

受理番号	E04-3520
試験番号	93520

## 最 終 報 告 書

チモールのオオミジンコによる繁殖試験

2005 年 10 月 14 日

化学物質評価研究機構

水質汚濁対策部

# 陳 述 書

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 チモールのオオミジンコによる繁殖試験

試験番号 93520

本最終報告書(写し)は、原本を正確にコピーしたものです。

2005年10月14日

運営管理者



## 陳 述 書

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 チモールのオオミジンコによる繁殖試験

試験番号 93520

上記試験は以下の基準に従って実施したものです。

- (1) 「新規化学物質等に係る試験を実施する試験施設に関する基準について」(平成15年11月21日、薬食発第1121003号、平成15・11・17製局第3号、環保企発第031121004号)に規定する「新規化学物質等に係る試験を実施する試験施設に関する基準」
- (2) 「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ています。

2005年10月14日

試験責任者

## 信 頼 性 保 証 書

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 チモールのオオミジンコによる繁殖試験

試験番号 93520

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します。

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ました。

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	2005 年 5 月 16 日	2005 年 5 月 16 日
試験計画書	2005 年 5 月 16 日	2005 年 5 月 16 日
試験計画書の変更	2005 年 5 月 31 日	2005 年 5 月 31 日
	2005 年 6 月 8 日	2005 年 6 月 8 日
	2005 年 7 月 25 日	2005 年 7 月 25 日
	2005 年 10 月 6 日	2005 年 10 月 6 日
試験計画書からの逸脱	2005 年 5 月 31 日	2005 年 5 月 31 日
暴露開始時	2005 年 7 月 25 日	2005 年 7 月 26 日
暴露開始後	2005 年 8 月 4 日	2005 年 8 月 5 日
	2005 年 8 月 5 日	2005 年 8 月 5 日
	2005 年 8 月 15 日	2005 年 8 月 17 日
生データ、最終報告書草案	2005 年 10 月 7 日	2005 年 10 月 11 日
最終報告書	2005 年 10 月 14 日	2005 年 10 月 14 日

2005 年 10 月 14 日

信頼性保証部門責任者

## 目 次

	頁
要 約 .....	5
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. 適用 GLP .....	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. 被験物質 .....	8
12. 試験材料と方法 .....	10
13. 試験結果及び考察 .....	14
14. 試験成績の信頼性に影響を及ぼしたと思われる事項 .....	16
Table 1 to10 .....	17 to 25
Figure 1,2 .....	26,27
Appendix 1 Water quality of dilution water	
Appendix 2 Method of analysis and result of measurement of test substance concentration	
Appendix 3 Calibration curve and chromatogram	
Appendix 4 Result of reproduction test	
Appendix 5 Statistical method for NOEC calculation	
Additional data Result of preliminary test	

## 要 約

## チモールのオオミジンコによる繁殖試験

## &lt;試験条件&gt;

- ・被験物質：チモール
- ・試験生物：オオミジンコ(*Daphnia magna*)
- ・暴露期間：21日間
- ・試験濃度：4.00、2.00、1.00、0.500及び0.250 mg/L(公比2.0)の5濃度区及び対照区
- ・試験生物数：10頭／試験区(1頭×10試験容器)
- ・試験用水：脱塩素水道水
- ・試験方式：半止水式(換水頻度；1回/2日)
- ・試験液の調製：供試試料を超音波照射によって試験用水に溶解した試験原液を用いて調製
- ・試験液量：800 mL／試験区(80 mL×10試験容器)
- ・水温：20±1℃
- ・照明：室内灯、16時間明／8時間暗
- ・給餌：ミジンコ1頭当たり*Chlorella vulgaris*を0.1～0.2 mgC(有機炭素含量)／日の割合で1日に1回
- ・エアレーション：なし
- ・試験液中の被験物質濃度の分析：HPLC法 (調製時及び換水前)

## &lt;結果&gt;

- ・試験液中の被験物質濃度(対設定値)：調製時 99.5～105%  
換水前 86.4～104%
- ・21日間EC50(50%繁殖阻害濃度)：3.49 mg/L(95%信頼限界；3.27～3.78 mg/L)
- ・親ミジンコのLC50(半数致死濃度)：>4.00 mg/L
- ・LOEC (最小影響濃度)：4.00 mg/L
- ・NOEC(最大無影響濃度)：2.00 mg/L  
(上記濃度は、設定濃度に基づく値)

1. 表 題  
チモールのオオミジンコによる繁殖試験
2. 試験委託者  
名 称 環境省  
所 在 地 (〒100-8975)東京都千代田区霞が関 1-2-2
3. 試験施設  
名 称 財団法人 化学物質評価研究機構 久留米事業所  
所 在 地 (〒839-0801)福岡県久留米市宮ノ陣三丁目2番7号  
TEL (0942) 34-1500
4. 試験目的  
被験物質のミジンコ類の繁殖に対する影響を調べる。
5. 試験法  
本試験は以下の試験法に従って行った。  
(1) 「第三種監視化学物質に係る有害性の調査のための試験の方法について」  
ミジンコの繁殖に及ぼす影響に関する試験(ミジンコ繁殖試験)(平成16年3  
月25日付け平成16・3・19製局第6号環保企発第040325004号)]  
(2) 「OECD Guidelines for Testing of Chemicals」に定める “*Daphnia magna*  
Reproduction Test (Guideline 211, 1998)”
6. 適用GLP  
本試験は以下の基準を適用した。  
(1) 「新規化学物質等に係る試験を実施する試験施設に関する基準について」  
(平成15年11月21日、薬食発第1121003号、平成15・11・17製局第3号、環保企  
発第031121004号)に規定する「新規化学物質等に係る試験を実施する試験施  
設に関する基準」  
(2) 「OECD Principles of Good Laboratory Practice」(November 26, 1997)
7. 試験日程
  - 1) 試験開始日 2005 年 5 月 16 日
  - 2) 実験開始日 2005 年 7 月 25 日
  - 3) 実験終了日 2005 年 8 月 15 日
  - 4) 試験終了日 2005 年 10 月 14 日

## 8. 試資料の保管

## 1) 被験物質

供試試料\*を保管用容器に入れ密栓後、最終報告書作成後10年間、久留米事業所試料保管室に保管する。保管期間経過後の処置は試験委託者と協議の上決定する。ただし、保管中に品質が著しく変化する物質の保管期間は、その品質が保管に耐えうる期間とし、廃棄に際しては試験委託者の承認を得る。

\* 試験番号93517、93518、93519及び93520についての共用保管試料とする。

## 2) 生データ、資料等

生データ、試験計画書、その他必要な資料等は最終報告書と共に、最終報告書作成後10年間、久留米事業所資料保管室に保管する。保管期間終了後の取扱いについては、保管期間終了前に試験委託者と協議する。

## 9. 試験関係者

試験責任者

所属 試験第四課

生物試験担当者

分析担当者

## 10. 最終報告書の承認

試験責任者

2005年10月14日

氏名

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_



## 11. 被 験 物 質

最終報告書においてチモールは次の名称などを有するものとする。供給者提供資料等による被験物質及び供試試料情報を以下に示す。

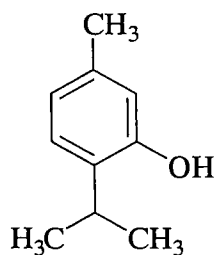
## 11.1 被 験 物 質

## 1) 名 称

チモール

## 2) 構 造 式 等

## (1) 構 造 式



## (2) 分 子 式

$C_{10}H_{14}O$

## (3) 分 子 量

150.22<sup>\*5</sup>

## (4) C A S 番 号

89-83-8

## 3) 物理化学的性質等

## (1) 外 観

白色微細結晶<sup>\*1</sup>

## (2) 融 点

51.4℃<sup>\*1</sup>

## (3) 沸 点

233.5℃<sup>\*2,\*3</sup>

## (4) 蒸 気 圧

1 mmHg at 64℃<sup>\*2</sup>、2.5 hPa at 50℃<sup>\*2</sup>、10 mmHg at 107℃<sup>\*2</sup>、100 mmHg at 164℃<sup>\*2</sup>

## (5) 比 重

0.969 at 20/4℃<sup>\*2</sup>

## (6) 溶 解 度

水 1 g/L<sup>\*4</sup>

エタノール、クロロホルム、ジエチルエーテル、オリーブ油、氷酢酸に溶解<sup>\*4</sup>

(7) 分配係数  
3.30(計算値)<sup>\*2</sup>

(8) 安定性  
光によって変化する。<sup>\*3</sup>

## 11.2 供試試料

- 1) ロット番号  
CEH0126<sup>\*1</sup>
- 2) 純度  
100.0%(毛管カラムGC)<sup>\*1</sup>

## 情報源

- \*1：供給者提供の添付資料( [redacted] 検査成績書より)
  - \*2：Karel Verschueren “Handbook of Environmental Data on Organic Chemicals” 4<sup>th</sup> Ed.
  - \*3：化学大辞典編集委員会編「化学大辞典」(共立出版) 1960.
  - \*4：Richardson, M.L.et al “The Dictionary of Substances and their Effects” Royal Society of Chemistry, 1993.
  - \*5：日本化学会 原子量表(2003)を用いて算出した値
- 3) 入手先  
(独)国立環境研究所 化学物質環境リスク研究センター(供給者： [redacted])
  - 4) 被験物質の確認  
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。
  - 5) 保管条件及び保管条件下での安定性の確認
    - (1) 保管条件  
試験中の被験物質は室温暗所で保管した。
    - (2) 安定性の確認  
実験開始前及び終了後に測定した被験物質の赤外吸収スペクトルに変化がなかったことから、実験期間中の被験物質が安定であったことを確認した。

## 12. 試験材料と方法

## 1) 試験生物

## (1) 種

オオミジンコ (*Daphnia magna* Clone A)

## (2) 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類である。

## (3) 供給源

英国Sheffield大学(所在地 Sheffield S10 2UQ, United Kingdom)より分譲された*Daphnia magna*(Clone A)の子孫で、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(脱塩素水道水)、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*Chlorella vulgaris*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。また、試験系の再現性を確認するために実施(2005年5月24日~5月26日に実施)したニクロム酸カリウム(試薬特級、和光純薬工業製)の急性遊泳阻害試験の48時間EC50は0.283 mg/Lであった。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: 0.112~0.350 mg/L)であった[平均 $\pm$ 標準偏差は $0.231\pm 0.060$  mg/L( $n=49$ )]。

## (4) 幼体の選別

生後24時間以内の幼体を用いた。

## (5) 群分け

無作為に抽出を行った。

## 2) 試験用水

十分にエアレーションし、温度調節した脱塩素水道水を用いた。使用時に、残留塩素濃度が0.02 mg/L以下であることを確認した。定期的に測定した試験用水の水質測定結果をAppendix 1に示す。

## 3) 試験器具及び装置

## (1) 試験器具

試験容器: 100 mLガラスピーカー

また、ゴミの進入や試験液の蒸散を防ぐため蓋をした。

## (2) 試験装置

恒温槽: プラスチック製水槽

加温冷却ユニット(HCA250型、佐藤工業製)

## 4) 試験条件

## (1) 暴露条件

## ①方 式

被験物質を含む試験液へ試験生物を暴露した。

試験は1回/2日の頻度で試験液の全量を交換する半止水式で行った。

## ②期 間

21日間

## ③試験濃度

試験は4.00、2.00、1.00、0.500及び0.250 mg/L(公比2.0)の5濃度区で行った。試験濃度及び公比は48時間急性遊泳阻害試験の結果(48時間EC50:4.46 mg/L)及び予備試験結果から決定した。予備試験結果をAdditional dataに示す。なお、被験物質の純度は100.0%であるため純度補正は行わなかった。

## ④対 照 群

被験物質を含まない試験用水のみの対照区を設けた。

## ⑤試験生物数

10頭／試験区(1頭×10試験容器)

## ⑥試験液量

800 mL／試験区(80 mL×10試験容器)

## (2) 環 境 条 件

## ①水 温

20±1℃

## ②溶存酸素濃度

暴露期間中の溶存酸素濃度は飽和濃度の60%以上(約5 mg/L以上)とした。また、暴露期間中、エアレーションは行わなかった。

## ③pH

試験液のpH調整は行わず、暴露期間中のpHの変動は1.5以内とした。

## ④全 硬 度

10～250 mg/L(CaCO<sub>3</sub>換算)の範囲内であった。

## ⑤照 明

室内灯による16時間明(光強度 15～20 μE/m<sup>2</sup>s以下)／8時間暗

## ⑥給 餌

ミジンコ1頭当たり*Chlorella vulgaris*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。

## 5) 試験液の調製法

被験物質の純度が100.0%であるため、試験原液調製時に純度補正は行わなかった。

供試試料を必要量秤量し、試験用水と混合後約30分間超音波照射しながら攪拌して100 mg/Lの試験原液を調製した。この試験原液の被験物質濃度を測定し、その結果を実際の試験原液濃度とした。調製容器にて試験原液濃度より算出した必要量の試験原液と試験用水を混合、攪拌して調製し、各試験容器に分割した。

試験原液の実測濃度及び各試験区の調製量に対する試験原液添加量を以下に示す。

(暴露開始時～6日後)

試験区(mg/L)	試験原液濃度(mg/L)	試験原液添加量(mL/1,000 mL)
対照区	—	—
0.250	100 (実測濃度 92.1 mg/L)	2.71
0.500		5.43
1.00		10.9
2.00		21.7
4.00		43.4

(8日後～12日後)

試験区(mg/L)	試験原液濃度(mg/L)	試験原液添加量(mL/1,000 mL)
対照区	—	—
0.250	100 (実測濃度 96.3 mg/L)	2.60
0.500		5.19
1.00		10.4
2.00		20.8
4.00		41.5

(14日後～20日後)

試験区(mg/L)	試験原液濃度(mg/L)	試験原液添加量(mL/1,000 mL)
対照区	—	—
0.250	100 (実測濃度 90.0 mg/L)	2.78
0.500		5.56
1.00		11.11
2.00		22.2
4.00		44.4

## 6) 観察と測定

### (1) 親ミジンコの生死

暴露開始後から終了時まで毎日観察し、生死を記録した。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。

### (2) 産出された幼体の数と状態

親ミジンコから産出される幼体数を初産日から終了時まで毎日計数した。また、肉眼での状態を観察した。計数と観察後の幼体は処分した。

### (3) 親ミジンコの状態

産仔の観察時に、親ミジンコの大きさ、遊泳行動の異常の有無、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。

## (3) 水質及び暴露環境

試験液の溶存酸素濃度、pH、水温及び総硬度を暴露期間中に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)測定した。調製時は水質測定用に調製容器より分取した試験液について、換水前には各試験区につき10試験容器のうち1試験容器について測定した。光強度については暴露期間中1回測定した。溶存酸素濃度は溶存酸素計(YSI MODEL 58、Yellow Springs Instruments製)、pHはガラス電極式水素イオン濃度計(HM-14P型、東亜ディーケーケー製)、水温は検定済ガラス製棒状温度計で測定した。総硬度はEDTA滴定法により測定した。また、光強度はポータブル光量子計(QSL-100、Biospherical Instruments製)で測定した。

## (4) 試験液中の被験物質濃度

被験物質濃度の測定は、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)測定した。調製時は別途分取した試験液について、換水前には各試験区につき10試験容器のうち1試験容器について測定した。換水前に採取した試験液は遠心分離(3,000 rpm、10分間)により餌を除去して測定に用いた。被験物質濃度の分析は高速液体クロマトグラフィー(HPLC)により行った。被験物質濃度の分析方法及び測定結果をAppendix 2、検量線及びクロマトグラムをAppendix 3に示す。

## 7) 結果の処理

暴露期間中に測定した試験液中の被験物質濃度が試験設定濃度の±20%以内であったため、結果の算出には設定濃度を用いることとした。

## (1) 親ミジンコの半数致死濃度(LC50)

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、LC50は「>試験最高濃度」と表示した。

## (2) 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、

$n$  : 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

$m$  : 試験区当たりの系列数(最大 10)

## (3) 50%繁殖阻害濃度(EC50)

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、14及び21日間の50%繁殖阻害濃度(EC50)をMoving average法により算出し、それらの95%信頼限界も算出した。

## (4) 最小影響濃度(LOEC)と最大無影響濃度(NOEC)

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、Bartlett法による等分散検定を行った後、一元配置分散分析を行った。分散分析において有意差が認められたため、Dunnettの多重比較法による検定を行った。

各試験容器の初産日については、Kruskal-Wallisの順位和検定後にDunnettの多重比較法(ノンパラメトリック)による検定を行った。親ミジンコの死亡数については、死亡が観察されなかったため検定は行わなかった。

これらの統計的有意差検定結果からLOEC及びNOECを評価する。

## 8) 試験成立条件

(1) 暴露終了時に対照群の親ミジンコの死亡率は20%を超えない。

(2) 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頭以上である。

## 9) 数値の取扱い

数値の丸め方は、JIS Z 8401 規則Bによる。

## 13. 試験結果及び考察

## 1) ミジンコの観察結果

## (1) 親ミジンコの死亡数及び死亡率

対照群及び濃度区での親ミジンコの累積死亡率は共に暴露終了時で0%であり、試験成立条件である20%を超えないという基準を満たした。

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、Figure 1及びAppendix 4に示す。

## (2) 初産日

対照群での親ミジンコの初産日は全て9日後であり、適正な範囲と考えられた。

0.250～2.00 mg/L区での親ミジンコの初産日は9日であり、対照群と同じであった。また、4.00 mg/L区では平均12.5日であり、対照群と比較し統計的な有意差がみられた。

各試験区における親ミジンコの初産日をTable 2、有意差検定結果をAppendix 5に示す。

- (3) 平均累積生存産仔数  
 対照群の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134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。  
 0.250～2.00 mg/L区での親ミジンコの1頭当たりの平均累積生存産仔数は126～136頭であり対照群と比較し統計的な有意差はみられなかった。また、4.00 mg/L区では49.1頭であり、対照群と比較し統計的な有意差がみられた。  
 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 4、有意差検定結果をTable 6及びAppendix 5に示す。
- (4) 親ミジンコの大きさと状態  
 暴露期間中、対照群において何ら症状はみられなかった。また、0.250～2.00 mg/L区においても何ら症状はみられなかった。4.00 mg/L区では暴露3日後から全生物において成長阻害が観察されたが、19日以降は対照区と変わらない状態まで大きさが回復するものもみられた。また、体色明化、活動度の低下が19日以降観察された。
- (5) 休眠卵の発生等  
 暴露期間中、いずれの試験区でも休眠卵の発生は認められなかった。死亡幼体については、対照群、2.00及び4.00 mg/L区で観察された。墮胎卵については、全試験区で観察された。
- 2) 試験液の観察と測定結果
- (1) 試験液の状態  
 試験液調製時は全試験区で無色透明であり、換水前ではクロレラの給餌により薄緑色を呈していた。
- (2) 水質及び暴露環境  
 暴露期間中に測定した水温は19.9～20.0℃であり、 $20 \pm 1$ ℃の範囲であった。溶存酸素濃度は8.9～9.0 mg/Lであり、飽和溶存酸素濃度の60%以上\*であった。pHは7.6～8.1であり、1.5以内の変動であった。総硬度は44.3～51.1 mgCaCO<sub>3</sub>/Lであり、10～250 mgCaCO<sub>3</sub>/Lの範囲であった。光強度は9.30  $\mu$ E/m<sup>2</sup>sであり、15～20  $\mu$ E/m<sup>2</sup>s以下であった。  
 以上のことから、水温、溶存酸素濃度、pH、総硬度及び光強度については、ミジンコの試験環境として適正範囲であったと考えられる。  
 試験液の水温をTable 7、溶存酸素濃度をTable 8、pHをTable 9、総硬度をTable 10に示す。  
 \* 19～21℃の飽和溶存酸素濃度：9.01～8.68 mg/L、JIS K 0102
- (3) 試験液中の被験物質濃度  
 測定した試験液中の被験物質濃度は、調製時では設定濃度に対して99.5～105%、換水前では86.4～104%であり、設定濃度の $\pm 20\%$ 以内に保たれていた。被験物質濃度の測定結果をAppendix 2に示す。
- 3) 親ミジンコに対するLC50  
 チモールの親ミジンコに対する14及び21日間LC50は共に>4.00 mg/Lであった。  
 14及び21日間の親ミジンコのLC50をTable 4に示す。



## 4) 繁殖についてのEC50

チモールの14日間EC50は3.03 mg/L(95%信頼限界：2.76～3.37 mg/L)、21日間EC50は3.49 mg/L(95%信頼限界：3.27～3.78 mg/L)であった。

14及び21日間のEC50をTable 5に示す。

## 5) 繁殖についてのLOEC及びNOEC

チモールの親ミジンコの繁殖に対する21日間のLOECは4.00 mg/L、NOECは2.00 mg/Lであった。

親ミジンコ1頭当たりの累積生存産仔数の有意差検定結果をTable 6及びAppendix 5に示す。

## 6) 考 察

本試験は被験物質の試験生物に対する繁殖の影響を調べる目的で行った。暴露期間中、試験液中の被験物質濃度は設定濃度の±20%以内に保たれ、また、試験環境条件も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適切なものであったと判断される。

## 14. 試験成績の信頼性に影響を及ぼしたと思われる事項

換水前に採取した試験液中の被験物質濃度を測定する際、前処理として遠心分離(3,000 rpm、10分間)により餌を除去してから行ったが、この操作については計画書に記載されておらず、試験計画書からの逸脱が生じた。しかしながら、前処理操作の一部記載漏れによるものであり、また、通常実施しているものであるため試験結果への影響はないと判断される。したがって、試験成績の信頼性に及ぼす影響はないと考えられる。

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)
0.250	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	( 0)	( 0)	( 0)	( 0)	( 0)	( 0)	( 0)	( 0)	( 0)	( 0)	( 0)
0.500	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	( 0)	( 0)	( 0)	( 0)	( 0)	( 0)	( 0)	( 0)	( 0)	( 0)	( 0)
1.00	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	( 0)	( 0)	( 0)	( 0)	( 0)	( 0)	( 0)	( 0)	( 0)	( 0)	( 0)
2.00	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	( 0)	( 0)	( 0)	( 0)	( 0)	( 0)	( 0)	( 0)	( 0)	( 0)	( 0)
4.00	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	( 0)	( 0)	( 0)	( 0)	( 0)	( 0)	( 0)	( 0)	( 0)	( 0)	( 0)

Table 1. (continued)

Nominal concentration ( mg/L)	Exposure time (day)										
	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)
0.250	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	( 0)	( 0)	( 0)	( 0)	( 0)	( 0)	( 0)	( 0)	( 0)	( 0)	( 0)
0.500	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	( 0)	( 0)	( 0)	( 0)	( 0)	( 0)	( 0)	( 0)	( 0)	( 0)	( 0)
1.00	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	( 0)	( 0)	( 0)	( 0)	( 0)	( 0)	( 0)	( 0)	( 0)	( 0)	( 0)
2.00	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	( 0)	( 0)	( 0)	( 0)	( 0)	( 0)	( 0)	( 0)	( 0)	( 0)	( 0)
4.00	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	( 0)	( 0)	( 0)	( 0)	( 0)	( 0)	( 0)	( 0)	( 0)	( 0)	( 0)

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.						
	1	2	3	4	5	6	7
Control	9	9	9	9	9	9	9
0.250	9	9	9	9	9	9	9
0.500	9	9	9	9	9	9	9
1.00	9	9	9	9	9	9	9
2.00	9	9	9	9	9	9	9
4.00	12	14	13	11	13	11	13

Table 2. (continued)

Nominal concentration ( mg/L)	Vessel No.			Mean
	8	9	10	
Control	9	9	9	9.0
0.250	9	9	9	9.0
0.500	9	9	9	9.0
1.00	9	9	9	9.0
2.00	9	9	9	9.0
4.00	12	13	13	12.5

Table 3. Mean cumulative number of juveniles produced per adult alive( $\Sigma F_1/P$ ) 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	18.5	18.5
0.250	0	0	0	0	0	0	0	0	0	19.2	19.2
0.500	0	0	0	0	0	0	0	0	0	19.5	19.5
1.00	0	0	0	0	0	0	0	0	0	18.9	18.9
2.00	0	0	0	0	0	0	0	0	0	18.4	18.4
4.00	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Table 3. (continued)

Nominal concentration (mg/L)	Exposure time (day)										
	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
Control	18.5	52.7	52.7	52.7	85.8	89.0	89.0	89.2	134	134	134
0.250	19.2	51.7	51.7	51.7	83.2	83.2	83.2	83.2	126	126	126
0.500	19.5	54.4	54.4	54.4	89.8	89.8	89.8	110	136	136	136
1.00	18.9	50.9	50.9	50.9	86.9	86.9	86.9	109	132	132	132
2.00	18.4	47.3	47.3	47.3	81.9	81.9	81.9	85.7	128	128	128
4.00	1.8	4.5	8.4	12.9	14.3	20.7	24.1	31.5	41.5	43.6	49.1

Table 4. LC50 values for parental *Daphnia* based on nominal concentrations

Exposure duration (day)	LC50 ( mg/L)	95-Percent confidence limits ( mg/L)	Statistical procedure used for determination of LC50
14	>4.00	–	–
21	>4.00	–	–

Table 5. Calculated EC50 values for inhibition of reproduction based on nominal concentrations

Exposure duration (day)	EC50 ( mg/L)	95% confidence intervals ( mg/L) (Slope of the dose-response curve)	Statistical procedure used for determination of EC50
14	3.03	2.76 to 3.37 ( - )	Moving average
21	3.49	3.27 to 3.78 ( - )	Moving average

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	137	130	134	135	129	130	140
0.250	140	132	127	123	130	121	115
0.500	139	130	121	139	148	125	138
1.00	123	130	134	133	121	127	130
2.00	126	130	128	136	139	131	123
4.00	41	44	44	56	44	72	33

Table 6. (continued)

Nominal concentration (mg/L)	Vessel No.			Mean	S.D.	Significant difference
	8	9	10			
Control	135	145	122	134	6.4	
0.250	124	128	123	126	6.8	
0.500	132	139	145	136	8.5	
1.00	140	139	138	132	6.6	
2.00	130	119	119	128	6.6	
4.00	75	45	37	49.1	14.2	**

\*\* : Significantly different from Control at  $p < 0.01$ .

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

Nominal concentration ( mg/L)		Temperature (°C)					
		0-day	2-day	8-day	10-day	14-day	16-day
Control	New	20.0		20.0		20.0	
	Old		20.0		20.0		19.9
0.250	New	20.0		20.0		20.0	
	Old		20.0		20.0		19.9
0.500	New	20.0		20.0		20.0	
	Old		20.0		19.9		19.9
1.00	New	20.0		20.0		20.0	
	Old		20.0		19.9		19.9
2.00	New	20.0		20.0		19.9	
	Old		20.0		19.9		20.0
4.00	New	20.0		20.0		20.0	
	Old		20.0		19.9		20.0

New : Freshly prepared test solutions

Old : Test solutions after 2-day exposure

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

Nominal concentration ( mg/L)		Dissolved oxygen concentration (mg/L)					
		0-day	2-day	8-day	10-day	14-day	16-day
Control	New	8.9		9.0		9.0	
	Old		9.0		9.0		9.0
0.250	New	8.9		9.0		9.0	
	Old		9.0		9.0		9.0
0.500	New	8.9		9.0		9.0	
	Old		9.0		9.0		9.0
1.00	New	8.9		9.0		9.0	
	Old		9.0		9.0		8.9
2.00	New	8.9		9.0		9.0	
	Old		9.0		9.0		8.9
4.00	New	8.9		9.0		9.0	
	Old		9.0		9.0		9.0

New : Freshly prepared test solutions

Old : Test solutions after 2-day exposure



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

Nominal concentration ( mg/L)		pH					
		0-day	2-day	8-day	10-day	14-day	16-day
Control	New	7.7		7.7		7.7	
	Old		7.7		7.6		7.6
0.250	New	7.8		7.8		7.8	
	Old		7.9		7.7		7.8
0.500	New	7.9		7.9		7.9	
	Old		8.0		7.6		7.7
1.00	New	7.9		7.9		7.9	
	Old		8.0		7.7		7.6
2.00	New	7.9		7.9		7.9	
	Old		8.0		7.7		7.7
4.00	New	7.9		7.9		7.9	
	Old		8.1		7.8		7.7

New : Freshly prepared test solutions

Old : Test solutions after 2-day exposure

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

Nominal concentration ( mg/L)		Total hardness (mgCaCO <sub>3</sub> /L)					
		0-day	2-day	8-day	10-day	14-day	16-day
Control	New	45.1		47.5		48.1	
	Old		45.1		46.5		47.1
0.250	New	45.7		47.9		47.1	
	Old		45.1		47.1		45.9
0.500	New	45.5		47.1		48.1	
	Old		45.5		47.7		46.5
1.00	New	45.5		48.1		47.5	
	Old		45.3		48.1		46.5
2.00	New	44.3		48.1		51.1	
	Old		45.5		49.7		46.1
4.00	New	44.5		48.3		47.5	
	Old		44.7		47.7		47.3

New : Freshly prepared test solutions

Old : Test solutions after 2-day exposure

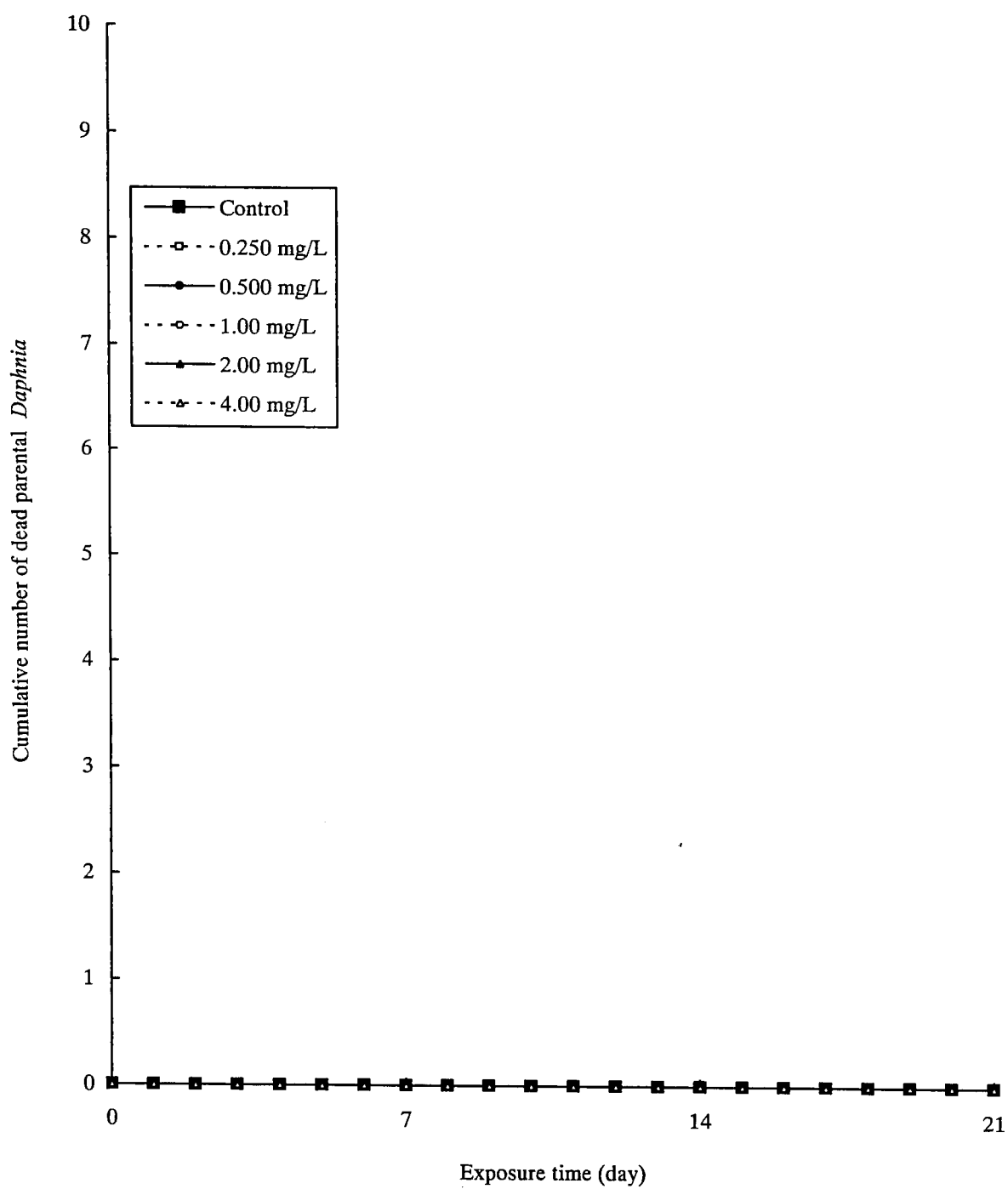


Figure 1. Cumulative number of dead parental *Daphnia*.

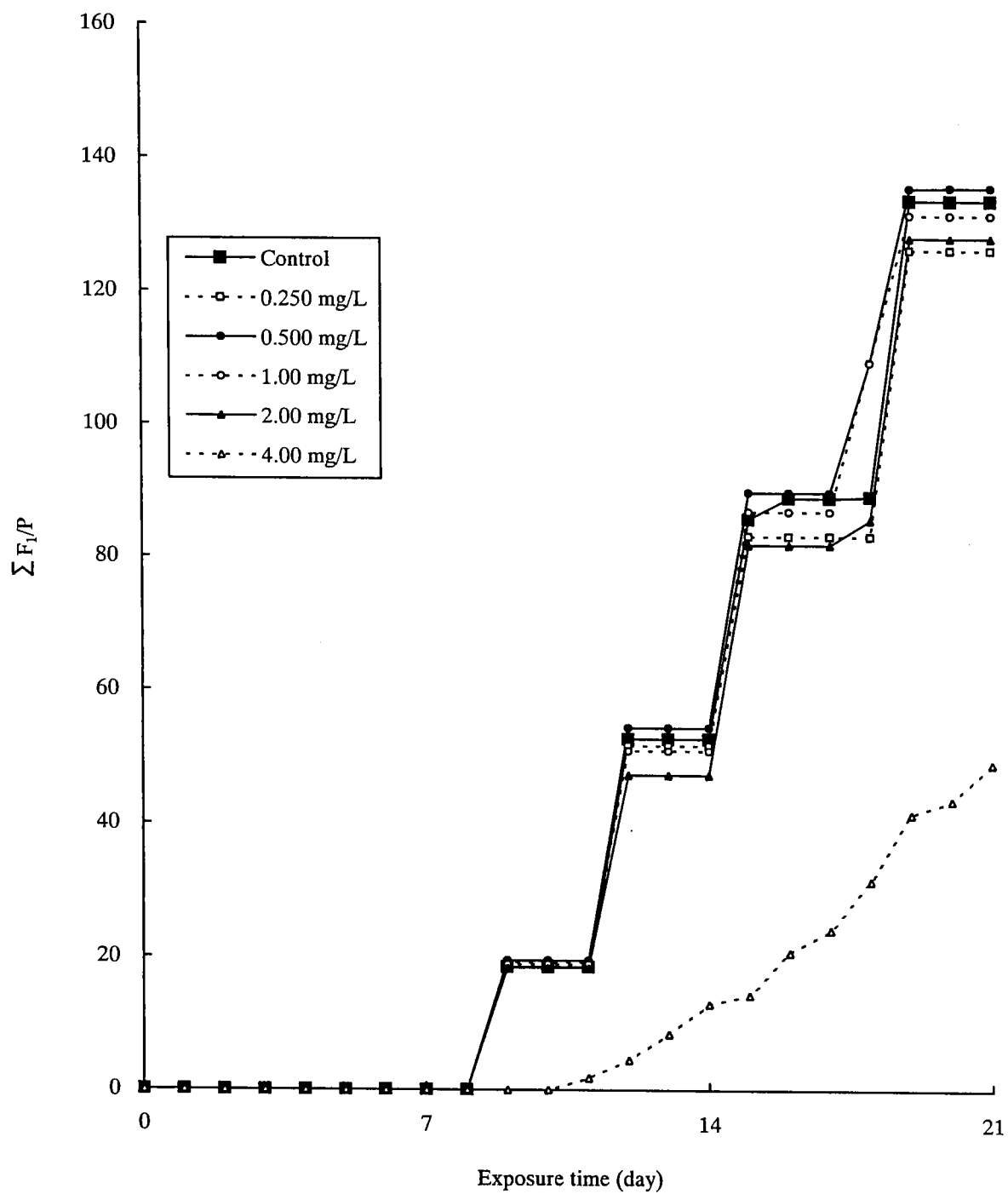


Figure 2. Mean cumulative number of juveniles produced per adult alive ( $\Sigma F_1/P$ ).

## Appendix 1

Water quality of dilution water

Water quality of dilution water (Sampling on July 8, 2005)

項 目	單位	檢查結果	定量下限
Ca, Mg etc. (Hardness)	mg/L	29.2	0.1
Suspended substance	mg/L	< 1	1
pH	—	7.6(23℃)	—
Organic carbon	mg/L	1.0	0.1
Chemical oxygen demand	mg/L	1.0	0.5
Free chlorine	mg/L	< 0.02	0.02
Ammonium nitrogen	mg/L	0.01	0.01
Cyanide	mg/L	< 0.01	0.01
Alkalinity	mg/L	20	1
Electric conductivity	mS/m	12.6	—
Organic phosphorous	mg/L	< 0.1	0.1
Alkyl mercury	mg/L	< 0.0005	0.0005
Mercury	mg/L	< 0.0005	0.0005
Cadmium	mg/L	< 0.001	0.001
Hexavalent chromium	mg/L	< 0.02	0.02
Lead	mg/L	< 0.005	0.005
Arsenicum	mg/L	< 0.001	0.001
Boron	mg/L	0.05	0.02
Fluorine	mg/L	< 0.1	0.1
Iron	mg/L	< 0.01	0.01
Copper	mg/L	< 0.005	0.005
Cobalt	mg/L	< 0.001	0.001
Manganese	mg/L	< 0.01	0.01
Zinc	mg/L	< 0.01	0.01
Aluminum	mg/L	0.031	0.001
Nickel	mg/L	< 0.001	0.001
Silver	mg/L	< 0.0001	0.0001
Sulfate ion	mg/L	16.1	0.1
Chloride ion	mg/L	14	1
Sodium	mg/L	10.1	0.01
Potassium	mg/L	2.9	0.01
Calcium	mg/L	8.4	0.01
Magnesium	mg/L	2.0	0.01
1,2-dichloropropane	mg/L	< 0.0001	0.0001
Chlorothalonil	mg/L	< 0.0001	0.0001
Propyzamide	mg/L	< 0.0001	0.0001
Chlornitrofen	mg/L	< 0.0001	0.0001
Simazine	mg/L	< 0.001	0.001
Thiobencarb	mg/L	< 0.0001	0.0001
Diazinon	mg/L	< 0.0001	0.0001
Isoxathion	mg/L	< 0.0001	0.0001
Fenitrothion	mg/L	< 0.0001	0.0001
EPN	mg/L	< 0.0001	0.0001
Dichlorvos	mg/L	< 0.0001	0.0001
Iprobenfos	mg/L	< 0.0001	0.0001
PCB	mg/L	< 0.0005	0.0005

## Appendix 2

Method of analysis and result of measurement of test substance concentration

## 1. 被験物質濃度の分析方法

### 1) 試験液の前処理操作

採取した試験液<sup>\*1</sup>は、そのまま若しくは脱塩素水道水で適宜希釈して分析試料とした。

<sup>\*1</sup> 換水前に採取した試験液は遠心分離(3,000 rpm、10分間)により餌を除去して測定に用いた。

### 2) 分析方法

前処理操作を行って得られた分析試料は、下記の定量条件に基づき高速液体クロマトグラフィー(HPLC)により被験物質の定量を行った。分析試料中の被験物質濃度はクロマトグラム上のピーク面積を濃度既知の標準溶液のピーク面積と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 3に示す。

#### 分析機器の定量条件

機 器	高速液体クロマトグラフ
ポンプ	島津製作所製 SCL-10Avp
検出器	島津製作所製 LC-10AD
オートインジェクター	島津製作所製 SPD-10A
カラムオーブン	島津製作所製 SIL-10A
ワインディングガッ	島津製作所製 CTO-10A
カラム	島津製作所製 DGU-14A
	L-column ODS (化学物質評価研究機構製)
	15 cm×4.6 mm I.D.
カラム温度	40℃
溶 離 液	アセトニトリル/水 <sup>*2</sup> 6/4(v/v)
流 量	1.0 mL/min
測 定 波 長	275 nm
注 入 量	100 μL
感 度	
検 出 器	0.5 AU/1 V

<sup>\*2</sup> 水道水を超純水装置システムを用いて処理した水

### 3) 標準溶液の調製

分析試料中の被験物質濃度を求めるための標準溶液の調製は次のように行った。なお、被験物質の純度が100.0%であるため、純度補正は行わなかった。

供試試料50.0 mgを電子分析天びんで正確にはかりとり、アセトニトリルに溶解して1,000 mg/Lの被験物質溶液を調製した。これをアセトニトリルで希釈して20.0 mg/Lの被験物質溶液を調製した。続いてこれを脱塩素水道水で希釈して1.00 mg/Lの被験物質溶液を調製した。さらにこれを脱塩素水道水で希釈して0.100 mg/Lの標準溶液を調製した。



## 4) 検量線の作成

3)の標準溶液の調製と同様にして0.0100、0.0500、0.100及び0.200 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、定量性を確認した。作成した検量線をAppendix 3に示す。なお、試験液中の被験物質の定量下限は、定量性が確認された範囲内での最小の標準溶液濃度(0.0100 mg/L)とした。

## 5) ブランク試験

## (1) 方 法

1)の試験液の前処理操作と同じ操作により、被験物質を加えない試験用水について、ブランク試験を行った。ブランク試験は、2点について実施した。

## (2) 結 果

(1)の方法により測定した結果、ブランク試験においてクロマトグラム上の被験物質位置にはピークは認められなかった。

## 2. 測定結果

試験液中の被験物質濃度の測定結果を次頁に示す。

Appendix table 2-1. Measured concentrations of test substance in test solutions

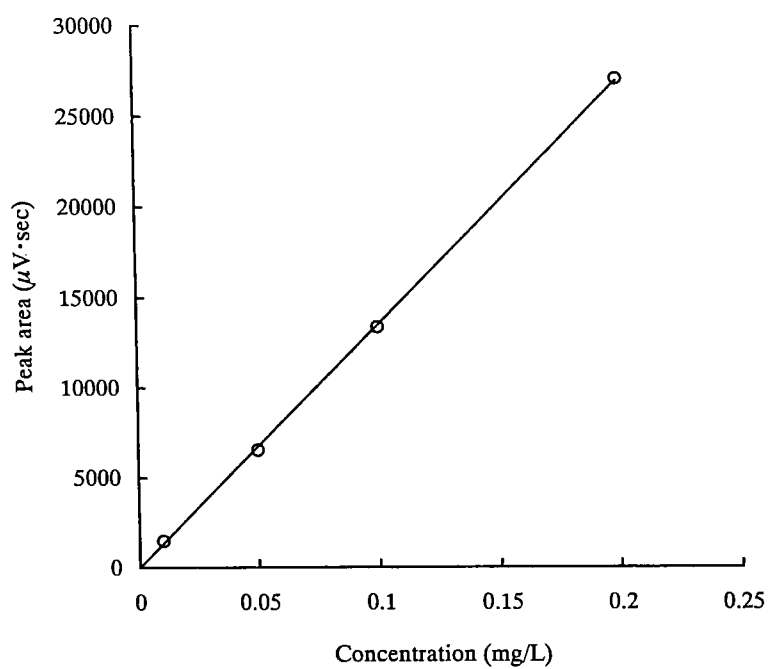
Nominal concentration (mg/L)	Measured concentration(mg/L) (Percentage of nominal concentration)						
	At the start	2-day	8-day	10-day	14-day	16-day	Mean <sup>a</sup>
		Before the renewal	After the renewal	Before the renewal	After the renewal	Before the renewal	
Control	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	—
0.250	0.254 (102)	0.251 (101)	0.258 (103)	0.232 (92.6)	0.262 (105)	0.222 (88.9)	0.246 (98.4)
0.500	0.522 (104)	0.507 (101)	0.497 (99.5)	0.452 (90.3)	0.523 (105)	0.432 (86.4)	0.488 (97.5)
1.00	1.02 (102)	1.04 (104)	1.02 (102)	0.944 (94.4)	1.03 (103)	0.930 (93.0)	0.997 (99.7)
2.00	2.09 (104)	2.02 (101)	2.05 (103)	1.88 (94.0)	2.08 (104)	1.87 (93.5)	2.00 (99.8)
4.00	4.19 (105)	4.15 (104)	4.15 (104)	3.74 (93.5)	4.21 (105)	3.54 (88.4)	3.99 (99.7)

n.d. : Not detected (&lt;0.0100 mg/L)

<sup>a</sup> The values are expressed as geometric means.

## Appendix 3

Calibration curve and chromatogram



$$y = 134551x$$

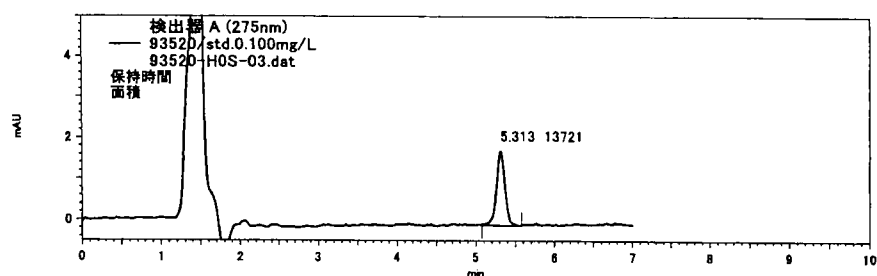
$$r = 1.00$$

Concentration (mg/L)	Peak area (μV·sec)
0.0100	1476
0.0500	6552
0.100	13352
0.200	26999

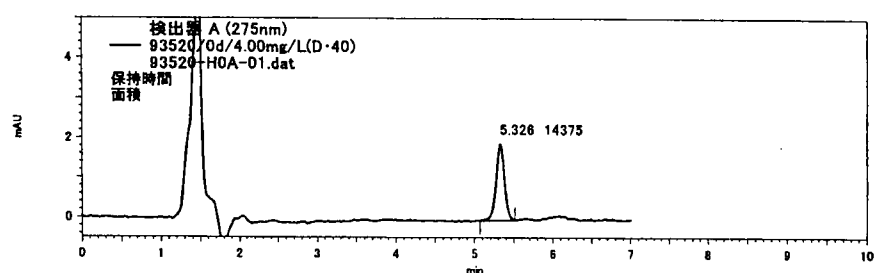
Appendix figure 3-1. Calibration curve of thymol for analysis by HPLC.

Standard solution 0.100 mg/L

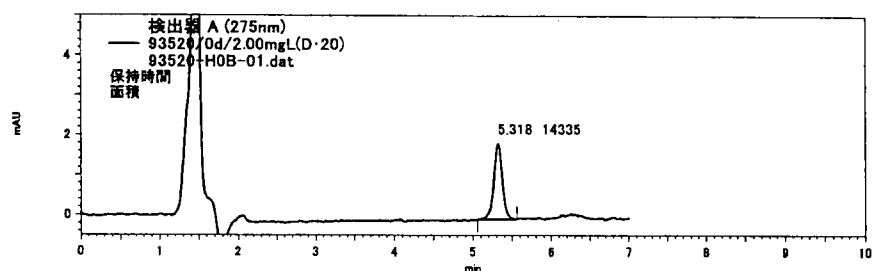
試験番号 93520



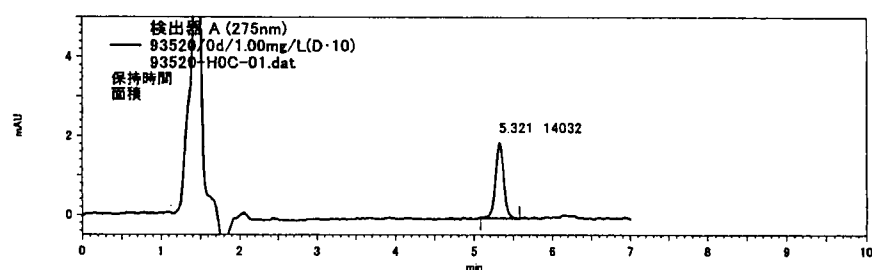
4.00 mg/L (Nominal concentration)



2.00 mg/L (Nominal concentration)



1.00 mg/L (Nominal concentration)

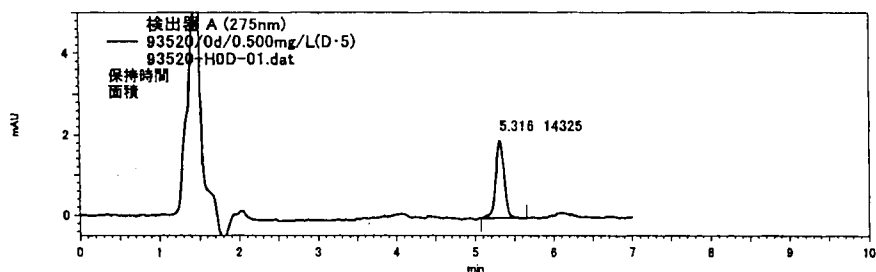


2005.7.25

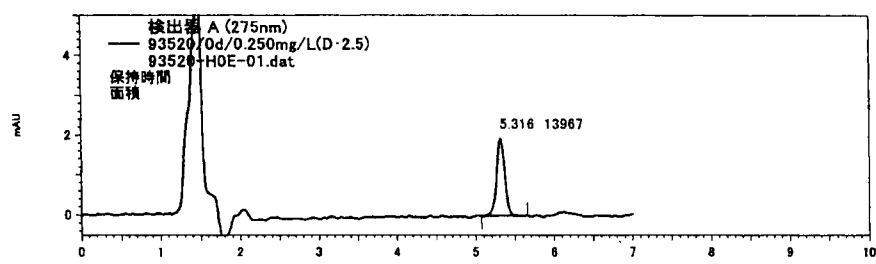
Appendix figure 3-2-1. HPLC chromatogram at the start of the exposure.

試験番号 93520

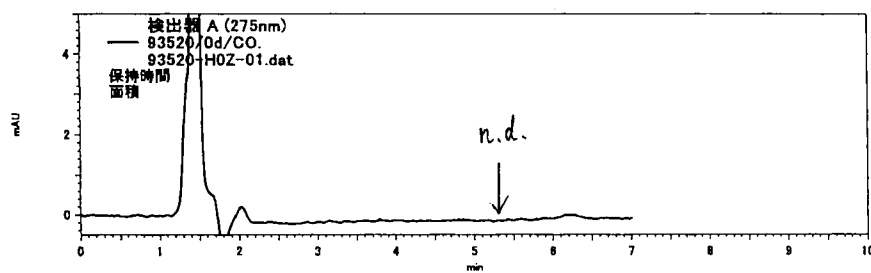
0.500 mg/L (Nominal concentration)



0.250 mg/L (Nominal concentration)



Control

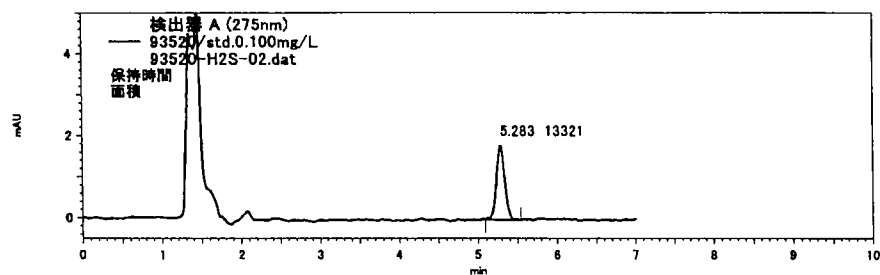


2015.7.25

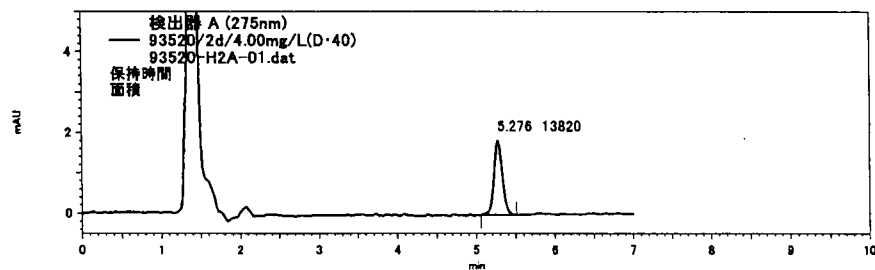
Appendix figure 3-2-2. HPLC chromatogram at the start of the exposure.

Standard solution 0.100 mg/L

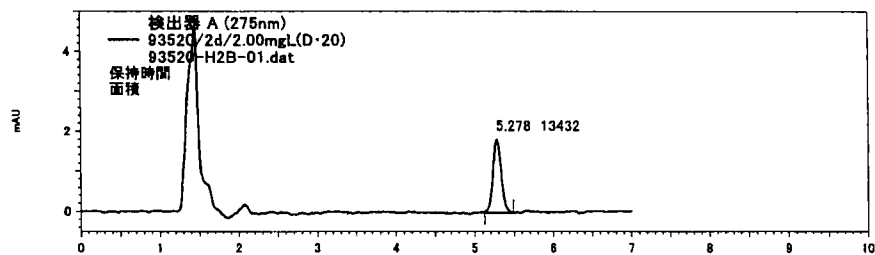
試験番号 93520



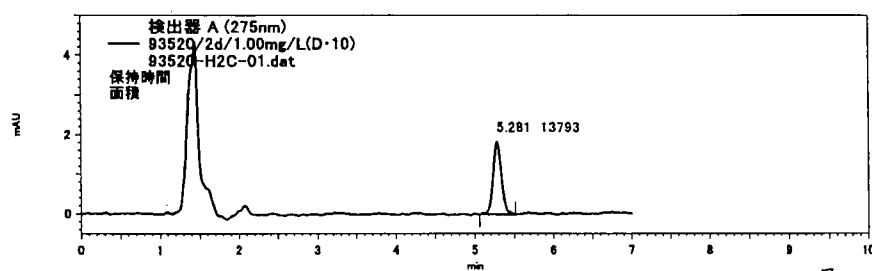
4.00 mg/L (Nominal concentration)



2.00 mg/L (Nominal concentration)



1.00 mg/L (Nominal concentration)

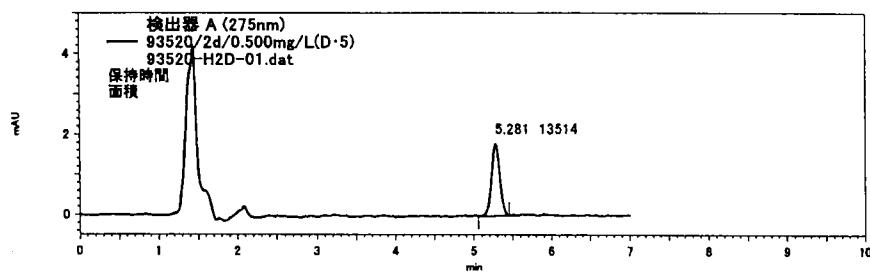


2005.7.27

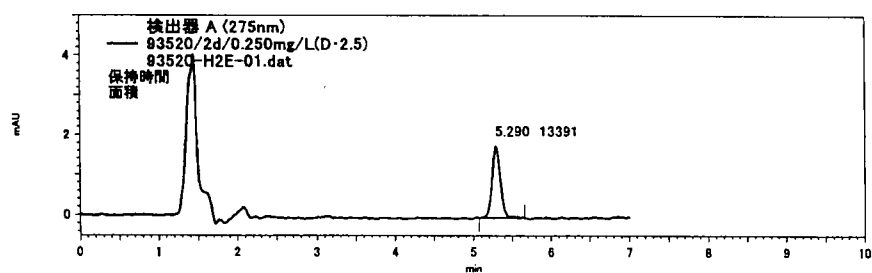
Appendix figure 3-3-1. HPLC chromatogram after the exposure at 2-day.

試験番号 93520

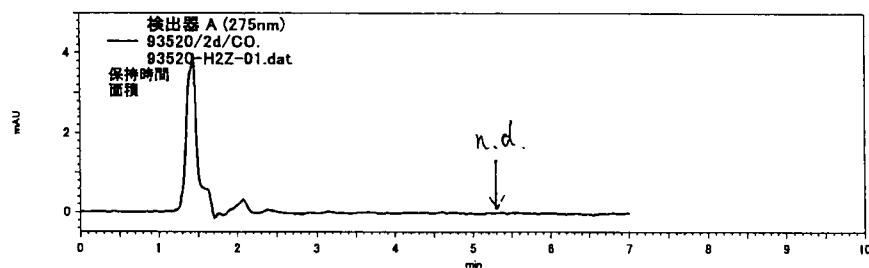
0.500 mg/L (Nominal concentration)



0.250 mg/L (Nominal concentration)



Control



2005. 7. 27

Appendix figure 3-3-2. HPLC chromatogram after the exposure at 2-day.



## Appendix 4

### Result of reproduction test

Appendix Table 4-1. Result of reproduction test  
(Control)

Rep. No.	Counts	Time																					Total
		7/26	7/27	7/28	7/29	7/30	7/31	8/1	8/2	8/3	8/4	8/5	8/6	8/7	8/8	8/9	8/10	8/11	8/12	8/13	8/14	8/15	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	
1	F <sub>1</sub> generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	18	0	0	36	0	0	39	0	0	0	44	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	0	18	0	0	36	0	0	39	0	0	0	44	0	0	137
	Cumulative reproductivity	0	0	0	0	0	0	0	0	18	18	18	54	54	54	93	93	93	93	137	137	137	
2	F <sub>1</sub> generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	18	0	0	34	0	0	37	0	0	0	41	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
	Total	0	0	0	0	0	0	0	0	18	0	0	34	0	0	37	0	0	0	41	0	0	130
	Cumulative reproductivity	0	0	0	0	0	0	0	0	18	18	18	52	52	52	89	89	89	89	130	130	130	
3	F <sub>1</sub> generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	18	0	0	34	0	0	38	0	0	0	44	0	0	134
		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	18	0	0	34	0	0	38	0	0	0	44	0	0	134
	Cumulative reproductivity	0	0	0	0	0	0	0	0	18	18	18	52	52	52	90	90	90	90	134	134	134	
4	F <sub>1</sub> generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	13	0	0	33	0	0	40	0	0	1	48	0	0	135
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
	Total	0	0	0	0	0	0	0	0	14	0	0	33	0	0	40	0	0	1	48	0	0	136
	Cumulative reproductivity	0	0	0	0	0	0	0	0	13	13	13	46	46	46	86	86	86	87	135	135	135	
5	F <sub>1</sub> generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	19	0	0	35	0	0	0	32	0	0	43	0	0	129
		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	35	0	0	0	32	0	0	43	0	0	129
	Cumulative reproductivity	0	0	0	0	0	0	0	0	19	19	19	54	54	54	54	86	86	86	129	129	129	
6	F <sub>1</sub> generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	19	0	0	32	0	0	35	0	0	0	44	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
	Total	0	0	0	0	0	0	0	0	19	0	0	32	0	0	35	0	0	0	44	0	0	130
	Cumulative reproductivity	0	0	0	0	0	0	0	0	19	19	19	51	51	51	86	86	86	86	130	130	130	
7	F <sub>1</sub> generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	19	0	0	33	0	0	40	0	0	0	48	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
	Total	0	0	0	0	0	0	0	0	19	0	0	33	0	0	40	0	0	0	48	0	0	140
	Cumulative reproductivity	0	0	0	0	0	0	0	0	19	19	19	52	52	52	92	92	92	92	140	140	140	

Appendix Table 4-1. Continued

		( Control )																						
Rep. No.	Counts		Time																					Total
			7/26	7/27	7/28	7/29	7/30	7/31	8/1	8/2	8/3	8/4	8/5	8/6	8/7	8/8	8/9	8/10	8/11	8/12	8/13	8/14	8/15	
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	
8	F <sub>1</sub> generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0	18	0	0	36	0	0	35	0	0	0	46	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	18	0	0	36	0	0	35	0	0	0	46	0	0	135
	Cumulative reproductivity	0	0	0	0	0	0	0	0	18	18	18	54	54	54	89	89	89	89	135	135	135		
9	F <sub>1</sub> generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0	23	0	0	38	0	0	36	0	0	1	47	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	23	0	0	38	0	0	36	0	0	1	47	0	0	145
	Cumulative reproductivity	0	0	0	0	0	0	0	0	23	23	23	61	61	61	97	97	97	98	145	145	145		
10	F <sub>1</sub> generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0	20	0	0	31	0	0	31	0	0	0	40	0	0	122
		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	31	0	0	31	0	0	0	40	0	0	122
	Cumulative reproductivity	0	0	0	0	0	0	0	0	20	20	20	51	51	51	82	82	82	82	122	122	122		

Appendix Table 4-2. Result of reproduction test  
(Nominal concentration : 0.250 mg/L)

Rep. No.	Counts	Time																					Total
		7/26	7/27	7/28	7/29	7/30	7/31	8/1	8/2	8/3	8/4	8/5	8/6	8/7	8/8	8/9	8/10	8/11	8/12	8/13	8/14	8/15	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	
1	F <sub>1</sub> generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	21	0	0	37	0	0	35	0	0	0	47	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
		Total	0	0	0	0	0	0	0	21	0	0	37	0	0	35	0	0	0	47	0	0	140
	Cumulative reproductivity	0	0	0	0	0	0	0	0	21	21	21	58	58	58	93	93	93	93	140	140	140	
2	F <sub>1</sub> generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	23	0	0	38	0	0	30	0	0	0	41	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
		Total	0	0	0	0	0	0	0	23	0	0	38	0	0	30	0	0	0	41	0	0	132
	Cumulative reproductivity	0	0	0	0	0	0	0	0	23	23	23	61	61	61	91	91	91	91	132	132	132	
3	F <sub>1</sub> generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	19	0	0	37	0	0	39	0	0	0	32	0	0	127
		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	19	0	0	37	0	0	39	0	0	0	32	0	0	127
	Cumulative reproductivity	0	0	0	0	0	0	0	0	19	19	19	56	56	56	95	95	95	95	127	127	127	
4	F <sub>1</sub> generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	17	0	0	30	0	0	28	0	0	0	48	0	0	123
		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	17	0	0	30	0	0	28	0	0	0	48	0	0	123
	Cumulative reproductivity	0	0	0	0	0	0	0	0	17	17	17	47	47	47	75	75	75	75	123	123	123	
5	F <sub>1</sub> generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	20	0	0	29	0	0	35	0	0	0	46	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
		Total	0	0	0	0	0	0	0	20	0	0	29	0	0	35	0	0	0	46	0	0	130
	Cumulative reproductivity	0	0	0	0	0	0	0	0	20	20	20	49	49	49	84	84	84	84	130	130	130	
6	F <sub>1</sub> generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	22	0	0	35	0	0	24	0	0	0	40	0	0	121
		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	35	0	0	24	0	0	0	40	0	0	121
	Cumulative reproductivity	0	0	0	0	0	0	0	0	22	22	22	57	57	57	81	81	81	81	121	121	121	
7	F <sub>1</sub> generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	15	0	0	30	0	0	32	0	0	0	38	0	0	115
		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	15	0	0	30	0	0	32	0	0	0	38	0	0	115
	Cumulative reproductivity	0	0	0	0	0	0	0	0	15	15	15	45	45	45	77	77	77	77	115	115	115	

Appendix Table 4-2. Continued

(Nominal concentration : 0.250 mg/L)

Rep. No.	Counts	Time																					Total
		7/26	7/27	7/28	7/29	7/30	7/31	8/1	8/2	8/3	8/4	8/5	8/6	8/7	8/8	8/9	8/10	8/11	8/12	8/13	8/14	8/15	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	
8	F <sub>1</sub> generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	20	0	0	30	0	0	28	0	0	0	46	0	0	124
		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	20	0	0	30	0	0	28	0	0	0	46	0	0	124
	Cumulative reproductivity	0	0	0	0	0	0	0	0	20	20	20	50	50	50	78	78	78	78	124	124	124	
9	F <sub>1</sub> generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	17	0	0	29	0	0	35	0	0	0	47	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
		Total	0	0	0	0	0	0	0	17	0	0	29	0	0	35	0	0	0	47	0	0	128
	Cumulative reproductivity	0	0	0	0	0	0	0	0	17	17	17	46	46	46	81	81	81	81	128	128	128	
10	F <sub>1</sub> generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	18	0	0	30	0	0	29	0	0	0	46	0	0	123
		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	18	0	0	30	0	0	29	0	0	0	46	0	0	123
	Cumulative reproductivity	0	0	0	0	0	0	0	0	18	18	18	48	48	48	77	77	77	77	123	123	123	

Appendix Table 4-3. Result of reproduction test  
(Nominal concentration : 0.500 mg/L)

Rep. No.	Counts	Time																					Total
		7/26	7/27	7/28	7/29	7/30	7/31	8/1	8/2	8/3	8/4	8/5	8/6	8/7	8/8	8/9	8/10	8/11	8/12	8/13	8/14	8/15	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	
1	F <sub>1</sub> generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	18	0	0	37	0	0	33	0	0	0	51	0	0	139
		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	18	0	0	37	0	0	33	0	0	0	51	0	0	139
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	18	18	18	55	55	55	88	88	88	88	139	139	139	
2	F <sub>1</sub> generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	19	0	0	39	0	0	36	0	0	36	0	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
		Total	0	0	0	0	0	0	0	19	0	0	39	0	0	36	0	0	36	0	0	0	130
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	19	19	19	58	58	58	94	94	94	130	130	130	130	
3	F <sub>1</sub> generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	16	0	0	31	0	0	25	0	0	2	47	0	0	121
		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	16	0	0	31	0	0	25	0	0	2	47	0	0	121
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	16	16	16	47	47	47	72	72	72	74	121	121	121	
4	F <sub>1</sub> generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	21	0	0	37	0	0	32	0	0	0	48	1	0	139
		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	37	0	0	32	0	0	0	48	1	0	139
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	21	21	21	58	58	58	90	90	90	90	138	139	139	
5	F <sub>1</sub> generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	23	0	0	41	0	0	38	0	0	18	28	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
		Total	0	0	0	0	0	0	0	23	0	0	41	0	0	38	0	0	18	28	0	0	148
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	23	23	23	64	64	64	102	102	102	120	148	148	148	
6	F <sub>1</sub> generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	19	0	0	30	0	0	32	0	0	0	44	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
		Total	0	0	0	0	0	0	0	19	0	0	30	0	0	32	0	0	0	44	0	0	125
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	19	19	19	49	49	49	81	81	81	81	125	125	125	
7	F <sub>1</sub> generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	22	0	0	29	0	0	38	0	0	7	42	0	0	138
		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	29	0	0	38	0	0	7	42	0	0	138
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	22	22	22	51	51	51	89	89	89	96	138	138	138	

Appendix Table 4-3. Continued

( Nominal concentration : 0.500 mg/L )

(Nominal concentration : 0.500 mg/L)																								
Rep. No.	Counts		Time																					Total
			7/26	7/27	7/28	7/29	7/30	7/31	8/1	8/2	8/3	8/4	8/5	8/6	8/7	8/8	8/9	8/10	8/11	8/12	8/13	8/14	8/15	
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	
8	F <sub>1</sub> generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0	19	0	0	35	0	0	38	0	0	40	0	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	0	19	0	0	35	0	0	38	0	0	40	0	0	0
	Cumulative reproductivity	0	0	0	0	0	0	0	0	0	19	19	19	54	54	54	92	92	92	132	132	132	132	
9	F <sub>1</sub> generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0	17	0	0	37	0	0	40	0	0	45	0	0	0	139
		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	17	0	0	37	0	0	40	0	0	45	0	0	0
	Cumulative reproductivity	0	0	0	0	0	0	0	0	0	17	17	17	54	54	54	94	94	94	139	139	139	139	
10	F <sub>1</sub> generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0	21	0	0	33	0	0	42	0	0	49	0	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	0	21	0	0	33	0	0	42	0	0	49	0	0	0
	Cumulative reproductivity	0	0	0	0	0	0	0	0	0	21	21	21	54	54	54	96	96	96	145	145	145	145	

Appendix Table 4-4. Result of reproduction test  
(Nominal concentration : 1.00 mg/L)

Rep. No.	Counts	Time																					Total
		7/26	7/27	7/28	7/29	7/30	7/31	8/1	8/2	8/3	8/4	8/5	8/6	8/7	8/8	8/9	8/10	8/11	8/12	8/13	8/14	8/15	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	
1	F <sub>1</sub> generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	17	0	0	33	0	0	29	0	0	0	44	0	0	123
		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	17	0	0	33	0	0	29	0	0	0	44	0	0	123
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	17	17	17	50	50	50	79	79	79	79	123	123	123	
2	F <sub>1</sub> generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	20	0	0	26	0	0	36	0	0	46	2	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
		Total	0	0	0	0	0	0	0	20	0	0	26	0	0	36	0	0	46	2	0	0	130
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	20	20	20	46	46	46	82	82	82	128	130	130	130	
3	F <sub>1</sub> generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	21	0	0	33	0	0	40	0	0	40	0	0	0	134
		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	33	0	0	40	0	0	40	0	0	0	134
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	21	21	21	54	54	54	94	94	94	134	134	134	134	
4	F <sub>1</sub> generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	19	0	0	29	0	0	37	0	0	9	39	0	0	133
		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	19	0	0	29	0	0	37	0	0	9	39	0	0	133
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	19	19	19	48	48	48	85	85	85	94	133	133	133	
5	F <sub>1</sub> generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	14	0	0	33	0	0	36	0	0	38	0	0	0	121
		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	14	0	0	33	0	0	36	0	0	38	0	0	0	121
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	14	14	14	47	47	47	83	83	83	121	121	121	121	
6	F <sub>1</sub> generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	21	0	0	29	0	0	34	0	0	0	43	0	0	127
		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	29	0	0	34	0	0	0	43	0	0	127
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	21	21	21	50	50	50	84	84	84	84	127	127	127	
7	F <sub>1</sub> generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	14	0	0	33	0	0	37	0	0	0	46	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
		Total	0	0	0	0	0	0	0	14	0	0	33	0	0	37	0	0	0	46	0	0	130
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	14	14	14	47	47	47	84	84	84	84	130	130	130	



Appendix Table 4-4. Continued

(Nominal concentration : 1.00 mg/L)

Rep. No.	Counts	Time																					Total
		7/26	7/27	7/28	7/29	7/30	7/31	8/1	8/2	8/3	8/4	8/5	8/6	8/7	8/8	8/9	8/10	8/11	8/12	8/13	8/14	8/15	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	
8	F <sub>1</sub> generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	20	0	0	34	0	0	38	0	0	48	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
		Total	0	0	0	0	0	0	0	20	0	0	34	0	0	38	0	0	48	0	0	0	140
	Cumulative reproductivity	0	0	0	0	0	0	0	0	20	20	20	54	54	54	92	92	92	140	140	140	140	
9	F <sub>1</sub> generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	20	0	0	35	0	0	37	0	0	44	3	0	0	139
		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	20	0	0	35	0	0	37	0	0	44	3	0	0	139
	Cumulative reproductivity	0	0	0	0	0	0	0	0	20	20	20	55	55	55	92	92	92	136	139	139	139	
10	F <sub>1</sub> generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	23	0	0	35	0	0	36	0	0	0	44	0	0	138
		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	23	0	0	35	0	0	36	0	0	0	44	0	0	138
	Cumulative reproductivity	0	0	0	0	0	0	0	0	23	23	23	58	58	58	94	94	94	94	138	138	138	

Appendix Table 4-5. Result of reproduction test  
(Nominal concentration : 2.00 mg/L)

Rep. No.	Counts	Time																					Total
		7/26	7/27	7/28	7/29	7/30	7/31	8/1	8/2	8/3	8/4	8/5	8/6	8/7	8/8	8/9	8/10	8/11	8/12	8/13	8/14	8/15	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	
1	F <sub>1</sub> generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	21	0	0	28	0	0	32	0	0	1	44	0	0	126
		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	28	0	0	32	0	0	1	44	0	0	126
	Cumulative reproductivity	0	0	0	0	0	0	0	0	21	21	21	49	49	49	81	81	81	82	126	126	126	
2	F <sub>1</sub> generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	20	0	0	28	0	0	35	0	0	0	47	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
		Total	0	0	0	0	0	0	0	20	0	0	28	0	0	35	0	0	0	47	0	0	130
	Cumulative reproductivity	0	0	0	0	0	0	0	0	20	20	20	48	48	48	83	83	83	83	130	130	130	
3	F <sub>1</sub> generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	21	0	0	24	0	0	35	0	0	2	46	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
		Total	0	0	0	0	0	0	0	21	0	0	24	0	0	35	0	0	2	46	0	0	128
	Cumulative reproductivity	0	0	0	0	0	0	0	0	21	21	21	45	45	45	80	80	80	82	128	128	128	
4	F <sub>1</sub> generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	21	0	0	32	0	0	31	0	0	0	52	0	0	136
		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	32	0	0	31	0	0	0	52	0	0	136
	Cumulative reproductivity	0	0	0	0	0	0	0	0	21	21	21	53	53	53	84	84	84	84	136	136	136	
5	F <sub>1</sub> generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	16	0	0	32	0	0	41	0	0	34	16	0	0	139
		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	16	0	0	32	0	0	41	0	0	34	16	0	0	139
	Cumulative reproductivity	0	0	0	0	0	0	0	0	16	16	16	48	48	48	89	89	89	123	139	139	139	
6	F <sub>1</sub> generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	17	0	0	33	0	0	36	0	0	0	45	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
		Total	0	0	0	0	0	0	0	17	0	0	33	0	0	36	0	0	0	45	0	0	131
	Cumulative reproductivity	0	0	0	0	0	0	0	0	17	17	17	50	50	50	86	86	86	86	131	131	131	
7	F <sub>1</sub> generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	16	0	0	29	0	0	33	0	0	0	45	0	0	123
		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	16	0	0	29	0	0	33	0	0	0	45	0	0	123
	Cumulative reproductivity	0	0	0	0	0	0	0	0	16	16	16	45	45	45	78	78	78	78	123	123	123	

Appendix Table 4-5. Continued

(Nominal concentration : 2.00 mg/L)

Rep. No.	Counts	Time																					Total
		7/26	7/27	7/28	7/29	7/30	7/31	8/1	8/2	8/3	8/4	8/5	8/6	8/7	8/8	8/9	8/10	8/11	8/12	8/13	8/14	8/15	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	
8	F <sub>1</sub> generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	19	0	0	30	0	0	37	0	0	0	44	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
		Total	0	0	0	0	0	0	0	19	0	0	30	0	0	37	0	0	0	44	0	0	130
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	19	19	19	49	49	49	86	86	86	86	130	130	130	
9	F <sub>1</sub> generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	16	0	0	24	0	0	34	0	0	1	44	0	0	119
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
		Total	0	0	0	0	0	0	0	17	0	0	24	0	0	34	0	0	1	44	0	0	120
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	16	16	16	40	40	40	74	74	74	75	119	119	119	
10	F <sub>1</sub> generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	17	0	0	29	0	0	32	0	0	0	41	0	0	119
		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	17	0	0	29	0	0	32	0	0	0	41	0	0	119
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	17	17	17	46	46	46	78	78	78	78	119	119	119	

## Appendix 4-6. Result of reproduction test

(Nominal concentration : 4.00 mg/L)

Rep. No.	Counts		Time																					Total
			7/26	7/27	7/28	7/29	7/30	7/31	8/1	8/2	8/3	8/4	8/5	8/6	8/7	8/8	8/9	8/10	8/11	8/12	8/13	8/14	8/15	
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	
1	F <sub>1</sub> generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	13	0	0	4	0	0	24	0	0	0	41	
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8	0	0	1	0	0	0	9	
	Total	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	13	0	0	12	0	0	25	0	0	0	50	
	Cumulative reproductivity	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	13	13	13	17	17	17	41	41	41	41		
2	F <sub>1</sub> generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	13	0	0	17	0	0	0	14	44	
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	2	
	Total	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	13	0	0	19	0	0	0	14	46	
	Cumulative reproductivity	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	13	13	13	30	30	30	30	44		
3	F <sub>1</sub> generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9	0	0	10	0	0	25	0	0	44	
		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	0	0	0	9	0	0	10	0	0	25	0	0	44	
	Cumulative reproductivity	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9	9	9	19	19	19	44	44	44		
4	F <sub>1</sub> generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0	14	0	0	17	0	0	21	0	56	
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	
	Total	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0	14	0	0	18	0	0	21	0	57	
	Cumulative reproductivity	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	4	4	18	18	18	35	35	35	56	56		
5	F <sub>1</sub> generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9	0	0	13	0	0	22	0	0	44	
		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	0	0	0	9	0	0	13	0	0	22	0	0	44	
	Cumulative reproductivity	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9	9	9	22	22	22	44	44	44		
6	F <sub>1</sub> generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0	0	14	0	0	18	0	0	0	22	0	0	18	72	
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	2	3	
	Total	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	14	0	0	19	0	0	0	22	0	0	20	75	
	Cumulative reproductivity	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	14	14	14	32	32	32	32	54	54	54	72		
7	F <sub>1</sub> generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7	0	0	12	0	0	14	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	
	Total	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7	0	0	12	0	0	14	0	0	33	
	Cumulative reproductivity	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7	7	7	19	19	19	33	33	33		

## Appendix 4-6. Continued

( Nominal concentration : 4.00 mg/L )

Rep. No.	Counts	Time																					Total
		7/26	7/27	7/28	7/29	7/30	7/31	8/1	8/2	8/3	8/4	8/5	8/6	8/7	8/8	8/9	8/10	8/11	8/12	8/13	8/14	8/15	
8	F <sub>1</sub> generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	14	0	0	10	0	0	28	0	0	23	75
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0	1	5
		Total	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	14	0	0	14	0	0	28	0	0	24	80
	Cumulative reproductivity	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	14	14	14	24	24	24	52	52	52	75	
9	F <sub>1</sub> generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8	0	0	14	0	0	23	0	0	45
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	2
		Total	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9	0	0	14	0	0	24	0	0	47
	Cumulative reproductivity	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8	8	8	22	22	22	45	45	45	
10	F <sub>1</sub> generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6	0	0	15	0	0	16	0	0	37
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	3
		Total	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6	0	0	15	0	0	19	0	0	40
	Cumulative reproductivity	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6	6	6	21	21	21	37	37	37	

## Appendix 5

### Statistical method for NOEC calculation

## 初産日

クラスカルワルツの検定 有意である

検定統計量:58.4428448788219

X2値(5%):11.0704976935164

## ダンネットの検定

群名	平均	標準偏差	検定結果	平均の差	平均の信頼区間	順位平均	順位標準偏差	Control	0.250 mg/L	0.500 mg/L	1.00 mg/L	2.00 mg/L	4.00 mg/L
Control	9	0		0	0	25.5	0	25.5	25.5	25.5	25.5	25.5	53.5
0.250 mg/L	9	0		0	12.7	25.5	0	25.5	25.5	25.5	25.5	25.5	60.0
0.500 mg/L	9	0		0	12.7	25.5	0	25.5	25.5	25.5	25.5	25.5	57.0
1.00 mg/L	9	0		0	12.7	25.5	0	25.5	25.5	25.5	25.5	25.5	51.5
2.00 mg/L	9	0		0	12.7	25.5	0	25.5	25.5	25.5	25.5	25.5	57.0
4.00 mg/L	12.5	0.972	**	30	15.5	55.5	2.82	25.5	25.5	25.5	25.5	25.5	57.0
								25.5	25.5	25.5	25.5	25.5	57.0

\*\* : Significantly different from Control at  $p < 0.01$

# 累積産仔数

バートレットの検定 有意でない  
一元配置の分散分析 有意である

検定統計量:10.3204718504504

X2値(5%):11.0704976935164

検定統計量:151.571759040929

F値(5%):2.38606986157422

## ダンネットの検定

群名	平均	標準偏差	検定結果	平均の差	平均の信頼区間
Control	134	6.40		0	0
0.250	126	6.83		7	10.0
0.500	136	8.51		2	10.0
1.00	132	6.55		2	10.0
2.00	128	6.61		6	10.0
4.00	49	14.2	**	85	12.4

\*\* : Significantly different from Control at  $p < 0.01$



## Additional data

Result of preliminary test

## 予備試験結果

### ＜生物への影響＞

#### 予備試験

試験区(mg/L)	親の生存率 (%)	14 日間の生存親 1 頭当たり における平均累積産仔数	統計処理 結果
対照区	100	57.4	
0.500	100	45.0	
1.58	80	39.8	*
5.00	40	0.0	

試験期間 : 14 日間

暴露方式 : 半止水式

(換水頻度 : 4 日後までは 1 回/1 日、5 日後以降は 1 回/2 日)

試験生物 : 5 頭/区(5 連/区)

試験液調製法 : 供試試料と試験用水と混合後、約30分超音波照射して溶解した試験原液を用いて調製した。

\* : 有意差あり( $p < 0.05$ )

### ＜試験液中の被験物質濃度＞

設定濃度 (mg/L)	測定濃度 (mg/L) (対設定濃度 %)			
	暴露開始時	24時間後	48時間後	72時間後
0.500	0.495 (99.0)	0.457 (91.4)	0.426 (85.3)	0.376 (75.1)
5.00	4.98 (99.5)	4.85 (97.0)	4.61 (92.2)	4.09 (81.8)