

受付番号	662-06-E-4258
試験番号	94258

## 最終報告書

13F-AcOHの*Pseudokirchneriella subcapitata*による藻類生長阻害試験

2007年5月25日

財団法人化学物質評価研究機構



本文書は正本を正確に転写したものです。  
財団法人 化学物質評価研究機構 久留米事業所  
2007年5月25日  
試験責任者 吉川 真弓

## 陳 述 書

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      ダイキン工業株式会社

試験の表題      13F-AcOHの*Pseudokirchneriella subcapitata*による藻類生長阻害試験

試験番号      94258

上記試験は以下のGLPに従って実施したものです。

- (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）に規定する「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」
- (2) 「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ています。

2007年5月25日

試験責任者

吉川真弓

吉川真弓

## 信 頼 性 保 証 書

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      ダイキン工業株式会社

試験の表題      13F-AcOHの*Pseudokirchneriella subcapitata* による藻類生長阻害試験

試験番号          94258

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します。

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ました。

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	2007年4月19日	2007年4月19日
試験計画書	2007年4月20日	2007年4月20日
暴露開始時, 暴露開始後	2007年4月23日	2007年4月27日
	2007年4月26日	2007年4月27日
生データ、最終報告書草案	2007年5月24日	2007年5月24日
最終報告書	2007年5月25日	2007年5月25日

2007年5月25日

信頼性保証部門責任者

白石圭二

白石圭二

## 目 次

	頁
表 題 .....	1
試験委託者 .....	1
試験施設 .....	1
試験目的 .....	1
試験法 .....	1
適用 GLP .....	1
試験日程 .....	2
試験資料の保管 .....	2
試験関係者 .....	3
最終報告書の承認 .....	3
要 約 .....	4
1. 被験物質 .....	5
2. 供試試料 .....	6
3. 試験材料と方法 .....	7
4. 試験結果及び考察 .....	13
5. 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

## 試験結果の表及び図

表1 暴露開始時と終了時の試験液のpH

表2 暴露期間中の培養装置内温度及び光強度

表3 各時間での細胞数

表4 各濃度における生長阻害率

表5 生長速度におけるEC<sub>50</sub>及びNOEC

表6 有意差検定結果

表7 試験の有効性

図1 生長速度を指標とした場合の濃度－生長阻害率曲線

図2 各試験区での生長曲線

付属資料1 培地の組成

付属資料2 被験物質濃度の分析方法及び測定結果

付属資料3 検量線及びクロマトグラム

別添資料 予備試験結果

表 題	13F-AcOHの <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> による藻類生長阻害試験
試験委託者	ダイキン工業株式会社 (〒566-8585) 大阪府摂津市西一津屋1番1号
試験施設	財団法人化学物質評価研究機構 久留米事業所 (〒839-0801) 福岡県久留米市宮ノ陣三丁目2番7号
試験目的	13F-AcOHの藻類の生長に対する影響を調べる。
試験法	本試験は以下の試験法に従って行った。 (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、環保企発第031121002号、平成18年11月20日一部改正)に規定する〈藻類生長阻害試験〉 (2)「OECD Guidelines for Testing of Chemicals」に定める“Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test (Guideline 201,23 March 2006)”
適用 GLP	本試験は以下の基準を適用した。 (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)に規定する「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」 (2)「OECD Principles of Good Laboratory Practice」(November 26, 1997)

## 試験日程

試験開始日	2007年4月20日
実験開始日	2007年4月23日
実験終了日	2007年4月26日
試験終了日	2007年5月25日

## 試験資料の保管

## (1) 被験物質

供試試料<sup>\*1</sup>を保管用容器に入れ密栓後、化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律（以下「化審法」と記す）第4条第1項若しくは第2項、第4条の2第2項、第3項若しくは第8項、第5条の4第2項、第24条第2項又は第25条の3第2項の規定による通知を受けた後10年間、または品質低下をおこさないで安定に保管しうる期間のいずれか短い方の期間、久留米事業所試料保管室に保管する。保管期間経過後の処置または廃棄に際しては試験委託者と協議の上決定する。

\*1 試験番号94258、94259及び94260についての共用保管試料とする。

## (2) 生データ、資料等

生データ、試験計画書、試験委託書、被験物質調査票、その他必要な資料等は最終報告書と共に、化審法第4条第1項若しくは第2項、第4条の2第2項、第3項若しくは第8項、第5条の4第2項、第24条第2項又は第25条の3第2項の規定による通知を受けた後10年間、久留米事業所資料保管室に保管する。保管期間経過後の処置は試験委託者と協議の上決定する。

## 試験関係者

試験責任者

吉川真弓所属 試験第四課

生物試験担当者

杉本弘子北嶋美和子永田茜

分析試験担当者

春口寿子鏡山知世井上仁美杉本弘子小野美香

## 最終報告書の承認

2007年5月25日

試験責任者

吉川真弓

吉川真弓

## 要 約

## 試験の表題

13F-AcOHの*Pseudokirchneriella subcapitata*による藻類生長阻害試験

## 試験条件

(1) 被 験 物 質	13F-AcOH
(2) 試 験 生 物	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>
(3) 暴 露 期 間	72時間
(4) 試 験 濃 度	100、45.5、20.7、9.39及び4.27mg/L (公比2.2) の5濃度区 及び対照区
(5) 試 験 方 式	旋回振とう培養 (約100回/分)
(6) 試 験 液 の 調 製	供試試料と培地を混合し、約1時間攪拌後、フィルタ ーろ過したろ液 (試験原液) を用いて調製
(7) 連 数	6連/対照区 3連/濃度区
(8) 試 験 液 量	600mL/対照区 (100mL/試験容器) 300mL/濃度区 (100mL/試験容器)
(9) 培 養 温 度	21~24℃ (±2℃の変動幅)
(10) 照 明	蛍光灯による照明 [液面付近での光強度60~ 120μE/m <sup>2</sup> /s (変動幅±20%) とする連続照明]
(11) 生 長 の 測 定	細胞濃度
(12) 試 験 液 中 の 被 験 物 質 の 分 析	LC-MS法 (暴露開始時及び終了時)

## 試験結果

(1) 試験液中の被験物質濃度 (対設定値)	暴露開始時	90.5~99.2%
	暴露終了時	90.1~95.9%
(2) EC <sub>50</sub> (E <sub>r</sub> C <sub>50</sub> )		>100mg/L
(3) NOEC (生長速度0-3d)		4.27mg/L
[(2)、(3)は、設定濃度に基づく値]		



## 1. 被験物質

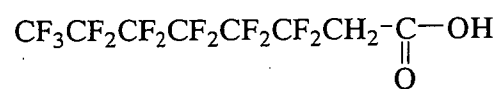
本最終報告書において13F-AcOHは、次の名称等を有するものとする。

1.1 名称<sup>\*2</sup>

3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,8-トリデカフルオロオクタン酸

1.2 構造式等<sup>\*2</sup>

構造式



分子式       $\text{C}_8\text{H}_3\text{F}_{13}\text{O}_2$

分子量      378.09

\*2 試験委託者提供資料による。

## 2. 供試試料

### 2.1 供給者及びロット番号\*2

供給者	ダイキン工業株式会社
ロット番号	S6X01

### 2.2 純度\*2

被験物質	99.4%
不純物	不明成分 0.6%

### 2.3 被験物質の確認

試験委託者提供の赤外吸収スペクトルと久留米事業所の当該測定スペクトルが一致することを確認した。

### 2.4 物理化学的性状\*2

常温における性状	白色固体
溶解度	ジメチルスルホキシド 可溶
	アセトン 可溶

\*2 試験委託者提供資料による。

### 2.5 保管条件及び保管条件下での安定性確認

保管条件	室温遮光保存
安定性確認	実験開始前及び終了後に被験物質の赤外吸収スペクトルを測定した結果、両スペクトルは一致し、保管条件下で安定であることを確認した。

### 3. 試験材料と方法

#### 3.1 試験生物

##### (1) 種

*Pseudokirchneriella subcapitata* (ATCC 22662)

(旧学名：*Selenastrum capricornutum*)

##### (2) 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類である。

##### (3) 供給源

American Type Culture Collection (12301 Parklawn Drive Rockville, Maryland 20852-1776 U.S.A.) より1995年6月30日に入手した*Pseudokirchneriella subcapitata*で久留米事業所で継代培養しているものを用いた。また、試験系の再現性を確認するために本試験と同様な培地で3回実施(2006年12月11日～12月14日、n=2及び2007年2月19日～2月22日、n=1)した試験生物によるニクロム酸カリウム(和光純薬工業製 試薬特級)のE<sub>1</sub>C<sub>50</sub>はそれぞれ0.781、0.962及び0.930mg/Lであった。

#### 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 (Guideline 201, 23 March 2006) に示されている培地を用いた。培地の組成を付属資料1に示す。培地は滅菌したものを用いた。

#### 3.3 試験器具及び装置

##### (1) 試験器具

試験容器：滅菌した500mL容ガラス製三角フラスコ  
(通気性のシリコセン<sup>®</sup>付)

##### (2) 試験装置

培養装置：温度維持、連続照明及び連続振とう培養が可能で、一定の光強度を維持可能な装置(光照射式恒温振とう培養器 ユーエスアイ製)を用いた。

### 3.4 試験条件

#### (1) 暴露条件

##### (a) 方式

被験物質を含む試験液へ試験生物を暴露し、旋回振とう培養（約100回/分）を行った。

##### (b) 期間

72時間

##### (c) 試験濃度

試験は100、45.5、20.7、9.39及び4.27mg/L（公比2.2）の5濃度区で行った。試験濃度及び公比は予備試験結果から決定した。試験濃度は純度（99.4%）補正を行った値で表示した。予備試験結果を別添資料に示す。

##### (d) 対照群

被験物質を含まない培地に試験原液と同様の調製処理をした対照区を設けた。

##### (e) 連数

6連/対照区

3連/濃度区

##### (f) 暴露開始時の細胞数

保存培養から前培養用培地に植えつぎ、試験と同じ条件下で3日間培養し、対数増殖期の細胞を含んだ藻類培養液（前培養液）を約 $10^4$  cells/mLになるように試験液に接種した。

##### (g) 試験操作

無菌操作により実施した。

##### (h) 試験液量

600mL/対照区（100mL/試験容器）

300mL/濃度区（100mL/試験容器）

## (2) 環境条件

## (a) 温度

21～24℃（±2℃の変動幅）

## (b) 照明

400～700nmのスペクトル幅をもつ蛍光灯を用い、液面付近での光強度が60～120 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ <sup>\*3</sup>（変動幅±20%）の連続照明とした。

\*3  $120\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s} = 0.72 \times 10^{20} \text{photons}/\text{m}^2/\text{s}$

## 3.5 試験液の調製法

試験原液の調製は純度（99.4%）補正して行った。

メノウ乳鉢で微細化した供試試料と培地を100mg/L（設定）になるように混合し、約1時間攪拌後、ガラス繊維フィルター（ADVANTEC製 GB-140 孔径0.4 $\mu\text{m}$ ）で吸引ろ過したろ液を試験原液とした。調製容器に必要な量の試験原液と培地<sup>\*4</sup>を混合し、攪拌して試験液を調製し、各試験容器に分割した。

各試験区の調製量に対する試験原液添加量を以下に示す。

試験区 (mg/L)	試験原液添加量 (mL/400mL)
対照区	—
4.27	17.08
9.39	37.56
20.7	82.8
45.5	182
100	400

\*4 対照区と同様の調製処理をした培地

### 3.6 観察と測定

#### (1) 藻類の生長等

生長量は細胞濃度を用いて表した。

暴露開始後24時間毎に72時間まで細胞濃度を粒子計数装置（ベックマン・コールター製 コールターカウンター Z1）により計数した。その際、試験液のバックグラウンドを測定するため、培地<sup>4</sup>について同時に測定し、ブランク補正を行った。また、暴露終了時には各試験区につき1試験容器について細胞の状態を生物顕微鏡（オリンパス製 BX41）を用いて観察した。

#### (2) 試験液の状態

試験液の状態を暴露開始時及び終了時に観察した。

#### (3) 水質及び暴露環境

試験液のpHを暴露開始時と終了時に測定した。暴露開始時は調製容器より別途分取した試験液を測定し、暴露終了時には各試験区につき1試験容器を測定した。培養装置内の温度、光強度を暴露期間中少なくとも1日1回測定した。pHはガラス電極式水素イオン濃度計（東亜ディーケーケー製 HM-21P）、温度は検定済ガラス製棒状温度計、光強度は光量子計（LI-COR製 LI-250A）で測定した。

#### (4) 試験液中の被験物質濃度

試験液中の被験物質濃度の測定は暴露開始時及び終了時に行った。暴露開始時の測定用試験液は調製容器より別途分取したものをを用いた。暴露終了時の測定用試験液は各試験区の試験容器からそれぞれ均等量採取し混合後、遠心分離（3000rpmで10分間）により藻体を除去したものをを用いた。被験物質濃度の分析は液体クロマトグラフィーー質量分析法（LC-MS）により行った。被験物質濃度の分析方法及び測定結果を付属資料2、検量線及びクロマトグラムを付属資料3に示す。

#### (5) 培地への溶解度

被験物質の培地への溶解度は100mg/L以上であったため、本試験では培地への溶解度は測定しなかった。

### 3.7 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試験設定濃度の±20%以内であったため、結果の算出には設定濃度を用いた。

#### (1) 濃度－阻害率の算定法

各試験区の細胞数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各濃度区での阻害率を算出した。

##### 生長速度の比較（速度法）

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

$\mu_{i-j}$  =  $t_i$ 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。

$N_i$  =  $t_i$ 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 ( $d$ )

EC<sub>50</sub>を算出する場合は、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。対照群については、試験の有効性を調べるために1日ごとの生長速度を求めた。

各濃度区における阻害百分率 ( $I_\mu$ ) は対照群の平均生長速度 ( $\mu_c$ ) と各濃度区での生長速度 ( $\mu_i$ ) との間の差として次のように計算した。

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

## (2) $EC_{50}^{*5}$ の算出法

本試験濃度範囲で50%以上の阻害率が得られなかったため、 $EC_{50}$ は「>試験最高濃度」と表示した。その際、速度法により求めた $EC_{50}$ は $E_rC_{50}$ と記載した。

\*5  $EC_{50}$  (Median Effective Concentration) : 暴露期間において試験生物の生長を50%阻害する被験物質濃度を示す。

## (3) 最大無影響濃度 ( $NOEC^{*6}$ ) の算出

生長速度について、Bartlett法による等分散検定を行った後、各濃度区と対照区との有意差の有無を一元配置分散分析及びDunnnetの多重比較法により求めた。これらの有意差検定結果に加え、試験結果全体を考慮し、 $NOEC$ を評価した。

\*6  $NOEC$ (No Observed Effect Concentration) : 暴露期間において試験生物の生長に影響が認められない試験最高濃度を示す。

## 3.8 有効性基準

- (1) 対照群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。
- (2) 対照群における毎日の生長速度の変動係数が暴露期間を通じて35%を超えてはならない。
- (3) 対照群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。

## 3.9 数値の取扱い

数値の丸め方は、JIS Z 8401 : 1999 規則Bに従った。



#### 4. 試験結果及び考察

##### 4.1 試験液の観察と測定結果

###### (1) 試験液の状態

暴露開始時は無色透明であった。暴露終了時には細胞の増殖により100及び45.5mg/L区ではやや薄緑色、その他の濃度区では緑色を呈していた。

対照群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。

###### (2) 試験液の水質及び暴露環境

試験液のpHは暴露開始時では7.2～7.8、暴露終了時では7.7～7.8であった。培養装置内の温度は22.2～22.8℃、光強度は82～84 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ であった。試験液のpHの測定結果を表1、培養装置内の温度及び光強度の測定結果を表2に示す。

###### (3) 試験液中の被験物質濃度

測定した試験液中の被験物質濃度は暴露開始時では設定値に対して90.5～99.2%、暴露終了時では90.1～95.9%であり、設定濃度の $\pm 20\%$ 以内に保たれていた。被験物質濃度の測定結果を付属資料2に示す。

##### 4.2 EC<sub>50</sub>

生長速度によって算出した13F-AcOHのEC<sub>50</sub> (E<sub>r</sub>C<sub>50</sub>) は $>100\text{mg}/\text{L}$ であった。各時間での細胞数を表3、生長阻害率を表4、生長速度におけるEC<sub>50</sub>を表5に示す。また、生長速度における濃度－生長阻害率曲線を図1に示す。

##### 4.3 各試験区での生長曲線、細胞観察結果及びNOEC

100mg/L区では阻害が認められたものの対数増殖を示した。45.5、20.7及び9.39mg/L区では対照群に近い生長を、4.27mg/L区では対照群と同様の生長を示した。

以下の細胞観察結果は全て対照群との比較に基づくものである。全ての濃度区において対照群と同様であった。対照群では異常がみられなかった。

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4.27mg/Lであった。NOECを表5、有意差検定結果を表6、生長曲線を図2に示す。

#### 4.4 試験の有効性

試験の有効性に関する詳細な結果を表7に示す。

##### (1) 対照群における生長

対照群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。暴露終了時には初期細胞数の96.8倍以上に増殖し、有効性基準（16倍以上の増殖）を満たしていた。

##### (2) 対照群における日間生長速度

対照群における日間生長速度の平均変動係数は16.4%（11.6～21.3%）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。

##### (3) 対照群における繰り返し間の生長速度

対照群における繰り返し間の生長速度の変動係数は0.477%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。

#### 4.5 考 察

本試験は試験法上限濃度（100mg/L）以下での試験生物に対するEC<sub>50</sub>並びにNOECを求める試験として行った。暴露期間中、試験液中の被験物質濃度は設定濃度の±20%以内に保たれ、また、試験環境条件も適切な範囲内であったことから、本試験は試験法に準じたものであったと判断される。

#### 5. 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。

表1 暴露開始時と終了時の試験液のpH

設定濃度 (mg/L)	pH	
	開始時	終了時
対 照 区	7.8	7.8
4.27	7.7	7.8
9.39	7.6	7.8
20.7	7.5	7.8
45.5	7.4	7.8
100	7.2	7.7

表2 暴露期間中の培養装置内温度及び光強度

暴露期間	開始時	1日	2日	終了時
培養装置内温度 (°C)	22.5	22.8	22.2	22.3
光 強 度 ( $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ )	83	82	84	84

表3 各時間での細胞数

設定濃度 (mg/L)	No.	細胞数 ( $\times 10^4$ cells/mL)			
		開始時*7	24時間	48時間	72時間
対照区	1	1.00	4.01	23.2	102
	2	1.00	4.96	26.5	101
	3	1.00	4.26	27.9	96.8
	4	1.00	4.31	28.0	101
	5	1.00	4.48	26.1	103
	6	1.00	4.72	29.8	99.3
	平均 S.D.	1.00 0	4.46 0.342	26.9 2.26	100 2.19
4.27	1	1.00	3.60	21.9	101
	2	1.00	4.45	24.9	92.7
	3	1.00	3.89	25.9	89.6
	平均 S.D.	1.00 0	3.98 0.433	24.2 2.07	94.6 6.08
	9.39	1	1.00	3.43	18.2
2		1.00	3.71	20.2	70.1
3		1.00	3.29	19.1	71.7
平均 S.D.		1.00 0	3.47 0.213	19.2 1.01	72.8 3.38
20.7		1	1.00	3.44	17.5
	2	1.00	3.55	19.4	65.2
	3	1.00	3.34	18.9	68.7
	平均 S.D.	1.00 0	3.44 0.105	18.6 0.986	67.3 1.83
	45.5	1	1.00	3.10	15.8
2		1.00	3.03	15.3	56.5
3		1.00	3.19	15.0	59.0
平均 S.D.		1.00 0	3.11 0.0842	15.3 0.407	57.4 1.39
100		1	1.00	2.38	10.1
	2	1.00	2.33	10.5	38.5
	3	1.00	2.49	11.5	41.9
	平均 S.D.	1.00 0	2.40 0.0822	10.7 0.740	40.6 1.83

\*7 前培養液の測定値に基づく値

表4 各濃度における生長阻害率

設定濃度 (mg/L)	No.	生長速度 (0-3日)	阻害率 (%)
対 照 区	1	1.54	-
	2	1.54	-
	3	1.52	-
	4	1.54	-
	5	1.55	-
	6	1.53	-
	平均	1.54	-
4.27	1	1.54	-0.205
	2	1.51	1.72
	3	1.50	2.47
	平均	1.52	1.33
9.39	1	1.45	5.88
	2	1.42	7.81
	3	1.42	7.31
	平均	1.43**	7.00
20.7	1	1.41	8.48
	2	1.39	9.36
	3	1.41	8.23
	平均	1.40**	8.69
45.5	1	1.35	12.4
	2	1.34	12.5
	3	1.36	11.6
	平均	1.35**	12.2
100	1	1.24	19.2
	2	1.22	20.8
	3	1.25	18.9
	平均	1.23**	19.6

\*\* : 1%水準で有意差あり

(有意差検定結果の詳細は表6を参照)

表5 生長速度におけるEC<sub>50</sub>及びNOEC

検出指標	EC <sub>50</sub> (mg/L)	NOEC (mg/L)
生長速度	>100	4.27

表6 有意差検定結果

設定濃度 (mg/L)	検出指標
	生長速度
4.27	—
9.39	**
20.7	**
45.5	**
100	**
検定法	Bartlett法 一元配置分散分析 Dunnettの多重比較法

\*\* : 1%水準で有意差あり

— : 有意差なし

表7 試験の有効性

## &lt;日間変動&gt;

対照群	平均	標準偏差	変動係数(%)	16.4 (平均)
1	1.54	0.19	12.4	
2	1.54	0.18	11.6	
3	1.52	0.32	21.3	
4	1.54	0.30	19.6	
5	1.55	0.20	12.8	
6	1.53	0.32	20.9	

## &lt;繰り返し間の変動&gt;

	0-3day
平均	1.54
標準偏差	0.01
変動係数(%)	0.477

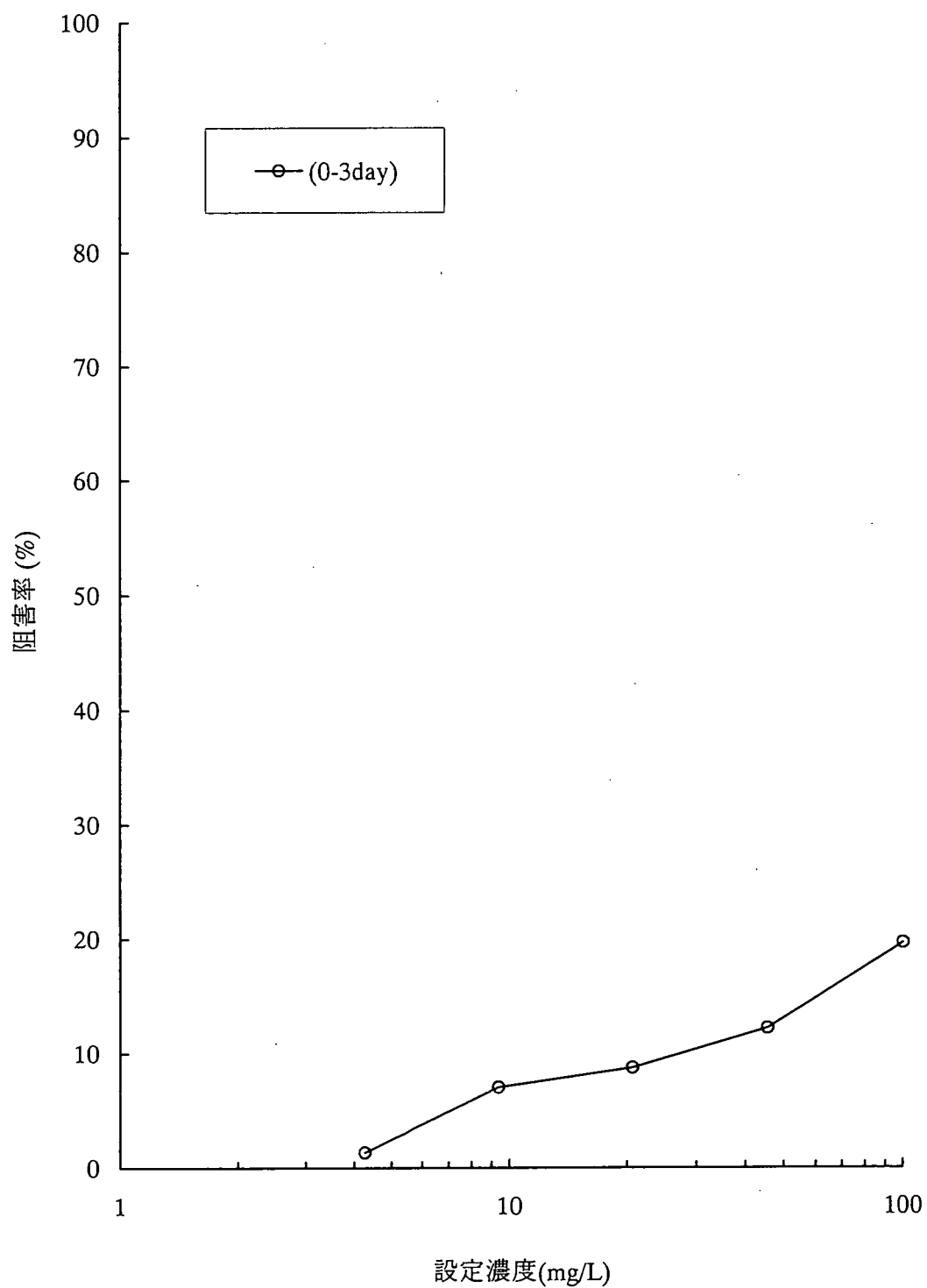


図1 生長速度を指標とした場合の濃度－生長阻害率曲線



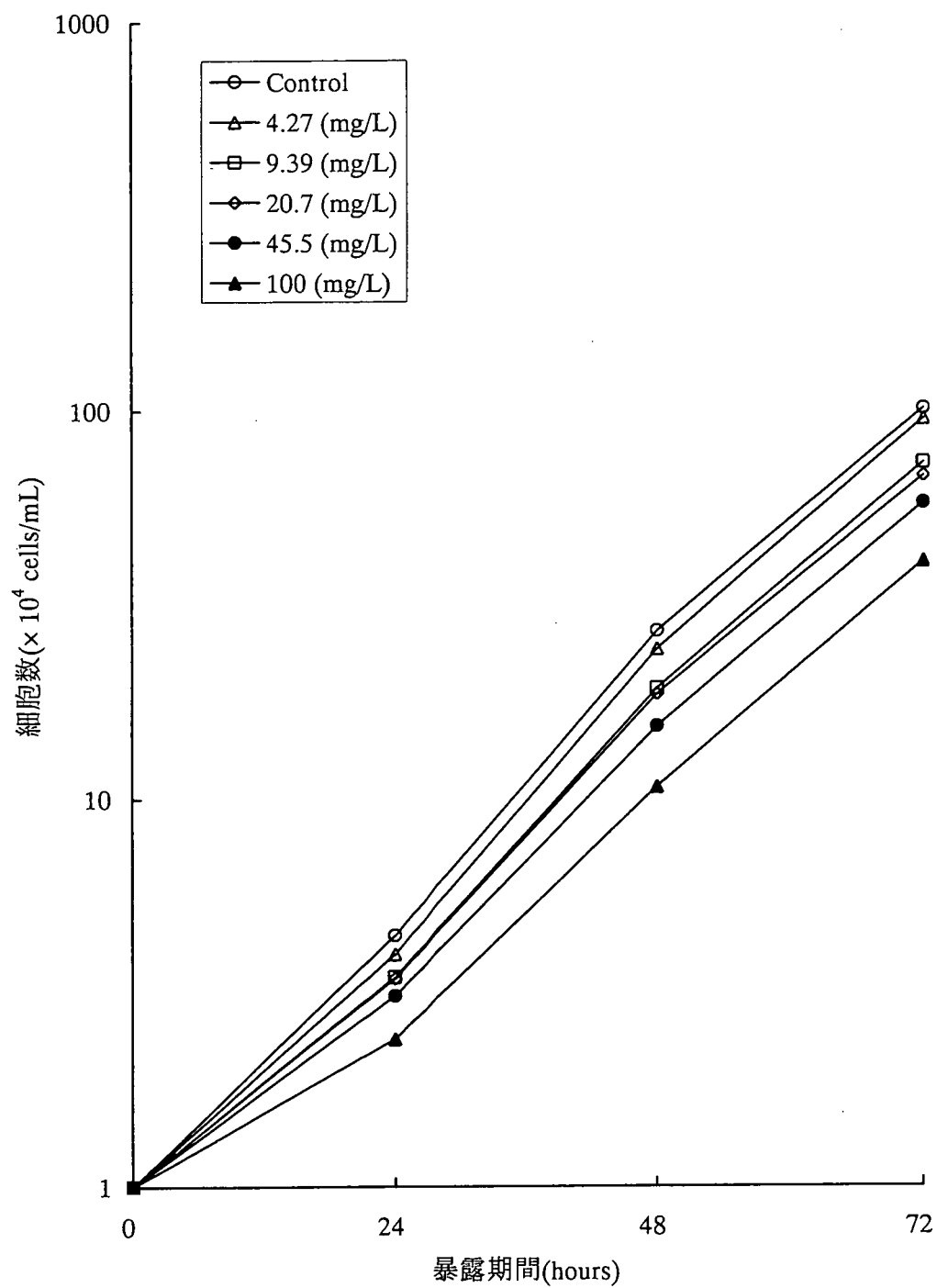


図2 各試験区での生長曲線

## 付属資料1

培地の組成

OECD推奨培地  
[Guideline 201 (23 March 2006) ]

成 分 名	量
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0.185 mg
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0.415 mg
ZnCl <sub>2</sub>	0.003 mg
FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.064 mg
Na <sub>2</sub> EDTA·2H <sub>2</sub> O	0.1 mg
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.0015 mg
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.007 mg
CuCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.00001 mg
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	18 mg
NH <sub>4</sub> Cl	15 mg
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.6 mg
NaHCO <sub>3</sub>	50 mg
MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	12 mg
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	15 mg

上の成分を純水で1Lに定容した。

## 付属資料2

被験物質濃度の分析方法及び測定結果

## 1. 試験液の前処理操作

採取した試験液について、そのまま若しくは培地で適宜希釈して分析試料を調製した。

## 2. 分析方法

前処理操作を行って得られた分析試料は、下記の定量条件に基づき液体クロマトグラフィー—質量分析法（LC-MS）により被験物質の定量を行った。分析試料中の被験物質濃度は、クロマトグラム上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。得られたクロマトグラム（一例）を付属資料3に示す。

### 定量条件

機 器	液体クロマトグラフ—質量分析計
液体クロマトグラフ	島津製作所製 LC-20A Series
質量分析計	サーモエレクトロン製 TSQ Quantum Discovery型

### 液体クロマトグラフ条件

カラム	L-column ODS (15cm×2.1mmI.D., 化学物質評価研究機構製)
カラム温度	40℃
溶離液	A (20%) : 水* / ぎ酸 (1000/0.5 V/V) B (80%) : アセトニトリル / ぎ酸 (1000/0.5 V/V)
流量	0.2mL/min
注入量	1μL

### 質量分析計条件

イオン化法	エレクトロスプレーイオン化法 (ESI)
検出イオン	負イオン
検出法	選択イオンモニタリング (SIM)
測定イオン(m/z)	377
イオンチューブ温度	250℃

\* 水道水を超純水装置システムで処理した水

### 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行った。また、標準溶液の調製は純度（99.4%）補正して行った。

メノウ乳鉢で微細化した供試試料100mg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994mg/Lの被験物質溶液を調製した。これを培地で希釈して4.97mg/Lの標準溶液を調製した。

### 4. 検量線の作成

3.の標準溶液の調製と同様にして0.497、2.49、4.97及び9.94mg/Lの標準溶液を調製した。これらを2.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被験物質濃度により検量線を作成し、定量性を確認した。作成した検量線を付属資料3に示す。なお、試験液中の被験物質の定量下限値は、定量性が確認された範囲内での最小の標準溶液濃度（0.497mg/L）とした。

## 5. 測定結果

試験液中の被験物質濃度の測定結果を以下の表に示す。

付表2-1 試験液中の被験物質濃度

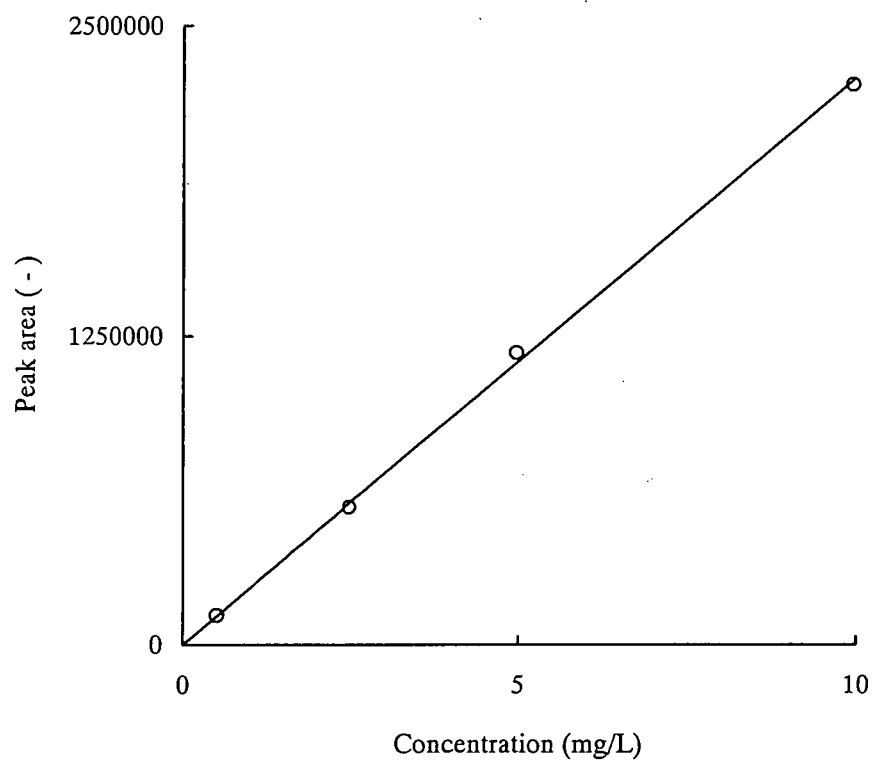
設定濃度 (mg/L)	測定濃度 (mg/L) (対設定濃度 %)		
	暴露開始時	暴露終了時	幾何平均値
対照区	n.d.	n.d.	—
4.27	4.03 (94.5)	3.85 (90.1)	3.94 (92.3)
9.39	8.50 (90.5)	8.67 (92.3)	8.58 (91.4)
20.7	20.1 (96.9)	19.7 (95.3)	19.9 (96.1)
45.5	44.0 (96.7)	43.6 (95.9)	43.8 (96.3)
100	99.2 (99.2)	95.5 (95.5)	97.4 (97.4)

n.d. : <0.497mg/L

## 付属資料3

検量線及びクロマトグラム





$$y = 229396x$$

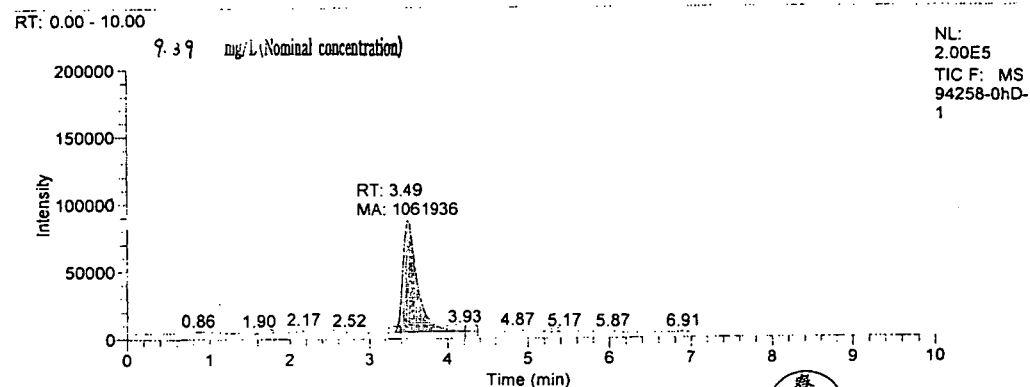
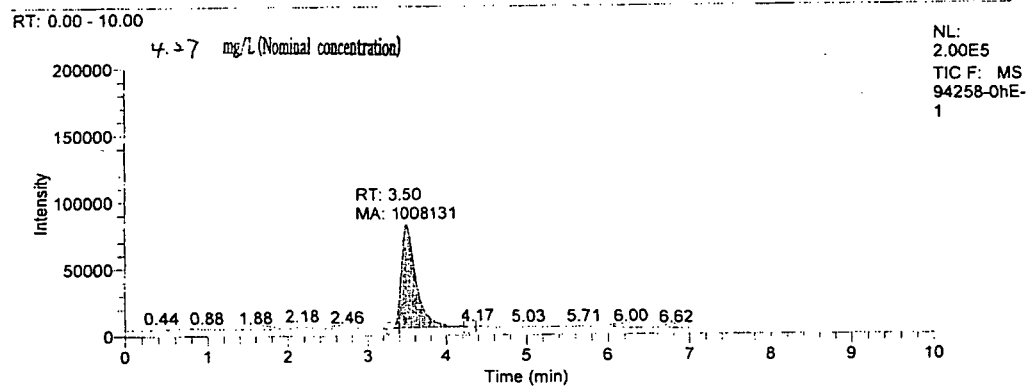
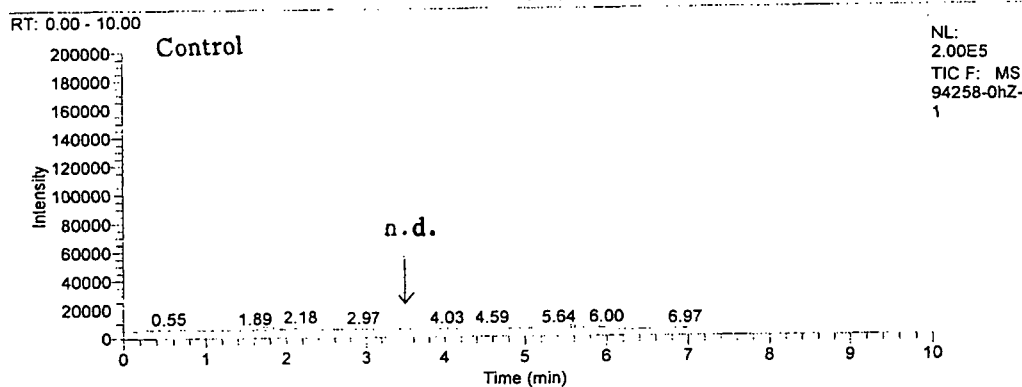
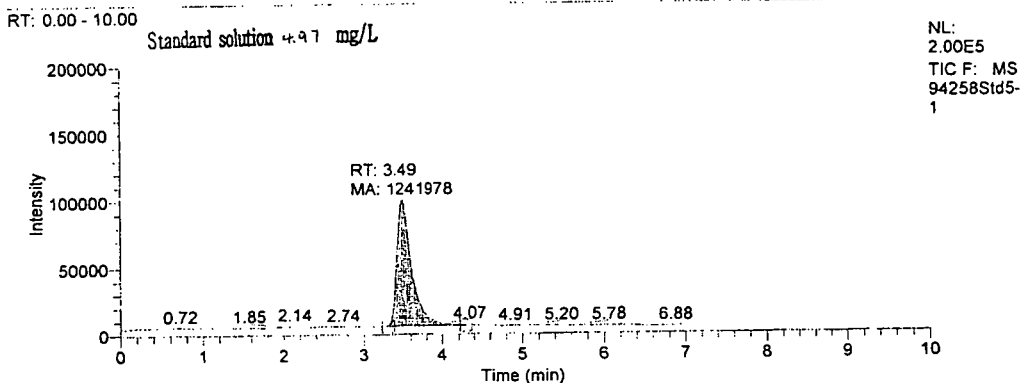
$$r = 1.00$$

Concentration (mg/L)	Peak area (-)
0.497	118452
2.49	555237
4.97	1181800
9.94	2263124

付図3-1 13F-AcOHのLC-MSによる検量線

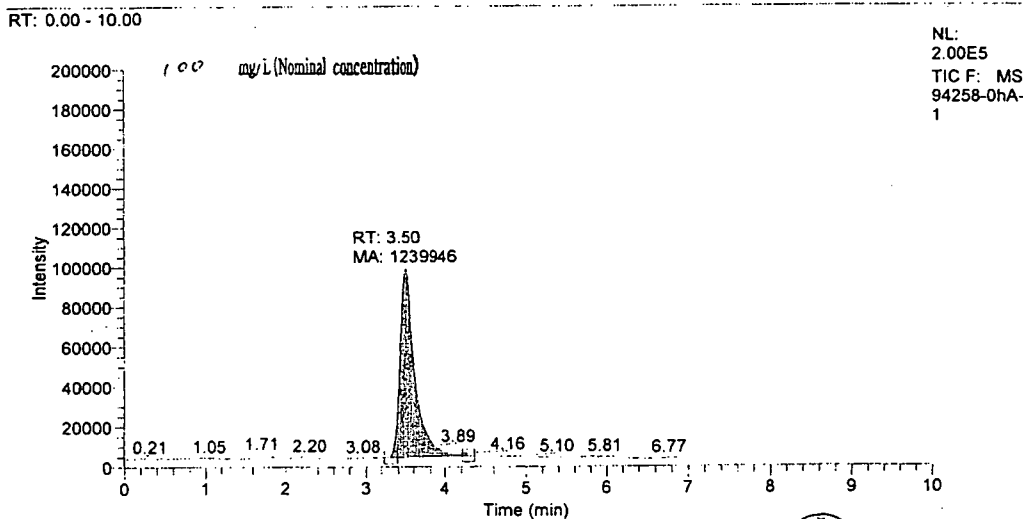
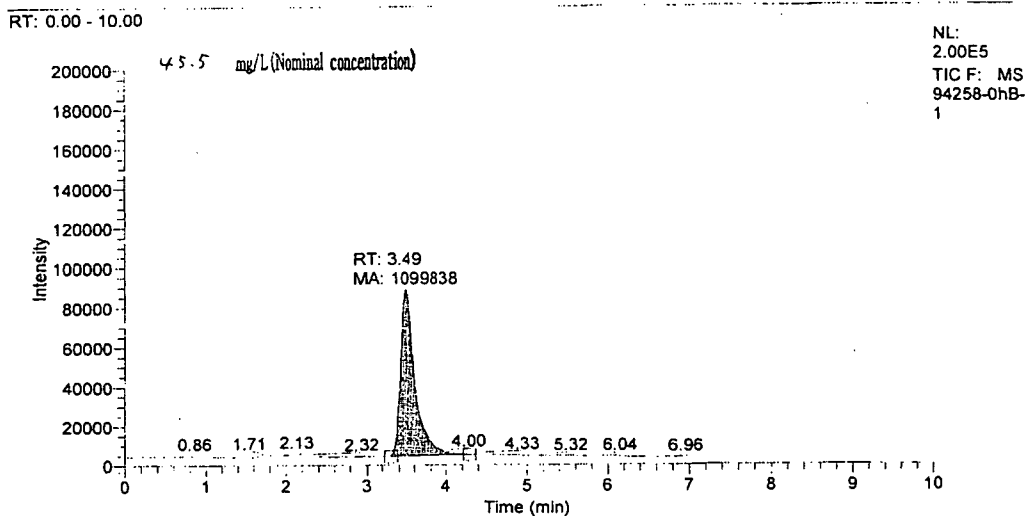
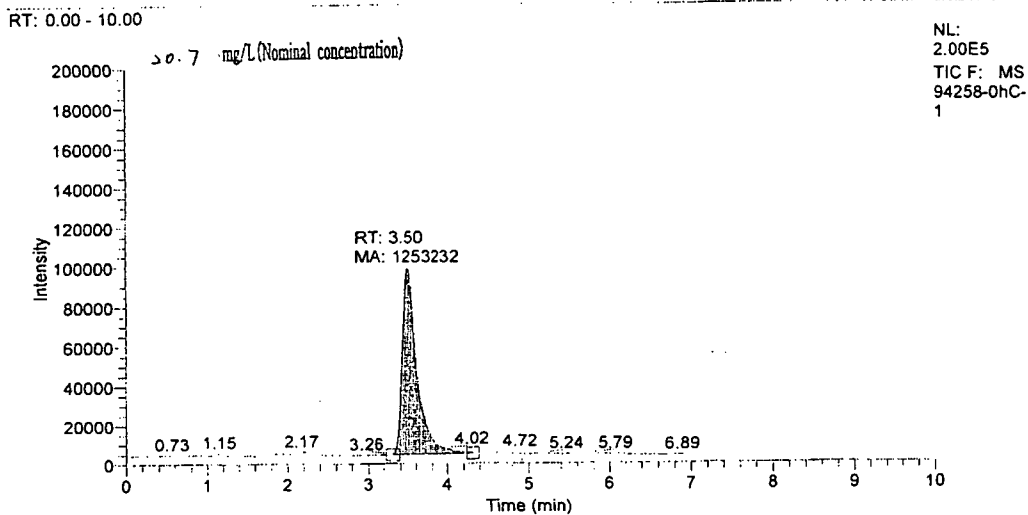
吉川  
07.4.21  
真弓

94258

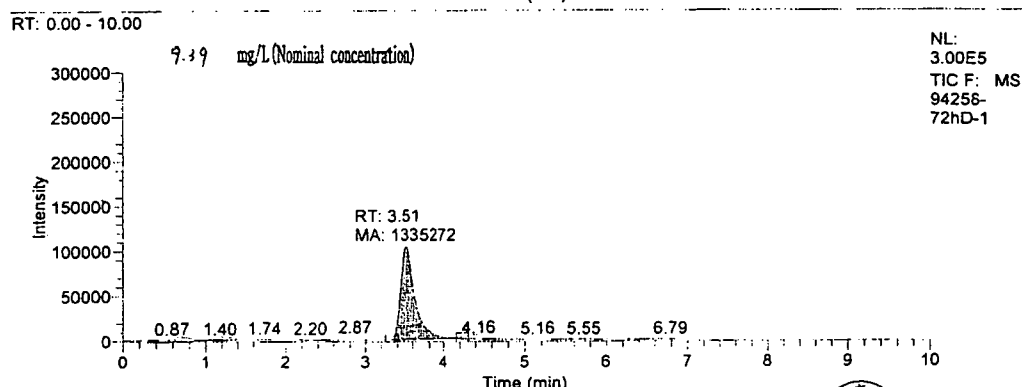
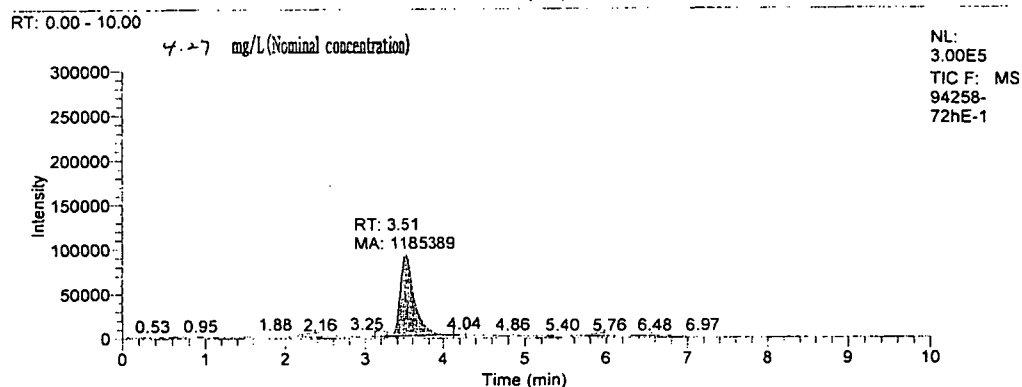
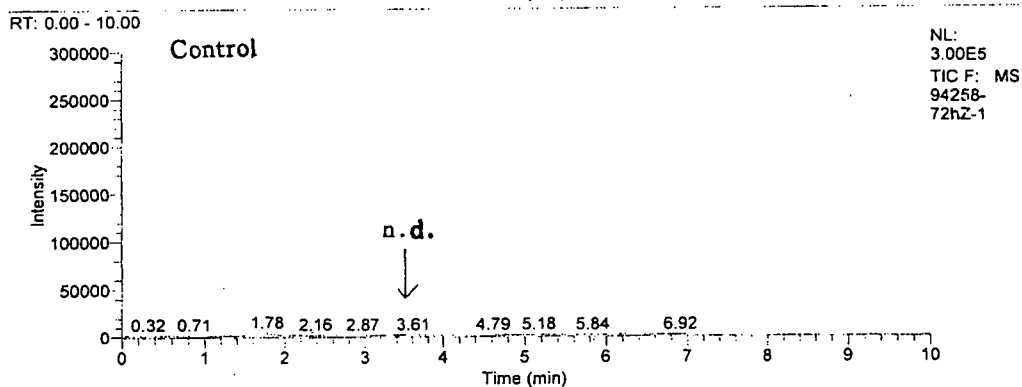
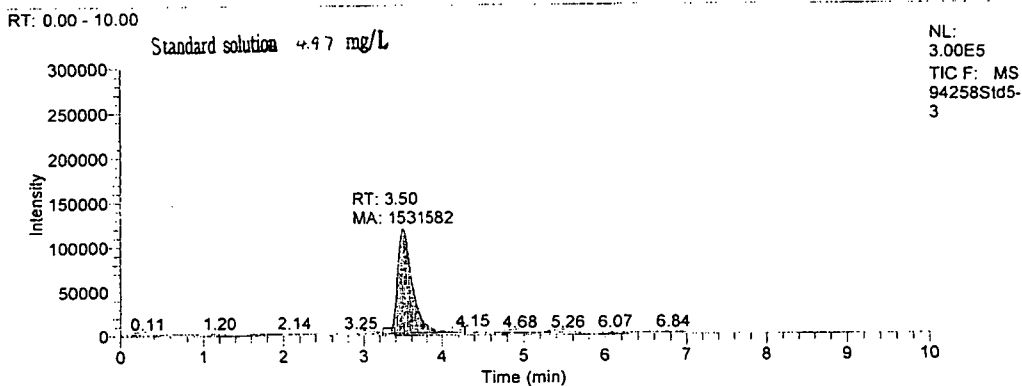


春  
07.4.23  
口

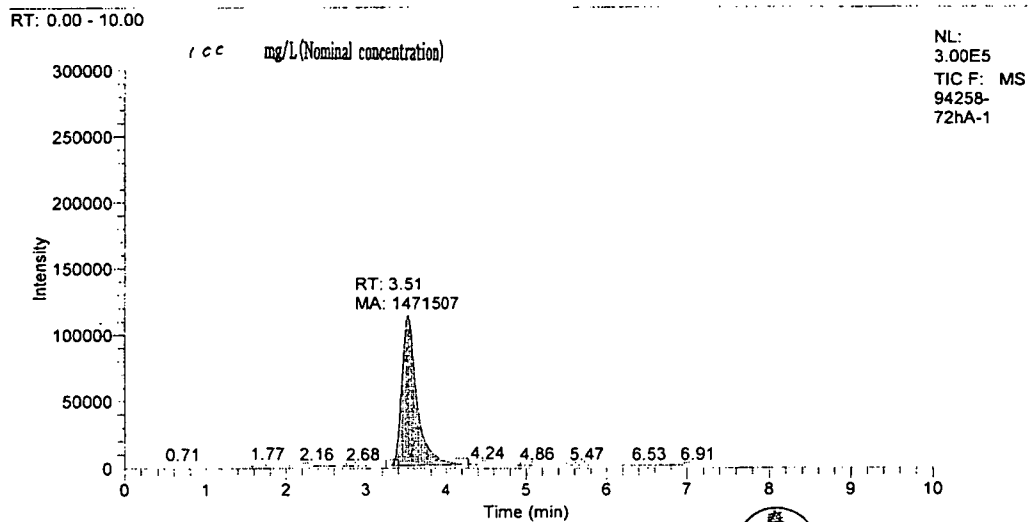
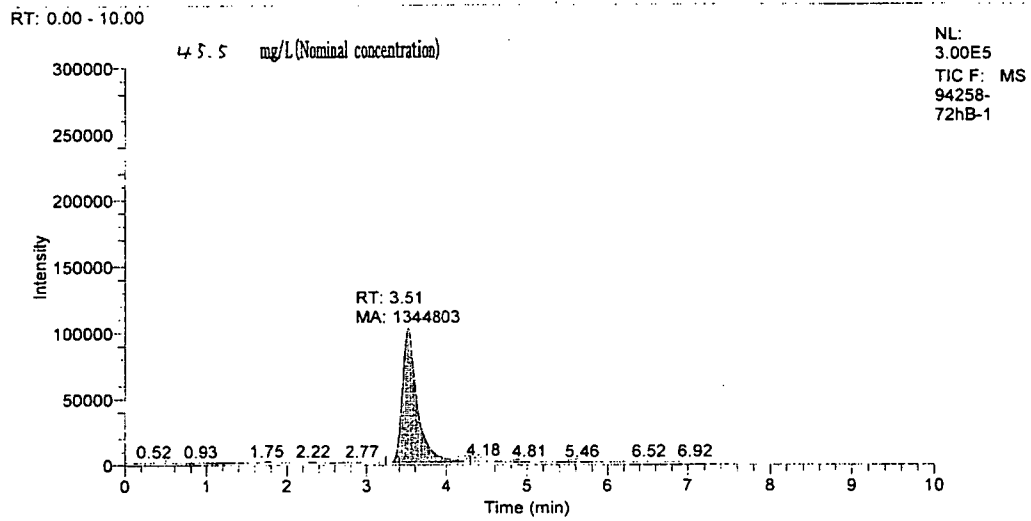
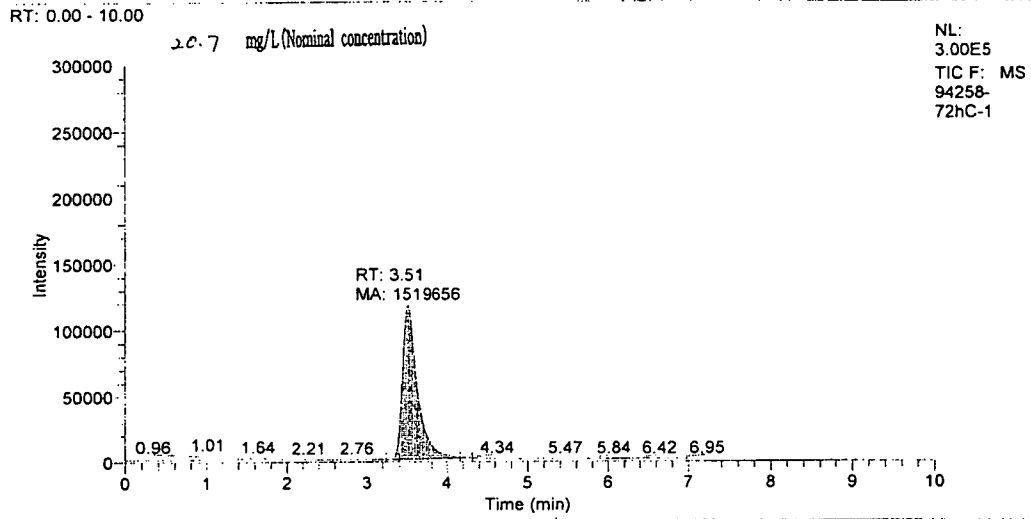
付図3-2-1 試験液のLC-MSクロマトグラム (暴露開始時)



付図3-2-2 試験液のLC-MSクロマトグラム (暴露開始時)



付図3-3-1 試験液のLC-MSクロマトグラム (暴露終了時)



付図3-3-2 試験液のLC-MSクロマトグラム (暴露終了時)

別添資料

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が 100mg/L 以下であることが予想されたため、溶解度測定を検討を行った。結果を以下に示す。

### 1) 検 討

#### (1) 内 容

供試試料と培地を 100mg/L になるように混合後、室温で 1 時間及び 3 時間攪拌して、被験物質の溶解性を確認した。

#### (2) 結 果

ガラス繊維フィルター（ADVANTEC 製 GB-140 孔径 0.4 $\mu$ m）による吸引ろ過を行った後、被験物質分析を行った。その結果、被験物質濃度は 1 時間攪拌では 96.0mg/L、3 時間攪拌では 103mg/L であった。

\* フィルター吸着がないことを確認している。

### 2) 被験物質の培地への溶解度検討結果のまとめ

被験物質の培地への溶解度は 100mg/L 以上と判断されたため、本試験では溶解度測定は実施しないこととした。

## 2. 試験生物への影響

### 1) 予備試験1

#### (1) 内 容

試験法の上限濃度(100 mg/L)になるように、供試試料と培地を混合し、約48時間攪拌して被験物質分散懸濁液を調製し、生物を暴露して影響を確認した。

#### (2) 結 果

設定濃度 (mg/L)	生長阻害率 (%)
	生長速度 (0-3d)
100 (分散懸濁液)	5.92

連 数：2連／濃度区

測 定 法：クロロフィル蛍光測定法

分散懸濁液において若干の影響が認められた。

## 2) 予備試験2

## (1) 内 容

予備試験1において若干の影響が確認されたことより、不溶物による物理的影響を排除した試験系で被験物質の生物への影響を確認するため、予備試験1と同様な方法で調製した被験物質分散懸濁液（ただし、攪拌時間は約1時間）をガラス繊維フィルター（ADVANTEC製 GB-140 孔径0.4 $\mu$ m）で吸引ろ過したろ液を適宜培地で希釈して試験液を調製し、生物を暴露して影響を確認した。また、同時に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。

## (2) 結 果

設定濃度区 (mg/L)	生長阻害率(%)
	生長速度(0-3d)
10.0	1.45
30.0	6.10
100	20.9

連 数：2連/10.0、30.0mg/L区及び対照区、1連/100mg/L区

測 定 法：細胞計数法

試験法の上限濃度である100mg/Lで20%の阻害が認められた。10.0mg/L付近では無影響と考えられた。



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
10.0	10.0 (100)	9.76 (97.6)
10.0 (藻体なし)		9.82 (98.2)
100	103 (103)	99.2 (99.2)

暴露開始時及び終了時における試験液中の被験物質濃度はいずれもほぼ設定濃度付近であり、藻体への被験物質の取り込み等による濃度低下も認められなかった。これより被験物質濃度は暴露期間中、安定に維持されると推察された。

### 3) 試験生物への影響（予備試験結果）のまとめ

試験法の上限濃度である 100mg/L 区においては 20%程度の阻害がみられた。10.0 区付近ではほぼ無影響と思われるが僅かに影響がみられる可能性もあった。試験液中の被験物質濃度は暴露期間中、安定に維持されると推察された。

## 3. 本試験の実施

### 1) 培地への溶解度測定

被験物質の培地への溶解度は 100mg/L 以上と判断されたため、本試験では培地への溶解度は測定しなかった。

### 2) 本試験

予備試験結果から、本試験は100、45.5、20.7、9.39及び4.27mg/L（公比2.2）の5濃度区及び対照区で実施した。試験濃度は純度（99.4%）補正を行った値で表示した。試験液は、100mg/Lになるように供試試料と培地を混合し、約1時間攪拌した後、ガラス繊維フィルターで吸引ろ過して試験原液（100mg/L）を調製し、培地で適宜希釈して調製した。試験液中の被験物質濃度の測定は暴露開始時及び終了時に行った。