CERI

受付番号	662-06-E-4226
試験番号	94226

最 終 報 告 書

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

2007 年 7 月 25 日

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。
財団法人 化学物質評価研究機構 久留米事業所
2007 年 7 月 25 日
試験責任者

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-SFMAの*Pseudokirchneriella subcapitata*による藻類生長阻害試験

試 験 番 号　　94226

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 7 月 25 日

試 験 責 任 者

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-SFMAの*Pseudokirchneriella subcapitata*による藻類生長阻害試験

試験番号　　94226

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 6 月 15 日	2007 年 6 月 15 日
試験計画書	2007 年 6 月 18 日	2007 年 6 月 18 日
試験計画書の変更	2007 年 6 月 25 日	2007 年 6 月 25 日
溶解度測定	2007 年 6 月 19 日	2007 年 6 月 22 日
	2007 年 6 月 20 日	2007 年 6 月 22 日
暴露開始時、暴露開始後	2007 年 6 月 28 日	2007 年 7 月 2 日
	2007 年 6 月 29 日	2007 年 7 月 2 日
	2007 年 7 月 2 日	2007 年 7 月 2 日
生データ、最終報告書草案	2007 年 7 月 25 日	2007 年 7 月 25 日
最終報告書	2007 年 7 月 25 日	2007 年 7 月 25 日

2007 年 7 月 25 日

信頼性保証部門責任者

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 …… 6
2. 供 試 試 料 …… 7
3. 試験材料と方法 …… 8
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 …… 15
6. 試験計画書から逸脱した事項 …… 15

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　濃度区における生長阻害率
表5　生長速度におけるEC_{50}及びNOEC
表6　有意差検定結果
表7　試験の有効性
図1　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　被験物質及び13F-EtOH（加水分解物）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
付属資料4　培地への溶解度
別添資料1　予備試験結果
別添資料2　本試験不採用結果

表　　題	13F-SFMAの*Pseudokirchneriella subcapitata*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-SFMA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及びガイダンス文書に従って行った。 (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)" (3)「OECD Guidance Document 23 "Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures"」(September 2000)
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6月18日
実験開始日	2007年6月19日
溶解度測定開始日	2007年6月19日
生物暴露開始日	2007年6月29日
実験終了日	2007年7月2日
溶解度測定終了日	2007年6月20日
生物暴露終了日	2007年7月2日
試験終了日	2007年7月25日

試資料の保管

(1) 被験物質

供試試料*1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94226、94227及び94228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

生物試験担当者

分析試験担当者

最終報告書の承認

2007年 7月25日

試 験 責 任 者

要　　約

試験の表題

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

試験条件

(1) 被験物質	13F-SFMA
(2) 試験生物	*Pseudokirchneriella subcapitata*
(3) 暴露期間	72時間
(4) 試験濃度	被験物質飽和液（設定添加濃度：約100mg/L）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、密閉状態で約24時間撹拌後、約1時間静置し、中層を採取して被験物質飽和液を調製
(7) 連数	6連／試験区
(8) 試験液量	600mL／試験区（100mL／試験容器　別途分析用試験容器を2容器設けた。）
(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^2/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及び13F-EtOH（加水分解物）の分析	GC法（暴露開始時、暴露開始後24時間、48時間及び暴露終了時）

試験結果

(1) 培地への溶解度（23±1℃）	0.0646mg/L	
(2) 試験液中の被験物質濃度（対暴露開始時）	暴露開始時	0.0473mg/L
	暴露開始後24時間	0.0105mg/L（22.1%）
	暴露開始後48時間	0.0113mg/L（23.9%）
	暴露終了時	0.00720mg/L（15.2%）
(3) 試験液中の13F-EtOH濃度	暴露開始時	＜0.00593mg/L
	暴露開始後24時間	＜0.00593mg/L
	暴露開始後48時間	＜0.00593mg/L
	暴露終了時	＜0.00593mg/L
		（定量下限値未満）
(4) EC_{50}（E_rC_{50}）	＞0.0130mg/L	
(5) NOEC（生長速度0-3d）	≧0.0130mg/L	

［(4)及び(5)は測定された被験物質濃度の幾何平均値に基づく値］

結　　論

本試験は、被験物質の培地への溶解度付近における試験生物への影響の有無を確認するための限度試験として実施した。試験液調製時の被験物質濃度は培地への溶解度（0.0646mg/L）に対してやや低い値（0.0473mg/L）を示したが、70%以上の値であり、調製時における試験液の被験物質濃度はほぼ溶解度付近であったと判断される。被験物質は、暴露期間中、顕著な濃度低下が認められたが、揮発性物質の藻類生長阻害試験における限界性（試験容器中のヘッドスペースへの揮発）と推測される。上記の本試験条件下で試験生物に何ら影響はみられなかったことから、被験物質は溶解度付近の濃度において試験生物に対して急性的な影響を及ぼさないと判断される。一方、暴露期間中、被験物質の加水分解物（13F-EtOH）は検出されず、加水分解物による影響はなかったと判断される。

1. 被験物質

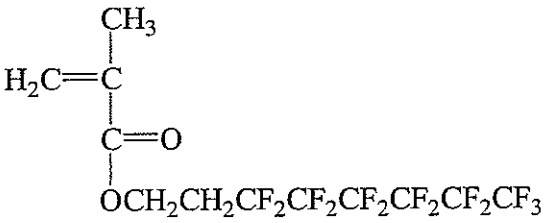
本最終報告書において13F-SFMAは、次の名称等を有するものとする。

1.1 名　　称[*2]

3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,8-トリデカフルオロオクチル=メタクリラート

1.2 構造式等[*2]

構造式



分子式　　$C_{12}H_9F_{13}O_2$

分子量　　432.18

CAS番号　　2144-53-8

*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	6Y002

2.2 純度*2

被験物質	99.8%
不純物	不明成分　0.2%

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	無色透明液体	
沸点	92℃（8mmHg）	
密度	1.496g/cm^3（25℃）	
溶解度	水	不溶
	ジメチルスルホキシド	可溶（任意に混合）
	アセトン	可溶（任意に混合）

*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	室温暗所保存
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実施(2007年5月21日～5月24日)した試験生物による二クロム酸カリウム(和光純薬工業製　試薬特級）のE_rC_{50}（0-3d）は0.900mg/Lであった。この値は久留米事業所での同指標における過去3件分のバックグラウンドデータの規定範囲内（平均±2×標準偏差：0.698～1.08mg/L）であった［平均±標準偏差は0.891±0.097mg/L（n=3）］。

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（密閉容器）

(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

予備試験の結果から培地への溶解度付近で試験生物に対して無影響と予測されたため、本試験では約24時間撹拌して調製した被験物質飽和液（設定添加濃度：約100mg/L）のみの限度試験で行った。予備試験結果を別添資料1に示す。

(d) 対照群

被験物質を含まない培地に試験液と同様の調製処理（ただし中層からの採水は実施しない）をした対照区を設けた。

(e) 連　　数

6連／試験区

(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5×10^3cells/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／試験区（100mL／試験容器　別途分析用試験容器を2容器設けた。）

(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60～120μE/m^2/s（変動幅±20%）の連続照明とした。

3.5　試験液の調製法

調製時に純度補正は行わなかった。また、供試試料は密度［1.496g/cm^3（25℃）］を用いて容量による添加を行った。

約100mg/L（設定）になるように調製容器にて供試試料と培地を混合し、ヘッドスペースがほとんど無い密閉状態でマグネティックスターラーにより約24時間撹拌後、約1時間静置し、中層を採取して被験物質飽和液を調製し、各試験容器に分割した。

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、各試験区における試験液のバックグラウンドを測定するため、別途バックグラウンド測定用に調製した試験容器（藻体なし）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

予備試験結果より経時的な測定が必要と考えられたことから、試験液中の被験物質濃度の測定は暴露開始時、暴露開始後24時間、48時間及び暴露終了時に行った。また、被験物質は加水分解により2-（ペルフルオロヘキシル）エタノール（略称13F-EtOH, 試験番号94232～94234の被験物質）を生成するため、被験物質の濃度測定と同時に13F-EtOH濃度の測定を行った。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用いた。暴露開始後24時間及び48時間の測定用試験液は分析用試験容器（100mL）からそれぞれ全量用いた。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たものを用いた。被験物質及び13F-EtOH（加水分解物）濃度の分析はガスクロマトグラフィー（GC）により行った。被験物質及び13F-EtOH（加水分解物）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未満と予想されたため、本試験では培地への溶解度を測定した。溶解度測定の詳細及び測定結果を付属資料4に示す。

3.7　結果の算出

結果の算出には測定濃度の幾何平均値を用いた。

(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。

$$\mu_{i\text{-}j}=\frac{lnN_j - lnN_i}{t_j - t_i}$$

ここで

μ_{i-j} ＝ t_i 時からt_j 時までの期間の生長速度。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_{50}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。

濃度区における阻害百分率（I_μ）は対照群の平均生長速度（μ_c）と濃度区での生長速度（μ_t）との間の差として次のように計算した。

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

(2) EC_{50}[*3]の算出法

本試験濃度で50%以上の阻害率が得られなかったため、EC_{50}は「＞試験濃度」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。

*3 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[*4]）の算出

生長速度について、F検定による等分散検定を行った後、濃度区と対照区との有意差の有無をStudentのt検定により求めた。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。

*4 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

設定濃度と測定濃度の幾何平均値の対比表を以下に示す。

設定添加濃度（mg/L）	測定濃度の幾何平均値（mg/L）
100	0.0130

以下の本文中の濃度区表示は測定濃度の幾何平均値で示す。

4.1　試験液の観察と測定結果

(1) 試験液の状態

0.0130mg/L区及び対照群ともに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7.8、暴露終了時では9.8及び10.1であった。対照群のpHの変動幅が試験法の規定（通常の場合、1.5以上変動してはならない）を超えていた。培養装置内の温度は23.0～23.6℃、光強度は88～103$\mu E/m^2/s$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、暴露開始時は0.0473mg/L、暴露開始後24時間は0.0105mg/L、48時間は0.0113mg/L、暴露終了時は0.00720mg/Lであり、開始時に対してそれぞれ22.1、23.9、15.2%であった。また、暴露期間中、13F-EtOHは検出されなかった。被験物質濃度の測定結果を付属資料2に示す。

4.2 EC_{50}

生長速度によって算出した13F-SFMAのEC_{50}（E_rC_{50}）は＞0.0130mg/Lであった。各時間での細胞数を表3、生長阻害率を表4、EC_{50}を表5に示す。

4.3 各試験区での生長曲線、細胞観察結果及びNOEC

0.0130mg/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。対照群において異常は観察されなかった。0.0130mg/L区では対照群と同様であった。

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≧0.0130mg/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1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65.6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20.9%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0.951%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、被験物質の培地への溶解度付近における試験生物への影響の有無を確認するための限度試験として実施した。試験液調製時の被験物質濃度は培地への溶解度（0.0646mg/L）に対してやや低い値（0.0473mg/L）を示したが、70%以上の値であり、調製時における試験液の被験物質濃度はほぼ溶解度付近であったと判断される。被験物質は、暴露期間中、顕著な濃度低下が認められたが、揮発性物質の藻類生長阻害試験における限界性（試験容器中のヘッドスペースへの揮発）と推測される。上記の本試験条件下で試験生物に何ら影響はみられなかったことから、被験物質は溶解度付近の濃度において試験生物に対して急性的な影響を及ぼさないと判断される。一方、暴露期間中、被験物質の加水分解物（13F-EtOH）は検出されず、加水分解物による影響はなかったと判断される。

試験環境条件に関しては、対照群のpHの変動幅が試験法の規定を超える上昇が認められた。これは、揮発性物質の藻類生長阻害試験における限界性（密閉系の試験容器のため外部とのガス交換が不可能）と判断される。pH以外の試験環境条件は適切な範囲内であり、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。

6. 試験計画書から逸脱した事項

当該事項はなかった。

表1　暴露開始時と終了時の試験液のpH

測定濃度*5 (mg/L)	pH	
	開始時	終了時
対　照　区	7.8	10.1
0.0130	7.8	9.8

*5　測定濃度の幾何平均値（以下測定濃度と表示する。）

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（℃）	23.3	23.5	23.6	23.0
光　強　度（$\mu E/m^2/s$）	103	88	102	102

表3　各時間での細胞数

測定濃度 (mg/L)	No.	細　胞　数（×10^4cells/mL）			
		開始時*6	24時間	48時間	72時間
対照区	1	0.500	1.53	8.57	36.8
	2	0.500	1.57	8.09	35.3
	3	0.500	1.51	7.96	34.6
	4	0.500	1.55	8.48	36.2
	5	0.500	1.45	8.20	34.9
	6	0.500	1.41	7.45	32.8
	平均	0.500	1.50	8.13	35.1
	S.D.	0	0.0593	0.403	1.40
0.0130	1	0.500	1.71	7.89	34.9
	2	0.500	1.74	7.76	33.6
	3	0.500	1.85	7.49	35.6
	4	0.500	1.72	7.85	37.1
	5	0.500	1.76	8.03	36.3
	6	0.500	1.67	7.83	35.5
	平均	0.500	1.74	7.81	35.5
	S.D.	0	0.0604	0.181	1.19

*6　前培養液の測定値に基づく値

表4　濃度区における生長阻害率

測定濃度 (mg/L)	No.	生長速度 (0-3日)	阻害率 (%)
対照区	1	1.43	-
	2	1.42	-
	3	1.41	-
	4	1.43	-
	5	1.41	-
	6	1.39	-
	平均	1.42	-
0.0130	1	1.41	0.158
	2	1.40	1.02
	3	1.42	-0.370
	4	1.44	-1.29
	5	1.43	-0.773
	6	1.42	-0.265
	平均	1.42	-0.254

(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_{50}及びNOEC

検出指標	EC_{50} (mg/L)	NOEC (mg/L)
生長速度	＞0.0130	≧0.0130

表6　有意差検定結果

測定濃度 (mg/L)	検　出　指　標 生　長　速　度
0.0130	n.s.
検定法	*F*検定 Studentの*t*検定

n.s.：有意差なし

表7　試験の有効性

日間変動

対照群	平均	標準偏差	変動係数（%）	
1	1.43	0.30	21.2	20.9 （平均）
2	1.42	0.25	17.9	
3	1.41	0.28	19.9	
4	1.43	0.28	19.8	
5	1.41	0.33	23.5	
6	1.39	0.32	22.9	

繰り返し間の変動

	0-3day
平均	1.42
標準偏差	0.01
変動係数（%）	0.951

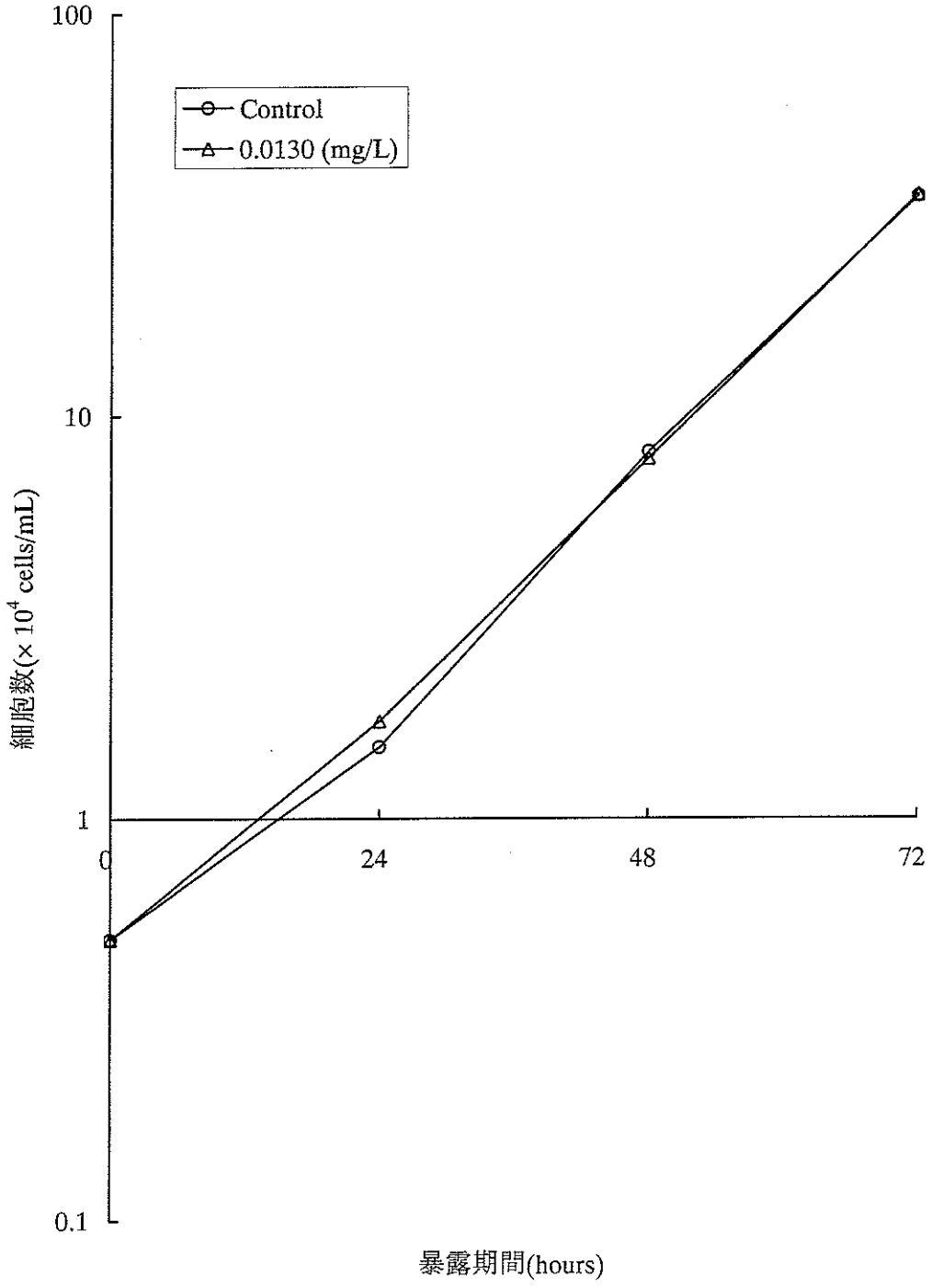


図1　各試験区での生長曲線

付属資料1

培地の組成

OECD培地
［Guideline 201（23 March 2006）］

成　分　名	量	
H_3BO_3	0.185	mg
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	0.415	mg
$ZnCl_2$	0.003	mg
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	0.064	mg
$Na_2EDTA \cdot 2H_2O$	0.1	mg
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0.0015	mg
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0.007	mg
$CuCl_2 \cdot 2H_2O$	0.00001	mg
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	18	mg
NH_4Cl	15	mg
KH_2PO_4	1.6	mg
$NaHCO_3$	50	mg
$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	12	mg
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	15	mg

上の成分を純水で1Lに定容した。

付属資料2

被験物質及び13F-EtOH（加水分解物）濃度の分析方法及び測定結果

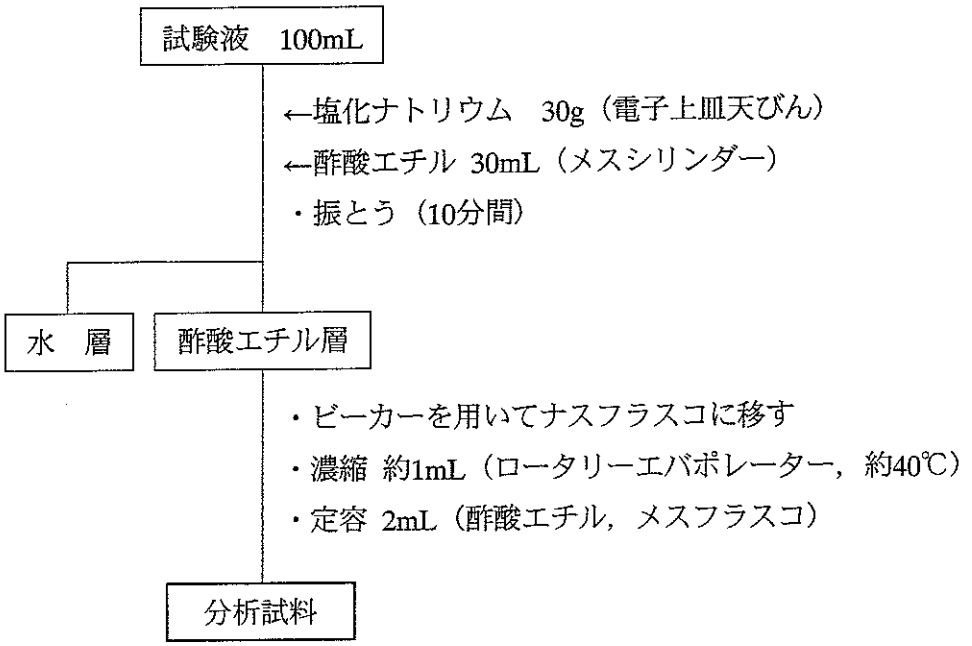
1. 試験液の分析

予備検討の結果より、暴露期間中に被験物質の加水分解生成物である13F-EtOHが生成するため、試験液の分析は、被験物質及び13F-EtOHについて実施した。

2. 試験液の前処理操作

採取した試験液について、以下のフロースキームにより前処理操作を行い、分析試料を調製した。

フロースキーム



3. 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ガスクロマトグラフィー（GC）により被験物質及び13F-EtOH（加水分解物）の定量を行った。分析試料中の被験物質及び13F-EtOH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。なお、被験物質及び13F-EtOH濃度が検量線の範囲を超えたものについては、その範囲に入るように希釈し分析した。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	ガスクロマトグラフ
	Hewlett Packard製　HP 6890 Series GC System
自動試料導入装置	Hewlett Packard製　HP6890 Series
検　出　器	水素炎イオン化検出器（FID）
カ　ラ　ム	DB-WAX　膜厚 0.50μm　（Agilent Technologies製）
	30m×0.32mmI.D.　フューズドシリカ製
カラム温度	40℃（5min）$\xrightarrow{①}$ 150℃（0min）$\xrightarrow{②}$ 240℃（2min）
昇温速度	①15℃/min　②50℃/min
試料導入部温度	200℃
キャリアガス	ヘリウム
カラム流量	1.8mL/min
水　　素	40.0mL/min
空　　気	400mL/min
注　入　量	2μL
導入モード	スプリットレス
パージ流量	20.0mL/min
パージ時間	0.50min
検　出　器	
温　　度	240℃
感　　度	レンジ2^0

4. 標準溶液の調製

分析試料中の被験物質及び13F-EtOH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、標準溶液の調製はそれぞれ被験物質純度（99.8%）及び13F-EtOH純度（99.8%）で補正して行った。

供試試料100.2mgを電子分析天びんで正確にはかりとり、酢酸エチルに溶解して1000mg/Lの被験物質溶液を調製した。また、13F-EtOH分析用標品（試験番号94232～94234の供試試料）100.2mgを電子分析天びんで正確にはかりとり、酢酸エチルに溶解して1000mg/Lの13F-EtOH溶液を調製した。被験物質溶液を酢酸エチルで希釈する際に13F-EtOH溶液を添加し、被験物質及び13F-EtOH濃度がそれぞれ25.0mg/Lになるように被験物質及び13F-EtOH溶液を調製した。これを酢酸エチルで希釈して被験物質及び13F-EtOH濃度2.50mg/Lの標準溶液を調製した。

5. 検量線の作成

4.の標準溶液の調製と同様にして被験物質及び13F-EtOH濃度0.250、1.25、2.50及び5.00mg/Lの標準溶液を調製した。これらを3.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または13F-EtOH濃度によりそれぞれ検量線を作成し、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、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（0.250mg/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0.00590mg/Lとした。また、13F-EtOH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（0.250mg/L）とした。よって、試験液中の13F-EtOHの定量下限値は前処理操作を考慮し0.00593mg/Lとした。

6. 回収試験及びブランク試験

6.1 方　　法

2.の試験液の前処理操作における被験物質の回収率を求めるため、培地に被験物質溶液(アセトンで調製)を添加し、事前に回収試験を行った。また、同様に13F-EtOHの回収率を求めるため、培地に13F-EtOH溶液（アセトンで調製）を添加し、事前に回収試験を行った。さらに、被験物質及び13F-EtOHを加えない培地（アセトンを添加）について、回収試験と同じ操作により事前にブランク試験を行った。回収試験及びブランク試験は、2点について実施した。

被験物質添加量　5.00μg、13F-EtOH添加量　5.00μg

6.2 結　　果

6.1の方法により測定した結果、ブランク試験においてクロマトグラム上の被験物質及び13F-EtOH位置にはピークは認められなかった。分析操作における各2点の回収率及び平均回収率は下記に示すとおりであり、平均回収率を分析試料中の被験物質及び13F-EtOH濃度を求める場合の補正値とした。

分析操作における回収率

83.0%　86.6%　平均　84.8%

分析操作における13F-EtOHの回収率

82.0%　86.7%　平均　84.3%

7. 測 定 結 果

試験液中の被験物質及び13F-EtOH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

設定添加濃度 (mg/L)	被験物質測定濃度（mg/L） (対開始時濃度%)				
	暴露開始時	24時間	48時間	暴露終了時	幾何平均値
対照区	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
100	0.0473	0.0105 (22.1)	0.0113 (23.9)	0.00720 (15.2)	0.0130

n.d. : ＜0.00590mg/L

付表2-2　試験液中の13F-EtOH濃度

設定添加濃度 (mg/L)	13F-EtOH測定濃度（mg/L） (対開始時濃度%)			
	暴露開始時	24時間	48時間	暴露終了時
対照区	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
100	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

n.d. : ＜0.00593mg/L

幾何平均値は以下の式によって算出される。

$$\text{antilog}\left(\frac{1}{2(t_n - t_1)}\sum_{i=1}^{n-1}\left[\left(\log(conc_i) + \log(conc_{i+1})\right)\cdot(t_{i+1} - t_i)\right]\right)$$

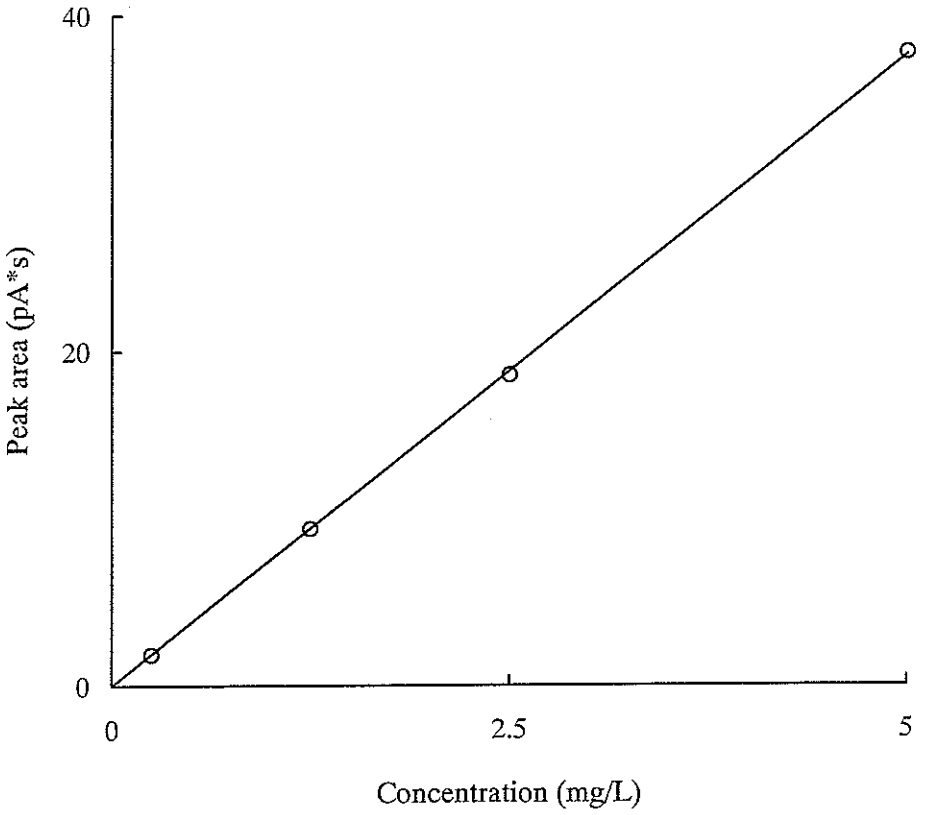
ここで

t_1 = 暴露開始時< t_2<･･･t_n = 暴露終了時

$conc_1$ = 暴露開始時濃度, $conc_2$,･･･, $conc_n$ = 暴露終了時濃度

付属資料3

検量線及びクロマトグラム



y = 7.51x
r = 1.00

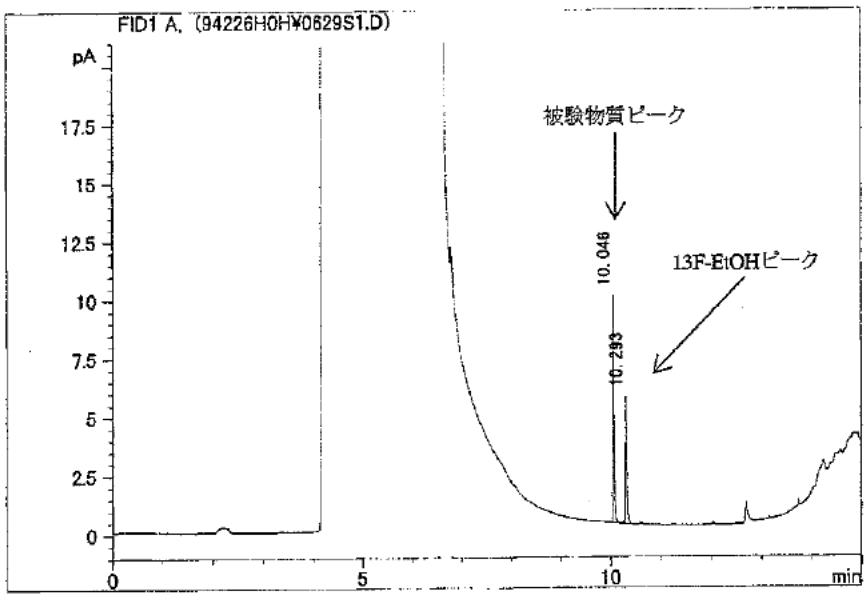
Concentration (mg/L)	Peak area (pA*s)
0.250	1.839
1.25	9.357
2.50	18.548
5.00	37.672

付図3-1　13F-SFMAのGCによる検量線

Standard solution 2.50mg/L

Study No. 94226

測定オペレータ　:
メソッド名　: C:¥HPCHEM¥1¥METHODS¥94226.M
生データファイル名: C:¥HPCHEM¥1¥DATA¥94226H0H¥0629S1.D
サンプル名　: std 2.50mg/L



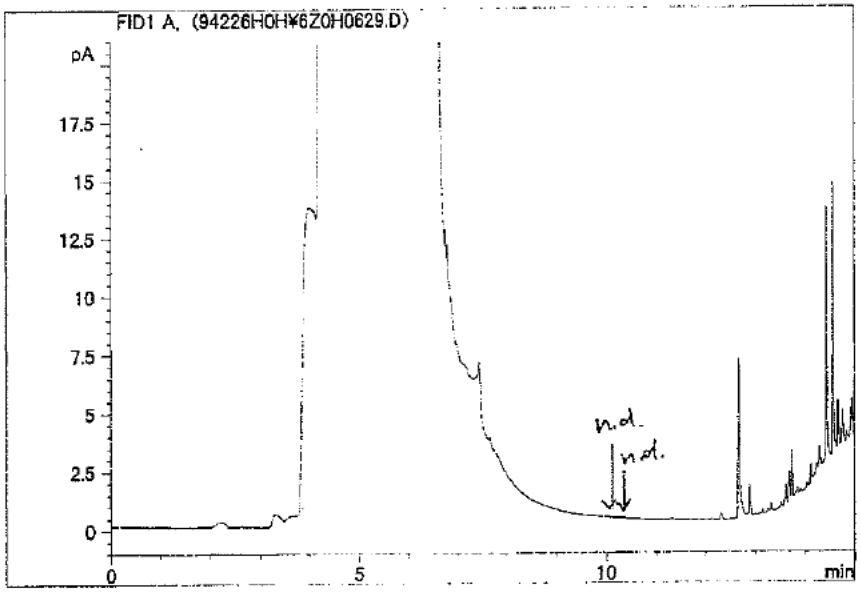
#	ﾒｲﾝﾋﾟｰｸ面積	ﾒｲﾝﾋﾟｰｸ高さ	実測 RT
1	18.626	9.683	10.046
2	12.455	5.439	10.293

付図3-2-1　標準溶液のGCクロマトグラム（暴露開始時）

Control

Study No. 94226

測定オペレータ　　:
メソッド名　　: C:¥HPCHEM¥1¥METHODS¥94226.M
生データファイル名: C:¥HPCHEM¥1¥DATA¥94226H0H¥6Z0H0629.D
サンプル名　　: Cont. (*50) H0h



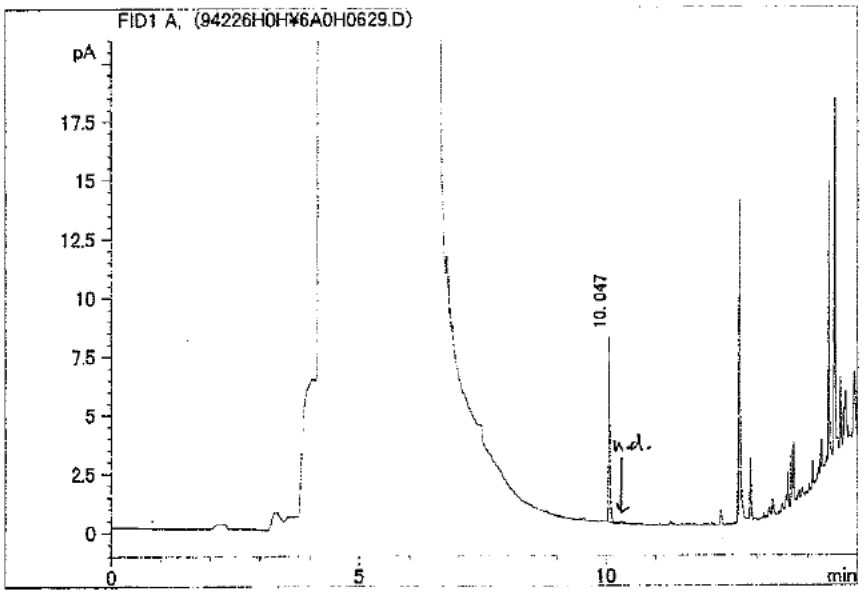
#	ﾒｲﾝﾋﾟｰｸ面積	ﾒｲﾝﾋﾟｰｸ高さ	実測 RT

付図3-2-2　試験液のGCクロマトグラム（暴露開始時）

100mg/L (Nominal concentration)

Study No. 94226

測定オペレータ :
メソッド名 : C:¥HPCHEM¥1¥METHODS¥94226.M
生データファイル名 : C:¥HPCHEM¥1¥DATA¥94226H0H¥6A0H0629.D
サンプル名 : 100(*50)H0h



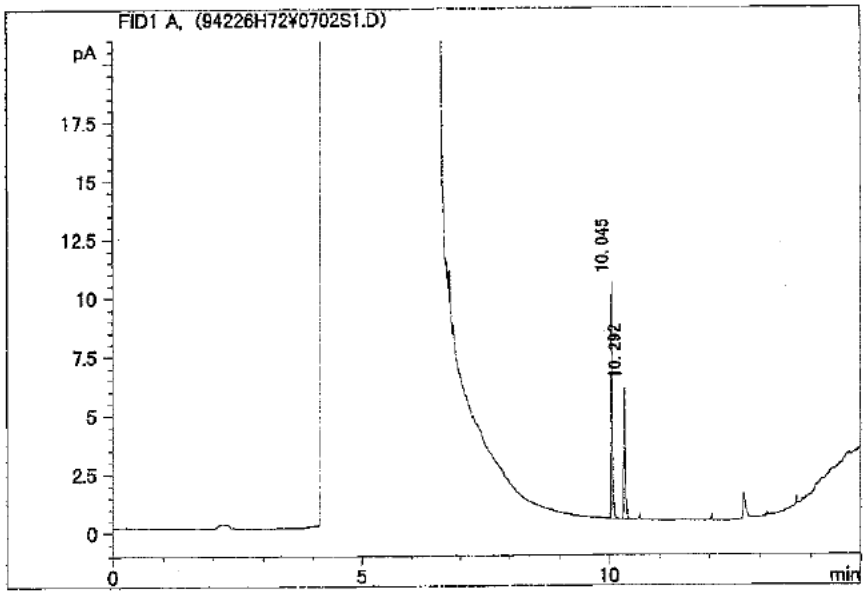
#	ﾒｲﾝﾋﾟｰｸ面積	ﾒｲﾝﾋﾟｰｸ高さ	実測 RT
1	14.945	7.850	10.047

付図3-2-3　試験液のGCクロマトグラム（暴露開始時）

Standard solution 2.50mg/L

Study No. 94226

測定オペレータ　　:
メソッド名　　: C:¥HPCHEM¥1¥METHODS¥94226.M
生データファイル名: C:¥HPCHEM¥1¥DATA¥94226H72¥0702S1.D
サンプル名　　: std 2.50mg/L



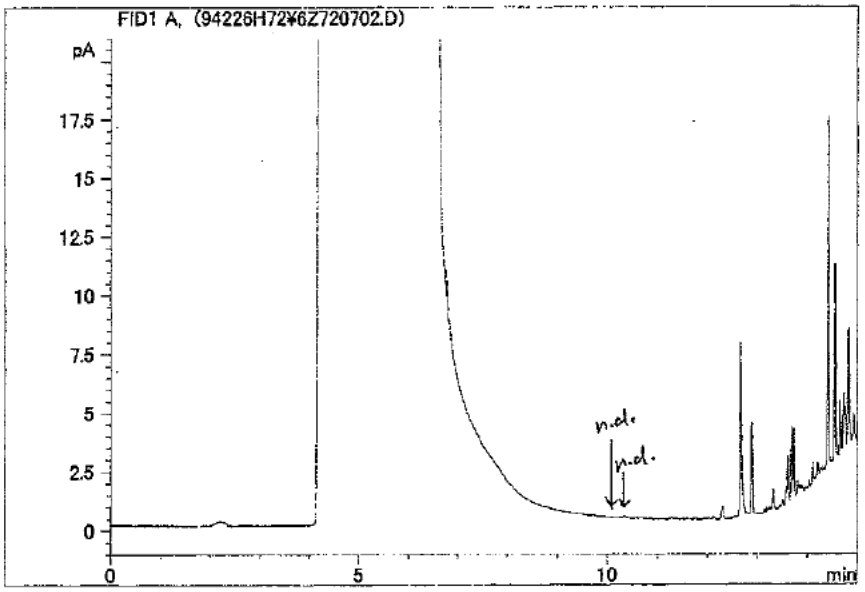
#	ﾒｲﾝﾋﾟｰｸ面積	ﾒｲﾝﾋﾟｰｸ高さ	実測 RT
1	18.543	10.041	10.045
2	12.198	5.594	10.292

付図3-3-1　標準溶液のGCクロマトグラム（暴露終了時）

Control

Study No. 94226

測定オペレータ　　:
メソッド名　　: C:¥HPCHEM¥1¥METHODS¥94226.M
生データファイル名: C:¥HPCHEM¥1¥DATA¥94226H72¥6Z720702.D
サンプル名　　: Cont. (*50) H72h



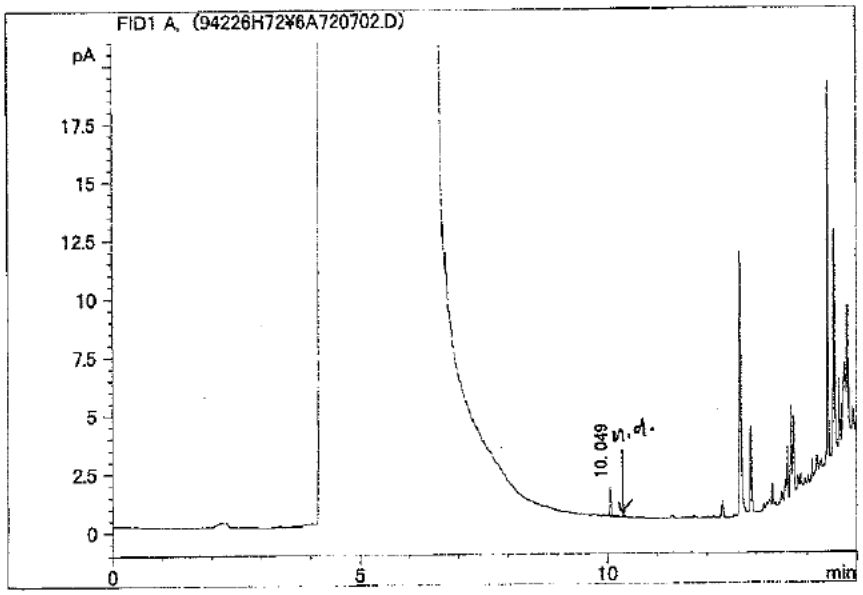
#	ﾒｲﾝﾋﾟｰｸ面積	ﾒｲﾝﾋﾟｰｸ高さ	実測 RT

付図3-3-2　試験液のGCクロマトグラム（暴露終了時）

100mg/L (Nominal concentration)

Study No. 94226

測定オペレータ :
メソッド名 : C:¥HPCHEM¥1¥METHODS¥94226.M
生データファイル名 : C:¥HPCHEM¥1¥DATA¥94226H72¥6A720702.D
サンプル名 : 100(*50)H72h



#	メインピーク面積	メインピーク高さ	実測 RT
1	2.263	1.251	10.049

付図3-3-3　試験液のGCクロマトグラム（暴露終了時）

付属資料4

培地への溶解度

1. 表　　題

培地への溶解度

2. 試 験 目 的

生態毒性試験における被験物質の培地への溶解度を測定する。

3. 試験の概要

被験物質と培地を混合し、生態毒性試験と同様の温度条件下で24時間撹拌後、静置して試験液の中層を分析に用いた。

4. 試験の実施

4.1　試験装置及び器具

恒　温　槽：プラスチック製水槽
　　加熱・冷却ユニット（佐藤工芸製　HCA250）
撹 拌 装 置：マグネティックスターラー
容　　器：改良型ガラス製容器（全内容量　約600mL）

4.2　試 験 条 件

(1) 試 験 温 度：23±1℃

(2) 分 析 回 数：1回（撹拌24時間後）

(3) 試 験 連 数：n=3（試料-1、試料-2及び試料-3とする）

4.3 試験操作

(1) 供試試料と培地を約100mg/L*になるように改良型ガラス製容器にて混合し、気相のないように密閉して試験液とした。

* 供試試料の密度1.496g/cm^{3}を用いて添加容量（40.1μL）を算出し、添加した。

(2) 試験温度に設定された恒温槽中で、マグネティックスターラーにより緩やかに撹拌した。

(3) 撹拌24時間後に試験液の撹拌を停止させ、恒温槽中にて約1時間静置した。

(4) 静置後、被験物質及び予想される被験物質の加水分解生成物である13F-EtOHの定量分析を行った。

4.4 試験液の分析

(1) 試験液の前処理操作

改良型ガラス製容器の分取口から、シリンジで試験液の中層を慎重に採取した。採取した液について付属資料2の2.試験液の前処理操作のフロースキームにより前処理操作を行い、分析試料を調製した。

(2) 分析方法

付属資料2の3.分析方法参照。

4.5 標準溶液の調製

付属資料2の4.標準溶液の調製参照。

4.6 検量線の作成

付属資料2の5.検量線の作成参照。

4.7 回収試験及びブランク試験

付属資料2の6.回収試験及びブランク試験参照。

5. 試 験 結 果

被験物質の培地への溶解度は0.0646mg/Lであった。また、同時に測定した13F-EtOH濃度はn.d.であった。測定結果を以下の表に示す。

付表4-1　撹拌24時間後の測定値（被験物質）

試料名	測定値 (mg/L)	算術平均値 (mg/L)
試料-1	0.0614	0.0646
試料-2	0.0721	
試料-3	0.0604	

付表4-2　撹拌24時間後の測定値（13F-EtOH）

試料名	測定値 (mg/L)	算術平均値 (mg/L)
試料-1	n.d.	n.d.
試料-2	n.d.	
試料-3	n.d.	

n.d. : ＜0.00593mg/L

別添資料 1

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 未満であることが予想されたため、溶解度測定の検討を行った。なお、溶解度測定予備試験 2 は魚類急性毒性試験（試験番号 94228）にて実施したものである。

1) 溶解度測定予備試験1

(1) 内　　容

被験物質は揮発性を有していることが疑われたため、改良型ガラス製容器に約 100mg/L 相当になるように供試試料と培地を混合して密閉し、試験条件下（23±1℃）にて 24 及び 48 時間緩やかに撹拌した後、約 1 時間静置して中層液を採取した。被験物質は、遠心分離やメンブランフィルターろ過を行うことで濃度低下することが判明していることから、不溶物除去のために遠心分離やメンブランフィルターろ過は行わなかった。採取した中層液は前処理操作を行い、ガスクロマトグラフィー（GC）により濃度分析を実施した（n=2）。

(2) 結　　果

設定添加濃度 (mg/L)	測定濃度（mg/L）	
	撹拌 24 時間後	撹拌 48 時間後
約 100（試料-1）	0.0647	−
約 100（試料-2）	0.0653	−
約 100（試料-3）	−	0.0744
約 100（試料-4）	−	0.0603

被験物質の培地への溶解度は 0.06～0.08mg/L 付近と考えられた。

2) 溶解度測定予備試験2

(1) 内　　容

被験物質は加水分解性を有していることが疑われたため、被験物質の溶解濃度測定と同時に、予想される加水分解生成物である 13F-EtOH（試験番号 94232～94234 の被験物質）の分析を行った。はじめに、改良型ガラス製容器に約 100mg/L 相当になるように供試試料と試験用水（脱塩素水道水）を混合して密閉し、魚類急性毒性試験の温度条件下（24±1℃）にて 24 及び 48 時間緩やかに撹拌した後、約 1 時間静置して中層液を採取した。採取した中層液は前処理操作を行い、ガスクロマトグラフィー（GC）により被験物質及び 13F-EtOH の濃度分析を実施した（n=2）。

(2) 結　　果

被験物質濃度分析

設定添加濃度 (mg/L)	被験物質測定濃度（mg/L）	
	撹拌 24 時間後	撹拌 48 時間後
約 100（試料-1）	0.0218	−
約 100（試料-2）	0.0303	−
約 100（試料-3）	−	0.0351
約 100（試料-4）	−	0.0221

13F-EtOH 濃度分析

設定添加濃度 (mg/L)	13F-EtOH 測定濃度（mg/L）	
	撹拌 24 時間後	撹拌 48 時間後
約 100（試料-1）	0.0157	−
約 100（試料-2）	0.0162	−
約 100（試料-3）	−	0.0364
約 100（試料-4）	−	0.0283

被験物質の溶解濃度は 0.02～0.04mg/L 程度であり、24 及び 48 時間撹拌でほぼ同様であった。また、被験物質の加水分解生成物である 13F-EtOH は、24 時間撹拌で 0.01～0.02mg/L、48 時間撹拌で 0.02～0.04mg/L 程度生成していた。

3) 被験物質の培地への溶解度検討結果のまとめ

被験物質は揮発性を有していることが疑われたため、溶解度測定用の飽和液の調製には改良型ガラス製容器を用い、撹拌は緩やかに行った。溶解度測定予備試験 1 の結果において、被験物質の培地への溶解度は 0.06～0.08mg/L 付近と考えられたが、溶解度予備試験 2 においては、脱塩素水道水に対して 0.02～0.04mg/L 程度しか溶解しておらず、撹拌条件や被験物質性状、濃度レベルなどを考慮すると、被験物質の培地への溶解度は 0.01～0.1mg/L 付近であると考えられた。また、溶解度測定予備試験 1 及び 2 の結果より、被験物質が 24 時間撹拌と 48 時間撹拌でほぼ同様な溶解濃度を示すのに対し、溶解度測定予備試験 2 の結果より、13F-EtOH 濃度は 48 時間撹拌で 24 時間撹拌の約 2 倍となっており、13F-EtOH 生成量は増加傾向を示した。

以上の結果より、本試験では改良型ガラス製容器を使用することとし、被験物質が既に 48 時間撹拌時と同等以上に溶解しており、かつ生成する変化物が少ない 24 時間撹拌により溶解度測定を実施することとした。

2. 試験生物への影響

1) 予 備 試 験1

(1) 内　　容

試験上限濃度（約 100mg/L）になるように培地に供試試料を添加し、約 48 時間撹拌した後、約 1 時間静置し、中層を採取して試験液（被験物質飽和液）を調製した。その後、生物を暴露し影響の有無を確認した。なお、被験物質は揮発性を有することが疑われたため、試験液はヘッドスペースが無い密閉状態で調製し、試験容器は揮発性物質用密閉容器を使用した。また、同時に試験液中の被験物質濃度の測定を行った。なお、藻体への被験物質の取り込みの有無を確認するための検討は、遠心分離等の藻体分離操作ができないため、実施しなかった。

(2) 結　　果

設定濃度区 (mg/L)	生長阻害率(%)
	生長速度(0-3d)
約100	1.15

連　　数：2連／試験区

測 定 法：細胞計数法

被験物質飽和溶液において若干の影響が認められた。

設定濃度区 (mg/L)	測定濃度（mg/L）(対開始時濃度 %)	
	暴露開始時	暴露終了時 (72時間後)
約100	0.0428	0.00467 (10.9)

暴露開始時の被験物質濃度は溶解濃度付近であった。暴露終了時には著しく濃度が低下し、開始時濃度の約11%であった。

2) 予備試験2

(1) 内　　容

試験上限濃度（約100mg/L）になるように培地に供試試料を添加し、撹拌した後、約1時間静置し、中層を採取して試験液（被験物質飽和液）を調製した。その際、溶解度予備試験より被験物質は撹拌24時間で飽和濃度に達していることが考えられたが、被験物質の加水分解物（13F-EtOH）の生成が経時的に増加していくことが確認されたため、撹拌時間を24時間とした。その後、生物を暴露し影響の有無を確認した。なお、試験容器は揮発性物質用密閉容器を使用した。

(2) 結　　果

設定濃度区 (mg/L)	生長阻害率（%） 生長速度（0-3d）
約100	-2.82

連　　数：3連／試験区

測 定 法：細胞計数法

被験物質飽和溶液において影響は認められなかった。

2) 試験生物への影響（予備試験結果）のまとめ

試験法の試験上限濃度（約100mg/L）になるように供試試料と培地を混合し、密閉状態にて約24時間撹拌した後、約1時間静置し、中層採取した被験物質飽和液（設定添加濃度：約100mg/L）で、試験生物に影響は認められなかった。暴露期間中、被験物質の揮発等により試験液中の被験物質濃度は著しく低下した。藻類生長阻害試験では換水作業が行えず、また、藻類の生長には試験容器内に適度なヘッドスペースが必要と考えられることから、飽和液付近の濃度を維持した試験設計は困難であった。

3. 予備試験結果（まとめ）

溶解度予備試験においては、被験物質は撹拌24時間で飽和濃度に達していると考えられた。また、被験物質の加水分解物（13F-EtOH）の生成が経時的に増加していくことが確認された。

生物への影響予備試験においては、通常の手法である撹拌48時間で調製された被験物質飽和溶液で試験生物に若干の影響が認められた。しかし撹拌24時間で調製された被験物質飽和溶液で試験生物に影響は認められなかった。溶解度予備試験より、撹拌24時間で調製された被験物質飽和溶液と48時間での飽和溶液では被験物質の濃度は同程度であるのに対し、加水分解物は48時間での飽和溶液の方がより多く存在していた。以上の結果より撹拌48時間で調製した被験物質飽和溶液での試験生物への影響は、加水分解物によるものと予想される。このため、本試験においては被験物質の飽和濃度（溶解濃度）が同等であれば加水分解物の生成がより少ない試験液を用いることが妥当であると判断し、撹拌時間24時間で調製された被験物質飽和液にて本試験を実施することとした。

4. 本試験の設定

1) 培地への溶解度測定

溶解度測定予備試験結果から、培地への溶解度測定は、約100mg/Lとなるように供試試料と培地を混合後、密閉して23±1℃の条件下で24時間緩やかに撹拌した試験液を用いて実施した。不溶物除去としては、遠心分離やフィルターろ過等の手法は使用せず、撹拌停止後試験液を約1時間静置し中層液を採取することにより可能な限り不溶物を取り除くこととし、この試験液について被験物質濃度分析とともに被験物質の加水分解生成物である13F-EtOHの濃度分析を行った。

2) 本 試 験

予備試験の結果から培地への溶解度付近で試験生物に対して無影響と予測されたため、本試験では約24時間撹拌して調製した被験物質飽和液（設定添加濃度：約100mg/L）及び対照区により実施した。試験液の調製については、約100mg/Lになるように調製容器に供試試料と培地を加え、ヘッドスペースがない密閉状態でマグネティックスターラーにより約24時間撹拌後、約1時間静置し、中層を採取して試験液（被験物質飽和液）を調製した。また、試験液中の被験物質及び13F-EtOH濃度の測定は暴露開始時、暴露開始後24時間、48時間及び暴露終了時に行った。

別添資料 2

本試験不採用結果
（実験期間　2007 年 6 月 19 日～2007 年 6 月 22 日）

不採用理由：本試験でNOECが算出されなかったため。

別表１　暴露開始時と終了時の試験液の pH

測定濃度[*5] (mg/L)	pH	
	開始時	終了時
対　照　区	7.8	8.9
0.0729	7.7	9.5

*5　測定濃度の幾何平均値（以下測定濃度と表示する。）

別表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（℃）	22.8	22.2	22.8	23.0
光　強　度（$\mu E/m^2/s$）	88	81	87	85

別表３　各時間での細胞数

測定濃度 (mg/L)	No.	細　胞　数（×10^4cells/mL）			
		開始時*6	24 時間	48 時間	72 時間
対照区	1	0.500	1.90	8.98	42.0
	2	0.500	2.00	7.77	34.8
	3	0.500	2.30	11.3	48.1
	4	0.500	2.03	9.34	42.7
	5	0.500	2.03	9.17	44.9
	6	0.500	2.22	11.1	48.3
	平均	0.500	2.08	9.60	43.5
	S.D.	0	0.151	1.34	5.01
0.0729	1	0.500	2.13	10.1	30.8
	2	0.500	1.89	10.0	32.0
	3	0.500	2.01	8.38	27.3
	4	0.500	1.50	6.19	21.3
	5	0.500	1.78	9.24	31.0
	6	0.500	1.90	8.58	25.9
	平均	0.500	1.87	8.74	28.0
	S.D.	0	0.216	1.43	4.06

*6　前培養液の測定値に基づく値

別表４　濃度区における生長阻害率

測定濃度 (mg/L)	No.	生長速度 (0-3 日)	阻害率 (%)
対照区	1	1.48	-
	2	1.41	-
	3	1.52	-
	4	1.48	-
	5	1.50	-
	6	1.52	-
	平均	1.49	-
0.0729	1	1.37	7.62
	2	1.39	6.75
	3	1.33	10.3
	4	1.25	15.9
	5	1.38	7.41
	6	1.32	11.5
	平均	1.34**	9.90

**：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）

別表５　生長速度における EC_{50} 及び NOEC

検出指標	EC_{50} (mg/L)	NOEC (mg/L)
生長速度	＞0.0729	＜0.0729

別表６　有意差検定結果

測定濃度 (mg/L)	検　出　指　標 生　長　速　度
0.0729	＊＊
検定法	*F* 検定 Student の *t* 検定

＊＊：1%水準で有意差あり

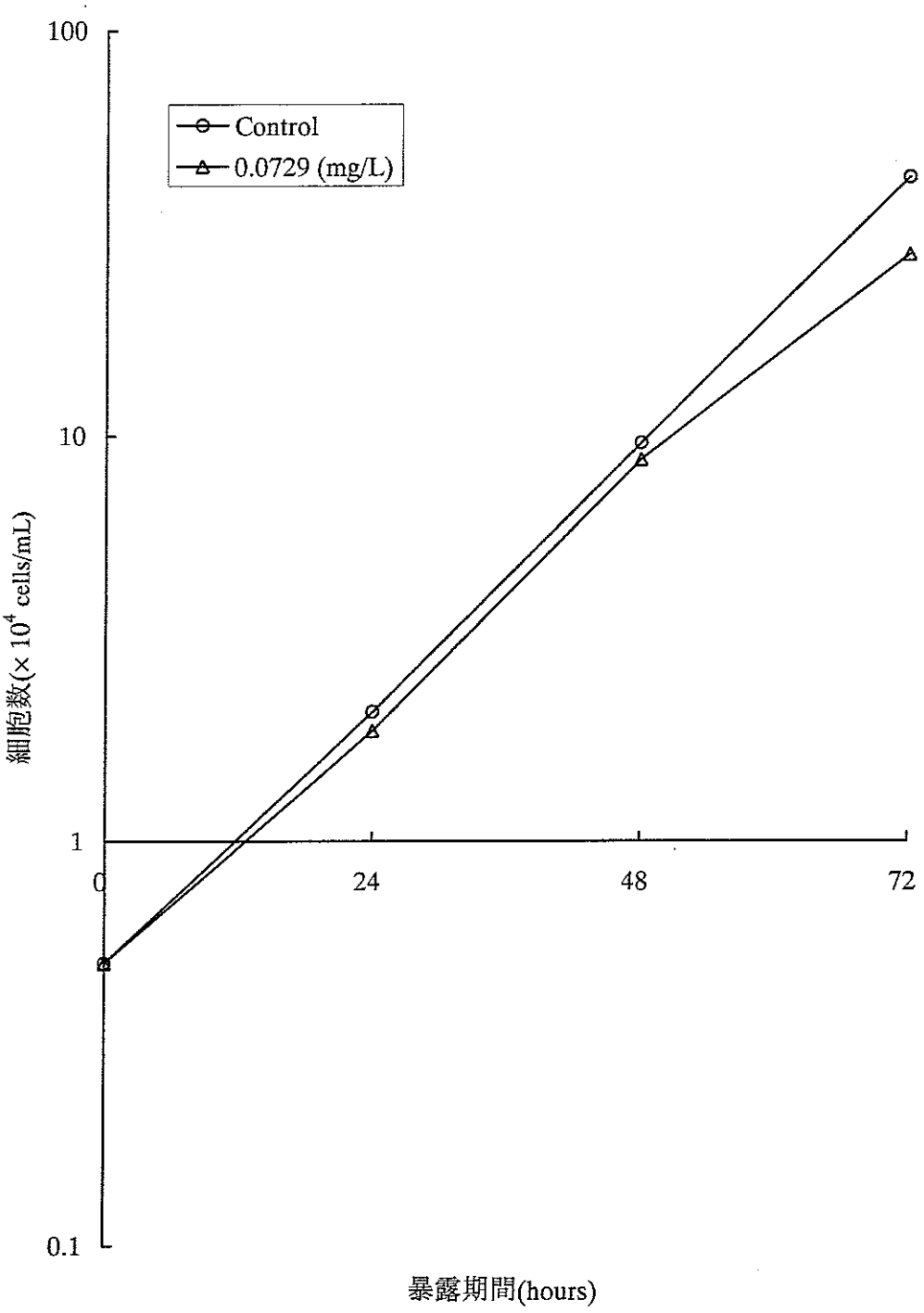
別表７　試験の有効性

日間変動

対照群	平均	標準偏差	変動係数（%）	
1	1.48	0.12	8.32	5.66 （平均）
2	1.41	0.08	5.34	
3	1.52	0.07	4.47	
4	1.48	0.07	4.75	
5	1.50	0.09	6.27	
6	1.52	0.07	4.81	

繰り返し間の変動

	0-3day
平均	1.49
標準偏差	0.04
変動係数（%）	2.72



別図1　各試験区での生長曲線