

環境省殿

本写しは原本と相違ありません

(株)三菱化学安全科学研究所
横浜研究所 試験責任者

最終報告書

パルミチン酸の
オオミジンコ (*Daphnia magna*) に対する繁殖試験

(試験番号：A050381)

2008年 2月14日

株式会社三菱化学安全科学研究所

陳 述 書

株式会社三菱化学安全科学研究所

横浜研究所

試 験 委 託 者 : 環境省

表 題 : パルミチン酸のオオミジンコ (*Daphnia magna*)
に対する繁殖試験

試 験 番 号 : A050381

本試験は試験計画書および標準操作手順書に従って実施され、本報告書はその結果を正しく記載したものである。

また、本試験は下記のGLPに従って実施したものである。

「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, 最終改正:平成17年4月1日)

2008年 2月14日

試験責任者



信 頼 性 保 証 書

株式会社三菱化学安全科学研究所

横浜研究所

試 験 委 託 者 : 環境省
 表 題 : パルミチン酸のオオミジンコ (*Daphnia magna*) に対する繁殖試験
 試 験 番 号 : A050381

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

記

| 実 施 事 項 | 実 施 日 | 運営管理者および 試験責任者への報告日 |
|--------------|-------------|------------------------|
| 試験計画書監査 | | |
| 試験計画書 | 2006年 9月14日 | 2006年 9月14日 |
| 変更書(変更番号:01) | 2008年 1月16日 | 2008年 1月16日 |
| 試験の査察 | | |
| 試験液の調製 | 2006年 9月14日 | 2006年 9月14日 |
| ミジンコの投入 | 2006年 9月14日 | 2006年 9月14日 |
| 試験液の分析 | 2006年 9月29日 | 2006年 9月29日 |
| ミジンコの観察 | 2006年10月 5日 | 2006年10月 5日 |
| 最終報告書監査 | 2008年 2月14日 | 2008年 2月14日 |

2008年 2月14日

信頼性保証部門担当者

(2007年10月31日付退職)

試験実施概要

1. 表 題 : パルミチン酸のオオミジンコ (*Daphnia magna*)
に対する繁殖試験
(試験番号: A050381)
2. 試 験 目 的 : 被験物質のオオミジンコ (*Daphnia magna*) に対する繁殖試験
を行い, 21 日間の最小作用濃度 (LOEC) と最大無作用濃度
(NOEC) を求め, 可能な限り 50%繁殖阻害濃度 (EC50) も求
める。
3. 適用ガイドライン : OECD Guideline for Testing of Chemicals 211 (1998)
“*Daphnia magna* Reproduction Test”
4. 適 用 G L P : 「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, 環境企発第 031121004 号, 最終改正: 平
成 17 年 4 月 1 日)
5. 試 験 委 託 者 : 環境省
東京都千代田区霞が関一丁目 2-2
6. 試 験 受 託 者 : 株式会社三菱化学安全科学研究所
東京都港区芝浦四丁目 2 番 8 号
(2007 年 4 月 1 日付, 移転により住所変更)
7. 試 験 施 設 : 株式会社三菱化学安全科学研究所 横浜研究所
神奈川県横浜市青葉区鴨志田町 1000 番地
8. 試 験 責 任 者 : XXXXXXXXXX
生態化学研究部

9. 試験担当者： ██████████ (2007年8月 1日付転勤)
(試験実施)

██████████ (2007年1月31日付退職)
(試験実施)

██████████ (2007年9月30日付退職)
(試験実施)

10. 試験日程： 試験開始日 2006年 9月14日
暴露開始日 2006年 9月14日
暴露終了日 2006年10月 5日
試験終了日 2008年 2月14日

11. 保管： 下記の試資料を，株式会社三菱化学安全科学研究所 横浜
研究所の試資料保管施設に保管する。

- 1) 試験計画書
- 2) 最終報告書
- 3) 生データ
- 4) 被験物質
- 5) 対照物質
- 6) その他必要なもの

目 次

| | 頁 |
|--|--------|
| 要 約 | 7 |
| 1 被験物質 | 9 |
| 1.1 名称, 構造式および物理化学的性状 | 9 |
| 1.2 供試試料 | 10 |
| 1.3 保管法および安定性の確認 | 10 |
| 2 供試生物 | 11 |
| 3 試験方法 | 13 |
| 3.1 試験条件 | 13 |
| 3.2 希釈水 | 13 |
| 3.3 試験容器および恒温槽等 | 14 |
| 3.4 試験濃度の設定 | 14 |
| 3.5 試験液の調製 | 14 |
| 3.6 試験液の分析 | 15 |
| 3.7 試験操作 | 15 |
| 3.8 結果の算出 | 16 |
| 4 結果および考察 | 17 |
| 4.1 試験成績の信頼性に影響を及ぼしたと思われる環境要因 | 17 |
| 4.2 試験液中の被験物質濃度 | 17 |
| 4.3 ミジンコの観察結果 | 17 |
| 4.4 親ミジンコの半数致死濃度 (LC50) | 18 |
| 4.5 50%繁殖阻害濃度 (EC50) | 18 |
| 4.6 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) | 18 |
| 4.7 試験液の水温, 溶存酸素濃度, pH および硬度 | 18 |
| Table 1~11 | 19~28 |
| Figure 1, 2 | 21, 24 |
| 付属資料-1 赤外吸収スペクトル | 29~30 |
| 付属資料-2 希釈水の水質 | 31~32 |
| 付属資料-3 試験液の調製 | 33~34 |
| 付属資料-4 試験液の分析 | 35~43 |
| 付属資料-5 ミジンコの観察結果 | 44~47 |
| 付属資料-6 結果の算出 | 48~49 |

要 約

試験委託者

環境省

表題パルミチン酸のオオミジンコ (*Daphnia magna*) に対する繁殖試験試験番号

A050381

試験方法

本試験は、OECD Guideline for Testing of Chemicals 211 (1998) “*Daphnia magna* Reproduction Test” に準拠して実施した。

- 1) 暴露方式 : 半止水式 (毎日, 試験液の全量を交換)
水面をテフロンシートで被覆
- 2) 暴露期間 : 21日間
- 3) 試験濃度 (設定値) : 対照区, 助剤対照区, 0.510* mg/L
*脱塩素水道水に対する被験物質の溶解度での限度試験
助剤濃度一定: 100 µL/L (ジメチルホルムアミド使用)
- 4) 試験液量 : 80 mL/容器
- 5) 連数 : 10容器/試験区
- 6) 供試生物数 : 10頭/試験区 (1頭/容器)
- 7) 試験温度 : 20±1°C
- 8) 照明 : 室内光, 16時間明 (800 lux以下) /8時間暗
- 9) 分析法 : 高速液体クロマトグラフィー質量分析 (LC/MS)

結 果

1) 試験液中の被験物質濃度

分析の結果、測定値の設定値に対する割合は、試験液調製時において 94～112%、換水前において 検出下限値未満～35%であった。濃度減少の主な原因は、ミジンコおよび餌であるクロレラへの吸着・取り込み、さらに、被験物質の微生物による分解等が考えられた。

なお、8日目の分析の際に、0.510 mg/L 区の分析値が検出下限値未満となった。このため、阻害濃度の算出の際には、8日目の分析値として、検出下限値である 0.03 mg/L を用いることとした。

2) 21日間暴露後の結果

| | (mg/L) | 95%信頼区間 (mg/L) |
|---------------------|--------|----------------|
| 親ミジンコの半数致死濃度 (LC50) | > 0.22 | 算出不可 |
| 50%繁殖阻害濃度 (EC50) | > 0.22 | 算出不可 |
| 最大無作用濃度 (NOEC) | > 0.22 | — |
| 最小作用濃度 (LOEC) | > 0.22 | — |

1 被験物質

1.1 名称, 構造式および物理化学的性状

| | | | |
|--------------------------------------|--|---------|---------|
| 被験物質の名称 | パルミチン酸 | | |
| 別名 | (略称: PALM) | | |
| CAS番号 | 57-10-3 | | |
| 構造式又は示性式 (いずれも不明の場合は, その製法の概要) | $\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{C} - (\text{CH}_2)_{14} - \text{CH}_3 \\ \diagup \\ \text{HO} \end{array} \quad *1$ | | |
| 分子量 | 256.43 | | |
| 試験に供した物質の純度 (%) | 98.7% | | |
| 試験に供した物質のロット番号 | SDM2000 | | |
| 不純物の名称及び含有率 | - | | |
| 蒸気圧 | 0.998 mmHg (154°C) *1 | | |
| 対水溶解度 | 0.00072% (20°C) *1 | | |
| 1-オクタノール/水分配係数 | - | | |
| 融点 | 61.7°C | | |
| 沸点 | 390°C | | |
| 常温における性状 | 白色, 微粒 | | |
| 安定性 | - | | |
| 溶媒に対する溶解度等 | 溶媒 | 溶解度 | 溶媒中の安定性 |
| | ジエチルエーテル | 溶けやすい | - |
| | エタノール | やや溶けやすい | - |

上記内容は供給者提供資料による。

ただし*の内容は以下の通り。

*1: 独立行政法人製品評価技術基盤機構ホームページ 化学物質総合検索システム

<http://www.safe.nite.go.jp/japan/db.html>

1.2 供試試料

供給者： XXXXXXXXXX

1.3 保管法および安定性の確認

被験物質は試験期間中、当研究所の試験物質保管用デシケータ（保管条件：室温，暗所）内に保管した。試験終了時に、保管した被験物質の赤外吸収スペクトルを測定した。得られたスペクトルは試験開始時に測定したスペクトルと一致したことから、被験物質は保管中安定であったと判断した。赤外吸収スペクトルを付属資料-1に示す。

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

2 供試生物

- 1) 一般名 : オオミジンコ
- 2) 学名 : *Daphnia magna*
- 3) 入手先 : 環境庁国立環境研究所 (現: 独立行政法人国立環境研究所)
- 4) 入手日 : 1995年 7月18日
- 5) 継代飼育条件 : 24時間以内齢の幼体を以下の条件で継代飼育した
- 飼育水 : Elendt M4 (OECD Guideline for Testing of Chemicals 202 (2004) “*Daphnia* sp., Acute Immobilisation Test” に記載されている調製水)
- 飼育密度 : 1頭/80 mL (25頭/2 L) 以下
- 飼育容器 : 2~3 Lガラス製容器
- 水温 : 20±1°C
- 溶存酸素濃度 : 飽和濃度の60%以上
- pH : 6.0~9.0
- 照明 : 室内光, 16時間明 (800 lux以下) / 8時間暗
- 飼育期間 : 2~4週間 (この期間に生まれる幼体を継代)
- 餌 : *Chlorella vulgaris* (単細胞緑藻類)
(藻類から培養液を遠心分離し, 希釈水に置換して使用)
- 給餌量 : 0.1~0.2 mg C (有機炭素含量) / 頭 / 日
(飼育密度, 成長度や繁殖状況等により変動する)
- 飼育水の交換 : 定期的に (例えば3回/週) 交換。幼体は極力, 毎日除去。
- 6) 感受性 : 定期的 (約6ヶ月毎) に基準物質 (重クロム酸カリウム, 試薬特級) による急性遊泳阻害試験を行い, オオミジンコの感受性を調べている。1998年6月以降の48時間の半数遊泳阻害濃度 (EC50) は、以下の通りである。

平均値±標準偏差=0.75±0.14 mg/L, n=17

(最小値~最大値=0.57~1.02 mg/L)

7) 供試生物を得るための親ミジンコの飼育条件：

通常、試験に用いる希釈水と飼育水が同じであるため、じゅん化期間は設けないが、本被験物質は、希釈水として脱塩素水道水を用いるため、以下の条件で24時間以内齢の幼体を飼育、じゅん化し供試生物の親とした。

飼育水： 脱塩素水道水 (3.2 参照)

じゅん化期間： 2006年 8月24日～2006年 9月14日

その他の条件： 継代飼育条件と同じ

暴露開始前2週間の親の死亡： < 5%

休眠卵および雄の発生： 無し

8) 供試生物： 雌の幼体 (24時間以内齢)

3 試験方法

本試験は、OECD Guideline for Testing of Chemicals 211 (1998) “*Daphnia magna* Reproduction Test” に準拠して実施した。

3.1 試験条件

- 1) 暴露方式： 半止水式（毎日、試験液の全量を交換）
- 2) 暴露期間： 21日間
- 3) 試験液量： 80 mL／容器
- 4) 連数： 10容器／試験区
- 5) 供試生物数： 10頭／試験区（1頭／容器）
- 6) 試験温度： 20±1℃
- 7) 溶存酸素濃度： 飽和濃度の60%以上
(暴露期間中のエアレーションは実施していない)
- 8) pH： 試験液のpH調整なし
- 9) 硬度： 250 mg/L以下 (CaCO₃換算)
- 10) 照明： 室内光, 16時間明 (800 lux 以下) / 8時間暗
- 11) 餌 *Chlorella vulgaris* (単細胞緑藻類)
藻類から培養液を遠心分離し、希釈水に置換して使用
- 12) 給餌： 0.15 mg C (有機炭素含量) / 頭 / 日

3.2 希釈水

被験物質が Elendt M4 に難溶であるため脱塩素水道水を使用した。脱塩素水道水は横浜市水道水を活性炭処理後、活性炭で除去できない極微量の遊離塩素を中和するため希釈水にチオ硫酸ナトリウム水溶液を添加することにより準備した。希釈水の水質は6ヶ月毎に水質検査を行い、水産用水基準に適合していることを確認している。検査結果については付属試料-2に示す。硬度は通常 30~100 mg/L (CaCO₃換算), pHは 6.5~8.5 である。週に一回、残留塩素のないことを確認した。

3.3 試験容器および恒温槽等

- 1) 試験容器： 100mL容ガラスビーカー（試験液の蒸散，被験物質の揮散防止のために水面をテフロンシートで覆い，さらに試験容器には蓋をした）
- 2) 恒温槽： 塩ビ製水槽（恒温装置，タイテック製 クールニットCL-80F型）
- 3) 水温計： ハンナ製 チェックテンプ
- 4) 溶存酸素計： 電気化学計器製 DOL-10型
- 5) pH計： 東亜電波工業製 HM-40V型
- 6) 硬度測定キット： ハック製 HA-DT
- 7) 電子天秤： メトラー製 AG204型
メトラー製 AE163型
メトラー製 AB204-S型
メトラー製 PB3002型

3.4 試験濃度の設定

オオミジンコに対する急性遊泳阻害試験の結果（48 時間 EC50 値： >0.510 mg/L（設定値）， >0.250 mg/L（測定値））に基づき，本試験濃度を次のように決定した。

本試験濃度（設定値）： 対照区，助剤対照区， 0.510^* mg/L

*：脱塩素水道水に対する被験物質の溶解度での限度試験

3.5 試験液の調製

試験液の調製方法を付属資料－3に示す。対照区は希釈水のみとし，助剤対照区には助剤のみを含むもの（助剤濃度： $100\mu\text{L/L}$ ）を調製した。調製した試験液は1試験区につき10個の試験容器に各80 mL入れた。なお，調製に用いる原液は暴露開始時に調製し，冷蔵，暗所条件下で保存した（同条件下で21日間以上安定）。

3.6 試験液の分析

暴露期間中3回、換水前後に分析を行った。全試験区の各1試験容器より試験液を採取し分析試料とした。これを高速液体クロマトグラフィー質量分析(LC/MS)により分析した。詳細を付属資料-4に示す。

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。ミジンコ投入の際、試験液量に対するピペットからの飼育水の添加量は全量で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日後まで飼育した。暴露期間中は毎日一定量の給餌を行った(3.1参照)。また、以下の要領で、ミジンコの観察および水質測定を行った。

1) ミジンコの観察：

親ミジンコ： 生死、遊泳状態および外観の異常の有無を毎日観察して記録した。死亡個体があれば除去した。

産出幼体： 最初の産仔から毎日、幼体の生存数を計数して除去した。死亡幼体、墮胎卵、休眠卵の発生等の有無を観察して記録した。最初の幼体産出日(初産日)を記録した。

2) 水質測定： 試験液の外観、水温、溶存酸素濃度、pHおよび硬度を、全試験区各1試験容器の試験液について、暴露期間中に4回、換水前後に測定し、記録した。

3.8 結果の算出

1) 阻害濃度算出に用いる被験物質濃度の決定

阻害濃度の算出に用いる被験物質濃度は、測定値の平均値（時間加重平均）とした。

2) 親ミジンコの半数致死濃度（LC50）の算出

通常は21日間の各試験区における、親ミジンコの死亡数と供試個体数（10頭）から死亡率（%）を求め、半数致死濃度（21d-LC50）を可能な限り決定するが、本試験においては試験上限濃度のみの限度試験のため、半数致死濃度（21d-LC50）の算出はせずに「> 試験濃度」とした。

3) 50%繁殖阻害濃度（EC50）の算出

通常は助剤対照区に対する各濃度区での生存親1頭当たりの平均累積産仔数（生存幼体）から繁殖率%（A）を求め、繁殖阻害率*%（100-A）を算出し、21日間の50%繁殖阻害濃度（21d-EC50）を可能な限り決定するが、本試験においては試験上限濃度のみの限度試験のため、50%繁殖阻害濃度（EC50）の算出はせずに「> 試験濃度」とした。

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

4) 最大無作用濃度（NOEC）および最小作用濃度（LOEC）*

各試験容器毎の21日間の生存親1頭当たりの累積産仔数を算出し、濃度区と助剤対照区との有意差の有無を以下の方法（統計的手法**）により求め、最大無作用濃度（NOEC）および最小作用濃度（LOEC）を決定した。

* 最大無作用濃度（NOEC）：助剤対照区に比べ、有意な繁殖阻害が認められない最高濃度
 最小作用濃度（LOEC）：助剤対照区に比べ、有意な繁殖阻害が認められる最低濃度

** 統計的手法（産仔の有無に関わらず親が死亡した場合は算出から除外）

| | |
|---|--------------|
| 2 群の比較 (助剤対照区以外に1群) | |
| F 検定 | |
| 等分散が認められる場合 | 等分散が認められない場合 |
| Student の t 検定 | Welch の t 検定 |
| Yukms ソフトウェア Statlight「#3 2群の比較」(Yukms Corp, 東京) | |

4 結果および考察

4.1 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。

4.2 試験液中の被験物質濃度

暴露期間中に3回、換水前後の試験液中の被験物質濃度を測定した。その分析結果をTable 1に、代表的なクロマトグラムを付属資料-4に示す。

分析の結果、測定値の設定値に対する割合は、試験液調製時において94~112%、換水前において検出下限値未満~35%であった。濃度減少の主な原因は、ミジンコおよび餌であるクロレラへの吸着・取り込み、さらに、被験物質の微生物による分解等が考えられた。

なお、8日目の分析の際に、0.510 mg/L区の測定値は検出下限値未満となったため、検出下限値を用いて測定値の平均値を算出することとした。

4.3 ミジンコの観察結果

暴露期間中のミジンコの観察結果を付属資料-5に示す。

親ミジンコの死亡数および死亡率

暴露期間中の各試験区における親ミジンコの累積死亡数および死亡率をTable 2-1、Table 2-2 およびFigure 1に示す。

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、暴露終了時で共に10%であり、試験成立条件である20%以下の基準を満たした。0.510 mg/L区における死亡率は暴露終了時で10%であった。

初産日

各試験区における親ミジンコの初産日をTable 3に示す。

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日後であり、正常な範囲内と判断された。0.510 mg/L区においては暴露開始9日以内であり、正常な範囲内と判断された。

平均累積産仔数

暴露期間中の各試験区における親ミジンコ1頭当たりの平均累積産仔数をTable 4 およびFigure 2に示す。

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

どちらも120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。

0.510 mg/L区においては129頭であった。

休眠卵の発生等

暴露期間を通して、全試験区において休眠卵の発生は認められなかった。

4.4 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 および以下に示す。

21日間 LC50 : > 0.22 mg/L (95%信頼区間 : 算出不可)

4.5 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 および以下に示す。

21日間 EC50 : > 0.22 mg/L (95%信頼区間 : 算出不可)

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

親ミジンコ1頭あたりの累積産仔数に及ぼす21日間暴露の最大無作用濃度 (NOEC) および最小作用濃度 (LOEC) を Table 7 および以下に、算出結果を付属資料-6に示す。

21日間 NOEC : > 0.22 mg/L

21日間 LOEC : > 0.22 mg/L

4.7 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 に示す。

試験液の外観は、全試験区において無色であった。すべての試験区において、水温は $20 \pm 1^\circ\text{C}$ 、溶存酸素濃度は飽和溶存酸素濃度 (20.0°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 ($6.0 \sim 9.0$ で 1.5 の変動内) 内であった。また硬度も適正範囲内 (250 mg/L 以下) であった。

以上

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

| Nominal Concentration (mg/L) | Date→ | Measured Concentration (mg/L) | | | | | | TWM* ¹ (mg/L) | % of Nominal |
|------------------------------------|-------|-------------------------------|----------|----------|---------------------|-----------|-----------|-----------------------------|-----------------|
| | | 0 New | 1 Old | 7 New | 8 Old | 14 New | 15 Old | | |
| Control | | <0.03 | <0.03 | <0.03 | <0.03 | <0.03 | <0.03 | - | - |
| Solvent control | | <0.03 | <0.03 | <0.03 | <0.03 | <0.03 | <0.03 | - | - |
| 0.510 | | 0.48 | 0.18 | 0.52 | <0.03* ² | 0.57 | 0.03 | 0.22 | 43 |

Table 1-2 Measured Concentration as a Percentage of Nominal

| Nominal Concentration (mg/L) | Date→ | Measured Concentration as a Percentage of Nominal | | | | | |
|------------------------------------|-------|---|----------|----------|----------|-----------|-----------|
| | | 0 New | 1 Old | 7 New | 8 Old | 14 New | 15 Old |
| 0.510 | | 94 | 35 | 102 | < 6 | 112 | 6 |

New: Freshly prepared test solution

Old: Old test solution before renewal

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

*2: The value of the detection limit (0.03 mg/L) was used for determination of the time weight mean because measured value was below the detection limit (0.03mg/L).

| | Concentration (mg/L) | | | % of Nominal | | |
|-----|----------------------|---|------|--------------|---|------|
| | Min. | ~ | Max. | Min. | ~ | Max. |
| New | 0.48 | ~ | 0.57 | 94 | ~ | 112 |
| Old | < 0.03 | ~ | 0.18 | < 6 | ~ | 35 |

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

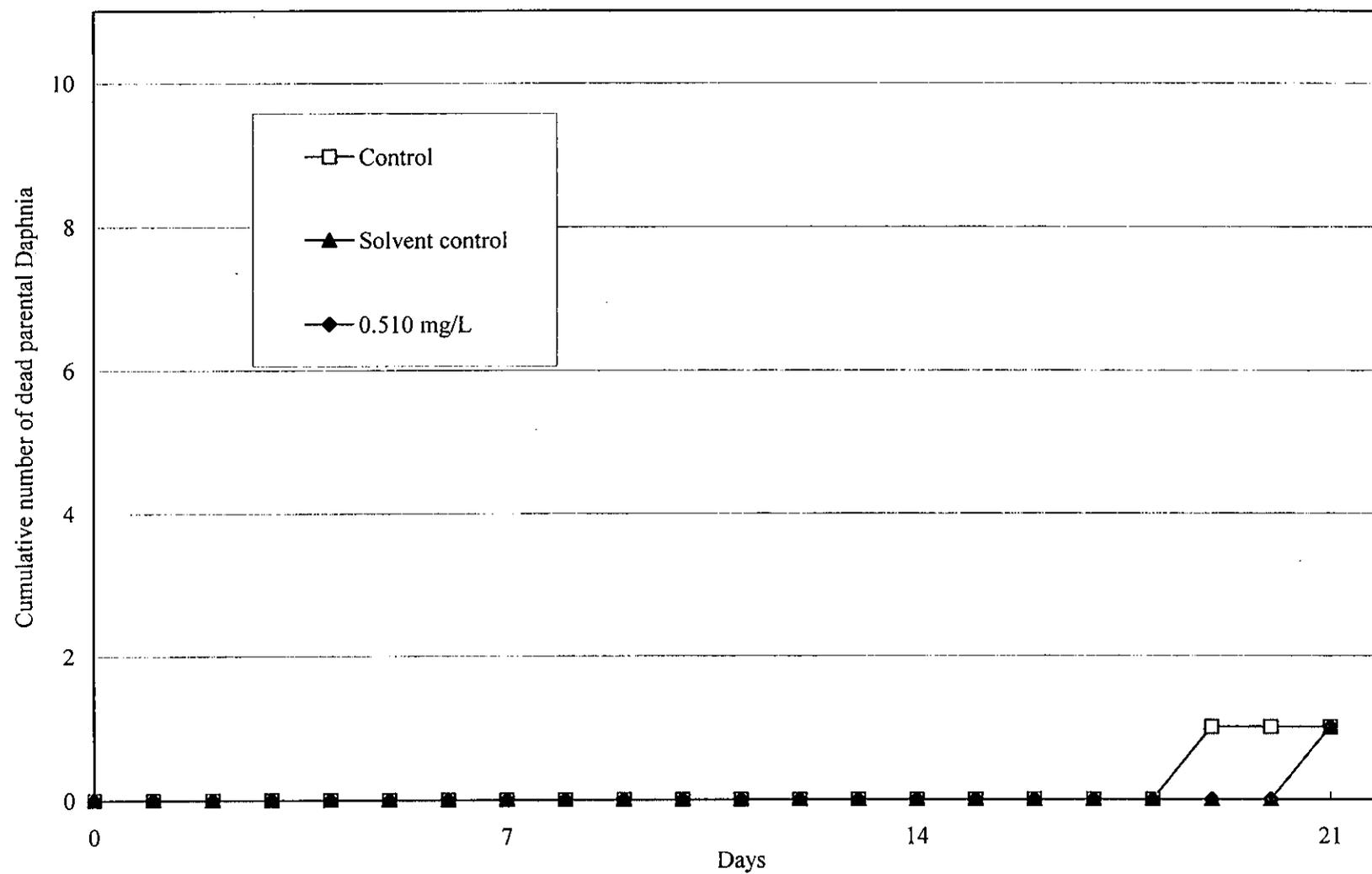
| Nominal conc. (mg/L) | Measured conc.*1 (mg/L) | Days | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|----------------------------|-------------------------------|------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
| | | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 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 | 1 | 1 | 1 |
| Solvent control | -- | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| 0.510 | 0.22 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |

*1: Time-weighted mean measured concentration

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

| Nominal conc. (mg/L) | Measured conc.*1 (mg/L) | Days | | | | | |
|----------------------------|-------------------------------|------|---|---|---|----|----|
| | | 1 | 2 | 4 | 7 | 14 | 21 |
| Control | -- | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 10 |
| Solvent control | -- | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 10 |
| 0.510 | 0.22 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 10 |

*1: Time-weighted mean measured concentration

Figure 1 Cumulative Number of Dead Parental *Daphnia*

Values in legend are given in the nominal concentration.

Table 3 Time (Days) to First Brood Production

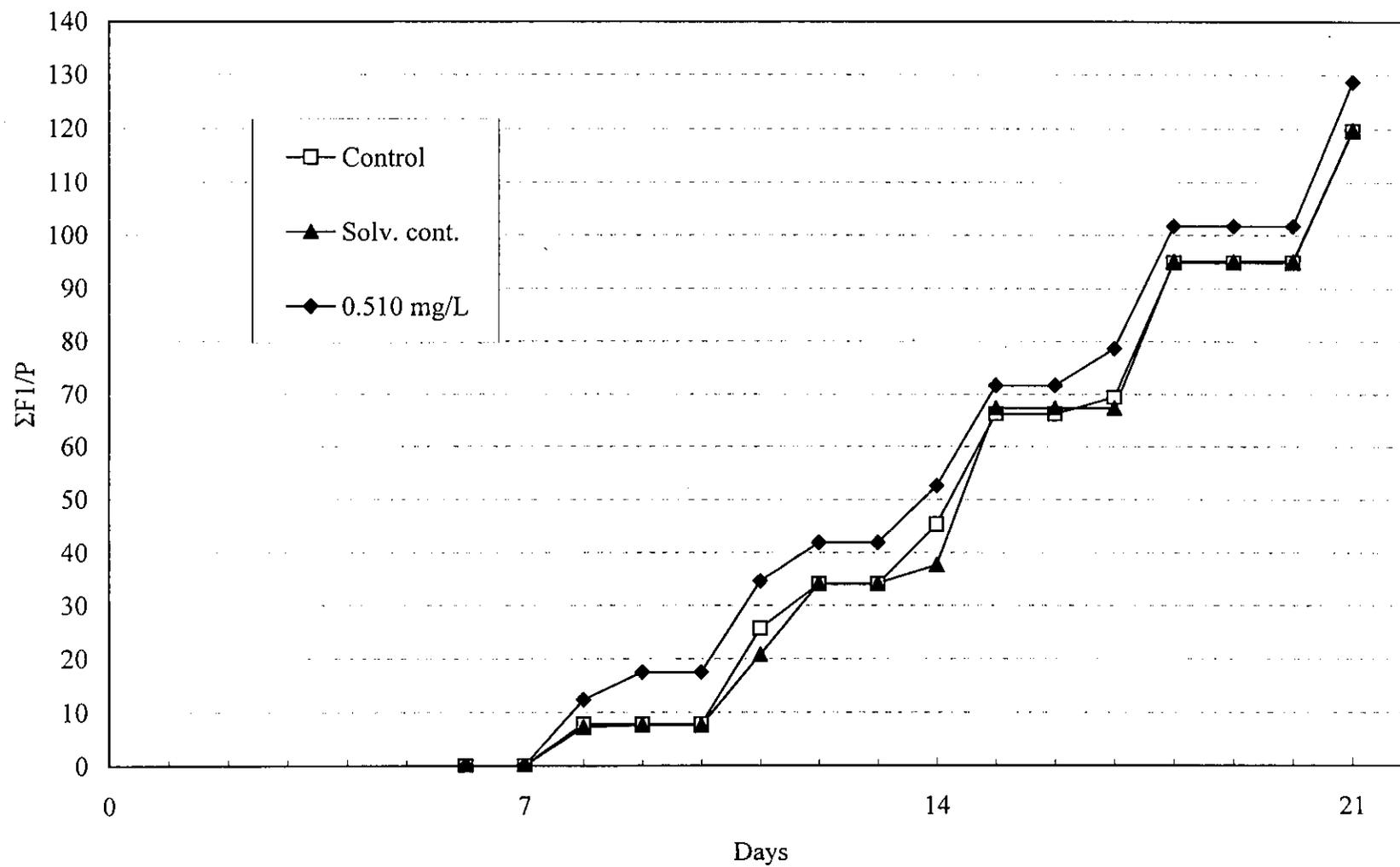
| Vessel No. | Nominal Concentration, mg/L (Measured Concentration ^{*1} , mg/L) | | |
|------------|--|-----------------|-----------------|
| | Control | Solvent control | 0.510 (0.22) |
| 1 | 8 | 8 | 9 |
| 2 | 8 | 8 | 8 |
| 3 | 8 | 8 | 8 |
| 4 | 8 | 8 | 8 |
| 5 | 8 | 8 | 8 |
| 6 | 8 | 8 | 8 |
| 7 | 8 | 8 | 8 |
| 8 | 8 | 8 | 8 |
| 9 | 8 | 8 | 8 |
| 10 | 8 | 8 | 9 |
| Min | 8 | 8 | 8 |
| Max | 8 | 8 | 9 |

*1: Time-weighted mean measured concentration

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

| Nominal conc. (mg/L) | Measured conc. ^{*1} (mg/L) | Days | | | | | | | | | | | | | | | |
|-------------------------|--|------|-----|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|-------|-------|-------|-------|
| | | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 |
| Control | -- | 0.0 | 0.0 | 7.8 | 7.8 | 7.8 | 25.7 | 34.0 | 34.0 | 45.3 | 66.2 | 66.2 | 69.4 | 94.9 | 94.9 | 94.9 | 119.6 |
| Solv. cont. | -- | 0.0 | 0.0 | 7.2 | 7.6 | 7.6 | 20.8 | 34.1 | 34.1 | 37.7 | 67.3 | 67.3 | 67.3 | 95.1 | 95.1 | 95.1 | 119.8 |
| 0.510 | 0.22 | 0.0 | 0.0 | 12.3 | 17.4 | 17.4 | 34.6 | 41.9 | 41.9 | 52.6 | 71.7 | 71.7 | 78.7 | 101.8 | 101.8 | 101.8 | 128.7 |

*1: Time-weighted mean measured concentration

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 (mg/L) | 95% Confidence limits (mg/L) | Statistical method |
|-----------------------|-------------|------------------------------|--------------------|
| 21 | > 0.22 | -- | -- |

--: Could not be determined

The LC50 value and its 95% confidence limits could not be determined by statistical method because the mortality of parental *Daphnia* at the maximum concentration level was less than 50%.

Table 6 Calculated EC50 Values for Inhibition of Reproduction

| Exposure Period (day) | EC50 (mg/L) | 95% Confidence limits (mg/L) | Statistical method |
|-----------------------|-------------|------------------------------|--------------------|
| 21 | > 0.22 | -- | -- |

--: Could not be determined

The EC50 value and its 95% confidence limits could not be determined by statistical method because the reproduction inhibition rate at the maximum concentration level was less than 50%.

Table 7 Cumulative Number of Juveniles Produced per Adult Alive for 21 Days in Each Test Vessel and Results of Statistical Comparison of the Mean Values (by Student's t Paired Comparison Test)

| Vessel No. | Nominal Concentration, mg/L (Measured Concentration ^{*1} , mg/L) | | |
|------------------------|--|------------|-----------------|
| | Control | Solv.cont. | 0.510 (0.22) |
| 1 | 111 | 129 | 118 |
| 2 | 109 | 127 | 144 |
| 3 | 122 | 109 | 141 |
| 4 | 108 | 110 | D |
| 5 | 121 | D | 136 |
| 6 | 116 | 119 | 117 |
| 7 | 132 | 128 | 109 |
| 8 | D | 125 | 146 |
| 9 | 139 | 113 | 121 |
| 10 | 118 | 118 | 126 |
| Mean | 119.6 | 119.8 | 128.7 |
| S.D. | 10.5 | 7.9 | 13.4 |
| Inhibition rate(%) | | | -7.4 |
| Significant difference | | | - |

*1: Time-weighted mean measured concentration.

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

-: Indicates no significant difference.

*: Indicates a significant difference ($\alpha=0.05$) from the control.
(There was no sign in this test.)

** : Indicates a significant difference ($\alpha=0.01$) from the control.
(There was no sign in this test.)

No Observed Effect Concentration (NOEC):

> 0.22 mg/L

Lowest Observed Effect Concentration (LOEC):

> 0.22 mg/L

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

| Nominal Concentration (mg/L) | Measured Concentration* ¹ (mg/L) | Date→ | Temperature (°C) | | | | | | | | Min. | Max. |
|------------------------------------|---|-------|------------------|----------|----------|----------|-----------|-----------|-----------|-----------|------|------|
| | | | 0 new | 1 old | 5 new | 6 old | 12 new | 13 old | 20 new | 21 old | | |
| Control | -- | | 20.1 | 19.8 | 19.9 | 19.9 | 20.1 | 19.9 | 20.1 | 19.8 | 19.8 | 20.1 |
| Solvent control 0.510 | -- 0.22 | | 20.1 | 19.8 | 19.9 | 19.9 | 20.1 | 19.9 | 20.1 | 19.8 | 19.8 | 20.1 |
| Total | | | | | | | | | | | 19.8 | 20.1 |

*1: Time-weighted mean measured concentration
 new: freshly prepared test solution, old: old test solution before renewal

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

| Nominal Concentration (mg/L) | Measured Concentration* ¹ (mg/L) | Date→ | D.O. (mg/L) | | | | | | | | Min. | Max. |
|------------------------------------|---|-------|-------------|----------|----------|----------|-----------|-----------|-----------|-----------|------|------|
| | | | 0 new | 1 old | 5 new | 6 old | 12 new | 13 old | 20 new | 21 old | | |
| Control | -- | | 8.1 | 8.2 | 8.0 | 8.0 | 8.5 | 8.3 | 8.4 | 7.8 | 7.8 | 8.5 |
| Solvent control 0.510 | -- 0.22 | | 8.2 | 8.3 | 8.0 | 8.0 | 8.5 | 8.4 | 8.3 | 7.6 | 7.6 | 8.5 |
| Total | | | | | | | | | | | 7.1 | 8.5 |

*1: Time-weighted mean measured concentration
 new: freshly prepared test solution, old: old test solution before renewal

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

| Nominal Concentration (mg/L) | Measured Concentration* ¹ (mg/L) | Date→ | pH | | | | | | | | Min. | Max. |
|------------------------------------|---|-------|----------|----------|----------|----------|-----------|-----------|-----------|-----------|------|------|
| | | | 0 new | 1 old | 5 new | 6 old | 12 new | 13 old | 20 new | 21 old | | |
| Control | -- | | 7.7 | 7.9 | 7.8 | 7.6 | 7.9 | 7.6 | 7.6 | 7.4 | 7.4 | 7.9 |
| Solvent control | -- | | 7.9 | 7.9 | 7.8 | 7.6 | 7.9 | 7.7 | 7.7 | 7.4 | 7.4 | 7.9 |
| 0.510 | 0.22 | | 7.9 | 7.8 | 7.8 | 7.6 | 7.9 | 7.6 | 7.7 | 7.3 | 7.3 | 7.9 |
| Total | | | | | | | | | | | 7.3 | 7.9 |

*1: Time-weighted mean measured concentration

new: freshly prepared test solution,

old: old test solution before renewal

Table 11 Total Hardness (as CaCO₃) during a 21-day Period under the Semi-Static Condition

| Nominal Concentration (mg/L) | Measured Concentration* ¹ (mg/L) | Date→ | Total hardness (as CaCO ₃ , mg/L) | | | | | | | | Min. | Max. | |
|------------------------------------|---|-------|--|----------|----------|----------|-----------|-----------|-----------|-----------|------|------|----|
| | | | 0 new | 1 old | 5 new | 6 old | 12 new | 13 old | 20 new | 21 old | | | |
| Control | -- | | 46 | 48 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 46 | 50 |
| Solvent control | -- | | 52 | 52 | 52 | 50 | 52 | 52 | 50 | 50 | 50 | 50 | 52 |
| 0.510 | 0.22 | | 52 | 52 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 52 |
| Total | | | | | | | | | | | 46 | 52 | |

*1: Time-weighted mean measured concentration

new: freshly prepared test solution,

old: old test solution before renewal

付属資料－ 1

赤外吸収スペクトル

Figure A-1-1 Infrared absorption spectrum of the test substance at the start of the study

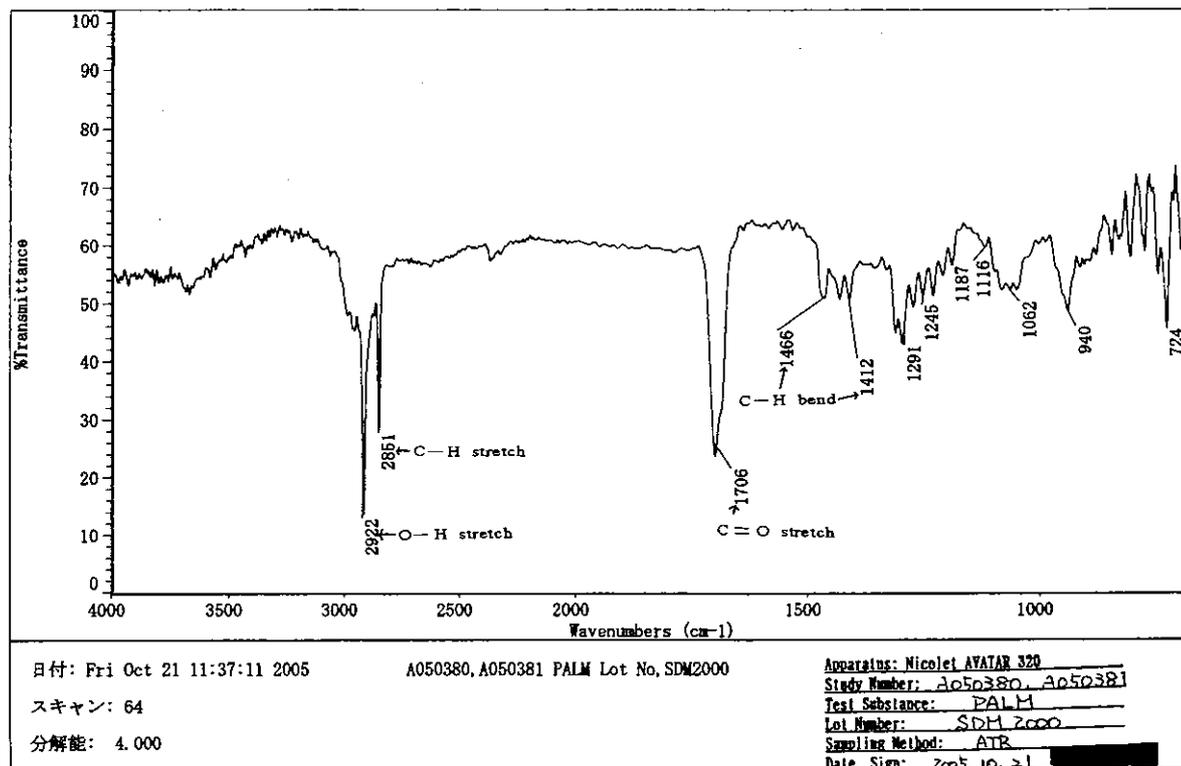
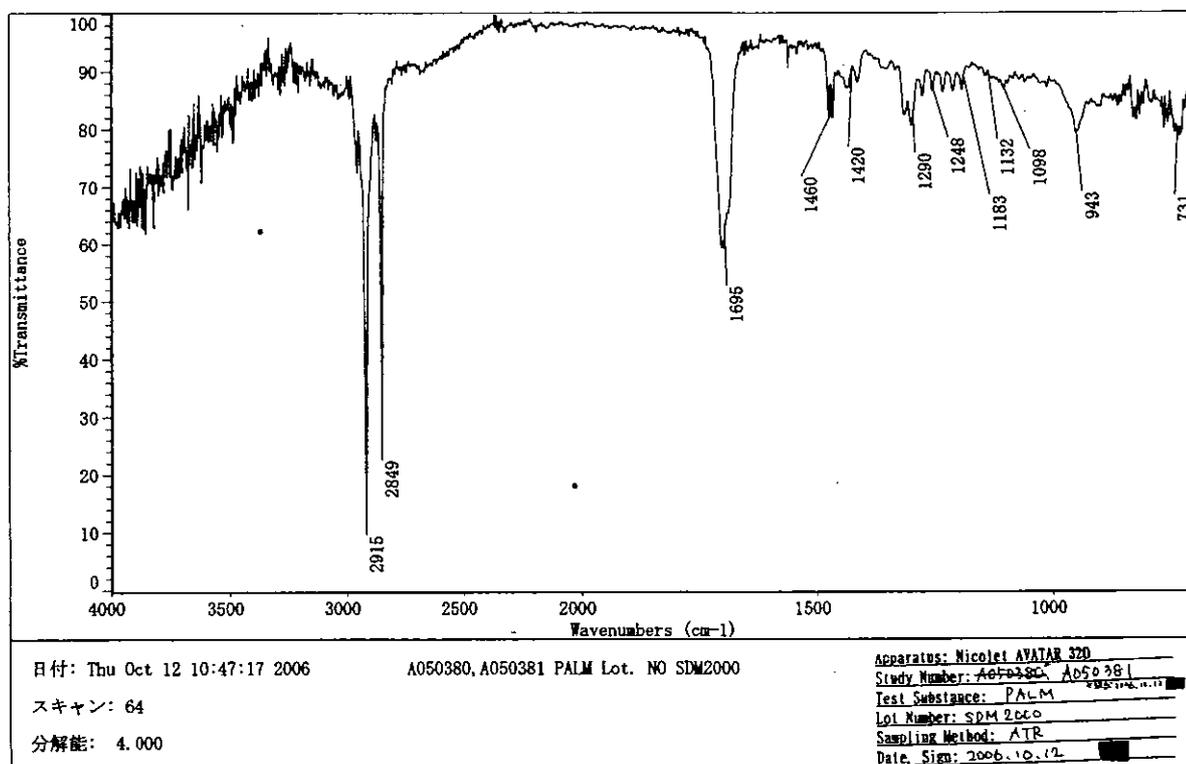


Figure A-1-2 Infrared absorption spectrum of the test substance at the end of the study



付属資料－ 2

希积水の水質

Table A-1 Dilution Water Quality

| Parameter | Concentration | |
|--|---------------|------------|
| BOD | <2.0 | mg/L |
| COD | <3.0 | mg/L |
| pH | 7.5 | (25°C) |
| Coliform group bacteria | N.D. | |
| Oil | N.D. | |
| Cadmium | <0.01 | mg/L |
| Cyanide | N.D. | |
| Lead | <0.1 | mg/L |
| Chromium | <0.05 | mg/L |
| Arsenic | <0.05 | mg/L |
| Mercury | <0.0005 | mg/L |
| Free chlorine | <0.02 | mg/L |
| Bromide | <1.0 | mg/L |
| Fluoride | <1.5 | mg/L |
| Sulfide | <0.3 | mg/L |
| Total ammonium | <1.0 | mg/L |
| Copper | <0.005 | mg/L |
| Zinc | <0.1 | mg/L |
| Aluminum | <0.1 | mg/L |
| Tin | <1.0 | mg/L |
| Manganese | <1.0 | mg/L |
| Iron | <1.0 | mg/L |
| Nickel | <0.1 | mg/L |
| Total phosphorus | <0.1 | mg/L |
| Selenium | <0.001 | mg/L |
| Phenols | <0.002 | mg/L |
| Anionic surfactant | <0.02 | mg/L |
| Evaporation residue | 92 | mg/L |
| Electric conductivity | 117 | μ S/cm |
| Total hardness (as CaCO ₃) | 52 | mg/L |
| Alkalinity | 38 | mg/L |
| Sodium | 7.0 | mg/L |
| Potassium | 2.6 | mg/L |
| Calcium | 14 | mg/L |
| Magnesium | 4.3 | mg/L |

N.D.: Not Detected

sampling date: August 30, 2006

付属資料－ 3

試験液の調製

試験液の調製

1. 準備

① 被験物質原液の調製

| | | | |
|------|-------|----------------|------|
| 採取量 | ----> | 51 | mg |
| 溶媒 | ----> | N,N-ジメチルホルムアミド | |
| 最終容量 | ----> | 10 | mL |
| 容器 | ----> | メソトル | |
| 濃度 | ----> | 5100 | mg/L |
| 混合方式 | ----> | 手で転倒攪拌(溶解容易) | |

② 助剤原液の調製

| | | | |
|----|-------|-----------------------|--|
| 助剤 | ----> | N,N-ジメチルホルムアミドをそのまま使用 | |
|----|-------|-----------------------|--|

2. 試験液の調製

①, ②の各原液を下記の表の通り採取し, 希釈水で希釈して試験液とする。
対照区は希釈水のみとする。

| | | | |
|------|-------|--|---|
| 希釈水 | ----> | 十分暴気し $20 \pm 1^\circ\text{C}$ にした脱塩素水道水 | |
| 最終容量 | ----> | 1.00 | L |
| 容器 | ----> | メスフラスコ | |
| 混合方式 | ----> | スターラーで攪拌しながら添加, 添加後1分攪拌 | |

(以下の濃度表示は, 最小桁数に合わせている)

| 設定試験濃度 mg/L | 区No. (略称) | ①原液 mL | ②助剤原液 mL | 助剤濃度 $\mu\text{L/L}$ |
|----------------|--------------|-----------|-------------|-------------------------|
| 対照区 | C | 0 | 0 | 0 |
| 助剤対照区 | SC | 0 | 0.100 | 100 |
| 0.510 | Conc.1 | 0.100 | 0 | 100 |

付属資料－ 4

試験液の分析

1 高速液体クロマトグラフィー質量分析 (LC/MS) 測定条件

(装置)

高速液体クロマトグラフ質量分析計 Agilent 1100 型 No.4
 ワークステーション: Agilent 1100 シリーズ[®] (Windows XP)
 高速液体クロマトグラフ (HPLC) : Agilent Technologies 1100 型
 デガッサ: G 1 3 7 9 A 型
 送液ポンプ: G 1 3 1 2 A 型 (ハイパソ[®])
 オートサンプラ: G 1 3 1 3 A 型
 カラムオープン: G 1 3 1 6 A 型
 質量選択検出器 (MSD) : G 1 9 5 6 B 型

(条件)

[HPLC 条件]

カラム: GL Sciences 製 Inertsil ODS-3V 5 μ m 3.0mm i.d. \times 250mm
 カラムオープン: 40 $^{\circ}$ C
 溶離液: A 液 20mM キ⁺酸アンモニウム水*溶液: キ⁺酸 (1000:1)
 B 液 メタノール
 A 液 10%, B 液 90%
 試料注入量: 5 μ L
 流速: 0.4 mL/min

*: JIS K 0557 A4 グレードの水

[MSD 条件]

Ionization: Electrospray
 Nebulizer: N₂ (35psi)
 Drying gas: N₂ (12L/min, 350 $^{\circ}$ C)
 Mode: Negative
 Fragmentor: 150V

SIM (Selected Ion Monitoring) 条件:

Quant ion m/z 255.50

2 検量線

テトラヒドロフランを用い、1000 mg/Lの標準液を調製した後、これをメタノールで希釈し、0, 0.05～0.50 mg/Lの標準溶液を調製した。標準溶液の分析を以下のように行った。なお、本試験に必要な定量範囲は極めて低濃度であり、標準溶液 0 mg/Lにおいてもブランクピークが認められた。したがって、各標準溶液のピーク面積からこのブランクピークの面積を差し引き、それぞれのピーク面積 (count) を縦軸に、濃度 (mg/L) を横軸にとり、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、0.9997と良好であった。作成した検量線をFigure A-4-1に示す。

標準溶液 0.75 mL 採取
| ←脱塩素水道水 0.75 mL 添加
混合
|
LC/MS測定

3 検出限界

分析毎に測定するブランクピーク面積を差し引いたピーク面積として 1000 countに設定し、これに相当する試験液中の被験物質濃度0.03 mg/Lを検出限界とした。なお、ブランクピークについては、目視により可能な限り検出した。

4 試験液の分析方法

- 1) 試験液を以下のように分析した。代表的なクロマトグラムを Figure A-4-2 (3), (4), (7), (8)に示す。

分析試料
| ←メタノール 0.75 mL 添加
混合
|
LC/MS測定

2) 標準溶液を「2 検量線」と同様に分析した。代表的なクロマトグラムを Figure A-4-2 (1), (2), (5), (6)に示す。

3) 各分析時に測定した標準溶液 0 mg/Lのピークをブランクピークとし、試験液および標準溶液のピーク面積からブランクピーク的面積を差し引いた。差し引いたそれぞれのピーク面積を用いて、一点検量法により各試験液の被験物質濃度を定量した。

5 添加回収試験

分析前処理は「4 試験液の分析方法」に示したように、試験液とメタノールを混合する操作だけであるので、添加回収試験の必要はなかった。したがって、回収率の補正は行わなかった。

Figure A-4-1 Calibration curve

| No. | Concentration (mg/L) | a | b* |
|-----|----------------------|-------------------|------------------------------------|
| | | Peak Area (count) | Peak Area - BL (STD 0mg/L) (count) |
| 1 | 0.00 | 339 | 0 |
| 2 | 0.05 | 2078 | 1739 |
| 3 | 0.10 | 3942 | 3603 |
| 4 | 0.20 | 7858 | 7519 |
| 5 | 0.50 | 19746 | 19407 |

*: b = a - 339

$Y = 38,527X$
 $r = 0.9997$

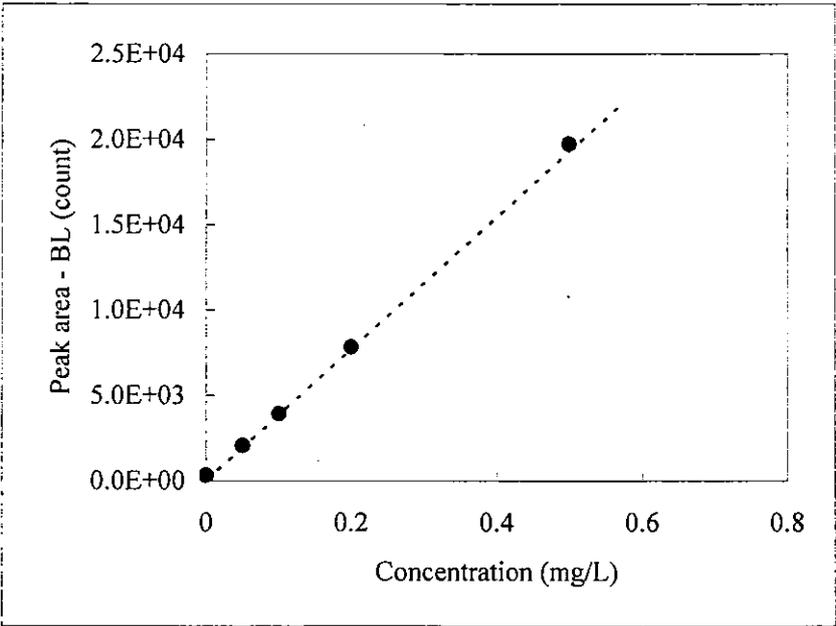
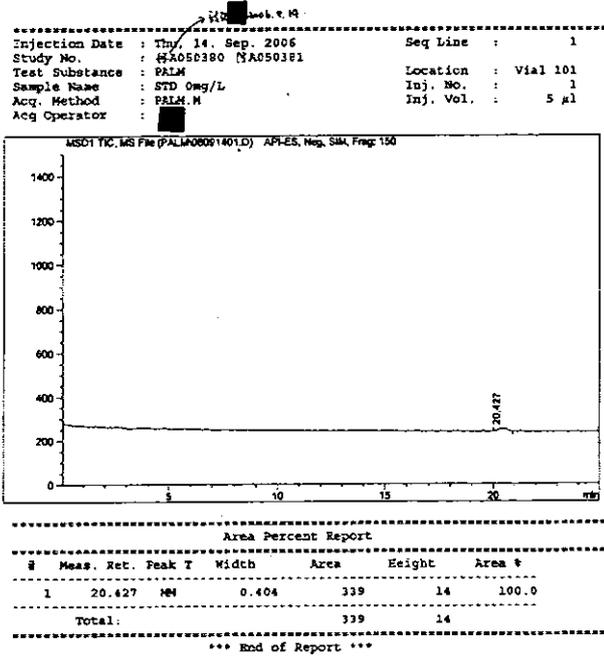


Figure A-4-2 Representative chromatograms

(1) Standard 0 mg/L ; Day 0



(2) Standard 0.50 mg/L ; Day 0

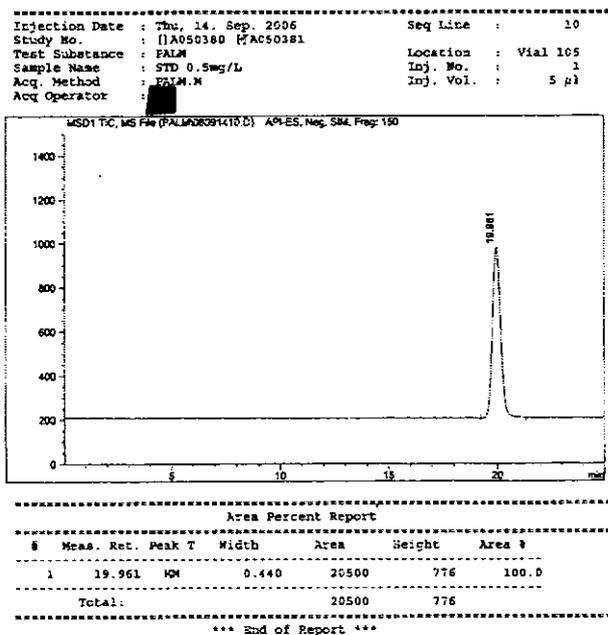


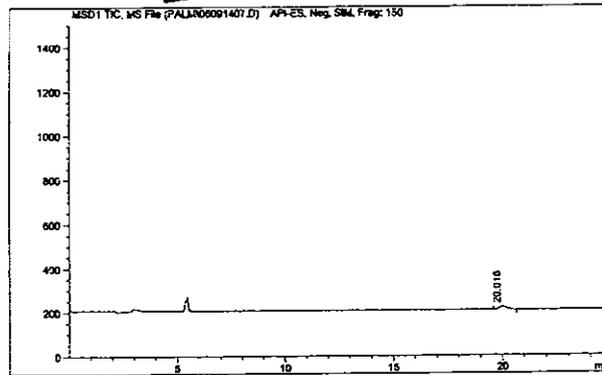
Figure A-4-2 Continued

(3) Solvent Control ; Day 0

```

-----
Injection Date : Thu, 14, Sep, 2006      Seq Line :      7
Study No.      : IJA050380 WJA050381
Test Substance : PALM                    Location  : Vial 112
Sample Name    : DAP0dSC                Inj. No.  :      1
Acq. Method    : PALM.M                 Inj. Vol.  :      5 µl
Acq Operator   : ██████████

```



```

-----
Area Percent Report
-----
#  Meas. Ret. Peak T  Width  Area  Height  Area %
-----
1  20.016  MM      0.386  106     13     100.0
-----
Total:                106     13
-----
*** End of Report ***

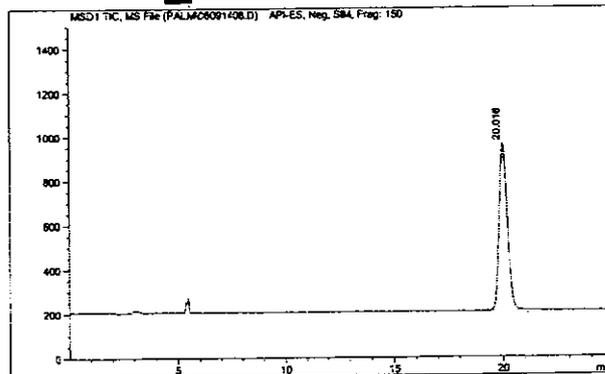
```

(4) 0.510 mg/L nominal ; Day 0

```

-----
Injection Date : Thu, 14, Sep, 2006      Seq Line :      8
Study No.      : IJA050380 WJA050381
Test Substance : PALM                    Location  : Vial 113
Sample Name    : DAP0dC1                Inj. No.  :      1
Acq. Method    : PALM.M                 Inj. Vol.  :      5 µl
Acq Operator   : ██████████

```



```

-----
Area Percent Report
-----
#  Meas. Ret. Peak T  Width  Area  Height  Area %
-----
1  20.016  MM      0.436  19719  754     100.0
-----
Total:                19719  754
-----
*** End of Report ***

```

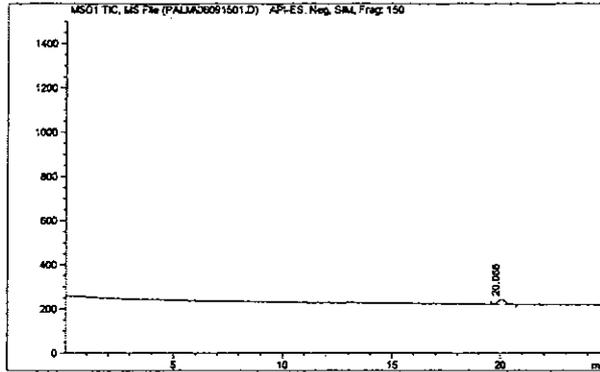
Figure A-4-2 Continued

(5) Standard 0 mg/L ; Day 1

```

-----
Injection Date : Fri, 15. Sep. 2006          Seq Line : 1
Study No.      : [JA050380 MA050381
Test Substance : PALM                        Location  : Vial 101
Sample Name    : STD 0mg/L                  Inj. No.  : 1
Acq. Method   : PALM.M                     Inj. Vol.  : 5 µl
Acq Operator   : ██████████

```



```

-----
                          Area Percent Report
-----
# Meas. Ret. Peak T Width Area Height Area %
-----
1 20.056 MM 0.408 568 23 100.0
-----
Total: 568 23
-----
*** End of Report ***

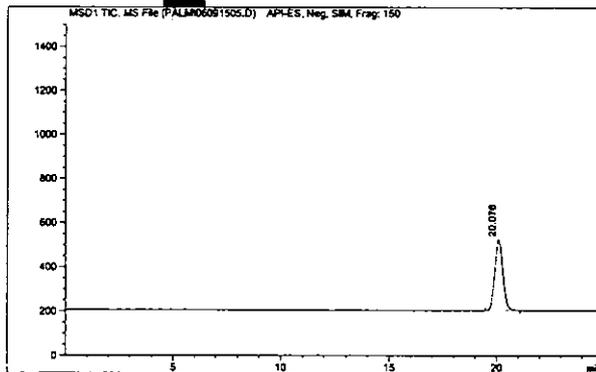
```

(6) Standard 0.20 mg/L ; Day 1

```

-----
Injection Date : Fri, 15. Sep. 2006          Seq Line : 5
Study No.      : [JA050380 MA050381
Test Substance : PALM                        Location  : Vial 105
Sample Name    : STD 0.2mg/L               Inj. No.  : 1
Acq. Method   : PALM.M                     Inj. Vol.  : 5 µl
Acq Operator   : ██████████

```



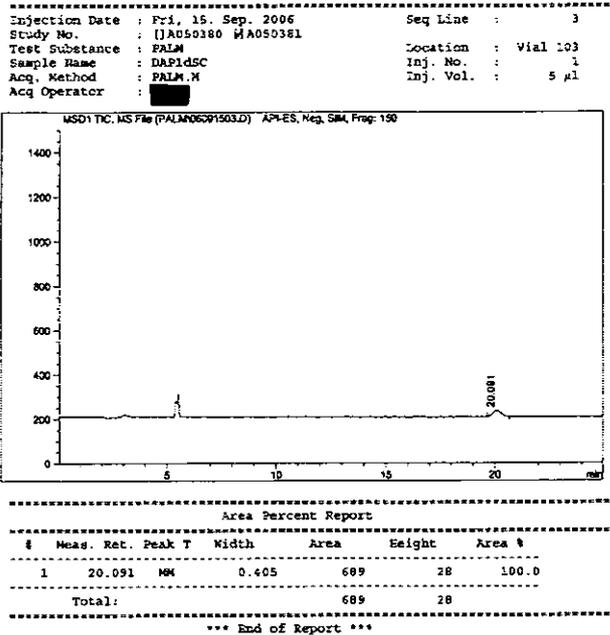
```

-----
                          Area Percent Report
-----
# Meas. Ret. Peak T Width Area Height Area %
-----
1 20.076 MM 0.441 8513 322 100.0
-----
Total: 8513 322
-----
*** End of Report ***

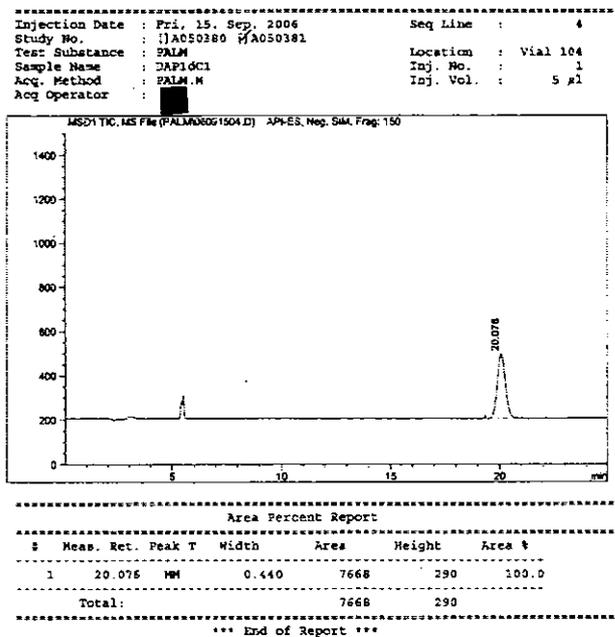
```

Figure A-4-2 Continued

(7) Solvent Control ; Day 1



(8) 0.510 mg/L nominal ; Day 0



付属資料－5

ミジンコの観察結果

Appendix 5-1 Result of reproduction test

Test chemical: PALM

(Untreated control)

| Rep. No. | Counts | Time | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | Total |
|----------|---------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|-------|
| | | 9/15 1 d | 9/16 2 d | 9/17 3 d | 9/18 4 d | 9/19 5 d | 9/20 6 d | 9/21 7 d | 9/22 8 d | 9/23 9 d | 9/24 10 d | 9/25 11 d | 9/26 12 d | 9/27 13 d | 9/28 14 d | 9/29 15 d | 9/30 16 d | 10/1 17 d | 10/2 18 d | 10/3 19 d | 10/4 20 d | 10/5 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 | 9 | 0 | 0 | 21 | 0 | 0 | 0 | 29 | 0 | 0 | 32 | 0 | 0 | 20 | |
| | Cumulative reproductivity | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 9 | 9 | 9 | 30 | 30 | 30 | 30 | 59 | 59 | 59 | 91 | 91 | 91 | 111 | 111 |
| 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 | 3 | 0 | 0 | 27 | 0 | 0 | 0 | 32 | 0 | 0 | 28 | 0 | 0 | 19 | |
| | Cumulative reproductivity | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 3 | 3 | 30 | 30 | 30 | 30 | 62 | 62 | 62 | 90 | 90 | 90 | 109 | 109 |
| 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 | 8 | 0 | 0 | 26 | 1 | 0 | 0 | 33 | 0 | 0 | 31 | 0 | 0 | 23 | |
| | Cumulative reproductivity | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 8 | 8 | 8 | 34 | 35 | 35 | 35 | 68 | 68 | 68 | 99 | 99 | 99 | 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 | 1 | |
| | F1 generation Live | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 6 | 0 | 0 | 2 | 26 | 0 | 0 | 29 | 0 | 0 | 22 | 0 | 0 | 23 | |
| | Cumulative reproductivity | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 6 | 6 | 6 | 8 | 34 | 34 | 34 | 63 | 63 | 63 | 85 | 85 | 85 | 108 | 108 |
| 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 | 6 | 0 | 0 | 27 | 0 | 0 | 32 | 0 | 0 | 29 | 2 | 0 | 0 | 25 | |
| | Cumulative reproductivity | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 6 | 6 | 6 | 33 | 33 | 33 | 65 | 65 | 65 | 94 | 96 | 96 | 96 | 121 | 121 |
| 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 | 4 | 0 | 0 | 27 | 0 | 0 | 35 | 0 | 0 | 25 | 0 | 0 | 0 | 25 | |
| | Cumulative reproductivity | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4 | 4 | 4 | 4 | 31 | 31 | 31 | 66 | 66 | 66 | 91 | 91 | 91 | 116 | 116 |
| 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 | 7 | 0 | 0 | 31 | 0 | 0 | 32 | 0 | 0 | 0 | 31 | 0 | 0 | 31 | |
| | Cumulative reproductivity | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 7 | 7 | 7 | 38 | 38 | 38 | 70 | 70 | 70 | 70 | 101 | 101 | 101 | 132 | 132 |
| 8 | 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 | 15 | 0 | 0 | 15 | 0 | 0 | 15 | 20 | 0 | 0 | 27 | 0 | | | |
| | Cumulative reproductivity | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 15 | 15 | 15 | 30 | 30 | 30 | 45 | 65 | 65 | 65 | 92 | 92 | | -- | |
| 9 | P generation Live | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | |
| | F1 generation Live | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 27 | 0 | 0 | 38 | 0 | 0 | 0 | 34 | 0 | 0 | 30 | |
| | Cumulative reproductivity | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 10 | 10 | 10 | 37 | 37 | 37 | 75 | 75 | 75 | 75 | 109 | 109 | 109 | 139 | 139 |
| 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 | 17 | 0 | 0 | 0 | 21 | 0 | 0 | 30 | 0 | 0 | 24 | 0 | 0 | 26 | |
| | Cumulative reproductivity | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 17 | 17 | 17 | 17 | 38 | 38 | 38 | 68 | 68 | 68 | 92 | 92 | 92 | 118 | 118 |

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

Appendix 5-2 Result of reproduction test

Test chemical: PALM

(Solvent control)

| Rep. No. | Counts | Time | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | Total | |
|----------|---------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|-------|-----|
| | | 9/15 1 d | 9/16 2 d | 9/17 3 d | 9/18 4 d | 9/19 5 d | 9/20 6 d | 9/21 7 d | 9/22 8 d | 9/23 9 d | 9/24 10 d | 9/25 11 d | 9/26 12 d | 9/27 13 d | 9/28 14 d | 9/29 15 d | 9/30 16 d | 10/1 17 d | 10/2 18 d | 10/3 19 d | 10/4 20 d | 10/5 21 d | | |
| 1 | P generation | Live | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | | |
| | F1 generation | Live | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 28 | 0 | 0 | 37 | 0 | 0 | 27 | 0 | 0 | 27 | | |
| | Cumulative reproductivity | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 10 | 10 | 10 | 38 | 38 | 38 | 75 | 75 | 75 | 102 | 102 | 102 | 129 | 129 | |
| 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 | 11 | 0 | 0 | 26 | 0 | 0 | 35 | 0 | 0 | 29 | 0 | 0 | 26 | | |
| | Cumulative reproductivity | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 11 | 11 | 11 | 37 | 37 | 37 | 72 | 72 | 72 | 101 | 101 | 101 | 127 | 127 | |
| 3 | 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 | 8 | 0 | 0 | 23 | 2 | 0 | 0 | 31 | 0 | 0 | 28 | 0 | 0 | 17 | |
| | Cumulative reproductivity | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 8 | 8 | 8 | 31 | 33 | 33 | 64 | 64 | 64 | 92 | 92 | 92 | 109 | 109 | |
| 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 | 7 | 0 | 0 | 15 | 13 | 0 | 0 | 28 | 0 | 0 | 25 | 0 | 0 | 22 | |
| | Cumulative reproductivity | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 7 | 7 | 7 | 22 | 35 | 35 | 35 | 63 | 63 | 63 | 88 | 88 | 88 | 110 | 110 |
| 5 | 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 | 15 | 0 | 0 | 0 | 25 | 0 | 0 | 25 | 0 | 0 | 23 | 0 | 0 | 5 | |
| | Cumulative reproductivity | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 15 | 15 | 15 | 15 | 40 | 40 | 40 | 65 | 65 | 65 | 88 | 88 | 88 | 93 | -- |
| 6 | 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 | 7 | 3 | 0 | 0 | 27 | 0 | 0 | 34 | 0 | 0 | 25 | 0 | 0 | 23 | |
| | Cumulative reproductivity | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 7 | 10 | 10 | 10 | 37 | 37 | 37 | 71 | 71 | 71 | 96 | 96 | 96 | 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 | | |
| | F1 generation | Live | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 8 | 0 | 0 | 0 | 27 | 0 | 0 | 38 | 0 | 0 | 28 | 0 | 0 | 27 | |
| | Cumulative reproductivity | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 8 | 8 | 8 | 8 | 35 | 35 | 35 | 73 | 73 | 73 | 101 | 101 | 101 | 128 | 128 |
| 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 | 4 | 0 | 0 | 33 | 0 | 0 | 0 | 31 | 0 | 0 | 33 | 0 | 0 | 24 | |
| | Cumulative reproductivity | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4 | 4 | 4 | 37 | 37 | 37 | 37 | 68 | 68 | 68 | 101 | 101 | 101 | 125 | 125 |
| 9 | 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 | 4 | 0 | 0 | 0 | 23 | 0 | 0 | 33 | 0 | 0 | 27 | 0 | 0 | 26 | |
| | Cumulative reproductivity | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4 | 4 | 4 | 4 | 27 | 27 | 27 | 60 | 60 | 60 | 87 | 87 | 87 | 113 | 113 |
| 10 | 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 | 6 | 0 | 0 | 22 | 0 | 0 | 32 | 0 | 0 | 0 | 28 | 0 | 0 | 30 | |
| | Cumulative reproductivity | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 6 | 6 | 6 | 28 | 28 | 28 | 60 | 60 | 60 | 60 | 88 | 88 | 88 | 118 | 118 |

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

Appendix 5-3 Result of reproduction test

Test chemical: PALM

(Concentration 1)

| Rep. No. | Counts | Time | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | Total | |
|----------|---------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|-------|--------------|
| | | 9/15 1 d | 9/16 2 d | 9/17 3 d | 9/18 4 d | 9/19 5 d | 9/20 6 d | 9/21 7 d | 9/22 8 d | 9/23 9 d | 9/24 10 d | 9/25 11 d | 9/26 12 d | 9/27 13 d | 9/28 14 d | 9/29 15 d | 9/30 16 d | 10/1 17 d | 10/2 18 d | 10/3 19 d | 10/4 20 d | | 10/5 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 | 21 |
| | F1 generation | Live | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 18 | 0 | 0 | 19 | 0 | 0 | 26 | 0 | 0 | 29 | 0 | 0 | 26 | 118 |
| | Cumulative reproductivity | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 18 | 18 | 18 | 37 | 37 | 37 | 63 | 63 | 63 | 92 | 92 | 92 | 118 | 118 |
| 2 | P generation | Live | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 21 |
| | F1 generation | Live | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 16 | 0 | 0 | 26 | 1 | 0 | 0 | 34 | 0 | 0 | 38 | 0 | 0 | 29 | 144 |
| | Cumulative reproductivity | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 16 | 16 | 16 | 42 | 43 | 43 | 43 | 77 | 77 | 77 | 115 | 115 | 115 | 144 | 144 |
| 3 | P generation | Live | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 21 |
| | F1 generation | Live | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 19 | 0 | 0 | 24 | 0 | 0 | 32 | 0 | 0 | 30 | 5 | 0 | 0 | 31 | 141 |
| | Cumulative reproductivity | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 19 | 19 | 19 | 43 | 43 | 43 | 75 | 75 | 75 | 105 | 110 | 110 | 110 | 141 | 141 |
| 4 | P generation | Live | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 21 |
| | F1 generation | Live | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 21 | 1 | 0 | 0 | 36 | 0 | 0 | 27 | 0 | 0 | 27 | 0 | 0 | 1 | 113 |
| | Cumulative reproductivity | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 21 | 22 | 22 | 22 | 58 | 58 | 58 | 85 | 85 | 85 | 112 | 112 | 112 | 113 | -- |
| 5 | P generation | Live | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 21 |
| | F1 generation | Live | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 19 | 0 | 0 | 27 | 0 | 0 | 29 | 0 | 0 | 0 | 30 | 0 | 0 | 31 | 136 |
| | Cumulative reproductivity | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 19 | 19 | 19 | 46 | 46 | 46 | 75 | 75 | 75 | 75 | 105 | 105 | 105 | 136 | 136 |
| 6 | P generation | Live | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 21 |
| | F1 generation | Live | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 18 | 0 | 0 | 22 | 1 | 0 | 0 | 27 | 0 | 0 | 25 | 0 | 0 | 24 | 117 |
| | Cumulative reproductivity | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 18 | 18 | 18 | 40 | 41 | 41 | 41 | 68 | 68 | 68 | 93 | 93 | 93 | 117 | 117 |
| 7 | P generation | Live | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 21 |
| | F1 generation | Live | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 15 | 0 | 0 | 20 | 2 | 0 | 0 | 28 | 0 | 0 | 22 | 0 | 0 | 22 | 109 |
| | Cumulative reproductivity | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 15 | 15 | 15 | 35 | 37 | 37 | 37 | 65 | 65 | 65 | 87 | 87 | 87 | 109 | 109 |
| 8 | P generation | Live | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 21 |
| | F1 generation | Live | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 14 | 0 | 0 | 35 | 0 | 0 | 35 | 0 | 0 | 33 | 0 | 0 | 0 | 29 | 146 |
| | Cumulative reproductivity | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 14 | 14 | 14 | 49 | 49 | 49 | 84 | 84 | 84 | 117 | 117 | 117 | 117 | 146 | 146 |
| 9 | P generation | Live | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 21 |
| | F1 generation | Live | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 10 | 8 | 0 | 0 | 23 | 0 | 0 | 29 | 0 | 0 | 26 | 0 | 0 | 25 | 121 |
| | Cumulative reproductivity | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 10 | 18 | 18 | 18 | 41 | 41 | 41 | 70 | 70 | 70 | 96 | 96 | 96 | 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 | 21 |
| | F1 generation | Live | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 20 | 0 | 0 | 20 | 0 | 0 | 28 | 0 | 0 | 33 | 0 | 0 | 25 | 126 |
| | Cumulative reproductivity | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 20 | 20 | 20 | 40 | 40 | 40 | 68 | 68 | 68 | 101 | 101 | 101 | 126 | 126 |

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

付属資料一 6

結果の算出

Table A-6-1 Calculation of the NOEC, LOEC (21days)

| Input Data Table | | |
|------------------|--------------------------------|--------------------|
| No. | Solvent Control (Group1) | Conc.1 (Group2) |
| 1 | 129 | 118 |
| 2 | 127 | 144 |
| 3 | 109 | 141 |
| 4 | 110 | * |
| 5 | * | 136 |
| 6 | 119 | 117 |
| 7 | 128 | 109 |
| 8 | 125 | 146 |
| 9 | 113 | 121 |
| 10 | 118 | 126 |

| Group | Samples | Mean | S.E. | S.D. | Variance |
|-------|---------|----------|--------|---------|----------|
| 1 | 9 | 119.7778 | 2.6182 | 7.8546 | 61.6944 |
| 2 | 9 | 128.6667 | 4.4783 | 13.4350 | 180.5000 |

| Method | vs | Side | Stat. | 0.0500 | 0.0100 | 0.001 Prob. |
|--------------------|--------|------|-------|--------|---------|-----------------------|
| F test | 1 vs 2 | | 0 | 2.9257 | <3.4381 | 6.0289 12.0455 0.0750 |
| Student test | 1 vs 2 | | 2 | 1.7135 | <2.1199 | 2.9208 4.0150 0.1059 |
| Aspin-Welch t test | 1 vs 2 | | 2 | 1.7135 | 2.1621 | 3.0163 4.2300 0.1123 |