

環境省殿

## 最 終 報 告 書

チオ尿素の藻類(*Selenastrum capricornutum*)に対する生長阻害試験

(試験番号：第14021号)

2003年3月31日

財団法人 日本食品分析センター 多摩研究所

## 試験実施概要

1. 表 題：チオ尿素の藻類(*Selenastrum capricornutum*)に対する生長阻害試験
2. 試験目的：チオ尿素の藻類(*Selenastrum capricornutum*)に対する生長阻害試験を行い、50%生長阻害濃度(EC<sub>50</sub>)及び最大無作用濃度(NOEC)を求める。
3. 試験方法：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
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：
  - 1) 名 称：環境省
  - 2) 住 所：〒100-8975 東京都千代田区霞ヶ関1丁目2番2号
  - 3) 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 ■■■■■
6. 試験受託者：
  - 1) 名 称：財団法人 日本食品分析センター
  - 2) 住 所：〒151-0062 東京都渋谷区元代々木町52番1号
  - 3) 代 表 者：■■■■■
7. 試験施設：
  - 1) 名 称：財団法人 日本食品分析センター 多摩研究所
  - 2) 住 所：〒206-0025 東京都多摩市永山6丁目11番10号  
〒206-0025 東京都多摩市永山6丁目21番6号(別館)
  - 3) 運営管理者：■■■■■(多摩研究所長)

8. 試験責任者

所 属：環境科学部

氏 名：[REDACTED]

9. 分析担当責任者

所 属：応用試験部 農薬試験課

氏 名：[REDACTED]

10. 試験担当者

生物系

所 属：環境科学部 環境生物安全課

氏 名：[REDACTED] , [REDACTED] , [REDACTED]

分析系

所 属：応用試験部 農薬試験課

氏 名：[REDACTED] , [REDACTED] , [REDACTED]

11. 試験日程

試験開始日：2002年12月20日

実験開始日：2003年2月10日

実験終了日：2003年2月13日

試験終了日：2003年3月31日

12. 記録及び資料の保管

試験に関する下記の記録及び試料は、1)については最終報告書作成後10年間または品質低下を起こさずに保存し得る期間のいずれか短い方の期間、2)から5)については10年間、財団法人日本食品分析センター多摩研究所資料保管施設に保管する。その後の保管については試験委託者と別途協議の上、定める。

- 1) 被験物質
- 2) 試験計画書
- 3) 生データ及び最終報告書
- 4) 信頼性保証部門の検閲記録
- 5) その他必要なもの

13. 最終報告書の承認

試験責任者

所 属： 財団法人 日本食品分析センター 多摩研究所 環境科学部

氏 名：   2003 年 3 月 3 / 日 承認

## 目次

	頁
要 旨 .....	7
1 被験物質 .....	9
1.1 名称, 構造式及び物理化学的性状 .....	9
1.2 供試試料 .....	9
1.3 保管方法及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 .....	11
3.3 試験容器, 藻類培養試験装置及び機器 .....	11
3.4 試験濃度の設定 .....	11
3.5 試験液の調製 .....	11
3.6 試験液の分析 .....	11
3.7 試験操作 .....	12
4 結果の算出 .....	12
4.1 生長曲線 .....	12
4.2 生長阻害率の算出 .....	12
4.3 結果の算出に用いた試験濃度の決定 .....	13
4.4 50 %生長阻害濃度 ( $EC_{50}$ ) の算出 .....	13
4.5 最大無作用濃度 (NOEC) .....	13
4.6 統計的手法 .....	13
5 結果及び考察 .....	13
5.1 試験液中の被験物質濃度 .....	13
5.2 試験液の状態 .....	14
5.3 生長曲線 .....	14
5.4 50 %生長阻害濃度 ( $EC_{50}$ ) .....	14
5.5 最大無作用濃度 (NOEC) .....	14
5.6 供試生物の観察された影響 .....	15
5.7 試験液の水温及び pH .....	15
5.8 試験計画書からの逸脱事項 .....	15
5.9 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
5.10 試験の妥当性 .....	15
5.11 結果の評価と考察 .....	15

Table 1～7 .....	16～20
Figure 1～4 .....	21～22
付属資料-1 OECD 培地 .....	23
付属資料-2 予備試験結果 .....	24
付属資料-3 統計処理データ .....	25～27
付属資料-4 試験液中の被験物質濃度の分析方法 .....	28～32

## 要 旨

### 試験委託者

環境省

### 表 題

チオ尿素の藻類(*Selenastrum capricornutum*)に対する生長阻害試験

### 試験番号

第14021号

### 試験方法

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

- 1) 被験物質：チオ尿素
- 2) 暴露方式：振とう培養(100 r/min), 開放系(通気性シリコン栓)
- 3) 供試生物：*Selenastrum capricornutum*
- 4) 暴露期間：72時間
- 5) 試験濃度(設定値)：  
    対照区, 10, 18, 32, 56 及び 100 mg/l  
    公比：1.8
- 6) 試験液量：100 ml/容器
- 7) 連 数：3 容器/1 試験区
- 8) 初期細胞濃度： $1 \times 10^4$  cells/ml
- 9) 試験温度：22.1～22.5℃
- 10) 照 明：フラスコ液面付近で 4,100～4,300 lx.(連続照明)
- 11) pH : 7.9～8.2(試験液の pH 調整は行わなかった。)
- 12) 培 地：OECD 化学品テストガイドラインに示されている培地
- 13) 分 析 法：高速液体クロマトグラフィー質量分析法

結 果

以下の値は測定値(算術平均)を基に示した。

1) 50 %生長阻害濃度( $EC_{50}$ )

面積法

$E_bC_{50}(0-72)$  : 110 mg/l 以上

速度法

$E_rC_{50}(24-48)$  : 110 mg/l 以上

$E_rC_{50}(24-72)$  : 110 mg/l 以上

2) 最大無作用濃度(NOEC)

面積法

$NOEC_b(0-72)$  : 34 mg/l (Dunnett の多重比較法により算出した。)

速度法

$NOEC_r(24-48)$  : 110 mg/l (Dunnett の多重比較法により算出した。)

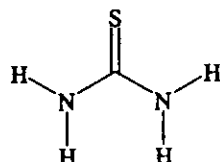
$NOEC_r(24-72)$  : 34 mg/l (Dunnett の多重比較法により算出した。)



## 1 被験物質

### 1.1 名称, 構造式及び物理化学的性状

名称: チオ尿素  
別名: チオウレア, チオカルバミド<sup>1)</sup>  
CAS No: 62-56-6  
構造式:



分子式:  $\text{CH}_4\text{N}_2\text{S}$   
分子量: 76.12<sup>1)</sup>  
沸点: —  
融点: 176~178 °C<sup>1)2)</sup>  
水溶解度: 9 g/l (20 °C)<sup>1)</sup>, 15.3 % (21 °C)<sup>2)</sup>  
比重: 1.406 (20 °C)<sup>1)</sup>  
pKa: 解離基なし<sup>1)</sup>  
logPow: 2.5 (実測値), -1.02 (実測値), -1.02 (計算値)<sup>1)</sup>  
蒸気圧:  $1 \times 10^{-5}$  Pa ( $7.5 \times 10^{-8}$  mmHg) (20 °C)<sup>1)</sup>  
均一性: 同一ロットのものを使用した。  
安定性: —  
生分解性: 水中では微生物によって分解されにくい<sup>1)</sup>。  
その他: —  
出典: 1) 財団法人 化学物質評価研究機構: “既存化学物質安全性(ハザード)評価シート” (1997)  
2) [REDACTED]: “製品安全データシート” (1993)

### 1.2 供試試料

純度: 99.3 %  
ロット番号: 409C2143  
供給者: [REDACTED]  
供給量: 25 g×4 本  
入手日: 2002年12月5日  
外観: 白色結晶, 無臭

### 1.3 保管方法及び保管条件下での安定性

#### 1) 保管方法

被験物質は当センターの被験物質保管庫(冷蔵庫)に保管した。

#### 2) 被験物質の確認及び保管条件下の安定性

入手した被験物質について赤外分光光度計により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。また、試験終了時にも同様にスペクトルを測定し、試験開始前のスペクトルと変化が認められないことを確認した。その結果、被験物質は保管条件下において安定であったと判断された。

## 2 供試生物

#### 1) 学 名 : *Selenastrum capricornutum*

(現在の学名は *Pseudokirchneriella subcapitata* に変更されている。)

#### 2) 株 番 号 : ATCC22662 株

#### 3) 入 手 等 : American Type Culture Collection より入手(2000 年 9 月 7 日) したものを、 センターにおいて無菌的に継代培養した種である。使用藻類は 6 ヶ月毎に細菌検査を行い、無菌性が確認されたものを使用した。

#### 4) 基準物質による検定の結果 : 基準物質(重クロム酸カリウム, 試薬特級)による 72 時間の 50 % 生長阻害濃度 $E_0C_{50}$ は 0.53 mg/l (2003 年 2 月 7 日) であった。当センターにおける 2000 年 11 月以降の $E_0C_{50}$ 値のバックグラウンドデータ ( $0.70 \pm 0.10$ mg/l) と比較した結果、供試生物の感受性は、やや高い状態にあると判断した。

#### 5) 前 培 養 : 試験に供する藻類は試験条件と同じ条件で暴露開始前に 3 日間培養(2003 年 2 月 7 日~2 月 10 日) したものをを使用した。前培養終了時に、変形や異常な細胞の出現が無いことを確認した。

なお、前培養終了時の細胞濃度は  $183.10 \times 10^4$  cells/ml であり、対数増殖期にあると判断した。

## 3 試験方法

### 3.1 試験条件

- 1) 暴露方式 : 振とう培養(100 r/min), 開放系(通気性シリコン栓)
- 2) 暴露期間 : 72 時間
- 3) 試験液量 : 100 ml/容器
- 4) 連 数 : 3 容器/1 試験区
- 5) 初期細胞濃度 :  $1 \times 10^4$  cells/ml
- 6) 試験温度 : 22.1~22.5 °C
- 7) 照 明 : フラスコ液面付近で 4,100~4,300 lx. (連続照明)
- 8) pH : 7.9~8.2 (試験液の pH 調整は行わなかった。)

### 3.2 培地

前培養及び試験ともに OECD 化学品テストガイドラインに示されている培地を用いた。培地は滅菌したものを使用した。

培地の成分表を付属資料-1 に示した。

### 3.3 試験容器、藻類培養試験装置及び機器

- 1) 試験容器：500 ml 容ガラス製三角フラスコ [株式会社 前田製作所] (容器のサイズ；底面の内径 約 10 cm×高さ 約 17 cm。試験容器には通気性のシリコン栓をした。)
- 2) 藻類培養試験装置：光照射式恒温振とう機 TA-60RL [高崎科学器械株式会社]
- 3) 光学顕微鏡：CK2 [オリンパス光学工業株式会社]
- 4) 粒子計数装置：コールター Z1 [ベックマン・コールター株式会社]
- 5) 粒子計数装置用電解液：ISOTON II [ベックマン・コールター株式会社]
- 6) 血球計算盤：THOMA [エルマ販売株式会社]
- 7) pH 計：HM-14P [東亜ディーケーケー株式会社]
- 8) 温度計：AP-210E [安立計器株式会社]
- 9) 照度計：NT-1332 [N. T. コーポレーション]

### 3.4 試験濃度の設定

予備試験において、100 mg/l の濃度区では藻類の生長が 30 % 阻害 ( $I_p$ ) され、10 mg/l の濃度区で藻類の生長阻害が認められなかったことに基き、本試験では、100 mg/l 以下の濃度を公比 1.8 で 5 濃度区 (10, 18, 32, 56 及び 100 mg/l) 設定した。

なお、予備試験の結果は付属資料-2 に示した。

### 3.5 試験液の調製

試験液調製時の培地は、調製前に恒温槽内で  $23 \pm 2$  °C にした。

被験物質を超音波処理により培地に溶解させ被験物質原液 (1,000 mg/l) を調製した。

この原液を培地に添加して各濃度区の試験液を調製した。

対照区には、培地のみの無処理の対照区を設けた。

なお、被験物質は純度が 99.3 % と高純度であったため、純度を考慮せず秤取した。よって、設定した試験濃度は、供試試料の濃度として示した。また、被験物質原液は用時調製とした。

### 3.6 試験液の分析

試験液中の被験物質濃度の分析は、高速液体クロマトグラフを用いて、全試験区について、暴露開始時 (0 時間) 及び終了時 (暴露開始後 72 時間) に行い、その算術平均値を求めた。なお、暴露開始時は分析用及び 4 連分 (pH 及び水温測定用を含む。) を同時に調製した容器から試験液を 20 ml 採取して分析用試験液とした。暴露終了時は各試験区のそれぞれ 3 連の試験容器から等量ずつ採取し混合した 20 ml を分析用試験液とした。暴露終了時の分析に際しては、採取した試験液をろ過により、藻体を除去してから行った。

なお、分析方法は付属資料-4 に示した。

### 3.7 試験操作

前培養した藻類の細胞数を計数し、試験液中の細胞濃度が  $1 \times 10^4$  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  $23 \pm 2$  °C の培養装置に設置し試験を開始した。その後、24、48 及び 72 時間に細胞濃度を測定した。なお、細胞濃度の測定は、粒子計数装置により行った。

試験液中の藻類について、暴露開始後、24、48 及び 72 時間に肉眼による色調観察を、さらに 72 時間には顕微鏡下での細胞形態観察を行った。

試験液調製時の水温及び pH は 3 容器とは別の予備 1 容器について測定し各試験区の暴露開始時の水温及び pH とし、終了時には各試験区の 3 容器のうち 1 容器について水温及び pH を測定した。暴露期間中、培養装置内の温度、照度を 1 日 1 回測定した。

なお、暴露期間中の試験液についてはその状態(外観等)を観察し、記録した。

## 4 結果の算出

### 4.1 生長曲線

試験区及び対照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

次に下記の方法(面積法及び速度法)で生長阻害率を算出した。

#### 1) 生長曲線下の面積の比較(面積法)による生長阻害率( $I_A$ )

生長曲線下の面積は次の式により算出した。

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

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

生長曲線下の面積より各試験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、

$A_c$  : 対照区の生長曲線下の面積

$A_t$  : 各試験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( $\mu$ )を次の式より算出した。

$$\mu = \frac{\ln N_n - \ln N_1}{t_n - t_1}$$

ここで、

$N_1$ :  $t_1$ 時の実測細胞濃度(cells/ml)

$N_n$ :  $t_n$ 時の実測細胞濃度(cells/ml)

$t_1$ : 暴露開始後最初に細胞濃度を測定した時間

$t_n$ : 暴露開始後n回目に細胞濃度を測定した時間

平均の生長速度( $\mu$ )より各試験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、

$\mu_c$ : 対照区の平均生長速度

$\mu_t$ : 各試験区における平均生長速度

## 4.3 結果の算出に用いた試験濃度の決定

結果の算出に用いた試験濃度は測定値(算術平均)とした。

## 4.4 50 %生長阻害濃度( $EC_{50}$ )の算出

最高試験濃度において阻害率が50 %未満であったため $EC_{50}$ の算出は行わなかった。

## 4.5 最大無作用濃度(NOEC)

Dunnettの多重比較検定(片側, 有意水準:  $\alpha=0.05$ )により対照区と比較して有意差が認められない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)と記載した。

## 4.6 統計的手法

本試験結果に使用した統計ソフトを以下に示した。また、統計ソフトの入力値とその出力結果を付属資料-3に示した。

Yukms 統計ライブラリー 生物検定編(ユックムス株式会社)

## 5 結果及び考察

### 5.1 試験液中の被験物質濃度

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

暴露開始時及び終了時(72 時間後)の試験液中の測定濃度は、それぞれ 11.1~109 mg/l, 10.9

～102 mg/l (設定濃度：10～100 mg/l)であり、設定濃度に対する割合は、暴露開始時が101～111%，暴露終了時(72時間後)が96～109%であった。

各濃度区の設定濃度に対する測定濃度の算術平均値は10 mg/lで11.0 mg/l, 18 mg/lで17.7 mg/l, 32 mg/lで33.7 mg/l, 56 mg/lで57.9 mg/l及び100 mg/lで106 mg/lであり、

暴露開始時及び終了時の測定濃度は設定濃度の±20%以内を維持できた。よって、本被験物質は試験液中で安定であったと考えられた。

以上のことから、以下の値(50%生長阻害濃度及び最大無作用濃度)は測定値から算出した算術平均値を基に示した。

## 5.2 試験液の状態

暴露開始時の試験液は無色透明であった。また、72時間後の試験液は、全ての濃度区において開始時と比較して変化が認められなかった。

## 5.3 生長曲線

暴露期間中の細胞濃度をTable 2及び生長曲線をFigure 1に示した。また、濃度－阻害率のグラフをFigure 2～4に示した。

72時間後の平均細胞濃度は11.0 mg/lで $198.30 \times 10^4$  cells/ml, 17.7 mg/lで $187.17 \times 10^4$  cells/ml, 33.7 mg/lで $201.30 \times 10^4$  cells/ml, 57.9 mg/lで $120.63 \times 10^4$  cells/ml及び106 mg/lで $96.89 \times 10^4$  cells/mlであった。

なお、対照区では $189.03 \times 10^4$  cells/mlであった。

## 5.4 50%生長阻害濃度( $EC_{50}$ )

各時間における生長阻害率をTable 3に、50%生長阻害濃度( $EC_{50}$ )をTable 4に示した。以上のことから、以下の結果を得た。

### 面積法

$E_bC_{50}(0-72)$  : 110 mg/l 以上

### 速度法

$E_rC_{50}(24-48)$  : 110 mg/l 以上

$E_rC_{50}(24-72)$  : 110 mg/l 以上

## 5.5 最大無作用濃度(NOEC)

最大無作用濃度(NOEC)をTable 5及び以下に示した。

### 面積法

$NOEC_b(0-72)$  : 34 mg/l (Dunnettの多重比較法により算出した。)

### 速度法

$NOEC_r(24-48)$  : 110 mg/l (Dunnettの多重比較法により算出した。)

$NOEC_r(24-72)$  : 34 mg/l (Dunnettの多重比較法により算出した。)

5.6 供試生物の観察された影響

肉眼による色調観察及び顕微鏡下での細胞形態観察の結果、全試験区において色調の異常、細胞の変形及び異常な細胞の出現は観察されなかった。

5.7 試験液の水温及び pH

試験液の水温を Table 6, pH を Table 7 に示した。

暴露期間中の各試験区の水温は 22.1~22.5℃, pH は 7.9~8.2 であり、水温は  $23 \pm 2$ ℃ の範囲で試験環境条件を満たしていた。

5.8 試験計画書からの逸脱事項

なし。

5.9 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

なし。

5.10 試験の妥当性

対照区の暴露開始 72 時間後の平均細胞濃度は、 $189.03 \times 10^4$  cells/ml であり、暴露開始時の細胞濃度の 16 倍以上に増加したため、本試験の成立が確認された。

5.11 結果の評価と考察

試験液中の被験物質濃度の分析結果から、被験物質濃度は一定に保たれていたことが確認された。よって、暴露期間中の藻類は、ほぼ設定濃度通りの被験物質に連続的に暴露されていたと判断した。本試験では面積及び速度法より算出した  $EC_{50}$  はいずれも 110 mg/l 以上であったことから、本被験物質の藻類の生長に対する影響は低いものと考えられた。

本被験物質は藻類の栄養源と成り得る窒素を多く含有しているため、藻類の増殖が促進された可能性が考えられた。なお、暴露終了時に目視及び顕微鏡下で藻体の観察を行ったところ、色調の異常及び細胞の変形等は認められなかった。

本被験物質は水溶解度が高く、難分解性物質であることから、自然環境中に流出した場合には、水系への拡散が早く、その地域に生息する生物に対して、長期間の暴露影響を及ぼす可能性が高いと推察された。よって、本試験より得られた毒性に関する情報のみから、その影響を推察するには注意が必要であると考えられた。

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

Nominal Concentration (mg/l)	Measured Concentration (mg/l)				Mean <sup>a</sup> Measured Concentration (mg/l)
	0 Hour	Percent of Nominal	72 Hours	Percent of Nominal	
Control	< 0.5	—	< 0.5	—	—
10	11.1	111	10.9	109	11.0
18	18.1	101	17.3	96	17.7
32	34.3	107	33.1	103	33.7
56	61.1	109	54.7	98	57.9
100	109	109	102	102	106

a : Arithmetic Mean



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

Nominal Concentration (mg/l)	Mean <sup>a</sup> Measured Concentration (mg/l)	No.	Cells Densities( $\times 10^4$ cells/ml)			
			0 Hour	24 Hours	48 Hours	72 Hours
Control	—	1	1.0	6.73	41.78	212.00
		2	1.0	6.27	38.49	180.50
		3	1.0	6.54	34.14	174.60
		Average	1.0	6.51	38.14	189.03
		SD	0.0	0.23	3.83	20.11
10	11.0	1	1.0	5.73	32.62	200.40
		2	1.0	6.52	35.29	186.60
		3	1.0	6.48	34.65	207.90
		Average	1.0	6.24	34.19	198.30
		SD	0.0	0.45	1.39	10.80
18	17.7	1	1.0	4.67	33.14	192.60
		2	1.0	5.47	35.54	172.10
		3	1.0	5.53	34.19	196.80
		Average	1.0	5.22	34.29	187.17
		SD	0.0	0.48	1.20	13.22
32	33.7	1	1.0	6.05	35.41	191.60
		2	1.0	6.17	35.99	211.70
		3	1.0	6.31	36.66	200.60
		Average	1.0	6.18	36.02	201.30
		SD	0.0	0.13	0.63	10.07
56	57.9	1	1.0	5.05	26.98	119.80
		2	1.0	5.18	28.16	111.10
		3	1.0	4.96	29.08	131.00
		Average	1.0	5.06	28.07	120.63
		SD	0.0	0.11	1.05	9.98
100	106	1	1.0	3.14	17.90	83.03
		2	1.0	3.77	18.00	93.83
		3	1.0	3.94	25.89	113.80
		Average	1.0	3.62	20.60	96.89
		SD	0.0	0.42	4.58	15.61

SD = Standard deviation

a : Arithmetic Mean

Table 3. Percentage Inhibition of *Selenastrum capricornutum*

Nominal Concentration (mg/l)	Mean <sup>a</sup> Measured Concentration (mg/l)	No.	Area Under the Growth Curves		Growth Rate			
			Area A(0-72hr)	Inhibition (%) I <sub>A</sub> (0-72hr)	Rate $\mu$ (24-48hr)	Inhibition (%) I <sub>A</sub> (24-48hr)	Rate $\mu$ (24-72hr)	Inhibition (%) I <sub>A</sub> (24-72hr)
Control	—	1	36,482,400	—	0.076077	—	0.071875	—
		2	31,802,400	—	0.075609	—	0.069999	—
		3	30,115,200	—	0.068856	—	0.068428	—
		Average	32,800,000	—	0.073514	—	0.070101	—
		SD	3,298,744	—	0.004041	—	0.001726	—
10	11.0	1	32,652,000	0.45	0.072467	1.42	0.074054	-5.64
		2	31,826,400	2.97	0.070364	4.28	0.069877	0.32
		3	34,219,200	-4.33	0.069857	4.97	0.072257	-3.08
		Average	32,899,200	-0.30	0.070896	3.56	0.072063	-2.80
		SD	1,215,403	3.71	0.001384	1.88	0.002095	2.99
18	17.7	1	31,586,400	3.70	0.081649	-11.07	0.077489	-10.54
		2	29,894,400	8.86	0.077974	-6.07	0.071850	-2.49
		3	32,548,800	0.77	0.075906	-3.25	0.074417	-6.16
		Average	31,343,200	4.44	0.078510	-6.80	0.074585	-6.40
		SD	1,343,808	4.10	0.002909	3.96	0.002823	4.03
32	33.7	1	32,342,400	1.40	0.073622	-0.15	0.071986	-2.11
		2	34,922,400	-6.47	0.073481	0.04	0.073656	-5.07
		3	33,784,800	-3.00	0.073315	0.27	0.072066	-2.80
		Average	33,683,200	-2.69	0.073473	0.05	0.072569	-3.52
		SD	1,292,997	3.94	0.000154	0.21	0.000942	1.34
56	57.9	1	21,463,200	34.56	0.069821	5.02	0.065967	5.90
		2	20,733,600	36.79	0.070546	4.04	0.063867	8.89
		3	23,289,600	29.00	0.073694	-0.24	0.068204	2.71
		Average	21,828,800	33.45**	0.071354	2.94	0.066013	5.83*
		SD	1,316,636	4.01	0.002059	2.80	0.002169	3.09
100	106	1	14,413,200	56.06	0.072524	1.35	0.068229	2.67
		2	15,884,400	51.57	0.065137	11.40	0.066967	4.47
		3	20,215,200	38.37	0.078445	-6.71	0.070068	0.05
		Average	16,837,600	48.67**	0.072035	2.01	0.068421	2.40
		SD	3,016,164	9.20	0.006667	9.07	0.001559	2.22

SD = Standard deviation,

a: Arithmetic Mean

\*  $\alpha=0.05$ (significant difference)

\*\*  $\alpha=0.01$ (significant difference)

Table 4. Calculated EC<sub>50</sub> Values

Based on I <sub>A</sub> (0-72hr) value(Areas under the growth curves)		
EbC <sub>50</sub> ( 0-72) (mg/l)	95-Percent Confidence Limits (mg/l)	Statistical Method
> 110	—	—
Based on I <sub>B</sub> (24-48hr) value(Growth Rates)		
ErC <sub>50</sub> (24-48) (mg/l)	95-Percent Confidence Limits (mg/l)	Statistical Method
> 110	—	—
Based on I <sub>B</sub> (24-72hr) value(Growth Rates)		
ErC <sub>50</sub> (24-72) (mg/l)	95-Percent Confidence Limits (mg/l)	Statistical Method
> 110	—	—

Table 5. Calculated NOEC

Based on I <sub>A</sub> (0-72hr) value(Areas under the growth curves)	
NOECb(0-72) (mg/l)	Statistical Method
34	Dunnett's multicomparison test
Based on I <sub>B</sub> (24-48hr) value(Growth Rates)	
NOECr(24-48) (mg/l)	Statistical Method
110	Dunnett's multicomparison test
Based on I <sub>B</sub> (24-72hr) value(Growth Rates)	
NOECr(24-72) (mg/l)	Statistical Method
34	Dunnett's multicomparison test

Table 6. Temperature

Nominal Concentration (mg/l)	Mean <sup>a</sup> Measured Concentration (mg/l)	Temperature (°C)	
		0 Hour	72 Hours
Control	—	22.2	22.2
10	11.0	22.3	22.4
18	17.7	22.2	22.5
32	33.7	22.2	22.4
56	57.9	22.1	22.4
100	106	22.1	22.3

a : Arithmetic Mean

Table 7. pH Values

Nominal Concentration (mg/l)	Mean <sup>a</sup> Measured Concentration (mg/l)	pH	
		0 Hour	72 Hours
Control	—	7.9	8.2
10	11.0	8.0	8.0
18	17.7	7.9	8.1
32	33.7	7.9	8.2
56	57.9	7.9	8.1
100	106	7.9	8.0

a : Arithmetic Mean

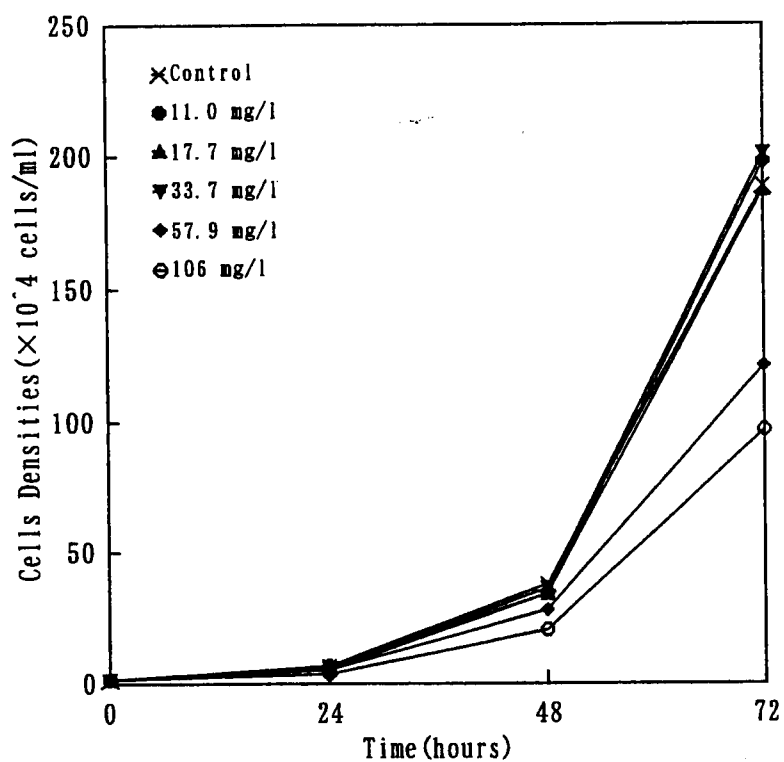


Figure 1. Algal Growth Curve of *Selenastrum capricornutum*  
(Mean Cell Densities vs time during the 72-hour exposure)

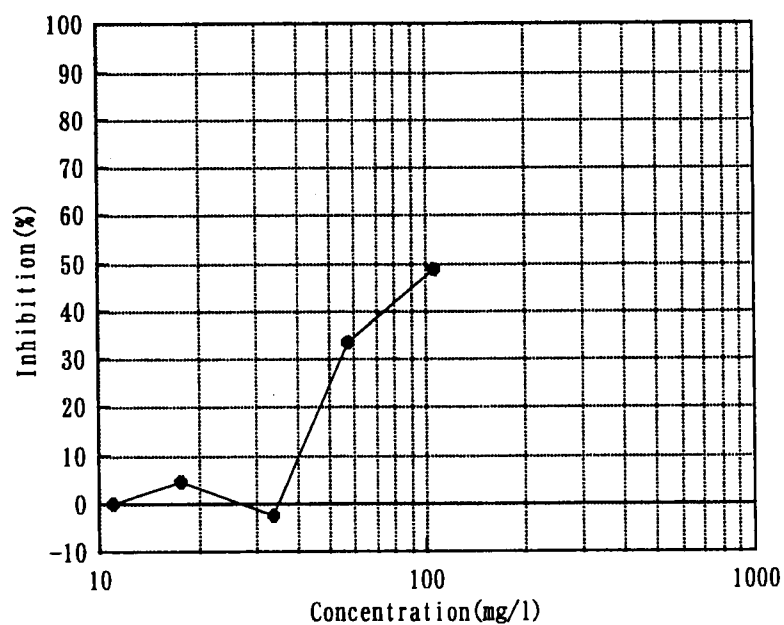


Figure 2. Concentration-Inhibition Curve Based on  $I_A$  Values Calculated from the Area  
under the Growth Curves

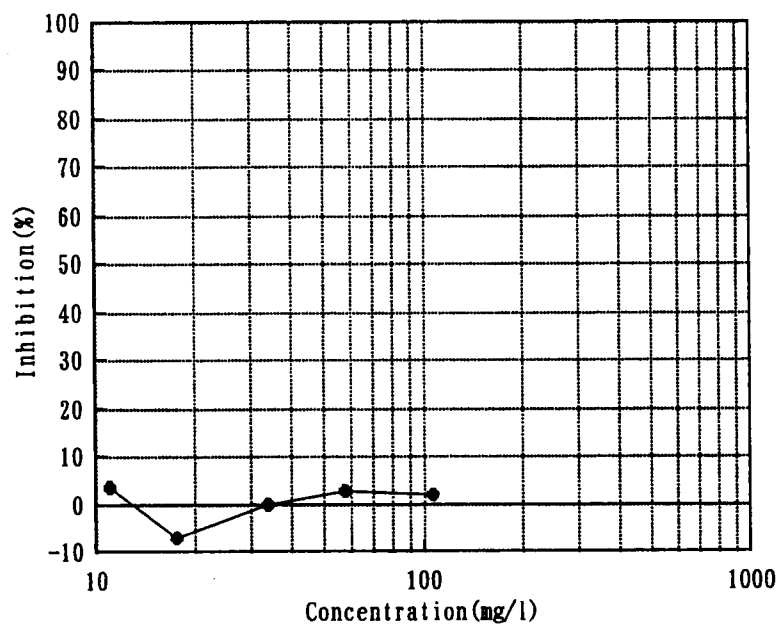


Figure 3. Concentration-Inhibition Curve Based on  $I_m$  Values Calculated from the Growth Rates (24-48)

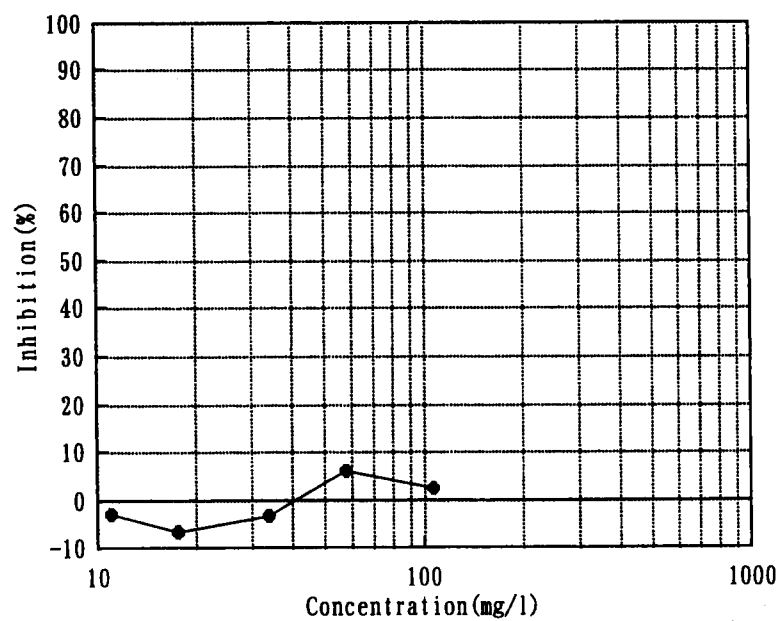


Figure 4. Concentration-Inhibition Curve Based on  $I_m$  Values Calculated from the Growth Rates (24-72)

付属資料-1 : OECD 培地

Table 1. OECD medium

Nutrient salts	Concentration (mg/l)
$\text{NH}_4\text{Cl}$	15
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	12
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	18
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	15
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	1.6
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.08
$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.1
$\text{H}_3\text{BO}_3$	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

付属資料-2：予備試験結果

予備試験結果を Table 1 に示した。

Table 1. Cells Densities and Percentage Inhibition of *Selenastrum capricornutum*

Nominal Concentration (mg/l)					(Range finding test)
	Cells Densities*( $\times 10^4$ cells/ml)				Area under the growth curves
	0 Hour	24 Hours	48 Hours	72 Hours	Inhibition (%) $I_A(0-72hr)$
10	1.0	4.65	26.37	163.63	-10.40
100	1.0	4.18	20.64	94.63	30.33
Control	1.0	4.74	26.88	141.67	—

\*: Base for the data were the values standardized on the cells densities of each of the three parallels.



付属資料-3：統計処理データ

統計ソフトの入力値とその出力結果を以下に示した。

NOECb(0-72) [Based on  $I_A(0-72hr)$  value(Areas under the growth curves)]

試験番号 第14021号  
被験物質名 TUR  
生長曲線下の面積の比較による阻害

M:1  
L:3  
C:6

Control	S. Control	11	17.7	33.7	57.9	106
3.648240		3.265200	3.158640	3.234240	2.146320	1.441320
3.180240		3.182640	2.989440	3.492240	2.073360	1.588440
3.011520		3.421920	3.254880	3.378480	2.328960	2.021520

YUKMS 統計ライブラリー I  
COMPARISON OF AREAS UNDER THE GROWTH CURVES  
NOEC

Model: 1 Basic statistic <<Column>>		Filename : IA-NC.DAT		nxt: 0	
No.	1	2	3	4	5
N	3	3	3	3	3
Mean	3.28000	3.28992	3.13432	3.36832	2.18288
Variance	0.10882	0.01477	0.01806	0.01672	0.01734
S.D.	0.32987	0.12154	0.13438	0.12930	0.13166
S.E.	0.19045	0.07017	0.07758	0.07465	0.07602
.....					
No.	6				
N	3				
Mean	1.68376				
Variance	0.09097				
S.D.	0.30162				
S.E.	0.17414				
=====					
Dunnett : Parametric multiple comparison					1-side
Comparison	Differ.	Critical	Statistic	Probability	.05 table .01 table
mean	value			value	value
1 vs 2	-0.010	0.430724	-0.05763	0.815912	2.50225 3.41975
1 vs 3	0.146	0.430724	0.84631	0.493862	2.50225 3.41975
1 vs 4	-0.088	0.430724	-0.51309	0.643066	2.50225 3.41975
1 vs 5	1.097	0.588658**	6.37361	0.000079	2.50225 3.41975
1 vs 6	1.596	0.588658**	9.27320	0.000004	2.50225 3.41975
=====					

NOECr(24-48) [Based on  $I_m$ (24-48hr) value(Growth Rates)]

試験番号 第14021号  
被験物質名 TUR  
平均生長速度の比較による阻害 (24-48)

M:1  
L:3  
C:6

Control	S. Control	11	17.7	33.7	57.9	106
0.076077		0.072467	0.081649	0.073622	0.069821	0.072524
0.075609		0.070364	0.077974	0.073481	0.070546	0.065137
0.068856		0.069857	0.075906	0.073315	0.073694	0.078445

YUKMS 統計ライブラリー I  
COMPARISON OF GROWTH RATES  
NOEC (24-48HR)

Model: 1 Basic statistic <<Column>>			Filename : IM48-NC.DAT		nxt: 0	
No.	1	2	3	4	5	
N	3	3	3	3	3	
Mean	0.07351	0.07090	0.07851	0.07347	0.07135	
Variance	0.00002	0.00000	0.00001	0.00000	0.00000	
S. D.	0.00404	0.00138	0.00291	0.00015	0.00206	
S. E.	0.00233	0.00080	0.00168	0.00009	0.00119	
No.	6					
N	3					
Mean	0.07204					
Variance	0.00004					
S. D.	0.00667					
S. E.	0.00385					
Dunnett : Parametric multiple comparison						
Comparison	Differ.	Critical	Statistic	Probability	.05 table	1-side .01 table
mean	value			value	value	
1 vs 2	0.003	0.007244	0.90437	0.467854	2.50225	3.41975
1 vs 3	-0.005	0.007244	-1.72571	0.172162	2.50225	3.41975
1 vs 4	0.000	0.007244	0.01428	0.829122	2.50225	3.41975
1 vs 5	0.002	0.007244	0.74627	0.539074	2.50225	3.41975
1 vs 6	0.001	0.007244	0.51079	0.644060	2.50225	3.41975

NOECr(24-72) [Based on I<sub>h</sub>(24-72hr) value(Growth Rates)]

試験番号 第14021号  
被験物質名 TUR  
平均生長速度の比較による阻害 (24-72)

M:1  
L:3  
C:6

Control	S. Control	11	17.7	33.7	57.9	106
0.071875		0.074054	0.077489	0.071986	0.065967	0.068229
0.069999		0.069877	0.071850	0.073656	0.063867	0.066967
0.068428		0.072257	0.074417	0.072066	0.068204	0.070068

YUKMS 統計ライブラリー I  
COMPARISON OF GROWTH RATES  
NOEC (24-72HR)

Model: 1 Basic statistic <<Column>>					Filename : IM72-NC.DAT			next: 0
No.	1	2	3	4	5			
N	3	3	3	3	3			
Mean	0.07010	0.07206	0.07459	0.07257	0.06601			
Variance	0.00000	0.00000	0.00001	0.00000	0.00000			
S. D.	0.00173	0.00210	0.00282	0.00094	0.00217			
S. E.	0.00100	0.00121	0.00163	0.00054	0.00125			
No.	6							
N	3							
Mean	0.06842							
Variance	0.00000							
S. D.	0.00156							
S. E.	0.00090							
Dunnett : Parametric multiple comparison								
Comparison	Differ.	Critical	Statistic	Probability	.05 table	.01 table	l-side	
mean	value			value	value			
1 vs 2	-0.002	0.004031	-1.21777	0.335576	2.50225	3.41975		
1 vs 3	-0.004	0.004031*	-2.78352	0.030785	2.50225	3.41975		
1 vs 4	-0.002	0.004031	-1.53224	0.225751	2.50225	3.41975		
1 vs 5	0.004	0.004031*	2.53732	0.047101	2.50225	3.41975		
1 vs 6	0.002	0.004031	1.04232	0.407527	2.50225	3.41975		

## 付属資料-4：試験液中の被験物質濃度の分析方法

### 1 標準品

被験物質を使用した。

### 2 試薬、試液及び標準溶液の調製

#### 1) 試薬

メタノール：高速液体クロマトグラフ用

酢酸：特級

Milli-Q水：水道水を活性炭カートリッジ、逆浸透カートリッジ及びイオン交換樹脂で精製した後 Milli-Q system で精製したもの

C<sub>18</sub>ミニカラム：Waters 社, Sep-Pak Plus C18 カートリッジ

前処理用フィルター：Millipore 社, Millex-LH, 孔径 0.45 µm

#### 2) 試液

##### ① 1 %酢酸

Milli-Q水100 ml及び酢酸1 mlを混合した。

##### ② 0.01 %酢酸

Milli-Q水990 ml及び1 %酢酸10 mlを混合した。

#### 3) 標準溶液の調製

被験物質0.025 gを精密に秤り、Milli-Q水に溶解して50 mlとし、これを標準原液とした。この標準原液をMilli-Q水で希釈して40 mg/l溶液を調製し、この一定量を取りMilli-Q水で適宜希釈して0.0125, 0.0625, 0.25及び0.5 mg/lの標準溶液を調製した。

### 3 試料溶液の調製

#### 1) 対照区, 10及び18 mg/lの試験培地

試験培地の2.5 mlを100 mlのメスフラスコに正確に量り取り、Milli-Q水で定容とした。

C<sub>18</sub>ミニカラムに10 ml容の注射筒を取りつけ、メタノール5 mlで洗浄した。これに試験培地の希釈液の10 mlを流下させ流出液を捨てた後、C<sub>18</sub>ミニカラムの先端に前処理用フィルターを接続した。これに試験培地の希釈液の2 mlを流下させ、これを試料溶液とした。

#### 2) 32 mg/lの試験培地

試験培地の1 mlを100 mlのメスフラスコに正確に量り取り、Milli-Q水で定容とした。

C<sub>18</sub>ミニカラムに10 ml容の注射筒を取りつけ、メタノール5 mlで洗浄した。これに試験培地の希釈液の10 mlを流下させ流出液を捨てた後、C<sub>18</sub>ミニカラムの先端に前処理用フィルターを接続した。これに試験培地の希釈液の2 mlを流下させ、これを試料溶液とした。

#### 3) 56 mg/lの試験培地

試験培地の1 mlを200 mlのメスフラスコに正確に量り取り、Milli-Q水で定容とした。

C<sub>18</sub>ミニカラムに10 ml容の注射筒を取りつけ、メタノール5 mlで洗浄した。これに試験培地の

希釈液の10 mlを流下させ流出液を捨てた後、C<sub>18</sub>ミニカラムの先端に前処理用フィルターを接続した。これに試験培地の希釈液の2 mlを流下させ、これを試料溶液とした。

4) 100 mg/lの試験培地

試験培地の1 mlを20 mlのメスフラスコに正確に量り取り、Milli-Q水で定容し、その1 mlを20 mlのメスフラスコに量り取り、Milli-Q水で定容とした(試験培地1 mlの400 ml定容相当)。

C<sub>18</sub>ミニカラムに10 ml容の注射筒を取りつけ、メタノール5 mlで洗浄した。これに試験培地の希釈液の10 mlを流下させ流出液を捨てた後、C<sub>18</sub>ミニカラムの先端に前処理用フィルターを接続した。これに試験培地の希釈液の2 mlを流下させ、これを試料溶液とした。

4 高速液体クロマトグラフ-質量分析計操作条件

機種：Agilent 1100 G1312Aバイナリポンプ [Agilent Technologies]

検出器：Agilent 1100 G1946D LC/MSD SL [Agilent Technologies]

カラム：CAPCELL PAK C<sub>18</sub> AQ, φ2.0 mm×15 cm [株式会社 資生堂]

カラム温度：40 °C

移動相：0.01 % 酢酸

流量：0.2 ml/min

イオン化法：ESI(positiveモード)

ドラインガス：窒素(10 l/分, 350 °C)

ネブライザーガス：窒素(30 psi)

フラグメンター電圧：90 V

キャピラリー電圧：2,000 V

設定質量数(m/z)：77.1

データ処理装置：LC/MSD ChemiStation(Rev. A.09.01) [Agilent Technologies]

5 定量

2の3)で調製した標準溶液及び3で調製した試料溶液4 µlを高速液体クロマトグラフ-質量分析計に注入した。標準溶液の濃度とピーク高から検量線を作成し、試験培地中の被験物質濃度を算出した。

6 検出限界

$$\text{検出限界} : \frac{0.05 \text{ ng}}{1,000} \times \frac{2 \text{ ml} \times 1,000}{4 \text{ µl}} \times \frac{1}{0.05 \text{ ml}^*} = 0.5 \text{ mg/l}$$

$$* 0.05 \text{ ml} = \frac{2.5 \text{ ml}}{100 \text{ ml}} \times 2 \text{ ml}$$

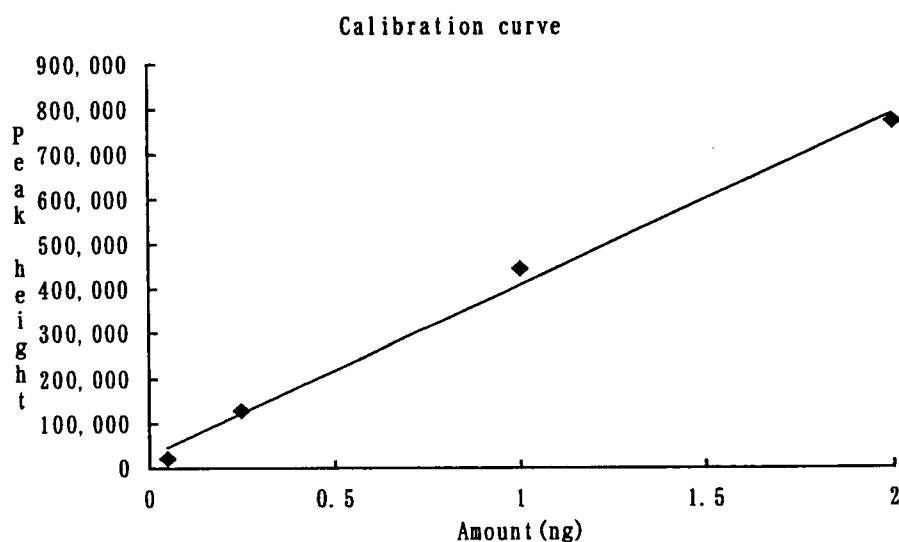
## 7 添加回収試験

### 1) 低濃度添加

培地に被験物質を10 mg/lになるように添加し、この溶液を用いて添加回収試験を行った。試験は平行測定3回で実施し、回収率は122.8 %, 121.5 %, 105.3 % (平均116.5 %)であった。

### 2) 高濃度添加

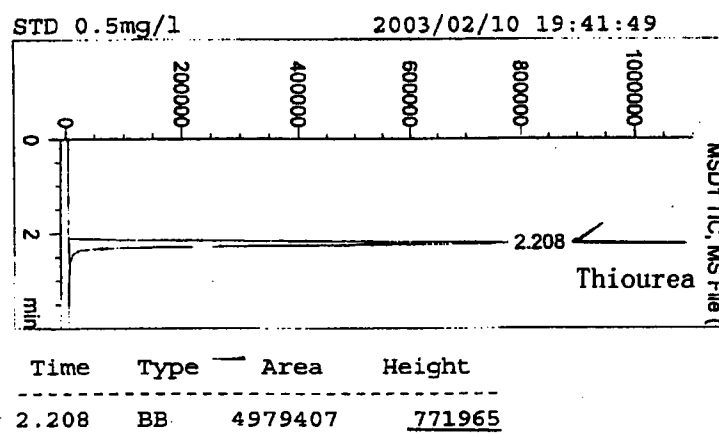
培地に被験物質を100 mg/lになるように添加し、この溶液を用いて添加回収試験を行った。試験は平行測定3回で実施し、回収率は101.8 %, 101.7 %, 101.5 % (平均101.7 %)であった。



Amount (ng)	Peak height
2	771,965
1	445,247
0.25	128,774
0.05	21,848

Figure 1. Calibration curve of Thiourea by HPLC analysis

Standard (0.5 mg/l): 0 hour



Control: 0 hour

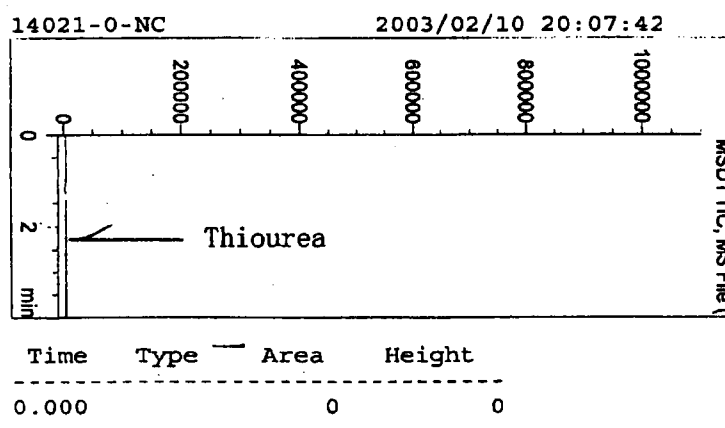
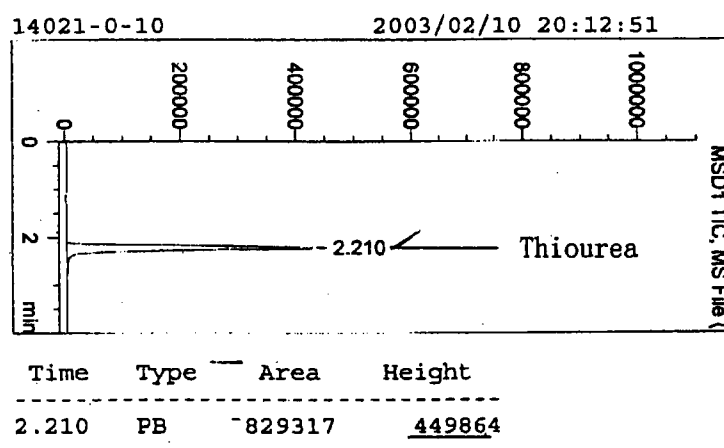


Figure 2-1. Representative chromatograms

Test solution (10 mg/l): 0 hour



Test solution (100 mg/l): 0 hour

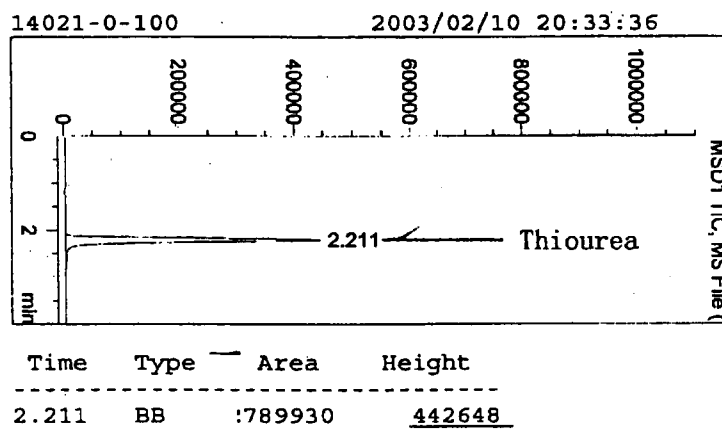


Figure 2-2. Representative chromatograms



## 陳述書

1 試験委託者

環境省

2 試験番号

第14021号

3 試験の表題

チオ尿素の藻類(*Selenastrum capricornutum*)に対する生長阻害試験

上記試験は、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)を遵守して実施したものです。

2003 年 3 月 31 日

財団法人 日本食品分析センター 多摩研究所

運営管理者



## 陳述書

1 試験委託者

環境省

2 試験番号

第14021号

3 試験の表題

チオ尿素の藻類(*Selenastrum capricornutum*)に対する生長阻害試験

上記試験は、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)を遵守して実施したものです。

なお、試験実施にあたっては、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)を遵守しました。

2003 年 3 月 3 | 日

財団法人 日本食品分析センター 多摩研究所

試験責任者



## 信頼性保証書

1 試験委託者

環境省

2 試験番号

第14021号

3 試験の表題

チオ尿素の藻類 (*Selenastrum capricornutum*) に対する生長阻害試験

4 検閲

本試験の検閲は、財団法人 日本食品分析センター 多摩研究所 信頼性保証部門の標準操作手順書に従い、以下のとおり実施した。

検 閲 内 容	検閲実施日	試験責任者への 報告年月日	運営管理者への 報告年月日
試験計画書	2002年12月20日	2002年12月20日	2002年12月20日
被験物質の受領	2003年01月08日	2003年01月09日	2003年01月09日
試験計画書	2003年02月10日	2003年02月12日	2003年02月12日
試験の実施	2003年02月10日	2003年02月12日	2003年02月12日
分析の実施, 試薬等 機器, 検体	2003年02月10日	2003年02月12日	2003年02月12日
試験の実施, 試薬等, 機器	2003年02月12日	2003年02月12日	2003年02月12日
試験の実施, 被験物質	2003年02月13日	2003年02月14日	2003年02月14日
試験中の保管文書	2003年03月25日	2003年03月25日	2003年03月25日
最終報告書草案及び生データ	2003年03月28日	2003年03月28日	2003年03月28日
最終報告書	2003年03月31日	2003年03月31日	2003年03月31日

上記検閲の結果、本試験最終報告書は試験に用いた方法が正確に記載され、報告結果は試験の生データを正確に反映していることを確認した。

2003 年 3 月 31 日

財団法人 日本食品分析センター 多摩研究所  
信頼性保証部門責任者

