

環境省 殿

## 最 終 報 告 書

2, 4, 6-トリメチルアニリンの  
ヒメダカ (*Oryzias latipes*) に対する急性毒性試験

(試験番号: No. 2007-生54)

2009年 6月23日作成

株式会社   
センター

原本と相違ないことを証明する。

2009年 6月24日

試験責任者 

# 陳 述 書

株式会社 クレハ分析センター

試験委託者： 環境省

表題           ： 2, 4, 6-トリメチルアニリンのヒメダカ (*Oryzias latipes*) に対する  
急性毒性試験

試験番号    ： No. 2007-生54

本試験は、

厚生労働省医薬食品局長、経済産業省製造産業局長、環境省総合環境政策局長連名通知「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」（薬食発第 1121003号、平成15・11・17製局第 3 号、環保企発第 031121004 号、平成15年11月21日、平成17年4月1日最終改正）

厚生労働省医薬食品局長、経済産業省製造産業局長、環境省総合環境政策局長連名通知「新規化学物質等に係る試験の方法について」（薬食発第 1121002 号、平成15・11・13 製局第 2 号、環保企発第 031121002 号、平成15年11月21日、平成18年11月20日一部最終改正）

に従って実施した。

本報告書の試験データの正確性および有効性について確認した。

2009年 6月23日

試験責任者



2009年 6月23日

確認： 運営管理者



# 信 頼 性 保 証 書

株式会社 クレハ分析センター

試験委託者： 環境省

表題           :   2, 4, 6-トリメチルアニリンのヒメダカ (*Oryzias latipes*) に対する  
急性毒性試験

試験番号   :   No. 2007-生54

## 記

	監査, 査察実施日	報 告 日	
		運 営 管 理 者	試 験 責 任 者
試験計画書の監査	2007年12月19日	2007年12月19日	2007年12月19日
実験状況の監査, 査察	2008年 1月28日	2008年 1月28日	2008年 1月28日
	2008年 2月 1日	2008年 2月 1日	2008年 2月 1日
実験終了後の監査	2008年 2月12日	2008年 2月12日	2008年 2月12日
組織体制の監査	2008年 2月20日	2008年 2月20日	2008年 2月20日
施設・設備の査察 試験用機器等 施設, 設備等 試験系	2008年 2月20日	2008年 2月20日	2008年 2月20日
試験報告書の監査	2009年 6月23日	2009年 6月23日	2009年 6月23日

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確認した。

2009年 6月23日

信頼性保証部門責任者

:

## 試験実施概要

1. 表題 : 2, 4, 6-トリメチルアニリンのヒメダカ (*Oryzias latipes*) に対する急性毒性試験
2. 試験目的 : ヒメダカ (*Oryzias latipes*) を被験物質に 96 時間暴露し、死亡率を測定することにより、ヒメダカに対する被験物質の毒性を明らかにする。
3. 試験法ガイドライン :

本試験は、厚生労働省医薬食品局長、経済産業省製造産業局長、環境省総合環境政策局長連名通知「新規化学物質等に係る試験の方法について」(薬食発第 1121002 号、平成15・11・13製局第 2 号、環保企発第 031121002 号、平成15年11月21日、平成18年11月20日一部最終改正)に従って実施した。
4. 適用 G L P : 本試験は、厚生労働省医薬食品局長、経済産業省製造産業局長、環境省総合環境政策局長連名通知「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」(薬食発第 1121003 号、平成15・11・17製局第 3 号、環保企発第 031121004 号、平成15年11月21日、平成17年4月1日最終改正)に従って実施した。
5. 試験委託者  
名称 : 環境省  
所在地 : 〒100-8975 東京都千代田区霞が関一丁目 2-2
6. 試験受託者  
名称 : 株式会社 クレハ分析センター  
本社所在地 : 〒974-8232 福島県いわき市錦町落合 1 6 番地  
代表者 : XXXXXXXXXX
7. 試験施設  
実施施設名 : 株式会社 クレハ分析センター  
所在地 : 〒974-8232 福島県いわき市錦町落合 1 6 番地

8. 試験関係者：

試験責任者	██████████	(生物試験室)
試験担当者	██████████	(生物試験担当者)
	██████████	(生物試験担当者)
	██████████	(濃度分析責任者)
	██████████	(濃度分析担当者)

9. 試験期間：

試験開始日	2007年12月19日
実験開始日	2008年 1月15日
(暴露期間	2008年 1月28日～2008年 2月 1日)
実験終了日	2008年 2月 4日
試験終了日	2009年 6月23日

## 目 次

	頁
要 旨.....	1
1 被験物質.....	3
1.1 名称、構造式および物理化学的性状.....	3
1.2 供試試料.....	3
1.3 被験物質の同一性の確認と保管方法および保管条件下での安定性.....	4
2 供試生物.....	4
3 試験方法.....	5
3.1 試験条件.....	5
3.2 試験用水.....	5
3.3 試験容器および恒温槽等.....	5
3.4 被験物質の溶解性確認.....	5
3.5 試験濃度の設定.....	6
3.6 試験溶液の調製（用時調製）.....	6
3.7 試験溶液中の被験物質濃度分析.....	6
3.8 試験操作.....	6
4 結果の算出.....	7
5 結果および考察.....	8
5.1 試験成績の信頼性に影響をおよぼしたと思われる環境要因.....	8
5.2 試験用水に対する被験物質の溶解性.....	8
5.3 試験溶液中の被験物質濃度.....	8
5.4 50 % 死亡濃度 (LC <sub>50</sub> ).....	8
5.5 0 % 死亡最高濃度、100 % 死亡最低濃度および最大無影響濃度.....	8
5.6 毒性症状.....	9
5.7 試験溶液の水温、溶存酸素濃度および pH.....	9
5.8 試験計画書からの逸脱の有無.....	10
6 保管.....	10
Table 1 ～ 8.....	11
Figure 1.....	15
付属資料－1 試験用水の水質.....	16
付属資料－2 予備試験の結果.....	18
付属資料－3 試験溶液の分析法.....	20
付属資料－4 統計解析.....	25

## 要 旨

試験委託者 環境省

表 題 2, 4, 6-トリメチルアニリンのヒメダカ(*Oryzias latipes*)に対する  
急性毒性試験

試験番号 No. 2007-生54

### 試験法ガイドライン

本試験は、厚生労働省医薬食品局長、経済産業省製造産業局長、環境省総合環境政策局長連名通知「新規化学物質等に係る試験の方法について」(薬食発第1121002号、平成15・11・13製局第2号、環保企発第031121002号、平成15年11月21日、平成18年11月20日一部最終改正)に従って実施した。

- 1) 被験物質 : 2, 4, 6-トリメチルアニリン
- 2) 暴露方式 : 半止水式 (48 時間後に試験溶液の全量を交換)
- 3) 供試生物 : ヒメダカ(*Oryzias latipes*)
- 4) 暴露期間 : 96 時間
- 5) 試験濃度 (設定値) : 対照区, 10, 18, 32, 42, 56, 75, 100 mg/L  
公比 ; 変則公比 10 ~ 32 mg/L : 公比 1.8  
32 ~ 100 mg/L : 公比 1.3
- 6) 試験溶液量 : 5 L/容器
- 7) 連数 : 1 容器/試験区
- 8) 供試生物数 : 10 尾/試験区
- 9) 試験温度 : 24±1 °C
- 10) 照明 : 室内光、16 時間明/8 時間暗
- 11) 給餌 : 無給餌
- 12) 通気 : なし
- 13) pH : 試験溶液の pH 調整は行わなかった
- 14) 分析法 : HPLC 法

## 結 果

予備的な検討において、被験物質の軽度の揮散性が認められたことから、密閉系で試験を行った。

### 1) 試験溶液中の被験物質濃度

暴露期間中の被験物質濃度の変動は分析誤差が主な原因と考えられたことから、各影響濃度の算出に当たっては、暴露開始時、48 時間換水前後および暴露終了時の測定値の算術平均値を採用した。

### 2) 50 % 死亡濃度 ( $LC_{50}$ )

24 時間  $LC_{50}$ : 61 mg/L ( 95 % 信頼限界 52 ~ 71 mg/L ) Binomial

48 時間  $LC_{50}$ : 61 mg/L ( 95 % 信頼限界 52 ~ 71 mg/L ) Binomial

72 時間  $LC_{50}$ : 61 mg/L ( 95 % 信頼限界 52 ~ 71 mg/L ) Binomial

96 時間  $LC_{50}$ : 55 mg/L ( 95 % 信頼限界 49 ~ 65 mg/L ) Logit



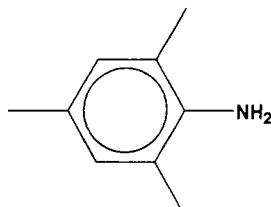
## 1 被験物質

### 1.1 名称、構造式および物理化学的性状

化学物質等の名称 : 2, 4, 6-トリメチルアニリン

CAS 番号\* : 88-05-1

構造式 :



分子式\* :  $C_9H_{13}N$

分子量\* : 135.21

蒸気圧\* : 0.0669 mmHg (25°C)

水溶解度\* : 617 mg/L (25°C)

ヘンリー定数\* :  $2.68E-006 \text{ atm} \cdot \text{m}^3/\text{mole}$

酸解離定数(pKa)\* : 4.38 (25°C)

1-オクタノール/水分配係数\* : 2.72

融点\* : -5°C

沸点\* : 232.5°C

外観\*\* : うすい黄色～赤みの黄色の透明液体

安定性\*\* : 保管中、徐々に着色することがある

溶媒に対する溶解性\*\* : 記載なし

### 1.2 供試試料

入手先 : [REDACTED]

入手量 : 25 mL × 4本 (全て同一ロット)

ロット番号\*\*\* : LAUTB

純度\*\*\* : 99.0 % (GC)

不純物の名称および含有率\*\*\* : 記載なし

入手日 : 2007年10月29日

### [出典]

\* : SRC PhysProp Database

\*\* : [REDACTED]「製品安全データシート」(作成・改定日2006年 8月30日)

\*\*\* : [REDACTED]「試験成績書」(2007年10月18日)

### 1.3 被験物質の同一性の確認と保管方法および保管条件下での安定性

被験物質は当施設の被験物質保管用冷蔵庫において遮光・密閉して保管した。

入手した被験物質の赤外吸収スペクトルを測定し、公的データ\*ならびに官能基のリストと照合して同一性を確認した。

実験終了後にも赤外吸収スペクトルを測定し、実験開始前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から、被験物質は実験期間中安定であったと判断した。

\*：独立行政法人 産業技術総合研究所「有機化合物スペクトルデータベース (SDBS)」

## 2 供試生物

- 1) 和名 : ヒメダカ
- 2) 学名 : *Oryzias latipes*
- 3) 全長 : 平均 2.6 cm (2.3 ~ 2.8 cm), n=10
- 4) 体重 : 平均 0.17 g (0.12 ~ 0.22 g), n=10
- 5) 入手先 : 自家繁殖
- 6) ロット番号 : FJ07B3
- 7) 感受性の確認 : 基準物質(硫酸銅(Ⅱ)五水和物, 試薬特級)による本ロットの96時間 50 % 死亡濃度(LC<sub>50</sub>)は 0.32 mg/L(無水物換算)(暴露期間: 2007年 10月22日~10月26日)であった。当施設における1997年12月以降の LC<sub>50</sub>は  $\bar{X}$  = 0.30 mg/L、S.D. = 0.10 mg/L、n= 31 であった。
- 8) じゅん化期間 : 2007年10月 2日 ~ 2008年 1月28日(10ヶ月齢)  
じゅん化期間中の連続した 7 日間の死亡率は 0.7 % で、試験には肉眼的に健康で正常な個体を使用した(じゅん化条件を以下に示す)。

### じゅん化条件

- 1) 飼育水 : 試験用水 (3.2項を参照)
- 2) 飼育方法 : 流水式
- 3) 水温 : 24±1 °C
- 4) 照明 : 室内光、16 時間明/8 時間暗
- 5) 餌 : テトラミン (メーカー: ㈱テトラ社)
- 6) 給餌量 : 魚体重の約 2 %/日 (暴露開始の 24 時間前からは無給餌)

### 3 試験方法

#### 3.1 試験条件

- 1) 暴露方式 : 半止水式 (48 時間後に試験溶液の全量を交換) (密閉系)
- 2) 暴露期間 : 96 時間
- 3) 試験溶液量 : 5 L/容器
- 4) 連数 : 1 容器/試験区
- 5) 供試生物数 : 10 尾/試験区
- 6) 通気 : なし
- 7) 試験温度 :  $24 \pm 1$  °C
- 8) 照明 : 室内光、16 時間 明/8 時間 暗
- 9) 給餌 : 無給餌
- 10) pH : 試験溶液の pH 調整は行わなかった

#### 3.2 試験用水

脱塩素水 (給水施設の水を活性炭処理で残留塩素等を除去した後、空気による通気処理を行ったもの) を使用した。試験用水の主な水質は、硬度が 31 mg/L ( $\text{CaCO}_3$  換算)、pH が 7.9 であった (暴露開始時)。残留塩素は、0.01 mg/L 未満であることを確認した。

また、2007年 8月29日の試験用水の分析結果を付属資料-1 に示した。

#### 3.3 試験容器および恒温槽等

- 1) 試験容器 : 5 L 容ねじ口瓶 (密閉容器) (柴田科学器械工業)
- 2) 恒温槽 : 恒温器 ラボサーモ LH-2000 (アドバンテック)
- 3) 水温計 : ガラス製水銀温度計
- 4) 溶存酸素計 : B-505 (飯島電子工業)
- 5) pH 計 : HM-30 V (東亜ディーケーケー)

#### 3.4 被験物質の溶解性確認

被験物質の試験用水に対する溶解性は、フラスコ攪拌法で確認した。

被験物質の水溶解度の文献値が 617 mg/L (25°C) であることから、試験用水を用いて 200 mg/L 溶液を調製後、試験温度 (24 °C) で 30 分間攪拌し、目視により溶解した状態であることを確認した。さらに、この調製液を 15 分間静置し、中層の一部を採取して HPLC 法により被験物質濃度を測定した。

### 3.5 試験濃度の設定

公比 3.2 での予備試験の結果(付属資料-2)、96 時間死亡率が 32 mg/L 区で 0 % (ただし、遊泳異常を認めた)、100 mg/L 区で 100 % であったことを基に、10 ~ 32 mg/L 区を公比 1.8、32 ~ 100 mg/L 区を公比 1.3 の変則公比により、10, 18, 32, 42, 56, 75, 100 mg/L 区および対照区を設定した。

### 3.6 試験溶液の調製 (用時調製)

1800 mgの被験物質を 10 Lのねじ口瓶に秤り入れ、試験用水で 9 L とした。これをマグネチックスターラーを用いて試験温度 (24 °C) で 30 分間攪拌し、15分間静置して 200 mg/L の試験原液とした(無色透明)。

この試験原液の 250, 450, 800, 1050, 1400, 1880, 2500 mL をそれぞれ試験容器に量り入れ、試験用水で 5 L とし、10, 18, 32, 42, 56, 75, 100 mg/L 区の試験溶液とした(全て無色透明)。

対照区には被験物質を加えない試験用水を用いた。

### 3.7 試験溶液中の被験物質濃度分析

暴露期間中の被験物質濃度の測定は、換水前後で 2 セット実施した。

暴露開始時、48 時間換水前後、および暴露終了時に各試験容器の中層より試験溶液を採取し、HPLC 法により被験物質濃度を測定した。

試験溶液の分析に際しては、標準溶液の測定を行い、そのピーク面積(カウント数)から定量した。

詳細は付属資料-3 試験溶液の分析法 (測定条件、検量線、添加回収率、保存安定性、定量下限値、検出限界値等) に示した。

### 3.8 試験操作

供試魚は乱数を用いて各試験区に無作為に割り付け、試験容器中に 1 試験区当り 10 尾投入して 2 日間の容器じゅん化を行った。

暴露開始前に、供試魚と同水槽でじゅん養した魚 10 尾の体重および全長を測定した後、魚網を用いて供試魚を各試験区の試験溶液に投入し、その時点を暴露開始時とした。

水温、溶存酸素濃度、pH は暴露開始時および 24 時間毎に測定 (換水時には換水前後にも測定) した。暴露期間中給餌は行わなかった。

暴露開始時、3、6、24、48、72、および 96 時間後に死亡個体数、ならびに観察された毒性の徴候あるいは異常の有無を記録した。死亡個体を発見した場合は、水質の悪化が起こらないよう速やかに取り除いた。

一般的な症状と定義を表 1 に記した。

表1 一般的な症状と定義

分類	症状	症状の定義			
死亡	死亡	観察可能な動き（例えば鰓蓋の動きなど）がなく、尾柄部に触れて反応がない状態。			
重篤	遊泳不能	鰓蓋のみが動いているが、遊泳等の運動が停止、または極度の異常を示している状態（仮死、横臥、横転等と称された症状が相当する）。			
異常	異常遊泳	正常ではない異常行動を示す状態。以下の症状が含まれる。 <ul style="list-style-type: none"><li>・上層遊泳（鼻上げを含む）</li><li>・平衡失調[平衡感覚が失われており、背泳、スパイラル遊泳（鉛直方向）、コークスクリュー遊泳（水平方向）等を示している。]</li><li>・方向不定遊泳（方向感覚がなく遊泳方向が定まらない）</li><li>・過活発（活動量が増加している。興奮、狂奔等）</li><li>・不活発（活動量が低下している）</li><li>・痙攣</li></ul>			
	外見異常	正常ではない外見を示す状態。表面に関する異常と形態に関する異常の2つがある。			
		表面	体色	明化、暗化	
			体表面	出血(内出血も含む) びらん(ただれる) 粘液異常(粘液過剰分泌、粘液凝固等)	
				鱗	立鱗(鱗が逆立つ) 脱鱗
			鰭	欠損	
	形態	背曲がり(骨折を含む) 眼球異常(眼球突出等)			
	呼吸異常	正常ではないが、鰓蓋の動きを示す状態。増加または減少がある。			
	その他	上記以外の毒性症状			
正常	正常	遊泳行動、外見等に異常が見られない状態。			

#### 4 結果の算出

各濃度区の死亡個体数と供試個体数(10尾)から死亡率を求め、24, 48, 72時間目はBinomial法(死亡率0%と100%の実測濃度の幾何平均値)により、96時間目はLogit法により50%死亡濃度(LC<sub>50</sub>)を算出し、同時に95%信頼限界を算出した。

また、供試魚の死亡率が0%の最高濃度(0%死亡最高濃度)、死亡率が100%の最低濃度(100%死亡最低濃度)および被験物質による影響が認められなかった最高濃度(最大無影響濃度)を算出した。

## 5 結果および考察

### 5.1 試験成績の信頼性に影響をおよぼしたと思われる環境要因

認められなかった。

### 5.2 試験用水に対する被験物質の溶解性

フラスコ攪拌法により調製した 200 mg/L 溶液が溶解した状態であることを目視で確認した後、この調製液を15 分間静置し、中層の一部を採取して、被験物質濃度を HPLC 法により測定した。測定結果は 197 mg/L であった。

### 5.3 試験溶液中の被験物質濃度

暴露開始時、48 時間後換水前後および暴露終了時に試験溶液中の被験物質濃度を測定した。その結果を Table 1 に示した。

暴露期間中に見られた濃度変動は測定誤差によるものと判断し、各影響濃度（50 % 死亡濃度、0 % 死亡最高濃度、100 % 死亡最低濃度）の算出に当たっては暴露開始時、48 時間換水前後、暴露終了時の算術平均値を採用した。

### 5.4 50 % 死亡濃度 ( $LC_{50}$ )

各観察時における死亡率を Table 2 に、50 % 死亡濃度 ( $LC_{50}$ ) を Table 3 に示した。また、各観察時間の濃度－死亡率について、Figure 1 に示した。

なお、対照区の死亡率は 0 % であり、試験成立条件を満たした。

96 時間 50 % 死亡濃度を求めるにあたり、入力に用いた観察点は対照区を含む全試験区（その中で 32 ～ 100 mg/L 区の値により自動算出）で、結論を以下に示した。

24 時間 50 % 死亡濃度 ( $LC_{50}$ ): 61 mg/L (95 % 信頼限界 52 ～ 71 mg/L) Binomial

48 時間 50 % 死亡濃度 ( $LC_{50}$ ): 61 mg/L (95 % 信頼限界 52 ～ 71 mg/L) Binomial

72 時間 50 % 死亡濃度 ( $LC_{50}$ ): 61 mg/L (95 % 信頼限界 52 ～ 71 mg/L) Binomial

96 時間 50 % 死亡濃度 ( $LC_{50}$ ): 55 mg/L (95 % 信頼限界 49 ～ 65 mg/L) Logit

### 5.5 0 % 死亡最高濃度、100 % 死亡最低濃度および最大無影響濃度

0 % 死亡最高濃度、100 % 死亡最低濃度および最大無影響濃度を Table 4 および以下に示した。

96 時間 0 % 死亡最高濃度 : 39 mg/L

96 時間 100 % 死亡最低濃度 : 71 mg/L

96 時間 最大無影響濃度 : 17 mg/L

## 5.6 毒性症状

暴露期間中に観察された毒性症状を表2 および Table 5 に示した。

表2. 暴露期間中の観測結果

濃度区	区分	観察時間											
		3 Hours		6 Hours		24 Hours		48 Hours		72 Hours		96 Hours	
対照区	死亡 (累積)	0		0		0		0		0		0	
	正常	10		10		10		10		10		10	
10 mg/L	死亡 (累積)	0		0		0		0		0		0	
	重篤	0		0		0		0		0		0	
	異常	0		0		0		0		0		0	
	正常	10		10		10		10		10		10	
18 mg/L	死亡 (累積)	0		0		0		0		0		0	
	重篤	0		0		0		0		0		0	
	異常	0		0		0		0		0		0	
	正常	10		10		10		10		10		10	
32 mg/L	死亡 (累積)	0		0		0		0		0		0	
	重篤	0		0		0		0		0		0	
	異常	4	AS 4	10	AS 10	7	AS 7	6	AS 6	8	AS 8	8	AS 8
	正常	6		0		3		4		2		2	
42 mg/L	死亡 (累積)	0		0		0		0		0		0	
	重篤	0		0		0		0		0		0	
	異常	10	AS 10	10	AS 10	10	AS 10	10	AS 10	10	AS 10	10	AS 10
	正常	0		0		0		0		0		0	
56 mg/L	死亡 (累積)	0		0		0		0		0		3	
	重篤	4	IS 4	3	IS 3	3	IS 3	3	IS 3	8	IS 8	5	IS 5
	異常	6	AS 6	7	AS 7	7	AS 7	7	AS 7	2	AS 2	2	AS 2
	正常	0		0		0		0		0		0	
75 mg/L	死亡 (累積)	1		3		10		10		10		10	
	重篤	8	IS 8	6	IS 6	0		0		0		0	
	異常	1	AS 1	1	AS 1	0		0		0		0	
	正常	0		0		0		0		0		0	
100 mg/L	死亡 (累積)	10		10		10		10		10		10	
	重篤	0		0		0		0		0		0	
	異常	0		0		0		0		0		0	
	正常	0		0		0		0		0		0	

AS : 異常遊泳 (abnormal swimming)

IS : 遊泳不能 (impossible to swim)

#### 5.7 試験溶液の水温、溶存酸素濃度および pH

試験溶液の水温を Table 6、溶存酸素濃度を Table 7、pH を Table 8 に示した。

96 時間の暴露期間中において、水温は 24.0 ～ 24.2 °C の範囲であり、暴露期間中の変動は 1 °C 以内であった。

溶存酸素濃度は 7.3 ～ 8.2 mg/L の範囲であり、すべての試験区で飽和溶存酸素濃度の 60 % 以上が維持され(24.0 °C の飽和溶存酸素濃度 : 8.25 mg/L)、試験成立条件を満たした。

pH は 7.4 ～ 7.9 の範囲で、暴露期間中の変動は 1.0 以内であった。

#### 5.8 試験計画書からの逸脱の有無

試験計画書からの逸脱は無かった。

### 6 保管

試験に関する下記の記録および試料は、当施設の資料保管施設に保管する。

- 1) 主計画表
- 2) 試験計画書、生データおよび最終報告書
- 3) 信頼性保証部門によって実施された監査または査察の記録
- 4) 職員の資格、訓練、経験および職務分掌の記録
- 5) 機器類の保守点検および校正の記録および報告書
- 6) コンピュータ化されたシステムの有効性確認の記録
- 7) 全標準操作手順書の経時的ファイル
- 8) 環境モニター記録
- 9) 被験物質、対照物質
- 10) その他の資料

以上



Table 1. Measured Concentration of the Test Substance in Test Solutions

Nominal Concentration (mg/L)	(Semi-Static Condition)							
	Measured Concentration, mg/L (Percent of Nominal)							
	0 Hour		48 Hours				96 Hours	
	new		old		new		old	
Control	<0.1	( - )	<0.1	( - )	<0.1	( - )	<0.1	( - )
10	9.73	( 97)	9.93	( 99)	9.49	( 95)	9.48	( 95)
18	17.5	( 97)	17.8	( 99)	17.1	( 95)	16.6	( 92)
32	30.3	( 95)	31.6	( 99)	30.0	( 94)	29.1	( 91)
42	39.6	( 94)	41.0	( 98)	39.0	( 93)	37.3	( 89)
56	50.9	( 91)	54.3	( 97)	52.5	( 94)	49.7	( 89)
75	70.5	( 94)	71.4	( 95)	D	( - )	D	( - )
100	94.5	( 95)	95.9	( 96)	D	( - )	D	( - )

new : Freshly prepared test solutions

old : Test solutions after 48 hours exposure

a : Arithmetic mean

- : Not calculated

D : All fish were dead at this observation time

Table 2. The Numbers of Dead Fish (Mortality)

Nominal Concentration (mg/L)	Mean <sup>a</sup> Measured Concentration (mg/L)	(Semi-Static Condition)			
		Cumulative Mortality (Percent Mortality)			
		24 Hours	48 Hours	72 Hours	96 Hours
Control	-	0( 0)	0( 0)	0( 0)	0( 0)
10	9.66	0( 0)	0( 0)	0( 0)	0( 0)
18	17.3	0( 0)	0( 0)	0( 0)	0( 0)
32	30.3	0( 0)	0( 0)	0( 0)	0( 0)
42	39.2	0( 0)	0( 0)	0( 0)	0( 0)
56	51.9	0( 0)	0( 0)	0( 0)	3( 30)
75	71.0	10(100)	10(100)	10(100)	10(100)
100	95.2	10(100)	10(100)	10(100)	10(100)

- : Not calculated

a : Arithmetic mean

Table 3. Calculated LC<sub>50</sub> Values

Exposure Period (Hours)	LC <sub>50</sub> (mg/L)	95 % Confidence Limits (mg/L)	Statistical Method
24	61	52 ~ 71	Binomial
48	61	52 ~ 71	Binomial
72	61	52 ~ 71	Binomial
96	55	49 ~ 65	Logit

Table 4. The Highest Concentration in 0 % Mortality, the Lowest Concentration in 100 % Mortality and No Observed Effect Concentration

Exposure Period (Hours)	Highest Concentration in 0 % Mortality (mg/L)	Lowest Concentration in 100 % Mortality (mg/L)	No Observed Effect Concentration (mg/L)
24	52	71	17
48	52	71	17
72	52	71	17
96	39	71	17

Table 5. Observed Toxic Symptoms

Nominal Concentration (mg/L)	Mean <sup>a</sup> Measured Concentration (mg/L)	Symptoms		
		Observation Time		
		3 Hours	6 Hours	24 Hours
Control	-	N	N	N
10	9.66	N	N	N
18	17.3	N	N	N
32	30.3	N(6) AS(4)	AS(10)	N(3) AS(7)
42	39.2	AS(10)	AS(10)	AS(10)
56	51.9	C(4) AS(6)	C(3) AS(7)	C(3) AS(7)
75	71.0	D(1) C(8) AS(1)	D(3) C(6) AS(1)	D(10)
100	95.2	D(10)	D(10)	D(10)

Nominal Concentration (mg/L)	Mean <sup>a</sup> Measured Concentration (mg/L)	Symptoms		
		Observation Time		
		48 Hours	72 Hours	96 Hours
Control	-	N	N	N
10	9.66	N	N	N
18	17.3	N	N	N
32	30.3	N(4) AS(6)	N(2) AS(8)	N(2) AS(8)
42	39.2	AS(10)	AS(10)	AS(10)
56	51.9	C(3) AS(7)	C(8) AS(2)	D(3) C(5) AS(2)
75	71.0	D(10)	D(10)	D(10)
100	95.2	D(10)	D(10)	D(10)

N : No toxic symptom was observed (Normal)

D : Death

C : Critical (Immobile) 游泳不能

AS : Abnormal swimming 異常游泳

- : Not calculated

a : Arithmetic mean

Table 6. Temperature

Nominal Concentration (mg/L)	Mean <sup>a</sup> Measured Concentration (mg/L)	(Semi-Static Condition)					
		Temperature, °C					
		0 Hour	24 Hours	48 Hours		72 Hours	96 Hours
		new		old	new		old
Control	-	24.0	24.2	24.2	24.0	24.0	24.1
10	9.66	24.0	24.2	24.2	24.0	24.0	24.1
18	17.3	24.0	24.2	24.2	24.0	24.0	24.1
32	30.3	24.0	24.2	24.2	24.0	24.0	24.1
42	39.2	24.0	24.2	24.2	24.0	24.0	24.1
56	51.9	24.0	24.2	24.2	24.0	24.0	24.1
75	71.0	24.0	24.2	D	D	D	D
100	95.2	24.0	24.2	D	D	D	D

new : Freshly prepared test solutions

old : Test solutions after 48 hours exposure

a : Arithmetic mean

- : Not calculated

D : All fish were dead at this observation time

Table 7. Dissolved Oxygen Concentrations

Nominal Concentration (mg/L)	Mean <sup>a</sup> Measured Concentration (mg/L)	(Semi-Static Condition)					
		Dissolved Oxygen Concentration, mg/L					
		0 Hour	24 Hours	48 Hours		72 Hours	96 Hours
		new		old	new		old
Control	-	8.2	7.7	7.5	8.2	7.6	7.4
10	9.66	8.2	7.7	7.5	8.2	7.6	7.3
18	17.3	8.2	7.7	7.5	8.2	7.7	7.4
32	30.3	8.2	7.8	7.6	8.2	7.6	7.3
42	39.2	8.2	7.7	7.5	8.2	7.6	7.4
56	51.9	8.2	7.7	7.5	8.2	7.7	7.5
75	71.0	8.2	7.9	D	D	D	D
100	95.2	8.2	8.1	D	D	D	D

new : Freshly prepared test solutions

old : Test solutions after 48 hours exposure

a : Arithmetic mean

- : Not calculated

D : All fish were dead at this observation time

Table 8. pH Values

Nominal Concentration (mg/L)	Mean <sup>a</sup> Measured Concentration (mg/L)	(Semi-Static Condition)					
		pH					
		0 Hour new	24 Hours	48 Hours		72 Hours	96 Hours
				old	new		old
Control	-	7.9	7.5	7.4	7.9	7.6	7.6
10	9.66	7.9	7.5	7.4	7.9	7.6	7.5
18	17.3	7.9	7.5	7.4	7.9	7.6	7.5
32	30.3	7.9	7.6	7.4	7.9	7.6	7.6
42	39.2	7.9	7.6	7.4	7.9	7.6	7.5
56	51.9	7.9	7.6	7.4	7.9	7.6	7.5
75	71.0	7.9	7.6	D	D	D	D
100	95.2	7.9	7.8	D	D	D	D

new : Freshly prepared test solutions

old : Test solutions after 48 hours exposure

a : Arithmetic mean

- : Not calculated

D : All fish were dead at this observation time

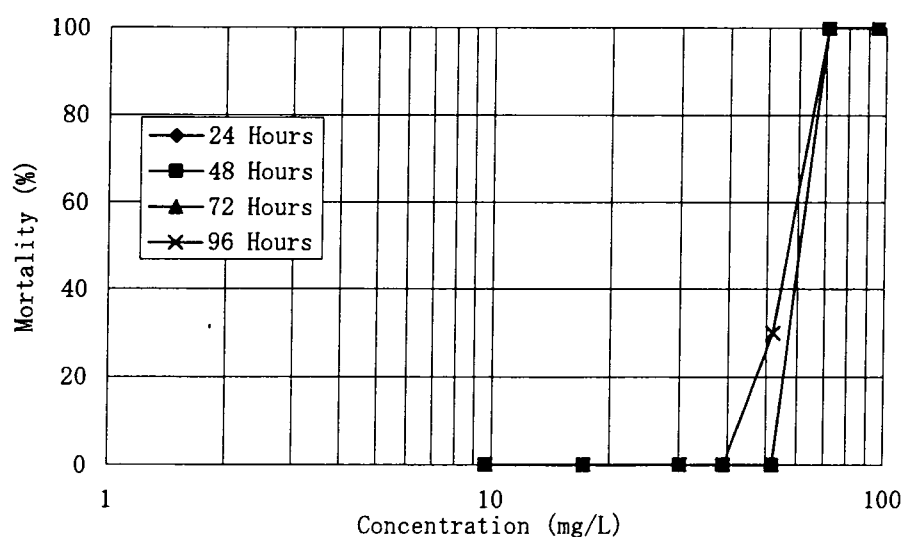


Figure 1. Concentration-Response (Mortality) Curve

## 付 属 資 料 ー 1

試 験 用 水 の 水 質

Table A-1 Water Quality of Dilution Water

Parameter	Concentration
BOD	<0.5 mg/L
COD	1.0 mg/L
Total phosphorus	<0.003 mg/L
pH	7.4 (23.7 °C)
Coliform group bacteria	N.D.
Mercury	<0.0005 mg/L
Copper	<0.01 mg/L
Cadmium	<0.002 mg/L
Zinc	<0.01 mg/L
Lead	<0.005 mg/L
Aluminium	0.03 mg/L
Nickel	<0.005 mg/L
Chromium	<0.05 mg/L
Manganese	<0.02 mg/L
Tin	<0.1 mg/L
Iron	<0.1 mg/L
Cyanide	<0.1 mg/L
Free chlorine	<0.05 mg/L
Bromide	<0.2 mg/L
Fluoride	0.06 mg/L
Sulfide	<0.5 mg/L
Total ammonium	<0.03 mg/L
Arsenic	<0.005 mg/L
Selenium	<0.005 mg/L
Evaporation residue	91 mg/L
Electric conductivity	10.2 mS/m
Total hardness (as CaCO <sub>3</sub> )	33 mg/L
Alkalinity	29 mg/L
Sodium	5.5 mg/L
Potassium	1.5 mg/L
Calcium	10.0 mg/L
Magnesium	2.1 mg/L

Date of measurement: August 29, 2007

## 付 属 資 料 - 2

### 予 備 試 験 の 結 果



Table B-1. The Numbers of Dead Fish (Mortality)  
(Range Finding Test)

Nominal Concentration (mg/L)	(Semi-Static Condition) Cumulative Mortality (Percent Mortality)			
	24 Hours	48 Hours	72 Hours	96 Hours
Control	0/5( 0)	0/5( 0)	0/5( 0)	0/5( 0)
10	0/5( 0)	0/5( 0)	0/5( 0)	0/5( 0)
32	0/5( 0)	0/5( 0)	0/5( 0)	0/5( 0)
100	5/5(100)	5/5(100)	5/5(100)	5/5(100)

Table B-2. Measured Concentration of the Substance in Test Water  
(Range Finding Test)

Nominal Concentration (mg/L)	(Semi-Static Condition) Measured Concentration (mg/L)			
	0 Hour new	48 Hours		96 Hours old
		old	new	
Control	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
10	9.35	9.57	9.44	9.71
32	30.3	31.1	29.8	31.0
100	91.7	95.8	D	D

new : Freshly prepared test solutions

old : Test solutions after 48 hours exposure

D : All fish were dead at this observation time.

Table B-3. Observed Toxic Symptoms  
(Range Finding Test)

Nominal Concentration (mg/L)	(Semi-Static Condition) Toxic Symptoms					
	Observation Time					
	3 Hours	6 Hours	24 Hours	48 Hours	72 Hours	96 Hours
Control	N	N	N	N	N	N
10	N	N	N	N	N	N
32	AS(5)	AS(5)	N(3) AS(2)	AS(5)	AS(5)	AS(5)
100	D(5)	D(5)	D(5)	D(5)	D(5)	D(5)

N : No toxic symptom was observed (Normal)

D : Death

AS : Abnormal swimming 異常遊泳

## 付 属 資 料 ― 3

### 試 験 溶 液 の 分 析 法

## 2, 4, 6-トリメチルアニリン分析法

### 1. 分析方法


#### (1) 分析法の概要

試験溶液（必要に応じ希釈）の一定量を、UV 検出器を備えた高速液体クロマトグラフ（HPLC）に注入し、クロマトグラムおよびピーク面積（カウント数）をデータ処理装置から求める。このピーク面積を用い、標準液の検量線から濃度を求め、希釈率で換算し、試験溶液中の被験物質の濃度を算出する。

#### (2) 装置および器具

a) 高速液体クロマトグラフ	: LC-10A型	島津製作所
b) 分離カラム	: Mightysil RP-18, 150 mm×4.6 mmφ	関東化学
c) カラム恒温槽	: CTO-10A型	島津製作所
d) UV 検出器	: SPD-10A型	島津製作所
e) データ処理装置	: FMV6266V9型	富士通
f) 化学天秤	: AE-240型	メトラー
g) 超音波洗浄器	: BRANSON 型	ヤマト科学
h) メスフラスコ	: 容量 10, 20, 100 mL	柴田科学
i) ビーカー	: 容量 50, 100 mL	柴田科学
j) ホールピペット	: 容量 1, 2, 3, 5, 9, 10 mL	柴田科学
k) メスシリンダー	: 容量 1000 mL	柴田科学

#### (3) 試薬

a) 2, 4, 6-トリメチルアニリン	: 純度 99.0 %, ロット番号 LAUTB	
b) アセトニトリル	: HPLC 用	和光純薬
c) 蒸留水	: HPLC 用	関東化学

#### (4) 試薬の調製

##### a) 溶離液【アセトニトリル/蒸留水(50/50)】

アセトニトリル 500 mL と蒸留水 500 mL をそれぞれメスシリンダーでリザーバービンに量り取る。各溶液は使用前に超音波処理をしながら減圧し、脱気する。低圧グラジェントユニットで、溶離液の混合比率がアセトニトリル/蒸留水 = 50/50(v/v)になるように設定する。

##### b) 被験物質標準原液 (100 mg/L)

被験物質約 10 mg を 100 mL メスフラスコに 0.1 mg の桁まで精秤する。これに蒸留

水を加えて100 mL とする。

秤量した質量から、純度換算を行った上で、正確な被験物質の濃度を算出する。

## (5) 操作

### [前処理]

- a) 必要に応じ検量線の被験物質濃度範囲内に入るように試験溶液を蒸留水で希釈する(2 ～ 20倍)。

### [測定操作]

- b) 「2. HPLC 測定条件」に記載する分析条件で HPLC を作動し、装置を安定させる。
- c) 「3. 検量線の作成」に記載する方法で検量線の標準液を調製する。
- d) 検量線の標準液、必要に応じて希釈した試料溶液の 20  $\mu$ L を HPLC に注入してクロマトグラムおよびピーク面積(カウント数)を得る。
- e) 検量線により濃度を求め、希釈率で換算し、試験溶液の被験物質濃度を算出する。

## 2. HPLC 測定条件

- (1) 分離カラム : Mightysil RP-18, 150 mm $\times$ 4.6 mm  $\phi$
- (2) 恒温槽温度 : 40  $^{\circ}$ C
- (3) 溶離液 : アセトニトリル/蒸留水 (50/50)
- (4) 流量 : 1.0 mL/min [アセトニトリル/蒸留水(50/50)混合溶液として]
- (5) 検出波長 : UV 210 nm
- (6) 注入量 : 20  $\mu$ L

## 3. 検量線の作成

- (1) 被験物質標準原液(99.99 mg/L) 1.0 mL、3.0 mL、9.0 mL をそれぞれ 100 mL メスフラスコに正確に分取し、蒸留水を加えて 100 mL とし、0.9999 mg/L、2.999 mg/L、8.999 mg/L 標準液を調整する。
- (2) 各標準液について 20  $\mu$ L を HPLC に注入し、データ処理装置からクロマトグラムおよびピーク面積(カウント数)を得る。被験物質濃度を縦軸に、ピーク面積を横軸にとり検量線を作成する。この時の回帰式の寄与率( $R^2$ )も算出する。

表1 検量線に使用したデータ例

No.	被験物質濃度 (mg/L)	ピーク面積 ( $\mu\text{V} \cdot \text{sec}$ )
1	0	0
2	0.9999	193014
3	2.999	589904
4	8.999	1726147

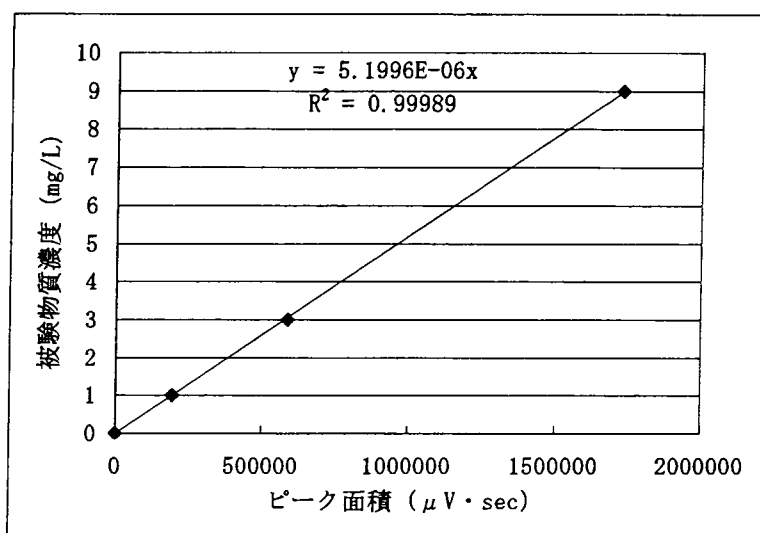


図1 検量線例

#### 4. 添加回収率

被験物質約 100 mg を精秤して試験用水に添加し、1003 mg/L の被験物質溶液を調製した。  
この被験物質溶液を試験用水に添加し、濃度が 1.003 mg/L、10.03 mg/L、100.3 mg/L における回収率を算出した。

結果を表2 に示す。回収率は 96 ～ 98 % であった。

表2 添加回収率

試料濃度 (mg/L)	n	測定値 (mg/L)	測定値平均 (mg/L)	回収率 (%)
1.003	1	0.9642	0.961	96
	2	0.9581		
10.03	1	9.756	9.75	97
	2	9.750		
100.3	1	97.70	97.8	98
	2	97.96		

## 5. 保存安定性

「4. 添加回収率」で調製した 3 濃度の試料溶液 (0.961 mg/L、9.75 mg/L、97.8 mg/L) を、密閉・遮光条件において 2 日間 10 ℃以下(冷蔵庫)で保存し、試料溶液の安定性を確認した。

結果を表3 に示す。2 日間 10 ℃以下保存液の濃度維持率は 95 ～ 98 % であった。

表3 経時変化

開始時測定値 (mg/L)	2日後			
	n	測定値 (mg/L)	測定値平均 (mg/L)	濃度維持率 (%)
0.961	1	0.9198	0.925	96
	2	0.9301		
9.75	1	9.528	9.52	98
	2	9.502		
97.8	1	92.78	92.8	95
	2	92.74		

## 6. 定量下限値および検出限界値

被験物質濃度 0.9909 mg/Lの試料液 20 μLを HPLC に 7 回注入し、得られた測定値の標準偏差値の 10 倍を定量下限値、3 倍を検出限界値とした。

結果を表4 に示す。定量下限値は 0.1 mg/L 、検出限界値は 0.03 mg/Lであった。

表4 定量下限値および検出限界値の算出データ

n	測定値 (mg/L)
1	0.9677
2	0.9632
3	0.9680
4	0.9534
5	0.9434
6	0.9564
7	0.9465
平均値	0.957
標準偏差 ( $\sigma_{n-1}$ )	0.0099

定量下限値 =  $0.0099 \times 10 \approx 0.1 \text{ mg/L}$

検出限界値 =  $0.0099 \times 3 \approx 0.03 \text{ mg/L}$

## 付 属 資 料 ー 4

統 計 解 析 結 果

( EcoTox ver. 2.6 d )

魚類 急性毒性試験

2007-生54\_2,4,6-トリメチルアニリン

ファイル名= 2030004 更新日: 2009/06/04

区	濃度	連	実測数(影響・死亡)				
	mg/L (log)		0	24	48	72	96 hour
1	0 (-)	1	10	0	0	0	0
2	9.66 (0.98)	1	10	0	0	0	0
3	17.3 (1.24)	1	10	0	0	0	0
4	30.3 (1.48)	1	10	0	0	0	0
5	39.2 (1.59)	1	10	0	0	0	0
6	51.9 (1.72)	1	10	0	0	0	3
7	71 (1.85)	1	10	10	10	10	10
8	95.2 (1.98)	1	10	10	10	10	10

[対照に対する] 割合 (%)

区	濃度	影響・死亡			
	mg/L (log)	24	48	72	96 hour
1	9.66 (0.98)	0.00	0.00	0.00	0.00
2	17.3 (1.24)	0.00	0.00	0.00	0.00
3	30.3 (1.48)	0.00	0.00	0.00	0.00
4	39.2 (1.59)	0.00	0.00	0.00	0.00
5	51.9 (1.72)	0.00	0.00	0.00	30.00
6	71 (1.85)	100.00	100.00	100.00	100.00
7	95.2 (1.98)	100.00	100.00	100.00	100.00

EC50計算に用いたデータ (Probit, Logit法)

区	濃度	影響・死亡				
	mg/L (log)	0	24	48	72	96 hour
1	9.66 (0.98)	10.00	—	—	—	—
2	17.3 (1.24)	10.00	—	—	—	—
3	30.3 (1.48)	10.00	—	—	—	0.10
4	39.2 (1.59)	10.00	—	—	—	0.10
5	51.9 (1.72)	10.00	0.10	0.10	0.10	3.00
6	71 (1.85)	10.00	9.90	9.90	9.90	9.90
7	95.2 (1.98)	10.00	—	—	—	9.90

2007-生54\_2,4,6-トリメチルアニリン

魚類 急性毒性試験 観察回数=5 濃度区数=8(mg/L)

繰返し数 = 1, 1, 1, 1, 1, 1, 1, 1

データファイル: 2030004 更新日: 2008/11/19

生物量

濃度	繰返し	0	24	48	72	96	hour
0	(1)	10.000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	
9.66	(1)	10.000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	
17.3	(1)	10.000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	
30.3	(1)	10.000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	
39.2	(1)	10.000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	
51.9	(1)	10.000	0.0000	0.0000	0.0000	3.0000	
71	(1)	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	
95.2	(1)	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	

生物量 (%)



濃度	24	48	72	96	hour
9.66	0.00	0.00	0.00	0.00	
17.3	0.00	0.00	0.00	0.00	
30.3	0.00	0.00	0.00	0.00	
39.2	0.00	0.00	0.00	0.00	
51.9	0.00	0.00	0.00	30.00	
71	100.00	100.00	100.00	100.00	
95.2	100.00	100.00	100.00	100.00	

E(L)C50 計算 収束判定値=0.0001 最大反復回数=50

===== EC50計算ごとの詳細データ =====

===== プロビット関数 =====

●● 24h Effect E(L)C50 計算 収束までの反復回数=2 ●●

◎ デザイン行列

濃度	n	y	y/n	Const.	log10(C)
51.9	10.00	0.100	0.01	1.000	1.715
71	10.00	9.900	0.99	1.000	1.851

◎ 回帰式の適合度の検定は、自由度が<1のためできない

◎ パラメータ推定

パラメータ名	係数( $\theta$ 推定)	標準誤差(SE)	$\theta$ 推定/SE
const	-60.96	21.89	-2.785
log(Conc.)	34.19	12.27	2.787
WALD検定	X2値=7.766	自由度=1	有意確率=0.005

◎ 推定値と残差

濃度	Y	Y推定	残差(度数)	Y/n(P)	$\pi$ 推定	残差(割合)
51.9	0.100	0.100	-6E-7	0.010	0.010	-6E-8
71	9.900	9.900	5.E-7	0.990	0.990	5.E-8

◎ 診断統計量

濃度	Cookの距離	てこ比	逸脱度残差	ピアソン残差	標準化 逸脱度残差	標準化 ピアソン残差
mg/L						
51.9	3.E+15	1.000	-2E-6	-2E-6	-12.35	-12.35
71	2.E+16	1.000	2.E-6	2.E-6	17.33	17.32

===== EC90%、80%、EC50%、20%、10%の推定 =====

log(EC90)	=	1.7457	(95% Range: 1.6431 - 1.7749)
EC90 (mg/L)	=	55.684	(95% Range: 43.968 - 59.558)
log(EC80)	=	1.7586	(95% Range: 1.6681 - 1.8009)
EC80 (mg/L)	=	57.358	(95% Range: 46.571 - 63.225)
log(EC50)	=	1.7832	(95% Range: 1.7159 - 1.8505)
EC50 (mg/L)	=	60.703	(95% Range: 51.987 - 70.881)
log(EC20)	=	1.8078	(95% Range: 1.7637 - 1.9002)
EC20 (mg/L)	=	64.244	(95% Range: 58.033 - 79.464)
log(EC10)	=	1.8207	(95% Range: 1.7887 - 1.9261)
EC10 (mg/L)	=	66.176	(95% Range: 61.469 - 84.357)

●● 48h Effect E(L)C50 計算 収束までの反復回数=2 ●●

◎ デザイン行列

濃度	n	y	y/n	Const.	log10(C)
51.9	10.00	0.100	0.01	1.000	1.715

71 10.00 9.900 0.99 1.000 1.851

◎ 回帰式の適合度の検定は、自由度が<1のためできない

◎ パラメータ推定

パラメータ名	係数( $\theta$ 推定)	標準誤差(SE)	$\theta$ 推定/SE
const	-60.96	21.89	-2.785
log(Conc.)	34.19	12.27	2.787
WALD検定	X2値=7.766 自由度=1 有意確率=0.005		

◎ 推定値と残差

濃度	Y	Y推定	残差(度数)	Y/n(P)	$\pi$ 推定	残差(割合)
51.9	0.100	0.100	-6E-7	0.010	0.010	-6E-8
71	9.900	9.900	5.E-7	0.990	0.990	5.E-8

◎ 診断統計量

濃度		標準化					
mg/L	Cookの距離	てこ比	逸脱度残差	ピアソン残差	逸脱度残差	ピアソン残差	
51.9	3.E+15	1.000	-2E-6	-2E-6	-12.35	-12.35	
71	2.E+16	1.000	2.E-6	2.E-6	17.33	17.32	

EC90%、80%、EC50%、20%、10%の推定		
log(EC90)	= 1.7457	(95% Range: 1.6431 - 1.7749)
EC90(mg/L)	= 55.684	(95% Range: 43.968 - 59.558)
log(EC80)	= 1.7586	(95% Range: 1.6681 - 1.8009)
EC80(mg/L)	= 57.358	(95% Range: 46.571 - 63.225)
log(EC50)	= 1.7832	(95% Range: 1.7159 - 1.8505)
EC50(mg/L)	= 60.703	(95% Range: 51.987 - 70.881)
log(EC20)	= 1.8078	(95% Range: 1.7637 - 1.9002)
EC20(mg/L)	= 64.244	(95% Range: 58.033 - 79.464)
log(EC10)	= 1.8207	(95% Range: 1.7887 - 1.9261)
EC10(mg/L)	= 66.176	(95% Range: 61.469 - 84.357)

●● 72h Effect E(L)C50 計算 収束までの反復回数=2 ●●

◎ デザイン行列

濃度	n	y	y/n	Const.	log10(C)
51.9	10.00	0.100	0.01	1.000	1.715
71	10.00	9.900	0.99	1.000	1.851

◎ 回帰式の適合度の検定は、自由度が<1のためできない

◎ パラメータ推定

パラメータ名	係数( $\theta$ 推定)	標準誤差(SE)	$\theta$ 推定/SE
const	-60.96	21.89	-2.785
log(Conc.)	34.19	12.27	2.787
WALD検定	X2値=7.766 自由度=1 有意確率=0.005		

◎ 推定値と残差

濃度	Y	Y推定	残差(度数)	Y/n(P)	$\pi$ 推定	残差(割合)
51.9	0.100	0.100	-6E-7	0.010	0.010	-6E-8
71	9.900	9.900	5.E-7	0.990	0.990	5.E-8

◎ 診断統計量

濃度		標準化					
mg/L	Cookの距離	てこ比	逸脱度残差	ピアソン残差	逸脱度残差	ピアソン残差	
51.9	3.E+15	1.000	-2E-6	-2E-6	-12.35	-12.35	

71	2. E+16	1. 000	2. E-6	2. E-6	17. 33	17. 32
=====EC90%, 80%, EC50%, 20%, 10%の推定=====						
log(EC90)	=	1. 7457	(95% Range: 1. 6431 - 1. 7749)			
EC90 (mg/L)	=	55. 684	(95% Range: 43. 968 - 59. 558)			
log(EC80)	=	1. 7586	(95% Range: 1. 6681 - 1. 8009)			
EC80 (mg/L)	=	57. 358	(95% Range: 46. 571 - 63. 225)			
log(EC50)	=	1. 7832	(95% Range: 1. 7159 - 1. 8505)			
EC50 (mg/L)	=	60. 703	(95% Range: 51. 987 - 70. 881)			
log(EC20)	=	1. 8078	(95% Range: 1. 7637 - 1. 9002)			
EC20 (mg/L)	=	64. 244	(95% Range: 58. 033 - 79. 464)			
log(EC10)	=	1. 8207	(95% Range: 1. 7887 - 1. 9261)			
EC10 (mg/L)	=	66. 176	(95% Range: 61. 469 - 84. 357)			
収束せず*						

●● 96h Effect E(L)C50 計算 収束までの反復回数=50 収束せず ●●

◎ デザイン行列

濃度	n	y	y/n	Const.	log10(C)
30. 3	10. 00	0. 100	0. 01	1. 000	1. 481
39. 2	10. 00	0. 100	0. 01	1. 000	1. 593
51. 9	10. 00	3. 000	0. 30	1. 000	1. 715
71	10. 00	9. 900	0. 99	1. 000	1. 851
95. 2	10. 00	9. 900	0. 99	1. 000	1. 979

◎ 回帰式の適合度の検定  $\chi^2$ 値(P=0. 05, df=3)= 7. 815 (P=0. 01, df=3)= 11. 34

X2乗 (逸脱度) = 2. 550 < 7. 815 適合する

X2乗 (ピアソン) = 2. 187 < 7. 815 適合する

AIC = 23. 25

◎ パラメータ推定

パラメータ名	係数( $\theta$ 推定)	標準誤差(SE)	$\theta$ 推定/SE
const	-19. 93	6. 220	-3. 204
log(Conc.)	11. 47	3. 587	3. 197
WALD検定	X2値=10. 221	自由度=1	有意確率=0. 001

◎ 推定値と残差

濃度	Y	Y推定	残差(度数)	Y/n(P)	$\pi$ 推定	残差(割合)
30. 3	0. 100	0. 017	0. 083	0. 010	0. 002	0. 008
39. 2	0. 100	0. 489	-0. 389	0. 010	0. 049	-0. 039
51. 9	3. 000	3. 984	-0. 984	0. 300	0. 398	-0. 098
71	9. 900	9. 038	0. 862	0. 990	0. 904	0. 086
95. 2	9. 900	9. 971	-0. 071	0. 990	0. 997	-0. 007

◎ 診断統計量

濃度	Cookの距離	てこ比	逸脱度残差	ピアソン残差	逸脱度残差	ピアソン残差
mg/L						
30. 3	0. 005	0. 172	0. 440	0. 650	0. 484	0. 714
39. 2	0. 094	0. 428	-0. 691	-0. 571	-0. 913	-0. 754
51. 9	0. 865	0. 624	-0. 647	-0. 636	-1. 056	-1. 037
71	2. 431	0. 714	1. 163	0. 925	2. 174	1. 729
95. 2	0. 001	0. 063	-0. 329	-0. 424	-0. 340	-0. 437

=====EC90%, 80%, EC50%, 20%, 10%の推定=====

log(EC90)	=	1. 6259	(95% Range: 1. 4983 - 1. 6260)
EC90 (mg/L)	=	42. 254	(95% Range: 31. 502 - 42. 268)
log(EC80)	=	1. 6642	(95% Range: 1. 5583 - 1. 6890)
EC80 (mg/L)	=	46. 156	(95% Range: 36. 165 - 48. 863)

log (EC50) = 1.7376 (95% Range: 1.6730 - 1.8094)  
 EC50 (mg/L) = 54.653 (95% Range: 47.097 - 64.483)  
 log (EC20) = 1.8110 (95% Range: 1.7877 - 1.9299)  
 EC20 (mg/L) = 64.715 (95% Range: 61.333 - 85.095)  
 log (EC10) = 1.8494 (95% Range: 1.8476 - 1.9929)  
 EC10 (mg/L) = 70.691 (95% Range: 70.412 - 98.372)

# ロジット関数

●● 24h Effect E(L)C50 計算 収束までの反復回数=2 ●●

◎ デザイン行列

濃度	n	y	y/n	Const.	log10(C)
51.9	10.00	0.100	0.01	1.000	1.715
71	10.00	9.900	0.99	1.000	1.851

◎ 回帰式の適合度の検定は、自由度が<1のためできない

◎ パラメータ推定

パラメータ名	係数(θ推定)	標準誤差(SE)	θ推定/SE
const	-120.4	58.94	-2.043
log (Conc.)	67.53	33.03	2.045

WALD検定 X2値=4.181 自由度=1 有意確率=0.041

◎ 推定値と残差

濃度	Y	Y推定	残差(度数)	Y/n(P)	π推定	残差(割合)
51.9	0.100	0.100	2.E-9	0.010	0.010	2.E-10
71	9.900	9.900	-1E-7	0.990	0.990	-1E-8

◎ 診断統計量

濃度 mg/L	Cookの距離	てこ比	逸脱度残差	ピアソン残差	標準化	
					逸脱度残差	ピアソン残差
51.9	1.E+10	1.000	1.E-8	7.E-9	0.045	0.033
71	9.E+12	1.000	-3E-7	-3E-7	-1.140	-1.135

EC90%、80%、EC50%、20%、10%の推定

log (EC90)	= 1.7507	(95% Range: 1.5259 - 1.9754)
EC90 (mg/L)	= 56.322	(95% Range: 33.567 - 94.502)
log (EC80)	= 1.7627	(95% Range: 1.5364 - 1.9890)
EC80 (mg/L)	= 57.901	(95% Range: 34.386 - 97.497)
log (EC50)	= 1.7832	(95% Range: 1.5543 - 2.0122)
EC50 (mg/L)	= 60.703	(95% Range: 35.832 - 102.84)
log (EC20)	= 1.8037	(95% Range: 1.5722 - 2.0353)
EC20 (mg/L)	= 63.642	(95% Range: 37.339 - 108.47)
log (EC10)	= 1.8157	(95% Range: 1.5826 - 2.0489)
EC10 (mg/L)	= 65.426	(95% Range: 38.250 - 111.91)

●● 48h Effect E(L)C50 計算 収束までの反復回数=2 ●●

◎ デザイン行列

濃度	n	y	y/n	Const.	log10(C)
51.9	10.00	0.100	0.01	1.000	1.715
71	10.00	9.900	0.99	1.000	1.851

◎ 回帰式の適合度の検定は、自由度が<1のためできない

◎ パラメータ推定

パラメータ名	係数(θ推定)	標準誤差(SE)	θ推定/SE
--------	---------	----------	--------

const	-120.4	58.94	-2.043
log(Conc.)	67.53	33.03	2.045

WALD検定 X2値=4.181 自由度=1 有意確率=0.041

◎ 推定値と残差

濃度	Y	Y推定	残差(度数)	Y/n(P)	$\pi$ 推定	残差(割合)
51.9	0.100	0.100	2.E-9	0.010	0.010	2.E-10
71	9.900	9.900	-1E-7	0.990	0.990	-1E-8

◎ 診断統計量

濃度	Cookの距離	てこ比	逸脱度残差	ピアソン残差	標準化 逸脱度残差	標準化 ピアソン残差
mg/L						
51.9	1.E+10	1.000	1.E-8	7.E-9	0.045	0.033
71	9.E+12	1.000	-3E-7	-3E-7	-1.140	-1.135

=====EC90%、80%、EC50%、20%、10%の推定=====

log(EC90)	=	1.7507	(95% Range: 1.5259 - 1.9754)
EC90(mg/L)	=	56.322	(95% Range: 33.567 - 94.502)
log(EC80)	=	1.7627	(95% Range: 1.5364 - 1.9890)
EC80(mg/L)	=	57.901	(95% Range: 34.386 - 97.497)
log(EC50)	=	1.7832	(95% Range: 1.5543 - 2.0122)
EC50(mg/L)	=	60.703	(95% Range: 35.832 - 102.84)
log(EC20)	=	1.8037	(95% Range: 1.5722 - 2.0353)
EC20(mg/L)	=	63.642	(95% Range: 37.339 - 108.47)
log(EC10)	=	1.8157	(95% Range: 1.5826 - 2.0489)
EC10(mg/L)	=	65.426	(95% Range: 38.250 - 111.91)

●● 72h Effect E(L)C50 計算 収束までの反復回数=2 ●●

◎ デザイン行列

濃度	n	y	y/n	Const.	log10(C)
51.9	10.00	0.100	0.01	1.000	1.715
71	10.00	9.900	0.99	1.000	1.851

◎ 回帰式の適合度の検定は、自由度が<1のためできない

◎ パラメータ推定

パラメータ名	係数( $\theta$ 推定)	標準誤差(SE)	$\theta$ 推定/SE
const	-120.4	58.94	-2.043
log(Conc.)	67.53	33.03	2.045

WALD検定 X2値=4.181 自由度=1 有意確率=0.041

◎ 推定値と残差

濃度	Y	Y推定	残差(度数)	Y/n(P)	$\pi$ 推定	残差(割合)
51.9	0.100	0.100	2.E-9	0.010	0.010	2.E-10
71	9.900	9.900	-1E-7	0.990	0.990	-1E-8

◎ 診断統計量

濃度	Cookの距離	てこ比	逸脱度残差	ピアソン残差	標準化 逸脱度残差	標準化 ピアソン残差
mg/L						
51.9	1.E+10	1.000	1.E-8	7.E-9	0.045	0.033
71	9.E+12	1.000	-3E-7	-3E-7	-1.140	-1.135

=====EC90%、80%、EC50%、20%、10%の推定=====

log(EC90)	=	1.7507	(95% Range: 1.5259 - 1.9754)
EC90(mg/L)	=	56.322	(95% Range: 33.567 - 94.502)
log(EC80)	=	1.7627	(95% Range: 1.5364 - 1.9890)
EC80(mg/L)	=	57.901	(95% Range: 34.386 - 97.497)

$\log(\text{EC50}) = 1.7832$  (95% Range: 1.5543 - 2.0122)  
 $\text{EC50 (mg/L)} = 60.703$  (95% Range: 35.832 - 102.84)  
 $\log(\text{EC20}) = 1.8037$  (95% Range: 1.5722 - 2.0353)  
 $\text{EC20 (mg/L)} = 63.642$  (95% Range: 37.339 - 108.47)  
 $\log(\text{EC10}) = 1.8157$  (95% Range: 1.5826 - 2.0489)  
 $\text{EC10 (mg/L)} = 65.426$  (95% Range: 38.250 - 111.91)

●● 96h Effect E(L)C50 計算 収束までの反復回数=6 ●●

◎ デザイン行列

濃度	n	y	y/n	Const.	$\log_{10}(C)$
30.3	10.00	0.100	0.01	1.000	1.481
39.2	10.00	0.100	0.01	1.000	1.593
51.9	10.00	3.000	0.30	1.000	1.715
71	10.00	9.900	0.99	1.000	1.851
95.2	10.00	9.900	0.99	1.000	1.979

◎ 回帰式の適合度の検定  $\chi^2$ 値(P=0.05, df=3)= 7.815 (P=0.01, df=3)= 11.34

X2乗 (逸脱度) = 1.025 < 7.815 適合する

X2乗 (ピアソン) = 2.560 < 7.815 適合する

AIC = 21.72

◎ パラメータ推定

パラメータ名	係数 ( $\theta$ 推定)	標準誤差 (SE)	$\theta$ 推定/SE
const	-50.06	17.54	-2.854
$\log(\text{Conc.})$	28.77	10.14	2.836

WALD検定 X2値=8.042 自由度=1 有意確率=0.005

◎ 推定値と残差

濃度	Y	Y推定	残差(度数)	Y/n(P)	$\pi$ 推定	残差(割合)
30.3	0.100	0.006	0.094	0.010	6.E-4	0.009
39.2	0.100	0.143	-0.043	0.010	0.014	-0.004
51.9	3.000	3.258	-0.258	0.300	0.326	-0.026
71	9.900	9.604	0.296	0.990	0.960	0.030
95.2	9.900	9.989	-0.089	0.990	0.999	-0.009

◎ 診断統計量

濃度 mg/L	Cookの距離	てこ比	逸脱度残差	ピアソン残差	標準化	
					逸脱度残差	ピアソン残差
30.3	0.032	0.039	0.618	1.236	0.630	1.261
39.2	0.004	0.316	-0.121	-0.115	-0.146	-0.138
51.9	0.516	0.843	-0.175	-0.174	-0.442	-0.439
71	1.165	0.731	0.571	0.480	1.101	0.926
95.2	0.032	0.072	-0.521	-0.870	-0.541	-0.904

=====EC90%、80%、EC50%、20%、10%の推定=====

$\log(\text{EC90}) = 1.6641$  (95% Range: 1.6074 - 1.7207)  
 $\text{EC90 (mg/L)} = 46.138$  (95% Range: 40.499 - 52.563)  
 $\log(\text{EC80}) = 1.6923$  (95% Range: 1.6017 - 1.7168)  
 $\text{EC80 (mg/L)} = 49.233$  (95% Range: 39.963 - 52.098)  
 $\log(\text{EC50}) = 1.7404$  (95% Range: 1.6923 - 1.8107)  
 $\text{EC50 (mg/L)} = 55.011$  (95% Range: 49.237 - 64.674)  
 $\log(\text{EC20}) = 1.7886$  (95% Range: 1.7829 - 1.9046)  
 $\text{EC20 (mg/L)} = 61.467$  (95% Range: 60.663 - 80.285)  
 $\log(\text{EC10}) = 1.8168$  (95% Range: 1.7550 - 1.8786)  
 $\text{EC10 (mg/L)} = 65.589$  (95% Range: 56.888 - 75.622)

\*\*\*\*\* END \*\*\*\*\*