

環境省殿

最 終 報 告 書

メチルヒドラジンの
藻類 (*Pseudokirchneriella subcapitata*) に対する生長阻害試験

(試験番号：A090261)

2010年 3月 4日

三菱化学メディエンス株式会社

陳 述 書

三菱化学メディエンス株式会社 メディケム事業本部

安科研事業部 横浜研究センター

試 験 委 託 者 : 環境省

表 題 : メチルヒドラジンの藻類 (*Pseudokirchneriella subcapitata*)
に対する生長阻害試験

試 験 番 号 : A090261

本試験は試験計画書および標準操作手順書に従って実施され、本報告書はその結果を正しく記載したものである。

また、本試験は下記のGLPに従って実施したものである。

「新規化学物質等に係る試験を実施する試験施設に関する基準について」

(平成15年11月21日 薬食発第1121003号, 平成15・11・17 製局第3号, 環境企発第031121004号, 最終改正: 平成20年7月4日)

2010年 3月 4日

試験責任者



信 頼 性 保 証 書

三菱化学メディエンス株式会社 メディケム事業本部

安科研事業部 横浜研究センター

試験委託者 : 環境省

表 題 : メチルヒドラジン
の藻類 (*Pseudokirchneriella subcapitata*) に対する生長阻害試験

試験番号 : A090261

本試験は下記のGLPに従って実施され、最終報告書が生データを反映していることを保証する。

「新規化学物質等に係る試験を実施する試験施設に関する基準について」
(平成15年11月21日 薬食発第 1121003号, 平成15・11・17製局第3号, 環保企発第 031121004号, 最終改正: 平成20年7月4日)


監査および査察の実施事項, 実施日および報告日を以下に示す。


実施事項	実施日	運営管理者および 試験責任者への報告日
試験計画書監査		
試験計画書草案	2010年 2月 5日	2010年 2月 5日
試験計画書	2010年 2月 15日	2010年 2月 15日
変更書(変更番号: 01)	2010年 2月 17日	2010年 2月 18日
試験の査察		
試験液の調製	2010年 2月 15日	2010年 2月 15日
藻類の添加	2010年 2月 15日	2010年 2月 15日
生物量の測定	2010年 2月 18日	2010年 2月 18日
最終報告書監査		
最終報告書草案	2010年 3月 3日	2010年 3月 3日
最終報告書	2010年 3月 4日	2010年 3月 4日


信頼性保証部門主担当者 : 2010年 3月 4日

試験実施概要

1. 表 題 : メチルヒドラジンの藻類 (*Pseudokirchneriella subcapitata*)
に対する生長阻害試験
(試験番号 : A 0 9 0 2 6 1)
2. 試 験 目 的 : 被験物質の藻類 (*Pseudokirchneriella subcapitata*) に対する
生長阻害試験 (72 時間) を行い, 半数生長阻害濃度 (EC50) お
よび最大無影響濃度 (NOEC) を求める。
3. 適用ガイドライン : 「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 15 年 11 月 21 日 薬食発第 1121002 号, 平成 15・11・13 製局
第 2 号, 環境企発第 031121002 号, 最終改正 : 平成 18 年 11 月
20 日)
4. 適 用 G L P : 「新規化学物質等に係る試験を実施する試験施設に関する基準
について」 (平成 15 年 11 月 21 日 薬食発第 1121003 号, 平成
15・11・17 製局第 3 号, 環境企発第 031121004 号, 最終改正 : 平
成 20 年 7 月 4 日)
5. 試 験 委 託 者 : 環境省
東京都千代田区霞が関一丁目 2 番 2 号
6. 試 験 受 託 者 : 三菱化学メディエンス株式会社
東京都港区芝浦四丁目 2 番 8 号
7. 試 験 施 設 : 三菱化学メディエンス株式会社 メディケム事業本部
安科研事業部 横浜研究センター
神奈川県横浜市青葉区鴨志田町 1000 番地

8. 試験責任者 : 
生態影響評価グループ

9. 試験担当者 : 
(試験実施)


(分析実施)

10. 試験日程 : 試験開始日 2010年 2月15日
 暴露開始日 2010年 2月15日
 暴露終了日 2010年 2月18日
 試験終了日 2010年 3月 4日

11. 保管 : 下記の試資料は、当施設の試資料保管施設に保管する。

- 1) 試験計画書
- 2) 最終報告書
- 3) 生データ
- 4) 対照物質
- 5) その他必要なもの

目 次

	頁
要 約.....	7
1 材料.....	9
1.1 被験物質.....	9
1.1.1 名称, 構造式および物理化学的性状.....	9
1.1.2 供試試料.....	10
1.1.3 保管法および安定性の確認.....	10
1.2 試験用水.....	10
1.3 供試生物.....	10
1.4 試験容器および藻類培養試験装置等.....	11
2 方法.....	12
2.1 試験方法.....	12
2.1.1 試験条件.....	12
2.1.2 予備試験結果.....	13
2.1.3 試験濃度の設定.....	14
2.1.4 試験液の調製.....	14
2.1.5 試験液および試験培養液の分析.....	14
2.1.6 試験操作.....	14
2.2 試験結果の評価.....	16
2.2.1 結果の算出.....	16
2.2.2 試験の有効性.....	18
3 結果および考察.....	19
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.....	19
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.....	19
3.3 試験液および試験培養液中の被験物質濃度.....	19
3.4 半数生長阻害濃度 (EC50) および最大無影響濃度 (NOEC).....	20
3.5 藻類の観察結果.....	20
3.6 試験の有効性.....	20
Table 1～8.....	21～25
Figure 1～2.....	26～27
付属資料－1 赤外吸収スペクトル.....	28～29
付属資料－2 培地の組成.....	30～31
付属資料－3 試験液の調製.....	32～33
付属資料－4 試験液および試験培養液の分析.....	34～43
付属資料－5 結果の算出.....	44～47

要 約

試験委託者 : 環境省

表 題 : メチルヒドラジンの藻類 (*Pseudokirchneriella subcapitata*) に対する生長
阻害試験

試験番号 : A090261

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15年11月21日
薬食発第1121002号, 平成15・11・13製局第2号, 環企発第031121002号,
最終改正:平成18年11月20日)に準拠して実施した。

- 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=10)
- 6) 試験温度 : 22 °C (暴露期間中の変動範囲は ± 2 °C以内)
- 7) 照明 : $65 \sim 75 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$, 白色蛍光灯で連続照明(液面付近)
- 8) 試験濃度(設定値) :

試験区	濃度 (mg/L)
対照区	—
濃度区1	0.050
濃度区2	0.11
濃度区3	0.22
濃度区4	0.47
濃度区5	1.0

公比 : 2.1

- 9) 分析法 : 高速液体クロマトグラフ質量分析 (LC/MS) 法

結 果：

阻害濃度の算出には暴露開始時の測定値を用いた。参考として、暴露期間中の全ての測定値の時間加重平均値を用いた結果も記載した。

1) 試験液および試験培養液中の被験物質濃度

濃度区 1～5 の暴露開始時の測定値は、それぞれ 0.0424, 0.0949, 0.185, 0.383, 0.763 mg/L であった。試験培養液中での被験物質濃度は経時的に減少し、暴露開始後 72 時間の測定値は、濃度区 1 および濃度区 2 では検出限界 (0.002 mg/L) 未満であり、濃度区 3～5 ではそれぞれ 0.00205, 0.0116, 0.0800 mg/L であった。ヒドラジンは、水中の溶存酸素などにより酸化されて分解されると考えられている。したがって、濃度減少の主な原因として、被験物質の試験液中での酸化が考えられた。

濃度区 1～5 の時間加重平均値はそれぞれ、0.0113*, 0.0251*, 0.0474, 0.110, 0.281 mg/L であった。

* 暴露開始後 72 時間のみ検出限界未満となった。72 時間の濃度は検出限界値を用いて算出した。

2) 生長速度の比較による阻害濃度

半数生長阻害濃度 ErC50(0-72h) : 0.279 mg/L (95%信頼区間 : 0.257～0.303 mg/L)

最大無影響濃度 NOECr(0-72h) : 0.0424 mg/L

参考：測定値の時間加重平均値から算出した阻害濃度

半数生長阻害濃度 ErC50(0-72h) : 0.0783 mg/L (95%信頼区間 : 0.0688～0.0891 mg/L)

最大無影響濃度 NOECr(0-72h) : 0.0113 mg/L

3) 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、全ての濃度区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

被 験 物 質 の 名 称	メチルヒドラジン ^{*1}		
別 名	(略称：MMH ^{*2})		
C A S 番 号	60-34-4 ^{*1}		
構 造 式 又 は 示 性 式	$\text{CH}_3\text{—NH—NH}_2$ ^{*3}		
分 子 量	46.07		
試 験 に 供 し た 物 質 の 純 度 (%)	99.8 (GC)		
試 験 に 供 し た 物 質 の ロ ッ ト 番 号	[REDACTED]		
不 純 物 の 名 称 及 び 含 有 率	—		
蒸 気 圧	6.6 kPa/ 25℃		
対 水 溶 解 度	混和		
1-オクタノール/水分配係数	-1.05		
融 点	-52℃		
沸 点	87℃		
常 温 に お け る 性 状	アンモニア臭を有する無色～微黄色透明液体		
安 定 性	強い還元剤であり、酸化剤と激しく反応し、火災や爆発の危険性がある。また、塩基であり、強酸と激しく反応する。空気中の湿度や水を吸収して白煙を生じる。		
溶 媒 に 対 す る 溶 解 度 等	溶媒	溶解度	溶媒中の安定性
	エーテル	可溶	—
	炭化水素系溶剤	可溶	—

上記内容は供給者提供資料による。ただし * の内容は以下の通り。

*1 試験委託者提供資料による。

*2 当施設にて決定。

*3 独立行政法人 製品評価技術基盤機構 既存化学物質安全性点検データ
(<http://www.safe.nite.go.jp>) による。

1.1.2 供試試料

供給者： XXXXXXXXXX

1.1.3 保管法および安定性の確認

被験物質は試験期間中、当施設の試験物質保管用冷蔵庫（保管条件：冷蔵，暗所，窒素充填）内に保管した。

実験終了後に、保管した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実験開始前に測定したスペクトルと一致したことから、被験物質は保管中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：Nicolet 製 AVATAR 320 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 μ m）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となることが記載されている。当施設でのpHは水質により 8.0 ± 0.2 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。
- 7) 感受性の確認： 定期的（約6ヶ月毎）に基準物質（重クロム酸カリウム，試薬特級）による生長阻害試験を行い，供試生物の感受性を調べている。
速度法により算出した最新の72時間半数生長阻害濃度を示す。

ErC50 : 0.826 mg/L (95%信頼区間 : 0.773 ~ 0.884 mg/L,

暴露期間 : 2009年12月15日 ~ 2009年12月18日)

以下に2000年6月以降のErC50平均値を示す。

ErC50平均値 \pm 標準偏差 = 0.821 \pm 0.0828 mg/L, n=20

(最小値 ~ 最大値 = 0.687 ~ 0.965 mg/L)

- 8) 前培養： 前培養期間；2010年2月12日～2010年2月15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： 300 mLガラス製三角フラスコ（IWAKI製）（通気性のシリコン栓付）
- 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-500型
- 5) pH計： 東亜電波工業製 HM-40V型
- 6) 温度計： Tasco Japan製 TNA-120型
- 7) 光量子計： Apogee製 QMSS型
Apogee製 QMSS-ELEC型
- 8) 電子天秤： メトラー製 AG204型
メトラー製 AE163型
メトラー製 AB204-S型
メトラー製 PB3002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 15 年 11 月 21 日 薬食発第 1121002 号，平成 15・11・13 製局第 2 号，環保企発第 031121002 号，最終改正：平成 18 年 11 月 20 日）に準拠して実施した。

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，藻類の接種も無菌条件下で行った。

2.1.1 試験条件

- 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／容器となる)
- 4) 連数： 6 容器／対照区，3 容器／濃度区
- 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=10)
- 6) 試験温度： 22℃（暴露期間中の変動範囲は±2℃以内）
- 7) 照明： 65～75 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ ，白色蛍光灯で連続照明（液面付近）
- 8) pH： 調整なし

2.1.2 予備試験結果

被験物質の試験用水に対する溶解度は >1000 mg/L（当施設測定値）であった。

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。結果を以下に示す。

予備試験結果（対照区 3 連、各濃度区 1 連）

No. 1

濃度 (mg/L)	阻害率 (%) I_{μ} (0-72h)*1	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
対照区	—	—	—	—
0.10	9.1	78	ND	5
1.0	89.7	81	8	8
10	93.4	96	35	—

No. 2

濃度 (mg/L)	阻害率 (%) I_{μ} (0-72h)*1	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	藻類添加無 密閉*2	藻類添加無 密閉・遮光*3
対照区	—	—	—	—	—	—
0.020	-1.1	96	ND	—	—	—
0.050	1.3	95	ND	ND	—	—
0.50	57.4	83	2	10	4	8

*1 「2.2.1 結果の算出, 2) 生長速度および生長阻害率の算出」に示した式により算出した。

*2 500 mL共栓付ガラス製三角フラスコを用いた。

*3 500 mL共栓付ガラス製三角フラスコをアルミ箱で覆い遮光した。

ND 検出されず

なお、暴露開始後 72 時間の分析において被験物質濃度の減少が認められた。ヒドラジンは、水中の溶存酸素などにより酸化されて分解されると考えられている。したがって、濃度減少の主な原因として、被験物質の試験液中での酸化が考えられた。

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	濃度 (mg/L)
対照区	—
濃度区 1	0.050
濃度区 2	0.11
濃度区 3	0.22
濃度区 4	0.47
濃度区 5	1.0

公比 : 2.1

2.1.4 試験液の調製

試験液の調製方法を付属資料－3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、暴露開始後 24, 48 時間および 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質量分析（LC/MS）法により分析した。分析方法の詳細を付属資料－4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。予備容器も同時に培養装置に設置した。暴露開始後24時間毎に再配置した。

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 9.5 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

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、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

対照区および各濃度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。
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か否かを確認した。

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

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

t_j : 暴露開始後 j 回目に生物量を測定した時間

各濃度区における生長阻害率 (I_μ) は対照区の生長速度の平均値と各濃度区での各々の生長速度と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

μ_t : 各濃度区における各々の生長速度

3) 阻害濃度算出に用いる被験物質濃度

被験物質は試験液中で経時的に酸化すると考えられ、暴露開始後72時間の試験培養液中で被験物質濃度が減少し、低濃度区側では検出限界未満になることが予想された。したがって、阻害濃度の算出に用いる被験物質濃度は、暴露開始（試験液調製）時の測定値とした。

なお、算出可能な場合は次の式より時間加重平均値を算出した。

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

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

$ConcA_n$: n期間の始めの測定値

(暴露開始時または暴露開始後 24, 48時間の測定値)

$ConcB_n$: n期間の終わりの測定値

(暴露開始後 24, 48時間または 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} (0-72h) を用いて、以下の方法により半数生長阻害濃度 (EC50) を決定した。なお、可能な場合は、参考として被験物質濃度の時間加重平均値を用いて算出した結果を記載した。

最高濃度区における阻害率	≥ 50%	< 50%
濃度－生長阻害率曲線の記載 (片対数紙にプロット)	記載	記載
EC50の決定方法	濃度－生長阻害率曲線において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）し、阻害率 50%との交点から算出 可能な限り 95%信頼区間を算出	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)

対照区と濃度区の生長速度 (μ_{0-72h}) 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試験最高濃度区の暴露開始 (試験液調製) 時の測定値を最大無影響濃度 (NOEC : NOECr (0-72h) と表記) とした。なお、可能な場合は、参考として被験物質濃度の時間加重平均値を用いた結果を記載した。

多群の比較 [対照区以外に2群以上]
Bartlett の等分散検定
等分散が認められる場合 一元配置分散分析 (ANOVA) パラメトリックの Dunnett, Williams または Scheffe の多重比較検定
等分散が認められない場合 Kruskal-Wallis の検定 ノンパラメトリックの Dunnett, Williams または Scheffe の多重比較検定
Yukms ソフトウェア Statlight 「#4 多群の比較」 (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

以下の条件が満たされる場合、試験を有効とみなした。

- 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、暴露開始時が全試験区で 7.8、暴露開始後 72 時間では 7.7～7.8 であった。

調製時の試験液の外観は、全ての試験区において、けん濁物質、浮遊物質、沈殿物は認められず、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、代表的なクロマトグラムを付属資料－4 に示す。

濃度区 1～5 の暴露開始時の測定値は、それぞれ 0.0424, 0.0949, 0.185, 0.383, 0.763 mg/L であった。試験培養液中での被験物質濃度は経時的に減少し、暴露開始後 72 時間の測定値は、濃度区 1 および濃度区 2 では検出限界（0.002 mg/L）未満であり、濃度区 3～5 ではそれぞれ 0.00205, 0.0116, 0.0800 mg/L であった。ヒドラジンは、水中の溶存酸素などにより酸化されて分解されると考えられている。したがって、濃度減少の主な原因として、被験物質の試験液中での酸化が考えられた。

濃度区 1～5 の時間加重平均値はそれぞれ、0.0113*, 0.0251*, 0.0474, 0.110, 0.281 mg/L であった。

* 暴露開始後 72 時間のみ検出限界未満となった。72 時間の濃度は検出限界値を用いて算出した。

3.4 半数生長阻害濃度 (EC50) および最大無影響濃度 (NOEC)

暴露期間中の全試験区の生物量を 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、濃度－阻害率曲線を Figure 2 に示す。得られた ErC50 および NOECr を以下に示す。

ErC50 (0-72h) : 0.279 mg/L (95%信頼区間 : 0.257~0.303 mg/L)

NOECr (0-72h) : 0.0424 mg/L

参考：測定値の時間加重平均値から算出した阻害濃度

ErC50 (0-72h) : 0.0783 mg/L (95%信頼区間 : 0.0688~0.0891 mg/L)

NOECr (0-72h) : 0.0113 mg/L

NOEC は、Bartlett の等分散検定 ($\alpha=0.01$) を行い等分散性を確認後、一元配置分散分析 (1-way ANOVA, $\alpha=0.05$) および Williams の多重比較検定 ($\alpha=0.05$, 両側) を用い決定した。詳細を付属試料—5 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、濃度区 3 以下の試験区で時間経過とともに緑色度が増加する傾向がみられた。濃度区 4 以上では緑色化することはなかった。

暴露開始後 72 時間の顕微鏡下での細胞形態観察の結果、全ての濃度区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すべて満たしたため、試験は有効であるとみなした。

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	21.5	65-72	100
24	22.1	65-74	100
48	21.6	65-72	100
72	21.7	65-72	100

Table 2 pH Values of Test Cultures

Test Group	pH		
	0 Hour	72 Hours	(Vessel No.)
Control	7.8	7.8	(1)
Conc.1	7.8	7.8	(1)
Conc.2	7.8	7.8	(1)
Conc.3	7.8	7.8	(1)
Conc.4	7.8	7.8	(1)
Conc.5	7.8	7.7	(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-
Conc.2	S-	F-	P-	C-
Conc.3	S-	F-	P-	C-
Conc.4	S-	F-	P-	C-
Conc.5	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 Cultures

Test Group	Nominal Concentration (mg/L)	Measured Concentration (mg/L) (Percent of Nominal)				Mean ^a Measured Concentration (mg/L) (Percent of Nominal)
		0 Hour	24 Hours	48 Hours	72 Hours	
Control	--	<0.002	<0.002	<0.002	<0.002	----
Conc.1	0.050	0.0424 (85)	0.0124 (25)	0.00330 (7)	<0.002 --	0.0113* (23)
Conc.2	0.11	0.0949 (86)	0.0268 (24)	0.00948 (9)	<0.002 --	0.0251* (23)
Conc.3	0.22	0.185 (84)	0.0505 (23)	0.0177 (8)	0.00205 (0.9)	0.0474 (22)
Conc.4	0.47	0.383 (81)	0.115 (24)	0.0533 (11)	0.0116 (2)	0.110 (23)
Conc.5	1.0	0.763 (76)	0.306 (31)	0.163 (16)	0.0800 (8)	0.281 (28)

a : Time weighted mean

* : The value of the detection limit (0.002 mg/L) was used as value at 72 hours for calculation of the concentration of time weighted mean.

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

Test Group	Nominal Concentration [Measured Conc. at 0 Hour (mg/L)]	Vessel No.	Biomass (cells/mL)			
			0 Hour*	24 Hours	48 Hours	72 Hours
Control	--	1	5000	29000	215000	1770000
		2	5000	30200	243000	1780000
		3	5000	28700	228000	1810000
		4	5000	31200	221000	1720000
		5	5000	30800	227000	1690000
		6	5000	29900	260000	1880000
		Average	5000	30000	232000	1780000
		SD	0	981	16500	67200
Conc.1	0.050 [0.0424]	1	5000	26600	197000	1700000
		2	5000	27800	209000	1840000
		3	5000	25900	179000	1550000
		Average	5000	26800	195000	1700000
		SD	0	961	15100	145000
Conc.2	0.11 [0.0949]	1	5000	21900	93500	665000
		2	5000	22100	167000	1160000
		3	5000	24400	105000	618000
		Average	5000	22800	122000	814000
		SD	0	1390	39500	300000
Conc.3	0.22 [0.185]	1	5000	17800	54200	225000
		2	5000	16700	54700	276000
		3	5000	15800	47500	144000
		Average	5000	16800	52100	215000
		SD	0	1000	4020	66600
Conc.4	0.47 [0.383]	1	5000	12200	23000	70300
		2	5000	12300	23600	58400
		3	5000	12900	22000	43000
		Average	5000	12500	22900	57200
		SD	0	379	808	13700
Conc.5	1.0 [0.763]	1	5000	11100	11600	12100
		2	5000	11800	11800	13800
		3	5000	10700	11300	10700
		Average	5000	11200	11600	12200
		SD	0	557	252	1550

SD : Standard deviation

* : Nominal initial biomass

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

Test Group	Nominal Concentration [Measured Conc. at 0hr] (mg/L)	Vessel No.	Growth Rate	
			Rate $\mu(0-72h)$	Inhibition(%) ^{*1} $I_{\mu}(0-72h)$
Control	--	1	0.0815	-
		2	0.0816	-
		3	0.0818	-
		4	0.0811	-
		5	0.0809	-
		6	0.0824	-
		Average SD	0.0816 0.0005	-
Conc.1	0.050 [0.0424]	1	0.0810	0.7
		2	0.0821	-0.6
		3	0.0797	2.3
		Average SD	0.0809 0.0012	0.8
Conc.2	0.11 [0.0949]	1	0.0679	16.8
		2	0.0756	7.4
		3	0.0669	18.0
		Average SD	0.0701** 0.0048	14.1
Conc.3	0.22 [0.185]	1	0.0529	35.2
		2	0.0557	31.7
		3	0.0467	42.8
		Average SD	0.0518** 0.0046	36.6
Conc.4	0.47 [0.383]	1	0.0367	55.0
		2	0.0341	58.2
		3	0.0299	63.4
		Average SD	0.0336** 0.0034	58.9
Conc.5	1.0 [0.763]	1	0.0123	84.9
		2	0.0141	82.7
		3	0.0106	87.0
		Average SD	0.0123** 0.0018	84.9

*1 : Values are the growth inhibition (%) relative to the control.

SD : Standard deviation

** : Indicates a significant difference ($\alpha=0.01$) from the control.

Table 7 EC50 and NOEC

Based on I_{μ} (0-72h) values (Growth rates)

ErC50 (0-72h) (mg/L)	95-Percent Confidence Limits (mg/L)	NOECr (0-72h) (mg/L)
0.279 ^{*1}	0.257—0.303	0.0424
[0.0783 ^{*2}]	[0.0688—0.0891]	[0.0113]

*1 : Using the data of conc.2, conc.3, conc.4 and conc.5

[] : Calculated from time weighted mean of measured concentration

*2 : Using the data of conc.3, conc.4 and conc.5

The ErC50 value and associated 95% confidence limits were determined by least squares linear regression analysis of the logarithm of test concentration against the growth inhibition (%) relative to the control.

The NOECr value was determined by an analysis of variance (ANOVA), Williams test, subsequent to Bartlett test for homogeneity of variances. Statistical analyses were performed using Yukms Statlight #4 software (Yukms Corp., Tokyo) and all tests of significance level were set at $\alpha=0.05$, except Bartlett test, which was set at $\alpha=0.01$.

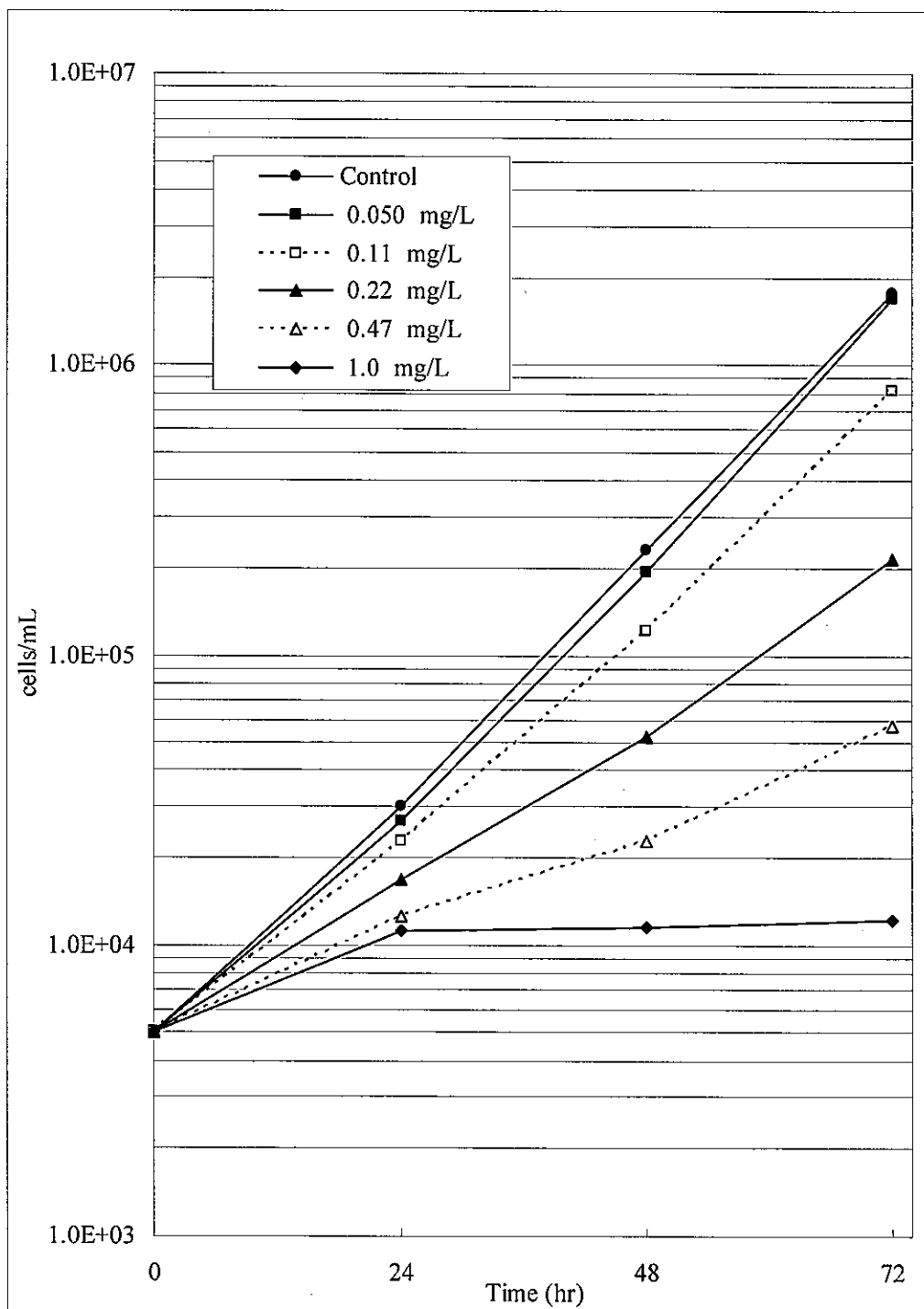
Table 8 Growth Rates of Control

Vessel No.	Growth Rate				Average of $\mu(0-24h, 24-48h,$ 48-72h)	SD	CV(%)
	$\mu(0-72h)$	$\mu(0-24h)$	$\mu(24-48h)$	$\mu(48-72h)$			
1	0.0815	0.0732	0.0835	0.0878	0.0815	0.0075	9.2
2	0.0816	0.0749	0.0869	0.0830	0.0816	0.0061	7.5
3	0.0818	0.0728	0.0864	0.0863	0.0818	0.0078	9.5
4	0.0811	0.0763	0.0816	0.0855	0.0811	0.0046	5.7
5	0.0809	0.0758	0.0832	0.0836	0.0809	0.0044	5.4
6	0.0824	0.0745	0.0901	0.0824	0.0823	0.0078	9.5
Average	0.0816	0.0746	0.0853	0.0848			7.8
SD	0.0005	0.0014	0.0031	0.0021			
CV(%)	0.6	1.9	3.6	2.5			

SD : Standard deviation

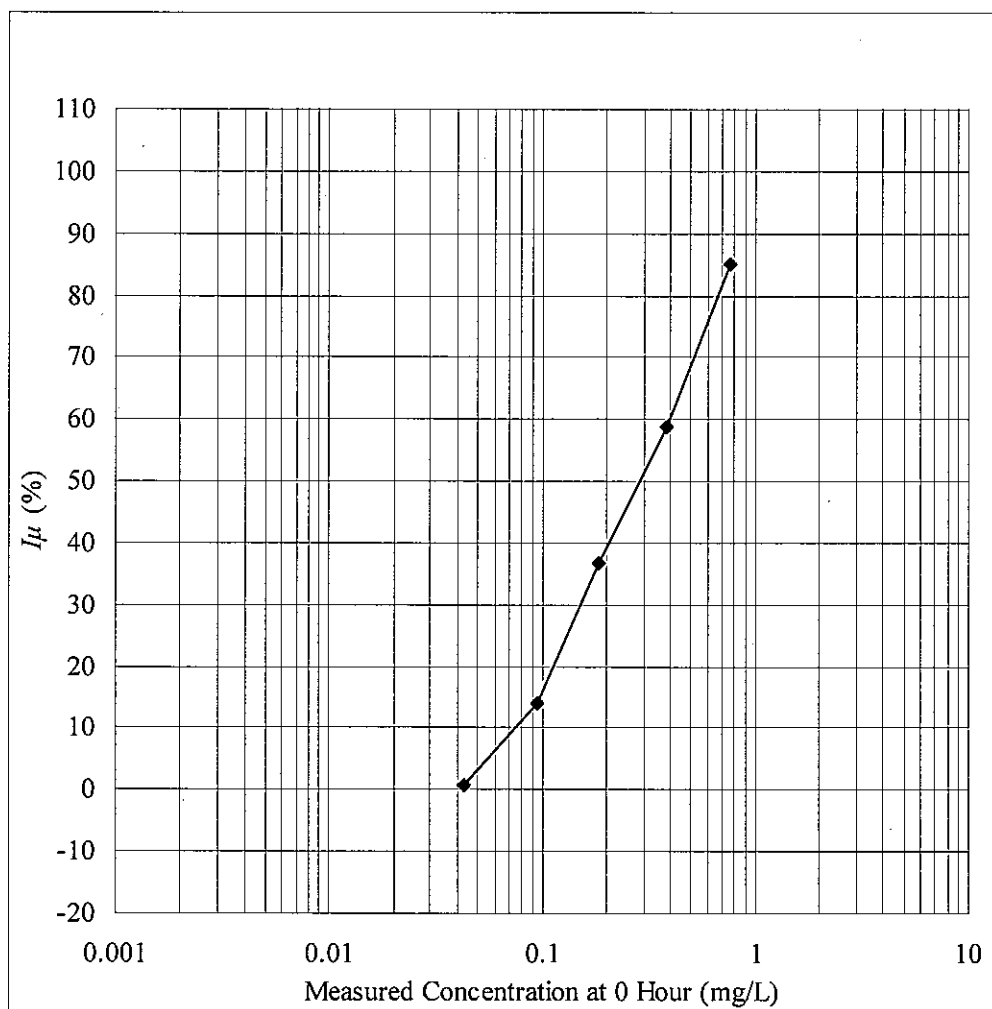
CV : Coefficient of variation

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



Values in legend are given in the nominal concentration.

Figure 2 Concentration-Inhibition Curve Based on I_μ Values Calculated from the Growth Rates



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 Start of Exposure

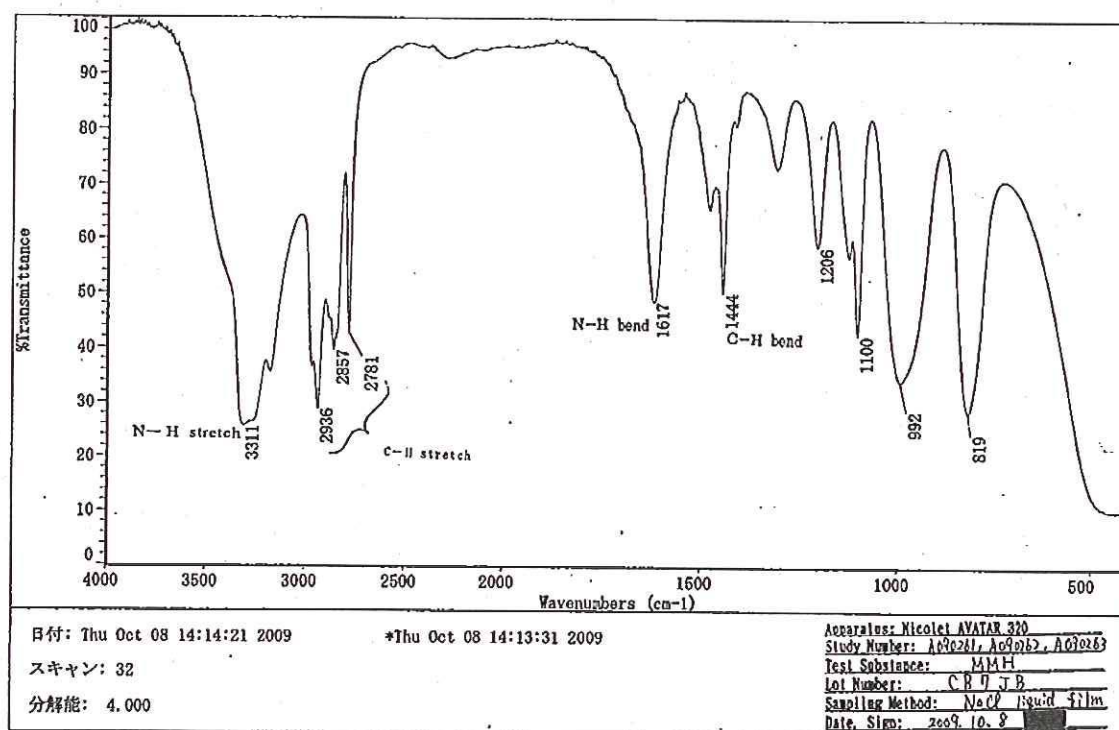
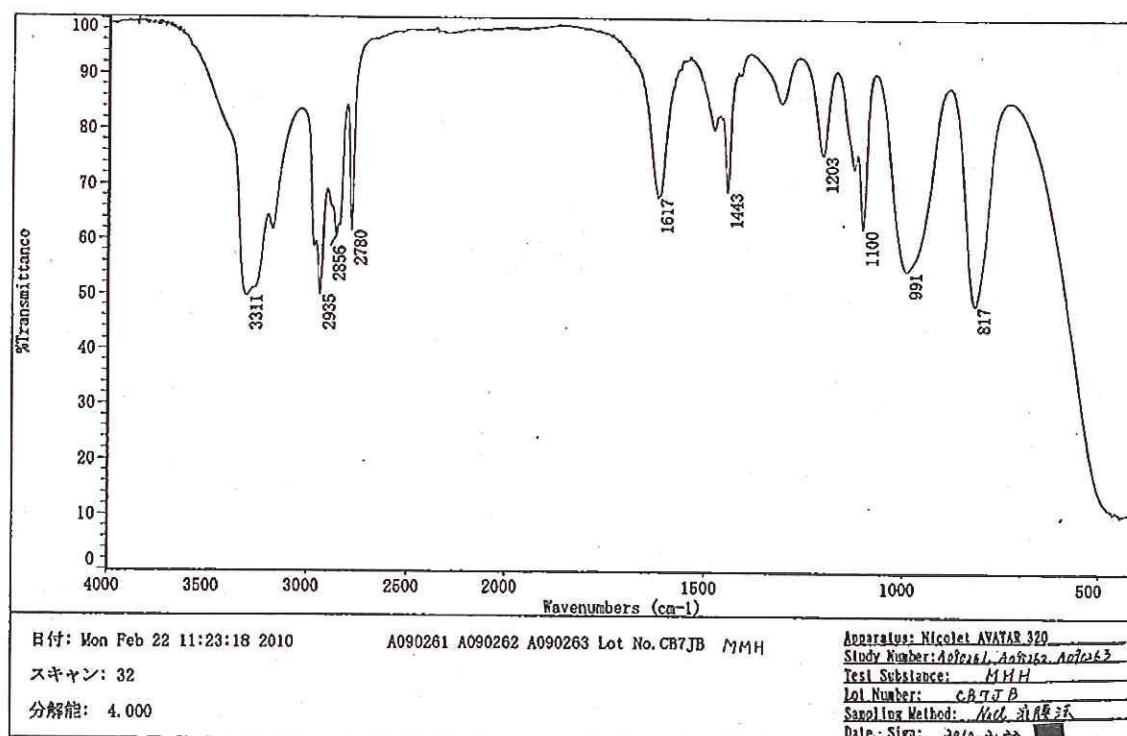


Figure A-1-2 Infrared Absorption Spectrum of the Test Substance after the End of Exposure



付属資料－ 2

培地の組成

Table A-2 Medium

<u>Nutrient salts</u>	<u>Concentration (mg/L)</u>
NH_4Cl	15.0
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	12.0
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	18.0
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	15.0
KH_2PO_4	1.6
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.064
$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.1
H_3BO_3	0.185
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.415
ZnCl_2	0.003
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.0015
$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.00001
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	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 CO_2 in atmospheric air is 8.1.

付属資料－ 3

試験液の調製

試験液の調製

準備

被験物質原液Ⅰの調製

比 重	---->	0.87	
採 取 量	---->	100	mg
		115	μL をマイクロピペットで採取
試験用水	---->	培地 (22℃)	
最終容量	---->	1000	mL
容 器	---->	メスフラスコ	
濃 度	---->	100	mg/L
混合方式	---->	転倒混和	

被験物質原液Ⅱの調製

採 取 量	---->	10	mL
試験用水	---->	培地 (22℃)	
最終容量	---->	1000	mL
容 器	---->	メスフラスコ	
濃 度	---->	1.0	mg/L
混合方式	---->	転倒混和	

試験液の調製

原液Ⅱを下記の表の通り採取し、試験用水で希釈して試験液とする。対照区は試験用水のみとする。

最終容量	---->	0.10	L
容 器	---->	300mLガラス製三角フラスコ(IWAKI製), 通気性シリコン栓	
混合方式	---->	手で振とう攪拌	
濃度公比	---->	2.11	
連 数	---->	6容器/対照区, 3容器/濃度区, 1予備容器/試験区	

設定試験濃度 mg/L	区No. (略称)	原液Ⅱ mL
対照区	C	0
0.050	Conc.1	5.00
0.11	Conc.2	11.0
0.22	Conc.3	22.0
0.47	Conc.4	47.0
1.0	Conc.5	100

付属資料－４

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質量分析 (LC/MS) 計 測定条件

装置

高速・高分離液体クロマトグラフ質量分析計 SL-HT システム No.1

ワークステーション: Agilent 1200 シリーズ*オペレーション (Windows XP)

高速・高分離液体クロマトグラフ (RRLC): Agilent Technologies 1200 型

デガッサ: G 1 3 7 9 B 型

送液ポンプ: G 1 3 1 2 B 型 (ハイリポンプ)

オートサンプラ: G 1 3 6 7 C 型

カラムオープン: G 1 3 1 6 B 型

質量選択検出器 (MSD): G 6 1 4 0 A 型

[HPLC 条件]カラム: SHISEIDO製 PC HILIC 5.0 μ m 2.0 mm i.d. \times 150 mm

カラムオープン: 40°C

溶離液: A液 20 mM γ -酸アンモニウム水*溶液: γ -酸 (1000:1, v/v)

B液 アセトリル

A液 25%, B液 75%

ストップタイム: 5 min

試料注入量: 20 μ L

流速: 0.4 mL/min

[MSD 条件]

Ionization: Electrospray

Fragmentor: 50 V

Nebulizer: N₂ (30 psig)Drying gas: N₂ (10 L/min, 300°C)

Mode: Positive

SIM (Selected Ion Monitoring) 条件:

Quant ion m/z 88.10 [M+H+CH₃CN]⁺

* 精製水: JIS K0557 A4 グレードの水

2. 検量線の作成と試験液および試験培養液中の被験物質濃度の定量

- 1) 被験物質を精製水で溶解，希釈し，0，0.0100～1.00 mg/L の標準溶液を調製した。
- 2) 標準溶液を以下のように分析した。

標準溶液 0.75 mL 採取

| ←アセトニトリル 0.75 mL 添加

混合

|

LC/MS測定

- 3) 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-4-1)。最小二乗法により直線回帰式 $Y=a+bX$ を求めた。相関関数 r は 0.999 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。そこで，試験液および試験培養液中の被験物質濃度の定量は，各分析時に測定した標準溶液 (用時調製) のピーク面積との比較で行った。
- 4) 検量線の最低濃度に対し 1/5 の視覚的に分析可能と思われる被験物質濃度 0.002 mg/L を検出限界とした。

3. 試験液および試験培養液の分析方法

試験液および試験培養液を以下のように分析した。代表的なクロマトグラムをFigure A-4-2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
0.75 mL 採取

| ←アセトニトリル 0.75 mL 添加

混合

|

LC/MS測定

暴露開始後 24, 48および 72時間

試験培養液：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・CR21E型)

|

上澄み液 0.75 mL 採取

|

←アセトニトリル 0.75 mL 添加

混合

|

LC/MS測定

Figure A-4-1 Calibration curve

No.	Concentration X (mg/L)	Peak Area Y (count)
1	0	0
2	0.0100	10226
3	0.0200	20948
4	0.0500	52451
5	0.100	106501
6	0.200	210195
7	0.500	500931
8	1.00	906233

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

$$a = 1.097E+04$$

$$b = 9.147E+05$$

$$r = 0.999$$

$$-8.593E+03 < a < 3.054E+04$$

(95-Percent Confidence Limits)

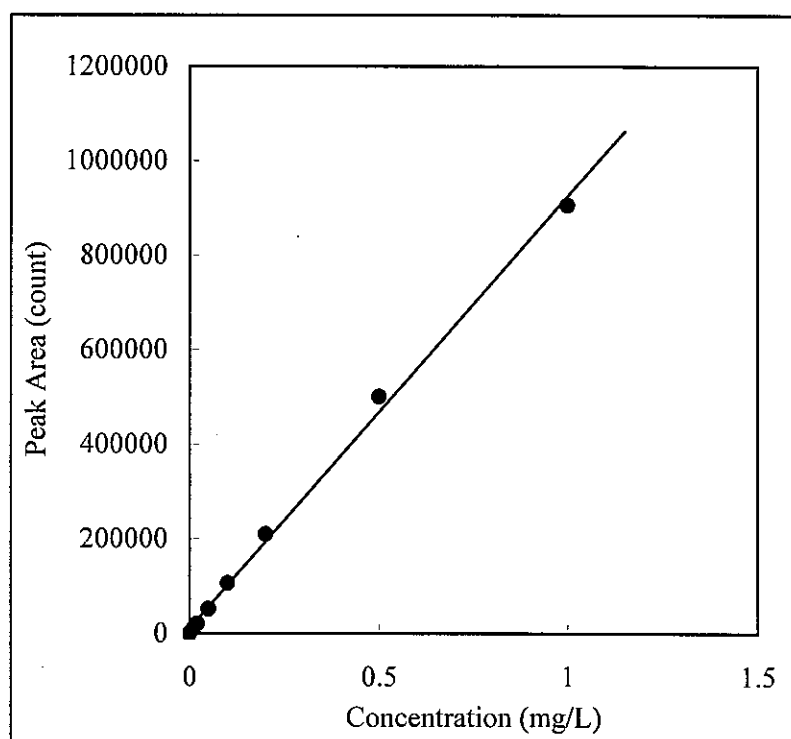
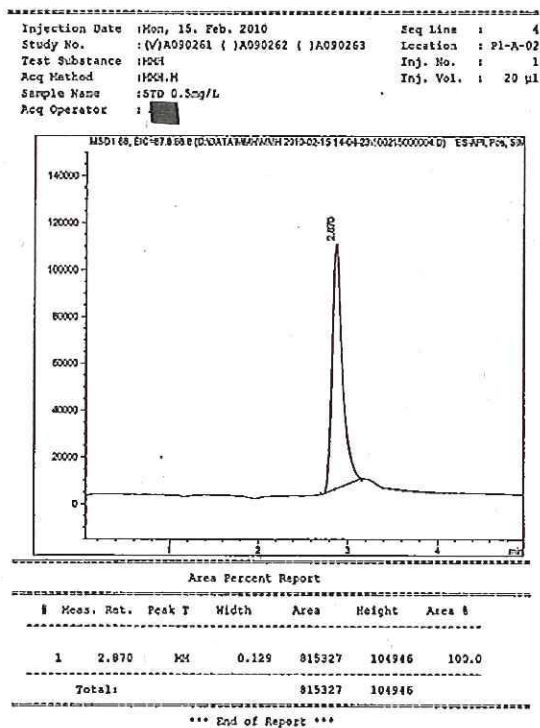


Figure A-4-2 Representative chromatograms

(1) Standard 0.500 mg/L ; 0 Hour



(2) Control ; 0 Hour

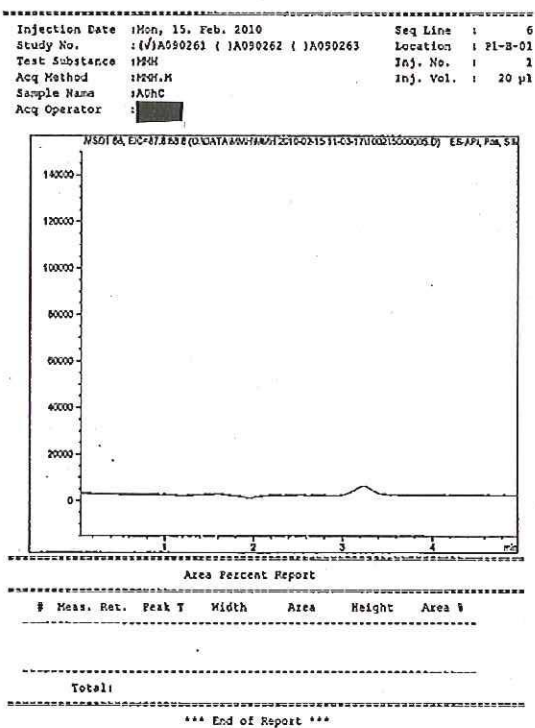
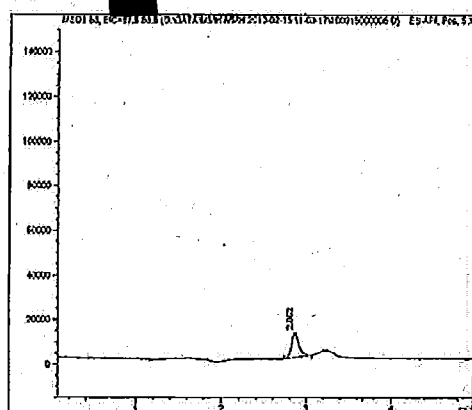


Figure A-4-2 Continued

(3) Conc.1 ; 0 Hour

Injection Date : Mon, 15. Feb. 2010 Seq Line : 7
 Study No. : (A090261) (A090262) (A090263) Location : P1-B-02
 Test Substance : (M2) Inj. No. : 1
 Acq Method : (M2) Inj. Vol. : 20 µl
 Sample Name : (A090261)
 Acq Operator :

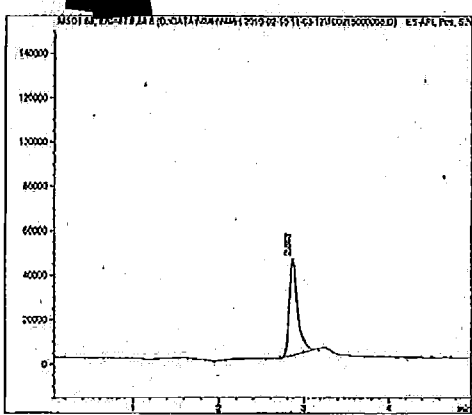


Area Percent Report						
#	Peak	Ret.	Peak T	Width	Area	Height
1	2.853	min	0.103	69103	10995	100.0
Total:				69103	10995	

*** End of Report ***

(4) Conc.3 ; 0 Hour

Injection Date : Mon, 15. Feb. 2010 Seq Line : 9
 Study No. : (A090261) (A090262) (A090263) Location : P1-B-04
 Test Substance : (M2) Inj. No. : 3
 Acq Method : (M2) Inj. Vol. : 20 µl
 Sample Name : (A090261)
 Acq Operator :



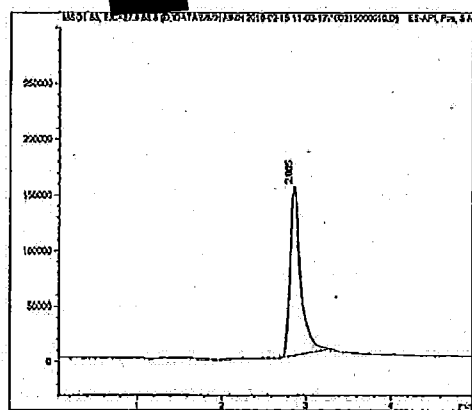
Area Percent Report						
#	Peak	Ret.	Peak T	Width	Area	Height
1	2.863	min	0.116	302405	43562	100.0
Total:				302405	43562	

*** End of Report ***

Figure A-4-2 Continued

(5) Conc.5 ; 0 Hour

Injection Date : Mon, 15. Feb, 2010 Seq Line : 11
 Study No. : (J)A090261 (JA090262 (JA090263 Location : PL-B-06
 Test Substance : IHDN Inj. No. : 1
 Acq Method : IHDN.M Inj. Vol. : 20 µl
 Sample Name : IHDN
 Acq Operator : [REDACTED]



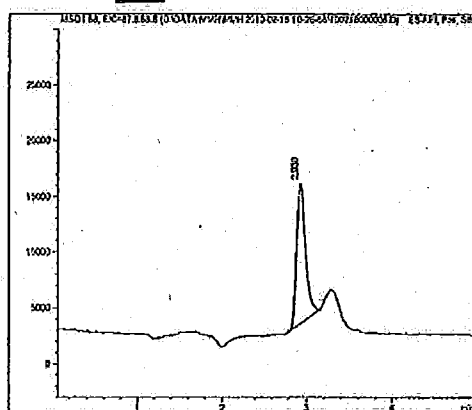
Area Percent Report

#	Mass. Pct.	Peak T	Width	Area	Height	Area %
1	2.885	100	0.136	1244737	152778	100.0
Total:				1244737	152778	

*** End of Report ***

(6) Standard 0.0500 mg/L ; 72 Hours

Injection Date : Thu, 18. Feb, 2010 Seq Line : 8
 Study No. : (J)A090261 (JA090262 (JA090263 Location : PL-A-02
 Test Substance : IHDN Inj. No. : 1
 Acq Method : IHDN.M Inj. Vol. : 20 µl
 Sample Name : STD 0.05 mg/L
 Acq Operator : [REDACTED]



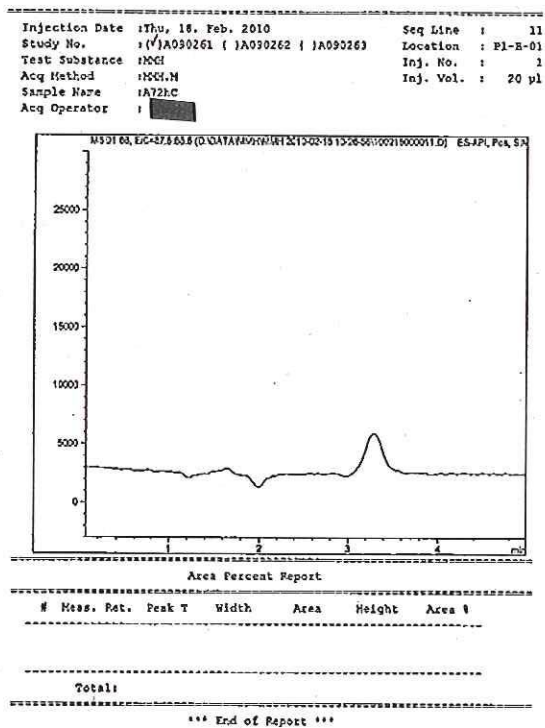
Area Percent Report

#	Mass. Pct.	Peak T	Width	Area	Height	Area %
1	2.930	100	0.315	87895	12701	100.0
Total:				87895	12701	

*** End of Report ***

Figure A-4-2 Continued

(7) Control ; 72 Hours



(8) Conc.1 ; 72 Hours

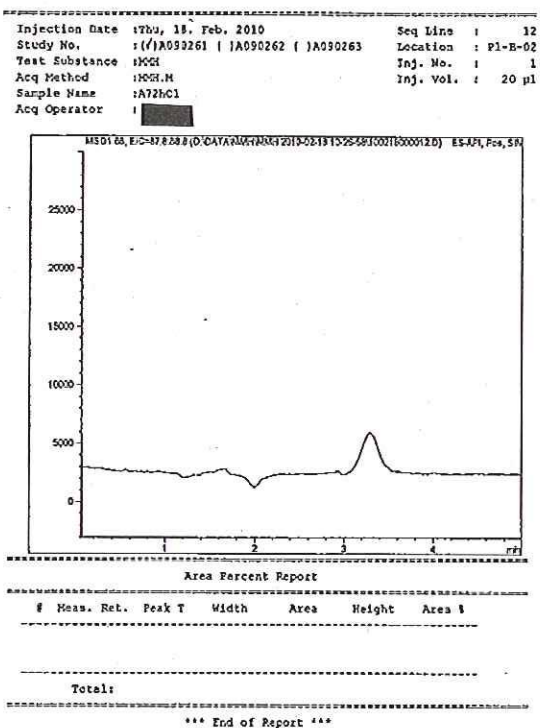
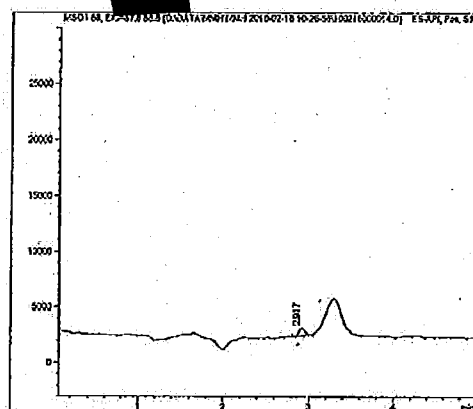


Figure A-4-2 Continued

(9) Conc.3 ; 72 Hours

Injection Date : Thu, 18. Feb. 2010 Seq Line : 16
 Study No. : (V)A090261 (JA090262) (JA090263) Location : FI-N-04
 Test Substance : H2O Inj. No. : 1
 Acq Method : H2O.M Inj. Vol. : 20 µl
 Sample Name : A72hc3
 Acq Operator :

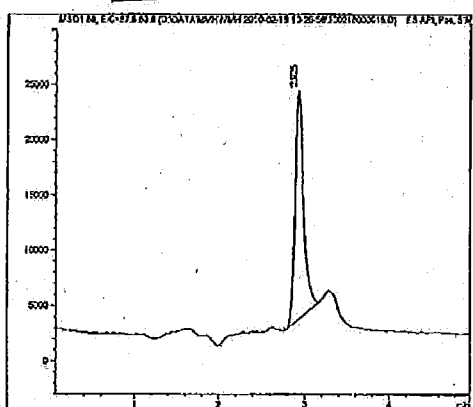


Area Percent Report						
#	Meas.	Ret.	Peak T	Width	Area	Height
1	2.917	104	0.032	3598	732	100.0
Totals				3598	732	

*** End of Report ***

(10) Conc.5 ; 72 Hours

Injection Date : Thu, 18. Feb. 2010 Seq Line : 16
 Study No. : (V)A090261 (JA090262) (JA090263) Location : FI-N-06
 Test Substance : H2O Inj. No. : 1
 Acq Method : H2O.M Inj. Vol. : 20 µl
 Sample Name : A72hc5
 Acq Operator :



Area Percent Report						
#	Meas.	Ret.	Peak T	Width	Area	Height
1	2.925	104	0.112	140600	20839	100.0
Totals				140600	20839	

*** End of Report ***

付属資料－ 5

結果の算出

Table A-5-1 Calculation of the ErC50 (0-72h)

(1) Calculated from measured concentration at 0 hour

直線回帰分析 (E C 50値の算出)

濃度 (mg/L)	阻害率 (%)	
x	log(x)	y
0.0949	-2.35	16.8
0.0949	-2.35	7.4
0.0949	-2.35	18.0
0.185	-1.69	35.2
0.185	-1.69	31.7
0.185	-1.69	42.8
0.383	-0.96	55.0
0.383	-0.96	58.2
0.383	-0.96	63.4
0.763	-0.27	84.9
0.763	-0.27	82.7
0.763	-0.27	87.0

EC ₅₀	95%信頼区間		単位
0.279	0.257	~ 0.303	(mg/L)

分散分析

Factor	SS	DF	V	F-ratio	f(0.05,f1,f2)
Between	8260.94	1	8260.94	434.48	>4.96
Within	190.13	10	19.01		
Total	8451.07	11			

Table A-5-1 Continued

(2) Calculated from time weighted mean of measured concentration

直線回帰分析 (E C 50値の算出)

濃度 (mg/L)	阻害率 (%)	
x	log(x)	y
0.0474	-3.05	35.2
0.0474	-3.05	31.7
0.0474	-3.05	42.8
0.110	-2.21	55.0
0.110	-2.21	58.2
0.110	-2.21	63.4
0.281	-1.27	84.9
0.281	-1.27	82.7
0.281	-1.27	87.0

EC ₅₀	95%信頼区間		単位
0.0783	0.0688	~ 0.0891	(mg/L)

分散分析

Factor	SS	DF	V	F-ratio	f(0.05,f1,f2)
Between	3505.58	1	3505.58	222.68	>5.59
Within	110.20	7	15.74		
Total	3615.78	8			

Table A-5-2 Calculation of the NOECr

Input Data Table

Control Group1	Conc.1 Group2	Conc.2 Group3	Conc.3 Group4	Conc.4 Group5	Conc.5 Group6
0.0815	0.0810	0.0679	0.0529	0.0367	0.0123
0.0816	0.0821	0.0756	0.0557	0.0341	0.0141
0.0818	0.0797	0.0669	0.0467	0.0299	0.0106
0.0811	*	*	*	*	*
0.0809	*	*	*	*	*
0.0824	*	*	*	*	*

Group	Samples	Mean	S.E.	S.D.	Variance		
1	6	0.0816	0.0002	0.0005	0.0000		
2	3	0.0809	0.0007	0.0012	0.0000		
3	3	0.0701	0.0027	0.0048	0.0000		
4	3	0.0518	0.0027	0.0046	0.0000		
5	3	0.0336	0.0020	0.0034	0.0000		
6	3	0.0123	0.0010	0.0018	0.0000		
Method	vs	Side	Stat.	0.05	0.01	0.001	Prob.
Bartlett test		0	14.8545	11.0705	<15.0863	20.5150	0.0110
Method	vs	Side	Stat.	0.05	0.01	0.0010	Prob.
1-way ANOVA		0	332.6183	>2.9013	4.5556	7.5674	0.0000
Method	vs	Side	Stat.	0.05	0.01	0.001	Prob.
Williams(1971,1972,1977)	1 vs 2	2	0.3061	2.1310	2.9470	999.9900	999.9900
Williams(1971,1972,1977)	1 vs 3	2	5.6677	>2.2050	>3.0030	999.9900	999.9900 **
Williams(1971,1972,1977)	1 vs 4	2	14.7856	>2.2290	>3.0190	999.9900	999.9900 **
Williams(1971,1972,1977)	1 vs 5	2	23.8207	>2.2410	>3.0270	999.9900	999.9900 **
Williams(1971,1972,1977)	1 vs 6	2	34.3618	>2.2470	>3.0310	999.9900	999.9900 **