

環境省殿

本写しは原本と相違ありません

㈱三菱化学安全科学研究所  
横浜研究所 運営管理者

## 最 終 報 告 書

メタクリル酸メチルの  
オオミジンコ (*Daphnia magna*) に対する繁殖阻害試験

(試験番号：A030427-3)

2004年10月25日

株式会社三菱化学安全科学研究所

# 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 : メタクリル酸メチルのオオミジンコ (*Daphnia magna*)  
に対する繁殖阻害試験

試 験 番 号 : A030427-3

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、本報告書はその結果を正しく記載したものである。

また、本試験は下記のGLPに従って実施したものである。

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

2004年10月25日

試験責任者





# 信 頼 性 保 証 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 : メタクリル酸メチルのオオミジンコ (*Daphnia magna*)  
に対する繁殖阻害試験

試 験 番 号 : A 0 3 0 4 2 7 - 3

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、下記の査察および監査実施により確認した。

## 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		2004年 8月17日	2004年 8月17日
試験の査察	試験液の調製	2004年 8月26日	2004年 8月26日
	ミジンコの投入	2004年 8月26日	2004年 8月26日
	ミジンコの観察	2004年 9月16日	2004年 9月16日
最終報告書監査		2004年10月25日	2004年10月25日

2004年10月25日

信頼性保証部門担当者



## 試験実施概要

1. 表 題 : メタクリル酸メチルのオオミジンコ (*Daphnia magna*)  
に対する繁殖阻害試験  
(試験番号 : A030427-3)
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 : 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)
4. 適用 GLP : 日本国環境省総合環境政策局環境保健部環境安全課環境リ  
スク評価室長通知「生態影響試験実施に関する基準の改正  
について」(別添)「生態影響試験実施に関する基準」  
(環保安第 242 号, 2001 年)
5. 試験委託者 : 環境省  
〒100-8975 東京都千代田区霞が関一丁目 2-2  
委託責任者 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 : 株式会社三菱化学安全科学研究所  
〒105-0014 東京都港区芝二丁目 1 番 30 号
7. 試験施設 : 株式会社三菱化学安全科学研究所 横浜研究所  
〒227-0033 神奈川県横浜市青葉区鴨志田町 1000 番地

8. 試験責任者 : [redacted]  
環境科学Cグループ

9. 試験担当者 : [redacted] [redacted] (2004年10月25日)  
(試験実施)

[redacted] [redacted] (2004年10月25日)  
(試験実施, 報告書作成)

[redacted] [redacted] (2004年10月25日)  
(試験実施)

[redacted] [redacted] (2004年10月25日)  
(試験実施)

[redacted] [redacted] (2004年10月25日)  
(分析実施)

10. 試験日程 : 試験開始日 2004年 8月17日  
実験開始日 2004年 8月26日  
実験終了日 2004年 9月16日  
試験終了日 2004年10月25日

11. 保管 : 試験計画書, 生データ, 被験物質, 記録文書および最終報告書は, 横浜研究所の保管施設に保管する。  
保管期間は, 最終報告書作成後10年間とし, 以後の保管は試験委託者と協議の上, 決定する。  
ただし, 被験物質については, 最終報告書作成後10年間または品質低下をおこさないで安定に保存しうる期間のいずれか短い方の期間とする。

# 目 次

	頁
要 約	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 試験液の水溫, 溶存酸素濃度, pH および硬度	17
5.8 試験計画書からの逸脱事項	17
Table 1~11	18~27
Figure 1, 2	20, 23
付属資料-1 希釈水の組成	28~29
付属資料-2 試験液の調製	30~31
付属資料-3 試験液の分析	32~39
付属資料-4 ミジンコの観察結果	40~46
付属資料-5 結果の算出	47~49

## 要 約

試 験 委 託 者 : 環境省

表 題 : メタクリル酸メチルのオオミジンコ (*Daphnia magna*) に対する  
繁殖阻害試験

試 験 番 号 : A 0 3 0 4 2 7 - 3

試 験 方 法 :

- 1) 適用ガイドライン: 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)
- 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 : 対照区, 1.50, 4.70, 15.0, 47.0, 150 mg/L  
(設定値) (揮散による損出が大きいことが予想されたため, 試験上限濃度よりやや高めに設定)  
公比: 3.2
- 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 : 室内光, 16時間明 (800 lux以下) / 8時間暗
- 11) 分 析 法 : ガスクロマトグラフィー質量分析 (GC/MS)

## 試 験 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は、調製時において 77～84%、換水前において 33～78%であった。

### 2) 21日間暴露後の結果

	(mg/L)	95%信頼区間 (mg/L)
親ミジンコの半数致死濃度 (LC50)	66.1	36.1～121
50%繁殖阻害濃度 (EC50)	36.1 < EC50 < 121 (算出不可)	
最大無作用濃度 (NOEC)	3.53	—
最小作用濃度 (LOEC)	11.8	—

## 1 被験物質

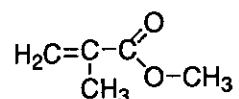
### 1.1 名称、構造式および物理化学的性状

名 称： メタクリル酸メチル（略称 MM）

別 名： メチルメタクリレート

CAS No： 80-62-6

構造式：



分子式：  $\text{C}_5\text{H}_8\text{O}_2$

分子量<sup>\*1</sup>： 100.12

融点<sup>\*1</sup>：  $-48^\circ\text{C}$

沸点<sup>\*1</sup>：  $100\sim 101^\circ\text{C}$

水溶解度<sup>\*1</sup>： 11.5g/L ( $20^\circ\text{C}$ )

比重<sup>\*1</sup>： 0.939

\*1：供給者提供資料

### 1.2 供試試料

純度<sup>\*1</sup>： 99.90%

ロット番号<sup>\*1</sup>： FA006551

供給者： XXXXXXXXXX

受領量<sup>\*1</sup>： 100mL

受領日： 2004年 2月 3日

外観<sup>\*1</sup>： 無色透明液体

\*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

試験開始前に、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試験物質保管用デシケータ（保管条件：室温、暗所）内に保管した。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。

（装置）フーリエ変換赤外分光分析装置：Nicolet製 AVATAR 320型

## 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： 定期的（約6ヶ月毎）に基準物質（重クロム酸カリウム、試薬特級）による急性遊泳阻害試験を行い、供試生物の感受性を調べている。1998年6月以降の48時間の半数遊泳阻害濃度（EC50）は、以下の通りである。

平均値±標準偏差＝0.76±0.16 mg/L, n=13  
（最小値～最大値＝0.57～1.02 mg/L）

- 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／80mL（25頭／2L）以下
  - 飼育容器： 2L ガラス製容器
  - 水温： 20±1℃
  - 溶存酸素濃度： 飽和濃度の60％以上
  - pH： 6～9
  - 照明： 室内光，16時間明（800 lux以下）／8時間暗
  - 飼育期間： 2004年 7月29日～2004年 8月26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）  
（藻類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。幼体は極力、毎日除去。

### 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）  
水面をテフロンシートで被覆
- 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±1℃
- 7) 溶存酸素濃度： 飽和濃度の60％以上  
（暴露期間中のエアレーションは実施していない）
- 8) pH： 試験液のpH調整は行わなかった
- 9) 硬度： 約 250 mg/L (CaCO<sub>3</sub>換算)
- 10) 照明： 室内光，16時間明（800 lux 以下）／8時間暗
- 11) 給餌： 種類： *Chlorella vulgaris*（単細胞緑藻類）  
（藻類培養液を遠心分離し，希釈水に置換して使用）  
量： 0.15 mg C（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： 100mL容ガラスビーカー  
（試験容器には蓋をし，水面をテフロンシートで覆った）
- 2) 恒温槽： 塩ビ製水槽（恒温装置，タイテック製 クールニットCL-80F型）
- 3) 水温計： ハンナ製 チェックテンプ
- 4) 溶存酸素計： 電気化学計器製 DOL-10型
- 5) pH計： 東亜電波工業製 HM-40V型
- 6) 硬度測定キット： ハック社製 HA-DT
- 7) 電子天秤： メトラー製 AG204型  
メトラー製 AE163型  
メトラー製 PB3002型

### 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（48時間  $EC_{50}$  値：146 mg/L（設定値），83.8 mg/L（測定値））に基づき，本試験濃度を次のように決定した。

対照区，1.50，4.70，15.0，47.0，150 mg/L（公比：3.2）

（揮散による損出が大きいことが予想されたため，試験上限濃度よりやや高めに設定）

### 3.5 試験液の調製

付属資料－2に示すように，被験物質原液を調製し，希釈水で希釈混合することにより，試験液を調製した。被験物質物質原液は3～7日毎に調製し，冷蔵，暗所で保存した。（同条件下で7日間安定）

調製した試験液は1区につき10個の試験容器に各80 mL入れた。

対照区は希釈水のみとした。

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3回，換水前後の各試験液を分析用に採取した。対照，1.50，4.70，15.0 mg/L区については10 mLを採取し，アセトンを100  $\mu$ L添加し混合した。47.0，150 mg/L区については精製水9 mLに試験液1 mLと，アセトンを100  $\mu$ L添加し混合した。分析はGC/MSにより行った。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，21日間の時間加重平均を求めた。詳細は付属資料－3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 障害濃度算出に用いる被験物質濃度の決定

障害濃度の算出に用いる被験物質濃度は、測定値（平均）とした。

##### 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）から死亡率（％）を求め、以下の方法で半数致死濃度（21d-LC50）を可能な限り決定した。

最高濃度区における死亡率	≥ 50%	< 50%
LC50の決定方法	Probit法, Moving average法, Binomial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。	推定される濃度領域を記載する
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%繁殖障害濃度（EC50）の算出

対照区に対する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）から繁殖率％（A）を求め、繁殖障害率％（100-A）を算出し、以下の方法で21日間の50%繁殖障害濃度（21d-EC50）を可能な限り決定した。

観察された障害率の最大値	≥ 50%	< 50%
EC50の決定方法	Logistic 曲線による回帰分析（Logit 法） 95%信頼区間を算出。	推定される濃度領域を記載する
平均累積産仔数の濃度区別の経時変化のグラフの記載	記載する。	記載する。

\*：親が死亡した場合は算出から除外する。例えば産仔の有無に関わらず21日間で親が全部死亡した区は繁殖障害率は求めない。

#### 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以下の方法（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、有意な繁殖障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、有意な繁殖障害が認められる最低濃度

\*\* 統計的手法（産仔の有無に関わらず親が死亡した場合は算出から除外）

多群の比較 (対照区以外に2群以上ある)	
Bartlett の等分散検定	
等分散が認められる場合	等分散が認められない場合
一元配置分散分析 (ANOVA)  パラメトリックの Dunnett, Williams または Scheffe の多重比較検定	Kruskal-Wallisの検定  ノンパラメトリックの Dunnett, Williams または Scheffe の多重比較検定
Yukms ソフトウェア Statlight 「#4 多群の比較」 (Yukms Corp, 東京)	

## 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, 代表的なクロマトグラムを付属資料-3に示した。

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は、調製時において77~84%, 換水前において33~78%であった。

### 5.3 ミジンコの観察結果

暴露期間中のミジンコの観察結果を付属資料-4に示した。

#### 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100%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初産前に全親ミジンコが死亡した。

#### 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98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。

最高濃度区においては初産前に全親ミジンコが死亡した。

### 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、算出結果を付属資料-5に示した。

21日間 LC50 : 66.1 mg/L (95%信頼区間 : 36.1~121 mg/L)

#### 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 : 36.1 < EC50 < 121 mg/L

(121 mg/Lにおいて全親ミジンコが死亡したため算出不可)

#### 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、算出結果を付属資料-5に示した。

21日間 NOEC : 3.53 mg/L

21日間 LOEC : 11.8 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℃の飽和溶存酸素濃度 : 8.8mg/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 (6.0~9.0で1.5の変動内) 内であった。また硬度も適正範囲内 (約250 mg/L) であった。

#### 5.8 試験計画書からの逸脱事項

該当する事象はなかった。

以 上

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

Nominal Concentration (mg/L)	Date→	Measured Concentration (mg/L)						TWM <sup>*1</sup> (mg/L)	% of Nominal
		7 New	8 Old	14 New	15 Old	20 New	21 Old		
Control		<0.003	<0.003	<0.003	<0.003	<0.003	<0.003	-	-
1.50		1.21	1.01	1.15	0.980	1.19	0.493	1.00	67
4.70		3.87	3.60	3.77	3.24	3.95	2.73	3.53	75
15.0		12.5	10.9	12.3	11.4	12.3	11.5	11.8	79
47.0		37.6	35.3	37.9	32.6	38.3	35.1	36.1	77
150		125	117	*	*	*	*	121	81

Table 1-2 Measured Concentration as a Percentage of Nominal

Nominal Concentration (mg/L)	Date→	Measured Concentration as a Percentage of Nominal					
		7 New	8 Old	14 New	15 Old	20 New	21 Old
1.50		81	67	77	65	79	33
4.70		82	77	80	69	84	58
15.0		83	73	82	76	82	77
47.0		80	75	81	69	81	75
150		83	78	*	*	*	*

New: Freshly prepared test solution

Old: Old test solution before renewal

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

\*: No measurement was made because all parental *Daphnia* were dead.

	Concentration (mg/L)			% of Nominal		
	Min.		Max.	Min.		Max.
New	1.15	~	125	77	~	84
Old	0.493	~	117	33	~	78

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

Nominal conc.	Measured conc. <sup>*1</sup>	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
1.50 mg/L	1.00 mg/L	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1
4.70 mg/L	3.53 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
15.0 mg/L	11.8 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
47.0 mg/L	36.1 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
150 mg/L	121 mg/L	0	0	0	0	0	1	8	9	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10

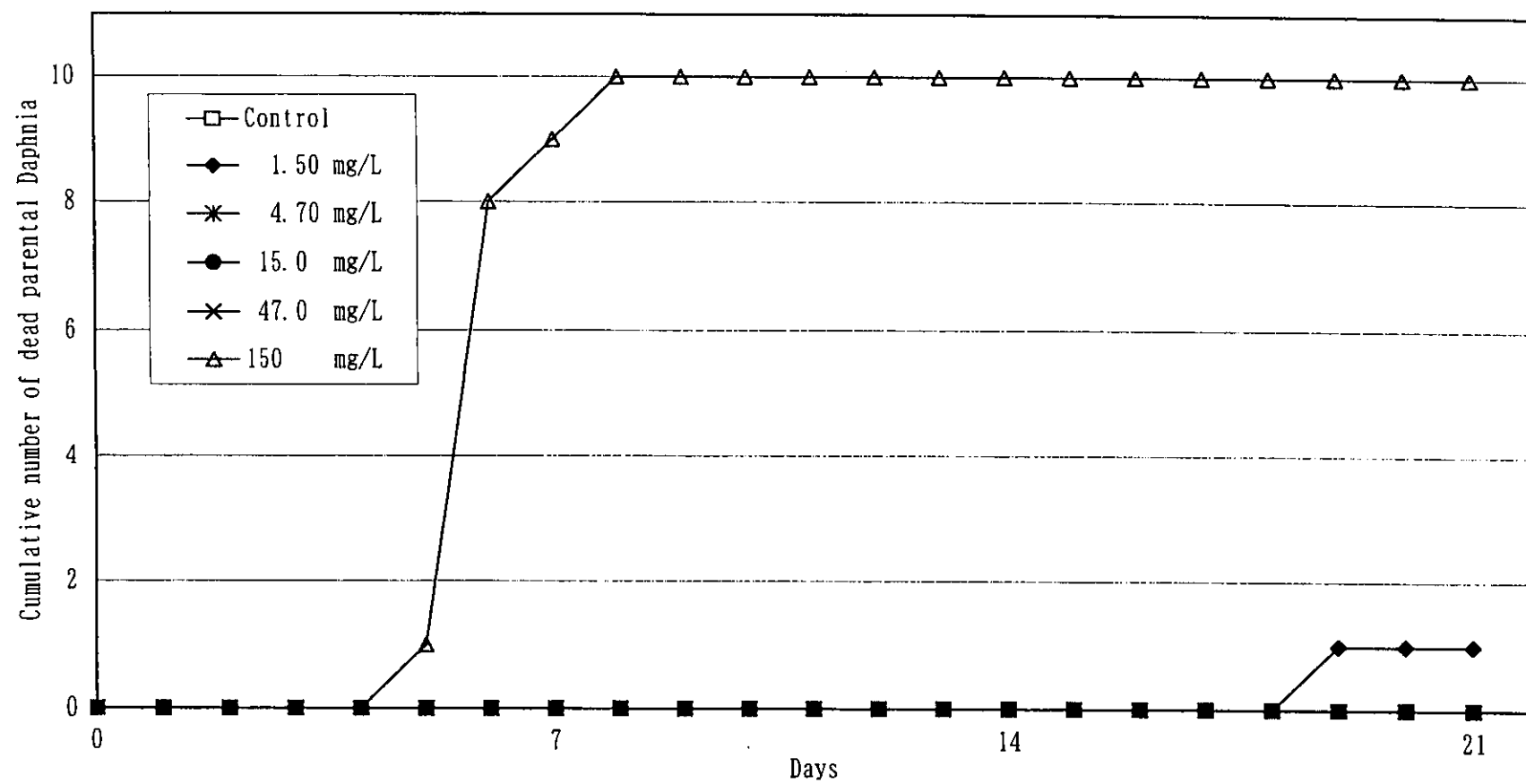
\*1: Time-weighted mean measured concentration

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

Nominal conc.	Measured conc. *1	Days					
		1	2	4	7	14	21
Control	--	0	0	0	0	0	0
1.50 mg/L	1.00 mg/L	0	0	0	0	0	10
4.70 mg/L	3.53 mg/L	0	0	0	0	0	0
15.0 mg/L	11.8 mg/L	0	0	0	0	0	0
47.0 mg/L	36.1 mg/L	0	0	0	0	0	0
150 mg/L	121 mg/L	0	0	0	90	100	100

\*1: Time-weighted mean measured concentration

Figure 1 Cumulative Number 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* <sup>1</sup> , mg/L)					
	Control	1.50 (1.00)	4.70 (3.53)	15.0 (11.8)	47.0 (36.1)	150 (121)
1	8	9	8	8	9	-
2	9	8	9	9	9	-
3	9	8	9	9	9	-
4	9	8	8	9	9	-
5	9	9	9	8	9	-
6	9	9	9	8	12	-
7	8	9	9	9	12	-
8	9	8	9	8	12	-
9	8	9	9	8	9	-
10	8	9	9	8	9	-
Min	8	8	8	8	9	-
Max	9	9	9	9	12	-

\*1: Time-weighted mean measured concentration

-: The parental *Daphnia* was dead before first brood production.

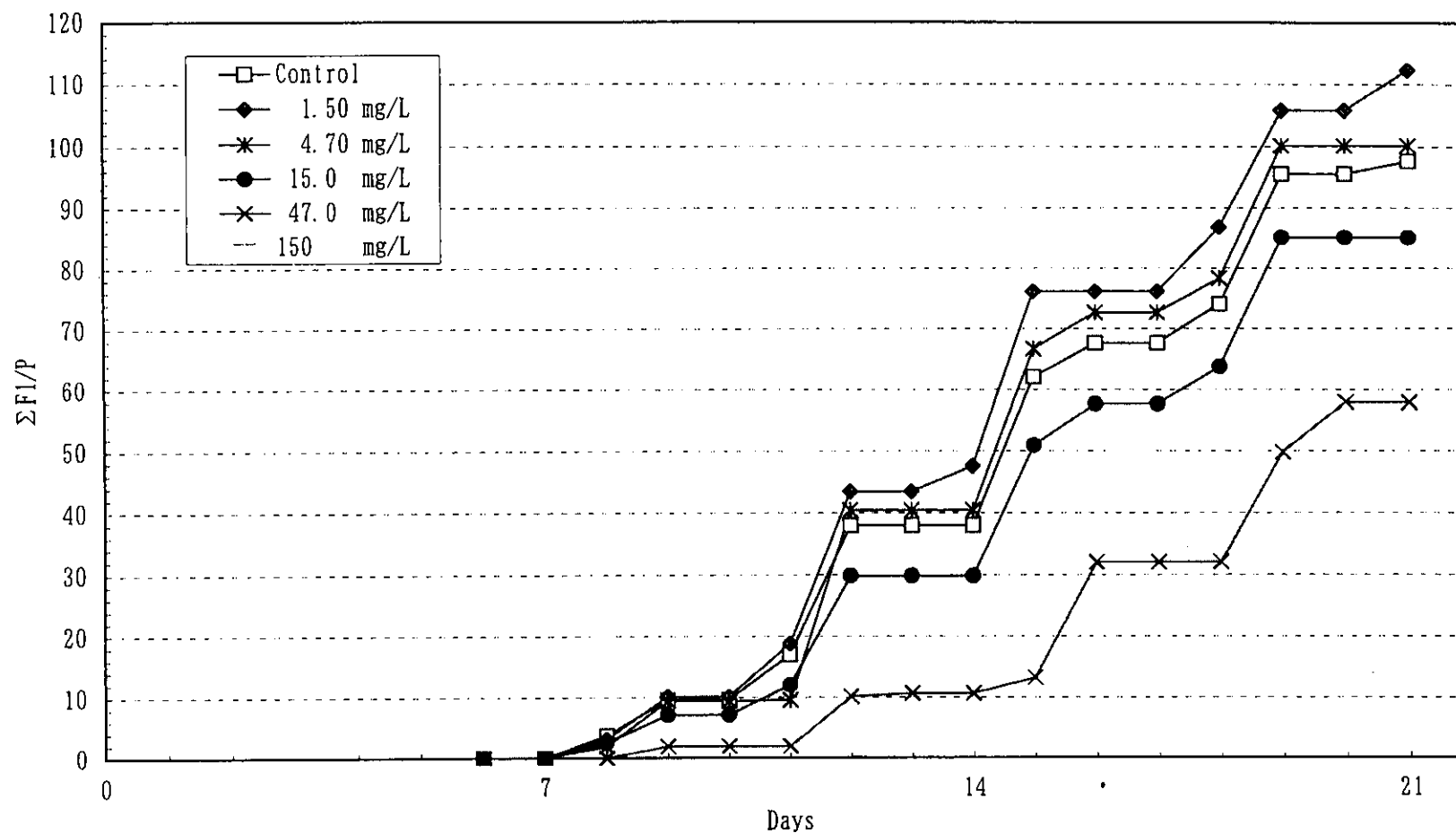
Table 4 Mean Cumulative Number of Juveniles Produced per Adult Alive for 21 Days ( $\Sigma F1/P$ )

Nominal Conc.	Measured conc. *1	Days															
		6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
Control	--	0.0	0.0	3.7	9.6	9.6	17.0	38.0	38.0	38.0	62.1	67.6	67.6	74.0	95.5	95.5	97.6
1.50 mg/L	1.00 mg/L	0.0	0.0	3.1	10.1	10.1	18.8	43.4	43.4	47.6	76.1	76.1	76.1	86.8	105.8	105.8	112.2
4.70 mg/L	3.53 mg/L	0.0	0.0	1.9	9.4	9.4	9.5	40.4	40.4	40.4	66.7	72.6	72.6	78.3	100.2	100.2	100.2
15.0 mg/L	11.8 mg/L	0.0	0.0	2.5	7.1	7.1	12.0	29.8	29.8	29.8	50.9	57.6	57.6	63.8	85.1	85.1	85.1
47.0 mg/L	36.1 mg/L	0.0	0.0	0.0	1.9	1.9	1.9	10.1	10.6	10.6	13.2	32.0	32.0	32.0	49.8	57.9	57.9
150 mg/L	121 mg/L	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

\*1: Time-weighted mean measured concentration

-: All parental *Daphnia* were dead during a 21-days testing period.

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



Values in legend are given in the nominal concentration.

--: All parental *Daphnia* were dead during a 21-days testing period.

Table 5      Calculated LC50 Values for Parental *Daphnia*

Exposure Period (day)	LC50 <sup>*1</sup> (mg/L)	95% Confidence limits (mg/L)	Statistical method
21	66.1	36.1 - 121	Binomial

\*1: Using the concentrations of 1.00 - 121 mg/L

Table 6      Calculated EC50 Values for Inhibition of Reproduction

Exposure Period (day)	EC50 (mg/L)	95% Confidence limits (mg/L)	Statistical method
21	36.1 < EC50 < 121 <sup>*1</sup>	--	--

\*1: By definition, it is difficult to determine the reproduction inhibition rate when there is no adult alive after 21days.

Since adult alive after 21days at 121mg/L was none, we did not determine the EC50 value.

--: Could not be determined

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

Vessel No.	Nominal Concentration, mg/L (Measured Concentration <sup>*1</sup> , mg/L)					
	Control	1.50 (1.00)	4.70 (3.53)	15.0 (11.8)	47.0 (36.1)	150 (121)
1	88	97	84	74	62	D
2	101	101	95	88	67	D
3	105	153	105	91	67	D
4	94	143	103	89	72	D
5	96	98	104	83	56	D
6	91	99	93	75	50	D
7	92	101	108	87	47	D
8	92	D	110	96	48	D
9	116	105	105	78	51	D
10	101	113	95	90	59	D
Mean	97.6	112.2	100.2	85.1	57.9	0.0
S. D.	8.4	21.0	8.1	7.3	8.9	
Inhibition rate (%)		-15.0	-2.7	12.8	40.7	100.0
Significant difference		-	-	*	**	++

\*1: Time-weighted mean measured concentration.

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

++: Statistical comparison test could not be performed for this concentration because adult alive after 21 days was none. However, we concluded that this concentration level showed adverse effect on *Daphnia* reproduction.

No Observed Effect Concentration (NOEC): 3.53 mg/L  
Lowest Observed Effect Concentration (LOEC): 11.8 mg/L

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

Nominal Concentration (mg/L)	Measured Concentration*1 (mg/L)	Date→	Temperature (°C)								Min.	Max.
			0 new	1 old	7 new	8 old	14 new	15 old	20 new	21 old		
Control	--		19.8	19.6	19.8	19.5	19.6	19.6	19.6	19.6	19.5	19.8
1.50	1.00		20.1	19.6	19.7	19.5	19.6	19.6	19.8	19.5	19.5	20.1
4.70	3.53		20.1	19.6	19.6	19.5	19.6	19.6	19.8	19.5	19.5	20.1
15.0	11.8		20.1	19.6	19.6	19.6	19.6	19.5	19.8	19.5	19.5	20.1
47.0	36.1		20.1	19.6	19.6	19.5	19.5	19.5	19.7	19.5	19.5	20.1
150	121		19.9	19.6	19.6	19.6	-	-	-	-	19.6	19.9
Total											19.5	20.1

\*1: Time-weighted mean measured concentration

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

-: No measurement was made because all parental *Daphnia* were dead.

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

Nominal Concentration (mg/L)	Measured Concentration*1 (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	--		8.8	8.6	8.8	7.8	8.8	7.5	8.8	8.0	7.5	8.8
1.50	1.00		8.8	8.6	8.8	7.8	8.8	7.7	8.8	7.7	7.7	8.8
4.70	3.53		8.8	8.6	8.8	7.7	8.7	7.3	8.8	7.7	7.3	8.8
15.0	11.8		8.8	8.5	8.8	8.0	8.8	7.8	8.8	7.5	7.5	8.8
47.0	36.1		8.8	8.6	8.8	7.9	8.8	8.1	8.8	7.3	7.3	8.8
150	121		8.8	8.4	8.8	8.3	-	-	-	-	8.3	8.8
Total											7.3	8.8

\*1: Time-weighted mean measured concentration

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

-: No measurement was made because all parental *Daphnia* were dead.

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

Nominal Concentration (mg/L)	Measured Concentration* <sup>1</sup> (mg/L)	Date→	pH								Min.	Max.
			0 new	1 old	7 new	8 old	14 new	15 old	20 new	21 old		
Control	--		8.3	8.3	8.3	7.9	8.3	7.6	8.3	7.6	7.6	8.3
1.50	1.00		8.3	8.3	8.3	7.9	8.3	7.6	8.3	7.6	7.6	8.3
4.70	3.53		8.3	8.2	8.4	7.9	8.3	7.5	8.3	7.6	7.5	8.4
15.0	11.8		8.3	8.2	8.4	7.9	8.3	7.6	8.3	7.5	7.5	8.4
47.0	36.1		8.3	8.1	8.4	7.9	8.3	7.8	8.3	7.4	7.4	8.4
150	121		8.3	8.1	8.3	8.1	-	-	-	-	8.1	8.3
Total											7.4	8.4

\*1: Time-weighted mean measured concentration

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

-: No measurement was made because all parental *Daphnia* were dead.

Table 11 Total Hardness (as CaCO<sub>3</sub>) during a 21-day Period under the Semi-Static Condition

Nominal Concentration (mg/L)	Measured Concentration* <sup>1</sup> (mg/L)	Date→	Total hardness (as CaCO <sub>3</sub> , mg/L)								Min.	Max.
			0 new	1 old	7 new	8 old	14 new	15 old	20 new	21 old		
Control	--		236	236	240	246	240	238	246	242	236	246
1.50	1.00		242	242	240	244	238	238	244	240	238	244
4.70	3.53		242	240	244	244	238	238	242	240	238	244
15.0	11.8		242	240	244	244	240	236	242	240	236	244
47.0	36.1		236	238	244	244	236	234	242	242	234	244
150	121		236	234	240	248	-	-	-	-	234	248
Total											234	248

\*1: Time-weighted mean measured concentration

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

-: No measurement was made because all parental *Daphnia* were dead.

## 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
$\text{NaHCO}_3$	64.8
$\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$	10.0
$\text{NaNO}_3$	0.274
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0.143
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	0.184

Trace elements	Concentration ( $\mu\text{g/L}$ )
$\text{H}_3\text{BO}_3$	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
$\text{ZnCl}_2$	13.0
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	10.0
KI	3.25
$\text{Na}_2\text{SeO}_3$	2.19
$\text{NH}_4\text{VO}_3$	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

### 試験液の調製

## 試験液の調製

### 1. 準備

#### ① 被験物質原液 I の調製

採取量	——>	1000	mg
溶媒	——>	試験用水 (十分暴気し $20\pm 1^{\circ}\text{C}$ にしたElendt M4溶液)	
最終容量	——>	1000	mL
容器	——>	マスフスコ	
濃度	——>	1000	mg/L
混合方式	——>	スターラー1分, 密栓	

### 2. 試験液の調製

①の原液 I を下記の表の通り採取し, 試験用水で希釈して試験液とする。

試験用水(最終容量)	——>	1.00	L
容器	——>	マスフスコ	
混合方式	——>	手で転倒攪拌, 密栓	
濃度公比	——>	3.16	

(以下の濃度表示は, 最小桁数に合わせている)

設定試験濃度 mg/L	区No. (略称)	①原液 I mL
対照区	C	0
1.50	Conc.1	1.5
4.70	Conc.2	4.7
15.00	Conc.3	15.0
47.00	Conc.4	47.0
150.00	Conc.5	150.0

## 付属資料－3

### 試験液の分析

## 1 試験液の分析方法

1) 各試験液を分析用に採取した。対照, 1.50, 4.70, 15.0 mg/L区については10 mLを採取し, アセトンを100  $\mu$ L添加し混合した。47.0, 150 mg/L区については精製水9 mLに試験液を1 mLを採取したものと, アセトンを100  $\mu$ L添加し混合した。分析はGC/MSにより行った。代表的なクロマトグラムをFigure A-3-2 (2), (3), (5), (6) に示した。

2) 精製水10 mLを測定用バイアルに採取し, アセトンで調製した標準溶液100  $\mu$ Lを添加し混合後, GC/MSにより分析した。代表的なクロマトグラムをFigure A-3-2 (1), (4) に示した。

3) 各試験液の被験物質濃度は, 各分析時に測定した標準溶液のピーク面積を用いて, 一点検量法により定量した。

なお, 暴露開始前に試験濃度範囲の全域にわたって検量線を作成し, 直線性を確認している。(「3 検量線」参照)

## 2 ガスクロマトグラフィー質量分析 (GC/MS) 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プラ付き) No.1

ガスクロマトグラフ (GC) : Agilent Technologies 6890 型

ヘッドスペースサンプラ (HSS) : Agilent Technologies 7694 型

質量選択検出器 (MSD) : Agilent Technologies 5973N 型

データ処理部 : ケミステーション (Windows NT)

### (条件)

#### [GC 条件]

カラム : J&W DB-5MS 60m×0.25mm×1.0μm

キャリアーガス : ヘリウム 1.0mL/min (Constant flow)

オープン温度 : 50℃ (2min) → 20℃/min → 190℃ (1min)

注入口温度 : 200℃

MS インターフェース温度 : 200℃

注入条件 : スプリット (スプリット比=250:1)

注入量 : 3.0μL (HSS サンプルループ容量)

#### [HSS 条件]

温度条件 : Oven=60℃, LOOP=120℃, Transfer Line=200℃

イベント時間 : GC Cycle Time=18 分

Vial Equilibration Time=20 分

Pressurization Time=0.2 分

Loop Fill Time=0.03 分

Loop Equilibration Time=0.2 分

Inject Time=0.2 分

バイアルパラメータ : Shake=2

#### [MSD 条件]

温度条件 : イオン源=230℃, 四重極マス・フィルタ=150℃

SIM (Selected Ion Monitoring) 条件 :

Solvent Delay=4min

Quant ion=69.0, 85.0, 100.0 m/z の TIC

## 3 検量線

アセトンを用い, 0, 20.0~5000 mg/Lの標準溶液を調製した。この標準溶液100μLを精製水10 mLに添加し (100倍希釈) GC/MSで測定した。横軸に濃度 (mg/L) を, 縦軸にピーク面積 (count) をとり, 検量線を作成した。検量線の最小二乗法による直線回帰式の相関係数は, 1.00と良好であった。作成した検量線をFigure A-3-1に示した。

#### 4 検出限界

最小検出ピーク面積を 1000countに設定し、これに相当する試験液中の被験物質濃度 0.003 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、試験液を採取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-3-1 Calibration curve

No	Concentration (mg/L)	Peak Area (count)
1	0	0
2	0.200	150122
3	0.500	389752
4	1.00	821912
5	2.00	1756276
6	5.00	4474954
7	10.0	9191505
8	20.0	17626955
9	50.0	43024692

$$Y = 865,469X$$

$$r = 1.00$$

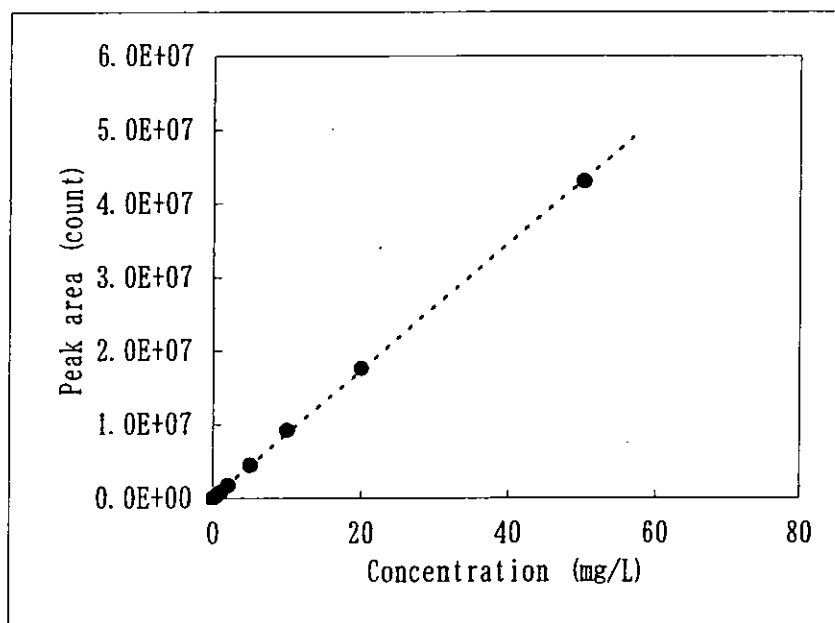
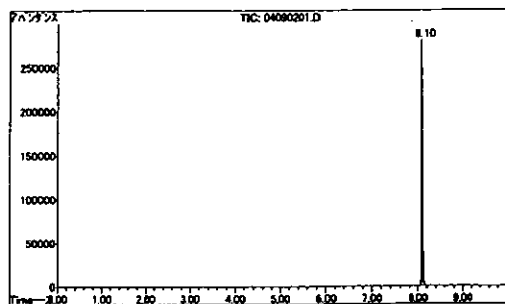


Figure A-3-2 Representative chromatograms

(1) Standard 5.00 mg/L ; Day 7

Study No. : A030427-3  
Date : 2004.09.02  
Operator :   
Sample Information:   
Sample Name : STD 5mg/L  
Misc Info :  
File Name : C:\MSDCHEM\1\DATA\A030427\04090201.D  
Acquired : 2 Sep 2004 14:01 using AcqMethod A030427S

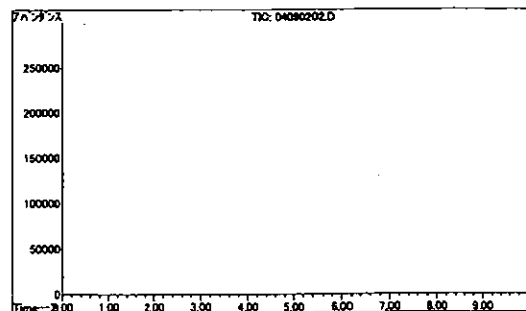


TIC: 04090201.D

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	8.096	M	0.027	4666002	8.001	8.535

(2) Control ; Day 7

Study No. : A030427-3  
Date : 2004.09.02  
Operator :   
Sample Information:   
Sample Name : DAP74C  
Misc Info :  
File Name : C:\MSDCHEM\1\DATA\A030427\04090202.D  
Acquired : 2 Sep 2004 14:19 using AcqMethod A030427S



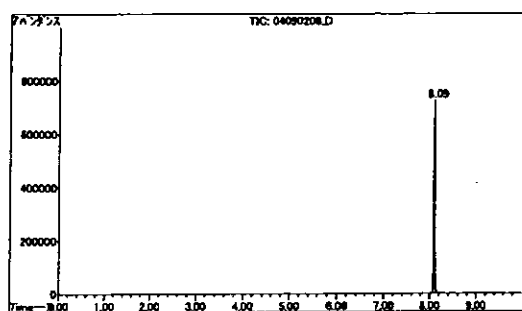
TIC: 04090202.D

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
ピークが検出できません						

Figure A-3-2 Continued

(3) 15.0 mg/L nominal ; Day 7

Study No. : A030427-3  
 Date : 2004.09.02  
 Operator :   
 Sample Information:   
 Sample Name : DAP7dC3  
 Misc Info :   
 File Name : C:\MSDCHEM\1\DATA\A030427\04090208.D  
 Acquired : 2 Sep 2004 18:39 using AcqMethod A030427S

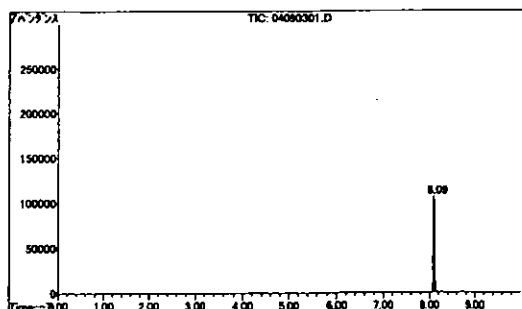


TIC: 04090208.D

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	8.094	M	0.027	11666672	8.040	8.516

(4) Standard 2.00 mg/L ; Day 8

Study No. : A030427-3  
 Date : 2004.09.03  
 Operator :   
 Sample Information:   
 Sample Name : STD 2mg/L  
 Misc Info :   
 File Name : C:\MSDCHEM\1\DATA\A030427\04090301.D  
 Acquired : 3 Sep 2004 12:32 using AcqMethod A030427S



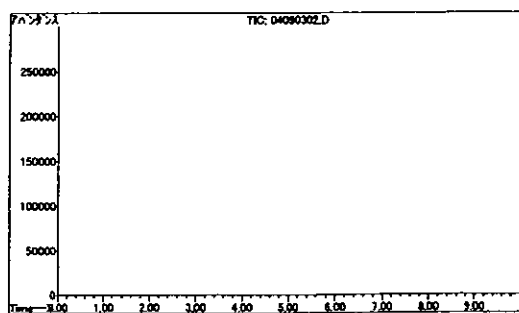
TIC: 04090301.D

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	8.095	M	0.027	1743613	8.002	8.383

Figure A-3-2 Continued

(5) Control ; Day 8

Study No. : A030427-3  
Date : 2004.09.03  
Operator :   
Sample Information:   
Sample Name : DAP8dC  
Misc Info :  
File Name : C:\MSDCHEM\1\DATA\A030427\04090302.D  
Acquired : 3 Sep 2004 12:54 using AcqMethod A030427S

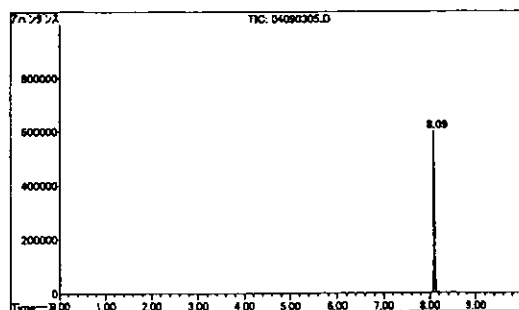


TIC: 04090302.D

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
ピークが検出できません						

(6) 15.0 mg/L nominal ; Day 8

Study No. : A030427-3  
Date : 2004.09.03  
Operator :   
Sample Information:   
Sample Name : DAP8dC3  
Misc Info :  
File Name : C:\MSDCHEM\1\DATA\A030427\04090305.D  
Acquired : 3 Sep 2004 13:49 using AcqMethod A030427S



TIC: 04090305.D

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	8.094	M	0.026	9522090	7.991	8.620

## 付属資料－4

### ミジンコの観察結果

## Appendix 4-1 Result of reproduction test

Test chemical: MM

(Untreated control)

Rep. No.	Counts		Time																					Total
			8/27	8/28	8/29	8/30	8/31	9/1	9/2	9/3	9/4	9/5	9/6	9/7	9/8	9/9	9/10	9/11	9/12	9/13	9/14	9/15	9/16	
			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	15	0	0	16	14	0	0	25	0	0	0	18	0	0	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	15	15	15	31	45	45	45	70	70	70	70	88	88	88	88
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	9	0	0	32	0	0	31	0	0	0	29	0	0	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	9	9	9	41	41	41	72	72	72	72	101	101	101	101
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	34	0	0	31	0	0	0	30	0	0	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	10	10	10	44	44	44	75	75	75	75	105	105	105	105
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	9	0	0	25	0	0	31	0	0	0	29	0	0	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	9	9	9	34	34	34	65	65	65	65	94	94	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	3	0	0	19	0	0	39	0	0	0	35	0	0	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	3	3	3	22	22	22	61	61	61	61	96	96	96	96
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	9	0	0	27	0	0	0	27	0	0	28	0	0	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	9	9	9	36	36	36	36	63	63	63	91	91	91	91
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	28	0	0	0	27	0	0	28	0	0	0	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	9	9	9	37	37	37	37	64	64	64	92	92	92	92	92
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	7	0	0	32	0	0	0	28	0	0	25	0	0	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	7	7	7	39	39	39	39	67	67	67	92	92	92	92
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	30	0	0	0	26	0	0	27	0	0	21	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	12	12	12	42	42	42	42	68	68	68	95	95	95	116	116
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	12	0	0	27	0	0	31	0	0	9	21	0	0	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	1	13	13	13	40	40	40	71	71	71	80	101	101	101	101

## Appendix 4-2 Result of reproduction test

Test chemical: MM

(Concentration 1)

Rep. No.	Counts		Time																					Total
			8/27	8/28	8/29	8/30	8/31	9/1	9/2	9/3	9/4	9/5	9/6	9/7	9/8	9/9	9/10	9/11	9/12	9/13	9/14	9/15	9/16	
			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	97
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0	10	0	0	34	0	0	28	0	0	0	25	0	0	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	10	10	10	44	44	44	72	72	72	72	97	97	97	
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	101
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	8	0	0	0	30	0	0	33	0	0	0	30	0	0	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	8	8	8	8	38	38	38	71	71	71	71	101	101	101	
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	153
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	8	0	0	41	0	0	37	0	0	0	36	0	0	31	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	8	8	8	49	49	49	86	86	86	86	122	122	122	153	
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	143
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	12	0	0	37	0	0	0	35	0	0	32	0	0	27	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	12	12	12	49	49	49	49	84	84	84	116	116	116	143	
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	98
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0	10	0	0	29	0	0	33	0	0	0	26	0	0	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	10	10	10	39	39	39	72	72	72	72	98	98	98	
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	99
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0	14	0	0	30	0	0	29	0	0	0	26	0	0	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	14	14	14	44	44	44	73	73	73	73	99	99	99	
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	101
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0	10	0	0	32	0	0	27	0	0	0	32	0	0	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	10	10	10	42	42	42	69	69	69	69	101	101	101	
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	8	0	0	33	0	0	0	34	0	0	37	0			
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	8	8	8	41	41	41	41	75	75	75	112	112			
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	105
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0	8	0	0	30	0	0	35	0	0	0	32	0	0	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	8	8	8	38	38	38	73	73	73	73	105	105	105	
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	113
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0	11	0	0	37	0	0	37	0	0	28	0	0	0	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	11	11	11	48	48	48	85	85	85	113	113	113	113	

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

## Appendix 4-3 Result of reproduction test

Test chemical: MM

(Concentration 2)

Rep. No.	Counts	Time																					Total
		8/27	8/28	8/29	8/30	8/31	9/1	9/2	9/3	9/4	9/5	9/6	9/7	9/8	9/9	9/10	9/11	9/12	9/13	9/14	9/15	9/16	
		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	
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	9	1	0	1	15	0	0	34	0	0	0	24	0	0
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	9	10	10	11	26	26	26	60	60	60	60	84	84	84
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	29	0	0	0	33	0	0	28	0	0
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	5	5	5	34	34	34	34	67	67	67	95	95	95
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	12	0	0	35	0	0	30	0	0	0	28	0	0
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	12	12	12	47	47	47	77	77	77	77	105	105	105
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	10	0	0	0	29	0	0	36	0	0	28	0	0	0
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	10	10	10	10	39	39	39	75	75	75	103	103	103	103
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	14	0	0	33	0	0	30	0	0	0	27	0	0
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	14	14	14	47	47	47	77	77	77	77	104	104	104
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	8	0	0	32	0	0	0	26	0	0	27	0	0
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	8	8	8	40	40	40	40	66	66	66	93	93	93
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	8	0	0	38	0	0	33	0	0	0	29	0	0
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	8	8	8	46	46	46	79	79	79	79	108	108	108
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	13	0	0	33	0	0	35	0	0	0	29	0	0
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	13	13	13	46	46	46	81	81	81	81	110	110	110
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	9	0	0	30	0	0	37	0	0	29	0	0	0
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	9	9	9	39	39	39	76	76	76	105	105	105	105
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	5	0	0	35	0	0	28	0	0	0	27	0	0
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	5	5	5	40	40	40	68	68	68	68	95	95	95

## Appendix 4-4 Result of reproduction test

Test chemical: MM

(Concentration 3)

Rep. No.	Counts	Time																					Total
		8/27	8/28	8/29	8/30	8/31	9/1	9/2	9/3	9/4	9/5	9/6	9/7	9/8	9/9	9/10	9/11	9/12	9/13	9/14	9/15	9/16	
		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	3	0	0	0	18	0	0	28	0	0	0	25	0	0
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	3	3	3	3	21	21	21	49	49	49	49	74	74	74
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	6	0	0	25	0	0	30	0	0	0	27	0	0
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	6	6	6	31	31	31	61	61	61	61	88	88	88
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	13	0	0	20	0	0	0	28	0	0	30	0	0
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	13	13	13	33	33	33	33	61	61	61	91	91	91
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	10	0	0	25	0	0	0	27	0	0	27	0	0
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	10	10	10	35	35	35	35	62	62	62	89	89	89
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	0	17	0	0	27	0	0	0	31	0	0
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	8	8	8	8	25	25	25	52	52	52	52	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	6	0	0	0	23	0	0	23	0	0	0	23	0	0
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	6	6	6	6	29	29	29	52	52	52	52	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	0	10	0	0	23	0	0	18	12	0	0	24	0	0
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	10	10	10	33	33	33	51	63	63	63	87	87	87
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	5	0	0	27	0	0	0	28	0	0	36	0	0	0
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	5	5	5	32	32	32	32	60	60	60	96	96	96	96
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	1	0	0	22	0	0	0	29	0	0	26	0	0	0
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	23	23	23	23	52	52	52	78	78	78	78
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	2	7	0	0	27	0	0	28	0	0	0	26	0	0
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	2	9	9	9	36	36	36	64	64	64	64	90	90	90

## Appendix 4-5 Result of reproduction test

Test chemical: MM

(Concentration 4)

Rep. No.	Counts		Time																					Total
			8/27	8/28	8/29	8/30	8/31	9/1	9/2	9/3	9/4	9/5	9/6	9/7	9/8	9/9	9/10	9/11	9/12	9/13	9/14	9/15	9/16	
			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	1	0	0	6	5	0	0	26	0	0	0	24	0	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	7	12	12	12	38	38	38	38	62	62	62
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	7	0	0	5	0	0	0	27	0	0	28	0	0	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	7	7	7	12	12	12	12	39	39	39	67	67	67	67
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	1	0	0	8	0	0	0	25	0	0	33	0	0	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	9	9	9	9	34	34	34	67	67	67	67
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	5	0	0	8	0	0	26	0	0	0	33	0	0	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	5	5	5	13	13	13	39	39	39	39	72	72	72	72
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	1	0	0	7	0	0	0	23	0	0	25	0	0	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	8	8	8	8	31	31	31	56	56	56	56
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	0	0	0	6	0	0	0	25	0	0	19	0	0	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6	6	6	6	31	31	31	50	50	50	50
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	0	0	0	11	0	0	0	13	0	0	23	0	0	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	11	11	11	11	24	24	24	47	47	47	47
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	0	10	0	0	0	11	0	0	2	25	0	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	10	10	10	21	21	21	23	48	48	48
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	3	0	0	4	0	0	0	20	0	0	15	9	0	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	3	3	3	7	7	7	7	27	27	27	42	51	51	51
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	1	0	0	17	0	0	0	18	0	0	0	23	0	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	18	18	18	18	36	36	36	36	59	59	59

## Appendix 4-6 Result of reproduction test

Test chemical: MM

(Concentration 5)

Rep. No.	Counts	Time																					Total
		8/27 1 d	8/28 2 d	8/29 3 d	8/30 4 d	8/31 5 d	9/1 6 d	9/2 7 d	9/3 8 d	9/4 9 d	9/5 10 d	9/6 11 d	9/7 12 d	9/8 13 d	9/9 14 d	9/10 15 d	9/11 16 d	9/12 17 d	9/13 18 d	9/14 19 d	9/15 20 d	9/16 21 d	
1	P generation	Live	1	1	1	1	1	0															
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0															
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0															--
2	P generation	Live	1	1	1	1	1	0															
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0															
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0															--
3	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	0														
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0														
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0													--
4	P generation	Live	1	1	1	1	1	0															
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0															
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0															--
5	P generation	Live	1	1	1	1	1	0															
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0															
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0															--
6	P generation	Live	1	1	1	1	1	0															
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0															
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0															--
7	P generation	Live	1	1	1	1	0																
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0																
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0																--
8	P generation	Live	1	1	1	1	1	0															
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0															
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0															--
9	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	0														
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0														
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0													--
10	P generation	Live	1	1	1	1	1	0															
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0															
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0															--

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

## 付属資料－5

結果の算出

Table A-5-1 Calculation of the LC50 (Representative, 21days)

TOXDAT MULTI-METHOD PROGRAM (BINOMIAL, MOVING AVERAGE AND PROBIT METHODS)					
ミジンコ繁殖阻害試験					
Time: 21day					
Conc. No	CONC. mg/L	NUMBER EXPOSED	NUMBER DEAD	PERCENT DEAD	BINOMIAL PROB. (%)
Control	0	10	0	0	----
Conc. 1	1	10	1	10	1. 07421875
Conc. 2	3. 53	10	0	0	0. 09765625
Conc. 3	11. 8	10	0	0	0. 09765625
Conc. 4	36. 1	10	0	0	0. 09765625
Conc. 5	121	10	10	100	0. 09765625

THE BINOMIAL TEST SHOWS THAT 36. 1 AND 121 CAN BE  
USED AS STATISTICALLY SOUND CONSERVATIVE 95 PERCENT  
CONFIDENCE LIMITS SINCE THE ACTUAL CONFIDENCE LEVEL  
ASSOCIATED WITH THESE LIMITS IS 99. 8046875 PERCENT.  
AN APPROXIMATE LC50 FOR THIS SET OF DATA IS 66. 0916030533487

WHEN THERE ARE LESS THAN TWO CONCENTRATIONS AT WHICH THE PERCENT  
DEAD IS BETWEEN 0 AND 100, NEITHER THE MOVING AVERAGE NOR THE  
PROBIT METHOD CAN GIVE ANY STATISTICALLY SOUND RESULTS.

Table A-5-2 Calculation of the NOEC, LOEC (21days)

**Input Data Table**

No.	Control	Conc. 1	Conc. 2	Conc. 3	Conc. 4	Conc. 5
	(Group1)	(Group2)	(Group3)	(Group4)	(Group5)	(Group6)
1	88	97	84	74	62	*
2	101	101	95	88	67	*
3	105	153	105	91	67	*
4	94	143	103	89	72	*
5	96	98	104	83	56	*
6	91	99	93	75	50	*
7	92	101	108	87	47	*
8	92	*	110	96	48	*
9	116	105	105	78	51	*
10	101	113	95	90	59	*

Group	Samples	Mean	S. E.	S. D.	Variance		
1	10	97.6000	2.6466	8.3693	70.0444		
2	9	112.2222	6.9956	20.9868	440.4444		
3	10	100.2000	2.5682	8.1213	65.9556		
4	10	85.1000	2.3212	7.3401	53.8778		
5	10	57.9000	2.8144	8.9001	79.2111		
Method	vs	Side	Stat.	0.05	0.01	0.001 Prob.	
Bartlett test			0 15.2999	9.4877	>13.2767	18.4668	0.004118
Method	vs	Side	Stat.	0.05	0.01	0.001 Prob.	
Kruskal-Wallis test			0 35.8490	9.4877	13.2767	>18.4668	3.108E-07
Method (nonparametric)	vs	Side	Stat.	0.05	0.01	0.001 Prob.	
Williams (1971, 1972, 1977) 1 vs 2			2 0	1.9587	2.5735	999.9900	999.9900
Williams (1971, 1972, 1977) 1 vs 3			2 0	2.0137	2.6043	999.9900	999.9900
Williams (1971, 1972, 1977) 1 vs 4			2 2.6413	>2.0305	2.6122	999.9900	999.9900 *
Williams (1971, 1972, 1977) 1 vs 5			2 4.4812	2.0386	>2.6151	999.9900	999.9900 **