


複 写 証 明 書

住化テクノサービス株式会社

試験表題: 4-クロロ-2-ニトロアニリンの藻類(*Pseudokirchneriella subcapitata*)に対する
生長阻害試験

試験番号: 0809EAI

試験責任者: 

試験委託者: 環境省

〒100-8975 東京都千代田区霞が関一丁目2番2号

これは、上記試験の最終報告書(正本)から正確に
複写されたものであることを証明します。

2009 年 3 月 25 日

試験責任者: 

環境省 殿

最 終 報 告 書

表題: 4-クロロ-2-ニトロアニリンの藻類(*Pseudokirchneriella subcapitata*)に対する生長阻害試験

試験番号: 0809EAI

試験終了日: 2009 年 3 月 25 日

試験施設名: 住化テクノサービス株式会社

所在地: 〒665-0051 兵庫県宝塚市高司四丁目 2 番 1 号

陳 述 書

試験委託者：環境省

〒100-8975 東京都千代田区霞が関一丁目2番2号

表題：4-クロロ-2-ニトロアニリンの藻類(*Pseudokirchneriella subcapitata*)に対する生長阻害試験

試験番号：0809EAI

上記試験は、下記の GLP 基準に準拠して実施したものである。

- (1) 「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 15 年 11 月 21 日 薬食発第 1121003 号、平成 15・11・17 製局第 3 号、環保企発第 031121004 号)
- (2) 「OECD Principles on Good Laboratory Practice」(as revised in 1997) ENV/MC/CHEM (98)17

2009 年 3 月 25 日

試験責任者：

住化テクノサービス株式会社

信頼性保証書

試験表題: 4-クロロ-2-ニトロアニリンの藻類(*Pseudokirchneriella subcapitata*)に対する生長阻害試験

試験番号: 0809EAI

本最終報告書の試験は、当施設の信頼性保証部門に関する標準操作手順書に従って下記の査察・監査を受けている。

査察・監査項目	査察・監査日	報告日	
	QAU	試験責任者	運営管理者
試験計画書	2008年11月6日	2008年11月7日	2008年11月10日
試験計画書変更書(1)	2008年11月11日	2008年11月12日	2008年11月12日
試験計画書変更書(2)	2008年12月11日	2008年12月12日	2008年12月12日
試験計画書変更書(3)	2009年1月6日	2009年1月7日	2009年1月7日
試験 (培地の調製)	2009年1月14日	2009年1月20日	2009年1月20日
(試験原液調製)	2009年1月19日	2009年1月20日	2009年1月20日
(試験液調製・暴露)	2009年1月20日	2009年1月20日	2009年1月20日
最終報告書 草稿	2009年3月24日		
最終版	2009年3月25日	2009年3月25日	2009年3月25日

本試験は適正に実施されており、本最終報告書は試験した方法、手順が正確に記録され、かつ、試験の生データを正確に反映していることを認めます。

2009年3月25日
住化テクノサービス株式会社
信頼性保証責任者

試験日程および試験従事者

試験番号: 0809EAI

表題: 4-クロロ-2-ニトロアニリンの藻類(*Pseudokirchneriella subcapitata*)に対する生長阻害試験

試験日程:

試験開始日: 2008 年 11 月 6 日

試験終了日: 2009 年 3 月 25 日

実験実施日:

予備試験期間: 2008 年 11 月 11 日～2008 年 12 月 18 日

本試験期間: 2009 年 1 月 19 日～2009 年 1 月 23 日

試験従事者:

試験責任者:

所属: 環境科学センター 環境生態部 環境生態チーム

試験担当者:

所属: 環境科学センター 環境生態部 環境生態チーム

所属: 環境科学センター 環境生態部 環境生態チーム

目 次

	頁
1. 要約.....	7
2. 緒言.....	7
3. 試験材料および試験方法.....	7
3.1. 被験物質.....	7
3.2. 供試生物.....	8
3.3. 培地.....	8
3.4. 試験条件.....	9
3.5. 試験に使用した機器など.....	9
3.6. 試験濃度の設定.....	9
3.7. 試験液の調製.....	10
3.8. 試験液中の被験物質濃度の測定.....	10
3.9. 試験操作.....	10
3.10. 結果の算出.....	10
3.10.1. 結果の処理に用いる被験物質濃度の算出.....	10
3.10.2. 生長曲線.....	11
3.10.3. 生長阻害率(I_p)の算出.....	11
3.10.4. E_rC50	11
3.10.5. $NOEC_r$	12
3.11. 試験の有効性.....	12
4. 試験結果および考察.....	12
4.1. 試験結果の信頼性に影響を及ぼしたと思われる諸要因.....	12
4.2. 被験物質の同一性および安定性の確認.....	12
4.3. 試験液中の被験物質濃度.....	12
4.4. 試験の有効性.....	12
4.5. 生物量および生長曲線.....	13
4.6. 細胞の形態的变化など.....	13
4.7. 4-クロロ-2-ニトロアニリンの藻類(<i>P. subcapitata</i>)に対する E_rC50 および $NOEC_r$	13
4.8. 光量子束密度、水温および pH など.....	13
5. 記録および資料の保管.....	13
表 1. 4-クロロ-2-ニトロアニリンの試験液中濃度.....	14
表 2. 4-クロロ-2-ニトロアニリンに暴露された藻類(<i>P. subcapitata</i>)の生物量.....	15
表 3. 4-クロロ-2-ニトロアニリンに暴露された藻類(<i>P. subcapitata</i>)の生長阻害率(I_p).....	16
表 4. 4-クロロ-2-ニトロアニリンの藻類(<i>P. subcapitata</i>)に対する E_rC50 および $NOEC_r$	17
表 5. 光量子束密度.....	17
表 6. 試験液の水温.....	17
表 7. 試験液の pH.....	18

図 1. 4-クロロ-2-ニトロアニリンに暴露された藻類(<i>P. subcapitata</i>)の生長曲線	19
図 2. 4-クロロ-2-ニトロアニリンに暴露された藻類(<i>P. subcapitata</i>)の濃度－阻害率曲線	20
付属資料-1. OECD 培地の組成表	21
付属資料-2. 試験液中の 4-クロロ-2-ニトロアニリンの定量法	22
付属資料-3. 試験液中の 4-クロロ-2-ニトロアニリンの分析法バリデーション試験	37
付属資料-4. 試験液中の 4-クロロ-2-ニトロアニリンの水中安定性試験	56

1. 要約

4-クロロ-2-ニトロアニリンの藻類(*Pseudokirchneriella subcapitata*)に対する 72 時間後の 50%生長阻害濃度[$E_rC_{50}(0-72h)$]は測定濃度の平均値をもとに求めた結果、8.5 mg a.i./L、最大無影響濃度[$NOEC_r(0-72h)$]は 2.1 mg a.i./L であった。

試験液中の被験物質濃度を暴露開始時および終了時に測定し、その平均値は設定濃度に対して 95～100%であった。

2. 緒言

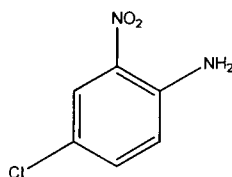
下記の試験法指針に準拠して被験物質の藻類(*P. subcapitata*)に対する生長阻害試験を行い、 E_rC_{50} および $NOEC_r$ を求めた。

- (1) 「新規化学物質等に係る試験の方法について」(平成 15 年 11 月 21 日 薬食発第 1121002 号、平成 15・11・13 製局第 2 号、環境企発第 031121002 号)の別添「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」に定めるⅣ. 藻類生長阻害試験(平成 18 年 11 月 20 日改正)
- (2) OECD Guidelines for the Testing of Chemicals 201, "Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test" (Adopted: 23 March 2006) (以下、OECD ガイドライン)

3. 試験材料および試験方法

3.1. 被験物質

- | | |
|------------------------|-----------------|
| (1) 名称: | 4-クロロ-2-ニトロアニリン |
| (2) 別名 ^{*1} : | — |
| (3) CAS番号: | 89-63-4 |
| (4) 構造式: | |



- | | |
|-----------------------------------|------------------|
| (5) 分子式: | $C_6H_5ClN_2O_2$ |
| (6) 分子量: | 172.57 |
| (7) 純度(%) ^{*1} : | 99.9 |
| (8) ロット番号 ^{*1} : | GJ01 |
| (9) 不純物の名称および含有率 ^{*1} : | 不明 |
| (10) 蒸気圧 ^{*1} : | 不明 |
| (11) 水溶解度 ^{*1} : | 不明 |
| (12) オクタノール/水分配係数 ^{*1} : | 不明 |

- (13) 融点(°C)*¹: 118
- (14) 沸点(°C)*¹: 不明
- (15) 常温における性状*¹: 橙色結晶性粉末
- (16) 安定性*¹: 不明
- (17) 溶媒に対する溶解度等*¹: エーテル、酢酸に可溶、メタノールに微溶
- (18) 有効期限: 受領日(2008年11月4日)より3年
- (19) 保管条件: 冷蔵庫
- (20) 同一性の確認*²: 入手した被験物質のIRスペクトルを測定し、既存のスペクトルと一致することを確認
- (21) 安定性の確認*²: 上記(20)で得たIRスペクトルと実験終了後に測定するIRスペクトルの比較により、保管中の安定性を確認
- (22) 製造元: XXXXXXXXXX

*1: 製造元提供資料による

*2: IR スペクトルの測定は広栄テクノ株式会社に委託した

3.2. 供試生物

- (1) 生物名: 単細胞緑藻類 *Pseudokirchneriella subcapitata*
(株番号: ATCC22662 株)
- (2) 入手先: American Type Culture Collection
- (3) 入手年月日: 1996 年 8 月 1 日
- (4) 入手後の管理: 寒天斜面培地を用いて無菌的に継代保存培養
試験には液体培地(OECD 培地)で培養した藻類を使用
- (5) 無菌性の確認: 細菌検査用培地を用いて定期的に無菌であることを確認した。
- (6) 感受性の確認: 対照物質(重クロム酸カリウム、試薬特級、ロット番号 903W2092、関東化学株)による $E_rC_{50}(0-72h)$ は 0.63 mg/L (試験番号: 08K2EAI、試験完了日: 2008 年 12 月 26 日、原則として約6ヶ月毎に感受性の確認試験を実施)であり、バックグラウンドデータ(2007 年 2 月~2008 年 8 月)は以下の通りである。
 $E_rC_{50}(0-72h)$ の平均値 \pm SD = 1.1 ± 0.29 mg/L (n=5)
- (7) 前培養期間: 2009 年 1 月 16 日~2009 年 1 月 20 日
(環境条件は試験と同様)

3.3. 培地

前培養および試験ともに、OECDガイドラインに記載の培地をろ過滅菌(孔径0.22 μ m)して使用した。組成表を付属資料-1 に示した。

3.4. 試験条件

- (1) 暴露方式: 振盪培養(100 rpm)
- (2) 暴露期間: 72 時間
- (3) 試験容器: 300 mL 容ガラス製三角フラスコ(通気性シリコン栓)
- (4) 試験液量: 100 mL/試験容器
- (5) 連数: 3 連/濃度区、6 連/無処理対照区
- (6) 初期生物量: 1×10^4 cells/mL
- (7) 水温: $21 \pm 2^\circ\text{C}$
- (8) pH: 調整せず
- (9) 照明: 連続照明: 白色蛍光灯使用、波長: 400~700 nm、
光量子束密度: $60 \sim 120 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s} \pm 15\%$ (フラスコ液面付近)

3.5. 試験に使用した機器など

- (1) 藻類培養試験器(以下、培養器): AGP-50RL 型(ダイキンプラント(株)製)
- (2) 電子天秤: AEX-200B 型(株島津製作所製)
- (3) 粒子計数装置: CDA-500 型(シスメックス(株)製)
- (4) 光学顕微鏡: BH-2 型(オリンパス(株)製)
- (5) 光量子計: LI-250A 型(LI-COR 社製)
- (6) 水温計: SK-1250MC 型(株佐藤計量器製作所製)
- (7) 連続温度記録計: TR-71U 型(株ティアンドデイ製)
- (8) pH 計: F-22 型(株堀場製作所製)
- (9) クリーンベンチ: BCM-1303W 型(日本エアーテック(株)製)
- (10) オートクレーブ: SS-325 型(株トミー精工製)
- (11) 遠心機: EX-126 型(株トミー精工製)

3.6. 試験濃度の設定

本試験に先立ち予備試験-1、予備試験-2 および予備試験-3 を実施した。予備試験-1 では溶解助剤として *N,N*-ジメチルホルムアミドを使用した(助剤濃度: 100 $\mu\text{L}/\text{L}$)、助剤なしでも溶解することが判明したため、助剤を用いない予備試験-2 および予備試験-3 を行った(下表参照)。これらの結果をもとに、本試験の設定濃度は公比 2.2($=\sqrt[3]{10}$)として 1.0, 2.2, 4.6, 10, および 22 mg a.i./L の 5 濃度段階とした。対照には被験物質を加えない培地のみの無処理対照区を設けた。

	予備試験-2				予備試験-3	
設定濃度(mg a.i./L)	1.0	3.2	10	32	1.5	22
0-72hr 生長阻害率(%)	-0.8	8.0	66.8	87.3	2.1	77.7

3.7. 試験液の調製

被験物質の溶解に時間を要するため、暴露開始前日に被験物質 0.0220 g(有効成分として 0.0220 g)を秤量し、培地で 1000 mL に定容後、室温で約 22 時間スターラー攪拌して試験原液を調製した。この試験原液から各設定濃度に必要な量を採取し、培地で 500 mL に定容して試験液を調製した。いずれの試験区の試験液についても、水温・pH 測定用およびバックグラウンド確認用のブランク液の液量を加味して一括調製した。

3.8. 試験液中の被験物質濃度の測定

試験液中の被験物質濃度は、本試験に先立って実施した水中安定性試験の結果に基づき、全試験区について暴露開始時および終了時に測定した。水中安定性試験の結果を付属資料-4 に示した。

分析試料は、暴露開始時には一括調製した試験液の一部を、暴露終了時には試験区毎に全連の中層から等量採取し混合した。採取した試料は、藻体を遠心分離(1750 G、10 分)で除去し、上清部分を高速液体クロマトグラフ(HPLC)による分析に供した(n=1)。実際の分析は広栄テクノ株式会社へ委託した。分析法の詳細(分析条件、検量線等)を付属資料-2 に、バリデーション試験の結果を付属資料-3 に示した。

3.9. 試験操作

前培養液の藻類細胞数を粒子計数装置で測定し、その生物量を算出した。試験液中の初期生物量が約 1×10^4 cells/mL となるように、前培養液を接種した。藻類添加後、試験液を各試験容器に 100 mL ずつ分注し、培養器内に設置して暴露を開始した。暴露開始 24、48 および 72 時間後に、粒子計数装置で細胞数を測定して生物量を求めた。

試験液の外観は毎日、細胞の形態的变化については暴露終了時に観察した。

試験液の pH は、暴露開始時および終了時に測定した。暴露開始時の pH は、全試験区について試験容器に分注後の残りの試験液を測定した。暴露終了時には、各試験区の 1 容器について測定した。

試験液の水温は暴露期間中 1 日 1 回測定した。暴露開始時および終了時は、pH 測定で使用する同じ試験液を測定した。24 および 48 時間については、水温測定用容器について測定した。なお、暴露期間中の培養器内の水温変動を監視するため、水温測定用容器について連続して測定した。

培養器の回転数は毎日確認した。光量子束密度は暴露開始時および終了時に測定した。

3.10. 結果の算出

3.10.1. 結果の処理に用いる被験物質濃度の算出

被験物質濃度の平均値(\overline{MC})は、以下の式により算出した。

$$(\overline{MC}) = (A - B) / \{\ln(A) - \ln(B)\}$$

A: 暴露開始時の測定濃度

B: 暴露終了時の測定濃度

ln: 自然対数

3.10.2. 生長曲線

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(0~72 時間)。

3.10.3. 生長阻害率(I_μ)の算出

指数関数的に増殖している培養での生長速度(μ_{i-j})は次式により計算した。

$$\mu_{i-j} = \frac{\ln X_j - \ln X_i}{t_j - t_i}$$

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

X_i : t_i 時の生物量(cells/mL)。試験開始時(t_0)については設定値を用いる。

X_j : t_j 時の生物量(cells/mL)。

t_i : 暴露開始後 i 回目に生物量を測定した時間(d)

t_j : 暴露開始後 j 回目に生物量を測定した時間(d)

各濃度区における生長(速度)阻害率(I_μ)は無処理対照区の生長速度の平均値(μ_c)と、各濃度区での生長速度の平均値(μ_T)との間の差として次のように計算した。

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

I_μ 値は被験物質濃度の対数に対してプロットして濃度－阻害率曲線を作成した。

3.10.4. E_rC50

3.10.3.で算出した生長阻害率(I_μ)を用いて、次の基準に従って E_rC50 を決定した。Logit 法を採用する場合は、コンピュータープログラム(EcoTox Statics、ver. 2.3b)を使用した。

生長阻害率	算出方法	基準
$\geq 50\%$	Logit	50%以上の阻害率を示す濃度の他に、それ以下の阻害率を示す濃度が3点以上ある場合
	Doudoroff	Logit法が不適切と判断された場合
$< 50\%$	—	試験最高濃度より大($>$)とする

3.10.5. NOEC_r

3.10.3.で算出した生長阻害率(I_p)をもとに、統計手法(等分散検定、一元配置分散分析または順位検定および多重比較検定)により、無処理対照区と比較して有意差($\alpha=0.05$)が認められない試験最高濃度をNOEC_r(0-72h)とした。NOECの検定にはコンピュータープログラム(EcoTox Statics、ver. 2.3b)を使用した。

3.11. 試験の有効性

無処理対照区について下記の項目を確認した。

- ・生物量が暴露期間中に少なくとも16倍に増殖すること。
- ・毎日の生長速度の変動係数が暴露期間を通じて35%を超えないこと。
- ・繰り返し間の生長速度(0-72h)の変動係数が7%を超えないこと。

4. 試験結果および考察

4.1. 試験結果の信頼性に影響を及ぼしたと思われる諸要因

試験計画書およびSOPからの逸脱等、試験結果の信頼性に影響を及ぼしたと思われる要因は認められなかった。

4.2. 被験物質の同一性および安定性の確認

被験物質の同一性および保管期間中の安定性をIRスペクトルにより確認した結果、入手した被験物質のスペクトルと既存のスペクトルは同一であり、また実験開始前と終了後のスペクトルに変化がなかったことから、保管期間中安定であったと判断された。

4.3. 試験液中の被験物質濃度

暴露期間中の試験液中の被験物質濃度を表1に示した。

被験物質濃度の設定値に対する割合は、暴露開始時および終了時で、それぞれ99～100%および95～100%であった。設定値に対する平均測定濃度の割合は95～100%であった。また、無処理対照区では定量限界(0.050 mg a.i./L)未満であった。

4.4. 試験の有効性

無処理対照区における試験の有効性の検証結果は下表のとおりで、試験は適切に行われたと判断した。

項目	基準	無処理対照区
生物量(72時間、cells/mL)	≥16倍	平均162倍
毎日の生長速度の変動係数	<35%	7.9～13.2%
繰り返し間の生長速度の変動係数	<7%	1.0%

4.5. 生物量および生長曲線

暴露期間中の生物量を表 2 に、生長曲線を図 1 にそれぞれ示した。

4.6. 細胞の形態的变化など

細胞の形態的变化などについて光学顕微鏡下で観察した結果、全ての試験区において異常は認められなかった。

4.7. 4-クロロ-2-ニトロアニリンの藻類(*P. subcapitata*)に対する E_rC_{50} および $NOEC_r$

各濃度区における生長阻害率を表 3 に、濃度－生長阻害率曲線を図 2 に示した。

以下に E_rC_{50} および $NOEC_r$ を示す(表 4)。

$E_rC_{50}(0-72h)$: 8.5 mg a.i./L

$NOEC_r(0-72h)$: 2.1 mg a.i./L

4.8. 光量子束密度、水温および pH など

暴露期間中の光量子束密度を表 5、試験液の水温を表 6、pH を表 7 に示した。

培養器内の光量子束密度は $63 \sim 74 \mu E/m^2/s$ であった。

水温は $20.1 \sim 21.4^\circ C$ であった。また、培養器内の水温変動を連続測定した結果、 $21 \pm 2^\circ C$ の範囲内で維持されていたことを確認した。

pH は $7.6 \sim 8.8$ であった。

試験液の外観は、全濃度区とも調製直後は着色(黄色)が認められた。暴露開始 24 時間後および 48 時間後は全濃度区で着色が確認されたものの、暴露開始 72 時間後の 1.0 および 2.2 mg a.i./L 区では、藻類の増殖により確認できなかった。また、全試験区において暴露期間中沈殿や析出などは認められなかった。

5. 記録および資料の保管

試験に関する下記の記録および資料は、最終報告書作成後 10 年間、当社試資料保管施設に保管する。その後の保管については別途、試験委託者と協議の上定める。

- (1) 試験計画書、同変更の記録
- (2) 生データ
- (3) 最終報告書
- (4) 信頼性保証部門の査察または監査の記録
- (5) その他関連する資料

以 上

表 1. 4-クロロ-2-ニトロアニリンの試験液中濃度

設定濃度 (mg a.i./L)	測定濃度 (mg a.i./L)		
	0 時間	72 時間	平均値
無処理対照区	<0.050	<0.050	—
1.0	1.0 [100]	1.0 [100]	1.0 [100]
2.2	2.2 [100]	2.1 [95]	2.1 [95]
4.6	4.6 [100]	4.5 [98]	4.5 [98]
10	9.9 [99]	10 [100]	9.9 [99]
22	22 [100]	22 [100]	22 [100]

[]: 設定に対する割合 (%)

表 2. 4-クロロ-2-ニトロアニリンに暴露された藻類(*P. subcapitata*)の生物量

設定濃度 (mg a.i./L)	連	生物量(cells/mL)			
		0 時間	24 時間	48 時間	72 時間
無処理 対照区	1	10000	45250	261700	1722400
	2	10000	44250	304520	1594400
	3	10000	47190	292000	1604000
	4	10000	42440	276860	1482400
	5	10000	47540	294820	1678000
	6	10000	48970	312620	1640600
	平均	10000	45940	290420	1620300
	SD	0	2404	18559	82606
1.0 [1.0]	1	10000	45300	287940	1756600
	2	10000	42680	277760	1614800
	3	10000	47860	280840	1524600
	平均	10000	45280	282180	1632000
	SD	0	2590	5221	116952
2.2 [2.1]	1	10000	42660	254920	1444000
	2	10000	38030	245480	1413400
	3	10000	41620	248420	1470400
	平均	10000	40770	249607	1442600
	SD	0	2429	4831	28526
4.6 [4.5]	1	10000	32330	132280	534000
	2	10000	35970	160100	679800
	3	10000	33970	157820	648600
	平均	10000	34090	150067	620800
	SD	0	1823	15446	76773
10 [9.9]	1	10000	24390	45200	58220
	2	10000	24830	49370	64840
	3	10000	25080	50870	57940
	平均	10000	24767	48480	60333
	SD	0	349	2938	3905
22 [22]	1	10000	19230	21030	22280
	2	10000	20020	21590	21760
	3	10000	19060	21490	20800
	平均	10000	19437	21370	21613
	SD	0	512	299	751

[]: 平均測定濃度

SD: 標準偏差

表 3. 4-クロロ-2-ニトロアニリンに暴露された藻類(*P. subcapitata*)の生長阻害率(I_p)

設定濃度 (mg a.i./L)	連	生長速度 (/d)					SD	CV
		0-72h	阻害率 ^{#1} I_p (%)	0-24h (A)	24-48h (B)	48-72h (C)		
無処理 対照区	1	1.7163		1.5096	1.7550	1.8843	1.7163	11.1
	2	1.6906		1.4873	1.9289	1.6555	1.6906	13.2
	3	1.6926		1.5516	1.8226	1.7035	1.6926	8.0
	4	1.6663		1.4455	1.8754	1.6779	1.6663	12.9
	5	1.7076		1.5590	1.8248	1.7390	1.7076	7.9
	6	1.7001		1.5886	1.8538	1.6578	1.7001	8.1
	平均	1.6956	—	1.5236	1.8434	1.7197		
	SD	0.0172		0.0527	0.0584	0.0865		
	CV	1.0		—	—	—		
1.0 [1.0]	1	1.7229						
	2	1.6948						
	3	1.6756						
	平均	1.6978	-0.1					
	SD	0.0237						
2.2 [2.1]	1	1.6575						
	2	1.6504						
	3	1.6636						
	平均	1.6572	2.3					
	SD	0.0066						
4.6 [4.5]	1	1.3259						
	2	1.4064						
	3	1.3907						
	平均	1.3744	18.9**					
	SD	0.0427						
10 [9.9]	1	0.5872						
	2	0.6231						
	3	0.5856						
	平均	0.5986	64.7**					
	SD	0.0212						
22 [22]	1	0.2670						
	2	0.2592						
	3	0.2441						
	平均	0.2568	84.9**					
	SD	0.0116						

[]: 平均測定濃度

#1: 無処理対照区に対する阻害率

SD: 標準偏差

CV: 変動係数(%)

**: 有意差あり(Dunnett, $\alpha=0.01$)

表 4. 4-クロロ-2-ニトロアニリンの藻類(*P. subcapitata*)に対する
E_rC50 および NOEC_r

E _r C50(0-72h) (mg a.i./L)	95%信頼限界 (mg a.i./L)	NOEC _r (0-72h) (mg a.i./L)
8.5 ^{#1}	7.9~9.3	2.1 ^{#2}

#1: Logit 法

#2: 多重比較検定 (Dunnett, $\alpha=0.01$)

表 5. 光量子束密度

暴露時間 (時間)	光量子束密度 ($\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$)
0	66~74
72	63~73

表 6. 試験液の水温

設定濃度 (mg a.i./L)	水温(°C)			
	0 時間 ^{#1}	24 時間	48 時間	72 時間 ^{#1}
無処理対照区	20.3	—	—	21.2
1.0 [1.0]	20.2	—	—	21.3
2.2 [2.1]	20.2	—	—	21.4
4.6 [4.5]	20.1	—	—	21.3
10 [9.9]	20.9	—	—	21.2
22 [22]	21.0	—	—	21.3
水温測定用容器内	—	20.9	21.1	—

[]: 平均測定濃度

#1: 試験液の水温

表 7. 試験液の pH

設定濃度 (mg a.i./L)	pH	
	0 時間	72 時間
無処理対照区	7.9	8.8
1.0 [1.0]	7.8	8.7
2.2 [2.1]	7.8	8.5
4.6 [4.5]	7.6	8.1
10 [9.9]	7.6	7.9
22 [22]	7.7	7.8

[]: 平均測定濃度

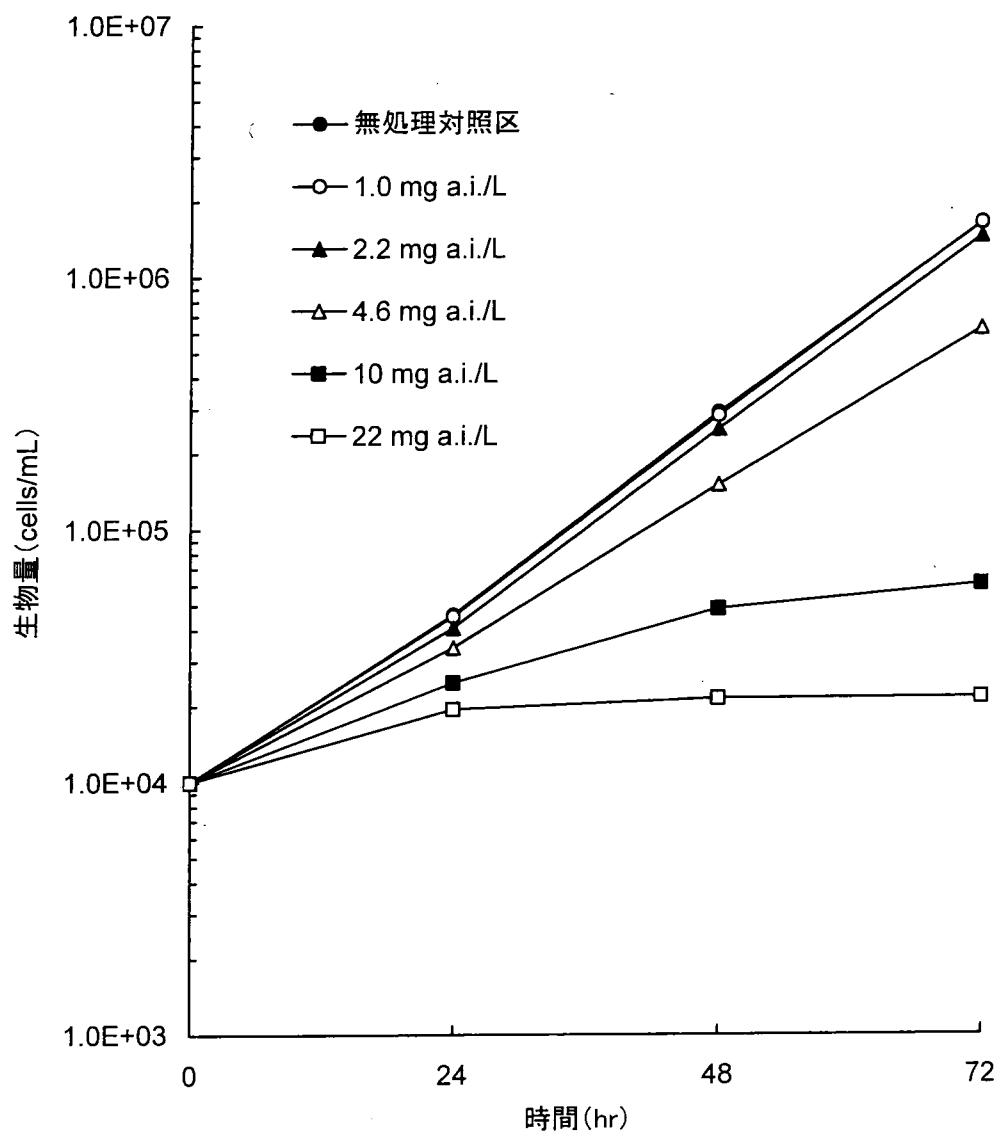


図 1. 4-クロロ-2-ニトロアニリンに暴露された藻類 (*P. subcapitata*) の生長曲線

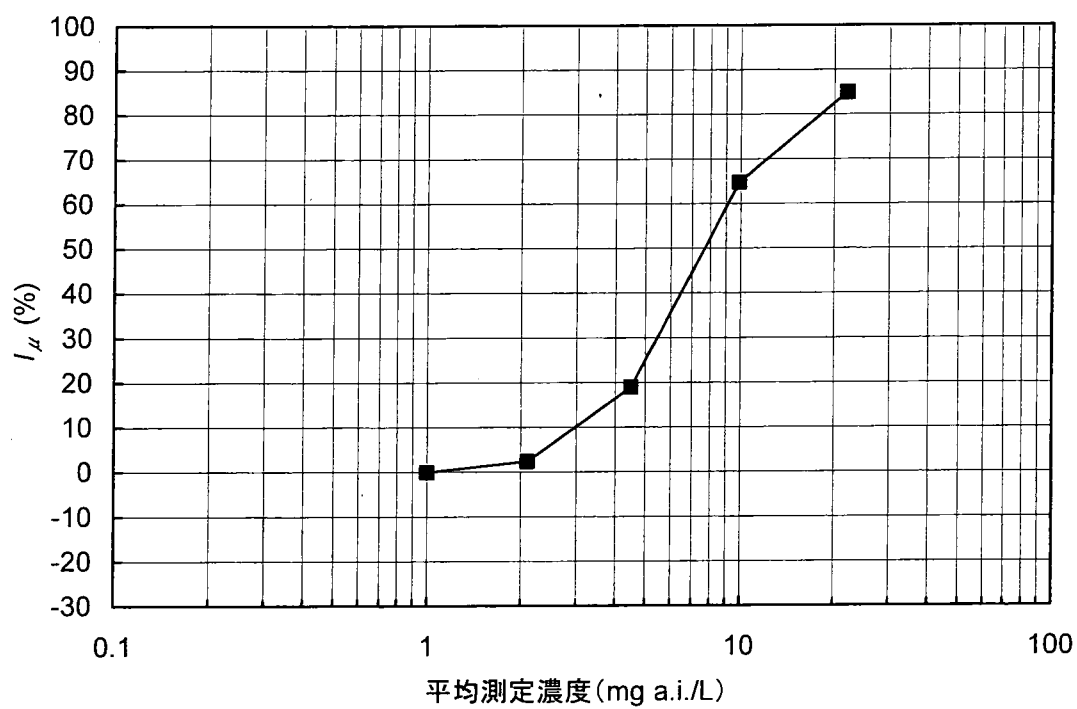


図 2. 4-クロロ-2-ニトロアニリンに暴露された藻類(*P. subcapitata*)の濃度－阻害率曲線

付属資料-1. OECD 培地の組成表

組成	濃度 (mg/L)
H_3BO_3	0.185
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.415
ZnCl_2	0.003
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.064
$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	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
KH_2PO_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

付属資料-2. 試験液中の 4-クロロ-2-ニトロアニリンの定量法

試験液中の 4-クロロ-2-ニトロアニリンの定量法

陳 述 書

1. 試験名: 4-クロロ-2-ニトロアニリンの藻類(*Pseudokirchneriella subcapitata*)に対する生長阻害試験
(物理化学系)

2. 試験番号: T08007-B

上記試験は、「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)(化学物質GLP)に従って実施したものであります。

広栄テクノ株式会社

試験責任者

2009年3月12日

受領年月日	2009.3.16
受領者	

変更届番号：T08007-B-1

最終報告書変更届

試験番号：T08007-B
変更届番号：T08007-B-1

表題：4-クロロ-2-ニトロアニリンの藻類(*Pseudokirchneriella subcapitata*)に対する生長阻害試験
(物理化学系)

1. 変更箇所
4/10 ページ 9. 結果

2. 変更内容
(変更前)
試験液中の 4-クロロ-2-ニトロアニリン濃度測定結果を表 1 に、クロマトグラムの一例を図 3~8 に示した。なお、定量限界は検量線の最小濃度である 0.0250mg a.i./L とした。

表 1 試験液中の 4-クロロ-2-ニトロアニリン濃度測定結果(0 時間及び 72 時間)

試験液	無処理 対照区	1.0mg a.i. /L 区	2.2mg a.i. /L 区	4.6mg a.i. /L 区	10mg a.i. /L 区	22mg a.i. /L 区
0 時間(mg a.i./L)	<0.0250	0.996	2.16	4.56	9.92	22.2
72 時間(mg a.i./L)	<0.0250	1.02	2.14	4.52	10.1	22.0

(変更後)
試験液中の 4-クロロ-2-ニトロアニリン濃度測定結果を表 1 に、クロマトグラムの一例を図 3~8 に示した。
~~濃度測定結果は、試験液中の 4-クロロ-2-ニトロアニリン濃度を表 1 に示す。また、クロマトグラムの一例を図 3~8 に示す。~~

表 1 試験液中の 4-クロロ-2-ニトロアニリン濃度測定結果(0 時間及び 72 時間)

試験液	無処理 対照区	1.0mg a.i. /L 区	2.2mg a.i. /L 区	4.6mg a.i. /L 区	10mg a.i. /L 区	22mg a.i. /L 区
0 時間(mg a.i./L)	<0.0250	0.996	2.16	4.56	9.92	22.2
72 時間(mg a.i./L)	<0.0250	1.02	2.14	4.52	10.1	22.0

3. 変更理由
定量限界は、バリデーション試験(試験 No.T08007)で保証された数値に訂正した。

試験責任者

2009 年 3 月 12 日

KOEI TECHNO

最終報告書

4-クロロ-2-ニトロアニリンの藻類(*Pseudokirchneriella subcapitata*)に
対する生長阻害試験(物理化学系)

試験番号:T08007-B

報告年月日:2009年2月16日

試験委託者:住化テクノサービス株式会社

試験施設:広栄テクノ株式会社

KOEI TECHNO

信頼性保証報告書

1. 試験の種類

4-クロロ-2-ニトロアニリンの藻類(*Pseudokirchneriella subcapitata*)に対する生長阻害試験
(物理化学系)

2. 試験No.

T08007-B

3. 被験物質の名称

4-クロロ-2-ニトロアニリン

本試験は、「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15年11月21日付け:薬食発第1121003号、平成15・11・17製局第3号、環保企発第031121004号)(化学物質GLP)に従って適正に行われており、最終報告書には、試験で使用方法および手順が正確に記載され、報告結果は、試験の生データを正確に反映していることを保証する。

なお、当施設で定めた信頼性保証業務標準手順書による監査・査察の状況は下記の通りである。

記

対 象	実 施 年 月 日	監 査 ・ 査 察 報 告 年 月 日
試験施設査察(実験前査察)	2009年 1月20日	2009年 1月20日
試験の実施状況		
監査及び査察(実験操作日)	2009年 1月20日	2009年 1月20日
	2009年 1月23日	2009年 1月23日
最終報告書監査	2009年 2月16日	2009年 2月16日
最終報告書監査(再)*	2009年 3月12日	2009年 3月12日

*最終報告書変更届(No.T08007-B-1、2009.3.12付)による再監査。

2009年 3月12日

信頼性保証業務担当者
所属 広栄テクノ株式会社
職 信頼性保証チームメンバー

氏名



試験 No.T08007-B

表題:4-クロロ-2-ニトロアニリンの藻類(*Pseudokirchneriella subcapitata*)に対する生長阻害試験
(物理化学系)


試験施設 名 称: 広栄テクノ株式会社
所在地: 〒536-0011 大阪市城東区放出西2丁目12番13号

試験委託者 名 称: 住化テクノサービス株式会社
所在地: 〒665-0051 兵庫県宝塚市高司4丁目2番1号

試験開始日: 2009年1月20日

試験終了日: 2009年2月16日

試験責任者 氏 名:  2009年2月16日
所 属: 検査試験チーム

試験担当者 氏 名: 
所 属: 検査試験チーム

試験 No.T08007-B

1. 試験目的

生態影響試験「4-クロロ-2-ニトロアニリンの藻類(*Pseudokirchneriella subcapitata*)に対する生長阻害試験」に供した試験液中の4-クロロ-2-ニトロアニリンの濃度を測定した。

2. 採用した試験方法

測定は、「生態影響試験における試験液中の4-クロロ-2-ニトロアニリンの分析法バリデーション試験(試験番号:T08007)」に従って行った。

3. 被験物質

名称 : 4-クロロ-2-ニトロアニリン
略称 : CNA
Lot No. : GJ01
純度 : 99.9%
製造者 : XXXXXXXXXX

4. 実験実施期間

2009年1月20日 ~ 2009年1月23日

5. 試験系に関する必要な事項

機器の使用については、各機器の標準操作手順書に従って操作した。
試験方法については、本報告書の7.に記載した。

6. 試験系の環境条件

室温(20~25℃)で行った。

7. 試験方法

7-1 液体クロマトグラフ(HPLC)条件

装置 : 日立製作所製 L-7000システム
データ処理装置 : 日立製作所製 D-7000
カラム : L-column ODS(5 μ m、4.6mmI.D×150mm)(財団法人 化学物質評価研究機構)
カラム温度 : 40℃
移動相 : 超純水 : アセトニトリル=50:50
流量 : 1.0mL/min
波長 : UV230nm
感度 : 1AU/V
注入量 : 100.0 μ L

試験 No.T08007-B

7-2 検量線の作成法(0 時間及び 72 時間)

被験物質 12.54mg(純度補正すると 12.53mg)を 1000mL メスフラスコに精密に秤量し、超純水を加えて溶解させて定容とし、12.5mg a.i./L の標準液原液を調製した。標準液原液 5mL を 50mL メスフラスコにとり、超純水を加えて定容とし、1.25mg a.i./L の標準液原液希釈液を調製した。標準液原液希釈液を超純水で適宜希釈し、0.0250、0.0375、0.0500、0.0625 及び 0.0750mg a.i./L の標準液を調製した。標準液(0.0250、0.0375、0.0500、0.0625 及び 0.0750mg a.i./L)の 100.0 μ L を 7-1 HPLC 条件で試験を行い、標準液の濃度を横軸に、4-クロロ-2-ニトロアニリンのピーク面積を縦軸にとり検量線を作成し、最小自乗法により回帰直線式を求めた。

7-3 分析試料の測定法

4-クロロ-2-ニトロアニリン濃度が 0.05mg a.i./L 相当量になるように希釈したものを分析試料溶液とした。分析試料溶液の 100.0 μ L につき 7-1 HPLC 条件で試験を行い、4-クロロ-2-ニトロアニリンのピーク面積を測定した。以下に分析試料溶液の調製法を記した。

・無処理対照区

分析試料を分析試料溶液とした(n=1)。

・1.0mg a.i./L 区

分析試料 1mL を 20mL メスフラスコに量り、超純水を加えてメスアップし、分析試料溶液とした(n=1)。

・2.2mg a.i./L 区

分析試料 1mL を 50mL メスフラスコに量り、超純水を加えてメスアップし、分析試料溶液とした(n=1)。

・4.6mg a.i./L 区

分析試料 1mL を 100mL メスフラスコに量り、超純水を加えてメスアップし、分析試料溶液とした(n=1)。

・10mg a.i./L 区

分析試料 1mL を 200mL メスフラスコに量り、超純水を加えてメスアップし、分析試料溶液とした(n=1)。

・22mg a.i./L 区

分析試料 1mL を 500mL メスフラスコに量り、超純水を加えてメスアップし、分析試料溶液とした(n=1)。

得られた 4-クロロ-2-ニトロアニリンのピーク面積から 7-2 で示す方法で求めた回帰直線式を用いて、分析試料溶液の 4-クロロ-2-ニトロアニリン濃度を求めた。生態影響試験に供した試験液中の 4-クロロ-2-ニトロアニリンの濃度は、次式により算出した。

4-クロロ-2-ニトロアニリンの濃度(mg a.i./L)=

分析試料溶液の 4-クロロ-2-ニトロアニリン濃度(測定値:mg a.i./L)×希釈倍率

試験 No.T08007-B

8. 試験計画書からの逸脱及び試験の成績に影響を及ぼしたと思われる環境要因

試験計画書からの逸脱及び試験の成績に影響を及ぼしたと思われる環境要因はなかった。

9. 結果

0 時間における試験液中の 4-クロロ-2-ニトロアニリンの定量に用いた検量線及び標準液のクロマトグラムの例を図 1,2 に示した。

試験液中の 4-クロロ-2-ニトロアニリン濃度測定結果を表 1 に、クロマトグラムの一例を図 3~8 に示した。なお、定量限界はバリテーション試験(試験番号:T08007)の模擬試料の最低濃度である 0.0500mg a.i./L とした。

表 1 試験液中の 4-クロロ-2-ニトロアニリン濃度測定結果(0 時間及び 72 時間)

試験液	無処理 対照区	1.0mg a.i. /L 区	2.2mg a.i. /L 区	4.6mg a.i. /L 区	10mg a.i. /L 区	22mg a.i. /L 区
0 時間(mg a.i./L)	<0.0500	0.996	2.16	4.56	9.92	22.2
72 時間(mg a.i./L)	<0.0500	1.02	2.14	4.52	10.1	22.0

10. データの解析に使用した統計学的方法等

- ・数値の丸め方は四捨五入とした。
- ・試験液中の 4-クロロ-2-ニトロアニリン測定値の報告は、四捨五入により有効桁数 3 桁に丸めた。

11. 保管すべき記録及び資料

以下のものについて、当試資料保管施設にて 10 年間保管する。10 年後の対応については試験委託者と協議して決定する。なお、残った試験液については、測定データに異常が無いことを確認した後、廃棄処分した。

試験計画書

主計画表

最終報告書

分析に関するすべての生データ

試料受領関係を含む当該試験に関する文書

監査・査察報告書

その他必要な書類

試験 No.T08007-B

12. 準拠した GLP

上記試験は、「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)(化学物質 GLP)に基づき実施した。

以 上

試験 No.T08007-B

4-クロロ-2-ニトロアニリン 標準液濃度(mg a.i./L)	AREA
0.0250	14879
0.0375	22854
0.0500	30517
0.0625	37845
0.0750	45561

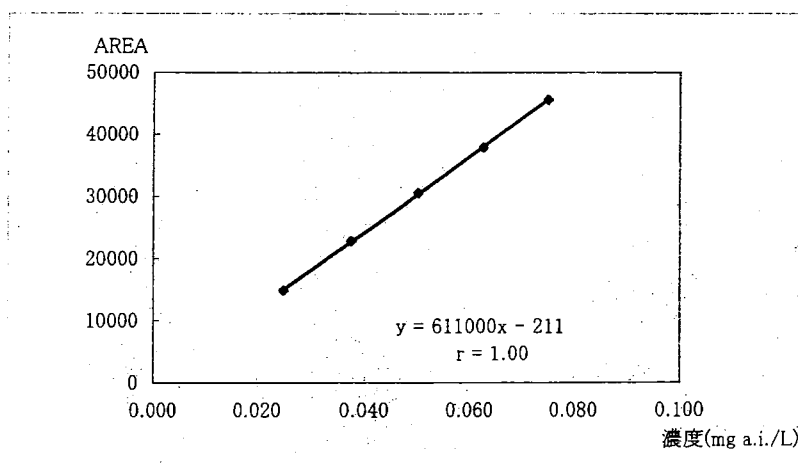


図1 HPLCによる4-クロロ-2-ニトロアニリンの検量線(例)

試験 No.T08007-B

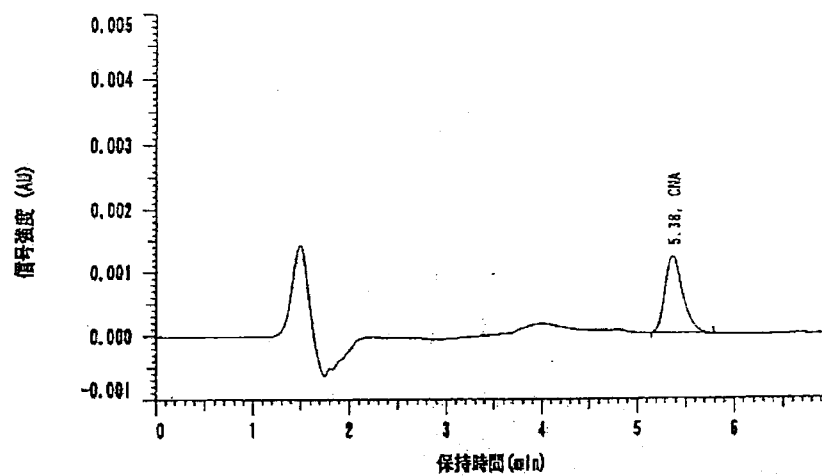


図 2 4-クロロ-2-ニトロアニリン標準液 (0.0250mg a.i./L)のクロマトグラム(例)

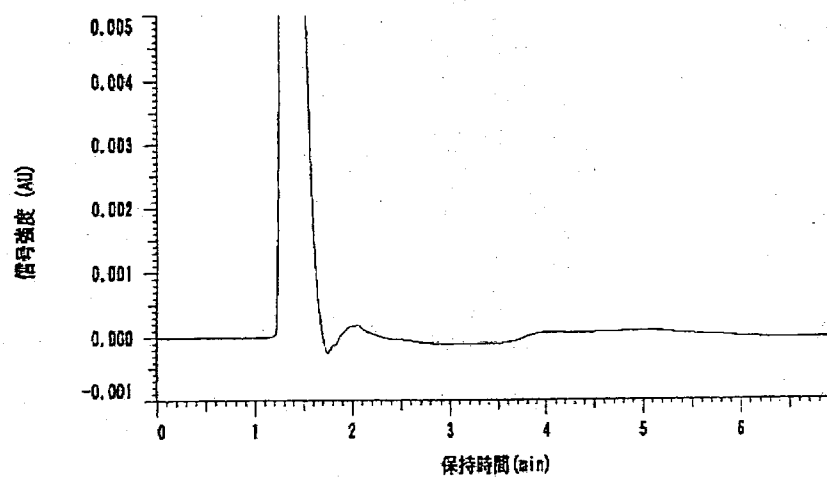


図 3 無処理対照区のクロマトグラム(例)

試験 No.T08007-B

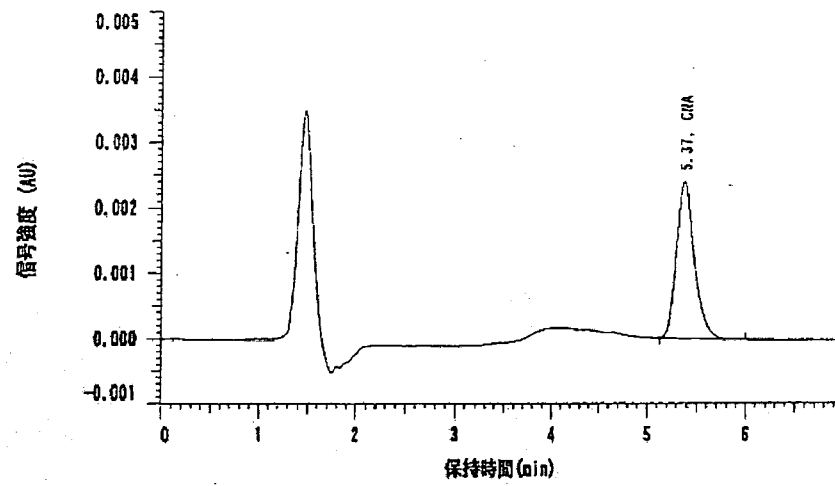


図 4 1.0mg a.i./L 区のクロマトグラム(例)

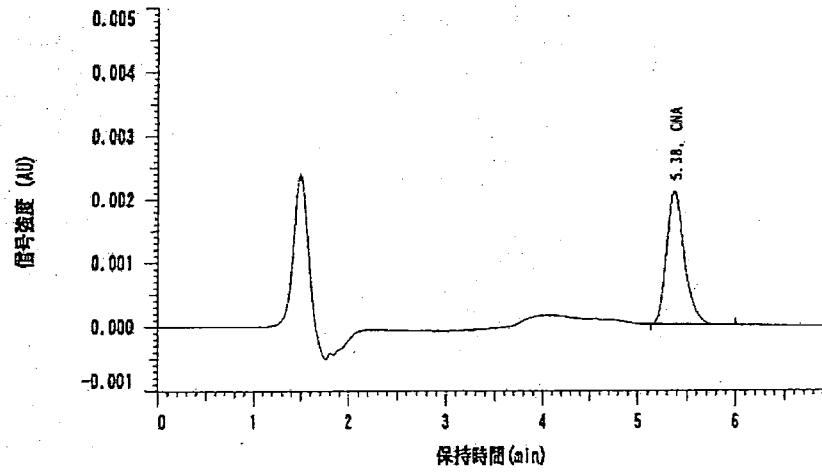


図 5 2.2mg a.i./L 区のクロマトグラム(例)

試験 No.T08007-B

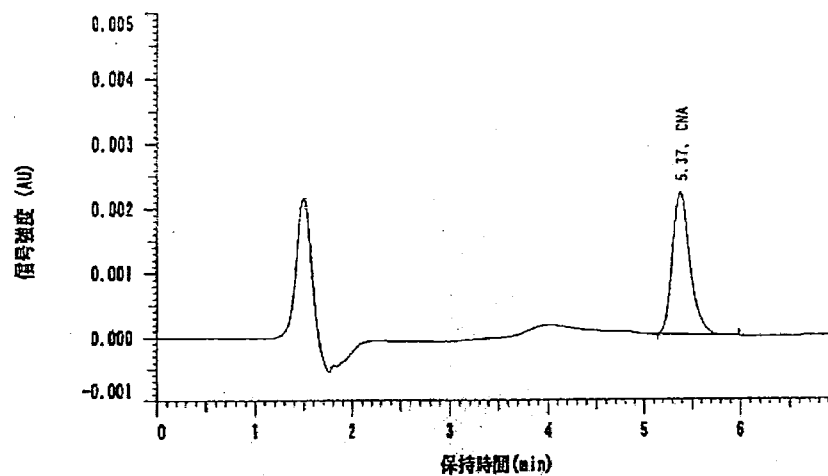


図 6 4.6mg a.i./L 区のクロマトグラム(例)

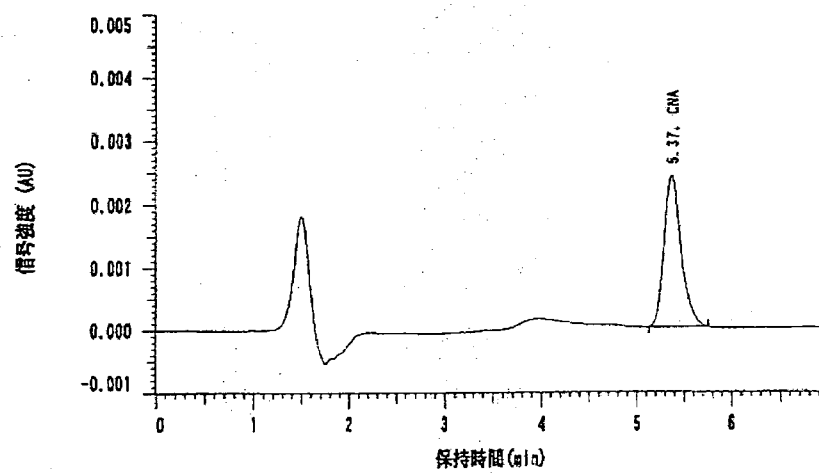


図 7 10mg a.i./L 区のクロマトグラム(例)

試験 No.T08007-B

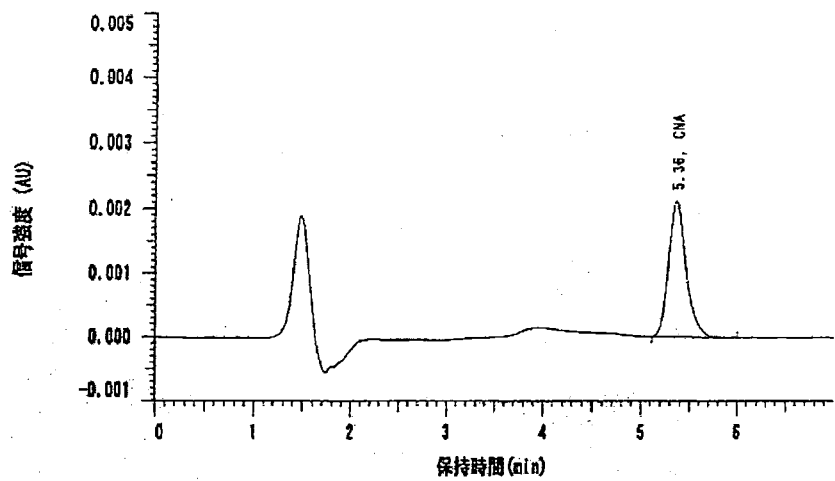


図 8 22mg a.i./L 区のクロマトグラム(例)

付属資料-3. 試験液中の 4-クロロ-2-ニトロアニリンの分析法バリデーション試験

試験液中の 4-クロロ-2-ニトロアニリンの分析法バリデーション試験

試験 No.T08007

陳 述 書

1. 試験名 : 生態影響試験における試験液中の 4-クロロ-2-ニトロアニリンの分析法バリデーション試験
2. 試験番号:T08007

上記試験は、「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)(化学物質GLP)に従って実施したものです。

広栄テクノ株式会社

試験責任者

2009年 3月 12日

KOEI TECHNO

受領年月日	2009.3.16
受領者	

変更届番号：T08007-1

最終報告書変更届

試験番号：T08007
変更届番号：T08007-1
ページ番号：1/3

表題：生態影響試験における試験液中の 4-クロロ-2-ニトロアニリンの分析法バリデーション試験

1. 変更箇所

- ①1/11 ページ 8.被験物質
②3/11 ページ 11.分析法バリデーションの実施方法(被験物質の採取量は純度にて換算した。)
11-6 真度検討用模擬試料の調製法
③3/11 ページ 11.分析法バリデーションの実施方法(被験物質の採取量は純度にて換算した。)
11-7 真度検討用分析試料溶液の調製法
④6/11 ページ 添付資料 1 4-クロロ-2-ニトロアニリン 直線性の確認及び測定結果

2. 変更内容

(変更前)

① 別 名：CNA

②・50mg a.i./L 模擬試料

被験物質 25.10mg を 500mL メスフラスコに量りとり、試験水を加えて溶解させメスアップした。
この溶液 9.97mL を 10mL メスフラスコに量りとり、試験水にてメスアップし、50.0mg a.i./L 模擬試料を調製した(n=1)。

・0.05mg a.i./L 模擬試料

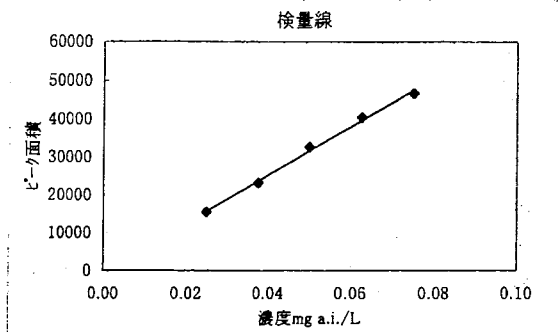
被験物質 10.21mg を 1000mL メスフラスコに量りとり、試験水を加えて溶解させメスアップした。
この溶液 0.98mL を 200mL メスフラスコに量りとり、試験水にてメスアップし、0.0500mg a.i./L 模擬試料を調製した(n=1)。

③なお、定量限界は模擬試料の最低濃度(0.05mg a.i./L)とした。

変更届番号：T08007-1

ページ番号:2/3

④



a= 639000
b= -216

<検量線の直線性>

r= 1.00 \geq 0.99

(変更後)

① XXXXXXXXXX : CNA

②・50mg a.i./L 模擬試料

被験物質 25.10mg XXXXXXXXXXを 500mL メスフラスコに量りとり、試験水を加えて溶解させメスアップした。この溶液 9.97mL を 10mL メスフラスコに量りとり、試験水にてメスアップし、50.0mg a.i./L 模擬試料を調製した(n=1)。

・0.05mg a.i./L 模擬試料

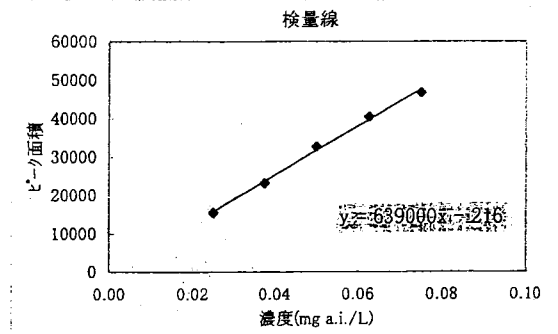
被験物質 10.21mg XXXXXXXXXXを 1000mL メスフラスコに量りとり、試験水を加えて溶解させメスアップした。この溶液 0.98mL を 200mL メスフラスコに量りとり、試験水にてメスアップし、0.0500mg a.i./L 模擬試料を調製した(n=1)。

③なお、定量限界は模擬試料の最低濃度(0.0500mg a.i./L)とした。

変更届番号：T08007-1

ページ番号：3/3

④



<検量線の直線性>

r =

1.00 \geq 0.99

3. 変更理由

- ①誤記訂正。
- ②記入もれ追記。
- ③有効数字3桁のため誤記訂正した。
- ④グラフ上に数式を掲載した。横軸の名称を誤記訂正した。

試験責任者

2009年3月12日

試験 No.T08007

最終報告書

生態影響試験における試験液中の 4-クロロ-2-ニトロアニリンの分析法バリデーション試験

試験番号:T08007

報告年月日:2009年1月16日

試験委託者:住化テクノサービス株式会社

試験施設:広栄テクノ株式会社

KOEI TECHNO

信頼性保証報告書

1. 試験の種類

生態影響試験における試験液中の4-クロロ-2-ニトロアニリンの分析法バリデーション試験

2. 試験No.

T08007

3. 被験物質の名称

4-クロロ-2-ニトロアニリン

本試験は、「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15年11月21日付け：薬食発第1121003号、平成15・11・17製局第3号、環保企発第031121004号）（化学物質GLP）に従って適正に行われており、最終報告書には、試験で使用方法および手順が正確に記載され、報告結果は、試験の生データを正確に反映していることを保証する。

なお、当施設で定めた信頼性保証業務標準手順書による監査・査察の状況は下記の通りである。

記

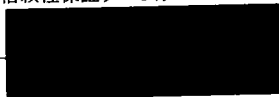
対 象	実 施 年 月 日	監 査 ・ 査 察 報 告 年 月 日
試験施設査察（実験前査察）	2008年12月 1日	2008年12月 3日
試験の実施状況		
監査及び査察（実験操作日）	2008年12月 3日	2008年12月 3日
最終報告書監査	2009年 1月16日	2009年 1月16日
最終報告書監査（再）*	2009年 3月12日	2009年 3月12日

*最終報告書変更届(No.T08007-1、2009.3.12付)による再監査。

2009年 3月 12日

信頼性保証業務担当者
所属 広栄テクノ株式会社
職 信頼性保証チームメンバー

氏名



試験 No.T08007

目 次

1. 表題
2. 試験目的
3. 試験委託者の名称及び所在地
4. 試験施設の名称及び所在地
5. 試験関係者の氏名及び所属
6. 試験番号
7. 試験期間
8. 被験物質
9. 主な試薬等
10. 主な機器
11. 分析法バリデーションの実施方法
12. 測定値の算出法及び数値の取扱い
13. 結果及び考察
14. 試験関係資料の保管
15. 試験の成績に影響を及ぼしたと思われる環境要因
16. データの解析に使用した統計処理計算方法
17. 準拠したGLP
18. 最終報告書の作成

試験 No.T08007

1. 表題

生態影響試験における試験液中の 4-クロロ-2-ニトロアニリンの分析法バリデーション試験

2. 試験目的

本試験は、生態影響試験における試験液中の 4-クロロ-2-ニトロアニリン分析法の信頼性を確保することを目的とした。

3. 試験委託者の名称及び所在地

名 称:住化テクノサービス株式会社

所在地:兵庫県宝塚市高司 4 丁目 2 番 1 号

4. 試験施設の名称及び所在地

名 称:広栄テクノ株式会社

所在地:大阪市城東区放出西 2 丁目 12 番 13 号

5. 試験関係者の氏名及び所属

試験責任者:

試験担当者:

6. 試験番号

T08007

7. 試験期間

試験開始日 2008 年 12 月 3 日

実験開始日 2008 年 12 月 3 日

実験終了日 2008 年 12 月 4 日

試験終了日 2009 年 1 月 16 日

8. 被験物質

名 称 : 4-クロロ-2-ニトロアニリン

略 称 : CNA

Lot No. : GJ01

純 度 : 99.9%

製造者 :

試験 No.T08007

9.主な試薬等

試薬名	等級	メーカー
アセトニトリル	HPLC 用	ナカライテスク
水	超純水	純水製造装置により製造
試験水	脱塩素水	試験委託者より提供

10.主な機器

機器名	型式	メーカー
液体クロマトグラフ(以下「HPLC」と記す)	L-7000システム	日立製作所
データ処理装置	D-7000	日立製作所
超純水製造装置	Milli-Q SPシステム	日本シボア
電子天秤	AX205	オラー・トレド

11. 分析法バリデーションの実施方法(被験物質の採取量は純度にて換算した。)

11-1 検討項目

(1)検量線の直線性

5 濃度の標準液より検量線(n=1)を作成し、その直線性(相関係数:r)を検討した。

(2)再現性

標準液(0.05mg a.i./L)を調製(n=1)し、繰り返し 6 回測定し、再現性(CV 値)を検討した。

(3)真度

模擬試料(0.05mg a.i./L 及び 50mg a.i./L)(n=1)から分析試料溶液を調製(n=3)した。これを HPLC にて測定(n=1)し、真度を検討した。

(4)標準液の安定性

標準液(0.05mg a.i./L)を室温下 24 時間放置した後、再度測定を行い(n=1)、安定性を検討した。

11-2 判断基準

(1)検量線の直線性

検量線の直線性(相関係数:r)は、0.99 以上とした。

(2)再現性

再現性(CV 値)は、5%以下とした。

(3)真度

真度は、95%以上とした。

(4)標準液の安定性

「再現性で求めた面積測定値の平均 $-3\sigma < 24$ 時間後の面積測定値 $<$ 再現性で求めた面積測定値の平均 $+3\sigma$ 」の場合安定とした。

試験 No.T08007

11-3 HPLC 条件

装置 : 日立製作所製 L-7000システム
 データ処理装置 : 日立製作所製 D-7000
 カラム : L-column ODS(5 μ m, 4.6mm I.D \times 150mm)(財団法人化学物質評価研究機構製)
 カラム温度 : 40℃
 移動相 : 水:アセトニトリル=50:50
 流量 : 1.0mL/min
 波長 : UV230nm
 感度 : 1AU/V
 注入量 : 100.0 μ L

11-4 検量線の作成法

被験物質 12.51mg(純度補正值=12.50mg)を 1000mLメスフラスコに量りとり、水を加えて溶解させ 12.5mg a.i./L の標準液原液を調製した。この標準液原液を水で適宜希釈し、0.0250、0.0375、0.0500、0.0625 及び 0.0750mg a.i./L の標準液を調製した(n=1)。この各標準液(0.0250、0.0375、0.0500、0.0625 及び 0.0750mg a.i./L)の 100.0 μ L につき、11-3 HPLC 条件で試験を行い、それぞれの濃度を横軸に、被験物質のピーク面積を縦軸にとり検量線を作成し、最小自乗法により回帰直線式を求めた。

11-5 再現性検討用標準液の調製法

11-4 検量線の作成の際に調製した 0.0500mg a.i./L 標準液を用いた。

11-6 真度検討用模擬試料の調製法

・50mg a.i./L 模擬試料

被験物質 25.10mg(純度補正值=25.07mg)を 500mLメスフラスコに量りとり、試験水を加えて溶解させメスアップした。この溶液 9.97mL を 10mLメスフラスコに量りとり、試験水にてメスアップし、50.0mg a.i./L 模擬試料を調製した(n=1)。

・0.05mg a.i./L 模擬試料

被験物質 10.21mg(純度補正值=10.20mg)を 1000mLメスフラスコに量りとり、試験水を加えて溶解させメスアップした。この溶液 0.98mL を 200mLメスフラスコに量りとり、試験水にてメスアップし、0.0500mg a.i./L 模擬試料を調製した(n=1)。

11-7 真度検討用分析試料溶液の調製法

11-6で調製した模擬試料の 0.05mg a.i./L 相当量になるように希釈したものを分析試料溶液とし、その 100.0 μ L につき 11-3 HPLC 条件で試験を行い、それぞれの 4-クロロ-2-ニトロアニリンのピーク面積を測定した(n=1)。以下にその分析試料溶液の調製法を記した。

・50mg a.i./L 模擬試料のコントロール

1000mLメスフラスコに試験水 1mL を正確に量り、水を加えてメスアップし、分析試料溶液とした(n=1)。

・0.05mg a.i./L 模擬試料のコントロール

試験水を分析試料溶液とした(n=1)。

・50mg a.i./L 模擬試料

1000mLメスフラスコに50mg a.i./L 模擬試料 1mL を正確に量り、水を加えてメスアップし、分析試料溶液とした(n=3)。

・0.05mg a.i./L 模擬試料

模擬試料を分析試料溶液とした(n=3)。

なお、定量限界は模擬試料の最低濃度(0.0500mg a.i./L)とした。

試験 No.T08007

12.測定値の算出法及び数値の取扱い

ピークの同定は保持時間により行い、被験物質の濃度 B(mg a.i./L)は、次式より算出した。

被験物質の濃度 B(mg a.i./L)=分析試料溶液の被験物質濃度 (測定値:mg a.i./L)×希釈倍率

真度(%)は、次式により算出した。

$$\text{真度}(\%) = (B/A) \times 100$$

ここに、A:模擬試料中の被験物質設定濃度(mg a.i./L)

- ・模擬試料中の被験物質設定濃度、分析試料溶液の被験物質濃度及び被験物質の濃度 B は、有効数字 3 桁に丸め、真度は整数に丸めた。
- ・相関係数 r は小数点以下 2 桁に丸め、CV 値は整数に丸めた。
- ・数値の丸め方は四捨五入とした。

13. 結果及び考察

13-1 検量線の直線性

5 濃度の標準液を 11-3 HPLC 条件で試験を行い、検量線(n=1)を作成した。得られた結果及び検量線を添付資料 1、クロマトを添付資料 2-1~2-3 に示した。

検量線の直線性(相関係数:r)は、0.0250~0.0750mg a.i./L の濃度範囲において 1.00 と良好な直線性を示した。

13-2 再現性

標準液(0.05mg a.i./L)を調製(n=1)し、11-3 HPLC 条件で繰り返し 6 回測定し、ピーク面積から再現性(CV 値)を検討した。結果を添付資料 3(表 1)に示した。

標準液の再現性(CV 値)は、0%と判断基準を満たした。

13-3 真度

真度検討用模擬試料(0.05 及び 50mg a.i./L)から分析試料溶液を調製(n=3)後、11-3 HPLC 条件で試験を行い、被験物質の濃度 B から真度を検討した。結果を添付資料 3(表 2)、クロマトの一例を添付資料 4 に示した。

被験物質の真度は、模擬試料(0.05mg a.i./L);平均 101%及び模擬試料(50mg a.i./L);平均 100%であり、いずれの濃度においても判断基準を満たした。

13-4 標準液の安定性

標準液(0.05mg a.i./L)を室温下 24 時間放置した後、11-3 HPLC 条件で試験を行い、安定性を検討した。結果を添付資料 3 に示した。

「再現性で求めた面積測定値の平均-3σ<24 時間後の面積測定値<再現性で求めた面積測定値の平均+3σ」の判断基準を満たしていたため、24 時間安定と考える。

試験 No.T08007

14. 試験関係資料の保管

試験関係資料(試験計画書、最終報告書、生データ、その他記録類等)は、当試験資料保管施設にて 10 年間保管する。10 年後の対応については試験委託者と協議して決定する。

15. 試験の成績に影響を及ぼしたと思われる環境要因

無し

16. データの解析に使用した統計処理計算方法

数値の平均は算術平均による。

17. 準拠した GLP

上記試験は、「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)(化学物質 GLP)に基づき実施した。

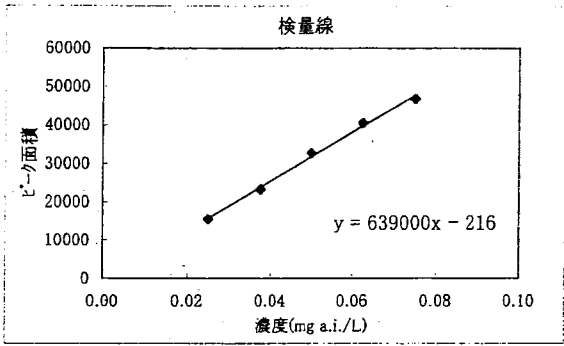
18. 最終報告書の作成

2009 年 1 月 16 日

試験責任者:

試験 No.T08007

添付資料 1 4-クロロ-2-ニトロアニリン 直線性の確認及び測定結果



<検量線の直線性>
 $r = 1.00 \geq 0.99$

<検量線>

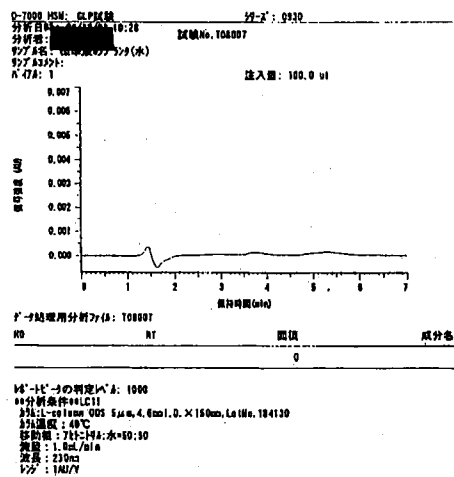
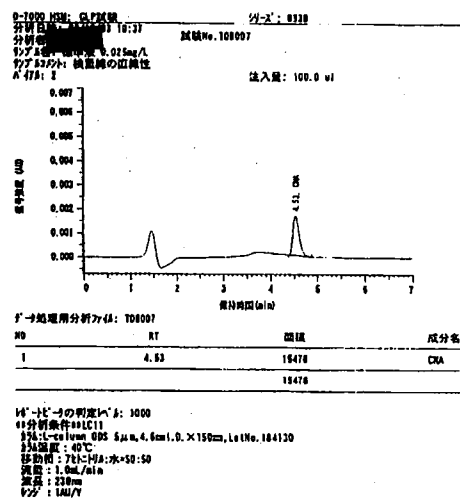
	濃度	AREA
標準液	4-クロロ-2-ニトロ アニリン (mg a.i./L)	4-クロロ-2-ニトロ アニリン
①	0.0250	15478
②	0.0375	23219
③	0.0500	32633
④	0.0625	40446
⑤	0.0750	46772

<分析試料溶液>

	AREA	濃度
分析試料溶液	4-クロロ-2-ニトロ アニリン	4-クロロ-2-ニトロ アニリン (mg a.i./L)
50mg a.i./L n=1	32173	0.0507
50mg a.i./L n=2	31845	0.0502
50mg a.i./L n=3	31743	0.0500
0.05mg a.i./L n=1	31771	0.0501
0.05mg a.i./L n=2	32081	0.0505
0.05mg a.i./L n=3	31926	0.0503

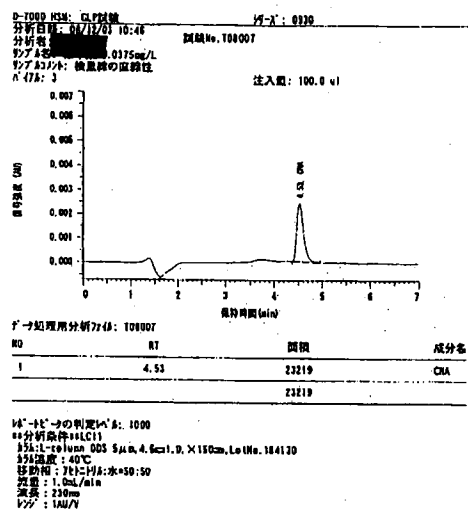
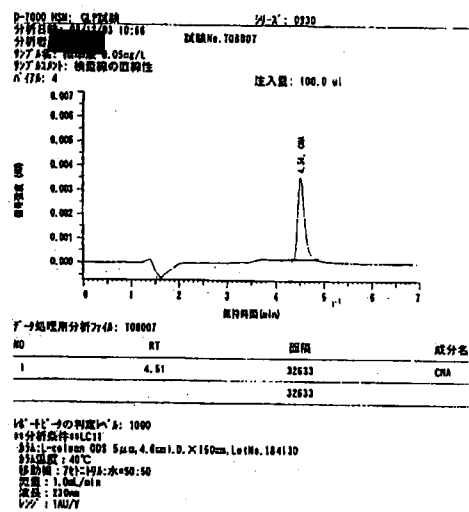
添付資料 2-1 4-クロロ-2-ニトロニリン 標準液 液体クロマトグラム

試験 No. T08007



添付資料 2-2 4-クロロ-2-ニトロエニル 標準液 液体クロマトグラム

試験 No. T08007

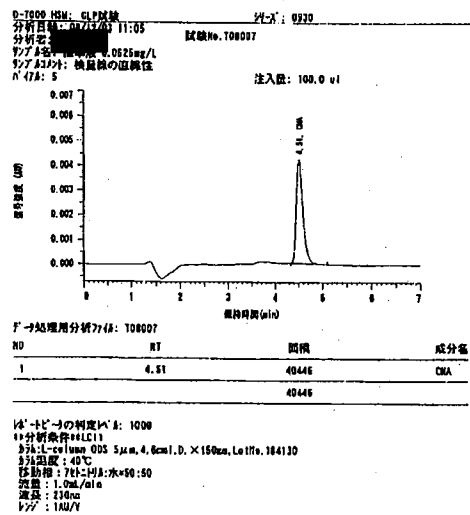
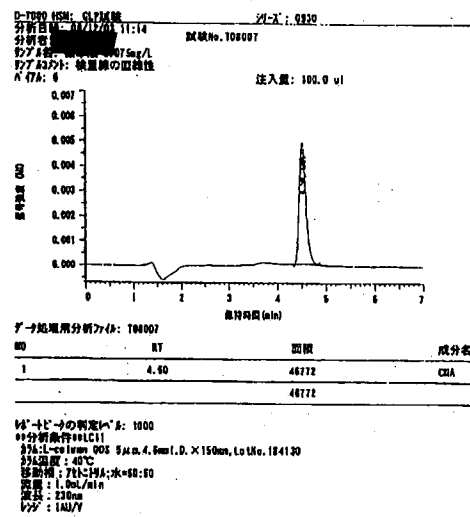


8/11

KOEL TECHNO

添付資料 2-3 4-クロロ-2-ニトロアニリン 標準液 液体クロマトグラム

試験 No. T08007



9/11

KOEI TECHNO

試験 No.T08007

添付資料 3 再現性、真度及び安定性

表1 再現性及び標準液の安定性

4-クロロ-2-ニトロアニリン		AREA	平均	σ	CV値(%)
0.0500mg a.i./L 標準液		4-クロロ-2-ニトロアニリン			
6回連続注入	1	32216	32200	144	0
	2	32394			
	3	31955			
	4	32271			
	5	32172			
	6	32194			
24時間後		32051	—	—	—

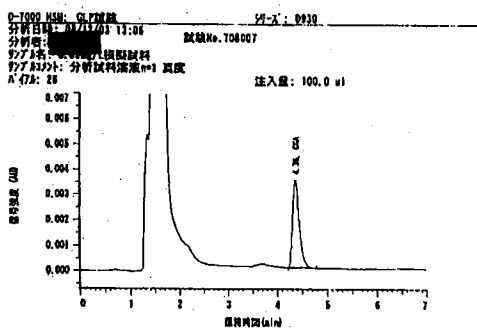
CV値(%)= 0 ≤5%

安定性: 再現性で求めた AREAの平均-3σ = 31768 < 24時間後の AREA = 32051 < 再現性で求めた AREAの平均+3σ = 32632

表2 真度

模擬試料	設定濃度 (mg a.i./L) A	分析試料溶液の 被験物質 濃度(mg a.i./L)	被験物質の 濃度 (mg a.i./L) B	真度	
				(%) C	(%) D
50mg a.i./L n=1	50.0	0.0507	50.7	101	100
50mg a.i./L n=2	50.0	0.0502	50.2	100	
50mg a.i./L n=3	50.0	0.0500	50.0	100	
0.05mg a.i./L n=1	0.0500	0.0501	0.0501	100	101
0.05mg a.i./L n=2	0.0500	0.0505	0.0505	101	
0.05mg a.i./L n=3	0.0500	0.0503	0.0503	101	

A: 設定濃度(mg a.i./L)=模擬試料中の被験物質設定濃度
B: 被験物質の濃度(mg a.i./L)=分析試料溶液の被験物質濃度(mg a.i./L)×希釈倍率(50mg a.i./L:1000倍,0.05mg a.i./L:1倍)
C: 真度(%)=(B/A)×100
D: 平均真度(%)



NO	RT	面积	成分名
1	4.36	31771	CMA
		31771	

14「ト」の判定値: 1000
 分析条件: L11
 試料: L-calcium DDS 6μm, 4.6cm I.D. × 150mm, Lot No. 18-4130
 炉温度: 40℃
 移動相: 7:1 (水): 水 = 50:50
 流量: 1.0mL/min
 波長: 230nm
 検出: 1AU/V

付属資料-4. 試験液中の 4-クロロ-2-ニトロアニリンの水中安定性試験

試験液中の 4-クロロ-2-ニトロアニリンの水中安定性試験

試験 No.T08007-G

陳 述 書

1. 試験名 : 生態影響試験(メダカ(*Oryzias latipes*))に対する急性毒性試験)における試験液中の4-クロロ-2-ニトロアニリンの水中安定性試験

2. 試験番号:T08007-G

上記試験は、「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)(化学物質GLP)に従って実施したものであります。

広栄テクノ株式会社

試験責任者

2009年3月12日

KOEI TECHNO

受領年月日	2009.3.16
受領者	

変更届番号：T08007-G-1

最終報告書変更届

試験番号：T08007-G
 変更届番号：T08007-G-1
 ページ番号：1/3

表題：生態影響試験(メダカ(*Oryzias latipes*))に対する急性毒性試験)における試験液中の 4-クロロ-2-ニトロアニリンの水中安定性試験

1. 変更箇所

- ①1/6 ページ 8.被験物質
 ②2/6 ページ 11.試験方法
 ③3/6 ページ 12.結果
 ④4/6 ページ 添付資料 1 検量線の一部

2. 変更内容

(変更前)

- ① 別 名：CNA
 ② 11-2 検量線の作成(被験物質は純度補正した量を量り取った。)
 ③ 試験液中の 4-クロロ-2-ニトロアニリンの濃度測定結果を表 1、無処理対照区、0.5mg a.i./L 区及び 10mg a.i./L 区の液体クロマトグラムの一例を添付資料 3、4 及び 5 に示した。
 0 時間における試験液中の被験物質の定量に用いた検量線及び標準液の液体クロマトグラムの一例を添付資料 1 及び 2 に示した。

表 1 4-クロロ-2-ニトロアニリンの濃度測定結果

試験液	4-クロロ-2-ニトロアニリン濃度 ^{*1} (mg a.i./L)			
	0 時間	24 時間	48 時間	96 時間
無処理対照区	<0.025	-*2	-*2	-*2
0.5mg a.i./L 区	0.506	0.488	0.498	0.476
10mg a.i./L 区	9.96	9.74	10.1	9.72

*1. 不検出は<0.025 mg a.i./L とした。

*2. 測定しなかった。

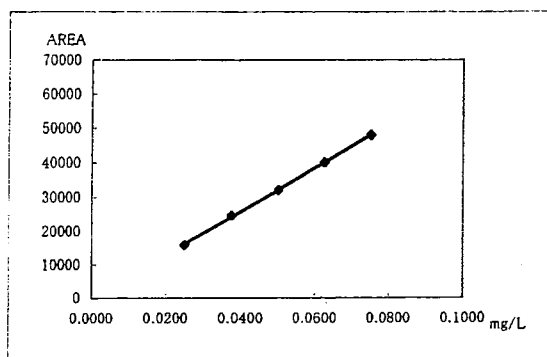
受領年月日	2009.3.16
受領者	

KOEI TECHNO

変更届番号：T08007-G-1

ページ番号：2/3

④



a= 639000

b= 132

R= 1.00

(変更後)

① 略 称：CNA

② 11-2 検量線の作成(被験物質の採取量は純度にて換算した。)

③ 試験液中の4-クロロ-2-ニトロアニリンの濃度測定結果を表1、無処理対照区、0.5mg a.i./L区及び10mg a.i./L区の液体クロマトグラムの一例を添付資料3、4及び5に示した。

0時間における試験液中の被験物質の定量に用いた検量線及び標準液の液体クロマトグラムの一例を添付資料1及び2に示した。なお、定量限界はハリデーソン試験(試験番号：T08007)の模擬試料の最低濃度である0.0500mg a.i./Lとした。

表1 4-クロロ-2-ニトロアニリンの濃度測定結果

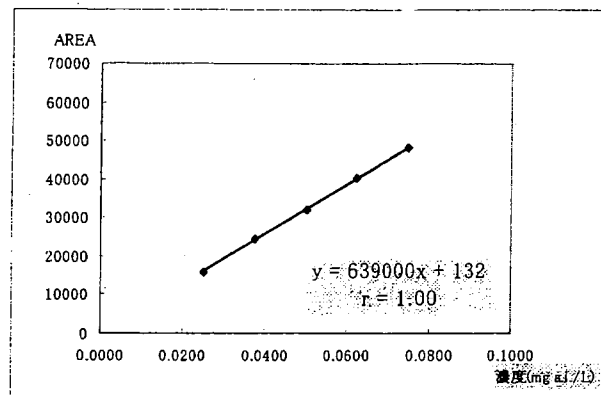
試験液	4-クロロ-2-ニトロアニリン濃度(mg a.i./L)			
	0時間	24時間	48時間	96時間
無処理対照区	<0.0500	*1	*1	*1
0.5mg a.i./L区	0.506	0.488	0.498	0.476
10mg a.i./L区	9.96	9.74	10.1	9.72

*1 測定しなかった。

変更届番号：T08007-G-1

ページ番号：3/3

④



3. 変更理由

- ①誤記訂正。
- ②誤記訂正。
- ③定量限界をバリテーション試験(試験番号:T08007)で保証された数値に訂正した。
- ④グラフ上に数式と相関係数(R から r に訂正)を掲載した。グラフの横軸に「濃度」を追記した。

試験責任者

2009年3月12日

試験 No.T08007-G

最終報告書

生態影響試験(メダカ(*Oryzias latipes*))に対する急性毒性試験)における試験液中の
4-クロロ-2-ニトロアニリンの水中安定性試験

試験番号:T08007-G

報告年月日:2009年1月16日

試験委託者:住化テクノサービス株式会社

試験施設:広栄テクノ株式会社

KOEI TECHNO

信頼性保証報告書

1. 試験の種類

生態影響試験(メダカ(*Oryzias latipes*)に対する急性毒性試験)における試験液中の
4-クロロ-2-ニトロアニリンの水中安定性試験

2. 試験No.

T08007-G

3. 被験物質の名称

4-クロロ-2-ニトロアニリン

本試験は、「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15年11月21日付け:薬食発第1121003号、平成15・11・17製局第3号、環保企発第031121004号)(化学物質GLP)に従って適正に行われており、最終報告書には、試験で使用方法および手順が正確に記載され、報告結果は、試験の生データを正確に反映していることを保証する。

なお、当施設で定めた信頼性保証業務標準手順書による監査・査察の状況は下記の通りである。

記

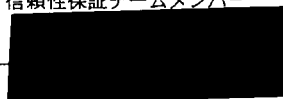
対 象	実 施 年 月 日	監査・査察報告年月日
試験施設査察(実験前査察)	2008年12月 1日	2008年12月 5日
試験の実施状況		
監査及び査察(実験操作日)	2008年12月 8日	2008年12月 8日
	2008年12月12日	2008年12月12日
最終報告書監査	2009年 1月16日	2009年 1月16日
最終報告書監査(再)*	2009年 3月12日	2009年 3月12日

*最終報告書変更届(No.T08007-G-1、2009.3.12付)による再監査。

2009年 3月12日

信頼性保証業務担当者
所属 広栄テクノ株式会社
職 信頼性保証チームメンバー

氏名



試験 No.T08007-G

目 次

1. 表題
2. 試験目的
3. 試験委託者の名称及び所在地
4. 試験施設の名称及び所在地
5. 試験関係者の氏名及び所属
6. 試験番号
7. 試験期間
8. 被験物質
9. 主な試薬等
10. 主な機器
11. 試験方法
12. 結果
13. 試験関係資料の保管
14. 試験の成績に影響を及ぼしたと思われる環境要因
15. データの解析に使用した統計処理計算方法
16. 準拠したGLP
17. 最終報告書の作成

試験 No.T08007-G

1. 表題

生態影響試験(メダカ(*Oryzias latipes*)に対する急性毒性試験)における試験液中の 4-クロロ-2-ニトロアニリンの水中安定性試験

2. 試験目的

本試験は、生態影響試験(メダカ(*Oryzias latipes*)に対する急性毒性試験)における試験液中の 4-クロロ-2-ニトロアニリンの水中安定性を確認することを目的とした。

3. 試験委託者の名称及び所在地

名 称:住化テクノサービス株式会社

所在地:兵庫県宝塚市高司 4 丁目 2 番 1 号

4. 試験施設の名称及び所在地

名 称:広栄テクノ株式会社

所在地:大阪市城東区放出西 2 丁目 12 番 13 号

5. 試験関係者の氏名及び所属

試験責任者

試験担当者

6. 試験番号

T08007-G

7. 試験期間

試験開始日 2008 年 12 月 5 日

実験開始日 2008 年 12 月 8 日

実験終了日 2008 年 12 月 12 日

試験終了日 2009 年 1 月 16 日

8. 被験物質

名 称 : 4-クロロ-2-ニトロアニリン

略 称 : CNA

Lot No. : GJ01

純 度 : 99.9%

製造者 :

試験 No.T08007-G

9. 主な試薬等

試薬名	等級	メーカー
アセトニトリル	HPLC 用	ナカライテスク
水	超純水	純水製造装置により製造
試験水	脱塩素水	試験委託者より提供

10. 主な機器

機器名	型式	メーカー
液体クロマトグラフ(以下「HPLC」と記す)	L-7000システム	日立製作所
データ処理装置	D-7000	日立製作所
超純水製造装置	Milli-Q SPシステム	日本シボア
電子天秤	AX205	オタマ・トレード

11. 試験方法

11-1 HPLC 条件

装置	: 日立製作所製 L-7000システム
データ処理装置	: 日立製作所製 D-7000
カラム	: L-column ODS(5 μ m, 4.6mm I.D \times 150mm)(財団法人化学物質評価研究機構製)
カラム温度	: 40 $^{\circ}$ C
移動相	: 水:アセトニトリル=50:50
流量	: 1.0mL/min
波長	: UV230nm
感度	: 1AU/V
注入量	: 100.0 μ L

11-2 検量線の作成(被験物質の採取量は純度にて換算した。)

被験物質 12.51mg(純度補正值=12.50mg)を 1000mLメスフラスコに量りとり、水を加えて溶解させ 12.5mg a.i./L の標準液原液を調製した。この標準液原液を水で適宜希釈し、0.0250、0.0375、0.0500、0.0625 及び 0.0750mg a.i./L の標準液を調製した(n=1)。この各標準液(0.0250、0.0375、0.0500、0.0625 及び 0.0750mg a.i./L)の 100.0 μ L につき、11-1 HPLC 条件で測定を行い(n=1)、それぞれの濃度を横軸に、被験物質のピーク面積を縦軸にとり検量線を作成し、最小自乗法により回帰直線式を求めた。

11-3 分析試料の測定

被験物質濃度が 0.05mg a.i./L 相当量になるように下記調製法に基づき希釈したものを分析試料溶液とした。分析試料溶液 100.0 μ L につき 11-1 HPLC 条件で試験を行い(n=1)、被験物質のピーク面積を測定し、回帰直線式より分析試料溶液の被験物質濃度(mg a.i./L)を算出した。

・無処理対照区

分析試料を分析試料溶液とした(n=1)。

・0.5mg a.i./L 区

分析試料 1mL を 10mLメスフラスコに正確に量り、水を加えてメスアップし、分析試料溶液とした(n=1)。

・10mg a.i./L 区

分析試料 1mL を 200mLメスフラスコに正確に量り、水を加えてメスアップし、分析試料溶液とした(n=1)。

試験 No.T08007-G

分析試料中の被験物質の濃度(mg a.i./L)は、次式により算出した。

被験物質の濃度(mg a.i./L)＝分析試料溶液の被験物質濃度(mg a.i./L)×希釈倍率

被験物質の濃度は、四捨五入により有効桁数3桁に丸めた。

12. 結果

試験液中の4-クロロ-2-ニトロアニリンの濃度測定結果を表1、無処理対照区、0.5mg a.i./L区及び10mg a.i./L区の液体クロマトグラムの一例を添付資料3、4及び5に示した。

0時間における試験液中の被験物質の定量に用いた検量線及び標準液の液体クロマトグラムの一例を添付資料1及び2に示した。なお、定量限界はバリデーション試験(試験番号:T08007)の模擬試料の最低濃度である0.0500mg a.i./Lとした。

表1 4-クロロ-2-ニトロアニリンの濃度測定結果

試験液	4-クロロ-2-ニトロアニリン濃度(mg a.i./L)			
	0時間	24時間	48時間	96時間
無処理対照区	<0.0500	— ^{*1}	— ^{*1}	— ^{*1}
0.5mg a.i./L区	0.506	0.488	0.498	0.476
10mg a.i./L区	9.96	9.74	10.1	9.72

*1 測定しなかった。

13. 試験関係資料の保管

試験関係資料(試験計画書、最終報告書、生データ、その他記録類等)は、当試資料保管施設にて10年間保管する。10年後の対応については試験委託者と協議して決定する。

14. 試験の成績に影響を及ぼしたと思われる環境要因

無し

15. データの解析に使用した統計処理計算方法

数値の丸め方は四捨五入とした。

16. 準拠した GLP

上記試験は、「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)(化学物質GLP)に基づき実施した。

17. 最終報告書の作成

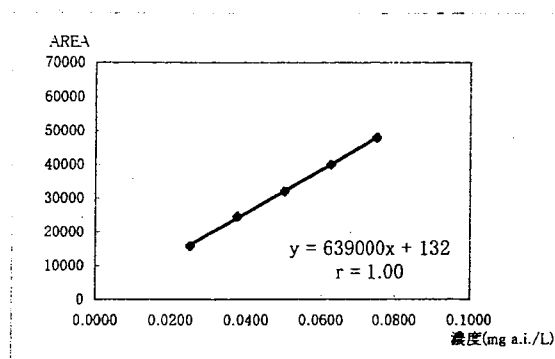
2009年 1月 16日

試験責任者:



試験 No.T08007-G

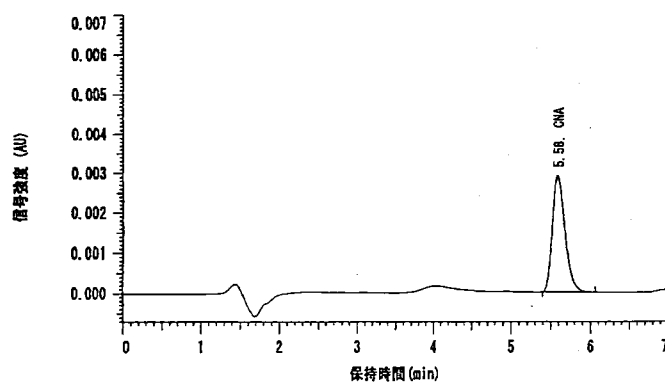
添付資料 1 検量線の一例



【検量線】

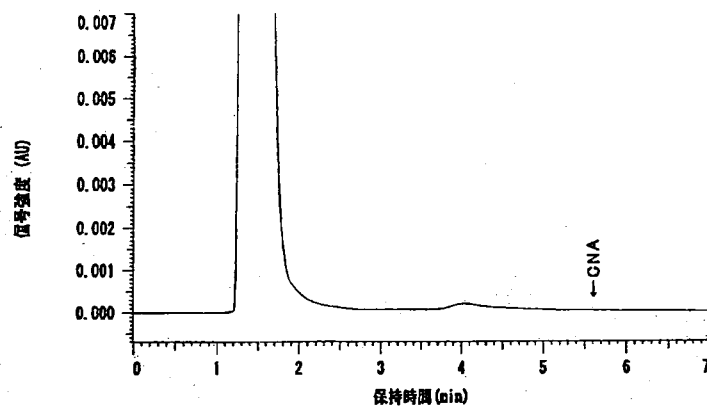
4-クロロ-2-ニトロアニリン 標準液濃度 (mg a.i./L)	AREA
0.0250	15819
0.0375	24562
0.0500	31996
0.0625	40126
0.0750	47997

添付資料 2 標準液の液体クロマトグラムの一例

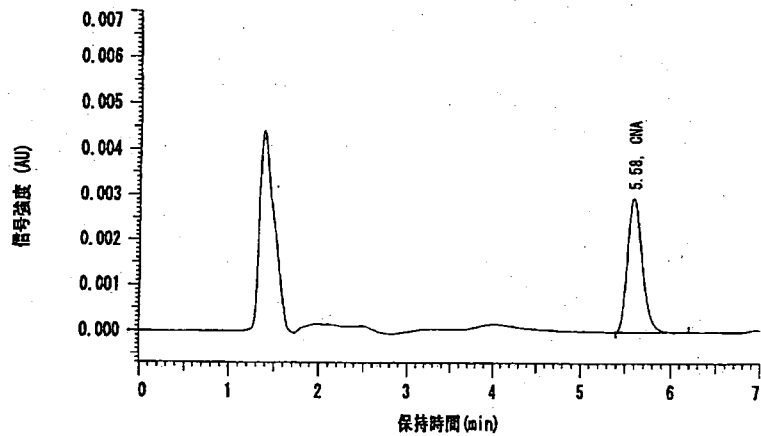


試験 No.T08007-G

添付資料 3 無処理対照区の液体クロマトグラムの一例

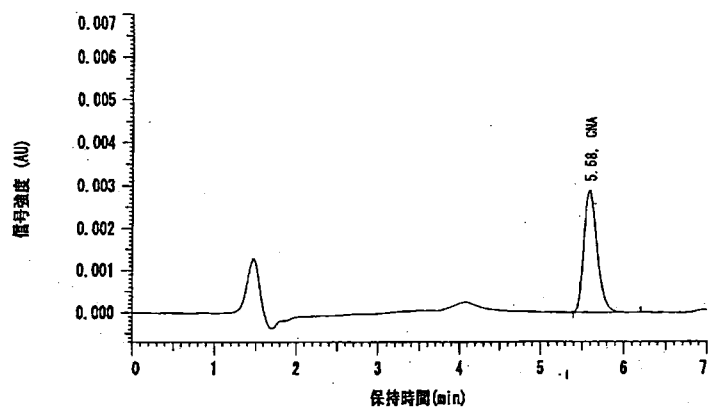


添付資料 4 0.5mg a.i./L 区の液体クロマトグラムの一例



試験 No.T08007-G

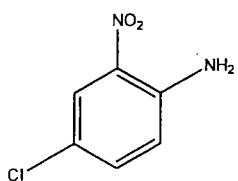
添付資料 5 10mg a.i./L 区の液体クロマトグラムの一例



[様式7]

藻類生長阻害試験結果報告書

1. 一般的事項

新規化学物質の名称 (IUPAC 命名法による)	4-クロロ-2-ニトロアニリン		
別 名	—		
C A S 番 号	89-63-4		
構造式または示性式 (いずれも不明な場合は、その製法の概要)			
分 子 量	172.57		
試験に供した新規化学物質の純度(%)	99.9		
試験に供した新規化学物質のロット番号	GJ01		
不純物の名称及び含有率	不明		
蒸 気 圧	不明		
対 水 溶 解 度	不明		
1-オクタノール/水分配係数	不明		
融 点	118°C		
沸 点	不明		
常温における性状	橙色結晶性粉末		
安 定 性	不明		
溶媒に対する溶解度等	溶媒	溶解度	溶媒中の安定性
	エーテル	可溶	—
	酢酸	可溶	—
	メタノール	微溶	—

2. 試験液の被験物質濃度の分析法

項 目	方 法
分析方法	<p>被験物質濃度が 0.05 mg a.i./L 相当量となるように試験液を超純水で希釈したものを HPLC に注入し、被験物質を定量した。以下の式により被験物質濃度を算出した。 濃度 (mg a.i./L) = 分析試料溶液の 4-クロロ-2-ニトロアニリン濃度 × 希釈倍率</p> <p>サンプリング: 全試験区 頻度: 暴露開始時および終了時 サンプリング量: 30 mL/試験区 (うち、遠心分離後の上澄み液から 20 mL/試験区を採取し分析に供した。) サンプリング法: 暴露開始時は試験液調製後、各試験容器に分注する前に 30 mL ずつ採取した。終了時は各連の中層から 10 mL ずつ (無処理対照区のみ 5 mL ずつ) 採取し、試験区毎に混合した。</p>
前処理法	<p>試験液中の藻体を遠心分離 (50 mL 容ガラス製試験管使用、1750 G、10 分) により除去した。上清部分を必要に応じて超純水にて希釈した。</p>
定量条件	<p>装置 (HPLC): L-7000 システム 日立製作所製 データ処理装置: D-7000 日立製作所製 カラム: L-column ODS (5 μm、4.6 mm I.D × 150 mm) カラム温度: 40°C 移動相: 超純水: アセトニトリル = 50:50 流量: 1.0 mL/min 波長: UV 230 nm 感度: 1 AU/V 注入量: 100.0 μL 定量限界: 0.050 mg a.i./L 平均回収率: 0.05 mg a.i./L (101%)、50 mg a.i./L (100%)</p>

3. 試験材料及び方法

項 目		内 容
試験方法		
試験生物	種(学名・株名)	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> ATCC22662 株
	入手先	American Type Culture Collection
	対照物質への感受性 (EC ₅₀) (対照物質名)	0-72h E _r C ₅₀ : 0.63 mg/L 重クロム酸カリウム(関東化学(株)製、試薬特級)
前培養	前培養の期間	3 日間 2009 年 1 月 16 日～2009 年 1 月 20 日
	培地名	OECD 培地
	環境条件(水温、光強度)	21±2℃ 62～65 μE/m ² /s
試験条件	試験容器	300mL 容ガラス製三角フラスコおよび通気性シリコーン栓
	培地名	OECD 培地
	暴露期間	本試験: 2009年1月20日～2009年1月23日
	試験濃度(設定値)	1.0、2.2、4.6、10 および 22 mg a.i./L 公比 2.2(= $\sqrt[3]{10}$)
	初期生物量	1 × 10 ⁴ cells/mL
	連数	試験濃度区 3 連
		対照区 6 連
	試験溶液量	100 mL/試験容器
	助剤	助剤の有無 無
		種類 ー
		濃度 ー
		助剤対照区の連数 ー
	培養方式(振とう培養、 静置培養、連続培養等)	振とう培養(100 rpm)
	水温又は培養温度	実測値: 20.1～21.4℃
	照明(光強度・時間等)	実測値: 63～74 μE/m ² /s
結果の算 出方法	速度法	E _r C ₅₀ : Logit 法 NOEC _r : 多重比較検定(Dunnett、α=0.05)

4. 試験結果及び考察

項 目	内 容
毒性値	0-72h E_rC_{50} : 8.5 mg a.i./L 0-72h $NOEC_r$: 2.1 mg a.i./L
試験濃度	実測値
考察及び 特記事項	<ul style="list-style-type: none"> 被験物質の溶解に時間を要するため、室温で約 22 時間スターラー攪拌して試験原液を調製した。 試験液中の被験物質濃度は測定濃度の平均値を採用した。 試験の有効性については基準値を全て満たしており、本試験はガイドラインに準じて適切に行われたと判断した。

5. 藻類の生長曲線および濃度－生長阻害曲線

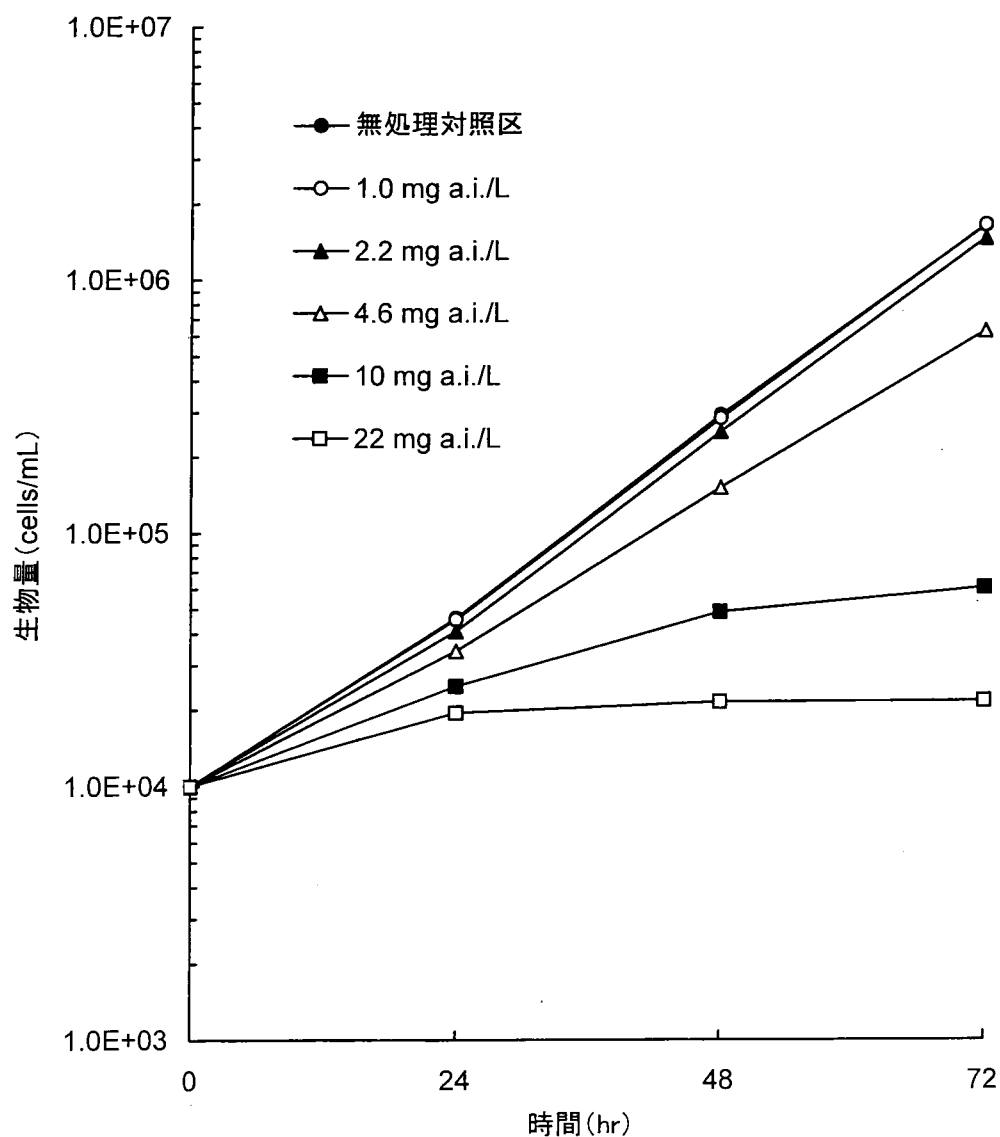


図 1. 藻類の生長曲線

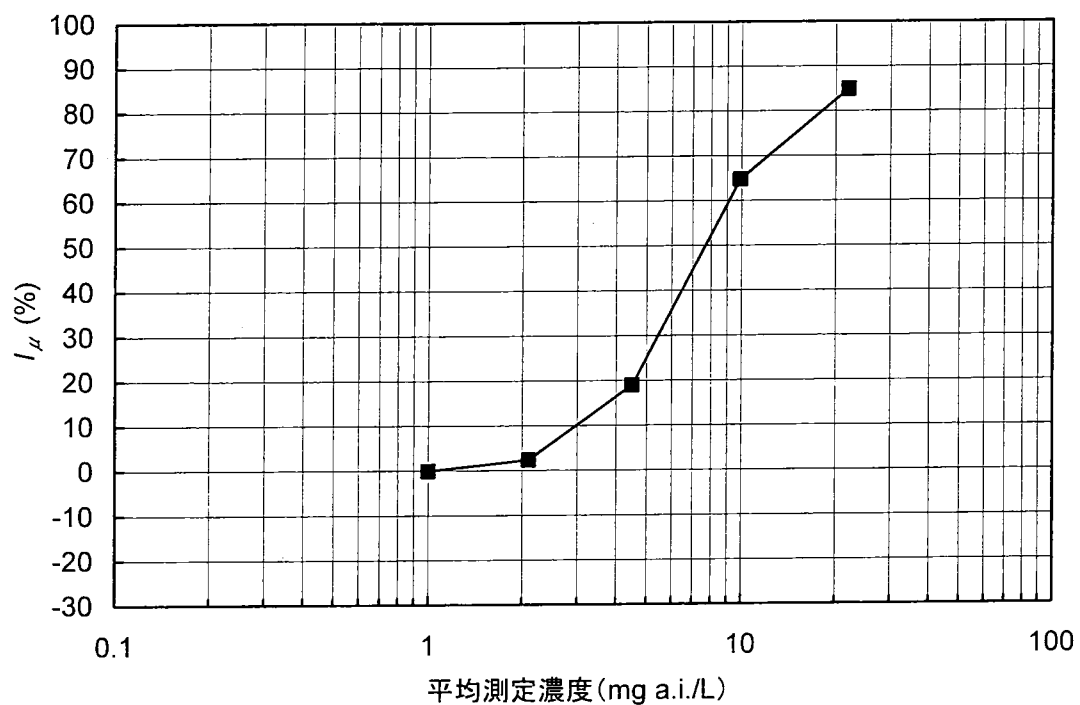


図 2. 藻類の濃度－生長阻害率曲線(生長速度)

6. その他

試験実施施設	名 称	住化テクノサービス株式会社
	所 在 地	〒665-0051 兵庫県宝塚市高司四丁目 2 番 1 号 電話: 0797(74)2100 FAX: 0797(74)2715
試験責任者	職 氏 名	■■■■■
	経 験 年 数	22 年
試 験 番 号	0809EAI	
試 験 期 間	2008 年 11 月 6 日 ～ 2009 年 3 月 25 日	

作成責任者	所 属	住化テクノサービス株式会社 環境科学センター 環境生態部 環境生態チーム
	氏 名	■■■■■