

最終報告書

試験名

tert-ブチル=ヒドロペルオキシドの藻類に対する生長阻害試験

著者

■■■■■■■■■■

試験終了日

2010年3月30日

試験施設

(株) 日曹分析センター (略称 NCAS) 小田原事業所
〒250-0216 神奈川県小田原市高田 345

試験委託者

環境省 総合環境政策局 環境保健部 企画課 化学物質審査室
〒100-8975 東京都千代田区霞が関 1-2-2

試験番号

NCAS 09-252

GLP 適合陳述書

試験番号： NCAS 09-252

試験名： tert-ブチル=ヒドロペルオキシドの藻類に対する生長阻害試験

この試験は、「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（最終改正 平成 20 年 7 月 4 日）に従って実施した。

この試験は、ここに述べられた方法により行われ、この最終報告書は試験実施により得られた生データを正確に反映したものである。

試験責任者：

[Redacted Signature]

2010 年 3 月 30 日

(株) 日曹分析センター 小田原事業所

信頼性保証書

試験番号： NCAS 09-252

試験名： tert-ブチル=ヒドロペルオキシドの藻類に対する生長阻害試験

上記試験の信頼性保証の監査又は査察を適用 GLP および信頼性保証部門 (QAU) の SOP に基づいて実施した。監査又は査察の結果は、以下の日付で試験責任者および運営管理者に報告した。

監査又は査察項目	日付 (月/日/年)		
	監査又は査察日	報告日	
		試験責任者	運営管理者
試験計画書	3/12/2010	3/12/2010	3/12/2010
試験計画書変更届 1	3/20/2010	3/20/2010	3/20/2010
試験計画書変更届 2	3/26/2010	3/26/2010	3/26/2010
実験操作			
・ 試験溶液の調製	3/15-16/2010	3/16/2010	3/16/2010
・ 試験溶液への暴露	3/15-16/2010	3/16/2010	3/16/2010
・ 分析試料の採取と処理	3/15-16/2010	3/16/2010	3/16/2010
・ GC 分析	3/15-16/2010	3/16/2010	3/16/2010
・ 細胞濃度の測定	3/16/2010	3/16/2010	3/16/2010
・ 顕微鏡観察	3/16/2010	3/16/2010	3/16/2010
・ 藻の入手、培養と継代	3/19/2010	3/19/2010	3/19/2010
・ 試験溶液の調製 (再)	3/20/2010	3/20/2010	3/20/2010
・ 試験溶液への暴露 (再)	3/20/2010	3/20/2010	3/20/2010
生データ	3/30/2010	3/30/2010	3/30/2010
報告書草案	3/30/2010	3/30/2010	3/30/2010
最終報告書	3/30/2010	3/30/2010	3/30/2010

QAU は、この試験が試験計画書および SOP に従って行われ、報告された方法や手段が実際に使われたものであり、結果は記録されたデータを正確に反映していることを確認した。

QAU 責任者



2010年3月30日

(株) 日曹分析センター

試験情報

試験番号： NCAS 09-252
試験名： tert-ブチル=ヒドロペルオキシドの藻類に対する生長阻害試験
報告書番号： NCAS 09-252

試験委託者： 環境省 総合環境政策局 環境保健部 企画課 化学物質審査室
〒100-8975 東京都千代田区霞が関 1-2-2

試験施設： (株) 日曹分析センター 小田原事業所
〒250-0216 神奈川県小田原市高田 345
TEL 0465-42-5268 FAX 0465-42-3586

試験責任者： XXXXXXXXXX
試験従事者： XXXXXXXXXX (供試生物の管理、試験溶液調製、細胞濃度測定、観察、温度・pH・
照度測定、結果算出)
XXXXXXXXXX (前培養、被験物質濃度の測定)
XXXXXXXXXX (被験物質濃度の測定)

試験開始日： 2010年3月12日
実験開始日： 2010年3月15日
暴露期間： 2010年3月15日～2010年3月18日 (1回目実験 [密閉系]、試験不成立)
2010年3月20日～2010年3月23日 (2回目実験 [開放系]、試験成立)
実験終了日： 2010年3月23日
試験終了日： 2010年3月30日

適用試験ガイドライン： 「新規化学物質等に係る試験の方法について」(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、<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> IV 藻類生長阻害試験、
OECD Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing
and Assessment No.23, Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of
Difficult Substances and Mixtures, Sep. 2000

試資料保管： 本試験に関する全ての文書は、当試験施設の資料室に試験終了後10年間保管
する。その後の保管場所は試験委託者と協議して決定する。また、被験物質は、
当試験施設に試験終了後少なくとも10年間またはその品質が評価に耐え得る
期間のいずれか短い方の期間保管する。

SOP および試験計画書からの逸脱： なし

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

目 次

表 紙	1
GLP 適合陳述書	2
信頼性保証書	3
試験情報	4
目 次	5
概 要	7
緒 言	7
実験材料および方法	8
1. 被験物質	8
2. 被験物質の確認	8
3. 被験物質の安定性の確認	8
4. 被験物質の溶解性の確認	8
5. 試薬および機器	9
6. 供試生物	9
7. 藻類生長阻害試験	10
8. 試験溶液中の被験物質濃度の分析	12
9. 生長阻害率の算出	13
結 果	14
1. 被験物質の確認	14
2. 被験物質の安定性の確認	15
3. 被験物質の溶解性の確認	15
4. 試験溶液中の被験物質濃度の分析法確認	15
5. 試験溶液中の被験物質濃度	15
6. 生長曲線および生長速度	15
7. ErC_{50} 、95%信頼限界および $NOECr$	16
8. 試験溶液の pH	16
9. 試験溶液の観察	16
10. 藻類の顕微鏡観察	16
11. 試験の有効性	16
考 察	17
結 論	17
表および図	18
表 1 試験溶液中の被験物質濃度	18
表 2 暴露期間中の細胞濃度	19
表 3-1 生長速度および生長阻害率（対照区）	20
表 3-2 生長速度および生長阻害率（濃度区）	21
表 4 ErC_{50} 、95%信頼限界および $NOECr$	21
表 5 試験溶液の pH	22
表 6 試験溶液の観察結果	22
表 7 藻類の顕微鏡観察結果	23

目次（続き）

図 1	tert-ブチル=ヒドロペルオキシドの核磁気共鳴スペクトル（重クロロホルム）	-----23
図 2	被験物質の核磁気共鳴スペクトル（暴露開始前、重水、試験番号 NCAS 09-254）	--24
図 3	被験物質の核磁気共鳴スペクトル（暴露終了後、重水、試験番号 NCAS 09-254）	--24
図 4	検量線の一例	-----25
図 5	標準溶液の GC クロマトグラム（設定濃度 5.05 mg/L、暴露開始時）	-----25
図 6	暴露開始時の対照区の GC クロマトグラム	-----26
図 7	暴露開始時の 4.40 mg/L 区（設定濃度）の GC クロマトグラム	-----26
図 8	暴露終了時の 4.40 mg/L 区（設定濃度）の GC クロマトグラム	-----27
図 9	藻類の生長曲線	-----28
図 10	速度法より求めた被験物質の設定濃度における生長速度阻害率	-----29
添付資料 1	OECD 培地	----- 30
添付資料 2	予備試験（試験番号 NCAS 09-251NG）	----- 31
添付資料 3	1回目実験（密閉系試験、試験番号 NCAS 09-252）	----- 32
添付資料 4	繰り返し精度の確認	----- 33
添付資料 5	試験溶液中の被験物質濃度（推定値）の算出	----- 34

概 要

tert-ブチル=ヒドロペルオキシド（略名：TBHP）を含む試験溶液に藻類を暴露し、72 時間の生長阻害試験を実施した。被験物質には 70%水溶液（TBHP 純度：66.0%）を用い、濃度は特に明記しない限り TBHP としての数値を表記した。

予備試験結果をもとに密閉系にて 1 回目実験を行ったが、試験の成立条件（対照区繰り返し間での生長速度の変動係数）を満たさなかった。また、低濃度で毒性を示したため、NOECr 決定を優先し、定量下限（検量線最小濃度：約 0.5 mg/L）を下回る濃度を含む 0.0854、0.188、0.414、0.910、2.00 および 4.40 mg/L の 6 濃度（公比 2.2）を設定濃度とし、開放系にて 2 回目実験を行った。

試験溶液中の被験物質濃度を測定した結果、暴露終了時の測定濃度が設定濃度に対し 20%以上変動した濃度区が認められ、低濃度区では藻類への吸着が考えられた。そのため、OECD Guidance Document No.23 および OECD Test Guideline No.201 パラグラフ 40 に従い、定量下限以下での被験物質濃度（推定値）の算出および平均濃度の算出を行い、これを暴露期間中の被験物質濃度として結果を算出した。

暴露 72 時間における生長速度より求めた 50%生長阻害濃度（ErC₅₀）および最大無影響濃度（NOECr）を以下に示す。

暴露期間	ErC ₅₀ (mg/L)	95%信頼限界 (mg/L)	NOECr (mg/L)
0-72 時間	1.1	1.0~1.2	0.137

緒 言

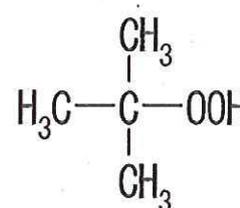
tert-ブチル=ヒドロペルオキシドを含む試験溶液に藻類を 72 時間暴露し、50%生長阻害濃度（ErC₅₀）および最大無影響濃度（NOECr）を求めるため、以下に従って試験を実施した。

- ・「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、環企発第 031121002 号）、最終改正：平成 18 年 11 月 20 日
 <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> IV 藻類生長阻害試験
- ・OECD Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No.23, Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures, Sep. 2000

実験材料および方法

1. 被験物質

名称:	tert-ブチル=ヒドロペルオキシド (略名: TBHP)
製品名:	tert-Butyl Hydroperoxide (70%水溶液)
化学名:	tert-Butyl hydroperoxide (IUPAC) 構造式:
CAS No.:	75-91-2
分子式:	C ₄ H ₁₀ O ₂
分子量:	90.12
ロット番号:	██████████
NCAS 検索番号:	STD-1149
純度:	66.0% (██████████の試験成績書による) その他 水 (██████████からの情報)
外観:	透明液体
入手先:	██████████
入手量:	100 g
入手日:	2010年1月14日
有効期限:	2013年1月14日(当施設内基準;有機試薬は購入後3年)
保存状態:	ポリプロピレン製容器に入れ冷蔵保存
水溶解度:	水に可溶 (MSDS より)
ヘンリー定数:	1.60×10 ⁻⁵ atm m ³ /mole (HENRYWIN v3.20)
危険有害性の要約:	有機過酸化物質。皮膚刺激。重篤な葉傷・眼の損傷。使用に際して保護手袋およびマスクを使用すること (MSDS より)。秤量は卓上ドラフトを備えた天秤を用いる等、局所排気機能のある場所で行うこと。



2. 被験物質の確認

暴露開始前に核磁気共鳴スペクトル (¹H NMR、重水) を測定し、The Aldrich Library of ¹³C and ¹H FT NMR Spectra EDITION I に記載されているスペクトル (重クロロホルム) との比較により被験物質を確認した。

この被験物質の確認は、同じ被験物質を使用した試験番号 NCAS 09-254 「tert-ブチル=ヒドロペルオキシドのヒメダカに対する急性毒性試験」 で実施した結果により代用した。

3. 被験物質の安定性の確認

暴露終了後に被験物質の核磁気共鳴スペクトル (¹H NMR、重水) を測定し、暴露開始前に測定したスペクトルと一致することを確認し、保存時の安定性を確認した。

この被験物質の安定性の確認は、同じ被験物質を使用した試験番号 NCAS 09-254 「tert-ブチル=ヒドロペルオキシドのヒメダカに対する急性毒性試験」 で実施した結果により代用した。

4. 被験物質の溶解性の確認

暴露開始時に 100 mg/L の試験原液を調製する際、溶解状態を目視で観察した。溶解していることが確認された場合、OECD 培地に対する溶解濃度を ≥100 mg/L とした。

5. 試薬および機器

イオン交換水：	バーンステッド型蒸留水製造装置 WDA-15S (いすゞ製作所) で製造した水を超純水製造装置トレピュア LV-08 (東レ) を用いて精製した水、およびイオン交換水製造装置 SA2100E (東京理科機械) を用いて精製した水
天 秤：	AG285、AE240 (メトラ)
ドラフト：	卓上型ドラフト (アズワン)
ろ過滅菌器：	NL154-0020 および NL166-0020 (0.2 μm 、NALGENE)
pH 計：	F-23 およびハンディ pH メータ D-51 (堀場製作所)
光量子計：	LI-1400 (メイワフォーシス)
温 度 計：	標準温度計 (測定範囲 0-50°C、最少目盛 0.1°C、株安藤計器製工所)
振とう培養機：	MR-100LS (高崎科学器械)
クリーンベンチ：	FG-1914L および BHC-1604 II A/B ₃ (日本エアーテック)
粒子計数分析装置：	F-520P (シスメックス)
計数装置用電解液：	セルパック (シスメックス)
超音波洗浄器：	UC-3 (池田理化) および Sonocleaner 200D (カイジョー)
顕 微 鏡：	BX51 TRF (オリンパス光学工業)
遠心分離機：	M200-IVD (佐久間製作所)、KN-70 (久保田製作所)
ダイヤフラム式真空ポンプ：	N86KT.18 (KNF JAPAN)
マイクロピペット：	ependorf Research V (エッペンドルフ)
遠沈管および試験管：	10 mL 共栓付ガラス製試験管
ガスクロマトグラフ (GC)：	Agilent Technologies
GC 装置：	Agilent 6890GC
データ処理装置：	Agilent Chem Station

6. 供試生物

分 類：	単細胞緑藻類
学 名：	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> (旧名 <i>Selenastrum capricornutum</i>)
入 手 先：	国立環境研究所 (茨城県つくば市小野川 16-2)
入 手 日：	2008 年 7 月 3 日
株 名：	NIES-35
感 受 性：	当施設における基準物質 (重クロム酸カリウム) による藻類生長阻害試験 (0.500、1.00、2.00 mg/L の 3 濃度区で実施) の 72 時間 ErC ₅₀ の背景データ ; 1.4 mg/L (n=1、2009 年 6 月実施、試験計画書番号 NCAS 09-059)
前培養条件：	供試生物は試験と同条件で前培養し、暴露開始前に約 72 時間培養した対数増殖期にあるものを使用した。前培養終了後、顕微鏡観察を行い、変形や異常な細胞の出現がないことを確認した。 培養期間 ; 2010 年 3 月 17 日 ~ 20 日 温度 ; 23.0°C (振とう培養機内温度) 照明 ; 連続照明 81~84 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ (白色蛍光灯、フラスコ液面付近)
使用実験施設：	A4 室

7. 藻類生長阻害試験

実験は 2 回行った (1 回目: 密閉系、2 回目: 開放系)。ただし、1 回目実験 (添付資料 3 を参照) は試験の成立条件を満たさなかったため、本文中では 2 回目実験について述べる。

7.1 試験条件

培養方式: 振とう培養 (100 rpm)
暴露期間: 72 時間
試験溶液量: 1 容器につき 100 mL
試験容器: アルミキャップ付 300 mL ガラス製三角フラスコ (開放系)
連 数: 3 容器/濃度区 (対照区は 6 容器)
初期細胞濃度: 5000 cells/mL (設定値)
試験温度: 23±2°C (振とう培養機内温度 22.9~23.1°C)
照 明: 連続照明 60~77 μE/m²/s (白色蛍光灯、フラスコ液面付近での実測値)
pH: 試験溶液の pH 調整は行わなかった。
培 地: OECD テストガイドライン推奨培地 (添付資料 1) を使用した。
使用実験施設: A3 室

7.2 試験溶液中の被験物質濃度の設定

被験物質は揮発性を有していると考えられたため (ヘンリー定数: 1.60×10⁻⁵ atm m³/mole)、密閉系にて予備試験 (試験計画書番号 NCAS 09-251NG) を行ったのち、1 回目実験 (密閉系、振とう培養 ≤ 20 rpm、試験成立条件を満たせず) を行った。詳細を添付資料 2 および 3 に示す。

予備試験および 1 回目実験より、水溶液中からの被験物質の揮散は多くないこと、および低濃度で毒性を示す結果が得られた。よって、2 回目試験では ErC₅₀ および NOEC_r を求めることを優先し、定量下限 (検量線の最小濃度: 約 0.5 mg/L) を下回る濃度を含む 0.0854、0.188、0.414、0.910、2.00 および 4.40 mg/L の 6 濃度 (公比 2.2) を設定濃度とし、開放系で試験を実施した。

7.3 試験溶液の調製

被験物質を 30.30 mg (tert-ブチル=ヒドロペルオキシドとして 20.0 mg [純度 66.0% で補正]) 秤量後、200 mL のメスフラスコに移し、OECD 培地で溶解、定容し 100 mg/L の試験原液を調製した。この溶液の 0.427、0.939、2.07、4.55、10.0 および 22.0 mL をそれぞれ 500 mL のメスフラスコに分取し、OECD 培地で定容して 0.0854、0.188、0.414、0.910、2.00 および 4.40 mg/L の試験溶液を調製した。

これらを各濃度区 3 個の試験容器に 100 mL ずつ分注した。試験溶液の調製はクリーンベンチ内で行った。対照区には、被験物質を含まない OECD 培地を 6 個の試験容器に 100 mL ずつ分注した。

7.4 試験操作

前培養した供試生物の細胞濃度を測定した結果は 1.61×10⁶ cells/mL であった。試験溶液中の細胞濃度が 5000 cells/mL となるように計算し、マイクロピペットを用いて前培養液 311

μL を各試験溶液の入った容器に無菌的に添加した。添加後、各試験容器を振とう培養機（装置設定温度 23.0°C ）に設置し培養を開始した。

暴露開始 24、48 および 72 時間後に各試験溶液中の細胞濃度を測定した。暴露期間中、日毎に振とう培養機内の試験容器の位置を並び替えた。暴露開始時の各試験区（各試験濃度区および対照区）の pH は、各試験溶液を調製した残りについて測定し、その値とした。暴露終了時の各試験区の pH は、各試験区の容器のうち 1 本について測定した。暴露期間中、振とう培養機内の温度と照度を 1 日 1 回測定した。

以下、時系列的に作業内容を示す。

暴露時間 (h)	作業
0	試験溶液の調製→振とう培養機内の温度および照度測定→前培養細胞濃度測定→供試生物の添加量算出→暴露→試験溶液の観察、pH 測定、前培養液の顕微鏡観察
24、48	細胞濃度測定、試験溶液の観察、振とう培養機内の温度および照度測定、試験容器の並び替え、顕微鏡観察
72	細胞濃度測定、試験溶液の観察、pH 測定、振とう培養機内の温度および照度測定、顕微鏡観察

7.5 供試生物の細胞濃度の測定法

次の表のように試験溶液（または培養液）を希釈して、粒子計数分析装置により細胞濃度（cells/mL）を測定した。暴露開始時において、試験溶液中の細胞濃度は測定せず、設定値である 5000 cells/mL を初期細胞濃度とした。

なお、藻類を含まない OECD 培地および最高濃度区の試験溶液中の粒子数は、それぞれ 323 および 573 個/mL であった。試験計画書に規定した 7×10^4 個/mL 以下であり、かつバックグラウンドとして十分低い値であったことから、測定した値をそのまま細胞濃度に採用した。

測定項目	採取量 (μL)	セルパック量 (μL)	希釈倍率
1. 継代中藻類の細胞濃度	100	9900	$\times 100$
2. 前培養終了後の細胞濃度	200	9800	$\times 50$
3. 藻類を含まない OECD 培地および最高濃度区の試験溶液中の粒子数	5000	5000	$\times 2$
4. 暴露開始 24 時間後の細胞濃度			
5. 暴露開始 48 時間後の細胞濃度	200	9800	$\times 50$
6. 暴露開始 72 時間後の細胞濃度			

7.6 試験溶液の観察および藻類の顕微鏡観察

試験溶液の観察は暴露開始時、24、48 および 72 時間後に目視で行い、着色や沈殿の有無を確認した。

藻類の顕微鏡観察は暴露開始 24、48 および 72 時間後に行った。マイクロピペットを用いて 1.5 mL の培養液をエッペンドルフチューブに採取し、遠心分離（設定温度 23°C 、16500 rpm、5 分間）を行った。上澄み液を除いた後、パストールピペットで沈殿した藻をスライドガラスに採取し、顕微鏡観察を行った（1 容器/試験区）。

8. 試験溶液中の被験物質濃度の分析

8.1 GC 条件

カラム：	Nukol 25327 (F.T. 0.5 μ m)、0.53 mm I.D. \times 30 m (SUPELCO)
カラム温度：	初期温度 40°C (0.5 分間保持) 40°C – 200°C (昇温速度 ; 10°C/min) 最終温度 200°C (1 分間保持)
注入口温度：	240°C
検出器：	FID
検出器温度：	250°C
注入量：	2.0 μ L
注入方法：	スプリットレス
キャリアーガス：	ヘリウム 5.0 mL/min (コンスタントフロー)
検出器ガス：	水素 40 mL/min、空気 450 mL/min
メイクアップガス：	ヘリウム 20 mL/min (メイクアップ+カラム流量)

8.2 標準溶液の調製および検量線

下表の通り、暴露開始時、24、48 および 72 時間後に標準溶液を調製した。被験物質を秤量後、100 mL 容メスフラスコに入れ、イオン交換水で溶解、定容して約 100 mg/L (tert-ブチル=ヒドロペルオキシドとしての濃度、純度 66.0%で補正) の標準原液を調製した。この原液をイオン交換水で希釈し、4 濃度の標準溶液を調製した。

暴露期間	被験物質質量 (mg)	標準溶液濃度* (mg/L)			
暴露開始時	15.25	5.05	2.02	1.01	0.505
24 時間後	15.19	5.00	2.00	1.00	0.500
48 時間後	15.17	5.00	2.00	1.00	0.500
72 時間後	15.48	5.10	2.04	1.02	0.510

*純度 66.0%で換算した値

調製した標準溶液の 2.0 μ L を 8.1 項の条件の GC に 1 回注入して分析した。被験物質濃度を横軸に、ピーク面積を縦軸にとり、最小二乗法により検量線を作成した。回帰式は二次曲線を採用した。

8.3 試験溶液中の被験物質濃度の分析法確認

8.3.1 検量線の妥当性の確認

検量線の回帰式および相関係数の二乗 (r^2) を求めるとともに、回帰式より逆算して定量値を求め、真度を算出した。相関係数の二乗 (r^2) が 0.98 以上、真度の変動が $\pm 20\%$ 以内の場合、検量線が妥当であると判断した。

8.3.2 繰り返し精度の確認

抽出等の操作が行われていないため添加回収試験は行わず、分析法の繰り返し精度の確認

を実施した（添付資料 4）。

8.4 試験溶液中の被験物質濃度の測定

暴露期間中における試験溶液中の被験物質濃度の推移を把握するため、測定は暴露開始時、24、48 および 72 時間後に行った。暴露開始時の測定は、各試験溶液を調製した残りからそれぞれ 10 mL を遠沈管に採取し試料溶液とした。暴露開始 24、48 および 72 時間後の測定は、各濃度区 3 連の試験溶液の各 3.0 mL を容器の中層より遠沈管に採取後、混合して 9.0 mL とし試料溶液とした（対照区は 6 連の試験溶液の各 1.5 mL を採取）。これらの試料溶液を遠心分離（3000 rpm、10 分間）したのち、得られた上澄み液を 8.1 項に示した GC 条件で分析した。得られたピーク面積から検量線を用いて被験物質濃度を求めた。

対照区についても同様の操作を行い、GC クロマトグラムの被験物質の検出位置に、定量を妨害するようなピークがないことを確認した。

暴露開始時、24、48 および 72 時間後の被験物質濃度について、次の式から平均測定濃度を算出し、これを暴露期間中の被験物質濃度とした。

<平均測定濃度の算出方法>（OECD Guidance Document No.23 より）

$$\text{Mean concentration} = \text{antilog} \left(\frac{1}{2(t_n - t_1)} \sum_{i=1}^{n-1} [(\log(\text{conc}_i) + \log(\text{conc}_{i+1})) \cdot (t_{i+1} - t_i)] \right)$$

Where: t_1 = initial time < t_2 < ... < t_n = final time
 conc_1 = initial concentration, $\text{conc}_2, \dots, \text{conc}_n$ = final concentration

なお、被験物質濃度が検量線範囲を下回った場合など（設定濃度が検量線範囲を下回る濃度区も含める）、OECD Guidance Document No.23 に従って対応し、適切な被験物質濃度を毒性値の算出に用いた。具体的には、検出下限＝定量下限（検量線最小濃度：約 0.5mg/L）とし、試験溶液の分析においてピーク不検出であった場合（設定濃度 0.910 mg/L 区の 72 時間後分析）、定量下限の 1/2 濃度を被験物質濃度として平均濃度の算出に用いた。また、定量下限以下の濃度区については、72 時間後の平均生物量（藻類細胞濃度の対数）と被験物質減少率より回帰式を求め、逆算して 72 時間後の被験物質濃度（推定値）の算出を行った（添付資料 5）。

9. 生長阻害率の算出

9.1 生長速度の比較（速度法）による生長速度阻害率（ I_μ ）の算出

各試験区（各試験濃度区および対照区）の細胞濃度を時間に対してプロットし、生長曲線を作成した（片対数グラフ）。この時、対照区の生長が暴露期間を通じて対数増殖期にあるか確認した。以下に示す速度法により、生長速度阻害率を算出した。対照区について、毎日の生長速度および繰り返し間の生長速度の変動係数を算出した（Microsoft® Excel 2003 使用）。

9.1.1 生長速度（ μ ）の算出方法

生長速度（ μ ）は自然対数を用いて求めた。

$$\mu_1 = (\ln N_{24} - \ln N_0) / 24$$

$$\mu_2 = (\ln N_{48} - \ln N_{24}) / 24$$

$$\mu_3 = (\ln N_{72} - \ln N_{48}) / 24$$

$$\mu_4 = (\ln N_{48} - \ln N_0) / 48$$

$$\mu_5 = (\ln N_{72} - \ln N_0) / 72$$

ここで、 N_0 : 暴露開始時の細胞濃度 (設定値)

N_{24} : 暴露 24 時間後の細胞濃度

N_{48} : 暴露 48 時間後の細胞濃度

N_{72} : 暴露 72 時間後の細胞濃度

μ_1 : 0-24 時間の生長速度

μ_2 : 24-48 時間の生長速度

μ_3 : 48-72 時間の生長速度

μ_4 : 0-48 時間の生長速度

μ_5 : 0-72 時間の生長速度

9.1.2 生長速度阻害率 (I_μ) の算出方法

$$I_\mu = (\mu_c - \mu_t) \times 100 / \mu_c$$

μ_c : 対照区の生長速度

μ_t : 試験区の生長速度

9.2 50%生長阻害濃度 (ErC₅₀) の算出

各試験濃度区における生長速度阻害率 (I_μ) の結果から、Microsoft® Excel 2003 の Statlight 「#8 回帰分析」 (Yukms Corp., 東京) を用いて Probit 法 (重みつき最小二乗法) により ErC₅₀ (0-72 h) および 95%信頼限界を算出した。算出には各試験濃度区の群平均値を使用せず、個々のデータを使用した。なお、ErC₅₀ および 95%信頼限界値の有効桁数は 2 桁とした。

9.3 最大無影響濃度 (NOECr) の決定

供試生物が生長阻害を受けない最高濃度区の被験物質濃度を NOECr として決定した。等分散検定 (Bartlett test, $\alpha=0.01$) を行った結果、等分散性であった。続いて一元配置分散分析 (1-way ANOVA, $\alpha=0.01, 0.05$) 後、多重比較検定の手法としてパラメトリックの Dunnett の検定 ($\alpha=0.01, 0.05$, 両側) を実施した。対照区と比較して有意差が認められない最高濃度区の被験物質濃度を NOECr とした。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。なお、NOECr の有効数字の桁数は 3 桁とした。

結 果

1. 被験物質の確認

The Aldrich Library of ¹³C and ¹H FT NMR Spectra EDITION I に収載されている tert-ブチル=ヒドロペルオキシドの核磁気共鳴スペクトル (重クロロホルム) を図 1 に、暴露開始前に測定した被験物質の核磁気共鳴スペクトル (¹H NMR、重水、試験番号 NCAS 09-254 にて実施) を図 2 に示す。

収載されているスペクトルと測定したスペクトルが一致したことより (両者の溶媒が異な

ることからケミカルシフトが若干異なるが〔1.14 ppm が TBHP の-CH₃、4.67 ppm が水のシグナルである〕、構造上の問題はないと判断された)、被験物質が tert-ブチル=ヒドロペルオキシドであることを確認した。

2. 被験物質の安定性の確認

暴露終了後に測定した被験物質の核磁気共鳴スペクトル (¹H NMR、重水、試験番号 NCAS 09-254 にて実施) を図 3 に示す。

暴露開始前および暴露終了後で測定したスペクトルが一致したことから、保存中は安定であったと判断した。

3. 被験物質の溶解性の確認

暴露開始時に 100 mg/L の試験原液を調製した際、溶解していることが目視で確認された。よって、OECD 培地に対する溶解濃度は ≥ 100 mg/L と判断した。

4. 試験溶液中の被験物質濃度の分析法確認

4.1 検量線の妥当性の確認

被験物質の検量線の一例を図 4 に、標準溶液の GC クロマトグラムの一例 (5.05 mg/L、暴露開始時) を図 5 に示す。

検量線の相関係数の二乗は 0.9998~1.0000 (繰り返し精度の確認、暴露開始時、24、48 および 72 時間後) でいずれも 0.98 以上であり、真度の変動はいずれも $\pm 20\%$ 以内であった。これより検量線は妥当と判断した。

5. 試験溶液中の被験物質濃度

試験溶液中の被験物質濃度の測定結果を表 1 に、暴露開始時の対照区の GC クロマトグラムを図 6 に、暴露開始時および暴露終了時の設定濃度 4.40 mg/L 区の GC クロマトグラムをそれぞれ図 7 および 8 に示す。

対照区の GC クロマトグラムにおいて、被験物質の検出位置に定量を妨害するようなピークは認められなかった。

試験溶液中の被験物質濃度を測定した結果、暴露終了時の測定濃度が設定濃度に対し 20% 以上変動した濃度区が認められた。0.0854、0.188 および 0.414 mg/L 区は、暴露期間を通して全て検出限界以下、0.910 mg/L 区は暴露 72 時間後に検出限界以下となった。

そのため、OECD Guidance Document No.23 および OECD Test Guideline No.201 パラグラフ 40 に従い、定量下限以下の濃度区における被験物質濃度 (推定値) の算出および平均濃度の算出を行った。なお、0.0854 および 0.188 mg/L 区は、暴露期間を通して被験物質のピークが検出できず、藻類の生長に影響を及ぼさなかったため (結果 6 項および 7 項)、平均測定濃度を算出しなかった。

暴露期間中、分解物と推定される新たなピークは GC クロマトグラム上に認められなかった。

6. 生長曲線および生長速度

暴露期間中の細胞濃度を表 2 に、生長速度および生長阻害率を表 3 に、生長曲線を図 9 に示す。

対照区における細胞濃度は、培養 72 時間で平均 301 倍に増加し、試験の成立条件（16 倍以上）を満たした。

対照区の生長速度について、繰り返し毎に各日（0-1 日、1-2 日、2-3 日）について求めた生長速度の変動係数（CV）の平均値は 9.10%であり、試験の成立条件（35%以内）を満たした。また、各繰り返し間の平均生長速度の変動係数は、0-72 時間で 4.13%であり、試験の成立条件（7%以内）を満たした。対照区の生長曲線は直線性を示し、これらの細胞は暴露期間を通じて対数増殖期にあったことが確認された。

7. ErC₅₀、95%信頼限界および NOECr

多重比較検定（Dunnett 法、両側）の結果を表 3-2 に、ErC₅₀ とその 95%信頼限界および NOECr を表 4 に、各被験物質濃度における生長速度阻害率を図 10 に示す。

ErC₅₀（0-72 h）および NOECr は平均測定濃度に基づいて算出、決定した。多重比較検定（Dunnett 法、両側）の結果、対照区と比べ有意差（5%有意水準）が認められない最高濃度区の被験物質濃度の 0.137 mg/L を NOECr と決定した。

8. 試験溶液の pH

試験溶液の pH を表 5 に示す。

対照区の pH は、暴露開始時および暴露終了時でいずれも 7.9 であり、pH 変動はなかった。

9. 試験溶液の観察

試験溶液の観察結果を表 6 に示す。

全ての試験区において、被験物質由来の着色や沈殿は認められなかった。

10. 藻類の顕微鏡観察

藻類の顕微鏡観察結果を表 7 に示す。

対照区について、暴露開始時から暴露終了時まで細胞形態の異常は認められなかった。試験濃度区において、高濃度側の 2 濃度区にてやや太めの藻が目立つ傾向が認められた。

11. 試験の有効性

以下に示した条件を満たしたため、試験は有効とみなした。

- ・ 対照区の細胞濃度が 72 時間で 16 倍以上に増加すること。
- ・ 対照区において、繰り返し毎に各日（0-1 日、1-2 日、2-3 日）の生長速度の変動係数を求め、その変動係数の平均値が 35%を超えないこと。
- ・ 対照区において、繰り返し間の暴露期間中（0-3 日）の平均生長速度を求め、その変動係数が 7%を超えないこと。

考 察

予備試験と1回目実験結果から、低濃度での毒性が示されたため、定量下限を下回る濃度を含む6濃度（公比2.2）を設定濃度として開放系実験（2回目実験）を行った。

被験物質濃度の測定結果と藻類の生長曲線から、試験溶液中の被験物質濃度低下の理由として、低濃度では藻類への吸着の可能性が考えられる。一方、高濃度では、振とう培養条件であることから、弱い揮散の影響も考えられる。

毒性値を算出するにあたり、OECD Guidance Document No.23に準じて、定量下限以下の濃度区における被験物質濃度（推定値）の算出と平均濃度の算出を行った。暴露開始時において、0.910～4.40 mg/L 区の測定濃度は設定濃度の95%以上であり、低濃度区でも同様の傾向が推定される。一方暴露72時間後は、0.910 mg/L 区の測定結果より、低濃度区では著しい濃度減少が推定される。よって、より確からしい濃度をもとに毒性値を算出するため、OECD Test Guideline No.201 パラグラフ40に従って72h推定濃度を算出することは妥当と考えられた。また、設定濃度を基にした結果算出と比べ安全側に見込まれる毒性値となることから、評価に問題は無いものと判断される。

なお、暴露期間中、GCクロマトグラム上にはtert-ブタノール（tert-ブチル=ヒドロペルオキシドの分解物）と推定されるピークが検量線試料も含め認められたが、濃度相関性や継時的なピーク増加の傾向は認められなかった。

結 論

tert-ブチル=ヒドロペルオキシド（略名：TBHP）を含む試験溶液に藻類を暴露し、72時間の生長阻害試験（開放系）を実施した。被験物質には70%水溶液（TBHP純度：66.0%）を用い、濃度は特に明記しない限りTBHPとしての数値を表記した。

低濃度で毒性を示したため、NOECr決定を優先し、定量下限（検量線最小濃度：約0.5 mg/L）を下回る濃度を含む0.0854、0.188、0.414、0.910、2.00および4.40 mg/Lの6濃度（公比2.2）を設定濃度とし、開放系にて実験を行った。

試験溶液中の被験物質濃度を測定した結果、暴露終了時の測定濃度が設定濃度に対し20%以上変動した濃度区が認められた。そのため、OECD Guidance Document No.23およびOECD Test Guideline No.201 パラグラフ40に従い、定量下限以下での被験物質濃度（推定値）の算出および平均濃度の算出を行い、これを暴露期間中の被験物質濃度として結果を算出した。

暴露72時間における生長速度より求めた50%生長阻害濃度（ErC₅₀）および最大無影響濃度（NOECr）を以下に示す。

暴露期間	ErC ₅₀ (mg/L)	95%信頼限界 (mg/L)	NOECr (mg/L)
0-72時間	1.1	1.0~1.2	0.137

表 1 試験溶液中の被験物質濃度

設定濃度 (mg/L)	測定濃度 (mg/L)				
	暴露開始時	暴露 24 時間	暴露 48 時間	暴露 72 時間	0-72 時間 平均測定濃度
対照区	< 0.505	< 0.500	< 0.500	< 0.510	—
0.0854	< 0.505	< 0.500	< 0.500	< 0.510	—
0.188	< 0.505 ^a	< 0.500	< 0.500	< 0.510	—
0.414	< 0.505 ^b	< 0.500 ^a	< 0.500	< 0.510 ^c	0.137 ^e (33.1)
0.910	0.870 (95.6)	0.834 (91.6)	0.734 (80.7)	< 0.510 ^d	0.661 ^f (72.6)
2.00	2.06 (103)	2.00 (100)	1.90 (95.0)	1.60 (80.0)	1.90 (95.0)
4.40	4.87 (111)	4.18 (95.0)	3.77 (85.7)	3.33 (75.7)	3.99 (90.7)

() 内の値は設定濃度に対する割合 (%)

- a: ピーク検出したが定量下限以下。
b: ピーク検出したが定量下限以下。設定濃度 (0.414 mg/L) を平均測定濃度の算出に代用した。
c: ピーク不検出。72 時間生物量と被験物質濃度減少率の回帰式より求めた推定濃度 (0.0455 mg/L) を平均測定濃度の算出に代用した。
d: ピーク不検出。検量線の最小濃度の 1/2 濃度 (0.255 mg/L) を平均測定濃度の算出に代用した。
e: 暴露開始時および 72 時間後における濃度をもとに平均測定濃度 (推定値) を算出した。
f: 各暴露時間における濃度をもとに平均測定濃度 (推定値) を算出した。

<平均測定濃度の算出方法>

(OECD Guidance Document No.23より)

$$\text{Mean concentration} = \text{antilog} \left(\frac{1}{2(t_n - t_1)} \sum_{i=1}^{n-1} [(\log(\text{conc}_i) + \log(\text{conc}_{i+1})) \cdot (t_{i+1} - t_i)] \right)$$

Where: t_1 = initial time < t_2 < ... < t_n = final time
 conc_1 = initial concentration, $\text{conc}_2, \dots, \text{conc}_n$ = final concentration

表 2 暴露期間中の細胞濃度

被験物質濃度 (mg/L)		サンプル No.	細胞濃度 (cells/mL)				増加倍率	
設定濃度	平均測定濃度		0 h	24 h	48 h	72 h	0-48 h	0-72 h
0.00 (対照区)	—	1	5,000	29,900	263,000	1,730,000		
		2	5,000	32,000	254,000	1,530,000		
		3	5,000	32,300	233,000	1,720,000		
		4	5,000	23,500	150,000	927,000		
		5	5,000	31,500	255,000	1,540,000		
		6	5,000	27,600	262,000	1,590,000		
		Average	5,000	29,467	236,167	1,506,167	47	301
SD	—*1	3,402	43,577	296,648	—	—		
0.0854	—	1	5,000	30,600	231,000	1,790,000		
		2	5,000	33,000	251,000	1,940,000		
		3	5,000	28,700	244,000	2,010,000		
		Average	5,000	30,767	242,000	1,913,333		
		SD	—*1	2,155	10,149	112,398	—	—
0.188	—	1	5,000	32,300	252,000	1,740,000		
		2	5,000	26,100	185,000	899,000		
		3	5,000	26,400	244,000	2,020,000		
		Average	5,000	28,267	227,000	1,553,000		
		SD	—*1	3,496	36,592	583,427	—	—
0.414	0.137*2	1	5,000	31,000	235,000	1,730,000		
		2	5,000	33,200	252,000	1,990,000		
		3	5,000	30,200	186,000	1,690,000		
		Average	5,000	31,467	224,333	1,803,333		
		SD	—*1	1,553	34,269	162,891	—	—
0.910	0.661*2	1	5,000	16,200	65,300	345,000		
		2	5,000	14,200	68,800	380,000		
		3	5,000	17,400	72,600	378,000		
		Average	5,000	15,933	68,900	367,667		
		SD	—*1	1,617	3,651	19,655	—	—
2.00	1.90	1	5,000	10,100	13,800	20,900		
		2	5,000	8,550	10,400	9,320		
		3	5,000	9,220	10,100	8,930		
		Average	5,000	9,290	11,433	13,050		
		SD	—*1	777	2,055	6,801	—	—
4.40	3.99	1	5,000	7,200	7,970	7,300		
		2	5,000	7,780	7,880	9,510		
		3	5,000	9,700	8,550	9,510		
		Average	5,000	8,227	8,133	8,773		
		SD	—*1	1,308	364	1,276	—	—

*1 計算値のため SD は算出しない

*2 推定値

表 3-1 生長速度および生長阻害率（対照区）

被験物質濃度 (mg/L)		サンプル No.	0-24 時間	24-48 時間	48-72 時間	0-48 時間		0-72 時間		対照区生長速度 (μ_1, μ_2, μ_3)		
設定濃度	平均測定濃度		生長速度 μ_1	生長速度 μ_2	生長速度 μ_3	生長速度 μ_4	阻害率 $I\mu_4$ (%)	生長速度 μ_5	阻害率 $I\mu_5$ (%)	Average	SD	CV (%)
0.00 (対照区)	-	1	0.0745	0.0906	0.0785	0.0826	—	0.0812	—	0.0812	0.00838	10.3
		2	0.0773	0.0863	0.0748	0.0818	—	0.0795	—	0.0795	0.00605	7.61
		3	0.0777	0.0823	0.0833	0.0800	—	0.0811	—	0.0811	0.00299	3.69
		4	0.0645	0.0772	0.0759	0.0709	—	0.0725	—	0.0725	0.00699	9.64
		5	0.0767	0.0871	0.0749	0.0819	—	0.0796	—	0.0796	0.00659	8.28
		6	0.0712	0.0938	0.0751	0.0825	—	0.0800	—	0.0800	0.0121	15.1
		Average	0.0737	0.0862	0.0771	0.0800	—	0.0790	—	—	—	9.10
		SD	0.00509	0.00590	0.00335	0.00453	—	0.00326	—			
		CV (%)	6.91	6.84	4.35	5.66	—	4.13	—			

表 3-2 生長速度および生長阻害率（濃度区）

被験物質濃度 (mg/L)		サンプル No.	0-24 時間	24-48 時間	48-72 時間	0-48 時間		0-72 時間	
設定濃度	平均測定 濃度		生長速度 μ_1	生長速度 μ_2	生長速度 μ_3	生長速度 μ_4	阻害率 $I\mu_4$ (%)	生長速度 μ_5	阻害率 $I\mu_5$ (%)
0.0854	—	1	0.0755	0.0842	0.0853	0.0799	0.125	0.0817	-3.42
		2	0.0786	0.0845	0.0852	0.0816	-2.00	0.0828	-4.81
		3	0.0728	0.0892	0.0879	0.0810	-1.25	0.0833	-5.44
		Average	0.0756	0.0860	0.0861	0.0808	-1.04	0.0826*	-4.56
		SD	0.00290	0.00280	0.00153	0.000862	—	0.000819	—
0.188	—	1	0.0777	0.0856	0.0805	0.0817	-2.12	0.0813	-2.91
		2	0.0689	0.0816	0.0659	0.0752	6.00	0.0721	8.73
		3	0.0693	0.0927	0.0881	0.0810	-1.25	0.0834	-5.57
		Average	0.0720	0.0866	0.0782	0.0793	0.877	0.0789*	0.0833
		SD	0.00497	0.00562	0.0113	0.00357	—	0.00601	—
0.414	0.137**	1	0.0760	0.0844	0.0832	0.0802	-0.250	0.0812	-2.78
		2	0.0789	0.0845	0.0861	0.0817	-2.12	0.0831	-5.19
		3	0.0749	0.0757	0.0919	0.0753	5.87	0.0809	-2.41
		Average	0.0766	0.0815	0.0871	0.0791	1.17	0.0817*	-3.46
		SD	0.00207	0.00505	0.00443	0.00335	—	0.00119	—
0.910	0.661**	1	0.0490	0.0581	0.0694	0.0535	33.1	0.0588	25.6
		2	0.0435	0.0657	0.0712	0.0546	31.8	0.0601	23.9
		3	0.0520	0.0595	0.0687	0.0557	30.4	0.0601	23.9
		Average	0.0482	0.0611	0.0698	0.0546	31.8	0.0597*	24.5
		SD	0.00431	0.00404	0.00129	0.00110	—	0.000751	—
2.00	1.90	1	0.0293	0.0130	0.0173	0.0212	73.5	0.0199	74.8
		2	0.0224	0.00816	-0.00457	0.0153	80.9	0.00865	89.1
		3	0.0255	0.00380	-0.00513	0.0146	81.8	0.00806	89.8
		Average	0.0257	0.00832	0.00253	0.0170	78.7	0.0122*	84.6
		SD	0.00346	0.00460	0.0128	0.00363	—	0.00667	—
4.40	3.99	1	0.0152	0.00423	-0.00366	0.00971	87.9	0.00526	93.3
		2	0.0184	0.000532	0.00783	0.00948	88.2	0.00893	88.7
		3	0.0276	-0.00526	0.00443	0.0112	86.0	0.00893	88.7
		Average	0.0204	-0.000166	0.00287	0.0101	87.4	0.00771*	90.2
		SD	0.00644	0.00478	0.00590	0.000934	—	0.00212	—

** : 推定値

多重比較検定 (Dunnett法、両側) の結果

対照区に対して * : $P < 0.05$ で有意差あり、 n.s. : 有意差なし表 4 ErC₅₀、95%信頼限界および NOECr

暴露期間	ErC ₅₀ (mg/L)	95%信頼限界 (mg/L)	NOECr (mg/L)
0-72 時間	1.1	1.0~1.2	0.137

表 5 試験溶液の pH

被験物質濃度 (mg/L)		pH	
設定濃度	平均測定濃度	0 時間	72 時間
対照区	—	7.9	7.9
0.0854	—	7.9	7.9
0.188	—	7.9	8.0
0.414	0.137*	7.9	8.0
0.910	0.661*	7.9	8.0
2.00	1.90	7.9	8.0
4.40	3.99	7.9	8.0

*: 推定値

表 6 試験溶液の観察結果

被験物質濃度 (mg/L)		暴露時間			
設定濃度	平均測定濃度	0 時間	24 時間	48 時間	72 時間
対照区	—	無色透明	無色透明	薄い緑色	緑色
0.0854	—	無色透明	無色透明	薄い緑色	緑色
0.188	—	無色透明	無色透明	薄い緑色	緑色
0.414	0.137*	無色透明	無色透明	薄い緑色	緑色
0.910	0.661*	無色透明	無色透明	無色透明	薄い緑色
2.00	1.90	無色透明	無色透明	無色透明	無色透明
4.40	3.99	無色透明	無色透明	無色透明	無色透明

*: 推定値

表 7 藻類の顕微鏡観察結果

被験物質濃度 (mg/L)		暴露時間		
設定濃度	平均測定濃度	24 時間	48 時間	72 時間
対照区	—	異常なし	異常なし	異常なし
0.0854	—	異常なし	異常なし	異常なし
0.188	—	異常なし	異常なし	異常なし
0.414	0.137*	異常なし	異常なし	異常なし
0.910	0.661*	異常なし	異常なし	異常なし
2.00	1.90	異常なし	異常なし	やや太めの藻が目立つ
4.40	3.99	異常なし	異常なし	やや太めの藻が目立つ

* : 推定値

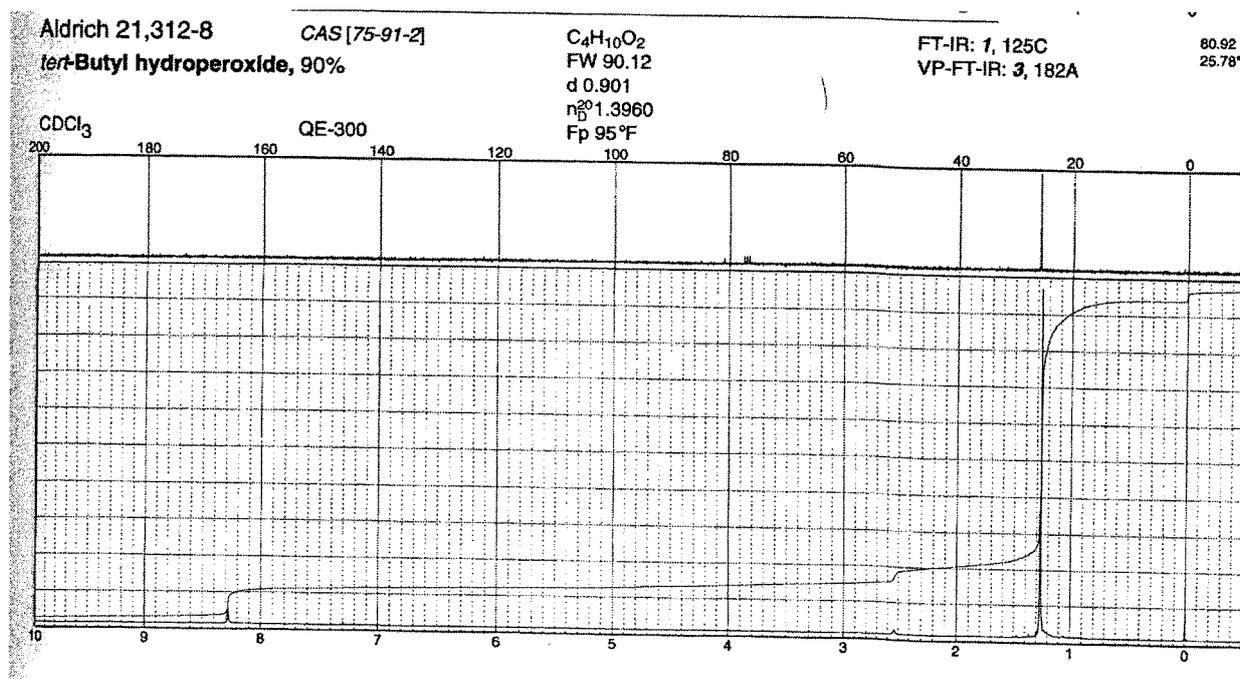


図 1 tert-ブチル=ヒドロペルオキシドの核磁気共鳴スペクトル (重クロロホルム)
 (The Aldrich Library of ¹³C and ¹H FT NMR Spectra EDITION I に記載)

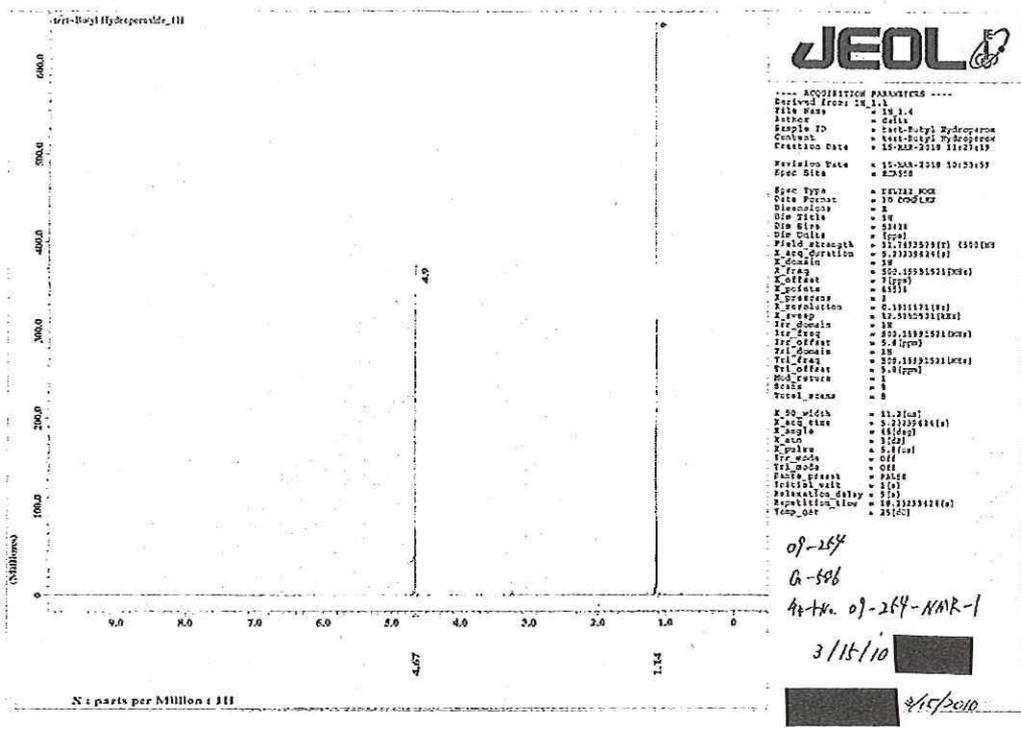


図 2 被験物質の核磁気共鳴スペクトル (暴露開始前、重水、試験番号 NCAS 09-254)

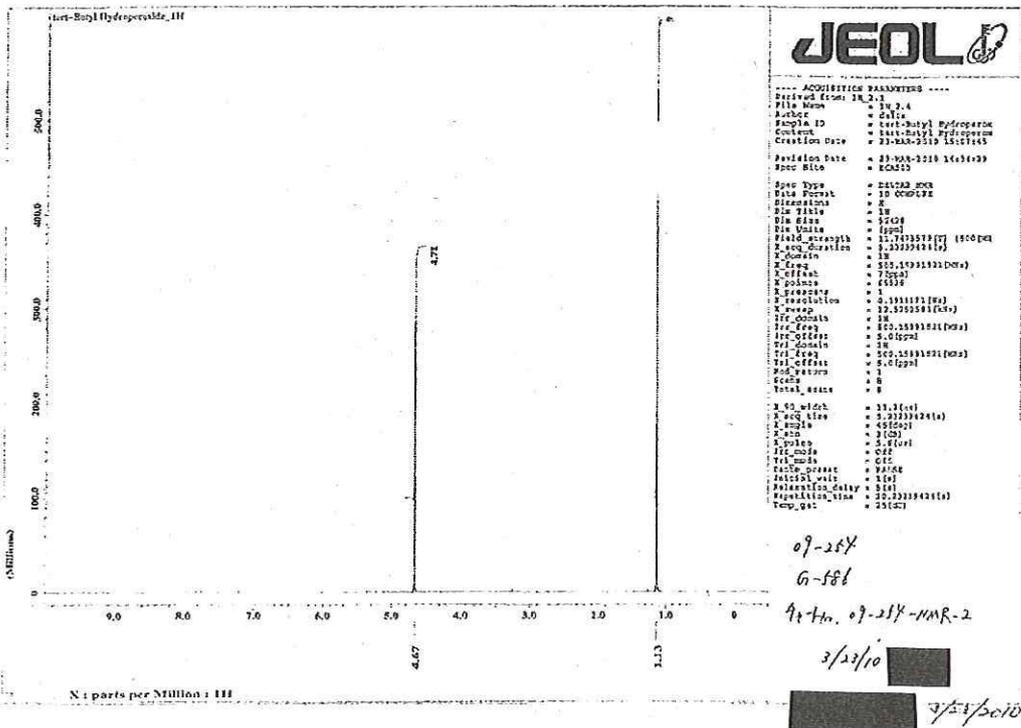


図 3 被験物質の核磁気共鳴スペクトル (暴露終了後、重水、試験番号 NCAS 09-254)

tert-ブチル=ヒドロペルオキシドの検量線

濃度 (mg/L)	ピーク面積	計算値 (mg/L)	真度 (%)
5.05	12.8	5.05	100
2.02	3.41	2.04	101
1.01	0.994	0.950	94.1
0.505	0.244	0.544	108

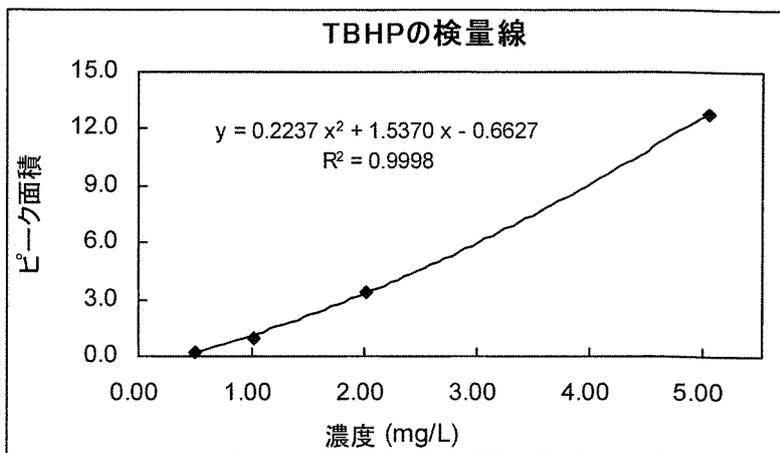
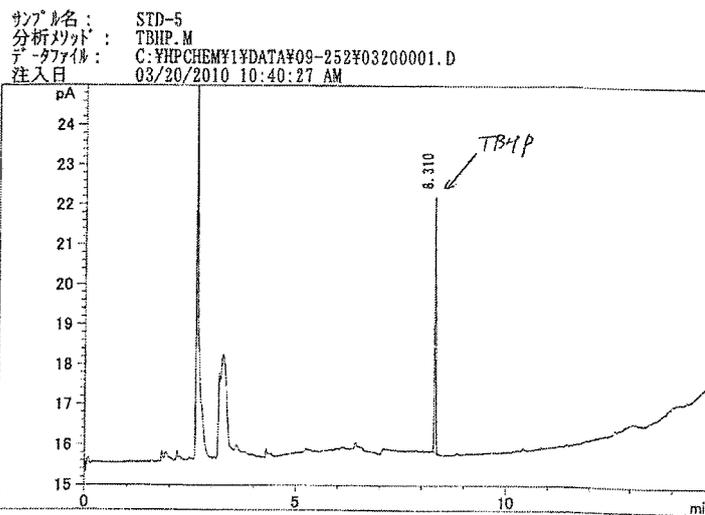


図 4 検量線の一例

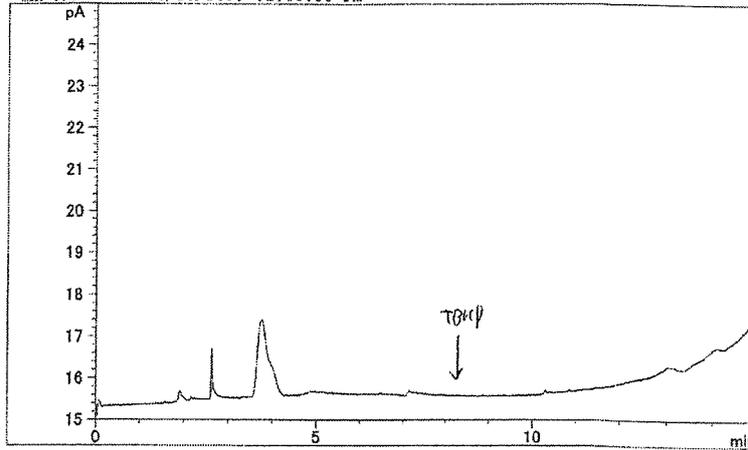


<積分結果>

#	Time (min.)	面積 (pA*s)	面積 %
1	8.31	12.81099	100.0 ← TBHP
2	0.00	0.00000	0.0

図 5 標準溶液の GC クロマトグラム (設定濃度 5.05 mg/L、暴露開始時)

サンプル名: M-C-0
 分析メソッド: TBHP.M
 データファイル: C:\HPCHEM\1\DATA\09-252\03200011.D
 注入日: 03/20/2010 02:41:36 PM

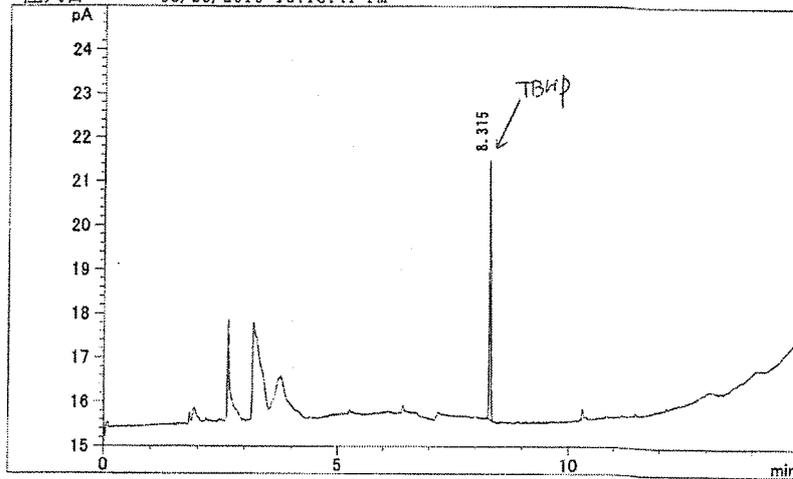


<積分結果>

#	Time (min.)	面積 (pA*s)	面積 %
---	-------------	-----------	------

図 6 暴露開始時の対照区の GC クロマトグラム

サンプル名: M-4.40-0
 分析メソッド: TBHP.M
 データファイル: C:\HPCHEM\1\DATA\09-252\03200005.D
 注入日: 03/20/2010 12:18:41 PM

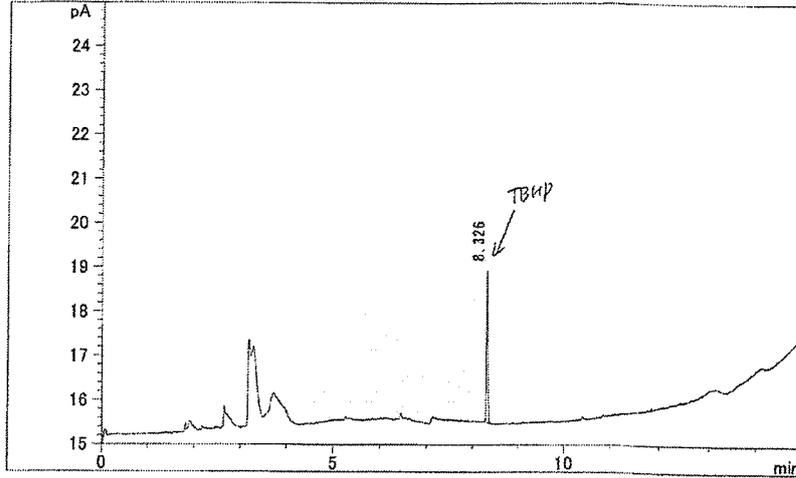


<積分結果>

#	Time (min.)	面積 (pA*s)	面積 %
1	8.31	12.09169	100.0 ← TBHP
2	0.00	0.00000	0.0

図 7 暴露開始時の 4.40 mg/L 区 (設定濃度) の GC クロマトグラム

サンプル名: M-4.40-72
 分析物質: TBHP.M
 データファイル: C:\YHP\CHEMY1\DATA\09-252\03230005.D
 注入日: 03/23/2010 12:01:24 PM



<積分結果>

#	Time(min.)	面積 (pA*s)	面積 %
1	8.33	6.72541	100.0 ← TBHP
2	0.00	0.00000	0.0

図8 暴露終了時の 4.40 mg/L 区 (設定濃度) の GC クロマトグラム

被験物質濃度 (mg/L)		細胞濃度 (cells/mL)			
設定濃度	平均測定濃度	0 h	24 h	48 h	72 h
0.00 (対照区)	—	5,000	29,467	236,167	1,506,167
0.0854	—	5,000	30,767	242,000	1,913,333
0.188	—	5,000	28,267	227,000	1,553,000
0.414	0.137*	5,000	31,467	224,333	1,803,333
0.910	0.661*	5,000	15,933	68,900	367,667
2.00	1.90	5,000	9,290	11,433	13,050
4.40	3.99	5,000	8,227	8,133	8,773

* : 推定値

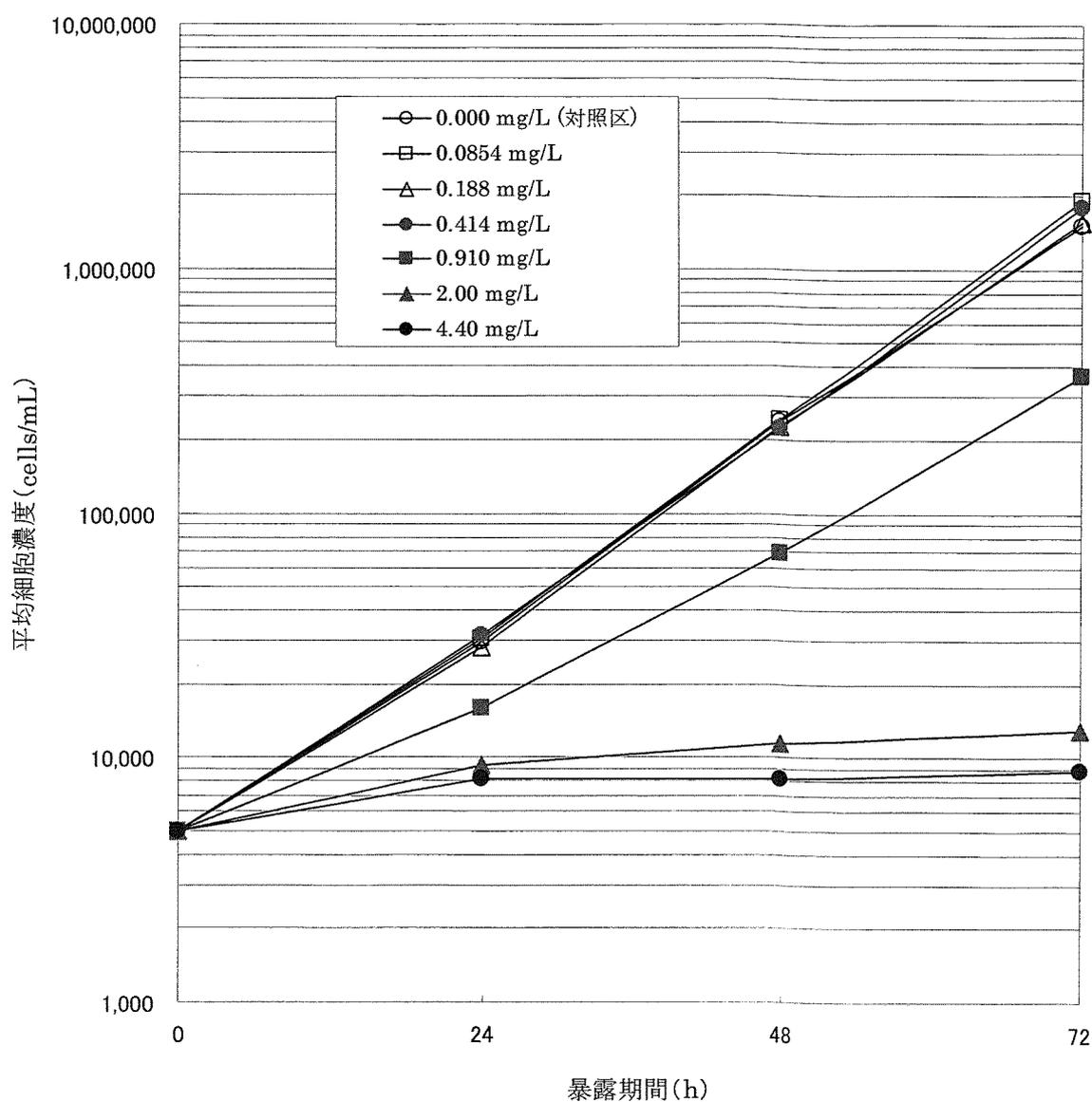


図 9 藻類の生長曲線

被験物質濃度 (mg/L)		生長速度阻害率 (平均) (%)	
設定濃度	平均測定濃度	0-48 h	0-72 h
0.0854	—	0.00*	0.00*
0.188	—	0.877	0.0833
0.414	0.137**	1.17	0.00*
0.910	0.661**	31.8	24.5
2.00	1.90	78.7	84.6
4.40	3.99	87.4	90.2

* : 阻害率がマイナスの値となったため、数値を 0.00 とした。

** : 推定値

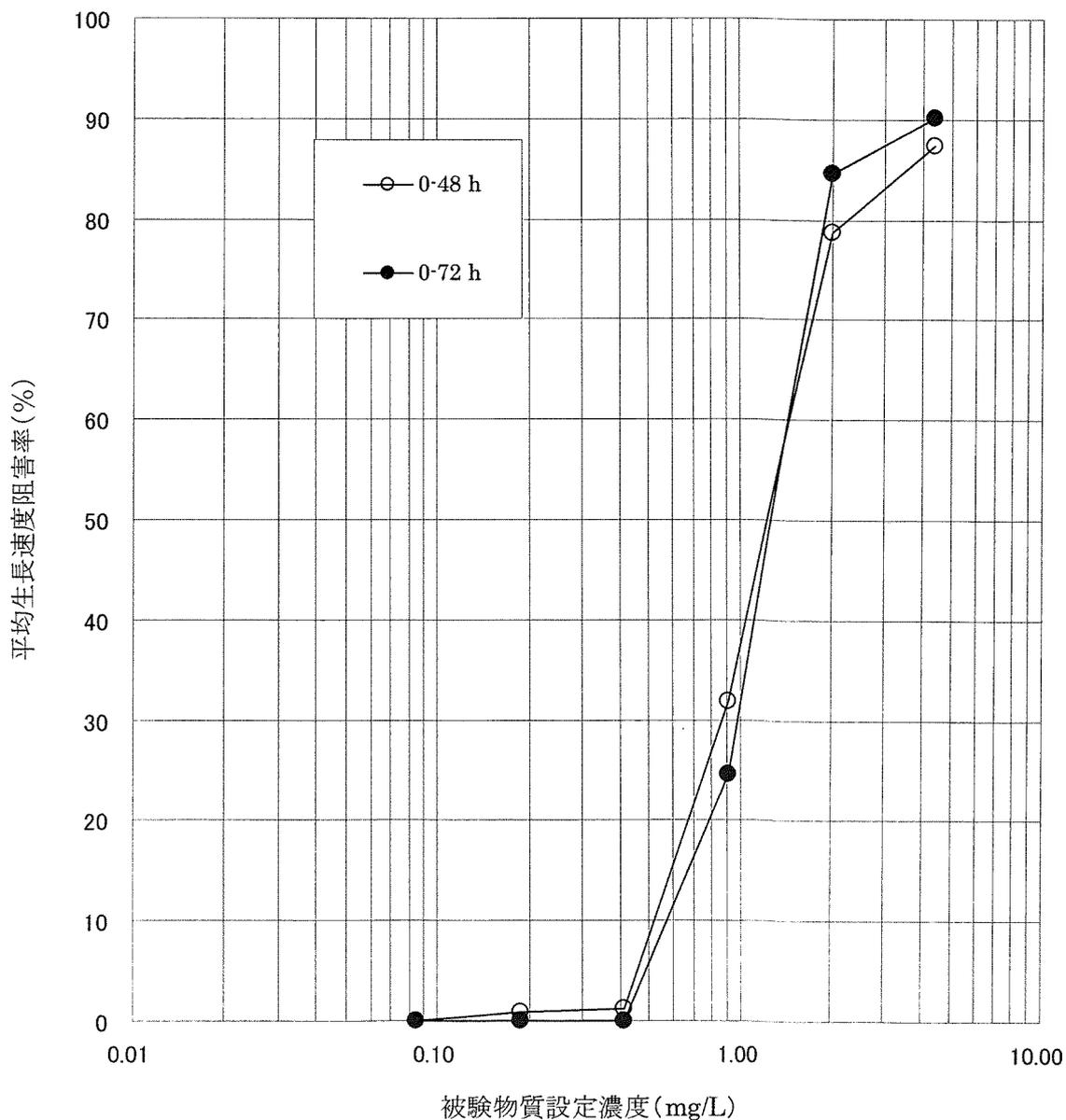


図 10 速度法より求めた被験物質の設定濃度における生長速度阻害率

添付資料 1 OECD 培地

☆ 培地の調製方法

- ろ過滅菌 (0.2 μm) 済みの原液 A (10 mL)、B (1.0 mL)、C (1.0 mL) および D (1.0 mL)* の順に加え、イオン交換水で 1 L に定容後、ろ過滅菌した。
- 培地調製後 pH を測定し、pH が 8.1 ± 0.2 であることを確認した。

原液	試薬	試験時の濃度 (mg/L)	
A	塩化アンモニウム	NH_4Cl	15
	塩化マグネシウム六水和物	$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	12
	塩化カルシウム二水和物	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	18
	硫酸マグネシウム七水和物	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	15
	リン酸二水素カリウム	KH_2PO_4	1.6
B	塩化鉄 (III)六水和物	$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.064
	EDTA 二ナトリウム二水和物	$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.1
C	ほう酸	H_3BO_3	0.185
	塩化マンガン四水和物	$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.415
	塩化亜鉛	ZnCl_2	0.003
	塩化コバルト六水和物	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.0015
	塩化銅二水和物	$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.00001
	モリブデン酸二ナトリウム二水和物	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.007
D	炭酸水素ナトリウム	NaHCO_3	50

なお、試薬はすべて和光純薬工業製の試薬特級を使用した。
上記溶液の調製は、すべてイオン交換水を用いた。

* : 用時調製とし、ろ過滅菌は不要とした (但し前培養はこの限りではない)。

添付資料 2 予備試験 (試験番号 NCAS 09-251NG)

被験物質は揮発性を有していると考えられたため(ヘンリー定数: $1.60 \times 10^{-5} \text{ atm m}^3/\text{mole}$)、密閉系および開放系で予備試験(試験計画書番号 NCAS 09-251NG)を行った。また、試験溶液の安定性の検討を行った。

1. 試験条件 (記載項目以外は 7.1 項と同条件)

	実験 1 (密閉系)	実験 2 (密閉系および開放系)
培養方式	振とう培養 ($\leq 20 \text{ rpm}$)	振とう培養 (100 rpm)
設定濃度	1.00、5.00 および 10.0 mg/L	1.00 および 10.0 mg/L
試験溶液量	1 容器につき 130 mL	1 容器につき 100 mL
試験容器	共栓付 100 mL ガラス製三角フラスコ (密閉系)	共栓付 100 mL ガラス製三角フラスコ (密閉系) アルミキャップ付 300 mL ガラス製三角フラスコ (開放系)
連数	3 容器/濃度区	3 容器/濃度区

2. 結果

2.1 実験 1

初期細胞濃度を 5000 cells/mL としたが、48 時間から 72 時間での生長速度が低下する傾向を示した。これは、密閉系試験のため炭素源としての CO_2 枯渇が原因と考えられた。対照区について、繰り返し毎の各日 (0-1 日、1-2 日、2-3 日) の生長速度の変動係数が 35% を超えたため、0-48 時間の生長速度阻害率を求めた結果、設定濃度 1.00、5.00 および 10.0 mg/L で阻害率はそれぞれ 32.6、84.4、94.2% であった。各試験濃度区の調製時および 72 時間後の実測濃度は、それぞれ設定濃度の 90.9~99.2%、63.3~106% であり、1.00 mg/L 区では被験物質濃度の低下と分解物ピーク (tert-ブタノールと推定) の増加が認められた。なお、藻類を含まない 10.0 mg/L 溶液の安定性 (光、加水分解、揮発性) を静置条件で検討した結果、72 時間後の実測濃度は設定濃度の 96% 以上と安定であった。

2.2 実験 2

結果を以下の表に示す。1.00 mg/L 区では、試験条件間で低下率に大きな差は認められなかったが、10.0 mg/L 区では開放系での濃度低下が著しかった。実験 1 の結果を踏まえ、開放系高濃度区では振とう操作により揮散が促進される傾向がみられた。また、密閉系では暴露後半で生長速度が抑制され、開放系に比べ阻害率が若干低くなる傾向にあった。

	設定濃度 (mg/L)	72 h 測定濃度 (対設定濃度、%)	生長阻害率 (%)
密閉系	1.00	72.3	38.8*
	10.0	119	76.6*
開放系	1.00	68.0	46.3**
	10.0	38.1	102**

* : 0-48 h 生長速度に基づいて算出した

** : 0-72 h 生長速度に基づいて算出した

添付資料 3 1回目実験（密閉系試験、試験番号 NCAS 09-252）

予備試験（添付資料 2、試験番号 NCAS 09-251NG で実施）の結果と GC 分析法における定量下限（約 0.5 mg/L）を踏まえ、密閉系試験（振とう培養 ≤ 20 rpm）を行った。

1. 試験条件（記載事項以外は 7.1 項と同条件）

培養方式： 振とう培養（ ≤ 20 rpm）
設定濃度： 1.00、1.80、3.24、5.83 および 10.5 mg/L の 5 濃度（公比 1.8）
試験溶液量： 1 容器につき 130 mL
試験容器： 共栓付 100 mL ガラス製三角フラスコ（密閉系）
連数： 3 容器／濃度区（対照区は 6 容器）

2. 結果

密閉系試験を実施した結果、以下の条件を満たさなかったため、試験は不成立であった。

- ・ 対照区において、繰り返し毎に各日（0-1 日、1-2 日、2-3 日）の生長速度の変動係数を求め、その変動係数の平均値が 35%を超えないこと。
- ・ 対照区において、繰り返し間の暴露期間中（0-3 日）の平均生長速度を求め、その変動係数が 7%を超えないこと。
- ・ 対照区において、繰り返し間の暴露期間中（0-2 日）の平均生長速度を求め、その変動係数が 7%を超えないこと。

暴露期間中の藻類の生長に関して、対照区の生長速度は日毎に低下する傾向を示し、48-72 時間での低下は顕著であった。これは、暴露期間中の生長速度の維持よりも被験物質濃度の維持を優先し、密閉系試験を選択したためである。対照区の pH 変動は暴露 72 時間で 1.5 であり、密閉系試験のため炭素源としての CO₂ 枯渇がこれらの原因と考えられた。生長速度および pH の変動を抑える方法として、初期細胞濃度を減らすことが有効とされているが、既に 5000 cells/mL と十分下げた条件であり、これ以上の低減は 24 時間後における細胞数の測定精度から考えて困難であることから、更なる対応は行わなかった。

一方、繰り返し間において、6 連中 3 容器での生長速度が低く、0-2 日でも変動係数が 7%を超えた。生長速度に差が生じた理由は不明である。

各試験溶液中の被験物質濃度について、調製時では設定濃度の 85.7~103%、72 時間後では設定濃度の 49.5（定量下限以下のため外挿値）~104%であった。試験最低濃度の 1.00 mg/L 区でのみ濃度低下が顕著であり（定量下限以下）、被験物質濃度の低下は藻類への吸着の可能性が考えられる。

なお、0-48 時間の生長速度阻害率は、試験最低濃度の 1.00 mg/L（設定濃度）においても 10%を超え、被験物質は低濃度で毒性を示した。

添付資料 4 繰り返し精度の確認

目的および方法

抽出等の操作が行われていないため添加回収試験は行わず、分析法の繰り返し精度の確認を実施した。1回目実験において、藻を添加する前の設定濃度 1.00 および 10.5 mg/L の試験溶液の残りから 10 mL を遠沈管に採取 (n=3) し、8.4 項と同様の操作を行い、被験物質濃度を算出した。得られた 3 連の被験物質濃度の変動係数が 10% 以内の場合、妥当な分析法と判断した。

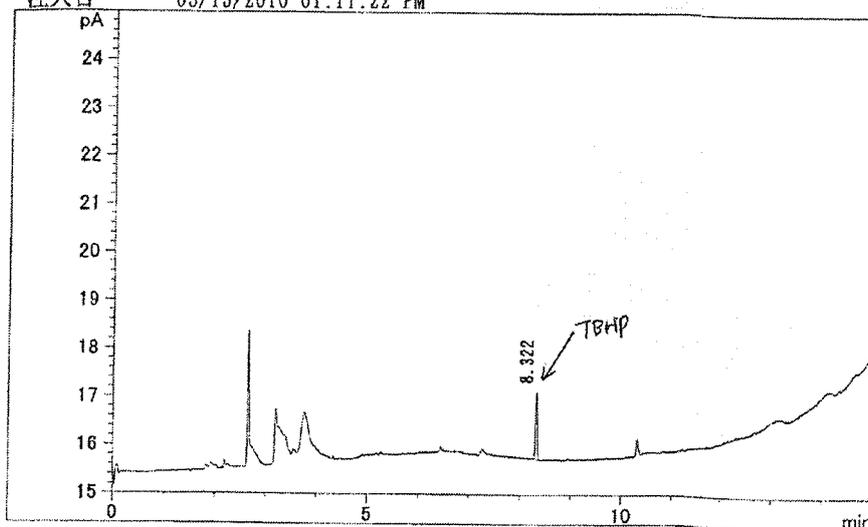
結果

繰り返し精度の確認結果および代表的な GC クロマトグラム (設定濃度 10.5 mg/L 溶液) を以下に示す。得られた 3 連の被験物質濃度の変動係数はいずれも 10% 以内であった。これらの結果より、本分析法は試験溶液中の被験物質濃度を測定する方法として妥当であると判断した。

表 繰り返し精度の確認結果

設定濃度 (mg/L)	測定濃度 (mg/L)	平均濃度 (mg/L)	変動係数 (%)
1.00	0.863, 0.845, 0.821	0.843	2.50
10.5	10.3, 9.65, 10.1	10.0	3.33

サンプル名: M-10.5-R1
 分析メソッド: TBHP.M
 データファイル: C:\YHPCHEMY1\DATA\09-252\03150005.D
 注入日: 03/15/2010 01:11:22 PM



<積分結果>

#	Time (min.)	面積 (pA*s)	面積 %
1	8.32	2.89560	100.0 ← TBHP
2	0.00	0.00000	0.0

図 代表的な GC クロマトグラム (設定濃度 10.5 mg/L)

添付資料 5 試験溶液中の被験物質濃度（推定値）の算出

OECD Guidance Document No.23 および OECD Test Guideline No.201 パラグラフ 40 に従い、定量下限以下の濃度区における試験溶液中の被験物質濃度（推定値）の算出を行った。

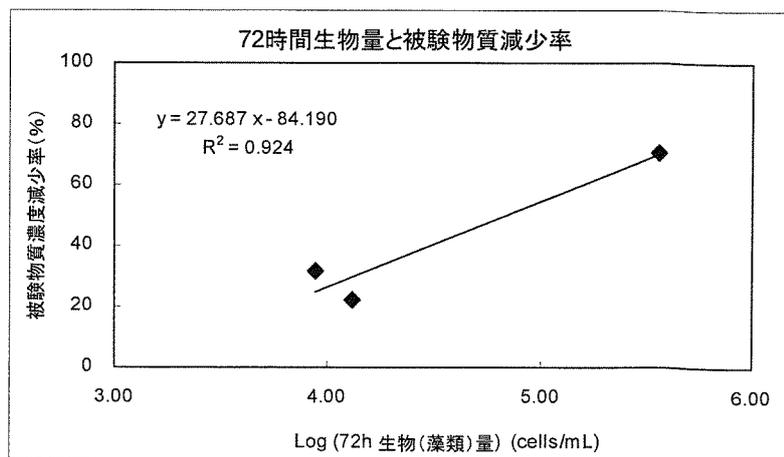
<算出方法> (OECD Test Guideline No.201 パラグラフ 40 より)

各濃度区における 72 時間後の平均生物量（藻類細胞濃度の対数）と被験物質減少率*より回帰式を求めた。この回帰式より逆算して被験物質濃度の減少率を求め、72 時間後の推定濃度を算出した (Microsoft® Excel 2003 使用)。この際、暴露開始時濃度は設定濃度とした。

* : $1 - [\text{測定濃度 (72 h)} / \text{測定濃度 (0 h)}]$

設定濃度 (mg/L)	測定濃度 (mg/L)		72 h 平均生物量		濃度減少率 (%)
	0 h	72 h	(cells/mL)	Log(cells/mL)	
対照区	<0.505	<0.510	1,506,167	6.18	—
0.0854	<0.505	<0.510	1,913,333	6.28	—
0.188	<0.505	<0.510	1,553,000	6.19	—
0.414	<0.505	<0.510	1,803,333	6.26	—
0.910	0.870	<0.510	367,667	5.57	70.7**
2.00	2.06	1.60	13,050	4.12	22.3
4.40	4.87	3.33	8,773	3.94	31.6

** : 72 h 測定濃度は、検量線最小濃度の 1/2 濃度 (0.255 mg/L) と置き換えて濃度減少率を算出した。



<算出結果>

設定濃度 (mg/L)	72 h 生物量 Log(cells/mL)	被験物質濃度 減少率(%)	72 h 推定濃度 (mg/L)
0.0854	6.28	89.7	0.00880
0.188	6.19	87.2	0.0241
0.414	6.26	89.0	0.0455