

受理番号	E04-3517
試験番号	93517

## 最 終 報 告 書

チモールの*Pseudokirchneriella subcapitata*による藻類生長阻害試験

2005 年 10 月 12 日

新南陽  
化学物質評価研究機構  
水質汚濁研究所

# 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 環境省

試験の表題 チモールの*Pseudokirchneriella subcapitata*による藻類生長阻害試験

試験番号 93517

本最終報告書(写し)は、原本を正確にコピーしたものです。

2005年10月12日

運営管理者



## 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 環境省

試験の表題 チモールの*Pseudokirchneriella subcapitata*による藻類生長阻害試験

試験番号 93517

上記試験は以下の基準に従って実施したものです。

- (1) 「新規化学物質等に係る試験を実施する試験施設に関する基準について」  
(平成15年11月21日、薬食発第1121003号、平成15・11・17製局第3号、環保企発第031121004号)に規定する「新規化学物質等に係る試験を実施する試験施設に関する基準」
- (2) 「OECD Principles of Good Laboratory Practice」(November 26, 1997)

また、本最終報告書は生データを正確に反映しており、試験データが有効であることを確認しています。

2005年10月12日

試験責任者

## 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 環境省

試験の表題 チモールの *Pseudokirchneriella subcapitata* による藻類生長阻害試験

試験番号 93517

本最終報告書は、試験の方法、手順が正確に記載され、試験結果は生データを正確に反映していることを保証します。

なお、監査又は査察の結果については、下記の通り試験責任者及び運営管理者に報告しました。

監査又は査察内容	監査又は査察日	報告日 (試験責任者及び運営管理者)
試験計画書草案	2005年6月10日	2005年6月10日
試験計画書	2005年6月10日	2005年6月10日
試験計画書の変更	2005年6月13日	2005年6月13日
暴露開始時	2005年6月13日	2005年6月16日
暴露開始後	2005年6月16日	2005年6月16日
生データ、最終報告書草案	2005年10月5日	2005年10月5日
最終報告書	2005年10月12日	2005年10月12日

2005年10月12日

信頼性保証部門責任者

## 目 次

	頁
要 約	5
1. 表 題	6
2. 試験委託者	6
3. 試験施設	6
4. 試験目的	6
5. 試験法	6
6. 適用GLP	6
7. 試験日程	6
8. 試資料の保管	7
9. 試験関係者	7
10. 最終報告書の承認	7
11. 被験物質	8
12. 試験材料と方法	10
13. 試験結果及び考察	14
14. 試験成績の信頼性に影響を及ぼしたと思われる事項	16
Tables	
Table 1	pH of test solutions ..... 17
Table 2	Temperature and light intensity in incubator ..... 17
Table 3	Value of cell concentration at each time ..... 18
Table 4	Growth inhibition ..... 19
Table 5	EC50 and NOEC on each endpoint to <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> ..... 20
Table 6	Result of statistical analysis ..... 20
Figures	
Figure 1	Concentration-response curve based on parameter of growth rate ..... 21
Figure 2	Concentration-response curve based on parameter of area under growth curve ..... 22
Figure 3	Concentration-response curve based on parameter of yield ..... 23
Figure 4	Growth curve of <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> in each exposure level ..... 24
Appendix 1. Composition of medium	
Appendix 2. Method of analysis and result of measurement of test substance concentration	
Appendix 3. Calibration curve and chromatogram	
Additional data Results of preliminary tests	

## 要 約

チモールの*Pseudokirchneriella subcapitata*による藻類生長阻害試験

## &lt;試験条件&gt;

- ・被験物質：チモール
- ・試験生物：*Pseudokirchneriella subcapitata*
- ・暴露期間：72時間
- ・試験濃度：20.0、9.09、4.13、1.88及び0.854 mg/L(公比2.2)の5濃度区及び対照区
- ・試験方式：旋回振とう培養(約100回/分)
- ・試験液の調製：供試試料を培地に溶解し、吸引ろ過して調製した試験原液を用いて調製
- ・連 数：6連/対照区  
3連/濃度区
- ・試験液量：600 mL/対照区(100 mL×6試験容器)  
300 mL/濃度区(100 mL×3試験容器)
- ・培養温度：21~24℃(±2℃の変動幅)
- ・照 明：蛍光灯による照明[液面付近での光強度60~120  $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ (変動幅±20%)  
とする連続照明]
- ・生長の測定：細胞濃度
- ・試験液中の被験物質濃度の分析：HPLC法 (暴露開始時及び終了時)

## &lt;結 果&gt;

- ・被験物質濃度(対設定値)：暴露開始時 93.6~101%  
：暴露終了時 86.7~92.3%
- ・ $E_r C_{50}(0-3d)$ ：13.5 mg/L(95%信頼限界；算出不可)
- ・ $E_b C_{50}(0-72h)$ ：7.73 mg/L(95%信頼限界；4.84~12.4 mg/L)
- ・ $E_y C_{50}(0-72h)$ ：7.53 mg/L(95%信頼限界；算出不可)
- ・NOEC(生長速度0-3d)：1.88 mg/L
- ・NOEC(生長曲線下面積)：1.88 mg/L
- ・NOEC(収量法)：1.88 mg/L  
(上記濃度は、設定濃度に基づく値)

1. 表 題  
チモールの*Pseudokirchneriella subcapitata*による藻類生長阻害試験
2. 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 1-2-2
3. 試験施設  
名 称 財団法人 化学物質評価研究機構 久留米事業所  
所 在 地 (〒839-0801)福岡県久留米市宮ノ陣三丁目2番7号  
TEL (0942) 34-1500
4. 試験目的  
被験物質の藻類の生長に対する影響を調べる。
5. 試験法  
本試験は以下の試験法及びガイダンス文書に従って行った。  
(1) 「新規化学物質等に係る試験の方法について」(平成15年11月21日、薬食発第1121002号、平成15・11・13製局第2号、環保企発第031121002号)に規定する<藻類生長阻害試験>  
(2) 「OECD Guidelines for Testing of Chemicals」に定める “Alga, Growth Inhibition Test (Guideline 201, 1984)”  
(3) 「OECD Guidance Document 23 “Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substance and Mixtures”」(September 2000)  
また、「OECD Guidelines for Testing of Chemicals」のDraft Guideline 201(April 2004)を一部参考にした。
6. 適用GLP  
本試験は以下の基準を適用した。  
(1) 「新規化学物質等に係る試験を実施する試験施設に関する基準について」(平成15年11月21日、薬食発第1121003号、平成15・11・17製局第3号、環保企発第031121004号)に規定する「新規化学物質等に係る試験を実施する試験施設に関する基準」  
(2) 「OECD Principles of Good Laboratory Practice」(November 26, 1997)
7. 試験日程
  - 1) 試験開始日 2005年 6月 10日
  - 2) 実験開始日 2005年 6月 13日
  - 3) 実験終了日 2005年 6月 16日
  - 4) 試験終了日 2005年 10月 12日

## 8. 試資料の保管

## 1) 被験物質

供試試料\*を保管用容器に入れ密栓後、最終報告書作成後10年間、久留米事業所試料保管室に保管する。保管期間経過後の処置は試験委託者と協議の上決定する。ただし、保管中に品質が著しく変化する物質の保管期間は、その品質が保管に耐えうる期間とし、廃棄に際しては試験委託者の承認を得る。

\* 試験番号93517、93518、93519及び93520についての共用保管試料とする。

## 2) 生データ、資料等

生データ、試験計画書、その他必要な資料等は最終報告書と共に、最終報告書作成後10年間、久留米事業所資料保管室に保管する。保管期間終了後の取扱いについては、保管期間終了前に試験委託者と協議する。

## 9. 試験関係者

試験責任者

[Redacted]  
所属 試験第四課

生物試験担当者

[Redacted] [Redacted] [Redacted]

分析担当者

[Redacted] [Redacted] [Redacted]

## 10. 最終報告書の承認

試験責任者

2005年10月12日

氏名

[Redacted]

## 11. 被験物質

最終報告書においてチモールは次の名称などを有するものとする。供給者提供資料等による被験物質及び供試試料情報を以下に示す。

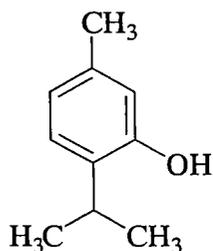
## 11.1 被験物質

## 1) 名称

チモール

## 2) 構造式等

## (1) 構造式



## (2) 分子式

$C_{10}H_{14}O$

## (3) 分子量

150.22<sup>\*5</sup>

## (4) CAS番号

89-83-8

## 3) 物理化学的性質等

## (1) 外観

白色微細結晶<sup>\*1</sup>

## (2) 融点

51.4°C<sup>\*1</sup>

## (3) 沸点

233.5°C<sup>\*2,\*3</sup>

## (4) 蒸気圧

1 mmHg at 64°C<sup>\*2</sup>、2.5 hPa at 50°C<sup>\*2</sup>、10 mmHg at 107°C<sup>\*2</sup>、100 mmHg at 164°C<sup>\*2</sup>

## (5) 比重

0.969 at 20/4°C<sup>\*2</sup>

## (6) 溶解度

水 1 g/L<sup>\*4</sup>

エタノール、クロロホルム、ジエチルエーテル、オリーブ油、氷酢酸に溶解<sup>\*4</sup>

- (7) 分配係数  
3.30(計算値)<sup>\*2</sup>
- (8) 安定性  
光によって変化する。<sup>\*3</sup>

## 11.2 供試試料

- 1) ロット番号  
CEH0126<sup>\*1</sup>
- 2) 純度  
100.0%(毛管カラムGC)<sup>\*1</sup>

## 情報源

- \*1：供給者提供の添付資料( [REDACTED] 検査成績書より)
- \*2：Karel Verschueren “Handbook of Environmental Data on Organic Chemicals” 4<sup>th</sup> Ed.
- \*3：化学大辞典編集委員会編「化学大辞典」(共立出版) 1960.
- \*4：Richardson, M.L.et al “The Dictionary of Substances and their Effects” Royal Society of Chemistry, 1993.
- \*5：日本化学会 原子量表(2003)を用いて算出した値
- 3) 入手先  
独立行政法人 国立環境研究所 化学物質環境リスク研究センター(供給者：  
[REDACTED])
- 4) 被験物質の確認  
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。
- 5) 保管条件及び保管条件下での安定性の確認
- (1) 保管条件  
試験中の被験物質は室温暗所で保管した。
- (2) 安定性の確認  
実験開始前及び終了後に測定した被験物質の赤外吸収スペクトルに変化がなかったことから、実験期間中の被験物質が安定であったことを確認した。

## 12. 試験材料と方法

## 1) 試験生物

## (1) 種

*Pseudokirchneriella subcapitata* (ATCC 22662)  
(旧学名：*Selenastrum capricornutum*)

## (2) 生物種選択の理由

テストガイドラインに推奨されている種類である。

## (3) 供給源

American Type Culture Collection (12301 Parklawn Drive Rockville, Maryland 20852-1776 U.S.A.) より 1995年6月30日に入手した *Pseudokirchneriella subcapitata* で久留米事業所で継代培養しているものを用いた。また、試験系の再現性を確認するために実施(2005年4月11日～4月14日に実施)した試験生物によるニクロム酸カリウム(試薬特級、和光純薬工業製)の  $E_6C50(0-72h)$  及び  $E_7C50(0-3d)$  はそれぞれ 0.524 及び 1.83 mg/L であった[バックグラウンドデータ： $E_6C50(0-72h)$  及び  $E_7C50(0-3d)$  の平均±標準偏差はそれぞれ  $0.408 \pm 0.079$  及び  $1.12 \pm 0.44$  mg/L、 $n=10$ (但し、2005年4月11日～4月14日に実施分データを含む)。また、 $E_7C50(0-3d)$  は外挿値を含む]。

## 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の Draft Guideline 201(April 2004) に示されている培地を用いた。培地の組成を Appendix 1 に示す。培地は滅菌したものを用いた。

## 3) 試験器具及び装置

## (1) 試験器具

試験容器： 滅菌した 500 mL 容ガラス製三角フラスコ  
(通気性のシリコセン®付)

## (2) 試験装置

培養装置： 温度維持、連続照明及び連続振とう培養が可能で、一定の光強度を維持可能な装置(低温恒温槽付回転式振とう培養機、TB-C-50RL、高崎科学器械製)を用いた。

## 4) 試験条件

## (1) 暴露条件

## ① 方式

被験物質を含む試験液へ試験生物を暴露し、旋回振とう培養(約100回/分)を行った。

## ② 期間

72時間

## ③ 試験濃度

試験は 20.0、9.09、4.13、1.88 及び 0.854 mg/L(公比 2.2) の 5 濃度区で行った。試験濃度及び公比は予備試験結果から決定した。予備試験結果を Additional data に示す。なお、被験物質の純度は 100.0% であるため、純度補正は行わなかった。

- ④連 数  
6連／対照区  
3連／濃度区

- ⑤対 照 群  
被験物質を含まない培地に試験原液と同様の調製処理をした対照区を設けた。

- ⑥暴露開始時の細胞数  
保存培養から前培養用培地に植えつぎ、試験と同じ条件下で3日間培養し、対数増殖期の細胞を含んだ藻類培養液(前培養液)を $10^4$  cells/mLになるように試験液に接種した。

- ⑦試 験 操 作  
無菌操作により実施した。

- ⑧試 験 液 量  
600 mL／対照区(100 mL×6試験容器)  
300 mL／濃度区(100 mL×3試験容器)

(2) 環 境 条 件

- ①温 度  
21～24℃(±2℃の変動幅)

- ②照 明  
400～700 nmのスペクトル幅をもつ蛍光灯を用い、液面付近での光強度を  
60～120  $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}^*$ (変動幅±20%)とする連続照明  
\*<sup>1</sup> 120  $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s} = 0.72 \times 10^{20}$  photons/ $\text{m}^2/\text{s}$

5) 試験液の調製法

被験物質の純度が100.0%であるため、試験原液調製時に純度補正は行わなかった。

必要量の供試試料を秤量し、培地に添加後、約1時間攪拌して溶解し、100 mg/Lの溶液を調製した。この溶液をメンブレンフィルター0.22  $\mu\text{m}$ (日本ミリポア株式会社製)で吸引ろ過したろ液を試験原液とした。調製容器に必要な量の試験原液と培地\*<sup>2</sup>を混合し、攪拌して調製し、各試験容器に分割した。

各試験区の試験原液濃度及び調製量に対する試験原液添加量を以下に示す。

試験区(mg/L)	試験原液濃度(mg/L)	試験原液添加量(mL/400 mL)
対照区	—	—
0.854	100	3.416
1.88		7.52
4.13		16.52
9.09		36.36
20.0		80.0

\*<sup>2</sup> 試験原液と同様の調製処理をした培地

## 6) 観察と測定

## (1) 藻類の生長等

暴露開始後24時間毎に72時間まで細胞濃度を粒子計数装置(コールターカウンター Z1型、ベックマン・コールター製)により計数した。その際、試験液のバックグラウンドを測定するため、培地について同時に測定し、ブランク補正を行った。また、暴露終了時には各試験区につき1試験容器について細胞の状態を生物顕微鏡(BX41、オリンパス製)を用いて観察した。

## (2) 試験液の状態

試験液の状態を暴露開始時及び終了時に観察した。

## (3) 水質及び暴露環境

試験液のpHを暴露開始時と終了時に測定した。暴露開始時は別途分取した試験液について測定し、暴露終了時には各試験区につき1試験容器を測定した。培養装置内の温度、光強度を暴露期間中1日1回測定した。pHはガラス電極式水素イオン濃度計(HM-14P型、東亜ディーケーケー製)、温度は検定済ガラス製棒状温度計、光強度はポータブル光量子計(QSL-100、Biospherical Instruments製)で測定した。

## (4) 試験液中の被験物質濃度

試験液中の被験物質濃度の測定は暴露開始時及び終了時に行った。暴露開始時の測定用試験液は調製容器から採水した。暴露終了時の測定用試験液は各試験区の試験容器から試験液をそれぞれ等量採取し混合後、遠心分離(3,000 rpmで10分間)により藻体を除去した。被験物質濃度の分析は高速液体クロマトグラフィー(HPLC)により行った。被験物質濃度の分析方法及び測定結果をAppendix 2、検量線及びクロマトグラムをAppendix 3に示す。

## 7) 結果の算出

暴露期間中に測定した試験液中の被験物質濃度が試験設定濃度の±20%以内であったため、結果の算出には設定濃度を用いた。

## (1) 濃度－阻害率の算定法

各試験区の細胞数の平均値を時間に対してプロットし、生長曲線を作成した。この曲線を用い、生長曲線下面積及び生長速度を比較して各濃度区での阻害率を算出した。

## ①生長速度の比較(速度法)

指数関数的に増殖しているときの生長速度は次式に従って計算した。

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

ここで

$\mu_{i-j}$  =  $t_i$  時から  $t_j$  時までの期間の生長速度。通常、日当たり( $d^{-1}$ )で表す。

$N_i$  =  $t_i$  時の実測細胞濃度(cells/mL)。試験開始時( $t_0$ )の細胞濃度については設定値を用いた。

$N_j$  =  $t_j$  時の実測細胞濃度(cells/mL)

$t_i$  = 暴露開始後*i*回目に細胞濃度を測定した時間( $d$ )

$t_j$  = 暴露開始後*j*回目に細胞濃度を測定した時間( $d$ )

EC50を算出する場合は、暴露開始時から72時間後までの暴露期間を通じた生長速度を求めた。対照群については、試験の有効性を調べるために1日ごとの生長速度を求めた。

各濃度区における阻害百分率( $I_{\mu}$ )は対照群の平均生長速度( $\mu_c$ )と各濃度区での生長速度( $\mu_t$ )との間の差として次のように計算した。

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

### ② 生長曲線下面積の比較(面積法)

生長曲線下面積を次式に従って計算した。

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

ここで

$A$  = 生長曲線下面積

$N_0$  = 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

$t_n$  = 暴露開始後n回目に細胞濃度を測定した時間

各濃度区における阻害百分率( $I_A$ )は対照群の平均生長曲線下面積( $A_c$ )と各濃度区での生長曲線下面積( $A_t$ )との間の差として次のように計算した。

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

### ③ 収量(Yield)の比較(収量法)

収量とは暴露終了時の生物量から暴露開始時の生物量を差し引いたものである。通常、生物量は乾重量によって表わされるが、代替測定パラメータと乾重量に相関性が認められる場合は代替測定パラメータで表してもよいことになっている。以下の式に示すように、細胞濃度において相関性が認められたため、生物量及び収量は乾重量ではなく細胞濃度で表した。

$$\left( \begin{array}{l} \text{<相関式>} \\ y = 1.25x \\ y = \text{乾重量(mg/L)}, x = \text{細胞濃度}(10^5 \text{ cells/mL}) \end{array} \right)$$

収量( $Y_i$ )は次のように計算した。

$$Y_i = B_e - B_s$$

ここで

$B_e$  = 暴露終了時の生物量(cells/mL)

$B_s$  = 暴露開始時の生物量[設定細胞濃度(cells/mL)]

各濃度区における阻害百分率( $I_y$ )は対照群の平均収量( $Y_c$ )と各濃度区での収量( $Y_t$ )との間の差として次のように計算した。

$$I_y = \frac{Y_c - Y_t}{Y_c} \times 100$$

(2) EC50\*<sup>1</sup>の算出法

各濃度区に対応する阻害率を片対数グラフにプロットし、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(可能な場合その95%信頼限界)を算出した。その際、生長速度により求めた場合は $E_r$ C50(0-3d)、生長曲線下面積により求めた場合は $E_b$ C50(0-72h)、収量により求めた場合は $E_y$ C50と記載した。

\*<sup>1</sup> EC50(Median Effective Concentration)：暴露期間において試験生物の生長を50%阻害する被験物質濃度を示す。

(3) 最大無影響濃度(NOEC\*<sup>2</sup>)の算出

各生長指標について、Bartlett法による等分散検定を行った後、各濃度区と対照群との有意差の有無を一元配置分散分析及びSchefféの多重比較法により求めた。ただし、各指標におけるEC50より高い濃度区は、有意差検定には使用しなかった。これらの有意差検定結果に加え、試験結果全体を考慮し、NOECを評価した。

\*<sup>2</sup> NOEC(No Observed Effect Concentration)：暴露期間において試験生物の生長に影響が認められない試験最高濃度を示す。

8) 有効性基準

- (1) 対照群における藻類の生長は72時間後に16倍以上でなければならない。
- (2) 対照群における毎日の生長速度の変動係数が暴露期間を通じて35%を超えてはならない。
- (3) 対照群における繰り返し間の生長速度の変動係数が7%を超えてはならない。

9) 数値の取扱い

数値の丸め方は、JIS Z 8401 規則Bによった。

13. 試験結果及び考察

1) 試験液の観察と測定結果

(1) 試験液の状態

暴露開始時は無色透明であった。暴露終了時には20.0 mg/L区では状態は変わらず、細胞の増殖により9.09 mg/L区でやや薄い緑色、4.13~0.854 mg/L区では緑色を呈していた。

対照群では暴露開始時は無色透明であり、暴露終了時には細胞の増殖により緑色を呈していた。

(2) 試験液の水質及び暴露環境

試験液のpHは暴露開始時では7.8~7.9、暴露終了時では7.7~7.9であった。培養装置内の温度は23.2~23.6℃、光強度は104~116  $\mu$ E/m<sup>2</sup>/sであった。試験液のpHの測定結果をTable 1、培養装置内の温度及び光強度の測定結果をTable 2に示す。

- (3) 試験液中の被験物質濃度  
測定した試験液中の被験物質濃度は暴露開始時では設定値に対して93.6～101%、暴露終了時では86.7～92.3%であり、設定濃度の±20%以内に保たれていた。被験物質濃度の測定結果をAppendix 2に示す。
- 2) EC50  
生長速度、生長曲線下面積及び収量によって算出したチモールの $E_r$ EC50(0-3d)、 $E_b$ EC50(0-72h)及び $E_y$ EC50は、それぞれ13.5(95%信頼限界：算出不可)、7.73(95%信頼限界：0.945～1.49 mg/L)及び7.53 mg/L(95%信頼限界：算出不可)であった。各時間での細胞数をTable 3、生長阻害率をTable 4、各指標でのEC50をTable 5に示す。また、各指標における濃度－生長阻害率曲線をFigure 1、2及び3に示す。
- 3) 各試験区での生長曲線、細胞観察結果及びNOEC  
20.0 mg/L区では暴露期間を通して生長は抑えられていた。9.09 mg/L区では阻害が認められたものの対数増殖を示した。4.13 mg/L区では対照区に近い生長を示し、1.88及び0.854 mg/L区では対照群と同様の生長を示した。  
以下の細胞観察結果は全て対照群との比較に基づくものである。20.0 mg/L区においては、ほとんどの細胞が膨張しており、9.09 mg/L区では、やや膨張した細胞がやや多く観察された。その他の濃度区では対照群と同様であった。  
有意差検定結果及び上記細胞観察結果より、生長速度、生長曲線下面積及び収量法におけるNOECはいずれも1.88 mg/Lであった。NOECをTable 5、有意差検定結果をTable 6、生長曲線をFigure 4に示す。
- 4) 試験の有効性
- (1) 対照群における生長  
対照群における供試藻類の生長は暴露終了時まで対数増殖を示した。暴露終了時には初期細胞数の114倍以上に増殖し、有効性基準(16倍以上の増殖)を満たしていた。
- (2) 対照群における日間生長速度  
対照群における毎日の平均生長速度は0-1日間では1.61、1-2日間では1.78、2-3日間では1.40であり、日間の生長速度の平均及び標準偏差は $1.60 \pm 0.19$ であった。これより算出された変動係数は11.9%であり、有効性基準(35%を超えてはならない)を満たしていた。
- (3) 対照群における繰り返し間の生長速度  
対照群における繰り返し間の生長速度の平均及び標準偏差は0-1日間では $1.61 \pm 0.02$ 、1-2日間では $1.78 \pm 0.10$ 、2-3日間では $1.40 \pm 0.08$ であった。これらより算出された変動係数はそれぞれ1.19、5.39及び5.63%であり、有効性基準(7%を超えてはならない)を満たしていた。

## 5) 考 察

本試験は被験物質の培地への溶解濃度以下での試験生物に対するEC50を求める試験として行った。試験液中の被験物質濃度は設定濃度の $\pm 20\%$ 以内に保たれ、また、試験環境条件も適切な範囲内であったことから、本試験は試験法に準じたものであったと判断される。

14. 試験成績の信頼性に影響を及ぼしたと思われる事項  
当該事項はなかった。

Table 1. pH of test solutions

Nominal concentration	pH	
	At the start	At the end
Control	7.8	7.7
0.854	7.8	7.8
1.88	7.8	7.8
4.13	7.8	7.8
9.09	7.8	7.9
20.0	7.9	7.9

Table 2. Temperature and light intensity in incubator

Exposure duration	At the start	1-day	2-day	At the end
Temperature(°C)	23.6	23.6	23.6	23.2
Light intensity( $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ )	116	106	104	107

Table 3. Value of cell concentration at each time

Nominal concentration (mg/L)	Rep.	Cell concentration ( $\times 10^4$ cells/mL)			
		0 hour <sup>a</sup>	24 hours	48 hours	72 hours
Control	A	1.00	5.07	32.5	121
	B	1.00	5.09	34.3	130
	C	1.00	4.92	28.7	131
	D	1.00	5.11	26.1	114
	E	1.00	4.92	28.2	114
	F	1.00	4.91	29.5	118
	Mean S.D.	1.00 0	5.01 0.0960	29.9 2.99	121 7.39
0.854	A	1.00	5.04	31.8	117
	B	1.00	5.18	33.4	114
	C	1.00	5.13	33.1	126
	Mean S.D.	1.00 0	5.12 0.0687	32.8 0.826	119 5.90
	1.88	A	1.00	5.06	28.7
B		1.00	4.99	30.1	121
C		1.00	5.07	28.9	123
Mean S.D.		1.00 0	5.04 0.0464	29.3 0.758	118 6.08
4.13		A	1.00	4.78	23.9
	B	1.00	4.88	24.4	104
	C	1.00	4.69	24.6	95.3
	Mean S.D.	1.00 0	4.78 0.0933	24.3 0.342	101 5.11
	9.09	A	1.00	4.08	13.1
B		1.00	3.93	12.7	39.5
C		1.00	3.86	13.1	46.7
Mean S.D.		1.00 0	3.96 0.114	13.0 0.239	44.2 4.04
20.0		A	1.00	1.74	2.30
	B	1.00	1.72	2.40	2.85
	C	1.00	1.84	2.43	2.88
	Mean S.D.	1.00 0	1.77 0.0626	2.38 0.0688	2.79 0.128

<sup>a</sup> The value based on the measured value of pre-culture

Table 4. Growth inhibition

Nominal concentration (mg/L)	No.	Growth rate (0-3d)	Inhibition rate (%)	Area under growth curve	Inhibition rate (%)	Yield	Inhibition rate (%)
Control	A	1.60	-	2300	-	120	-
	B	1.62	-	2440	-	129	-
	C	1.62	-	2320	-	130	-
	D	1.58	-	2060	-	113	-
	E	1.58	-	2100	-	113	-
	F	1.59	-	2180	-	117	-
	Mean	1.60	-	2230	-	120	-
0.854	A	1.59	0.690	2230	0.104	116	3.43
	B	1.58	1.21	2240	-0.156	113	5.81
	C	1.61	-0.769	2370	-5.94	125	-3.63
	Mean	1.59	0.375	2280	-2.00	118	1.87
1.88	A	1.57	1.73	2090	6.50	110	8.17
	B	1.60	0.00541	2240	-0.109	120	0.180
	C	1.60	-0.277	2230	0.168	122	-1.19
	Mean	1.59	0.486	2180	2.19	117	2.38
4.13	A	1.55	3.05	1880	15.6	104	13.9
	B	1.55	3.24	1890	15.5	103	14.7
	C	1.52	4.99	1790	19.9	94.3	21.6
	Mean	1.54*	3.76	1850**	17.0	100**	16.7
9.09	A	1.28	20.0	909	59.3	45.3	62.3
	B	1.23	23.4	814	63.6	38.5	68.0
	C	1.28	19.9	908	59.3	45.7	62.0
	Mean	1.26**	21.1	877	60.7	43.2	64.1
20.0	A	0.324	79.7	68.6	96.9	1.65	98.6
	B	0.349	78.2	73.2	96.7	1.85	98.5
	C	0.353	77.9	77.0	96.6	1.88	98.4
	Mean	0.342	78.6	72.9	96.7	1.79	98.5

\*\* : significant difference ( $p < 0.01$ )      \* : significant difference ( $p < 0.05$ )

(The detail of the results of statistical analysis refers to Table 6.)

Table 5. EC50 and NOEC on each endpoint to *Pseudokirchneriella subcapitata*

Endpoint	EC50(mg/L)	NOEC(mg/L)
Growth rate	13.5 (—)	1.88
Area under growth curve	7.73 (4.84 to 12.4)	1.88
Yield	7.53 (—)	1.88

In parentheses are 95% confidence intervals

— Not obtained

Table 6. Result of statistical analysis

Nominal concentration (mg/L)	End point		
	Growth rate (0-3d)	Area under growth curve	Yield
0.854	—	—	—
1.88	—	—	—
4.13	*	**	**
9.09	**		
20.0			
Statistical procedure	Bartlett's test. One-way ANOVA. Multiple comparison method (Scheffé).	Bartlett's test. One-way ANOVA. Multiple comparison method (Scheffé).	Bartlett's test. One-way ANOVA. Multiple comparison method (Scheffé).

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

\* : significant difference ( $p < 0.05$ )

— : no significant difference

Blank column expresses that the data in the exposure level were not used for the statistical analysis since the concentration was greater than EC50.

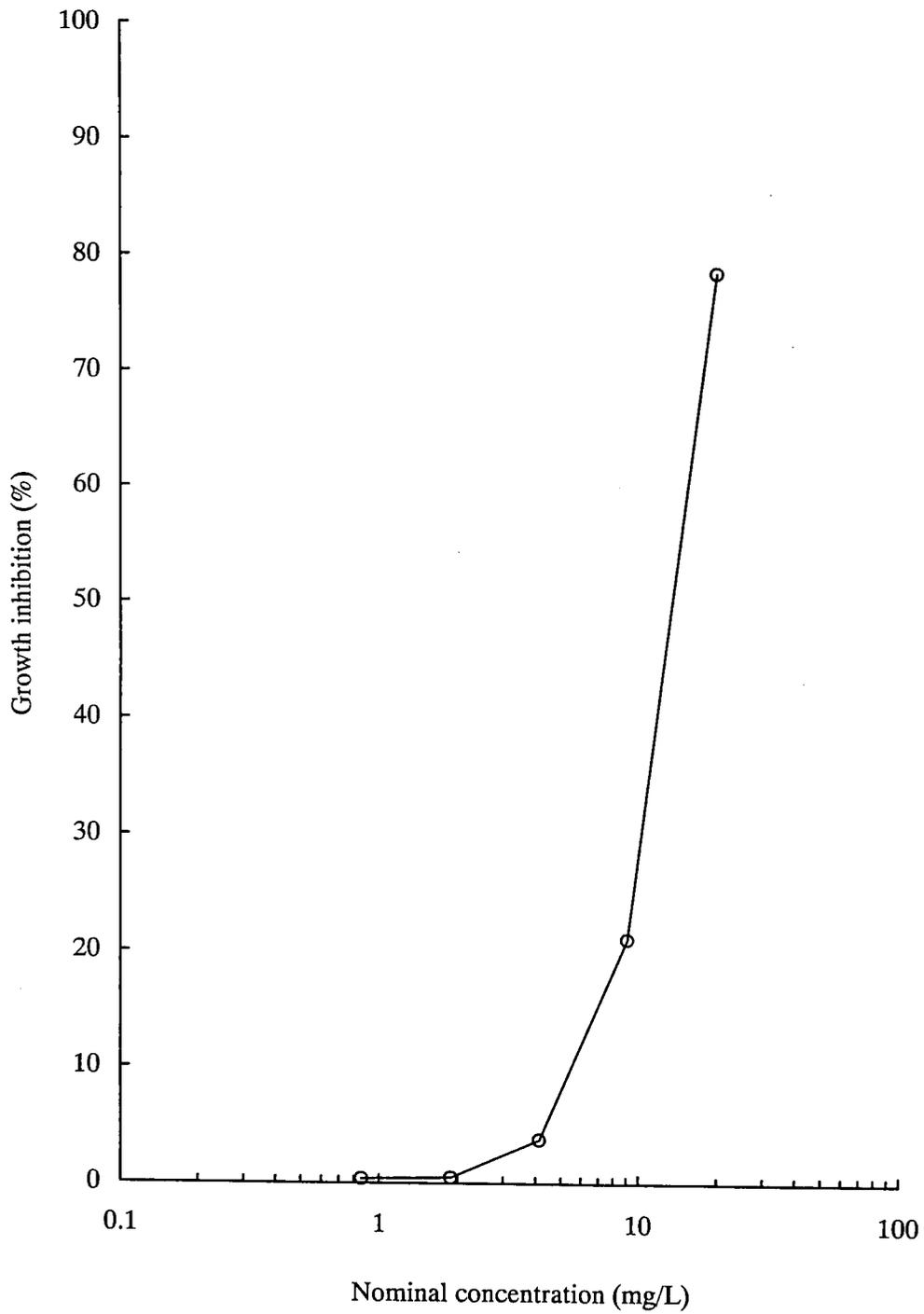


Figure 1. Concentration-response curve based on parameter of growth rate

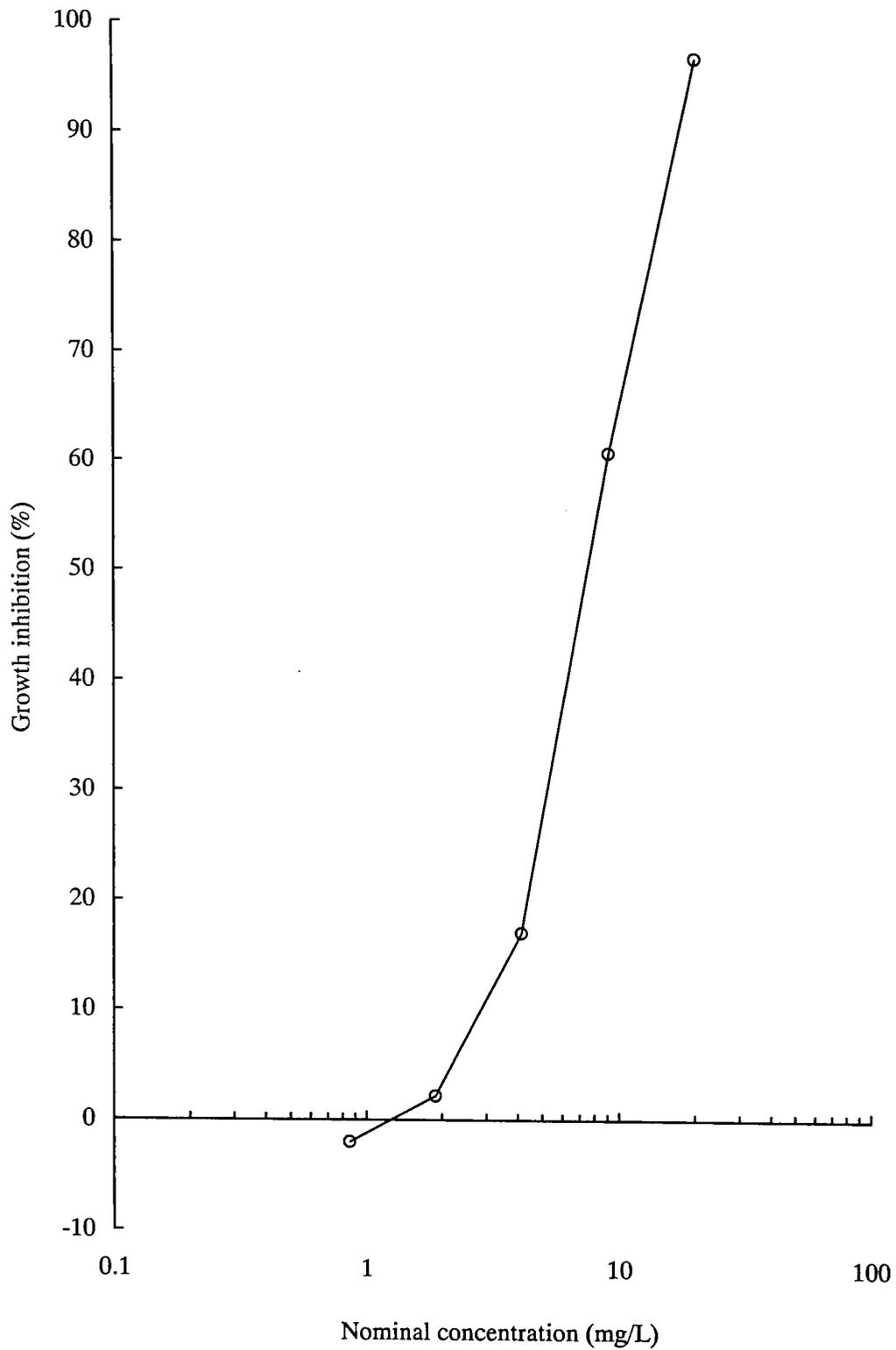


Figure 2. Concentration-response curve based on parameter of area under growth curve

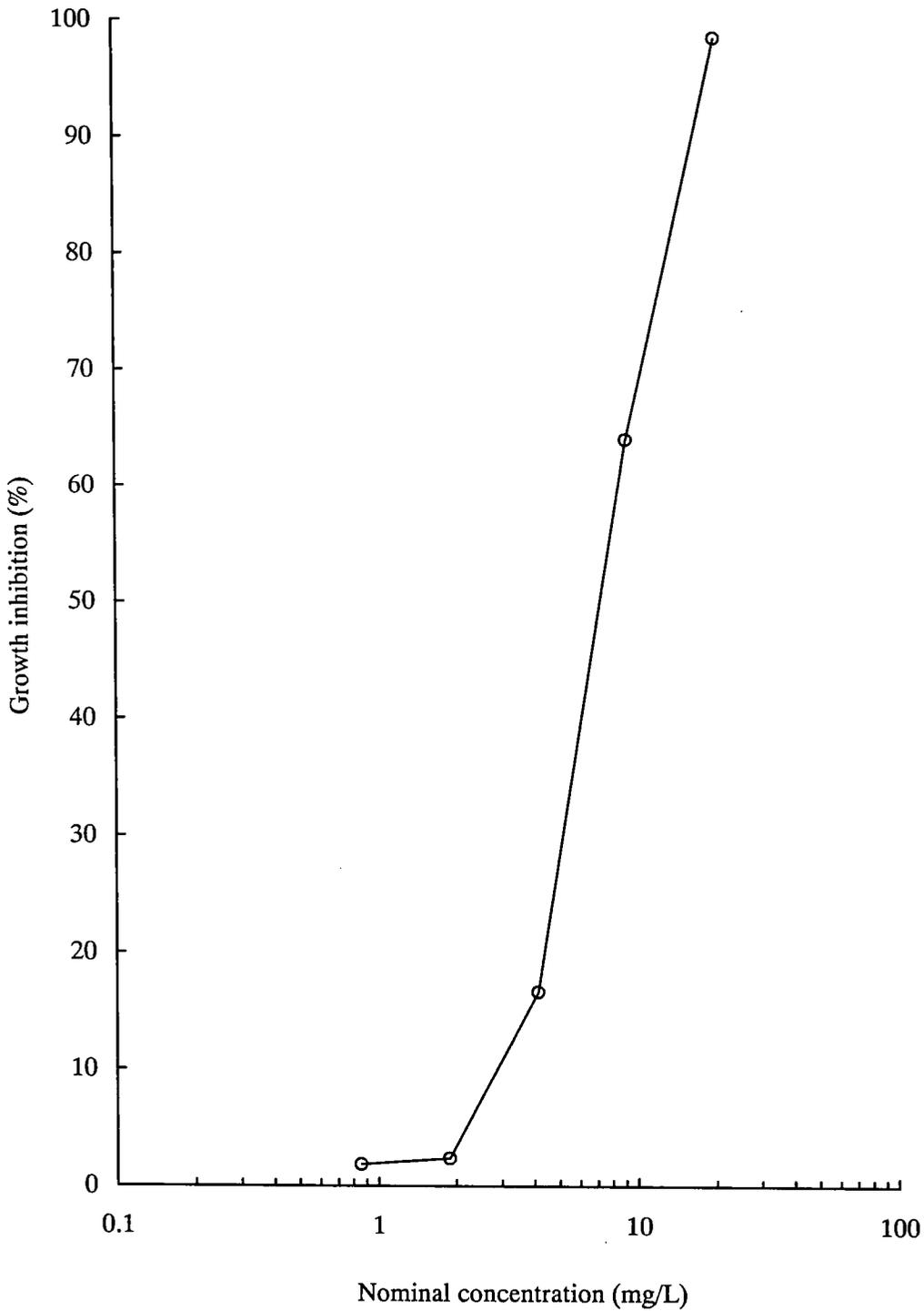


Figure 3. Concentration-response curve based on parameter of yield

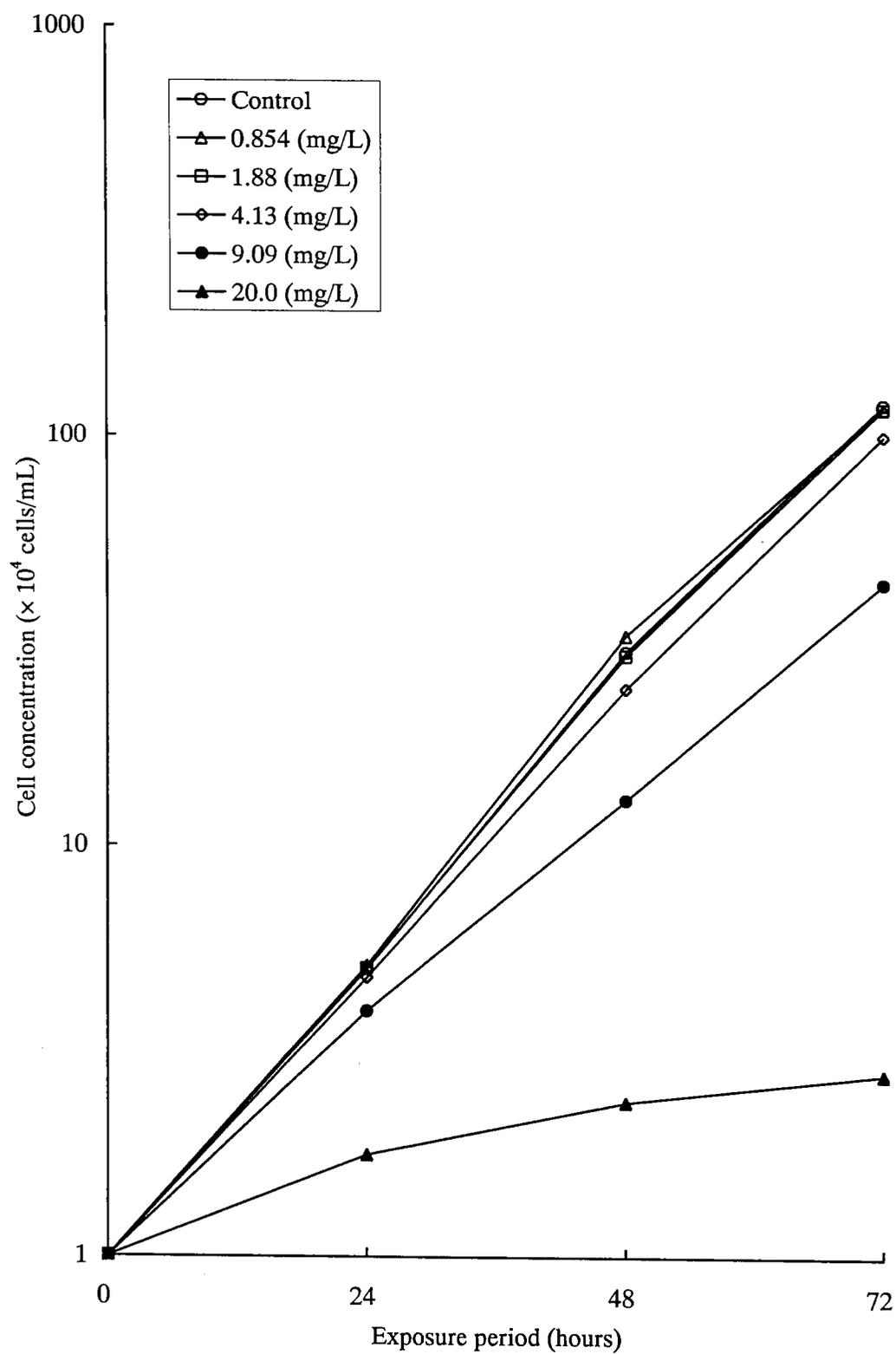


Figure 4. Growth curve of *Pseudokirchneriella subcapitata* in each exposure level

## Appendix 1

Composition of medium

## Composition of OECD medium [Draft Guideline 201(April 2004)]

Nutrient salt	Amount
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0.185 mg
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0.415 mg
ZnCl <sub>2</sub>	0.00300 mg
FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.0640 mg
Na <sub>2</sub> EDTA·2H <sub>2</sub> O	0.100 mg
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.00150 mg
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.00700 mg
CuCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.00001 mg
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	18.0 mg
NH <sub>4</sub> Cl	15.0 mg
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.60 mg
NaHCO <sub>3</sub>	50.0 mg
MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	12.0 mg
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	15.0 mg

The constituents mentioned above are filled up to 1 litre with purified water, where the unit of pH is approximately 8.1.

## Appendix 2

Method of analysis and result of measurement of test substance concentration

## 1. 被験物質濃度の分析方法

## 1) 試験液の前処理操作

採取した試験液は、そのまま若しくは培地で適宜希釈して分析試料とした。

## 2) 分析方法

前処理操作を行って得られた分析試料は、下記の定量条件に基づき高速液体クロマトグラフィー(HPLC)により被験物質の定量を行った。分析試料中の被験物質濃度はクロマトグラム上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。得られたクロマトグラム(一例)をAppendix 3に示す。

## 分析機器の定量条件

機 器	高速液体クロマトグラフ
システム	島津製作所製 SCL-10Avp
ポンプ	島津製作所製 LC-10AD
検出器	島津製作所製 SPD-10A
オートインジェクター	島津製作所製 SIL-10A
カラムオーブン	島津製作所製 CTO-10A
ワイナゲータ	島津製作所製 DGU-14A
カラム	L-column ODS (化学物質評価研究機構製) 15 cm×4.6 mm I.D.
カラム温度	40℃
溶離液	アセトニトリル/水* 6/4(v/v)
流 量	1.0 mL/min
測定波長	275 nm
注 入 量	100 μL
感 度	
検出器	0.5 AU/1 V

\* 水道水を超純水装置システムを用いて処理した水

## 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行った。なお、被験物質の純度が100.0%であるため、純度補正は行わなかった。

供試試料50.0 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200 mg/Lの被験物質溶液を調製した。続いてこれを培地で希釈して10.0 mg/Lの被験物質溶液を調製した。さらにこれを培地で希釈して1.00 mg/Lの標準溶液を調製した。

## 4) 検量線の作成

3)の標準溶液の調製と同様にして0.100、0.500、1.00及び2.00 mg/Lの標準溶液を調製した。これらを2)の定量条件に従って分析し、得られたそれぞれのクロマトグラム上のピーク面積と被験物質濃度により検量線を作成し、定量性を確認した。作成した検量線をAppendix 3に示す。なお、被験物質の定量下限は、定量性が確認された範囲内での最小の標準溶液濃度(0.100 mg/L)とした。よって、試験液中の被験物質の定量下限濃度は0.100 mg/Lとした。

## 5) ブランク試験

## (1) 方法

1)の試験液の前処理操作と同じ操作により、被験物質を加えない培地について、ブランク試験を行った。ブランク試験は、2点について実施した。

## (2) 結果

(1)の方法により測定した結果、ブランク試験においてクロマトグラム上の被験物質位置にはピークは認められなかった。

## 2. 測定結果

試験液中の被験物質濃度の測定結果を次頁に示す。

Appendix table 2-1. Measured concentrations of test substance in test solutions

Nominal concentration (mg/L)	Measured concentration(mg/L) (Percentage of nominal concentration)		
	At the start	At the end	Mean <sup>a</sup>
Control	n.d.	n.d.	—
0.854	0.866 (101)	0.788 (92.3)	0.826 (96.7)
1.88	1.84 (97.8)	1.66 (88.3)	1.75 (92.9)
4.13	4.13 (99.9)	3.74 (90.5)	3.93 (95.1)
9.09	9.03 (99.4)	7.88 (86.7)	8.44 (92.8)
20.0	18.7 (93.6)	17.8 (89.1)	18.3 (91.3)

n.d. : Not detected (<0.100 mg/L)

<sup>a</sup> The values are expressed as geometric means.

The values are expressed as geometric means calculated by the following equation :

$$\text{antilog} \left( \frac{1}{2(t_n - t_1)} \sum (\log(\text{conc}_i) + \log(\text{conc}_{i+1})) \cdot (t_{i+1} - t_i) \right)$$

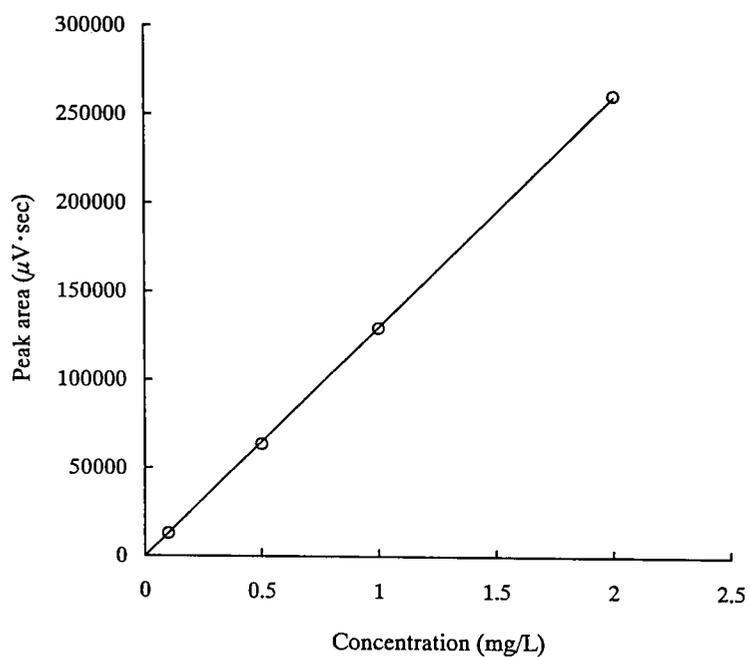
where

$t_1$  = initial time <  $t_2$  < ... <  $t_n$  = final time

$\text{conc}_1$  = initial concentration,  $\text{conc}_2, \dots, \text{conc}_n$  = final concentration.

## Appendix 3

Calibration curve and chromatogram



$$y = 130122x$$

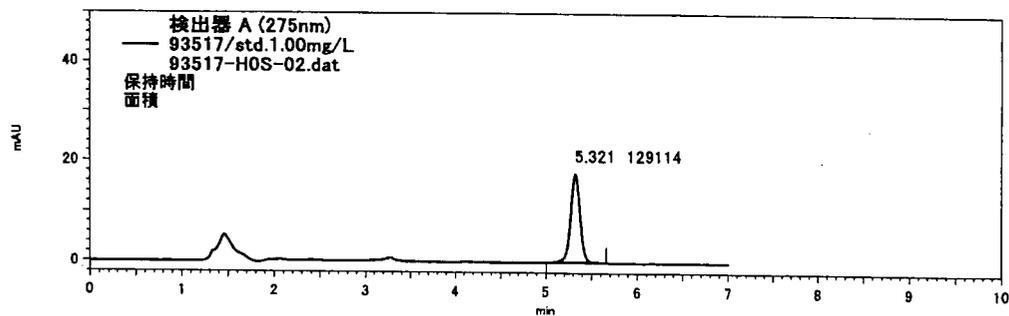
$$r = 1.00$$

Concentration (mg/L)	Peak area (μV·sec)
0.100	12757
0.500	63718
1.00	129593
2.00	260856

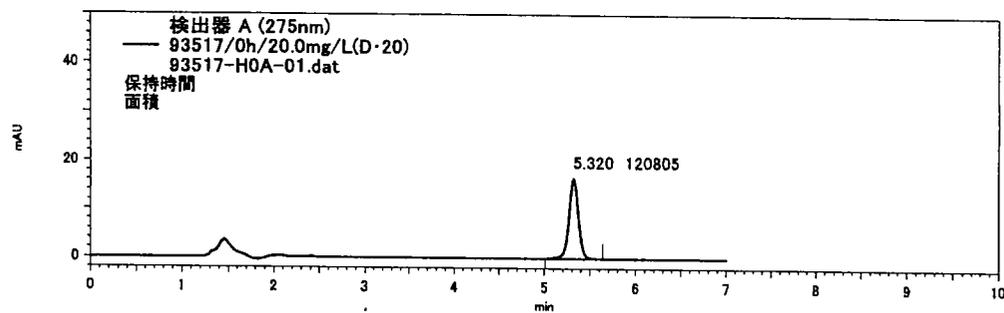
Appendix figure 3-1. Calibration curve of thymol for analysis by HPLC.

試験番号 93517

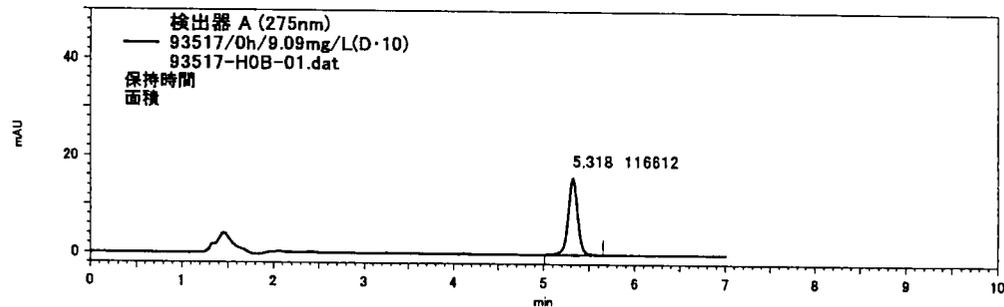
Standard solution 1.00 mg/L



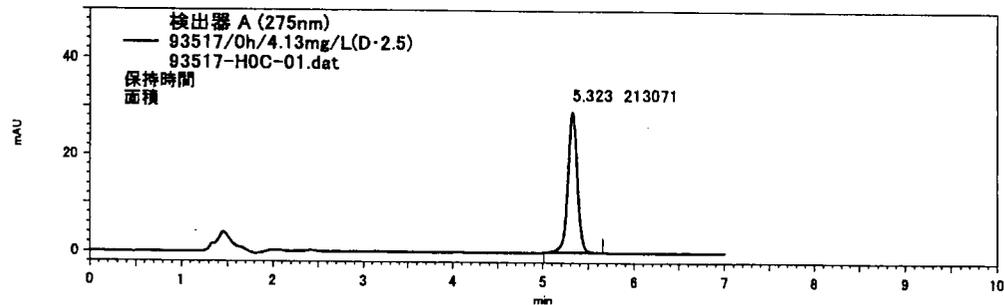
20.0 mg/L (Nominal concentration)



9.09 mg/L (Nominal concentration)



4.13 mg/L (Nominal concentration)

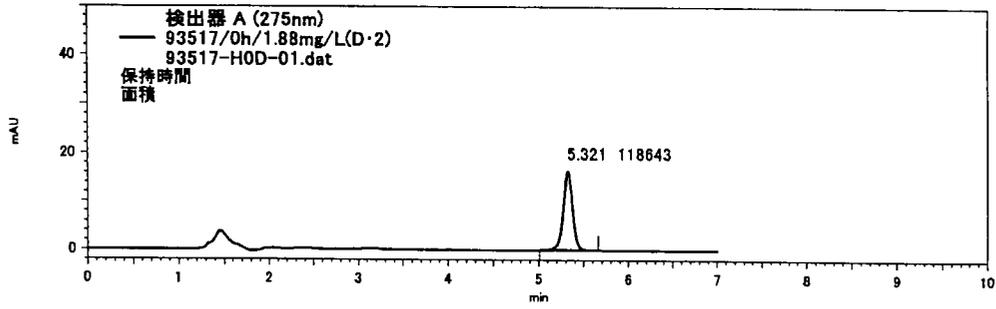


2005.6.13

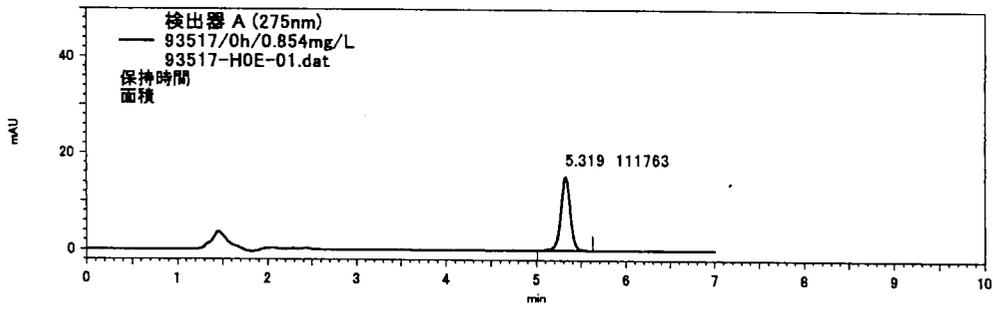
Appendix figure 3-2-1. HPLC chromatogram at the start of the exposure.

試験番号 93517

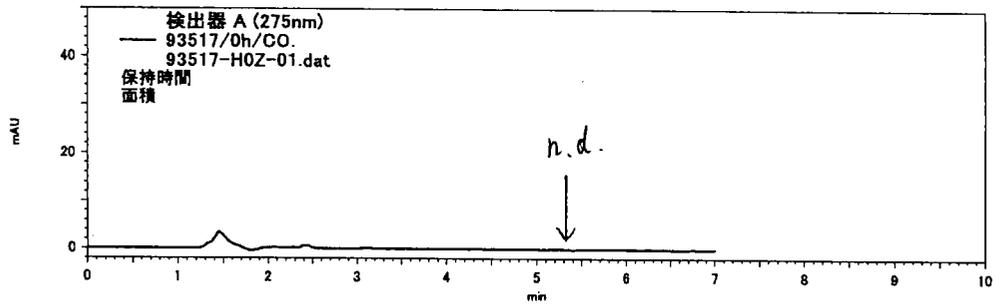
1.88 mg/L (Nominal concentration)



0.854 mg/L (Nominal concentration)



Control

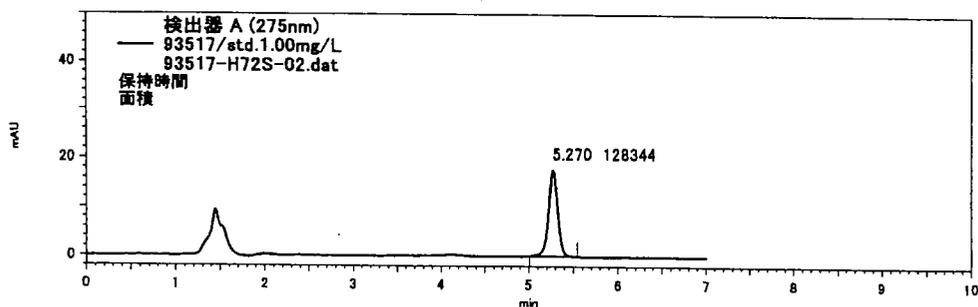


2005.6.13

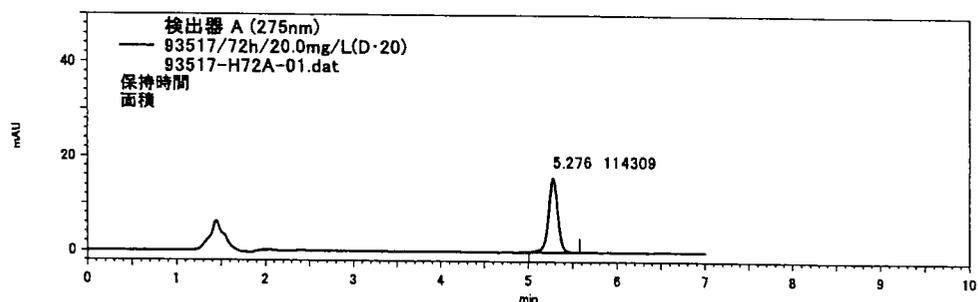
Appendix figure 3-2-2. HPLC chromatogram at the start of the exposure.

試験番号 93517

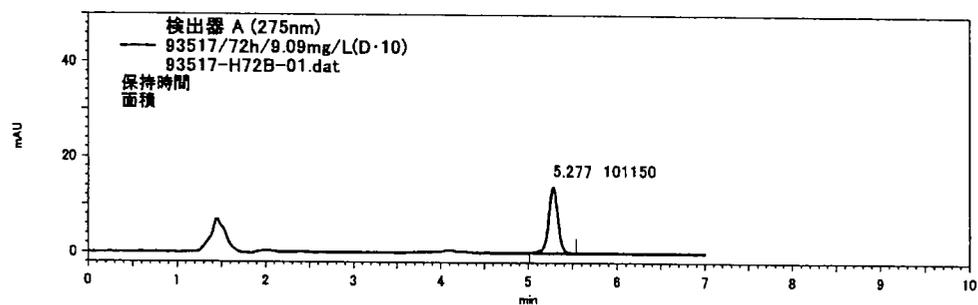
Standard solution 1.00 mg/L



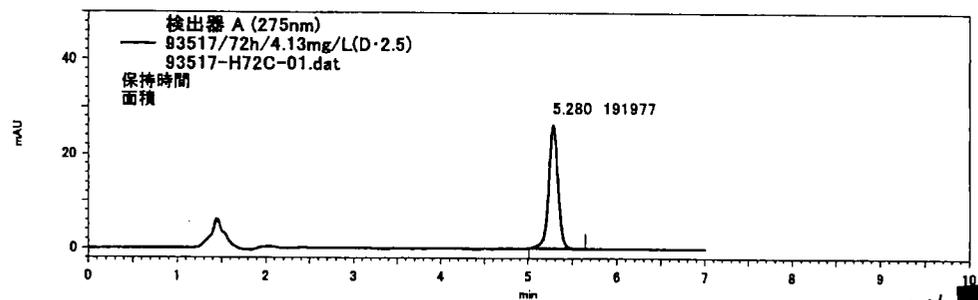
20.0 mg/L (Nominal concentration)



9.09 mg/L (Nominal concentration)



4.13 mg/L (Nominal concentration)

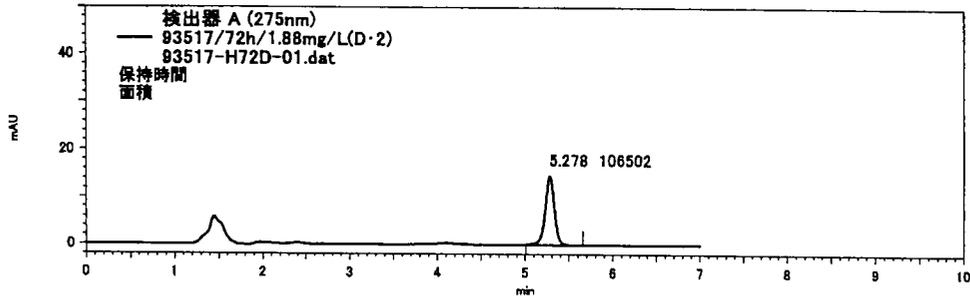


2006.6.16

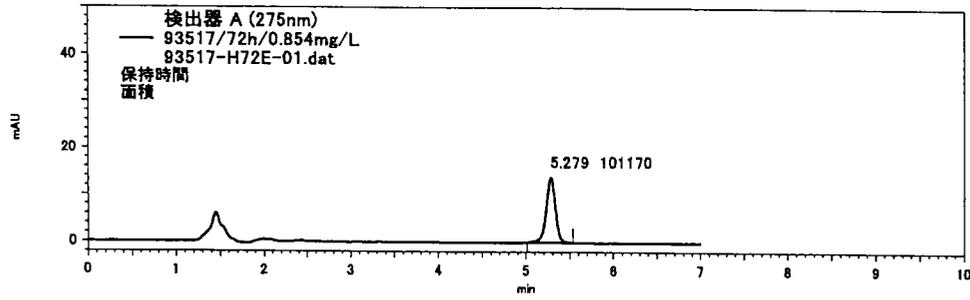
Appendix figure 3-3-1. HPLC chromatogram at the end of the exposure.

試験番号 93517

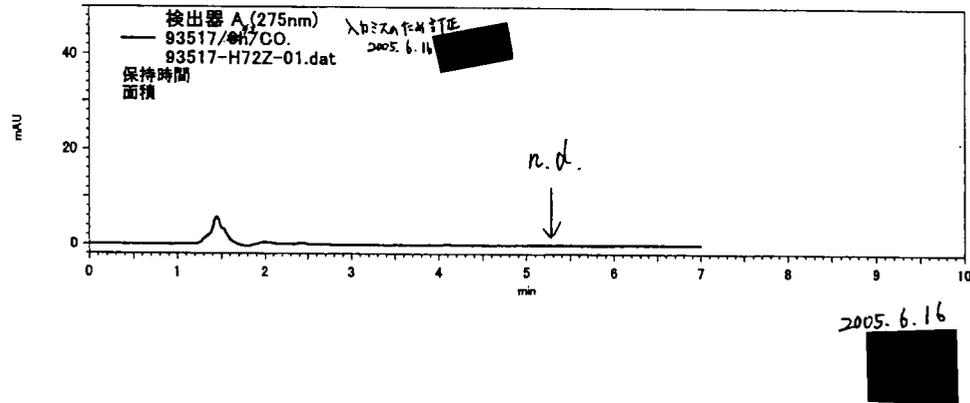
1.88 mg/L (Nominal concentration)



0.854 mg/L (Nominal concentration)



Control



Appendix figure 3-3-2. HPLC chromatogram at the end of the exposure.

## Additional data

Results of preliminary tests

## 予備試験結果

### ＜生物への影響＞

#### 予備試験1

濃度区 (mg/L)	阻 害 率 (%)	
	生長曲線下面積	生長速度
0.300	-3.45	-0.557
1.00	2.52	0.0998
3.00	26.8	6.24
10.0	79.2	32.5
30.0	99.2	93.7

連 数：1連/区

試験液調製法：培地と被験物質を混合、約1時間攪拌して溶解した試験原液を用いて調製した。試験原液調製は純度補正を実施しなかった。

測 定 法：細胞計数法

#### 予備試験2

濃度区 (mg/L)	阻 害 率 (%)	
	生長曲線下面積	生長速度
0.854	3.17	0.623
1.88	15.4	3.70
4.13	45.5	13.9
9.09	74.0	29.1
20.0	97.5	80.3

連 数：1連/区

試験液調製法：培地と被験物質を混合、約1時間攪拌して溶解し、0.22 $\mu$ mのメンブレンフィルターにて吸引ろ過滅菌した試験原液を用いて調製した。試験原液調製は純度補正を実施しなかった。

測 定 法：細胞計数法

### ＜試験液中の被験物質濃度＞

設定濃度 (mg/L)	測定濃度 (mg/L) (対設定濃度 %)	
	暴露開始時	暴露終了時
0.854	0.769 (90.1)	0.691 (80.9)
20.0	18.3 (91.3)	17.3 (86.5)

予備試験2と併行して実施