環境省　殿

最　終　報　告　書

２－ｔｅｒｔ－ブチルフェノールの藻類（*Pseudokirchneriella subcapitata*）
に対する生長阻害試験

（試験番号：No. 2010-生態14）

2011年　3月　3日

[redacted]

株式会社クレハ分析センター

[redacted]

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 [redacted]

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

試験番号　：　No. 2010-生態14

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）

OECD GUIDELINES FOR THE TESTING OF CHEMICALS 201: Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test (Adopted 23 March 2006)

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：[redacted]

2011年 3 月 3 日

確認：　運営管理者　署名：[redacted]

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

試験番号 ： No. 2010-生態14

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28日	2011年 1月26日 2011年 1月28日	2011年 1月25日 2011年 1月28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10月21日	2010年 8月 4日 2010年10月26日	2010年 8月 4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10月26日	2010年 8月 5日 2010年10月26日	2010年 8月 5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：[redacted]

試験実施概要

1．表題　：　２－ｔｅｒｔ－ブチルフェノールの藻類（*Pseudokirchneriella subcapitata*）に対する生長阻害試験

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

3．試験法ガイドライン：

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

OECD GUIDELINES FOR THE TESTING OF CHEMICALS 201: Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test (Adopted 23 March 2006)
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　：　[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 [redacted] (生物試験室)

試験担当者 [redacted] (生物試験担当者)

[redacted] (生物試験担当者)

[redacted] (濃度分析責任者)

[redacted] (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28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　前培養 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　培地 6
3.4　試験容器および機器 7
3.5　試験濃度の設定 7
3.6　試験溶液の調製 7
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　阻害濃度算出に用いる被験物質濃度の決定 9
4.2　生長曲線 10
4.3　生長速度の算出 10
4.4　50 % 生長阻害濃度（E_rC_{50}）の算出 10
4.5　最大無作用濃度（NOEC） 11
4.6　統計的手法 11
5　結果および考察 11
5.1　試験成績の信頼性に影響をおよぼしたと思われる環境要因 11
5.2　試験溶液中の被験物質濃度 12
5.3　生長曲線 12
5.4　50 % 生長阻害濃度（E_rC_{50}）の算出 13
5.5　最大無作用濃度（NOEC） 13
5.6　温度、光強度および pH 14
5.7　試験計画書からの逸脱の有無 14
6．保管 14
Table 1.～ 6. 15
Figure 1, 2 20
付属資料－Ⅰ　OECD培地 21
付属資料－Ⅱ　予備試験の結果 23
付属資料－Ⅲ　試験溶液の分析法 25
付属資料－Ⅳ　統計解析結果 31
付属資料－Ⅴ　濃度分析 HPLC クロマトグラム 42

要　旨

試験委託者　　環境省

表　　題　　２－ｔｅｒｔ－ブチルフェノールの藻類（*Pseudokirchneriella subcapitata*）に対する生長阻害試験

試験番号　　No. 2010-生態14

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）

OECD GUIDELINES FOR THE TESTING OF CHEMICALS 201: Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test (Adopted 23 March 2006)

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、振とう培養（100 rpm）（密閉系）
3) 供試生物　：　*Pseudokirchneriella subcapitata*（ATCC 22662）
4) 暴露期間　：　72 時間
5) 試験濃度(設定値)　：　対照区, 0.046, 0.10, 0.22, 0.46, 1.0, 2.2, 4.6 mg/L
（ブランク 0.10, 0.22, 0.46 mg/L）
公比；$10^{1/3}$（約 2.2）
6) 試験溶液量　：　100 mL／容器
7) 連数　：　3 容器／濃度区、6 容器／対照区
藻体の有無による試験溶液中の被験物質濃度の変化を調べるため、0.10, 0.22, 0.46 mg/L 区について、ブランクを各 1 連追加
8) 初期生物量　：　細胞数0.5×10^4 cells/mL（生物量として0.5 mg/L以下）
9) 試験温度　：　23℃で設定し、経時的変動範囲は ±2℃以内とする。
10) 照明　：　65 ～ 85 $\mu E/m^2/s$（フラスコ液面付近）で連続照明

11) pH　　：試験溶液の pH 調整は行わない

12) 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。

密閉系での試験のため、対照区での日毎の生長速度の変動係数は試験成立条件を満たしているものの大きく、また、pH 変動も 1.5 を超える結果であったため、0-72 時間の結果と共に、pH の変動が 1.2 であった 0 - 48 時間の結果を参考として併記する。

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は安定しており、暴露期間中の被験物質濃度は最大で 10 % 程度の変動が認められたが分析誤差が主因と考えられた。従って、各影響濃度（50 % 生長阻害濃度、最大無作用濃度）の算出に当たっては、暴露開始時、24, 48 時間および暴露終了時の測定値の算術平均値を採用した。0-48 時間の結果は、暴露開始時、24, 48 時間の測定値の算術平均値を採用した。

2) 生長速度の比較による阻害濃度

① 72 時間の各影響濃度（採用）

50 % 生長阻害濃度（E_rC_{50}）　：1.3 mg/L

（95 %信頼限界：1.2 ～ 1.4 mg/L）,Probit

最大無作用濃度（NOEC）　：0.098 mg/L , Dunnett

② 48 時間の各影響濃度（参考）

50 % 生長阻害濃度（E_rC_{50}）　：1.1 mg/L

（95 %信頼限界：1.0 ～ 1.1 mg/L）,Probit

最大無作用濃度（NOEC）　：0.099 mg/L , Dunnett

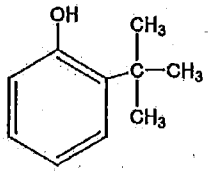
1　被験物質

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

構造式　：



分子式*　：　$C_{10}H_{14}O$

分子量*　：　150.22

蒸気圧*　：　0.09 mmHg (25℃)

水溶解度*　：　700 mg/L (25℃)

ヘンリー定数*　：　2.54E-005 atm･m^3/mole (25℃)

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℃

沸点*　：　223℃

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℃)***　：　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、単細胞緑藻類である *Pseudokirchneriella subcapitata*（旧名；*Selenastrum capricornutum*）を用いた。

本種は、American Type Culture Collectionより 1997年11月13日に入手した ATCC 22662株を、当施設において C 培地を用いて無菌的に継代培養しているものである。使用藻類は 6 ヶ月ごと(直近では2010年11月19日)に細菌の有無を検査して無菌状態であることを確認した。

2.2　感受性確認

6 ヶ月ごとに、3，5－ジクロロフェノール(純度 99 %)を基準物質とする生長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 72 時間 50 % 藻類生長阻害濃度（E_rC_{50}）は 1.8 mg/L（暴露期間 2010 年 10 月 5 日～2010 年 10 月 8 日）であった。

当施設における 2007年12月以降から直近前までの E_rC_{50} 値は平均 = 2.0 mg/L，標準偏差 = 0.28 mg/L，n = 8 であった。

2.3　前培養

藻類を試験条件にじゅん化させ、試験に用いる指数増殖期の前培養液を得るため、暴露開始前に 3 日間（2011 年 1 月 22 日～ 1 月 25 日）試験と同条件で前培養を行った。この間、藻類は指数増殖することを確認している。前培養液に接種する藻類は、

細胞数 0.5×10^4 cells/mL（生物量として 0.5 mg/L 以下）に調整し、暴露開始時に指数増殖期になる様にした。変形や異常な細胞の出現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℃）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、培地で定容後、マグネチックスターラーを用いて、試験温度（23℃）で 2 時間撹拌し、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、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した。

	測定濃度(mg/L)		
	試料-1	試料-2	平均
上層部	196	194	195
中層部	195	197	196
下層部	196	195	196

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 の溶液を更に培地で希釈し、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 300 mL の開放した三角フラスコ（開放条件）、300 mL の密栓した三角フラスコ（密閉系）およびアルミホイルで遮光し、密栓した 300 mL の三角フラスコ（遮光・密閉系）に入れ、培養試験器中で 72 時間試験条件に保ち、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	72 時間後（維持率 %）
開放系		0.838（ 88）
密閉系	0.950	0.940（ 99）
遮光・密閉系		0.968（102）

72 時間後の濃度維持率は低い順に開放系、密閉系、遮光・密閉系の結果となった。

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。

予備試験では、被験物質の藻体への吸着の有無について不明確であったことから、一部の濃度区については、藻体未接種区（ブランク）も各 1 連追加した。試験容器は滅菌したものを使用し、その他の器具の滅菌を行った。また、藻類の接種等の操作は無菌条件下で行った。

1) 暴露方式 : 密閉系（共栓付三角フラスコ）
振とう培養（100 rpm）
2) 暴露期間 : 72 時間
3) 試験溶液量 : 100 mL／容器
4) 連数 : 3 容器／濃度区、6 容器／対照区
藻体の有無による試験溶液中の被験物質濃度の変化を調べるため、0.10, 0.22, 0.46 mg/L 区について、ブランクを各 1 連追加
5) 初期生物量 : 細胞数0.5×10^4 cells/mL（生物量として0.5 mg/L以下）
6) 試験温度 : 23℃で設定し、経時的変動範囲は ±2℃以内とする。
7) 照明 : 65 ～ 85 $\mu E/m^2/s$（フラスコ液面付近）で連続照明（白色または昼光色の蛍光灯を用い、連続的に照射する。）
8) pH : 試験溶液の pH 調整は行わない

3.3 培地

前培養および試験ともに OECD GUIDELINES FOR THE TESTING OF CHEMICALS 201, Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test (Adopted 23 March 2006) において推奨されている培地を用い、成分表を付属資料 - I 「OECD培地」に示した。炭酸水素ナトリウムを除く成分を先に混合の上、大気との平衡状態とし、0.22 μm PVDF 製メンブランフィルター（商品名：Vacuum Driven Disposable Filtration System, メーカー：Asahi Techno Glass Corporation）を用いて減圧してろ過滅菌した。これに 0.20 μm ナイロン製メンブランフィルター（商品名：Disposable Ster-

ile Syringe Filter, code 2062-025 メーカー：Asahi Glass. Co., Ltd.）を用いて加圧してろ過滅菌した炭酸水素ナトリウム成分を添加した。

3.4　試験容器および機器

1) 試験容器	：300 mL容ガラス製共栓付三角フラスコ（ヘッドスペース：250 mL）を用い密栓した。		(柴田科学)
2) 天秤（被験物質秤量）	：上皿電子天秤	AE200	(メトラー)
3) 藻類培養試験装置	：	藻類培養試験器 GT-40S	(宮本理研工業)
4) 細胞濃度計数装置	：	粒子測定装置 F-520P	(Sysmex)
		粒子分布解析装置 PDA-500	(Sysmex)
5) pH 計	：	HM-30V	(東亜ディーケーケー)
6) 温度計	：	ガラス製水銀温度計	
7) 照度計	：	ANA-F9 型	(柴田科学)
8) 生物顕微鏡	：	BHS 型	(オリンパス)

3.5　試験濃度の設定

本試験の実施に先立ち、公比 $10^{1/2}$（約 3.2 と記載する）で、連数を 1 連とした 5 濃度区（0.032, 0.10, 0.32, 1.0 , 3.2 mg/L）の予備試験を行った結果、生長阻害率は 0.032 mg/L 区で 2 %、0.10 mg/L 区で 3 %、0.32 mg/L 区で 6 %、1.0 mg/L 区で 54 %、3.2 mg/L 区で 80 %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 $10^{1/3}$(約 2.2)で、0.046, 0.10, 0.22, 0.46, 1.0, 2.2, 4.6 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。

被験物質 20 mg を 100 mL ビーカーに秤りとり、培地を用いて 200 mL メスフラスコに移し入れ、培地で 200 mL とし、マグネチックスターラーを用いて試験温度（23 ℃）で 40 分間撹拌した。この溶液を 0.2 μm 親水性 PTFE タイプメンブランフィルターを用いて加圧ろ過滅菌し、100 mg/L の試験原液とした（無色透明）。

0.046, 0.22, 0.46, 1.0, 2.2, 4.6 mg/L 区の各試験溶液は、100 mg/L 試験原液の各 0.46, 2.2, 4.6, 10, 22, 46 mL を 1000 mL のメスフラスコに入れ、滅菌済み培地で 1000 mL とし、0.10 mg/L 区は 2.0 mL を 2000 mL メスフラスコに入れ、滅菌済み培地で 2000 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滅菌済み培地を用いた。

試験溶液の調製にあたり、pH の調整は行わなかった。

試験溶液調製時の培地は、調製前に 23±2℃にした。

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 24 時間毎に 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、24, 48 時間後には別に準備した 1 容器より試験溶液を採取し、暴露終了時には各試験容器から試験溶液を 50 mL ずつ採取、混合した試験溶液について行った。分析は、混合した試験溶液を遠心分離(3000 rpm, 15 分間)し、藻体を除去してから行った。

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、試験溶液の濃縮操作を加えると 0.006 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℃	
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 μL	

(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濃縮または純水で希釈した。

2)　試験環境の測定

暴露期間中、培養装置内の温度ならびにフラスコ液面の照度を 1 日 1 回測定した。

照度計を用いて測定した照度 (Lx) は、測定値に係数 0.013 を乗ずることにより μE/m²/s 単位に換算した。

試験溶液の pH を暴露開始時、24、48 時間後および暴露終了時に測定した。暴露

開始時、24, 48 時間後の pH は、予備用として別の容器に調製した試験溶液について測定し、暴露終了時の pH はすべての容器の試験溶液について測定した。

3.8 試験操作

1) 前培養液の接種

3 日間前培養した藻類の細胞濃度(cells/mL)を測定し（当施設の実績値は概ね 100 $\times 10^4$ cells/mL 程度）、試験溶液中の細胞濃度が 0.5$\times 10^4$ cells/mL となるように、前培養液の一定量を試験溶液の入った容器に添加した。

2) 暴露開始と細胞濃度測定

各試験容器を 23±2 ℃の培養装置に設置し、試験を開始する（試験条件は 3.2 参照）。その後、24、48 および 72 時間後に細胞濃度(cells/mL)を測定した。

3) 細胞濃度の計測法

細胞濃度の測定は各試験容器より試験溶液 1 mL を採取し、必要により希釈し、粒子計測装置により行った。試験期間中には試験溶液中の藻類について、顕微鏡下での細胞形態異常（形態学的な変化）の有無について観察を行った。

4) 藻体乾燥重量の測定

暴露終了時には、対照区の各フラスコの試験溶液から全量および一部をとり、その中の藻体の乾燥重量を求めた。藻体乾燥重量は、ろ過により藻体をメンブランフィルター上に集め、十分に乾燥した後に求めた重量から、ろ過で培地のみを通したメンブランフィルターに同じ処理をして測定した重量を差し引いて算出した。この藻体乾燥重量と暴露終了時の各フラスコの細胞濃度の回帰分析より回帰係数を算出し、各測定時における細胞濃度に乗じることで、試験溶液 1 mL あたりの藻体乾燥重量として生物量を算出した。

4 結果の算出

4.1 阻害濃度算出に用いる被験物質濃度の決定

暴露開始時、24、48 時間後および暴露終了時に、HPLC 法により被験物質濃度を測定した

暴露期間中の被験物質濃度は最大で 10 % 程度の変動が認められたが分析誤差によるものと考えられた。従って、各影響濃度（50 % 生長阻害濃度、最大無作用濃度）の算出に当たっては、暴露開始時、24、48 時間後および暴露終了時の測定値の算術平均値を採用した。

4.2　生長曲線

1)　生物量の算出

暴露終了時に測定した対照区の 6 試験容器の各細胞濃度（x：×10^4 cells/mL）と、その後に求めたそれぞれの単位容積あたりの乾燥重量（y：mg/mL）から算出した回帰式（y=0.00024417x, r^2=0.9718）を基に、暴露期間に測定した各試験区の細胞濃度を生物量（乾燥重量）に換算した。

2)　生長曲線

被験物質濃度と生長阻害率の関係は、生長速度の比較について計算した。暴露期間と、被験物質の各濃度区と対照区の生物量の変化の関係を表にした。各濃度区と対照区の生物量の平均値を時間に対してプロットし、生長曲線を作成した。この時、対照区の生長曲線が密閉系なので 48 － 72 時間の傾きが小さくなっているが、有効性の範囲内にあることを確認した。

4.3　生長速度の算出

指数関数的に増殖している時の個別の試験容器ごとの生長速度は次のようにして計算した。

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

ここで、

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

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

X_j＝ t_j 時の生物量

t_i＝暴露開始後 i 回目に生物量を測定した時間（d）

t_j＝暴露開始後 j 回目に生物量を測定した時間（d）

試験の有効性を調べるために、対照区の試験容器ごとに、1 日ごとの生長速度の変動係数を求め、これらの変動係数の平均値が 35 % を超えないことを確認した。

4.4　50 % 生長阻害濃度（E_rC_{50}）の算出

1) 生長阻害率の算出

各濃度区における個別の試験容器ごとの生長阻害率（I_{i-j}）は、対照区の生長速

度の平均値（μ_c）と個別の試験容器ごとの生長速度（μ_{i-j}）から、次の式により計算した。

なお、当報告書ではこの生長阻害率に 100 を乗じて % 表示とした。

$$I_{i-j} = \frac{\mu_c - \mu_{i-j}}{\mu_c}$$

2) 50 % 生長阻害濃度（E_rC_{50}）の算出

速度法による試験容器ごとの生長阻害率（I_{i-j}）の Probit 変換値を用い、Probit 法により50 % 生長阻害濃度ならびに 95 % 信頼限界を算出した。

4.5 最大無作用濃度（NOEC）

対照区と各濃度区の個別の試験容器ごとの生長速度μの値について、Bartlettの等分散検定と分散分析を行った結果、等分散性を認めたので、Dunnettの多重比較検定を行い、有意差が認められない試験最高濃度区の実測濃度（平均値）を最大無作用濃度（NOEC）とした。

4.6 統計的手法

統計ソフトは JMP ver. 8.0.2（SAS Institute Inc.）を用い、入力値とその出力結果を付属資料 - Ⅳ 「統計解析結果」に添付した。

5 結果および考察

5.1 試験成績の信頼性に影響をおよぼしたと思われる環境要因

本試験は密閉容器での試験を行ったため、藻類の増殖と共に pH の上昇が認められ、暴露終了時の対照区および低濃度区の pH は、本被験物質の酸解離定数（pKa）10.3 を超える値となった。pH 上昇による EC_{50} 値への影響について考察を行った。

統計ソフトによる EC_{50} 値の算出には、0.22 ～ 0.46 mg/L 区のデータを採用した。

この解析対象データの pH 範囲は暴露 48 時間で 8.0 ～ 8.1 であり、解離定数から推定すると、被験物質の 94 ～ 99 % は非解離状態にあり、この状態での EC_{50} 値は 1.1 mg/L であった。また、72 時間での解析対象範囲データの pH は 8.0 ～ 10.5 であり、被験物質の 39 ～ 99 % は非解離状態にあり、この状態での EC_{50} 値は 1.3 mg/L であった。

以上の結果より、殆ど非解離状態にある 48 時間の EC_{50} 値と暴露終了時の pH が上昇し、解離の進んだ状態の EC_{50} 値とは大きな差はなく、pH の毒性値に与える影響は小さいと考えられた。

5.2　試験溶液中の被験物質濃度

被験物質濃度の測定結果を Table 1 に示した。

暴露開始時の被験物質濃度は設定値の 91 % ～ 106 % であり、ほぼ設定通りに調製されており、暴露期間中の被験物質濃度は最大で 10 % 程度の変動が認められた。

また、藻体未接種区（ブランク）を設定した濃度区で吸着の影響はないと考えられた。

5.3　生長曲線

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

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

1）生長曲線

① 対照区の生物量の平均値は暴露期間中に 99 倍に増加した（試験成立条件：少なくとも 16 倍に増加）。

② 対照区の毎日の生長速度の変動係数（全容器の変動係数の平均値）は暴露期間を通じて 29.5 %（試験成立条件：35 % を超えない）。

③ 対照区の繰り返し間の生長速度の変動係数は 1.2 %（試験成立条件：7 % を超えない）。

表．試験の有効性確認のためのパラメーター(Table 2 より算出)

n	平均生長速度	区間生長速度			毎日の生長速度の変動係数 CV (%)
	0 － 72 hr	0 － 24 hr	24 － 48 hr	48 － 72 hr	
1	1.5562	1.7475	1.8405	1.0808	26.6
2	1.5356	1.8116	1.7792	1.0161	29.3
3	1.5082	1.8278	1.7602	0.9367	32.9
4	1.5295	1.7681	1.7658	1.0547	26.9
5	1.5409	1.8017	1.8081	1.0128	29.7
6	1.5132	1.8405	1.7363	0.9628	31.7
平均	1.5306	1.7995	1.7817	1.0106	29.5
標準偏差	0.0178		変動係数の平均値(%)		29.5
繰り返しの生長速度の変動係数(%)	1.2				

2) 細胞形態観察

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

5.4 50 % 生長阻害濃度 (E_rC_{50}) の算出

各濃度区における生長阻害率を Table 3 に、50 % 生長阻害濃度 (E_rC_{50})、濃度ー阻害率曲線を Figure 2 に示した。

JMP ver. 8.0.2 による統計解析を行うにあたり、同じ濃度区の 3 つの容器のうち、生長阻害率が 0 % 未満の容器が見られた 0.10 mg/L 以下の濃度区は観察点から除外した。さらに、個々の容器ごとの生長阻害率の Probit 法による変換値と、各試験区の被験物質濃度（平均値）の常用対数変換値をプロットしたグラフ上で、Probit 変換値が 0 (E_rC_{50}値に相当) の値を跨ぐ範囲の中で、直線性が最も良い区の選択範囲を検討し、0.22 ～ 4.6 mg/L 区を観察点として選択して、解析を行った（付属資料 - Ⅳ)。

密閉系での試験のため、対照区での日毎の生長速度の変動係数は試験成立条件を満たしているものの大きく、また、pH の変動も 1.5 を超える結果であったため、0 - 72 時間の結果と共に、pH の変動が 1.2 であった 0 - 48 時間の結果を参考として併記した。

結果を以下に示した。

(1) 採用値(0-72 時間)

50 % 生長阻害濃度 (E_rC_{50}) : 1.3 mg/L

(95 %信頼限界： 1.2 ～ 1.4 mg/L) ,Probit

(2) 参考値(0-48 時間)

50 % 生長阻害濃度 (E_rC_{50}) : 1.1 mg/L

(95 %信頼限界： 1.0 ～ 1.1 mg/L) ,Probit

5.5 最大無作用濃度 (NOEC)

最大無作用濃度 (NOEC) を Table 4 に示した。

JMP による統計解析の入力に用いた観察点は、対照区を含む全試験区とした（付属資料 - Ⅳ)。各区の分散については、Bartlett 検定により等分散性が確認された。

生長速度の比較による最大無作用濃度(NOEC)

最大無作用濃度 NOEC (0-72 hr) : 0.098 mg/L Dunnett

最大無作用濃度 NOEC (0-48 hr) : 0.099 mg/L (参考値) Dunnett

5.6　温度、光強度および pH

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

72 時間の暴露期間中の藻類培養試験器内の温度は 23.0 ～ 23.2 ℃ の範囲内であり、変動は 2 ℃以内であった。回転数は 101 rpm で一定であった。

光強度は平均 68 μE/m²/s (65 ～ 79 μE/m²/s の範囲内)であった。

試験溶液の pH は、対照区では暴露開始時に 7.9、48 時間後に 9.1、暴露終了時に 10.5 であった。pH の変動は 48 時間後は 1.5 以内であったが、暴露終了時には 1.5 を超えた。pH の上昇は密閉系における試験によるためと考えられた。濃度区では、暴露開始時には 7.9 ～ 8.0 であったが、暴露終了時には高濃度区で pH の上昇が抑えられ、 2.2 mg/L 区では 8.0 ～ 8.1、4.6 mg/L 区では 8.0 であった。

5.7　試験計画書からの逸脱の有無

試験原液調製時の液損失による再調製：

培地を用いて 100 mg/L の試験原液 500 mL を調製中、ろ過滅菌操作中に試験原液を零した。原液の再調製を行うことにしたが、培地の残量が 300 mL 程度であったため、200 mL の培地を用いて 100 mg/L の原液を調製し、試験を行った。

試験前の操作であり、各濃度区の試験溶液を調製するために必要な量の試験原液を調製することができたため、試験の質や完全性に影響はなかった。

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 Concentration of the Test Substance in Test Solution

(Closed System)

Nominal Concentration (mg/L)	Measured Concentration, mg/L (Percent of Nominal)				Mean[a] Measured Concentration (mg/L)	
	0 Hour	24 Hours	48 Hours	72 Hours	0-48 Hour	0-72 Hour
Control	<0.006 (-)	<0.006 (-)	<0.006 (-)	<0.006 (-)	-	-
0.046*	0.0447 (97)	0.0472 (103)	0.0452 (98)	0.0468 (102)	0.0457	0.0460
0.10*	0.106 (106)	0.0959 (96)	0.0944 (94)	0.0954 (95)	0.0989	0.0980
0.22	0.213 (97)	0.206 (94)	0.205 (93)	0.210 (95)	0.208	0.208
0.46	0.451 (98)	0.454 (99)	0.451 (98)	0.440 (96)	0.452	0.449
1.0	0.982 (98)	0.961 (96)	0.957 (96)	0.980 (98)	0.967	0.970
2.2	2.00 (91)	2.12 (96)	1.99 (90)	2.04 (93)	2.04	2.04
4.6	4.33 (94)	4.36 (95)	4.36 (95)	4.39 (95)	4.35	4.36
0.10*[b]	0.106 (106)	0.0978 (98)	0.0957 (96)	0.0985 (99)	0.0999	0.0996
0.22[b]	0.213 (97)	0.208 (95)	0.213 (97)	0.220 (100)	0.211	0.213
0.46[b]	0.451 (98)	0.456 (99)	0.437 (95)	0.456 (99)	0.448	0.450

a : Arithmetic mean
b : Without algae inoculation
* : measured the concentrated test solution

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

Nominal Concentration (Mean[a] Measured Concentration) (mg/L)	Vessel No.	Calculated Biomass [(Dry Cell Weight) (mg/mL)]			
		0 Hour	24 Hours	48 Hours	72 Hours
Control (-)	1	0.00012	0.00070	0.00441	0.01301
	2	0.00012	0.00075	0.00443	0.01223
	3	0.00012	0.00076	0.00441	0.01126
	4	0.00012	0.00072	0.00418	0.01201
	5	0.00012	0.00074	0.00451	0.01242
	6	0.00012	0.00077	0.00437	0.01143
	Average	0.00012	0.00074	0.00439	0.01206
	SD	0.00000	0.00003	0.00011	0.00065
0.046 (0.0460)	1	0.00012	0.00068	0.00417	0.01164
	2	0.00012	0.00073	0.00417	0.01189
	3	0.00012	0.00073	0.00408	0.01163
	Average	0.00012	0.00072	0.00414	0.01172
	SD	0.00000	0.00003	0.00005	0.00014
0.10 (0.0980)	1	0.00012	0.00073	0.00379	0.01235
	2	0.00012	0.00079	0.00422	0.01174
	3	0.00012	0.00074	0.00445	0.01150
	Average	0.00012	0.00075	0.00415	0.01186
	SD	0.00000	0.00003	0.00033	0.00044
0.22 (0.208)	1	0.00012	0.00065	0.00344	0.00981
	2	0.00012	0.00068	0.00389	0.01064
	3	0.00012	0.00073	0.00384	0.01054
	Average	0.00012	0.00069	0.00372	0.01033
	SD	0.00000	0.00004	0.00025	0.00045
0.46 (0.449)	1	0.00012	0.00049	0.00208	0.00755
	2	0.00012	0.00049	0.00202	0.00750
	3	0.00012	0.00052	0.00224	0.00700
	Average	0.00012	0.00050	0.00211	0.00735
	SD	0.00000	0.00002	0.00011	0.00030
1.0 (0.970)	1	0.00012	0.00037	0.00077	0.00181
	2	0.00012	0.00039	0.00078	0.00174
	3	0.00012	0.00038	0.00080	0.00178
	Average	0.00012	0.00038	0.00078	0.00178
	SD	0.00000	0.00001	0.00001	0.00004
2.2 (2.04)	1	0.00012	0.00028	0.00037	0.00051
	2	0.00012	0.00027	0.00039	0.00053
	3	0.00012	0.00030	0.00037	0.00055
	Average	0.00012	0.00028	0.00038	0.00053
	SD	0.00000	0.00002	0.00001	0.00002
4.6 (4.36)	1	0.00012	0.00016	0.00022	0.00029
	2	0.00012	0.00016	0.00024	0.00030
	3	0.00012	0.00016	0.00023	0.00029
	Average	0.00012	0.00016	0.00023	0.00029
	SD	0.00000	0.00000	0.00001	0.00001

SD : Standard deviation

a : Arithmetic mean (0-72 hr)

Values are calculated without any rounding off during the calculation on the work sheet, and are written in five decimal places.

Table 3. Percent Growth Inhibition in Biomass of *Pseudokirchneriella subcapitata*

(Closed System)

Nominal Concentration (Mean[a] Measured Conc.) mg/L	Vessel No.	Growth Rate in Biomass			
		Rate μ_{0-48}	Inhibition (%)*1 I_{0-48}	Rate μ_{0-72}	Inhibition (%)*1 I_{0-72}
Control (-)	1	1.7940		1.5562	
	2	1.7954		1.5356	
	3	1.7940		1.5082	
	4	1.7670		1.5295	
	5	1.8049		1.5409	
	6	1.7884		1.5132	
	Average	1.7906	0.00	1.5306	0.00
	SD	0.0127		0.0178	
0.046 (0.0460)	1	1.7655	1.40	1.5192	0.74
	2	1.7655	1.40	1.5261	0.29
	3	1.7552	1.98	1.5189	0.77
	Average	1.7621	1.59 N.S.	1.5214	0.60 N.S.
	SD	0.0060		0.0041	
0.10 (0.0980)	1	1.7180	4.06	1.5389	-0.54
	2	1.7713	1.08	1.5220	0.56
	3	1.7981	-0.42	1.5150	1.02
	Average	1.7625	1.57 N.S.	1.5253	0.35 N.S.
	SD	0.0408		0.0123	
0.22 (0.208)	1	1.6690	6.79	1.4622	4.47
	2	1.7307	3.35	1.4892	2.70
	3	1.7244	3.70	1.4862	2.90
	Average	1.7080	4.61**	1.4792	3.36**
	SD	0.0340		0.0148	
0.46 (0.449)	1	1.4172	20.85	1.3750	10.17
	2	1.4041	21.59	1.3728	10.31
	3	1.4551	18.74	1.3498	11.81
	Average	1.4255	20.39**	1.3658	10.76**
	SD	0.0265		0.0140	
1.0 (0.970)	1	0.9219	48.52	0.8996	41.23
	2	0.9297	48.08	0.8863	42.10
	3	0.9374	47.65	0.8928	41.67
	Average	0.9297	48.08**	0.8929	41.67**
	SD	0.0078		0.0066	
2.2 (2.04)	1	0.5608	68.68	0.4752	68.96
	2	0.5769	67.78	0.4923	67.83
	3	0.5543	69.05	0.5006	67.29
	Average	0.5640	68.50**	0.4894	68.03**
	SD	0.0116		0.0130	
4.6 (4.36)	1	0.2855	84.06	0.2848	81.39
	2	0.3288	81.64	0.2987	80.49
	3	0.3156	82.37	0.2904	81.03
	Average	0.3100	82.69**	0.2913	80.97**
	SD	0.0222		0.0070	

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

SD : Standard deviation

a : Arithmetic mean (0-72 hr)

NS : No significant difference

** : Significant difference $p<0.01$

Table 4-1. Calculated E_rC_{50} and NOEC
0-72 hr

		95 % Confidence Limits	Statistical Method
E_rC_{50} *	1.3 mg/L	1.2 — 1.4 mg/L	Probit
NOEC **	0.098 mg/L	-	Dunnett

* : Based on I_{0-72} value (Inhibition of growth rates)
** : Based on μ_{0-72} value (Growth rates)

Table 4-2. Calculated E_rC_{50} and NOEC
0-48 hr

		95 % Confidence Limits	Statistical Method
E_rC_{50} *	1.1 mg/L	1.0 — 1.1 mg/L	Probit
NOEC **	0.099 mg/L	-	Dunnett

* : Based on I_{0-48} value (Inhibition of growth rates)
** : Based on μ_{0-48} value (Growth rates)

Table 5. Daily Temperature and Light Intensity at the Incubation

Exposure Period (Hours)	Temperature (℃)	Light Intensity* ($\mu E/m^2/s$) Range of Measured Intensity	Light Intensity* ($\mu E/m^2/s$) Average	Revolution (rpm)
0	23.0	66 ~ 79	68	101
24	23.2	66 ~ 79	68	101
48	23.0	65 ~ 78	68	101
72	23.0	65 ~ 79	68	101

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

Table 6. pH Values

Nominal Concentration (mg/L)	Mean[a] Measured Concentration (mg/L)		pH			
			0 Hour	24 Hours	48 Hours	72 Hours
Control	-	1	7.9	8.1	9.1	10.5
		2				10.5
		3				10.5
		4				10.5
		5				10.5
		6				10.5
0.046	0.0460	1	7.9	8.1	9.2	10.5
		2				10.5
		3				10.5
0.10	0.0980	1	7.9	8.1	9.1	10.5
		2				10.5
		3				10.5
0.22	0.208	1	7.9	8.1	9.1	10.5
		2				10.5
		3				10.5
0.46	0.449	1	7.9	8.1	9.1	10.2
		2				10.1
		3				10.1
1.0	0.970	1	8.0	8.0	8.3	8.6
		2				8.6
		3				8.6
2.2	2.04	1	8.0	8.0	8.1	8.1
		2				8.0
		3				8.0
4.6	4.36	1	8.0	7.9	8.0	8.0
		2				8.0
		3				8.0

a : Arithmetic mean (0-72 hr)

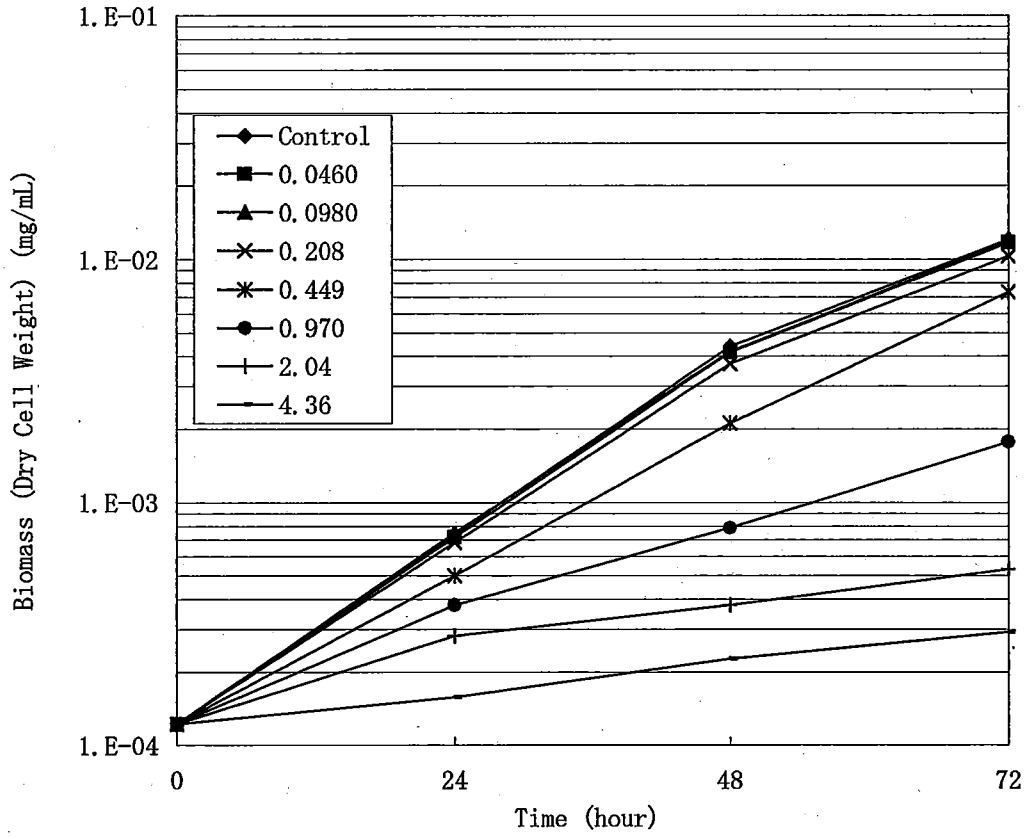


Figure 1. Algal Growth Curve of *Pseudokirchneriella subcapitata* (Biomass *vs* Time during the 72 hours Exposure)

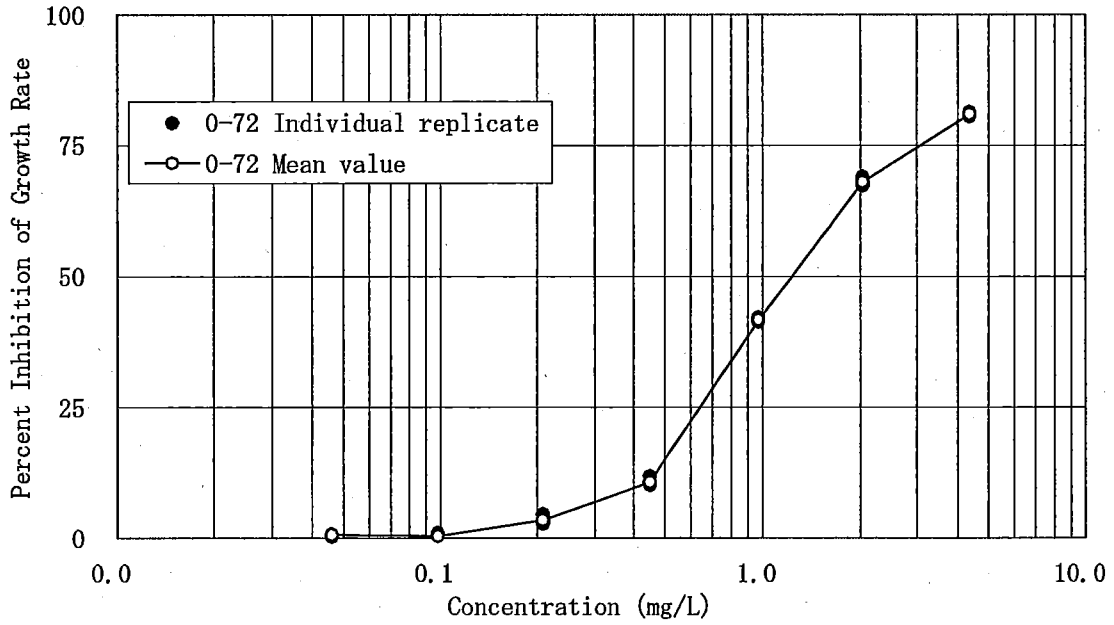


Figure 2. Concentration-Inhibition curve Based on $I_{0\text{-}72}$ Values Calculated from the Growth Curves

付属資料－Ⅰ

OECD培地

Table A-1. OECD medium

Nutrient salts	Concentration (mg/L)
H_3BO_3	0.185
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	0.415
$ZnCl_2$	0.003
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	0.064
$Na_2EDTA \cdot 2H_2O$	0.1
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0.0015
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0.007
$CuCl_2 \cdot 2H_2O$	0.00001
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	18
NH_4Cl	15
KH_2PO_4	1.6
$NaHCO_3$	50
$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	12
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	15

付属資料－II

予備試験の結果

(Range Finding Test)

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

(Open System)

Nominal Concentration (mg/L)	Caluculated Biomass (Dry Cell Weight) (mg/mL)			
	0 Hour	24 Hours	48 Hours	72 Hours
Control	0.00009	0.00055	0.00399	0.03044
0.032	0.00009	0.00051	0.00377	0.02706
0.10	0.00009	0.00048	0.00361	0.02542
0.32	0.00009	0.00043	0.00297	0.02132
1.0	0.00009	0.00024	0.00049	0.00134
3.2	0.00009	0.00014	0.00022	0.00029

Table B-2. Percent Growth Inhibition of *Pseudokirchneriella subcapitata*

(Open System)

Nominal Concentration (mg/L)	Growth rate	
	Rate μ (0-72)	Inhibition (%) I_{μ} (0-72)*
Control	1.9368	0.0
0.032	1.8976	2.0
0.10	1.8768	3.1
0.32	1.8181	6.1
1.0	0.8964	54
3.2	0.3856	80

* : Values are the percent inhibition relative to the control

Table B-3. Measured Concentration of the Test Substance in Test Solution

(Open System)

Nominal Concentration (mg/L)	Measured Concentration (mg/L) (Percent of Nominal)				Percent of Initial conc.
	0 Hour		72 Hours		
Control	<0.06	(-)	<0.06	(-)	-
0.032	0.0344	(107)	0.0353	(110)	103
0.10	0.0989	(99)	0.0813	(81)	82
0.32	0.287	(90)	0.240	(75)	84
1.0	0.929	(93)	0.784	(78)	84
3.2	2.89	(90)	2.47	(77)	86
0.032*	0.0344	(107)	0.0211	(66)	61

- : Not calculated

* : without algae inoculation

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

高濃度試験液は純水で希釈し、低濃度試験液は固相カラムを用いて濃縮する。

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
n) 固相抽出装置	: GL-SPE マニホールド	GL サイエンス
o) 固相カラム	: Sep-Pak ﾌﾟﾗｽ PS-2	Waters
p) 注射筒	: 容量 5 mL	柴田科学

(3) 試薬

a) 2-tert-ﾌﾞﾁﾙﾌｪﾉｰﾙ	: 純度 99.9 %、ロット番号[redacted]	[redacted]
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) ① 高濃度試験液(被験物質濃度 0.1 mg/L 以上)の場合

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。

② 低濃度試験液(被験物質濃度 0.1 mg/L 未満)の場合

アセトニトリル 10 mL を注射筒に取り、固相カラムに約 2 mL/min の速さで通液する。次に、純水 10 mL を同様の操作で通液し、固相カラムの洗浄および活性化を行う。活性化した固相カラムに試験溶液 100 mL を正確に通液し、アセトニトリル 5 mL を注射筒に取り、10 mL メスフラスコに約 2 mL/min の速さで通液後、純水で 10 mL とする。この試験用液を検量線の被験物質濃度範囲内に入るように純水で希釈し、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, 4.6×150 mm

(2) 恒温槽温度　：　40℃

(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 (μV・sec)
1	0	0
2	0.1024	1923
3	0.5120	9282
4	1.024	18540

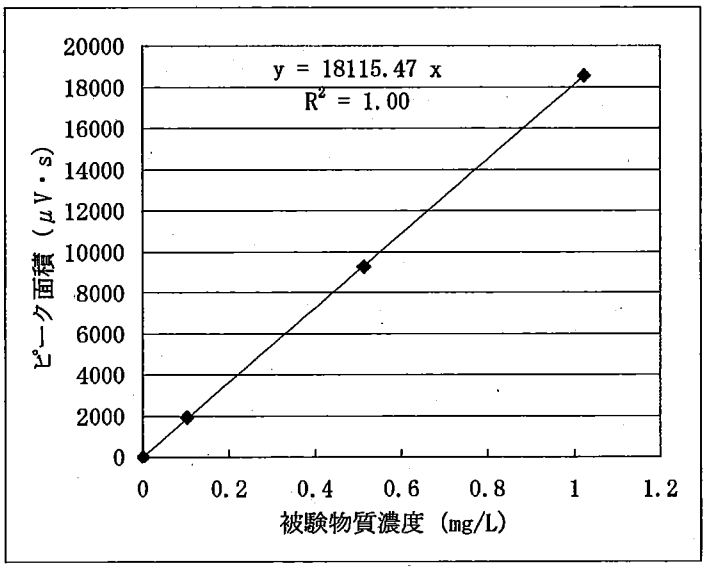


図1　検量線例

4．添加回収率

① 高濃度試験液(被験物質濃度 0.1 mg/L 以上)

1.(4).b)で調製した被験物質標準原液（1079 mg/L）を試験培地に添加し、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。

② 低濃度試験液(被験物質濃度 0.1 mg/L 未満)

1.(4).b)で調製した被験物質標準原液（1036 mg/L）を試験培地に添加し、濃度が0.03108 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 94 ～ 107 %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 (%)
0.03108	1	0.03098	0.0332	107
	2	0.03531		
0.1079	1	0.1068	0.101	94
	2	0.09555		
1.079	1	1.062	1.06	98
	2	1.058		
10.79	1	10.51	10.7	99
	2	10.79		

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（0.03108 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 100 ～ 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 (%)
0.0332	1	0.03414	0.0338	102
	2	0.03351		
0.101	1	0.1092	0.101	100
	2	0.09348		
1.06	1	1.070	1.07	101
	2	1.077		
10.7	1	10.82	10.7	100
	2	10.60		

6．定量下限値および検出限界値

① 高濃度試験液(被験物質濃度 0.1 mg/L 以上)の場合

被験物質濃度 0.1079 mg/Lの試料液50 μLをHPLCに7回注入し、得られた測定値の標準偏差値の10 倍を定量下限値、3 倍を検出限界値とした。

結果を表4-1 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4-1　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× 10 ≒ 0.06 mg/L

検出限界値＝ 0.00588×　3 ≒ 0.02 mg/L

② 低濃度試験液(被験物質濃度 0.1 mg/L 未満)の場合

被験物質濃度 0.01036 mg/Lの試料液 100 mL を1.(4). C)②の操作で7回濃縮して試験液を調製した。この液 50 μL を HPLC に注入し、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 4-2 に示す。定量下限値は 0.006 mg/L 、検出限界値は 0.002 mg/Lであった。

表4-2　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	0.01115
2	0.01014
3	0.01043
4	0.009684
5	0.01026
6	0.009581
7	0.01034
平均値	0.01022
標準偏差(σ_{n-1})	0.000523

定量下限値＝ 0.000523× 10 ≒ 0.006 mg/L

検出限界値＝ 0.000523×　3 ≒ 0.002 mg/L

付属資料－Ⅳ

統計解析結果

(JMP ver. 8.0.2)

EC_{50} 値算出
算出に用いた値（0-72時間）

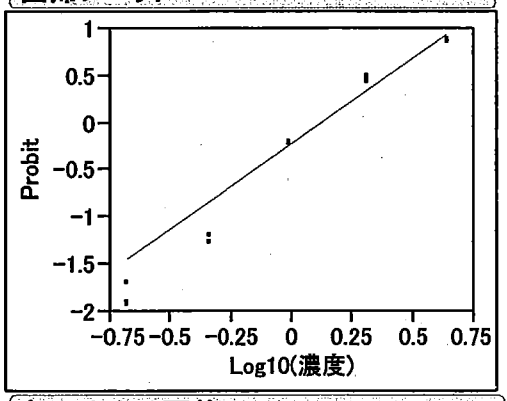
濃度	Log10(濃度)	Logit	Logit_重み	Probit	Probit_重み
0.22	-0.6820	-3.0620	12.5350	-1.6980	65.4320
	-0.6820	-3.5840	12.5350	-1.9260	65.4320
	-0.6820	-3.5100	12.5350	-1.8950	65.4320
0.46	-0.3480	-2.1790	115.3580	-1.2720	425.6140
	-0.3480	-2.1630	115.3580	-1.2640	425.6140
	-0.3480	-2.0100	115.3580	-1.1840	425.6140
1.0	-0.0130	-0.3550	3142.2710	-0.2220	8099.0740
	-0.0130	-0.3190	3142.2710	-0.1990	8099.0740
	-0.0130	-0.3360	3142.2710	-0.2100	8099.0740
2.2	0.3100	0.7980	654.5510	0.4950	1770.0370
	0.3100	0.7460	654.5510	0.4630	1770.0370
	0.3100	0.7210	654.5510	0.4480	1770.0370
4.6	0.6390	1.4760	1143.0820	0.8920	3550.0210
	0.6390	1.4170	1143.0820	0.8590	3550.0210
	0.6390	1.4520	1143.0820	0.8790	3550.0210

算出結果（0-72時間）

応答 Probit

重み: Probit_重み

回帰プロット



あてはめの要約

R2乗	0.969406
自由度調整R2乗	0.967053
誤差の標準偏差(RMSE)	5.427819
Yの平均	0.114312
オブザベーション(または重みの合計)	41730.53

分散分析

要因	自由度	平方和	平均平方	F値
モデル	1	12135.790	12135.8	411.9242
誤差	13	382.996	29.5	p値(Prob>F)
全体(修正済み)	14	12518.786		<.0001*

あてはまりの悪さ(LOF)

要因	自由度	平方和	平均平方	F値
あてはまりの悪さ(LOF)	3	372.83314	124.278	122.2878
純粋誤差	10	10.16272	1.016	p値(Prob>F)
合計誤差	13	382.99586		<.0001*
				最大R2乗
				0.9992

パラメータ推定値

項	推定値	標準誤差	t値	p値(Prob>|t|)
切片	-0.2119	0.031054	-6.82	<.0001*
Log10(濃度)	1.8012727	0.08875	20.30	<.0001*

逆推定

Probit	予測値 Log10(濃度)	下側限界	上側限界	1-Alpha
0.000000	0.11763921	0.08414223	0.14968164	0.9500
-0.842000	-0.34980806	-0.42142379	-0.29036083	
-1.282000	-0.59407979	-0.69236423	-0.51356260	

応答の期待値に対する信頼区間

逆推定

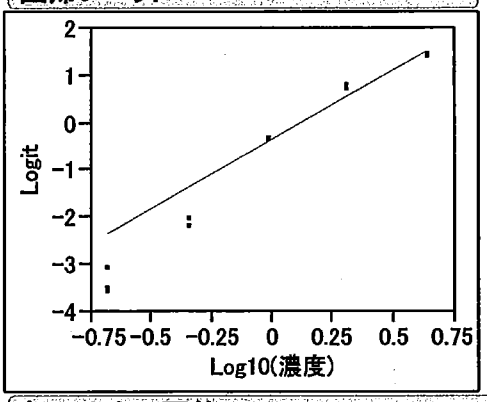
Probit	予測値 Log1	下側限界	上側限界	1-Alpha
0	0.1176392	0.0841422	0.1496816	0.95

EC50	95% 下限	95% 上限
1.31	1.21	1.41

応答 Logit

重み: Logit_重み

回帰プロット



あてはめの要約

R2乗	0.967539
自由度調整R2乗	0.965042
誤差の標準偏差(RMSE)	5.238488
Yの平均	0.158879
オブザベーション(または重みの合計)	15203.39

分散分析

要因	自由度	平方和	平均平方	F値
モデル	1	10633.254	10633.3	387.4844
誤差	13	356.743	27.4	p値(Prob>F)
全体(修正済み)	14	10989.997		<.0001*

あてはまりの悪さ(LOF)

要因	自由度	平方和	平均平方	F値
あてはまりの悪さ(LOF)	3	346.66377	115.555	114.6481
純粋誤差	10	10.07906	1.008	p値(Prob>F)
合計誤差	13	356.74283		<.0001*
				最大R2乗
				0.9991

パラメータ推定値

項	推定値	標準誤差	t値	p値(Prob>|t|)
切片	-0.330982	0.049237	-6.72	<.0001*
Log10(濃度)	2.9420743	0.149461	19.68	<.0001*

逆推定

Logit	予測値 Log10(濃度)	下側限界	上側限界	1-Alpha
0.000000	0.11249948	0.07988656	0.14379565	0.9500
-1.386000	-0.35859671	-0.43123817	-0.29875894	
-2.197000	-0.63425257	-0.73834339	-0.54968686	

応答の期待値に対する信頼区間

逆推定

Logit	予測値 Log1	下側限界	上側限界	1-Alpha
0	0.1124995	0.0798866	0.1437957	0.95

EC50	95% 下限	95% 上限
1.30	1.20	1.39

NOECの算出

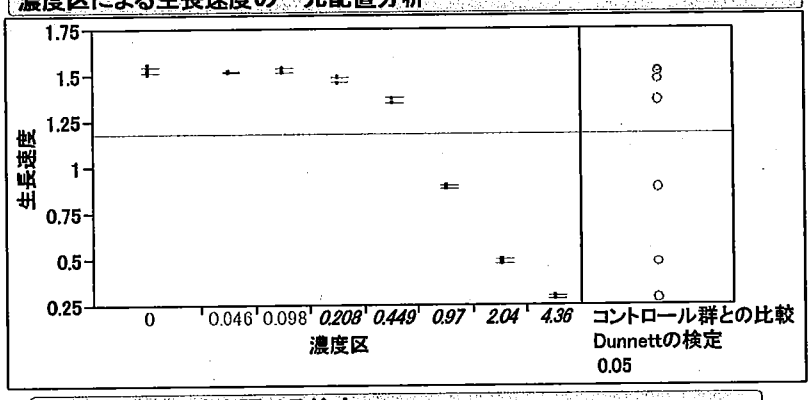
入力値

設定濃度(mg/L)	0 - 72 hr 実測平均濃度* (mg/L)	生長速度
0	0	1.55620
	0	1.53560
	0	1.50820
	0	1.52950
	0	1.54090
	0	1.51320
0.046	0.0460	1.51920
	0.0460	1.52610
	0.0460	1.51890
0.10	0.0980	1.53890
	0.0980	1.52200
	0.0980	1.51500
0.22	0.208	1.46220
	0.208	1.48920
	0.208	1.48620
0.46	0.449	1.37500
	0.449	1.37280
	0.449	1.34980
1.0	0.970	0.89960
	0.970	0.88630
	0.970	0.89280
2.2	2.04	0.47520
	2.04	0.49230
	2.04	0.50060
4.6	4.36	0.28480
	4.36	0.29870
	4.36	0.29040
	JMP 入力値	JMP 入力値

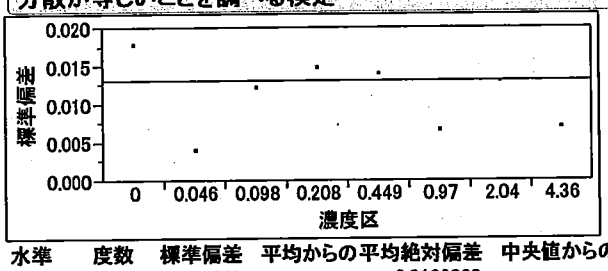
＊ ： 算術平均濃度(0-72 hr)

結果

濃度区による生長速度の一元配置分析



分散が等しいことを調べる検定



水準	度数	標準偏差	平均からの平均絶対偏差	中央値からの平均絶対偏差
0	6	0.0178448	0.0136333	0.0136333
0.046	3	0.0040731	0.0031333	0.0025000
0.098	3	0.0122870	0.0090667	0.0103000
0.208	3	0.0147986	0.0113333	0.0100000
0.449	3	0.0139576	0.0107111	0.0091333
0.97	3	0.0066506	0.0044667	0.0066000
2.04	3	0.0129516	0.0094444	0.0112333
4.36	3	0.0069936	0.0049333	0.0065000

検定	F値	分子自由度	分母自由度	p値(Prob>F)
O'Brien[.5]	0.7241	7	19	0.6536
Brown-Forsythe	0.6879	7	19	0.6811
Levene	1.3255	7	19	0.2920
Bartlett	0.7861	7	.	0.5989

警告: 標本サイズが小さいため、注意してください。

Welchの検定

Welchの分散分析: 分散が異なる場合の平均に対する検定

F値	分子自由度	分母自由度	p値(Prob>F)
8322.9487	7	7.3329	<.0001*

平均の比較

Dunnettの検定を使ったコントロール群との比較

コントロール群 =0

|d|	Alpha
2.93191	0.05

水準	Abs(Dif)-LSD	p値
0	-0.02	1.0000
0.098	-0.02	0.9937
0.046	-0.02	0.8964
0.208	0.024	0.0002*
0.449	0.138	<.0001*
0.97	0.61	<.0001*
2.04	1.014	<.0001*
4.36	1.212	<.0001*

値が正の場合、ペアになっている平均の間に有意差があることを示します。

EC_{50} 値算出
算出に用いた値（0-48時間）

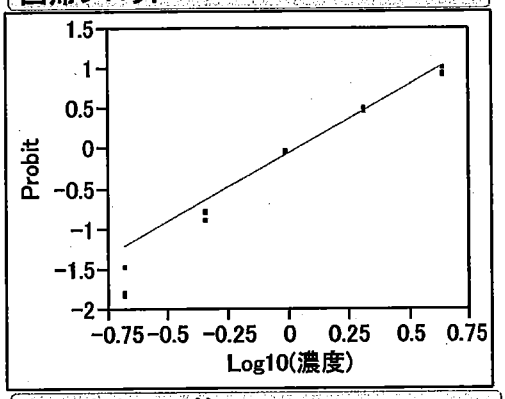
設定濃度	Log10(濃度)	Logit	Logit_重み	Probit	Probit_重み
0.22	-0.6820	-2.6190	6.1540	-1.4910	29.2080
	-0.6820	-3.3630	6.1540	-1.8320	29.2080
	-0.6820	-3.2590	6.1540	-1.7870	29.2080
0.46	-0.3450	-1.3340	117.4470	-0.8120	359.3910
	-0.3450	-1.2900	117.4470	-0.7860	359.3910
	-0.3450	-1.4670	117.4470	-0.8880	359.3910
1.0	-0.0150	-0.0590	3293.2930	-0.0370	8391.6920
	-0.0150	-0.0770	3293.2930	-0.0480	8391.6920
	-0.0150	-0.0940	3293.2930	-0.0590	8391.6920
2.2	0.3100	0.7850	1110.2040	0.4870	3006.6720
	0.3100	0.7440	1110.2040	0.4620	3006.6720
	0.3100	0.8020	1110.2040	0.4970	3006.6720
4.6	0.6380	1.6620	130.3920	0.9970	419.0120
	0.6380	1.4920	130.3920	0.9020	419.0120
	0.6380	1.5420	130.3920	0.9300	419.0120

算出結果（0-48時間）

応答 Probit

重み: Probit_重み

回帰プロット



あてはめの要約

R2乗	0.975582
自由度調整R2乗	0.973704
誤差の標準偏差(RMSE)	2.734806
Yの平均	0.089626
オブザベーション(または重みの合計)	36617.93

分散分析

要因	自由度	平方和	平均平方	F値
モデル	1	3884.6138	3884.61	519.3915
誤差	13	97.2291	7.48	p値(Prob>F)
全体(修正済み)	14	3981.8429		<.0001*

あてはまりの悪さ(LOF)

要因	自由度	平方和	平均平方	F値
あてはまりの悪さ(LOF)	3	87.222832	29.0743	29.0560
純粋誤差	10	10.006292	1.0006	p値(Prob>F)
合計誤差	13	97.229124		<.0001*
				最大R2乗
				0.9975

パラメータ推定値

項	推定値	標準誤差	t値	p値(Prob>|t|)
切片	-0.040006	0.015382	-2.60	0.0220*
Log10(濃度)	1.7020994	0.074686	22.79	<.0001*

逆推定

Probit	予測値 Log10(濃度)	下側限界	上側限界	1-Alpha
0.000000	0.02350413	0.00412192	0.04193144	0.9500
-0.842000	-0.47117907	-0.53157717	-0.42070683	
-1.282000	-0.72968336	-0.81619639	-0.65778408	

応答の期待値に対する信頼区間

逆推定

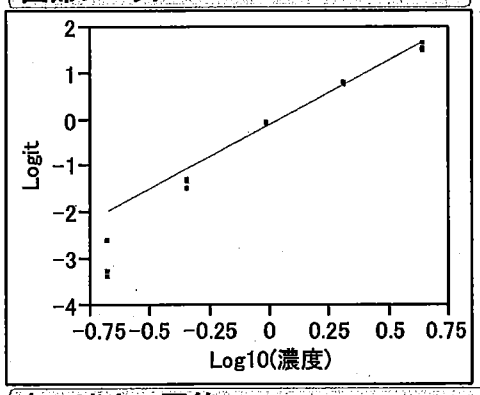
Probit	予測値 Log	下側限界	上側限界	1-Alpha
0	0.0235041	0.0041219	0.0419314	0.95

EC50	95% 下限	95% 上限
1.06	1.01	1.10

応答 Logit

重み: Logit_重み

回帰プロット



あてはめの要約

R2乗	0.974564
自由度調整R2乗	0.972607
誤差の標準偏差(RMSE)	2.656927
Yの平均	0.136368
オブザベーション(または重みの合計)	13972.47

分散分析

要因	自由度	平方和	平均平方	F値
モデル	1	3516.0971	3516.10	498.0830
誤差	13	91.7704	7.06	p値(Prob>F)
全体(修正済み)	14	3607.8674		<.0001*

あてはまりの悪さ(LOF)

要因	自由度	平方和	平均平方	F値
あてはまりの悪さ(LOF)	3	81.795396	27.2651	27.3335
純粋誤差	10	9.974983	0.9975	p値(Prob>F)
合計誤差	13	91.770379		<.0001*
				最大R2乗
				0.9972

パラメータ推定値

項	推定値	標準誤差	t値	p値(Prob>|t|)
切片	-0.061333	0.02416	-2.54	0.0247*
Log10(濃度)	2.7631703	0.12381	22.32	<.0001*

逆推定

Logit	予測値 Log10(濃度)	下側限界	上側限界	1-Alpha
0.000000	0.02219660	0.00342643	0.04003313	0.9500
-1.386000	-0.47940115	-0.54127064	-0.42795448	
-2.197000	-0.77290460	-0.86527676	-0.69650772	

応答の期待値に対する信頼区間

逆推定

Logit	予測値 Log	下側限界	上側限界	1-Alpha
0	0.0221966	0.0034264	0.0400331	0.95

EC50	95% 下限	95% 上限
1.05	1.01	1.10

NOECの算出

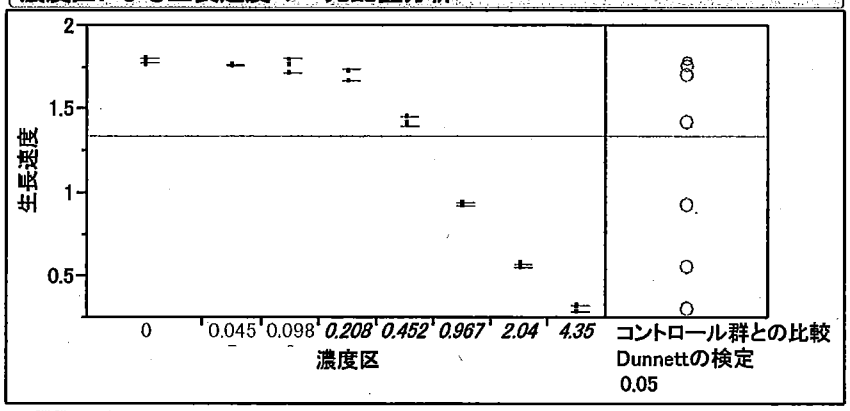
入力値

設定濃度(mg/L)	0 - 48 hr	
	実測平均濃度* (mg/L)	生長速度
0	0	1.794
	0	1.7954
	0	1.794
	0	1.767
	0	1.8049
	0	1.7884
0.046	0.0457	1.7655
	0.0457	1.7655
	0.0457	1.7552
0.10	0.0989	1.718
	0.0989	1.7713
	0.0989	1.7981
0.22	0.208	1.669
	0.208	1.7307
	0.208	1.7244
0.46	0.452	1.4172
	0.452	1.4041
	0.452	1.4551
1.0	0.967	0.9219
	0.967	0.9297
	0.967	0.9374
2.2	2.04	0.5608
	2.04	0.5769
	2.04	0.5543
4.6	4.35	0.2855
	4.35	0.3288
	4.35	0.3156
	JMP入力値	JMP入力値

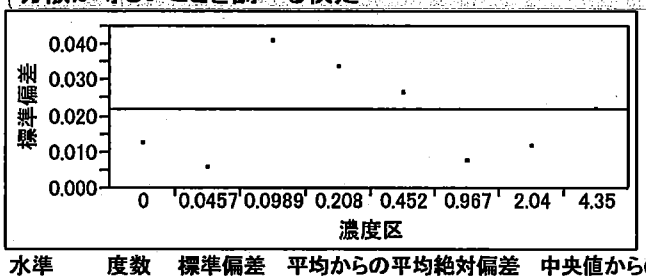
**： 算術平均濃度(0-48 hr)

結果

濃度区による生長速度の一元配置分析



分散が等しいことを調べる検定



水準	度数	標準偏差	平均からの平均絶対偏差	中央値からの平均絶対偏差
0	6	0.0127471	0.0086111	0.0074833
0.0457	3	0.0059467	0.0045778	0.0034333
0.0989	3	0.0407741	0.0296444	0.0356333
0.208	3	0.0339503	0.0260222	0.0226667
0.452	3	0.0264859	0.0197556	0.0213667
0.967	3	0.0077501	0.0051778	0.0077333
2.04	3	0.0116349	0.0086000	0.0097000
4.35	3	0.0221929	0.0163111	0.0188333

検定	F値	分子自由度	分母自由度	p値(Prob>F)
O'Brien[.5]	1.2532	7	19	0.3240
Brown-Forsythe	2.1064	7	19	0.0932
Levene	3.0066	7	19	0.0265*
Bartlett	1.5372	7	.	0.1494

警告: 標本サイズが小さいため、注意してください。

Welchの検定

Welchの分散分析: 分散が異なる場合の平均に対する検定

F値	分子自由度	分母自由度	p値(Prob>F)
4675.8111	7	7.1668	<.0001*

平均の比較

Dunnettの検定を使ったコントロール群との比較

コントロール群 =0

|d|	Alpha
2.93191	0.05

水準	Abs(Dif)-LSD	p値
0	-0.04	1.0000
0.0989	-0.02	0.3951
0.0457	-0.02	0.3805
0.208	0.037	0.0003*
0.452	0.319	<.0001*
0.967	0.815	<.0001*
2.04	1.181	<.0001*
4.35	1.435	<.0001*

値が正の場合、ペアになっている平均の間に有意差があることを示します。

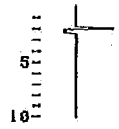
付属資料－V

濃度分析　HPLC　クロマトグラム

暴露開始時
検量線

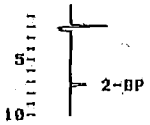
[redacted]

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



NO PEAKS

0.1024 μg/L
CH. 1 C.S 2.50 ATT 3 OFFS 0 01/25/11 14:46



D-2500 01/25/11 14:46

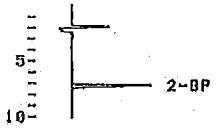
METHOD: 2-BP TAG: 2 CH: 1

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-AMT : 1.000

0.5120 μg/L
CH. 1 C.S 2.50 ATT 3 OFFS 0 01/25/11 14:50



D-2500 01/25/11 14:50

METHOD: 2-BP TAG: 3 CH: 1

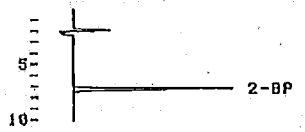
FILE: 1 CALC-METHOD: EXT-STD TABLE: 1 CONC: HEIGHT

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-AMT : 1.000

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	1700	0.000	BB	2-BP
TOTAL		18540	1700	0.000		

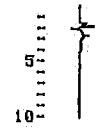
PEAK REJ : 0
SF : 1.000
SAMP-AMT : 1.000

対照区

[redacted]

検体 14-16 × 100/10 n=1

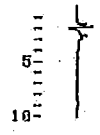
CH. 1 C.S 2.50 ATT 3 OFFS 0 01/25/11 18:31



NO PEAKS

m n=2

CH. 1 C.S 2.50 ATT 3 OFFS 0 01/25/11 18:43

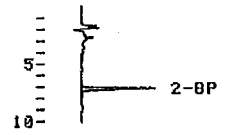


NO PEAKS

0.046 mg/L 区

空振 14-15 × 100/10 n=1

CH. 1 C.S 2.50 ATT 3 OFFS 0 01/25/11 18:54



D-2500 01/25/11 18:54

METHOD: 2-BP TAG: 23 CH: 1

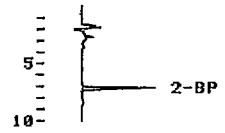
FILE: 1 CALC-METHOD: EXT-STD TABLE: 1 CONC: HEIGHT

NO.	RT	AREA	HEIGHT	CONC	BC	NAME
1	7.16	8190	785	0.000	BB	2-BP
TOTAL		8190	785	0.000		

PEAK REJ : 0
SF : 1.000
SAMP-AMT : 1.000

m n=2

CH. 1 C.S 2.50 ATT 3 OFFS 0 01/25/11 19:06



D-2500 01/25/11 19:06

METHOD: 2-BP TAG: 24 CH: 1

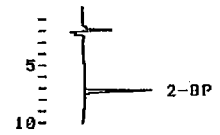
FILE: 1 CALC-METHOD: EXT-STD TABLE: 1 CONC: HEIGHT

NO.	RT	AREA	HEIGHT	CONC	BC	NAME
1	7.16	8004	784	0.000	BB	2-BP
TOTAL		8004	784	0.000		

PEAK REJ : 0
SF : 1.000
SAMP-AMT : 1.000

生姜 1K-2l × 1/10 n=1

CH. 1 C.S 2.50 ATT 3 OFFS 0 01/25/11 21:14



D-2500 01/25/11 21:14

METHOD: 2-BP TAG: 35 CH: 1

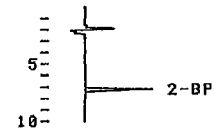
FILE: 1 CALC-METHOD: EXT-STD TABLE: 1 CONC: HEIGHT

NO.	RT	AREA	HEIGHT	CONC	BC	NAME
1	7.20	7822	724	0.000	BB	2-BP
TOTAL		7822	724	0.000		

PEAK REJ : 0
SF : 1.000
SAMP-AMT : 1.000

n n=2

CH. 1 C.S 2.50 ATT 3 OFFS 0 01/25/11 21:25



D-2500 01/25/11 21:25

METHOD: 2-BP TAG: 36 CH: 1

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

NO.	RT	AREA	HEIGHT	CONC	BC	NAME
1	7.20	7880	730	0.000	BB	2-BP
TOTAL		7880	730	0.000		

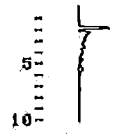
PEAK REJ : 0
SF : 1.000
SAMP-AMT : 1.000

7 2時間暴露終了時

0.046 mg/L 区

全糖 14 - 44 × 100/10 n=1

CH. 1 C.S 2.50 ATT 3 OFFS 0 01/20/11 17:53



D-2500 01/20/11 17:53

METHOD: 2-BP TAG: 15 CH: 1

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

NO.	RT	AREA	HEIGHT	CONC	BC	NAME
TOTAL		0	0	0.000		

PEAK REJ : 0
SP : 1.000
SAMP-AMT : 1.000

n=2

CH. 1 C.S 2.50 ATT 3 OFFS 0 01/20/11 18:05

D-2500 01/20/11 18:05

METHOD: 2-BP TAG: 16 CH: 1

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

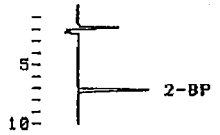
NO.	RT	AREA	HEIGHT	CONC	BC	NAME
TOTAL		0	0	0.000		

PEAK REJ : 0
SP : 1.000
SAMP-AMT : 1.000

4.6 mg/L 区

生殖14-51 ×1/10 n=1

CH. 1 C.S 2.50 ATT 3 OFFS 0 01/28/11 20:36



D-2500 01/28/11 20:36

METHOD: 2-BP TAG: 29 CH: 1

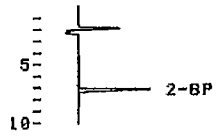
FILE: 1 CALC-METHOD: EXT-STD TABLE: 1 CONC: HEIGHT

NO.	RT	AREA	HEIGHT	CONC	BC	NAME
1	7.16	7823	744	0.000	BB	2-BP
TOTAL		7823	744	0.000		

PEAK REJ : 0
SF : 1.000
SAMP-AMT : 1.000

n n=2

CH. 1 C.S 2.50 ATT 3 OFFS 0 01/28/11 20:48



D-2500 01/28/11 20:48

METHOD: 2-BP TAG: 30 CH: 1

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

NO.	RT	AREA	HEIGHT	CONC	BC	NAME
1	7.16	7843	762	0.000	BB	2-BP
TOTAL		7843	762	0.000		

PEAK REJ : 0
SF : 1.000
SAMP-AMT : 1.000