

環境庁殿

試 験 報 告 書

塩化コリンのオオミジンコ (*Daphnia magna*) に対する繁殖阻害試験

(試験番号：NO1998-生15)

1999年 8月20日

株式会社ク  株式会社 

## 最終報告書修正書

試験名： 塩化コリンのオオミジンコ (*Daphnia magna*) に対する繁殖阻害試験

試験番号： 1998-生15

該当するページ： p-7, p-12, p-13

### ① p-7

修正する項目等：

訂正または追加前の内容 (\_\_\_\_部分の修正)

結 果

5) 21日間の最小無作用濃度 (LOEC) : 95.5 mg/L

訂正または追加後の内容

5) 21日間の最小作用濃度 (LOEC) : 95.5 mg/L

訂正または追加の理由： 記載ミス

### ② p-12

修正する項目等：

訂正または追加前の内容 (\_\_\_\_部分の修正)

#### 5. 2 試験水中の被験物質濃度

暴露開始当日、10日目および20日目の試験液調製時の被験物質濃度は設定値3.2 ~ 3.2 mg/Lに対して、それぞれ3.1 ~ 104 mg/L、3.3 ~ 104 mg/Lおよび3.2 ~ 101 mg/Lであり、設定値に対する割合はそれぞれ97 ~ 105%、103 ~ 107%、99 ~ 101%であった。また、1日目、11日目および21日目の換水前の濃度はそれぞれ3.1 ~ 101 mg/L、2.5 ~ 87.0 mg/Lおよび1.9 ~ 77.3 mg/Lであり、設定値に対する割合はそれぞれ97 ~ 103%、78 ~ 87%、59 ~ 77%であった。

設定値に対する割合が±20%を超えた濃度区があるため、実測値から対数平均濃度を算出し、それを基に時間加重平均濃度を求め、それを測定濃度とし、LC50、EC50を算出した。

訂正または追加後の内容

暴露開始当日、10日目および20日目の試験液調製時の被験物質濃度は設定値3.2 ~ 100 mg/Lに対して、それぞれ3.1 ~ 104 mg/L、3.3 ~ 104 mg/Lおよび3.2 ~ 101 mg/Lであり、設定値に対する割合はそれぞれ97 ~ 105%、103 ~ 107%、99 ~ 101%であった。また、1日目、11日目および21日目の換水前の濃度はそれぞれ3.1 ~ 101 mg/L、2.5 ~ 87.0 mg/Lおよび1.9 ~ 77.3 mg/Lであり、設定値に対する割合はそれぞれ97 ~ 103%、78 ~ 87%、59 ~ 77%であった。

訂正または追加の理由： 記載ミス

③ p-13

修正する項目等：

訂正または追加前の内容（\_\_\_\_部分の修正）

5. 4 親ミジンコの半数致死濃度（LC50）

21日間暴露の親ミジンコの半数致死濃度（LC50）は100mg/L以上（設定濃度）であった。

訂正または追加後の内容

5. 4 親ミジンコの半数致死濃度（LC50）

21日間暴露の親ミジンコの半数致死濃度（LC50）は95.5mg/L以上（測定濃度）であった。

訂正または追加の理由： 記載ミス

試験責任者氏名：



承認月日 2002年3月29日

## 陳 述 書

株式会社クレハ分析センター

試験委託者： 環境庁

表題： 塩化コリンのオオミジンコ (*Daphnia magna*) に対する繁殖阻害試験

試験番号： NO1998-生15

上記試験は環境庁のGLP規則に従って実施したものである。

1999年 8月20日

運営管理者



# 信 頼 性 保 証 証 明

株式会社クレハ分析センター

試験委託者： 環境庁

表題： 塩化コリン のオオミジンコ (*Daphnia magna*) に対する繁殖阻害試験

試験番号： NO1998-生15

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下記の通り確認した。

## 記

	実 施 日	運営管理者への 報告日	試験責任者への 報告日
試験実施状況査察	1999年7月 9日	1999年7月 9日	1999年7月 9日
	1999年7月16日	1999年7月16日	1999年7月16日
	1999年7月23日	1999年7月23日	1999年7月23日
	1999年7月30日	1999年7月30日	1999年7月30日
試験報告書監査	1999年8月17日	1999年8月17日	1999年8月17日

1999年8月20日

信頼性保証業務担当者：



## 試験実施概要

1. 表題：塩化コリンのオオミジンコ (*Daphnia magna*) に対する繁殖阻害試験
2. 試験目的：塩化コリンについて、オオミジンコ (*Daphnia magna*) に対する繁殖阻害試験を21日間行い、最小作用濃度 (LOEC) と最大無作用濃度 (NOEC) を求め、可能な限り50%繁殖阻害濃度 (EC50) も求める。
3. 適用ガイドライン：本試験は、OECD化学品テストガイドラインNo. 202「ミジンコ類、急性遊泳阻害試験および繁殖試験」(1984年4月採択)の改訂版であるガイドラインNo. 211「オオミジンコ繁殖試験」(1997年4月提案)に準拠した。
4. 適用GLP：本試験は環境庁のGLP規則に準拠した。
5. 試験委託者  
名称：環境庁  
住所：〒100-8975 東京都千代田区霞ヶ関一丁目2-2  
委託責任者：環境庁企画調整局環境保健部環境安全課環境リスク評価室  
室長補佐 XXXXXXXXXX
6. 試験受託者：  
名称：株式会社クレハ分析センター  
所在地：〒974-8686 福島県いわき市錦町落合16番地
7. 試験施設：  
名称：株式会社クレハ分析センター  
所在地：〒974-8686 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）	■■■■■	■■■■■	（1999年 8月20日）
試験責任者（理化学）	■■■■■	■■■■■	（1999年 8月20日）
試験担当者（生物）	■■■■■	■■■■■	（1999年 8月20日）
試験担当者（生物）	■■■■■	■■■■■	（1999年 8月20日）
試験担当者（生物）	■■■■■	■■■■■	（1999年 8月20日）
試験担当者（生物）	■■■■■	■■■■■	（1999年 8月20日）
試験担当者（理化学）	■■■■■	■■■■■	（1999年 8月20日）

9. 試験期間： 試験開始日 1999年 1月 4日  
試験終了日 1999年 8月20日  
暴露期間 1999年 7月 9日～  
1999年 7月30日

10. 保管：

試験計画書、生データ、記録文書および試験報告書は、試験報告書作成後10年間、株式会社クレハ分析センターの保管施設に保管する。その後の保管については試験委託者と協議の上決定する。

## 目 次

	頁
要旨	7
1. 被験物質	8
1. 1 名称、構造式および物理化学的性状	8
1. 2 供試試料	8
1. 3 被験物質の確認および保管条件下での安定性	8
2. 供試生物	9
3. 試験方法	9
3. 1 試験条件	9
3. 2 希釈水	10
3. 3 試験装置、試験容器および恒温槽等	10
3. 4 試験濃度の設定	10
3. 5 試験液の調製	10
3. 6 試験液の分析	10
3. 7 試験操作	10
4. 結果の算出	11
4. 1 親ミジンコの半数致死濃度 (LC50) の算出	11
4. 2 50%繁殖阻害濃度 (EC50) の算出	11
4. 3 最大無作用濃度 (NOEC) および最小作用濃度 (LOEC)	11
5. 結果および考察	12
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	12
5. 2 試験水中の被験物質濃度	12
5. 3 ミジンコの観察結果	12
5. 4 親ミジンコの半数致死濃度 (LC50)	13
5. 5 50%繁殖阻害濃度 (EC50)	13
5. 6 累積産仔数に及ぼす最大無作用濃度 (NOEC) および最小作用濃度 (LOEC)	13
5. 7 試験水の水温、溶存酸素濃度、pHおよび硬度	13
Table 1～11	14～23
Figure 1, 2	16, 19
付属資料－1 希釈水の水質	
付属資料－2 試験液の分析方法	
付属資料－3 ミジンコの観察結果	



## 要 旨

試験委託者 環境庁

表 題 塩化コリンのオオミジンコ (*Daphnia magna*) に対する繁殖阻害試験

試験番号 NO1998-生15

### 試験方法

本試験は、OECD化学品テストガイドラインNo.202「ミジンコ類、急性遊泳阻害試験および繁殖試験」（1984年4月採択）の改訂版であるガイドライン No.211「オオミジンコ繁殖試験」（1997年4月提案）に準拠して実施した。

- 1) 被験物質： 塩化コリン
- 2) 暴露方法： 半止水式（毎日、試験液の全量を交換）
- 3) 供試生物： オオミジンコ (*Daphnia magna*)
- 4) 暴露期間： 21日間
- 5) 試験濃度： 対照区、100、32、10および3.2 mg/L
- 6) 試験液量： 1容器（連）につき80ml
- 7) 連数： 1濃度区につき10連
- 8) 供試生物数： 10頭/濃度区（1連につき1頭）
- 9) 試験温度： 20±1℃
- 10) 照明： 16時間明/8時間暗
- 11) 被験物質の分析： HPLC法

### 結 果

#### 1) 試験液中の被験物質濃度

被験物質が設定濃度の±20%を越えたので、時間加重平均濃度を用いて計算を行った。

- 2) 21日間の親ミジンコの50%致死濃度（LC50）：  
100 mg/L以上（設定濃度）  
95.5 mg/L以上（測定濃度）
- 3) 21日間の50%繁殖阻害濃度（EC50）：58.9 mg/L  
（95%信頼区間：37.7 mg/L～83.7 mg/L）
- 4) 21日間の最大無作用濃度（NOEC）：30.2 mg/L
- 5) 21日間の最小無作用濃度（LOEC）：95.5 mg/L

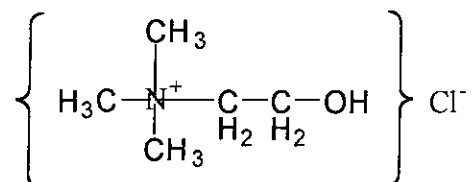
## 1. 被験物質

### 1. 1 名称、構造式および物理化学的性状

名称： 塩化コリン

(CAS : 67-48-1)

構造式：



分子式：  $[(\text{CH}_3)_3\text{N}(\text{CH}_2)_2\text{OH}]^+\text{Cl}^-$

分子量： 139.63

安定性： 安定

1-オクタノール／水分配係数 (log P) : 報告されていない

水への溶解度： 水に可溶

蒸気圧： 報告されていない

### 1. 2 供試試料

購入先： XXXXXXXXXX

入手先： XXXXXXXXXX

入手日： 1998年11月20日

ロット番号： PAR1681

外観： 白色結晶性粉末

純度及び不純物： 100.2%

### 1. 3 被験物質の確認および保管条件下での安定性

被験物質は当施設の冷蔵庫に保管した。

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、被験物質の構造と矛盾が認められないことを確認した。試験終了時にも同様に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結果、スペクトルに変化は認められなかったことより被験物質は当施設の冷蔵庫に保管中は安定であったと判断された。

## 2. 供試生物

試験には生後24時間令以内のオオミジンコ (*Daphnia magna*) の幼体を用いた。

本種は、1997年2月5日に国立環境研究所より入手したものを、(株)クレハ分析センターにおいて継代飼育しているものである。また、基準物質(重クロム酸カリウム、試薬特級)による48時間の半数遊泳阻害濃度(EC50)は0.079 mg/Lであった。

供試する幼体を得るためのミジンコの飼育方法

継代中のものから幼体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、翌日、産出された幼体を別のビーカーに分けた。この幼体(1999年6月16日生まれ)を供試ミジンコの親とし、以下の条件で飼育した。成熟し幼体を産むようになったら1週間に少なくとも2回以上幼体を除去した。3週目に入り暴露開始前日に、その前2週間の死亡率が0%で休眠卵や雄が発生しなかったバッチから、育房内に幼体を持つ雌成体を選別し、翌日(24時間以内)産出された幼体を試験に用いた(1999年7月9日暴露開始)。

飼育水： 希釈水(3.2参照)

飼育密度： 15頭/L飼育水

水温： 20±1℃

照明： 室内光、16時間明/8時間暗

餌： *Chlorella vulgaris*

給餌量： ミジンコ1頭当たり *Chlorella vulgaris* を0.15 mg C (有機炭素含量) / 日の割合で与えた。

## 3. 試験方法

### 3.1 試験条件

1) 暴露方法： 半止水式(換水は24時間)

2) 暴露期間： 21日間

3) 試験液量： 1容器(連)につき80 mL

4) 連数： 10容器(連) / 濃度区

5) 供試生物数： 10頭 / 1濃度区(1連につき1頭)

6) 試験温度： 20±1℃

7) 照明： 室内光、16時間明(1200lux以下) / 8時間暗

8) 給餌量： ミジンコ1頭当たり *Chlorella vulgaris* を0.15～0.18 mg C (有機炭素含量) / 日

### 3. 2 希釈水

脱塩素水（呉羽化学工業株式会社錦工場内の工業用水（塩素処理を行い、飲料水グレードのもの）を活性炭処理で残留塩素等を除去し、空気による曝気処理を行ったもの）を使用した。希釈水の主な水質として、硬度が37mg/L（CaCO<sub>3</sub>換算）、pHが7.3であった。

また、1999年2月2日の希釈水の分析結果を〔付属資料－1〕に示した。

### 3. 3 試験装置、試験容器および恒温槽等

試験容器： 200mL容ガラス製三角フラスコ（共栓付き）

恒温槽： 恒温室

水温計： 水銀温度計

pH計： 東亜電波工業（HM－30V）

溶存酸素計： 飯島電子工業（B－505）

ICP発光分析装置： 日立306型

### 3. 4 試験濃度の設定

オオミジンコに対する48時間急性遊泳阻害濃度は349mg/Lであることから、100mg/Lから始めて、それ以下の濃度を公比3.2で4段階設定した。各濃度区は以下の通りである。

（対照区、100、32、10、3.2mg/L）

### 3. 5 試験液の調製

1000mg/Lの濃度の塩化コリンを原液として希釈水で調製し、その所定量を1Lメスフラスコに入れ希釈水で定容し試験液とした。

### 3. 6 試験液の分析

全濃度区（但し、各1試験容器）について、暴露期間中に3回（換水前後で計6回）の頻度で10mLずつ採取し、HPLCにより分析した。試験水の分析に際しては、試料測定毎に標準溶液の測定を行い、そのピーク高さから定量した。詳細は〔付属資料－2〕に示した。

### 3. 7 試験操作

試験液の水温、溶存酸素濃度（DO）、pHおよび硬度を測定後、ガラスピペットを用いて供試ミジンコを投入し、その時点を暴露開始時とした。その際、ピペット内の飼育水が、全量で試験液量に対して1%以内となるようにした。その後、換水毎にミジンコを新しい試験液に移しかえ、21日目まで飼育した。暴露期間中は毎日一定量の給餌を行った（3.1参照）。

・ミジンコの観察：

(親ミジンコ) 生死、遊泳状態および外観の異常の有無を毎日観察して、記録した。  
計数後の死亡個体は取り除いた。

(産出幼体) 最初の産仔から毎日幼体の生存数を計数し、計数後の幼体は取り除いた。

死亡幼体、墮胎卵および休眠卵の発生等については、その有無を毎日観察し記録した。最初の幼体産出日を、初産日として記録した。

- ・水質測定　：水温、溶存酸素濃度 (D.O.)、pH を全濃度区 (但し、各 1 試験容器) について、暴露期間中に少なくとも 3 回 (調製時および換水前で 1 回) 換水前後に測定した。硬度は対照区について測定を行った。

#### 4 結果の算出

##### 4. 1 親ミジンコの半数致死濃度 (LC50) の算出

各濃度区での親ミジンコの死亡率は 20% 以下であることから、21 日間の半数致死濃度 (LC50) は試験最高濃度以上とした。

##### 4. 2 50%繁殖阻害濃度 (EC50) の算出

各濃度区での生存親 1 頭当たりの平均累積産仔数 (生存幼体) から阻害百分率を算出した。阻害百分率を Probit 解析法により 21 日間の 50% 繁殖阻害濃度 (EC50) およびその 95% 信頼限界を算出した。

##### 4. 3 最大無作用濃度 (NOEC) および最小作用濃度 (LOEC) と

各濃度区毎の 21 日間暴露の生存親 1 頭当たりの累積産仔数を算出し、各濃度区と対照区との有意差の有無を Dunnett multiple comparison 法により求め、対照区と有意差が認められない最高濃度 (最大無作用濃度：NOEC) および有意差が認められる最低濃度 (最小作用濃度：LOEC) を決定した。

統計解析には、統計処理手順書 (Z992050、992051) に従った。

## 5 結果および考察

### 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 認められなかった。

### 5. 2 試験水中の被験物質濃度

→3.2~32mg/L  
修正あり

暴露開始当日、10日目および20日目の試験液調製時の被験物質濃度は設定値3.2~32mg/Lに対して、それぞれ3.1~104mg/L、3.3~104mg/Lおよび3.2~101mg/Lであり、設定値に対する割合はそれぞれ97~105%、103~107%、99~101%であった。また、1日目、11日目および21日目の換水前の濃度はそれぞれ3.1~101mg/L、2.5~87.0mg/Lおよび1.9~77.3mg/Lであり、設定値に対する割合はそれぞれ97~103%、78~87%、59~77%であった。

設定値に対する割合が±20%を超えた濃度区があるため、実測値から対数平均濃度を算出し、それを基に時間加重平均濃度を求め、それを測定濃度とし、LC50、EC50を算出した。

[Table-1 (p. 14)、付属資料-2]

### 5. 3 ミジンコの観察結果

#### 親ミジンコの死亡数および死亡率

対照区での親ミジンコの死亡率は暴露終了時で0%であり、試験成立条件である20%以下の基準を満たした。

[Table2-1、2-2 (p. 15)、Figure1 (p. 16) 付属資料-3]

#### 初産日

対照区での親ミジンコの初産日は暴露開始後7~10日後であった。

[Table3- (p. 17) 付属資料-3]

#### 平均累積産仔数

対照区の21日間での親ミジンコ1頭当たりの平均累積産仔数は140.0頭であり、試験成立条件である平均累積産仔数60頭の基準を満たした。

[Table-4 (P. 18)、Figure-2 (P. 19)、付属資料-3]

#### 休眠卵の発生等

対照区および各試験濃度区で休眠卵は認められなかった。

5. 4 親ミジンコの半数致死濃度 (LC50)

21日間暴露の親ミジンコの半数致死濃度 (LC50) は100 mg/L以上 (設定濃度) であった。

[Table-5 (P. 20)]

↑ 100 mg/L  
修正あり

5. 5 50%繁殖阻害濃度 (EC50)

21日間暴露の50%繁殖阻害濃度 (EC50) は、58.9 mg/L (測定濃度) であり、その95%信頼区間は37.7 mg/L～83.7 mg/Lであった。

[Table-6 (P. 20)]

5. 6 累積産仔数に及ぼす最大無作用濃度 (NOEC) および最小作用濃度 (LOEC)

親ミジンコ1頭あたりの累積産仔数に及ぼす21日間の最大無作用濃度 (NOEC) は30.2 mg/L (測定濃度) であり、最小作用濃度 (LOEC) は95.5 mg/L (測定濃度) であった。

[Table-7 (P. 21)]

5. 7 試験水の水温、溶存酸素濃度、pHおよび硬度

21日間の暴露期間中の水温は20.3～21.0℃であり、設定範囲内であった。

溶存酸素濃度は6.7～8.1 mg/Lであり、すべての濃度区で飽和溶存酸素濃度の60%以上が維持された (20.0℃の飽和溶存酸素濃度: 8.84 mg/L)。

pHは7.0～7.7であり、変動は1以下であった。

硬度は23～37 mg/Lであり、設定範囲内であった。

以上のことから、水温、溶存酸素濃度 pHおよび硬度については、ミジンコの生育条件としては適切な範囲であったと思われる。

[Table-8、9、10、11 (P. 22、23)]

以 上

5) 無作用濃度  
修正あり

Table. 1 Measured Concentration of Choline chloride during a 21-day Exposure of *Daphnia magna* under Semi-Static Test Conditions

Nominal Concentration mg/L	Measured Concentration (mg/L)		Percent of Nominal	
	0 day new	1day old	new	old
Control	N. D.	N. D.	----	----
3.2	3.1	3.1	97	97
10	9.7	9.7	97	97
32	33.5	32.8	105	103
100	104	101	104	101

Nominal Concentration mg/L	Measured Concentration (mg/L)		Percent of Nominal	
	10 day new	11 day old	new	old
Control	N. D.	N. D.	----	----
3.2	3.3	2.5	103	78
10	10.3	8.1	103	81
32	34.2	25.7	107	80
100	104	87.0	104	87

Nominal Concentration mg/L	Measured Concentration (mg/L)		Percent of Nominal	
	20 day new	21 day old	new	old
Control	N. D.	N. D.	----	----
3.2	3.2	1.9	100	59
10	9.9	6.6	99	66
32	32.1	23.7	100	74
100	101	77.3	101	77

new : freshly prepared test solution

old : test solutions 24 hours after freshly prepared



Table 2-1 Cumulative Number of Dead Parental *Daphnia magna*

Conc. (mg/L)	Days																					
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	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
3.2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2
32	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Table 2-2 Mortality (%) of Parental *Daphnia magna*

Nomina Conc. (mg/L)	Days					
	1	2	4	7	14	21
Control	0	0	0	0	0	0
3.2	0	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	10	20
32	0	0	0	0	0	0
100	0	0	0	0	0	0

Figure 1 Cumulative Numbers of Dead Parental *Daphnia magna*

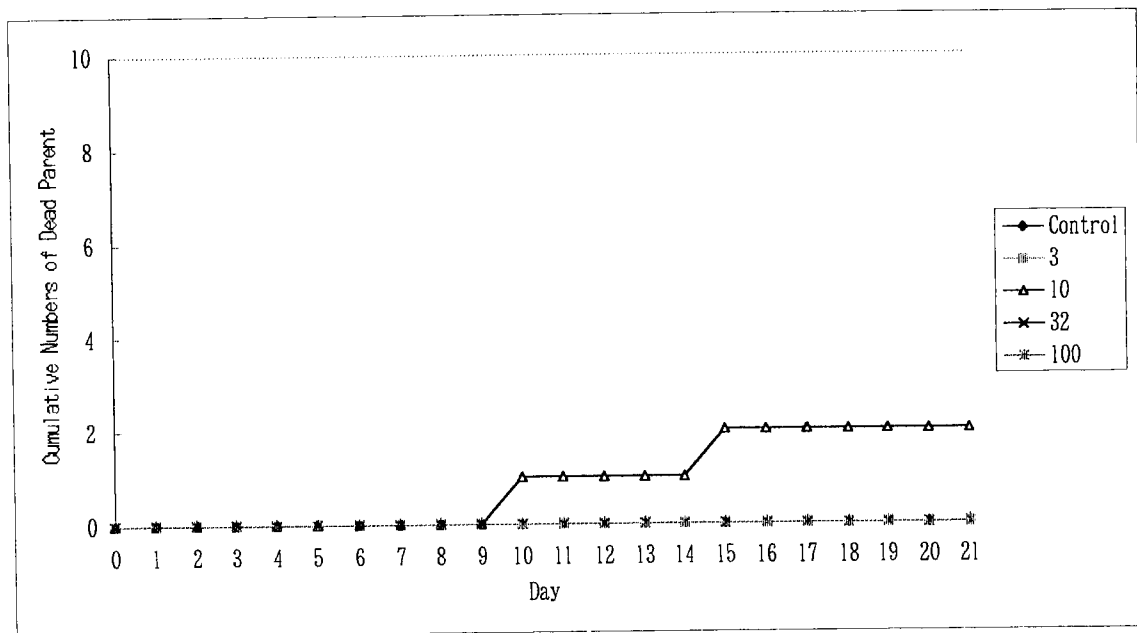


Table 3 Time (days) to First Brood Production

Vessel No.	Nominal Concentration (mg/L)				
	Control	3.2	10	32	100
1	8	8	8	7	15
2	8	9	8	8	10
3	8	7	9	8	11
4	8	8	11	8	11
5	8	8	8	8	11
6	8	10	8	11	9
7	8	7	7	7	11
8	7	8	11	11	12
9	10	7	11	8	11
10	8	7	8	7	11
Mean	8.3	7.9	8.9	8.3	11.2

Table 4 Mean Cumulative Numbers of Juveniles Produced per Adult ( $\Sigma F1/P$ )

Nominal Conc. (mg/L)	Measured Conc. (mg/L)	Days																	
		0	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	
Control	Control	0	0	1.0	11.8	12.0	14.0	36.5	36.6	43.0	66.4	66.4	74.2	105.9	106.1	111.5	140.0	140.0	
3.2	2.83	0	0	4.8	10.6	11.0	24.0	37.6	37.6	50.1	67.2	67.2	82.4	106.5	106.5	116.9	146.0	146.0	
10	9.00	0	0	0.1	8.3	9.0	9.9	32.6	32.8	39.8	63.5	63.5	70.3	103.8	103.9	109.5	142.0	142.0	
32	30.2	0	0	3.7	8.8	8.8	13.3	30.6	30.7	41.4	58.3	58.3	72.4	94.1	94.1	115.4	136.1	136.1	
100	95.5	0	0	0	0	0.3	0.8	2.7	4.1	4.1	5.6	7.5	8.9	9.5	11.8	11.8	11.8	11.8	

Figure 2 Mean Cumulative Numbers of Juveniles Produced per Adult ( $\Sigma F1/P$ ) during 21 days

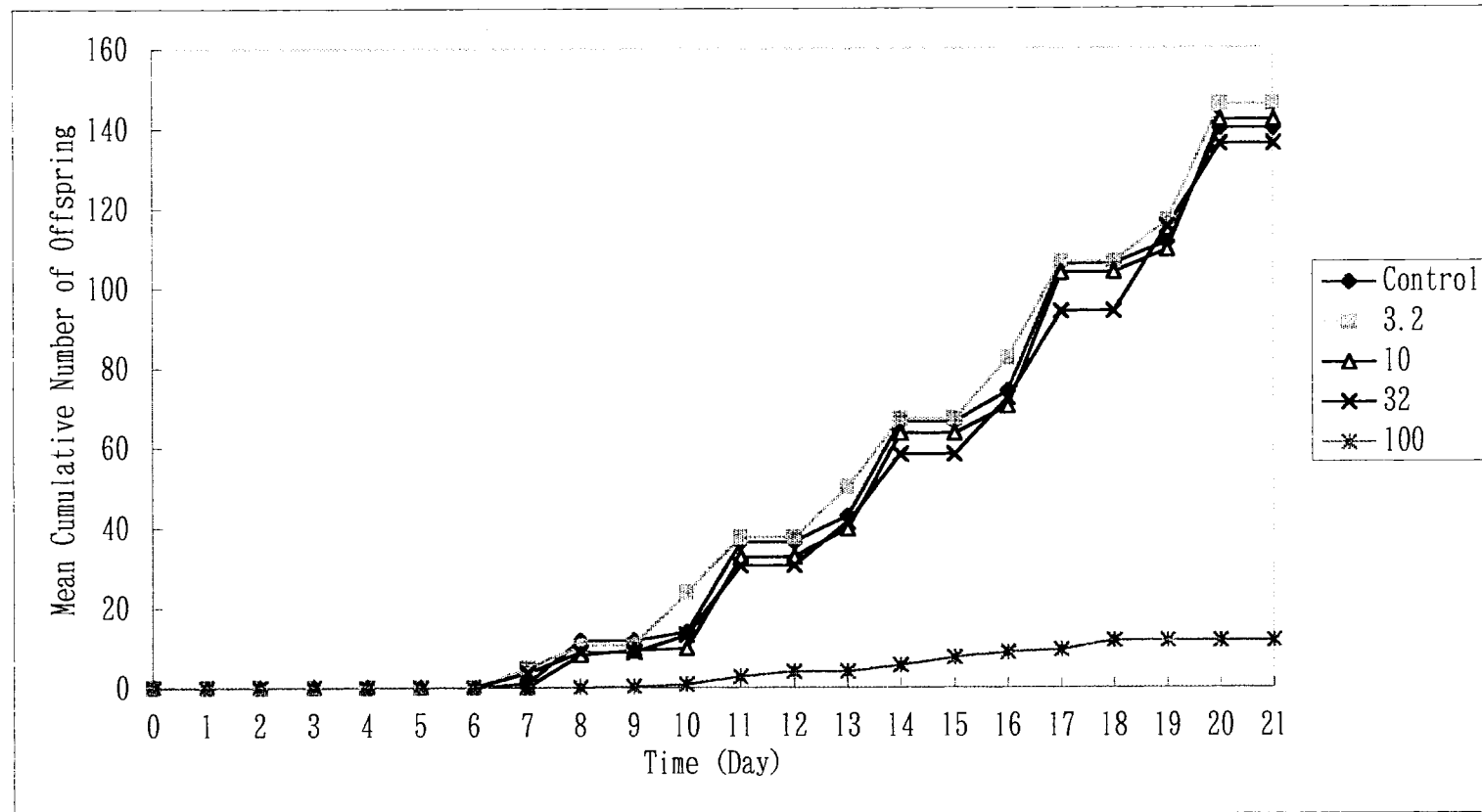


Table 5 Calculated LC50 Values for Parental *Daphnia magna*

Exposure period (day)	LC50 (mg/L)	95% Confidence limit (mg/L)	Statistical method
21	> 95.5	—	—

Table 6 Calculated EC50 Values for Inhibition of Reproduction

Exposure period (day)	EC50 (mg/L)	95% Confidence limit (mg/L)	Statistical method
21	58.9	37.7 ~ 83.7	Probit

Table 7 Cumulative numbers of juveniles produced per adult alive for 21days

Vessel No.	Nominal Concentration, mg/L (Measured Concentration, mg/L)				
	Control	3.2 (2.83)	10 (9.00)	32 (30.2)	100 (95.5)
1	162	150	D	140	13
2	151	136	147	147	12
3	152	143	125	114	5
4	142	150	D	168	12
5	150	154	139	125	11
6	136	124	151	125	12
7	128	152	152	142	10
8	118	140	129	129	17
9	121	162	140	149	11
10	140	149	153	122	15
Mean	140.0	146.0	142.0	136.1	11.8
S.D.	14.4	10.7	10.7	16.1	3.2
Inhibition ratio (%)		-4.3	-1.4	2.8	91.6
Significant difference		N.S	N.S	N.S	*

D : Were not calculated because the parental *Daphnia magna* was dead during a 21-days testing period

N.S :Indicate a no-significant difference by Dunnett multiple comparison procedure

\* :Indicate a significant difference by Dunnett multiple comparison procedure

Table 8 Temperature during a 21-day *Daphnia magna* Reproduction Inhibition Test (Semi-Static Test)

		Temperature, °C				
days		Nominal Concentration (mg/L)				
		Control	3.2	10	32	100
0	new	20.7	20.7	20.8	20.9	20.8
1	old	21.0	20.8	20.8	20.8	21.0
10	new	20.6	20.4	20.3	20.4	20.6
11	old	20.6	20.6	20.5	20.7	20.6
20	new	20.8	20.6	20.8	20.8	20.7
21	old	20.8	20.7	20.8	20.9	20.8

new : freshly prepared test solution

old : test solutions after 24 hours exposure

Table 9 Dissolved Oxygen Concentration(D.O.) during a 21-day *Daphnia magna* Reproduction Inhibition Test (Semi-Static Test)

		D.O. (mg/L)				
days		Nominal Concentration (mg/L)				
		Control	3.2	10	32	100
0	new	8.1	8.1	8.1	8.1	8.1
1	old	7.9	8.1	7.3	7.8	8.0
10	new	8.0	7.9	7.9	8.0	7.9
11	old	7.8	7.7	7.8	7.6	6.7
20	new	8.0	7.9	7.9	8.0	8.0
21	old	7.9	7.9	8.0	7.5	7.0

new : freshly prepared test solution

old : test solutions after 24 hours exposure



Table 10 pH during a 21-day *Daphnia magna* Reproduction Inhibition Test (Semi-Static Test)

pH		Nominal Concentration (mg/L)				
days		Control	3.2	10	32	100
0	new	7.3	7.4	7.4	7.4	7.4
1	old	7.5	7.4	7.3	7.2	7.2
10	new	7.4	7.4	7.4	7.4	7.4
11	old	7.6	7.7	7.6	7.5	7.1
20	new	7.3	7.3	7.4	7.4	7.4
21	old	7.3	7.4	7.2	7.0	7.0

new : freshly prepared test solution

old : test solutions after 24 hours exposure

Table 11 Total hardness (as CaCO<sub>3</sub>) during a 21-day *Daphnia magna* Reproduction Inhibition Test (Semi-Static Test)

Total hardness (as CaCO <sub>3</sub> ) (mg/L)		Nominal Concentration (mg/L)				
days		Control	3.2	10	32	100
0	new	37	36	37	36	36
1	old	34	34	34	35	28
10	new	24	23	24	24	24
11	old	23	23	23	23	23
20	new	28	29	28	28	28
21	old	28	28	28	28	28

new : freshly prepared test solution

old : test solutions after 24 hours exposure

付属試料－ 1

希釈水の水質

(全 1 頁)

## Water Quality of Dilute Water

Parameter	Concentration	
Coliform group bacteria	N. D.	
pH	8.1	--
BOD	<0.5	mg/L
COD	<0.5	mg/L
Mercury	<0.0005	mg/L
Copper	<0.01	mg/L
Cadmium	<0.002	mg/L
Zinc	<0.01	mg/L
Lead	<0.005	mg/L
Aluminium	<0.02	mg/L
Nickel	<0.005	mg/L
Chromium	<0.05	mg/L
Manganese	<0.02	mg/L
Tin	<0.1	mg/L
Iron	<0.1	mg/L
Cyanide	<0.1	mg/L
Free Chlorine	<0.05	Lmg/
Bromide ion	<0.2	mg/L
Fluoride	0.04	mg/L
Sulfide ion	<0.5	mg/L
Ammonium ion	<0.03	mg/L
Arsenic	<0.005	mg/L
Selenium	<0.005	mg/L
Evaporation residue	61	mg/L
Electric conductivity	7.4	mS/m
Total hardness (as CaCO <sub>3</sub> )	25.8	mg/L
Alkalinity	29.5	mg/L
Sodium	5.6	mg/L
Potassium	1.1	mg/L
Calcium	8.1	mg/L
Magnesium	1.8	mg/L
Total organophosphorous pesticide	<0.003	mg/L
Herbicide Simazine	<0.0003	mg/L
Herbicide Thiobencarb	<0.002	mg/L
Fungicide Thiuram	<0.0006	mg/L

Sampling Date : 1999.02.02

## 付属試料－2

試験液の分析方法

(全24頁)

## 塩化コリンの分析法

(株)クレハ分析センター

## 1. 試料 : 試験液

## 化学名及び化学式

塩化コリン

分子式

化学式

分子量

:  $C_5H_{14}ONCl$   
 :  $HOCH_2CH_2(CH_3)_3N^+Cl^-$   
 : 139.63

## 物理的・化学的性質

性状

: 水に可溶  
 : 白色の固体

## 2. 分析法

## 1) 装置及び器具

イオンクロマトグラフ

検出器 (電気伝導度)

インテグレーター

メスフラスコ

マイクロピペッター

マイクロシリンジ

: ノンサプレッサー型 IC  
 : L-3720  
 : D-7500  
 : 100ml  
 : 250、500、1000  $\mu$ l  
 : 50  $\mu$ l

日立製作所

日立製作所

日立製作所

## 2) 試薬

メタノール

水

りん酸

塩化コリン

: 試薬 特級  
 : 超純水 Milli-RX12  $\alpha$  Millipore  
 : 試薬 特級 (85%)  
 : 試薬 1級

## 3) 塩化コリン標準原液 (1200mg/ml)

塩化コリン標準品の約0.12gを正秤し、容量100mlのメスフラスコに秤りとり、水を標線まで加える。

## 4) イオンクロマトグラフの操作条件

カラム

溶離液

流量

検出器

注入量

: Shodex IC Y-521 昭和電工製  
 : 150mm  $\times$  4mm ID  
 : 7mM-りん酸溶液+メタノール (15%になる様に添加)  
 : 1.5ml/min  
 : 電気伝導検出器  
 : 50  $\mu$ l

## 5) 検量線の作製

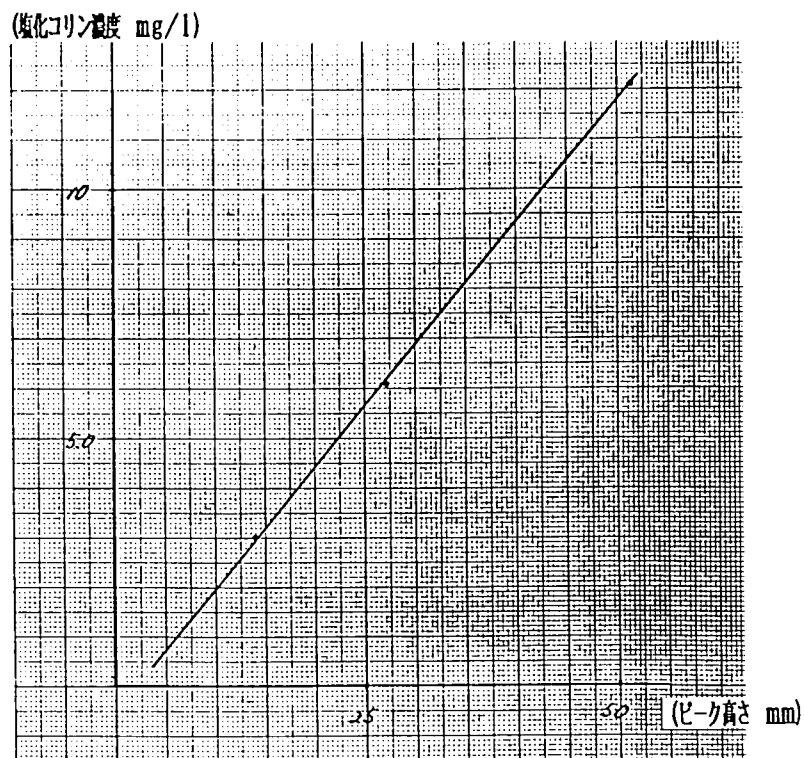
塩化コリン標準原液に水を加えて希釈し、3、6、12mg/lの標準液を調整する。この液50  $\mu$ lを上記条件の高速液体クロマトグラフに注入し、クロマトグラムをかけ、ピーク高さをノギス (mm) でかりとる。  
 濃度を縦軸に、横軸にピークの高さをとり検量線を作成する。

## ①. 検量線作成

表-1 Input Data

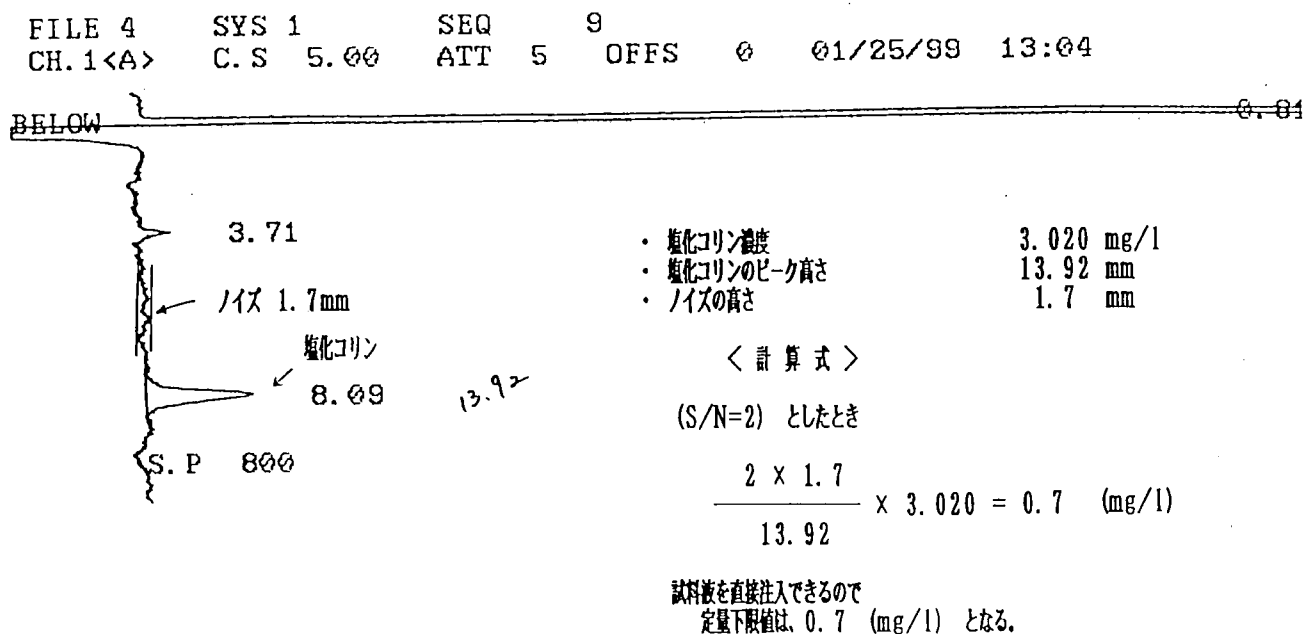
No.	標準溶液濃度 (mg/l)	ピーク高さ (mm)
1	3.020	13.92
2	6.050	27.18
3	12.100	51.40

図-1 検量線



②. 検出下限値の計算

図-2 クロマトグラム



計算により、定量下限値 0.7 mg/l、  
よって、定量下限値未満の表示NDは、0.7 mg/l 未満を示す。

6) 分析操作 (例 1000mg/l)

10ml 共栓フラスコに水約5ml をとり、これに、試料溶液の100 $\mu$ l をマイクロピペッターではかりとり、水を標線まで加える。

この液を50 $\mu$ l を前記条件のイオンクロマトグラフに注入し、クロマトグラムをかかせ、塩化コリンの保持時間に相当するピークの高さをノギスではかり、検量線より濃度を求める。

2. 添加回収率試験

塩化コリンの標準原液に水を加えて希釈し、約1~1000mg/l の試験溶液4種類を下記の様に調整し、繰り返し測定を行った結果、良好な回収率を得た。  
(各試験試料はn=2で測定した)

表-2 添加回収率試験の測定結果

No	試料濃度 (mg/l)	測定値 (mg/l)	回収率 (%)	平均回収率 (%)
1	1008	1023.9 1038.5	101.6 103.0	102.3
2	100.8	103.7 104.7	102.9 103.9	103.4
3	10.08	10.6 10.3	105.2 102.2	103.7
4	1.008	0.9 0.8	89.3 79.4	84.4

3. 保存安定性試験

塩化コリンの標準原液に水を加えて希釈し、約1~1000mg/l の試験溶液4種類を下記の様に調整した。この試験溶液を4℃の冷暗所に保存した時の3日間後の経時測定により保存安定性を求めた結果、いずれの濃度においても顕著な濃度変化は見られなかった。  
(各試験試料はn=2で測定した)

しかし、低濃度の値が低くなることもあるので、設定値より20%低くなった場合は、nの数を増やすか、検量線の感度変化等を確認する必要がある。

表-3 保存安定性試験の測定結果

No	試料濃度 (mg/l)	3日後の経時変化濃度 (mg/l)			
		調整時	1日目	3日目	平均
1	1008	1023.9 1038.5	987.8 1019.9	985.7 1003.5	1010.0
2	100.8	103.7 104.7	103.0 101.9	99.2 96.1	101.4
3	10.08	10.6 10.3	10.2 10.5	10.2 10.2	10.3
4	1.008	0.9 0.8	0.9 1.0	0.9 1.0	0.9

図-3 標準溶液の液体クロマトグラム (検量線作成用)

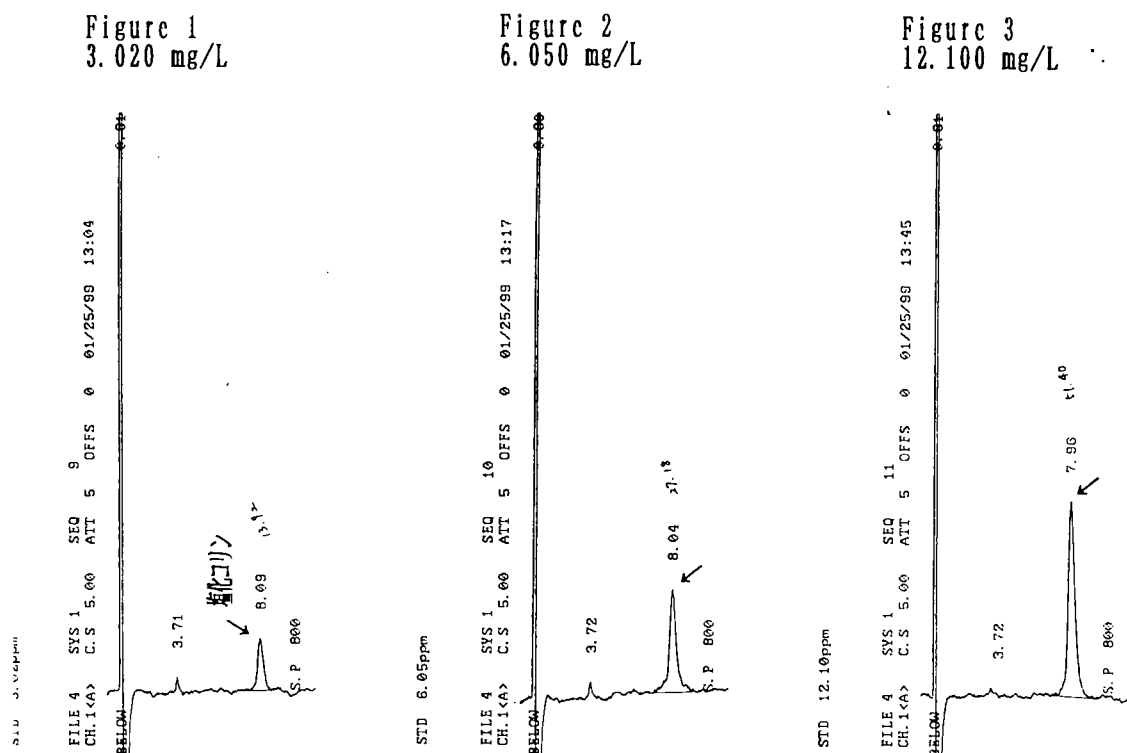


図-4 添加回収率試験の液体クロマトグラム

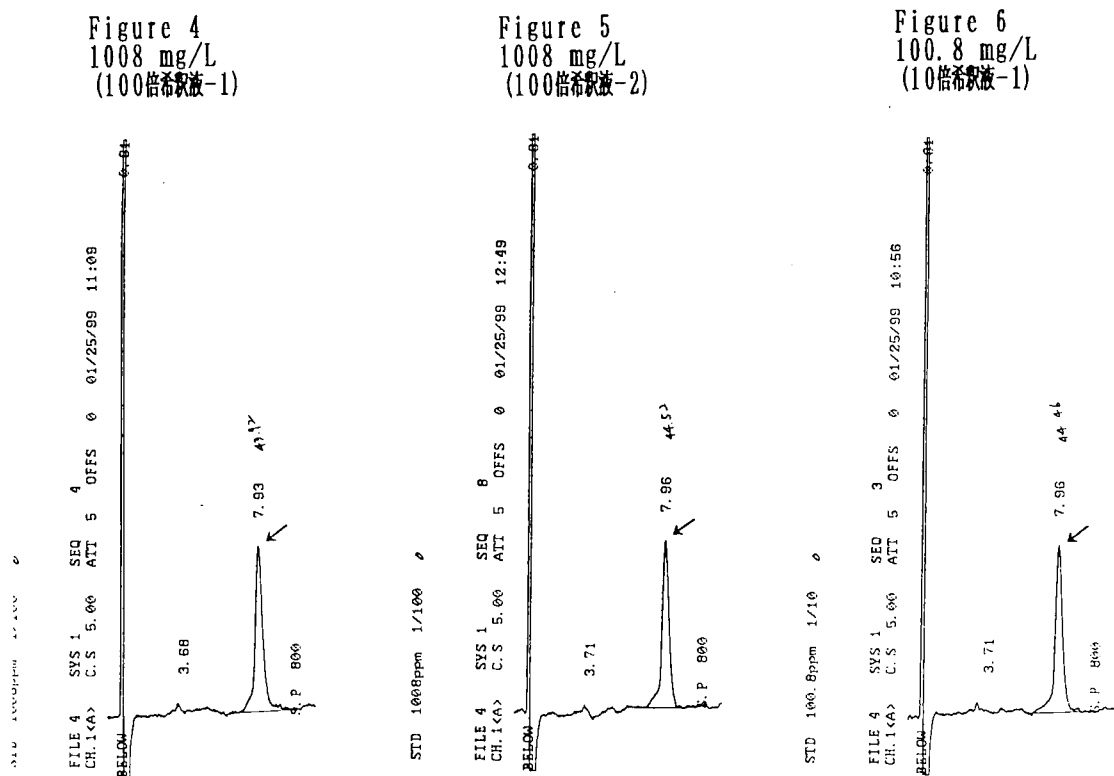




Figure 7  
100.8 mg/L  
(10倍稀释-2)

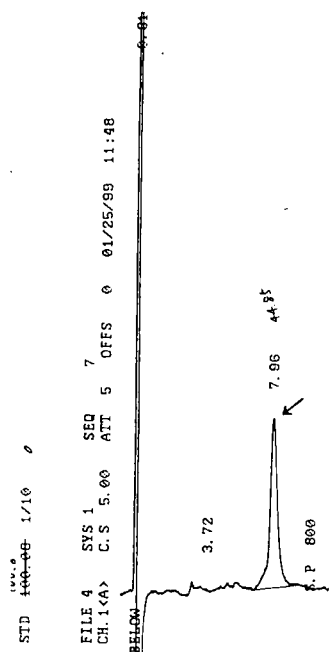


Figure 8  
10.08 mg/L  
(n-1)

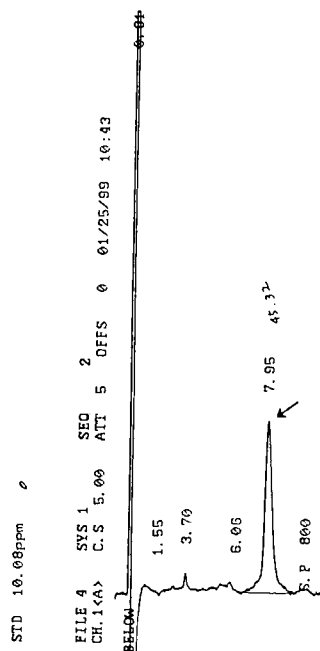


Figure 9  
10.08 mg/L  
(n-2)

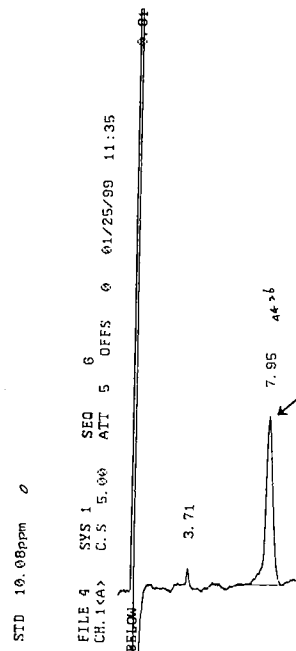


Figure 10  
1.008 mg/L  
(n-1)

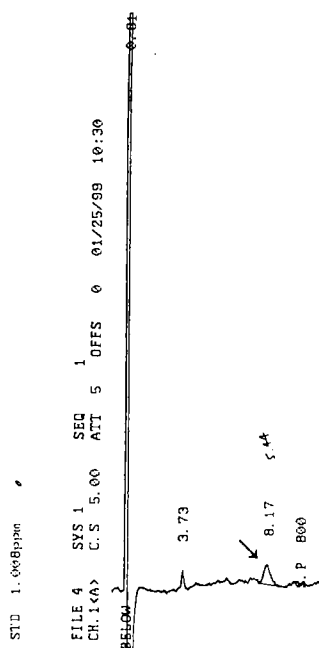


Figure 11  
1.008 mg/L  
(n-2)

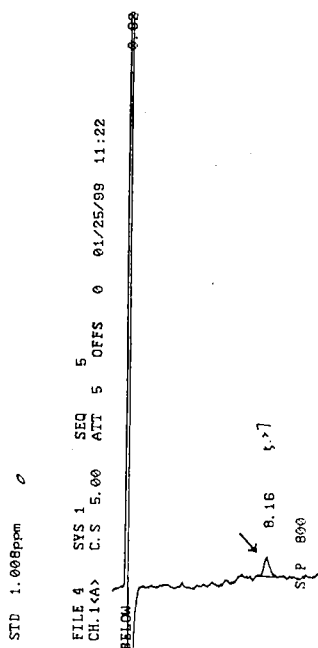


図-5 保存安定性試験の液体クロマトグラム

Figure 12  
標準溶液  
3.000 mg/L

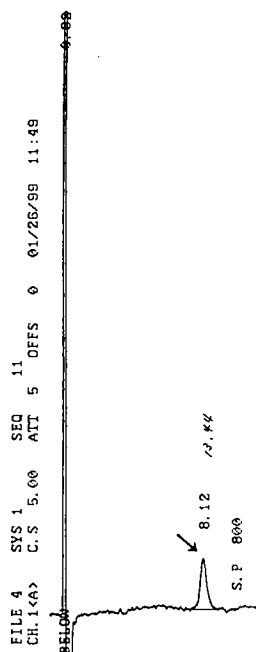


Figure 13  
標準溶液  
6.000 mg/L

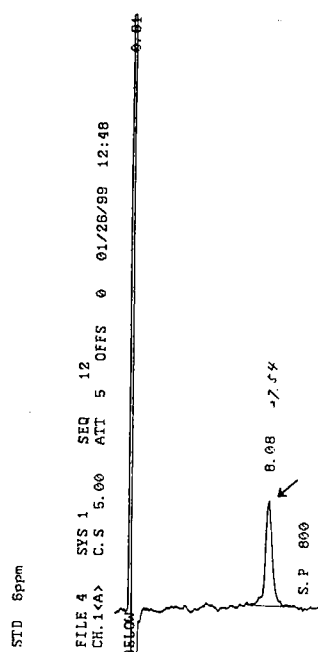


Figure 14  
標準溶液  
12.000 mg/L

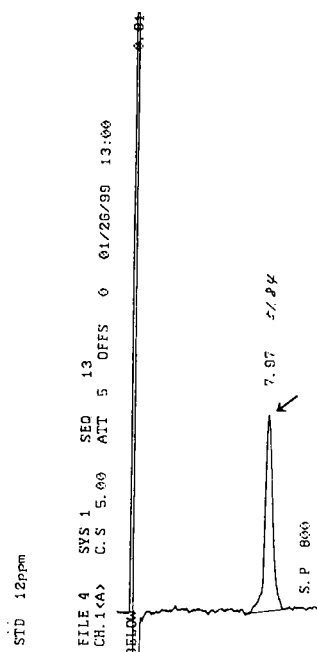


Figure 15  
1008 mg/L (1日後)  
(100倍希釈液-1)

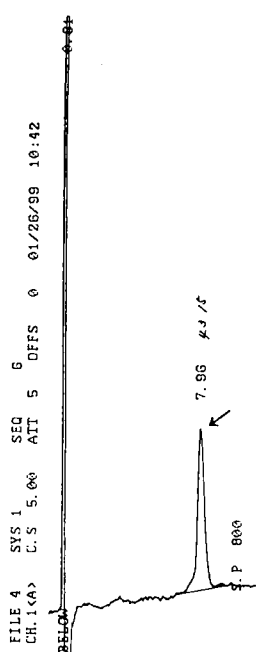


Figure 16  
1008 mg/L (1日後)  
(100倍希釈液-2)

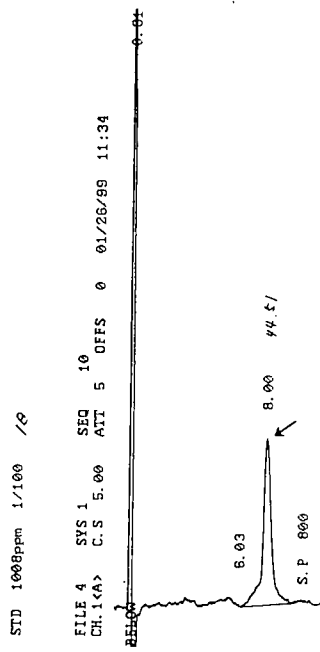


Figure 17  
100.8 mg/L (1日後)  
(10倍希釈液-1)

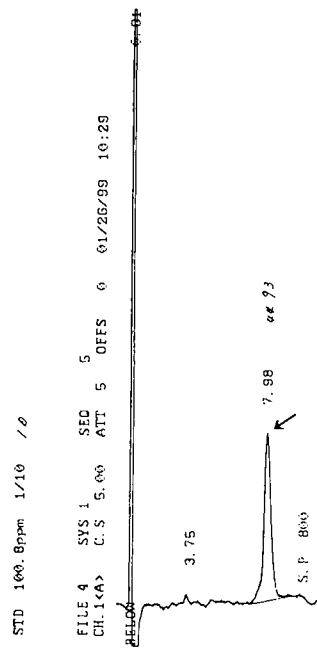


Figure 18  
100.8 mg/L (1日後)  
(10倍希釈液-2)

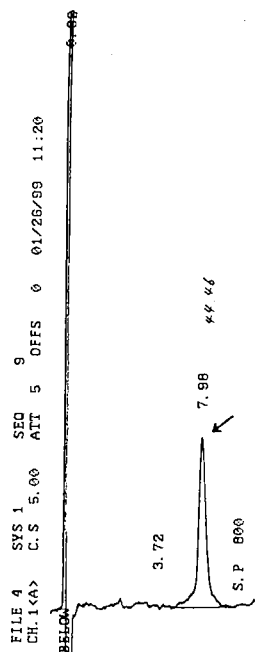


Figure 19  
10.08 mg/L (1日後)  
(n-1)

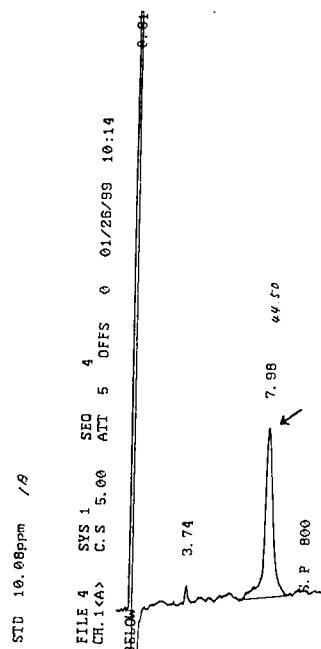


Figure 20  
10.08 mg/L (1日後)  
(n-2)

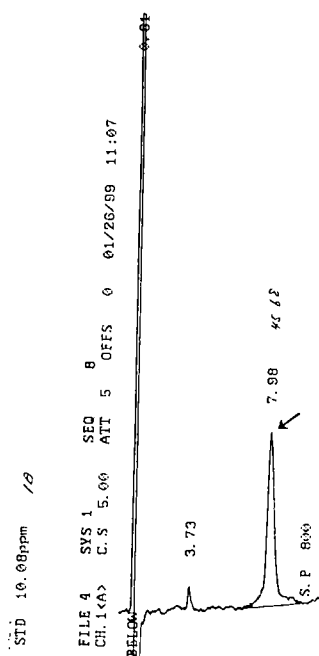


Figure 21  
1.008 mg/L (1日後)  
(n-1)

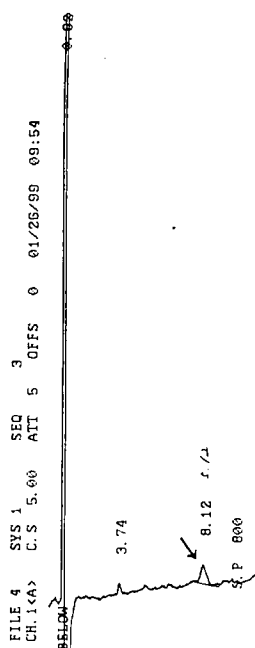


Figure 22  
1.008 mg/L (1日後)  
(n-2)

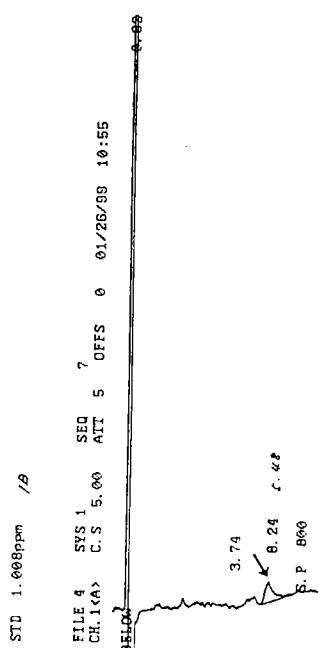


Figure 23  
標準溶液  
3.036 mg/L

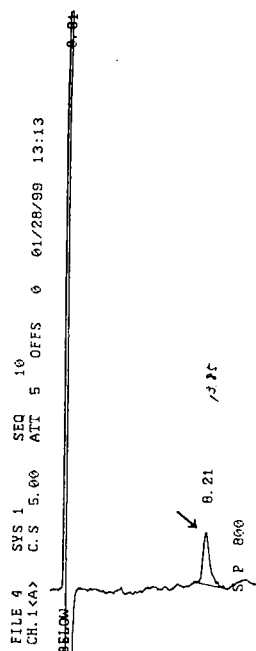


Figure 24  
標準溶液  
6.072 mg/L

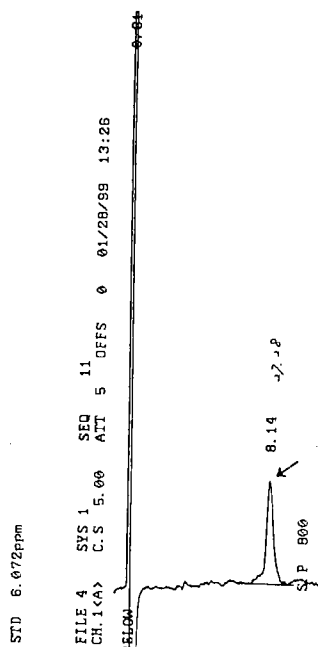


Figure 25  
標準溶液  
12.144 mg/L

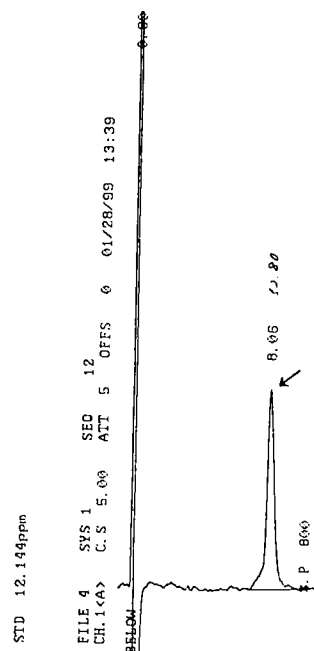


Figure 26  
1008 mg/L (3日後)  
(100倍希釈液-1)

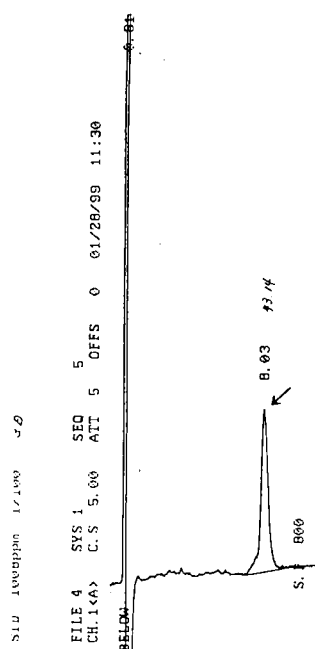


Figure 27  
1008 mg/L (3日後)  
(100倍希釈液-2)

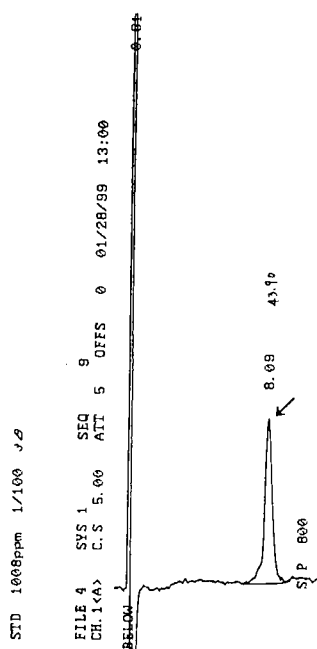


Figure 28  
100.8 mg/L (3日後)  
(10倍希釈液-1)

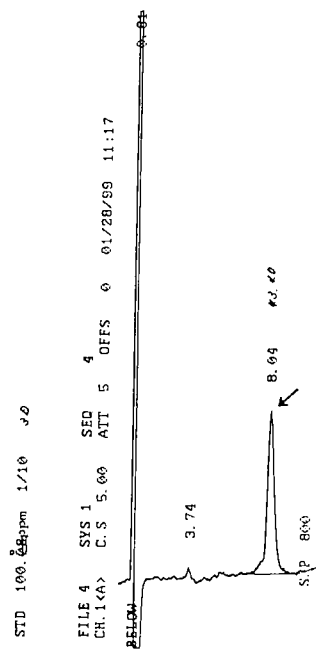


Figure 29  
100.8 mg/L (3日後)  
(10倍希釈液-2)

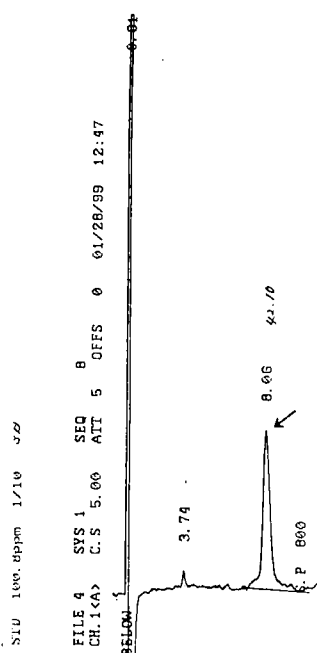


Figure 30  
10.08 mg/L (3日後)  
(n-1)

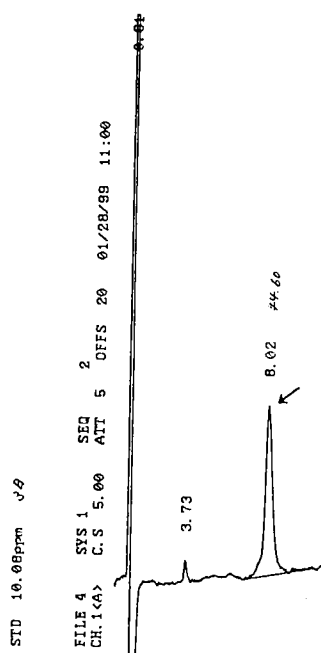


Figure 31  
10.08 mg/L (3日後)  
(n-2)

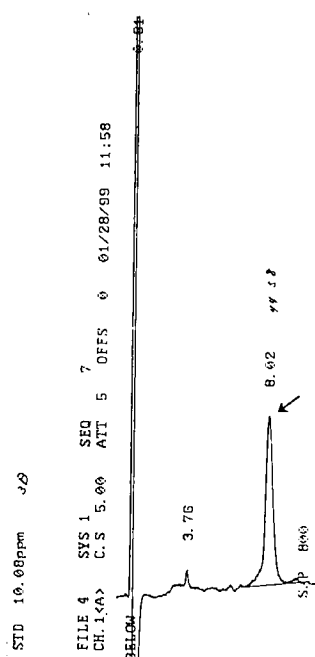


Figure 32  
1.008 mg/L (3日後)  
(n-1)

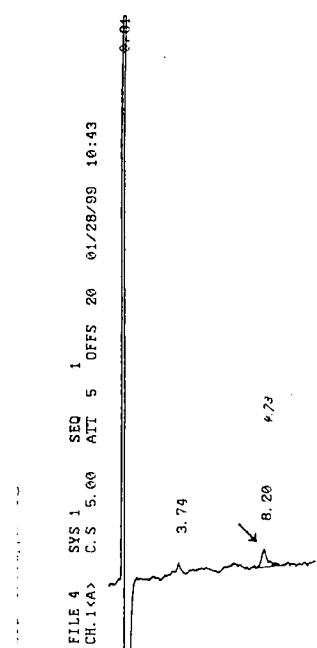
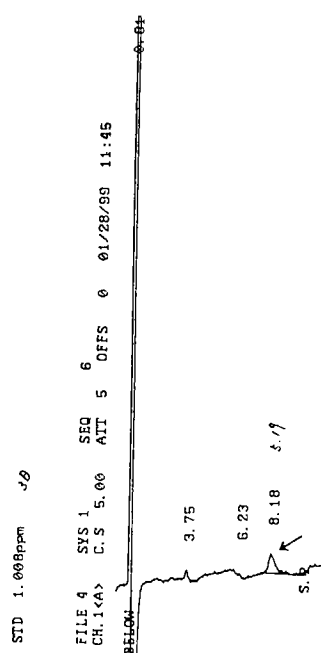


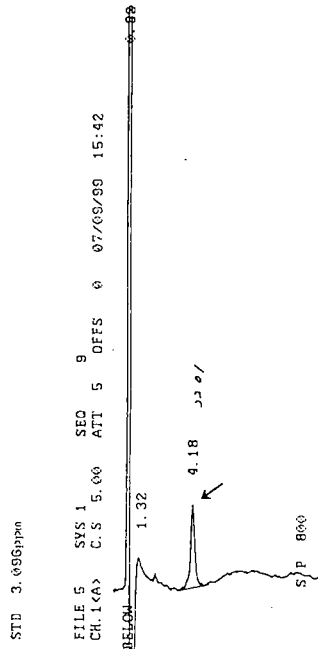
Figure 33  
1.008 mg/L (3日後)  
(n-2)



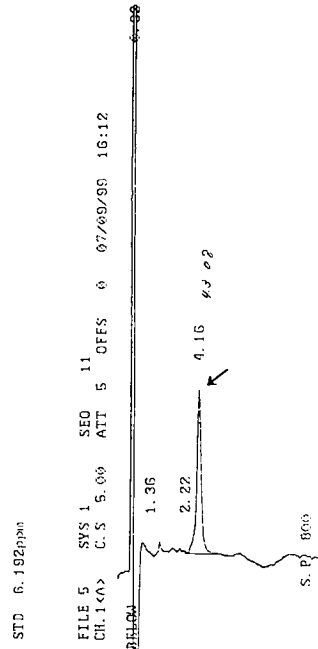
# 試験結果の液体クロマトグラム

試料名：塩化コリンのオオミジンコ (*Daphnia magna*) に対する繁殖阻害試験  
(試験番号：NO1998生-15)

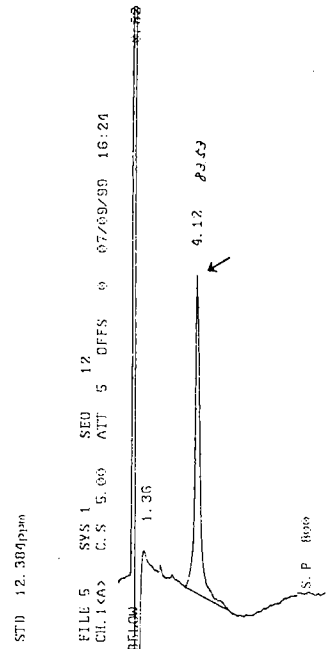
暴露開始時  
Figure 34  
標準液 3.108 mg/L



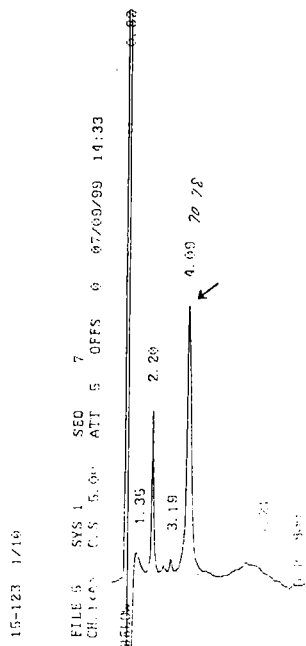
暴露開始時  
Figure 35  
標準液 6.216 mg/L



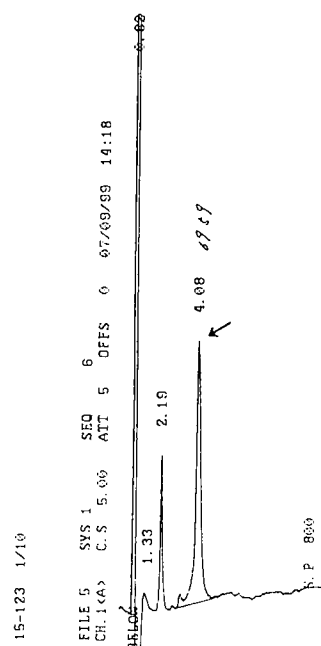
暴露開始時  
Figure 36  
標準液 12.432 mg/L



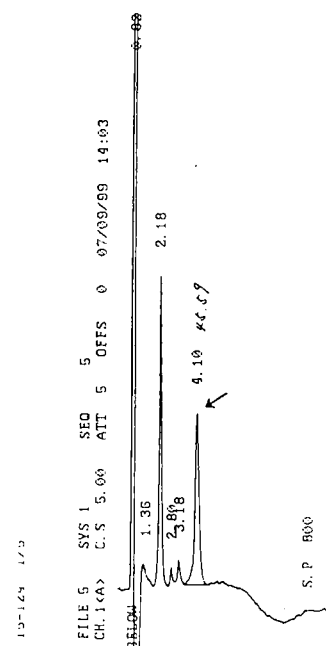
暴露開始時  
Figure 37  
100 mg/L  
生-15-123-1  
(10倍希釈液)

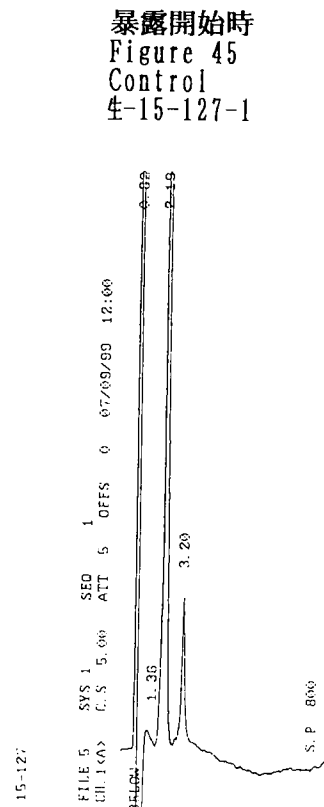
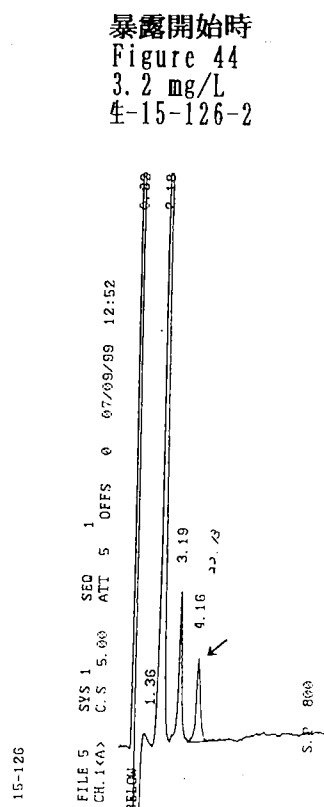
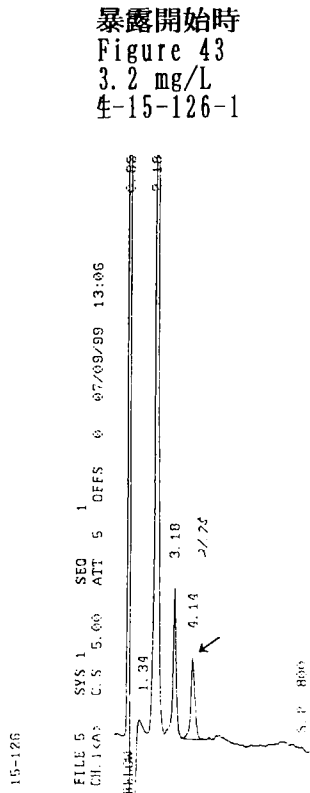
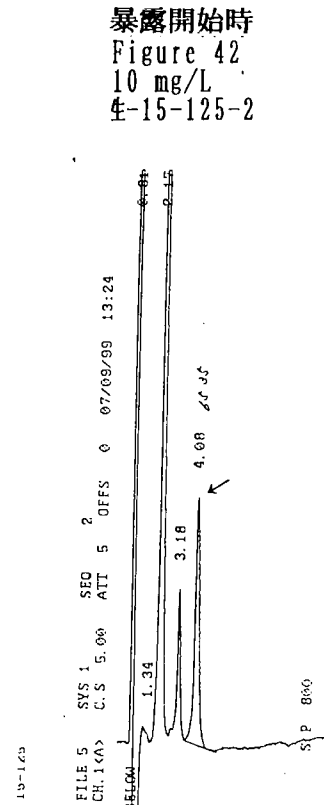
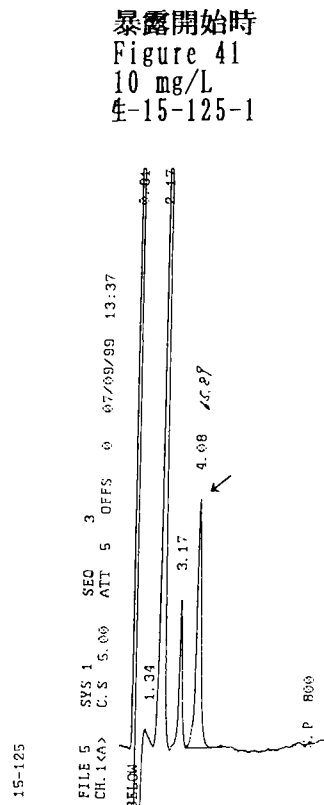
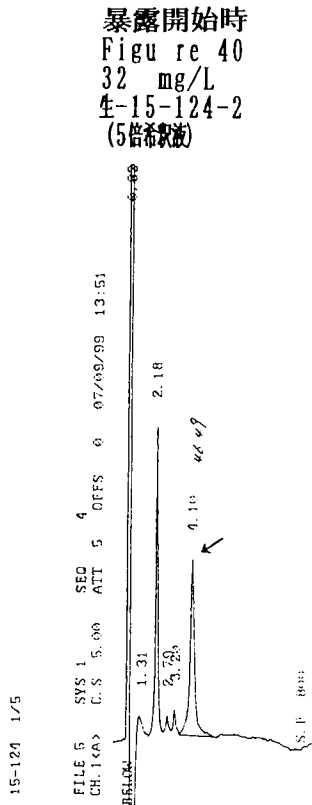


暴露開始時  
Figure 38  
100 mg/L  
生-15-123-2  
(10倍希釈液)

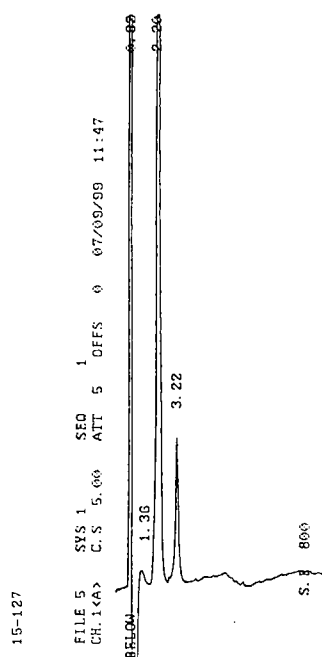


暴露開始時  
Figure 39  
32 mg/L  
生-15-124-1  
(5倍希釈液)

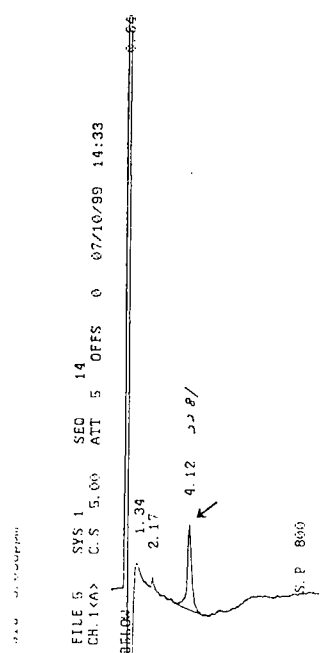




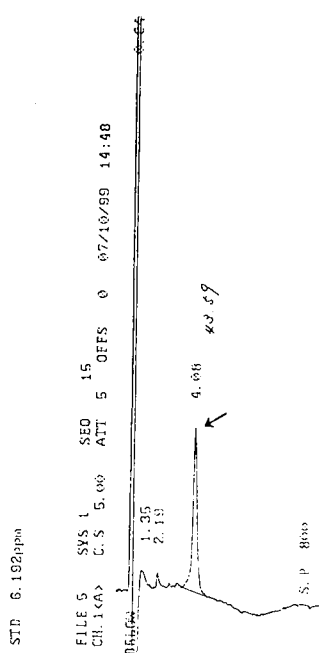
暴露開始時  
Figure 46  
Control  
4-15-127-2



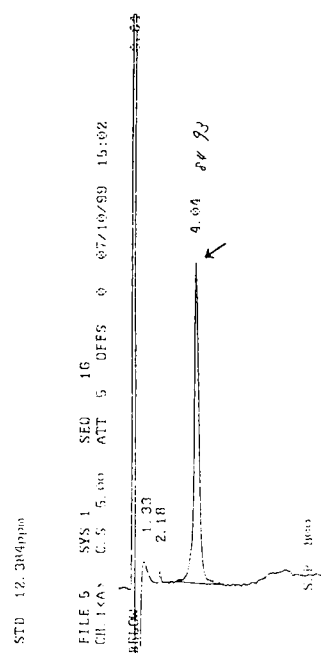
暴露 (24時間換水前)  
Figure 47  
標準溶液 3.096 mg/L



暴露 (24時間換水前)  
Figure 48  
標準溶液 6.192 mg/L

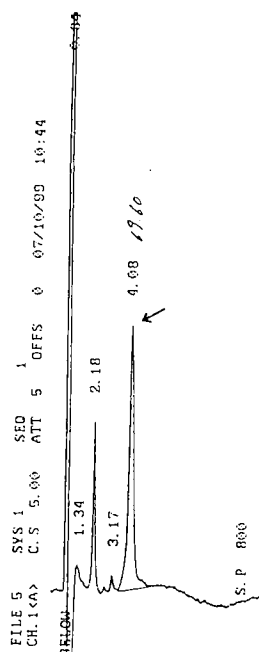


暴露 (24時間換水前)  
Figure 49  
標準溶液 12.384 mg/L

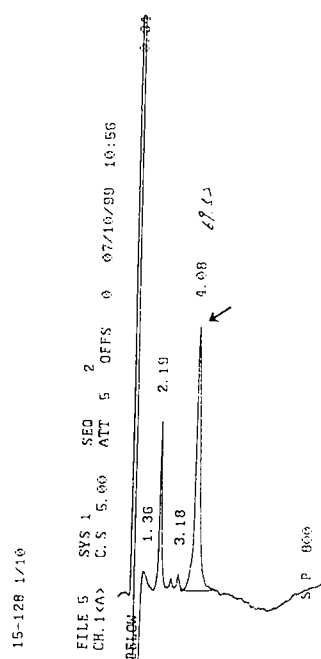




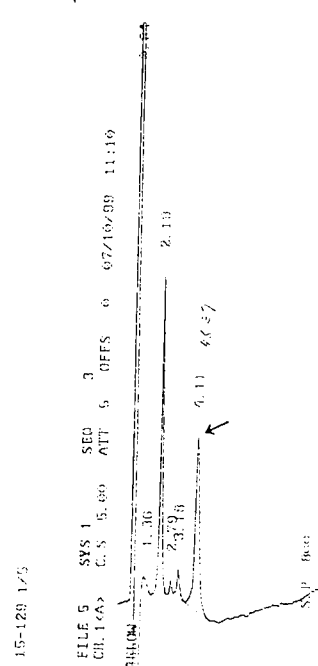
暴露 (24時間換水前)  
Figure 50  
100 mg/L  
生-15-128-1  
(10倍希釈液)



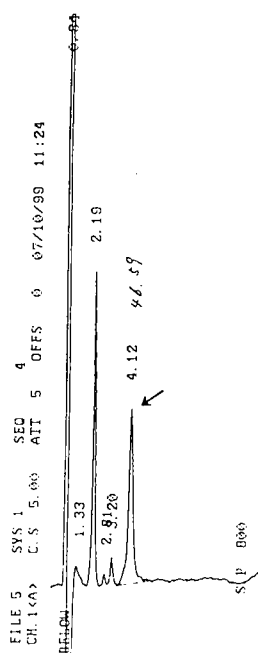
暴露 (24時間換水前)  
Figure 51  
100 mg/L  
生-15-128-2  
(10倍希釈液)



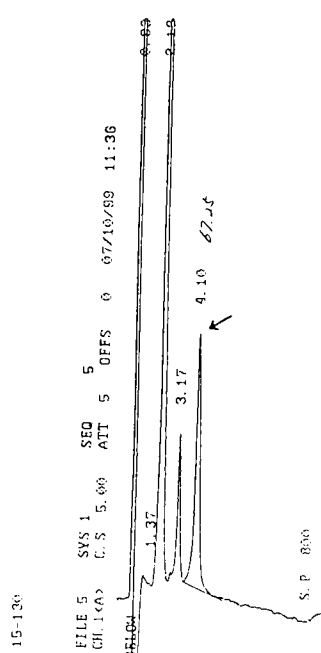
暴露 (24時間換水前)  
Figure 52  
32 mg/L  
生-15-129-1  
(5倍希釈液)



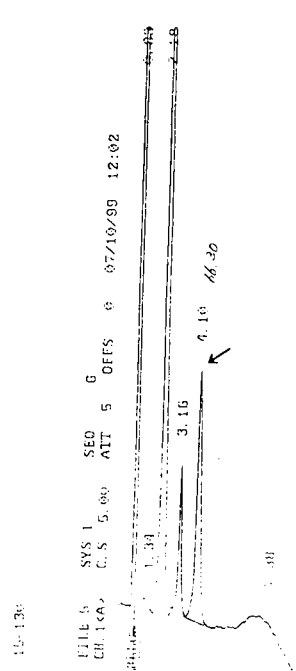
暴露 (24時間換水前)  
Figure 53  
32 mg/L  
生-15-129-2  
(5倍希釈液)



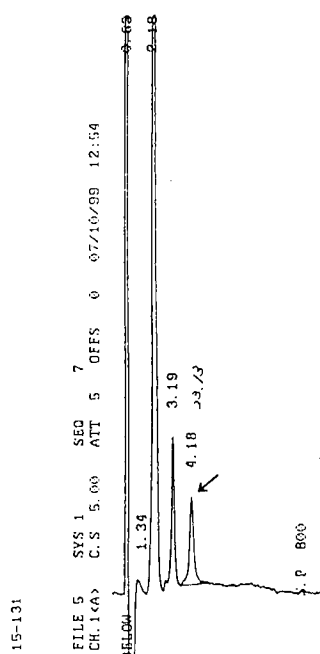
暴露 (24時間換水前)  
Figure 54  
10 mg/L  
生-15-130-1



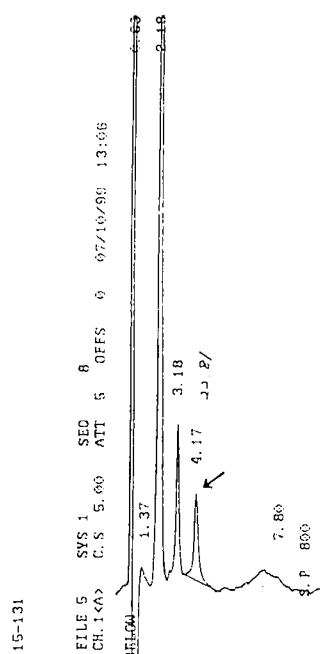
暴露 (24時間換水前)  
Figure 55  
10 mg/L  
生-15-130-2



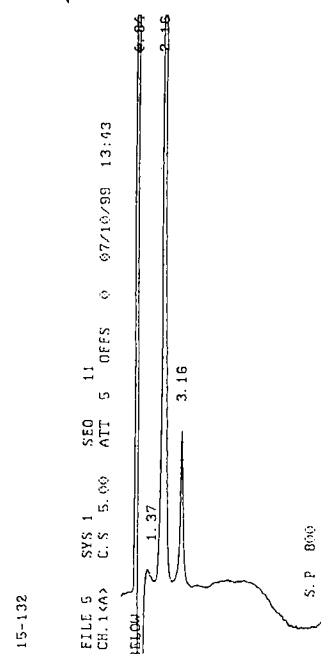
暴露 (24時間換水前)  
Figure 56  
3.2 mg/L  
4-15-131-1



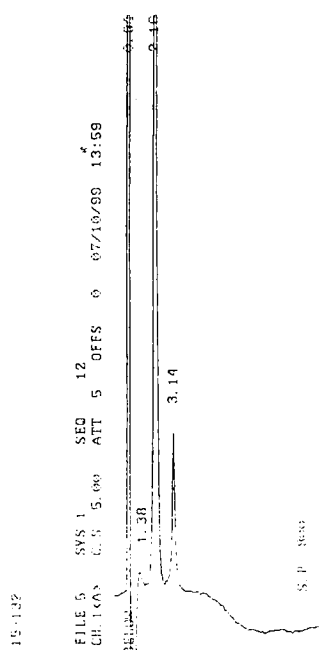
暴露 (24時間換水前)  
Figure 57  
3.2 mg/L  
4-15-131-2



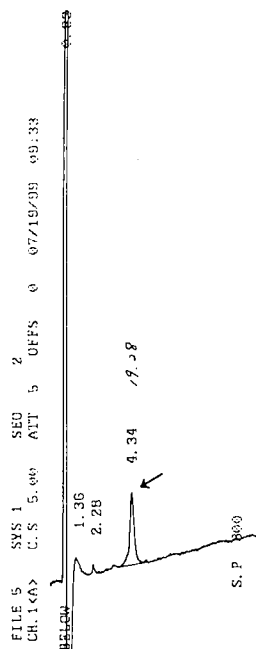
暴露 (24時間換水前)  
Figure 58  
Control  
4-15-132-1



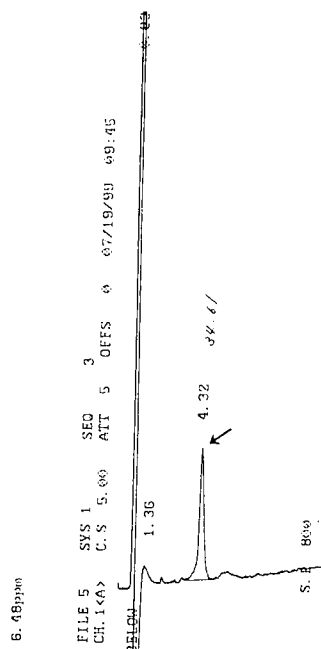
暴露 (24時間換水前)  
Figure 59  
Control  
4-15-132-2



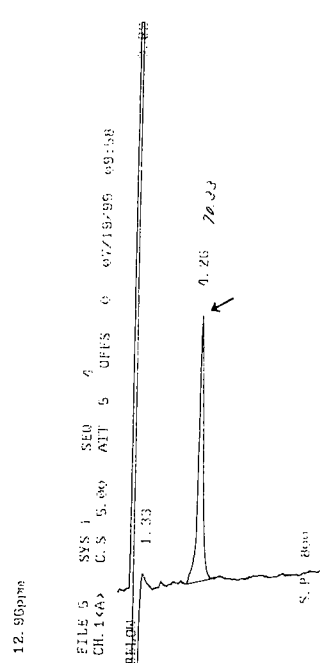
暴露 (第二週換水後)  
Figure 60  
標準溶液 3.240 mg/L



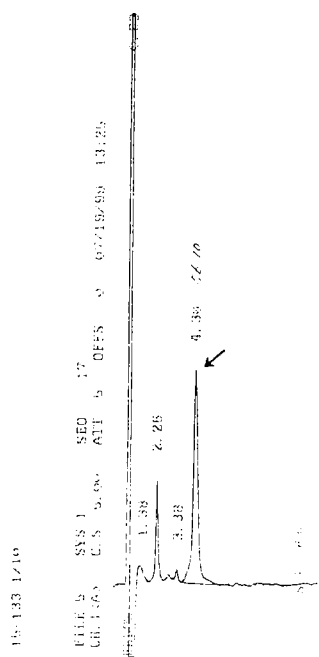
暴露 (第二週換水後)  
Figure 61  
標準溶液 6.480 mg/L



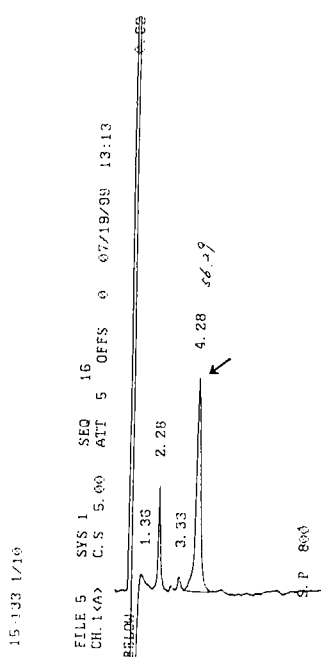
暴露 (第二週換水後)  
Figure 62  
標準溶液 12.960 mg/L



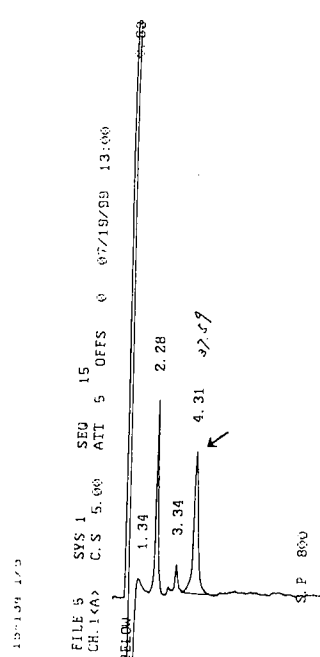
暴露 (第二週換水後)  
Figure 63  
100 mg/L  
生-15-133-1  
(10倍希釈液)



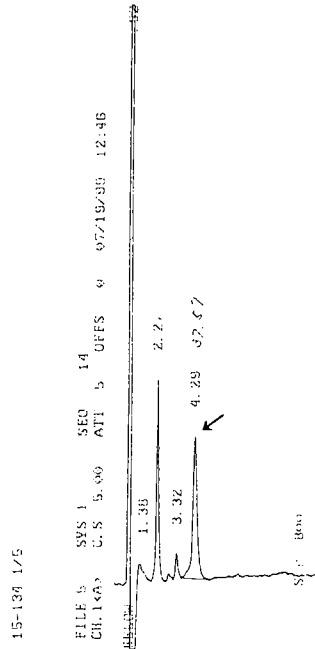
暴露 (第二週換水後)  
Figure 64  
100 mg/L  
生-15-133-2  
(10倍希釈液)



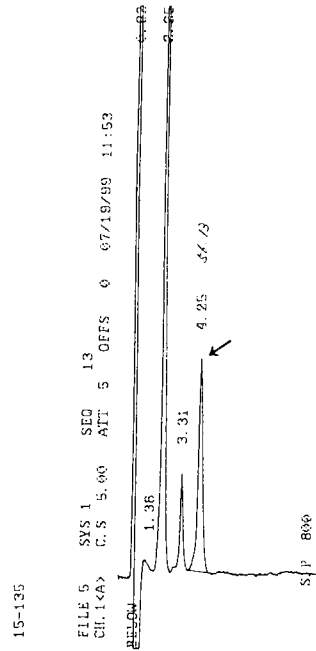
暴露 (第二週換水後)  
Figure 65  
32 mg/L  
生-15-134-1  
(5倍希釈液)



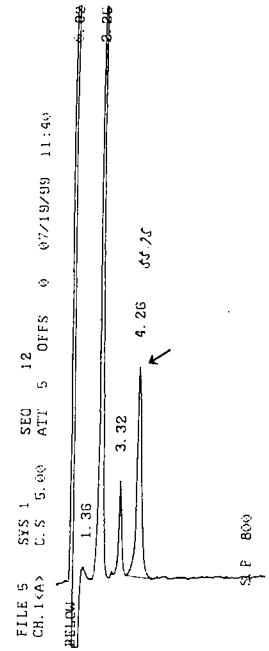
暴露 (第二週換水後)  
Figure 66  
32 mg/L  
生-15-134-2  
(5倍希釈液)



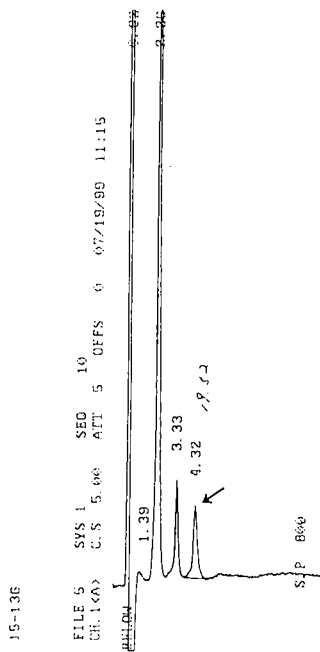
暴露 (第二週換水後)  
Figure 67  
10 mg/L  
生-15-135-1



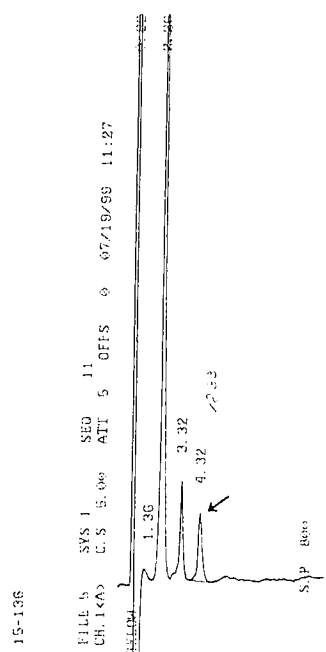
暴露 (第二週換水後)  
Figure 68  
10 mg/L  
生-15-135-2



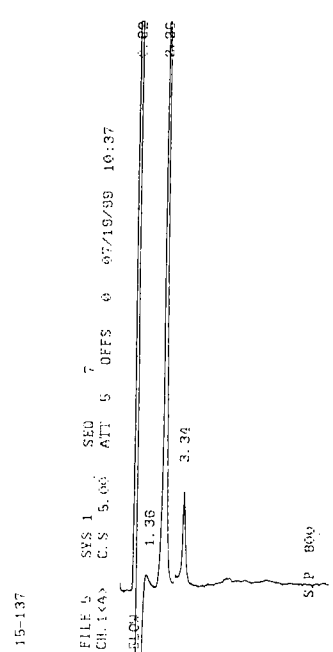
暴露 (第二週換水後)  
Figure 69  
3.2 mg/L  
生-15-136-1



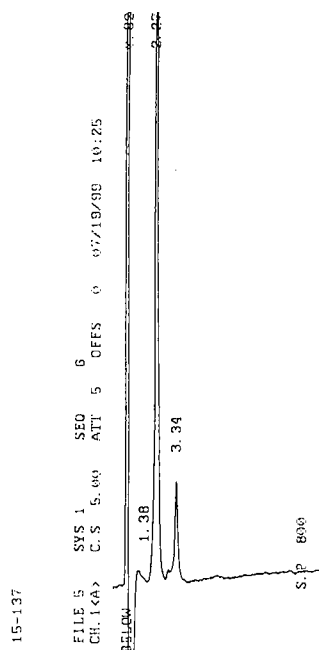
暴露 (第二週換水後)  
Figure 70  
3.2 mg/L  
生-15-136-2



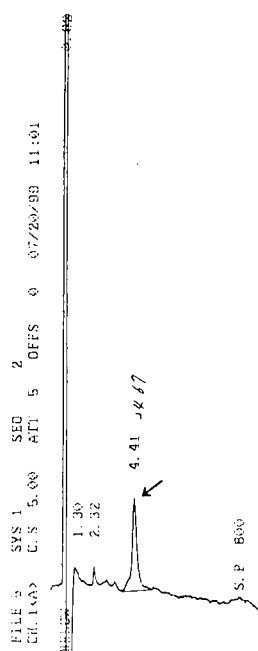
暴露 (第二週換水後)  
Figure 71  
Control  
生-15-137-1



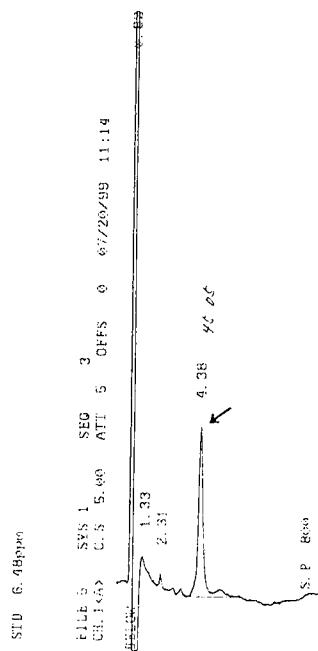
暴露 (第二週換水後)  
Figure 72  
Control  
4-15-137-2



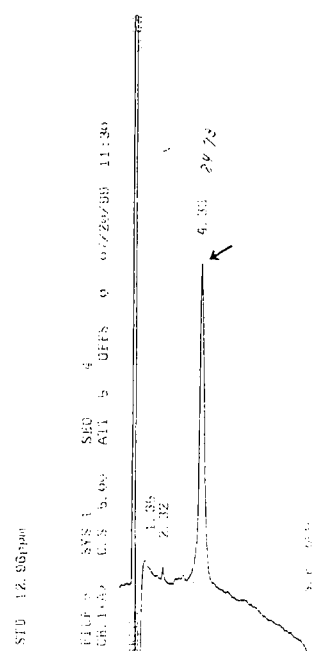
暴露 (第二週換水前)  
Figure 73  
標準溶液 3.240 mg/L



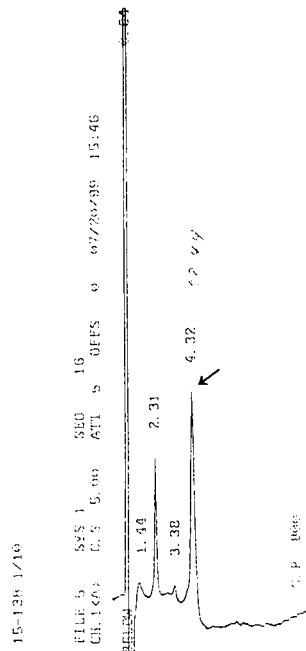
暴露 (第二週換水前)  
Figure 74  
標準溶液 6.480 mg/L



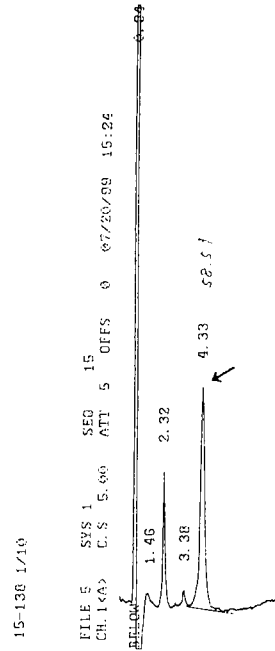
暴露 (第二週換水前)  
Figure 75  
標準溶液 12.960 mg/L



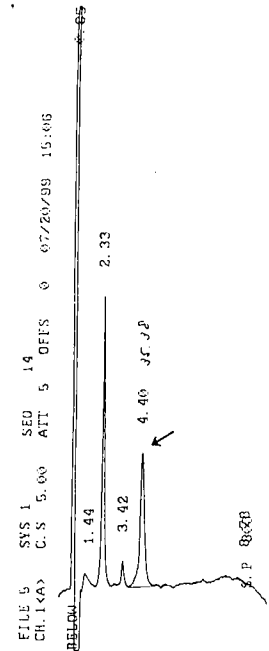
暴露 (第二週換水前)  
Figure 76  
100 mg/L  
生-15-138-1  
(10倍希釈液)



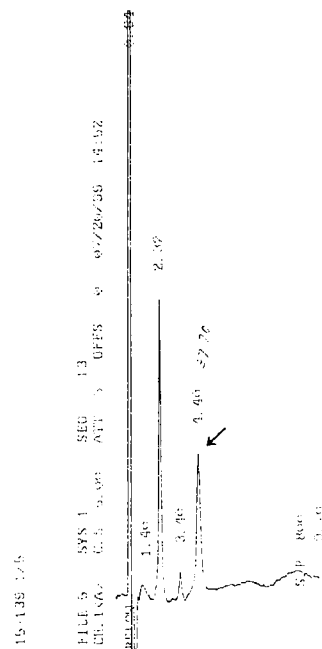
暴露 (第二週換水前)  
Figure 77  
100 mg/L  
生-15-138-2  
(10倍希釈液)



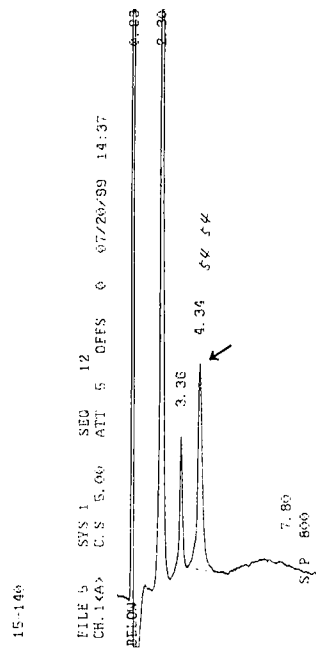
暴露 (第二週換水前)  
Figure 78  
32 mg/L  
生-15-139-1  
(5倍希釈液)



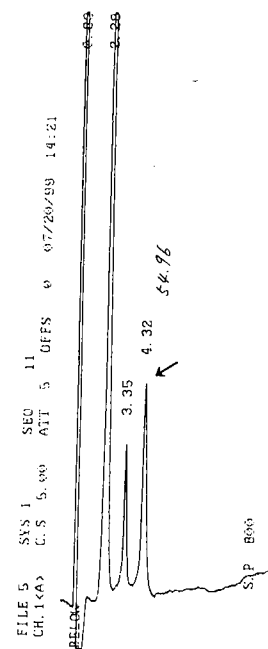
暴露 (第二週換水前)  
Figure 79  
32 mg/L  
生-15-139-2  
(5倍希釈液)



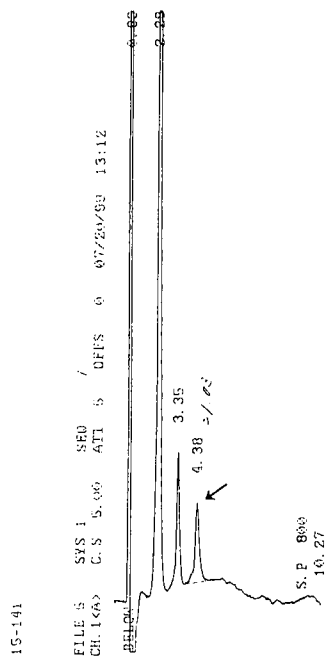
暴露 (第二週換水前)  
Figure 80  
10 mg/L  
生-15-140-1



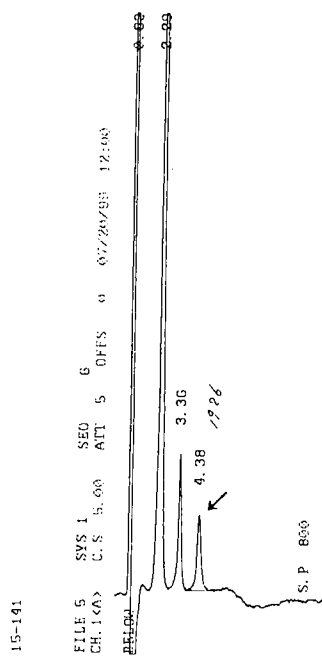
暴露 (第二週換水前)  
Figure 81  
10 mg/L  
生-15-140-2



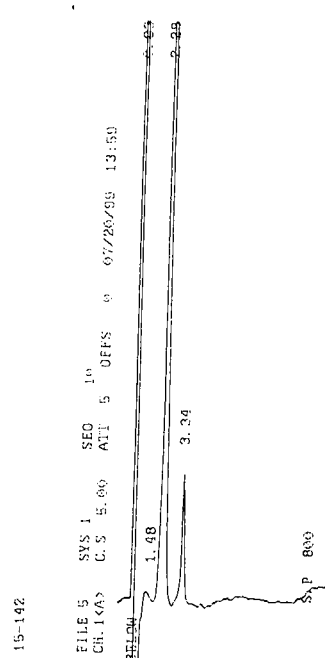
暴露 (第二週換水前)  
Figure 82  
3.2 mg/L  
生-15-141-1



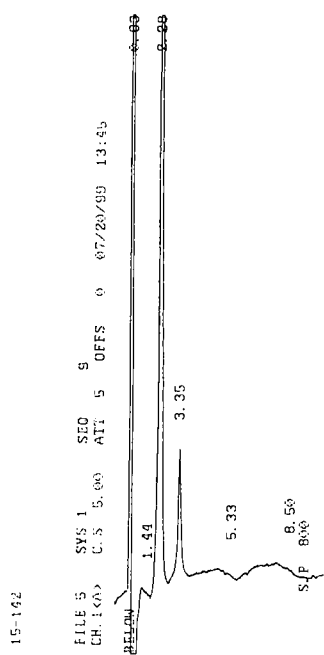
暴露 (第二週換水前)  
Figure 83  
3.2 mg/L  
生-15-141-2



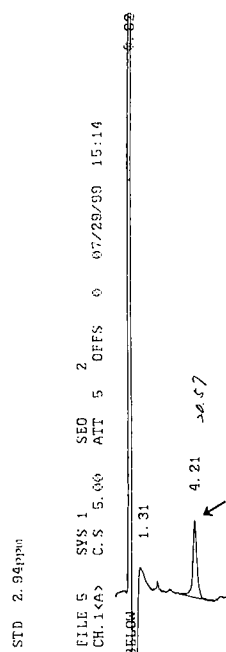
暴露 (第二週換水前)  
Figure 84  
Control  
生-15-142-1



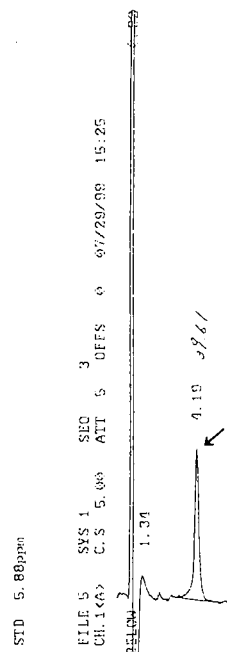
暴露 (第二週換水前)  
Figure 85  
Control  
生-15-142-2



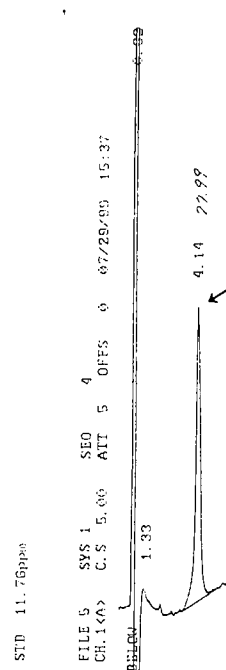
暴露 (第三週換水後)  
Figure 86  
標準溶液 2.940 mg/L



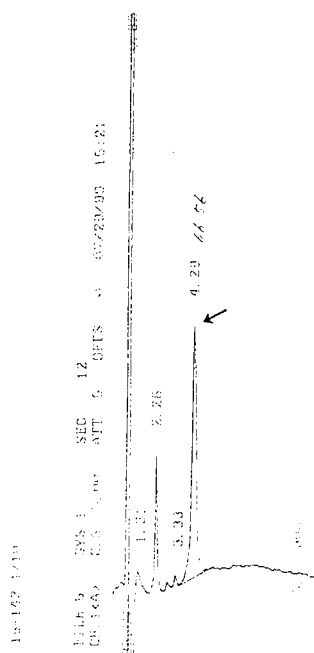
暴露 (第三週換水後)  
Figure 87  
標準溶液 5.880 mg/L



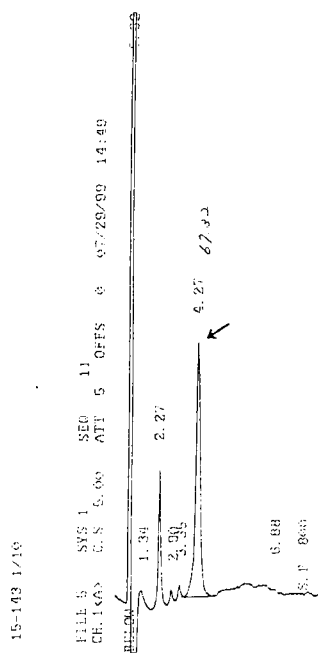
暴露 (第三週換水後)  
Figure 88  
標準溶液 11.760 mg/L



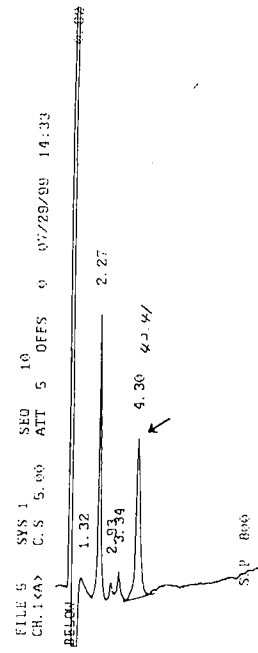
暴露 (第三週換水後)  
Figure 89  
100 mg/L  
生-15-143-1  
(10倍希釈液)



暴露 (第三週換水後)  
Figure 90  
100 mg/L  
生-15-143-2  
(10倍希釈液)

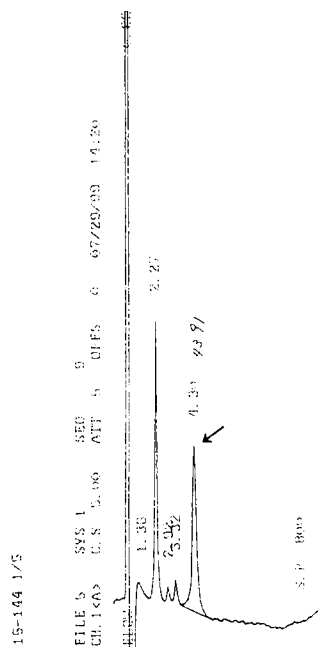


暴露 (第三週換水後)  
Figure 91  
32 mg/L  
生-15-144-1  
(5倍希釈液)

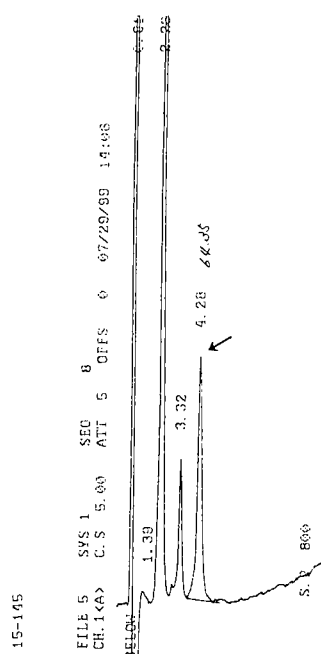




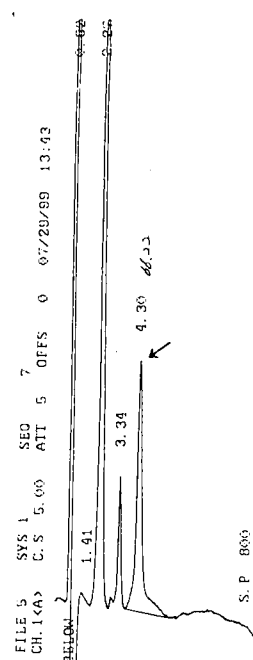
暴露 (第三週換水後)  
Figure 92  
32 mg/L  
生-15-144-2  
(5倍希釈液)



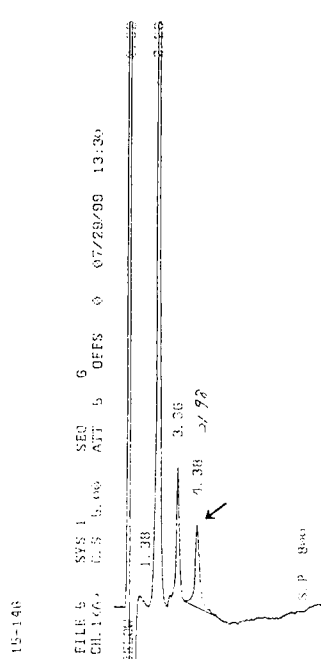
暴露 (第三週換水後)  
Figure 93  
10 mg/L  
生-15-145-1



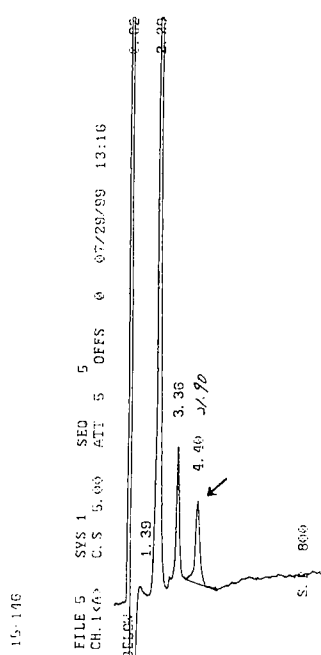
暴露 (第三週換水後)  
Figure 94  
10 mg/L  
生-15-145-2



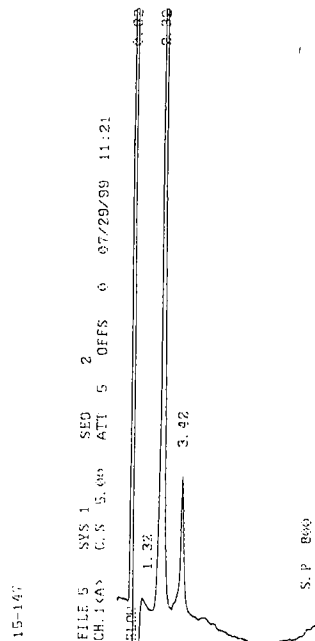
暴露 (第三週換水後)  
Figure 95  
3.2 mg/L  
生-15-146-1



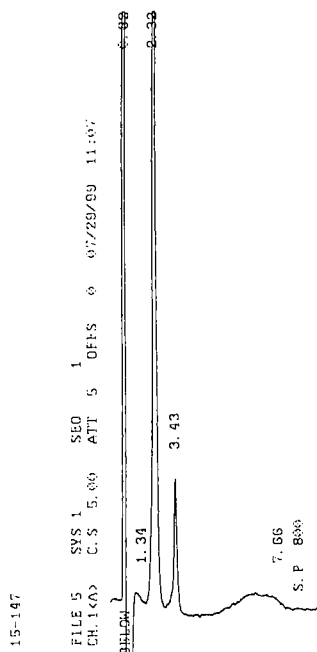
暴露 (第三週換水後)  
Figure 96  
3.2 mg/L  
生-15-146-2



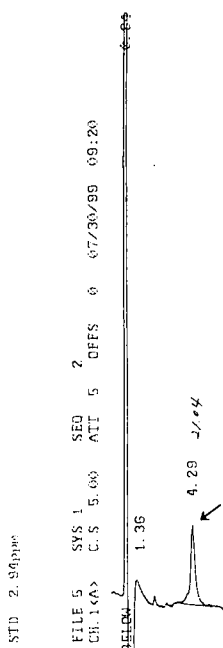
暴露 (第三週換水後)  
Figure 97  
Control  
生-15-147-1



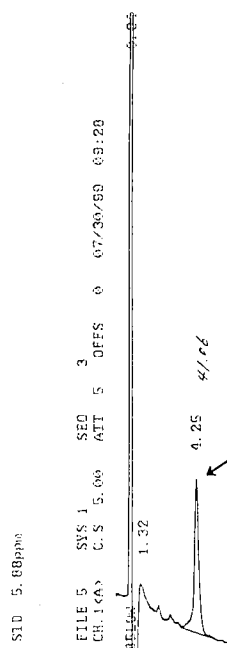
暴露 (第三週換水後)  
Figure 98  
Control  
4-15-147-2



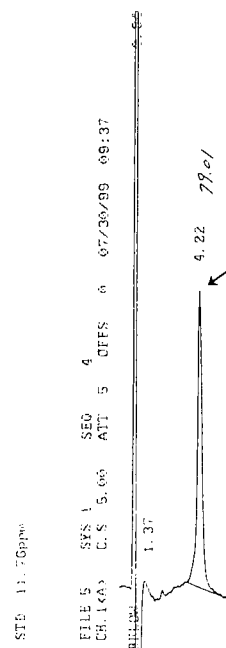
暴露終了時  
Figure 99  
標準液 2.940 mg/L



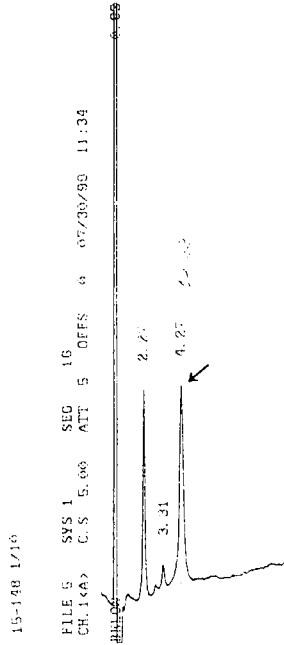
暴露終了時  
Figure 100  
標準液 5.880 mg/L



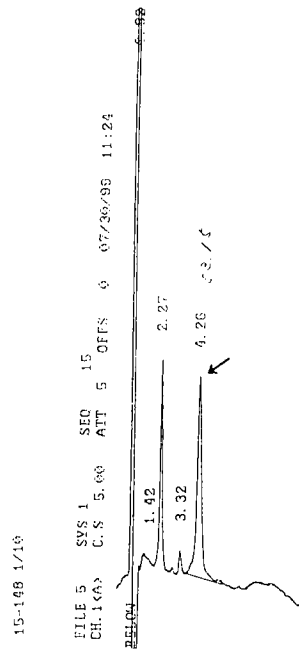
暴露終了時  
Figure 101  
標準液 11.760 mg/L



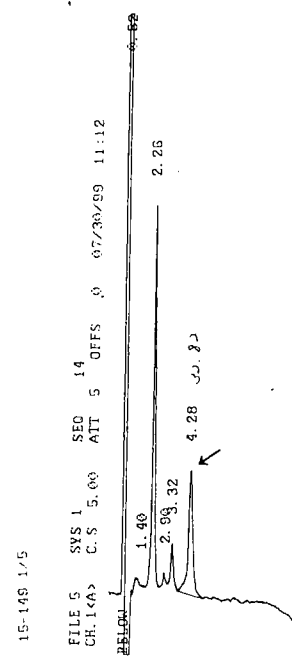
暴露終了時  
Figure 102  
100 mg/L  
生-15-148-1  
(10倍希釈液)



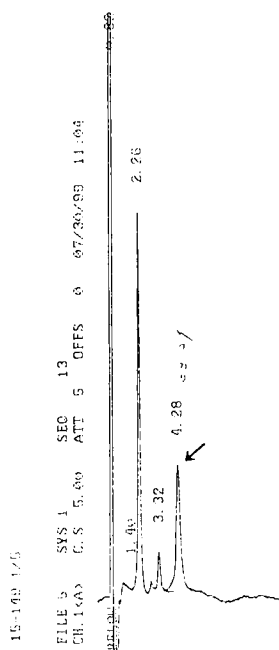
暴露終了時  
Figure 103  
100 mg/L  
生-15-148-2  
(10倍希釈液)



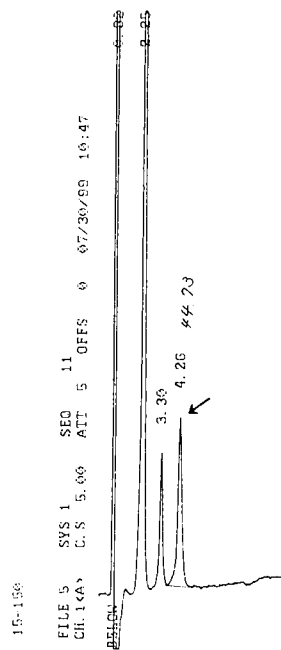
暴露終了時  
Figure 104  
32 mg/L  
生-15-149-1  
(5倍希釈液)



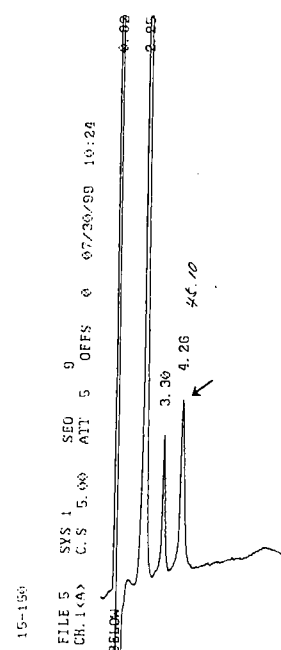
暴露終了時  
Figure 105  
32 mg/L  
生-15-149-2  
(5倍希釈液)



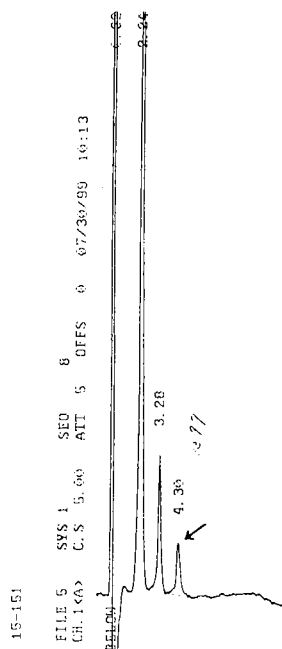
暴露終了時  
Figure 106  
10 mg/L  
生-15-150-1



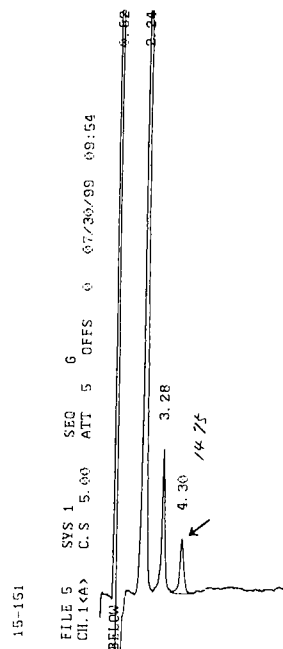
暴露終了時  
Figure 107  
10 mg/L  
生-15-150-2



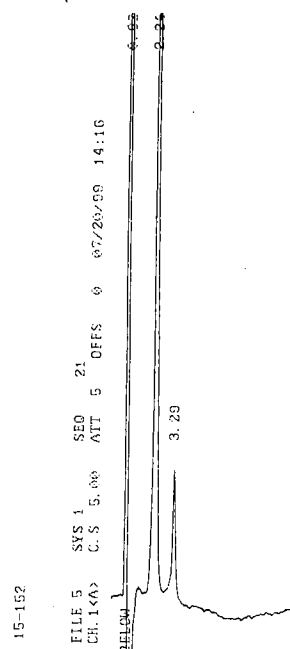
暴露終了時  
Figure 108  
3.2 mg/L  
生-15-151-1



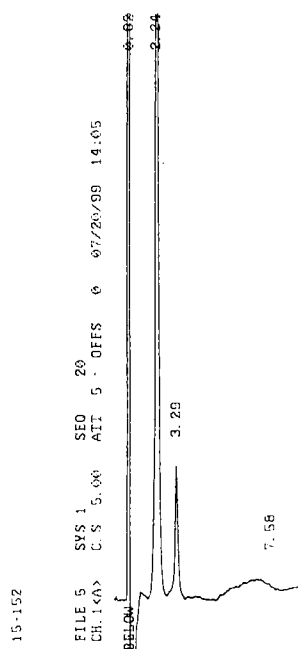
暴露終了時  
Figure 109  
3.2 mg/L  
生-15-151-2



暴露終了時  
Figure 110  
Control  
生-15-152-1



暴露終了時  
Figure 111  
Control  
生-15-152-2



## 付属試料－3

ミジンコの観察結果

(全 5 頁)

## Appendix 3-1 Result of Reproduction Test

(Test Chemical : Choline chloride)

Control

Rep. No.		Time																				Total	
		7/10	7/11	7/12	7/13	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
		1d	2d	3d	4d	5d	6d	7d	8d	9d	10d	11d	12d	13d	14d	15d	16d	17d	18d	19d	20d	21d	
1	P generation Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	---
	F1 generation Live	0	0	0	0	0	0	0	14	0	0	29	0	0	27	0	0	50	0	0	42	0	162
	Cumulative reproductivity	0	0	0	0	0	0	0	14	14	14	43	43	43	70	70	70	120	120	120	162	162	162
2	P generation Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	---
	F1 generation Live	0	0	0	0	0	0	0	15	0	0	26	1	0	31	0	0	40	0	0	38	0	151
	Cumulative reproductivity	0	0	0	0	0	0	0	15	15	15	41	42	42	73	73	73	113	113	113	151	151	151
3	P generation Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	---
	F1 generation Live	0	0	0	0	0	0	0	15	0	0	28	0	0	29	0	0	42	0	0	38	0	152
	Cumulative reproductivity	0	0	0	0	0	0	0	15	15	15	43	43	43	72	72	72	114	114	114	152	152	152
4	P generation Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	---
	F1 generation Live	0	0	0	0	0	0	0	12	0	0	25	0	0	27	0	0	44	0	0	34	0	142
	Cumulative reproductivity	0	0	0	0	0	0	0	12	12	12	37	37	37	64	64	64	108	108	108	142	142	142
5	P generation Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	---
	F1 generation Live	0	0	0	0	0	0	0	11	0	0	29	0	0	34	0	0	38	0	0	38	0	150
	Cumulative reproductivity	0	0	0	0	0	0	0	11	11	11	40	40	40	74	74	74	112	112	112	150	150	150
6	P generation Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	---
	F1 generation Live	0	0	0	0	0	0	0	13	0	0	24	0	0	31	0	0	30	2	0	36	0	136
	Cumulative reproductivity	0	0	0	0	0	0	0	13	13	13	37	37	37	68	68	68	98	100	100	136	136	136
7	P generation Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	---
	F1 generation Live	0	0	0	0	0	0	0	15	0	0	19	0	0	29	0	1	31	0	0	33	0	128
	Cumulative reproductivity	0	0	0	0	0	0	0	15	15	15	34	34	34	63	63	64	95	95	95	128	128	128
8	P generation Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	---
	F1 generation Live	0	0	0	0	0	0	10	2	0	18	2	0	33	0	0	35	3	0	0	15	0	118
	Cumulative reproductivity	0	0	0	0	0	0	10	12	12	20	32	32	65	65	65	100	103	103	103	118	118	118
9	P generation Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	---
	F1 generation Live	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	19	0	31	0	0	39	0	0	20	8	0	121
	Cumulative reproductivity	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	23	23	54	54	54	93	93	93	113	121	121	121
10	P generation Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	---
	F1 generation Live	0	0	0	0	0	0	0	11	0	0	24	0	0	26	0	3	39	0	34	3	0	140
	Cumulative reproductivity	0	0	0	0	0	0	0	11	11	11	35	35	35	61	61	64	103	103	137	140	140	140

The time (days) to first brood: 1: 8 days. 2: 8 days. 3: 8 days. 4: 8 days. 5: 8 days.  
6: 8 days. 7: 8 days. 8: 7 days. 9: 10 days. 10: 8 days.

## Appendix 3-2 Result of Reproduction Test

(Test Chemical : Choline chloride)

3.2 mg/L

Rep. No.	Time																					Total	
	7/10	7/11	7/12	7/13	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		
	1d	2d	3d	4d	5d	6d	7d	8d	9d	10d	11d	12d	13d	14d	15d	16d	17d	18d	19d	20d	21d		
1	P generation Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	---	
	F1 generation Live	0	0	0	0	0	0	0	16	0	0	24	0	0	27	0	0	45	0	0	38	0	150
	Cumulative reproductivity	0	0	0	0	0	0	0	16	16	16	40	40	40	67	67	67	112	112	112	150	150	150
2	P generation Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	---	
	F1 generation Live	0	0	0	0	0	0	0	2	22	5	0	31	0	0	35	0	0	41	0	0	136	
	Cumulative reproductivity	0	0	0	0	0	0	0	2	24	29	29	60	60	60	95	95	95	136	136	136	136	136
3	P generation Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	---	
	F1 generation Live	0	0	0	0	0	0	9	5	0	0	24	0	0	30	0	0	40	0	0	35	0	143
	Cumulative reproductivity	0	0	0	0	0	0	9	14	14	14	38	38	38	68	68	68	108	108	108	143	143	143
4	P generation Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	---	
	F1 generation Live	0	0	0	0	0	0	0	15	0	0	25	0	0	28	0	0	40	0	0	42	0	150
	Cumulative reproductivity	0	0	0	0	0	0	0	15	15	15	40	40	40	68	68	68	108	108	108	150	150	150
5	P generation Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	---	
	F1 generation Live	0	0	0	0	0	0	0	10	0	0	27	0	0	32	0	0	43	0	0	42	0	154
	Cumulative reproductivity	0	0	0	0	0	0	0	10	10	10	37	37	37	69	69	69	112	112	112	154	154	154
6	P generation Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	---	
	F1 generation Live	0	0	0	0	0	0	0	0	25	3	0	0	24	0	0	37	0	0	35	0	124	
	Cumulative reproductivity	0	0	0	0	0	0	0	0	25	28	28	28	52	52	52	89	89	89	124	124	124	124
7	P generation Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	---	
	F1 generation Live	0	0	0	0	0	0	12	1	0	22	4	0	33	0	0	39	0	0	0	41	0	152
	Cumulative reproductivity	0	0	0	0	0	0	12	13	13	35	39	39	72	72	72	111	111	111	111	152	152	152
8	P generation Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	---	
	F1 generation Live	0	0	0	0	0	0	0	11	0	0	24	0	0	30	0	0	36	0	0	39	0	140
	Cumulative reproductivity	0	0	0	0	0	0	0	11	11	11	35	35	35	65	65	65	101	101	101	140	140	140
9	P generation Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	---	
	F1 generation Live	0	0	0	0	0	0	13	0	0	30	0	0	27	0	0	45	0	0	28	19	0	162
	Cumulative reproductivity	0	0	0	0	0	0	13	13	13	43	43	43	70	70	70	115	115	115	143	162	162	162
10	P generation Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	---	
	F1 generation Live	0	0	0	0	0	0	14	0	0	33	0	0	34	0	0	33	0	0	35	0	0	149
	Cumulative reproductivity	0	0	0	0	0	0	14	14	14	47	47	47	81	81	81	114	114	114	149	149	149	149

The time (days) to first brood:

1: 8 days.

2:

9 days.

3:

7 days.

4:

8 days.

5:

8 days.

6: 10 days.

7:

7 days.

8:

8 days.

9:

7 days.

10:

7 days.

## Appendix 3-3 Result of Reproduction Test

(Test Chemical : Choline chloride)

10 mg/L

			Time																					
Rep.			7/10	7/11	7/12	7/13	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	
No.			1d	2d	3d	4d	5d	6d	7d	8d	9d	10d	11d	12d	13d	14d	15d	16d	17d	18d	19d	20d	21d	Total
1	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	---
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	13
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13
2	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	---
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	15	0	0	21	0	0	33	0	0	43	0	0	35	0	147
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	15	15	15	36	36	36	69	69	69	112	112	112	147	147	147
3	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	---
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0	9	4	14	0	30	0	0	11	26	0	0	31	0	125
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	9	13	27	27	57	57	57	68	94	94	94	125	125	125
4	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	---
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	24	0	16	20	0	0	0	0	0	0	0	60
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	24	24	40	60	60	60	60	60	60	60	60	60
5	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	---
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	8	0	0	27	0	0	31	0	0	38	0	0	35	0	139
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	8	8	8	35	35	35	66	66	66	104	104	104	139	139	139
6	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	---
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	13	0	0	23	0	0	30	0	0	40	0	0	45	0	151
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	13	13	13	36	36	36	66	66	66	106	106	106	151	151	151
7	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	---
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	1	15	0	0	25	1	0	29	0	0	41	0	0	40	0	152
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	1	16	16	16	41	42	42	71	71	71	112	112	112	152	152	152
8	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	---
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	22	0	0	32	0	0	38	1	0	36	0	129
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	22	22	22	54	54	54	92	93	93	129	129	129
9	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	---
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	26	0	0	34	0	0	42	0	0	38	0	140
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	26	26	26	60	60	60	102	102	102	140	140	140
10	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	---
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	14	0	0	24	0	26	1	0	43	0	0	45	0	0	153
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	14	14	14	38	38	64	65	65	108	108	108	153	153	153	153

The time (days) to first brood:

1: 8 days,

2: 8 days,

3: 9 days,

4: 11 days,

5: 8 days,

6: 8 days,

7: 7 days,

8: 11 days,

9: 11 days,

10: 8 days,



## Appendix 3-4 Result of Reproduction Test

(Test Chemical : Choline chloride)

32 mg/L

Rep. No.	Time																					
	7/10	7/11	7/12	7/13	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	
	1d	2d	3d	4d	5d	6d	7d	8d	9d	10d	11d	12d	13d	14d	15d	16d	17d	18d	19d	20d	21d	Total
1	P generation Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	---
	F1 generation Live	0	0	0	0	0	0	13	0	21	0	0	29	0	0	39	0	0	38	0	0	140
	Cumulative reproductivity	0	0	0	0	0	0	13	13	13	34	34	63	63	63	102	102	102	140	140	140	140
2	P generation Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	---
	F1 generation Live	0	0	0	0	0	0	11	0	0	25	0	0	30	0	4	34	0	43	0	0	147
	Cumulative reproductivity	0	0	0	0	0	0	11	11	11	36	36	36	66	66	70	104	104	147	147	147	147
3	P generation Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	---
	F1 generation Live	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	16	1	0	25	0	0	27	0	0	42	114
	Cumulative reproductivity	0	0	0	0	0	0	0	3	3	3	19	20	20	45	45	72	72	72	114	114	114
4	P generation Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	---
	F1 generation Live	0	0	0	0	0	0	0	14	0	0	26	0	0	29	0	0	45	0	14	40	168
	Cumulative reproductivity	0	0	0	0	0	0	0	14	14	14	40	40	40	69	69	69	114	114	128	168	168
5	P generation Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	---
	F1 generation Live	0	0	0	0	0	0	0	8	0	0	19	0	27	0	0	27	0	0	44	0	125
	Cumulative reproductivity	0	0	0	0	0	0	0	8	8	8	27	27	54	54	54	81	81	81	125	125	125
6	P generation Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	---
	F1 generation Live	0	0	0	0	0	0	0	0	0	21	0	0	28	0	0	34	0	0	42	0	125
	Cumulative reproductivity	0	0	0	0	0	0	0	0	0	21	21	21	49	49	49	83	83	83	125	125	125
7	P generation Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	---
	F1 generation Live	0	0	0	0	0	0	11	0	0	7	20	0	28	0	0	34	0	0	42	0	142
	Cumulative reproductivity	0	0	0	0	0	0	11	11	11	18	38	38	66	66	66	100	100	100	142	142	142
8	P generation Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	---
	F1 generation Live	0	0	0	0	0	0	0	0	0	24	0	0	31	0	0	34	0	0	40	0	129
	Cumulative reproductivity	0	0	0	0	0	0	0	0	0	24	24	24	55	55	55	89	89	89	129	129	129
9	P generation Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	---
	F1 generation Live	0	0	0	0	0	0	0	15	0	0	22	0	0	26	0	0	43	0	0	43	149
	Cumulative reproductivity	0	0	0	0	0	0	0	15	15	15	37	37	37	63	63	63	106	106	106	149	149
10	P generation Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	---
	F1 generation Live	0	0	0	0	0	0	13	0	0	17	0	0	23	0	0	37	0	0	32	0	122
	Cumulative reproductivity	0	0	0	0	0	0	13	13	13	30	30	30	53	53	53	90	90	90	122	122	122

The time (days) to first brood: 1: 7 days, 2: 8 days, 3: 8 days, 4: 8 days, 5: 8 days,  
6: 11 days, 7: 7 days, 8: 11 days, 9: 8 days, 10: 7 days.

## Appendix 3-5 Result of Reproduction Test

(Test Chemical : Choline chloride)

100 mg/L

Rep. No.	Time																					Total
	7/10 1d	7/11 2d	7/12 3d	7/13 4d	7/14 5d	7/15 6d	7/16 7d	7/17 8d	7/18 9d	7/19 10d	7/20 11d	7/21 12d	7/22 13d	7/23 14d	7/24 15d	7/25 16d	7/26 17d	7/27 18d	7/28 19d	7/29 20d	7/30 21d	
1	P generation Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	---
	F1 generation Live	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6	0	0	7	0	0	0
	Cumulative reproductivity	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6	6	6	13	13	13	13
2	P generation Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	---
	F1 generation Live	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	3	0	0	1	0	3	0	0	0	0	0
	Cumulative reproductivity	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	8	8	8	9	9	12	12	12	12	12	12
3	P generation Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	---
	F1 generation Live	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	3	0	0	1	0	0	0	0
	Cumulative reproductivity	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	4	4	4	5	5	5	5
4	P generation Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	---
	F1 generation Live	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0	4	0	4	0	0	0	0	0	0
	Cumulative reproductivity	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	4	4	8	8	12	12	12	12	12	12	12
5	P generation Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	---
	F1 generation Live	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	3	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0
	Cumulative reproductivity	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	5	5	5	5	5	11	11	11	11	11	11
6	P generation Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	---
	F1 generation Live	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	7	0	0	0	2	0	0	0	0
	Cumulative reproductivity	0	0	0	0	0	0	0	0	3	3	3	3	3	10	10	10	10	12	12	12	12
7	P generation Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	---
	F1 generation Live	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	1	0	0	1	0	0	5	0	0	0	0
	Cumulative reproductivity	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	4	4	4	5	5	5	10	10	10	10	10
8	P generation Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	---
	F1 generation Live	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7	0	0	5	0	0	5	0	0	0	0
	Cumulative reproductivity	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7	7	7	12	12	12	17	17	17	17	17
9	P generation Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	---
	F1 generation Live	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	3	0	0	4	3	0	0	0	0	0	0
	Cumulative reproductivity	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	4	4	4	8	11	11	11	11	11	11	11
10	P generation Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	---
	F1 generation Live	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	0	0	3	0	4	0	3	0	0	0	0
	Cumulative reproductivity	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	5	5	8	8	12	12	15	15	15	15	15

The time (days) to first brood: 1: 15 days, 2: 10 days, 3: 11 days, 4: 11 days, 5: 11 days,  
6: 9 days, 7: 11 days, 8: 12 days, 9: 11 days, 10: 11 days,