

1. 藻類生長阻害試験

要 約

試験委託者：環境省

表 題：プランルカスト水和物の藻類 (*Pseudokirchneriella subcapitata*) に対する生長阻害試験

試験番号：A191207

試験方法：本試験は、「新規化学物質等に係る試験の方法について＜藻類生長阻害試験，ミジンコ急性遊泳阻害試験及び魚類急性毒性試験＞」（平成23年3月31日 薬食発0331第7号，平成23・03・29製局第5号，環保企発第110331009号，最終改正：令和元年7月1日）に準拠して実施した。

本試験では被験物質としてプランルカスト水和物（0.5水和物 CAS番号150821-03-7）の藻類に対する生長阻害試験として依頼されたが，プランルカスト（CAS番号103177-37-3）を被験物質として試験を実施した。

不溶物を除去した水溶性画分^{*1}を試験液とし生物への暴露を行った。

^{*1}：水溶性画分（WSF，Water-soluble fraction）：

被験物質が溶解状態で存在しているとみなすことができる水溶性画分

- 1) 供試生物：単細胞緑藻類 (*Pseudokirchneriella subcapitata*)
- 2) 試験用水：試験ガイドライン推奨培地
- 3) 暴露期間：72時間
- 4) 培養方式：止水式（開放系），振とう培養（100 rpm）
- 5) 初期生物量：前培養した藻類 5×10^3 cells/mL
(指数増殖期の藻類乾燥重量： 1.8×10^{-8} mg/cell, n=30)
- 6) 試験温度：22℃（暴露期間中の変動範囲は $\pm 2^\circ\text{C}$ 以内）
- 7) 照明：60～75 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ ，白色蛍光灯での連続照明（液面付近）
- 8) 試験濃度：

| 試験区 | 負荷率 ^{*2} (mg/L) |
|---------------------|--------------------------|
| 対照区 | — |
| 濃度区 1 ^{*3} | 100 |

^{*2}：負荷率（Loading rate）：WSF の調製の際に用いられる被験物質と水の重量対容積比

^{*3}：試験ガイドライン上限濃度を負荷率とした限度試験

9) 分析法： 高速液体クロマトグラフ (HPLC) 法

結 果：

1) 生長速度の比較による阻害濃度

阻害濃度の算出には被験物質濃度の測定値の時間加重平均値を用いた。

半数生長阻害濃度 ErC50 (0-72h)： $>0.798 \text{ mg/L}$ (95%信頼区間：算出不可)

最大無影響濃度 NOECr (0-72h)： $\geq 0.798 \text{ mg/L}$ (Student の t 検定)

試験上限濃度（負荷率：100 mg/L，測定値の時間加重平均値：0.798 mg/L）での限度試験であり，濃度区 1 の阻害率が $<50\%$ であったため，ErC50 は $>$ 濃度区 1 とした。また，対照区と濃度区 1 の生長速度に有意差は認められなかったため，NOECr は濃度区 1 以上とした。

2) 藻類の形態観察

暴露開始後 72 時間の顕微鏡下での細胞形態観察の結果，濃度区 1 において，細胞形態の変化（収縮，膨張，破裂等）や細胞凝集は認められず，また，対照区との相違もなかった。

1 材料

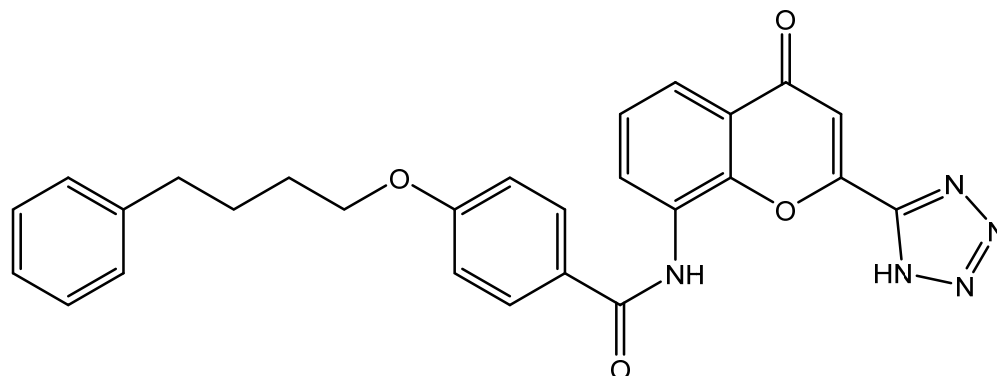
1.1 被験物質

1.1.1 名称、構造式および物理化学的性状

名 称*： プランルカスト

CAS 番号*： 103177-37-3

構造式：



分子式*： $C_{27}H_{23}N_5O_4$

分子量*： 481.5

*：供給者提供資料

1.1.2 供試試料

純度*： 100.0%

ロット番号*： 147164-59

供給者： Cayman Chemical Company

外観*： 結晶固体

*：供給者提供資料

1.1.3 保管法および安定性の確認

試験期間中、被験物質を下記のとおり保管した。

保管条件：冷凍，暗所，気密

保管場所：試験物質保管用冷凍庫

実験終了後に、被験物質の赤外吸収スペクトルを測定した。得られたスペクトルは試験前に測定したスペクトルと一致したことから、被験物質が保管条件下で安定であったと判断した。赤外吸収スペクトルを付属資料－1 に示す。

(装置) フーリエ変換赤外分光分析装置：

サーモフィッシャーサイエンティフィック製 Nicolet iS10 型

1.2 試験用水

前培養および試験ともに試験ガイドラインに示されている推奨培地を調製し、濾過滅菌（0.22 μm ）したものを使用した。組成表を付属資料-2 に示す。

試験ガイドラインには、大気との平衡状態で培地の pH が 8.1（25℃）となることが記載されている。当施設での pH は 8.0 付近（7.7～8.1，22℃）である。

1.3 供試生物

- 1) 分類： 単細胞緑藻類
- 2) 学名： *Pseudokirchneriella subcapitata*
- 3) 株名： ATCC22662
- 4) 入手先： American Type Culture Collection
- 5) 入手日： 1996 年 6 月 20 日
- 6) 入手後の管理： Gorham 培地を用い無菌的に継代培養。定期的（約 6 ヶ月毎）に細菌検査をし無菌性を確認した。
- 7) 前培養： 前培養期間；2020 年 2 月 22 日～2020 年 2 月 25 日
試験と同条件で前培養し、暴露開始時に指数増殖期になるようにした。
また、変形や異常な細胞の出現は認められなかった。

1.4 試験容器および藻類培養試験装置等

- 1) 試験容器： 500 mL ガラス製三角フラスコ（IWAKI，旭硝子製）（アルミ栓付）
- 2) 藻類培養試験装置： 伊藤製作所製 AGP-150RL 型
- 3) 光学顕微鏡： ニコン製 ECLIPSE TE300 型
- 4) 粒子計数装置： シスメックス製 CDA-1000 型
- 5) pH 計： 堀場製作所製 F-71 型
- 6) 温度計： Tasco Japan 製 TNA-120 型
- 7) 光量子計： Apogee 製 MQ-200 型
- 8) 電子天秤： メトラー製 AG204 型
メトラー製 AB204-S 型
メトラー製 PB3002 型
メトラー・トレド製 MS3002S 型

2 方法

2.1 試験方法

本試験は、「新規化学物質等に係る試験の方法について＜藻類生長阻害試験，ミジンコ急性遊泳阻害試験及び魚類急性毒性試験＞」（平成 23 年 3 月 31 日 薬食発 0331 第 7 号，平成 23・03・29 製局第 5 号，環保企発第 110331009 号，最終改正：令和元年 7 月 1 日）に準拠して実施した。

本試験では被験物質としてプランルカスト水和物（0.5 水和物 CAS 番号 150821-03-7）の藻類に対する生長阻害試験として依頼されたが，プランルカスト（CAS 番号 103177-37-3）を被験物質として試験を実施した。

不溶物を除去した水溶性画分*を試験液とし生物への暴露を行った。なお，試験用水に対する被験物質の溶解性について評価した結果を付属資料－3 に示す。

* 水溶性画分（WSF, Water-soluble fraction）：

被験物質が溶解状態で存在しているとみなすことができる水溶性画分

2.1.1 試験条件

試験条件について以下に記載する。試験容器およびその他の器具は，必要に応じて滅菌したものを使用した。また，藻類の接種も無菌操作で行った。

- 1) 培養方式： 止水式（開放系），振とう培養（100 rpm）
- 2) 暴露期間： 72 時間
- 3) 試験液量： 100 mL／容器
（被験物質の濃度分析に使用するため，藻類接種時は 99 mL／容器とした）
- 4) 連数： 6 容器／対照区，6 容器／試験区
- 5) 初期生物量： 前培養した藻類 5×10^3 cells/mL
（指数増殖期の藻類乾燥重量： 1.8×10^{-8} mg/cell, n=30）
- 6) 試験温度： 22℃（暴露期間中の変動範囲は $\pm 2^\circ\text{C}$ 以内）
- 7) 照明： 60～75 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ ，白色蛍光灯での連続照明（液面付近）
- 8) pH： 調整なし

2.1.2 予備試験結果

試験濃度を試験ガイドライン上限濃度（100 mg/L）以下とし、予備試験を実施した。被験物質を試験用水に添加し、スターラー攪拌を 48 時間実施した後、フィルター*1 でろ過*2 して不溶の被験物質を除くことにより、負荷率*3 100 mg/L の原液を調製した。この原液を試験用水で希釈して試験液を調製した。結果を以下に示す。

*1：メルクミリポア製，メンブレンフィルター HA 0.45 µm

*2：東洋濾紙製，吸引ポンプ EP-01 型

*3：負荷率（Loading rate）：WSF の調製の際に用いられる被験物質と水の重量対容積比

予備試験結果（対照区 3 連，濃度区 1 連）

| 設定濃度 (mg/L) | 障害率 (%) $I_{\mu}(0-3d)^{*4}$ | 試験液中の被験物質濃度（設定値に対する割合，%） | | | |
|-------------------|---------------------------------|--------------------------|-------------|--------------|--------------|
| | | 暴露開始時 | 暴露開始後 72 時間 | | |
| | | | 藻類添加有 | 藻類添加無 遠心有 | 藻類添加無 遠心無 |
| 対照区 | -- | N.D. | N.D. | N.A. | N.A. |
| 1.0 ^{*5} | 0.0 | 0.9 | N.A. | N.A. | N.A. |
| 10 ^{*5} | -0.8 | 0.8 | N.A. | N.A. | N.A. |
| 100 | -2.1 | 0.8 | 0.7 | 0.7 | 0.8 |

*4：「2.2.1 結果の算出，2) 生長速度および生長障害率の算出」に示した式により算出した。

*5：負荷率 100mg/L の濃度区用原液を希釈して調製したため希釈率から算出した値を記載

--：計算には該当せず

N.D.：Not detected

N.A.：Not analyzed

2.1.3 試験濃度の設定

2.1.2 に示した予備試験の結果に基づき，試験濃度を次のように決定した。

| 試験区 | 負荷率 (mg/L) |
|---------------------|------------|
| 対照区 | — |
| 濃度区 1 ^{*6} | 100 |

*6：試験ガイドライン上限濃度を負荷率とした限度試験

2.1.4 試験液の調製

試験液の調製方法を付属資料-4 に示す。pH 測定および試験培養液の色調観察のための試験液（各試験区 1 連，以下予備容器とする）も調製した。

調製時の試験液の外観を観察し記録した。

2.1.5 試験液および試験培養液の分析

暴露開始時および暴露開始後 72 時間に，全試験区の試験液および試験培養液中の被験物質濃度を，高速液体クロマトグラフ（HPLC）法により分析した。分析方法の詳細を付属資料-5 に示す。

2.1.6 試験操作

1) 暴露の開始

前培養した藻類を，生物量（代替パラメータとして細胞濃度）が 5×10^3 cells/mL となるよう，試験液の入った容器に一定量添加した。前培養液の生物量は，粒子計数装置および血球計算盤と顕微鏡により測定した。なお，予備容器には添加しなかった。

各試験容器を培養装置に，乱数表を用いランダムに配置し，暴露を開始した。暴露開始後 24 時間毎に再配置した。予備容器も同時に培養装置に設置した。

2) 生物量の測定

暴露開始後 24，48 および 72 時間に各試験容器より試験培養液 1.0 mL（72 時間では 0.5 mL）を採取し，粒子計数装置用電解液 9.0 mL（72 時間では 14.5 mL）と混合した後，生物量を粒子計数装置により測定した。

3) 試験培養液の色調観察および細胞形態観察

暴露開始時，暴露開始後 24，48 および 72 時間には試験培養液の色調を予備容器との比較で観察した。また，暴露開始後 72 時間には細胞形態を顕微鏡により観察した。

4) 試験環境の測定

試験液および試験培養液の pH を暴露開始時および暴露開始後 72 時間に測定した。暴露開始時の pH は，各試験区の予備容器から試験液を一部採取して測定した。暴露開始後 72 時間の pH は，各試験区の試験容器のうち 1 容器（No.1）の試験培養液について測定した。また，暴露期間中，培養装置内の温度，照明光強度および回転数を 1 日 1 回測定した。

2.2 試験結果の評価

2.2.1 結果の算出

1) 生長曲線

対照区および濃度区 1 の生物量の平均値を時間に対してプロットし、生長曲線を作成した（片対数グラフ）。この時、対照区の生長曲線が暴露期間中を通して指数増殖期にあることを確認した。

2) 生長速度および生長阻害率の算出

指数増殖している藻類の平均生長速度（ μ_{i-j} ）を次の式より算出した。

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

ここで、

μ_{i-j} : t_i 時と t_j 時の間の生長速度（／日）

X_i : t_i 時の生物量

[暴露開始時（ t_0 ）の生物量については設定値を用いる]

X_j : t_j 時の生物量

t_i : 暴露開始後 i 回目に生物量を測定した時間（日）

t_j : 暴露開始後 j 回目に生物量を測定した時間（日）

濃度区 1 における各連の生長阻害率（ I_μ ）は対照区の平均生長速度の平均値（ μ_c ）と濃度区 1 での各連の平均生長速度（ μ_t ）との間の差として次の式により算出した。

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

ここで、

μ_c : 対照区の平均生長速度の平均値

μ_t : 濃度区 1 における各連の平均生長速

3) 阻害濃度算出に用いる被験物質濃度

阻害濃度の算出に用いる被験物質濃度は、測定値の時間加重平均値とした。

時間加重平均値は次の式より算出した。

$$Area = \frac{ConcA_n - ConcB_n}{\ln(ConcA_n) - \ln(ConcB_n)} \times Hours$$

$$\overline{MC} = \frac{Total Areas}{Total Hours}$$

$ConcA_n$: 暴露開始時の測定値

$ConcB_n$: 暴露開始後 72 時間の測定値

($ConcA_n$ と $ConcB_n$ の値が同じ場合は、 $Area = ConcA_n \times Hours$ とする。)

\overline{MC} : 時間加重平均値

4) 半数生長阻害濃度 (EC50) の算出

72 時間の暴露期間を通じた生長阻害率 I_{μ} (0-3d)を用いて、以下の方法により藻類の生長を 50% 阻害する被験物質濃度 (半数生長阻害濃度 EC50) を決定した。

| | |
|------------------------------|---------------|
| 最高濃度区における阻害率 | <50% |
| 濃度－生長阻害率曲線の記載 (片対数紙にプロット) | 記載しない |
| EC50 の決定方法 | 推定される濃度領域を記載 |
| EC50 の表記方法 | ErC50 (0-72h) |

5) 最大無影響濃度 (NOEC)

対照区と濃度区 1 の生長速度 μ (0-3d)を以下の統計学的手法により比較し、有意差が認められない場合、最大無影響濃度 (NOEC : NOECr (0-72h)と表記) を濃度区 1 以上とした。

| |
|---|
| 2 群 の 比 較 [対照区以外に 1 群] |
| F 検 定 |
| 等分散が認められる場合 Student の t 検 定 |
| 等分散が認められない場合 Welch の t 検 定 |
| Yukms ソフトウェア Statlight 「#3 2 群の比較」 (Yukms Corp, 東京) |

6) 統計学的手法

試験結果の算出に用いた統計学的手法は、結果とともに示した。

2.2.2 試験の有効性

以下の条件から、本試験の有効性を判断した。

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

3 結果および考察

3.1 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

該当する事象はなかった。

3.2 培養試験装置内環境、試験液および試験培養液の pH、試験液の外観

暴露期間中の培養試験装置内環境（温度、照明光強度、回転数）を Table 1 に、暴露開始時の試験液および暴露開始後 72 時間の試験培養液の pH を Table 2 に、調製時の試験液の外観を Table 3 に示す。

培養試験装置内の温度は、設定範囲内（22℃、暴露期間中の変動範囲は±2℃以内）であった。pH は、暴露開始時が 7.7、暴露開始後 72 時間では 8.4～8.8 であった。

調製時の試験液の外観は、対照区および濃度区 1 とも、けん濁物質、浮遊物質、沈殿物質は認められず、色調は無色であった。

3.3 試験液および試験培養液中の被験物質濃度

試験液および試験培養液中の被験物質濃度の結果を Table 4 に、測定結果を付属資料—5 に示す。

濃度区 1 の暴露開始時の測定値は、0.938 mg/L、暴露開始後 72 時間の測定値は 0.673 mg/L であった。

濃度区 1 の測定値の時間加重平均値は、0.798 mg/L であった。

3.4 半数生長阻害濃度（EC50）および最大無影響濃度（NOEC）

暴露期間中の対照区および濃度区 1 の生物量を Table 5 に、生長曲線を Figure 1 に示す。対照区の生長曲線が暴露期間中を通して指数増殖期にあることを確認した。

生長速度と生長阻害率を Table 6 に、半数生長阻害濃度（EC50）および最大無影響濃度（NOEC）を Table 7 に示す。得られた ErC50 および NOECr を以下に示す。

ErC50 (0-72h) : >0.798 mg/L (95%信頼区間：算出不可)

NOECr (0-72h) : ≥0.798 mg/L (Student の t 検定)

試験上限濃度（負荷率：100 mg/L、測定値の時間加重平均値：0.798 mg/L）での限度試験であり、濃度区 1 の阻害率が<50%であったため ErC50 は>濃度区 1 とした。NOECr については、F 検定（α=0.05）を行い等分散性を確認後、Student の t 検定（α=0.05、両側）を用いて決定した。その結果、対照区と濃度区 1 の生長速度に有意差は認められなかったため、NOECr は濃度区 1 以上とした。詳細を付属資料—6 に示す。

3.5 藻類の観察結果

試験培養液の色調観察の結果、対照区および濃度区 1 とともに経時的に緑色度が増加する傾向がみられた。

暴露開始後 72 時間の顕微鏡下での細胞形態観察の結果、濃度区 1 において、細胞形態の変化（収縮、膨張、破裂等）や細胞凝集は認められず、また、対照区との相違もなかった。

3.6 試験の有効性

対照区の生物量を Table 5 に、生長速度を Table 8 に示す。

対照区の生物量は暴露期間中に 16 倍以上増加した。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 35%を、対照区の繰り返し間の生長速度の変動係数は 7%をそれぞれ超えることはなかった。

試験の有効性の条件を全て満たしたため、試験は有効であると判断した。

以 上

Table 1 Temperatures, Light Intensities and Revolutions in the Incubation Chamber

| Exposure Period (Hours) | Temperature (°C) | Light Intensity ($\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$) | Revolution (rpm) |
|----------------------------|---------------------|--|---------------------|
| 0 | 21.8 | 65-74 | 100 |
| 24 | 21.8 | 66-75 | 100 |
| 48 | 21.8 | 66-74 | 100 |
| 72 | 22.3 | 66-73 | 100 |

Table 2 pH Values of Test Solutions and Test Cultures

| Test Group | pH | | |
|------------|--------|----------|--------------|
| | 0 Hour | 72 Hours | (Vessel No.) |
| Control | 7.7 | 8.4 | (1) |
| Conc.1 | 7.7 | 8.8 | (1) |

Table 3 Appearances of Prepared Test Solutions before Inoculation

| Test Group | Suspended solids | Floating solids | Precipitation | Color |
|------------|------------------|-----------------|---------------|-------|
| Control | S- | F- | P- | C- |
| Conc.1 | S- | F- | P- | C- |

S- : Not observed (Transparent)

F- : Not observed

P- : Not observed

C- : Colorless

Table 4 Measured Concentration of the Test Substance in Test Solutions and Test Cultures

| Test Group | Loading Rate (mg/L) | Measured Concentration (mg/L) (Percent of Nominal) | | Mean ^a Measured Concentration (mg/L) (Percent of Nominal) |
|------------|---------------------|---|----------------|---|
| | | 0 Hour | 72 Hours | |
| Control | -- | <0.05 | <0.05 | ---- |
| Conc.1 | 100 | 0.938 (0.9) | 0.673 (0.7) | 0.798 (0.8) |

a : Time weighted mean

Table 5 Biomass of *Pseudokirchneriella subcapitata* during the 72-Hour Exposure

| Test Group | Loading Rate [Mean ^a Measured Concentration] (mg/L) | Vessel No. | Biomass (cells/mL) | | | |
|------------|---|---------------|--------------------|----------|----------|----------|
| | | | 0 Hour* | 24 Hours | 48 Hours | 72 Hours |
| Control | -- | 1 | 5000 | 29800 | 211000 | 1850000 |
| | | 2 | 5000 | 28900 | 263000 | 2140000 |
| | | 3 | 5000 | 27200 | 195000 | 1630000 |
| | | 4 | 5000 | 28400 | 245000 | 1780000 |
| | | 5 | 5000 | 31000 | 251000 | 2080000 |
| | | 6 | 5000 | 29400 | 242000 | 2110000 |
| | | Average | 5000 | 29100 | 235000 | 1930000 |
| Conc.1 | 100 [0.798] | SD | 0 | 1290 | 25900 | 209000 |
| | | 1 | 5000 | 33100 | 249000 | 2000000 |
| | | 2 | 5000 | 33400 | 241000 | 1730000 |
| | | 3 | 5000 | 33400 | 265000 | 2130000 |
| | | 4 | 5000 | 34200 | 267000 | 2130000 |
| | | 5 | 5000 | 29400 | 233000 | 1670000 |
| | | 6 | 5000 | 27900 | 219000 | 1810000 |
| | | Average | 5000 | 31900 | 246000 | 1910000 |
| | | SD | 0 | 2590 | 18600 | 202000 |

a: Time weighted mean

SD: Standard deviation

*: Nominal initial biomass

Table 6 Growth Inhibitions (%) of *Pseudokirchneriella subcapitata*

| Test Group | Loading Rate [Mean ^a Measured Concentration (mg/L)] | Vessel No. | Growth Rate | |
|------------|---|---------------|------------------------------------|---|
| | | | Rate ^{*1} μ (0-3d) | Inhibition(%) ^{*2} I_{μ} (0-3d) |
| Control | -- | 1 | 1.97 | |
| | | 2 | 2.02 | |
| | | 3 | 1.93 | |
| | | 4 | 1.96 | |
| | | 5 | 2.01 | |
| | | 6 | 2.02 | |
| | | Average SD | 1.98 0.037 | - |
| Conc.1 | 100 [0.798] | 1 | 2.00 | -0.7 |
| | | 2 | 1.95 | 1.8 |
| | | 3 | 2.02 | -1.7 |
| | | 4 | 2.02 | -1.7 |
| | | 5 | 1.94 | 2.4 |
| | | 6 | 1.96 | 1.0 |
| | | Average SD | 1.98 0.035 | 0.2 |

a: Time weighted mean

*1: Average and SD are calculated from original raw data, not from the rounded values (3 significant figures) presented in this table.

*2: Values are the growth inhibition (%) relative to the control. Inhibitions are calculated from original raw data of $\mu(0-3d)$, not from the rounded values (3 significant figures) presented in this table.

SD: Standard deviation

There is no significant difference ($\alpha < 0.05$) between the concentration group and the control.

Table 7 EC50 and NOEC

Based on I_{μ} (0-3d) values (Growth rates)

| ErC50 (0-72h) (mg/L) | 95-Percent Confidence Limits (mg/L) | NOECr (0-72h) (mg/L) |
|-------------------------|---|-------------------------|
| >0.798 | -- | ≥ 0.798 |

--: Not calculated

The ErC50 values and associated 95% confidence limits could not be determined by least squares linear regression analysis because the test was conducted at one concentration level.

The NOECr (0-72h) values were determined by Student's t-test, subsequent to F test for homogeneity of variances. Statistical analyses were performed using Yukms Statlight #3 software (Yukms Corp., Tokyo) and the significance level for both tests was set at $\alpha=0.05$.

Table 8 Growth Rates of Control

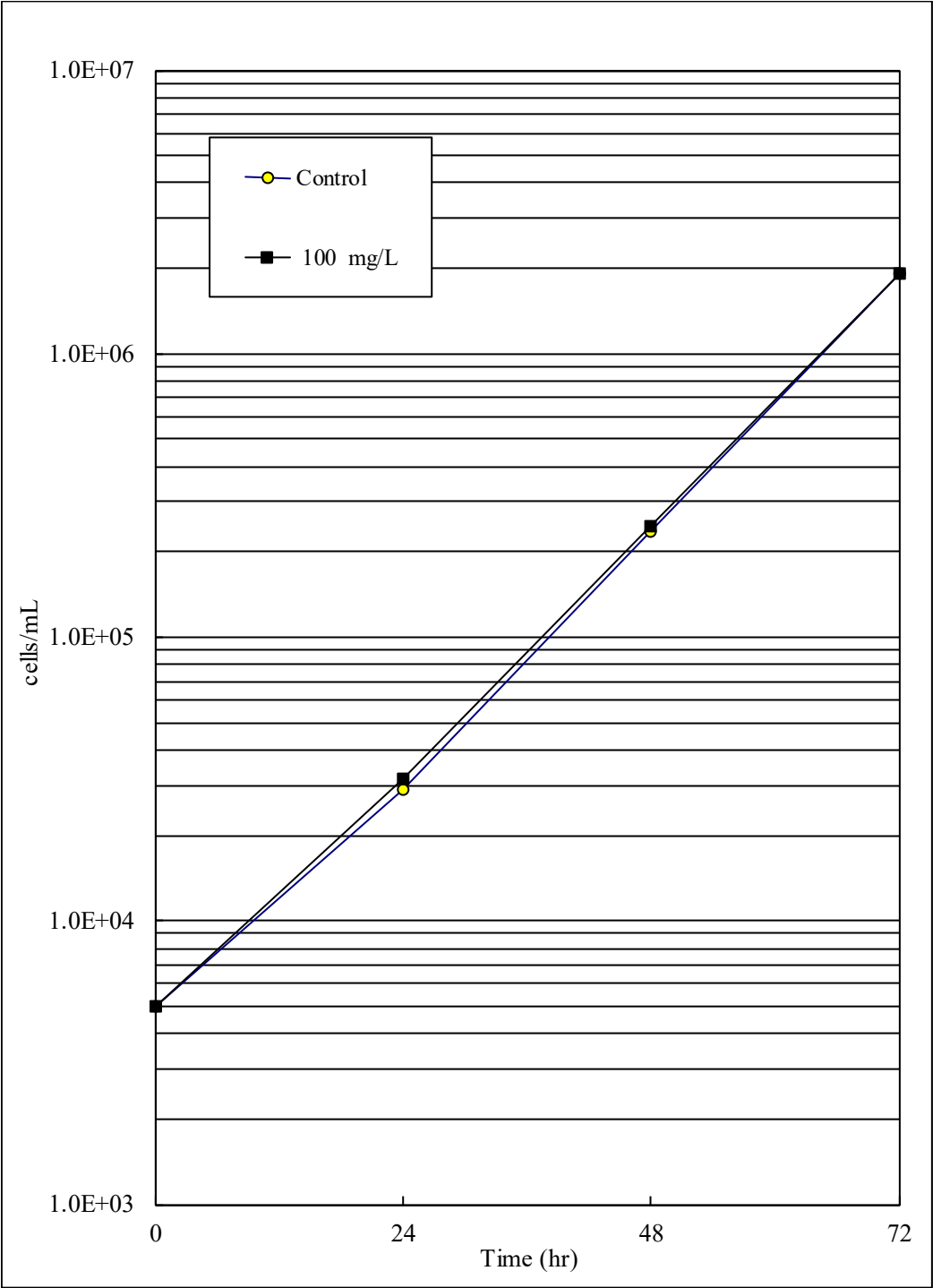
| Vessel No. | Growth Rate | | | | | | |
|---------------|-------------|-------------|-------------|-------------|---|-------|-------|
| | $\mu(0-3d)$ | $\mu(0-1d)$ | $\mu(1-2d)$ | $\mu(2-3d)$ | Average of $\mu(0-1d, 1-2d,$ $2-3d)$ | SD | CV(%) |
| 1 | 1.97 | 1.79 | 1.96 | 2.17 | 1.97 | 0.193 | 9.8 |
| 2 | 2.02 | 1.75 | 2.21 | 2.10 | 2.02 | 0.236 | 11.7 |
| 3 | 1.93 | 1.69 | 1.97 | 2.12 | 1.93 | 0.218 | 11.3 |
| 4 | 1.96 | 1.74 | 2.15 | 1.98 | 1.96 | 0.210 | 10.7 |
| 5 | 2.01 | 1.82 | 2.09 | 2.11 | 2.01 | 0.161 | 8.0 |
| 6 | 2.02 | 1.77 | 2.11 | 2.17 | 2.02 | 0.213 | 10.5 |
| Average | 1.98 | 1.76 | 2.08 | 2.11 | | | 10.3 |
| SD | 0.037 | 0.044 | 0.100 | 0.068 | | | |
| CV(%) | 1.9 | 2.5 | 4.8 | 3.2 | | | |

SD : Standard deviation

CV : Coefficient of variation

Average and SD are calculated from original raw data, not from the rounded values (3 significant figures) presented in this table.

Figure 1 Growth Curve of *Pseudokirchneriella subcapitata*
(Mean biomass vs time during the 72-hour exposure)



Value in legend is given in the loading rate.

付属資料－1

赤外吸収スペクトル

Figure A-1-1 Infrared Absorption Spectrum of the Test Substance before the Study

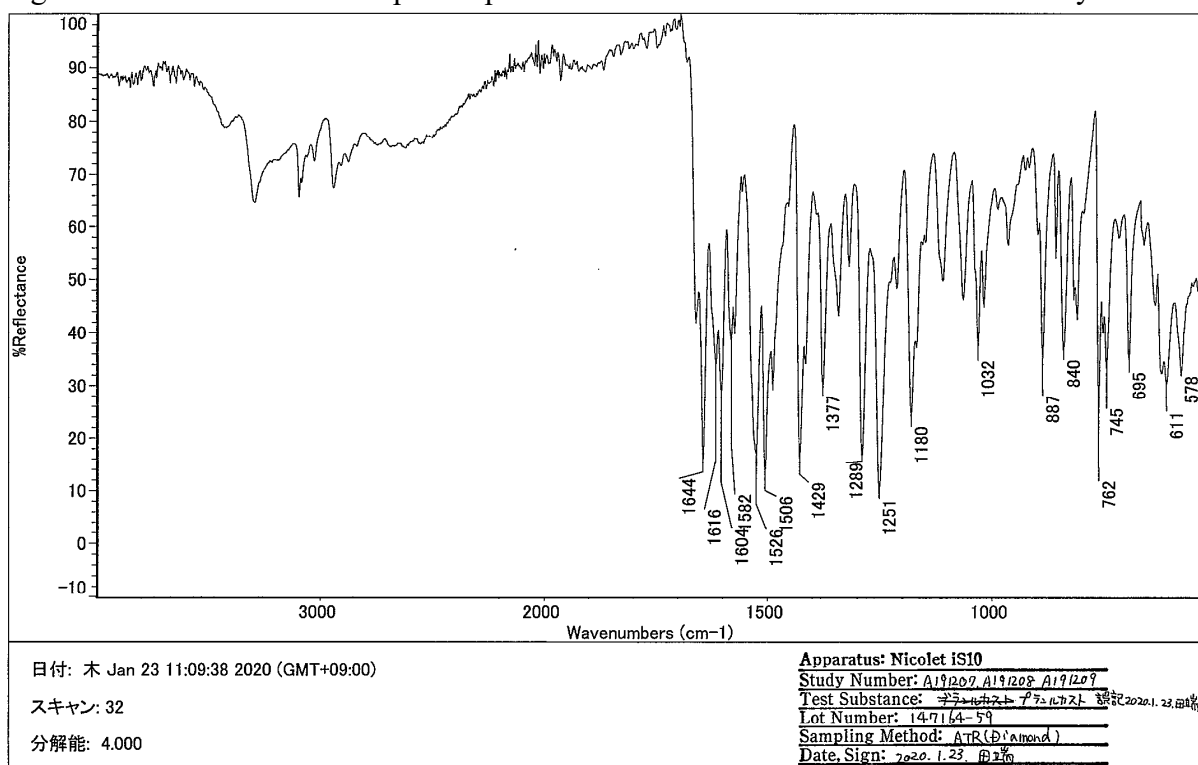
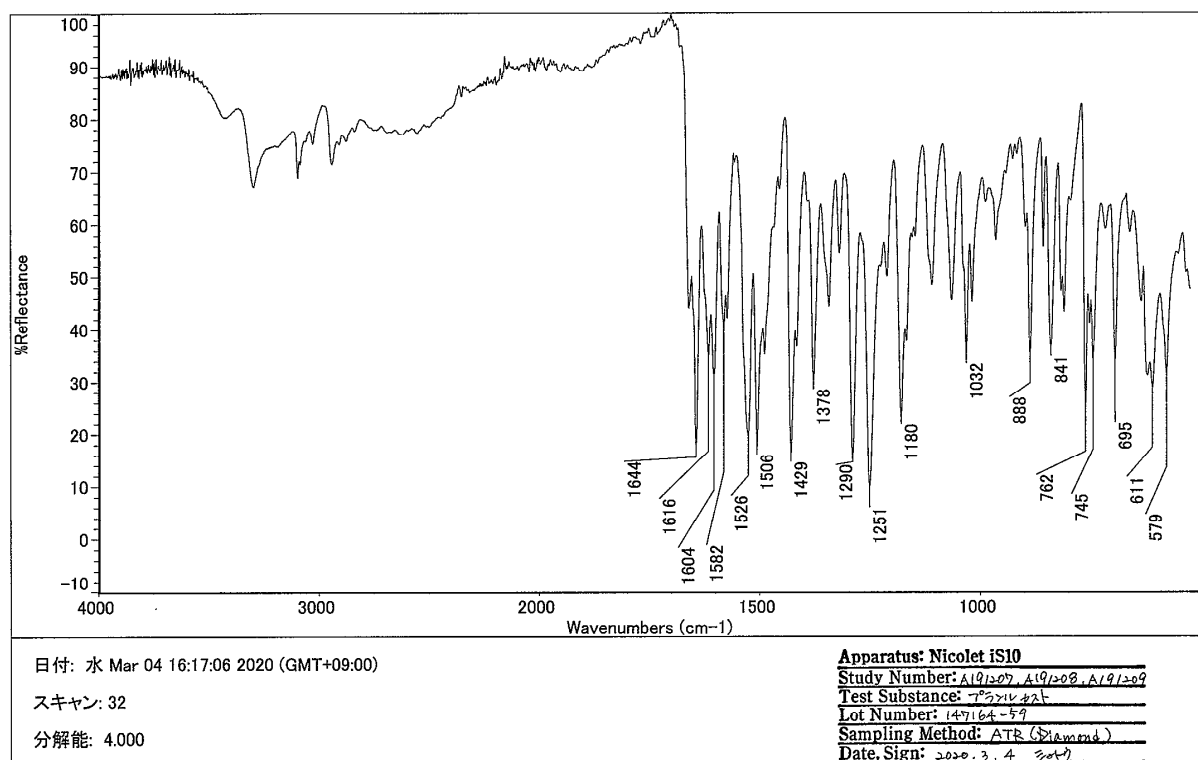


Figure A-1-2 Infrared Absorption Spectrum of the Test Substance after the End of Exposure



付属資料－2

培地の組成

Table A-2 OECD Medium

| <u>Nutrient salts</u> | <u>Concentration (mg/L)</u> |
|---|-----------------------------|
| NH ₄ Cl | 15 |
| MgCl ₂ ·6H ₂ O | 12 |
| CaCl ₂ ·2H ₂ O | 18 |
| MgSO ₄ ·7H ₂ O | 15 |
| KH ₂ PO ₄ | 1.6 |
| FeCl ₃ ·6H ₂ O | 0.064 |
| Na ₂ EDTA·2H ₂ O | 0.1 |
| H ₃ BO ₃ | 0.185 |
| MnCl ₂ ·4H ₂ O | 0.415 |
| ZnCl ₂ | 0.003 |
| CoCl ₂ ·6H ₂ O | 0.0015 |
| CuCl ₂ ·2H ₂ O | 0.00001 |
| Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O | 0.007 |
| NaHCO ₃ | 50 |

The test guideline shows that the pH of the medium which is obtained at equilibrium between the carbonate system of the medium and the partial pressure of CO₂ in atmospheric air is 8.1.

付属資料－3

試験用水に対する溶解性

1. 概要

以下に示す試験用水に対する被験物質の溶解性を評価した。

脱塩素水道水（魚類急性毒性試験用およびミジンコ急性遊泳阻害試験用）

OECD 培地（藻類生長阻害試験用）

2. 方法

- 1) 被験物質 20 mg を共栓付 200 mL 三角フラスコに採取し，試験用水を 200 mL 加えた。（仕込み濃度：100 mg/L，連数：3）

- 2) 脱塩素水道水は 24℃，OECD 培地は 21℃でスターラー*1により 48 時間攪拌した。

*1：ヤマト科学製 マグミキサー MG600

- 3) 攪拌後の試料をフィルター*2 でろ過し，得られたろ液の被験物質濃度を高速液体クロマトグラフ（HPLC）計により測定した。

*2：メルクミリポア製 HAWP09000 0.45 μm

3. 結果および考察

測定結果

| No. | 脱塩素水道水 | | OECD培地 | |
|-----|----------------|---------------|----------------|---------------|
| | 測定濃度 (mg/L) | 平均値 (mg/L) | 測定濃度 (mg/L) | 平均値 (mg/L) |
| 1 | 1.45 | 1.6 | 0.579 | 1.3 |
| 2 | 1.72 | | 1.36 | |
| 3 | 1.69 | | 1.82 | |

以上の結果から，被験物質の試験用水に対する溶解度は，脱塩素水道水（24℃）で 1.6 mg/L，OECD 培地（21℃）で 1.3 mg/L であると判断した。

付属資料－4

試験液の調製

試験液の調製

1. 準備

原液の調製

被験物質を下記の表の通り採取し試験用水を加え，混合・処理し，各試験区の原液とする。

| | | |
|--|------|------------------------------------|
| 試験用水 | ---- | OECD培地 (22℃) |
| 容 器 | ---- | メジューム瓶 |
| 混合方式 | ---- | 試験用水を最終容量まで加え，スターラー攪拌48時間 (22℃) *3 |
| 処 理 | ---- | 0.45 μ mのフィルター*1で吸引ろ過*2 |
| *1：メルクミリポア製 メンブレンフィルター HA 0.45 μ m | | |
| *2：東洋濾紙製 吸引ポンプ EP-01型 | | |
| *3：日立インキュベーター CR41C型 No. 1 | | |

| | 被験物質採取量 | 最終容量 | 負荷率 |
|--------|---------|-------|----------|
| 対照区用原液 | - | 1.0 L | - |
| 濃度区用原液 | 100 mg | 1.0 L | 100 mg/L |

2. 試験液の調製

各原液を下記の表の通り採取し，試験液とする。

| | | |
|------|------|-----------------------|
| 最終容量 | ---- | 100 mL |
| 容 器 | ---- | 500 mLガラス製三角フラスコ，アルミ栓 |
| 連 数 | ---- | 6容器/試験区，1予備容器/試験区 |

| 負荷率 mg/L | 区No. (略称) | 濃度区用原液 mL | 対照区用原液 mL |
|-------------|--------------|--------------|--------------|
| 対照区 | Cont. | 0 | 100 |
| 100 | Conc. 1 | 100 | 0 |

付属資料－5

試験液および試験培養液の分析

1. 高速液体クロマトグラフ (HPLC) 計 測定条件
装置

高速液体クロマトグラフ Agilent 1100 型 (No.6) , Agilent 製

ワークステーション : ChemStation

デガッサ : G1379A 型

送液ポンプ : G1311A 型 (クォータナリポンプ)

オートサンブラ : G1313A 型

カラムオーブン : G1316A 型

ダイオードアレイ検出器 (DAD) : G1315B 型

条件

カラム : Agilent製 Eclipse Plus C8 1.8 μ m 3.0 mm i.d.×50 mm

カラムオーブン : 50°C

溶離液 : A液 : 0.3%りん酸水溶液*, B液 : HPLC用アセトニトリル
A液 : 45%, B液 : 55%

ストップタイム : 3 min

流 速 : 0.5 mL/min

測定波長 : 258 nm

試料注入量 : 10 μ L

* : りん酸 1.5 mLを超純水 (JIS K0557 A4 グレード) 500 mLに添加し調製した。

2. 検量線の作成と定量下限の決定

1) 標準溶液の調製

被験物質 50 mg を秤量し、*N,N*-ジメチルホルムアミドで溶解し 50 mL に定容とし、1000 mg/L の溶液を調製した。この溶液を HPLC 用テトラヒドロフランで順次希釈し、0.0500, 0.100, 1.00, 10.0 mg/L の標準溶液を調製した。また、HPLC 用テトラヒドロフランを 0 mg/L の標準溶液とした。

2) 標準溶液の分析方法

標準溶液を以下のように分析した。

標準溶液 0.75 mL 採取

 | ←超純水 0.75 mL 添加

混合

 |

HPLC測定

3) 検量線の作成

横軸に濃度 (mg/L) を、縦軸にピーク面積 (count) をとり、検量線を作成した (Figure A-5-1)。検量線の作成に、0 mg/L の標準溶液の結果は含めなかった。最小二乗法により直線回帰式 $Y=a+bX$ を求めた。相関係数は 1.000 となり、直線性の基準 (0.995 以上) を満たした。また、切片 a の 95%信頼区間が原点を含むことから、検量線は原点を通過する直線とみなせた。

4) 定量下限

検量線の作成に用いる標準溶液の最低濃度である 0.05 mg/L を定量下限とした。

3. 試験液の分析

試験液を以下のように分析した。測定結果を Figure A-5-2 に示す。

暴露開始時

試験液：各試験区毎に，全ての試験容器の中層より1.0 mLずつ採取して混合

|

混合した試験液を0.75 mL 採取

| ←HPLC用テトラヒドロフラン0.75 mL 添加

HPLC 測定

暴露開始後72時間

試験液：各試験区毎に，全ての試験容器の中層より1.0 mLずつ採取して混合

|

遠心分離（3000 rpm，10分間，装置：日立工機製 CR21GII型）

|

上澄み液を 0.75 mL 採取

| ←HPLC 用テトラヒドロフラン 0.75 mL 添加

HPLC 測定

4. 試験液中の被験物質濃度の定量

試験液中の被験物質濃度の定量は，各分析時に測定する標準溶液のピーク面積との比較で行った。

Figure A-5-1 Calibration curve

| No. | Concentration X (mg/L) | Peak area Y (count) |
|-----|---------------------------|------------------------|
| 1 | 0.0500 | 1.165 |
| 2 | 0.100 | 3.246 |
| 3 | 1.00 | 35.687 |
| 4 | 10.0 | 386.696 |

$$Y = a + b \times X$$

$$a = -1.456E+00$$

$$-5.070E+00 < a < 2.158E+00$$

$$b = 3.880E+01$$

$$(95\% \text{ confidence interval})$$

$$r = 1.000$$

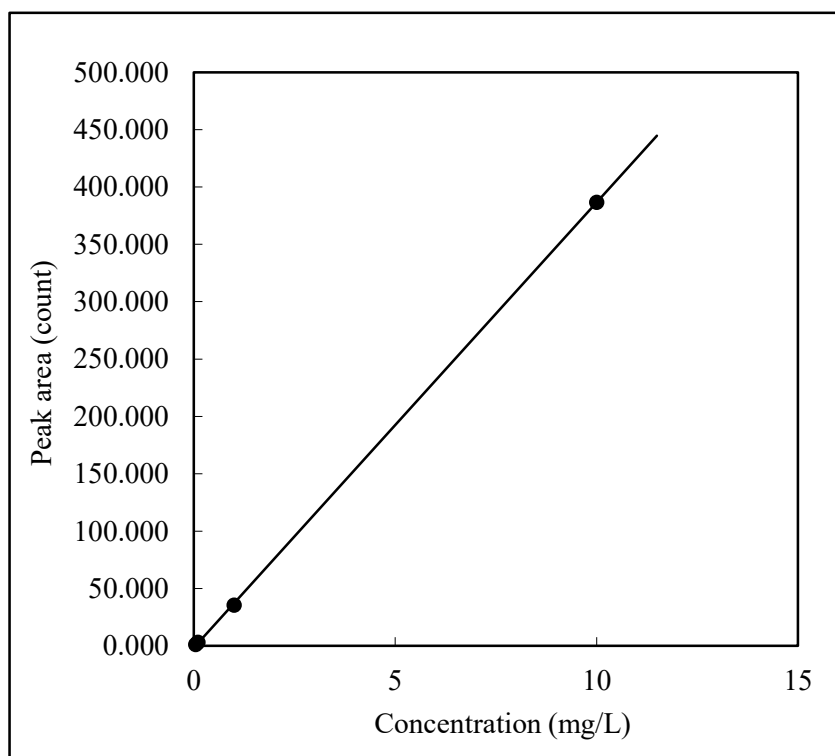
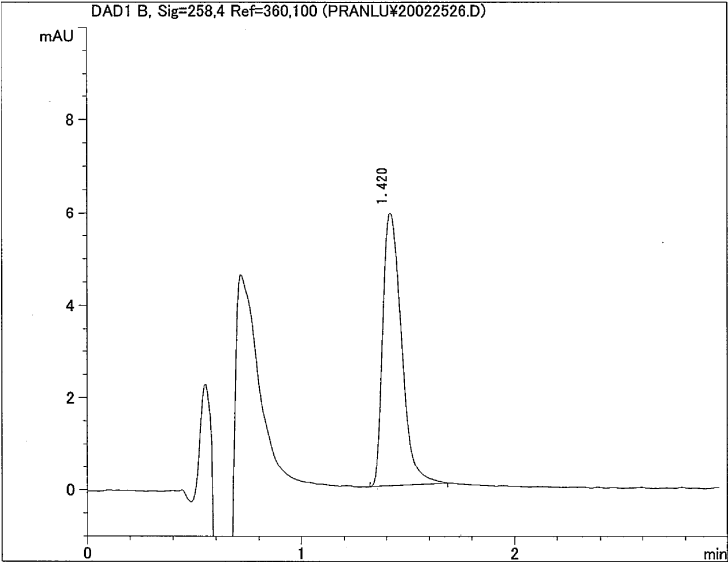


Figure A-5-2 Measurement Results

(1) Standard 1.00 mg/L ; 0 Hour

2020.02.25 田端

2020/02/25
試験番号, 名称 : [X]A191207 []A191208 []A191209 シーケンスタイン : 14
分析ロット : PRANLU.M プランルカスト水和剤 : 4
サンプル名 : STD 1 mg/L バイタル No. : 1
測定オペレータ : 田端 注入 No. : 1
注入量 : 10 ul



| 面積パーセントレポート | | | | | | |
|-------------|----------|-----|---------|------------|----------|-------|
| ピーク # | RT [min] | タイプ | 幅 [min] | 面積 [count] | 高さ [mAU] | 面積 % |
| 1 | 1.420 | MM | 0.101 | 36.029 | 6 | 100.0 |
| トータル: | | | | 36.029 | 6 | |

*** End of Report ***

Figure A-5-2 Measurement Results (Continued)

(2) Control ; 0 Hour

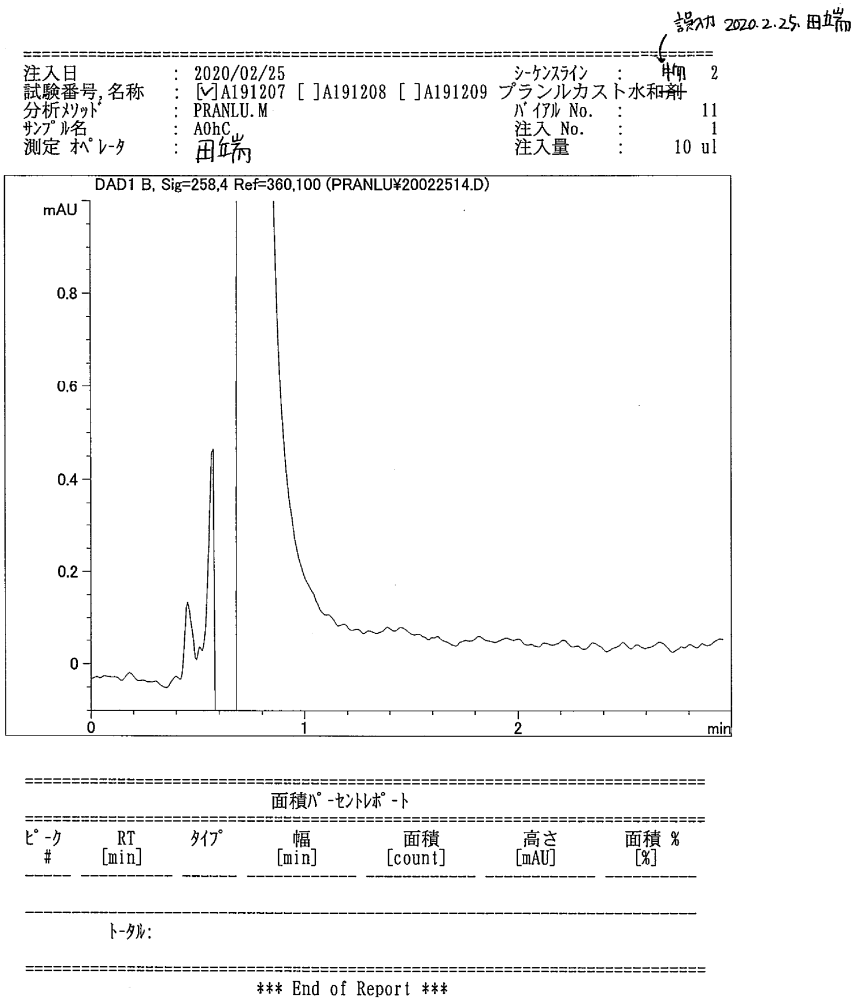


Figure A-5-2 Measurement Results (Continued)

(3) Conc.1 ; 0 Hour

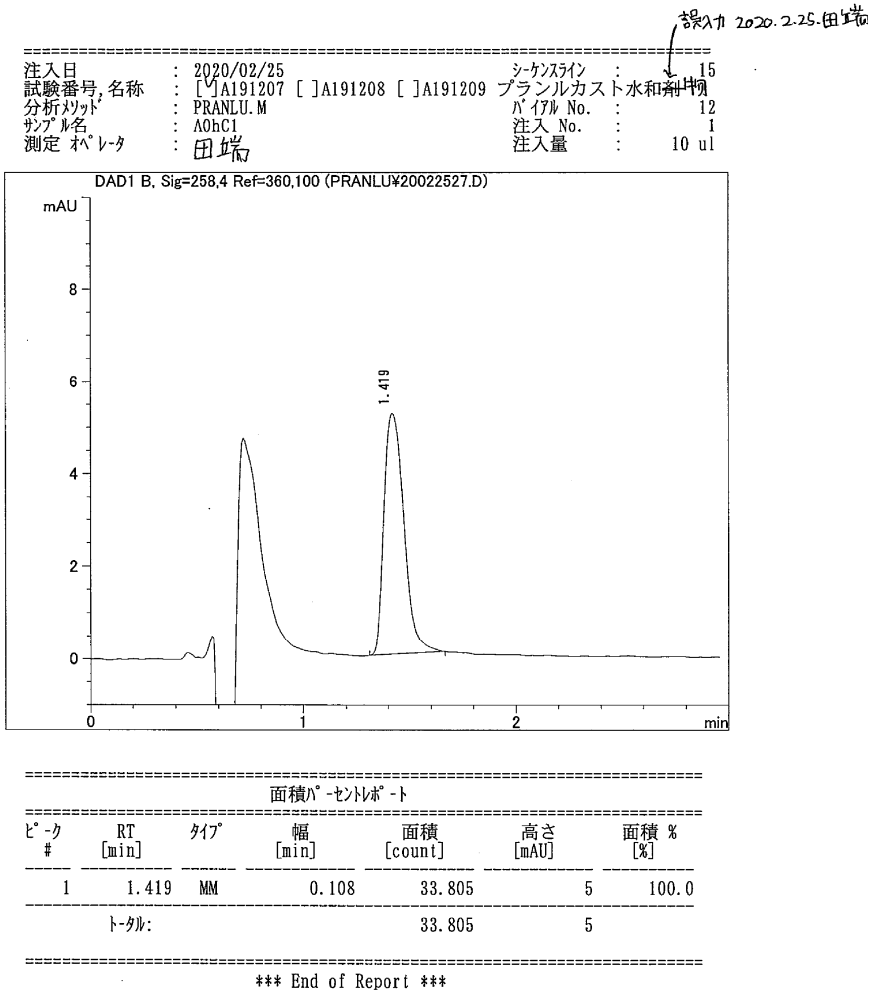


Figure A-5-2 Measurement Results (Continued)

(4) Standard 1.00 mg/L ; 72 Hours

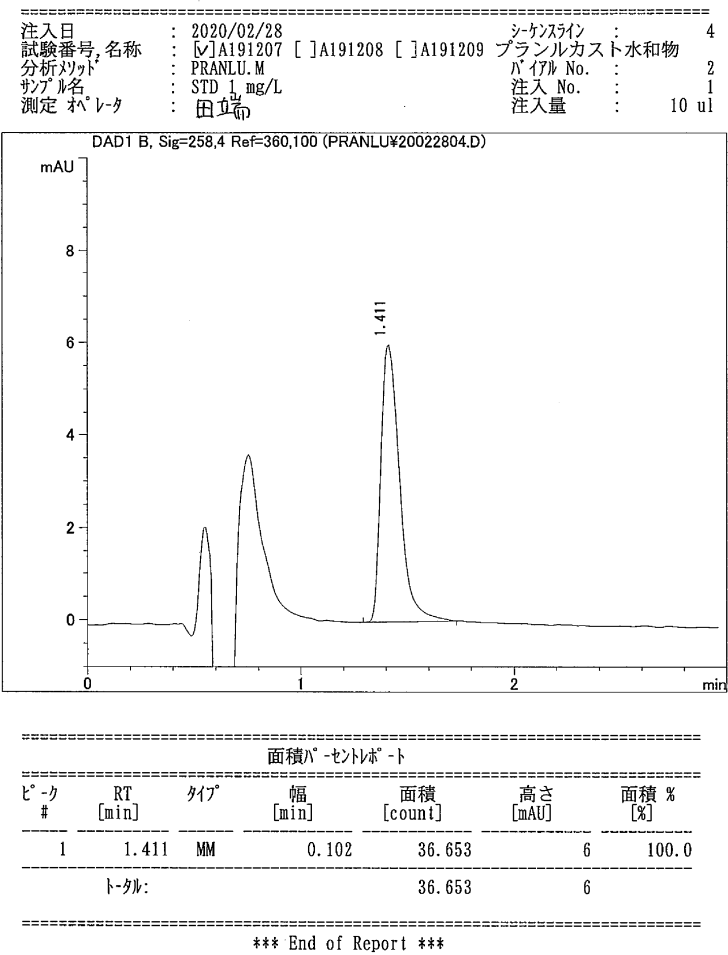


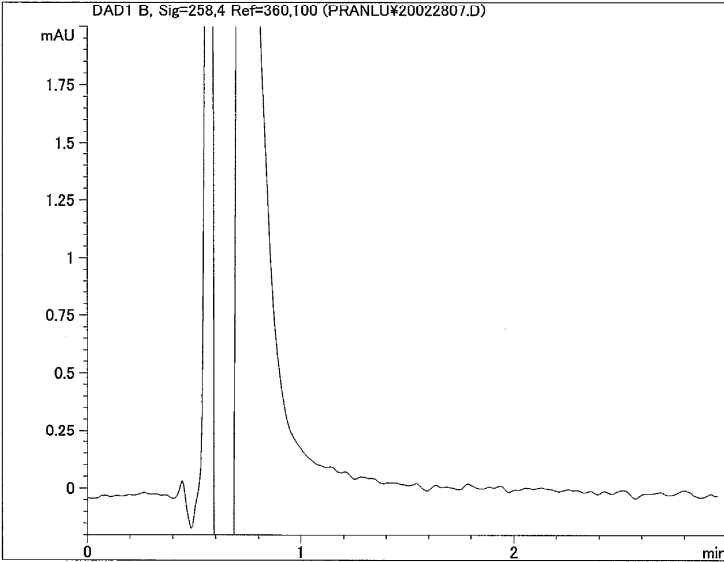
Figure A-5-2 Measurement Results (Continued)

(5) Control ; 72 Hour

=====

| | | | |
|----------|---|------------|---------|
| 注入日 | : 2020/02/28 | シケンサイン | : 7 |
| 試験番号, 名称 | : <input checked="" type="checkbox"/> A191207 <input type="checkbox"/> A191208 <input type="checkbox"/> A191209 | ブランルカスト水和物 | |
| 分析キット | : PRANLU.M | バイアル No. | : 11 |
| サンプル名 | : A72hC | 注入 No. | : 1 |
| 測定オペレータ | : 田端 | 注入量 | : 10 ul |

=====



=====

| 面積パーセントレポート | | | | | | |
|-------------|----------|-----|---------|------------|----------|------|
| ピーク # | RT [min] | タイプ | 幅 [min] | 面積 [count] | 高さ [mAU] | 面積 % |
| ----- | | | | | | |
| トータル: | | | | | | |

=====

*** End of Report ***

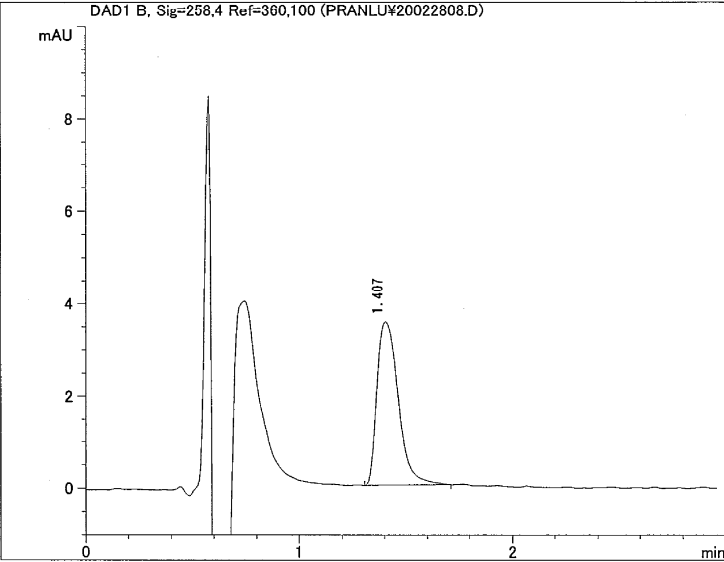
Figure A-5-2 Measurement Results (Continued)

(6) Conc.1 ; 72 Hours

=====

| | | | |
|----------|------------------------------------|------------|---------|
| 注入日 | : 2020/02/28 | シーケンスタイン | : 8 |
| 試験番号, 名称 | : [✓]A191207 []A191208 []A191209 | プランルカスト水和物 | |
| 分析ロット | : PRANLU.M | バッチ No. | : 12 |
| サンプル名 | : A72hC1 | 注入 No. | : 1 |
| 測定オペレータ | : 田中 | 注入量 | : 10 ul |

=====



=====

面積パーセントレポート

=====

| ピーク # | RT [min] | タイプ | 幅 [min] | 面積 [count] | 高さ [mAU] | 面積 % |
|-------|----------|-----|---------|------------|----------|-------|
| 1 | 1.407 | MM | 0.116 | 24.674 | 4 | 100.0 |
| トータル: | | | | 24.674 | 4 | |

=====

*** End of Report ***

=====

付属資料－6

結果の算出

Table A-6 Calculation of the NOECr

Results of Statistical Paired-comparison Test**Growth rates (0-72h)****Input Data Table**

| Control Group1 | Conc.1 Group2 |
|-------------------|------------------|
| 1.97 | 2.00 |
| 2.02 | 1.95 |
| 1.93 | 2.02 |
| 1.96 | 2.02 |
| 2.01 | 1.94 |
| 2.02 | 1.96 |

| Group | Samples | Mean | S.E. | S.D. | Variance | | |
|--------------------|---------|--------|--------|---------|----------|---------|--------|
| 1 | 6 | 1.9839 | 0.0150 | 0.0368 | 0.0014 | | |
| 2 | 6 | 1.9805 | 0.0145 | 0.0354 | 0.0013 | | |
| Method | vs | Side | Stat. | 0.0500 | 0.0100 | 0.0010 | Prob. |
| F test | 1 vs 2 | 0 | 1.0792 | <5.0503 | 10.9670 | 29.7524 | 0.4677 |
| Student test | 1 vs 2 | 2 | 0.1613 | <2.2281 | <3.1693 | 4.5868 | 0.8751 |
| Aspin-Welch t test | 1 vs 2 | 2 | 0.1613 | 2.2286 | 3.1703 | 4.5892 | 0.8751 |