

環境省 殿

最終報告書

o-ニトロフェノールのヒメダカ (*Oryzias latipes*) に対する急性毒性試験

(試験番号: No. 2008-生44)

2010年 2月19日作成

株式会社 センター

原本と相違ないことを証明する。

2010年 2月23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： 〇ーニトロフェノールのヒメダカ (*Oryzias latipes*) に対する
急性毒性試験

試験番号： No. 2008-生44

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。

2010年 2月19日

試験責任者



2010年 2月19日

確認： 運営管理者



信頼性保証書

株式会社 クレハ分析センター

試験委託者： 環境省

表題： 〇ーニトロフェノールのヒメダカ (*Oryzias latipes*) に対する
急性毒性試験

試験番号： No. 2008-生44

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	2009年 2月 5日	2009年 2月 5日	2009年 2月 5日
実験状況の監査, 査察	2009年 9月 7日	2009年 9月 7日	2009年 9月 7日
	2009年 9月11日	2009年 9月11日	2009年 9月11日
実験終了後の監査	2009年10月22日	2009年10月22日	2009年10月22日
組織体制の監査	2009年 8月 7日	2009年 8月 7日	2009年 8月 7日
施設・設備の査察 試験用機器等 施設, 設備等 試験系	2009年 8月10日	2009年 8月10日	2009年 8月10日
最終報告書の監査	2010年 2月19日	2010年 2月19日	2010年 2月19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。

2010年 2月19日

信頼性保証部門責任者：  

試験実施概要

1. 表題 : 〇ーニトロフェノールのヒメダカ (*Oryzias latipes*) に対する急性毒性試験
2. 試験目的 : ヒメダカ (*Oryzias latipes*) を被験物質に 96 時間暴露し、死亡率を測定することにより、ヒメダカ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G L P : 本試験は、厚生労働省医薬食品局長、経済産業省製造産業局長、環境省総合環境政策局長連名通知「新規化学物質等に係る試験を実施する試験施設に関する基準について」(薬食発第 1121003 号、平成15・11・17 製局第 3 号、環保企発第 031121004 号、平成15年11月21日、平成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 [REDACTED] (生物試験室)
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 2009年 2月 5日
実験開始日 2009年 6月23日
(暴露期間 2009年 9月 7日~2009年 9月11日)
実験終了日 2010年 1月15日
試験終了日 2010年 2月19日

目 次

	頁
要 旨	1
1 被験物質	3
1.1 名称、構造式および物理化学的性状	3
1.2 供試試料	3
1.3 被験物質の同一性の確認と保管方法および保管条件下での安定性	4
2 供試生物	4
2.1 供試生物	4
2.2 感受性確認	4
2.3 じゅん化	5
3 試験方法	5
3.1 試験条件	5
3.2 試験用水	6
3.3 試験容器および恒温槽等	6
3.4 被験物質の溶解性確認	6
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	7
3.8 試験操作	8
4 試験結果の算出	10
4.1 50 % 死亡濃度 (LC ₅₀) の算出に用いる被験物質濃度の決定	10
4.2 50 % 死亡濃度 (LC ₅₀) の算出	10
4.3 0 % 死亡最高濃度および 100 % 死亡最低濃度	10
5 結果および考察	10
5.1 試験成績の信頼性に影響をおよぼしたと思われる環境要因	10
5.2 試験用水に対する被験物質の溶解性	10
5.3 被験物質濃度の測定	11
5.4 50 % 死亡濃度 (LC ₅₀)	11
5.5 0 % 死亡最高濃度、100 % 死亡最低濃度および最大無作用濃度	11
5.6 毒性症状	11
5.7 試験溶液の水温、溶存酸素濃度および pH	14
5.8 試験溶液の pH 変動による毒性への影響	14
5.9 試験計画書からの逸脱の有無	14
6 保管	15
Table 1 ~ 8	16
Figure 1	23
付属資料-1 試験用水の水質	24
付属資料-2 予備試験の結果	26
付属資料-3 試験溶液の分析法	29
付属資料-4 統計解析結果	35

要 旨

試験委託者 環境省

表 題 〇ーニトロフェノールのヒメダカ (*Oryzias latipes*) に対する
急性毒性試験

試験番号 No. 2008-生44

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。

- 1) 被験物質 : 〇ーニトロフェノール
- 2) 暴露方式 : 半止水式 (48 時間後に試験溶液の全量を交換)
- 3) 供試生物 : ヒメダカ (*Oryzias latipes*)
- 4) 暴露期間 : 96 時間
- 5) 試験濃度 (設定値) : 対照区, 24, 32, 42, 56, 75, 100 mg/L
公比 ; $10^{1/8}$ (約 1.3)
- 6) 試験溶液量 : 3 L/容器
- 7) 連数 : 1 容器/試験区
- 8) 供試生物数 : 10 尾/試験区
- 9) 試験温度 : 24 ± 1 °C
- 10) 照明 : 室内光、16 時間明/8 時間暗
- 11) 給餌 : 無給餌
- 12) 通気 : なし
- 13) pH : 試験溶液の pH 調整は行わなかった
- 14) 分析法 : HPLC 法

結 果

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の減少は揮散によるものと考えられた。従って、各影響濃度（50 % 死亡濃度、0 % 死亡最高濃度、100 % 死亡最低濃度および最大無作用濃度）の算出にあたっては、時間加重平均値（暴露開始時と 48 時間換水前、および 48 時間換水後と暴露終了時のそれぞれの測定値の幾何平均値の算術平均値）を採用した。

2) 50 % 死亡濃度 (LC₅₀)

24 時間 50 % 死亡濃度 (LC₅₀) :
75 mg/L (95 % 信頼限界 69 ~ 83 mg/L) , Probit

48 時間 50 % 死亡濃度 (LC₅₀) :
70 mg/L (95 % 信頼限界 62 ~ 79 mg/L) , Probit

72 時間 50 % 死亡濃度 (LC₅₀) :
68 mg/L (95 % 信頼限界 60 ~ 77 mg/L) , Probit

96 時間 50 % 死亡濃度 (LC₅₀) :
64 mg/L (95 % 信頼限界 57 ~ 72 mg/L) , Probit

3) 0 % 死亡最高濃度、100 % 死亡最低濃度および最大無作用濃度

0 % 死亡最高濃度 : 38 mg/L

100 % 死亡最低濃度 : 90 mg/L

最大無作用濃度 : 29 mg/L

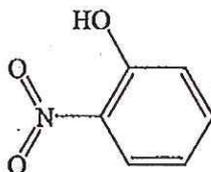
1 被験物質

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 : o-ニトロフェノール

CAS番号** : 88-75-5

構造式 :



分子式* : $C_6H_5NO_3$

分子量** : 139.11

蒸気圧* : 0.113 mmHg (25°C)

水溶解度* : 2500 mg/L (25°C)

ヘンリー一定数* : $1.28E-005 \text{ atm}\cdot\text{m}^3/\text{mole}$ (20°C)

酸解離定数 (pKa) * : 7.23 (25°C)

1-オクタノール/水分配係数* : 1.79

融点* : 44.8°C

沸点* : 216°C

比重** : 1.495

外観** : 黄色の結晶～結晶性粉末または塊

安定性** : 光により変質する。

溶媒に対する溶解性** : アルコール、エーテルに可溶

1.2 供試試料

入手先 : ██████████
入手量 : 25 g × 4 本 (全て同一ロット)
ロット番号*** : ██████████
外観*** : 黄色結晶性粉末
純度*** : 99.9 % (毛管カラム GC)
不純物の名称および含有率*** : 記載なし
入手日 : 2008年11月18日

[出典]

* : SRC PhysProp Database

** : ██████████ [製品安全データシート MSDS No. JW140221]
(作成日 2001年 9月 1日・改訂日 2008年 8月27日)

*** : ██████████ [検査成績書 Code No. 142-02212 成績書発行番号
9446940] (2008年11月17日)

1.3 被験物質の同一性の確認と保管方法および保管条件下での安定性

1) 保管方法

被験物質保管用冷蔵庫において、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、製造元より入手した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。さらに、公的データ* ならびに官能基のリストと照合して同一性を確認した。

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

* : 独立行政法人 産業技術総合研究所「有機化合物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、自家繁殖したヒメダカ (*Oryzias latipes*) を用いた。暴露開始時において、供試魚と同ロットのヒメダカの全長は 使用基準の 2.3 ± 1.2 cm を満たした。

- 1) ロット番号 : FJ08A6
- 2) 齢 : 15ヶ月齢
- 3) 全長 : 平均 2.5 cm (範囲 2.3 ~ 2.9 cm)
- 4) 体重 : 平均 0.14 g (範囲 0.10 ~ 0.22 g)
- 5) 測定数 : n = 10

2.2 感受性確認

供試魚と同ロットのヒメダカの基準物質 [硫酸銅(II)五水和物, 試薬特級] による急性毒性試験による 96 時間 50 % 死亡濃度 (LC_{50}) は 0.20 mg/L (暴露期間; 2009年5月11日 ~ 5月15日) であった。

当施設における 1997年12月以降の LC_{50} は $\bar{X} = 0.30$ mg/L、S.D. = 0.10 mg/L、n = 37 であった。

2.3 じゅん化

当該ロットのヒメダカの飼育中の観察において、寄生虫（ギロダクチルス）が認められたことから、2009年4月21日から4月23日の2日間、薬浴〔薬剤：リフィッシュ（メーカー：三栄製薬 薬浴濃度：134 mg/20 L）薬浴期間中は流水式の給水を停止した〕を行った後に、じゅん化を行った。

供試魚については、暴露開始2日前に試験容器に移し、容器じゅん化を行った。

同ロットの暴露開始前までの7日間連続の死亡率は0.9%で、試験には肉眼的に健康で正常な個体を使用した。

じゅん化時の飼育条件、状態(死亡率等)を以下に記載した。

- 1) 飼育水 : 試験に用いる試験用水 (3.2 項を参照) で飼育した
- 2) 飼育方法 : 流水式
- 3) 飼育密度 : 218 匹/ 60 L水槽
- 4) 水温 : 24±1 °C
- 5) 照明 : 室内光、16 時間明/8 時間暗
- 6) 餌 : テトラミン (メーカー：(株)テトラ社)
- 7) 給餌量 : 魚体重の約 2 % /日(暴露開始の 24 時間前からは無給餌)
- 8) じゅん化期間 : 2009年 4月24日 ~ 2009年 9月 7日
- 9) 7 日間死亡率 : 0.9 %

3 試験方法

以下の条件で試験を行った。

3.1 試験条件

- 1) 暴露方式 : 半止水式 (48 時間後に試験溶液の全量を交換)
- 2) 暴露期間 : 96 時間
- 3) 試験溶液量 : 3.0 L/容器
- 4) 連数 : 1 容器/試験区
- 5) 供試生物数 : 10 尾/試験区 (予備試験では 5 尾/試験区とする)
- 6) 試験温度 : 24°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飽和濃度の 60 % 以上 (約 5 mg/L) 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 ~ 8.5 の範囲とし、変動は 1.0 以内とする。
- 9) 照明 : 室内光、16 時間明/8 時間暗
- 10) 給餌 : 無給餌

11) かく乱 : 魚の行動に影響を及ぼすような、かく乱操作は避ける。

3.2 試験用水

脱塩素水（給水施設の水を活性炭処理で残留塩素等を除去した後、空気による通気処理を行ったもの）を使用した。

暴露開始時における試験用水の全硬度は、35 mg/L (CaCO₃換算)、pH は 8.0 であった。また DPD法により残留塩素が検出されないことを確認した。

半年に 1 回、定期的に測定する試験用水の水質分析結果（2009年 8月20日）を付属資料-1 「試験用水の水質」に示した。

3.3 試験容器および恒温槽等

- 1) 試験容器 : 3 L容ガラスビーカーを用いた。試験容器には、ヒメダカの飛び出しやゴミの混入を防止するため、小孔の開いたアクリル板で蓋をした。
- 2) 恒温槽 : 恒温器 ラボサーモ LH-2000 (アドバンテック)
- 3) 水温計 : ガラス製水銀温度計
- 4) 溶存酸素計 : B-505 (飯島電子工業)
- 5) pH 計 : HM-30 V (東亜ディーケーケー)
- 6) ICP(硬度分析用) : IRIS Advantage/AP (サーモエレクトロン)

3.4 被験物質の溶解性確認

被験物質の試験用水に対する溶解性は、フラスコ攪拌法で確認した。

被験物質の水溶解度の文献値が 2500 mg/L (25℃) であることから、試験用水 (pH 7.8) を用いて 100 mg/L 溶液を調製後、マグネチックスターラーを用いて試験温度 (24 °C) で 24 時間攪拌し、目視により溶解した状態であることを確認した。この時の溶液のpHは 6.9 であった。

この調製液をろ過しない場合と、エイジング処理 (100 mg/L 調製液の 100 mL をろ過器に入れ 20 分静置後、加圧ろ過し液を除去する操作を 1 回) を行った 0.2 μm 親水性 PTFE タイプメンブランフィルター (商品名: H020A090C、メーカー: ADVANTEC) で加圧ろ過したろ液中の被験物質濃度を HPLC 法により測定した。

また、被験物質の酸解離定数が 7.23 (25℃) と試験用水の pH に近い値であることから、pH によって被験物質の溶解性が変化することが考えられた。そこで、pH を 6.0 および 10.0 に調整した試験用水を用いて 100 mg/L 溶液を調製後、マグネチックスターラーを用いて試験温度 (24 °C) で 24 時間攪拌し、目視により溶解した状

態であることを確認した。この時の溶液の pH は 6.1 および 7.6 であった。これらについても同様に、加圧ろ過をしない場合とメンブランフィルターで加圧ろ過をしたろ液の被験物質濃度測定を行った。

3.5 試験濃度の設定

公比 $10^{1/2}$ (約 3.2) で 3 段階 (3.2 ~ 32 mg/L の範囲) の濃度設定による予備試験の結果 (付属資料-2)、96 時間後の死亡率は、最高濃度の 32 mg/L 区でも 0 % であった。この結果を基に、本試験においては公比を $10^{1/3}$ (約 1.3) とし、24, 32, 42, 56, 75, 100 mg/L 区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。

200 mg および 300 mg の被験物質を 2 L および 3 L メスフラスコにそれぞれ秤り入れ、試験用水でそれぞれ 2 L、3 L とした。これらを 2 本ずつ調製し、マグネチックスターラーを用いて試験温度 (24 °C) で 24 時間攪拌した。これらを 10 L ネジロビンに入れて混合し、100 mg/L の試験原液とした (黄色透明)。

次に、100 mg/L の試験原液 720, 960, 1260, 1680, 2250 mL をそれぞれ 3 L メスフラスコに採り、試験用水で 3 L とし、24, 32, 42, 56, 75 mg/L 区の試験溶液を調製した。100 mg/L 区は試験原液を用いた (全て軽度の黄色透明)。

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

暴露開始時と 48 時間換水前後および暴露終了時に、各試験容器の中層より試験溶液を採取し、HPLC 法により試験溶液中の被験物質濃度を測定した (ただし全て死亡し、換水を行わなかった濃度区については行わなかった)。試験溶液の分析に際しては、標準溶液の測定を行い、そのピーク面積 (カウント数) から定量した。

詳細な分析法は付属資料-3「試験溶液の分析法」(測定条件、検量線、添加回収率、保存安定性、定量下限値、検出限界値等) に示した。

2) 試験環境の測定

全試験区の水温、溶存酸素濃度、pH は暴露開始時および 24 時間毎に測定 (換水時には換水前後にも測定) した (ただし全て死亡し、換水を行わなかった濃度区に

については行わなかった)。試験水温の変動を監視するため、別に設けた試験容器および周囲の大気の温度を暴露期間中に継続して測定し記録した。

3.8 試験操作

本試験においては、供試魚は乱数を用いて各試験区に無作為に割り付け、試験容器中に1試験区当り10尾投入し、2日間の容器じゅん化を行った。

暴露開始前に、供試魚と同水槽で馴養した魚10尾の体重および全長を測定し、全長が 2.3 ± 1.2 cmの範囲内であることを確認した。その後、各試験区の試験溶液の水温、溶存酸素濃度ならびにpHを測定し、試験溶液に魚網を用いて供試魚を投入し、その時点を暴露開始時とした。

暴露期間中、給餌は行わなかった。

暴露開始直後、3, 6, 24, 48, 72 および 96 時間後に死亡個体数、ならびに観察された毒性の徴候あるいは異常の有無を記録した。鰓蓋の動きなどの観察可能な動きがなく、尾柄部に触れて反応がない場合には魚は死亡しているとみなした。観察時に死亡魚を発見した場合は、水質の悪化が起こらないよう速やかに取り除き、また死亡数を記録した。平衡、遊泳行動、呼吸機能、体色などに異常が観察された場合や、亜致死的な影響が観察された場合には記録した。

一般的に報告書に記載する症状と定義を表1に示した。その他、特異的症状(背曲がり、出血、体色変化、粘液の分泌、平衡失調、立鱗等)が観察された場合には、具体的にその旨を記載した。

観察された症状を「死亡、遊泳不能、異常遊泳、外見異常、呼吸異常、その他、正常」に分類し、それぞれの個体数が分かるように記載した。また、暴露終了時には個体別に症状の観察を行った。症状が重複している場合には個体毎にそれぞれの症状を記載した。

表1 一般的な症状と定義

分類	症状	症状の定義												
死亡	死亡	観察可能な動き（例えば鰓蓋の動きなど）がなく、尾柄部に触れて反応がない状態。												
重篤	遊泳不能	鰓蓋のみが動いているが、遊泳等の運動が停止、または極度の異常を示している状態（仮死、横臥、横転等と称される症状が相当する）												
異常	異常遊泳	<p>正常ではない異常行動を示す状態。以下の症状が含まれる。</p> <ul style="list-style-type: none"> ・上層遊泳（鼻上げを含む） ・平衡失調〔平衡感覚が失われており、背泳、スパイラル遊泳（鉛直方向）、コークスクリュー遊泳（水平方向）等を示している。〕 ・方向不定遊泳（方向感覚がなく遊泳方向が定まらない） ・過活発（活動量が増加している。興奮、狂奔等） ・不活発（活動量が低下している） ・痙攣 												
	外見異常	<p>正常ではない外見を示す状態。表面に関する異常と形態に関する異常の2つがある</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td rowspan="4" style="width: 30%; text-align: center;">表面</td> <td style="width: 20%; text-align: center;">体色</td> <td>明化、暗化</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">体表面</td> <td>出血（内出血も含む） びらん（ただれる） 粘液異常（粘液過剰分泌、粘液凝固等）</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">鱗</td> <td>立鱗（鱗が逆立つ） 脱鱗</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">鰭</td> <td>欠損</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">形態</td> <td colspan="2">背曲がり（骨折を含む） 眼球異常（眼球突出等）</td> </tr> </table>	表面	体色	明化、暗化	体表面	出血（内出血も含む） びらん（ただれる） 粘液異常（粘液過剰分泌、粘液凝固等）	鱗	立鱗（鱗が逆立つ） 脱鱗	鰭	欠損	形態	背曲がり（骨折を含む） 眼球異常（眼球突出等）	
	表面	体色		明化、暗化										
		体表面		出血（内出血も含む） びらん（ただれる） 粘液異常（粘液過剰分泌、粘液凝固等）										
		鱗		立鱗（鱗が逆立つ） 脱鱗										
		鰭	欠損											
形態	背曲がり（骨折を含む） 眼球異常（眼球突出等）													
呼吸異常	正常ではないが、鰓蓋の動きを示す状態。増加または減少がある。													
その他	上記以外の毒性症状													
正常	正常	遊泳行動、外見等に異常が見られない状態。												

4 試験結果の算出

4.1 50 % 死亡濃度 (LC₅₀) の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の減少は、揮散によるものと考えられた。従って各影響濃度 (50 % 死亡濃度、0 % 死亡最高濃度、100 % 死亡最低濃度および最大無作用濃度) の算出にあたっては時間加重平均値 (暴露開始時と 48 時間換水前、および 48 時間換水後と暴露終了時のそれぞれの測定値の幾何平均値の算術平均値) を採用した。

4.2 50 % 死亡濃度 (LC₅₀) の算出

各試験区の死亡数と供試個体数から、観察時間毎に死亡率 (%) を算出した。

次に、算出した死亡率と各試験区の被験物質濃度 (平均値) を用いて Probit 法により 24、48、72、96 時間の 50 % 死亡濃度 (LC₅₀) を算出し、95 % 信頼限界も算出した。統計ソフトは EcoTox ver. 2.6d を用いた。

4.3 0 % 死亡最高濃度および 100 % 死亡最低濃度

死亡率が 0 % である最高濃度 (0 % 死亡最高濃度) および死亡率が 100 % である最低濃度 (100 % 死亡最低濃度) を記載した。

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

認められなかった。

5.2 試験用水に対する被験物質の溶解性

フラスコ攪拌法により調製した 100 mg/L 溶液が溶解した状態であることを目視で確認した。この調製液をろ過しない場合と、エイジング処理 (100 mg/L 調製液の 100 mL をろ過器に入れ 20 分静置後、加圧ろ過し液を除去する操作を 1 回) を行った 0.2 μm 親水性 PTFE タイプメンブランフィルターで加圧ろ過したろ液の被験物質濃度を HPLC 法により測定した。その結果、被験物質濃度はろ過しない場合 99.6 mg/L (n = 1)、ろ過した場合 99.0 mg/L (n = 1) であり、この調製液は溶解していると考えられた。また、pH を 6.0 および 10.0 に調整した試験用水を用いて調製した 100 mg/L 溶液中の pH は 6.1 および 7.6 で被験物質濃度は、ろ過しない場合は 99.4 mg/L および 99.5 mg/L (各 n = 1)、ろ過した場合 98.5 mg/L および 99.1 mg/L (各 n = 1) であった。

したがって、pH 6.1 ~ 7.6 の範囲において、100 mg/L 溶液は溶解すると判断した。

5.3 被験物質濃度の測定

暴露開始時、48 時間換水前後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（ただし全て死亡し、換水を行わなかった濃度区については行わなかった）。その結果を Table 1 に示した。

暴露開始時および 48 時間後の換水時の試験溶液の被験物質濃度は、設定値の 98 ~ 101 % および 98 ~ 99 % であったが、48 時間後の換水前および暴露終了時被験物質濃度は設定値の 80 ~ 86 % および 84 ~ 88 % に減少した。これらは揮散が主因によるものと考えられた。

5.4 50 % 死亡濃度 (LC₅₀)

各観察時における死亡率を Table 2 に、50 % 死亡濃度 (LC₅₀) を Table 3 に示した。また、各観察時間の濃度-死亡率について、Figure 1 に示した。

96 時間暴露の対照区の死亡率は 0 % であり、試験成立条件を満たした。

EcoTox による統計解析の入力に用いた観察点（濃度区）は、暴露開始 72 時間後までは 51.3 ~ 90.1 mg/L、96 時間後は 38.5 ~ 90.1 mg/L [死亡率が 0 % であった区が複数あり、採用する区を検討し、回帰式の適合度が最も高くなる観察点を選択した（付属資料-4）] で、結論を以下に示した。

24 時間 50 % 死亡濃度 (LC₅₀) :
75 mg/L (95 % 信頼限界 69 ~ 83 mg/L) , Probit

48 時間 50 % 死亡濃度 (LC₅₀) :
70 mg/L (95 % 信頼限界 62 ~ 79 mg/L) , Probit

72 時間 50 % 死亡濃度 (LC₅₀) :
68 mg/L (95 % 信頼限界 60 ~ 77 mg/L) , Probit

96 時間 50 % 死亡濃度 (LC₅₀) :
64 mg/L (95 % 信頼限界 57 ~ 72 mg/L) , Probit

5.5 0 % 死亡最高濃度、100 % 死亡最低濃度および最大無作用濃度

0 % 死亡最高濃度、100 % 死亡最低濃度および最大無作用濃度を Table 4 および以下に示した。

0 % 死亡最高濃度 : 38 mg/L

100 % 死亡最低濃度 : 90 mg/L

最大無作用濃度 : 29 mg/L

5.6 毒性症状

暴露期間中に観察された個体毎の毒性症状を表 2 および Table 5 に示した。

表 2. 暴露期間中の観察結果(1)

設定濃度 (mg/L)	区分	観察時間					
		3 時間	6 時間	24 時間	48 時間	72 時間	96 時間
対照区	死亡 (累積)	0	0	0	0	0	0
	正常	10	10	10	10	10	10
24	死亡 (累積)	0	0	0	0	0	0
	重篤	0	0	0	0	0	0
	異常	0	0	0	0	0	0
	正常	10	10	10	10	10	10
32	死亡 (累積)	0	0	0	0	0	0
	重篤	0	0	0	0	0	0
	異常	0	0	0	0	0	0
	正常	10	10	10	10	10	10
42	死亡 (累積)	0	0	0	0	0	0
	重篤	0	0	0	0	0	0
	異常	0	0	0	0	1 (上層遊泳)	1 (上層遊泳)
	正常	10	10	10	10	9	9
56	死亡 (累積)	0	0	0	0	0	1
	重篤	0	0	0	0	0	0
	異常	2 (上層遊泳)	2 (上層遊泳)	3 (上層遊泳)	3 (上層遊泳)	8 (上層遊泳)	7 (上層遊泳)
	正常	8	8	7	7	2	2

表2. 暴露期間中の観察結果(1)つづき

設定濃度 (mg/L)	区分	観察時間					
		3 時間	6 時間	24 時間	48 時間	72 時間	96 時間
75	死亡 (累積)	0	0	1	4	5	6
	重篤	0	0	3 (横臥)	4 (横転:3 横臥:1)	5 (横転:1 横臥:4)	4 (横転:1 横臥:3)
	異常	9 (上層遊泳)	9 (上層遊泳)	6 (上層遊泳:4 平行失調:2)	2 (上層遊泳)	0	0
	正常	1	1	0	0	0	0
100	死亡 (累積)	0	9	10	10	10	10
	重篤	5 (横転:1 横臥:4)	0	0	0	0	0
	異常	5 (上層遊泳)	1 (上層遊泳)	0	0	0	0
	正常	0	0	0	0	0	0

5.7 試験溶液の水温、溶存酸素濃度および pH

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

96 時間の暴露期間中の水温は 23.9 ~ 24.2 °C の範囲内であり、暴露期間中の変動は 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内の水温は 24±1°C の範囲内であった。

溶存酸素濃度は 7.2 ~ 8.2 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 (24.0 °C の飽和溶存酸素濃度 : 8.25 mg/L) 、試験成立条件を満たした。

pH は被験物質濃度に依存して低下し、対照区では 暴露期間中 7.7 ~ 8.0 の範囲内であり、75 mg/L 区では 7.2 ~ 7.6 の範囲内であった。暴露期間中の同一容器内の変動は 1.0 以内であった。

5.8 試験溶液の pH 変動による毒性への影響

死亡が認められた 56 ~ 100 mg/L 区の暴露開始時の pH は酸解離定数 7.23 (25°C) (文献値) とほぼ同じで、pH 7.6 程度まで徐々に上昇する傾向が見られたことから、被験物質は、解離型の割合が更に増加していることが示唆された。そこで、75、100 mg/L 区において、試験液の pH を 8.0 に調整し、解離型の割合が増加した場合にヒメダカへの毒性が強くなるのか否かを確認した。その結果を以下に示した。

設定濃度 (mg/L)	pH			累積死亡数(死亡率 %)	
	暴露開始時	48 時間 換水前/換水後	暴露終了時	48 時間	96 時間
75	7.1	7.3 / 7.0	7.4	8/10 (80)	9/10 (90)
	8.0(pH調整)	7.5 / 8.0	7.6	0/10 (0)	0/10 (0)
100	7.0	7.3 / -	-	10/10 (100)	10/10 (100)
	8.0(pH調整)	7.6 / 8.0	7.8	5/10 (50)	5/10 (50)

* 上段 : pH 調整なし / 下段 : 初期 pH を変動後の pH に調整

暴露開始時に pH を変動後の pH (8.0) に調整した場合、毒性の軽減が認められた。以上の結果より、本試験中に試験溶液の pH が上昇したことから、ヒメダカに対する毒性は弱まり、毒性が弱く算出された可能性が示唆された。

5.9 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 Test Substance in Test Solution

(Semi-Static Condition)

Nominal Concentration (mg/L)	Measured Concentration, mg/L (Percent of Nominal)						Mean ^a Measured Concentration (mg/L)		
	0 Hour		48 Hours			96 Hours			
	new	old	old	new	old	old			
Control	<0.04	(-)	<0.04	(-)	<0.04	(-)	<0.04	(-)	-
24	24.0	(100)	20.6	(86)	23.8	(99)	21.0	(88)	22.3
32	31.4	(98)	27.2	(85)	31.6	(99)	27.8	(87)	29.4
42	41.9	(100)	35.7	(85)	41.3	(98)	35.5	(85)	38.5(38.48)
56	56.2	(100)	47.1	(84)	55.3	(99)	47.4	(85)	51.3
75	76.0	(101)	61.2	(82)	74.3	(99)	62.7	(84)	68.2
100	101	(101)	80.3	(80)	D	(-)	D	(-)	90.1

new : Freshly prepared test solutions

old : Test solutions after 48 hours exposure

a : Time-weighted mean

D : All fish were dead at this observation time

Table 2. The Numbers of Dead Fish (Mortality)

(Semi-Static Condition)

Nominal Concentration (mg/L)	Mean ^a Measured Concentration (mg/L)	Cumulative Mortality (Percent Mortality)			
		24 Hours	48 Hours	72 Hours	96 Hours
Control	-	0/10 (0)	0/10 (0)	0/10 (0)	0/10 (0)
24	22.3	0/10 (0)	0/10 (0)	0/10 (0)	0/10 (0)
32	29.4	0/10 (0)	0/10 (0)	0/10 (0)	0/10 (0)
42	38.5	0/10 (0)	0/10 (0)	0/10 (0)	0/10 (0)
56	51.3	0/10 (0)	0/10 (0)	0/10 (0)	1/10 (10)
75	68.2	1/10 (10)	4/10 (40)	5/10 (50)	6/10 (60)
100	90.1	10/10 (100)	10/10 (100)	10/10 (100)	10/10 (100)

a : Time-weighted mean

Table 3. Calculated LC₅₀ Values

Exposure Period (Hours)	LC ₅₀ (mg/L)	95 % Confidence Limits (mg/L)	Statistical Method
24	75	69 - 83	Probit
48	70	62 - 79	Probit
72	68	60 - 77	Probit
96	64	57 - 72	Probit

Table 4. The Highest Concentration in 0 % Mortality, the Lowest Concentration in 100 % Mortality and No Observed Effect Concentration

Exposure Period (Hours)	Highest Concentration in 0 % Mortality (mg/L)	Lowest Concentration in 100 % Mortality (mg/L)	No Observed Effect Concentration (mg/L)
24	51	90	38
48	51	90	38
72	51	90	29
96	38	90	29

Table 5. Observed Toxic Symptoms

(Semi-Static Condition)

Nominal Concentration (mg/L)	Mean ^a Measured Concentration (mg/L)	Toxic Symptoms					
		3 Hours	6 Hours	24 Hours	48 Hours	72 Hours	96 Hours
Control	-	N	N	N	N	N	N
24	22.3	N	N	N	N	N	N
32	29.4	N	N	N	N	N	N
42	38.5	N	N	N	N	N(9), AS(1)	N(9), AS(1)
56	51.3	N(8), AS(2)	N(8), AS(2)	N(7), AS(3)	N(7), AS(3)	N(2), AS(8)	N(2), AS(7)
75	68.2	N(1), AS(9)	N(1), AS(9)	AS(6), C(3)	AS(2), C(4)	C(5)	C(4)
100	90.1	AS(5), C(5)	AS(1)	D	D	D	D

a : Time-weighted mean

N : No toxic symptom was observed (Normal)

C : Critical (Immobile)

AS : Abnormal swimming

D : All fish were dead

Table 6. Temperature

(Semi-Static Condition)

Nominal Concentration (mg/L)	Mean ^a Measured Concentration (mg/L)	Temperature, °C					
		0 Hour new	24 Hours	48 Hours		72 Hours	96 Hours old
				old	new		
Control	-	24.0	23.9	23.9	24.2	24.0	24.0
24	22.3	24.2	23.9	23.9	24.2	24.0	24.0
32	29.4	24.2	23.9	23.9	24.2	24.0	24.0
42	38.5	24.2	23.9	23.9	24.2	24.0	24.0
56	51.3	24.2	23.9	23.9	24.2	24.0	24.0
75	68.2	24.2	23.9	23.9	24.2	24.0	24.0
100	90.1	24.2	23.9	NM	NM	NM	NM

- a : Time-weighted mean
- new : Freshly prepared test solutions
- old : Test solutions after 48 hours exposure
- NM : Not measured (All fish were dead)

Table 7. Dissolved Oxygen Concentrations

(Semi-Static Condition)

Nominal Concentration (mg/L)	Mean ^a Measured Concentration (mg/L)	Dissolved Oxygen Concentration, mg/L					
		0 Hour	24 Hours	48 Hours		72 Hours	96 Hours
				new	old		
Control	-	8.2	7.5	7.3	8.2	7.7	7.5
24	22.3	8.2	7.5	7.2	8.2	7.8	7.6
32	29.4	8.2	7.4	7.2	8.2	7.7	7.4
42	38.5	8.2	7.4	7.2	8.2	7.9	7.7
56	51.3	8.2	7.4	7.2	8.2	7.8	7.5
75	68.2	8.2	7.3	7.2	8.2	7.9	7.6
100	90.1	8.2	7.9	NM	NM	NM	NM

- a : Time-weighted mean
- new : Freshly prepared test solutions
- old : Test solutions after 48 hours exposure
- NM : Not measured (All fish were dead)

Table 8. pH Values

(Semi-Static Condition)

Nominal Concentration (mg/L)	Mean ^a Measured Concentration (mg/L)	pH					
		0 Hour new	24 Hours	48 Hours		72 Hours	96 Hours
				old	new		
Control	-	8.0	7.8	7.8	8.0	7.7	7.8
24	22.3	7.5	7.6	7.7	7.6	7.6	7.7
32	29.4	7.5	7.6	7.6	7.5	7.5	7.6
42	38.5	7.4	7.5	7.6	7.4	7.5	7.6
56	51.3	7.3	7.5	7.6	7.3	7.5	7.6
75	68.2	7.2	7.4	7.6	7.3	7.4	7.5
100	90.1	7.2	7.4	NM	NM	NM	NM

a : Time-weighted mean

new : Freshly prepared test solutions

old : Test solutions after 48 hours exposure

NM : Not measured (All fish were dead)

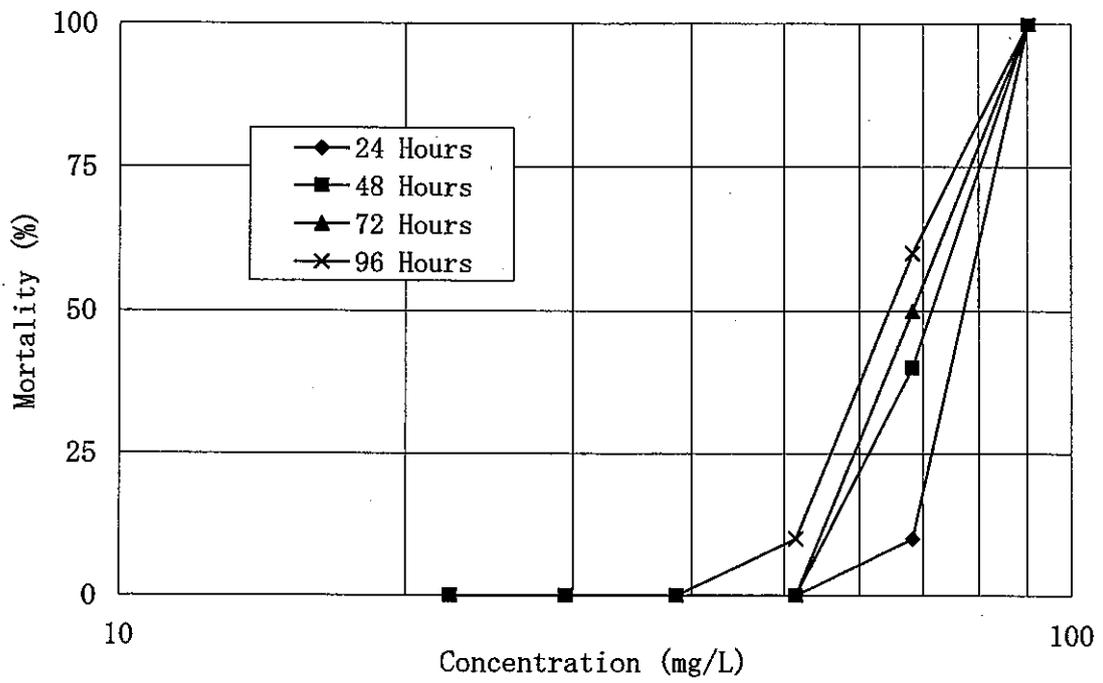


Figure 1. Concentration-Response (Mortality) Curves

付 属 資 料 - 1

試 験 用 水 の 水 質

Table A-1 Water Quality of Dilution Water

Parameter	Concentration
BOD	<0.5 mg/L
COD	<0.5 mg/L
Total phosphorus	<0.02 mg/L
pH	7.5 (26.4 °C)
Coliform group bacteria	N. D.
Mercury	<0.0005 mg/L
Copper	<0.01 mg/L
Cadmium	<0.002 mg/L
Zinc	<0.01 mg/L
Lead	<0.005 mg/L
Aluminium	<0.02 mg/L
Nickel	<0.005 mg/L
Chromium	<0.05 mg/L
Manganese	<0.02 mg/L
Tin	<0.1 mg/L
Iron	<0.1 mg/L
Cyanide	<0.1 mg/L
Free chlorine	<0.05 mg/L
Bromide	<0.2 mg/L
Fluoride	0.04 mg/L
Sulfide	<0.5 mg/L
Total ammonium	<0.03 mg/L
Arsenic	<0.005 mg/L
Selenium	<0.005 mg/L
Evaporation residue	68 mg/L
Electric conductivity	10.3 mS/m
Total hardness (as CaCO ₃)	34 mg/L
Alkalinity	30 mg/L
Sodium	5.6 mg/L
Potassium	1.4 mg/L
Calcium	10.0 mg/L
Magnesium	2.2 mg/L

Date of measurement: August 20, 2009

付 属 資 料 - 2

予 備 試 験 の 結 果

Table B-1. The Numbers of Dead Fish (Mortality)
(Range Finding Test)

Nominal Concentration (mg/L)	Cumulative Mortality (Percent Mortality)			
	24 Hours	48 Hours	72 Hours	96 Hours
Control	0/5 (0)	0/5 (0)	0/5 (0)	0/5 (0)
3.2	0/5 (0)	0/5 (0)	0/5 (0)	0/5 (0)
10	0/5 (0)	0/5 (0)	0/5 (0)	0/5 (0)
32	0/5 (0)	0/5 (0)	0/5 (0)	0/5 (0)

Table B-2. Measured Concentration of the Test Substance in Test Solution
(Range Finding Test)

Nominal Concentration (mg/L)	Measured Concentration (mg/L)			
	0 Hour	48 Hours		96 Hours
	new	old	new	old
Control	<0.04	<0.04	<0.04	<0.04
3.2	3.11	2.77	3.16	2.93
10	9.85	9.01	9.90	9.03
32	31.9	29.0	31.7	29.0

new : Freshly prepared test solutions

old : Test solutions after 48 hours exposure

Table B-3. Observed Toxic Symptoms
(Range Finding Test)

(Semi-Static Condition)

Nominal Concentration (mg/L)	Toxic Symptoms			
	24 Hours	48 Hours	72 Hours	96 Hours
Control	N	N	N	N
3.2	N	N	N	N
10	N	N	N	N
32	N	N	N	N

N : No toxic symptom was observed

付 属 資 料 ー 3

試 験 溶 液 の 分 析 法

o-ニトロフェノール分析法

1. 分析方法

(1) 分析法の概要

検量線の濃度範囲に入るように試験溶液を希釈後、その一定量を 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溶液の検量線から希釈液の濃度を求め、希釈倍率を換算することで試験溶液中の被験物質の濃度を算出する。

(2) 装置および器具

a) 高速液体クロマトグラフ	: LC-9A 型	島津製作所
b) 分離カラム	: L-column ODS, 250 mm×4.6 mm φ	化学物質評価研究機構
c) カラム恒温槽	: CTO-6A 型	島津製作所
d) UV 検出器	: SPD-6A 型	島津製作所
e) オートサンプラー	: SIL-6B 型	島津製作所
f) データ処理装置	: C-R5A 型	島津製作所
g) 化学天秤	: AE-166 型	メトラー
h) 超音波洗浄器	: VS-100III 8200 型	井内
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 50, 100 mL	柴田科学
l) ホールピペット	: 容量 2.5, 5, 10 mL	柴田科学
m) コマゴメピペット	: 容量 10 mL	柴田科学

(3) 試薬

a) o-ニトロフェノール	: 純度 99.9 %、ロット番号	
b) 純水	: 純水製造装置で調製	
c) メタノール	: 高速液体クロマトグラフ用	和光純薬
d) リン酸二水素カリウム	: 特級	関東化学

(4) 試薬の調製

- a) 緩衝溶液 [1/15 mol/L リン酸二水素カリウム水溶液]
リン酸二水素カリウム 9.07 g を純水に溶かし 1000 mL とする。(pH 約5.0 程度)
- b) 溶離液 [メタノール/緩衝溶液 (50 / 50)]
メタノール 500 mL と緩衝溶液 500 mL をそれぞれメスシリンダーで取りリザー

パー瓶に混合して調製する。(pH 約 5.7 程度) 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。

c) 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。これにメタノールを加えて溶解し 100 mL とする。

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. HPLC測定条件」に記載する分析条件で HPLCを作動し、装置を安定させる。
- b) 「3. 検量線の作成」に記載する方法で検量線の標準液を調製する。
- c) 検量線の標準液および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試験溶液 20 μ L を HPLC に注入しクロマトグラムおよびピーク面積(カウント数)を得る。
- d) 検量線により濃度を求め、希釈率で換算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 : L-column ODS, 250 mm \times 4.6 mm ϕ
- (2) 恒温槽温度 : 40 $^{\circ}$ C
- (3) 溶離液 : メタノール/緩衝溶液 (50/50)
- (4) 流量 : 1.1 mL/min
- (5) 検出波長 : UV 212 nm
- (6) 注入量 : 20 μ L

3. 検量線の作成

- (1) 被験物質標準原液 (1018 mg/L) 5 mL を 50 mL メスフラスコに正確に分取し、純水で 50 mL とし、101.8 mg/L 溶液を調製する。この溶液より 2.5, 5.0 mL をそれぞれ 50 mL メスフラスコに正確に分取し、純水を用いて 50 mL とし、5.090 mg/L、10.18 mg/L 標準溶液を調製する。さらに、10.18 mg/L 標準溶液より 5 mL を 50 mL メスフラスコに正確に分取し、純水を用いて 50 mL とし、1.018 mg/L 標準溶液を調製する。
- (2) 各標準溶液について 20 μ L を HPLC に注入し、データ処理装置からクロマトグラムおよびピーク面積(カウント数)を得る。被験物質濃度を横軸に、ピーク面積を縦軸にとり検量線を作成する。この時の回帰式の寄与率 (R^2) も算出する。

表1 検量線に使用したデータ例

No.	被験物質濃度 (mg/L)	ピーク面積 ($\mu\text{V} \cdot \text{sec}$)
1	0	0
2	1.018	71508
3	5.090	363476
4	10.18	734745

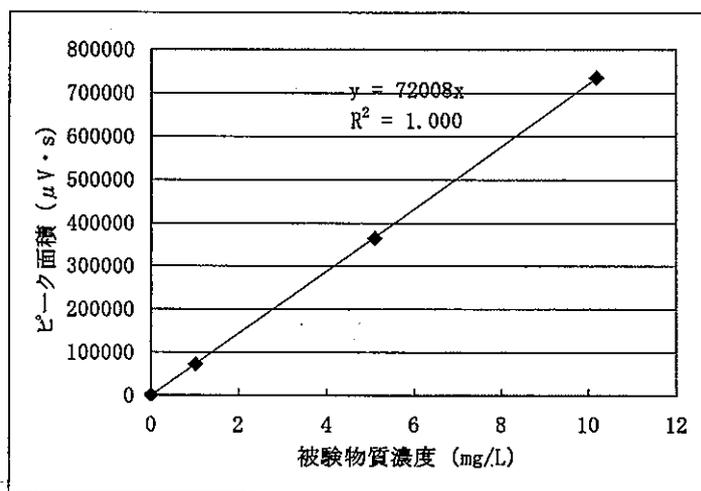


図1 検量線例

4. 添加回収率

被験物質標準原液 (1012 mg/L) を試験用水に添加し、濃度が 1.012 mg/L、10.12 mg/L、101.2 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 ~ 102 %であった。

表2 添加回収率

試料濃度 (mg/L)	n	測定値 (mg/L)	測定値平均 (mg/L)	回収率 (%)
1.012	1	0.9966	0.998	99
	2	0.9998		
10.12	1	10.20	10.2	101
	2	10.28		
101.2	1	103.0	103	102
	2	102.4		

5. 保存安定性

「4. 添加回収率」で調製した 3 濃度の試料溶液 (0.998 mg/L、10.2 mg/L、103 mg/L) を、密閉・遮光条件において 2 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。2 日間冷蔵庫保存液の濃度維持率は 100 ~ 102 %であった。

表3 保存安定性

開始時測定値 (mg/L)	2 日後			
	n	測定値 (mg/L)	測定値平均 (mg/L)	濃度維持率 (%)
0.998	1	1.004	1.00	100
	2	1.003		
10.2	1	10.36	10.4	102
	2	10.42		
103	1	104.1	104	101
	2	104.1		

6. 定量下限値および検出限界値

被験物質濃度 1.012 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 0.04 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	1.005
2	1.001
3	1.006
4	1.003
5	1.010
6	1.004
7	1.010
平均値	1.005
標準偏差 (σ_{n-1})	0.0034

定量下限値 = $0.0034 \times 10 \approx 0.04$ mg/L

検出限界値 = $0.0034 \times 3 \approx 0.02$ mg/L

付属資料 - 4

統計解析結果
(EcoTox ver. 2.6d)

魚類 急性毒性試験

2008-生44_オ-ニトロフェノ-ル

ファイル名= 2030039

更新日: 2009/09/29

区	濃度		連	実測数(影響・死亡)				
	mg/L	(log)		0	24	48	72	96 hour
1	0	(-)	1	10	0	0	0	0
2	22.3	(1.35)	1	10	0	0	0	0
3	29.4	(1.47)	1	10	0	0	0	0
4	38.5	(1.59)	1	10	0	0	0	0
5	51.3	(1.71)	1	10	0	0	0	1
6	68.2	(1.83)	1	10	1	4	5	6
7	90.1	(1.95)	1	10	10	10	10	10

[対照に対する] 割合 (%)

区	濃度		影響・死亡			
	mg/L	(log)	24	48	72	96 hour
1	22.3	(1.35)	0.00	0.00	0.00	0.00
2	29.4	(1.47)	0.00	0.00	0.00	0.00
3	38.5	(1.59)	0.00	0.00	0.00	0.00
4	51.3	(1.71)	0.00	0.00	0.00	10.00
5	68.2	(1.83)	10.00	40.00	50.00	60.00
6	90.1	(1.97)	100.00	100.00	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	72	96 hour
1	22.3	(1.35)	10.00	---	---	---	---
2	29.4	(1.47)	10.00	---	---	---	---
3	38.5	(1.59)	10.00	---	---	---	0.10
4	51.3	(1.71)	10.00	0.10	0.10	0.10	1.00
5	68.2	(1.83)	10.00	1.00	4.00	5.00	6.00
6	90.1	(1.95)	10.00	9.90	9.90	9.90	9.90

2008-生44_オ-ニトロフェノ-ル

魚類 急性毒性試験 観察回数=5 濃度区数=7(mg/L)

繰り返し数 = 1, 1, 1, 1, 1, 1, 1

データファイル: 2030039 更新日: 2009/12/12

生物量

濃度	線返し	0	24	48	72	96	hour
0	(1)	10.000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	
22.3	(1)	10.000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	
29.4	(1)	10.000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	
38.5	(1)	10.000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	
51.3	(1)	10.000	0.0000	0.0000	0.0000	1.0000	
68.2	(1)	10.000	1.0000	4.0000	5.0000	6.0000	
90.1	(1)	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	

生物量 (%)

濃度	24	48	72	96	hour
22.3	0.00	0.00	0.00	0.00	
29.4	0.00	0.00	0.00	0.00	
38.5	0.00	0.00	0.00	0.00	
51.3	0.00	0.00	0.00	10.00	

68.2	10.00	40.00	50.00	60.00
90.1	100.00	100.00	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 =====

収束せず

●● 24h 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)
51.3	10.00	0.100	0.01	1.000	1.710
68.2	10.00	1.000	0.10	1.000	1.834
90.1	10.00	9.900	0.99	1.000	1.955

◎ 回帰式の適合度の検定 χ^2 値(P=0.05, df=1)= 3.841 (P=0.01, df=1)= 6.635

X²乗 (逸脱度) = 1.433 < 3.841 適合する

X²乗 (ピアソン) = 12.33 >= 6.635 ** 適合が悪い

AIC = 14.18

◎ 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	-42.38	11.62	-3.648
log(Conc.)	22.58	6.202	3.641

WALD検定 X²値=13.255 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)
51.3	0.100	8.E-4	0.099	0.010	8.E-5	0.010
68.2	1.000	1.653	-0.653	0.100	0.165	-0.065
90.1	9.900	9.606	0.294	0.990	0.961	0.029

◎ 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
51.3	3.240	0.109	0.872	3.434	0.924	3.638
68.2	30.40	0.928	-0.592	-0.556	-2.201	-2.066
90.1	115.0	0.963	0.568	0.478	2.966	2.496

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

log(EC90)	= 1.8201	(95% Range: 1.7617 - 1.8360)
EC90 (mg/L)	= 66.086	(95% Range: 57.765 - 68.545)
log(EC80)	= 1.8396	(95% Range: 1.7887 - 1.8638)
EC80 (mg/L)	= 69.118	(95% Range: 61.476 - 73.082)
log(EC50)	= 1.8769	(95% Range: 1.8404 - 1.9171)
EC50 (mg/L)	= 75.312	(95% Range: 69.252 - 82.615)
log(EC20)	= 1.9141	(95% Range: 1.8922 - 1.9703)
EC20 (mg/L)	= 82.062	(95% Range: 78.012 - 93.392)
log(EC10)	= 1.9336	(95% Range: 1.9192 - 1.9981)
EC10 (mg/L)	= 85.827	(95% Range: 83.023 - 99.573)

●● 48h 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)
51.3	10.00	0.100	0.01	1.000	1.710
68.2	10.00	4.000	0.40	1.000	1.834
90.1	10.00	9.900	0.99	1.000	1.955

◎ 回帰式の適合度の検定 χ^2 値(P=0.05, df=1)= 3.841 (P=0.01, df=1)= 6.635
 X2乗 (逸脱度) = 0.089 < 3.841 適合する
 X2乗 (ピアソン) = 0.100 < 3.841 適合する
 AIC = 19.79

◎ 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	-35.70	12.90	-2.768
log(Conc.)	19.36	6.994	2.768

WALD検定 X2値=7.662 自由度=1 有意確率=0.006

◎ 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)
51.3	0.100	0.047	0.053	0.010	0.005	0.005
68.2	4.000	4.195	-0.195	0.400	0.420	-0.020
90.1	9.900	9.838	0.062	0.990	0.984	0.006

◎ 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
51.3	0.033	0.400	0.213	0.245	0.275	0.316
68.2	0.270	0.843	-0.126	-0.125	-0.317	-0.316
90.1	0.155	0.756	0.168	0.156	0.341	0.316

=====EC90%、80%、EC50%、20%、10%の推定=====

log(EC90)	= 1.7781	(95% Range: 1.7283 - 1.8279)
EC90(mg/L)	= 59.990	(95% Range: 53.488 - 67.281)
log(EC80)	= 1.8008	(95% Range: 1.7074 - 1.8083)
EC80(mg/L)	= 63.213	(95% Range: 50.979 - 64.314)
log(EC50)	= 1.8443	(95% Range: 1.7934 - 1.8967)
EC50(mg/L)	= 69.867	(95% Range: 62.138 - 78.833)
log(EC20)	= 1.8877	(95% Range: 1.8793 - 1.9851)
EC20(mg/L)	= 77.223	(95% Range: 75.739 - 96.628)
log(EC10)	= 1.9105	(95% Range: 1.8569 - 1.9640)
EC10(mg/L)	= 81.371	(95% Range: 71.935 - 92.045)

●● 72h Effect E(L)C50 計算 収束までの反復回数=3 ●●

◎ デザイン行列

濃度	n	y	y/n	Const.	log10(C)
51.3	10.00	0.100	0.01	1.000	1.710
68.2	10.00	5.000	0.50	1.000	1.834
90.1	10.00	9.900	0.99	1.000	1.955

◎ 回帰式の適合度の検定 χ^2 値(P=0.05, df=1)= 3.841 (P=0.01, df=1)= 6.635
 X2乗 (逸脱度) = 8.E-4 < 3.841 適合する
 X2乗 (ピアソン) = 8.E-4 < 3.841 適合する
 AIC = 20.10

◎ 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	-34.88	12.53	-2.784
log(Conc.)	19.02	6.828	2.786

WALD検定 X2値=7.762 自由度=1 有意確率=0.005

◎ 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)
51.3	0.100	0.094	0.006	0.010	0.009	6.E-4
68.2	5.000	5.019	-0.019	0.500	0.502	-0.002
90.1	9.900	9.894	0.006	0.990	0.989	6.E-4

◎ 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
51.3	6.E-4	0.584	0.018	0.018	0.028	0.028
68.2	0.002	0.816	-0.012	-0.012	-0.028	-0.028
90.1	6.E-4	0.600	0.018	0.018	0.028	0.028

=====EC90%、80%、EC50%、20%、10%の推定=====

log(EC90)	=	1.7662	(95% Range: 1.7162 - 1.8162)
EC90 (mg/L)	=	58.366	(95% Range: 52.018 - 65.490)
log(EC80)	=	1.7893	(95% Range: 1.6943 - 1.7957)
EC80 (mg/L)	=	61.559	(95% Range: 49.469 - 62.470)
log(EC50)	=	1.8335	(95% Range: 1.7807 - 1.8845)
EC50 (mg/L)	=	68.161	(95% Range: 60.350 - 76.650)
log(EC20)	=	1.8778	(95% Range: 1.8670 - 1.9734)
EC20 (mg/L)	=	75.471	(95% Range: 73.623 - 94.050)
log(EC10)	=	1.9009	(95% Range: 1.8471 - 1.9547)
EC10 (mg/L)	=	79.598	(95% Range: 70.320 - 90.102)

●● 96h 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)
38.5	10.00	0.100	0.01	1.000	1.585
51.3	10.00	1.000	0.10	1.000	1.710
68.2	10.00	6.000	0.60	1.000	1.834
90.1	10.00	9.900	0.99	1.000	1.955

◎ 回帰式の適合度の検定 χ^2 値(P=0.05, df=2)= 5.991 (P=0.01, df=2)= 9.210
X2乗 (逸脱度) = 0.370 < 5.991 適合する
X2乗 (ピアソン) = 0.482 < 5.991 適合する
AIC = 26.57

◎ 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	-23.40	6.387	-3.670
log(Conc.)	12.95	3.526	3.674

WALD検定 X2値=13.496 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)
38.5	0.100	0.021	0.079	0.010	0.002	0.008
51.3	1.000	1.048	-0.048	0.100	0.105	-0.005
68.2	6.000	6.358	-0.358	0.600	0.636	-0.036
90.1	9.900	9.722	0.178	0.990	0.972	0.018

◎ 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
38.5	0.030	0.144	0.397	0.554	0.430	0.599
51.3	0.011	0.721	-0.050	-0.050	-0.095	-0.094
68.2	0.098	0.592	-0.233	-0.235	-0.366	-0.368
90.1	0.153	0.543	0.394	0.343	0.583	0.507

=====EC90%、80%、EC50%、20%、10%の推定=====

log(EC90)	=	1.7080	(95% Range: 1.6184 - 1.7189)
EC90(mg/L)	=	51.055	(95% Range: 41.533 - 52.349)
log(EC80)	=	1.7420	(95% Range: 1.6649 - 1.7674)
EC80(mg/L)	=	55.208	(95% Range: 46.225 - 58.531)
log(EC50)	=	1.8070	(95% Range: 1.7538 - 1.8601)
EC50(mg/L)	=	64.118	(95% Range: 56.729 - 72.466)
log(EC20)	=	1.8720	(95% Range: 1.8427 - 1.9529)
EC20(mg/L)	=	74.467	(95% Range: 69.619 - 89.719)
log(EC10)	=	1.9059	(95% Range: 1.8892 - 2.0014)
EC10(mg/L)	=	80.525	(95% Range: 77.483 - 100.31)

===== ロジット関数 =====

●● 24h 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)
51.3	10.00	0.100	0.01	1.000	1.710
68.2	10.00	1.000	0.10	1.000	1.834
90.1	10.00	9.900	0.99	1.000	1.955

◎ 回帰式の適合度の検定 χ^2 値(P=0.05, df=1)= 3.841 (P=0.01, df=1)= 6.635

X²乗 (逸脱度) = 0.591 < 3.841 適合する

X²乗 (ピアソン) = 2.943 < 3.841 適合する

AIC = 13.33

◎ 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	-91.37	37.26	-2.452
log(Conc.)	48.73	20.11	2.423

WALD検定 X²値=5.872 自由度=1 有意確率=0.015

◎ 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)
51.3	0.100	0.003	0.097	0.010	3.E-4	0.010
68.2	1.000	1.196	-0.196	0.100	0.120	-0.020
90.1	9.900	9.801	0.099	0.990	0.980	0.010

◎ 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
51.3	0.044	0.029	0.701	1.690	0.711	1.716
68.2	117.7	0.988	-0.196	-0.191	-1.759	-1.716
90.1	84.86	0.983	0.248	0.224	1.896	1.716

=====EC90%、80%、EC50%、20%、10%の推定=====

log(EC90)	=	1.8297	(95% Range: 1.7082 - 1.8655)
EC90(mg/L)	=	67.557	(95% Range: 51.071 - 73.364)

log(EC80) = 1.8463 (95% Range: 1.7556 - 1.9143)
 EC80 (mg/L) = 70.195 (95% Range: 56.961 - 82.096)
 log(EC50) = 1.8748 (95% Range: 1.8366 - 1.9978)
 EC50 (mg/L) = 74.947 (95% Range: 68.647 - 99.497)
 log(EC20) = 1.9032 (95% Range: 1.8214 - 1.9850)
 EC20 (mg/L) = 80.020 (95% Range: 66.280 - 96.608)
 log(EC10) = 1.9198 (95% Range: 1.8373 - 2.0024)
 EC10 (mg/L) = 83.145 (95% Range: 68.755 - 100.55)

●● 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)
51.3	10.00	0.100	0.01	1.000	1.710
68.2	10.00	4.000	0.40	1.000	1.834
90.1	10.00	9.900	0.99	1.000	1.955

◎ 回帰式の適合度の検定 χ^2 値(P=0.05, df=1)= 3.841 (P=0.01, df=1)= 6.635

X2乗 (逸脱度) = 0.037 < 3.841 適合する

X2乗 (ピアソン) = 0.040 < 3.841 適合する

AIC = 19.74

◎ 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	-70.49	34.06	-2.070
log(Conc.)	38.24	18.53	2.063

WALD検定 X2値=4.256 自由度=1 有意確率=0.039

◎ 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)
51.3	0.100	0.061	0.039	0.010	0.006	0.004
68.2	4.000	4.080	-0.080	0.400	0.408	-0.008
90.1	9.900	9.860	0.040	0.990	0.986	0.004

◎ 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
51.3	0.011	0.358	0.147	0.161	0.183	0.201
68.2	0.287	0.935	-0.051	-0.051	-0.201	-0.201
90.1	0.049	0.708	0.114	0.108	0.212	0.201

=====EC90%、80%、EC50%、20%、10%の推定=====

log(EC90) = 1.7861 (95% Range: 1.6717 - 1.9004)
 EC90 (mg/L) = 61.102 (95% Range: 46.955 - 79.512)
 log(EC80) = 1.8073 (95% Range: 1.6915 - 1.9230)
 EC80 (mg/L) = 64.160 (95% Range: 49.151 - 83.753)
 log(EC50) = 1.8435 (95% Range: 1.7827 - 2.0188)
 EC50 (mg/L) = 69.746 (95% Range: 60.629 - 104.42)
 log(EC20) = 1.8798 (95% Range: 1.7594 - 2.0002)
 EC20 (mg/L) = 75.819 (95% Range: 57.464 - 100.04)
 log(EC10) = 1.9010 (95% Range: 1.7792 - 2.0227)
 EC10 (mg/L) = 79.613 (95% Range: 60.152 - 105.37)

●● 72h Effect E(L)C50 計算 収束までの反復回数=3 ●●

◎ デザイン行列

濃度	n	y	y/n	Const.	log10(C)
51.3	10.00	0.100	0.01	1.000	1.710
68.2	10.00	5.000	0.50	1.000	1.834
90.1	10.00	9.900	0.99	1.000	1.955

◎ 回帰式の適合度の検定 χ^2 値(P=0.05, df=1)= 3.841 (P=0.01, df=1)= 6.635

X2乗 (逸脱度) = 5.E-4 < 3.841 適合する

X2乗 (ピアソン) = 5.E-4 < 3.841 適合する

AIC = 20.10

◎ 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	-68.90	33.72	-2.044
log(Conc.)	37.58	18.38	2.045

WALD検定 X2値=4.180 自由度=1 有意確率=0.041

◎ 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)
51.3	0.100	0.095	0.005	0.010	0.010	5.E-4
68.2	5.000	5.009	-0.009	0.500	0.501	-9E-4
90.1	9.900	9.895	0.005	0.990	0.990	5.E-4

◎ 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
51.3	3.E-4	0.525	0.015	0.015	0.022	0.022	
68.2	0.003	0.927	-0.006	-0.006	-0.022	-0.022	
90.1	3.E-4	0.548	0.015	0.015	0.022	0.022	

=====EC90%、80%、EC50%、20%、10%の推定=====

log(EC90)	= 1.7752	(95% Range: 1.6670 - 1.8834)
EC90(mg/L)	= 59.595	(95% Range: 46.456 - 76.450)
log(EC80)	= 1.7968	(95% Range: 1.6873 - 1.9063)
EC80(mg/L)	= 62.631	(95% Range: 48.675 - 80.589)
log(EC50)	= 1.8337	(95% Range: 1.7172 - 1.9407)
EC50(mg/L)	= 68.184	(95% Range: 52.145 - 87.232)
log(EC20)	= 1.8706	(95% Range: 1.7566 - 1.9846)
EC20(mg/L)	= 74.230	(95% Range: 57.095 - 96.506)
log(EC10)	= 1.8922	(95% Range: 1.7769 - 2.0075)
EC10(mg/L)	= 78.011	(95% Range: 59.823 - 101.73)

●● 96h 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)
38.5	10.00	0.100	0.01	1.000	1.585
51.3	10.00	1.000	0.10	1.000	1.710
68.2	10.00	6.000	0.60	1.000	1.834
90.1	10.00	9.900	0.99	1.000	1.955

◎ 回帰式の適合度の検定 χ^2 値(P=0.05, df=2)= 5.991 (P=0.01, df=2)= 9.210

X2乗 (逸脱度) = 0.328 < 5.991 適合する

X2乗 (ピアソン) = 0.284 < 5.991 適合する

AIC = 26.53

◎ 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	-42.50	13.38	-3.177
log(Conc.)	23.49	7.375	3.185
WALD検定	X ² 値=10.142	自由度=1	有意確率=0.001

◎ 推定値と残差

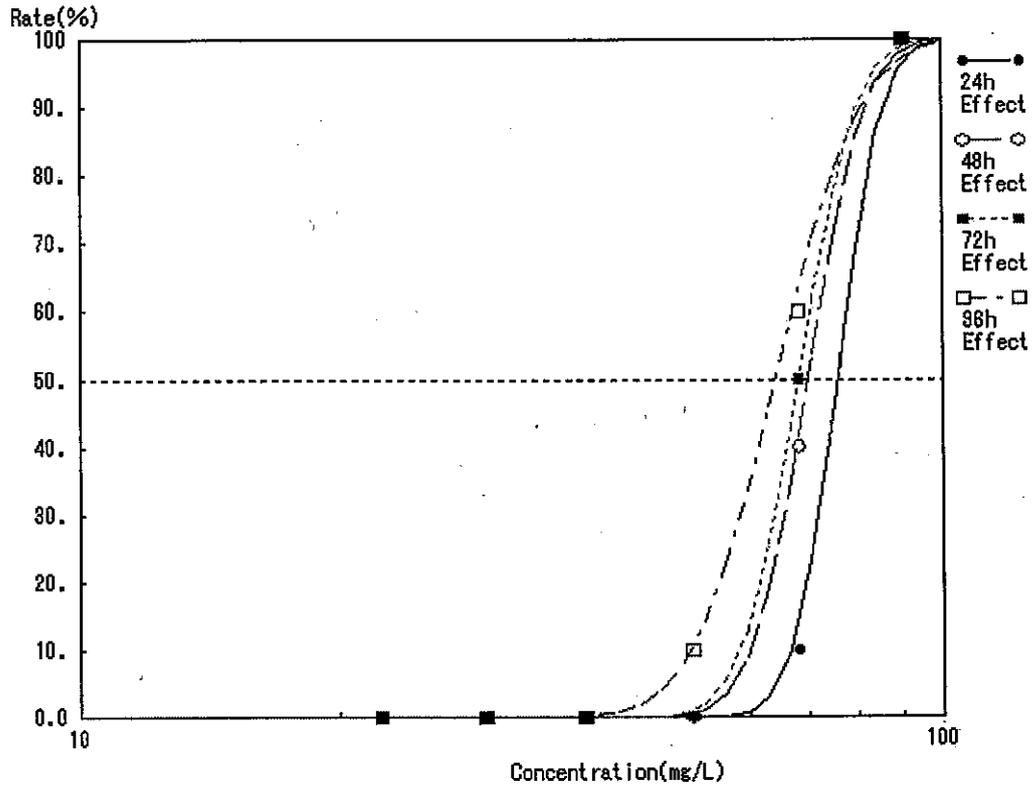
濃度	Y	Y推定	残差(度数)	Y/n(P)	π 推定	残差(割合)
38.5	0.100	0.052	0.048	0.010	0.005	0.005
51.3	1.000	0.882	0.118	0.100	0.088	0.012
68.2	6.000	6.386	-0.386	0.600	0.639	-0.039
90.1	9.900	9.680	0.220	0.990	0.968	0.022

◎ 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
38.5	0.005	0.158	0.190	0.214	0.207	0.233
51.3	0.061	0.688	0.129	0.131	0.230	0.235
68.2	0.303	0.723	-0.252	-0.254	-0.479	-0.482
90.1	0.104	0.431	0.461	0.395	0.611	0.524

EC90%、80%、EC50%、20%、10%の推定		
log(EC90)	=	1.7160 (95% Range: 1.6621 - 1.7699)
EC90 (mg/L)	=	52.000 (95% Range: 45.927 - 58.875)
log(EC80)	=	1.7505 (95% Range: 1.6579 - 1.7679)
EC80 (mg/L)	=	56.302 (95% Range: 45.485 - 58.600)
log(EC50)	=	1.8095 (95% Range: 1.7510 - 1.8648)
EC50 (mg/L)	=	64.498 (95% Range: 56.367 - 73.243)
log(EC20)	=	1.8686 (95% Range: 1.8442 - 1.9616)
EC20 (mg/L)	=	73.887 (95% Range: 69.852 - 91.544)
log(EC10)	=	1.9031 (95% Range: 1.8987 - 2.0183)
EC10 (mg/L)	=	80.001 (95% Range: 79.189 - 104.30)

***** END *****



Dose-response curve for LC50 of Fish Acute Toxicity Test (Probit method)
 2008-生44_α-ニトロフェノール