

環境省殿

本写しは原本と相違ありません

(株)三菱化学安全科学研究所
横浜研究所 運営管理者

最 終 報 告 書

2,4-ジニトロ-6-(1-メチルプロピル) フェノールの
藻類 (*Pseudokirchneriella subcapitata*) に対する生長阻害試験

(試験番号: A030420-1)

2004年12月15日

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 : 環境省

表 題 : 2,4-ジニトロ-6-(1-メチルプロピル) フェノールの藻類
(*Pseudokirchneriella subcapitata*) に対する生長阻害試験

試 験 番 号 : A030420-1

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、本報告書はその結果を正しく記載したものである。

また、本試験は下記のGLPに従って実施したものである。

日本国環境省総合環境政策局環境保健部環境安全課環境リスク評価室長通知「生態影響試験実施に関する基準の改正について」(別添)「生態影響試験実施に関する基準」(環保安第242号, 2001年)

2004年12月15日

試験責任者

[Redacted]

[Redacted]

信 頼 性 保 証 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 : 環境省

表 題 : 2,4-ジニトロ-6-(1-メチルプロピル)フェノールの藻類
(*Pseudokirchneriella subcapitata*) に対する生長阻害試験

試 験 番 号 : A030420-1

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、下記の査察および監査実施により確認した。

記

実 施 事 項		実 施 日	運営管理者および 試験責任者への報告日
試験計画書監査		2004年10月 4日	2004年10月 4日
試験の査察	試験液の調製	2004年10月26日	2004年10月26日
	藻類の添加	2004年10月26日	2004年10月26日
	試験液の分析	2004年10月29日	2004年10月29日
	細胞濃度の測定	2004年10月29日	2004年10月29日
最終報告書監査		2004年12月15日	2004年12月15日

2004年12月15日

信頼性保証部門担当者



試験実施概要

1. 表 題 : 2,4-ジニトロ-6-(1-メチルプロピル)フェノールの藻類
(*Pseudokirchneriella subcapitata*) に対する生長阻害試験
(試験番号: A030420-1)
2. 試験目的 : 被験物質の藻類 (*Pseudokirchneriella subcapitata*) に対する生長阻害試験を 72 時間行い, 50%生長阻害濃度 (EC50) および最大無作用濃度 (NOEC) を求める。
3. 適用ガイドライン : 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)
4. 適用 GLP : 日本国環境省総合環境政策局環境保健部環境安全課環境リスク評価室長通知「生態影響試験実施に関する基準の改正について」(別添)「生態影響試験実施に関する基準」
(環保安第 242 号, 2001 年)
5. 試験委託者 : 環境省
〒100-8975 東京都千代田区霞が関一丁目2-2
委託責任者 総合環境政策局環境保健部環境安全課
環境リスク評価室 室長補佐 XXXXXXXXXX
6. 試験受託者 : 株式会社三菱化学安全科学研究所
〒105-0014 東京都港区芝二丁目1番30号
7. 試験施設 : 株式会社三菱化学安全科学研究所 横浜研究所
〒227-0033 神奈川県横浜市青葉区鴨志田町1000番地
8. 試験責任者 : XXXXXXXXXX
環境科学Cグループ

9. 試験担当者 : [redacted] [redacted] 2004年12月15日
(試験実施, 報告書作成)

[redacted] [redacted] 2004年12月15日
(試験実施)

[redacted] [redacted] 2004年12月15日
(試験実施)

[redacted] [redacted] 2004年12月15日
(試験実施)

[redacted] [redacted] 2004年12月15日
(分析実施)

10. 試験日程 : 試験開始日 2004年10月 4日
実験開始日 2004年10月26日
実験終了日 2004年10月29日
試験終了日 2004年12月15日

11. 保管 : 試験計画書, 生データ, 被験物質, 記録文書および最終報告書は, 横浜研究所の保管施設に保管する。
保管期間は, 最終報告書作成後10年間とし, 以後の保管は試験委託者と協議の上, 決定する。
ただし, 被験物質については, 最終報告書作成後10年間または品質低下をおこさないで安定に保存しうる期間のいずれか短い方の期間とする。

目 次

	頁
要 約	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	11
3 試験方法	11
3.1 試験条件	11
3.2 培地	11
3.3 試験容器および藻類培養試験装置等	12
3.4 試験濃度の設定	12
3.5 試験液の調製	13
3.6 試験液および試験培養液の分析	13
3.7 試験操作	13
4 結果の算出	14
4.1 生長曲線	14
4.2 生長阻害率の算出	14
4.3 EC50およびNOECの算出に用いる被験物質濃度の決定	15
4.4 50%生長阻害濃度 (EC50) の算出	15
4.5 最大無作用濃度 (NOEC)	16
5 結果および考察	17
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	17
5.2 試験液および試験培養液中の被験物質濃度	17
5.3 生長曲線	17
5.4 50%生長阻害濃度 (EC50) および最大無作用濃度 (NOEC)	18
5.5 温度およびpH	18
5.6 試験計画書からの逸脱事項	18
Table 1～6	19～23
Figure 1～3	24～26
付属資料－1 OEC D培地の組成	27～28
付属資料－2 試験液の調製	29～30
付属資料－3 試験液および試験培養液の分析	31～41
付属資料－4 結果の算出	42～48

要 約

試 験 委 託 者 : 環境省

表 題 : 2,4-ジニトロ-6-(1-メチルプロピル)フェノールの藻類
(*Pseudokirchneriella subcapitata*) に対する生長阻害試験

試 験 番 号 : A030420-1

試 験 方 法 :

- 1) 適用ガイドライン: 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)
- 2) 暴 露 方 式 : 止水式 (開放系), 振とう培養 (100rpm)
- 3) 供 試 生 物 : *Pseudokirchneriella subcapitata* (株名: ATCC22662)
(旧学名: *Selenastrum capricornutum*)
- 4) 暴 露 期 間 : 72時間
- 5) 試 験 濃 度 : 対照区, 助剤対照区, 0.100, 0.190, 0.360, 0.690, 1.30, 2.50 mg/L
(設定値) 公比: 1.9
助剤濃度一定: 98 μ L/L (N,N-ジメチルホルムアミド使用)
- 6) 試 験 液 量 : 100 mL/容器
- 7) 連 数 : 3 容器/試験区
- 8) 初期細胞濃度 : 前培養した藻類 1×10^4 cells/mL
- 9) 試 験 温 度 : 23 ± 2 $^{\circ}$ C
- 10) 照 明 : 4000 lux ($\pm 20\%$ の変動内, フラスコ液面付近) で連続照明
- 11) 分 析 法 : 高速液体クロマトグラフィー (HPLC)

試 験 結 果 :

- 1) 試験液および試験培養液中の被験物質濃度

被験物質濃度分析の結果, 測定値の設定値に対する割合は, 暴露開始時の試験液において 94~102 %, 暴露終了時の試験培養液において 94~98 %であった。阻害濃度の算出には暴露開始時の測定値を用いた。

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 EbC_{50} (0-72h) : 0.813 mg/L (95%信頼区間: 算出不可)

最大無作用濃度 $NOEC_b$ (0-72h) : 0.188 mg/L

3) 生長速度の比較による阻害濃度

50%生長阻害濃度 ErC_{50} (24-48h) : 1.16 mg/L (95%信頼区間: 算出不可)

最大無作用濃度 $NOEC_r$ (24-48h) : 0.337 mg/L

50%生長阻害濃度 ErC_{50} (24-72h) : 1.32 mg/L (95%信頼区間: 1.18~1.47 mg/L)

最大無作用濃度 $NOEC_r$ (24-72h) : 0.701 mg/L

4) 藻類の形態観察

暴露終了時の顕微鏡下での細胞形態観察の結果、全ての濃度区において細胞形態の変化(収縮, 膨張, 破裂等)や細胞凝集は認められず, また, 対照区および助剤対照区との相違もなかった。

1 被験物質

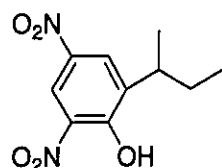
1.1 名称、構造式および物理化学的性状

名 称： 2,4-ジニトロ-6-(1-メチルプロピル) フェノール (略称 DNB P)

別 名： ジノセブ

CAS No： 88-85-7

構造式：



分子式： $C_{10}H_{12}N_2O_5$

分子量^{*1}： 240.22

融点^{*1}： 41.7～42.0℃

溶解度^{*1}： エタノールに易溶

水溶解度^{*2}： 22.7mg/L (精製水^{*3}, 20℃, 48時間攪拌, HPLC分析)

*1：供給者提供資料

*2：当社測定値

*3：JIS K0557 A4グレードの水, ヤマト科学製 超純水製造装置 WR600A

1.2 供試試料

純度^{*1}： 99.9% (GC)

ロット番号^{*1}： 2274X

供給者： XXXXXXXXXX

受領量^{*1}： 100mg×25

受領日： 2004年 8月10日

外観^{*1}： 橙黄色固体

*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

試験開始前に、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。

試験期間中、被験物質は当研究所の試験物質保管用冷蔵庫（保管条件：冷蔵，暗所）内に保管した。また、試験終了時にも赤外吸収スペクトルを測定し、試験開始時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。

（装置）フーリエ変換赤外分光分析装置：Nicolet 製 AVATAR 320 型

2 供試生物

- 1) 和名： ムレミカズキモ (単細胞緑藻類)
- 2) 学名： *Pseudokirchneriella subcapitata*
(旧学名： *Selenastrum capricornutum*)
- 3) 株名： ATCC22662
- 4) 入手先： American Type Culture Collection
- 5) 入手日： 1996年6月20日
- 6) 入手後の管理： Gorham培地を用い無菌的に継代培養。定期的 (約6ヶ月) に細菌検査をし無菌性を確認。
- 7) 感受性の確認： 定期的 (約6ヶ月毎) に基準物質 (重クロム酸カリウム, 試薬特級) による生長阻害試験を行い, 供試生物の感受性を調べている。1996年11月以降の72時間50%生長阻害濃度 (Ebc50) は, 以下の通りである。
平均値 ± 標準偏差 = 0.428 ± 0.0728 mg/L, n=15
(最小値 ~ 最大値 = 0.285 ~ 0.543 mg/L)
- 8) 前培養： 前培養期間; 2004年10月22日~2004年10月26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

試験容器およびその他の器具は, 必要に応じて滅菌したものを使用した。また, 藻類の接種も無菌条件下で行った。

3.1 試験条件

- 1) 暴露方式： 止水式 (開放系), 振とう培養 (100rpm)
- 2) 暴露期間： 72時間
- 3) 試験液量： 100 mL/容器
- 4) 連数： 3 容器/試験区
- 5) 初期細胞濃度： 前培養した藻類 1×10^4 cells/mL
- 6) 試験温度： 23 ± 2 °C
- 7) 照明： 4000 lux (±20%の変動内, フラスコ液面付近) で連続照明
- 8) pH： 試験液のpH調整なし

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No. 201に示されている推奨培地を濾過滅菌 (0.22 μm) 後用いた。組成表を付属資料-1に示した。

3.3 試験容器および藻類培養試験装置等

- 1) 試験容器： 300 mL容ガラス製三角フラスコ（IWAKI製）（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： ニコン製 ECLIPSE TE300型
- 4) 粒子計数装置： シスメックス製 CDA-500型
- 5) 粒子計数装置用電解液： シスメックス製 セルパック
- 6) pH計： 東亜電波工業製 HM-40V型
- 7) 温度計： Tasco Japan 製 TNA-120型
- 8) 照度計： トプコン製 IM-2D型
- 9) 電子天秤： メトラー製 AG204型
メトラー製 AE163型
メトラー製 PB3002型

3.4 試験濃度の設定

以下の表に示す予備試験（各1連）結果に基づき、本試験濃度を次のように決定した。

本試験濃度：対照区，助剤対照区，

0.100, 0.190, 0.360, 0.690, 1.30, 2.50 mg/L

公比：1.9

予備試験結果

No. 1	
濃度 (mg/L)	助剤対照区に対する 72時間後の生長率 (%)
対照区	100
0.100	93
0.200	75
0.500	45
2.00	1
5.00	1
10.0	1

No. 2	
濃度 (mg/L)	助剤対照区に対する 72時間後の生長率 (%)
対照区	100
0.080	113
0.100	97
0.150	115
0.800	52
1.00	32
2.00	2

3.5 試験液の調製

試験液調製時の培地は、調製前に恒温槽内または恒温室内で 23 ± 2 °C にした。

付属資料－2 に示すように、被験物質原液および助剤原液を調製し、添加混合することにより試験液を調製した。対照区は培地のみとし、助剤対照区には助剤のみを含むもの（助剤濃度：98 $\mu\text{L/L}$ ）を調製した。なお、各原液は用時調製した。

調製時の試験液の外観は対照区および助剤対照区において無色透明、0.360 mg/L 以下の濃度区では薄黄色透明、0.690 mg/L 以上の濃度区では黄色透明であった。

3.6 試験液および試験培養液の分析

暴露開始時（0hr）には各試験区3個の試験容器より試験液を2.0 mLずつ採取して混合したものをもとに分析試料とした。暴露終了時（72hr）には、各試験区3個の試験容器より試験培養液を2.0 mLずつ採取して混合し、藻類を遠心分離（3000rpm, 10分間）後の上澄み液を分析試料とした。

各分析試料1.0 mLにアセトニトリルを等量添加し混合後、HPLCにより分析した。各試験液および各試験培養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－3に示した。

3.7 試験操作

前培養した藻類の細胞数を粒子計数装置（CDA-500）および血球計算盤と顕微鏡で計数し、試験液中の細胞濃度が 1×10^4 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 ± 2 °C の培養装置に設置（ランダム発生表に従いランダム配置、24hr毎に再配置）し試験を開始し、24、48 および 72時間後に細胞濃度を測定した。細胞濃度は各試験容器より試験培養液1.0 mL（72hrでは0.5 mL）を採取し、粒子計数装置用電解液（セルパック）9.0 mL（72hrでは9.5 mL）と混合した後、粒子計数装置（CDA-500）により計数した。

試験培養液中の藻類について、暴露開始後0、24 および 48時間には、肉眼による色調観察を、また、暴露終了時には、肉眼による色調観察および顕微鏡下での細胞形態観察を行った。色調観察は、藻体添加なしの試験液との相対で行った。

各試験区における暴露開始時の試験液および暴露終了時の試験培養液のpHを測定した。暴露開始時のpHは、各試験区3容器とは別に調製した予備1容器について測定し、暴露終了時のpHは、3容器のうち1容器（No.1）について測定した。暴露期間中、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 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 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（ A ）は次の式により算出した。

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

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（ A ）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（助剤使用時は助剤対照区）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_A ）

対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（ μ ）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、

μ : 生長速度

N_i : t_i 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_i : 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 (μ) より各濃度区における平均生長速度の低下百分率 (I_m) を次の式により算出した。

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

ここで,

μ_c : 対照区 (助剤使用時は助剤対照区) の平均生長速度

μ_i : 各濃度区における平均生長速度

4.3 EC50およびNOECの算出に用いる被験物質濃度の決定

4.4, 4.5のEC50およびNOECの算出に用いる被験物質濃度は, 暴露開始時の測定値とした。

4.4 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生長阻害率 (I_A 値および I_m 値) を用いて, 以下の方法で50%生長阻害濃度 (EC50) を算出した。

最高濃度区における阻害率	$\geq 50\%$	$< 50\%$
濃度－生長阻害率曲線の記載 (片対数紙にプロット)	記載する。	記載する。
EC50の決定方法	濃度－生長阻害率曲線において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%との交点から算出。 可能な限り 95%信頼区間を算出。	推定される濃度領域を記載する。
EC50の表記方法	I_A 値より求めた場合: EbC50 (0-72h) I_m 値より求めた場合: ErC50 (24-48h), ErC50 (24-72h)	

4.5 最大無作用濃度 (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 Dunnettまたは Williams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 (0-72h), 速度法により求めた場合は NOECr (24-48h) または NOECr (24-72h) とした。なお、NOECb (0-72h) の算出には Williamsの多重比較検定を、NOECr (24-48h) および NOECr (24-72h) の算出には Dunnettの多重比較検定を採用した。

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 試験液および試験培養液中の被験物質濃度

暴露開始時の試験液および暴露終了時の試験培養液中の被験物質濃度を測定した。その結果を Table 1 に、代表的なクロマトグラムを付属資料-3 に示した。

被験物質濃度分析の結果、測定値の設定値に対する割合は、暴露開始時の試験液において 94~102 %、暴露終了時の試験培養液において 94~98 % であった。

5.3 生長曲線

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

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 280 倍、287 倍増加し、試験条件（開放系条件）下で正常な生長を示した。各濃度区の細胞濃度は濃度の増加とともに（用量依存的に）減少する傾向がみられた。

試験培養液の肉眼による色調観察の結果、対照区、助剤対照区および 1.30 mg/L 以下の濃度区では、時間経過とともに緑色度が増加する傾向がみられた。2.50 mg/L の濃度区では、暴露終了時（72hr）まで緑色化することはなかった。

また、暴露終了時の顕微鏡下での細胞形態観察の結果、全ての濃度区において細胞形態の変化（収縮、膨張、破裂等）や細胞凝集は認められず、また、対照区および助剤対照区との相違もなかった。

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

濃度区における生長阻害率を Table 3 に, 50%生長阻害濃度 (EC50) および最大無作用濃度 (NOEC) を Table 4 に, 濃度-阻害率曲線を Figure 2 および Figure 3 に, EC50 および NOEC の算出結果 (使用した統計的手法, 入力値, 入力に用いた観察点 (試験区) およびその出力結果) を付属資料-4 に示した。得られた結果から, 以下の結論を得た。

1) 生長曲線下面積の比較による阻害濃度

EbC50 (0-72h) : 0.813 mg/L (95%信頼区間: 算出不可)

NOECb (0-72h) : 0.188 mg/L

2) 生長速度の比較による阻害濃度

ErC50 (24-48h) : 1.16 mg/L (95%信頼区間: 算出不可)

NOECr (24-48h) : 0.337 mg/L

ErC50 (24-72h) : 1.32 mg/L (95%信頼区間: 1.18~1.47 mg/L)

NOECr (24-72h) : 0.701 mg/L

5.5 温度および pH

暴露期間中の培養試験装置内の温度を Table 5 に, 試験液および試験培養液の pH を Table 6 に示した。

培養試験装置内の温度は, 設定範囲 ($23 \pm 2^\circ\text{C}$) 内であった。pH は, 暴露開始時の試験液が 7.7~7.8 であり, 暴露終了時の試験培養液が 7.8~10.2 であった。対照区, 助剤対照区および 0.690 mg/L 以下の濃度区では, pH が 1 以上増加したが, 炭酸同化が盛んに行われ藻類の生長率が高ければ 1 以上増加することがあり, 問題はないと考えられた。

5.6 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 Measured Concentration of the Test Substance in Test Cultures

Nominal Concentration (mg/L)	Measured Concentration (mg/L)			
	0 Hour	Percent of Nominal	72 Hours	Percent of Nominal
Control	<0.00005	--	<0.00005	--
Solvent Control	<0.00005	--	<0.00005	--
0.100	0.0945	95	0.0950	95
0.190	0.188	99	0.182	96
0.360	0.337	94	0.340	94
0.690	0.701	102	0.652	94
1.30	1.27	98	1.27	98
2.50	2.37	95	2.38	95

Table 2 Cell Densities of *Pseudokirchneriella subcapitata* during the 72-Hour Exposure

Nominal Concentration [Measured Conc. at 0hr] (mg/L)	Vessel No.	Cell Densities (cells/mL)			
		0 Hour*	24 Hours	48 Hours	72 Hours
Control	1	10000	70100	521900	2969800
	2	10000	69600	482900	2749800
	3	10000	66600	463900	2689800
	Average	10000	68800	489600	2803100
	SD	0	1900	29600	147400
Solvent Control	1	10000	68000	517900	3099800
	2	10000	71700	533900	3059800
	3	10000	69400	543900	2459800
	Average	10000	69700	531900	2873100
	SD	0	1900	13100	358500
0. 100 [0. 0945]	1	10000	68400	514900	3179800
	2	10000	74500	571900	3299800
	3	10000	66900	501900	2789800
	Average	10000	69900	529600	3089800
	SD	0	4000	37200	266600
0. 190 [0. 188]	1	10000	62600	500900	2749800
	2	10000	64800	522900	2939800
	3	10000	62400	562900	3119800
	Average	10000	63300	528900	2936500
	SD	0	1300	31400	185000
0. 360 [0. 337]	1	10000	62200	422900	2529800
	2	10000	58400	405900	2519800
	3	10000	63200	479900	2919800
	Average	10000	61300	436200	2656500
	SD	0	2500	38800	228100
0. 690 [0. 701]	1	10000	49100	332900	1839800
	2	10000	48800	332900	1849800
	3	10000	48800	319900	1759800
	Average	10000	48900	328600	1816500
	SD	0	200	7500	49300
1. 30 [1. 27]	1	10000	39100	89400	261800
	2	10000	38300	84200	280800
	3	10000	37200	96400	301800
	Average	10000	38200	90000	281500
	SD	0	1000	6100	20000
2. 50 [2. 37]	1	10000	11800	13200	13500
	2	10000	12200	14300	15400
	3	10000	12700	13700	15300
	Average	10000	12200	13700	14700
	SD	0	500	600	1100

SD : Standard deviation

* : Nominal initial densities

Table 3 Growth Inhibition (%) of *Pseudokirchneriella subcapitata*

Nominal Concentration [Measured Conc. at 0hr]		Area under the growth curves		Growth Rate			
mg/L	Vessel No.	Area A (0-72h)	Inhibition (%) ^{*1} I _A (0-72h)	Rate μ (24-48h)	Inhibition (%) ^{*1} I _μ (24-48h)	Rate μ (24-72h)	Inhibition (%) ^{*1} I _μ (24-72h)
Control	1	49246000		0.0836		0.0780	
	2	45658000		0.0807		0.0766	
	3	44410000		0.0809		0.0771	
	Average	46438000	-	0.0817	-	0.0772	-
	SD	2511000		0.0016		0.0007	
Solvent Control	1	50659000		0.0846		0.0796	
	2	50652000		0.0837		0.0782	
	3	43637000		0.0858		0.0743	
	Average	48316000	-	0.0847	-	0.0774	-
	SD	4052000		0.0011		0.0027	
0.100 [0.0945]	1	51557000		0.0841		0.0800	
	2	54511000		0.0849		0.0790	
	3	46529000		0.0840		0.0777	
	Average	50866000	-5.3	0.0843	0.5	0.0789	-1.9
	SD	4036000		0.0005		0.0012	
0.190 [0.188]	1	45922000		0.0867		0.0788	
	2	48782000		0.0870		0.0795	
	3	51845000		0.0916		0.0815	
	Average	48850000	-1.1	0.0884	-4.4	0.0799	-3.2
	SD	2962000		0.0027		0.0014	
0.360 [0.337]	1	41400000		0.0799		0.0772	
	2	40781000		0.0808		0.0784	
	3	47472000		0.0845		0.0799	
	Average	43218000	10.6*	0.0817	3.5	0.0785	-1.4
	SD	3697000		0.0024		0.0014	
0.690 [0.701]	1	30646000		0.0797		0.0755	
	2	30758000		0.0800		0.0757	
	3	29366000		0.0783		0.0747	
	Average	30257000	37.4**	0.0793	6.4*	0.0753	2.7
	SD	773000		0.0009		0.0005	
1.30 [1.27]	1	5626000		0.0345		0.0396	
	2	5710000		0.0328		0.0415	
	3	6228000		0.0397		0.0436	
	Average	5855000	87.9**	0.0357	57.9**	0.0416	46.3**
	SD	326000		0.0036		0.0020	
2.50 [2.37]	1	162000		0.0047		0.0028	
	2	221000		0.0066		0.0049	
	3	217000		0.0032		0.0039	
	Average	200000	99.6++	0.0048	94.3**	0.0039	95.0**
	SD	33000		0.0017		0.0011	

*1 Values are the growth inhibition (%) relative to 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.

++ Statistical comparison test could not be performed for this concentration since data including this concentration did not show homogeneity of variances. However, it was concluded that this concentration level showed adverse effect on algal growth judging from I_A values.

Table 4 Calculated EC50 and NOEC

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

EC50 (0-72h) (mg/L)	95-Percent Confidence Limits (mg/L)	NOECb (0-72h) (mg/L)
0.813 ^{*1}	--	0.188

Based on I_A (24-48h) value (Growth rates)

EC50 (24-48h) (mg/L)	95-Percent Confidence Limits (mg/L)	NOECr (24-48h) (mg/L)
1.16 ^{*1}	--	0.337

Based on I_A (24-72h) value (Growth rates)

EC50 (24-72h) (mg/L)	95-Percent Confidence Limits (mg/L)	NOECr (24-72h) (mg/L)
1.32 ^{*2}	1.18-1.47	0.701

The EC50 values and associated 95% confidence limits were determined by least squares linear regression analysis of the logarithm of test concentration against the growth inhibition (%) relative to the solvent control.

- *1 using the measured concentrations of 0.701 and 1.27 mg/L in the regression analysis
- *2 using the measured concentrations of 0.701, 1.27 and 2.37 mg/L in the regression analysis
- not calculated

The NOEC values were determined by an analysis of variance (ANOVA), Dunnett or Williams test, subsequent to Bartlett 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 test, which was at $\alpha=0.01$.

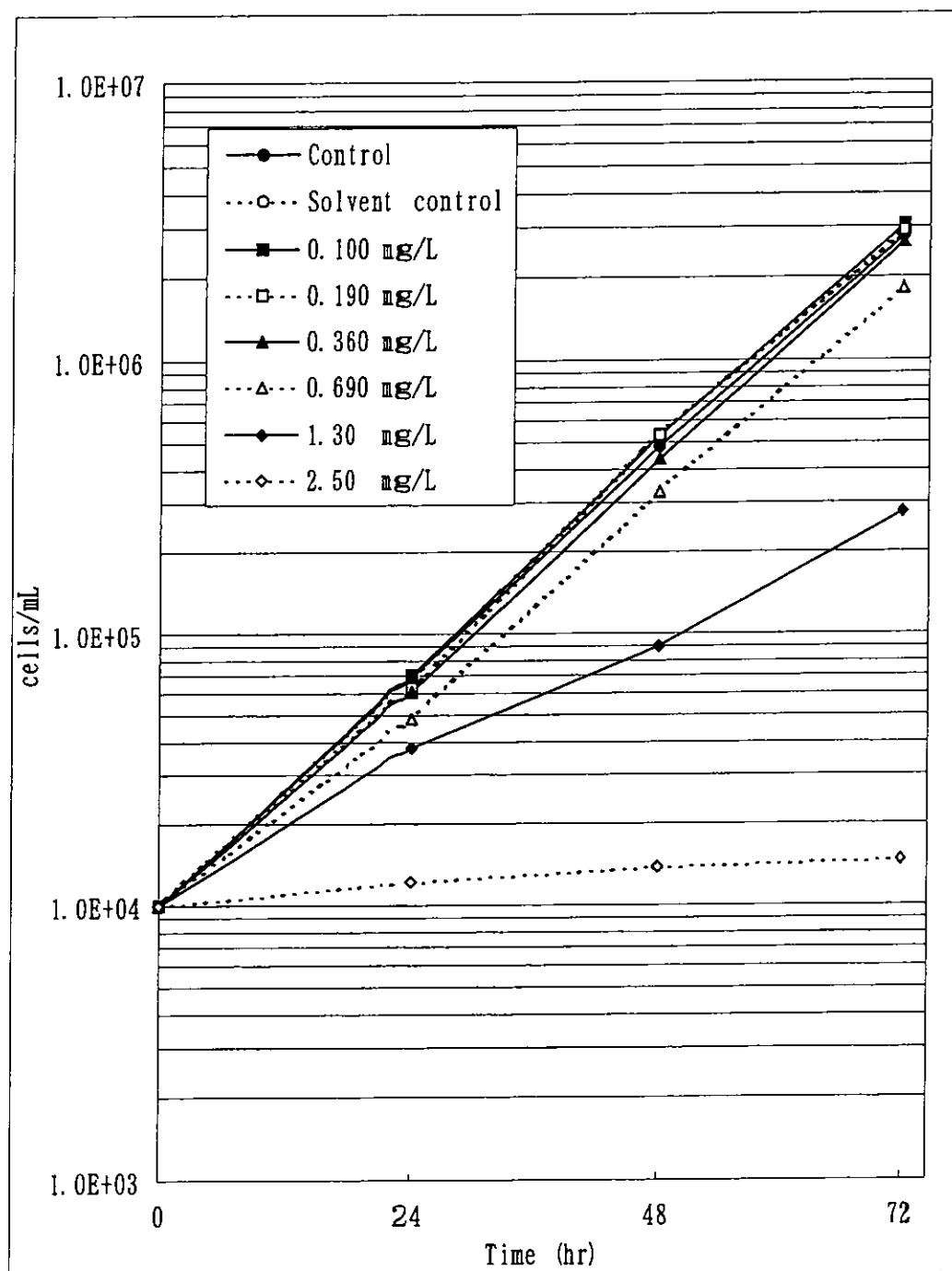
Table 5 Temperature in the Incubation Chamber

Exposure Period (Hours)	Temperature (°C)
0	22.7
24	22.6
48	22.9
72	22.9

Table 6 pH Values of Test Cultures

Nominal Concentration [Measured Conc. at Ohr] (mg/L)		pH		
		0 Hour	72 Hours (Vessel No)	
Control		7.8	10.1	(1)
Solvent Control		7.8	10.1	(1)
0.100	[0.0945]	7.8	10.0	(1)
0.190	[0.188]	7.8	10.2	(1)
0.360	[0.337]	7.8	10.2	(1)
0.690	[0.701]	7.8	9.2	(1)
1.30	[1.27]	7.8	7.9	(1)
2.50	[2.37]	7.7	7.8	(1)

Figure 1 Algal Growth Curve of *Pseudokirchneriella subcapitata*
(Mean cell counts vs time during the 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

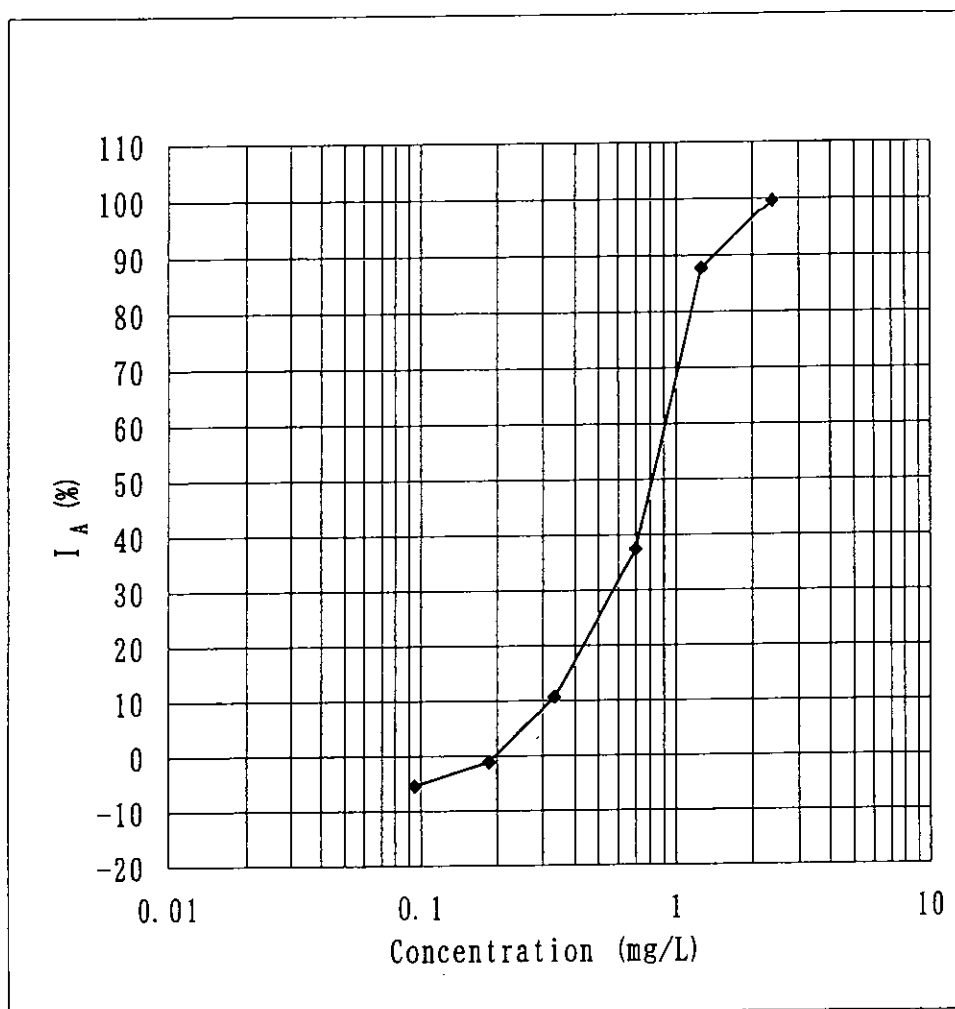
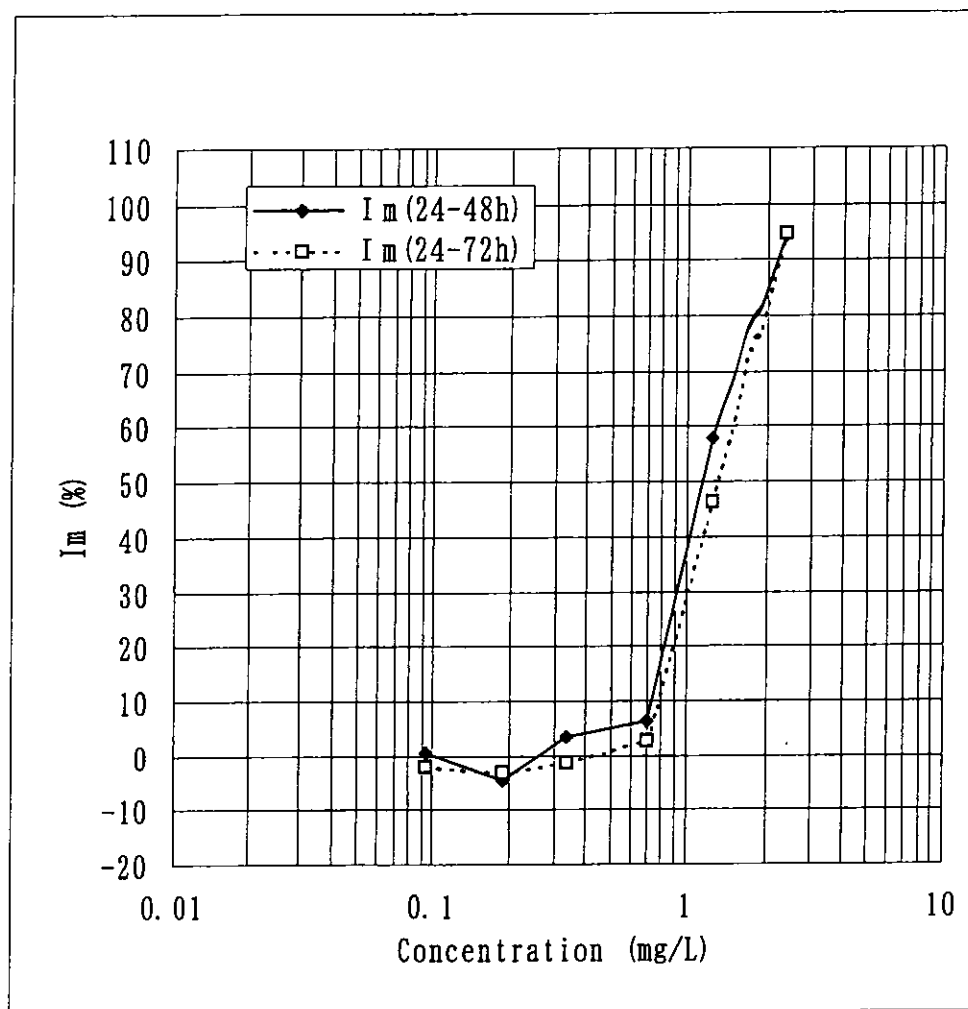


Figure 3 Concentration-Inhibition Curve Based on I_m values Calculated from the Growth Rates



付属資料－ 1

OECD 培地の組成

Table A-1 OECD medium

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

付属資料－ 2

試験液の調製

試験液の調製

1. 準備

① 被験物質原液Ⅰの調製

採取量	→	125	mg
溶媒	→	N,N-シメチルホルムアミド (比重をおおよそ1とする)	
最終容量	→	5	mL
容器	→	マスボトル	
濃度	→	25000	mg/L
混合方式	→	手で転倒攪拌(溶解容易), 密栓	

② 被験物質原液Ⅱの調製

原液Ⅰ採取量	→	100	μL
溶媒	→	試験用水(23±2℃にしたOECD推奨培地)	
最終容量	→	1000	mL
容器	→	マスフラスコ	
濃度	→	2.50	mg/L
助剤濃度	→	98	μL/L
混合方式	→	スターラーで攪拌しながら添加後, 超音波10分, 密栓	

③ 助剤原液の調製

助剤	→	N,N-シメチルホルムアミド	
採取量	→	198	μL
溶媒	→	試験用水(23±2℃にしたOECD推奨培地)	
最終容量	→	2000	mL
容器	→	マスフラスコ	
助剤濃度	→	98	μL/L
混合方式	→	スターラーで攪拌しながら添加後, 超音波10分, 密栓	

2. 試験液の調製

②, ③の各原液を下記の表の通り採取し, 添加, 混合して試験液とする。

試験用水(最終容量)	→	0.10	L
容器	→	300mL容ガラス製三角フラスコ(IWAKI製)	
混合方式	→	手で振とう攪拌, 通気性シリコン栓	
濃度公比	→	1.904	
1濃度区の数	→	3	

(以下の濃度表示は, 最小桁数に合わせている)

設定試験濃度 mg/L	区No. (略称)	②原液Ⅱ mL	③助剤原液 mL	助剤濃度 μL/L
対 照 区	C	→	0	0
助剤対照区	SC	→	0	100.000
0.100	Conc.1	→	4.000	96.000
0.190	Conc.2	→	7.600	92.400
0.360	Conc.3	→	14.400	85.600
0.690	Conc.4	→	27.600	72.400
1.300	Conc.5	→	52.000	48.000
2.500	Conc.6	→	100.000	0

付属資料－ 3

試験液および試験培養液の分析

1 試験液および試験培養液の分析方法

1) 各試験区3個の試験容器より試験液または試験培養液 2.0 mLずつを採取して 10 mL 容ガラス沈殿管で混合した。

暴露開始時はこれを分析試料とした。

暴露終了時はこれを遠心分離* (3000 rpm, 10分間) し、藻類を分離した上澄み液を分析試料とした。

なお、0.690 mg/L以上の濃度区は精製水で10倍希釈した。

*装置:日立工機製 CR 2 1 E型

2) アセトニトリルで調製した標準溶液 1.0 mLを測定用バイアルに採取し、精製水を等量添加し混合後、HPLCにより分析した。クロマトグラムをFigure A-3-2 (1), (7)に示した。

3) 各分析試料 1.0 mLを測定用バイアルに採取し、アセトニトリルを等量添加し混合後、HPLCにより分析した。代表的なクロマトグラムをFigure A-3-2 (2), (3), (4), (5), (6), (8), (9), (10), (11), (12)に示した。

4) 各試験液および試験培養液の被験物質濃度は、各分析時に測定した標準溶液のピーク面積を用いて、一点検量法により定量した。

なお、暴露開始前に試験濃度範囲の全域にわたって検量線を作成し、直線性を確認している。(「3 検量線」参照)

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 (HPLC) :

Agilent 1100 型 カラムスイッチング装置付 (No2)

ワークステーション: Agilent 1100 シリーズワークステーション (Windows NT)

デガッサ: G1322A型

送液ポンプ: G1311A型 (クォータリポンプ, 分析用)

G1311A型 (クォータリポンプ, 濃縮用)

オートサンプラ: G1313A型

カラムオープン: G1316A型 (カラムスイッチングバルブ)

フォトダイオードアレイ検出器: G1315B型

(条件)

カラム: 分析用 GLサイエンス製 Inertsil ODS-3V 5 μ m 4.6mm i.d. \times 150mm

濃縮用 GLサイエンス製 Inertsil ODS-3 5 μ m 4.0mm i.d. \times 10mm

カラムオープン: 40 $^{\circ}$ C

溶離液: 分析用 0.1% 酸水溶液 / アセトニトリル = 25 / 75 (v/v)

濃縮用 0.1% 酸水溶液 / アセトニトリル = 70 / 30 (v/v)

流速: 分析用 1.0 mL/min

濃縮用 0 ~ 3 min 2.5 mL/min

3 ~ 8 min 0.05 mL/min

8 ~ 12 min 2.5 mL/min

カラムスイッチングバルブ: 0min (濃縮側), 3min (分析側), 8min (濃縮側)

測定波長: 267nm

試料注入量: 1600 μ L

3 検量線

アセトニトリルを用い, 0.00500 ~ 0.500 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等量の精製水で希釈したものをHPLCで測定した。横軸に濃度 (mg/L) を, 縦軸にピーク面積 (count) をとり, 検量線を作成した。検量線の最小二乗法による直線回帰式の相関係数は 1.00 と良好であった。作成した検量線を Figure A-3-1 に示した。

4 検出限界

最小検出ピーク面積を 0.1 count に設定し, これに相当する試験液または試験培養液中の被験物質濃度 0.00005 mg/L を検出限界とした。

5 添加回収試験

分析前処理は、「1 試験液および試験培養液の分析方法」に示したように試験液または試験培養液とアセトニトリルを混合する操作だけであるので添加回収試験の必要はなかった。したがって、回収率の補正は行わなかった。

Figure A-3-1 Calibration curve

No	Concentration (mg/L)	Peak Area (count)
1	0	0
2	0.00500	10.8
3	0.0100	21.2
4	0.0200	42.4
5	0.0500	108.9
6	0.100	209.9
7	0.200	434.1
8	0.500	1072.3

$$Y = 2,147X$$

$$r = 1.00$$

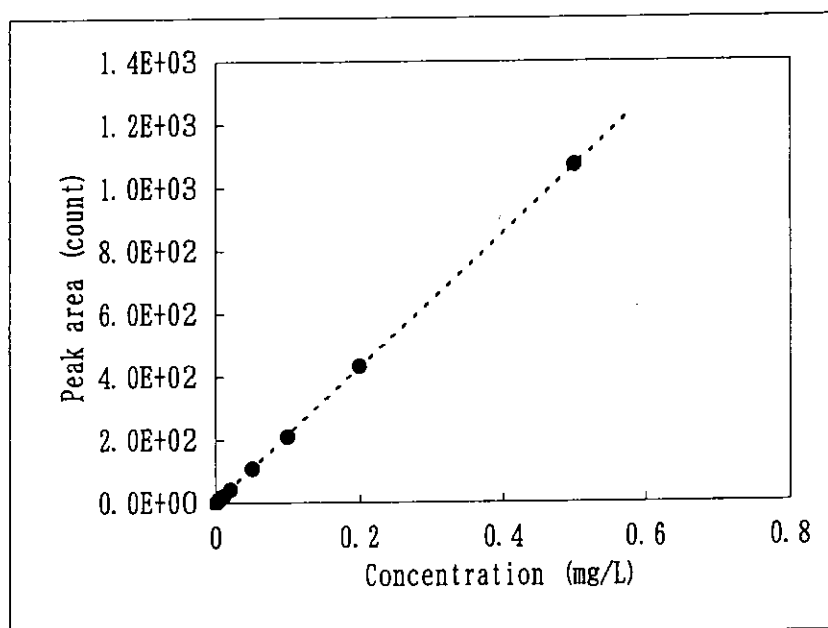
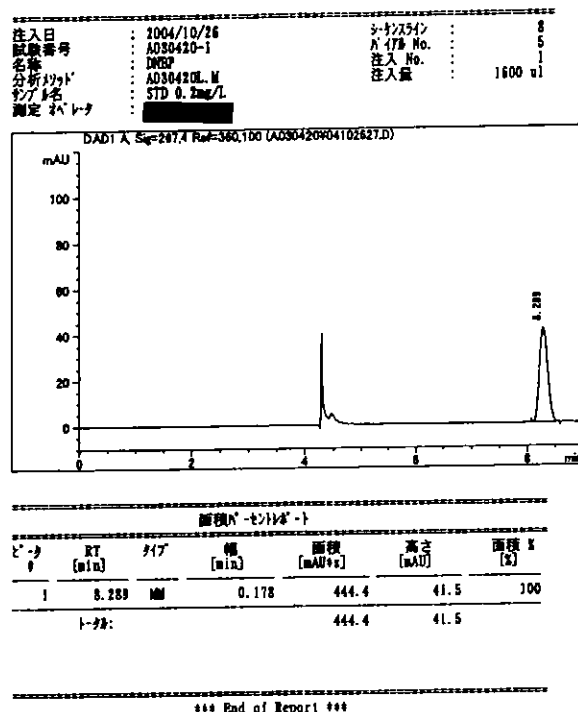


Figure A-3-2 Representative chromatograms

(1) Standard 0.200 mg/L ; 0 Hour



(2) Control ; 0 Hour

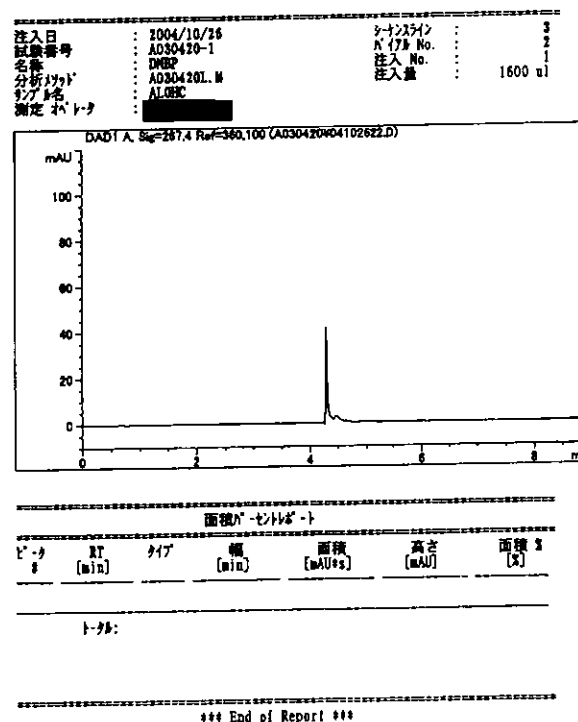
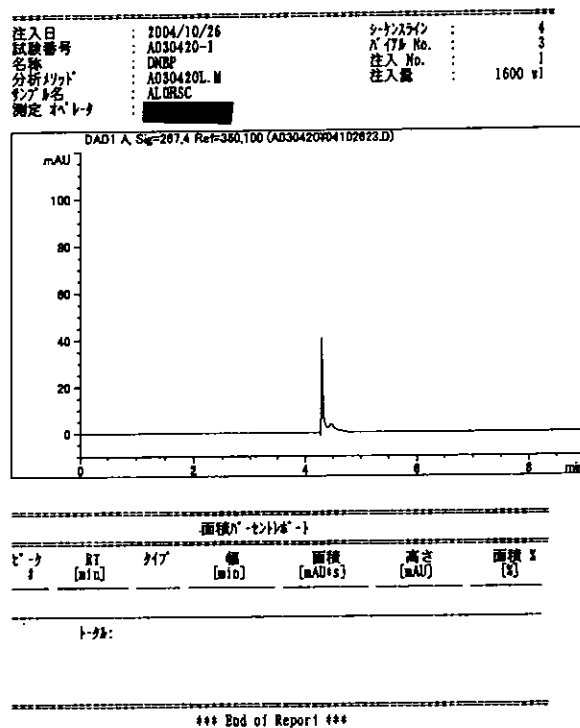


Figure A-3-2 Continued

(3) Solvent control ; 0 Hour



(4) 0.100 mg/L nominal ; 0 Hour

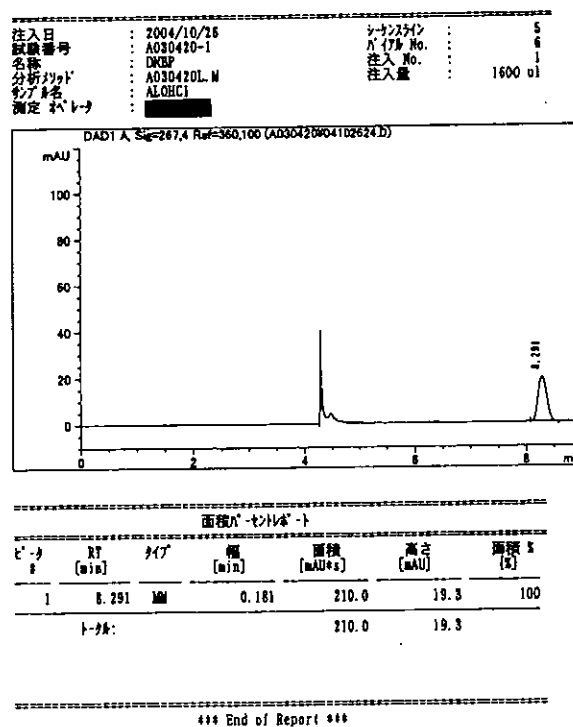
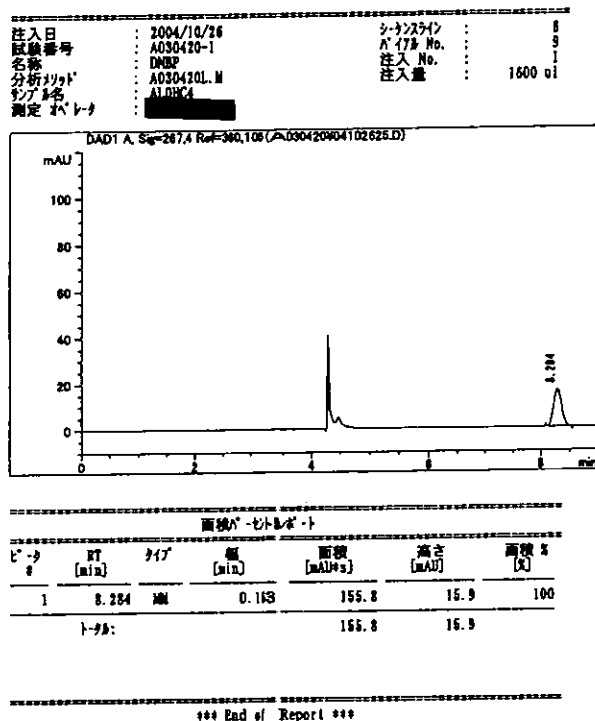


Figure A-3-2 Continued

(5) 0.690 mg/L nominal ; 0 Hour



(6) 2.50 mg/L nominal ; 0 Hour

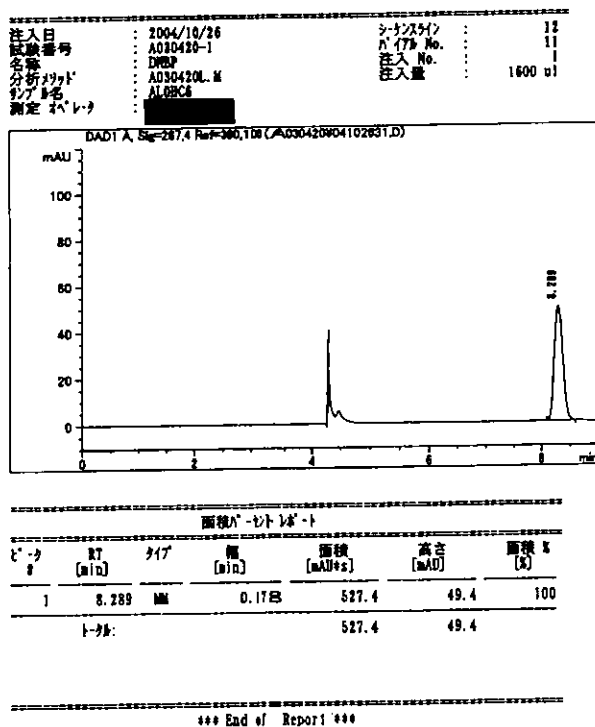
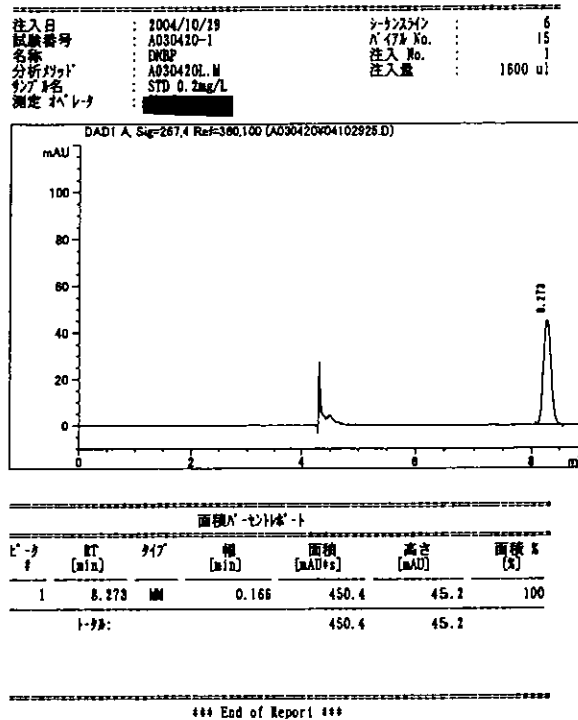


Figure A-3-2 Continued

(7) Standard 0.200 mg/L ; 72 Hours



(8) Control ; 72 Hours

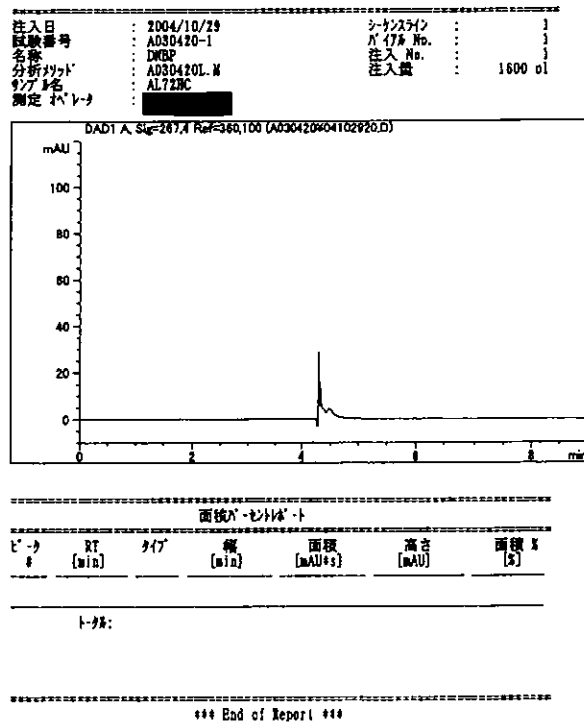
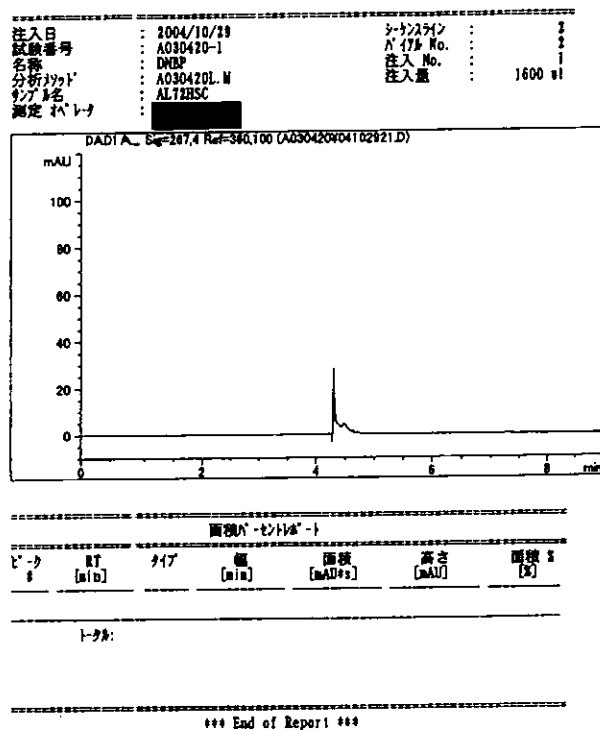


Figure A-3-2 Continued

(9) Solvent control ; 72 Hours



(10) 0.100 mg/L nominal ; 72 Hours

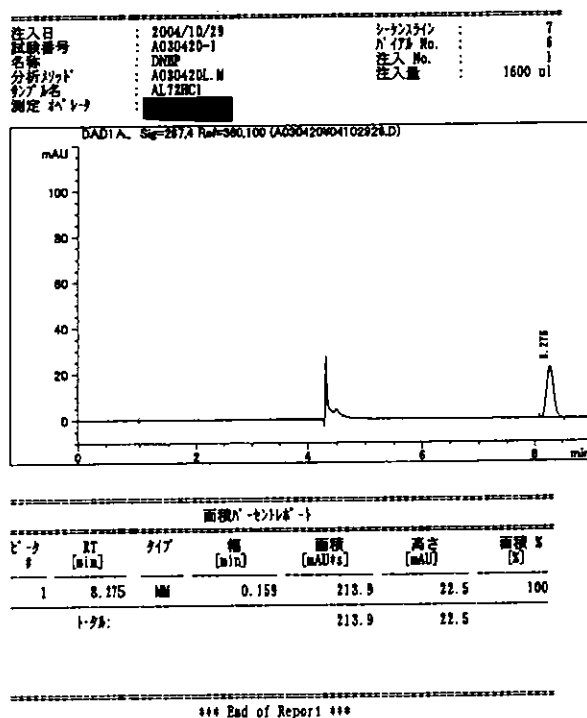
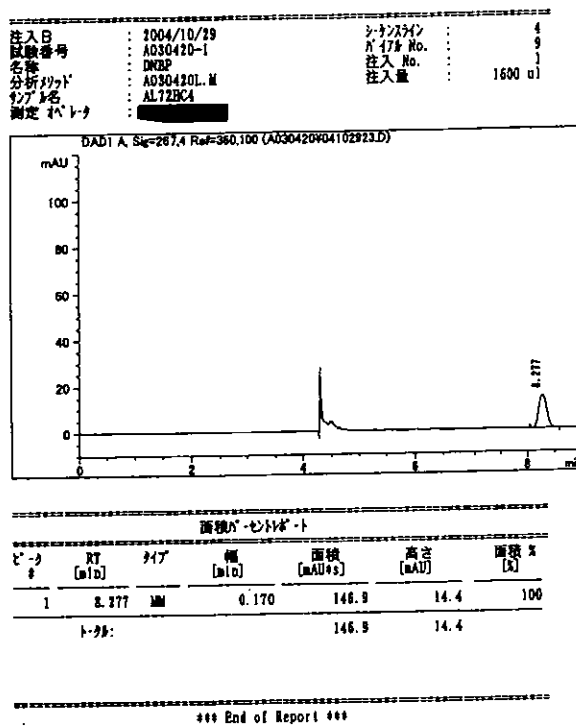
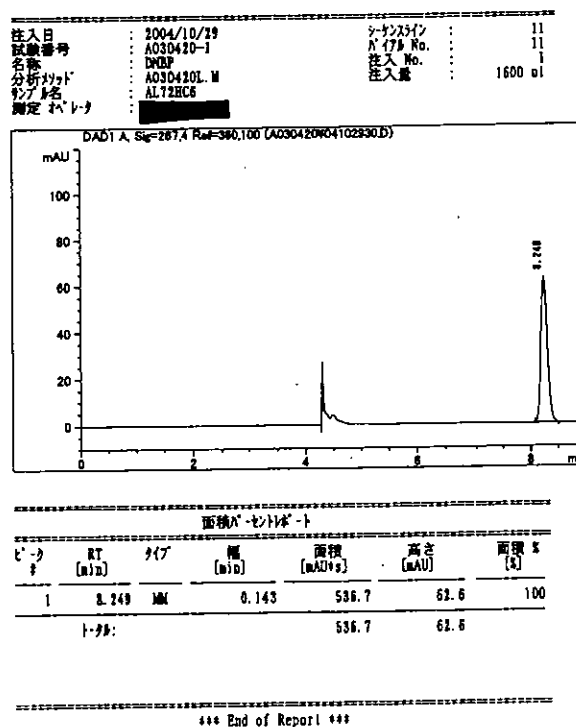


Figure A-3-2 Continued

(11) 0.690 mg/L nominal ; 72 Hours



(12) 2.50 mg/L nominal ; 72 Hours



付属資料一 4

結果の算出

Table A-4-1 Calculation of the EC50

(1) EbC50 (0-72h)

直線回帰分析 (EC50値の算出)

濃度 (mg/L)		阻害率 (%)
x	log (x)	y
0.701	-0.36	37.4
1.27	0.24	87.9

EC ₅₀	95%信頼区間	単位
0.813	#NUM! ~ #NUM!	(mg/L)

分散分析

Factor	SS	DF	V	F-ratio	f (0.05, f1, f2)
Between	1275.13	1	1275.13	#DIV/0!	#NUM!
Within	0.00	0	#DIV/0!		
Total	1275.13	1			

Table A-4-1 Continued

(2) ErC50 (24-48h)

直線回帰分析 (E C 50値の算出)

濃度 (mg/L)	阻害率 (%)	
x	log (x)	y
0.701	-0.36	6.4
1.27	0.24	57.9

EC ₅₀	95%信頼区間		単位
1.16	#NUM!	~ #NUM!	(mg/L)

分散分析

Factor	SS	DF	V	F-ratio	f (0.05, f1, f2)
Between	1326.13	1	1326.13	#DIV/0!	#NUM!
Within	0.00	0	#DIV/0!		
Total	1326.13	1			

Table A-4-1 Continued

(3) ErC50 (24-72h)

直線回帰分析 (E C50値の算出)

濃度 (mg/L)	阻害率 (%)	
x	log (x)	y
0.701	-0.36	2.7
1.27	0.24	46.3
2.37	0.86	95.0

EC ₅₀	95%信頼区間		単位
1.32	1.18	~ 1.47	(mg/L)

分散分析

Factor	SS	DF	V	F-ratio	f (0.05, f1, f2)
Between	4262.62	1	4262.62	3135.05	>161.45
Within	1.36	1	1.36		
Total	4263.98	2			

Table A-4-2 Calculation of the NOEC

(1) NOECb (0-72h)

Input Data Table

Sol. cont. Group1	Conc. 1 Group2	Conc. 2 Group3	Conc. 3 Group4	Conc. 4 Group5	Conc. 5 Group6	Conc. 6 Group7
5065.9	5155.7	4592.2	4140.0	3064.6	562.6	16.2
5065.2	5451.1	4878.2	4078.1	3075.8	571.0	22.1
4363.7	4652.9	5184.5	4747.2	2936.6	622.8	21.7

Group	Samples	Mean	S. E.	S. D.	Variance		
1	3	4,831.6000	233.9501	405.2134	164,197.9300		
2	3	5,086.5667	232.9988	403.5658	162,865.3733		
3	3	4,884.9667	171.0158	296.2080	87,739.1633		
4	3	4,321.7667	213.4659	369.7337	136,703.0433		
5	3	3,025.6667	44.6505	77.3370	5,981.0133		
6	3	585.4667	18.8235	32.6033	1,062.9733		
7	3	20.0000	1.9035	3.2970	10.8700		
Method Bartlett test	vs	Side 0	Stat. 23.0867	0.05 12.5916	0.01 >16.8119	0.001 22.4577	Prob. 0.00076796
Conc. 6を除く Method Bartlett test	vs	Side 0	Stat. 9.6541	0.05 11.0705	0.01 <15.0863	0.001 20.5152	Prob. 0.0856
Method 1-way ANOVA	vs	Side 0	Stat. 97.3298	0.05 >3.1059	0.01 5.0643	0.001 8.8921	Prob. 2.7604E-09
Method Williams (1971, 1972, 1977)	1 vs 2	Side 2	Stat. 0	0.05 2.1790	0.01 3.0550	0.001 999.9900	Prob. 999.9900
Williams (1971, 1972, 1977)	1 vs 3	2	0.2975	2.2580	3.1180	999.9900	999.9900
Williams (1971, 1972, 1977)	1 vs 4	2	2.5583	>2.2840	3.1380	999.9900	999.9900 *
Williams (1971, 1972, 1977)	1 vs 5	2	7.7610	>2.2970	>3.1470	999.9900	999.9900 **
Williams (1971, 1972, 1977)	1 vs 6	2	17.5562	>2.3040	>3.1520	999.9900	999.9900 **

Table A-4-2 Continued

(2) NOECr (24-48h)

Input Data Table

Sol. cont. Group1	Conc. 1 Group2	Conc. 2 Group3	Conc. 3 Group4	Conc. 4 Group5	Conc. 5 Group6	Conc. 6 Group7
0.0846	0.0841	0.0867	0.0799	0.0797	0.0345	0.0047
0.0837	0.0849	0.0870	0.0808	0.0800	0.0328	0.0066
0.0858	0.0840	0.0916	0.0845	0.0783	0.0397	0.0032

Group	Samples	Mean	S. E.	S. D.	Variance		
1	3	0.0847	0.0006	0.0011	0.0000		
2	3	0.0843	0.0003	0.0005	0.0000		
3	3	0.0884	0.0016	0.0027	0.0000		
4	3	0.0817	0.0014	0.0024	0.0000		
5	3	0.0793	0.0005	0.0009	0.0000		
6	3	0.0357	0.0021	0.0036	0.0000		
7	3	0.0048	0.0010	0.0017	0.0000		
Method	vs	Side	Stat.	0.05	0.01	0.001	Prob.
Bartlett test		0	7.7311	12.5916	<16.8119	22.4577	0.2585
Method	vs	Side	Stat.	0.05	0.01	0.001	Prob.
1-way ANOVA		0	3.228.9705	>3.8660	7.1914	15.5208	1.10749E-11
Method	vs	Side	Stat.	0.05	0.01	0.001	Prob.
Dunnnett	1 vs 2	2	0.2117	2.9124	3.7633	999.9900	0.9999
Dunnnett	1 vs 3	2	2.1558	2.9124	3.7633	999.9900	0.1899
Dunnnett	1 vs 4	2	1.7131	2.9124	3.7633	999.9900	0.3742
Dunnnett	1 vs 5	2	3.0989	>2.9124	3.7633	999.9900	0.0353 *
Dunnnett	1 vs 6	2	28.3139	>2.9124	>3.7633	999.9900	1.37076E-06 **
Dunnnett	1 vs 7	2	46.1184	>2.9124	>3.7633	999.9900	1.37076E-06 **

Table A-4-2 Continued

(3) NOECr (24-72h)

Input Data Table

Sol. cont. Group1	Conc. 1 Group2	Conc. 2 Group3	Conc. 3 Group4	Conc. 4 Group5	Conc. 5 Group6	Conc. 6 Group7
0.0796	0.0800	0.0788	0.0772	0.0755	0.0396	0.0028
0.0782	0.0790	0.0795	0.0784	0.0757	0.0415	0.0049
0.0743	0.0777	0.0815	0.0799	0.0747	0.0436	0.0039

Group	Samples	Mean	S. E.	S. D.	Variance		
1	3	0.0774	0.0016	0.0027	0.0000		
2	3	0.0789	0.0007	0.0012	0.0000		
3	3	0.0799	0.0008	0.0014	0.0000		
4	3	0.0785	0.0008	0.0014	0.0000		
5	3	0.0753	0.0003	0.0005	0.0000		
6	3	0.0416	0.0012	0.0020	0.0000		
7	3	0.0039	0.0006	0.0011	0.0000		
Method	vs	Side	Stat.	0.05	0.01	0.001	Prob.
Bartlett test		0	4.7622	12.5916	<16.8119	22.4577	0.5747
Method	vs	Side	Stat.	0.05	0.01	0.001	Prob.
1-way ANOVA		0	986.6435	>2.8477	4.4558	7.4358	1.45377E-17
Method	vs	Side	Stat.	0.05	0.01	0.001	Prob.
Dunnett	1 vs 2	2	1.1694	2.9124	3.7633	999.9900	0.7122
Dunnett	1 vs 3	2	1.9574	2.9124	3.7633	999.9900	0.2607
Dunnett	1 vs 4	2	0.8643	2.9124	3.7633	999.9900	0.8890
Dunnett	1 vs 5	2	1.5761	2.9124	3.7633	999.9900	0.4506
Dunnett	1 vs 6	2	27.3023	>2.9124	>3.7633	999.9900	1.37076E-06 **
Dunnett	1 vs 7	2	56.0536	>2.9124	>3.7633	999.9900	1.37076E-06 **