

受付番号	662-11-E-5703
試験番号	95703

最 終 報 告 書

o-ニトロアニリンの *Pseudokirchneriella subcapitata* を用いる藻類生長阻害試験

2012 年 2 月

一般財団法人化学物質評価研究機構

久留米事業所

本文書は正本を正確に転写したものです。
一般財団法人 化学物質評価研究機構 久留米事業所
2012 年 2 月 20 日
試験責任者

陳 述 書

一般財団法人化学物質評価研究機構
久留米事業所

試験委託者 環境省

試験の表題 *o*-ニトロアニリンの *Pseudokirchneriella subcapitata* を用いる藻類生長阻害試験

試験番号 95703

上記試験は以下の GLP に従って実施したものである。

- a) 「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」（平成 23 年 3 月 31 日、薬食発 0331 第 8 号、平成 23・03・29 製局第 6 号、環保企発第 110331010 号）に定める「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」
- b) OECD Principles of Good Laboratory Practice, November 26, 1997

また、本最終報告書は生データを正確に反映しており、試験データが有効であることを確認した。

2012 年 2 月 10 日

試験責任者

信 頼 性 保 証 書

一般財団法人化学物質評価研究機構
久留米事業所

試験委託者 環境省

試験の表題 *o*-ニトロアニリンの*Pseudokirchneriella subcapitata* を用いる藻類生長阻害試験

試験番号 95703

本最終報告書は、試験の方法、手順が正確に記載され、試験結果は生データを正確に反映していることを保証する。

なお、監査又は査察の結果については、下記の通り試験責任者及び運営管理者に報告した。

監査又は査察内容	監査又は査察日	報告日 (試験責任者及び運営管理者)
試験計画書草案	2011年12月28日	2011年12月28日
試験計画書	2011年12月28日	2011年12月28日
暴露開始時	2012年1月10日	2012年1月10日
暴露開始後	2012年1月13日	2012年1月13日
生データ、最終報告書草案	2012年2月8日	2012年2月8日
最終報告書	2012年2月10日	2012年2月10日

2012 年 2 月 10 日

信頼性保証部門責任者



目 次

	頁
1. 表 題	6
2. 試験委託者	6
3. 試験施設	6
4. 試験目的	6
5. 試験法	6
6. GLP 基準	6
7. 試験日程	6
8. 試資料の保管	7
9. 試験関係者	7
10. 最終報告書の承認	7
11. 要 約	8
12. 試験材料	9
12.1 被験物質	9
12.2 試験生物	10
13. 試験の実施	10
13.1 培 地	10
13.2 試験器具及び装置	11
13.3 試験液の調製法	11
13.4 試験条件	11
13.5 観察と測定	11
13.6 結果の算出	12
13.7 試験の有効性	13
13.8 数値の取扱い	13
14. 試験結果及び考察	13
14.1 試験液の観察と測定結果	13
14.2 E_1C_{50}	14
14.3 各試験区での生長曲線、細胞観察結果及び NOEC	14
14.4 試験の有効性	14
14.5 考 察	14
15. 試験成績の信頼性に影響を及ぼしたと思われる環境要因	14

Tables

Table 1	pH of test solutions	15
Table 2	Culture temperature and light intensity in incubator	15
Table 3	Value of biomass at each time	16
Table 4	Growth rate and growth inhibition	17
Table 5	E_rC_{50} and NOEC	18
Table 6	Result of statistical analysis	18
Table 7	Variation of growth rates in control	18

Figures

Figure 1	Concentration-response curve	19
Figure 2	Growth curve	20

Appendix 1	被験物質濃度の測定方法及び結果
Appendix 2	検量線及びクロマトグラム
Additional data	予備試験結果

1. 表 題

o-ニトロアニリンの *Pseudokirchneriella subcapitata* を用いる藻類生長阻害試験

2. 試験委託者

名 称 環境省

住 所 〒100-8975 東京都千代田区霞が関 1-2-2

3. 試験施設

名 称 一般財団法人化学物質評価研究機構 久留米事業所

住 所 〒839-0801 福岡県久留米市宮ノ陣三丁目 2 番 7 号

4. 試験目的

o-ニトロアニリンの *Pseudokirchneriella subcapitata* に対する生長阻害試験を行い、0-72 時間の 50%生長阻害濃度 (EC₅₀) 及び最大無影響濃度 (NOEC) を求める。

5. 試験法

- a) 「新規化学物質等に係る試験の方法について」(平成 23 年 3 月 31 日、薬食発 0331 第 7 号、平成 23・03・29 製局第 5 号、環保企発第 110331009 号) に定める「藻類生長阻害試験」
- b) OECD Guidelines for Testing of Chemicals, No.201, March 23, 2006, Annex 5 corrected: July 28, 2011, "Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test"
- c) OECD Guidance Document, No.23, September 2000, "Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures"

6. GLP 基準

- a) 「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」(平成 23 年 3 月 31 日、薬食発 0331 第 8 号、平成 23・03・29 製局第 6 号、環保企発第 110331010 号) に定める「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」
- b) OECD Principles of Good Laboratory Practice, November 26, 1997

7. 試験日程

試 験 開 始 日	2011 年 12 月 28 日
実 験 開 始 日	2012 年 1 月 10 日
実 験 終 了 日	2012 年 1 月 13 日
試 験 終 了 日	2012 年 2 月 10 日

8. 試資料の保管

試験計画書（正本）、最終報告書（正本）、生データ、試験委託書、契約書写し及びその他の記録は当試験施設に保管し、被験物質は保管しない。

保管期間は最終報告書提出後 10 年間とする。

保管期間終了後の処置（継続保管、廃棄又は返却）は、試験委託者と協議の上決定する。

9. 試験関係者

試験責任者

（所属 試験第四課）

試験担当者（生物試験の実施）

試験担当者（分析試験の実施）

10. 最終報告書の承認

2012 年 2 月 10 日

試験責任者

11. 要 約

試験条件

試験生物	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>
試験区	100、32、10、3.2、1.0 mg/L (公比 $\sqrt{10}$) の5濃度区及び対照区
試験液の調製	供試試料を培地に溶解して調製した試験原液を用いて調製
暴露方式	旋回振とう培養 (約 100 回/分)
暴露期間	72 時間
連 数	6 連/対照区 3 連/試験濃度区
試験液量	600 mL/対照区 (100 mL/試験容器) 300 mL/試験濃度区 (100 mL/試験容器)
培養温度	22.2~22.8℃
光強度	92~95 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$
生物量の測定	細胞濃度
被験物質濃度の測定	HPLC 法 (暴露開始時及び終了時)

試験結果

EC ₅₀ (E _r C ₅₀)	44 mg/L (95%信頼限界: 42~45 mg/L)
NOEC (生長速度 0-3d)	1.0 mg/L
(上記濃度は、設定濃度に基づく値)	

12. 試験材料

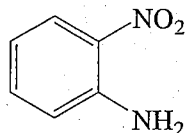
12.1 被験物質

a) 名称等

名 称 *o*-ニトロアニリン
CAS 番号 88-74-4

b) 構造式等

構造式

分子式 $C_6H_5N_2O_2$ 分子量 138.13 ^{*1}^{*1} 原子量表 (2011) を用いて算出した値

c) 供試試料

被験物質純度 100.0% (キャピラリーカラム GC) ^{*2}

供給者

ロット番号

被験物質は純度 100% として取り扱った。

^{*2} 供給者提供の検査成績書

d) 物理化学的性状

蒸気圧 4 Pa (20°C) ^{*3}対水溶解度 14.9 g/L (30°C) ^{*3}

1-オクタノール/水分配係数

 $\log P_{\text{oct}}$ 1.44/1.83 ^{*4}融 点 73.3°C ^{*2}沸 点 284°C ^{*3*4*5}常温における性状 黄みの赤褐色、粉末又は小塊 ^{*2}安定性 光により変質する ^{*5}

溶媒に対する溶解度等

エタノール、アセトン、ジエチルエーテル及び希塩酸に溶けやすく、水にほとんど溶けない。 ^{*5}

比 重 0.9015 (25/4°C) ^{*3*5}^{*3} 化学物質総合情報提供システム (CHRIP)^{*4} Kavel verschueren "Handbook of Environmental Data on Organic Chemicals" 4th Ed.^{*5} 製造元 () の製品安全データシート

e) 保管条件

冷暗所保管した。

f) 被験物質の同一性及び保管条件下における安定性の確認

当試験施設で測定した赤外吸収スペクトルが独立行政法人産業技術総合研究所の有機化合物スペクトルデータベースに記載の赤外吸収スペクトルと一致することが確認された。また、実験開始前及び終了後の赤外吸収スペクトルを比較することにより、保管条件下における被験物質の安定性を確認した。

g) 取扱い上の注意

手袋、マスク、保護めがね及び白衣を着用し、皮膚、目への接触及び吸入を避けた。
また、被験物質はひょう量時のみ黄色灯下で取り扱った。

12.2 試験生物

種	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>
生物種選択の理由	テストガイドラインに推奨されている種
入手源	American Type Culture Collection
入手株番号	ATCC 22662
入手日	1995 年 6 月 30 日
入手後の管理	当試験施設で無菌的に継代培養
試験系の再現性の確認	定期的に基準物質による藻類生長阻害試験を実施 最新のデータを以下に示す。 基準物質：二クロム酸カリウム (和光純薬工業 試薬特級 ロット番号 HLH7646) 実施期間；2011 年 6 月 13 日～6 月 16 日 $E_{rC_{50}}$ (0-3d) : 0.99 mg/L この値は当試験施設におけるバックグラウンドデータの規定範囲内(平均 $\pm 2 \times$ 標準偏差)であった[平均 \pm 標準偏差：0.94 \pm 0.18 mg/L (n=18)]。

13. 試験の実施

13.1 培 地

前培養及び試験ともに精製水で調製した OECD 培地 (OECD TG 201 ; March 23, 2006) を用いた。

Component	mg/L	Component	mg/L
H ₃ BO ₃	0.185	CuCl ₂ ·2H ₂ O	0.00001
MnCl ₂ ·4H ₂ O	0.415	CaCl ₂ ·2H ₂ O	18.0
ZnCl ₂	0.00300	NH ₄ Cl	15.0
FeCl ₃ ·6H ₂ O	0.0640	KH ₂ PO ₄	1.60
Na ₂ EDTA·2H ₂ O	0.100	NaHCO ₃	50.0
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.00150	MgCl ₂ ·6H ₂ O	12.0
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.00700	MgSO ₄ ·7H ₂ O	15.0

13.2 試験器具及び装置

試験容器	500 mL 容ガラス製三角フラスコ（通気性のシリコセン®付）
培養装置	連続振とう培養、温度及び照明の制御が可能な装置 （光照射式恒温振とう培養器、ユーエスアイ）

13.3 試験液の調製法

必要量の供試試料をひょう量し、培地と混合後、溶解するまで 110 分間攪拌し、100 mg/L の試験原液を調製した。調製容器内で必要量の試験原液及び試験原液と同様の処理をした培地（処理培地）を混合、攪拌して試験液を調製し、各試験容器に分割した。ひょう量は黄色灯下で行った。

13.4 試験条件

暴露方式	旋回振とう培養（約 100 回/分）
暴露期間	72 時間
試験濃度	100、32、10、3.2、1.0 mg/L（公比 $\sqrt{10}$ ） 予備試験結果から試験濃度及び公比を決定した。 予備試験結果を Additional data に示す。
対照区	被験物質を含まない処理培地
連 数	6 連/対照区 3 連/試験濃度区
試験液量	600 mL/対照区（100 mL/試験容器） 300 mL/試験濃度区（100 mL/試験容器）
暴露開始時の細胞数	3 日間前培養した藻類の細胞数を計数し、試験液中の細胞濃度が 0.75×10^4 cells/mL になるように試験液に接種した。
試験操作	無菌操作により実施した。
温 度	21～24℃（±2℃の変動幅）
照 明	設定値 90 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ （設定値の±20%以内、平均値±15%の変動幅） 400～700 nm のスペクトル幅をもつ蛍光灯による連続照明

13.5 観察と測定

a) 藻類の生長等

測定項目	生物量（細胞濃度）
測定頻度	暴露開始後 24 時間ごと（試験液のバックグラウンドを測定しブランク補正を実施）
細胞観察	暴露終了時に各試験区につき 1 試験容器
測定機器	コールターカウンター Z1（ベックマン・コールター） 生物顕微鏡 BX41（オリンパス）

b) 試験液の状態

暴露開始時及び終了時に観察

c) 試験液の水質及び暴露環境

pH	調製容器より別途分取して測定（暴露開始時） 各試験区につき1試験容器を測定（暴露終了時）
培養装置内温度	暴露期間中1日1回測定
光強度	培養装置内で暴露期間中1日1回測定
測定機器	ポータブル pH 計 HM-21P（東亜ディーケーケー） 検定済ガラス製棒状温度計 光量子計 LI-250A（LI-COR）

d) 試験液中の被験物質濃度

測定頻度	暴露開始時及び終了時
採水方法	調製容器より別途分取（暴露開始時） 各試験区の試験容器から均等量採取し混合（暴露終了時）
藻体除去	遠心分離（3000 rpm, 10 分間）（暴露終了時のみ実施）
採水量	約 10～12 mL（全試験区）
測定方法	Appendix 1 参照

13.6 結果の算出

暴露期間中に測定した試験液中の被験物質濃度が設定濃度の $\pm 20\%$ 以内であったため、結果の算出には設定濃度を用いることとした。

a) 阻害率の算定法

各試験区の生物量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。この曲線を用い、生長速度を比較して阻害率を算出した。

生長速度の比較

指数関数的に増殖しているときの生長速度は次式に従って計算した。

$$\mu_{i-j} = \frac{\ln N_j - \ln N_i}{t_j - t_i}$$

ここで

μ_{i-j} = t_i 時から t_j 時までの期間の生長速度。日当たり (d^{-1}) で表す。

N_i = t_i 時の実測細胞濃度 (cells/mL)。試験開始時 (t_0) の細胞濃度は設定値を用いた。

N_j = t_j 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 (d)

t_j = 暴露開始後 j 回目に細胞濃度を測定した時間 (d)

EC₅₀ の算出においては、暴露開始時から 72 時間後までの暴露期間を通じた生長速度を求めた。対照区については、試験の有効性を調べるために 1 日ごとの生長速度も求めた。

試験濃度区における生長阻害率は対照区の各連の平均生長速度の平均値 (μ_c) と試験濃度区での各連の平均生長速度 (μ_T) との間の差を次式に従って算出した値 (I_μ) の平均値とした。

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

b) EC₅₀ の算出法

各試験濃度区に対応する阻害率を片対数グラフにプロットし、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 EC₅₀ 及びその 95%信頼限界を算出した。生長速度により求めた EC₅₀ は E_rC₅₀ と記載した。

EC₅₀ は、当事業所にて開発したコンピュータプログラム（Microsoft Excel により起動）を用いて算出した。

c) NOEC の評価

生長速度について、Bartlett 法による等分散検定を行った後、各試験濃度区と対照区との有意差の有無を Kruskal-Wallis の順位和検定及び Mann-Whitney の U 検定により求めた。ただし、E_rC₅₀ より高い試験濃度区は、有意差検定には使用しなかった。有意差検定は、当事業所にて開発したコンピュータプログラム（Microsoft Excel により起動）及び統計処理ソフトウェア（SPSS 16.0J for Windows）を用いて実施した。有意差検定結果及び細胞観察結果より、NOEC を評価した。

13.7 試験の有効性

- a) 対照区における藻類の生長は 72 時間後に 16 倍以上でなければならない。
- b) 対照区における毎日の生長速度の平均変動係数が暴露期間を通じて 35%を超えてはならない。
- c) 対照区における繰り返し間の生長速度の変動係数が 7%を超えてはならない。

13.8 数値の取扱い

数値の丸め方は、JIS Z 8401 : 1999 規則 B に従った。

14. 試験結果及び考察

14.1 試験液の観察と測定結果

a) 試験液の状態

試験濃度区では暴露開始時は濃度に依存して黄色澄明であった。暴露終了時には 100 mg/L 区は黄色澄明であり、細胞の増殖により 32 mg/L 区ではわずかに懸濁した黄色、その他の試験濃度区では濃度依存的に黄緑色（濃度が低い程緑色が強い）を呈していた。対照区では暴露開始時は無色透明であり、暴露終了時には細胞の増殖により緑色を呈していた。

b) 試験液の水質及び暴露環境

試験液の pH を Table 1、培養装置内温度及び光強度を Table 2 に示す。

試験液の pH は 7.8~7.9 であった。培養装置内温度は 22.2~22.8℃、光強度は 92~95 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ であった。

c) 試験液中の被験物質濃度

被験物質濃度の測定方法及び結果を Appendix 1、検量線及びクロマトグラムを Appendix 2 に示す。

測定した試験液中の被験物質濃度は暴露開始時では 0.83~98 mg/L、暴露終了時では 0.81~97 mg/L であった。また、設定濃度に対してそれぞれ 83~102% 及び 81~101% であり、設定濃度の $\pm 20\%$ 以内に保たれていた。

14.2 E_rC_{50}

各時間での生物量を Table 3、生長速度及び生長阻害率を Table 4、 E_rC_{50} を Table 5 に示す。また、濃度-生長阻害率曲線を Figure 1 に示す。

生長速度によって算出した被験物質の E_rC_{50} は 44 mg/L (95%信頼限界: 42~45 mg/L) であった。

14.3 各試験区での生長曲線、細胞観察結果及び NOEC

NOEC を Table 5、有意差検定結果を Table 6、生長曲線を Figure 2 に示す。

100 mg/L 区では暴露期間を通して生長は著しく抑えられていた。32 及び 10 mg/L 区では阻害が認められたものの対数増殖を示した。3.2 mg/L 区では対照区に近い生長を示した。1.0 mg/L 区では対照区と同様の生長を示した。

以下の細胞観察結果は全て対照区との比較に基づくものである。全試験濃度区で対照区と同様であった。対照区では異常がみられなかった。

生長速度について有意差検定を行った結果、32、10 及び 3.2 mg/L 区において統計学的な有意差が認められた。有意差検定結果及び上記細胞観察結果より、生長速度における NOEC は 1.0 mg/L であった。

14.4 試験の有効性

a) 対照区における生長

対照区における供試藻類の生長は暴露終了時まで対数増殖を示した (Figure 2 参照)。

暴露終了時には初期生物量の 119 倍以上 (Table 3 参照) に増殖し、有効性基準 (16 倍以上の増殖) を満たしていた。

b) 対照区における日間生長速度

対照区における日間生長速度の平均変動係数は 9.6% (Table 7 参照) であり、有効性基準 (35%を超えてはならない) を満たしていた。

c) 対照区における繰り返し間の生長速度

対照区における繰り返し間の生長速度の変動係数は 0.99% (Table 7 参照) であり、有効性基準 (7%を超えてはならない) を満たしていた。

14.5 考 察

試験は被験物質の培地への溶解濃度以下での試験生物に対する影響を求める試験として行った。その結果、 E_rC_{50} は 44 mg/L、NOEC は 1.0 mg/L であった。試験液中の被験物質濃度は設定濃度の $\pm 20\%$ 以内に維持され、また、試験環境条件も適切な範囲内であったことから、試験は試験法に準じたものであったと判断される。

15. 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

当該要因はなかった。

Table 1 pH of test solutions

Nominal concentration (mg/L)	pH	
	At the start	At the end
Control	7.8	7.9
1.0	7.8	7.9
3.2	7.8	7.9
10	7.8	7.9
32	7.8	7.9
100	7.9	7.9

Table 2 Culture temperature and light intensity in incubator

Time	At the start	1-day	2-day	At the end
Culture temperature (°C)	22.2	22.4	22.3	22.8
Light intensity ($\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$)	95	92	94	93

Table 3 Value of biomass at each time

Nominal concentration (mg/L)	No.	Cell concentration ($\times 10^4$ cells/mL)			
		0 hour ^a	24 hours	48 hours	72 hours
Control	A	0.75	4.7	23	96
	B	0.75	4.3	22	94
	C	0.75	4.3	20	89 ^b
	D	0.75	4.4	22	100
	E	0.75	4.5	22	100
	F	0.75	4.5	22	99
	Mean	0.75	4.5	22	96
	S.D.	0	0.15	0.88	4.5
1.0	A	0.75	3.9	21	90
	B	0.75	3.7	21	91
	C	0.75	3.9	21	90
	Mean	0.75	3.8	21	91
	S.D.	0	0.11	0.27	0.48
3.2	A	0.75	4.0	19	80
	B	0.75	4.3	20	82
	C	0.75	4.0	19	78
	Mean	0.75	4.1	19	80
	S.D.	0	0.18	0.71	1.7
10	A	0.75	3.5	15	52
	B	0.75	3.2	14	53
	C	0.75	3.8	15	52
	Mean	0.75	3.5	14	53
	S.D.	0	0.28	0.73	0.28
32	A	0.75	1.8	5.3	17
	B	0.75	1.7	5.4	16
	C	0.75	1.6	5.4	15
	Mean	0.75	1.7	5.4	16
	S.D.	0	0.081	0.086	0.99
100	A	0.75	1.2	1.3	1.5
	B	0.75	1.2	1.4	1.6
	C	0.75	1.2	1.3	1.7
	Mean	0.75	1.2	1.3	1.6
	S.D.	0	0.039	0.058	0.089

a The value based on the measured value of pre-culture

b The minimum cell growth in control (biomass at the end of exposure / biomass at the start of exposure)

$$89 / 0.75 = 119$$

Table 4 Growth rate and growth inhibition

Nominal concentration (mg/L)	No.	Growth rate (0-3d)	Inhibition rate (%)
Control	A	1.62	-
	B	1.61	-
	C	1.59	-
	D	1.63	-
	E	1.63	-
	F	1.63	-
	Mean	1.62	-
	S.D.	0.0160	-
1.0	A	1.60	1.3
	B	1.60	1.1
	C	1.60	1.2
	Mean	1.60	1.2
	S.D.	0.00177	0.11
3.2	A	1.56	3.9
	B	1.56	3.3
	C	1.55	4.2
	Mean	1.56	3.8
	S.D.	0.00694	0.43
10	A	1.42	13
	B	1.42	12
	C	1.42	12
	Mean	1.42	12
	S.D.	0.00176	0.11
32	A	1.04	36
	B	1.03	36
	C	0.996	38
	Mean	1.02	37
	S.D.	0.0209	1.3
100	A	0.236	85
	B	0.253	84
	C	0.273	83
	Mean	0.254	84
	S.D.	0.0185	1.1

Table 5 E_rC_{50} and NOEC

E_rC_{50} (mg/L)	NOEC (mg/L)
44 (42 to 45)	1.0

Values in parentheses express 95% confidence interval.

Table 6 Result of statistical analysis

Nominal concentration (mg/L)	Statistical analysis	Statistical procedure
1.0	n.s.	Bartlett's test Kruskal-Wallis rank-sum test Mann-Whitney's U-test
3.2	*	
10	*	
32	*	
100	-	

n.s. : No significant difference

* : Significant difference ($p < 0.05$)

- : The data in the exposure level was not used for the statistical analysis since the concentration was greater than E_rC_{50} .

Table 7 Variation of growth rates in control

< Variation for section-by-section specific growth rates in the controls >

Control No.	Mean	Standard deviation	Coefficient of variation (%)	
A	1.62	0.203	13	9.6 (Mean)
B	1.61	0.154	9.6	
C	1.59	0.140	8.8	
D	1.63	0.128	7.9	
E	1.63	0.151	9.2	
F	1.63	0.152	9.3	

< Variation of average specific growth rates in replicate controls >

	0-3day
Mean	1.62
Standard deviation	0.0160
Coefficient of variation (%)	0.99

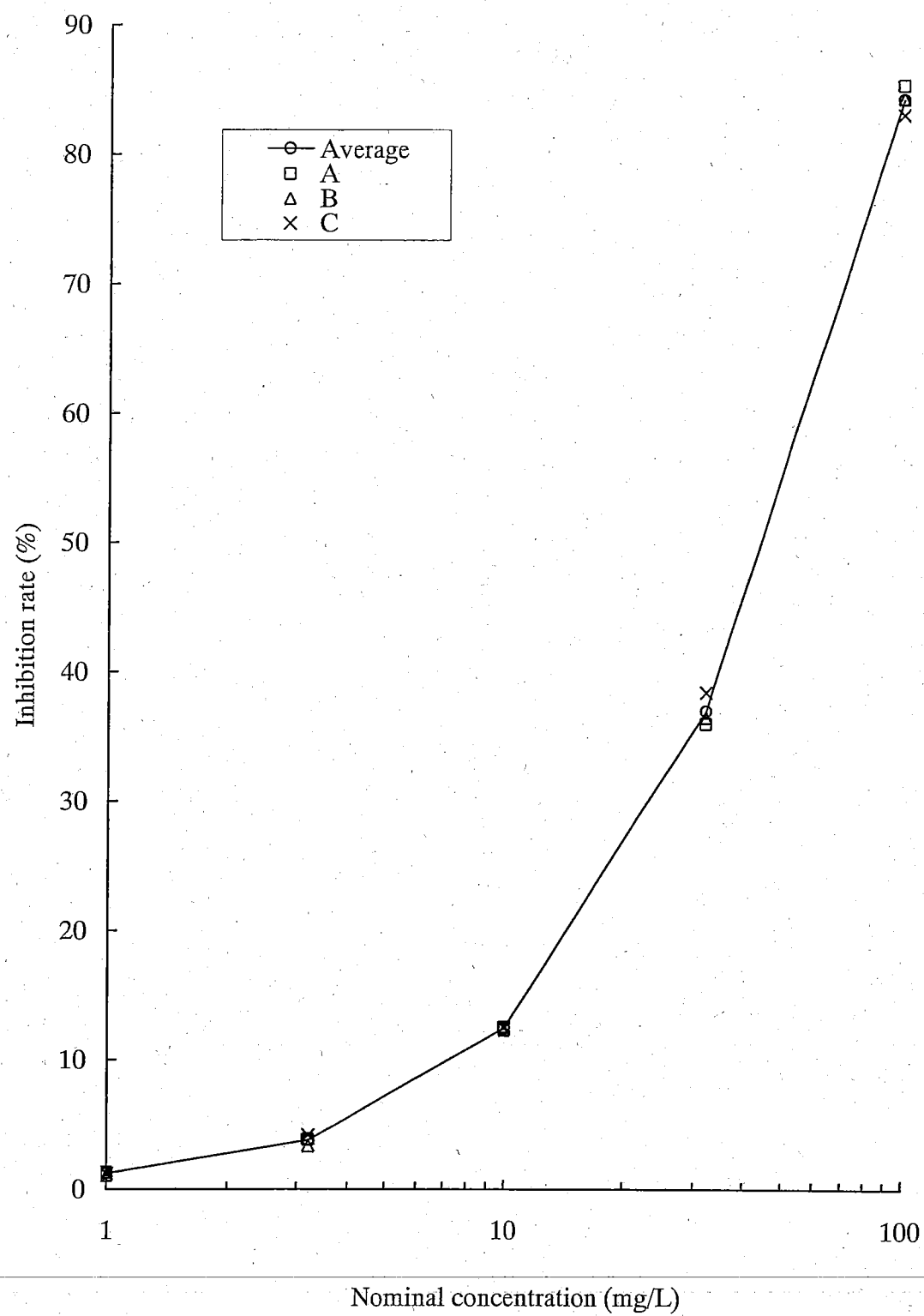


Figure 1 Concentration-response curve.

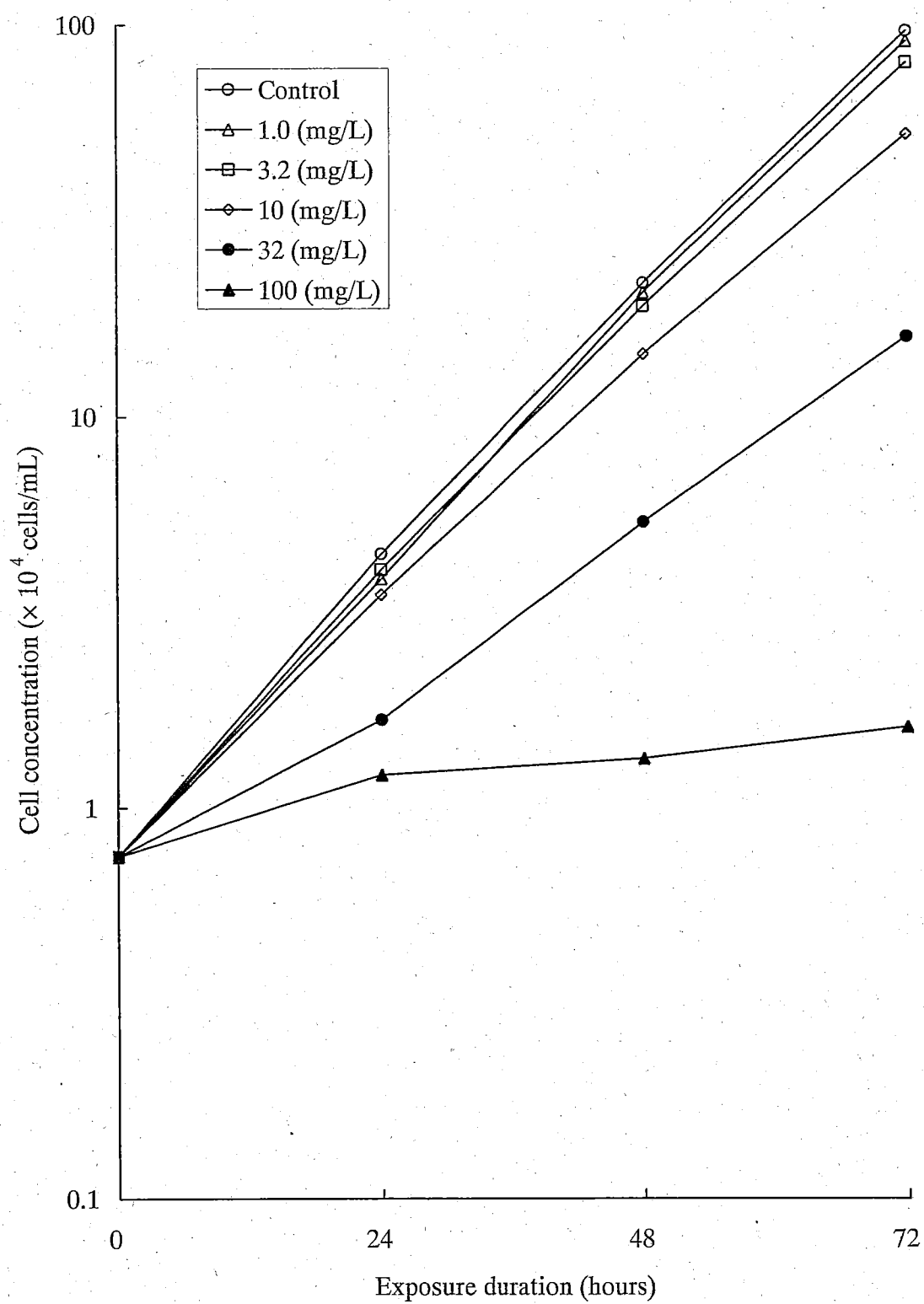


Figure 2 Growth curve.

Appendix 1

被験物質濃度の測定方法及び結果

1. 分析試料の前処理法

採取した試験液について、最終試料の組成がアセトニトリル/培地 (1/1 v/v) になるように適宜希釈して高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 試料を調製した。

2. 被験物質の定量分析

a) 定量方法

被験物質の定量は 1 濃度の標準溶液を用いた絶対検量線法で行った。

本定量方法の有効性を確認するために、c) の標準溶液と同様に調製した 0.010、0.050、0.10 及び 0.20 mg/L の 4 濃度の標準溶液を用いて検量線を作成した。その結果、クロマトグラム上のピーク面積と濃度により作成した検量線の回帰式が原点を通る直線であったことから有効性が確認された。作成した検量線及び HPLC 試料の分析によって得られたクロマトグラムを Appendix 2 に示す。

分析試料中の被験物質の定量下限値は、定量性が確認された範囲での標準溶液の最低濃度 (0.010 mg/L) とした。よって、試験液中の被験物質の定量下限値は前処理操作を考慮して 0.10 mg/L とした。

b) 分析条件

機 器	高速液体クロマトグラフ LC-2010AHT (紫外可視分光検出器内蔵) (島津製作所)
カラム	L-column2 ODS (150 mm × 2.1 mm I.D., 粒子径 5 µm, 化学物質評価研究機構)
カラム温度	40℃
溶離液	A (60%) : アセトニトリル B (40%) : 超純水
流 量	0.2 mL/min
測定波長	230 nm
注入量	20 µL

c) 標準溶液の調製及び被験物質濃度の算出

供試試料 50 mg を電子分析天びんで正確にはかりとり、アセトニトリルに溶解して 1000 mg/L の被験物質溶液を調製した。これをアセトニトリル/培地 (1/1 v/v) になるように希釈して 1.0 mg/L の被験物質溶液を調製した。さらにこれをアセトニトリル/培地 (1/1 v/v) で希釈して 0.10 mg/L の標準溶液を調製した。

HPLC 試料中の被験物質濃度は、標準溶液及び HPLC 試料のクロマトグラム上で得られるピーク面積を比較し、比例計算して求めた。

3. 測定結果

試験液中の被験物質濃度の測定結果を以下に示す。

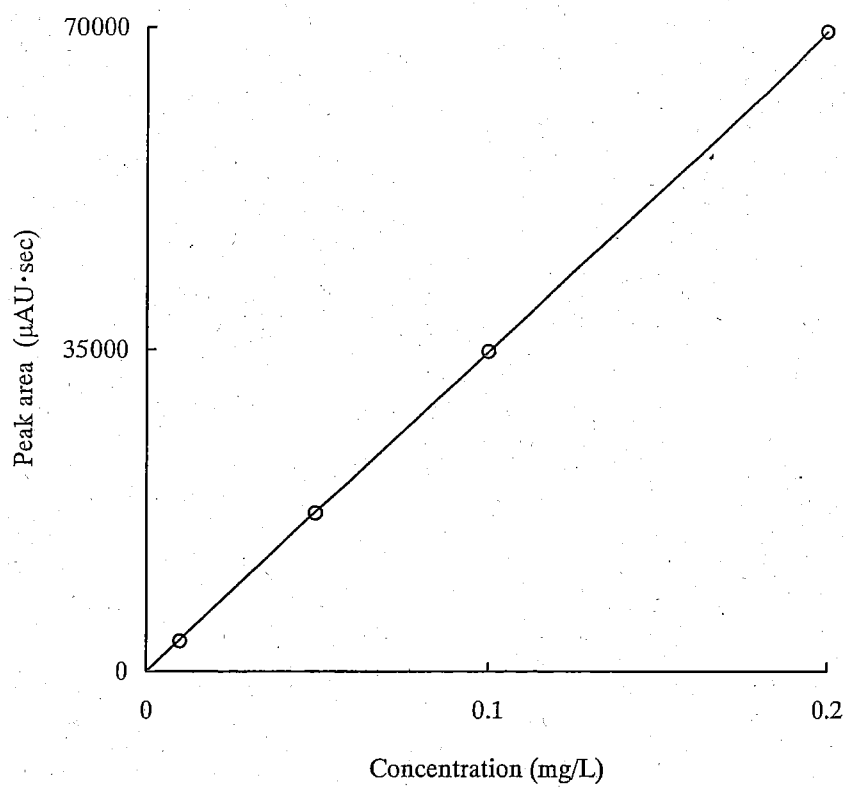
Appendix table 1-1 Measured concentrations of test item in test solutions

Nominal concentration (mg/L)	Measured concentration (mg/L) (Percentage of measured concentration versus nominal concentration %)		
	At the start	At the end	Geometric mean
Control	n.d.	n.d.	
1.0	0.83 (83)	0.81 (81)	0.82 (82)
3.2	3.2 (100)	3.2 (101)	3.2 (101)
10	10 (102)	9.9 (99)	10 (100)
32	32 (101)	31 (97)	32 (99)
100	98 (98)	97 (97)	98 (98)

n.d. : <0.10 mg/L

Appendix 2

検量線及びクロマトグラム



Concentration (mg/L)	Peak area ($\mu\text{AU}\cdot\text{sec}$)
0.010	3292
0.050	17195
0.10	34764
0.20	69441

Appendix figure 2-1 Calibration curve of test item for analysis by HPLC.

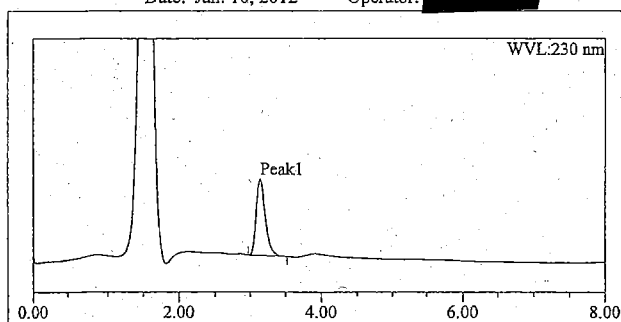
95703

Standard solution 0.10 mg/L

Date: Jan. 10, 2012

Operator: [REDACTED]

95703 120110Std04



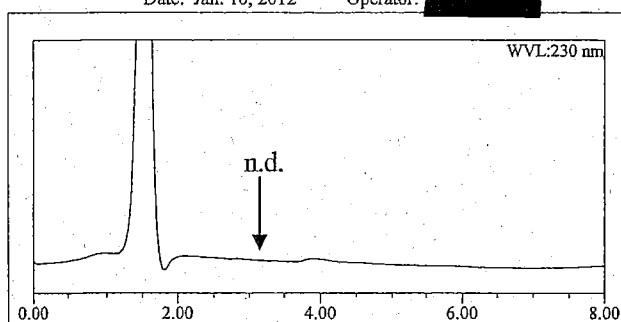
No.	Time (min)	Height (μAU)	Area (μAU-sec)	Area (%)
Peak1	3.14	3908	34760	100.00
Total	-	-	34760	100.00

Control

Date: Jan. 10, 2012

Operator: [REDACTED]

95703 120110 H0bZ



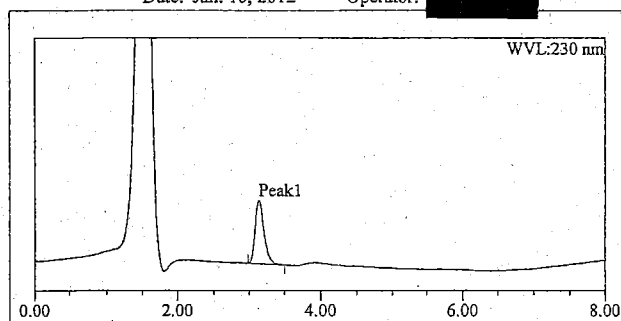
No.	Time (min)	Height (μAU)	Area (μAU-sec)	Area (%)
Peak1	-	-	-	-
Total	-	-	0	0.00

1.0 mg/L exposure level

Date: Jan. 10, 2012

Operator: [REDACTED]

95703 120110 H0hE



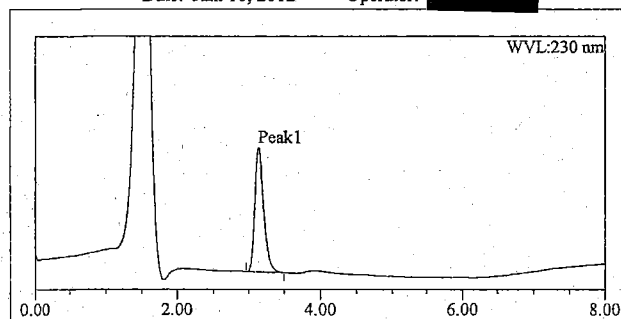
No.	Time (min)	Height (μAU)	Area (μAU-sec)	Area (%)
Peak1	3.13	3277	28706	100.00
Total	-	-	28706	100.00

3.2 mg/L exposure level

Date: Jan. 10, 2012

Operator: [REDACTED]

95703 120110 H0hD



No.	Time (min)	Height (μAU)	Area (μAU-sec)	Area (%)
Peak1	3.13	6401	55855	100.00
Total	-	-	55855	100.00

Date 2012.1.10

Name [REDACTED]

Appendix figure 2-2-1 HPLC chromatograms at start of exposure.

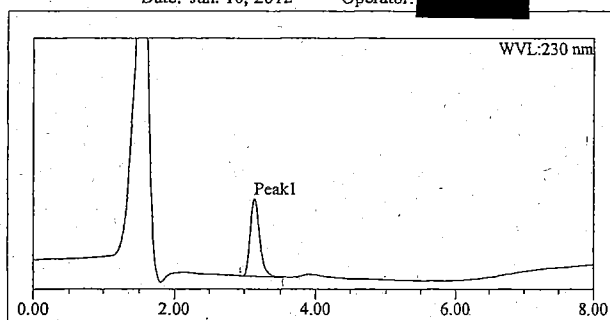
95703

10 mg/L exposure level

Date: Jan. 10, 2012

Operator: [REDACTED]

95703 120110 H0hC



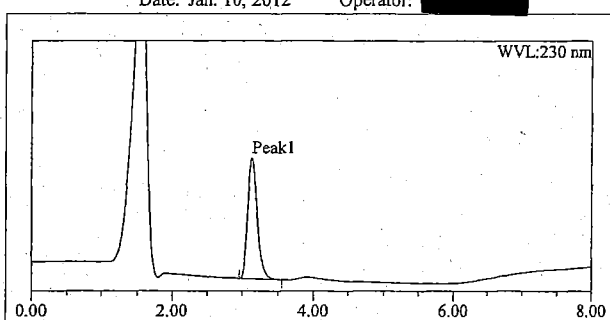
No.	Time (min)	Height (μAU)	Area (μAU·sec)	Area (%)
Peak1	3.13	4013	35350	100.00
Total	-	-	35350	100.00

32 mg/L exposure level

Date: Jan. 10, 2012

Operator: [REDACTED]

95703 120110 H0hB



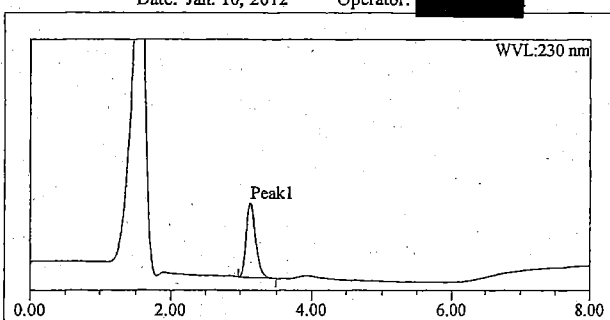
No.	Time (min)	Height (μAU)	Area (μAU·sec)	Area (%)
Peak1	3.13	6285	56109	100.00
Total	-	-	56109	100.00

100 mg/L exposure level

Date: Jan. 10, 2012

Operator: [REDACTED]

95703 120110 H0hA



No.	Time (min)	Height (μAU)	Area (μAU·sec)	Area (%)
Peak1	3.13	3859	34182	100.00
Total	-	-	34182	100.00

Date 2012.1.10

Name [REDACTED]

Appendix figure 2-2-2 HPLC chromatograms at start of exposure.

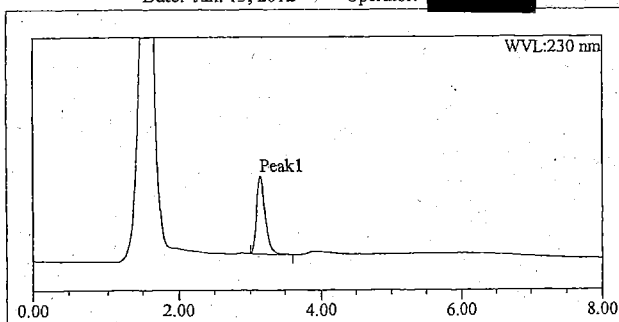
95703

Standard solution 0.10 mg/L

Date: Jan. 13, 2012

Operator: [REDACTED]

95703 120113Std02



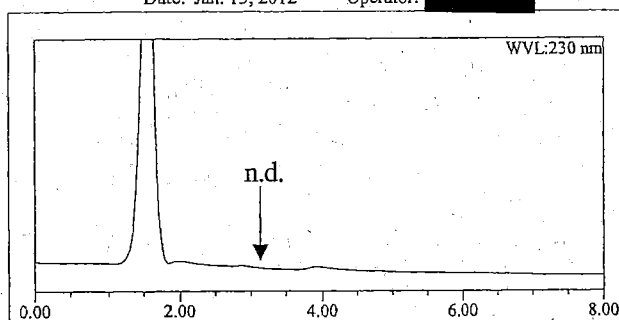
No.	Time (min)	Height (μAU)	Area (μAU·sec)	Area (%)
Peak1	3.14	4010	34619	100.00
Total	-	-	34619	100.00

Control

Date: Jan. 13, 2012

Operator: [REDACTED]

95703 120113 H72hZ



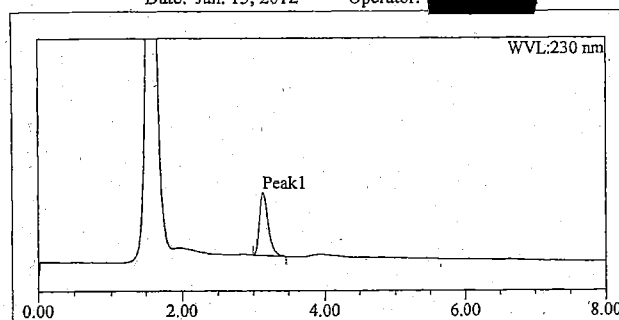
No.	Time (min)	Height (μAU)	Area (μAU·sec)	Area (%)
Peak1	-	-	-	-
Total	-	-	0	0.00

1.0 mg/L exposure level

Date: Jan. 13, 2012

Operator: [REDACTED]

95703 120113 H72hE



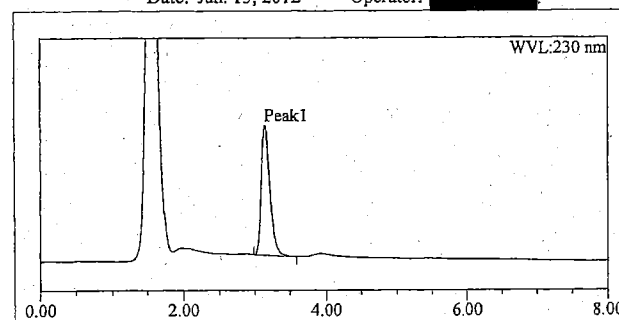
No.	Time (min)	Height (μAU)	Area (μAU·sec)	Area (%)
Peak1	3.14	3232	28112	100.00
Total	-	-	28112	100.00

3.2 mg/L exposure level

Date: Jan. 13, 2012

Operator: [REDACTED]

95703 120113 H72hD



No.	Time (min)	Height (μAU)	Area (μAU·sec)	Area (%)
Peak1	3.14	6683	55890	100.00
Total	-	-	55890	100.00

Date 2012-1-13

Name [REDACTED]

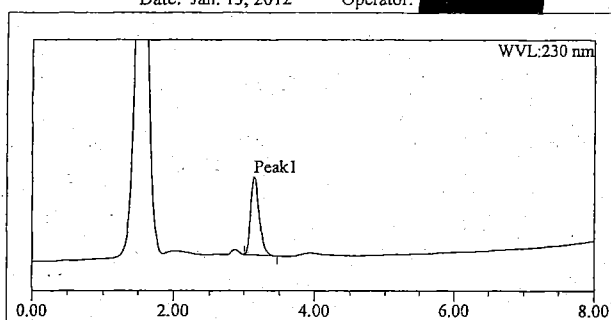
Appendix figure 2-3-1 HPLC chromatograms at end of exposure.

95703

10 mg/L exposure level

Date: Jan. 13, 2012

Operator: [REDACTED]



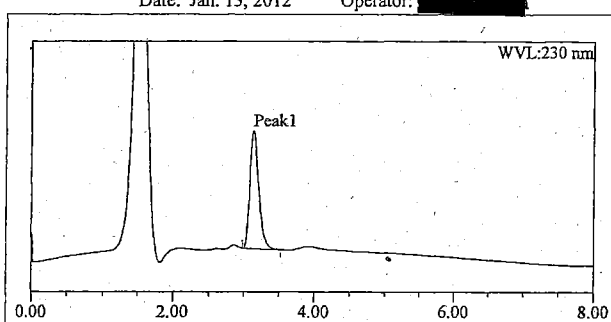
95703 120113 H72hC

No.	Time (min)	Height (μAU)	Area (μAU·sec)	Area (%)
Peak1	3.14	4044	34273	100.00
Total	-	-	34273	100.00

32 mg/L exposure level

Date: Jan. 13, 2012

Operator: [REDACTED]



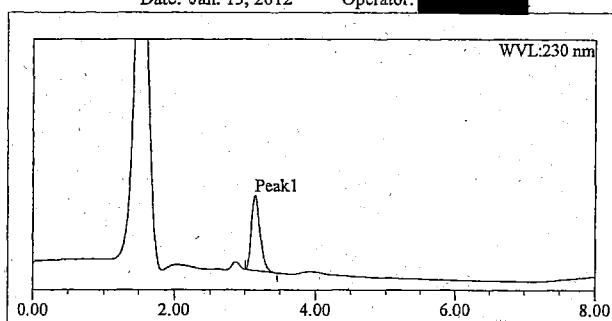
95703 120113 H72hB

No.	Time (min)	Height (μAU)	Area (μAU·sec)	Area (%)
Peak1	3.14	6141	53952	100.00
Total	-	-	53952	100.00

100 mg/L exposure level

Date: Jan. 13, 2012

Operator: [REDACTED]



95703 120113 H72hA

No.	Time (min)	Height (μAU)	Area (μAU·sec)	Area (%)
Peak1	3.14	3891	33672	100.00
Total	-	-	33672	100.00

Date 2012-1-13

Name [REDACTED]

Appendix figure 2-3-2 HPLC chromatograms at end of exposure.

Additional data

予備試験結果

1. 被験物質の培地への溶解度

被験物質の培地への溶解度は 100 mg/L 以上であった。

2. 被験物質の着色の影響

被験物質は黄みの赤褐色を呈しており、培地に溶解した被験物質溶液は黄色澄明であることから、100 mg/L の溶解液を用いて被験物質の光吸収や着色による光減衰について調査した。

方 法 培地 100 mL 入りの試験容器と培地で調製した 100 mg/L 100 mL 入りの試験容器について、同一場所に設置した場合の各試験容器下の光強度を測定した。

結 果

溶液の種類	光強度 ($\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$)	光減衰率 (対培地)
培地	91	—
100 mg/L の溶解液	88	3.3%

減衰率が<5%であったことより、100 mg/L 以下では被験物質による光減衰はないと判断された。

3. 生物予備試験

連 数 2 連又は 1 連/試験区

測定法 細胞計数法

試験液調製法 供試試料と培地を混合、攪拌、溶解して調製した試験原液を適宜培地で希釈して調製した。

分 析 試験液中の被験物質濃度の測定を行った。藻体への被験物質の取り込み等の有無を確認するために藻体を添加しない試験液についても測定した。

<試験生物への影響>

設定濃度区 (mg/L)	生長速度 (0-3d) に基づく 生長阻害率 (%)
0.32	-1.4
1.0	0.73
3.2	0.59
10	8.2
32	34
100	79

＜試験液中の被験物質濃度＞

設定濃度区 (mg/L)	測定濃度 (mg/L) (対設定濃度%)	
	暴露開始時	暴露終了時
0.32	0.31 (96)	0.32 (100)
0.32 (藻体なし)		0.32 (100)
100	98 (98)	100 (102)
100 (藻体なし)		100 (101)

藻体吸着:なし

4. 本試験条件

試験濃度 100、32、10、3.2、1.0 mg/L (公比 $\sqrt{10}$) 及び対照区