

環境庁殿

試 験 報 告 書

トリクロロエチレンの藻類 (*Selenastrum capricornutum*) に対する生長阻害試験

(試験番号: 5 B 4 5 9 G)

1996年3月29日作成

株式会社三井化学安全科学研究所

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： 環境庁

表題： トリクロロエチレンの藻類 (*Selenastrum capricornutum*) に対する生長阻害
試験

試験番号： 5 B 4 5 9 G

本試験は環境庁のG L P規則に従って実施したものである。

1 9 9 6 年 3 月 2 9 日

運営管理者

[Redacted]

[Redacted]

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： 環境庁

表題： トリクロロエチレンの藻類 (*Selenastrum capricornutum*) に対する生長阻害
試験

試験番号： 5 B 4 5 9 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
試験実施状況査察	1996年 3月18日	1996年 3月18日
	1996年 3月21日	1996年 3月21日
試験報告書監査	1996年 3月29日	1996年 3月29日

1996年 3月29日

信頼性保証担当者：

[Redacted]

[Redacted]

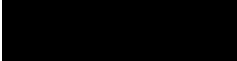
[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

試験実施概要

1. 表題： トリクロロエチレンの藻類 (*Selenastrum capricornutum*) に対する生長阻害試験
2. 試験目的： トリクロロエチレンについて、藻類 (*Selenastrum capricornutum*) に対する生長阻害試験を72時間行い、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) に準拠して実施した。
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 東京都千代田区霞ヶ関一丁目2-2
委託担当者： 環境庁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： 株式会社三菱化学安全科学研究所
所在地： 〒105 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 神奈川県横浜市青葉区鴨志田町1000番地

8. 試験関係者：

試験責任者

[REDACTED]

[REDACTED]

(1996年3月29日)

試験担当者

[REDACTED]

[REDACTED]

(1996年3月29日)

分析担当者

[REDACTED]

[REDACTED]

(1996年3月29日)

[REDACTED]

[REDACTED]

(1996年3月29日)

9. 試験期間： 試験開始日 1995年10月23日
試験終了日 1996年 3月29日
暴露期間 1996年 3月18日～1996年 3月21日

10. 保管：

試験計画書，生データ，記録文書，試験報告書および被験物質は，試験報告書作成後10年間，株式会社三菱化学安全科学研究所 横浜研究所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 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, 藻類培養試験装置および機器等	11
3.4 試験濃度の設定	11
3.5 試験液の調製	11
3.6 試験液の分析	11
3.7 試験操作	12
4 結果の算出	12
4.1 藻類生長曲線	12
4.2 藻類生長阻害濃度の算出	12
4.3 無影響濃度 (NOEC) の算出	13
5 結果および考察	14
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	14
5.2 試験液中の被験物質濃度	14
5.3 藻類生長曲線	14
5.4 半数影響濃度 (EC50) および無影響濃度 (NOEC)	14
5.5 温度および pH	15
6 試験計画書からの逸脱事項	15
Table 1~7	16~22
Figure 1~3	23~24
付属資料-1 試験液の分析方法	25~33

要 旨

試験委託者

環境庁

表 題

トリクロロエチレンの藻類 (*Selenastrum capricornutum*) に対する生長阻害試験

試験番号

5 B 4 5 9 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: トリクロロエチレン
- 2) 暴露方式: 止水式, 密閉静置培養 (1日3回手による振とうを行った)
- 3) 供試生物: *Selenastrum capricornutum* (NIES-35)
- 4) 暴露期間: 72時間
- 5) 試験濃度 (設定値): 対照区, 32, 57, 100, 180, 320 mg/L
(公比: 1.8, 助剤濃度: 0mg/L)
- 6) 試験液量: 100 mL (OECD培地)
- 7) 連数: 3 容器/濃度区
- 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 (連続照明)
- 11) 被験物質の分析: GC法

結 果

1) 試験液中の被験物質濃度

各試験液の濃度は開始時において設定の47～74%であったため、下記の生長阻害濃度の算出には測定値を採用した。

2) 生長曲線下の面積の比較による50%生長阻害濃度

$E_b C_{50}$ (0-72h) : 83 mg/L (95%信頼区間 : 77 mg/L～89 mg/L)

無影響濃度 (NOEC) : 36 mg/L

3) 生長速度の比較による50%生長阻害濃度

$E_r C_{50}$ (24-48h) : 100 mg/L (95%信頼区間 : 64 mg/L～160 mg/L)

無影響濃度 (NOEC) : 74 mg/L

$E_r C_{50}$ (24-72h) : 100 mg/L (95%信頼区間 : 72 mg/L～150 mg/L)

無影響濃度 (NOEC) : 74 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： トリクロロエチレン
構造式： $\text{CHCl}=\text{CCl}_2$
分子式： C_2HCl_3
分子量*1： 131.39
水への溶解度*2： 1100 ppm (25 °C) , 160 ppm (25 °C)
蒸気圧*2： 60 mmHg (20 °C)
融点*2： -86.4 °C
沸点*2： 86.7 °C
密度*1： 1.464 g/mL (20 °C)

*1:供給者提供資料

*2:環境化学物質要覧—環境庁環境化学物質研究会編, 丸善 (昭和63年)

1.2 供試試料

純度*1： 99.9 %
水分*1： 0.002 %
不揮発物*1： 0.001 %以下
ロット番号*1： ESL3504
供給者： XXXXXXXXXX
供給量*1： 500 mL
入手日： 1995年10月2日
外観*1： 無色澄明液体

*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

被験物質は当研究所の冷蔵庫に保管した。

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、被験物質の構造と矛盾が認められないことを確認した。試験終了時にも同様にスペクトルを測定し、試験開始前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無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

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

本種は、1995年6月7日に（財）地球・人間フォーラム（つくば市）より入手したN I E S - 3 5 株を、当研究所において無菌的に継代培養しているものである。基準物質（重クロム酸カリウム、試薬特級）による72時間の生長阻害濃度（E_bC50）は、0.39 mg/Lであった。

前培養

試験に供する藻類は、試験条件と同じ条件で暴露開始前に3日間前培養した。

3. 試験方法

3.1 試験条件

- | | |
|------------|-----------------------------|
| 1) 暴露方式： | 止水式，密閉静置培養（1日3回手による振とうを行った） |
| 2) 暴露期間： | 72時間 |
| 3) 試験液量： | 100 mL（OECD培地） |
| 4) 連数： | 3 容器／濃度区 |
| 5) 初期細胞濃度： | 1×10 ⁴ cells/mL |
| 6) 試験温度： | 23±2 °C |
| 7) 照明： | 4000 lux（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。

[Table 1 (p.16)]

3.3 試験容器, 藻類培養試験装置および機器等

- 1) 試験容器 : 300 mL容ガラス製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 : オリンパス光学製 FHT型
- 4) pHメーター : 電気化学計器製 PHL-20型
オリオン製 卓上pH計/イオン計 900A型
- 5) コールターカウンター : Colter Electronics Ltd. Colter Counter ZM型
- 6) 電解液 : Colter Electronics Ltd. ISOTON-II
- 7) 温度計 : Tasco Japan Co. Ltd. TNA-120型
- 8) 照度計 : トプコン製 IM-2D型

3.4 試験濃度の設定

本試験の実施に先立ち, 対照区および 10, 32, 100, 320, 1000 mg/Lの5段階の濃度区(公比3.2, 各1連)で予備試験を行った。その結果, 対照区における72時間後の生長率を100%とした場合, 10 mg/Lで97%, 32 mg/Lで90%, 100 mg/Lで71%, 320 mg/Lで7%, 1000 mg/Lで4%であった(但し, 設定値に基づく)。

したがって, 本試験における濃度を対照区および32, 57, 100, 180, 320 mg/L(公比:1.8, 各3連)の5段階の濃度区とした。

3.5 試験液の調製

被験物質を500mg採取し, OECD培地で希釈し500 mLに定容とし, これを2時間室温にて攪はんし, 被験物質の飽和水溶液を調製した(全部溶解した場合, 被験物質濃度 1000 mg/Lに相当する)。

各試験容器に 100mL のOECD培地(滅菌済)を入れ, 被験物質原液添加量分を除去後, 被験物質原液を等比級数的に添加し, 被験物質濃度 32, 57, 100, 180, 320 mg/L の試験液を調製した。対照区には培地のみを調製した。

3.6 試験液の分析

暴露開始時(0hr)および終了時(72hr)に, 各濃度区3連の試験容器より試験液を2.0 mLずつ, 採取して混合した。開始時には, このうち 5.0 mLを分析試料とし, 終了時には藻類を遠心分離(3000rpm, 10分間)し, 上澄み液 5.0 mLを分析試料とした。

各分析試料をn-ヘキサンにより抽出後, 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-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。被験物質は揮発性であるため、分析試料を採取後、直ちに容器を密栓した。

各試験容器を 23 ± 2 °Cの培養装置に設置し、静置条件で試験を開始し、24、48および72時間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2.0mLを採取し、電解液（ISOTON-II）18mLと混合した後、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連とは別に調製した予備1本について測定し、各濃度区の暴露開始時の pH とし、終了時には3連全て測定した。試験期間中、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 藻類生長曲線

試験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

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50%生長阻害濃度 ($E_b C50$)

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 値を用いて Probit法により $E_b C 50$ (0-72) およびその95%信頼区間を算出した。その際、供試個体数に 100 (対照の値を100%として) を適用した (EC50算出において阻害率がマイナスの値を示すものについては、0%阻害とした)。また、参考までに各濃度区に対応する I_A 値を片対数紙にプロットし直線性の認められる点を回帰分析 (最小二乗法) し、阻害率50%の交点から $E_b C 50$ (0-72) およびその95%信頼区間を算出した。

2) 生長速度の比較による50%生長阻害濃度 ($E_r C 50$)

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 値を用いて Probit法により $E_r C 50$ (24-48), $E_r C 50$ (24-72) およびその95%信頼区間を算出した。その際、供試個体数に 100 (対照の値を100%として) を適用した (EC50算出において阻害率がマイナスの値を示すものについては、0%阻害とした)。また、参考までに各濃度区に対応する I_A 値を片対数紙にプロットし直線性の認められる点を回帰分析 (最小二乗法) し、阻害率50%の交点から $E_r C 50$ (24-48), $E_r C 50$ (24-72) およびその95%信頼区間を算出した。

4.3 無影響濃度 (NOEC) の算出

Dunnettの多重比較検定 (Yukms 統計ライブラリー I 統計解析編 ver. 3.0, 両側検定) 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。

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

該当する事象は無かった。

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 21.1～151 mg/L（設定値 32～320 mg/L）であり、設定値に対する割合は 47～74 %であった。各試験液の濃度は開始時において設定の±20%を超えたため、各影響濃度の算出には測定値を採用した。暴露72時間の被験物質濃度は 8.36～90.5 mg/Lであり、設定値に対する割合は 26～29 %であった。被験物質濃度減少の原因は、揮散または藻類への移行によるものと思われた。

[Table 2 (p.17), 付属資料-1]

5.3 藻類生長曲線

対照区における細胞濃度は72時間の培養で 約37 倍増加し、試験条件下で正常な生長を示した。但し、揮発性物質でなければ通気性のシリコン栓をし、かつ振とう培養を行い、通常は100倍以上の生長が認められるのに比べると、炭酸ガスの供給が行われにくいため生長率は低かった。

また、32 mg/L区（測定値：21mg/L）では33倍、57 mg/L区（測定値：36mg/L）では33倍、100 mg/L区（測定値：74mg/L）では32倍、180 mg/L区（測定値：110mg/L）では4.7倍、320 mg/L区（測定値：150mg/L）では1.9倍の生長を示した。

[Table 3 (p.18), Figure 1 (p.23)]

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50%生長阻害濃度

Probit法により求めた $E_b C 50(0-72h)$ は83 mg/Lであり、その95%信頼区間は 77 mg/L～89 mg/Lであった。

(参考データ：最小二乗法による $E_b C 50(0-72h) = 94$ mg/L, 95%信頼区間=22～400 mg/L)

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 36 mg/L であった。

[Table 4, 5 (p.19, 20), Figure 2(p.24)]

2) 生長速度の比較による50%生長阻害濃度

Probit法により求めた $E_r C 50(24-48h)$, $E_r C 50(24-72h)$ は、それぞれ 120 mg/L, 110 mg/L であり、それらの95%信頼区間は何れも算出不可能であった。但し、最小二乗法による E_r

C50(24-48h)は100 mg/L, その95%信頼区間は64~160 mg/Lであり, E_r C50 (24-72h)は100 mg/L, 95%信頼区間は72 ~150 mg/Lであったため, ここでは信頼区間の得られた最小二乗法による結果を採用した。

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 74 mg/L (24-48h), 74 mg/L (24-72h)であった。

[Table 4,5 (p. 19, 20), Figure 3 (p.24)]

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 23.0℃ (4回測定)であり, 設定範囲内であった。試験液のpHは暴露開始時が 7.6であり, 試験終了時が 7.6~10.1であり, 100 mg/L区以下の濃度区では全ての容器でpHが1以上増加した。これは, 生長率が高かったためと考えられる。

[Table 6,7 (p.21, 22)]

6. 試験計画書からの逸脱事項

- 1) 計画書では暴露(培養)方式を振とう培養(100rpm)と記載したが, 被験物質は揮発性が高く, 振とうによる揮発が考えられたため, 本試験では容器を密閉式とし1日3回手による振とうを行う程度に留めた。
- 2) 計画書では試験容器の蓋を綿栓または通気性のシリコン栓としたが, 上記1)の理由により, 共栓付き三角フラスコを用いることにより完全密栓した。
- 3) pHメーターは当初, 電気化学計器製 PHL-20型のみが記載されていたが, 本試験ではオリオン製 卓上pH計/イオン計 900A型も追加使用した。
- 4) 照度計は当初, 試験計画書に記載漏れであったので報告書に記載した。

以上

Table 1 OECD medium

<u>Nutrient salts</u>	<u>Concentration (mg/L)</u>
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

Table 2. Measured Concentrations during a 72-Hour Exposure

Nominal Concentration mg/L	Measured concentration(mg/L)			
	0 Hour	Percent of Nominal	72 Hour	Percent of Nominal
Control	<0.005	--	<0.005	--
32	21.1	66	8.36	26
57	36.3	64	15.6	27
100	73.6	74	27.8	28
180	109	61	52.9	29
320	151	47	90.5	28

Table 3. Cell Density of *Selenastrum capricornutum*

Nominal concentration		Cell density (cells/mL)			
mg/L	No.	0hour	24hour	48hour	72hour
Control	1	10,000	70,200	207,600	396,600
	2	10,000	65,800	222,800	331,400
	3	10,000	62,400	223,600	381,800
	Average	10,000	66,133	218,000	369,933
	S. D.	0	3,911	9,016	34,181
32	1	10,000	68,200	230,800	317,200
	2	10,000	61,600	224,200	349,200
	3	10,000	64,600	228,000	332,600
	Average	10,000	64,800	227,667	333,000
	S. D.	0	3,305	3,313	16,004
57	1	10,000	64,800	229,800	350,400
	2	10,000	56,400	210,400	355,400
	3	10,000	61,200	216,200	294,800
	Average	10,000	60,800	218,800	333,533
	S. D.	0	4,214	9,958	33,637
100	1	10,000	58,200	208,000	323,400
	2	10,000	51,200	192,000	301,200
	3	10,000	49,200	182,000	325,400
	Average	10,000	52,867	194,000	316,667
	S. D.	0	4,726	13,115	13,432
180	1	10,000	23,400	43,600	56,600
	2	10,000	27,800	32,000	41,000
	3	10,000	25,800	39,000	45,200
	Average	10,000	25,667	38,200	47,600
	S. D.	0	2,203	5,841	8,072
320	1	10,000	19,800	13,400	17,600
	2	10,000	19,000	19,600	21,200
	3	10,000	22,400	16,000	18,600
	Average	10,000	20,400	16,333	19,133
	S. D.	0	1,778	3,113	1,858

Each value represents the mean of three sample counts.

Table 4. Growth Inhibition of Selenastrum capricornutum

Nominal Conc. (Measured conc.)		Area	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	10826000	-	0.0452	-	0.0361	-
	2	10303000	-	0.0508	-	0.0337	-
	3	10846000	-	0.0532	-	0.0377	-
	Average	10658000	-	0.0497	-	0.0358	-
32 (21)	1	10382000		0.0508		0.0320	
	2	10450000		0.0538		0.0361	
	3	10414000		0.0525		0.0341	
	Average	10415000	2.3	0.0524	-5.4	0.0341	4.7
57 (36)	1	10675000		0.0527		0.0352	
	2	10068000		0.0549		0.0383	
	3	9595000		0.0526		0.0328	
	Average	10113000	5.1	0.0534	-7.4	0.0354	1.1
100 (74)	1	9670000		0.0531		0.0357	
	2	8851000		0.0551		0.0369	
	3	8854000		0.0545		0.0394	
	Average	9125000	**14.4	0.0542	-9.1	0.0373	-4.2
180 (110)	1	1687000		0.0259		0.0184	
	2	1327000		0.0059		0.0081	
	3	1498000		0.0172		0.0117	
	Average	1504000	**85.9	0.0163	**67.2	0.0127	**64.5
320 (150)	1	408000		-0.0163		-0.0025	
	2	581000		0.0013		0.0023	
	3	545000		-0.0140		-0.0039	
	Average	511000	**95.2	-0.0097	**119.5	-0.0014	**103.9

*:5%, **:1% Significant Level

Table 5. Calculated EC50 and NOEC

Based on the areas under growth curve(0-72h)

	Ec50 (0-72h) (mg/L)	95-Percent Confidence Limits (mg/L)
by Probit	83	77 ~ 89
NOECb(0-72h)	36	

Based on the growth rates(24-48h)

	ErC50 (24-48h) (mg/L)	95-Percent Confidence Limits (mg/L)
by Simple regression analysis	100	64 ~ 160
NOECr(24-48h)	74	

Based on the growth rates(24-72h)

	ErC50 (24-72h) (mg/L)	95-Percent Confidence Limits (mg/L)
by Simple regression analysis	100	72 ~ 150
NOECr(24-72h)	74	

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

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

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

Nominal Concentration mg/L	No.	pH	
		0 Hour	72 Hour
Control	1	7.6	10.0
	2	7.6	10.0
	3	7.6	10.1
32	1	7.6	10.0
	2	7.6	10.0
	3	7.6	10.0
57	1	7.6	10.0
	2	7.6	10.0
	3	7.6	10.0
100	1	7.6	10.0
	2	7.6	10.0
	3	7.6	10.0
180	1	7.6	7.9
	2	7.6	7.8
	3	7.6	7.8
320	1	7.7	7.6
	2	7.7	7.6
	3	7.7	7.7

Figure 1 Algal Growth Curve of *Selenastrum capricornutum*

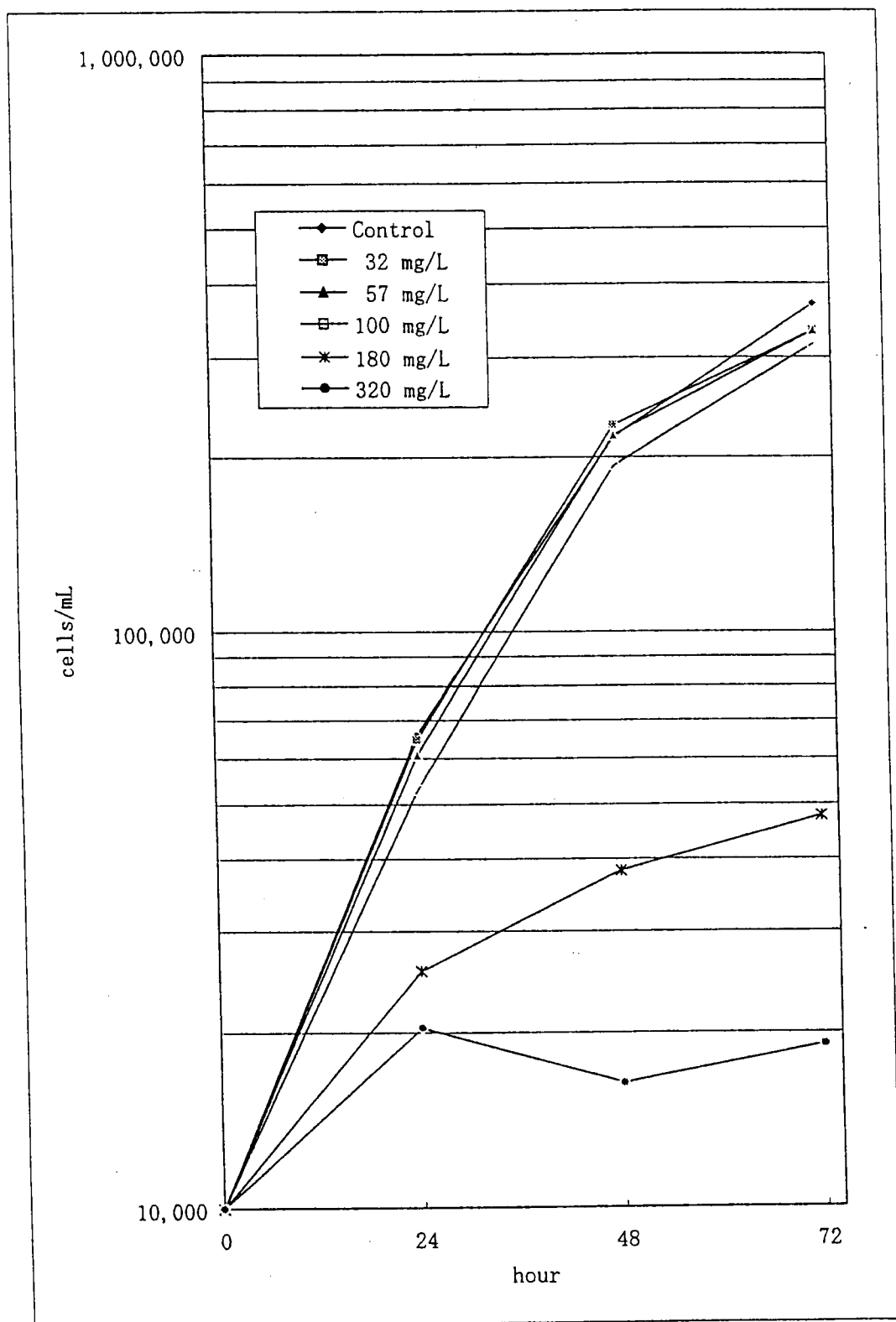


Figure 2 Measured Concentration-Inhibition Curve Based on I_A value

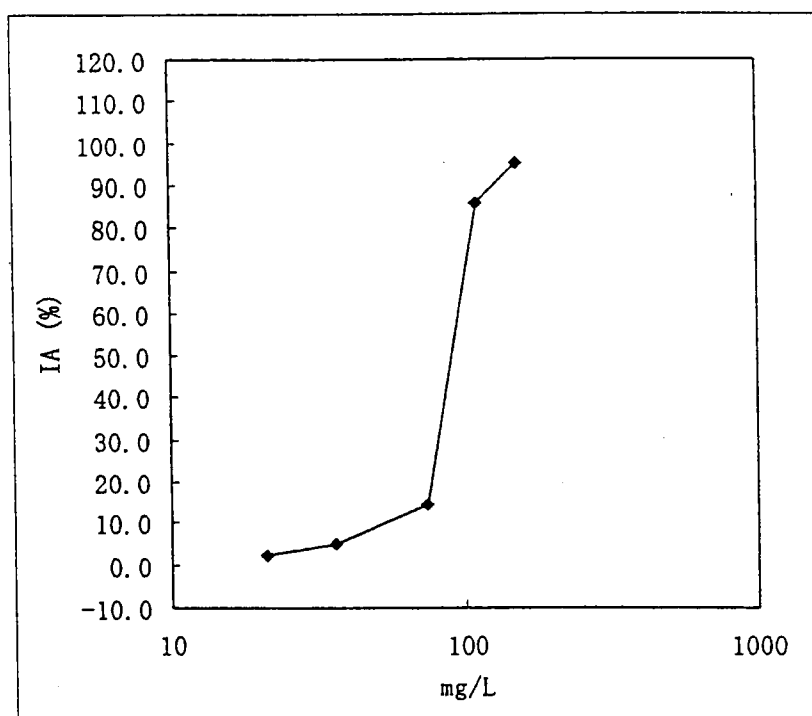
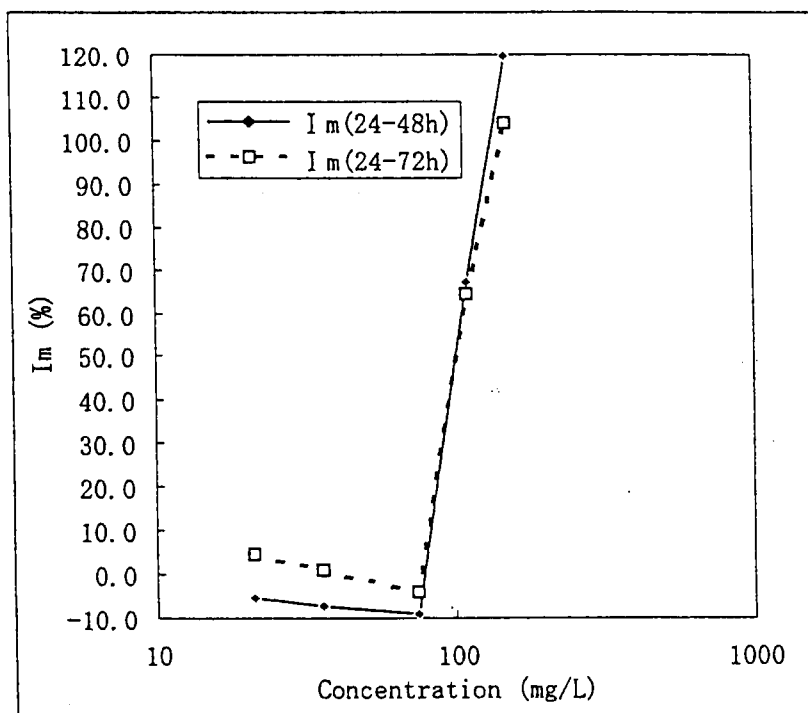


Figure 3 Measured Concentration-Inhibition Curve of Based on I_m value



付属資料－1

試験液の分析方法

試験液の分析方法

1 試験液の分析方法

暴露開始時（0hr）および終了時（72hr）に、各濃度区3連の試験容器より試験液を2.0 mLずつ、採取して混合した。開始時には、このうち 5.0 mLを分析試料とし、終了時には藻類を遠心分離（3000rpm, 10分間）し、上澄み液 5.0 mLを分析試料とした。各分析試料の分析方法を以下に示す。

- (1) 各分析試料 5.0 mLを 10 mL容ガラス沈殿管に採取
↓
- (2) 各分析試料に n-ヘキサン 2.0mLを加え振とう
大洋科学製リンプロシェーカーSR-II（10分間、速度目盛7）
↓
- (3) 遠心分離機で水層とヘキサン層を分離
日立製CR5B（3000rpm, 10分間）
↓
- (4) ヘキサン層をバースツールベットで採取し、定容容器（メストル又はメスフラスコ）に採取
↓
- (5) (2)～(4)の操作をもう一度くり返し、ヘキサンで定容
↓
- (6) (5)の定容液をGC測定用バイアルに約1～2 mL採取
↓
- (7) GC測定

・ヘキサンによる定容量

試験液設定濃度 (mg/L)	定容量(mL) (0hr)	定容量(mL) (72hr)
対照	5.0	5.0
30	25	25
57	25	25
100	25	50
180	50	25
320	50	50

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 : HEWLETT PACKARD HP G1800A GCD (No.1)
オートサンプラ : 7673A
検出器 : EID (Electron Ionization Detector)
データ処理装置 : HP GCD ChemStation

(条件)

カラム : HP-624 M.S. 30m×0.25mm×1.40 μm
キャリアーガス : ヘリウム 0.6mL/min
オーブン温度 : 40°C (1.0min) → 10°C/min → 130°C (0min)
注入口温度 : 200°C
検出器温度 (インターフェース) : 260°C
注入方法 : Splitless, Sampling Time : 60sec
注入量 : 1.0 μL

検出器条件 : Solvent Delay 6.5min
Quant ion 129.85m/z
Qualifier ion 94.90m/z

3 検量線

被験物質の1000mg/L n-ヘキサン溶液を調製し、順次、n-ヘキサンで希釈し0, 0.2, 0.5, 1.0, 2.0, 5.0, 10.0, 20.0mg/Lの標準溶液を調製した。この標準溶液を、GCに注入しピーク面積を測定した。横軸に濃度を (mg/L) , 縦軸にピーク面積 (count表示) 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0.99997と良好であった。

4 定量限界

最小検出ピーク面積を1000countに設定し、これに相当する試験液中の被験物質濃度0.005mg/Lを定量限界とした。

5 添加回収試験

被験物質濃度 5.0 mg/Lの試験溶液を調製し、この溶液を「1 試験液の分析方法」に従って分析した。2回行った添加回収試験の平均値は79 %であった。試料の分析結果は、この添加回収率で補正した値を用いた。

Figure A-1-1 Calibration Curve by GC Analysis

Input Data

No.	Concentration (mg/L)	Peak Area (count)
0	0	0
1	0.2	64120
2	0.5	162533
3	1.0	322789
4	2.0	657058
5	5.0	1644111
6	10.0	3357648
7	20.0	6793521

$$Y = -17,500 + 339,600 X$$

$$r = 0.99997$$

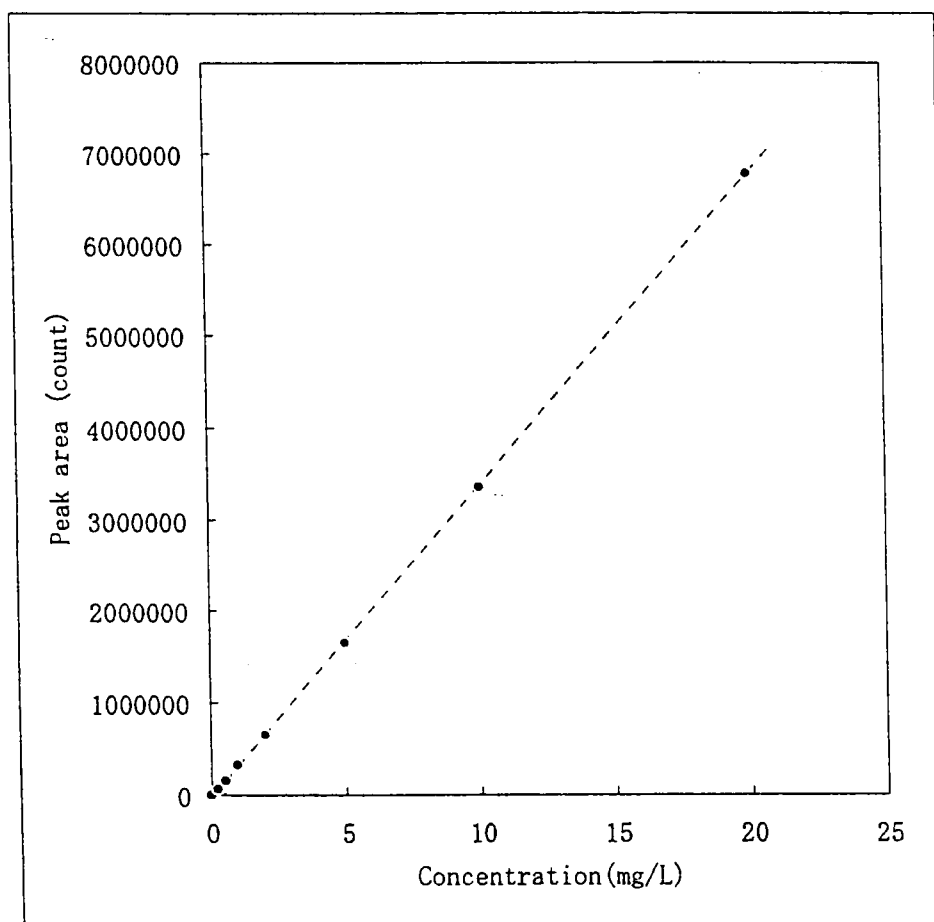
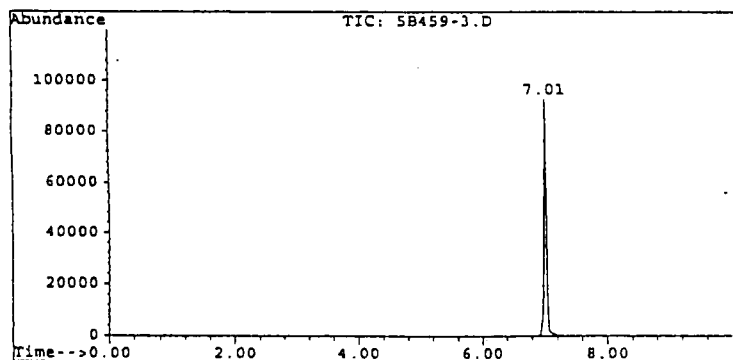


Figure A-1-2 Representative chromatograms

(1) Standard 10 mg/L ; 0 hr

Study No. : 584596
 Date : 16.3.19
 Operator :
 Sample Information:
 Sample Name : E-95 std 10.0ppm
 Misc Info : Trichloroethylene
 File Name : A:\SB459\SB459-3.D
 Acquired : 19 Mar 96 3:02 pm using AcqMethod E-95S

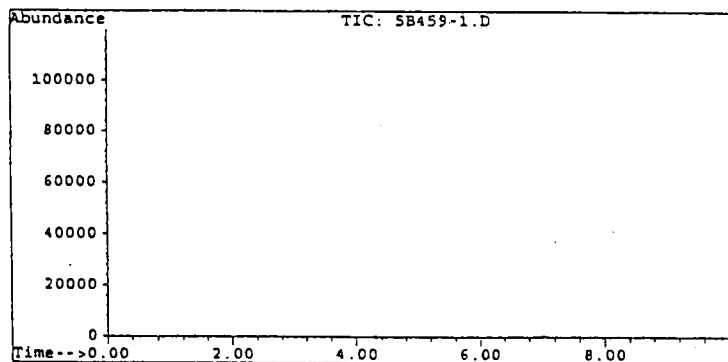


TIC: SB459-3.D
 E-95 std 10.0ppm

Peak#	Ret Time	Type	Width	Area	Start Time	End Time
1	7.015	M	0.048	2663029	6.904	7.230

(2) Control ; 0 hr(x 1)

Study No. : 584596
 Date : 16.3.19
 Operator :
 Sample Information:
 Sample Name : control 0hr 3/18
 Misc Info : Trichloroethylene
 File Name : A:\SB459\SB459-1.D
 Acquired : 19 Mar 96 2:02 pm using AcqMethod E-95S



TIC: SB459-1.D
 control 0hr 3/18

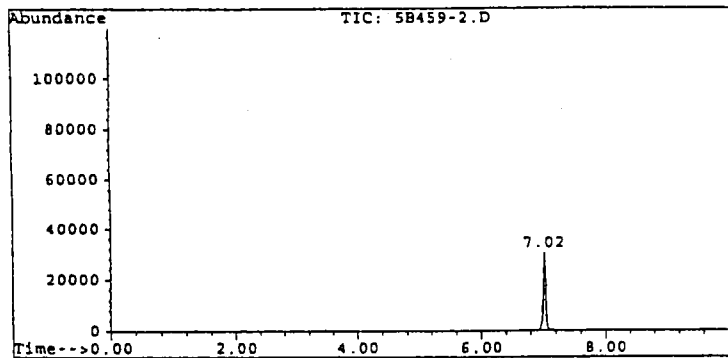
Peak#	Ret Time	Type	Width	Area	Start Time	End Time
No peaks detected						

Figure A-1-2 Continued

(3) 32 mg/L nominal ; 0 hr(x 5)

Study No. : 584596
 Date : 196.3.19
 Operator :
 Sample Information:
 Sample Name : conc-1 32ppm 0hr
 Misc Info : Trichloroethylene
 File Name : A:\58459\58459-2.D
 Acquired : 19 Mar 96 2:32 pm using AcqMethod E-95S

x 5



TIC: 58459-2.D

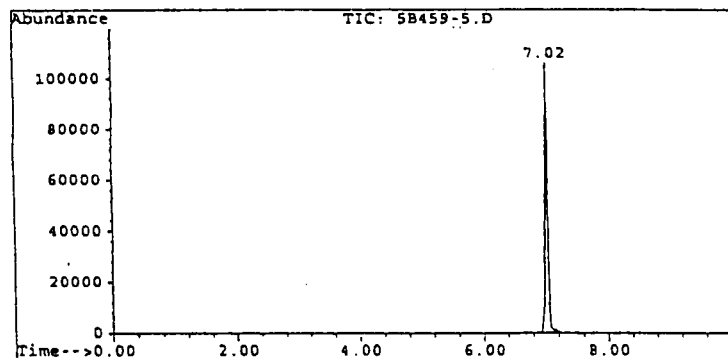
conc-1 32ppm 0hr

Peak#	Ret Time	Type	Width	Area	Start Time	End Time
1	7.023	M	0.048	887131	6.901	7.222

(4) 100 mg/L nominal ; 0 hr(x 5)

Study No. : 584596
 Date : 196.3.19
 Operator :
 Sample Information:
 Sample Name : conc-3 100ppm 0hr 3/18
 Misc Info : Trichloroethylene
 File Name : A:\58459\58459-5.D
 Acquired : 19 Mar 96 3:54 pm using AcqMethod E-95S

x 5



TIC: 58459-5.D

conc-3 100ppm 0hr 3/18

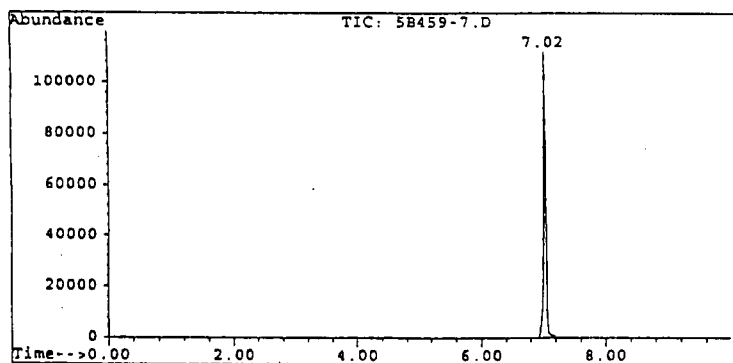
Peak#	Ret Time	Type	Width	Area	Start Time	End Time
1	7.025	M	0.049	1095810	6.888	7.263

Figure A-1-2 Continued

(5) 320 mg/L nominal ; 0 hr (x 10)

Study No. : 584576
 Date : 196.3.17
 Operator :
 Sample Information:
 Sample Name : conc-5 320ppm 0hr 3/18
 Misc Info : Trichloroethylene
 File Name : A:\5B459\5B459-7.D
 Acquired : 19 Mar 96 4:35 pm using AcqMethod E-95S

x 10



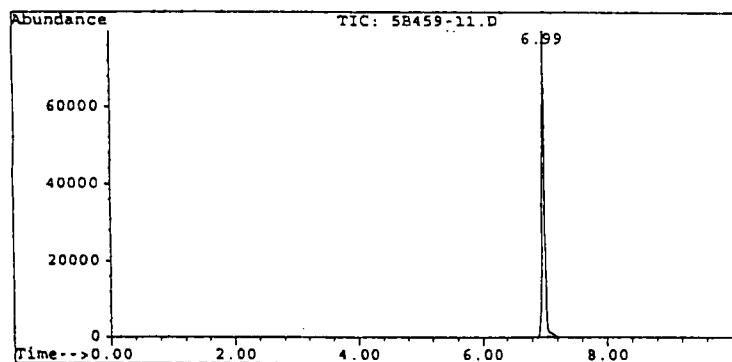
TIC: 5B459-7.D

conc-5 320ppm 0hr 3/18

Peak#	Ret Time	Type	Width	Area	Start Time	End Time
1	7.025	M	0.047	1182582	6.907	7.216

(6) Standard 10 mg/L ; 72 hr

Study No. : 584576
 Date : 196.3.21
 Operator :
 Sample Information:
 Sample Name : E-95 std 10.0ppm
 Misc Info : Trichloroethylene
 File Name : A:\5B459\5B459-11.D
 Acquired : 21 Mar 96 5:18 pm using AcqMethod E-95S



TIC: 5B459-11.D

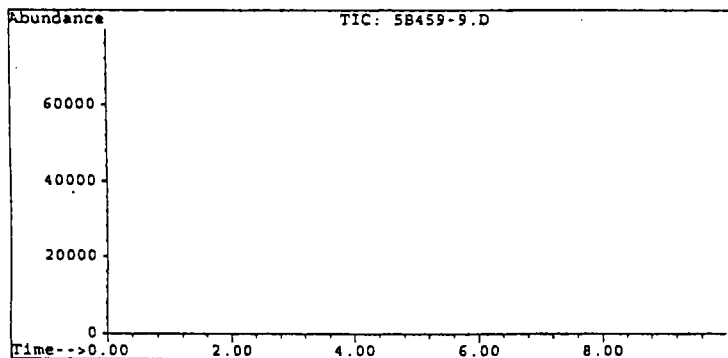
E-95 std 10.0ppm

Peak#	Ret Time	Type	Width	Area	Start Time	End Time
1	6.994	M	0.048	2626210	6.879	7.231

Figure A-1-2 Continued

(7) Control ; 72 hr(x 1)

Study No. : 58459
 Date : 196.3.21
 Operator :
 Sample Information:
 Sample Name : control 72hr 3/21
 Misc Info : Trichloroethylene
 File Name : A:\58459\58459-9.D
 Acquired : 21 Mar 96 4:31 pm using AcqMethod E-95S



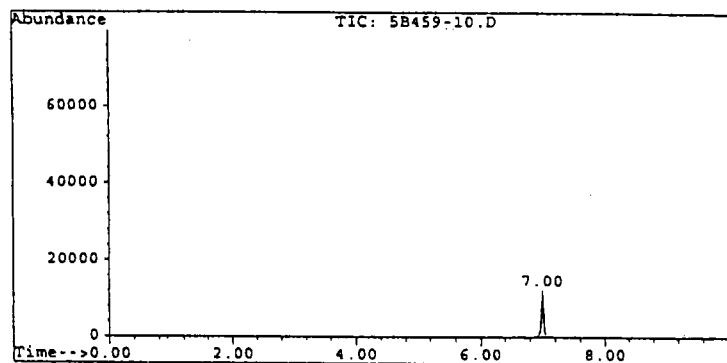
TIC: 58459-9.D

control 72hr 3/21

Peak#	Ret Time	Type	Width	Area	Start Time	End Time
No peaks detected						

(8) 32 mg/L nominal ; 72 hr(x 5)

Study No. : 58459
 Date : 196.3.21
 Operator :
 Sample Information:
 Sample Name : conc-1 32ppm 72hr 3/21
 Misc Info : Trichloroethylene
 File Name : A:\58459\58459-10.D
 Acquired : 21 Mar 96 4:53 pm using AcqMethod E-95S



TIC: 58459-10.D

conc-1 32ppm 72hr 3/21

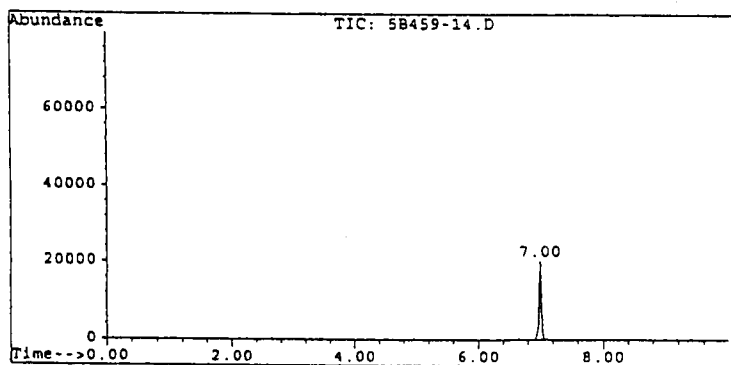
Peak#	Ret Time	Type	Width	Area	Start Time	End Time
1	6.998	M	0.047	346783	6.893	7.200

Figure A-1-2 Continued

(9) 100 mg/L nominal ; 72 hr(x 10)

Study No. : 584576
 Date : 196.3.21
 Operator :
 Sample Information:
 Sample Name : conc-3 100ppm 72hr 3/21
 Misc Info : Trichloroethylene
 File Name : A:\58459\58459-14.D
 Acquired : 21 Mar 96 6:21 pm using AcqMethod E-95S

x 10



TIC: 58459-14.D

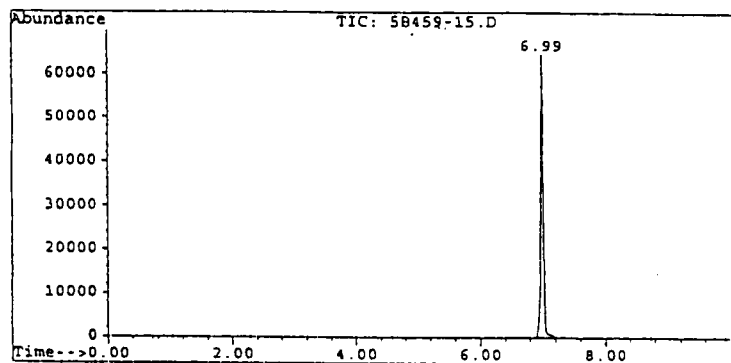
conc-4 180ppm 72hr 3/21

Peak#	Ret Time	Type	Width	Area	Start Time	End Time
1	6.996	M	0.047	576836	6.894	7.199

(10) 320 mg/L nominal ; 72 hr(x 10)

Study No. : 584576
 Date : 196.3.21
 Operator :
 Sample Information:
 Sample Name : conc-5 320ppm 72hr 3/21
 Misc Info : Trichloroethylene
 File Name : A:\58459\58459-15.D
 Acquired : 21 Mar 96 6:50 pm using AcqMethod E-95S

x 10



TIC: 58459-15.D

conc-5 320ppm 72hr 3/21

Peak#	Ret Time	Type	Width	Area	Start Time	End Time
1	6.995	M	0.048	1877317	6.852	7.270