

環境省殿

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
[Redacted]

最 終 報 告 書

メタクリル酸メチルの
藻類 (*Pseudokirchneriella subcapitata*) に対する生長阻害試験

(試験番号: A030427-1)

2004年 9月24日

株式会社三菱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 : 環境省

表 題 : メタクリル酸メチルの藻類 (*Pseudokirchneriella subcapitata*) に対する生長阻害試験

試 験 番 号 : A030427-1

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。

日本国環境省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長通知「生態影響試験実施に関する基準の改正について」(別添)「生態影響試験実施に関する基準」(環保安第242号, 2001年)

2004年 9月24日

試験責任者





信 頼 性 保 証 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 : メタクリル酸メチルの藻類 (*Pseudokirchneriella subcapitata*)
に対する生長阻害試験

試 験 番 号 : A030427-1

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、下記の査察および監査実施により確認した。

記

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		2004年 6月28日	2004年 6月28日
試験の査察	試験液の調製	2004年 7月27日	2004年 7月27日
	藻類の添加	2004年 7月27日	2004年 7月27日
	試験液の分析	2004年 7月27日	2004年 7月27日
	細胞濃度の測定	2004年 7月30日	2004年 7月30日
最終報告書監査		2004年 9月24日	2004年 9月24日

2004年 9月24日

信頼性保証部門担当者



試験実施概要

1. 表 題 : メタクリル酸メチルの藻類 (*Pseudokirchneriella subcapitata*) に対する生長阻害試験
(試験番号: A030427-1)
2. 試験目的 : 被験物質の藻類 (*Pseudokirchneriella subcapitata*) 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 : 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)
4. 適用 GLP : 日本国環境省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長通知「生態影響試験実施に関する基準の改正について」(別添)「生態影響試験実施に関する基準」
(環保安第 242 号, 2001 年)
5. 試験委託者 : 環境省
〒100-8975 東京都千代田区霞が関一丁目 2-2
委託責任者 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 XXXXXXXXXX
6. 試験受託者 : 株式会社三菱化学安全科学研究所
〒105-0014 東京都港区芝二丁目 1 番 30 号
7. 試験施設 : 株式会社三菱化学安全科学研究所 横浜研究所
〒227-0033 神奈川県横浜市青葉区鴨志田町 1000 番地

8. 試験責任者 : [redacted]
環境科学Cグループ

9. 試験担当者 : [redacted] [redacted] 2004年 9月24日
(試験実施)

[redacted] [redacted] 2004年 9月24日
(試験実施)

[redacted] [redacted] 2004年 9月24日
(試験実施, 報告書作成)

[redacted] [redacted] 2004年 9月24日
(試験実施)

[redacted] [redacted] 2004年 9月24日
(分析実施)

10. 試験日程 : 試験開始日 2004年 6月28日
実験開始日 2004年 7月27日
実験終了日 2004年 7月30日
試験終了日 2004年 9月24日

11. 保管 : 試験計画書, 生データ, 被験物質, 記録文書および最終報告書は, 横浜研究所の保管施設に保管する。
保管期間は, 最終報告書作成後10年間とし, 以後の保管は試験委託者と協議の上, 決定する。
ただし, 被験物質については, 最終報告書作成後10年間または品質低下をおこさないで安定に保存しうる期間のいずれか短い方の期間とする。

目 次

	頁
要 約	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	11
3 試験方法	11
3.1 試験条件	11
3.2 培地	11
3.3 試験容器および藻類培養試験装置等	12
3.4 試験濃度の設定	12
3.5 試験液の調製	13
3.6 試験液および試験培養液の分析	13
3.7 試験操作	13
4 結果の算出	14
4.1 生長曲線	14
4.2 生長阻害率の算出	14
4.3 EC50およびNOECの算出に用いる被験物質濃度の決定	15
4.4 50%生長阻害濃度（EC50）の算出	15
4.5 最大無作用濃度（NOEC）	16
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 試験液および試験培養液中の被験物質濃度	17
5.3 生長曲線	17
5.4 50%生長阻害濃度（EC50）および最大無作用濃度（NOEC）	18
5.5 温度およびpH	18
5.6 試験計画書からの逸脱事項	18
Table 1～6	19～23
Figure 1～3	24～26
付属資料－1 OECD培地の組成	27～28
付属資料－2 試験液の調製	29～30
付属資料－3 試験液および試験培養液の分析	31～38
付属資料－4 結果の算出	39～42

要 約

試 験 委 託 者 : 環境省

表 題 : メタクリル酸メチルの藻類 (*Pseudokirchneriella subcapitata*) に対する生長阻害試験

試 験 番 号 : A030427-1

試 験 方 法 :

- 1) 適用ガイドライン: 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)
- 2) 暴 露 方 式 : 止水式 (密閉系), 振とう培養 (100rpm)
- 3) 供 試 生 物 : *Pseudokirchneriella subcapitata* (株名: ATCC22662)
(旧学名: *Selenastrum capricornutum*)
- 4) 暴 露 期 間 : 72時間
- 5) 試 験 濃 度 : 対照区, 150* mg/L
(設定値) (* 試験上限濃度での限度試験, 揮発性物質のため暴露開始時の測定値が 100 mg/L付近になるように設定)
- 6) 試 験 液 量 : 100 mL/容器
- 7) 連 数 : 3 容器/試験区
- 8) 初期細胞濃度 : 前培養した藻類 1×10^4 cells/mL
- 9) 試 験 温 度 : 23 ± 2 °C
- 10) 照 明 : 4000 lux ($\pm 20\%$ 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質量分析 (GC/MS)

試 験 結 果 :

- 1) 試験液および試験培養液中の被験物質濃度

被験物質濃度分析の結果, 測定値の設定値に対する割合は, 暴露開始時の試験液において 64 %, 暴露終了時の試験培養液において 51 %であった。暴露開始時の濃度減少の主な原因は, 揮発性物質のため調製時に揮散したためと考えられた。暴露終了時の濃度減少の主な原因は, 藻体への移行および揮散ではないかと思われた。阻害濃度の算出には暴露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} (0-72h) : >96.7 mg/L (95%信頼区間: 算出不可)

最大無作用濃度 $NOEC_b$ (0-72h) : >96.7 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} (24-48h) : >96.7 mg/L (95%信頼区間: 算出不可)

最大無作用濃度 $NOEC_r$ (24-48h) : >96.7 mg/L

50%生長阻害濃度 ErC_{50} (24-72h) : >96.7 mg/L (95%信頼区間: 算出不可)

最大無作用濃度 $NOEC_r$ (24-72h) : >96.7 mg/L

4) 藻類の形態観察

暴露終了時の顕微鏡下での細胞形態観察の結果、150 mg/L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 被験物質

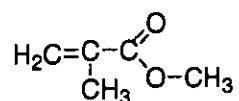
1.1 名称, 構造式および物理化学的性状

名 称 : メタクリル酸メチル (略称 MM)

別 名 : メチルメタクリレート

CAS No : 80-62-6

構造式 :



分子式 : $\text{C}_5\text{H}_8\text{O}_2$

分子量^{*1} : 100.12

融点^{*1} : -48°C

沸点^{*1} : $100\sim 101^\circ\text{C}$

水溶解度^{*1} : 11.5g/L (20°C)

比重^{*1} : 0.939

*1 : 供給者提供資料

1.2 供試試料

純度^{*1} : 99.90%

ロット番号^{*1} : FA006551

供給者 : XXXXXXXXXX

受領量^{*1} : 100mL

受領日 : 2004年 2月 3日

外観^{*1} : 無色透明液体

*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

試験開始前に、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試験物質保管用デシケータ（保管条件：室温，暗所）内に保管した。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。

（装置）フーリエ変換赤外分光分析装置：Nicolet 製 AVATAR 320 型

2 供試生物

- 1) 和名： ムレミカズキモ (単細胞緑藻類)
- 2) 学名： *Pseudokirchneriella subcapitata*
(旧学名： *Selenastrum capricornutum*)
- 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) 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。1996年11月以降の72時間50%生長阻害濃度 (EbC50) は, 以下の通りである。
平均値 ± 標準偏差 = 0.428 ± 0.0728 mg/L, n=15
(最小値 ~ 最大値 = 0.285 ~ 0.543 mg/L)
- 8) 前培養： 前培養期間; 2004年7月23日~2004年7月27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

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。

3.1 試験条件

- 1) 暴露方式： 止水式 (密閉系), 振とう培養 (100rpm)
- 2) 暴露期間： 72時間
- 3) 試験液量： 100 mL/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 (±20%の変動内, フラスコ液面付近) で連続照明
- 8) pH： 試験液のpH調整なし

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No. 201に示されている推奨培地を濾過滅菌 (0.22 μm) 後用いた。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（IWAKI製，ヘッドスペース容量：当社測定値 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) 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 HM-40V型
- 7) 温度計： Tasco Japan 製 TNA-120型
- 8) 照度計： トプコン製 IM-2D型
- 9) 電子天秤： メトラー製 AG204型
メトラー製 AE163型
メトラー製 PB3002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。

本試験濃度：対照区， 150* mg/L

（* 試験上限濃度での限度試験，揮発性物質のため暴露開始時の測定値が100 mg/L付近になるように設定）

予備試験結果

濃度 (mg/L)	0hr測定濃度 (mg/L) [設定値に 対する%]	72hr測定濃度 (mg/L) [設定値に 対する%]	対照区に対する 72時間後の生長率 (%)
対照区	--		100
15.0	10.4 [69]	2.92 [19] 8.61 [57]*	121
38.0	--		130
75.0	--		140
113	--		147
150	108 [72]	59.5 [40] 98.4 [66]*	136

* 藻体添加なし

3.5 試験液の調製

試験液調製時の培地は、調製前に恒温槽内または恒温室内で 23 ± 2 °C にした。

付属資料－2 に示すように、被験物質原液を調製し、培地で希釈混合することにより、試験液を調製した。対照区は培地のみとした。なお、原液は用時調製した。

調製時の試験液の外観は、全ての試験区において無色透明であった。

3.6 試験液および試験培養液の分析

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。暴露終了時 (72hr) には、各試験区 3 個の試験容器より試験培養液を 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 0.75 mL にアセトン等を等量添加し混合後、GC/MS により分析した。各試験液および各試験培養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－3 に示した。

3.7 試験操作

前培養した藻類の細胞数を粒子計数装置 (CDA-500) および血球計算盤と顕微鏡で計数し、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 (ランダム発生表に従いランダム配置, 24hr 毎に再配置) 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培養液 1.0 mL を採取し、粒子計数装置用電解液 (セルパック) 9.0 mL と混合した後、粒子計数装置 (CDA-500) により計数した。

試験培養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、肉眼による色調観察および顕微鏡下での細胞形態観察を行った。

各試験区における暴露開始時の試験液および暴露終了時の試験培養液の pH を測定した。暴露開始時の pH 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、暴露終了時の pH は、3 容器のうち 1 容器 (No.1) について測定した。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（A）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（A）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_μ ）

対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、

μ : 生長速度

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 (I_m) 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

4.4, 4.5のEC50およびNOECの算出に用いる被験物質濃度は、暴露開始時の測定値とした。

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	$\geq 50\%$	$< 50\%$
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。	推定される濃度領域を記載する。
EC50の表記方法	I_A 値より求めた場合: EbC50 (0-72h) I_m 値より求めた場合: ErC50 (24-48h), ErC50 (24-72h)	

4.5 最大無作用濃度 (NOEC)

対照区と比較する区が1濃度区であるため、等分散の検定をF検定 ($\alpha=0.05$) で行い、等分散ならば Student の t 検定 ($\alpha=0.05$, 両側) を、また等分散でなければ Welch の t 検定 ($\alpha=0.05$, 両側) を行った。対照区と比較して有意差が認められない場合、最大無作用濃度 (NOEC) は「>試験濃度」と表記した。その際、面積法により求めた場合は NOECb (0-72h)、速度法により求めた場合は NOECr (24-48h) または NOECr (24-72h) とした。

以上の統計解析には Yukms ソフトウェア Statlight「#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。

5.2 試験液および試験培養液中の被験物質濃度

暴露開始時の試験液および暴露終了時の試験培養液中の被験物質濃度を測定した。その結果を Table 1 に、クロマトグラムを付属資料-3 に示した。

被験物質濃度分析の結果、測定値の設定値に対する割合は、暴露開始時の試験液において 64 %、暴露終了時の試験培養液において 51 %であった。暴露開始時の濃度減少の主な原因は、揮発性物質のため調製時に揮散したためと考えられた。暴露終了時の濃度減少の主な原因は、藻体への移行および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 63 倍増加し、試験条件（密閉系条件）下で正常な生長を示した。

試験培養液の肉眼による色調観察の結果、全ての試験区において、時間経過とともに緑色度が増加する傾向がみられた。

また、暴露終了時の顕微鏡下での細胞形態観察の結果、150 mg/L 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。

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, NOEC の算出結果 (使用した統計的手法, 入力値, 入力に用いた観察点 (試験区) およびその出力結果) を付属資料-4 に示した。得られた結果から, 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

EbC50 (0-72h) : >96.7 mg/L (95%信頼区間: 算出不可)

NOECb (0-72h) : >96.7 mg/L

2) 生長速度の比較による阻害濃度

ErC50 (24-48h) : >96.7 mg/L (95%信頼区間: 算出不可)

NOECr (24-48h) : >96.7 mg/L

ErC50 (24-72h) : >96.7 mg/L (95%信頼区間: 算出不可)

NOECr (24-72h) : >96.7 mg/L

5.5 温度および pH

暴露期間中の培養試験装置内の温度を Table 5 に, 試験液および試験培養液の pH を Table 6 に示した。

培養試験装置内の温度は, 設定範囲 ($23 \pm 2^\circ\text{C}$) 内であった。pH は, 暴露開始時の試験液が 7.9~8.0 であり, 暴露終了時の試験培養液が 9.7~10.4 であった。全試験区で pH が 1 以上増加したが, 炭酸同化が盛んに行われ藻類の生長率が高ければ 1 以上増加することがあり, 問題はないと考えられた。

5.6 試験計画書からの逸脱事項

該当する事象はなかった。

以 上

Table 1 Measured Concentration of the Test Substance in Test Cultures

Nominal Concentration (mg/L)	Measured Concentration (mg/L)			
	0 Hour	Percent of Nominal	72 Hours	Percent of Nominal
Control	<0.1	--	<0.1	--
150	96.7	64	77.1	51

Table 2 Cell Densities of *Pseudokirchneriella subcapitata* during the 72-Hour Exposure

Nominal Concentration [Measured Conc. at 0hr] (mg/L)	Vessel No.	Cell Densities (cells/mL)			
		0 Hour*	24 Hours	48 Hours	72 Hours
Control	1	10000	53900	322800	608500
	2	10000	56800	309800	629500
	3	10000	55400	303800	642500
	Average	10000	55400	312100	626800
	SD	0	1500	9700	17200
150 [96.7]	1	10000	51800	271800	777500
	2	10000	52700	290800	749500
	3	10000	57300	302800	750500
	Average	10000	53900	288500	759200
	SD	0	3000	15600	15900

SD: Standard deviation

* : Nominal initial densities

Table 3 Growth Inhibition (%) of *Pseudokirchneriella subcapitata*

Nominal Concentration [Measured Conc. at 0hr]		Area under the growth curves		Growth Rate			
mg/L	Vessel No.	Area	Inhibition (%) ^{*1}	Rate	Inhibition (%) ^{*1}	Rate	Inhibition (%) ^{*1}
		A (0-72h)	I _A (0-72h)	μ (24-48h)	I _μ (24-48h)	μ (24-72h)	I _μ (24-72h)
Control	1	15743000		0.0746		0.0505	
	2	15752000		0.0707		0.0501	
	3	15731000		0.0709		0.0511	
	Average SD	15742000 11000	-	0.0721 0.0022	-	0.0506 0.0005	-
150 [96.7]	1	16496000		0.0691		0.0564	
	2	16638000		0.0712		0.0553	
	3	17048000		0.0694		0.0536	
	Average SD	16727000 287000	-6.3+	0.0699 0.0011	3.1	0.0551 0.0014	-8.9++

^{*1} Values are the growth 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. (There was no sign in this test.)

+, ++ This concentration level showed a significant difference (+: $\alpha=0.05$, ++: $\alpha=0.01$), but we concluded that this concentration level did not show adverse effect on Algal growth.

Table 4 Calculated EC50 and NOEC

Based on I_A (0-72h) value (Areas under growth curve)

ErC50 (0-72h) (mg/L)	95-Percent Confidence Limits (mg/L)	NOECb (0-72h) (mg/L)
>96.7	--	>96.7

Based on I_A (24-48h) value (Growth rates)

ErC50 (24-48h) (mg/L)	95-Percent Confidence Limits (mg/L)	NOECr (24-48h) (mg/L)
>96.7	--	>96.7

Based on I_A (24-72h) value (Growth rates)

ErC50 (24-72h) (mg/L)	95-Percent Confidence Limits (mg/L)	NOECr (24-72h) (mg/L)
>96.7	--	>96.7

The EC50 values and associated 95% confidence limits could not be determined by least squares linear regression analysis because the test was conducted at one concentration level.

-- not calculated

The NOEC values were determined by Student's and Aspin-Welch's t-test, subsequent to F test for homogeneity of variances. Statistical analyses were performed using Yukms Statlight #3 software (Yukms Corp., Tokyo) and all tests of significance were at $\alpha = 0.05$.

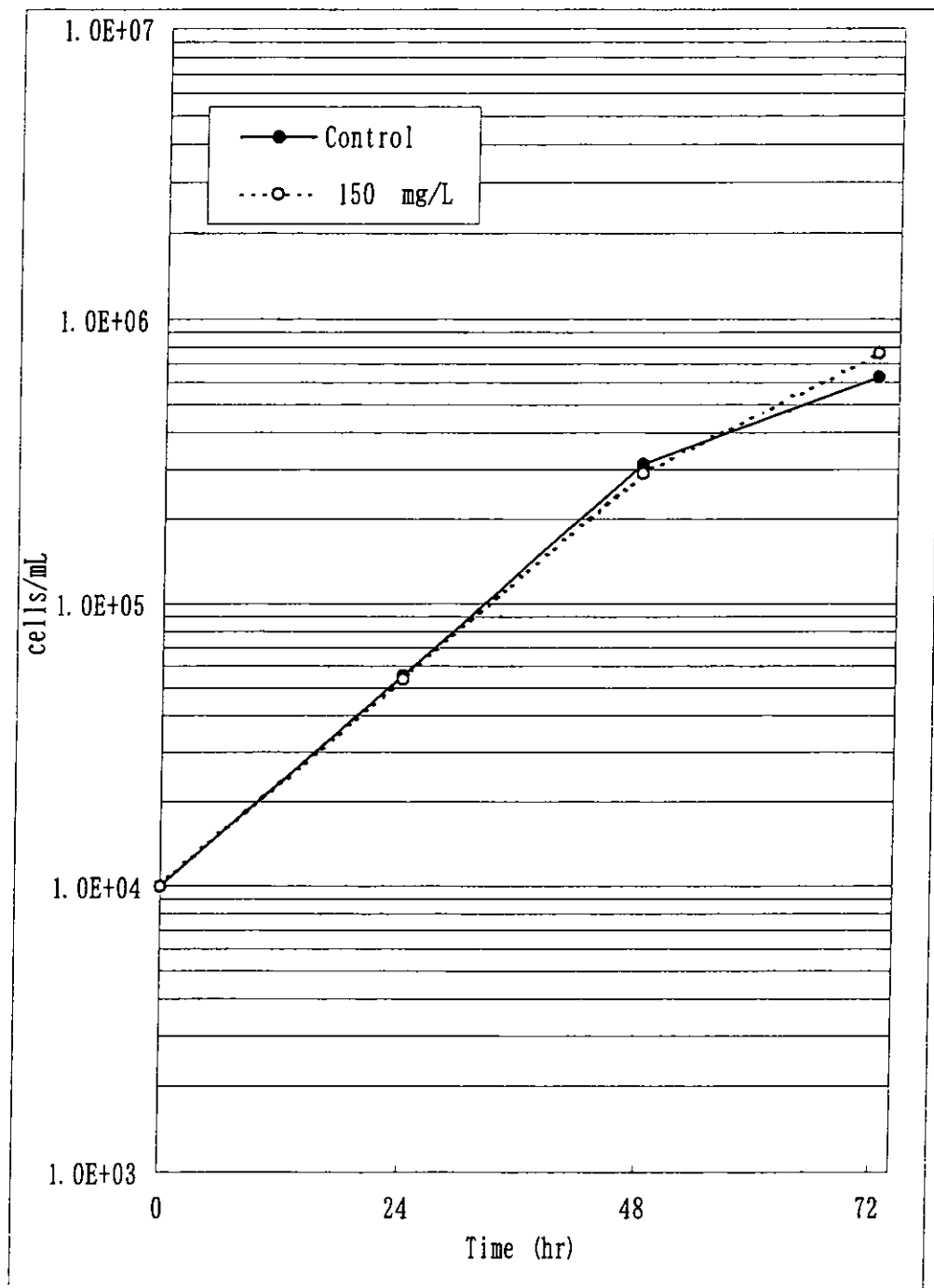
Table 5 Temperature in the Incubation Chamber

Exposure Period (Hours)	Temperature (°C)
0	22.9
24	22.3
48	22.1
72	22.9

Table 6 pH Values of Test Cultures

Nominal Concentration [Measured Conc. at 0hr] (mg/L)	pH	
	0 Hour	72 Hours (Vessel No)
Control	8.0	10.4 (1)
150 [96.7]	7.9	9.7 (1)

Figure 1 Algal Growth Curve of *Pseudokirchneriella subcapitata*
(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

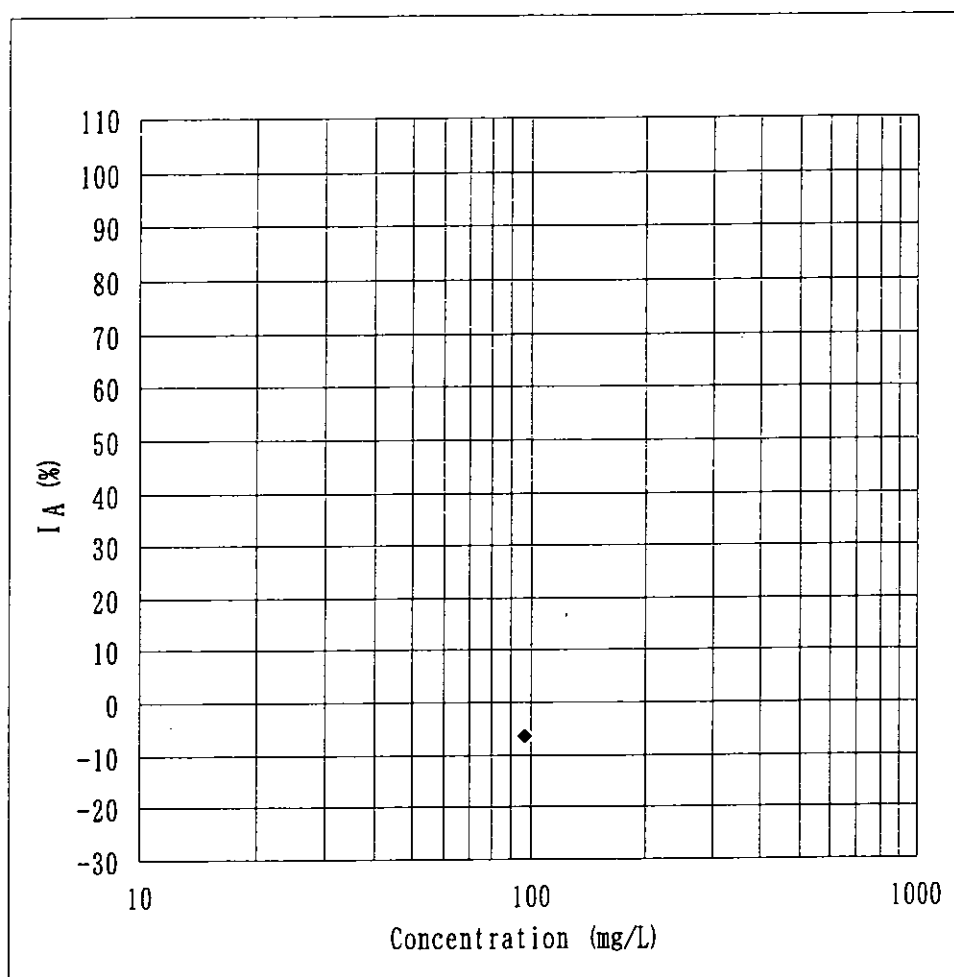
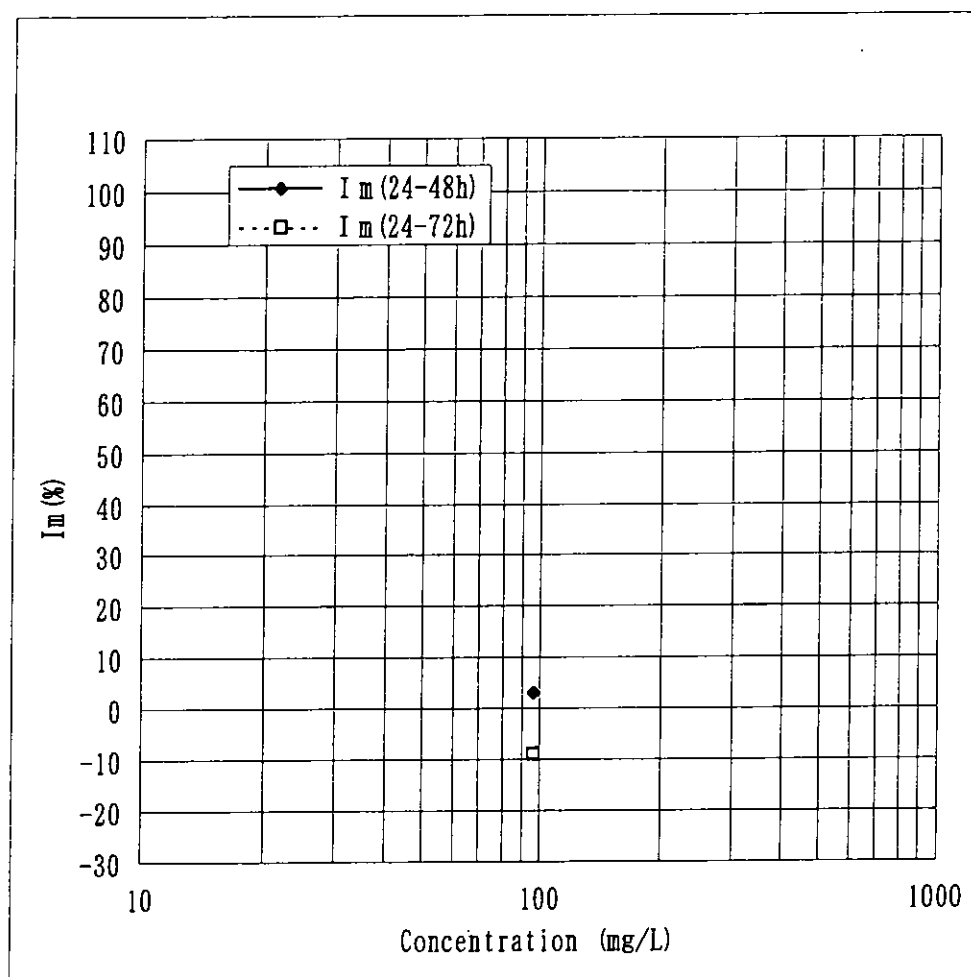


Figure 3 Concentration-Inhibition Curve Based on I_m values Calculated from the Growth Rates



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

試験液の調製

試験液の調製

1. 準備

① 被験物質原液 I の調製

採取量	→	200	mg
溶媒	→	試験用水 (23±2°CにしたOECD推奨培地)	
最終容量	→	200	mL
容器	→	マスフラスコ	
濃度	→	1000	mg/L
混合方式	→	スターラーで攪拌 (1分), 密栓	

2. 試験液の調製

①の原液 I を攪拌せずそのまま, 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。

試験用水 (最終容量)	→	0.10	L
容器	→	500mL容共栓付三角フラスコ (IWAKI製)	
混合方式	→	手で振とう攪拌, 密栓	
濃度公比	→		
1濃度区の連数	→	3	

(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)	①原液 I mL
対照区	C	→ 0
150	Conc.1	→ 15.000

付属資料－ 3

試験液および試験培養液の分析

1 試験液および試験培養液の分析方法

- 1) 各濃度区 3 個の試験容器より試験液または試験培養液 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: 日立工機製 CR 2 1 E 型

- 2) アセトンで調製した標準溶液 0.75 mL を測定用バイアルに採取し, 精製水* を等量添加し混合後, GC/MS により分析した。クロマトグラムを Figure A-3-2 (1), (4) に示した。

* : JIS K0557 A4 グレードの水, ヤマト科学製 超純水製造装置 WR600A

- 3) 各分析試料 0.75 mL を測定用バイアルに採取し, アセトンを等量添加し混合後, GC/MS により分析した。クロマトグラムを Figure A-3-2 (2), (3), (5), (6) に示した。

- 4) 各試験液および試験培養液の被験物質濃度は, 各分析時に測定した標準溶液のピーク面積を用いて, 一点検量法により定量した。

なお, 暴露開始前に試験濃度範囲の全域にわたって検量線を作成し, 直線性を確認している。(「3 検量線」参照)

2 ガスクロマトグラフィー質量分析 (GC/MS) 測定条件 (装置)

ガスクロマトグラフ質量分析計 No.2

ガスクロマトグラフ (GC) : Agilent Technologies 6890N 型
オートサンプラ : Agilent Technologies 7683 型
質量選択検出器 (MSD) : Agilent Technologies 5973 型
データ処理部 : MSD ケミステーション (Windows xp)

(条件)

[GC 条件]

カラム : Agilent HP-5MS 30m×0.25mm×0.25 μm
キャリアーガス : ヘリウム 1.0mL/min (Constant flow)
オープン温度 : 45℃ (5min) → 20℃/min → 150℃
注入口温度 : 200℃
MS インターフェース温度 : 280℃
注入条件 : スプリットレス
注入量 : 1.0 μL

[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 :
Solvent Delay= 2min
Filament off= 5min
Quant ion= 69.1, 100.1 m/z の TIC

3 検量線

アセトンを用い, 0, 0.5~200 mg/L の標準溶液を調製した。この標準溶液を一定量採取し等量の精製水で希釈したものを GC/MS で測定した。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。検量線の最小二乗法による直線回帰式の相関係数は 1.00 と良好であった。作成した検量線を Figure A-3-1 に示した。

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または試験培養液中の被験物質濃度 0.1 mg/L を検出限界とした。

5 添加回収試験

分析前処理は、「1 試験液および試験培養液の分析方法」に示したように試験液または試験培養液とアセトン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-3-1 Calibration curve

Input Data		
No.	Concentration (mg/L)	Peak Area (count)
1	0	0
2	0.5	5683
3	1.0	10900
4	2.0	29134
5	5.0	68234
6	10.0	140691
7	20.0	318486
8	50.0	820328
9	100	1787176
10	200	3574183

$$Y = 17,778X$$

$$r = 1.00$$

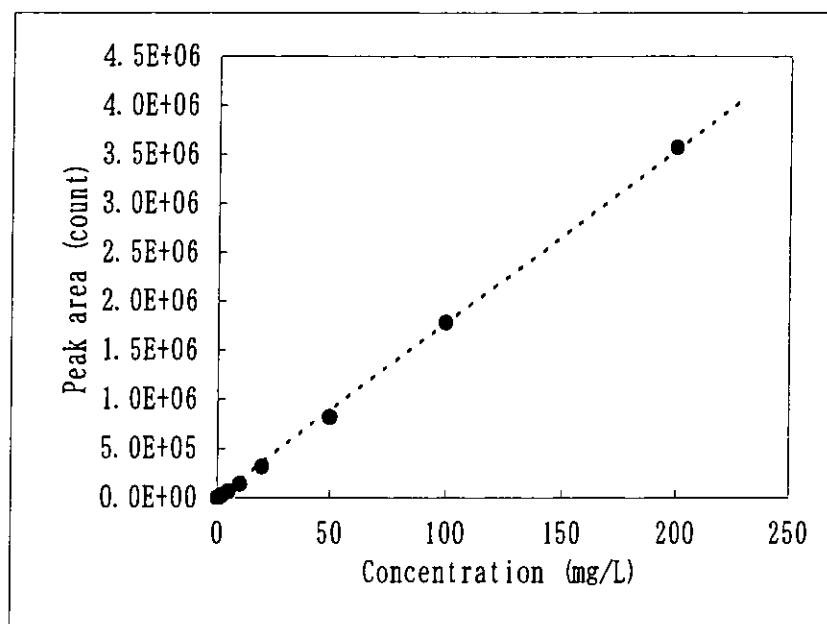
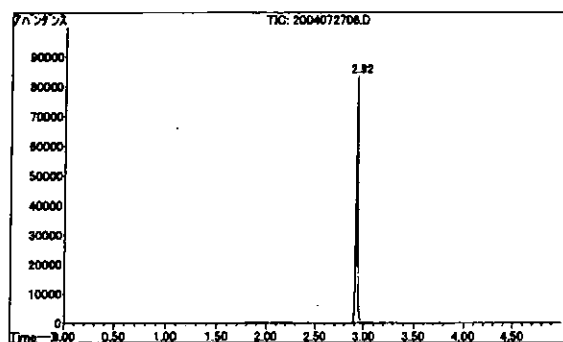


Figure A-3-2 Representative chromatograms

(1) Standard 100 mg/L ; 0 Hour

Study No. : A030427-1
 Date : 2004.07.27
 Operator :
 Sample Information: MM
 Sample Name : STD 100mg/L
 Misc Info :
 File Name : C:\MSDCHEM\1\DATA\A030427\2004072706.D
 Acquired : 27 Jul 2004 14:38 using AcqMethod A030427

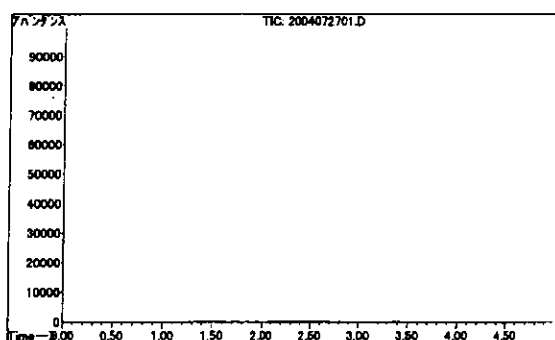


TIC: 2004072706.D

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	2.918	M	0.024	1263652	2.895	3.082

(2) Control ; 0 Hour

Study No. : A030427-1
 Date : 2004.07.27
 Operator :
 Sample Information: MM
 Sample Name : ALORC
 Misc Info :
 File Name : C:\MSDCHEM\1\DATA\A030427\2004072701.D
 Acquired : 27 Jul 2004 12:21 using AcqMethod A030427



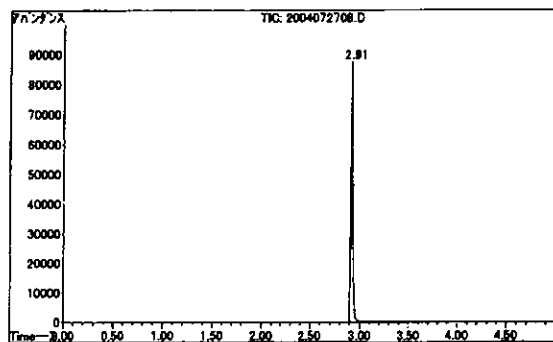
TIC: 2004072701.D

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-3-2 Continued

(3) 150 mg/L nominal ; 0 Hour

Study No. : A030427-1
 Date : 2004.07.27
 Operator :
 Sample Information:
 Sample Name : ALORCI
 Misc Info :
 File Name : C:\MSDCHEM\1\FDATA\A030427\2004072708.D
 Acquired : 27 Jul 2004 16:18 using AcqMethod A030427

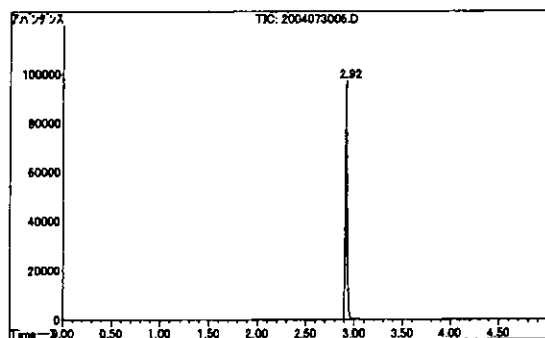


TIC: 2004072708.D

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	2.915	M	0.023	1222485	2.885	3.091

(4) Standard 100 mg/L ; 72 Hours

Study No. : A030427-1
 Date : 2004.7.30
 Operator :
 Sample Information:
 Sample Name : STD 100mg/L
 Misc Info :
 File Name : C:\MSDCHEM\1\FDATA\A030427\2004073005.D
 Acquired : 30 Jul 2004 13:55 using AcqMethod A030427



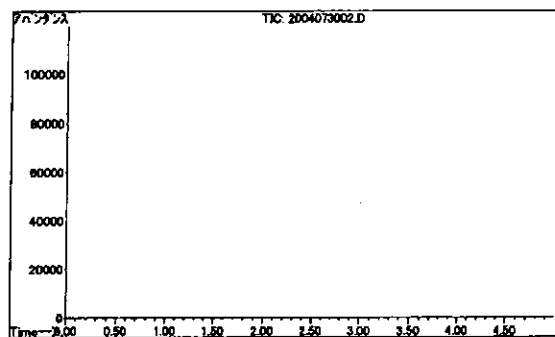
TIC: 2004073005.D

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	2.917	M	0.024	1471457	2.894	3.074

Figure A-3-2 Continued

(5) Control ; 72 Hours

Study No. : A030427-1
 Date : 2004.7.30
 Operator :
 Sample Information:
 Sample Name : AL72HC
 Misc Info :
 File Name : C:\MSDCHEM\1\DATA\A030427\2004073002.D
 Acquired : 30 Jul 2004 12:12 using AcqMethod A030427

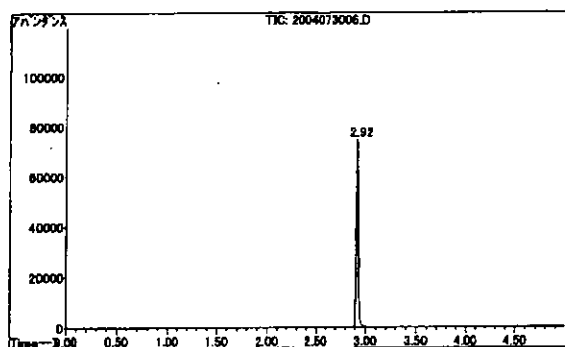


TIC: 2004073002.D

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						

(6) 150 mg/L nominal ; 72 Hours

Study No. : A030427-1
 Date : 2004.7.30
 Operator :
 Sample Information:
 Sample Name : AL72HC1
 Misc Info :
 File Name : C:\MSDCHEM\1\DATA\A030427\2004073006.D
 Acquired : 30 Jul 2004 14:10 using AcqMethod A030427



TIC: 2004073006.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	2.917	M	0.023	1135029	2.894	3.074

付属資料－ 4

結果の算出

Table A-4 Calculation of the NOEC

(1) NOECb (0-72h)

Input Data Table

Control	Conc. 1
Group1	Group2
1574.3	1649.6
1575.2	1663.8
1573.1	1704.8

Group	Samples	Mean	S. E.	S. D.	Variance			
1	3	1,574.2000	0.6083	1.0536	1.1100			
2	3	1,672.7333	16.5491	28.6638	821.6133			
Method	vs	Side	Stat.	0.05	0.01	0.001	Prob.	
F test	1 vs 2	0	740.1922	>19.0000	99.0000	999.0000	0.00134918	
Student t test	1 vs 2	2	5.9500	2.7763	4.6021	8.5802	0.00400338	
Aspin-Weich t test	1 vs 2	2	5.9500	>4.2822	9.7337	28.7822	0.0272 *	

Table A-4 Continued

(2) NOECr (24-48h)

Input Data Table

Control	Conc. 1
Group1	Group2
0.0746	0.0691
0.0707	0.0712
0.0709	0.0694

Group	Samples	Mean	S. E.	S. D.	Variance			
1	3	0.0721	0.0013	0.0022	0.0000			
2	3	0.0699	0.0007	0.0011	0.0000			
Method	vs	Side	Stat.	0.05	0.01	0.001	Prob.	
F test	1 vs 2	0	3.7390	<19.0000	99.0000	999.0000	0.2110	
Student t test	1 vs 2	2	1.5178	<2.7763	4.6021	8.5802	0.2037	
Aspin-Welch t test	1 vs 2	2	1.5178	3.1825	5.8323	12.7492	0.3408	

Table A-4 Continued

(3) NOECr (24-72h)

Input Data Table

Control	Conc. 1
Group1	Group2
0.0505	0.0564
0.0501	0.0553
0.0511	0.0536

Group	Samples	Mean	S. E.	S. D.	Variance		
1	3	0.0506	0.0003	0.0005	0.0000		
2	3	0.0551	0.0008	0.0014	0.0000		
Method	vs	Side	Stat.	0.05	0.01	0.001	Prob.
F test	1 vs 2	0	7.8553	<19.0000	99.0000	999.0000	0.1129
Student t test	1 vs 2	2	5.2424	>2.7763	>4.6021	8.5802	0.0063 **
Aspin-Welch t test	1 vs 2	2	5.2424	3.5710	7.1236	17.6592	0.0426