

環境省 殿



最 終 報 告 書

2-tert-ブチルフェノールのオオミジンコ (*Daphnia magna*) に対する
急性遊泳阻害試験

(試験番号 : No. 2010-生態15)

2011 年 3 月 3 日

株式会社 クロバ分析センター

原本と相違ないことを証明する。

2011 年 3 月 25 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-tert-ブチルフェノールのオオミジンコ (*Daphnia magna*) に対する
急性遊泳阻害試験

試験番号： No. 2010-生態15

本試験は、

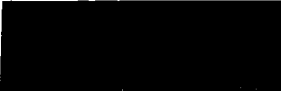
厚生労働省医薬食品局長、経済産業省製造産業局長、環境省総合環境政策局長連名通知「新規化学物質等に係る試験を実施する試験施設に関する基準について」（薬食発第 1121003 号、平成15・11・17 製局第 3 号、環保企発第 031121004 号、平成15年11月21日、平成20年7月4日改正）

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）

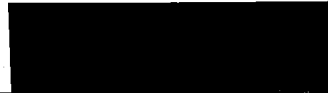
に従って実施した。

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。

2011 年 3 月 3 日

試験責任者 署名： 

2011 年 3 月 3 日

確認： 運営管理者 署名： 

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-tert-ブチルフェノールのオオミジンコ (*Daphnia magna*) に対する
急性遊泳阻害試験

試験番号： No. 2010-生態15

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	2011年 1月19日	2011年 1月20日	2011年 1月19日
実験状況の監査, 査察	2011年 1月25日	2011年 1月26日	2011年 1月25日
	2011年 1月27日	2011年 1月27日	2011年 1月27日
実験終了後の監査	2011年 2月 4日	2011年 2月 4日	2011年 2月 4日
組織体制の監査	2010年 8月 4日	2010年 8月 4日	2010年 8月 4日
	2010年10月21日	2010年10月26日	2010年10月21日
施設・設備の査察 試験用機器等 施設, 設備等 試験系	2010年 8月 5日	2010年 8月 5日	2010年 8月 5日
	2010年10月26日	2010年10月26日	2010年10月26日
最終報告書の監査	2011年 3月 3日	2011年 3月 3日	2011年 3月 3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。

2011年 3 月 3 日

信頼性保証部門責任者 署名：

試験実施概要

1. 表題 : 2-tert-ブチルフェノールのオオミジンコ (*Daphnia magna*) に対する急性遊泳阻害試験

2. 試験目的 : オオミジンコ (*Daphnia magna*) を被験物質に 48 時間暴露し、対照区に対する遊泳阻害率を測定することにより、ミジンコの遊泳に対する被験物質の毒性を明らかにする。

3. 試験法ガイドライン :

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

4. 適用GLP : 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20年7月4日改正)に従って実施した。

5. 試験委託者

名称 : 環境省

所在地 : 〒100-8975 東京都千代田区霞が関一丁目2-2

6. 試験受託者

名称 : 株式会社クレハ分析センター

本社所在地 : 〒974-8232 福島県いわき市錦町落合16番地

代表者 : XXXXXXXXXX

7. 試験施設

実施施設名 : 株式会社クレハ分析センター

所在地 : 〒974-8232 福島県いわき市錦町落合16番地

8. 試験関係者：

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

9. 試験期間：

試験開始日	2011 年 1 月 19 日
実験開始日	2011 年 1 月 25 日
実験終了日	2011 年 1 月 27 日
試験終了日	2011 年 3 月 3 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 被験物質の保管方法および保管条件下での安定性	4
2 供試生物	4
2.1 供試生物	4
2.2 感受性確認	4
2.3 試験に用いる幼体を得るための親ミジンコの飼育方法と供試幼体の基準	4
3 試験方法	5
3.1 予備的検討結果	5
3.2 試験条件	6
3.3 試験用水	7
3.4 試験容器および恒温槽等	7
3.5 試験濃度の設定	7
3.6 試験溶液の調製	8
3.7 被験物質濃度等の測定	8
3.8 試験操作	9
4 結果の算出	9
4.1 遊泳阻害濃度算出に用いる被験物質濃度の決定	9
4.2 50 % 遊泳阻害濃度 (EC_{50}) の算出	9
4.3 0 % 遊泳阻害最高濃度および 100 % 遊泳阻害最低濃度	10
5 結果および考察	10
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	10
5.2 試験溶液中の被験物質濃度	10
5.3 50 % 遊泳阻害濃度 (EC_{50})	10
5.4 0 % 遊泳阻害最高濃度および 100 % 遊泳阻害最低濃度	10
5.5 試験溶液の水温、溶存酸素濃度、pH および硬度	11
5.6 試験計画書からの逸脱の有無	11
6 保管	11
Table 1. - 8.	12
Figure 1.	15
付属資料-I 試験用水の水質	16
付属資料-II 予備試験の結果	18
付属資料-III 試験溶液の分析法	20
付属資料-IV 統計解析結果	25
付属資料-V 濃度分析 HPLC クロマトグラム	31

要 旨

試験委託者 環境省

表 題 2-tert-ブチルフェノールのオオミジンコ (*Daphnia magna*)
に対する急性遊泳阻害試験

試験番号 No. 2010-生態15

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 日改正)に従って実施した。

試験条件

- 1) 被験物質 : 2-tert-ブチルフェノール
- 2) 暴露方式 : 止水式 (密閉系)
- 3) 供試生物 : オオミジンコ (*Daphnia magna*)
- 4) 暴露期間 : 48 時間
- 5) 試験濃度 (設定値) : 対照区, 1.0, 1.5, 2.2, 3.2, 4.6, 6.8, 10 mg/L
公比 ; $10^{1/6}$ (約 1.5)
- 6) 試験溶液量 : 100 mL/容器
- 7) 連数 : 4 容器/試験区
- 8) 供試生物数 : 20 頭/試験区 (5 頭/容器)
- 9) 試験温度 : 20 °C で設定し、経時的および各試験容器間の変動範囲は
±1 °C 以内とする。
- 10) 照明 : 室内光、16 時間明/8 時間暗
- 11) 給餌 : 無給餌
- 12) pH : 試験溶液の pH 調整は行わない。暴露期間中の pH は 6.0
～ 9.0 の範囲とし、1.5 以内の変動とする。
- 13) 分析法 : HPLC 法

結 果

予備的な検討で、本被験物質は開放系で揮散する可能性があり、人健康への影響も懸念されることから、密閉系での試験が望ましいと考えられた。また、当局も密閉系が望ましいとの意見であったことから、密閉系での試験を行った。

1) 試験溶液中の被験物質濃度

暴露期間中の被験物質濃度に最大で 10 % 程度の減少が認められた。従って、各影響濃度（50 % 遊泳阻害濃度、0 % 遊泳阻害最高濃度、100 % 遊泳阻害最低濃度）の算出に当たっては、暴露開始時、および暴露終了時の測定値の幾何平均値を採用した。

2) 24 時間暴露後の結果

50 % 遊泳阻害濃度 (EC_{50})	:	4.3 mg/L
		(95 % 信頼限界 : 3.8~4.9 mg/L) , Probit
0 % 遊泳阻害最高濃度	:	1.6 mg/L
100 % 遊泳阻害最低濃度	:	10 mg/L

3) 48 時間暴露後の結果

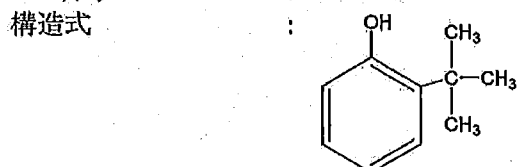
50 % 遊泳阻害濃度 (EC_{50})	:	3.7 mg/L
		(95 % 信頼限界 : 3.3~4.2 mg/L) , Probit
0 % 遊泳阻害最高濃度	:	1.6 mg/L
100 % 遊泳阻害最低濃度	:	6.9 mg/L

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-tert-ブチルフェノール

CAS 番号* : 88-18-6



分子式* : $C_{10}H_{14}O$

分子量* : 150.22

蒸気圧* : 0.09 mmHg (25°C)

水溶解度* : 700 mg/L (25°C)

ヘンリー定数* : $2.54E-005 \text{ atm}\cdot\text{m}^3/\text{mole}$ (25°C)

酸解離定数* (pKa) : 10.3

1-オクタノール/水分配係数* : 3.31

融点* : -6.8°C

沸点* : 223°C

外観** : うすい黄色～赤褐色の液体

安定性** : 光により変質する

溶媒に対する溶解性** : エタノールに可溶

1.2 供試試料

入手先 : [REDACTED]

入手量 : 25 g × 4 本 (同一ロット)

ロット番号*** : [REDACTED]

含量*** : 99.9 % (毛管カラム GC)

密度(20°C)*** : 0.984 g/mL

不純物の名称および含有率*** : 記載なし

水分*** : 0.01 %

入手日 : 2010 年 11 月 22 日

〔出典〕

* : SRC PhysProp Database

** : [REDACTED] 「製品安全データシート」 [REDACTED]
(作成 : 2001 年 09 月 01 日・改訂日 : 2009 年 05 月 14 日)

*** : [REDACTED] 「検査成績書」 ([REDACTED]
2010 年 11 月 22 日) 成績書発行番号 [REDACTED]

1.3 被験物質の保管方法および保管条件下での安定性

1) 保管方法

被験物質保管用冷蔵庫（約 4℃）において、遮光・密閉保管した。

2) 被験物質の確認および保管条件下の安定性

入手した被験物質について赤外吸収スペクトルを測定し、公的データ*との比較により、被験物質の特性が認められることを確認した。

実験終了後にも赤外吸収スペクトルを測定し、試験開始前に測定したスペクトルと比較した。その結果、スペクトルに変化はなかったことから、被験物質は実験期間中安定であったと判断した。

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

2 供試生物

2.1 供試生物

試験には、オオミジンコ (*Daphnia magna*) の幼体 (24 時間齢以内) を用いた。本種は、独立行政法人国立環境研究所より 1997 年 2 月 5 日に入手したものを、当施設において継代飼育しているものである。

2.2 感受性確認

6 ヶ月ごとに、重クロム酸カリウム (二クロム酸カリウム、試薬特級) を基準物質とする急性遊泳阻害試験を実施して感受性の確認を行っている。直近の基準物質による 48 時間 50 % 遊泳阻害濃度 (EC_{50}) は 0.75 mg/L [暴露期間：2010 年 10 月 6 日～2010 年 10 月 8 日] であった。1999 年 10 月以降、直近までの EC_{50} 値は 平均=0.82 mg/L, 標準偏差=0.16 mg/L, n=24 (M4 人工調製水) であった。

2.3 試験に用いる幼体を得るための親ミジンコの飼育方法と供試幼体の基準

孵化した 24 時間齢以内の幼体を 3 ～ 4 週間飼育したものの中から、育房内に卵を抱えた肉眼的に健康かつ十分な大きさの雌成体を選別し、別に用意したビーカーに移した。翌日、産まれた幼体を供試ミジンコの親とし、最長で 4 週間飼育した。飼育期間中は産まれたおおよその幼体数を毎日確認し、生まれた幼体はその日のうちに除去した。

飼育開始 19 日後、すなわち暴露開始前日に幼体を除去した。翌日、孵化した 24

時間齢以内の幼体を試験に用いた。

試験に用いたバッチの親については、30 頭中 4 頭以上の死亡、死産の発生、休眠卵や雄の発生、初産日の遅れ、および体の変色等の何らかのストレスを受けた症状は認められなかった。また、初産幼体は試験に使用しなかった。同一の試験においては、全て同じバッチに生まれた幼体を用いた。

親ミジンコの飼育方法、日齢等は下記の通りであった。

- 1) 飼育水 : 試験に用いる試験用水(3.3 項参照)で飼育した。
飼育水は(3 回/週の頻度で)原則として月、水、金曜日に換水した。
- 2) 飼育密度 : 30 頭/2 L 飼育水
- 3) 水温 : $20 \pm 1^{\circ}\text{C}$
- 4) 照明 : 室内光、16 時間 明/8 時間 暗
- 5) 餌 : クロレラ工業(株)より購入したクロレラ (*Chlorella vulgaris*) の培養液から遠心分離操作により藻類を回収し、これを飼育水に再分散したものを与えた。
- 6) 給餌量 : ミジンコ 1 頭当たり次の量の藻類を毎日与えた。
0 ~ 10 日 : 0.15 mgC (有機炭素含量) / 日
11 ~ 20 日 : 0.18 mgC (有機炭素含量) / 日
21 ~ 28 日 : 0.20 mgC (有機炭素含量) / 日
- 7) 容器 : 2 L のガラス製のビーカーを用い、試験容器と同様にゴミの混入等を防止するため蓋をした。
- 8) じゅん化期間 : 2011 年 1 月 5 日 ~ 2011 年 1 月 25 日(20 日齢)
暴露開始前 2 週間の親の死亡率は 3.3 % (30 頭中 1 頭)であり、休眠卵および雄の発生は認められなかった。

3 試験方法

3.1 予備的検討結果

1) 被験物質の溶解性確認

本被験物質の水溶解度の文献値が 700 mg/L (25°C) であることから、被験物質 200 mg を秤量し、1000 mL メスフラスコに入れ、試験用水で定容後、マグネチックスターラーを用いて、試験温度 (20°C) で 2 時間攪拌し、200 mg/L の溶液を調製した。目視で溶解していることを確認後、更に遠心分離 (3000 rpm, 15 分間) 操作を行い、被験物質溶液の上層、中層および下層部の被験物質濃度を HPLC 法により測定した。結果を以下の表に示す。

	測定濃度 (mg/L)		
	試料-1	試料-2	平均
上層部	191	193	192
中層部	193	192	193
下層部	190	192	191

200 mg/L に調製した被験物質溶液は溶解していると判断した。

2) 試験溶液中での被験物質濃度の安定性

開放系、密閉系および密閉・遮光条件下における試験溶液の安定性の検討を以下の手順で行った。

1) で調製した 200 mg/L の溶液を更に試験用水で希釈し、1.0 mg/L の試験溶液を調製し、各試験溶液の 100 mL をそれぞれ 100 mL ガラス製ビーカー（開放条件）、110 mL スクリュービン（密閉系）およびアルミホイルで遮光した 110 mL スクリュービン（遮光・密閉系）に入れ、48 時間試験温度（20℃）に保ち、被験物質濃度を HPLC 法により測定した。

	測定濃度 (mg/L)	
	開始時	48 時間後 (維持率 %)
開放系		0.931 (99)
密閉系	0.938	0.946 (101)
遮光・密閉系		0.973 (104)

48 時間後の濃度は設定値に対してやや低いものの、開始時の濃度に対してはほぼ同等(99 ～ 104 %)であり、濃度減少は少ないものと判断した。

3.2 試験条件

予備検討の結果および予備試験の結果を基に、以下の条件で試験を行った。予備的な検討で、本被験物質は開放系で揮散する可能性があり、人健康への影響も懸念されることから、密閉系での試験が望ましいと考えられた。また、当局も密閉系が望ましいとの意見であったことから、密閉系での試験を行った。

- 1) 暴露方式 : 止水式 (密閉系)
- 2) 暴露期間 : 48 時間

- 3) 試験溶液量 : 100 mL/容器
4) 連数 : 4 容器/試験区
5) 供試生物数 : 20 頭/試験区 (5 頭/容器)
6) 試験温度 : 20 °Cで設定し、経時的および各試験容器間の変動範囲は ± 1 °C以内とする。
7) 溶存酸素濃度 : 暴露期間中、通気は行わない。暴露期間中の溶存酸素濃度は 3 mg/L 以上を維持する。
8) pH : 試験溶液の pH 調整は行わない。暴露期間中の pH は 6.0 ~ 9.0 の範囲とし、1.5 以内の変動とする。
9) 照明 : 室内光、16 時間 明/8 時間 暗
10) 給餌 : 無給餌

3.3 試験用水

Elendt M4 人工調製水 [OECD GUIDELINES FOR THE TESTING OF CHEMICALS 211: *Daphnia magna* Reproduction Test (Adopted 3, October 2008) に記載してある人工調製水]を使用した。成分表を付属資料-I に示した。

暴露開始時における試験用水の全硬度は 252 mg/L (CaCO₃ 換算) で、pH は 7.9 であった。2009 年 1 月以降、2010 年 12 月までの全硬度は 平均= 252 mg/L, 標準偏差=5.0 mg/L, n=18 であった。

3.4 試験容器および恒温槽等

- 1) 試験容器 : 110 mL 容ガラス製スクリー管瓶を用い、密栓した
(ヘッドスペース : 10 mL)
2) 天秤 : 上皿電子天秤 AE200 (メトラー)
(被験物質秤量)
3) 恒温槽 : 恒温室
4) 水温計 : ガラス製水銀温度計
5) 溶存酸素計 : B-505 (飯島電子工業)
6) pH 計 : HM-30V (東亜ディーケーケー)
7) ICP(硬度分析用) : IRIS Advantage/AP (サーモエレクトロン)

3.5 試験濃度の設定

本試験の実施に先立ち、公比 10^{1/3} (約 2.2 と記載する) で、連数を 4 連とした 4 濃度区 (1.0, 2.2, 4.6, 10 mg/L) の予備試験を行った結果、48 時間の遊泳阻害率は 1.0 mg/L 区で 0 %、2.2 mg/L 区で 5 %、4.6 mg/L 区で 90 %、10 mg/L 区で

100 %であった（付属資料-Ⅱ）。予備試験の結果を基に、本試験では公比 $10^{1/6}$ （約 1.5）で、1.0, 1.5, 2.2, 3.2, 4.6, 6.8, 10 mg/L および対照区を設定した。

3.6 試験溶液の調製

試験溶液は用時調製とした。

50 mg の被験物質を 100 mL ビーカーに秤り取り、試験用水で 500 mL メスフラスコに流し込み、500 mL とし、マグネチックスターラーを用いて試験温度（20 °C）で 2 時間攪拌し、100 mg/L の試験原液とした（無色透明）。

1.0, 1.5, 2.2, 3.2, 4.6, 6.8, 10 mg/L 区の各試験溶液は、100 mg/L の試験原液の各 10, 15, 22, 32, 46, 68, 100 mL を 1000 mL のメスフラスコに入れ、試験用水で 1000 mL としてそれぞれ調製した（全て無色透明）。

対照区には被験物質を加えない試験用水を用いた。

3.7 被験物質濃度等の測定

1) 被験物質濃度の測定

試験溶液中の被験物質濃度の分析は、全試験区について暴露開始時および暴露終了時に HPLC 法により行った。

暴露開始時には調製した試験溶液より採取し、暴露終了時には各試験容器の中層より 3 mL ずつ採取、混合した試験溶液について行った。

試料の測定条件および前処理方法の概略を以下に記載した。詳細な分析方法は付属資料 - Ⅲ「試験溶液の分析法」（測定条件、検出限界値および定量下限値、添加回収率、保存安定性、検量線）に示した。

定量下限値は 0.06 mg/L であった。

(1) 測定条件

高速液体クロマトグラフ	: L-6000 型	日立製作所
分離カラム	: Mightysil RP-18, 4.6×150 mm	関東化学
恒温槽温度	: 40°C	
溶離液	: アセトニトリル／純水 (60／40)	
流量	: 0.8 mL/min	
検出波長	: UV 273 nm	
注入量	: 50 μ L	

(2) 前処理方法

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純水で希釈した。

2) 試験環境の測定

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

試験水温の変動を監視するために、別に設けた試験容器の水温および周囲の大気等の温度を暴露期間中に継続して測定して記録した。

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

3.8 試験操作

試験溶液の水温、溶存酸素濃度、pH を測定後、供試ミジンコを投入し、その時点暴露開始時とした。

供試ミジンコの投入には先端を広口に加工したガラスピペットを用い、投入の際のピペット内の飼育水は、試験溶液量に対して、全量で 1 mL 以内とした。

暴露開始 24 および 48 時間後にミジンコの遊泳阻害数の観察を行った。試験容器を穏やかに動かした後、15 秒間の観察期間中に泳がなかった場合は遊泳阻害されたとみなした（ただし、遊泳とは第二触角を使い、水中で自分の体を動かす、もしくは自立的に移動することをいい、水底を這って動くものは遊泳阻害に含めた。水面で動くものについては、水滴を落とす等の操作でミジンコを強制的に水中に沈めた時に遊泳しても、再び浮上した場合には遊泳阻害に含めた。また、正常な遊泳でない場合でも 15 秒間の観察中に 1 回でも水中を遊泳した場合は、阻害に含めなかった）。

4 結果の算出

4.1 遊泳阻害濃度算出に用いる被験物質濃度の決定

暴露期間中の被験物質濃度に最大で 10 % 程度の減少が認められたが、被験物質の揮発によるものと考えられた。従って、各影響濃度（50 % 遊泳阻害濃度、0 % 遊泳阻害最高濃度、100 % 遊泳阻害最低濃度）の算出に当たっては、暴露開始時、および暴露終了時の測定値の幾何平均値を採用した。

4.2 50 % 遊泳阻害濃度 (EC_{50}) の算出

各試験区のミジンコの遊泳阻害数と供試個体数（20 頭）から、観察時間ごとに遊泳阻害率（%）を求め、被験物質濃度と遊泳阻害率の関係から、Probit 法により 50 % 遊泳阻害濃度 (EC_{50}) および 95 % 信頼限界を算出した。

統計ソフトは、EcoTox ver. 2.6 d を用いた。

4.3 0 % 遊泳阻害最高濃度および 100 % 遊泳阻害最低濃度

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

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 試験溶液中の被験物質濃度

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

暴露開始時の被験物質濃度は設定値の 101 ~ 111 % であり、ほぼ設定通りに調製された。

また、暴露期間中の被験物質濃度に最大で 10 % 程度の減少が認められた。

5.3 50 % 遊泳阻害濃度 (EC_{50})

24 時間毎の観察時における遊泳阻害率を Table 2 に、50 % 遊泳阻害濃度 (EC_{50}) を Table 3 に、また、濃度-遊泳阻害率曲線を Figure 1 に示した。

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

EcoTox による統計解析を行うにあたり、観察点として採用する区を、下限は遊泳阻害率が 0 % の区、上限は遊泳阻害率 100 % の区の範囲で選択し、24 時間は 1.57 ~ 10 mg/L 区、48 時間は 1.57 ~ 6.88 mg/L 区を採用した (付属資料-IV)。

結果を以下に示した。

24 時間 50 % 遊泳阻害濃度 (EC_{50}) : 4.3 mg/L

(95 % 信頼限界 : 3.8 ~ 4.9 mg/L) , Probit

48 時間 50 % 遊泳阻害濃度 (EC_{50}) : 3.7 mg/L

(95 % 信頼限界 : 3.3 ~ 4.2 mg/L) , Probit

5.4 0 % 遊泳阻害最高濃度および 100 % 遊泳阻害最低濃度

0 % 遊泳阻害最高濃度および 100 % 遊泳阻害最低濃度を Table 4 および次頁に示した。

24 時間 0 % 遊泳阻害最高濃度 : 1.6 mg/L

48 時間 0 % 遊泳阻害最高濃度 : 1.6 mg/L

24 時間 100 % 遊泳阻害最低濃度 : 10 mg/L

48 時間 100 % 遊泳阻害最低濃度 : 6.9 mg/L

5.5 試験溶液の水温、溶存酸素濃度、pH および硬度

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

48 時間の暴露期間中の水温は 19.2 ~ 19.7 °C の範囲内であり、変動は 1 °C 以内であった。試験水温の変動を連続的に監視するために別に設けた試験容器と、周囲の大気温度は共に 20 ± 1 °C の範囲内であった。

溶存酸素濃度は 8.5 ~ 8.9 mg/L の範囲内で、すべての試験区で飽和溶存酸素濃度の 60 % 以上が維持され (20.0 °C の飽和溶存酸素濃度 : 8.84 mg/L)、試験成立条件 (3 mg/L 以上) を満たした。

暴露期間中の pH は、7.8 ~ 7.9 の範囲内であり、変動は 1.5 以内であった。

全硬度は 244 ~ 256 mg/L の範囲内であった。

5.6 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
- 10) その他の資料

以 上

Table 1. Measured Concentrations of the Substance in Test Solution

(Static Condition, Closed System)						
Nominal Concentration (mg/L)	Measured Concentration, mg/L (Percent of Nominal)					Mean ^a Measured Concentration (mg/L)
	0 Hour new		48 Hours old		Percent of Initial	
Control	<0.06	(-)	<0.06	(-)	[-]	-
1.0	1.02	(102)	1.02	(102)	[100]	1.02
1.5	1.66	(111)	1.48	(99)	[89]	1.57
2.2	2.23	(101)	2.18	(99)	[98]	2.20
3.2	3.35	(105)	3.22	(101)	[96]	3.28
4.6	4.69	(102)	4.56	(99)	[97]	4.62
6.8	6.92	(102)	6.84	(101)	[99]	6.88
10	10.2	(102)	9.83	(98)	[96]	10.0

new : Freshly prepared test solutions

old : Test solutions after 48 hours exposure

a : Geometric mean

Table 2. The Numbers of Immobile *Daphnia*

Nominal Concentration (mg/L)	Mean ^a Measured Concentration (mg/L)	Number of <i>Daphnia</i>	(Static Condition, Closed System)									
			Cumulative Numbers of Immobilized <i>Daphnia</i> (Percent Immobility)									
			24 Hours					48 Hours				
			1	2	3	4	Total	1	2	3	4	Total
Control	-	20	0	0	0	0	0 (0)	0	0	0	0	0 (0)
1.0	1.02	20	0	0	0	0	0 (0)	0	0	0	0	0 (0)
1.5	1.57	20	0	0	0	0	0 (0)	0	0	0	0	0 (0)
2.2	2.20	20	0	0	1	0	1 (5)	0	0	1	0	1 (5)
3.2	3.28	20	1	0	1	1	3 (15)	1	1	1	2	5 (25)
4.6	4.62	20	3	3	2	3	11 (55)	4	5	3	4	16 (80)
6.8	6.88	20	4	5	5	5	19 (95)	5	5	5	5	20 (100)
10	10.0	20	5	5	5	5	20 (100)	5	5	5	5	20 (100)

a : Geometric mean

Table 3. Calculated EC₅₀ Values

Exposure Period (Hours)	EC ₅₀ (mg/L)	95 % Confidence Limits (mg/L)	Statistical Method
24	4.3	3.8 - 4.9	Probit
48	3.7	3.3 - 4.2	Probit

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

Exposure Period (Hours)	Highest Concentration in 0 % Immobility (mg/L)	Lowest Concentration in 100 % Immobility (mg/L)
24	1.6	10
48	1.6	6.9

Table 5. Temperature

Nominal Concentration (mg/L)	Mean ^a Measured Concentration (mg/L)	(Static Condition, Closed System) Temperature, °C		
		0 Hour new	24 Hours	48 Hours old
Control	-	19.2	19.3	19.4
1.0	1.02	19.2	19.3	19.4
1.5	1.57	19.4	19.4	19.4
2.2	2.20	19.4	19.4	19.4
3.2	3.28	19.4	19.4	19.6
4.6	4.62	19.4	19.5	19.6
6.8	6.88	19.6	19.6	19.6
10	10.0	19.7	19.6	19.7

new : Freshly prepared test solutions

old : Test solutions after 48 hours exposure

a : Geometric mean

Table 6. Dissolved Oxygen Concentrations

(Static Condition, Closed System)

Nominal Concentration (mg/L)	Mean ^a Measured Concentration (mg/L)	Dissolved Oxygen Concentration, mg/L		
		0 Hour new	24 Hours	48 Hours old
Control	-	8.8	8.7	8.6
1.0	1.02	8.8	8.7	8.5
1.5	1.57	8.8	8.7	8.6
2.2	2.20	8.8	8.7	8.6
3.2	3.28	8.8	8.7	8.5
4.6	4.62	8.8	8.7	8.5
6.8	6.88	8.9	8.7	8.5
10	10.0	8.8	8.6	8.5

new : Freshly prepared test solutions

old : Test solutions after 48 hours exposure

a : Geometric mean

Table 7. pH Values

(Static Condition, Closed System)

Nominal Concentration (mg/L)	Mean ^a Measured Concentration (mg/L)	pH		
		0 Hour new	24 Hours	48 Hours old
Control	-	7.9	7.9	7.8
1.0	1.02	7.9	7.9	7.8
1.5	1.57	7.9	7.9	7.9
2.2	2.20	7.9	7.9	7.9
3.2	3.28	7.9	7.9	7.9
4.6	4.62	7.9	7.9	7.9
6.8	6.88	7.9	7.9	7.8
10	10.0	7.9	7.9	7.9

new : Freshly prepared test solutions

old : Test solutions after 48 hours exposure

a : Geometric mean

Table 8. Total Hardness(as CaCO_3)

Nominal Concentration (mg/L)	Mean ^a Measured Concentration (mg/L)	(Static Condition, Closed System)	
		Total Hardness (as CaCO_3), mg/L	
		0 Hour new	48 Hours old
Control	—	252	249
1.0	1.02	250	249
1.5	1.57	251	248
2.2	2.20	249	250
3.2	3.28	255	248
4.6	4.62	251	244
6.8	6.88	252	245
10	10.0	256	245

new : Freshly prepared test solutions

old : Test solutions after 48 hours exposure

a : Geometric mean

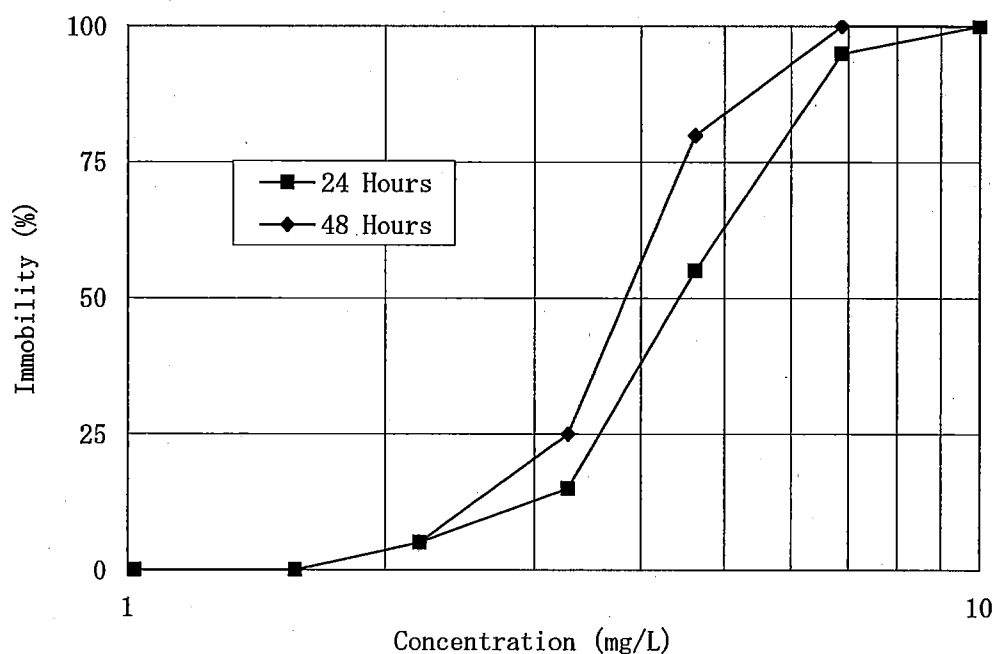


Figure 1. Concentration-Response (Immobility) Curves

付 属 資 料 - I



試 験 用 水 の 水 質

(

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

Macro nutrients	Concentration	Unit
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	293.8	mg /L
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	123.3	mg /L
KCl	5.80	mg /L
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
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.3605	mg /L
LiCl	0.3060	mg /L
RbCl	0.0710	mg /L
$\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.152	mg /L
NaBr	0.0160	mg /L
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.0630	mg /L
$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.01675	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	$\mu\text{g/L}$
Na_2SeO_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 - II



予 備 試 験 の 結 果

Range Finding Test

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

(Static Condition, Open System)

Nominal Concentration (mg/L)	Cumulative Numbers of Immobilized <i>Daphnia</i> (Percent Immobility)			
	24 Hours		48 Hours	
Control	0/20	(0)	0/20	(0)
1.0	0/20	(0)	0/20	(0)
2.2	0/20	(0)	1/20	(5)
4.6	11/20	(55)	18/20	(90)
10	20/20	(100)	20/20	(100)

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

(Static Condition, Open System)

Nominal Concentration (mg/L)	Measured Concentration (mg/L) (Percent of Nominal)			
	0 Hour new		48 Hours old	
Control	<0.06	(-)	<0.06	(-)
1.0	0.9445	(94)	0.890	(89)
2.2	2.18	(99)	2.03	(92)
4.6	4.31	(94)	4.10	(89)
10	9.59	(96)	8.95	(89)

new : Freshly prepared test solutions

old : Test solutions after 48 hours exposure

付 属 資 料 - III

試 験 溶 液 の 分 析 法

2-tert-ブチルフェノール分析法

1. 分析方法

(1) 分析法の概要

試験溶液の一定量を、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、標準液の検量線から試験溶液中の被験物質の濃度を求める。

(2) 装置および器具

a) 高速液体クロマトグラフ	: L-6000 型	日立製作所
b) 分離カラム	: Mightysil RP-18, 4.6×150 mm	関東化学
c) カラム恒温槽	: L-5025 型	日立製作所
d) UV 検出器	: L-4000 型	日立製作所
e) オートサンプラー	: L-2200 型	日立製作所
f) データ処理装置	: D-2500 型	日立製作所
g) 化学天秤	: AG-204 型	メトラー
h) 超音波洗浄器	: BRANSON 8200 型	ヤマト科学
i) 純水製造装置	: Milli-Q SP TOC	ミリポア
j) メスシリンダー	: 容量 500 mL	柴田科学
k) メスフラスコ	: 容量 10, 25, 100 mL	柴田科学
l) ホールピペット	: 容量 1 mL	柴田科学
m) メスピペット	: 容量 1 mL	柴田科学

(3) 試薬

a) 2-tert-ブチルフェノール	: 純度 99.9 %, ロット番号	
b) アセトニトリル	: HPLC 用	和光純薬
c) 純水	: 純水製造装置で製造	

(4) 試薬の調製

a) 溶離液

アセトニトリル 600 mL と純水 400 mL をメスシリンダーで取り混合する。調製した溶離液は使用前に超音波処理をしながら減圧し、脱気する。

b) 被験物質標準原液 (1000 mg/L)

被験物質約 100 mg を 100 mL メスフラスコに 0.1 mg の桁まで精秤する。これにアセトニトリルを加えて溶解し標線を合わせる。

秤量した質量から、純度換算を行った上、正確な被験物質の濃度を算出する。

(5) 操作

- a) 2 に記載する分析条件で HPLC を作動し、装置を安定させる。
- b) 3 に記載する方法で検量線を作成する。
- c) 検量線の被験物質濃度範囲内に入るように試験溶液を純水で希釈し、その 50 μL を HPLC に注入してクロマトグラムと同時にピーク面積を得る。
- d) 検量線により濃度を求め、希釈率を補正して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, 4.6 \times 150 mm
- (2) 恒温槽温度 : 40 $^{\circ}\text{C}$
- (3) 溶離液 : アセトニトリル／純水 (60／40)
- (4) 流量 : 0.8 mL/min
- (5) 検出波長 : UV 273 nm
- (6) 注入量 : 50 μL

3. 検量線の作成

- (1) 被験物質標準原液 (1000 mg/L) 0.25 mL を 25 mL メスフラスコに正確に分取し、純水で標線を合わせ、10 mg/L 標準液を調製する。標準液 10 mg/L から、0.1 mL、0.5 mL、1.0 mL をそれぞれ 10 mL メスフラスコに正確に分取し、純水を用いて標線を合わせ、0.1 mg/L、0.5 mg/L、1.0 mg/L 標準液とする。
- (2) 各標準液について 50 μL を HPLC に注入し、データ処理装置からクロマトグラムと同時にピーク面積 (カウント数) を得る。被験物質濃度を横軸にピーク面積を縦軸にとり検量線を作成する。この時の回帰式の相関係数も算出する。

表 1 検量線に使用したデータ例

No.	被験物質濃度 (mg/L)	ピーク面積 ($\mu\text{V} \cdot \text{sec}$)
1	0	0
2	0.1024	1923
3	0.5120	9282
4	1.024	18540

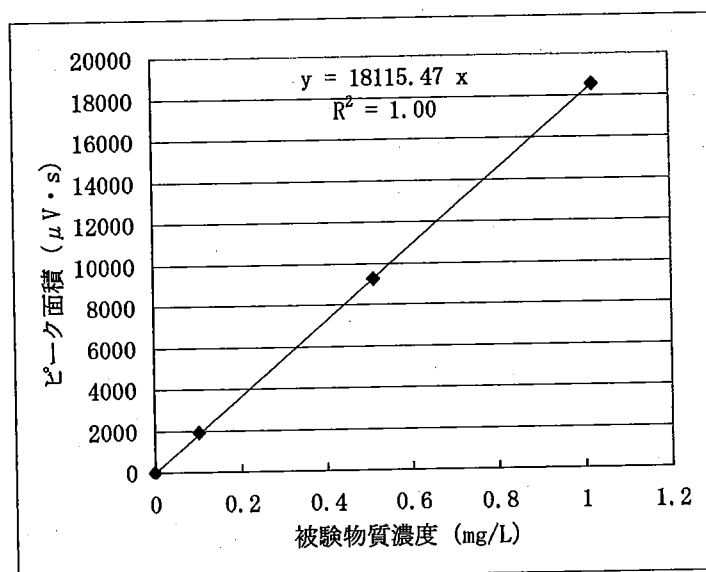


図1 検量線例

4. 添加回収率

1. (4).b)で調製した被験物質標準原液 (1079 mg/L) を試験用水に添加し、濃度が 0.1079 mg/L、1.079 mg/L、10.79 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 %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 (%)
0.1079	1	0.1041	0.107	99
	2	0.1103		
1.079	1	1.063	1.07	99
	2	1.071		
10.79	1	10.71	10.7	99
	2	10.77		

5. 保存安定性

4の添加回収で調製した3濃度の試料溶液 (0.1079 mg/L、1.079 mg/L、10.79 mg/L) を、密閉・遮光条件において3日間冷蔵庫で保存し、試料溶液の安定性を確認した。

結果を表3に示す。3日間冷蔵庫保存液の濃度維持率は 99 ~ 102 % であった。

表3 経時変化

開始時測定値 (mg/L)	3日後			
	n	測定値 (mg/L)	測定値平均 (mg/L)	濃度維持率 (%)
0.107	1	0.1035	0.106	99
	2	0.1086		
1.07	1	1.066	1.07	100
	2	1.081		
10.7	1	10.86	10.9	102
	2	10.96		

6. 定量下限値および検出限界値

被験物質濃度 0.1079 mg/L の試料液 50 μ L 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 0.06 mg/L、検出限界値は 0.02 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	0.1206
2	0.1082
3	0.1193
4	0.1139
5	0.1066
6	0.1212
7	0.1138
平均値	0.1148
標準偏差 (σ_{n-1})	0.00588

定量下限値 = $0.00588 \times 10 \rightleftharpoons 0.06 \text{ mg/L}$

検出限界値 = $0.00588 \times 3 \rightleftharpoons 0.02 \text{ mg/L}$



付 属 資 料 - IV

統 計 解 析 結 果
(EcoTox ver. 2.6d)

ミジンコ 急性遊泳阻害試験

2010-生態 15(幾何)

ファイル名= 2020126 更新日: 2011/01/31

区	濃度	連	実測数(影響・死亡)-----		
	mg/L (log)		0	24	48 hour
1	0 (-)	1	20	0	0
2	1.02 (0.01)	1	20	0	0
3	1.57 (0.20)	1	20	0	0
4	2.2 (0.34)	1	20	1	1
5	3.28 (0.52)	1	20	3	5
6	4.62 (0.66)	1	20	11	16
7	6.88 (0.84)	1	20	19	20
8	10 (1.00)	1	20	20	20

[対照に対する] 割合 (%)

区	濃度	影響・死亡-----	
	mg/L (log)	24	48 hour
1	1.02 (0.01)	0.00	0.00
2	1.57 (0.20)	0.00	0.00
3	2.2 (0.34)	5.00	5.00
4	3.28 (0.52)	15.00	25.00
5	4.62 (0.66)	55.00	80.00
6	6.88 (0.84)	95.00	100.00
7	10 (1.00)	100.00	100.00

EC50 計算に用いたデータ (Probit, Logit 法)

区	濃度	影響・死亡-----		
	mg/L (log)	0	24	48 hour
1	1.02 (0.01)	20.00	---	---
2	1.57 (0.20)	20.00	0.20	0.20
3	2.2 (0.34)	20.00	1.00	1.00
4	3.28 (0.52)	20.00	3.00	5.00
5	4.62 (0.66)	20.00	11.00	16.00
6	6.88 (0.84)	20.00	19.00	19.80
7	10 (1.00)	20.00	19.80	---

2010-生態 15(幾何)

ミジンコ 急性遊泳阻害試験 観察回数=3 濃度区数=8(mg/L)

繰返し数 = 1, 1, 1, 1, 1, 1, 1, 1

データファイル: 2020126 更新日: 2011/01/31

生物量-----					
濃度	繰返し	0	24	48	hour
0	(1)	20.000	0.0000	0.0000	
1.02	(1)	20.000	0.0000	0.0000	
1.57	(1)	20.000	0.0000	0.0000	
2.2	(1)	20.000	1.0000	1.0000	
3.28	(1)	20.000	3.0000	5.0000	

4.62	(1)	20.000	11.000	16.000
6.88	(1)	20.000	19.000	20.000
10	(1)	20.000	20.000	20.000

生物量 (%)

濃度	24	48	hour
1.02	0.00	0.00	
1.57	0.00	0.00	
2.2	5.00	5.00	
3.28	15.00	25.00	
4.62	55.00	80.00	
6.88	95.00	100.00	
10	100.00	100.00	

E(L)C50 計算 収束判定値=0.0001 最大反復回数=50

===== EC50 計算ごとの詳細データ =====

===== プロビット関数 =====

●● 24h Effect E(L)C50 計算 収束までの反復回数=5 ●●

◎ デザイン行列

濃度	n	y	y/n	Const.	log10(C)
1.57	20.00	0.200	0.01	1.000	0.196
2.2	20.00	1.000	0.05	1.000	0.342
3.28	20.00	3.000	0.15	1.000	0.516
4.62	20.00	11.00	0.55	1.000	0.665
6.88	20.00	19.00	0.95	1.000	0.838
10	20.00	19.80	0.99	1.000	1.000

◎ 回帰式の適合度の検定 χ^2 値(P=0.05, df=4)= 9.488 (P=0.01, df=4)= 13.28

X2 乗 (逸脱度) = 1.778 < 9.488 適合する

X2 乗 (ピアソン) = 2.077 < 9.488 適合する

AIC = 70.57

◎ 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	-4.178	0.683	-6.121
log(Conc.)	6.578	1.045	6.292
WALD 検定	X2 値=39.593	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)
1.57	0.200	0.039	0.161	0.010	0.002	0.008
2.2	1.000	0.541	0.459	0.050	0.027	0.023
3.28	3.000	4.324	-1.324	0.150	0.216	-0.066
4.62	11.00	11.53	-0.535	0.550	0.577	-0.027
6.88	19.00	18.17	0.831	0.950	0.908	0.042
10	19.80	19.84	-0.036	0.990	0.992	-0.002

◎ 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						
1.57	0.038	0.093	0.581	0.823	0.609	0.864
2.2	0.175	0.359	0.567	0.633	0.708	0.790

3.28	0.383	0.449	-0.751	-0.719	-1.012	-0.969
4.62	0.030	0.386	-0.241	-0.242	-0.308	-0.309
6.88	0.399	0.493	0.700	0.645	0.983	0.905
10	0.001	0.219	-0.086	-0.089	-0.097	-0.101

=====EC90%、80%、EC50%、20%、10%の推定=====

log(EC90)	=	0.4404	(95% Range: 0.3824 - 0.4572)
EC90 (mg/L)	=	2.7567	(95% Range: 2.4122 - 2.8656)
log(EC80)	=	0.5073	(95% Range: 0.4508 - 0.5370)
EC80 (mg/L)	=	3.2157	(95% Range: 2.8236 - 3.4432)
log(EC50)	=	0.6352	(95% Range: 0.5816 - 0.6895)
EC50 (mg/L)	=	4.3174	(95% Range: 3.8162 - 4.8925)
log(EC20)	=	0.7632	(95% Range: 0.7125 - 0.8421)
EC20 (mg/L)	=	5.7965	(95% Range: 5.1577 - 6.9517)
log(EC10)	=	0.8300	(95% Range: 0.7808 - 0.9218)
EC10 (mg/L)	=	6.7615	(95% Range: 6.0373 - 8.3529)

●● 48h Effect E(L)C50 計算 収束までの反復回数=4 ●●

◎ デザイン行列

濃度	n	y	y/n	Const.	log10(C)
1.57	20.00	0.200	0.01	1.000	0.196
2.2	20.00	1.000	0.05	1.000	0.342
3.28	20.00	5.000	0.25	1.000	0.516
4.62	20.00	16.00	0.80	1.000	0.665
6.88	20.00	19.80	0.99	1.000	0.838

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

X2 乗 (逸脱度) = 1.338 < 7.815 適合する

X2 乗 (ピアソン) = 1.810 < 7.815 適合する

AIC = 60.27

◎ 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	-4.498	0.813	-5.532
log(Conc.)	7.873	1.388	5.672
WALD 検定	X2 値=32.172	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)
1.57	0.200	0.031	0.169	0.010	0.002	0.008
2.2	1.000	0.716	0.284	0.050	0.036	0.014
3.28	5.000	6.627	-1.627	0.250	0.331	-0.081
4.62	16.00	15.38	0.623	0.800	0.769	0.031
6.88	19.80	19.64	0.160	0.990	0.982	0.008

◎ 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						
1.57	0.057	0.100	0.638	0.956	0.672	1.008
2.2	0.106	0.484	0.323	0.342	0.450	0.476
3.28	0.544	0.484	-0.792	-0.773	-1.103	-1.077
4.62	0.145	0.547	0.336	0.330	0.499	0.491
6.88	0.037	0.384	0.294	0.269	0.374	0.343

=====EC90%、80%、EC50%、20%、10%の推定=====

log(EC90)	=	0.4085	(95% Range: 0.3510 - 0.4222)
EC90 (mg/L)	=	2.5615	(95% Range: 2.2441 - 2.6435)

$\log(\text{EC80}) = 0.4644$ (95% Range: 0.4096 - 0.4905)
 $\text{EC80 (mg/L)} = 2.9132$ (95% Range: 2.5682 - 3.0938)
 $\log(\text{EC50}) = 0.5713$ (95% Range: 0.5217 - 0.6212)
 $\text{EC50 (mg/L)} = 3.7263$ (95% Range: 3.3244 - 4.1802)
 $\log(\text{EC20}) = 0.6782$ (95% Range: 0.6338 - 0.7519)
 $\text{EC20 (mg/L)} = 4.7662$ (95% Range: 4.3033 - 5.6480)
 $\log(\text{EC10}) = 0.7340$ (95% Range: 0.6924 - 0.8202)
 $\text{EC10 (mg/L)} = 5.4206$ (95% Range: 4.9248 - 6.6102)

===== ロジット関数 =====

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

◎ デザイン行列

濃度	n	y	y/n	Const.	$\log_{10}(C)$
1.57	20.00	0.200	0.01	1.000	0.196
2.2	20.00	1.000	0.05	1.000	0.342
3.28	20.00	3.000	0.15	1.000	0.516
4.62	20.00	11.00	0.55	1.000	0.665
6.88	20.00	19.00	0.95	1.000	0.838
10	20.00	19.80	0.99	1.000	1.000

◎ 回帰式の適合度の検定 χ^2 値(P=0.05, df=4)= 9.488 (P=0.01, df=4)= 13.28

X2 乗 (逸脱度) = 0.973 < 9.488 適合する

X2 乗 (ピアソン) = 1.071 < 9.488 適合する

AIC = 69.77

◎ 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	-7.836	1.461	-5.363
$\log(\text{Conc.})$	12.27	2.252	5.451

WALD 検定 X2 値=29.715 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)
1.57	0.200	0.087	0.113	0.010	0.004	0.006
2.2	1.000	0.515	0.485	0.050	0.026	0.024
3.28	3.000	3.635	-0.635	0.150	0.182	-0.032
4.62	11.00	11.59	-0.594	0.550	0.580	-0.030
6.88	19.00	18.40	0.597	0.950	0.920	0.030
10	19.80	19.77	0.034	0.990	0.988	0.002

◎ 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						
1.57	0.008	0.093	0.327	0.383	0.344	0.402
2.2	0.115	0.265	0.608	0.685	0.709	0.799
3.28	0.138	0.503	-0.378	-0.368	-0.535	-0.523
4.62	0.074	0.504	-0.268	-0.269	-0.381	-0.382
6.88	0.186	0.455	0.527	0.493	0.713	0.667
10	7.E-4	0.180	0.072	0.070	0.080	0.078

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

$\log(\text{EC90}) = 0.4594$ (95% Range: 0.3948 - 0.4722)
 $\text{EC90 (mg/L)} = 2.8802$ (95% Range: 2.4822 - 2.9665)
 $\log(\text{EC80}) = 0.5255$ (95% Range: 0.4652 - 0.5537)
 $\text{EC80 (mg/L)} = 3.3535$ (95% Range: 2.9185 - 3.5785)

$\log(\text{EC50}) = 0.6384$ (95% Range: 0.5854 - 0.6929)
 $\text{EC50 (mg/L)} = 4.3496$ (95% Range: 3.8491 - 4.9310)
 $\log(\text{EC20}) = 0.7514$ (95% Range: 0.7056 - 0.8322)
 $\text{EC20 (mg/L)} = 5.6416$ (95% Range: 5.0765 - 6.7947)
 $\log(\text{EC10}) = 0.8175$ (95% Range: 0.7759 - 0.9136)
 $\text{EC10 (mg/L)} = 6.5686$ (95% Range: 5.9688 - 8.1964)

●● 48h Effect E(L)C50 計算 収束までの反復回数=4 ●●

◎ デザイン行列

濃度	n	y	y/n	Const.	$\log_{10}(C)$
1.57	20.00	0.200	0.01	1.000	0.196
2.2	20.00	1.000	0.05	1.000	0.342
3.28	20.00	5.000	0.25	1.000	0.516
4.62	20.00	16.00	0.80	1.000	0.665
6.88	20.00	19.80	0.99	1.000	0.838

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

X2 乗 (逸脱度) = 0.685 < 7.815 適合する

X2 乗 (ピアソン) = 0.744 < 7.815 適合する

AIC = 59.62

◎ 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	-8.438	1.734	-4.865
$\log(\text{Conc.})$	14.68	2.966	4.949

WALD 検定 X^2 値=24.493 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)
1.57	0.200	0.077	0.123	0.010	0.004	0.006
2.2	1.000	0.639	0.361	0.050	0.032	0.018
3.28	5.000	5.923	-0.923	0.250	0.296	-0.046
4.62	16.00	15.78	0.224	0.800	0.789	0.011
6.88	19.80	19.59	0.214	0.990	0.979	0.011

◎ 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
1.57	0.013	0.104	0.372	0.447	0.393	0.473
2.2	0.094	0.362	0.425	0.460	0.532	0.575
3.28	0.398	0.606	-0.459	-0.452	-0.732	-0.720
4.62	0.035	0.632	0.123	0.123	0.203	0.202
6.88	0.034	0.296	0.374	0.336	0.445	0.401

=====EC90%、80%、EC50%、20%、10%の推定=====

$\log(\text{EC90}) = 0.4252$ (95% Range: 0.3609 - 0.4343)
 $\text{EC90 (mg/L)} = 2.6617$ (95% Range: 2.2957 - 2.7181)
 $\log(\text{EC80}) = 0.4804$ (95% Range: 0.4217 - 0.5046)
 $\text{EC80 (mg/L)} = 3.0228$ (95% Range: 2.6404 - 3.1957)
 $\log(\text{EC50}) = 0.5749$ (95% Range: 0.5255 - 0.6247)
 $\text{EC50 (mg/L)} = 3.7572$ (95% Range: 3.3539 - 4.2143)
 $\log(\text{EC20}) = 0.6693$ (95% Range: 0.6294 - 0.7449)
 $\text{EC20 (mg/L)} = 4.6699$ (95% Range: 4.2600 - 5.5577)
 $\log(\text{EC10}) = 0.7246$ (95% Range: 0.6902 - 0.8152)
 $\text{EC10 (mg/L)} = 5.3034$ (95% Range: 4.8998 - 6.5341)

***** END *****

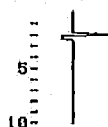
付 属 資 料 - V

濃 度 分 析 HPLC ク ロ マ ト グ ラ ム

1. 検量線

0 mg/L

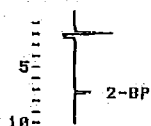
CH. 1 C.S 2.50 ATT 3 OFFS 0 01/25/11 14:35



NO PEAKS

0.1024 mg/L

CH. 1 C.S 2.50 ATT 3 OFFS 0 01/25/11 14:46



D-2500

01/25/11 14:46

METHOD: 2-BP

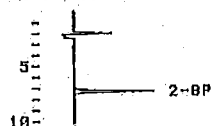
TAG: 2 CH: 1

FILE: 1 CALC-METHOD: EXT-STD TABLE: 1 CONC: HEIGHT

NO.	RT	AREA	HEIGHT	CONC	BC	NAME
1	7.20	1923	184	0.000	BB	2-BP
TOTAL		1923	184	0.000		
PEAK REJ :		0				
SF :		1.000				
SAMP-AHT :		1.000				

0.5120 mg/L

CH. 1 C.S 2.50 ATT 3 OFFS 0 01/25/11 14:58



D-2500

01/25/11 14:58

METHOD: 2-BP

TAG: 3 CH: 1

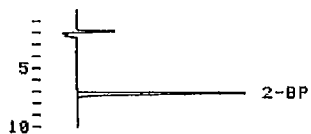
FILE: 1 CALC-METHOD: EXT-STD TABLE: 1 CONC: HEIGHT

NO.	RT	AREA	HEIGHT	CONC	BC	NAME
1	7.18	9282	904	0.000	BB	2-BP
TOTAL		9282	904	0.000		
PEAK REJ :		0				
SF :		1.000				
SAMP-AHT :		1.000				

1.024 mg/L

1.024 mg/L

CH. 1 C.S 2.50 ATT 3 OFFS 0 01/25/11 15:09



D-2500

01/25/11 15:09

METHOD: 2-BP

TAG: 4 CH: 1

FILE: 1 CALC-METHOD: EXT-STD TABLE: 1 CONC: HEIGHT

NO.	RT	AREA	HEIGHT	CONC	BC	NAME
1	7.18	18540	1788	0.000	BB	2-BP
TOTAL		18540	1788	0.000		
PEAK REJ :		0				
SF :		1.000				
SAMP-AMT :		1.000				

2. 暴露開始時

対照区 n=1,2

2011.1.25 15:11 n=1

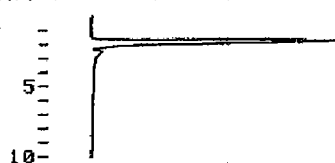
CH. 1 C.S 2.50 ATT 3 OFFS 0 01/25/11 15:26



NO PEAKS

2011.1.25 15:37 n=2

CH. 1 C.S 2.50 ATT 3 OFFS 0 01/25/11 15:37

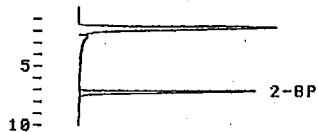


NO PEAKS

1.0 mg/L ☒

生醫 A-12 N=1

CH. 1 C.S 2.50 ATT 3 OFFS 0 01/25/11 15:48



D-2500

01/25/11 15:48

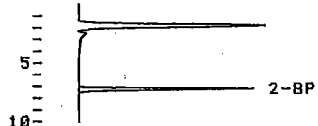
METHOD: 2-BP TAG: 7 CH: 1

FILE: 1 CALC-METHOD: EXT-STD TABLE: 1 CONC: HEIGHT

NO.	RT	AREA	HEIGHT	CONC	BC	NAME
1	7.18	18486	1835	0.000	BB	2-BP
TOTAL		18486	1835	0.000		
PEAK REJ :		0				
SF :		1.000				
SAMP-AMT :		1.000				

生醫 A-12 N=2

CH. 1 C.S 2.50 ATT 3 OFFS 0 01/25/11 16:00



D-2500

01/25/11 16:00

METHOD: 2-BP TAG: 8 CH: 1

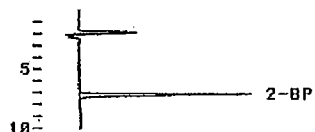
FILE: 1 CALC-METHOD: EXT-STD TABLE: 1 CONC: HEIGHT

NO.	RT	AREA	HEIGHT	CONC	BC	NAME
1	7.18	18481	1828	0.000	BB	2-BP
TOTAL		18481	1828	0.000		
PEAK REJ :		0				
SF :		1.000				
SAMP-AMT :		1.000				

10 mg/L 区(10 倍希釈液)

588 15-18 x 1/10 x=1

CH. 1 C.S 2.50 ATT 3 OFFS 0 01/25/11 18:08



D-2500

01/25/11 18:08

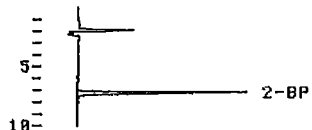
METHOD: 2-BP TAG: 19 CH: 1

FILE: 1 CALC-METHOD: EXT-STD TABLE: 1 CONC: HEIGHT

NO.	RT	AREA	HEIGHT	CONC	BC	NAME
1	7.19	18428	1796	0.000	BB	2-BP
TOTAL		18428	1796	0.000		
PEAK REJ :		0				
SF :		1.000				
SAMP-AHT :		1.000				

588 20-2

CH. 1 C.S 2.50 ATT 3 OFFS 0 01/25/11 18:20



D-2500

01/25/11 18:20

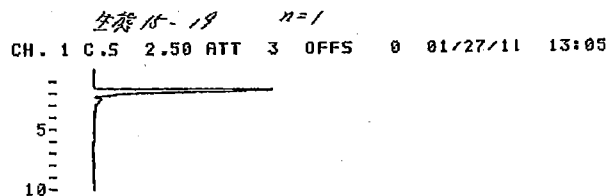
METHOD: 2-BP TAG: 20 CH: 1

FILE: 1 CALC-METHOD: EXT-STD TABLE: 1 CONC: HEIGHT

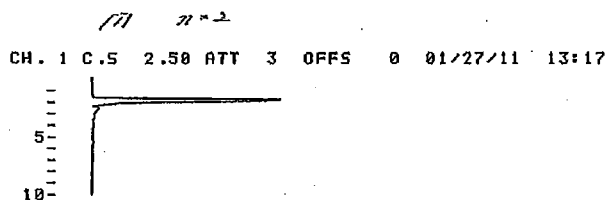
NO.	RT	AREA	HEIGHT	CONC	BC	NAME
1	7.20	18677	1795	0.000	BB	2-BP
TOTAL		18677	1795	0.000		
PEAK REJ :		0				
SF :		1.000				
SAMP-AHT :		1.000				

暴露終了時
48 時間暴露終了時

対照区

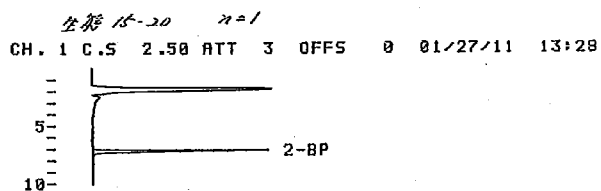


NO PEAKS



NO PEAKS

1.0 mg/L 区



D-2500

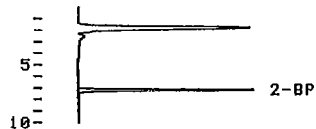
01/27/11 13:28

METHOD: 2-BP TAG: 7 CH: 1

FILE: 1 CALC-METHOD: EXT-STD TABLE: 1 CONC: HEIGHT

NO.	RT	AREA	HEIGHT	CONC	BC	NAME
1	7.14	18447	1855	0.000	00	2-BP
TOTAL		18447	1855	0.000		
PEAK REJ : 0						
SF : 1.000						
SAMP-ANT : 1.000						

CH. 1 C.S 2.50 ATT 3 OFF5 0 01/27/11 13:40



D-2500

01/27/11 13:40

METHOD: 2-BP TAG: 8 CH: 1

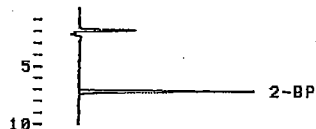
FILE: 1 CALC-METHOD: EXT-STD TABLE: 1 CONC: HEIGHT

NO.	RT	AREA	HEIGHT	CONC	BC	NAME
1	7.14	18748	1852	0.000	88	2-BP
TOTAL		18748	1852	0.000		
PEAK REJ :		0				
SF :		1.000				
SAMP-AMT :		1.000				

10 mg/L ☒

全数検出 - 2.5 x 1/10 n=1

CH. 1 C.S 2.50 ATT 3 OFF5 0 01/27/11 15:48



D-2500

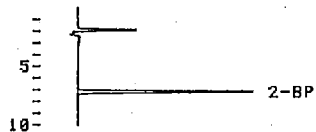
01/27/11 15:48

METHOD: 2-BP TAG: 19 CH: 1

FILE: 1 CALC-METHOD: EXT-STD TABLE: 1 CONC: HEIGHT

NO.	RT	AREA	HEIGHT	CONC	BC	NAME
1	7.14	17887	1845	0.000	88	2-BP
TOTAL		17887	1845	0.000		
PEAK REJ :		0				
SF :		1.000				
SAMP-AMT :		1.000				

CH. 1 C.S 2.50 ATT 3 OFF5 0 01/27/11 15:59



D-2500

01/27/11 15:59

METHOD: 2-BP

TAG: 20 CH: 1

FILE: 1 CALC-METHOD: EXT-STD TABLE: 1 CONC: HEIGHT

NO.	RT	AREA	HEIGHT	CONC	BC	NAME
1	7.14	18094	1862	0.000	BB	2-BP
TOTAL		18094	1862	0.000		
PEAK REJ :		0				
SF :		1.000				
SAMP-AMT :		1.000				