

環境省殿

本写しは原本と相違ありません

三菱化学メディエンス(株)

横浜研究センター 試験責任者

## 最 終 報 告 書

*N,N*-ジメチルヒドラジンの

藻類 (*Pseudokirchneriella subcapitata*) に対する生長阻害試験

(試験番号 : A090258)

2010年 2月24日

三菱化学メディエンス株式会社

陳 述 書

三菱化学メディエンス株式会社 メディケム事業本部  
安科研事業部 横浜研究センター

試 験 委 託 者 : 環境省

表 題 : *N,N*-ジメチルヒドラジンの藻類 (*Pseudokirchneriella subcapitata*) に対する生長阻害試験

試 験 番 号 : A090258

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。

「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, 環境企発第031121004号, 最終改正: 平成20年7月4日)

2010年 2月24日

試験責任者

## 信 頼 性 保 証 書

三菱化学メディエンス株式会社 メディケム事業本部

安科研事業部 横浜研究センター

試験委託者 : 環境省

表 題 : *N,N*-ジメチルヒドラジン  
の藻類 (*Pseudokirchneriella subcapitata*) に対する生長阻害試験

試験番号 : A090258

本試験は下記のGLPに従って実施され、最終報告書が生データを反映していることを保証する。

「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, 環企発第 031121004号, 最終改正: 平成20年7月4日)

監査および査察の実施事項, 実施日および報告日を以下に示す。

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		
試験計画書草案	2010年 1月27日	2010年 1月27日
試験計画書	2010年 1月29日	2010年 1月29日
変更書(変更番号: 01)	2010年 2月17日	2010年 2月18日
試験の査察		
試験液の調製	2010年 2月 1日	2010年 2月 1日
藻類の添加	2010年 2月 1日	2010年 2月 1日
生物量の測定	2010年 2月 4日	2010年 2月 4日
最終報告書監査		
最終報告書草案	2010年 2月23日	2010年 2月23日
最終報告書	2010年 2月24日	2010年 2月24日

信頼性保証部門主担当者 : 2010年 2月24日

## 試験実施概要

1. 表 題 : *N,N*-ジメチルヒドラジンの藻類 (*Pseudokirchneriella subcapitata*) に対する生長阻害試験  
(試験番号 : A090258)
2. 試験目的 : 被験物質の藻類 (*Pseudokirchneriella subcapitata*) に対する生長阻害試験 (72 時間) を行い, 半数生長阻害濃度 (EC50) および最大無影響濃度 (NOEC) を求める。
3. 適用ガイドライン : 「新規化学物質等に係る試験の方法について<藻類生長阻害試験, ミジンコ急性遊泳阻害試験及び魚類急性毒性試験>」(平成 15 年 11 月 21 日 薬食発第 1121002 号, 平成 15・11・13 製局第 2 号, 環境企発第 031121002 号, 最終改正 : 平成 18 年 11 月 20 日)
4. 適用 G L P : 「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, 環境企発第 031121004 号, 最終改正 : 平成 20 年 7 月 4 日)
5. 試験委託者 : 環境省  
東京都千代田区霞が関一丁目 2 番 2 号
6. 試験受託者 : 三菱化学メディエンス株式会社  
東京都港区芝浦四丁目 2 番 8 号
7. 試験施設 : 三菱化学メディエンス株式会社 メディケム事業本部  
安科研事業部 横浜研究センター  
神奈川県横浜市青葉区鴨志田町 1000 番地

8. 試験責任者 : [REDACTED]  
生態影響評価グループ

9. 試験担当者 : [REDACTED]  
(試験実施)

[REDACTED]  
(分析実施)

10. 試験日程 : 試験開始日 2010年 1月29日  
暴露開始日 2010年 2月 1日  
暴露終了日 2010年 2月 4日  
試験終了日 2010年 2月24日

11. 保管 : 下記の試資料は、当施設の試資料保管施設に保管する。

- 1) 試験計画書
- 2) 最終報告書
- 3) 生データ
- 4) 対照物質
- 5) その他必要なもの

## 目 次

	頁
要 約.....	7
1 材料.....	9
1.1 被験物質.....	9
1.1.1 名称, 構造式および物理化学的性状.....	9
1.1.2 供試試料.....	10
1.1.3 保管法および安定性の確認.....	10
1.2 試験用水.....	10
1.3 供試生物.....	10
1.4 試験容器および藻類培養試験装置等.....	11
2 方法.....	12
2.1 試験方法.....	12
2.1.1 試験条件.....	12
2.1.2 予備試験結果.....	13
2.1.3 試験濃度の設定.....	14
2.1.4 試験液の調製.....	14
2.1.5 試験液および試験培養液の分析.....	14
2.1.6 試験操作.....	15
2.2 試験結果の評価.....	16
2.2.1 結果の算出.....	16
2.2.2 試験の有効性.....	18
3 結果および考察.....	19
3.1 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.....	19
3.2 培養試験装置内環境, 試験液および試験培養液の pH, 試験液の外観.....	19
3.3 試験液および試験培養液中の被験物質濃度.....	19
3.4 半数生長阻害濃度 (EC50) および最大無影響濃度 (NOEC).....	20
3.5 藻類の観察結果.....	20
3.6 試験の有効性.....	20
Table 1~8.....	21~25
Figure 1~2.....	26~27
付属資料-1 赤外吸収スペクトル.....	28~29
付属資料-2 培地の組成.....	30~31
付属資料-3 試験液の調製.....	32~33
付属資料-4 試験液および試験培養液の分析.....	34~43
付属資料-5 結果の算出.....	44~46

## 要 約

試験委託者 : 環境省

表 題 : *N,N*-ジメチルヒドラジンの藻類 (*Pseudokirchneriella subcapitata*) に対する生長阻害試験

試験番号 : A090258

試験方法 : 本試験は、「新規化学物質等に係る試験の方法について<藻類生長阻害試験, ミジンコ急性遊泳阻害試験及び魚類急性毒性試験>」(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, 最終改正:平成18年11月20日)に準拠して実施した。

- 1) 供試生物 : 単細胞緑藻類 (*Pseudokirchneriella subcapitata*)
- 2) 試験用水 : 試験ガイドライン推奨培地
- 3) 暴露期間 : 72時間
- 4) 培養方式 : 止水式(開放系), 振とう培養(100 rpm)
- 5) 初期生物量 : 前培養した藻類  $5 \times 10^3$  cells/mL  
(指数増殖期の藻類乾燥重量:  $1.8 \times 10^{-8}$  mg/cell, n=10)
- 6) 試験温度 : 22 °C (暴露期間中の変動範囲は $\pm 2$  °C以内)
- 7) 照明 : 65~75  $\mu$ E/m<sup>2</sup>/s, 白色蛍光灯で連続照明(液面付近)
- 8) 試験濃度(設定値) :

試験区	濃度 (mg/L)
対照区	—
濃度区 1	0.20
濃度区 2	0.43
濃度区 3	0.93
濃度区 4	2.0
濃度区 5	4.3
濃度区 6	9.3
濃度区 7	20

公比 : 2.2

- 9) 分析法 : 高速液体クロマトグラフ質量分析(LC/MS)法

## 結 果：

阻害濃度の算出には測定値の時間加重平均値を用いた。

### 1) 試験液および試験培養液中の被験物質濃度

濃度区 1～7 の測定値（時間加重平均値）は、それぞれ 0.129, 0.282, 0.604, 1.35, 3.06, 6.86, 15.4 mg/L であり、被験物質濃度の減少が認められた。濃度減少の主な原因として、試験液中での被験物質の変化が考えられた。

### 2) 生長速度の比較による阻害濃度

半数生長阻害濃度  $ErC50(0-72h)$  : 3.40 mg/L (95%信頼区間 : 2.96～3.90 mg/L)

最大無影響濃度  $NOECr(0-72h)$  : 0.129 mg/L

### 3) 藻類の形態観察

暴露開始後 72時間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，対照区との相違もなかった。



## 1 材料

## 1.1 被験物質

## 1.1.1 名称、構造式および物理化学的性状

被 験 物 質 の 名 称	<i>N,N</i> -ジメチルヒドラジン <sup>*1</sup>		
別 名	(略称: UDMH <sup>*2</sup> )		
C A S 番 号	57-14-7 <sup>*1</sup>		
構 造 式 又 は 示 性 式	<sup>*3</sup> $  \begin{array}{c}  \text{NH}_2 \\    \\  \text{N} \\  / \quad \backslash \\  \text{H}_3\text{C} \quad \text{CH}_3  \end{array}  $		
分 子 量	60.10		
試 験 に 供 し た 物 質 の 純 度 ( % )	99.1 (GC)		
試 験 に 供 し た 物 質 の ロ ッ ト 番 号	[REDACTED]		
不 純 物 の 名 称 及 び 含 有 率	—		
蒸 気 圧	20.93 kPa/25℃		
対 水 溶 解 度	可溶		
1-オクタノール/水分配係数	—		
融 点	-58℃		
沸 点	64℃		
常 温 に お け る 性 状	アンモニア臭のある無色～微黄色透明液体		
安 定 性	吸湿性がある。空気中では発煙し、徐々に黄変する。燃焼や高温により分解し; 窒素酸化物、水素、アンモニア、ジメチルアニリン、窒化水素酸などの有害なフェームを生成する。		
溶 媒 に 対 す る 溶 解 度 等	溶媒	溶解度	溶媒中の安定性
	アルコール	可溶	—
	エーテル	可溶	—
	炭化水素	可溶	—

上記内容は供給者提供資料による。ただし \* の内容は以下の通り。

\*1 試験委託者提供資料による。

\*2 当施設にて決定。

\*3 独立行政法人製品評価技術基盤機構 (<http://www.safe.nite.go.jp>) による。

## 1.1.2 供試試料

供給者： XXXXXXXXXX

## 1.1.3 保管法および安定性の確認

被験物質は試験期間中、当施設の試験物質保管用冷蔵庫（保管条件：冷蔵，暗所，窒素充填）内に保管した。

実験終了後に、保管した被験物質の赤外吸収スペクトルを測定した。得られたスペクトルは実験開始前に測定したスペクトルと一致したことから、被験物質は保管中安定であったと判断した。赤外吸収スペクトルを付属資料-1に示す。

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

## 1.2 試験用水

前培養および試験ともに試験ガイドラインに示されている推奨培地を調製し、濾過滅菌（0.22  $\mu$ m）したものを使用した。組成表を付属資料-2に示す。

試験ガイドラインには、大気との平衡状態で培地のpHが8.1となることが記載されている。当施設でのpHは水質により  $8.0 \pm 0.2$  である。

## 1.3 供試生物

- 1) 分類： 単細胞緑藻類
- 2) 学名： *Pseudokirchneriella subcapitata*
- 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ヶ月毎）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。  
速度法により算出した最新の72時間半数生長阻害濃度を示す。

ErC50 : 0.826 mg/L (95%信頼区間 : 0.773 ~ 0.884 mg/L,

暴露期間 : 2009年12月15日 ~ 2009年12月18日)

以下に2000年6月以降のErC50平均値を示す。

ErC50平均値  $\pm$  標準偏差 = 0.821  $\pm$  0.0828 mg/L, n=20

(最小値 ~ 最大値 = 0.687 ~ 0.965 mg/L)

- 8) 前培養： 前培養期間；2010 年 1 月 29 日～2010 年 2 月 1 日  
試験と同条件で前培養し，暴露開始時に指数増殖期になるようにした。  
また，変形や異常な細胞の出現は認められなかった。

#### 1.4 試験容器および藻類培養試験装置等

- 1) 試験容器： 300 mL 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) pH 計： 東亜電波工業製 HM-40V 型  
6) 温度計： Tasco Japan 製 TNA-120 型  
7) 光量子計： Apogee 製 QMSS 型  
Apogee 製 QMSS-ELEC 型  
8) 電子天秤： メトラー製 AG204 型  
メトラー製 AE163 型  
メトラー製 AB204-S 型  
メトラー製 PB3002 型

## 2 方法

### 2.1 試験方法

本試験は、「新規化学物質等に係る試験の方法について＜藻類生長阻害試験，ミジンコ急性遊泳阻害試験及び魚類急性毒性試験＞」（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，最終改正：平成 18 年 11 月 20 日）に準拠して実施した。

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。

#### 2.1.1 試験条件

- 1) 培養方式： 止水式（開放系），振とう培養（100 rpm）
- 2) 暴露期間： 72時間
- 3) 試験液量： 100 mL／容器  
(被験物質の濃度分析に使用するため，藻類接種時は 99 mL／容器となる)
- 4) 連数： 6 容器／対照区，3 容器／濃度区
- 5) 初期生物量： 前培養した藻類  $5 \times 10^3$  cells/mL  
(指数増殖期の藻類乾燥重量： $1.8 \times 10^{-8}$  mg/cell, n=10)
- 6) 試験温度： 22°C（暴露期間中の変動範囲は $\pm 2^\circ\text{C}$ 以内）
- 7) 照明： 65～75  $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ ，白色蛍光灯で連続照明（液面付近）
- 8) pH： 調整なし

## 2.1.2 予備試験結果

被験物質の試験用水に対する溶解度は >100 mg/L (当施設測定値) であった。

試験濃度を、試験ガイドライン上限濃度 (100 mg/L) 以下とし、予備試験を実施した。結果を以下に示す。

予備試験結果 (対照区 3 連, 各濃度区 1 連)

No. 1

濃度 (mg/L)	阻害率 (%) $I_{\mu}$ (0-72h) *1	試験液中の被験物質濃度 (設定値に対する割合, %)			
		暴露開始時	暴露開始後 72 時間		
			藻類添加有	藻類添加無	藻類添加無 密閉*2
対照区	--	---	--	--	--
0.10	-0.5	--	--	--	---
1.0	10.4	70	43	43	37
10	71.1	86	59	61	59
100	92.7	--	--	---	--

No. 2

濃度 (mg/L)	阻害率 (%) $I_{\mu}$ (0-72h) *1
対照区	--
0.20	1.9
0.50	9.4
20	91.0

\*1 「2.2.1 結果の算出, 2) 生長速度および生長阻害率の算出」に示した式により算出した。

\*2 500 mLガラス製共栓付三角フラスコを用いた。

なお、暴露開始後 72 時間の分析において被験物質濃度の減少が認められた。濃度減少の主な原因として、試験液中での被験物質の変化が考えられた。

### 2.1.3 試験濃度の設定

2.1.2 に示した予備試験の結果に基づき、試験濃度を次のように決定した。

試験区	濃度 (mg/L)
対照区	—
濃度区 1	0.20
濃度区 2	0.43
濃度区 3	0.93
濃度区 4	2.0
濃度区 5	4.3
濃度区 6	9.3
濃度区 7	20

公比：2.2

### 2.1.4 試験液の調製

試験液の調製方法を付属資料－3に示す。pH測定および試験培養液の色調観察のための試験液（各試験区1連，以下予備容器とする）も調製した。

調製時の試験液の外観を観察し記録した。

### 2.1.5 試験液および試験培養液の分析

暴露開始時，暴露開始後24，48時間および72時間に，全試験区の試験液および試験培養液中の被験物質濃度を，高速液体クロマトグラフ質量分析（LC/MS）法により分析した。分析方法の詳細を付属資料－4に示す。

## 2.1.6 試験操作

### 1) 暴露の開始

前培養した藻類を、生物量（代替パラメータとして細胞濃度）が  $5 \times 10^3$  cells/mLとなるよう、試験液の入った容器に一定量添加した。前培養液の生物量は、粒子計数装置および血球計算盤と顕微鏡により測定した。なお、予備容器には添加しなかった。

各試験容器を培養装置に、乱数表を用いランダムに配置し、暴露を開始した。予備容器も同時に培養装置に設置した。暴露開始後24時間毎に再配置した。

### 2) 生物量の測定

暴露開始後 24, 48および 72時間に各試験容器より試験培養液 1.0 mL（72時間では 0.5 mL）を採取し、粒子計数装置用電解液 9.0 mL（72時間では 9.5 mL）と混合した後、生物量を粒子計数装置により測定した。

### 3) 試験培養液の色調観察および細胞形態観察

暴露開始時、暴露開始後 24, 48および 72時間には試験培養液の色調を予備容器との比較で観察した。また、暴露開始後 72時間には細胞形態を顕微鏡により観察した。

### 4) 試験環境の測定

暴露開始時の pHは、各試験区の予備容器から試験液を一部採取して測定し、暴露開始後 72時間の pHは、各試験区の試験容器のうち1容器（No. 1）の試験培養液について測定した。また、暴露期間中、培養装置内の温度、照明光強度および回転数を1日1回測定した。

## 2.2 試験結果の評価

### 2.2.1 結果の算出

#### 1) 生長曲線

対照区および各濃度区の生物量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。  
この時、対照区の生長曲線が暴露期間中を通して指数増殖期にあるか否かを確認した。

#### 2) 生長速度および生長阻害率の算出

指数増殖している藻類の生長速度 ( $\mu_{i-j}$ ) を次の式より算出した。

$$\mu_{i-j} = \frac{\ln X_j - \ln X_i}{t_j - t_i}$$

ここで、

$\mu_{i-j}$  :  $t_i$  時と  $t_j$  時の間の生長速度

$X_i$  :  $t_i$  時の生物量

[暴露開始時 ( $t_0$ ) の生物量については設定値を用いる]

$X_j$  :  $t_j$  時の生物量

$t_i$  : 暴露開始後  $i$  回目に生物量を測定した時間

$t_j$  : 暴露開始後  $j$  回目に生物量を測定した時間

各濃度区における生長阻害率 ( $I_\mu$ ) は対照区の生長速度の平均値と各濃度区での各々の生長速度との差として次の式により算出した。

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

ここで、

$\mu_c$  : 対照区の平均生長速度

$\mu_t$  : 各濃度区における各々の生長速度



## 3) 阻害濃度算出に用いる被験物質濃度

阻害濃度の算出に用いる被験物質濃度は、測定値の時間加重平均値とした。

時間加重平均値は次の式より算出した。

$$Area = \frac{ConcA_n - ConcB_n}{\ln(ConcA_n) - \ln(ConcB_n)} \times Hours$$

$$\overline{MC} = \frac{Total\ Areas}{Total\ Hours}$$

$ConcA_n$ : n期間の始めの測定値

(暴露開始時または暴露開始後 24, 48時間の測定値)

$ConcB_n$ : n期間の終わりの測定値

(暴露開始後 24, 48時間または 72時間の測定値)

( $ConcA_n$ と $ConcB_n$ の値が同じ場合は、 $Area = ConcA_n \times Hours$ とする。)

$\overline{MC}$ : 時間加重平均値

## 4) 半数生長阻害濃度 (EC50) の算出

72時間の暴露期間を通じた生長阻害率  $I_{\mu}$  (0-72h) を用いて、以下の方法により半数生長阻害濃度 (EC50) を決定した。

最高濃度区における阻害率	≥ 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	記載
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) し、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
EC50の表記方法	ErC50 (0-72h)	

## 5) 最大無影響濃度 (NOEC)

対照区と濃度区の生長速度 ( $\mu_{0-72h}$ ) を以下の統計学的手法により比較し、有意差が認められない試験最高濃度区の時間加重平均値を最大無影響濃度 (NOEC : NOECr (0-72h) と表記) とした。

多群の比較 [対照区以外に2群以上]
Bartlett の等分散検定
等分散が認められる場合 一元配置分散分析 (ANOVA) パラメトリックの Dunnett, Williams または Scheffe の多重比較検定
等分散が認められない場合 Kruskal-Wallis の検定 ノンパラメトリックの Dunnett, Williams または Scheffe の多重比較検定
Yukms ソフトウェア Statlight 「#4 多群の比較」 (Yukms Corp, 東京)

## 6) 統計学的手法

試験結果の算出に用いた統計学的手法は、結果とともに示した。

## 2.2.2 試験の有効性

以下の条件が満たされる場合、試験を有効とみなした。

- 1) 対照区の生物量が暴露期間中に少なくとも 16 倍に増殖すること。
- 2) 対照区の毎日の生長速度の変動係数が暴露期間を通じて 35% を超えないこと。
- 3) 対照区の繰り返し間の生長速度の変動係数が 7% を超えないこと。

### 3 結果および考察

#### 3.1 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。

#### 3.2 培養試験装置内環境，試験液および試験培養液のpH，試験液の外観

暴露期間中の培養試験装置内環境（温度，照明光強度，回転数）を Table 1 に，暴露開始時の試験液および暴露開始後 72 時間の試験培養液のpHを Table 2 に，調製時の試験液の外観を Table 3 に示す。

培養試験装置内の温度は，設定範囲内（22℃，暴露期間中の変動範囲は±2℃以内）であった。pHは，暴露開始時が全試験区で 7.8，暴露開始後 72 時間では 7.5～7.7であった。

調製時の試験液の外観は，全ての試験区において，けん濁物質，浮遊物質，沈殿物は認められず，色調は無色であった。

#### 3.3 試験液および試験培養液中の被験物質濃度

試験液および試験培養液中の被験物質濃度の結果を Table 4 に，代表的なクロマトグラムを付属資料－4に示す。

濃度区 1～7 の測定値（時間加重平均値）は，それぞれ 0.129, 0.282, 0.604, 1.35, 3.06, 6.86, 15.4 mg/L であり，被験物質濃度の減少が認められた。濃度減少の主な原因として，試験液中での被験物質の変化が考えられた。

### 3.4 半数生長阻害濃度 (EC50) および最大無影響濃度 (NOEC)

暴露期間中の全試験区の生物量を Table 5 に、生長曲線を Figure 1 に示す。対照区の生長曲線が暴露期間中を通して指数増殖期にあることを確認した。

生長速度と生長阻害率を Table 6 に、半数生長阻害濃度 (EC50) および最大無影響濃度 (NOEC) を Table 7 に、濃度－阻害率曲線を Figure 2 に示す。得られた ErC50 および NOECr を以下に示す。

NOEC は、Bartlett の等分散検定 ( $\alpha=0.01$ ) を行い等分散性を確認後、一元配置分散分析 (1-way ANOVA,  $\alpha=0.05$ ) および Williams の多重比較検定 ( $\alpha=0.05$ , 両側) を用い決定した。詳細を付属試料－5 に示す。

ErC50 (0-72h) : 3.40 mg/L (95%信頼区間 : 2.96～3.90 mg/L)

NOECr (0-72h) : 0.129 mg/L

### 3.5 藻類の観察結果

試験培養液の色調観察の結果、濃度区 5 以下の試験区で時間経過とともに緑色度が増加する傾向がみられた。濃度区 6 以上では、緑色化することはなかった。

暴露開始後 72 時間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、対照区との相違もなかった。

### 3.6 試験の有効性

対照区の生物量を Table 5 に、生長速度を Table 8 に示す。

対照区の生物量は暴露期間中に 16 倍以上増加した。また、対照区の毎日の生長速度の変動係数は暴露期間を通じて 35% を、対照区の繰り返し間の生長速度の変動係数は 7% をそれぞれ超えることはなかった。

試験の有効性の条件をすべて満たしたため、試験は有効であるとみなした。

以 上

Table 1 Temperatures, Light Intensities and Revolutions in the Incubation Chamber

Exposure Period (Hours)	Temperature (°C)	Light Intensity ( $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ )	Revolution (rpm)
0	21.2	68-73	100
24	21.6	66-75	100
48	21.6	65-73	100
72	21.5	65-74	100

Table 2 pH Values of Test Cultures

Test Group	pH		
	0 Hour	72 Hours	(Vessel No.)
Control	7.8	7.5	(1)
Conc.1	7.8	7.6	(1)
Conc.2	7.8	7.6	(1)
Conc.3	7.8	7.6	(1)
Conc.4	7.8	7.6	(1)
Conc.5	7.8	7.6	(1)
Conc.6	7.8	7.6	(1)
Conc.7	7.8	7.7	(1)

Table 3 Appearances of Prepared Test Solutions before Inoculation

Test Group	Suspended solids	Floating solids	Precipitation	Color
Control	S-	F-	P-	C-
Conc.1	S-	F-	P-	C-
Conc.2	S-	F-	P-	C-
Conc.3	S-	F-	P-	C-
Conc.4	S-	F-	P-	C-
Conc.5	S-	F-	P-	C-
Conc.6	S-	F-	P-	C-
Conc.7	S-	F-	P-	C-

S- : Not observed (transparent)

F- : Not observed

P- : Not observed

C- : Colorless

Table 4 Measured Concentration of the Test Substance in Test Cultures

Test Group	Nominal Concentration (mg/L)	Measured Concentration (mg/L) (Percent of Nominal)				Mean <sup>a</sup> Measured Concentration (mg/L) (Percent of Nominal)
		0 Hour	24 Hours	48 Hours	72 Hours	
Control	--	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	----
Conc.1	0.20	0.175 (88)	0.152 (76)	0.0998 (50)	0.0991 (50)	0.129 (65)
Conc.2	0.43	0.365 (85)	0.321 (75)	0.241 (56)	0.209 (49)	0.282 (66)
Conc.3	0.93	0.762 (82)	0.673 (72)	0.534 (57)	0.457 (49)	0.604 (65)
Conc.4	2.0	1.73 (87)	1.49 (75)	1.21 (61)	0.975 (49)	1.35 (68)
Conc.5	4.3	3.77 (88)	3.34 (78)	2.86 (67)	2.24 (52)	3.06 (71)
Conc.6	9.3	8.23 (88)	7.37 (79)	6.42 (69)	5.44 (58)	6.86 (74)
Conc.7	20	17.7 (89)	15.9 (80)	14.8 (74)	13.4 (67)	15.4 (77)

a : Time weighted mean

Table 5 Biomass of *Pseudokirchneriella subcapitata* during the 72-Hour Exposure

Test Group	Nominal Concentration [Mean <sup>a</sup> Measured Concentration] (mg/L)	Vessel No.	Biomass (cells/mL)			
			0 Hour*	24 Hours	48 Hours	72 Hours
Control	--	1	5000	31700	241000	1840000
		2	5000	33700	272000	2080000
		3	5000	30100	279000	2130000
		4	5000	33800	282000	2270000
		5	5000	33000	274000	2110000
		6	5000	34200	291000	2350000
		Average	5000	32800	273000	2130000
		SD	0	1570	17100	176000
Conc.1	0.20 [ 0.129 ]	1	5000	35500	311000	1930000
		2	5000	33000	269000	1840000
		3	5000	33700	276000	1960000
		Average	5000	34100	285000	1910000
		SD	0	1290	22500	62400
Conc.2	0.43 [ 0.282 ]	1	5000	31900	252000	1250000
		2	5000	31500	224000	1270000
		3	5000	37500	293000	1530000
		Average	5000	33600	256000	1350000
		SD	0	3350	34700	156000
Conc.3	0.93 [ 0.604 ]	1	5000	29300	188000	965000
		2	5000	32000	173000	801000
		3	5000	26300	165000	988000
		Average	5000	29200	175000	918000
		SD	0	2850	11700	102000
Conc.4	2.0 [ 1.35 ]	1	5000	26000	126000	280000
		2	5000	25800	144000	464000
		3	5000	25500	127000	265000
		Average	5000	25800	132000	336000
		SD	0	252	10100	111000
Conc.5	4.3 [ 3.06 ]	1	5000	20400	84900	99000
		2	5000	22500	77400	93200
		3	5000	23100	81100	94300
		Average	5000	22000	81100	95500
		SD	0	1420	3750	3080
Conc.6	9.3 [ 6.86 ]	1	5000	18900	38600	67400
		2	5000	19300	27900	44500
		3	5000	17700	31400	56600
		Average	5000	18600	32600	56200
		SD	0	833	5460	11500
Conc.7	20 [ 15.4 ]	1	5000	17300	17400	15800
		2	5000	16200	16800	18400
		3	5000	18500	18400	15800
		Average	5000	17300	17500	16700
		SD	0	1150	808	1500

a : Time weighted mean

SD : Standard deviation

\* : Nominal initial biomass

Table 6 Growth Inhibitions (%) of *Pseudokirchneriella subcapitata*

Test Group	Nominal Concentration [Mean <sup>a</sup> Measured Conc.] (mg/L)	Vessel No.	Growth Rate	
			Rate $\mu(0-72h)$	Inhibition(%) <sup>*1</sup> $I_{\mu}(0-72h)$
Control	--	1	0.0821	-
		2	0.0838	-
		3	0.0841	-
		4	0.0850	-
		5	0.0840	-
		6	0.0855	-
		Average SD	0.0841 0.0012	-
Conc.1	0.20 [ 0.129 ]	1	0.0827	1.7
		2	0.0821	2.4
		3	0.0829	1.4
		Average SD	0.0826 0.0004	1.8
Conc.2	0.43 [ 0.282 ]	1	0.0767	8.8
		2	0.0769	8.6
		3	0.0795	5.5
		Average SD	0.0777** 0.0016	7.6
Conc.3	0.93 [ 0.604 ]	1	0.0731	13.1
		2	0.0705	16.2
		3	0.0734	12.7
		Average SD	0.0723** 0.0016	14.0
Conc.4	2.0 [ 1.35 ]	1	0.0559	33.5
		2	0.0629	25.2
		3	0.0551	34.5
		Average SD	0.0580** 0.0043	31.1
Conc.5	4.3 [ 3.06 ]	1	0.0415	50.7
		2	0.0406	51.7
		3	0.0408	51.5
		Average SD	0.0410** 0.0005	51.3
Conc.6	9.3 [ 6.86 ]	1	0.0361	57.1
		2	0.0304	63.9
		3	0.0337	59.9
		Average SD	0.0334** 0.0029	60.3
Conc.7	20 [ 15.4 ]	1	0.0160	81.0
		2	0.0181	78.5
		3	0.0160	81.0
		Average SD	0.0167** 0.0012	80.2

a : Time weighted mean

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

SD : Standard deviation

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



Table 7 EC50 and NOEC

Based on  $I_{\mu}$  (0-72h) values (Growth rates)

ErC50 (0-72h) (mg/L)	95-Percent Confidence Limits (mg/L)	NOECr (0-72h) (mg/L)
3.40*	2.96 – 3.90	0.129

\*: Using the data of conc.4, conc.5, conc.6 and conc.7

The ErC50 value 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 control.

The NOECr value was determined by an analysis of variance (ANOVA), 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 level were set at  $\alpha=0.05$ , except Bartlett test, which was set at  $\alpha=0.01$ .

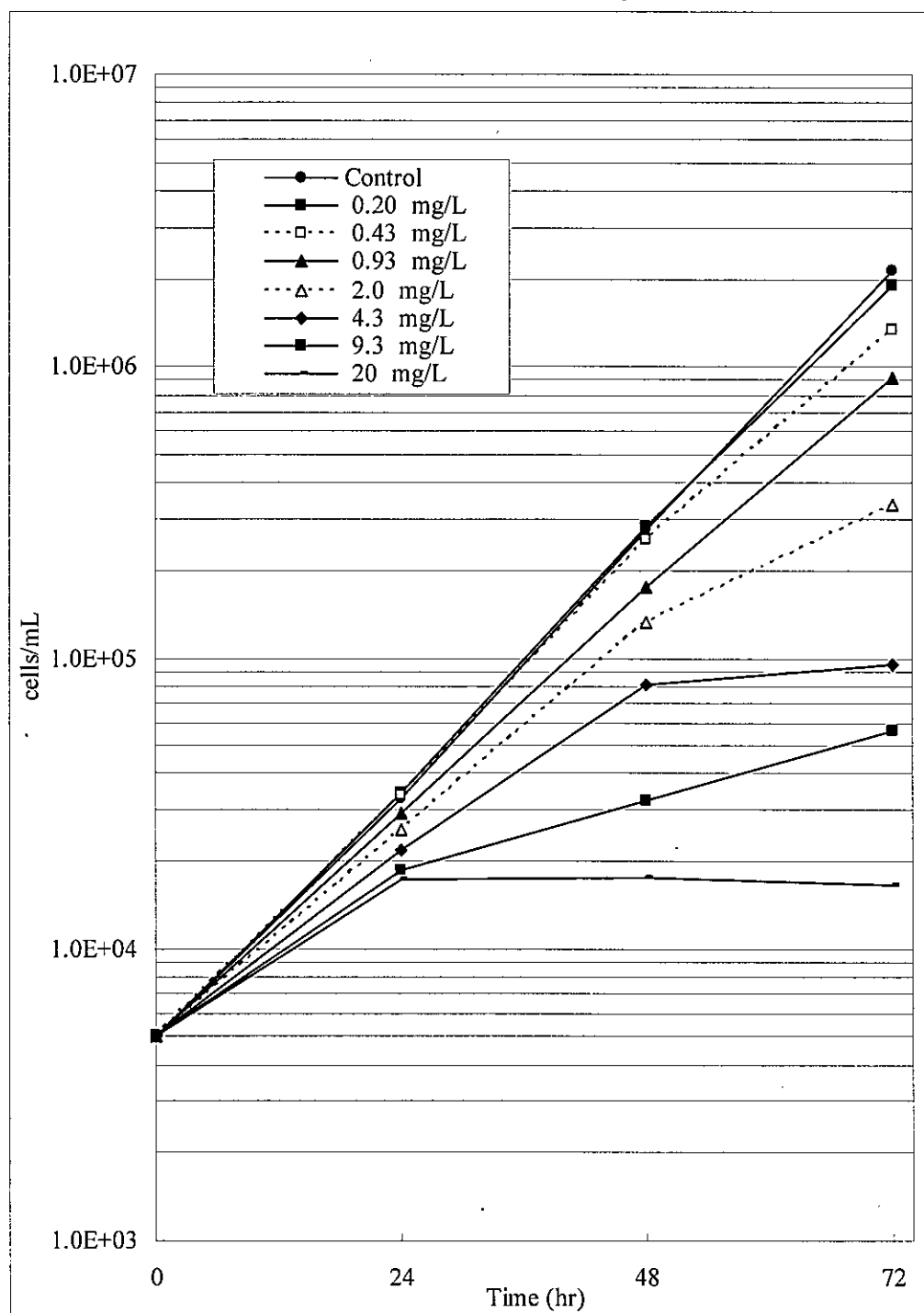
Table 8 Growth Rates of Control

Vessel No.	Growth Rate				Average of $\mu(0-24h, 24-48h,$ $48-72h)$	SD	CV(%)
	$\mu(0-72h)$	$\mu(0-24h)$	$\mu(24-48h)$	$\mu(48-72h)$			
1	0.0821	0.0770	0.0845	0.0847	0.0821	0.0044	5.4
2	0.0838	0.0795	0.0870	0.0848	0.0838	0.0039	4.7
3	0.0841	0.0748	0.0928	0.0847	0.0841	0.0090	10.7
4	0.0850	0.0796	0.0884	0.0869	0.0850	0.0047	5.5
5	0.0840	0.0786	0.0882	0.0851	0.0840	0.0049	5.8
6	0.0855	0.0801	0.0892	0.0870	0.0854	0.0047	5.5
Average	0.0841	0.0783	0.0884	0.0855			6.3
SD	0.0012	0.0020	0.0027	0.0011			
CV(%)	1.4	2.6	3.1	1.3			

SD : Standard deviation

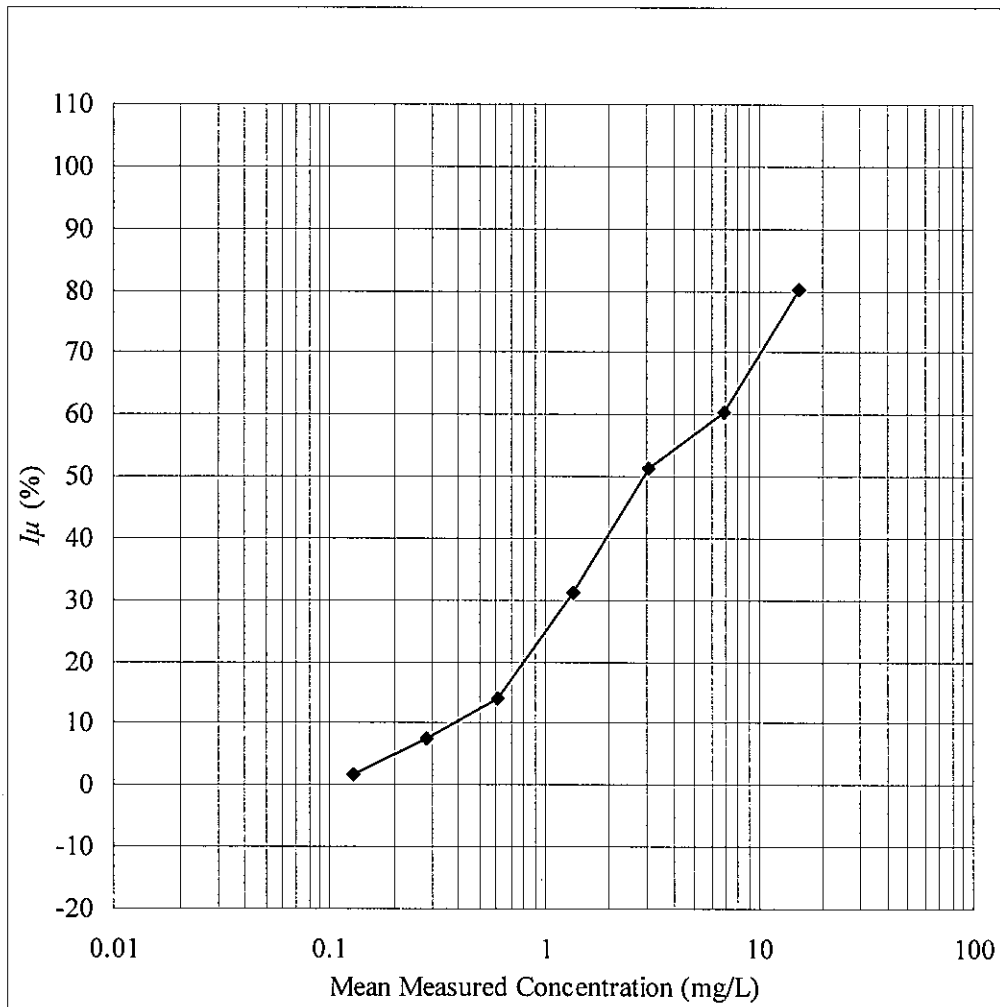
CV : Coefficient of variation

Figure 1 Growth Curve of *Pseudokirchneriella subcapitata*  
(Mean biomass vs time during the 72-hour exposure)



Values in legend are given in the nominal concentration.

Figure 2 Concentration-Inhibition Curve Based on  $I_{\mu}$  Values Calculated from the Growth Rates



付属資料－ 1

赤外吸収スペクトル

Figure A-1-1 Infrared Absorption Spectrum of the Test Substance before the Start of Exposure

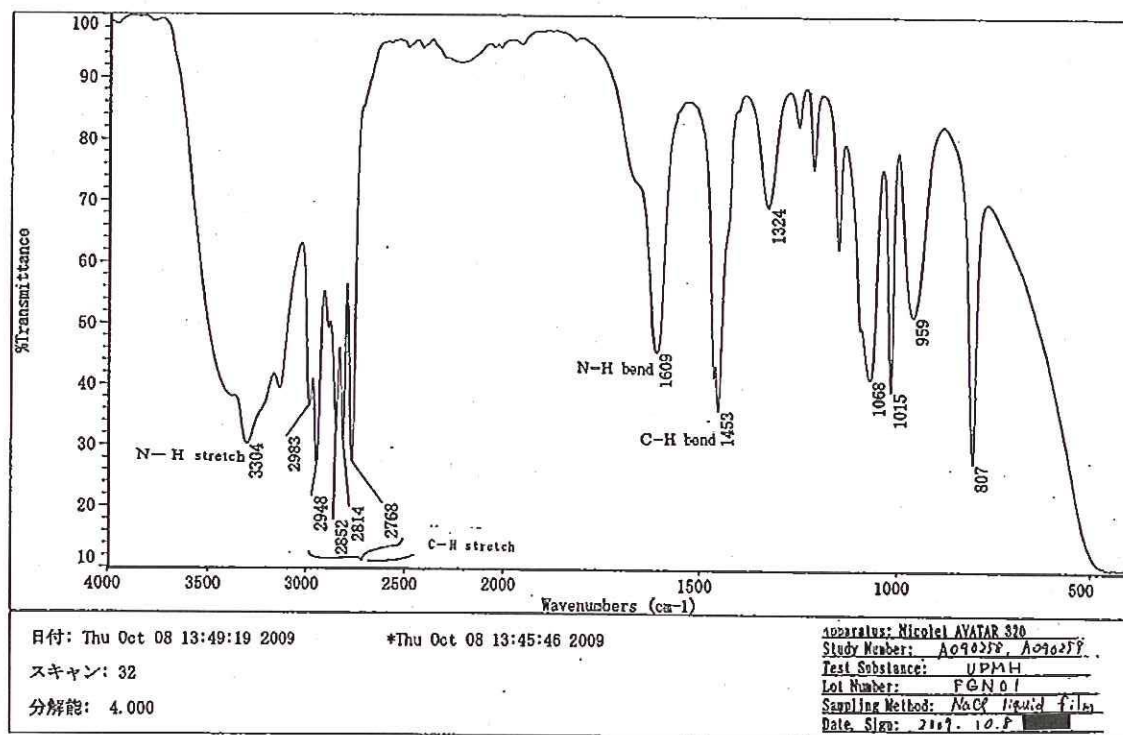
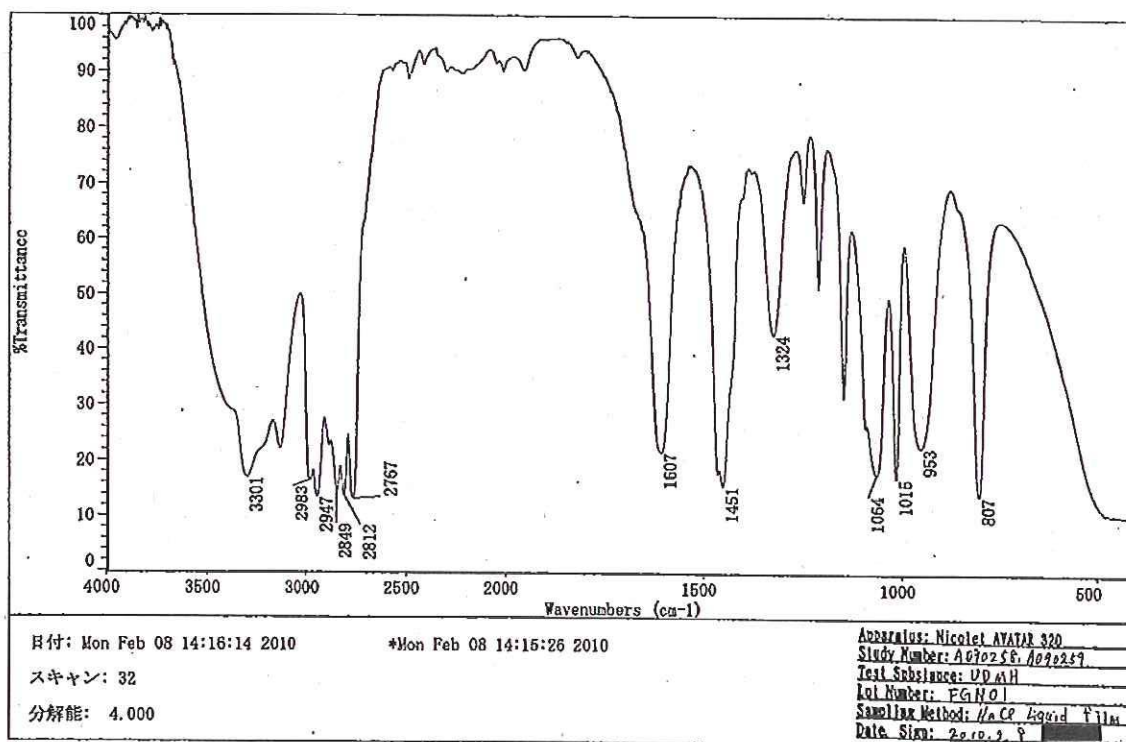


Figure A-1-2 Infrared Absorption Spectrum of the Test Substance after the End of Exposure



## 付属資料－ 2

培地の組成

Table A-2 Medium

Nutrient salts	Concentration (mg/L)
$\text{NH}_4\text{Cl}$	15.0
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	12.0
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	18.0
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	15.0
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	1.6
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.064
$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.1
$\text{H}_3\text{BO}_3$	0.185
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.415
$\text{ZnCl}_2$	0.003
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.0015
$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.00001
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.007
$\text{NaHCO}_3$	50

The test guideline shows that the pH of the medium which is obtained at equilibrium between the carbonate system of the medium and the partial pressure of  $\text{CO}_2$  in atmospheric air is 8.1.

## 付属資料－ 3

### 試験液の調製



## 試験液の調製

## 1. 準備

## 被験物質原液の調製

採取量	――→	100	mg
試験用水	――→	培地 (22℃)	
最終容量	――→	1000	mL
容器	――→	マスフラスコ	
濃度	――→	100	mg/L
混合方式	――→	転倒混和	

## 2. 試験液の調製

被験物質原液を下記の表の通り採取し、試験用水で希釈して試験液とする。対照区は試験用水のみとする。

最終容量	――→	0.10	L
容器	――→	300mLガラス製三角フラスコ(IWAKI製)	通気性シリコン栓
混合方式	――→	手で振とう攪拌	
濃度公比	――→	2.15	
連数	――→	6容器/対照区, 3容器/濃度区, 1予備容器/試験区	

設定試験濃度 mg/L	区No. (略称)	原液 mL
対照区	C	0
0.20	Conc.1	0.200
0.43	Conc.2	0.430
0.93	Conc.3	0.930
2.0	Conc.4	2.00
4.3	Conc.5	4.30
9.3	Conc.6	9.30
20	Conc.7	20.0

## 付属資料－ 4

試験液および試験培養液の分析

## 1. 高速液体クロマトグラフ質量分析 (LC/MS) 計 測定条件

装置 ,

高速・高分離液体クロマトグラフ質量分析計 SL-HT システム No.3

ワークステーション : Agilent 1200 シリーズワークステーション

高速・高分離液体クロマトグラフ (RRLC) : Agilent Technologies 1200 型

デガッサ : G 1 3 7 9 B 型

送液ポンプ : G 1 3 1 2 B 型 (ハイプレッソ)

オートサンプラ : G 1 3 2 9 B 型

カラムオーブン : G 1 3 1 6 B 型

質量選択検出器 (MSD) : G 6 1 4 0 A 型

[HPLC 条件]カラム : SHISEIDO製 PC HILIC 5.0  $\mu$ m 2.0 mm i.d.  $\times$  150 mm

カラムオーブン : 40°C

溶離液 : A液 20 mM 酢酸アンモニウム水\*溶液 : 酢酸 (1000 : 1, v/v)

B液 アセトリル

A液 50%, B液 50%

ストップタイム : 4 min

試料注入量 : 20  $\mu$ L

流速 : 0.2 mL/min

[MSD 条件]

Ionization : Electrospray

Fragmentor : 100 V

Nebulizer : N<sub>2</sub> (30 psig)Drying gas : N<sub>2</sub> (10 L/min, 300°C)

Mode : Positive

SIM (Selected Ion Monitoring) 条件 :

Quant ion  $m/z$  61.20 [M+H]<sup>+</sup>

\* 精製水 : JIS K0557 A4 グレードの水

## 2. 検量線の作成

- 1) 被験物質を精製水で溶解，希釈し，0，0.0500～1.00 mg/L の標準溶液を調製した。
- 2) 標準溶液を以下のように分析した。

標準溶液 適量採取

|

LC/MS測定

- 3) 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 (Figure A-4-1)。最小二乗法により直線回帰式  $Y=a+bX$  を求めた。相関関数  $r$  は 1.000 となり，直線性の基準 (0.995 以上) を満たした。また，切片  $a$  の 95%信頼区間が原点を含むことから，検量線は原点を通過する直線とみなせた。

## 3. 試験液および試験培養液中の被験物質濃度の定量

- 1) 試験液および試験培養液を以下のように分析した。代表的なクロマトグラムをFigure A-4-2に示す。

暴露開始時

試験液：各試験区毎に，全ての試験容器の中層より1.0 mL ずつ採取して混合  
(精製水で適宜希釈\*) 適量採取

|

LC/MS測定

暴露開始後 24, 48および 72時間

試験培養液：各試験区毎に，全ての試験容器の中層より1.0 mL ずつ採取して混合

|

遠心分離 (3000 rpm, 10分間, 装置：日立工機製 CR21E型)

|

上澄み液 (精製水で適宜希釈\*) 適量採取

|

LC/MS測定

\* 検量線範囲を超えるものについて適宜希釈した。

- 2) 標準溶液を「2. 検量線 2)」と同様に分析した。代表的なクロマトグラムを Figure A-4-2 に示す。

- 3) 試験液のピーク面積と標準溶液のピーク面積から、一点検量線により被験物質濃度を計算した。対照区でブランクピークは認められなかったため、そのピーク面積による補正を行わず被験物質濃度を計算した。

#### 4. 検出限界

検量線の最低濃度に対し 1/5 の視覚的に分析可能と思われる被験物質濃度 0.01 mg/L を検出限界とした。

Figure A-4-1 Calibration curve

No.	Concentration X (mg/L)	Peak Area Y (count)
1	0	0
2	0.0500	237021
3	0.100	454975
4	0.500	2355265
5	1.00	4615893

$$Y = a + b \times X$$

$$a = 5.791\text{E}+03$$

$$b = 4.627\text{E}+06$$

$$r = 1.000$$

$$-4.038\text{E}+04 < a < 5.197\text{E}+04$$

( 95-Percent Confidence Limits)

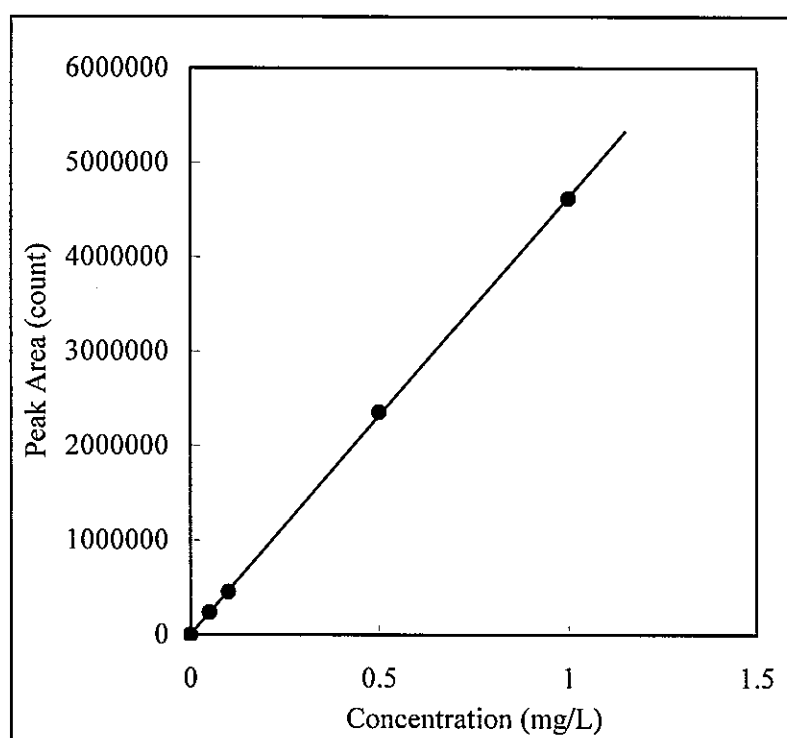
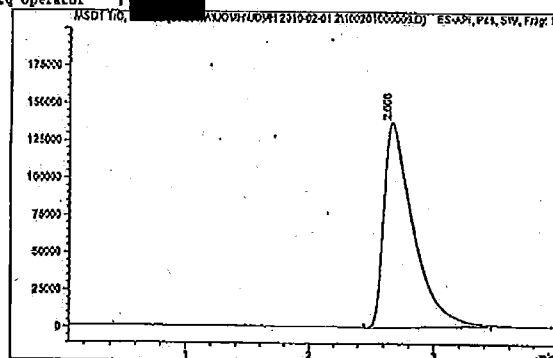


Figure A-4-2 Representative chromatograms

## (1) Standard 0.500 mg/L ; 0 Hour

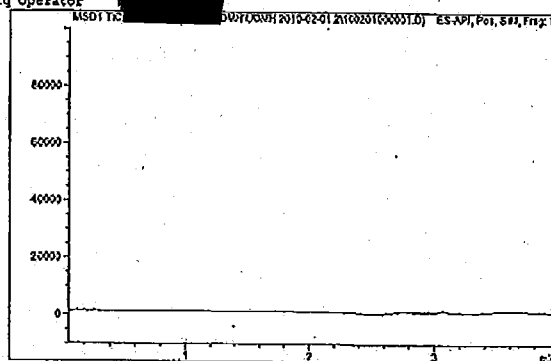
Injection Date : Mon, 1. Feb. 2010      Seq Line : 10  
 Study No. : (A090258)(A090259)      Location : Vial 5  
 Test Substance : UDHH      Inj. No. : 1  
 Acq Method : D:\DATA\UDHH\UDHH 2010-02-01      Inj. Vol. : 20 µl  
                  2\UDHH.M  
 Sample Name :   
 Acq Operator :



Area Percent Report						
Peak #	Ret. [min.]	Peak T [min.]	Width [min.]	Area [count]	Height [count]	Area %
1	2.668	0.01	0.271	2239857	137656	100.0
Total:				2239857	137656	
*** End of Report ***						

## (2) Control ; 0 Hour

Injection Date : Mon, 1. Feb. 2010      Seq Line : 2  
 Study No. : (A090258)(A090259)      Location : Vial 11  
 Test Substance : UDHH      Inj. No. : 1  
 Acq Method : D:\DATA\UDHH\UDHH 2010-02-01      Inj. Vol. : 20 µl  
                  2\UDHH.M  
 Sample Name :   
 Acq Operator :

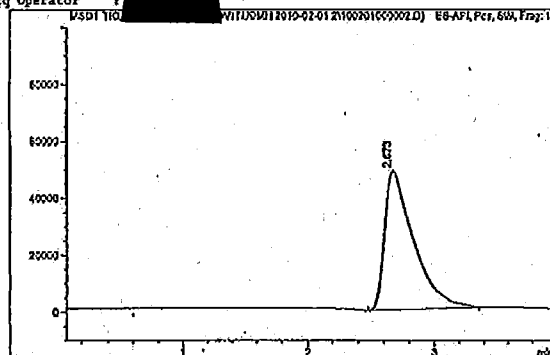


Area Percent Report						
Peak #	Ret. [min.]	Peak T [min.]	Width [min.]	Area [count]	Height [count]	Area %
Total:						
*** End of Report ***						

Figure A-4-2 Continued

## (3) Conc.1 ; 0 Hour

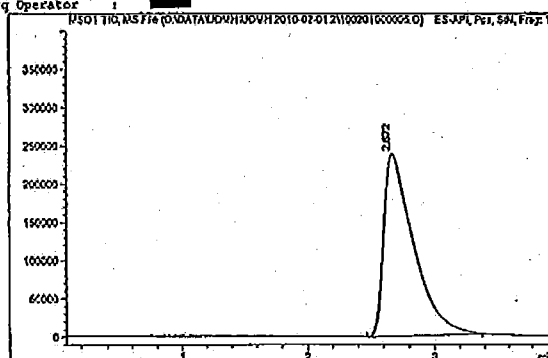
Injection Date : Mon, 1. Feb. 2010 Seq Line : 3  
 Study No. : JJA090258 JJA090259 Location : Vial 12  
 Test Substance : UDMH Inj. No. : 1  
 Acq Method : D:\DATA\UDMH\UDMH 2010-02-01 Inj. Vol. : 20 µl  
 Sample Name : 2\UDMH.M  
 Acq Operator : [REDACTED]



Area Percent Report						
Peak #	Mean Ret. (min.)	Peak T (min.)	Width (min.)	Area (count)	Height (count)	Area %
1	2.673	NM	0.267	783979	48944	100.0
Total:				783979	48944	
*** End of Report ***						

## (4) Conc.4 ; 0 Hour

Injection Date : Mon, 1. Feb. 2010 Seq Line : 6  
 Study No. : JJA090258 JJA090259 Location : Vial 15  
 Test Substance : UDMH Inj. No. : 1  
 Acq Method : D:\DATA\UDMH\UDMH 2010-02-01 Inj. Vol. : 20 µl  
 Sample Name : 2\UDMH.M  
 Acq Operator : [REDACTED]



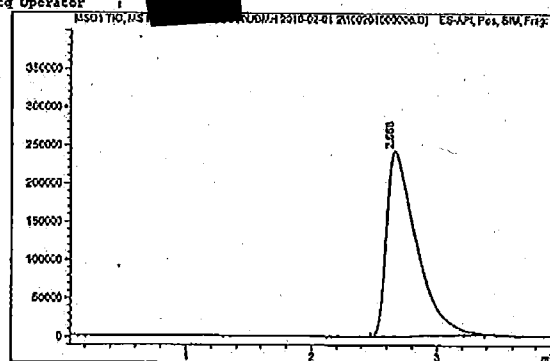
Area Percent Report						
Peak #	Mean Ret. (min.)	Peak T (min.)	Width (min.)	Area (count)	Height (count)	Area %
1	2.672	NM	0.272	3886135	238214	100.0
Total:				3886135	238214	
*** End of Report ***						



Figure A-4-2 Continued

## (5) Conc.7 ; 0 Hour

Injection Date : Mon, 1. Feb, 2010 Seq Line : 9  
 Study No. : (A090258)(A090259) Location : Vial 18  
 Test Substance : UDMH Inj. No. : 1  
 Acq Method : D:\DATA\UDMH\UDMH 2010-02-01 Inj. Vol. : 20 µl  
 Sample Name : 2\UDMH.H  
 Acq Operator : [REDACTED]

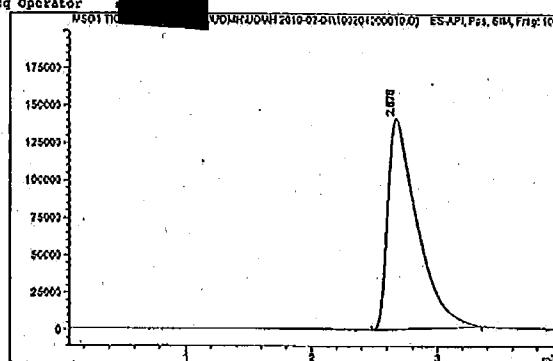


Area Percent Report						
Peak #	Peak Ret. (min.)	Peak T (min.)	Width (min.)	Area (count)	Height (count)	Area %
1	2.658	NH	0.273	3962912	242004	100.0
Total:				3962912	242004	

\*\*\* End of Report \*\*\*

## (6) Standard 0.500 mg/L ; 72 Hours

Injection Date : Thu, 4. Feb, 2010 Seq Line : 11  
 Study No. : (A090258)(A090259) Location : Vial 21  
 Test Substance : UDMH Inj. No. : 1  
 Acq Method : D:\DATA\UDMH\UDMH 2010-02-04 Inj. Vol. : 20 µl  
 Sample Name : Std 0.5mg/L  
 Acq Operator : [REDACTED]



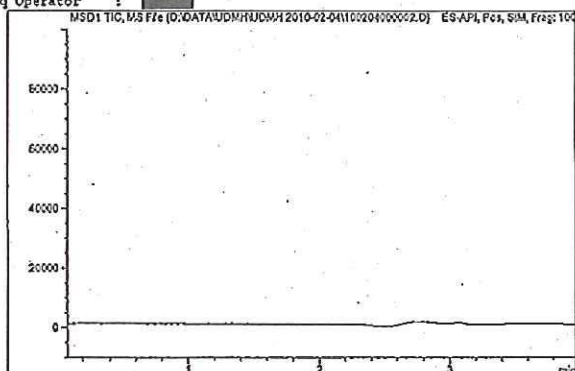
Area Percent Report						
Peak #	Peak Ret. (min.)	Peak T (min.)	Width (min.)	Area (count)	Height (count)	Area %
1	2.676	NH	0.268	2267648	140800	100.0
Total:				2267648	140800	

\*\*\* End of Report \*\*\*

Figure A-4-2 Continued

## (7) Control ; 72 Hours

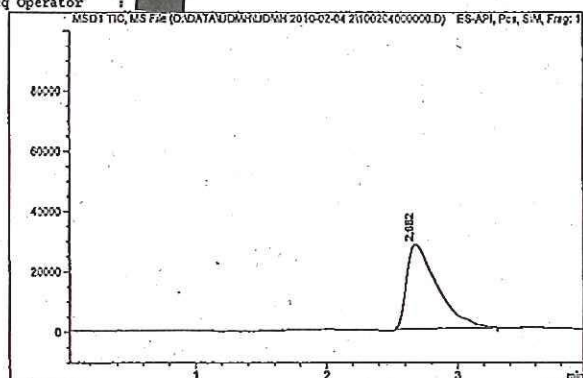
Injection Date : Thu, 4. Feb. 2010 Seq Line : 3  
 Study No. : JJA090258(JJA090259 Location : Vial 22  
 Test Substance : UDMH Inj. No. : 1  
 Acq Method : D:\DATA\UDMH\UDMH 2010-02-04 Inj. Vol. : 20 µl  
 Sample Name : A72hC  
 Acq Operator :



Area Percent Report						
Peak #	Meas. Ret. [min.]	Peak T [min.]	Width [min.]	Area [count]	Height [count]	Area %
Total:						
*** End of Report ***						

## (8) Conc.1 ; 72 Hours

Injection Date : Thu, 4. Feb. 2010 Seq Line : 1  
 Study No. : JJA090258(JJA090259 Location : Vial 23  
 Test Substance : UDMH Inj. No. : 1  
 Acq Method : D:\DATA\UDMH\UDMH 2010-02-04 Inj. Vol. : 20 µl  
 Sample Name : A72hC1  
 Acq Operator :

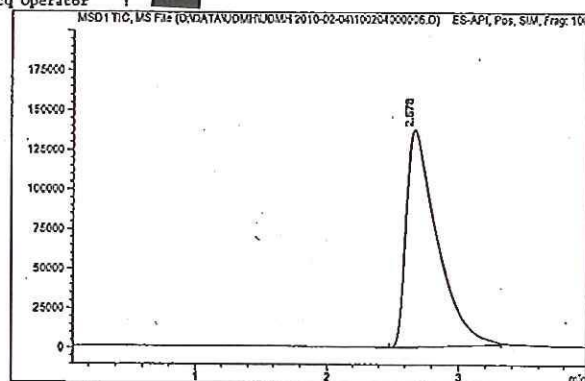


Area Percent Report						
Peak #	Meas. Ret. [min.]	Peak T [min.]	Width [min.]	Area [count]	Height [count]	Area %
1	2.682	PM	0.267	449341	28033	100.0
Total:				449341	28033	
*** End of Report ***						

Figure A-4-2 Continued

## (9) Conc.4 ; 72 Hours

Injection Date : Thu, 4. Feb. 2010 Seq Line : 7  
 Study No. : J\A090258\J\A090259 Location : Vial 26  
 Test Substance : UDMH Inj. No. : 1  
 Acq Method : D:\DATA\UDMH\UDMH 2010-02-04\100204\000026.D Inj. Vol. : 20 µl  
 Sample Name : A72hC4  
 Acq Operator :

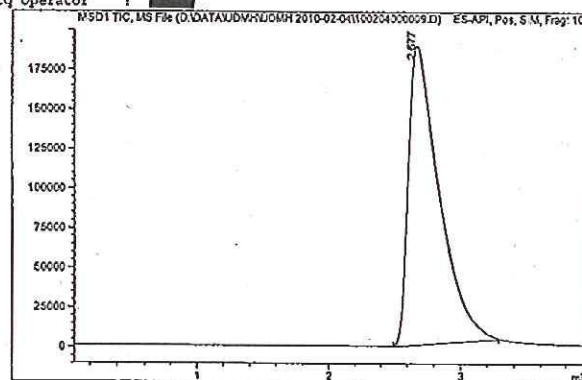


Area Percent Report						
Peak #	Meas. Ret. [min.]	Peak T [min.]	Width [min.]	Area [count]	Height [count]	Area %
1	2.678	NM	0.268	2211896	137580	100.0
Total:				2211896	137580	

\*\*\* End of Report \*\*\*

## (10) Conc.7 ; 72 Hours

Injection Date : Thu, 4. Feb. 2010 Seq Line : 10  
 Study No. : J\A090258\J\A090259 Location : Vial 29  
 Test Substance : UDMH Inj. No. : 1  
 Acq Method : D:\DATA\UDMH\UDMH 2010-02-04\100204\000029.D Inj. Vol. : 20 µl  
 Sample Name : A72hC7  
 Acq Operator :



Area Percent Report						
Peak #	Meas. Ret. [min.]	Peak T [min.]	Width [min.]	Area [count]	Height [count]	Area %
1	2.677	NM	0.268	3038941	189201	100.0
Total:				3038941	189201	

\*\*\* End of Report \*\*\*

## 付属資料－ 5

結果の算出

Table A-5-1 Calculation of the ErC50 (0-72h)

直線回帰分析 (E C 50値の算出)

濃度 (mg/L)	阻害率 (%)	
x	log(x)	y
1.35	0.30	33.5
1.35	0.30	25.2
1.35	0.30	34.5
3.06	1.12	50.7
3.06	1.12	51.7
3.06	1.12	51.5
6.86	1.93	57.1
6.86	1.93	63.9
6.86	1.93	59.9
15.4	2.73	81.0
15.4	2.73	78.5
15.4	2.73	81.0

EC <sub>50</sub>	95%信頼区間		単位
3.40	2.96	~ 3.90	(mg/L)

分散分析

Factor	SS	DF	V	F-ratio	f(0.05,f1,f2)
Between	3666.10	1	3666.10	241.31	>4.96
Within	151.93	10	15.19		
Total	3818.03	11			

Table A-5-2 Calculation of the NOECr

Input Data Table							
Control	Conc.1	Conc.2	Conc.3	Conc.4	Conc.5	Conc.6	Conc.7
Group1	Group2	Group3	Group4	Group5	Group6	Group7	Group8
0.0821	0.0827	0.0767	0.0731	0.0559	0.0415	0.0361	0.0160
0.0838	0.0821	0.0769	0.0705	0.0629	0.0406	0.0304	0.0181
0.0841	0.0829	0.0795	0.0734	0.0551	0.0408	0.0337	0.0160
0.0850	*	*	*	*	*	*	*
0.0840	*	*	*	*	*	*	*
0.0855	*	*	*	*	*	*	*

Group	Samples	Mean	S.E.	S.D.	Variance		
1	6	0.0841	0.0005	0.0012	0.0000		
2	3	0.0826	0.0002	0.0004	0.0000		
3	3	0.0777	0.0009	0.0016	0.0000		
4	3	0.0723	0.0009	0.0016	0.0000		
5	3	0.0580	0.0025	0.0043	0.0000		
6	3	0.0410	0.0003	0.0005	0.0000		
7	3	0.0334	0.0017	0.0029	0.0000		
8	3	0.0167	0.0007	0.0012	0.0000		

Method	vs	Side	Stat.	0.05	0.01	0.001	Prob.
Bartlett test		0	13.8346	14.0671	<18.4753	24.3219	0.0542

Method	vs	Side	Stat.	0.05	0.01	0.001	Prob.
1-way ANOVA		0	559.9119	>2.5435	3.7653	5.8452	1.3057E-10

Method	vs	Side	Stat.	0.05	0.01	0.001	Prob.
Williams(1971,1972,1977)	1 vs 2	2	1.0885	2.0930	2.8610	999.9900	999.9900
Williams(1971,1972,1977)	1 vs 3	2	4.5813	>2.1630	>2.9110	999.9900	999.9900 **
Williams(1971,1972,1977)	1 vs 4	2	8.4329	>2.1850	>2.9250	999.9900	999.9900 **
Williams(1971,1972,1977)	1 vs 5	2	18.7437	>2.1950	>2.9320	999.9900	999.9900 **
Williams(1971,1972,1977)	1 vs 6	2	30.9444	>2.2020	>2.9360	999.9900	999.9900 **
Williams(1971,1972,1977)	1 vs 7	2	36.3749	>2.2050	>2.9380	999.9900	999.9900 **
Williams(1971,1972,1977)	1 vs 8	2	48.3604	>2.2079	>2.9399	999.9900	999.9900 **

## 藻類生長阻害試験結果報告書

## 1. 一般的事項

被 験 物 質 の 名 称	N,N-ジメチルヒドラジン <sup>*1</sup>		
別 名	(略称：UDMH <sup>*2</sup> )		
C A S 番 号	57-14-7 <sup>*1</sup>		
構 造 式 又 は 示 性 式	<sup>*3</sup> $  \begin{array}{c}  \text{NH}_2 \\    \\  \text{N} \\  / \quad \backslash \\  \text{H}_3\text{C} \quad \text{CH}_3  \end{array}  $		
分 子 量	60.10		
試 験 に 供 し た 物 質 の 純 度 ( % )	99.1 (GC)		
試 験 に 供 し た 物 質 の ロ ッ ト 番 号	[REDACTED]		
不 純 物 の 名 称 及 び 含 有 率	—		
蒸 気 圧	20.93 kPa/25℃		
対 水 溶 解 度	可溶		
1-オクタノール/水分分配係数	—		
融 点	-58℃		
沸 点	64℃		
常 温 に お け る 性 状	アンモニア臭のある無色～微黄色透明液体		
安 定 性	吸湿性がある。空気中では発煙し、徐々に黄変する。燃焼や高温により分解し、窒素酸化物、水素、アンモニア、ジメチルアニリン、窒化水素酸などの有害なフェームを生成する。		
溶 媒 に 対 す る 溶 解 度 等	溶媒	溶解度	溶媒中の安定性
	アルコール	可溶	—
	エーテル	可溶	—
	炭化水素	可溶	—

上記内容は[REDACTED]提供資料による。ただし \* の内容は以下の通り。

\*1 環境省提供資料による。

\*2 三菱化学メディエンス株式会社にて決定。

\*3 独立行政法人製品評価技術基盤機構 (<http://www.safe.nite.go.jp>) による。

## 2. 試験溶液の被験物質濃度の分析方法

項 目	方 法
分析方法	高速液体クロマトグラフ質量分析（LC/MS）法
前処理法	<p>暴露開始時</p> <p>試験液：各試験区毎に，全ての試験容器の中層より1.0 mL ずつ採取して混合（精製水で適宜希釈*）適量採取</p> <p>↓</p> <p>LC/MS測定</p> <p>暴露開始後 24, 48および 72時間</p> <p>試験培養液：各試験区毎に，全ての試験容器の中層より1.0 mL ずつ採取して混合</p> <p>↓</p> <p>遠心分離（3000 rpm, 10分間，装置：日立工機製 CR21E型）</p> <p>↓</p> <p>上澄み液（精製水で適宜希釈*）適量採取</p> <p>↓</p> <p>LC/MS測定</p> <p>* 検量線範囲を超えるものについて適宜希釈した。</p>
定量条件	別紙－1 参照



## 3. 試験材料及び方法

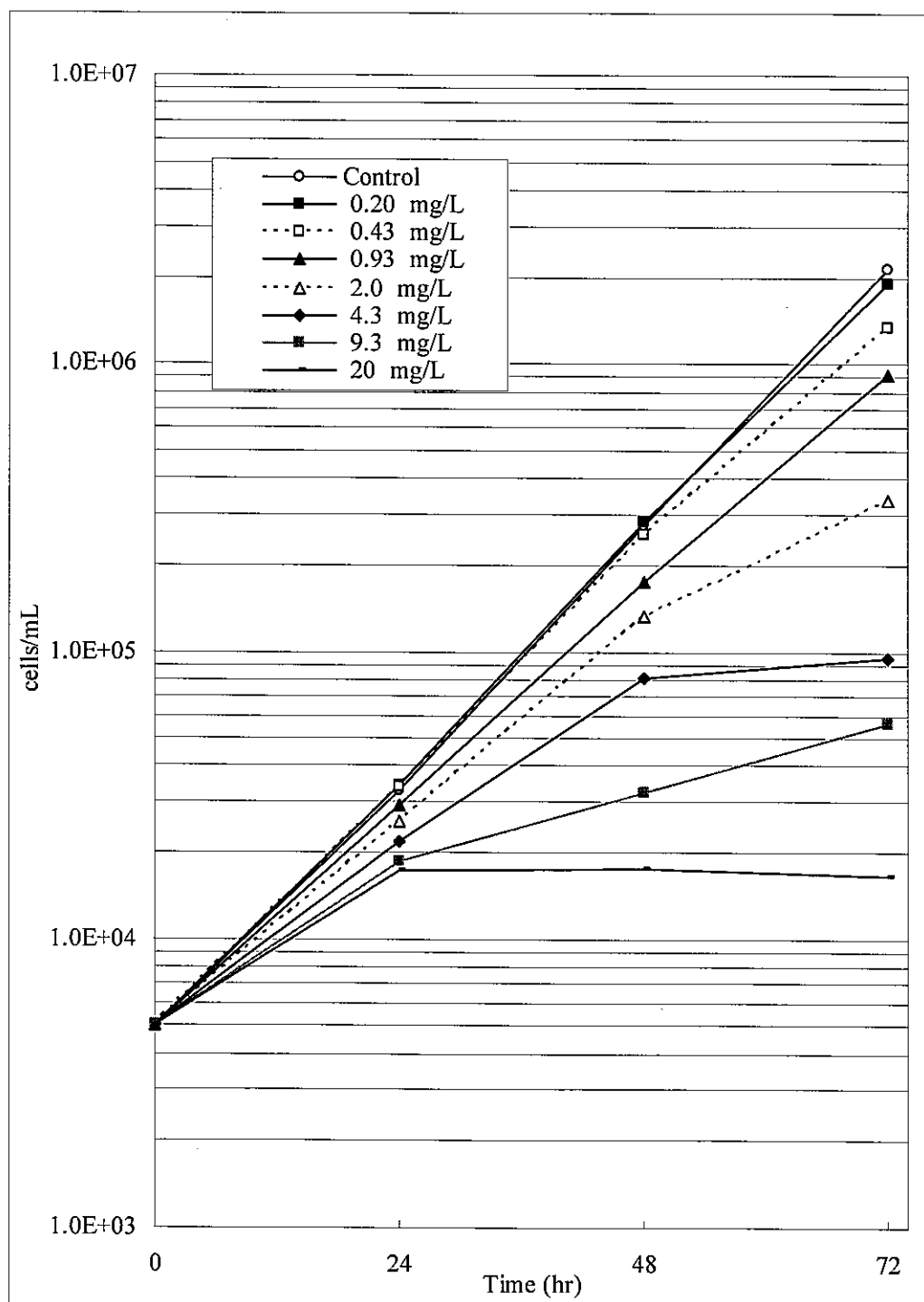
項 目		内 容	
試験生物	種 (学名・株名)	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> ATCC22662	
	入手先	American Type Culture Collection	
	対照物質への感受性 (EC50) (対照物質名)	72時間 ErC50 = 0.821 ± 0.0828 mg/L, n=20 重クロム酸カリウム, 試薬特級	
前培養	前培養の期間	2010年 1月29日～2010年 2月 1日	
	培地名	試験ガイドライン推奨培地	
	環境条件 (水温, 光強度)	22℃, 65～75 μE/m <sup>2</sup> /s	
試験条件	試験容器		300 mLガラス製三角フラスコ (IWAKI製) (通気性のシリコン栓付)
	培地名		試験ガイドライン推奨培地
	暴露期間		2010年 2月 1日～2010年 2月 4日
	試験濃度 (設定値 負荷率)		対照区, 0.20, 0.43, 0.93, 2.0, 4.3, 9.3, 20 mg/L (公比 : 2.2)
	初期細胞濃度		5×10 <sup>3</sup> cells / mL
	連数	試験濃度区	3 容器
		対照区	6 容器
	試験溶液量		100 mL／容器
	助剤	助剤の有無	無
		種類	—
		濃度	—
		助剤対照区の連数	—
	培養方式 (振とう培養, 静置培養, 連続培養等)		止水式 (開放系), 振とう培養 (100 rpm)
	水温または培養温度		22℃ (暴露期間中の変動範囲は±2℃以内)
	照明 (光強度, 時間等)		65～75 μE/m <sup>2</sup> /s 白色蛍光灯で連続照明 (液面付近)
結果の 算出方法	速度法	ErC50 (0-72h) : 直線回帰分析 NOECr (0-72h) : Williamsの多重比較検定	

## 4. 試験結果及び考察

項 目	内 容
毒性値	ErC50 (0-72h)= 3.40 mg/L (95%信頼区間：2.96～3.90 mg/L) NOECr (0-72h)= 0.129 mg/L
試験濃度	1. 設定値      ②. 実測値
考察及び 特記事項	濃度区 1～7 の測定値（時間加重平均値）は、それぞれ 0.129, 0.282, 0.604, 1.35, 3.06, 6.86, 15.4 mg/L であり、被験物質濃度の減少が認められた。濃度減少の主な原因として、試験液中での被験物質の変化が考えられた。

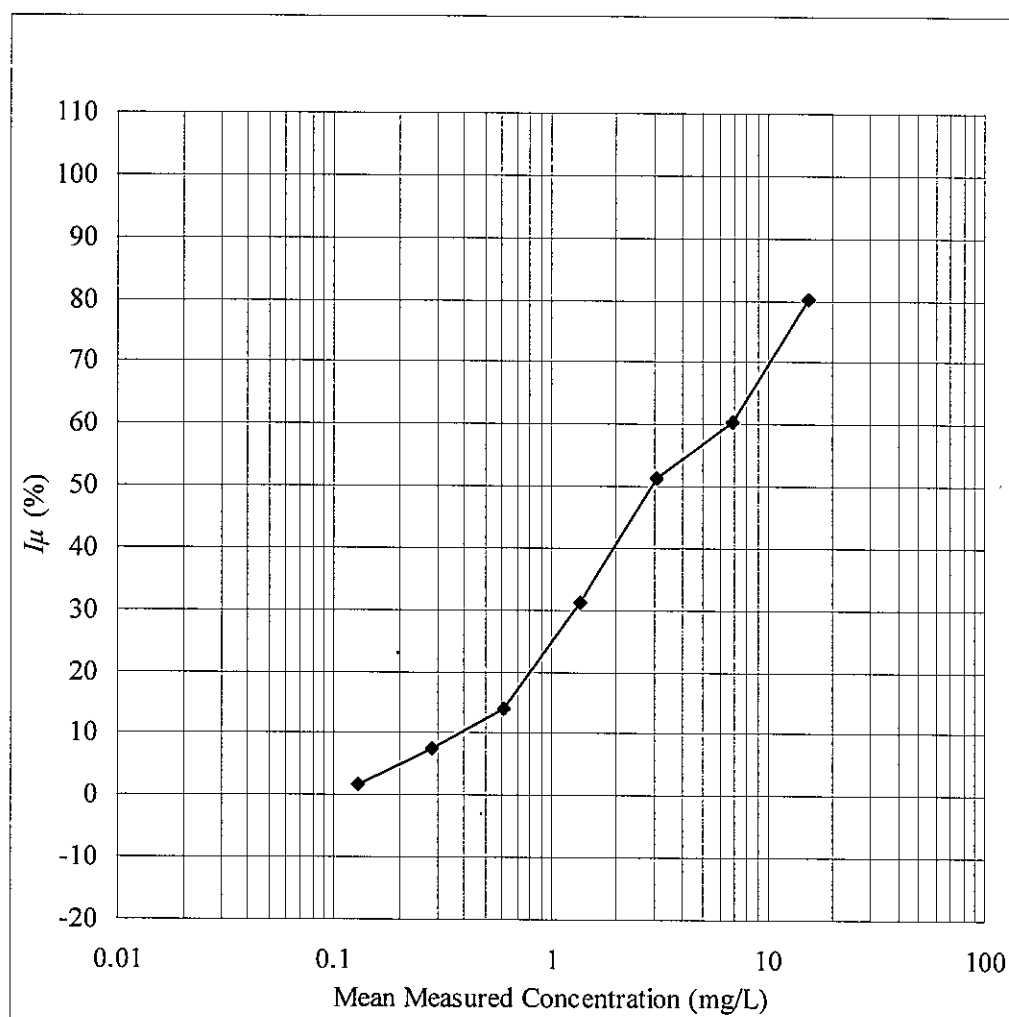
## 5. 藻類の生長曲線および濃度－生長阻害率曲線

Figure 1 Growth Curve of *Pseudokirchneriella subcapitata*  
(Mean biomass vs time during the 72-hour exposure)



Values in legend are given in the nominal concentration.

Figure 2 Concentration-Inhibition Curve Based on  $I_\mu$  values Calculated from the Growth Rates



## 6. その他

試験実施施設	名称	三菱化学メディエンス株式会社 メディケム事業本部 安科研事業部 横浜研究センター
	所在地	神奈川県横浜市青葉区鴨志田町1000番地 電話 045(963)3548 FAX 045(961)6296
試験責任者	職氏名	研究員 [REDACTED]
	経験年数	14年
試験番号	A090258	
試験期間	2010年 1月29日～2010年 2月24日	

作成責任者	所属	三菱化学メディエンス株式会社 メディケム事業本部 安科研事業部 横浜研究センター
	氏名	[REDACTED]

## 別紙ー 1 高速液体クロマトグラフ質量分析 (LC/MS) 計 測定条件

装置

高速・高分離液体クロマトグラフ質量分析計 SL-HT システム No.3

ワークステーション :	Agilent 1200 シリーズ*ケミステーション
高速・高分離液体クロマトグラフ (RRLC) :	Agilent Technologies 1200 型
デガッサ :	G 1 3 7 9 B 型
送液ポンプ :	G 1 3 1 2 B 型 (ハイリポンプ)
オートサンプラ :	G 1 3 2 9 B 型
カラムオーブン :	G 1 3 1 6 B 型
質量選択検出器 (MSD) :	G 6 1 4 0 A 型

[HPLC 条件]

カラム :	SHISEIDO製 PC HILIC 5.0 $\mu$ m 2.0 mm i.d. $\times$ 150 mm
カラムオーブン :	40°C
溶離液 :	A液 20 mM $\gamma$ -酸アンモニウム水*溶液 : $\gamma$ -酸 (1000 : 1, v/v) B液 アセトリル A液 50%, B液 50%
ストップタイム :	4 min
試料注入量 :	20 $\mu$ L
流速 :	0.2 mL/min

[MSD 条件]

Ionization :	Electrospray
Fragmentor :	100 V
Nebulizer :	N <sub>2</sub> (30 psig)
Drying gas :	N <sub>2</sub> (10 L/min, 300°C)
Mode :	Positive
SIM (Selected Ion Monitoring) 条件 :	
Quant ion $m/z$	61.20 [M+H] <sup>+</sup>

\* 精製水 : JIS K0557 A4 グレードの水