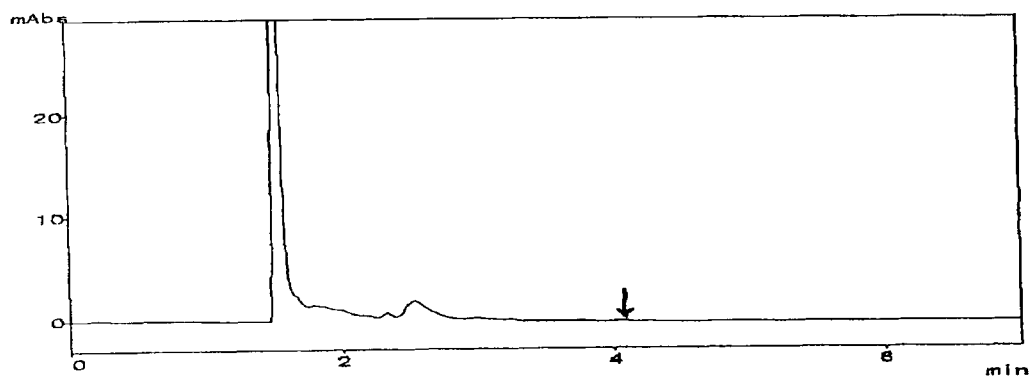
Appendix 2-4. Representative HPLC chromatogram of solvent control solution at 0-hour.



Appendix 2-5. Representative HPLC chromatogram of 0.250 mg/L di- $\alpha$ -cumyl peroxide standard at 72-hour.



Appendix 2-6. Representative HPLC chromatogram of di- $\alpha$ -cumyl peroxide in 3.20 mg/L test solution at 72- hour.



Appendix 2-7. Representative HPLC chromatogram of solvent control solution at 72- hour.

## 別添資料

(培地中での被験物質の安定性)

(全 1 頁)



被験物質名 : Di- $\alpha$ -cumyl peroxide

1) 目的及び概要

本試験において暴露終了時の試験液中の被験物質濃度が設定濃度の80%を下回ることが予想された。

予想される濃度低下が藻類に起因するものか否かを調べるため、本試験と併行して藻体が入っていない試験最低濃度での被験物質を経時的に分析した。

2) 結果

分析結果を以下の表に示す。

濃度(mg/L)	調製時	24時間後	48時間後	72時間後
藻体入 0.512	0.494 (96.5)	0.422 (82.4)	0.366 (71.5)	0.309 (60.4)
藻体なし 0.512	0.494 (96.5)	0.416 (81.2)	0.370 (72.2)	0.337 (65.8)

\*本試験での分析結果を用いた。

カッコ内は対設定濃度を示す。

藻体が入っていない試験液でも濃度低下がおこり、その度合いは藻体入りのものとほぼ同様であった。これより、被験物質は試験培地中で不安定であり、試験液中の被験物質の濃度低下は藻類に起因するものではないことが判明した。