

環境省殿

本写しは原本と相違ありません

(株)三菱化学安全科学研究所
横浜研究所 運営管理者

最 終 報 告 書

四塩化炭素の藻類 (*Selenastrum capricornutum*)

に対する生長阻害試験

(試験番号：A020366-1)

2003年 9月30日

株式会社三菱化学安全科学研究所

陳 述 書

株式会社三菱化学安全科学研究所

横浜研究所

試 験 委 託 者 : 環境省

表 題 : 四塩化炭素の藻類 (*Selenastrum capricornutum*) に対する生
長阻害試験

試 験 番 号 : A 0 2 0 3 6 6 - 1

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 G L P に従って実施したものである。

日本国環境省総合環境政策局環境保健部環境安全課環境リスク評価室長通知「生
態影響試験実施に関する基準の改正について」(別添)「生態影響試験実施に関
する基準」(環保安第 242 号, 2001 年)

2 0 0 3 年 9 月 3 0 日

試験責任者

■■■■■■■■■■

■■■■■■■■

信 頼 性 保 証 書

株式会社三菱化学安全科学研究所

横浜研究所

試 験 委 託 者 : 環境省

表 題 : 四塩化炭素の藻類 (*Selenastrum capricornutum*) に対する生長阻害試験

試 験 番 号 : A 0 2 0 3 6 6 - 1

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、本報告書には試験に使用した方法、手順が正確に記載されており、試験結果は生データを正確に反映していることを、下記の査察および監査実施により確認した。

記

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		2 0 0 3 年 6 月 1 6 日	2 0 0 3 年 6 月 1 6 日
試験の査察	試験液の調製	2 0 0 3 年 7 月 2 9 日	2 0 0 3 年 7 月 2 9 日
	藻類の投入	2 0 0 3 年 7 月 2 9 日	2 0 0 3 年 7 月 2 9 日
	藻類の観察	2 0 0 3 年 8 月 1 日	2 0 0 3 年 8 月 1 日
最終報告書監査		2 0 0 3 年 9 月 3 0 日	2 0 0 3 年 9 月 3 0 日

2 0 0 3 年 9 月 3 0 日

信頼性保証部門担当者



試験実施概要

1. 表 題 : 四塩化炭素の藻類 (*Selenastrum capricornutum*) に対する生長阻害試験
(試験番号: A020366-1)
2. 試験目的 : 被験物質の藻類 (*Selenastrum capricornutum*) に対する生長阻害試験を 72 時間行い, 50%生長阻害濃度 (EC50) および最大無作用濃度 (NOEC) を求める。
3. 適用ガイドライン : OECD 化学品テストガイドライン No. 201「藻類生長阻害試験」(1984 年)
4. 適用 GLP : 日本国環境省総合環境政策局環境保健部環境安全課環境リスク評価室長通知「生態影響試験実施に関する基準の改正について」(別添)「生態影響試験実施に関する基準」
(環保安第 242 号, 2001 年)
5. 試験委託者 : 環境省
〒100-8975 東京都千代田区霞が関一丁目 2-2
委託責任者 総合環境政策局環境保健部環境安全課
環境リスク評価室 室長補佐 XXXXXXXXXX
6. 試験受託者 : 株式会社三菱化学安全科学研究所
〒105-0014 東京都港区芝二丁目 1 番 30 号
7. 試験施設 : 株式会社三菱化学安全科学研究所 横浜研究所
〒227-0033 神奈川県横浜市青葉区鴨志田町 1000 番地

8. 試験責任者： [redacted]

生態科学研究部

(2003年 9月 1日付, グループ再編により名称変更)

9. 試験担当者： [redacted]

[redacted] 2003年 9月30日

(試験実施)

[redacted]

[redacted] 2003年 9月30日

(試験実施, 報告書作成)

[redacted]

[redacted] 2003年 9月30日

(分析実施)

10. 試験日程： 試験開始日 2003年 6月16日
実験開始日 2003年 7月29日
実験終了日 2003年 8月 1日
試験終了日 2003年 9月30日

11. 保管： 試験計画書, 生データ, 被験物質, 記録文書および最終報告書は, 横浜研究所の保管施設に保管する。
保管期間は, 最終報告書作成後10年間とし, 以後の保管は試験委託者と協議の上, 決定する。
ただし, 被験物質については, 最終報告書作成後10年間または品質低下をおこさないで安定に保存しうる期間のいずれか短い方の期間とする。

目 次

	頁
要 旨	7
1 被験物質	9
1.1 名称, 構造式および物理化学的性状	9
1.2 供試試料	9
1.3 被験物質の確認および保管条件下での安定性	10
2 供試生物	11
3 試験方法	11
3.1 試験条件	11
3.2 培地	11
3.3 試験容器および藻類培養試験装置等	12
3.4 試験濃度の設定	12
3.5 試験液の調製	13
3.6 試験液および試験培養液の分析	13
3.7 試験操作	14
4 結果の算出	15
4.1 生長曲線	15
4.2 生長阻害率の算出	15
4.3 EC50およびNOECの算出に用いる被験物質濃度の決定	16
4.4 50%生長阻害濃度 (EC50) の算出	16
4.5 最大無作用濃度 (NOEC)	17
5 結果および考察	18
5.1 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	18
5.2 試験液および試験培養液中の被験物質濃度	18
5.3 生長曲線	18
5.4 50%生長阻害濃度 (EC50) および最大無作用濃度 (NOEC)	19
5.5 温度およびpH	19
5.6 試験計画書からの逸脱事項	19
Table 1~6	20~24
Figure 1~3	25~27
付属資料-1 OEC D培地の組成	28~29
付属資料-2 試験液および試験培養液の分析	30~39
付属資料-3 結果の算出	40~46

要 旨

試 験 委 託 者 : 環境省

表 題 : 四塩化炭素の藻類 (*Selenastrum capricornutum*) に対する生長阻害試験

試 験 番 号 : A 0 2 0 3 6 6 - 1

試 験 方 法 :

- 1) 適用ガイドライン: OECD 化学品テストガイドライン No. 201「藻類生長阻害試験」
(1984年)
- 2) 暴露方式: 止水式(密閉系), 連続振とう培養(100rpm)
- 3) 供試生物: *Selenastrum capricornutum* (株名: ATCC22662)
(現在 *Pseudokirchneriella subcapitata*と学名が変更されている。)
- 4) 暴露期間: 72時間
- 5) 試験濃度: 対照区, 0.650, 1.18, 2.21, 3.90, 7.15, 13.0 mg/L
(設定値) 公比: 1.8
- 6) 試験液量: 100 mL (OECD培地) / 容器
- 7) 連 数: 3 容器 / 試験区
- 8) 初期細胞濃度: 前培養した藻類 1×10^4 cells/mL
- 9) 試験温度: 23 ± 2 °C
- 10) 照 明: 4000 lux ($\pm 20\%$ の変動内, フラスコ液面付近) で連続照明
- 11) 分 析 法: ガスクロマトグラフィー質量分析 (GC/MS)

試 験 結 果 :

- 1) 試験液および試験培養液中の被験物質濃度

被験物質濃度分析の結果, 測定値の設定値に対する割合は, 暴露開始時の試験液において 45~61 %, 暴露終了時の試験培養液において 6~7 %であった。被験物質は揮発性であることから, 濃度減少の主な原因は揮散と考えられた。阻害濃度の算出には開始時の測定値を用いた。

2) 生長曲線下面積の比較による阻害濃度

50%生長阻害濃度 EbC_{50} (0-72h) : 0.891 mg/L (95%信頼区間 : 0.702~1.13 mg/L)

最大無作用濃度 $NOECb$ (0-72h) : 0.379 mg/L

3) 生長速度の比較による阻害濃度

50%生長阻害濃度 ErC_{50} (24-48h) : 1.52 mg/L (算出不可)

最大無作用濃度 $NOECr$ (24-48h) : 0.544 mg/L

50%生長阻害濃度 ErC_{50} (24-72h) : 2.08 mg/L (95%信頼区間 : 1.40~3.10 mg/L)

最大無作用濃度 $NOECr$ (24-72h) : 1.18 mg/L

4) 藻類の形態観察

暴露終了時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 被験物質

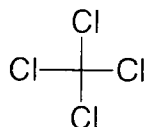
1.1 名称，構造式および物理化学的性状

名 称： 四塩化炭素（略称 C C L 4）

別 名： テトラクロロメタン

CAS No.： 56-23-5

構造式：



分子式： C C l₄

分子量^{*1}： 153.82

沸点^{*1}： 76.8℃

融点^{*1}： -23℃

水溶解度^{*1}： 不溶（0.08g/100mL水, 20℃）

比重^{*1}： 1.597（20/20℃）

その他^{*1}： 甘い刺激臭，クロロホルム様

*1： 供給者提供資料

1.2 供試試料

純度^{*1}： 99.9%（GC）

ロット番号^{*1}： XXXXXXXXXX

供給者： XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX

受領量^{*1}： 500mL

受領日： 2002年11月 7日

外観^{*1}： 無色澄明液体

*1： 供給者提供資料

1.3 被験物質の確認および保管条件下での安定性

試験開始前に、入手した被験物質について赤外吸収スペクトルを測定し、被験物質の特性が認められることを確認した。

試験期間中、被験物質は当研究所の試験物質保管用デシケータ（保管条件：室温，暗所，窒素封入）内に保管した。また，試験終了時にも赤外吸収スペクトルを測定し，試験開始時に測定したスペクトルと比較した。その結果，スペクトルに変化はなかったことより被験物質は保管中安定であったと判断された。

2 供試生物

- 1) 和名： ムレミカズキモ (単細胞緑藻類)
- 2) 学名： *Selenastrum capricornutum*
- 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) 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。1996年11月以降の72時間50%生長阻害濃度 (Ebc50) は, 以下の通りである。
平均値 ± 標準偏差 = 0.433 ± 0.0768 mg/L, n=13
(最小値 ~ 最大値 = 0.285 ~ 0.543 mg/L)
- 8) 前培養： 前培養期間; 2003年7月25日~2003年7月29日
この間, 藻類は対数増殖した。(環境条件は試験と同様)

3 試験方法

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。

3.1 試験条件

- 1) 暴露方式： 止水式 (密閉系), 連続振とう培養 (100rpm)
- 2) 暴露期間： 72時間
- 3) 試験液量： 100 mL (OECD培地, 3.2参照) / 容器
- 4) 連数： 3 容器 / 試験区
- 5) 初期細胞濃度： 前培養した藻類 1×10^4 cells/mL
- 6) 試験温度： 23 ± 2 °C
- 7) 照明： 4000 lux (±20%の変動内, フラスコ液面付近) で連続照明
- 8) pH： 試験液のpH調整なし

3.2 培地

前培養および試験ともにOECD化学品テストガイドラインに示されている培地をろ過滅菌 ($0.22 \mu\text{m}$) 後用いた。組成表を付属資料-1に示した。

3.3 試験容器および藻類培養試験装置等

- 1) 試験容器： 500 mL容ガラス製共栓付き三角フラスコ（IWAKI製，ヘッドスペース容量：当社測定値 490 mL）
- 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) 粒子計数装置用電解液： シスメックス製 セルパック
- 6) pH計： 東亜電波工業製 卓上pH計 HM-40V型 No. 2
- 7) 温度計： Tasco Japan 製 TNA-120型
- 8) 照度計： トプコン製 IM-2D型

3.4 試験濃度の設定

以下の表に示す予備試験（各1連）3回目の結果に基づき，本試験濃度を次のように決定した。

本試験濃度：対照区，

0.650, 1.18, 2.21, 3.90, 7.15, 13.0 mg/L（公比：1.8）

予備試験結果

1回目

濃度 (mg/L) [72時間- 分析結果(%)]*	助剤対照区 に対する72 時間後の 生長率 (%)
助剤対照区 密閉系	100
10.0 密閉系 [6]	108
10.0** 密閉系 [9]	--
10.0** 開放系 [0.003]	--

2回目

濃度 (mg/L) [72時間- 分析結果(%)]*	対照区に 対する72 時間後の 生長率 (%)
対照区 密閉系	100
13.0 密閉系 [7]	3
13.0** 密閉系 [10]	--

3回目（密閉系）

濃度 (mg/L)	対照区に 対する72 時間後の 生長率 (%)
対照区	100
0.260	87
0.650	82
1.30	89
5.20	8
10.4	2
26.0	2

* 72時間後の分析結果（設定値に対する%）

** 藻体添加なし

被験物質は揮発性であり，予備試験1回目，2回目の72時間後の分析結果から，主な濃度減少理由は揮散と考えられた。

3.5 試験液の調製

試験液調製時の培地は、調製前に恒温槽内または恒温室内で 23 ± 2 °C にした。

以下の表の通りに、被験物質原液を調製した。

		被験物質原液
調製方法	被験物質採取量	130 mg (被験物質を 81.5 μ L 採取')
	定容液	培地
	定容量	1000 mL
	溶解方法	超音波による機械的溶解 (8 分間)
	被験物質濃度	130 mg/L
調製頻度		暴露開始時
保管条件等		保管せず

* : 比重より算出

試験液は、この原液を用いて3.4に示した各試験濃度になるよう各試験容器に 100 mL調製した。1 濃度区につき 3 個の試験容器を準備した。各試験容器に原液添加量分を差し引いた量の培地を入れ、被験物質原液を等比級数的に添加した。

対照区は培地のみとした。

調製時の試験液の状態（外観）は全試験区において無色透明であった。

3.6 試験液および試験培養液の分析

暴露開始時 (0hr) には各試験区 3 容器とは別に調製した予備 1 容器より試験液を 10 mL 採取 (7.15 mg/L および 13.0 mg/L の濃度区では 1.0 mL 採取し、精製水 9.0 mL に添加) したものを分析試料とした。暴露終了時 (72hr) には、各試験区 3 個の試験容器より試験培養液を 5.0 mL ずつ採取して混合し、藻類を遠心分離 (3000rpm, 10 分間) 後の上澄み液を分析試料とした。

各分析試料 10 mL にアセトン 100 μ L を添加し混合後、GC/MS により分析した。各試験液および各試験培養液の被験物質濃度は、標準溶液のピーク面積との比から定量した。詳細は付属資料-2 に示した。

3.7 試験操作

前培養した藻類の細胞数を粒子計数装置（CDA-500）および血球計算盤と顕微鏡で直接計数し、細胞濃度が 1×10^4 cells/mL となるように、前培養液の一定量を試験液の入った容器に添加した。

各試験容器を 23 ± 2 °C の培養装置に設置し試験を開始し、24、48 および 72 時間後に細胞濃度を測定した。細胞濃度は各試験容器より試験培養液 1.0 mL を採取し、粒子計数装置用電解液（セルパック）9.0 mL と混合した後、粒子計数装置（CDA-500）により計測した。

試験培養液中の藻類について、暴露開始後 0、24 および 48 時間には、肉眼による色調観察を、また、暴露終了時には、肉眼による色調観察および顕微鏡下での細胞形態観察を行った。

各試験区における暴露開始時の試験液および暴露終了時の試験培養液の pH を測定した。暴露開始時の pH は、各試験区 3 容器とは別に調製した予備 1 容器について測定し、暴露終了時の pH は、3 容器のうち 1 容器（No 1）について測定した。暴露期間中、培養装置内の温度、照度を少なくとも 1 日 1 回測定した。

4 結果の算出

4.1 生長曲線

各試験区の細胞濃度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。

4.2 生長阻害率の算出

下記の方法（面積法および速度法）で生長阻害率を算出した。

1) 生長曲線下の面積の比較（面積法）による生長阻害率（ I_A ）

生長曲線下の面積（A）は次の式により算出した。

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

ここで、

A : 生長曲線下の面積

N_0 : 暴露開始時の設定細胞濃度 (cells/mL)

N_1 : t_1 時の実測細胞濃度 (cells/mL)

N_n : t_n 時の実測細胞濃度 (cells/mL)

t_1 : 暴露開始後最初に細胞濃度を測定した時間

t_n : 暴露開始後n回目に細胞濃度を測定した時間

生長曲線下の面積（A）より各濃度区における生長の阻害百分率（ I_A ）を次の式により算出した。

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

ここで、

A_c : 対照区（助剤使用時は助剤対照区）の生長曲線下の面積

A_t : 各濃度区における生長曲線下の面積

2) 生長速度の比較（速度法）による生長阻害率（ I_A ）

対数増殖している培養での細胞濃度の平均値から平均の生長速度（ μ ）を次の式より算出した。

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

ここで、

μ : 生長速度

N_1 : t_1 時の実測細胞濃度 (cells/mL)

N_n : t_n 時の実測細胞濃度 (cells/mL)

t_1 : 暴露開始後最初に細胞濃度を測定した時間

t_n : 暴露開始後 n 回目に細胞濃度を測定した時間

平均の生長速度 (μ) より各濃度区における平均生長速度の低下百分率 (I_m) を次の式により算出した。

$$I_m = \frac{\mu_c - \mu_t}{\mu_c} \times 100$$

ここで,

μ_c : 対照区 (助剤使用時は助剤対照区) の平均生長速度

μ_t : 各濃度区における平均生長速度

4.3 EC50およびNOECの算出に用いる被験物質濃度の決定

4.4, 4.5のEC50およびNOECの算出に用いる被験物質濃度は, 開始時の測定値とした。

4.4 50%生長阻害濃度 (EC50) の算出

4.2で算出した面積法および速度法による生長阻害率 (I_A 値および I_M 値) を用いて, 以下の方法で50%生長阻害濃度 (EC50) を算出した。

最高濃度区における阻害率	$\geq 50\%$	$< 50\%$
濃度－生長阻害率曲線の記載 (片対数紙にプロット)	記載する。	記載する。
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) を行い, 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する。
EC50の表記方法	I_A 値より求めた場合: EbC50 (0-72h) I_M 値より求めた場合: ErC50 (24-48h), ErC50 (24-72h)	

4.5 最大無作用濃度 (NOEC)

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 Dunnettの多重比較検定 ($\alpha=0.05$, 両側) を行い、対照区と比較して有意差が認められない最高試験濃度を最大無作用濃度 (NOEC) とした。その際、面積法により求めた場合はNOECb (0-72h), 速度法により求めた場合は NOECr (24-48h) またはNOECr (24-72h) とした。

以上の統計解析には Yukms ソフトウェア Statlight「#4 多群の比較」(Yukms Corp., 東京) を用いた。

5 結果および考察

5.1 試験結果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。

5.2 試験液および試験培養液中の被験物質濃度

暴露開始時の試験液および暴露終了時の試験培養液中の被験物質濃度を測定した。その結果を Table 1 に、代表的なクロマトグラムを付属資料-2 に示した。

被験物質濃度分析 (3.6 参照) の結果、測定値の設定値に対する割合は、暴露開始時の試験液において 45~61 %, 暴露終了時の試験培養液において 6~7 % であった。被験物質は揮発性であること、また、72 時間後の分析結果において全ての濃度区で一律の濃度減少がみられたことから、濃度減少の主な原因は揮散と考えられた。以下の結果、50% 生長阻害濃度 (EC50) および最大無作用濃度 (NOEC) の算出には開始時の測定値を用いた。

5.3 生長曲線

暴露期間中の細胞濃度を Table 2 および生長曲線を Figure 1 に示した。

対照区における細胞濃度は 72 時間の培養で平均 61 倍増加し、試験条件 (密閉系条件) 下で正常な生長を示した。各濃度区の細胞濃度は濃度の増加とともに (用量依存的に) 減少する傾向がみられた。

試験培養液の肉眼による色調観察の結果、対照区および 2.21 mg/L 以下の濃度区では、暴露開始 48 時間後の観察において緑色を帯び始め、その後時間の経過とともに緑色度が増加する傾向がみられた。3.90 mg/L の濃度区では、暴露開始 48 時間後の観察において緑色を帯び始めたが、その後時間の経過にともなう緑色度の増加はみられなかった。7.15 mg/L および 13.0 mg/L の濃度区では、暴露終了時 (72hr) まで緑色化することはなかった。また、暴露終了時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。

5.4 50%生長阻害濃度 (EC50) および最大無作用濃度 (NOEC)

濃度区における生長阻害率を Table 3 に、50%生長阻害濃度 (EC50) および最大無作用濃度 (NOEC) を Table 4 に、濃度-阻害率曲線を Figure 2 および Figure 3 に、EC50 および NOEC の算出結果 (使用した統計的手法, 入力値, 入力に用いた観察点 (試験区) およびその出力結果) を付属資料-3 に示した。得られた結果から、以下の結論を得た。

1) 生長曲線下面積の比較による阻害濃度

EbC50 (0-72h) : 0.891 mg/L (95%信頼区間 : 0.702~1.13 mg/L)

NOECb (0-72h) : 0.379 mg/L

2) 生長速度の比較による阻害濃度

ErC50 (24-48h) : 1.52 mg/L (算出不可)

NOECr (24-48h) : 0.544 mg/L

ErC50 (24-72h) : 2.08 mg/L (95%信頼区間 : 1.40~3.10 mg/L)

NOECr (24-72h) : 1.18 mg/L

5.5 温度およびpH

暴露期間中の培養試験装置内の温度を Table 5 に、試験液および試験培養液の pH を Table 6 に示した。

培養試験装置内の温度は、設定範囲 ($23 \pm 2^{\circ}\text{C}$) 内であった。pH は、暴露開始時の試験液が 7.7~7.8 であり、暴露終了時の試験培養液が 8.3~10.4 であった。対照区および 3.90 mg/L 以下の濃度区では、pH が 1 以上増加したが、炭酸同化が盛んに行われ藻類の生長率が高ければ 1 以上増加することがあり、問題はないと考えられた。

5.6 試験計画書からの逸脱事項

該当する事象はなかった。

以 上

Table 1 Measured Concentration of the Test Substance in Test Cultures

Nominal Concentration (mg/L)	Measured Concentration (mg/L)			
	0 Hour	Percent of Nominal	72 Hours	Percent of Nominal
Control	<0.0004	--	<0.0004	--
0.650	0.379	58	0.0386	6
1.18	0.544	46	0.0728	6
2.21	1.18	53	0.148	7
3.90	2.18	56	0.259	7
7.15	3.20	45	0.449	6
13.0	7.90	61	0.799	6

Table 2 Cell Densities of *Selenastrum capricornutum* during the 72-Hour Exposure

Nominal Concentration [Measured Conc. at 0hr] (mg/L)	Vessel No.	Cell Densities (cells/mL)			
		0 Hour	24 Hours	48 Hours	72 Hours
Control	1	10000	58700	300200	612800
	2	10000	62200	331200	587800
	3	10000	53300	282200	631800
	Average	10000	58100	304500	610800
	SD	0	4500	24800	22100
0.650 [0.379]	1	10000	48900	282200	600800
	2	10000	50400	284200	634800
	3	10000	53700	293200	629800
	Average	10000	51000	286500	621800
	SD	0	2500	5900	18400
1.18 [0.544]	1	10000	37600	194200	512800
	2	10000	35100	168200	533800
	3	10000	39200	208200	571800
	Average	10000	37300	190200	539500
	SD	0	2100	20300	29900
2.21 [1.18]	1	10000	25200	85900	357800
	2	10000	23800	79400	334800
	3	10000	20200	79600	281800
	Average	10000	23100	81600	324800
	SD	0	2600	3700	39000
3.90 [2.18]	1	10000	18400	21200	53700
	2	10000	14900	21100	56000
	3	10000	16600	18600	51500
	Average	10000	16600	20300	53700
	SD	0	1800	1500	2300
7.15 [3.20]	1	10000	12600	13500	16600
	2	10000	12700	13000	15600
	3	10000	13700	12600	15800
	Average	10000	13000	13000	16000
	SD	0	600	500	500
13.0 [7.90]	1	10000	13400	13100	13300
	2	10000	12200	13500	13200
	3	10000	12100	12700	13000
	Average	10000	12600	13100	13200
	SD	0	700	400	200

SD = Standard deviation

Table 3 Growth Inhibition (%) of *Selenastrum capricornutum*

Nominal Concentration [Measured Conc. at 0hr]		Area under the growth curves		Growth Rate			
mg/L	Vessel No.	Area A (0-72h)	Inhibition (%) [†] I _A (0-72h)	Rate μ (24-48h)	Inhibition (%) [†] I _μ (24-48h)	Rate μ (24-72h)	Inhibition (%) [†] I _μ (24-72h)
Control	1	15367000		0.0680		0.0489	
	2	15895000		0.0697		0.0468	
	3	15034000		0.0694		0.0515	
	Average	15432000	-	0.0690	-	0.0491	-
	SD	434000		0.0009		0.0024	
0.650 [0.379]	1	14556000		0.0730		0.0523	
	2	15048000		0.0721		0.0528	
	3	15283000		0.0707		0.0513	
	Average	14962000	3.0	0.0719	-4.2	0.0521	-6.1
	SD	371000		0.0012		0.0008	
1.18 [0.544]	1	11117000		0.0684		0.0544	
	2	10685000		0.0653		0.0567	
	3	12199000		0.0696		0.0558	
	Average	11334000	26.6**	0.0678	1.7	0.0556	-13.2**
	SD	780000		0.0022		0.0012	
2.21 [1.18]	1	6360000		0.0511		0.0553	
	2	5894000		0.0502		0.0551	
	3	5177000		0.0571		0.0549	
	Average	5810000	62.4**	0.0528	23.5**	0.0551	-12.2**
	SD	596000		0.0038		0.0002	
3.90 [2.18]	1	995000		0.0059		0.0223	
	2	936000		0.0145		0.0276	
	3	863000		0.0047		0.0236	
	Average	931000	94.0**	0.0084	87.8**	0.0245	50.1**
	SD	66000		0.0053		0.0028	
7.15 [3.20]	1	226000		0.0029		0.0057	
	2	204000		0.0010		0.0043	
	3	221000		-0.0035		0.0030	
	Average	217000	98.6+	0.0001	99.9**	0.0043	91.2**
	SD	12000		0.0033		0.0014	
13.0 [7.90]	1	196000		-0.0009		-0.0002	
	2	175000		0.0042		0.0016	
	3	151000		0.0020		0.0015	
	Average	174000	98.9+	0.0018	97.4**	0.0010	98.0**
	SD	23000		0.0026		0.0010	

† Values are the growth inhibition (%) relative to the control. SD Standard deviation

* Indicates a significant difference ($\alpha=0.05$) from the control. (There was no sign in this test.)

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

+ Statistical comparison test could not be performed for these concentrations since data including these concentrations did not show homogeneity of variances. However, it was concluded that these concentration levels showed adverse effect on algal growth judging from I_A values.

++ These concentration levels showed a significant difference ($\alpha=0.01$), but we concluded that these concentration levels did not show adverse effect on Algal growth.

Table 4 Calculated EC50 and NOEC

Based on I_A (0-72h) value (Areas under growth curve)

EbC50 (0-72h) (mg/L)	95-Percent Confidence Limits (mg/L)	NOECb (0-72h) (mg/L)
0.891 ^{*1}	0.702-1.13	0.379

Based on I_A (24-48h) value (Growth rates)

ErC50 (24-48h) (mg/L)	95-Percent Confidence Limits (mg/L)	NOECr (24-48h) (mg/L)
1.52 ^{*2}	--	0.544

Based on I_A (24-72h) value (Growth rates)

ErC50 (24-72h) (mg/L)	95-Percent Confidence Limits (mg/L)	NOECr (24-72h) (mg/L)
2.08 ^{*3}	1.40-3.10	1.18

The EC50 values 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.

- *1 using the measured concentrations of 0.544, 1.18 and 2.18 mg/L in the regression analysis
- *2 using the measured concentrations of 1.18 and 2.18 mg/L in the regression analysis
- *3 using the measured concentrations of 1.18, 2.18 and 3.20 mg/L in the regression analysis
- not calculated

The NOEC values were determined by an analysis of variance (ANOVA), Dunnett 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 were at $\alpha=0.05$, except Bartlett test, which was at $\alpha=0.01$.

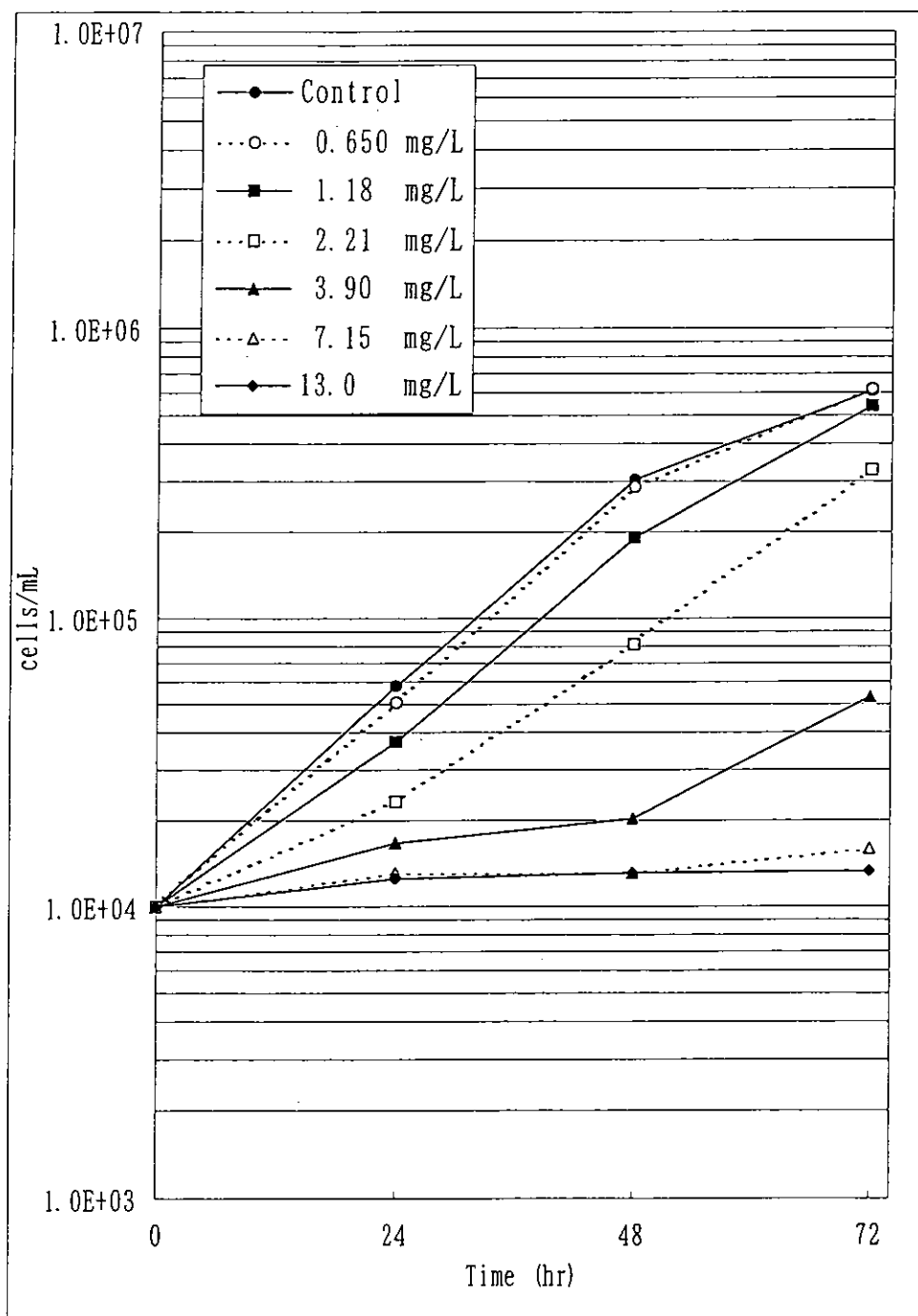
Table 5 Temperature in the Incubation Chamber

Exposure Period (Hours)	Temperature (°C)
0	23.2
24	23.0
48	22.9
72	23.2

Table 6 pH Values of Test Cultures

Nominal Concentration		pH		
[Measured Conc. at 0hr]		0 Hour	72 Hours	
(mg/L)			(Vessel No)	
Control		7. 8	10. 3	(1)
0. 650	[0. 379]	7. 7	10. 4	(1)
1. 18	[0. 544]	7. 8	10. 3	(1)
2. 21	[1. 18]	7. 8	9. 9	(1)
3. 90	[2. 18]	7. 8	8. 9	(1)
7. 15	[3. 20]	7. 7	8. 6	(1)
13. 0	[7. 90]	7. 8	8. 3	(1)

Figure 1 Algal Growth Curve of *Selenastrum capricornutum*
(Mean cell counts vs time during the 72-hour exposure)



Values in legend are given in the nominal concentration.

Figure 2 Concentration-Inhibition Curve Based on I_A Values Calculated from the Area under the Growth Curves

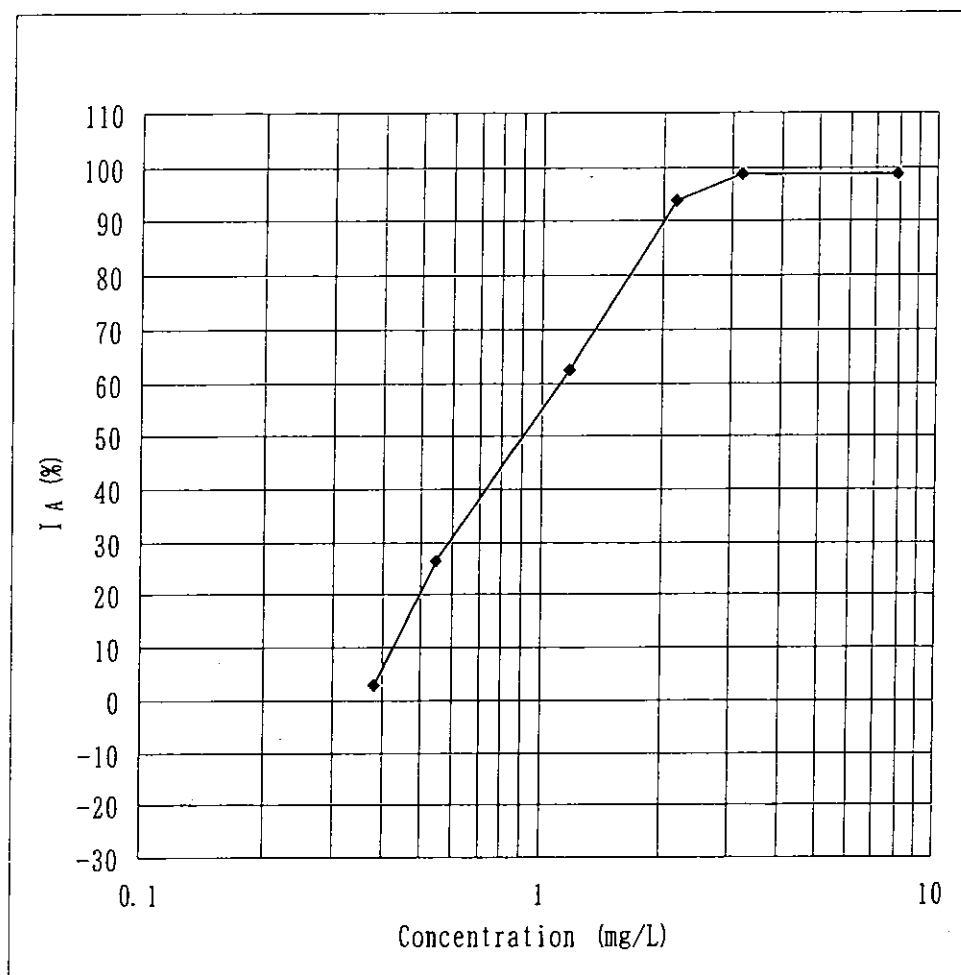
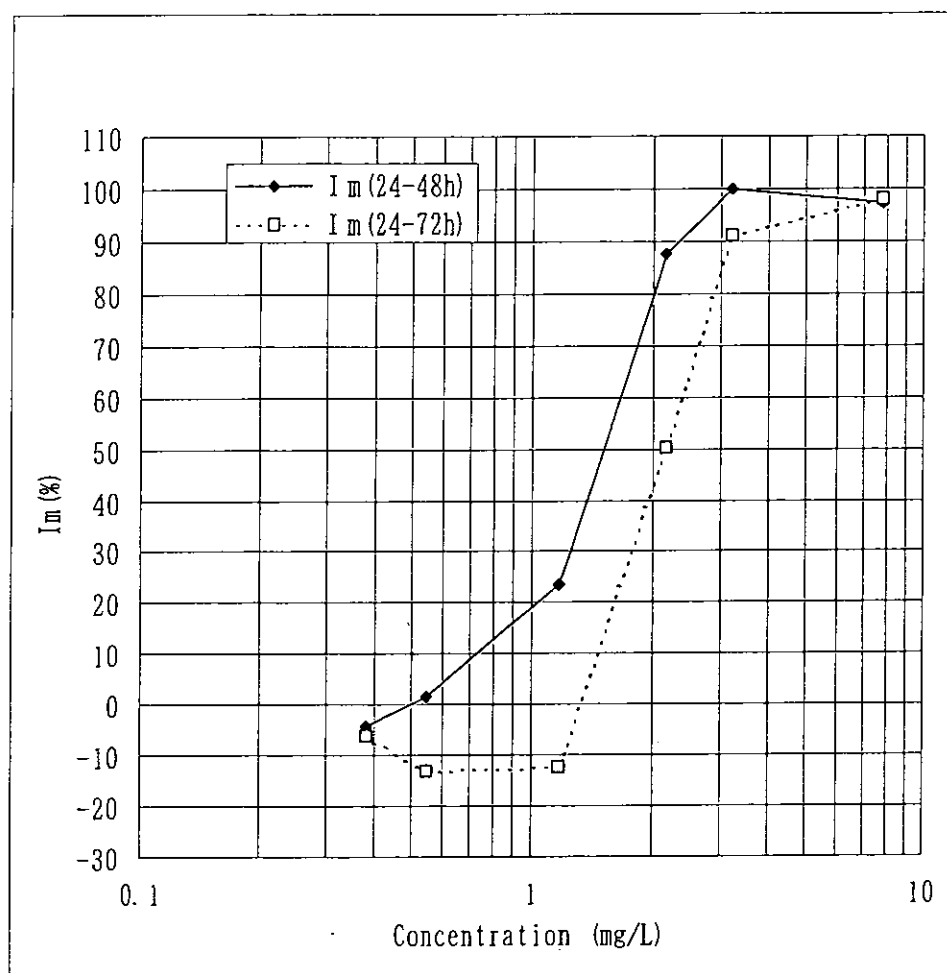


Figure 3 Concentration-Inhibition Curve Based on I_m values Calculated from the Growth Rates



付属資料－ 1

OECD 培地の組成

Table A-1 OECD medium

Nutrient salts	Concentration (mg/L)
H ₃ BO ₃	0.185
MnCl ₂ ·4H ₂ O	0.415
ZnCl ₂	0.003
FeCl ₃ ·6H ₂ O	0.08
Na ₂ EDTA·2H ₂ O	0.1
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.0015
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.007
CuCl ₂ ·2H ₂ O	0.00001
CaCl ₂ ·2H ₂ O	18
NH ₄ Cl	15
KH ₂ PO ₄	1.6
NaHCO ₃	50
MgCl ₂ ·6H ₂ O	12
MgSO ₄ ·7H ₂ O	15

付属資料－ 2

試験液および試験培養液の分析

1 試験液および試験培養液の分析方法

- 1) 暴露開始時は各試験区 3 容器とは別に調製した予備 1 容器より試験液を 10 mL 採取 (7.15 mg/L および 13.0 mg/L の濃度区では 1.0 mL 採取し, 精製水 9.0 mL に添加) したものを分析試料とした。

暴露終了時は各試験区 3 個の試験容器より試験培養液を 5.0 mL ずつ採取して 50 mL 容プラスチック沈殿管で混合し, これを遠心分離* (3000 rpm, 10 分間) し, 藻類を分離した上澄み液を分析試料とした。

* 装置: 日立工機製 CR21E 型

- 2) 各分析試料 10 mL を測定用バイアルに採取し, アセトンを 100 μ L 添加し混合後 GC/MS により分析した。代表的なクロマトグラムを Figure A-2-2 (2), (3), (4), (5), (7), (8), (9), (10) に示した。
- 3) 精製水 10 mL を測定用バイアルに採取し, アセトンで調製した標準溶液を 100 μ L 添加し混合後, GC/MS により分析した。クロマトグラムを Figure A-2-2 (1), (6) に示した。
- 4) 各試験液および試験培養液の被験物質濃度は, 各分析時に測定した標準溶液のピーク面積を用いて, 一点検量法により定量した。

なお, 暴露開始前に試験濃度範囲の全域にわたって検量線を作成し, 直線性を確認している。(「3 検量線」参照)

2 ガスクロマトグラフィー質量分析計 (GC/MS) 測定条件

(装置)

ガスクロマトグラフ質量分析計 (ヘッドスペースサンプラ付き) (No. 1)

ガスクロマトグラフ (GC) : Agilent Technologies 6890 型

ヘッドスペースサンプラ (HSS) : Agilent Technologies 7694 型

質量選択検出器 (MSD) : Agilent Technologies 5973N 型

データ処理部 : ミニステーション (Windows NT)

(条件)

[GC 条件]

カラム : J&W DB-1701 60m×0.25mm×1.0μm

キャリアーガス : ヘリウム 1.0mL/min (Constant flow)

オープン温度 : 100℃ (3min) → 20℃/min → 240℃ (2min)

注入口温度 : 250℃

MS インターフェース温度 : 200℃

注入条件 : スプリット (スプリット比=50:1)

注入量 : 3.0mL (HSS サンプルループ容量)

[HSS 条件]

温度条件 : Oven=60℃, Loop=120℃, Transfer Line=200℃

イベント時間 : GC Cycle Time=20 分

Vial Equilibration Time=20 分

Pressurization Time=0.2 分

Loop Fill Time=0.03 分

Loop Equilibration Time=0.2 分

Inject Time=0.2 分

バイアルパラメータ : Shake=2

[MSD 条件]

温度条件 : イオン源=230℃, 四重極マス・フィルタ=150℃

SIM (Selected Ion Monitoring) 条件 :

Solvent Delay=6min

Quant ion=116.9m/z

Qualify ion=118.9m/z

3 検量線

アセトンを用い, 0, 1.00~500 mg/L の標準溶液を調製した。この標準溶液 100μL を精製水 10 mL に添加し (100 倍希釈) GC/MS で測定した。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。検量線の最小二乗法による直線回帰式の相関係数は 1.00 と良好であった。作成した検量線を Figure A-2-1 に示した。

4 検出限界

最小検出ピーク面積を 10000 count に設定し、これに相当する試験液または試験培養液中の被験物質濃度 0.0004 mg/L を検出限界とした。

5 添加回収試験

分析前処理は、「1 試験液および試験培養液の分析方法」に示したように試験液または試験培養液を採取する操作だけであるので添加回収試験の必要はなかった。したがって、回収率の補正は行わなかった。

Figure A-2-1 Calibration curve

No.	Concentration (mg/L)	Peak Area (count)
1	0	0
2	0.0100	633105
3	0.0200	1183236
4	0.0500	2498099
5	0.100	5195287
6	0.200	10044964
7	0.500	23925278
8	1.00	48827941
9	2.00	97553159
10	5.00	239415714

$$Y = 48,036,791X$$

$$r = 1.00$$

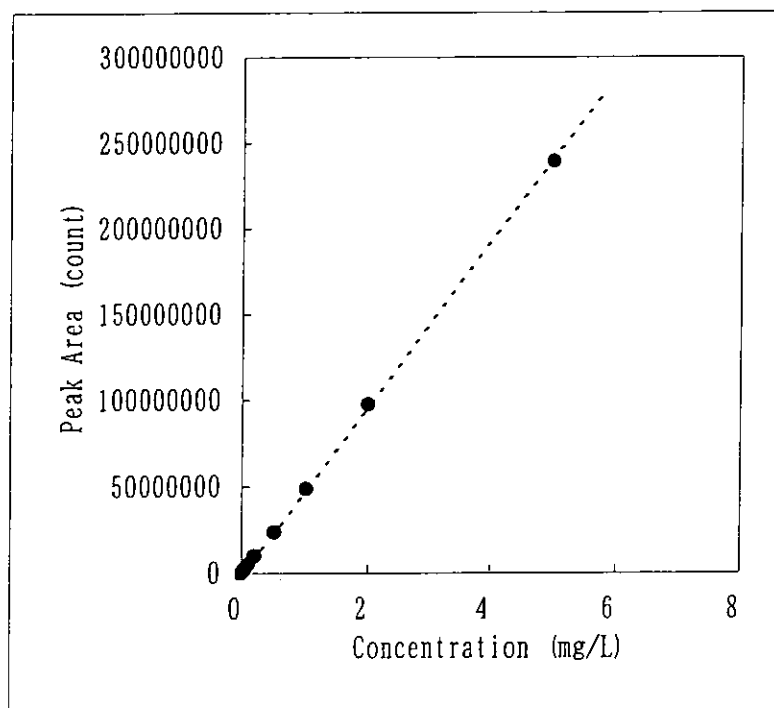
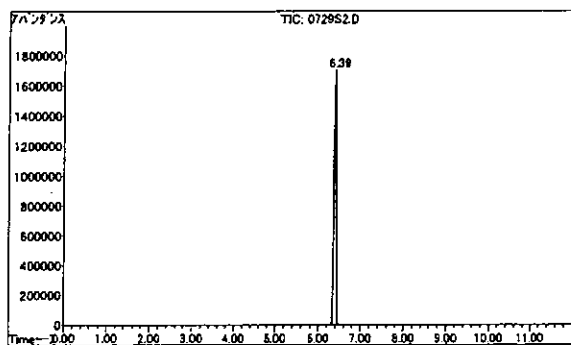


Figure A-2-2 Representative chromatograms

(1) Standard 2.00 mg/L ; 0 Hour

Study No. : A020366-1
 Date : 2003. 07. 29
 Operator :
 Sample Information: CCL4
 Sample Name : std 2mg/L
 Misc Info :
 File Name : C:\MSDCHEM\1\DATA\A020366\0729S2.D
 Acquired : 29 Jul 2003 14:55 using AcqMethod A020366

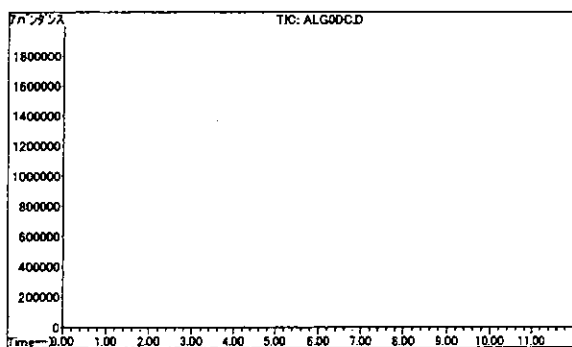


TIC: 0729S2.D

ピーク	リテンションタイム	タイプ	半値幅	面積	開始時間	終了時間
1	6.387	M	0.069	70745742	6.291	6.495

(2) Control ; 0 Hour

Study No. : A020366-1
 Date : 2003. 07. 29
 Operator :
 Sample Information: CCL4
 Sample Name : Alg. 0hr Control
 Misc Info :
 File Name : C:\MSDCHEM\1\DATA\A020366\ALG0DC.D
 Acquired : 29 Jul 2003 15:16 using AcqMethod A020366



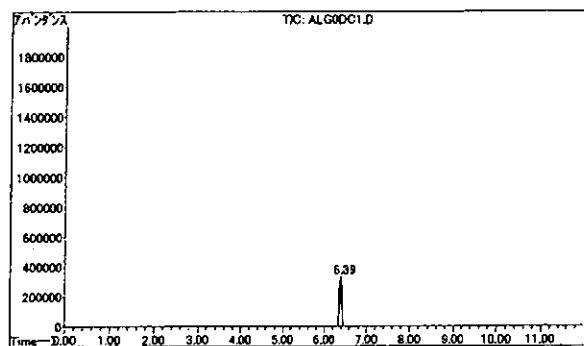
TIC: ALG0DC.D

ピーク	リテンションタイム	タイプ	半値幅	面積	開始時間	終了時間
ピークが検出できません						

Figure A-2-2 Continued

(3) 0.650 mg/L nominal ; 0 Hour

Study No. : A020366-1
 Date : 2003. 07. 29
 Operator :
 Sample Information: CCL4
 Sample Name : Alg. 0hr Conc. 1
 Misc Info :
 File Name : C:\MSDCHEM\1\DATA\A020366\ALG0DC1.D
 Acquired : 29 Jul 2003 15:38 using AcoMethod A020366

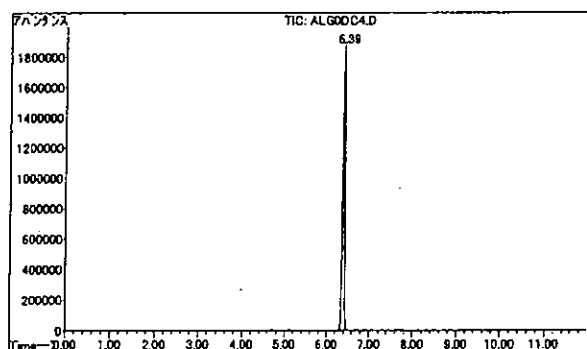


TIC: ALG0DC1.D

ピーク	リテンションタイム	タイプ	半値幅	面積	開始時間	終了時間
1	6.392	M	0.067	13423165	6.291	6.503

(4) 3.90 mg/L nominal ; 0 Hour

Study No. : A020366-1
 Date : 2003. 07. 29
 Operator :
 Sample Information: CCL4
 Sample Name : Alg. 0hr Conc. 4
 Misc Info :
 File Name : C:\MSDCHEM\1\DATA\A020366\ALG0DC4.D
 Acquired : 29 Jul 2003 16:42 using AcoMethod A020366



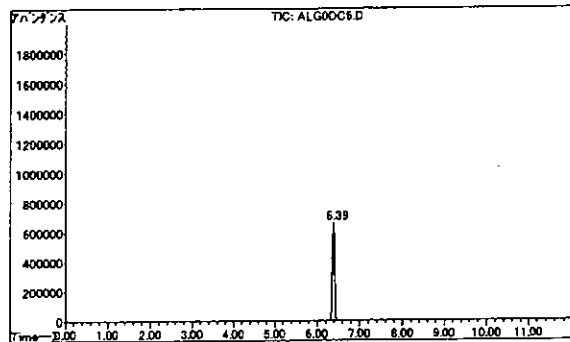
TIC: ALG0DC4.D

ピーク	リテンションタイム	タイプ	半値幅	面積	開始時間	終了時間
1	6.391	M	0.068	76967134	6.295	6.502

Figure A-2-2 Continued

(5) 13.0 mg/L nominal ; 0 Hour

Study No. : A020366-1
 Date : 2003.07.29
 Operator :
 Sample Information: CCL4
 Sample Name : Alg. 0hr Conc. 6
 Misc Info :
 File Name : C:\MSDCHEM\1\DATA\A020366\ALG0DC6.D
 Acquired : 29 Jul 2003 17:25 using AcqMethod A020366

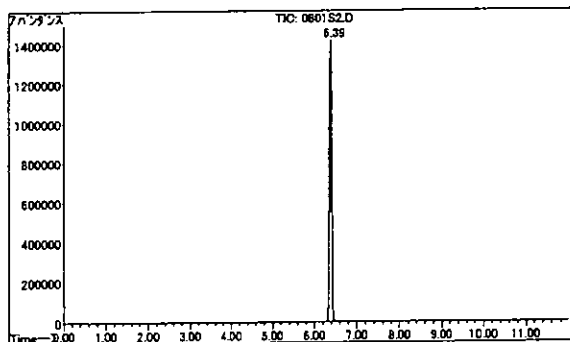


TIC: ALG0DC6.D

ピーク	リテンションタイム	タイプ	半値幅	面積	開始時間	終了時間
1	6.393	M	0.070	27948879	6.295	6.485

(6) Standard 2.00 mg/L ; 72 Hours

Study No. : A020366-1
 Date : 2003.08.01
 Operator :
 Sample Information: CCL4
 Sample Name : std 2mg/L
 Misc Info :
 File Name : C:\MSDCHEM\1\DATA\A020366\0801S2.D
 Acquired : 1 Aug 2003 12:29 using AcqMethod A020366



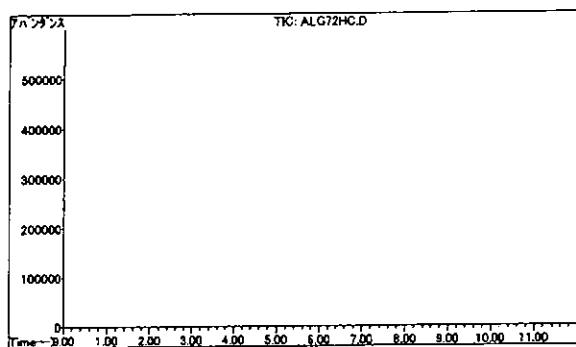
TIC: 0801S2.D

ピーク	リテンションタイム	タイプ	半値幅	面積	開始時間	終了時間
1	6.387	M	0.071	60492781	6.296	6.486

Figure A-2-2 Continued

(7) Control ; 72 Hours

Study No. : A020366-1
 Date : 2003. 08. 01
 Operator :
 Sample Information: CCL4
 Sample Name : Alg. 72hr Control
 Misc Info :
 File Name : C:\MSDCHEM\1\DATA\A020366\ALG72HC.D
 Acquired : 1 Aug 2003 12:52 using AcoMethod A020366

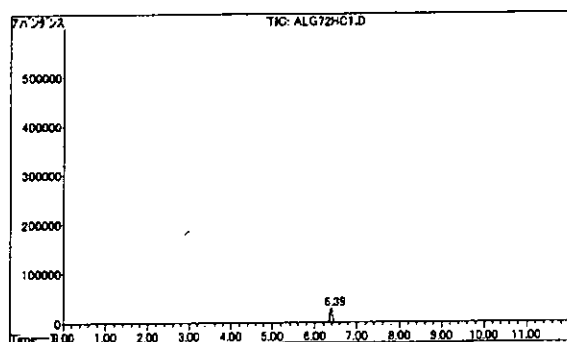


TIC: ALG72HC.D

ピーク	リテンションタイム	タイプ	半値幅	面積	開始時間	終了時間
ピークが検出できません						

(8) 0.650 mg/L nominal ; 72 Hours

Study No. : A020366-1
 Date : 2003. 08. 01
 Operator :
 Sample Information: CCL4
 Sample Name : Alg. 72hr Conc. 1
 Misc Info :
 File Name : C:\MSDCHEM\1\DATA\A020366\ALG72HC1.D
 Acquired : 1 Aug 2003 13:13 using AcoMethod A020366



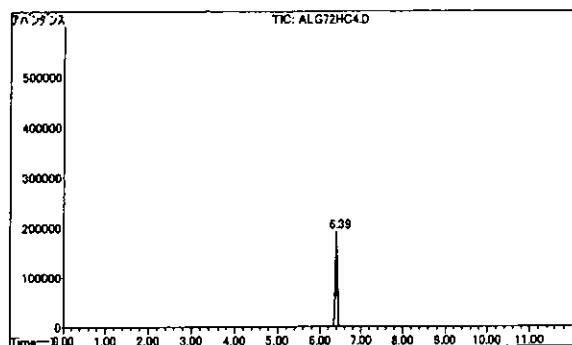
TIC: ALG72HC1.D

ピーク	リテンションタイム	タイプ	半値幅	面積	開始時間	終了時間
1	6.388	M	0.068	1168410	6.295	6.491

Figure A-2-2 Continued

(9) 3.90 mg/L nominal ; 72 Hours

Study No. : A020366-1
 Date : 2003. 08. 01
 Operator :
 Sample Information: CCL4
 Sample Name : Alg 72hr Conc. 4
 Misc Info :
 File Name : C:\MSDCHEM\1\DATA\A020366\ALG72HC4.D
 Acquired : 1 Aug 2003 14:18 using AcqMethod A020366

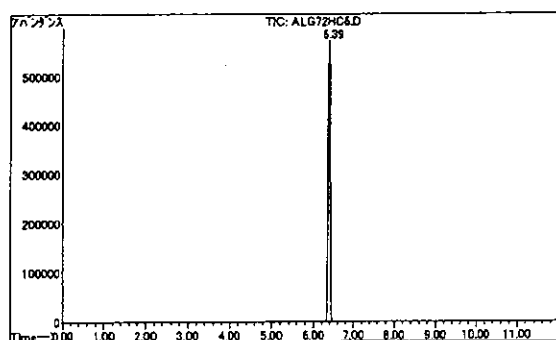


TIC: ALG72HC4.D

ピーク	リテンションタイム	タイプ	半値幅	面積	開始時間	終了時間
1	6.390	M	0.068	7842336	6.294	6.489

(10) 13.0 mg/L nominal ; 72 Hours

Study No. : A020366-1
 Date : 2003. 08. 01
 Operator :
 Sample Information: CCL4
 Sample Name : Alg 72hr Conc. 6
 Misc Info :
 File Name : C:\MSDCHEM\1\DATA\A020366\ALG72HC6.D
 Acquired : 1 Aug 2003 15:01 using AcqMethod A020366



TIC: ALG72HC6.D

ピーク	リテンションタイム	タイプ	半値幅	面積	開始時間	終了時間
1	6.390	M	0.070	24169652	6.297	6.500

付属資料－ 3

結果の算出

Table A-3-1 Calculation of the EC50

(1) EbC50 (0-72h)

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. 544	-0. 61	26. 6
1. 18	0. 17	62. 4
2. 18	0. 78	94. 0

EC ₅₀	95%信頼区間		単位
0. 891	0. 702	~ 1. 13	(mg/L)

分散分析

Factor	SS	DF	V	F-ratio	f (0. 05, f1, f2)
Between	2272. 18	1	2272. 18	1060. 46	>161. 45
Within	2. 14	1	2. 14		
Total	2274. 32	2			

Table A-3-1 Continued

(2) ErC50 (24-48h)

直線回帰分析 (E C 50値の算出)

濃度 (mg/L)	阻害率 (%)	
x	log (x)	y
1.18	0.17	23.5
2.18	0.78	87.8

EC ₅₀	95%信頼区間		単位
1.52	#NUM!	~ #NUM!	(mg/L)

分散分析

Factor	SS	DF	V	F-ratio	f (0.05, f1, f2)
Between	2067.25	1	2067.25	#DIV/0!	#NUM!
Within	0.00	0	#DIV/0!		
Total	2067.25	1			

Table A-3-1 Continued

(3) ErC50 (24-72h)

直線回帰分析 (E C 50値の算出)

濃度 (mg/L)		阻害率 (%)
x	log (x)	y
1.18	0.17	0.0
2.18	0.78	50.1
3.20	1.16	91.2

EC ₅₀	95%信頼区間	単位
2.08	1.40 ~ 3.10	(mg/L)

分散分析

Factor	SS	DF	V	F-ratio	f (0.05, f1, f2)
Between	4148.54	1	4148.54	175.21	>161.45
Within	23.68	1	23.68		
Total	4172.22	2			

Table A-3-2 Calculation of the NOEC

(1) NOECb (0-72h)

Input Data Table

Control Group1	Conc. 1 Group2	Conc. 2 Group3	Conc. 3 Group4	Conc. 4 Group5	Conc. 5 Group6	Conc. 6 Group7
1536.7	1455.6	1111.7	636.0	99.5	22.6	19.6
1589.5	1504.8	1068.5	589.4	93.6	20.4	17.5
1503.4	1528.3	1219.9	517.7	86.3	22.1	15.1

Group	Samples	Mean	S. E.	S. D.	Variance		
1	3	1,543.2000	25.0665	43.4165	1,884.9900		
2	3	1,496.2333	21.4193	37.0994	1,376.3633		
3	3	1,133.3667	45.0280	77.9909	6,082.5733		
4	3	581.0333	34.4055	59.5921	3,551.2233		
5	3	93.1333	3.8176	6.6124	43.7233		
6	3	21.7000	0.6658	1.1533	1.3300		
7	3	17.4000	1.3000	2.2517	5.0700		
Method	vs	Side	Stat.	0.05	0.01	0.001	Prob.
Bartlett test		0	25.7284	12.5916	>16.8119	22.4577	0.0003
Conc. 6を除く Method	vs	Side	Stat.	0.0500	0.0100	0.0010	Prob.
Bartlett test		0	17.3099	11.0705	>15.0863	20.5152	0.00394831
Conc. 5, 6を除く Method	vs	Side	Stat.	0.05	0.01	0.001	Prob.
Bartlett test		0	6.4296	9.4877	<13.2767	18.4668	0.1693
Method	vs	Side	Stat.	0.05	0.01	0.001	Prob.
1-way ANOVA		0	449.9107	>3.4780	5.9943	11.2828	3.0774E-11
Method	vs	Side	Stat.	0.0500	0.0100	0.0010	Prob.
Dunnett	1 vs 2	2	1.1308	2.8905	3.8834	999.9900	0.6352
Dunnett	1 vs 3	2	9.8671	>2.8905	>3.8834	999.9900	8.3609E-06 **
Dunnett	1 vs 4	2	23.1650	>2.8905	>3.8834	999.9900	2.0136E-06 **
Dunnett	1 vs 5	2	34.9116	>2.8905	>3.8834	999.9900	2.0119E-06 **

Table A-3-2 Continued

(2) NOECr (24-48h)

Input Data Table

Control Group1	Conc. 1 Group2	Conc. 2 Group3	Conc. 3 Group4	Conc. 4 Group5	Conc. 5 Group6	Conc. 6 Group7
0.0680	0.0730	0.0684	0.0511	0.0059	0.0029	-0.0009
0.0697	0.0721	0.0653	0.0502	0.0145	0.0010	0.0042
0.0694	0.0707	0.0696	0.0571	0.0047	-0.0035	0.0020

Group	Samples	Mean	S. E.	S. D.	Variance		
1	3	0.0690	0.0005	0.0009	0.0000		
2	3	0.0719	0.0007	0.0012	0.0000		
3	3	0.0678	0.0013	0.0022	0.0000		
4	3	0.0528	0.0022	0.0038	0.0000		
5	3	0.0084	0.0031	0.0053	0.0000		
6	3	0.0001	0.0019	0.0033	0.0000		
7	3	0.0018	0.0015	0.0026	0.0000		
Method Bartlett test	vs	Side 0	Stat. 6.5020	0.0500 12.5916	0.0100 <16.8119	0.0010 22.4577	Prob. 0.3694
Method 1-way ANOVA	vs	Side 0	Stat. 356.8717	0.0500 >2.8477	0.0100 4.4558	0.0010 7.4358	Prob. 0.0000
Method	vs	Side	Stat.	0.0500	0.0100	0.0010	Prob.
Dunnett	1 vs 2	2	1.1474	2.9124	3.7633	999.9900	0.7265
Dunnett	1 vs 3	2	0.5011	2.9124	3.7633	999.9900	0.9897
Dunnett	1 vs 4	2	6.4225	>2.9124	>3.7633	999.9900	8.4705E-05 **
Dunnett	1 vs 5	2	24.0020	>2.9124	>3.7633	999.9900	1.3708E-06 **
Dunnett	1 vs 6	2	27.2595	>2.9124	>3.7633	999.9900	1.3708E-06 **
Dunnett	1 vs 7	2	26.6133	>2.9124	>3.7633	999.9900	1.3708E-06 **

Table A-3-2 Continued

(3) NOECr (24-72h)

Input Data Table						
Control Group	Conc. 1 Group2	Conc. 2 Group3	Conc. 3 Group4	Conc. 4 Group5	Conc. 5 Group6	Conc. 6 Group7
0.0489	0.0523	0.0544	0.0553	0.0223	0.0057	-0.0002
0.0468	0.0528	0.0567	0.0551	0.0276	0.0043	0.0016
0.0515	0.0513	0.0558	0.0549	0.0236	0.0030	0.0015

Group	Samples	Mean	S. E.	S. D.	Variance	
1	3	0.0491	0.0014	0.0024	0.0000	
2	3	0.0521	0.0004	0.0008	0.0000	
3	3	0.0556	0.0007	0.0012	0.0000	
4	3	0.0551	0.0001	0.0002	0.0000	
5	3	0.0245	0.0016	0.0028	0.0000	
6	3	0.0043	0.0008	0.0014	0.0000	
7	3	0.0010	0.0006	0.0010	0.0000	

Method	vs	Side	Stat.	0.05	0.01	0.001 Prob.
Bartlett test			0	9.5766	12.5916	<16.8119 22.4577 0.1437

Method	vs	Side	Stat.	0.0500	0.0100	0.0010 Prob.
1-way ANOVA			0	686.6261	>2.8477	4.4558 7.4358 0.0000

Method	vs	Side	Stat.	0.05	0.01	0.001 Prob.
Dunnett	1 vs 2		2	2.3431	2.9124	3.7633 999.9900 0.1387
Dunnett	1 vs 3		2	5.0172	>2.9124	>3.7633 999.9900 0.00095518 **
Dunnett	1 vs 4		2	4.6097	>2.9124	>3.7633 999.9900 0.00202097 **
Dunnett	1 vs 5		2	18.7701	>2.9124	>3.7633 999.9900 1.3709E-06 **
Dunnett	1 vs 6		2	34.1783	>2.9124	>3.7633 999.9900 1.3708E-06 **
Dunnett	1 vs 7		2	36.7506	>2.9124	>3.7633 999.9900 1.3708E-06 **