

受理番号	E03-3191
試験番号	93191

最 終 報 告 書

p-(フェニルアゾ)アニリンのオオミジンコによる繁殖試験

2004 年 10 月 27 日

化学物質評価研究機構
久留米事業所

陳 述 書

財団法人 化学物質評価研究機構
久留米事業所

試験委託者 環境省

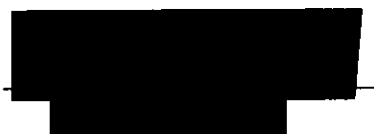
試験の表題 *p*-(フェニルアソ)アニリンのオオミジンコによる繁殖試験

試験番号 93191

本最終報告書(写し)は、原本を正確にコピーしたものです。

2004 年 11 月 / 日

運営管理者



陳 述 書

財団法人 化学物質評価研究機構
久留米事業所

試験委託者 環境省

試験の表題 *p*-(フェニルアゾ)アニリンのオオミジンコによる繁殖試験

試験番号 93191

上記試験は日本国環境省総合環境政策局環境保健部環境安全課環境リスク評価室長通知「生態影響試験実施に関する基準の改正について」(別添)「生態影響試験実施に関する基準」(環保安第242号、2001年)に従って実施したものです。

2004 年10月27日

試験責任者



信 頼 性 保 証 書

財団法人 化学物質評価研究機構
久留米事業所

試験委託者 環境省

試験の表題 *p*-(フェニルアゾ)アニリンのオオミジンコによる繁殖試験

試験番号 93191

上記試験は財団法人化学物質評価研究機構久留米事業所の信頼性保証部門が監査又は査察を実施しており、監査又は査察を行った内容、日付並びに試験責任者及び運営管理者に報告を行った日付は以下の通りです。

監査又は査察内容	監査又は査察日	報告日（試験責任者）	報告日（運営管理者）
試験計画書	2004年7月12日	2004年7月13日	2004年7月13日
	2004年10月22日	2004年10月22日	2004年10月22日
試験実施状況	2004年7月13日	2004年7月14日	2004年7月14日
	2004年7月22日	2004年8月2日	2004年8月2日
	2004年8月2日	2004年8月2日	2004年8月2日
生データ及び最終報告書	2004年10月27日	2004年10月27日	2004年10月27日

本最終報告書は、試験の方法が正確に記載されており、内容が試験計画書及び標準操作手順書に従い、かつ、生データを正確に反映していることを保証します。

2004年10月27日

信頼性保証部門責任者

目 次

	頁
要 約.....	1
1. 表 題.....	2
2. 試験委託者.....	2
3. 試験施設.....	2
4. 試験目的.....	2
5. 試験方法.....	2
6. 適用 G L P.....	2
7. 試験日程.....	2
8. 試験関係者.....	3
9. 最終報告書の承認.....	3
10. 記録及び試資料の保管.....	3
11. 被 験 物 質.....	4
12. 試験材料と方法.....	5
13. 試験結果.....	11
14. 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.....	12
Table 1～11	13～22
Figure 1, 2	23, 24
Appendix 1 (Water quality of dilution water)	
Appendix 2 (Calibration curve and chromatogram)	
Appendix 3 (Result of reproduction test)	
Appendix 4 (Statistical method for NOEC calculation)	

別添資料 *p*-(フェニルアソ)アニリンのオオミジンコによる繁殖試験予備試験結果

要 約

p-(フェニルアゾ)アニリンのオオミジンコ(*Daphnia magna*)による繁殖試験を実施した。

試験は、1試験区10頭を用い、5濃度区[設定濃度：0.0160、0.00800、0.00400、0.00200及び0.00100 mg/L(公比2.0)]及び対照区、暴露期間21日間、水温20±1℃、1回/日の頻度で試験液の全量を交換する半止水式で行った。

その結果、試験液中の被験物質濃度は、設定濃度に対して80.2～106%であった。試験結果は測定濃度の時間加重平均値(前述の設定濃度を測定濃度表示にした場合、0.0144、0.00708、0.00365、0.00178及び0.000922 mg/L)に基づいて算出した。

p-(フェニルアゾ)アニリンの21日間における親ミジンコの半数致死濃度(LC50)、50%繁殖阻害濃度(EC50)は共に>0.0144 mg/L、最小影響濃度(LOEC)は0.0144 mg/L、最大無影響濃度(NOEC)は0.00708 mg/Lであった。

1. 表 題

p-(フェニルアゾ)アニリンのオオミジンコによる繁殖試験

2. 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 1-2-2

3. 試験施設

名 称 財団法人 化学物質評価研究機構 久留米事業所

所 在 地 (〒830-0023)福岡県久留米市中央町 19-14
TEL (0942) 34-1500

4. 試験目的

被験物質のミジンコ類の繁殖に対する影響を調べる。

5. 試験方法

段階的な濃度に調製した被験物質を含む試験液にオオミジンコを21日間暴露した。この間、親ミジンコの生死、症状及び繁殖能力等を観察して影響の有無を調べた。また対照群と統計的手法を用いて比較し、その結果からLOEC*¹とNOEC*²を求め、可能な限りEC50*³も求めた。

試験は「OECD Guidelines for Testing of Chemicals, Section 2 : Effects on Biotic Systems, 211 “*Daphnia magna* Reproduction Test”, 1998」及び「OECD Guidance Document 23 “Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures”」に準じて行った。

*¹ LOEC (Lowest Observed Effect Concentration) : 暴露期間において対照群と比較して試験生物の繁殖と生存に統計的有意な影響を及ぼす被験物質の試験最低濃度を示す。ただし、この濃度以上においては同等以上の影響がみられなければならない。

*² NOEC (No Observed Effect Concentration) : LOECの直ぐ下の試験濃度であり、暴露期間において対照群と比較して試験生物の繁殖に統計的有意な影響を及ぼさない濃度である。

*³ EC50 (Median Effective Concentration) : 暴露期間において試験生物の繁殖に50%の減少を与える被験物質濃度を示す。影響の指標は繁殖阻害による。

6. 適用GLP

この試験は、日本国環境省総合環境政策局環境保健部環境安全課環境リスク評価室長通知「生態影響試験実施に関する基準の改正について」(別添)「生態影響試験実施に関する基準」(環保安第242号、2001年)に適合して行った。

7. 試験日程

1) 試験開始日 2004 年 7 月 12 日


2) 実験開始日 2004 年 7 月 13 日

3) 実験終了日 2004 年 8 月 3 日

4) 試験終了日 2004 年 10 月 27 日

8. 試験関係者

試験責任者


 所属 試験第四課

生物試験担当者




分析担当者




9. 最終報告書の承認

試験責任者

2004 年 10 月 27 日

氏 名




10. 記録及び試資料の保管

1) 被験物質

供試試料約5 g*を保管用容器に入れ密栓後、最終報告書作成後10年間、久留米事業所試料保管室に保管する。保管期間経過後の処置は試験委託者と協議の上決定する。ただし、保管中に品質が著しく変化する物質の保管期間は、その品質が保管に耐えうる期間とし、廃棄に際しては試験委託者の承認を得る。
 * 試験番号93189、93190、93191及び93192についての共用保管試料とする。

2) 生データ、資料等

生データ、試験計画書、その他必要な資料等は最終報告書と共に、最終報告書作成後10年間、久留米事業所資料保管室に保管する。保管期間経過後の処置は試験委託者と協議の上決定する。

11. 被 験 物 質

被験物質に関する情報を以下に示す。供試試料に関する情報については供給者資料等によった。

1) 名 称

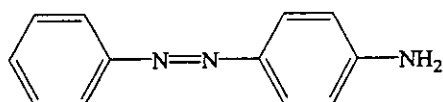
p-(フェニルアゾ)アニリン

2) C A S 番 号

60-09-3

3) 構 造 式 等

(1) 構 造 式



(2) 分 子 式

$C_{12}H_{11}N_3$

(3) 分 子 量

197.24^{*2}

4) 物理化学的性質等

(1) 融 点

124.3℃^{*1}

(2) 沸 点

>360℃^{*2}

(3) 分配係数

logPow=2.98 (calculated)^{*2}

情 報 源

*1: 供給者提供の添付資料

*2: [REDACTED]

5) 供試試料に関する情報

(1) 純 度

99.0%

(2) ロット番号

PKH7121

(3) 供 給 者

[REDACTED]

(4) 供 給 量

25 g

(5) 入 手 日
2003年12月26日

(6) 外 観
だいたい色粉末

- 6) 被験物質の確認
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、被験物質の特性が認められることを確認した。
- 7) 保管条件及び保管条件下での安定性の確認
- (1) 保 管 条 件
試験中の被験物質は室温暗所で保管した。
- (2) 安定性の確認
実験開始前及び終了後に測定した被験物質の赤外吸収スペクトルに変化がなかったことから、実験期間中の被験物質が安定であったことを確認した。

12. 試験材料と方法

1) 試 験 生 物

(1) 種

オオミジンコ (*Daphnia magna* Clone A)

(2) 生物種選択の理由

テストガイドラインに推奨されている種類である。

(3) 供 給 源

英国Sheffield大学(所在地 Sheffield S10 2UQ, United Kingdom)より分譲された*Daphnia magna*(Clone A)の子孫で、久留米事業所で継代飼育している成体より産出された幼体を用いた。幼体を産出する成体は、試験条件と同じ水質(脱塩素水道水)、水温(20±1℃)及び明暗周期(16時間明/8時間暗)下で飼育したもの(14日齢)で成体の生存率が100%の群(ロット)を使用した。継代飼育中はミジンコ1頭当たり*Chlorella vulgaris*を0.1～0.2 mgC(有機炭素含量)/日の割合で1日に1回給餌した。また、試験系の再現性を確認するために実施した基準物質(ニクロム酸カリウム、試薬特級、和光純薬工業株式会社)の急性遊泳阻害試験の48時間EC50は0.283 mg/Lであった。この値は久留米事業所における基準物質の48時間EC50の規定範囲内(平均±2×標準偏差：0.110～0.352mg/L)であった[平均±標準偏差は0.231±0.061mg/L(n=45)]。

(4) 幼体の選別

成体群が産出した生後24時間以内の幼体を用いた。

(5) 群 分 け

無作為に抽出を行った。

2) 試験用水

十分にエアレーションし、温度調節した脱塩素水道水を用いた。使用時には、残留塩素濃度が0.02 mg/L以下であることを確認した。定期的に測定した試験用水の水質測定結果をAppendix 1に示す。

3) 試験器具及び装置

(1) 試験器具

試験容器： 100 mLガラスビーカー

また、ゴミの進入や試験液の蒸散を防ぐため蓋をした。

(2) 試験装置

恒温槽： 加熱冷却装置によって試験容器内の水温を $20\pm 1^{\circ}\text{C}$ に維持可能なもの

4) 試験条件

(1) 暴露条件

①方 式

被験物質を含む試験液へ試験生物を暴露した。

試験は1回/日の頻度で試験液の全量を交換する半止水式で行った。

②期 間

21日間

③試験濃度

試験は5濃度区[設定濃度：0.0160、0.00800、0.00400、0.00200及び0.00100 mg/L(公比2.0)]で行った。試験濃度及び公比は48時間急性遊泳阻害試験の結果(48時間EC50：0.461 mg/L)及び予備試験の結果から決定した。試験濃度は純度(99.0%)補正を行った値で表示した。予備試験結果は別添資料に示す。

④対 照 群

被験物質を含まない試験用水のみの対照区を設けた。

⑤試験生物数

10頭/試験区(1頭×10試験容器)

⑥試験液量

800 mL/試験区(80 mL×10試験容器)

(2) 環境条件

①水 温

$20\pm 1^{\circ}\text{C}$

②溶存酸素濃度(DO)

暴露期間中のDOは飽和濃度の60%以上(約5 mg/L以上)を維持するようにした。

③pH

試験液のpH調整は行わず、暴露期間中のpHは1.5以内の変動になるようにした。

④全 硬 度

10～250 mg/L(CaCO₃換算)とした。

⑤照 明

室内灯による16時間明(光強度15～20 $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$ 以下)/8時間暗

⑥給 餌

ミジンコ1頭当たり*Chlorella vulgaris*を0.1～0.2 mgC(有機炭素含量)/日の割合で1日に1回給餌した。

5) 試験液の調製法

試験原液の調製は純度(99.0%)補正して行った。

必要量の被験物質を秤量し、試験用水と混合後、超音波を照射して被験物質を粉碎後約1時間攪拌して溶解し、10.0 mg/Lの試験原液を調製した。調製容器に入れた試験用水に必要な量の試験原液を添加後、攪拌して試験液を調製した。調製は試験区毎に行い、これを各試験容器に分割した。

6) 観察と測定

(1) 親ミジンコの生死

暴露開始後から終了時まで毎日観察し、生死を記録した。肢及び腹部の動きが観察されない場合を死亡とみなした。

(2) 産出された幼体の数と状態

親ミジンコから産出される幼体数を初産日から終了時まで毎日計数した。また、肉眼での状態を観察した。計数と観察後の幼体は処分した。

(3) 親ミジンコの状態

産仔の観察時に、親ミジンコの大きさ、遊泳行動の異常の有無、雌雄の判別、育房内の卵の有無(抱卵日)、休眠卵や墮胎卵の有無などを観察した。

(4) 水 質 等

試験液の溶存酸素濃度、pH、水温及び全硬度を暴露期間中に6回(調製時及び換水前のものを1回/週の頻度で3回繰り返し)測定した。調製時は水質測定用に調製容器より分取した試験液について、換水前には各試験区に付き10試験容器のうち1試験容器について測定した。光強度については暴露期間中1回測定した。溶存酸素濃度は溶存酸素計58型(Yellow Springs Instrument Co., Inc.)、pHはガラス電極式水素イオン濃度計HM-14P型(東亜ディーケーケー)、水温は検定済ガラス製棒状温度計で測定した。全硬度はEDTA滴定法により測定した。また、光強度はポータブル光量子計QSL-100(Biospherical Instruments Inc.)で測定した。

(5) 試験液中の被験物質濃度

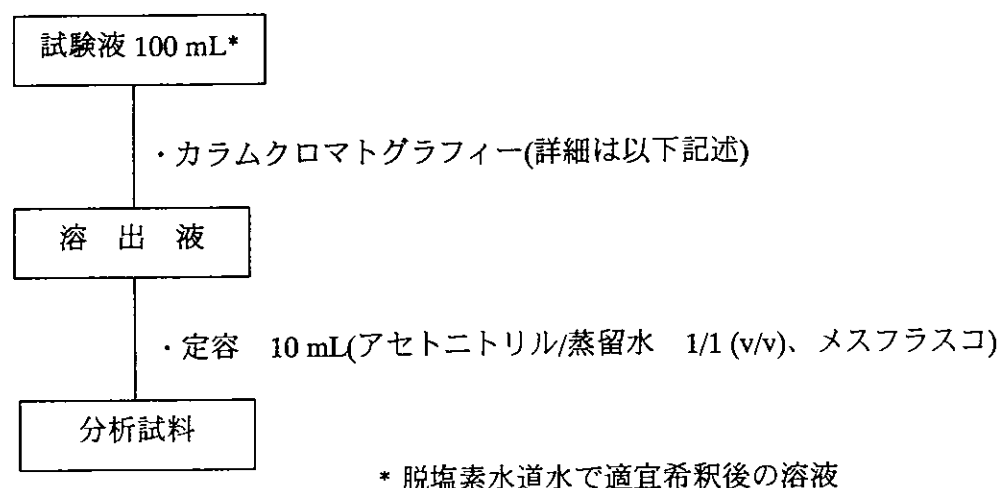
①採水と分析回数

被験物質濃度の測定は暴露期間中に6回(調製時及び換水前のものを1回／週の頻度で3回繰り返し)行った。調製時は被験物質濃度測定用に調製容器より分取した試験液について測定した。換水前は各試験容器の中層から均等量採取し、混合した。換水前に採取した試験液は遠心分離(3,000 rpm、10分間)により、餌を除去して測定に用いた。

②試験液の前処理操作

採取した試験液は、そのまま若しくは脱塩素水道水で適宜希釈後、以下のフロースキームにより前処理操作を行い、分析試料とした。

フロースキーム



カラムクロマトグラフの条件

セップパック C18

(洗浄法：アセトニトリル、蒸留水各10 mL)

負荷法 全量を負荷した。

脱水法 遠心分離 (3,000 rpmで5 min)

溶出法 溶出液 アセトニトリル/蒸留水 1/1 (v/v) 約8 mL
この溶出液を分析に供した。

③分析方法

前処理操作を行って得られた分析試料は、次頁の定量条件に基づき高速液体クロマトグラフィー(HPLC)により被験物質の定量を行った。最終試料溶液中の被験物質濃度はクロマトグラム上のピーク面積を濃度既知の標準溶液のピーク面積と比較し、比例計算して求めた。得られたクロマトグラムの一部をAppendix 2に示す。

分析機器の定量条件

機 器	高速液体クロマトグラフ
ポ ン プ	島津製作所製 LC-10AD
検 出 器	島津製作所製 SPD-10AV
オートインジェクター	島津製作所製 SIL-10A _{XL}
カ ラ ム	L-column ODS 15 cm×4.6 mmφ ステンレス製
カラム温度	40℃
溶 離 液	アセトニトリル/蒸留水 55/45 (v/v)
流 量	1.0 mL/min
測 定 波 長	382 nm
注 入 量	400 μL
感 度	
検 出 器	0.5 AU/1 V

④標準溶液の調製

分析試料中の被験物質濃度を求めるための標準溶液の調製は次のように行った。また、標準溶液の調製は純度(99.0%)補正して行った。

被験物質20.2 mgを電子分析天びんで正確にはかりとり、アセトニトリルに溶解して1,000 mg/Lの被験物質溶液を調製した。これをアセトニトリルで希釈して50.0 mg/Lの被験物質溶液を調製した。続いてこれをアセトニトリルで希釈して1.00 mg/Lの被験物質溶液を調製した。さらにこれをアセトニトリル/蒸留水 1/1で希釈して0.100 mg/Lの被験物質溶液を調製した。0.100 mg/Lの被験物質溶液をアセトニトリル/蒸留水 1/1で希釈して0.0100 mg/Lの標準溶液を調製した。

⑤検量線の作成

④の標準溶液の調製と同様にして0.00100、0.00500、0.0100及び0.0200 mg/Lの標準溶液を調製した。これらを③の定量条件に従って分析し、得られたそれぞれのクロマトグラム上のピーク面積と被験物質濃度により検量線を作成した。本試験に用いた検量線をAppendix 2に示す。なお、試験液中の被験物質の検出下限は検量線の濃度及びピーク面積値を用いて回帰分析を行い、得られた数値を基にして算出された濃度(0.000491 mg/L)とした。よって、試験液中の検出下限濃度は前処理操作を考慮して、0.0000549 mg/Lとした。

⑥回収試験及びブランク試験

②の試験液分析操作における被験物質の回収率を求めるため、試験用水に被験物質溶液を添加し、回収試験を行った。また、被験物質を加えない試験用水について、回収試験と同じ操作によりブランク試験を行った。得られた2点の回収率は90.7及び88.1%、その平均値は89.4%であり、被験物質濃度を求める場合の補正值とした。

7) 結果の処理

結果の算出には測定濃度の時間加重平均値を用いた。

(1) 親ミジンコの半数致死濃度(LC50)

14日間、21日間共に本試験濃度範囲で50%以上の死亡率が得られなかったため、LC50は「>試験最高濃度」と表示した。

(2) 累積生存産仔数

各試験容器(生存親1頭当たり)の暴露期間中の累積生存産仔数(TF)及び平均累積生存産仔数(\overline{TF})を以下の式より求めた。

$$TF = \sum_{n=1}^{ne} F_n$$

ここで、

n : 幼体観察回数

F_n : n 回目の生存幼体数

ne : 最終観察回

$$\overline{TF} = \frac{\sum_{n=1}^m TF_n}{m}$$

ここで、

n : 試験容器数

TF_n : 各試験容器(生存親1頭当たり)の累積生存産仔数

m : 試験区当たりの系列数(最大10)

(3) 50%繁殖障害濃度(EC50)

本試験濃度範囲で50%以上の繁殖障害が得られなかったため、EC50は「>試験最高濃度」と表示した。

(4) 最小影響濃度(LOEC)と最大無影響濃度(NOEC)

各試験区での生存親ミジンコ1頭当たりの累積生存産仔数について、Bartlettによる等分散検定を行った後、各濃度区と対照区との有意差の有無を、一元配置分散分析及びSchefféの多重比較法により検定を行った。初産日及び親ミジンコの死亡数については共にKruskal-Wallisの順位和検定を行った。これらの結果からLOEC及びNOECを評価した。統計的有意差検定における入力データ及びそれらの出力結果をAppendix 4に示す。

8) 数値の取扱い

数値の丸め方は、JIS Z 8401 規則Bによった。

13. 試験結果

設定濃度と測定濃度の時間加重平均値の対比表を以下に示す。

設定濃度 (mg/L)	測定濃度の 時間加重平均値(mg/L)
0.00100	0.000922
0.00200	0.00178
0.00400	0.00365
0.00800	0.00708
0.0160	0.0144

以下の本文中の濃度区表示は測定濃度の時間加重平均値で示す。

1) ミジンコの観察結果

(1) 親ミジンコの死亡数及び死亡率

対照区での親ミジンコの累積死亡率は暴露終了時で0%であり、試験成立条件である20%を超えないという基準を満たした。

各濃度区における暴露終了時の累積死亡率は0.000922、0.00178、0.00365、0.00708及び0.0144 mg/L区で、それぞれ10、0、10、10及び20%であった。また、対照区と比較して統計的な有意差は認められなかった。

暴露期間中の各試験区における親ミジンコの累積死亡数及び死亡率の結果をTable 1、Figure 1及びAppendix 3に示す。

(2) 初産日

対照区での親ミジンコの初産日は平均8.1日であり、適正な範囲と考えられた。

0.000922～0.0144 mg/L区での親ミジンコの初産日は平均8.0～8.2日であり、対照区と比較して統計的な有意差は認められなかった。

各試験区における親ミジンコの初産日をTable 2に示す。

(3) 平均累積生存産仔数

対照区の21日間での親ミジンコ1頭当たりの平均累積生存産仔数は110頭であり、試験成立条件である60頭以上の基準を満たした。

0.000922～0.00708 mg/L区での親ミジンコの1頭当たりの平均累積生存産仔数は95.8～111頭であった。また、0.0144 mg/L区では84.3頭であり、対照区と比較して統計的な有意差が認められた。

暴露期間中の各試験区における親ミジンコ1頭当たりの平均累積生存産仔数の結果をTable 3、Figure 2及びAppendix 3、有意差検定結果をAppendix 4に示す。

(4) 親ミジンコの大きさと状態

対照区において成長阻害及び症状はみられなかった。

成長阻害については0.0144 mg/L区で6～10日後に観察されたが、その他の濃度区では観察されなかった。

0.000922～0.00365 mg/L区においては体色明化や遊泳阻害が暴露終了時に観察された。

0.00708及び0.0144 mg/L区においては体色明化、遊泳阻害などみられたが、それらの症状が観察された個体はその後、死に至った。

- (5) 休眠卵の発生等
 暴露期間中、いずれの試験区でも休眠卵の発生は認められなかった。
 また、0.000922及び0.0144 mg/L区で死亡仔虫及び墮胎卵が観察され、0.00708 mg/L区では墮胎卵のみが観察された。その他の試験区では観察されなかった。
- 2) 親ミジンコに対するLC50
 親ミジンコに対する14及び21日間LC50は共に>0.0144 mg/Lであった。
 14及び21日間の親ミジンコのLC50をTable 4に示す。
- 3) 繁殖についてのEC50
 14及び21日間EC50は共に>0.0144 mg/Lであった。
 14及び21日間のEC50をTable 5に示す。
- 4) 繁殖についてのLOEC及びNOEC
 親ミジンコの繁殖についての21日間のLOECは0.0144 mg/L、NOECは0.00708 mg/Lであった。
 親ミジンコ1頭当たりの累積生存産仔数の有意差検定結果をTable 6及びAppendix 4に示す。
- 5) 試験液の観察と測定結果
- (1) 試験液の状態
 試験液調製時には無色透明であり、換水前ではクロレラの給餌により薄緑色を呈していた。
- (2) 試験液の水温、溶存酸素濃度(DO)、pH及び硬度等
 暴露期間中に測定した水温は20.0～20.3℃であり、20±1℃の範囲であった。DOは8.5～8.9 mg/Lであり、飽和溶存酸素濃度の60%以上であった(19～21℃の飽和溶存酸素濃度：9.01～8.68 mg/L、JIS K 0102)。pHは7.4～7.7であり、1.5以内の変動であった。全硬度は38.8～52.4 mgCaCO₃/Lであり、10～250 mgCaCO₃/Lの範囲であった。光強度は7.0 μE/m²sであり、15～20 μE/m²s以下であった。
 以上のことから、水温、DO、pH及び硬度については、ミジンコの試験環境として適正範囲であったと考えられる。
 試験液の水温をTable 7、溶存酸素濃度をTable 8、pHをTable 9、全硬度をTable 10に示す。
- (3) 試験液中の被験物質濃度
 試験液中の被験物質濃度は、調製時では設定濃度に対して84.4～106%、換水前では80.2～95.7%であった。被験物質濃度の測定結果をTable 11に示す。
 また、クロマトグラムの一部をAppendix 2に示す。
14. 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
 当該要因はなかった。

Table 1. Cumulative number of dead parental *Daphnia* during exposure to *p*-Phenylazoaniline

Measured concentration* (mg/L)	Exposure time (day)										
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Control	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)
0.000922	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)
0.00178	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)
0.00365	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)
0.00708	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)
0.0144	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)

*Time-weighted mean

Table 1. (continued)

Measured concentration* (mg/L)	Exposure time (day)										
	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
Control	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)
0.000922	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(10.0)
0.00178	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)
0.00365	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(10.0)
0.00708	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1
	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(10.0)	(10.0)	(10.0)	(10.0)	(10.0)
0.0144	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2
	(10.0)	(10.0)	(10.0)	(10.0)	(10.0)	(20.0)	(20.0)	(20.0)	(20.0)	(20.0)	(20.0)

*Time-weighted mean

The values in parentheses express mortality (%) of *Daphnia*.

Table 2. Time (days) required to first brood production during exposure to *p*-Phenylazoaniline

Measured concentration* (mg/L)	Vessel No.						
	1	2	3	4	5	6	7
Control	8	9	8	8	8	8	8
0.000922	8	8	8	8	8	8	8
0.00178	8	8	8	8	8	8	8
0.00365	8	9	8	8	9	8	8
0.00708	8	8	8	8	8	8	8
0.0144	8	9	-	8	8	8	8

*Time-weighted mean

Table 2. (continued)

Measured concentration* (mg/L)	Vessel No.			Mean
	8	9	10	
Control	8	8	8	8.1
0.000922	8	8	8	8.0
0.00178	8	9	9	8.2
0.00365	8	8	8	8.2
0.00708	8	8	8	8.0
0.0144	8	9	8	8.2

*Time-weighted mean

Table 3. Mean cumulative number of juveniles produced per adult alive($\Sigma F_1/P$) during exposure to *p*-Phenylazoaniline

Measured concentration* (mg/L)	Exposure time (day)										
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Control	0	0	0	0	0	0	0	0	14.8	16.6	16.6
0.000922	0	0	0	0	0	0	0	0	16.8	16.8	16.8
0.00178	0	0	0	0	0	0	0	0	13.8	17.6	17.6
0.00365	0	0	0	0	0	0	0	0	12.9	16.2	16.2
0.00708	0	0	0	0	0	0	0	0	17.8	17.8	17.8
0.0144	0	0	0	0	0	0	0	0	10.3	14.1	14.1

*Time-weighted mean

Table 3. (continued)

Measured concentration* (mg/L)	Exposure time (day)										
	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
Control	22.5	28.3	28.3	28.3	52.7	52.7	52.7	81.2	81.2	81.2	110
0.000922	31.6	32.1	32.1	32.1	57.1	57.1	57.1	79.4	79.4	79.4	95.8
0.00178	26.5	31.6	31.6	31.6	58.5	58.5	58.5	85.5	85.5	85.5	110
0.00365	21.3	28.7	28.7	28.7	56.8	56.8	56.8	83.2	83.2	83.2	107
0.00708	27.6	32.9	32.9	32.9	57.9	57.9	57.9	85.8	85.8	85.8	111
0.0144	21.4	25.5	25.5	25.5	47.6	47.6	47.6	64.0	64.0	64.0	84.3

*Time-weighted mean

Table 4. Calculated LC50 values of *p*-Phenylazoaniline for parental *Daphnia* based on measured concentrations

Exposure time (day)	LC50 (mg/L)	95-Percent confidence limits (mg/L)	Statistical method
14	>0.0144	-	-
21	>0.0144	-	-

Table 5. Calculated EC50 values of *p*-Phenylazoaniline for inhibition of reproduction based on measured concentrations

Exposure time (day)	EC50 (mg/L)	95-Percent confidence limits (mg/L)	Statistical method
14	>0.0144	-	-
21	>0.0144	-	-

Table 6. Significance test of difference between the mean cumulative number of juveniles produced per adult in control and test vessels after 21 days exposure to *p*-Phenylazoaniline

Measured concentration* (mg/L)	Vessel No.						
	1	2	3	4	5	6	7
Control	128	116	98	112	117	107	110
0.000922	100	89	-	73	85	96	85
0.00178	106	115	114	97	113	111	96
0.00365	131	78	112	101	108	130	102
0.00708	111	101	-	122	109	104	115
0.0144	82	78	-	77	89	78	-

*Time-weighted mean

Table 6. (continued)

Measured concentration* (mg/L)	Vessel No.			Mean	S.D.	Significant difference
	8	9	10			
Control	100	104	110	110	8.8	
0.000922	109	115	110	95.8	14.0	
0.00178	122	119	106	110	8.7	
0.00365	106	-	92	107	16.8	
0.00708	113	118	102	111	7.3	
0.0144	67	106	97	84.3	12.5	**

*Time-weighted mean

** : Significantly different from Control at $p < 0.01$.

Table 7. Temperature of test solutions during 21-day *Daphnia* reproduction test to *p*-Phenylazoaniline

Measured concentration* (mg/L)		Temperature (°C)					
		0-day	1-day	7-day	8-day	14-day	15-day
Control	New	20.1		20.2		20.1	
	Old		20.3		20.3		20.3
0.000922	New	20.0		20.1		20.1	
	Old		20.3		20.3		20.3
0.00178	New	20.0		20.1		20.1	
	Old		20.3		20.3		20.3
0.00365	New	20.0		20.1		20.1	
	Old		20.3		20.3		20.3
0.00708	New	20.0		20.1		20.2	
	Old		20.3		20.3		20.3
0.0144	New	20.0		20.1		20.2	
	Old		20.3		20.3		20.3

*Time-weighted mean

New : freshly prepared test solutions

Old : test solutions after 24 hours exposure

Table 8. Dissolved oxygen concentrations of test solutions during 21-day *Daphnia* reproduction test to *p*-Phenylazoaniline

Measured concentration* (mg/L)		Dissolved oxygen concentration (mg/L)					
		0-day	1-day	7-day	8-day	14-day	15-day
Control	New	8.6		8.6		8.6	
	Old		8.8		8.6		8.7
0.000922	New	8.7		8.6		8.7	
	Old		8.8		8.6		8.9
0.00178	New	8.7		8.6		8.7	
	Old		8.8		8.5		8.8
0.00365	New	8.7		8.6		8.7	
	Old		8.8		8.5		8.7
0.00708	New	8.7		8.6		8.7	
	Old		8.8		8.5		8.8
0.0144	New	8.7		8.6		8.6	
	Old		8.8		8.6		8.7

*Time-weighted mean

New : freshly prepared test solutions

Old : test solutions after 24 hours exposure

Table 9. pH values of test solutions during 21-day *Daphnia* reproduction test to *p*-Phenylazoaniline

Measured concentration*		pH					
(mg/L)		0-day	1-day	7-day	8-day	14-day	15-day
Control	New	7.5		7.5		7.5	
	Old		7.5		7.5		7.5
0.000922	New	7.5		7.6		7.5	
	Old		7.5		7.5		7.5
0.00178	New	7.5		7.7		7.6	
	Old		7.6		7.4		7.5
0.00365	New	7.5		7.7		7.6	
	Old		7.6		7.5		7.4
0.00708	New	7.6		7.7		7.6	
	Old		7.6		7.5		7.4
0.0144	New	7.6		7.7		7.7	
	Old		7.6		7.5		7.5

*Time-weighted mean

New : freshly prepared test solutions

Old : test solutions after 24 hours exposure

Table 10. Total hardness values of test solutions during 21-day *Daphnia* reproduction test to *p*-Phenylazoaniline

Measured concentration*		Total hardness (mgCaCO ₃ /L)					
(mg/L)		0-day	1-day	7-day	8-day	14-day	15-day
Control	New	42.4		38.8		47.2	
	Old		42.6		43.8		46.0
0.000922	New	41.8		44.2		47.2	
	Old		42.4		52.4		46.0
0.00178	New	43.0		45.2		47.4	
	Old		43.0		50.4		46.6
0.00365	New	42.8		40.8		47.8	
	Old		42.4		51.2		46.4
0.00708	New	42.0		44.6		47.2	
	Old		42.0		46.6		47.0
0.0144	New	41.2		41.0		47.8	
	Old		41.2		45.8		46.8

*Time-weighted mean

New : freshly prepared test solutions

Old : test solutions after 24 hours exposure

Table 11. Measured concentrations of test substance in test solutions

Nominal concentration (mg/L)	Measured concentration (mg/L) (Percentage of nominal)			
	0-day ^{a)}	1-day ^{b)}	7-day ^{a)}	8-day ^{b)}
Control	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
0.00100	0.000908 (90.8)	0.000879 (87.9)	0.00106 (106)	0.000906 (90.6)
0.00200	0.00170 (85.2)	0.00169 (84.3)	0.00206 (103)	0.00178 (89.1)
0.00400	0.00355 (88.8)	0.00337 (84.2)	0.00424 (106)	0.00372 (92.9)
0.00800	0.00675 (84.4)	0.00668 (83.5)	0.00803 (100)	0.00725 (90.6)
0.0160	0.0141 (88.3)	0.0136 (85.1)	0.0167 (104)	0.0153 (95.7)

Table 11. (continued)

Nominal concentration (mg/L)	Measured concentration (mg/L) (Percentage of nominal)		Time-weighted mean ^{c)} (mg/L)
	14-day ^{a)}	15-day ^{b)}	
Control	n.d.	n.d.	-
0.00100	0.000972 (97.2)	0.000819 (81.9)	0.000922 (92.2)
0.00200	0.00184 (92.2)	0.00162 (80.9)	0.00178 (89.0)
0.00400	0.00368 (92.1)	0.00336 (84.1)	0.00365 (91.3)
0.00800	0.00716 (89.6)	0.00661 (82.7)	0.00708 (88.5)
0.0160	0.0141 (87.9)	0.0128 (80.2)	0.0144 (90.2)

n.d. : Not detected(0.0000549 mg/L)

a) freshly prepared test solutions

b) test solutions after 24 hours exposure

c) The values are expressed as time-weighted means calculated by the following equation:

$$\{(C_0 - C_1)/(\ln C_0 - \ln C_1) + (C_7 - C_8)/(\ln C_7 - \ln C_8) + (C_{14} - C_{15})/(\ln C_{14} - \ln C_{15})\}/3$$

where

 C_n : the measured concentration at n-day $\ln C_n$: the natural logarithm of C_n

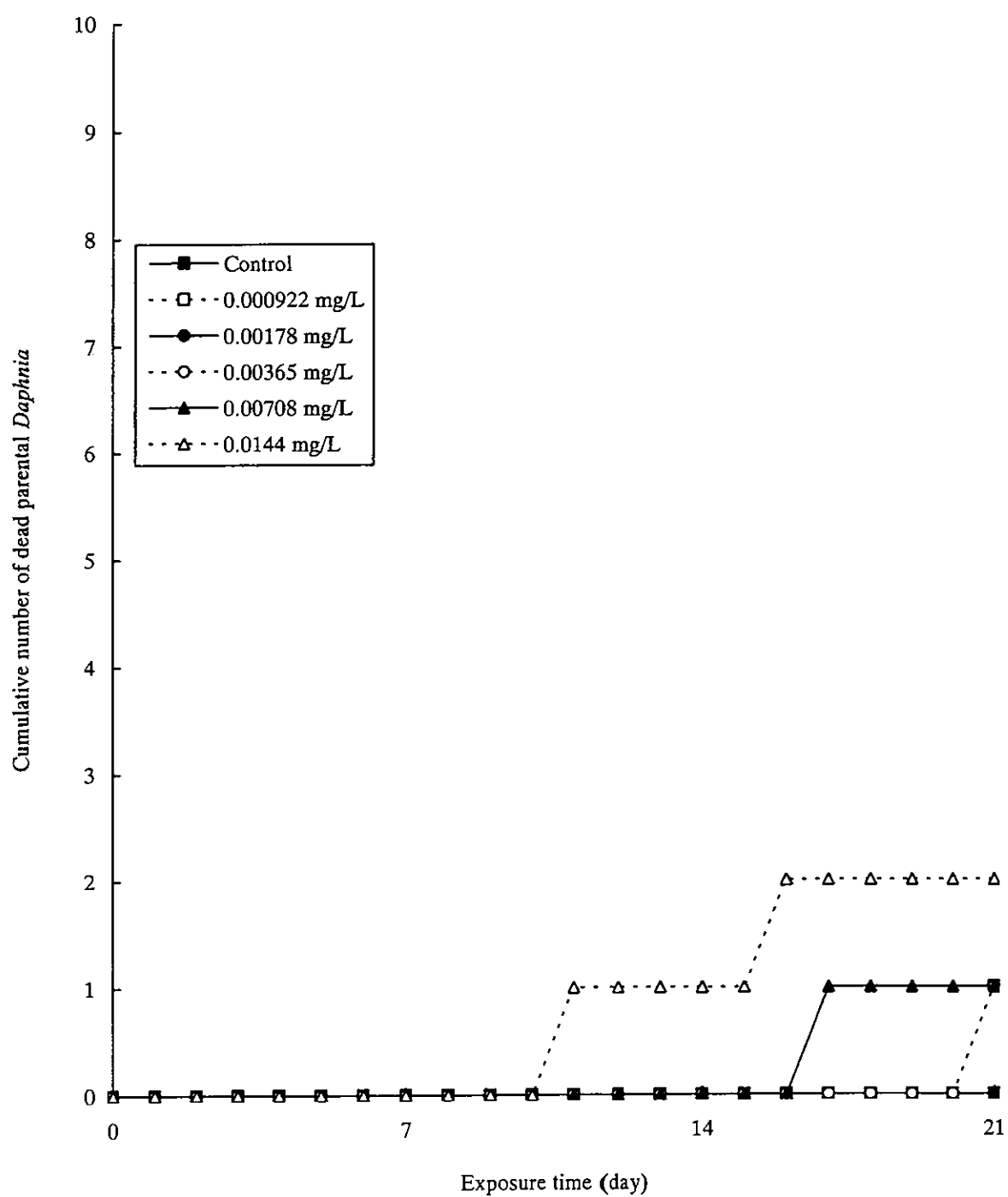


Figure 1. Cumulative number of dead parental *Daphnia*.

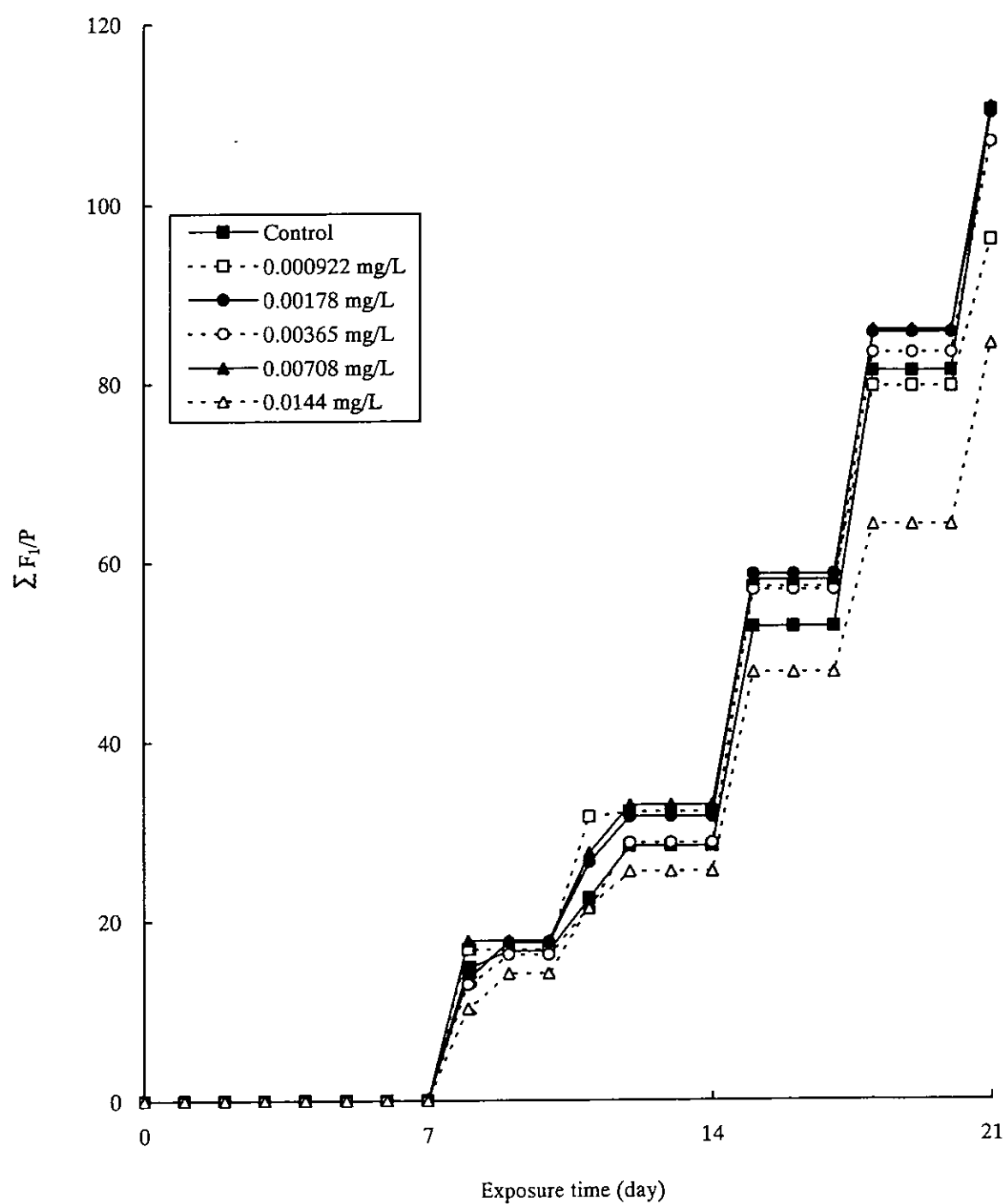


Figure 2. Mean cumulative number of juveniles produced per adult alive ($\Sigma F_1/P$).

Appendix 1

Water quality of dilution water

(one page)

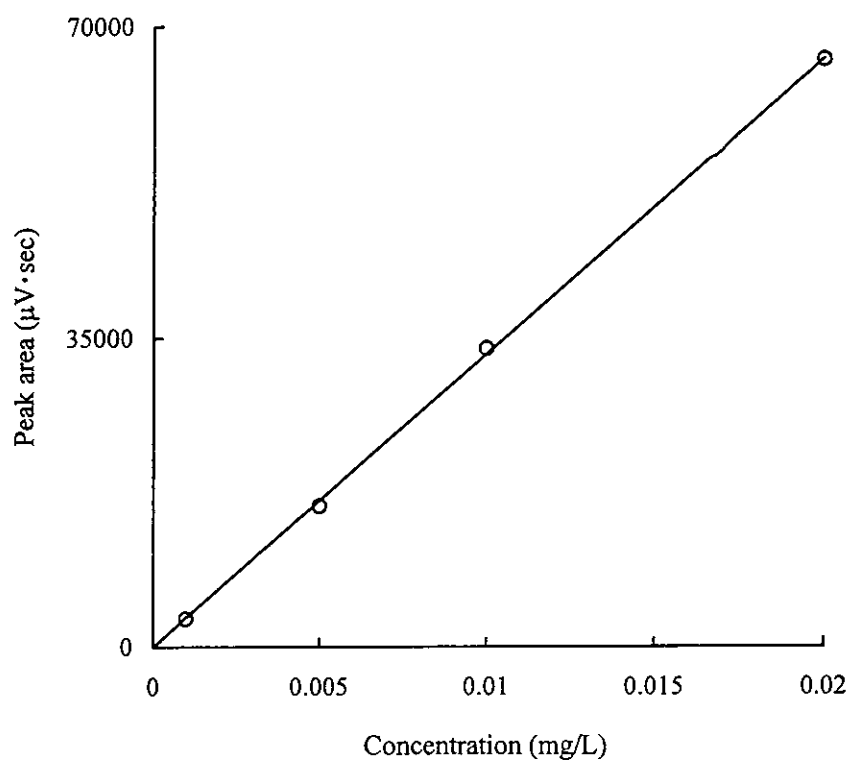
Water quality of dilution water (Sampling on July 8, 2004)

Parameter	Unit	Results	Lower limit of detection
Ca, Mg etc. (Hardness)	mg/L	42.7	0.1
Suspended substance	mg/L	< 1	1
pH	—	7.1(23°C)	—
Organic carbon	mg/L	0.4	0.1
Chemical oxygen demand	mg/L	< 0.5	0.5
Free chlorine	mg/L	not detected	0.01
Ammonium nitrogen	mg/L	0.03	0.01
Cyanide	mg/L	not detected	0.01
Alkalinity	mg/L	33	1
Electric conductivity	mS/m	17.3	—
Organic phosphorous	mg/L	not detected	0.1
Alkyl mercury	mg/L	not detected	0.0005
Mercury	mg/L	not detected	0.0005
Cadmium	mg/L	not detected	0.001
Hexavalent chromium	mg/L	not detected	0.02
Lead	mg/L	not detected	0.005
Arsenicum	mg/L	not detected	0.001
Boron	mg/L	not detected	0.02
Fluorine	mg/L	not detected	0.1
Iron	mg/L	not detected	0.01
Copper	mg/L	not detected	0.005
Cobalt	mg/L	not detected	0.001
Manganese	mg/L	not detected	0.01
Zinc	mg/L	not detected	0.01
Aluminum	mg/L	0.005	0.001
Nickel	mg/L	not detected	0.001
Silver	mg/L	not detected	0.0001
Sulfate ion	mg/L	18.9	0.1
Chloride ion	mg/L	17	1
Sodium	mg/L	14	0.01
Potassium	mg/L	3.60	0.01
Calcium	mg/L	12.0	0.01
Magnesium	mg/L	3.1	0.01
1,2-dichloropropane	mg/L	not detected	0.0001
Chlorothalonil	mg/L	not detected	0.0001
Propyzamide	mg/L	not detected	0.0001
Chlornitrofen	mg/L	not detected	0.0001
Simazine	mg/L	not detected	0.001
Thiobencarb	mg/L	not detected	0.0001
Diazinon	mg/L	not detected	0.0001
Isoxathion	mg/L	not detected	0.0001
Fenitrothion	mg/L	not detected	0.0001
EPN	mg/L	not detected	0.0001
Dichlorvos	mg/L	not detected	0.0001
Iprobenfos	mg/L	not detected	0.0001
PCB	mg/L	not detected	0.0005

Appendix 2

Calibration curve and chromatogram

(three pages)

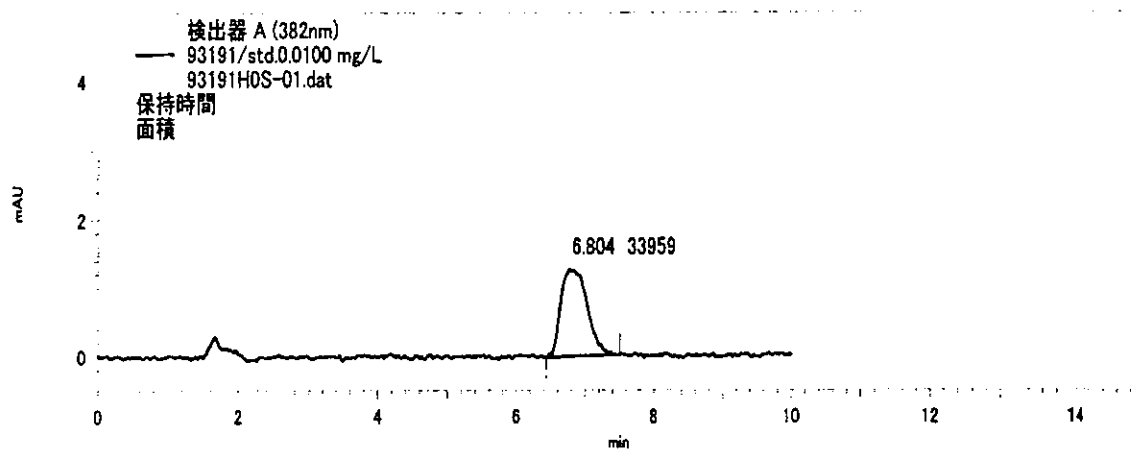


$$y = 3318546x$$

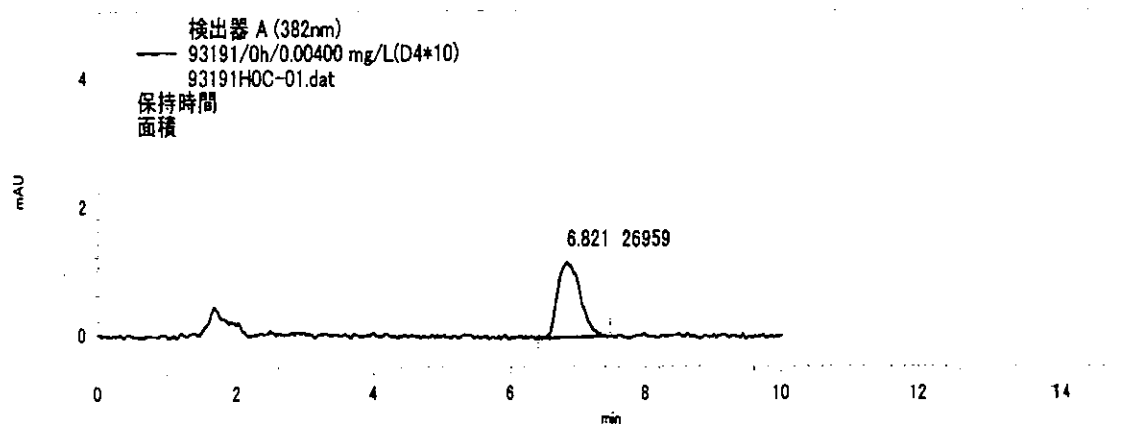
$$r = 1.00$$

Concentration (mg/L)	Peak area ($\mu\text{V}\cdot\text{sec}$)
0.00100	3165
0.00500	15978
0.0100	33808
0.0200	66221

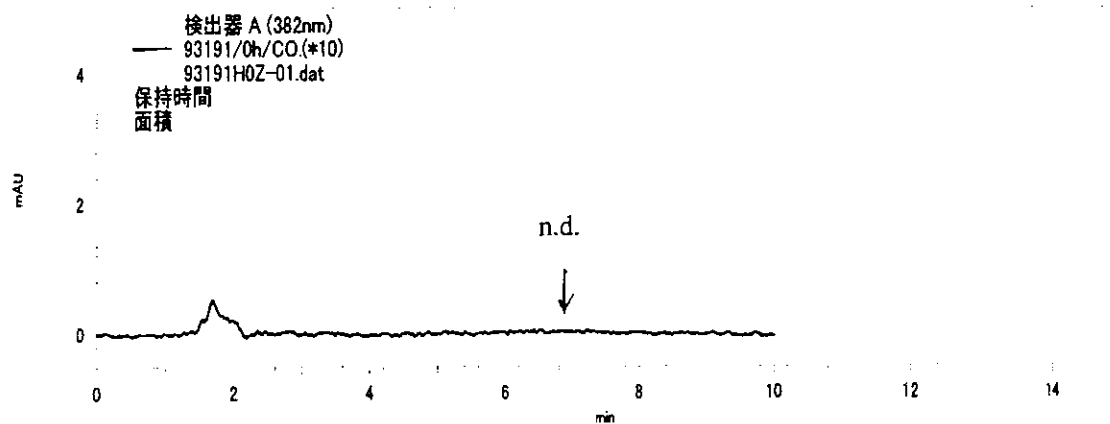
Appendix 2-1 Calibration curve of *p*-phenylazoaniline by HPLC analysis.



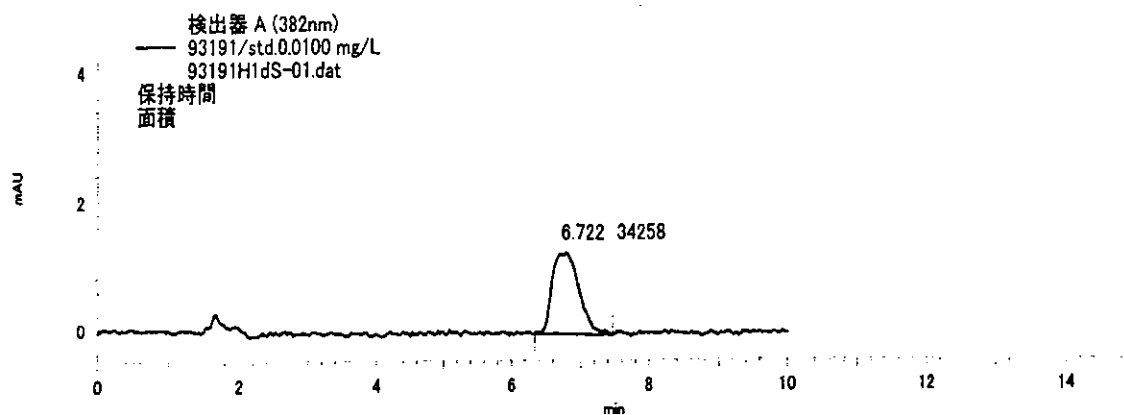
Appendix 2-2 HPLC chromatogram of 0.0100 mg/L standard solution at the start of the exposure.



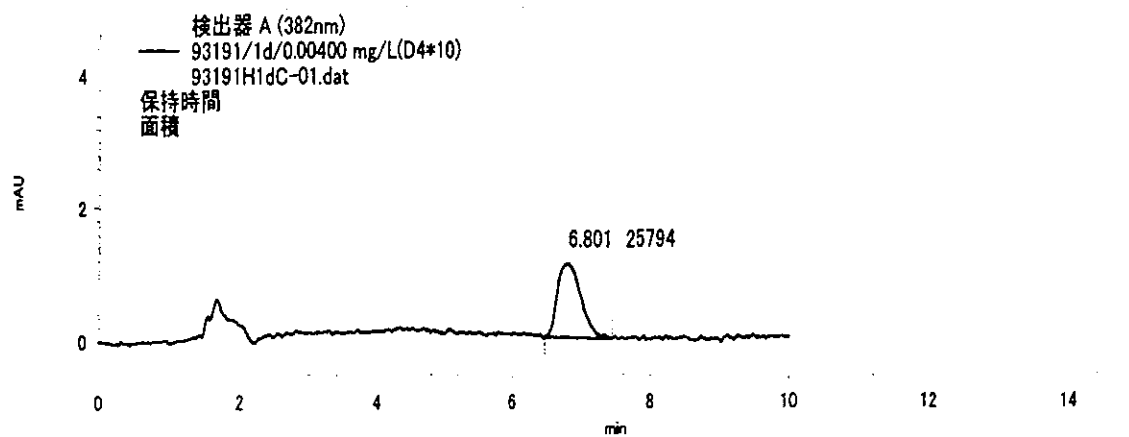
Appendix 2-3 HPLC chromatogram of 0.00400 mg/L (nominal concentration) at the start of the exposure.



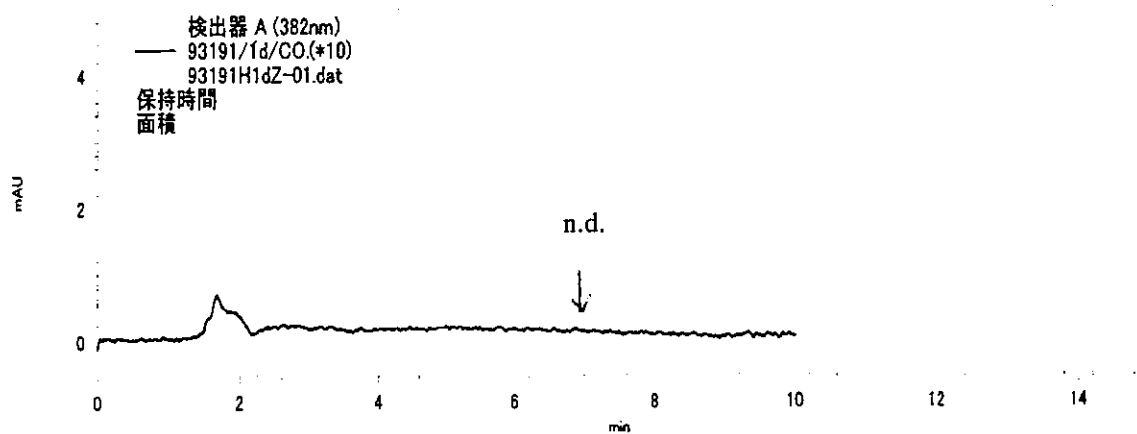
Appendix 2-4 HPLC chromatogram of control at the start of the exposure.



Appendix 2-5 HPLC chromatogram of 0.0100 mg/L standard solution after the exposure at 1 day.



Appendix 2-6 chromatogram of 0.00400 mg/L (nominal concentration) after the exposure at 1 day.



Appendix 2-7 HPLC chromatogram of control after the exposure at 1 day.

Appendix 3

Result of reproduction test

(twelve pages)

Appendix 3-1. Result of reproduction test
(Control)

Rep. No.	Counts		(Control)																					Total
			Time																					
			7/14	7/15	7/16	7/17	7/18	7/19	7/20	7/21	7/22	7/23	7/24	7/25	7/26	7/27	7/28	7/29	7/30	7/31	8/1	8/2	8/3	
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	
1	F ₁ generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	18	0	0	15	0	0	0	24	0	0	36	0	0	35	128
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Total	0	0	0	0	0	0	0	0	18	0	0	15	0	0	0	24	0	0	36	0	0	35
	Cumulative reproductivity	0	0	0	0	0	0	0	0	18	18	18	33	33	33	33	57	57	57	93	93	93	128	
2	F ₁ generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0	18	0	0	9	0	0	27	0	0	29	0	0	33	116
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Total	0	0	0	0	0	0	0	0	0	18	0	0	9	0	0	27	0	0	29	0	0	33
	Cumulative reproductivity	0	0	0	0	0	0	0	0	0	18	18	18	27	27	27	54	54	54	83	83	83	116	
3	F ₁ generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	20	0	0	14	0	0	0	25	0	0	21	0	0	18	98
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Total	0	0	0	0	0	0	0	0	20	0	0	14	0	0	0	25	0	0	21	0	0	18
	Cumulative reproductivity	0	0	0	0	0	0	0	0	20	20	20	34	34	34	34	59	59	59	80	80	80	98	
4	F ₁ generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	15	0	0	0	14	0	0	22	0	0	29	0	0	32	112
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Total	0	0	0	0	0	0	0	0	15	0	0	0	14	0	0	22	0	0	29	0	0	32
	Cumulative reproductivity	0	0	0	0	0	0	0	0	15	15	15	15	29	29	29	51	51	51	80	80	80	112	
5	F ₁ generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	15	0	0	0	12	0	0	26	0	0	33	0	0	31	117
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Total	0	0	0	0	0	0	0	0	15	0	0	0	12	0	0	26	0	0	33	0	0	31
	Cumulative reproductivity	0	0	0	0	0	0	0	0	15	15	15	15	27	27	27	53	53	53	86	86	86	117	
6	F ₁ generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	16	0	0	0	12	0	0	23	0	0	28	0	0	28	107
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Total	0	0	0	0	0	0	0	0	16	0	0	0	12	0	0	23	0	0	28	0	0	28
	Cumulative reproductivity	0	0	0	0	0	0	0	0	16	16	16	16	28	28	28	51	51	51	79	79	79	107	
7	F ₁ generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	15	0	0	0	11	0	0	25	0	0	30	0	0	29	110
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Total	0	0	0	0	0	0	0	0	15	0	0	0	11	0	0	25	0	0	30	0	0	29
	Cumulative reproductivity	0	0	0	0	0	0	0	0	15	15	15	15	26	26	26	51	51	51	81	81	81	110	

Appendix 3-1. Continued

(Control)

Rep. No.	Counts		Time																					Total
			7/14	7/15	7/16	7/17	7/18	7/19	7/20	7/21	7/22	7/23	7/24	7/25	7/26	7/27	7/28	7/29	7/30	7/31	8/1	8/2	8/3	
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	
8	F ₁ generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	17	0	0	10	0	0	0	20	0	0	25	0	0	28	100
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Total	0	0	0	0	0	0	0	17	0	0	10	0	0	0	20	0	0	25	0	0	28	100
	Cumulative reproductivity	0	0	0	0	0	0	0	17	17	17	27	27	27	27	47	47	47	72	72	72	100		
9	F ₁ generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	14	0	0	11	0	0	0	25	0	0	27	0	0	27	104
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Total	0	0	0	0	0	0	0	14	0	0	11	0	0	0	25	0	0	27	0	0	27	104
	Cumulative reproductivity	0	0	0	0	0	0	0	14	14	14	25	25	25	25	50	50	50	77	77	77	104		
10	F ₁ generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	18	0	0	9	0	0	0	27	0	0	27	0	0	29	110
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Total	0	0	0	0	0	0	0	18	0	0	9	0	0	0	27	0	0	27	0	0	29	110
	Cumulative reproductivity	0	0	0	0	0	0	0	18	18	18	27	27	27	27	54	54	54	81	81	81	110		

Appendix 3-2. Result of reproduction test

(Measured concentration* : 0.000922 mg/L)

Rep. No.	Counts		Time																					Total
			7/14	7/15	7/16	7/17	7/18	7/19	7/20	7/21	7/22	7/23	7/24	7/25	7/26	7/27	7/28	7/29	7/30	7/31	8/1	8/2	8/3	
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	
1	F ₁ generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	16	0	0	11	3	0	0	30	0	0	25	0	0	15	100
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	✓	0	0	0	0	0	0	-
		Total	0	0	0	0	0	0	0	16	0	0	11	3	0	0	30	0	0	25	0	0	15	100
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	16	16	16	27	30	30	30	60	60	60	85	85	85	100	
2	F ₁ generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	16	0	0	9	2	0	0	26	0	0	14	0	0	22	89
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Total	0	0	0	0	0	0	0	16	0	0	9	2	0	0	26	0	0	14	0	0	22	89
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	16	16	16	25	27	27	27	53	53	53	67	67	67	89	
3	F ₁ generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	21	0	0	0	12	0	0	24	0	0	16	0	0	M	(73)
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	(0)
		Total	0	0	0	0	0	0	0	21	0	0	0	12	0	0	24	0	0	16	0	0	-	(73)
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	21	21	21	21	33	33	33	57	57	57	73	73	73	73	
4	F ₁ generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	20	0	0	9	0	0	0	27	0	0	0	0	0	17	73
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Total	0	0	0	0	0	0	0	20	0	0	9	0	0	0	27	0	0	0	0	0	17	73
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	20	20	20	29	29	29	29	56	56	56	56	56	56	73	
5	F ₁ generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	16	0	0	14	0	0	0	20	0	0	22	0	0	13	85
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	✓	0	0	0	0	0	0	-
		Total	0	0	0	0	0	0	0	16	0	0	14	0	0	0	20	0	0	22	0	0	13	85
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	16	16	16	30	30	30	30	50	50	50	72	72	72	85	
6	F ₁ generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	17	0	0	17	0	0	0	31	0	0	25	0	0	6	96
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Total	0	0	0	0	0	0	0	17	0	0	17	0	0	0	31	0	0	25	0	0	6	96
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	17	17	17	34	34	34	34	65	65	65	90	90	90	96	
7	F ₁ generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	16	0	0	19	0	0	0	22	0	0	28	0	0	0	85
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Total	0	0	0	0	0	0	0	16	0	0	19	0	0	0	22	0	0	28	0	0	0	85
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	16	16	16	35	35	35	35	57	57	57	85	85	85	85	

*Time-weighted mean

'M' shows mortality of parental *Daphnia*.

Appendix 3-2. Continued

(Measured concentration* : 0.000922 mg/L)

Rep. No.	Counts		Time																					Total
			7/14	7/15	7/16	7/17	7/18	7/19	7/20	7/21	7/22	7/23	7/24	7/25	7/26	7/27	7/28	7/29	7/30	7/31	8/1	8/2	8/3	
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	
8	F ₁ generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	14	0	0	19	0	0	0	20	0	0	32	0	0	24	109
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Total	0	0	0	0	0	0	0	14	0	0	19	0	0	0	20	0	0	32	0	0	24	109
	Cumulative reproductivity	0	0	0	0	0	0	0	14	14	14	33	33	33	33	53	53	53	85	85	85	109		
9	F ₁ generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	18	0	0	18	0	0	0	31	0	0	25	0	0	23	115
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Total	0	0	0	0	0	0	0	18	0	0	18	0	0	0	31	0	0	25	0	0	23	115
	Cumulative reproductivity	0	0	0	0	0	0	0	18	18	18	36	36	36	36	67	67	67	92	92	92	115		
10	F ₁ generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	18	0	0	17	0	0	0	18	0	0	30	0	0	27	110
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Total	0	0	0	0	0	0	0	18	0	0	17	0	0	0	18	0	0	30	0	0	27	110
	Cumulative reproductivity	0	0	0	0	0	0	0	18	18	18	35	35	35	35	53	53	53	83	83	83	110		

*Time-weighted mean

Appendix 3-3. Result of reproduction test

(Measured concentration* : 0.00178 mg/L)

Rep. No.	Counts		Time																					Total
			7/14	7/15	7/16	7/17	7/18	7/19	7/20	7/21	7/22	7/23	7/24	7/25	7/26	7/27	7/28	7/29	7/30	7/31	8/1	8/2	8/3	
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	
1	F ₁ generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	13	0	0	16	0	0	0	24	0	0	26	0	0	27	106
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	✓	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-
		Total	0	0	0	0	0	0	0	13	0	0	16	0	0	0	24	0	0	26	0	0	27	106
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	13	13	13	29	29	29	29	53	53	53	79	79	79	106	
2	F ₁ generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	19	0	0	0	12	0	0	27	0	0	29	0	0	28	115
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Total	0	0	0	0	0	0	0	19	0	0	0	12	0	0	27	0	0	29	0	0	28	115
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	19	19	19	19	31	31	31	58	58	58	87	87	87	115	
3	F ₁ generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	18	0	0	7	7	0	0	30	0	0	26	0	0	26	114
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Total	0	0	0	0	0	0	0	18	0	0	7	7	0	0	30	0	0	26	0	0	26	114
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	18	18	18	25	32	32	32	62	62	62	88	88	88	114	
4	F ₁ generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	17	0	0	13	0	0	0	28	0	0	21	0	0	18	97
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Total	0	0	0	0	0	0	0	17	0	0	13	0	0	0	28	0	0	21	0	0	18	97
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	17	17	17	30	30	30	30	58	58	58	79	79	79	97	
5	F ₁ generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	19	0	0	15	0	0	0	25	0	0	23	0	0	31	113
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Total	0	0	0	0	0	0	0	19	0	0	15	0	0	0	25	0	0	23	0	0	31	113
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	19	19	19	34	34	34	34	59	59	59	82	82	82	113	
6	F ₁ generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	19	0	0	5	7	0	0	26	0	0	34	0	0	20	111
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Total	0	0	0	0	0	0	0	19	0	0	5	7	0	0	26	0	0	34	0	0	20	111
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	19	19	19	24	31	31	31	57	57	57	91	91	91	111	
7	F ₁ generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	17	0	0	15	0	0	0	24	0	0	20	0	0	20	96
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Total	0	0	0	0	0	0	0	17	0	0	15	0	0	0	24	0	0	20	0	0	20	96
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	17	17	17	32	32	32	32	56	56	56	76	76	76	96	

*Time-weighted mean

Appendix 3-3. Continued

(Measured concentration* : 0.00178 mg/L)

Rep. No.	Counts		Time																					Total
			7/14	7/15	7/16	7/17	7/18	7/19	7/20	7/21	7/22	7/23	7/24	7/25	7/26	7/27	7/28	7/29	7/30	7/31	8/1	8/2	8/3	
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	
8	F ₁ generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	16	0	0	18	0	0	0	26	0	0	34	0	0	28	122
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Total	0	0	0	0	0	0	0	16	0	0	18	0	0	0	26	0	0	34	0	0	28	122
	Cumulative reproductivity	0	0	0	0	0	0	0	16	16	16	34	34	34	34	60	60	60	94	94	94	122		
9	F ₁ generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0	19	0	0	12	0	0	29	0	0	33	0	0	26	119
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Total	0	0	0	0	0	0	0	0	19	0	0	12	0	0	29	0	0	33	0	0	26	119
	Cumulative reproductivity	0	0	0	0	0	0	0	0	19	19	19	31	31	31	60	60	60	93	93	93	119		
10	F ₁ generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0	19	0	0	13	0	0	30	0	0	24	0	0	20	106
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Total	0	0	0	0	0	0	0	0	19	0	0	13	0	0	30	0	0	24	0	0	20	106
	Cumulative reproductivity	0	0	0	0	0	0	0	0	19	19	19	32	32	32	62	62	62	86	86	86	106		

*Time-weighted mean

Appendix 3-4. Result of reproduction test

(Measured concentration* : 0.00365 mg/L)

Rep. No.	Counts	Time																					Total
		7/14	7/15	7/16	7/17	7/18	7/19	7/20	7/21	7/22	7/23	7/24	7/25	7/26	7/27	7/28	7/29	7/30	7/31	8/1	8/2	8/3	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	
1	F ₁ generation	Live	0	0	0	0	0	0	18	0	0	16	0	0	0	27	0	0	37	0	0	33	131
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Total	0	0	0	0	0	0	18	0	0	16	0	0	0	27	0	0	37	0	0	33	131
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	18	18	18	34	34	34	34	61	61	61	98	98	98	131	
2	F ₁ generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	13	0	0	0	0	0	24	0	0	22	0	0	19	78
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Total	0	0	0	0	0	0	0	13	0	0	0	0	0	24	0	0	22	0	0	19	78
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	13	13	13	13	13	13	37	37	37	59	59	59	78	
3	F ₁ generation	Live	0	0	0	0	0	0	16	0	0	0	14	0	0	27	0	0	25	0	0	30	112
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Total	0	0	0	0	0	0	16	0	0	0	14	0	0	27	0	0	25	0	0	30	112
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	16	16	16	16	30	30	30	57	57	57	82	82	82	112	
4	F ₁ generation	Live	0	0	0	0	0	0	19	0	0	0	10	0	0	28	0	0	23	0	0	21	101
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Total	0	0	0	0	0	0	19	0	0	0	10	0	0	28	0	0	23	0	0	21	101
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	19	19	19	19	29	29	29	57	57	57	80	80	80	101	
5	F ₁ generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	17	0	0	13	0	0	36	0	0	22	0	0	20	108
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Total	0	0	0	0	0	0	0	17	0	0	13	0	0	36	0	0	22	0	0	20	108
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	17	17	17	30	30	30	66	66	66	88	88	88	108	
6	F ₁ generation	Live	0	0	0	0	0	0	22	0	0	13	0	0	0	30	0	0	37	0	0	28	130
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Total	0	0	0	0	0	0	22	0	0	13	0	0	0	30	0	0	37	0	0	28	130
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	22	22	22	35	35	35	35	65	65	65	102	102	102	130	
7	F ₁ generation	Live	0	0	0	0	0	0	16	0	0	8	7	0	0	28	0	0	24	0	0	19	102
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Total	0	0	0	0	0	0	16	0	0	8	7	0	0	28	0	0	24	0	0	19	102
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	16	16	16	24	31	31	31	59	59	59	83	83	83	102	

*Time-weighted mean

Appendix 3-4. Continued

(Measured concentration* : 0.00365 mg/L)

Rep. No.	Counts	Time																					Total
		7/14	7/15	7/16	7/17	7/18	7/19	7/20	7/21	7/22	7/23	7/24	7/25	7/26	7/27	7/28	7/29	7/30	7/31	8/1	8/2	8/3	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	
8	F ₁ generation	Live	0	0	0	0	0	0	8	0	0	0	18	0	0	28	0	0	27	0	0	25	106
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Total	0	0	0	0	0	0	8	0	0	0	18	0	0	28	0	0	27	0	0	25	106
	Cumulative reproductivity	0	0	0	0	0	0	0	8	8	8	8	26	26	26	54	54	54	81	81	81	106	
9	F ₁ generation	Live	0	0	0	0	0	0	17	0	0	10	0	0	0	28	0	0	23	0	0	M	(78)
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	(0)
		Total	0	0	0	0	0	0	17	0	0	10	0	0	0	28	0	0	23	0	0	-	(78)
	Cumulative reproductivity	0	0	0	0	0	0	0	17	17	17	27	27	27	27	55	55	55	78	78	78	78	
10	F ₁ generation	Live	0	0	0	0	0	0	17	0	0	9	4	0	0	25	0	0	21	0	0	16	92
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Total	0	0	0	0	0	0	17	0	0	9	4	0	0	25	0	0	21	0	0	16	92
	Cumulative reproductivity	0	0	0	0	0	0	0	17	17	17	26	30	30	30	55	55	55	76	76	76	92	

*Time-weighted mean

'M' shows mortality of parental *Daphnia*.

Appendix 3-5. Result of reproduction test

(Measured concentration* : 0.00708 mg/L)

Rep. No.	Counts		Time																					Total
			7/14	7/15	7/16	7/17	7/18	7/19	7/20	7/21	7/22	7/23	7/24	7/25	7/26	7/27	7/28	7/29	7/30	7/31	8/1	8/2	8/3	
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	
1	F ₁ generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	16	0	0	12	10	0	0	25	0	0	27	0	0	21	111
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Total	0	0	0	0	0	0	0	16	0	0	12	10	0	0	25	0	0	27	0	0	21	111
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	16	16	16	28	38	38	38	63	63	63	90	90	90	111	
2	F ₁ generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	19	0	0	0	12	0	0	26	0	0	21	0	0	23	101
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Total	0	0	0	0	0	0	0	19	0	0	0	12	0	0	26	0	0	21	0	0	23	101
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	19	19	19	19	31	31	31	57	57	57	78	78	78	101	
3	F ₁ generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	17	0	0	13	1	0	0	27	0	M	-	-	-	-	(58)
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-	-	-	(0)
		Total	0	0	0	0	0	0	0	17	0	0	13	1	0	0	27	0	-	-	-	-	-	(58)
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	17	17	17	30	31	31	31	58	58	58	58	58	58	58	
4	F ₁ generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	20	0	0	0	14	0	0	26	0	0	31	0	0	31	122
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Total	0	0	0	0	0	0	0	20	0	0	0	14	0	0	26	0	0	31	0	0	31	122
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	20	20	20	20	34	34	34	60	60	60	91	91	91	122	
5	F ₁ generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	18	0	0	15	0	0	0	27	0	0	31	0	0	18	109
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Total	0	0	0	0	0	0	0	18	0	0	15	0	0	0	27	0	0	31	0	0	18	109
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	18	18	18	33	33	33	33	60	60	60	91	91	91	109	
6	F ₁ generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	16	0	0	0	12	0	0	26	0	0	24	0	0	26	104
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Total	0	0	0	0	0	0	0	16	0	0	0	12	0	0	26	0	0	24	0	0	26	104
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	16	16	16	16	28	28	28	54	54	54	78	78	78	104	
7	F ₁ generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	15	0	0	20	0	0	0	25	0	0	28	0	0	27	115
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Total	0	0	0	0	0	0	0	15	0	0	20	0	0	0	25	0	0	28	0	0	27	115
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	15	15	15	35	35	35	35	60	60	60	88	88	88	115	

*Time-weighted mean

'M' shows mortality of parental *Daphnia*.

Appendix 3-5. Continued

(Measured concentration* : 0.00708 mg/L)

Rep. No.	Counts		Time																					Total
			7/14	7/15	7/16	7/17	7/18	7/19	7/20	7/21	7/22	7/23	7/24	7/25	7/26	7/27	7/28	7/29	7/30	7/31	8/1	8/2	8/3	
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	
8	F ₁ generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	19	0	0	11	0	0	0	26	0	0	27	0	0	30	113
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Total	0	0	0	0	0	0	0	0	19	0	0	11	0	0	0	26	0	0	27	0	0	30
	Cumulative reproductivity	0	0	0	0	0	0	0	0	19	19	19	30	30	30	30	56	56	56	83	83	83	113	
9	F ₁ generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	21	0	0	13	0	0	0	25	0	0	30	0	0	29	118
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Total	0	0	0	0	0	0	0	0	21	0	0	13	0	0	0	25	0	0	30	0	0	29
	Cumulative reproductivity	0	0	0	0	0	0	0	0	21	21	21	34	34	34	34	59	59	59	89	89	89	118	
10	F ₁ generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	16	0	0	17	0	0	0	19	0	0	32	0	0	18	102
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Total	0	0	0	0	0	0	0	0	16	0	0	17	0	0	0	19	0	0	32	0	0	18
	Cumulative reproductivity	0	0	0	0	0	0	0	0	16	16	16	33	33	33	33	52	52	52	84	84	84	102	

*Time-weighted mean

Appendix 3-6. Result of reproduction test

(Measured concentration* : 0.0144 mg/L)

Rep. No.	Counts	Time																					Total
		7/14	7/15	7/16	7/17	7/18	7/19	7/20	7/21	7/22	7/23	7/24	7/25	7/26	7/27	7/28	7/29	7/30	7/31	8/1	8/2	8/3	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	
1	F ₁ generation	Live	0	0	0	0	0	0	15	0	0	8	1	0	0	25	0	0	18	0	0	15	82
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	✓	0	0	0	0	0	✓	0	0	0	-
		Total	0	0	0	0	0	0	15	0	0	8	1	0	0	25	0	0	18	0	0	15	82
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	15	15	15	23	24	24	24	49	49	49	67	67	67	82	
2	F ₁ generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	16	0	0	12	0	0	21	0	0	9	0	0	20	78
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	✓	0	0	0	-
		Total	0	0	0	0	0	0	0	16	0	0	12	0	0	21	0	0	9	0	0	20	78
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	16	16	16	28	28	28	49	49	49	58	58	58	78	
3	F ₁ generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0	0	M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(0)
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(0)
		Total	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(0)
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
4	F ₁ generation	Live	0	0	0	0	0	0	16	0	0	13	0	0	0	23	0	0	8	0	0	17	77
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	✓	0	0	✓	-
		Total	0	0	0	0	0	0	16	0	0	13	0	0	0	23	0	0	8	0	0	17	77
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	16	16	16	29	29	29	29	52	52	52	60	60	60	77	
5	F ₁ generation	Live	0	0	0	0	0	0	13	1	0	0	4	0	0	20	0	0	28	0	0	23	89
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	✓	-
		Total	0	0	0	0	0	0	13	1	0	0	4	0	0	20	0	0	28	0	0	23	89
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	13	14	14	14	18	18	18	38	38	38	66	66	66	89	
6	F ₁ generation	Live	0	0	0	0	0	0	12	0	0	17	0	0	0	21	0	0	2	0	0	26	78
		Dead	0	0	0	0	0	0	✓	0	0	0	0	0	0	0	0	0	✓	0	0	0	-
		Total	0	0	0	0	0	0	12	0	0	17	0	0	0	21	0	0	2	0	0	26	78
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	12	12	12	29	29	29	29	50	50	50	52	52	52	78	
7	F ₁ generation	Live	0	0	0	0	0	0	19	0	0	0	10	0	0	0	M	-	-	-	-	-	(29)
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-	-	-	-	(0)
		Total	0	0	0	0	0	0	19	0	0	0	10	0	0	0	-	-	-	-	-	-	(29)
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	19	19	19	19	29	29	29	29	29	29	29	29	29	29	

*Time-weighted mean

'M' shows mortality of parental *Daphnia*.

Appendix 3-6. Continued

(Measured concentration* : 0.0144 mg/L)

Rep. No.	Counts		Time																					Total
			7/14	7/15	7/16	7/17	7/18	7/19	7/20	7/21	7/22	7/23	7/24	7/25	7/26	7/27	7/28	7/29	7/30	7/31	8/1	8/2	8/3	
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	
8	F ₁ generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	13	0	0	8	3	0	0	18	0	0	10	0	0	15	67
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	✓	0	0	✓	-
		Total	0	0	0	0	0	0	0	0	13	0	0	8	3	0	0	18	0	0	10	0	0	15
	Cumulative reproductivity	0	0	0	0	0	0	0	0	13	13	13	21	24	24	24	42	42	42	52	52	52	67	
9	F ₁ generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0	14	0	0	13	0	0	24	0	0	28	0	0	27	106
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Total	0	0	0	0	0	0	0	0	14	0	0	13	0	0	24	0	0	28	0	0	27	106
	Cumulative reproductivity	0	0	0	0	0	0	0	0	14	14	14	27	27	27	51	51	51	79	79	79	106		
10	F ₁ generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	13	0	0	12	0	0	0	25	0	0	28	0	0	19	97
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	✓	-
		Total	0	0	0	0	0	0	0	13	0	0	12	0	0	0	25	0	0	28	0	0	19	97
	Cumulative reproductivity	0	0	0	0	0	0	0	13	13	13	25	25	25	25	50	50	50	78	78	78	97		

*Time-weighted mean

Appendix 4

Statistical method for NOEC calculation

(one page)

累積産仔数

パートレットの検定 有意でない
一元配置の分散分析 有意である

検定統計量:8.20390216784906
検定統計量:7.15588453024531

X2値(5%):11.0704976935164
F値(5%):2.40437538598259

シェフェの検定

群名	平均	標準偏差	検定結果	平均の差	平均の信頼区間
Control	110	8.83		0.00	0.00
0.000922	95.8	14.0		14.4	18.6
0.00178	110	8.65		0.300	18.1
0.00365	107	16.8		3.53	18.6
0.00708	111	7.26		0.356	18.6
0.0144	84.3	12.5	**	26.0	22.9

別添資料

p-(フェニルアゾ)アニリンのオオミジンコによる繁殖試験

予備試験結果
(全1頁)

予備試験結果

＜生物への影響＞

試験区(mg/L)	親ミジンコ死亡率(%)	平均累積生存産仔数
対照区	0	131
0.00100	0	129
0.00316	0	111
0.0100	0	75

暴露方式：半止水式(換水 1 回/1 日)

暴露期間：21 日間

試験生物数/試験液量：1 頭/80 mL×5 連

＜試験液中の被験物質の安定性＞

設定濃度 (mg/L)	対設定濃度 (%)	
	0 時間	24 時間
対照区	n.d.	n.d.
0.00100	101	75.0
0.0100	82.0	60.8
0.100	81.5	65.6

約4週齢の成体1頭と、生後24時間以内の幼体30頭を暴露した試験液中の被験物質濃度を測定した。