

受付番号	662-10-E-5279
試験番号	95279

最 終 報 告 書

トリメチルアミンのオオミジンコ繁殖試験

2011 年 3 月

一般財団法人化学物質評価研究機構

久留米事業所

本文書は正本を正確に転写したものです。
一般財団法人 化学物質評価研究機構 久留米事業所
2011 年 3 月 28 日
試験責任者

陳 述 書

一般財団法人化学物質評価研究機構
久留米事業所

試験委託者 環境省

試験の表題 トリメチルアミンのオオミジンコ繁殖試験

試験番号 95279

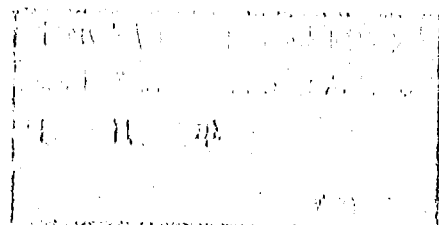
上記試験は以下の GLP に従って実施したものである。

OECD Principles of Good Laboratory Practice, November 26, 1997

また、本最終報告書は生データを正確に反映しており、試験データが有効であることを確認した。

2011 年 3 月 28 日

試験責任者



信 頼 性 保 証 書

一般財団法人化学物質評価研究機構
久留米事業所

試験委託者 環境省

試験の表題 トリメチルアミンのオオミジンコ繁殖試験

試験番号 95279

本最終報告書は、試験の方法、手順が正確に記載され、試験結果は生データを正確に反映していることを保証する。

なお、監査又は査察の結果については、下記の通り試験責任者及び運営管理者に報告した。

監査又は査察内容	監査又は査察日	報告日 (試験責任者及び運営管理者)
試験計画書草案	2011 年 1 月 13 日	2011 年 1 月 13 日
試験計画書	2011 年 1 月 14 日	2011 年 1 月 14 日
試験計画書の変更	2011 年 2 月 1 日	2011 年 2 月 1 日
	2011 年 2 月 28 日	2011 年 2 月 28 日
暴露開始時	2011 年 2 月 28 日	2011 年 2 月 28 日
暴露開始後	2011 年 3 月 7 日	2011 年 3 月 7 日
	2011 年 3 月 17 日	2011 年 3 月 18 日
生データ、最終報告書草案	2011 年 3 月 26 日	2011 年 3 月 26 日
生データ、最終報告書草案 再査察	2011 年 3 月 28 日	2011 年 3 月 28 日
最終報告書	2011 年 3 月 28 日	2011 年 3 月 28 日

2011 年 3 月 28 日

信頼性保証部門責任者

目 次

	頁
1. 表 題	6
2. 試験委託者	6
3. 試験施設	6
4. 試験目的	6
5. 試験法	6
6. GLP 基準	6
7. 試験日程	6
8. 試資料の保管	7
9. 試験関係者	7
10. 最終報告書の承認	7
11. 要 約	8
12. 試験材料	9
12.1 被験物質	9
12.2 供試試料	10
12.3 試験生物	11
13. 試験の実施	12
13.1 試験用水	12
13.2 試験器具及び装置	12
13.3 試験液の調製法	12
13.4 試験条件	12
13.5 観察と測定	13
13.6 結果の算出	13
13.7 試験の有効性	14
13.8 数値の取扱い	14
14. 試験結果	15
14.1 ミジンコの観察結果	15
14.2 試験液の観察と測定結果	15
14.3 親ミジンコに対する LC_{50}	16
14.4 50%繁殖阻害濃度 (EC_{50})	16
14.5 考 察	16
15. 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

Tables and Figures

Table 1 to 10	17 to 22
Figure 1, 2	23, 24
Appendix 1	被験物質濃度の測定方法及び結果	
Appendix 2	検量線及びクロマトグラム	
Appendix 3	個体別産出幼体数	
Additional data 1	予備試験結果	
Additional data 2	不採用本試験結果	



1. 表 題

トリメチルアミンのオオミジンコ繁殖試験

2. 試験委託者

名 称 環境省

住 所 〒100-8975 東京都千代田区霞が関 1-2-2

3. 試験施設

名 称 一般財団法人化学物質評価研究機構 久留米事業所

住 所 〒839-0801 福岡県久留米市宮ノ陣三丁目 2 番 7 号

4. 試験目的

トリメチルアミン塩酸塩を用いてミジンコ類の繁殖に対する影響を調べ、最小影響濃度 (LOEC)、最大無影響濃度 (NOEC)、可能ならば 50%繁殖阻害濃度 (EC₅₀) を求める。



5. 試験法

a) OECD Guidelines for Testing of Chemicals, No.211, October 3, 2008, "*Daphnia magna* Reproduction Test"

b) OECD Guidance Document, No.23, September 2000, "Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures"

6. GLP 基準

OECD Principles of Good Laboratory Practice, November 26, 1997

7. 試験日程

試験開始日	2011 年 1 月 14 日
実験開始日	2011 年 2 月 28 日
実験終了日	2011 年 3 月 21 日
試験終了日	2011 年 3 月 28 日

8. 試資料の保管

試験計画書（正本）、最終報告書（正本）、生データ、試験委託書及びその他の記録、並びに被験物質は当試験施設に保管する。

保管期間は最終報告書提出後 10 年間とする。

保管期間終了後の処置（継続保管、廃棄又は返却）は、試験委託者と協議の上決定する。

9. 試験関係者

試験責任者

[REDACTED]

（所属 試験第四課）

試験担当者（生物試験の実施）

[REDACTED]

試験担当者（分析試験の実施）

[REDACTED]

10. 最終報告書の承認

2011 年 3 月 28 日

試験責任者

[REDACTED]

11. 要 約

試験条件

試験生物	オオミジンコ (<i>Daphnia magna</i>)
試験用水	ASTM 調製水
試験区	20、8.0、3.2、1.3、0.51 mg/L (公比 2.5) の 5 濃度区及び対照区
試験液の調製	供試試料と試験用水を混合、攪拌して調製した試験原液を用いて調製
暴露方式	半止水式 (毎日試験液の全量を交換)
暴露期間	21 日間
連 数	10 連/試験区
試験生物数	10 頭/試験区 (1 頭/試験容器)
試験液量	800 mL/試験区 (80 mL/試験容器)
水 温	19.8~20.0°C
照 明	室内灯による 16 時間明 (光強度 $15\sim20\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) / 8 時間暗
給 餌	ミジンコ 1 頭当たり <i>Chlorella vulgaris</i> を 0.1~0.2 mgC (有機炭素含量) / 日の割合で 1 日に 1 回給餌
エアレーション	無し
被験物質濃度の測定	HPLC 法 (調製時及び換水前のものを 1 回/週の頻度で 3 回繰り返し)

試験結果

21 日間 EC ₅₀ (50%繁殖阻害濃度)	14 mg/L
親ミジンコの 21 日間 LC ₅₀ (半数致死濃度)	>20 mg/L
LOEC (最低影響濃度)	20 mg/L
NOEC (最大無影響濃度)	8.0 mg/L

(上記濃度は、設定濃度に基づく値)

12. 試験材料

12.1 被験物質

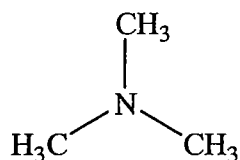
a) 名称等

名 称 トリメチルアミン

CAS 番号 75-50-3

b) 構造式等

構造式



分子式 $\text{C}_3\text{H}_9\text{N}$

分子量 59.11^{*1}

*1 原子量表 (2010) を用いて算出した値

c) 物理化学的性状

蒸気圧 187 kPa (20°C)^{*2}

対水溶解度 890 g/L (30°C)^{*2}

1-オクタノール/水分配係数 (log Pow)

0.16^{*2*3}

融 点 -117.08°C^{*2}

沸 点 2.87°C^{*2}

溶媒に対する溶解度等

溶 媒	溶解度	溶媒中の安定性
ジエチルエーテル	溶解 ^{*3}	-
ベンゼン	溶解 ^{*3}	-
トルエン	溶解 ^{*3}	-
クロロホルム	溶解 ^{*3}	-

比 重 $d^{-5} 0.662$ ^{*3}

*2 化学物質総合情報提供システム (CHRIP)

*3 Richardson, M.L. et al "The Dictionary of Substances and their Effects" The Royal Society of Chemistry, 1993.

12.2 供試試料

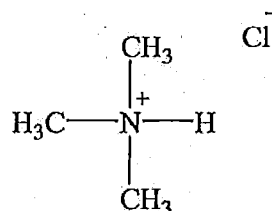
a) 名称等

名 称 トリメチルアミン塩酸塩

CAS 番号 593-81-7

b) 構造式等

構造式



分子式 $\text{C}_3\text{H}_{10}\text{ClN}$

分子量 95.57^{*1}

*1 原子量表 (2010) を用いて算出した値

c) 純度等

純度 98.4%^{*4}

不純物 水分 2.6%^{*4}

供給者

ロット番号

純度は100%として取り扱った。

*4 供給者提供の試験成績書

d) 物理化学的性状

蒸気圧 $1.66 \times 10^{-6} \text{ mmHg (25}^\circ\text{C)}$ ^{*2}

対水溶解度 易溶^{*7}

1-オクタノール/水分配係数 (log Pow)

<-3.4^{*5} (実測値)

融 点 200°C ^{*2} (焼結又は昇華)

沸 点 $277 \sim 278^\circ\text{C}$ ^{*2} (分解)

常温における性状 形状: 結晶~粉末、色: 白色~ほとんど白色^{*6}

溶媒に対する溶解度等

溶 媒	溶解度	溶媒中の安定性
エタノール	易溶 ^{*7}	-
クロロホルム	可溶 ^{*7}	-
エーテル	不溶 ^{*7}	-

比 重 $1.03 (20^\circ\text{C})$ ^{*5}

*2 化学物質総合情報提供システム (CHRIP)

*5 Karel Verschueren "Handbook of Environmental Data on Organic Chemicals" 4th Ed.

*6 製造元 [redacted] の製品安全データシート

*7 化学大辞典編集委員会編「化学大辞典」(共立出版)1960.

e) 保管条件

窒素封入し、デシケーター中で冷暗所保管した。

f) 被験物質の同一性及び保管条件下における安定性の確認

入手した供試試料について赤外吸収スペクトルを測定し、供試試料の特性が認められることを確認した。また、実験開始前及び終了後の赤外吸収スペクトルを比較することにより、保管条件下における供試試料の安定性を確認した。

g) 取扱い上の注意

手袋、マスク、保護めがね及び白衣を着用し、皮膚、目への接触及び吸入をさけた。

12.3 試験生物

種	オオミジンコ (<i>Daphnia magna</i> Clone A)
生物種選択の理由	テストガイドラインに推奨されている種
入手源	英国 Sheffield 大学 (所在地 Sheffield S10 2UQ, United Kingdom)
入手日	1990 年 7 月 9 日
順 化	久留米事業所で継代飼育している成体より産出された幼体を用いた。幼体を産出する成体は、試験条件と同じ水質 (ASTM 調製水)、水温 ($20\pm 1^{\circ}\text{C}$) 及び明暗周期 (16 時間明/8 時間暗) 下で 14 日間以上飼育したもの (14 日齢) で成体の生存率が 100% の群 (ロット) を使用した。継代飼育中はミジンコ 1 頭当たり <i>Chlorella vulgaris</i> を 0.1~0.2 mgC (有機炭素含量) /日の割合で 1 日に 1 回給餌した。
幼体の選別	生後 24 時間以内の幼体
群分け	無作為抽出
試験系の再現性の確認	定期的に基準物質による急性遊泳阻害試験を実施 最新のデータを以下に示す。 基準物質：二クロム酸カリウム (和光純薬工業 試薬特級 ロット番号 ALP5310) 実施期間：2010 年 11 月 2 日~11 月 4 日 48 時間 EC_{50} : 0.78 mg/L この値は久留米事業所におけるバックグラウンドデータの規定範囲内 (平均 $\pm 2\times$ 標準偏差) であった [平均 \pm 標準偏差 : 0.83 ± 0.23 mg/L (n=3)] 。

13. 試験の実施

試験はトリメチルアミン塩酸塩を用いて実施し、濃度はトリメチルアミン濃度で表示した。

13.1 試験用水

ASTM 調製水 (ASTM E 729 ; 2007) を用いた。(セレン 1 µg/L、ビタミン B₁₂ 1 µg/L 含有。硬度 166.7~175.1 mg/L) 含有成分を以下に示す。

Substance	Formula	Final concentration in aqueous dilution media (mg/L)
Sodium hydrogen carbonate	NaHCO ₃	192
Calcium sulphate dihydrate	CaSO ₄ · 2H ₂ O	120
Magnesium sulphate heptahydrate	MgSO ₄ · 7H ₂ O	246
Potassium chloride	KCl	8
Sodium selenite	Na ₂ SeO ₃	0.00219
Vitamin B ₁₂	-	0.001

13.2 試験器具及び装置

試験容器	100 mL ガラス製ビーカー
蓋	透明なプラスチック製の蓋
恒温槽	プラスチック製水槽 加熱・冷却ユニット HCA 250 (佐藤工芸)

13.3 試験液の調製法

必要量の供試試料を秤量 [$C_3H_9N/C_3H_{10}ClN=59.11/95.57$ (61.85%) で換算] し、試験用水に溶解させて試験原液を調製した。調製容器にて必要量の試験原液と試験用水を混合、攪拌して試験液を調製し、各試験容器に分割した。

13.4 試験条件

暴露方式	半止水式 (毎日試験液の全量を交換)
暴露期間	21 日間
試験濃度	20、8.0、3.2、1.3、0.51 mg/L (公比 2.5) 予備試験結果及び不採用本試験結果から試験濃度及び公比を決定した。 予備試験結果を Additional data 1、不採用本試験結果を Additional data 2 に示す。
対照区	被験物質を含まない試験用水
連 数	10 連/試験区
試験生物数	10 頭/試験区 (1 頭/試験容器)
試験液量	800 mL/試験区 (80 mL/試験容器)
水 温	20±1°C
溶存酸素濃度	3 mg/L 以上 (エアレーション無し)
pH 調整	暴露期間中の pH は 6~9、1.5 以内の変動とした。試験液の pH 調整は行わなかった。
全硬度	140 mg/L 以上 (CaCO ₃ 換算)

照 明	室内灯による 16 時間明 (光強度 $15\sim 20\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) / 8 時間暗
給 餌	ミジンコ 1 頭当たり <i>Chlorella vulgaris</i> を $0.1\sim 0.2\text{ mgC}$ (有機炭素含量) / 日の割合で 1 日に 1 回給餌した。

13.5 観察と測定

a) 試験生物の一般状態

暴露開始後から終了時まで毎日、親ミジンコの生死を観察した。肢及び腹部の動きが観察されない場合を死亡とみなした。

親ミジンコが産出した生存幼体数、死亡幼体数を初産日から終了時まで毎日計数した。また、産仔の観察時に、親ミジンコの大きさ、遊泳行動及び外見の異常の有無、雌雄の判別、育房内の卵の有無 (抱卵日)、休眠卵や墮胎卵の有無などを観察した。

b) 試験液の状態

暴露期間中に 1 回、試験液の状態を調製時及び換水前に観察

c) 試験液の水質及び環境条件

測定項目	溶存酸素濃度、pH、水温、全硬度、光強度
測定頻度	水質は暴露期間中に 6 回 (調製時及び換水前のものを 1 回/週の頻度で 3 回繰り返し)、光強度は暴露期間中 1 回測定
測定方法	調製容器より別途分取した試験液について測定 (調製時) 各試験区につき 1 試験容器について測定 (換水前)
測定機器	溶存酸素計 YSI MODEL 58 (YSI Incorporated) ポータブル pH 計 HM-21P (東亜ディーケーケー) 検定済ガラス製棒状温度計 光量子計 LI-250A (LI-COR)
硬度測定	EDTA 滴定法

d) 試験液中の被験物質濃度 (トリメチルアミン濃度)

測定頻度	暴露期間中に 6 回 (調製時及び換水前のものを 1 回/週の頻度で 3 回繰り返し)
採水方法	調製容器より別途分取 (調製時) 各試験区につき 1 試験容器の中層から採取 (換水前)
餌の除去	遠心分離 (3000 rpm、10 分間) (調製時以外)
測定方法	Appendix 1 参照

13.6 結果の算出

暴露期間中に測定した試験液中の被験物質濃度が設定濃度の $\pm 20\%$ 以内であったため、結果の算出には設定濃度を用いた。

a) 親ミジンコの半数致死濃度 (LC_{50})

本試験濃度範囲で 50%以上の死亡率が得られなかったため、 LC_{50} は「>試験最高濃度」と表示した。また、親ミジンコ死亡数の試験区別経時変化のグラフを記載した。

b) 累積生存産仔数

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

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

ここで、

n : 幼体観察回数

F_n : n 回目の生存幼体数

ne : 最終観察回

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

ここで、

m : 試験区当たりの系列数（最大10）

n : 試験容器数

TF_n : 各試験容器（生存親 1 頭当たり）の累積生存産仔数

c) 50%繁殖阻害濃度（ EC_{50} ）

算出された各試験区での生存親ミジンコ 1 頭当たりの平均累積生存産仔数を用いて、Ecotox Statics ver. 2.6 d を用いて Logit 法により 21 日間の 50%繁殖阻害濃度（ EC_{50} ）を算出し、95%信頼限界も算出した。各 EC_{50} の算出には全濃度区を用いた。また、平均累積生存産仔数の試験区別経時変化のグラフを記載した。

d) 最小影響濃度（LOEC）と最大無影響濃度（NOEC）

算出された各試験区での生存親ミジンコ 1 頭当たりの平均累積生存産仔数については、Bartlett 法による等分散検定を行い、Kruskal-Wallis の順位和検定を行い、Dunnett の多重比較法による検定を行った。親ミジンコの死亡数については、Kruskal-Wallis の順位和検定を行い、初産日については、Kruskal-Wallis の順位和検定を行い、Mann-Whitney の U 検定を行った。これらの有意差検定結果から LOEC 及び NOEC を評価した。

有意差検定は、当事業所にて開発したコンピュータプログラム（Microsoft Excel により起動）及び統計処理ソフトウェア（SPSS 16.0J for Windows）を用いて実施した。

13.7 試験の有効性

- a) 暴露終了時に対照群の親ミジンコの死亡率は 20%を超えてはならない。
- b) 暴露終了時に対照群の生存親ミジンコ 1 頭当たりの平均累積生存産仔数は 60 頭以上でなければならない。

13.8 数値の取扱い

数値の丸め方は、JIS Z 8401 : 1999 規則 B に従った。

14. 試験結果

14.1 ミジンコの観察結果

a) 親ミジンコの死亡数及び死亡率

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の結果を Table 1 及び Figure 1 に示す。対照区で親ミジンコ 1 頭の死亡がみられ累積死亡率は 10%であったが、試験成立条件である 20%を超えないという基準を満たしていた。

0.35 mg/L で親ミジンコ 1 頭、23 mg/L で 4 頭の死亡がみられたが、その他の濃度区では親ミジンコに死亡はみられず、対照区と比較して、いずれも有意な差は認められなかった。

b) 初産日

各試験区における親ミジンコの初産日を Table 2 に示す。

対照区での親ミジンコの初産日は平均 9 日であった。

20 mg/L での親ミジンコの初産日は平均 12 日であり、対照区と比較して統計的な有意差が認められた。その他の濃度区での親ミジンコの初産日は平均 8 あるいは 9 日であり、対照区と比較して統計的な有意差は認められなかった。

c) 平均累積生存産仔数

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生存産仔数の結果を Table 3 及び Figure 2、各容器における累積生存産仔数の結果を Appendix 3、有意差検定結果を Table 6 に示す。

対照区の 21 日間での親ミジンコ 1 頭当たりの平均累積生存産仔数は 145 頭であり、有効性基準である 60 頭以上の基準を満たしていた。

0.51、1.3、3.2 及び 8.0 mg/L での親ミジンコ 1 頭当たりの平均累積生存産仔数はそれぞれ 155 頭、150 頭、156 及び 128 頭であり、対照区と比較して統計的な有意差は認められなかった。20 mg/L で親ミジンコ 1 頭当たりの平均累積生存産仔数は 35 頭であり、対照区と比較しても顕著な減少がみられ、さらに統計的な有意差が認められた。

d) 親ミジンコの一般状態

暴露期間中、対照区で異常はみられなかった。0.51、1.3、3.2 及び 8.0 mg/L で成長阻害、体色明化あるいは活動度の低下が、20 mg/L ではさらに、遊泳阻害が観察された。

e) 休眠卵の発生等

暴露期間中、対照区及び濃度区において休眠卵の発生は認められなかった。

対照区、0.51、1.3 及び 8.0 mg/L で墮胎卵が、3.2 及び 8.0 mg/L で死亡幼体が観察された。

14.2 試験液の観察と測定結果

a) 試験液の状態

調製時は全試験濃度区で無色透明であった。換水前ではクロレラの給餌により薄緑色を呈していた。

b) 試験液の水質

試験液の温度を Table 7、溶存酸素濃度を Table 8、pH を Table 9、全硬度を Table 10 に示す。

暴露期間中に測定した水温は 19.8～20.0℃であり、20±1℃の範囲であった。溶存酸素濃度は 8.4～9.0 mg/L であり、3 mg/L を超えていた。pH は 8.0～8.4 で 6～9 の範囲内であり、1.5 以内の変動であった。全硬度は 166.7～170.3 mgCaCO₃/L であり、140 mgCaCO₃/L を超

えていた。光強度は $15 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ であり、 $15 \sim 20 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ の範囲内であった。以上のことから、水温、溶存酸素濃度、pH、全硬度及び光強度について、環境条件として適正範囲であったと考えられる。

c) 試験液中の被験物質濃度（トリメチルアミン濃度）

被験物質濃度の測定結果を Appendix 1、クロマトグラムの一部を Appendix 2 に示す。

測定した試験液中の被験物質濃度は、調製時では $0.51 \sim 20 \text{ mg/L}$ 、換水前は $0.47 \sim 20 \text{ mg/L}$ であった。換水前あるいは暴露終了時の被験物質濃度は、設定濃度の $91 \sim 102\%$ の範囲であった。

14.3 親ミジンコに対する LC_{50}

14 及び 21 日間の親ミジンコの LC_{50} を Table 4 に示す。

親ミジンコに対する 14 及び 21 日間 LC_{50} は共に $>20 \text{ mg/L}$ であった。

14.4 50%繁殖阻害濃度 (EC_{50})

21 日間の EC_{50} を Table 5 に示す。

21 日間の EC_{50} は 14 mg/L であった。

14.5 考 察

被験物質（トリメチルアミン）は常温でガスであり、取り扱いが困難であるため、試験委託者と協議の上、試験実施上の操作性などを考慮して供試試料としてトリメチルアミン塩酸塩を用い、トリメチルアミン濃度に換算して評価した。

本試験は半止水式（毎日換水）にて暴露を実施した。その結果、被験物質のミジンコ繁殖に対する影響は、 NOEC は 8.0 mg/L 、 LOEC は 20 mg/L であった。

暴露期間中、試験液中の被験物質濃度は設定濃度を維持していた。

試験環境条件は適切な範囲内であったことから、本試験は試験法に準じたものであったと判断される。

15. 試験成績の信頼性に影響を及ぼしたと思われる環境要因

当該要因はなかった。

Table 1 Cumulative number of dead parental *Daphnia* during exposure

Nominal concentration (mg/L)	Exposure time (day)										
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Control	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)
0.51	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)
1.3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(10)
3.2	0	0	0	0	0	0	0	2	2	2	2
	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(20)	(20)	(20)	(20)
8.0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	2
	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(20)	(20)	(20)
20	0	0	0	0	0	0	1	1	2	2	2
	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(10)	(10)	(20)	(20)	(20)

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

Table 1 continued

Nominal concentration (mg/L)	Exposure time (day)										
	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
Control	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	(0)	(10)	(10)	(10)	(10)	(10)	(10)	(10)	(10)	(10)	(10)
0.51	0	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2
	(0)	(10)	(10)	(10)	(20)	(20)	(20)	(20)	(20)	(20)	(20)
1.3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	(10)	(10)	(10)	(10)	(10)	(10)	(10)	(10)	(10)	(10)	(10)
3.2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	(20)	(20)	(20)	(20)	(20)	(20)	(20)	(20)	(20)	(20)	(20)
8.0	2	2	2	2	2	3	3	3	3	3	3
	(20)	(20)	(20)	(20)	(20)	(30)	(30)	(30)	(30)	(30)	(30)
20	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	(20)	(20)	(20)	(20)	(20)	(20)	(20)	(20)	(20)	(20)	(20)

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

Table 2 Time (days) required to first brood production during exposure

Nominal concentration (mg/L)	Vessel No.										Mean
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
Control	7	7	9	9	9	8	9	9	9	8	8
0.51	9	9	9	9	9	9	9	9	-	9	9
1.3	9	9	8	9	9	9	9	9	9	12	9
3.2	7	9	8	9	8	9	9	-	8	-	8
8.0	-	8	-	9	8	9	9	9	9	10	9
20	16	17	11	-	-	11	10	10	10	10	12**

-: no production of brood

**: Significantly different from control at $p < 0.01$

Table 3 Mean cumulative number of juveniles produced per adult alive during exposure

Nominal concentration (mg/L)	Exposure time (day)										
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Control	0	0	0	0	0	0	0	3	8	19	24
0.51	0	0	0	0	0	0	0	0	0	22	22
1.3	0	0	0	0	0	0	0	0	2	21	21
3.2	0	0	0	0	0	0	0	2	8	19	22
8.0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	15	18
20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2

Table 3 continued

Nominal concentration (mg/L)	Exposure time (day)										
	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
Control	32	52	52	72	96	96	113	114	130	140	145
0.51	22	60	60	60	107	107	107	118	145	145	155
1.3	25	58	59	64	100	105	109	134	142	143	150
3.2	34	53	53	74	96	96	117	131	135	147	156
8.0	24	36	39	50	58	73	87	93	110	115	128
20	2	2	2	3	3	6	13	13	21	35	35

Table 4 Calculated LC₅₀ values for parental *Daphnia* based on measured concentration

Exposure duration (day)	LC ₅₀ (mg/L)	95% confidence interval (mg /L)	Statistical procedure used for determination of LC ₅₀
14	>20	-	-
21	>20	-	-

- : Not obtained

Table 5 Calculated EC₅₀ values for inhibition of reproduction based on measured concentration

Exposure duration (day)	EC ₅₀ (mg/L)	95% confidence interval (mg/L) (Slope of the dose-response curve)	Statistical procedure used for determination of EC ₅₀
21	14	13 to 16 (-)	Logit analysis

- : Not obtained

Table 6 Significance test of difference between the mean cumulative number of juveniles produced per adult alive in control and test vessels after 21-day exposure

Nominal concentration (mg/L)	Vessel No.						
	1	2	3	4	5	6	7
Control	144	170	145	132	125	159	141
0.51	135	149	-	153	193	150	177
1.3	-	166	172	160	137	163	128
3.2	146	131	177	140	168	148	179
8.0	-	160	-	130	171	70	-
20	30	46	47	-	-	45	33

- : This data is not used, because parental *Daphnia* died.

Table 6. continued

Nominal concentration (mg/L)	Vessel No.			Mean	S.D.
	8	9	10		
Control	-	116	170	145	19
0.51	137	-	143	155	20
1.3	208	154	65	150	39
3.2	-	157	-	156	18
8.0	160	106	97	128	38
20	22	20	38	35**	11

** : Significantly different from control at $p < 0.01$

- : This data is not used, because parental *Daphnia* died.

Table 7 Temperature of test solutions during 21-day *Daphnia* reproduction test

Nominal concentration (mg/L)		Temperature (°C)					
		0-day	1-day	7-day	8-day	16-day	17-day
Control	New	20.0		20.0		19.9	
	Old		20.0		20.0		19.8
0.51	New	20.0		20.0		19.9	
	Old		20.0		20.0		19.8
1.3	New	20.0		20.0		19.9	
	Old		19.9		20.0		19.8
3.2	New	20.0		20.0		19.9	
	Old		19.9		20.0		19.8
8.0	New	20.0		20.0		19.9	
	Old		19.9		20.0		19.8
20	New	20.0		20.0		19.9	
	Old		19.9		20.0		19.8

New: freshly prepared test solutions

Old: test solutions before renewal

Table 8 Dissolved oxygen concentration of test solutions during 21-day *Daphnia* reproduction test

Nominal concentration (mg/L)		Dissolved oxygen concentration (mg/L)					
		0-day	1-day	7-day	8-day	16-day	17-day
Control	New	8.7		8.7		8.6	
	Old		8.9		8.5		8.4
0.51	New	8.7		8.7		8.6	
	Old		8.9		8.5		8.4
1.3	New	8.6		8.7		8.6	
	Old		9.0		8.5		8.4
3.2	New	8.6		8.7		8.6	
	Old		9.0		8.6		8.4
8.0	New	8.7		8.7		8.6	
	Old		9.0		8.6		8.4
20	New	8.7		8.6		8.6	
	Old		9.0		8.5		8.4

New: freshly prepared test solutions

Old: test solutions before renewal

Table 9 pH values of test solutions during 21-day *Daphnia* reproduction test

Nominal concentration (mg/L)		pH					
		0-day	1-day	7-day	8-day	16-day	17-day
Control	New	8.1		8.1		8.1	
	Old		8.3		8.1		8.1
0.51	New	8.2		8.0		8.1	
	Old		8.3		8.1		8.1
1.3	New	8.2		8.0		8.1	
	Old		8.4		8.1		8.1
3.2	New	8.2		8.0		8.1	
	Old		8.3		8.1		8.1
8.0	New	8.1		8.0		8.1	
	Old		8.3		8.1		8.1
20	New	8.1		8.0		8.1	
	Old		8.3		8.2		8.2

New: freshly prepared test solutions

Old: test solutions before renewal

Table 10 Total hardness values of test solutions during 21-day *Daphnia* reproduction test

Nominal concentration (mg/L)		Total hardness (mg CaCO ₃ /L)					
		0-day	1-day	7-day	8-day	16-day	17-day
Control	New	166.7		168.7		167.7	
	Old		168.7		168.7		167.7
0.51	New	166.7		167.7		167.7	
	Old		167.7		166.7		169.7
1.3	New	166.7		166.7		167.7	
	Old		167.3		168.7		168.7
3.2	New	166.7		167.7		167.7	
	Old		166.7		167.7		168.3
8.0	New	167.3		166.7		167.7	
	Old		167.3		167.7		169.7
20	New	167.3		166.7		167.3	
	Old		166.7		168.7		170.3

New: freshly prepared test solutions

Old: test solutions before renewal

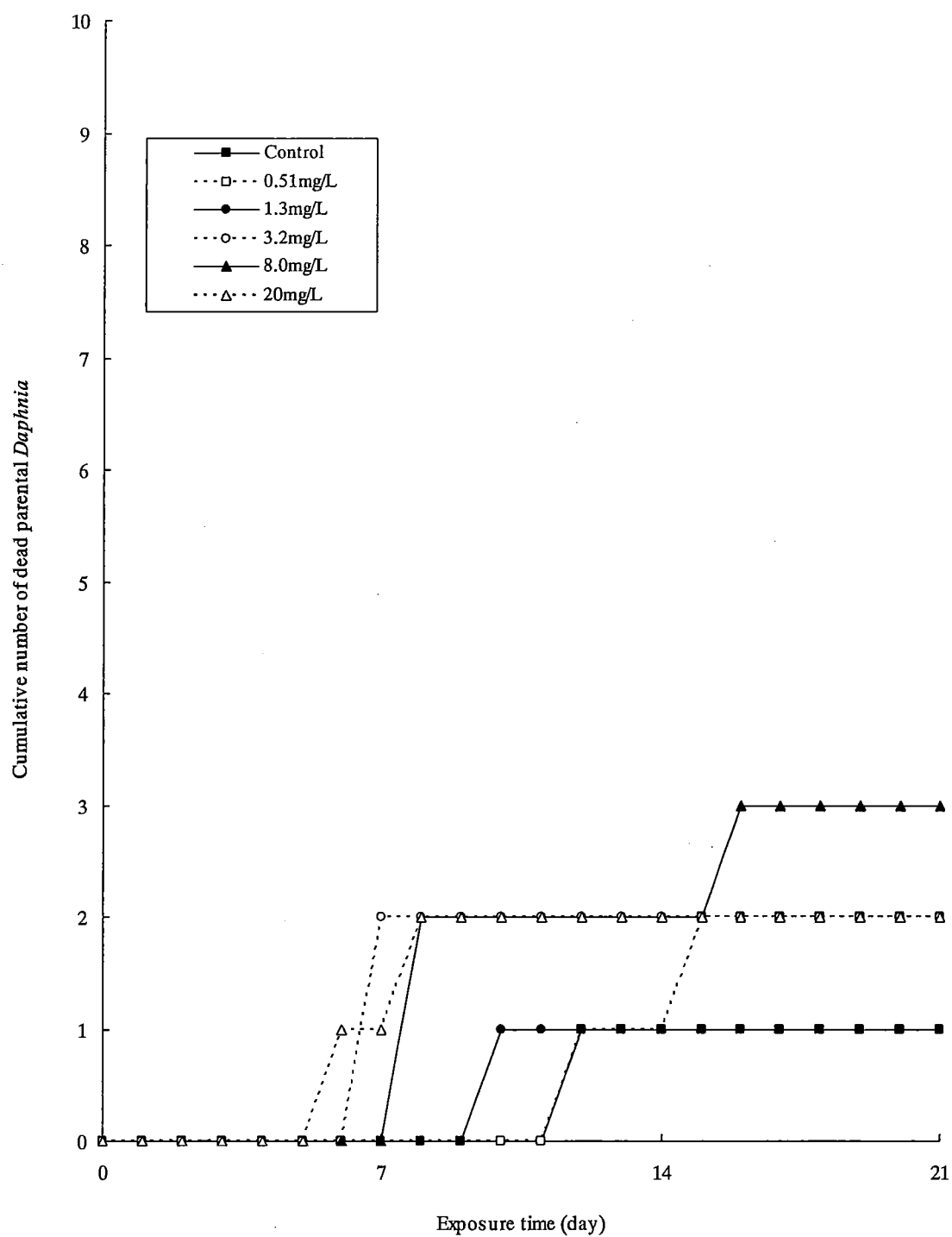


Figure 1 Cumulative number of dead parental *Daphnia* during exposure.

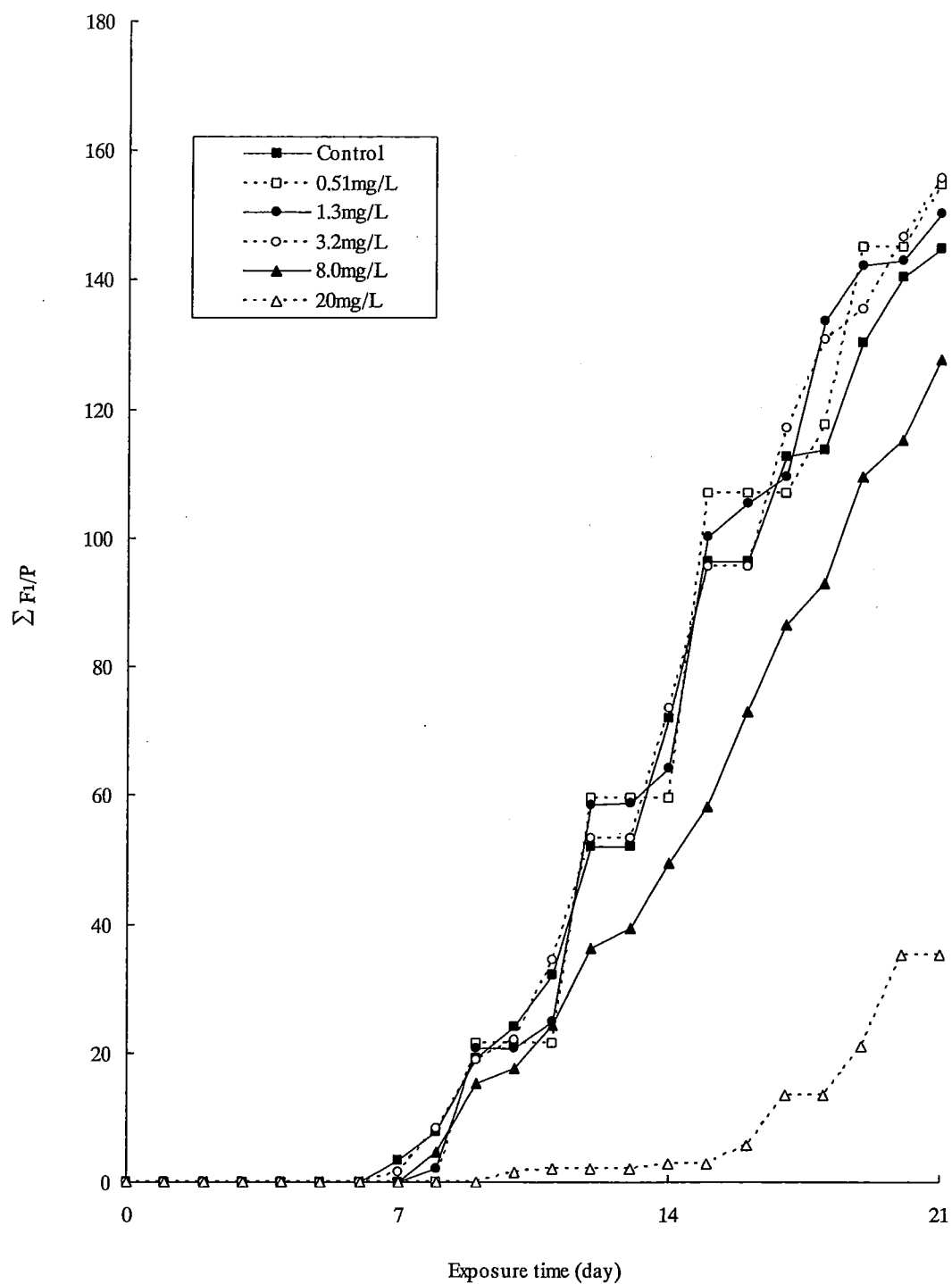


Figure 2 Mean cumulative number of alive juveniles produce per adult alive.

Appendix 1



被験物質濃度の測定方法及び結果

1. 試験液の前処理操作

採取した試験液をそのまま若しくは ASTM 調製水で適宜希釈して、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）試料を調製した。

2. 被験物質濃度の測定

HPLC 試料中の被験物質濃度は、クロマトグラム上で得られた濃度既知の標準溶液のピーク面積と HPLC 試料のピーク面積とを比較し、比例計算して求めた。得られたクロマトグラム（一例）を Appendix 2 に示す。

定量条件

機 器	高速液体クロマトグラフ	
ポンプ	LC-20AD _{SP}	（島津製作所）
電気伝導度検出器	CDD-10A _{SP}	（島津製作所）
カラムオープン	CTO-20A _{CSP}	（島津製作所）
オートインジェクター	SIL-20A	（島津製作所）
システムコントローラー	SCL-10A _{VP}	（島津製作所）
デガッサー	DGU-20A ₃	（島津製作所）
カラム	Shim-pak IC-C4（150 mm × 4.6 mm I.D., 島津製作所）	
カラム温度	40°C	
溶離液	2.5 mmol/L しゅう酸溶液	
流 量	1.0 mL/min	
注入量	100 μL	

3. 標準溶液の調製

供試試料 162 mg を正確にはかりとり、超純水に溶解して 1000 mg/L の被験物質溶液を調製した。これを ASTM 調製水で希釈して 1.0 mg/L の標準溶液を調製した。

なお、供試試料の秤量は被験物質含有量 61.85% で換算（ $C_3H_9N/C_3H_{10}ClN=59.11/95.57$ ）して行った。

4. 検量線の作成

3. の標準溶液の調製と同様にして 0.10、0.50、1.0 及び 2.0 mg/L の標準溶液を調製した。これらを 2. の定量条件に従って分析し、得られたそれぞれのクロマトグラム上のピーク面積と被験物質濃度により検量線を作成した。作成した検量線を Appendix 2 に示す。なお、試験液中の被験物質の定量下限値は、定量性が確認された範囲での標準溶液の最低濃度（0.10 mg/L）とした。

5. 測定結果

試験液中の被験物質濃度の測定結果を以下に示す。

Appendix table 1-1 Measured concentrations of test item in test solutions

Nominal concentration (mg/L)	Measured concentration (mg/L) (Percentage of measured concentration versus nominal concentration %)						
	At the start	1 day old	7 days new	8 days old	16 days new	17 days old	Geometric mean
Control	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
0.51	0.54 (105)	0.52 (102)	0.51 (100)	0.50 (99)	0.52 (102)	0.47 (91)	0.51 (100)
1.3	1.4 (104)	1.3 (99)	1.3 (102)	1.3 (98)	1.3 (101)	1.2 (95)	1.3 (100)
3.2	3.3 (103)	3.2 (99)	3.2 (100)	3.1 (98)	3.2 (101)	3.1 (95)	3.2 (99)
8.0	7.3 (91)	7.9 (99)	8.0 (101)	7.9 (99)	8.1 (101)	7.3 (92)	7.8 (97)
20	20 (98)	20 (100)	20 (102)	20 (99)	20 (101)	19 (96)	20 (99)

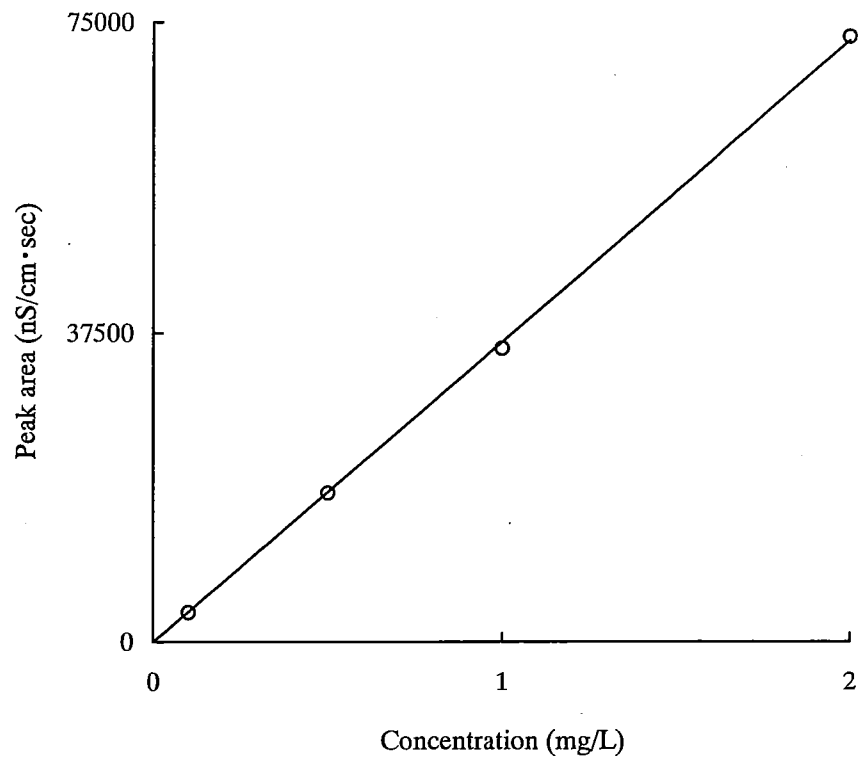
old : before the renewal

new : after the renewal

n.d. : < 0.10 mg/L

Appendix 2

検量線及びクロマトグラム



$$y = 36366x$$

$$r = 1.00$$

Concentration (mg/L)	Peak area (nS/cm·sec)
0.10	3523
0.50	18026
1.0	35560
2.0	73180

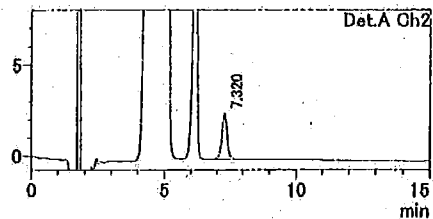
Appendix figure 2-1 Calibration curve of test item for analysis by HPLC.

Study No. 95279

サンプル名 : Standard solution 1.0 mg/L
データファイル : 95279-110228-S01.lcd

ピークテーブル D:_¥95279-110228¥95279-110228-S01.lcd

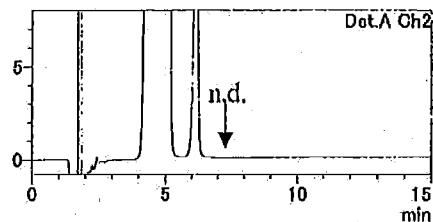
検出器A	ピーク#	保持時間	面積	高さ
1	7.320	35757	2494	

D:_¥95279-110228¥95279-110228-S01.lcd
uS/cm

サンプル名 : Control
データファイル : 95279-110228-H0dZ.lcd

ピークテーブル D:_¥95279-110228¥95279-110228-H0dZ.lcd

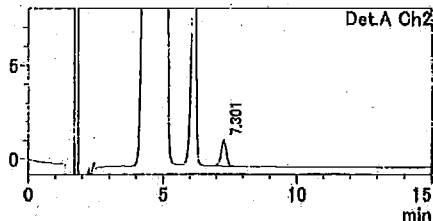
検出器A	ピーク#	保持時間	面積	高さ
1	0.000	0	0	

D:_¥95279-110228¥95279-110228-H0dZ.lcd
uS/cm

サンプル名 : 0.51 mg/L exposure level
データファイル : 95279-110228-H0dE.lcd

ピークテーブル D:_¥95279-110228¥95279-110228-H0dE.lcd

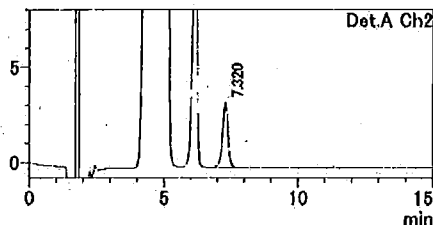
検出器A	ピーク#	保持時間	面積	高さ
1	7.301	19175	1064	

D:_¥95279-110228¥95279-110228-H0dE.lcd
uS/cm

サンプル名 : 1.3 mg/L exposure level
データファイル : 95279-110228-H0dD.lcd

ピークテーブル D:_¥95279-110228¥95279-110228-H0dD.lcd

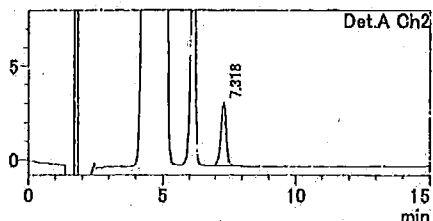
検出器A	ピーク#	保持時間	面積	高さ
1	7.320	48357	3354	

D:_¥95279-110228¥95279-110228-H0dD.lcd
uS/cm

サンプル名 : 3.2 mg/L exposure level
データファイル : 95279-110228-H0dG.lcd

ピークテーブル D:_¥95279-110228¥95279-110228-H0dG.lcd

検出器A	ピーク#	保持時間	面積	高さ
1	7.318	47027	3272	

D:_¥95279-110228¥95279-110228-H0dG.lcd
uS/cm

Date: 2011.2.28

Name: [REDACTED]

Appendix figure 2-2-1 HPLC chromatograms at start of exposure.

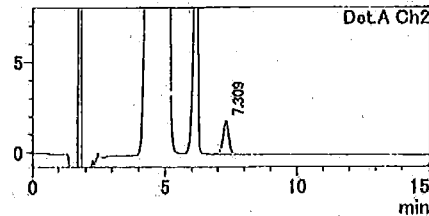
Study No. 95279

サンプル名 : 8.0 mg/L exposure level
 データファイル : 95279-110228-H0dB.lcd

ピークテーブル D:_Y95279-110228\Y95279-110228-H0dB.lcd

検出数A	ピーク	保持時間	面積	高さ
1		7.309	26136	1833

D:_Y95279-110228\Y95279-110228-H0dB.lcd
 uS/cm

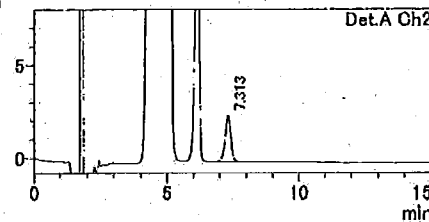


サンプル名 : 20 mg/L exposure level
 データファイル : 95279-110228-H0dA.lcd

ピークテーブル D:_Y95279-110228\Y95279-110228-H0dA.lcd

検出数A	ピーク	保持時間	面積	高さ
1		7.313	34903	2438

D:_Y95279-110228\Y95279-110228-H0dA.lcd
 uS/cm



Date: 2011. 2. 24

Name: [REDACTED]

Appendix figure 2-2-2 HPLC chromatograms at start of exposure.

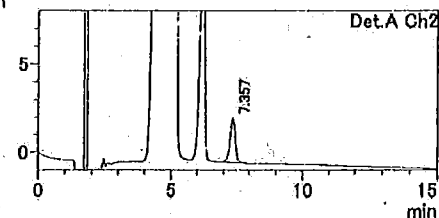
Study No. 95279

サンプル名 : Standard solution 1.0 mg/L
データファイル : 95279-110301-S01.lcd

ピークテーブル D:_¥95279-110301¥95279-110301-S01.lcd

検出器A	ピーク#	保持時間	面積	高さ
1	1	7.357	34959	2461

D:_¥95279-110301¥95279-110301-S01.lcd
uS/cm

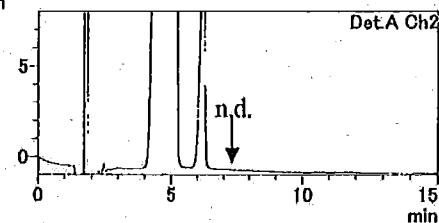


サンプル名 : Control
データファイル : 95279-110301-H1dZ.lcd

ピークテーブル D:_¥95279-110301¥95279-110301-H1dZ.lcd

検出器A	ピーク#	保持時間	面積	高さ
1	1	0.000	0	0

D:_¥95279-110301¥95279-110301-H1dZ.lcd
uS/cm

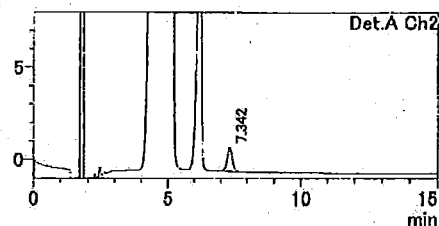


サンプル名 : 0.51 mg/L exposure level
データファイル : 95279-110301-H1dE.lcd

ピークテーブル D:_¥95279-110301¥95279-110301-H1dE.lcd

検出器A	ピーク#	保持時間	面積	高さ
1	1	7.342	18123	1281

D:_¥95279-110301¥95279-110301-H1dE.lcd
uS/cm

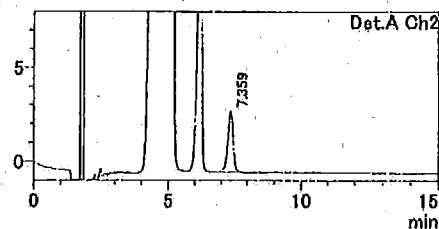


サンプル名 : 1.3 mg/L exposure level
データファイル : 95279-110301-H1dD.lcd

ピークテーブル D:_¥95279-110301¥95279-110301-H1dD.lcd

検出器A	ピーク#	保持時間	面積	高さ
1	1	7.359	45034	3155

D:_¥95279-110301¥95279-110301-H1dD.lcd
uS/cm

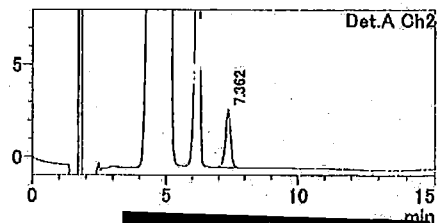


サンプル名 : 3.2 mg/L exposure level
データファイル : 95279-110301-H1dC.lcd

ピークテーブル D:_¥95279-110301¥95279-110301-H1dC.lcd

検出器A	ピーク#	保持時間	面積	高さ
1	1	7.362	44271	3100

D:_¥95279-110301¥95279-110301-H1dC.lcd
uS/cm



Date: 2011.3.1

Name: [REDACTED]

Appendix figure 2-3-1 HPLC chromatograms at 1 day after exposure (before renewal).

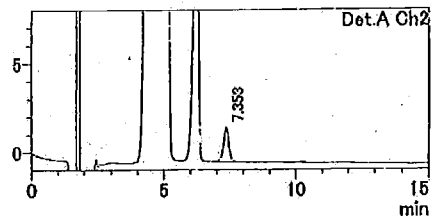
Study No. 95279

サンプル名 : 8.0 mg/L exposure level
 データファイル : 95279-110301-H1dB.lcd

ピークテーブル D:\¥95279-110301¥95279-110301-H1dB.lcd
 検出器A

ピーク#	保持時間	面積	高さ
1	7.353	27660	1976

D:\¥95279-110301¥95279-110301-H1dB.lcd
 uS/cm

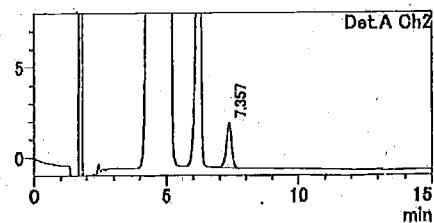


サンプル名 : 20 mg/L exposure level
 データファイル : 95279-110301-H1dA.lcd

ピークテーブル D:\¥95279-110301¥95279-110301-H1dA.lcd
 検出器A

ピーク#	保持時間	面積	高さ
1	7.357	35039	2474

D:\¥95279-110301¥95279-110301-H1dA.lcd
 uS/cm



Date: 2011. 3. 1

Name: [REDACTED]

Appendix figure 2-3-2 HPLC chromatograms at 1 day after exposure (before renewal).

Appendix 3



個体別産出幼体数

(

Appendix table 3-1 Result of reproduction test

Control

Rep. No.	Counts		Time																					Total
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	
1	F ₁ generation	Live	0	0	0	0	0	0	12	7	0	0	29	0	0	37	0	0	30	0	0	0	29	144
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Total	0	0	0	0	0	0	12	7	0	0	29	0	0	37	0	0	30	0	0	0	29	144
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	12	19	19	19	48	48	48	85	85	85	115	115	115	115	144	
2	F ₁ generation	Live	0	0	0	0	0	0	18	0	0	27	2	0	0	48	0	0	42	0	0	23	10	170
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Total	0	0	0	0	0	0	18	0	0	27	2	0	0	48	0	0	42	0	0	23	10	170
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	18	18	18	45	47	47	47	95	95	95	137	137	137	160	170	
3	F ₁ generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0	24	0	0	43	0	0	46	0	0	0	32	0	0	145
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Total	0	0	0	0	0	0	0	0	24	0	0	43	0	0	46	0	0	0	32	0	0	145
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	24	24	24	67	67	67	113	113	113	113	145	145	145	
4	F ₁ generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0	23	0	0	39	0	0	47	0	0	0	23	0	0	132
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Total	0	0	0	0	0	0	0	0	23	0	0	39	0	0	47	0	0	0	23	0	0	132
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	23	23	23	62	62	62	109	109	109	109	132	132	132	
5	F ₁ generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0	25	0	0	37	0	0	28	0	0	7	28	0	0	125
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Total	0	0	0	0	0	0	0	0	25	0	0	37	0	0	28	0	0	7	28	0	0	125
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	25	25	25	62	62	62	90	90	90	97	125	125	125	
6	F ₁ generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	16	0	18	8	0	0	47	0	0	39	0	0	31	0	159
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Total	0	0	0	0	0	0	0	16	0	18	8	0	0	47	0	0	39	0	0	31	0	159
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	16	16	34	42	42	42	89	89	89	128	128	128	159	159	
7	F ₁ generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0	16	0	0	39	0	0	49	0	0	3	34	0	0	141
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Total	0	0	0	0	0	0	0	0	16	0	0	39	0	0	49	0	0	3	34	0	0	141
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	16	16	16	55	55	55	104	104	104	107	141	141	141	

Appendix table 3-1 Continued

Control

Rep. No.	Counts		Time																					Total
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	
8	F ₁ generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0	19	0	0	M(43)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(62)
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(0)
		Total	0	0	0	0	0	0	0	0	19	0	0	(43)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(62)
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	19	19	19	62	62	62	62	62	62	62	62	62	62	
9	F ₁ generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0	14	0	0	21	0	0	48	0	0	0	33	0	0	116
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Total	0	0	0	0	0	0	0	0	14	0	0	21	0	0	48	0	0	0	33	0	0	116
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	14	14	14	35	35	35	83	83	83	83	116	116	116	
10	F ₁ generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	17	0	0	33	0	0	48	0	0	36	0	0	36	0	170
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Total	0	0	0	0	0	0	0	17	0	0	33	0	0	48	0	0	36	0	0	36	0	170
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	17	17	17	50	50	50	98	98	98	134	134	134	170	170	

M: mortality of parental *Daphnia*

The values in parentheses express number of juveniles

Appendix table 3-2 Result of reproduction test

0.51 mg/L

Rep. No.	Counts		Time																					Total
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	
1	F ₁ generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0	23	0	0	34	0	0	41	0	0	0	37	0	0	135
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Total	0	0	0	0	0	0	0	0	23	0	0	34	0	0	41	0	0	0	37	0	0	135
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	23	23	23	57	57	57	98	98	98	98	135	135	135	
2	F ₁ generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0	24	0	0	41	0	0	44	0	0	0	40	0	0	149
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Total	0	0	0	0	0	0	0	0	24	0	0	41	0	0	44	0	0	0	40	0	0	149
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	24	24	24	65	65	65	109	109	109	109	149	149	149	
3	F ₁ generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0	25	0	0	44	0	0	M(44)	-	-	-	-	-	-	(113)
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	(0)
		Total	0	0	0	0	0	0	0	0	25	0	0	44	0	0	(44)	-	-	-	-	-	-	(113)
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	25	25	25	69	69	69	113	113	113	113	113	113	113	
4	F ₁ generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0	27	0	0	37	0	0	49	0	0	4	36	0	0	153
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Total	0	0	0	0	0	0	0	0	27	0	0	37	0	0	49	0	0	4	36	0	0	153
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	27	27	27	64	64	64	113	113	113	117	153	153	153	
5	F ₁ generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0	17	0	0	45	0	0	54	0	0	40	0	0	37	193
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Total	0	0	0	0	0	0	0	0	17	0	0	45	0	0	54	0	0	40	0	0	37	193
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	17	17	17	62	62	62	116	116	116	156	156	156	193	
6	F ₁ generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0	24	0	0	41	0	0	48	0	0	0	37	0	0	150
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Total	0	0	0	0	0	0	0	0	24	0	0	41	0	0	48	0	0	0	37	0	0	150
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	24	24	24	65	65	65	113	113	113	113	150	150	150	
7	F ₁ generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0	14	0	0	35	0	0	48	0	0	40	0	0	40	177
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Total	0	0	0	0	0	0	0	0	14	0	0	35	0	0	48	0	0	40	0	0	40	177
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	14	14	14	49	49	49	97	97	97	137	137	137	177	

M: mortality of parental *Daphnia*

The values in parentheses express number of juveniles

Appendix table 3-2 Continued

0.51 mg/L

Rep. No.	Counts	Time																					Total
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	
8	F ₁ generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	21	0	0	31	0	0	50	0	0	0	35	0	0	137
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Total	0	0	0	0	0	0	0	21	0	0	31	0	0	50	0	0	0	35	0	0	137
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	21	21	21	52	52	52	102	102	102	102	137	137	137	
9	F ₁ generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(0)
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(0)
		Total	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(0)
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
10	F ₁ generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	22	0	0	41	0	0	45	0	0	0	35	0	0	143
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Total	0	0	0	0	0	0	0	22	0	0	41	0	0	45	0	0	0	35	0	0	143
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	22	22	22	63	63	63	108	108	108	108	143	143	143	

M: mortality of parental *Daphnia*

The values in parentheses express number of juveniles

Appendix table 3-3 Result of reproduction test

1.3 mg/L

Rep. No.	Counts		Time																					Total
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	
1	F ₁ generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0	16	M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(16)
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(0)
	Total		0	0	0	0	0	0	0	0	16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(16)
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	
2	F ₁ generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0	30	0	0	47	0	0	50	0	0	39	0	0	0	166
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Total		0	0	0	0	0	0	0	0	30	0	0	47	0	0	50	0	0	39	0	0	0	166
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	30	30	30	77	77	77	127	127	127	166	166	166	166	
3	F ₁ generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	18	0	0	37	0	0	50	0	0	36	0	0	7	24	172
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Total		0	0	0	0	0	0	0	18	0	0	37	0	0	50	0	0	36	0	0	7	24	172
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	18	18	18	55	55	55	105	105	105	141	141	141	148	172	
4	F ₁ generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0	26	0	0	43	0	0	44	0	0	47	0	0	0	160
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Total		0	0	0	0	0	0	0	0	26	0	0	43	0	0	44	0	0	47	0	0	0	160
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	26	26	26	69	69	69	113	113	113	160	160	160	160	
5	F ₁ generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0	21	0	0	32	0	0	47	0	0	37	0	0	0	137
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Total		0	0	0	0	0	0	0	0	21	0	0	32	0	0	47	0	0	37	0	0	0	137
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	21	21	21	53	53	53	100	100	100	137	137	137	137	
6	F ₁ generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0	26	0	0	45	2	0	49	0	0	41	0	0	0	163
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Total		0	0	0	0	0	0	0	0	26	0	0	45	2	0	49	0	0	41	0	0	0	163
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	26	26	26	71	73	73	122	122	122	163	163	163	163	
7	F ₁ generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0	14	0	0	37	1	0	0	48	0	0	28	0	0	128
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Total		0	0	0	0	0	0	0	0	14	0	0	37	1	0	0	48	0	0	28	0	0	128
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	14	14	14	51	52	52	52	100	100	100	128	128	128	

M: mortality of parental *Daphnia*

The values in parentheses express number of juveniles

Appendix table 3-3 Continued

1.3 mg/L

Rep. No.	Counts	Time																					Total	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21		
8	F ₁ generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0	24	0	0	45	0	0	49	0	0	47	0	0	43	208
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Total	0	0	0	0	0	0	0	0	0	24	0	0	45	0	0	49	0	0	47	0	0	43	208
	Cumulative reproductivity	0	0	0	0	0	0	0	0	0	24	24	24	69	69	69	118	118	118	165	165	165	208	
9	F ₁ generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0	27	0	0	44	0	0	42	0	0	0	41	0	0	154
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Total	0	0	0	0	0	0	0	0	0	27	0	0	44	0	0	42	0	0	0	41	0	0	154
	Cumulative reproductivity	0	0	0	0	0	0	0	0	0	27	27	27	71	71	71	113	113	113	113	154	154	154	
10	F ₁ generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	0	0	41	0	0	6	8	0	0	65
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Total	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	0	0	41	0	0	6	8	0	0	65
	Cumulative reproductivity	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	10	10	51	51	51	57	65	65	65	

Appendix table 3-4 Result of reproduction test

3.2 mg/L

Rep. No.	Counts		Time																					Total
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	
1	F ₁ generation	Live	0	0	0	0	0	0	13	0	0	25	0	0	0	40	0	0	43	0	0	25	0	146
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Total	0	0	0	0	0	0	13	0	0	25	0	0	0	40	0	0	43	0	0	25	0	146
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	13	13	13	38	38	38	38	78	78	78	121	121	121	146	146	
2	F ₁ generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0	25	0	0	30	0	0	40	0	0	0	36	0	0	131
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Total	0	0	0	0	0	0	0	0	25	0	0	30	0	0	40	0	0	0	36	0	0	131
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	25	25	25	55	55	55	95	95	95	95	131	131	131	
3	F ₁ generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	19	0	0	39	0	0	42	0	0	41	0	0	0	36	177
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Total	0	0	0	0	0	0	0	19	0	0	39	0	0	42	0	0	41	0	0	0	36	177
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	19	19	19	58	58	58	100	100	100	141	141	141	141	177	
4	F ₁ generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0	20	0	0	44	0	0	43	0	0	33	0	0	0	140
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Total	0	0	0	0	0	0	0	0	20	0	0	44	0	0	43	0	0	33	0	0	0	140
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	20	20	20	64	64	64	107	107	107	140	140	140	140	
5	F ₁ generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	17	0	0	28	0	0	46	0	0	44	0	0	33	0	168
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
		Total	0	0	0	0	0	0	0	17	0	0	29	0	0	46	0	0	44	0	0	33	0	169
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	17	17	17	45	45	45	91	91	91	135	135	135	168	168	
6	F ₁ generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0	21	0	0	43	0	0	48	0	0	36	0	0	0	148
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Total	0	0	0	0	0	0	0	0	21	0	0	43	0	0	48	0	0	36	0	0	0	148
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	21	21	21	64	64	64	112	112	112	148	148	148	148	
7	F ₁ generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0	19	0	0	35	0	0	45	0	0	42	0	0	38	179
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
		Total	0	0	0	0	0	0	0	0	19	0	0	36	0	0	45	0	0	42	0	0	38	180
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	19	19	19	54	54	54	99	99	99	141	141	141	179	

Appendix table 3-4 Continued

3.2 mg/L

Rep. No.	Counts	Time																					Total	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21		
8	F ₁ generation	Live	0	0	0	0	0	0	M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(0)
		Dead	0	0	0	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(0)
		Total	0	0	0	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(0)
	Cumulative reproductivity	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
9	F ₁ generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	17	0	0	32	0	0	34	0	0	43	0	0	31	0	157
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Total	0	0	0	0	0	0	0	17	0	0	32	0	0	34	0	0	43	0	0	31	0	157
	Cumulative reproductivity	0	0	0	0	0	0	0	17	17	17	49	49	49	83	83	83	126	126	126	157	157		
10	F ₁ generation	Live	0	0	0	0	0	0	M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(0)
		Dead	0	0	0	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(0)
		Total	0	0	0	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(0)
	Cumulative reproductivity	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

M: mortality of parental *Daphnia*

The values in parentheses express number of juveniles

Appendix table 3-5 Result of reproduction test

8.0 mg/L

Rep. No.	Counts		Time																					Total
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	
1	F ₁ generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(0)
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(0)
		Total	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(0)
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
2	F ₁ generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	15	0	0	18	0	0	33	0	0	47	0	0	0	47	160
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Total	0	0	0	0	0	0	0	15	0	0	18	0	0	33	0	0	47	0	0	0	47	160
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	15	15	15	33	33	33	66	66	66	113	113	113	113	160	
3	F ₁ generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(0)
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(0)
		Total	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(0)
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
4	F ₁ generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0	22	0	0	29	0	0	0	40	0	0	39	0	0	130
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Total	0	0	0	0	0	0	0	0	22	0	0	29	0	0	0	40	0	0	39	0	0	130
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	22	22	22	51	51	51	51	91	91	91	130	130	130	
5	F ₁ generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	17	0	0	28	0	0	38	0	0	48	0	0	40	0	171
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Total	0	0	0	0	0	0	0	17	0	0	28	0	0	38	0	0	48	0	0	40	0	171
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	17	17	17	45	45	45	83	83	83	131	131	131	171	171	
6	F ₁ generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0	14	0	0	9	0	0	29	0	0	0	18	0	0	70
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Total	0	0	0	0	0	0	0	0	14	0	0	9	0	0	29	0	0	0	18	0	0	70
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	14	14	14	23	23	23	52	52	52	52	70	70	70	
7	F ₁ generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0	19	0	0	20	0	0	26	M	-	-	-	-	-	(65)
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-	-	-	-	(0)
		Total	0	0	0	0	0	0	0	0	19	0	0	20	0	0	26	-	-	-	-	-	-	(65)
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	19	19	19	39	39	39	65	65	65	65	65	65	65	

M: mortality of parental *Daphnia*

The values in parentheses express number of juveniles

Appendix table 3-5 Continued

8.0 mg/L

Rep. No.	Counts	Time																					Total	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21		
8	F ₁ generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0	19	0	0	24	0	0	32	0	0	45	0	0	40	160
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		Total	0	0	0	0	0	0	0	0	19	0	0	24	0	0	32	0	0	45	0	0	40	160
	Cumulative reproductivity	0	0	0	0	0	0	0	0	19	19	19	43	43	43	75	75	75	120	120	120	160		
9	F ₁ generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0	20	0	0	21	0	0	0	33	0	0	32	0	0	106
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		Total	0	0	0	0	0	0	0	0	20	0	0	21	0	0	0	33	0	0	32	0	0	106
	Cumulative reproductivity	0	0	0	0	0	0	0	0	20	20	20	41	41	41	41	74	74	74	106	106	106		
10	F ₁ generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0	17	0	0	23	0	0	30	0	0	27	0	0	97	
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	
		Total	0	0	0	0	0	0	0	0	0	18	0	0	23	0	0	30	0	0	27	0	0	98
	Cumulative reproductivity	0	0	0	0	0	0	0	0	0	17	17	17	40	40	40	70	70	70	97	97	97		

Appendix table 3-6 Result of reproduction test

20 mg/L

Rep. No.	Counts		Time																					Total
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	
1	F ₁ generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8	0	0	22	0	0	30
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Total	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8	0	0	22	0	0	30
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8	8	8	30	30	30	
2	F ₁ generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	18	0	0	28	0	46
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Total	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	18	0	0	28	0	46
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	18	18	18	46	46	
3	F ₁ generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	3	0	0	14	0	0	29	0	47
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Total	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	3	0	0	14	0	0	29	0	47
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	4	4	4	18	18	18	47	47	
4	F ₁ generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(0)
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(0)
		Total	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(0)
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	F ₁ generation	Live	0	0	0	0	0	M	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(0)
		Dead	0	0	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(0)
		Total	0	0	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(0)
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	F ₁ generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0	16	0	0	25	0	45
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Total	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0	16	0	0	25	0	45
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	4	4	4	4	4	20	20	20	45	45	
7	F ₁ generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0	5	0	0	22	0	0	33
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Total	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0	5	0	0	22	0	0	33
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	0	6	6	6	6	6	6	11	11	11	33	33	33	

M: mortality of parental *Daphnia*

The values in parentheses express number of juveniles

Appendix table 3-6 Continued

20 mg/L

Rep. No.	Counts	Time																					Total
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	
8	F ₁ generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	5	0	0	15	0	0	22
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Total	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	5	0	0	15	0	0	22
	Cumulative reproductivity	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	2	2	2	2	7	7	7	22	22	22	
9	F ₁ generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	5	0	0	1	12	0	20
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Total	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	5	0	0	1	12	0	20
	Cumulative reproductivity	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	2	2	2	2	7	7	7	8	20	20	
10	F ₁ generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	3	0	0	13	0	0	20	0	38
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Total	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	3	0	0	13	0	0	20	0	38
	Cumulative reproductivity	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	2	2	5	5	5	18	18	18	38	38	

Additional data 1

予備試験結果

1. 予備検討

繁殖予備試験

(1)目的

急性遊泳阻害試験（試験番号：95278）の結果（48時間EC₅₀：28 mg/L）を参考に繁殖試験予備試験を実施した。また、試験液中の被験物質の安定性を確認した。

(2)方法と条件

暴露期間：14 日間

暴露方式：半止水式（毎日試験液の全量を交換）

試験用水：人工調製水（ASTM 調製水）

試験濃度：15、10、2.0、0.40 mg/L（トリメチルアミン換算値）

試験生物数：4 頭／試験区（1 頭／試験容器）

試験液量：320 mL／試験区（80 mL／試験容器）

試験液調製法：供試試料と試験用水を混合後、攪拌し溶解させ、1000 mg/L の試験原液を調製した。試験原液を試験用水で希釈し各濃度の試験液を調製した。

濃度分析：HPLC を用いて調製時及び換水前に測定した。

(3)結果

設定濃度 (mg/L)	累積 死亡率 (%)	初産日 (生後日数)	累積生存産仔数 /親 1 頭		24 時間後の被験物質濃度 維持率（対調製時、%）	
			平均	標準偏差	0-1 日後	14-15 日後
対照区	0	8.3	40	7.6	—	—
0.40	0	8.0	32	6.1	100	97
2.0	0	8.8	29	7.3	96	102
10	0	9.0	22**	6.2	96	100
15	0	13*	7.5**	3.9	98	96

*: Significantly different from control at $p < 0.05$

**: Significantly different from control at $p < 0.01$

(4)結論

NOEC は 2.0～10 mg/L 付近にあると推定された。

2. 本試験条件

試験濃度 20、10、5.0、2.5、1.3 mg/L（公比 2.0）

暴露方式 半止水式（毎日試験液の全量を交換）

Additional data 2

不採用本試験結果

(実験期間 2011 年 2 月 3 日～2011 年 2 月 24 日)

不採用理由：本試験において NOEC が得られなかったため。

Table 1 Significance test of difference between the mean cumulative number of juveniles produced per adult alive in control and test vessels after 21-day exposure

Nominal Concentration (mg/L)	Vessel No.						
	1	2	3	4	5	6	7
Control	206	200	175	207	159	212	222
1.3	81	57	79	156	141	128	174
2.5	166	139	177	-	171	118	105
5.0	75	-	121	88	93	89	86
10	129	80	37	59	73	70	121
20	4	-	2	46	-	9	-

Table 1 continued

Nominal Concentration (mg/L)	Vessel No.			Mean	S.D.	Significant difference
	8	9	10			
Control	189	172	217	196	21.2	-
1.3	109	154	148	123	39.3	**
2.5	138	113	123	139	26.8	**
5.0	135	114	140	105	23.5	**
10	-	60	66	77.2	29.7	**
20	0	12	28	14.4	16.8	**

**, $p < 0.01$

No observed effect concentration (NOEC) = 0 mg/L