

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

環境庁殿

試 験 報 告 書

4, 4'-イソプロピリデンビス (2, 6-ジブロモフェノール) の藻類 (*Selenastrum capricornutum*)
に対する生長阻害試験

(試験番号 : 9 B 4 3 4 G)

2 0 0 0 年 3 月 3 1 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： 4, 4'-イソプロピリデンビス (2, 6-ジブロモフェノール) の藻類 (*Selenastrum c
apricornutum*) に対する生長阻害試験

試験番号： 9 B 4 3 4 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。

2 0 0 0 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： 4, 4'-イソプロピリデンビス (2, 6-ジブロモフェノール) の藻類 (*Selenastrum c
apricornutum*) に対する生長阻害試験

試験番号： 9 B 4 3 4 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	2 0 0 0 年 1 月 2 5 日	2 0 0 0 年 1 月 2 5 日
	2 0 0 0 年 1 月 2 8 日	2 0 0 0 年 1 月 2 8 日
試験報告書監査	2 0 0 0 年 3 月 3 1 日	2 0 0 0 年 3 月 3 1 日

2 0 0 0 年 3 月 3 1 日

信頼性保証担当者：

■■■■■■■■■■

■■■■

■■■■■■■■■■

■■■■

試験実施概要

1. 表題： 4,4'-イソプロピリデンビス(2,6-ジブロモフェノール)の藻類 (*Selenastrum capricornutum*) に対する生長阻害試験
2. 試験目的： 被験物質の藻類 (*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) および最大無作用濃度 (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： 〒100-8975 東京都千代田区霞が関一丁目2-2
委託担当者： 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 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： 〒105-0014 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： 〒227-0033 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]

[REDACTED]

(2000年 3月31日)

試験担当者

[REDACTED]

[REDACTED]

(2000年 3月31日)

[REDACTED]

[REDACTED]

(2000年 3月31日)

分析担当者

[REDACTED]

[REDACTED]

(2000年 3月31日)

9. 試験期間： 試験開始日 1999年11月16日
試験終了日 2000年 3月31日
暴露期間 2000年 1月25日～2000年 1月28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
- 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 生長曲線	13
4.2 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 最大無作用濃度（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 生長曲線	15
5.4 50%生長阻害濃度（EC50）および最大無作用濃度（NOEC）	15
5.5 温度およびpH	16
Table 1～6	17～21
Figure 1～3	22～24
付属資料－1 OECD培地	25～26
付属資料－2 試験液の分析方法	27～36

要 旨

試験委託者

環境庁

表 題

4, 4'-イソプロピリデンビス (2, 6-ジブロモフェノール) の藻類 (*Selenastrum capricornutum*) に対する生長阻害試験

試験番号

9 B 4 3 4 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: 4, 4'-イソプロピリデンビス (2, 6-ジブロモフェノール)
- 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. 50, 1. 05, 2. 20, 4. 60, 9. 55, 20. 0 mg/L
(公比: 2. 1, 助剤濃度一定: 80 mg/L, 2-メキシタールおよびHC0-40使用)
- 6) 試験液量: 100 mL (OECD培地) / 容器
- 7) 連数: 3 容器 / 濃度区
- 8) 初期細胞濃度: 1×10^4 cells/mL
- 9) 試験温度: 23 ± 2 °C
- 10) 照明: 4000 lux (±20%の変動内, フラスコ液面付近) で連続照明
- 11) 分析法: HPLC法

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値の±20%を超えたものがなかったため、下記の生長阻害濃度の算出には設定値を採用した。

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) : 7.08 mg/L (95%信頼区間：算出不可)

最大無作用濃度 NOECb (0-72) : 4.60 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) : 13.2 mg/L (95%信頼区間：算出不可)

最大無作用濃度 NOECr (24-48) : 9.55 mg/L

50%生長阻害濃度 ErC50 (24-72) : 13.6 mg/L (95%信頼区間：算出不可)

最大無作用濃度 NOECr (24-72) : 4.60 mg/L

1 被験物質

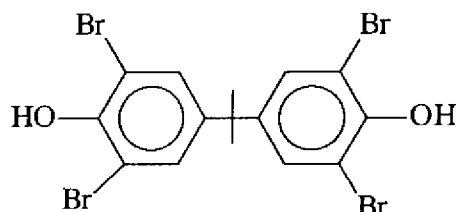
1.1 名称、構造式および物理化学的性状

名 称： 4,4'-イソプロピリデンビス(2,6-ジブロモフェノール) (略称 I P D B)

別 名： テトラブロモビスフェノールA

CAS No： 79-94-7

構造式：



分子式： $C_{15}H_{12}Br_4O_2$

分子量^{*1}： 543.87

融点^{*1}： 182.2℃

水溶解度^{*1}： 不溶

安定性^{*1}： 通常の取扱条件で安定，酸化剤との接触に注意

*1:供給者提供資料

1.2 供試試料

純度^{*1}： 99.7% (中和法)

ロット番号^{*1}： GG01

供給者： XXXXXXXXXX

供給量^{*1}： 50 g

入手日： 1999年9月3日

外観^{*1}： 白色結晶性粉末

*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、被験物質の特性が認められることを確認した。試験終了後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

- 1) 学名 : *Selenastrum capricornutum*
- 2) 入手先 : American Type Culture Collection
- 3) 入手株番号 : ATCC22662株
- 4) 入手日 : 1996年6月20日
- 5) 入手後の管理 : Gorham培地を用い無菌的に継代培養
- 6) 感受性の確認 : 基準物質（重クロム酸カリウム，試薬特級）による72時間50%藻類生長阻害濃度（EbC50）=0.423 mg/L（この値は当研究所における1996年11月以降の EbC50値 0.285～0.486 mg/L，n=5 の範囲内にある。）
- 7) 前培養 : 前培養期間；2000年1月21日～2000年1月25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) 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，3.2参照）／容器
- 4) 連数 : 3容器／濃度区
- 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

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。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： 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 卓上pH計 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

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，

0.50, 1.05, 2.20, 4.60, 9.55 および 20.0 mg/L

（公比：2.1）

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	111	100
1.00	100	90
1.82	70	63
3.31	81	73
6.03	66	60
11.0	24	22
20.0	2	2

3.5 試験液の調製

被験物質を 100 mg 精秤し、2-メトキシエタノール 100 mg に溶解後、分散助剤 (HCO-40) を 300 mg 加え混合した。これを培地で溶解し 100 mL に定容し、被験物質濃度 1000 mg/L の被験物質溶液を調製した。同時に被験物質を含まない助剤溶液 4000 mg/L (2-メトキシエタノール 1000 mg/L, HCO-40 3000 mg/L) を調製した。

各試験容器に 100 mL の培地を入れ、被験物質溶液および助剤溶液の添加量分を除去後、各濃度区の助剤濃度が一定 (80 mg/L) となるように助剤溶液を加えた。同時に被験物質溶液を等比級数的に添加し、被験物質濃度 0.50, 1.05, 2.20, 4.60, 9.55, 20.0 mg/L の試験液を調製した。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: 80 mg/L) を調製した。

3.6 試験液の分析

暴露開始時 (0hr) には各濃度区 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分析試料とした。終了時 (72hr) には、各濃度区 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、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 0.75 mL 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-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 1×10^4 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) により計測した。

試験液各濃度区における pH を、暴露開始時には各濃度区 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 (72hr) には 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（ 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、

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 (μ) 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,

μ_c : 対照区 (または助剤対照区) の平均生長速度

μ_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生長阻害率 (I_A 値および I_m 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 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 (0-72), 速度法により求めた場合は NOECr (24-48) または NOECr (24-72) とした。

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

試験開始時および72時間後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。

開始時における濃度が設定濃度に対して±20%を超える分析結果がなかったため、以下の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 0.35～13.3 mg/Lであり、設定値に対する割合は 60～73 %であった。被験物質は疎水性が高く水に難溶のため、濃度減少の主な原因は、藻体への移行ではないかと思われた。

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 162倍、151倍増加し、試験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。

5.4 50%生長阻害濃度（EC50）および最大無作用濃度（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）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阻害濃度

EbC50 (0-72) : 7.08 mg/L (95%信頼区間：算出不可)

NOECb (0-72) : 4.60 mg/L

2) 生長速度の比較による阻害濃度

ErC50 (24-48) : 13.2 mg/L (95%信頼区間：算出不可)

NOECr (24-48) : 9.55 mg/L

ErC50 (24-72) : 13.6 mg/L (95%信頼区間：算出不可)

NOECr (24-72) : 4.60 mg/L

5.5 温度およびpH

72時間の暴露期間中の培養試験器内の温度を Table 5に、試験液のpHをTable 6に示した。

温度は設定範囲 ($23\pm2^{\circ}\text{C}$) 内であった。試験液のpHは暴露開始時が 7.9~8.0 であり、試験終了時が 7.9~9.1 であった。炭酸同化が盛んに行われ藻類の生長率が高ければ、pH が1以上増加することがある。今回は、0.50 mg/Lの試験区でpHが1以上増加した。

以 上

Table 1. Measured Concentrations of the Test Substance in Test Water

Nominal Concentration (mg/L)	Measured Concentration (mg/L)			
	0 Hour	Percent of Nominal	72 Hour	Percent of Nominal
Control	<0.02	--	<0.02	--
Solvent Control.	<0.02	--	<0.02	--
0.50	0.59	118	0.35	70
1.05	1.25	119	0.77	73
2.20	2.54	115	1.55	70
4.60	4.26	93	2.77	60
9.55	9.02	94	6.09	64
20.0	19.0	95	13.3	67

Table 2. Cell Densities of *Selenastrum capricornutum* during the 72-Hour Exposure

Nominal Concentration mg/L	Vessel No.	Cell Densities (cells/mL)			
		0 Hour	24 Hours	48 Hours	72 Hours
Control	1	10000	33300	220500	1639300
	2	10000	33800	220500	1699300
	3	10000	35300	197500	1509300
	Average	10000	34100	212800	1616000
	SD	0	1000	13300	97100
Solvent. cont.	1	10000	35700	212500	1549300
	2	10000	37200	208500	1529300
	3	10000	33200	200500	1459300
	Average	10000	35400	207200	1512600
	SD	0	2000	6100	47300
0. 50	1	10000	35400	200500	1509300
	2	10000	31800	205500	1539300
	3	10000	28700	195500	1489300
	Average	10000	32000	200500	1512600
	SD	0	3400	5000	25200
1. 05	1	10000	34100	203500	1629300
	2	10000	30500	188500	1539300
	3	10000	26900	165500	1299300
	Average	10000	30500	185800	1489300
	SD	0	3600	19100	170600
2. 20	1	10000	36700	203500	1529300
	2	10000	26900	209500	1469300
	3	10000	25800	180500	1199300
	Average	10000	29800	197800	1399300
	SD	0	6000	15300	175800
4. 60	1	10000	27000	178500	1329300
	2	10000	25500	196500	1339300
	3	10000	23400	198500	1239300
	Average	10000	25300	191200	1302600
	SD	0	1800	11000	55100
9. 55	1	10000	15400	88300	480300
	2	10000	15400	67900	317300
	3	10000	14900	62400	262300
	Average	10000	15200	72900	353300
	SD	0	300	13600	113400
20. 0	1	10000	13800	14900	23700
	2	10000	12900	14100	21700
	3	10000	12800	11600	21700
	Average	10000	13200	13500	22400
	SD	0	600	1700	1200

SD= Standard deviation

Table 3. Percent Growth Inhibition of *Selenastrum capricornutum*

Nominal Conc. (Measured Conc. at 0Hr)		Area under the growth curves		Growth Rate			
mg/L	No.	Area A (0-72h)	Inhibition (%) * ₁ I A (0-72h)	Rate μ (24-48h)	Inhibition (%) * ₁ I m (24-48h)	Rate μ (24-72h)	Inhibition (%) * ₁ I m (24-72h)
Control	1	25163000		0.0788		0.0812	
	2	25895000		0.0781		0.0816	
	3	23099000		0.0717		0.0782	
	Average SD	24719000 1450000	-	0.0762 0.0039	-	0.0803 0.0019	-
Solvent Cont.	1	23948000		0.0743		0.0786	
	2	23648000		0.0718		0.0774	
	3	22520000		0.0749		0.0788	
	Average SD	23372000 753000	-	0.0737 0.0016	-	0.0783 0.0008	-
0.50 (0.59)	1	23173000		0.0723		0.0782	
	2	23567000		0.0777		0.0808	
	3	22652000		0.0799		0.0823	
	Average SD	23131000 459000	1.0	0.0766 0.0039	-3.9	0.0804 0.0021	-2.7
1.05 (1.25)	1	24654000		0.0744		0.0806	
	2	23128000		0.0759		0.0817	
	3	19609000		0.0757		0.0808	
	Average SD	22464000 2587000	3.9	0.0753 0.0008	-2.2	0.0810 0.0006	-3.4
2.20 (2.54)	1	23516000		0.0714		0.0777	
	2	22705000		0.0855		0.0833	
	3	18743000		0.0811		0.0800	
	Average SD	21655000 2554000	7.3	0.0793 0.0072	-7.6	0.0803 0.0028	-2.6
4.60 (4.26)	1	20284000		0.0787		0.0812	
	2	20800000		0.0851		0.0825	
	3	19597000		0.0891		0.0827	
	Average SD	20227000 604000	13.5	0.0843 0.0052	-14.4	0.0821 0.0008	-4.9
9.55 (9.02)	1	7652000		0.0728		0.0717	
	2	5207000		0.0618		0.0630	
	3	4403000		0.0597		0.0598	
	Average SD	5754000 1692000	75.4**	0.0648 0.0070	12.1	0.0648 0.0062	17.2**
20.0 (19.0)	1	373000		0.0032		0.0113	
	2	308000		0.0037		0.0108	
	3	246000		-0.0041		0.0110	
	Average SD	309000 64000	98.7**	0.0009 0.0044	98.8**	0.0110 0.0003	86.0**

*₁ Values are the percent inhibition relative to the solvent control.

SD Standard deviation

* Indicates a significant difference ($\alpha=0.05$) from the solvent control. (there was no sign in this test.)** Indicates a significant difference ($\alpha=0.01$) from the solvent control.

Table 4. 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)
7.08 ^{*1}	--	4.60

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)
13.2 ^{*2}	--	9.55

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)
13.6 ^{*2}	--	4.60

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

- *1 using the concentrations of 4.60 and 9.55 mg/L in the regression analysis
- *2 using the concentrations of 9.55 and 20.0 mg/L in the regression analysis
- not calculated

The NOEC values were determined by an analysis of variance (ANOVA), Dunnett 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 $\alpha=0.01$.

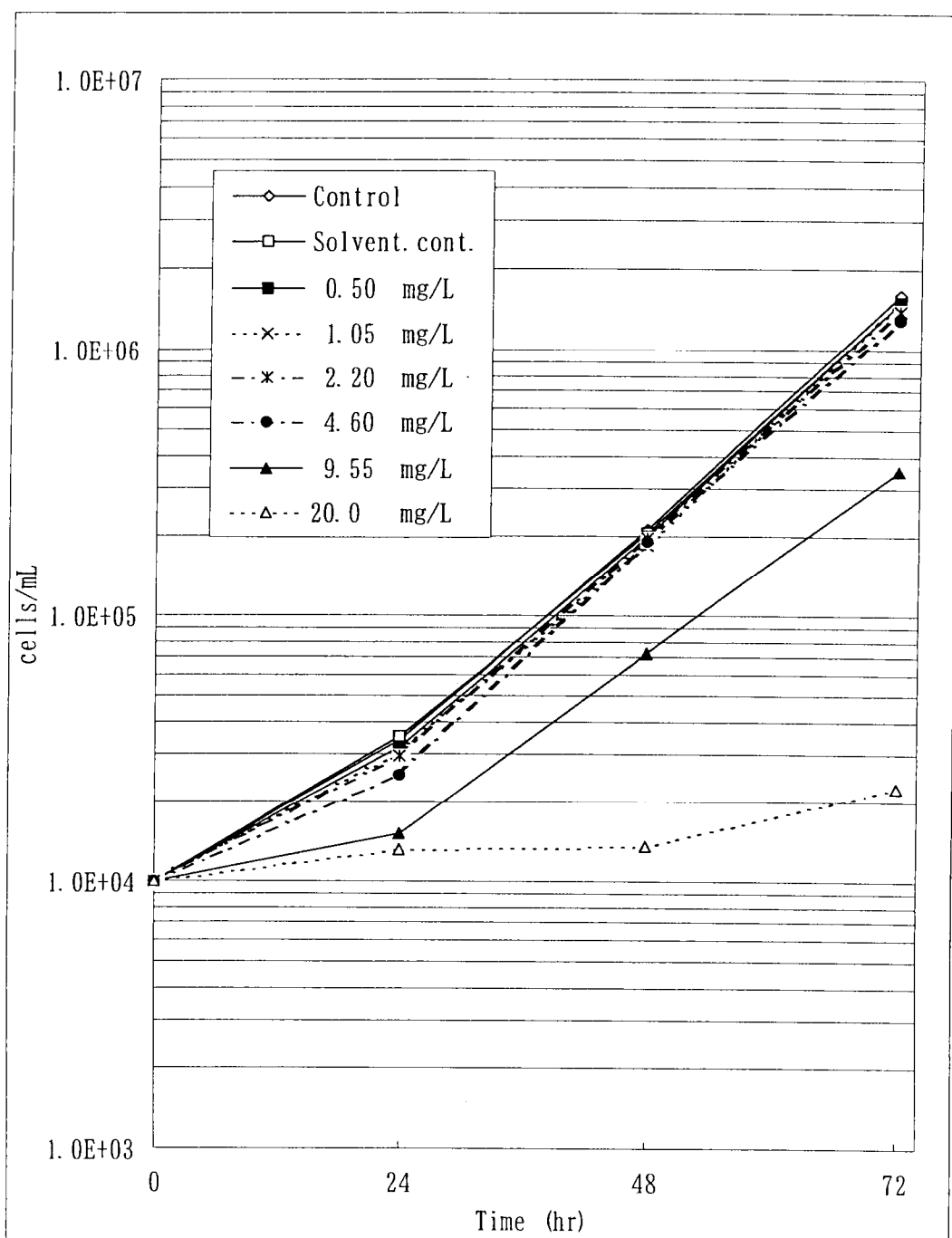
Table 5. Temperature in the Incubation Chamber

Exposure Period (Hours)	Temperature (°C)
0	23.2
24	22.5
48	23.6
72	21.8

Table 6. pH Values

Nominal Concentration mg/L	pH		
	0 Hour	72 Hour (Vessel No)	
Control	8.0	7.6	(1)
Solvent control	8.0	8.8	(1)
0.50	8.0	9.1	(1)
1.05	8.0	8.9	(1)
2.20	8.0	8.8	(1)
4.60	8.0	8.4	(1)
9.55	8.0	8.0	(1)
20.0	7.9	7.9	(1)

Figure 1 Algal Growth Curve of *Selenastrum capricornutum*
(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

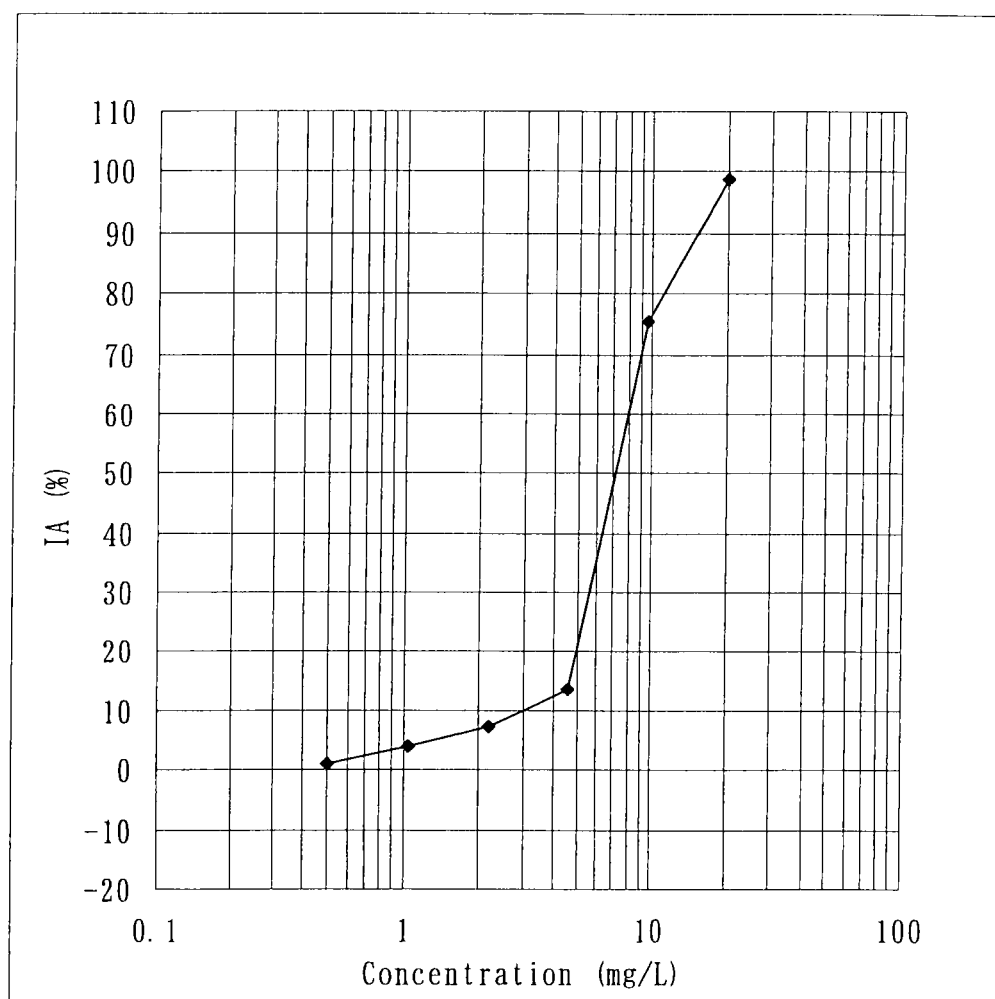
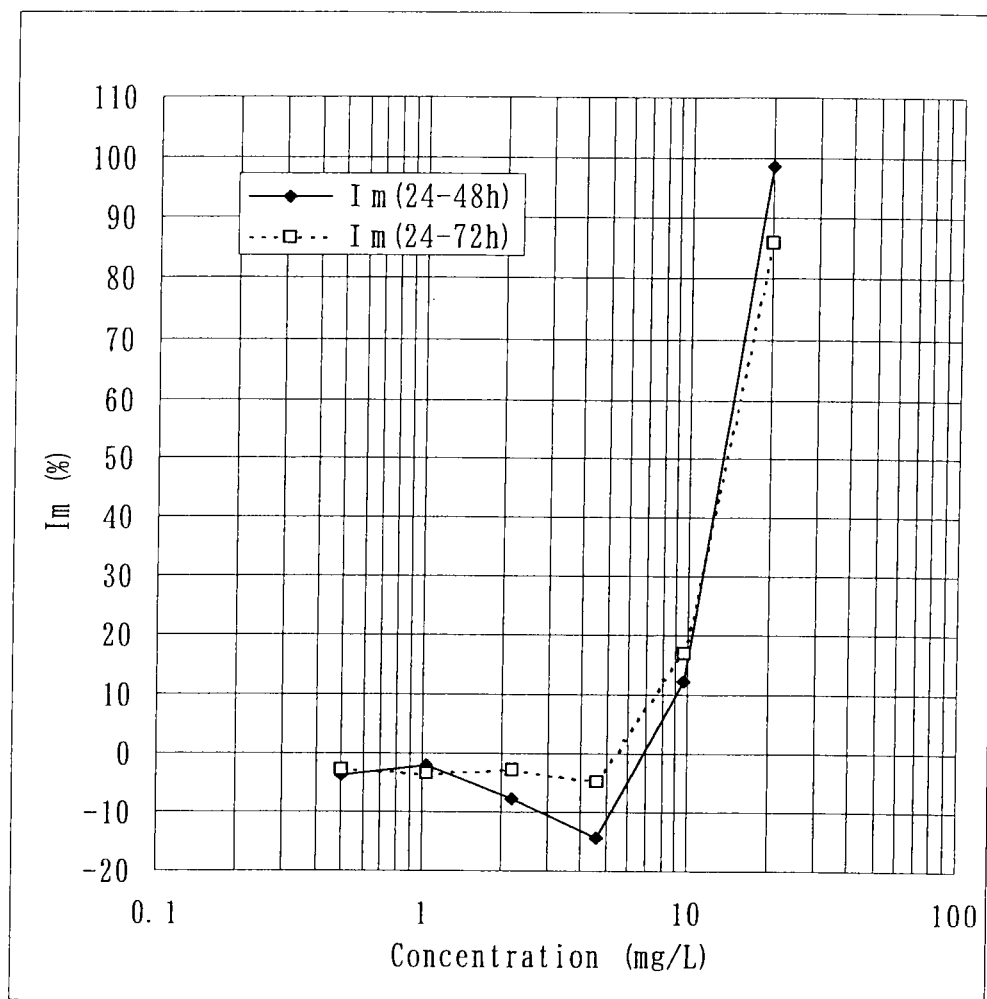


Figure 3 Concentration-Inhibition Curve Based on I_m values Calculated from the Growth Rates



付属資料－1

OECD培地

Table A-1 OECD medium

<u>Nutrient salts</u>	<u>Concentration (mg/L)</u>
H ₃ B ₃ O 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
<u>MgSO₄·7H₂O</u>	<u>15</u>

付属資料－ 2

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) 各濃度区3個の試験容器より試験液 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。

*装置:日立製CR 2 1 E

- 2) 各分析試料をHPLC測定用バイアルに直接 0.75 mL採取し、アセトニトリルを 0.75 mL加え混合したものをHPLC測定試料とした。

標準液（アセトニトリル溶液）はHPLC測定用バイアルに直接 0.75 mL採取し、これに0.75 mLの水を加え混合したものを用いた。

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 :	ヒューレットパッカート製 HP-1100 型 (NO.1)
ワークステーション :	HPケミステーション (Windows 95)
パソコン :	HP Vectra XM, ディスプレイ ; Vectra VCA 1280
プリンター :	HP製 LASER JET 4 PLUS
デガッサー :	G1322A型
送液ポンプ :	G1312A型
オートサンプラ :	G1313A型
カラムオープン :	G1316A型
紫外可視分光検出器 :	G1314A型

(条件)

カラム :	Inertsil ODS-3V, 5 μ m, 4.6 \times 150mm (GL Sciences Inc. 製)
溶離液 :	Acetonitrile 90 %, 0.01Mりん酸二水素ナトリウム 10 %
流速 :	1.0 mL/min
測定波長 :	206 nm
試料注入量 :	20 μ L
カラムオープン温度 :	40.0 $^{\circ}$ C

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, 0.10, 0.20, 0.50, 1.00, 2.00, 5.00, 10.0, 20.0 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 検出限界

最小検出ピーク面積を 1.0 countに設定し、これに相当する試験液中の被験物質濃度 0.02 mg/Lを検出限界とした。

5 添加回収試験

試験液の分析は、「1 試験液の分析方法」に示したように試験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無かった。したがって、回収率の補正は行っていない。

Figure A-2-1 Calibration Curve

Input Data		
No.	Concentration (mg/L)	Peak Area (count)
1	0	0
2	0.10	7.0
3	0.20	14.4
4	0.50	37.0
5	1.00	75.0
6	2.00	119.3
7	5.00	377.1
8	10.0	759.7
9	20.0	1537.3

$$Y = 76.5X$$

$$r = 1.000$$

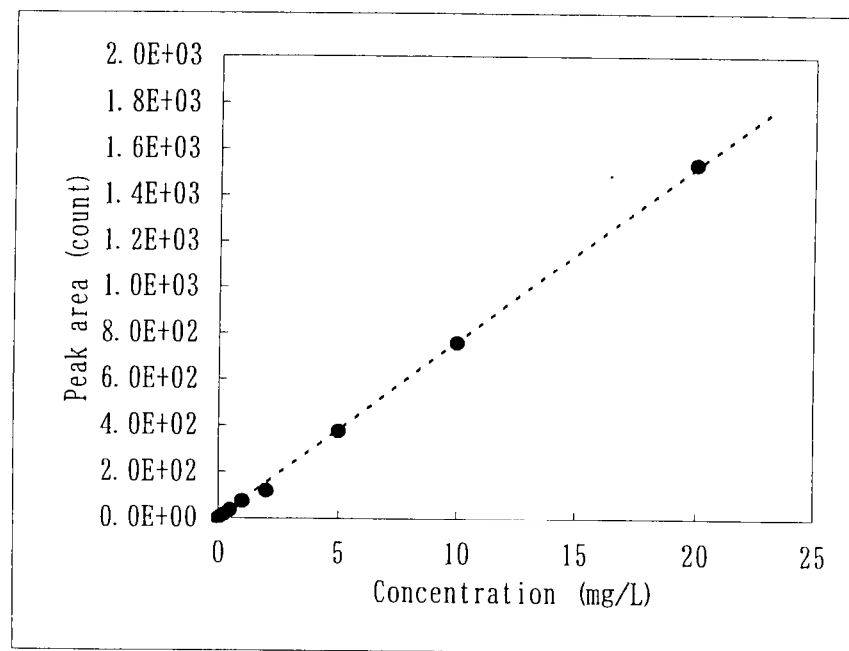
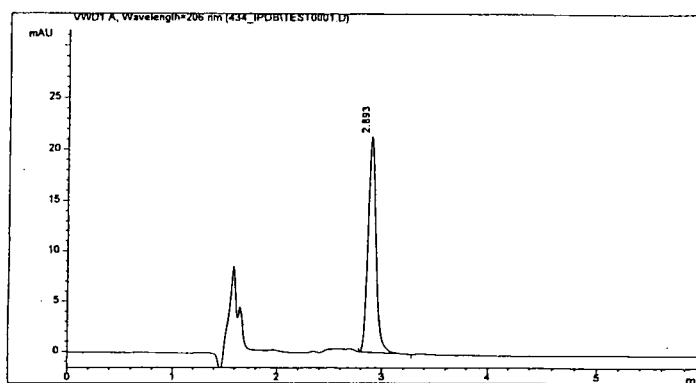


Figure A-2-2 Representative chromatograms

(1) Standard 2.00 mg/L ; 0 hr

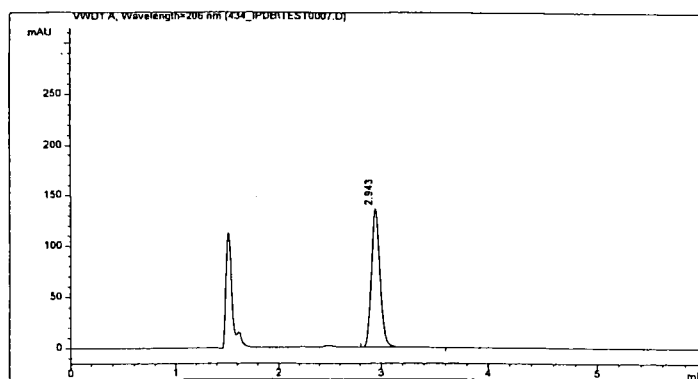
Injection Date : 00/01/25 Seq Line : 1
 Test No. : 9B434G Vial No. : 1
 Test Substance : IPDB Inj. Vol. : 20 µl
 Sample Name : std 2 mg/L
 Acq Operator : XXXXXXXXXX
 Acq. Method : 9B434G.M
 Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\1999.M\9B434G.M



Area Percent Report:						
Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [count]	Height [count]	Area %
1	2.893	VP	0.083	116.6	21.40	100
Total :				116.6		

(2) Standard 10.0 mg/L ; 0 hr

Injection Date : 00/01/25 Seq Line : 7
 Test No. : 9B434G Vial No. : 2
 Test Substance : IPDB Inj. Vol. : 20 µl
 Sample Name : std 10 mg/L
 Acq Operator : XXXXXXXXXX
 Acq. Method : 9B434G.M
 Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\1999.M\9B434G.M

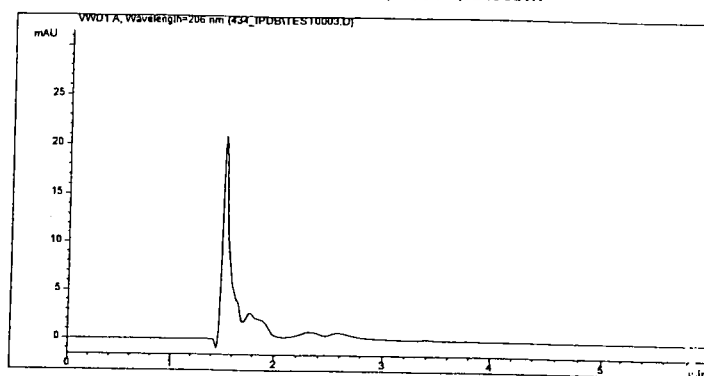


Area Percent Report:						
Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [count]	Height [count]	Area %
1	2.943	VBA	0.086	766.5	136.39	100
Total :				766.5		

Figure A-2-2 Continued

(3) Solvent Control ; 0 hr

Injection Date : 00/01/25 Seq Line : 3
 Test No. : 9B434G Vial No. : 12
 Test Substance : IPDB Inj. Vol. : 20 µl
 Sample Name : s-control 0hr
 Acq Operator : XXXXXXXXXX
 Acq. Method : 9B434G.M
 Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\1999.M\9B434G.M



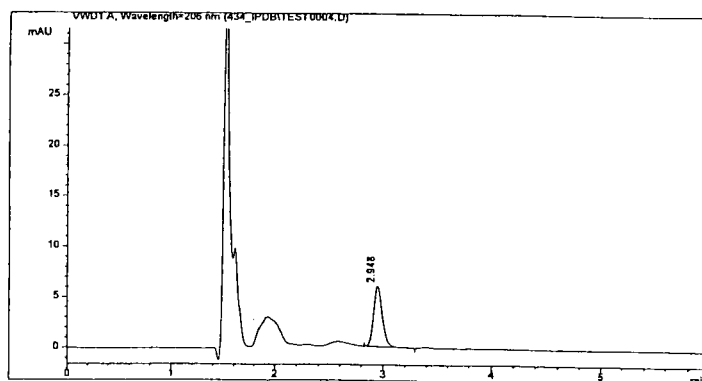
Area Percent Report:

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [count]	Height [count]	Area % [%]
--------	---------------	------	-------------	--------------	----------------	------------

No peaks found

(4) 0.50 mg/L nominal ; 0 hr

Injection Date : 00/01/25 Seq Line : 4
 Test No. : 9B434G Vial No. : 13
 Test Substance : IPDB Inj. Vol. : 20 µl
 Sample Name : conc-1 0hr
 Acq Operator : XXXXXXXXXX
 Acq. Method : 9B434G.M
 Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\1999.M\9B434G.M



Area Percent Report:

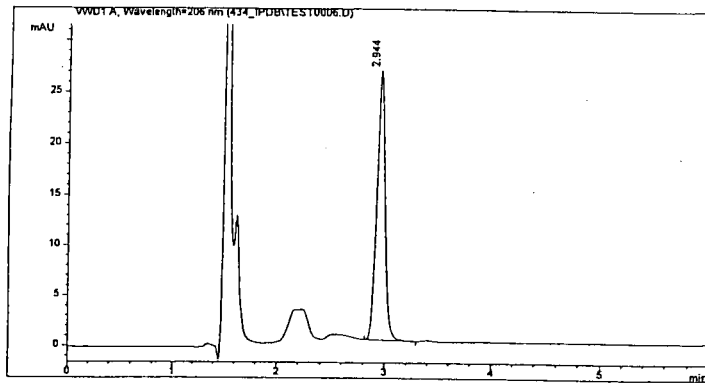
Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [count]	Height [count]	Area % [%]
1	2.948	VP	0.086	34.2	6.06	100

Total : 34.2

Figure A-2-2 Continued

(5) 2.20 mg/L nominal ; 0 hr

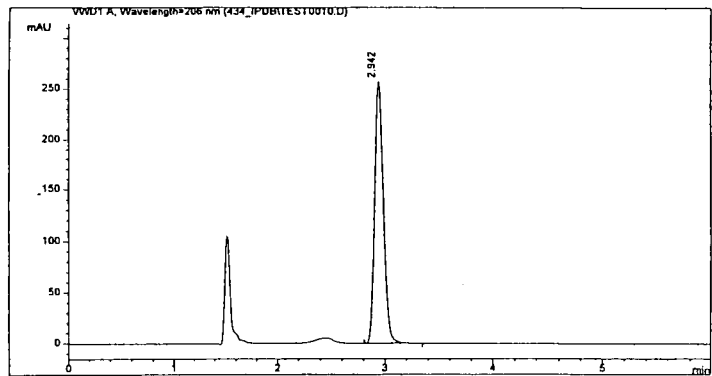
Injection Date : 00/01/25 Seq Line : 6
 Test No. : 9B434G Vial No. : 15
 Test Substance : IPDB Inj. Vol. : 20 µl
 Sample Name : conc-3 0hr
 Acq Operator :
 Acq. Method : 9B434G.M
 Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\1999.M\9B434G.M



Area Percent Report:						
Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [count]	Height [count]	Area %
1	2.944	VP	0.085	148.0	26.60	100
Total :				148.0		

(6) 20.0 mg/L nominal ; 0 hr

Injection Date : 00/01/25 Seq Line : 10
 Test No. : 9B434G Vial No. : 18
 Test Substance : IPDB Inj. Vol. : 20 µl
 Sample Name : conc-6 0hr
 Acq Operator :
 Acq. Method : 9B434G.M
 Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\1999.M\9B434G.M



Area Percent Report:						
Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [count]	Height [count]	Area %
1	2.942	BV	0.088	1452.7	257.93	100
Total :				1452.7		

(7) Standard 2.00 mg/L ; 72 hr

V99DTX, Wavelength=206 nm (434_IPDBTEST0011.U)

mAU

25

20

15

10

5

0

0 1 2 3 4 5

3.169

Area Percent Report:						
Pack #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [count]	Height [count]	Area %
1	3.169	MM	0.099	126.1	21.31	100
Total :				126.1		

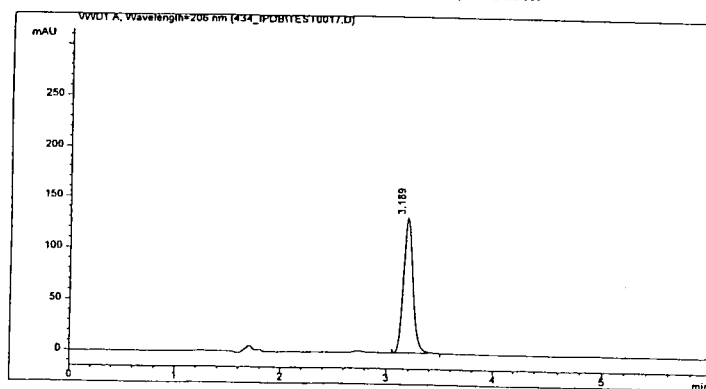
(8) Standard 10.0 mg/L ; 72 hr

```

Injection Date : 00/01/28
Test No.       : 9B434G
Test Substance : IPDB
Sample Name    : std 10 mg/L
Acq Operator   : 
Acq. Method    : 9B434G.M
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\1999.M\9B434G.M

Seq Line      : 7
Vial No.      : 2
Inj. Vol.     : 20 µl

```

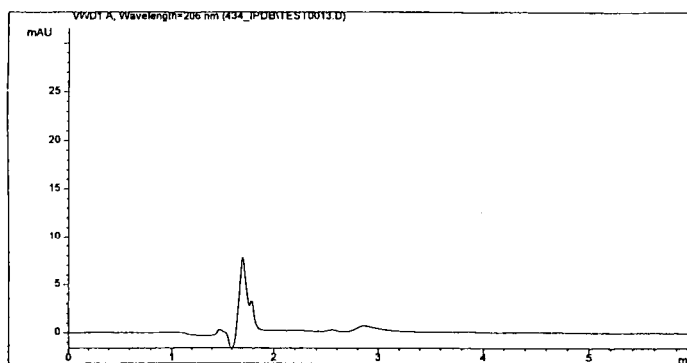


Area Percent Report:						
Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [count]	Height [count]	Area % [%]
1	3.189	MM	0.103	811.5	131.93	100
Total :				811.5		

Figure A-2-2 Continued

(9) Solvent Control ; 72 hr

Injection Date : 00/01/28 Seq Line : 3
 Test No. : 9B434G Vial No. : 12
 Test Substance : IPDB Inj. Vol. : 20 µl
 Sample Name : s-control 72hr
 Acq Operator :
 Acq. Method : 9B434G.M
 Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\1999.M\9B434G.M



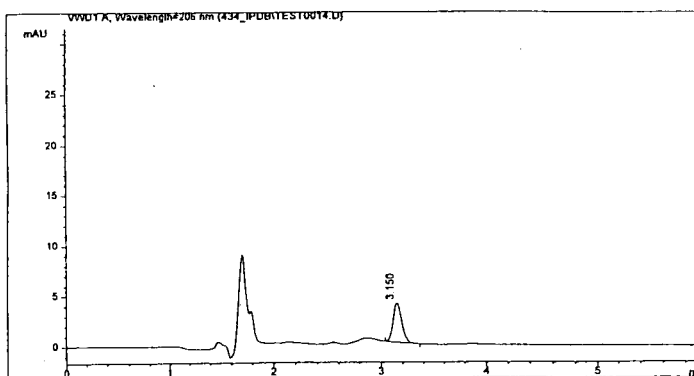
Area Percent Report:

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [count]	Height [count]	Area % [%]
--------	---------------	------	-------------	--------------	----------------	------------

No peaks found

(10) 0.50 mg/L nominal ; 72 hr

Injection Date : 00/01/28 Seq Line : 4
 Test No. : 9B434G Vial No. : 13
 Test Substance : IPDB Inj. Vol. : 20 µl
 Sample Name : conc-1 72hr
 Acq Operator :
 Acq. Method : 9B434G.M
 Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\1999.M\9B434G.M



Area Percent Report:

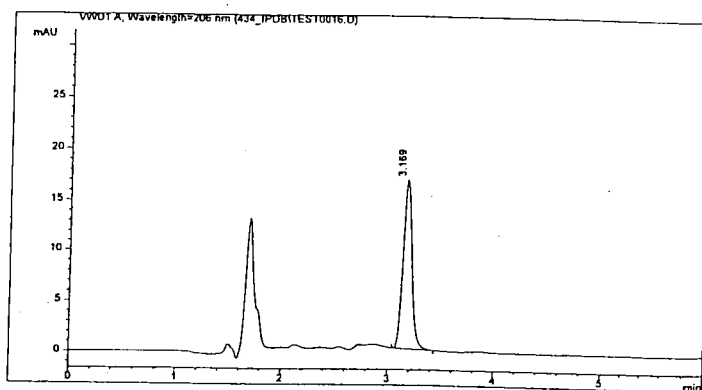
Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [count]	Height [count]	Area % [%]
1	3.150	MM	0.094	22.0	3.91	100
Total :				22.0		

Figure A-2-2 Continued

(11) 2.20 mg/L nominal ; 72 hr

Injection Date : 00/01/28
 Test No. : 9B434G
 Test Substance : IPDB
 Sample Name : conc-3 72hr
 Acq Operator :
 Acq. Method : 9B434G.M
 Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\1999.M\9B434G.M

Seq Line : 6
 Vial No. : 15
 Inj. Vol. : 20 µl

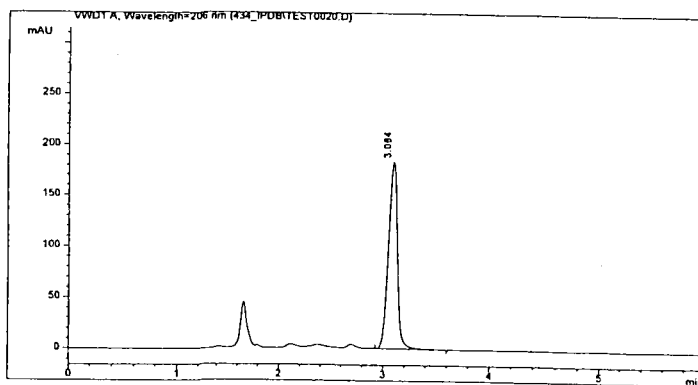


Area Percent Report:					
Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [count]	Height [count]
1	3.169	MM	0.097	97.7	16.78
Total :				97.7	

(12) 20.0 mg/L nominal ; 72 hr

Injection Date : 00/01/28
 Test No. : 9B434G
 Test Substance : IPDB
 Sample Name : conc-6 72hr
 Acq Operator :
 Acq. Method : 9B434G.M
 Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\1999.M\9B434G.M

Seq Line : 10
 Vial No. : 18
 Inj. Vol. : 20 µl



Area Percent Report:					
Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [count]	Height [count]
1	3.084	VBA	0.090	1083.1	184.33
Total :				1083.1	