

受付番号	662-20-E-9483
試験番号	99483

## 試 験 報 告 書

クロトリマゾールの *Raphidocelis subcapitata* を用いる藻類生長阻害試験

2021 年 3 月

一般財団法人化学物質評価研究機構  
久留米事業所

## 目 次

総頁数 38

1. 表 題 .....	4
2. 試験委託者 .....	4
3. 試験施設 .....	4
4. 試験目的 .....	4
5. 試験法 .....	4
6. 試験日程 .....	4
7. 要 約 .....	5
8. 試験材料 .....	6
8.1 被験物質 .....	6
8.2 試験生物 .....	7
9. 試験の実施 .....	7
9.1 培 地 .....	7
9.2 試験器具及び装置 .....	7
9.3 試験液の調製法 .....	7
9.4 試験条件 .....	8
9.5 観察及び測定 .....	8
9.6 結果の算出 .....	9
9.7 試験の有効性 .....	10
9.8 数値の取扱い .....	10
10. 試験結果及び考察 .....	10
10.1 試験液の観察及び測定結果 .....	10
10.2 $E_rC_{50}$ .....	11
10.3 各試験区での生長曲線、細胞観察結果及び NOEC .....	11
10.4 試験の有効性 .....	11
10.5 考 察 .....	11
11. 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 .....	12

Table 1	pH of test solutions.....	13
Table 2	Culture temperature and light intensity in incubator.....	13
Table 3	Value of biomass at each time .....	14
Table 4	Growth rate and growth inhibition rate .....	15
Table 5	$E_rC_{50}$ and NOEC.....	16
Table 6	Result of statistical analysis.....	16
Table 7	Variation of growth rates in control.....	17
Figure 1	Concentration-response curve.....	18
Figure 2	Growth curve.....	19
Appendix 1	被験物質濃度の測定方法及び結果	
Appendix 2	検量線及びクロマトグラム	
Additional data	予備試験結果	

## 1. 表 題

クロトリマゾールの *Raphidocelis subcapitata* を用いる藻類生長阻害試験

## 2. 試験委託者

名 称 環境省大臣官房環境保健部環境安全課

所在地 〒100-8975 東京都千代田区霞が関 1-2-2

## 3. 試験施設

名 称 一般財団法人化学物質評価研究機構 久留米事業所

所在地 〒839-0801 福岡県久留米市宮ノ陣三丁目 2 番 7 号

## 4. 試験目的

クロトリマゾールの *Raphidocelis subcapitata* に対する生長阻害試験を行い、0-72 時間の 50% 生長阻害濃度 (EC<sub>50</sub>) 及び最大無影響濃度 (NOEC) を求める。

## 5. 試験法

「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、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 2 年 11 月 5 日、薬生発 1105 第 2 号、20201015 製局第 1 号、環保企発第 2011055 号) に定める「藻類生長阻害試験」

## 6. 試験日程

試 験 開 始 日	2021 年 2 月 5 日
実 験 開 始 日	2021 年 2 月 9 日
実 験 終 了 日	2021 年 2 月 12 日
試 験 終 了 日	2021 年 3 月 19 日

## 7. 要 約

被験物質

クロトリマゾール

試験目的

クロトリマゾールの *Raphidocelis subcapitata* に対する生長阻害試験を行い、0-72 時間の 50%生長阻害濃度 (EC<sub>50</sub>) 及び最大無影響濃度 (NOEC) を求める。

試験法

「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、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、薬生発 0701 第 1 号、20190619 製局第 2 号、環保企発第 1907011 号) に定める「藻類生長阻害試験」

試験条件

試験生物	<i>Raphidocelis subcapitata</i>
試験区	試験原液含有率として 100, 31.6, 10.0, 3.16, 1.00, 0.316、0.100 % (公比 $\sqrt{10}$ ) の 7 濃度区 (測定濃度として 0.347、0.106、0.0345、 0.0107、0.00350、0.00104、0.000348 mg/L) 及び対照区
試験液の調製	設定濃度として 100 mg/L になるように供試試料と OECD 培地 を混合し、48 時間攪拌後、メンブランフィルターでろ過して調 製した試験原液を適宜培地で希釈して調製
暴露方式	旋回振とう培養 (約 100 回/分)
暴露期間	72 時間
連 数	6 連/対照区 (バックグラウンド測定用に 1 試験容器を別途設定) 3 連/試験濃度区
試験液量	600 mL/対照区 (100 mL/試験容器) 300 mL/試験濃度区 (100 mL/試験容器) (バックグラウンド測定用に 100 mL/対照区を別途設定)
培養温度	22.2～22.5℃
光強度	88～89 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$
生物量の測定	細胞濃度
被験物質濃度の測定	LC-MS/MS 法 (暴露開始時及び終了時)

試験結果

培地への溶解度 (23±1℃)	0.363 mg/L (予備試験での測定値)
EC <sub>50</sub> (E <sub>r</sub> C <sub>50</sub> )	0.260 mg/L (95%信頼限界 : 0.235～0.289 mg/L)
NOEC (生長速度 0-3d)	0.000348 mg/L (EC <sub>50</sub> 及び NOEC は、測定濃度の時間加重平均値に基づく値)

## 8. 試験材料

## 8.1 被験物質

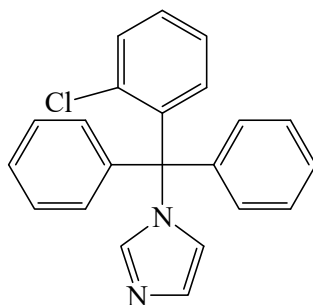
## a) 名称等

名 称 クロトリマゾール

CAS 番号 23593-75-1

## b) 構造式等

構造式



分子式  $C_{22}H_{17}ClN_2$

分子量 344.84

## c) 供試試料

被験物質純度 100.0%

供給者 富士フイルム和光純薬株式会社

ロット番号 WDF0216

## d) 物理化学的性状

融 点  $146^{\circ}\text{C}$

外 観 白色の粉末

## e) 保管条件

室温暗所保管した。

## f) 取扱い上の注意

手袋、マスク、保護めがね及び白衣を着用し、皮膚、目への接触及び吸入を避けた。

## 8.2 試験生物

種	<i>Raphidocelis subcapitata</i>
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
入手源	American Type Culture Collection
入手株番号	ATCC 22662
入手日	1995 年 6 月 30 日
入手後の管理	当試験施設で無菌的に継代培養
試験系の再現性の確認	定期的に基準物質による藻類生長阻害試験を実施 最新のデータを以下に示す。 基準物質：ニクロム酸カリウム (試薬特級, ロット番号 YLF7267, 富士フイルム 和光純薬) 実施期間：2021 年 3 月 1 日～3 月 4 日 E <sub>r</sub> C <sub>50</sub> (0-3d) : 1.1 mg/L この値は当試験施設におけるバックグラウンドデータの規定 範囲内 [平均±2×標準偏差：1.0～1.4 mg/L (n=7)] であった。

## 9. 試験の実施

### 9.1 培地

前培養及び試験共に精製水で調製した OECD 培地 (OECD TG 201 ; March 23, 2006) を用いた。

Component	mg/L	Component	mg/L
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0.185	CuCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.00001
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0.415	CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	18.0
ZnCl <sub>2</sub>	0.00300	NH <sub>4</sub> Cl	15.0
FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.0640	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.60
Na <sub>2</sub> EDTA·2H <sub>2</sub> O	0.100	NaHCO <sub>3</sub>	50.0
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.00150	MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	12.0
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.00700	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	15.0

### 9.2 試験器具及び装置

試験容器	300 mL 容ガラス製三角フラスコ (通気性のシリコセン®付)
培養装置	光照射式恒温振とう培養機 LP-0.7LEDSS (日本医科器械製作所、機器番号 SIN-008)

### 9.3 試験液の調製法

供試試料 0.0800 g をひょう量し、100 mg/L (設定) になるように培地 800 mL と混合し、マグネティックスターラーにより 48 時間攪拌した後、メンブランフィルター (PVDF, 孔径 0.45 µm, Merck) で吸引ろ過したろ液を試験原液とした。調製容器内で必要量の試験原液と対照区と同様の処理をした培地を混合し、攪拌して試験液を調製し、各試験容器に分割した。

## 9.4 試験条件

暴露方式	旋回振とう培養（約 100 回/分）
暴露期間	72 時間
試験濃度	試験原液含有率として 100、31.6、10.0、3.16、1.00、0.316、0.100%（公比 $\sqrt{10}$ ） 予備試験結果から試験濃度及び公比を決定した。 予備試験結果を Additional data に示す。
対照区	試験原液調製と同様の処理をした被験物質を含まない培地
連 数	6 連/対照区（バックグラウンド測定用に 1 試験容器を別途設定） 3 連/試験濃度区
試験液量	600 mL/対照区（100 mL/試験容器） 300 mL/試験濃度区（100 mL/試験容器） （バックグラウンド測定用に 100 mL/対照区を別途設定）
暴露開始時の細胞数	本試験と同様の条件で 2021 年 2 月 6 日～2021 年 2 月 9 日まで 3 日間前培養した藻類の細胞数を計数し、試験液中の細胞濃度が $0.50 \times 10^4$ cells/mL になるように試験液に接種した。前培養については使用前に細胞の状態を観察し、変形や異常な形態の細胞が無いことを確認した。
試験操作	無菌操作により実施した。
温 度	21～24℃（ $\pm 2^\circ\text{C}$ の変動幅）
照 明	400～700 nm の波長領域で設定値 $90 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ （設定値の $\pm 20\%$ 以内、 平均値 $\pm 15\%$ の変動幅）に調整した LED 蛍光灯による連続照明

## 9.5 観察及び測定

### a) 藻類の生長等

測定項目	生物量（細胞濃度）
測定頻度	暴露開始後 24 時間ごと（バックグラウンド測定用に調製した試験容器のブランク値を測定し、ブランク補正を実施）
細胞観察	暴露終了時に各試験区につき 1 試験容器
測定機器	コールターカウンター Z2（ベックマン・コールター、機器番号 CC-004） 顕微鏡 ECLIPSE Ci-L（ニコン）

### b) 試験液の状態

暴露開始時及び終了時に観察

### c) 試験液の水質及び暴露環境

pH	調製容器より別途分取して測定（暴露開始時） 各試験区につき 1 試験容器を測定（暴露終了時）
培養装置内温度及び光強度	暴露開始時、暴露 1 日後、暴露 2 日後及び暴露終了時に測定



測定機器      pH 計   HM-21P (東亜ディーケーケー)  
                  ガラス製棒状温度計  
                  光量子計   LI-250A (LI-COR)

d) 試験液中の被験物質濃度

測定頻度      暴露開始時及び終了時  
 採水方法      調製容器より別途分取 (暴露開始時)  
                  各試験区の試験容器から均等量採取し混合 (暴露終了時)  
 藻体除去      遠心分離 (3000 rpm, 10 分間) (暴露終了時のみ実施)  
 採水量        約 10 mL (暴露開始時：全試験区)  
                  12 mL (暴露終了時：全試験区)  
 測定方法      Appendix 1 参照

## 9.6 結果の算出

結果の算出には暴露期間中に測定した試験液中の被験物質濃度の時間加重平均値を用いた。

a) 阻害率の算定法

各試験区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。また、生長速度を比較して阻害率を算出した。

生長速度の比較

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。

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

ここで

$\mu_{i-j}$  =  $t_i$  時から  $t_j$  時までの期間の生長速度。日当たり ( $d^{-1}$ ) で表す。

$X_i$  =  $t_i$  時の生物量。試験開始時 ( $t_0$ ) の生物量は設定値を用いた。

$X_j$  =  $t_j$  時の実測生物量

$t_i$  = 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 ( $d$ )

EC<sub>50</sub> 及び NOEC の算出においては、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。対照区については、試験の有効性を調べるために 1 日ごとの生長速度も求めた。

試験濃度区における生長阻害率は対照区の各連の平均生長速度の平均値 ( $\mu_c$ ) と試験濃度区での各連の平均生長速度 ( $\mu_T$ ) との間の差を次式に従って算出した値 ( $I_\mu$ ) とした。

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

b) EC<sub>50</sub> の算出法

各試験濃度区に対応する阻害率を片対数グラフにプロットし、直線性の認められる点〔試験原液含有率 100 及び 31.6%区（測定濃度として 0.347 及び 0.106 mg/L 区）〕を用いて直線回帰分析（最小二乗法）を行い、阻害率 50%との交点から EC<sub>50</sub> 及びその 95%信頼限界を算出した。生長速度により求めた EC<sub>50</sub> は E<sub>r</sub>C<sub>50</sub> と記載した。

EC<sub>50</sub> は、当試験施設にて開発したコンピュータプログラム（Microsoft Excel により起動）を用いて算出した。

## c) NOEC の評価

生長速度について、Bartlett 法による等分散検定を行った結果、5%有意水準で等分散が認められたため、各試験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 Dunnett の多重比較法により求めた。有意差検定はエクセル統計 2012 for Windows ver.1.16 を用いて実施した。有意差検定結果及び細胞観察結果より、NOEC を評価した。

## 9.7 試験の有効性

- a) 対照区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。
- b) 対照区における毎日の生長速度の平均変動係数が暴露期間を通じて 35%を超えてはならない。
- c) 対照区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。

## 9.8 数値の取扱い

数値の丸め方は、JIS Z 8401 : 2019 規則 B に従った。

## 10. 試験結果及び考察

以下の本文中における試験濃度は、試験原液の含有率（100、31.6、10.0、3.16、1.00、0.316、0.100%）における測定濃度の時間加重平均値（0.347、0.106、0.0345、0.0107、0.00350、0.00104 及び 0.000348 mg/L）で示す。

## 10.1 試験液の観察及び測定結果

## a) 試験液の状態

試験濃度区では暴露開始時は無色透明であった。暴露終了時には 0.347 mg/L 区で無色透明、細胞の増殖により 0.106 及び 0.0345 mg/L 区でわずかに薄い緑色、その他の試験濃度区では緑色を呈していた。

対照区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。

## b) 試験液の水質及び暴露環境

試験液の pH を Table 1、培養装置内温度及び光強度を Table 2 に示す。

試験液の pH は 7.8～8.0 であった。培養装置内温度は 22.2～22.5℃、光強度は 88～89  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  であった。

c) 試験液中の被験物質濃度

被験物質濃度の測定方法及び結果を Appendix 1、検量線及びクロマトグラムを Appendix 2 に示す。

測定した試験液中の被験物質濃度は暴露開始時では 0.000390～0.381 mg/L、暴露終了時では 0.000309～0.315 mg/L であり、開始時濃度に対して 64.4～82.6%であった。

10.2  $E_rC_{50}$

各時間での生物量を Table 3、生長速度及び生長阻害率を Table 4、 $E_rC_{50}$  を Table 5 に示す。また、濃度－生長阻害率曲線を Figure 1 に示す。

生長速度によって算出した被験物質の  $E_rC_{50}$  は 0.260 mg/L (95%信頼限界：0.235～0.289 mg/L) であった。

10.3 各試験区での生長曲線、細胞観察結果及び NOEC

NOEC を Table 5、有意差検定結果を Table 6、生長曲線を Figure 2 に示す。

0.347 mg/L 区では暴露 48 時間後まで緩やかな対数増殖を示したが、その後生長は抑えられていた。0.106 mg/L 区では暴露 48 時間後まで対数増殖を示したが、その後生長は若干緩やかとなった。0.0345 及び 0.0107 mg/L 区では阻害が認められたものの対数増殖を示した。0.00350 及び 0.00104 mg/L 区では対照区に近い生長を示した。0.000348 mg/L 区では対照区と同様の生長を示した。

以下の細胞観察結果は全て対照区との比較に基づくものである。全ての試験濃度区で対照区と同様であった。対照区では異常はみられなかった。

生長速度について有意差検定を行った結果、0.347、0.106、0.0345、0.0107、0.00350 及び 0.00104 mg/L 区において統計学的な有意差が認められた。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 0.000348 mg/L であった。

10.4 試験の有効性

a) 対照区における生長

対照区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 (Figure 2 参照)。暴露終了時には初期生物量の 102 倍以上 (Table 3 参照) に増殖し、有効性基準 (16 倍以上の増殖) を満たしていた。

b) 対照区における日間生長速度

対照区における日間生長速度の平均変動係数は 10% (Table 7 参照) 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。

c) 対照区における繰り返し間の生長速度

対照区における繰り返し間の生長速度の変動係数は 1.0% (Table 7 参照) 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。

10.5 考 察

試験は被験物質の培地への溶解濃度以下での試験生物に対する影響を求める試験として行った。その結果、 $E_rC_{50}$  は 0.260 mg/L (95%信頼限界：0.235～0.289 mg/L)、NOEC は 0.000348 mg/L であった。試験液中の被験物質濃度は、暴露終了時の測定濃度が開始時濃度の 64.4～82.6%であったことから、暴露期間中に若干の低下がみられた。また、試験環境条件も適切な範囲内であったことから、試験は試験法に準じたものであったと判断される。

11. 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。

Table 1 pH of test solutions

Measured concentration <sup>a</sup> (mg/L)	pH	
	At the start	At the end
Control	7.8	8.0
0.000348	7.8	8.0
0.00104	7.8	8.0
0.00350	7.8	8.0
0.0107	7.8	8.0
0.0345	7.8	8.0
0.106	7.8	7.9
0.347	7.8	7.9

a : Time-weighted mean of the measured concentrations  
(also expressed as measured concentration in the following  
tables and figures)

Table 2 Culture temperature and light intensity in incubator

Time	At the start	1-day	2-day	At the end
Culture temperature (°C)	22.5	22.2	22.3	22.5
Light intensity (μmol/m <sup>2</sup> /s)	89	88	88	88

Table 3 Value of biomass at each time

Measured concentration (mg/L)	Vessel	Cell concentration ( $\times 10^4$ cells/mL)			
		0 hours <sup>b</sup>	24 hours	48 hours	72 hours
Control	A	0.50	2.1	12	51 <sup>c</sup>
	B	0.50	1.9	11	58
	C	0.50	2.0	12	58
	D	0.50	2.2	12	56
	E	0.50	2.2	12	56
	F	0.50	2.0	12	59
	Mean S.D.	0.50 0	2.1 0.091	12 0.33	56 2.6
0.000348	A	0.50	1.9	11	59
	B	0.50	2.1	10	55
	C	0.50	2.1	12	55
	Mean S.D.	0.50 0	2.1 0.12	11 0.75	57 2.1
0.00104	A	0.50	2.1	10	52
	B	0.50	1.9	9.6	45
	C	0.50	1.9	9.4	43
	Mean S.D.	0.50 0	1.9 0.10	9.7 0.35	47 4.3
0.00350	A	0.50	2.0	9.9	45
	B	0.50	2.1	10	45
	C	0.50	2.1	11	46
	Mean S.D.	0.50 0	2.1 0.056	10 0.35	46 0.52
0.0107	A	0.50	1.7	8.7	37
	B	0.50	2.0	9.4	39
	C	0.50	1.7	10	39
	Mean S.D.	0.50 0	1.8 0.17	9.4 0.62	39 1.1
0.0345	A	0.50	2.1	8.5	30
	B	0.50	1.8	7.8	26
	C	0.50	1.8	7.3	25
	Mean S.D.	0.50 0	1.9 0.20	7.9 0.59	27 2.9
0.106	A	0.50	1.8	6.4	15
	B	0.50	1.9	7.7	19
	C	0.50	1.8	7.0	17
	Mean S.D.	0.50 0	1.8 0.091	7.0 0.67	17 2.2
0.347	A	0.50	1.6	3.2	3.8
	B	0.50	1.6	3.4	3.9
	C	0.50	1.5	3.0	3.4
	Mean S.D.	0.50 0	1.6 0.042	3.2 0.23	3.7 0.27

b: The value based on the measured value of pre-culture

c: The minimum cell growth in the control (biomass at the end of exposure / biomass at the start of exposure)  $51 / 0.50 = 102$

Table 4 Growth rate and growth inhibition rate

Measured concentration (mg/L)	Vessel	Growth rate (0-3d)	Growth inhibition rate (%)
Control	A	1.54	-
	B	1.58	-
	C	1.58	-
	D	1.57	-
	E	1.58	-
	F	1.59	-
	Mean S.D.	1.57 0.0160	- -
0.000348	A	1.59	-1.0
	B	1.57	0.31
	C	1.57	0.33
	Mean S.D.	1.58 0.0123	-0.13 0.78
0.00104	A	1.55	1.8
	B	1.50	4.5
	C	1.49	5.5
	Mean S.D.	1.51 0.0304	4.0 1.9
0.00350	A	1.50	4.6
	B	1.50	4.5
	C	1.51	4.2
	Mean S.D.	1.50 0.00382	4.4 0.24
0.0107	A	1.44	8.7
	B	1.45	7.7
	C	1.45	7.6
	Mean S.D.	1.45 0.00937	8.0 0.60
0.0345	A	1.37	13
	B	1.32	16
	C	1.30	17
	Mean S.D.	1.33 0.0348	16 2.2
0.106	A	1.13	28
	B	1.21	23
	C	1.18	25
	Mean S.D.	1.17 0.0431	25 2.7
0.347	A	0.673	57
	B	0.683	57
	C	0.636	60
	Mean S.D.	0.664 0.0248	58 1.6

Table 5  $E_rC_{50}$  and NOEC

$E_rC_{50}$ (mg/L)	NOEC (mg/L)
0.260 (0.235 to 0.289)	0.000348

Values in parentheses express 95% confidence limits.

Table 6 Result of statistical analysis

Measured concentration (mg/L)	Result by Dunnett's multiple comparison test	Statistical procedure
0.000348	n.s.	Bartlett's test One-way ANOVA Dunnett's multiple comparison test
0.00104	*	
0.00350	**	
0.0107	**	
0.0345	**	
0.106	**	
0.347	**	

n.s. : No significant difference

\* : Significant difference ( $p < 0.05$ )

\*\* : Significant difference ( $p < 0.01$ )



Table 7 Variation of growth rates in control

&lt; Variation for section-by-section specific growth rates in the controls &gt;

Vessel	Mean	Standard deviation	Coefficient of variation (%)	
A	1.54	0.159	10	10 (Mean)
B	1.58	0.204	13	
C	1.58	0.180	11	
D	1.57	0.104	6.6	
E	1.58	0.125	7.9	
F	1.59	0.204	13	

&lt; Variation of average specific growth rates in replicate controls &gt;

	0-3day
Mean	1.57
Standard deviation	0.0160
Coefficient of variation (%)	1.0

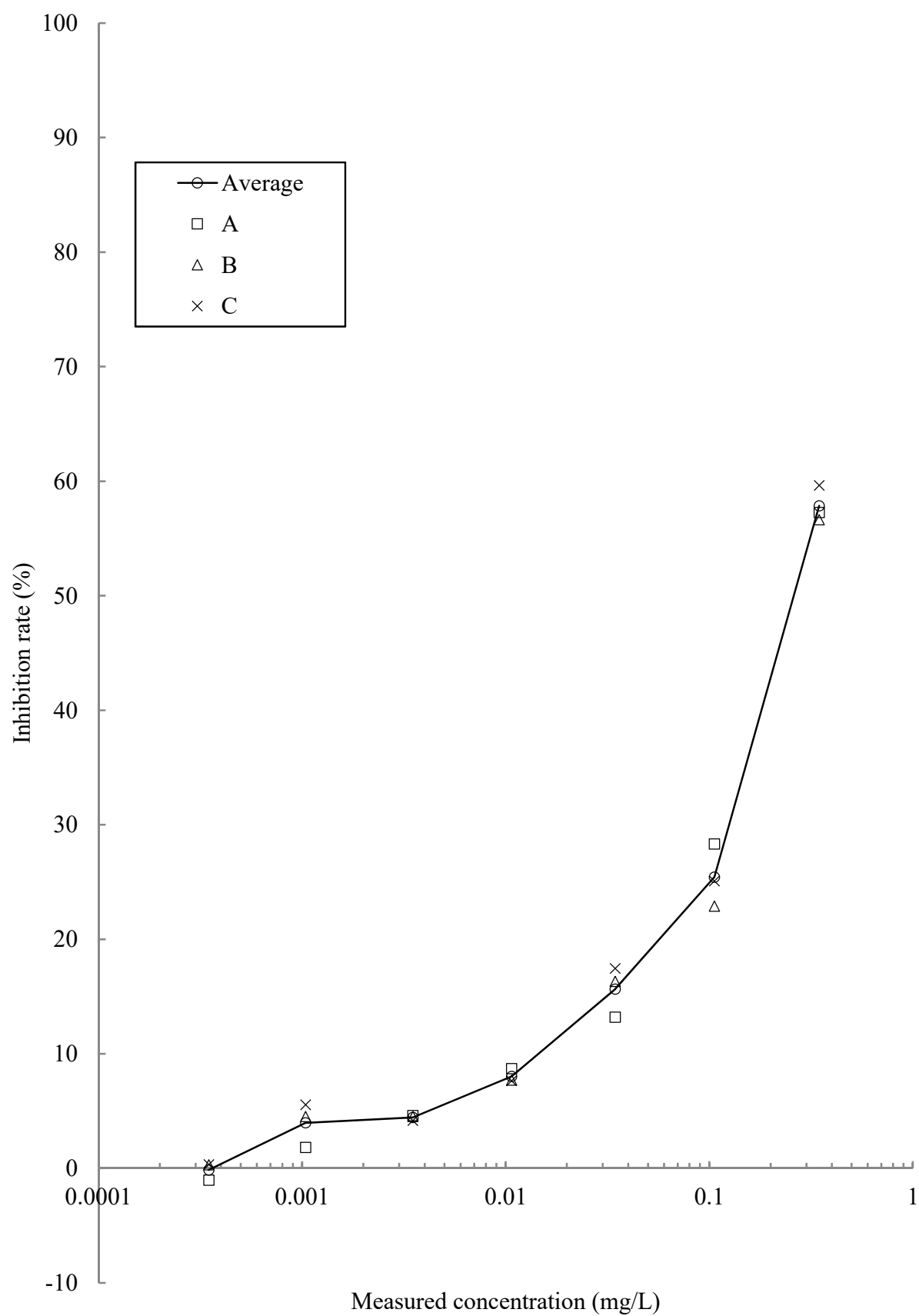


Figure 1 Concentration-response curve.

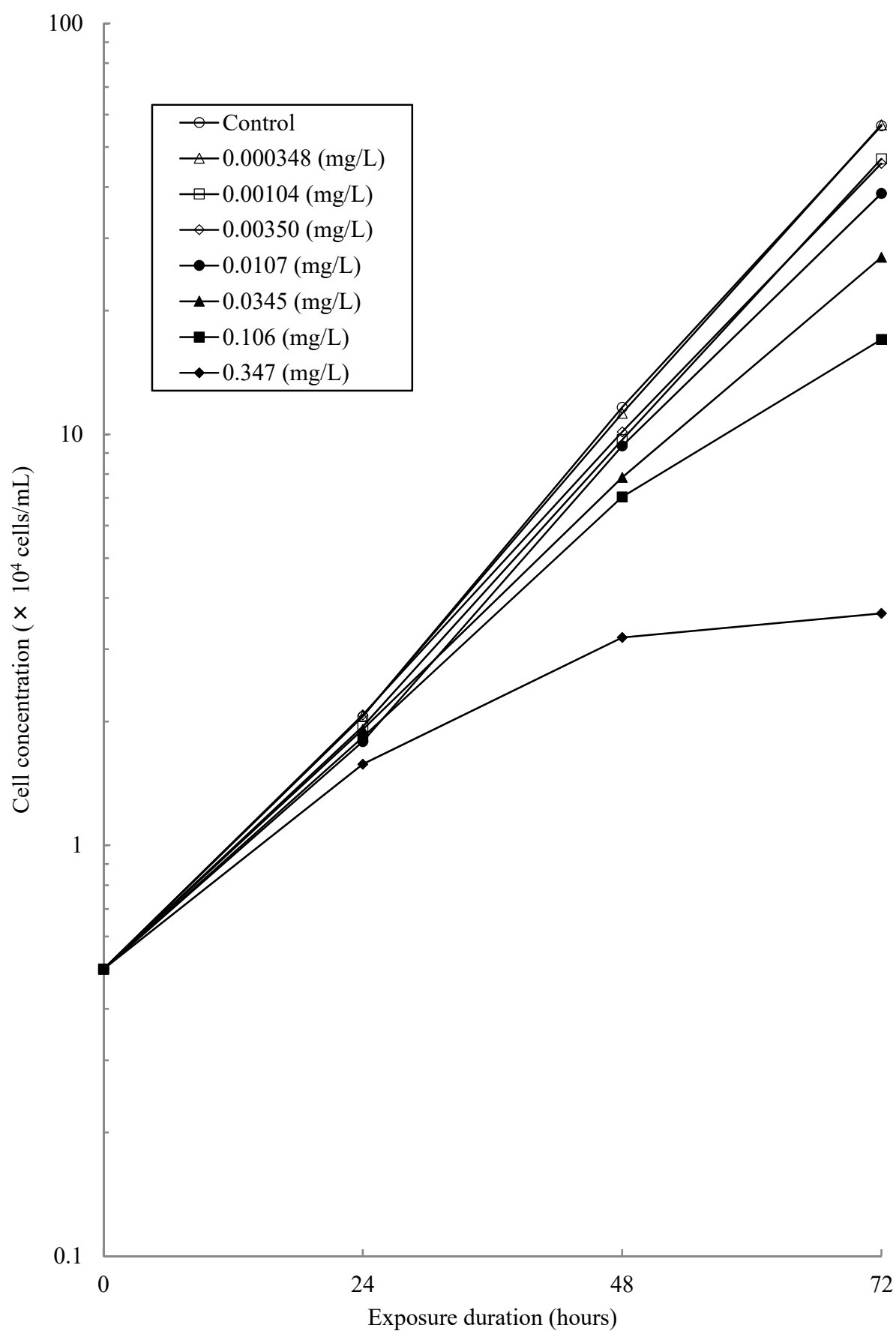


Figure 2 Growth curve.

## Appendix 1

被験物質濃度の測定方法及び結果

## 1. 試験液の前処理法

採取した試験液を分析用試料とし、最終試料の組成がメタノール/培地（1/1 v/v）になるように適宜希釈して液体クロマトグラフィー・タンデム質量分析法（LC-MS/MS）試料を調製した。

## 2. 被験物質の定量分析

## a) 定量方法

本定量方法の有効性を確認するために、c)の標準溶液と同様に調製した 0.000100, 0.00100, 0.00250, 0.00500, 0.0100 及び 0.0500 mg/L の 6 濃度の標準溶液を用いて検量線（最小二乗法による回帰式： $Y=aX+b$ , Y:応答量, X:被験物質濃度）を作成した。その結果、クロマトグラム上のピーク面積と濃度により作成した検量線の相関係数  $r$  は 0.995 以上であり、切片  $b$  の絶対値は応答量の最大値の 5%以内であったことから、検量線は原点を通過する直線とみなし、被験物質の定量は 1 濃度の標準溶液を用いた絶対検量線法で行った（Appendix figure 2-1 参照）。また、LC-MS/MS 試料の分析によって得られたクロマトグラムを Appendix 2 に示す。

分析試料中の被験物質の定量下限値（LOQ : limit of quantification）は、定量性が確認された範囲での標準溶液の最低濃度（0.000100 mg/L）とした。よって、試験液中の被験物質の定量下限値（LOQ）は前処理操作（最低希釈倍率:2 倍）を考慮して 0.000200 mg/L とした。

## b) 分析条件

機 器	液体クロマトグラフィー質量分析計（機器番号 LCMS-017）	
液体クロマトグラフ	Nexera X2	（島津製作所）
質量分析計	LCMS-8060	（島津製作所）

液体クロマトグラフ条件

カラム	L-column2 ODS（35 mm × 2.1 mm I.D., 粒子径 5 μm, 化学物質評価研究機構）
カラム温度	40℃
溶離液	A（30%）：5 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液 B（70%）：5 mmol/L 酢酸アンモニウムのメタノール溶液
流 量	0.2 mL/min
注入量	5 μL

## 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                    正イオン  
 検出法                        選択反応モニタリング (SRM)  
 測定イオン

プリカーサーイオン ( <i>m/z</i> )	プロダクトイオン ( <i>m/z</i> )	コリジョンエネルギー (eV)
345.2	165.1	-31
345.2	199.1	-38
345.2	239.2	-55
345.2	241.2	-37
347.2	165.2	-32
347.2	239.2	-55
347.2	241.1	-38
347.2	279.1	-12
367.1	165.2	-35
367.1	241.2	-43
367.1	277.2	-19
369.1	165.2	-34
369.1	279.1	-19

インターフェイス温度      120℃  
 DL 温度                      200℃  
 ネブライザーガス流量      1.50 L/min  
 ドライイングガス流量      10.00 L/min

## c) 標準溶液の調製及び被験物質濃度の算出

供試試料 50.0 mg を電子分析天びんで正確にはかりとり、メタノールに溶解して 50 mL に定容し、1000 mg/L の被験物質溶液を調製した。これをメタノールで希釈して 100 mg/L の被験物質溶液を調製した。これをメタノール/培地 (1/1 v/v) で希釈して 0.00500 mg/L の標準溶液を調製した。

LC-MS/MS 試料中の被験物質濃度は、標準溶液及び LC-MS/MS 試料のクロマトグラム上で得られるピーク面積を比較し、比例計算して求めた。

## 3. 測定結果

試験液中の被験物質濃度の測定結果を以下に示す。

Appendix table 1-1 Measured concentration of test item in test solution

Stock solution content (%)	Measured concentration (mg/L) (Percentage of measured concentration versus that at the start %)		
	At the start	At the end	Time-weighted mean
Control	<LOQ	<LOQ	
0.100	0.000390	0.000309 (79.2)	0.000348
0.316	0.00128	0.000825 (64.4)	0.00104
1.00	0.00400	0.00305 (76.2)	0.00350
3.16	0.0124	0.00921 (74.3)	0.0107
10.0	0.0389	0.0303 (77.8)	0.0345
31.6	0.119	0.0950 (80.0)	0.106
100	0.381	0.315 (82.6)	0.347

LOQ : 0.000200 mg/L

The time-weighted mean is calculated by the following expression:

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

where

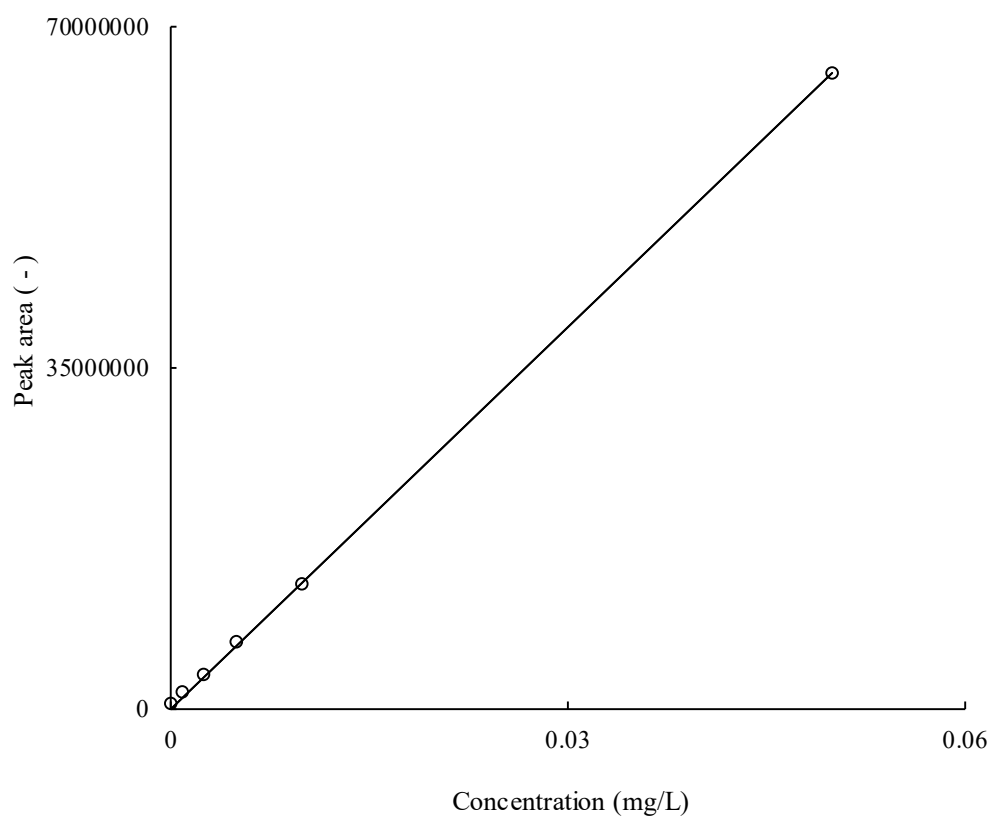
$C_n$  : the measured concentration at n hours

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

## Appendix 2

検量線及びクロマトグラム





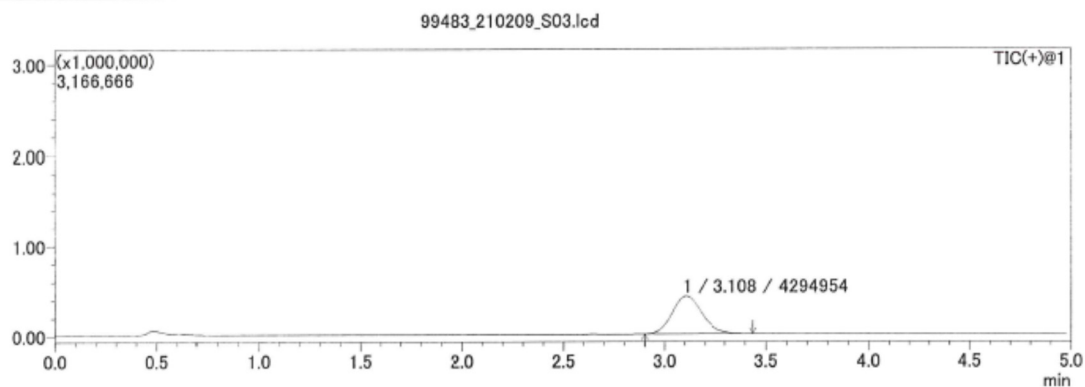
$$y = 1301521144x$$

$$r = 1.00$$

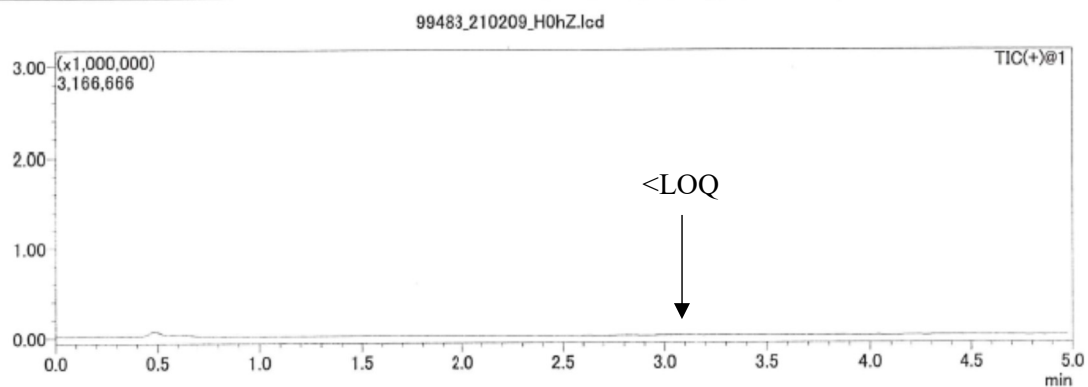
Concentration (mg/L)	Peak area ( - )
0.000100	425955
0.00100	1597760
0.00250	3521024
0.00500	6759564
0.0100	12810011
0.0500	65072024

Appendix figure 2-1 Calibration curve of test item for analysis by LC-MS/MS.

Sample ID : 99483  
Sample name : Standard solution 0.00500 mg/L  
Vial number : 1  
Acquisition date : 2021/02/09  
Inj. Volume : 5  
Data file : 99483\_210209\_S03.lcd  
Method file : 99483\_99485\_mrm\_201210.lcm

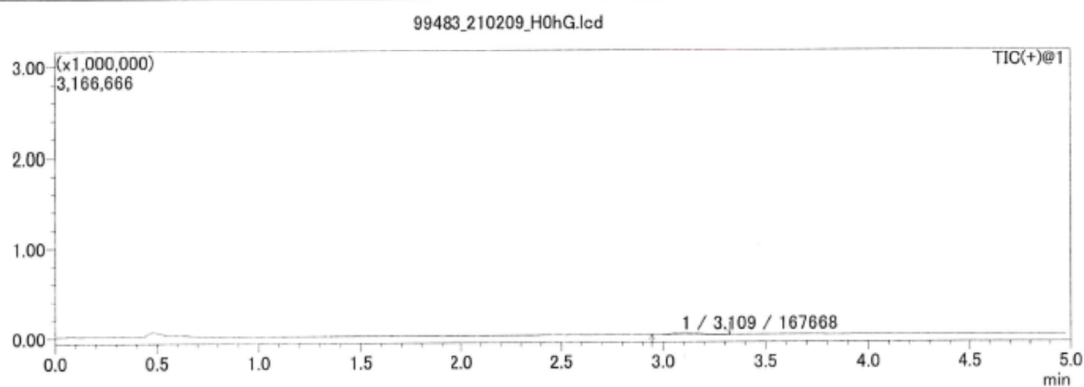


Sample ID : 99483  
Sample name : Control  
Vial number : 2  
Acquisition date : 2021/02/09  
Inj. Volume : 5  
Data file : 99483\_210209\_H0hZ.lcd  
Method file : 99483\_99485\_mrm\_201210.lcm

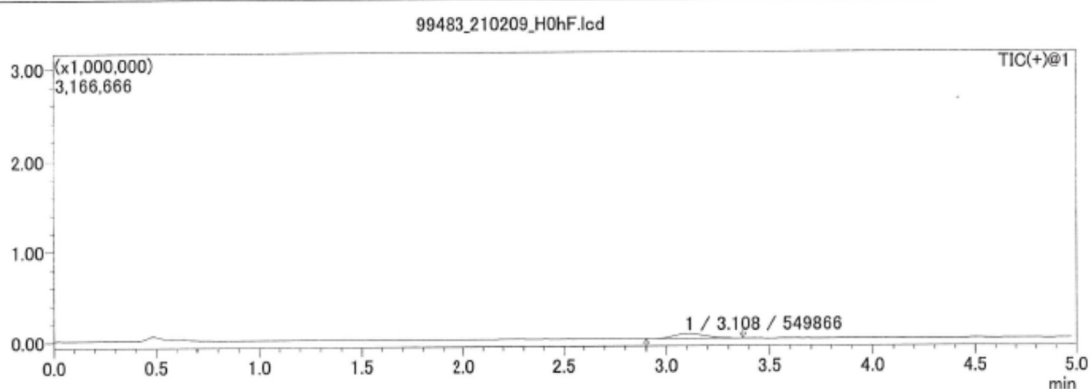


Appendix figure 2-2-1 LC-MS/MS chromatograms at start of exposure.

Sample ID : 99483  
Sample name : 0.100% exposure level  
Vial number : 3  
Acquisition date : 2021/02/09  
Inj. Volume : 5  
Data file : 99483\_210209\_H0hG.lcd  
Method file : 99483\_99485\_mrm\_201210.lcm

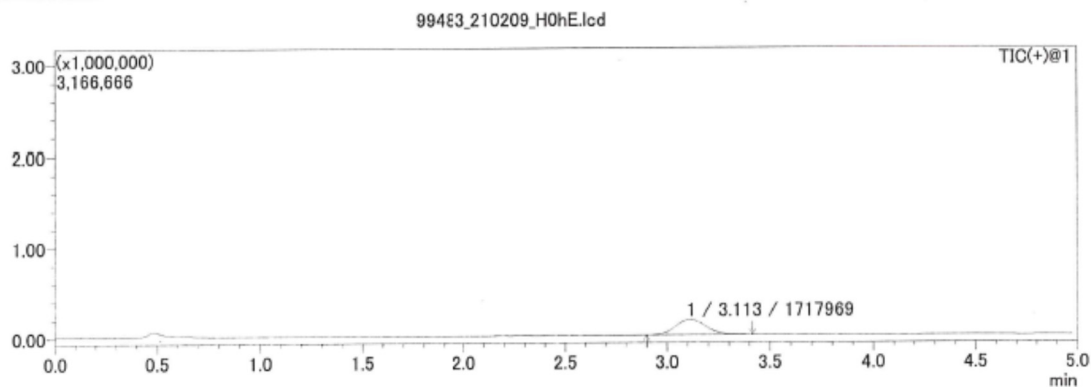


Sample ID : 99483  
Sample name : 0.316% exposure level  
Vial number : 4  
Acquisition date : 2021/02/09  
Inj. Volume : 5  
Data file : 99483\_210209\_H0hF.lcd  
Method file : 99483\_99485\_mrm\_201210.lcm

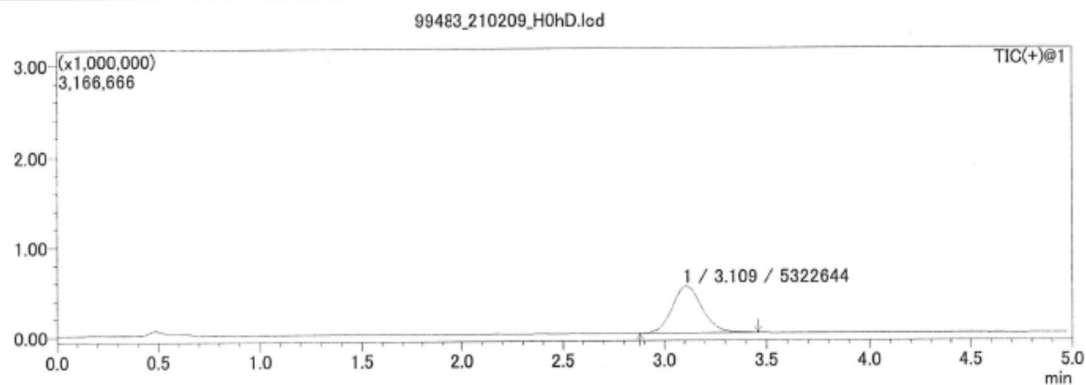


Appendix figure 2-2-2 LC-MS/MS chromatograms at start of exposure.

Sample ID : 99483  
Sample name : 1.00% exposure level  
Vial number : 5  
Acquisition date : 2021/02/09  
Inj. Volume : 5  
Data file : 99483\_210209\_H0hE.lcd  
Method file : 99483\_99485\_mrm\_201210.lcm

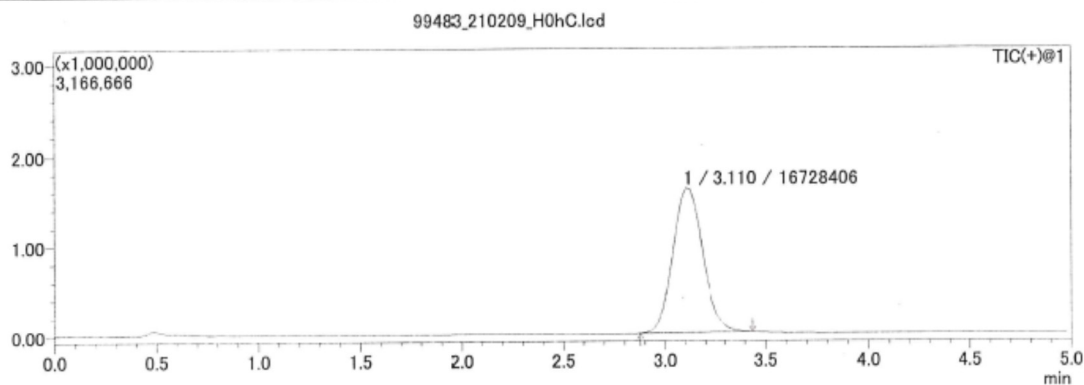


Sample ID : 99483  
Sample name : 3.16% exposure level  
Vial number : 6  
Acquisition date : 2021/02/09  
Inj. Volume : 5  
Data file : 99483\_210209\_H0hD.lcd  
Method file : 99483\_99485\_mrm\_201210.lcm

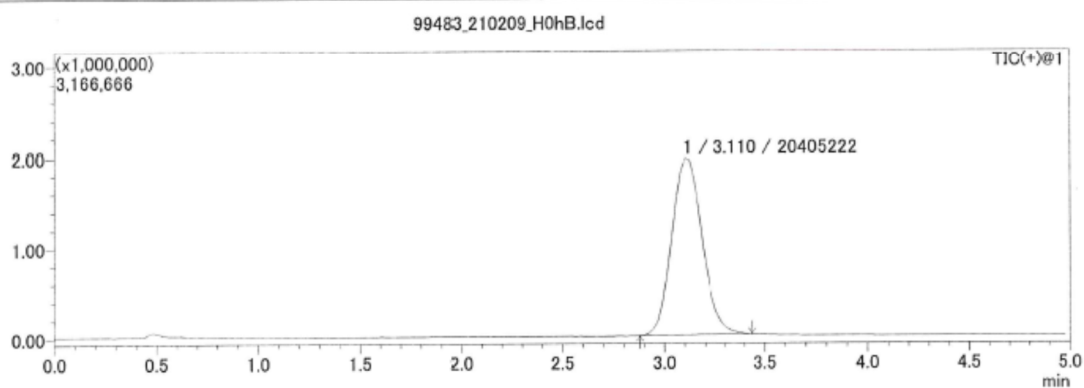


Appendix figure 2-2-3 LC-MS/MS chromatograms at start of exposure.

Sample ID : 99483  
Sample name : 10.0% exposure level  
Vial number : 7  
Acquisition date : 2021/02/09  
Inj. Volume : 5  
Data file : 99483\_210209\_H0hC.lcd  
Method file : 99483\_99485\_mrm\_201210.lcm

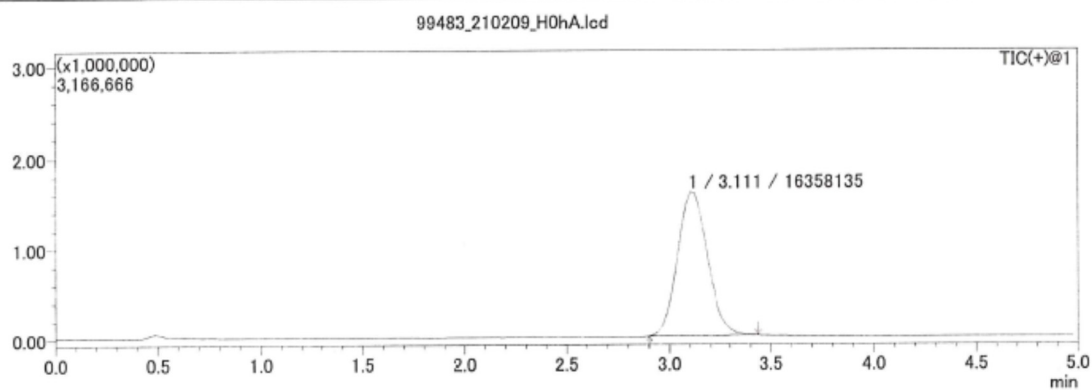


Sample ID : 99483  
Sample name : 31.6% exposure level  
Vial number : 8  
Acquisition date : 2021/02/09  
Inj. Volume : 5  
Data file : 99483\_210209\_H0hB.lcd  
Method file : 99483\_99485\_mrm\_201210.lcm



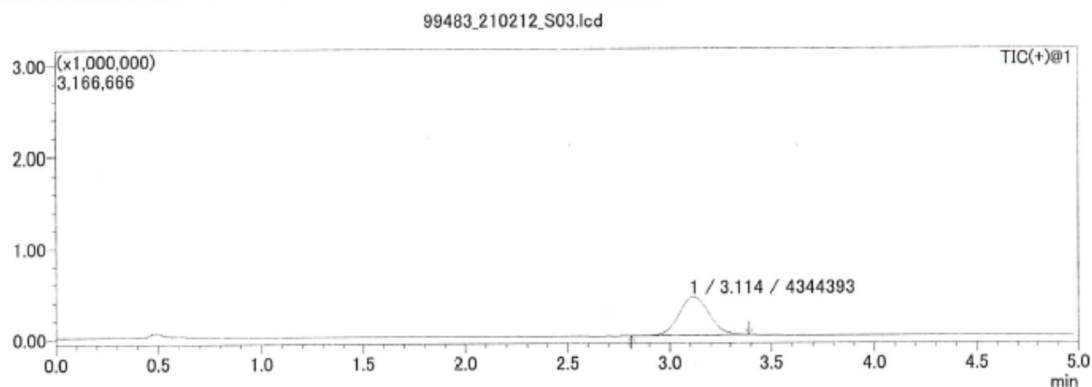
Appendix figure 2-2-4 LC-MS/MS chromatograms at start of exposure.

Sample ID	: 99483
Sample name	: 100% exposure level
Vial number	: 9
Acquisition date	: 2021/02/09
Inj. Volume	: 5
Data file	: 99483_210209_H0hA.lcd
Method file	: 99483_99485_mrm_201210.lcm

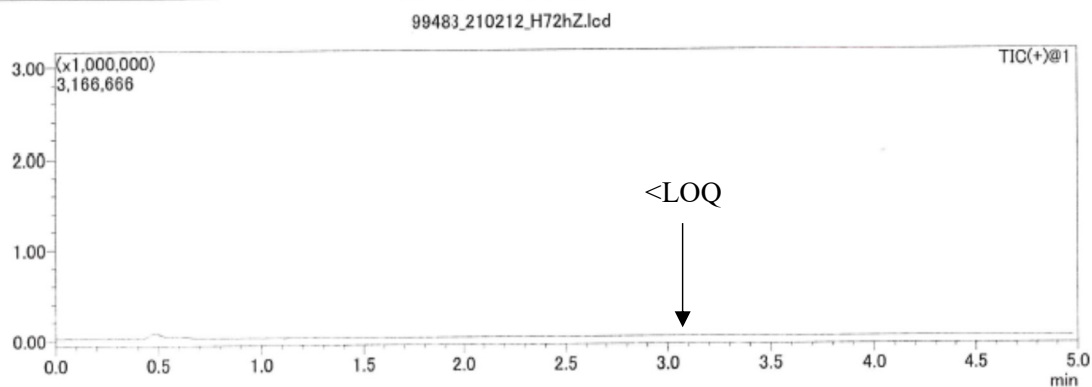


Appendix figure 2-2-5 LC-MS/MS chromatogram at start of exposure.

Sample ID : 99483  
Sample name : Standard solution 0.00500 mg/L  
Vial number : 1  
Acquisition date : 2021/02/12  
Inj. Volume : 5  
Data file : 99483\_210212\_S03.lcd  
Method file : 99483\_99485\_mrm\_201210.lcm

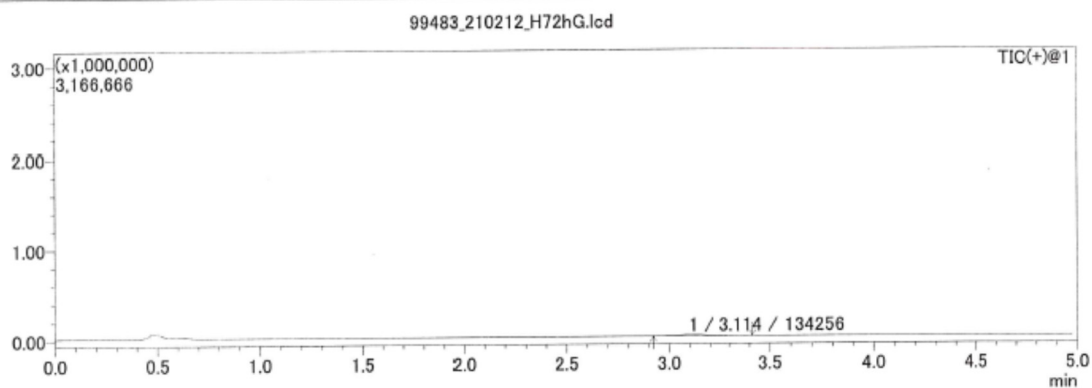


Sample ID : 99483  
Sample name : Control  
Vial number : 2  
Acquisition date : 2021/02/12  
Inj. Volume : 5  
Data file : 99483\_210212\_H72hZ.lcd  
Method file : 99483\_99485\_mrm\_201210.lcm

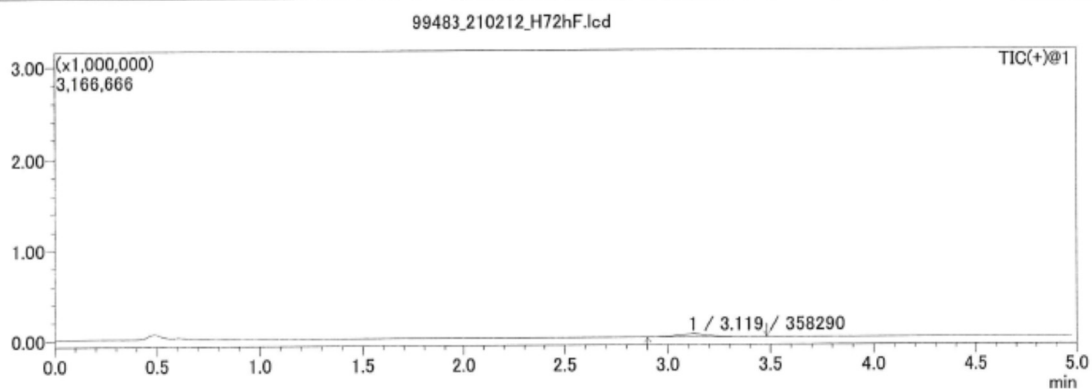


Appendix figure 2-3-1 LC-MS/MS chromatograms at end of exposure.

Sample ID : 99483  
Sample name : 0.100% exposure level  
Vial number : 3  
Acquisition date : 2021/02/12  
Inj. Volume : 5  
Data file : 99483\_210212\_H72hG.lcd  
Method file : 99483\_99485\_mrm\_201210.lcm



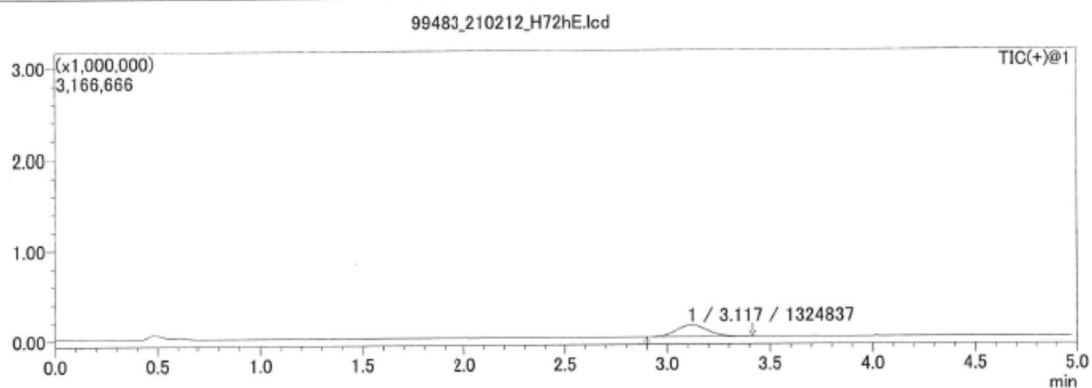
Sample ID : 99483  
Sample name : 0.316% exposure level  
Vial number : 4  
Acquisition date : 2021/02/12  
Inj. Volume : 5  
Data file : 99483\_210212\_H72hF.lcd  
Method file : 99483\_99485\_mrm\_201210.lcm



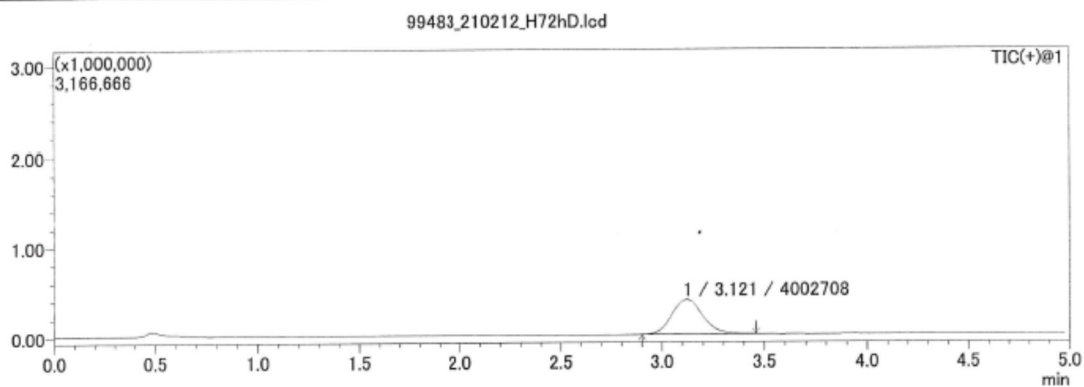
Appendix figure 2-3-2 LC-MS/MS chromatograms at end of exposure.



Sample ID : 99483  
Sample name : 1.00% exposure level  
Vial number : 5  
Acquisition date : 2021/02/12  
Inj. Volume : 5  
Data file : 99483\_210212\_H72hE.lcd  
Method file : 99483\_99485\_mrm\_201210.lcm

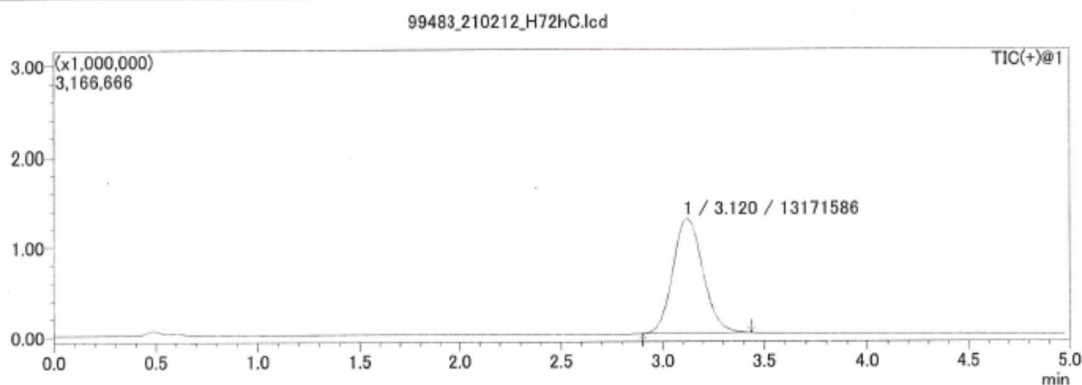


Sample ID : 99483  
Sample name : 3.16% exposure level  
Vial number : 6  
Acquisition date : 2021/02/12  
Inj. Volume : 5  
Data file : 99483\_210212\_H72hD.lcd  
Method file : 99483\_99485\_mrm\_201210.lcm

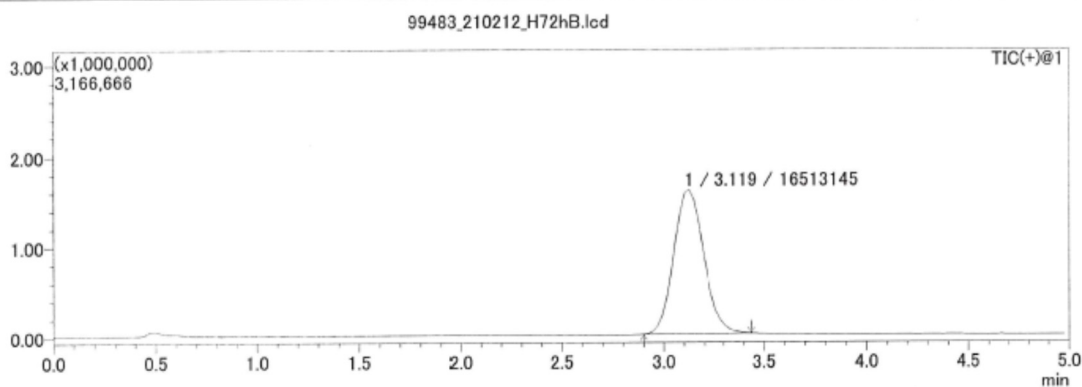


Appendix figure 2-3-3 LC-MS/MS chromatograms at end of exposure.

Sample ID : 99483  
Sample name : 10.0% exposure level  
Vial number : 7  
Acquisition date : 2021/02/12  
Inj. Volume : 5  
Data file : 99483\_210212\_H72hC.lcd  
Method file : 99483\_99485\_mrm\_201210.lcm

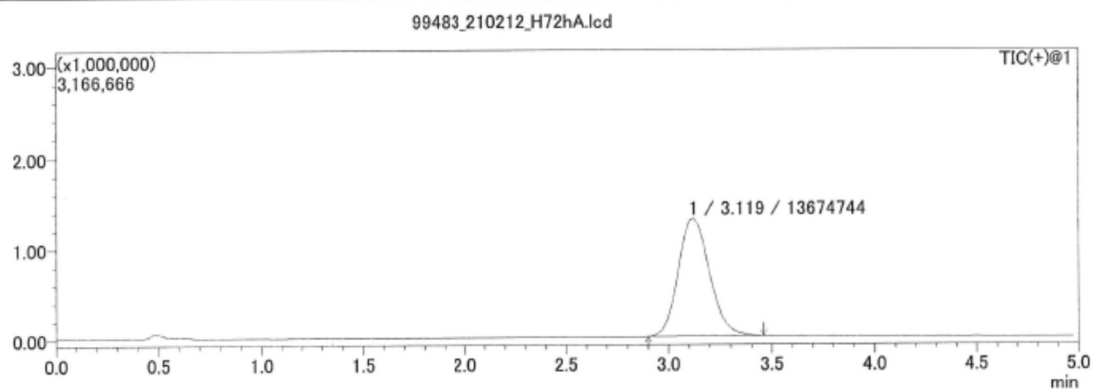


Sample ID : 99483  
Sample name : 31.6% exposure level  
Vial number : 8  
Acquisition date : 2021/02/12  
Inj. Volume : 5  
Data file : 99483\_210212\_H72hB.lcd  
Method file : 99483\_99485\_mrm\_201210.lcm



Appendix figure 2-3-4 LC-MS/MS chromatograms at end of exposure.

Sample ID	: 99483
Sample name	: 100% exposure level
Vial number	: 9
Acquisition date	: 2021/02/12
Inj. Volume	: 5
Data file	: 99483_210212_H72hA.lcd
Method file	: 99483_99485_mrm_201210.lcm



Appendix figure 2-3-5 LC-MS/MS chromatogram at end of exposure.

Additional data

予備試験結果

## 1. 被験物質の培地への溶解度

設定濃度	100 mg/L
調製方法	供試試料と培地を混合して攪拌
温 度	23±1℃
攪拌時間	48 時間
不溶物除去	1 時間静置後、採取した中層をメンブランフィルター（PVDF, 孔径 0.45 μm, Merck）で吸引ろ過した。なお、フィルターはあらかじめ約 50 mL の試験液で洗浄を行った。
測定方法	Appendix 1 と同様

## &lt;溶解度測定結果&gt;

試料名	測定濃度 (mg/L)	算術平均値 (mg/L)
	48 時間攪拌後	
試料-1	0.347	0.363
試料-2	0.370	
試料-3	0.371	

培地への溶解度: 0.363 mg/L

## 2. 生物予備試験

連 数	2 連/試験区
測定法	細胞計数法
試験液調製法	100 mg/L になるように供試試料と培地を混合し、48 時間攪拌後、メンブ ランフィルター（PVDF, 孔径 0.45 μm, Merck）でろ過して調製した試験 原液をそのままもしくは培地で適宜希釈して各試験液を調製した。
分 析	<試験生物への影響 2>の 0.100、1.00 及び 100%区において、試験液中 の被験物質濃度の測定を行った。また、藻体への被験物質の取り込み等 の有無を確認するため、0.100 及び 1.00%区については藻体を添加しない 試験液についても測定した。

## &lt;試験生物への影響 1&gt;

試験原液含有率 (%)	生長速度 (0-3d) に基づく 生長阻害率 (%)
1.00	5.5
10.0	16
100	54

## &lt;試験生物への影響 2&gt;

試験原液含有率 (%)	生長速度 (0-3d) に基づく 生長阻害率 (%)
0.100	0.53
1.00	4.2
10.0	12
100	44

## &lt;試験液中の被験物質濃度&gt;

試験原液含有率 (%)	測定濃度 (mg/L) (対開始時濃度%)	
	暴露開始時	暴露終了時
0.100	0.000303	0.000219 (72.3)
0.100 (藻体なし)		0.000240 (79.2)
1.00	0.00222	0.00175 (78.9)
1.00 (藻体なし)		0.00219 (98.5)
100	0.238	0.217 (91.1)

藻体が関与した濃度低下：若干あり

## 3. 本試験条件

試験区	試験原液含有率 100、31.6、10.0、3.16、1.00、0.316、0.100% (公比 $\sqrt{10}$ ) 及び対照区
濃度分析	暴露開始時及び終了時に実施