

本写しは原本と相違ありません

いであ株式会社

環境創造研究所

運営管理者

大西悠太

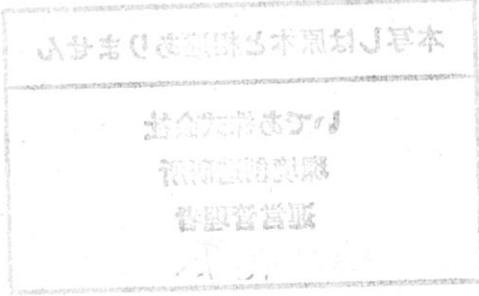
## 最終報告書

スルファピリジンの藻類 (*Raphidocelis subcapitata*) に対する生長阻害試験

(試験番号 : 1905-201)

2020年3月19日 作成

い で あ 株 式 会 社



## 陳述書

いであ株式会社  
環境創造研究所

試験委託者： 環境省

表題： スルファピリジンの藻類 (*Raphidoce lis subcapitata*) に対する生長阻害試験

試験番号： 1905-201

本試験は、厚生労働省医薬食品局長、経済産業省製造産業局長及び環境省総合環境政策局長通知「新規化学物質等に係る試験を実施する試験施設に関する基準について」（平成23年3月31日付け薬食発第0331第8号、平成23・03・29製局第6号、環保企発第110331010号）及び、同通知別添5「藻類生長阻害試験、ミジンコ急性遊泳阻害試験、魚類急性毒性試験、ミジンコの繁殖に及ぼす影響に関する試験、魚類の初期生活段階における生息又は生育に及ぼす影響に関する試験及びユスリカの生息又は生育に及ぼす影響に関する試験に際して付加される事項」に準拠して実施したものである。

2020年5月19日

試験責任者： 石川英律

## 信 賴 性 保 証 書

いであ株式会社  
環境創造研究所

試験委託者 : 環境省

試験の表題 : スルファピリジンの藻類(*Raphidoce lis subcapitata*)に対する生長阻害試験

試験番号 : 1905-201

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、本最終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とおり確認した。

監査・査察項目	監査・査察実施日	試験責任者への報告日	運営管理者への報告日
試験計画書	2020年2月19日	2020年2月19日	2020年2月19日
被験物質溶液調製時 (試験液調製時)、暴露開始時	2020年3月1日	2020年3月2日	2020年3月2日
暴露実験終了時	2020年3月4日	2020年3月5日	2020年3月5日
試料分析時(試料の前処理、試料の測定)	2020年3月5日	2020年3月5日	2020年3月5日
最終報告書案	2020年3月17日	2020年3月17日	2020年3月17日
最終報告書	2020年3月18日	2020年3月18日	2020年3月19日

2020 年 3 月 19 日

信頼性保証担当者

深海 総一

## 試験実施概要

### 1. 表題

スルファピリジンの藻類 (*Raphidocelis subcapitata*) に対する生長阻害試験

### 2. 試験番号

1905-201

### 3. 試験目的

スルファピリジンの藻類 (*Raphidocelis subcapitata*) に対する生長阻害試験を実施して、50% 生長阻害濃度 (ErC50) 及び最大無作用濃度 (NOEC) を求める。

### 4. 試験方法

本試験は、厚生労働省医薬食品局長、経済産業省製造産業局長及び環境省総合環境政策局長連名通知「新規化学物質等に係る試験の方法について」(平成 23 年 3 月 31 日付け薬食発 0331 第 7 号、平成 23・03・29 製局第 5 号、環保企発第 110331009 号) に準拠して実施した。

### 5. 適用 GLP

厚生労働省医薬食品局長、経済産業省製造産業局長及び環境省総合環境政策局長通知「新規化学物質等に係る試験を実施する試験施設に関する基準について」(平成 23 年 3 月 31 日付け薬食発第 0331 第 8 号、平成 23・03・29 製局第 6 号、環保企発第 110331010 号) 及び、同通知別添 5 「藻類生長阻害試験、ミジンコ急性遊泳阻害試験、魚類急性毒性試験、ミジンコの繁殖に及ぼす影響に関する試験、魚類の初期生活段階における生息又は生育に及ぼす影響に関する試験及びユスリカの生息又は生育に及ぼす影響に関する試験に際して付加される事項」

### 6. 試験委託者

名称 : 環境省

所在地 : 〒100-8975 東京都千代田区霞が関 1-2-2

## 7. 試験受託者

名称 : いであ株式会社  
所在地 : 〒154-0012 東京都世田谷区駒沢 3-15-1  
代表者 : 代表取締役社長 田畠 彰久

## 8. 試験施設

名称 : いであ株式会社 環境創造研究所  
所在地 : 〒421-0212 静岡県焼津市利右衛門1334-5

## 9. 試験関係者

試験責任者 : 石川 英律  ( 2020 年 3 月 19 日 )  
( 所属 リスク評価部 )

試験担当者 : 岡村 哲郎  ( 2020 年 3 月 19 日 )  
( 操作全般、化学分析、とりまとめ )

試験担当者 : 戸田 美沙  ( 2020 年 3 月 19 日 )  
( 暴露試験、化学分析 )

試験担当者 : 戸塚 優  ( 2020 年 3 月 19 日 )  
( 暴露試験、化学分析 )

## 10. 試験期間

試験開始日 : 2020 年 2 月 18 日  
暴露実験開始日 : 2020 年 3 月 1 日  
暴露実験終了日 : 2020 年 3 月 4 日  
試験終了日 : 2020 年 3 月 19 日

## 11. 記録及び試資料の保管

本試験に関する下記の記録及び試資料は、試験終了後、当施設の試資料保管施設に 10 年間保管する。

- 1) 試験計画書、同変更の記録
- 2) 最終報告書
- 3) 生データ

- 4) 信頼性保証担当者の監査・査察記録  
5) 被験物質（保管用以外の被験物質については廃棄）

## 目 次

要 約.....	8
1. 被験物質 .....	10
1.1 名称、構造式及び物理化学的性状.....	10
1.2 供試試料 .....	11
1.3 保管方法及び保管条件下での安定性.....	11
1.4 暴露条件下での安定性 .....	11
2. 供試生物 .....	12
3. 試験方法 .....	12
3.1 前培養 .....	12
3.2 培地 .....	12
3.3 試験条件 .....	12
3.4 試験容器及び機器等 .....	13
3.5 試験濃度の設定 .....	13
3.6 試験液の調製 .....	14
3.7 試験液の分析 .....	14
3.8 試験操作 .....	14
4. 結果の算出 .....	16
4.1 生長曲線 .....	16
4.2 生長阻害率の算出 .....	16
4.3 50%生長阻害濃度 (ErC50) の算出.....	16
4.4 最大無作用濃度 (NOEC) .....	17
5. 結果及び考察 .....	18
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.....	18
5.2 試験液中の被験物質濃度 .....	18
5.3 生長曲線 .....	18
5.4 50%生長阻害濃度 (ErC50) 及び最大無作用濃度 (NOEC).....	18
5.5 温度、光量子束密度及び pH .....	18
5.6 試験液の色調及び細胞形態の観察結果.....	19
5.7 試験結果の評価及び考察 .....	19
Table.....	20
Figure.....	27
付属資料-1 OECD 培地 .....	29
付属資料-2 予備試験結果 .....	31
付属資料-3 試験液の調製方法 .....	33
付属資料-4 試験液の分析方法 .....	36

## 要 約

### 試験委託者

環境省

### 表題

スルファピリジンの藻類 (*Raphidocelis subcapitata*) に対する生長阻害試験

### 試験番号

1905-201

### 試験方法

本試験は、厚生労働省医薬食品局長、経済産業省製造産業局長及び環境省総合環境政策局長連名通知「新規化学物質等に係る試験の方法について」（平成23年3月31日付け薬食発0331第7号、平成23・03・29製局第5号、環保企発第110331009号）に準拠して実施した。

- 1) 被験物質 : スルファピリジン
- 2) 暴露方式 : 開放系（通気性シリコン製栓）、振とう培養（100 rpm）
- 3) 供試生物 : *Raphidocelis subcapitata* (ATCC 22662)
- 4) 暴露期間 : 72時間
- 5) 試験濃度（設定値） : 0.500、1.60、5.00、16.0、及び $50.0 \text{ mg/L}$ （公比；約3.2）、NOEC算出用として、 $1.00 \times 10^{-2}$ 、 $0.316 \times 10^{-2}$  及び $0.100 \times 10^{-2} \text{ mg/L}$ （公比；3.2）、及び対照区
- 6) 試験液量 : 100 mL／容器
- 7) 連数 : 3容器／試験濃度区、6容器／対照区
- 8) 初期生物量 : 細胞濃度で $0.5 \times 10^4 \text{ cells/mL}$
- 9) 試験温度 : 23°C設定（変動幅は±2°C）
- 10) 照明 : 蛍光灯による連続照明  
(波長400～700 nmの範囲の光量子について60～90  $\mu \text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ )
- 11) 助剤の種類 : 使用しない

- 12) 試験液中の助剤濃度 : -  
13) 分析方法 : HPLC

## 結果

### 1) 試験液中の被験物質濃度

設定濃度に対する実測濃度の割合は、暴露開始時の試験液が95～110%、暴露終了時の試験液が85～117%であった。暴露期間中、概ね一定の被験物質濃度を維持していたものと考えられた。したがって、50%生長阻害濃度 (ErC50) 及び最大無作用濃度 (NOEC) は、各実測濃度を算術平均した濃度に基づき示した。

### 2) 生長速度の比較による阻害濃度

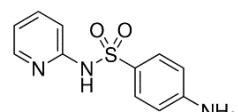
暴露試験の結果、0.534 mg/L 試験濃度区までは、被験物質濃度の上昇に伴う生長阻害が緩やかであったが、それよりも高い濃度域では生長阻害率が急激に増加するのが認められた。最大無作用濃度 (NOEC) については、対照区と比較して5%の危険率で有意差が認められない最大濃度の試験濃度区とした。

ErC50 (0-3d) : 12.1 mg/L (95%信頼区間 : 10.2 - 14.4 mg/L)  
NOECr (0-3d) : 0.00323 mg/L

## 1. 被験物質

### 1.1 名称、構造式及び物理化学的性状

本被験物質は動物用医薬品の合成抗菌剤（サルファ剤）として使用されている。その作用機作は葉酸の合成阻害であり、動物細胞はもともと葉酸合成系がないことから微生物に対してのみ選択毒性を有する。このため、甲殻類及び魚類に対しての生理活性はないものと考えられる。一方、藻類は葉酸合成系を有することが知られていることから、藻類に高い毒性を有することが考えられる。

- 1) 名称 : スルファピリジン
- 2) 別名 : Sulfapyridine<sup>1)</sup>、スルファピリジン<sup>2), 3)</sup>、  
2-(4-Aminobenzenesulfonamido) pyridine<sup>2)</sup>、  
2-Sulfanilamidopyridine<sup>2)</sup>、N'-2-Pyridylsulfanilide<sup>2)</sup>
- 3) CAS番号 : 144-83-2<sup>2), 3)</sup>
- 4) 構造式 : 
- 5) 分子式 : C<sub>11</sub>H<sub>11</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>S<sup>2), 3)</sup>
- 6) 分子量 : 249. 29<sup>3)</sup>
- 7) 蒸気圧 : データなし<sup>3), 4)</sup>
- 8) 対水溶解度 : 情報なし<sup>2)</sup>、ほとんど溶けない<sup>3)</sup>、268 mg/L(25°C)<sup>4)</sup>、  
275 mg/L(24. 4°C)<sup>5)</sup>
- 9) 1-オクタノール/水分配係数 : データなし<sup>3)</sup>、0.35<sup>4)</sup>
- 10) 融点 : 190°C<sup>2)</sup>、193°C<sup>3)</sup>、192°C<sup>4)</sup>
- 11) 沸点 : 情報なし<sup>2)</sup>、データなし<sup>3), 4)</sup>
- 12) 常温における性状 : 白色～うすい黄色の粉末結晶<sup>2)</sup>、白色～わずかにうすい黄褐色の粉末結晶<sup>3)</sup>
- 13) 安定性 : 適切な条件下においては安定<sup>2)</sup>、光により変質するおそれあり<sup>3)</sup>
- 14) 溶媒に対する溶解度 : アセトニトリル；≥4,000 mg/L(22.5°C)<sup>6)</sup>、  
アセトン；≥6,666 mg/L(22.5°C)<sup>7)</sup>
- 15) 試験用水に  
対する溶解度 : 297 mg/L(23.7°C)<sup>8)</sup>
- 16) 取扱い時の注意点 : 換気のよい場所で使用し、適切な保護具を着用する<sup>2)</sup>、局所排気を使用し、強酸化剤との接触を避ける<sup>3)</sup>

#### (参考資料)

- 1) PubChem
- 2) 東京化成工業(株)安全データシート(2018/10/4)

- 3) 富士フィルム和光純薬(株)安全データシート (2018/8/17, 版 2)
- 4) PhysProp Database (in EPI suite v4.1)
- 5) 当試験施設確認値 (191216-1905-Y-5)
- 6) 当試験施設確認値 (191216-1905-Y-3)
- 7) 当試験施設確認値 (191216-1905-Y-4)
- 8) 当試験施設確認値 (191216-1905-Y-201-2)

## 1.2 供試試料

- 1) ロット番号 : 5PSKD
- 2) 純度 : 99.8 area% (HPLC)、100.1% (中和滴定)
- 3) 不純物の名称及び含有量 : 不明
- 4) 供給者 : 東京化成工業株式会社
- 5) 入手量 : 25 g × 2 本
- 6) 入手日 : 2019 年 12 月 10 日

## 1.3 保管方法及び保管条件下での安定性

- 1) 保管方法 : 被験物質は、当試験施設内調製室 (GLP対象施設) の冷蔵庫内に設置した被験物質保管容器 (冷蔵) に保管した。
- 2) 供試試料の確認 : 入手した供試試料が目的とする被験物質と同一であることを委託者提供資料の赤外吸収スペクトルで確認した。
- 3) 保管条件下での安定性の確認 : 実験終了後に測定した供試試料の赤外吸収スペクトルに変化がみられなかったことから、保管条件下で安定であったと判断した。

## 1.4 暴露条件下での安定性

OECD 培地 (3.2 培地参照) を試験用水として使用して、設定濃度 0.048 及び 50.0 mg/L の試験液を調製した。試験と同様の光条件と暗条件(照明の点灯なし)の 2 条件でそれぞれの濃度の試料を保管した。水温の設定は 23.0°C とした。

試験液調製時の実測濃度は 0.0493 及び 49.3 mg/L であった。明条件では、24 時間後でそれぞれ 0.0503 及び 49.7 mg/L、48 時間後では 0.0518 及び 49.6 mg/L、72 時間後では 0.0531 及び 49.1 mg/L であった。暗条件では、24 時間後でそれぞれ 0.0503 及び 50.6 mg/L、48 時間後では 0.0526 及び 48.9 mg/L、72 時間後では 0.0501 及び 49.8 mg/L であった。

以上の結果より、本試験物質は当試験施設で用いる試験用水 (OECD 培地) に溶解した場合に著しい生分解は生じず、かつ暴露試験を実施する光条件下において光分解は生じ

ないものと考えられた。

## 2. 供試生物

- 1) 学名 : *Raphidocelis subcapitata*
- 2) 株名 : ATCC 22662
- 3) 入手先 : American Type Culture Collection
- 4) 入手日 : 2002年 9月 7日
- 5) 入手後の管理 : ATCC Culture Medium 625 (以下、ATCC培地とする) の斜面培地を用いて無菌的に継代培養
- 6) 感受性試験の結果 : 基準物質 二クロム酸カリウム  
暴露期間 2019年12月30日～2020年1月2日  
 $ErC50(0\text{--}72\text{h}) = 0.90 \text{ mg/L}$  (95%信頼区間 : 0.88～0.93 mg/L)  
(当施設の規定範囲内【平均値±2 標準偏差 : 0.71～1.17 mg/L、N=28 (試験実施期間 : 2005年5月～)】であった)
- 7) 前々培養 : 供試藻類を継代培養している斜面培地から化審法テストガイドラインに記載されている推奨培地 (以下、OECD 培地とする)  
【付属資料-1 参照】に植え換え、2020年 2月 24 日～27 日まで振とう培養した。

## 3. 試験方法

### 3.1 前培養

試験と同じ環境条件(設定温度 23°C、光量子束密度範囲 62.54～70.93  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ )  
で 2020 年 2 月 27 日～3 月 1 日の間培養した。

### 3.2 培地

前培養及び暴露試験には、OECD 培地を使用した。

### 3.3 試験条件

- 1) 暴露方式 : 開放系 (通気性シリコン製栓)、振とう培養 (100 rpm)
- 2) 暴露期間 : 72時間
- 3) 試験液量 : 100 mL／試験容器
- 4) 連数 : 3容器／試験濃度区、6容器／対照区
- 5) 初期生物量 : 細胞濃度で  $0.5 \times 10^4 \text{ cells/mL}$  (前培養した藻類)

- 6) 試験温度 : 23°C設定（変動幅は±2°C）  
 7) 照明 : 蛍光灯による連続照明  
     (波長400～700 nmの範囲の光量子について60～90  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ )  
 8) pH : 試験液のpHは調整しない  
 9) 助剤の種類 : 使用しない  
 10) 試験液中の助剤濃度 : -

### 3.4 試験容器及び機器等

- 1) 試験容器 : 300 mL容ガラス製三角フラスコ（通気性シリコン製栓付）  
 2) 藻類培養試験装置 : タイテック製 恒温振とう培養器（型式：BR-300LF）  
 3) 光学顕微鏡 : オリンパス製 生物顕微鏡（型式：BH2）  
 4) 粒子計数装置 : シスメックス株式会社製細胞計数分析装置（型式：CDA-1000）  
 5) 電子天びん : メトラー・トレド株式会社製 電子天秤（型式：MS205DU）  
 6) 水温計 : アズワン株式会社製 デジタル温度計（型式：WT-200）  
 7) pH 計 : 堀場製作所製 カスタニーATC pH メーター（型式：D-21）  
 8) 光量子計 : LICOR 社製 ライトメーター（型式：LI-250）  
     測定波長の範囲：400～700 nm  
 9) 超音波洗浄器 : アズワン製 超音波洗浄器（型式：MUC-63）  
 10) ドライサーモバス : 東京理化器械株式会社製 サーモバス（型式：MG-2000）  
     東京理化器械株式会社製 濃縮ユニット（型式：S-112）

### 3.5 試験濃度の設定

本被験物質は動物用医薬品の合成抗菌剤（サルファ剤）として使用されており、その作用機作は葉酸合成系を阻害する。藻類は葉酸合成系を有しており、既往の研究においてもサルファ剤が藻類の生長に低濃度で影響することが報告されている\*。このため、本試験に先立ち公比を4.0として、0.012、0.048、0.192、0.766、3.05、12.5及び50.0 mg/Lの7試験濃度区を設定した予備試験を実施した。

予備試験の結果、50%生長阻害濃度（ErC50）は、9.54 mg/Lと算出された。一方、最も低い設定濃度0.012 mg/Lにおいて生長阻害率は7.4%であり、最大無作用濃度（NOEC）は算出できなかった。本被験物質に対する藻類の応答は非常に緩やかであった。予備試験の結果は、【付属資料-2】に示した。したがって、本試験の設定濃度は、ErC50を算出す

る濃度域を設定し、この濃度とは不連続な濃度範囲において、NOEC算出用の暴露濃度を設定することとした。予備試験の結果は、【付属資料-2】に示した。

本試験の設定濃度は、予備試験において生長阻害率が72.4%だった50.0 mg/Lを最高濃度として、公比約3.2で16.0、5.00、1.60及び0.500 mg/Lを設定して、ErC50を算出した。また、 $1.00 \times 10^{-2}$ 、 $0.316 \times 10^{-2}$ 及び $0.100 \times 10^{-2}$  mg/L(公比：3.2)の3試験濃度区でNOECを算出した。別に対照区を設けた。

\*)福永彩、山下尚之、田中宏明：藻類生長阻害試験を用いた医薬品の毒性評価、環境工学研究論文集、Vol. 43, 2006.

### 3.6 試験液の調製

被験物質の純度は、99.8 area%(HPLC)、100.1%(中和滴定)であることから、純度は補正しなかった。

本被験物質の試験液を直接添加法で調製した場合、溶液上面（水面）に非常に細かい粉状の被験物質が確認され、超音波処理や激しい転倒混和を実施した場合でも未溶解の被験物質が溶液上面（水面）に浮かぶことが確認された。そのため、試験液は、20時間以上攪拌して調製した。調製方法は【付属資料-3】に示した。

### 3.7 試験液の分析

#### 1) 分析方法

試験液中の被験物質濃度は、HPLC 分析計で測定した。分析における測定条件等は、【付属資料-4】に示した。

#### 2) 試料の採取頻度

試料は、全試験区について、暴露開始時（0時間）及び暴露終了時（72時間後）の試験液から採取した。

### 3.8 試験操作

前培養した供試藻類の細胞数を粒子計数装置により計数し、試験液中の生物量（細胞濃度）が $0.5 \times 10^4$  cells/mLとなるように前培養液を試験液の入った試験容器に無菌的に接種した。

各試験容器を藻類培養試験装置内に設置し、この時点を暴露開始時とした。暴露期間中は、24、48及び72時間後に培地プランクの粒子数、各試験区の細胞数を、粒子計数装置を使用して計数した。各試験容器の細胞数から培地プランク値を差し引き、生物

量を算出した。各容器の計数値から培地ブランク値を差し引いた値がマイナスとなるものは、生物量を 0 とした。

藻類培養試験装置内の試験容器の配置は、24 時間ごとに乱数表を用いて変更した。

藻類培養試験装置内の温度及び光量子束密度を暴露開始時から暴露終了時まで 24 時間ごとに測定した。また、試験液の pH を暴露開始時及び暴露終了時に各試験区について測定した。暴露開始時の pH は、調製した試験液の余りを用いて測定した。暴露終了時の pH は、各試験区で 1 つの試験容器内の試験液について測定した。

暴露開始時、24、48 時間後及び暴露終了時に、各試験区について肉眼による試験液の色調を観察し、暴露終了時に各試験区の 1 つの容器について藻類の細胞形態を観察した。

#### 4. 結果の算出

##### 4.1 生長曲線

各試験区の容器ごとの生物量を時間に対してプロットした。また、各試験区の生物量の平均値から生長曲線を作成した。

##### 4.2 生長阻害率の算出

生長阻害率 ( $I_{\mu}$ ) は、生長速度の比較（速度法）による方法で算出した。

各々の試験容器について暴露開始時から暴露終了時(72時間後)までの生長速度 ( $\mu$ ) を次式より算出した。

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

ここで、

$\mu_{i-j}$  :  $t_i$  時から  $t_j$  時までの期間の生長速度 ( $d^{-1}$ )

$X_i$  :  $t_i$  時の生物量 (cells/mL)、暴露開始時( $t_0$ )の生物量は 5,000 (cells/mL)

$X_j$  :  $t_j$  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)

試験濃度区における各試験容器での生長阻害率 ( $I_{\mu}$ ) を次式より算出した。

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

ここで、

$\mu_c$  : 対照区における全試験容器での生長速度 ( $d^{-1}$ ) の平均値

$\mu_T$  : 試験濃度区における各試験容器での生長速度 ( $d^{-1}$ )

##### 4.3 50%生長阻害濃度 (ErC50) の算出

50%生長阻害濃度 (ErC50) 及び最大無作用濃度 (NOEC) (4.4 参照) は、各試験濃度区の実測濃度を算術平均した濃度 (5.2 参照) に基づき示した。

50%生長阻害濃度 (ErC50) は、4.2 で算出した速度法による生長阻害率 ( $I_{\mu}$ ) が 10% 以上の試験濃度区及び 90% 以下の試験濃度区の生長阻害率を用い、最小二乗法により算

出した。

#### 4.4 最大無作用濃度(NOEC)

最大無作用濃度(NOEC)は、最小作用濃度(LOEC)の一段階下の試験濃度で、対照区と比較したとき、暴露期間中に統計的に有意な影響( $\alpha < 0.05$ )を与えない最高濃度とした。最小作用濃度(LOEC)は、暴露期間中に対照区と比較して被験物質が供試生物の生長を統計的に有意に減少させている( $\alpha < 0.05$ )ことが観察される最低の試験濃度とした。

全試験区の0-72時間生長速度についてBartlett法による等分散性の検定( $\alpha : 0.05$ )を行った結果、等分散性が認められたため、すべての試験区で一元配置分散分析(ANOVA)( $\alpha : 0.05$ )を行った。その結果、試験区間において有意差が認められたため、対照区と試験濃度区についてDunnett法による多重比較検定( $\alpha : 0.05$ 、両側)を行った。統計処理には、「Ecotox\_Statics」(ver. 2.6、大分大学 吉岡義正氏作成)を使用した。

## 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 該当する事項はなかった。

### 5.2 試験液中の被験物質濃度

各試験区における被験物質濃度の測定結果をTable 1に示した。

設定濃度に対する実測濃度の割合は、暴露開始時の試験液が 95～110%、暴露 72 時間の試験液が 85～117%であった。

50%生長阻害濃度 (ErC50) 及び最大無作用濃度 (NOEC) は、暴露開始時と暴露終了時の被験物質の実測濃度の平均濃度（算術平均）に基づき示した。

### 5.3 生長曲線

暴露期間中の生物量をTable 2-1及び2-2に、生長曲線をFigure 1 に示した。また、暴露期間中の対照区の生長速度をTable 3に示した。

暴露72時間後の、対照区の生物量は平均で初期生物量の約171倍に増加した。また、対照区の毎日の生長速度の変動係数は暴露期間を通じて6.9%、繰り返し間の生長速度の変動係数は2.2%であり、化審法テストガイドラインで定められた試験の有効性を判断する基準をすべて満たしていた。

### 5.4 50%生長阻害濃度 (ErC50) 及び最大無作用濃度 (NOEC)

試験濃度区における生長阻害率を Table 4-1 及び 4-2 に示した。

50%生長阻害濃度 (ErC50) 及び最大無作用濃度 (NOEC) を Table 5 及び以下に、濃度－阻害率曲線を Figure 2 に示した。

ErC50 は、1.54、4.74、15.6 及び 50.1 mg/L 試験濃度区の生長阻害率を用い、最小二乗法により算出した。最大無作用濃度 (NOEC) については、0.00939 mg/L 以上の試験濃度区が対照区と比較して 5% の危険率で有意差を認めたため、0.00323 mg/L とした。

ErC50 (0-3d) : 12.1 mg/L (95%信頼区間 : 10.2 - 14.4 mg/L)

NOECr (0-3d) : 0.00323 mg/L

### 5.5 温度、光量子束密度及び pH

暴露期間中の温度をTable 6、光量子束密度をTable 7、pH をTable 8 に示した。

暴露期間中の藻類培養試験装置内の温度は 22.8～22.9°C、光量子束密度は 64.26～

67.02  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  であった。

試験液のpHは、暴露開始時で7.5～7.7、暴露終了時（72時間後）で7.7～8.2であった。  
対照区における変動幅は0.5であった。

### 5.6 試験液の色調及び細胞形態の観察結果

暴露開始時の試験液はすべての試験区において無色透明であった。  
暴露終了時（72時間後）は、すべての試験区で細胞増殖のため薄い緑色を呈し、暴露濃度が高くなるに従い呈色が薄くなる傾向がみられた。  
暴露終了時（72時間後）の細胞形態を観察した結果、15.6 mg/L試験濃度区及び50.1 mg/L試験濃度区において細胞が丸みを帯びる異常がみられたが、その他の試験区では形態変化や凝集等の異常は認められなかった。

### 5.7 試験結果の評価及び考察

本被験物質は、試験液を直接添加法で調製した場合、溶液上面（水面）に非常に細かい粉状の被験物質が確認され、超音波処理や激しい転倒混和を実施した場合でも未溶解の被験物質が溶液上面（水面）に浮かぶ現象が確認された。そのため、試験液は、20時間以上攪拌して調製した。

設定濃度に対する実測濃度の割合は、暴露開始時の試験液が95～110%、暴露終了時の試験液が85～117%であった。暴露期間中、概ね一定の被験物質濃度を維持していたものと考えられた。したがって、50%生長阻害濃度（ErC50）及び最大無作用濃度（NOEC）は、各実測濃度を算術平均した濃度に基づき示した。

暴露試験の結果、0.534 mg/L試験濃度区までは、被験物質濃度の上昇に伴う生長阻害が緩やかであったが、それよりも高い濃度域では生長阻害率が急激に増加するのが認められ、72時間の50%生長阻害濃度（ErC50）は12.1 mg/L、最大無作用濃度（NOEC）は0.00323 mg/Lであった。

本試験は、対照区の生物量が16倍以上に増加し、毎日の生長速度の変動係数、繰り返し間の生長速度の変動係数についても試験の有効性をすべて満たしており、かつ、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として該当するものはなかった。

15.6 mg/L試験濃度区及び50.1 mg/L試験濃度区において細胞形状に異常が認められたが、本被験物質は、藻類の葉酸合成系を阻害することから、この異常は葉酸合成を阻害されたことによるものと考えられた。

以 上

Table 1 Measured Concentrations of the Test Substance in Test Solution

Nominal Concentration (mg/L)	Measured concentration* (mg/L) (Percent of Nominal**)		Mean*** Measured Concentration (mg/L)
	0 hour	72 hours	
Control	<0.00029	<0.00029	<0.00029
$0.100 \times 10^{-2}$	0.00099 (100)	0.00101 (101)	0.00100 (100)
$0.316 \times 10^{-2}$	0.00347 (110)	0.00299 (95)	0.00323 (102)
$1.00 \times 10^{-2}$	0.0102 (102)	0.00855 (85)	0.00939 (94)
0.500	0.483 (97)	0.585 (117)	0.534 (107)
1.60	1.52 (95)	1.57 (98)	1.54 (96)
5.00	4.86 (97)	4.62 (92)	4.74 (95)
16.0	16.0 (100)	15.3 (94)	15.6 (98)
50.0	50.5 (101)	49.7 (99)	50.1 (100)

\*: Rounded by the number of digits of quantitation lower limit.

\*\*: Calculated using the value before rounding, the value was expressed as an integer.

\*\*\*: arithmetic mean

Table 2-1 Cell Densities of *Raphidocelis subcapitata* during the 72-hour Exposure

Nominal Concentration (mg/L)	Mean Measured Concentration* (mg/L)	Vessel No.	Cell Densities ( $\times 10^4$ cells/mL)			
			0hour	24hours	48hours	72hours
Control	<0. 00029	1	0. 50	3. 00	16. 9	83. 0
		2	0. 50	3. 33	17. 5	86. 1
		3	0. 50	3. 19	16. 8	84. 3
		4	0. 50	3. 16	15. 4	74. 3
		5	0. 50	3. 05	18. 9	104
		6	0. 50	3. 03	16. 9	80. 2
	Average		0. 50	3. 13	17. 1	85. 3
			0	0. 12	1. 14	10. 0
			0. 0	4. 0	6. 7	11. 8
$0. 100 \times 10^{-2}$	0. 00100	1	0. 50	3. 06	17. 8	83. 3
		2	0. 50	2. 72	16. 8	82. 7
		3	0. 50	3. 24	18. 1	96. 2
		Average	0. 50	3. 01	17. 6	87. 4
		SD	0	0. 26	0. 68	7. 63
		CV (%)	0. 0	8. 8	3. 9	8. 7
	0. 316 $\times 10^{-2}$	1	0. 50	3. 23	18. 0	83. 1
		2	0. 50	2. 92	16. 6	85. 7
		3	0. 50	3. 08	17. 6	91. 9
		Average	0. 50	3. 08	17. 4	86. 9
		SD	0	0. 16	0. 72	4. 52
		CV (%)	0. 0	5. 0	4. 1	5. 2
$1. 00 \times 10^{-2}$	0. 00939	1	0. 50	3. 02	18. 2	60. 2
		2	0. 50	3. 49	18. 7	60. 3
		3	0. 50	3. 22	17. 3	59. 3
		Average	0. 50	3. 24	18. 1	59. 9
		SD	0	0. 24	0. 71	0. 55
		CV (%)	0. 0	7. 3	3. 9	0. 9
	0. 500	1	0. 50	3. 02	15. 3	56. 3
		2	0. 50	3. 00	14. 3	52. 4
		3	0. 50	2. 90	15. 1	58. 8
		Average	0. 50	2. 97	14. 9	55. 8
		SD	0	0. 06	0. 53	3. 23
		CV (%)	0. 0	2. 2	3. 6	5. 8

\*: arithmetic mean

SD : Standard deviation

Table 2-2 Cell Densities of *Raphidocelis subcapitata* during the 72-hour Exposure

Nominal Concentration (mg/L)	Mean Measured Concentration* (mg/L)	Vessel No.	Cell Densities ( $\times 10^4$ cells/mL)			
			0hour	24hours	48hours	72hours
1. 60	1. 54	1	0.50	2.81	12.1	33.6
		2	0.50	2.82	11.8	30.8
		3	0.50	2.95	13.0	38.0
		Average	0.50	2.86	12.3	34.1
		SD	0	0.08	0.62	3.63
		CV (%)	0.0	2.7	5.1	10.6
5. 00	4. 74	1	0.50	2.48	6.63	15.6
		2	0.50	2.49	7.53	16.0
		3	0.50	2.40	6.91	14.2
		Average	0.50	2.46	7.02	15.3
		SD	0	0.05	0.46	0.95
		CV (%)	0.0	2.0	6.6	6.2
16. 0	15. 6	1	0.50	1.74	3.00	4.21
		2	0.50	1.89	3.02	4.00
		3	0.50	1.82	2.94	3.86
		Average	0.50	1.82	2.99	4.02
		SD	0	0.08	0.04	0.18
		CV (%)	0.0	4.1	1.4	4.4
50. 0	50. 1	1	0.50	1.51	2.14	2.64
		2	0.50	1.42	1.98	2.46
		3	0.50	1.46	1.98	2.53
		Average	0.50	1.46	2.03	2.54
		SD	0	0.05	0.09	0.09
		CV (%)	0.0	3.1	4.5	3.6

\*: arithmetic mean

SD : Standard deviation

Table 3 Growth of *Raphidocelis subcapitata* during the 72-hours Exposure  
at Control condition.

Vessel No.	Growth Rate ( $d^{-1}$ )			Ave.	SD	CV (%)	Average of CV (%) 【A】
	0-24h	24-48h	48-72h				
1	1.78	1.73	1.59	1.70	0.10	5.8	6.9
2	1.89	1.66	1.59	1.72	0.15	9.0	
3	1.85	1.67	1.61	1.71	0.12	7.1	
4	1.84	1.59	1.58	1.67	0.15	8.8	
5	1.80	1.83	1.71	1.78	0.06	3.6	
6	1.79	1.72	1.56	1.69	0.12	7.2	
Average			1.71				
SD			0.04				
CV (%) 【B】			2.2				

SD: Standard deviation

CV (%):Calculated using the value before rounding.

A: mean CV (%) for section-by-section specific growth rates

B: CV (%) of average specific growth rates during the whole test period in replicate

Table 4-1 Percentage of Growth Inhibition of *Raphidoce lis subcapitata*

Nominal Concentration (mg/L)	Mean Measured Concentration* (mg/L)	Vessel No.	Growth rate	
			Rate $\mu$ (0-72h)	Inhibition (%) $I\mu$ (0-72h)
Control	<0. 00029	1	1. 70	
		2	1. 72	
		3	1. 71	
		4	1. 67	
		5	1. 78	
		6	1. 69	
		Average	1. 71	-
$0. 100 \times 10^{-2}$	0. 00100	SD	0. 04	
		CV (%)	2. 2	
		1	1. 71	0. 4
		2	1. 70	0. 5
		3	1. 75	-2. 4
		Average	1. 72	-0. 5
		SD	0. 03	
$0. 316 \times 10^{-2}$	0. 00323	CV (%)	1. 7	
		1	1. 70	0. 4
		2	1. 71	-0. 2
		3	1. 74	-1. 6
		Average	1. 72	-0. 4
		SD	0. 02	
		CV (%)	1. 0	
$1. 00 \times 10^{-2}$	0. 00939	1	1. 60	6. 7
		2	1. 60	6. 7
		3	1. 59	7. 0
		Average	1. 60	6. 8
		SD	0. 00	
		CV (%)	0. 2	
0. 500	0. 534	1	1. 57	8. 0
		2	1. 55	9. 4
		3	1. 59	7. 2
		Average	1. 57	8. 2
		SD	0. 02	
		CV (%)	1. 2	

\*: arithmetic mean

SD : Standard deviation

Table 4-2 Percentage of Growth Inhibition of *Raphidoce lis subcapitata*

Nominal Concentration (mg/L)	Mean Measured Concentration* (mg/L)	Vessel No.	Growth rate	
			Rate $\mu$ (0-72h)	Inhibition(%) $I\mu$ (0-72h)
1. 60	1. 54	1	1. 40	18. 1
		2	1. 37	19. 8
		3	1. 44	15. 7
		Average	1. 41	17. 8
		SD	0. 04	
		CV (%)	2. 5	
5. 00	4. 74	1	1. 15	33. 0
		2	1. 15	32. 5
		3	1. 11	34. 9
		Average	1. 14	33. 5
		SD	0. 02	
		CV (%)	1. 8	
16. 0	15. 6	1	0. 71	58. 7
		2	0. 69	59. 7
		3	0. 68	60. 4
		Average	0. 69	59. 6
		SD	0. 01	
		CV (%)	2. 1	
50. 0	50. 1	1	0. 55	67. 9
		2	0. 52	69. 3
		3	0. 53	68. 8
		Average	0. 54	68. 7
		SD	0. 01	
		CV (%)	2. 3	

\*: arithmetic mean

SD : Standard deviation

Table 5 Calculated EC50 and NOEC

ErC50(0-3d) (mg/L)	95-Percent Confidence Limits (mg/L)	NOECr(0-3d) (mg/L)
12. 1	10. 2	-
	14. 4	0. 00323

Calculated by Mean Measured Concentration

Table 6 Temperature in the Incubation Chamber

Exposure Period (hours)	Temperature (°C)
0	22.9
24	22.8
48	22.8
72	22.8

Table 7 Photon Flux Density in the Incubation Chamber

Exposure Period (hours)	Photon Flux Density <sup>a</sup> ( $\mu\text{ mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ )
0	67.02
24	64.85
48	64.52
72	64.26

a: average of five sites

Table 8 pH Values

Nominal Concentration (mg/L)	Mean Measured Concentration* (mg/L)	Vessel No.	pH	
			0 hour	72 hours
Control	<0.00029	1	7.7	8.2
$0.100 \times 10^{-2}$	0.00100	1	7.6	8.1
$0.316 \times 10^{-2}$	0.00323	1	7.6	8.1
$1.00 \times 10^{-2}$	0.00939	1	7.6	8.0
0.500	0.534	1	7.6	7.9
1.60	1.54	1	7.6	7.9
5.00	4.74	1	7.6	7.7
16.0	15.6	1	7.5	7.7
50.0	50.1	1	7.5	7.7

\*:arithmetic mean

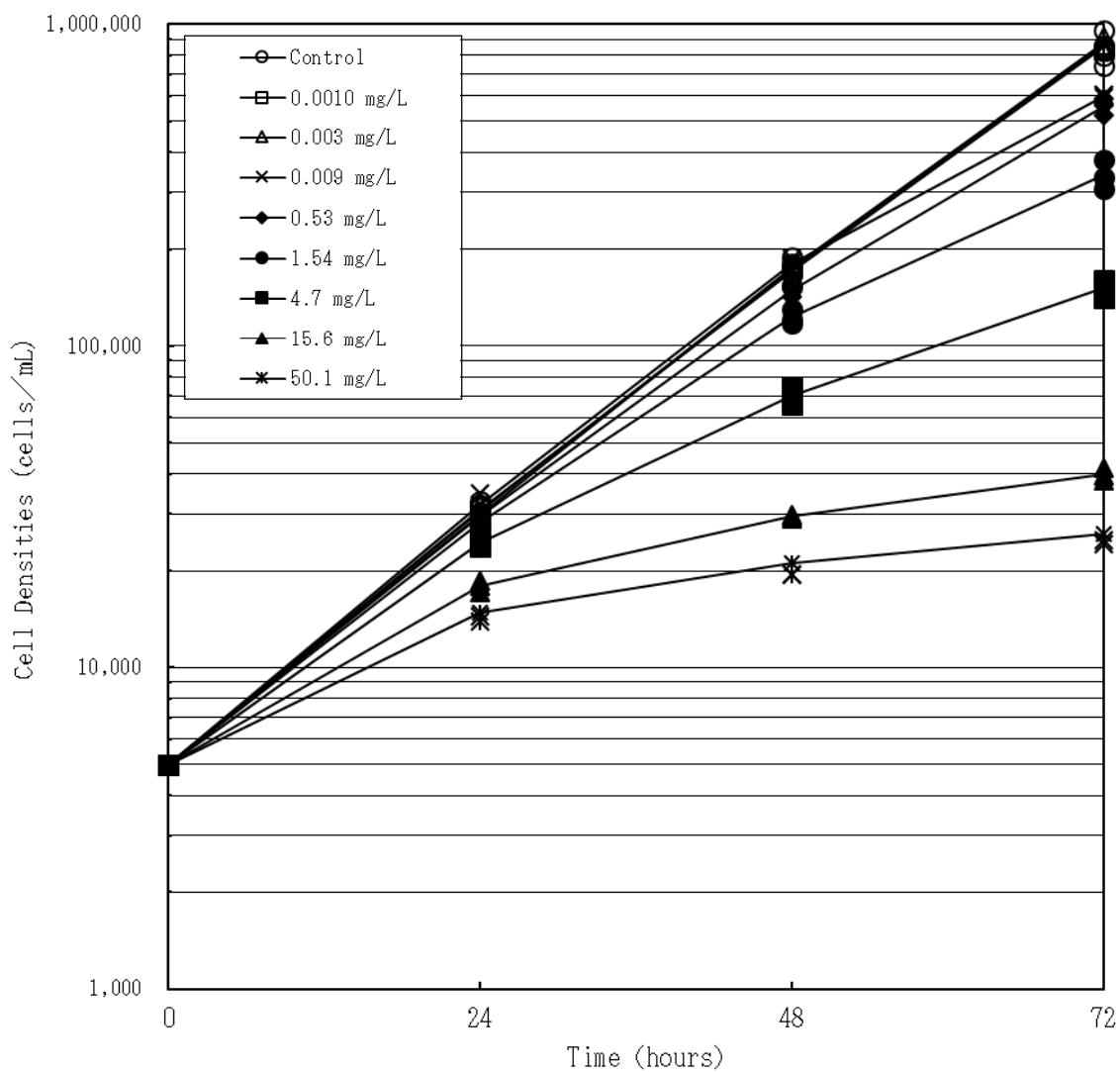
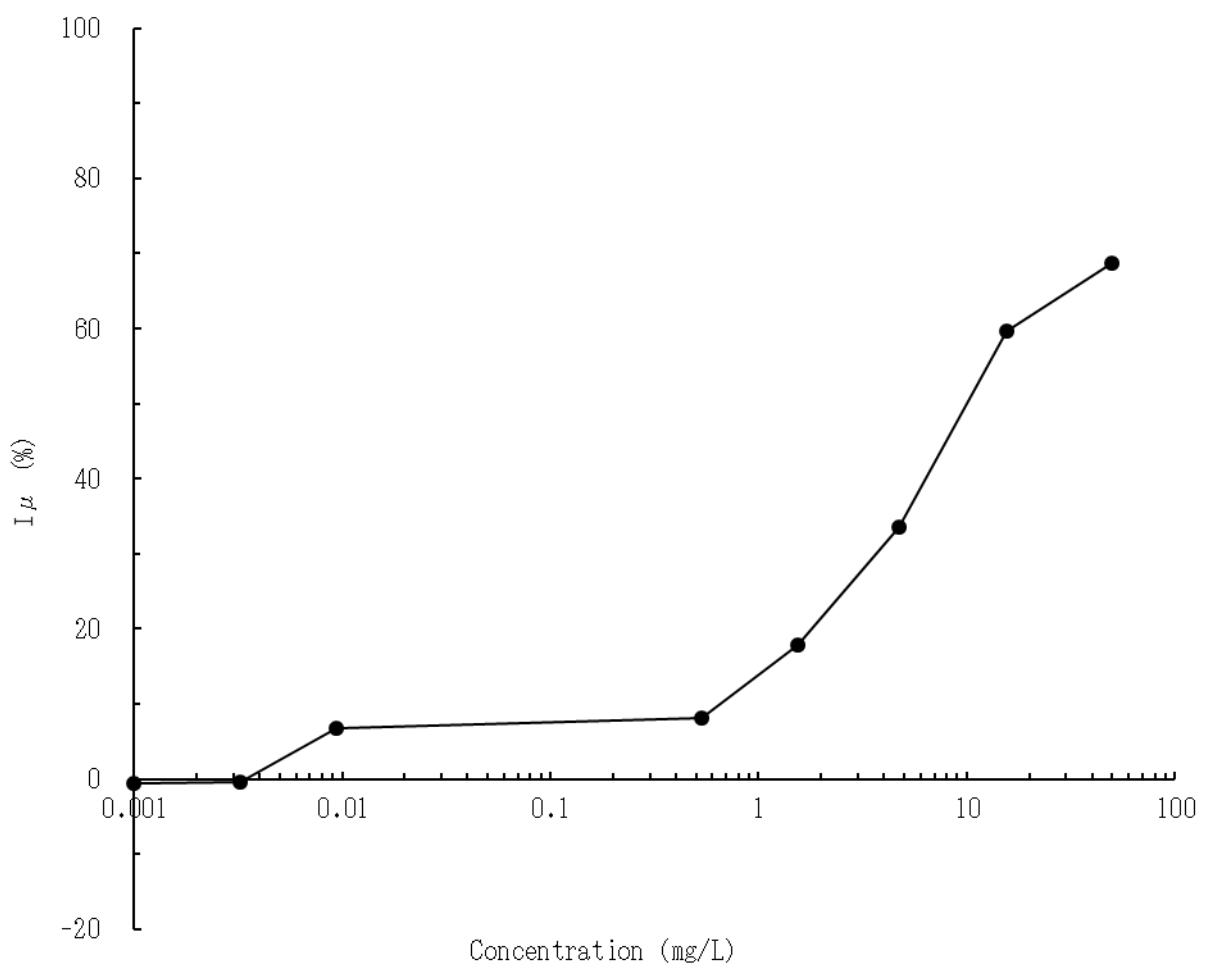


Figure 1 Algal Growth Curve of *Raphidocelis subcapitata*

at several concentrations.

(Mean cell counts vs. time during the 72-hours exposure)



[ Mean Measured Concentration]

Figure 2 Concentration-Inhibition Curve Based on Group Means of Im Values  
Calculated from the Growth Rate.

## 付属資料-1 O E C D 培地

Appendix Table 1 OECD medium

Nutrient salts	Concentration (mg/L)
NH <sub>4</sub> Cl	15
MgCl <sub>2</sub> •6H <sub>2</sub> O	12
CaCl <sub>2</sub> •2H <sub>2</sub> O	18
MgSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O	15
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1. 6
FeCl <sub>3</sub> •6H <sub>2</sub> O	0. 064
Na <sub>2</sub> EDTA•2H <sub>2</sub> O	0. 1
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0. 185
MnCl <sub>2</sub> •4H <sub>2</sub> O	0. 415
ZnCl <sub>2</sub>	0. 003
CoCl <sub>2</sub> •6H <sub>2</sub> O	0. 0015
CuCl <sub>2</sub> •2H <sub>2</sub> O	0. 00001
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> •2H <sub>2</sub> O	0. 007
NaHCO <sub>3</sub>	50

pH (was not controlled) :8. 1±0. 3

## 付属資料-2 予備試験結果

暴露条件

- 1) 暴露方式 : 開放系（通気性シリコン製栓）、振とう培養（100 rpm）
- 2) 供試生物 : *Raphidocelis subcapitata* (ATCC 22662)
- 3) 暴露期間 : 72時間
- 4) 試験濃度（設定値） : 0.012、0.048、0.192、0.766、3.05、12.5及び50.0 mg/L（公比；4）の2試験濃度区、及び対照区
- 5) 試験液量 : 100 mL／容器
- 6) 連数 : 3容器／対照区、2容器／試験濃度区
- 7) 初期生物量 :  $0.5 \times 10^4$  cells/mL
- 8) 試験温度 : 23°C設定（変動幅は±2°C）
- 9) 照明 : 蛍光灯による連続照明  
(波長400～700 nmの範囲の光量子について60～90  $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ )

Appendix Table 2-1 Percentage of Growth Inhibition of  
*Raphidocelis subcapitata*

Nominal Concentration (mg/L)	Growth rate	
	Rate $\mu$ (0-72h)	Inhibition (%) $I\mu$ (0-72h)
Control	1.75	-
0.012	1.60	7.4
0.048	1.61	8.1
0.192	1.58	10.1
0.766	1.56	11.2
3.05	1.19	32.3
12.5	0.78	55.4
50.0	0.48	72.4

### 付属資料-3 試験液の調製方法

1. 濃厚液 I (被験物質濃度 100 mg/L、調製量 500 mL、試験濃度区 04~08 用) の調製方法
  - 1) 被験物質を秤量皿に 50.04 mg 秤量した。
  - 2) 500 mL 容ガラス製共栓付き三角フラスコに被験物質を全量入れた。
  - 3) 500 mL 容ガラス製メスシリンダーを使用して、500 mL の試験用水を被験物質の入った三角フラスコに入れた。
  - 4) 超音波洗浄器を使用して、30 分間超音波処理した。
  - 5) 38 mm オクタゴン回転子をフラスコに入れ、約 21 時間強攪拌した。
  
2. 濃厚液 II (被験物質濃度 1.0 mg/L、調製量 200 mL、試験濃度区 01~03 用) の調製方法
  - 1) 一昼夜強攪拌して被験物質が溶解した濃厚液 I を、2 mL 容ホールピペットで採取して 200 mL 容メスフラスコに入れた。
  - 2) 試験用水でメスアップした。
  
3. 試験液の調製
  - 1) 濃厚液 I 及び II を以下の表にしたがい 04~08 区については 500 mL 容メスフラスコ、01 ~03 区については 1,000 mL 容メスフラスコに入れた。

付表 3-1 試験液の調製方法

試験区番号	04	05	06	07	08
試験濃度 (mg/L)	0.500	1.60	5.00	16.0	50.0
濃厚液 I 添加量 (mL)	2.5	8	25	80	250
使用する定器具	2.5 mL 容マイクロビュット	10 mL 容マイクロビュット	50 mL 容メスシリンダー	100 mL 容メスシリンダー	250 mL 容メスシリンダー

付表 3-2 試験液の調製方法

試験区番号	01	02	03
試験濃度 (mg/L)	0.00100	0.00316	0.0100
濃厚液 II 添加量 (mL)	1.0	3.16	10.0
使用する定器具	1 mL 容マイクロビュット	5 mL 容マイクロビュット	10 mL 容マイクロビュット

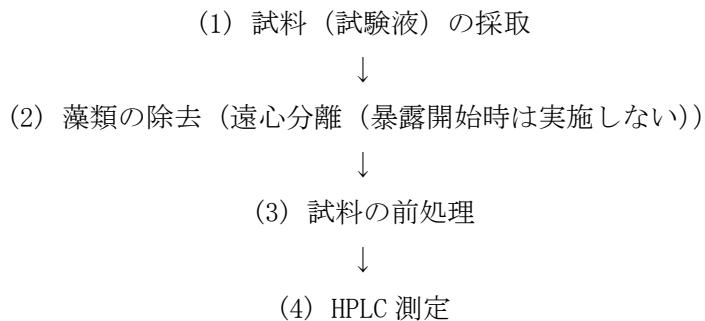
- 2) 試験用水でメスアップして転倒混和した。
- 3) 0.22  $\mu\text{m}$  フィルター (ADVANTEC; 25CS020AS、0.20  $\mu\text{m}$ ) でろ過滅菌し、ろ液は乾熱滅菌済

みの 500 mL 容デュラン瓶に入れた。

- 4) クリーンベンチ内で、乾熱滅菌済みの 100 mL 容メスシリンドーを使用して、乾熱滅菌した各試験容器に 100 mL ずつ分注した。
- 5) 対照区については、被験物質を含まない試験用水 1L を 3) に従いろ過滅菌し、ろ液を乾熱滅菌済みの 1 L 容デュラン瓶に入れた。クリーンベンチ内で、乾熱滅菌済みの 100 mL 容メスシリンドーを使用して、乾熱滅菌した試験容器 6 基に 100 mL ずつ分注した。

#### 付属資料-4 試験液の分析方法

## 1. 分析方法 (HPLC 法)



## 2. 試料（試験液）の採取及び遠心分離

- 1) 暴露開始時は調製した試験液の余りを試料とした。
- 2) 試験区 04～08 については、各試験区について 1 mL 容マイクロピペットで試験液を 0.75 mL 採取して 1.5 mL 容バイアルに入れた後、1 mL 容マイクロピペットでアセトニトリルを 0.75 mL 加えて蓋をし、よく混合した。
- 3) 対照区及び試験濃度区 01～03 については、50 mL 容ガラス製比色管 4 本に 50 mL ずつ試料を採取し濃縮操作開始時まで冷蔵保存した。
- 4) 暴露終了時の試験濃度区 04～08 については、10 mL 容マイクロピペットで各試験容器から 3.3 mL の試験液を採取し、10 mL 容ガラス製試験管 1 本に 9.9 mL ずつ採取した。試験濃度区 01～03 については、各試験濃度区の 3 基の試験容器に入っている試験液を 1 基の試験容器に合わせて混合した後、10 mL 容ガラス製試験管 22 本に 10 mL ずつ採取した。  
対照区については、6 基の試験容器に入っている試験液を 1 L 容ガラス製三角フラスコ内で合わせて混合した後、10 mL 容ガラス製試験管 22 本に 10 mL ずつ採取した。
- 5) 遠心分離 ( $1,700 \times g$ 、10 min) して藻体を沈殿させた。
- 6) 試験区 04～08 については、藻体が混入しないように注意しながら 1 mL 容マイクロピペットで試験液を 0.75 mL 採取して 1.5 mL 容バイアルに入れた後、1 mL 容マイクロピペットでアセトニトリルを 0.75 mL 加えて蓋をし、よく混合した。
- 7) 対照区及び試験濃度区 01～03 については、藻体が混入しないように注意しながら、10 mL 容ガラス製駒込ピペットで試料を採取して、50 mL 容ガラス製比色管 4 本に 50 mL ずつ採取した後、濃縮操作に供した。

## 3. 前処理（濃縮操作）

- 1) 固相カートリッジ(Oasis HLB plus)に 10 mL 容注射筒を取り付け、アセトニトリル 10 mL、純水 10 mL の順で洗浄した。

- 2) 試料 100 mL を少しづつ注射筒に入れて通水した。
- 3) 各比色管に純水を約 15 mL 入れ、同様に注射筒に入れて通水した。
- 4) カートリッジに注射器で空気を 3 回以上通して脱水した。
- 5) アセトニトリル 5 mL で、10 mL 容試験管に溶出させた。
- 6) 窒素ガスを吹き付けて、アセトニトリル量を試験管の目盛りで 1 mL に定容した。
- 7) パストールピペットを使用して、試験管の目盛りで 2 mL になるまで純水を加えた。
- 8) 混合後、パストールピペットを使用して 1.5 mL 容バイアルに採取し、分析試料とした。

#### 4. 高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 測定条件

(装置)

高速液体クロマトグラフ	:	Agilent HP-1200 型
ワークステーション	:	HP ケミステーション
オペレーションシステム	:	Windows XP
デガッサー	:	G1322A 型
送液ポンプ	:	G1311A 型
オートサンプラー	:	G1329A 型
カラムオーブン	:	G1316A 型
紫外線可視分光検出器	:	G1315D 型

(条件)

カラム	:	Mightysil RP-18 GP 150-4.6 (5 $\mu$ m) 関東化学(株)
カラムオーブン	:	40 °C
溶離液	:	CH <sub>3</sub> CN* : 水=27 : 73
流速	:	0.2 mL/min
測定波長	:	270 nm

\*:富士フィルム和光純薬(株)製 HPLC 分析用

#### 5. 検量線

アセトニトリル (富士フィルム和光純薬(株)製 HPLC 分析用) 及び純水を等量混合した溶液 (以下「調製溶液」とする) を調製した。

被験物質 10.04 mg を秤量して 100 mL 容メスフラスコに入れ、アセトニトリル (富士フィルム和光純薬(株)製 HPLC 分析用) でメスアップした (100 mg/L-STD)。

以下の表に従い、標準溶液を 10 mL 容ガラス製試験管に添加して 10 mL にメスアップした。調製した標準溶液は、分析直前まで冷蔵保管した。

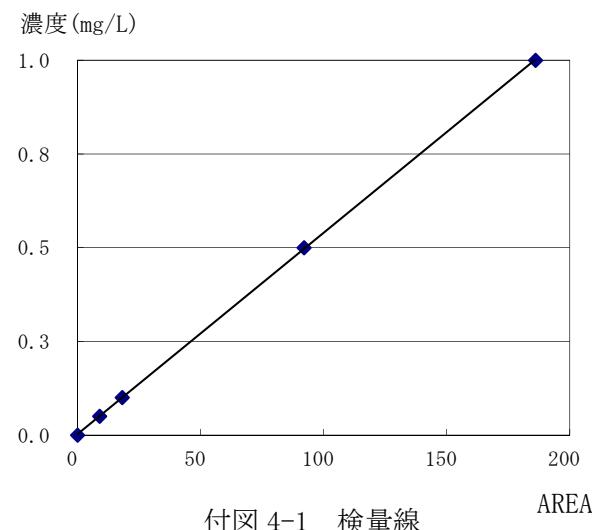
付表 4-1 標準溶液の調製方法

標準溶液(mg/L)	50	20	10	5	1	0.5	0.1	0.05
添加する STD の濃度(mg/L)	100	50	20	10	5	1	0.5	0.1
STD 添加量(mL)	5	4	5	5	2	5	2	5
使用する 定容器具						ホールピペット		
メスアップする 溶液の種類	純水					調製溶液		

測定に際しては、対照区及び試験区 01～03 の試料用と、試験区 04～08 の試料用として各々検量線を作成した。対照区及び試験区 01～03 の試料用に作成した検量線の  $R^2$  値は 0.9999～1.0000 であり、高い直線性を示した。(付表 4-2、付図 4-1)

付表 4-2 標準溶液の濃度及びピークエリア

濃度(mg/L)	AREA
0	0.00000
0.05	8.97942
0.1	18.13102
0.5	92.01623
1	186.05128

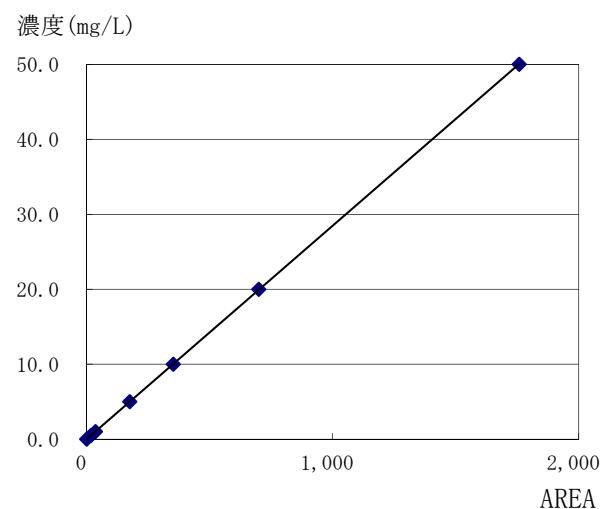


付図 4-1 検量線

また、試験区 04～08 の試料用として作成した検量線の  $R^2$  値は 1.0000 であり、同様に高い直線性を示した。(付表 4-3、付図 4-2)

付表 4-3 標準溶液の濃度及びピークエリア

濃度(mg/L)	AREA
0	0.00000
0.5	17.72547
1	35.76248
5	175.42947
10	352.09570
20	699.59058
50	1,757.95508



付図 4-2 検量線

## 6. 装置検出下限 (IDL)

暴露試験実施前に、1.0 mg/L の標準溶液を7連で分析した。7回の測定結果から標準偏差(s)を算出し、IDL(装置検出下限値)を次式に従い算出した。また、その3倍値をIQL(測定定量下限値)として求めた。

$$IDL = t(n-1, 0.01) \times s$$

ここで、 $t(n-1, 0.01)$ は自由度n-1の危険率1%（片側）のt値である『3.143』を与えた。

---

検出下限値 : 0.022 mg/L

---

定量下限値 : 0.066 mg/L

---

## 7. 添加回収試験及び測定値の補正

OECD培地を用いて0.0025 mg/L溶液を調製し、添加回収試験を実施した結果(n=7)、平均回収率は91.7%であったことから、この値で化学分析による測定値を補正した。

---

測定値の補正係数 : 0.917

---

濃縮操作を実施した試料については、以下に示す定量下限値を超える分析測定値について、補正係数で除して算出した。

## 8. 測定検出下限値 (MDL) 及び定量下限値 (MQL)

OECD培地を用いた0.0025 mg/L溶液の添加回収試験の結果(n=7)より、標準偏差(s)を算出し、MDL(測定検出下限値)を次式に従い算出した。また、その3倍値をMQL(定量下限値)として求めた。

$$MDL = t(n-1, 0.01) \times s$$

ここで、 $t(n-1, 0.01)$ は自由度n-1の危険率1%（片側）のt値である『3.143』を与えた。

---

検出下限値 : 0.00029 mg/L

---

定量下限値 : 0.00087 mg/L

---