

環境庁殿

試 験 報 告 書

3,5,5-トリメチル-2-シクロヘキセン-1-オン の藻類 (*Selenastrum capricornutum*)
に対する生長阻害試験

(試験番号 : NMMP/E97/1060)

平成 9 年 6 月 30 日作成

株式会社東レリサーチセンター

陳 述 書

株式会社東レリサーチセンター
名古屋研究部

試験委託者 : 環境庁

表題 : 3,5,5-トリメチル-2-シクロヘキセン-1-オン の
藻類 (*Selenastrum capricornutum*) に対する生長阻害試験

試験番号 : NMMP/E97/1060

上記試験は環境庁のG L P規則に従って実施したものである。

平成 9 年 6 月 30 日

運営管理者

[Redacted]

[Redacted]

信 頼 性 保 証 証 明

株式会社東レリサーチセンター
名古屋研究部

試験委託者 : 環境庁

表題 : 3,5,5-トリメチル-2-シクロヘキセン-1-オン の
藻類 (*Selenastrum capricornutum*) に対する生長阻害試験

試験番号 : NMMP/E97/1060

本試験は試験計画書および標準操作手順書に従って実施され、本報告書には試験に使用した方法、手順が正確に記載されており、試験結果は生データを正確に反映していることを下記の通り確認した。

記

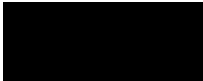
	実施日	運営管理者および 試験責任者への報告日
試験実施状況査察	平成 9 年 2 月 18 日	平成 9 年 2 月 18 日
試験報告書監査	平成 9 年 6 月 3 日	平成 9 年 6 月 6 日

平成 9 年 6 月 30 日

信頼性保証担当者 :



試験実施概要

1. 表題 : 3,5,5-トリメチル-2-シクロヘキセン-1-オンの藻類 (*Selenastrum capricornutum*) に対する生長阻害試験
2. 試験目的 : 3,5,5-トリメチル-2-シクロヘキセン-1-オンについて、藻類 (*Selenastrum capricornutum*) に対する生長阻害試験を行い、生長阻害濃度 (EC50) および無影響濃度 (NOEC) を求める。
3. 適用ガイドライン : 本試験は、OECD 化学品テストガイドライン No.201「藻類生長阻害試験」(1984 年) に準拠して実施する。
4. 適用GLP : 本試験は環境庁のGLP規則に準拠した。
5. 試験委託者
名称 : 環境庁
住所 : (〒100) 東京都千代田区霞が関一丁目2-2
委託担当者 : 企画調整局環境保健部環境安全課保健専門官 
6. 試験受託者
名称 : 株式会社東レリサーチセンター
所在地 : (〒103) 東京都千代田区日本橋室町3-1-8
7. 試験施設
名称 : 株式会社東レリサーチセンター 名古屋研究部
所在地 : (〒455) 愛知県名古屋市港区大江町9-1

8. 試験関係者：

試験責任者	[redacted]	[redacted]	(平成 9 年 6 月 30 日)
試験担当者	[redacted]	[redacted]	(平成 9 年 6 月 30 日)
試験担当者	[redacted]	[redacted]	(平成 9 年 6 月 30 日)
試験担当者	[redacted]	[redacted]	(平成 9 年 6 月 30 日)
試験担当者	[redacted]	[redacted]	(平成 9 年 6 月 30 日)
試験担当者	[redacted]	[redacted]	(平成 9 年 6 月 30 日)
試験担当者	[redacted]	[redacted]	(平成 9 年 6 月 30 日)
試験担当者	[redacted]	[redacted]	(平成 9 年 6 月 30 日)

9. 試験期間： 試験開始日 平成 9 年 2 月 14 日
試験終了日 平成 9 年 6 月 30 日
曝露期間 平成 9 年 2 月 17 日 ～ 平成 9 年 2 月 20 日

10. 保管：

試験計画書、生データ、記録文書および試験報告書は、試験報告書作成後 10 年間、株式会社東レリサーチセンター名古屋研究部の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協議のうえ決定する。

目 次

	頁
要 旨	7
1 被験物質	9
1.1 名称、構造式および物理化学的性状	9
1.2 供試試料	9
1.3 保管方法及び保管条件下の安定性の確認	9
2 供試生物	10
3 試験方法	10
3.1 試験条件	10
3.2 培地	10
3.3 試験容器、藻類培養試験装置および機器	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	13
4.1 藻類生長曲線	13
4.2 藻類生長阻害濃度の算出	13
4.3 無影響濃度(NOEC)の算出	14
4.4 使用した統計手法	14
5 結果および考察	17
5.1 試験成績の信頼性に影響を及ぼしたと思われる環境要因	17
5.2 試験液中の被験物質濃度	17
5.3 藻類成長曲線	17
5.4 半数影響濃度 (EC50) および無影響濃度 (NOEC)	17
5.5 温度および pH	18
Table 1～7	19～25
Figure 1～3	26～28
添付資料－1 試験液の分析方法	29～36

要 旨

試験委託者

環境庁

表 題

3,5,5-トリメチル-2-シクロヘキセン-1-オン の藻類 (*Selenastrum capricornutum*) に対する
生長阻害試験

試験番号

NMMP/E97/1060

試験方法

本試験は、OECD 化学品テストガイドライン No.201「藻類生長阻害試験」(1984 年)に準
拠

して実施する。

- | | |
|-------------------|--|
| 1) 被験物質 : | 3,5,5-トリメチル-2-シクロヘキセン-1-オン |
| 2) 培養方式 : | 振とう培養 (100rpm) |
| 3) 供試生物種: | <i>Selenastrum capricornutum</i> (ATCC-22662) |
| 4) 温度 : | 23±2 °C |
| 5) 暴露期間 : | 72 時間 |
| 6) 試験液量 : | 100 mL (OECD 培地) |
| 7) 照明 : | 4,460 ~ 4,494 lux (連続照明) |
| 8) 初期細胞濃度 : | 1×10 ⁴ cells/mL |
| 9) 試験濃度 (設定) : | 対照区、24mg/L、43mg/L、78mg/L、140mg/L、
252mg/L、454mg/L |
| 10) 試験液中の被験物質の分析: | HPLC 法 (暴露開始時、終了時) |

結 果

- 1) 生長曲線下の面積の比較による生長阻害濃度

EbC50 (0-72) = 111.7 mg/L (95%信頼区間 : 102.9 mg/L ~ 121.1 mg/L)

無影響濃度 (NOEC(面積法 0-72)) = 43 mg/L

(上記濃度は、全て設定値に基づく値)

2) 生長速度の比較による生長阻害濃度

ErC50 (24-48) = 174.5 mg/L (95%信頼区間 : 166.9 mg/L ~ 182.3 mg/L)

無影響濃度 (NOEC(速度法 24-48)) = 78 mg/L

ErC50 (24-72) = 205.2 mg/L (95%信頼区間 : 189.5 mg/L ~ 222.4 mg/L)

無影響濃度 (NOEC(速度法 24-72)) = 78mg/L

(上記濃度は、全て設定値に基づく値)

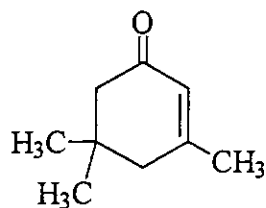
1 被験物質

1.1 名称、構造式および物理化学的性状

名 称： 3,5,5-トリメチル-2-シクロヘキセン-1-オン

(略称 イソホロン、識別符号 I P)

構造式：



分子式： $C_9H_{14}O$

分子量： 138.21

1-オクタノール／水分配係数 (logP) : 1.70

水溶性： 12000 ppm (20℃)

融点： -8.10℃

沸点： 214.0 ~ 215.2℃

水への溶解度： 微溶 (1.2%/20℃)

蒸気圧(mmHg)： 0.380 ~ 1.000 (20.0~38.0℃)

生化学的性質： 濃縮性なし~低い

(上記の数値はMSDSから引用した)

1.2 供試試料

購入先： XXXXXXXXXX
入手先： XXXXXXXXXX
入手日： 平成8年12月26日
ロット番号： FGD 01
供給量： 500g
外観： 無色透明液体
純度： 97%以上

1.3 保管方法及び保管条件下の安定性の確認

1) 保管方法

被験物質は光遮断した試料保管庫に室温で保管した。

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吸収スペクトル、NMRスペクトルの測定および高速液体クロマトグラフ分析を行い、被験物質の構造に矛盾が無いこと、および純度を確認した。

試験終了時にも同様の測定を行ない、試験開始前に測定した結果と比較したところ、差は認められなかった。従って、被験物質は当研究部の試料保管庫に保管中は安定であったと判断された。

2 供試生物

試験には、単細胞緑藻類である *Selenastrum capricornutum* を用いた。

本種は、American Type Culture Collection より入手した ATCC22662 株を、当研究部において無菌的に継代培養しているものである。

また、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、藻類の感受性を調べた結果、基準物質による 72 時間の生長阻害濃度（EbC50）は、0.48mg/L であった。

前培養

試験に供す藻類は試験条件と同じ条件で暴露開始前に 3 日間培養したものを使用した。培養後、顕微鏡観察を行ない変形や異常な細胞が現れていないことを確認した。

3 試験方法

3.1 試験条件

以下の条件で試験を行った。但し、試験容器は滅菌したものを使用し、必要に応じてその他器具の滅菌も行った。また、藻類の接種も無菌条件下で行った。

- 1) 培養方式： 振とう培養（100rpm）
- 2) 温度： 23±2 °C
- 3) 暴露期間： 72 時間
- 4) 試験液量： 100 mL（OECD 培地）
- 5) 照明： 4,460 ～ 4,494 lux（連続照明）
- 6) pH： 暴露期間中、pH の調整は行わなかった。
- 7) 初期細胞濃度： 1×10^4 cells/mL

3.2 培地

前培養および試験ともに OECD 化学品テストガイドラインに示されている培地を調製し、滅菌して使用した。

[Table- 1 (p.19)]

3.3 試験容器、藻類培養試験装置および機器

試験容器	: 300 mL 容ガラス製三角フラスコ (通気性のシリコン栓付)
藻類培養試験装置	: 伊藤製作所 AGP-150RL
光学顕微鏡	: ニコン 培養倒立顕微鏡 TMS-F
pHメーター	: 堀場製作所 カスタニー LAB pHメーター F-22
粒子計数装置	: コールター社 コールター Z 1
粒子計数装置用電解液	: アイソトンII
温度計	: アルコール温度計
照度計	: 東京光学機械 デジタル照度計 IM-2D

3.4 試験濃度の設定

本試験の実施に先立って、0.8mg/L、4.0mg/L、20mg/L、100mg/L、500mg/L の 5 濃度区 (公比 5) を設定した予備試験を行い、面積法(0-72h)による EbC50 を 105 mg/L と推定した。

この予備試験結果に基づき、本試験では 105 mg/L が中間濃度となるよう、公比 1.8 で 24mg/L、43mg/L、78mg/L、140mg/L、252mg/L、454mg/L の 6 段階の濃度区を設定した。

3.5 試験液の調製

濃度区および対照区毎に 4 個の試験容器を用い試験液を調製した。このうち 1 個は pH 測定用とし、試験液の分析や細胞数の計数には用いなかった。

培地に被験物質を溶解して 1000mg/L とし、これをろ過滅菌して被験物質物質原液とした。各試験液はろ過滅菌した培地に被験物質物質原液を加えることにより調製した。対照区には培地を用いた。試験液は無色透明で、沈殿等は見られなかった。

3.6 試験液の分析

試験液濃度の分析は高速液体クロマトグラフ (HPLC) 法により行った。

暴露開始時 (菌体混合直後、0 時間) および暴露終了時 (72 時間) に各濃度区 3 連の試験容器から試験液をそれぞれ 0.40ml 採取し混合後、遠心分離(2000rpm, 20 分)により藻体を除

去してから分析した。

分析法の詳細は添付資料－1 に示した。

3.7 試験操作

前培養した藻類の細胞数を計数し、試験液中の細胞濃度が 1×10^4 cells/mL になるように、前培養液の一定量を試験液の入った容器に添加した。

各試験容器を 23 ± 2 °C の培養装置に設置して試験を開始し、24、48 および 72 時間後に細胞濃度を測定した。

細胞濃度の測定は各試験容器より試験液 0.2mL を採取し、電解液(ISOTON-II)と混合して全量を 20mL とした後、コールタカウンターにより計測した。

試験液調製時の pH は 3 連の他に用意した予備 1 本についてのみ測定し、各濃度区の暴露開始時の pH とした。終了時には 3 連全てを測定し、その平均値を試験終了時の pH とした。

試験期間中、培養装置内の温度と照度を 1 日 1 回測定した。

4 結果の算出

4.1 藻類生長曲線

各濃度区およ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 藻類生長阻害濃度の算出

次に下記の方法で生長阻害濃度を算出した。

1) 生長曲線下の面積の比較による生長阻害濃度 (EbC50)

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濃度区における生長の阻害百分率 (I_A) を次の式により算出した。

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

ここで、

A_c : 対照区の生長曲線下の面積

A_t : 各濃度区における生長曲線下の面積

各濃度区に対応する I_A 値から Probit 法により EbC50 (0-72) およびその 95%信頼区間を算出した。(統計的手法: 吉岡義正教授 Probit 法)

2) 生長速度の比較による生長阻害濃度 (ErC50)

指数増殖している培養での細胞濃度の平均値から平均の生長速度 (μ) を次の式より算出した。

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

ここで、

N_1 : t_1 時の実測細胞濃度 (cells/mL)

N_n : t_n 時の実測細胞濃度 (cells/mL)

t_1 : 暴露開始後最初に細胞濃度を測定した時間

t_n : 暴露開始後 n 回目に細胞濃度を測定した時間

平均の生長速度 (μ) より各濃度区における平均生長速度の低下百分率を次の式により算出した。

$$I_m = \frac{\mu_c - \mu_t}{\mu_c} \times 100$$

ここで、

μ_c : 対照区の平均生長速度

μ_t : 各濃度区における平均生長速度

各濃度区に対応する I_m 値から Probit 法により $ErC50(24-48)$ 、 $ErC50(24-72)$ およびその 95%信頼区間を算出した。(統計的手法: 吉岡義正教授 Probit 法)

4.3 無影響濃度(NOEC)の算出

統計的手法 (等分散性検定および平均値の差の検定) により対照区と比較して有意差 (5%水準) が認められない最高試験濃度を無影響濃度(NOEC)とした。

4.4 使用した統計手法

1) Probit 法

吉岡義正 岐阜医療短期大学教授 (現 大分大学教育学部教授) により環境庁 生態影響試験の $LC50$, $EC50$ を計算するために開発された Probit 法プログラム (Version 3.1) をそのまま利用して $EC50$ を算出した。

2) 等分散性の検定 (F 検定)

平均値の差の検定に先立って、以下の手順で等分散性の検定を行い、その検定結果により、平均値の差の検定手法を選択する。

対照群 : X_1, X_2, \dots, X_m ; 群の大きさを m

処理群 : Y_1, Y_2, \dots, Y_n ; 群の大きさを n として以下の計算をする。

$$V_x = \frac{\sum_{i=1}^m (X_i - \bar{X})^2}{m-1}, \quad \bar{X} = \frac{\sum_{i=1}^m X_i}{m}$$

$$V_y = \frac{\sum_{i=1}^n (Y_i - \bar{Y})^2}{n-1}, \quad \bar{Y} = \frac{\sum_{i=1}^n Y_i}{n}$$

$$V_x \geq V_y \text{ の場合 ; } F_0 = \frac{V_x}{V_y}, \quad v_1 = m-1, \quad v_2 = n-1$$

$$V_y \geq V_x \text{ の場合 ; } F_0 = \frac{V_y}{V_x}, \quad v_1 = n-1, \quad v_2 = m-1$$

有意水準を 5% とし、その 1/2 を α とする ($\alpha = 0.025$)。

F 分布表から $F(v_1, v_2, \alpha)$ の値を読む。群の大きさはともに 3 であるので、第 1 自由度 (v_1) と第 2 自由度 (v_2) はそれぞれ 2 となり、 $F(2, 2, 0.025) = 39$ となる。

$F_0 \geq F(v_1, v_2, \alpha)$ ならば、5% の危険率で 2 群の分散は異なると判定する (有意差有り)。

2) 平均値の差の検定 (t 検定) - F 検定で有意差が無い場合 (Student) -

対照群 : X_1, X_2, \dots, X_m ; 群の大きさを m

処理群 : Y_1, Y_2, \dots, Y_n ; 群の大きさを n として以下の計算をする。

$$S_x = \sum_{i=1}^m (X_i - \bar{X})^2, \quad \bar{X} = \frac{\sum_{i=1}^m X_i}{m}$$

$$S_y = \sum_{i=1}^n (Y_i - \bar{Y})^2, \quad \bar{Y} = \frac{\sum_{i=1}^n Y_i}{n}$$

$$t_0 = \frac{|\bar{X} - \bar{Y}|}{\sqrt{\frac{S_x + S_y}{m+n-2} \left(\frac{1}{m} + \frac{1}{n} \right)}}, \quad v = m+n-2$$

有意水準を 5% とし、その 1/2 を α ($\alpha = 0.025$) とする (両側検定)。

自由度 (ν) と α から t 分布表の $t(\nu, \alpha)$ の値を読む。群の大きさはともに 3 であるので、 $\nu = 4$ となり、 $t(4, 0.025) = 2.776$ となる。

$t_0 \geq t(\nu, \alpha)$ ならば、5%の危険率で 2 群の平均値は異なると判定する (有意差有り)。

3) 平均値の差の検定 (t 検定) - F 検定で有意差がある場合 (Welch) -

対照群: X_1, X_2, \dots, X_m ; 群の大きさを m

処理群: Y_1, Y_2, \dots, Y_n ; 群の大きさを n として以下の計算をする。

$$V_x = \frac{\sum_{i=1}^m (X_i - \bar{X})^2}{m-1}, \quad \bar{X} = \frac{\sum_{i=1}^m X_i}{m}$$

$$V_y = \frac{\sum_{i=1}^n (Y_i - \bar{Y})^2}{n-1}, \quad \bar{Y} = \frac{\sum_{i=1}^n Y_i}{n}$$

$$t_0 = \frac{|\bar{X} - \bar{Y}|}{\sqrt{\frac{V_x}{m} + \frac{V_y}{n}}}, \quad \nu = \frac{\left(\frac{V_x}{m} + \frac{V_y}{n}\right)^2}{\frac{\left(\frac{V_x}{m}\right)^2}{m-1} + \frac{\left(\frac{V_y}{n}\right)^2}{n-1}}$$

有意水準を 5% とし、その 1/2 を α ($\alpha = 0.025$) とする (両側検定)。

ν が整数の場合、t 分布表の $t(\nu, \alpha)$ の値を読む。

ν が整数ではないの場合、 ν の小数部分を切り捨てた整数 n_1 と切り上げた整数 n_2 とを求め、次式から $t(\nu, \alpha)$ を求める。

$$t(\nu, \alpha) = \{t(n_1, \alpha) - t(n_2, \alpha)\} \times (n_2 - \nu) + t(n_2, \alpha)$$

$t_0 \geq t(\nu, \alpha)$ ならば、5%の危険率で 2 群の平均値は異なると判定する (有意差有り)。

5 結果および考察

5.1 試験成績の信頼性に影響を及ぼしたと思われる環境要因

なし。

5.2 試験液中の被験物質濃度

暴露開始時の被験物質濃度は 23.79 ~ 438.80 mg/L (設定値 24 ~ 454 mg/L) であり、暴露 72 時間の被験物質濃度は 22.33 ~ 407.11 mg/L (設定値 24 ~ 454 mg/L) であった。

設定値に対する割合は、暴露開始時が 95.6 ~ 99.1 %、暴露 72 時間が 88.6 ~ 93.0 % であった。

[Table 2 (p.20)]

5.3 藻類成長曲線

- 1) 対照区における細胞濃度は 72 時間の培養で約 150 倍に増殖し、試験条件下で正常な生長を示した。
- 2) 24mg/L と 43mg/L の濃度区では 72 時間の培養で細胞濃度が約 160 ~ 170 倍に増殖し、対照区とほぼ同程度の生長を示した。
- 3) 454mg/L の最高濃度区では 72 時間の培養でほとんど増殖せず、ほぼ完全な生長阻害が見られた。
- 4) 上記以外の 3 濃度区 (78, 140, 252mg/L) では 72 時間の培養で濃度依存的に生長阻害が見られた。

[Table 3 (p.21), Figure 1 (p.26)]

5.4 半数影響濃度 (EC50) および無影響濃度 (NOEC)

- 1) 生長曲線下の面積の比較による生長阻害濃度 (EbC50)

EbC50(0-72)は 111.7 mg/L であり、その 95%信頼区間は 102.9 mg/L ~ 121.1 mg/L であった。

(統計的手法：吉岡義正教授 Probit 法)

対照区と比較して有意差が認められない最高試験濃度 (無影響濃度 (NOEC)) は、43mg/L (NOEC(面積法 0-72)) であった。

(統計的手法：F 検定および t 検定、有意水準 5 %、両側検定)

[Table 4, 5 (p.22,23), Figure 2(p.27)]

(上記濃度は、全て設定値に基づく値である。)

2) 生長速度の比較による生長阻害濃度 (ErC50)

ErC50(24-48) と ErC50(24-72)は、それぞれ 174.5 mg/L、205.2 mg/L であり、それらの 95%信頼区間はそれぞれ 166.9 mg/L ~ 182.3 mg/L、189.5 mg/L ~ 222.4 mg/L であった。

(統計的手法：吉岡義正教授 Probit 法)

対照区と比較して有意差が認められない最高試験濃度（無影響濃度(NOEC)）は、それぞれ 78 mg/L (NOEC(速度法 24-48))、78 mg/L (NOEC(速度法 24-72)) であった。

(統計的手法：F 検定および t 検定、有意水準 5 %、両側検定)

[Table 4, 5 (p.22,23), Figure 3 (p.28)]

(上記濃度は、全て設定値に基づく値である。)

5.5 温度および pH

72 時間の暴露期間中の藻類培養試験器内の温度は 22.2 ~ 22.8℃であり、その平均温度は 22.6℃であった。

試験液の pH は暴露開始時が 7.1 ~ 7.3 であり、試験終了時が 7.6 ~ 8.3 であった。

[Table 6, 7 (p.24, 25)]

以 上

Table 1 O E C D medium

<u>Nutrient salts</u>	<u>concentration (mg/L)</u>
H ₃ BO ₃	0.185 mg
MnCl ₂ ·4H ₂ O	0.415 mg
ZnCl ₂	0.003 mg
FeCl ₃ ·6H ₂ O	0.08 mg
Na ₂ EDTA·2H ₂ O	0.1 mg
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.0015mg
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.007 mg
CuCl ₂ ·2H ₂ O	0.00001 mg
CaCl ₂ ·2H ₂ O	18 mg
NH ₄ Cl	15 mg
KH ₂ PO ₄	1.6 mg
NaHCO ₃	50 mg
MgCl ₂ ·6H ₂ O	12 mg
MgSO ₄ ·7H ₂ O	15 mg

Table 2. Measured Concentrations of 3,5,5-Trimethyl-2-cyclohexen-1-one During
a 72-Hour Exposure of *Selenastrum capricornutum*

Nominal Concentration (mg/L)	Measured concentration (mg/L)			
	0 Hour	Percent of Nominal	72 Hour	Percent of Nominal
Control	< 0.05	—	< 0.05	—
24	23.79	99.1	22.33	93.0
43	42.07	97.8	39.26	91.3
78	76.90	98.6	71.83	92.1
140	133.82	95.6	125.20	89.4
252	246.15	97.7	223.32	88.6
454	438.80	96.7	407.11	89.7

Table 3. Cell Density of *Selenastrum capricornutum*

Nominal Concentration (mg/L)	No.	Cell Density($\times 10^4$ cells/mL)			
		0 Hour	24 Hour	48 Hour	72 Hour
Control	1	1.00	7.20	28.60	153.60
	2	1.00	6.57	32.40	151.80
	3	1.00	8.17	27.50	147.77
	Average	1.00	7.31	29.50	151.06
	S.D.	0.0000	0.8060	2.5710	2.9852
24	1	1.00	6.93	29.67	170.07
	2	1.00	5.63	28.47	170.67
	3	1.00	6.80	30.73	179.67
	Average	1.00	6.45	29.62	173.47
	S.D.	0.0000	0.7160	1.1307	5.3777
43	1	1.00	5.73	28.50	167.60
	2	1.00	5.77	29.73	165.03
	3	1.00	6.33	27.87	151.00
	Average	1.00	5.94	28.70	161.21
	S.D.	0.0000	0.3355	0.9460	8.9350
78	1	1.00	5.93	21.33	98.53
	2	1.00	5.20	21.13	96.33
	3	1.00	4.67	22.87	87.77
	Average	1.00	5.27	21.78	94.21
	S.D.	0.0000	0.6326	0.9521	5.6846
140	1	1.00	3.97	11.20	38.93
	2	1.00	4.87	10.67	37.10
	3	1.00	4.00	11.63	36.27
	Average	1.00	4.28	11.17	37.43
	S.D.	0.0000	0.5112	0.4809	1.3610
252	1	1.00	3.07	4.17	12.03
	2	1.00	2.67	4.47	9.33
	3	1.00	2.97	4.30	11.17
	Average	1.00	2.90	4.31	10.84
	S.D.	0.0000	0.2082	0.1504	1.3793
454	1	1.00	2.20	2.20	3.30
	2	1.00	3.17	2.50	2.63
	3	1.00	2.53	1.87	2.80
	Average	1.00	2.63	2.19	2.91
	S.D.	0.0000	0.4932	0.3151	0.3483

Table 4. Growth Inhibition of *Selenastrum capricornutum*

Nomimal Concentration		Area $\times 10^4$	Inhibition (%)	Rate	Inhibition (%)	Rate	Inhibition (%)
(mg/L)	No.	A (0-72h)	I _A (0-72h)	μ (24-48h)	I _m (24-48h)	μ (24-72h)	I _m (24-72h)
Control	1	2642	—	0.0575	—	0.0638	—
	2	2697		0.0665		0.0654	
	3	2569		0.0506		0.0603	
	Average	2636		0.0582		0.0632	
24.0	1	2859	-9.53	0.0606	-9.42	0.0667	-8.69
	2	2806		0.0675		0.0711	
	3	2997		0.0628		0.0682	
	Average	2887		0.0637		0.0687	
43.0	1	2773	-2.65	0.0668	-12.83	0.0703	-8.86
	2	2772		0.0683		0.0699	
	3	2573		0.0618		0.0661	
	Average	2706		0.0656		0.0688	
78.0	1	1777	34.77	0.0533	-1.96	0.0585	4.75
	2	1728		0.0584		0.0608	
	3	1654		0.0662		0.0611	
	Average	1720		0.0593		0.0602	
140.0	1	771	71.17	0.0432	31.03	0.0476	28.34
	2	758		0.0327		0.0423	
	3	750		0.0445		0.0459	
	Average	760		0.0401		0.0453	
252	1	258	90.77	0.0128	71.55	0.0285	56.66
	2	223		0.0215		0.0261	
	3	249		0.0154		0.0276	
	Average	243		0.0166		0.0274	
454	1	85	96.56	0.0000	112.89	0.0084	96.48
	2	108		-0.0099		-0.0039	
	3	79		-0.0126		0.0021	
	Average	91		-0.0075		0.0022	

Table 5. Calculated EC50 and NOEC

Based on I_A value

	Calculated value (mg/L)	95-Percent Confidence Limits (mg/L)
EbC50 (0-72h)	111.7	102.9 ~ 121.1
NOECb (0-72h)	43	----

Based on I_m value

	Calculated value (mg/L)	95-Percent Confidence Limits (mg/L)
ErC50 (24-48h)	174.5	166.9 ~ 182.3
NOECr (24-48h)	78	----
ErC50 (24-72h)	205.2	189.5 ~ 222.4
NOECr (24-72h)	78	----

Table 6. Daily Temperature in the Incubation Chamber During a 72-Hour Exposure

Exposure Period (Hours)	Temperature (°C)
0	22.5
24	22.2
48	22.8
72	22.8
Average	22.6

Table 7. pH Values at 0-Hour and 72-Hour Exposure

Nominal Concentration (mg/L)	pH	
	0 Hour	72 Hour
Control	7.3	8.3
24	7.3	8.3
43	7.3	8.3
78	7.1	7.9
140	7.3	7.7
252	7.3	7.6
454	7.3	7.6

Figure 1 Algal Growth Curve of *Selenastrum capricornutum*

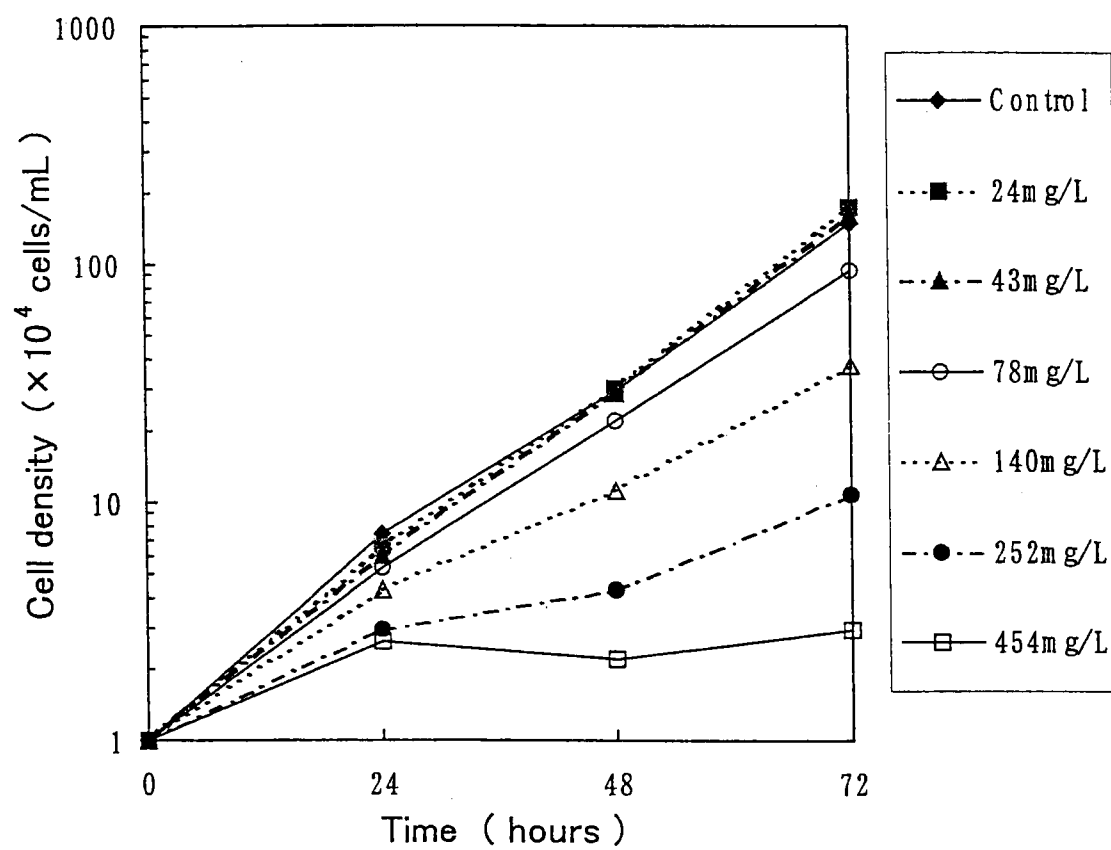


Figure 2 Concentration-Inhibition Curve of *Selenastrum capricornutum* based on I_A value

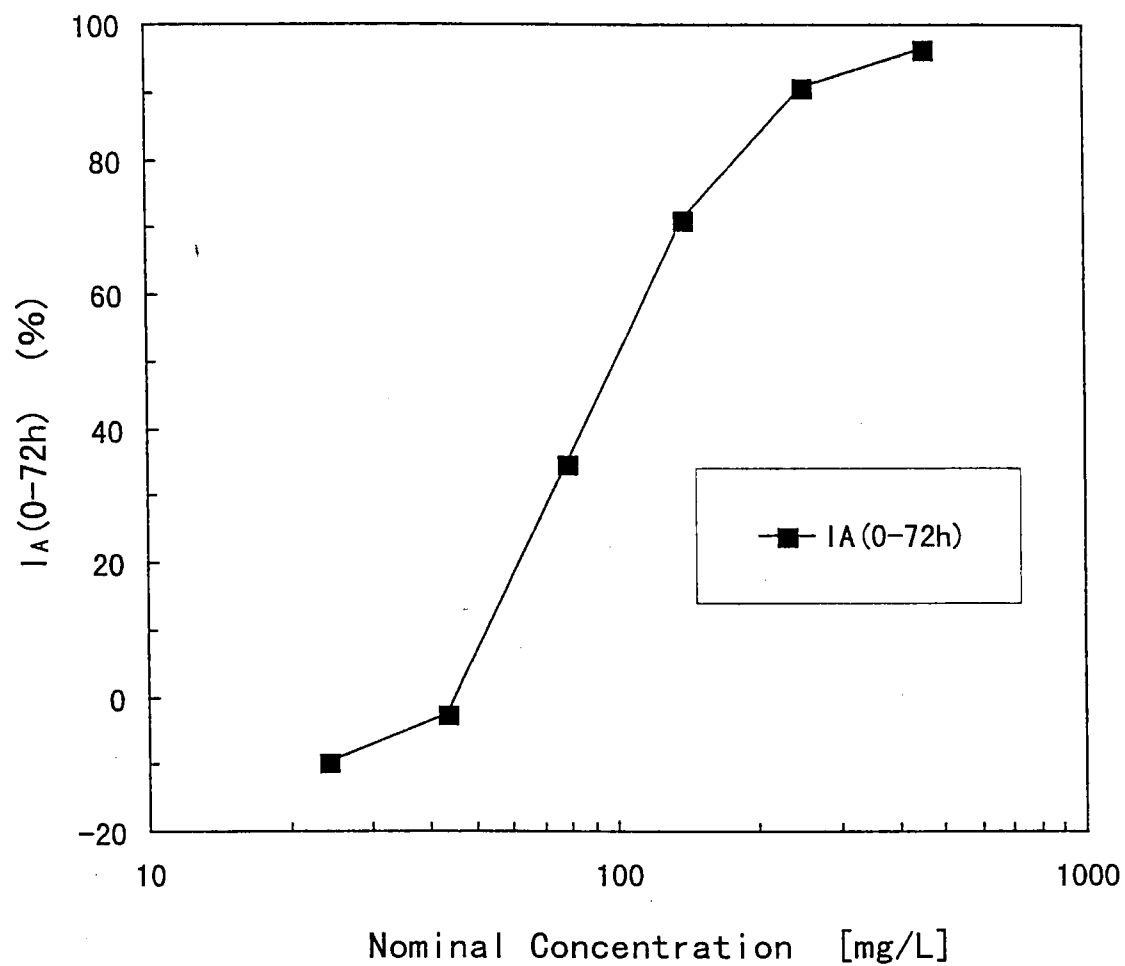
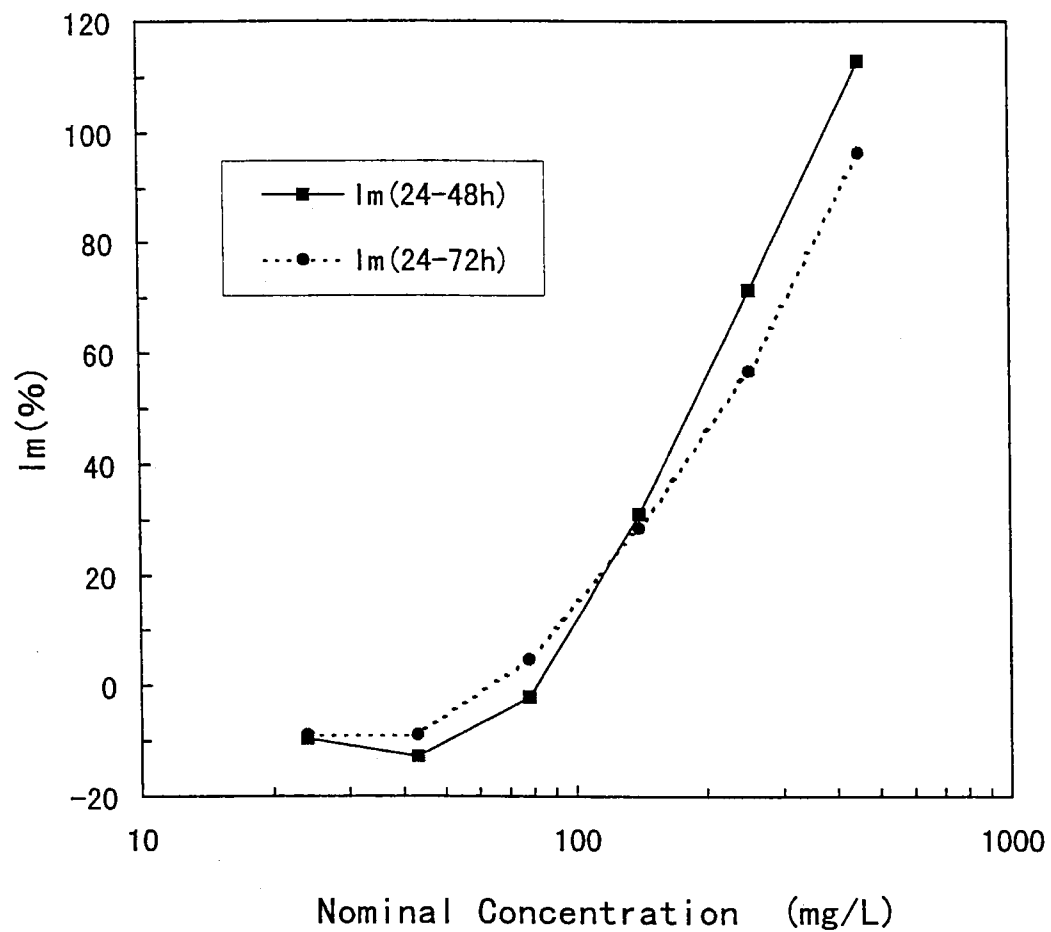


Figure 3 Concentration-Inhibition Curve of *Selenastrum capricornutum* based on I_m value



添付資料－1

試験液の分析方法

(全 7 頁)

試験液の分析方法

1. 試験液の分析方法

各試験（0.5～1.5mL 程度）をバイアル瓶に採取する。

測定濃度が 100mg/L を越える場合は予め蒸留水で希釈する。

HPLC のオートサンプラーにセットして一定量を自動注入する。

検量線から被験物質濃度を求める。

2. 高速液体クロマトグラフィー（HPLC）測定条件

カラム : C18 5 μ m, 4.6mm ϕ \times 150mm

カラム温度 : 40 $^{\circ}$ C

注入量 : 20 μ L

移動相 : A ; 水 / アセトニトリル / 酢酸 = 84.5 / 15 / 0.5

B ; 水 / アセトニトリル / 酢酸 = 9.5 / 90 / 0.5

A / B = 50 / 50

流 速 : 1.0mL / min

検出波長 : 235nm

3. 検量線

0.1mg/L から 100mg/L までの 5 種類の標準液を分析し、その面積値から直線性を確認した。

[Figure 1(p.31)]

測定日毎に 3 種類(10, 50, 100mg/L)の標準溶液の測定を行い、その面積値を用いて検量線を作成した。

4. 添加回収率

試験培地に標準液の一定量を添加して、回収率を求めた。

3,5,5-トリメチル-2-シクロヘキセン-1-オン 10mg/L の回収率は94.87%であり、25mg/L の回収率は102.21%であった。

Figure 1 Calibration Curve of 3,5,5-Trimethyl-2-cyclohexen-1-one by HPLC Analysis

Input Data

No.	Concentration (mg/L)	Peak Area (mAU*sec.)
1	0.1	12.00823
2	1.0	96.80765
3	10	926.50433
4	50	4538.85547
5	100	9044.68457

$$Y(\text{Peak Area}) = 8.73399 + 90.41872 X(\text{Concentration})$$

$$r^2 = 1.00000$$

r^2 : coefficient of correlation

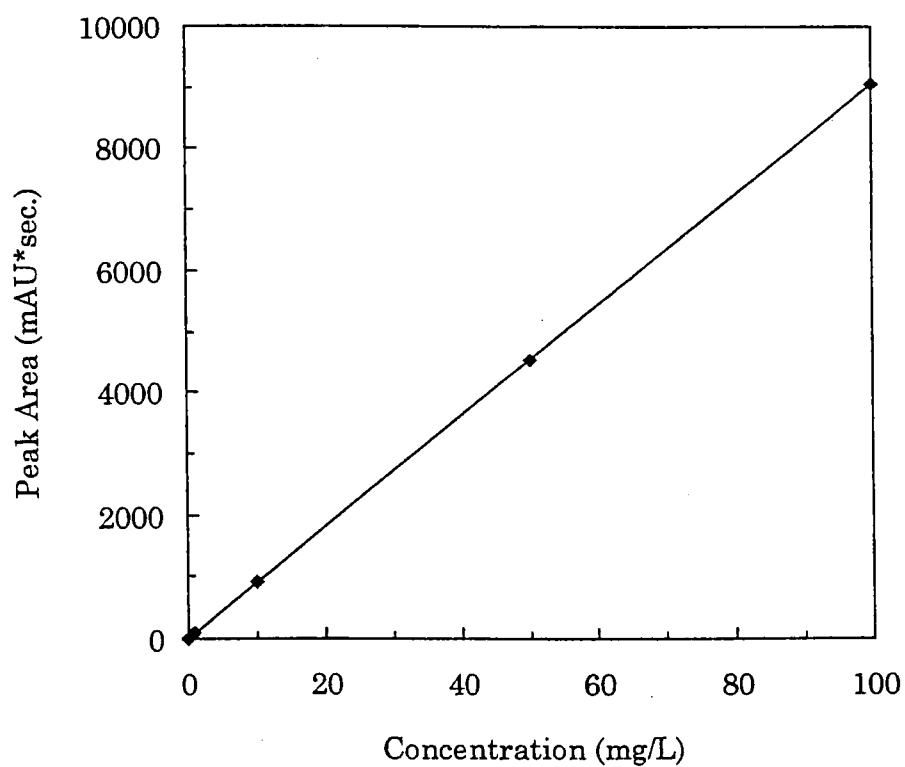
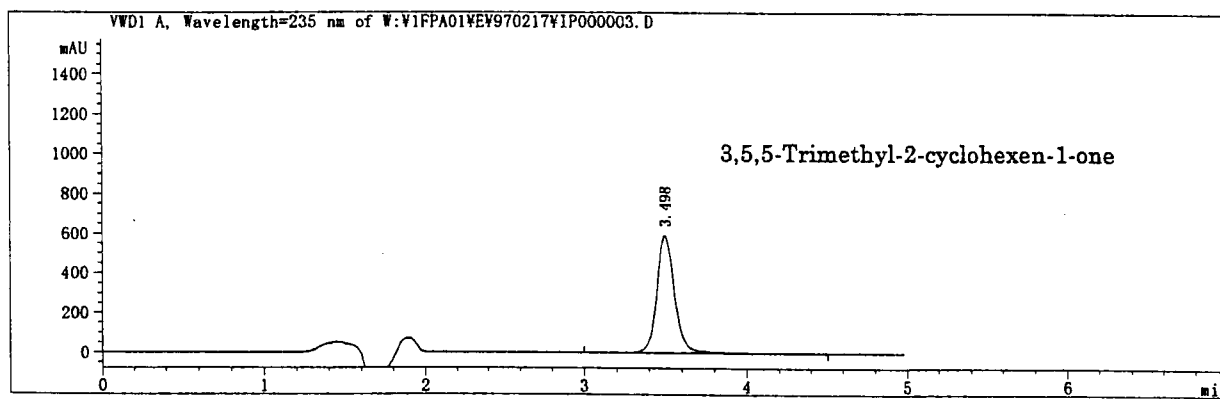


Figure 2 Representative chromatograms

(1) Standard 50 mg/L ; 0h



(2) Standard 50 mg/L ; 72h

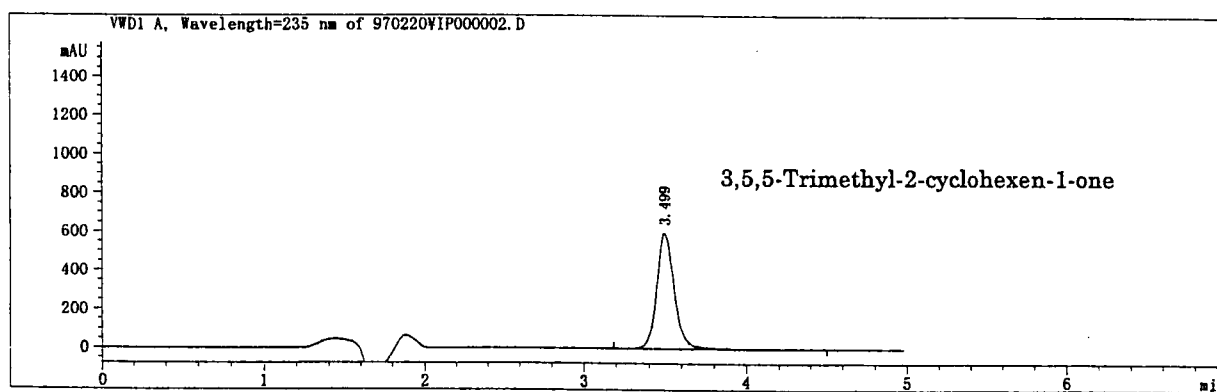
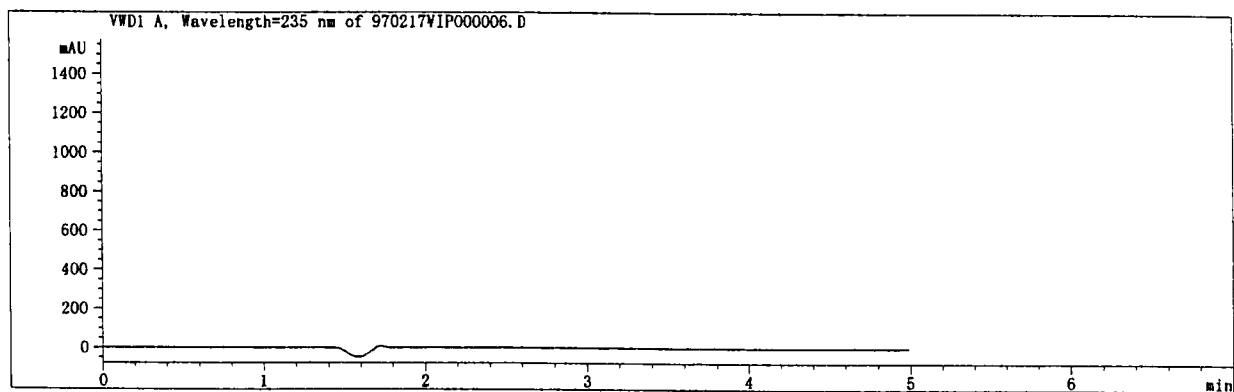


Figure 2 Continued

(3) Control ; 0 h



(4) Control; 72 h

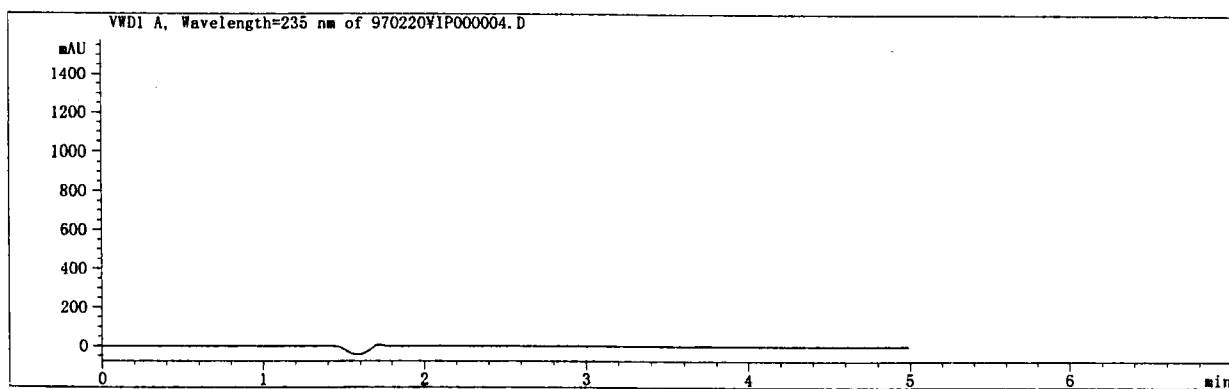
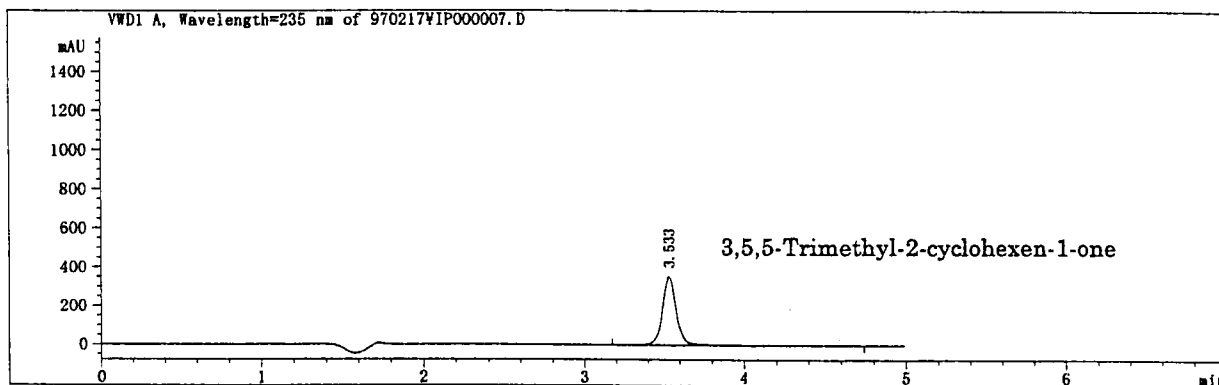


Figure 2 Continued

(5) 24 mg/L nominal; 0 h



(6) 24 mg/L nominal; 72 h

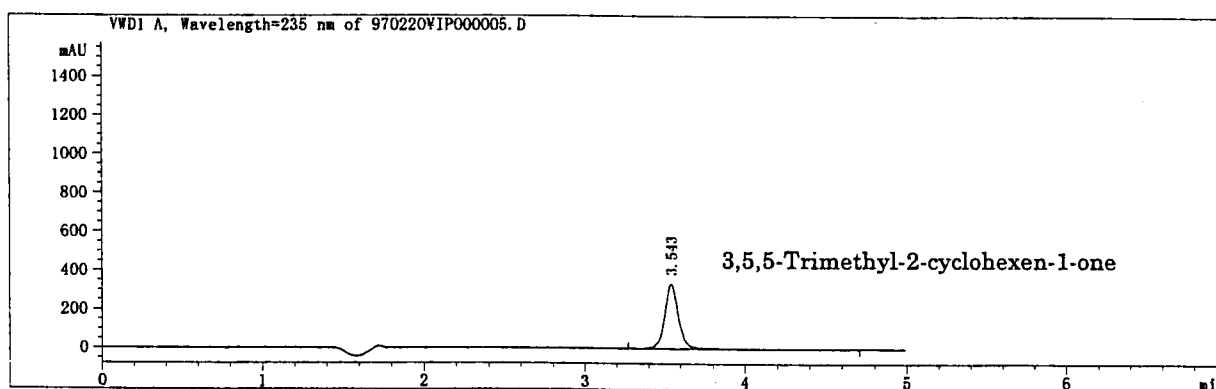
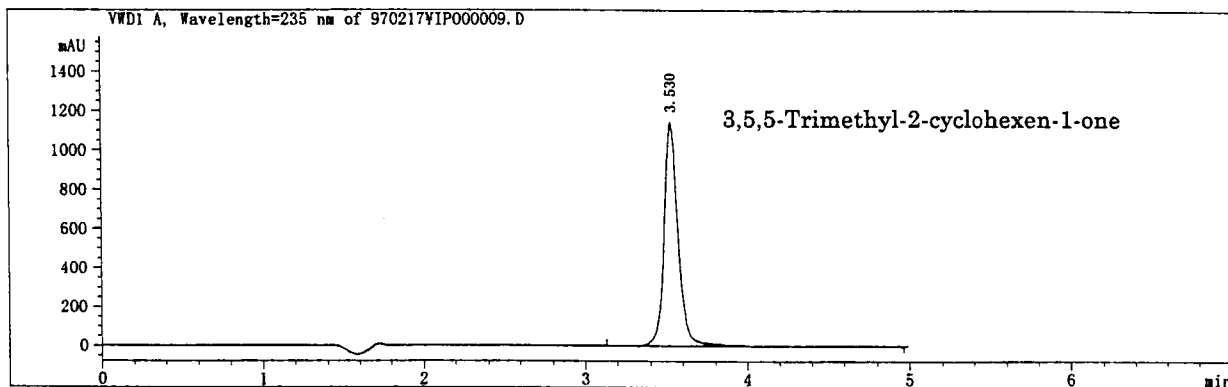


Figure 2 Continued

(7) 78 mg/L nominal; 0 h



(8) 78 mg/L nominal; 72 h

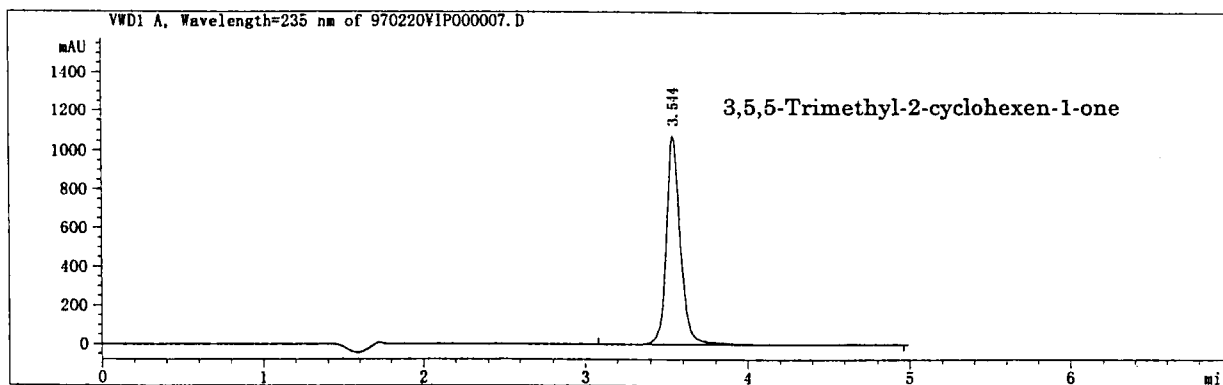
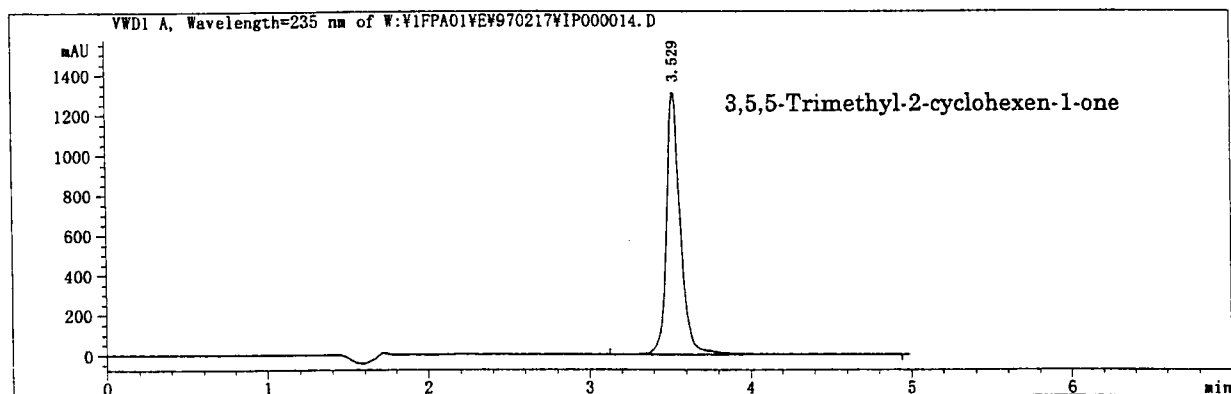


Figure 2 Continued

(9) 454 mg/L nominal; 0 h (diluted to 90.8 mg/L)



(10) 454 mg/L nominal; 72 h (diluted to 45.4 mg/L)

