

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

修正番号：01

## 試験報告書修正書

試験委託者：環境省

表題：ジメチルホルムアミドのオオミジンコ (*Daphnia magna*) に対する  
繁殖阻害試験

試験番号：5B481G

### 修正内容

修正箇所：9頁 1.1 名称，構造式および物理化学的性状（名称が記載されていない）

### 理由

名称の記載不足

---

試験実施施設：株式会社三菱化学安全科学研究所 横浜研究所

2002年 3月 8日 作成 試験責任者

(2002年 3月 8日 交替)

2002年 3月 8日 確認 信頼性保証業務担当者

2002年 3月 8日 承認 運営管理者

環境庁殿

## 試 験 報 告 書

ジメチルホルムアミドのオオミジンコ (*Daphnia magna*)に対する繁殖阻害試験

(試験番号：5 B 4 8 1 G)

1996年3月29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： ジメチルホルムアミドのオオミジンコ (*Daphnia magna*) に対する繁殖  
阻害試験

試験番号： 5 B 4 8 1 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。

1 9 9 6 年 3 月 2 9 日

運営管理者

[Redacted Signature]

[Redacted Stamp]

## 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： ジメチルホルムアミドのオオミジンコ (*Daphnia magna*)に対する繁殖  
阻害試験

試験番号： 5 B 4 8 1 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	1996年 1月31日	1996年 1月31日
	1996年 2月21日	1996年 2月21日
試験報告書監査	1996年 3月29日	1996年 3月29日

1996年 3月29日

信頼性保証担当者：

## 試験実施概要

1. 表題： ジメチルホルムアミドのオオミジンコ (*Daphnia magna*) に対する繁殖阻害試験
2. 試験目的： ジメチルホルムアミドについて、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: ErC 50) を求める。
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. 202 「ミジンコ類、急性遊泳阻害試験および繁殖試験」 (1984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 東京都千代田区霞ヶ関一丁目2-2  
委託担当者： 環境庁企画調整局環境保健部環境安全課保健専門官 
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 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 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]

(1996年3月29日)

試験担当者

[REDACTED]

[REDACTED]

(1996年3月29日)

[REDACTED]

[REDACTED]

(1996年3月29日)

[REDACTED]

[REDACTED]

(1996年3月29日)

分析担当者

[REDACTED]

[REDACTED]

(1996年3月29日)

9. 試験期間： 試験開始日

1995年10月23日

試験終了日

1996年 3月29日

暴露期間

1996年 1月31日～1996年 2月21日

10. 保管：

試験計画書，生データ，記録文書，試験報告書および被験物質は，試験報告書作成後10年間，株式会社三菱化学安全科学研究所 横浜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	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	13
4.1 親ミジンコの半数致死濃度 (LC50) の算出	13
4.2 50%繁殖阻害濃度 (ErC50) の算出	13
4.3 最大無作用濃度 (NOECr) および最小作用濃度 (LOECr)	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 (ErC50)	16
5.6 累積産仔数に及ぼす最大無作用濃度 (NOECr) および最小作用濃度 (LOECr)	17
5.7 試験液の水温, 溶存酸素濃度および pH	17
Table 1~10	18~27
Figure 1, 2	20, 22
付属資料-1 希釈水の水質	28~29
付属資料-2 試験液の分析方法	30~36
付属資料-3 ミジンコの観察結果	37~42

## 要 旨

### 試験委託者

環境庁

### 表 題

ジメチルホルムアミドのオオミジンコ (*Daphnia magna*) に対する繁殖阻害試験

### 試験番号

5 B 4 8.1 G

### 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、急性遊泳阻害試験および繁殖試験」 (1984年) に準拠して実施した。

- 1) 被験物質： ジメチルホルムアミド
- 2) 暴露方式： 半止水式 (週に3回、試験液の全量を交換)
- 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, 100, 320, 1000 mg/L (公比 3.2 )
- 6) 試験液量： 800 mL
- 7) 連数： 4 容器/濃度区
- 8) 供試生物数： 40頭/濃度区 (1 連に付き10頭で1 濃度区40頭)
- 9) 試験温度： 20±1℃
- 10) 照明： 16時間明/8時間暗
- 11) 被験物質の分析： GC法



## 結 果

### 1) 試験液中の被験物質濃度

暴露期間中に測定した試験液の調製時および換水前の被験物質実測濃度が、全て設定値の±20%以内であったので、各影響濃度の算出には設定値を採用した。

2) 21 日間の親ミジンコの半数致死濃度 (LC50): >1000 mg/L

3) 21 日間の 50% 繁殖阻害濃度 (ErC50): >1000 mg/L

4) 21 日間の最大無作用濃度 (NOECr): >1000 mg/L

5) 21 日間の最小作用濃度 (LOECr): >1000 mg/L

## 1 被験物質

### 1.1 名称, 構造式および物理化学的性状

構造式:  $\text{HCON}(\text{CH}_3)_2$   
分子式:  $\text{C}_3\text{H}_7\text{NO}$   
分子量\*1: 73.09  
log Pow\*2: -0.87~-0.59  
水への溶解度\*2: 可溶  
蒸気圧\*2: 3.7 mmHg (25 °C), 2.7 mmHg (20 °C)  
密度\*1: 0.948 g/mL (20 °C)  
融点\*2: -61 °C  
沸点\*2: 153 °C

\*1: 供給者提供資料

\*2: 環境化学物質要覧—環境庁環境化学物質研究会編, 丸善 (昭和63年)

### 1.2 供試試料

純度\*1: 100.0 %  
ロット番号\*1: SKJ4874  
供給者: XXXXXXXXXX  
供給量\*1: 500 mL  
入手日: 1995年10月9日  
外観\*1: 無色澄明液体  
水溶状\*1: 澄明  
エタノール溶状\*1: 澄明  
水分\*1: 0.09 %  
不揮発物\*1: 0.005 %以下

\*1: 供給者提供資料

## 1 被験物質

## 1.1 名称，構造式および物理化学的性状

名称： ジメチルホルムアミド  
構造式：  $\text{HCON}(\text{CH}_3)_2$   
分子式：  $\text{C}_3\text{H}_7\text{NO}$   
分子量\*1： 73.09  
log Pow\*2： -0.87~-0.59  
水への溶解度\*2： 可溶  
蒸気圧\*2： 3.7 mmHg (25℃)， 2.7 mmHg (20℃)  
密度\*1： 0.948 g/mL (20℃)  
融点\*2： -61℃  
沸点\*2： 153℃

\*1:供給者提供資料

\*2:環境化学物質要覧－環境庁環境化学物質研究会編，丸善（昭和63年）

## 1.2 供試試料

純度\*1： 100.0 %  
ロット番号\*1： SKI4874  
供給者： XXXXXXXXXX  
供給量\*1： 500 mL  
入手日： 1995年10月9日  
外観\*1： 無色澄明液体  
水溶状\*1： 澄明  
エタノール溶状\*1： 澄明  
水分\*1： 0.09 %  
不揮発物\*1： 0.005 %以下

\*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。

入手した被験物質について赤外吸収スペクトルを測定し、被験物質の構造と矛盾が認められないことを確認した。試験終了時にも同様に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無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

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、1995年7月18日に国立環境研究所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）による48時間の半数遊泳阻害濃度 (EiC50) は 0.14 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

継代中のものから幼体を抱えた肉眼的に健康かつ十分な大きさの雌成体を選別し、別に用意したビーカーに移し、翌日、産出された幼体を別のビーカーに分けた。この幼体を供試ミジンコの親とし、以下の条件で4週間飼育した。成熟し幼体を産むようになったら1週間に2回幼体を除去した。暴露開始前日に、その前2週間の死亡率が5%以下で休眠卵や雄が発生しなかったバッチから、育苗内に幼体を持つ雌成体を選別し、翌日（24時間以内）産出された幼体を試験に用いた。

1) 飼育水: 希釈水 (3.2参照)

2) 飼育密度: 幼体時 100 頭/3L 飼育水

成熟個体 50 頭/3L 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: *Chlorella vulgaris*

6) 給餌量: ミジンコ1頭当たり 0.1~0.2 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(3回/週 試験液を全量交換)
- 2) 暴露期間： 21 日間
- 3) 試験液量： 800 mL (溶存酸素濃度を確保するため、試験液量を増やした。)
- 4) 連数： 4 容器/濃度区
- 5) 供試生物数： 40 頭/濃度区 (1 連につき 10 頭で 1 濃度区 40 頭)
- 6) 試験温度：  $20 \pm 1^{\circ}\text{C}$
- 7) 照明： 室内光, 16 時間明/8 時間暗
- 8) 餌： *Chlorella vulgaris*
- 9) 給餌量： ミジンコ 1 頭当たり 0.1~0.2 mgC (有機炭素含量) / 日

#### 3.2 希釈水

脱塩素水 (横浜市水道水を活性炭処理し、残留塩素等を除去した後、充分通気したもの) を使用した。希釈水の硬度は 50 mg/L ( $\text{CaCO}_3$ 換算), pH は 7.9 であった。

[付属資料-1]

#### 3.3 試験容器および恒温槽等

- 1) 試験容器： 1 L 容ガラスビーカー
- 2) 恒温槽： PVC 製水槽 (恒温装置 TAITEC 製 COOLNIT CL-80F 型)
- 3) 水温計： 横河電機製 2455 02 型
- 4) pH 計： 東亜電波工業製 HM-40V 型
- 5) 溶存酸素計： 電気化学計器製 DOL-10 型

#### 3.4 試験濃度の設定

オオミジンコに対する48時間急性遊泳阻害濃度(48hr-EiC50値:  $>1000 \text{ mg/L}$ )の結果から、本試験は公比 3.2 で 3 段階を設定した。各濃度区は以下の通りである。

(対照区, 100, 320 および  $1000 \text{ mg/L}$ )

### 3.5 試験液の調製

被験物質を 20000mg 採取し、純水で希釈し 250 mL に定容とし、被験物質濃度 80000 mg/L の原液を調製した。

1.0 L 容のガラスビーカーに希釈水を入れ、上記被験物質原液を各濃度に応じて添加、混合し、被験物質濃度 100, 320 および 1000 mg/L の各試験液を調製した。

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 2 回（調製時および 2 または 3 日後の換水前で 1 回） 5.0 mL ずつ採取し、各試料を直接 GC に注入する方法により分析した。試験液の分析に際しては、試料測定毎に標準液（濃度 500 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

試験液の水温、溶存酸素濃度（D.O.）、pH 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）観察は生存数、遊泳阻害数、育房内に卵を持つ個体数および大きさと状態を対照区と比較し、毎日記録した。計数後の親ミジンコの死亡個体は取り除いた。

（産出幼体） 幼体の生死の数および大きさ、休眠卵の発生等について、換水時に観察し、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。

- ・水温： 全濃度区（但し，各1試験容器）について，換水前後に測定した。
- ・溶存酸素濃度(D.O.)：全ての試験液について，換水前後に測定した。
- ・pH： 全濃度区（但し，各1試験容器）について，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

通常は各濃度区での親ミジンコの死亡数と供試個体数（40頭）から，Probit 法，Moving average 法またはBinomial 法により各暴露期間の半数致死濃度 (LC50)およびその95%信頼限界を算出するが，本試験では21日間の暴露期間中，親ミジンコの死亡数が50%未満であったため，LC50値の算出は不可能であった。

##### 4.2 50%繁殖阻害濃度 (ErC50) の算出

###### 累積産仔数の算出

各試験容器の親1頭当たりの暴露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。

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

ここで，

- n: 幼体観察回数
  - $F_n$ : 暴露開始後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
  - $P_{n-1}$ : 暴露開始後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: 濃度区当たりの連数（試験容器数：4）

#### ErC50 値の算出

各濃度区での累積産仔数と対照区での累積産仔数の比から、各濃度区での累積産仔数に及ぼす阻害率を求めた。通常はその値を用いて、Probit 法により14および21日目の50%繁殖阻害濃度 (ErC50) およびその95%信頼限界を算出するが、本試験では最高濃度区においても阻害率が50%未満であったため、ErC50値の算出は不可能であった。

#### 4.3 最大無作用濃度 (NOECr)および最小作用濃度 (LOECr)

各試験容器毎の親1頭当たりの累積産仔数を算出し、各濃度区と対照区との有意差の有無を Dunnettの多重比較検定 (Yukms 統計ライブラリー I 統計解析編 ver.3.0, 両側検定) 法により求め、対照区と比較して有意差 (5%水準) が認められない最高濃度 (最大無作用濃度: NOECr) および有意差が認められる最低濃度 (最小作用濃度: LOECr) を決定した。



## 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

暴露開始時および16日目の試験液調製時の分析結果を下記に示した。

(設定値 100, 320, 1000 mg/L)

暴露開始時 (設定値に対する割合 98～103 %)

暴露開始16日目 (設定値に対する割合 92～96 %)

また、それらの2または3日後(換水前)の分析結果を下記に示した。

暴露開始2日目 (設定値に対する割合 101～104 %)

暴露開始19日目 (設定値に対する割合 100～101 %)

したがって、全実測濃度が設定値の±20%以内であったので、各濃度の算出には設定値を採用した。

[Table 1 (p.18), 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および死亡率

対照区での親ミジンコの死亡率は暴露終了時で5%であり、試験成立条件である20%以下の基準を満たした。

暴露終了時の親ミジンコの死亡率は100 mg/L 区で10%, 320 mg/L 区で5%, 1000 mg/L 区で10%であった。

[Table 2-1, 2-2 (p.19), Figure 1 (p.20) 付属資料－3]

### 初産日

対照区での親ミジンコの初産日は暴露開始8または9日目であり、試験成立条件である9日以内の基準を満たした。

その他の濃度区における親ミジンコの初産日は、全容器とも暴露開始8日目であった。

[Table 3 (p.21), 付属資料-3]

### 平均累積産仔数

対照区での親ミジンコは全容器とも3腹以上産出し、1頭当たりの平均累積産仔数は46頭であった。試験成立条件である3腹以上を産出し、平均累積産仔数20頭の基準を満たした。

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は、100 mg/L区で44頭、320 mg/L区で45頭、1000 mg/L区で42頭であった。

[Table 4 (p.22), Figure 2 (p.22) 付属資料-3]

### 親ミジンコの大きさと状態

何れの濃度区においても、全暴露期間を通して対照区と比較して親ミジンコの大きさに差は認められなかった。

### 休眠卵の発生等

全暴露期間を通して、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日間の親ミジンコの半数致死濃度 (LC50) は >1000 mg/Lであった。

その他の観察日(1, 2, 4, 7および14日目)の半数致死濃度も、>1000 mg/Lであった。

[Table 5 (p.23)]

## 5.5 50%繁殖阻害濃度 (ErC50)

14日間および21日間の50%繁殖阻害濃度 (ErC50) は、何れも >1000 mg/L であった。

[Table 6 (p.23)]

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

親ミジンコ 1 頭あ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 >1000 mg/L で、最小作用濃度 (LOECr) も >1000 mg/L であった。

[Table 7 (p.24) ]

#### 5.7 試験液の水溫、溶存酸素濃度および pH

21 日間の暴露期間中の水溫は 19.8~20.7 °C であり、設定範囲内であった。

溶存酸素濃度は 7.9~9.5 mg/L であり、すべての試験水槽で飽和溶存酸素濃度の 60% 以上が維持された (20.0°C 水中の飽和溶存酸素濃度: 8.8 mg/L)。

pH は 7.4~8.3 であり、変動は 1 以下であった。

以上のことから、水溫、溶存酸素濃度および pH は、ミジンコの成育条件として適切な範囲内であったと思われる。

[Table 8 (p.25), Table 9 (p.26), Table 10 (p.27) ]

以 上

Table 1 Measured Concentrations of the Test Substance during a 21-day Exposure of *Daphnia magna* under Semi-Static Test Conditions

Nominal Concentration mg/L	Measured Concentration (mg/L)		Percent of Nominal	
	0 day new	2 day old	0 day new	2 day old
Control	< 12	< 12	----	----
Solvent Control	< 12	< 12	----	----
100	103	104	103	104
320	318	323	99	101
1000	978	1006	98	101

Nominal Concentration mg/L	Measured Concentration (mg/L)		Percent of Nominal	
	16 day new	19 day old	16 day new	19 day old
Control	< 12	< 12	----	----
Solvent Control	< 12	< 12	----	----
100	96	101	96	101
320	296	319	93	100
1000	921	999	92	100

new: freshly prepared test solution

old: test solutions 2days or 3days after freshly prepared

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

Conc. 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	1	1	1	1	1	1	1	2
100	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	3	4	4
320	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2
1000	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	3	4	4	4

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

Conc. mg/L	Days					
	1	2	4	7	14	21
control	0.0	0.0	0.0	0.0	2.5	5.0
100	0.0	0.0	0.0	2.5	2.5	10.0
320	0.0	2.5	2.5	2.5	2.5	5.0
1000	0.0	0.0	0.0	0.0	5.0	10.0

Figure 1 Cumulative Numbers of Dead Parental *Daphnia*

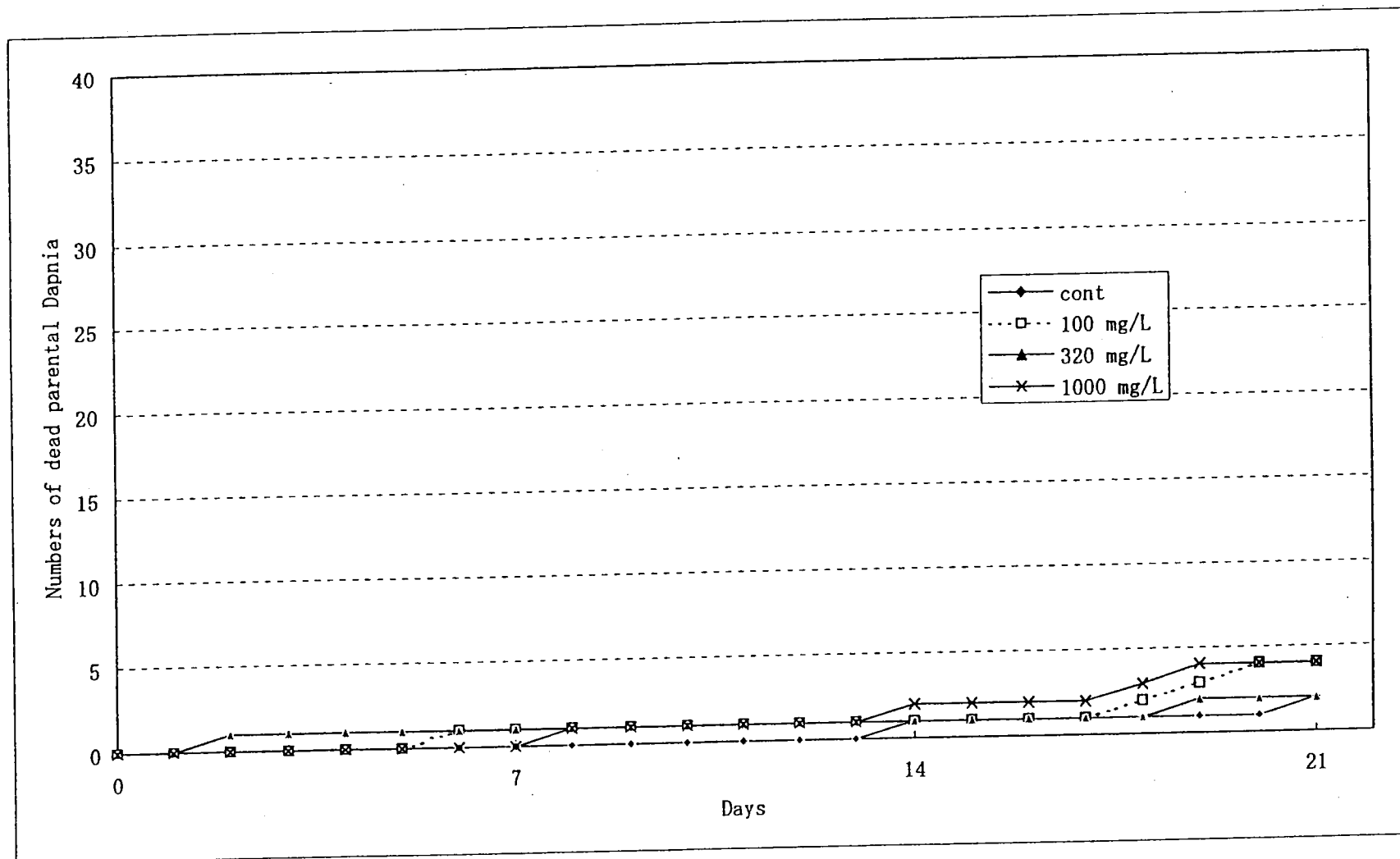


Table 3 Time (day) to First Brood Production

Vessel No.	Concentration(mg/L)			
	Control	100	320	1000
1	8	8	8	8
2	8	8	8	8
3	8	8	8	8
4	9	8	8	8
Mean	8.25	8.00	8.00	8.00

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

Conc. (mg/L)	Days									
	0	2	5	7	9	12	14	16	19	21
cont	0	0	0	0.00	8.03	16.05	22.12	26.78	36.29	45.93
100	0	0	0	0.00	7.60	15.74	21.16	26.60	35.50	44.32
320	0	0	0	0.00	8.89	17.42	23.36	28.01	36.93	44.71
1000	0	0	0	0.00	8.14	13.11	19.92	24.44	33.30	42.19

Figure 2 Mean Cumulative Numbers of Juveniles Produced per Adult ( $\Sigma F1/P$ ) during 21 days

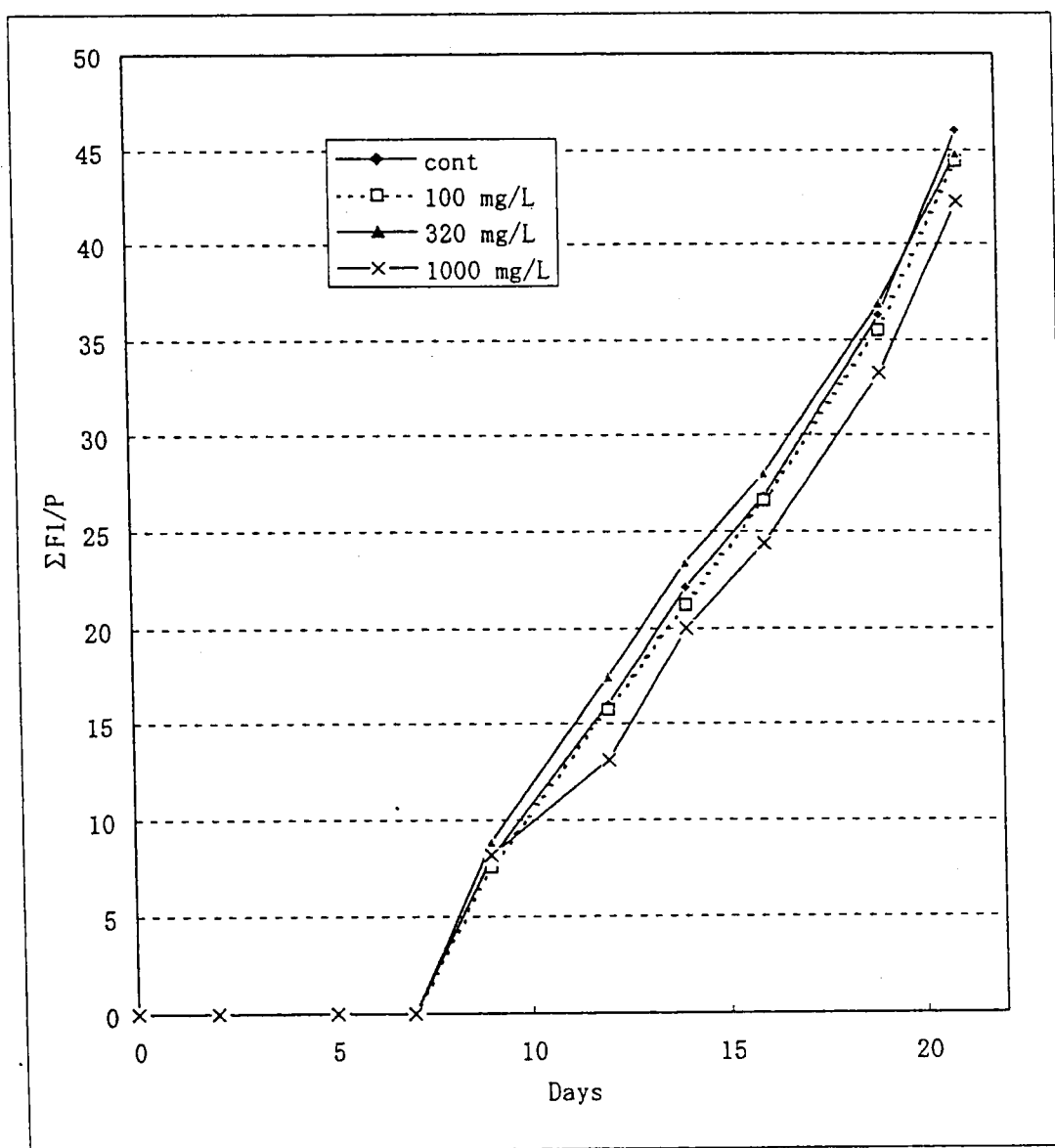




Table 5      Calculated LC50 Values for Parental *Daphnia*

Exposure period (day)	LC50 (mg/L)	95 % Confidence limits (mg/L)	Statistical method
1	> 1000	-	-
2	> 1000	-	-
4	> 1000	-	-
7	> 1000	-	-
14	> 1000	-	-
21	> 1000	-	-

Table 6      Calculated ErC50 Values for Inhibition of Reproduction

Exposure period (day)	ErC50 (mg/L)	95 % Confidence limits (mg/L)	Statistical method
14	> 1000	-	-
21	> 1000	-	-

Table 7      Mean cumulative numbers of juveniles produced per adult in  
control and test vessels after 21 days  
(by Dunnett multiple comparison procedure, Two-sided test)

Vessel No.	Concentration(mg/L)			
	Control	100	320	1000
1	50.69	45.10	45.56	36.72
2	48.30	43.70	46.80	48.15
3	41.71	44.30	37.70	45.70
4	43.00	44.17	48.78	38.20
Mean	45.93	44.32	44.71	42.19
S.D.	4.27	0.58	4.86	5.59
Inhibition rate(%)		3.5	2.6	8.1
Significant difference		-	-	-

\*: 5%, \*\*: 1% Significant Level

Table 8 Temperature Values during a 21-day *Daphnia* Reproduction Inhibition Test (Seemi-Static Test)

		Temperature, °C			
days		Nominal Concentration (mg/L)			
		Control	100	320	1000
0	new	19.8	20.1	20.2	20.1
2	old	20.4	20.3	20.3	20.3
2	new	20.4	20.4	20.0	20.5
5	old	20.3	20.3	20.3	20.3
5	new	20.0	20.3	20.3	20.4
7	old	20.4	20.5	20.4	20.4
7	new	20.0	20.1	20.1	20.2
9	old	20.0	19.9	19.9	19.9
9	new	20.4	20.4	20.4	20.5
12	old	20.0	20.0	20.0	20.0
12	new	20.0	20.0	20.0	20.0
14	old	20.2	20.2	20.2	20.2
14	new	20.5	20.5	20.6	20.7
16	old	20.2	20.2	20.2	20.2
16	new	20.2	20.6	20.5	20.6
19	old	20.0	20.1	20.1	20.1
19	new	20.0	20.4	20.4	20.4
21	old	20.1	20.1	20.1	20.1

new: freshly prepared test solutions

old: test solutions after 2-3 days exposure

Table 9 Dissolved Oxygen Concentration (D.O.) during a 21-day *Daphnia* Reproduction Inhibition Test (Semi-Static Test)

		D. O. (mg/L)			
		Nominal Concentration (mg/L)			
days		Control	100	320	1000
0	new	8.6	8.8	8.7	8.6
2	old	9.1-9.4	9.4-9.5	9.4-9.5	9.2-9.3
2	new	9.0	9.0	8.9	9.0
5	old	8.2-8.4	8.3-8.7	8.3-8.6	8.4-8.6
5	new	8.5	8.5	8.4	8.5
7	old	8.1-8.2	8.2-8.5	8.5-8.6	8.3-8.5
7	new	8.1	8.2	8.2	8.3
9	old	7.9-8.3	8.6-8.8	8.5-8.9	8.6-8.8
9	new	8.2	8.4	8.5	8.3
12	old	8.6-8.8	7.9-9.1	8.7-8.9	8.4-8.8
12	new	8.7	8.7	8.8	8.7
14	old	8.1-8.4	8.4-8.5	8.2-8.5	8.3-8.5
14	new	8.4	8.4	8.4	8.5
16	old	8.4-8.8	8.6-8.9	8.6-8.8	8.4-8.5
16	new	8.6	8.7	8.5	8.6
19	old	8.7-8.9	8.8-9.1	9.0-9.2	8.6-9.0
19	new	8.5	8.6	8.5	8.6
21	old	8.3-8.4	8.2-8.6	8.1-8.6	8.3-8.4

new: freshly prepared test solutions

old: test solutions after 2-3 days exposure

Table 10 pH during a 21-day *Daphnia* Reproduction Inhibition Test  
(Semi-Static Test)

pH		Nominal Concentration (mg/L)			
days		Control	100	320	1000
0	new	8.1	8.1	8.2	8.0
2	old	8.2	8.3	8.3	8.3
2	new	8.1	8.1	8.1	8.1
5	old	7.9	8.0	8.0	8.0
5	new	7.8	7.9	7.9	7.9
7	old	8.0	8.0	8.0	8.0
7	new	8.1	8.1	8.0	8.0
9	old	8.0	8.0	8.0	8.0
9	new	8.0	8.1	8.1	8.1
12	old	8.0	8.1	8.0	8.0
12	new	7.9	8.0	8.0	8.0
14	old	7.7	7.8	7.8	7.8
14	new	7.9	7.9	7.9	7.9
16	old	7.8	7.9	7.4	7.9
16	new	7.9	7.9	8.0	7.9
19	old	7.9	7.9	7.8	7.9
19	new	7.8	7.8	7.9	7.9
21	old	7.8	7.8	7.8	7.8

new: freshly prepared test solutions

old: test solutions after 2-3 days exposure

## 付属資料－ 1

希釈水の水質

# Water Quality of Dilution Water

Parameter	Concentration
COD	<1 mg/L
Total phosphorus	<0.01 mg/L
pH	7.9 (22°C)
Coliform group bacteria	N.D.
Mercury	<0.0001 mg/L
Copper	<0.001 mg/L
Cadmium	<0.001 mg/L
Zinc	0.02 mg/L
Lead	<0.01 mg/L
Aluminium	0.05 mg/L
Nickel	<0.01 mg/L
Chromium	<0.01 mg/L
Manganese	<0.1 mg/L
Tin	<0.1 mg/L
Iron	<0.1 mg/L
Cyanide	<0.001 mg/L
Free chlorine	0.01 mg/L
Bromide ion	<0.1 mg/L
Fluoride	<0.1 mg/L
Sulfide ion	<0.03 mg/L
Ammonium ion	<0.1 mg/L
Arsenic	<0.01 mg/L
Selenium	<0.01 mg/L
Evaporation residue	110 mg/L
Electric conductivity	140 $\mu$ S/cm
Total hardness (as CaCO <sub>3</sub> )	50 mg/L
Alkalinity	40 mg/L
Sodium	6.6 mg/L
Potassium	1.2 mg/L
Calcium	7.8 mg/L
Magnesium	3.6 mg/L

measured date: November 24, 1995

## 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

各分析試料を直接GCに注入する方法により分析した。各試験液の被験物質濃度は標準溶液のピーク面積との比から定量した。

### 2 ガスクロマトグラフィー (GC) 測定条件

#### (装置)

ガスクロマトグラフ:	HEWLETT PACKARD製 5890A SERIES II型
オートサンプラ:	HEWLETT PACKARD製 7673型
検出器:	FID (Flame Ionization Detector)
データ処理装置:	HEWLETT PACKARD製 GC-AED-MS ChemStation

#### (条件)

カラム:	HP FFAP 25mx0.20mmx0.33 $\mu$ m
キャリアガス:	ヘリウム 1.0 mL/min
オーブン温度:	Initial temp. 40°C Initial time 1.0 min Rate 12°C/min Final temp. 140°C Final time 0.7 min
注入口温度:	140°C
検出器温度:	230°C
検出器条件:	水素 30 mL/min 空気 400 mL/min メイクアップガス 窒素 30 mL/min
注入方法:	Split (Split Ratio; 30:1)
注入量:	1.0 $\mu$ L

### 3 検量線

被験物質の10000mg/L 水溶液を調製し、順次、水で希釈し 50, 100, 200, 500, 1000 mg/Lの標準溶液を調製した。この標準溶液を直接GCに注入することにより測定した。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。検量線はほぼ原点を通る直線となり、最小二乗法による直線回帰式の相関係数は1.00000と良好であった。

### 4 定量限界

最小検出ピーク面積を 20 countに設定し、これに相当する試験液中の被験物質濃度 12 mg/Lを定量限界とした。

### 5 添加回収試験

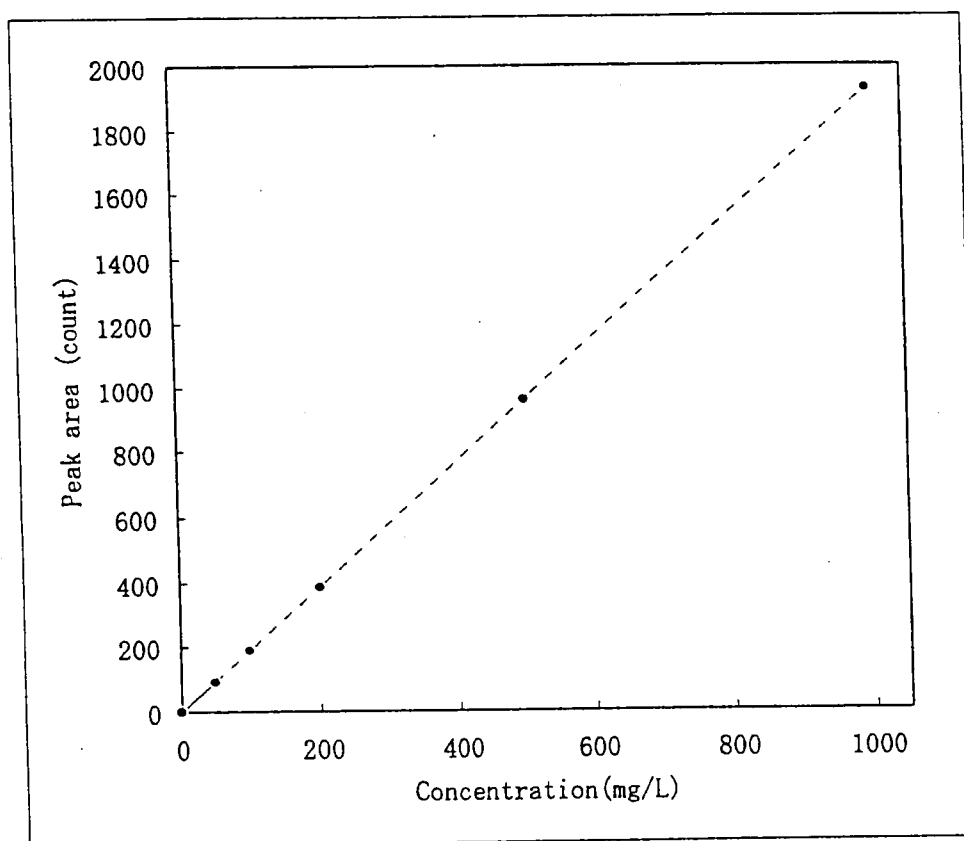
GC直接注入法のため添加回収試験は実施しなかった。

Figure A-2-1 Calibration Curve by HPLC Analysis

Input Data		
No.	Concentration (mg/L)	Peak Area (count)
0	0	0
1	50.0	93.31
2	100.0	189.70
3	200.0	385.80
4	500.0	960.44
5	1000.0	1927.00

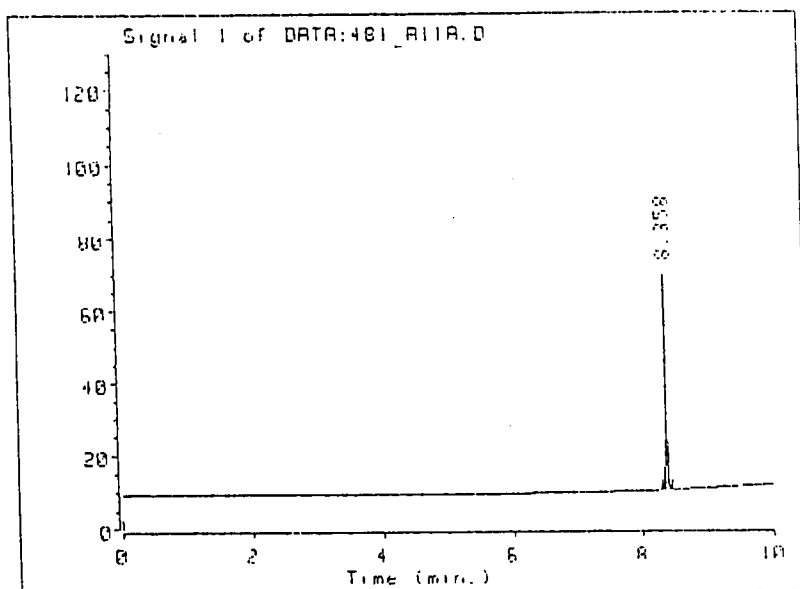
$$Y = -1.779 + 1.928 X$$

$$r = 1.00000$$



# Figure A-2-2 Representative Chromatograms

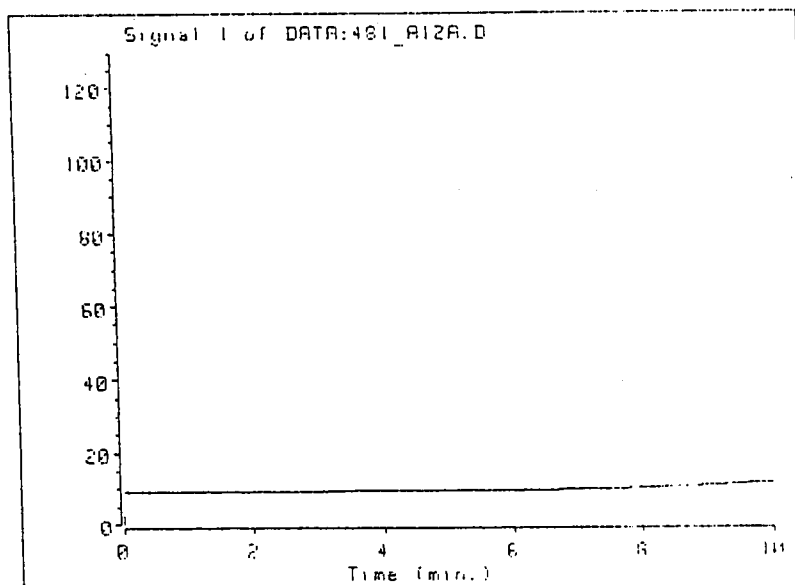
(1) Standard 500 mg/L; Day 16



Signal 1 of DATA:481\_A11A.D  
DATA:481\_A11A.D

PL	RT	Time	Type	Width	Area	StartTime	EndTime	Symmetry	Height
1	8.358	88		0.025	945.75	8.303	8.443	0.8335	68.04

(2) Control ; Day 16 (new)

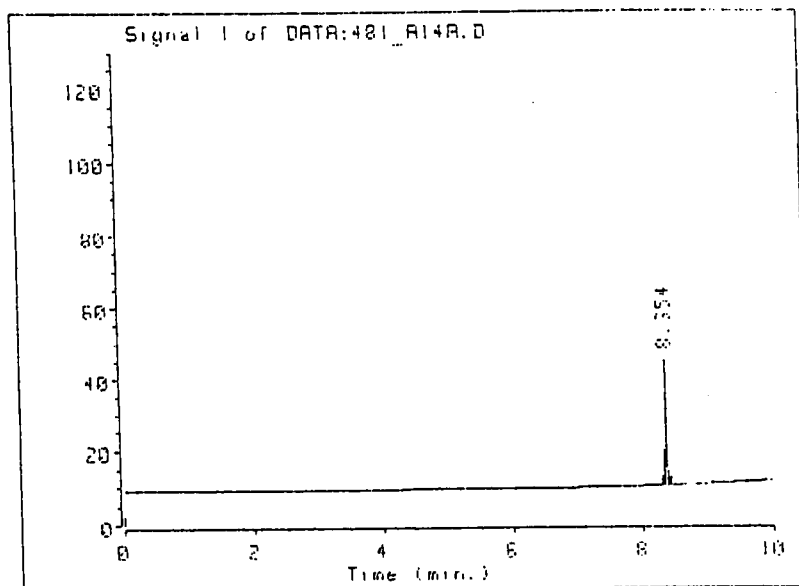


Signal 1 of DATA:481\_A12A.D  
DATA:481\_A12A.D

No peaks detected

Figure A-2-2 Continued

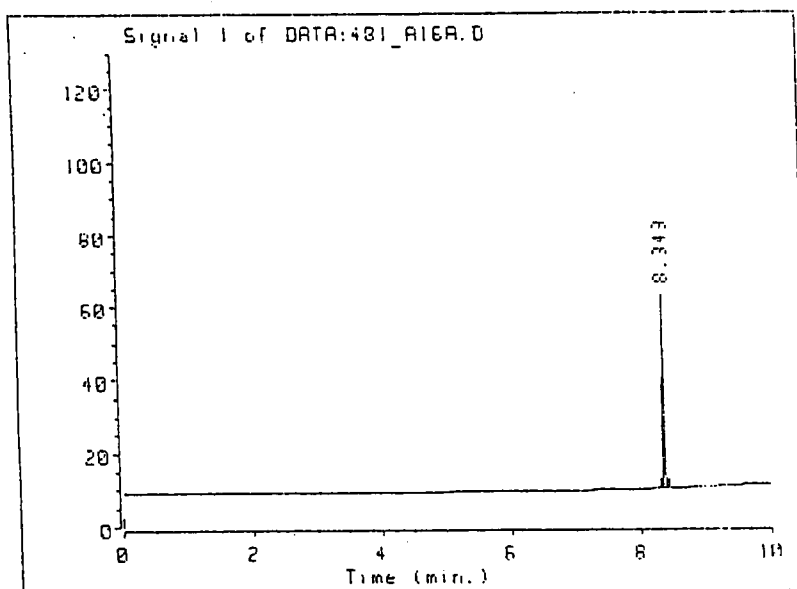
(3) 320 mg/L nominal; Day 16 (new)



Signal 1 of DATA:481\_A14A.D  
DATA:481\_A14A.D

PK	RT	Type	Width	Area	StartTime	EndTime	Symmetry	Height
1	8.354	BB	0.025	560.54	8.303	8.433	0.8341	35.00

(4) Standard 500 mg/L; Day 19

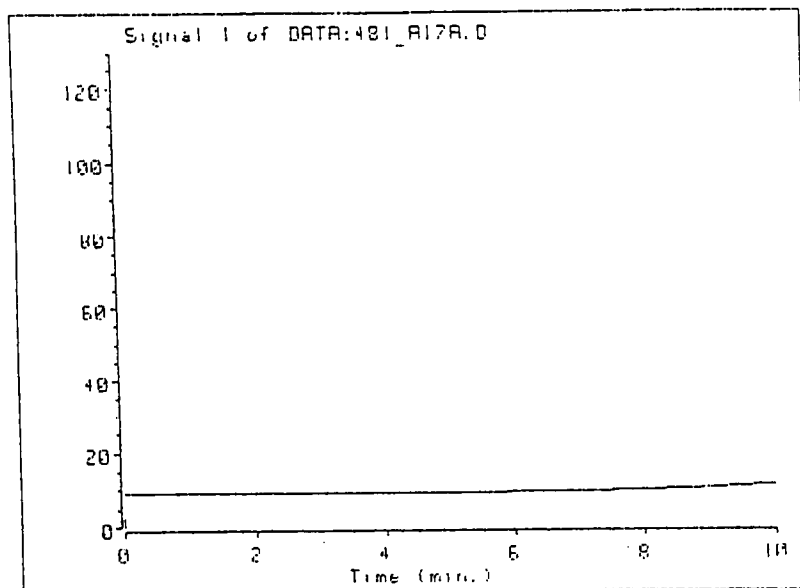


Signal 1 of DATA:481\_A16A.D  
DATA:481\_A16A.D

PK	RT	Type	Width	Area	StartTime	EndTime	Symmetry	Height
1	8.349	BB	0.026	862.11	8.293	8.430	0.8403	53.29

Figure A-2-2 Continued

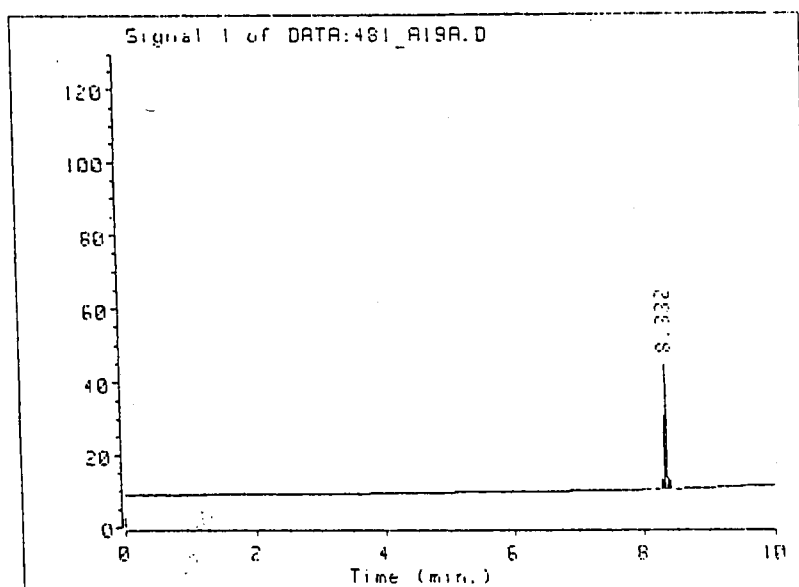
(5) Control ; Day 19 (old)



Signal 1 of DATA:481\_A17A.D  
DATA:481\_A17A.D

No peaks detected

(6) 320 mg/L nominal; Day 19 (old)



Signal 1 of DATA:481\_A19A.D  
DATA:481\_A19A.D

PK#	RT	Time	Type	Width	Area	StartTime	EndTime	Symmetry	Height
1	8.332	BB		0.026	549.40	8.283	8.413	0.8246	34.18

### 付属資料－3

ミジンコの観察結果

## Appendix 3-1 Result of reproduction test

(Test chemical: Dimethylformamide)  
(Nominal conc.: 0 mg/L)

Dispersant conc.: 0 mg/L)

		(Nominal conc. : 0 mg/L,										Dispersant conc. : 0 mg/L,												
Rep. No.	Counts	Time																					Total	
		2/1	2/2	2/3	2/4	2/5	2/6	2/7	2/8	2/9	2/10	2/11	2/12	2/13	2/14	2/15	2/16	2/17	2/18	2/19	2/20	2/21		
		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	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	9	9	9	9	9	9	9	9	--	
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	--		
	F1 generation	Live		0			0		0		80			59		74		49			101	111	474	
			Dead		0			0		0		0			4		0		2			0	0	6
		Total		0			0		0		80			63		74		51			101	111	480	
	Reproductivity/P		0.00			0.00		0.00		8.00			5.90		7.79		5.44			11.22		12.33	50.69	
	Cumulative reproductivity		0.00			0.00		0.00		8.00			13.90		21.69		27.13			38.36		50.69		
2	P generation	Live	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	--		
	F1 generation	Live		0			0		0		74			89		67		48			109	96	483	
			Dead		0			0		0		5			2		0		2			0	13	22
		Total		0			0		0		79			91		67		50			109	109	505	
	Reproductivity/P		0.00			0.00		0.00		7.40			8.90		6.70		4.80			10.90		9.60	48.30	
	Cumulative reproductivity		0.00			0.00		0.00		7.40			16.30		23.00		27.80			38.70		48.30		
3	P generation	Live	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	--		
	F1 generation	Live		0			0		0		72			94		42		38			89	78	413	
			Dead		0			0		0		4			2		0		1			0	0	7
		Total		0			0		0		76			96		42		39			89	78	420	
	Reproductivity/P		0.00			0.00		0.00		7.20			9.40		4.20		3.80			8.90		8.21	41.71	
	Cumulative reproductivity		0.00			0.00		0.00		7.20			16.60		20.80		24.60			33.50		41.71		
4	P generation	Live	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	--		
	F1 generation	Live		0			0		0		95			79		56		46			70	84	430	
			Dead		0			0		0		7			4		0		0			0	0	11
		Total		0			0		0		102			83		56		46			70	84	441	
	Reproductivity/P		0.00			0.00		0.00		9.50			7.90		5.60		4.60			7.00		8.40	43.00	
	Cumulative reproductivity		0.00			0.00		0.00		9.50			17.40		23.00		27.60			34.60		43.00		

The time (days) to first brood: 1: 8 days, 2: 8 days, 3: 8 days, 4: 9 days.



## Appendix 3-2 Result of reproduction test

(Test chemical: Dimethylformamide)

(Nominal conc.: 100 mg/L,

Dispersant conc.: 0 mg/L)

Rep. No.	Counts	Time																					Total
		2/1	2/2	2/3	2/4	2/5	2/6	2/7	2/8	2/9	2/10	2/11	2/12	2/13	2/14	2/15	2/16	2/17	2/18	2/19	2/20	2/21	
		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	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	--
		Live		0		0		0		64			71		56		70			83		107	451
	Fl generation	Dead		0		0		0		8			4		2		3			0		10	27
		Total		0				0		72			75		58		73			83		117	478
2		Reproductivity/P		0.00		0.00		0.00		6.40			7.10		5.60		7.00			8.30		10.70	45.10
		Cumulative reproductivity		0.00		0.00		0.00		6.40			13.50		19.10		26.10			34.40		45.10	
	P generation	Live	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	9	8	8	--
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	2	--
	Fl generation	Live		0		0		0		69			83		57		31			100		78	418
3		Dead		0		0		0		9			5		4		2			0		2	22
		Total		0		0		0		78			88		61		33			100		80	440
		Reproductivity/P		0.00		0.00		0.00		6.90			8.30		5.70		3.10			10.53		9.18	43.70
		Cumulative reproductivity		0.00		0.00		0.00		6.90			15.20		20.90		24.00			34.53		43.70	
	P generation	Live	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	--
4		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	--
	Fl generation	Live		0		0		0		102			76		76		28			77		84	443
		Dead		0		0		0		2			1		1		3			0		3	10
		Total		0		0		0		104			77		77		31			77		87	453
		Reproductivity/P		0.00		0.00		0.00		10.20			7.60		7.60		2.80			7.70		8.40	44.30
5		Cumulative reproductivity		0.00		0.00		0.00		10.20			17.80		25.40		28.20			35.90		44.30	
	P generation	Live	10	10	10	10	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	8	8	8	8	--
		Dead	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	--
	Fl generation	Live		0		0		0		62			86		25		80			77		56	386
		Dead		0		0		0		5			0		10		7			0		0	22
6		Total		0		0		0		67			86		35		87			77		56	408
		Reproductivity/P		0.00		0.00		0.00		6.89			9.56		2.78		8.89			9.06		7.00	44.17
		Cumulative reproductivity		0.00		0.00		0.00		6.89			16.44		19.22		28.11			37.17		44.17	

The time (days) to first brood: 1: 8 days, 2: 8 days, 3: 8 days, 4: 8 days.

## Appendix 3-3 Result of reproduction test

(Test chemical: Dimethylformamide)

(Nominal conc.: 320 mg/L,

Dispersant conc.: 0 mg/L)

Rep. No.	Counts	Time																					Total
		2/1	2/2	2/3	2/4	2/5	2/6	2/7	2/8	2/9	2/10	2/11	2/12	2/13	2/14	2/15	2/16	2/17	2/18	2/19	2/20	2/21	
		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	10	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	--
		Dead	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	--
													66		50		47			97		65	410
	F1 generation	Live		0			0			85					0		1			0		0	1
		Dead		0			0			0													
	Total		0			0		0		85										97		65	411
2	Reproductivity/P		0.00			0.00		0.00		9.44			7.33		5.56		5.22			10.78		7.22	45.56
	Cumulative reproductivity		0.00			0.00		0.00		9.44			16.78		22.33		27.56			38.33		45.56	
	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	--
	F1 generation	Live		0			0			89			137		42		59			83		58	468
		Dead		0			0			3			1		0		0			0		10	14
3	Total		0			0		0		92			138		42		59			83		68	482
	Reproductivity/P		0.00			0.00		0.00		8.90			13.70		4.20		5.90			8.30		5.80	46.80
	Cumulative reproductivity		0.00			0.00		0.00		8.90			22.60		26.80		32.70			41.00		46.80	
	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	--
	F1 generation	Live		0			0			97			52		33		34			70		91	377
4		Dead		0			0			6			0		1		3			0		12	22
	Total		0			0		0		103			52		34		37			70		103	399
	Reproductivity/P		0.00			0.00		0.00		9.70			5.20		3.30		3.40			7.00		9.10	37.70
	Cumulative reproductivity		0.00			0.00		0.00		9.70			14.90		18.20		21.60			28.60		37.70	
	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	--
4	F1 generation	Live		0			0			75			79		107		41			91		81	474
		Dead		0			0			2			3		0		4			0		0	9
	Total		0			0		0		77			82		107		45			91		81	483
	Reproductivity/P		0.00			0.00		0.00		7.50			7.90		10.70		4.10			9.58		9.00	48.78
	Cumulative reproductivity		0.00			0.00		0.00		7.50			15.40		26.10		30.20			39.78		48.78	

The time (days) to first brood: 1: 8 days, 2: 8 days, 3: 8 days, 4: 8 days.

## Appendix 3-4 Result of reproduction test

(Test chemical: Dimethylformamide)

(Nominal conc.: 1000 mg/L,

Dispersant conc.: 0 mg/L)

Rep. No.	Counts	Time																					Total
		2/1	2/2	2/3	2/4	2/5	2/6	2/7	2/8	2/9	2/10	2/11	2/12	2/13	2/14	2/15	2/16	2/17	2/18	2/19	2/20	2/21	
		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	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	9	9	9	--
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	--
	F1 generation	Live		0		0		0		97			41		59		40		34			85	356
		Dead		0		0		0		3			2		1		11		0			12	29
		Total		0		0		0		100			43		60		51		34			97	385
	Reproductivity/P		0.00			0.00		0.00		9.70			4.10		5.90		4.00		3.58			9.44	36.72
	Cumulative reproductivity		0.00			0.00		0.00		9.70			13.80		19.70		23.70		27.28			36.72	
2	P generation	Live	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	9	9	9	9	9	9	9	9	--
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	--
	F1 generation	Live		0		0		0		81			45		77		71		104			72	450
		Dead		0		0		0		21			8		0		4		0			7	40
		Total		0		0		0		102			53		77		75		104			79	490
	Reproductivity/P		0.00			0.00		0.00		8.10			4.50		8.11		7.89		11.56			8.00	48.15
	Cumulative reproductivity		0.00			0.00		0.00		8.10			12.60		20.71		28.59		40.15			48.15	
3	P generation	Live	10	10	10	10	10	10	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	--
		Dead	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	--
	F1 generation	Live		0		0		0		71			79		64		28		89			84	415
		Dead		0		0		0		10			10		0		5		0			2	27
		Total		0		0		0		81			89		64		33		89			86	442
	Reproductivity/P		0.00			0.00		0.00		7.47			8.78		7.11		3.11		9.89			9.33	45.70
	Cumulative reproductivity		0.00			0.00		0.00		7.47			16.25		23.36		26.47		36.36			45.70	
4	P generation	Live	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	9	9	9	--
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	--
	F1 generation	Live		0		0		0		73			25		61		31		99			79	368
		Dead		0		0		0		27			2		1		8		0			1	39
		Total		0		0		0		100			27		62		39		99			80	407
	Reproductivity/P		0.00			0.00		0.00		7.30			2.50		6.10		3.10		10.42			8.78	38.20
	Cumulative reproductivity		0.00			0.00		0.00		7.30			9.80		15.90		19.00		29.42			38.20	

The time (days) to first brood: 1: 8 days, 2: 8 days, 3: 8 days, 4: 8 days.