

環境省 殿

最 終 報 告 書

2, 4, 6-トリメチルアニリンの
藻類 (*Pseudokirchneriella subcapitata*) に対する生長阻害試験


(試験番号: No. 2007-生52)

2009年 6月23日作成

原本と相違ないことを証明する。

株式会社 センター

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藻類 (*Pseudokirchneriella subcapitata*)
に対する生長阻害試験

試験番号 : No. 2007-生52

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藻類 (*Pseudokirchneriella subcapitata*)
に対する生長阻害試験

試験番号 : No. 2007-生52

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19日	2008年 2月19日	2008年 2月19日
	2008年 2月22日	2008年 2月22日	2008年 2月22日
実験終了後の監査	2008年12月12日	2008年12月15日	2008年12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藻類 (*Pseudokirchneriella subcapitata*) に対する生長阻害試験

2. 試験目的 : 指数増殖期の藻類 (*Pseudokirchneriella subcapitata*) を被験物質に暴露し、対照区に対する生長阻害率を測定することにより、藻類の生長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 : 

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19日 ～ 2008年 2月22日)
実験終了日	2008年 2月26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	4
3.1 試験条件	4
3.2 培地	5
3.3 試験容器、藻類培養試験装置および機器等	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）	5
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
4.1 生物量の算出	7
4.2 生長曲線	7
4.3 生長阻害率の算出	7
4.4 50 % 生長阻害濃度 (E_rC_{50}) の算出	8
4.5 最大無影響濃度 (NOEC)	8
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 試験培地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	9
5.4 生長曲線	9
5.5 50 % 生長阻害濃度 (E_rC_{50}) および最大無影響濃度 (NOEC)	10
5.6 温度、光強度および pH	10
5.7 試験計画書からの逸脱の有無	11
6 保管	11
Table 1 ～ 6	12
Figure 1, 2	17
付属資料－1 OECD 培地	18
付属資料－2 予備試験の結果	20
付属資料－3 試験溶液の分析法	22
付属資料－4 統計解析結果	27

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藻類 (*Pseudokirchneriella subcapitata*)
に対する生長阻害試験

試験番号 No. 2007-生52

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、振とう培養 (100 rpm)
- 3) 供試生物 : *Pseudokirchneriella subcapitata* (ATCC 22662)
- 4) 暴露期間 : 72 時間
- 5) 試験濃度(設定値) : 対照区, 0.46, 1.0, 2.2, 4.6, 10, 22, 46, 100 mg/L
公比 ; 2.2
- 6) 試験溶液量 : 100 mL (OECD 培地) / 容器
- 7) 連数 : 3 容器/濃度区、6 容器/対照区
- 8) 初期生物量 : 0.5 mg/L 以下(細胞濃度として 0.5×10^4 cells/mL)
- 9) 試験温度 : 23 ± 2 °C
- 10) 照明 : 60 ~ 120 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ (フラスコ液面付近) で連続照明
- 11) pH : 試験溶液の pH 調整は行わなかった
- 12) 分析法 : HPLC 法

結 果

予備試験において揮散によると考えられる軽度の被験物質濃度低下が認められたが、試験は開放系とし、48 時間後にも分析を追加した。

1) 試験溶液中の被験物質濃度

暴露開始時から暴露終了時の間に、揮散によると考えられる約 10 % の被験物質濃度の減少が認められたことから、各影響濃度(50 % 生長阻害濃度、最大無影響濃度)の算出に当たっては、暴露開始時、48 時間後および暴露終了時の測定値の幾何平均値を採用した。

2) 生長速度の比較による阻害濃度

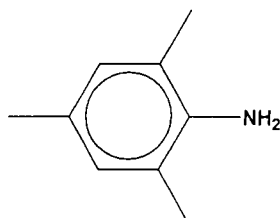
50 % 生長阻害濃度 E_rC_{50} : 27 mg/L(95 % 信頼限界: 24 ~ 29 mg/L), Logit

最大無影響濃度 NOEC(Rate 0 - 72 hr) : 2.0 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* : $C_9H_{11}N$
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「有機化合物のスペクトルデータベース (SDBS)」

2 供試生物

- 1) 学名 : *Pseudokirchneriella subcapitata*
(旧名称 : *Selenastrum capricornutum*)
- 2) 入手先 : American Type Culture Collection
- 3) 入手日 : 1997 年 11 月 13 日
- 4) 入手株番号 : ATCC 22662 株
- 5) 入手後の管理 : C 培地を用いて無菌的に継代培養
- 6) 感受性の確認 : 直近の基準物質(3, 5-ジクロロフェノール, 純度 99 %)による 72 時間 50 % 藻類生長阻害濃度 ($E_{1/2}$) は 2.5 mg/L(暴露期間 : 2007 年 12 月 11 日～12 月 14 日)であった。
- 7) 前培養 : 前培養期間 ; 2008 年 2 月 16 日 ～ 2008 年 2 月 19 日
この間、藻類は指数増殖した(環境条件は試験と同様)。

3 試験方法

3.1 試験条件

- 1) 暴露方式 : 止水式、振とう培養 (100 rpm)
- 2) 暴露期間 : 72 時間
- 3) 試験溶液量 : 100 mL (OECD 培地、3.2 参照) / 容器
- 4) 連数 : 3 容器/濃度区、6 容器/対照区
- 5) 初期生物量 : 0.5 mg/L 以下(前培養した藻類 : 細胞濃度として 0.5×10^4 cells/mL)
- 6) 試験温度 : 23 ± 2 °C
- 7) 照明 : $60 \sim 120 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ (フラスコ液面付近) で連続照明
- 8) pH : 試験溶液の pH 調整は行わなかった

3.2 培地

前培養および試験ともに OECD GUIDELINES FOR THE TESTING OF CHEMICALS 201, Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test (Aadopted 23 March 2006) において推奨されている培地を用い、成分表を付属資料-1 に示した。NaHCO₃ を除く成分を先に混合の上、大気との平衡状態とした。これにろ過滅菌済みの NaHCO₃ 成分を添加した。

3.3 試験容器、藻類培養試験装置および機器等

- | | | |
|-------------|----------------------|-------------|
| 1) 試験容器 | : 300 mL 容ガラス製三角フラスコ | (柴田科学器械工業) |
| | 通気性シリコンキャップ | (信越ポリマー) |
| 2) 藻類培養試験装置 | : 藻類培養試験器 GT-40S | (宮本理研工業) |
| 3) 光学顕微鏡 | : 生物顕微鏡 BHS | (オリンパス光学工業) |
| 4) 粒子計数装置 | : 粒子計数分析装置 F-520P | (Sysmex) |
| 5) 粒子分布解析装置 | : PDA-500 | (Sysmex) |
| 6) pH 計 | : HM-30V | (東亜ディーケーケー) |
| 7) 温度計 | : ガラス製水銀温度計 | |
| 8) 照度計 | : ANA-F9 型 | (柴田科学器械工業) |

3.4 被験物質の溶解性確認

被験物質の試験培地に対する溶解性は、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、試験培地を用いて 100 mg/L 溶液を調製後、試験温度 (23 °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。その後、この調製液の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)、72 時間生長阻害率が 1.0 mg/L 区で 2.5 %、3.2 mg/L 区で 4.4 %、10 mg/L 区で 8.5 %、32 mg/L 区で 47 % であったことを基に、公比 2.2 で 0.46, 1.0, 2.2, 4.6, 10, 22, 46, 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)

100 mg の被験物質を 1 L メスフラスコに秤り入れ、試験培地で 1 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 (23 °C) で 30 分間攪拌し、0.22 μm のメンブランフィルターでろ過し、100 mg/L の一次原液とした (無色透明)。次に、一次原液の 10, 22, 46

mL をそれぞれ 90, 78, 54 mL の滅菌済み試験培地の入った 300 mL 三角フラスコに加えて 10, 22, 46 mg/L の 2 次原液を調製した。さらに、46 mg/L の 2 次原液の 10 mL を 90 mL の滅菌済み試験培地の入った 300 mL 三角フラスコに加えて 4.6 mg/L の 3 次原液を調製した。

0.46 mg/L 区の試験溶液は 4.6 mg/L の 3 次原液から 10 mL を 90 mL の滅菌済み試験培地の入った 300 mL 三角フラスコに加えて調製した(無色透明)。

1.0, 2.2, 4.6 mg/L 区の試験溶液は 10, 22, 46 mg/L の 2 次原液から各 10 mL を 90 mL の滅菌済み試験培地の入った 300 mL 三角フラスコに加えて調製した(無色透明)。

10, 22, 46 mg/L 区の試験溶液は一次原液の 10, 22, 46 mL を 90, 78, 54 mL の滅菌済み試験培地の入った 300 mL 三角フラスコに加えて調製した(無色透明)。

100 mg/L 区は一次原液の 100 mL を 300 mL 三角フラスコに加えて用いた(無色透明)。

対照区には被験物質を加えない滅菌済み試験培地を用いた。

3.7 試験溶液中の被験物質濃度分析

予備試験において揮散によると考えられる軽度の被験物質濃度低下が認められたが、試験は開放系とし、48 時間後にも分析を追加した。

暴露開始時には調製した試験溶液より採取したものについて、48 時間後には各濃度区 の試験容器とは別に調製した予備 1 容器より採取したものについて、暴露終了時にはそれぞれ 3 容器/濃度区、6 容器/対照区から試験溶液を等量ずつ採取し、混合したものについて、遠心分離により藻体を除去した後、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

前培養した藻類の細胞数を計数し、 23 ± 2 °C に調整した試験溶液中に生物量 0.5 mg/L 以下(細胞濃度として 0.5×10^4 cells/mL, 対照区の日毎の変動係数を試験成立条件内に、また暴露開始時と暴露終了時の pH 変動範囲をできるだけ小さくするため)となるように、前培養液を添加した。

各試験容器を 23 ± 2 °C に調整された培養装置に設置して暴露開始とし、24、48 および 72

時間後に細胞濃度を測定した。測定は、各試験容器より試験溶液の一定量（24 時間後は2 mL、48、72 時間後は1 mL）を採取し、セルパック（専用の希釈液）を用いて希釈（24、48、72 時間後にそれぞれ4 倍、10 倍、50 倍に希釈）した溶液について行い、滅菌した試験培地を同様に希釈した溶液の測定値を差し引いて細胞濃度を求めた。また、24、48、72 時間後には顕微鏡下で細胞の形態観察も行った。

pH は、暴露開始時には調製した試験溶液より採取したものについて、48 時間後には各濃度区の試験容器とは別に調製した予備 1 容器について測定し、暴露終了時には全ての試験容器について測定した。

培養装置内の温度および光強度は、暴露期間中に 1 日 1 回測定した。

光強度は、照度計を用いて Lx を単位として測定し、測定値に係数 0.013（白色光の光強度換算係数）を乗ずることにより $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ 単位に換算した。

生物量の測定は、暴露終了時に対照区の各フラスコの培養液（約 90 mL）より、培養液の全量もしくは一部をとり、減圧ろ過により 0.22 μm メンブランフィルター上に藻体を集め、65 $^{\circ}\text{C}$ で 24 時間乾燥させ、23 $^{\circ}\text{C}$ で 2 時間静置冷却した後に重量を測定した。この値と、試験培地のみを通したメンブランフィルターに同じ処理をして測定した重量を差し引いて、藻体の乾燥重量を求めた。

4 結果の算出

4.1 生物量の算出

暴露終了時に測定した対照区の 6 試験容器の各細胞濃度 ($x: \times 10^4 \text{ cells/mL}$) と、その後に求めたそれぞれの単位容積あたりの乾燥重量 ($y: \text{mg/mL}$) から算出した回帰式 ($y=0.0002008x$, $r^2=0.957$) を基に、暴露期間に測定した各試験区の細胞濃度を生物量(乾燥重量)に換算した。

4.2 生長曲線

各試験区の生物量の平均値を時間に対してプロットし、生長曲線を作成した。

4.3 生長阻害率の算出

生物量について、指数増殖している培養での生長速度 (μ) を次の式より算出した。

$$\mu_{i-j} = \frac{\ln X_j - \ln X_i}{t_j - t_i}$$

ここで、

$\mu_{i-j} = t_i$ 時から t_j 時までの期間の生長速度。通常、日当たり(d^{-1})で表す。

$X_i = t_i$ 時の生物量。暴露開始時(t_0)の生物量については設定値を用いる。

$X_j = t_j$ 時の生物量

t_i = 暴露開始後 i 回目に生物量を測定した時間 (d)

t_j = 暴露開始後 j 回目に生物量を測定した時間 (d)

平均の生長速度 (μ) より、各濃度区における生長阻害率 I_μ (%) を次の式により算出した。

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

ここで、

μ_c : 対照区の平均生長速度

μ_t : 各濃度区における平均生長速度

4.4 50 % 生長阻害濃度 (EC_{50}) の算出

4.3 で算出した速度法による生長阻害率 (I_μ 値) を用いて Logit 法 (Probit 法は計算が収束しなかったため) により 50 % 生長阻害濃度 (EC_{50}) を算出し、同時に 95 % 信頼限界を算出した。その際、 E_4C_{50} と表記した。なお、統計ソフトは EcoTox ver. 2.6d を使い、生物量 (乾燥重量 mg/mL) に係数として 10^5 を乗じた値を入力した (この対応を行わないと結果が算出されなかったため)。

4.5 最大無影響濃度 (NOEC)

対照区と比較して有意差が認められない最高濃度区の実測濃度 (平均値) を最大無影響濃度 (NOEC) とした。その際、NOEC (Rate 0 - 72 hr) と表記した。

統計手法は EcoTox ver. 2.6d において DUNNETT 法を用いた。

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 試験培地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。その後、この調製液の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 100 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。

全ての試験区で、被験物質濃度が暴露開始時から 48 時間後には約 7 %、72 時間後には約 10 % 程度減少した。予備的な検討では揮散性について明瞭な傾向は把握できなかったが、メダカに対する急性毒性試験（試験番号：No. 2007-生54）や、オオミジンコに対する急性遊泳障害試験（試験番号：No. 2007-生53）においては揮散性が認められていることから、被験物質濃度の減少の主因は揮散であると考えられた。

各影響濃度(50 % 生長阻害濃度、最大無影響濃度)の算出に当たっては、暴露開始時、48 時間後および暴露終了時の測定値から以下の式より求めた幾何平均値を採用した。

$$\text{anti} \log \left(\frac{1}{2(t_n - t_1)} \sum_{i=1}^{n-1} [(\log(\text{conc}_i) + \log(\text{conc}_{i+1})) \cdot (t_{i+1} - t_i)] \right)$$

t_i : 暴露開始後 i 回目分析時までの時間(h)

conc_i : t_i 時の濃度(mg/L)

5.4 生長曲線

暴露期間中の生物量(mg/mL)を Table 2 に、生長曲線を Figure 1 に示した。

試験の有効性確認のためのパラメーターを Table 2 の値より求めた結果、各パラメーターは以下の通りとなり、いずれも試験成立条件を満たした。

- 1) 対照区の生物量は 72 時間培養の平均値で暴露開始時の 312 倍に増加した
(試験成立条件：少なくとも 16 倍に増加)。
- 2) 繰り返しの生長速度の変動係数は 1.1 % (試験成立条件：7 % を超えない)。
- 3) 毎日の生長速度の変動係数の平均値は 9.2 % (試験成立条件：35 % を超えない)。

表. 試験の有効性確認のためのパラメーター (Table 2 より算出)

n	平均生長速度	区間生長速度			毎日の生長速度の変動係数 CV (%)
	0 - 72 hr	0 - 24 hr	24 - 48 hr	48 - 72 hr	
1	1.9192	1.7405	2.1203	1.8969	9.9
2	1.9287	1.7579	2.1972	1.8309	12.2
3	1.9182	1.8083	1.9962	1.9500	5.1
4	1.9377	1.7750	2.0921	1.9462	8.2
5	1.8928	1.7750	2.1411	1.7625	11.4
6	1.8847	1.8083	2.0608	1.7851	8.1
平均	1.9136	1.7775	2.1013	1.8619	9.2
標準偏差	0.0206	変動係数の平均値 (%)			9.2
繰り返しの生長速度の変動係数 (%)	1.1				

また、24, 48, 72 時間後の観察において、対照区および濃度区に細胞の形態異常は観察されなかった。

5.5 50 % 生長阻害濃度 (E_rC_{50}) および最大無影響濃度 (NOEC)

各試験区における生長阻害率を Table 3 に、50 % 生長阻害濃度 (E_rC_{50}) および最大無影響濃度 (NOEC) を Table 4 に、濃度－阻害率曲線を Figure 2 示した。

入力に用いた観察点は対照区を含む全試験区で、結論を以下に示した。

1) 生長速度の比較による阻害濃度

E_rC_{50} : 27 mg/L (95 % 信頼限界 : 24 ~ 29 mg/L), Logit

NOEC (Rate 0-72 hr) : 2.0 mg/L

5.6 温度、光強度および pH

藻類培養試験器内の温度、光強度および回転数を Table 5、試験溶液の pH を Table 6 に示した。

72 時間の暴露期間中の藻類培養試験器内の温度は 22.8 ~ 23.0 °C の範囲であり、変動は 2.0 °C 以内であった。回転数は 100 rpm で一定であった。

光強度は平均 $69 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ ($65 \sim 79 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ の範囲)であった。

試験溶液の pH は、対照区で暴露開始時に 8.0、暴露終了時に 8.6 ～ 8.9 の範囲内であり、変動は 1.5 以内であった。濃度区では暴露開始時に 7.9 ～ 8.0 で、暴露終了時に 8.1 ～ 9.0 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資料は、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、その他の試料
- 10) その他の資料

以 上

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

Nominal Concentration (mg/L)	Measured Concentration (mg/L) (Percent of Nominal)						Mean ^a Measured Concentration (mg/L)
	0 Hour		48 Hours		72 Hours		
Control	<0.1	(-)	<0.1	(-)	<0.1	(-)	-
0.46	0.457	(99)	0.420	(91)	0.403	(88)	0.429
1.0	0.991	(99)	0.924	(92)	0.910	(91)	0.943
2.2	2.15	(98)	2.00	(91)	1.95	(89)	2.04
4.6	4.42	(96)	4.15	(90)	3.99	(87)	4.21
10	9.58	(96)	8.89	(89)	8.39	(84)	9.03
22	20.6	(94)	19.1	(87)	18.3	(83)	19.4
46	42.8	(93)	39.7	(86)	38.6	(84)	40.5
100	91.8	(92)	86.0	(86)	82.5	(83)	87.3

a : Geometric mean

- : Not calculated

Table 2. Calculated Biomass (Dry Cell Weight) of *Pseudokirchneriella subcapitata* during the 72 hours Exposure

Nominal Concentration (Mean Measured Concentration) (mg/L)	Vessel No.	Calculated Biomass [Dry Cell Weight (mg/mL)]			
		0 Hour	24 Hours	48 Hours	72 Hours
Control (-)	1	0.00010	0.00057	0.00475	0.03166
	2	0.00010	0.00058	0.00522	0.03257
	3	0.00010	0.00061	0.00449	0.03156
	4	0.00010	0.00059	0.00478	0.03347
	5	0.00010	0.00059	0.00502	0.02925
	6	0.00010	0.00061	0.00479	0.02855
	Average	0.00010	0.00059	0.00484	0.03118
0.46 (0.429)	S D	0.00000	0.00002	0.00025	0.00191
	1	0.00010	0.00054	0.00439	0.02935
	2	0.00010	0.00059	0.00489	0.03016
	3	0.00010	0.00061	0.00445	0.03026
	Average	0.00010	0.00058	0.00458	0.02992
1.0 (0.943)	S D	0.00000	0.00004	0.00027	0.00050
	1	0.00010	0.00056	0.00430	0.03026
	2	0.00010	0.00059	0.00493	0.02966
	3	0.00010	0.00059	0.00455	0.03136
	Average	0.00010	0.00058	0.00459	0.03043
2.2 (2.04)	S D	0.00000	0.00002	0.00032	0.00086
	1	0.00010	0.00058	0.00448	0.02865
	2	0.00010	0.00059	0.00484	0.02855
	3	0.00010	0.00059	0.00436	0.02735
	Average	0.00010	0.00059	0.00456	0.02818
4.6 (4.21)	S D	0.00000	0.00001	0.00025	0.00072
	1	0.00010	0.00055	0.00390	0.02534
	2	0.00010	0.00058	0.00442	0.02644
	3	0.00010	0.00060	0.00425	0.02634
	Average	0.00010	0.00058	0.00419	0.02604
10 (9.03)	S D	0.00000	0.00003	0.00027	0.00061
	1	0.00010	0.00051	0.00319	0.01706
	2	0.00010	0.00055	0.00365	0.01701
	3	0.00010	0.00055	0.00353	0.01784
	Average	0.00010	0.00054	0.00346	0.01730
22 (19.4)	S D	0.00000	0.00002	0.00024	0.00047
	1	0.00010	0.00039	0.00156	0.00611
	2	0.00010	0.00042	0.00177	0.00694
	3	0.00010	0.00045	0.00150	0.00606
	Average	0.00010	0.00042	0.00161	0.00637
46 (40.5)	S D	0.00000	0.00003	0.00014	0.00049
	1	0.00010	0.00020	0.00031	0.00036
	2	0.00010	0.00019	0.00027	0.00039
	3	0.00010	0.00021	0.00026	0.00035
	Average	0.00010	0.00020	0.00028	0.00037
100 (87.3)	S D	0.00000	0.00001	0.00003	0.00002
	1	0.00010	0.00013	0.00014	0.00021
	2	0.00010	0.00011	0.00014	0.00020
	3	0.00010	0.00012	0.00017	0.00019
	Average	0.00010	0.00012	0.00015	0.00020
	S D	0.00000	0.00001	0.00002	0.00001

S D : Standard deviation

a : Geometric mean

- : Not calculated

Table 3. Percent Growth Inhibition of *Pseudokirchneriella subcapitata*

Nominal Concentration (Mean ^a Measured Concentration) (mg/L)	Vessel No.	Growth Rate	
		Rate μ (0-72 hr)	Inhibition (%) ^{*1} I_{μ} (0-72 hr)
Control (-)	1	1.9192	
	2	1.9287	
	3	1.9182	
	4	1.9377	
	5	1.8928	
	6	1.8847	
	Average SD	1.9136 0.0206	0.00
0.46 (0.429)	1	1.8940	
	2	1.9030	
	3	1.9041	
	Average SD	1.9004 0.0055	0.69 ^{NS}
1.0 (0.943)	1	1.9041	
	2	1.8975	
	3	1.9160	
	Average SD	1.9059 0.0094	0.40 ^{NS}
2.2 (2.04)	1	1.8859	
	2	1.8847	
	3	1.8704	
	Average SD	1.8803 0.0086	1.74 ^{NS}
4.6 (4.21)	1	1.8450	
	2	1.8592	
	3	1.8579	
	Average SD	1.8540 0.0079	3.11 ^{**}
10 (9.03)	1	1.7131	
	2	1.7121	
	3	1.7280	
	Average SD	1.7177 0.0089	10.24 ^{**}
22 (19.4)	1	1.3708	
	2	1.4133	
	3	1.3681	
	Average SD	1.3841 0.0254	27.67 ^{**}
46 (40.5)	1	0.4270	
	2	0.4537	
	3	0.4176	
	Average SD	0.4328 0.0187	77.38 ^{**}
100 (87.3)	1	0.2473	
	2	0.2310	
	3	0.2140	
	Average SD	0.2308 0.0167	87.94 ^{**}

*1: Values are the percent inhibition relative to the control.

SD: Standard deviation a: Geometric mean -: Not calculated

NS: No significant difference **: Significant difference $p < 0.01$

Table 4. Calculated E_rC_{50} and NOEC

	E_rC_{50} (mg/L)	95% Confidence Limits (mg/L)	NOEC (mg/L)
$E_rC_{50}^*$	27	24 ~ 29	NOEC(Rate 0-72 hr) 2.0

*: Based on I_μ (0-72 hr) value (Growth rates)

Table 5. Daily Temperature, Light Intensity and Revolution at the Incubation

Exposure Period (Hours)	Temperature (°C)	Light Intensity*($\mu E/m^2/s$)		Revolution (rpm)
		Range of measured intensity	Average	
0	22.8	65 ~ 79	69	100
24	23.0	66 ~ 79	69	100
48	23.0	65 ~ 79	69	100
72	23.0	66 ~ 79	69	100

*: Calibrated from light-measuring instruments in Lx(factor : 0.013)

Table 6. pH Values

Nominal Concentration (mg/L)	Mean ^a Measured Concentration (mg/L)	pH		
		0 Hour	48 Hours	72 Hours
Control	-	1	8.0	8.0
		2		8.8
		3		8.6
		4		8.8
		5		8.8
		6		8.9
0.46	0.429	1	7.9	8.1
		2		8.9
		3		9.0
1.0	0.943	1	7.9	8.1
		2		8.9
		3		8.7
2.2	2.04	1	7.9	8.1
		2		9.0
		3		8.8
4.6	4.21	1	7.9	8.1
		2		8.8
		3		8.7
10	9.03	1	7.9	8.1
		2		8.8
		3		8.6
22	19.4	1	8.0	8.1
		2		8.3
		3		8.3
46	40.5	1	7.9	8.0
		2		8.1
		3		8.1
100	87.3	1	7.9	8.0
		2		8.1
		3		8.1

a : Geometric mean

- : Not calculated

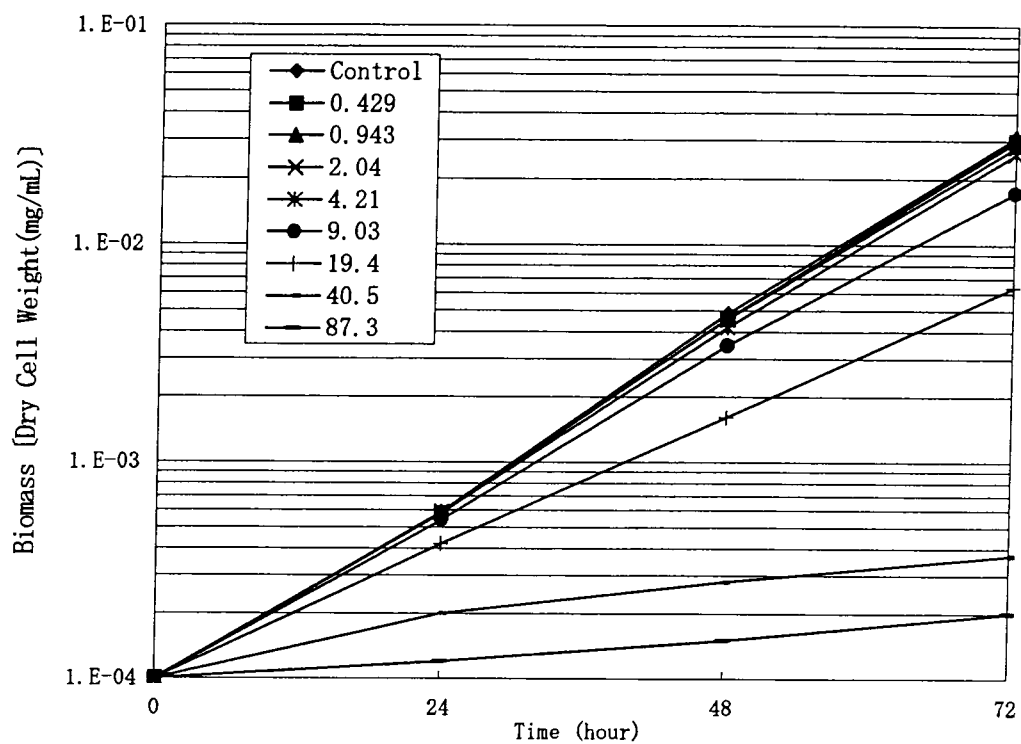


Figure 1. Algal Growth Curve of *Pseudokirchneriella subcapitata*
(Biomass vs time during the 72 hours exposure)

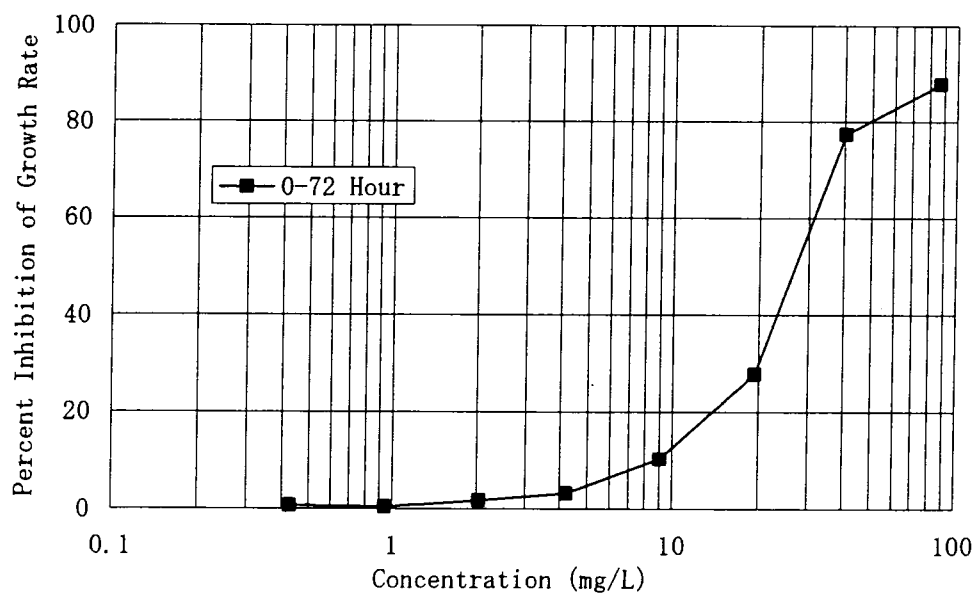


Figure 2. Concentration-Inhibition Curve Based on %I Values Calculated from the Growth Curves

付 属 資 料 ー 1

OECD 培 地

Table A-1. OECD medium

<u>Nutrient salts</u>	<u>Concentration (mg/L)</u>
H ₃ BO ₃	0.185
MnCl ₂ ·4H ₂ O	0.415
ZnCl ₂	0.003
FeCl ₃ ·6H ₂ O	0.064
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 ー 2

予 備 試 験 の 結 果

Table B-1. Calculated Biomass (Dry Cell Weight) of *Pseudokirchneriella subcapitata* during the 72 hours Exposure

Nominal Concentration (mg/L)	(Range Finding Test)			
	Calculated Biomass [Dry Cell Weight (mg/mL)]			
	0 Hour	24 Hours	48 Hours	72 Hours
Control	0.00010	0.00063	0.00504	0.03489
1.0	0.00010	0.00061	0.00488	0.03007
3.2	0.00010	0.00055	0.00413	0.02702
10	0.00010	0.00053	0.00356	0.02125
32	0.00010	0.00032	0.00080	0.00226

Table B-2. Percent Growth Inhibition of *Pseudokirchneriella subcapitata* (Range Finding Test)

Nominal Concentration (mg/L)	Growth rate	
	Rate μ (0-72 hr)	Inhibition (%) I_{μ} (0-72 hr)*1
Control	1.9516	0.00
1.0	1.9020	2.54
3.2	1.8664	4.37
10	1.7863	8.47
32	1.0393	46.75

*1: Values are the percent inhibition relative to the control

Table B-3. Measured Concentration of the Test Substance in Test Water (Range Finding Test)

Nominal Concentration (mg/L)	Measured Concentration (mg/L) (Percent of Nominal)				Mean ^a Measured Concentration (mg/L)
	0 Hour		72 Hours		0-72 Hour
Control	<0.1	(-)	<0.1	(-)	-
1.0	1.01	(101)	0.830	(83)	9.16
3.2	3.14	(98)	2.65	(83)	2.88
10	9.66	(97)	7.84	(78)	8.70
32	30.3	(95)	24.5	(77)	27.2

a: Geometric mean -: 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の分析法

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 μ 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) 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 ϕ
- (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 μ 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 μ 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 ($\mu V \cdot sec$)
1	0	0
2	0.9999	200764
3	2.999	613229
4	8.999	1797606

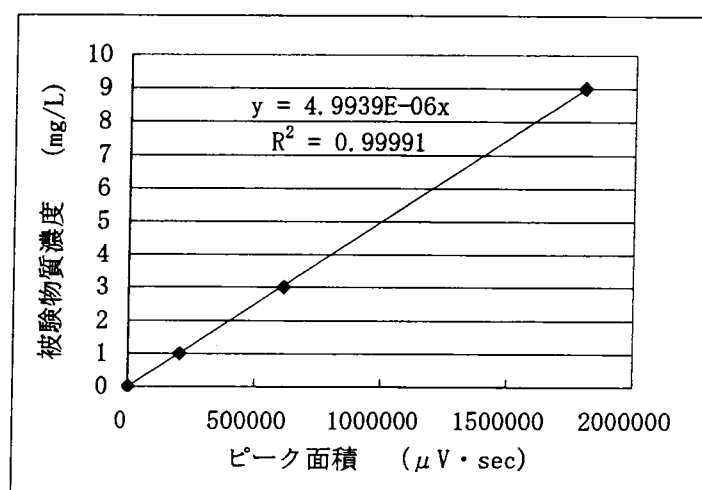


図 1 検量線例

4. 添加回収率

被験物質約 100 mg を精秤して試験培地に添加し、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培地に添加し、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 ～ 103 %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	1.038	1.03	103
	2	1.023		
10.03	1	10.06	10.0	100
	2	9.948		
100.3	1	99.28	98.9	99
	2	98.54		

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 (1.03 mg/L、10.0 mg/L、98.9 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 93 ～ 99 % であった。

表 3 保存安定性

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 (%)
1.03	1	0.9995	0.994	97
	2	0.9894		
10.0	1	10.038	9.89	99
	2	9.736		
98.9	1	92.48	92.3	93
	2	92.12		

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(σ_{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. 2.6d)

藻類 生長阻害試験

2007-生 52

ファイル名= 2010012 更新日: 2008/02/28

区	濃度		連	実測数(生存)			
	mg/L	(log)		0	24	48	72 hour
1	0	(-)	1	10	57	475	3166
1	0	(-)	2	10	58	522	3257
1	0	(-)	3	10	61	449	3156
1	0	(-)	4	10	59	478	3347
1	0	(-)	5	10	59	502	2925
1	0	(-)	6	10	61	479	2855
2	0.429	(-0.37)	1	10	54	439	2935
2	0.429	(-0.37)	2	10	59	489	3016
2	0.429	(-0.37)	3	10	61	445	3026
3	0.943	(-0.03)	1	10	56	430	3026
3	0.943	(-0.03)	2	10	59	493	2966
3	0.943	(-0.03)	3	10	59	455	3136
4	2.04	(0.31)	1	10	58	448	2865
4	2.04	(0.31)	2	10	59	484	2855
4	2.04	(0.31)	3	10	59	436	2735
5	4.21	(0.62)	1	10	55	390	2534
5	4.21	(0.62)	2	10	58	442	2644
5	4.21	(0.62)	3	10	60	425	2634
6	9.03	(0.96)	1	10	51	319	1706
6	9.03	(0.96)	2	10	55	365	1701
6	9.03	(0.96)	3	10	55	353	1784
7	19.4	(1.29)	1	10	39	156	611
7	19.4	(1.29)	2	10	42	177	694
7	19.4	(1.29)	3	10	45	150	606
8	40.5	(1.61)	1	10	20	31	36
8	40.5	(1.61)	2	10	19	27	39
8	40.5	(1.61)	3	10	21	26	35
9	87.3	(1.94)	1	10	13	14	21
9	87.3	(1.94)	2	10	11	14	20
9	87.3	(1.94)	3	10	12	17	19

変換値 (面積・速度[/day])

Conc.		0-72h	0-72h	0-48h	24-72h
(mg/L)	No.	Area	Rate	Rate	Rate
0	(1)	8.4800	1.9192	1.9304	2.0086
0	(2)	8.6059	1.9287	1.9775	2.0141
0	(3)	8.4900	1.9182	1.9022	1.9731
0	(4)	8.5486	1.9377	1.9335	2.0191
0	(5)	8.5302	1.8928	1.9580	1.9518
0	(6)	8.5045	1.8847	1.9346	1.9230
0.429	(1)	8.3093	1.8940	1.8910	1.9977
0.429	(2)	8.5193	1.9030	1.9449	1.9671
0.429	(3)	8.4600	1.9041	1.8977	1.9521
0.943	(1)	8.3402	1.9041	1.8806	1.9948
0.943	(2)	8.5191	1.8975	1.9490	1.9587
0.943	(3)	8.4667	1.9160	1.9089	1.9866
2.04	(1)	8.3889	1.8859	1.9011	1.9499
2.04	(2)	8.4816	1.8847	1.9397	1.9396

2.04	(3)	8.3557	1.8704	1.8875	1.9182
4.21	(1)	8.1358	1.8450	1.8318	1.9151
4.21	(2)	8.3353	1.8592	1.8944	1.9098
4.21	(3)	8.3281	1.8579	1.8748	1.8910
9.03	(1)	7.6615	1.7131	1.7313	1.7550
9.03	(2)	7.8703	1.7121	1.7987	1.7158
9.03	(3)	7.8606	1.7280	1.7819	1.7396
19.4	(1)	6.1645	1.3708	1.3736	1.3758
19.4	(2)	6.4286	1.4133	1.4368	1.4024
19.4	(3)	6.2643	1.3681	1.3540	1.3001
40.5	(1)	2.4650	0.4270	0.5657	0.2939
40.5	(2)	2.3156	0.4537	0.4966	0.3596
40.5	(3)	2.3238	0.4176	0.4778	0.2554
87.3	(1)	0.9698	0.2473	0.1682	0.2398
87.3	(2)	0.7784	0.2310	0.1682	0.2989
87.3	(3)	1.0339	0.2140	0.2653	0.2298

変換値 (面積/速度[/day])の平均値と標本標準偏差

Conc. (mg/L)	No.	0-72h Area	0-72h Rate	0-48h Rate	24-72h Rate
0	(6)	8.5265 (0.05)	1.9136 (0.02)	1.9394 (0.03)	1.9816 (0.04)
0.429	(3)	8.4295 (0.11)	1.9004 (0.01)	1.9112 (0.03)	1.9723 (0.02)
0.943	(3)	8.4420 (0.09)	1.9059 (0.01)	1.9128 (0.03)	1.9800 (0.02)
2.04	(3)	8.4087 (0.07)	1.8804 (0.01)	1.9095 (0.03)	1.9359 (0.02)
4.21	(3)	8.2664 (0.11)	1.8540 (0.01)	1.8670 (0.03)	1.9053 (0.01)
9.03	(3)	7.7975 (0.12)	1.7177 (0.01)	1.7706 (0.04)	1.7368 (0.02)
19.4	(3)	6.2858 (0.13)	1.3841 (0.03)	1.3881 (0.04)	1.3594 (0.05)
40.5	(3)	2.3681 (0.08)	0.4327 (0.02)	0.5134 (0.05)	0.3030 (0.05)
87.3	(3)	0.9273 (0.13)	0.2308 (0.02)	0.2006 (0.06)	0.2562 (0.04)

対照に対する阻害率 (%) — 各個の値 —

Conc. (mg/L)	No.	0-72h Area	0-72h Rate	0-48h Rate	24-72h Rate
0.429	(1)	2.55	1.02	2.50	-0.81
0.429	(2)	0.09	0.55	-0.28	0.73
0.429	(3)	0.78	0.49	2.15	1.49
0.943	(1)	2.19	0.49	3.03	-0.67
0.943	(2)	0.09	0.84	-0.49	1.15
0.943	(3)	0.70	-0.13	1.57	-0.25
2.04	(1)	1.61	1.44	1.97	1.60
2.04	(2)	0.53	1.51	-0.02	2.12
2.04	(3)	2.00	2.25	2.67	3.20
4.21	(1)	4.58	3.58	5.55	3.36
4.21	(2)	2.24	2.84	2.32	3.62
4.21	(3)	2.33	2.91	3.33	4.57
9.03	(1)	10.15	10.48	10.73	11.43

9.03	(2)	7.70	10.53	7.26	13.41
9.03	(3)	7.81	9.70	8.12	12.21
19.4	(1)	27.70	28.36	29.17	30.57
19.4	(2)	24.60	26.14	25.91	29.23
19.4	(3)	26.53	28.50	30.18	34.39
40.5	(1)	71.09	77.69	70.83	85.17
40.5	(2)	72.84	76.29	74.39	81.86
40.5	(3)	72.75	78.18	75.37	87.11
87.3	(1)	88.63	87.08	91.33	87.90
87.3	(2)	90.87	87.93	91.33	84.92
87.3	(3)	87.87	88.82	86.32	88.41

対照に対する阻害率 (%) — 平均値 —

Conc.		0-72h	0-72h	0-48h	24-72h
(mg/L)	No.	Area	Rate	Rate	Rate
0.429	(3)	1.14	0.69	1.45	0.47
0.943	(3)	0.99	0.40	1.37	0.08
2.04	(3)	1.38	1.73	1.54	2.31
4.21	(3)	3.05	3.11	3.73	3.85
9.03	(3)	8.55	10.23	8.70	12.35
19.4	(3)	26.28	27.67	28.42	31.40
40.5	(3)	72.23	77.39	73.53	84.71
87.3	(3)	89.12	87.94	89.66	87.07

対照の 0-72h, 0-48h, 24-72h, の速度に差があるか?

分散分析 P=0.05 ; F=3.68232

変動要因	自由度	平方和	平均平方	F 値
グループ間変動	2	0.0165	0.0083	
グループ内変動	15	0.0130	9.E-4	9.5013*

統計的に、日毎の増殖速度が一定といえません。

しかし、OBOD 試験法は統計値によって判断するとしていません。

BC50 計算に用いたデータ (Probit, Logit 法)

区	濃度	Start	0-72h	0-72h	0-48h	24-72h
	mg/L (log)		Area	Rate	Rate	Rate
1	0.429 (-0.37)	200.00	—	1.38	—	—
2	0.943 (-0.03)	200.00	—	0.80	—	—
3	2.04 (0.31)	200.00	—	3.47	—	—
4	4.21 (0.62)	200.00	—	6.22	—	—
5	9.03 (0.96)	200.00	—	20.47	—	—
6	19.4 (1.29)	200.00	—	55.34	—	—
7	40.5 (1.61)	200.00	—	154.77	—	—
8	87.3 (1.94)	200.00	—	175.88	—	—

2007-生 52

藻類 生長阻害試験 観察回数=4 濃度区数=9(mg/L)

繰返し数 = 6, 3, 3, 3, 3, 3, 3, 3, 3

データファイル: 2010012 更新日: 2008/02/28

生物量

濃度	繰返し	0	24	48	72	hour
0	(1)	10.000	57.000	475.00	3166.0	
	(2)	10.000	58.000	522.00	3257.0	
	(3)	10.000	61.000	449.00	3156.0	

	(4)	10.000	59.000	478.00	3347.0
	(5)	10.000	59.000	502.00	2925.0
	(6)	10.000	61.000	479.00	2855.0
0.429	(1)	10.000	54.000	439.00	2935.0
	(2)	10.000	59.000	489.00	3016.0
	(3)	10.000	61.000	445.00	3026.0
0.943	(1)	10.000	56.000	430.00	3026.0
	(2)	10.000	59.000	493.00	2966.0
	(3)	10.000	59.000	455.00	3136.0
2.04	(1)	10.000	58.000	448.00	2865.0
	(2)	10.000	59.000	484.00	2855.0
	(3)	10.000	59.000	436.00	2735.0
4.21	(1)	10.000	55.000	390.00	2534.0
	(2)	10.000	58.000	442.00	2644.0
	(3)	10.000	60.000	425.00	2634.0
9.03	(1)	10.000	51.000	319.00	1706.0
	(2)	10.000	55.000	365.00	1701.0
	(3)	10.000	55.000	353.00	1784.0
19.4	(1)	10.000	39.000	156.00	611.00
	(2)	10.000	42.000	177.00	694.00
	(3)	10.000	45.000	150.00	606.00
40.5	(1)	10.000	20.000	31.000	36.000
	(2)	10.000	19.000	27.000	39.000
	(3)	10.000	21.000	26.000	35.000
87.3	(1)	10.000	13.000	14.000	21.000
	(2)	10.000	11.000	14.000	20.000
	(3)	10.000	12.000	17.000	19.000

生物量 (%)				
濃度	24	48	72	hour
0.429	1.14	0.69	1.45	
0.943	0.99	0.40	1.37	
2.04	1.38	1.73	1.54	
4.21	3.05	3.11	3.73	
9.03	8.55	10.23	8.70	
19.4	26.28	27.67	28.42	
40.5	72.23	77.39	73.53	
87.3	89.12	87.94	89.66	

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 =====

収束せず

●● 0-72h Rate 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)
0.429	200.0	2.000	0.01	1.000	-0.368
0.943	200.0	2.000	0.01	1.000	-0.025
2.04	200.0	3.469	0.02	1.000	0.310
4.21	200.0	6.224	0.03	1.000	0.624
9.03	200.0	20.47	0.10	1.000	0.956
19.4	200.0	55.34	0.28	1.000	1.288

40.5	200.0	154.8	0.77	1.000	1.607
87.3	200.0	175.9	0.88	1.000	1.941

◎ 回帰式の適合度の検定 χ^2 値(P=0.05, df=6)= 12.59 (P=0.01, df=6)= 16.81
 X2 乗 (逸脱度) = 54.35 > 16.81 ** 適合が悪い
 X2 乗 (ピアソン) = 273.0 > 16.81 ** 適合が悪い
 AIC = 922.7

◎ 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	-2.984	0.122	-24.36
log (Conc.)	2.102	0.090	23.45
WALD 検定	X2 値=549.808	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)	π 推定	残差(割合)
0.429	2.000	0.017	1.983	0.010	9.E-5	0.010
0.943	2.000	0.239	1.761	0.010	0.001	0.009
2.04	3.469	1.965	1.504	0.017	0.010	0.008
4.21	6.224	9.462	-3.238	0.031	0.047	-0.016
9.03	20.47	32.96	-12.50	0.102	0.165	-0.062
19.4	55.34	78.20	-22.86	0.277	0.391	-0.114
40.5	154.8	130.7	24.03	0.774	0.654	0.120
87.3	175.9	172.7	3.167	0.879	0.864	0.016

◎ 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						
0.429	21.07	0.031	3.881	15.09	3.943	15.34
0.943	2.713	0.105	2.236	3.608	2.363	3.814
2.04	0.449	0.227	0.973	1.078	1.107	1.227
4.21	0.514	0.298	-1.148	-1.079	-1.369	-1.287
9.03	1.605	0.266	-2.530	-2.382	-2.953	-2.781
19.4	2.292	0.239	-3.391	-3.313	-3.887	-3.798
40.5	5.124	0.341	3.700	3.572	4.558	4.400
87.3	0.482	0.493	0.664	0.652	0.932	0.916

EC90%、80%、EC50%、20%、10%の推定		
log (EC90)	= 0.8098	(95% Range: 0.7821 - 0.8309)
EC90 (mg/L)	= 6.4534	(95% Range: 6.0554 - 6.7745)
log (EC80)	= 1.0191	(95% Range: 0.9866 - 1.0479)
EC80 (mg/L)	= 10.449	(95% Range: 9.6960 - 11.167)
log (EC50)	= 1.4194	(95% Range: 1.3777 - 1.4631)
EC50 (mg/L)	= 26.267	(95% Range: 23.863 - 29.049)
log (EC20)	= 1.8198	(95% Range: 1.7688 - 1.8784)
EC20 (mg/L)	= 66.035	(95% Range: 58.728 - 75.571)
log (EC10)	= 2.0290	(95% Range: 1.9733 - 2.0954)
EC10 (mg/L)	= 106.92	(95% Range: 94.036 - 124.57)

ロジット関数

●● 0-72h Rate 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)
0.429	200.0	2.000	0.01	1.000	-0.368
0.943	200.0	2.000	0.01	1.000	-0.025

2.04	200.0	3.469	0.02	1.000	0.310
4.21	200.0	6.224	0.03	1.000	0.624
9.03	200.0	20.47	0.10	1.000	0.956
19.4	200.0	55.34	0.28	1.000	1.288
40.5	200.0	154.8	0.77	1.000	1.607
87.3	200.0	175.9	0.88	1.000	1.941

◎ 回帰式の適合度の検定 χ^2 値(P=0.05, df=6)= 12.59 (P=0.01, df=6)= 16.81
X2乗 (逸脱度) = 27.71 > 16.81 ** 適合が悪い
X2乗 (ピアソン) = 50.58 > 16.81 ** 適合が悪い
AIC = 896.0

◎ 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	-5.888	0.318	-18.52
log(Conc.)	4.123	0.223	18.48
WALD検定	X2値=341.328	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/h(P)	π 推定	残差(割合)
0.429	2.000	0.122	1.878	0.010	6.E-4	0.009
0.943	2.000	0.498	1.502	0.010	0.002	0.008
2.04	3.469	1.967	1.502	0.017	0.010	0.008
4.21	6.224	7.015	-0.791	0.031	0.035	-0.004
9.03	20.47	24.95	-4.481	0.102	0.125	-0.022
19.4	55.34	71.82	-16.48	0.277	0.359	-0.082
40.5	154.8	135.3	19.44	0.774	0.677	0.097
87.3	175.9	178.4	-2.564	0.879	0.892	-0.013

◎ 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						
0.429	0.290	0.019	2.731	5.384	2.757	5.437
0.943	0.131	0.052	1.603	2.132	1.646	2.189
2.04	0.093	0.124	0.971	1.076	1.038	1.150
4.21	0.019	0.238	-0.310	-0.304	-0.355	-0.348
9.03	0.371	0.346	-0.986	-0.959	-1.219	-1.186
19.4	2.377	0.345	-2.479	-2.429	-3.063	-3.002
40.5	5.751	0.431	3.033	2.938	4.022	3.896
87.3	0.247	0.445	-0.575	-0.585	-0.772	-0.785

EC90%、80%、EC50%、20%、10%の推定		
log(EC90)	=	0.8953 (95% Range: 0.8643 - 0.9155)
EC90 (mg/L)	=	7.8582 (95% Range: 7.3164 - 8.2311)
log(EC80)	=	1.0920 (95% Range: 1.0576 - 1.1200)
EC80 (mg/L)	=	12.360 (95% Range: 11.419 - 13.183)
log(EC50)	=	1.4283 (95% Range: 1.3881 - 1.4697)
EC50 (mg/L)	=	26.811 (95% Range: 24.441 - 29.494)
log(EC20)	=	1.7646 (95% Range: 1.7186 - 1.8194)
EC20 (mg/L)	=	58.154 (95% Range: 52.314 - 65.984)
log(EC10)	=	1.9613 (95% Range: 1.9119 - 2.0240)
EC10 (mg/L)	=	91.472 (95% Range: 81.648 - 105.68)

***** END *****

●● 薬類 0-72h 速度法 NOEC 推定結果の書き出し ==> *5%で有意, **1%で有意 ●●
2007-生52 薬類 生長阻害試験

◎ NOEC 計算用元データ

濃度 mg/L	0	0.429	0.943	2.04	4.21	9.03	19.4	40.5	87.3	平均
1	1.9192	1.8940	1.9041	1.8859	1.8450	1.7131	1.3708	0.4270	0.2473	
2	1.9287	1.9030	1.8975	1.8847	1.8592	1.7121	1.4133	0.4537	0.2310	
3	1.9182	1.9041	1.9160	1.8704	1.8579	1.7280	1.3681	0.4176	0.2140	
4	1.9377	-	-	-	-	-	-	-	-	
5	1.8928	-	-	-	-	-	-	-	-	
6	1.8847	-	-	-	-	-	-	-	-	
平均	1.9136	1.9004	1.9059	1.8804	1.8540	1.7177	1.3841	0.4327	0.2308	1.5133
標準偏差	0.0206	0.0056	0.0094	0.0086	0.0078	0.0089	0.0253	0.0187	0.0167	

◎ 各濃度区の対照平均に対する相対量

濃度 mg/L	0	0.429	0.943	2.04	4.21	9.03	19.4	40.5	87.3
1	100.30	98.98	99.51	98.56	96.42	89.52	71.64	22.31	12.92
2	100.79	99.45	99.16	98.49	97.16	89.47	73.86	23.71	12.07
3	100.24	99.51	100.13	97.75	97.09	90.30	71.50	21.82	11.18
4	101.26	-	-	-	-	-	-	-	-
5	98.92	-	-	-	-	-	-	-	-
6	98.49	-	-	-	-	-	-	-	-
平均	100.00	99.31	99.60	98.27	96.89	89.77	72.33	22.61	12.06

◎ パートレットの等分散性の検定

χ^2 乗検定値 (p:0.05)= 15.51 (p:0.01)= 20.09 自由度= 8
 計算値(7.403) <= 15.51 5%の危険率で等分散性を認める。

◎ 一元配置分散分析 (全ての濃度区の平均数に差がないとみなせるか)

要因	平方和	自由度	平均平方	検定値(F)
処理	11.23849	8.000000	1.404812	5526.906
誤差	0.005338	21.00000	2.54E-4	
全体	11.24383	29.00000		

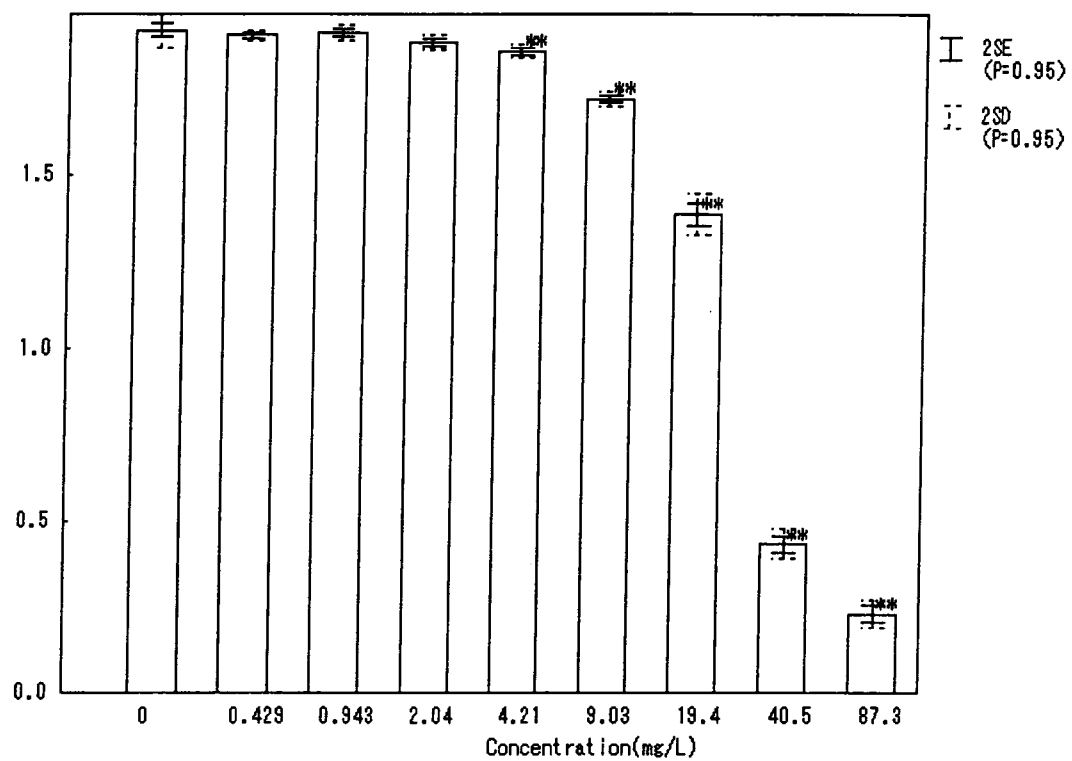
F検定基準値 (p:0.05)= 2.420 (p:0.01)= 3.506 自由度= 8 : 21
 計算値(5527) > 2.420

5%の危険率で「濃度区間に差がない」仮説を棄却する。
 即ち、濃度区間に差があるとみなす。

◎ Dunnett 型の検定 (どの濃度区が対照に比べて差があるかを特定する)

濃度 mg/L	0	0.429	0.943	2.04	4.21	9.03	19.4	40.5	87.3
計算値	-	1.169	0.681	2.944	5.282**	17.37**	46.97**	131.4**	149.3**
Dunnett 確率		0.8371	0.9898	0.0512	0.0002	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001

Growth Rate(0-72h)



NOEC Estimation by Algae Growth Test

NOEC 0-72h速度法

2007-生52