

環境省殿

試 験 報 告 書

2, 6-ジメチルアニリンのオオミジンコ (*Daphnia magna*)
に対する繁殖試験

(試験番号: No. 2002-生21)

2003年 5月26日作成

株式会社 クレハ分析センター

原本と相違ないことを証明する。

2003 年 5 月 26 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, 6-ジメチルアニリンのオオミジンコ (*Daphnia magna*) に対する繁殖試験

試験番号： No. 2002-生21

適用GLP： 本試験は日本国環境省総合環境政策局環境保健部環境安全課環境リスク評価室長 通知
「生態影響試験実施に関する基準の改正について」(別添)「生態影響試験実施に関する基準」(環保安第 242 号, 2001 年) に従って実施したものである。

2003年 5月26日

承認 試験責任者

確認 運営管理者

[Redacted Signature]

[Redacted Signature]

[Redacted Stamp]

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, 6-ジメチルアニリンのオオミジンコ (*Daphnia magna*)に対する繁殖試験

試験番号： No. 2002-生21

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	2002年12月20日	2002年12月20日	2002年12月20日
実験状況の監査, 査察	2003年 1月29日	2003年 1月30日	2003年 1月30日
	2003年 2月 5日	2003年 2月 5日	2003年 2月 5日
	2003年 2月12日	2003年 2月13日	2003年 2月13日
	2003年 2月19日	2003年 2月20日	2003年 2月20日
実験終了後の監査	2003年 3月 3日	2003年 3月 4日	2003年 3月 4日
組織体制の監査	2003年 1月30日	2003年 1月30日	2003年 1月30日
施設・設備の査察			
試験用機器等	2003年 1月30日	2003年 1月30日	2003年 1月30日
施設, 設備等	2003年 1月30日	2003年 1月30日	2003年 1月30日
試 験 系	2003年 1月30日	2003年 1月30日	2003年 1月30日
試験報告書の監査	2003年 5月26日	2003年 5月26日	2003年 5月26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上記の通り確認した。

2003年 5月26日

信頼性保証担当者：



試験実施概要

1. 表題： 2, 6-ジメチルアニリンのオオミジンコ (*Daphnia magna*) に対する繁殖試験
2. 試験目的： 被験物質のオオミジンコ (*Daphnia magna*) に対する繁殖試験を21日間行い、最小作用濃度 (LOEC) と最大無作用濃度 (NOEC) を求め、可能な限り50%繁殖阻害濃度 (EC50) も求める。
3. 試験方法： 本試験は、OECD 化学品テストガイドライン No. 211 「オオミジンコ繁殖試験」 (1998 年) に準拠した。
4. 適用GLP： 本試験は日本国環境省総合環境政策局環境保健部環境安全課環境リスク評価室長通知「生態影響試験実施に関する基準の改正について」(別添)「生態影響試験実施に関する基準」(環保安第 242 号, 2001 年) に従って実施したものである。
5. 試験委託者
名称： 環境省
住所： 〒100-8975 東京都千代田区霞が関一丁目2-2
委託担当者： 総合環境政策局環境保健部環境安全課環境リスク評価室
室長補佐 [REDACTED]
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： [REDACTED]
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	████████	(生物試験部)	████████	(2003年 5月26日)
試験担当者	████████	(生物試験担当者)	████████	(2003年 5月26日)
	████████	(生物試験担当者)	████████	(2003年 5月26日)
	████████	(生物試験担当者)	████████	(2003年 5月26日)
	████████	(生物試験担当者)	████████	(2003年 5月26日)
	████████	(生物試験担当者)	████████	(2003年 5月26日)
	████████	(濃度分析責任者)	████████	(2003年 5月26日)
	████████	(濃度分析担当者)	████████	(2003年 5月26日)

9. 試験期間： 試験開始日 2002年12月20日
試験終了日 2003年 5月26日
暴露期間 2003年 1月29日～2003年 2月19日

10. 保管：

試験に関する下記の記録および試資料は、試験報告書作成後10年間、当施設資料保管施設に保管する。その後の保管については別途協議の上定める。

- 1) 主計画表
- 2) 試験計画書、生データ及び最終報告書
- 3) 信頼性保証部門によって実施された監査又は査察の記録
- 4) 機器類の保守点検及び校正の記録及び報告書
- 5) 職員の資格、訓練、経験及び職務分掌の記録
- 6) 全標準操作手順書の経時的ファイル
- 7) 環境モニター記録
- 8) 被験物質、対照物質、その他の試料並びに標本

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 被験物質の確認および保管条件下での安定性	3
2 供試生物	4
3 試験方法	5
3.1 試験条件	5
3.2 希釈水	5
3.3 試験容器および恒温槽等	5
3.4 試験濃度の設定	5
3.5 試験液の調製(用時調製)	6
3.6 試験液の分析	6
3.7 試験操作	6
4 結果の算出	6
4.1 親ミジンコの半数致死濃度 (LC50) の算出	6
4.2 50%繁殖阻害濃度 (EC50) の算出	7
4.3 最大無作用濃度 (NOEC) および最小作用濃度 (LOEC)	7
5 結果および考察	7
5.1 試験成績の信頼性に影響を及ぼしたと思われる環境要因	7
5.2 試験液中の被験物質濃度	7
5.3 ミジンコの観察結果	7
5.4 親ミジンコの半数致死濃度 (LC50)	8
5.5 50%繁殖阻害濃度 (EC50)	8
5.6 累積産仔数に及ぼす最大無作用濃度 (NOEC) および最小作用濃度 (LOEC)	8
5.7 試験液の水温, 溶存酸素濃度, p H および硬度	9
Table 1~11	10~17
Figure 1, 2	12, 13
付属資料ー1 希釈水の水質	18, 19
付属資料ー2 ミジンコの観察結果	20~26
付属資料ー3 試験液の分析法	27~30
付属資料ー4 統計解析結果	31

要 旨

試験委託者 環境省

表 題 2, 6-ジメチルアニリンのオオミジンコ (*Daphnia magna*) に対する繁殖試験

試験番号 No. 2002-生21

試験方法

本試験は、OECD 化学品テストガイドラインNo. 211「オオミジンコ繁殖試験」(1998年)に準拠して実施した。

- 1) 被験物質： 2, 6-ジメチルアニリン
- 2) 暴露方式： 半止水式 (週 3 回 (月、水、金曜日) に試験液の全量を交換)
- 3) 供試生物： オオミジンコ (*Daphnia magna*)
- 4) 暴露期間： 21日間
- 5) 試験濃度(設定値)： 対照区, 1.0, 2.2, 4.6, 10, 22 mg/L
公比 ; 2.2
- 6) 試験液量： 80 mL/容器
- 7) 連数： 10 容器/試験区
- 8) 供試生物数： 10 頭/試験区 (1 頭/容器)
- 9) 試験温度： 20±1 ℃
- 10) 照明： 室内光、16 時間明/8 時間暗
- 11) pH： 試験液の pH調整は行わない
- 12) 分析法： HPLC法

結 果

1) 試験液中の被験物質濃度

被験物質の濃度は換水前後の測定値から対数平均値を計算し、21 日間の時間加重平均値を求め、各影響濃度を算出した。

2) 21 日間暴露の各影響濃度結果を以下に示す。

親ミジンコの半数致死濃度 (LC50) : 12.1 mg/L (95%信頼区間 : 9.43~16.7 mg/L), Probit

50% 繁殖阻害濃度 (EC50) : 6.54 mg/L (95%信頼区間 : 6.38~6.70 mg/L), Probit

最大無作用濃度 (NOEC) : 2.23 mg/L

最小作用濃度 (LOEC) : 4.59 mg/L

1 被験物質

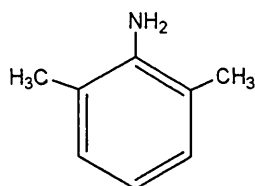
1.1 名称, 構造式および物理化学的性状*

名 称: 2, 6-ジメチルアニリン

別 名: 2, 6-キシリジン

CAS No.: 87-62-7

構造式:



分子式: $C_8H_{11}N$

分子量: 121.18

沸点: 216 °C

融点: 11.2 °C

水溶解度: 微溶(M 4 人工調製水で 1000 mg/L溶解することを当施設で確認した)

比重: 0.980 (20/4°C)

logP: データなし

*: [REDACTED]
[REDACTED]

1.2 供試試料

純度: 99 %

ロット番号: [REDACTED]

供給者: [REDACTED]

受領量: 25 mL 3 本

受領日: 2002年10月4日

外観: 油状液体 ([REDACTED]より)

1.3 被験物質の確認および保管条件下での安定性

被験物質は当施設の冷蔵庫に保管した。

入手した被験物質の赤外吸収スペクトルを測定し、被験物質の構造と矛盾が認められないことを確認した。実験終了時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より被験物質は保管中安定であったと判断された。

2 供試生物

- 1)和名： オオミジンコ
- 2)学名： *Daphnia magna*
- 3)入手先： 環境省国立環境研究所
- 4)入手日： 1997 年 2 月 5 日
- 5)入手後の管理： 継代培養（最大飼育期間；4 週間，換水頻度；少なくとも週 2 回）
- 6)感受性の確認： 基準物質（重クロム酸カリウム，試薬特級）による 48 時間の半数遊泳阻害濃度（ EC_{50} ） = 0.88 mg/L（当施設における 1999 年 10 月以降の EC_{50} は 0.44～1.16 mg/L、 $n=8$ の範囲にある。（M4 人工調製水））
- 7)親の馴化： 馴化期間；2003 年 1 月 4 日～2003 年 1 月 29 日（25 日齢）
暴露開始前 2 週間の親の死亡率は 5%以下で休眠卵および雄の発生は認められなかった。（馴化条件を以下に示す。）
- 8)供試齢： 生後 24 時間齢以内の幼体

馴化条件

- 1)飼育水： 希釈水（3.2 参照）
- 2)飼育密度： 30 頭／2 L 飼育水
- 3)水温： 20 ± 1 °C
- 4)照明： 室内光、16 時間明／8 時間暗
- 5)餌： *Chlorella vulgaris*
- 6)給餌量： ミジンコ 1 頭当たり 0.15 ～ 0.2 mgC（有機炭素）／日

3 試験方法

3.1 試験条件

- 1) 暴露方式： 半止水式 (週 3 回 (月、水、金曜日) に試験液の全量を交換)
- 2) 暴露期間： 21 日間
- 3) 試験液量： 80 mL/容器
- 4) 連数： 10 容器/試験区
- 5) 供試生物数： 10 頭/試験区 (1 頭/容器)
- 6) 試験温度： 20 ± 1 °C
- 7) 照明： 室内光、16 時間明/8 時間暗
- 8) 餌： *Chlorella vulgaris*
- 9) 給餌量： ミジンコ 1 頭当たり 0.15 ~ 0.2 mgC (有機炭素) /日
- 10) pH： 試験液の pH 調整は行わない

3.2 希釈水

人工調製水 Elendt M4 を用いた。成分表を付属資料-1 に示した。

3.3 試験容器および恒温槽等

- 1) 試験容器： 100 mL ガラス製スクルー管瓶
- 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： 飯島電子工業 (B-505)
- 5) pH 計： 東亜電波工業 (HM-30 V)
- 6) 硬度： ICP 発光分析装置 (日立 306 型)

3.4 試験濃度の設定

オオミジンコに対する 48 時間急性遊泳阻害濃度は 20.0 mg/L であることから、22 mg/L から始めて、それ以下の濃度を公比 2.2 で 5 段階設定した。各試験区は以下の通りである。

1.0, 2.2, 4.6, 10, 22 mg/L および対照区を設定した。

3.5 試験液の調製(用時調製)

100 mL メスフラスコに 2,6-ジメチルアニリン 100 mg を量りとり、希釈水で定容し 1000 mg/L の試験原液を調製(わずかに赤褐色)し、その所定量を 1 L メスフラスコに入れ希釈水で定容し、各試験区の試験液とした(無色透明)。

対照区は 2,6-ジメチルアニリンを加えない希釈水を用いた。

3.6 試験液の分析

全試験区(但し、各 1 試験容器)について、暴露期間中に 3 回(換水前後で計 6 回)の頻度で 10 mL ずつ採取し、HPLC 法により被験物質の濃度を分析した。試験液の分析に際しては、試料測定毎に標準溶液の測定を行い、そのピーク面積から定量した。

詳細は付属資料-2(測定条件、検量線、添加回収、定量下限・検出限界等)に示した。

3.7 試験操作

試験液の水温、溶存酸素濃度、pH および硬度を測定後、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、全量で試験液量に対して 1 % 以内となるようにした。その後、換水毎にミジンコを新しい試験液に移しかえ、21 日後まで飼育した。暴露期間中は毎日一定量の給餌を行った(3.1 参照)。

・ミジンコの観察：

(親ミジンコ) 生死、遊泳状態および外観の異常の有無を毎日観察して、記録した。

(産出幼体) 最初の産仔から毎日幼体の生存数を計数し、計数後の幼体は取り除いた。死亡幼体、随胎卵および休眠卵の発生等については、その有無を毎日観察し記録した。最初の幼体産出日を、初産日として記録した。

・水質測定： 水温、溶存酸素濃度、pH および硬度を、全試験区(ただし、各 1 試験容器)について、暴露期間中に 3 回、換水前後に測定した。

4 結果の算出

4.1 親ミジンコの半数致死濃度(LC50)の算出

各試験区での親ミジンコの死亡数と供試個体数(10 頭)を用いて、Probit 法により、21 日間の半数致死濃度(21d-LC50)を算出した。また、可能な限りその 95 % 信頼区間を算出した。

4.2 50%繁殖障害濃度 (EC50) の算出

各試験区での生存親 1 頭当たりの平均累積産仔数(生存幼体)から障害率を求め、Probit法により、50 %繁殖障害濃度 (EC50) を算出した。また、可能な限りその 95 %信頼区間を算出した。

4.3 最大無作用濃度 (NOEC) および最小作用濃度 (LOEC)

各試験区の容器毎に 21 日間生存した親 1 頭当たりの累積産仔数を算出し、各試験区と対照区との有意差の有無を以下の統計手法により求めた。有意差が認められない最高濃度を最大無作用濃度 (NOEC) 、有意差が認められる最低濃度を最小作用濃度 (LOEC) とした。

統計的手法は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及ぼしたと思われる環境要因

認められなかった。

5.2 試験液中の被験物質濃度

暴露期間中の試験液中の被験物質濃度を測定した結果を、Table 1-1、Table 1-2 に示した。

被験物質の濃度は換水前後の測定値から対数平均値を計算し、21 日間の時間加重平均値を求め、各影響濃度を算出した。

5.3 ミジンコの観察結果

親ミジンコの死亡数および死亡率

暴露期間中の各試験区における親ミジンコの累積死亡数および死亡率の結果を Table 2-1、Table 2-2 および Figure 1 に示した。

対照区での親ミジンコの死亡率は暴露終了時で 0%であり、試験成立条件である 20%以下の基準を満たした。

初産日

各試験区における親ミジンコの初産日を Table 3 に示した。

対照区での親ミジンコの初産日は暴露開始 8~10日後であり、正常な範囲内と判断した。

平均累積産仔数

暴露期間中の各試験区における親ミジンコ 1 頭当たりの平均累積産仔数の結果を Table 4 および Figure 2 に示した。

対照区の 21日間での親ミジンコ 1 頭当たりの平均累積産仔数は 143.9 頭であり、試験成立条件である 60 頭の基準を満たした。

休眠卵の発生等

全暴露期間を通して、対照区および全試験区において休眠卵の発生は認められなかった。

5.4 親ミジンコの半数致死濃度 (LC50)

21日間暴露の親ミジンコの半数致死濃度 (21d-LC50) を Table 5 および以下に示した。

設定濃度 22 mg/L 区において親ミジンコが全数死亡、10 mg/L 区では 2 頭死亡、4.6 mg/L区で死亡がなかったことより、入力した観察点(試験区)を 4.59, 9.88, 21.4 mg/L(時間加重平均値)および対照区とし、以下の結論を得た。

21日間 LC50 : 12.1 mg/L (95%信頼区間 : 9.43 ~ 16.7 mg/L), Probit

5.5 50%繁殖阻害濃度 (EC50)

21日間暴露の50%繁殖阻害濃度 (EC50) を Table 6 および以下に示した。

設定濃度 22 mg/Lでは全ての親が死亡したため、入力に用いた観察点(試験区)を 0.994, 2.23, 4.59, 9.88, mg/L 区および対照区とし、以下の結論を得た。

21日間 EC50 : 6.54 mg/L (95%信頼区間 : 6.38 ~ 6.70 mg/L), Probit

5.6 累積産仔数に及ぼす最大無作用濃度 (NOEC) および最小作用濃度 (LOEC)

有意差検定結果 (Table 7) から、累積産仔数に及ぼす最大無作用濃度 (NOEC) および最小作用濃度 (LOEC) に関して以下の結論を得た。

21日間 NOEC : 2.23 mg/L

21日間 LOEC : 4.59 mg/L

5.7 試験液の水温、溶存酸素濃度、pH および硬度

暴露期間中における試験液の水温を Table 8、溶存酸素濃度を Table 9、pH を Table 10、硬度を Table 11 に示した。

21 日間の暴露期間中の水温は 20.2 ～ 20.6 ℃であり、設定範囲内であった。溶存酸素濃度は 7.2 ～ 8.8 mg/L の範囲内であり、すべての試験区で飽和溶存酸素濃度の 60%以上が維持された（20.0 ℃の飽和溶存酸素濃度：8.84mg/L）。pH は 7.3 ～ 7.9 の範囲内であり、変動は 1 以下であった。硬度は 242 ～ 264 mg/L の範囲内であった（当施設における 1999 年 12 月以降の硬度は $\bar{X} \pm S.D. = 255 \pm 17$ mg/L）。

以上のことから、水温、溶存酸素濃度、pH および硬度については、ミジンコの生育条件として適切な範囲であったと思われる。

以上

Table 1-1 Measured Concentrations of the Test Substance in Test Water during a 21-day Exposure Period

(Semi-Static Conditions)

Nominal Concentration (mg/L)	Date→	Measured Concentration (mg/L)						TWM* ¹ (mg/L)	% of Nominal
		0 new	2 old	9 new	12 old	19 new	21 old		
Control		<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	—	—
1.0		0.980	0.963	1.02	1.00	1.00	0.987	0.994	99
2.2		2.24	2.26	2.24	2.24	2.21	2.17	2.23	101
4.6		4.48	4.54	4.66	4.63	4.61	4.60	4.59	100
10		9.56	9.69	10.1	10.0	9.88	9.85	9.88	99
22		21.4	21.4	—	—	—	—	21.4	97

Table 1-2 Measured Concentrations as a Percentage of Nominal

Nominal Concentration (mg/L)	Date→	Measured Concentration as a Percentage of Nominal					
		0 new	2 old	9 new	12 old	19 new	21 old
Control		—	—	—	—	—	—
1.0		98	96	102	100	100	99
2.2		102	103	102	102	100	99
4.6		97	99	101	101	100	100
10		96	97	101	100	99	99
22		97	97	—	—	—	—

new: Freshly prepared test solution

old: Old test solution before renewal

*1 : Time-weighted mean measured concentration during 21 days.

Table 2-1 Cumulative Numbers of Dead Parental *Daphnia*

Table 2-1. Cumulative Numbers of Dead Parental <i>Daphnia</i>																						
Nominal conc.	Days																					
(mg/L)	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
Control	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1.0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1
2.2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	2	2
22	0	0	0	6	8	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10

Table 2-2 Mortality (%) of Parental *Daphnia*

Nominal conc.	Days					
(mg/L)	1	2	4	7	14	21
Control	0	0	0	0	0	0
1.0	0	0	0	0	0	10
2.2	0	0	0	0	0	0
4.6	0	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	10	20
22	0	0	80	100	100	100

Figure 1 Cumulative Numbers of Dead Parental *Daphnia*

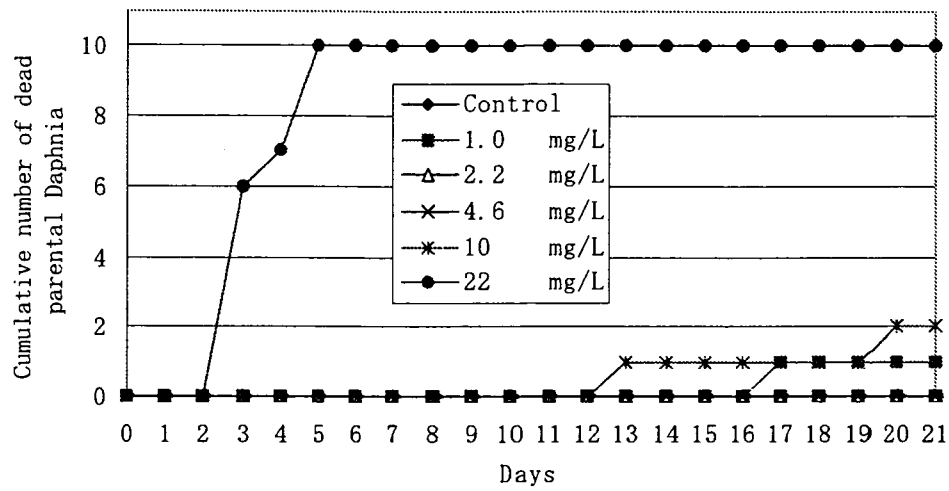


Table 3 Time (Days) to First Brood Production

Vessel No.	Nominal Concentration, mg/L (Measured Concentration, mg/L *1)					
	Control	1.0 (0.994)	2.2 (2.23)	4.6 (4.59)	10 (9.88)	22 (21.4)
1	8	8	8	8	20	—
2	8	8	8	8	—	—
3	8	8	8	8	12	—
4	8	8	8	9	—	—
5	8	8	8	8	11	—
6	8	8	8	9	11	—
7	10	8	8	10	12	—
8	8	8	8	11	11	—
9	8	10	8	10	11	—
10	8	8	8	8	—	—
Min	8	8	8	8	11	—
Max	10	10	8	11	20	—

1: Time-weighted mean measured concentration

Table 4 Mean Cumulative Numbers of Juveniles Produced per Adult Alive for 21 Days ($\Sigma F1/P$)

Nominal	Days														
Conc. (mg/L)	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
Control	0	7.5	7.5	11.4	26.0	26.0	29.2	66.3	66.3	69.4	105.9	105.9	105.9	143.9	143.9
1.0	0	8.1	8.1	9.7	25.4	25.4	29.4	66.9	66.9	71.8	103.8	103.8	107.3	138.9	138.9
2.2	0	10.1	10.1	10.3	26.4	26.4	26.4	64.0	65.8	65.8	101.3	105.8	105.8	134.7	142.1
4.6	0	4.3	6.1	9.0	17.1	20.3	27.1	46.5	54.1	64.7	82.9	91.2	101.6	114.6	123.2
10	0	0	0	0	0.5	0.6	0.6	0.6	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	2.0	2.0
22	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Figure 2 Time Course of $\Sigma F1/P$ for Each Concentration Level

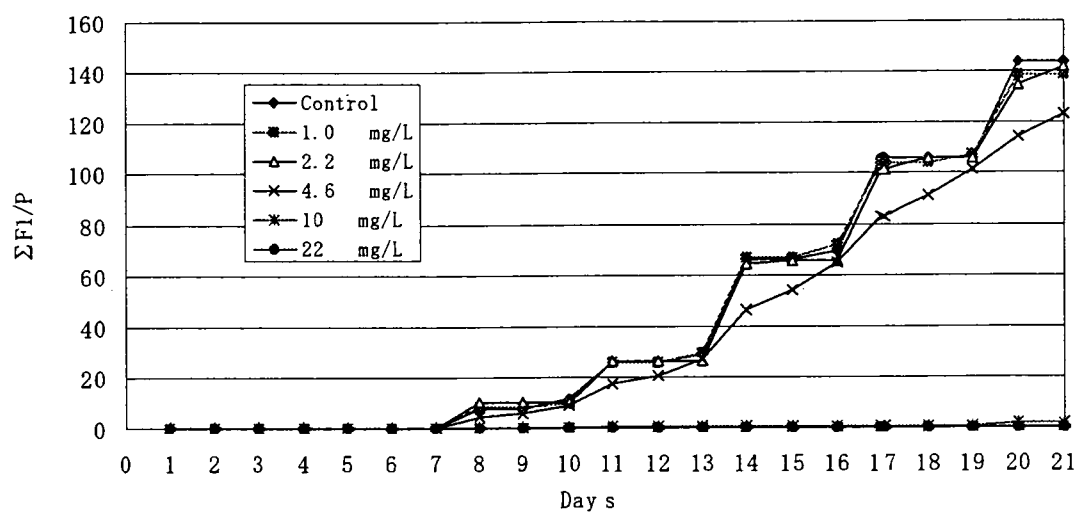


Table 5 Calculated LC50 Values for Parental *Daphnia*

Exposure Period (day)	LC50 (mg/L)	95% Confidence Limits (mg/L)	Statistical Method
21	12.1	9.43~16.7	Probit

Table 6 Calculated EC50 Values for Inhibition of Reproduction

Exposure Period (day)	EC50 (mg/L)	95% Confidence Limits (mg/L)	Statistical Method
21	6.54	6.38~6.70	Probit

Table 7 Cumulative Numbers of Juveniles Produced per Adult Alive for 21 Days in Each Test Vessels and Results of Statistical Comparison of the Mean Values (by Dunnett's Multicomparison Test)

Vessel No.	Nominal Concentration, mg/L (Measured Concentration*1, mg/L)					
	Control	1.0 (0.994)	2.2 (2.23)	4.6 (4.59)	10 (9.88)	22 (21.4)
1	148	D	150	120	10	D
2	153	130	147	127	0	D
3	148	148	134	132	2	D
4	156	142	134	137	0	D
5	129	141	141	134	1	D
6	139	139	136	133	2	D
7	107	155	158	110	D	D
8	145	137	143	95	1	D
9	152	126	140	115	D	D
10	162	132	138	129	0	D
Mean	143.9	138.9	142.1	123.2	2.0	-
S. D.	15.9	9.0	7.7	13.2	3.3	-
Inhibition rate(%)		3.5	1.3	14.4	98.6	-
Significant difference		N. S	N. S	p<0.01	p<0.01	

*1: Time-weighted mean measured concentration.

D: Were not included for calculation because the parental *Daphnia* was dead during a 21-days testing period.

N. S: Indicate no-significant difference

Table 8 Temperature

(Semi-Static Condition)									
Nominal Concentration (mg/L)	Date→	Temperature (°C)						Min.	Max.
		0 new	2 old	9 new	12 old	19 new	21 old		
Control		20.4	20.6	20.4	20.6	20.3	20.4	20.3	20.6
1.0		20.3	20.5	20.3	20.6	20.2	20.2	20.2	20.6
2.2		20.4	20.5	20.3	20.6	20.2	20.2	20.2	20.6
4.6		20.3	20.5	20.3	20.6	20.2	20.2	20.2	20.6
10		20.3	20.5	20.3	20.6	20.2	20.2	20.2	20.6
22		20.3	20.5					20.3	20.5
Total								20.2	20.6

new: Freshly prepared test solution, old: Old test solution before renewal

Table 9 Dissolved Oxygen Concentration (D.O.)

(Semi-Static Condition)									
Nominal Concentration (mg/L)	Date→	D.O. (mg/L)						Min.	Max.
		0 new	2 old	9 new	12 old	19 new	21 old		
Control		8.7	8.6	8.5	7.3	8.7	8.2	7.3	8.7
1.0		8.7	8.6	8.5	7.2	8.8	7.9	7.2	8.8
2.2		8.7	8.5	8.5	7.3	8.8	8.1	7.3	8.8
4.6		8.7	8.5	8.5	7.2	8.8	8.0	7.2	8.8
10		8.7	8.6	8.5	7.4	8.7	8.2	7.4	8.7
22		8.7	8.6					8.6	8.7
Total								7.2	8.8

new: Freshly prepared test solution, old: Old test solution before renewal

Table 10 pH Values

(Semi-Static Condition)

Nominal Concentration (mg/L)	Date→	pH						Min.	Max.
		0 new	2 old	9 new	12 old	19 new	21 old		
Control		7.8	7.9	7.8	7.4	7.8	7.6	7.4	7.9
1.0		7.8	7.8	7.8	7.4	7.8	7.6	7.4	7.8
2.2		7.8	7.8	7.8	7.4	7.8	7.6	7.4	7.8
4.6		7.8	7.9	7.8	7.4	7.9	7.6	7.4	7.9
10		7.8	7.9	7.8	7.3	7.8	7.7	7.3	7.9
22		7.8	7.9					7.8	7.9
Total								7.3	7.9

new: Freshly prepared test solution,

old: Old test solution before renewal

Table 11 Total Hardness (as CaCO₃)

(Semi-Static Condition)

Nominal Concentration (mg/L)	Date→	Total Hardness (as CaCO ₃ , mg/L)						Min.	Max.
		0 new	2 old	9 new	12 old	19 new	21 old		
Control		256	246	244	257	253	259	244	259
1.0		247	242	246	255	256	261	242	261
2.2		257	251	248	260	258	259	248	260
4.6		258	244	247	262	259	257	244	262
10		261	247	248	263	258	259	247	263
22		264	249					249	264
Total								242	264

new: Freshly prepared test solution,

old: Old test solution before renewal

付属資料－ 1

希釈水の水質

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
NaHCO_3	64.8	mg /L
$\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$	10.0	mg /L
NaNO_3	0.274	mg /L
KH_2PO_4	0.143	mg /L
K_2HPO_4	0.184	mg /L

Trace elements	Concentration	Unit
H_3BO_3	2.8595	mg /L
$\text{MnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	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
ZnCl_2	0.0130	mg /L
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.0100	mg /L
KI	3.25	$\mu\text{g/L}$
NaSeO_3	2.19	$\mu\text{g/L}$
NH_4VO_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 (B_{12})	1.00	$\mu\text{g/L}$
Biotine	0.750	$\mu\text{g/L}$

付属資料－ 2

ミジンコの観察結果

Table A-2-1 Result of Reproduction Test

(Test Chemical : 2,6-Dimethylaniline)

Control

Rep. No.	Count		Time																				
			1/29	1/30	1/31	2/1	2/2	2/3	2/4	2/5	2/6	2/7	2/8	2/9	2/10	2/11	2/12	2/13	2/14	2/15	2/16	2/17	2/18
			1d	2d	3d	4d	5d	6d	7d	8d	9d	10d	11d	12d	13d	14d	15d	16d	17d	18d	19d	20d	21d
1	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	8	0	5	14	0	1	38	0	0	41	0	0	41	0
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	8	8	13	27	27	28	66	66	66	107	107	107	148	148
2	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	11	0	0	17	0	0	43	0	0	40	0	0	42	0
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	11	11	11	28	28	28	71	71	71	111	111	111	153	153
3	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	8	0	17	1	0	2	39	0	0	45	0	0	36	0
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	8	8	25	26	26	28	67	67	67	112	112	112	148	148
4	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	8	0	0	15	0	0	41	0	0	46	0	0	46	0
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	8	8	8	23	23	23	64	64	64	110	110	110	156	156
5	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	5	0	0	17	0	0	38	0	0	35	0	0	34	0
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	5	5	5	22	22	22	60	60	60	95	95	95	129	129
6	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0	15	0	0	48	0	0	38	0	0	34	0
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	4	4	4	19	19	19	67	67	67	105	105	105	139	139
7	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0	0	17	0	0	29	0	0	31	0	0	30	0	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	0	17	17	17	46	46	46	77	77	77	107	107	107
8	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	9	0	0	21	0	0	36	0	0	40	0	0	39	0
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	9	9	9	30	30	30	66	66	66	106	106	106	145	145
9	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	10	0	0	19	0	0	45	0	0	41	0	0	37	0
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	10	10	10	29	29	29	74	74	74	115	115	115	152	152
10	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	12	0	0	27	0	0	43	0	0	39	0	0	41	0
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	12	12	12	39	39	39	82	82	82	121	121	121	162	162

Table A-2-2 Result of Reproduction Test

(Test Chemical : 2,6-Dimethylaniline)

1.0 mg/L

Rep. No.	Count		Time																					Total
			1/29	1/30	1/31	2/1	2/2	2/3	2/4	2/5	2/6	2/7	2/8	2/9	2/10	2/11	2/12	2/13	2/14	2/15	2/16	2/17	2/18	
			1d	2d	3d	4d	5d	6d	7d	8d	9d	10d	11d	12d	13d	14d	15d	16d	17d	18d	19d	20d	21d	
1	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0		
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	11	0	0	19	0	0	41	0	0	40	0	0	0		
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	11	11	11	30	30	30	71	71	71	111	111	111	111		
2	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1		
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	8	0	0	19	0	0	39	0	0	37	0	0	27		
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	8	8	8	27	27	27	66	66	66	103	103	103	130		
3	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1		
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	11	0	0	16	0	0	42	0	0	40	0	0	39		
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	11	11	11	27	27	27	69	69	69	109	109	109	148		
4	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1		
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	9	0	0	22	0	0	41	0	0	34	0	0	36		
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	9	9	9	31	31	31	72	72	72	106	106	106	142		
5	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1		
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	10	0	0	18	0	0	44	0	0	33	0	0	36		
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	10	10	10	28	28	28	72	72	72	105	105	105	141		
6	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1		
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	10	0	0	13	0	0	42	0	0	38	0	0	36		
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	10	10	10	23	23	23	65	65	65	103	103	103	139		
7	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1		
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	10	0	0	23	0	0	49	0	0	34	0	0	39		
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	10	10	10	33	33	33	82	82	82	116	116	116	155		
8	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1		
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	11	0	0	16	0	0	40	0	0	33	0	0	37		
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	11	11	11	27	27	27	67	67	67	100	100	100	137		
9	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1		
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0	0	14	0	0	36	0	0	44	0	0	32	0		
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	0	14	14	14	50	50	50	94	94	94	126	126		
10	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1		
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0	15	0	0	40	0	0	39	0	0	34		
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	4	4	4	19	19	19	59	59	59	98	98	98	132		

Table A-2-3 Result of Reproduction Test

(Test Chemical : 2,6-Dimethylaniline)

2.2 mg/L

			Time																					
Rep.	Count		1/29	1/30	1/31	2/1	2/2	2/3	2/4	2/5	2/6	2/7	2/8	2/9	2/10	2/11	2/12	2/13	2/14	2/15	2/16	2/17	2/18	
No.			1d	2d	3d	4d	5d	6d	7d	8d	9d	10d	11d	12d	13d	14d	15d	16d	17d	18d	19d	20d	21d	Total
1	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	13	0	0	16	0	0	38	0	0	43	0	0	40	0	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	13	13	13	29	29	29	67	67	67	110	110	110	150	150	150
2	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	13	0	0	17	0	0	41	0	0	38	1	0	37	0	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	13	13	13	30	30	30	71	71	71	109	110	110	147	147	147
3	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	7	0	2	14	0	0	39	0	0	37	0	0	35	0	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	7	7	9	23	23	23	62	62	62	99	99	99	134	134	134
4	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	6	0	0	15	0	0	39	0	0	40	0	0	34	0	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	6	6	6	21	21	21	60	60	60	100	100	100	134	134	134
5	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	12	0	0	16	0	0	37	0	0	39	0	0	37	0	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	12	12	12	28	28	28	65	65	65	104	104	104	141	141	141
6	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	10	0	0	14	0	0	40	0	0	40	0	0	32	0	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	10	10	10	24	24	24	64	64	64	104	104	104	136	136	136
7	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	8	0	0	24	0	0	43	0	0	42	0	0	0	41	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	8	8	8	32	32	32	75	75	75	117	117	117	158	158	158
8	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	11	0	0	18	0	0	19	18	0	0	44	0	0	33	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	11	11	11	29	29	29	48	66	66	66	110	110	110	143	143
9	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	11	0	0	14	0	0	40	0	0	39	0	0	36	0	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	11	11	11	25	25	25	65	65	65	104	104	104	140	140	140
10	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	10	0	0	13	0	0	40	0	0	37	0	0	38	0	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	10	10	10	23	23	23	63	63	63	100	100	100	138	138	138

Table A-2-4 Result of Reproduction Test

(Test Chemical : 2,6-Dimethylaniline)

4.6 mg/L

Rep. No.	Count		Time																				
			1/29	1/30	1/31	2/1	2/2	2/3	2/4	2/5	2/6	2/7	2/8	2/9	2/10	2/11	2/12	2/13	2/14	2/15	2/16	2/17	2/18
			1d	2d	3d	4d	5d	6d	7d	8d	9d	10d	11d	12d	13d	14d	15d	16d	17d	18d	19d	20d	21d
1	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	9	0	0	8	1	0	41	0	0	37	0	0	0	24
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	9	9	9	17	18	18	59	59	59	96	96	96	96	120
2	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	8	0	0	14	0	0	40	0	0	33	0	0	32	0
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	8	8	8	22	22	22	62	62	62	95	95	95	127	127
3	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	7	0	0	12	0	0	42	0	0	39	0	0	32	0
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	7	7	7	19	19	19	61	61	61	100	100	100	132	132
4	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0	9	0	0	21	0	0	35	0	0	39	0	0	33
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	9	9	9	30	30	30	65	65	65	104	104	104	137
5	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	11	0	0	21	0	0	34	0	0	36	0	0	32	0
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	11	11	11	32	32	32	66	66	66	102	102	102	134	134
6	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0	9	0	0	10	0	0	41	0	0	44	0	0	29
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	9	9	9	19	19	19	60	60	60	104	104	104	133
7	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0	0	15	0	0	22	0	0	38	0	0	35	0	0
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	0	15	15	15	37	37	37	75	75	75	110	110	110
8	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	11	0	17	1	0	32	0	0	33	1	0
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	11	11	28	29	29	61	61	61	94	95	95
9	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0	0	14	0	0	29	0	0	36	0	0	36	0	0
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	0	14	14	14	43	43	43	79	79	79	115	115	115
10	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	8	0	0	15	0	0	36	0	0	37	0	0	33	0
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	8	8	8	23	23	23	59	59	59	96	96	96	129	129

Table A-2-5 Result of Reproduction Test

(Test Chemical : 2,6-Dimethylaniline)

10 mg/L

Rep. No.	Count		Time																				
			1/29	1/30	1/31	2/1	2/2	2/3	2/4	2/5	2/6	2/7	2/8	2/9	2/10	2/11	2/12	2/13	2/14	2/15	2/16	2/17	2/18
			1d	2d	3d	4d	5d	6d	7d	8d	9d	10d	11d	12d	13d	14d	15d	16d	17d	18d	19d	20d	21d
1	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	0
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	10
2	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2
4	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
6	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
7	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
8	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
9	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
10	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Table A-2-6 Result of Reproduction Test

(Test Chemical : 2,6-Dimethylaniline)

22 mg/L

Rep. No.	Count		Time																					
			1/29	1/30	1/31	2/1	2/2	2/3	2/4	2/5	2/6	2/7	2/8	2/9	2/10	2/11	2/12	2/13	2/14	2/15	2/16	2/17	2/18	
			1d	2d	3d	4d	5d	6d	7d	8d	9d	10d	11d	12d	13d	14d	15d	16d	17d	18d	19d	20d	21d	Total
1	P generation	Live	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	P generation	Live	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	P generation	Live	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	P generation	Live	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	P generation	Live	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	P generation	Live	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7	P generation	Live	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8	P generation	Live	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9	P generation	Live	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10	P generation	Live	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

付属資料－ 3

試験液の分析法

2,6-ジメチルアニリンの分析法

1 分析方法

(1) 分析法の概要

試験液または希釈した試験液の一定量を、UV 検出器を備えた HPLC に注入し、クロマトグラムと同時にピーク面積（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、予め作成した検量線から試験液中の 2,6-ジメチルアニリンの濃度を求める。

(2) 試薬及び装置

アセトニトリル	: 試薬 HPLC 用	和光純薬(株)
りん酸二水素カリウム	: 試薬特級	関東化学(株)
純水	: 超純水製造装置 GS-200	アドバンテック(株)
2,6-ジメチルアニリン	: 試薬特級	■■■■■■■■■■
	Lot No. WAQ5400 min 99%	
メスフラスコ	: 容量 100mL、50mL、20mL	
マイクロピペット	: 容量 500 μ L、1000 μ L	
HPLC	: L-6000	(株)日立製作所
検出器(UV)	: L-7420	(株)日立製作所
インテグレーター	: D-7500	(株)日立製作所
恒温槽	: 556	GLサイエンス(株)
マイクロシリンジ	: 容量 50 μ L	(株)伊藤製作所

(3) 操作

- ① 2 に記載する分析条件で HPLC を作動し、装置を安定させる。
- ② 3 に記載する方法で検量線の作成を行う。
- ③ 試験液を使用する検量線の濃度範囲内に入るように純水で希釈し、検量線を作成した条件の HPLC に 30 μ L を注入、クロマトグラムと同時にピーク面積を得る。
- ④ 検量線により測定時の濃度を求め、希釈率を補正して、試験液の 2,6-ジメチルアニリン濃度を算出する。

2 HPLCの測定条件

分離管	: Mightysil RP-18GP 150 mm × 4.6 mm (5 μm)	関東化学工業 (株)
検出波長	: UV 210 nm	
温度	: 40℃	
移動相	: 25mmol KH ₂ PO ₄ :アセトリル (50 : 50 V/V)	
流量	: 1.0 mL/min	
感度	: AUX RANGE : 0.5	
保持時間	: 4.2 min	
試料量	: 30 μL	

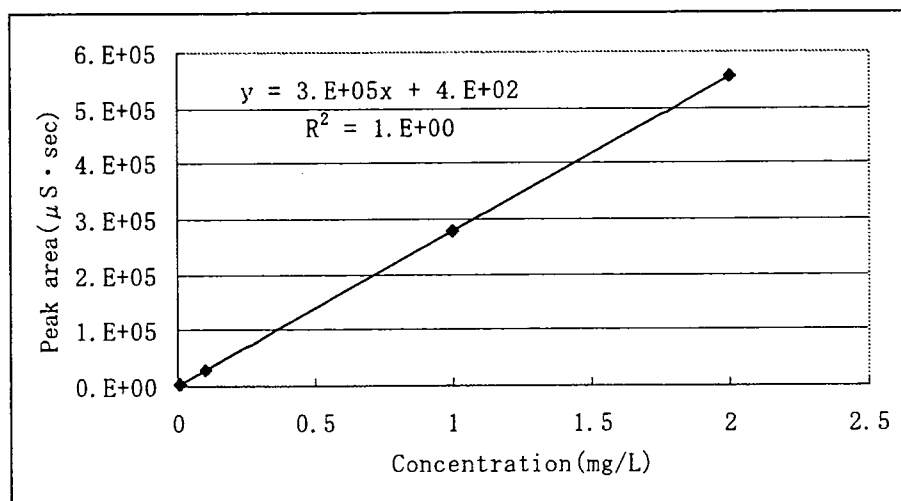
3 検量線

2,6-ジメチルアニリンの標準原液 (100mg/L) に純水を加えて希釈し、0.01, 0.1, 1.0, 2.0mg/L の標準溶液を調製する。この溶液 30 μL を HPLC に注入し、クロマトグラムを画かせピーク面積を記録させる。ピークの面積を縦軸に、濃度を横軸にとり検量線を作成する。

Table 1. 検量線データ例

No	Concentration (mg / L)	Peak Area (μS・sec)
1	0.01	2700
2	0.1	28269
3	1.0	278505
4	2.0	554834

Figure 1 Calibration Curve of 2,6-Dimethylaniline by HPLC Analysis



4 添加回収率

標準原液（200mg/L）に純水を加えて希釈し、0.10 と 1.04mg/L の試料溶液を調製し繰り返し測定により添加回収率を求めた。

結果を Table-2 に示す。平均回収率は 99.0～99.7 %であった。

Table 2. 添加回収率の測定結果

試料溶液 No.	試料濃度 (mg/L)	測定値 (mg/L)	回収率 (%)	平均回収率 (%)	変動係数 (%)
1	0.10	0.100	100.0	99.0	1.01
		0.099	99.0		
		0.098	98.0		
2	1.04	1.04	100.0	99.7	0.58
		1.03	99.0		
		1.04	100.0		

5 定量下限値および検出限界値

2,6-ジメチルアニリン濃度 0.01 mg/L 溶液を HPLC に 7 回注入し、得られた結果の標準偏差値の 10 倍を定量下限値、3 倍を検出限界値とした。

Table 3. 定量下限値および検出限界値の算出データ

No.	測定値 (mg/L)
1	0.010
2	0.010
3	0.009
4	0.010
5	0.010
6	0.009
7	0.009
平均値	0.010
標準偏差 (σ_{n-1})	0.0005

$$\text{定量下限値} = 0.0005 \times 10 \approx 0.01 \text{ mg/L}$$

$$\text{検出限界値} = 0.0005 \times 3 \approx 0.002 \text{ mg/L}$$

付属資料－ 4

統計解析結果

(EcoTox Statics Version 2.1)

ミジンコ 急性遊泳阻害試験

2,6-ジメチルアニリン (親の死亡) 再解析

ファイル名= 2020058 更新日: 03/03/30

区	濃度	連	実測数(影響・死亡)	
	mg/L (log)		0	21 day
1	0 (-)	1	10	0
2	4.59 (.662)	1	10	0
3	9.88 (.995)	1	10	2
4	21.4 (1.330)	1	10	10

[対照に対する] 割合 (%)

区	濃度	影響・死亡%
	mg/L (log)	21 day
1	4.59 (.662)	0
2	9.88 (.995)	20
3	21.4 (1.330)	100

EC50計算に用いたデータ (Probit, Logit法)

区	濃度	影響・死亡
	mg/L (log)	0 21 day
1	4.59 (.662)	10 0.1
2	9.88 (.995)	10 2
3	21.4 (1.330)	10 9.9

2,6-ジメチルアニリン (親の死亡) 再解析

ミジンコ 急性遊泳阻害試験 観察回数=2 濃度区数=4(mg/L)

繰返し数 = 1, 1, 1, 1

データファイル: 2020058 更新日: 03/03/30

生物量

濃度	繰返し	0	21	day
0	(1)	10	0	
4.59	(1)	10	0	
9.88	(1)	10	2	
21.4	(1)	10	10	

生物量 (%)

濃度	21	day
4.59	0.00	
9.88	20.00	
21.4	100.00	

E(L)C50 計算 収束判定値=0 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

●● 21d Effect E(L)C50 計算 収束までの反復回数=50 収束せず ●●

◎ デザイン行列

濃度	n	y	y/n	Const.	log10(C)
4.59	10	0.1	0.01	1	.6618
9.88	10	2	0.2	1	.9948
21.4	10	9.9	0.99	1	1.3304

◎ 回帰式の適合度の検定 χ^2 値(P=0.05, df=1)=3.8414 (P=0.01, df=1)=6.6348

X2乗 (逸脱度) = .6631 < 3.8414 適合する

X2乗 (ピアソン) = 2.9249 < 3.8414 適合する

AIC = 16.911

◎ 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	-8.734	2.8655	-3.048
log(Conc.)	8.0605	2.6693	3.0197
WALD検定	X2値=9.119	自由度=1	有意確率=0.003

◎ 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)
4.59	0.1	.0034	.0966	0.01	.00034	.0097
9.88	2	2.3690	-0.369	0.2	.2369	-3.690
21.4	9.9	9.7666	.1334	0.99	.9767	.0133

◎ 診断統計量

濃度	Cookの距離	てこ比	逸脱度残差	ピアソン残差	逸脱度残差	標準化	ピアソン残差
mg/L							
4.59	.1976	.0749	.6969	1.6648	.7246		1.7309
9.88	23.953	.9605	-0.279	-0.274	-1.408		-1.381
21.4	34.627	.9645	.3147	.2793	1.6713		1.4834

```

=====EC90%、80%、EC50%、20%、10%の推定=====
log(EC90) = .92463 (95% Range: .71775 - .92861 )
EC90(mg/L) = 8.40679 (95% Range: 5.22100 - 8.48424)
log(EC80) = .97921 (95% Range: .80584 - 1.02914)
EC80(mg/L) = 9.53255 (95% Range: 6.39497 - 10.6940)
log(EC50) = 1.08362 (95% Range: .97435 - 1.22147)
EC50(mg/L) = 12.1233 (95% Range: 9.42652 - 16.6520)
log(EC20) = 1.18804 (95% Range: 1.14286 - 1.41379)
EC20(mg/L) = 15.4182 (95% Range: 13.8951 - 25.9294)
log(EC10) = 1.24261 (95% Range: 1.23095 - 1.51432)
EC10(mg/L) = 17.4829 (95% Range: 17.0195 - 32.6831)

```

===== ロジット関数 =====

●● 21d Effect E(L)C50 計算 収束までの反復回数=6 ●●

◎ デザイン行列

濃度	n	y	y/n	Const.	log10(C)
4.59	10	0.1	0.01	1	.6618
9.88	10	2	0.2	1	.9948
21.4	10	9.9	0.99	1	1.3304

◎ 回帰式の適合度の検定 χ^2 値(P=0.05, df=1)=3.8414 (P=0.01, df=1)=6.6348
 X2乗 (逸脱度) = 2.743 < 3.8414 適合する
 X2乗 (ピアソン) = 5.380 < 3.8414 適合する
 AIC = 16.522

◎ 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	-16.86	7.2067	-2.340
log(Conc.)	15.667	7.0007	2.2379

WALD検定 X^2 値=5.008 自由度=1 有意確率=0.025

◎ 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)
4.59	0.1	.0150	.0850	0.01	.0015	.0085
9.88	2	2.1693	-0.169	0.2	.2169	-1.692
21.4	9.9	9.8157	.0843	0.99	.9816	.0084

◎ 診断統計量

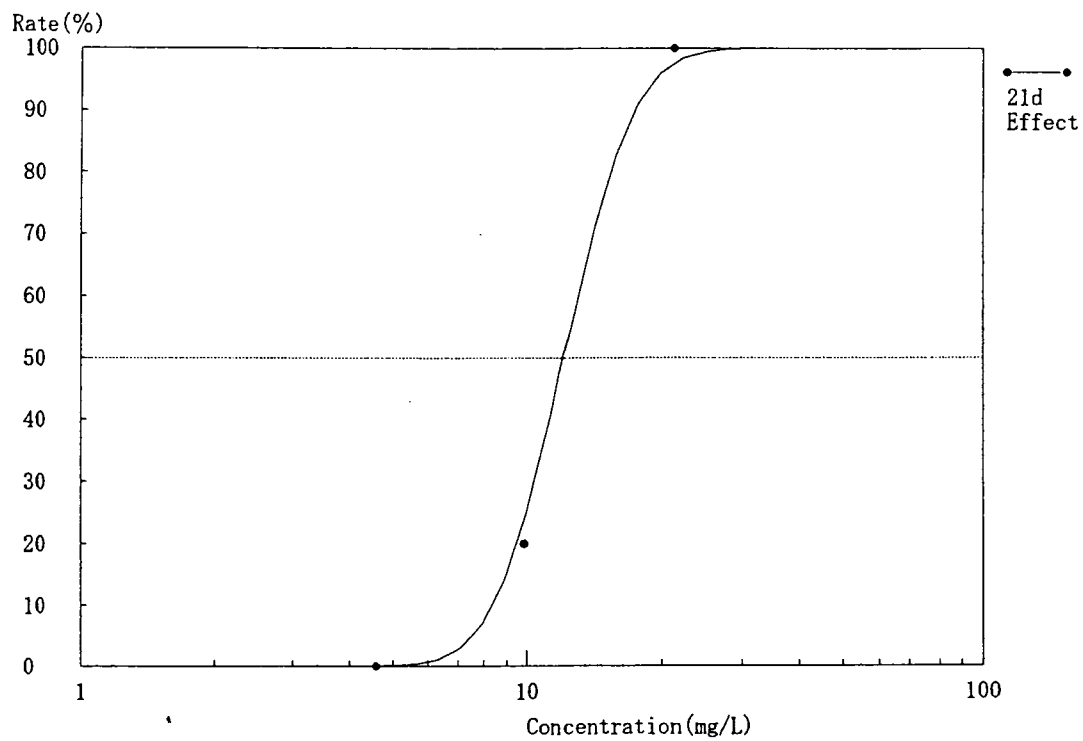
濃度 mg/L	Cookの距離	てこ比	逸脱度残差	ピアソン残差	標準化	
					逸脱度残差	ピアソン残差
4.59	.0313	.1044	.4583	.6942	.4842	.7335
9.88	8.3097	.9686	-0.131	-0.129	-0.740	-0.733
21.4	3.4152	.9270	.2169	.1982	.8027	.7335

```

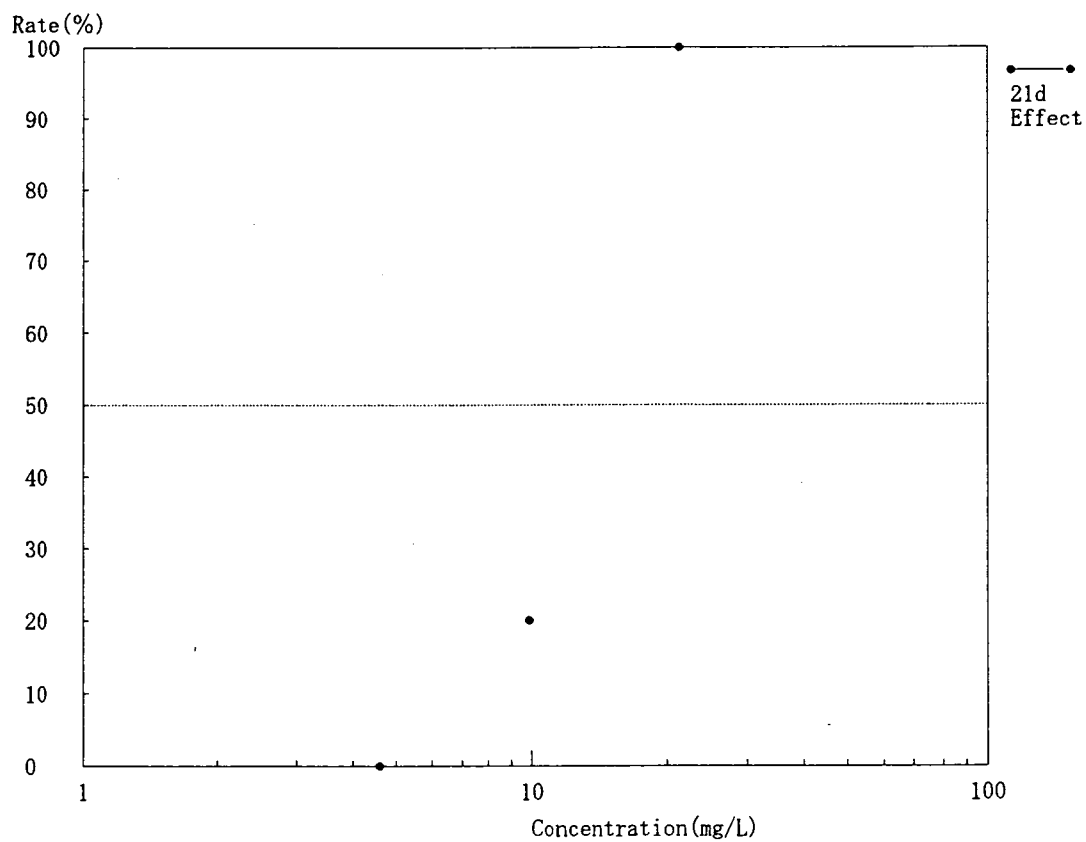
=====EC90%、80%、EC50%、20%、10%の推定=====
log(EC90) = .93645 (95% Range: .41041 - .88493 )
EC90(mg/L) = 8.63865 (95% Range: 2.57280 - 7.67232)
log(EC80) = .98821 (95% Range: .61943 - 1.12018)
EC80(mg/L) = 9.73208 (95% Range: 4.16327 - 13.1881)
log(EC50) = 1.07669 (95% Range: .97677 - 1.52236)
EC50(mg/L) = 11.9313 (95% Range: 9.47920 - 33.2932)
log(EC20) = 1.16517 (95% Range: 1.33411 - 1.92453)
EC20(mg/L) = 14.6275 (95% Range: 21.5828 - 84.0485)
log(EC10) = 1.21693 (95% Range: 1.54314 - 2.15979)
EC10(mg/L) = 16.4790 (95% Range: 34.9250 - 144.473)

```

***** END *****



Dose-response curve for EC50 of Daphnia Acute Immobilization Test
2,6-ジメチルアニリン (親の死亡) 再解析 (Probit method)



Dose-response curve for EC50 of Daphnia Acute Immobilization Test
2,6-ジメチルアニリン (親の死亡) 再解析 (Logestic method)

ミジンコ 繁殖試験 (産仔) 1X10, 4X10

2,6-ジメチルアニリン

ファイル名= 2110019 更新日: 03/03/29

区	濃度 mg/L	(log)	連	実測数(生存)							
				0	1	2	3	4	5	6	7 day
1	0	(-)	1	0	0	0	0	0	0	0	0
1	0	(-)	2	0	0	0	0	0	0	0	0
1	0	(-)	3	0	0	0	0	0	0	0	0
1	0	(-)	4	0	0	0	0	0	0	0	0
1	0	(-)	5	0	0	0	0	0	0	0	0
1	0	(-)	6	0	0	0	0	0	0	0	0
1	0	(-)	7	0	0	0	0	0	0	0	0
1	0	(-)	8	0	0	0	0	0	0	0	0
1	0	(-)	9	0	0	0	0	0	0	0	0
1	0	(-)	10	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0.994	(-2.61)	1	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0.994	(-2.61)	2	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0.994	(-2.61)	3	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0.994	(-2.61)	4	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0.994	(-2.61)	5	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0.994	(-2.61)	6	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0.994	(-2.61)	7	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0.994	(-2.61)	8	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0.994	(-2.61)	9	0	0	0	0	0	0	0	0
3	2.23	(.348)	1	0	0	0	0	0	0	0	0
3	2.23	(.348)	2	0	0	0	0	0	0	0	0
3	2.23	(.348)	3	0	0	0	0	0	0	0	0
3	2.23	(.348)	4	0	0	0	0	0	0	0	0
3	2.23	(.348)	5	0	0	0	0	0	0	0	0
3	2.23	(.348)	6	0	0	0	0	0	0	0	0
3	2.23	(.348)	7	0	0	0	0	0	0	0	0
3	2.23	(.348)	8	0	0	0	0	0	0	0	0
3	2.23	(.348)	9	0	0	0	0	0	0	0	0
3	2.23	(.348)	10	0	0	0	0	0	0	0	0
4	4.59	(.662)	1	0	0	0	0	0	0	0	0
4	4.59	(.662)	2	0	0	0	0	0	0	0	0
4	4.59	(.662)	3	0	0	0	0	0	0	0	0
4	4.59	(.662)	4	0	0	0	0	0	0	0	0
4	4.59	(.662)	5	0	0	0	0	0	0	0	0
4	4.59	(.662)	6	0	0	0	0	0	0	0	0
4	4.59	(.662)	7	0	0	0	0	0	0	0	0
4	4.59	(.662)	8	0	0	0	0	0	0	0	0
4	4.59	(.662)	9	0	0	0	0	0	0	0	0
4	4.59	(.662)	10	0	0	0	0	0	0	0	0
5	9.88	(.995)	1	0	0	0	0	0	0	0	0
5	9.88	(.995)	2	0	0	0	0	0	0	0	0
5	9.88	(.995)	3	0	0	0	0	0	0	0	0
5	9.88	(.995)	4	0	0	0	0	0	0	0	0
5	9.88	(.995)	5	0	0	0	0	0	0	0	0
5	9.88	(.995)	6	0	0	0	0	0	0	0	0
5	9.88	(.995)	7	0	0	0	0	0	0	0	0
5	9.88	(.995)	8	0	0	0	0	0	0	0	0

区	濃度 mg/L	(log)	連	実測数(生存)							
				8	9	10	11	12	13	14	15 day
1	0	(-)	1	8	0	5	14	0	1	38	0
1	0	(-)	2	11	0	0	17	0	0	43	0
1	0	(-)	3	8	0	17	1	0	2	39	0
1	0	(-)	4	8	0	0	15	0	0	41	0
1	0	(-)	5	5	0	0	17	0	0	38	0
1	0	(-)	6	4	0	0	15	0	0	48	0
1	0	(-)	7	0	0	17	0	0	29	0	0
1	0	(-)	8	9	0	0	21	0	0	36	0
1	0	(-)	9	10	0	0	19	0	0	45	0
1	0	(-)	10	12	0	0	27	0	0	43	0
2	0.994	(-2.61)	1	8	0	0	19	0	0	39	0
2	0.994	(-2.61)	2	11	0	0	16	0	0	42	0
2	0.994	(-2.61)	3	9	0	0	22	0	0	41	0
2	0.994	(-2.61)	4	10	0	0	18	0	0	44	0
2	0.994	(-2.61)	5	10	0	0	13	0	0	42	0
2	0.994	(-2.61)	6	10	0	0	23	0	0	49	0
2	0.994	(-2.61)	7	11	0	0	16	0	0	40	0
2	0.994	(-2.61)	8	0	0	14	0	0	36	0	0
2	0.994	(-2.61)	9	4	0	0	15	0	0	40	0
3	2.23	(.348)	1	13	0	0	16	0	0	38	0
3	2.23	(.348)	2	13	0	0	17	0	0	41	0
3	2.23	(.348)	3	7	0	2	14	0	0	39	0
3	2.23	(.348)	4	6	0	0	15	0	0	39	0
3	2.23	(.348)	5	12	0	0	16	0	0	37	0
3	2.23	(.348)	6	10	0	0	14	0	0	40	0

3	2.23	(.348)	7	8	0	0	24	0	0	43	0
3	2.23	(.348)	8	11	0	0	18	0	0	19	18
3	2.23	(.348)	9	11	0	0	14	0	0	40	0
3	2.23	(.348)	10	10	0	0	13	0	0	40	0
4	4.59	(.662)	1	9	0	0	8	1	0	41	0
4	4.59	(.662)	2	8	0	0	14	0	0	40	0
4	4.59	(.662)	3	7	0	0	12	0	0	42	0
4	4.59	(.662)	4	0	9	0	0	21	0	0	35
4	4.59	(.662)	5	11	0	0	21	0	0	34	0
4	4.59	(.662)	6	0	9	0	0	10	0	0	41
4	4.59	(.662)	7	0	0	15	0	0	22	0	0
4	4.59	(.662)	8	0	0	0	11	0	17	1	0
4	4.59	(.662)	9	0	0	14	0	0	29	0	0
4	4.59	(.662)	10	8	0	0	15	0	0	36	0
5	9.88	(.995)	1	0	0	0	0	0	0	0	0
5	9.88	(.995)	2	0	0	0	0	0	0	0	0
5	9.88	(.995)	3	0	0	0	0	1	0	0	1
5	9.88	(.995)	4	0	0	0	0	0	0	0	0
5	9.88	(.995)	5	0	0	0	1	0	0	0	0
5	9.88	(.995)	6	0	0	0	2	0	0	0	0
5	9.88	(.995)	7	0	0	0	1	0	0	0	0
5	9.88	(.995)	8	0	0	0	0	0	0	0	0

区	濃度		連	実測数(生存)							
	mg/L	(log)		16	17	18	19	20	21	day	
1	0	(-)	1	0	41	0	0	41	0		
1	0	(-)	2	0	40	0	0	42	0		
1	0	(-)	3	0	45	0	0	36	0		
1	0	(-)	4	0	46	0	0	46	0		
1	0	(-)	5	0	35	0	0	34	0		
1	0	(-)	6	0	38	0	0	34	0		
1	0	(-)	7	31	0	0	0	30	0		
1	0	(-)	8	0	40	0	0	39	0		
1	0	(-)	9	0	41	0	0	37	0		
1	0	(-)	10	0	39	0	0	41	0		
2	0.994	(-2.61)	1	0	37	0	0	27	0		
2	0.994	(-2.61)	2	0	40	0	0	39	0		
2	0.994	(-2.61)	3	0	34	0	0	36	0		
2	0.994	(-2.61)	4	0	33	0	0	36	0		
2	0.994	(-2.61)	5	0	38	0	0	36	0		
2	0.994	(-2.61)	6	0	34	0	0	39	0		
2	0.994	(-2.61)	7	0	33	0	0	37	0		
2	0.994	(-2.61)	8	44	0	0	32	0	0		
2	0.994	(-2.61)	9	0	39	0	0	34	0		
3	2.23	(.348)	1	0	43	0	0	40	0		
3	2.23	(.348)	2	0	38	1	0	37	0		
3	2.23	(.348)	3	0	37	0	0	35	0		
3	2.23	(.348)	4	0	40	0	0	34	0		
3	2.23	(.348)	5	0	39	0	0	37	0		
3	2.23	(.348)	6	0	40	0	0	32	0		
3	2.23	(.348)	7	0	42	0	0	0	41		
3	2.23	(.348)	8	0	0	44	0	0	33		
3	2.23	(.348)	9	0	39	0	0	36	0		
3	2.23	(.348)	10	0	37	0	0	38	0		
4	4.59	(.662)	1	0	37	0	0	0	24		
4	4.59	(.662)	2	0	33	0	0	32	0		
4	4.59	(.662)	3	0	39	0	0	32	0		
4	4.59	(.662)	4	0	0	39	0	0	33		
4	4.59	(.662)	5	0	36	0	0	32	0		
4	4.59	(.662)	6	0	0	44	0	0	29		
4	4.59	(.662)	7	38	0	0	35	0	0		
4	4.59	(.662)	8	32	0	0	33	1	0		
4	4.59	(.662)	9	36	0	0	36	0	0		
4	4.59	(.662)	10	0	37	0	0	33	0		
5	9.88	(.995)	1	0	0	0	0	10	0		
5	9.88	(.995)	2	0	0	0	0	0	0		
5	9.88	(.995)	3	0	0	0	0	0	0		
5	9.88	(.995)	4	0	0	0	0	0	0		
5	9.88	(.995)	5	0	0	0	0	0	0		
5	9.88	(.995)	6	0	0	0	0	0	0		
5	9.88	(.995)	7	0	0	0	0	0	0		
5	9.88	(.995)	8	0	0	0	0	0	0		

[対照に対する] 割合 (%)

区	濃度	21d
	mg/L	oung
1	0.994 (-2.61)	96.517
2	2.23 (.348)	98.749
3	4.59 (.662)	85.615
4	9.88 (.995)	1.3899

EC50計算に用いたデータ (Probit, Logit法)

区 濃度 21d

	mg/L (log)	Start	young
1	0.994 (-2.61)	143.89	138.88
2	2.23 (.348)	143.89	142.09
3	4.59 (.662)	143.89	123.19
4	9.88 (.995)	143.89	2.0000

2,6-ジメチルアニリン

ミジンコ 繁殖試験 (産仔) 1X10, 4X10 観察回数=22 濃度区数=5(mg/L)

繰返し数 = 10, 9, 10, 10, 8

データファイル: 2110019 更新日: 03/03/29

生物量

濃度	0-21day	産仔数 (%)
0	143.9	(-)
0.994	138.888	(96.5)
2.23	142.1	(98.7)
4.59	123.2	(85.6)
9.88	2	(1.4)

E(L)C50 計算 収束判定値=0 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 =====

!! 計算を途中で打ち切っています。回帰の信頼性は保障できません。 !!

●● 21d young E(L)C50 計算 収束までの反復回数=36 ●●

◎ デザイン行列

濃度	n	y	y/n	Const.	log10(C)
0.994	143.9	138.88	.965	1	-2.613
2.23	143.9	142.09	.987	1	.3483
4.59	143.9	123.19	.856	1	.6618
9.88	143.9	2.0000	.014	1	.9948

◎ 回帰式の適合度の検定 χ^2 値(P=0.05, df=2)=5.9915 (P=0.01, df=2)=9.2103

X2乗 (逸脱度) =91.091 >= 9.2103 ** 適合が悪い

X2乗 (ピアソン) =3.2E+7 >= 9.2103 ** 適合が悪い

AIC =263.90

◎ 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	10.640	.1547	68.781
log(Conc.)	-13.04	.2097	-62.21
WALD検定	X2値=3871.285	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)
0.994	138.88	143.89	-5.011	.9652	1	-3.482
2.23	142.09	143.89	-1.799	.9875	1.0000	-1.250
4.59	123.19	140.66	-17.46	.8562	.9775	-0.121
9.88	2.0000	1.3917	.6083	.0139	.0097	.0042

◎ 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						
計算不能項目あり	中止					

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

log(EC90)	= .91373	(95% Range: .90198 - .92595)
EC90(mg/L)	= 8.19832	(95% Range: 7.97964 - 8.43236)
log(EC80)	= .88001	(95% Range: .86868 - .89176)
EC80(mg/L)	= 7.58594	(95% Range: 7.39054 - 7.79395)
log(EC50)	= .81551	(95% Range: .80496 - .82635)
EC50(mg/L)	= 6.53895	(95% Range: 6.38201 - 6.70420)
log(EC20)	= .75101	(95% Range: .74124 - .76094)
EC20(mg/L)	= 5.63647	(95% Range: 5.51110 - 5.76681)
log(EC10)	= .71729	(95% Range: .70793 - .72674)
EC10(mg/L)	= 5.21545	(95% Range: 5.10424 - 5.33021)

===== ロジット関数 =====

●● 21d young E(L)C50 計算 収束までの反復回数=7 ●●

◎ デザイン行列

濃度	n	y	y/n	Const.	log10(C)
0.994	143.9	138.88	.965	1	-2.613
2.23	143.9	142.09	.987	1	.3483
4.59	143.9	123.19	.856	1	.6618
9.88	143.9	2.0000	.014	1	.9948

◎ 回帰式の適合度の検定 χ^2 値(P=0.05, df=2)=5.9915 (P=0.01, df=2)=9.2103

X2乗 (逸脱度) =60.827 >= 9.2103 ** 適合が悪い

X2乗 (ピアソン) =586.39 >= 9.2103 ** 適合が悪い

AIC =267.29

◎ 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	8.0788	.7043	11.470
log(Conc.)	-10.53	.9273	-11.35
WALD検定	X2値=129.009 自由度=1 有意確率=0.000		

◎ 推定値と残差

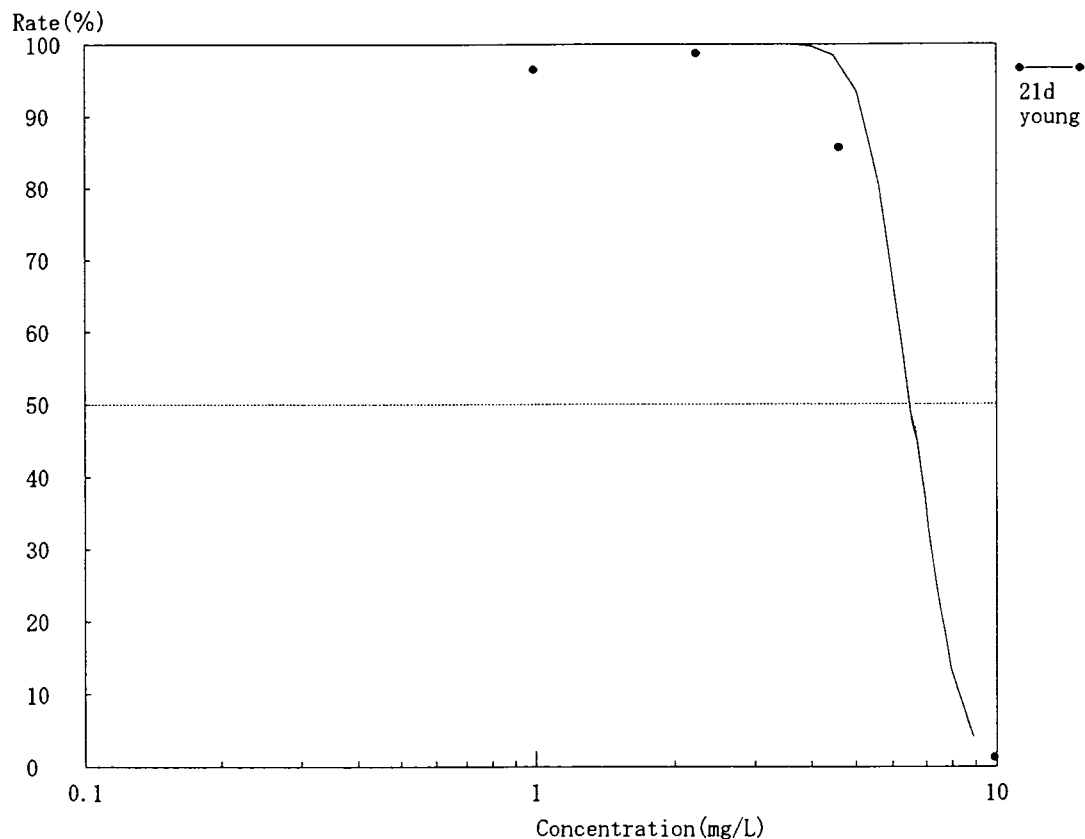
濃度	Y	Y 推定	残差(度数)	Y/n(P)	π 推定	残差(割合)
0.994	138.88	143.85	-4.967	.9652	.9997	-3.452
2.23	142.09	142.17	-7.214	.9875	.9880	-5.013
4.59	123.19	108.17	15.021	.8562	.7518	.1044
9.88	2.0000	11.981	-9.981	.0139	.0833	-6.936

◎ 診断統計量

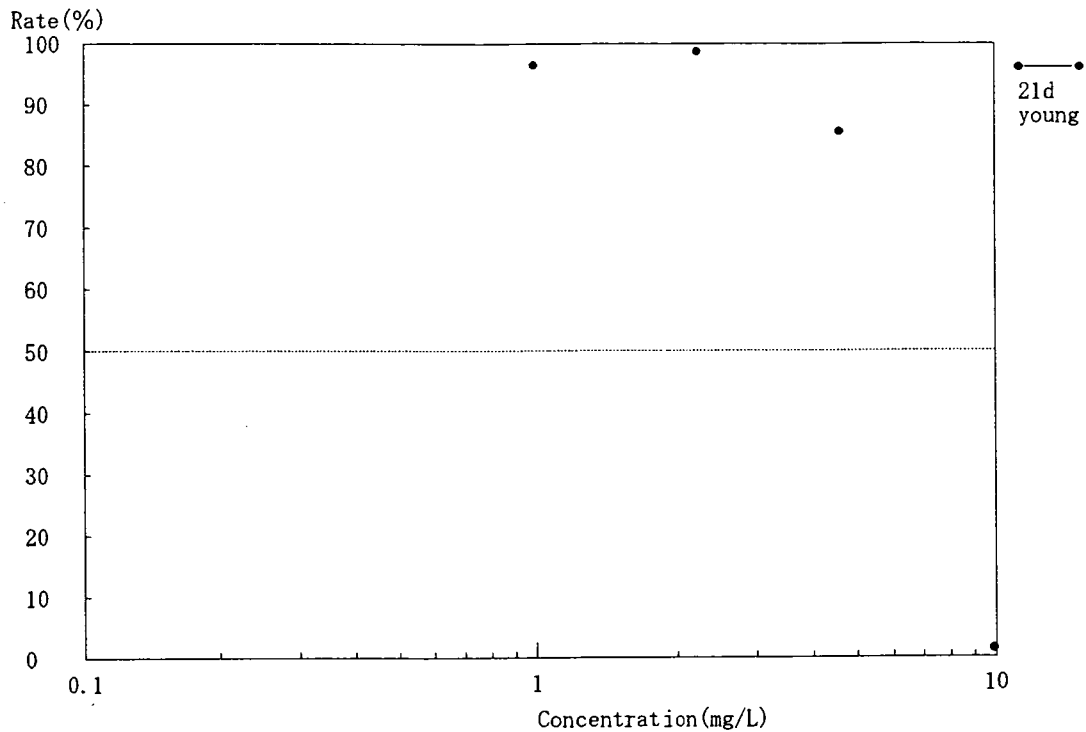
濃度 mg/L	Cookの距離	てこ比	逸脱度残差	ピアソン残差	標準化 逸脱度残差	標準化 ピアソン残差
0.994	6.4384	.0217	-6.151	-23.85	-6.218	-24.11
2.23	.00076	.2683	-5.484	-5.521	-6.411	-0.064
4.59	105.40	.8193	3.0741	2.8987	7.2314	6.8190
9.88	338.52	.8908	-3.679	-3.011	-11.13	-9.112

EC90%、80%、EC50%、20%、10%の推定		
log(EC90)	= .97562	(95% Range: .94417 - 1.02153)
EC90(mg/L)	= 9.45405	(95% Range: 8.79371 - 10.5082)
log(EC80)	= .89863	(95% Range: .86787 - .93912)
EC80(mg/L)	= 7.91821	(95% Range: 7.37685 - 8.69208)
log(EC50)	= .76701	(95% Range: .73743 - .79825)
EC50(mg/L)	= 5.84804	(95% Range: 5.46302 - 6.28420)
log(EC20)	= .63539	(95% Range: .60700 - .65738)
EC20(mg/L)	= 4.31911	(95% Range: 4.04571 - 4.54335)
log(EC10)	= .55840	(95% Range: .53069 - .57497)
EC10(mg/L)	= 3.61746	(95% Range: 3.39386 - 3.75812)

***** END *****



Dose-response curve for EC50 of Daphnia Reproduction Test
2,6-ジメチルアニリン (Probit method)



Dose-response curve for EC50 of Daphnia Reproduction Test
2,6-ジメチルアニリン (Logestic method)

●● 21d NOEC 産仔の推定結果の書き出し =====> **5%で有意, ***1%で有意 ●●
2,6-ジメチルアニリン
ミジンコ 繁殖試験 (産仔) 1X10, 4X10 生物量は 1 を掛けてある

◎ NOEC計算用元データ

濃度 mg/L	0	0.994	2.23	4.59	9.88	平均
1	148	130	150	120	10	
2	153	148	147	127	0	
3	148	142	134	132	2	
4	156	141	134	137	0	
5	129	139	141	134	1	
6	139	155	136	133	2	
7	107	137	158	110	1	
8	145	126	143	95	0	
9	152	132	140	115	-	
10	162	-	138	129	-	
平均	143.9	138.888	142.1	123.2	2	114
標準偏差	15.863	9.0339	7.6804	13.231	3.3381	

◎ 各濃度区の対照平均に対する相対量

濃度mg/L	0	0.994	2.23	4.59	9.88
1	102.85	90.34	104.24	83.39	6.95
2	106.32	102.85	102.15	88.26	0.00
3	102.85	98.68	93.12	91.73	1.39
4	108.41	97.98	93.12	95.21	0.00
5	89.65	96.59	97.98	93.12	0.69
6	96.59	107.71	94.51	92.43	1.39
7	74.36	95.21	109.80	76.44	0.69
8	100.76	87.56	99.37	66.02	0.00
9	105.63	91.73	97.29	79.92	-
10	112.58	-	95.90	89.65	-
平均	100	96.517	98.749	85.615	1.3899

◎ バートレットの等分散性の検定

χ^2 二乗検定値 (p;0.05)=9.4877 (p;0.01)=13.276 自由度= 4
計算値(15.803) > 9.4877 5%の危険率で等分散性を認めない。

◎ クラスカル・ワリスの順位検定 (Kruskal-Wallis test):全順位法

順位 濃度 mg/L	0	0.994	2.23	4.59	9.88
1	39	18	41	13	8
2	43	39	37	15	2
3	39	34	23	19.5	6.5
4	45	32.5	23	26.5	2
5	16.5	29.5	32.5	23	4.5

6	29.5	44	25	21	6.5
7	10	26.5	46	11	4.5
8	36	14	35	9	2
9	42	19.5	31	12	-
10	47	-	28	16.5	-
平均順位	34.7	28.555	32.15	16.65	4.5
χ ² 二乗検定基準値(p:0.05)=9.4877 (p:0.01)=13.276 自由度= 4					
計算値(29.703) => (9.488) 5%の危険率で有意差を認める。					

◎ ノンパラメトリックDunnett型の検定法

濃度 mg/L	0	0.994	2.23	4.59	9.88
計算値	-	1.3502	1.0591	2.7612**	3.5670**
Dunnett確率		0.1770	0.2896	0.0058	0.0004

▲ 参考：等分散性を認めた場合の計算

等分散性の仮定を満足しないため、順位検定を行った。
 毒性試験のような場合は、等分散性の仮定を満足しないことが多い。
 順位検定は情報の脱落を伴うため、検出力が低くなる。
 そのため、[等分散性の仮定を満足すると仮定した]分析結果をしめす。

◎ 一元配置分散分析 (全ての濃度区間の平均数に差がないとみなせるか) -----

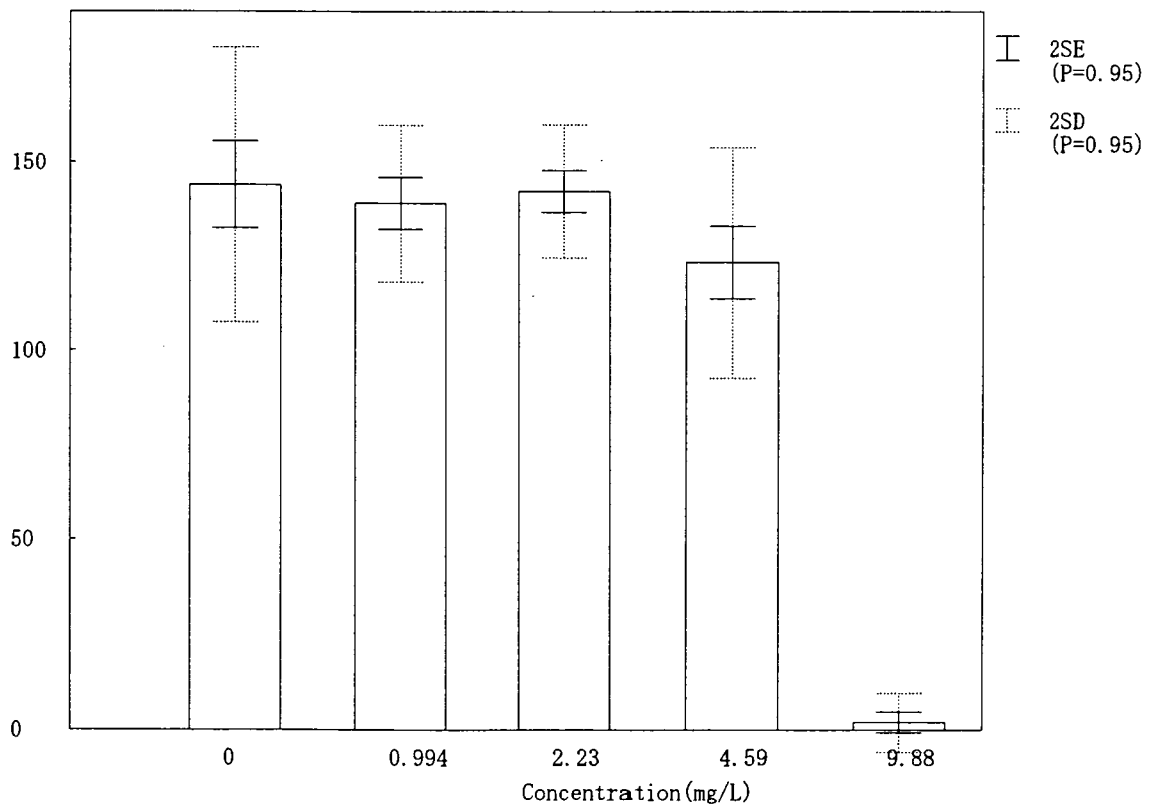
要因	平方和	自由度	平均平方	検定値(F)
処理	123609.7	4	30902.43	254.3764
誤差	5102.289	42	121.4831	
全体	128712	46		
F検定基準値 (p:0.05)=2.5943 (p:0.01)=3.8021 自由度= 4 : 42				
計算値(254.3) > 2.5943				

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	0.994	2.23	4.59	9.88
計算値	-	.9895	.3652	4.1995**	27.141**
Dunnett確率		0.7258	0.9889	0.0005	0.0000

Survival



2,6-ジメチルアニリン (21d young)