

本写しは原本と相違ありません
(株)三菱化学安全科学研究所
横浜研究所 運営管理者

環境省殿

最 終 報 告 書

イソプレンのオオミジンコ (*Daphnia magna*) に対する繁殖阻害試験

(試験番号：A 0 0 0 4 6 4 - 3 G)

2 0 0 1 年 1 0 月 3 1 日作成

株式会社三菱化学安全科学研究所

本写しは原本と相違ありません

(株)三菱化学安全科学研究所
横浜研究所 運営管理者

修正番号：01

最 終 報 告 書 修 正 書

試験委託者：環境省

表 題：イソプレンのオオミジンコ (*Daphnia magna*) に対する繁殖阻害試験

試験番号：A000464-3G

修 正 内 容

修正箇所：5頁 10. 保管

修正前：5) 被験物質

修正後：5) 被験物質は保管しない（沸点がきわめて低く、正常な保管が困難なため）

理 由

記載ミス

試験実施施設：株式会社三菱化学安全科学研究所 横浜研究所

2001年12月26日 作成 試験責任者

2001年12月26日 確認 信頼性保証業務担当者

2001年12月26日 承認 運営管理者

陳 述 書

株式会社三菱化学安全科学研究所
横浜研究所

試験委託者： 環境省

表題： イソプレンのオオミジンコ (*Daphnia magna*) に対する繁殖阻害試験

試験番号： A 0 0 0 4 6 4 - 3 G

本試験は環境省のG L P規則に従って実施したものである。

2 0 0 1 年 1 0 月 3 1 日

運営管理者

[Redacted Signature]

[Redacted Stamp]

信 頼 性 保 証 証 明

株式会社三菱化学安全科学研究所
横浜研究所

試験委託者： 環境省

表題： イソプレンのオオミジンコ (*Daphnia magna*) に対する繁殖阻害試験

試験番号： A 0 0 0 4 6 4 - 3 G

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 事 項	実 施 日	運営管理者および 試験責任者への報告日
試験計画書監査	2 0 0 0 年 1 1 月 2 2 日	2 0 0 0 年 1 1 月 2 2 日
試験の査察	試験液の調製 2 0 0 1 年 5 月 2 4 日	2 0 0 1 年 5 月 2 4 日
	ミジンコの投入 2 0 0 1 年 5 月 2 4 日	2 0 0 1 年 5 月 2 4 日
	ミジンコの観察 2 0 0 1 年 6 月 1 4 日	2 0 0 1 年 6 月 1 4 日
最終報告書監査	2 0 0 1 年 1 0 月 3 1 日	2 0 0 1 年 1 0 月 3 1 日

2 0 0 1 年 1 0 月 3 1 日

信頼性保証業務担当者：

試験実施概要

1. 表題： イソプレンのオオミジンコ (*Daphnia magna*) に対する繁殖阻害試験
2. 試験目的： 被験物質のオオミジンコ (*Daphnia magna*) に対する繁殖阻害試験を行い、21日間の最小作用濃度 (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. 211「オオミジンコ繁殖試験」(1998年) に準拠した。
4. 適用GLP： 本試験は環境省のGLP規則に準拠した。
5. 試験委託者
名称： 環境省
住所： 〒100-8975 東京都千代田区霞が関一丁目2-2
委託担当者： 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
室長補佐 XXXXXXXXXX
6. 試験受託者：
名称： 株式会社三菱化学安全科学研究所
所在地： 〒105-0014 東京都港区芝二丁目1-30
7. 試験施設：
名称： 株式会社三菱化学安全科学研究所 横浜研究所
所在地： 〒227-0033 神奈川県横浜市青葉区鴨志田町1000番地

「10. 保管」について

次頁の「10. 保管」には、

5) 被験物質

と記載されているが、これは記載ミスのため、

5) 被験物質は保管しない（沸点がきわめて低く、正常な保管が困難なため）

と読み替えるものとする。

試験実施施設： 株式会社三菱化学安全科学研究所 横浜研究所

2001年12月26日 作成 試験責任者

[Redacted]

[Redacted]

8. 試験関係者：

試験責任者

[REDACTED]

(2001年10月31日)

試験担当者

[REDACTED]

(2001年10月31日)

[REDACTED]

(2001年10月31日)

[REDACTED]

(2001年10月31日)

[REDACTED]

(2001年10月31日)

[REDACTED]

(2001年10月31日)

分析担当者

[REDACTED]

(2001年10月31日)

[REDACTED]

(2001年10月31日)

9. 試験期間： 試験開始日

2000年11月22日

試験終了日

2001年10月31日

暴露期間

2001年 5月24日～2001年 6月14日

10. 保管：

試験に関する下記の記録及び試資料は、最終報告書作成後10年間、当研究所試資料保管施設に保管する。その後の保管については別途協議の上定める。

- 1) 試験計画書
- 2) 最終報告書
- 3) 生データ
- 4) 信頼性保証業務担当者の監査・査察記録
- 5) 被験物質 訂正
- 6) その他必要なもの

目 次

	頁
要 旨	7
1 被験物質	9
1.1 名称, 構造式および物理化学的性状	9
1.2 供試試料	9
1.3 被験物質の確認および保管条件下での安定性	10
2 供試生物	10
3 試験方法	11
3.1 試験条件	11
3.2 希釈水	11
3.3 試験容器および恒温槽等	11
3.4 試験濃度の設定	12
3.5 試験液の調製	12
3.6 試験液の分析	12
3.7 試験操作	13
4 結果の算出	14
4.1 阻害濃度算出に用いる被験物質濃度の決定	14
4.2 親ミジンコの半数致死濃度 (LC50) の算出	14
4.3 50%繁殖阻害濃度 (EC50) の算出	14
4.4 最大無作用濃度 (NOEC) および最小作用濃度 (LOEC)	15
5 結果および考察	16
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	16
5.2 試験液中の被験物質濃度	16
5.3 ミジンコの観察結果	16
5.4 親ミジンコの半数致死濃度 (LC50)	17
5.5 50%繁殖阻害濃度 (EC50)	17
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)	17
5.7 試験液の水温, 溶存酸素濃度, pH および硬度	17
Table 1~11	18~26
Figure 1, 2	20, 22
付属資料-1 希釈水の組成	27~28
付属資料-2 試験液の分析	29~36
付属資料-3 ミジンコの観察結果	37~43

要 旨

試験委託者

環境省

表 題

イソプレンのオオミジンコ (*Daphnia magna*) に対する繁殖阻害試験

試験番号

A 0 0 0 4 6 4 - 3 G

試験方法

本試験は、OECD 化学品テストガイドラインNo. 211「オオミジンコ繁殖試験」(1998年)に準拠して実施した。

- 1) 被験物質： イソブレン
- 2) 暴露方式： 半止水式 (毎日試験液の全量を交換)
水面をテフロンシートで被覆
- 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 (設定値) :
対照区, 0.100, 0.300, 0.900, 2.70, 8.00 mg/L
公比: 約 3.0
- 6) 試験液量： 80 mL/容器
- 7) 連数： 10容器/試験区
- 8) 供試生物数： 10頭/試験区 (1頭/容器)
- 9) 試験温度： 20±1℃
- 10) 照明： 16時間明/8時間暗
- 11) 分析法： ガスクロマトグラフィー (GC)

結 果

1) 試験液中の被験物質濃度

試験液の分析の結果、測定値の設定値に対する割合が、 $\pm 20\%$ を超える値があったため、結果の算出には測定値の時間加重平均値を用いた。

2) 21 日間暴露後の結果

親ミジンコの半数致死濃度 (LC50) : $> 3.09 \text{ mg/L}$

(95%信頼区間：算出不可)

50%繁殖阻害濃度 (EC50) : $> 3.09 \text{ mg/L}$

(95%信頼区間：算出不可)

最大無作用濃度 (NOEC) : 0.402 mg/L

最小作用濃度 (LOEC) : 0.936 mg/L

1 被験物質

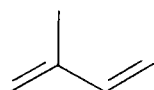
1.1 名称, 構造式および物理化学的性状

名 称: イソプレン (略称 I S P)

別 名: 2-メチル-1, 3-ブタジエン

CAS No: 78-79-5

構造式:



分子式: C_5H_8

分子量^{*1}: 68.11

沸点^{*2}: 34.1℃

融点^{*2}: -145.9℃

水溶解度^{*1}: 300 mg/L (20℃)

比重^{*2}: 0.681 (20℃)

オクタノール/水分配係数 (log P) ^{*2}: 2.30

安定性^{*2}: 酸化剤または酸と接触すると激しく反応する。

その他^{*2}: 揮発性, 特異臭

*1: Handbook of Environmental Data on Organic Chemicals, 3rd ed. ed. by
Verschuieren, K., Von Nostrand Reinhold Company, New York (1996)

*2: 供給者提供資料

1.2 供試試料

純度^{*1}: 99.3% (GC法)

安定剤として 4-*tert*-ブチルヒドロキノンを約 50ppm含有

ロット番号^{*1}: 207D2183

供給者: XXXXXXXXXX

受領量^{*1}: 25 mL

受領日: 2000年11月14日

外観^{*1}: 無色液体

*1: 供給者提供資料

1.3 被験物質の確認および保管条件下での安定性

入手した被験物質について赤外吸収スペクトルを測定し、被験物質の特性が認められることを確認した。試験期間中、被験物質は当研究所の冷蔵庫に保管した。また、試験終了時にも赤外吸収スペクトルを測定し、試験開始時に測定したスペクトルと比較した。その結果、スペクトルに変化はなかったことより被験物質は保管中は安定であったと判断された。

2 供試生物

- 1) 和名： オオミジンコ
- 2) 学名： *Daphnia magna*
- 3) 入手先： 環境庁国立環境研究所（現 独立行政法人国立環境研究所）
- 4) 入手日： 1995 年 7 月 18 日
- 5) 感受性： 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（ EC_{50} ） = 0.68 mg/L（この値は当研究所における 1998 年 6 月以降の EC_{50} 値 0.57～1.02 mg/L， $n=5$ の範囲内にある。）
- 6) 生育段階： 雌の幼体（24 時間以内令）
- 7) 供試生物を得るための親ミジンコの飼育条件：
 - 飼育水： 希釈水（3.2 参照）
 - 飼育密度： 1 頭／80 mL 飼育水（25 頭／2 L）
 - 水温： $20 \pm 1^{\circ}\text{C}$
 - 溶存酸素濃度： 飽和濃度の 60％以上
 - pH： 6.7～8.5
 - 照明： 室内光，16 時間明（800 lux 以下）／8 時間暗
 - 飼育期間： 2001 年 5 月 7 日～2001 年 5 月 24 日
 - 暴露開始前 2 週間の親の死亡率： 0％
 - 休眠卵および雄の発生： 無し
 - 餌の種類： *Chlorella vulgaris*（単細胞緑藻類）
（生きている藻類から培養液を遠心分離し，希釈水に置換して使用）
 - 給餌量： 0.2 mg C（有機炭素含量）／頭／日
 - 飼育水の交換： 定期的に 3 回／週 交換

3 試験方法

3.1 試験条件

- 1) 暴露方式： 半止水式（毎日試験液の全量を交換）
- 2) 暴露期間： 21 日間
- 3) 試験液量： 80 mL／容器
- 4) 連数： 10 容器／試験区
- 5) 供試生物数： 10 頭／試験区（1 頭／容器）
- 6) 試験温度： $20 \pm 1^{\circ}\text{C}$
- 7) 溶存酸素濃度： 3 mg/L 以上，望ましくは飽和濃度の 60% 以上
暴露期間中，試験液のエアレーションは行わない
- 8) pH： 6～9（被験物質に起因するものであれば，この限りでない）
変動 1.5 以内
ただし 試験液の pH 調整は行わない
- 9) 硬度： 約 250 mg/L (CaCO_3 換算)
- 10) 照明： 室内光，16 時間明（800 lux 以下）／8 時間暗
- 11) 餌： 種類： *Chlorella vulgaris*（単細胞緑藻類）
（生きている藻類から培養液を遠心分離し希釈水に置換して使用）
量： 0.15 mgC（有機炭素含量）／頭／日

3.2 希釈水

OECD 化学品テストガイドライン No. 211 「オオミジンコ繁殖試験」に記載されている調製水，Elendt M4 を用いた。組成を付属資料－1 に示した。

3.3 試験容器および恒温槽等

- 1) 試験容器： 100 mL 容ガラスビーカー，テフロンシート製蓋
- 2) 恒温槽： 塩ビ製水槽（恒温装置，タイテック製 ケルニット CL-80F）
- 3) 水温計： 横河電機製 2455 02 型 No. 1
- 4) 溶存酸素計： 電気化学計器製 DOL-10 型 No. 2
- 5) pH 計： 東亜電波工業製 HM-40V 型 No. 1
- 6) 硬度測定キット： 共立理化学研究所製 WAD-TH

3.4 試験濃度の設定

オオミジンコに対する急性遊泳阻害試験の結果（設定濃度に基づく 48時間 EC_{50} 値：6.86 mg/L）に基づき，本試験濃度を次のように決定した。

対照区，0.100，0.300，0.900，2.70，8.00 mg/L（公比：約 3.0）

3.5 試験液の調製

試験液調製時の希釈水は，調製前に暴気を行い，恒温槽内で $20 \pm 1^{\circ}\text{C}$ とした。

被験物質をマイクロシリンジで 73.4 μL (50 mg) 採取し，これを精製水に溶解して 500 mL に定容し，濃厚な被験物質溶液（被験物質濃度 100 mg/L）を調製した。

1.0 L 容のメスフラスコに希釈水を入れ，上記の濃厚な被験物質溶液を各濃度に応じて添加し，各試験液を調製した。1 濃度区につき 10 個の試験容器に各 80 mL 入れた。

対照区には，被験物質を含まない希釈水を用いた。

調製時の試験液の状態（外観）は全試験区において無色透明であった。

3.6 試験液の分析

全試験区各 1 試験容器について，暴露期間中に 3 回，換水前後の各試験液を 5 mL 採取し，2-メトキシエタノール 50 μL を添加し混合後，GC により分析した。各試験液の被験物質濃度は，標準溶液のピーク面積との比から定量した。詳細は付属資料－2 に示した。

3.7 試験操作

試験液の水溫，溶存酸素濃度，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。ミジンコ投入の際，試験液量に対するピペット内の飼育水が全量で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日後まで飼育した。暴露期間中は毎日一定量の給餌を行った（3.1 参照）。また，以下の要領で，ミジンコの観察および水質測定を行った。

1) 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。死亡個体があれば除去した。

産出幼体：最初の産仔から毎日，幼体の生存数を計数して除去した。死亡幼体，墮胎卵，休眠卵の発生等の有無を観察して記録した。最初の幼体産出日（初産日）を記録した。

2) 水質測定：水溫，溶存酸素濃度，pHおよび硬度を，全試験区各1試験容器について，暴露期間中に4回，換水前後に測定した。

4 結果の算出

4.1 阻害濃度算出に用いる被験物質濃度の決定

試験液の分析（3.6参照）の結果，測定値の設定値に対する割合により，阻害濃度の算出に用いる被験物質濃度を，以下の表に従い決定した。

測定値の 設定値に対する割合	全ての値が±20%以内	±20%を超える値が ひとつでもある
算出に使用する濃度 (全試験区)	設定値	測定値の 時間加重平均値

4.2 親ミジンコの半数致死濃度（LC50）の算出

21日間の各試験区における，親ミジンコの死亡数と供試個体数（10頭）から遊泳阻害率（%）を求め，以下の方法で半数致死濃度（LC50）を決定した。

最高濃度区における死亡率	≥ 50%	< 50%
LC50算出の可否	可	不可
LC50の決定方法	Binomial法, Moving average法, Probit法での算出結果から 適切と判断されたものを採用。 可能な限り95%信頼区間を算出。	> 最高濃度区 とする。
死亡数の経時変化グラフ の記載	記載する。	記載する。

4.3 50%繁殖阻害濃度（EC50）の算出

対照区と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）を用いて，Logistic 曲線にあてはめ，回帰分析し（Logit 法），21日間の50%繁殖阻害濃度（EC50）および 95%信頼区間を可能な限り算出した。また，平均累積産仔数の試験区別の経時変化のグラフを記載した。

4.4 最大無作用濃度 (NOEC) および 最小作用濃度 (LOEC) *

各試験容器毎の21日間の生存親 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統計的手法**により求め、最大無作用濃度 (NOEC) および 最小作用濃度 (LOEC) を決定した。

* 最大無作用濃度 (NOEC) : 対照区に比べ、有意な繁殖阻害が認められない最高濃度
最小作用濃度 (LOEC) : 対照区に比べ、有意な繁殖阻害が認められる最低濃度

** 統計手法: Bartlett の等分散検定, 一元配置分散分析 (ANOVA) および Dunnett の多重比較検定

統計解析には、Yukms ソフトウェア Statlight「#4 多群の比較」(Yukms Corp, 東京) を用いた。

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

該当する事象はなかった。

5.2 試験液中の被験物質濃度

暴露期間中に3回、換水前後の試験液中の被験物質濃度を測定した。その結果を Table 1 に示した。

調製時および換水時においても濃度低下が著しかったのは、被験物質の沸点が34.1℃と極めて低いことに起因するものと判断した。

試験液の分析(3.6 参照)の結果、測定値の設定値に対する割合が、±20%を超える値があったため、以下の結果(親ミジンコの半数致死濃度、50%繁殖阻害濃度、最大無作用濃度および最小作用濃度)には測定値の時間加重平均値を用いた。

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

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および死亡率の結果を Table 2-1, Table 2-2 および Figure 1 に示した。

対照区における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。最高濃度区における死亡率は暴露終了時で10%であった。

初産日

各試験区における親ミジンコの初産日を Table 3 に示した。

対照区における親ミジンコの初産日は、暴露開始9日以内であり、正常な範囲内と判断された。最高濃度区においては、暴露開始12日以内であった。

なお、暴露開始5日後の0.900 mg/L 区 No. 3 容器において、ミジンコを移しかえる際に、誤って落下させたため、この容器の結果は欠測値とした

平均累積産仔数

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産仔数の結果を Table 4 および Figure 2 に示した。

対照区における21日間での親ミジンコ1頭当たりの平均累積産仔数は92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。

最高濃度区における21日間での親ミジンコ1頭当たりの平均累積産仔数は49頭であった。

休眠卵の発生等

暴露期間を通して、全試験区において休眠卵の発生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) を Table 5 および以下に示した。

21日間 LC50 : $> 3.09 \text{ mg/L}$ (95%信頼区間 : 算出不可)

5.5 50%繁殖阻害濃度 (EC50)

21日間暴露の50%繁殖阻害濃度 (EC50) を Table 6 および以下に示した。

21日間 EC50 : $> 3.09 \text{ mg/L}$ (95%信頼区間 : 算出不可)

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日間暴露の最大無作用濃度 (NOEC) および最小作用濃度 (LOEC) を Table 7 および以下に示した。

21日間 NOEC : 0.402 mg/L

21日間 LOEC : 0.936 mg/L

5.7 試験液の水温、溶存酸素濃度、pH および硬度

暴露期間中における試験液の水温を Table 8、溶存酸素濃度を Table 9、pH を Table 10、硬度を Table 11 に示した。

水温はすべての試験区で $20 \pm 1^\circ\text{C}$ で、溶存酸素濃度はすべての試験液槽で飽和溶存酸素濃度 (20.0°C の飽和溶存酸素濃度 : 8.8 mg/L) の60%以上であり、いずれも試験基準を満たした。pHはミジンコの飼育環境として適正範囲 ($6.0 \sim 9.0$ で1.5の変動内) 内であった。また、硬度も適正範囲内 (250 mg/L 前後) と判断した。

以 上

Table 1-1 Measured Concentrations of the Test Substance in Test Water during a 21-day Exposure Period
(*Daphnia* Reproduction Inhibition Test under the Semi-Static Test Conditions)

Nominal Concentration (mg/L)	Date→	Measured Concentration (mg/L)						TWM* ¹ (mg/L)	% of Nominal
		0 New	1 Old	7 New	8 Old	14 New	15 Old		
Control		<0.0007	<0.0007	<0.0007	<0.0007	<0.0007	<0.0007	-	-
0.100		0.0507	0.0248	0.0350	0.0232	0.0754	0.0435	0.0410	41
0.300		0.144	0.0983	0.111	0.0804	0.191	0.134	0.125	42
0.900		0.442	0.320	0.334	0.256	0.606	0.470	0.402	45
2.70		0.986	0.821	0.778	0.605	1.37	1.08	0.936	35
8.00		3.45	2.61	2.62	2.12	4.31	3.49	3.09	39

Table 1-2 Measured Concentrations as a Percentage of Nominal

Nominal Concentration (mg/L)	Date→	Measured Concentration as a Percentage of Nominal					
		0 New	1 Old	7 New	8 Old	14 New	15 Old
0.100		51	25	35	23	75	44
0.300		48	33	37	27	64	45
0.900		49	36	37	28	67	52
2.70		37	30	29	22	51	40
8.00		43	33	33	27	54	44

New: Freshly prepared test solution

Old: Old test solution before renewal

*1: Time-weighted mean measured concentration during 21 days.

	Concentration (mg/L)		% of Nominal	
	Min.	Max.	Min.	Max.
New	0.0350	~	4.31	29 ~ 75
Old	0.0232	~	3.49	22 ~ 52

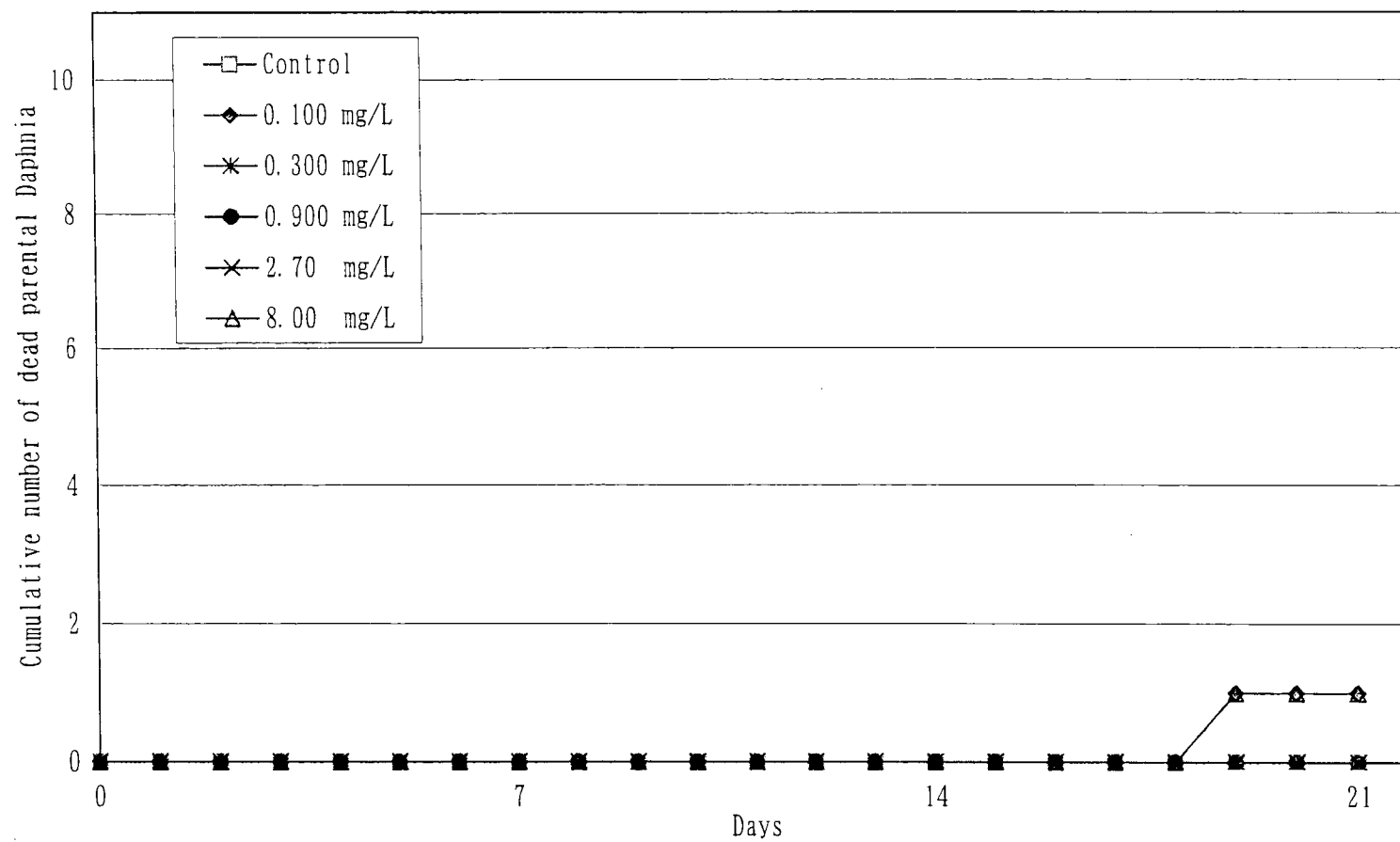
Table 2-1 Cumulative Number of Dead Parental *Daphnia*

Nominal conc.	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
0.100 mg/L	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1
0.300 mg/L	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0.900 mg/L	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2.70 mg/L	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8.00 mg/L	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1

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

Nominal conc.	Days					
	1	2	4	7	14	21
Control	0	0	0	0	0	0
0.100 mg/L	0	0	0	0	0	10
0.300 mg/L	0	0	0	0	0	0
0.900 mg/L	0	0	0	0	0	0
2.70 mg/L	0	0	0	0	0	0
8.00 mg/L	0	0	0	0	0	10

Figure 1 Cumulative Numbers of Dead Parental *Daphnia*



Values in legend are given in the nominal concentration.

Table 3 Time (Days) to First Brood Production

Vessel No.	Nominal Concentration, mg/L (Measured Concentration, mg/L ^{*1})					
	Control	0.100 (0.0410)	0.300 (0.125)	0.900 (0.402)	2.70 (0.936)	8.00 (3.09)
1	8	8	8	8	9	12
2	9	8	8	8	8	9
3	8	8	9	M	9	9
4	8	8	8	8	8	9
5	8	8	8	8	9	9
6	8	9	8	9	9	8
7	8	8	8	8	9	9
8	8	8	9	9	8	8
9	8	8	8	8	8	9
10	8	8	8	8	9	9
Min	8	8	8	8	8	8
Max	9	9	9	9	9	12

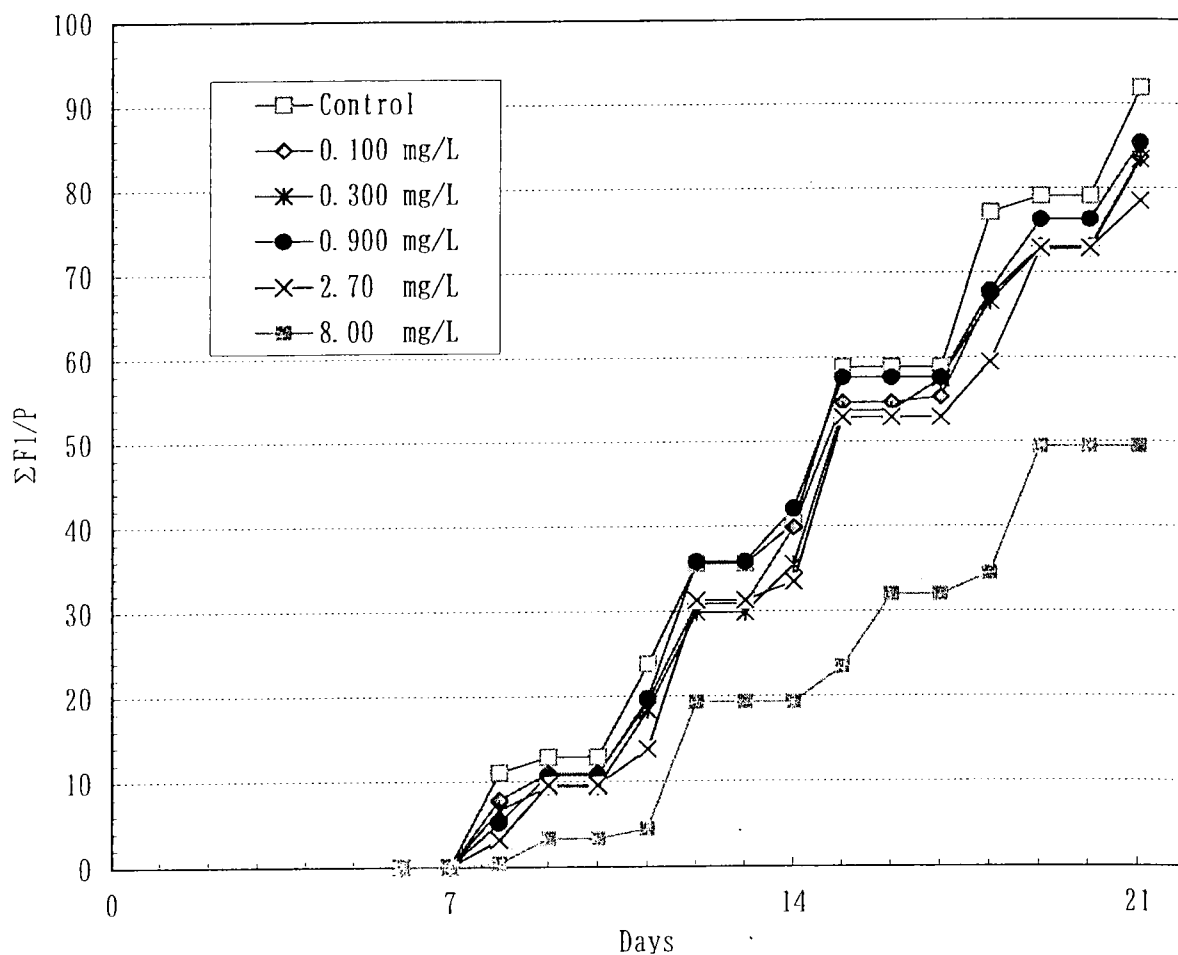
*1: Time-weighted mean measured concentration.

M: Was treated as a missing value because the adult was dropped out during transferring before first brood production.

Table 4 Mean Cumulative Numbers of Juveniles Produced per Adult Alive for 21 Days ($\Sigma F1/P$)

Nominal Conc.	Days															
	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
Control	0.0	0.0	11.1	12.9	12.9	23.8	35.6	35.6	40.3	58.9	58.9	58.9	77.2	79.1	79.1	91.9
0.100 mg/L	0.0	0.0	7.9	11.0	11.0	19.3	30.9	30.9	39.9	54.7	54.7	55.3	67.3	73.1	73.1	83.7
0.300 mg/L	0.0	0.0	6.7	9.4	9.4	18.4	29.9	29.9	35.5	53.7	53.7	57.5	66.7	72.8	72.8	83.4
0.900 mg/L	0.0	0.0	5.2	10.8	10.8	19.8	35.9	35.9	42.1	57.7	57.7	57.7	67.9	76.3	76.3	85.4
2.70 mg/L	0.0	0.0	3.2	9.6	9.6	13.8	31.3	31.3	33.5	52.9	52.9	52.9	59.5	72.9	72.9	78.5
8.00 mg/L	0.0	0.0	0.4	3.3	3.3	4.4	19.3	19.3	19.3	23.4	32.0	32.0	34.4	49.4	49.4	49.4

Figure 2 Time Course of $\Sigma F1/P$ for Each Concentration Level



Values in legend are given in the nominal concentration.

Table 5 Calculated LC50 Values for Parental *Daphnia*

Exposure Period (day)	LC50* ¹ (mg/L)	95% Confidence limits (mg/L)	Statistical method
21	> 3.09	-- -- --	--

*1: Based on the time-weighted mean measured concentration

Table 6 Calculated EC50 Values for Inhibition of Reproduction

Exposure Period (day)	EC50* ¹ (mg/L)	95% Confidence limits (mg/L)	Statistical method
21	> 3.09	-- -- --	--

*1: Based on the time-weighted mean measured concentration

The LC50 and EC50 values and their associated 95% confidence limits could not be determined by statistical methods because the mortality of parental *Daphnia* and the reproduction inhibition rate at the maximum concentration level were less than 50%.

Table 7 Cumulative Numbers of Juveniles Produced per Adult Alive for 21 Days in Each Test Vessels and Results of Statistical Comparison of the Mean Values (by Dunnett's Multicomparison Test)

Vessel No.	Nominal Concentration, mg/L (Measured Concentration*1, mg/L)					
	Control	0.100 (0.0410)	0.300 (0.125)	0.900 (0.402)	2.70 (0.936)	8.00 (3.09)
1	75	87	71	71	77	52
2	78	73	103	75	64	52
3	85	81	78	M	76	47
4	100	D	90	94	94	49
5	83	99	92	80	76	65
6	101	77	63	75	76	41
7	88	68	69	91	79	58
8	111	82	80	82	84	D
9	99	109	95	94	87	48
10	99	77	93	107	72	33
Mean	91.9	83.7	83.4	85.4	78.5	49.4
S. D.	11.7	13.0	13.1	11.8	8.3	9.2
Inhibition rate (%)		9.0	9.2	7.0	14.6	46.2
Significant difference		-	-	-	*	**

*1: Time-weighted mean measured concentration.

M: Was treated as a missing value because the adult was dropped out during transferring after 5 days exposure.

D: Were not included for calculation because the parental *Daphnia* was dead during a 21-days testing period.

-: Indicates no significant difference.

*: Indicates a significant difference ($\alpha=0.05$) from the control.

** : Indicates a significant difference ($\alpha=0.01$) from the control.

No Observed Effect Concentration (NOEC): 0.402 mg/L
Lowest Observed Effect Concentration (LOEC): 0.936 mg/L

Table 8 Temperature during a 21-day Period under the Semi-Static Conditions

Nominal Concentration (mg/L)	Date→	Temperature (°C)								Min.	Max.
		0 new	1 old	7 new	8 old	14 new	15 old	20 new	21 old		
Control		20.1	19.7	20.3	20.4	20.5	20.3	20.3	20.5	19.7	20.5
0.100		20.1	19.7	20.3	20.4	20.5	20.3	20.3	20.5	19.7	20.5
0.300		20.1	19.7	20.3	20.4	20.5	20.3	20.3	20.5	19.7	20.5
0.900		20.1	19.7	20.3	20.4	20.5	20.3	20.3	20.5	19.7	20.5
2.70		20.1	19.7	20.3	20.4	20.5	20.3	20.3	20.5	19.7	20.5
8.00		20.1	19.7	20.3	20.4	20.5	20.3	20.3	20.5	19.7	20.5
Total										19.7	20.5

new: freshly prepared test solution, old: old test solution before renewal

Table 9 Dissolved Oxygen Concentration (D.O.) during a 21-day Period under the Semi-Static Conditions

Nominal Concentration (mg/L)	Date→	D. O. (mg/L)								Min.	Max.
		0 new	1 old	7 new	8 old	14 new	15 old	20 new	21 old		
Control		8.6	8.4	8.7	8.3	8.7	7.8	8.7	7.6	7.6	8.7
0.100		8.6	8.4	8.6	8.0	8.7	7.7	8.6	7.6	7.6	8.7
0.300		8.7	8.6	8.6	8.1	8.7	7.8	8.7	8.0	7.8	8.7
0.900		8.7	8.7	8.6	8.2	8.7	7.8	8.6	8.0	7.8	8.7
2.70		8.6	8.8	8.6	8.2	8.7	7.8	8.5	8.0	7.8	8.8
8.00		8.6	8.8	8.6	8.4	8.7	7.9	8.6	8.1	7.9	8.8
Total										7.6	8.8

new: freshly prepared test solution, old: old test solution before renewal

Table 10 pH during a 21-day Period under the Semi-Static Conditions

Nominal Concentration (mg/L)	Date→	pH								Min.	Max.
		0 new	1 old	7 new	8 old	14 new	15 old	20 new	21 old		
Control		7.9	7.7	8.1	7.5	8.0	7.3	8.2	7.3	7.3	8.2
0.100		7.9	7.7	8.0	7.4	8.2	7.4	8.0	7.3	7.3	8.2
0.300		7.9	7.7	8.0	7.4	8.2	7.5	8.2	7.5	7.4	8.2
0.900		7.9	7.7	8.0	7.5	8.3	7.5	8.2	7.5	7.5	8.3
2.70		7.9	7.8	8.0	7.6	8.3	7.5	8.2	7.5	7.5	8.3
8.00		7.9	7.7	8.0	7.6	8.2	7.5	8.2	7.6	7.5	8.2
Total										7.3	8.3

new: freshly prepared test solution, old: old test solution before renewal

Table 11 Total Hardness (as CaCO₃) during a 21-day Period under the Semi-Static Conditions

Nominal Concentration (mg/L)	Date→	Total hardness (as CaCO ₃ , mg/L)								Min.	Max.
		0 new	1 old	7 new	8 old	14 new	15 old	20 new	21 old		
Control		235	235	250	240	260	230	235	235	230	260
0.100		245	240	250	245	250	235	230	240	230	250
0.300		240	240	250	250	265	235	235	245	235	265
0.900		240	240	250	250	250	235	240	240	235	250
2.70		240	235	250	250	250	235	235	230	230	250
8.00		230	230	260	235	265	225	230	225	225	265
Total										225	265

new: freshly prepared test solution, old: old test solution before renewal

付属資料－ 1

希釈水の組成

Table A-1 Elendt M4 Medium Recommended by OECD Guideline No. 211
Used as Dilution Water

Macro nutrients	Concentration (mg/L)
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	293.8
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	123.3
KCl	5.80
NaHCO_3	64.8
$\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$	10.0
NaNO_3	0.274
KH_2PO_4	0.143
K_2HPO_4	0.184

Trace elements	Concentration ($\mu\text{g/L}$)
H_3BO_3	2859.5
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	360.5
LiCl	306.0
RbCl	71.0
$\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	152.0
NaBr	16.0
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	63.0
$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	16.8
ZnCl_2	13.0
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	10.0
KI	3.25
Na_2SeO_3	2.19
NH_4VO_3	0.575
$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	2500
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	995.5

Vitamines	Concentration ($\mu\text{g/L}$)
Thiamine hydrochloride	75.0
Cyanocobalamine (B12)	1.00
Biotine	0.750

付属資料－ 2

試験液の分析

1 試験液の分析方法

- 1) 各試験液を測定用バイアルに5 mL採取し、2-メトキシエタノール50 μ Lを添加し混合後、GCにより分析した。
- 2) 2-メトキシエタノールで調製した標準溶液50 μ Lを、精製水5 mLを予め入れておいた測定用バイアルに添加し混合後、GCにより分析した。
- 3) 各試験液の被験物質濃度は、標準溶液のピーク面積との比から定量した。

2 ガスクロマトグラフィー (GC) 測定条件

(装置)

ガスクロマトグラフ質量分析計 (ヘッドスペースサンブラ付き), No. 1

ガスクロマトグラフ: Agilent (Hewlett Packard) 6890

ワークステーション: Agilent/ミステーション (Windows NT)

注入口: スプリット/スプリットレス

ヘッドスペースサンブラ (HSS): Agilent 7694

質量選択検出器 (MSD): Agilent 5973N MSD (Mass Selective Detector)

(条件)

GC条件

カラム: DB-5MS, 60 m×0.25 mm (i.d.), df=1.0 μm

キャリアーガス: ヘリウム (constant flow)

流速: 1.0 mL/min

カラムオープン温度: 40 °C (5 min) → 20 °C/min → 140 °C (3 min)

注入口温度: 200 °C (Front), MSインターフェース温度: 200 °C

注入方法: Split, Split ratio=1:250

試料注入量: 3.0 mL (HSSサンプルループ容量)

HSS条件

温度条件: Oven=60 °C, Loop=120 °C, Transfer Line=200 °C

イベント時間: Vial Equilibration Time=20 min

Pressurization Time=0.2 min

Loop Fill Time=0.03 min

Loop Equilibration Time=0.2 min

Inject Time=0.2 min

バイアルパラメータ: Shake=2

MSD条件

温度条件： イオン源温度=150 ℃，四重極マス・フィルタ温度=230 ℃

SIM (Selected Ion Monitoring) 条件：

Solvent Delay=6 min

Quant ion=68 m/z

Qualifier ion = non

3 検量線

被験物質の1000 mg/L 2-メトキシエタノール溶液を調製し，2-メトキシエタノールで順次希釈し，0, 1.00～1000 mg/Lの標準溶液を調製した。この標準溶液を50 μ L採取し 5 mLの精製水に添加したものを分析サンプルとしGCで測定した。横軸に濃度を（mg/L），縦軸にピーク面積をとり，検量線を作成した。検量線はほぼ原点を通る直線となり，最小二乗法による直線回帰式の相関係数は1.000と良好であった。

4 検出限界

最小検出ピーク面積を 1000 count に設定し，これに相当する試験液中の被験物質濃度 0.0007 mg/Lを検出限界とした。

5 添加回収試験

分析前処理は，「1 試験液の分析方法」に示したように，試験液と2-メトキシエタノールを混合する操作だけであるので，添加回収試験の必要はなかった。したがって，回収率の補正は行わなかった。

Figure A-2-1 Calibration Curve

No.	Concentration (mg/L)	Peak Area (count)
1	0	0
2	1.00	30919
3	2.00	56573
4	5.00	149135
5	10.0	294510
6	20.0	619337
7	50.0	1612919
8	100	3351277
9	200	6510411
10	500	17209551
11	1000	32736022

Each 2-methoxyethanol standard solution was added to 100-fold volume of water before injection.

$$Y = 33,057X$$

$$r = 1.000$$

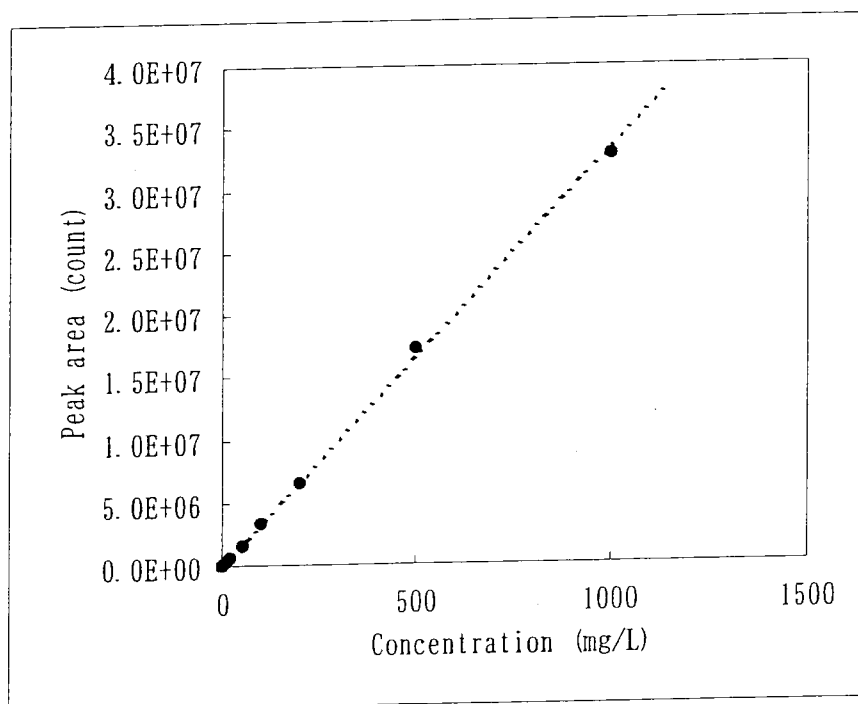
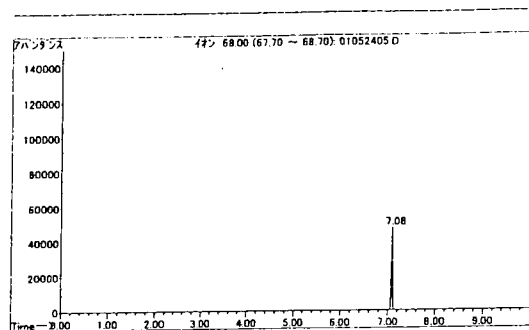


Figure A-2-2 Representative chromatograms

(1) Standard 50.0 mg/L ; Day 0

(Standard solution was added to 100-fold volume of water before injection.)

Study No. : A000464-3G
 Date : 2001.05.24
 Operator :
 Sample Information: STD 0.5ppm } STD 50ppm 56.4mg } 61.4.24
 Sample Name : STD 0.5ppm }
 Misc Info :
 File Name : C:\MSDCHEM\1\DATA\1\SP\01052405.D
 Acquired : 24 May 2001 13:48 using AcqMethod ISP-1

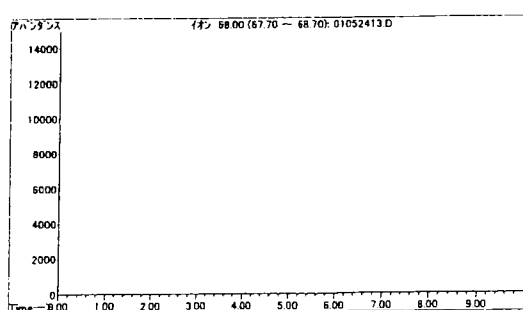


イオン 68.00 (67.70 ~ 68.70): 01052405.D
 STD 0.5ppm

ピーク	リテンションタイム	タイプ	半値幅	面積	開始時間	終了時間
1	7.082	M	0.032	930274	7.019	7.173

(2) Control ; Day 0

Study No. : A000464-3G
 Date : 2001.05.24
 Operator :
 Sample Information: control
 Sample Name : control
 Misc Info :
 File Name : C:\MSDCHEM\1\DATA\1\SP\01052413.D
 Acquired : 24 May 2001 17:01 using AcqMethod ISP-1



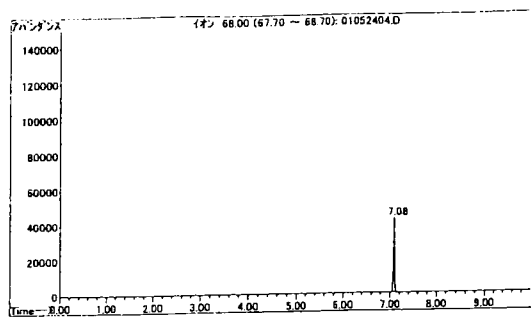
イオン 68.00 (67.70 ~ 68.70): 01052413.D
 control

加マゲルが積分されていません

Figure A-2-2 Continued

(3) 0.900 mg/L nominal ; Day 0

Study No. : A000464-3G
 Date : 2001.05.24
 Operator :
 Sample Information: C3
 Sample Name : C3
 Misc Info :
 File Name : C:\MSDCHEM\1\DATA\ISP\01052404.D
 Acquired : 24 May 2001 13:26 using AcqMethod ISP-1



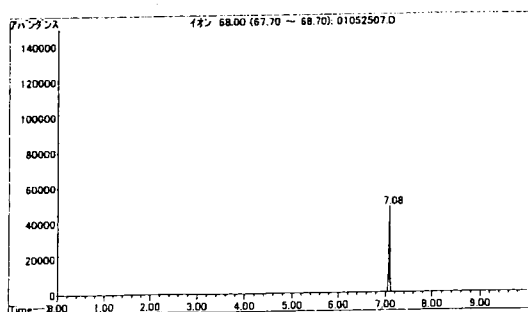
イオン 68.00 (67.70 ~ 68.70): 01052404.D
 C3

ピーク	リテンションタイム	タイプ	半値幅	面積	開始時間	終了時間
1	7.083	M	0.032	822519	7.017	7.176

(4) Standard 50.0 mg/L ; Day 1

(Standard solution was added to 100-fold volume of water before injection.)

Study No. : A000464-3G
 Date : 2001.05.25
 Operator :
 Sample Information: STD 0.5ppm
 Sample Name : STD 0.5ppm
 Misc Info :
 File Name : C:\MSDCHEM\1\DATA\ISP\01052507.D
 Acquired : 25 May 2001 14:11 using AcqMethod ISP-1



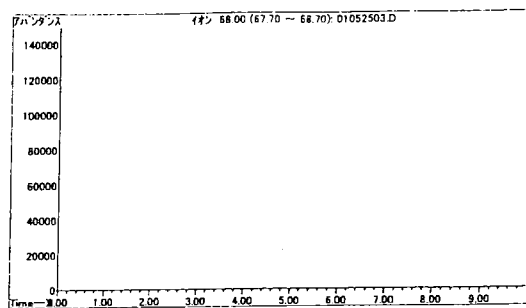
イオン 68.00 (67.70 ~ 68.70): 01052507.D
 STD 0.5ppm

ピーク	リテンションタイム	タイプ	半値幅	面積	開始時間	終了時間
1	7.081	M	0.032	936571	7.016	7.178

Figure A-2-2 Continued

(5) Control ; Day 1

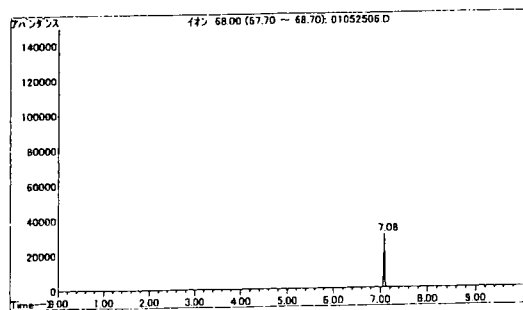
Study No. : A000464-3G
 Date : 2001.05.25
 Operator : XXXXXXXXXX
 Sample Information: Control
 Sample Name : control
 Misc Info :
 File Name : C:\MSDCHEM\1\DATA\ISP\01052503.D
 Acquired : 25 May 2001 12:45 using AcqMethod ISP-1



イオン 68.00 (67.70 ~ 68.70): 01052503.D
 control
 加算が横分されていません

(6) 0.900 mg/L nominal ; Day 1

Study No. : A000464-3G
 Date : 2001.05.25
 Operator : XXXXXXXXXX
 Sample Information: C3
 Sample Name : C3
 Misc Info :
 File Name : C:\MSDCHEM\1\DATA\ISP\01052506.D
 Acquired : 25 May 2001 13:50 using AcqMethod ISP-1



イオン 68.00 (67.70 ~ 68.70): 01052506.D
 C3

ピーク	リテンションタイム	タイプ	半値幅	面積	開始時間	終了時間
1	7.081	M	0.032	599279	7.020	7.173

付属資料－3

ミジンコの観察結果

Appendix 3-1 Result of reproduction test

Test chemical: ISP

(Untreated control)

Rep. No.	Counts		Time																					Total
			5/25	5/26	5/27	5/28	5/29	5/30	5/31	6/1	6/2	6/3	6/4	6/5	6/6	6/7	6/8	6/9	6/10	6/11	6/12	6/13	6/14	
			1 d	2 d	3 d	4 d	5 d	6 d	7 d	8 d	9 d	10 d	11 d	12 d	13 d	14 d	15 d	16 d	17 d	18 d	19 d	20 d	21 d	
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	13	0	0	0	21	0	0	23	0	0	18	0	0	0	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	13	13	13	13	34	34	34	57	57	57	75	75	75	75	75
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	0	17	0	0	28	0	0	14	0	0	0	19	0	0	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	17	17	17	45	45	45	59	59	59	59	78	78	78	78
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	12	0	0	17	0	0	0	21	0	0	20	0	0	15	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	12	12	12	29	29	29	29	50	50	50	70	70	70	85	85
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	11	0	0	0	21	0	0	25	0	0	21	0	0	22	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	11	11	11	11	32	32	32	57	57	57	78	78	78	100	100
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	16	0	0	0	25	0	0	23	0	0	19	0	0	0	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	16	16	16	16	41	41	41	64	64	64	83	83	83	83	83
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	16	1	0	21	0	0	0	25	0	0	20	0	0	18	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	16	17	17	38	38	38	38	63	63	63	83	83	83	101	101
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	11	0	0	4	23	0	0	25	0	0	18	0	0	7	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	11	11	11	15	38	38	38	63	63	63	81	81	81	88	88
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	14	0	0	26	0	0	0	24	0	0	25	0	0	22	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	14	14	14	40	40	40	40	64	64	64	89	89	89	111	111
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	10	0	0	22	0	0	21	5	0	0	20	0	0	21	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	10	10	10	32	32	32	53	58	58	58	78	78	78	99	99
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	8	0	0	19	0	0	26	1	0	0	22	0	0	23	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	8	8	8	27	27	27	53	54	54	54	76	76	76	99	99

Appendix 3-2 Result of repropduction test

Test chemical: ISP

(Concentration 1)

Rep. No.	Counts		Time																					Total
			5/25 1 d	5/26 2 d	5/27 3 d	5/28 4 d	5/29 5 d	5/30 6 d	5/31 7 d	6/1 8 d	6/2 9 d	6/3 10 d	6/4 11 d	6/5 12 d	6/6 13 d	6/7 14 d	6/8 15 d	6/9 16 d	6/10 17 d	6/11 18 d	6/12 19 d	6/13 20 d	6/14 21 d	
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	8	0	0	14	0	0	29	0	0	0	16	0	0	20	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	8	8	8	22	22	22	51	51	51	51	67	67	67	87	87
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	14	0	0	0	22	0	0	23	0	0	0	14	0	0	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	14	14	14	14	36	36	36	59	59	59	59	73	73	73	73
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	7	0	0	10	0	0	26	0	0	6	10	0	0	22	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	7	7	7	17	17	17	43	43	43	49	59	59	59	81	81
4	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0			
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	16	0	0	19	0	0	25	0	0	0	18	0			
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	16	16	16	35	35	35	60	60	60	60	78	78			--
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	9	0	0	15	0	0	25	0	0	0	24	0	0	26	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	9	9	9	24	24	24	49	49	49	49	73	73	73	99	99
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	0	15	0	0	27	0	0	16	0	0	0	19	0	0	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	15	15	15	42	42	42	58	58	58	58	77	77	77	77
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	9	0	0	8	13	0	0	23	0	0	15	0	0	0	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	9	9	9	17	30	30	30	53	53	53	68	68	68	68	68
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	11	0	0	8	16	0	0	22	0	0	17	0	0	8	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	11	11	11	19	35	35	35	57	57	57	74	74	74	82	82
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	12	0	0	20	0	0	1	31	0	0	26	0	0	19	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	12	12	12	32	32	32	33	64	64	64	90	90	90	109	109
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	1	13	0	0	26	0	0	18	0	0	0	19	0	0	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	1	14	14	14	40	40	40	58	58	58	58	77	77	77	77

-- : Were not included for calculation because the parental *Daphnia* was dead during a 21-days testing period.

Appendix 3-3 Result of reproduction test

Test chemical: ISP

(Concentration 2)

Rep. No.	Counts		Time																					Total
			5/25 1 d	5/26 2 d	5/27 3 d	5/28 4 d	5/29 5 d	5/30 6 d	5/31 7 d	6/1 8 d	6/2 9 d	6/3 10 d	6/4 11 d	6/5 12 d	6/6 13 d	6/7 14 d	6/8 15 d	6/9 16 d	6/10 17 d	6/11 18 d	6/12 19 d	6/13 20 d	6/14 21 d	
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	13	0	0	17	0	0	0	22	0	0	19	0	0	0	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	13	13	13	30	30	30	30	52	52	52	71	71	71	71	71
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	13	0	0	21	0	0	26	0	0	20	0	0	0	23	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	13	13	13	34	34	34	60	60	60	80	80	80	80	103	103
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	10	0	0	29	0	0	20	0	0	0	19	0	0	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	10	10	10	39	39	39	59	59	59	59	78	78	78	78
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	9	0	0	0	22	0	0	23	0	0	16	0	0	20	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	9	9	9	9	31	31	31	54	54	54	70	70	70	90	90
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	10	0	0	16	0	0	0	26	0	0	22	0	0	18	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	10	10	10	26	26	26	26	52	52	52	74	74	74	92	92
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	4	0	0	5	15	0	0	22	0	0	11	6	0	0	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	4	4	4	9	24	24	24	46	46	46	57	63	63	63	63
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	4	7	0	0	20	0	0	22	0	0	0	16	0	0	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	4	11	11	11	31	31	31	53	53	53	53	69	69	69	69
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	10	0	0	29	0	0	21	0	0	0	20	0	0	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	10	10	10	39	39	39	60	60	60	60	80	80	80	80
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	8	0	0	16	0	0	30	0	0	18	0	0	0	23	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	8	8	8	24	24	24	54	54	54	72	72	72	72	95	95
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	6	0	0	15	0	0	0	26	0	0	24	0	0	22	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	6	6	6	21	21	21	21	47	47	47	71	71	71	93	93

Appendix 3-4 Result of repropduction test

Test chemical: ISP

(Concentration 3)

Rep. No.	Counts		Time																					Total
			5/25	5/26	5/27	5/28	5/29	5/30	5/31	6/1	6/2	6/3	6/4	6/5	6/6	6/7	6/8	6/9	6/10	6/11	6/12	6/13	6/14	
			1 d	2 d	3 d	4 d	5 d	6 d	7 d	8 d	9 d	10 d	11 d	12 d	13 d	14 d	15 d	16 d	17 d	18 d	19 d	20 d	21 d	
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	2	8	0	0	30	0	0	17	0	0	0	14	0	0	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	2	10	10	10	40	40	40	57	57	57	57	71	71	71	71
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	1	13	0	0	27	0	0	16	0	0	0	18	0	0	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	1	14	14	14	41	41	41	57	57	57	57	75	75	75	75
3	P generation	Live	1	1	1	1	0																	
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0																	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0																	M
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	2	0	0	20	0	0	31	0	0	0	18	0	0	23	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	2	2	2	22	22	22	53	53	53	53	71	71	71	94	94
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	10	0	0	3	25	0	0	25	0	0	9	8	0	0	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	10	10	10	13	38	38	38	63	63	63	72	80	80	80	80
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	0	15	0	0	26	0	0	19	0	0	0	15	0	0	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	15	15	15	41	41	41	60	60	60	60	75	75	75	75
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	7	0	0	18	0	0	25	0	0	0	20	0	0	21	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	7	7	7	25	25	25	50	50	50	50	70	70	70	91	91
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	14	0	0	27	0	0	20	0	0	0	21	0	0	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	14	14	14	41	41	41	61	61	61	61	82	82	82	82
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	11	0	0	18	5	0	0	19	0	0	22	0	0	19	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	11	11	11	29	34	34	34	53	53	53	75	75	75	94	94
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	22	5	0	0	24	0	0	23	0	0	19	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	14	14	14	36	41	41	41	65	65	65	88	88	88	107	107

M : Was treated as a missing value because the adult was dropped out during transferring after 5 days exposure.

Appendix 3-5 Result of reproduction test

Test chemical: ISP

(Concentration 4)

Rep. No.	Counts		Time																					Total
			5/25	5/26	5/27	5/28	5/29	5/30	5/31	6/1	6/2	6/3	6/4	6/5	6/6	6/7	6/8	6/9	6/10	6/11	6/12	6/13	6/14	
			1 d	2 d	3 d	4 d	5 d	6 d	7 d	8 d	9 d	10 d	11 d	12 d	13 d	14 d	15 d	16 d	17 d	18 d	19 d	20 d	21 d	
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	0	15	0	0	25	0	0	18	0	0	0	19	0	0	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	15	15	15	40	40	40	58	58	58	58	77	77	77	77
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	8	0	0	0	19	0	0	20	0	0	0	17	0	0	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	8	8	8	8	27	27	27	47	47	47	47	64	64	64	64
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	7	0	0	30	0	0	19	0	0	0	20	0	0	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	7	7	7	37	37	37	56	56	56	56	76	76	76	76
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	9	0	0	18	1	0	0	26	0	0	21	0	0	19	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	9	9	9	27	28	28	28	54	54	54	75	75	75	94	94
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	0	12	0	0	27	0	0	18	0	0	0	19	0	0	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	12	12	12	39	39	39	57	57	57	57	76	76	76	76
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	0	11	0	0	24	0	0	20	0	0	0	21	0	0	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	11	11	11	35	35	35	55	55	55	55	76	76	76	76
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	0	9	0	0	28	0	0	22	0	0	0	20	0	0	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	9	9	9	37	37	37	59	59	59	59	79	79	79	79
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	7	0	0	12	0	0	22	0	0	0	22	0	0	21	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	7	7	7	19	19	19	41	41	41	41	63	63	63	84	84
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	8	0	0	12	0	0	0	28	0	0	23	0	0	16	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	8	8	8	20	20	20	20	48	48	48	71	71	71	87	87
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	0	10	0	0	21	0	0	23	0	0	0	18	0	0	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	10	10	10	31	31	31	54	54	54	54	72	72	72	72

Appendix 3-6 Result of repropduction test

Test chemical: ISP

(Concentration 5)

Rep. No.	Counts		Time																					Total
			5/25	5/26	5/27	5/28	5/29	5/30	5/31	6/1	6/2	6/3	6/4	6/5	6/6	6/7	6/8	6/9	6/10	6/11	6/12	6/13	6/14	
			1 d	2 d	3 d	4 d	5 d	6 d	7 d	8 d	9 d	10 d	11 d	12 d	13 d	14 d	15 d	16 d	17 d	18 d	19 d	20 d	21 d	
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	0	0	0	0	17	0	0	18	0	0	0	17	0	0	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	17	17	17	35	35	35	35	52	52	52	52
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	0	5	0	0	18	0	0	0	13	0	0	16	0	0	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	5	5	5	23	23	23	23	36	36	36	52	52	52	52
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	4	0	0	13	0	0	0	14	0	0	16	0	0	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	4	4	4	17	17	17	17	31	31	31	47	47	47	47
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	0	1	0	0	15	0	0	0	20	0	0	13	0	0	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	16	16	16	16	36	36	36	49	49	49	49
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	0	5	0	0	30	0	0	14	0	0	0	16	0	0	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	5	5	5	35	35	35	49	49	49	49	65	65	65	65
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	4	0	0	10	0	0	0	5	0	0	22	0	0	0	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	4	4	4	14	14	14	14	19	19	19	41	41	41	41	41
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	0	5	0	0	19	0	0	0	15	0	0	19	0	0	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	5	5	5	24	24	24	24	39	39	39	58	58	58	58
8	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0			
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	6	0	0	13	0	0	1	11			
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	2	2	2	2	8	8	8	21	21	21	22	33			--
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	4	0	0	14	0	0	0	8	0	0	22	0	0	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	4	4	4	18	18	18	18	26	26	26	48	48	48	48
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	0	2	0	0	8	0	0	0	7	0	0	16	0	0	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	2	10	10	10	10	17	17	17	33	33	33	33

-- : Were not included for calculation because the parental *Daphnia* was dead during a 21-days testing period.