

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

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: A050073)

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 : A 0 5 0 0 7 3

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，環保企発第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)	$ \begin{array}{c} \text{H} \quad \text{O} \\ \quad \\ \text{Cl}-\text{C}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{H} \end{array} $		
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	-
	メタノール	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: $\pm 20\%$ 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 μm) 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(Na.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)

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

$$\overline{MC} = \frac{\overline{mc}_1 + \overline{mc}_2 + \dots + \overline{mc}_n}{n}$$

\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	0.0838	0.0037	4.4
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			
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		Growth Rate		Area under the growth curves	
[Mean ^a Measured Conc.]		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	0.0838	-	32620000	-
SD	0.0014		2778000		
0.0200 [0.0182]	1	0.0849		35180000	
	2	0.0857		36714000	
	3	0.0839		33191000	
	Average	0.0848	-1.2	35028000	-7.4
SD	0.0009		1766000		
0.0340 [0.0331]	1	0.0845		33282000	
	2	0.0824		29082000	
	3	0.0843		33030000	
	Average	0.0837	0.1	31798000	2.5
SD	0.0012		2355000		
0.0590 [0.0586]	1	0.0775		20567000	
	2	0.0761		18584000	
	3	0.0772		20334000	
	Average	0.0769	8.2**	19828000	39.2**
SD	0.0007		1084000		
0.100 [0.107]	1	0.0570		5502000	
	2	0.0541		4463000	
	3	0.0563		5224000	
	Average	0.0558	33.4**	5063000	84.5**
SD	0.0015		538000		
0.170 [0.179]	1	0.0418		1960000	
	2	0.0355		1385000	
	3	0.0353		1338000	
	Average	0.0375	55.3**	1561000	95.2**
SD	0.0037		346000		
0.300 [0.316]	1	0.0314		1010000	
	2	0.0253		688000	
	3	0.0247		692000	
	Average	0.0271	67.7**	797000	97.6**
SD	0.0037		185000		

^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 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)

EbC50 (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 concentration 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

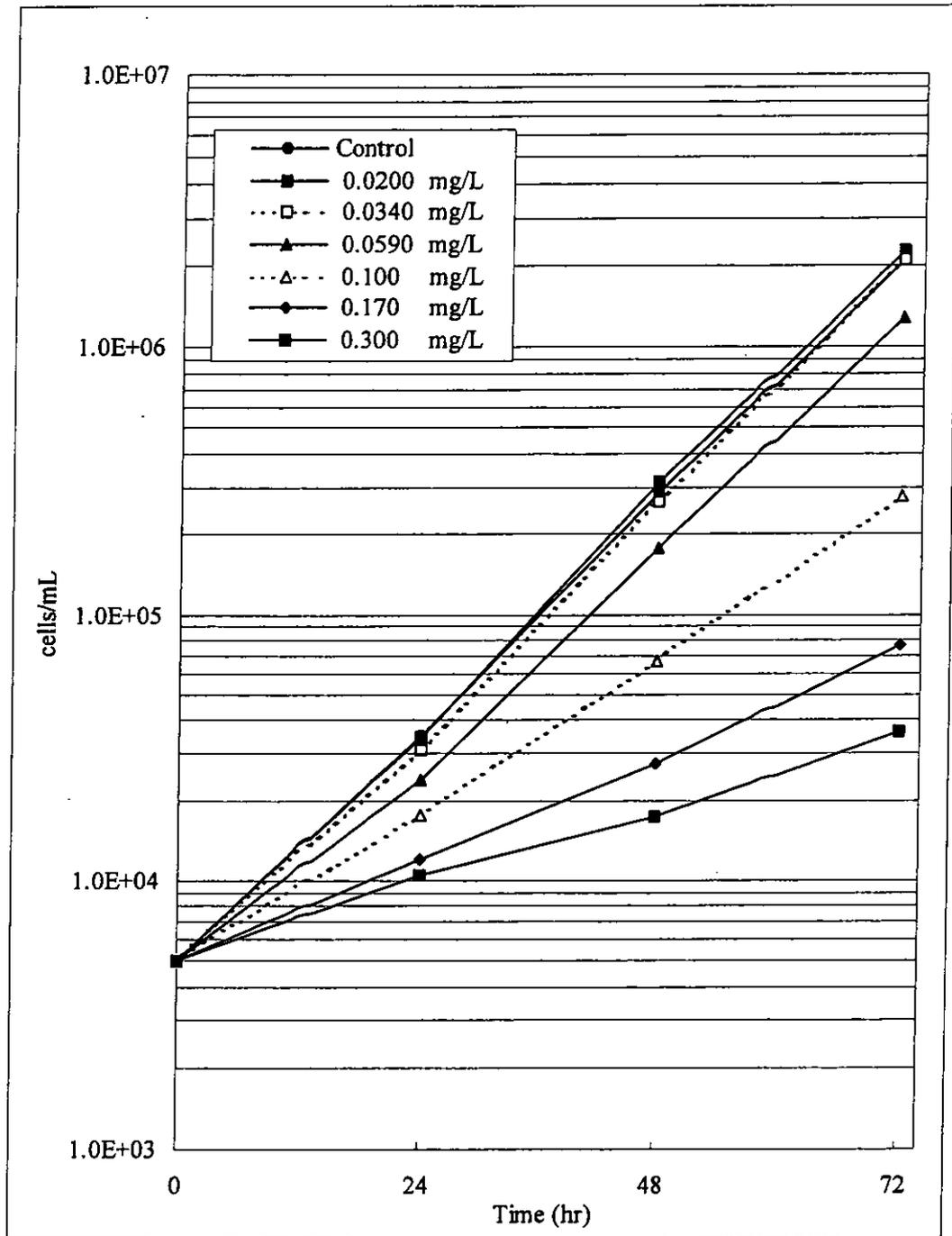
Table 8 Appearance of Test Solutions after Preparation

Nominal Concentration [Mean ^a Measured Conc.] (mg/L)	Suspended solids	Floating solids	Precipitation	Oily Substances	Color
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

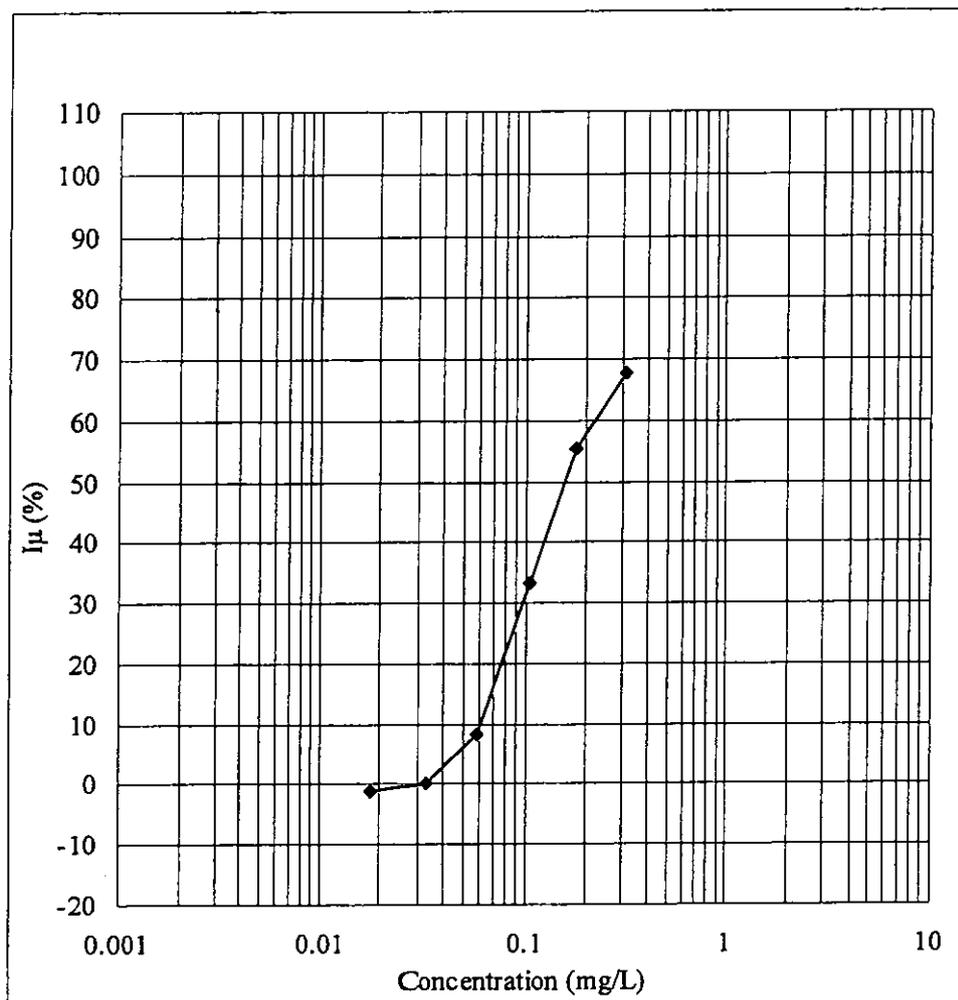
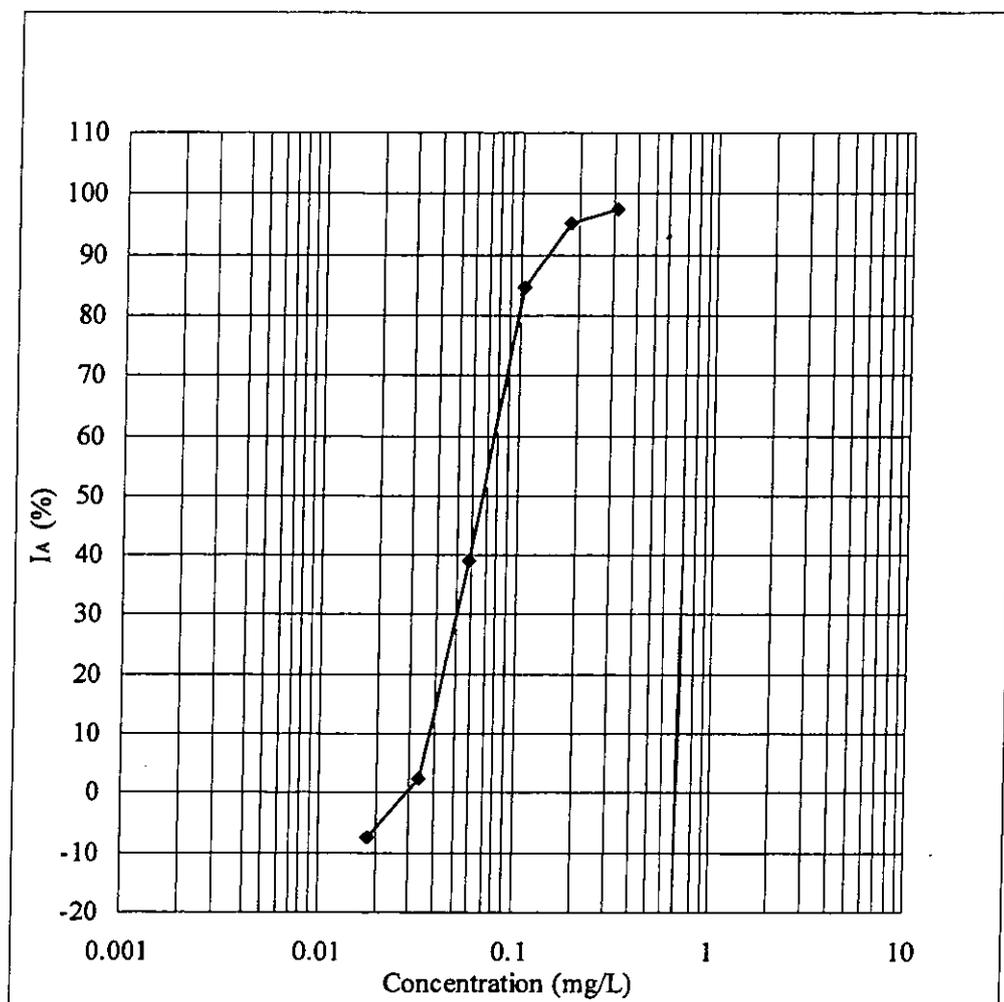


Figure 3 Concentration-Inhibition Curve Based on I_A Values Calculated from the Area under the Growth Curves



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

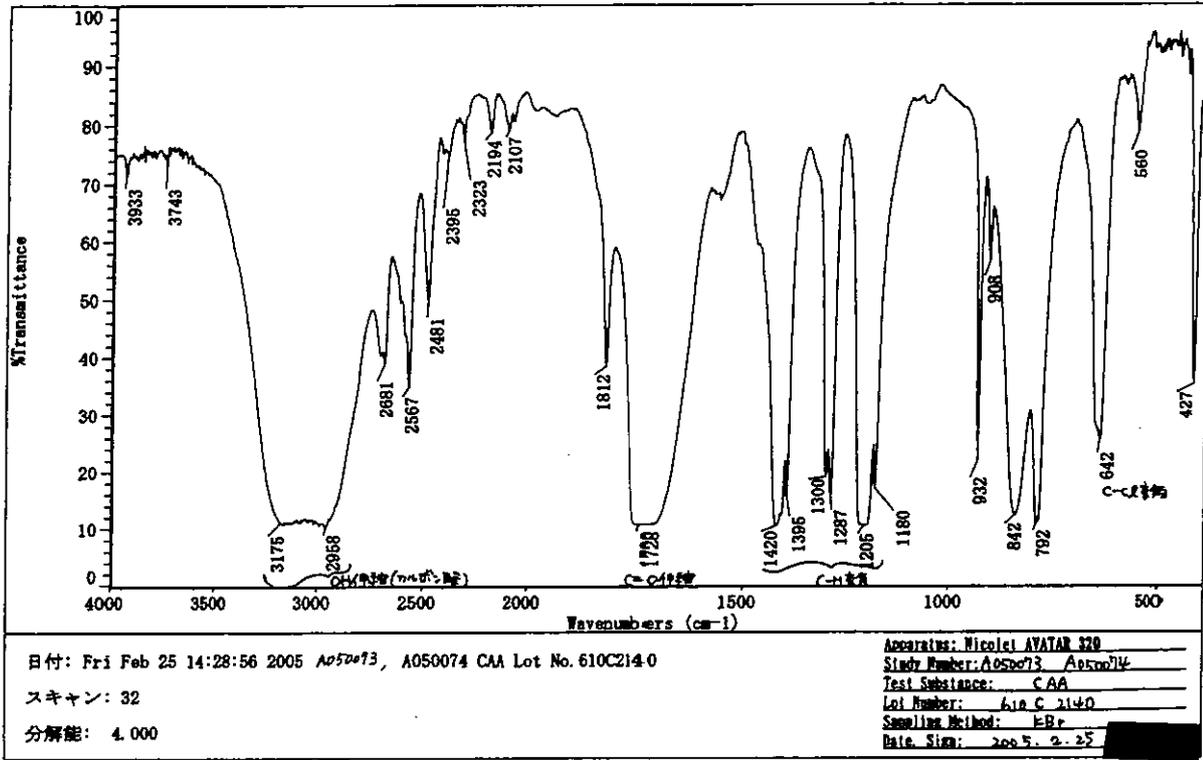
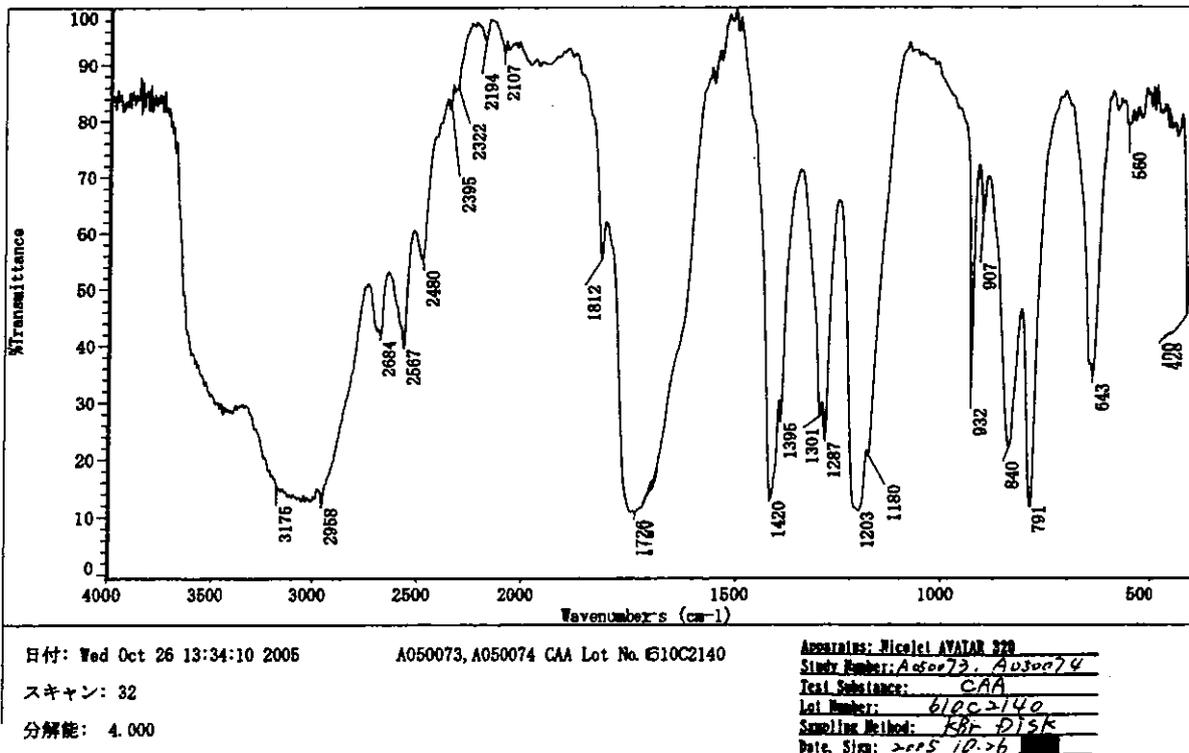


Figure A-1-2 Infrared absorption spectrum of the test substance at the end of the study



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 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
K ₂ HPO ₄	1.6
NaHCO ₃	50
MgCl ₂ ·6H ₂ O	12
MgSO ₄ ·7H ₂ O	15
<hr/>	
pH	8.3

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 No.3
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 : G 1 3 7 9 A 型
送液ポンプ : G 1 3 1 2 A 型 (ハイパンプ)
オートサンプラ : G 1 3 1 3 A 型
カラムオープン : G 1 3 1 6 A 型
質量選択検出器 (MSD) : G 1 9 4 6 D 型

(条件)

[HPLC 条件]

カラム: Shiseido製 CAPCELL PAK C18 AQ 5 μ m 3.0mm i.d. \times 150mm
カラムオープン: 50 $^{\circ}$ C
溶離液: A液 0.1% キ酸水溶液
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 μ L
流速: 0.4 mL/min

[MSD 条件]

Ionization: Electrospray
Fragmentor: 75V
Nebulizer: N₂ (30psi)
Drying gas: N₂ (10L/min, 300 $^{\circ}$ C)
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

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

$$r = 1.00$$

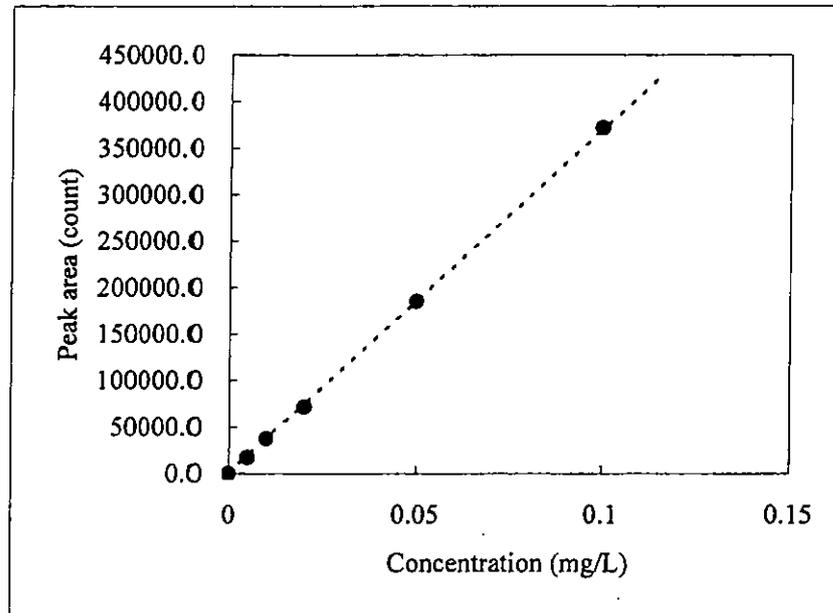
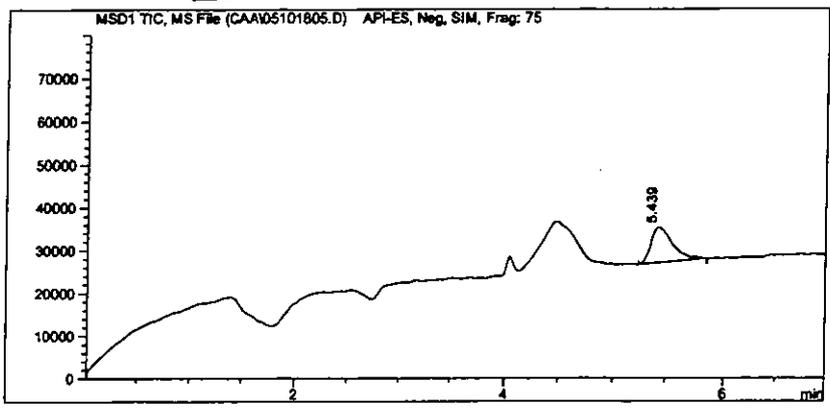


Figure A-4-2 Representative chromatograms

(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   : ██████████
=====
    
```



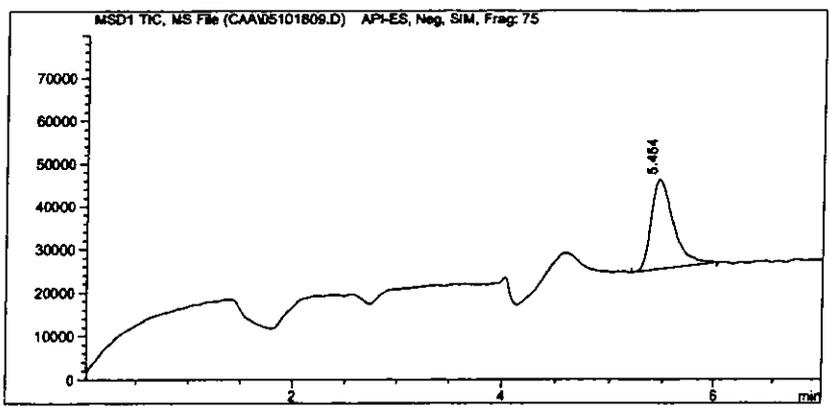
```

=====
                          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   : ██████████
=====
    
```



```

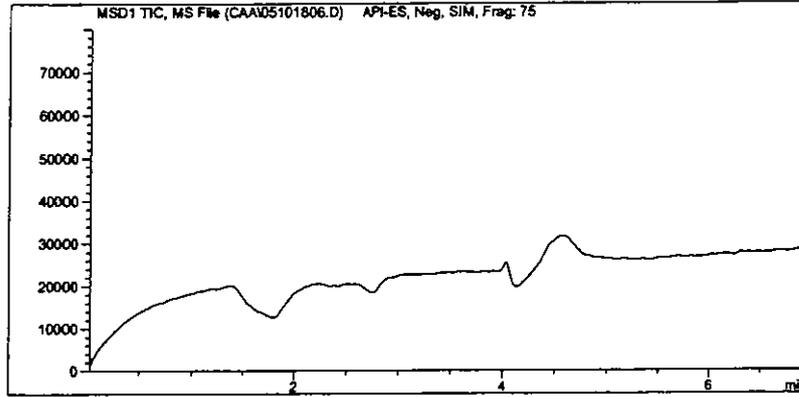
=====
                          Area Percent Report
=====
#  Meas. Ret. Peak T  Width  Area  Height  Area %
-----
1   5.454   MM      0.242 307655  21186  100.0
-----
Total:                          307655  21186
=====
*** End of Report ***
    
```

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   : ██████████
    
```



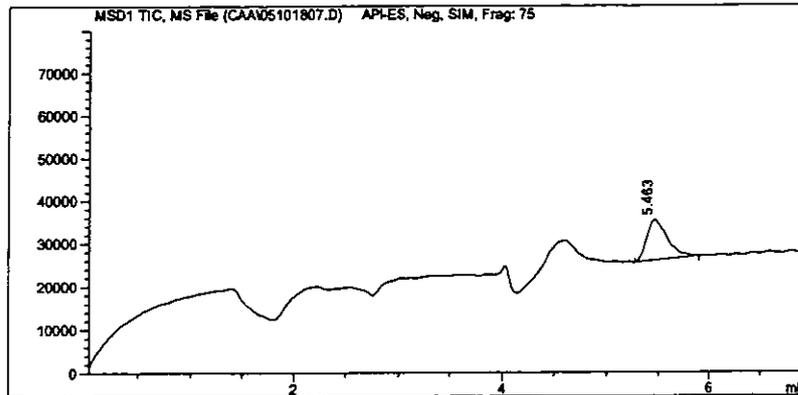
```

=====
                          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   : ██████████
    
```



```

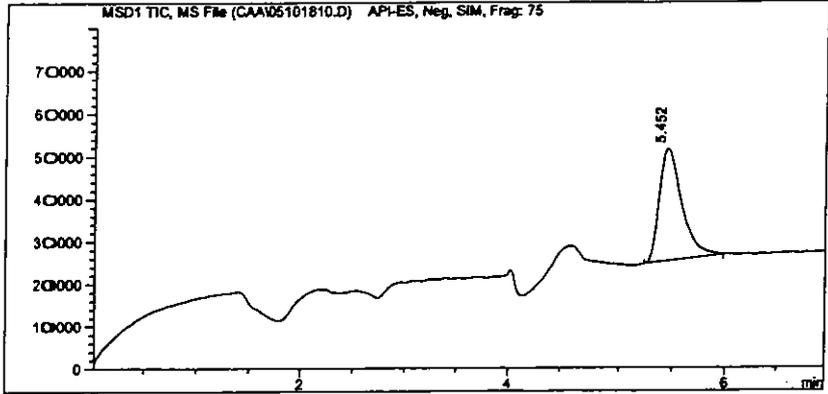
=====
                          Area Percent Report
=====
# Meas. Ret. Peak T Width Area Height Area %
=====
1 5.463 MM 0.232 132624 9546 100.0
Total: 132624 9546
=====
*** End of Report ***
    
```

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   : ██████████
    
```



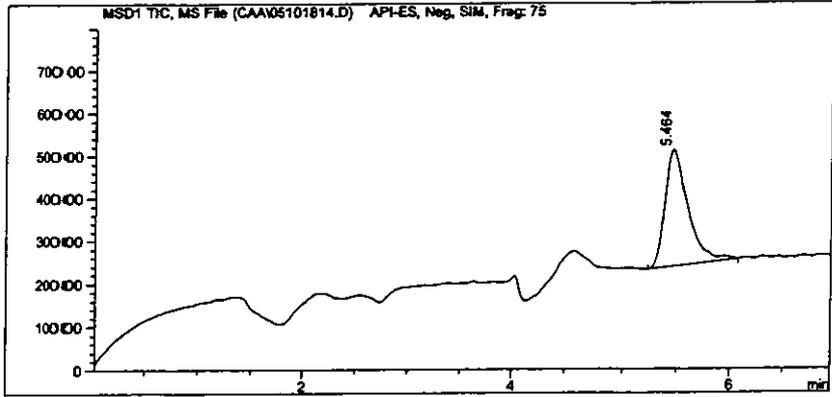
```

=====
                          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   : ██████████
    
```



```

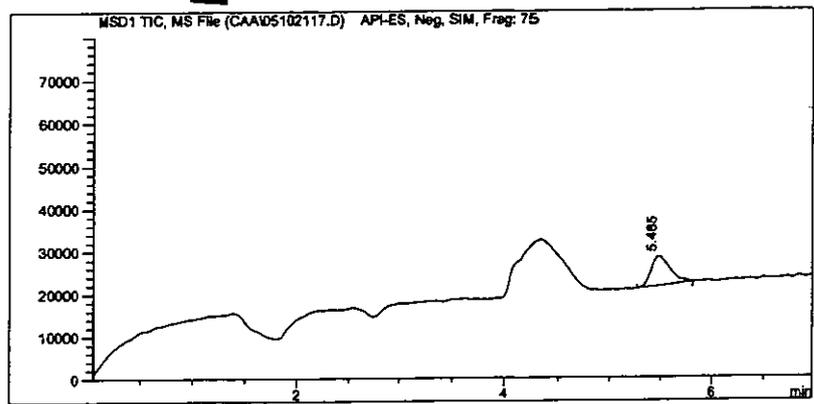
=====
                          Area Percent Report
=====
#   Meas. Ret. Peak T   Width   Area   Height   Area %
-----
1   5.464   MM        0.247  403309  27254   100.0
-----
Total:                          403309  27254
=====
*** End of Report ***
    
```

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   : ██████████
    
```



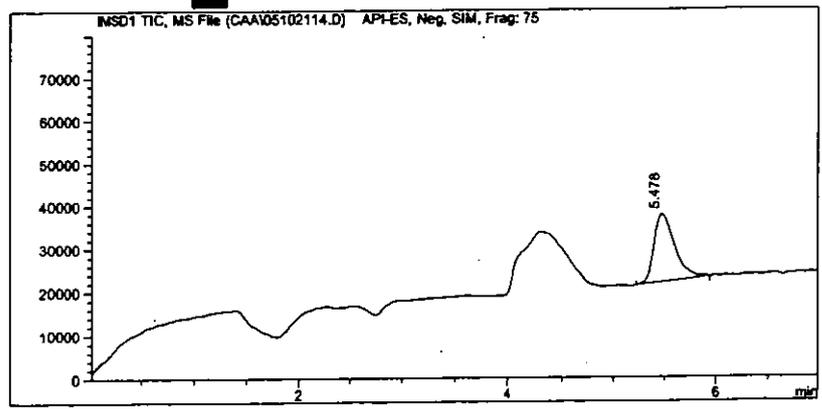
```

=====
                          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   : ██████████
    
```



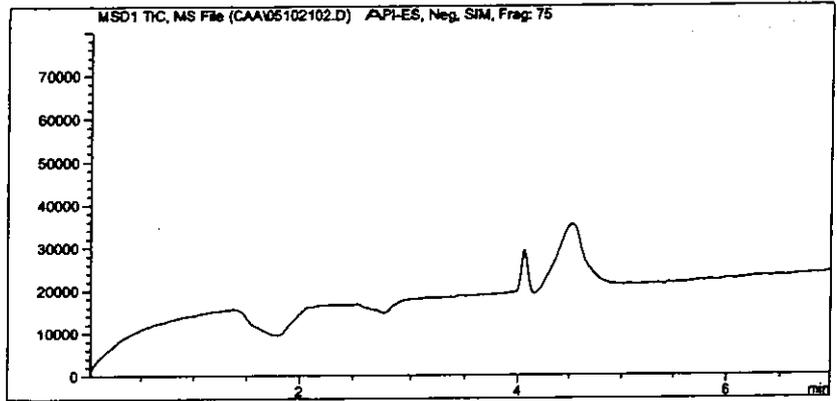
```

=====
                          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 ***
    
```

(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   : ██████████
=====
    
```



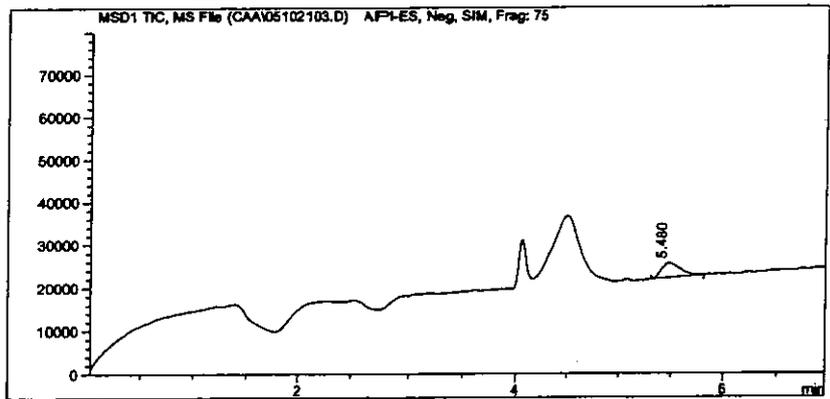
```

=====
                          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    : AL72HC                     Inj. Vol. : 80 µl
Acq. Method    : CAA.M
Acq Operator   : ██████████
=====
    
```



```

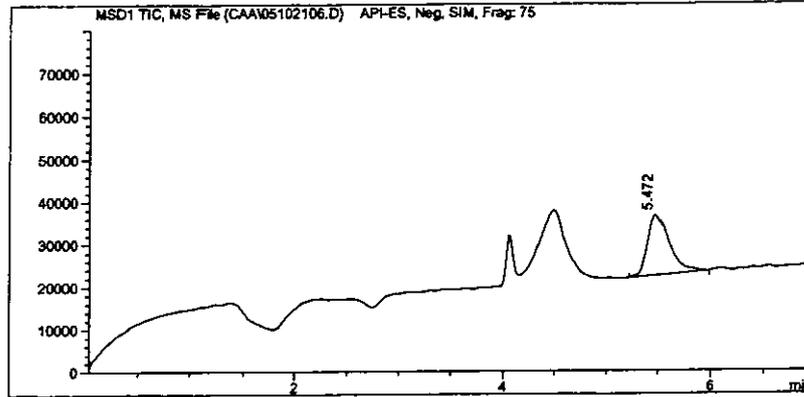
=====
                          Area Percent Report
=====
# Meas. Ret. Peak T Width Area Height Area %
=====
1 5.480 MM 0.202 43742 3614 100.0
Total: 43742 3614
=====
*** End of Report ***
    
```

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   : ██████████
    
```



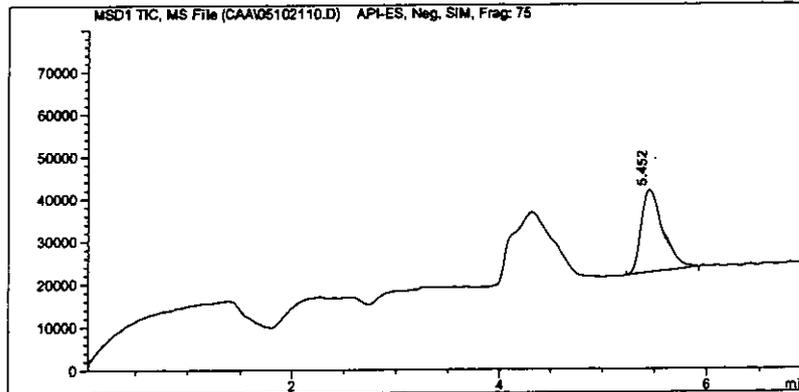
```

=====
                          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 C50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	Proib.
Bartlett test		0	15.6944	12.5916	<16.8119	22.4577	0.0155
Method	vs	Side	Stat.	0.0500	0.0100	0.0010	Proib.
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	Proib.
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		Yield	
[Mean ^a Measured Conc.]		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

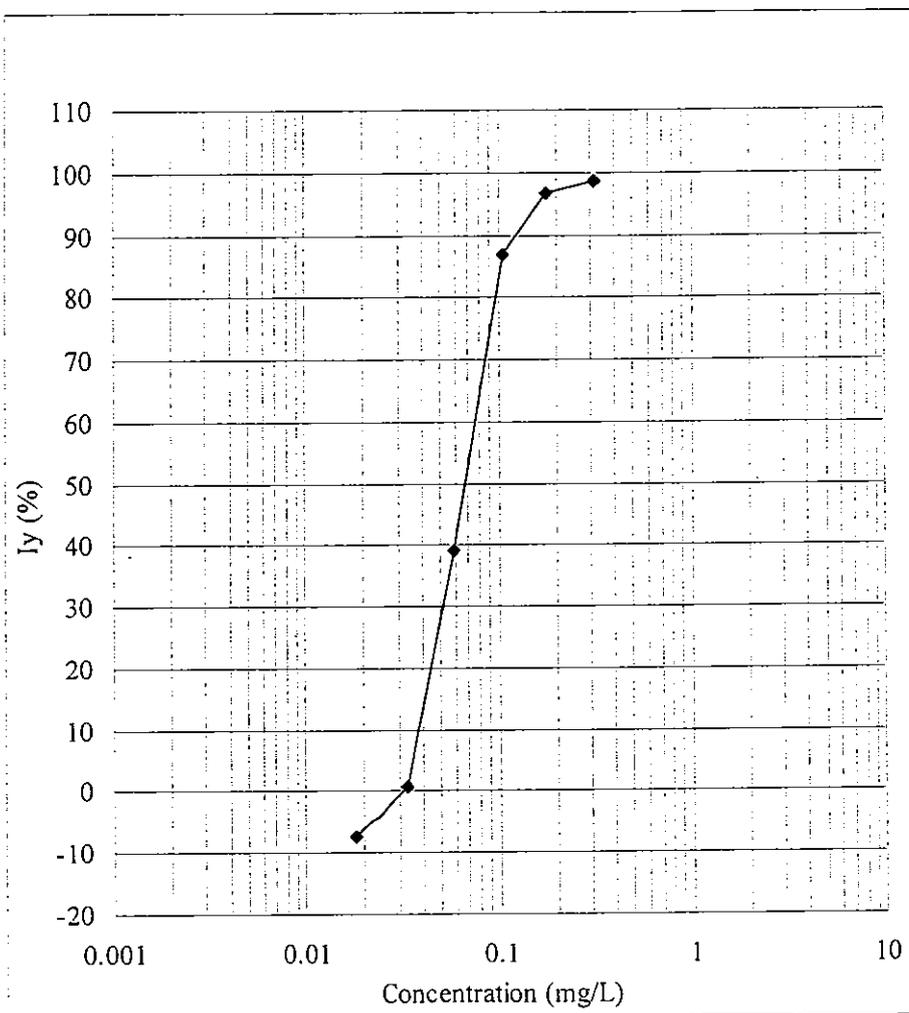


Table 3 Calculation of the EyC50 (0-72h)

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, f1, 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 **