

受付番号	662-22-E-0298
試験番号	910298

試 験 報 告 書

N-アセチル-5-アミノサリチル酸の *Raphidocelis subcapitata* を用いる藻類生長阻害試験

2023 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 27

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.....	15
Figure 1	Growth curve.....	16
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

N-アセチル-5-アミノサリチル酸の *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

N-アセチル-5-アミノサリチル酸の *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	2023 年 1 月 26 日
実 験 開 始 日	2023 年 1 月 30 日
実 験 終 了 日	2023 年 2 月 2 日
試 験 終 了 日	2023 年 3 月 6 日

7. 要 約

被験物質

N-アセチル-5-アミノサリチル酸

試験目的

N-アセチル-5-アミノサリチル酸の *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	設定濃度として 100 mg/L (試験法の上限濃度での限度試験) 及び対照区
試験液の調製	供試試料と OECD 培地を混合、溶解するまで攪拌して調製
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/試験区(バックグラウンド測定用に 1 試験容器を別途設定)
試験液量	600 mL/試験区 (100 mL/試験容器) (バックグラウンド測定用に 100 mL/試験区を別途設定)
培養温度	22.8～23.2℃
光強度	89 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

EC ₅₀ (E _r C ₅₀)	>100 mg/L
NOEC (生長速度 0-3d)	≥100 mg/L
(EC ₅₀ 及び NOEC は、設定濃度に基づく値)	

8. 試験材料

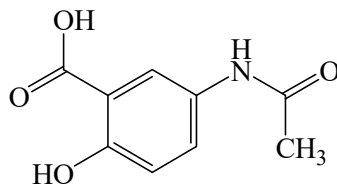
8.1 被験物質

a) 名称等

名 称	<i>N</i> -アセチル-5-アミノサリチル酸
別 名	5-アセトアミド-2-ヒドロキシ安息香酸
CAS 番号	51-59-2

b) 構造式等

構造式

分子式 $C_9H_9NO_4$

分子量 195.17

c) 供試試料

被験物質純度	98%
供給者	BLD Pharmatech Ltd.
ロット番号	CLW023
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

外観	淡黄色固体
----	-------

e) 保管条件

デシケーター中で冷暗所保管した。

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：2023 年 2 月 13 日～2 月 16 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 : 0.99～1.5 mg/L (n=12)] 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 (日本医化器械製作所、機器番号 SIN-010)

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、マグネティックスターラーで溶解するまで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	設定濃度として 100 mg/L（試験法の上限濃度での限度試験） 予備試験結果から試験濃度を決定した。 予備試験結果を Additional data に示す。
対照区	被験物質を含まない培地
連 数	6 連/試験区（バックグラウンド測定用に 1 試験容器を別途設定）
試験液量	600 mL/試験区（100 mL/試験容器） （バックグラウンド測定用に 100 mL/試験区を別途設定）
暴露開始時の細胞数	本試験と同様の条件で 2023 年 1 月 27 日～2023 年 1 月 30 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℃の範囲内で設定し、変動は設定値 $\pm 2^\circ\text{C}$ 以内とした。
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）に調整した蛍光灯型 LED 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（各試験区において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

暴露期間中に測定した試験液中の被験物質濃度が設定濃度の 80～120%であったため、結果の算出には設定濃度を用いた。

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「>試験濃度」と表示した。生長速度により求めた EC₅₀ は E_rC₅₀ と記載した。

c) NOEC の評価

生長速度について、 F 検定による等分散検定を行った後、5%有意水準で等分散が認められたため、Student の t 検定を行った。有意差検定は、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）により実施した。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。試験濃度区で阻害が得られなかったため、NOEC は「 \geq 試験濃度」と表示した。

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

10.1 試験液の観察及び測定結果

a) 試験液の状態

試験濃度区及び対照区共に暴露開始時は無色透明であり、暴露終了時には細胞の増殖により緑色を呈していた。

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 7.2~8.0 であった。培養装置内温度は 22.8~23.2℃、光強度は 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 100 mg/L（対設定濃度として 100%）、暴露終了時では 101 mg/L（対設定濃度として 101%）であり、設定濃度の 80 ~120%以内に保たれていた。

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。

生長速度によって算出した被験物質の E_rC_{50} は >100 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 1 に示す。

試験濃度区では対照区以上の生長を示した。細胞観察の結果、対照区で異常はみられず、試験濃度区も対照区と同様であった。

生長速度について有意差検定を行った結果、統計学的な有意差が認められたが、生長が良かったことによるものであり、有害な影響ではないと考えられた。よって、有意差検定結果及び試験結果全体を考慮し、生長速度における NOEC は ≥ 100 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 1 参照)。暴露終了時には初期生物量の 72 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 7.6% (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 0.91% (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

試験は試験法での上限濃度 (100 mg/L) における試験生物への影響の有無を確認する限度試験として行った。その結果、試験生物に何ら影響はみられなかったことから、被験物質は試験法での上限濃度において試験生物に対し影響を及ぼさないと判断される。

暴露期間中に測定した試験液中の被験物質濃度は設定濃度の 80~120%以内に維持され、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

Nominal concentration (mg/L)	pH	
	At the start	At the end
Control	7.7	7.9
100	7.2	8.0

Table 2 Culture temperature and light intensity in incubator

Time	At the start	1-day	2-day	At the end
Culture temperature (°C)	23.1	23.2	22.8	22.8
Light intensity ($\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$)	89	89	89	89

Table 3 Value of biomass at each time

Nominal concentration (mg/L)	Vessel	Cell concentration ($\times 10^4$ cells/mL)			
		0 hours ^a	24 hours	48 hours	72 hours
Control	A	0.50	1.8	8.2	37
	B	0.50	1.7	8.4	36 ^b
	C	0.50	1.7	8.3	38
	D	0.50	1.9	8.7	38
	E	0.50	2.1	8.9	38
	F	0.50	2.0	9.4	41
	Mean	0.50	1.9	8.7	38
	S.D.	0	0.15	0.46	1.5
100	A	0.50	2.0	9.7	41
	B	0.50	2.0	9.2	41
	C	0.50	2.1	9.7	42
	D	0.50	2.0	9.7	43
	E	0.50	2.0	9.7	44
	F	0.50	2.0	9.3	39
	Mean	0.50	2.0	9.6	42
	S.D.	0	0.037	0.23	1.7

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

b : The minimum cell growth in the control (biomass at the end of exposure/biomass at the start of exposure)

$$36/0.50 = 72$$

Table 4 Growth rate and growth inhibition rate

Nominal concentration (mg/L)	Vessel	Growth rate (0-3d)	Growth inhibition rate (%)
Control	A	1.43	-
	B	1.43	-
	C	1.45	-
	D	1.45	-
	E	1.44	-
	F	1.47	-
	Mean	1.44	-
	S.D.	0.0131	-
100	A	1.47	-2.0
	B	1.47	-1.9
	C	1.48	-2.4
	D	1.48	-2.8
	E	1.49	-3.4
	F	1.45	-0.69
	Mean	1.47	-2.2
	S.D.	0.0134	0.93

Table 5 ErC₅₀ and NOEC

ErC ₅₀ (mg/L)	NOEC (mg/L)
> 100	≥ 100

Table 6 Result of statistical analysis

Nominal concentration (mg/L)	Statistical analysis	Statistical procedure
100	(**)	<i>F</i> test Student's <i>t</i> -test

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

Values in parentheses express significant difference on statistical analysis because of higher growth rate compared with the control (no adverse effect).

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	1.43	0.108	7.5	7.6 (Mean)
B	1.43	0.171	12	
C	1.45	0.190	13	
D	1.45	0.0969	6.7	
E	1.44	0.0243	1.7	
F	1.47	0.0674	4.6	

< Variation of average specific growth rates in replicate controls >

	0-3day
Mean	1.44
Standard deviation	0.0131
Coefficient of variation (%)	0.91

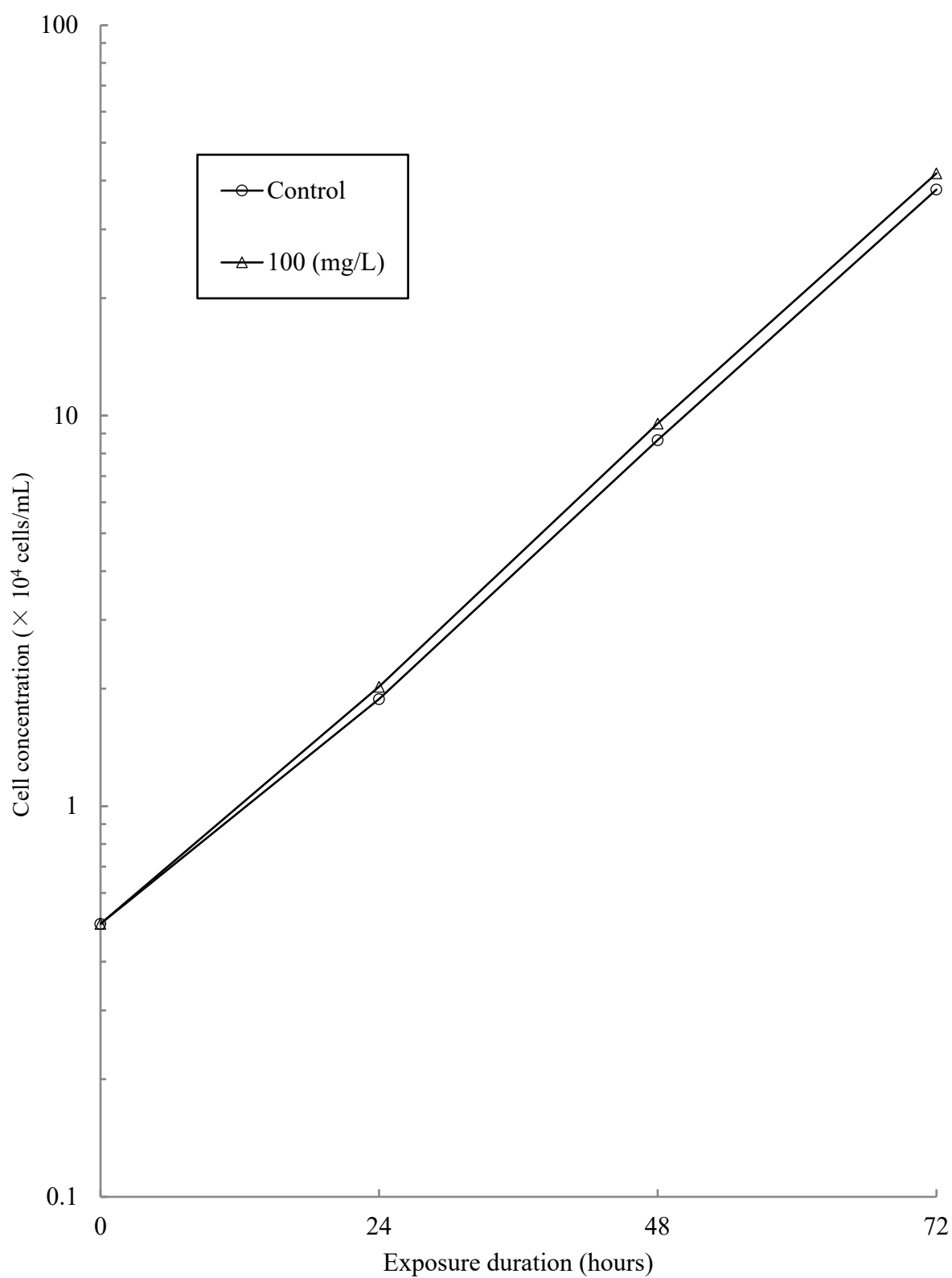


Figure 1 Growth curve.

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、そのまま若しくは培地で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、0.0100、0.100、0.500、1.00 及び 2.00 mg/L の 5 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 (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 (0.0100 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-139)	
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	(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 _{3R}	(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°C	
溶離液	A (48%) : メタノール/りん酸 (1000/1 v/v) B (52%) : 超純水/りん酸 (1000/1 v/v)	
流 量	1.0 mL/min	
測定波長	254 nm	
注入量	100 µL	

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 (試験番号: 910300 で実施)。これをメタノールで希釈して 10.0 mg/L の被験物質溶液を調製した (試験番号: 910300 で実施)。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た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

Nominal concentration (mg/L)	Measured concentration (mg/L) (Percentage of measured concentration versus nominal concentration %)		
	At the start	At the end	Time-weighted mean
Control	<LOQ	<LOQ	
100	100 (100)	101 (101)	101 (101)

LOQ: 0.0100 mg/L

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

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

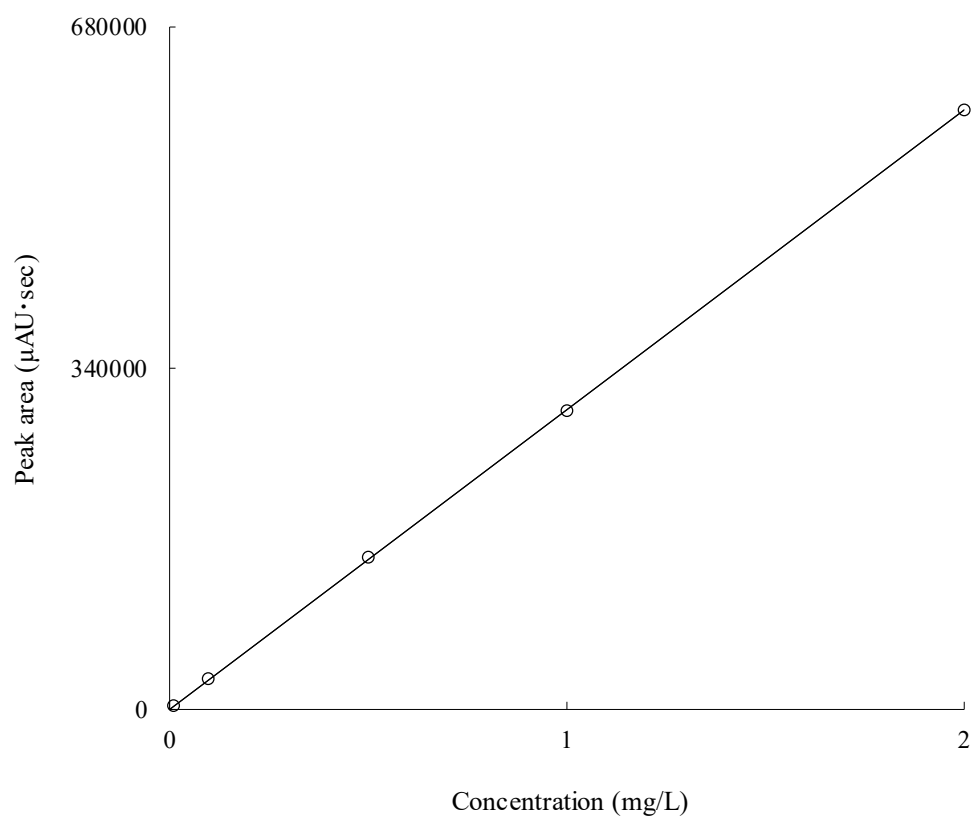
where

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



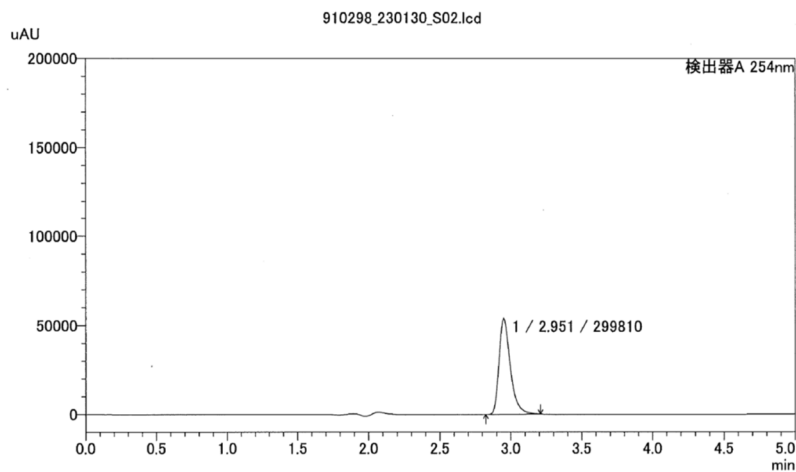
$$y = 298408x$$

$$r = 1.00$$

Concentration (mg/L)	Peak area ($\mu\text{AU}\cdot\text{sec}$)
0.0100	3108
0.100	29992
0.500	150502
1.00	297360
2.00	597007

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

Sample ID : 910298
 Sample Name : Standard solution 1.00 mg/L
 Vial# : 31
 Injection Volume : 100
 Month-Day Acquired : 2023/01/30
 Data File : 910298_230130_S02.lcd
 Original Method File : 910298_910300_B52.lcm
 Acquired by : Yumi Nonaka

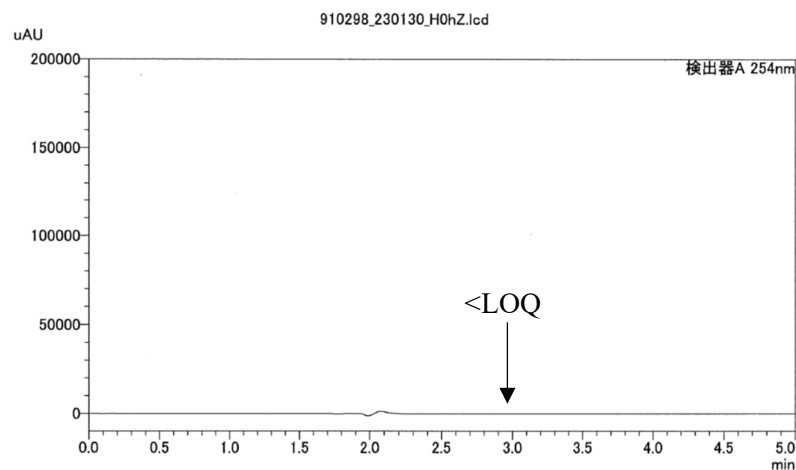


910298_230130_S02.lcd

検出器A 254nm

Peak No	Peak code	Time (min)	Height (μ AU)	Area (μ AU \cdot sec)	Area (%)
1	1	2.95	54113	299810	100.0
合計			54113	299810	100.0

Sample ID : 910298
 Sample Name : Control
 Vial# : 32
 Injection Volume : 100
 Month-Day Acquired : 2023/01/30
 Data File : 910298_230130_H0hZ.lcd
 Original Method File : 910298_910300_B52.lcm
 Acquired by : Yumi Nonaka



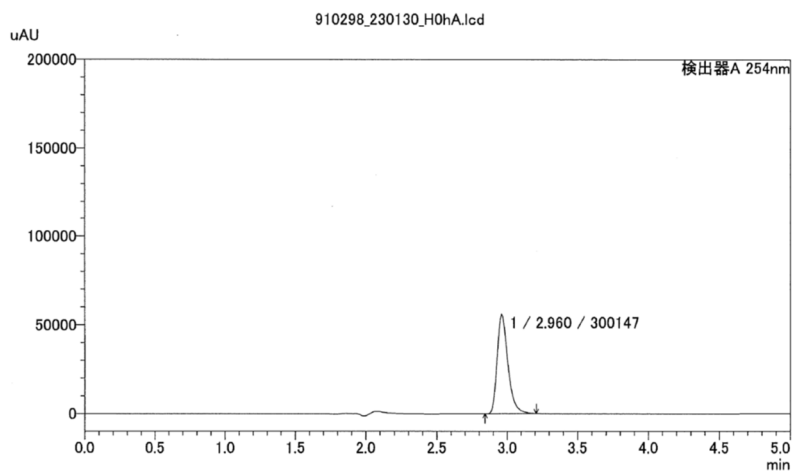
910298_230130_H0hZ.lcd

検出器A 254nm

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

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

Sample ID : 910298
 Sample Name : 100 mg/L exposure level
 Vial# : 33
 Injection Volume : 100
 Month-Day Acquired : 2023/01/30
 Data File : 910298_230130_H0hA.lcd
 Original Method File : 910298_910300_B52.lcm
 Acquired by : Yumi Nonaka



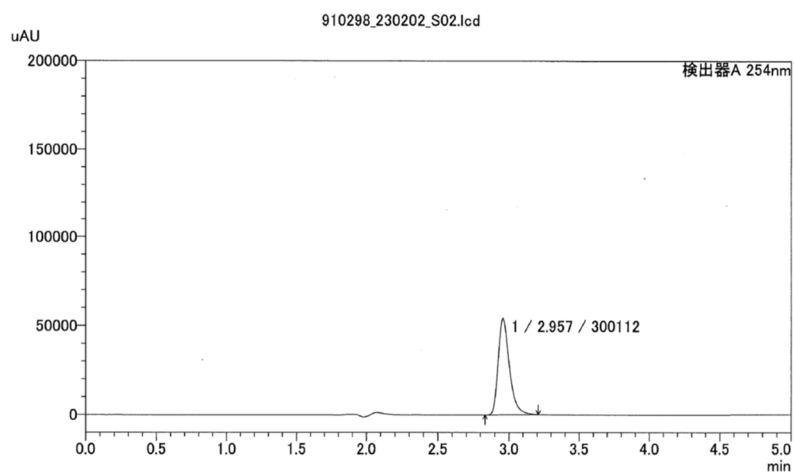
910298_230130_H0hA.lcd

検出器A 254nm

Peak No	Peak code	Time (min)	Height (μ AU)	Area (μ AU \cdot sec)	Area (%)
1	1	2.96	55914	300147	100.0
合計			55914	300147	100.0

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

Sample ID : 910298
 Sample Name : Standard solution 1.00 mg/L
 Vial# : 31
 Injection Volume : 100
 Month-Day Acquired : 2023/02/02
 Data File : 910298_230202_S02.lcd
 Original Method File : 910298_910300_B52.lcm
 Acquired by : Yumi Nonaka

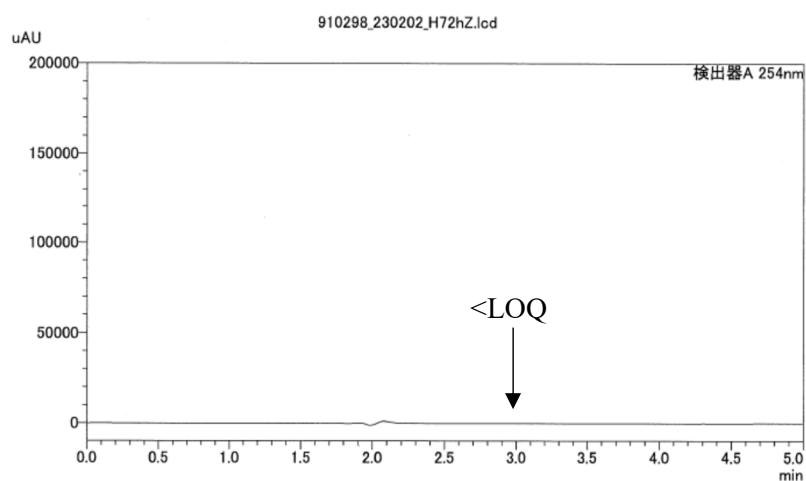


910298_230202_S02.lcd

検出器A 254nm

Peak No	Peak code	Time (min)	Height (μ AU)	Area (μ AU \cdot sec)	Area (%)
1	1	2.96	54236	300112	100.0
合計			54236	300112	100.0

Sample ID : 910298
 Sample Name : Control
 Vial# : 32
 Injection Volume : 100
 Month-Day Acquired : 2023/02/02
 Data File : 910298_230202_H72hZ.lcd
 Original Method File : 910298_910300_B52.lcm
 Acquired by : Yumi Nonaka



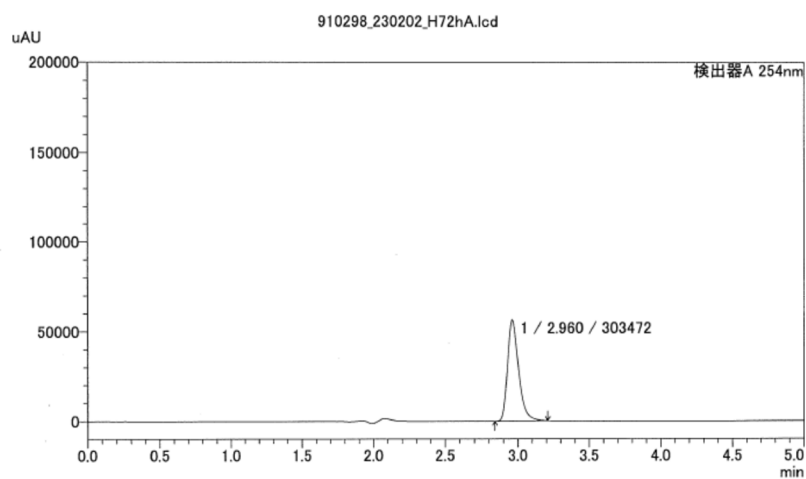
910298_230202_H72hZ.lcd

検出器A 254nm

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

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

Sample ID : 910298
 Sample Name : 100 mg/L exposure level
 Vial# : 33
 Injection Volume : 100
 Month-Day Acquired : 2023/02/02
 Data File : 910298_230202_H72hA.lcd
 Original Method File : 910298_910300_B52.lcm
 Acquired by : Yumi Nonaka



910298_230202_H72hA.lcd

検出器A 254nm

Peak No	Peak code	Time (min)	Height (μ AU)	Area (μ AU·sec)	Area (%)
1	1	2.96	56535	303472	100.0
合計			56535	303472	100.0

Appendix figure 2-3-2 HPLC chromatogram at end of exposure.

Additional data

予備試験結果

1. 予備試験で用いた供試試料

N-アセチル-5-アミノサリチル酸（ロット番号 CLW023）

2. 被験物質の培地への溶解度

被験物質の培地への溶解度は目視で 100 mg/L 以上と判断された。

3. 生物予備試験

連 数 2 又は 3 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、攪拌し溶解させて試験原液を調製した。この試験原液をそのまま若しくは培地で希釈し、各試験液を調製した。

分 析 100 mg/L 区について試験液中の被験物質濃度の測定を行った。藻体への被験物質の取り込み等の有無を確認するために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＞

設定濃度区 (mg/L)	生長速度 (0-3d) に基づく 生長阻害率 (%)
10.0	0.42
100	-1.0

＜試験液中の被験物質濃度＞

設定濃度区 (mg/L)	測定濃度 (mg/L) (対設定濃度%)	
	暴露開始時	暴露終了時
100	103 (103)	105 (105)
100 (藻体なし)		101 (101)

藻体吸着: なし

4. 本試験条件

試験区 設定濃度として 100 mg/L（試験法の上限濃度での限度試験）及び対照区

初期細胞濃度 0.5×10^4 cells/mL

生物量測定 細胞計数法

濃度分析 暴露開始時及び終了時に実施