

環境庁殿

# 最 終 報 告 書

*o*-アニシジンの藻類(*Selenastrum capricornutum*)に対する生長阻害試験

(試験番号：91746)

1997年3月28日作成

財団法人 化学品検査協会  
化学品安全センター 毒物学研究所

陳 述 書

財団法人 化学品検査協会  
化学品安全センター 久留米研究所

試験委託者： 環境庁

表 題： o-アニシジンの藻類(*Selenastrum capricornutum*)に対する  
生長阻害試験

試験番号： 91746

上記試験は契約書別添2「生態影響試験実施に関する基準」(平成7年9月26日)に  
準拠したものである。

1997年 3月 28日

運営管理者



## 信 頼 性 保 証 書

財団法人 化学品検査協会  
化学品安全センター 久留米研究所

試験委託者： 環境庁

表 題： *o*-アニシジンの藻類(*Selenastrum capricornutum*)に対する生長阻害試験

試験番号： 91746

本試験は試験計画書及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通り確認した。

監査又は査察内容	実施日	報告日(運営管理者)	報告日(試験責任者)
試験計画書監査	1997年 2月13日	1997年 2月13日	1997年 2月13日
試験計画書の変更監査	1997年 2月21日	1997年 2月21日	1997年 2月21日
試験実施状況査察	1997年 2月24日	1997年 3月 4日	1997年 3月 3日
試験実施状況査察	1997年 2月27日	1997年 3月 4日	1997年 3月 3日
最終報告書監査	1997年 3月28日	1997年 3月28日	1997年 3月28日

1997年 3月28日

信頼性保証部門責任者



## 試験実施概要

### 1 表 題

o-アニシジンの藻類(*Selenastrum capricornutum*)に対する生長阻害試験

### 2 試験目的

o-アニシジンについて、藻類(*Selenastrum capricornutum*)に対する生長阻害試験を行い、50%生長阻害濃度(EC50)及び無影響濃度(NOEC)を求める。

### 3 試験方法

本試験は、OECD化学品テストガイドライン No.201「藻類生長阻害試験」(1984年)に準拠して実施した。

### 4 適用GLP

本試験は契約書別添 2「生態影響試験実施に関する基準」(平成 7 年 9 月 26 日)に準拠した。

### 5 試験委託者

名 称： 環境庁

住 所： (〒100)東京都千代田区霞が関 1-2-2

### 6 試験受託者

名 称： 財団法人 化学品検査協会

住 所： (〒136)東京都江東区亀戸 5-6-21

### 7 試験施設

名 称： 化学品安全センター 久留米研究所

住 所： (〒830)福岡県久留米市中央町 19-14

運営管理者： XXXXXXXXXX

8 試験関係者

試験責任者

[Redacted]

試験担当者

生物試験担当

[Redacted]

分析担当

[Redacted]

データ処理担当

[Redacted]

試験資料管理部門責任者

[Redacted]

9 最終報告書の承認

1997年3月28日

試験責任者

氏名

[Redacted]

10 試験期間

試験開始日

1997年2月13日

試験終了日

1997年3月28日

暴露期間

1997年2月24日～1997年2月27日

11 保管

試験計画書、生データ、記録文書、最終報告書及び被験物質は、最終報告書作成後10年間、財団法人 化学品検査協会 化学品安全センター 久留米研究所の保管施設に保管する。その後の保管については試験委託者と協議のうえ決定する。

## 目 次

	頁
要 旨 .....	1
1 被 験 物 質 .....	2
1.1 名称、構造式及び物理化学的性状 .....	2
1.2 被験物質の確認及び保管条件下での安定性 .....	3
2 試 験 生 物 .....	3
3 試 験 方 法 .....	3
3.1 試 験 条 件 .....	3
3.2 培 地 .....	3
3.3 試験容器、藻類培養試験装置及び機器 .....	4
3.4 試験濃度の設定 .....	4
3.5 試験液の調製 .....	4
3.6 試験液の分析 .....	4
3.7 試 験 操 作 .....	5
3.8 数値の取扱い .....	5
4. 結果の算出 .....	5
4.1 藻類生長曲線 .....	5
4.2 藻類生長阻害濃度の算出 .....	5
4.3 50%生長阻害濃度(EC50)の算出 .....	6
4.4 無影響濃度(NOEC)の算出 .....	6
5 結果及び考察 .....	7
5.1 試験成績の信頼性に影響を及ぼしたと思われる環境要因 .....	7
5.2 試験液中の被験物質濃度 .....	7
5.3 藻類生長曲線 .....	7
5.4 50%生長阻害濃度(EC50)及び無影響濃度(NOEC) .....	7
5.5 温度、pH及び照度 .....	8
5.6 試験液の状態 .....	8
Table 1～8 .....	9～16
Figure 1～3 .....	17～18

付属資料-1 試験液の分析方法及び分析チャート

## 要 旨

試験委託者

環境庁

表 題o-アニシジンの藻類(*Selenastrum capricornutum*)に対する生長阻害試験試験番号

91746

試験方法

本試験は、OECD化学品テストガイドライン No.201「藻類生長阻害試験」(1984年)に準拠して実施した。

- 1) 被験物質： o-アニシジン
- 2) 試験生物： *Selenastrum capricornutum* (ATCC 22662)
- 3) 初期細胞濃度：  $1 \times 10^4$  cells/mL
- 4) 暴露期間： 72時間
- 5) 培養方式： 振とう培養 (100 rpm)
- 6) 試験濃度： 30.0、15.0、7.50、3.75、1.88、0.938 mg/L(公比：2.0)及び対照区
- 7) 連 数： 1試験区につき3連
- 8) 試験液量： 1容器(1連)につき100 mL
- 9) 試験水温：  $23 \pm 2^\circ\text{C}$
- 10) 照 明： 4,400～4,500 lux (連続照明)
- 11) 試験液中の被験物質の分析： 高速液体クロマトグラフィー (HPLC)  
(暴露開始時、暴露終了時)

結 果

- 1) 生長曲線下の面積の比較による生長阻害濃度  
 $E_0C_{50}(0-72h) = 21.1 \text{ mg/L}$   
 無影響濃度(NOEC) = 7.50 mg/L
- 2) 生長速度の比較による生長阻害濃度  
 $E_rC_{50}(24-48h) > 30.0 \text{ mg/L}$  (30.0 mg/Lで $E_rC_{35}$ )  
 無影響濃度(NOEC) = 15.0 mg/L  
 $E_rC_{50}(24-72h) > 30.0 \text{ mg/L}$  (30.0 mg/Lで $E_rC_{41}$ )  
 無影響濃度(NOEC) = 15.0 mg/L  
 (上記濃度は、全て設定値に基づく値)

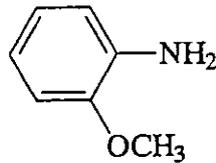
## 1 被験物質

本報告書において*o*-アニシジンは、次の名称及び品質等を有するものとする。  
被験物質に関する情報については供給者提供の添付資料等によった。

## 1.1 名称、構造式及び物理化学的性状

- 1) 名 称：*o*-アニシジン  
(CAS番号 90-04-0)

- 2) 構造式：



- 3) 分子式： $C_7H_9NO$   
 4) 分子量：123.15  
 5) 外 観：赤褐色澄明の液体 #1  
 6) 安定性：不明  
 7) 1-オクタノール/水分配係数(logP)： $\log Kow=0.95$  #3  
 8) pKa：4.52 (25°C) #3  
 9) 水への溶解度： $1.4 \times 10^4$  mg/L (25°C) #3  
 10) 蒸気圧： $<0.1$  mmHg (30°C) #2  
 11) 純度及び不純物：含量 99.7% (毛管カラムGC) #1  
 12) ロット番号：LEJ5225  
 13) 供給者：XXXXXXXXXX  
 14) 供給量：25 mL  
 15) 入手日：1996年12月25日

情報源

- #1：供給者提供の添付資料  
 #2：環境庁化学物質研究会編「環境化学物質要覧」(丸善)1988.  
 #3：Hazardous Substances Data Bank(HSDB), U.S. National Library of Medicine (1995).

## 1.2 被験物質の確認及び保管条件下での安定性

被験物質は当研究所の冷蔵庫に保管した。

入手した被験物質について赤外吸収スペクトルを測定し、被験物質の特性と矛盾が認められないことを確認した。暴露終了後にも同様にスペクトルを測定し、暴露開始前に測定したスペクトルと比較した結果、スペクトルに変化は無かったことより被験物質は当研究所の冷蔵庫に保管中は安定であったと判断された。

## 2 試験生物

試験には、単細胞緑藻類である *Selenastrum capricornutum* を用いた。

本種は、American Type Culture Collection (12301 Parklawn Drive Rockville, Maryland, 20852-1776 U.S.A.)より入手したATCC 22662株を、当研究所において無菌的に継代培養しているものである。基準物質(重クロム酸カリウム、試薬特級、和光純薬工業株式会社)の72時間 $E_0$ C50は、0.358 mg/Lであった。

### 前 培 養

試験に供する藻類は試験条件と同じ条件で暴露開始前に3日間培養したものを使用した。

## 3 試験方法

### 3.1 試験条件

- 1) 培養方式： 振とう培養 (100 rpm)
- 2) 暴露期間： 72時間
- 3) 連 数： 1試験区に付き3連
- 4) 初期細胞濃度：  $1 \times 10^4$  cells/mL
- 5) 試験液量： 1容器(1連)に付き100 mL
- 6) 試験水温：  $23 \pm 2^\circ\text{C}$
- 7) 照 明： 4,400~4,500 lux (連続照明)
- 8) pH : 暴露期間中、pHの調整は行わなかった。

### 3.2 培 地

前培養及び試験ともにOECD化学品テストガイドラインに示されている培地を用いた。

[Table-1 (p.9)]

### 3.3 試験容器、藻類培養試験装置及び機器

- 1) 試験容器： 500 mL容ガラス製三角フラスコ(通気性のシリコ栓付)
- 2) 藻類培養試験装置： 温度維持及び連続振とう培養が可能で、連続照明及び一定の照度を保てる装置(高崎科学器械)を用いた。
- 3) 光学顕微鏡： システム顕微鏡BHS(オリンパス光学工業)
- 4) pH計 .: ガラス電極式水素イオン濃度計HM-14P(東亜電波工業)
- 5) コ-ルター-カウンター: コールターカウンターZI型(コールター)
- 6) 電解液： アイソトンII(コールター)
- 7) 温度計： 測温抵抗体PT100オーム(培養装置設備)

### 3.4 試験濃度の設定

本試験に先立って行った予備試験の結果では40.0 mg/Lで100%生長阻害、3.13 mg/Lでわずかに生長阻害と考えられたので、試験濃度は30.0 mg/Lを最高濃度として公比2.0で6濃度区(30.0、15.0、7.50、3.75、1.88、及び0.938 mg/L)を設定した。対照には培地のみの対照区を設けた。

### 3.5 試験液の調製

必要量の被験物質を培地に溶解させ500 mg/Lの試験原液を調製し、これを0.45 $\mu$ mメンブランフィルターで濾過滅菌した。試験液は、各濃度区毎に必要な量の試験原液と培地を混合して調製した。

### 3.6 試験液の分析

暴露開始時には試験液分析用及び水質測定用にあらかじめ別途調製した試験容器(試験液)から一部を採取しHPLCにより分析した。暴露終了時には各試験区の3容器の中層より試験液を等量採取して混合した後、遠心分離(3,000 rpmで10分間)をして、藻体を除去し、その上澄液を分析に供した。試験液の分析に際しては、標準溶液(濃度5.00 mg/L)の測定を行い、そのピーク面積比から定量した。詳細は付属資料-1に示した。

### 3.7 試験操作

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 $1 \times 10^4$  cells/mLとなるように、前培養液の一定量を試験液の入った容器に添加した。

各試験容器を $23 \pm 2$ ℃の培養装置に設置し試験を開始し、24、48及び72時間に細胞濃度を測定した。細胞濃度の測定は各試験容器より試験液を少量採取し、電解液(アイソトンII)で適宜希釈後、コールターカウンターにより計測した。

暴露開始時のpHは水質測定用にあらかじめ別途調製した試験容器(試験液)について測定し各試験区のpHとし、暴露終了時には各試験区の3連のうち1本を測定した。暴露期間中、培養装置内の温度、照度を1日1回測定した。

### 3.8 数値の取扱い

数値の丸め方は、JIS Z 8202 1985 参考 3 規則 B によった。

## 4 結果の算出

得られたデータを基に以下の3項目の結果を算出した。なお、暴露開始時の被験物質の測定濃度が設定値の $\pm 20\%$ 以内であったので、結果の算出には設定濃度を用いた。

### 4.1 藻類生長曲線

各試験区の細胞濃度の平均値を時間に対してプロットし生長曲線を作成した。

### 4.2 藻類生長阻害濃度の算出

次に下記の方法で生長阻害濃度を算出した。

#### 1) 生長曲線下の面積の比較による生長阻害濃度( $E_0C50$ )

生長曲線下の面積は次の式により算出した。

$$A = \frac{N_1 - N_0}{2} \times t_1 + \frac{N_1 + N_2 - 2N_0}{2} \times (t_2 - t_1) + \dots + \frac{N_{n-1} + N_n - 2N_0}{2} \times (t_n - t_{n-1})$$

ここで、

$A$  : 生長曲線下の面積

$N_0$  : 暴露開始時の設定細胞濃度(cells/mL)

$N_1$  :  $t_1$ 時の実測細胞濃度(cells/mL)

$N_n$  :  $t_n$ 時の実測細胞濃度(cells/mL)

$t_1$  : 暴露開始後最初に細胞濃度を測定した時間

$t_n$  : 暴露開始後n回目に細胞濃度を測定した時間

生長曲線下の面積より各濃度区における生長の阻害百分率( $I_A$ )を次の式により算出した。

$$I_A = \frac{A_c - A_t}{A_c} \times 100$$

ここで、

$A_c$  : 対照区の生長曲線下の面積

$A_t$  : 各濃度区における生長曲線下の面積

## 2) 生長速度の比較による生長阻害濃度( $E_1C50$ )

指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( $\mu$ )を次の式より算出した。

$$\mu = \frac{\ln N_n - \ln N_1}{t_n - t_1}$$

ここで、

$N_1$  :  $t_1$ 時の実測細胞濃度(cells/mL)

$N_n$  :  $t_n$ 時の実測細胞濃度(cells/mL)

$t_1$  : 暴露開始後最初に細胞濃度を測定した時間

$t_n$  : 暴露開始後n回目に細胞濃度を測定した時間

平均の生長速度( $\mu$ )より各濃度区における平均生長速度の低下百分率( $I_m$ )を次の式により算出した。

$$I_m = \frac{\mu_c - \mu_t}{\mu_c} \times 100$$

ここで、

$\mu_c$  : 対照区の平均生長速度

$\mu_t$  : 各濃度区における平均生長速度

## 4.3 50%生長阻害濃度( $EC50$ )の算出

4.2で算出した面積法及び速度法による藻類生長阻害率( $I_A$ 値及び $I_m$ 値)を片対数紙にプロットし回帰直線(最小二乗法)と阻害率50%との交点から $E_0C50(0-72)$ 、 $E_1C50(24-48)$ 、 $E_2C50(24-72)$ 及び可能な限りその95%信頼限界を算出した。

## 4.4 無影響濃度( $NOEC$ )の算出

各試験容器毎の生長曲線下面積及び生長速度について、一元配置分散分析、Kruskal-Wallisの順位和検定、Dunnnettの多重比較法及びノンパラメトリックの多重比較法(Dunnnett)により有意差の検定を行い、対照区と比較して有意差(5%水準)が認められない最高試験濃度を無影響濃度( $NOEC$ )とした。

## 5 結果及び考察

### 5.1 試験成績の信頼性に影響を及ぼしたと思われる環境要因

該当する要因はなかった。

### 5.2 試験液中の被験物質濃度

暴露開始時及び暴露終了時(暴露開始後72時間)に試験液中の被験物質濃度を測定した。被験物質の測定濃度の設定値に対する割合は、暴露開始時で82.7～95.8%、暴露終了時で81.9～87.0%であった。

[Table 2 (p.10), 付属資料-1]

### 5.3 藻類生長曲線

対照区における細胞濃度は暴露終了時まで約120倍に増殖した。これは本試験条件下で正常に生長したことを示す。各濃度区の生長は対照区と比較して以下のとおりであった。30.0 mg/Lの濃度区では、藻体の生長がみられたものの暴露開始後24時間から阻害がみられ、生長曲線は緩やかであった。15.0 mg/Lの濃度区では、暴露開始後24時間からやや阻害がみられ、生長量もやや少なかったが、対照区の生長過程と類似したものであった。7.50 mg/L区、3.75 mg/L区、1.88 mg/L区及び0.938 mg/L区では対照区とほぼ同じ生長を示した。

[Table 3 (p.11), Figure 1 (p.17)]

### 5.4 50%生長阻害濃度(EC50)及び無影響濃度(NOEC)

#### 1) 生長曲線下面積の比較による生長阻害濃度

*o*-アニシジンの設定濃度に基づく $E_pC50(0-72h)$ は21.1 mg/Lであり、その95%信頼限界は本試験の濃度範囲では得られなかった。対照区と比較して有意差が認められない最高試験濃度〔無影響濃度(NOEC)〕は7.50 mg/L(設定濃度)であった。

[Table 4,5 (p.12,13), Figure 2(p.18)]

#### 2) 生長速度の比較による生長阻害濃度

*o*-アニシジンの設定濃度に基づく $E_rC50(24-48h)$ 、 $E_rC50(24-72h)$ は、共に>30.0 mg/Lであり、それらの95%信頼限界は共に本試験の結果からは得られなかった。対照区と比較して有意差が認められない最高試験濃度〔無影響濃度(NOEC)〕は、NOEC(速度法24-48)では15.0 mg/L(設定濃度)であり、NOEC(速度法24-72)では30.0 mg/L(設定濃度)であったが、30.0 mg/L区での速度法24-72による阻害率が各試験容器とも25%以上(平均40.4%)であることより、NOEC(速度法24-72)は15.0 mg/L(設定濃度)とするのが妥当と考えられる。

[Table 4,5 (p.12,13), Figure 3 (p.18)]

#### 5.5 温度、pH及び照度

暴露期間中の藻類培養装置内の温度は23.2～23.7℃であった。試験液のpHは暴露開始時が8.0であり、暴露終了時が7.9～10.6であった。暴露期間中の藻類培養装置内の照度は4,400～4,500 luxであった。

[Table 6,7,8 (p.14～16)]

#### 5.6 試験液の状態

調製時の試験液は無色透明であった。暴露終了時では30.0 mg/L区及び15.0 mg/L区では試験液は薄紫色に変化し、細胞増殖のための緑色も混じっていた。それ以外の濃度区では細胞増殖のため緑色を呈していた。

以上

Table 1. OECD medium

Nutrient salts	Concentration (mg/L)
$\text{H}_3\text{BO}_3$	0.185
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.415
$\text{ZnCl}_2$	0.003
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.08
$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.1
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.0015
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.007
$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.00001
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	18
$\text{NH}_4\text{Cl}$	15
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	1.6
$\text{NaHCO}_3$	50
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	12
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	15

Table 2. Concentrations of *o*-anisidine in growth inhibition test using *Selenastrum capricornutum* under static conditions

Nominal concentration (mg/L)	Measured concentration (mg/L) (Percent of nominal)		
	0-hour <sup>a)</sup>	72-hour <sup>b)</sup>	Mean <sup>c)</sup>
Control	n.d.	n.d.	n.d.
0.938	0.776 (82.7)	0.768 (81.9)	0.772 (82.3)
1.88	1.61 (85.6)	1.57 (83.6)	1.59 (84.6)
3.75	3.16 (84.3)	3.12 (83.1)	3.14 (83.7)
7.50	6.35 (84.6)	6.20 (82.7)	6.27 (83.6)
15.0	14.4 (95.8)	13.1 (87.0)	13.7 (91.3)
30.0	28.2 (94.0)	26.1 (87.0)	27.1 (90.5)

n.d. : < 0.200 mg/L

a) initial

b) final

c) The values are expressed as time-weighted means calculated by the following equation:

$$(C_0 - C_{72}) / (\ln C_0 - \ln C_{72})$$

where

$C_0$  : the measured concentration at 0-hour

$C_{72}$  : the measured concentration at 72-hour

$\ln C_0$  : the natural logarithm of  $C_0$

$\ln C_{72}$  : the natural logarithm of  $C_{72}$

Table3. Cell density of *Selenastrum capricornutum* during 72-hour exposure to *o*-anisidine

Nominal concentration (mg/L)	No.	Cell density ( $\times 10^4$ cells/mL)			
		0-hour	24-hour	48-hour	72-hour
Control	1	1.0	6.0	36.7	126.6
	2	1.0	7.0	34.5	124.0
	3	1.0	6.6	39.2	126.5
	Average	1.0	6.5	36.8	125.7
	S.D.	0.0	0.5	2.4	1.4
0.938	1	1.0	6.8	38.7	139.1
	2	1.0	7.3	41.2	126.8
	3	1.0	7.3	44.0	132.0
	Average	1.0	7.1	41.3	132.6
	S.D.	0.0	0.3	2.7	6.1
1.88	1	1.0	6.0	32.0	107.4
	2	1.0	6.8	35.7	126.2
	3	1.0	6.2	41.6	120.1
	Average	1.0	6.3	36.4	117.9
	S.D.	0.0	0.4	4.8	9.6
3.75	1	1.0	7.0	34.1	123.3
	2	1.0	6.8	39.8	128.0
	3	1.0	6.7	36.3	131.5
	Average	1.0	6.8	36.8	127.6
	S.D.	0.0	0.2	2.8	4.1
7.50	1	1.0	5.9	32.2	109.5
	2	1.0	5.9	34.0	126.4
	3	1.0	6.8	32.8	116.4
	Average	1.0	6.2	33.0	117.4
	S.D.	0.0	0.5	0.9	8.5
15.0	1	1.0	5.8	28.8	95.4
	2	1.0	5.6	31.4	100.6
	3	1.0	5.7	25.3	64.7
	Average	1.0	5.7	28.5	86.9
	S.D.	0.0	0.1	3.1	19.4
30.0	1	1.0	5.1	13.8	22.4
	2	1.0	4.2	13.0	20.6
	3	1.0	5.0	17.4	46.2
	Average	1.0	4.8	14.7	29.7
	S.D.	0.0	0.5	2.4	14.3

Table 4. Growth inhibition of *Selenastrum capricornutum* during 72-hour exposure to *o*-anisidine

Nominal Concentration (mg/L)	No.	Area	Inhibition	Rate	Inhibition	Rate	Inhibition
		( $\times 10^4$ )	(%)		(%)		(%)
		A(0-72h)	I <sub>A</sub> (0-72h)	$\mu$ (24-48h)	I <sub>m</sub> (24-48h)	$\mu$ (24-72h)	I <sub>m</sub> (24-72h)
Control	1	2480	-	0.0758	-	0.0637	-
	2	2420	-	0.0666	-	0.0600	-
	3	2560	-	0.0743	-	0.0615	-
	Average	2490		0.0722		0.0617	
0.938	1	2700	-8.58	0.0725	-0.432	0.0629	-1.91
	2	2630	-5.54	0.0721	0.131	0.0595	3.62
	3	2760	-10.8	0.0748	-3.56	0.0603	2.36
	Average	2690	-8.31	0.0731	-1.29	0.0609	1.36
1.88	1	2140	13.9	0.0699	3.22	0.0602	2.52
	2	2470	0.574	0.0693	4.07	0.0609	1.28
	3	2530	-1.64	0.0791	-9.50	0.0616	0.144
	Average	2380	4.29	0.0727	-0.737	0.0609	1.32
3.75	1	2410	3.21	0.0660	8.62	0.0597	3.23
	2	2590	-4.33	0.0734	-1.67	0.0611	1.09
	3	2550	-2.54	0.0705	2.38	0.0620	-0.507
	Average	2520	-1.22	0.0700	3.11	0.0609	1.27
7.50	1	2170	12.8	0.0704	2.43	0.0608	1.59
	2	2410	2.93	0.0730	-1.09	0.0639	-3.44
	3	2290	8.11	0.0657	8.98	0.0593	3.98
	Average	2290	7.95	0.0697	3.44	0.0613	0.710
15.0	1	1920	23.0	0.0664	8.02	0.0582	5.74
	2	2030	18.2	0.0721	0.121	0.0603	2.28
	3	1460	41.3	0.0617	14.5	0.0505	18.3
	Average	1800	27.5	0.0667	7.56	0.0563	8.76
30.0	1	662	73.4	0.0414	42.6	0.0308	50.1
	2	600	75.9	0.0470	34.9	0.0331	46.4
	3	1030	58.5	0.0523	27.6	0.0464	24.8
	Average	764	69.3	0.0469	35.1	0.0368	40.4

Table 5. Calculated EC50 and NOEC of *o*-anisidine in *Selenastrum capricornutum*

Based on $I_A$ value		
	<i>o</i> -anisidine (mg/L)	95-Percent confidence limits (mg/L)
EbC50(0-72h)	21.1	-
NOECb(0-72h)	7.50	-
Based on $I_m$ value		
	<i>o</i> -anisidine (mg/L)	95-Percent confidence limits (mg/L)
ErC50(24-48h)	> 30.0	-
NOECr(24-48h)	15.0	-
ErC50(24-72h)	> 30.0	-
NOECr(24-72h)	15.0	-

Table 6. Temperature in the incubation chamber during 72-hour exposure to *o*-anisidine

Exposure time (hour)	Temperature (°C)
0	23.3
24	23.7
48	23.2
72	23.7
Average	23.5

Table 7. pH values of test solutions at 0-hour and 72-hour exposure to *o*-anisidine

Nominal concentration (mg/L)	pH	
	0-hour	72-hour
Control	8.0	10.6
0.938	8.0	9.8
1.88	8.0	10.0
3.75	8.0	10.2
7.50	8.0	9.9
15.0	8.0	9.1
30.0	8.0	7.9

Table 8. Light intensity in the incubation chamber during 72-hour exposure to *o*-anisidine

Exposure time (hour)	Light intensity (lux)
0	4,500
24	4,500
48	4,400
72	4,400
Average	4,450

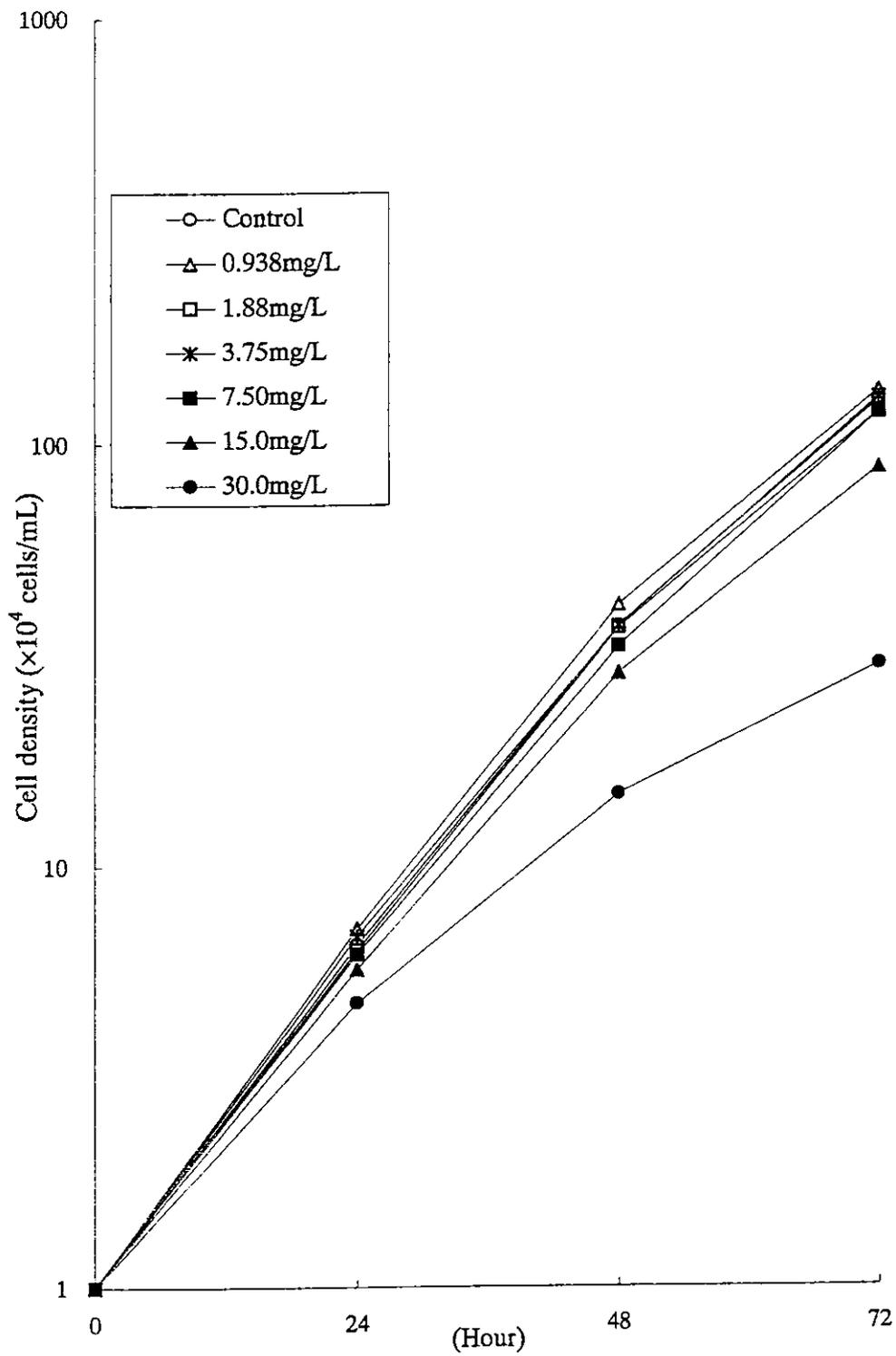


Figure 1. Growth curve of *Selenastrum capricornutum* during 72-hour exposure to *o*-anisidine.

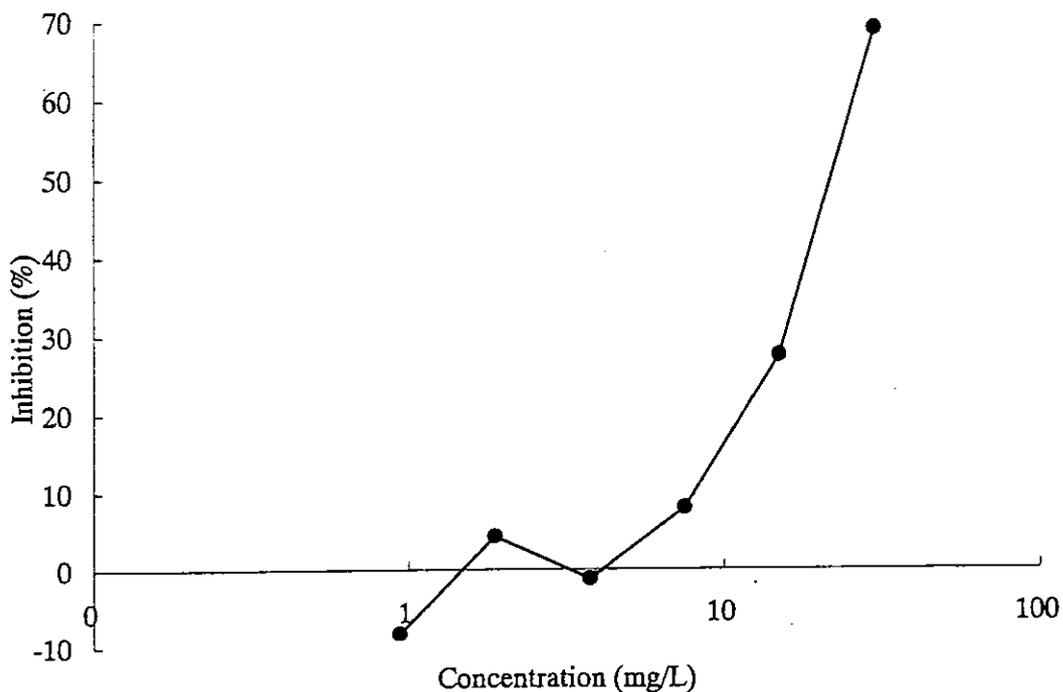


Figure 2. Concentration-Inhibition curve of *o*-anisidine in *Selenastrum capricornutum* based on  $I_A$  value.

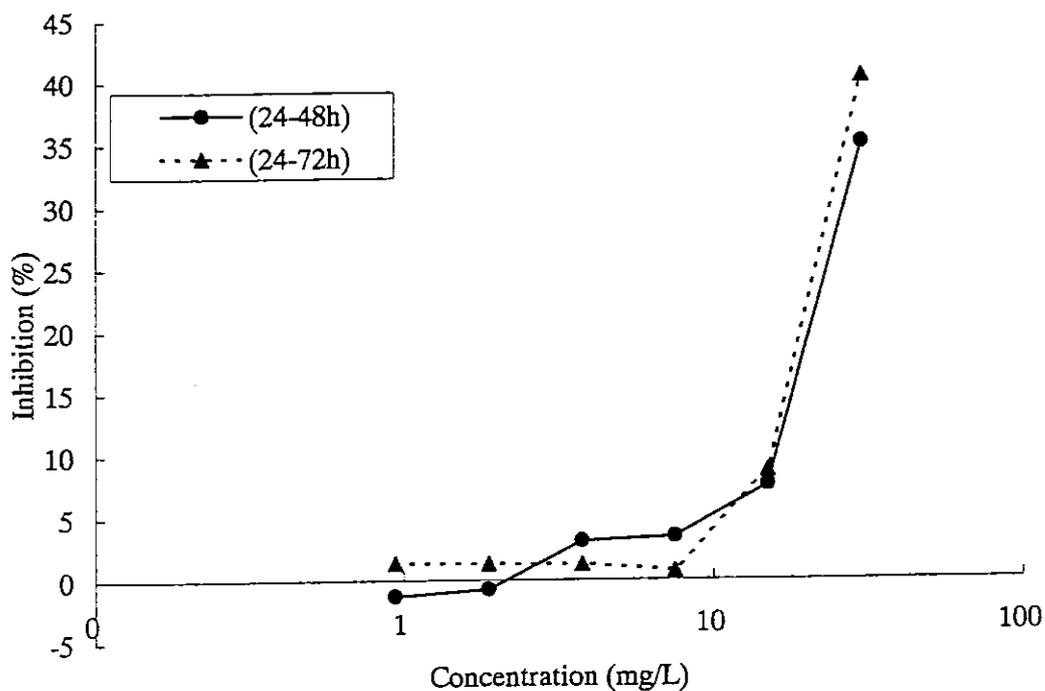


Figure 3. Concentration-Inhibition curve of *o*-anisidine in *Selenastrum capricornutum* based on  $I_m$  value.

## 付属資料-1

試験液の分析方法及び分析チャート

(全 10 頁)

試 験 名 : 藻類生長阻害試験

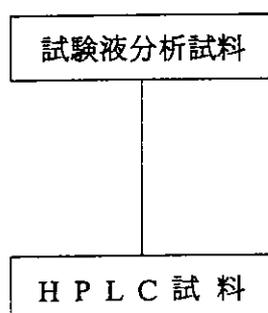
被験物質物質名 : *o*-アニシジン

1) 試験液の分析方法

(1) 試験液の前処理操作

混合した溶液はそのまま若しくは脱塩素水道水で希釈して、以下のフロースキームに従い高速液体クロマトグラフィー(HPLC)によって分析した。

フロースキーム



HPLC試料中の被験物質濃度は、クロマトグラム上の被験物質のピーク面積を濃度既知の標準溶液のピーク面積と比較し、比例計算して求めた。

(2) 被験物質溶液の調製

被験物質100 mgを正確にはかりとり、アセトニトリルに溶解して1,000 mg/Lの被験物質溶液を調製した。これをアセトニトリルで希釈して100 mg/Lの被験物質溶液を調製した。

(3) 標準溶液の調製

分析試料中の被験物質濃度を求めるための標準溶液の調製は次のようにして行った。100 mg/Lの被験物質溶液を脱塩素水道水で希釈して5.00 mg/Lの標準溶液とした。

## 2) HPLCの分析条件

機 器	高速液体クロマトグラフ
ポ ン プ	島津製作所製 LC-10AD
検 出 器	島津製作所製 SPD-10A
オートインジェクター	島津製作所製 SIL-10A
カ ラ ム	L-column ODS (化学品検査協会製) 15 cm×4.6 mm φ ステンレス製
カラム温度	40℃
溶 解 液	7.5 mg/L リン酸緩衝液 (pH6.9) 30/70 (V/V)
流 量	1.0 mL/min
測 定 流 量	280 nm
注 入 量	100 μL
感 度	
検 出 器	1 AU/1 V
記 録 計	ATTEN 2 <sup>5</sup>

## 3) 検量線の作成

(3)の標準溶液の調製と同様にして0.20、1.00及び5.00 mg/Lの標準溶液を調製した。また、1,000 mg/Lの被験物質溶液より25.0 mg/Lの標準溶液を調製した。これらを分析機器の定量条件に従って分析し、得られたそれぞれのクロマトグラム上のピーク面積と濃度により、検量線を作成した。

Content of figure

- Figure 1. Calibration curve of *o*-anisidine by HPLC analysis.
- Figure 2-1. Example of chromatogram.  
( standard solution of 5.00 mg/L, 0-hour )
- Figure 2-2. Example of chromatogram.  
( fresh test solution of 7.50 mg/L as nominal concentration,  
0-hour )
- Figure 2-3. Example of chromatogram.  
( fresh test solution of control, 0-hour )
- Figure 2-4. Example of chromatogram.  
( standard solution of 5.00 mg/L, 72-hour )
- Figure 2-5. Example of chromatogram.  
( expired test solution of 7.50 mg/L as nominal concentration,  
72-hour )
- Figure 2-6. Example of chromatogram.  
( expired test solution of control, 72-hour )

Input data		
Run	Concentration (mg/L)	Peak area ( $\mu\text{V}\cdot\text{sec}$ )
1	0.200	23099
2	1.00	115335
3	5.00	587645
4	25.0	2966347

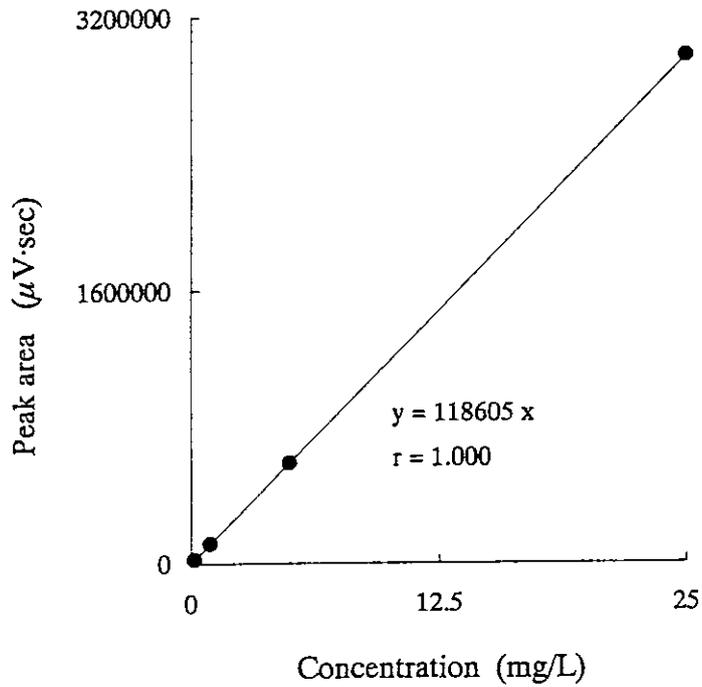


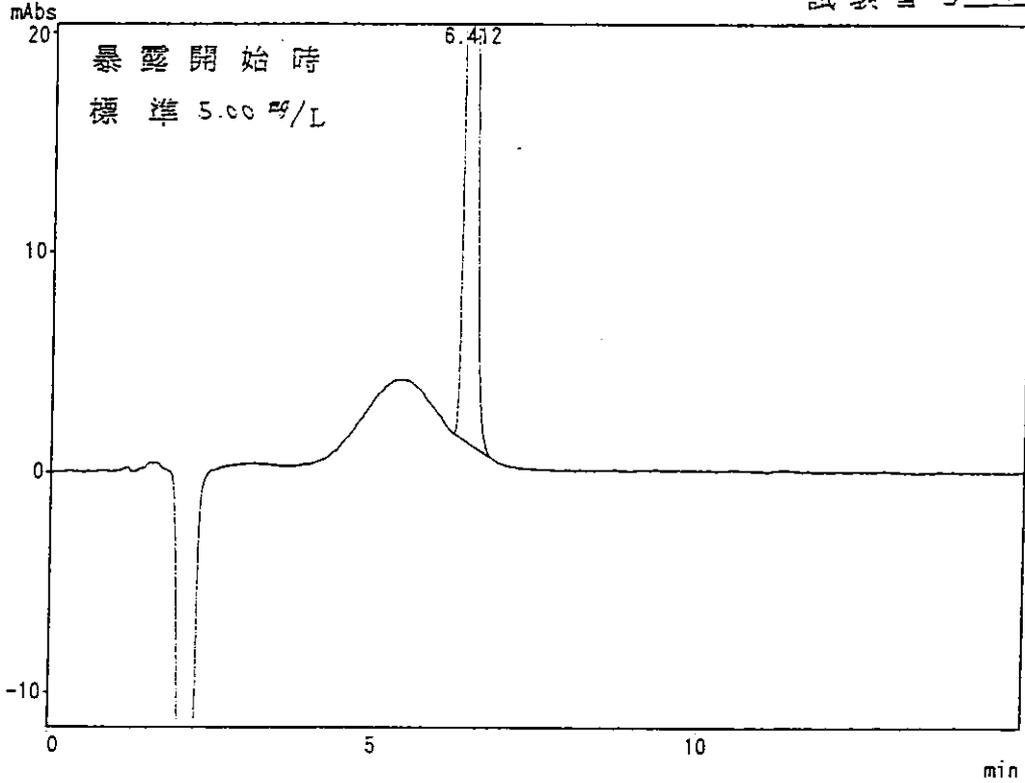
Figure 1. Calibration curve of *o*-anisidine by HPLC analysis.

CLASS-LC10 システム番号=2 Ch=1 レポート番号=244 テータ=1746HOS.D22 97/02/24 20:08:14  
 サンプル : オニシツン/std.  
 ID : 5ppm  
 サンプル量 : 100  
 タイプ : 標準試料  
 検出器 : SPD-10A シングル  
 オペレータ名 :   
 メソッド名 : ANI-T.M01

1997.2.25

\*\*\* カロマトグラム \*\*\*

試験番号 91746



\*\*\* ヒートマップ \*\*\*

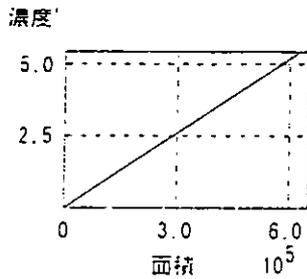
PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	6.412	579223	61312	R	1		o-7ニシツン

\*\*\* キャリブレーション結果 \*\*\*

\*\* ID テーブル \*\*

IDNO	成分名	時間	濃度	F1	F2
1	o-7ニシツン	6.40	5	8.632254e-006	

\*\* 検量線 \*\*



IDNO: 1  
 NAME: o-7ニシツン  
 TIME: 6.4

濃度	面積
(1) 5	579223
F1	F2
(1) 8.63225e-006	0

r2 = 1

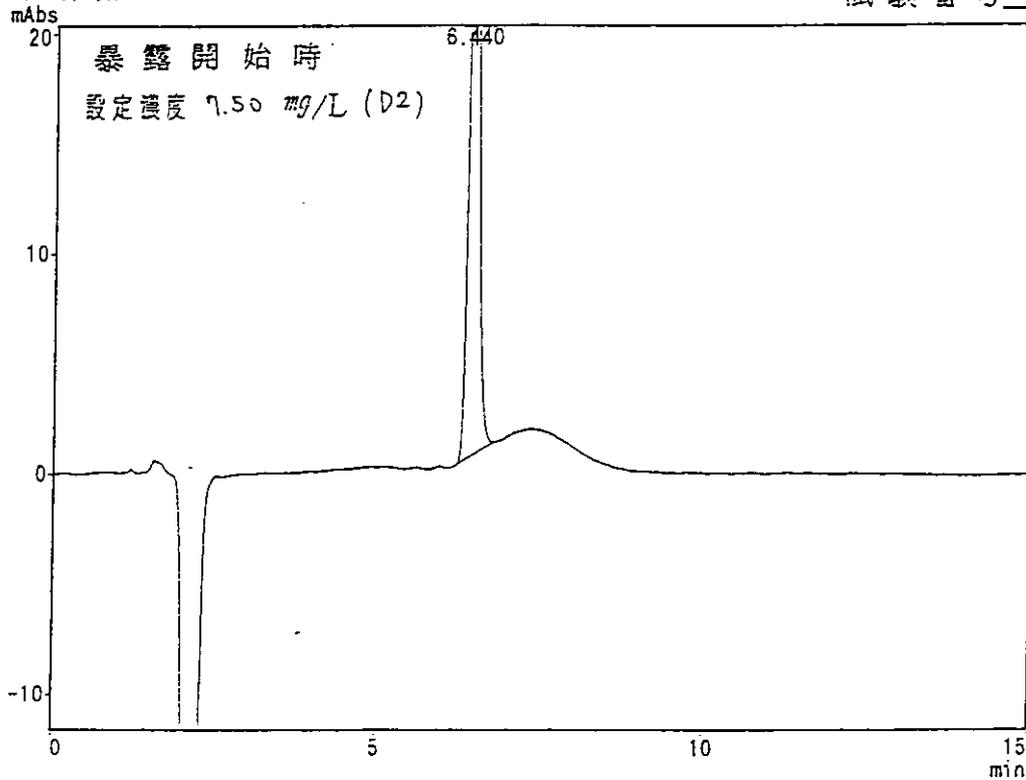
Figure 2-1. Example of chromatogram.  
 (standard solution of 5.00 mg/L, 0-hour)

CLASS-LC10 システム番号=2 Ch=1 レポート番号=253 データ=1746HOC.021 97/02/24 21:16:52  
 サンプル : ANI/S3/0h  
 ID : 7.50/2  
 サンプル量 : 50  
 タイプ : 未知試料  
 検出器 : SPD-10A シングル  
 オペレータ名 :   
 メソッド名 : ANI-T.M01

1997.2.25

\*\*\* クロマトグラム \*\*\*

試験番号 91746



\*\*\* ピークレポート \*\*\*

PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	6.440	367718	39373	R	1	6.3485	o-アニジン
		367718	39373			6.3485	

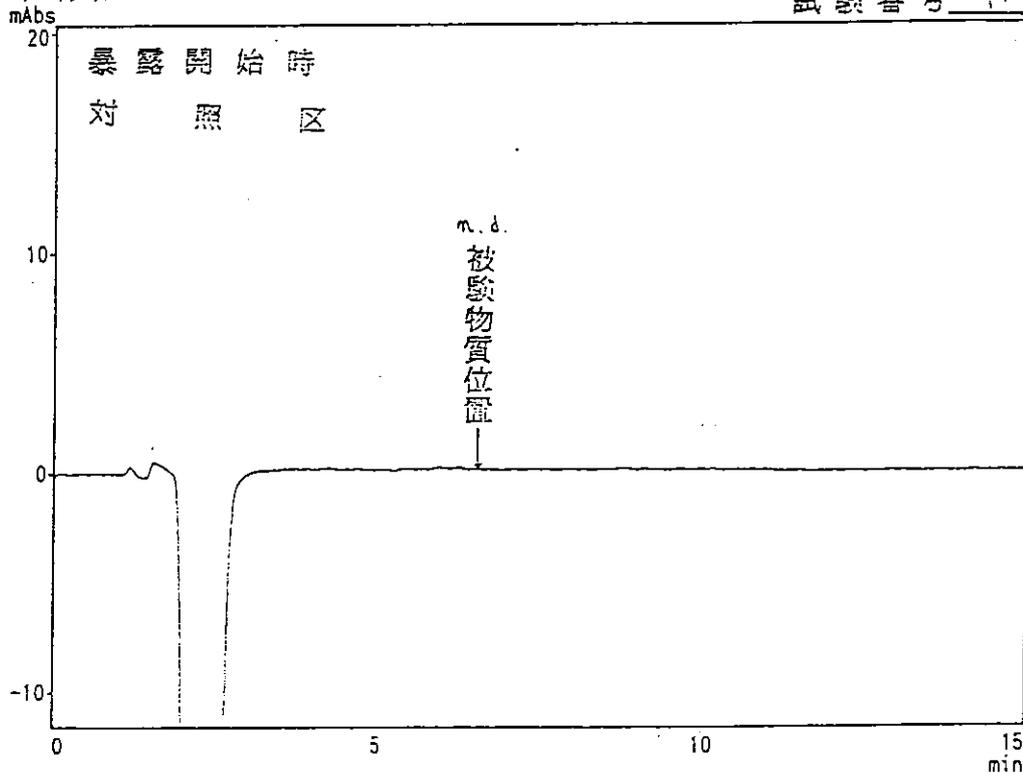
Figure 2-2. Example of chromatogram.  
 ( fresh test solution of 7.50 mg/L as nominal concentration, 0-hour )

CLASS-LC10 システム番号=2 Ch=1 検出器番号=270 データ=1746H02.D21 97/02/24 16:56:46  
サンプル : ANI/S7/0h  
ID : 対照区  
サンプル量 : 100  
タイプ : 未知試料  
検出器 : SPD-10A シンク  
オペレータ名 : XXXXXXXXXX  
メソッド名 : ANI-1.M01

1997.2.27

\*\*\* カマトグラム \*\*\*

試験番号 91746



\*\*\* ピークレポート \*\*\*  
!! ピークがありません !!

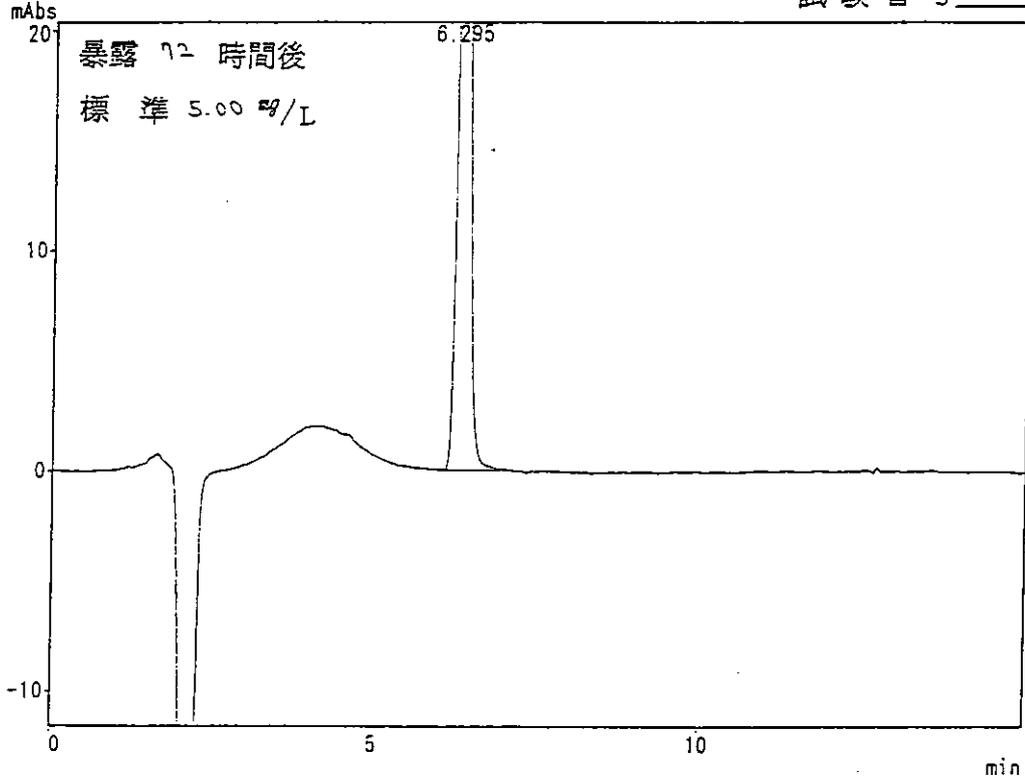
Figure 2-3. Example of chromatogram.  
( fresh test solution of control, 0-hour )

CLASS-LC10 システム番号=2 Ch=1 レポート番号=417 テータ=1746H72S.D22 97/02/27 15:53:14  
 サンプル : o-アニリン/std.  
 ID : 5ppm  
 サンプル量 : 100  
 タイプ : 標準試料  
 検出器 : SPD-10A シングル  
 オペレータ名 :   
 メソッド名 : ANI-1.M01

1997. 2. 27

\*\*\* クロマトグラム \*\*\*

試験番号 91746



\*\*\* ピークレポート \*\*\*

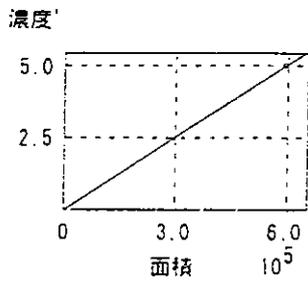
PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	6.295	594853	60833	S R	1		o-アニリン

\*\*\* キャリブレーション結果 \*\*\*

\*\* ID テーブル \*\*

IDNO	成分名	時間	濃度	F1	F2
1	o-アニリン	6.32	5	8.405441e-006	

\*\* 検量線 \*\*



IDNO: 1  
 NAME: o-アニリン  
 TIME: 6.32

濃度	面積
(1) 5	594853
F1	F2
(1) 8.40544e-006	0

r2 = 1

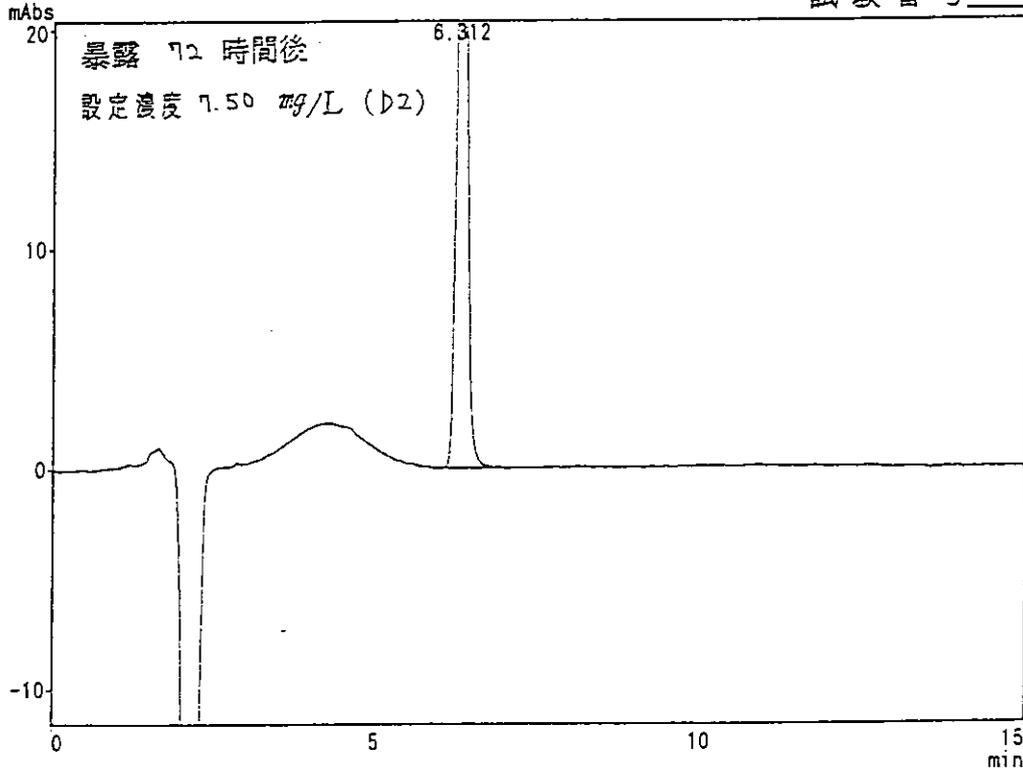
Figure 2-4. Example of chromatogram.  
 (standard solution of 5.00 mg/L, 72-hour)

CLASS-LC10 システム番号=2 Ch=1 レポート番号=423 テータ=1746H72C.D21 97/02/27 17:01:50  
 サンプル : ANI/S3/72h  
 ID : 7.50/2  
 サンプル量 : 50  
 タイプ : 未知試料  
 検出器 : SPD-10A シングル  
 オペレータ名 :   
 メソッド名 : ANI-1.M01

1997.2.27

\*\*\* クロマトグラム \*\*\*

試験番号 91746



\*\*\* ヒートマップ \*\*\*

PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	6.312	368745	38506	SV R	1	6.1989	o-アニジン
		368745	38506			6.1989	

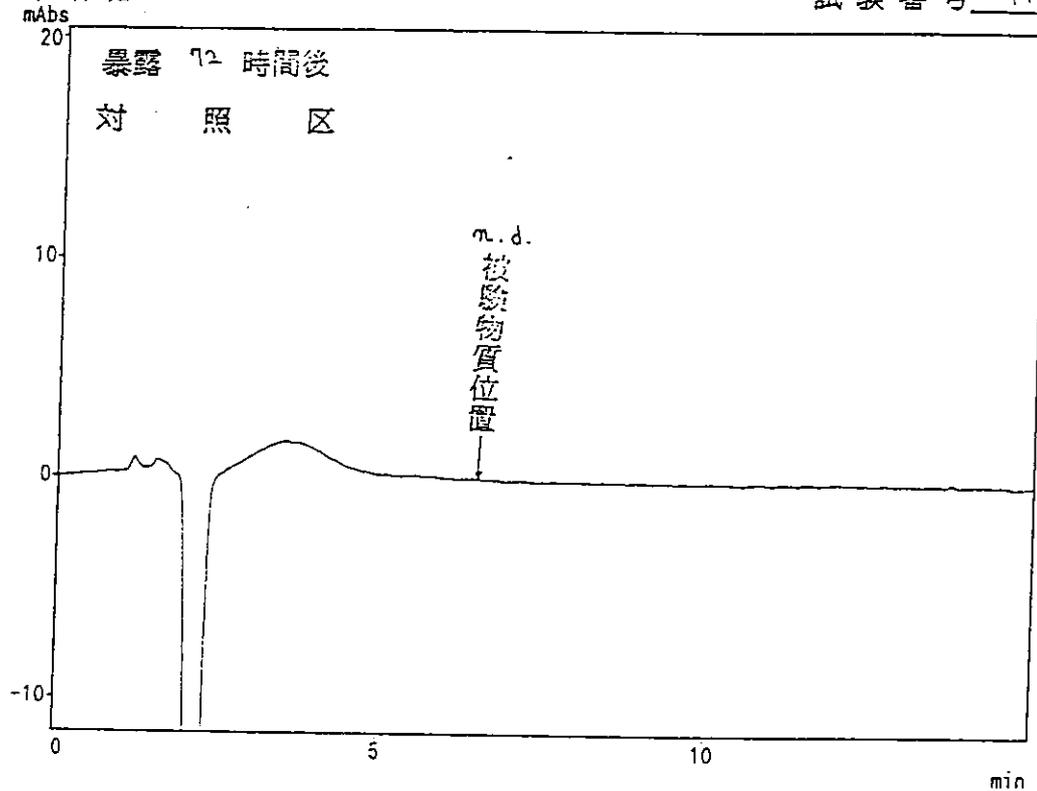
Figure 2-5. Example of chromatogram.  
 (expired test solution of 7.50 mg/L as nominal concentration, 72-hour)

CLASS-LC10 システム番号=2 Ch=1 レポート番号=414 データ=1746H72Z.D21 97/02/27 15:18:56  
サンプル : ANI/S7/72h  
ID : 対照区  
サンプル量 : 100  
タイプ : 未知試料  
検出器 : SPD-10A シングル  
オペレーター名 :   
レポート名 : ANI-1.M01

1997.2.27

試験番号 91746

\*\*\* クロマトグラム \*\*\*



\*\*\* ピークレポート \*\*\*  
!! ピークがありません !!

Figure 2-6. Example of chromatogram.  
( expired test solution of control, 72-hour )