

環境省 殿

最 終 報 告 書

o-ニトロフェノールの藻類 (*Pseudokirchneriella subcapitata*)

に対する生長阻害試験

(試験番号: No. 2008-生42)

2010年 4月 8日作成

株式会社ニクロム分析センター

原本と相違ないことを証明する。

2010年 4月 8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藻類 (*Pseudokirchneriella subcapitata*)
に対する生長阻害試験

試験番号： No. 2008-生42

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。

2010年 4月 8日

試験責任者



2010年 4月 8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藻類 (*Pseudokirchneriella subcapitata*)
に対する生長阻害試験

試験番号： No. 2008-生42

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15日	2009年 9月15日	2009年 9月15日
	2009年 9月18日	2009年 9月18日	2009年 9月18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 4月 8日	2010年 4月 8日	2010年 4月 8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 4月 8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]	(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15日～2009年 9月18日)
実験終了日	2010年 1月15日
試験終了日	2010年 4月 8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 被験物質の確認および保管条件下の安定性	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 試験条件	5
3.2 培地	5
3.3 試験容器、藻類培養試験装置および機器等	5
3.4 被験物質の溶解性確認	6
3.5 試験濃度の設定	6
3.6 試験溶液の調製	6
3.7 被験物質濃度等の測定	7
4 結果の算出	8
4.1 阻害濃度算出に用いる被験物質濃度の決定	8
4.2 生長曲線	8
4.3 生長速度の算出	8
4.5 最大無作用濃度 (NOEC)	9
4.6 統計的手法	9
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 培地に対する被験物質の溶解性	10
5.3 試験溶液中の被験物質濃度	10
5.4 生長曲線	10
5.5 50 % 生長阻害濃度 (E_rC_{50}) の算出	11
5.6 最大無作用濃度 (NOEC)	11
5.7 温度、光強度および pH	12
5.8 試験溶液の pH 変動による生長阻害への影響	12
5.9 試験計画書からの逸脱の有無	13
6. 保管	13
Table 1 ～ 6	14
Figure 1, 2	19
付属資料 - 1 OECD培地	20
付属資料 - 2 予備試験の結果	22
付属資料 - 3 試験溶液の分析法	25
付属資料 - 4 統計解析結果	31

要 旨

試験委託者 環境省

表 題 〇ーニトロフェノールの藻類 (*Pseudokirchneriella subcapitata*) に対する生長阻害試験

試験番号 No. 2008-生42

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。

- 1) 被験物質 : 〇ーニトロフェノール
- 2) 暴露方式 : 止水式、振とう培養 (100 rpm)
- 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, 1.0, 1.6, 2.5, 4.0, 6.3, 10, 16 mg/L
公比 ; $10^{1/5}$ (約 1.6)
- 6) 試験溶体量 : 100 mL (OECD 培地) / 容器
- 7) 連数 : 3 容器 / 濃度区、6 容器 / 対照区
- 8) 初期生物量 : 0.5 mg/L 以下(細胞濃度として 0.5×10^4 cells/mL)
- 9) 試験温度 : 23 ± 2 °C
- 10) 照明 : $60 \sim 120 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ (フラスコ液面付近) で連続照明
- 11) pH : 試験溶液の pH 調整は行わなかった
- 12) 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微な変動は揮散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、暴露開始時および暴露終了時の測定値の幾何平均値を採用した。

2) 生長速度の比較による阻害濃度

50 % 生長阻害濃度 (EC_{50}) : 6.0 mg/L
(95 %信頼限界 : 5.4 ~ 6.8 mg/L) , Logit

最大無作用濃度 (NOEC)
: 0.92 mg/L

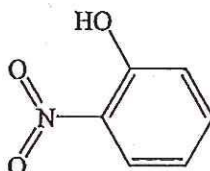
1 被験物質

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 (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 被験物質の確認および保管条件下の安定性

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、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 ヶ月毎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

直近の基準物質(3,5-ジクロロフェノール 99 %)による 72 時間 50 % 藻類生長阻害濃度(E_rC_{50})は 1.9 mg/L (暴露期間 2009年 5月12日～ 5月15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 $\bar{X} = 2.3$ mg/L、S.D. = 0.15 mg/L、n= 4 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(2009年 9月12日 ～ 9月15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の生物量は 0.5 mg/L 以下(細胞数として 0.5×10^4 cells/mL)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

以下の条件で試験を行った。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。

3.1 試験条件

- 1) 暴露方式 : 開放系 (通気性シリコンキャップ)
振とう培養 (100 rpm)
- 2) 暴露期間 : 72 時間
- 3) 試験溶液量 : 100 mL (OECD 培地、3.2 参照) / 容器
- 4) 連数 : 3 容器 / 濃度区、6 容器 / 対照区
- 5) 初期生物量 : 0.5 mg/L 以下 (細胞数として 0.5×10^4 cells/mL)
- 6) 試験温度 : 23℃で設定し、経時的変動範囲は $\pm 2^\circ\text{C}$ 以内とする。
- 7) 照明 : 60 ~ 120 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ (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、連続的かつ均一に照射する。)
- 8) pH : 試験溶液の pH 調整は行わない。

3.2 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 - 1 「OECD培地」に示した。 NaHCO_3 を除く成分を先に混合の上、大気との平衡状態とし、ろ過滅菌した。これにろ過滅菌済の NaHCO_3 成分を添加した。

3.3 試験容器、藻類培養試験装置および機器等

- 1) 試験容器 : 300 mL 容ガラス製三角フラスコ (柴田科学)
通気性シリコンキャップ C-40 (信越ポリマー)
- 2) 藻類培養試験装置 : 藻類培養試験器 GT-40S (宮本理研工業)
- 3) 光学顕微鏡 : 生物顕微鏡 BHS (オリンパス光学工業)
- 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)

3.4 被験物質の溶解性確認

被験物質の培地に対する溶解性は、フラスコ攪拌法で測定した。

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、培地を用いて 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 (23 ℃) 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。さらに、この調製液をエイジング処理 (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 (商品名: H020A090C、メーカー: ADVANTEC) で加圧ろ過後、ろ液中の被験物質濃度を HPLC 法により測定した。

3.5 試験濃度の設定

公比 $10^{1/2}$ (約 3.2) での予備試験の結果 (付属資料 - 2)、72 時間生長阻害率が 1.0 mg/L 区で 0.28 %、3.2 mg/L 区で 3.71 %、10 mg/L 区で 84.8 %、32 mg/L 区で 88.8 % であった。

この結果を基に、本試験では公比 $10^{1/5}$ (約 1.6) で 1.0, 1.6, 2.5, 4.0, 6.3, 10, 16 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、培地成分の NaHCO_3 を加えた培地で 1 L とした。これを、マグネチックスターラーを用いて試験温度 (23 ℃) で 24 時間攪拌した。この溶液を 0.2 μ m 親水性 PTFE タイプメンブランフィルター (H020A090C, ADVANTEC) を用いて加圧でろ過滅菌し、被験物質濃度 100 mg/L の一次原液とした (黄色透明)。

次に、濃度 100 mg/L の一次原液 10, 16, 25, 40, 63 mL をそれぞれ 90, 84, 75, 60, 37 mL の滅菌済み試験培地の入った 300 mL 三角フラスコに加えて 10, 16, 25, 40, 63 mg/L の二次原液を調製した。

1.0, 1.6, 2.5, 4.0, 6.3 mg/L 区の試験溶液は、10, 16, 25, 40, 63 mg/L の二次原液から各 10 mL を 90 mL の滅菌済み試験培地の入った 300 mL 三角フラスコにそれぞれ加えて調製した (いずれも黄色透明)。

10, 16 mg/L 区の試験溶液は、一次原液の 10, 16 mL をそれぞれ 90, 84 mL の滅菌済み試験培地の入った 300 mL 三角フラスコにそれぞれ加えて調製した (いずれも黄色透明)。

対照区には被験物質を加えない滅菌済み培地を用いた。

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試験溶液より採取したものについて、暴露終了時には、対照区は各 6 容器、濃度区は各 3 容器より試験溶液を等量ずつ採取し混合したものについて、遠心分離（23 ℃，3000 rpm × 15 分）により藻体を除去した後、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。

なお、予備試験において 1.0 mg/L 区で藻体を接種しない区を設け、暴露終了時、の被験物質濃度を比較したところ、暴露終了時の接種区の濃度が 0.932 mg/L、未接種区の濃度が 0.927 mg/L であり、藻体への被験物質の吸着は認められなかった。

2) 試験環境の測定

暴露期間中、培養装置内の温度並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 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ 単位に換算した。

pH は暴露開始時および終了時に測定した。暴露開始時の 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 は全ての容器の試験溶液について測定した。

3.8 試験操作

前培養した藻類の細胞数を計数し、 23 ± 2 ℃ に調整した試験溶液中に生物量 0.5 mg/L 以下（細胞濃度として 0.5×10^4 cells/mL，対照区の日毎の変動係数を試験成立条件内に、また暴露開始時と暴露終了時の pH 変動範囲をできるだけ小さくするため）となるように、前培養液を添加した。

各試験容器を 23 ± 2 ℃ に調整された培養装置に設置して暴露開始とし、24、48 および 72 時間後に細胞濃度を測定した。すなわち各試験容器より試験溶液の一定量（24 時間後は 2 mL、48、72 時間後は 1 mL）を採取し、セルパック（専用の希釈液）を用いて希釈（細胞数に応じて 4 倍、10 倍、50 倍に希釈）した溶液について行い、滅菌した培地を同様に希釈した溶液の測定値をブランクとして差し引いて細胞濃度を求めた。

生物量の測定は、暴露終了時に対照区の各フラスコ培養液（約 85 mL）より、フラ

スごとに培養液の全量もしくは一部を採り、減圧ろ過により 0.22 μm メンブランフィルター上に藻体を集めた。このフィルターを 65 $^{\circ}\text{C}$ で 24 時間乾燥させ、それを 23 $^{\circ}\text{C}$ で 2 時間静置冷却した後に乾燥重量を測定した。この値と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、藻体の乾燥重量を求めた。

24、48、72 時間後には顕微鏡下で細胞の形態観察も行った。

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

暴露期間中の被験物質濃度の軽微な変動は揮散によるものと考えられた。従って影響濃度（50 % 生長阻害濃度および最大無作用濃度）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 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 ($x: \times 10^4 \text{ cells/mL}$) 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 ($y: \text{mg/mL}$) から算出した回帰式 ($y=0.0001787x$, $r^2=0.98$) 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暴露期間を通じて指数増殖期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とき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。通常、日当たり (d^{-1}) で表す。

X_i = t_i 時の生物量。暴露開始時 (t_0) 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 Logit 変換値を用い、Logit 法により (Probit 法よりも回帰曲線の寄与率がより高かったため) 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)

個別の試験容器ごとの生長速度を基に、濃度区について対照区との分散分析と多重比較を行った結果、Dunnett 法により、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 - 4 「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

認められなかった。

5.2 培地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 タイプメンブレンフィルター(商品名:H020A090C、メーカー:ADVANTEC)で加圧ろ過後、上澄中の被験物質濃度を HPLC 法により測定した。

その結果、実測濃度はろ過なしの溶液では、99.5 mg/L、加圧ろ過を行った溶液では 98.3 mg/L (それぞれ $n=1$)であり、設定濃度との差は分析誤差が主因になって生じたと考え、被験物質 100 mg/L が溶解した状態であると判断した。

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 HPLC 法により測定した。その結果を Table 1 に示した。

被験物質濃度は、暴露開始時において設定値の 93 ~ 97 % の範囲であり、暴露期間中の変動も軽微であった。設定値との差並びに暴露期間中の変動は、揮散が主因によるものと考えられた。

5.4 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 275 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 6.3 % (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 0.8 % (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	1.8908	1.7228	1.9716	1.9780	7.7
2	1.8743	1.7579	1.9827	1.8825	6.0
3	1.8815	1.8017	1.8927	1.9501	4.0
4	1.8658	1.7405	1.9159	1.9410	5.9
5	1.8695	1.7228	2.0550	1.8306	9.1
6	1.8493	1.8017	1.9623	1.7840	5.3
平均	1.8719	1.7579	1.9634	1.8944	6.3
標準偏差	0.0142	変動係数の平均値 (%)			6.3
繰り返しの生長速度の変動係数 (%)	0.8				

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。

5.5 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-阻害率曲線を Figure 2 に示した。

JMP による統計解析の入力に用いた観察点については、濃度と生長阻害率について直線性が認められる 1.0 mg/L区~16 mg/L区を選択し、重み付けを行った (付属資料 - 4)。

結果を以下に示した。

生長阻害率の比較による 50 % 生長阻害濃度 (E_rC_{50})

50 % 生長阻害濃度 E_rC_{50} : 6.0 mg/L
(95 %信頼限界 : 5.4 ~ 6.8 mg/L) , Logit

5.6 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区は、対照区を含む 0.92 ~ 3.7 mg/L 区とした (付属資料 - 4)。なお Bartlett 検定より等分散性は確認された。

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) : 0.92 mg/L、Dunnett

5.7 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 23.1 ~ 23.3 °C の範囲内であり、変動は 2 °C 以内であった。回転数は 100 ~ 101 rpm であった。

光強度は平均 68 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ (66 ~ 79 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ の範囲内) であった。また、試験溶液が黄色に着色したためフラスコ底部の光強度を測定した。対照区 70 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ で濃度区は 70 ~ 72 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ の範囲内であった。16 mg/L 区の試験溶液の吸収スペクトル [分光光度計 (U-3310 形) ; 測定範囲 = 350 ~ 750 nm] の最大吸収波長 410 nm であった。

試験溶液の pH は、対照区では暴露開始時に 7.8、暴露終了時に 8.2 ~ 8.4 の範囲内であり、変動は 1.5 以内であった。濃度区では、暴露開始時には 7.6 ~ 7.8、暴露終了時には 7.9 ~ 8.3 の範囲内であった。

5.8 試験溶液の pH 変動による生長阻害への影響

暴露期間中の試験溶液の pH は酸解離定数 7.23 (25 °C) (文献値) より高く、除々に上昇する傾向が見られたことから、試験溶液中における被験物質は、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、4.0、16 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藻類の生長阻害が強くなるか否かを確認した。

その結果を以下に示した。

設定濃度 (mg/L)	p H				72 時間の細胞数 平均±標準偏差 (×10 ⁴ cells/mL)	有意差 検定
	暴露開始時	暴露終了時				
4.0	7.7	8.0	8.0	8.0	99.60±2.9	NS
	7.9(pH調整)	8.0	8.1	8.1	102.83±2.2	
16	7.5	7.9	7.9	7.9	0.69±0.02	NS
	7.9(pH調整)	7.9	7.9	7.9	0.72±0.09	

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

NS : No significant difference

暴露開始時に pH を変動後の pH (7.9) に調整した場合、生長阻害に影響は認められなかった。

以上のことから本試験中に試験溶液の pH が上昇しても、藻類に対する毒性は変わらないことが示唆された。

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 Concentration of the Test Substance in Test Solution

Nominal Concentration (mg/L)	Measured Concentration, mg/L (Percent of Nominal)				Mean ^a Measured Concentration (mg/L)
	0 Hour		72 Hours		
Control	<0.03	(-)	<0.03	(-)	-
1.0	0.944	(94)	0.894	(89)	0.919
1.6	1.52	(95)	1.46	(91)	1.49
2.5	2.38	(95)	2.31	(92)	2.34
4.0	3.74	(94)	3.70	(93)	3.72
6.3	5.88	(93)	5.82	(92)	5.85
10	9.57	(96)	9.25	(93)	9.41
16	15.5	(97)	14.6	(91)	15.0

a : Geometric mean

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

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	0.00009	0.00050	0.00359	0.02597
	2	0.00009	0.00052	0.00376	0.02472
	3	0.00009	0.00054	0.00359	0.02526
	4	0.00009	0.00051	0.00346	0.02410
	5	0.00009	0.00050	0.00391	0.02436
	6	0.00009	0.00054	0.00385	0.02293
	Average SD	0.00009 0.00000	0.00052 0.00002	0.00369 0.00017	0.02456 0.00104
1.0 (0.919)	1	0.00009	0.00054	0.00348	0.02240
	2	0.00009	0.00052	0.00375	0.02276
	3	0.00009	0.00058	0.00362	0.02329
	Average SD	0.00009 0.00000	0.00054 0.00003	0.00361 0.00013	0.02282 0.00045
1.6 (1.49)	1	0.00009	0.00052	0.00354	0.02195
	2	0.00009	0.00053	0.00364	0.02204
	3	0.00009	0.00053	0.00349	0.02204
	Average SD	0.00009 0.00000	0.00053 0.00001	0.00355 0.00008	0.02201 0.00005
2.5 (2.34)	1	0.00009	0.00048	0.00315	0.01856
	2	0.00009	0.00052	0.00344	0.01671
	3	0.00009	0.00055	0.00324	0.01745
	Average SD	0.00009 0.00000	0.00052 0.00004	0.00328 0.00015	0.01757 0.00093
4.0 (3.72)	1	0.00009	0.00046	0.00235	0.01158
	2	0.00009	0.00055	0.00299	0.01187
	3	0.00009	0.00050	0.00233	0.01114
	Average SD	0.00009 0.00000	0.00050 0.00004	0.00256 0.00037	0.01153 0.00036
6.3 (5.85)	1	0.00009	0.00034	0.00060	0.00142
	2	0.00009	0.00041	0.00081	0.00192
	3	0.00009	0.00044	0.00081	0.00176
	Average SD	0.00009 0.00000	0.00040 0.00005	0.00074 0.00012	0.00170 0.00025
10 (9.41)	1	0.00009	0.00016	0.00016	0.00016
	2	0.00009	0.00016	0.00018	0.00015
	3	0.00009	0.00018	0.00016	0.00014
	Average SD	0.00009 0.00000	0.00016 0.00001	0.00017 0.00001	0.00015 0.00001
16 (15.0)	1	0.00009	0.00016	0.00014	0.00014
	2	0.00009	0.00012	0.00015	0.00014
	3	0.00009	0.00014	0.00018	0.00016
	Average SD	0.00009 0.00000	0.00014 0.00002	0.00015 0.00002	0.00014 0.00001

SD : Standard deviation

a : Geometric 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*

Nominal Concentration (Mean ^a Measured Concentration) mg/L	Vessel No.	Growth Rate in Biomass	
		Rate μ_{0-72}	Inhibition (%) ^{*1} I_{0-72}
Control (-)	1	1.8908	-
	2	1.8743	-
	3	1.8815	-
	4	1.8658	-
	5	1.8695	-
	6	1.8493	-
	Average	1.8719	0.00
	SD	0.0142	-
1.0 (0.919)	1	1.8414	1.63
	2	1.8467	1.34
	3	1.8545	0.93
	Average	1.8475 ^{NS}	1.30
	SD	0.0066	-
1.6 (1.49)	1	1.8347	1.98
	2	1.8361	1.91
	3	1.8361	1.91
	Average	1.8356 ^{**}	1.94
	SD	0.0008	-
2.5 (2.34)	1	1.7787	4.98
	2	1.7437	6.85
	3	1.7582	6.07
	Average	1.7602 ^{**}	5.96
	SD	0.0176	-
4.0 (3.72)	1	1.6215	13.37
	2	1.6297	12.94
	3	1.6087	14.06
	Average	1.6200 ^{**}	13.46
	SD	0.0106	-
6.3 (5.85)	1	0.9225	50.72
	2	1.0227	45.37
	3	0.9932	46.94
	Average	0.9795	47.67
	SD	0.0515	-
10 (9.41)	1	0.1846	90.14
	2	0.1729	90.76
	3	0.1567	91.63
	Average	0.1714	90.84
	SD	0.0140	-
16 (15.0)	1	0.1439	92.31
	2	0.1439	92.31
	3	0.1846	90.14
	Average	0.1575	91.59
	SD	0.0235	-

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

SD : Standard deviation

a : Geometric mean (0-72 hr)

NS : No significant difference

** : Significant difference $p < 0.01$

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

Table 4. Calculated E_rC_{50} and NOEC

		95 % Confidence Limits	Statistical Method
E_rC_{50} *	6.0 mg/L	5.4 - 6.8 mg/L	Logit
NOEC **	0.92 mg/L	—	Dunnett

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

Table 5. Daily Temperature and Light Intensity at the Incubation

Exposure Period (Hours)	Temperature (°C)	Light Intensity* ($\mu E/m^2/s$)		Revolution (rpm)
		Range of Measured Intensity	Average	
0	23.1	66 ~ 79	68	101
24	23.2	66 ~ 79	68	101
48	23.2	66 ~ 79	68	101
72	23.3	66 ~ 79	68	100

* : 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	72 Hours
Control	-	1	7.8	8.2
		2		8.3
		3		8.4
		4		8.4
		5		8.4
		6		8.3
1.0	0.919	1	7.8	8.3
		2		8.2
		3		8.3
1.6	1.49	1	7.8	8.3
		2		8.2
		3		8.2
2.5	2.34	1	7.8	8.2
		2		8.3
		3		8.2
4.0	3.72	1	7.7	8.2
		2		8.1
		3		8.1
6.3	5.85	1	7.6	8.0
		2		8.0
		3		8.0
10	9.41	1	7.6	8.0
		2		7.9
		3		7.9
16	15.0	1	7.6	7.9
		2		7.9
		3		7.9

a : Geometric mean (0-72 hr)

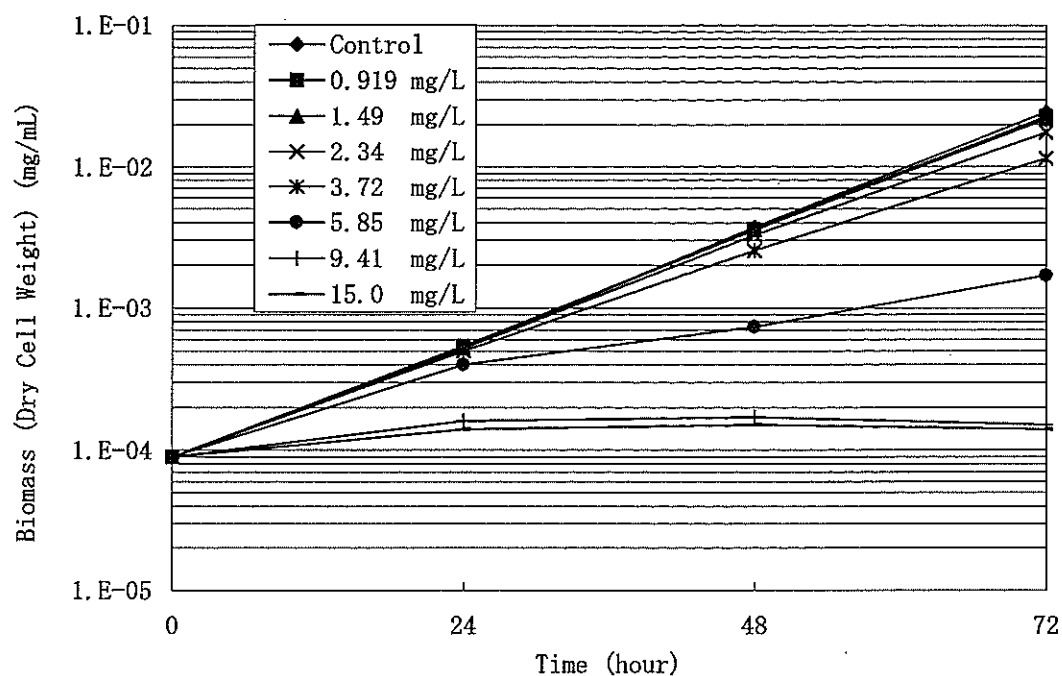


Figure 1. Algal Growth Curve of *Pseudokirchneriella subcapitata* (Biomass vs Time during the 72 hours Exposure)

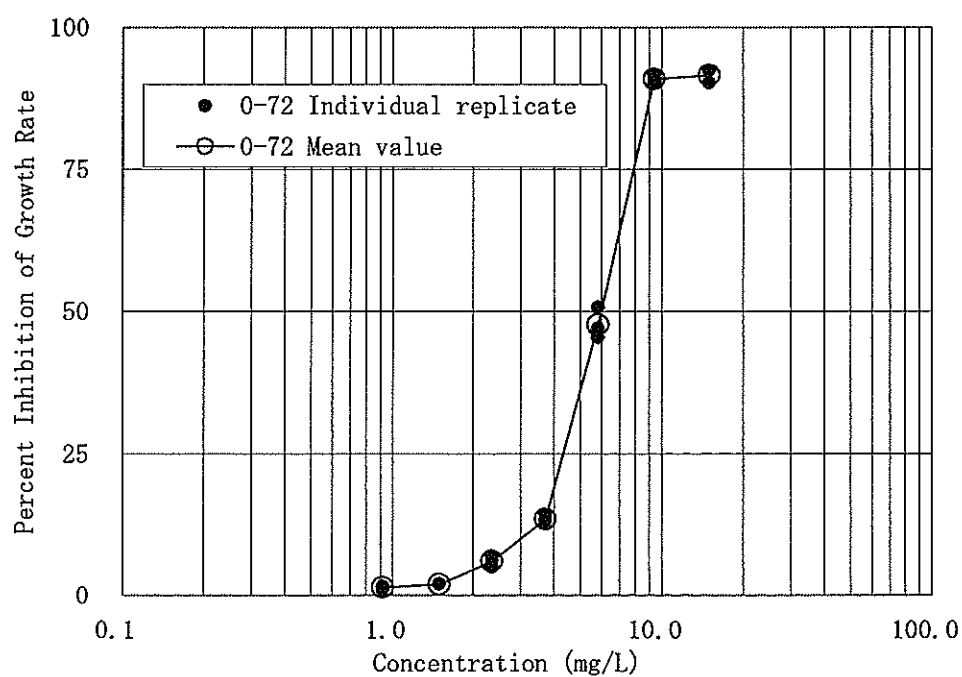


Figure 2. Concentration-Inhibition curve Based on I_{0-72} Values Calculated from the Growth Curves

付 属 資 料 - 1

OECD 培 地

Table A-1. OECD medium

<u>Nutrient salts</u>	<u>Concentration</u> <u>(mg/L)</u>
H ₃ BO ₃	0.185
MnCl ₂ ·4H ₂ O	0.415
ZnCl ₂	0.003
FeCl ₃ ·6H ₂ O	0.064
Na ₂ EDTA·2H ₂ O	0.1
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.0015
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.007
CuCl ₂ ·2H ₂ O	0.00001
CaCl ₂ ·2H ₂ O	18
NH ₄ Cl	15
KH ₂ PO ₄	1.6
NaHCO ₃	50
MgCl ₂ ·6H ₂ O	12
MgSO ₄ ·7H ₂ O	15

付 属 資 料 - 2

予 備 試 験 の 結 果

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

Nominal Concentration (mg/L)	Calculated Biomass[Dry Cell Weight (mg/mL)]			
	0 Hour	24 Hours	48 Hours	72 Hours
Control	0.00010	0.00051	0.00452	0.03110
1.0	0.00010	0.00051	0.00421	0.03061
3.2	0.00010	0.00048	0.00355	0.02514
10	0.00010	0.00019	0.00026	0.00024
32	0.00010	0.00017	0.00017	0.00019

Table B-2. Percent Growth Inhibition of *Pseudokirchneriella subcapitata* (Range Finding Test)

Nominal Concentration (mg/L)	Growth rate	
	Rate μ_{0-72}	Inhibition (%) I_{0-72}^*
Control	1.9133	0.00
1.0	1.9080	0.28
3.2	1.8423	3.71
10	0.2918	84.75
32	0.2140	88.82

* : Values are the percent inhibition relative to the control

Table B-3. Measured Concentration of the Test Substance in Test Solution
(Range Finding Test)

Nominal Concentration (mg/L)	Measured Concentration, mg/L (Percent of Nominal)			
	0 Hour		72 Hours	
Control	<0.03	(-)	<0.03	(-)
1.0	0.952	(95)	0.932	(93)
			0.927 *	(93)
3.2	3.00	(94)	2.93	(92)
10	9.65	(97)	9.41	(94)
32	29.9	(93)	28.8	(90)

* : Without algae inoculation

付 属 資 料 - 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 %, [REDACTED]
b) メタノール	: 高速液体クロマトグラフ用 和光純薬
c) 純水	: 純水製造装置で調製
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 (1006 mg/L) 5 mL を 50 mL メスフラスコに正確に分取し、純水を加えて 50 mL とし、100.6 mg/L 溶液を調製する。この溶液から 5 mL、2.5 mL を 50 mL メスフラスコに正確に分取し、純水で 50 mL とし、10.06 mg/L、5.030

mg/L 標準溶液を調製する。さらに 10.06 mg/L 標準溶液から 5 mL を 50 mL メスフラスコに正確に分取し、純水で 50mL とし、1.006 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 (μ V \cdot sec)
1	0	0
2	1.006	73514
3	5.030	368121
4	10.06	743798

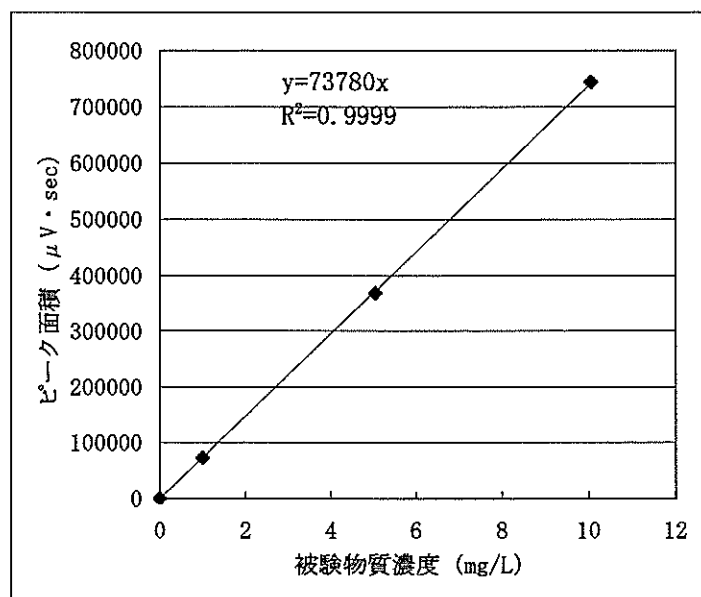


図1 検量線例

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 97 ～ 101 %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	0.9751	0.982	97
	2	0.9880		
10.12	1	10.03	10.0	99
	2	10.06		
101.2	1	102.2	102	101
	2	102.2		

5. 保存安定性

「4. の添加回収率」で調製した 3 濃度の試料溶液（0.982 mg/L、10.0 mg/L、102 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。試験溶液の濃度維持率は 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 (%)
0.982	1	0.9986	0.999	102
	2	0.9993		
10.0	1	10.22	10.2	102
	2	10.24		
102	1	102.9	103	101
	2	102.9		

6. 定量下限値および検出限界値

被験物質濃度1.003 mg/Lの試料液 20 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 0.03 mg/L、検出限界値は 0.009 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	0.9931
2	0.9917
3	0.9948
4	0.9946
5	0.9944
6	0.9941
7	0.9871
平均値	0.9928
標準偏差 (σ_{n-1})	0.00275

定量下限値 = $0.00275 \times 10 \rightleftharpoons 0.03 \text{ mg/L}$

検出限界値 = $0.00275 \times 3 \rightleftharpoons 0.009 \text{ mg/L}$

付 属 資 料 - 4

統 計 解 析 結 果 (JMP ver. 8.0.2)

EC₅₀ 値算出
算出に用いた値

濃度区	実測濃度	Log10(濃度)	生長阻害率	logit	Logit_重み	probit	probit_重み
1.0	0.919	-0.0370	0.0163	-4.1030	12.10	-2.1380	83.40
	0.919	-0.0370	0.0134	-4.2960	12.10	-2.2130	83.40
	0.919	-0.0370	0.0093	-4.6700	12.10	-2.3540	83.40
1.6	1.49	0.1730	0.0198	-3.9000	2091.60	-2.0570	12853.20
	1.49	0.1730	0.0191	-3.9380	2091.60	-2.0720	12853.20
	1.49	0.1730	0.0191	-3.9380	2091.60	-2.0720	12853.20
2.5	2.34	0.3700	0.0498	-2.9500	34.20	-1.6470	153.90
	2.34	0.3700	0.0685	-2.6110	34.20	-1.4870	153.90
	2.34	0.3700	0.0607	-2.7390	34.20	-1.5490	153.90
4.0	3.72	0.5710	0.1337	-1.8680	427.80	-1.1090	1478.60
	3.72	0.5710	0.1294	-1.9060	427.80	-1.1290	1478.60
	3.72	0.5710	0.1406	-1.8100	427.80	-1.0780	1478.60
6.3	5.85	0.7670	0.5072	0.0290	82.30	0.0180	209.80
	5.85	0.7670	0.4537	-0.1860	82.30	-0.1160	209.80
	5.85	0.7670	0.4694	-0.1230	82.30	-0.0770	209.80
10	9.41	0.9740	0.9014	2.2130	121.00	1.2890	474.50
	9.41	0.9740	0.9076	2.2850	121.00	1.3260	474.50
	9.41	0.9740	0.9163	2.3930	121.00	1.3810	474.50
16	15.0	1.1770	0.9231	2.4850	40.30	1.4260	160.00
	15.0	1.1770	0.9231	2.4850	40.30	1.4260	160.00
	15.0	1.1770	0.9014	2.2130	40.30	1.2890	160.00

JMP入力値

JMP入力値

JMP入力値

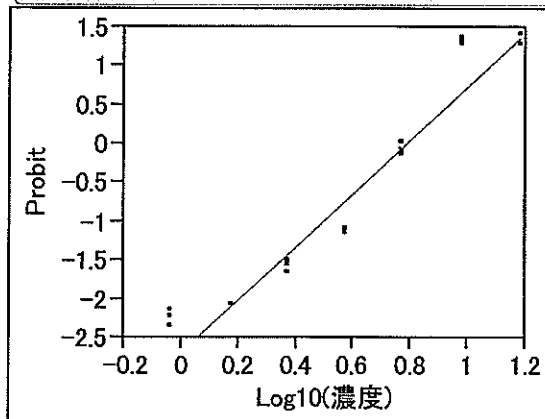
JMP入力値

JMP入力値

応答 Probit

重み: Probit 重み

回帰プロット



あてはめの要約

R2乗	0.94495
自由度調整R2乗	0.942052
誤差の標準偏差(RMSE)	8.629941
Yの平均	-1.80284
オブザベーション(または重みの合計)	46240.2

分散分析

要因	自由度	平方和	平均平方	F値
モデル	1	24289.552	24289.6	326.1398
誤差	19	1415.042	74.5	p値(Prob>F)
全体(修正済み)	20	25704.594		<.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)	5	1401.1228	280.225	281.8562
純粋誤差	14	13.9190	0.994	p値(Prob>F)
合計誤差	19	1415.0418		<.0001*
最大R2乗				0.9995

パラメータ推定値

項	推定値	標準誤差	t値	p値(Prob> t)
切片	-2.68366	0.063162	-42.49	<.0001*
Log10(濃度)	3.4518009	0.191137	18.06	<.0001*

逆推定

予測値				
Probit	Log10(濃度)	下側限界	上側限界	1-Alpha
0.000000	0.777466494	0.718510861	0.850644076	0.9500
-0.842000	0.533535853	0.496465630	0.578185794	
-1.282000	0.406066159	0.377880761	0.438360276	

応答の期待値に対する信頼区間

応答 Probit
重み: Probit_重み

逆推定

Probit	予測値	Log10(濃度)	下側限界	上側限界	1-Alpha
0	0.77746649	0.71851086	0.85064408	0.95	
-0.842	0.53353585	0.49646563	0.57818579		
-1.282	0.40606616	0.37788076	0.43836028		

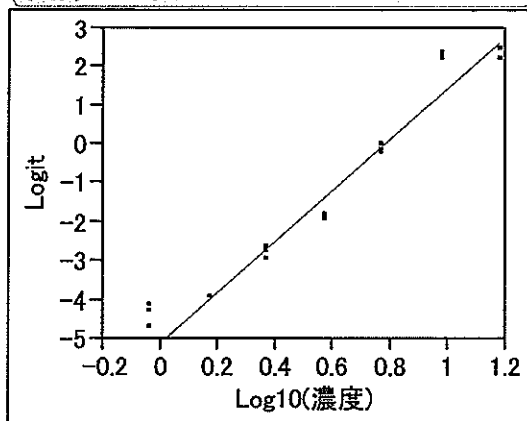
応答の期待値に対する信頼区間

EC50	5.991	5.230	7.090
EC20	3.416	3.137	3.786
EC10	2.547	2.387	2.744

応答 Logit

重み: Logit 重み

回帰プロット



あてはめの要約

R2乗	0.966417
自由度調整R2乗	0.964649
誤差の標準偏差(RMSE)	6.344692
Yの平均	-3.12786
オブザベーション(または重みの合計)	8427.9

分散分析

要因	自由度	平方和	平均平方	F値
モデル	1	22009.675	22009.7	546.7547
誤差	19	764.847	40.3	p値(Prob>F)
全体(修正済み)	20	22774.522		<.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)	5	750.83359	150.167	150.0202
純粋誤差	14	14.01368	1.001	p値(Prob>F)
合計誤差	19	764.84727		<.0001*
				最大R2乗
				0.9994

パラメータ推定値

項	推定値	標準誤差	t値	p値(Prob> t)
切片	-5.104397	0.109186	-46.75	<.0001*
Log10(濃度)	6.5577445	0.280452	23.38	<.0001*

逆推定

	予測値			
Logit	Log10(濃度)	下側限界	上側限界	1-Alpha
0.000000	0.778376900	0.733826218	0.830632573	0.9500
-1.386000	0.567023744	0.536535492	0.601802791	
-2.197000	0.443353175	0.418915421	0.470083951	

応答の期待値に対する信頼区間

応答 Logit
重み: Logit_重み

逆推定

Logit	予測値	Log10(濃度)	下側限界	上側限界	1-Alpha
0	0.77837690	0.73382622	0.83063257		0.95
-1.386	0.56702374	0.53653549	0.60180279		
-2.197	0.44335318	0.41891542	0.47008395		

応答の期待値に対する信頼区間

EC50	6.003	5.418	6.771
EC20	3.690	3.440	3.998
EC10	2.776	2.624	2.952

最大無作用濃度 (NOEC) 算出
入力値

濃度区	生長速度
0	1.89080
0	1.87430
0	1.88150
0	1.86580
0	1.86950
0	1.84930
0.919	1.84140
0.919	1.84670
0.919	1.85450
1.49	1.83470
1.49	1.83610
1.49	1.83610
2.34	1.77870
2.34	1.74370
2.34	1.75820
3.72	1.62150
3.72	1.62970
3.72	1.60870
5.85	0.92250
5.85	1.02270
5.85	0.99320
9.41	0.18460
9.41	0.17290
9.41	0.15670
15.0	0.14390
15.0	0.14390
15.0	0.18460