

環境庁殿

最 終 報 告 書

o-アニシジンのオオミジンコ(*Daphnia magna*)に対する繁殖阻害試験

(試験番号：91748)

1997 年 3 月 28 日作成

財団法人 化学品検査協会
化学品安全センター 久留米研究所

陳 述 書

財団法人 化 学 品 検 査 協 会
化学品安全センター 久留米研究所

試験委託者： 環境庁

表 題： o-アニシジンのオオミジンコ(*Daphnia magna*)に対する
繁殖阻害試験

試験番号： 91748

上記試験は契約書別添 2「生態影響試験実施に関する基準」(平成 7 年 9 月 26 日)に
準拠したものである。

1997年 3月 28日

運営管理者



信 頼 性 保 証 書

財団法人 化 学 品 検 査 協 会
化学品安全センター 久留米研究所

試験委託者： 環境庁

表 題： o-アニシジンのオオミジンコ(*Daphnia magna*)に対する
繁殖阻害試験

試験番号： 91748

本試験は試験計画書及び標準操作手順書に従って実施され、本報告書には試験に使用した方法、手順が正確に記載されており、試験結果は生データを正確に反映していることを下記の通り確認した。

監査又は査察内容	実施日	報告日(運営管理者)	報告日(試験責任者)
試験計画書監査	1997年 2月20日	1997年 2月20日	1997年 2月20日
試験実施状況査察	1997年 2月24日	1997年 2月27日	1997年 2月26日
試験実施状況査察	1997年 3月10日	1997年 3月19日	1997年 3月19日
試験実施状況査察	1997年 3月17日	1997年 3月19日	1997年 3月19日
最終報告書監査	1997年 3月28日	1997年 3月28日	1997年 3月28日

1997年 3月28日

信頼性保証部門責任者



試験実施概要

1 表 題

o-アニシジンのオオミジンコ(*Daphnia magna*)に対する繁殖阻害試験

2 試験目的

o-アニシジンについて、オオミジンコ(*Daphnia magna*)に対する繁殖阻害試験を21日間行い、繁殖状態に対照区と有意差の認められない最高濃度(NOECr)及び産仔数を50%減少させると算定される濃度(50%繁殖阻害濃度:ErC50)を求める。

3 試験方法

本試験は、OECD化学品テストガイドライン No.202「ミジンコ類、急性遊泳阻害試験及び繁殖試験」(1984年)に準拠した。

4 適用GLP

本試験は契約書別添 2「生態影響試験実施に関する基準」(平成 7 年 9 月 26 日)に準拠した。

5 試験委託者

名 称： 環境庁

住 所： (〒100)東京都千代田区霞が関 1-2-2

6 試験受託者

名 称： 財団法人 化学品検査協会

住 所： (〒136)東京都江東区亀戸 5-6-21

7 試験施設

名 称： 化学品安全センター 久留米研究所

住 所： (〒830)福岡県久留米市中央町 19-14

運営管理者： XXXXXXXXXX

8 試験関係者

試験責任者

[REDACTED]

試験担当者

生物試験担当

[REDACTED]

分析担当

[REDACTED]

データ処理担当

[REDACTED]

試験資料管理部門責任者

[REDACTED]

9 最終報告書の承認

1997年 3 月 28 日

試験責任者

氏名

[REDACTED]

10 試験期間

試験開始日 1997 年 2 月 20 日

試験終了日 1997 年 3 月 28 日

暴露期間 1997 年 2 月 24 日 ~ 1997 年 3 月 17 日

11 保管

試験計画書、生データ、記録文書、最終報告書及び被験物質は、最終報告書作成後10年間、財団法人 化学品検査協会 化学品安全センター 久留米研究所の保管施設に保管する。その後の保管については試験委託者と協議のうえ決定する。

目 次

	頁
要 旨	1
1 被 験 物 質	2
1.1 名称、構造式及び物理化学的性状	2
1.2 被験物質の確認及び保管条件下での安定性	3
2 試 験 生 物	3
3 試 験 方 法	4
3.1 試 験 条 件	4
3.2 希 釈 水	4
3.3 試験容器及び恒温槽等	4
3.4 試験濃度の設定	4
3.5 試験液の調製	5
3.6 試験液の分析	5
3.7 試 験 操 作	5
3.8 数値の取扱い	5
4 結果の算出	6
4.1 親ミジンコの半数致死濃度(LC50)の算出	6
4.2 50%繁殖阻害濃度(ErC50)の算出	6
4.3 最大無作用濃度(NOECr)及び最小作用濃度(LOECr)	7
5 結果及び考察	7
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	7
5.2 試験液中の被験物質濃度	7
5.3 ミジンコの観察結果	7
5.4 親ミジンコの50%致死濃度(LC50)	9
5.5 50%繁殖阻害濃度(ErC50)	9
5.6 累積産仔数に及ぼす最大無作用濃度(NOECr)及び最小作用濃度(LOECr)	9
5.7 試験液の水溫、溶存酸素濃度及びpH	9
5.8 試験液の状態	9
Table 1～10	10～18
Figure 1, 2	19, 20
付属資料－1 希釈水の水質	
付属資料－2 試験液の分析方法及び分析チャート	
付属資料－3 ミジンコの観察結果	

要 旨

試験委託者

環境庁

表 題o-アニシジンのオオミジンコ(*Daphnia magna*)に対する繁殖阻害試験試験番号

91748

試験方法

本試験は、OECD化学品テストガイドライン No.202「ミジンコ類、急性遊泳阻害試験及び繁殖試験」(1984年)に準拠して実施した。

- 1) 被験物質： o-アニシジン
- 2) 試験生物： オオミジンコ(*Daphnia magna*)
- 3) 生物数： 40頭／1試験区(1連につき10頭で1試験区40頭)
- 4) 暴露期間： 21日間
- 5) 暴露方式： 半止水式(週に3回、試験液を交換)
- 6) 試験濃度： 2.00、1.00、0.500、0.250及び0.125 mg/L(公比：2.0)及び対照区
- 7) 連 数： 1試験区につき4連
- 8) 試験液量： 1容器(1連)につき800 mL
- 9) 試験水温： 20±1℃
- 10) 照 明： 16時間明／8時間暗
- 11) 試験液中の被験物質の分析： 高速液体クロマトグラフィー (HPLC)
(0、2、11、14、16及び18日目)

結 果

- 1) 21日間の親ミジンコの50%致死濃度(LC50)
> 2.00 mg/L
- 2) 21日間の50%繁殖阻害濃度(ErC50)
=1.28 mg/L(95%信頼限界：1.10～1.52 mg/L)
- 3) 最大無作用濃度(NOECr)=0.250 mg/L
- 4) 最小作用濃度(LOECr)=0.500 mg/L
(上記濃度は、全て設定値に基づく値)

1 被 験 物 質

本報告書においてo-アニシジンは、次の名称及び品質等を有するものとする。

被験物質に関する情報については供給者提供の添付資料等によった。

1.1 名称、構造式及び物理化学的性状

- 1) 名 称 : o-アニシジン
(CAS番号 90-04-0)

- 2) 構 造 式 :



- 3) 分 子 式 : C_7H_9NO
 4) 分 子 量 : 123.15
 5) 外 観 : 赤褐色澄明の液体 ^{#1}
 6) 安 定 性 : 不明
 7) 1-オクタノール／水分配係数(logP) : $\log K_{ow}=0.95$ ^{#3}
 8) pKa : 4.52 (25℃) ^{#3}
 9) 水への溶解度 : 1.4×10^4 mg/L (25℃) ^{#3}
 10) 蒸 気 圧 : < 0.1 mmHg (30℃) ^{#2}
 11) 純度及び不純物 : 含量 99.7% (毛管カラムGC) ^{#1}
 12) ロット番号 : LEJ5225
 13) 供 給 者 : XXXXXXXXXX
 14) 供 給 量 : 25 mL
 15) 入 手 日 : 1996 年 12 月 25 日

情 報 源

- #1 : 供給者提供の添付資料
 #2 : 環境庁化学物質研究会編「環境化学物質要覧」(丸善) 1988.
 #3 : Hazardous Substances Data Bank(HSDB), U.S. National Library of Medicine (1995).

1.2 被験物質の確認及び保管条件下での安定性

被験物質は当研究所の冷蔵庫に保管した。

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、被験物質の特性と矛盾が認められないことを確認した。暴露終了後にも同様にスペクトルを測定し、暴露開始前に測定したスペクトルと比較した結果、スペクトルに変化はなかったことより被験物質は当研究所の冷蔵庫に保管中は安定であったと判断された。

2 試験生物

試験には生後24時間令以内のオオミジンコ(*Daphnia magna*)の幼体を用いた。

本種は、U.S. EPA Environmental Research Laboratory, Duluthより入手したものを、当研究所において継代飼育しているものである。また、基準物質(重クロム酸カリウム、試薬特級、和光純薬工業株式会社)の48時間 EC_{50} は0.283 mg/Lであった。

供試する幼体を得るためのミジンコの飼育方法

継代飼育している2～4週令のミジンコを試験生物の親とした。成熟し幼体を生むようになったら少なくとも、試験前日に幼体を除去した。但し、死亡個体の多いバッチ、休眠卵や雄が生じたバッチのミジンコは使用しなかった。

- 1) 飼育水： 希釈水(3.2参照)
- 2) 飼育密度： 10頭／800 mL飼育水
- 3) 水温： $20\pm 1^{\circ}\text{C}$
- 4) 照明： 室内光、16時間明／8時間暗
- 5) 餌： 単細胞緑藻類(*Chlorella vulgaris*)
藻類培養液を遠心操作により、希釈水に置換して給餌した。
- 6) 給餌量： ミジンコ1頭当たり*Chlorella vulgaris*を0.1 ～ 0.2 mgC(有機炭素含量)／日の割合で与えた。この範囲でミジンコの成育段階に応じて段階的に餌の量を変えて与えた。

3 試験方法

3.1 試験条件

- 1) 暴露方式： 被験物質を含む試験液へ試験生物を暴露する葉浴方式を用いた。
試験は、週に3回試験液を交換する半止水式で行った。
- 2) 暴露期間： 21日間
- 3) 連 数： 1試験区に付き4連
- 4) 生物数： 40頭／1試験区(1連に付き10頭で1試験区40頭)
- 5) 試験液量： 1容器(1連)に付き800 mL
- 6) 試験水温： $20 \pm 1^{\circ}\text{C}$
- 7) 照 明： 室内光、16時間明／8時間暗
- 8) 給 餌 量： ミジンコ1頭当たり *Chlorella vulgaris* を $0.1 \sim 0.2 \text{ mgC}$ (有機炭素含量)／日の割合で与えた。

3.2 希 釈 水

脱塩素水道水(久留米市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)を使用した。希釈水の水質として、硬度は 55.6 mg/L (CaCO_3 換算)、pHは7.7であった。希釈水使用時にはオルトトリジン法によって残留塩素濃度が 0.02 mg/L 以下であることを確認した。

[付属資料-1]

3.3 試験容器及び恒温槽等

- 1) 試験容器： 1,000 mL容のガラス製容器(外径12.0 cm、高さ12.5 cm)を用いた。
- 2) 恒 温 槽： 加温冷却機によって試験容器内の水温を $20 \pm 1^{\circ}\text{C}$ に維持する恒温槽を用いた。
- 3) 水 温 計： 検定済ガラス製棒状温度計
- 4) pH 計： ガラス電極式水素イオン濃度計 HM-14P 型(東亜電波工業)
- 5) 溶存酸素計： 溶存酸素計58型(Yellow Springs Instrument Co., Inc.)

3.4 試験濃度の設定

急性遊泳障害試験の結果である48-h EC_{50} 値(22.5 mg/L)及び本試験に先立ち行った予備試験の結果から、試験濃度は 2.00 mg/L を最高濃度として公比2.0で5濃度区(2.00 、 1.00 、 0.500 、 0.250 及び 0.125 mg/L)を決定した。対照には希釈水のみに対照区を設けた。

3.5 試験液の調製

必要量の被験物質を希釈水に溶解させ、20.0 mg/Lの試験原液を調製した。試験液は、各濃度区毎に必要な量の試験原液と希釈水を混合して調製し、4個の試験容器に分割した。

3.6 試験液の分析

全試験区(但し、4試験容器の中層より等量を採取したものを混合した1試料/1試験区)について、暴露期間中に6回(換水前後のものを3回繰り返し)の頻度で採取し、換水前のものについては遠心分離(3,000 rpmで10分間)をして餌を除いた後、そのまま若しくは希釈してHPLCにより分析した。試験液の分析に際しては、標準溶液(濃度0.0500 mg/L)の測定を行い、そのピーク面積比から定量した。詳細は付属資料-2に示した。

3.7 試験操作

試験液の水溫、溶存酸素濃度、pHを測定後、試験生物を投入し、その時点を暴露開始時とした。先端が比較的広口のガラスピペットを用いて試験生物を投入した。その際、試験液量に対して、ピペット内の飼育水は全量で1%以内を目安とした。その後、換水毎にミジンコを新しい試験液に移しかえ、21日目まで飼育した。暴露期間中は毎日一定量の給餌を行った(3.1参照)。

・ミジンコの観察：

(親ミジンコ) 毎日、生存数、遊泳阻害数、大きさと状態を対照区と比較して観察した。死亡した親ミジンコは計数後に取り除いた。

(産出幼体) 換水前に幼体の生死の数及び休眠卵の発生等について観察した。計数後の幼体は取り除いた。最初の幼体産出日を記録した。

・水質測定：水溫、溶存酸素濃度、pHを全試験区(但し、各1試験容器)について、暴露期間中に10回(換水前後のものを5回繰り返し)の頻度で測定した。

3.8 数値の取扱い

数値の丸め方は、JIS Z 8202-1985 参考 3 規則 B によった。

4 結果の算出

得られたデータを基に以下3項目の結果を算出した。結果の算出には、被験物質の測定濃度が設定値の±20%以内であったので設定濃度を用いた。

4.1 親ミジンコの半数致死濃度(LC50)の算出

各濃度区での親ミジンコの死亡数と供試個体数(40頭)を用いて、14及び21日目の半数致死濃度(LC50)を算出した。

4.2 50%繁殖障害濃度(ErC50)の算出

累積産仔数の算出

各試験容器の親1頭当たりの試験期間中の累積産仔数(TF)及び平均累積産仔数(\overline{TF})を以下の式より求めた。

$$TF = \sum_{n=1}^{ne} \frac{2 \times Fn}{P_{n-1} + P_n}$$

ここで、

n : 幼体観察回数

Fn : n 回目の幼体数(但し、生存幼体)

P_n : 暴露開始後 n 回目の観察時の親の数

P_{n-1} : $n-1$ 回目の親の数

P_0 : 最初に幼体を観察した日の前日の親の数

ne : 最終観察回

(但し、 $P_{n-1} + P_n$ が0の場合は、無視した。)

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

ここで、

TF_n : 各試験容器の累積産仔数

m : 濃度区当たりの系列数(試験容器数 : 4)

ErC50値の算出

Moving average法により50%繁殖障害濃度(ErC50)を算出した。但し、供試個体数に対照区の平均累積産仔数を、生存数に各濃度区での平均累積産仔数を適用して計算した。14及び21日目のErC50値を算出し、それらの95%信頼限界も示した。

4.3 最大無作用濃度(NOECr)及び最小作用濃度(LOECr)

4.2に示した方法で算出した各試験容器毎の親1頭当たりの累積産仔数について、Bartlett法による等分散検定を行った後、各濃度区と対照区との有意差の有無を一元配置分散分析及びDunnnettの多重比較法により求め、対照区と有意差の認められない最高濃度(最大無作用濃度：NOECr)及び有意差の認められる最低濃度(最小作用濃度：LOECr)を決定した。

5 結果及び考察

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

該当する要因はなかった。

5.2 試験液中の被験物質濃度

試験液調製時の被験物質の測定濃度の設定値に対する割合は85.9～99.9%、2～3日後(換水前)で82.8～107%であった。いずれの測定値もほぼ設定どおりであった。

[Table 1 (p.10), 付属資料-2]

5.3 ミジンコの観察結果

親ミジンコの死亡数及び死亡率

対照区での親ミジンコの累積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。

0.125 mg/L区、0.250 mg/L区、0.500 mg/L区及び1.00 mg/L区では殆ど死亡はみられなかったが、試験最高濃度の2.00 mg/L区では暴露開始4日目より死亡がみられ始め、暴露終了時では35%の累積死亡率であり、対照区と統計的にも有意差がみられた。

(上記濃度は、全て設定濃度を示す)

[$p=0.01$, 統計的方法：Kruskal-Wallisの順位和検定及び
ノンパラメトリックの多重比較法(Dunnnett)]

[Table 2 (p.11), Figure 1 (p.19), 付属資料-3]

初産日

対照区での親ミジンコの初産日は7日であり、試験成立条件である9日以内の基準を満たした。

0.125 mg/L区、0.250 mg/L区、0.500 mg/L区及び1.00 mg/L区での初産日は7日であり、対照区と同じであった。

試験最高濃度の2.00 mg/L区での初産日は平均7.5日であったが、対照区とも統計的に有意差がみられなかった。

(上記濃度は、全て設定濃度を示す)

($p=0.05$,統計的方法：Kruskal-Wallisの順位和検定)

[Table 3 (p.12)]

平均累積産仔数

対照区での親ミジンコ1頭当たりの平均累積産仔数は100頭であり、試験成立条件である40頭の基準を満たした。

0.125 mg/L区及び0.250 mg/L区での親ミジンコ1頭当たりの平均累積産仔数は96～88頭であり、対照区と有意差はみられなかった。0.500 mg/L区、1.00 mg/L区及び2.00 mg/L区での親ミジンコ1頭当たりの平均累積産仔数は対照区よりも少なく、統計的にも有意差がみられた。

(上記濃度は、全て設定濃度を示す)

($p=0.05$,統計的方法：一元配置分散分析及びDunnnettの多重比較法)

[Table 4 (p.13), Figure 2 (p.20),付属資料-3]

親ミジンコの大きさと状態

0.125 mg/L区、0.250 mg/L区、0.500 mg/L区及び1.00 mg/L区では対照区と比較して大きさや状態に殆ど違いはみられなかった。

0.125 mg/L区では9～11日目に1個体で活動度の低下や体色の明化がみられたが、12日目に死亡した。

2.00 mg/L区では暴露開始3日目より遊泳阻害や成長阻害、4日目より体色の明化がみられた。9日目より成長阻害だけが認められるようになり、その症状は暴露終了時まで継続した。

(上記濃度は、全て設定濃度を示す)

休眠卵の発生等

暴露期間中、休眠卵の発生はいずれの試験区でもみられなかった。

落下卵はいずれの試験区でも観察され、各濃度区では対照区よりもやや多く認められた。

5.4 親ミジンコの50%致死濃度(LC50)

21日間の親ミジンコの50%致死濃度(LC50)は > 2.00 mg/L(設定濃度)であった。
2.00 mg/Lでの親ミジンコの死亡率は35%であった。

[Table 5 (p.14)]

5.5 50%繁殖阻害濃度(ErC50)

設定濃度に基づいて算出した14日間の50%繁殖阻害濃度(ErC50)は、0.664 mg/Lであり、その95%信頼限界は0.547~0.827 mg/Lであった。また、21日間のErC50は、1.28 mg/Lであり、その95%信頼限界は1.10~1.52 mg/Lであった。

[Table 6 (p.14)]

5.6 累積産仔数に及ぼす最大無作用濃度(NOECr)及び最小作用濃度(LOECr)

親ミジンコ1頭当たりの累積産仔数に及ぼす21日間の最大無作用濃度(NOECr)は0.250 mg/Lであり、最小作用濃度(LOECr)は0.500 mg/Lであった。

(上記濃度は、全て設定濃度を示す)

($p=0.05$,統計的方法：一元配置分散分析及びDunnnettの多重比較法)

[Table 7 (p.15)]

5.7 試験液の水温、溶存酸素濃度及びpH

暴露期間中に測定した水温は19.9~20.3℃であり、 20 ± 1 ℃の範囲であった。溶存酸素濃度は6.3~8.8 mg/Lであり、飽和溶存酸素濃度の60%以上であった(20.0℃の飽和溶存酸素濃度：8.84 mg/L)。pHは7.1~7.8であり、変動は1以下であった。

以上のことから、水温、溶存酸素濃度及びpHについては、ミジンコの生育条件としては適切な範囲であったと思われる。

[Table 8,9,10 (p.16~18)]

5.8 試験液の状態

試験液調製時には無色透明であり、クロレラを給餌した後は淡緑色を呈していた。換水前ではその色が薄くなり、その程度はミジンコの数が多い時ほど著しかった。

以 上

Table 1. Concentrations of *o*-anisidine in reproduction test using *Daphnia magna* under semi-static conditions

Nominal concentration (mg/L)	Measured concentration (mg/L) (Percent of nominal)			
	0-day ^{a)}	2-day ^{b)}	11-day ^{a)}	14-day ^{b)}
Control	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
0.125	0.124 (99.0)	0.122 (97.7)	0.116 (92.7)	0.110 (88.0)
0.250	0.235 (94.1)	0.249 (99.6)	0.227 (90.9)	0.207 (82.8)
0.500	0.492 (98.5)	0.535 (107)	0.431 (86.1)	0.427 (85.4)
1.00	0.989 (98.9)	1.06 (106)	0.859 (85.9)	0.923 (92.3)
2.00	2.00 (99.9)	1.98 (99.2)	1.72 (86.1)	1.85 (92.5)

Table 1. (continued)

Nominal concentration (mg/L)	Measured concentration (mg/L) (Percent of nominal)		Time-weighted mean ^{c)} (mg/L)
	16-day ^{a)}	18-day ^{b)}	
Control	n.d.	n.d.	-
0.125	0.120 (96.2)	0.124 (99.3)	0.118 (94.7)
0.250	0.237 (94.6)	0.237 (94.9)	0.230 (92.0)
0.500	0.465 (92.9)	0.463 (92.7)	0.463 (92.6)
1.00	0.974 (97.4)	0.908 (90.8)	0.944 (94.4)
2.00	1.98 (99.1)	2.12 (106)	1.92 (96.0)

n.d. : < 0.0250 mg/L

The values in parentheses express percent of nominal.

a) fresh solutions

b) expired solutions

c) The values are expressed as time-weighted means calculated by the following equation:

$$\{2(C_0-C_2)/(\ln C_0-\ln C_2)+3(C_{11}-C_{14})/(\ln C_{11}-\ln C_{14})+2(C_{16}-C_{18})/(\ln C_{16}-\ln C_{18})\}/7$$

where

 C_x : the measured concentration at x-day $\ln C_x$: the natural logarithm of C_x

Table 2. Cumulative number of dead parental *Daphnia* during exposure to *o*-anisidine

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)
0.125	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)	3 (7.5)	8 (20.0)	8 (20.0)	13 (32.5)	13 (32.5)	14 (35.0)	14 (35.0)

Table 2. (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)
0.125	0 (0)	1 (2.5)	1 (2.5)	1 (2.5)	1 (2.5)	1 (2.5)	1 (2.5)	1 (2.5)	1 (2.5)	1 (2.5)	1 (2.5)
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	14 (35.0)	14 (35.0)	14 (35.0)	14 (35.0)	14 (35.0)	14 (35.0)	14 (35.0)	14 (35.0)	14 (35.0)	14 (35.0)	14 (35.0)

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

Table 3. Time (days) required to first brood production during exposure to *o*-anisidine

Nominal concentration (mg/L)	Vessel No.				Mean
	1	2	3	4	
Control	7	7	7	7	7.0
0.125	7	7	7	7	7.0
0.250	7	7	7	7	7.0
0.500	7	7	7	7	7.0
1.00	7	7	7	7	7.0
2.00	7	9	7	7	7.5

Table 4. Mean cumulative number of juveniles produced per adult ($\Sigma F_1/P$)
during exposure to *o*-anisidine

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	7.5	7.5	9.5	9.5
0.125	0	0	0	0	0	0	0	6.1	6.1	10.1	10.1
0.250	0	0	0	0	0	0	0	2.8	2.8	6.3	6.3
0.500	0	0	0	0	0	0	0	4.0	4.0	6.8	6.8
1.00	0	0	0	0	0	0	0	2.7	2.7	5.7	5.7
2.00	0	0	0	0	0	0	0	0.1	0.1	0.6	0.6

Table 4. (continued)

Nominal concentration (mg/L)	Exposure time (day)										
	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
Control	31.3	31.3	31.3	59.7	59.7	75.4	75.4	79.6	79.6	79.6	100
0.125	25.8	25.8	25.8	50.7	50.7	70.7	70.7	77.1	77.1	77.1	96.3
0.250	25.4	25.4	25.4	42.6	42.6	50.6	50.6	61.4	61.4	61.4	87.9
0.500	22.5	22.5	22.5	32.6	32.6	37.0	37.0	43.5	43.5	43.5	73.4
1.00	26.2	26.2	26.2	38.0	38.0	41.4	41.4	48.7	48.7	48.7	73.6
2.00	3.4	3.4	3.4	5.2	5.2	5.8	5.8	7.7	7.7	7.7	19.4

Table 5. Calculated LC50 values of *o*-anisidine for parental *Daphnia* based on nominal concentrations

Exposure time (day)	LC50 (mg/L)	95-Percent confidence limits (mg/L)	Statistical method
14	> 2.00	-	-
21	> 2.00	-	-

Table 6. Calculated ErC50 values of *o*-anisidine for inhibition of reproduction based on nominal concentrations

Exposure time (day)	ErC50 (mg/L)	95-Percent confidence limits (mg/L)	Statistical method
14	0.664	0.547 ~ 0.827	moving average
21	1.28	1.10 ~ 1.52	moving average

Table 7. Significance test of difference between the mean cumulative numbers of juveniles produced per adult in control and test vessels after 21 days exposure to *o* -anisidine

Nominal concentration (mg/L)	Vessel No.				Mean	S.D.	Significant difference
	1	2	3	4			
Control	98	90	101	112	100	8.8	
0.125	102	92	97	94	96	4.5	
0.250	96	106	80	69	88	16.5	
0.500	92	60	65	77	73	14.3	*
1.00	73	59	66	96	74	16.2	*
2.00	16	19	23	20	19	3.0	-

* : Significantly different from Control at $p < 0.05$.

The data of 2.00 mg/L were omitted from statistical analysis.

No observed effect concentration (NOECr) = 0.250 mg/L

Lowest observed effect concentration (LOECr) = 0.500 mg/L

Table 8. Temperature of test solutions during 21-day *Daphnia* reproduction inhibition test to *o*-anisidine

Nominal concentration (mg/L)		Temperature (°C)									
		0-day	2-day	4-day	7-day	9-day	11-day	14-day	16-day	18-day	21-day
Control	New	20.3		20.1		20.0		19.9		20.0	
	Old		20.3		20.2		20.0		19.9		20.0
0.125	New	20.3		20.1		20.0		19.9		20.0	
	Old		20.3		20.2		20.0		19.9		20.0
0.250	New	20.3		20.1		20.0		19.9		20.0	
	Old		20.3		20.2		20.0		19.9		20.0
0.500	New	20.3		20.1		20.0		19.9		20.0	
	Old		20.3		20.3		20.0		19.9		20.0
1.00	New	20.3		20.1		20.0		19.9		20.0	
	Old		20.3		20.3		20.0		19.9		20.0
2.00	New	20.3		20.1		20.0		19.9		20.0	
	Old		20.3		20.3		20.0		19.9		20.0

new : freshly prepared test solutions

old : test solutions after 48 or 72 hours exposure

Table 9. Dissolved oxygen concentrations of test solutions during 21-day
Daphnia reproduction inhibition test to *o*-anisidine

Nominal concentration (mg/L)	Dissolved oxygen concentration (mg/L)									
		0-day	2-day	4-day	7-day	9-day	11-day	14-day	16-day	18-day 21-day
Control	New	8.7		8.8		8.7		8.8		8.8
	Old		8.5		8.1		7.7		7.7	7.4
0.125	New	8.7		8.8		8.7		8.8		8.8
	Old		8.5		8.2		7.5		7.7	7.6
0.250	New	8.7		8.8		8.7		8.8		8.8
	Old		8.5		8.3		7.4		7.7	7.6
0.500	New	8.7		8.8		8.7		8.8		8.8
	Old		8.5		8.1		6.3		7.7	7.7
1.00	New	8.7		8.8		8.7		8.8		8.8
	Old		8.6		8.2		7.5		8.0	7.6
2.00	New	8.7		8.8		8.7		8.8		8.8
	Old		8.6		8.7		7.3		8.0	7.9

new : freshly prepared test solutions

old : test solutions after 48 or 72 hours exposure

Table 10. pH values of test solutions during 21-day *Daphnia* reproduction inhibition test to *o*-anisidine

Nominal concentration (mg/L)		pH									
		0-day	2-day	4-day	7-day	9-day	11-day	14-day	16-day	18-day	21-day
Control	New	7.5		8.0		7.7		7.9		7.7	
	Old		7.7		7.5		7.3		7.3		7.3
0.125	New	7.5		7.7		7.7		7.6		7.6	
	Old		7.7		7.5		7.3		7.4		7.4
0.250	New	7.5		7.7		7.7		7.6		7.7	
	Old		7.8		7.6		7.3		7.3		7.4
0.500	New	7.5		7.7		7.7		7.6		7.6	
	Old		7.8		7.5		7.1		7.4		7.4
1.00	New	7.6		7.7		7.7		7.6		7.6	
	Old		7.8		7.6		7.3		7.4		7.3
2.00	New	7.6		7.7		7.7		7.6		7.6	
	Old		7.8		7.7		7.3		7.4		7.5

new : freshly prepared test solutions

old : test solutions after 48 or 72 hours exposure

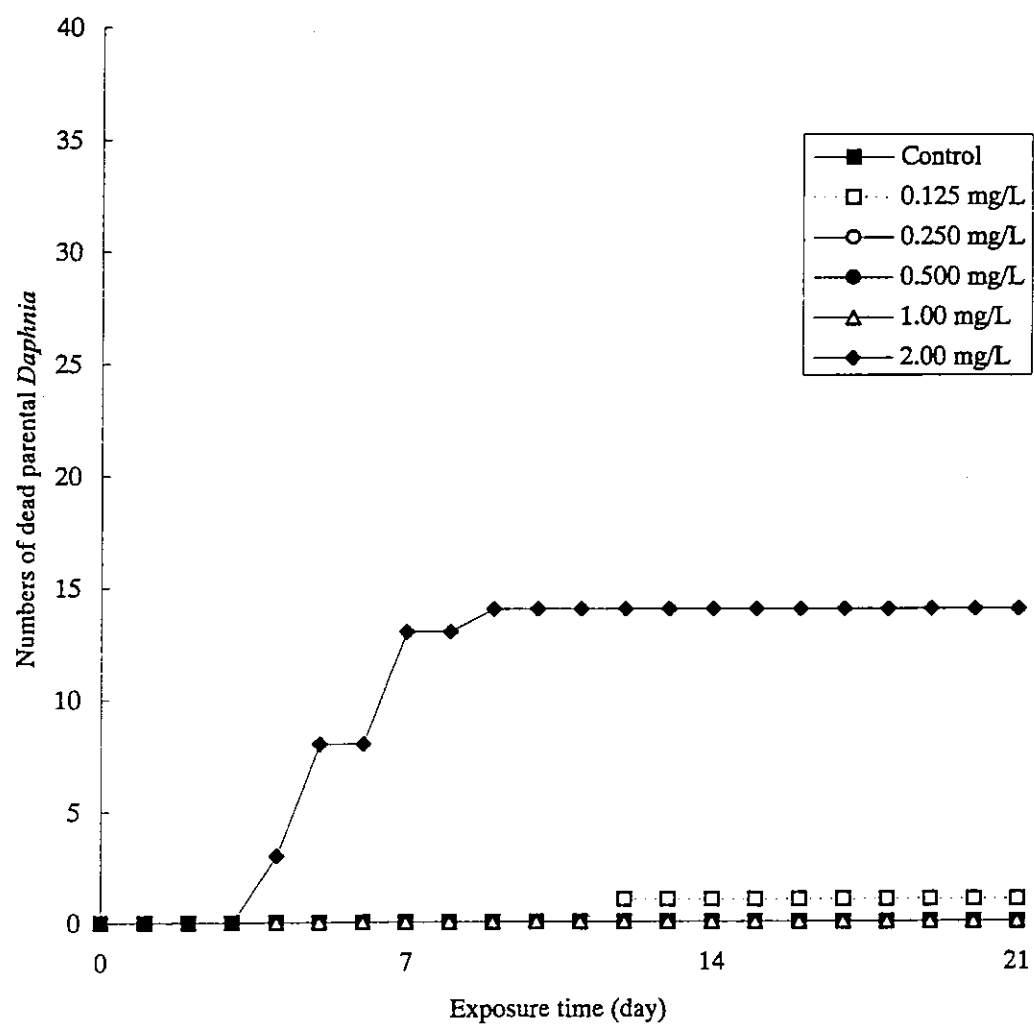


Figure 1. Cumulative numbers of dead parental *Daphnia*.

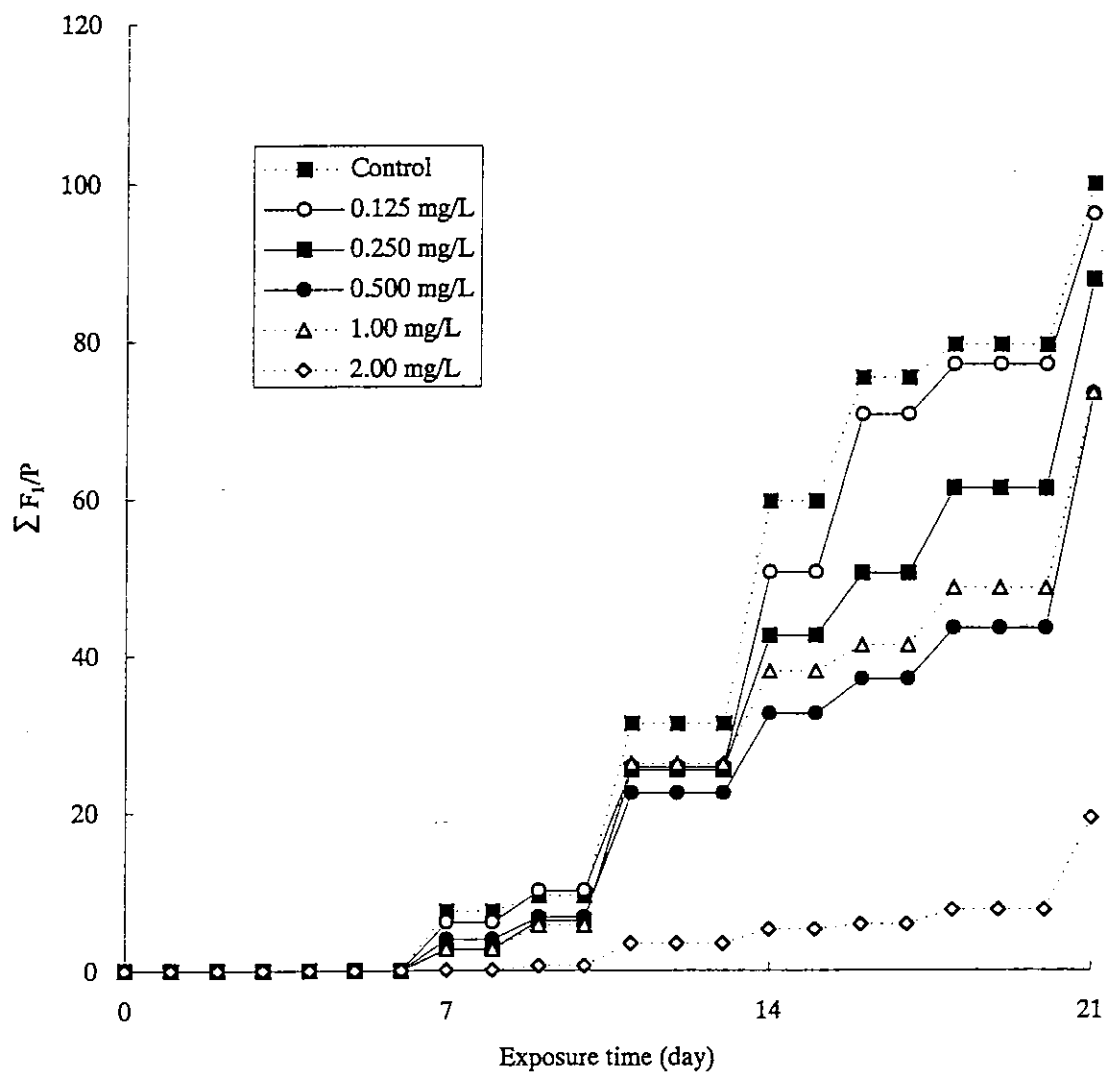


Figure 2. Mean cumulative numbers of juveniles produced per adult ($\Sigma F_1/P$).

付属資料－1

希釈水の水質

(全 2 頁)

Appendix 1. Water quality of dilution water

Parameter	Concentration	Lower limit
	1997.Feb.4	of detection
pH	7.7	
COD (mg/L)	0.2	
Coliform group bacteria (MPN/100mL)	0	
Total phosphorus (mg/L)	0.007	
Total mercury (mg/L)	N.D.	0.0005
Copper (mg/L)	N.D.	0.005
Cadmium (mg/L)	N.D.	0.005
Zinc (mg/L)	N.D.	0.01
Lead (mg/L)	N.D.	0.005
Aluminium (mg/L)	N.D.	0.1
Nickel (mg/L)	N.D.	0.01
Total chromium (mg/L)	N.D.	0.02
Manganese (mg/L)	N.D.	0.01
Tin (mg/L)	N.D.	0.5
Iron (mg/L)	0.05	0.01
Cyanide (mg/L)	N.D.	0.1
Free chlorine (mg/L)	N.D.	0.01
Bromide ion (mg/L)	N.D.	0.1
Fluoride (mg/L)	N.D.	0.15
Sulfide ion (mg/L)	N.D.	0.1
Ammonia nitrogen (mg/L)	N.D.	0.01
Arsenic (mg/L)	N.D.	0.002
Selenium (mg/L)	N.D.	0.002
Evaporation residue (mg/L)	120	
Electric conductivity (μs/cm)	171	
Total hardness (as CaCO ₃) (mg/L)	55.6	
Alkalinity (mg/L)	37.5	
Sodium (mg/L)	14.9	
Potassium (mg/L)	3.76	
Calcium (mg/L)	14.8	
Magnesium (mg/L)	4.52	

Appendix 1. (continued)

Parameter		Concentration	Lower limit
		1997.Feb.4	of detection
1,2-Dichloropropane	(mg/L)	N.D.	0.006
Diazinon	(mg/L)	N.D.	0.0005
Isoxathion	(mg/L)	N.D.	0.0008
Fenitrothion (MEP)	(mg/L)	N.D.	0.0003
Isoprothiolane	(mg/L)	N.D.	0.004
Oxine cupper	(mg/L)	N.D.	0.004
Chlorothalonil (TPN)	(mg/L)	N.D.	0.004
Propyzamide	(mg/L)	N.D.	0.0008
EPN	(mg/L)	N.D.	0.0006
Dichlorvos (DDVP)	(mg/L)	N.D.	0.001
Fenobucarb (BPMC)	(mg/L)	N.D.	0.002
Iprobenfos (IBP)	(mg/L)	N.D.	0.0008
Chlormitrofen (CNP)	(mg/L)	N.D.	0.0005
Thiram	(mg/L)	N.D.	0.0006
Simazine (CAT)	(mg/L)	N.D.	0.0003
Thiobencarb	(mg/L)	N.D.	0.002
PCB	(mg/L)	N.D.	0.0005

N.D. : not detected

付属資料－2

試験液の分析方法及び分析チャート

(全10頁)

試 験 名 : ミジンコ繁殖阻害試験

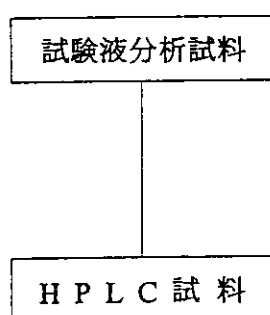
被験物質物質名 : *o*-アニシジン

1) 試験液の分析方法

(1) 試験液の前処理操作

混合した溶液はそのまま若しくは希釈水で希釈して、以下のフロースキームに従い高速液体クロマトグラフィー(HPLC)によって分析した。

フロースキーム



HPLC試料中の被験物質濃度は、クロマトグラム上の被験物質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。

(2) 被験物質溶液の調製

被験物質 100 mg を正確にはかりとり、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 10.0 mg/L の被験物質溶液を調製した。

(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して行った。10.0 mg/L の被験物質溶液を希釈水で希釈して 0.0500 mg/L の標準溶液とした。

2) HPLCの分析条件

機 器	高速液体クロマトグラフ
ポ ン プ	島津製作所製 LC-10AD
検 出 器	島津製作所製 SPD-10A
オートインジェクター	島津製作所製 SIL-10A
カ ラ ム	L-column ODS (化学品検査協会製) 15 cm×4.6 mmφ ステンレス製
カ ラ ム 温 度	40℃
溶 解 液	アセトリル/5 mmol/Lりん酸緩衝液 (pH6.9) 30/70 (V/V)
流 量	1.0 mL/min
測 定 流 量	280 nm
注 入 量	400 μL
感 度	
検 出 器	1 AU/1 V
記 録 計	ATTEN 2 ⁵

3) 検量線の作成

(3)の標準溶液の調製と同様にして0.0250、0.0500及び0.100 mg/Lの標準溶液を調製した。これらを分析機器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濃度により、検量線を作成した。

Content of figure

- Figure 1. Calibration curve of *o*-anisidine by HPLC analysis.
- Figure 2-1. Example of chromatogram.
(standard solution of 0.0500 mg/L, 0-day)
- Figure 2-2. Example of chromatogram.
(fresh test solution of 0.500 mg/L as nominal concentration,
0-day)
- Figure 2-3. Example of chromatogram.
(fresh test solution of control, 0-day)
- Figure 2-4. Example of chromatogram.
(standard solution of 0.0500 mg/L, 2-day)
- Figure 2-5. Example of chromatogram.
(expired test solution of 0.500 mg/L as nominal concentration,
2-day)
- Figure 2-6. Example of chromatogram.
(expired test solution of control, 2-day)

Input data		
Run	Concentration (mg/L)	Peak area (μ V·sec)
1	0.0250	11358
2	0.0500	21939
3	0.100	43948

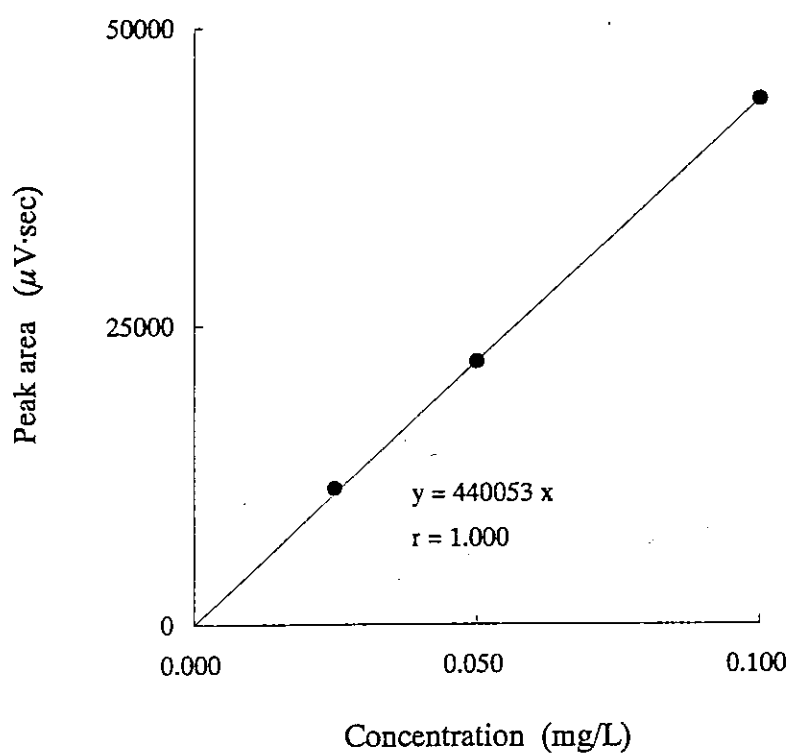


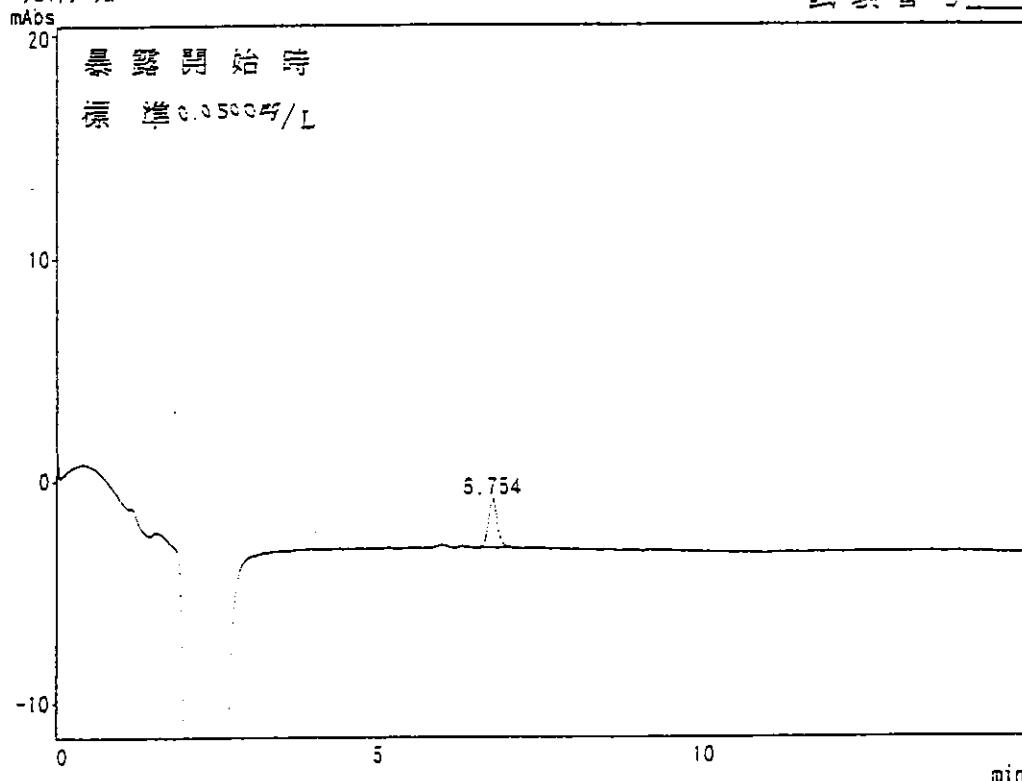
Figure 1. Calibration curve of *o*-anisidine by HPLC analysis.

CLASS-LC10 システム番号=2 Ch=1 レポート番号=252 テーグ=1743HOS.012 97/02/24 17:36:02
 サンプル : アニリン/std.
 ID : 0.05ppm
 サンプル量 : 100
 タイプ : 標準試料
 検出器 : SPD-10A シグナル
 サンプル名 : XXXXXXXXXX
 メソッド名 : ANI-1.M02

1997. 2.25

*** カロリタグラフ ***

試験番号 21743



*** ピークレポート ***

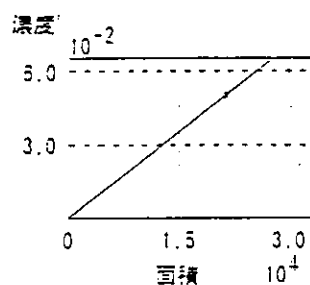
PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MR	IDNO	CONC	NAME
1	6.754	21092	2225	V R	1		o-7ニシン
		21092	2225				

*** キャリブレーション結果 ***

** ID テーブル **

IDNO	成分名	時間	濃度	F1	F2
1	o-7ニシン	6.76	0.05	2.370556e-006	

** 交差線 **



IDNO: 1
NAME: o-7ニシン
TIME: 6.76

濃度 面積
(1) 0.05 21092

F1 F2
(1) 2.370556e-006 0

r2 = 1

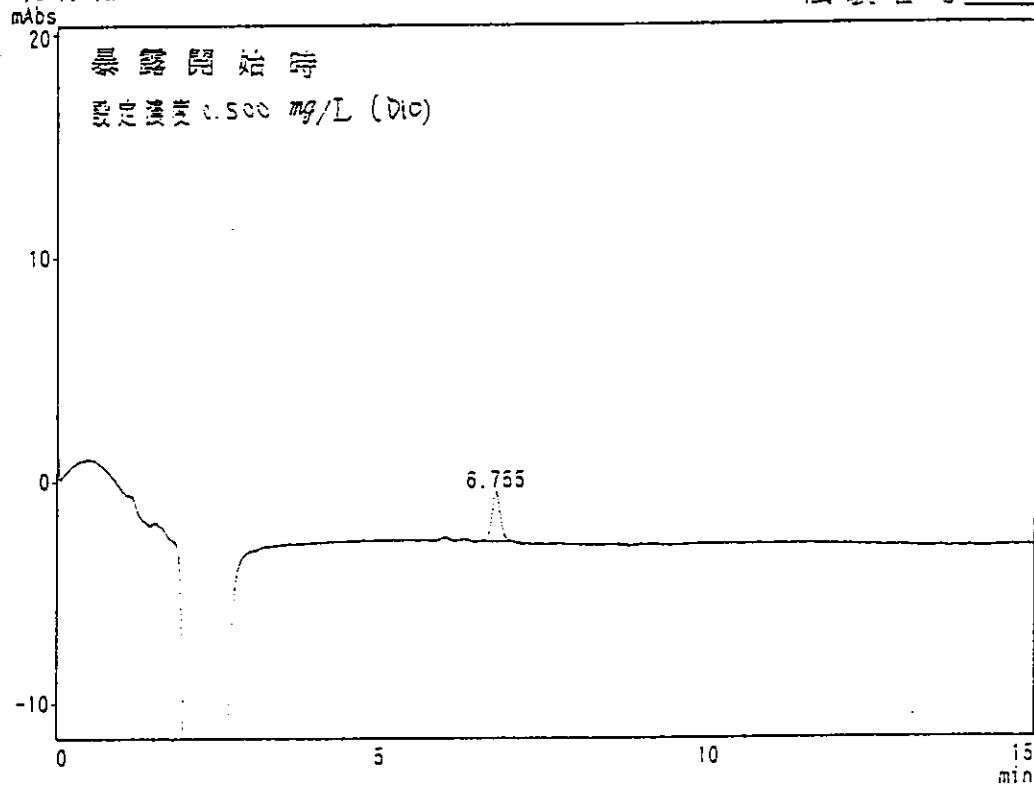
Figure 2-1. Example of chromatogram.
 (standard solution of 0.0500 mg/L, 0-day)

CLASS-LOG: システム番号=2 Ch=1 レポート番号=265 テータ=1748HOC.D11 97/02/24 18:34:58
 サンプル : ANI/D3/0d
 ID : 0.500/10
 サンプル量 : 10
 タイプ : 未知試料
 検出器 : SPD-10A シングル
 モデラ名 : XXXXXXXXXX
 メソッド名 : ANI-1.M02

1997.2.25

*** クロマトグラム ***

試験番号 91743



*** ピークレポート ***

PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	6.755	20767	2255	R	1	0.4923	o-7ニジシン
		20767	2255			0.4923	

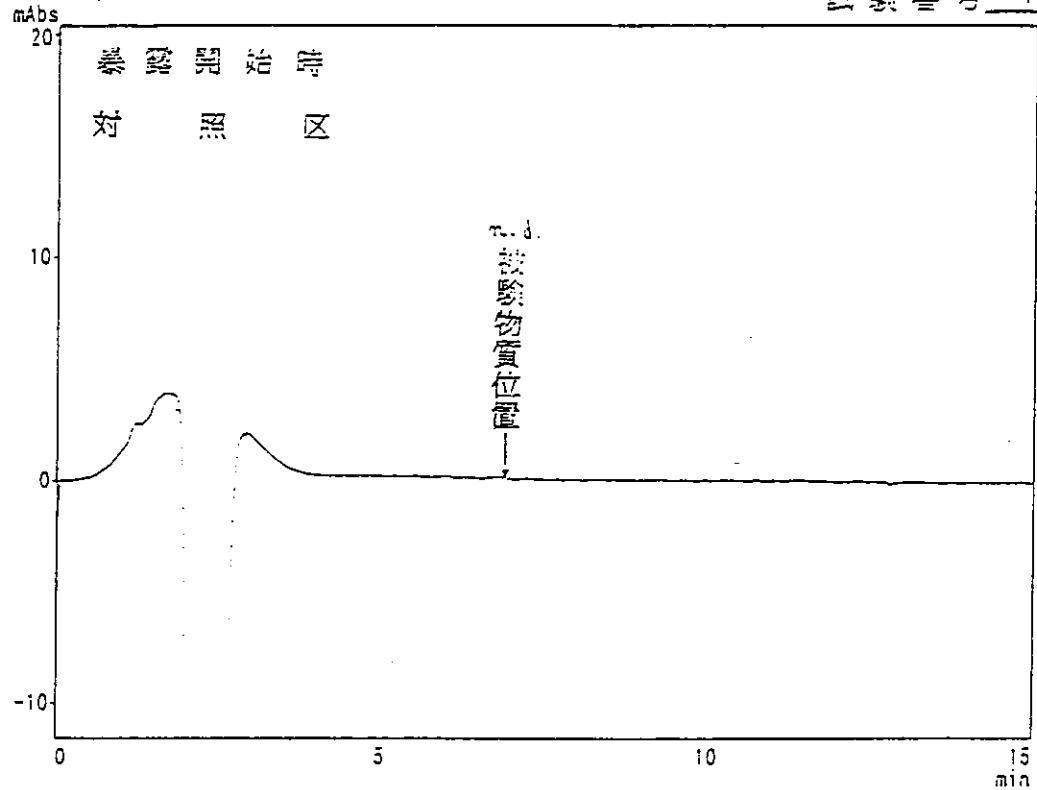
Figure 2-2. Example of chromatogram.
 (fresh test solution of 0.500 mg/L as nominal concentration, 0-day)

CLASS=LC10 システム番号=2 Ch=1 レポート番号=269 テータ=1748H0Z.D11 97/02/24 15:37:08
 サンプル : ANI/06/0d
 ID : 対照区
 サンプル量 : 100
 タイプ : 未知試料
 検出器 : SPD-10A シングル
 プローブ名 : XXXXXXXXXX
 メソッド名 : ANI-T.M02

1997.2.25

*** クロマトグラム ***

試験番号 91743



*** ピークレポート ***
 !! ピークがありません !!

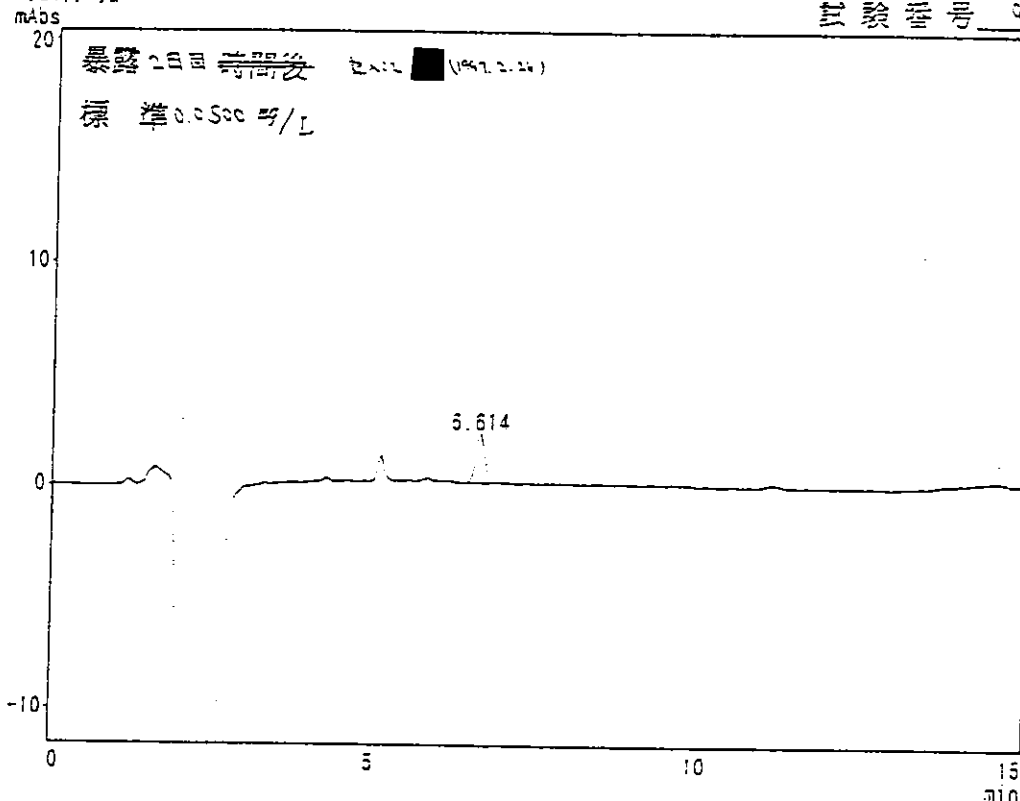
Figure 2-3. Example of chromatogram.
 (fresh test solution of control, 0-day)

CLASS-1C10 システム番号=2 Ch=1 レポート番号=323 テータ=1748H2S.D12 97/02/26 12:55:46
 サンプリング : 7ニシツン/std.
 ID : 0.050pm
 サンプリング量 : 100
 タイプ : 標準試料
 検出器 : SPD-10A シングル
 分析剤名 : XXXXXXXXXX
 メソッド名 : ANI-1.M02

1997.2.26

*** クロマトグラム ***

試験番号 91743



*** ピークデータ ***

PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MX	IDNO	CONC	NAME
1	5.614	21443	2242	S	R	1	o-7ニシツン

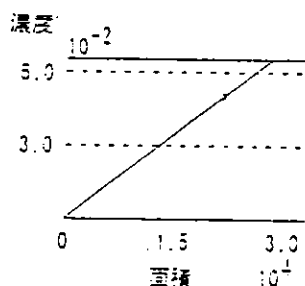
21443 2242

*** キャリブレーション結果 ***

** ID テータ **

IDNO	成分名	時間	濃度	F1	F2
1	o-7ニシツン	5.69	0.05	2.331774e-006	

** 検量線 **



IDNO: 1
 NAME: o-7ニシツン
 TIME: 5.69

濃度	面積
(1) 0.05	21443

F1	F2
(1) 2.33177e-006	0

r2 = 1

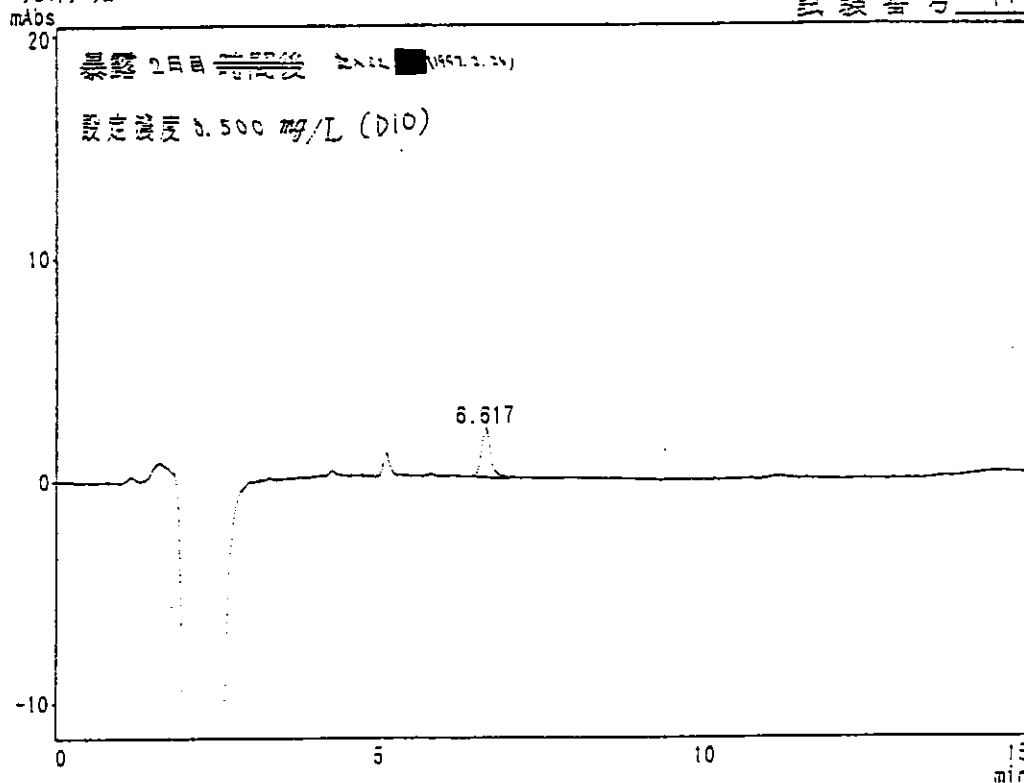
Figure 2-4. Example of chromatogram.
 (standard solution of 0.500 mg/L, 2-day)

CLASS-LC10 システム番号=2 Ch=1 レポート番号=327 テーラー=1748H2C.D11 97/02/26 13:54:42
 サンプル : ANI/03/2d
 ID : 0.500/10
 サンプル量 : 10
 タイプ : 未知試料
 検出器 : SPD-10A シンク
 サンプル名 : XXXXXXXXXX
 フォント名 : ANI-T.M02

1997.2.26

*** クロマトグラム ***

試験番号 91743



*** ヒートマップ ***

PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	6.617	22939	2282	SV R	1	0.5349	o-7ニシン
		22939	2282			0.5349	

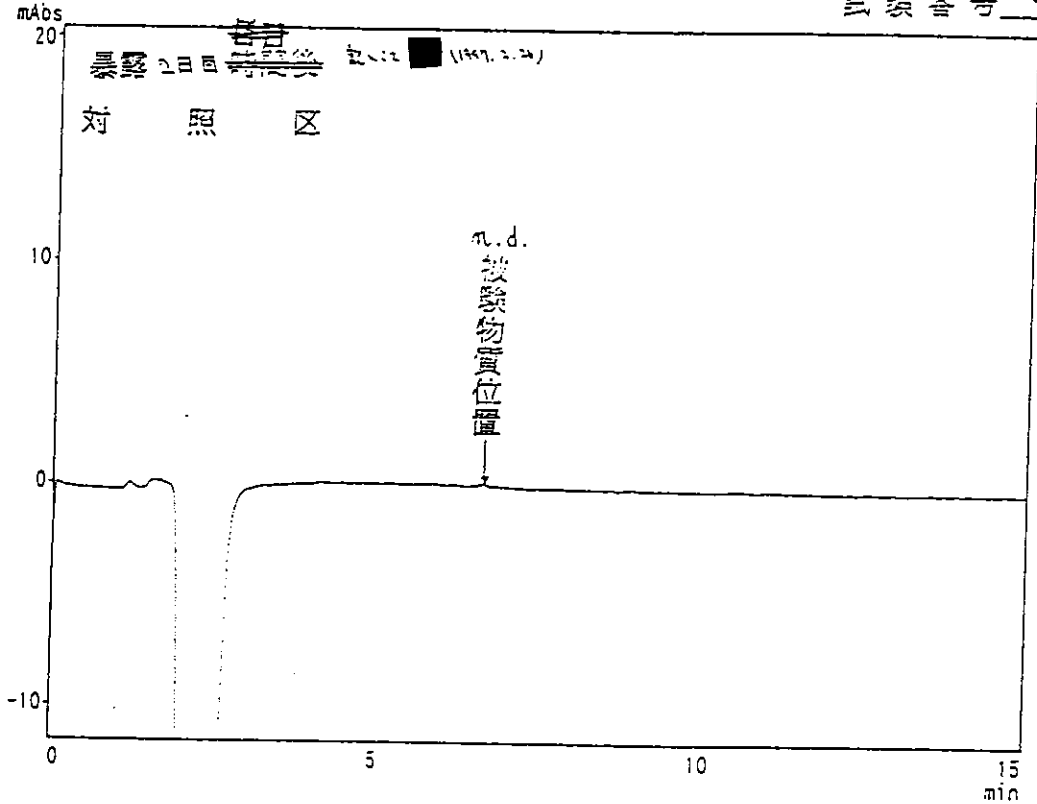
Figure 2-5. Example of chromatogram.
 (expired test solution of 0.500 mg/L as nominal concentration, 2-day)

CLASS-LC10 システム番号=2 Ch=1 レポート番号=315 テータ=1748H2Z.D11 97/02/26 12:16:30
 サンプル : ANI/D6/2d
 ID : 対照区
 サンプル量 : 100
 タイプ : 未知試料
 検出器 : SPD-10A シンク
 モデラ名 : XXXXXXXXXX
 メソッド名 : ANI-1.M02

1997.2.26

*** クロマトグラム ***

試験番号 91748



*** ピークレポート ***
 !! ピークがありません !!

Figure 2-6. Example of chromatogram.
 (expired test solution of control, 2-day)

付属資料－3

ミジンコの観察結果

(全 6 頁)

Appendix 3-1. Result of reproduction test

		(Nominal concentration : Control)																					
Rep. No.	Counts	Time																					Total
		2/25	2/26	2/27	2/28	3/1	3/2	3/3	3/4	3/5	3/6	3/7	3/8	3/9	3/10	3/11	3/12	3/13	3/14	3/15	3/16	3/17	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	
1	P generation	Live	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	-
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-
	F ₁ generation	Live						92		12		210			314		208		11			132	979
		Dead						0		3		20			29		33		0			0	85
		Total						92		15		230			343		241		11			132	1064
	Cumulative reproductivity							9.2		1.2		21.0			31.4		20.8		1.1			13.2	98
2	P generation	Live	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	-
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-
	F ₁ generation	Live						81		4		230			293		110		1			185	904
		Dead						0		1		25			54		139		0			13	232
		Total						81		5		255			347		249		1			198	1136
	Cumulative reproductivity							8.1		0.4		23.0			29.3		11.0		0.1			18.5	90
3	P generation	Live	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	-
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-
	F ₁ generation	Live						85		7		202			253		195		17			249	1008
		Dead						1		0		11			48		31		0			1	92
		Total						86		7		213			301		226		17			250	1100
	Cumulative reproductivity							8.5		0.7		20.2			25.3		19.5		1.7			24.9	101
4	P generation	Live	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	-
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-
	F ₁ generation	Live						43		55		231			277		115		138			258	1117
		Dead						0		3		6			103		45		2			2	161
		Total						43		58		237			380		160		140			260	1278
	Cumulative reproductivity							4.3		5.5		23.1			27.7		11.5		13.8			25.8	112
Cumulative reproductivity								4.3		9.8		32.9			60.6		72.1		85.9			111.7	

Appendix 3-2. Result of reproduction test

(Nominal concentration : 0.125 mg/L)

Rep. No	Counts		Time																					Total
			2/25	2/26	2/27	2/28	3/1	3/2	3/3	3/4	3/5	3/6	3/7	3/8	3/9	3/10	3/11	3/12	3/13	3/14	3/15	3/16	3/17	
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	
1	P generation	Live	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	-
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-
	F ₁ generation	Live							52		52		163			326		219		86			126	1024
		Dead							1		11		7			17		1		0			58	95
	Total								53		63		170			343		220		86			184	1119
	Cumulative reproductivity								5.2		5.2		16.3			32.6		21.9		8.6			12.6	102
									5.2		10.4		26.7			59.3		81.2		89.8			102.4	
	P generation	Live	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	-
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-
	F ₁ generation	Live							68		23		143			272		219		54			144	923
		Dead							0		4		36			35		11		0			7	93
	Total								68		27		179			307		230		54			151	1016
	Cumulative reproductivity								6.8		2.3		14.3			27.2		21.9		5.4			14.4	92
									6.8		9.1		23.4			50.6		72.5		77.9			92.3	
3	P generation	Live	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	-
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	-
	F ₁ generation	Live							55		50		157			179		185		56			224	906
		Dead							3		7		25			121		32		0			26	214
	Total								58		57		182			300		217		56			250	1120
	Cumulative reproductivity								5.5		5.0		15.7			18.8		20.6		6.2			24.9	97
									5.5		10.5		26.2			45.0		65.6		71.8			96.7	
	P generation	Live	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	-
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-
	F ₁ generation	Live							69		35		163			210		159		52			249	937
		Dead							2		6		8			130		66		0			16	228
	Total								71		41		171			340		225		52			265	1165
	Cumulative reproductivity								6.9		3.5		16.3			21.0		15.9		5.2			24.9	94
									6.9		10.4		26.7			47.7		63.6		68.8			93.7	

Appendix 3-3. Result of reproduction test

(Nominal concentration : 0.250 mg/L)

Rep. No	Counts		Time																					Total
			2/25	2/26	2/27	2/28	3/1	3/2	3/3	3/4	3/5	3/6	3/7	3/8	3/9	3/10	3/11	3/12	3/13	3/14	3/15	3/16	3/17	
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	
1	P generation	Live	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	-
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-
	F ₁ generation	Live							33		46		208			196		113		129			235	960
		Dead							0		13		14			118		43		3			0	191
		Total							33		59		222			314		156		132			235	1151
	Cumulative reproductivity								3.3		4.6		20.8			19.6		11.3		12.9			23.5	96
2	P generation	Live	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	-
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-
	F ₁ generation	Live							22		32		158			289		169		132			262	1064
		Dead							3		17		18			52		3		0			0	93
		Total							25		49		176			341		172		132			262	1157
	Cumulative reproductivity								2.2		3.2		15.8			28.9		16.9		13.2			26.2	106
3	P generation	Live	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	-
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-
	F ₁ generation	Live							39		23		212			111		31		140			246	802
		Dead							3		9		7			175		202		20			0	416
		Total							42		32		219			286		233		160			246	1218
	Cumulative reproductivity								3.9		2.3		21.2			11.1		3.1		14.0			24.6	80
4	P generation	Live	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	-
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-
	F ₁ generation	Live							16		42		184			92		6		31			320	691
		Dead							0		9		16			252		107		15			0	399
		Total							16		51		200			344		113		46			320	1090
	Cumulative reproductivity								1.6		4.2		18.4			9.2		0.6		3.1			32.0	69
4	Cumulative reproductivity								1.6		5.8		24.2			33.4		34.0		37.1			69.1	

Appendix 3-4. Result of reproduction test

(Nominal concentration : 0.500 mg/L)

Rep. No	Counts		Time																					Total
			2/25	2/26	2/27	2/28	3/1	3/2	3/3	3/4	3/5	3/6	3/7	3/8	3/9	3/10	3/11	3/12	3/13	3/14	3/15	3/16	3/17	
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	
1	P generation	Live	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	-
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-
	F ₁ generation	Live							21		35		199			181		124		56			305	921
		Dead							3		13		18			105		117		3			0	259
	Total								24		48		217			286		241		59			305	1180
	Cumulative reproductivity								2.1		3.5		19.9			18.1		12.4		5.6			30.5	92
									2.1		5.6		25.5			43.6		56.0		61.6			92.1	
2	P generation	Live	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	-
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-
	F ₁ generation	Live							61		3		81			78		26		27			320	596
		Dead							6		4		20			248		254		2			0	534
	Total								67		7		101			326		280		29			320	1130
	Cumulative reproductivity								6.1		0.3		8.1			7.8		2.6		2.7			32.0	60
									6.1		6.4		14.5			22.3		24.9		27.6			59.6	
3	P generation	Live	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	-
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-
	F ₁ generation	Live							45		23		160			69		11		62			283	653
		Dead							5		4		25			131		216		0			10	391
	Total								50		27		185			200		227		62			293	1044
	Cumulative reproductivity								4.5		2.3		16.0			6.9		1.1		6.2			28.3	65
									4.5		6.8		22.8			29.7		30.8		37.0			65.3	
4	P generation	Live	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	-
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-
	F ₁ generation	Live							31		51		188			76		17		115			289	767
		Dead							1		5		30			236		134		27			0	433
	Total								32		56		218			312		151		142			289	1200
	Cumulative reproductivity								3.1		5.1		18.8			7.6		1.7		11.5			28.9	77
									3.1		8.2		27.0			34.6		36.3		47.8			76.7	

Appendix 3-5. Result of reproduction test

(Nominal concentration : 1.00 mg/L)

Rep. No	Counts		Time																					Total
			2/25	2/26	2/27	2/28	3/1	3/2	3/3	3/4	3/5	3/6	3/7	3/8	3/9	3/10	3/11	3/12	3/13	3/14	3/15	3/16	3/17	
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	
1	P generation	Live	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	-
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-
	F ₁ generation	Live							6		53		228			114		12		99			218	730
		Dead							1		17		22			200		112		10			1	363
		Total							7		70		250			314		124		109			219	1093
	Cumulative reproductivity								0.6		5.3		22.8			11.4		1.2		9.9			21.8	73
									0.6		5.9		28.7			40.1		41.3		51.2			73.0	
2	P generation	Live	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	-
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-
	F ₁ generation	Live							48		16		159			61		9		12			284	589
		Dead							7		0		17			177		210		26			11	448
		Total							55		16		176			238		219		38			295	1037
	Cumulative reproductivity								4.8		1.6		15.9			6.1		0.9		1.2			28.4	59
									4.8		6.4		22.3			28.4		29.3		30.5			58.9	
3	P generation	Live	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	-
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-
	F ₁ generation	Live							25		21		189			78		27		82			239	661
		Dead							7		14		21			182		111		23			0	358
		Total							32		35		210			260		138		105			239	1019
	Cumulative reproductivity								2.5		2.1		18.9			7.8		2.7		8.2			23.9	66
									2.5		4.6		23.5			31.3		34.0		42.2			66.1	
4	P generation	Live	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	-
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-
	F ₁ generation	Live							30		30		243			220		85		100			255	963
		Dead							3		4		7			84		54		0			0	152
		Total							33		34		250			304		139		100			255	1115
	Cumulative reproductivity								3.0		3.0		24.3			22.0		8.5		10.0			25.5	96
									3.0		6.0		30.3			52.3		60.8		70.8			96.3	

Appendix 3-6. Result of reproduction test

(Nominal concentration : 2.00 mg/L)

Rep. No	Counts		Time																					Total	
			2/25	2/26	2/27	2/28	3/1	3/2	3/3	3/4	3/5	3/6	3/7	3/8	3/9	3/10	3/11	3/12	3/13	3/14	3/15	3/16	3/17		
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21		
1	P generation	Live	10	10	10	9	8	8	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	-	
		Dead	0	0	0	1	2	2	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	-	
	F ₁ generation	Live							0			1			16		2		7		4			49	79
		Dead							1			3			5		15		4		12			6	46
	Total								1			4			21		17		11		16			55	125
	Cumulative reproductivity								0.0			0.2			3.2		0.4		1.4		0.8			9.8	16
2	P generation	Live	10	10	10	10	9	9	8	8	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	-	
		Dead	0	0	0	0	1	1	2	2	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	-	
	F ₁ generation	Live							0			6			16		2		0		16			92	132
		Dead							0			13			13		15		0		7			3	51
	Total								0			19			29		17		0		23			95	183
	Cumulative reproductivity								0.0			0.8			2.3		0.3		0.0		2.3			13.1	19
3	P generation	Live	10	10	10	9	7	7	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	-	
		Dead	0	0	0	1	3	3	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	-	
	F ₁ generation	Live							1			2			25		24		7		5			74	138
		Dead							10			16			12		14		9		0			0	61
	Total								11			18			37		38		16		5			74	199
	Cumulative reproductivity								0.2			0.3			4.2		4.0		1.2		0.8			12.3	23
4	P generation	Live	10	10	10	9	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	-	
		Dead	0	0	0	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	-	
	F ₁ generation	Live							1			7			13		19		0		28			92	160
		Dead							11			41			24		4		11		7			5	103
	Total								12			48			37		23		11		35			97	263
	Cumulative reproductivity								0.1			0.9			1.6		2.4		0.0		3.5			11.5	20