

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  
[Redacted]

環境庁殿

## 試 験 報 告 書

4,4'-イソプロピリデンビス(2,6-ジブロモフェノール)のオオミジンコ (*Daphnia magna*)  
に対する繁殖阻害試験

(試験番号：9 B 4 7 8 G)

2000年 3月31日作成

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： 環境庁

表題： 4, 4' -イソプロピリデンビス (2, 6-ジブロモフェノール) のオオミジンコ  
(*Daphnia magna*) に対する繁殖阻害試験

試験番号： 9 B 4 7 8 G

本試験は環境庁の G L P 規則に従って実施したものである。

2 0 0 0 年 3 月 3 1 日

運営管理者





## 信 頼 性 保 証 証 明

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： 環境庁

表題： 4,4'-イソプロピリデンビス(2,6-ジブROMフェノール)のオオミジンコ  
(*Daphnia magna*) に対する繁殖阻害試験

試験番号： 9 B 4 7 8 G





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通り確認した。

### 記

	実施日	運営管理者および 試験責任者への報告日
試験実施状況査察	2000年 3月 7日	2000年 3月 7日
	2000年 3月 28日	2000年 3月 28日
試験報告書監査	2000年 3月 31日	2000年 3月 31日

2000年 3月 31日

信頼性保証担当者：

## 試験実施概要

1. 表題： 4,4'-イソプロピリデンビス(2,6-ジブロモフェノール)のオオミジンコ (*Daphnia magna*) に対する繁殖阻害試験
2. 試験目的： 被験物質のオオミジンコ (*Daphnia magna*) に対する繁殖阻害試験を21日間行い、最小作用濃度 (LOEC) と最大無作用濃度 (NOEC) を求め、可能な限り50%繁殖阻害濃度 (EC50) も求める。
3. 適用ガイドライン： 本試験は、OECD 化学品テストガイドライン No. 211「オオミジンコ繁殖試験」(1998年) に準拠した。
4. 適用GLP： 本試験は環境庁のGLP規則に準拠した。
5. 試験委託者  
名称： 環境庁  
住所： 〒100-8975 東京都千代田区霞が関一丁目2-2  
委託担当者： 企画調整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：  
名称： 株式会社三菱化学安全科学研究所  
所在地： 〒105-0014 東京都港区芝二丁目1-30
7. 試験施設：  
名称： 株式会社三菱化学安全科学研究所 横浜研究所  
所在地： 〒227-0033 神奈川県横浜市青葉区鴨志田町1000番地

8. 試験関係者：

試験責任者	[REDACTED]	[REDACTED]	(2000年 3月31日)
試験担当者	[REDACTED]	[REDACTED]	(2000年 3月31日)
	[REDACTED]	[REDACTED]	(2000年 3月31日)
	[REDACTED]	[REDACTED]	(2000年 3月31日)
	[REDACTED]	[REDACTED]	(2000年 3月31日)
	[REDACTED]	[REDACTED]	(2000年 3月31日)
分析担当者	[REDACTED]	[REDACTED]	(2000年 3月31日)

9. 試験期間： 試験開始日 1999年11月16日  
試験終了日 2000年 3月31日  
暴露期間 2000年 3月 7日～2000年 3月28日

10. 保管：

試験に関する下記の記録及び試資料は，試験報告書作成後10年間，当研究所試資料保管施設に保管する。その後の保管については別途協議の上定める。

- 1) 試験計画書，同変更の記録
- 2) 試験報告書
- 3) 生データ
- 4) 信頼性保証業務担当者の監査・査察記録
- 5) 被験物質
- 6) その他必要なもの

# 目 次

	頁
要 旨	7
1 被験物質	9
1.1 名称, 構造式および物理化学的性状	9
1.2 供試試料	9
1.3 被験物質の確認および保管条件下での安定性	10
2 供試生物	10
3 試験方法	11
3.1 試験条件	11
3.2 希釈水	11
3.3 試験容器および恒温槽等	11
3.4 試験濃度の設定	11
3.5 試験液の調製	12
3.6 試験液の分析	12
3.7 試験操作	12
4 結果の算出	14
4.1 親ミジンコの半数致死濃度 (LC50) の算出	14
4.2 50%繁殖阻害濃度 (EC50) の算出	14
4.3 最大無作用濃度 (NOEC) および最小作用濃度 (LOEC)	14
5 結果および考察	15
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	15
5.2 試験液中の被験物質濃度	15
5.3 ミジンコの観察結果	15
5.4 親ミジンコの半数致死濃度 (LC50)	16
5.5 50%繁殖阻害濃度 (EC50)	16
5.6 累積産仔数に及ばず最大無作用濃度 (NOEC) および最小作用濃度 (LOEC)	16
5.7 試験液の水温, 溶存酸素濃度, pH および硬度	16
Table 1~11	17~25
Figure 1, 2	19, 21
付属資料-1 希釈水の水質	26~27
付属資料-2 試験液の分析方法	28~34
付属資料-3 ミジンコの観察結果	35~42

## 要 旨

### 試験委託者

環境庁

### 表 題

4, 4' -イソプロピリデンビス (2, 6-ジブロモフェノール) のオオミジンコ (*Daphnia magna*) に対する繁殖阻害試験

### 試験番号

9 B 4 7 8 G

### 試験方法

本試験は、OECD 化学品テストガイドラインNo. 211「オオミジンコ繁殖試験」(1998年) に準拠して実施した。

- 1) 被験物質： 4, 4' -イソプロピリデンビス (2, 6-ジブロモフェノール)
- 2) 暴露方式： 半止水式 (48時間毎に試験液の全量を交換)  
水面をテフロンシートで被覆
- 3) 供試生物： オオミジンコ (*Daphnia magna*)
- 4) 暴露期間： 21日間
- 5) 試験濃度 (設定値) :  
対照区, 助剤対照区, 0. 08, 0. 25, 0. 80, 2. 50, 8. 00 mg/L  
公比 : 3. 2  
助剤濃度一定 : 100 mg/L (HCO-60 および ジメチルホルムアミド 使用)
- 6) 試験液量： 80 mL/容器
- 7) 連数： 10容器/濃度区
- 8) 供試生物数： 10頭/濃度区 (1頭/容器)
- 9) 試験温度： 20±1℃
- 10) 照明： 16時間明/8時間暗
- 11) 分析法： H P L C 法

## 結 果

### 1) 試験液中の被験物質濃度

被験物質の測定濃度がすべて設定値の±20%以内であったため、各影響濃度の算出には設定値を採用した。

### 2) 21日間暴露の各影響濃度結果を以下に示す。

親ミジンコの半数致死濃度 (LC50) : 1.74 mg/L

(95%信頼限界 : 1.11~2.87 mg/L)

50% 繁殖阻害濃度 (EC50) : 1.66 mg/L

(95%信頼限界 : 1.45~1.85 mg/L)

最大無作用濃度 (NOEC) : 0.80 mg/L

最小作用濃度 (LOEC) : 2.50 mg/L



## 1 被験物質

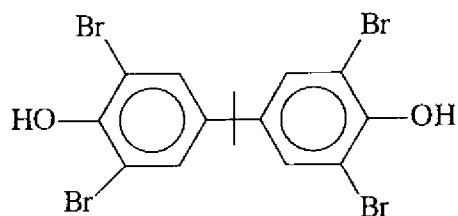
### 1.1 名称, 構造式および物理化学的性状

名 称 : 4,4'-イソプロピリデンビス(2,6-ジブロモフェノール) (略称IPDB)

別 名 : テトラブロモビスフェノールA

CAS No. : 79-94-7

構造式 :



分子式 :  $C_{15}H_{12}Br_4O_2$

分子量<sup>\*1</sup> : 543.87

融点<sup>\*1</sup> : 182.2℃

水溶解度<sup>\*1</sup> : 不溶

安定性<sup>\*1</sup> : 通常の取扱条件で安定, 酸化剤との接触に注意

\*1:供給者提供資料

### 1.2 供試試料

純度<sup>\*1</sup> : 99.7% (中和法)

ロット番号<sup>\*1</sup> : GG01

供給者 : XXXXXXXXXX

供給量<sup>\*1</sup> : 50 g

入手日 : 1999年9月3日

外観<sup>\*1</sup> : 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

被験物質は当研究所の冷蔵庫に保管した。

入手した被験物質の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。試験終了時にも赤外吸収スペクトルを測定し、試験開始前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： オオミジンコ
- 2) 学名： *Daphnia magna*
- 3) 入手先： 環境庁国立環境研究所
- 4) 入手日： 1995 年 7 月 18 日
- 5) 入手後の管理： 継代培養（最大飼育期間；4 週間，換水頻度；少なくとも週 3 回）
- 6) 感受性の確認： 基準物質（重クロム酸カリウム，試薬特級）による 48 時間の半数遊泳阻害濃度（ $EC_{50}$ ）＝ 0.57 mg/L（この値は当研究所における 1998 年 6 月以降の  $EC_{50}$  値 0.59～1.02 mg/L（ $n=3$ ）にほぼ一致する。）
- 7) 親の馴化： 馴化期間；2000 年 2 月 16 日～2000 年 3 月 7 日  
暴露開始前 2 週間の親の死亡率は 0% で休眠卵および雄の発生は認められなかった。（馴化条件は以下に示す。）
- 8) 供試令： 生後 24 時間令以内の幼体

### 馴化条件

- 1) 飼育水： 希釈水（3.2 参照）
- 2) 飼育密度： 1 頭／80mL 飼育水（25 頭／2L）
- 3) 水温：  $20 \pm 1^{\circ}\text{C}$
- 4) 照明： 室内光，16 時間明（800 lux 以下）／8 時間暗
- 5) 餌： *Chlorella vulgaris*
- 6) 給餌量： ミジンコ 1 頭当たり 0.2 mgC（有機炭素含量）／日

### 3 試験方法

#### 3.1 試験条件

- 1) 暴露方式： 半止水式（48 時間毎に試験液の全量を換水）  
水面をテフロンシートで被覆
- 2) 暴露期間： 21 日間
- 3) 試験液量： 80 mL／容器
- 4) 連数： 10 容器／濃度区
- 5) 供試生物数： 10 頭／濃度区（1 頭／容器）
- 6) 試験温度：  $20 \pm 1^{\circ}\text{C}$
- 7) 照明： 室内光，16 時間明（800 lux 以下）／8 時間暗
- 8) 餌： *Chlorella vulgaris*
- 9) 給餌量： ミジンコ 1 頭当たり 0.15 mgC（有機炭素含量）／日

#### 3.2 希釈水

OECD 化学品テストガイドライン No. 211 「オオミジンコ繁殖試験」に記載してある調製水，Elendt M4 を用いた。成分表を付属資料－1 に示した。

#### 3.3 試験容器および恒温槽等

- 1) 試験容器： 100 mL 容ガラスビーカー，テフロンシート製蓋
- 2) 恒温槽： 塩ビ製水槽（恒温装置，タイテック製 ケルニット CL-80F）
- 3) 水温計： 横河電機製 2455 02 型
- 4) 溶存酸素計： 電気化学計器製 DOL-10 型
- 5) pH 計： 東亜電波工業製 HM-40V 型
- 6) 硬度： 共立理化学研究所製 ドロップテスト 全硬度 WAD-TH

#### 3.4 試験濃度の設定

オオミジンコに対する48時間急性遊泳阻害試験の結果（設定濃度に基づく48hr-EiC50値：7.87 mg/L）から，本試験は公比 3.2 で5段階を設定した。各濃度区は以下の通りである。

対照区，助剤対照区，0.08，0.25，0.80，2.50，8.00 mg/L

### 3.5 試験液の調製

被験物質を 100 mg 秤取し、ジメチルホルムアミド 750 mg に溶解後、HCO-60 500 mg を加え混合した。これを純水で希釈し 100 mL に定容し、被験物質濃度 1000 mg/L の原液を調製した。同時に被験物質を含まない助剤原液 12500 mg/L（ジメチルホルムアミド 7500 mg/L, HCO-60 5000 mg/L）を調製した。

1.0 L 容のメスフラスコに希釈水を入れ、上記被験物質原液を各濃度区に応じて添加した後、助剤濃度が一定（100 mg/L）になるように助剤原液を加え、各試験液を調製した。1 濃度区につき 10 個の試験容器に 80 mL ずつ分注して、試験に用いた。

助剤対照区には、被験物質を含まないもの（助剤濃度：100 mg/L）を調製した。

対照区には、希釈水のみを用いた。

### 3.6 試験液の分析

全濃度区（但し、各 1 試験容器）について、暴露期間中に 3 回、換水前後の各試験液 0.75 mL を測定用バイアルに採取し、アセトニトリルを等量添加後 HPLC により分析した。アセトニトリルで調製した標準溶液（0.20 および 2.00 mg/L）は、等量の水で希釈したものを HPLC 測定試料とした。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

試験液の水温、溶存酸素濃度、pH および硬度を測定後、ガラスピペットを用いて供試ミジンコを投入し、その時点を暴露開始時とした。その際、ピペット内の飼育水が、全量で試験液量に対して 1 % 以内となるようにした。その後、換水毎にミジンコを新しい試験液に移しかえ、21 日後まで飼育した。暴露期間中は毎日一定量の給餌を行った（3.1 参照）。

・ミジンコの観察：

（親ミジンコ）生死，遊泳状態および外観の異常の有無を毎日観察して，記録した。計数後の死亡個体は取り除いた。

（産出幼体） 最初の産仔から毎日幼体の生存数を計数し，計数後の幼体は取り除いた。死亡幼体，墮胎卵および休眠卵の発生等については，その有無を毎日観察し記録した。最初の幼体産出日を，初産日として記録した。

・水質測定： 水温，溶存酸素濃度，pHおよび硬度を，全濃度区（但し，各1試験容器）について，暴露期間中に4回，換水前後に測定した。

#### 4 結果の算出

##### 4.1 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 (10頭) を用いて, Binomial法, Moving average法およびProbit法により, 21日間の半数致死濃度 (LC50) を算出し, いずれか適切な結果を採用した。また, 可能な限りその95%信頼限界を算出した。

##### 4.2 50%繁殖阻害濃度 (EC50) の算出

各濃度区での生存親1頭当たりの平均累積産仔数 (生存幼体) から阻害率を求め, Logit法 (Yukms 統計ライブラリー「生物検定編 Ver. 5.0」 (Yukms Corp., 東京) により, 50%繁殖阻害濃度 (EC50) を算出し, 可能な限りその95%信頼限界を算出した。

##### 4.3 最大無作用濃度 (NOEC) および最小作用濃度 (LOEC)

各濃度区の容器毎に21日間生存した親1頭当たりの累積産仔数を算出し, 各濃度区と助剤対照区との有意差の有無を以下の統計手法により求めた。有意差が認められない最高濃度を最大無作用濃度 (NOEC), 有意差が認められる最低濃度を最小作用濃度 (LOEC) とした。

統計手法: Bartlettの等分散検定, 一元配置分散分析 (1-way ANOVA), DunnettまたはWilliamsの多重比較検定 ( $\alpha=0.05$ , 両側)

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

該当する事象はなかった。

### 5.2 試験液中の被験物質濃度

暴露期間中の試験液中の被験物質濃度を測定した結果を、Table 1 に示した。

被験物質の測定濃度がすべて設定値の±20%以内であったため、各影響濃度の算出には設定値を採用した。

### 5.3 ミジンコの観察結果

#### 親ミジンコの死亡数および死亡率

暴露期間中の各濃度区における親ミジンコの累積死亡数および死亡率の結果を Table 2-1, Table 2-2 および Figure 1 に示した。

対照区および助剤対照区における親ミジンコの死亡率は暴露終了時で 0%および 20%であり、試験成立条件である20%以下の基準を満たした。最高濃度区における死亡率は暴露終了時で 100%であった。

#### 初産日

各濃度区における親ミジンコの初産日を Table 3 に示した。

対照区および助剤対照区における親ミジンコの初産日は暴露開始8日以内であり、正常な範囲内と判断された。最高濃度区においては、初産前に全親ミジンコが死亡した。

#### 平均累積産仔数

暴露期間中の各濃度区における親ミジンコ1頭当たりの平均累積産仔数の結果を Table 4 および Figure 2 に示した。

対照区および助剤対照区における21日間での親ミジンコ1頭当たりの平均累積産仔数はそれぞれ 99頭および121頭であり、試験成立条件である60頭の基準を満たした。

最高濃度区においては初産前に全親ミジンコが死亡した。

#### 休眠卵の発生等

全暴露期間を通して、対照区、助剤対照区および全濃度区において休眠卵の発生は認められなかった。

#### 5.4 親ミジンコの半数致死濃度 (LC50)

21日間暴露の親ミジンコの半数致死濃度 (LC50) を Table 5 および以下に示した。

21日間 LC50 : 1.74 mg/L (95%信頼区間 : 1.11~2.87 mg/L)

#### 5.5 50%繁殖阻害濃度 (EC50)

21日間暴露の50%繁殖阻害濃度 (EC50) を Table 6 および以下に示した。

21日間 EC50 : 1.66 mg/L (95%信頼区間 : 1.45~1.85 mg/L)

#### 5.6 累積産仔数に及ぼす最大無作用濃度 (NOEC) および最小作用濃度 (LOEC)

親ミジンコ1頭あたりの累積産仔数に及ぼす21日間暴露の最大無作用濃度 (NOEC) および最小作用濃度 (LOEC) を Table 7 に示し、以下の結論を得た。

21日間 NOEC : 0.80 mg/L

21日間 LOEC : 2.50 mg/L

#### 5.7 試験液の水温、溶存酸素濃度、pH および硬度

暴露期間中における試験液の水温を Table 8、溶存酸素濃度を Table 9、pHを Table 10、硬度を Table 11 に示した。

水温はすべての濃度区で $20 \pm 1^\circ\text{C}$ で、溶存酸素濃度はすべての試験液槽で飽和溶存酸素濃度 ( $20.0^\circ\text{C}$ の飽和溶存酸素濃度 : 8.8mg/L) の60%以上であり、いずれも試験基準を満たした。pHはミジンコの飼育環境として適正範囲 (6.0~9.0で1.5の変動内) 内にあった。また、硬度も適正範囲内 (250mg/L前後) と判断した。

以 上



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

Nominal Concentration (mg/L)	Date→	Measured Concentration (mg/L)						TWM* <sup>1</sup> (mg/L)	% of Nominal
		0 New	2 Old	8 New	10 Old	20 New	21 Old		
Control		<0.02	<0.02	<0.02	<0.02	<0.02	<0.02	-	-
Solvent control		<0.02	<0.02	<0.02	<0.02	<0.02	<0.02	-	-
0.08		0.07	0.07	0.08	0.08	0.07	0.07	0.08	95
0.25		0.23	0.23	0.25	0.24	0.25	0.23	0.24	96
0.80		0.92	0.91	0.94	0.72	0.75	0.76	0.86	107
2.50		2.85	2.93	2.89	2.30	2.40	2.43	2.69	108
8.00		9.39	*	*	*	*	*	*	*

Table 1-2 Measured Concentrations as a Percentage of Nominal

Nominal Concentration (mg/L)	Date→	Measured Concentration as a Percentage of Nominal					
		0 New	2 Old	8 New	10 Old	20 New	21 Old
0.08		88	88	100	100	88	88
0.25		92	92	100	96	100	92
0.80		115	114	118	90	94	95
2.50		114	117	116	92	96	97
8.00		117	*	*	*	*	*

New: Freshly prepared test solution

Old: Old test solution before renewal

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

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

	Concentration (mg/L)			% of Nominal		
	Min.		Max.	Min.		Max.
New	0.07	~	9.39	88	~	118
Old	0.07	~	2.93	88	~	117

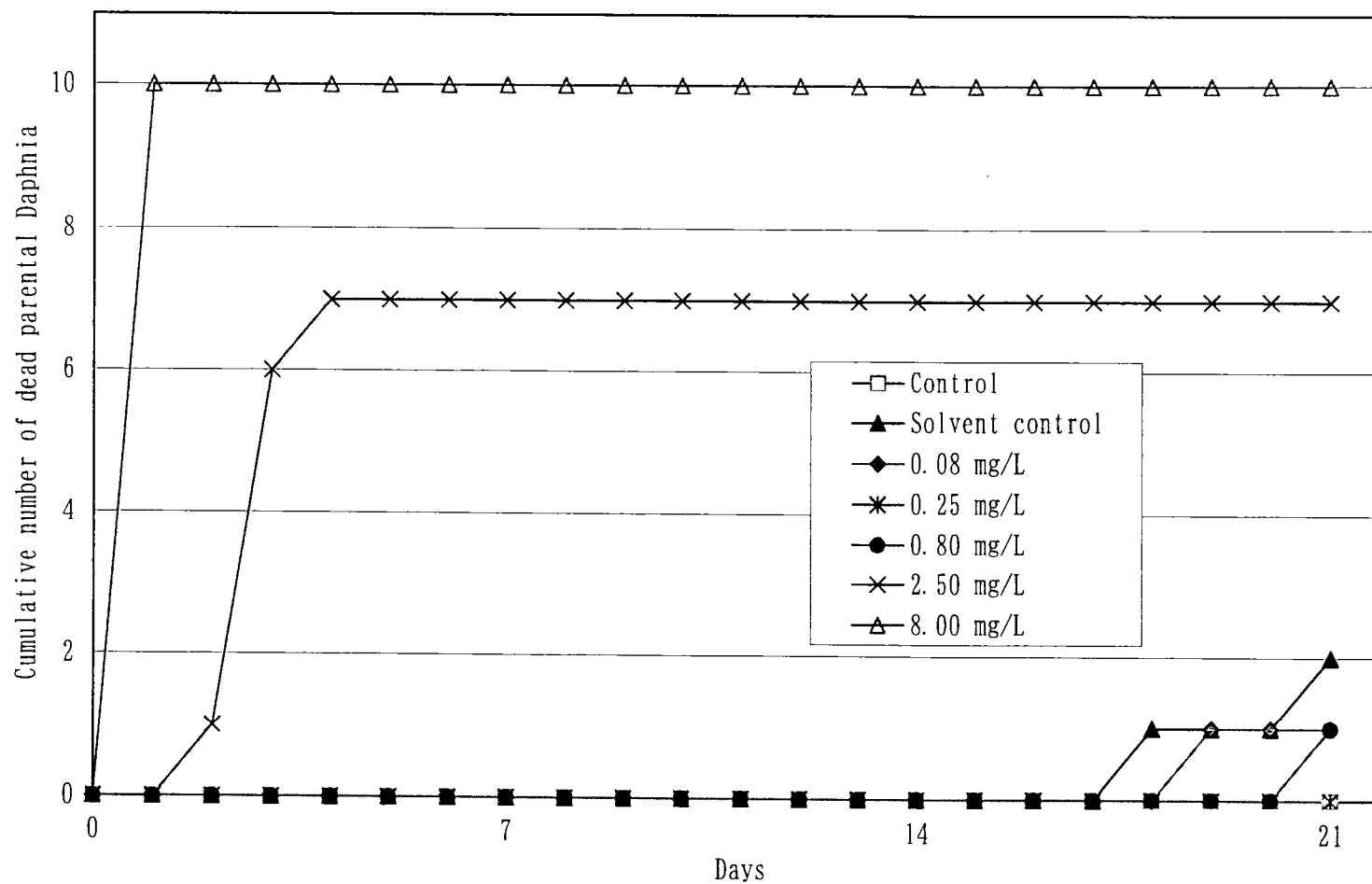
Table 2-1 Cumulative Number of Dead Parental *Daphnia*

Nominal conc.	Days																					
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
Control	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Solvent control	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	2
0.08 mg/L	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1
0.25 mg/L	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0.80 mg/L	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
2.50 mg/L	0	0	1	6	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7
8.00 mg/L	0	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10

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

Nominal conc.	Days					
	1	2	4	7	14	21
Control	0	0	0	0	0	0
Solvent control	0	0	0	0	0	20
0.08 mg/L	0	0	0	0	0	10
0.25 mg/L	0	0	0	0	0	0
0.80 mg/L	0	0	0	0	0	10
2.50 mg/L	0	10	70	70	70	70
8.00 mg/L	100	100	100	100	100	100

Figure 1 Cumulative Numbers of Dead Parental *Daphnia*



Values in legend are given in the nominal concentration.

Table 3 Time (Days) to First Brood Production

Vessel No.	Nominal Concentration, mg/L						
	Control	Solvent control	0.08	0.25	0.80	2.50	8.00
1	8	7	8	7	8	—	—
2	8	8	8	8	8	16	—
3	8	7	7	8	8	—	—
4	8	8	8	8	8	17	—
5	8	8	8	8	8	—	—
6	8	8	8	8	8	—	—
7	8	7	8	8	8	—	—
8	8	8	8	8	8	14	—
9	7	7	8	8	8	—	—
10	7	7	8	8	8	—	—
Min	7	7	7	7	8	14	—
Max	8	8	8	8	8	17	—

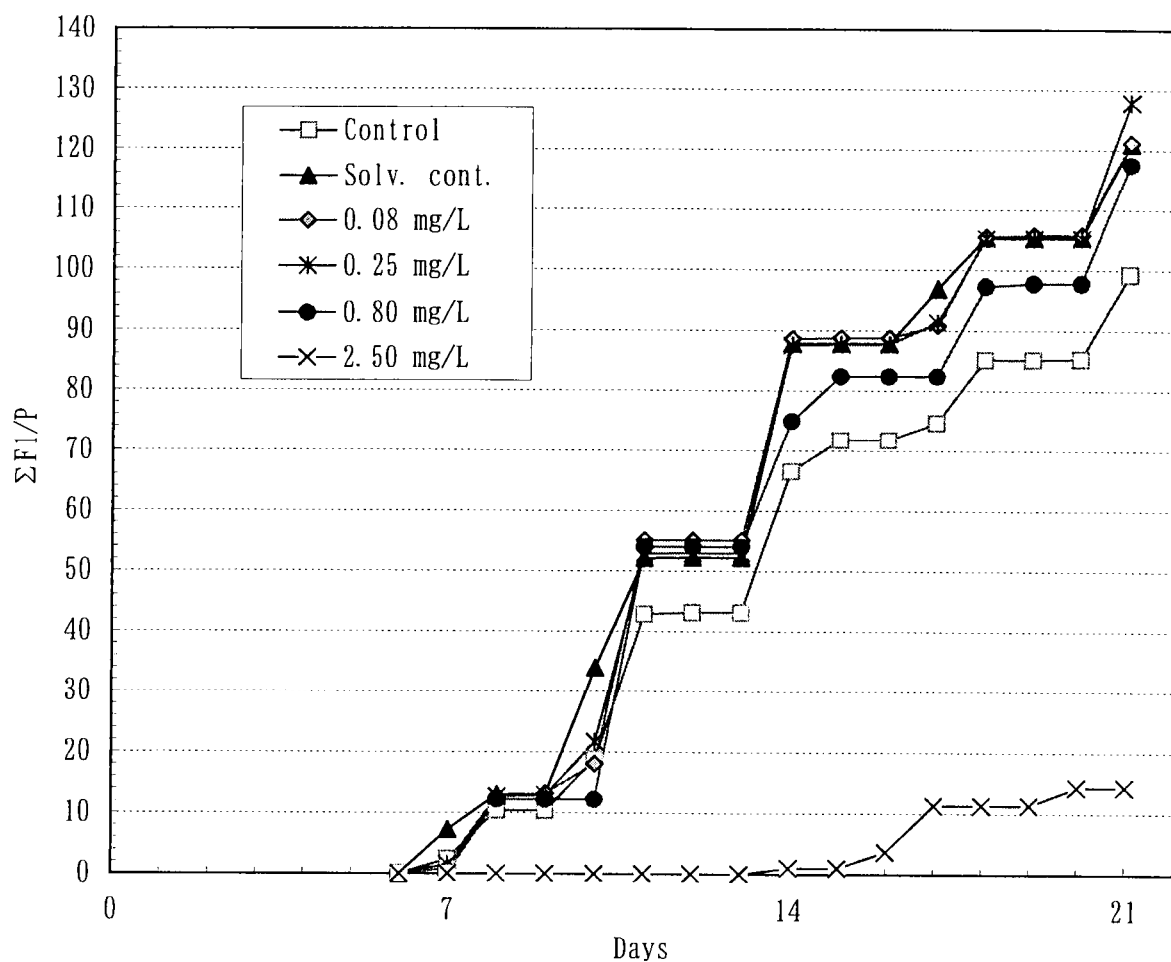
—: The parental *Daphnia* was dead before first brood production.

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

Nominal Conc.	Days															
	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
Control	0.0	2.4	10.4	10.4	18.8	42.9	43.2	43.2	66.6	71.8	71.8	74.7	85.2	85.2	85.3	99.3
Solv. cont.	0.0	7.3	13.0	13.1	34.0	52.1	52.3	52.3	87.9	87.9	87.9	97.0	105.4	105.4	105.4	121.0
0.08 mg/L	0.0	0.8	12.7	13.2	18.1	55.1	55.1	55.1	88.7	88.8	88.8	90.9	105.6	105.8	105.8	121.2
0.25 mg/L	0.0	1.5	12.7	12.9	21.7	52.9	53.0	53.0	87.6	87.7	87.7	91.4	105.2	105.2	105.2	127.9
0.80 mg/L	0.0	0.0	12.2	12.2	12.2	54.0	54.0	54.0	75.0	82.4	82.4	82.4	97.4	97.9	97.9	117.6
2.50 mg/L	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	1.0	3.7	11.3	11.3	11.3	14.3	14.3
8.00 mg/L	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

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

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



Values in legend are given in the nominal concentration.

Table 5      Calculated LC50 Values for Parental *Daphnia*

Exposure Period (day)	LC50 <sup>*1</sup> (mg/L)	95% Confidence limits (mg/L)		Statistical method
21	1.74	1.11	-- 2.87	Moving average

\*1: Based on the nominal concentration

Table 6      Calculated EC50 Values for Inhibition of Reproduction

Exposure Period (day)	EC50 <sup>*1</sup> (mg/L)	95% Confidence limits (mg/L)		Statistical method
21	1.66	1.45	-- 1.85	Logit

\*1: Based on the nominal concentration

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

Vessel No.	Nominal Concentration, mg/L						
	Control	Solv. cont.	0.08	0.25	0.80	2.50	8.00
1	104	145	125	138	127	D	D
2	88	88	140	122	113	17	D
3	89	122	116	129	D	D	D
4	86	D	D	136	114	11	D
5	78	131	108	137	130	D	D
6	94	132	97	119	95	D	D
7	123	116	124	125	110	D	D
8	99	107	127	118	119	15	D
9	115	127	129	126	121	D	D
10	117	D	125	129	129	D	D
Mean	99.3	121.0	121.2	127.9	117.6	14.3	0.0
S. D.	15.0	17.5	12.6	7.3	11.1	3.1	
Inhibition rate (%)			-0.2	-5.7	2.8	88.2	100.0
Significant difference			-	-	-	**	++

- D: Were not included for calculation because the parental *Daphnia* was dead during a 21-days testing period.  
 -: Indicates no significant difference.  
 \*: Indicates a significant difference ( $\alpha=0.05$ ) from the solvent control.  
 (There was no sign in this test.)  
 \*\*: Indicates a significant difference ( $\alpha=0.01$ ) from the solvent control.  
 ++: Statistical comparison test could not be performed for this concentration because adult alive after 21 days was none.  
 However, we concluded that this concentration level showed adverse effect on *Daphnia* reproduction.

No Observed Effect Concentration (NOEC): 0.80 mg/L  
 Lowest Observed Effect Concentration (LOEC): 2.50 mg/L

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

Nominal Concentration (mg/L)	Date→	Temperature (°C)								Min.	Max.
		0 new	2 old	6 new	8 old	14 new	16 old	18 new	20 old		
Control		20.2	20.0	20.1	20.0	19.9	20.0	20.1	19.9	19.9	20.2
Solvent control		20.2	20.0	20.1	20.0	19.9	20.0	20.1	19.9	19.9	20.2
0.08		20.2	19.9	20.2	20.1	19.9	19.9	20.1	19.8	19.8	20.2
0.25		20.1	19.9	20.2	20.1	19.8	19.9	19.9	19.9	19.8	20.2
0.80		20.1	19.9	20.2	20.1	19.8	20.0	20.1	19.9	19.8	20.2
2.50		20.1	19.9	20.2	20.1	19.8	19.9	20.0	19.9	19.8	20.2
8.00		20.1	-	-	-	-	-	-	-	20.1	20.1
Total										19.8	20.2

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

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

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

Nominal Concentration (mg/L)	Date→	D. O. (mg/L)								Min.	Max.
		0 new	2 old	6 new	8 old	14 new	16 old	18 new	20 old		
Control		8.6	8.4	8.6	7.9	8.9	8.0	8.9	8.3	7.9	8.9
Solvent control		8.6	8.0	8.5	7.3	8.6	7.9	8.9	8.0	7.3	8.9
0.08		8.6	8.0	8.6	7.6	8.7	7.7	8.9	8.1	7.6	8.9
0.25		8.5	8.1	8.6	7.6	8.7	7.5	8.9	8.1	7.5	8.9
0.80		8.7	8.0	8.6	7.8	8.4	7.8	8.9	8.0	7.8	8.9
2.50		8.7	8.0	8.4	8.1	8.8	7.9	8.9	8.3	7.9	8.9
8.00		8.5	-	-	-	-	-	-	-	8.5	8.5
Total										7.3	8.9

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

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



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

Nominal Concentration (mg/L)	Date→	pH								Min.	Max.
		0 new	2 old	6 new	8 old	14 new	16 old	18 new	20 old		
Control		8.1	7.8	8.1	7.3	8.4	7.3	8.3	7.4	7.3	8.4
Solvent control		8.1	7.7	8.2	7.2	8.4	7.4	8.3	7.3	7.2	8.4
0.08		8.1	7.7	8.1	7.2	8.4	7.4	8.3	7.2	7.2	8.4
0.25		8.2	7.7	8.1	7.1	8.4	7.3	8.3	7.3	7.1	8.4
0.80		8.1	7.7	8.1	7.2	8.4	7.4	8.3	7.3	7.2	8.4
2.50		8.1	7.8	8.1	7.5	8.4	7.5	8.3	7.3	7.3	8.4
8.00		7.9	-	-	-	-	-	-	-	7.9	7.9
Total										7.1	8.4

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

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

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

Nominal Concentration (mg/L)	Date→	Total hardness (as CaCO <sub>3</sub> , mg/L)								Min.	Max.
		0 new	2 old	6 new	8 old	14 new	16 old	18 new	20 old		
Control		230	235	235	230	235	230	245	230	230	245
Solvent control		230	235	240	235	235	230	220	235	220	240
0.08		225	235	235	235	225	230	225	230	225	235
0.25		225	235	245	225	225	225	245	235	225	245
0.80		225	230	240	235	235	230	250	230	225	250
2.50		225	230	240	230	235	230	250	235	225	250
8.00		220	-	-	-	-	-	-	-	220	220
Total										220	250

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

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

## 付属資料－ 1

希釈水の水質

Table A-1 Elendt M4 Medium Recommended by OECD Guideline No. 211

Used as Dilution Water

Macro nutrients	Concentration	Unit
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	293.8	mg /L
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	123.3	mg /L
KCl	5.80	mg /L
$\text{NaHCO}_3$	64.8	mg /L
$\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$	10.0	mg /L
$\text{NaNO}_3$	0.274	mg /L
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0.143	mg /L
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	0.184	mg /L

Trace elements	Concentration	Unit
$\text{H}_3\text{BO}_3$	2.8595	mg /L
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.3605	mg /L
LiCl	0.3060	mg /L
RbCl	0.0710	mg /L
$\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.152	mg /L
NaBr	0.0160	mg /L
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.0630	mg /L
$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.0168	mg /L
$\text{ZnCl}_2$	0.0130	mg /L
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.0100	mg /L
KI	3.25	$\mu\text{g/L}$
$\text{Na}_2\text{SeO}_3$	2.19	$\mu\text{g/L}$
$\text{NH}_4\text{VO}_3$	0.575	$\mu\text{g/L}$
$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	2.50	mg /L
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.9955	mg /L

Vitamines	Concentration	Unit
Thiamine hydrochloride	75.0	$\mu\text{g/L}$
Cyanocobalamine (B12)	1.00	$\mu\text{g/L}$
Biotine	0.750	$\mu\text{g/L}$

## 付属資料－ 2

試験液の分析方法

## 試験液の分析方法

### 1 試験液の分析方法

各試験液 0.75 mLを測定用バイアルに採取し、アセトニトリル 0.75 mLを加え混合し、HPLCにより分析した。アセトニトリルで調製した標準溶液（0.20 および 2.00 mg/L）は、等量の水で希釈したものをHPLC測定試料とした。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。

### 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：	Hewlett Packard製 HP-1100型 (No. 1)
ワークステーション：	HPキーステーション (Windows 95)
パソコン：	HP Vectra XM, ディスプレイ； Vectra VCA 1280
プリンター：	HP製 LASER JET 4 PLUS
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 $\mu$ m, 4.6 x150 mm (GL Sciences Inc.)
溶離液：	Acetonitrile 90 %, 0.01Mリン酸二水素ナトリウム 10 %
流速：	1.0 mL/min
測定波長：	206 nm
試料注入量：	20 $\mu$ L
カラムオープン温度：	40℃

### 3 検量線

被験物質の1000 mg/L アセトニトリル溶液を調製し、順次、アセトニトリルで希釈し 0, 0.10, 0.20, 0.50, 1.00, 2.00, 5.00, 10.0, 20.0 mg/Lの標準溶液を調製した。この標準溶液を等量の水で希釈したものを、HPLC測定試料とした。横軸に濃度を (mg/L) , 縦軸にピーク面積 (count表示) 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、1.000 であった。

### 4 検出限界

最小検出ピーク面積を 1 countに設定し、これに相当する試験液中の被験物質濃度 0.02 mg/Lを検出限界とした。

### 5 添加回収試験

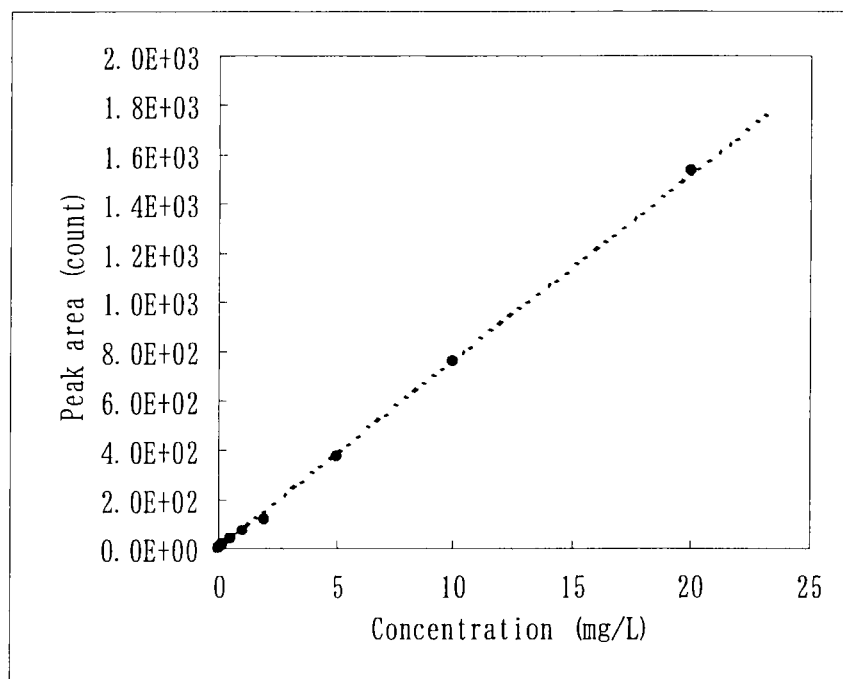
HPLC直接注入法のため添加回収試験は実施しなかった。

Figure A-2-1 Calibration Curve

No.	Concentration (mg/L)	Peak Area (count)
1	0	0
2	0.10	7.0
3	0.20	14.4
4	0.50	37.0
5	1.00	75.0
6	2.00	119.3
7	5.00	377.1
8	10.0	759.7
9	20.0	1537.3

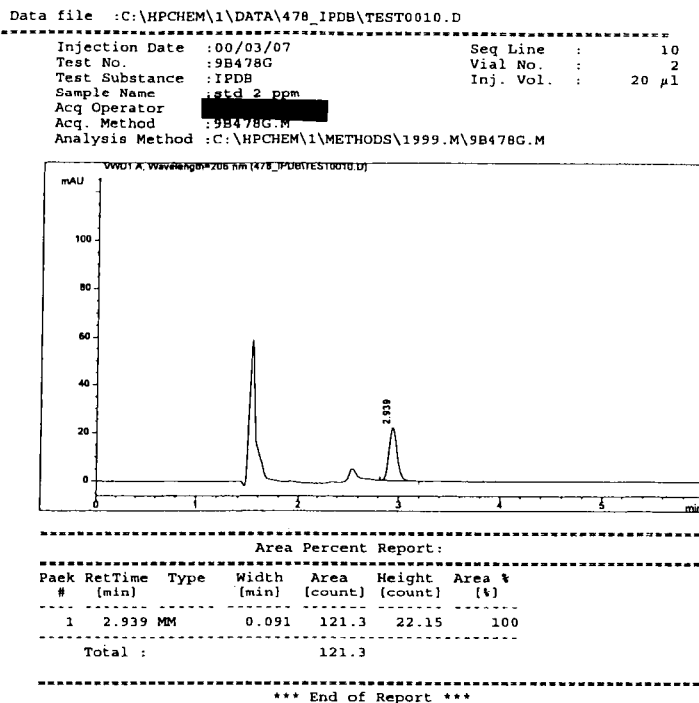
$$Y = 76.5X$$

$$r = 1.000$$



# Figure A-2-2 Representative chromatograms

(1) Standard 2.00 mg/L ; Day 0



(2) Solvent Control ; Day 0

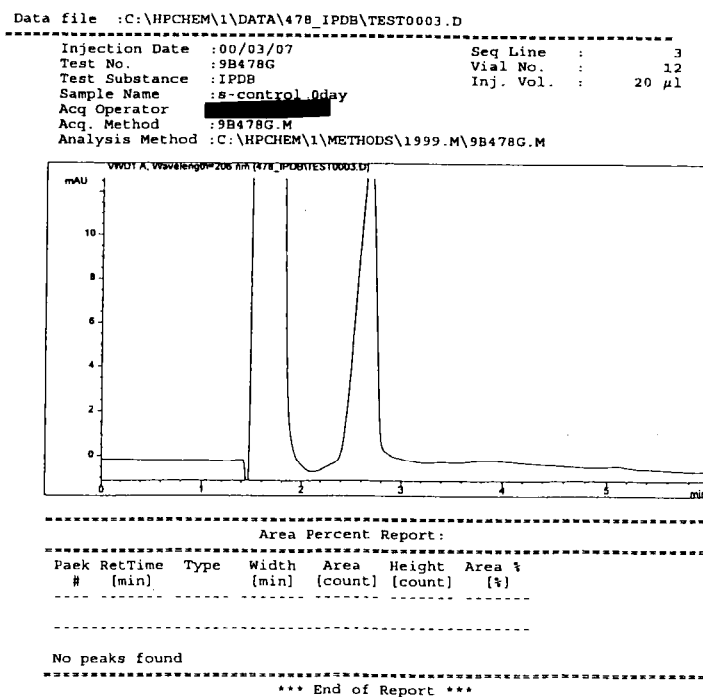
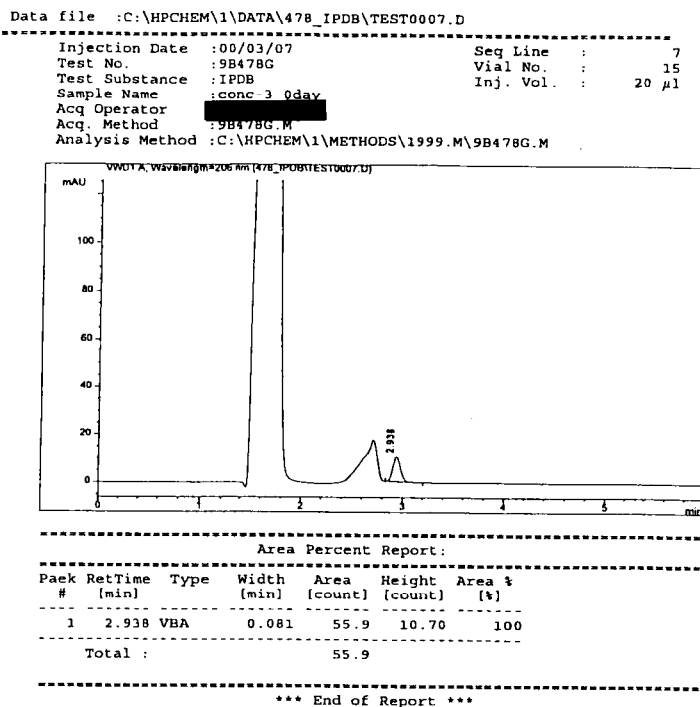




Figure A-2-2 Continued

(3) 0.80 mg/L nominal ; Day 0



(4) Standard 2.00 mg/L ; Day 2

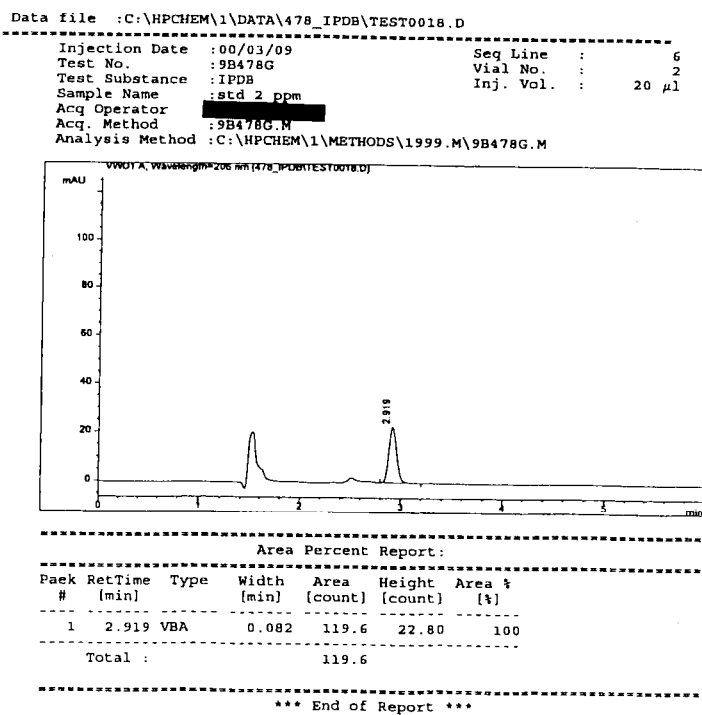
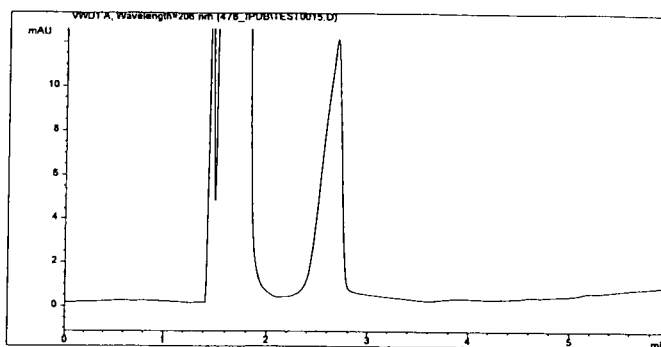


Figure A-2-2 Continued

(5) Solvent Control ; Day 2

Data file :C:\HPCHEM\1\DATA\478\_IPDB\TEST0015.D

Injection Date :00/03/09 Seq Line : 3  
 Test No. :9B478G Vial No. : 12  
 Test Substance :IPDB Inj. Vol. : 20 µl  
 Sample Name :s-control 2day  
 Acq Operator :  
 Acq. Method :9B478G.M  
 Analysis Method :C:\HPCHEM\1\METHODS\1999.M\9B478G.M



Area Percent Report:

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

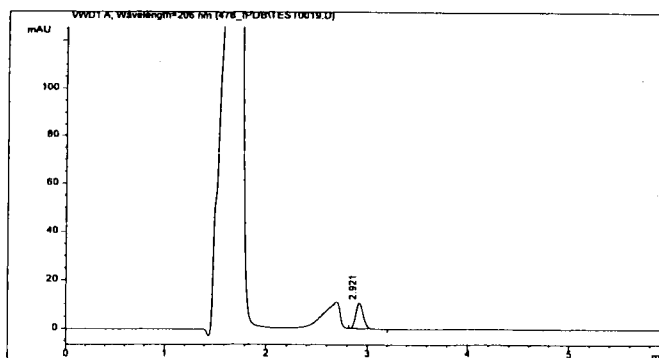
No peaks found

\*\*\* End of Report \*\*\*

(6) 0.80 mg/L nominal ; Day 2

Data file :C:\HPCHEM\1\DATA\478\_IPDB\TEST0019.D

Injection Date :00/03/09 Seq Line : 7  
 Test No. :9B478G Vial No. : 15  
 Test Substance :IPDB Inj. Vol. : 20 µl  
 Sample Name :conc-3 2day  
 Acq Operator :  
 Acq. Method :9B478G.M  
 Analysis Method :C:\HPCHEM\1\METHODS\1999.M\9B478G.M



Area Percent Report:

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [count]	Height [count]	Area %
1	2.921	VBA	0.079	54.2	10.72	100
Total :				54.2		

\*\*\* End of Report \*\*\*

### 付属資料－3

ミジンコの観察結果

## Appendix 3-1 Result of reprodution test

Test chemical: IPDB

(Untreated control)

Rep. No.	Counts		Time																					Total
			3/8	3/9	3/10	3/11	3/12	3/13	3/14	3/15	3/16	3/17	3/18	3/19	3/20	3/21	3/22	3/23	3/24	3/25	3/26	3/27	3/28	
			1 d	2 d	3 d	4 d	5 d	6 d	7 d	8 d	9 d	10 d	11 d	12 d	13 d	14 d	15 d	16 d	17 d	18 d	19 d	20 d	21 d	
1	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	12	0	0	41	0	0	24	0	0	0	11	0	0	16	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	12	12	12	53	53	53	77	77	77	77	88	88	88	104	104
2	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	12	0	0	36	0	0	0	27	0	0	13	0	0	0	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	12	12	12	48	48	48	48	75	75	75	88	88	88	88	88
3	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	5	0	0	30	0	0	22	0	0	0	13	0	0	19	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	5	5	5	35	35	35	57	57	57	57	70	70	70	89	89
4	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0	11	2	0	31	0	0	0	14	0	1	23	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	4	4	4	15	17	17	48	48	48	48	62	62	63	86	86
5	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	8	0	0	31	1	0	0	25	0	0	13	0	0	0	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	8	8	8	39	40	40	40	65	65	65	78	78	78	78	78
6	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	11	0	0	28	0	0	29	0	0	0	13	0	0	13	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	11	11	11	39	39	39	68	68	68	68	81	81	81	94	94
7	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	13	0	0	45	0	0	28	0	0	0	15	0	0	22	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	13	13	13	58	58	58	86	86	86	86	101	101	101	123	123
8	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	15	0	0	18	0	0	29	0	0	0	13	0	0	24	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	15	15	15	33	33	33	62	62	62	62	75	75	75	99	99
9	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	10	0	0	38	1	0	0	38	0	0	15	0	0	0	13	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	10	10	10	48	49	49	49	87	87	87	102	102	102	102	115	115
10	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	14	0	0	46	0	0	0	33	0	0	14	0	0	0	10	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	14	14	14	60	60	60	60	93	93	93	107	107	107	107	117	117

## Appendix 3-2 Result of repropduction test

Test chemical: IPDB

(Solvent control)

Rep. No.	Counts		Time																					Total
			3/8	3/9	3/10	3/11	3/12	3/13	3/14	3/15	3/16	3/17	3/18	3/19	3/20	3/21	3/22	3/23	3/24	3/25	3/26	3/27	3/28	
			1 d	2 d	3 d	4 d	5 d	6 d	7 d	8 d	9 d	10 d	11 d	12 d	13 d	14 d	15 d	16 d	17 d	18 d	19 d	20 d	21 d	
1	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	19	0	0	41	0	0	0	39	0	0	26	0	0	0	20	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	19	19	19	60	60	60	60	99	99	99	125	125	125	125	145	145
2	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	8	0	0	16	0	0	24	0	0	0	17	0	0	23	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	8	8	8	24	24	24	48	48	48	48	65	65	65	88	88
3	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	12	0	0	39	0	0	0	43	0	0	16	0	0	0	12	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	12	12	12	51	51	51	51	94	94	94	110	110	110	110	122	122
4	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	12	0	0	42	0	0	32	0	0	0	18	0	0	26	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	12	12	12	54	54	54	86	86	86	86	104	104	104	130	--
5	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	11	0	0	45	0	0	39	0	0	0	18	0	0	18	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	11	11	11	56	56	56	95	95	95	95	113	113	113	131	131
6	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	13	1	0	46	1	0	32	0	0	0	13	0	0	26	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	13	14	14	60	61	61	93	93	93	93	106	106	106	132	132
7	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	12	0	0	44	0	0	0	33	0	0	17	0	0	0	10	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	12	12	12	56	56	56	56	89	89	89	106	106	106	106	116	116
8	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	14	0	0	38	0	0	36	0	0	0	19	0	0	0	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	14	14	14	52	52	52	88	88	88	88	107	107	107	107	107
9	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	15	0	0	43	0	0	0	39	0	0	14	0	0	0	16	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	15	15	15	58	58	58	58	97	97	97	111	111	111	111	127	127
10	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0				
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	16	0	0	35	1	0	0	38	0	0	21	1				
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	16	16	16	51	52	52	52	90	90	90	111	112				--

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

## Appendix 3-3 Result of reproduction test

Test chemical: IPDB

(Concentration 1)

Rep. No.	Counts		Time																					Total
			3/8	3/9	3/10	3/11	3/12	3/13	3/14	3/15	3/16	3/17	3/18	3/19	3/20	3/21	3/22	3/23	3/24	3/25	3/26	3/27	3/28	
			1 d	2 d	3 d	4 d	5 d	6 d	7 d	8 d	9 d	10 d	11 d	12 d	13 d	14 d	15 d	16 d	17 d	18 d	19 d	20 d	21 d	
1	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	12	0	0	48	0	0	31	0	0	0	15	0	0	19	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	12	12	12	60	60	60	91	91	91	91	106	106	106	125	125
2	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	12	3	0	50	0	0	37	0	0	0	16	0	0	22	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	12	15	15	65	65	65	102	102	102	102	118	118	118	140	140
3	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	7	12	0	44	0	0	0	34	0	0	19	0	0	0	0	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	7	19	19	63	63	63	63	97	97	97	116	116	116	116	116	116
4	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0			
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	10	0	0	32	0	0	39	0	0	0	17	0			
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	10	10	10	42	42	42	81	81	81	81	98	98			--
5	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	11	0	0	24	0	0	35	0	0	0	16	1	0	21	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	11	11	11	35	35	35	70	70	70	70	86	87	87	108	108
6	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	9	2	0	40	0	0	31	0	0	0	15	0	0	0	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	9	11	11	51	51	51	82	82	82	82	97	97	97	97	97
7	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	12	0	0	44	0	0	33	0	0	0	16	0	0	19	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	12	12	12	56	56	56	89	89	89	89	105	105	105	124	124
8	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	10	0	0	42	0	0	31	1	0	0	19	0	0	24	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	10	10	10	52	52	52	83	84	84	84	103	103	103	127	127
9	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	13	0	0	41	0	0	41	0	0	0	20	0	0	14	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	13	13	13	54	54	54	95	95	95	95	115	115	115	129	129
10	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	16	0	0	44	0	0	29	0	0	0	15	1	0	20	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	16	16	16	60	60	60	89	89	89	89	104	105	105	125	125

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

## Appendix 3-4 Result of repropduction test

Test chemical: IPDB

(Concentration 2)

Rep. No.	Counts		Time																					Total
			3/8	3/9	3/10	3/11	3/12	3/13	3/14	3/15	3/16	3/17	3/18	3/19	3/20	3/21	3/22	3/23	3/24	3/25	3/26	3/27	3/28	
			1 d	2 d	3 d	4 d	5 d	6 d	7 d	8 d	9 d	10 d	11 d	12 d	13 d	14 d	15 d	16 d	17 d	18 d	19 d	20 d	21 d	
1	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	15	0	0	41	0	0	0	42	0	0	21	0	0	0	19	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	15	15	15	56	56	56	56	98	98	98	119	119	119	119	138	138
2	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	15	0	0	40	1	0	28	0	0	0	16	0	0	22	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	15	15	15	55	56	56	84	84	84	84	100	100	100	122	122
3	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	9	0	0	35	0	0	36	0	0	0	20	0	0	29	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	9	9	9	44	44	44	80	80	80	80	100	100	100	129	129
4	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	18	0	0	43	0	0	33	0	0	0	12	0	0	30	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	18	18	18	61	61	61	94	94	94	94	106	106	106	136	136
5	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	17	1	0	41	0	0	30	1	0	0	18	0	0	29	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	17	18	18	59	59	59	89	90	90	90	108	108	108	137	137
6	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	8	1	0	45	0	0	33	0	0	0	14	0	0	18	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	8	9	9	54	54	54	87	87	87	87	101	101	101	119	119
7	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	11	0	47	4	0	0	34	0	0	16	0	0	0	13	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	11	11	58	62	62	62	96	96	96	112	112	112	112	125	125
8	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	14	0	0	36	0	0	33	0	0	0	19	0	0	16	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	14	14	14	50	50	50	83	83	83	83	102	102	102	118	118
9	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	8	0	0	29	0	0	42	0	0	0	21	0	0	26	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	8	8	8	37	37	37	79	79	79	79	100	100	100	126	126
10	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	12	0	0	39	0	0	35	0	0	0	18	0	0	25	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	12	12	12	51	51	51	86	86	86	86	104	104	104	129	129

## Appendix 3-5 Result of repropduction test

Test chemical: IPDB

(Concentration 3)

Rep. No.	Counts		Time																					Total
			3/8	3/9	3/10	3/11	3/12	3/13	3/14	3/15	3/16	3/17	3/18	3/19	3/20	3/21	3/22	3/23	3/24	3/25	3/26	3/27	3/28	
			1 d	2 d	3 d	4 d	5 d	6 d	7 d	8 d	9 d	10 d	11 d	12 d	13 d	14 d	15 d	16 d	17 d	18 d	19 d	20 d	21 d	
1	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	15	0	0	43	0	0	30	0	0	0	15	1	0	23	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	15	15	15	58	58	58	88	88	88	88	103	104	104	127	127
2	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	12	0	0	31	0	0	31	1	0	0	14	1	0	23	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	12	12	12	43	43	43	74	75	75	75	89	90	90	113	113
3	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	13	0	0	38	0	0	28	0	0	0	16	0	0	0	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	13	13	13	51	51	51	79	79	79	79	95	95	95	95	--
4	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	12	0	0	41	0	0	14	12	0	0	14	1	0	20	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	12	12	12	53	53	53	67	79	79	79	93	94	94	114	114
5	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	8	0	0	50	0	0	29	0	0	0	17	0	0	26	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	8	8	8	58	58	58	87	87	87	87	104	104	104	130	130
6	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	17	0	0	36	0	0	0	27	0	0	15	0	0	0	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	17	17	17	53	53	53	53	80	80	80	95	95	95	95	95
7	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	12	0	0	46	0	0	27	0	0	0	12	0	0	13	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	12	12	12	58	58	58	85	85	85	85	97	97	97	110	110
8	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	14	0	0	43	0	0	0	26	0	0	14	1	0	21	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	14	14	14	57	57	57	57	83	83	83	97	98	98	119	119
9	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	7	0	0	40	0	0	32	1	0	0	18	0	0	23	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	7	7	7	47	47	47	79	80	80	80	98	98	98	121	121
10	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	13	0	0	46	0	0	26	0	0	0	16	0	0	28	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	13	13	13	59	59	59	85	85	85	85	101	101	101	129	129

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



## Appendix 3-6 Result of repropduction test

Test chemical: IPDB

(Concentration 4)

Rep. No.	Counts	Time																					Total
		3/8	3/9	3/10	3/11	3/12	3/13	3/14	3/15	3/16	3/17	3/18	3/19	3/20	3/21	3/22	3/23	3/24	3/25	3/26	3/27	3/28	
		1 d	2 d	3 d	4 d	5 d	6 d	7 d	8 d	9 d	10 d	11 d	12 d	13 d	14 d	15 d	16 d	17 d	18 d	19 d	20 d	21 d	
1	P generation	Live	1	1	0																		
	F1 generation	Live	0	0	0																		
	Cumulative reproductivity		0	0	0																		--
2	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8	0	0	0	9	0
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8	8	8	8	17	17
3	P generation	Live	1	1	0																		
	F1 generation	Live	0	0	0																		
	Cumulative reproductivity		0	0	0																		--
4	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	11	0	0	0	0
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	11	11	11	11	11
5	P generation	Live	1	0																			
	F1 generation	Live	0	0																			
	Cumulative reproductivity		0	0																			--
6	P generation	Live	1	1	0																		
	F1 generation	Live	0	0	0																		
	Cumulative reproductivity		0	0	0																		--
7	P generation	Live	1	1	1	0																	
	F1 generation	Live	0	0	0	0																	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0																	--
8	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	12	0	0	0	0
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	3	3	3	15	15	15	15	15
9	P generation	Live	1	1	0																		
	F1 generation	Live	0	0	0																		
	Cumulative reproductivity		0	0	0																		--
10	P generation	Live	1	1	0																		
	F1 generation	Live	0	0	0																		
	Cumulative reproductivity		0	0	0																		--

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

## Appendix 3-7 Result of repropduction test

Test chemical: IPDB

(Concentration 5)

Rep. No.	Counts		Time																					Total
			3/8	3/9	3/10	3/11	3/12	3/13	3/14	3/15	3/16	3/17	3/18	3/19	3/20	3/21	3/22	3/23	3/24	3/25	3/26	3/27	3/28	
			1 d	2 d	3 d	4 d	5 d	6 d	7 d	8 d	9 d	10 d	11 d	12 d	13 d	14 d	15 d	16 d	17 d	18 d	19 d	20 d	21 d	
1	P generation	Live	0																					
	F1 generation	Live	0																					
	Cumulative reproductivity		0																					--
2	P generation	Live	0																					
	F1 generation	Live	0																					
	Cumulative reproductivity		0																					--
3	P generation	Live	0																					
	F1 generation	Live	0																					
	Cumulative reproductivity		0																					--
4	P generation	Live	0																					
	F1 generation	Live	0																					
	Cumulative reproductivity		0																					--
5	P generation	Live	0																					
	F1 generation	Live	0																					
	Cumulative reproductivity		0																					--
6	P generation	Live	0																					
	F1 generation	Live	0																					
	Cumulative reproductivity		0																					--
7	P generation	Live	0																					
	F1 generation	Live	0																					
	Cumulative reproductivity		0																					--
8	P generation	Live	0																					
	F1 generation	Live	0																					
	Cumulative reproductivity		0																					--
9	P generation	Live	0																					
	F1 generation	Live	0																					
	Cumulative reproductivity		0																					--
10	P generation	Live	0																					
	F1 generation	Live	0																					
	Cumulative reproductivity		0																					--

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