

環境省 殿

本写しは原本と相違ありません

(株)三菱化学安全科学研究所
横浜研究所 運営管理者

最 終 報 告 書

2,2-ビス[4-ヒドロキシ-3,5-ジブロモフェニル]プロパンの
藻類 (*Pseudokirchneriella subcapitata*) に対する生長阻害試験

(試験番号：A050386)

2006年 8月 1日

株式会社三菱化学安全科学研究所

陳 述 書

株式会社三菱化学安全科学研究所

横浜研究所

試 験 委 託 者 : 環境省

表 題 : 2,2-ビス [4-ヒドロキシ-3,5-ジブロモフェニル] プロパンの藻類
(*PseudoKirkneriella subcapitata*) に対する生長阻害試験

試 験 番 号 : A 0 5 0 3 8 6

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

また、本試験は下記の G L P に従って実施したものである。

「新規化学物質等に係る試験を実施する試験施設に関する基準について」

(平成 15 年 11 月 21 日 薬食発第 1121003 号, 平成 15・11・17 製局第 3 号, 環境企発
第 031121004 号, 最終改正: 平成 17 年 4 月 1 日)

2 0 0 6 年 8 月 1 日

試験責任者

信 頼 性 保 証 書

株式会社三菱化学安全 科学研究所

横浜研究所

試 験 委 託 者 : 環境省

表 題 : 2,2-ビス[4-ヒドロキシ-3,5-ジプロモフェニル]プロパンの藻類
(*Pseudokirchneriella subcapitata*) に対する生長阻害試験

試 験 番 号 : A 0 5 0 3 8 6

本試験は試験計画書および標準操作手順書に従って実施され、本報告書には試験に使用した方法、手順が正確に記載されており、試験結果は生データを正確に反映していることを、下記の査察および監査実施により確認した。

記

実 施 事 項	実 施 日	運営管理者および 試験責任者への報告日
試験計画書監査		
試験計画書	2006年 2月 6日	2006年 2月 6日
変更書(変更番号:01)	2006年 6月 5日	2006年 6月 5日
試験の査察		
試験液の調製	2006年 2月 7日	2006年 2月 7日
藻類の添加	2006年 2月 7日	2006年 2月 7日
試験液の調製	2006年 6月 6日	2006年 6月 6日
藻類の添加	2006年 6月 6日	2006年 6月 6日
試験液の分析	2006年 6月 9日	2006年 6月 9日
細胞濃度の測定	2006年 6月 9日	2006年 6月 9日
最終報告書監査	2006年 8月 1日	2006年 8月 1日

信頼性保証部門担当者: 2006年 8月 1日

2006年 8月 1日

(2006年3月31日付退職)

試験実施概要

1. 表 題 : 2, 2-ビス[4-ヒドロキシ-3, 5-ジブロモフェニル]プロパンの藻類
(*Pseudokirchneriella subcapitata*) に対する生長阻害試験
(試験番号 : A 0 5 0 3 8 6)
2. 試 験 目 的 : 被験物質の藻類 (*Pseudokirchneriella subcapitata*) に対する
生長阻害試験 (72 時間) を行い, 半数生長阻害濃度 (EC50) お
よび最大無影響濃度 (NOEC) を求める。
3. 適用ガイドライン : 「新規化学物質等に係る試験の方法について<藻類生長阻害試
験, ミジンコ急性遊泳阻害試験及び魚類急性毒性試験>」(平
成 15 年 11 月 21 日 薬食発第 1121002 号, 平成 15・11・13 製局
第 2 号, 環保企発第 031121002 号, 最終改正: 平成 17 年 4 月 1
日)
4. 適 用 G L P : 「新規化学物質等に係る試験を実施する試験施設に関する基準
について」(平成 15 年 11 月 21 日 薬食発第 1121003 号, 平成
15・11・17 製局第 3 号, 環保企発第 031121004 号, 最終改正: 平
成 17 年 4 月 1 日)
5. 試 験 委 託 者 : 環境省
東京都千代田区霞が関一丁目 2 - 2
6. 試 験 受 託 者 : 株式会社三菱化学安全科学研究所
東京都港区芝二丁目 1 番 30 号
7. 試 験 施 設 : 株式会社三菱化学安全科学研究所 横浜研究所
神奈川県横浜市青葉区鴨志田町 1000 番地
8. 試 験 責 任 者 : XXXXXXXXXX
生態化学研究部

9. 試験担当者： [redacted] [redacted] (2006年 8月 1日)
(試験実施, 分析実施, 報告書作成)

[redacted] [redacted] (2006年 8月 1日)
(試験実施)

10. 試験日程： 試験開始日 2006年 2月 6日
暴露開始日 2006年 6月 6日
暴露終了日 2006年 6月 9日
試験終了日 2006年 8月 1日

11. 保管： 下記の試資料は、(株)三菱化学安全科学研究所 横浜研究所の
試資料保管施設に保管する。

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

目 次

頁

要 約	7
1 被験物質	9
1.1 名称, 構造式および物理化学的性状	9
1.2 供試試料	10
1.3 保管法および安定性の確認	10
2 供試生物	10
3 試験方法	10
3.1 試験条件	11
3.2 培地	11
3.3 試験容器および藻類培養試験装置等	11
3.4 試験濃度の設定	12
3.5 試験液の調製	12
3.6 試験液および試験培養液の分析	13
3.7 試験操作	13
3.8 結果の算出	14
4 結果および考察	18
4.1 試験成績の信頼性に影響を及ぼしたと思われる環境要因	18
4.2 試験液および試験培養液中の被験物質濃度	18
4.3 生長曲線	18
4.4 半数生長阻害濃度 (EC50) および最大無影響濃度 (NOEC)	18
4.5 培養試験装置内環境, 試験液および試験培養液の pH, 試験液の外観	19
4.6 藻類の観察結果	19
Table 1~8	20~25
Figure 1~4	26~29
付属資料-1 赤外吸収スペクトル	30~31
付属資料-2 化審法テストガイドライン推奨培地の組成	32~33
付属資料-3 試験液の調製	34~35
付属資料-4 試験液および試験培養液の分析	36~47
付属資料-5 結果の算出	48~53

要 約

試験委託者

環境省

表題

2,2-ビス [4-ヒドロキシ-3,5-ジブロモフェニル] プロパンの藻類 (*Pseudokirchneriella subcapitata*) に対する生長阻害試験

試験番号

A 0 5 0 3 8 6

試験方法

本試験は「新規化学物質等に係る試験の方法について〈藻類生長阻害試験，ミジンコ急性遊泳阻害試験及び魚類急性毒性試験〉」（平成15年11月21日 薬食発第 1121002号，平成15・11・13製局第2号，環境企発第031121002号，最終改正：平成17年4月1日）に準拠して実施した。

- 1) 培養方式： 止水式（開放系），振とう培養（100rpm）
- 2) 暴露期間： 72時間
- 3) 試験濃度（設定値）：
対照区，助剤対照区，0.570，1.00，1.80，3.20，5.70* mg/L
* 試験液調製可能最高濃度
公比：1.8
助剤濃度一定：94 μ L/L（N,N'-ジメチルホルムアミド使用）
- 4) 試験液量： 100 mL／容器
- 5) 連数： 6 容器／対照区および助剤対照区，3 容器／濃度区
- 6) 初期細胞濃度： 前培養した藻類 5×10^3 cells/mL
- 7) 試験温度： 23 ± 2 °C
- 8) 照明： 75μ E/m²/s（装置中央フラスコ液面付近）で連続照明
（装置内変動：±20％以内）
- 9) 分析法： 高速液体クロマトグラフィー（HPLC）

結 果

1) 試験液および試験培養液中の被験物質濃度

測定値の設定値に対する割合は、暴露開始時の試験液において 85～88%，暴露終了時の試験培養液において 4～7%であった。濃度減少の主な原因は、培養条件下での光による被験物質の変化が考えられた。阻害濃度の算出には測定値の平均値（時間加重平均）を用いた。

2) 生長速度の比較による阻害濃度

半数生長阻害濃度 $ErC50$ (0-72h) : $> 1.88 \text{ mg/L}$ (95%信頼区間：算出不可)*

最大無影響濃度 $NOECr$ (0-72h) : 0.497 mg/L

*試験最高濃度区は、試験液調製可能最高濃度 (5.70 mg/L ，測定値の平均値： 1.88 mg/L) であり、阻害率が<50%であったため、「>試験最高濃度」という結果となった。

3) 生長曲線下面積の比較による阻害濃度

半数生長阻害濃度 $EbC50$ (0-72h) : 1.53 mg/L (95%信頼区間：算出不可)

最大無影響濃度 $NOECb$ (0-72h) : 0.268 mg/L

4) 収量の比較による阻害濃度

半数生長阻害濃度 $EyC50$ (0-72h) : 1.57 mg/L (95%信頼区間：算出不可)

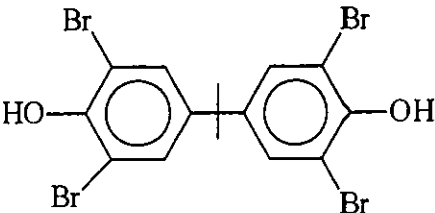
最大無影響濃度 $NOECy$ (0-72h) : 0.268 mg/L

5) 藻類の形態観察

暴露終了時の顕微鏡下での細胞形態観察の結果、全濃度区において細胞形態の変化（収縮，膨張，破裂等）や細胞凝集は認められず，また，対照区および助剤対照区との相違もなかった。

1 被験物質

1.1 名称、構造式および物理化学的性状

被 験 物 質 の 名 称	2, 2-ビス [4-ヒドロキシ-3, 5-ジブロモフェニル] プロパン		
別 名	(略称：I P D B)		
C A S 番 号	79-94-7		
構 造 式 又 は 示 性 式 (いずれも不明の場合は、 その製法の概要)			
分 子 量	543. 87		
試 験 に 供 し た 物 質 の 純 度 (%)	99. 8%		
試 験 に 供 し た 物 質 の ロ ッ ト 番 号	T556F		
不 純 物 の 名 称 及 び 含 有 率	—		
蒸 気 圧	—		
対 水 溶 解 度	不溶		
1-オクタノール/水分配係数	—		
融 点	183. 6℃		
沸 点	—		
常 温 に お け る 性 状	白色結晶性粉末		
安 定 性	通常の取り扱い条件においては安定。 酸化剤との接触に注意する。		
溶 媒 に 対 す る 溶 解 度 等	溶 媒	溶 解 度	溶 媒 中 の 安 定 性
	メタノール	可溶	—
	エーテル	可溶	—
	アセトニトリル	>1000 mg/L*	—
	ジメチルホルムアミド*	>57000 mg/L*	—

上記内容は供給者提供資料による。

ただし、*の内容は以下の通り。

*：当社測定値

1.2 供試試料

供給者： XXXXXXXXXX

1.3 保管法および安定性の確認

被験物質は試験期間中、当研究所内の試験物質保管用冷蔵庫（保管条件：冷蔵，暗所，密栓）内に保管した。試験終了時，保管した被験物質の赤外吸収スペクトルを測定した。得られたスペクトルは試験開始時に測定したスペクトルと一致したことから，被験物質は保管中安定であったと判断した。赤外吸収スペクトルを付属資料－1に示す。

（装置）フーリエ変換赤外分光分析装置：Nicolet AVATAR 320 型

2 供試生物

- 1) 分類 : 単細胞緑藻類
- 2) 学名 : *Pseudokirchneriella subcapitata*
- 3) 株名 : ATCC22662
- 4) 入手先 : American Type Culture Collection
- 5) 入手日 : 1996年6月20日
- 6) 入手後の管理 : Gorham培地を用い無菌的に継代培養。定期的（約6ヶ月）に細菌検査をし無菌性を確認。
- 7) 感受性の確認 : 定期的（約6ヶ月毎）に基準物質（重クロム酸カリウム，試薬特級）による生長阻害試験を行い，供試生物の感受性を調べている。1996年11月以降の72時間50%生長阻害濃度（EbC50）は，以下の通りである。
平均値 ± 標準偏差 = 0.428 ± 0.0683 mg/L, n=18
（最小値 ～ 最大値 = 0.285 ～ 0.543 mg/L）
- 8) 前培養 : 前培養期間；2006年6月2日～2006年6月6日
この間，藻類は対数増殖した。（環境条件は試験と同様）

3 試験方法

本試験は「新規化学物質等に係る試験の方法について＜藻類生長阻害試験，ミジンコ急性遊泳阻害試験及び魚類急性毒性試験＞」（平成15年11月21日 薬食発第1121002号，平成15・11・13 製局第2号，環境企発第031121002号，最終改正：平成17年4月1日）（以下，化審法テストガイドラインと称する）に準拠して実施した。

試験容器およびその他の器具は，必要に応じて滅菌したものを使用した。また，藻類の接種も無菌条件下で行った。

3.1 試験条件

- 1) 培養方式 : 止水式（開放系），振とう培養（100rpm）
- 2) 暴露期間 : 72時間
- 3) 試験液量 : 100 mL／容器
- 4) 連数 : 6 容器／対照区および助剤対照区，3 容器／濃度区
- 5) 初期細胞濃度 : 前培養した藻類 5×10^3 cells/mL
- 6) 試験温度 : 23 ± 2 °C
- 7) 照明 : $75 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ （装置中央フラスコ液面付近）で連続照明
（装置内変動：±20%以内）
- 8) pH : 試験液の pH 調整なし

3.2 培地

前培養および試験ともに化審法テストガイドライン＜藻類生長阻害試験＞に示されている推奨培地を濾過滅菌（ $0.22 \mu\text{m}$ ）後用いた。組成表を付属資料－2に示す。

3.3 試験容器および藻類培養試験装置等

- 1) 試験容器 : 300 mL容ガラス製三角フラスコ（IWAKI製）（通気性のシリコン栓付）
- 2) 藻類培養試験装置 : 伊藤製作所製 AGP-150RL型
- 3) 光学顕微鏡 : ニコン製 ECLIPSE TE300型
- 4) 粒子計数装置 : シスメックス製 CDA-500型
- 5) pH計 : 東亜電波工業製 HM-40V型
- 6) 温度計 : Tasco Japan 製 TNA-120型
- 7) 光量子計 : Apogee製 QMSS型
- 8) 電子天秤 : メトラー製 AG204型
メトラー製 AE163型
メトラー製 AB204-S型
メトラー製 PB3002型

3.4 試験濃度の設定

試験濃度は、当該被験物質の培地に対する溶解度 5.7 mg/L（当社測定値）以下とした。
以下の表に示す予備試験（各 1 連）結果に基づき、本試験濃度を次のように決定した。

なお、予備試験において被験物質の濃度減少がみられるが、この主な原因としては、培養条件下での光による被験物質の変化が考えられた。

本試験濃度（設定値）：対照区、助剤対照区、0.570, 1.00, 1.80, 3.20, 5.70* mg/L

* 試験液調製可能最高濃度

公比：1.8

予備試験結果

濃度 (mg/L)	阻害率 (%) $I_y(0-72h)^{*1}$	0時間時分析結果 (設定値に対する 割合, %)	72時間後分析結果 (設定値に対する割合, %)		
			藻類添加有	藻類添加無	藻類添加無 遮光 ^{*2}
助剤対照区	--	--	--	--	--
0.285	11	97	<0.8	<0.8	98
0.570	-2	--	--	--	--
1.14	10	--	--	--	--
2.85	10	--	--	--	--
5.70	41	85	8	8	86

*1 「3.8 結果の算出, 2) 生長阻害率の算出, ③収量の比較（収量法）による生長阻害率」に示した式に基いて算出した。

*2 フラスコをアルミ箔で覆ったもの

3.5 試験液の調製

試験液の調製方法を付属資料－3に示す。対照区は培地のみとし、助剤対照区には助剤のみを含むもの（助剤濃度：94 μ L/L）を調製した。なお、調製に用いた各原液は用時調製した。また、pH測定および色調観察のための試験液（各試験区 1 連、以下予備容器とする）も調製した。

調製時の試験液の外観を観察し記録した。

3.6 試験液および試験培養液の分析

暴露開始時，開始24，48時間後および終了時に，全試験区の試験液および試験培養液中の被験物質濃度を，高速液体クロマトグラフィー（HPLC）により分析した。

暴露開始時には，各試験区毎に，全ての試験容器より試験液を一定量ずつ採取して混合したものを分析試料とした。暴露開始24，48時間後および暴露終了時には，各試験区毎に，全ての試験容器より試験培養液を一定量ずつ採取して混合し，藻類を遠心分離（3000 rpm，10 分間）後の上澄み液を分析試料とした。

詳細を付属資料－4に示す。

3.7 試験操作

前培養した藻類の細胞数を，粒子計数装置および血球計算盤と顕微鏡で計数し，試験液中の細胞濃度が 5×10^3 cells/mL となるように，前培養液の一定量を試験液の入った容器に添加した。なお，予備容器には前培養液は添加しなかった。

各試験容器を 23 ± 2 °C の培養装置に設置（ランダム発生表に従いランダム配置，24 時間毎に再配置）し試験を開始した。同時に予備容器も設置した。その後，24，48 および 72 時間後に細胞濃度を測定した。細胞濃度は各試験容器より試験培養液 1.0 mL（72 時間では 0.5 mL）を採取し，粒子計数装置用電解液 9.0 mL（72 時間では 9.5 mL）と混合した後，粒子計数装置により計数した。

試験培養液中の藻類について，暴露開始後 0，24 および 48 時間には，肉眼による色調観察を，また暴露終了時には，肉眼による色調観察および顕微鏡下での細胞形態観察を行った。3.20 mg/L および 5.70 mg/L の濃度区において，暴露開始後 48 時間以降で試験液の褐色化がみられたため，それ以降，これらの濃度区の色調観察は予備容器との相対で行った。

各試験区における暴露開始時の試験液および暴露終了時の試験培養液の pH を測定した。暴露開始時の pH は，予備容器から試験液を一部採取して測定し，終了時の pH は，各試験区の試験容器のうち 1 容器（No 1）の試験培養液について測定した。暴露期間中，培養装置内の温度，照明光強度および回転数を少なくとも 1 日 1 回測定した。

3.8 結果の算出

1) 生長曲線

各試験区の細胞濃度の平均値を時間に対してプロットし生長曲線を作成した。

2) 生長阻害率の算出

下記の方法（速度法、面積法および収量法）で生長阻害率を算出した。

① 生長速度の比較（速度法）による生長阻害率（ I_μ ）

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

$$\mu_{i-n} = \frac{\ln N_n - \ln N_i}{t_n - t_i}$$

ここで、

μ_{i-n} : 生長速度

N_i : t_i 時の実測細胞濃度 (cells/mL)

[試験開始時（ t_0 ）の細胞濃度については設定値を用いる]

N_n : t_n 時の実測細胞濃度 (cells/mL)

t_i : 暴露開始後 i 回目に細胞濃度を測定した時間

t_n : 暴露開始後 n 回目に細胞濃度を測定した時間

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

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

ここで、

μ_c : 対照区（助剤使用時は助剤対照区）の平均生長速度

μ_i : 各濃度区における平均生長速度

② 生長曲線下の面積の比較（面積法）による生長阻害率（ I_A ）

生長曲線下の面積（ A ）は次の式により算出した。

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

ここで,

A : 生長曲線下の面積

N_0 : 暴露開始時の設定細胞濃度 (cells/mL)

N_1 : t_1 時の実測細胞濃度 (cells/mL)

N_n : t_n 時の実測細胞濃度 (cells/mL)

t_1 : 暴露開始後最初に細胞濃度を測定した時間

t_n : 暴露開始後 n 回目に細胞濃度を測定した時間

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

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

ここで,

A_c : 対照区 (助剤使用時は助剤対照区) の生長曲線下の面積

A_t : 各濃度区における生長曲線下の面積

③収量の比較 (収量法) による生長阻害率 (I_y)

収量 (Y) は次の式により算出した。

$$Y = N_n - N_0$$

ここで,

Y : 収量

N_0 : 暴露開始時の設定細胞濃度 (cells/mL)

N_n : t_n 時の実測細胞濃度 (cells/mL)

平均の収量より各濃度区における生長の阻害百分率 (I_y) を次の式により算出した。

$$I_y = \frac{Y_c - Y_t}{Y_c} \times 100$$

ここで,

Y_c : 対照区 (助剤使用時は助剤対照区) の収量

Y_t : 各濃度区における収量

3) 阻害濃度算出に用いる被験物質濃度の決定

4), 5) のEC50およびNOECの算出に用いる被験物質濃度は、測定値の平均値（時間加重平均）とした。

（時間加重平均）

$$\overline{mc}_n = \frac{ConcA_n - ConcB_n}{\ln(ConcA_n) - \ln(ConcB_n)}$$

$$\overline{MC} = \frac{\overline{mc}_1 + \overline{mc}_2 + \cdots + \overline{mc}_n}{n}$$

\overline{mc}_n : 各暴露期間の平均測定濃度
 (ConcA_n と ConcB_n が同じ値の場合は ConcA_n)

ConcA_n : n期間の始めの測定濃度
 (暴露開始時または暴露開始24, 48時間後の測定濃度)

ConcB_n : n期間の終わりの測定濃度
 (暴露開始24, 48時間後または暴露終了時の測定濃度)

\overline{MC} : 平均測定濃度

4) 半数生長阻害濃度（EC50）の算出

2) で算出した速度法、面積法および収量法による生長阻害率（I_μ 値、I_A 値およびI_y 値）を用いて、以下の方法で半数生長阻害濃度（EC50）を決定した。

最高濃度区における阻害率	≥ 50%	< 50%
濃度－生長阻害率曲線の記載 (片対数紙にプロット)	記載する。	記載する。
EC50の決定方法	濃度－生長阻害率曲線において直線性の認められる点を用いて直線回帰分析（最小二乗法）を行い、阻害率 50%との交点から算出。 可能な限り 95%信頼区間を算出。	推定される濃度領域を記載する。
EC50の表記方法	I _μ 値より求めた場合：ErC50 (0-72h) I _A 値より求めた場合：EbC50 (0-72h) I _y 値より求めた場合：EyC50 (0-72h)	

5) 最大無影響濃度 (NOEC)

以下の統計的手法により、助剤対照区と比較して有意差が認められない試験最高濃度を最大無影響濃度 (NOEC) とした。その際、速度法により求めた場合は NOECr (0-72h)、面積法により求めた場合は NOECb (0-72h)、収量法により求めた場合は NOECy (0-72h) と記載した。

多群の比較 [対照区 (または助剤対照区) 以外に2群以上]		2 群の比較 [対照区 (または助剤対照区) 以外に1群]	
Bartlett の等分散検定		F 検定	
等分散が認められる場合	等分散が認められない場合	等分散が認められる場合	等分散が認められない場合
一元配置分散分析 (ANOVA) パラメトリックのDunnett, Williams または Scheffe の多重比較検定	Kruskal-Wallisの検定 ノンパラメトリックのDunnett, Williams または Scheffe の多重比較検定	Student の t 検定	Welch の t 検定
Yukms ソフトウェア Statlight「#4 多群の比較」 (Yukms Corp, 東京)		Yukms ソフトウェア Statlight「#3 2群の比較」 (Yukms Corp, 東京)	

なお、本試験のNOECは、Bartlettの等分散検定 ($\alpha=0.01$) を行い等分散性を確認後、一元配置分散分析 (1-way ANOVA, $\alpha=0.05$) および Dunnettまたは Williamsの多重比較検定 ($\alpha=0.05$, 両側) を用い算出した。

4 結果および考察

4.1 試験成績の信頼性に影響を及ぼしたと思われる環境要因

該当する事象はなかった。

4.2 試験液および試験培養液中の被験物質濃度

暴露開始時の試験液，暴露開始 24，48 時間後および暴露終了時の試験培養液中の被験物質濃度を測定した。その結果を Table 1 に，代表的なクロマトグラムを付属資料－4 に示す。

被験物質濃度分析の結果，測定値の設定値に対する割合は，暴露開始時の試験液において 85～88%，暴露終了時の試験培養液において 4～7% であった。予備試験において同一培養装置内に設置した遮光した試験液には濃度減少が認められなかったことから，濃度減少の主な原因は，培養条件下での光による被験物質の変化が考えられた。

4.3 生長曲線

暴露期間中の細胞濃度を Table 2，対照区の生長速度を Table 3 および生長曲線を Figure 1 に示す。

対照区および助剤対照区における細胞濃度は 72 時間の培養でそれぞれ平均 535 倍および 514 倍増加し，また，対照区の毎日の生長速度の変動係数は暴露期間を通じて 35%，繰り返し間の生長速度の変動係数は 15% を超えることはなく，試験条件（開放系条件）下で正常な生長を示した。各濃度区の細胞濃度は，用量依存的に減少する傾向がみられた。

4.4 半数生長阻害濃度（EC50）および最大無影響濃度（NOEC）

濃度区における生長阻害率を Table 4 に，半数生長阻害濃度（EC50）および最大無影響濃度（NOEC）を Table 5 に，濃度－阻害率曲線を Figure 2，Figure 3 および Figure 4 に，EC50 および NOEC の算出結果（使用した統計的手法，入力値，入力に用いた観察点（試験区）およびその出力結果）を付属資料－5 に示す。得られた EC50 および NOEC を以下に示す。

1) 生長速度の比較による阻害濃度

ErC50 (0-72h) : > 1.88 mg/L (95%信頼区間：算出不可) *

NOECr (0-72h) : 0.497 mg/L

* 試験最高濃度区は，試験液調製可能最高濃度（5.70 mg/L，測定値の平均値：1.88 mg/L）であり，阻害率が<50%であったため，「>試験最高濃度」という結果となった。

2) 生長曲線下面積の比較による阻害濃度

EbC50 (0-72h) : 1.53 mg/L (95%信頼区間：算出不可)

NOECb (0-72h) : 0.268 mg/L

3) 収量の比較による阻害濃度

EyC50 (0-72h) : 1.57 mg/L (95%信頼区間：算出不可)

NOECy (0-72h) : 0.268 mg/L

4.5 培養試験装置内環境，試験液および試験培養液のpH，試験液の外観

暴露期間中の培養試験装置内環境（温度，照明光強度，回転数）をTable 6に，暴露開始時の試験液および暴露終了時の試験培養液のpHをTable 7に示す。

培養試験装置内の温度は，設定範囲（ $23 \pm 2^\circ\text{C}$ ）内であった。pHは，暴露開始時 7.9～8.0，暴露終了時 8.0～9.7であった。対照区においては，1.5以上のpHの変動は認められなかった。

また，調製時の試験液の外観をTable 8に示す。全ての試験区において，けん濁物質，浮遊物質，沈殿物，油状物質は認められず，色調は無色であった。

4.6 藻類の観察結果

試験培養液の肉眼による色調観察の結果，全試験区で時間経過とともに緑色度が増加する傾向がみられた。

暴露終了時の顕微鏡下での細胞形態観察の結果，全濃度区において細胞形態の変化（収縮，膨張，破裂等）や細胞凝集は認められず，また，対照区および助剤対照区との相違もなかった。

以 上

Table 1 Measured Concentration of the Test Substance in Test Cultures

Nominal Concentration (mg/L)	Measured Concentration (mg/L) (Percent of Nominal)				Mean ^a Measured Concentration (mg/L) (Percent of Nominal)
	0 Hour	24 Hour	48 Hours	72 Hours	
Control	<0.0007	<0.0007	<0.0007	<0.0007	----
Solvent Control	<0.0007	<0.0007	<0.0007	<0.0007	----
0.570	0.501 (88)	0.180 (32)	0.0586 (10)	0.0200 (4)	0.153 (27)
1.00	0.858 (86)	0.313 (31)	0.110 (11)	0.0397 (4)	0.268 (27)
1.80	1.53 (85)	0.581 (32)	0.223 (12)	0.0753 (4)	0.497 (28)
3.20	2.72 (85)	1.08 (34)	0.437 (14)	0.153 (5)	0.919 (29)
5.70	4.88 (86)	2.33 (41)	0.960 (17)	0.418 (7)	1.88 (33)

a : time weighted mean

Table 2 Cell Densities of *Pseudokirchneriella subcapitata* during the 72-Hour Exposure

Nominal Concentration [Mean ^a Measured Conc.] (mg/L)	Vessel No.	Cell Densities (cells/mL)			
		0 Hour*	24 Hours	48 Hours	72 Hours
Control	1	5000	35900	387800	2659800
	2	5000	35500	313800	2469800
	3	5000	41000	380800	2909800
	4	5000	42300	339800	2619800
	5	5000	47000	426800	2979800
	6	5000	32200	302800	2419800
	Average	5000	39000	358600	2676500
	SD	0	5400	47900	227400
Solvent Control	1	5000	34900	436800	2629800
	2	5000	44300	409800	2939800
	3	5000	36300	343800	2689800
	4	5000	35200	331800	2299800
	5	5000	33700	335800	2419800
	6	5000	32900	384800	2439800
	Average	5000	36200	373800	2569800
	SD	0	4100	43600	231200
0.570 [0.153]	1	5000	51200	370800	2549800
	2	5000	55400	389800	2829800
	3	5000	36200	376800	2879800
	Average	5000	47600	379100	2753100
	SD	0	10100	9700	177900
1.00 [0.268]	1	5000	45400	338800	2549800
	2	5000	35000	309800	2229800
	3	5000	44800	364800	2579800
	Average	5000	41700	337800	2453100
	SD	0	5800	27500	194000
1.80 [0.497]	1	5000	31600	300800	2369800
	2	5000	31800	333800	2289800
	3	5000	26700	264800	2059800
	Average	5000	30000	299800	2239800
	SD	0	2900	34500	160900
3.20 [0.919]	1	5000	29900	271800	2259800
	2	5000	21100	207800	2079800
	3	5000	27500	290800	2229800
	Average	5000	26200	256800	2189800
	SD	0	4500	43500	96400
5.70 [1.88]	1	5000	18900	120800	959800
	2	5000	21100	140800	1039800
	3	5000	23300	122800	944800
	Average	5000	21100	128100	981500
	SD	0	2200	11000	51100

a : time weighted mean

SD : Standard deviation

* : Nominal initial densities

Table 3 Growth Rate of Control

Vessel No.	Growth Rate			Average	SD	CV(%)
	μ (0-24h)	μ (24-48h)	μ (48-72h)			
1	0.0821	0.0992	0.0802	0.0872	0.0046	5.3
2	0.0817	0.0908	0.0860			
3	0.0877	0.0929	0.0847			
4	0.0890	0.0868	0.0851			
5	0.0934	0.0919	0.0810			
6	0.0776	0.0934	0.0866			
Average	0.0853	0.0925	0.0839	0.0872	0.0046	5.3
SD	0.0058	0.0040	0.0027			
CV(%)	6.8	4.3	3.2			

SD: Standard deviation

CV: Coefficient of variation

Table 4 Growth Inhibition (%) of *Pseudokirchneriella subcapitata*

Nominal Concentration		Growth Rates		Areas under the growth curves		Yields	
[Mean ^a Measured Conc.]		Rate	Inhibition(%) ^{*1}	Area	Inhibition(%) ^{*1}	Yield	Inhibition(%) ^{*1}
(mg/L)	Vessel No.	μ (0-72h)	I_{μ} (0-72h)	A(0-72h)	I_A (0-72h)	Y(0-72h)	I_Y (0-72h)
Control	1	0.0872		41786000		2654800	
	2	0.0861		37721000		2464800	
	3	0.0884		44741000		2904800	
	4	0.0870		40308000		2614800	
	5	0.0888		46829000		2974800	
	6	0.0859		36778000		2414800	
	Average SD	0.0872 0.0012	-	41361000 3921000	-	2671500 227400	-
Solvent Control	1	0.0870		42578000		2624800	
	2	0.0886		45876000		2934800	
	3	0.0873		41100000		2684800	
	4	0.0852		36106000		2294800	
	5	0.0859		37606000		2414800	
	6	0.0860		39002000		2434800	
	Average SD	0.0867 0.0012	-	40378000 3561000	-	2564800 231200	-
0.570 [0.153]	1	0.0866		40426000		2544800	
	2	0.0880		44342000		2824800	
	3	0.0883		44170000		2874800	
	Average SD	0.0876 0.0009	-1.0	42979000 2213000	-6.4	2748100 177900	-7.1
1.00 [0.268]	1	0.0866		39518000		2544800	
	2	0.0847		34733000		2224800	
	3	0.0868		40488000		2574800	
	Average SD	0.0860 0.0012	0.8	38246000 3081000	5.3	2448100 194000	4.6
1.80 [0.497]	1	0.0856		36115000		2364800	
	2	0.0851		35952000		2284800	
	3	0.0836		31414000		2054800	
	Average SD	0.0848 0.0010	2.2	34494000 2668000	14.6**	2234800 160900	12.9*
3.20 [0.919]	1	0.0849		34058000		2254800	
	2	0.0838		30151000		2074800	
	3	0.0847		34097000		2224800	
	Average SD	0.0845 0.0006	2.5*	32769000 2267000	18.8**	2184800 96400	14.8**
5.70* [1.88]	1	0.0730		14570000		954800	
	2	0.0741		16063000		1034800	
	3	0.0728		14544000		939800	
	Average SD	0.0733 0.0007	15.5**	15059000 870000	62.7**	976500 51100	61.9**

a time weighted mean

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

SD Standard deviation

★ The maximum attainable concentration under the present test conditions and preparation methods.

* Indicates a significant difference ($\alpha=0.05$) from the solvent control.

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

Table 5 Calculated EC50 and NOEC

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

ErC50 (0-72h) (mg/L)	95-Percent Confidence Limits (mg/L)	NOECr (0-72h) (mg/L)
> 1.88	--	0.497

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

EbC50 (0-72h) (mg/L)	95-Percent Confidence Limits (mg/L)	NOECb (0-72h) (mg/L)
1.53 ^{*1}	--	0.268

Based on I_y (0-72h) value (Yields)

EyC50 (0-72h) (mg/L)	95-Percent Confidence Limits (mg/L)	NOECy (0-72h) (mg/L)
1.57 ^{*1}	--	0.268

The ErC50 value and associated 95% confidence limits could not be determined by least squares linear regression analysis because the growth inhibition (%) at the maximum concentration level was less than 50%.

The EbC50 and EyC50 values and associated 95 % confidence limits were determined by least squares linear regression analysis of the logarithm of test concentration against the growth inhibition (%) relative to the solvent control.

- *1 using the measured concentrations of 0.919 and 1.88 mg/L in the regression analysis
- not calculated

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

Table 6 Temperature, Light Intensity and Revolutions in the Incubation Chamber

Exposure Period (Hours)	Temperature (°C)	Light Intensity (μ E/m ² /s)	Revolutions (rpm)
0	22.5	72-74	100
24	23.3	68-72	100
48	22.8	70-74	100
72	23.0	70-74	100

Table 7 pH Values of Test Cultures

Nominal Concentration [Mean ^a Measured Conc.] (mg/L)	pH		
	0 Hour	72 Hours (Vessel No.)	
Control	8.0	9.3	(1)
Solvent Control	7.9	9.6	(1)
0.570 [0.153]	7.9	9.4	(1)
1.00 [0.268]	7.9	9.7	(1)
1.80 [0.497]	7.9	9.3	(1)
3.20 [0.919]	7.9	8.5	(1)
5.70 [1.88]	7.9	8.0	(1)

a : time weighted mean

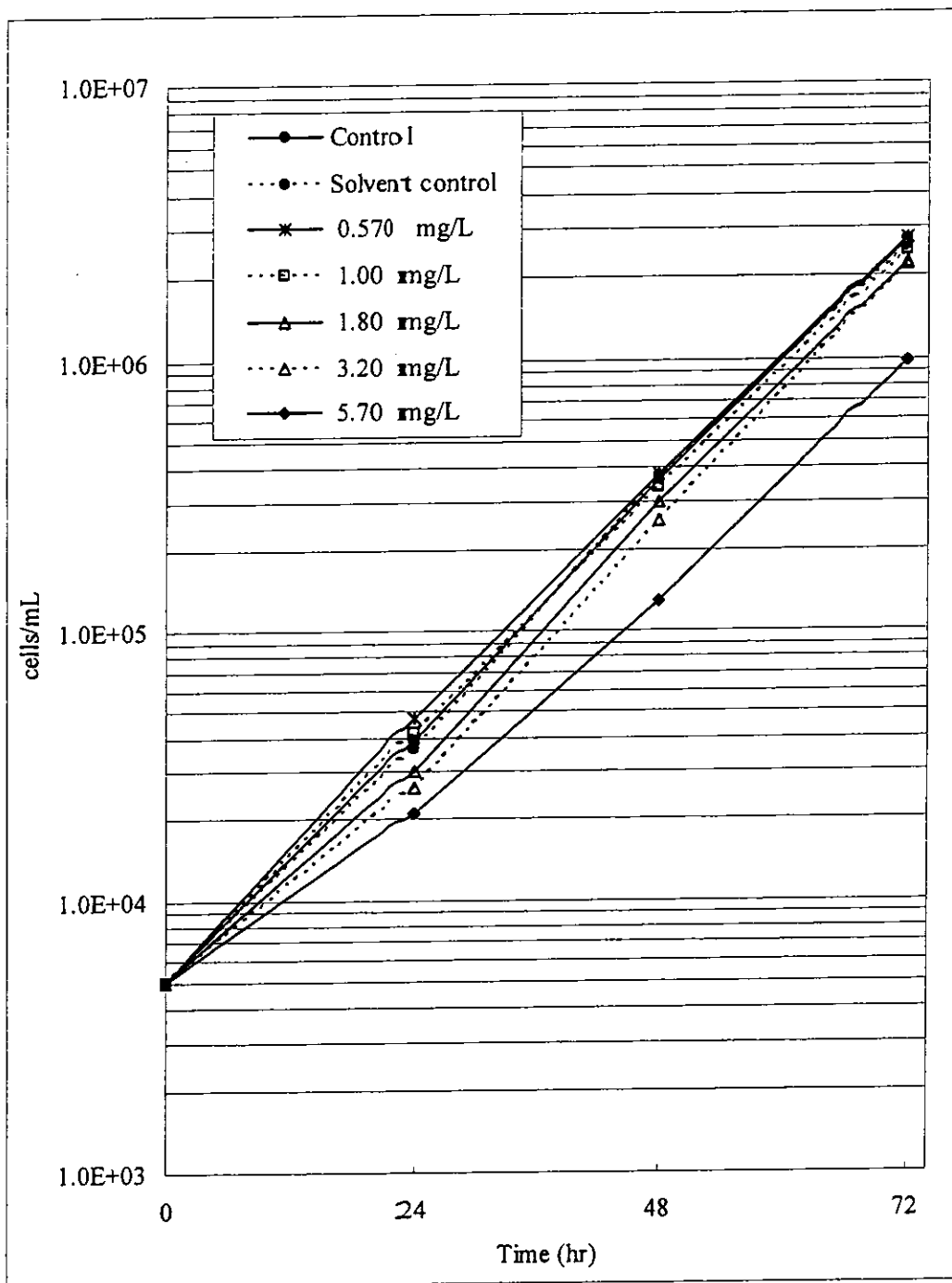
Table 8 Appearance of Test Solutions after Preparation

Nominal Concentration [Mean ^a Measured Conc.] (mg/L)		Suspended solids	Floating solids	Precipitation	Oily Substances	Color
Control		none	none	none	none	c-
Solvent Control		none	none	none	none	c-
0.570	[0.153]	none	none	none	none	c-
1.00	[0.268]	none	none	none	none	c-
1.80	[0.497]	none	none	none	none	c-
3.20	[0.919]	none	none	none	none	c-
5.70	[1.88]	none	none	none	none	c-

a : time weighted mean

c- : colorless

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



Values in legend are given in the nominal concentration.

Figure 2 Concentration-Inhibition Curve Based on I_{μ} values Calculated from the Growth Rates

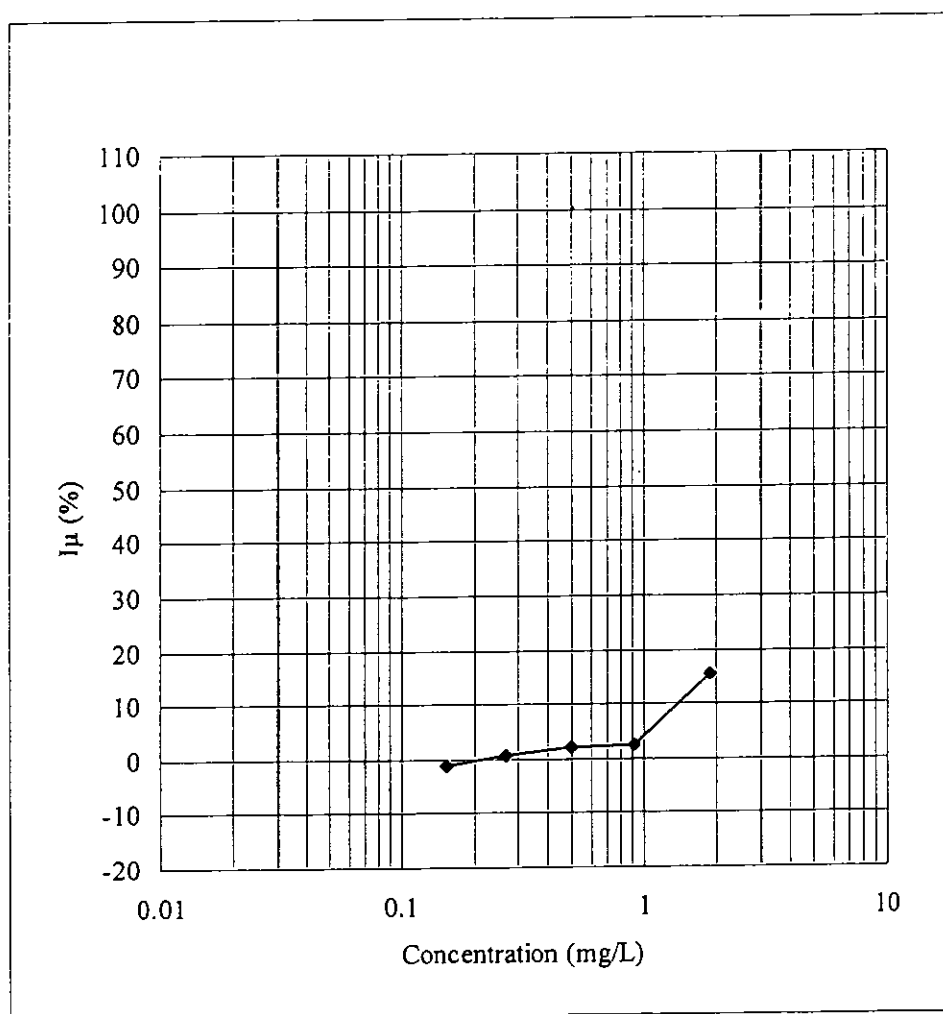


Figure 3 Concentration-Inhibition Curve Based on I_A Values Calculated from the Area under the Growth Curves

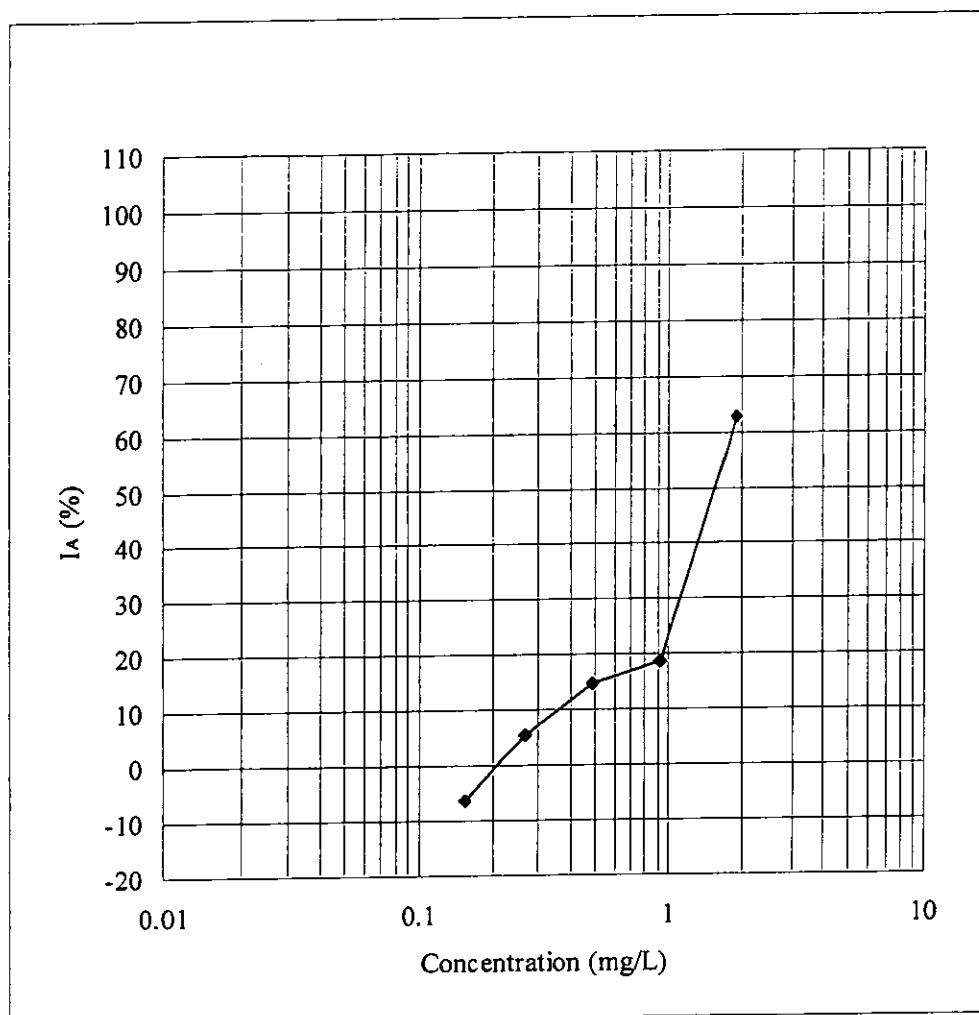
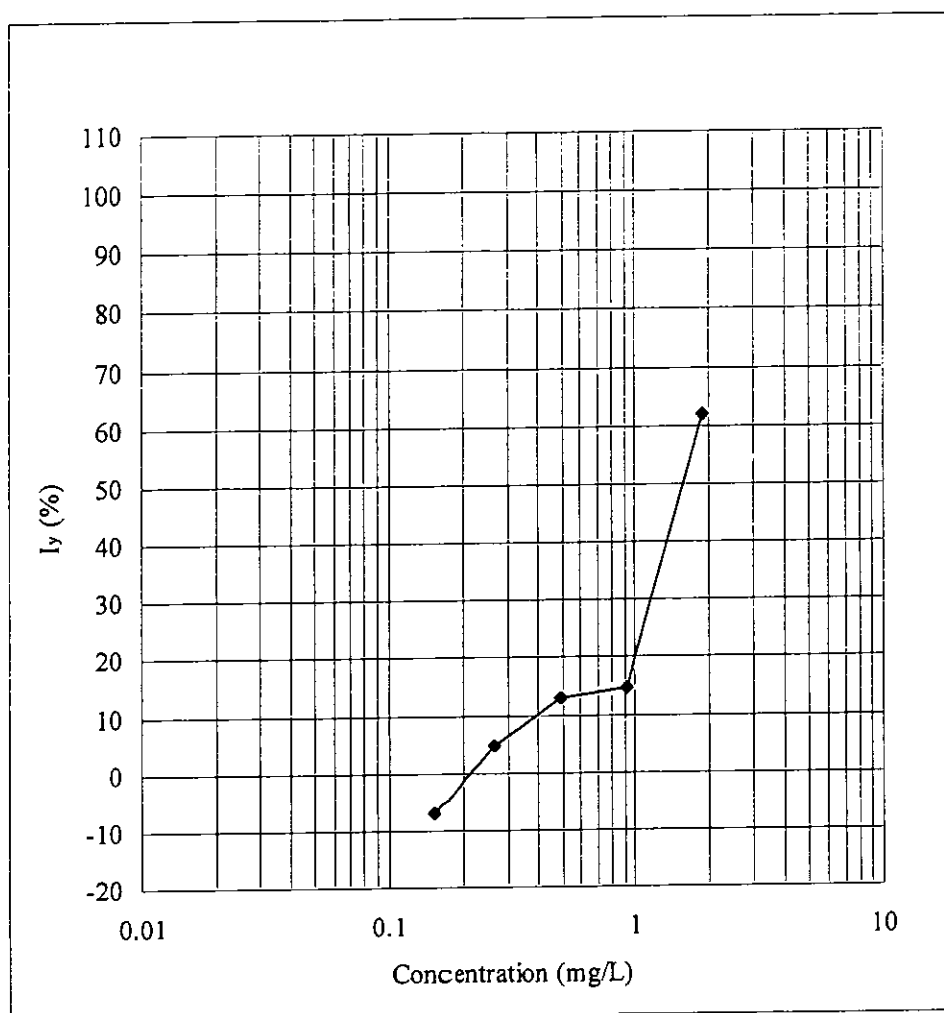


Figure 4 Concentration-Inhibition Curve Based on I_y Values Calculated from the Yields



付属資料－ 1

赤外吸収スペクトル

Figure A-1-1 Infrared absorption spectrum of the test substance at the start of the study

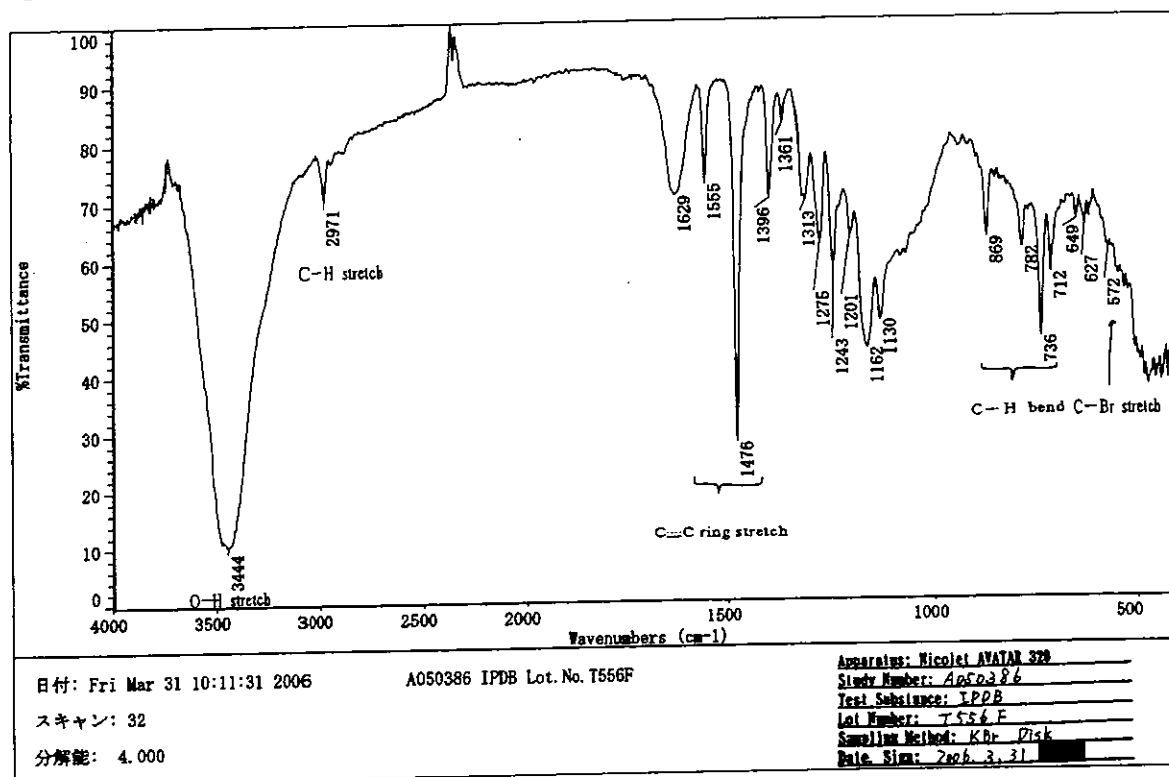
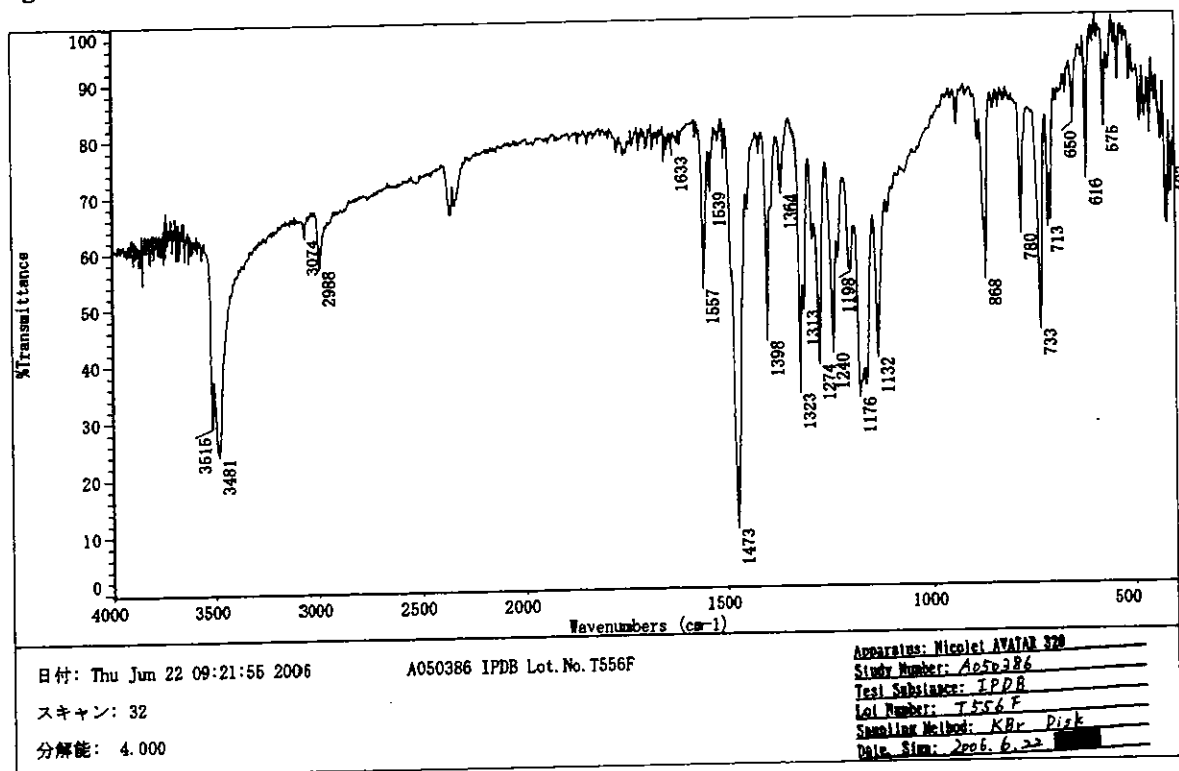


Figure A-1-2 Infrared absorption spectrum of the test substance at the end of the study



付属資料－ 2

化審法テストガイドライン推奨培地の組成

Table A-2 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	0.08
Na ₂ EDTA · 2H ₂ O	0.1
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0.0015
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0.007
CuCl ₂ · 2H ₂ O	0.00001
CaCl ₂ · 2H ₂ O	18
NH ₄ Cl	15
K ₂ HPO ₄	1.6
NaHCO ₃	50
MgCl ₂ · 6H ₂ O	12
MgSO ₄ · 7H ₂ O	15
<hr/>	
<u>pH</u>	<u>8.3</u>

付属資料－ 3

試験液の調製

試験液の調製

1. 準備

① 被験物質原液Ⅰの調製

採取量	→	570	mg
溶媒	→	N,N-ジメチルホルムアミド	
最終容量	→	10	mL
容器	→	メスボトル	
濃度	→	57000	mg/L
混合方式	→	手で転倒攪拌(溶解容易), 密栓	

② 被験物質原液Ⅱの調製

原液Ⅰ採取量	→	100	μL
溶媒	→	試験用水(23±2°Cにした化審法テストガイドライン推奨培地)	
最終容量	→	1000	mL
容器	→	メスフラスコ	
濃度	→	5.70	mg/L
助剤濃度	→	94	μL/L
混合方式	→	スターラーで2分攪拌, 超音波10分, 密栓	

③ 助剤原液の調製

助剤	→	N,N-ジメチルホルムアミド	
採取量	→	188	μL
溶媒	→	試験用水(23±2°Cにした化審法テストガイドライン推奨培地)	
最終容量	→	2000	mL
容器	→	メジュームビン	
助剤濃度	→	94	μL/L
混合方式	→	スターラーで2分攪拌, 超音波10分, 密栓	

2. 試験液の調製

②, ③の各原液を下記の表の通り採取し, 試験用水で添加, 混合して試験液とする。

試験用水(最終容量)	→	0.10	L
容器	→	300mL容ガラス製三角フラスコ(IWAKI製), 通気性シリコン栓	
混合方式	→	手で振とう攪拌	
濃度公比	→	1.78	
1濃度区の数	→	6容器/対照区および助剤対照区, 3容器/濃度区	

(以下の濃度表示は, 最小桁数に合わせている)

設定試験濃度 mg/L	区No. (略称)	②原液Ⅱ mL	③助剤原液 mL	助剤濃度 μL/L
対 照 区	C	→ 0	0	0
助剤対照区	SC	→ 0	100	94
0.570	Conc.1	→ 10.000	90.000	94
1.000	Conc.2	→ 17.545	82.455	94
1.800	Conc.3	→ 31.580	68.420	94
3.200	Conc.4	→ 56.140	43.860	94
5.700	Conc.5	→ 100	0	94

付属資料－４

試験液および試験培養液の分析

1 高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 測定条件

(装置)

高速液体クロマトグラフ (HPLC) :

Agilent 1100型 カラムスイッチング装置付 (No.1)

ワークステーション:	Agilent 1100 システム (Windows NT)
デガッサ:	G 1 3 2 2 A型 (分析用)
送液ポンプ:	G 1 3 1 1 A型 (クォータリポンプ, 分析用) G 1 3 1 0 A型 (アイソクラティックポンプ, 濃縮用)
オートサンプラ:	G 1 3 1 3 A型
カラムオープン:	G 1 3 1 6 A型 (カラムスイッチングバルブ)
フォトダイオードアレイ検出器:	G 1 3 1 5 B型

(条件)

カラム:	分析用	GLサイエンス製 Inertsil ODS-3V 5 μ m 4.6 mm i.d. \times 150 mm
	濃縮用	GLサイエンス製 Inertsil ODS-3 5 μ m 4.0 mm i.d. \times 10 mm

カラムオープン: 40 $^{\circ}$ C

溶離液:	分析用	0.1%リン酸水溶液/アセトニトリル=25/75 (v/v)
	濃縮用	0.1%リン酸水溶液/アセトニトリル=70/30 (v/v)

流速:	分析用	1.0 mL/min
	濃縮用	0.00 min 2.5 mL/min 3.00 min 2.5 mL/min 3.01 min 0.05 mL/min 10.00 min 0.05 mL/min 10.01 min 2.5 mL/min 14.00 min 2.5 mL/min 14.01 min 0.05 mL/min 20.00 min 0.05 mL/min

カラムスイッチングバルブ: 0 min (濃縮側), 3 min (分析側), 10 min (濃縮側)

測定波長: 210 nm

試料注入量: 500 μ L

* : JIS K0557 A4グレードの水

2 検量線

アセトニトリルを用い、0, 0.01~0.50 mg/Lの標準溶液を調製した。標準溶液の分析を以下のように行った。横軸に濃度 (mg/L) を、縦軸にピーク面積 (count) をとり、検量線を作成した。検量線の最小二乗法による直線回帰式の相関係数は 0.9998と良好であった。作成した検量線を Figure A-4-1に示す。

標準溶液 0.75 mL 採取
| ←培地 0.75 mL 添加
混合
|
HPLC測定

3 検出限界

試験液または試験培養液中の被験物質濃度 0.0007 mg/Lを検出限界とした。

4 試験液および試験培養液の分析方法

1) 試験液および試験培養液を以下のように分析した。代表的なクロマトグラムを Figure A-4-2 (2), (3), (4), (5), (6), (9), (10), (11), (12), (13)に示す。

分析試料^{*1} (培地で適宜希釈^{*2}) 0.75 mL 採取
| ←アセトニトリル 0.75 mL 添加
混合
|
HPLC測定

- *1 各試験区毎に、全ての試験容器より試験液または試験培養液を一定量ずつ採取して混合した。暴露開始時はこれを分析試料とした。暴露開始24, 48時間後および暴露終了時は、これを遠心分離 (3000 rpm, 10分間, 装置:日立工機製 CR21E型) し、藻類を分離した上澄み液を分析試料とした。
- *2 検量線範囲を超えるものについて適宜希釈した。

2) 標準溶液を「2 検量線」と同様に分析した。代表的なクロマトグラムを Figure A-4-2 (1), (7), (8)に示す。

3) 各試験液の被験物質濃度は、各分析時に測定した標準溶液のピーク面積を用いて、一点検量法により定量した。

5 添加回収試験

分析前処理は、「4 試験液および試験培養液の分析方法」に示すように試験液または試験培養液とアセトニトリルを混合する操作だけであるので添加回収試験の必要はないと判断した。したがって、回収率による被験物質濃度の補正は行わなかった。

Figure A-4-1 Calibration curve

No.	Concentration (mg/L)	Peak Area (count)
1	0.0	0
2	0.01	16.9
3	0.02	35.2
4	0.05	88.6
5	0.10	163.3
6	0.20	356.8
7	0.50	893.1

$$Y = 1,781X$$

$$r = 0.9998$$

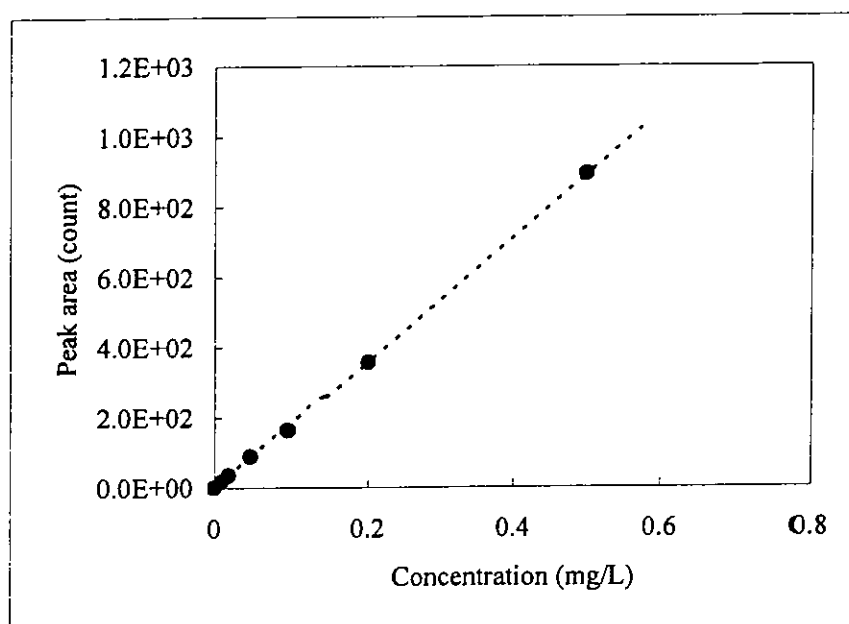
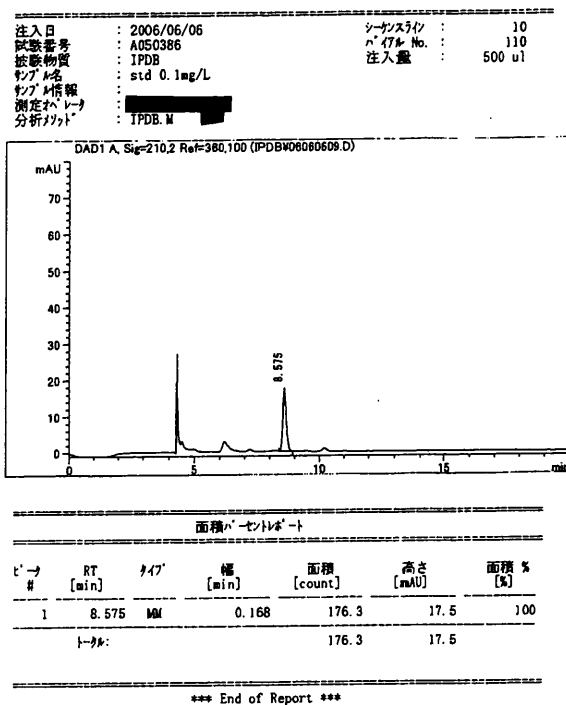


Figure A-4-2 Representative chromatograms

(1) Standard 0.10 mg/L ; 0 Hour



(2) Control ; 0 Hour

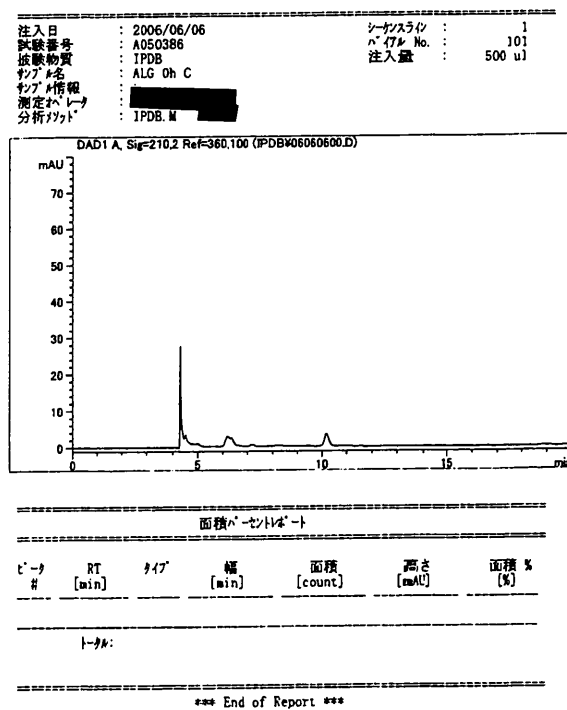
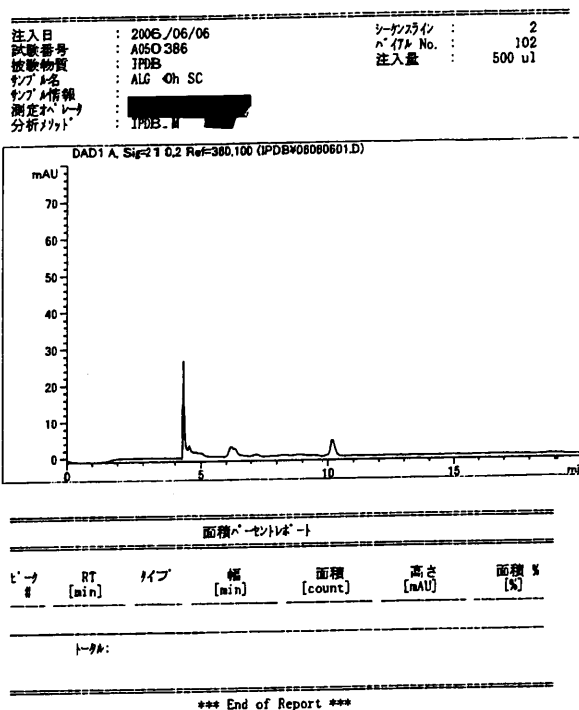


Figure A-4-2 Continued

(3) Solvent control 1 ; 0 Hour



(4) 0.570 mg/L nominal ; 0 Hour

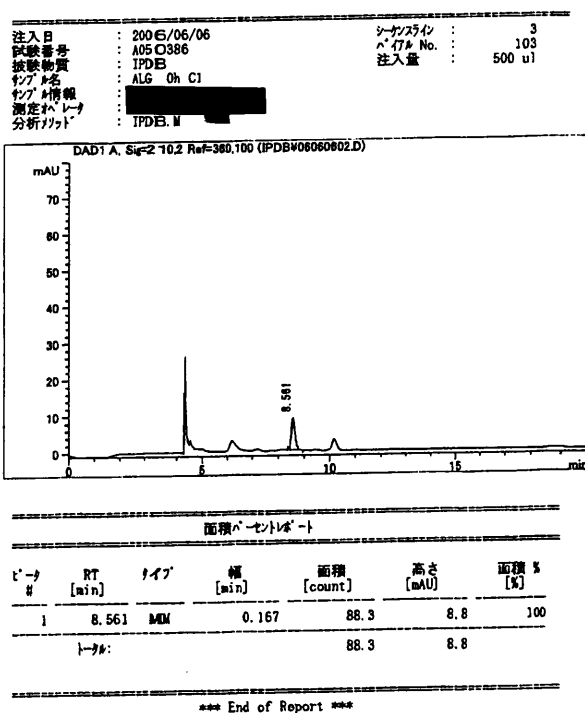
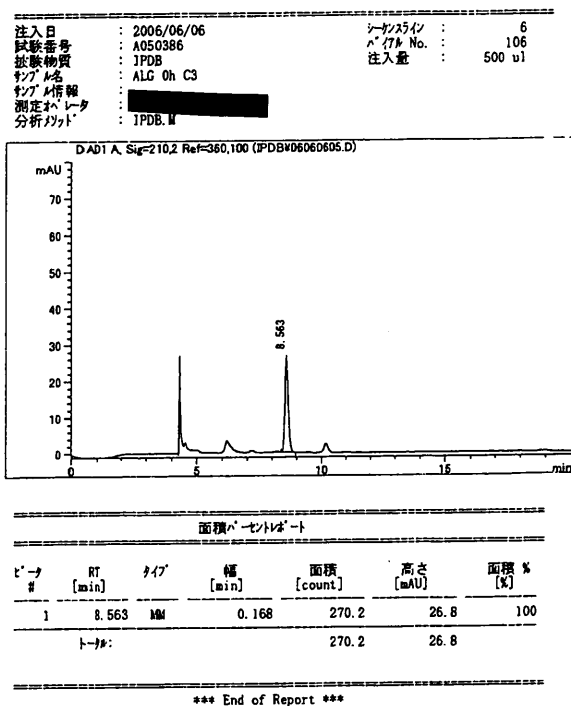


Figure A-4-2 Continued

(5) 1.80 mg/L nominal ; 0 Hour



(6) 5.70 mg/L nominal ; 0 Hour

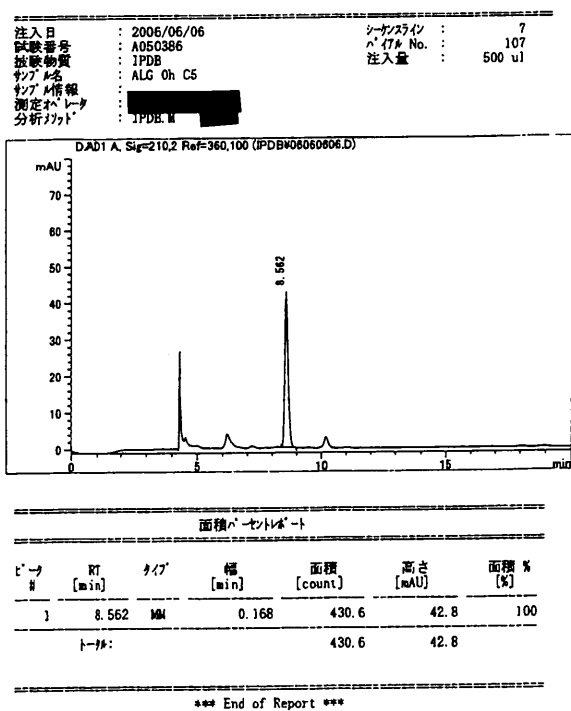
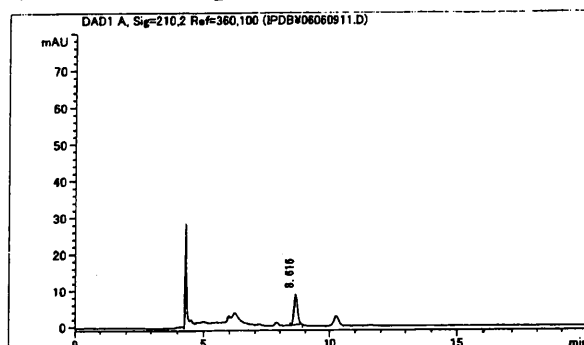


Figure A-4-2 Continued

(7) Standard 0.05 mg/L ; 72 Hours

注入日 : 2006/06/09 シーサンライン : 12
 試験番号 : A050386 ページ No. : 112
 投与物質 : IPDB 注入量 : 500 μ l
 サンプル名 : std 0.05mg/L
 サンプル情報 :
 測定オペレータ :
 分析ソフト : IPDB.M

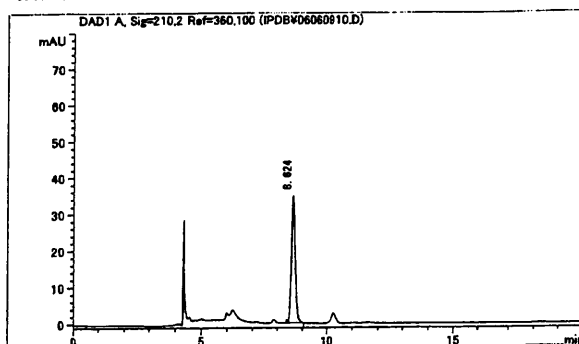


面積パーセントレポート						
ピーク #	RT [min]	タイプ	幅 [min]	面積 [count]	高さ [mAU]	面積 %
1	8.616	MM	0.162	82.8	8.5	100
トータル:				82.8	8.5	

*** End of Report ***

(8) Standard 0.20 mg/L ; 72 Hours

注入日 : 2006/06/09 シーサンライン : 11
 試験番号 : A050386 ページ No. : 111
 投与物質 : IPDB 注入量 : 500 μ l
 サンプル名 : std 0.2mg/L
 サンプル情報 :
 測定オペレータ :
 分析ソフト : IPDB.M

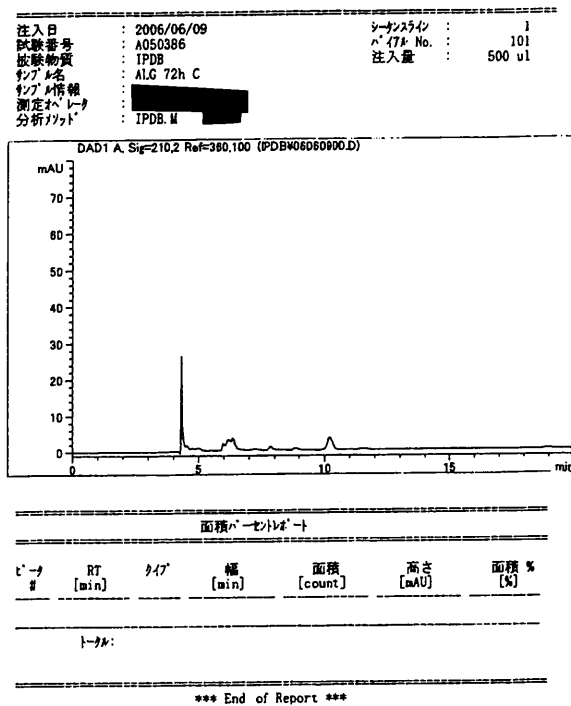


面積パーセントレポート						
ピーク #	RT [min]	タイプ	幅 [min]	面積 [count]	高さ [mAU]	面積 %
1	8.624	MM	0.172	358.8	34.9	100
トータル:				358.8	34.9	

*** End of Report ***

Figure A-4-2 Continued

(9) Control ; 72 Hours



(10) Solvent control ; 72 Hours

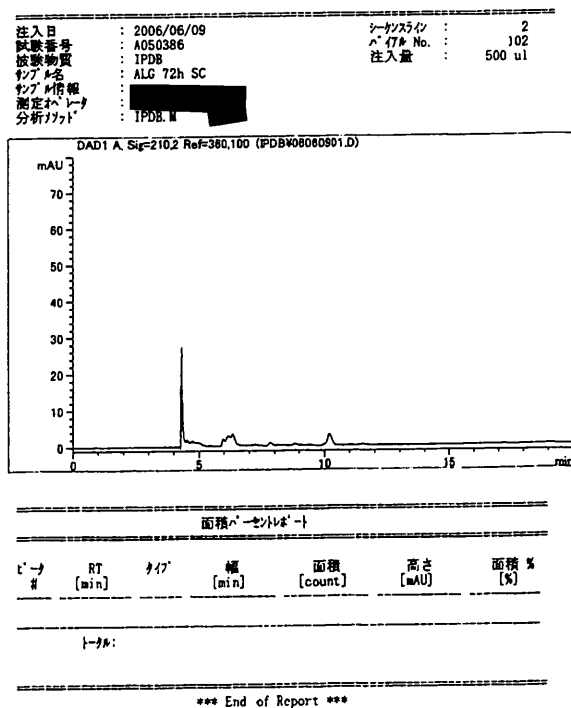
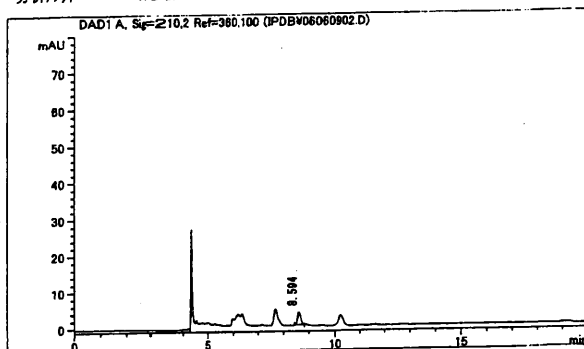


Figure A-4-2 Continued

(11) 0.570 mg/L nominal ; 72 Hours

注入日 : 2006/06/09 シーケンス : 3
 試験番号 : A05-0386 バイタル No. : 103
 投与物質 : IPDB 注入量 : 500 ul
 サンプル名 : ALG 72h C1
 サンプル情報 :
 測定値 :
 分析ロット : IPDB.M

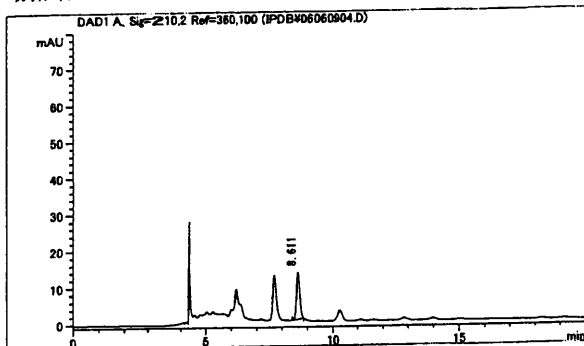


面積パーセントレポート						
ピーク #	RT [min]	タイプ	幅 [min]	面積 [count]	高さ [mAU]	面積 %
1	8.594	BM	0.154	33.2	3.6	100
トータル:				33.2	3.6	

*** End of Report ***

(12) 1.80 mg/L nominal ; 72 Hours

注入日 : 2006/06/09 シーケンス : 5
 試験番号 : A05-0386 バイタル No. : 105
 投与物質 : IPDB 注入量 : 500 ul
 サンプル名 : ALG 72h C3
 サンプル情報 :
 測定値 :
 分析ロット : IPDB.M

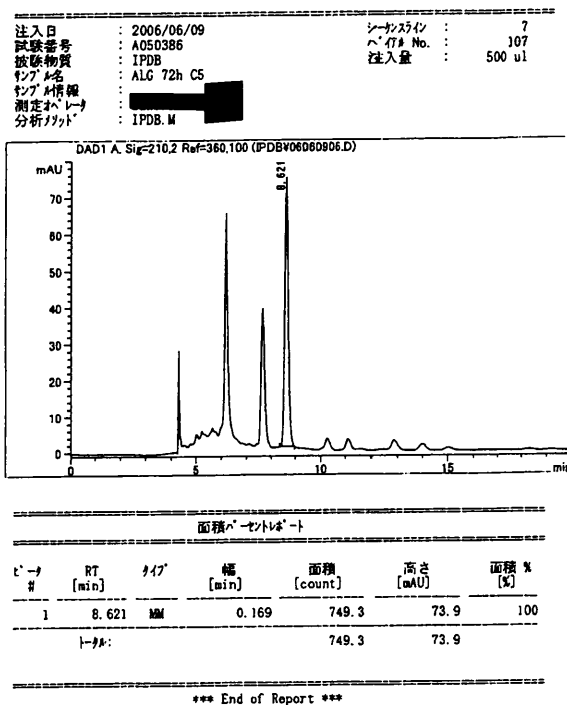


面積パーセントレポート						
ピーク #	RT [min]	タイプ	幅 [min]	面積 [count]	高さ [mAU]	面積 %
1	8.611	BM	0.161	124.7	12.9	100
トータル:				124.7	12.9	

*** End of Report ***

Figure A-4-2 Continued

(13) 5.70 mg/L nominal ; 72 Hours



付属資料－ 5

結果の算出

Table A-5-1 Calculation of the EC50

(1) EbC50 (0-72h)

直線回帰分析 (E C 50値の算出)

濃度 (mg/L)	阻害率 (%)	
x	log(x)	y
0.919	-0.08	18.8
1.88	0.63	62.7

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

分散分析

Factor	SS	DF	V	F-ratio	f(0.05,f1,f2)
Between	963.61	1	963.61	#DIV/0!	#NUM!
Within	0.00	0	#DIV/0!		
Total	963.61	1			

Table A-5-1 Continued

(2) EC_{50} (0-72h)直線回帰分析 (EC_{50} 値の算出)

濃度 (mg/L)	阻害率 (%)	
x	log(x)	y
0.919	-0.08	14.8
1.88	0.63	61.9

EC_{50}	95%信頼区間		単位
1.57	#NUM!	~ #NUM!	(mg/L)

分散分析

Factor	SS	DF	V	F-ratio	f(0.05,f1,f2)
Between	1109.21	1	1109.21	#DIV/0!	#NUM!
Within	0.00	0	#DIV/0!		
Total	1109.21	1			

Table A-5-2 Calculation of the NOEC

(1) NOECr (0-72h)

Input Data Table

Sol.conc.	Conc.1	Conc.2	Conc.3	Conc.4	Conc.5
Group1	Group2	Group3	Group4	Group5	Group6
0.0870	0.0866	0.0866	0.0856	0.0849	0.0730
0.0886	0.0880	0.0847	0.0851	0.0838	0.0741
0.0873	0.0883	0.0868	0.0836	0.0847	0.0728
0.0852	*	*	*	*	*
0.0859	*	*	*	*	*
0.0860	*	*	*	*	*

Group	Samples	Mean	S.E.	S.D.	Variance		
1	6	0.0867	0.0005	0.0012	0.0000		
2	3	0.0876	0.0005	0.0009	0.0000		
3	3	0.0860	0.0007	0.0012	0.0000		
4	3	0.0848	0.0006	0.0010	0.0000		
5	3	0.0845	0.0003	0.0006	0.0000		
6	3	0.0733	0.0004	0.0007	0.0000		
Method	vs	Side	Stat.	0.05	0.01	0.001	Prob.
Bartlett test		0	1.5387	11.0705	<15.0863	20.5152	0.9086
Method	vs	Side	Stat.	0.05	0.01	0.001	Prob.
1-way ANOVA		0	84.5293	>2.9013	4.5556	7.5674	3.2164E-10
Method	vs	Side	Stat.	0.05	0.01	0.001	Prob.
Dunnett	1 vs 2	2	1.3405	2.8161	3.6392	999.9900	0.5988
Dunnett	1 vs 3	2	0.8783	2.8161	3.6392	999.9900	0.8778
Dunnett	1 vs 4	2	2.6348	2.8161	3.6392	999.9900	0.0781
Dunnett	1 vs 5	2	3.0509	>2.8161	3.6392	999.9900	0.0351 *
Dunnett	1 vs 6	2	18.5362	>2.8161	>3.6392	999.9900	1.3718E-06 **

Table A-5-2 Continued

(2) NOECb (0-72h)

Input Data Table

Sol. cont. Group1	Conc.1 Group2	Conc.2 Group3	Conc.3 Group4	Conc.4 Group5	Conc.5 Group6
4257.8	4042.6	3951.8	3611.5	3405.8	1457.0
4587.6	4434.2	3473.3	3595.2	3015.1	1606.3
4110.0	4417.0	4048.8	3141.4	3409.7	1454.4
3610.6	*	*	*	*	*
3760.6	*	*	*	*	*
3900.2	*	*	*	*	*

Group	Samples	Mean	S.E.	S.D.	Variance		
1	6	4,037.8000	145.3922	356.1366	126,833.2640		
2	3	4,297.9333	127.7632	221.2923	48,970.2933		
3	3	3,824.6333	177.8844	308.1048	94,928.5833		
4	3	3,449.3667	154.0552	266.8315	71,199.0233		
5	3	3,276.8667	130.8882	226.7050	51,395.1433		
6	3	1,505.9000	50.2056	86.9587	7,561.8100		
Method	vs	Side	Stat.	0.05	0.01	0.001	Prob.
Bartlett test		0	3.3583	11.0705	<15.0863	20.5152	0.6449
Method	vs	Side	Stat.	0.05	0.01	0.001	Prob.
1-way ANOVA		0	40.7161	>2.9013	4.5556	7.5674	3.34E-08
Method	vs	Side	Stat.	0.05	0.01	0.001	Prob.
Williams(1971,1972,1977)	1 vs 2	2	0	2.1310	2.9470	999.9900	999.9900
Williams(1971,1972,1977)	1 vs 3	2	1.4331	2.2050	3.0030	999.9900	999.9900
Williams(1971,1972,1977)	1 vs 4	2	3.2264	>2.2290	>3.0190	999.9900	999.9900 **
Williams(1971,1972,1977)	1 vs 5	2	4.0508	>2.2410	>3.0270	999.9900	999.9900 **
Williams(1971,1972,1977)	1 vs 6	2	12.5139	>2.2470	>3.0310	999.9900	999.9900 **

Table A-5-2 Continued

(3) NOECy (0-72h)

Input Data Table

Sol.cont. Group1	Conc.1 Group2	Conc.2 Group3	Conc.3 Group4	Conc.4 Group5	Conc.5 Group6
2624.8	2544.8	2544.8	2364.8	2254.8	954.8
2934.8	2824.8	2224.8	2284.8	2074.8	1034.8
2684.8	2874.8	2574.8	2054.8	2224.8	939.8
2294.8	*	*	*	*	*
2414.8	*	*	*	*	*
2434.8	*	*	*	*	*

Group	Samples	Mean	S.E.	S.D.	Variance		
1	6	2,564.8000	94.3751	231.1709	53,440.0000		
2	3	2,748.1333	102.6861	177.8576	31,633.3333		
3	3	2,448.1333	112.0020	193.9931	37,633.3333		
4	3	2,234.8000	92.9157	160.9348	25,900.0000		
5	3	2,184.8000	55.6776	96.4365	9,300.0000		
6	3	976.4667	29.4863	51.0718	2,608.3333		
Method	vs	Side	Stat.	0.05	0.01	0.001	Prob.
Bartlett test		0	4.3258	11.0705	<15.0863	20.5152	0.5035
Method	vs	Side	Stat.	0.05	0.01	0.001	Prob.
1-way ANOVA		0	39.4861	>2.9013	4.5556	7.5674	4.12E-08
Method	vs	Side	Stat.	0.05	0.01	0.001	Prob.
Williams(1971,1972,1977)	1 vs 2	2	0	2.1310	2.9470	999.9900	999.9900
Williams(1971,1972,1977)	1 vs 3	2	1.3315	2.2050	3.0030	999.9900	999.9900
Williams(1971,1972,1977)	1 vs 4	2	2.9292	>2.2290	3.0190	999.9900	999.9900 *
Williams(1971,1972,1977)	1 vs 5	2	3.3037	>2.2410	>3.0270	999.9900	999.9900 **
Williams(1971,1972,1977)	1 vs 6	2	12.3535	>2.2470	>3.0310	999.9900	999.9900 **