

環境省殿

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

最 終 報 告 書

ペンタクロロフェノールのヒメダカ (*Oryzias latipes*)
に対する初期生活段階毒性試験

(試験番号：A010474)

2002年 6月28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 : ペンタクロロフェノールのヒメダカ (*Oryzias latipes*)
に対する初期生活段階毒性試験

試 験 番 号 : A 0 1 0 4 7 4

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)

2002年 6月28日

試験責任者

[Redacted Signature]

[Redacted Stamp]

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 : ペンタクロロフェノールのヒメダカ (*Oryzias latipes*)
に対する初期生活段階毒性試験

試 験 番 号 : A010474

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		2002年 3月15日	2002年 3月15日
試験の査察	試験液の調製	2002年 3月27日	2002年 3月27日
	卵・胚の投入	2002年 3月29日	2002年 3月29日
	胚・魚の観察	2002年 4月 9日	2002年 4月 9日
	魚の観察	2002年 4月30日	2002年 4月30日
最終報告書監査		2002年 6月28日	2002年 6月28日

2002年 6月28日

信頼性保証部門担当者



試験実施概要

1. 表 題 : ペンタクロロフェノールのヒメダカ (*Oryzias latipes*)
に対する初期生活段階毒性試験
(試験番号: A010474)
2. 試験目的 : 被験物質のヒメダカ (*Oryzias latipes*) に対する初期生活段階毒性試験を行い, 最小作用濃度 (LOEC) および最大無作用濃度 (NOEC) を求める。
3. 適用ガイドライン : OECD 化学品テストガイドライン No. 210 「魚類の初期生活段階毒性試験」 (1992 年)
4. 適用 G L P : 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. 運営管理者 : XXXXXXXXXX

9. 試験責任者 : [redacted] [redacted] (2002年 6月28日)
生態化学グループ

10. 試験担当者 : [redacted] [redacted] (2002年 6月28日)
(試験実施, 分析実施, 報告書作成)

[redacted] [redacted] (2002年 6月28日)
(試験実施)

11. 試験日程 : 試験開始日 2002年 3月15日
実験開始日 2002年 3月29日
実験終了日 2002年 5月 8日
試験終了日 2002年 6月28日

12. 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

要 旨	頁
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	12
3.4 試験濃度の設定	12
3.5 試験液の調製	13
3.6 試験液の分析	14
3.7 試験操作	14
4 結果の算出	16
4.1 最小作用濃度 (LOEC) および最大無作用濃度 (NOEC) 算出に用いる 被験物質濃度の決定	16
4.2 最小作用濃度 (LOEC) および最大無作用濃度 (NOEC) の算出	16
5 結果および考察	17
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	17
5.2 試験液中の被験物質濃度	17
5.3 孵化率および孵化日数	17
5.4 卵・胚時期における発生異常	17
5.5 孵化仔魚・稚魚の生存率	18
5.6 孵化仔魚・稚魚の形態・行動異常および摂餌状況	18
5.7 暴露終了時の生存個体重量	18
5.8 暴露終了時の生存個体体長	18
5.9 最小作用濃度 (LOEC) および最大無作用濃度 (NOEC)	19
5.10 試験液の水温, 溶存酸素濃度, pH および硬度	19
Table 1~11	20~34
Figure 1~8	35~39
付属資料-1 希釈水の水質	40~41
付属資料-2 試験液の分析	42~49

要 旨

試 験 委 託 者 : 環境省

表 題 : ペンタクロロフェノールのヒメダカ (*Oryzias latipes*)
に対する初期生活段階毒性試験

試 験 番 号 : A 0 1 0 4 7 4

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. 210「魚類の初期生活段階毒性試験」(1992年)
- 2) 暴 露 方 式 : 流水式
- 3) 供 試 生 物 : ヒメダカ (*Oryzias latipes*)
- 4) 暴 露 期 間 : 40日間(対照区の孵化率が70%以上になった日の30日後まで)
- 5) 試 験 濃 度 : 対照区, 助剤対照区,
(設定値) 0.0050, 0.013, 0.032, 0.080, 0.20 mg/L
公比; 2.5
助剤濃度一定; 0.1 mL/L (ジメチルホルムアミド使用)
- 6) 試験液供給量 : 約46 L/容器/日, 試験容器内水量; 約2.5 L
(換水率; 約18回/日)
- 7) 連 数 : 3容器/試験区
- 8) 供 試 生 物 数 : 60個体/試験区 (20個体/容器)
- 9) 試 験 温 度 : 卵・胚期; 24±1 °C
仔魚・稚魚期; 23±2 °C
- 10) 溶存酸素濃度 : 飽和濃度の60%以上 (エアレーションなし)
- 11) pH : 試験液のpH調整なし
- 12) 照 明 : 室内光, 16時間明 (1000 lux以下) / 8時間暗
- 13) 給 餌 : 仔魚・稚魚期に飽食量給餌
- 14) 分 析 法 : 高速液体クロマトグラフィー (HPLC)

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が、全て±20%以内であったため、
結果の算出には設定値を用いた。

2) 最小作用濃度 (LOEC) : 0.032 mg/L

3) 最大無作用濃度 (NOEC) : 0.013 mg/L

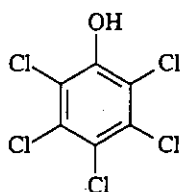
1 被験物質

1.1 名称、構造式および物理化学的性状

名 称： ペンタクロロフェノール（略称 PCP）

CAS No： 87-86-5

構造式：



分子式： C_6Cl_5OH

分子量^{*1}： 266.34

沸点^{*1}： 309 °C（分解）

融点^{*1}： 190.2 °C

水溶解度^{*2}： 14 mg/L (20 °C)

比重^{*1}： 1.98

log Pow^{*1}： 5.01

その他^{*1}： 特異臭

*1: 供給者提供資料

*2:

(2001)

1.2 供試試料

純度^{*1}： 99.5% (GC法)

ロット番号^{*1}： JSG9302

供給者：

受領量^{*1}： 200 mg×25

受領日： 2001年11月30日

外観^{*1}： 白色結晶性粉末

*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冷蔵庫（保管条件：冷蔵，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。

2 供試生物

- 1) 和名： ヒメダカ
- 2) 学名： *Oryzias latipes*
- 3) 親魚の入手先： 三京水産株式会社（東京都新宿区市谷田町一丁目1番地）
- 4) 親魚の入手日： 2002年 1月16日
- 5) 親魚のロット番号： 02-H-0116
- 6) 親魚の被鱗体長： 約2.0 cm
- 7) 親魚のじゅん化期間： 2002年 1月29日～2002年 3月29日
暴露開始前7日間の死亡率は5%未満で、受精卵の採卵には肉眼的に健康で正常な個体を使用した。（暴露開始前12日間のじゅん化条件は以下に示す。）
- 8) 親魚のじゅん化条件：
飼育水： 希釈水（3.2 参照）
飼育方式： 流水式（飼育密度 1.0 g/L/日以下）
水温： 24±1 ℃
溶存酸素濃度： 飽和濃度の80%以上
pH 6.5～8.5
照明： 室内光，16時間明（1000 lux以下）／8時間暗
餌の種類： テトラリスカス（テトラベ社），オミシンコ（自家繁殖），
コロラ（コロラ工業株式会社）
給餌量： 飽食量

3 試験方法

3.1 試験条件

- 1) 暴露方式： 流水式
- 2) 暴露期間： 40日間（受精卵から暴露し，対照区の孵化率が70%以上になった日の30日後まで）
- 3) 試験液供給量： 約46 L／容器／日，試験容器内水量；約2.5 L
（換水率；約18回／日）
- 4) 連数： 3容器／試験区
- 5) 供試生物数： 60個体／試験区（20個体／容器）
（収容密度；1日当たり0.5 g／Lを超えず，常に5 g／Lを超えないようにした）
- 6) 試験温度： 卵・胚期； 24±1 ℃
仔魚・稚魚期； 23±2 ℃
- 7) 溶存酸素濃度： 飽和濃度の60%以上に維持した（エアレーションなし）
- 8) pH： 試験液のpH調整は行わなかった
- 9) 照明： 室内光，16時間明（1000 lux 以下）／8時間暗
- 10) 給餌： 仔魚・稚魚に対してBSN* を1日1～2回飽食量与えた。また，ト
ミンベビー（トウモロコシ社）を孵化後1週間程度まで1日1～2回補助
的に与えた。
*； 孵化直後のブラインシュリンプ® 孵化幼生（ブラインシュリンプ® イッグの入手
先；MACKAY MARINE BRINE SHRIMP CO., INC.）

3.2 希釈水

脱塩素水（水道水を活性炭処理し，残留塩素等を除去したもので，充分通気したもの）を希釈水として使用した。希釈水水質測定結果を付属資料－1に示した。使用時には残留塩素が無いことを確認した。魚飼育水として適正な水質であると判断した。

3.3 試験容器および恒温槽等

- 1) 試験容器： 3 L容ガラス水槽（間口120×幅200×高さ140 mm）
（ただし、孵化前はステンレス製細孔網入り容器を上記水槽に吊り下げ、その中で胚を暴露した）
- 2) 恒温槽： 恒温室
- 3) 流水式試験装置： 3 L容ガラス水槽に排水用のステンレス製細孔網入りサイホンを取り付け、以下に示した定量ポンプ、自動流路切替え装置（3連式）を使用し、試験液を供給した。
希釈水ポンプ：
モーター（駆動部）； Cole-Parmer製 MASTERFLEX® 7543-30
ポンプヘッド； Cole-Parmer製 MASTERFLEX® 7017-21
チューブ； Cole-Parmer製 MASTERFLEX® PharMed 6485-17
試験原液ポンプ：
日本精密科学製 ミニミカポンプ SP-Y [3]-2500
チューブ；テフロン製
自動流路切り替え装置：
日本精密科学製 自動流路切り替え装置（電磁弁切り替え式）
チューブ；テフロン製
- 4) 水温計： 横河電機製 2455 02型 No. 4
- 5) 溶存酸素計： 電気化学計器製 DOL-10型 No. 2
- 6) pH計： 東亜電波工業製 HM-40V型 No. 1

3.4 試験濃度の設定

被験物質の急性毒性試験結果および延長毒性試験結果（何れも環境省提供資料）をもとに濃度範囲を決定した。96時間の半数致死濃度（LC50）が0.19 mg/L、14日間のLC50および最大無作用濃度（NOEC）がそれぞれ0.18 mg/L、0.039 mg/Lであったので、試験濃度を次のように設定した。

試験濃度： 対照区，助剤対照区，0.0050，0.013，0.032，0.080，0.20 mg/L

公比：2.5

3.5 試験液の調製

被験物質原液および助剤原液を調製した（下表参照*）。

	被験物質原液	助剤原液
被験物質採取量	760 mg	--
溶解助剤 (ジメチルホルムアミド)	380 mL	855 mL
定容量 (定容液：精製水)	400 mL	900 mL
被験物質濃度	1900 mg/L	--
助剤濃度	950 mL/L	950 mL/L

調製した被験物質原液を助剤原液で段階的に希釈し、各試験区の試験原液を調製した（下表参照*）。

試験濃度 (mg/L)	試験原液濃度 (mg/L)	被験物質原液添加量 (mL)	定容量 (mL) {定容液：助剤原液}
助剤対照区	0	0	200
0.0050	47.5	5.00	200
0.013	119	12.5	200
0.032	300	31.6	200
0.080	756	79.6	200
0.20	1900	200	200

試験液は、流水式試験装置を使用して、試験原液と希釈水を一定流量で連続的に混合し、試験容器内に供給した。対照区には希釈水のみを供給した。助剤濃度は各濃度区で一定とし、同じ濃度の助剤対照区を設けた（ジメチルホルムアミド：0.1 mL/L）。

流水式試験装置運転中は、試験原液と希釈水の流量を週1回の頻度で調べ、その期間を通じて10%以上の変動がないようにした。

試験液の状態（外観）は、暴露期間を通じて、全ての試験区で無色透明であった。

*：調製量に応じてスケールダウンした。

3.6 試験液の分析

暴露開始時，7日後，14日後，21日後，28日後，35日後（週1回）に，各試験区の試験液を一定量採取し，等量のアセトニトリルを加え混合後，HPLC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

試験は卵の受精後できるだけ早く開始した。採卵した卵はばらばらにし，顕微鏡により発生段階の同じ受精卵（16細胞期～32細胞期）を必要数選別し，試験に用いた。

各試験容器の試験液の水溫，溶存酸素濃度，pH，硬度を測定後，胚を1容器当たり20個（1試験区＝20個×3容器）を無作為に投入した。暴露期間中は各試験液の水溫，溶存酸素濃度を週1回測定し，暴露終了時に水溫，溶存酸素濃度，pH，硬度を測定した。対照区・No.1の水溫を1日1回測定した。餌は3.1.10)を参考にして毎日，飽食量を与えたが，残餌はできるだけ少なくした。残餌や糞は毎日観察する際に，必要な頻度で除去した。

暴露開始後の観察

卵・胚： 孵化と生存に関しては1日に1回観察し、その数を記録した。死亡した卵・胚は観察後できるだけ早く取り除いた。死亡の判断基準は下記の通りとした。

卵；半透明性が顕著に消失し、白く不透明になる

胚；体の動きや心拍が停止する

また、胚の発眼の有無および発生異常が見られないかの観察を顕微鏡下で週3回行い、発生異常が見られた場合には記録した。

仔魚・稚魚： 生存に関しては1日に1回観察し、その数を記録した。死亡した仔魚・稚魚は観察後できるだけ早く取り除いた。死亡の判断基準は下記の通りとした。

仔魚と稚魚；動きがない、呼吸運動の停止、心拍の停止、中枢神経の不透明化、機械的な刺激に対する反応の欠如

また、形態異常と行動異常の観察を週3回行い、異常な仔魚・稚魚の数を記録した。異常な仔魚・稚魚は死亡したときにだけ取り除いた。行動異常の分類は下記の通りとし、残餌の有無などから摂餌量の多少についても記載した。

異常呼吸；対照区および助剤対照区の魚と比較して鰓蓋の動きが異なるもの。

異常遊泳；明らかに対照区および助剤対照区の魚と異なる遊泳をしたものの。動作の緩慢、過敏、痙攣、反転等。

遊泳不能；底部または水面で動いているものの、水中を遊泳することが不可能なもの。横転、仮死を含む。

体重： 暴露終了時に全ての生存魚の体重を個体別に測定した。

体長： 暴露終了時に全ての生存魚の体長を個体別に測定した。

4 結果の算出

4.1 最小作用濃度 (LOEC) および最大無作用濃度 (NOEC) 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, 最小作用濃度 (LOEC) および最大無作用濃度 (NOEC) 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	測定値の算術平均値

4.2 最小作用濃度 (LOEC) および最大無作用濃度 (NOEC) の算出

試験により得られた結果 (孵化率, 孵化日数, 暴露終了時の生存率, 暴露終了時の正常個体 (健康魚) 率, 暴露終了時の体重, 体長) について, 各濃度区と助剤対照区との有意差の有無を統計的手法*により求め, 最小作用濃度 (LOEC) および最大無作用濃度 (NOEC) を決定した。

最小作用濃度 (LOEC) : 助剤対照区と比較したときに被験物質の有意な影響が ($p < 0.05$) 観察される最も低い試験濃度とする。しかし, LOEC以上の全ての濃度区ではLOECで観察されたものに等しいかあるいはそれ以上の有害な影響がなければならない。

最大無作用濃度 (NOEC) : LOECのすぐ下の試験濃度とする。

* 統計的手法: Bartlett の等分散検定, 一元配置分散分析 (ANOVA) およびDunnett の多重比較検定を用いた。また, 不等分散が認められた場合は, Kruskal-Wallisの検定, ノンパラメトリックのDunnetおよびWilliams の多重比較検定を用いた。

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

該当する事象は無かった。

5.2 試験液中の被験物質濃度

暴露開始時，7日後，14日後，21日後，28日後，35日後（週1回）に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。

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，暴露期間を通じて82～108%と，全て±20%以内であったため，結果の算出には設定値を用いた。

また，試験液の被験物質濃度が平均測定値の±20%以内に維持され，試験成立条件を満たした。

5.3 孵化率および孵化日数

各観察日における孵化数，孵化日数，孵化率を Table 2に，累積孵化率曲線を Figure 1に，平均孵化率の図を Figure 2に，平均孵化日数の図を Figure 3に示した。

平均孵化率に関しては，対照区および助剤対照区でそれぞれ93.3%および96.7%であり，試験成立条件を満たした。濃度区の平均孵化率は何れの濃度区でも90%以上であり，助剤対照区との有意差は認められなかった。

平均孵化日数に関しては，0.080 mg/L以下の濃度区では助剤対照区との有意差は認められず，0.20 mg/L区において有意差が認められた。

5.4 卵・胚時期における発生異常

各観察日における胚の発生異常を Table 3に示した。

対照区，助剤対照区，0.013 mg/L区，0.080 mg/L区において，最大で2個体の奇形が観察されたが，発生率は3.3%以下と低く，濃度依存性も認められないため自然発生率範囲と判断した。その他には肉眼的に認められる異常は観察されなかったため，有意差検定は実施しなかった。

5.5 孵化仔魚・稚魚の生存率

孵化後の仔魚・稚魚の生存数および暴露終了時の生存率（孵化後および全暴露期間）を Table 4に、孵化後の生存率曲線を Figure 4に、全暴露期間の平均生存率の図を Figure 5に示した。

孵化後の平均生存率に関しては、対照区および助剤対照区でそれぞれ100%および 98.2%であり、試験成立条件を満たした。濃度区の平均生存率は0.080 mg/L以下の濃度区では助剤対照区との有意差は認められず、0.20 mg/L区において有意差が認められた。

全暴露期間の平均生存率に関しては、0.080 mg/L以下の濃度区では助剤対照区との有意差は認められず、0.20 mg/L区において有意差が認められた。

5.6 孵化仔魚・稚魚の形態・行動異常および摂餌状況

各観察日における孵化後の仔魚・稚魚の形態・行動異常を Table 5に、摂餌状況を Table 6に示した。

形態・行動異常に関しては、助剤対照区、0.0050 mg/L区、0.013 mg/L区、0.080 mg/L区、0.20 mg/L区において、最大で1個体の形態・行動異常が観察されたが、発生率も1.7%と低く、濃度依存性も認められないため自然発生率範囲と判断した。また、暴露終了時には、何れの試験区でも異常個体が観察されなかったため、正常個体数（生存数から異常個体数を除いたもの）は生存数と同等と判断した。

摂餌状況に関しても、何れの試験区でも摂餌能力の低下は認められなかった。

5.7 暴露終了時の生存個体重量

暴露終了時の生存個体の重量を Table 7および Figure 6に示した。

0.080 mg/L以下の濃度区では助剤対照区と有意差は認められず、0.20 mg/L区において有意差が認められた。

5.8 暴露終了時の生存個体体長

暴露終了時の生存個体の体長を Table 8および Figure 7に示した。

0.013 mg/L以下の濃度区では助剤対照区と有意差は認められず、0.032 mg/L以上の濃度区において有意差が認められた。

5.9 最小作用濃度 (LOEC) および最大無作用濃度 (NOEC)

助剤対照区と比較して影響が認められた濃度区を下表に●で示した。

設定濃度 (mg/L)	孵化率	孵化 日数	胚の 発生 異常	孵化後 の 生存率	全暴露 期間の 生存率	正常 個体率	体重	体長
0.0050								
0.013								
0.032								●
0.080								●
0.20		●		●	●	●	●	●

以上の結果から、最小作用濃度 (LOEC) は 0.032 mg/L、最大無作用濃度 (NOEC) は 0.013 mg/Lと判断した。また、助剤対照区では対照区と比較し、有意な影響が認められず、試験成立条件を満たした。

5.10 試験液の水温、溶存酸素濃度、pHおよび硬度

試験液の水温をTable 9およびFigure 8に、溶存酸素濃度をTable 10に、pHおよび硬度をTable 11に示した。

水温は全ての試験区で 24 ± 1 °C (胚時期)、 23 ± 2 °C (仔魚・稚魚期)であり、試験容器間では ± 1.5 °C未満であった。また、対照区・No. 1の水温は連続した日の間で ± 1.5 °C未満であり、何れも試験成立条件を満たした。

溶存酸素濃度は全ての試験区で飽和溶存酸素濃度 (24.0 °Cの飽和溶存酸素濃度：8.25 mg/L) の60%以上であり、試験成立条件を満たした。

pHおよび硬度は、飼育環境として適正範囲 (pH：6.0～8.5、硬度：30～100 mgCaCO₃/L) であった。

以 上

Table 1 Measured Concentration of the Test Substance in Test Water (Flow-through Conditon)

Nominal Concentration (mg/L)	Measured Concentration (mg/L) (Percent of Nominal)						Mean ^a	S.D.	C.V. (%)
	0 day	7 day	14 day	21 day	28 day	35 day			
Control	<0.0002	<0.0002	<0.0002	<0.0002	<0.0002	<0.0002	----	----	----
Solvent Control	<0.0002	<0.0002	<0.0002	<0.0002	<0.0002	<0.0002	----	----	----
0.0050	0.0042 (84)	0.0051 (102)	0.0052 (104)	0.0054 (108)	0.0052 (104)	0.0049 (98)	0.0050 (100)	0.0004	8.5
0.013	0.0106 (82)	0.0127 (98)	0.0134 (103)	0.0140 (108)	0.0138 (106)	0.0135 (104)	0.0130 (100)	0.0013	9.7
0.032	0.0278 (87)	0.0328 (103)	0.0335 (105)	0.0345 (108)	0.0331 (103)	0.0323 (101)	0.0323 (101)	0.0023	7.2
0.080	0.0677 (85)	0.0778 (97)	0.0768 (96)	0.0803 (100)	0.0786 (98)	0.0760 (95)	0.0762 (95)	0.0044	5.8
0.20	0.176 (88)	0.201 (101)	0.197 (99)	0.197 (99)	0.201 (101)	0.196 (98)	0.195 (98)	0.009	4.8

a : Arithmetic mean

Table 2 Days to Hatch and Hatching Rate during Exposure

Nominal Concentration (mg/L)	Vessel No.	Number of Embryos	Number Hatched on Each Exposure Day														Total Number Hatched	Days to Hatch		Hatching Rate (%)	
			Day 6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	Each Mean		Mean \pm S.D.	Each Value	Mean \pm S.D.	
Control	1	20	0	0	0	0	15	4								19	10.20	10.13	95.0	93.3	
	2	20	0	0	0	1	13	3	0	1	0					18	10.25	± 0.17	90.0	± 2.9	
	3	20	0	0	0	4	12	3	0	0	0					19	9.93		95.0		
Solvent Control	1	20	0	0	0	3	14	3								20	9.98	9.82	100	96.7	
	2	20	0	0	0	6	12	1								19	9.72	± 0.14	95.0	± 2.9	
	3	20	0	0	0	7	10	1	1							19	9.76		95.0		
0.0050	1	20	0	0	0	8	10									18	9.54	9.55	90.0	95.0	
	2	20	0	0	0	13	6	1								20	9.38	± 0.17	100	± 5.0	
	3	20	0	0	0	6	12	1								19	9.72		95.0		
0.013	1	20	0	0	1	11	8									20	9.33	9.44	100	95.0	
	2	20	0	0	0	8	8	1	0	0	0					17	9.57	± 0.12	85.0	± 8.7	
	3	20	0	0	0	12	7	1								20	9.43		100		
0.032	1	20	0	0	0	13	4	1								18	9.32	9.53	90.0	93.3	
	2	20	0	0	0	5	13	2								20	9.83	± 0.27	100	± 5.8	
	3	20	0	0	0	10	8									18	9.43		90.0		
0.080	1	20	0	0	0	5	13	0	0	1						19	9.86	9.81	95.0	91.7	
	2	20	0	0	0	6	11	2								19	9.77	± 0.05	95.0	± 5.8	
	3	20	0	0	0	4	12	1								17	9.81		85.0		
0.20	1	20	0	0	0	2	7	10								19	10.40	10.54 **	95.0	96.7	
	2	20	0	0	0	0	7	13								20	10.64	± 0.12	100	± 2.9	
	3	20	0	0	0	0	8	11								19	10.57		95.0		

*: Significantly different from solvent control group at $p < 0.05$ (There was no sign in this analysis.)

**: Significantly different from solvent control group at $p < 0.01$ (by Dunnett multicomparison test)

$$\text{Each mean of days to hatch (day)} = T_1^{N1/N} \times T_2^{N2/N} \times \dots \times T_i^{Ni/N} \times \dots \times T_n^{Nn/N}$$

where: i = hatching date

T_1 = the first hatching date

T_2 = the second hatching date

T_n = the last hatching date

N = total number hatched

$N1$ = number hatched at starting day of hatching

$N2$ = number hatched at second day of hatching

Nn = number hatched at the end

Table 3 Abnormality (except death) Observed at Embryo during Exposure

Nominal Concentration (mg/L)	Vessel No.	Exposure Time (Day)						
		3	5	7	10	12	14	16
Control	1	-	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	De(1)	De(1)	De(1)	-	-
	3	-	-	De(1)	De(1)	De(1)	-	-
Solvent Control	1	-	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	-	-
	3	De(2)	De(2)	De(2)	De(2)	-	-	-
0.0050	1	-	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-	-	-
0.013	1	-	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	De(1)	De(1)	De(1)	-	-
	3	-	-	-	-	-	-	-
0.032	1	-	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-	-	-
0.080	1	De(1)	De(1)	De(1)	De(1)	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-	-	-
0.20	1	-	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-	-	-

- : No symptom

De : Deformity

The number in parentheses is the number of abnormal embryos.

Table 4 Survival Number during Exposure after Hatching

Nominal Concentration (mg/L)	Survival Number																																									Survival Rate (%) at the End of Test			
																																										from the Start		after Hatching	
	No.	E	H	Day 8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	Each Value	Mean \pm S.D.	Each Value	Mean \pm S.D.				
Control	1	20	19			15	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	95.0	93.3	100	100.0		
	2	20	18		1	14	17	17	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	90.0	± 2.9	100	± 0.0	
	3	20	19		4	16	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	95.0		100		
Solvent	1	20	20		3	17	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	100	95.0	100	98.2	
Control	2	20	19		6	18	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	95.0	± 5.0	100	± 3.0	
	3	20	19		7	17	18	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	90.0		94.7		
0.0050	1	20	18		8	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	90.0	93.3	100	98.3	
	2	20	20		13	19	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	95.0	± 2.9	95.0	± 2.9	
	3	20	19		6	18	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	95.0		100		
0.013	1	20	20	1	12	20	20	20	20	20	20	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	95.0	93.3	95.0	98.3	
	2	20	17		8	16	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	85.0	± 7.6	100	± 2.9	
	3	20	20		12	19	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	100		100		
0.032	1	20	18		13	17	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	90.0	93.3	100	100.0	
	2	20	20		5	18	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	100	± 5.8	100	± 0.0	
	3	20	18		10	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	90.0		100		
0.080	1	20	19		5	18	18	18	19	19	19	19	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	90.0	90.0	94.7	98.2	
	2	20	19		6	17	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	95.0	± 5.0	100	± 3.0	
	3	20	17		4	16	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	85.0		100		
0.20	1	20	19		2	9	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	85.0	78.3 *(1)	89.5	81.1 *(2)	
	2	20	20		7	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	75.0	± 5.8	75.0	± 7.5	
	3	20	19		8	19	19	18	18	18	18	17	17	17	17	17	17	17	17	16	16	16	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	75.0		78.9		

E : Number of embryos at the start of exposure H : Total number hatched

(1): Significantly different from solvent control group at $p < 0.05$ (by Dunnett multicomparison test)(2): Significantly different from solvent control group at $p < 0.05$ (by Williams multicomparison test)**: Significantly different from solvent control group at $p < 0.01$ (There was no sign in this analysis.)

Table 5 Abnormality (except death) Observed at Larvae and Juvenile Fish during Exposure

Nominal Concentration (mg/L)	Vessel No.	Exposure Time (Day)					
		10	12	14	17	19	21
Control	1	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-	-
Solvent Control	1	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	-
	3	-	De(1)	De(1)	De(1)	De(1)	De(1)
0.0050	1	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-	-
0.013	1	-	De(1) + AP(1) = (1)	De(1) + AP(1) = (1)	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-	-
0.032	1	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-	-
0.080	1	-	-	De(1) + AS(1) = (1)	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-	-
0.20	1	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	-
	3	-	AP(1)	-	-	-	-

- : No symptom

AS : Abnormal swimming AP : Paralysis De : Deformity

The number in parentheses is the number of abnormal fish.

Table 5 (Continued)

Nominal Concentration (mg/L)	Vessel No.	Exposure Time (Day)					
		24	26	28	31	33	35
Control	1	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-	-
Solvent Control	1	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-	-
0.0050	1	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-	-
0.013	1	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-	-
0.032	1	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-	-
0.080	1	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-	-
0.20	1	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-	-

- : No symptom

AS : Abnormal swimming AP : Paralysis De : Deformity

The number in parentheses is the number of abnormal fish.

Table 5 (Continued)

Nominal Concentration (mg/L)	Vessel No.	Exposure Time (Day)		Number of Surviving Fish (at the End of Test)	Number ^a of Healthy Fish	Healthy Fish Rate (%)	
		38	40			Each Value	Mean \pm S.D.
Control	1	-	-	19	19	95.0	93.3
	2	-	-	18	18	90.0	± 2.9
	3	-	-	19	19	95.0	
Solvent Control	1	-	-	20	20	100	95.0
	2	-	-	19	19	95.0	± 5.0
	3	-	-	18	18	90.0	
0.0050	1	-	-	18	18	90.0	93.3
	2	AS(1)	-	19	19	95.0	± 2.9
	3	-	-	19	19	95.0	
0.013	1	-	-	19	19	95.0	93.3
	2	-	-	17	17	85.0	± 7.6
	3	-	-	20	20	100	
0.032	1	-	-	18	18	90.0	93.3
	2	-	-	20	20	100	± 5.8
	3	-	-	18	18	90.0	
0.080	1	-	-	18	18	90.0	90.0
	2	-	-	19	19	95.0	± 5.0
	3	-	-	17	17	85.0	
0.20	1	-	-	17	17	85.0	78.3 *
	2	-	-	15	15	75.0	± 5.8
	3	-	-	15	15	75.0	

- : No symptom

AS : Abnormal swimming AP : Paralysis De : Deformity

The number in parentheses is the number of abnormal fish.

a : Number of Healthy Fish

= Number of Surviving Fish - Number of Abnormal Fish

*: Significantly different from solvent control group at $p < 0.05$ (by Dunnett multicomparison test)**: Significantly different from solvent control group at $p < 0.01$ (There was no sign in this analysis.)

Table 6 Feeding Activity Observed at Larvae and Juvenile Fish during Exposure

Nominal Concentration (mg/L)	Vessel No.	Exposure Time (Day)													
		10	12	14	17	19	21	24	26	28	31	33	35	38	40
Control	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Solvent Control	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0.0050	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0.013	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0.032	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0.080	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0.20	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

- : Normal feeding activity

Table 7 Individual Wet Body Weight (mg) of Fish Surviving at the End of Exposure

Fish No.	Nominal Concentration (mg/L)											
	Control			Solvent Control			0.0050			0.013		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
1	109	114	159	169	126	135	117	103	135	163	139	115
2	117	143	105	139	156	150	120	150	161	103	101	113
3	115	140	151	129	135	154	138	173	146	134	151	119
4	100	119	138	95	171	149	164	113	112	28	136	121
5	135	135	101	127	163	127	164	167	82	137	119	126
6	83	129	131	109	153	124	147	145	102	182	128	125
7	132	119	99	69	136	152	130	139	137	132	129	137
8	85	103	134	150	136	111	116	140	152	136	154	92
9	124	96	124	115	134	120	160	143	137	127	124	138
10	124	131	140	145	131	106	139	126	165	158	155	136
11	125	113	112	160	105	144	139	140	136	137	115	149
12	131	115	109	152	138	121	40	166	161	122	115	87
13	109	133	121	115	96	96	97	139	140	122	99	146
14	140	87	97	149	129	105	176	153	119	119	140	134
15	102	95	128	95	120	136	140	133	150	146	150	130
16	111	129	131	151	149	138	132	116	178	125	142	125
17	98	140	117	137	93	139	52	130	153	78	139	123
18	136	116	164	89	132	90	133	136	126	146	-	129
19	115	-	125	143	134	-	-	140	107	148	-	114
20	-	-	-	112	-	-	-	-	-	-	-	101
Mean	115	120	126	127	134	128	128	140	137	128	131	123
S.D.	17	17	20	27	21	20	36	18	24	33	17	16
n	56			57			56			56		
Total Mean	120			130			135			127		
Total S.D.	18			22			27			23		
Total C.V.	15			17			20			18		

n : Total number of fish measured

- : No measurement was made because fish had died until the end of exposure.

Table 7 (Continued)

Fish No.	Nominal Concentration (mg/L)								
	0.032			0.080			0.20		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
1	140	111	110	107	126	136	90	97	112
2	149	106	83	103	132	146	89	98	97
3	129	159	115	92	103	98	101	84	120
4	119	113	115	128	79	129	65	99	98
5	109	113	118	87	141	103	101	103	75
6	123	172	124	134	112	129	96	95	83
7	119	94	143	97	99	124	83	83	91
8	134	152	140	137	136	126	96	92	92
9	108	106	115	148	134	108	106	135	82
10	149	125	110	104	154	105	109	93	65
11	101	126	123	135	131	133	104	120	60
12	126	103	122	119	122	137	114	87	66
13	115	110	126	130	137	113	78	120	87
14	110	108	155	135	117	131	74	84	114
15	106	109	149	141	128	121	91	93	5
16	109	166	118	154	115	79	111	-	-
17	116	65	126	130	104	17	91	-	-
18	109	94	113	124	96	-	-	-	-
19	-	108	-	-	103	-	-	-	-
20	-	118	-	-	-	-	-	-	-
Mean	121	118	122	123	119	114	94	99	83
S.D.	15	26	16	20	19	30	14	15	28
n	56			54			47		
Total Mean	120			119			92 **		
Total S.D.	20			23			20		
Total C.V.	16			19			22		

n : Total number of fish measured

- : No measurement was made because fish had died until the end of exposure.

* : Significantly different from solvent control group at $p < 0.05$ (There was no sign in this analysis.)

** : Significantly different from solvent control group at $p < 0.01$ (by Dunnett multicomparison test)

Table 8 Individual Body Length (mm) of Fish Surviving at the End of Exposure

Fish No.	Nominal Concentration (mg/L)											
	Control			Solvent Control			0.0050			0.013		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
1	19.1	19.3	20.5	21.0	19.8	20.9	18.8	18.5	19.8	20.2	19.3	19.3
2	19.3	20.2	18.3	21.0	21.8	20.7	19.9	20.4	21.0	18.3	18.0	18.0
3	18.9	20.0	20.7	20.3	20.0	21.0	20.0	21.1	20.9	20.0	19.8	19.2
4	19.0	19.8	20.0	18.2	21.4	21.0	21.1	18.5	18.7	12.4	19.2	20.3
5	20.3	20.2	19.4	20.7	20.7	19.5	21.1	20.8	17.3	19.8	19.0	19.7
6	18.0	20.1	20.6	18.9	20.8	18.9	20.8	19.9	18.5	21.2	19.4	19.6
7	20.9	19.8	18.5	16.7	20.1	20.0	20.3	19.3	20.3	19.3	19.1	20.3
8	17.3	18.4	19.7	20.2	20.9	19.0	19.3	19.9	20.1	19.3	20.3	17.4
9	20.0	17.9	18.7	18.9	19.8	19.4	20.8	19.6	19.5	18.5	19.4	19.9
10	19.9	20.4	20.1	20.9	19.2	18.7	20.4	19.5	21.4	20.4	20.9	18.7
11	20.4	18.3	18.5	21.2	18.8	20.9	19.7	19.4	19.1	19.2	18.7	21.0
12	21.3	19.9	18.3	20.7	20.1	19.5	15.1	20.4	20.5	18.7	18.7	17.6
13	19.3	20.6	19.4	19.2	18.2	18.1	19.2	20.1	19.9	18.2	17.6	20.1
14	21.1	18.7	18.3	19.8	20.1	18.1	21.8	20.2	18.4	19.2	19.9	20.0
15	19.3	18.5	19.3	17.7	19.4	20.1	20.1	19.7	20.4	19.9	20.0	19.5
16	18.9	20.0	19.3	20.8	20.5	20.4	19.9	19.6	20.4	18.8	19.6	19.2
17	18.7	20.2	19.6	19.9	18.0	19.5	15.1	19.3	20.3	16.9	20.2	19.0
18	19.8	19.7	21.0	17.7	20.3	17.6	19.0	19.0	18.9	19.8	-	19.2
19	19.4	-	20.1	20.4	19.1	-	-	20.0	18.2	20.2	-	18.6
20	-	-	-	18.9	-	-	-	-	-	-	-	18.0
Mean	19.5	19.6	19.5	19.6	19.9	19.6	19.6	19.7	19.7	19.0	19.3	19.2
SD	1.0	0.8	0.9	1.3	1.0	1.1	1.8	0.7	1.1	1.9	0.8	1.0
n	56			57			56			56		
Total Mean	19.5			19.7			19.7			19.2		
Total SD	0.9			1.1			1.2			1.3		
Total CV	4.6			5.8			6.3			6.7		

n : Total number of fish measured

- : No measurement was made because fish had died until the end of exposure.

Table 8 (Continued)

Fish No.	Nominal Concentration (mg/L)								
	0.032			0.080			0.20		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
1	19.4	18.5	18.3	18.2	19.5	18.6	17.5	17.5	17.0
2	20.3	17.1	17.0	17.4	19.5	20.0	17.6	17.7	18.0
3	18.9	20.8	18.8	17.2	18.6	17.5	17.4	16.5	18.1
4	18.6	18.3	19.0	19.0	16.7	18.6	15.0	17.3	17.2
5	18.9	18.6	19.5	16.9	20.3	17.7	17.6	17.6	15.6
6	18.9	21.4	19.0	19.0	18.2	19.0	17.2	17.1	16.1
7	18.4	18.0	19.7	17.5	17.5	18.6	15.9	16.3	16.9
8	19.2	20.7	19.3	18.8	19.8	18.9	16.7	16.8	16.3
9	18.0	18.7	18.7	19.8	19.2	18.2	18.5	18.9	16.5
10	20.4	18.6	18.9	17.5	20.0	17.3	17.6	16.0	15.5
11	18.0	18.9	19.1	19.3	18.9	19.7	17.1	17.3	14.9
12	18.4	18.0	19.3	18.3	19.4	19.5	17.8	16.7	14.9
13	18.5	19.5	19.4	19.4	19.7	18.1	15.8	18.5	16.9
14	18.2	18.3	21.1	19.9	18.8	19.4	15.6	15.9	17.5
15	18.1	18.2	19.6	20.1	18.8	18.6	16.6	17.4	6.9
16	18.5	20.6	18.7	20.4	19.0	16.4	18.1	-	-
17	18.4	15.9	19.5	18.9	18.0	9.9	17.5	-	-
18	18.4	17.3	18.6	19.0	17.3	-	-	-	-
19	-	18.2	-	-	17.9	-	-	-	-
20	-	19.0	-	-	-	-	-	-	-
Mean	18.7	18.7	19.1	18.7	18.8	18.0	17.0	17.2	15.9
SD	0.7	1.3	0.8	1.1	1.0	2.3	0.9	0.8	2.7
n	56			54			47		
Total Mean	18.8 **			18.5 **			16.7 **		
Total SD	1.0			1.5			1.7		
Total CV	5.2			8.3			10.5		

n : Total number of fish measured

- : No measurement was made because fish had died until the end of exposure.

* : Significantly different from solvent control group at $p < 0.05$ (There was no sign in this analysis.)** : Significantly different from solvent control group at $p < 0.01$ (by Dunnett multicomparison test)

Table 9 Temperature of Test Water during Exposure

Nominal Concentration (mg/L)	Vessel No.	Temperature (°C)							Min.	Max.	
		0 day	5 day	12 day	19 day	26 day	33 day	40 day			
Control	1	23.9	23.3	23.6	23.8	23.6	24.3	24.1	23.3	24.3	
	2	24.0	23.4	23.7	23.9	23.7	24.5	24.4	23.4	24.5	
	3	24.1	23.4	23.8	23.9	23.8	24.6	24.5	23.4	24.6	
Solvent Control	1	24.2	23.6	23.8	23.9	24.0	24.7	24.6	23.6	24.7	
	2	24.2	23.8	23.9	24.0	24.1	24.7	24.6	23.8	24.7	
	3	24.3	23.8	24.0	24.2	24.1	24.8	24.7	23.8	24.8	
0.0050	1	24.2	23.8	24.0	24.3	24.4	24.7	24.5	23.8	24.7	
	2	24.2	23.9	24.0	24.2	24.4	24.8	24.5	23.9	24.8	
	3	24.3	23.9	24.0	24.4	24.5	24.7	24.7	23.9	24.7	
0.013	1	24.3	24.2	24.0	24.4	24.6	24.7	24.6	24.0	24.7	
	2	24.3	24.2	24.1	24.5	24.6	24.9	24.5	24.1	24.9	
	3	24.2	24.2	24.0	24.5	24.7	24.8	24.8	24.0	24.8	
0.032	1	24.1	24.3	23.9	24.4	24.5	24.8	24.6	23.9	24.8	
	2	24.1	24.2	23.9	24.4	24.6	24.8	24.6	23.9	24.8	
	3	24.1	24.2	23.9	24.4	24.6	24.8	24.6	23.9	24.8	
0.080	1	24.0	23.9	23.8	24.2	24.3	24.5	24.4	23.8	24.5	
	2	23.9	23.9	23.6	24.2	24.4	24.6	24.3	23.6	24.6	
	3	23.9	24.1	23.6	24.2	24.4	24.6	24.4	23.6	24.6	
0.20	1	23.8	23.8	23.5	24.1	24.2	24.4	24.2	23.5	24.4	
	2	23.7	23.8	23.4	24.0	24.2	24.4	24.1	23.4	24.4	
	3	23.7	23.8	23.5	24.1	24.2	24.4	24.2	23.5	24.4	
A : Min.		23.7	23.3	23.4	23.8	23.6	24.3	24.1	Total	23.3	24.9
B : Max.		24.3	24.3	24.1	24.5	24.7	24.9	24.8			
B-A		0.6	1.0	0.7	0.7	1.1	0.6	0.7			

Table 10 Dissolved Oxygen Concentration (D.O.) of Test Water during Exposure

Nominal Concentration (mg/L)	Vessel No.	Dissolved Oxygen Concentration (mg/L)							Min.	Max.	
		0 day	5 day	12 day	19 day	26 day	33 day	40 day			
Control	1	8.3	8.5	8.4	8.4	8.3	8.0	8.0	8.0	8.5	
	2	8.4	8.6	8.4	8.4	8.3	8.0	8.0	8.0	8.6	
	3	8.4	8.6	8.6	8.3	8.3	7.9	7.9	7.9	8.6	
Solvent Control	1	8.3	8.5	8.5	8.3	8.3	7.9	8.0	7.9	8.5	
	2	8.4	8.5	8.5	8.3	8.4	7.9	8.0	7.9	8.5	
	3	8.4	8.7	8.5	8.4	8.4	7.9	7.9	7.9	8.7	
0.0050	1	8.6	8.6	8.5	8.4	8.4	8.0	8.0	8.0	8.6	
	2	8.7	8.6	8.5	8.4	8.4	7.9	8.0	7.9	8.7	
	3	8.6	8.6	8.6	8.4	8.3	8.0	8.0	8.0	8.6	
0.013	1	8.6	8.6	8.6	8.4	8.4	7.9	8.0	7.9	8.6	
	2	8.6	8.6	8.6	8.4	8.4	8.0	8.2	8.0	8.6	
	3	8.6	8.7	8.7	8.3	8.3	8.0	8.2	8.0	8.7	
0.032	1	8.5	8.6	8.6	8.4	8.3	8.0	8.1	8.0	8.6	
	2	8.5	8.6	8.7	8.5	8.4	8.0	8.1	8.0	8.7	
	3	8.6	8.7	8.6	8.4	8.4	8.1	8.2	8.1	8.7	
0.080	1	8.6	8.6	8.7	8.4	8.3	8.0	8.0	8.0	8.7	
	2	8.4	8.7	8.7	8.4	8.4	8.0	8.0	8.0	8.7	
	3	8.5	8.7	8.6	8.4	8.4	8.0	8.0	8.0	8.7	
0.20	1	8.5	8.6	8.6	8.4	8.4	8.0	8.1	8.0	8.6	
	2	8.6	8.7	8.7	8.4	8.4	8.0	8.1	8.0	8.7	
	3	8.5	8.7	8.7	8.4	8.3	8.2	8.2	8.2	8.7	
A : Min.		8.3	8.5	8.4	8.3	8.3	7.9	7.9	Total	7.9	8.7
B : Max.		8.7	8.7	8.7	8.5	8.4	8.2	8.2			
B-A		0.4	0.2	0.3	0.2	0.1	0.3	0.3			

Table 11 pH Values and Total Hardness of Test Water at the Start and the End of Exposure

Nominal Concentration mg/L	Vessel No.	pH				Total Hardness (mgCaCO ₃ /L)			
		0 day	40 day	Min.	Max.	0 day	40 day	Min.	Max.
Control	1	7.4	7.1	7.1	7.4	85	53	53	85
	2	7.4	7.2	7.2	7.4	82	59	59	82
	3	7.4	7.1	7.1	7.4	90	53	53	90
Solvent Control	1	7.4	7.1	7.1	7.4	80	52	52	80
	2	7.4	7.1	7.1	7.4	80	53	53	80
	3	7.3	7.2	7.2	7.3	72	58	58	72
0.0050	1	7.4	7.1	7.1	7.4	78	52	52	78
	2	7.3	7.1	7.1	7.3	72	52	52	72
	3	7.3	7.1	7.1	7.3	71	53	53	71
0.013	1	7.3	7.2	7.2	7.3	75	54	54	75
	2	7.3	7.2	7.2	7.3	70	61	61	70
	3	7.3	7.1	7.1	7.3	70	58	58	70
0.032	1	7.3	7.1	7.1	7.3	72	60	60	72
	2	7.3	7.1	7.1	7.3	75	53	53	75
	3	7.3	7.2	7.2	7.3	78	60	60	78
0.080	1	7.3	7.2	7.2	7.3	78	51	51	78
	2	7.3	7.3	7.3	7.3	72	51	51	72
	3	7.3	7.2	7.2	7.3	90	51	51	90
0.20	1	7.3	7.1	7.1	7.3	73	52	52	73
	2	7.3	7.2	7.2	7.3	78	60	60	78
	3	7.3	7.2	7.2	7.3	72	56	56	72
		Total		7.1	7.4	Total		51	90

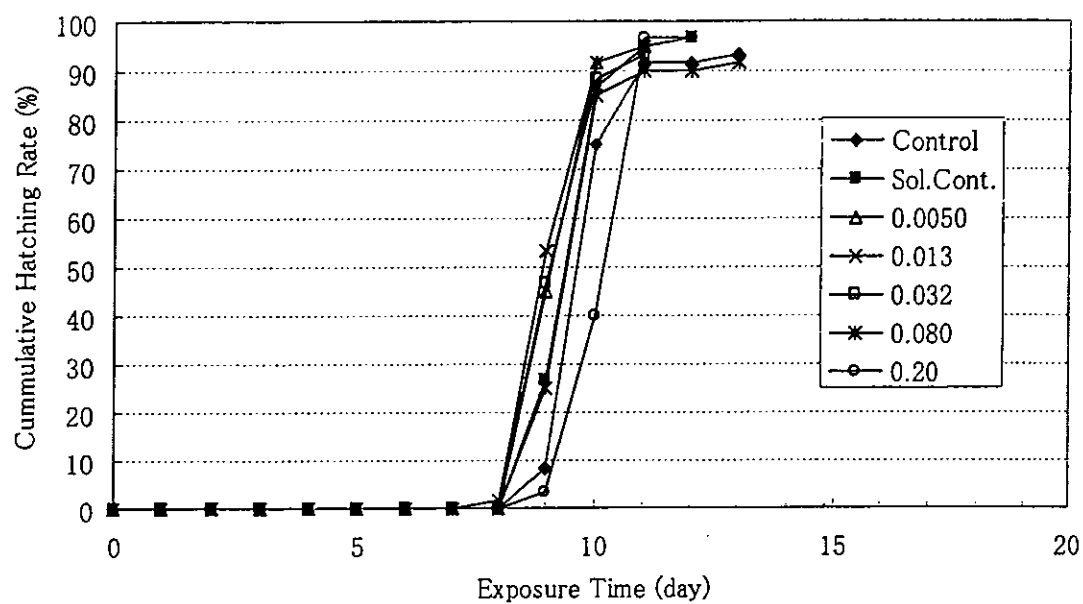


Figure 1 Cumulative Hatching Rate during Exposure
(Values in legend are given in the nominal concentration.)

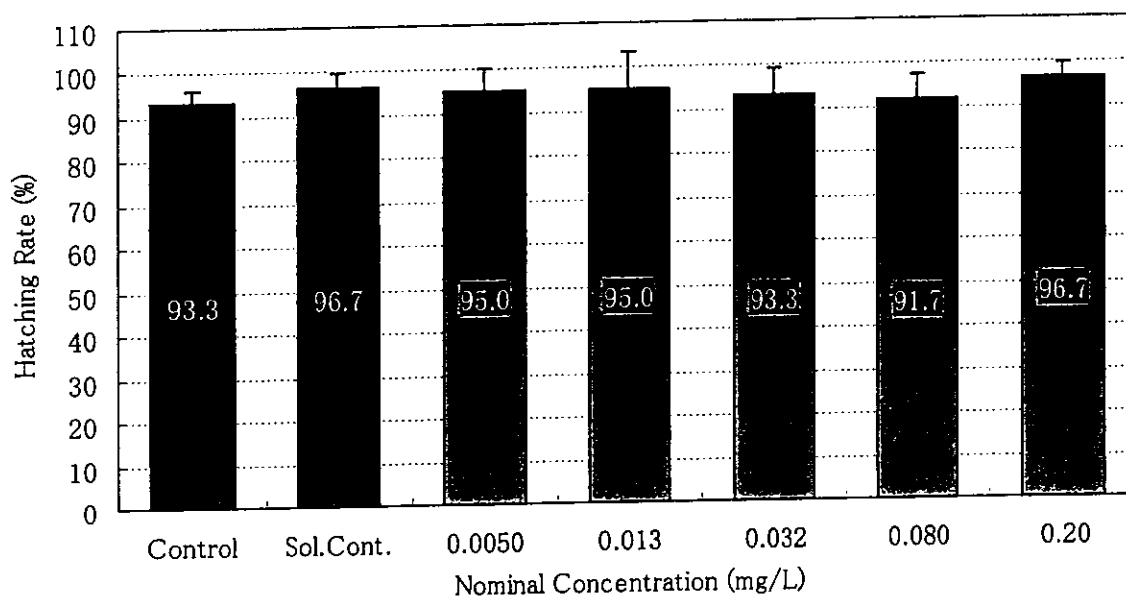


Figure 2 Mean Value and Standard Deviation (3 Vessels Each) of Hatching Rate

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

(There was no sign in this analysis.)

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

(There was no sign in this analysis.)

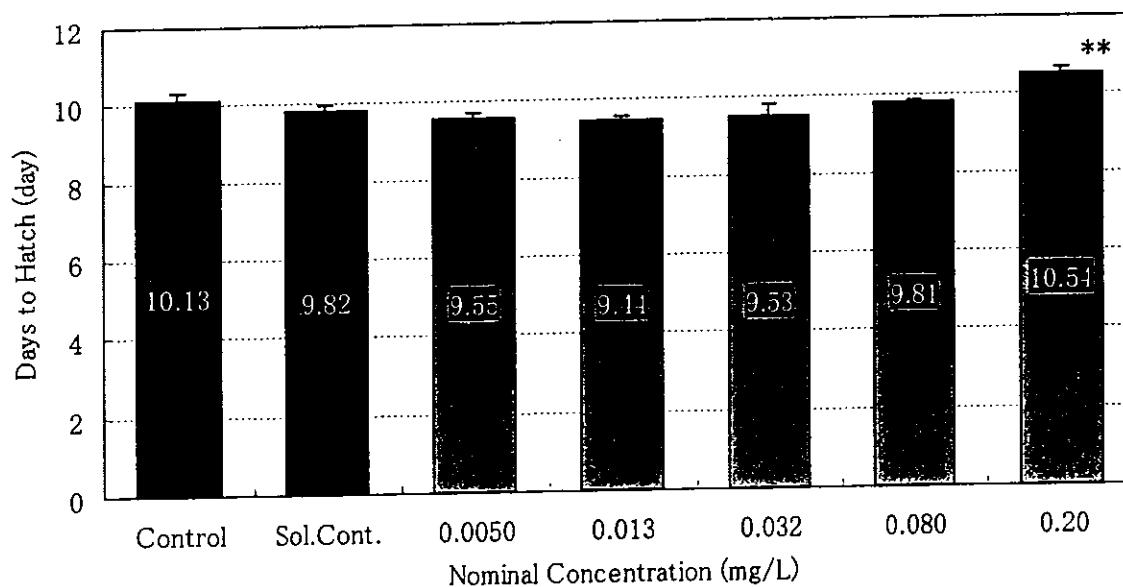


Figure 3 Mean Value and Standard Deviation (3 Vessels Each) of Days to Hatch

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

(There was no sign in this analysis.)

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

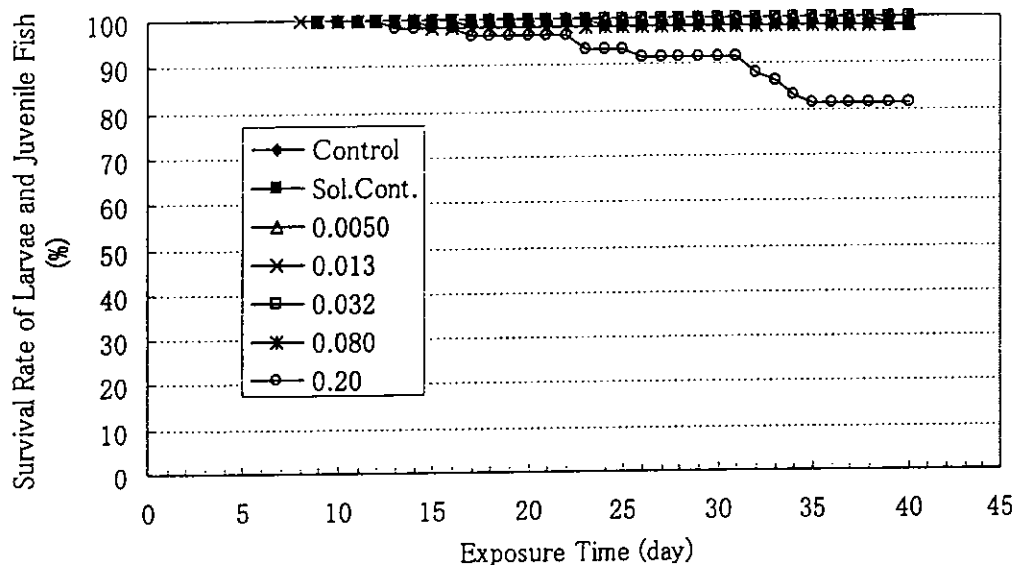


Figure 4 Survival Rate of Larvae and Juvenile Fish during Exposure after Hatching
(Values in legend are given in the nominal concentration.)

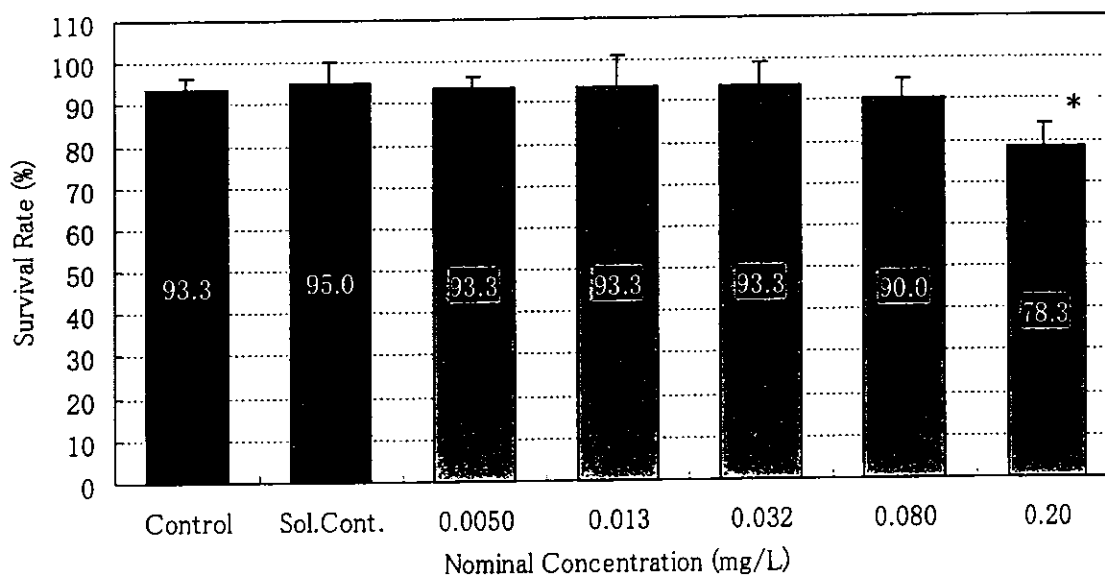


Figure 5 Mean Value and Standard Deviation (3 Vessels Each) of Survival Rate
at the End of Exposure (from the Start)

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

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

(There was no sign in this analysis.)

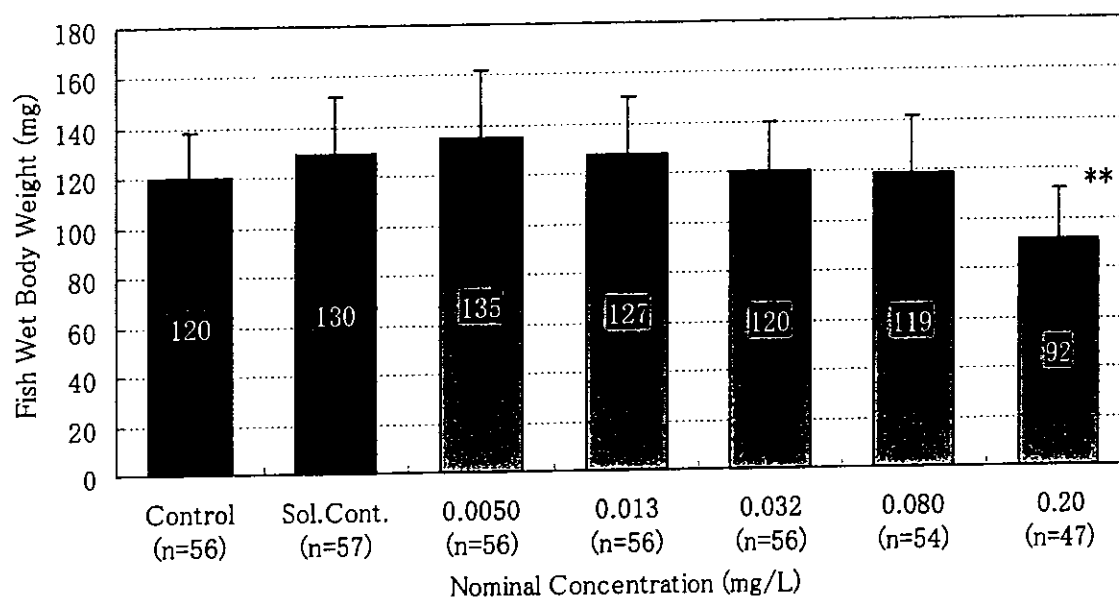


Figure 6 Mean Value and Standard Deviation of Wet Body Weight of Fish at the End of Exposure

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

(There was no sign in this analysis.)

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

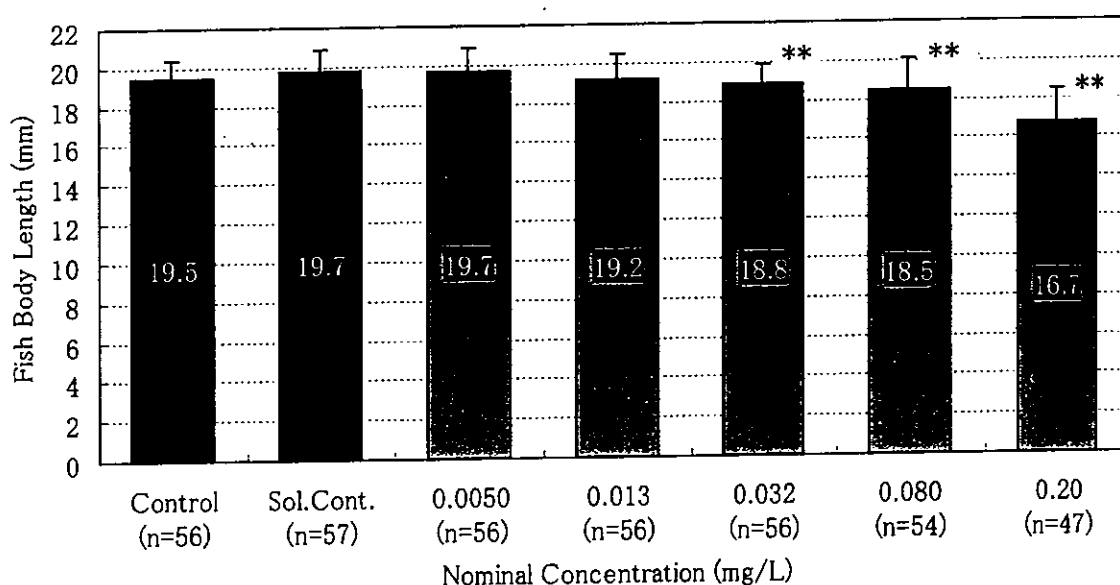


Figure 7 Mean Value and Standard Deviation of Body Length of Fish at the End of Exposure

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

(There was no sign in this analysis.)

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

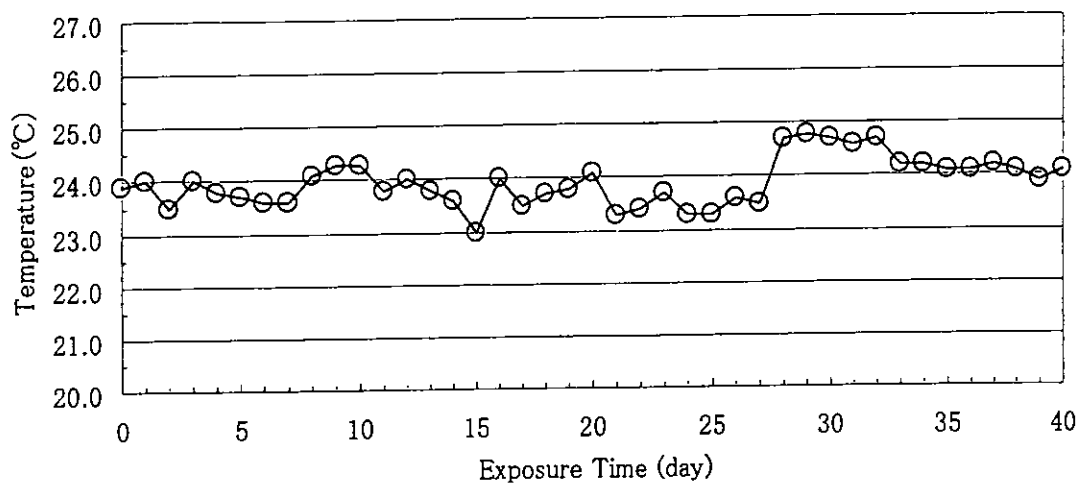


Figure 8 Water Temperature of Successive Days during Exposure

付属資料－ 1

希釈水の水質

Table A-1

Dilution water quality

Parameter	Concentration	
BOD	1	mg/L
COD	<1	mg/L
pH	7.8	(21°C)
Coliform group bacteria	N. D.	
Oil	N. D.	
Cadmium	<0.001	mg/L
Cyanide	N. D.	
Lead	<0.01	mg/L
Chromium	<0.005	mg/L
Arsenic	<0.005	mg/L
Mercury	<0.0001	mg/L
Free chlorine	<0.01	mg/L
Bromide	<0.05	mg/L
Fluoride	<0.08	mg/L
Sulfide	<0.03	mg/L
Total ammonium	<0.05	mg/L
Copper	0.001	mg/L
Zinc	<0.01	mg/L
Aluminum	0.03	mg/L
Tin	<0.1	mg/L
Manganese	<0.1	mg/L
Iron	<0.1	mg/L
Nickel	<0.01	mg/L
Total phosphorus	0.01	mg/L
Selenium	<0.005	mg/L
Phenols	<0.002	mg/L
Anionic surfactant	<0.02	mg/L
Evaporation residue	110	mg/L
Electric conductivity	160	μ S/cm
Total hardness (as CaCO ₃)	68	mg/L
Alkalinity	45	mg/L
Sodium	10	mg/L
Potassium	1.6	mg/L
Calcium	15	mg/L
Magnesium	5	mg/L

sampling date: February 13, 2002

付属資料－ 2

試験液の分析

1 試験液の分析方法

- 1) 各試験区毎に、それぞれの試験容器（3 連）から試験液を 0.25 mL ずつ測定用バイアルに採取し（合計 0.75 mL）、アセトニトリル 0.75 mL を添加し混合後、HPLCにより分析した。代表的なクロマトグラムをFigure A-2-2 (2), (3), (4), (6), (7), (8)に示した。
- 2) アセトニトリルで調製した標準溶液0.75 mLを測定用バイアルに採取し、精製水0.75 mLを添加し混合後、HPLCにより分析した。代表的なクロマトグラムをFigure A-2-2 (1), (5)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 高速液体クロマトグラフィー（HPLC）測定条件

（装置）

高速液体クロマトグラフ：	ヒューレットパッカート製HP-1100型 (No. 1)
ワークステーション：	HPミステーション (Windows 95)
デガッサー：	G1322A型
送液ポンプ：	G1312A型
オートサンプラ：	G1313A型
カラムオープン：	G1316A型
紫外可視分光検出器：	G1314A型

（条件）

カラム：	Inertsil ODS-3V, 5 μ m, 4.6 \times 150 mm (GL Sciences Inc.)
溶離液：	アセトニトリル 70%, 0.1%りん酸 30%*
流速：	1.0 mL/min
測定波長：	214 nm
試料注入量：	100 μ L
カラムオープン温度：	40 $^{\circ}$ C

*：暴露開始7日後以降は、ブランクピークと被験物質ピークが重なったため、「アセトニトリル 65%, 0.1%りん酸 35%」で実施した（その条件下での検量線の直線性についても確認している）。

3 検量線

アセトニトリルを用い、0, 0.0020~0.500 mg/Lの標準溶液を調製した。この標準溶液を一定量採取し等量の精製水で希釈したものをHPLC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-2-1に示した。

4 検出限界

最小検出ピーク面積を0.1countに設定し、これに相当する試験液中の被験物質濃度0.0002 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、試験液とアセトニトリ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	0.0020	1.3
3	0.0050	3.5
4	0.0100	6.9
5	0.0200	14.1
6	0.0500	35.8
7	0.100	74.5
8	0.200	148.1
9	0.500	364.2

$$Y = 730X$$

$$r = 1.00$$

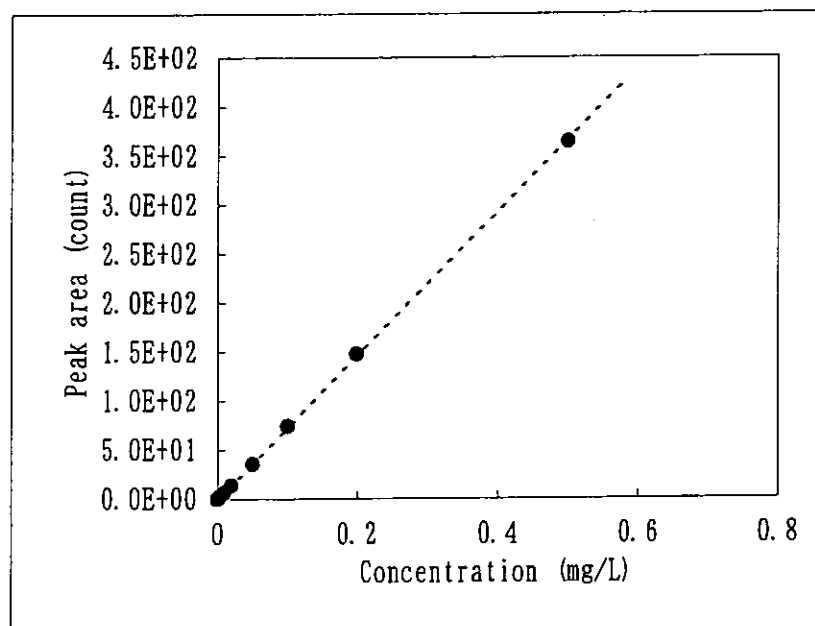
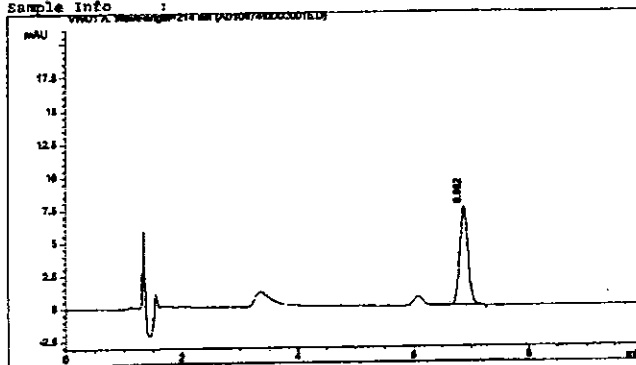


Figure A-2-2 Representative chromatograms

(1) Standard 0.100 mg/L ; 0 day

Injection Date : 02/03/29 Seq Line : 15
 Test No. : A010474 Vial No. : 2
 Test Substance : PCP Inj. Vol. : 100 µl
 Sample Name : std 0.1ppm
 Acq Operator :
 Acq. Method : A010474.M
 Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\2001\A010474.M
 Sample Info :



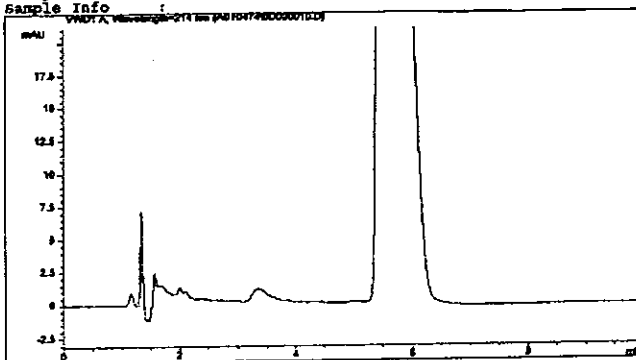
Area Percent Report:

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [count]	Height [count]	Area %
1	6.862	PM	0.167	74.9	7.49	100
74.9						

*** End of Report ***

(2) Control ; 0 day

Injection Date : 02/03/29 Seq Line : 10
 Test No. : A010474 Vial No. : 11
 Test Substance : PCP Inj. Vol. : 100 µl
 Sample Name : control 0d
 Acq Operator :
 Acq. Method : A010474.M
 Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\2001\A010474.M
 Sample Info :



Area Percent Report:

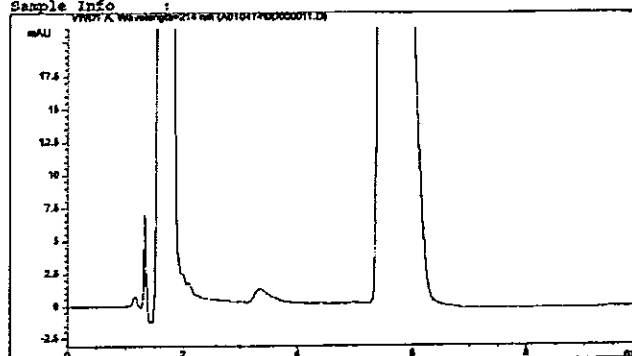
Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [count]	Height [count]	Area %
1	6.862	PM	0.167	74.9	7.49	100

*** End of Report ***

Figure A-2-2 Continued

(3) Solvent Control ; 0 day

Injection Date : 02/03/29 Seq Line : 11
 Test No. : A010474 Vial No. : 12
 Test Substance : PCP Inj. Vol. : 100 µl
 Sample Name : s-cont 0d
 Acq Operator :
 Acq. Method : A010474.M
 Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\2001\A010474.M
 Sample Info :



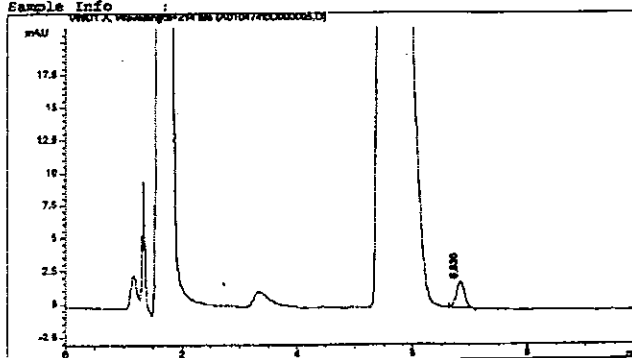
Area Percent Report:

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [count]	Height [count]	Area %
--------	---------------	------	-------------	--------------	----------------	--------

*** End of Report ***

(4) 0.032 mg/L nominal ; 0 day

Injection Date : 02/03/29 Seq Line : 5
 Test No. : A010474 Vial No. : 15
 Test Substance : PCP Inj. Vol. : 100 µl
 Sample Name : C3 0d
 Acq Operator :
 Acq. Method : A010474.M
 Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\2001\A010474.M
 Sample Info :



Area Percent Report:

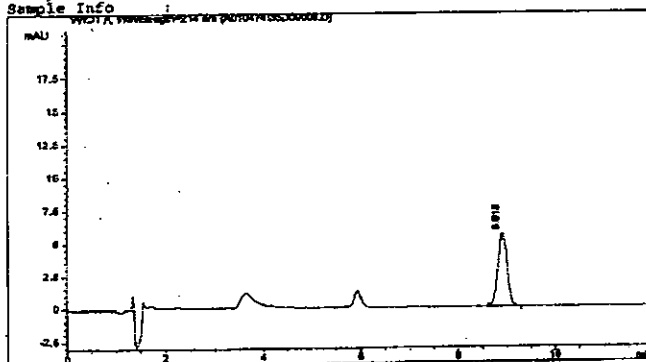
Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [count]	Height [count]	Area %
1	6.830 MN		0.164	19.2	3.94	100

*** End of Report ***

Figure A-2-2 Continued

(5) Standard 0.100 mg/L ; 35 day

Injection Date : 02/05/03 Seq Line : 8
 Test No. : A010474 Vial No. : 2
 Test Substance : PCP Inj. Vol. : 100 µl
 Sample Name : Std 0.100mg
 Acq Operator : [REDACTED]
 Acq. Method : A010474.M
 Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\2001\A010474.M
 Sample Info :



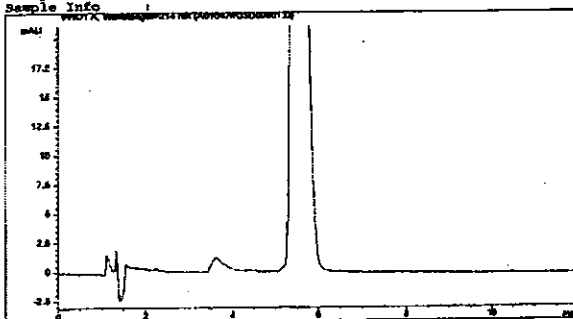
Area Percent Report:

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [count]	Height [count]	Area %
1	8.915	PM	0.218	73.4	5.61	100
73.4						

*** End of Report ***

(6) Control ; 35 day

Injection Date : 02/05/03 Seq Line : 1
 Test No. : A010474 Vial No. : 12
 Test Substance : PCP Inj. Vol. : 100 µl
 Sample Name : Control 35d
 Acq Operator : [REDACTED]
 Acq. Method : A010474.M
 Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\2001\A010474.M
 Sample Info :



Area Percent Report:

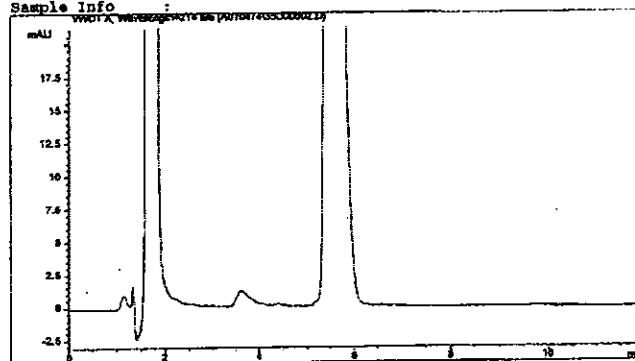
Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [count]	Height [count]	Area %
1	8.915	PM	0.218	73.4	5.61	100

*** End of Report ***

Figure A-2-2 Continued

(7) Solvent Control ; 35 day

Injection Date : 02/05/03 Seq Line : 2
 Test No. : A010474 Vial No. : 12
 Test Substance : PCP Inj. Vol. : 100 µl
 Sample Name : s-cont 35d
 Acq Operator :
 Acq. Method : A010474.M
 Analysis Method : C:\NPCHEM\1\METHODS\2001\A010474.M
 Sample Info :



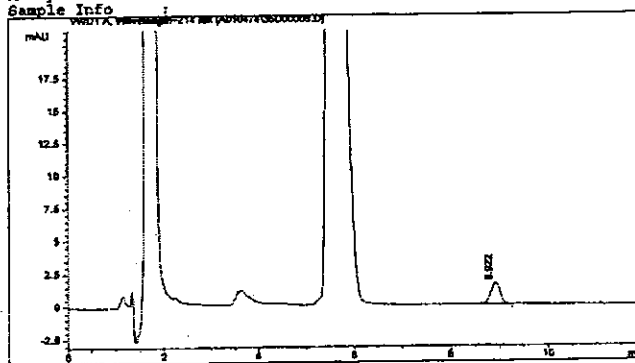
Area Percent Report:

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [count]	Height [count]	Area %
--------	---------------	------	-------------	--------------	----------------	--------

*** End of Report ***

(8) 0.032 mg/L nominal ; 35 day

Injection Date : 02/05/03 Seq Line : 6
 Test No. : A010474 Vial No. : 15
 Test Substance : PCP Inj. Vol. : 100 µl
 Sample Name : C3 35d
 Acq Operator :
 Acq. Method : A010474.M
 Analysis Method : C:\NPCHEM\1\METHODS\2001\A010474.M
 Sample Info :



Area Percent Report:

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [count]	Height [count]	Area %
1	8.922 MM		0.238	21.0	1.61	100

21.0

*** End of Report ***