

受付番号	662-21-E-9865
試験番号	99865

試 験 報 告 書

オキシブリンールの *Raphidocelis subcapitata* を用いる藻類生長阻害試験

2022 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 30

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}	10
10.3 各試験区での生長曲線、細胞観察結果及び NOEC	10
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	11

Table 1	pH of test solutions.....	12
Table 2	Culture temperature and light intensity in incubator.....	12
Table 3	Value of biomass at each time	13
Table 4	Growth rate and growth inhibition rate	14
Table 5	E _r C ₅₀ and NOEC.....	15
Table 6	Result of statistical analysis	15
Table 7	Variation of growth rates in control.....	16
Figure 1	Concentration-response curve	17
Figure 2	Growth curve.....	18
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

オキシプリノールの *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

オキシプリノールの *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 (EC₅₀) 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	2022 年 1 月 14 日
実 験 開 始 日	2022 年 1 月 18 日
実 験 終 了 日	2022 年 1 月 21 日
試 験 終 了 日	2022 年 3 月 2 日

7. 要 約

被験物質

オキシプリノール

試験目的

オキシプリノールの *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（EC₅₀）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 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」

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%（公比 $\sqrt[10]{10}$ ）の 6 濃度区（測定濃度として 69.6、19.7、6.19、2.03、0.646、0.203 mg/L）及び対照区
試験液の調製	100 mg/L（設定）になるように供試試料と OECD 培地を混合し、48 時間攪拌した後、メンブランフィルターで吸引ろ過して調製した試験原液を用いて調製
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	22.6～22.8℃
光強度	90～93 μmol/m ² /s
生物量の測定	細胞濃度
被験物質濃度の測定	HPLC 法（暴露開始時及び終了時）

試験結果

培地への溶解度（23±1℃）	67.7 mg/L（予備試験での測定値）
EC ₅₀ （E _r C ₅₀ ）	>69.6 mg/L
NOEC（生長速度 0-3d）	2.03 mg/L
（EC ₅₀ 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

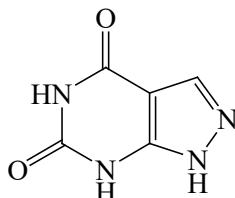
a) 名称等

名 称 オキシプリノール

CAS 番号 2465-59-0

b) 構造式等

構造式



分子式 $C_5H_4N_4O_2$

分子量 152.11

c) 供試試料

被験物質純度 98.8% (HPLC)

供給者 Thermo Fisher Scientific K.K.

ロット番号 10146366

被験物質の純度は 100% として取り扱った。

d) 物理化学的性状

融点 $>300^{\circ}\text{C}$

外観 淡黄色粉末

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：二クロム酸カリウム (試薬特級, ロット番号 YLF7267, 富士フイルム 和光純薬) 実施期間：2022 年 2 月 14 日～2 月 17 日 ErC ₅₀ (0-3d) : 1.4 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 : 0.99～1.4 mg/L (n=10)] 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 ₃ BO ₃	0.185	CuCl ₂ ・2H ₂ O	0.00001
MnCl ₂ ・4H ₂ O	0.415	CaCl ₂ ・2H ₂ O	18.0
ZnCl ₂	0.00300	NH ₄ Cl	15.0
FeCl ₃ ・6H ₂ O	0.0640	KH ₂ PO ₄	1.60
Na ₂ EDTA・2H ₂ O	0.100	NaHCO ₃	50.0
CoCl ₂ ・6H ₂ O	0.00150	MgCl ₂ ・6H ₂ O	12.0
Na ₂ MoO ₄ ・2H ₂ O	0.00700	MgSO ₄ ・7H ₂ 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

100 mg/L (設定) になるように供試試料 (0.100 g) と培地 (1000 mL) を混合したものを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。試験原液含有率 100%区については試験原液をそのまま試験液とした。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。

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%（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	試験原液と同様の調製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 2022 年 1 月 15 日～2022 年 1 月 18 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 0.50×10^4 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（暴露終了時は除外）。
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-006） 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） 6 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

μ_{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)

EC₅₀ 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 (μ_c) と試験濃度区での各連の平均生長速度 (μ_T) との間の差を次式に従って算出した値 (I_μ) とした。

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

b) EC₅₀ の算出法

試験濃度範囲で 50%以上の阻害率が得られなかったため、EC₅₀ は「>試験最高濃度」と表示した。生長速度により求めた EC₅₀ は E_rEC₅₀ と記載した。

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なかったため、各試験濃度区と対照区について Step-down Jonckheere-Terpstra

trend test により有意差検定を行った。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試験結果全体を考慮し、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、試験原液含有率（100、31.6、10.0、3.16、1.00 及び 0.316%）における測定濃度の時間加重平均値（69.6、19.7、6.19、2.03、0.646 及び 0.203 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。暴露終了時には細胞の増殖により 69.6 mg/L 区では薄い緑色、19.7 mg/L 区では少し薄い緑色、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 7.7～8.0 であった。培養装置内温度は 22.6～22.8℃、光強度は 90～93 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ 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 0.197～64.0 mg/L、暴露終了時では 0.209～75.6 mg/L であり、開始時濃度に対して 97.9～118%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 >69.6 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。

69.6 mg/L 区では阻害が認められたものの、対数増殖を示した。19.7 及び 6.19 mg/L 区ではやや阻害が認められたものの対数増殖を示し、69.6 mg/L より高い生長を示した。そ

の他の試験濃度区では対照区に近い生長を示した。

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。69.6 mg/L 区では一部小型化した細胞がみられた。その他の試験濃度区では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、69.6、19.7、6.19、2.03 及び 0.203 mg/L 区において統計学的な有意差が認められた。2.03 及び 0.203 mg/L 区では有意差が認められたものの、平均阻害率は 2.3 及び 2.6%と同程度の低値であり、濃度と阻害率に用量相関はみられなかった。また 0.203 mg/L 区の一つ上の 0.646 mg/L 区では有意差は認められなかった。よって、試験結果全体を考慮し、生長速度における NOEC は 2.03 mg/L と判断した。

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 90 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 4.3% (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 1.4% (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 >69.6 mg/L、NOEC は 2.03 mg/L であった。

NOEC については、生長速度について有意差検定を行った結果、2.03 及び 0.203 mg/L 区では有意差が認められたものの、平均阻害率は 2.3 及び 2.6%と同程度の低値であり、濃度と阻害率に用量相関はみられず、また、0.203 mg/L 区の一つ上の 0.646 mg/L 区では有意差は認められなかったため、NOEC は 2.03 mg/L と判断した。

暴露終了時の細胞観察において、69.6 mg/L 区では一部小型化した細胞がみられた。当該濃度区の平均生長阻害率は 18%であることから、細胞分裂の過程で何らかの異常があった可能性が考えられる。

試験液中の被験物質濃度は開始時濃度の 80~120%に保たれ、また、試験環境条件も適切な範囲内であったことから、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 ^a (mg/L)	pH	
	At the start	At the end
Control	7.8	8.0
0.203	7.8	8.0
0.646	7.8	8.0
2.03	7.8	8.0
6.19	7.8	8.0
19.7	7.8	8.0
69.6	7.7	8.0

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)	22.8	22.7	22.7	22.6
Light intensity (μmol/m ² /s)	91	93	92	90

Table 3 Value of biomass at each time

Measured concentration (mg/L)	Vessel	Cell concentration ($\times 10^4$ cells/mL)			
		0 hours ^b	24 hours	48 hours	72 hours
Control	A	0.50	2.2	9.5	48
	B	0.50	2.3	9.8	50
	C	0.50	2.3	11	54
	D	0.50	2.2	9.3	45 ^c
	E	0.50	2.2	9.5	45 ^c
	F	0.50	2.2	10	49
	Mean	0.50	2.2	9.8	48
	S.D.	0	0.049	0.46	3.2
0.203	A	0.50	2.1	9.5	43
	B	0.50	2.0	9.7	41
	C	0.50	1.9	9.3	46
	Mean	0.50	2.0	9.5	43
	S.D.	0	0.097	0.16	2.6
0.646	A	0.50	2.1	9.4	44
	B	0.50	2.2	9.9	48
	C	0.50	2.2	9.7	52
	Mean	0.50	2.2	9.7	48
	S.D.	0	0.011	0.26	4.0
2.03	A	0.50	2.1	8.8	45
	B	0.50	2.3	9.4	42
	C	0.50	2.0	9.2	43
	Mean	0.50	2.1	9.1	43
	S.D.	0	0.13	0.30	1.2
6.19	A	0.50	1.9	8.6	35
	B	0.50	2.1	7.7	35
	C	0.50	1.9	8.2	35
	Mean	0.50	2.0	8.2	35
	S.D.	0	0.12	0.41	0.12
19.7	A	0.50	2.0	7.4	28
	B	0.50	2.0	7.1	29
	C	0.50	2.0	7.5	30
	Mean	0.50	2.0	7.3	29
	S.D.	0	0.036	0.22	1.1
69.6	A	0.50	1.7	5.9	21
	B	0.50	1.9	6.2	21
	C	0.50	1.8	6.3	21
	Mean	0.50	1.8	6.1	21
	S.D.	0	0.12	0.21	0.17

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)

$$45 / 0.50 = 90$$

Table 4 Growth rate and growth inhibition rate

Measured concentration (mg/L)	Vessel	Growth rate (0-3d)	Growth inhibition rate (%)
Control	A	1.52	-
	B	1.53	-
	C	1.56	-
	D	1.50	-
	E	1.50	-
	F	1.53	-
	Mean	1.52	-
	S.D.	0.0217	-
0.203	A	1.48	2.8
	B	1.47	3.8
	C	1.50	1.2
	Mean	1.48	2.6
	S.D.	0.0200	1.3
0.646	A	1.49	1.9
	B	1.52	0.0021
	C	1.55	-1.8
	Mean	1.52	0.036
	S.D.	0.0277	1.8
2.03	A	1.50	1.7
	B	1.48	2.8
	C	1.48	2.6
	Mean	1.49	2.3
	S.D.	0.00908	0.60
6.19	A	1.42	7.1
	B	1.41	7.2
	C	1.41	7.1
	Mean	1.41	7.2
	S.D.	0.00116	0.076
19.7	A	1.34	12
	B	1.36	11
	C	1.37	10
	Mean	1.36	11
	S.D.	0.0125	0.82
69.6	A	1.25	18
	B	1.25	18
	C	1.25	18
	Mean	1.25	18
	S.D.	0.00271	0.18

Table 5 E_rC_{50} and NOEC

E_rC_{50} (mg/L)	NOEC (mg/L)
> 69.6	2.03

Table 6 Result of statistical analysis

Measured concentration (mg/L)	Result by Step-down Jonckheere-Terpstra trend test	Statistical procedure
0.203	* d	Bartlett's test Step-down Jonckheere-Terpstra trend test
0.646	n.s.	
2.03	* d	
6.19	**	
19.7	**	
69.6	**	

n.s. : No significant difference

* : Significant difference ($p < 0.05$)

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

d : Although there was significant difference, it was judged that the test item caused no adverse effect on the test organism. Because the average inhibition rates at 2.03 and 0.203 mg/L levels were low and negligible.

Table 7 Variation of growth rates in control

< Variation for section-by-section specific growth rates in the controls >

Vessel	Mean	Standard deviation	Coefficient of variation (%)	
A	1.52	0.0849	5.6	4.3 (Mean)
B	1.53	0.0795	5.2	
C	1.56	0.0599	3.8	
D	1.50	0.0695	4.6	
E	1.50	0.0484	3.2	
F	1.53	0.0505	3.3	

< Variation of average specific growth rates in replicate controls >

	0-3day
Mean	1.52
Standard deviation	0.0217
Coefficient of variation (%)	1.4

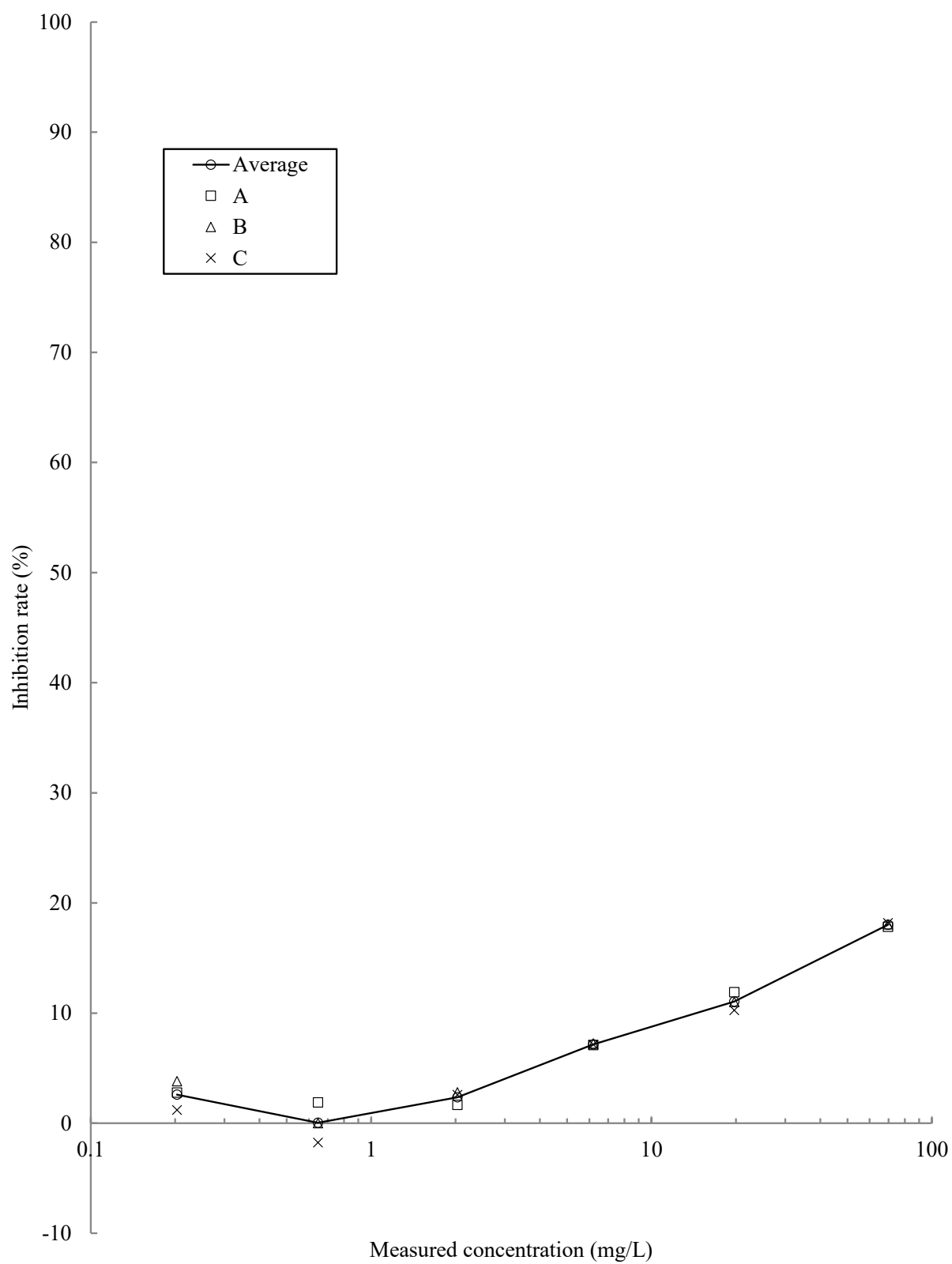


Figure 1 Concentration-response curve.

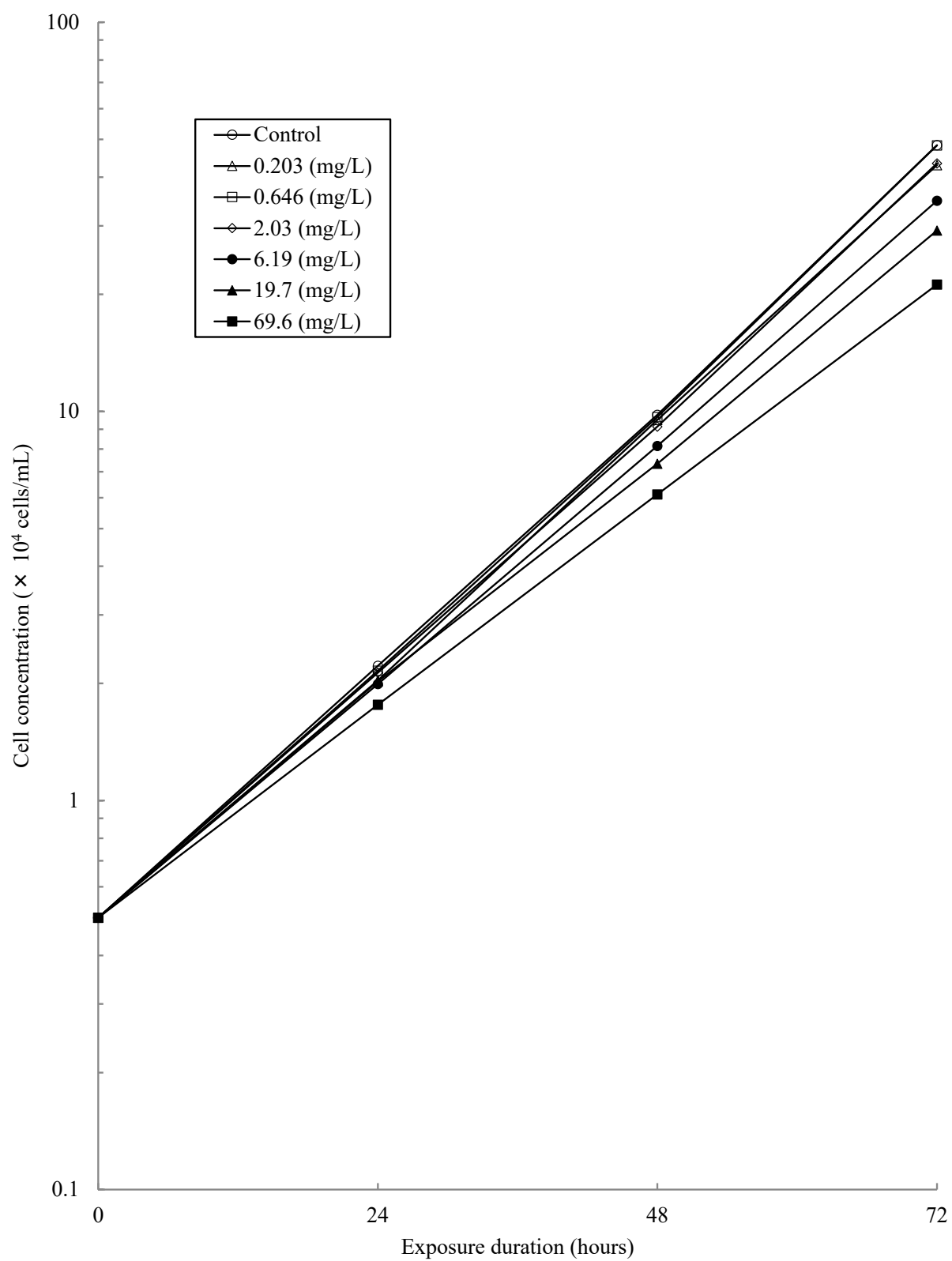


Figure 2 Growth curve.

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、そのまま若しくは培地で適宜希釈して高速液体クロマトグラフィー（HPLC）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0.100、0.500、1.00 及び 2.00 mg/L の4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、HPLC 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。

試験液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（0.100 mg/L）とした。

b) 分析条件

機 器	高速液体クロマトグラフ（機器番号 LC-153）	
ポンプ	LC-20AD	（島津製作所）
紫外可視分光検出器	SPD-20A	（島津製作所）
カラムオーブン	CTO-20A	（島津製作所）
オートインジェクター	SIL-20A _{HT}	（島津製作所）
システムコントローラー	CBM-20A	（島津製作所）
デガッサー	DGU-20A ₃	（島津製作所）
ソフトウェア	LabSolutions CS（島津製作所）	
カラム	L-column ODS (150 mm × 4.6 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（2%）：アセトニトリル B（98%）：超純水/ぎ酸（1000/1 v/v）	
流 量	1.0 mL/min	
測定波長	250 nm	
注入量	10 µL	

c) 標準溶液の調製及び被験物質濃度の算出

供試試料 10.0 mg を電子分析天びんで正確にはかりとり、0.5%アンモニア水に溶解して 10 mL に定容し、1000 mg/L の被験物質溶液を調製した。これを培地で希釈して 20.0 mg/L の被験物質溶液を調製した。さらにこれを培地で希釈して 1.00 mg/L の標準溶液を調製した。

HPLC 試料中の被験物質濃度は、標準溶液及び HPLC 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	
0.316	0.197	0.209 (106)	0.203
1.00	0.646	0.645 (99.9)	0.646
3.16	2.03	2.03 (99.7)	2.03
10.0	6.15	6.23 (101)	6.19
31.6	19.9	19.4 (97.9)	19.7
100	64.0	75.6 (118)	69.6

LOQ : 0.100 mg/L

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

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

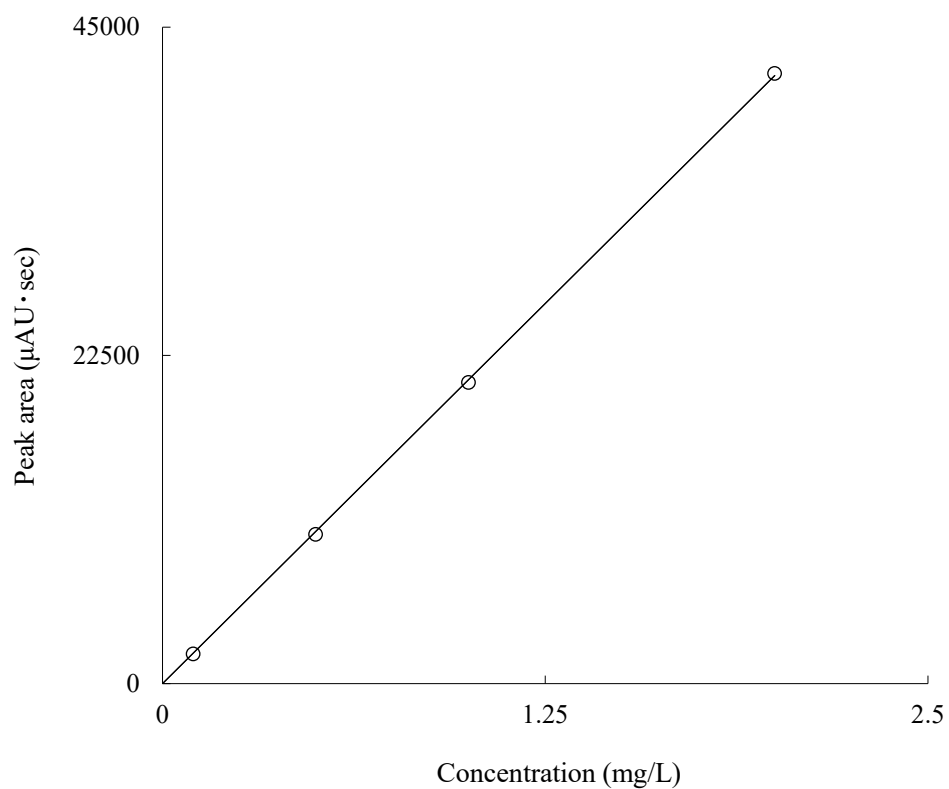
where

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



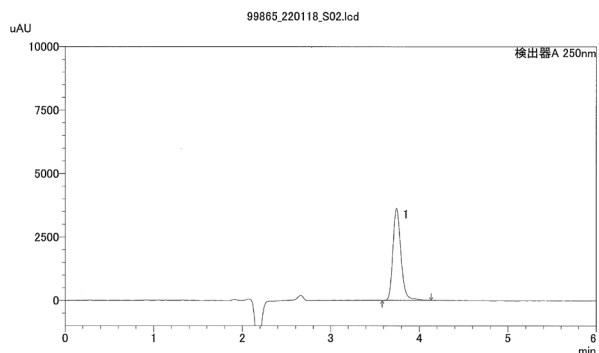
$$y = 20842x$$

$$r = 1.00$$

Concentration (mg/L)	Peak area ($\mu\text{AU} \cdot \text{sec}$)
0.100	2030
0.500	10223
1.00	20649
2.00	41832

Appendix figure 2-1 Calibration curve of test item for analysis by HPLC.

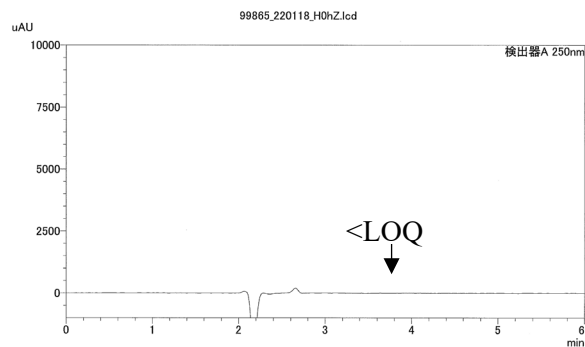
Sample ID : 99865
 Sample Name : Standard solution 1.00 mg/L
 Vial# : 8
 Injection Volume : 10
 Month-Day Acquired : 2022/01/18
 Data File : 99865_220118_S02.lcd
 Original Method File : 99865-99867default_method.lcm
 Acquired by : Chikako Yanagihara



99865_220118_S02.lcd
 検出器A 250nm

Peak No	Peak code	Time (min)	Height (μAU)	Area (μAU·sec)	Area (%)
1		3.74	3639	22772	100.0
合計				3639	22772

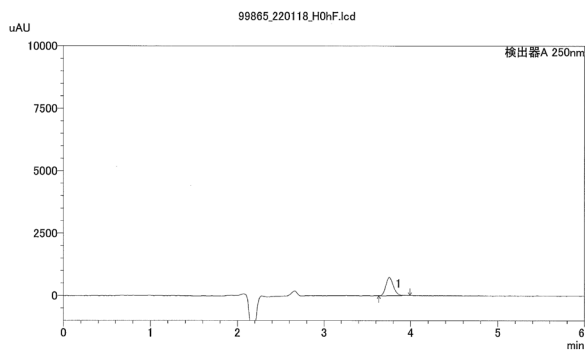
Sample ID : 99865
 Sample Name : Control
 Vial# : 9
 Injection Volume : 10
 Month-Day Acquired : 2022/01/18
 Data File : 99865_220118_H0hZ.lcd
 Original Method File : 99865-99867default_method.lcm
 Acquired by : Chikako Yanagihara



99865_220118_H0hZ.lcd
 検出器A 250nm

Peak No	Peak code	Time (min)	Height (μAU)	Area (μAU·sec)	Area (%)
合計					

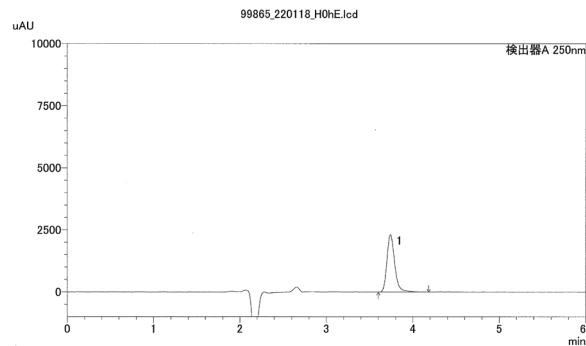
Sample ID : 99865
 Sample Name : 0.316 % exposure level
 Vial# : 10
 Injection Volume : 10
 Month-Day Acquired : 2022/01/18
 Data File : 99865_220118_H0hF.lcd
 Original Method File : 99865-99867default_method.lcm
 Acquired by : Chikako Yanagihara



99865_220118_H0hF.lcd
 検出器A 250nm

Peak No	Peak code	Time (min)	Height (μAU)	Area (μAU·sec)	Area (%)
1		3.75	731	4476	100.0
合計			731	4476	100.0

Sample ID : 99865
 Sample Name : 1.00 % exposure level
 Vial# : 11
 Injection Volume : 10
 Month-Day Acquired : 2022/01/18
 Data File : 99865_220118_H0hE.lcd
 Original Method File : 99865-99867default_method.lcm
 Acquired by : Chikako Yanagihara

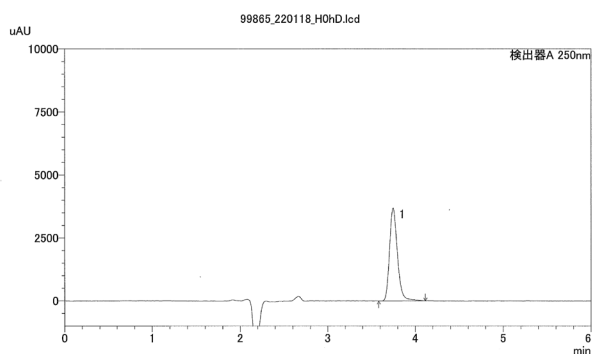


99865_220118_H0hE.lcd
 検出器A 250nm

Peak No	Peak code	Time (min)	Height (μAU)	Area (μAU·sec)	Area (%)
1		3.74	2329	14711	100.0
合計			2329	14711	100.0

Appendix figure 2-2-1 HPLC chromatograms at start of exposure.

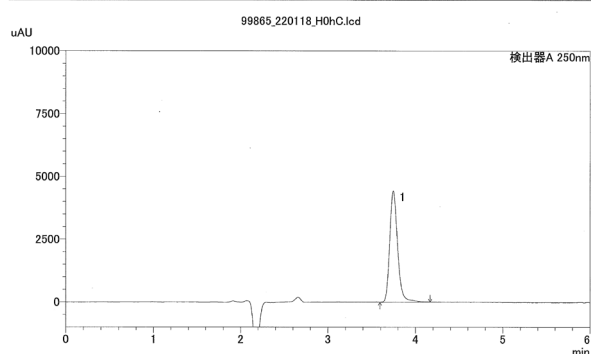
Sample ID : 99865
 Sample Name : 3.16 % exposure level
 Vial# : 12
 Injection Volume : 10
 Month-Day Acquired : 2022/01/18
 Data File : 99865_220118_H0hD.lcd
 Original Method File : 99865-99867default_method.lcm
 Acquired by : Chikako Yanagihara



99865_220118_H0hD.lcd

Peak No	Peak code	Time (min)	Height (μ AU)	Area (μ AU·sec)	Area (%)
1		3.75	3694	23130	100.0
合計			3694	23130	100.0

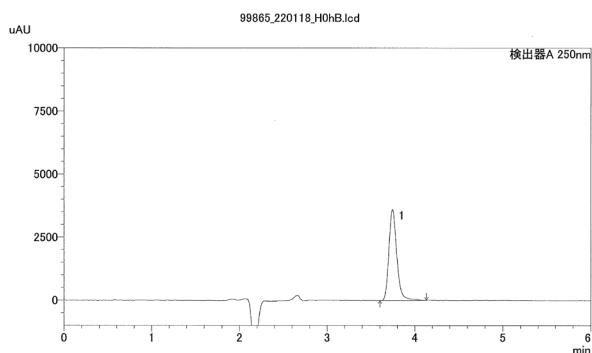
Sample ID : 99865
 Sample Name : 10.0 % exposure level
 Vial# : 13
 Injection Volume : 10
 Month-Day Acquired : 2022/01/18
 Data File : 99865_220118_H0hC.lcd
 Original Method File : 99865-99867default_method.lcm
 Acquired by : Chikako Yanagihara



99865_220118_H0hC.lcd

Peak No	Peak code	Time (min)	Height (μ AU)	Area (μ AU·sec)	Area (%)
1		3.74	4437	28022	100.0
合計			4437	28022	100.0

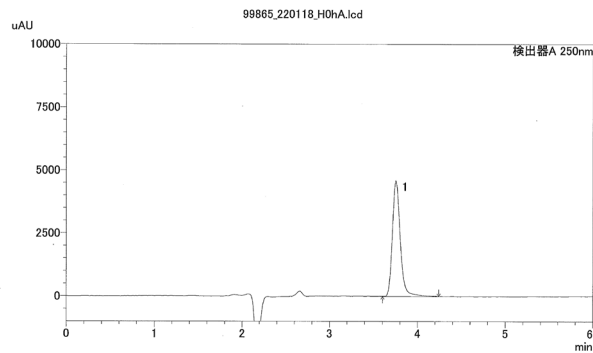
Sample ID : 99865
 Sample Name : 31.6 % exposure level
 Vial# : 14
 Injection Volume : 10
 Month-Day Acquired : 2022/01/18
 Data File : 99865_220118_H0hB.lcd
 Original Method File : 99865-99867default_method.lcm
 Acquired by : Chikako Yanagihara



99865_220118_H0hB.lcd

Peak No	Peak code	Time (min)	Height (μ AU)	Area (μ AU·sec)	Area (%)
1		3.74	3613	22623	100.0
合計			3613	22623	100.0

Sample ID : 99865
 Sample Name : 100 % exposure level
 Vial# : 15
 Injection Volume : 10
 Month-Day Acquired : 2022/01/18
 Data File : 99865_220118_H0hA.lcd
 Original Method File : 99865-99867default_method.lcm
 Acquired by : Chikako Yanagihara

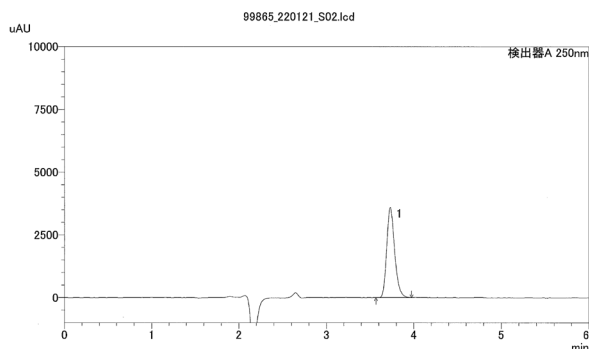


99865_220118_H0hA.lcd

Peak No	Peak code	Time (min)	Height (μ AU)	Area (μ AU·sec)	Area (%)
1		3.75	4598	29156	100.0
合計			4598	29156	100.0

Appendix figure 2-2-2 HPLC chromatograms at start of exposure.

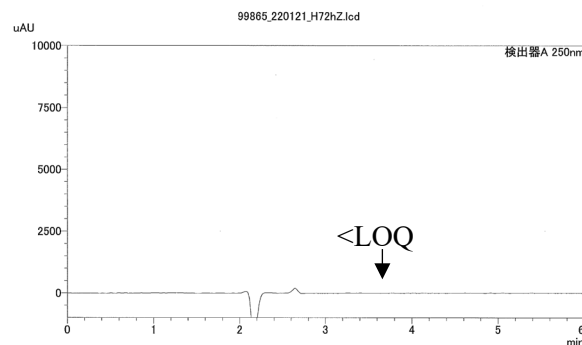
Sample ID : 99865
 Sample Name : Standard solution 1.00 mg/L
 Vial# : 32
 Injection Volume : 10
 Month-Day Acquired : 2022/01/21
 Data File : 99865_220121_S02.lcd
 Original Method File : 99865-99867default_method.lcm
 Acquired by : Chikako Yanagihara



99865_220121_S02.lcd
 検出器A 250nm

Peak No	Peak code	Time (min)	Height (μ AU)	Area (μ AU·sec)	Area (%)
1		3.73	3595	22826	100.0
合計			3595	22826	100.0

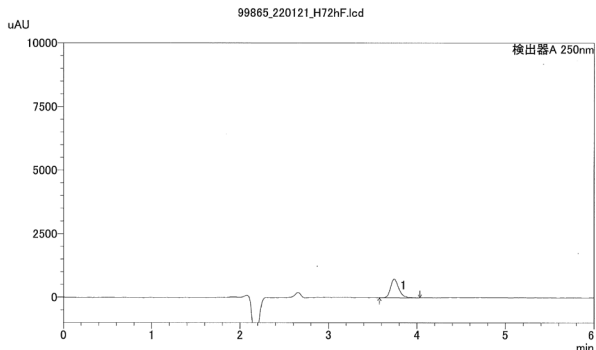
Sample ID : 99865
 Sample Name : Control
 Vial# : 33
 Injection Volume : 10
 Month-Day Acquired : 2022/01/21
 Data File : 99865_220121_H72hZ.lcd
 Original Method File : 99865-99867default_method.lcm
 Acquired by : Chikako Yanagihara



99865_220121_H72hZ.lcd
 検出器A 250nm

Peak No	Peak code	Time (min)	Height (μ AU)	Area (μ AU·sec)	Area (%)
合計					

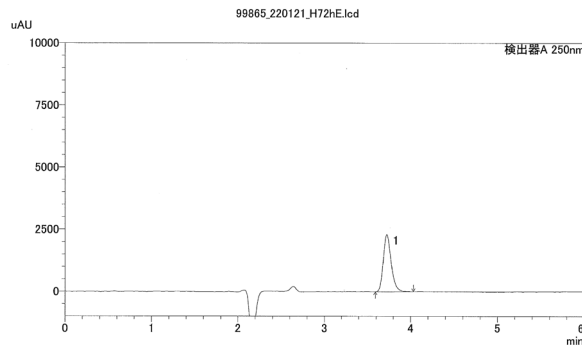
Sample ID : 99865
 Sample Name : 0.316 % exposure level
 Vial# : 34
 Injection Volume : 10
 Month-Day Acquired : 2022/01/21
 Data File : 99865_220121_H72hF.lcd
 Original Method File : 99865-99867default_method.lcm
 Acquired by : Chikako Yanagihara



99865_220121_H72hF.lcd
 検出器A 250nm

Peak No	Peak code	Time (min)	Height (μ AU)	Area (μ AU·sec)	Area (%)
1		3.74	734	4761	100.0
合計			734	4761	100.0

Sample ID : 99865
 Sample Name : 1.00 % exposure level
 Vial# : 35
 Injection Volume : 10
 Month-Day Acquired : 2022/01/21
 Data File : 99865_220121_H72hE.lcd
 Original Method File : 99865-99867default_method.lcm
 Acquired by : Chikako Yanagihara

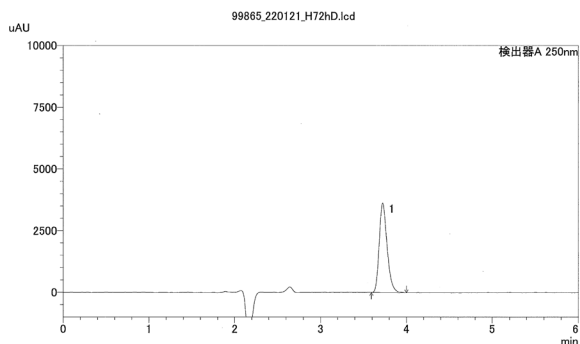


99865_220121_H72hE.lcd
 検出器A 250nm

Peak No	Peak code	Time (min)	Height (μ AU)	Area (μ AU·sec)	Area (%)
1		3.72	2310	14732	100.0
合計			2310	14732	100.0

Appendix figure 2-3-1 HPLC chromatograms at end of exposure.

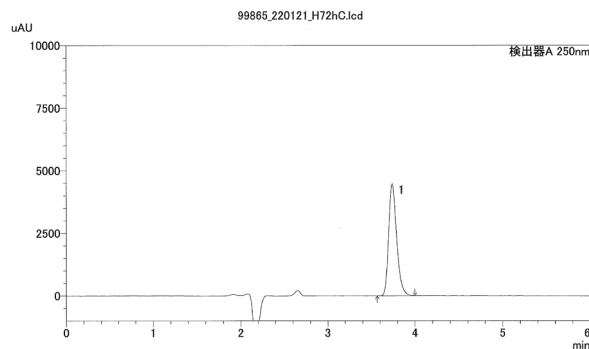
Sample ID : 99865
 Sample Name : 3.16 % exposure level
 Vial# : 36
 Injection Volume : 10
 Month-Day Acquired : 2022/01/21
 Data File : 99865_220121_H72hD.lcd
 Original Method File : 99865-99867default_method.lcm
 Acquired by : Chikako Yanagihara



99865_220121_H72hD.lcd
 検出器A 250nm

Peak No	Peak code	Time (min)	Height (μAU)	Area (μAU·sec)	Area (%)
1		3.72	3636	23113	100.0
合計			3636	23113	100.0

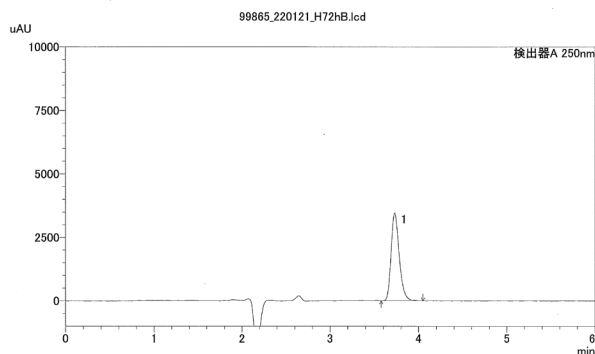
Sample ID : 99865
 Sample Name : 10.0 % exposure level
 Vial# : 37
 Injection Volume : 10
 Month-Day Acquired : 2022/01/21
 Data File : 99865_220121_H72hC.lcd
 Original Method File : 99865-99867default_method.lcm
 Acquired by : Chikako Yanagihara



99865_220121_H72hC.lcd
 検出器A 250nm

Peak No	Peak code	Time (min)	Height (μAU)	Area (μAU·sec)	Area (%)
1		3.74	4481	28459	100.0
合計			4481	28459	100.0

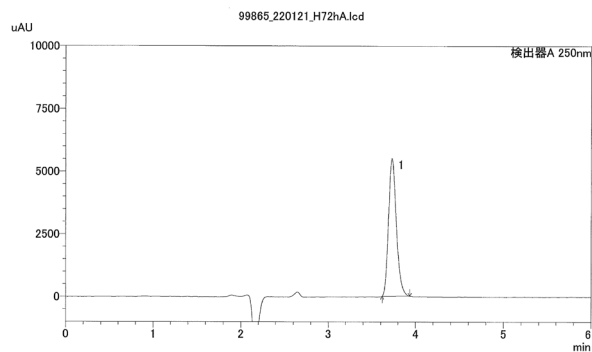
Sample ID : 99865
 Sample Name : 31.6 % exposure level
 Vial# : 38
 Injection Volume : 10
 Month-Day Acquired : 2022/01/21
 Data File : 99865_220121_H72hB.lcd
 Original Method File : 99865-99867default_method.lcm
 Acquired by : Chikako Yanagihara



99865_220121_H72hB.lcd
 検出器A 250nm

Peak No	Peak code	Time (min)	Height (μAU)	Area (μAU·sec)	Area (%)
1		3.73	3456	22190	100.0
合計			3456	22190	100.0

Sample ID : 99865
 Sample Name : 100 % exposure level
 Vial# : 39
 Injection Volume : 10
 Month-Day Acquired : 2022/01/21
 Data File : 99865_220121_H72hA.lcd
 Original Method File : 99865-99867default_method.lcm
 Acquired by : Chikako Yanagihara



99865_220121_H72hA.lcd
 検出器A 250nm

Peak No	Peak code	Time (min)	Height (μAU)	Area (μAU·sec)	Area (%)
1		3.73	5481	34498	100.0
合計			5481	34498	100.0

Appendix figure 2-3-2 HPLC chromatograms 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。

<溶解度測定結果>

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	68.4	67.7
試料-2	68.0	
試料-3	66.6	

培地への溶解度: 67.7 mg/L

2. 生物予備試験

2.1 予備試験 1

連 数	2 連/試験区
初期細胞濃度	0.5×10 ⁴ cells/mL
測定法	細胞計数法
試験液調製法	100 mg/L (設定)になるように供試試料*1と培地を混合し 24 時間攪拌後、メンブランフィルター（PVDF, 孔径 0.45 μm, Merck）で吸引ろ過して試験原液を調製し、培地で適宜希釈して各試験液を調製した。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。 *1：予備試験 1 のみ、富士フイルム和光純薬（研究用試薬, ロット番号 LKL0890）を用いた。

<試験生物への影響 1>

試験原液含有率 (%)	生長速度 (0-3d) に基づく 生長阻害率 (%)
0.100	0.86
1.00	3.4
10.0	13
100	20

2.2 予備試験 2

連 数	2 連/試験区
初期細胞濃度	0.5×10^4 cells/mL
測定法	細胞計数法
試験液調製法	100 mg/L (設定) 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 μ m, Merck) で吸引ろ過して試験原液を調製し、培地で適宜希釈して各試験液を調製した。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。
分 析	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、試験原液含有率 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。

<試験生物への影響 2>

試験原液含有率 (%)	生長速度 (0-3d) に基づく 生長阻害率 (%)
0.300	1.6
1.00	0.24
100	19

<試験液中の被験物質濃度>

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
0.300	0.201	0.201 (100)
1.00	0.631	0.636 (101)
1.00 (藻体なし)		0.635 (101)
100	70.0	64.4 (91.9)

藻体吸着: なし

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 % (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