

陳 述 書

財団法人 化学物質評価研究機構
久留米事業所

試験委託者 住友林業株式会社

試験の表題 SF0409の*Selenastrum capricornutum*による藻類生長阻害試験

試験番号 93506

本最終報告書(写し)は、原本を正確にコピーしたものです。

2005 年 2 月 18 日

試験責任者 末田 昭二郎
末 田 昭二郎

受理番号	E04-3506
試験番号	93506

最 終 報 告 書

SF0409の*Pseudokirchneriella subcapitata*による藻類生長阻害試験

2005 年 2 月 17 日

化学物質評価研究機構

久留米事業所

陳 述 書

財団法人 化学物質評価研究機構
久留米事業所

試験委託者 住友林業株式会社

試験の表題 SF0409の*Pseudokirchneriella subcapitata*による藻類生長阻害試験

試験番号 93506

上記試験は以下の基準に従って実施したものです。

- (1) 「農薬の毒性に関する試験の適正実施に係る基準」(11農産第6283号平成11年10月1日)
- (2) 「OECD Principles of Good Laboratory Practice」(November 26, 1997)

また、本最終報告書は生データを正確に反映しており、試験データが有効であることを確認しています。

2005 年 2 月 17 日

試験責任者 末田 昭二郎
末 田 昭二郎

信 頼 性 保 証 書

財団法人 化学物質評価研究機構
久留米事業所

試験委託者 住友林業株式会社

試験の表題 SF0409 の *Pseudokirchneriella subcapitata* による藻類生長阻害試験

試験番号 93506

本最終報告書は、試験の方法、手順が正確に記載され、試験結果は生データを正確に反映していることを保証します。

なお、検閲の結果については、下記の通り試験責任者及び運営管理者に報告しました。

検閲内容	検閲日	報告日 (試験責任者及び運営管理者)
試験計画書草案	2005 年 1 月 20 日	2005 年 1 月 21 日
試験計画書	2005 年 1 月 24 日	2005 年 1 月 24 日
暴露開始時	2005 年 1 月 24 日	2005 年 1 月 28 日
暴露開始後	2005 年 1 月 27 日	2005 年 1 月 28 日
生データ、最終報告書草案	2005 年 2 月 16 日	2005 年 2 月 16 日
最終報告書	2005 年 2 月 17 日	2005 年 2 月 17 日

2005 年 2 月 17 日

信頼性保証業務担当者 松 延 保 子
松 延 保 子

目 次

	頁
要 約	5
1. 表 題	6
2. 試験委託者	6
3. 試験施設	6
4. 試験目的	6
5. 試験法	6
6. 適用GLP	6
7. 試験日程	6
8. 資料の保管	7
9. 試験関係者	7
10. 最終報告書の承認	7
11. 被験物質	8
12. 試験材料と方法	9
13. 試験結果及び考察	13
14. 試験成績の信頼性に影響を及ぼしたと思われる事項	14
試験結果の表	
表1 暴露開始時と終了時の試験液のpH及び水温	15
表2 暴露期間中の培養装置内温度及び光強度	15
表3 各時間でのクロロフィル蛍光値	16
表4 各濃度における生長阻害率	17
表5 各指標におけるEC50及びNOEC	18
表6 有意差検定結果	18
試験結果の図	
図1 生長曲線下面積を指標とした場合の濃度－生長阻害率曲線	19
図2 生長速度を指標とした場合の濃度－生長阻害率曲線	20
図3 各試験区での生長曲線	21
付属資料 培地の組成	
別添資料 予備試験結果	

要 約

SF0409の*Pseudokirchneriella subcapitata*による藻類生長阻害試験

<試験条件>

- ・被験物質：SF0409
- ・供試生物：*Pseudokirchneriella subcapitata*
- ・暴露期間：72時間
- ・試験濃度：100、25.0、6.25、1.56及び0.391 mg/L(公比4.0)の5濃度区及び対照区
- ・試験方式：旋回振とう培養(約100回/分)
- ・試験液の調製：被験物質と培地を混合、攪拌して調製した試験原液を用いて調製
- ・連 数：3連/試験区
- ・培養温度：23±2℃
- ・照 明：蛍光灯による照明[液面付近での光強度60～120 $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$ (変動幅±20%)とする連続照明]
- ・生長の測定：クロロフィル蛍光値

<結 果>

- ・ $E_bC50(0-72h)$ ：12.5 mg/L(95%信頼限界；4.62～33.9 mg/L)
 - ・ $E_rC50(24-48h)$ ：18.3 mg/L(95%信頼限界；算出不可)
 - ・ $E_rC50(24-72h)$ ：29.0 mg/L(95%信頼限界；算出不可)
 - ・NOEC(生長曲線下面積)：1.56 mg/L
 - ・NOEC(生長速度24-48h)：1.56 mg/L
 - ・NOEC(生長速度24-72h)：6.25 mg/L
- (上記濃度は、設定濃度に基づく値)

1. 表 題
SF0409の*Pseudokirchneriella subcapitata*による藻類生長阻害試験
2. 試験委託者
名 称 住友林業株式会社
所 在 地 (〒100-8270)東京都千代田区丸の内 1-8-1
3. 試験施設
名 称 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
TEL (0942) 34-1500
4. 試験目的
被験物質の藻類の生長に対する影響を調べる。
5. 試験法
本試験は以下の試験法に従って行った。
(1) 「農薬の登録申請に係る試験成績について(別添)農薬の登録申請時に提出される試験成績の作成に係る指針 水産動植物への影響に関する試験 藻類生長阻害試験(2-7-3)(平成12年11月24日付け 12農産第8147号農林水産省 農産園芸局長通知)」
(2) 「OECD Guidelines for Testing of Chemicals」に定める “Alga, Growth Inhibition Test (Guideline 201, 1984)”
6. 適用GLP
本試験は以下の基準を適用した。
(1) 「農薬の毒性に関する試験の適正実施に係る基準」(11農産第6283号平成11年10月1日)
(2) 「OECD Principles of Good Laboratory Practice」(November 26 1997)
7. 試験日程
 - 1) 試験開始日 2005 年 1 月 24 日
 - 2) 実験開始日 2005 年 1 月 24 日
 - 3) 実験完了日 2005 年 1 月 27 日
 - 4) 試験完了日 2005 年 2 月 17 日

8. 資料の保管

1) 被験物質

被験物質*を保管用容器に入れ密栓後、農薬登録取得後5年間、久留米事業所試料保管室に保管する。保管期間経過後の処置は試験委託者と協議の上決定する。ただし、保管中に品質が著しく変化する物質の保管期間は、その品質が保管に耐えうる期間とし、廃棄に際しては試験委託者の承認を得る。

* 試験番号93506、93507及び93508についての共用保管試料とする。

2) 生データ、資料等

生データ、試験計画書、その他必要な資料等は最終報告書と共に、農薬登録取得後15年間、久留米事業所資料保管室に保管する。保管期間終了後の取扱いについては、保管期間終了前に試験委託者と協議する。

9. 試験関係者

試験責任者 末 田 昭二郎
所属 試験第四課

試験担当者 山 口 澄 華、北 嶋 美和子
亀 川 あゆみ、井 上 仁 美

10. 最終報告書の承認

試験責任者

2005 年 2 月 17 日

氏 名 末田 昭二郎
末 田 昭二郎

11. 被 験 物 質

試験委託者提供資料による被験物質情報を以下に示す。

- 1) 名 称
ヒノキ防草材
- 2) 略 称
SF0409
- 3) ロット番号
SF040901
- 4) 外 観
粗粉末状、緑色
- 5) 成分及び含有量
不明 (ヒノキ葉の乾燥粉末)
- 6) 安 定 性
水、その他の溶媒、熱、光等に対して安定
- 7) 提 供 者
住友林業株式会社
- 8) 被験物質の確認
受領した被験物質の貼付ラベル及び送付案内の記載内容等が、試験委託者提供の被験物質情報と一致することを確認した。
- 9) 保 管 条 件
試験中の被験物質は室温暗所で保管した。

12. 試験材料と方法

1) 試験生物

(1) 種

Pseudokirchneriella subcapitata (ATCC 22662)

(旧学名: *Selenastrum capricornutum*)

(2) 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類である。

(3) 供給源

American Type Culture Collection (12301 Parklawn Drive Rockville, Maryland 20852-1776 U.S.A.) より 1995 年 6 月 30 日に入手した *Pseudokirchneriella subcapitata* で久留米事業所で継代培養しているものを用いた。また、試験系の再現性を確認するために実施(2004年10月12日～10月15日に実施)した試験生物による基準物質(二クロム酸カリウム、試薬特級、和光純薬工業株式会社)のE_bC50(0-72h)は0.426 mg/Lであり、この値は久留米事業所での同指標におけるバックグラウンドデータの規定範囲内(平均 $\pm 2 \times$ 標準偏差: 0.280～0.469 mg/L)であった[平均 $\pm$ 標準偏差は0.375 $\pm$ 0.047 mg/L(n=32)]。

2) 培地

前培養及び試験ともにOECD化学品テストガイドラインに示されている培地(OECD推奨培地)を用いた。培地の組成を付属資料に示す。培地は滅菌したものを用いた。

3) 試験器具及び装置

(1) 試験器具

試験容器: 滅菌した500 mL容ガラス製三角フラスコ
(通気性のシリコセン®付)

(2) 試験装置

培養装置: 温度維持、連続照明及び連続振とう培養が可能で、一定の光強度を維持可能な装置(低温恒温槽付回転式振とう培養機 TB-C-50RL 高崎科学器械株式会社製)を用いた。

4) 試験条件

(1) 暴露条件

① 方式

被験物質を含む試験液へ試験生物を暴露し、旋回振とう培養(約100回/分)を行った。

② 期間

72時間

③ 試験濃度

試験は5濃度区[100、25.0、6.25、1.56及び0.391 mg/L(公比4.0)]で行った。試験濃度及び公比は予備試験結果から決定した。予備試験結果を別添資料に示す。

④連 数
3連／試験区

⑤対 照 群
被験物質を含まない培地のみの対照区を設けた。

⑥暴露開始時の細胞数
保存培養から前培養用培地に植えつぎ、試験と同じ条件下で3日間培養し、対数増殖期の細胞を含んだ藻類培養液(前培養液)を 10^4 cells/mLになるように試験液に接種した。

⑦試 験 操 作
無菌操作により実施した。

⑧試 験 液 量
300 mL／試験区(100 mL×3試験容器)

(2) 環 境 条 件

①温 度
 $23\pm 2^{\circ}\text{C}$

②照 明
400～700 nmのスペクトル幅をもつ蛍光灯を用い、液面付近での光強度を
 $60\sim 120 \mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}^*$ (変動幅 $\pm 20\%$)とする連続照明
 $*120 \mu\text{E}/\text{m}^2\text{s} = 0.72 \times 10^{20} \text{photons}/\text{m}^2\text{s}$

5) 試験液の調製法

必要量の被験物質を秤量し、培地と混合後、約1時間攪拌して1,000 mg/Lの試験原液を調製した。さらにこの試験原液を攪拌しながら必要量分取し、培地と混合、攪拌して100 mg/Lの試験原液を調製した。これらの試験原液を攪拌しながら必要量分取し、各試験容器に入れた培地と混合して試験液を調製した。各試験区の試験液調製量に対する試験原液添加量を以下に示す。

試験区(mg/L)	試験原液濃度(mg/L)	試験原液添加量(mL/100 mL)
対照区	—	—
0.391	100	0.391
1.56	1,000	0.156
6.25	1,000	0.625
25.0	1,000	2.50
100	1,000	10.0

6) 観察と測定

(1) 藻類の生長等

暴露開始後24時間毎に72時間までクロロフィル蛍光値を分光蛍光光度計(F-2000、日立製作所製)により測定した。その際、各試験区における試験液のバックグラウンドを測定するため、別途バックグラウンド測定用に調製した試験容器(藻体なし)について同時に測定し、ブランク補正を行った。なお、測定用に採水した試験液はメッシュスクリーンMS-50目(408 μ m)にて大粒子の被験物質を除去した。対照群にも同様の操作を行った。また、暴露終了時には各試験区につき1試験容器について細胞の状態を生物顕微鏡(BX41、オリンパス株式会社製)を用いて観察した。

(2) 試験液の状態

試験液の状態を暴露開始時及び終了時に観察した。

(3) 水質及び暴露環境

試験液のpH及び水温を暴露開始時と終了時に測定した。暴露開始時は別途調製した試験液について測定し、暴露終了時には各試験区につき1試験容器を測定した。培養装置内の温度、光強度を暴露期間中1日1回測定した。pHはガラス電極式水素イオン濃度計HM-14P型(東亜ディーケーケー)、温度は検定済ガラス製棒状温度計、光強度はポータブル光量子計QSL-100(Biospherical Instruments Inc.)で測定した。

7) 結果の算出

結果の算出には設定濃度を用いた。

(1) 濃度－阻害率の算定法

各試験区のクロロフィル蛍光値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。この曲線を用い、生長曲線下面積及び生長速度を比較して各濃度区での阻害率を算出した。

① 生長曲線下面積の比較(面積法)

生長曲線下面積を次式に従って計算した。

$$A = \frac{N_1 - N_0}{2} \times t_1 + \frac{N_1 + N_2 - 2N_0}{2} \times (t_2 - t_1) + \frac{N_{n-1} + N_n - 2N_0}{2} \times (t_n - t_{n-1})$$

ここで

A = 生長曲線下面積

N_0 = 暴露開始時(t_0)の設定細胞数におけるクロロフィル蛍光値
(relative unit)

N_1 = t_1 時に測定したクロロフィル蛍光値(relative unit)

N_n = t_n 時に測定したクロロフィル蛍光値(relative unit)

t_1 = 暴露開始後最初にクロロフィル蛍光値を測定した時間

t_n = 暴露開始後n回目にクロロフィル蛍光値を測定した時間

各濃度区における阻害百分率(I_A)は対照群の平均生長曲線下面積(A_c)と各濃度区での生長曲線下面積(A_i)との間の差として次のように計算した。

$$I_A = \frac{A_c - A_t}{A_c} \times 100$$

② 生長速度の比較(速度法)

生長曲線から2測定時(t_1 , t_n)でのそれぞれのクロロフィル蛍光値(N_1 , N_n)から平均の生長速度(μ)を次式に従って計算した。 t_1 と t_n は、各々24時間と48時間及び24時間と72時間を用いた。

$$\mu = \frac{\ln N_n - \ln N_1}{t_n - t_1}$$

各濃度区における阻害百分率(I_μ)は対照群の平均生長速度(μ_c)と各濃度区での生長速度(μ_t)との間の差として次のように計算した。

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

(2) EC50^{*1}の算出法

各濃度区に対応する阻害率を片対数紙にプロットし、直線性の認められる点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EC50(可能な場合その95%信頼限界)を算出した。その際、面積法により求めた場合は $E_bC50(0-72h)$ 、速度法により求めた場合は $E_rC50(24-48h)$ 又は $E_rC50(24-72h)$ と記載した。

^{*1} EC50(Median Effective Concentration)：暴露期間において試験生物の生長を50%阻害する被験物質濃度を示す。

(3) 最大無影響濃度(NOEC^{*2})の算出

生長曲線下面積、24-48時間及び24-72時間生長速度について、Bartlett法による等分散検定を行った後、各濃度区と対照群との有意差の有無を生長曲線下面積及び24-72時間生長速度については一元配置分散分析及びDunnettの多重比較法、24-48時間生長速度についてはKruskal-Wallisの順位和検定及びDunnettの多重比較法(ノンパラメトリック)により求めた。ただし、各指標におけるEC50より高い濃度区は、有意差検定には使用しなかった。これらの有意差検定結果に加え、試験結果全体を考慮し、NOECを評価した。

^{*2} NOEC(No Observed Effect Concentration)：暴露期間において試験生物の生長に影響が認められない試験最高濃度を示す。

8) 有効性基準

対照群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。

9) 数値の取扱い

数値の丸め方は、JIS Z 8401 規則Bによった。

13. 試験結果及び考察

1) 試験液の観察と測定結果

(1) 試験液の状態

暴露開始時は100 mg/L区では淡黄褐色、その他の濃度区では無色であった。また、全濃度区で濃度依存的に被験物質の沈殿が見られた。暴露終了時には100 mg/L区では開始時よりもやや濃い淡黄褐色、25.0 mg/L区では細胞の増殖により微かに薄い緑色、6.25 mg/L区でやや薄い緑色、その他の濃度区では緑色を呈していた。また、全濃度区で濃度依存的に被験物質の沈殿が見られた。

(2) 試験液の水質及び暴露環境

試験液のpHは暴露開始時では7.9～8.0、暴露終了時では8.0～8.2であった。試験液の水温は暴露開始時及び暴露終了時では23.0～23.2℃であった。培養装置内の温度は23.0～23.2℃、光強度は107～116 $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$ であった。試験液のpH及び水温の測定結果を表1、培養装置内の温度及び光強度の測定結果を表2に示す。

2) EC50

生長曲線下面積、24-48時間及び24-72時間生長速度によって算出したSF0409の $E_b\text{C50}(0-72\text{h})$ は12.5 mg/L(95%信頼限界：4.62～33.9 mg/L)、 $E_r\text{C50}(24-48\text{h})$ は18.3 mg/L(95%信頼限界：算出不可)、 $E_r\text{C50}(24-72\text{h})$ は29.0 mg/L(95%信頼限界：算出不可)であった。各時間でのクロロフィル蛍光値を表3、生長阻害率を表4、各指標でのEC50を表5に示す。また、各指標における濃度－生長阻害率曲線を図1及び図2に示す。

3) 各試験区での生長曲線、細胞観察結果及びNOEC

100 mg/L区では暴露期間を通して生長は著しく抑えられていた。25.0及び6.25 mg/L区では阻害が認められたものの対数増殖を示した。1.56及び0.391 mg/L区では対照群に近い生長を示した。

以下の細胞観察結果は全て対照群との比較に基づくものである。100 mg/L区においてやや膨張している細胞がやや多くみられ、25.0 mg/L区でもやや膨張した細胞及び凝集した細胞がやや多くみられた。その他の濃度区では対照群と同様であった。

有意差検定結果及び上記細胞観察結果より、生長曲線下面積及び24-72時間生長速度におけるNOECはそれぞれ1.56及び6.25 mg/Lであった。24-48時間生長速度におけるNOECは統計学的有意差検定結果では6.25 mg/Lであった。しかし、NOECと判定された濃度での阻害率はそれぞれ23.1、13.8、17.2%であり、生長阻害があると考えられたため、1濃度区低い1.56 mg/LをNOECと評価した。NOECを表5、有意差検定結果を表6、生長曲線を図3に示す。

4) 試験の有効性

対照群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。暴露終了時には初期クロロフィル蛍光値の91.0倍以上に増殖し、有効性基準(16倍以上の増殖)を満たしていた。

5) 考 察

本試験において被験物質を添加した試験液では粒子成分が存在するため、粒子計数器及び顕微鏡観察による細胞数の計数が出来なかった。よって、クロロフィル蛍光値を測定することによって生長量を測定した。ただし、本被験物質はヒノキ葉の乾燥粉末であり、高濃度区においては被験物質由来と思われるクロロフィル蛍光のブランク値が測定された。試験生物(藻体)の生長量としてはこのブランク補正を行った値で表示したが、試験最高濃度区である100 mg/L区の暴露後24時間では、被験物質由来のブランク値の方が試験生物由来のクロロフィル蛍光値よりも大きく、ブランク値のばらつきにより正確なブランク補正が出来ていないと思われる結果が得られた。ただし、100 mg/L区においても被験物質由来のブランク値は暴露後48及び72時間では漸次減少し、試験生物の生長量測定に与える影響も減少したと思われる。また、25.0 mg/L以下の濃度区ではブランク値による影響は軽微なものであった。

以上のことから、本試験の結果から算出したEC50及びNOECは被験物質の作用を反映した妥当なものであると判断した。以下に参考データとして、各試験区のブランク値を示す。

ブランク試料におけるクロロフィル蛍光値(relative unit)

試験区 (mg/L)	暴露後24時間	暴露後48時間	暴露後72時間
100	14.2	6.00	3.84
25.0	3.64	2.47	1.33
6.25	1.50	1.07	0.827
1.56	0.931	0.650	0.786
0.391	0.938	0.777	0.753
対照区	0.806	0.810	0.739

14. 試験成績の信頼性に影響を及ぼしたと思われる事項
当該事項はなかった。

表1 暴露開始時と終了時の試験液のpH及び水温

設定濃度 (mg/L)	pH		水温	
	開始時	終了時	開始時	終了時
対 照 区	7.9	8.0	23.1	23.0
0.391	8.0	8.1	23.0	23.2
1.56	8.0	8.2	23.1	23.2
6.25	8.0	8.2	23.1	23.0
25.0	8.0	8.1	23.1	23.0
100	8.0	8.1	23.2	23.1

表2 暴露期間中の培養装置内温度及び光強度

暴露期間	開始時	1日	2日	終了時
培養装置内温度(℃)	23.2	23.0	23.2	23.0
光 強 度 ($\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$)	116	112	107	109

表3 各時間でのクロロフィル蛍光値

設定濃度 (mg/L)	No.	クロロフィル蛍光値(relative unit)			
		開始時*	24時間	48時間	72時間
対 照 区	1	4.20	22.5	119	415
	2	4.20	24.1	120	408
	3	4.20	23.9	121	382
	平均	4.20	23.5	120	402
	S.D.	0	0.913	1.10	17.2
0.391	1	4.20	24.5	131	445
	2	4.20	23.9	129	461
	3	4.20	24.1	131	479
	平均	4.20	24.1	130	462
	S.D.	0	0.292	1.44	17.2
1.56	1	4.20	19.8	117	453
	2	4.20	21.6	123	496
	3	4.20	22.2	131	523
	平均	4.20	21.2	124	491
	S.D.	0	1.25	6.81	35.0
6.25	1	4.20	15.4	54.0	219
	2	4.20	14.8	60.4	278
	3	4.20	15.9	61.6	287
	平均	4.20	15.4	58.7	261
	S.D.	0	0.578	4.08	36.9
25.0	1	4.20	8.71	28.6	99.4
	2	4.20	13.4	27.8	113
	3	4.20	10.2	29.8	112
	平均	4.20	10.8	28.7	108
	S.D.	0	2.41	0.980	7.72
100	1	4.20	15.1	8.26	6.49
	2	4.20	8.09	5.42	8.79
	3	4.20	11.0	6.56	7.58
	平均	4.20	11.4	6.75	7.62
	S.D.	0	3.52	1.43	1.15

* 前培養液の測定値に基づく値

表4 各濃度における生長阻害率

設定濃度 (mg/L)	No.	生長曲線下 面積	阻害率 (%)	生長速度 (24-48時間)	阻害率 (%)	生長速度 (24-72時間)	阻害率 (%)
対 照 区	1	8120	-	0.0695	-	0.0608	-
	2	8110	-	0.0669	-	0.0589	-
	3	7820	-	0.0677	-	0.0577	-
	平均	8020	-	0.0680	-	0.0591	-
0.391	1	8820	-10.0	0.0700	-2.89	0.0604	-2.20
	2	8940	-11.5	0.0701	-3.11	0.0617	-4.33
	3	9220	-14.9	0.0705	-3.59	0.0623	-5.32
	平均	8990	-12.2	0.0702	-3.20	0.0615	-3.95
1.56	1	8480	-5.76	0.0741	-8.92	0.0652	-10.3
	2	9170	-14.4	0.0724	-6.45	0.0653	-10.3
	3	9700	-20.9	0.0739	-8.64	0.0658	-11.3
	平均	9110*	-13.7	0.0735	-8.00	0.0654*	-10.6
6.25	1	4040	49.6	0.0523	23.1	0.0553	6.42
	2	4890	39.0	0.0587	13.8	0.0611	-3.40
	3	5050	37.0	0.0564	17.2	0.0602	-1.85
	平均	4660**	41.9	0.0558	18.0	0.0589	0.392
25.0	1	1840	77.1	0.0495	27.2	0.0507	14.2
	2	2100	73.9	0.0304	55.3	0.0444	24.9
	3	2060	74.4	0.0447	34.3	0.0500	15.4
	平均	2000	75.1	0.0415	39.0	0.0484**	18.2
100	1	386	95.2	-0.0251	137	-0.0176	130
	2	178	97.8	-0.0167	125	0.00173	97.1
	3	260	96.8	-0.0215	132	-0.00773	113
	平均	275	96.6	-0.0211	131	-0.00786	113

** : 1%水準で有意差あり

* : 5%水準で有意差あり

(有意差検定結果の詳細は表6を参照)

表5 各指標におけるEC50及びNOEC

検出指標	EC50(mg/L)	NOEC(mg/L)
生長曲線下面積	12.5(4.62~33.9)	1.56
24-48時間生長速度	18.3	1.56
24-72時間生長速度	29.0	6.25

()内は95%信頼限界を示す。

表6 有意差検定結果

設定濃度 (mg/L)	検出指標		
	生長曲線下面積	生長速度(24-48時間)	生長速度(24-72時間)
0.391	—	—	—
1.56	(*)	—	(*)
6.25	**	—	—
25.0			**
100			
検定法	Bartlett法 一元配置分散分析 Dunnettの多重比較法	Bartlett法 Kruskal-Wallisの順位 和検定 Dunnettの多重比較法 (ノンパラメトリック)	Bartlett法 一元配置分散分析 Dunnettの多重比較法

** : 1%水準で有意差あり

* : 5%水準で有意差あり

— : 有意差なし

()は対照区より指標値が高かったために有意差がみられた(有害な影響ではない)ことを示す。

空欄はEC50より高い濃度区のため検定には使用しなかったことを示す。

24-48時間生長速度におけるNOECは統計学的有意差検定結果では6.25 mg/Lであった。しかし、この濃度では生長阻害があると考えられたため1.56 mg/LをNOECと評価した。

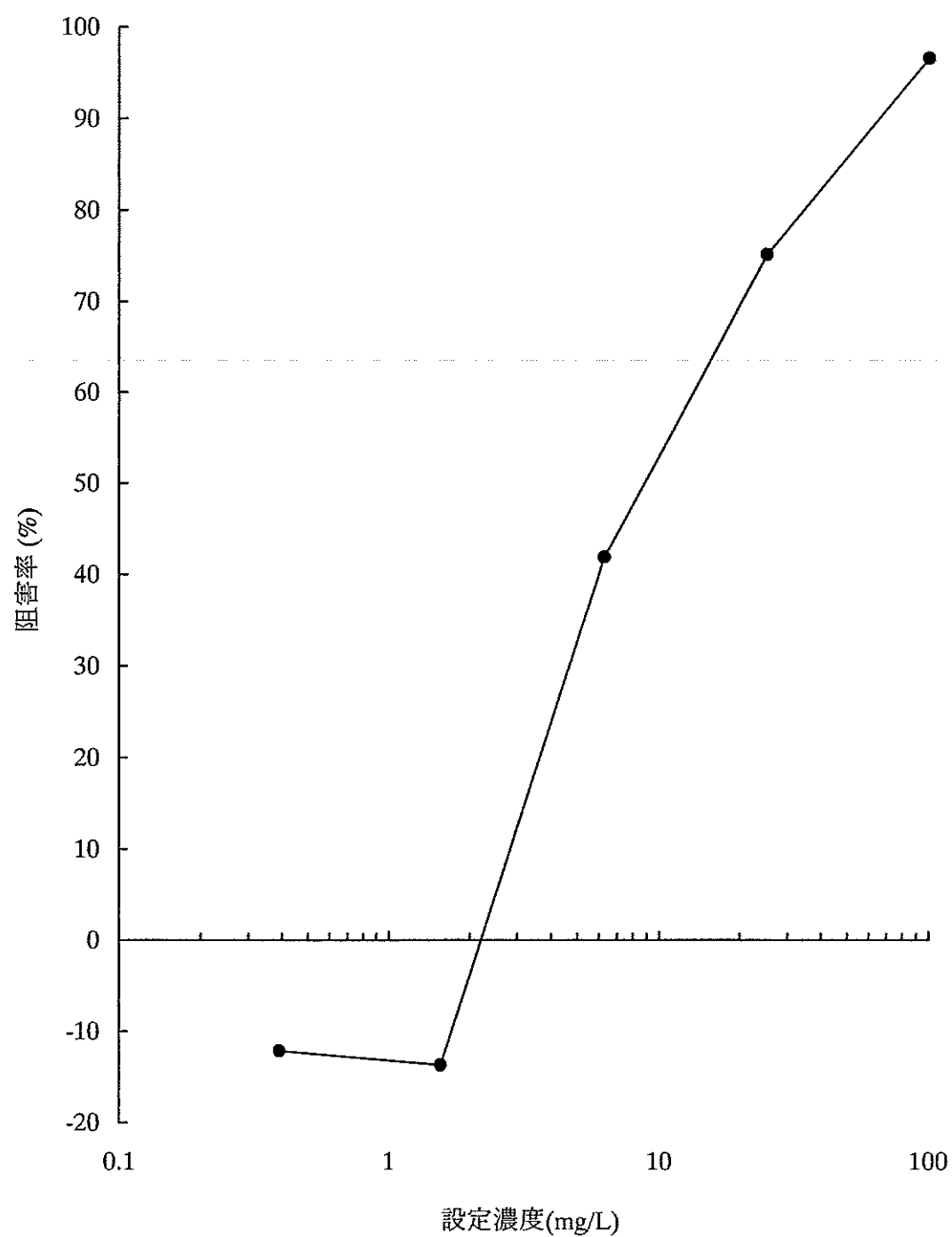


図1 生長曲線下面積を指標とした場合の濃度－生長阻害率曲線

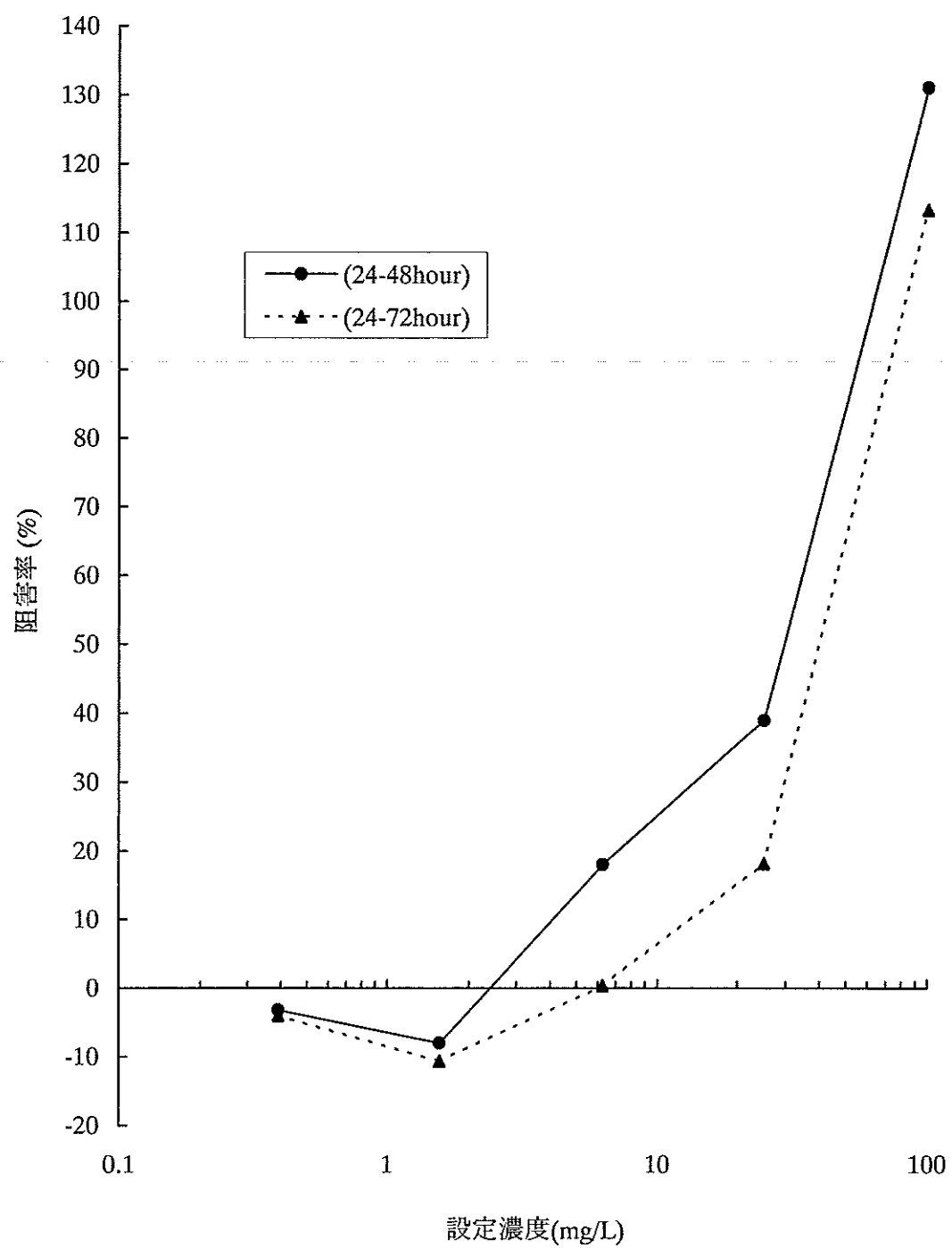


図2 生長速度を指標とした場合の濃度－生長阻害率曲線

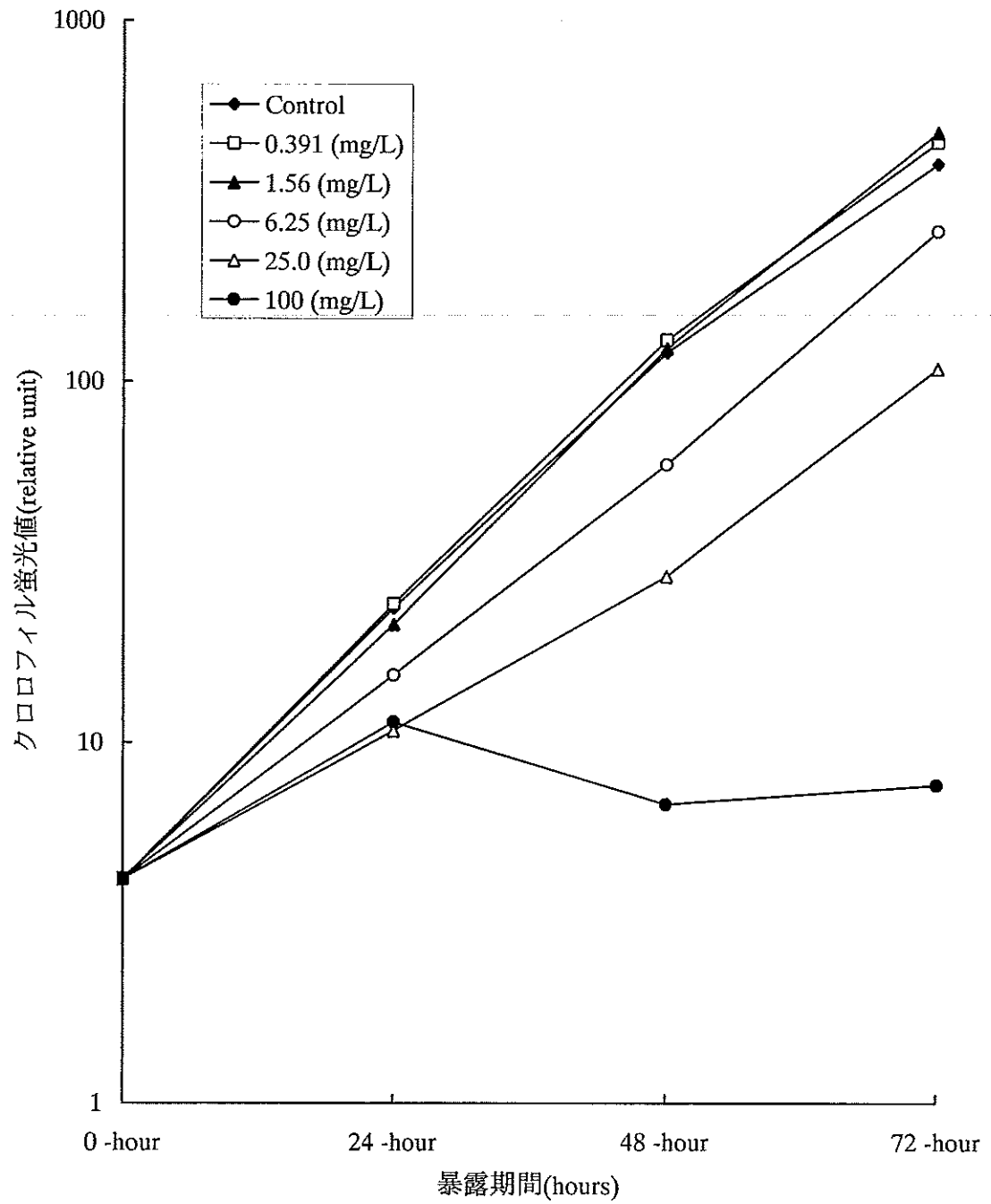


図3 各試験区での生長曲線

付属資料

培地の組成

OECD 推奨培地

成 分 名	量	
H_3BO_3	0.185	mg
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.415	mg
ZnCl_2	0.003	mg
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.08	mg
$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.1	mg
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.0015	mg
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.007	mg
$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.00001	mg
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	18	mg
NH_4Cl	15	mg
KH_2PO_4	1.6	mg
NaHCO_3	50	mg
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	12	mg
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	15	mg

上の成分を純水で 1 L に定容した。pH は約 8 である。

別添資料

予備試驗結果

予備試験結果

<生物への影響>

予備試験1

濃度区 (mg/L)	阻 害 率 (%)		
	生長曲線下面積	生長速度(24-48h)	生長速度(24-72h)
0.100	0.450	0.0302	-1.68
1.00	3.85	-1.58	-1.26
10.0	34.8	14.3	-5.38
100	93.3	111	110

連 数：1 連／区

試験液調製法：培地と被験物質を混合後、1時間攪拌して調製した試験原液を用いて調製した。

測 定 法：蛍光測定法

予備試験2

濃度区 (mg/L)	阻 害 率 (%)		
	生長曲線下面積	生長速度(24-48h)	生長速度(24-72h)
0.391	-3.41	-0.499	-0.492
1.56	-10.0	-11.3	-9.35
6.25	16.4	-33.5	-10.4
25.0	80.2	70.6	30.2
100*	99.9	63.8	34.3

*100 mg/L 区のみブランク補正実施

連 数：2 連／0.391 及び 1.56 mg/L 区、1 連／6.25～100 mg/L 区

試験液調製法：培地と被験物質を混合後、1時間攪拌して調製した試験原液を用いて調製した。

測 定 法：蛍光測定法