

環境省 殿

## 最 終 報 告 書

2, 4, 6-トリメチルアニリンの  
オオミジンコ (*Daphnia magna*) に対する急性遊泳阻害試験


(試験番号: No. 2007-生53)

2009年 6月23日作成

株式会社  

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オオミジンコ(*Daphnia magna*)に対する  
急性遊泳阻害試験

試験番号： No. 2007-生53

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オオミジンコ (*Daphnia magna*) に対する  
急性遊泳阻害試験

試験番号： No. 2007-生53

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 2月25日	2008年 2月25日	2008年 2月25日
	2008年 2月27日	2008年 2月27日	2008年 2月27日
実験終了後の監査	2008年 4月 7日	2008年 4月 7日	2008年 4月 7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オオミジンコ(*Daphnia magna*)に対する急性遊泳阻害試験
2. 試験目的 : オオミジンコ(*Daphnia magna*)を被験物質に 48 時間暴露し、対照区に対する遊泳阻害率を測定することにより、ミジンコの遊泳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16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16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 2月25日～2008年 2月27日)
実験終了日	2008年 2月28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.....	5
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.....	7
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.....	7
5.2 試験用水に対する被験物質の溶解性.....	7
5.3 試験溶液中の被験物質濃度.....	7
5.4 50 % 遊泳阻害濃度 (EC <sub>50</sub> ).....	8
5.5 0 % 阻害最高濃度および 100 % 阻害最低濃度.....	8
5.6 試験溶液の水温、溶存酸素濃度、pH および硬度.....	8
5.7 試験計画書からの逸脱の有無.....	9
6 保管.....	9
Table 1 ～ 8.....	10
Figure 1.....	13
付属資料ー 1 試験用水の水質.....	14
付属資料ー 2 予備試験および 1 回目本試験の結果.....	16
付属資料ー 3 試験溶液の分析法.....	19
付属資料ー 4 統計解析結果.....	24

## 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オオミジンコ (*Daphnia magna*) に対する  
急性遊泳阻害試験

試験番号 No. 2007-生53

### 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      | : 止水式  |
| 3) 供試生物      | : オオミジンコ ( <i>Daphnia magna</i> )  |
| 4) 暴露期間      | : 48 時間  |
| 5) 試験濃度(設定値) | : 対照区, 5.6, 10, 12, 14, 18, 32, 56, 100 mg/L<br>公比; 変則公比 5.6 ~ 10 mg/L、18 ~ 100 mg/L: 公比 1.8<br>10 ~ 14 mg/L : 公比 1.2<br>14 ~ 18 mg/L : 公比 1.3 |
| 6) 試験溶液量     | : 100 mL/容器  |
| 7) 連数        | : 4 容器/試験区   |
| 8) 供試生物数     | : 20 頭/試験区 (5 頭/容器)  |
| 9) 試験温度      | : 20±1 °C  |
| 10) 照明       | : 室内光、16 時間明/8 時間暗   |
| 11) 給餌       | : 無給餌  |
| 12) pH       | : 試験溶液の pH 調整は行わなかった   |
| 13) 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

暴露期間中のわずかな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、暴露開始時および暴露終了時の測定値の算術平均値を採用した。

### 2) 24 時間暴露後の結果

50 % 遊泳阻害濃度 ( $EC_{50}$ ) : > 91 mg/L

0 % 阻害最高濃度 : 12 mg/L

100 % 阻害最低濃度 : > 91 mg/L

### 3) 48 時間暴露後の結果

50 % 遊泳阻害濃度 ( $EC_{50}$ ) : 12 mg/L (95 % 信頼限界: 11~12 mg/L), Probit

0 % 阻害最高濃度 : 5.5 mg/L

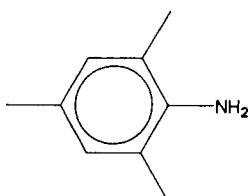
100 % 阻害最低濃度 : 17 mg/L



## 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 : XXXXXXXXXX  
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  
\*\* : XXXXXXXXXX「製品安全データシート」(作成・改定日2006年 8月30日)  
\*\*\* : XXXXXXXXXX「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 : オオミジンコ
- 2) 学名 : *Daphnia magna*
- 3) 入手先 : 独立行政法人国立環境研究所
- 4) 入手日 : 1997年 2月 5日
- 5) 入手後の管理 : 継代飼育(最大飼育期間; 4 週間, 換水頻度; 少なくとも週 3 回)
- 6) 感受性の確認 : 基準物質〔重クロム酸カリウム(二クロム酸カリウム)試薬特級〕による 48 時間 50 % 遊泳阻害濃度 ( $EC_{50}$ ) は 0.80 mg/L (暴露期間: 2007年10月16日～10月18日)。  
当施設における 1999年10月以降の  $EC_{50}$  値は  $\bar{X} = 0.87$  mg/L, S. D. = 0.21 mg/L,  $n = 19$  (M4 人工調製水) であった。
- 7) 親のじゅん化 : じゅん化期間; 2008年 1月29日 ~ 2008年 2月25日 (27 日齢)  
暴露開始前 2 週間の親の死亡率は 0 % で休眠卵および雄の発生は認められなかった(じゅん化条件を以下に示す)。
- 8) 供試齢 : 生後 24 時間齢以内の幼体

### じゅん化条件

- 1) 飼育水 : 試験用水 (3.2項を参照)
- 2) 飼育密度 : 30 頭/2 L 飼育水
- 3) 水温 :  $20 \pm 1$  °C
- 4) 照明 : 室内光、16 時間明/8 時間暗
- 5) 餌 : *Chlorella* sp.
- 6) 給餌量 : ミジンコ 1 頭当たり 0.15 ~ 0.20 mgC (有機炭素) / 日

### 3 試験方法

#### 3.1 試験条件

- 1) 暴露方式 : 止水式 (密閉系)
- 2) 暴露期間 : 48 時間
- 3) 試験溶液量 : 100 mL/容器
- 4) 連数 : 4 容器/試験区
- 5) 供試生物数 : 20 頭/試験区 (5 頭/容器)
- 6) 試験温度 :  $20 \pm 1$  °C
- 7) 照明 : 室内光、16 時間明/8 時間暗
- 8) 給餌 : 無給餌
- 9) pH : 試験溶液の pH 調整は行わなかった

#### 3.2 試験用水

Elendt M4 人工調製水 [OECD GUIDELINES FOR THE TESTING OF CHEMICALS 211: *Daphnia magna* Reproduction Test (Adopted 21 September 1998) に記載してある人工調製水] を使用した。成分表を付属資料-1 に示した。

暴露開始時における試験用水の硬度は 251 mg/L (CaCO<sub>3</sub> 換算)、pH が 8.0 であった。

#### 3.3 試験容器および恒温槽等

- 1) 試験容器 : 110 mL スクリュー管瓶 (密閉容器)
- 2) 恒温槽 : 恒温室
- 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)
- 6) 硬度 : IRIS Advantage/AP (サーモエレクトロン)

#### 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 100 mg/L 溶液を調製後、試験温度 (20 °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)、48 時間遊泳阻害率が 10 mg/L で 0 % (一

部に遊泳異常を認めた)、32 mg/L で 75 % であったことを基に、公比 1.5 で、6.8, 10, 15, 22, 32, 46, 68, 100 mg/L の濃度設定で一回目の本試験を行った。しかし、遊泳阻害率が 6.8 mg/L で 0 %, 10 mg/L で 5 %, 15 ~ 32 mg/L で 90 ~ 95 %, 68 mg/L で 100 % であり、EC<sub>50</sub>値は非常に狭い範囲内にあると考えられた。そのため、公比を 1.8 とし、10 ~ 14 mg/L の間は公比 1.2、14 ~ 18 mg/L の間は公比 1.3 の変則公比を採用し、5.6, 10, 12, 14, 18, 32, 56, 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)

300 mg の被験物質を 3 Lメスフラスコに秤り入れ、試験用水で 3 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(20 ℃)で 30 分間攪拌し、15 分間静置して 100 mg/L の試験原液とした(無色透明)。

この試験原液 56, 100, 120, 140, 180, 320, 560 mL をそれぞれ 1 L のメスフラスコに量り入れ、試験用水で 1 L とし、5.6 ~ 56 mg/L 区 の試験溶液とした。100 mg/L 区については試験原液を使用した(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

暴露開始時には調製した各試験溶液より採取したものについて、暴露終了時には各試験容器の中層より試験溶液を等量ずつを採取し、混合したものについて、HPLC 法により被験物質濃度を測定した。被験物質濃度の分析に際しては、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

試験溶液の水温、溶存酸素濃度、pH を測定後、先端を広口に加工したガラスピペットを用いて供試ミジンコを投入し、その時点を暴露開始時とした。その際、ピペット内の飼育水が、全量で試験溶液量に対して 1 % 以内となるようにし、暴露終了時(暴露開始 48 時間後)まで飼育した。

暴露開始 24 および 48 時間後にミジンコの遊泳阻害の観察を行った。試験容器を穏やかに動かした後、15 秒間の観察期間中に泳がなかった場合は遊泳阻害されたとみなした(ただし、遊泳とは第二触角を使い、水中で自分の体を動かす、もしくは自立的に移動することといい、水底を這って動くものは阻害に含めた。水面で動くものについては、水滴を落とす等

の操作でミジンコを強制的に水中に沈めると遊泳するが、再び浮上した場合には遊泳阻害に含めた。また、正常な遊泳でない場合でも15 秒間の観察中に 1 回でも水中を遊泳した場合は、阻害に含めなかった)。

水温、溶存酸素濃度および pH は、暴露開始時、24 時間後および暴露終了時に、全試験区(ただし各 1 試験容器)の試験溶液について測定した。

また、暴露開始時および暴露終了時に、全試験区の試験溶液(ただし各 1 試験容器)について、ICP 法によりCa、Mg 濃度を測定し、その値より各試験溶液の全硬度を算出した。

#### 4 結果の算出

各試験区のミジンコの遊泳阻害数と供試個体数(20 頭)から遊泳阻害率(%)を求め、Probit 法により48 時間の 50 % 遊泳阻害濃度( $EC_{50}$ )を算出し、同時に 95 % 信頼限界も算出した。

また、ミジンコが遊泳阻害を受けない最高濃度を 0 % 阻害最高濃度とし、全てのミジンコが遊泳阻害を受ける最低濃度を 100 % 阻害最低濃度とした。

統計ソフトは EcoTox ver. 2.6 d を用いた。

#### 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 100 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 101 mg/L であった。

##### 5.3 試験溶液中の被験物質濃度

暴露開始時および暴露終了時に試験溶液中の被験物質濃度を HPLC 法により測定した。その結果を Table 1 に示した。

暴露期間中にわずかに被験物質濃度の低下が見られたが、密閉系であり、揮散による影響がより強く出ると考えられる低濃度での低下割合が高濃度よりも小さいことから、分析誤差が主な原因と考え、各影響濃度(50 % 遊泳阻害濃度、0 % 阻害最高濃度、100 % 阻害最低濃度)の算出に当たっては、暴露開始時および暴露終了時の測定値の算術平均値を採用した。

#### 5.4 50 % 遊泳阻害濃度 ( $EC_{50}$ )

各観察時間における遊泳阻害数を Table 2、50 % 遊泳阻害濃度 ( $EC_{50}$ ) を Table 3 に、濃度－遊泳阻害率曲線を Figure 1 に示した。

48 時間暴露後の対照区の遊泳阻害率は 0 %、水面に浮いたミジンコは 0 % であり、試験成立条件を満たした。

入力に用いた観察点は対照区を含む全試験区（その中で、48 時間後は 10 ～ 14 mg/L 区 24 時間後は 14 ～ 100 mg/L 区の値により自動算出）で、結論を以下に示した。

なお、24 時間 50 % 遊泳阻害濃度は 18 mg/L 区以上の濃度区での遊泳阻害率が 35 ～ 50 % にとどまり、50 % 遊泳阻害濃度が試験最高濃度区の10倍以上の濃度に算出されたため、試験最高濃度区の実測濃度の平均値より大とした。

24 時間 50 % 遊泳阻害濃度 ( $EC_{50}$ ) : > 91 mg/L

48 時間 50 % 遊泳阻害濃度 ( $EC_{50}$ ) : 12 mg/L (95 % 信頼限界: 11～12 mg/L),  
Probit

#### 5.5 0 % 阻害最高濃度および 100 % 阻害最低濃度

0 % 阻害最高濃度および 100 % 阻害最低濃度を Table 4 および以下に示した。

24 時間 0 % 阻害最高濃度 : 12 mg/L

48 時間 0 % 阻害最高濃度 : 5.5 mg/L

24 時間 100 % 阻害最高濃度 : > 91 mg/L

48 時間 100 % 阻害最高濃度 : 17 mg/L

#### 5.6 試験溶液の水温、溶存酸素濃度、pH および硬度

試験溶液の水温を Table 5、溶存酸素濃度を Table 6、pH を Table 7、硬度を Table 8 に示した。

48 時間の暴露期間中の水温は 20.2 ～ 20.6 °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 8.7 ～ 8.9 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(20.0 °C の飽和溶存酸素濃度: 8.84 mg/L)、試験成立条件(3 mg/L 以上)を満たした。

pH は 8.0 で一定であった。また、硬度は 247 ～ 254 mg/L の範囲であった。

#### 5.7 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 Solution

(Static Condition in Closed System)

Nominal Concentration (mg/L)	Measured Concentration ( mg/L ) (Percent of Nominal)				Mean <sup>a</sup> Measured Concentration (mg/L)
	0 Hour		48 Hours		
	new		old		
Control	<0.1	( - )	<0.1	( - )	-
5.6	5.57	( 99)	5.52	( 99)	5.55 (5.545)
10	9.83	( 98)	9.74	( 97)	9.79
12	11.6	( 97)	11.6	( 97)	11.6
14	13.6	( 97)	13.5	( 96)	13.6
18	17.2	( 96)	17.0	( 94)	17.1
32	29.6	( 93)	29.7	( 93)	29.7
56	52.4	( 94)	50.7	( 91)	51.6
100	91.9	( 92)	90.2	( 90)	91.1

new : Freshly prepared test solutions

old : Test solutions after 48 hours exposure

a : Arithmetic mean

- : Not calculated

Table 2. The Numbers of Immobile *Daphnia*

(Static Condition in Closed System)

Nominal Concentration (mg/L)	Mean <sup>a</sup> Measured Concentration (mg/L)	Number of <i>Daphnia</i>	Cumulative Numbers of Immobilized <i>Daphnia</i> (Percent Immobility)									
			24 Hours					48 Hours				
			1	2	3	4	Total	1	2	3	4	Total
Control	-	20	0	0	0	0	0 ( 0)	0	0	0	0	0 ( 0)
5.6	5.55	20	0	0	0	0	0 ( 0)	0	0	0	0	0 ( 0)
10	9.79	20	0	0	0	0	0 ( 0)	0	1	0	0	1 ( 5)
12	11.6	20	0	0	0	0	0 ( 0)	1	1	2	3	7 ( 35)
14	13.6	20	1	1	1	1	4 ( 20)	5	5	4	5	19 ( 95)
18	17.1	20	4	2	1	3	10 ( 50)	5	5	5	5	20 (100)
32	29.7	20	2	3	1	2	8 ( 40)	5	5	5	5	20 (100)
56	51.6	20	3	3	1	2	9 ( 45)	5	5	5	5	20 (100)
100	91.1	20	2	2	2	1	7 ( 35)	5	5	5	5	20 (100)

a : Arithmetic mean

- : Not calculated



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

Exposure Period (Hours)	EC <sub>50</sub> (mg/L)	95 % Confidence Limits (mg/L)	Statistical Method
24	> 91	-	-
48	12	11 ~ 12	Probit

- : Not calculated

Table 4. Highest Concentration in 0 % Immobility and Lowest Concentration in 100 % Immobility

Exposure Period (Hours)	Highest Concentration in 0 % Immobility (mg/L)	Lowest Concentration in 100 % Immobility (mg/L)
24	12	> 91
48	5.5	17

Table 5. Temperature

Nominal Concentration (mg/L)	Mean <sup>a</sup> Measured Concentration (mg/L)	(Static Condition in Closed System)		
		Temperature, °C		
		0 Hour new	24 Hours	48 Hours old
Control	-	20.2	20.4	20.2
5.6	5.55	20.4	20.4	20.2
10	9.79	20.4	20.4	20.2
12	11.6	20.4	20.3	20.2
14	13.6	20.5	20.4	20.4
18	17.1	20.5	20.5	20.5
32	29.7	20.5	20.5	20.5
56	51.6	20.5	20.5	20.6
100	91.1	20.5	20.6	20.6

new : Freshly prepared test solutions

old : Test solutions after 48 hours exposure

a : Arithmetic mean

- : Not calculated

Table 6. Dissolved Oxygen Concentrations

(Static Condition in Closed System)

Nominal Concentration (mg/L)	Mean <sup>a</sup> Measured Concentration (mg/L)	Dissolved Oxygen Concentration, mg/L		
		0 Hour new	24 Hours	48 Hours old
Control	–	8.9	8.8	8.7
5.6	5.55	8.9	8.8	8.7
10	9.79	8.8	8.8	8.8
12	11.6	8.9	8.8	8.8
14	13.6	8.9	8.8	8.7
18	17.1	8.9	8.8	8.7
32	29.7	8.9	8.8	8.8
56	51.6	8.9	8.8	8.8
100	91.1	8.9	8.8	8.8

new : Freshly prepared test solutions

old : Test solutions after 48 hours exposure

a : Arithmetic mean

– : Not calculated

Table 7. pH Values

(Static Condition in Closed System)

Nominal Concentration (mg/L)	Mean <sup>a</sup> Measured Concentration (mg/L)	pH		
		0 Hour new	24 Hours	48 Hours old
Control	–	8.0	8.0	8.0
5.6	5.55	8.0	8.0	8.0
10	9.79	8.0	8.0	8.0
12	11.6	8.0	8.0	8.0
14	13.6	8.0	8.0	8.0
18	17.1	8.0	8.0	8.0
32	29.7	8.0	8.0	8.0
56	51.6	8.0	8.0	8.0
100	91.1	8.0	8.0	8.0

new : Freshly prepared test solutions

old : Test solutions after 48 hours exposure

a : Arithmetic mean

– : Not calculated

Table 8. Total Hardness(as  $\text{CaCO}_3$ )

Nominal Concentration (mg/L)	Mean <sup>a</sup> Measured Concentration (mg/L)	(Static Condition in Closed System) Total Hardness(as $\text{CaCO}_3$ ), mg/L	
		0 Hour new	48 Hours old
Control	-	251	249
5.6	5.55	247	250
10	9.79	253	248
12	11.6	249	252
14	13.6	250	251
18	17.1	254	251
32	29.7	249	250
56	51.6	249	252
100	91.1	252	251

new : Freshly prepared test solutions

old : Test solutions after 48 hours exposure

a : Arithmetic mean

- : Not calculated

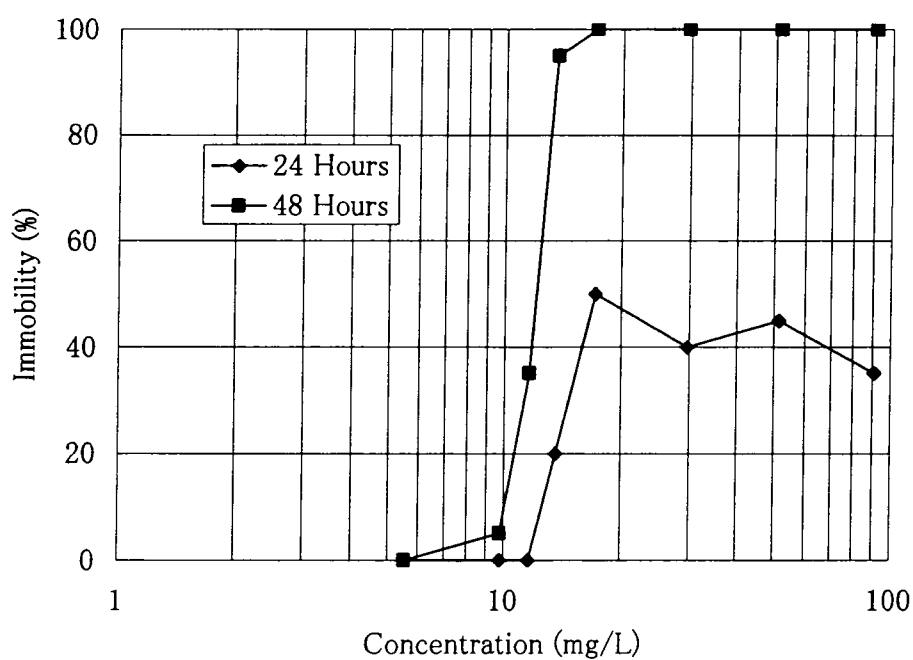


Figure 1. Concentration - Response (Immobility) Curve

## 付 属 資 料 ー 1

試 験 用 水 の 水 質

Table A-1 Elendt M4 Medium Recommended by OECD Guideline No.211 Used as Dilution Water

Macro nutrients	Concentration	Unit
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	293.8	mg /L
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	123.3	mg /L
KCl	5.80	mg /L
$\text{NaHCO}_3$	64.8	mg /L
$\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$	10.0	mg /L
$\text{NaNO}_3$	0.274	mg /L
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0.143	mg /L
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	0.184	mg /L

Trace elements	Concentration	Unit
$\text{H}_3\text{BO}_3$	2.8595	mg /L
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.3605	mg /L
LiCl	0.3060	mg /L
RbCl	0.0710	mg /L
$\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.152	mg /L
NaBr	0.0160	mg /L
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.0630	mg /L
$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.0168	mg /L
$\text{ZnCl}_2$	0.0130	mg /L
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.0100	mg /L
KI	3.25	$\mu\text{g/L}$
$\text{Na}_2\text{SeO}_3$	2.19	$\mu\text{g/L}$
$\text{NH}_4\text{VO}_3$	0.575	$\mu\text{g/L}$
$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	2.50	mg /L
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.9955	mg /L

Vitamines	Concentration	Unit
Thiamine hydrochloride	75.0	$\mu\text{g/L}$
Cyanocobalamine ( $\text{B}_{12}$ )	1.00	$\mu\text{g/L}$
Biotine	0.750	$\mu\text{g/L}$

## 付 属 資 料 ー 2

予 備 試 験 お よ び 1 回 目 本 試 験 の 結 果

Range Finding Test

Table B-1-1. The Numbers of Immobile *Daphnia*

Nominal Concentration (mg/L)	(Static Condition in Closed System)	
	Cumulative Numbers of Immobilized <i>Daphnia</i> (Percent Immobility)	
	24 Hours	48 Hours
Control	0/20( 0)	0/20( 0)
1.0	0/20( 0)	0/20( 0)
3.2	0/20( 0)	0/20( 0)
10	0/20( 0)	0/20( 0)
32	12/20( 60)	15/20( 75)

Table B-1-2. Measured Concentration of the Substance in Test Water

Nominal Concentration (mg/L)	(Static Condition in Closed System)			
	Measured Concentration (mg/L) (Percent of Nominal)			
	0 Hour new		48 Hours old	
Control	<0.1	( - )	<0.1	( - )
1.0	1.01	(101)	1.02	(102)
3.2	3.21	(100)	3.21	(100)
10	9.71	( 97)	9.87	( 99)
32	31.5	( 98)	31.6	( 99)

new : Freshly prepared test solutions

old : Test solutions after 48 hours exposure

- : Not calculated

## Results of 1st Test

Table B-2-1. The Numbers of Immobile *Daphnia*

(Static Condition in Closed System)

Nominal Concentration (mg/L)	Cumulative Numbers of Immobilized <i>Daphnia</i> (Percent Immobility)	
	24 Hours	48 Hours
Control	0/20( 0)	0/20( 0)
6.8	0/20( 0)	0/20( 0)
10	0/20( 0)	1/20( 5)
15	10/20( 50)	19/20( 95)
22	12/20( 60)	18/20( 90)
32	16/20( 80)	19/20( 95)
46	14/20( 70)	19/20( 95)
68	14/20( 70)	20/20(100)
100	16/20( 80)	20/20(100)

Table B-2-2. Measured Concentration of the Substance in Test Water

(Static Condition in Closed System)

Nominal Concentration (mg/L)	Measured Concentration (mg/L) (Percent of Nominal)			
	0 Hour new		48 Hours old	
Control	<0.1	( - )	<0.1	( - )
6.8	6.88	(101)	6.88	(101)
10	10.2	(102)	10.2	(102)
15	15.4	(103)	15.5	(103)
22	22.4	(102)	22.4	(102)
32	31.7	( 99)	32.8	(103)
46	46.1	(100)	46.5	(101)
68	67.1	( 99)	67.5	( 99)
100	99.8	(100)	99.3	( 99)

new : Freshly prepared test solutions

old : Test solutions after 48 hours exposure

- : Not calculated



## 付 属 資 料 ー 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、希釈倍率で換算し、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 mm φ	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。低圧グラジエントユニットで、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 標準液を調製する。
- (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	202711
3	2.999	616479
4	8.999	1788504

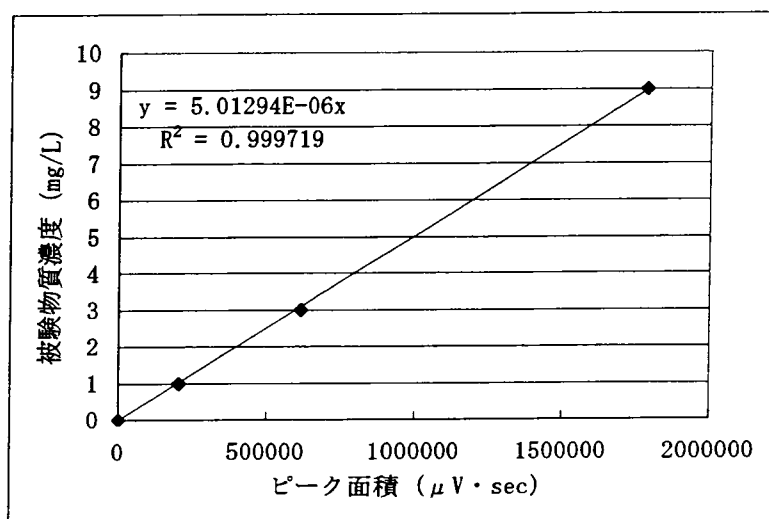


図1 検量線例

#### 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 99 ～ 101 % 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	1.003	1.01	101
	2	1.009		
10.03	1	10.07	10.1	101
	2	10.07		
100.3	1	99.40	99.6	99
	2	99.86		

## 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 (1.01 mg/L、10.1 mg/L、99.6 mg/L) を、密閉・遮光条件において 2 日間 10 °C 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 °C 以下保存液の濃度維持率は 93 ～ 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 (%)
1.01	1	0.9252	0.935	93
	2	0.9457		
10.1	1	9.628	9.67	96
	2	9.702		
99.6	1	97.92	98.0	98
	2	98.02		

## 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 =  $0.0099 \times 10 \approx 0.1$  mg/L

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

## 付 属 資 料 - 4

統 計 解 析 結 果

( EcoTox ver. 2.6 d )

ミジンコ 急性遊泳阻害試験

2007-生53(2回目)

ファイル名= 2020010 更新日: 2008/11/19

区	濃度		連	実測数(影響・死亡)		
	mg/L	( log )		0	24	48 hour
1	0	( - )	1	20	0	0
2	5.55	( 0.74)	1	20	0	0
3	9.79	( 0.99)	1	20	0	1
4	11.6	( 1.06)	1	20	0	7
5	13.6	( 1.13)	1	20	4	19
6	17.1	( 1.23)	1	20	10	20
7	29.7	( 1.47)	1	20	8	20
8	51.6	( 1.71)	1	20	9	20
9	91.1	( 1.96)	1	20	7	20

[対照に対する] 割合 (%)

区	濃度	影響・死亡	
	mg/L ( log )	24	48 hour
1	5.55 ( 0.74)	0.00	0.00
2	9.79 ( 0.99)	0.00	5.00
3	11.6 ( 1.06)	0.00	35.00
4	13.6 ( 1.13)	20.00	95.00
5	17.1 ( 1.23)	50.00	100.00
6	29.7 ( 1.47)	40.00	100.00
7	51.6 ( 1.71)	45.00	100.00
8	91.1 ( 1.96)	35.00	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 hour
1	5.55 ( 0.74)	20.00	—	—
2	9.79 ( 0.99)	20.00	—	1.00
3	11.6 ( 1.06)	20.00	—	7.00
4	13.6 ( 1.13)	20.00	4.00	19.00
5	17.1 ( 1.23)	20.00	10.00	—
6	29.7 ( 1.47)	20.00	8.00	—
7	51.6 ( 1.71)	20.00	9.00	—
8	91.1 ( 1.96)	20.00	7.00	—

2007-生53(2回目)

ミジンコ 急性遊泳阻害試験 観察回数=3 濃度区数=9(mg/L)

繰返し数 = 1, 1, 1, 1, 1, 1, 1, 1, 1

データファイル: 2020010 更新日: 2008/11/19

生物量

濃度	繰返し	0	24	48	hour
0	(1)	20.000	0.0000	0.0000	
5.55	(1)	20.000	0.0000	0.0000	
9.79	(1)	20.000	0.0000	1.0000	
11.6	(1)	20.000	0.0000	7.0000	
13.6	(1)	20.000	4.0000	19.000	
17.1	(1)	20.000	10.000	20.000	
29.7	(1)	20.000	8.0000	20.000	
51.6	(1)	20.000	9.0000	20.000	
91.1	(1)	20.000	7.0000	20.000	

生物量 (%)

濃度	24	48	hour
5.55	0.00	0.00	

9.79	0.00	5.00
11.6	0.00	35.00
13.6	20.00	95.00
17.1	50.00	100.00
29.7	40.00	100.00
51.6	45.00	100.00
91.1	35.00	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=4 ●●

#### ◎ デザイン行列

濃度	n	y	y/n	Const.	log10(C)
13.6	20.00	4.000	0.20	1.000	1.134
17.1	20.00	10.00	0.50	1.000	1.233
29.7	20.00	8.000	0.40	1.000	1.473
51.6	20.00	9.000	0.45	1.000	1.713
91.1	20.00	7.000	0.35	1.000	1.960

◎ 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) = 4.507 < 7.815 適合する  
 X2乗 (ピアソン) = 4.378 < 7.815 適合する  
 AIC = 136.6

#### ◎ 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	-0.603	0.644	-0.936
log(Conc.)	0.197	0.419	0.471
WALD検定	X2値=0.222	自由度=1	有意確率=0.637

#### ◎ 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)
13.6	4.000	7.048	-3.048	0.200	0.352	-0.152
17.1	10.00	7.194	2.806	0.500	0.360	0.140
29.7	8.000	7.551	0.449	0.400	0.378	0.022
51.6	9.000	7.914	1.086	0.450	0.396	0.054
91.1	7.000	8.291	-1.291	0.350	0.415	-0.065

#### ◎ 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						
13.6	1.930	0.491	-1.494	-1.427	-2.094	-2.000
17.1	0.737	0.357	1.281	1.307	1.597	1.630
29.7	0.007	0.202	0.206	0.207	0.231	0.232
51.6	0.073	0.295	0.493	0.497	0.588	0.592
91.1	0.945	0.655	-0.592	-0.586	-1.007	-0.998

#### EC90%、80%、EC50%、20%、10%の推定

log(EC90)	= -3.4382	(95% Range:-5.5704 - 9.1901)
EC90(mg/L)	= 4.E-4	(95% Range: 3.E-6 - 2.E+9)
log(EC80)	= -1.2101	(95% Range:-3.8075 - 1.3874)
EC80(mg/L)	= 0.0617	(95% Range: 2.E-4 - 24.402)
log(EC50)	= 3.0525	(95% Range:-5.1411 - 7.9637)
EC50(mg/L)	= 1128.5	(95% Range: 7.E-6 - 9.E+7)
log(EC20)	= 7.3151	(95% Range:-14.553 - 16.852)
EC20(mg/L)	= 2.E+7	(95% Range: 3.E-15 - 7.E+16)
log(EC10)	= 9.5432	(95% Range:-19.472 - 21.498)
EC10(mg/L)	= 3.E+9	(95% Range: 3.E-20 - 3.E+21)



●● 48h Effect E(L)C50 計算 収束までの反復回数=5 ●●

◎ デザイン行列

濃度	n	y	y/n	Const.	log10(C)
9.79	20.00	1.000	0.05	1.000	0.991
11.6	20.00	7.000	0.35	1.000	1.064
13.6	20.00	19.00	0.95	1.000	1.134

◎ 回帰式の適合度の検定  $\chi^2$ 値(P=0.05, df=1)= 3.841 (P=0.01, df=1)= 6.635  
 X2乗 (逸脱度) = 0.988 < 3.841 適合する  
 X2乗 (ピアソン) = 1.028 < 3.841 適合する  
 AIC = 46.77

◎ 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	-25.11	5.197	-4.831
log (Conc.)	23.40	4.838	4.836
WALD検定	X2値=23.389	自由度=1	有意確率=0.000

◎ 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)
9.79	1.000	0.542	0.458	0.050	0.027	0.023
11.6	7.000	8.400	-1.400	0.350	0.420	-0.070
13.6	19.00	18.43	0.573	0.950	0.921	0.029

◎ 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						
9.79	0.810	0.612	0.566	0.632	0.909	1.014
11.6	0.798	0.608	-0.640	-0.634	-1.023	-1.014
13.6	1.820	0.780	0.507	0.476	1.081	1.014

EC90%、80%、EC50%、20%、10%の推定		
log (EC90)	= 1.0183	(95% Range: 0.9887 - 1.0263)
EC90 (mg/L)	= 10.431	(95% Range: 9.7433 - 10.623)
log (EC80)	= 1.0371	(95% Range: 1.0109 - 1.0491)
EC80 (mg/L)	= 10.892	(95% Range: 10.253 - 11.197)
log (EC50)	= 1.0731	(95% Range: 1.0532 - 1.0928)
EC50 (mg/L)	= 11.833	(95% Range: 11.304 - 12.382)
log (EC20)	= 1.1091	(95% Range: 1.0956 - 1.1365)
EC20 (mg/L)	= 12.855	(95% Range: 12.463 - 13.693)
log (EC10)	= 1.1279	(95% Range: 1.1178 - 1.1594)
EC10 (mg/L)	= 13.423	(95% Range: 13.115 - 14.433)

ロジット関数

●● 24h Effect E(L)C50 計算 収束までの反復回数=4 ●●

◎ デザイン行列

濃度	n	y	y/n	Const.	log10(C)
13.6	20.00	4.000	0.20	1.000	1.134
17.1	20.00	10.00	0.50	1.000	1.233
29.7	20.00	8.000	0.40	1.000	1.473
51.6	20.00	9.000	0.45	1.000	1.713
91.1	20.00	7.000	0.35	1.000	1.960

◎ 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) = 4.509 < 7.815 適合する  
 X2乗 (ピアソン) = 4.379 < 7.815 適合する  
 AIC = 136.6

◎ 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 -0.965 1.042 -0.926  
log(Conc.) 0.316 0.677 0.467  
WALD検定 X2値=0.218 自由度=1 有意確率=0.641

◎ 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)
13.6	4.000	7.054	-3.054	0.200	0.353	-0.153
17.1	10.00	7.199	2.801	0.500	0.360	0.140
29.7	8.000	7.551	0.449	0.400	0.378	0.022
51.6	9.000	7.910	1.090	0.450	0.396	0.054
91.1	7.000	8.286	-1.286	0.350	0.414	-0.064

◎ 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						
13.6	1.915	0.489	-1.497	-1.429	-2.094	-2.000
17.1	0.735	0.357	1.279	1.305	1.594	1.627
29.7	0.007	0.203	0.206	0.207	0.231	0.232
51.6	0.073	0.294	0.495	0.498	0.589	0.593
91.1	0.952	0.657	-0.589	-0.584	-1.006	-0.997

EC90%、80%、EC50%、20%、10%の推定		
log(EC90)	= -3.9019	(95% Range: -6.6193 - 10.288)
EC90(mg/L)	= 1.E-4	(95% Range: 2.E-7 - 2.E+10)
log(EC80)	= -1.3340	(95% Range: -4.2240 - 1.5561)
EC80(mg/L)	= 0.0463	(95% Range: 6.E-5 - 35.985)
log(EC50)	= 3.0560	(95% Range: -5.2048 - 8.0371)
EC50(mg/L)	= 1137.6	(95% Range: 6.E-6 - 1.E+8)
log(EC20)	= 7.4459	(95% Range: -14.980 - 17.284)
EC20(mg/L)	= 3.E+7	(95% Range: 1.E-15 - 2.E+17)
log(EC10)	= 10.014	(95% Range: -20.698 - 22.694)
EC10(mg/L)	= 1.E+10	(95% Range: 2.E-21 - 5.E+22)

●● 48h Effect E(L)C50 計算 収束までの反復回数=5 ●●

◎ デザイン行列

濃度	n	y	y/n	Const.	log10(C)
9.79	20.00	1.000	0.05	1.000	0.991
11.6	20.00	7.000	0.35	1.000	1.064
13.6	20.00	19.00	0.95	1.000	1.134

◎ 回帰式の適合度の検定  $\chi^2$ 値(P=0.05, df=1)= 3.841 (P=0.01, df=1)= 6.635  
X2乗(逸脱度) = 0.675 < 3.841 適合する  
X2乗(ピアソン) = 0.725 < 3.841 適合する  
AIC = 46.45

◎ 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	-45.84	11.32	-4.049
log(Conc.)	42.67	10.55	4.046
WALD検定	X2値=16.368	自由度=1	有意確率=0.000

◎ 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)
9.79	1.000	0.551	0.449	0.050	0.028	0.022
11.6	7.000	7.928	-0.928	0.350	0.396	-0.046
13.6	19.00	18.52	0.479	0.950	0.926	0.024

◎ 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						
9.79	0.334	0.480	0.552	0.614	0.766	0.851
11.6	1.095	0.751	-0.428	-0.424	-0.858	-0.851

13.6	1.204	0.769	0.433	0.409	0.901	0.851
=====EC90%、80%、EC50%、20%、10%の推定=====						
log (EC90)	=	1.0228	(95% Range: 0.9882 - 1.0269)			
EC90 (mg/L)	=	10.539	(95% Range: 9.7313 - 10.638)			
log (EC80)	=	1.0418	(95% Range: 1.0126 - 1.0521)			
EC80 (mg/L)	=	11.011	(95% Range: 10.295 - 11.274)			
log (EC50)	=	1.0743	(95% Range: 1.0545 - 1.0951)			
EC50 (mg/L)	=	11.866	(95% Range: 11.337 - 12.449)			
log (EC20)	=	1.1068	(95% Range: 1.0963 - 1.1382)			
EC20 (mg/L)	=	12.788	(95% Range: 12.483 - 13.746)			
log (EC10)	=	1.1258	(95% Range: 1.1208 - 1.1634)			
EC10 (mg/L)	=	13.360	(95% Range: 13.206 - 14.567)			

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