

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

クロロ酢酸の

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

(試験番号 : A 0 5 0 0 7 3)

2005年11月25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 : クロロ酢酸の藻類 (*Pseudokirchneriella subcapitata*) に
対する生長阻害試験

試 験 番 号 : A050073

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」

(薬食発第1121003号、平成15・11・17製局第3号、環保企発第031121004号、2003)

2005年11月25日

試験責任者

(2005年11月 1日付, から氏名変更)

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 : クロロ酢酸の藻類 (*Pseudokirchneriella subcapitata*) に対する
生長阻害試験

試 験 番 号 : A050073

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 | | |
| 試験計画書 | 2005年10月 7日 | 2005年10月 7日 |
| 試験の査察 | | |
| 試験液の調製 | 2005年10月18日 | 2005年10月18日 |
| 藻類の添加 | 2005年10月18日 | 2005年10月18日 |
| 試験液の分析 | 2005年10月21日 | 2005年10月21日 |
| 細胞濃度の測定 | 2005年10月21日 | 2005年10月21日 |
| 最終報告書監査 | 2005年11月25日 | 2005年11月25日 |

信頼性保証部門担当者: 2005年11月25日

2005年11月25日

2005年11月25日

試験実施概要

1. 表 題 : クロロ酢酸の藻類 (*Pseudokirchneriella subcapitata*) に対する生長阻害試験
(試験番号 : A050073)
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>」(薬食発第 1121002 号, 平成 15・11・13 製局第 2 号, 環保企発第 031121002 号, 2003)
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」(薬食発第 1121003 号, 平成 15・11・17 製局第 3 号, 環保企発第 031121004 号, 2003)
5. 試験委託者 : 環境省
東京都千代田区霞が関一丁目 2-2
6. 試験受託者 : 株式会社三菱化学安全科学研究所
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
神奈川県横浜市青葉区鴨志田町 1000 番地
8. 試験責任者 : XXXXXXXXXX
環境科学 C グループ
(2005 年 11 月 1 日付, XXXXXXXXXX から氏名変更)

9. 試験担当者 : [redacted] [redacted] (2005年11月25日)
(試験実施, 報告書作成)

[redacted] [redacted] (2005年11月25日)
(試験実施)

[redacted] [redacted] (2005年11月25日)
(試験実施)

[redacted] [redacted] (2005年11月25日)
(試験実施)

[redacted] [redacted] (2005年11月25日)
(分析実施)

10. 試験日程 : 試験開始日 2005年10月 7日
暴露開始日 2005年10月18日
暴露終了日 2005年10月21日
試験終了日 2005年11月25日

11. 保管 : 下記の試資料は, (株)三菱化学安全科学研究所 横浜研究所の
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 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 | 10 |
| 1.3 保管法および安定性の確認 | 10 |
| 2 供試生物 | 11 |
| 3 試験方法 | 11 |
| 3.1 試験条件 | 11 |
| 3.2 培地 | 12 |
| 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 | 13 |
| 3.5 試験液の調製 | 14 |
| 3.6 試験液および試験培養液の分析 | 14 |
| 3.7 試験操作 | 14 |
| 3.8 結果の算出 | 15 |
| 4 結果および考察 | 18 |
| 4.1 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 |
| 4.2 試験液および試験培養液中の被験物質濃度 | 18 |
| 4.3 生長曲線 | 18 |
| 4.4 半数生長阻害濃度 (EC50) および最大無影響濃度 (NOEC) | 18 |
| 4.5 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 | 19 |
| 4.6 藻類の観察結果 | 19 |
| Table 1~8 | 20~25 |
| Figure 1~3 | 26~28 |
| 付属資料-1 赤外吸収スペクトル | 29~30 |
| 付属資料-2 化審法テストガイドライン推奨培地の組成 | 31~32 |
| 付属資料-3 試験液の調製 | 33~34 |
| 付属資料-4 試験液および試験培養液の分析 | 35~45 |
| 付属資料-5 結果の算出 | 46~50 |

要 約

試験委託者

環境省

表題

クロロ酢酸の藻類 (*Pseudokirchneriella subcapitata*) に対する生長阻害試験

試験番号

A050073

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>」（薬食発第1121002号，平成15・11・13製局第2号，環企発第031121002号，2003）（以下，化審法テストガイドラインと称する）に準拠して実施した。

- 1) 培養方式： 止水式（開放系），振とう培養（100rpm）
- 2) 暴露期間： 72時間
- 3) 試験濃度（設定値）：
対照区，
0.0200, 0.0340, 0.0590, 0.100, 0.170, 0.300 mg/L
公比：1.7
- 4) 試験液量： 100 mL／容器
- 5) 連数： 6 容器／対照区，3 容器／濃度区
- 6) 初期細胞濃度： 前培養した藻類 5×10^3 cells/mL
- 7) 試験温度： 23 ± 2 °C
- 8) 照明： $75 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ （装置中央フラスコ液面付近）で連続照明
（装置内変動：±20％以内）
- 9) 分析法： 高速液体クロマトグラフィー質量分析（LC／MS）

結 果

1) 試験液および試験培養液中の被験物質濃度

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 106～111 %，暴露終了時の試験培養液において 49～103 %であった。濃度減少の主な原因は、低濃度の方が減少が大きいことから、藻体への移行が考えられた。阻害濃度の算出には測定値の平均値（時間加重平均）を用いた。

2) 生長速度の比較による阻害濃度

半数生長阻害濃度 $ErC50$ (0-72h) : 0.158 mg/L (95%信頼区間 : 0.152～0.164 mg/L)

最大無影響濃度 $NOECr$ (0-72h) : 0.0331 mg/L

3) 生長曲線下面積の比較による阻害濃度

半数生長阻害濃度 $EbC50$ (0-72h) : 0.0663 mg/L (95%信頼区間 : 0.0500～0.0880 mg/L)

最大無影響濃度 $NOECb$ (0-72h) : 0.0331 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、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。

1 被験物質

1.1 名称，構造式および物理化学的性状

| | | | |
|----------------------------------|--|-------------------|-------------|
| 被験物質の名称 | クロロ酢酸 | | |
| 別名 | モノクロロ酢酸（略称：CAA） | | |
| 構造式又は示性式 (いずれも不明の場合は、その製法の概要) | <div>$\begin{array}{c} \text{H} \quad \text{O} \\ \quad \\ \text{Cl}-\text{C}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{H} \end{array}$</div> | | |
| 試験に供した物質の純度 | 100.0% | 試験に供した物質の Lot No. | 610C2140 |
| 不純物の名称及び濃度 | — | | |
| C A S 番号 | 79-11-8 | 蒸気圧 | 1 hPa (20℃) |
| 分子量 | 94.50* | 分配係数 | — |
| 融点 | 62.8℃ | 常温における性状 | 無色結晶 |
| 沸点 | 189℃ | | |
| 安定性 | 通常条件で安定 | | |
| 溶媒に対する溶解度等 | 溶媒 | 溶解度 | 溶媒中の安定性 |
| | 水 | 45% (20℃) | — |
| | エタノール | 可溶 | — |
| | クロロホルム | 可溶 | — |

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。

*：当社計算値

1.2 供試試料

供給者： XXXXXXXXXX

1.3 保管法および安定性の確認

被験物質は試験期間中、当研究所内の試験物質保管用冷蔵庫（保管条件：冷蔵，暗所）内に保管した。試験終了時，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試験開始時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：Nicolet AVATAR 320 型

2 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）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 = 0.430 ± 0.0698 mg/L, n=17
(最小値 ~ 最大値 = 0.285 ~ 0.543 mg/L)
- 8) 前培養 : 前培養期間；2005年10月14日～2005年10月18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

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＞」（薬食発第1121002号，平成15・11・13製局第2号，環企発第031121002号，2003）（以下，化審法テストガイドラインと称する）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。

3.1 試験条件

- 1) 培養方式 : 止水式（開放系），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 : 6容器／対照区，3容器／濃度区
- 5) 初期細胞濃度 : 前培養した藻類 5×10^3 cells/mL
- 6) 試験温度 : 23 ± 2 °C
- 7) 照明 : $75 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ （装置中央フラスコ液面付近）で連続照明
（装置内変動：±20%以内）
- 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化審法テストガイドライン〈藻類生長阻害試験〉に示されている推奨培地を濾過滅菌 ($0.22\mu\text{m}$) 後用いた。組成表を付属資料-2に示す。

3.3 試験容器および藻類培養試験装置等

- 1) 試験容器 : 300 mL容ガラス製三角フラスコ (IWAKI製) (通気性のシリコン栓付)
- 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) 光量子計 : Apogee製 QMSS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 AB204-S型
メトラー製 PB3002型

3.4 試験濃度の設定

試験濃度は、当該被験物質の培地に対する溶解度>1000 mg/L（当社測定値）のため、試験上限濃度の 100 mg/L以下とし、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。

なお、予備試験において被験物質の濃度減少がみられるが、この主な原因としては、低濃度の方が減少が大きいことから、藻体への移行が考えられた。

本試験濃度（設定値）：対照区、

0.0200, 0.0340, 0.0590, 0.100, 0.170, 0.300 mg/L

公比：1.7

予備試験結果

No. 1

| 濃度 (mg/L) | 対照区に対する 72時間後の阻害率 (%) | 0時間時分析結果 (設定値に対する 割合, %) | 72時間後分析結果 (設定値に対する割合, %) | |
|--------------|-----------------------------|--------------------------------|-----------------------------|-------|
| | | | 藻類添加有 | 藻類添加無 |
| 対照区 | -- | -- | -- | -- |
| 0.00800 | 2 | 104 | 40 | 134 |
| 0.00900 | -1 | -- | -- | -- |
| 0.0100 | 1 | 112 | 36 | 104 |
| 0.0150 | 7 | -- | -- | -- |
| 0.0200 | -2 | 109 | 40 | 115 |

No. 2

| 濃度 (mg/L) | 対照区に対する 72時間後の阻害率 (%) | 0時間時分析結果 (設定値に対する 割合, %) | 72時間後分析結果 (設定値に対する割合, %) | |
|--------------|-----------------------------|--------------------------------|-----------------------------|-------|
| | | | 藻類添加有 | 藻類添加無 |
| 対照区 | -- | -- | -- | -- |
| 0.0150 | -31 | -- | -- | -- |
| 0.0200 | -39 | 102 | 71 | -- |
| 0.0300 | -30 | 100 | 61 | -- |
| 0.0400 | 34 | -- | -- | -- |
| 0.200 | 97 | -- | -- | -- |
| 0.300 | 99 | -- | -- | -- |
| 0.400 | 99 | 108 | 101 | -- |

3.5 試験液の調製

試験液の調製方法を付属資料－3に示す。対照区は培地のみとした。なお、調製に用いた各原液は用時調製した。

調製時の試験液の外観を観察し記録した。

3.6 試験液および試験培養液の分析

暴露開始時、開始24、48時間後および終了時に、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、高速液体クロマトグラフィー質量分析（LC/MS）により分析した。

暴露開始時には、各試験区毎に、全ての試験容器より試験液を一定量ずつ採取して混合したものを分析試料とした。暴露開始24、48時間後および暴露終了時には、各試験区毎に、全ての試験容器より試験培養液を一定量ずつ採取して混合し、藻類を遠心分離（3000 rpm, 10分間）後の上澄み液を分析試料とした。

詳細を付属資料－4に示す。

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 5×10^3 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（72 時間では 0.5 mL）を採取し、粒子計数装置用電解液（セルパック）9.0 mL（72 時間では 9.5 mL）と混合した後、粒子計数装置により計数した。

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、各試験区の試験容器とは別の予備容器の試験液について測定し、終了時の 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。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少なくとも 1 日 1 回測定した。

3.8 結果の算出

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。

2) 生長阻害率の算出

下記の方法（速度法および面積法）で生長阻害率を算出した。

①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。

$$\mu_{i-n} = \frac{\ln N_n - \ln N_i}{t_n - t_i}$$

ここで、

μ_{i-n} : 生長速度

N_i : t_i 時の実測細胞濃度 (cells/mL)

[試験開始時（ t_0 ）の細胞濃度については設定値を用いる]

N_n : t_n 時の実測細胞濃度 (cells/mL)

t_i : 暴露開始後 i 回目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_μ ）を次の式により算出した。

$$I_\mu = \frac{\mu_c - \mu_i}{\mu_c} \times 100$$

ここで、

μ_c : 対照区の平均生長速度

μ_i : 各濃度区における平均生長速度

②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

N₀: 暴露開始時の設定細胞濃度 (cells/mL)

N₁: t₁時の実測細胞濃度 (cells/mL)

N_n: t_n時の実測細胞濃度 (cells/mL)

t₁: 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

3) 阻害濃度算出に用いる被験物質濃度の決定

4), 5) のEC50およびNOECの算出に用いる被験物質濃度は、測定値の平均値 (時間加重平均) とした。

(時間加重平均)

$$\overline{mc_n} = \frac{ConcA_n - ConcB_n}{\ln(ConcA_n) - \ln(ConcB_n)}$$

$$\overline{MC} = \frac{\overline{mc_1} + \overline{mc_2} + \cdots + \overline{mc_n}}{n}$$

$\overline{mc_n}$: 各暴露期間の平均測定濃度
(ConcA_nとConcB_nが同じ値の場合はConcA_n)

ConcA_n: n期間の始めの測定濃度
(暴露開始時または暴露開始24, 48時間後の測定濃度)

ConcB_n: n期間の終わりの測定濃度
(暴露開始24, 48時間後または暴露終了時の測定濃度)

\overline{MC} : 平均測定濃度

4) 半数生長阻害濃度 (EC50) の算出

2) で算出した速度法および面積法による生長阻害率 (I_{μ} 値および I_A 値) を用いて、以下の方法で半数生長阻害濃度 (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_{μ} 値より求めた場合: ErC50 (0-72h) I_A 値より求めた場合: EbC50 (0-72h) | |

5) 最大無影響濃度 (NOEC)

最大無影響濃度 (NOEC) は、速度法により求めた場合は NOECr (0-72h) , 面積法により求めた場合は NOECb (0-72h) とした。

それぞれの算出には、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 Dunnettの多重比較検定 ($\alpha=0.05$, 両側) を行った。その結果、対照区と比較して有意差が認められない試験最高濃度をNOEC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」 (Yukms Corp., 東京) を用いた。

4 結果および考察

4.1 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。

4.2 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、暴露開始 24, 48 時間後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、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 106~111 %, 暴露終了時の試験培養液において 49~103 %であった。濃度減少の主な原因は、低濃度の方が減少が大きいことから、藻体への移行が考えられた。

4.3 生長曲線

暴露期間中の細胞濃度を Table 2, 対照区の生長速度を Table 3 および生長曲線を Figure 1 に示す。

対照区における細胞濃度は 72 時間の培養で平均 420 倍増加し、また、対照区における繰り返し間の生長速度の変動係数および毎日の生長速度の変動係数は、それぞれ 15%, 35% を超えることはなく、試験条件（開放系条件）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。

4.4 半数生長阻害濃度（EC50）および最大無影響濃度（NOEC）

濃度区における生長阻害率を Table 4 に、半数生長阻害濃度（EC50）および最大無影響濃度（NOEC）を Table 5 に、濃度-阻害率曲線を Figure 2 および Figure 3 に、EC50 および 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-5 に示す。得られた EC50 および NOEC を以下に示す。

1) 生長速度の比較による阻害濃度

ErC50 (0-72h) : 0.158 mg/L (95%信頼区間 : 0.152~0.164 mg/L)

NOECr (0-72h) : 0.0331 mg/L

2) 生長曲線下面積の比較による阻害濃度

EbC50 (0-72h) : 0.0663 mg/L (95%信頼区間 : 0.0500~0.0880 mg/L)

NOECb (0-72h) : 0.0331 mg/L

4.5 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 6に，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Table 7に示す。

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 8.0～8.2，暴露終了時 8.0～9.8であった。

また，調製時の試験液の外観をTable 8に示す。全ての試験区において，けん濁物質，浮遊物質，沈殿物，油状物質は認められず，色調は無色であった。

4.6 藻類の観察結果

試験培養液の肉眼による色調観察の結果，全濃度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。

以 上

Table 1 Measured Concentration of the Test Substance in Test Cultures

| Nominal Concentration (mg/L) | Measured Concentration (mg/L) (Percent of Nominal) | | | | Mean ^a Measured Concentration (Percent of Nominal) (mg/L) |
|------------------------------------|---|-----------------|-----------------|----------------|---|
| | 0 Hour | 24 Hour | 48 Hours | 72 Hours | |
| Control | <0.0003 | <0.0003 | <0.0003 | <0.0003 | --- |
| 0.0200 | 0.0218 (109) | 0.0209 (105) | 0.0185 (93) | 0.0098 (49) | 0.0182 (91) |
| 0.0340 | 0.0370 (109) | 0.0373 (110) | 0.0346 (102) | 0.0195 (57) | 0.0331 (97) |
| 0.0590 | 0.0623 (106) | 0.0623 (106) | 0.0604 (102) | 0.0448 (76) | 0.0586 (99) |
| 0.100 | 0.111 (111) | 0.107 (107) | 0.109 (109) | 0.0993 (99) | 0.107 (107) |
| 0.170 | 0.184 (108) | 0.175 (103) | 0.183 (108) | 0.172 (101) | 0.179 (105) |
| 0.300 | 0.328 (109) | 0.313 (104) | 0.317 (106) | 0.310 (103) | 0.316 (105) |

a : time weighted mean

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

| Nominal Concentration [Mean ^a Measured Conc.] (mg/L) | Vessel No. | Cell Densities (cells/mL) | | | |
|---|---------------|---------------------------|---------------|-----------------|-------------------|
| | | 0 Hour* | 24 Hours | 48 Hours | 72 Hours |
| Control | 1 | 5000 | 35500 | 287800 | 2279700 |
| | 2 | 5000 | 36400 | 279800 | 1939700 |
| | 3 | 5000 | 31300 | 268800 | 1799700 |
| | 4 | 5000 | 36800 | 299800 | 2339700 |
| | 5 | 5000 | 33800 | 283800 | 2059700 |
| | 6 | 5000 | 35200 | 306800 | 2169700 |
| | Average SD | 5000 0 | 34800 2000 | 287800 13800 | 2098000 206000 |
| 0.0200 [0.0182] | 1 | 5000 | 33700 | 314800 | 2259700 |
| | 2 | 5000 | 34600 | 307800 | 2399700 |
| | 3 | 5000 | 34800 | 310800 | 2099700 |
| | Average SD | 5000 0 | 34400 600 | 311100 3500 | 2253000 150100 |
| 0.0340 [0.0331] | 1 | 5000 | 30600 | 268800 | 2199700 |
| | 2 | 5000 | 32600 | 246800 | 1889700 |
| | 3 | 5000 | 30100 | 278800 | 2159700 |
| | Average SD | 5000 0 | 31100 1300 | 264800 16400 | 2083000 168600 |
| 0.0590 [0.0586] | 1 | 5000 | 22800 | 181800 | 1329700 |
| | 2 | 5000 | 24200 | 162800 | 1199700 |
| | 3 | 5000 | 25100 | 184800 | 1299700 |
| | Average SD | 5000 0 | 24000 1200 | 176500 11900 | 1276400 68100 |
| 0.100 [0.107] | 1 | 5000 | 17900 | 72000 | 303700 |
| | 2 | 5000 | 16200 | 59400 | 245700 |
| | 3 | 5000 | 18500 | 67800 | 287700 |
| | Average SD | 5000 0 | 17500 1200 | 66400 6400 | 279000 30000 |
| 0.170 [0.179] | 1 | 5000 | 11800 | 31500 | 101700 |
| | 2 | 5000 | 12200 | 25700 | 64600 |
| | 3 | 5000 | 11600 | 25000 | 63300 |
| | Average SD | 5000 0 | 11900 300 | 27400 3600 | 76500 21800 |
| 0.300 [0.316] | 1 | 5000 | 10600 | 20100 | 47800 |
| | 2 | 5000 | 10400 | 15300 | 30900 |
| | 3 | 5000 | 10400 | 16100 | 29700 |
| | Average SD | 5000 0 | 10500 100 | 17200 2600 | 36100 10100 |

a : time weighted mean

SD : Standard deviation

* : Nominal initial densities

Table 3 Growth Rate of Control

| Vessel No. | Growth Rate | | | Average | SD | CV(%) |
|------------|---------------|----------------|----------------|---------|--------|-------|
| | μ (0-24h) | μ (24-48h) | μ (48-72h) | | | |
| 1 | 0.0817 | 0.0872 | 0.0862 | | | |
| 2 | 0.0827 | 0.0850 | 0.0807 | | | |
| 3 | 0.0764 | 0.0896 | 0.0792 | | | |
| 4 | 0.0832 | 0.0874 | 0.0856 | | | |
| 5 | 0.0796 | 0.0887 | 0.0826 | | | |
| 6 | 0.0813 | 0.0902 | 0.0815 | | | |
| Average | 0.0808 | 0.0880 | 0.0826 | 0.0838 | 0.0037 | 4.4 |
| SD | 0.0025 | 0.0019 | 0.0028 | | | |
| CV(%) | 3.1 | 2.2 | 3.4 | | | |

SD: Standard deviation

CV: Coefficient of variation

Table 4 Growth Inhibition (%) of *Pseudokirchneriella subcapitata*

| Nominal Concentration [Mean ^a Measured Conc.] | | Growth Rate | | Area under the growth curves | |
|---|---------------|------------------|-----------------------------|------------------------------|-----------------------------|
| | | Rate | Inhibition(%) ^{*1} | Area | Inhibition(%) ^{*1} |
| (mg/L) | Vessel No. | μ (0-72h) | I_{μ} (0-72h) | A(0-72h) | I_A (0-72h) |
| Control | 1 | 0.0850 | | 34816000 | |
| | 2 | 0.0828 | | 30565000 | |
| | 3 | 0.0817 | | 28499000 | |
| | 4 | 0.0854 | | 35855000 | |
| | 5 | 0.0836 | | 32039000 | |
| | 6 | 0.0843 | | 33944000 | |
| | Average SD | 0.0838 0.0014 | - | 32620000 2778000 | - |
| 0.0200 [0.0182] | 1 | 0.0849 | | 35180000 | |
| | 2 | 0.0857 | | 36714000 | |
| | 3 | 0.0839 | | 33191000 | |
| | Average SD | 0.0848 0.0009 | -1.2 | 35028000 1766000 | -7.4 |
| 0.0340 [0.0331] | 1 | 0.0845 | | 33282000 | |
| | 2 | 0.0824 | | 29082000 | |
| | 3 | 0.0843 | | 33030000 | |
| | Average SD | 0.0837 0.0012 | 0.1 | 31798000 2355000 | 2.5 |
| 0.0590 [0.0586] | 1 | 0.0775 | | 20567000 | |
| | 2 | 0.0761 | | 18584000 | |
| | 3 | 0.0772 | | 20334000 | |
| | Average SD | 0.0769 0.0007 | 8.2** | 19828000 1084000 | 39.2** |
| 0.100 [0.107] | 1 | 0.0570 | | 5502000 | |
| | 2 | 0.0541 | | 4463000 | |
| | 3 | 0.0563 | | 5224000 | |
| | Average SD | 0.0558 0.0015 | 33.4** | 5063000 538000 | 84.5** |
| 0.170 [0.179] | 1 | 0.0418 | | 1960000 | |
| | 2 | 0.0355 | | 1385000 | |
| | 3 | 0.0353 | | 1338000 | |
| | Average SD | 0.0375 0.0037 | 55.3** | 1561000 346000 | 95.2** |
| 0.300 [0.316] | 1 | 0.0314 | | 1010000 | |
| | 2 | 0.0253 | | 688000 | |
| | 3 | 0.0247 | | 692000 | |
| | Average SD | 0.0271 0.0037 | 67.7** | 797000 185000 | 97.6** |

^a time weighted mean

^{*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.

Table 5 C calculated EC50 and NOEC

Based on I_{μ} (0-72h) value (Growth rates)

| ErC50 (0-72h) (mg/L) | 95-Percent Confidence Limits (mg/L) | NOECr (0-72h) (mg/L) |
|-------------------------|---|-------------------------|
| 0.158 ^{*1} | 0.152-0.164 | 0.0331 |

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

| EcC50 (0-72h) (mg/L) | 95-Percent Confidence Limits (mg/L) | NOECb (0-72h) (mg/L) |
|-------------------------|---|-------------------------|
| 0.0663 ^{*2} | 0.0500-0.0880 | 0.0331 |

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

- *1 using the measured concentrations of 0.0586, 0.107 and 0.179 mg/L in the regression analysis
- *2 using the measured concentrations of 0.0331, 0.0586 and 0.107 mg/L in the regression analysis

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 $\alpha=0.01$.

Table 6 Temperature, Light Intensity and Revolutions in the Incubation Chamber

| Exposure Period (Hours) | Temperature (°C) | Light Intensity ($\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$) | Revolutions (rpm) |
|----------------------------|---------------------|--|----------------------|
| 0 | 22.2 | 75-78 | 100 |
| 24 | 22.7 | 75-78 | 100 |
| 48 | 22.5 | 74-78 | 100 |
| 72 | 23.0 | 72-76 | 100 |

Table 7 pH Values of Test Cultures

| Nominal Concentration [Mean ^a Measured Conc.] (mg/L) | | pH | | |
|---|----------|--------|-----------------------|-----|
| | | 0 Hour | 72 Hours (Vessel No.) | |
| Control | | 8.0 | 9.0 | (1) |
| 0.0200 | [0.0182] | 8.1 | 9.8 | (1) |
| 0.0340 | [0.0331] | 8.1 | 9.4 | (1) |
| 0.0590 | [0.0586] | 8.1 | 9.1 | (1) |
| 0.100 | [0.107] | 8.1 | 8.2 | (1) |
| 0.170 | [0.179] | 8.2 | 8.1 | (1) |
| 0.300 | [0.316] | 8.1 | 8.0 | (1) |

a : time weighted mean

Table 8 Appearance of Test Solutions after Preparation

| Nominal Concentration [Mean ^a Measured Conc.] (mg/L) | | Suspended solids | Floating solids | Precipitation | Oily Substances | Color |
|---|----------|---------------------|--------------------|---------------|--------------------|-------|
| Control | | none | none | none | none | c- |
| 0.0200 | [0.0182] | none | none | none | none | c- |
| 0.0340 | [0.0331] | none | none | none | none | c- |
| 0.0590 | [0.0586] | none | none | none | none | c- |
| 0.100 | [0.107] | none | none | none | none | c- |
| 0.170 | [0.179] | none | none | none | none | c- |
| 0.300 | [0.316] | none | none | none | none | c- |

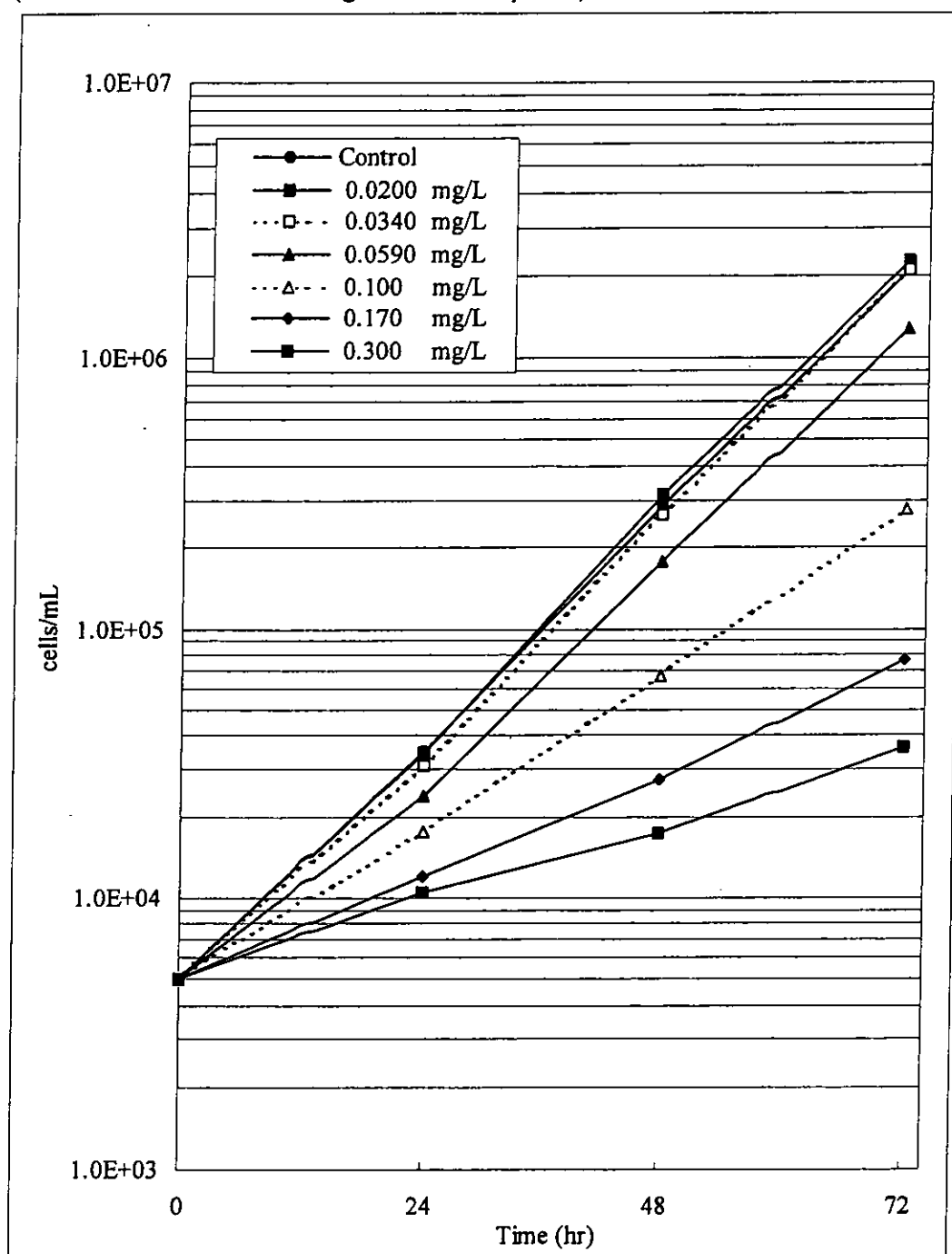
a : time weighted mean

c- : colorless

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_{μ} values Calculated from the Growth Rates

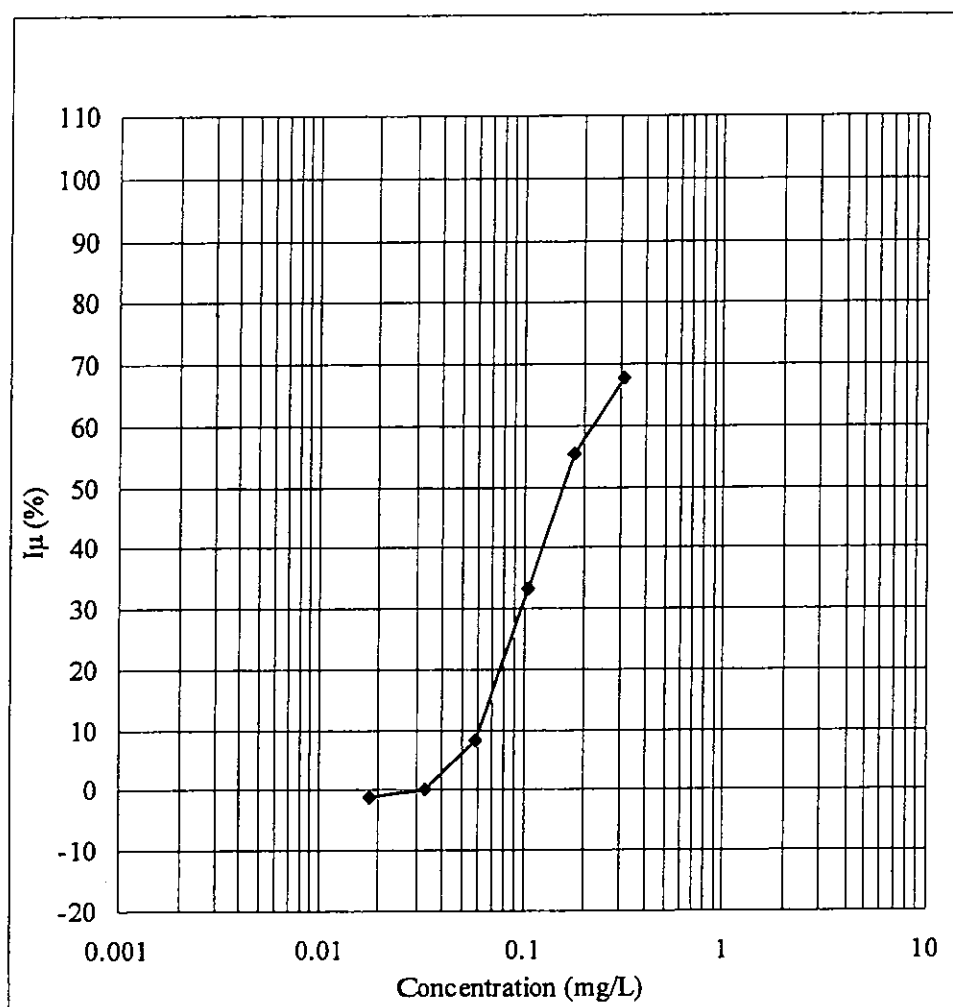
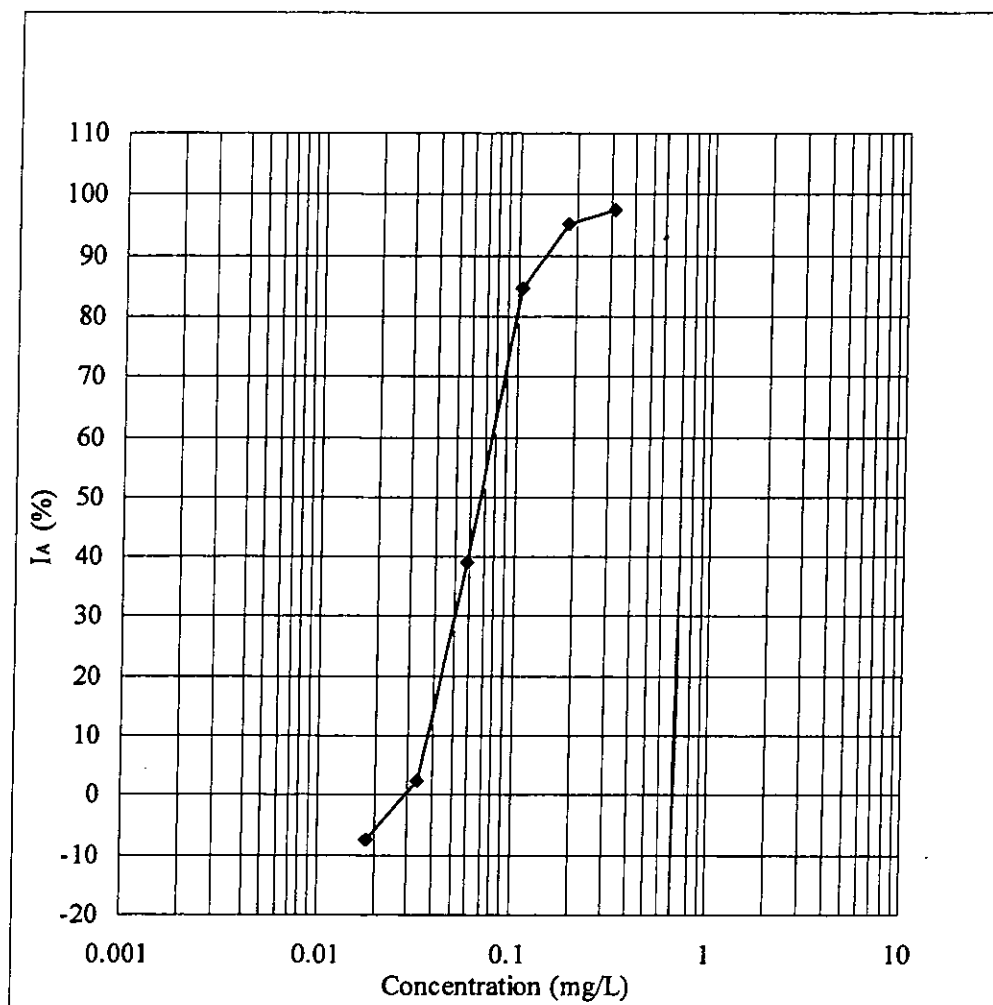


Figure 3 Concentration-Inhibition Curve Based on I_A Values Calculated from the Area under the Growth Curves



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 at the start of the study

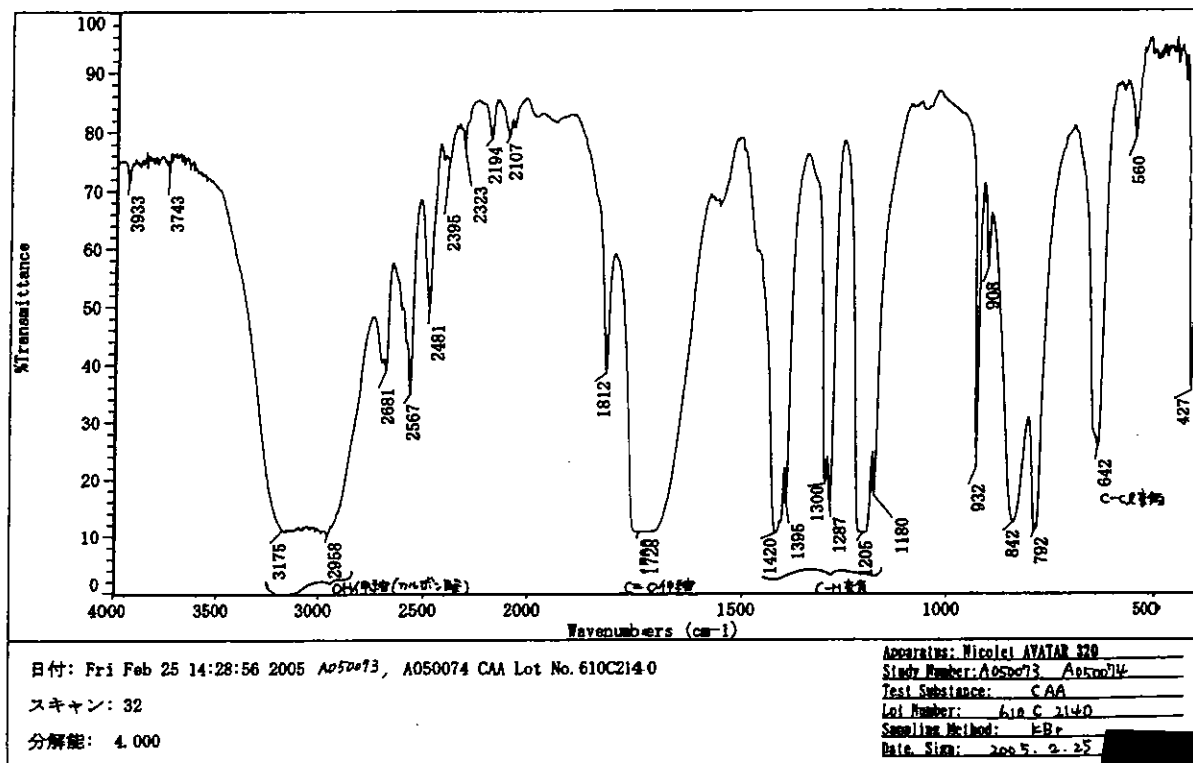
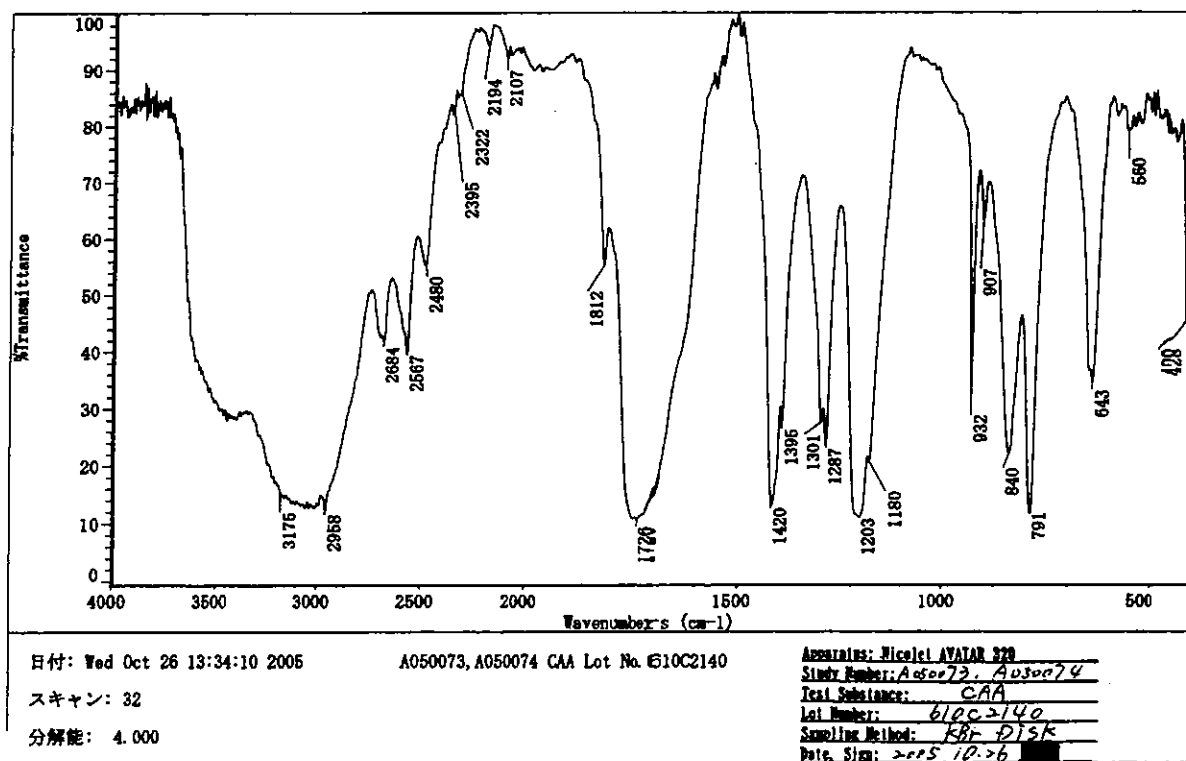


Figure A-1-2 Infrared absorption spectrum of the test substance at the end of the study



付属資料－ 2

化審法テストガイドライン推奨培地の組成

Table A-2 Medium

| <u>Nutrient salts</u> | <u>Concentration (mg/L)</u> |
|---|-----------------------------|
| H_3BO_3 | 0.185 |
| $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ | 0.415 |
| ZnCl_2 | 0.003 |
| $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ | 0.08 |
| $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | 0.1 |
| $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ | 0.0015 |
| $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | 0.007 |
| $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | 0.00001 |
| $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | 18 |
| NH_4Cl | 15 |
| K_2HPO_4 | 1.6 |
| NaHCO_3 | 50 |
| $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ | 12 |
| $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 15 |
| <hr/> | |
| <u>pH</u> | <u>8.3</u> |

付属資料－ 3

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 | ——> | 100 | mg |
| 溶媒 | ——> | 試験用水 (23±2℃にした化審法テストガイドライン推奨培地) | |
| 最終容量 | ——> | 100 | mL |
| 容器 | ——> | メスフラスコ | |
| 濃度 | ——> | 1000 | mg/L |
| 混合方式 | ——> | 手で転倒攪拌, 密栓 | |

② 被験物質原液Ⅱの調製

| | | | |
|------|-----|---------------------------------|------|
| 採取量 | ——> | 1000 | μL |
| 溶媒 | ——> | 試験用水 (23±2℃にした化審法テストガイドライン推奨培地) | |
| 最終容量 | ——> | 1000 | mL |
| 容器 | ——> | メスフラスコ | |
| 濃度 | ——> | 1.00 | mg/L |
| 混合方式 | ——> | 手で転倒攪拌, 密栓 | |

2. 試験液の調製

②の原液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。

| | | | |
|------------|-----|--------------------------|---|
| 試験用水(最終容量) | ——> | 0.10 | L |
| 容器 | ——> | 300mL容ガラス製三角フラスコ(IWAKI製) | |
| 混合方式 | ——> | 手で振とう攪拌, 通気性シリコン栓 | |
| 濃度公比 | ——> | 1.72 | |
| 1濃度区の連数 | ——> | 6容器/対照区, 3容器/濃度区 | |

(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) | ②原液Ⅱ mL |
|----------------|--------------|------------|
| 対照区 | C | 0 |
| 0.0200 | Conc.1 | 2.0000 |
| 0.0340 | Conc.2 | 3.4000 |
| 0.0590 | Conc.3 | 5.9000 |
| 0.1000 | Conc.4 | 10.0000 |
| 0.1700 | Conc.5 | 17.0000 |
| 0.3000 | Conc.6 | 30.0000 |

付属資料－ 4

試験液および試験培養液の分析

1 高速液体クロマトグラフィー質量分析 (LC/MS) 測定条件

(装置)

高速液体クロマトグラフ質量分析計 Agilent 1100 型 No3
ワークステーション: Agilent 1100 シリーズ クエスチョン (Windows NT)
高速液体クロマトグラフ (HPLC) : Agilent Technologies 1100 型
デガッサ: G1379A 型
送液ポンプ: G1312A 型 (ハイパンプ)
オートサンプラ: G1313A 型
カラムオーブン: G1316A 型
質量選択検出器 (MSD) : G1946D 型

(条件)

[HPLC 条件]

カラム: Shiseido 製 CAPCELL PAK C18 AQ $5\mu\text{m}$ 3.0mm i.d. \times 150mm
カラムオーブン: 50℃
溶離液: A液 0.1% * 酸水溶液
B液 メタノール
0.00 min A液 97%, B液 3%
6.00 min A液 77%, B液 23%
7.00 min A液 77%, B液 23%
試料注入量: 80 μL
流速: 0.4 mL/min

[MSD 条件]

Ionization: Electrospray
Fragmentor: 75V
Nebulizer: N_2 (30psi)
Drying gas: N_2 (10L/min, 300℃)
Mode: Negative
SIM (Selected Ion Monitoring) 条件:
Quant ion m/z 93.20 と m/z 95.20 の TIC

*: JIS K0557 A4 グレードの水

2 検量線

化審法テストガイドライン推奨培地を用い、0, 0.005~0.100 mg/Lの標準溶液を調製した。標準溶液の分析を以下のように行った。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-4-1に示す。

標準溶液 1.5mL 採取

|

LC/MS測定

3 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 0.0003 mg/Lを検出限界とした。

4 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 (3), (4), (5), (6), (9), (10), (11), (12)に示す。

分析試料*

| (試験用水で適宜希釈**)

1.5mL 採取

|

LC/MS測定

* 各試験区毎に、全ての試験容器より試験液または試験培養液を一定量ずつ採取して混合した。暴露開始時はこれを分析試料とした。暴露開始24, 48時間後および暴露終了時は、これを遠心分離 (3000 rpm, 10分間, 装置:日立工機製 CR21E型) し、藻類を分離した上澄み液を分析試料とした。

** 検量線範囲を超えるものについて適宜希釈した。

2) 標準溶液を「2 検量線」と同様に分析した。代表的なクロマトグラムを Figure A-4-2 (1), (2), (7), (8)に示す。

3) 各試験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。

5 添加回収試験

分析前処理は、「4 試験液および試験培養液の分析方法」に示すように試験液または試験培養液を採取する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-4-1 Calibration curve

| No. | Concentration (mg/L) | Peak Area (count) |
|-----|-------------------------|----------------------|
| 1 | 0.000 | 0 |
| 2 | 0.005 | 17301 |
| 3 | 0.010 | 37448 |
| 4 | 0.020 | 71531 |
| 5 | 0.050 | 185195 |
| 6 | 0.100 | 371752 |

$$Y = 3,710,292X$$

$$r = 1.00$$

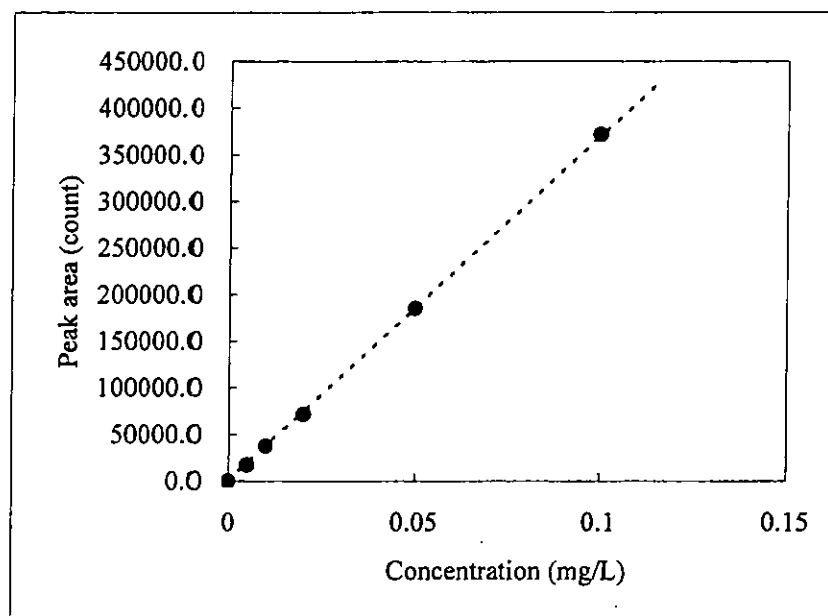
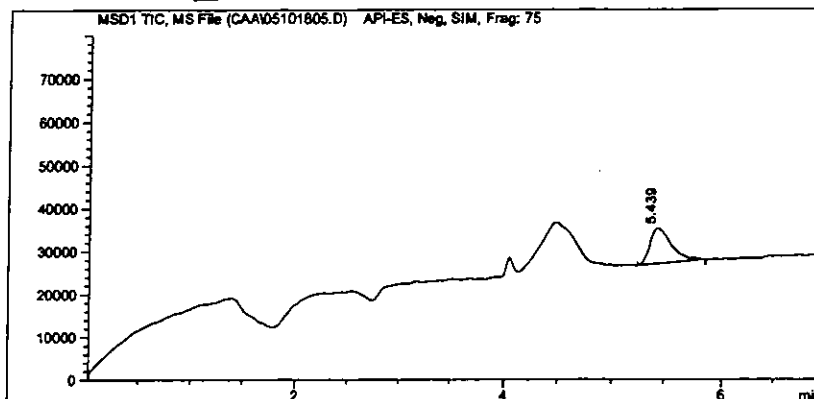


Figure A-4-2 Representative chromatograms

(1) Standard 0.02 mg/L ; 0 Hour

```

=====
Injection Date : Tue, 18. Oct. 2005      Seq Line :      5
Study No.      : A050073                 Location  : Vial 11
Test Substance : CAA                     Inj. No.  :      1
Sample Name    : STD 0.02mg/L K          Inj. Vol. :     80 µl
Acq. Method    : CAA.M
Acq Operator   : ██████████
=====
  
```



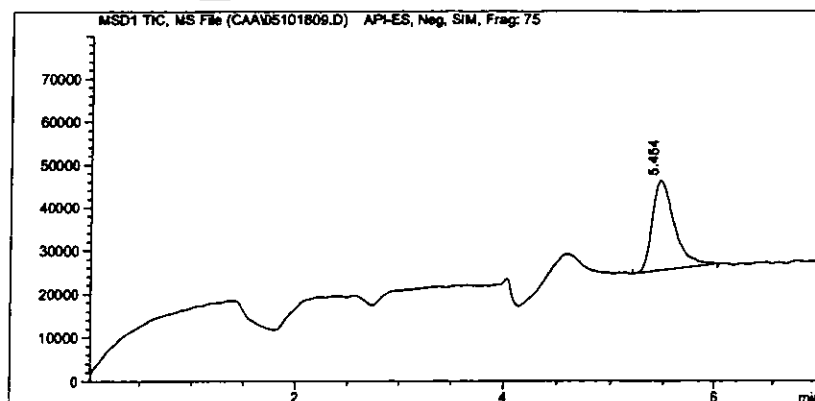
```

=====
                        Area Percent Report
=====
#  Meas. Ret. Peak T  Width   Area   Height   Area %
-----
1   5.439    MM      0.240  121552   8442    100.0
-----
Total:                        121552   8442
=====
*** End of Report ***
  
```

(2) Standard 0.05 mg/L ; 0 Hour

```

=====
Injection Date : Tue, 18. Oct. 2005      Seq Line :      9
Study No.      : A050073                 Location  : Vial 12
Test Substance : CAA                     Inj. No.  :      1
Sample Name    : STD 0.05mg/L K          Inj. Vol. :     80 µl
Acq. Method    : CAA.M
Acq Operator   : ██████████
=====
  
```



```

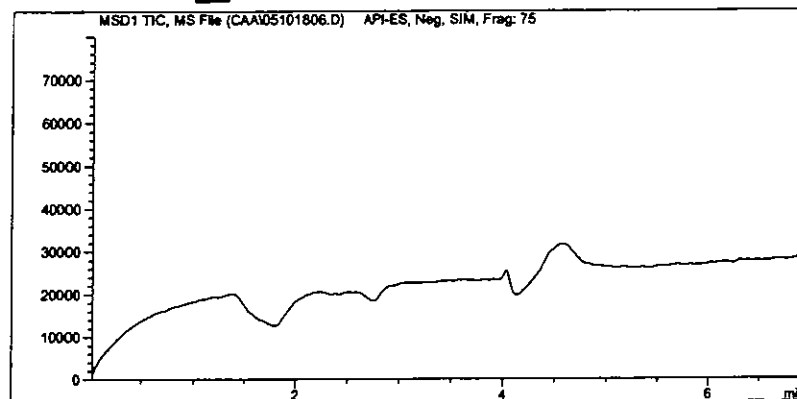
=====
                        Area Percent Report
=====
#  Meas. Ret. Peak T  Width   Area   Height   Area %
-----
1   5.454    MM      0.242  307655  21186    100.0
-----
Total:                        307655  21186
=====
*** End of Report ***
  
```

Figure A-4-2 Continued

(3) Control ; 0 Hour

```

=====
Injection Date : Tue, 18. Oct. 2005      Seq Line : 6
Study No.      : A050073                Location  : Vial 1
Test Substance : CAA                    Inj. No.  : 1
Sample Name    : AL0HC                  Inj. Vol. : 80 µl
Acq. Method    : CAA.M
Acq Operator   : █████
=====
  
```

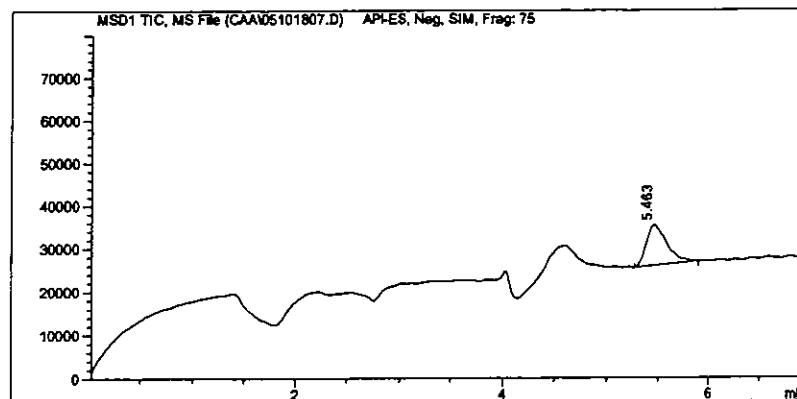


| Area Percent Report | | | | | | |
|-----------------------|-------|------|--------|-------|------|--------|
| # | Meas. | Ret. | Peak T | Width | Area | Height |
| | | | | | | Area % |
| Total: | | | | | | |
| *** End of Report *** | | | | | | |

(4) 0.0200 mg/L nominal ; 0 Hour

```

=====
Injection Date : Tue, 18. Oct. 2005      Seq Line : 7
Study No.      : A050073                Location  : Vial 2
Test Substance : CAA                    Inj. No.  : 1
Sample Name    : AL0HC1                 Inj. Vol. : 80 µl
Acq. Method    : CAA.M
Acq Operator   : █████
=====
  
```

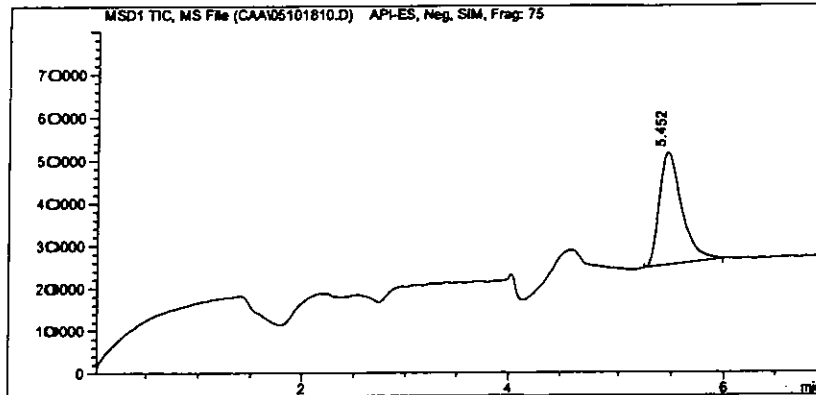


| Area Percent Report | | | | | | |
|-----------------------|-------|------|--------|--------|------|--------|
| # | Meas. | Ret. | Peak T | Width | Area | Height |
| | | | | | | Area % |
| 1 | 5.463 | MM | 0.232 | 132624 | 9546 | 100.0 |
| Total: | | | | | | |
| *** End of Report *** | | | | | | |

Figure A-4-2 Continued

(5) 0.0590 mg/L nominal ; 0 Hour

```
=====
Injection Date : Tue, 18. Oct. 2005      Seq Line : 10
Study No.      : A050073                 Location  : Vial 4
Test Substance : CAA                     Inj. No.  : 1
Sample Name    : AL0HC3                  Inj. Vol. : 80 µl
Acq. Method    : CAA.M
Acq Operator   : ██████████
=====
```



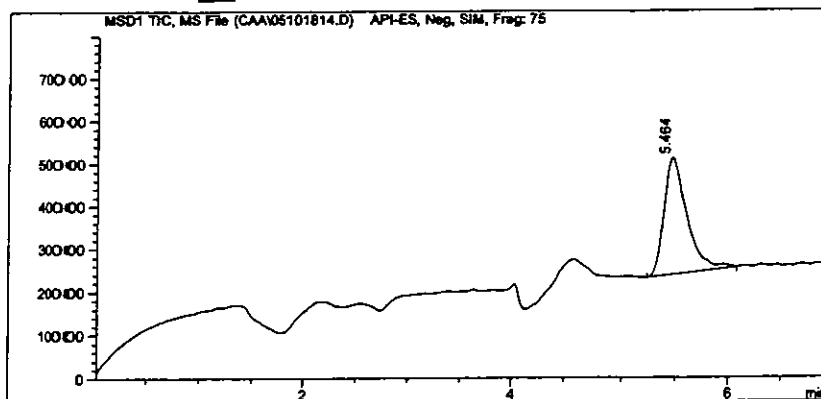
```
=====
Area Percent Report
=====
```

| # | Meas. Ret. | Peak T | Width | Area | Height | Area % |
|--------|------------|--------|-------|--------|--------|--------|
| 1 | 5.452 | MM | 0.239 | 383450 | 26767 | 100.0 |
| Total: | | | | 383450 | 26767 | |

```
=====
*** End of Report ***
=====
```

(6) 0.300 mg/L nominal ; 0 Hour

```
=====
Injection Date : Tue, 18. Oct. 2005      Seq Line : 14
Study No.      : A050073                 Location  : Vial 7
Test Substance : CAA                     Inj. No.  : 1
Sample Name    : AL0HC6                  Inj. Vol. : 80 µl
Acq. Method    : CAA.M
Acq Operator   : ██████████
=====
```



```
=====
Area Percent Report
=====
```

| # | Meas. Ret. | Peak T | Width | Area | Height | Area % |
|--------|------------|--------|-------|--------|--------|--------|
| 1 | 5.464 | MM | 0.247 | 403309 | 27254 | 100.0 |
| Total: | | | | 403309 | 27254 | |

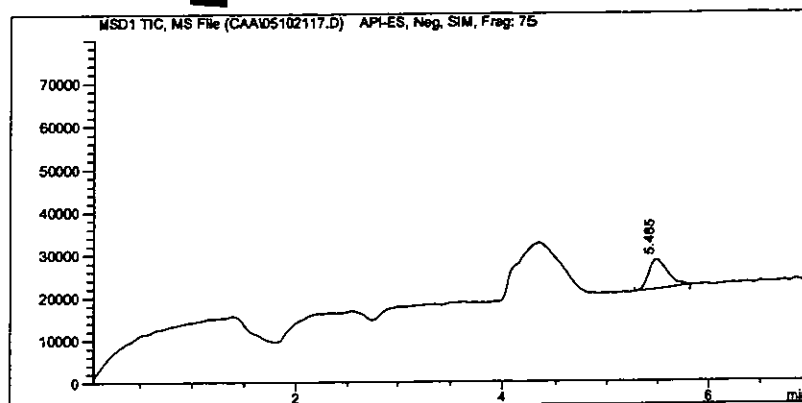
```
=====
*** End of Report ***
=====
```

Figure A-4-2 Continued

(7) Standard 0.02 mg/L ; 72 Hours

```

=====
Injection Date : Fri, 21. Oct. 2005      Seq Line : 6
Study No.      : A050073                 Location  : Vial 11
Test Substance : CAA                     Inj. No.  : 1
Sample Name    : STD 0.02mg/L K          Inj. Vol. : 80 µl
Acq. Method    : CAA.M
Acq Operator   : ██████████
=====
  
```



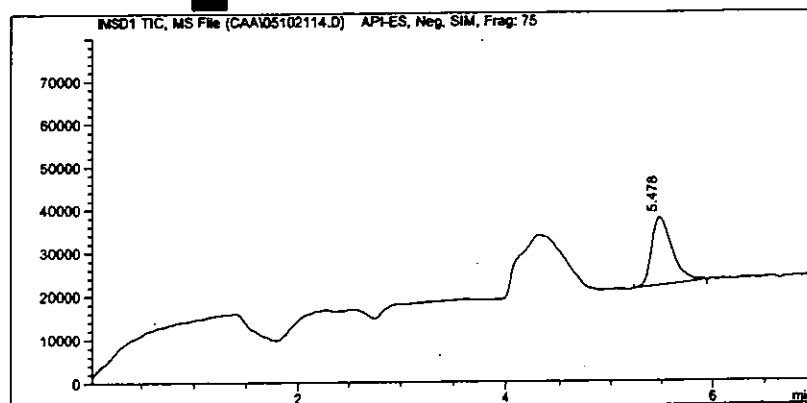
| Area Percent Report | | | | | | |
|---------------------|------------|--------|-------|-------|--------|--------|
| # | Meas. Ret. | Peak T | Width | Area | Height | Area % |
| 1 | 5.485 | MM | 0.211 | 89447 | 7051 | 100.0 |
| Total: | | | | 89447 | 7051 | |

*** End of Report ***

(8) Standard 0.05 mg/L ; 72 Hours

```

=====
Injection Date : Fri, 21. Oct. 2005      Seq Line : 3
Study No.      : A050073                 Location  : Vial 12
Test Substance : CAA                     Inj. No.  : 1
Sample Name    : STD 0.05mg/L K          Inj. Vol. : 80 µl
Acq. Method    : CAA.M
Acq Operator   : ██████████
=====
  
```



| Area Percent Report | | | | | | |
|---------------------|------------|--------|-------|--------|--------|--------|
| # | Meas. Ret. | Peak T | Width | Area | Height | Area % |
| 1 | 5.478 | MM | 0.228 | 219672 | 16091 | 100.0 |
| Total: | | | | 219672 | 16091 | |

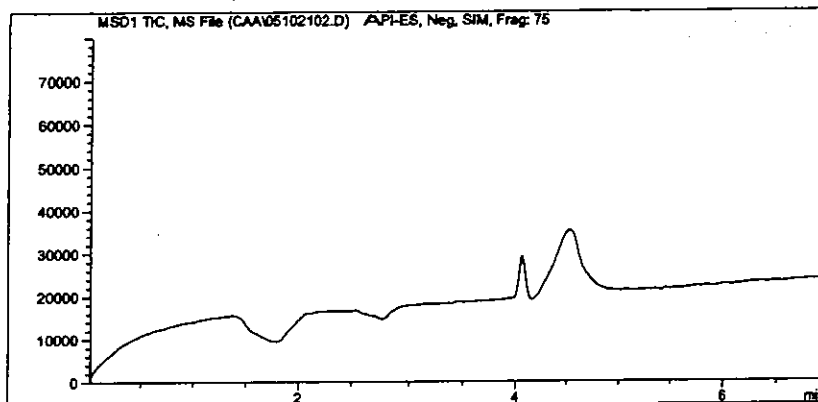
*** End of Report ***

Figure A-4-2 Continued

(9) Control ; 72 Hours

```

=====
Injection Date : Fri, 21. Oct. 2005      Seq Line : 1
Study No.      : A050073                 Location  : Vial 1
Test Substance : CAA                     Inj. No.  : 1
Sample Name    : AL72HC                  Inj. Vol. : 80 µl
Acq. Method    : CAA.M
Acq Operator   : 
=====
  
```



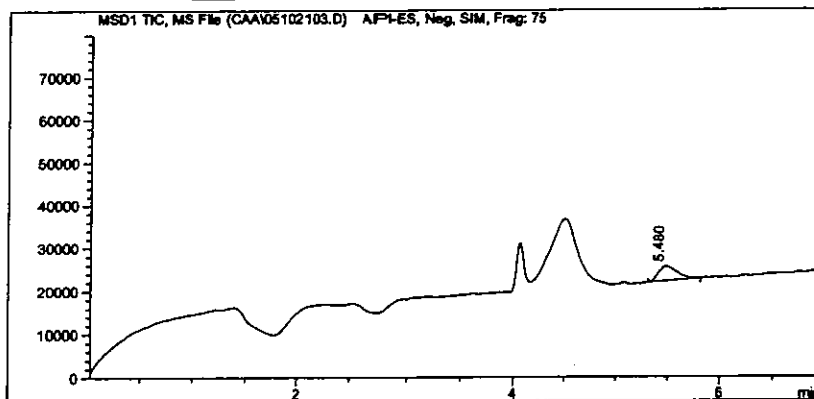
```

=====
                        Area Percent Report
=====
#   Meas. Ret. Peak T   Width    Area    Height    Area %
=====
Total:
=====
*** End of Report ***
=====
  
```

(10) 0.0200 mg/L nominal ; 72 Hours

```

=====
Injection Date : Fri, 21. Oct. 2005      Seq Line : 2
Study No.      : A050073                 Location  : Vial 2
Test Substance : CAA                     Inj. No.  : 1
Sample Name    : AL72HC1                 Inj. Vol. : 80 µl
Acq. Method    : CAA.M
Acq Operator   : 
=====
  
```



```

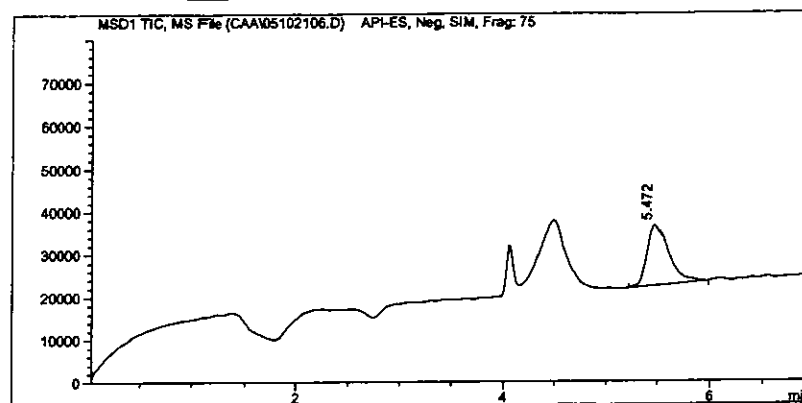
=====
                        Area Percent Report
=====
#   Meas. Ret. Peak T   Width    Area    Height    Area %
=====
1   5.480   MM         0.202    43742    3614     100.0
=====
Total:                      43742    3614
=====
*** End of Report ***
=====
  
```

Figure A-4-2 Continued

(11) 0.0590 mg/L nominal ; 72 Hours

```

=====
Injection Date : Fri, 21. Oct. 2005      Seq Line : 5
Study No.      : A050073                 Location  : Vial 4
Test Substance : CAA                     Inj. No.  : 1
Sample Name    : AL72HC3                 Inj. Vol. : 80 µl
Acq. Method    : CAA.M
Acq Operator   : █████
=====
  
```



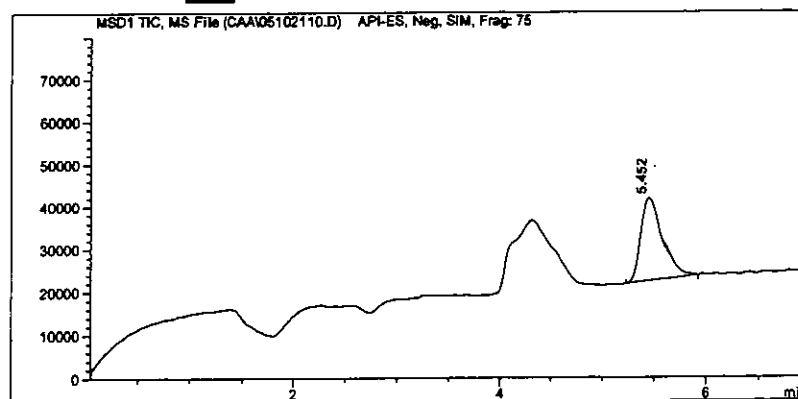
| Area Percent Report | | | | | | |
|---------------------|------------|--------|-------|--------|--------|--------|
| # | Meas. Ret. | Peak T | Width | Area | Height | Area % |
| 1 | 5.472 | MM | 0.228 | 197037 | 14406 | 100.0 |
| Total: | | | | 197037 | 14406 | |

*** End of Report ***

(12) 0.300 mg/L nominal ; 72 Hours

```

=====
Injection Date : Fri, 21. Oct. 2005      Seq Line : 9
Study No.      : A050073                 Location  : Vial 7
Test Substance : CAA                     Inj. No.  : 1
Sample Name    : AL72HC6                 Inj. Vol. : 80 µl
Acq. Method    : CAA.M
Acq Operator   : █████
=====
  
```



| Area Percent Report | | | | | | |
|---------------------|------------|--------|-------|--------|--------|--------|
| # | Meas. Ret. | Peak T | Width | Area | Height | Area % |
| 1 | 5.452 | MM | 0.234 | 272639 | 19401 | 100.0 |
| Total: | | | | 272639 | 19401 | |

*** End of Report ***

付属資料－ 5

結果の算出

Table A-5-1 Calculation of the EC50

(1) 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 |
| 0.0586 | -2.84 | 8.2 |
| 0.107 | -2.23 | 33.4 |
| 0.179 | -1.72 | 55.3 |

| EC ₅₀ | 95%信頼区間 | 単位 |
|------------------|---------------|--------|
| 0.158 | 0.152 ~ 0.164 | (mg/L) |

分散分析

| Factor | SS | DF | V | F-ratio | f(0.05,f1,f2) |
|---------|---------|----|---------|----------|---------------|
| Between | 1110.99 | 1 | 1110.99 | 43404.60 | 161.45 |
| Within | 0.03 | 1 | 0.03 | | |
| Total | 1111.02 | 2 | | | |

Table A-5-1 Continued

(2) EbC50 (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 |
| 0.0331 | -3.41 | 2.5 |
| 0.0586 | -2.84 | 39.2 |
| 0.107 | -2.23 | 84.5 |

| EC ₅₀ | 95%信頼区間 | | 単位 |
|------------------|---------|----------|--------|
| 0.0663 | 0.0500 | ～ 0.0880 | (mg/L) |

分散分析

| Factor | SS | DF | V | F-ratio | f(0.05,f1,f2) |
|---------|---------|----|---------|---------|---------------|
| Between | 3367.41 | 1 | 3367.41 | 487.13 | 161.45 |
| Within | 6.91 | 1 | 6.91 | | |
| Total | 3374.33 | 2 | | | |

Table A-5-2 Calculation of the NOEC

(1) NOECr (0-72h)

Input Data Table

| control Group1 | Conc.1 Group2 | Conc.2 Group3 | Conc.3 Group4 | Conc.4 Group5 | Conc.5 Group6 | Conc.6 Group7 |
|-------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| 0.0850 | 0.0849 | 0.0845 | 0.0775 | 0.0570 | 0.0418 | 0.0314 |
| 0.0828 | 0.0857 | 0.0824 | 0.0761 | 0.0541 | 0.0355 | 0.0253 |
| 0.0817 | 0.0839 | 0.0843 | 0.0772 | 0.0563 | 0.0353 | 0.0247 |
| 0.0854 | * | * | * | * | * | * |
| 0.0836 | * | * | * | * | * | * |
| 0.0843 | * | * | * | * | * | * |

| Group | Samples | Mean | S.E. | S.D. | Variance |
|-------|---------|--------|--------|--------|----------|
| 1 | 6 | 0.0838 | 0.0006 | 0.0014 | 0.0000 |
| 2 | 3 | 0.0848 | 0.0005 | 0.0009 | 0.0000 |
| 3 | 3 | 0.0837 | 0.0007 | 0.0012 | 0.0000 |
| 4 | 3 | 0.0769 | 0.0004 | 0.0007 | 0.0000 |
| 5 | 3 | 0.0558 | 0.0009 | 0.0015 | 0.0000 |
| 6 | 3 | 0.0375 | 0.0021 | 0.0037 | 0.0000 |
| 7 | 3 | 0.0271 | 0.0021 | 0.0037 | 0.0000 |

| | | | | | | | |
|---------------|----|------|--------|---------|----------|---------|--------|
| Method | vs | Side | Stat. | 0.05 | 0.01 | 0.001 | Prob. |
| Bartlett test | | 0 | 9.1266 | 12.5916 | <16.8119 | 22.4577 | 0.1666 |

| | | | | | | | |
|-------------|----|------|----------|---------|--------|--------|--------|
| Method | vs | Side | Stat. | 0.05 | 0.01 | 0.001 | Prob. |
| 1-way ANOVA | | 0 | 438.5615 | >2.6987 | 4.1015 | 6.5625 | 0.0000 |

| | | | | | | | |
|---------|--------|------|---------|---------|---------|----------|---------------|
| Method | vs | Side | Stat. | 0.05 | 0.01 | 0.001 | Prob. |
| Dunnett | 1 vs 2 | 2 | 0.6981 | 2.8465 | 3.6335 | 999.9900 | 0.9680 |
| Dunnett | 1 vs 3 | 2 | 0.0450 | 2.8465 | 3.6335 | 999.9900 | 1.0000 |
| Dunnett | 1 vs 4 | 2 | 4.6390 | >2.8465 | >3.6335 | 999.9900 | 0.00131259 ** |
| Dunnett | 1 vs 5 | 2 | 18.9164 | >2.8465 | >3.6335 | 999.9900 | 1.3761E-06 ** |
| Dunnett | 1 vs 6 | 2 | 31.2571 | >2.8465 | >3.6335 | 999.9900 | 1.3761E-06 ** |
| Dunnett | 1 vs 7 | 2 | 38.2832 | >2.8465 | >3.6335 | 999.9900 | 1.3761E-06 ** |

Table A-5-2 Continued
(2) NOECb (0-72h)

Input Data Table

| control | Conc.1 | Conc.2 | Conc.3 | Conc.4 | Conc.5 | Conc.6 |
|---------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| Group1 | Group2 | Group3 | Group4 | Group5 | Group6 | Group7 |
| 3481.6 | 3518.0 | 3328.2 | 2056.7 | 550.2 | 196.0 | 101.0 |
| 3056.5 | 3671.4 | 2908.2 | 1858.4 | 446.3 | 138.5 | 68.8 |
| 2849.9 | 3319.1 | 3303.0 | 2033.4 | 522.4 | 133.8 | 69.2 |
| 3585.5 | * | * | * | * | * | * |
| 3203.9 | * | * | * | * | * | * |
| 3394.4 | * | * | * | * | * | * |

| Group | Samples | Mean | S.E. | S.D. | Variance |
|-------|---------|------------|----------|----------|-------------|
| 1 | 6 | 3,261.9667 | 113.4076 | 277.7907 | 77,167.6867 |
| 2 | 3 | 3,502.8333 | 101.9826 | 176.6390 | 31,201.3433 |
| 3 | 3 | 3,179.8000 | 135.9947 | 235.5497 | 55,483.6800 |
| 4 | 3 | 1,982.8333 | 62.5792 | 108.3903 | 11,748.4633 |
| 5 | 3 | 506.3000 | 31.0548 | 53.7886 | 2,893.2100 |
| 6 | 3 | 156.1000 | 19.9961 | 34.6342 | 1,199.5300 |
| 7 | 3 | 79.6667 | 10.6673 | 18.4763 | 341.3733 |

| | | | | | | | |
|---------------|----|------|---------|---------|----------|---------|--------|
| Method | vs | Side | Stat. | 0.0500 | 0.0100 | 0.0010 | Prob. |
| Bartlett test | | 0 | 15.6944 | 12.5916 | <16.8119 | 22.4577 | 0.0155 |

| | | | | | | | |
|-------------|----|------|----------|---------|--------|--------|------------|
| Method | vs | Side | Stat. | 0.0500 | 0.0100 | 0.0010 | Prob. |
| 1-way ANOVA | | 0 | 232.1088 | >2.6987 | 4.1015 | 6.5625 | 2.4045E-15 |

| | | | | | | | |
|---------|--------|------|---------|---------|---------|----------|-----------|
| Method | vs | Side | Stat. | 0.05 | 0.01 | 0.001 | Prob. |
| Dunnett | 1 vs 2 | 2 | 1.8260 | 2.8465 | 3.6335 | 999.9900 | 0.3491 |
| Dunnett | 1 vs 3 | 2 | 0.6229 | 2.8465 | 3.6335 | 999.9900 | 0.9813 |
| Dunnett | 1 vs 4 | 2 | 9.6973 | >2.8465 | >3.6335 | 999.9900 | 0.0000 ** |
| Dunnett | 1 vs 5 | 2 | 20.8911 | >2.8465 | >3.6335 | 999.9900 | 0.0000 ** |
| Dunnett | 1 vs 6 | 2 | 23.5460 | >2.8465 | >3.6335 | 999.9900 | 0.0000 ** |
| Dunnett | 1 vs 7 | 2 | 24.1255 | >2.8465 | >3.6335 | 999.9900 | 0.0000 ** |

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 試験責任者

環境省殿

添付資料

クロロ酢酸の藻類 (*Pseudokirchneriella subcapitata*) に対する生長阻害試験
—収量法による半数生長阻害濃度および最大無影響濃度の算出—

(試験番号：A050073)

2008年 5月12日

株式会社三菱化学安全科学研究所 横浜研究所

試験責任者

(旧試験責任者

2005年11月25日に報告した結果(暴露期間中の細胞濃度：報告書 21 頁, Table 2 参照)を基に, 収量の比較(収量法)による半数生長阻害濃度(EC50)および最大無影響濃度(NOEC)を求めたので, 以下に報告する。

1. 算出方法

1) 収量法による結果の算出方法

下記の方法に従って収量の比較(収量法)による生長阻害率(I_y)を算出した。

収量(Y)は次の式により算出した。

$$Y = N_n - N_0$$

ここで, Y : 収量

N_0 : 暴露開始時の設定細胞濃度 (cells/mL)

N_n : t_n 時の実測細胞濃度 (cells/mL)

収量(Y)より各濃度区における生長の阻害百分率(I_y)を次の式により算出した。

$$I_y = \frac{Y_c - Y_t}{Y_c} \times 100$$

ここで, Y_c : 対照区の平均収量

Y_t : 各濃度区における平均収量

2) 半数生長阻害濃度 (EC50) の算出

1) で算出した収量法による生長阻害率 (I_y 値) を用いて、以下の方法で半数生長阻害濃度 (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_y 値より求めた場合 : EyC50 (0-72h) | |

3) 最大無影響濃度 (NOEC)

最大無影響濃度 (NOEC) は、NOECy (0-72h) とした。NOECy (0-72h) の算出には、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) を行った。その結果、対照区と比較して有意差が認められない試験最高濃度をNOEC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」(Yukms Corp., 東京) を用いた。

2. 結果

濃度区における生長阻害率を Table 1 に、半数生長阻害濃度 (EyC50) および最大無影響濃度 (NOECy) を Table 2 に、濃度－阻害率曲線を Figure 1 に、EyC50 および NOECy 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 Table 3 および Table 4 に、それぞれ示す。濃度区における生長阻害率の結果から、以下の結果を得た。

EyC50(0-72h) : 0.0657 mg/L (95%信頼区間 : 0.0497~0.0870 mg/L)

NOECy(0-72h) : 0.0331 mg/L

以 上

Table 1 Growth Inhibition (%) of *Pseudokirchneriella subcapitata*

| Nominal Concentration [Mean ^a Measured Conc.] | | Yield | |
|---|---------------|-------------------|------------------------|
| | | Yield | Inhibition (%) *1 |
| (mg/L) | Vessel No. | Y(0-72h) | I _y (0-72h) |
| Control | 1 | 2274700 | |
| | 2 | 1934700 | |
| | 3 | 1794700 | |
| | 4 | 2334700 | |
| | 5 | 2054700 | |
| | 6 | 2164700 | |
| | Average SD | 2093000 206000 | - |
| 0.0200 [0.0182] | 1 | 2254700 | |
| | 2 | 2394700 | |
| | 3 | 2094700 | |
| | Average SD | 2248000 150100 | -7.4 |
| 0.0340 [0.0331] | 1 | 2194700 | |
| | 2 | 1884700 | |
| | 3 | 2154700 | |
| | Average SD | 2078000 168600 | 0.7 |
| 0.0590 [0.0586] | 1 | 1324700 | |
| | 2 | 1194700 | |
| | 3 | 1294700 | |
| | Average SD | 1271400 68100 | 39.3** |
| 0.100 [0.107] | 1 | 298700 | |
| | 2 | 240700 | |
| | 3 | 282700 | |
| | Average SD | 274000 30000 | 86.9** |
| 0.170 [0.179] | 1 | 96700 | |
| | 2 | 59600 | |
| | 3 | 58300 | |
| | Average SD | 71500 21800 | 96.6** |
| 0.300 [0.316] | 1 | 42800 | |
| | 2 | 25900 | |
| | 3 | 24700 | |
| | Average SD | 31100 10100 | 98.5++ |

a time weighted mean

*1 Values are the growth inhibition (%) relative to the control.

SD Standard deviation

* Indicates a significant difference ($\alpha=0.05$) 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 since data including this concentration did not show homogeneity of variances. However, it was concluded that this concentration level showed adverse effect on algal growth judging from I_y values.

Table 2 Calculated EyC50 and NOECy

Based on I_y (0-72h) value (Yield)

| EyC50 (0-72h) (mg/L) | 95-Percent Confidence Limits (mg/L) | NOECy (0-72h) (mg/L) |
|-------------------------|---|-------------------------|
| 0.0657 ^{*1} | 0.0497-0.0870 | 0.0331 |

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

*1 using the measured concentrations of 0.0331, 0.0586 and 0.107 mg/L in the regression analysis

The NOEC 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 were at $\alpha=0.05$, except Bartlett test, which was at $\alpha=0.01$.

Figure 1 Concentration-Inhibition Curve Based on I_y Values Calculated from the Yield

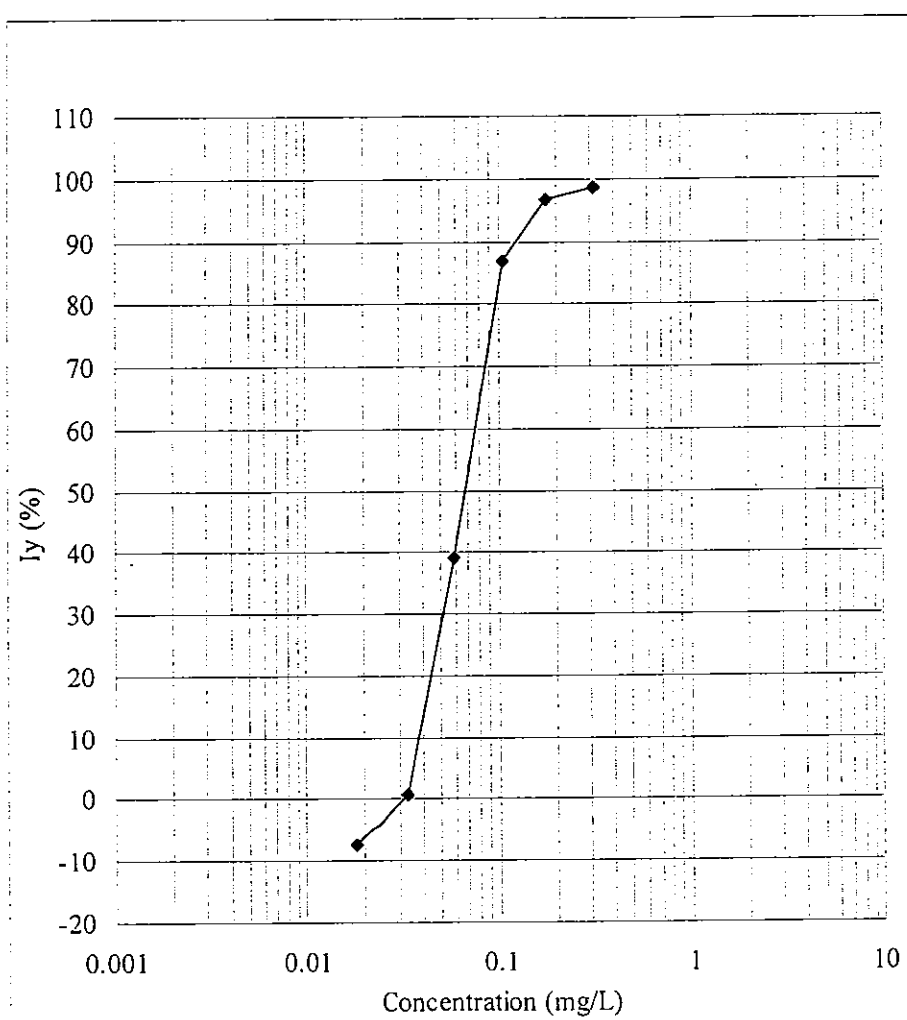


Table 3 Calculation of the EyC50 (0-72h)

直線回帰分析 (E C50値の算出)

| 濃度 (mg/L) | 阻害率 (%) | |
|-----------|---------|------|
| x | log(x) | y |
| 0.0331 | -3.41 | 0.7 |
| 0.0586 | -2.84 | 39.3 |
| 0.107 | -2.23 | 86.9 |

| EC ₅₀ | 95%信頼区間 | | 単位 |
|------------------|---------|----------|--------|
| 0.0657 | 0.0497 | ～ 0.0870 | (mg/L) |

分散分析

| Factor | SS | DF | V | F-ratio | f(0.05,fl,f2) |
|---------|---------|----|---------|---------|---------------|
| Between | 3721.17 | 1 | 3721.17 | 493.01 | > 161.45 |
| Within | 7.55 | 1 | 7.55 | | |
| Total | 3728.72 | 2 | | | |

Table 4 Calculation of the NOECy (0-72h)

Input Data Table

| control | Conc.1 | Conc.2 | Conc.3 | Conc.4 | Conc.5 | Conc.6 |
|---------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| Group1 | Group2 | Group3 | Group4 | Group5 | Group6 | Group7 |
| 2274.7 | 2254.7 | 2194.7 | 1324.7 | 298.7 | 96.7 | 42.8 |
| 1934.7 | 2394.7 | 1884.7 | 1194.7 | 240.7 | 59.6 | 25.9 |
| 1794.7 | 2094.7 | 2154.7 | 1294.7 | 282.7 | 58.3 | 24.7 |
| 2334.7 | * | * | * | * | * | * |
| 2054.7 | * | * | * | * | * | * |
| 2164.7 | * | * | * | * | * | * |

| Group | Samples | Mean | S.E. | S.D. | Variance | | |
|--|---------|------------|----------|----------|-------------|----------|-------------|
| 1 | 6 | 2.093.0333 | 84.0800 | 205.9531 | 42.416.6667 | | |
| 2 | 3 | 2.248.0333 | 86.6667 | 150.1111 | 22.533.3333 | | |
| 3 | 3 | 2.078.0333 | 97.3539 | 168.6219 | 28.433.3333 | | |
| 4 | 3 | 1.271.3667 | 39.2994 | 68.0686 | 4.633.3333 | | |
| 5 | 3 | 274.0333 | 17.2948 | 29.9555 | 897.3333 | | |
| 6 | 3 | 71.5333 | 12.5889 | 21.8047 | 475.4433 | | |
| 7 | 3 | 31.1333 | 5.8436 | 10.1214 | 102.4433 | | |
| Method | vs | Side | Stat. | 0.05 | 0.01 | 0.001 | Prob. |
| Bartlett test | | 0 | 18.5235 | 12.5916 | >16.8119 | 22.4577 | 0.00504888 |
| 等分散性が認められないため明らかに影響のあるConc.6を除いて以下の検定を行う | | | | | | | |
| Method | vs | Side | Stat. | 0.05 | 0.01 | 0.001 | Prob. |
| Bartlett test | | 0 | 11.1933 | 11.0705 | <15.0863 | 20.5152 | 0.0477 |
| Method | vs | Side | Stat. | 0.05 | 0.01 | 0.001 | Prob. |
| 1-way ANOVA | | 0 | 142.8053 | >2.9013 | 4.5556 | 7.5674 | 1.3481E-10 |
| Method | vs | Side | Stat. | 0.05 | 0.01 | 0.001 | Prob. |
| Williams(1971,1972,1977) | 1 vs 2 | 2 | 0 | 2.1310 | 2.9470 | 999.9900 | 999.9900 |
| Williams(1971,1972,1977) | 1 vs 3 | 2 | 0.6067 | 2.2050 | 3.0030 | 999.9900 | 999.9900 |
| Williams(1971,1972,1977) | 1 vs 4 | 2 | 7.9476 | >2.2290 | >3.0190 | 999.9900 | 999.9900 ** |
| Williams(1971,1972,1977) | 1 vs 5 | 2 | 17.0236 | >2.2410 | >3.0270 | 999.9900 | 999.9900 ** |
| Williams(1971,1972,1977) | 1 vs 6 | 2 | 18.8664 | >2.2470 | >3.0310 | 999.9900 | 999.9900 ** |