


環境省 殿

最 終 報 告 書

o-ニトロ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. 2008-生43)

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. 2008-生43

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. 2008-生43

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10月 7日	2009年10月 7日	2009年10月 7日
	2009年10月 9日	2009年10月 9日	2009年10月 9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 : オーニトロ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	2009年 2月 5日
実験開始日	2009年 6月23日
(暴露期間	2009年10月 7日~2009年10月 9日)
実験終了日	2010年 1月14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 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 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 結果の算出	8
4.1 遊泳阻害濃度算出に用いる被験物質濃度の決定	8
4.2 50 % 遊泳阻害濃度 (EC ₅₀) の算出	8
4.3 0 % 遊泳阻害最高濃度および 100 % 遊泳阻害最低濃度	9
5 結果および考察	9
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	9
5.2 試験用水に対する被験物質の溶解性	9
5.3 試験溶液中の被験物質濃度	9
5.4 50 % 遊泳阻害濃度 (EC ₅₀)	9
5.5 0 % 遊泳阻害最高濃度および 100 % 遊泳阻害最低濃度	10
5.6 試験溶液の水温、溶存酸素濃度、pH および硬度	10
5.7 試験液の pH 変動による遊泳阻害への影響	10
5.8 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-1 試験用水の水質	16
付属資料-2 予備試験の結果	18
付属資料-3 試験溶液の分析法	20
付属資料-4 統計解析結果	26

要 旨

試験委託者 環境省

表 題 o-ニトロ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. 2008-生43

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 : o-ニトロフェノール
- 2) 暴露方式 : 止水式
- 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, 7.2, 10, 14, 19, 27, 37, 52 mg/L
公比 ; $10^{1/7}$ (約 1.4)
- 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 ± 1 °C
- 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 調整は行わなかった
- 13) 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軽度な減少は、揮散によるものと考えられた。従って、各影響濃度（50 % 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)	:	50 mg/L
		(95 % 信頼限界 : 40 ~ 95 mg/L) , Probit
0 % 遊泳阻害最高濃度	:	18 mg/L
100 % 遊泳阻害最低濃度	:	>49 mg/L

3) 48 時間暴露後の結果

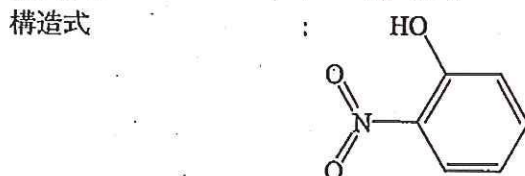
50 % 遊泳阻害濃度 (EC ₅₀)	:	28 mg/L
		(95 % 信頼限界 : 26 ~ 31 mg/L) , Probit
0 % 遊泳阻害最高濃度	:	18 mg/L
100 % 遊泳阻害最低濃度	:	49 mg/L

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



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 : [REDACTED]

入手量 : 25 g × 4 本 (全て同一ロット)

ロット番号^{***} : [REDACTED]

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

** : [REDACTED]「製品安全データシート [REDACTED]」
(作成日 2001 年 9 月 1 日・改訂日 2008 年 8 月 27 日)

*** : [REDACTED]「検査成績書 [REDACTED] 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、オオミジンコ (*Daphnia magna*) の雌の幼体 (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

直近の基準物質〔重クロム酸カリウム (二クロム酸カリウム) 試薬特級〕による 48 時間 50 % 遊泳阻害濃度 (EC_{50}) は 0.68 mg/L [暴露期間 ; 2009 年 4 月 7 日 ~ 4 月 9 日] であった。

当施設における 1999 年 10 月以降の EC_{50} 値は $\bar{X} = 0.85$ mg/L、S.D. = 0.19 mg/L、 $n = 22$ (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、育苗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、次頁に記載する条件で最長で 4 週間飼育した。飼育期間中は産まれた幼体数を毎日確認し、産まれた幼体はその日のうちに除去した。

暴露開始前日 (飼育開始 21 日) に仔ミジンコを分離した。翌日、孵化した 24 時間齢以内の幼体を試験に用いた。

飼育中の親については、2 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、全て同じバッチに産まれた幼体を用いた。

親世代の飼育方法、状態、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(3.2 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 : 当施設で培養した単細胞緑藻類 (*Chlorella vulgaris*) の培養液を遠心分離操作により分離し、飼育水に置換して与えた。
- 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 : 2009 年 9 月 14 日 ~ 2009 年 10 月 7 日 (22 日齢)
暴露開始前 2 週間の親の死亡率は 0 % 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

以下の条件で試験を行った。

3.1 試験条件

- 1) 暴露方式 : 止水式
- 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 $\pm 1^{\circ}\text{C}$ 以内とする
- 7) 照明 : 室内光、16 時間 明/8 時間 暗
- 8) 給餌 : 給餌は行わない

- 9) 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。
- 10) 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。

3.2 試験用水

Elendt M4 人工調製水 [OECD GUIDELINES FOR THE TESTING OF CHEMICALS 202: *Daphnia* sp., Acute Immobilisation Test (Adopted April 13, 2004) 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-1 に示した。

暴露開始時における試験用水の硬度は 255 mg/L (CaCO₃ 換算)、pH は 7.9 であった。

3.3 試験容器および恒温槽等

- 1) 試験容器 : 100 mL ガラスビーカーを用いた。試験容器にはゴミの混入を防止するため薄いアクリル板で蓋をした。
- 2) 恒温槽 : 恒温室
- 3) 水温計 : ガラス製水銀温度計
- 4) 溶存酸素計 : 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 8.0) 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 (20℃) 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 7.0 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 (20℃) 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 6.3 および 7.9 であった。これらについても同様にろ過しない場合と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測定を行った。

3.5 試験濃度の設定

公比 $10^{1/2}$ (約 3.2) で 4 段階 (1.0~32 mg/L の範囲) の濃度設定による予備試験を行った結果 (付属資料-2)、48 時間遊泳阻害率は 10 mg/L 区で 0 %、32 mg/L 区で 90 %であった。この結果を基に、本試験においては公比を $10^{1/7}$ (約 1.4) とし、7.2, 10, 14, 19, 27, 37, 52 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。

100 mg の被験物質を 1 L メスフラスコに秤り入れ、試験用水で 1 L とした。これを 2 本調製し、マグネチックスターラーを用いて試験温度 (20 °C) で 24 時間攪拌した。これらを 2 L ビーカーに入れて混合し、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 72, 100, 140, 190, 270, 370 および 520 mL をそれぞれ 1 L メスフラスコに採り、試験用水で 1 L として 7.2, 10, 14, 19, 27, 37 および 52 mg/L 区の試験溶液を調製した (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

暴露開始時には調製した各試験溶液について、暴露終了時には各試験容器の中層より等量を採取し混合した試験溶液について、HPLC 法により被験物質濃度を測定した。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。

2) 試験環境の測定

全試験区 (ただし、各試験区 1 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（各試験区ごとに試験容器から等量の試験溶液を採取、混合したもの）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が比較的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 % 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ると遊泳するが、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）。

遊泳阻害以外の行動や外見の異常は無かった。

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の軽度な減少は、揮散によるものと考えられた。従って、各影響濃度（50 % 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、観察時間毎に遊泳阻害率（%）を求め、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

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 μ m 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 99.8 mg/L (n = 1)、ろ過した場合 100.0 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 6.3 および 7.9 で被験物質濃度は、ろ過しない場合 99.7 mg/L および 99.5 mg/L (各 n = 1)、ろ過した場合 98.7 mg/L および 99.5 mg/L (各 n = 1) であった。

したがって、pH 6.3 ~ 7.9 の範囲において、100 mg/L 溶液は溶解すると判断した。

5.3 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 97 % ~ 99 % であったが、暴露終了時には 91 % ~ 96 % と軽度に減少した。これは揮散が主因によるものと考えられた。

5.4 50 % 遊泳阻害濃度 (EC₅₀)

各観察時における遊泳阻害率を Table 2 に、50 % 遊泳阻害濃度 (EC₅₀) 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 による統計解析の入力に用いた観察点(濃度区)は、18.2 ~ 49.3 mg/L

〔遊泳阻害が 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 % 遊泳阻害濃度(EC_{50}) : 50 mg/L
(95 % 信頼限界 : 40 ~ 95 mg/L), Probit
48 時間 50 % 遊泳阻害濃度(EC_{50}) : 28 mg/L
(95 % 信頼限界 : 26 ~ 31 mg/L), Probit

5.5 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 および以下に示した。

24 時間 0 % 遊泳阻害最高濃度 : 18 mg/L
48 時間 0 % 遊泳阻害最高濃度 : 18 mg/L

24 時間 100 % 遊泳阻害最低濃度 : >49 mg/L
48 時間 100 % 遊泳阻害最低濃度 : 49 mg/L

5.6 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、硬度を Table 8 に示した。

48 時間の暴露期間中の水温は 20.6 ~ 20.9 °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 8.3 ~ 8.6 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 (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。

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 7.9 ~ 8.0 の範囲内であり、52 mg/L 区では 7.3 ~ 7.9 の範囲であった。暴露期間中の変動はいずれも 1.5 以内であった。

硬度は 250 ~ 263 mg/L の範囲内であった。

5.7 試験溶液の pH 変動による遊泳阻害への影響

暴露期間中の pH は酸解離定数 7.23 (25 °C) (文献値) より高く、除々に上昇の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、27、52 mg/L 区において、試験液の pH を変動後の pH まで高く調整し、解離型の割合が増加した場合にミジンコへの遊泳阻害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)	p H			48 時間遊泳阻害数 (阻害率 %)
	暴露開始時	24 時間	暴露終了時	
27	7.4	7.8	8.0	3/20 (15)
	7.9(pH 調整)	8.0	8.0	0/20 (0)
52	7.2	7.7	7.9	20/20 (100)
	7.9(pH 調整)	8.0	8.0	3/20 (15)

* 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 (7.9) に調整した場合、遊泳阻害の軽減が認められた。

以上のことから本試験中に試験溶液の pH が上昇したことから、ミジンコに対する毒性が弱まり、遊泳阻害が弱く算出された可能性が示唆された。

5.8 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)

Nominal Concentration (mg/L)	Measured Concentration, mg/L (Percent of Nominal)		Mean ^a Measured Concentration (mg/L)
	0 Hour new	48 Hours old	
Control	<0.05 (-)	<0.05 (-)	-
7.2	6.97 (97)	6.77 (94)	6.87
10	9.86 (99)	9.56 (96)	9.71
14	13.6 (97)	13.3 (95)	13.4
19	18.4 (97)	18.1 (95)	18.2
27	26.2 (97)	25.4 (94)	25.8
37	36.1 (98)	34.3 (93)	35.2
52	51.2 (98)	47.5 (91)	49.3

new : Freshly prepared test solutions

old : Test solutions after 48 hours exposure

a : Geometric mean

Table 2. The Numbers of Immobile *Daphnia*
(Static Condition)

Nominal Concentration (mg/L)	Mean ^a Measured Concentration (mg/L)	Number of <i>Daphnia</i>	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)
7.2	6.87	20	0	0	0	0	0(0)	0	0	0	0	0(0)
10	9.71	20	0	0	0	0	0(0)	0	0	0	0	0(0)
14	13.4	20	0	0	0	0	0(0)	0	0	0	0	0(0)
19	18.2	20	0	0	0	0	0(0)	0	0	0	0	0(0)
27	25.8	20	0	1	1	1	3(15)	0	3	1	2	6(30)
37	35.2	20	1	1	3	3	8(40)	4	5	4	5	18(90)
52	49.3	20	1	2	2	3	8(40)	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	50	40 - 95	Probit
48	28	26 - 31	Probit

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

(Static Condition)		
Exposure Period (Hours)	Highest Concentration in 0 % Immobility (mg/L)	Lowest Concentration in 100 % Immobility (mg/L)
24	18	>49
48	18	49

Table 5. Temperature

(Static Condition)				
Nominal Concentration (mg/L)	Mean ^a Measured Concentration (mg/L)	Temperature, °C		
		0 Hour new	24 Hours	48 Hours old
Control	-	20.7	20.8	20.6
7.2	6.87	20.8	20.8	20.6
10	9.71	20.8	20.8	20.6
14	13.4	20.8	20.8	20.6
19	18.2	20.9	20.8	20.6
27	25.8	20.9	20.8	20.7
37	35.2	20.9	20.8	20.7
52	49.3	20.9	20.9	20.8

new : Freshly prepared test solutions

old : Test solutions after 48 hours exposure

a : Geometric mean

Table 6. Dissolved Oxygen Concentrations

(Static Condition)

Nominal Concentration (mg/L)	Mean ^a Measured Concentration (mg/L)	Dissolved Oxygen Concentration, mg/L		
		0 Hour new	24 Hours	48 Hours old
Control	-	8.6	8.5	8.3
7.2	6.87	8.6	8.5	8.3
10	9.71	8.6	8.4	8.3
14	13.4	8.6	8.4	8.3
19	18.2	8.6	8.4	8.4
27	25.8	8.6	8.4	8.3
37	35.2	8.6	8.4	8.3
52	49.3	8.5	8.4	8.3

new : Freshly prepared test solutions

old : Test solutions after 48 hours exposure

a : Geometric mean

Table 7. pH Values

(Static Condition)

Nominal Concentration (mg/L)	Mean ^a Measured Concentration (mg/L)	pH		
		0 Hour new	24 Hours	48 Hours old
Control	-	7.9	7.9	8.0
7.2	6.87	7.7	7.9	8.0
10	9.71	7.6	7.9	8.0
14	13.4	7.6	7.9	8.0
19	18.2	7.5	7.9	8.0
27	25.8	7.4	7.8	8.0
37	35.2	7.4	7.8	7.9
52	49.3	7.3	7.7	7.9

new : Freshly prepared test solutions

old : Test solutions after 48 hours exposure

a : Geometric mean

Table 8. Total Hardness(as CaCO₃)

Nominal Concentration (mg/L)	Mean ^a Measured Concentration (mg/L)	(Static Condition) Total Hardness (as CaCO ₃), mg/L	
		0 Hour new	48 Hours old
Control	-	255	263
7.2	6.87	254	255
10	9.71	253	253
14	13.4	254	253
19	18.2	254	252
27	25.8	253	251
37	35.2	254	250
52	49.3	253	252

new : Freshly prepared test solutions

old : Test solutions after 48 hours exposure

a : Geometric mean

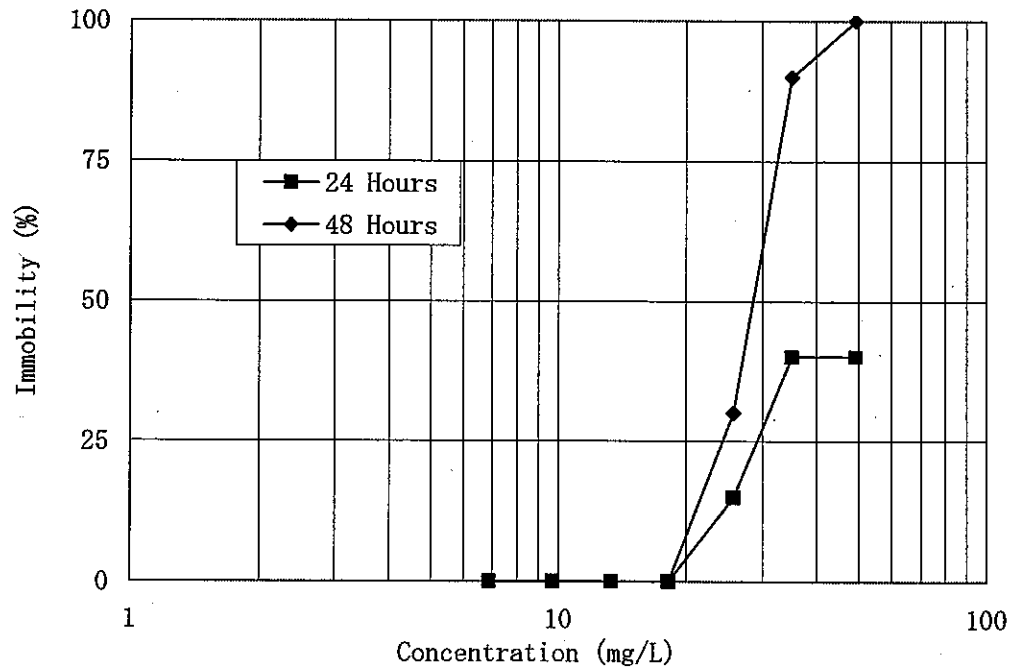


Figure 1. Concentration-Response (Immobility) Curves

付 属 資 料 ー 1

試 験 用 水 の 水 質

Table A-1 Elendt M4 Medium Recommended by OECD Guideline No. 202
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 - 2

予 備 試 験 の 結 果

Table B-1. The Numbers of Immobile *Daphnia*
(Range Finding Test)

Nominal Concentration (mg/L)	(Static Condition)	
	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)
3.2	0/20 (0)	0/20 (0)
10	0/20 (0)	0/20 (0)
32	2/20 (10)	18/20 (90)

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

Nominal Concentration (mg/L)	(Static Condition)	
	Measured Concentration (mg/L) (Percent of Nominal)	
	0 Hour new	48 Hours old
Control	<0.05 (-)	<0.05 (-)
1.0	0.980 (98)	0.944 (94)
3.2	3.19 (100)	3.07 (96)
10	9.96 (100)	9.66 (97)
32	31.7 (99)	30.5 (95)

new : Freshly prepared test solutions

old : Test solutions after 48 hours exposure

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 mmφ	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バー一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 (1010 mg/L) 100 μ L を 10 mL メスフラスコに正確に分取し、純水で 10 mL とし、101.0 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、純水で 50 mL とし、5.050 mg/L、10.10 mg/L 標準溶液を調製する。さらに 10.10 mg/L 標準溶液より 5.0 mL を 50 mL メスフラスコに正確に分取し、純水で 50 mL とし 1.010 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 ($\mu V \cdot sec$)
1	0	0
2	1.010	74155
3	5.050	371103
4	10.10	744726

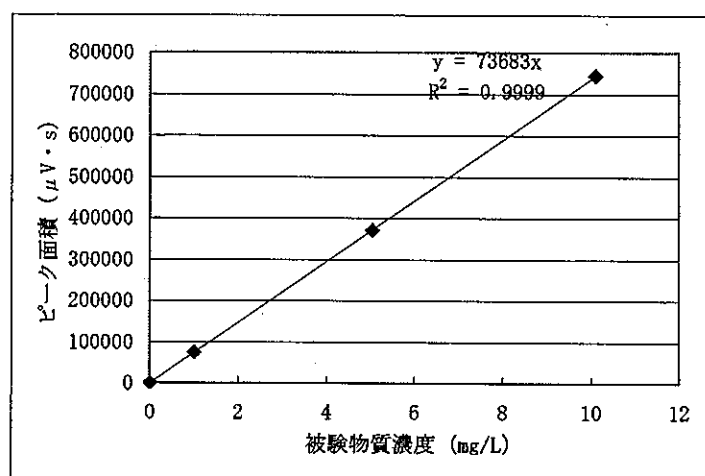


図 1 検量線例

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 98 ～ 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	0.9891	0.995	98
	2	1.000		
10.12	1	10.19	10.2	101
	2	10.20		
101.2	1	103.6	103	102
	2	102.8		

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（0.995 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 101 ～ 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 (%)
0.995	1	0.9995	1.00	101
	2	1.004		
10.2	1	10.33	10.4	102
	2	10.37		
103	1	105.0	105	102
	2	104.6		

6. 定量下限値および検出限界値

被験物質濃度 1.003 mg/L の試料溶液 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 0.05 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	0.9943
2	0.9925
3	1.000
4	1.000
5	0.9986
6	1.005
7	0.9969
平均値	0.9981
標準偏差 (σ_{n-1})	0.00413

定量下限値 = $0.00413 \times 10 \approx 0.05$ mg/L

検出限界値 = $0.00413 \times 3 \approx 0.02$ mg/L

付 属 資 料 ー 4

統 計 解 析 結 果
(EcoTox ver. 2.6d)

ミジンコ 急性遊泳阻害試験

2008-生 43-2

ファイル名= 2020074

更新日: 2009/10/15

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	6.87 (0.84)	1	20	0	0
3	9.71 (0.99)	1	20	0	0
4	13.4 (1.13)	1	20	0	0
5	18.2 (1.26)	1	20	0	0
6	25.8 (1.41)	1	20	3	6
7	35.2 (1.55)	1	20	8	18
8	49.3 (1.69)	1	20	8	20

[対照に対する] 割合 (%)

区	濃度	影響・死亡	24	48 hour
	mg/L (log)			
1	6.87 (0.84)		0.00	0.00
2	9.71 (0.99)		0.00	0.00
3	13.4 (1.13)		0.00	0.00
4	18.2 (1.26)		0.00	0.00
5	25.8 (1.41)		15.00	30.00
6	35.2 (1.55)		40.00	90.00
7	49.3 (1.69)		40.00	100.00

EC50 計算に用いたデータ (Probit, Logit 法)

区	濃度	影響・死亡	0	24	48 hour
	mg/L (log)				
1	6.87 (0.84)		20.00	—	—
2	9.71 (0.99)		20.00	—	—
3	13.4 (1.13)		20.00	—	—
4	18.2 (1.26)		20.00	0.20	0.20
5	25.8 (1.41)		20.00	3.00	6.00
6	35.2 (1.55)		20.00	8.00	18.00
7	49.3 (1.69)		20.00	8.00	19.80

2008-生 43-2

ミジンコ 急性遊泳阻害試験 観察回数=3 濃度区数=8(mg/L)

繰り返し数 = 1, 1, 1, 1, 1, 1, 1, 1

データファイル: 2020074 更新日: 2009/10/15

生物量				
濃度	繰返し	0	24	48 hour
0	(1)	20.000	0.0000	0.0000
6.87	(1)	20.000	0.0000	0.0000
9.71	(1)	20.000	0.0000	0.0000
13.4	(1)	20.000	0.0000	0.0000
18.2	(1)	20.000	0.0000	0.0000
25.8	(1)	20.000	3.0000	6.0000
35.2	(1)	20.000	8.0000	18.000
49.3	(1)	20.000	8.0000	20.000

生物量 (%)			
濃度	24	48	hour
6.87	0.00	0.00	
9.71	0.00	0.00	
13.4	0.00	0.00	
18.2	0.00	0.00	
25.8	15.00	30.00	
35.2	40.00	90.00	
49.3	40.00	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=6 ●●

◎ デザイン行列

濃度	n	y	y/n	Const.	log10(C)
18.2	20.00	0.200	0.01	1.000	1.260
25.8	20.00	3.000	0.15	1.000	1.412
35.2	20.00	8.000	0.40	1.000	1.547
49.3	20.00	8.000	0.40	1.000	1.693

◎ 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) = 2.903 < 5.991 適合する
 X2 乗 (ピアソン) = 2.706 < 5.991 適合する
 AIC = 79.89

◎ 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	-6.427	1.753	-3.666
log(Conc.)	3.779	1.138	3.320
WALD 検定	X2 値=11.024	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)
18.2	0.200	0.959	-0.759	0.010	0.048	-0.038
25.8	3.000	2.747	0.253	0.150	0.137	0.013
35.2	8.000	5.602	2.398	0.400	0.280	0.120
49.3	8.000	9.763	-1.763	0.400	0.488	-0.088

◎ 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						
18.2	0.809	0.541	-0.960	-0.794	-1.416	-1.172
25.8	0.013	0.379	0.162	0.164	0.206	0.209
35.2	0.466	0.311	1.153	1.194	1.388	1.438
49.3	4.485	0.769	-0.792	-0.789	-1.648	-1.641

EC90%, 80%, EC50%, 20%, 10%の推定		
log(EC90)	= 1.3616	(95% Range: 1.1214 - 1.4181)
EC90(mg/L)	= 22.991	(95% Range: 13.224 - 26.187)
log(EC80)	= 1.4780	(95% Range: 1.2874 - 1.6095)
EC80(mg/L)	= 30.059	(95% Range: 19.381 - 40.688)
log(EC50)	= 1.7007	(95% Range: 1.6049 - 1.9756)
EC50(mg/L)	= 50.199	(95% Range: 40.267 - 94.531)
log(EC20)	= 1.9234	(95% Range: 1.9225 - 2.3417)
EC20(mg/L)	= 83.833	(95% Range: 83.661 - 219.63)
log(EC10)	= 2.0398	(95% Range: 1.8176 - 2.2621)
EC10(mg/L)	= 109.61	(95% Range: 65.700 - 182.85)

●● 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)
18.2	20.00	0.200	0.01	1.000	1.260
25.8	20.00	6.000	0.30	1.000	1.412
35.2	20.00	18.00	0.90	1.000	1.547
49.3	20.00	19.80	0.99	1.000	1.693

◎ 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) = 0.510 < 5.991 適合する
 X2 乗 (ピアソン) = 0.850 < 5.991 適合する
 AIC = 46.43

◎ 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	-17.43	3.570	-4.882
log(Conc.)	12.01	2.449	4.903
WALD 検定	X2 値=24.044	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)
18.2	0.200	0.213	-0.013	0.010	0.011	-7E-4
25.8	6.000	6.295	-0.295	0.300	0.315	-0.015
35.2	18.00	17.45	0.553	0.900	0.872	0.028
49.3	19.80	19.96	-0.162	0.990	0.998	-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
18.2	5.E-4	0.415	-0.029	-0.029	-0.038	-0.038
25.8	0.067	0.680	-0.142	-0.142	-0.252	-0.251
35.2	0.874	0.756	0.383	0.371	0.776	0.751
49.3	0.071	0.149	-0.584	-0.832	-0.633	-0.901

EC90%、80%、EC50%、20%、10%の推定		
log(EC90)	=	1.3451 (95% Range: 1.2884 - 1.3598)
EC90(mg/L)	=	22.134 (95% Range: 19.427 - 22.897)
log(EC80)	=	1.3817 (95% Range: 1.3310 - 1.4043)
EC80(mg/L)	=	24.083 (95% Range: 21.431 - 25.372)
log(EC50)	=	1.4518 (95% Range: 1.4126 - 1.4896)
EC50(mg/L)	=	28.301 (95% Range: 25.859 - 30.877)
log(EC20)	=	1.5219 (95% Range: 1.4942 - 1.5749)
EC20(mg/L)	=	33.258 (95% Range: 31.201 - 37.576)
log(EC10)	=	1.5585 (95% Range: 1.5368 - 1.6195)
EC10(mg/L)	=	36.186 (95% Range: 34.420 - 41.638)

ロジット関数

●● 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)
18.2	20.00	0.200	0.01	1.000	1.260
25.8	20.00	3.000	0.15	1.000	1.412
35.2	20.00	8.000	0.40	1.000	1.547
49.3	20.00	8.000	0.40	1.000	1.693

◎ 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
 X^2 乗 (逸脱度) = 3.388 < 5.991 適合する
 X^2 乗 (ピアソン) = 3.063 < 5.991 適合する
AIC = 80.38

◎ パラメータ推定

パラメータ名	係数(θ 推定)	標準誤差(SE)	θ 推定/SE
const	-10.67	3.175	-3.361
log(Conc.)	6.272	2.036	3.081
WALD 検定	X^2 値=9.494	自由度=1	有意確率=0.002

◎ 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)
18.2	0.200	1.181	-0.981	0.010	0.059	-0.049
25.8	3.000	2.794	0.206	0.150	0.140	0.010
35.2	8.000	5.492	2.508	0.400	0.275	0.125
49.3	8.000	9.732	-1.732	0.400	0.487	-0.087

◎ 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
18.2	0.796	0.486	-1.141	-0.931	-1.592	-1.298
25.8	0.009	0.393	0.131	0.133	0.169	0.170
35.2	0.545	0.320	1.210	1.256	1.466	1.523
49.3	6.092	0.801	-0.778	-0.775	-1.745	-1.738

EC90%、80%、EC50%、20%、10%の推定		
log(EC90)	=	1.3511 (95% Range: 1.0586 - 1.3684)
EC90(mg/L)	=	22.444 (95% Range: 11.444 - 23.356)
log(EC80)	=	1.4804 (95% Range: 1.2609 - 1.6004)
EC80(mg/L)	=	30.226 (95% Range: 18.234 - 39.844)
log(EC50)	=	1.7014 (95% Range: 1.6068 - 1.9969)

EC50(mg/L) = 50.280 (95% Range: 40.435 - 99.293)
log(EC20) = 1.9224 (95% Range: 1.7020 - 2.1428)
EC20(mg/L) = 83.639 (95% Range: 50.349 - 138.94)
log(EC10) = 2.0517 (95% Range: 1.8164 - 2.2869)
EC10(mg/L) = 112.64 (95% Range: 65.531 - 193.62)

●● 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)
18.2	20.00	0.200	0.01	1.000	1.260
25.8	20.00	6.000	0.30	1.000	1.412
35.2	20.00	18.00	0.90	1.000	1.547
49.3	20.00	19.80	0.99	1.000	1.693

◎ 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) = 0.135 < 5.991 適合する

X2 乗 (ピアソン) = 0.163 < 5.991 適合する

AIC = 46.05

◎ 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	-32.18	7.300	-4.408
log(Conc.)	22.18	5.032	4.409

WALD 検定 X2 値=19.437 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)
18.2	0.200	0.288	-0.088	0.010	0.014	-0.004
25.8	6.000	5.930	0.070	0.300	0.297	0.003
35.2	18.00	17.87	0.126	0.900	0.894	0.006
49.3	19.80	19.91	-0.108	0.990	0.995	-0.005

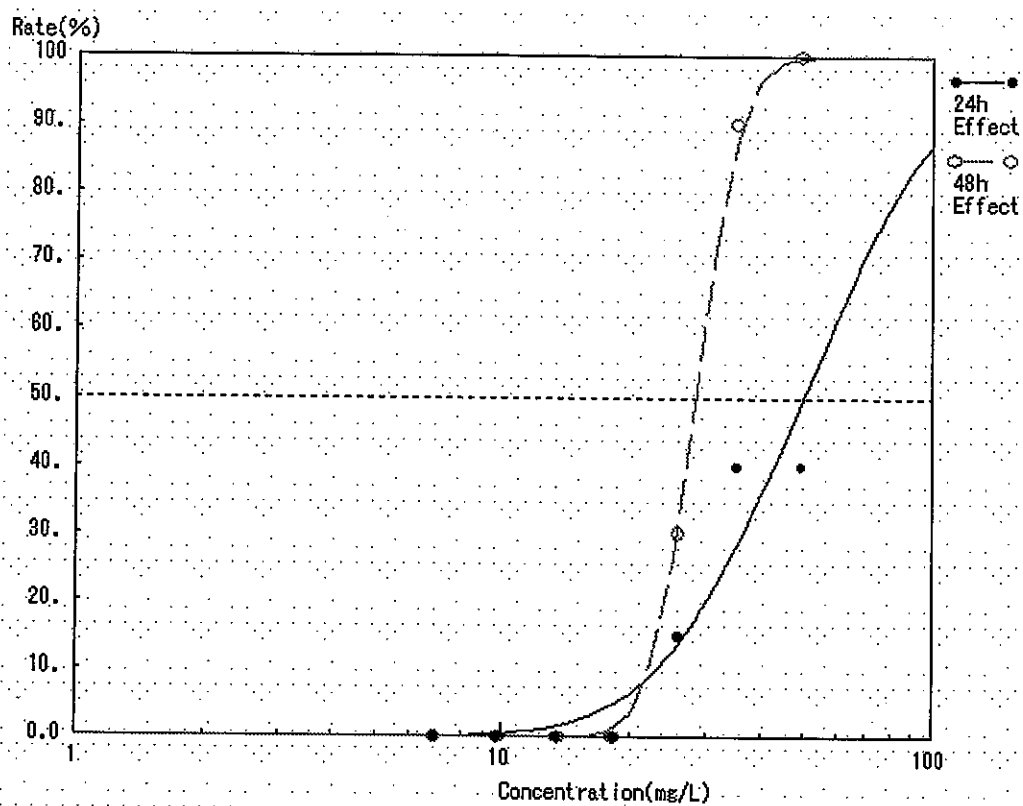
◎ 診断統計量

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						
18.2	0.008	0.300	-0.175	-0.165	-0.209	-0.197
25.8	0.011	0.792	0.034	0.034	0.075	0.075
35.2	0.052	0.755	0.092	0.091	0.186	0.184
49.3	0.013	0.153	-0.308	-0.356	-0.334	-0.387

EC90%、80%、EC50%、20%、10%の推定

log(EC90)	= 1.3515	(95% Range: 1.2914 - 1.3638)
EC90(mg/L)	= 22.466	(95% Range: 19.560 - 23.109)
log(EC80)	= 1.3881	(95% Range: 1.3360 - 1.4103)
EC80(mg/L)	= 24.439	(95% Range: 21.675 - 25.723)
log(EC50)	= 1.4506	(95% Range: 1.4122 - 1.4899)
EC50(mg/L)	= 28.221	(95% Range: 25.832 - 30.894)
log(EC20)	= 1.5131	(95% Range: 1.4884 - 1.5694)
EC20(mg/L)	= 32.588	(95% Range: 30.787 - 37.105)
log(EC10)	= 1.5496	(95% Range: 1.5330 - 1.6160)
EC10(mg/L)	= 35.449	(95% Range: 34.116 - 41.302)

***** END *****



Dose-response curve for EC50 of Daphnia Acute Immobilization Test (Probit method)

2008-生43-2

