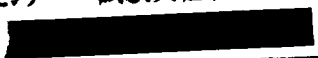



環境省殿

本写しは原本と相違ありません	
三菱化学メディエンス㈱	
横浜研究センター	試験責任者
	



最 終 報 告 書

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

(試験番号：A080435)

2009年 7月28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 : acetaldehydeの藻類 (*Pseudokirchneriella subcapitata*)
に対する生長阻害試験

試 験 番 号 : A 0 8 0 4 3 5

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)

2009年 7月28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 : acetaldehyde
の藻類 (*Pseudokirchneriella subcapitata*) に対する生長阻害試験

試験番号 : A080435

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, 環境企発第 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	2009年 5月21日	2009年 5月22日
試験計画書	2009年 5月22日	2009年 5月22日
変更書(変更番号: 01)	2009年 7月16日	2009年 7月16日
試験の査察		
試験液の調製	2009年 5月26日	2009年 5月26日
藻類の添加	2009年 5月26日	2009年 5月26日
試験液の分析	2009年 5月25, 27日	2009年 5月27日
生物量の測定	2009年 5月29日	2009年 5月29日
最終報告書監査		
最終報告書草案	2009年 7月23日	2009年 7月28日
最終報告書	2009年 7月28日	2009年 7月28日

信頼性保証部門主担当者 : 2009年 7月28日

試験実施概要

1. 表 題 : acetaldehydeの藻類 (*Pseudokirchneriella subcapitata*) に対する生長阻害試験
(試験番号: A080435)
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 : XXXXXXXXXX
生態影響評価グループ

9. 試験担当者 : 
(試験・分析実施)

10. 試験日程 : 試験開始日 2009年 5月22日
 暴露開始日 2009年 5月26日
 暴露終了日 2009年 5月29日
 試験終了日 2009年 7月28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) 被験物質
- 5) 対照物質
- 6) 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.....	13
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.....	14
2.2 試験結果の評価.....	15
2.2.1 結果の算出.....	15
2.2.2 試験の有効性.....	17
3 結果および考察.....	18
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.....	18
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.....	18
3.3 試験液および試験培養液中の被験物質濃度.....	18
3.4 半数生長阻害濃度 (EC50) および最大無影響濃度 (NOEC).....	19
3.5 藻類の観察結果.....	19
3.6 試験の有効性.....	19
Table 1～8.....	20～24
Figure 1～2.....	25～26
付属資料－1 赤外吸収スペクトル.....	27～28
付属資料－2 培地の組成.....	29～30
付属資料－3 試験液の調製.....	31～32
付属資料－4 試験液および試験培養液の分析.....	33～42
付属資料－5 結果の算出.....	43～45

要 約

試験委託者 : 環境省

表 題 : acetaldehydeの藻類 (*Pseudokirchneriella subcapitata*) に対する生長阻害試験

試験番号 : A080435

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 (密閉系), 振とう培養 (100 rpm)
- 5) 初期生物量 : 前培養した藻類 5×10^3 cells/mL
(指数増殖期の藻類乾燥重量: 1.7×10^{-8} mg/cell, n=8)
- 6) 試験温度 : 22 °C (暴露期間中の変動範囲は ± 2 °C以内)
- 7) 照明 : 60~65 μ E/m²/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	5.0
濃度区 2	10
濃度区 3	22
濃度区 4	46
濃度区 5	96
濃度区 6	200

公比 : 2.1

- 9) 分析法 : ガスクロマトグラフ質量分析 (GC/MS) 法

結 果：

1) 試験液および試験培養液中の被験物質濃度

被験物質濃度は、暴露開始時の試験液において低濃度区側から5.06, 9.32, 20.1, 42.9, 102, 178 mg/Lであり、それぞれの設定値に対する割合は 89～106 %であった。また、暴露開始後 72 時間の試験培養液においては、5.0 mg/L 濃度区（濃度区 1）では、被験物質が検出されず（<0.05 mg/L），10～200 mg/L 濃度区（濃度区 2～6）では、それぞれが0.205, 5.89, 26.7, 67.8および131 mg/Lであった。暴露期間中、被験物質の濃度減少が認められ、藻類が生長している 5.0, 10 および22 mg/L 濃度区で、特に著しい濃度減少が認められた。本被験物質は、低いlog kowを示し、微生物分解が良好であることから、藻類の生長による被験物質の分解等の変化が生じたと思われる。

また、被験物質濃度は、暴露開始後 24 時間でそれぞれの設定値に対する割合が 61～70 %であり、全ての濃度区で一定の濃度減少が認められた。46, 96 および200 mg/L 濃度区では、その後被験物質濃度を維持した。本被験物質は揮発性を有し、暴露の初期に水中からの揮散があったことが推察された。

2) 生長速度の比較による阻害濃度

阻害濃度の算出には測定値の時間加重平均値を用いた。

半数生長阻害濃度 ErC50(0-72h)： 25.8 mg/L (95%信頼区間：17.4～38.5 mg/L)

最大無影響濃度 NOECr(0-72h)： 1.86 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、46 mg/L 濃度区（濃度区 4）以上の濃度区では、一部で細胞容積の拡大（膨張）が認められた。22 mg/L 濃度区（濃度区 3）以下の濃度区では、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	acetaldehyde *1		
別 名	(略称: AA) *2		
C A S 番 号	75-07-0 *1		
構 造 式 又 は 示 性 式	<div style="text-align: center;"> ^{*3}  </div>		
分 子 量	44.05		
試 験 に 供 し た 物 質 の 純 度 (%)	99.57 (GC)		
試 験 に 供 し た 物 質 の ロ ッ ト 番 号	99896TJ		
不 純 物 の 名 称 及 び 含 有 率	—		
蒸 気 圧	1008.5 hPa at 20°C 1451 hPa at 30°C 2660 hPa at 55°C		
対 水 溶 解 度	Completely miscible		
1-オクタノール/水分配係数	Log Pow 0.5		
融 点	-125°C		
沸 点	21°C at 1013 hPa		
常 温 に お け る 性 状	無色透明液体		
安 定 性	安定		
溶 媒 に 対 す る 溶 解 度 等	溶媒	溶解度	溶媒中の安定性
	—	—	—

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 JSTの有機化合物辞書DB「日本化学物質辞書」検索サービス
(<http://nikkajweb.jst.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，窒素封入）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：

サーモフィッシャーサイエンティフィック製 Nicolet iS10 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 μ 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。

ErC50：0.833 mg/L（95%信頼区間：0.634 ～ 1.09 mg/L，

暴露期間：2008年12月9日 ～ 2008年12月12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 = 0.823 \pm 0.0871 mg/L, n=18

（最小値 ～ 最大値 = 0.687 ～ 0.965 mg/L）

- 8) 前培養： 前培養期間；2009年 5月22日～2009年 5月25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： 500 mLガラス製共栓付き三角フラスコ（IWAKI製，ヘッドスペース容量：当施設測定値 490 mL）
- 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，環境企発第 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（密閉系）*，振とう培養（100 rpm）
* 被験物質の揮発性が高いため密閉系を用いた。
- 2) 暴露期間： 72時間
- 3) 試験液量： 100 mL／容器
- 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 5×10^3 cells/mL
(指数増殖期の藻類乾燥重量： 1.7×10^{-8} mg/cell, n=8)
- 6) 試験温度： 22℃（暴露期間中の変動範囲は±2℃以内）
- 7) 照明： 60～65 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ ，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

被験物質の培地に対する溶解度は >10000 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、密閉系）

濃度 (mg/L)	阻害率 (%) I_{μ} (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
対照区	--	検出せず	検出せず	--
1.0	-2.6	109	検出せず	105
5.0	-1.2	--	--	--
20	21.3	--	--	--
100	68.1	105	100 [22] *2	102 [20] *2

*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 開放系：300 mLガラス製三角フラスコ（シリコン栓付）で培養

なお、暴露開始後 72時間の分析において藻類が生長している 1.0 mg/L濃度区で、被験物質濃度の著しい減少が認められた。本被験物質は、低いlog k_{ow} を示し、微生物分解が良好であることから、減少理由として、藻類が存在することによる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を踏まえ、より正確な半数生長阻害濃度（EC50）を算出するため、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	5.0
濃度区 2	10
濃度区 3	22
濃度区 4	46
濃度区 5	96
濃度区 6	200

公比：2.1

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2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，ガスクロマトグラフ質量分析（GC/MS）法により分析した。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 5×10^3 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，予備容器のうち1容器には，上記の要領で藻類を添加し，もう1容器は添加しなかった。

各試験容器を培養装置に設置（ランダム発生表に従いランダム配置，24時間毎に再配置）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。

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を採取し，粒子計数装置用電解液9.0 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藻を添加していない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 (μ_{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、

μ_{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_μ) は対照区の生長速度の平均値と各濃度区での生長速度の平均値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、

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

3) 阻害濃度算出に用いる被験物質濃度の決定

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。

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

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

$ConcA_n$: 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_{μ} (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	$\geq 50\%$	$< 50\%$
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 (μ_{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 7.8～7.9，暴露開始後 72 時間では 7.8～10.5 であった。対照区，5.0 および 10 mg/L 濃度区（濃度区 1 および 2）において pH が 1.5 以上増加した。藻類の炭酸同化作用により試験培養液中の重炭酸イオン濃度が減少し，密閉条件下であるため空気の交換（CO₂の供給）がほとんど無く，結果として pH が増加したと考えられた。

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。

被験物質濃度は，暴露開始時の試験液において低濃度区側から 5.06，9.32，20.1，42.9，102，178 mg/L であり，それぞれの設定値に対する割合は 89～106 % であった。また，暴露開始後 72 時間の試験培養液においては，5.0 mg/L 濃度区（濃度区 1）では，被験物質が検出されず

（<0.05 mg/L），10～200 mg/L 濃度区（濃度区 2～6）では，それぞれが 0.205，5.89，26.7，67.8 および 131 mg/L であった。暴露期間中，被験物質の濃度減少が認められ，藻類が生長している 5.0，10 および 22 mg/L 濃度区で，特に著しい濃度減少が認められた。本被験物質は，低い log K_{ow} を示し，微生物分解が良好であることから，藻類の生長による被験物質の分解等の変化が生じたと思われる。

また，被験物質濃度は，暴露開始後 24 時間でそれぞれの設定値に対する割合が 61～70 % であり，全ての濃度区で一定の濃度減少が認められた。46，96 および 200 mg/L 濃度区では，その後被験物質濃度を維持した。本被験物質は揮発性を有し，暴露の初期に水中からの揮散があったことが推察された。

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 (ErC50) および最大無影響濃度 (NOECr) 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。

ErC50 は、濃度－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し、阻害率 50 %との交点から算出した。

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。詳細を付属資料—5 に示す。

ErC50(0-72h) : 25.8 mg/L (95%信頼区間 : 17.4~38.5 mg/L)

NOECr(0-72h) : 1.86 mg/L

3.5 藻類の観察結果

試験培養液の色調観察の結果、46 mg/L 濃度区 (濃度区 4) 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。暴露期間中 96 mg/L 濃度区 (濃度区 5) はわずかに色調が変化し、200 mg/L 濃度区 (濃度区 6) は、全く変化しなかった。

暴露開始後 72 時間の顕微鏡下での細胞形態観察の結果、濃度区 4 以上の濃度区では、一部で、細胞容積の拡大 (膨張) が認められた。22 mg/L 濃度区 (濃度区 3) 以下の濃度区では、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 (μ E/m ² /s)	Revolution (rpm)
0	21.3	62-64	100
24	21.9	61-63	100
48	21.7	61-63	100
72	21.7	61-63	100

Table 2 pH Values of Test Cultures

Test Group	pH		
	0 Hour	72 Hours (Vessel No.)	
Control	7.9	10.5	(1)
Conc.1	7.9	10.4	(1)
Conc.2	7.9	10.1	(1)
Conc.3	7.9	8.5	(1)
Conc.4	7.8	7.9	(1)
Conc.5	7.9	7.9	(1)
Conc.6	7.8	7.8	(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-

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 ^a Measured Concentration (mg/L)
		0 Hour	24 Hours	48 Hour	72 Hours (Percent of Nominal)	
Control	--	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	----
Conc.1	5.0	5.06	3.06	0.500	<0.05	1.86*
		(101)	(61)	(10)	--	(37)
Conc.2	10	9.32	6.65	2.80	0.205	4.45
		(93)	(67)	(28)	(2)	(45)
Conc.3	22	20.1	15.2	13.1	5.89	13.6
		(91)	(69)	(60)	(27)	(62)
Conc.4	46	42.9	31.7	30.5	26.7	32.2
		(93)	(69)	(66)	(58)	(70)
Conc.5	96	102	67.1	64.9	67.8	71.9
		(106)	(70)	(68)	(71)	(75)
Conc.6	200	178	140	139	131	144
		(89)	(70)	(70)	(66)	(72)

a : Time weighted mean

* : The value of the detection limit (0.05 mg/L) was used for determination of the concentration of time weighted mean.

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

Test Group	Nominal Concentration [Mean ^a Measured Concentration (mg/L)]	Vessel No.	Biomass (cells/mL)			
			0 Hour*	24 Hours	48 Hours	72 Hours
Control	--	1	5000	26200	212000	666000
		2	5000	23800	204000	678000
		3	5000	24300	228000	685000
		4	5000	25600	218000	653000
		5	5000	25400	262000	735000
		6	5000	29200	283000	792000
		Average	5000	25800	235000	702000
		SD	0	1910	31200	52400
Conc.1	5.0 [1.86]	1	5000	22500	195000	662000
		2	5000	24000	247000	673000
		3	5000	24400	210000	651000
		Average	5000	23600	217000	662000
		SD	0	1000	26800	11000
Conc.2	10 [4.45]	1	5000	19900	110000	570000
		2	5000	22200	109000	553000
		3	5000	19300	110000	505000
		Average	5000	20500	110000	543000
		SD	0	1530	577	33700
Conc.3	22 [13.6]	1	5000	18600	63100	147000
		2	5000	18500	66900	159000
		3	5000	19000	54100	115000
		Average	5000	18700	61400	140000
		SD	0	265	6570	22700
Conc.4	46 [32.2]	1	5000	18200	40200	51700
		2	5000	20400	37200	52300
		3	5000	18000	41100	54900
		Average	5000	18900	39500	53000
		SD	0	1330	2040	1700
Conc.5	96 [71.9]	1	5000	10600	11500	12100
		2	5000	10200	11400	11100
		3	5000	9580	11000	9840
		Average	5000	10100	11300	11000
		SD	0	514	265	1130
Conc.6	200 [144]	1	5000	6260	5910	5230
		2	5000	6110	6850	5910
		3	5000	6260	6500	5090
		Average	5000	6210	6420	5410
		SD	0	87	475	439

a : Time weighted mean

SD : Standard deviation

* : Nominal initial biomass

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

Test Group	Nominal Concentration [Mean ^a Measured Conc.] (mg/L)	Vessel No.	Growth Rate	
			Rate μ (0-72h)	Inhibition(%) ^{*1} I_{μ} (0-72h)
Control	--	1	0.0679	
		2	0.0682	
		3	0.0683	
		4	0.0677	
		5	0.0693	
		6	0.0703	
		Average SD	0.0686 0.0010	-
Conc.1	5.0 [1.86]	1	0.0679	
		2	0.0681	
		3	0.0676	
		Average SD	0.0679 0.0003	1.0
Conc.2	10 [4.45]	1	0.0658	
		2	0.0654	
		3	0.0641	
		Average SD	0.0651 0.0009	5.1**
Conc.3	22 [13.6]	1	0.0470	
		2	0.0480	
		3	0.0435	
		Average SD	0.0462 0.0024	32.7**
Conc.4	46 [32.2]	1	0.0324	
		2	0.0326	
		3	0.0333	
		Average SD	0.0328 0.0005	52.2**
Conc.5	96 [71.9]	1	0.0123	
		2	0.0111	
		3	0.0094	
		Average SD	0.0109 0.0015	84.1**
Conc.6	200 [144]	1	0.0006	
		2	0.0023	
		3	0.0002	
		Average SD	0.0010 0.0011	98.5**

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_{μ} (0-72h) values (Growth rates)

ErC50 (0-72h) (mg/L)	95-Percent Confidence Limits (mg/L)	NOECr (0-72h) (mg/L)
25.8	17.4-38.5	1.86

The ErC50 value and associated 95% confidence limits were determined by least squares linear regression analysis using the logarithm of time weighted mean measured concentration of 22, 46, 96 and 200 mg/L concentration groups 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 $\alpha=0.01$.

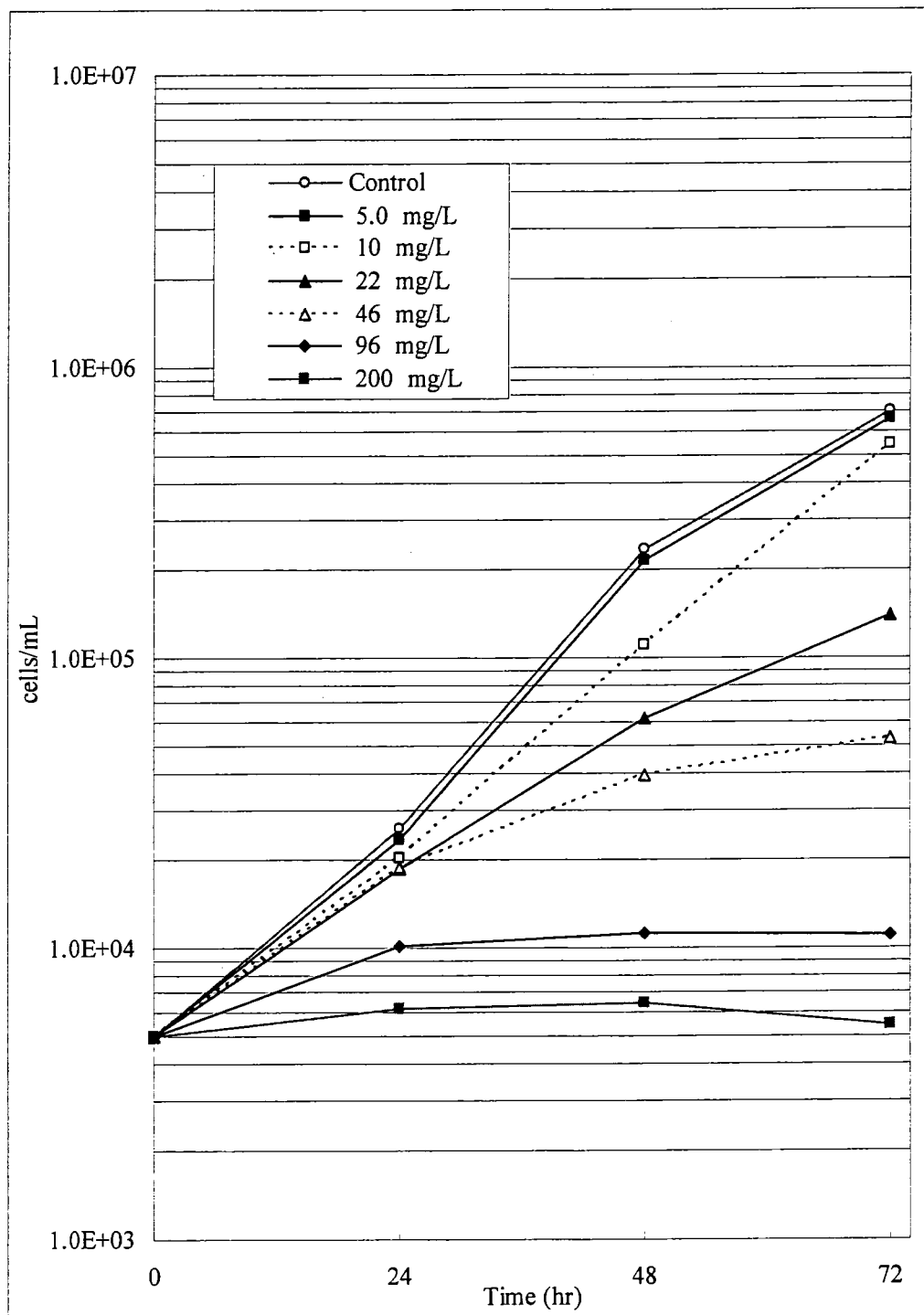
Table 8 Growth Rates of Control

Vessel No.	Growth Rate						
	$\mu(0-72h)$	$\mu(0-24h)$	$\mu(24-48h)$	$\mu(48-72h)$	Average of $\mu(0-24h, 24-48h,$ $48-72h)$	SD	CV(%)
1	0.0679	0.0690	0.0871	0.0477	0.0679	0.0197	29.0
2	0.0682	0.0650	0.0895	0.0500	0.0682	0.0199	29.2
3	0.0683	0.0659	0.0933	0.0458	0.0683	0.0238	34.8
4	0.0677	0.0680	0.0892	0.0457	0.0676	0.0218	32.2
5	0.0693	0.0677	0.0972	0.0430	0.0693	0.0271	39.1
6	0.0703	0.0735	0.0946	0.0429	0.0703	0.0260	37.0
Average	0.0686	0.0682	0.0918	0.0459			33.6
SD	0.0010	0.0030	0.0038	0.0027			
CV(%)	1.5	4.4	4.1	5.9			

SD : Standard deviation

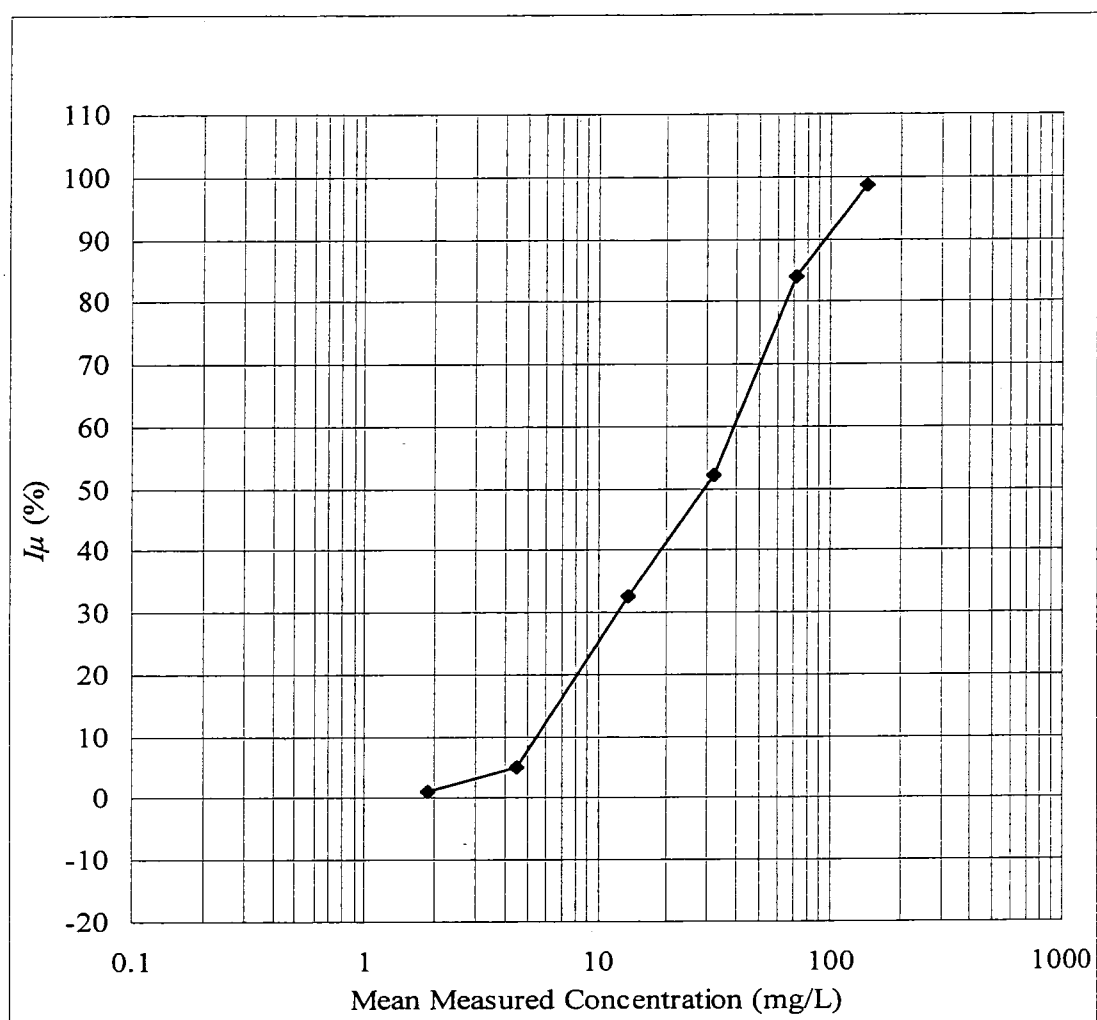
CV : Coefficient of variation

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_μ 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

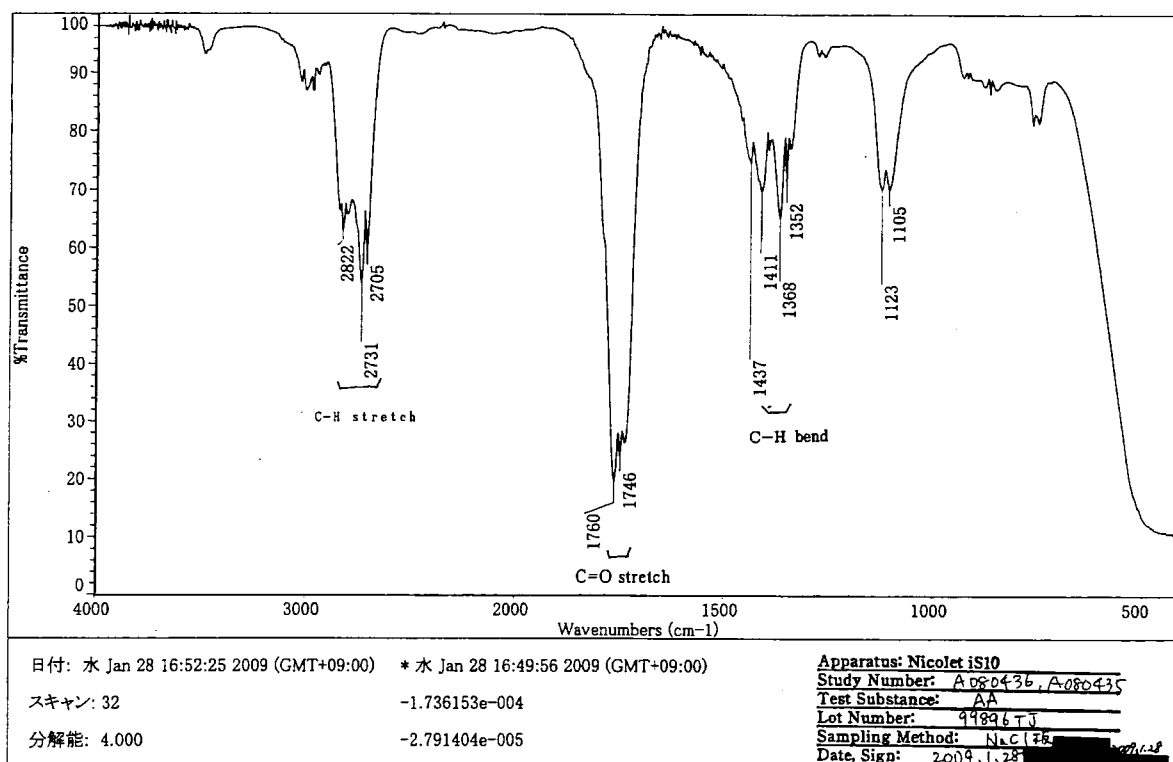
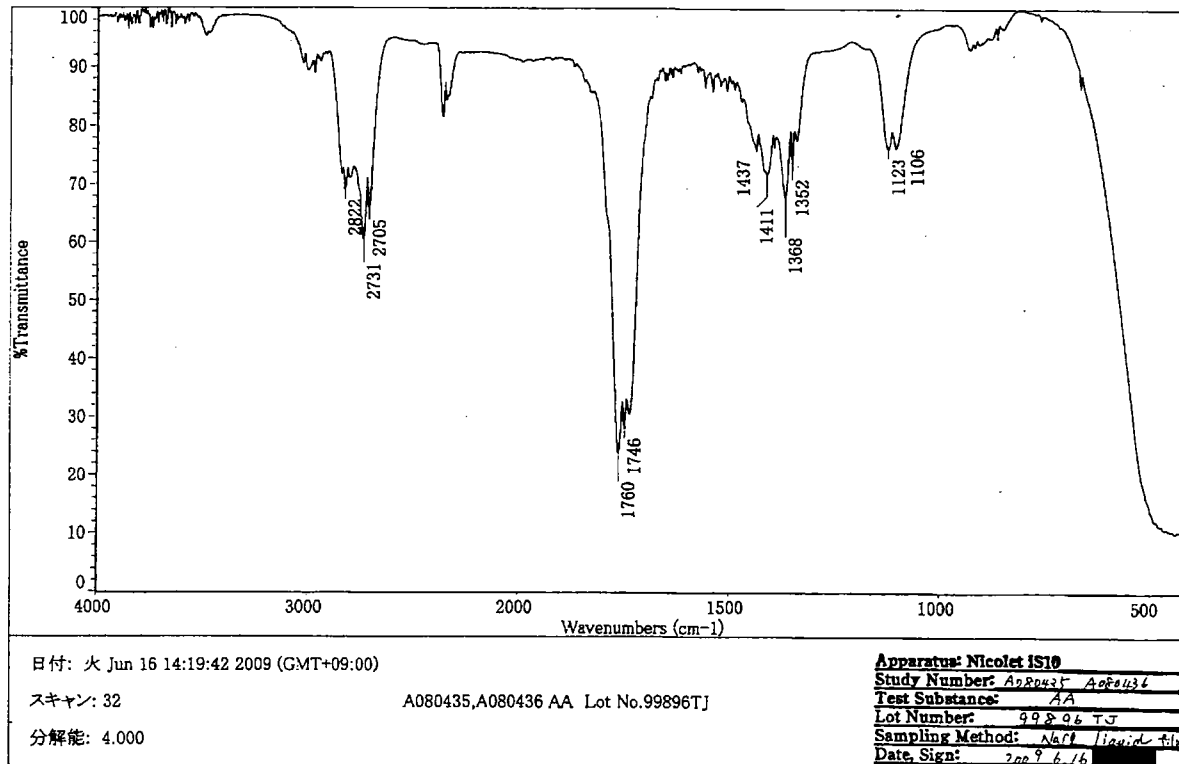


Figure A-1-2 Infrared Absorption Spectrum of the Test Substance after the End of Exposure



付属資料－ 2

培地の組成

Table A-2 Medium

<u>Nutrient salts</u>	<u>Concentration (mg/L)</u>
NH_4Cl	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
KH_2PO_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
H_3BO_3	0.185
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.415
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
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 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

密度: 0.785 g/cm³

被験物質原液 I の調製

採取量	――→	260	μL(マイクロピペットで採取)
試験用水	――→	培地(22°C)	
最終容量	――→	1020	mL
容器	――→	メスフラスコ	
濃度	――→	200	mg/L
混合方式	――→	スターラーで攪拌 5分	密栓

2. 試験液の調製

被験物質原液 I 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	――→	500mL容ガラス製共栓付き三角フラスコ(IWAKI製)	
混合方式	――→	手で振とう攪拌	
濃度公比	――→	2.09	
連数	――→	6容器/対照区, 3容器/濃度区, 2予備容器/試験区	

(以下の濃度表示は、最小桁数に合わせている)

設定試験濃度 mg/L	区No. (略称)	原液 I mL
対照区	C	0.0
5.0	Conc.1	2.5
10.0	Conc.2	5.0
22.0	Conc.3	11.0
46.0	Conc.4	23.0
96.0	Conc.5	48.0
200	Conc.6	100.0

付属資料－ 4

試験液および試験培養液の分析

1. ガスクロマトグラフ質量分析 (GC/MS) 計 測定条件

装置

ガスクロマトグラフ質量分析計 (ヘッドスペースサンプラ付き) No.2

ガスクロマトグラフ (GC) : Agilent Technologies 6890N 型

ヘッドスペースサンプラ (HSS) : Agilent Technologies G1888 型

質量選択検出器 (MSD) : Agilent Technologies 5973 *inert* 型

データ処理部 : MSD ケミステーション (Windows XP)

[GC 条件]

カラム : Agilent INNOWAX 30 m×0.25 mm×0.25 μm

キャリアーガス : ヘリウム 1.0 mL/min (Constant flow)

ストップタイム : 12 min

オープン温度 : 40°C (2 min) → 5°C/min → 50°C (2 min) → 15°C/min → 140°C

注入口温度 : 250°C

MS インターフェース温度 : 280°C

注入条件 : スプリット (スプリット比 = 100 : 1)

注入量 : 1.0 mL (HSS サンプルループ容量)

[HSS 条件]

温度条件 : Oven 45°C, LOOP 120°C, Transfer Line 200°C

イベント時間 : GC Cycle Time 20 min

Vial Equilibration Time 20 min

Pressurization Time 0.2 min

Loop Fill Time 0.03 min

Loop Equilibration Time 0.2 min

Inject Time 1 min

バイアルパラメータ : Shake (HIGH)

[MSD 条件]

温度条件 : イオン源 230°C, 四重極マス・フィルタ 150°C

SIM (Selected Ion Monitoring) 条件 :

Filament off 3 min

Quant ion *m/z* 44.0

2. 検量線の作成と試験液および試験培養液中の被験物質濃度の定量

- 1) 被験物質を精製水*で溶解，希釈し，0，0.500～50.0 mg/L の標準溶液を調製した。

*：JIS K0557 A4 グレードの水

- 2) 標準溶液を以下のように分析した。

標準溶液 10 mL 採取
|
GC/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。相関係数は 0.9999 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。そこで，試験液および試験培養液中の被験物質濃度の定量は，各分析時に測定した標準溶液のピーク面積との比較で行った。

- 4) 検量線の最低濃度に対し，1/10 程度で視覚的に分析可能と思われる被験物質濃度 0.05 mg/L を暴露期間中の検出限界とした。

3. 試験液および試験培養液の分析方法

- 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：各試験区毎に藻類を添加していない予備容器の中層より採取

精製水*¹
+
試験液*² 10 mL (精製水との合計)
|
混合
|
分析試料
|
GC/MS測定

*¹：JIS K0557 A4 グレードの水

*²：精製水と試験液の比率を変えることによって被験物質濃度を検量線範囲に入れる。検量線範囲に入ると予想される試験区は，試験培養液 10 mL (精製水 = 0 mL) とした。

暴露開始後 24, 48および 72時間：各試験区毎に藻類を添加した予備容器の中層より採取

精製水*1

+

試験培養液*2 10 mL (精製水との合計)

|

混合

|

分析試料

|

GC/MS測定

*1：JIS K0557 A4 グレードの水

*2：精製水と試験培養液の比率を変えることによって被験物質濃度を検量線範囲に入れる。検量線範囲に入ると予想される試験区は、試験培養液 10 mL (精製水 = 0 mL) とした。

Figure A-4-1 Calibration curve

Input Data

No.	Concentration X (mg/L)	Peak Area Y (count)
1	0	0
2	0.500	4200
3	1.00	7259
4	5.00	36316
5	10.0	68931
6	20.0	136990
7	50.0	329409

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

$$a = 1.956E+03$$

$$b = 6.583E+03$$

$$r = 0.9999$$

$$-7.036E+02 < a < 4.615E+03$$

(95-Percent Confidence Limits)

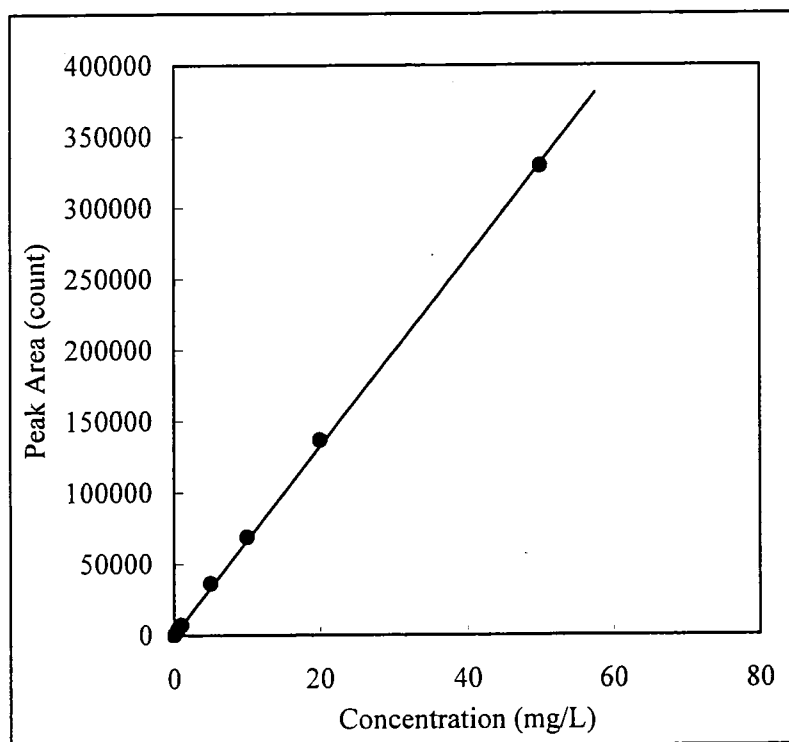
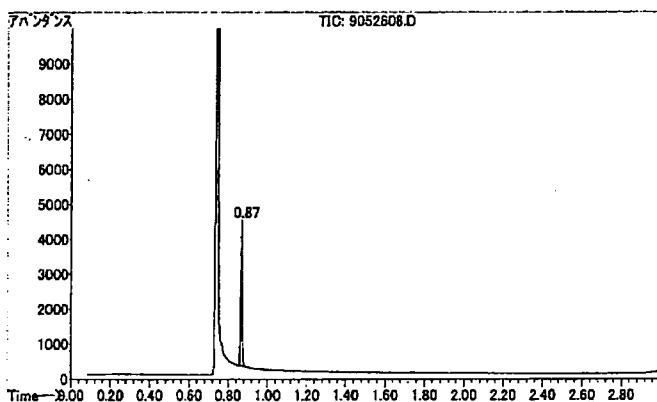


Figure A-4-2 Representative chromatograms

(1) Standard 5.00 mg/L ; 0 Hour

Study No. : [✓]A080435 []A080436
 Date : 2009.5.26
 Operator : XXXXXXXXXX
 Sample Information: AA
 Sample Name : std 5mg/L
 Misc Info :
 File Name : C:\MSDCHEM\1\FDATA\AA\9052608.D
 Acquired : 26 May 2009 15:00 using AcqMethod AA

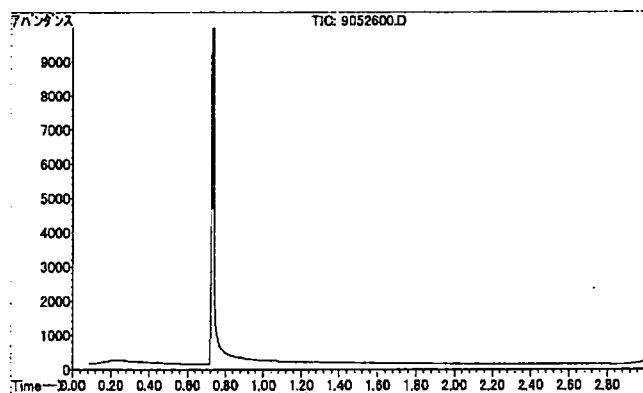


TIC: 9052608.D

ピーク#	リテンションタイム	タイプ	半値幅	面積	開始時間	終了時間
1	0.868	M	0.010	24001	0.856	0.887

(2) Control ; 0 Hour

Study No. : [✓]A080435 []A080436
 Date : 2009.5.26
 Operator : XXXXXXXXXX
 Sample Information: AA
 Sample Name : A0hC
 Misc Info :
 File Name : C:\MSDCHEM\1\FDATA\AA\9052600.D
 Acquired : 26 May 2009 11:59 using AcqMethod AA



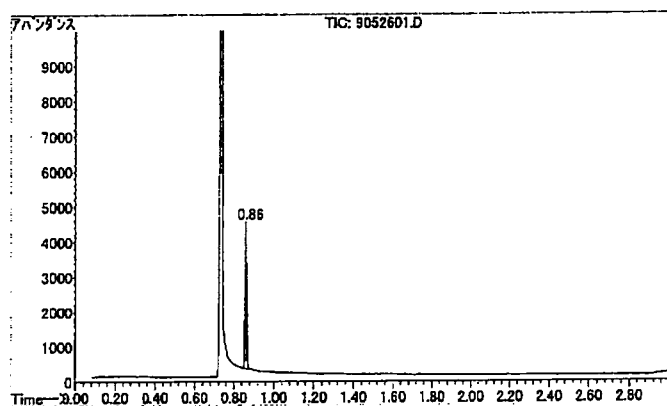
TIC: 9052600.D

ピーク#	リテンションタイム	タイプ	半値幅	面積	開始時間	終了時間
ピークが検出できません						

Figure A-4-2 Continued

(3) Conc.1 ; 0 Hour

Study No. : [V]A080435 []A080436
 Date : 2009. 5. 26
 Operator : XXXXXXXXXX
 Sample Information: AA
 Sample Name : A0hC1
 Misc Info :
 File Name : C:\MSDCHEM\1\DATA\AA\9052601.D
 Acquired : 26 May 2009 12:22 using AcqMethod AA

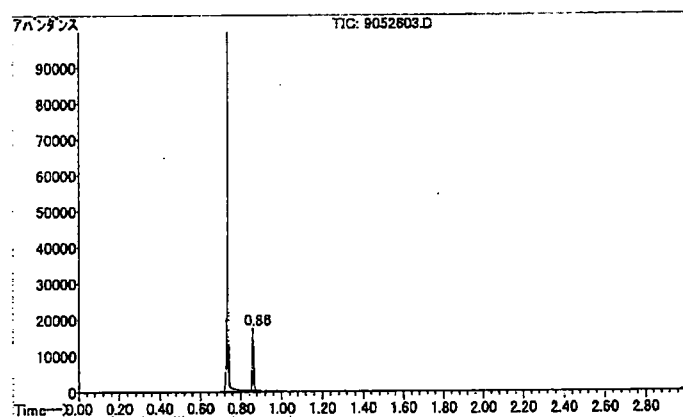


TIC: 9052601.D

ピーク#	リテンションタイム	タイプ	半値幅	面積	開始時間	終了時間
1	0.860	M	0.010	24273	0.843	0.881

(4) Conc.3 ; 0 Hour

Study No. : [V]A080435 []A080436
 Date : 2009. 5. 26
 Operator : XXXXXXXXXX
 Sample Information: AA
 Sample Name : A0hC3
 Misc Info :
 File Name : C:\MSDCHEM\1\DATA\AA\9052603.D
 Acquired : 26 May 2009 13:07 using AcqMethod AA



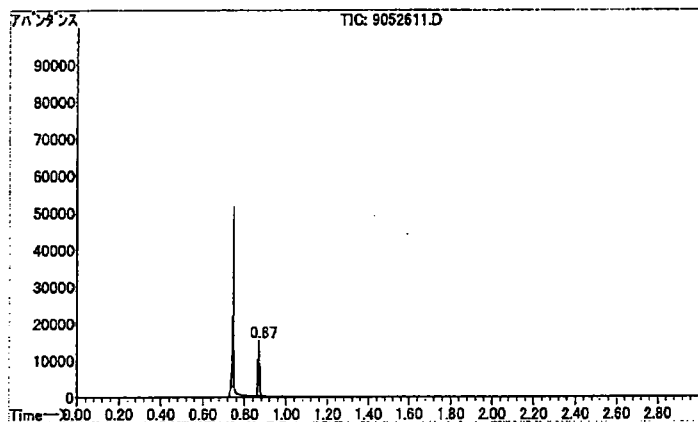
TIC: 9052603.D

ピーク#	リテンションタイム	タイプ	半値幅	面積	開始時間	終了時間
1	0.860	BB	0.009	97264	0.846	0.879

Figure A-4-2 Continued

(5) Conc.6 ; 0 Hour

Study No. : [✓]A080435 []A080436
 Date : 2009.5.26
 Operator : XXXXXXXXXX
 Sample Information: AA
 Sample Name : A0hC6
 Misc Info :
 File Name : C:\MSDCHEM\1\DATA\AA\9052611.D
 Acquired : 26 May 2009 16:07 using AcqMethod AA

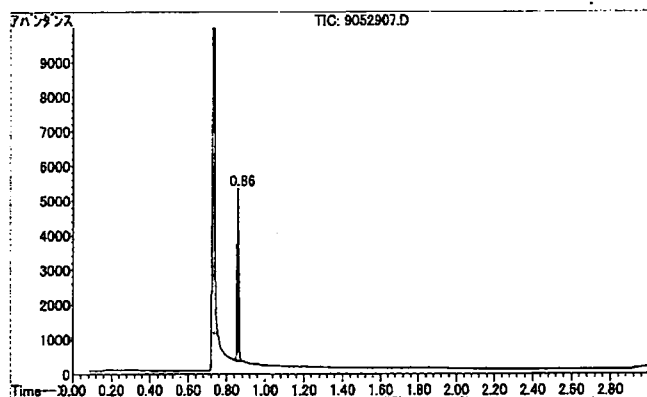


TIC: 9052611.D

ピーク#	リテンションタイム	タイプ	半値幅	面積	開始時間	終了時間
1	0.868	M	0.009	85764	0.853	0.896

(6) Standard 5.00 mg/L ; 72 Hours

Study No. : [✓]A080435 []A080436
 Date : 2009.5.29
 Operator : XXXXXXXXXX
 Sample Information: AA
 Sample Name : std 5mg/L
 Misc Info :
 File Name : C:\MSDCHEM\1\DATA\AA\9052907.D
 Acquired : 29 May 2009 12:43 using AcqMethod AA



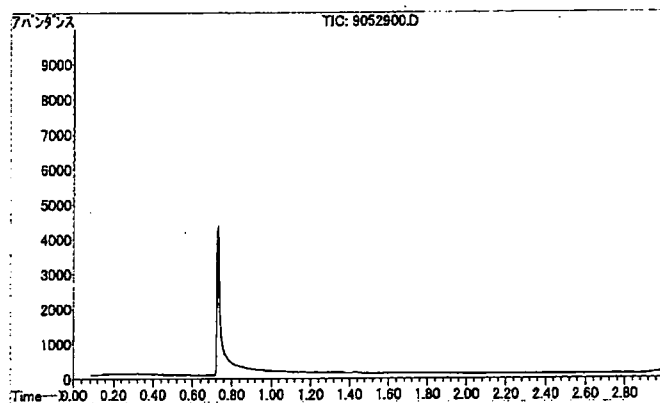
TIC: 9052907.D

ピーク#	リテンションタイム	タイプ	半値幅	面積	開始時間	終了時間
1	0.860	M	0.010	28537	0.846	0.884

Figure A-4-2 Continued

(7) Control ; 72 Hours

Study No. : ☒ A080435 [] A080436
 Date : 2009. 5. 29
 Operator : XXXXXXXXXX
 Sample Information: AA
 Sample Name : A72hC
 Misc Info :
 File Name : C:\MSDCHEM\1\DATA\AA\9052900.D
 Acquired : 29 May 2009 10:05 using AcqMethod AA

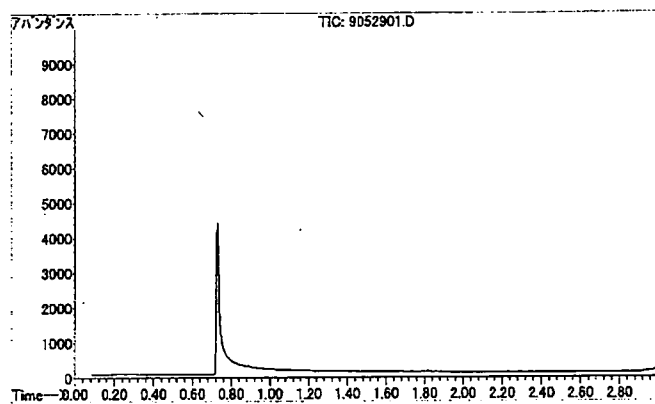


TIC: 9052900.D

ピーク#	リテンションタイム	タイプ	半値幅	面積	開始時間	終了時間
ピークが検出できません						

(8) Conc.1 ; 72 Hours

Study No. : ☒ A080435 [] A080436
 Date : 2009. 5. 29
 Operator : XXXXXXXXXX
 Sample Information: AA
 Sample Name : A72hC1
 Misc Info :
 File Name : C:\MSDCHEM\1\DATA\AA\9052901.D
 Acquired : 29 May 2009 10:28 using AcqMethod AA



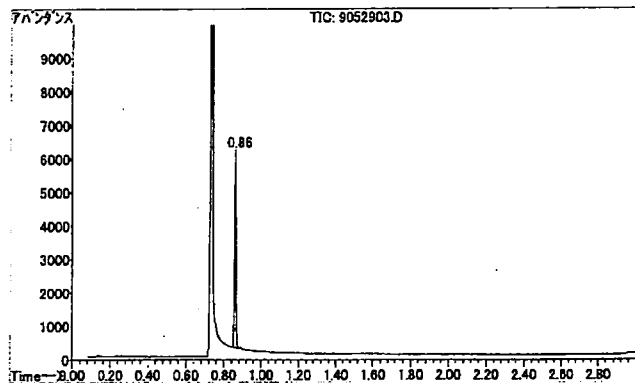
TIC: 9052901.D

ピーク#	リテンションタイム	タイプ	半値幅	面積	開始時間	終了時間
ピークが検出できません						

Figure A-4-2 Continued

(9) Conc.3 ; 72 Hours

Study No. : [✓]A080435 []A080436
 Date : 2009. 5. 29
 Operator : XXXXXXXXXX
 Sample Information: AA
 Sample Name : A72hC3
 Misc Info :
 File Name : C:\MSDCHEM\1\DATA\AA\9052903.D
 Acquired : 29 May 2009 11:13 using AcqMethod AA

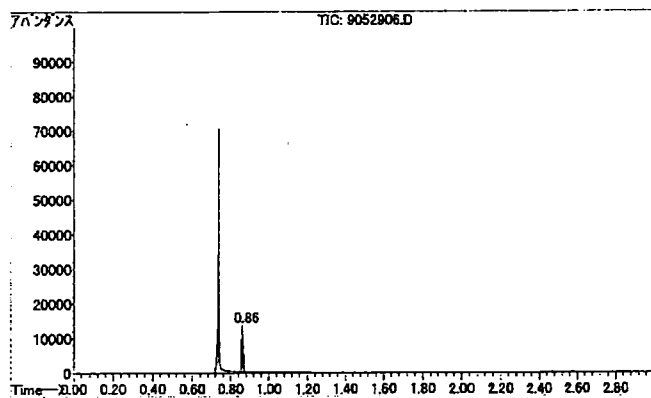


TIC: 9052903.D

ピーク#	リテンションタイム	タイプ	半値幅	面積	開始時間	終了時間
1	0.860	M	0.009	33614	0.847	0.882

(10) Conc.6 ; 72 Hours

Study No. : [✓]A080435 []A080436
 Date : 2009. 5. 29
 Operator : XXXXXXXXXX
 Sample Information: AA
 Sample Name : A72hC6
 Misc Info :
 File Name : C:\MSDCHEM\1\DATA\AA\9052906.D
 Acquired : 29 May 2009 12:21 using AcqMethod AA



TIC: 9052906.D

ピーク#	リテンションタイム	タイプ	半値幅	面積	開始時間	終了時間
1	0.859	M	0.009	76557	0.846	0.891

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
13.6	2.61	32.7
32.2	3.47	52.2
71.9	4.28	84.1
144	4.97	98.5

EC ₅₀	95%信頼区間		単位
25.8	17.4	~ 38.5	(mg/L)

分散分析

Factor	SS	DF	V	F-ratio	f(0.05,f1,f2)
Between	2639.67	1	2639.67	130.50	>18.51
Within	40.45	2	20.23		
Total	2680.13	3			

Table A-5-2 Calculation of the NOECr

Input Data Table							
	control Group1	Conc.1 Group2	Conc.2 Group3	Conc.3 Group4	Conc.4 Group5	Conc.5 Group6	Conc.6 Group7
	0.0679	0.0679	0.0658	0.0470	0.0324	0.0123	0.0006
	0.0682	0.0681	0.0654	0.0480	0.0326	0.0111	0.0023
	0.0683	0.0676	0.0641	0.0435	0.0333	0.0094	0.0002
	0.0677	*	*	*	*	*	*
	0.0693	*	*	*	*	*	*
	0.0703	*	*	*	*	*	*

Group	Samples	Mean	S.E.	S.D.	Variance		
1	6	0.0686	0.0004	0.0010	0.0000		
2	3	0.0679	0.0001	0.0003	0.0000		
3	3	0.0651	0.0005	0.0009	0.0000		
4	3	0.0462	0.0014	0.0024	0.0000		
5	3	0.0328	0.0003	0.0005	0.0000		
6	3	0.0109	0.0008	0.0015	0.0000		
7	3	0.0010	0.0006	0.0011	0.0000		


Method	vs	Side	Stat.	0.05	0.01	0.001 Prob.	
Bartlett test		0	8.7042	12.5916	<16.8119	22.4577	0.1909

Method	vs	Side	Stat.	0.05	0.01	0.001 Prob.	
1-way ANOVA		0	1,798.8509	>2.6987	4.1015	6.5625	-2.53E-18

Method	vs	Side	Stat.	0.05	0.01	0.001 Prob.	
Williams(1971,1972,1977)	1 vs 2	2	0.8750	<2.1100	<2.8980	999.9900	999.9900
Williams(1971,1972,1977)	1 vs 3	2	4.1026	>2.1810	>2.9510	999.9900	999.9900 **
Williams(1971,1972,1977)	1 vs 4	2	26.1906	>2.2040	>2.9660	999.9900	999.9900 **
Williams(1971,1972,1977)	1 vs 5	2	41.8233	>2.2150	>2.9730	999.9900	999.9900 **
Williams(1971,1972,1977)	1 vs 6	2	67.2944	>2.2220	>2.9770	999.9900	999.9900 **
Williams(1971,1972,1977)	1 vs 7	2	78.8439	>2.2260	>2.9800	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	acetaldehyde *1		
別 名	(略称：A A) *2		
C A S 番 号	75-07-0 *1		
構 造 式 又 は 示 性 式	<div style="text-align: center;">*3  </div>		
分 子 量	44.05		
試 験 に 供 し た 物 質 の 純 度 (%)	99.57 (GC)		
試 験 に 供 し た 物 質 の ロ ッ ト 番 号	99896TJ		
不 純 物 の 名 称 及 び 含 有 率	—		
蒸 気 圧	1008.5 hPa at 20℃ 1451 hPa at 30℃ 2660 hPa at 55℃		
対 水 溶 解 度	Completely miscible		
1-オクタノール/水 分配係数	Log Pow 0.5		
融 点	-125℃		
沸 点	21℃ at 1013 hPa		
常 温 に お け る 性 状	無色透明液体		
安 定 性	安定		
溶媒に対する溶解度等	溶媒	溶解度	溶媒中の安定性
	—	—	—

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

*1 環境省資料による。

*2 三菱化学メディエンス株式会社にて決定。

*3 JSTの有機化合物辞書DB「日本化学物質辞書」検索サービス
(<http://nikkajiweb.jst.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	ガスクロマトグラフ質量分析（GC/MS）法
前処理法	<p>暴露開始時：各試験区毎に藻類を添加していない予備容器の中層より採取</p> <p>精製水 + 試験液* 10 mL（精製水との合計） 混合 分析試料 GC/MS測定</p> <p>暴露開始後 24, 48および 72時間：各試験区毎に藻類を添加した予備容器の中層より採取</p> <p>精製水 + 試験培養液*10 mL（精製水との合計） 混合 分析試料 GC/MS測定</p> <p>*：精製水と試験液および試験培養液の比率を変えることによって被験物質濃度を検量線範囲に入れる。検量線範囲に入ると予想される試験区は、試験培養液 10 mL（精製水＝ 0 mL）とした。</p>
定量条件	別紙－1 参照

3. 試験材料及び方法

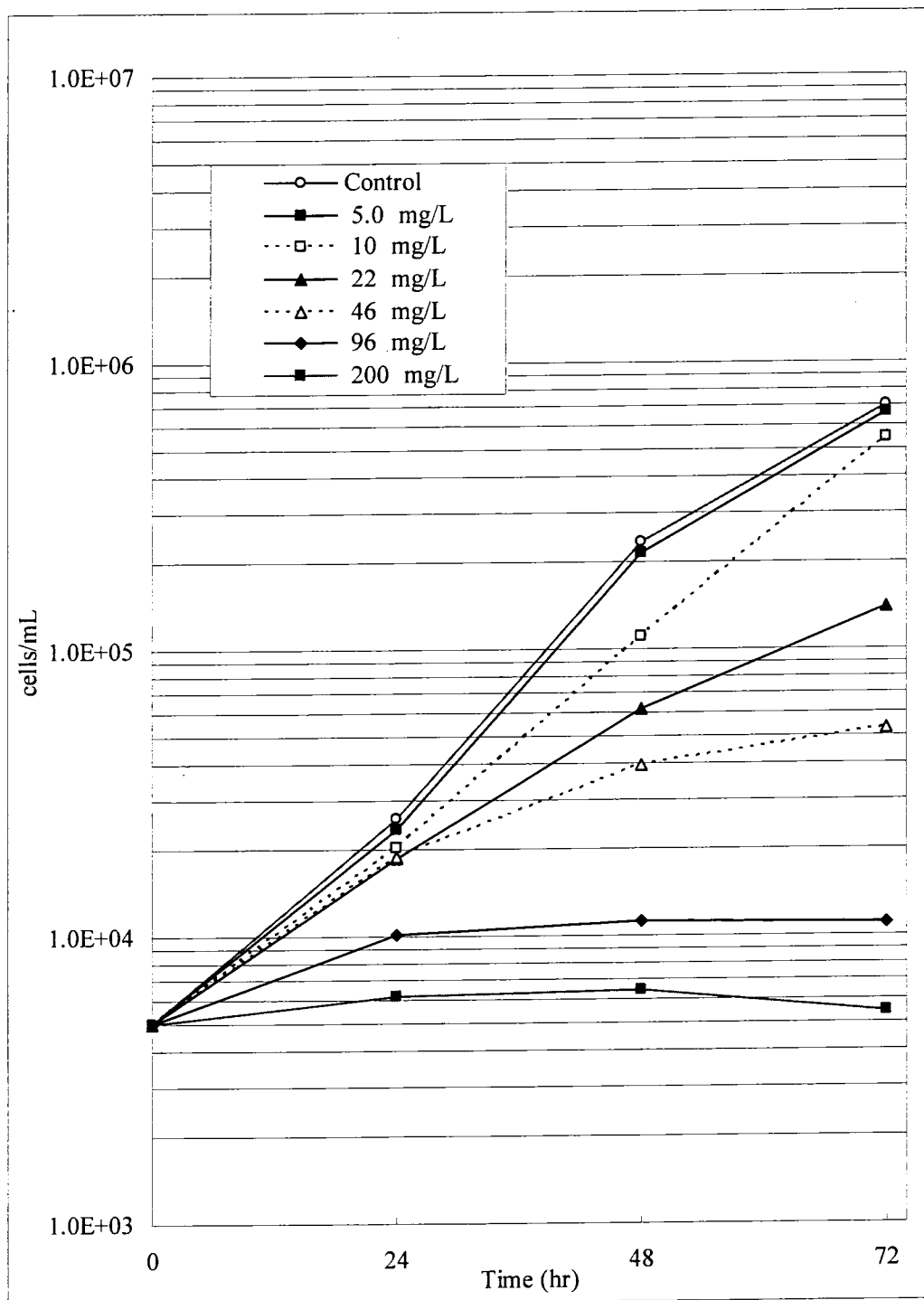
項 目		内 容	
試験生物	種 (学名・株名)	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> ATCC22662	
	入手先	American Type Culture Collection	
	対照物質への感受性 (EC50) (対照物質名)	72時間 ErC50 = 0.823 ± 0.0871 mg/L, n=18 重クロム酸カリウム, 試薬特級	
前培養	前培養の期間	2009年 5月22日 ~ 2009年 5月25日	
	培地名	試験ガイドライン推奨培地	
	環境条件 (水温, 光強度)	22℃, 60~65 μE/m ² /s	
試験条件	試験容器	500 mLガラス製共栓付三角フラスコ (IWAKI製)	
	培地名	試験ガイドライン推奨培地	
	暴露期間	2009年 5月26日~2009年 5月29日	
	試験濃度 (設定値)	対照区, 5.0, 10, 22, 46, 96, 200 mg/L 公比 : 2.1	
	初期細胞濃度	5×10 ³ 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 (密閉系), 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)		60~65 μE/m ² /s 白色蛍光灯で連続照射 (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)= 25.8 mg/L (95%信頼区間：17.4～38.5 mg/L) NOECr(0-72h)= 1.86 mg/L
試験濃度	1. 設定値 ②. 実測値
考察及び 特記事項	<p>被験物質濃度は、暴露開始時の試験液において低濃度区側から5.06, 9.32, 20.1, 42.9, 102, 178 mg/Lであり、それぞれの設定値に対する割合は 89～106 %であった。また、暴露開始後 72時間の試験培養液においては、5.0 mg/L 濃度区（濃度区1）では、被験物質が検出されず（<0.05 mg/L）、10～200 mg/L 濃度区（濃度区2～6）では、それぞれが0.205, 5.89, 26.7, 67.8 および131 mg/Lであった。暴露期間中、被験物質の濃度減少が認められ、藻類が生長している5.0, 10 および22 mg/L 濃度区で、特に著しい濃度減少が認められた。本被験物質は、低いlog kowを示し、微生物分解が良好であることから、藻類の生長による被験物質の分解等の変化が生じたと思われる。</p> <p>また、被験物質濃度は、暴露開始後 24 時間でそれぞれの設定値に対する割合が 61～70 %であり、全ての濃度区で一定の濃度減少が認められた。46, 96 および 200 mg/L 濃度区では、その後被験物質濃度を維持した。本被験物質は揮発性を有し、暴露の初期に水中からの揮散があったことが推察された。</p>

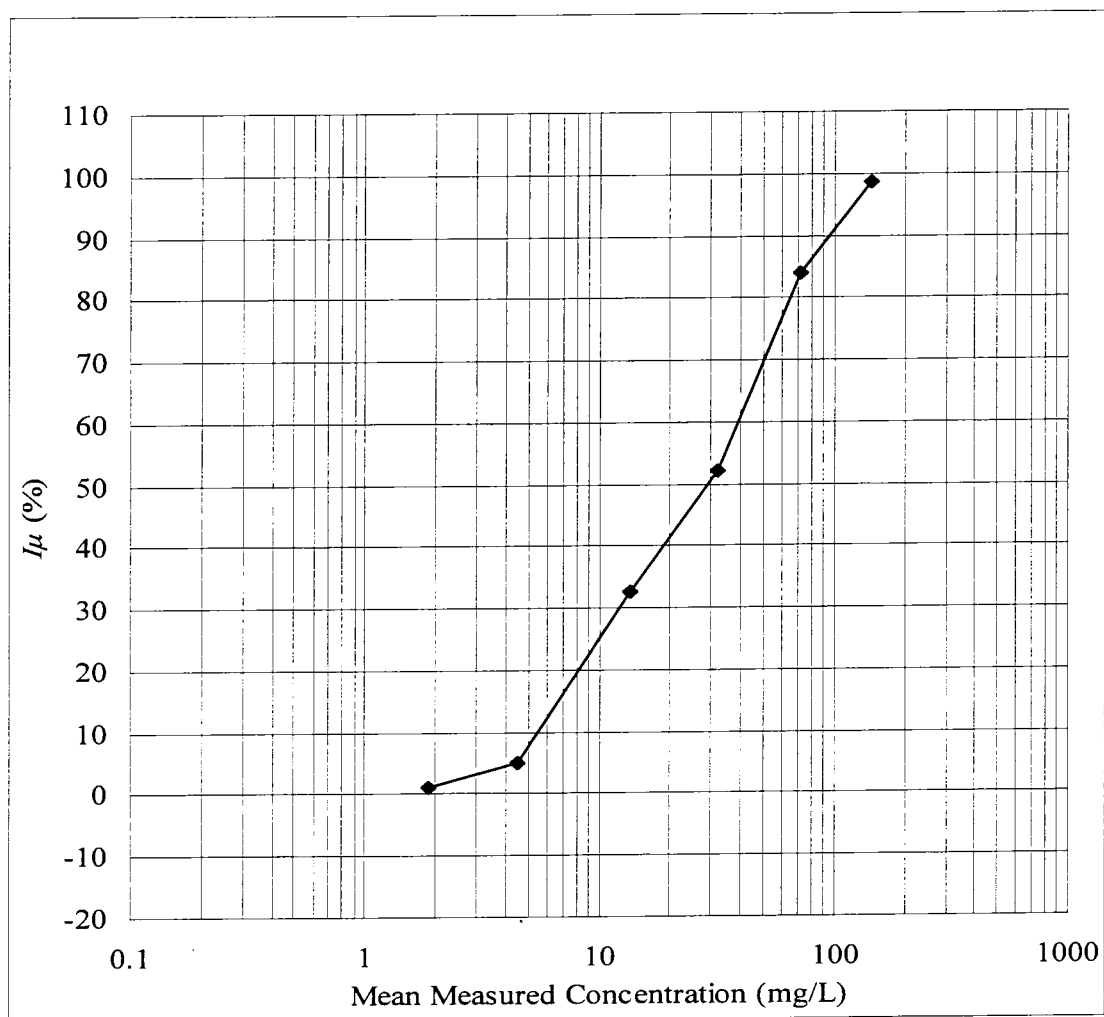
5. 藻類の生長曲線および濃度－生長阻害率曲線

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



Value in legend is given in the nominal concentration.

Figure 2 Concentration-Inhibition Curve Based on I_μ 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	副主任研究員 [REDACTED]
	経 験 年 数	6年
試験番号	A080435	
試験期間	2009年 5月22日～2009年 7月28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 ガスクロマトグラフ質量分析（GC/MS）計 測定条件

装置

ガスクロマトグラフ質量分析計（ヘッドスペースサンプラ付き）No.2

ガスクロマトグラフ(GC)： Agilent Technologies 6890N 型

ヘッドスペースサンプラ(HSS)： Agilent Technologies G1888 型

質量選択検出器(MSD)： Agilent Technologies 5973 *inert* 型

データ処理部： MSD ケミステーション (Windows XP)

[GC 条件]

カラム： Agilent INNOWAX 30 m×0.25 mm×0.25 μm

キャリアーガス： ヘリウム 1.0 mL/min(Constant flow)

ストップタイム： 12 min

オープン温度： 40℃(2 min)→5℃/min→50℃(2 min)→15℃/min→140℃

注入口温度： 250℃

MS インターフェース温度： 280℃

注入条件： スプリット (スプリット比 = 100 : 1)

注入量： 1.0 mL (HSS サンプルループ容量)

[HSS 条件]

温度条件： Oven 45℃, LOOP 120℃, Transfer Line 200℃

イベント時間： GC Cycle Time 20 min

Vial Equilibration Time 20 min

Pressurization Time 0.2 min

Loop Fill Time 0.03 min

Loop Equilibration Time 0.2 min

Inject Time 1 min

バイアルパラメータ： Shake (HIGH)

[MSD 条件]

温度条件： イオン源 230℃, 四重極マス・フィルタ 150℃

SIM (Selected Ion Monitoring) 条件：

Filament off 3 min

Quant ion m/z 44.0