

本写しは原本と相違ありません

(株)三菱化学安全科学研究所
横浜研究所 運営管理者

環境省殿

最 終 報 告 書

イソプレンの藻類 (*Selenastrum capricornutum*)
に対する生長阻害試験

(試験番号：A 0 0 0 4 6 4 - 1 G)

2 0 0 1 年 6 月 2 9 日作成

株式会社三菱化学安全科学研究所

本写しは原本と相違ありません

(株)三菱化学安全科学研究所
横浜研究所 運営管理者

修正番号：01

最終報告書修正書

試験委託者：環境省

表題：イソプレンの藻類 (*Selenastrum capricornutum*) に対する生長阻害試験

試験番号：A000464-1G

修正内容

修正箇所：5頁 10. 保管

修正前：5) 被験物質

修正後：5) 被験物質は保管しない（沸点がきわめて低く、正常な保管が困難なため）

理由

記載ミス

試験実施施設：株式会社三菱化学安全科学研究所 横浜研究所

2001年12月26日 作成 試験責任者

2001年12月26日 確認 信頼性保証業務担当者

2001年12月26日 承認 運営管理者

陳 述 書

株式会社三菱化学安全科学研究所
横浜研究所

試験委託者： 環境省

表題： イソプレンの藻類 (*Selenastrum capricornutum*) に対する生長阻害試験

試験番号： A 0 0 0 4 6 4 - 1 G

本試験は環境省のG L P規則に従って実施したものである。

2 0 0 1 年 6 月 2 9 日

運営管理者

[Redacted Signature]

[Redacted Stamp]

信 頼 性 保 証 証 明

株式会社三菱化学安全科学研究所
横浜研究所

試験委託者： 環境省

表題： イソプレンの藻類 (*Selenastrum capricornutum*) に対する生長阻害試験

試験番号： A 0 0 0 4 6 4 - 1 G

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
試験計画書監査		2 0 0 0 年 1 1 月 2 2 日	2 0 0 0 年 1 1 月 2 2 日
試験の査察	試験液の調製	2 0 0 1 年 6 月 1 9 日	2 0 0 1 年 6 月 1 9 日
	藻類の投入	2 0 0 1 年 6 月 1 9 日	2 0 0 1 年 6 月 1 9 日
	藻類の観察	2 0 0 1 年 6 月 2 2 日	2 0 0 1 年 6 月 2 2 日
最終報告書監査		2 0 0 1 年 6 月 2 9 日	2 0 0 1 年 6 月 2 9 日

2 0 0 1 年 6 月 2 9 日


信頼性保証業務担当者：

■■■■■■■■■■

■■■■■■■■■■

■■■■■■■■■■
■■■■■■■■■■
■■■■■■■■■■

試験実施概要

1. 表題： イソプレンの藻類 (*Selenastrum capricornutum*) に対する生長阻害試験
2. 試験目的： 被験物質の藻類 (*Selenastrum capricornutum*) に対する生長阻害試験を72時間行い、50%生長阻害濃度 (EC50) および最大無作用濃度 (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) に準拠して実施した。
4. 適用GLP：本試験は環境省のGLP規則に準拠した。
5. 試験委託者
名称： 環境省
住所： 〒100-8975 東京都千代田区霞が関一丁目2-2
委託担当者： 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：
名称： 株式会社三菱化学安全科学研究所
所在地： 〒105-0014 東京都港区芝二丁目1-30
7. 試験施設：
名称： 株式会社三菱化学安全科学研究所 横浜研究所
所在地： 〒227-0033 神奈川県横浜市青葉区鴨志田町1000番地

「10. 保管」について

次頁の「10. 保管」には,

5) 被験物質

と記載されているが, これは記載ミスのため,

5) 被験物質は保管しない (沸点がきわめて低く, 正常な保管が困難なため)

と読み替えるものとする。

試験実施施設： 株式会社三菱化学安全科学研究所 横浜研究所

2001年12月26日 作成 試験責任者



8. 試験関係者：

試験責任者

[REDACTED]

(2001年 6月29日)

試験担当者

[REDACTED]

(2001年 6月29日)

分析担当者

[REDACTED]

(2001年 6月29日)

9. 試験期間： 試験開始日 2000年11月22日
試験終了日 2001年 6月29日
暴露期間 2001年 6月19日～2001年 6月22日

10. 保管：

試験に関する下記の記録及び試資料は、最終報告書作成後10年間、当研究所試資料保管施設に保管する。その後の保管については別途協議の上、定める。

- 1) 試験計画書
- 2) 最終報告書
- 3) 生データ
- 4) 信頼性保証業務担当者の監査・査察記録
- 5) 被験物質 訂正
- 6) その他必要なもの

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 被験物質の確認およ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	10
3.3 試験容器および藻類培養試験装置等	11
3.4 試験濃度の設定	11
3.5 試験液の調製	12
3.6 試験液の分析	12
3.7 試験操作	12
4 結果の算出	13
4.1 生長曲線	13
4.2 生長阻害率の算出	13
4.3 EC50およびNOECの算出に用いる被験物質濃度の決定	14
4.4 50%生長阻害濃度 (EC50) の算出	14
4.5 最大無作用濃度 (NOEC)	15
5 結果および考察	16
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	16
5.2 試験液中の被験物質濃度	16
5.3 生長曲線	16
5.4 50%生長阻害濃度 (EC50) および最大無作用濃度 (NOEC)	17
5.5 温度およびpH	17
Table 1~6	18~22
Figure 1~3	23~25
付属資料－1 OECD培地の組成	26~27
付属資料－2 試験液の分析	28~37

要 旨

試験委託者

環境省

表 題

イソプレンの藻類 (*Selenastrum capricornutum*) に対する生長阻害試験

試験番号

A 0 0 0 4 6 4 - 1 G

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)に準拠して実施した。

- 1) 被験物質: イソペン
- 2) 暴露方式: 止水式(密閉), 振とう培養(100rpm)
- 3) 供試生物: *Selenastrum capricornutum* (ATCC22662)
- 4) 暴露期間: 72時間
- 5) 試験濃度(設定値):
対照区, 10.0, 22.0, 46.0, 100, 220, 460, 1000 mg/L
(公比: 約2.2)
(被験物質濃度が藻類投入時に最高濃度区で, 400 mg/Lの濃度が保持できるように原液の調製した。)
- 6) 試験液量: 100 mL (OECD培地) / 容器
- 7) 連数: 3 容器 / 試験区
- 8) 初期細胞濃度: 1×10^4 cells/mL
- 9) 試験温度: 23 ± 2 °C
- 10) 照明: 4000 lux (±20%の変動内, フラスコ液面付近) で連続照明
- 11) 分析法: ガスクロマトグラフィー (GC)

結 果

1) 試験液中の被験物質濃度

試験液の分析の結果、暴露開始時の測定値の設定値に対する割合が±20%を超える値があったため、下記の阻害濃度の算出には開始時の測定値を用いた。

2) 生長曲線下面積の比較による阻害濃度

50%生長阻害濃度 EbC_{50} (0-72) : 239 mg/L (95%信頼区間：算出不可)

最大無作用濃度 $NOEC_b$ (0-72) : 82.7 mg/L

3) 生長速度の比較による阻害濃度

50%生長阻害濃度 ErC_{50} (24-48) : 339 mg/L (95%信頼区間：算出不可)

最大無作用濃度 $NOEC_r$ (24-48) : 168 mg/L

50%生長阻害濃度 ErC_{50} (24-72) : >383 mg/L (95%信頼区間：算出不可)

最大無作用濃度 $NOEC_r$ (24-72) : 168 mg/L

1 被験物質

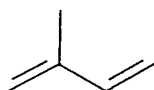
1.1 名称, 構造式および物理化学的性状

名 称: イソプレン (略称 I S P)

別 名: 2-メチル-1, 3-ブタジエン

CAS No.: 78-79-5

構造式:



分子式: C_5H_8

分子量^{*1}: 68.11

沸点^{*2}: 34.1℃

融点^{*2}: -145.9℃

水溶解度^{*1}: 300 mg/L (20℃)

比重^{*2}: 0.681 (20℃)

オクタノール/水分配係数 (log P) ^{*2}: 2.30

安定性^{*2}: 酸化剤または酸と接触すると激しく反応する。

その他^{*2}: 揮発性, 特異臭

*1: Handbook of Environmental Data on Organic Chemicals, 3rd ed. ed. by

Verschuieren, K., Von Nostrand Reinhold Company, New York (1996)

*2: 供給者提供資料

1.2 供試試料

純度^{*1}: 99.3% (GC法)

安定剤として 4-*tert*-ブチルヒドロキノンを約50ppm含有

ロット番号^{*1}: 207D2183

供給者: XXXXXXXXXX

受領量^{*1}: 25 mL

受領日: 2000年11月14日

外観^{*1}: 無色液体

*1: 供給者提供資料

1.3 被験物質の確認および保管条件下での安定性

入手した被験物質について赤外吸収スペクトルを測定し、被験物質の特性が認められることを確認した。試験期間中、被験物質は当研究所の冷蔵庫に保管した。また、試験終了時にも赤外吸収スペクトルを測定し、試験開始時に測定したスペクトルと比較した。その結果、スペクトルに変化はなかったことより被験物質は保管中安定であったと判断された。

2 供試生物

- 1) 和名： ムレミカズキモ（単細胞緑藻類）
- 2) 学名： *Selenastrum capricornutum*
- 3) 入手先： American Type Culture Collection
- 4) 入手株番号： ATCC22662株
- 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
- 7) 感受性の確認： 基準物質（重クロム酸カリウム，試薬特級）による72時間50%藻類生長阻害濃度（EbC50）=0.543 mg/L（この値は当研究所における1996年11月以降のEbC50値 0.285~0.529 mg/L，n=8にはほぼ一致する。）
- 8) 前培養： 前培養期間；2001年6月15日~2001年6月19日
この間、藻類は対数増殖した。（環境条件は試験と同様）

3 試験方法

3.1 試験条件

- 1) 暴露方式： 止水式（密閉），振とう培養（100rpm）
- 2) 暴露期間： 72時間
- 3) 試験液量： 100 mL（OECD培地，3.2参照）／容器
- 4) 連数： 3容器／試験区
- 5) 初期細胞濃度： 前培養した藻類 1×10^4 cells/mL
- 6) 試験温度： 23 ± 2 °C
- 7) 照明： 4000 lux（ $\pm 20\%$ の変動内，フラスコ液面付近）で連続照明

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用いた。組成表を付属資料－1に示した。

3.3 試験容器および藻類培養試験装置等

- 1) 試験容器： 500 mL容ガラス製共栓付き三角フラスコ
- 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) 粒子計数装置用電解液： シスメックス製 セルパック
- 6) pH計： 東亜電波工業製 卓上pH計 HM-40V型 No. 2
- 7) 温度計： Tasco Japan 製 TNA-120型
- 8) 照度計： トプコン製 IM-2D型

3.4 試験濃度の設定

以下の表に示す予備試験（各1連）結果に基づき、本試験濃度を次のように決定した。

また、被験物質濃度が藻類投入時に最高濃度区で、400 mg/Lの濃度が保持できるように原液の調製した。

本試験濃度：対照区，10.0，22.0，46.0，100，220，460，1000 mg/L
(公比：約 2.2)

予備試験結果

試験開始時の試験液の分析付きで予備試験を行った。

濃度 (mg/L) (設定値)	濃度 (mg/L) (測定値)	対照区に対する 72時間後の生長率 (%)
対照区	<0.0006	100
5.00	3.93	100
50.0	39.6	83
500	368	36

3.5 試験液の調製

被験物質を 1090 mg相当分である 1600 μ L 採取し、これを 1090 mLの培地で溶解し、被験物質濃度 1000 mg/Lの被験物質溶液を調製した。ただし、これは予備試験の結果より、藻類投入時に 400 mg/L程度の濃度が保持できるように調製するのが目的である。また、水溶解度は文献値では300 mg/L (20℃) であるが、当社測定値では500 mg/L (OECD培地, 23℃) (分析値: 499 mg/L) であった。

各試験容器に 100 mLの培地を入れ、被験物質溶液の添加量分を除去後、被験物質溶液を等比級数的に添加し、各試験液を調製した。対照区は培地のみとした。

調製時の試験液の状態(外観)は、全試験区において無色透明であった。

3.6 試験液の分析

暴露開始時(0hr)には各試験区3個の試験容器より試験液を 2.0 mLずつ採取して混合したものを分析試料とした。終了時(72hr)には、各試験区3個の試験容器より試験液を 2.0 mLずつ採取して混合し、藻類を遠心分離(3000rpm, 10分間)後の上澄み液を分析試料とした。

各分析試料に精製水および2-メトキシエタノールを添加混合後、GCにより分析した。各試験液の被験物質濃度は標準溶液のピーク面積との比から定量した。詳細は付属資料-2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 ± 2 °Cの培養装置に設置し試験を開始し、24, 48および72時間後に細胞濃度を測定した。細胞濃度は各試験容器より試験液 1.0 mLを採取し、粒子計数装置用電解液(セルパッ) 9.0 mLと混合した後、粒子計数装置(CDA-500)により計測した。

試験液中の藻類について、暴露開始後 0, 24および48時間には、肉眼による色調観察を、また、暴露終了時には色調観察および顕微鏡下での細胞形態観察を行った。

各試験区における試験液のpHを、暴露開始時には各試験区3容器とは別に調製した予備1容器について測定し、暴露終了時(72hr)には3容器のうち1容器(No.1)について測定した。また、細胞濃度が3容器中で2倍以上差がある場合、pHを3容器とも測定した。暴露期間中、培養装置内の温度、照度を少なくとも1日1回測定した。

4 結果の算出

4.1 生長曲線

各試験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

下記の方法（面積法および速度法）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、

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

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（ 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

4.3 EC50およびNOECの算出に用いる被験物質濃度の決定

試験液の分析の結果, 暴露開始時の測定値の設定値に対する割合により, 4.4, 4.5のEC50およびNOECの算出に用いる被験物質濃度を, 以下の表に従い決定した。

開始時の測定値の設定値に対する割合	全ての値が±20%以内	±20%を超える値がひとつでもある
算出に使用する濃度 (全試験区)	設定値	開始時の測定値

4.4 50%生長阻害濃度 (EC50) の算出

4.2で算出した面積法および速度法による生長阻害率 (I_A 値および I_m 値) を用いて, 以下の方法で50%生長阻害濃度 (EC50) を算出した。

最高濃度区における阻害率	$\geq 50\%$	$< 50\%$
EC50算出の可否	可	不可
濃度－生長阻害率曲線の記載 (片対数紙にプロット)	記載する。	記載する。
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) を行い, 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。	> 最高濃度区とする。
EC50の表記方法	I_A 値より求めた場合: EbC50 (0-72) I_m 値より求めた場合: ErC50 (24-48), ErC50 (24-72)	

4.5 最大無作用濃度 (NOEC)

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 Dunnettの多重比較検定 ($\alpha=0.05$, 両側) を行い、対照区と比較して有意差が認められない最高試験濃度を最大無作用濃度 (NOEC) とした。また、NOEC_r (24-48), NOEC_r (24-72) については、データのバラツキがあったが、藻体の生長に対し阻害を示しているとして判断した383 mg/L (設定値: 1000 mg/L) を除いて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, $\alpha=0.05$) を行い、対照区と比較して有意差が認められない最高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NOEC_b (0-72), 速度法により求めた場合は NOEC_r (24-48) またはNOEC_r (24-72) とした。

以上の統計解析には Yukms ソフトウェア Statlight「#4 多群の比較」および「#3 2群の比較」(Yukms Corp., 東京) を用いた。

5 結果および考察

5.1 試験結果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。

5.2 試験液中の被験物質濃度

暴露開始時および72時間後に試験液中の被験物質濃度を測定した。その結果をTable 1に示した。

試験液の分析 (3.6 参照) の結果、暴露開始時の測定値の設定値に対する割合が±20%を超える値があったため、以下の結果 (50%生長阻害濃度 (EC50) および最大無作用濃度 (NOEC)) には測定値を用いた。

暴露72時間の被験物質濃度は 0.138~12.3 mg/Lであり、設定値に対する割合は 1~2 %であった。濃度減少の主な原因は揮散ではないかと思われた。

5.3 生長曲線

暴露期間中の細胞濃度をTable 2および生長曲線を Figure 1に示した。

対照区における細胞濃度は72時間の培養で平均 55倍増加し、試験条件下で正常な生長を示した。各濃度区の細胞濃度は濃度の増加とともに (用量依存的に) 減少する傾向がみられた。383 mg/L (設定値 : 1000 mg/L) の濃度区で、3 容器の生長率が7倍近く異なった。これは、生物反応の差の他、水溶解度限界付近である試験液中の被験物質濃度にバラツキが生じていた可能性も懸念されるが、棄却する決定的な要因がないため棄却はしなかった。

また、対照区および 168 mg/L (設定値 : 460 mg/L) 以下の濃度区では暴露開始24時間後の観察において、肉眼的に試験液が緑色を帯びていた。その後、時間の経過とともに緑色度が増加する傾向がみられた。また、383 mg/L (設定値 : 1000 mg/L) の濃度区では72時間後の観察において、肉眼的に試験液が緑色を帯びていた。暴露終了時の顕微鏡下での細胞形態観察の結果、全濃度区において細胞形態の変化 (収縮, 膨張, 破裂等) や細胞凝集は認められず、また、対照区との相違もなかった。

5.4 50%生長阻害濃度 (EC50) および最大無作用濃度 (NOEC)

濃度区における生長阻害率を Table 3 に、50%生長阻害濃度 (EC50) および最大無作用濃度 (NOEC) を Table 4 に、濃度－阻害率曲線を Figure 2 および Figure 3 に示した。以上の結果から、以下の結論を得た。

1) 生長曲線下面積の比較による阻害濃度

Ec50 (0-72) : 239 mg/L (95%信頼区間：算出不可)

NOECb (0-72) : 82.7 mg/L

2) 生長速度の比較による阻害濃度

ErC50 (24-48) : 339 mg/L (95%信頼区間：算出不可)

NOECr (24-48) : 168 mg/L

ErC50 (24-72) : >383 mg/L (95%信頼区間：算出不可)

NOECr (24-72) : 168 mg/L

5.5 温度およびpH

72時間の暴露期間中の培養試験装置内の温度を Table 5に、試験液のpHをTable 6に示した。

培養試験装置内の温度は設定範囲 (23±2℃) 内であった。試験区のpHは暴露開始時が7.7～7.8であり、暴露終了時は8.1～10.4であった。炭酸同化が盛んに行われ藻類の生長率が高ければ、pHが1以上増加することがある。今回は、対照区および168 mg/L (設定値：460 mg/L) 以下の濃度区でpHが1以上増加した。

以 上

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

Nominal Concentration (mg/L)	Measured Concentration (mg/L)			
	0 Hour	Percent of Nominal	72 Hours	Percent of Nominal
Control	<0.0004	---	<0.0004	---
10.0	4.54	45	0.138	1
22.0	9.29	42	0.297	1
46.0	20.1	44	0.714	2
100	34.8	35	1.27	1
220	82.7	38	3.11	1
460	168	37	6.63	1
1000	383	38	12.3	1

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

Nominal Concentration mg/L	Vessel No.	Cell Densities (cells/mL)			
		0 Hour	24 Hours	48 Hours	72 Hours
Control	1	10000	62200	300800	539800
	2	10000	52300	243800	555800
	3	10000	47500	236800	544800
	Average	10000	54000	260500	546800
	SD	0	7500	35100	8200
10.0	1	10000	55700	258800	550800
	2	10000	53000	247800	561800
	3	10000	57100	287800	585800
	Average	10000	55300	264800	566100
	SD	0	2100	20700	17900
22.0	1	10000	53600	253800	544800
	2	10000	52700	242800	542800
	3	10000	47400	233800	530800
	Average	10000	51200	243500	539500
	SD	0	3400	10000	7600
46.0	1	10000	54000	249800	559800
	2	10000	49900	239800	541800
	3	10000	43600	222800	497800
	Average	10000	49200	237500	533100
	SD	0	5200	13700	31900
100	1	10000	55100	257800	550800
	2	10000	42200	218800	499800
	3	10000	45100	204800	459800
	Average	10000	47500	227100	503500
	SD	0	6800	27500	45600
220	1	10000	53300	239800	528800
	2	10000	47200	235800	496800
	3	10000	45200	237800	492800
	Average	10000	48600	237800	506100
	SD	0	4200	2000	19700
460	1	10000	47800	213800	401800
	2	10000	46400	220800	397800
	3	10000	46600	219800	430800
	Average	10000	46900	218100	410100
	SD	0	800	3800	18000
1000	1	10000	11400	19600	54600
	2	10000	14900	48400	199800
	3	10000	10900	14000	28000
	Average	10000	12400	27300	94100
	SD	0	2200	18500	92500

SD= Standard deviation

Table 3. Percent Growth Inhibition of *Selenastrum capricornutum*

Nominal Conc. (Measured Conc. at 0Hr)		Area under the growth curves		Growth Rate			
mg/L	No.	Area A (0-72h)	Inhibition (%) * ₁ I A (0-72h)	Rate μ (24-48h)	Inhibition (%) * ₁ I m (24-48h)	Rate μ (24-72h)	Inhibition (%) * ₁ I m (24-72h)
Control	1	14590000		0.0657		0.0450	
	2	13176000		0.0641		0.0492	
	3	12761000		0.0669		0.0508	
	Average SD	13509000 959000	-	0.0656 0.0014	-	0.0483 0.0030	-
10.0 (4.54)	1	13558000		0.0640		0.0477	
	2	13361000		0.0643		0.0492	
	3	14707000		0.0674		0.0485	
	Average SD	13875000 727000	-2.7	0.0652 0.0019	0.6	0.0485 0.0008	-0.4
22.0 (9.29)	1	13315000		0.0648		0.0483	
	2	13006000		0.0637		0.0486	
	3	12518000		0.0665		0.0503	
	Average SD	12946000 402000	4.2	0.0650 0.0014	0.9	0.0491 0.0011	-1.7
46.0 (20.1)	1	13409000		0.0638		0.0487	
	2	12854000		0.0654		0.0497	
	3	11767000		0.0680		0.0507	
	Average SD	12677000 835000	6.2	0.0657 0.0021	-0.2	0.0497 0.0010	-2.9
100 (34.8)	1	13519000		0.0643		0.0480	
	2	11662000		0.0686		0.0515	
	3	10915000		0.0630		0.0484	
	Average SD	12032000 1341000	10.9	0.0653 0.0029	0.5	0.0493 0.0019	-2.1
220 (82.7)	1	12780000		0.0627		0.0478	
	2	12154000		0.0670		0.0490	
	3	12106000		0.0692		0.0498	
	Average SD	12347000 376000	8.6	0.0663 0.0033	-1.1	0.0489 0.0010	-1.2
460 (168)	1	10500000		0.0624		0.0444	
	2	10586000		0.0650		0.0448	
	3	10963000		0.0646		0.0463	
	Average SD	10683000 246000	20.9**	0.0640 0.0014	2.4	0.0452 0.0010	6.4
1000 (383)	1	799000		0.0226		0.0326	
	2	3317000		0.0491		0.0541	
	3	334000		0.0104		0.0197	
	Average SD	1483000 1605000	89.0**	0.0274 0.0198	58.2++	0.0355 0.0174	26.5++

*₁ Values are the percent inhibition relative to the control.

SD Standard deviation

* Indicates a significant difference ($\alpha=0.05$) from the control.
(There was no sign in this test.)** Indicates a significant difference ($\alpha=0.01$) from the control.

++ Statistical comparison test could not be performed for this concentration.

However, we concluded that this concentration level showed adverse effect on Alga growth.

Table 4. Calculated EC50 and NOEC

Based on I_A (0-72h) value (Areas under growth curve)		
EcC50 (0-72) (mg/L)	95-Percent Confidence Limits (mg/L)	NOECb (0-72) (mg/L)
239* ¹	--	82.7
Based on I_m (24-48h) value (Growth rates)		
ErC50 (24-48) (mg/L)	95-Percent Confidence Limits (mg/L)	NOECr (24-48) (mg/L)
339* ¹	--	168
Based on I_m (24-72h) value (Growth rates)		
ErC50 (24-72) (mg/L)	95-Percent Confidence Limits (mg/L)	NOECr (24-72) (mg/L)
>383	--	168

The EC50 values and associated 95% confidence limits were determined by least squares linear regression analysis of the logarithm of measured test concentration against percent growth inhibition relative to the control.

*1 using the concentrations of 168 and 383 mg/L in the regression analysis
 -- not calculated

The NOEC values were determined by an analysis of variance (ANOVA), Dunnett 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 were at $\alpha=0.05$, except Bartlett test, which was at $\alpha=0.01$.

Further, the NOECr (24-48), NOECr (24-72) values were determined by an analysis of variance (ANOVA), subsequent to Bartlett test for homogeneity of variances, after excluding the 383 mg/L values. Statistical analyses were performed using Yukms Statlight #4 software (Yukms Corp., Tokyo) and all tests of significance were at $\alpha=0.05$, except Bartlett test, which was at $\alpha=0.01$.

Table 5. Temperature in the Incubation Chamber

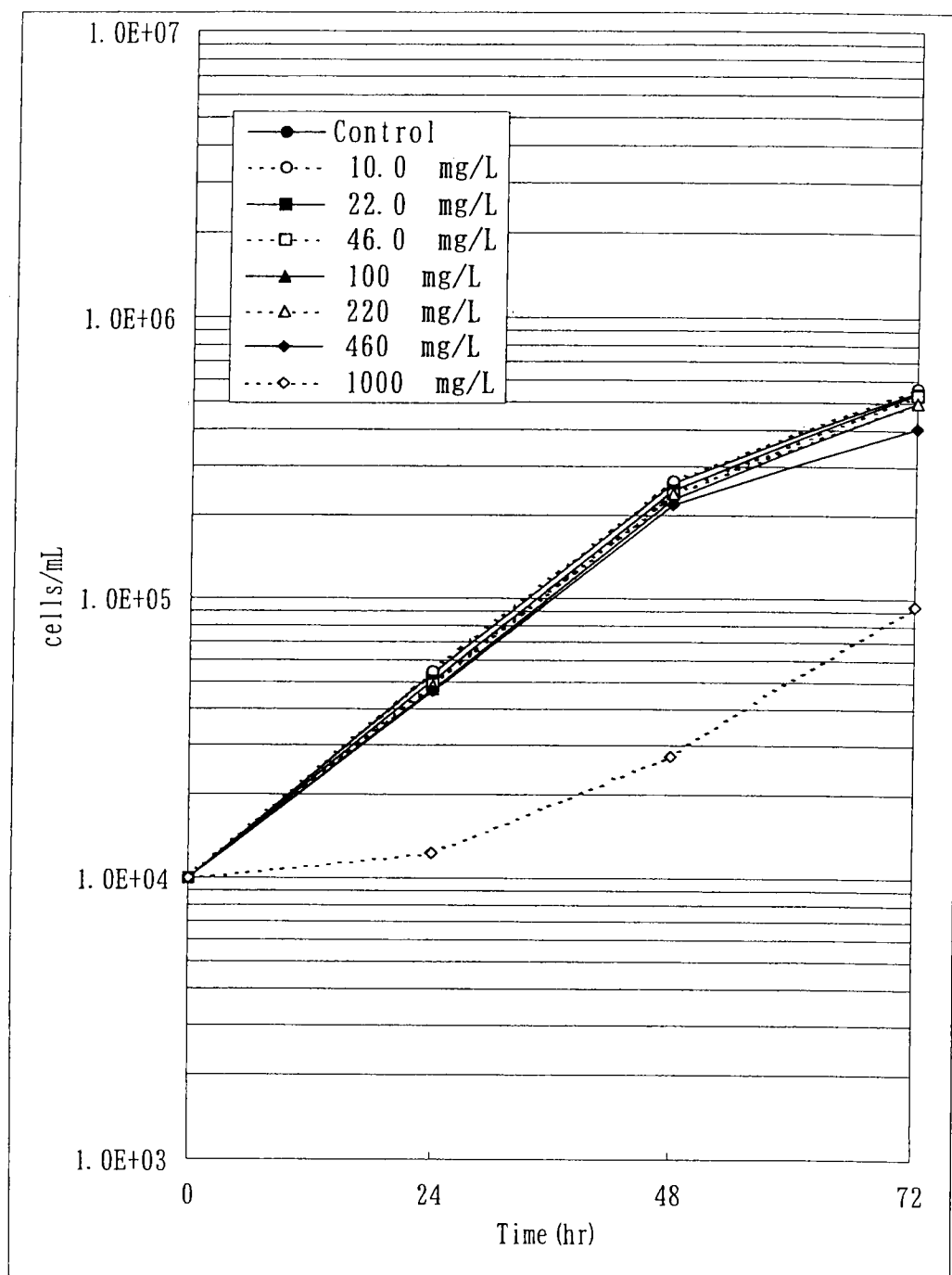
Exposure Period (Hours)	Temperature (°C)
0	23.5
24	22.1
48	23.5
72	23.0

Table 6. pH Values

Nominal Concentration mg/L	pH		
	0 Hour	72 Hours (Vessel No)	
Control	7.7	10.4	(1)
10.0	7.7	10.4	(1)
22.0	7.7	10.4	(1)
46.0	7.7	10.4	(1)
100	7.8	10.4	(1)
220	7.8	10.4	(1)
460	7.8	10.4	(1)
1000	7.8	8.1	(1)
		8.6	(2)
		8.1	(3)

*1 : pH in each vessel was measured because the cell densities among three vessels after 72hours were different more than twice.

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



Values in legend are given in the nominal concentration.

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

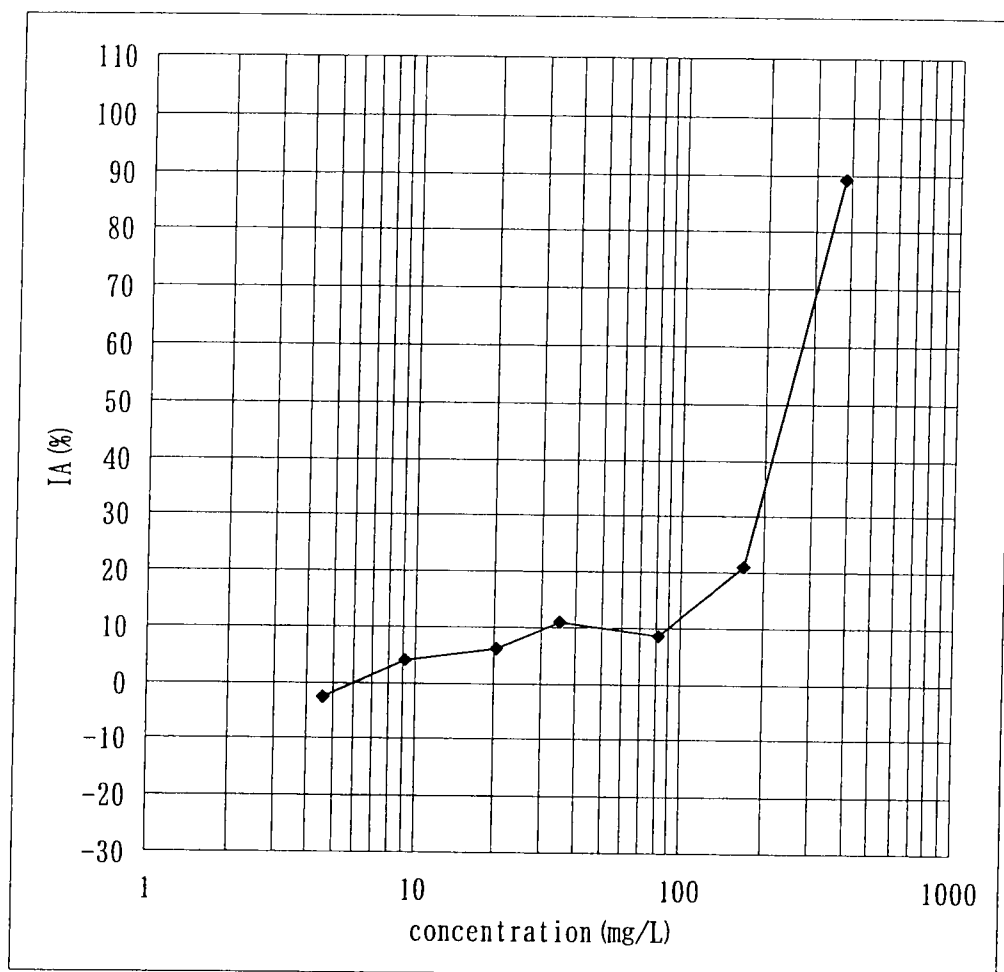
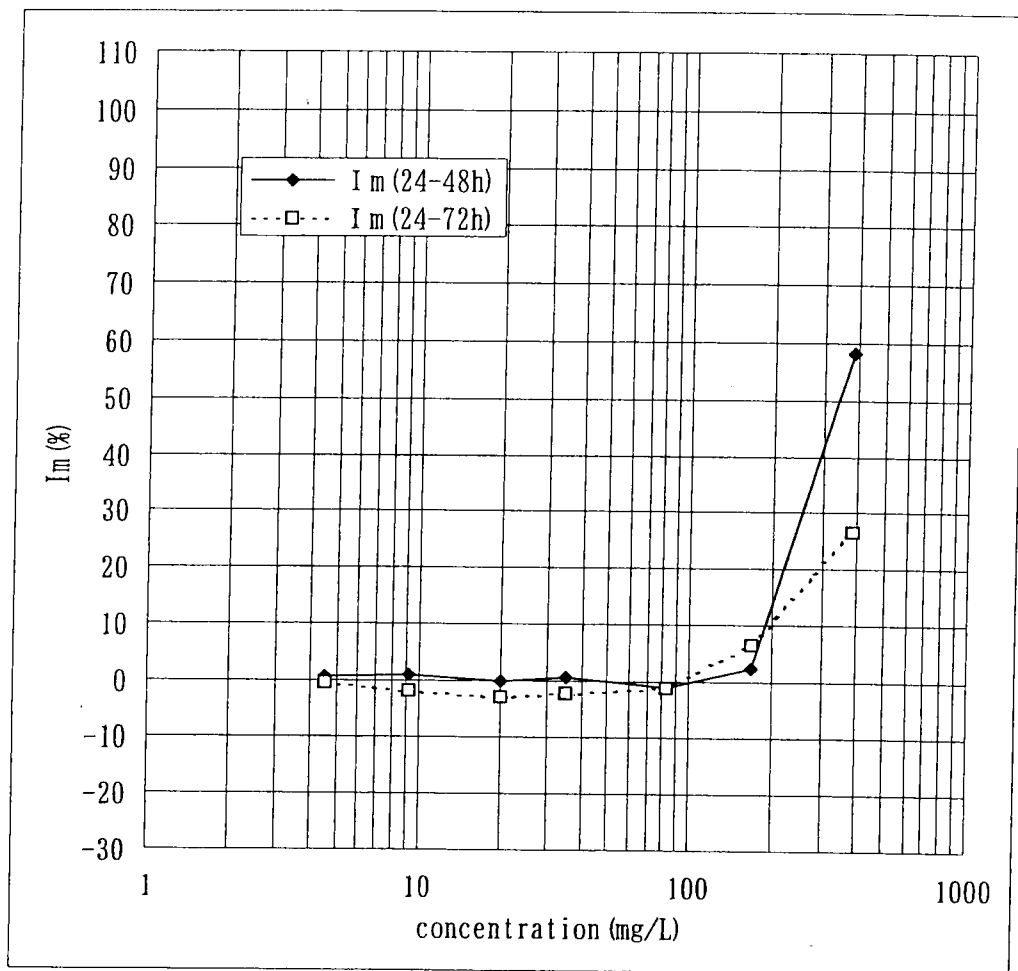


Figure 3 Concentration-Inhibition Curve Based on I_m values Calculated from the Growth Rates



付属資料－ 1

OECD培地の組成

Table A-1 OECD medium

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

付属資料－ 2

試験液の分析

1 試験液の分析方法

- 1) 各濃度区 3 個の試験容器より試験液 2.0 mL ずつを採取して 10 mL 容ガラス沈殿管で混合した。

暴露開始時はこれを分析試料とした。

暴露終了時はこれを遠心分離* (3000 rpm, 10分間) し、藻類を分離した上澄み液を分析試料とした。

*装置:日立製CR21E

- 2) 対照区の分析試料は5.00 mLをバイアルに採取し、2-メトキシエタノール 50 μ L 添加混合後、GCにより分析した。10.0~46.0 mg/Lの濃度区の分析試料は予め精製水 4.50 mLの入ったバイアルに 0.5 mL採取し (10倍希釈)、2-メトキシエタノール 50 μ L添加混合後、GCにより分析した。100~1000 mg/Lの濃度区の分析試料は予め精製水 4.95 mLの入ったバイアルに 0.5 mL採取し (100倍希釈)、2-メトキシエタノール 50 μ L添加混合後、GCにより分析した。

- 3) 2-メトキシエタノールで調製した標準溶液 50 μ Lを、予め精製水 5.00 mLの入ったバイアルに採取し (101倍希釈) 混合後、GCにより分析した。

- 4) 各試験液の被験物質濃度は、標準溶液のピーク面積との比から定量した。

2 ガスクロマトグラフィー (GC) 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ブラ付き), No. 1 (SOP/INS/254)

ガスクロマトグラフ: Agilent (Hewlett Packard) 6890

ワークステーション: Agilent/ケミステーション (Windows NT)

注入口: スプリット/スプリットレス

ヘッドスペースサンブラ (HSS): Agilent 7694

質量選択検出器 (MSD): Agilent 5973N MSD (Mass Selective Detector)

(条件)

GC条件

カラム: DB-5MS, 60 m x 0.25 mm (i.d.), $df=1.0\mu m$

キャリアーガス: ヘリウム (constant flow)

流速: 1.0 mL/min

カラムオープン温度: 40°C (5 min.) \rightarrow 20°C/min. \rightarrow 140°C (3 min.)

注入口温度: 200°C (Front), MSインターフェース温度: 200°C

注入方法: Split, Split ratio=1:250

試料注入量: 3.0 mL (HSSサンプリング容量)

HSS条件

温度条件: Oven=60°C, Loop=120°C, Transfer Line=200°C

イベント時間: Vial Equilibration Time=20分

Pressurization Time=0.2分

Loop Fill Time=0.03分

Loop Equilibration Time=0.2分

Inject Time=0.2分

バイアルパラメータ: Shake=2

MSD条件

温度条件: イオン源温度=150°C, 四重極マス・フィルタ温度=230°C

SIM (Selected Ion Monitoring) 条件:

Solvent Delay=6 min.

Quant ion=68 m/z

Qualifier ion=non

3 検量線

被験物質の1000 mg/L 2-メトキシエタノール溶液を調製し、2-メトキシエタノールで順次希釈し、0, 1.00~1000 mg/Lの標準溶液を調製した。この標準溶液を50 μ L採取し5 mLの精製水に添加したものを分析サンプルとしGCで測定した。横軸に濃度を (mg/L), 縦軸にピーク面積 (count) をとり、検量線を作成した。検量線はほぼ原点を通る直線となり、最小二乗法による直線回帰式の相関係数は1.000と良好であった。

4 検出限界

最小検出ピーク面積を 1000 countに設定し、これに相当する試験液中の被験物質濃度 0.0004 mg/Lを検出限界とした。

5 添加回収試験

分析前処理は、「1 試験液の分析方法」に示したように試験液と2-メトキシエタノールを混合する操作だけであるので添加回収試験の必要はなかった。したがって、回収率の補正は行わなかった。

Figure A-2-1 Calibration Curve

Input Data		
No.	Concentration (mg/L)	Peak Area (count)
1	0.0	0
2	1.00	30919
3	2.00	56573
4	5.00	149135
5	10.0	294510
6	20.0	619337
7	50.0	1612919
8	100	3351277
9	200	6510411
10	500	17209551
11	1000	32736022

Each 2-methoxyethanol standard solution was added to 100-fold volume of water before injection.

$$Y = 33,057X$$

$$r = 1.000$$

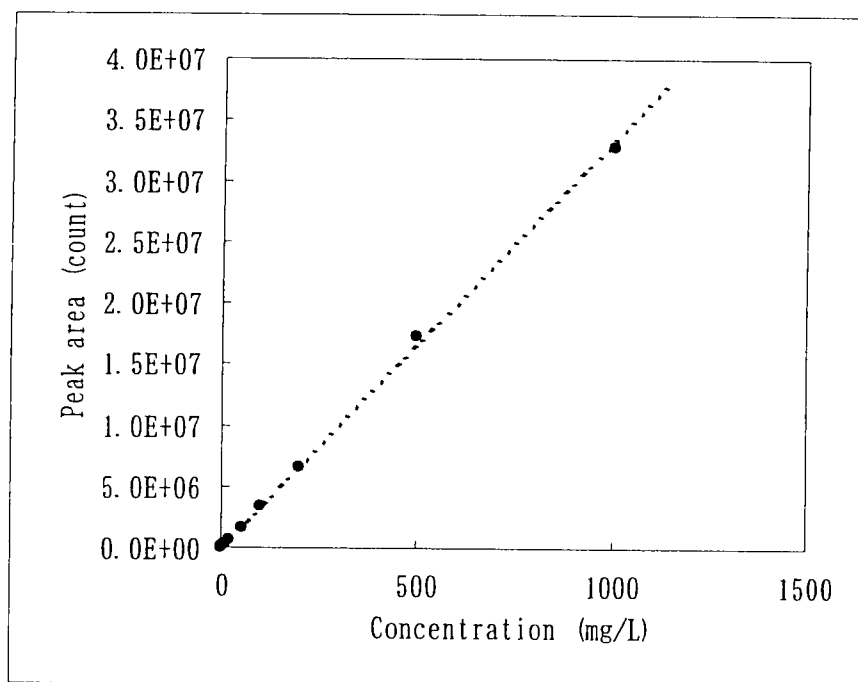
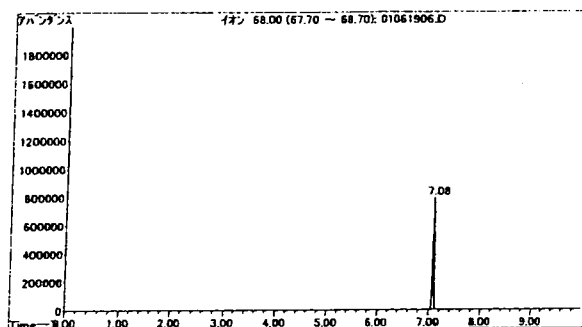


Figure A-2-2 Representative chromatograms

(1) Standard 500 mg/L ; 0 Hour
(Standard solution was added to 100-fold volume of water before injection.)

Study No. : A000464-1G
Date : 2001. 06. 19
Operator :
Sample Information: STD 5ppm { 500ppm 標準液 }
Sample Name : STD 5ppm
Misc Info :
File Name : C:\MSDCHEM\1\DATA\ISP\01061906.D
Acquired : 19 Jun 2001 14:30 using AcqMethod ISP-1

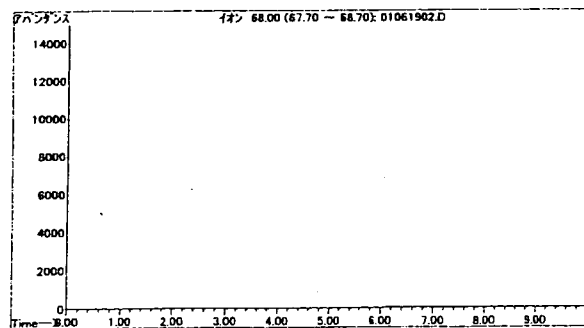


イオン 68.00 (67.70 ~ 68.70): 01061906.D
STD 5ppm

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	7.081	M	0.032	15558105	6.998	7.173

(2) Control ; 0 Hour

Study No. : A000464-1G
Date : 2001. 06. 19
Operator :
Sample Information: control
Sample Name : control
Misc Info :
File Name : C:\MSDCHEM\1\DATA\ISP\01061902.D
Acquired : 19 Jun 2001 13:04 using AcqMethod ISP-1



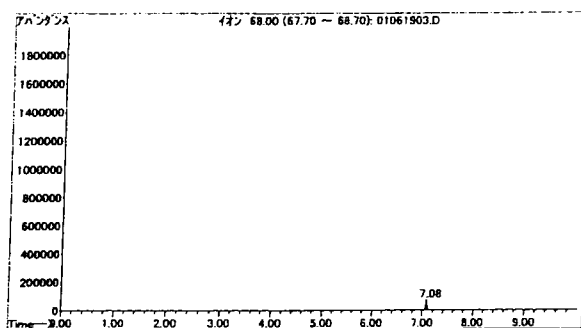
イオン 68.00 (67.70 ~ 68.70): 01061902.D
control

クロマトグラムが積分されていません

Figure A-2-2 Continued

(3) 10.0 mg/L nominal ; 0 Hour

Study No. : A000464-1G
Date : 2001.06.19
Operator :
Sample Information: C1
Sample Name : C1
Misc Info :
File Name : C:\MSDCHEM\1\DATA\ISP\01061903.D
Acquired : 19 Jun 2001 13:25 using AcqMethod ISP-1

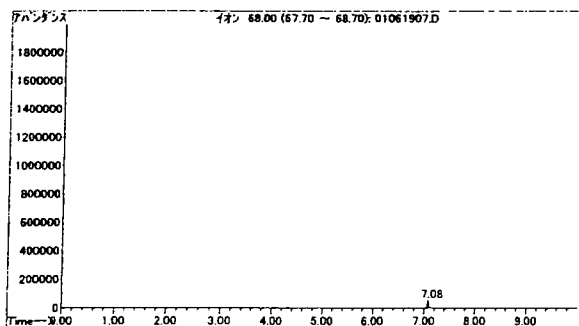


イオン 68.00 (67.70 ~ 68.70) : 01061903.D
C1

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	7.082	M	0.032	1413361	7.015	7.179

(4) 100 mg/L nominal ; 0 Hour

Study No. : A000464-1G
Date : 2001.06.19
Operator :
Sample Information: C4
Sample Name : C4
Misc Info :
File Name : C:\MSDCHEM\1\DATA\ISP\01061907.D
Acquired : 19 Jun 2001 14:51 using AcqMethod ISP-1



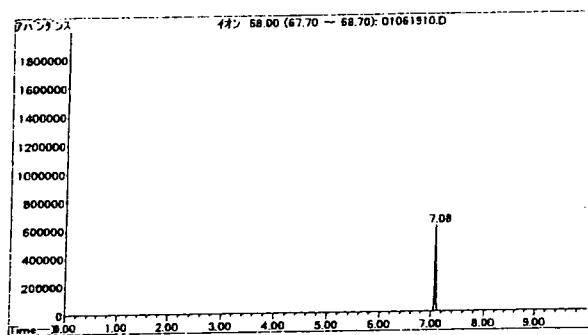
イオン 68.00 (67.70 ~ 68.70) : 01061907.D
C4

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	7.082	M	0.032	1084206	7.010	7.177

Figure A-2-2 Continued

(5) 1000 mg/L nominal ; 0 Hour

Study No. : A000464-1G
 Date : 2001.06.19
 Operator :
 Sample Information: C7
 Sample Name : C7
 Misc Info :
 File Name : C:\MSDCHEM\1\DATA\ISP\01061910.D
 Acquired : 19 Jun 2001 15:56 using AcqMethod ISP-1

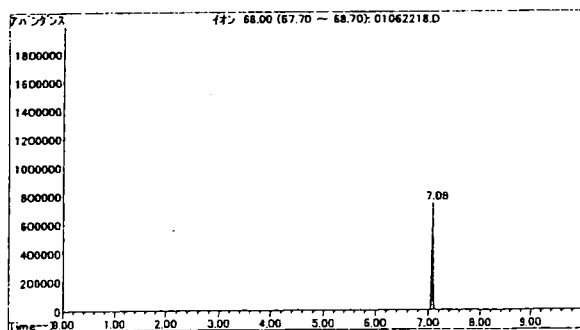


イオン 68.00 (67.70 ~ 68.70): 01061910.D
 C7

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	7.081	M	0.032	11919894	7.016	7.175

(6) Standard 500 mg/L ; 72 Hours
 (Standard solution was added to 100-fold volume of water before injection.)

Study No. : A000464-1G
 Date : 2001.06.22
 Operator :
 Sample Information: STD 5ppm } 500ppm に加水 50.0 mL
 Sample Name : STD 5ppm
 Misc Info :
 File Name : C:\MSDCHEM\1\DATA\VCH\01062218.D
 Acquired : 22 Jun 2001 18:47 using AcqMethod ISP-1



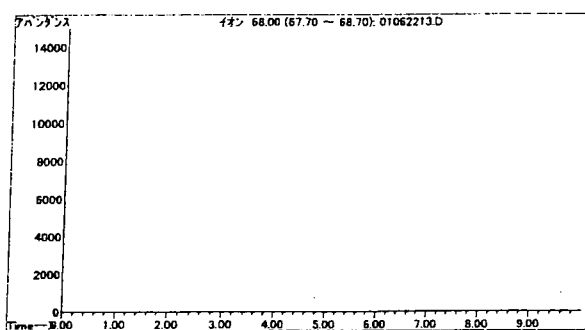
イオン 68.00 (67.70 ~ 68.70): 01062218.D
 STD 5ppm

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	7.080	M	0.032	14576128	7.002	7.174

Figure A-2-2 Continued

(7) Control ; 72 Hours

Study No. : A000464-1G
 Date : 2001.06.22
 Operator : XXXXXXXXXX
 Sample Information: control
 Sample Name : control
 Misc Info :
 File Name : C:\MSDCHEM\1\DATA\VCH\01062213.D
 Acquired : 22 Jun 2001 16:59 using AcqMethod ISP-1

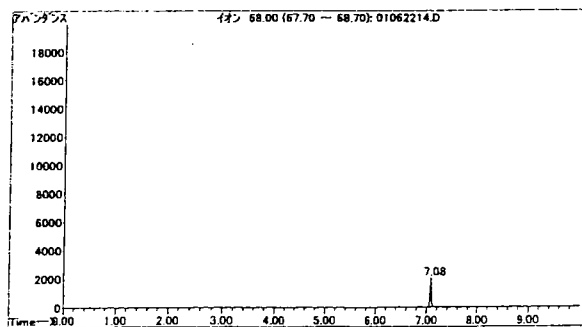


イオン 68.00 (67.70 ~ 68.70) : 01062213.D
 control

クロマトグラムが積分されていません

(8) 10.0 mg/L nominal ; 72 Hours

Study No. : A000464-1G
 Date : 2001.06.22
 Operator : XXXXXXXXXX
 Sample Information: C1
 Sample Name : C1
 Misc Info :
 File Name : C:\MSDCHEM\1\DATA\VCH\01062214.D
 Acquired : 22 Jun 2001 17:20 using AcqMethod ISP-1



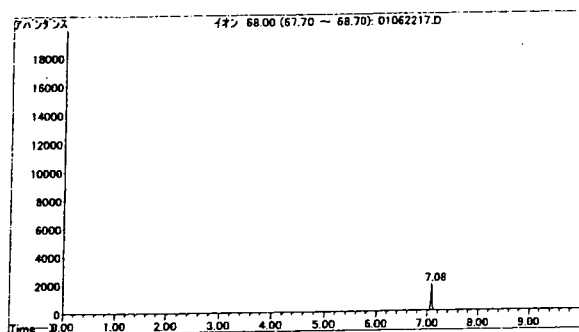
イオン 68.00 (67.70 ~ 68.70) : 01062214.D
 C1

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	7.081	M	0.033	40239	7.020	7.157

Figure A-2-2 Continued

(9) 100 mg/L nominal ; 72 Hours

Study No. : A000464-1G
Date : 2001.06.22
Operator :
Sample Information: C4
Sample Name : C4
Misc Info :
File Name : C:\MSDCHEM\1\DATA\VCH\01062217.D
Acquired : 22 Jun 2001 18:25 using AcqMethod ISP-1

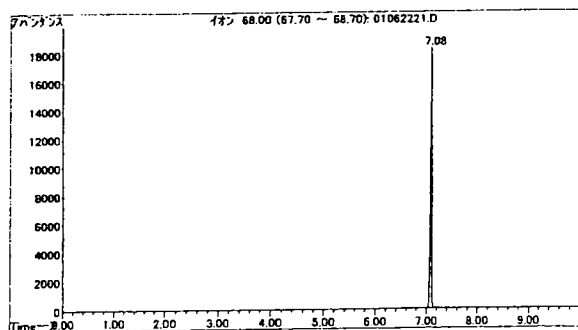


イオン 68.00 (67.70 ~ 68.70): 01062217.D
C4

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	7.080	M	0.033	36955	7.025	7.165

(10) 1000 mg/L nominal ; 72 Hours

Study No. : A000464-1G
Date : 2001.06.22
Operator :
Sample Information: C7
Sample Name : C7
Misc Info :
File Name : C:\MSDCHEM\1\DATA\VCH\01062221.D
Acquired : 22 Jun 2001 19:51 using AcqMethod ISP-1



イオン 68.00 (67.70 ~ 68.70): 01062221.D
C7

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	7.081	M	0.032	357181	7.021	7.177