

環境省殿

## 最 終 報 告 書

エチレンジアミン四酢酸のオオミジンコ (*Daphnia magna*) に対する繁殖阻害試験

(試験番号：第14013号)

2003年3月31日

財団法人 日本食品分析センター 多摩研究所

## 試験実施概要

1. 表 題：エチレンジアミン四酢酸のオオミジンコ (*Daphnia magna*) に対する繁殖阻害試験
2. 試験目的：エチレンジアミン四酢酸のオオミジンコ (*Daphnia magna*) に対する繁殖阻害試験を行い、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 (EC<sub>50</sub>) も求める。
3. 試験方法：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
4. 適用 GLP：日本国環境省総合環境政策局環境保健部環境安全課環境リスク評価室長通知「生態影響試験実施に関する基準の改正について」(別添)「生態影響試験実施に関する基準」(環保安第 242 号, 2001 年)
5. 試験委託者：
  - 1) 名 称：環境省
  - 2) 住 所：〒100-8975 東京都千代田区霞ヶ関1丁目2番2号
  - 3) 委託責任者：総合環境政策局環境保健部環境安全課環境リスク評価室  
室長補佐 [REDACTED]
6. 試験受託者：
  - 1) 名 称：財団法人 日本食品分析センター
  - 2) 住 所：〒151-0062 東京都渋谷区元代々木町52番1号
  - 3) 代 表 者：[REDACTED]
7. 試験施設：
  - 1) 名 称：財団法人 日本食品分析センター 多摩研究所
  - 2) 住 所：〒206-0025 東京都多摩市永山6丁目11番10号  
〒206-0025 東京都多摩市永山6丁目21番6号(別館)
  - 3) 運営管理者：[REDACTED](多摩研究所長)

8. 試験責任者

所 属：環境科学部

氏 名：[REDACTED]

9. 分析担当責任者

所 属：応用試験部 農薬試験課

氏 名：[REDACTED]

10. 試験担当者

生物系

所 属：環境科学部 環境生物安全課

氏 名：[REDACTED] , [REDACTED] , [REDACTED] , [REDACTED] , [REDACTED] ,  
[REDACTED] , [REDACTED]

分析系

所 属：応用試験部 農薬試験課

氏 名：[REDACTED] , [REDACTED] , [REDACTED]

11. 試験日程

試験開始日：2002年12月20日

実験開始日：2003年1月29日

実験終了日：2003年2月19日

試験終了日：2003年3月31日

12. 記録及び資料の保管

試験に関する下記の記録及び試料は、1)については最終報告書作成後10年間または品質低下を  
起こさずに保存し得る期間のいずれか短い方の期間、2)から5)については10年間、財団法人  
日本食品分析センター多摩研究所資料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  
別途協議の上、定める。

- 1) 被験物質
- 2) 試験計画書
- 3) 生データ及び最終報告書
- 4) 信頼性保証部門の検閲記録
- 5) その他必要なもの

13. 最終報告書の承認

試験責任者

所 属： 財団法人 日本食品分析センター 多摩研究所 環境科学部

氏 名：



2003 年 3 月 3 / 日 承認

## 目次

	頁
要 旨 .....	7
1 被験物質 .....	9
1.1 名称, 構造式及び物理化学的性状 .....	9
1.2 供試試料 .....	9
1.3 保管方法及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 試験容器及び恒温槽等 .....	11
3.4 試験濃度の設定 .....	12
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 結果の算出に用いた試験濃度の決定 .....	13
4.2 親ミジンコの半数致死濃度(LC <sub>50</sub> )の算出 .....	13
4.3 50 %繁殖阻害濃度(EC <sub>50</sub> )の算出.....	13
4.4 最大無作用濃度(NOEC)及び最小作用濃度(LOEC).....	13
4.5 試験容器間の均一性解析.....	13
4.6 統計的手法.....	13
5 結果及び考察 .....	14
5.1 試験液中の被験物質濃度 .....	14
5.2 試験液の状態 .....	14
5.3 ミジンコの観察結果 .....	14
5.4 親ミジンコの半数致死濃度(21d-LC <sub>50</sub> ) .....	15
5.5 50 %繁殖阻害濃度(EC <sub>50</sub> ) .....	15
5.6 最大無作用濃度(NOEC)及び最小作用濃度(LOEC) .....	15
5.7 試験液の水温, 溶存酸素濃度, pH 及び硬度 .....	15
5.8 試験計画書からの逸脱事項.....	15
5.9 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
5.10 試験の妥当性 .....	16
5.11 結果の評価と考察.....	16

Table 1～4 .....	17～20
Figure 1～2 .....	21
Table 5～11 .....	22～25
付属資料-1 希釈水の水質 .....	26
付属資料-2 予備試験結果 .....	27
付属資料-3 統計処理データ .....	28～29
付属資料-4 試験液中の被験物質濃度の分析方法 .....	30～37
付属資料-5 ミジンコの観察結果 .....	38～46

## 要 旨

### 試験委託者

環境省

### 表 題

エチレンジアミン四酢酸のオオミジンコ (*Daphnia magna*) に対する繁殖阻害試験

### 試験番号

第14013号

### 試験方法

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

- 1) 被験物質：エチレンジアミン四酢酸
- 2) 暴露方式：半止水式(24 時間毎全量換水)
- 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, 1.0, 1.8, 3.2, 5.6, 10, 18 及び 32 mg/l  
公比：1.8
- 6) 試験液量：80 ml/容器
- 7) 連 数：10 容器/1 試験区(別に予備として 2 容器を追加)
- 8) 供試生物数：10 頭/試験区(1 頭/1 容器)
- 9) 試験温度：19.1～20.8 °C
- 10) 溶存酸素濃度：8.7～10.1 mg/l(暴露期間中, エアレーションは行わなかった。)
- 11) pH : 7.0～8.3(試験液の pH 調整は行わなかった。)
- 12) 硬 度：75～86 mg/l(CaCO<sub>3</sub> 換算)
- 13) 照 明：室内光, 16 時間明期/8 時間暗期
- 14) 餌 料：単細胞緑藻類(*Chlorella vulgaris*)  
(藻類培養液を遠心操作により, 希釈水に置換して給餌した。)
- 15) 給 餌 量：開始時～7 日後 ; 0.10～0.15 mgC(有機体炭素)/頭/日  
8 日後～14 日後 ; 0.15 mgC(有機体炭素)/頭/日  
15 日後～21 日後 ; 0.15～0.17 mgC(有機体炭素)/頭/日
- 16) 希 釈 水：水道水(茨城県つくば市)を脱塩素したもの
- 17) 分 析 法：ガスクロマトグラフィー質量分析法

結 果

以下の値は測定値(算術平均)を基に示した。

- 1) 親ミジンコの半数致死濃度(21d-LC<sub>50</sub>)  
33 mg/l 以上
- 2) 50 %繁殖阻害濃度(EC<sub>50</sub>)  
13 mg/l(95 %信頼区間 ; 13(12.7)~13(13.2) mg/l)  
Logit 変換による単回帰分析法により算出した。
- 3) 最大無作用濃度(NOEC)  
5.5 mg/l, Dunnett の多重比較検定法により算出した。。
- 4) 最小作用濃度(LOEC)  
10 mg/l, Dunnett の多重比較検定法により算出した。。



## 1 被験物質

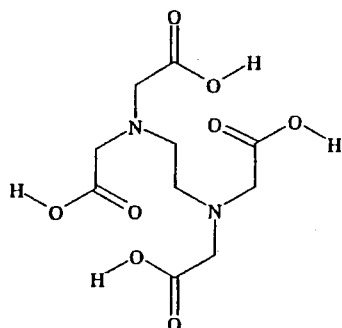
### 1.1 名称, 構造式及び物理化学的性状

名 称: エチレンジアミン四酢酸

別 名: EDTA, エデト酸<sup>1)</sup>

CAS No.: 60-00-4

構造式:



分子式:  $C_{10}H_{16}N_2O_8$

分子量: 292.25<sup>1)</sup>

沸点: —

融点: 240 °C (分解)<sup>3)</sup>

水溶解度: 0.51 g/l<sup>1)</sup>, 0.50 g/l<sup>2)</sup>

比重: 1.651 (25/4 °C)<sup>1)</sup>

pKa: 1.5, 2.0, 2.68, 6.11, 10.17<sup>1)</sup>

logPow: -1.97 (計算値)<sup>1)</sup>

蒸気圧: <1.33 Pa (<0.01 mmHg)<sup>1)</sup>

均一性: 同一ロットのものを使用した。

安定性: 通常の使用においては安定であるが, 240 °C 以上に加熱すると分解する<sup>3)</sup>。

生分解性: 難分解<sup>1)</sup>

その他: 重金属イオンと強固な溶解性錯塩を形成する<sup>1)</sup>。

出典: 1) 財団法人 化学物質評価研究機構: “既存化学物質安全性(ハザード) 評価シート” (1997)

2) Merck & Co., Inc., “The Merck Index”, 11th Ed. (1989)

3) [REDACTED]: “製品安全データシート” (1993)

### 1.2 供試試料

純 度: 99.9 %

ロット番号: 408C2281

供給者: [REDACTED]

供給量: 25 g×4本

入手日: 2002年12月5日

外 観: 白色結晶, 無臭

### 1.3 保管方法及び保管条件下での安定性

#### 1) 保管方法

被験物質は当センターの被験物質保管庫(冷蔵庫)に保管した。

#### 2) 被験物質の確認及び保管条件下の安定性

入手した被験物質について赤外分光光度計により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。また、試験終了時にも同様にスペクトルを測定し、試験開始前のスペクトルと変化が認められないことを確認した。その結果、被験物質は保管条件下において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) 入手等：自家繁殖(1998年6月23日、国立環境研究所より入手)

#### 4) 基準物質による検定の結果：基準物質(重クロム酸カリウム、試薬特級)による48時間の半遊泳阻害濃度( $EC_{50}$ )は0.75 mg/l(2003年1月8日)であった。 当センターにおける1998年10月以降の $EC_{50}$ 値のバックグラウンドデータ( $0.60 \pm 0.13$ mg/l)と比較した結果、供試生物の感受性は、通常の状態にあると判断した。

#### 5) 試験使用の齢：雌の幼体(生後24時間以内齢)

#### 6) 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、別に用意したピーカーに移し、翌日、産出された幼体を別のピーカーに分けた。この幼体を供試ミジンコの親とし、以下の条件で19日間(2003年1月10日～1月29日)飼育した。成熟し幼体を産むようになったら1週間に3回幼体を除去した。暴露開始前日に育苗内に幼体を持つ雌成体を選別し、翌日(24時間以内)、親ミジンコ(19日齢)より産出された幼体を試験に用いた。

試験には、産出された幼体から健康で肉眼的に正常な個体をランダムに選別して使用した。産仔が初産の場合や親ミジンコの死亡が多い容器は使用しなかった。なお、飼育期間中、ミジンコの成育は良好で、産出幼体の死産、墮胎卵、休眠卵及び雄の発生は認められなかった。飼育密度を35頭から25頭/l飼育水に変更した以降の親ミジンコの死亡率は0%であった。

### 親ミジンコの飼育条件

① 飼育水：希釈水(3.2参照)

② 飼育方法：半止水式(週3回全量換水を行った。)

③ 飼育容器：1l容ガラス製ピーカー

④ 飼育密度：開始時～4日後；35頭/l飼育水，5日後～19日後；25頭/l飼育水

⑤ 水温：19.0～20.3℃

⑥ 照明：室内光，16時間明期/8時間暗期

- ⑦ 餌料：単細胞緑藻類(*Chlorella vulgaris*)  
(藻類培養液を遠心操作により、希釈水に置換して給餌した。)
- ⑧ 給餌：開始時～7日後 ; 0.01～0.06 mgC(有機体炭素)/頭/日  
8日後～14日後 ; 0.06～0.08 mgC(有機体炭素)/頭/日  
15日後～19日後 ; 0.08～0.10 mgC(有機体炭素)/頭/日

### 3 試験方法

#### 3.1 試験条件

- 1) 暴露方式：半止水式(24時間毎全量換水)
- 2) 暴露期間：21日間
- 3) 試験液量：80 ml/容器
- 4) 連数：10容器/1試験区(別に予備として2容器を追加)
- 5) 供試生物数：10頭/試験区(1頭/1容器)
- 6) 試験温度：19.1～20.8℃
- 7) 溶存酸素濃度：8.7～10.1 mg/l (暴露期間中、エアレーションは行わなかった。)
- 8) pH : 7.0～8.3 (試験液のpH調整は行わなかった。)
- 9) 硬度：75～86 mg/l mg/l(CaCO<sub>3</sub>換算)
- 10) 照明：室内光, 16時間明期/8時間暗期
- 11) 餌料：単細胞緑藻類(*Chlorella vulgaris*)  
(藻類培養液を遠心操作により、希釈水に置換して給餌した。)
- 12) 給餌量：開始時～7日後 ; 0.10～0.15 mgC(有機体炭素)/頭/日  
8日後～14日後 ; 0.15 mgC(有機体炭素)/頭/日  
15日後～21日後 ; 0.15～0.17 mgC(有機体炭素)/頭/日

#### 3.2 希釈水

脱塩素水[水道水(茨城県つくば市)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。脱塩素水使用時には、残留塩素が無いことを確認した。硬度は 83 mg/l(CaCO<sub>3</sub>換算), pHは7.3であった。

希釈水の定期的な水質測定結果は付属資料-1に示した。

#### 3.3 試験容器及び恒温槽等

- 1) 試験容器：100 ml 容ガラス製ビーカー(容器のサイズ；内径 約5 cm×高さ 約7 cm)を用いた。  
試験容器にはゴミの侵入や試験液の蒸散を防ぐ意味で蓋をした。
- 2) 恒温室：21.84R-5510[日立冷熱株式会社]
- 3) 水温計：AP-210E[安立計器株式会社]
- 4) 溶存酸素計：DO-14P[東亜ディーケーケー株式会社]
- 5) pH計：HM-14P[東亜ディーケーケー株式会社]
- 6) 塩素比色計：OT-I型[理研光学株式会社]

### 3.4 試験濃度の設定

繁殖阻害試験の予備試験結果より、10 mg/lの濃度区ではミジンコの繁殖阻害率が68 %であり、1.0 mg/lの濃度区では繁殖阻害が認められなかったことに基づき、本試験では、32 mg/l以下の濃度を公比1.8で7濃度区(1.0, 1.8, 3.2, 5.6, 10, 18及び32 mg/l)設定した。

なお、予備試験の結果は付属資料-2に示した。

### 3.5 試験液の調製

試験液調製時の希釈水は、調製前に暴気を行い、恒温槽内で $20 \pm 1$  °Cにした。

被験物質を超音波処理により希釈水に溶解させ被験物質原液(100 mg/l)を調製した。

この被験物質原液を希釈水に添加して各濃度区の試験液を調製した。

対照区には、希釈水のみが無処理の対照区を設けた。

なお、被験物質は純度が99.9 %と高純度であったため、純度を考慮せず秤取した。よって、設定した試験濃度は、供試試料の濃度として示した。また、被験物質原液は用時調製とした。

### 3.6 試験液の分析

試験液中の被験物質濃度の分析は、ガスクロマトグラフー質量分析計を用いて、全試験区について暴露開始時(0時間)、1日後の換水前、7日後の換水後、8日後の換水前、14日後の換水後及び15日後の換水前の計6回行い、その算術平均値を求めた。暴露開始時、7及び14日後の換水後は、分析用及び12連分を同時に調製した容器から試験液を50 ml採取して分析用試験液とした。また、1, 8及び15日後の換水前は、各試験区のそれぞれ12連の試験容器から全量混合した試験液を50 ml採取し、それぞれ分析用試験液とした。

なお、分析方法は付属資料-4に示した。

### 3.7 試験操作

試験液の水温、溶存酸素濃度、pH及び硬度を測定後、供試ミジンコを投入し、その時点を暴露開始時とした。先端が比較的広口のガラスピペットを用いて供試ミジンコを投入した。その際、試験液量に対して、ピペット内の希釈水は全量で1 %以内を目安とした。その後、換水毎にミジンコを新しい試験液に移しかえ、21日後まで飼育した。暴露期間中は毎日給餌を行った。

#### ・ミジンコの観察

[親ミジンコ]：毎日、生死を計数した。また、状態を観察して異常(遊泳阻害、外観等)が認められた場合はその状況を記載した。計数後の死亡個体は取り除いた。

換水時に新しい試験液に移す際は、古い試験液は極力入らないようにした。

[産出幼体]：最初の産仔から毎日幼体の生存数を計数し、計数後の幼体は取り除いた。

死亡幼体、墮胎卵、休眠卵の発生等についてはその有無を観察した。最初の幼体産出日(初産日)を記録した。

#### ・水質測定

各試験区の水温、溶存酸素濃度、pH及び硬度を、全試験区について、暴露開始時、1日後の換水前、7日後の換水後、8日後の換水前、14日後の換水後、15日後の換水前に測定した。

暴露開始時及び各時間の換水後については同一容器で調製した試験液について実施した。各換水前については全容器から全量混合したものについて実施した。

なお、暴露期間中の試験液についてはその状態(外観等)を観察し、記録した。

#### 4 結果の算出

結果の算出は、12連中の試験容器番号の若いものから10連のデータを用いた。

なお、10 mg/l 濃度区で親ミジンコに死亡が認められたが、試験の妥当性における対照区の死亡率の成立条件範囲内であり、死亡は被験物質の影響と考え難く、結果には予備容器のデータを代わりに採用した。

##### 4.1 結果の算出に用いた試験濃度の決定

結果の算出に用いた試験濃度は測定値(算術平均)とした。

##### 4.2 親ミジンコの半数致死濃度(LC<sub>50</sub>)の算出

本試験では親ミジンコの死亡率として50%以上の結果が得られなかったため、21日間の半数致死濃度(21d-LC<sub>50</sub>)の算出を行わなかった。

##### 4.3 50%繁殖阻害濃度(EC<sub>50</sub>)の算出

対照区と各濃度区において21日間生存した親1頭あたりの平均累積産仔数から算出した繁殖阻害率を用いて、Logistic曲線にあてはめ、回帰分析し、21日間の50%繁殖阻害濃度(EC<sub>50</sub>)を算出した。それらの95%信頼区間も算出した。また、平均累積産仔数の試験区別の経時変化のグラフを記載した。

##### 4.4 最大無作用濃度(NOEC)及び最小作用濃度(LOEC)\*

各試験容器毎の21日間の生存親1頭あたりの累積産仔数を算出し、各試験区と対照区(または助剤対照区)との有意差の有無をBartlettの等分散検定、一元配置分散分析(ANOVA)及びDunnettの多重比較検定(片側、有意水準:  $\alpha=0.05$ )により求め、対照区と有意差の認められない最高濃度(NOEC)及び有意差の認められる最低濃度(LOEC)を決定した。

\* 最大無作用濃度(NOEC): 繁殖状態に対照区と有意差の認められない最高濃度

最小作用濃度(LOEC): 繁殖状態に対照区と有意差の認められる最低濃度

##### 4.5 試験容器間の均一性解析

異常値が認められなかったため、試験容器間の均一性解析は実施しなかった。

##### 4.6 統計的手法

本試験結果に使用した統計ソフトを以下に示した。また、統計ソフトの入力値とその出力結果を付属資料-3に示した。

Yukms 統計ライブラリー 生物検定編(ユックムス株式会社)

## 5 結果及び考察

### 5.1 試験液中の被験物質濃度

暴露開始時, 1日後の換水前, 7日後の換水後, 8日後の換水前, 14日後の換水後及び15日後の換水前に試験液中の被験物質濃度を測定し, その結果をTable 1に示した。

暴露開始時, 7日後の換水後及び14日後の換水後の試験液中の測定濃度は, それぞれ0.94~30.3 mg/l, 1.14~33.3 mg/l, 1.09~34.3 mg/l (設定濃度: 1.0~32 mg/l)であり, 設定濃度に対する割合は, 暴露開始時が85~95%, 7日後の換水後が98~116%及び14日後の換水後が98~110%であった。

また, 1日後の換水前, 8日後の換水前及び15日後の換水前の試験液中の測定濃度は, それぞれ1.01~36.6 mg/l, 0.95~31.4 mg/l, 0.90~29.9 mg/l (設定濃度: 1.0~32 mg/l)であり, 設定濃度に対する割合は, 1日後の換水前が98~114%, 8日後の換水前が86~104%及び15日後の換水前が90~100%であった。

各濃度区の設定濃度に対する測定濃度の算術平均値は1.0 mg/lで1.01 mg/l, 1.8 mg/lで1.78 mg/l, 3.2 mg/lで3.30 mg/l, 5.6 mg/lで5.49 mg/l, 10 mg/lで10.0 mg/l, 18 mg/lで18.1 mg/l及び32 mg/lで32.6 mg/lであり, 測定濃度は設定濃度の±20%以内を維持できた。よって, 本被験物質は試験液中で安定であったと考えられた。

以上のことから, 以下の値(親ミジンコの半数致死濃度, 50%繁殖障害濃度, 最大無作用濃度及び最小作用濃度)は測定値から算出した算術平均値を基に示した。

### 5.2 試験液の状態

暴露開始時の試験液は無色透明であった。また, 1日後の試験液は全ての濃度区で開始時と比較して変化が認められなかった。

### 5.3 ミジンコの観察結果

#### 1) 親ミジンコの累積死亡数及び死亡率

21日後の親ミジンコの死亡率は全ての試験区で0%であった。

各試験区における親ミジンコの累積死亡数をTable 2-1に示した。親ミジンコの死亡率をTable 2-2に示した。

#### 2) 親ミジンコの状態

暴露期間を通して, 全ての試験区で遊泳障害は観察されなかった。また, 対照区と比較して小さい個体も観察されなかった。

#### 3) 産出幼体等の状態

暴露開始より11日以降, 死亡幼体が10.0 mg/l以上の濃度区で観察された。また, 9日以降, 墮胎卵が5.49 mg/l以上の濃度区で観察された。死亡幼体及び墮胎卵を産出する個体の割合は, 高濃度区になるほど高くなった。また, 対照区では死亡幼体及び墮胎卵は観察されなかった。なお, 対照区及び各濃度区において, 休眠卵の発生は認められなかった。

#### 4) 初産日

各濃度区の初産日は, 1.01 mg/l, 1.78 mg/l, 3.30 mg/l及び5.49 mg/lで8~9日後, 10.0 mg/lで8~14日後, 18.1 mg/lで12~18日後及び32.6 mg/lで18~21日後であった。

対照区は8~9日後であった。各試験区における初産日をTable 3に示した。

5) 平均累積産仔数

各濃度区の21日後の生存親1頭当たりの平均累積産仔数は、1.01 mg/l で192.9頭、1.78 mg/l で190.3頭、3.30 mg/l で195.3頭、5.49 mg/l で181.6頭及び10.0 mg/l で144.6頭、18.1 mg/l で18.9頭、32.6 mg/l で0.9頭であった。

対照区の生存親1頭当たりの平均累積産仔数は、174.6頭であった。

各試験区における生存親1頭当たりの平均累積産仔数をTable 4及びFigure 1に示した。

5.4 親ミジンコの半数致死濃度(21d-LC<sub>50</sub>)

21日後の親ミジンコの半数致死濃度(21d-LC<sub>50</sub>)をTable 5及び以下に示した。

親ミジンコの半数致死濃度(21d-LC<sub>50</sub>) : 33 mg/l 以上

5.5 50 %繁殖阻害濃度(EC<sub>50</sub>)

21日後の50 %繁殖阻害濃度(EC<sub>50</sub>)をTable 6及び以下に示した。また、濃度-繁殖阻害率のグラフをFigure 2に示した。

50 %繁殖阻害濃度(EC<sub>50</sub>) : 13 mg/l (95 %信頼区間 ; 13(12.7)~13(13.2) mg/l)

Logit 変換による単回帰分析により算出した。

5.6 最大無作用濃度(NOEC)及び最小作用濃度(LOEC)

最大無作用濃度(NOEC)及び最小作用濃度(LOEC)をTable 7及び以下に示した。

なお、32.6 mg/l 濃度区は生存幼体の平均累積産仔数が0.9頭であり、対照区(174.6頭)と比較して明らかに少なかったため、NOEC及びLOECの算出に用いなかった。

最大無作用濃度(NOEC) : 5.5 mg/l (Dunnettの多重比較検定法により算出した。)

最小作用濃度(LOEC) : 10 mg/l (Dunnettの多重比較検定法により算出した。)

5.7 試験液の水温、溶存酸素濃度、pH及び硬度

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。

暴露期間中の各試験区の水温は19.1~20.8℃、溶存酸素濃度は8.7~10.1 mg/l、pHは7.0~8.3、硬度は75~86 mg/l (CaCO<sub>3</sub>換算)であり、水温は20±1℃、溶存酸素濃度は3 mg/l以上、pHは6.0~9.0、硬度は10~250 mg/lの範囲で試験環境条件を満たしていた。

5.8 試験計画書からの逸脱事項

なし。

5.9 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

なし。

#### 5.10 試験の妥当性

暴露終了時に対照区の親ミジンコの死亡率が0%(20%以下), 平均累積産仔数が174.6頭(60頭以上)であったため, 本試験の成立が確認された。

#### 5.11 結果の評価と考察

試験液中の被験物質濃度の分析結果から, 被験物質濃度は一定に保たれていたことが確認された。よって, 暴露期間中の供試生物は, ほぼ設定濃度通りの被験物質に連続的に暴露されていたと判断した。また, 0%繁殖阻害最高濃度と100%繁殖阻害最低濃度の間隔が狭いことから, 本被験物質の供試生物に対する用量反応性は鋭敏であると考えられた。しかし, 本被験物質は水中の金属イオンと錯体を形成する性質を有していることから, 本被験物質そのものによる直接的な影響を評価した結果では無い可能性があると考えられた。また, 希釈水中の硬度成分や必須微量元素が, 本被験物質と反応することにより, 供試生物への取り込みが促進または阻害された可能性があり, これらが試験結果に影響を与えていた可能性が示唆された。

本被験物質は難分解性物質であり, 自然環境中に流出した場合には, その地域に生息する生物に対して, 長期間の暴露影響を及ぼす可能性が高く, より低濃度でも影響が現れる可能性もあると推察された。また, キレート作用を有することから, 環境水の水質が異なることによって, 生物への影響が変化する可能性も考えられた。よって, 本試験より得られた情報のみから, その影響を推察するには注意が必要であり, より長期的な暴露による影響を確認する必要があると考えられた。



Table 1. Measured Concentration of the Test Substance in the Test Water during 21-day Exposure Period  
(Semi-Static Condition)

Nominal Concentration (mg/l)	Date	Measured Concentration (mg/l)												Mean <sup>a</sup> Measured Concentration (mg/l)	Percent of Nominal
		0 (New)	Percent of Nominal	1 (Old)	Percent of Nominal	7 (New)	Percent of Nominal	8 (Old)	Percent of Nominal	14 (New)	Percent of Nominal	15 (Old)	Percent of Nominal		
Control		< 0.05	—	< 0.05	—	< 0.05	—	< 0.05	—	< 0.05	—	< 0.05	—	—	—
1.0		0.94	94	1.01	101	1.14	114	0.95	95	1.09	109	0.90	90	1.01	101
1.8		1.61	89	1.81	101	2.09	116	1.55	86	1.93	107	1.71	95	1.78	99
3.2		3.04	95	3.13	98	3.72	116	3.34	104	3.40	106	3.19	100	3.30	103
5.6		4.74	85	6.00	107	5.47	98	5.71	102	5.50	98	5.52	99	5.49	98
10		9.12	91	9.81	98	11.6	116	9.8	98	10.0	100	9.70	97	10.0	100
18		15.9	88	19.0	106	18.8	104	18.7	104	19.8	110	16.4	91	18.1	101
32		30.3	95	36.6	114	33.3	104	31.4	98	34.3	107	29.9	93	32.6	102

a : Arithmetic Mean, New : freshly prepared test solution, Old : test solution after 24 Hours exposure

	Concentration(mg/l)		% of Nominal	
	Min.	Max.	Min.	Max.
New	0.94	~	85	~
Old	0.90	~	86	~

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

Table 2-1. Cumulative Numbers of Dead Juvenile <i>Daphnia</i>																							
Nominal Concentration (mg/l)	Mean <sup>a</sup> Measured Concentration (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	0	0	0
1.0	1.01	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1.8	1.78	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3.2	3.30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5.6	5.49	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10	10.0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
18	18.1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
32	32.6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

a : Arithmetic Mean

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

Nominal Conc. (mg/l)	Mean <sup>a</sup> Measured Conc. (mg/l)	Days					
		1	2	4	7	14	21
Control	—	0	0	0	0	0	0
1.0	1.01	0	0	0	0	0	0
1.8	1.78	0	0	0	0	0	0
3.2	3.30	0	0	0	0	0	0
5.6	5.49	0	0	0	0	0	0
10	10.0	0	0	0	0	0	0
18	18.1	0	0	0	0	0	0
32	32.6	0	0	0	0	0	0

a : Arithmetic Mean

Table 3. Time (Days) to First Brood Production

No.	Nominal Concentration(mg/l)							
	[Mean <sup>a</sup> Measured Concentration (mg/l)]							
	Control	1.0 [1.01]	1.8 [1.78]	3.2 [3.30]	5.6 [5.49]	10 [10.0]	18 [18.1]	32 [32.6]
1	8	9	9	8	9	12	15	—
2	8	8	9	8	9	9	15	21
3	9	9	8	9	9	9	14	18
4	9	9	9	9	9	9	12	21
5	9	8	9	9	9	11	15	—
6	9	9	8	9	9	14	21	—
7	8	9	9	8	9	9	15	—
8	9	9	9	9	9	12	15	—
9	9	9	9	8	8	8	12	21
10	9	8	9	9	9	12	12	—
Min.	8	8	8	8	8	8	12	18
Max.	9	9	9	9	9	14	21	21

a : Arithmetic Mean

— : No brood production was observed during a 21-day testing period.

Table 4. Mean Cumulative Numbers of Living Young per Surviving Parental *Daphnia* for 21 Days ( $\Sigma F1/P$ )  
(Base for the data were the values standardized on the numbers of surviving parental *Daphnia* of each of the ten parallels.)

Nominal Concentration (mg/l)	Mean <sup>a</sup> Measured Concentration (mg/l)	Days															
		6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
Control	—	0.0	0.0	4.6	13.3	13.4	24.9	57.8	57.8	75.2	111.2	111.2	111.2	150.1	150.1	150.1	174.6
1.0	1.01	0.0	0.0	3.5	13.7	14.0	30.3	60.0	60.1	72.8	115.1	115.1	119.7	162.1	162.2	162.2	192.9
1.8	1.78	0.0	0.0	2.5	13.4	13.4	31.1	57.1	57.3	63.4	110.0	110.0	114.1	153.9	154.7	154.7	190.3
3.2	3.30	0.0	0.0	4.6	12.6	12.6	32.0	56.0	56.3	73.2	110.8	110.9	116.1	158.1	158.1	158.1	195.3
5.6	5.49	0.0	0.0	0.4	11.2	11.2	14.8	54.1	54.7	54.7	108.3	108.3	108.3	151.8	154.6	154.6	181.6
10	10.0	0.0	0.0	0.2	1.4	1.4	6.2	25.1	25.1	36.3	67.6	67.6	67.6	104.5	104.5	104.5	144.6
18	18.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.3	1.3	1.4	5.5	5.7	5.7	12.2	12.7	12.7	18.9
32	32.6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1	0.1	0.1	0.9

a : Arithmetic Mean

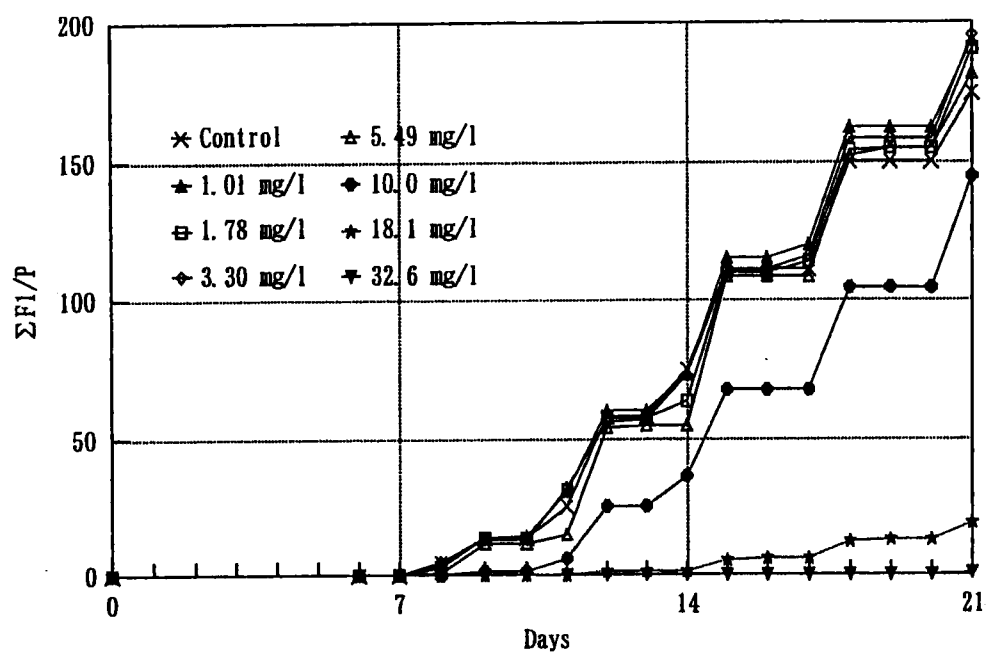


Figure 1. Time Course of  $\Sigma F1/P$  for Each Concentration Level

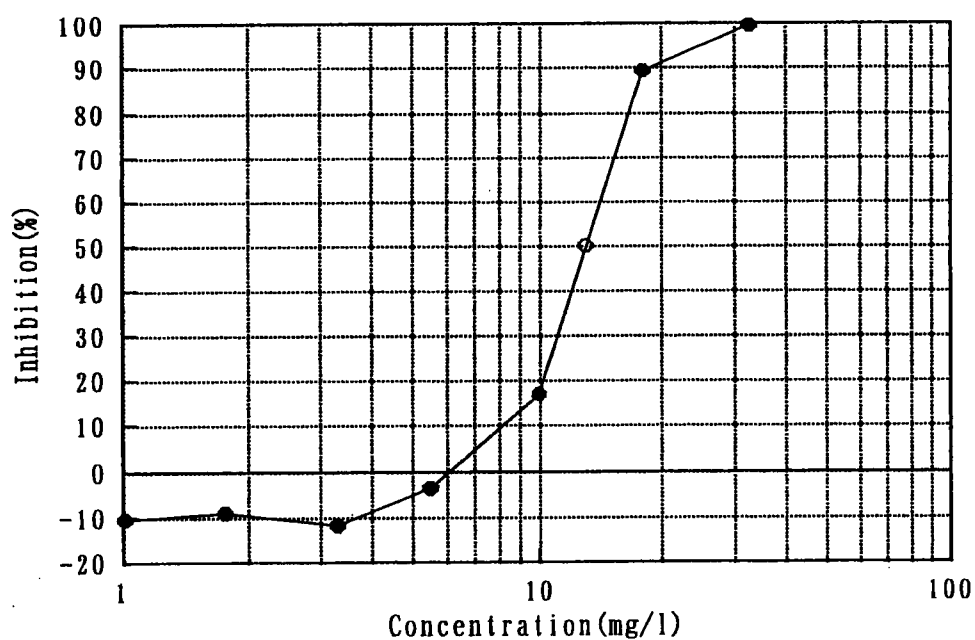


Figure 2. Concentration-Inhibition of Reproduction Curve

Table 5. Calculated  $LC_{50}$  Values for Parental *Daphnia*

Exposure Period (Days)	$LC_{50}$ (mg/l)	95-Percent Confidence Limits (mg/l)	Statistical Method
21	> 33	—	—

Table 6. Calculated  $EC_{50}$  Values for Inhibition of Reproduction

Exposure Period (Days)	$EC_{50}$ (mg/l)	95-Percent Confidence Limits (mg/l)	Statistical Method
21	13	13 (12. 7) ~ 13 (13. 2)	Simple regression

Table 7. Cumulative Numbers of Living Young per Surviving Parental *Daphnia* for 21 Days in Each Test Vessel and Result of Statistical Comparison of the Mean Values (by Dunnett's Multicomparison Test)

No.	Nominal Concentration(mg/l)							
	[Mean <sup>a</sup> Measured Concentration (mg/l)]							
	Control	1.0 [1.01]	1.8 [1.78]	3.2 [3.30]	5.6 [5.49]	10 [10.0]	18 [18.1]	32 [32.6]
1	194	218	200	189	154	140	16	0
2	195	206	199	213	197	162	56	3
3	196	210	205	210	160	144	14	5
4	143	168	150	183	197	179	9	0
5	179	193	164	205	208	175	5	0
6	145	170	189	198	165	96	13	0
7	202	168	210	204	184	123	29	0
8	190	202	201	188	210	110	7	0
9	152	192	196	195	172	159	32	1
10	150	202	189	168	169	158	8	0
Mean	174.6	192.9	190.3	195.3	181.6	144.6	18.9	0.9
S. D.	24.1	18.3	19.0	13.7	20.4	27.6	15.9	1.7
Inhibition rate(%)		-10.5	-9.0	-11.9	-4.0	17.2	89.2	99.5
Significant difference		—	—	—	—	**	**	— <sup>b</sup>
NOEC						○		
LOEC							○	

a : Arithmetic Mean

\*\* :  $\alpha=0.01$ (significant difference)

b : Not included for calculation because mean cumulative numbers of living young were significantly fewer than that of the control

Table 8. Temperature

(Semi-Static Condition)

Nominal Concentration (mg/l)	Mean <sup>a</sup> Measured Concentration (mg/l)	Date	Temperature(°C)						Min.	Max.
			0 New	1 Old	7 New	8 Old	14 New	15 Old		
Control	—		19.1	19.5	19.9	19.6	19.2	19.2	19.1	19.9
1.0	1.01		19.7	19.6	19.4	20.3	19.7	20.0	19.4	20.3
1.8	1.78		19.6	19.9	19.6	20.2	19.8	19.8	19.6	20.2
3.2	3.30		19.7	19.8	19.7	20.2	19.8	19.7	19.7	20.2
5.6	5.49		20.1	19.6	19.8	20.1	19.7	19.9	19.6	20.1
10	10.0		20.3	19.7	20.1	20.3	19.9	19.7	19.7	20.3
18	18.1		20.8	19.7	20.5	20.2	20.1	20.1	19.7	20.8
32	32.6		20.8	19.7	20.4	20.1	20.5	19.9	19.7	20.8
Range									19.1	20.8

a : Arithmetic Mean

New : Freshly prepared test solution , Old : Test solution after 24 hours exposure

Table 9. Dissolved Oxygen Concentration

(Semi-Static Condition)

Nominal Concentration (mg/l)	Mean <sup>a</sup> Measured Concentration (mg/l)	Date	Dissolved Oxygen Concentration(mg/l)						Min.	Max.
			0 New	1 Old	7 New	8 Old	14 New	15 Old		
Control	—		9.6	9.8	9.1	9.1	9.2	9.3	9.1	9.8
1.0	1.01		9.8	10.1	9.4	9.5	9.5	8.7	8.7	10.1
1.8	1.78		9.8	10.1	9.4	9.6	9.6	8.7	8.7	10.1
3.2	3.30		9.8	10.1	9.4	9.5	9.7	8.8	8.8	10.1
5.6	5.49		9.8	10.1	9.4	9.6	9.7	8.7	8.7	10.1
10	10.0		9.6	10.1	9.4	9.6	9.7	9.0	9.0	10.1
18	18.1		9.7	10.1	9.4	9.7	9.7	9.0	9.0	10.1
32	32.6		9.5	10.0	9.3	9.6	9.8	9.3	9.3	10.0
Range									8.7	10.1

a : Arithmetic Mean

New : Freshly prepared test solution , Old : Test solution after 24 hours exposure



Table 10. pH Values

(Semi-Static Condition)

Nominal Concentration (mg/l)	Mean <sup>a</sup> Measured Concentration (mg/l)	Date	pH						Min.	Max.
			0 New	1 Old	7 New	8 Old	14 New	15 Old		
Control	—		8.0	8.1	8.1	7.8	8.0	7.7	7.7	8.1
1.0	1.01		7.9	8.2	7.9	8.0	8.0	7.8	7.8	8.2
1.8	1.78		7.9	8.2	7.9	8.0	8.0	7.8	7.8	8.2
3.2	3.30		7.9	8.3	7.9	8.0	7.9	7.8	7.8	8.3
5.6	5.49		7.7	8.2	7.8	8.0	7.8	7.7	7.7	8.2
10	10.0		7.6	8.2	7.7	7.9	7.7	7.7	7.6	8.2
18	18.1		7.4	8.1	7.6	7.9	7.6	7.7	7.4	8.1
32	32.6		7.0	8.1	7.4	7.8	7.2	7.6	7.0	8.1
Range									7.0	8.3

a : Arithmetic Mean

New : Freshly prepared test solution , Old : Test solution after 24 hours exposure

Table 11. Total Hardness (as CaCO<sub>3</sub>)

(Semi-Static Condition)

Nominal Concentration (mg/l)	Mean <sup>a</sup> Measured Concentration (mg/l)	Date	Total Hardness (as CaCO <sub>3</sub> , mg/l)						Min.	Max.
			0 New	1 Old	7 New	8 Old	14 New	15 Old		
Control	—		85	85	85	86	86	86	85	86
1.0	1.01		86	86	86	86	86	86	86	86
1.8	1.78		85	85	86	86	86	86	85	86
3.2	3.30		84	85	85	85	85	85	84	85
5.6	5.49		84	85	84	85	84	85	84	85
10	10.0		82	84	83	83	83	84	82	84
18	18.1		80	82	81	81	81	81	80	82
32	32.6		76	75	76	76	75	77	75	77
Range									75	86

a : Arithmetic Mean

New : Freshly prepared test solution , Old : Test solution after 24 hours exposure

付属資料-1：希釈水の水質

Quality of Test Water

Parameter	Concentration	Parameter	Concentration
pH Value	7.7(20℃)	Iprobenfos (IBP)	< 0.0005 mg/l
Coliform Group	Not Detected	Chlornitrofen (CNP)	< 0.00001 mg/l
Total residue	220 mg/l	Chemical oxygen demand (COD <sub>Cr</sub> )	< 10 mg/l
Phenols	< 0.005 mg/l	Biochemical oxygen demand	< 1 mg/l
Total hardness (as CaCO <sub>3</sub> )	85 mg/l	Suspended solids	< 1 mg/l
Nitrate and Nitrite	0.7 mg/l	Phosphorus	< 0.01 mg/l
Fluoride	0.13 mg/l	Bromide ion	< 0.5 mg/l
Dichloromethane	< 0.001 mg/l	Sulfide ion (S <sup>2-</sup> )	< 0.01 mg/l
Carbon tetrachloride	< 0.0002 mg/l	Electric conductivity (25℃)	37 mS/m
1,2-Dichloroethane	< 0.0002 mg/l	Alkalinity (CaCO <sub>3</sub> )	49 mg/l
1,1-Dichloroethylene	< 0.001 mg/l	Total organic carbon (TOC)	1.9 mg/l
Cis-1,2-Dichloroethylene	< 0.001 mg/l	Ammonium nitrogen (NH <sub>3</sub> -N)	< 0.04 mg/l
1,1,1-Trichloroethane	< 0.001 mg/l	PCB	< 0.0005 mg/l
1,1,2-Trichloroethane	< 0.0005 mg/l	Mercury	< 0.0001 mg/l
Trichloroethylene	< 0.001 mg/l	Cadmium	< 0.001 mg/l
Tetrachloroethylene	< 0.001 mg/l	Cyanide	< 0.005 mg/l
1,3-Dichloropropene	< 0.0002 mg/l	Lead	< 0.005 mg/l
Benzene	< 0.001 mg/l	Chromium (VI)	< 0.005 mg/l
Chloroform	< 0.001 mg/l	Arsenic	< 0.001 mg/l
Thiram	< 0.0005 mg/l	Selenium	< 0.001 mg/l
Simazine (CAT)	< 0.0002 mg/l	Nickel	< 0.001 mg/l
Thiobencarb	< 0.001 mg/l	Copper	0.02 mg/l
Isoxathion	< 0.0005 mg/l	Zinc	< 0.005 mg/l
Diazinon	< 0.0005 mg/l	Aluminum	< 0.05 mg/l
Fenitrothion (MEP)	< 0.0002 mg/l	Manganese	< 0.005 mg/l
Isoprothiolane	< 0.001 mg/l	Iron	< 0.03 mg/l
Chlorothalonil (TPN)	< 0.001 mg/l	Tin	< 0.1 mg/l
Propyzamide	< 0.0005 mg/l	Sodium	35 mg/l
EPN	< 0.0005 mg/l	Potassium	7.0 mg/l
Dichlorvos (DDVP)	< 0.001 mg/l	Calcium	21 mg/l
Fenobucarb (BPMC)	< 0.001 mg/l	Magnesium	8.2 mg/l

Date: January 7, 2003

付属資料-2：予備試験結果

予備試験結果を Table 1 に示した。

Table 1. Cumulative Numbers of Living Young per Surviving Parental *Daphnia* for 12 Days in Each Test Vessel

No.	Nominal Concentration(mg/l)			
	Control	0.10	1.0	10
1	44	46	59	1
2	31	48	57	44
3	29	52	61	13
4	46	62	27	11
5	39	42	36	33
6	54	31	62	26
7	51	50	46	4
8	51	49	35	0
9	53	41	42	5
10	33	57	57	6
11	47	30	42	22
12	43	44	56	0
Total	521	552	580	165
Mean	43.4	46.0	48.3	13.8
S. D.	8.7	9.4	11.8	14.4
Inhibition rate(%)		-6.0	-11.3	68.2



NOEC and LOEC values for reproduction after 21 days exposure

入力データ (YUKMS 多重比較)

試験番号 第14013号

被験物質名 EDTA

21日目の繁殖産仔数

M:1

L:10

C:7

対照区	1	1.8	3.2	5.6	10	18
194.00	218.00	200.00	189.00	154.00	140.00	16.00
195.00	208.00	199.00	213.00	197.00	162.00	56.00
196.00	210.00	205.00	210.00	180.00	144.00	14.00
143.00	168.00	150.00	182.00	197.00	179.00	9.00
179.00	193.00	164.00	205.00	208.00	175.00	5.00
145.00	170.00	189.00	198.00	165.00	96.00	12.00
202.00	168.00	210.00	204.00	184.00	123.00	29.00
190.00	202.00	201.00	188.00	210.00	110.00	7.00
152.00	192.00	196.00	195.00	172.00	169.00	32.00
160.00	202.00	189.00	168.00	169.00	158.00	8.00

Model: 1 Basic statistic	<<Column>>					File:Filename : NOEC.DAT	axl: 0
No.	1	2	3	4	5		
N	10	10	10	10	10		
Mean	174.00000	192.90000	190.30000	195.30000	181.60000		
Variance	583.15556	336.10000	360.01111	188.45556	415.37778		
S.D.	24.14861	18.33303	18.97396	13.72791	20.38082		
S.E.	7.63646	5.79741	6.00009	4.34115	6.44498		

No.	6	7
N	10	10
Mean	144.60000	18.90000
Variance	760.48889	252.10000
S.D.	27.57696	15.87766
S.E.	8.72060	5.02098

Bartlett test	
Bartlett's statistic	CHI-SQR( 6
Q.05000	probability
5.79930	12.59159
	0.44604

Data table	File name NOEC.DAT					axl: 0
No.	1	2	3	4	5	
N	10	10	10	10	10	
Mean	174.60000	192.90000	190.30000	195.30000	181.60000	
Variance	583.15556	336.10000	360.01111	188.45556	415.37778	
S.D.	24.14861	18.33303	18.97396	13.72791	20.38082	
S.E.	7.63646	5.79741	6.00009	4.34115	6.44498	
-----						
No.	6	7				
N	10	10				
Mean	144.60000	18.90000				
Variance	760.48889	252.10000				
S.D.	27.57696	15.87766				
S.E.	8.72060	5.02098				

1-way ANOVA with completely randomized design				
Factor	Sum of squar	D.F.	Mean of squar	F Statistic
A	240047.885714	6	40007.980952	94.714764
Error	26061.200000	63	413.66841	
Total	266109.085714	69		0.000000

Estimated population means and 95 percent confidence limit			
Lower confidence limit	Population mean	Upper confidence limit	
A(1)	161.747239	174.600000	187.452761
A(2)	180.047239	192.900000	205.752761
A(3)	177.447239	190.300000	203.162761
A(4)	182.447239	195.300000	208.162761
A(5)	168.747239	181.600000	194.452761
A(6)	131.747239	144.600000	157.452761
A(7)	6.047239	18.900000	31.762761

Model: 1	Basic statistic <<Column>>		Filename : NOEC.DAT		axl: 0
No.	1	2	3	4	5
N	10	10	10	10	10
Mean	174.60000	192.90000	190.30000	195.30000	181.60000
Variance	683.15556	336.10000	360.01111	188.45556	415.37778
S.D.	24.14861	18.33303	18.97396	13.72791	20.38082
S.E.	7.63646	5.79741	6.00009	4.34115	6.44498
.....					
No.	6	7			
N	10	10			
Mean	144.60000	18.90000			
Variance	760.48889	252.10000			
S.D.	27.57696	15.87766			
S.E.	8.72060	5.02098			

Dunnnett : Parametric multiple comparison						1-side	
Comparison	Differ.	Critical	Statistic	Probability	.05 table	.01 table	
mean	value			value	value		
1 vs 2	-18.300	21.304528	-2.01191	0.09577	2.34223	2.99177	
1 vs 3	-16.700	21.304528	-1.72607	0.167407	2.34223	2.99177	
1 vs 4	-20.700	21.304528	-2.27577	0.057882	2.34223	2.99177	
1 vs 5	-7.000	21.304528	-0.76958	0.567759	2.34223	2.99177	
1 vs 6	30.000	27.112563**	8.29822	0.004216	2.34223	2.99177	
1 vs 7	155.700	27.112563**	17.11775	0.000001	2.34223	2.99177	

## 付属資料-4：試験液中の被験物質濃度の分析方法

### 1 標準品

エチレンジアミン四酢酸二水素二ナトリウム二水和物( ), 純度99.5 %

### 2 試薬、試液及び標準溶液の調製

#### 1) 試薬

アセトン, ジクロロメタン：残留農薬試験用

trans-1, 2-シクロヘキサンジアミン-N, N, N', N'-四酢酸一水和物(以下「CyDTA」と略),

水酸化ナトリウム, リン酸二水素カリウム：特級

ポリエチレングリコール 400：1 級

無水硫酸ナトリウム：残留農薬試験用

三ふっ化ほう素メタノール錯体メタノール溶液：ガスクロマトグラフ用

フルオランテン-d<sub>10</sub>：環境分析用

水(脱イオン水を蒸留したもの)

#### 2) 試液

##### ① 10 mol/l 水酸化ナトリウム溶液

水 100 ml に水酸化ナトリウム 40 g を溶解した。

##### ② 1 mol/l 水酸化ナトリウム溶液

水 90 ml 及び 10 mol/l 水酸化ナトリウム溶液 10 ml を混合した。

##### ③ 1 mol/l リン酸二水素カリウム緩衝液

水 200 ml にリン酸二水素カリウム 27.2 g を溶解し, 10 mol/l 水酸化ナトリウム溶液を加えて pH 7 に調整した。

##### ④ CyDTA 100 mg/l 溶液

CyDTA 10 mg を 1 mol/l 水酸化ナトリウム溶液に溶解し, 100 ml とした。

##### ⑤ フルオランテン-d<sub>10</sub> 100 mg/l 溶液

フルオランテン-d<sub>10</sub> 10 mg をアセトンに溶解し, 100 ml とした。

##### ⑥ 内標準溶液

フルオランテン-d<sub>10</sub> 100 mg/l 溶液 1 ml を室温で窒素ガスを通じて乾固させ, ジクロロメタン 100 ml に溶解した。

##### ⑦ 0.1 %PEG/DCM 溶液

ポリエチレングリコール 0.1 ml とジクロロメタン 100 ml を混合した。

#### 3) 標準溶液の調製

標準品 25.0 mg を精密に秤り, 水に溶解して 50 ml とした(500 mg/l)。この 2 ml を水で希釈して正確に 20 ml とし標準溶液(1)とした(50 mg/l)。さらに, この 1 ml を水で希釈して 20 ml とし, 標準溶液(2)とした(2.5 mg/l)。

標準溶液(2)を 1, 0.5, 0.25, 0.125 及び 0.05 ml ずつはかり取り, 試料溶液と同様に操作し, そのうちの 4 濃度を検量線作成用標準溶液とした。

### 3 試料溶液の調製

#### 1) 対照区の試験液

試験液の2 mlにCyDTA 100 mg/l溶液50  $\mu$ lを添加し、100  $^{\circ}$ Cに加熱しながら窒素気流下で乾固した。そこに三ふっ化ほう素メタノール錯体メタノール溶液 1 mlを加えて密栓をし、80  $^{\circ}$ Cで30分間誘導体化反応を行った。

反応終了後、室温まで放冷し、内標準溶液50  $\mu$ l及び1 mol/lリン酸二水素カリウム緩衝液(pH 7)3 mlを加え、50 mlの分液漏斗に移した後、ジクロロメタン3 mlを加えて振とう機を用いて5分間激しく振とうした。暫時放置後ジクロロメタン層を分取し、水層にはジクロロメタン3 mlを加え、同様の操作を繰り返した。全ジクロロメタン層を無水硫酸ナトリウム約5 gをのせたガラスろ過器を用いて脱水し、ろ過器上をジクロロメタン3 mlで洗浄した。ろ液及び洗液を5 mlの試験管に合わせ、0.1 %PEG/DCM溶液0.1 mlを添加した後、室温で窒素ガスを通じて1 mlまで濃縮し、定容とした。

#### 2) 1.0 mg/lの試験液

試験液の5 mlを10 mlのメスフラスコに正確に量り取り、水で定容した。その2 mlにCyDTA 100 mg/l溶液50  $\mu$ lを添加し、100  $^{\circ}$ Cに加熱しながら窒素気流下で乾固した。そこに三ふっ化ほう素メタノール錯体メタノール溶液 1 mlを加えて密栓をし、80  $^{\circ}$ Cで30分間誘導体化反応を行った。

反応終了後、室温まで放冷し、内標準溶液50  $\mu$ l及び1 mol/lリン酸二水素カリウム緩衝液(pH 7)3 mlを加え、50 mlの分液漏斗に移した後、ジクロロメタン3 mlを加えて振とう機を用いて5分間激しく振とうした。暫時放置後ジクロロメタン層を分取し、水層にはジクロロメタン3 mlを加え、同様の操作を繰り返した。全ジクロロメタン層を無水硫酸ナトリウム約5 gをのせたガラスろ過器を用いて脱水し、ろ過器上をジクロロメタン3 mlで洗浄した。ろ液及び洗液を5 mlの試験管に合わせ、0.1 %PEG/DCM溶液0.1 mlを添加した後、室温で窒素ガスを通じて1 mlまで濃縮し、定容とした。

#### 3) 1.8 mg/lの試験液

試験液の5 mlを20 mlのメスフラスコに正確に量り取り、水で定容した。その2 mlにCyDTA 100 mg/l溶液50  $\mu$ lを添加し、100  $^{\circ}$ Cに加熱しながら窒素気流下で乾固した。そこに三ふっ化ほう素メタノール錯体メタノール溶液1 mlを加えて密栓をし、80  $^{\circ}$ Cで30分間誘導体化反応を行った。

反応終了後、室温まで放冷し、内標準溶液50  $\mu$ l及び1 mol/lリン酸二水素カリウム緩衝液(pH 7)3 mlを加え、50 mlの分液漏斗に移した後、ジクロロメタン3 mlを加えて振とう機を用いて5分間激しく振とうした。暫時放置後ジクロロメタン層を分取し、水層にはジクロロメタン3 mlを加え、同様の操作を繰り返した。全ジクロロメタン層を無水硫酸ナトリウム約5 gをのせたガラスろ過器を用いて脱水し、ろ過器上をジクロロメタン3 mlで洗浄した。ろ液及び洗液を5 mlの試験管に合わせ、0.1 %PEG/DCM溶液0.1 mlを添加した後、室温で窒素ガスを通じて1 mlまで濃縮し、定容とした。

#### 4) 3.2 mg/lの試験液

試験液の4 mlを20 mlのメスフラスコに正確に量り取り、水で定容した。その2 mlにCyDTA 100 mg/l溶液50  $\mu$ lを添加し、100  $^{\circ}$ Cに加熱しながら窒素気流下で乾固した。そこに三ふ

っ化ほう素メタノール錯体メタノール溶液1 mlを加えて密栓をし、80℃で30分間誘導体  
化反応を行った。

反応終了後、室温まで放冷し、内標準溶液50 µl及び1 mol/lリン酸二水素カリウム緩衝  
液(pH 7)3 mlを加え、50 mlの分液漏斗に移した後、ジクロロメタン3 mlを加えて振とう  
機を用いて5分間激しく振とうした。暫時放置後ジクロロメタン層を分取し、水層にはジ  
クロロメタン3 mlを加え、同様の操作を繰り返した。全ジクロロメタン層を無水硫酸ナト  
リウム約5 gをのせたガラスろ過器を用いて脱水し、ろ過器上をジクロロメタン3 mlで洗  
浄した。ろ液及び洗液を5 mlの試験管に合わせ、0.1 %PEG/DCM溶液0.1 mlを添加した後、  
室温で窒素ガスを通じて1 mlまで濃縮し、定容とした。

5) 5.6 mg/lの試験液

試験液の2 mlを20 mlのメスフラスコに正確に量り取り、水で定容した。その2 mlにCyDTA  
100 mg/l溶液50 µlを添加し、100℃に加熱しながら窒素気流下で乾固した。そこに三ふ  
っ化ほう素メタノール錯体メタノール溶液1 mlを加えて密栓をし、80℃で30分間誘導体  
化反応を行った。

反応終了後、室温まで放冷し、内標準溶液50 µl及び1 mol/lリン酸二水素カリウム緩衝  
液(pH 7)3 mlを加え、50 mlの分液漏斗に移した後、ジクロロメタン3 mlを加えて振とう  
機を用いて5分間激しく振とうした。暫時放置後ジクロロメタン層を分取し、水層にはジ  
クロロメタン3 mlを加え、同様の操作を繰り返した。全ジクロロメタン層を無水硫酸ナト  
リウム約5 gをのせたガラスろ過器を用いて脱水し、ろ過器上をジクロロメタン3 mlで洗  
浄した。ろ液及び洗液を5 mlの試験管に合わせ、0.1 %PEG/DCM溶液0.1 mlを添加した後、  
室温で窒素ガスを通じて1 mlまで濃縮し、定容とした。

6) 10 mg/lの試験液

試験液の1 mlを20 mlのメスフラスコに正確に量り取り、水で定容した。その2 mlにCyDTA  
100 mg/l溶液50 µlを添加し、100℃に加熱しながら窒素気流下で乾固した。そこに三ふ  
っ化ほう素メタノール錯体メタノール溶液1 mlを加えて密栓をし、80℃で30分間誘導体  
化反応を行った。

反応終了後、室温まで放冷し、内標準溶液50 µl及び1 mol/lリン酸二水素カリウム緩  
衝液(pH 7)3 mlを加え、50 mlの分液漏斗に移した後、ジクロロメタン3 mlを加えて振とう  
機を用いて5分間激しく振とうした。暫時放置後ジクロロメタン層を分取し、水層にはジ  
クロロメタン3 mlを加え、同様の操作を繰り返した。全ジクロロメタン層を無水硫酸ナト  
リウム約5 gをのせたガラスろ過器を用いて脱水し、ろ過器上をジクロロメタン3 mlで洗  
浄した。ろ液及び洗液を5 mlの試験管に合わせ、0.1 %PEG/DCM溶液0.1 mlを添加した後、  
室温で窒素ガスを通じて1 mlまで濃縮し、定容とした。

7) 18 mg/lの試験液

試験液の1 mlを25 mlのメスフラスコに正確に量り取り、水で定容した。その2 mlにCyDTA  
100 mg/l溶液50 µlを添加し、100℃に加熱しながら窒素気流下で乾固した。そこに三ふ  
っ化ほう素メタノール錯体メタノール溶液 1 mlを加えて密栓をし、80℃で30分間誘導体  
化反応を行った。

反応終了後、室温まで放冷し、内標準溶液50 µl及び1 mol/lリン酸二水素カリウム緩衝



液(pH 7)3 mlを加え、50 mlの分液漏斗に移した後、ジクロロメタン3 mlを加えて振とう機を用いて5分間激しく振とうした。暫時放置後ジクロロメタン層を分取し、水層にはジクロロメタン3 mlを加え、同様の操作を繰り返した。全ジクロロメタン層を無水硫酸ナトリウム約5 gをのせたガラスろ過器を用いて脱水し、ろ過器上をジクロロメタン3 mlで洗浄した。ろ液及び洗液を5 mlの試験管に合わせ、0.1 %PEG/DCM溶液0.1 mlを添加した後、室温で窒素ガスを通じて1 mlまで濃縮し、定容とした。

8) 32 mg/lの試験液

試験液の1 mlを50 mlのメスフラスコに正確に量り取り、水で定容した。その2 mlにCyDTA 100 mg/l溶液50  $\mu$ lを添加し、100  $^{\circ}$ Cに加熱しながら窒素気流下で乾固した。そこに三ふっ化ほう素メタノール錯体メタノール溶液1 mlを加えて密栓をし、80  $^{\circ}$ Cで30分間誘導体化反応を行った。

反応終了後、室温まで放冷し、内標準溶液50  $\mu$ l及び1 mol/lリン酸二水素カリウム緩衝液(pH 7)3 mlを加え、50 mlの分液漏斗に移した後、ジクロロメタン3 mlを加えて振とう機を用いて5分間激しく振とうした。暫時放置後ジクロロメタン層を分取し、水層にはジクロロメタン3 mlを加え、同様の操作を繰り返した。全ジクロロメタン層を無水硫酸ナトリウム約5 gをのせたガラスろ過器を用いて脱水し、ろ過器上をジクロロメタン3 mlで洗浄した。ろ液及び洗液を5 mlの試験管に合わせ、0.1 %PEG/DCM溶液0.1 mlを添加した後、室温で窒素ガスを通じて1 mlまで濃縮し、定容とした。

4 ガスクロマトグラフ-質量分析計操作条件

機種 : HP6890 [Agilent Technologies]

検出器 : MSD・SIMモード HP5973A [Agilent Technologies]

分離管 : DB-5MS(Phenyl Arylene ポリマー化学結合型, 膜厚 0.25  $\mu$ m)

内径 0.25 mm×長さ 30 m [Agilent Technologies]

温度 : 分離管 150  $^{\circ}$ C(2分)→15  $^{\circ}$ C/分→280  $^{\circ}$ C(10分)

注入口 250  $^{\circ}$ C, トランスファーライン 280  $^{\circ}$ C, イオン源 230  $^{\circ}$ C

ガス流量 : キャリヤーガス(ヘリウム) 1.0 ml/分(定流量モード)

設定質量数(m/z) : EDTA=174, CyDTA=402, フルオランテン-d<sub>10</sub>=212

データ処理装置 : MSDケミステーション, G1701AJ Version A.03.01.J

[Agilent Technologies]

5 定量

2の3)で調製した検量線作成用標準溶液及び3で調製した試料溶液2  $\mu$ lをガスクロマトグラフ-質量分析計に注入した。標準溶液の濃度と内標準物質とのピーク面積比から検量線を作成し、試料溶液から得られた対象物質と内標準物質との面積比から検出量を求めた。次に検出量、試験液採取量等から、試験液中の被験物質濃度を算出した。

## 6 検出限界

$$\text{検出限界} : \frac{0.25 \text{ ng}}{1,000} \times \frac{1 \text{ ml} \times 1,000}{2 \mu\text{l}} \times \frac{1}{2 \text{ ml}} \times 0.785^* = 0.05 \text{ mg/l}$$

$$* \text{ Factor } 0.785 = \frac{\text{被験物質分子量 } 292.3}{\text{標準品分子量 } 372.2}$$

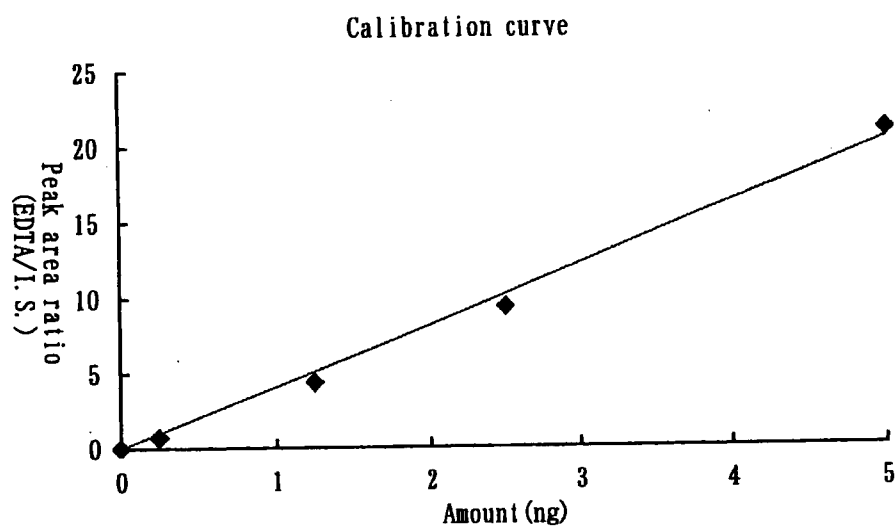
## 7 添加回収試験

### 1) 低濃度添加

希釈水に被験物質を1 mg/lになるように添加し、この溶液を用いて添加回収試験を行った。試験は平行測定3回で実施し、回収率は91.5 %, 89.7 %, 89.6 % (平均90.3 %)であった。

### 2) 高濃度添加

希釈水に被験物質を50 mg/lになるように添加し、この溶液を用いて添加回収試験を行った。試験は平行測定3回で実施し、回収率は110.9 %, 105.1 %, 98.3 % (平均104.8 %)であった。

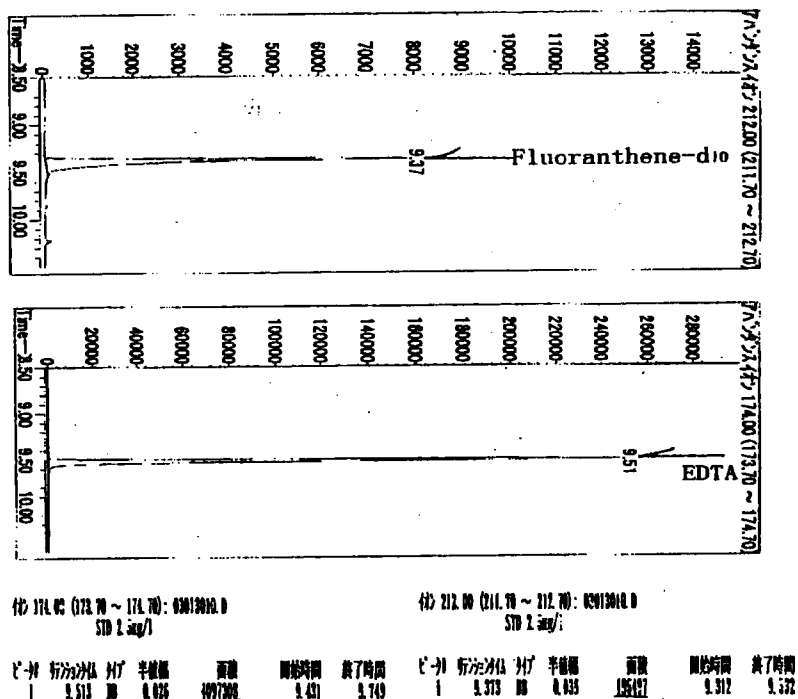


Amount (ng)	Peak area ratio (EDTA/I. S. *)
5	20.9584188
2.5	9.349087679
1.25	4.373729305
0.25	0.716468807

\*Internal Standard

Figure 1. Calibration curve of EDTA by GC analysis

Standard (2.5 mg/l): 0 hour



Control: 0 hour

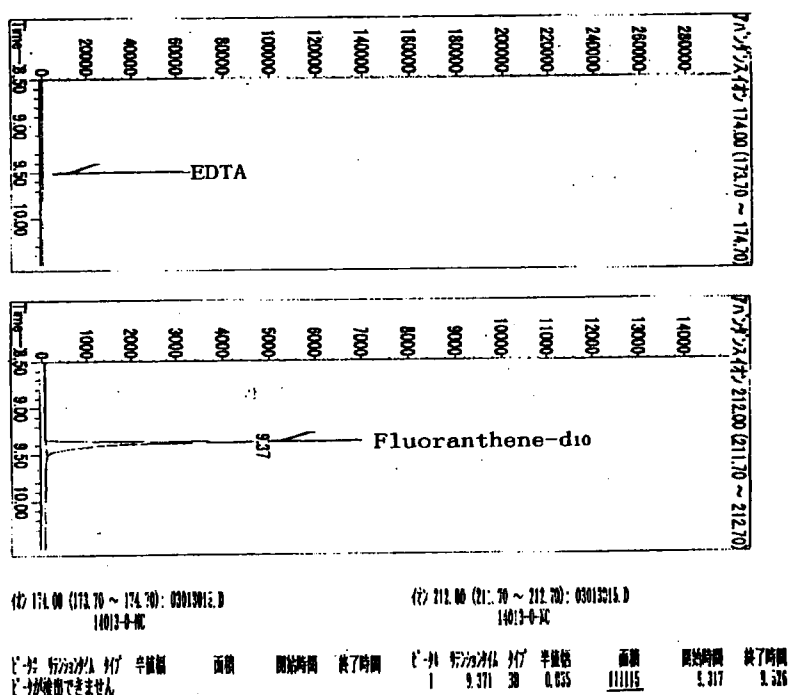
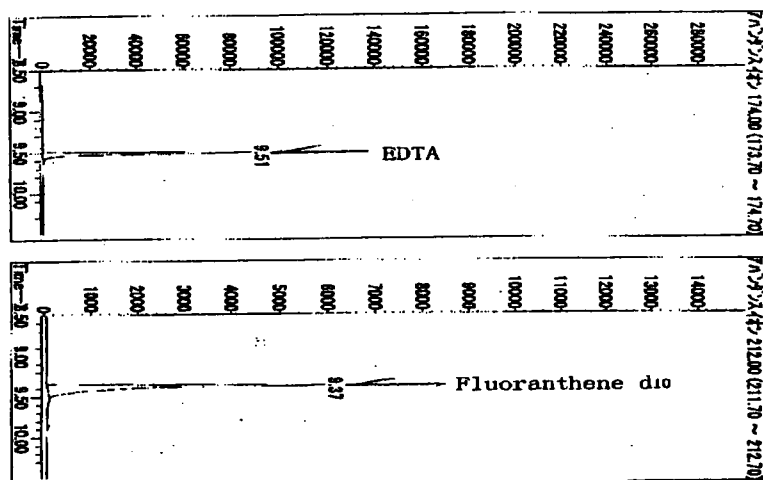


Figure 2-1. Representative chromatograms

Test solution (1.0 mg/l): 0 hour

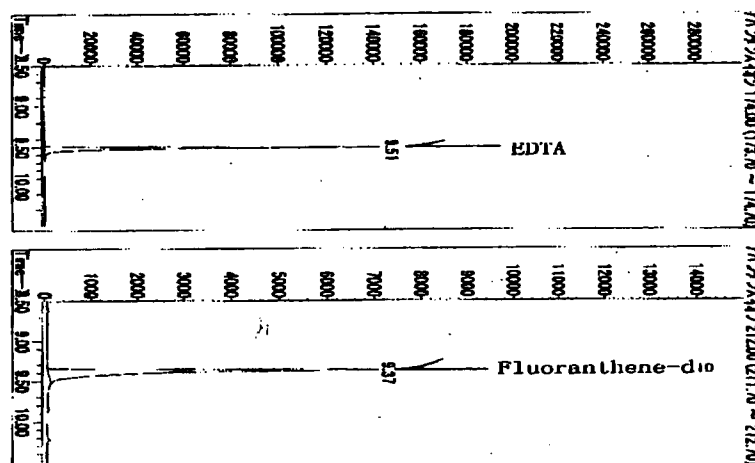


(1) 174.00 (172.70 ~ 174.70): 03013016.D  
14013-0-1-0

(2) 212.00 (211.70 ~ 212.70): 03013018.D  
14013-0-1-0

検体	検出波長	検出波長	半量値	面積	開始時間	終了時間	検体	検出波長	検出波長	半量値	面積	開始時間	終了時間
1	9.511	9.511	0.024	1355412	9.445	9.713	1	9.370	9.370	0.024	1152411	9.312	9.526

Test solution (32 mg/l): 0 hour



(1) 174.00 (172.70 ~ 174.70): 03013022.D  
14013-0-32

(2) 212.00 (211.70 ~ 212.70): 03013022.D  
14013-0-32

検体	検出波長	検出波長	半量値	面積	開始時間	終了時間	検体	検出波長	検出波長	半量値	面積	開始時間	終了時間
1	9.512	9.512	0.024	2233999	9.445	9.700	1	9.372	9.372	0.017	177707	9.315	9.529

Figure 2-2. Representative chromatograms

付属資料-5：ミジンコの観察記録

Table A-1 Result of reproduction test: Control

Rep. No.	Counts		Time																					
			1/30 1d	1/31 2d	2/1 3d	2/2 4d	2/3 5d	2/4 6d	2/5 7d	2/6 8d	2/7 9d	2/8 10d	2/9 11d	2/10 12d	2/11 13d	2/12 14d	2/13 15d	2/14 16d	2/15 17d	2/16 18d	2/17 19d	2/18 20d	2/19 21d	total
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	1
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	17	0	0	31	0	0	62	0	0	0	41	0	0	43	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	17	17	17	48	48	48	110	110	110	110	151	151	151	194	194
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	1
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	16	0	0	44	0	0	55	0	0	0	41	0	0	39	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	16	16	16	60	60	60	115	115	115	115	156	156	156	195	195
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	1
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	14	0	0	53	0	0	52	0	0	40	0	0	37		
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	14	14	14	67	67	67	119	119	119	159	159	159	196	196
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	1
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	8	0	0	47	0	0	48	0	0	40	0	0	0		
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	8	8	8	55	55	55	103	103	103	143	143	143	143	143
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	1
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	13	0	0	48	0	0	49	0	0	29	0	0	40		
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	13	13	13	61	61	61	110	110	110	139	139	139	179	179
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	1
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	14	0	0	44	0	0	50	0	0	37	0	0	0		
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	14	14	14	58	58	58	108	108	108	145	145	145	145	145
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	1
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	13	2	0	40	0	0	57	0	0	0	41	0	0	49	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	13	15	15	55	55	55	112	112	112	112	153	153	153	202	202
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	1
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	15	0	0	45	0	0	53	0	0	40	0	0	37		
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	15	15	15	60	60	60	113	113	113	153	153	153	190	190
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	1
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	12	0	0	48	0	0	51	0	0	41	0	0	0		
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	12	12	12	60	60	60	111	111	111	152	152	152	152	152
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	1
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	9	1	0	44	0	0	57	0	0	39	0	0	0		
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	9	10	10	54	54	54	111	111	111	150	150	150	150	150

P generation: ○; not detected immobility

F1 generation: F; observed the first brood

Table A-2 Result of reproduction test: Nominal concentration: 1.0 mg/l Measured concentration: 1.01 mg/l

Rep. No.	Counts	Time																						
		1/30 1d	1/31 2d	2/1 3d	2/2 4d	2/3 5d	2/4 6d	2/5 7d	2/6 8d	2/7 9d	2/8 10d	2/9 11d	2/10 12d	2/11 13d	2/12 14d	2/13 15d	2/14 16d	2/15 17d	2/16 18d	2/17 19d	2/18 20d	2/19 21d	total	
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	0	18 <sup>F</sup>	0	0	51	0	0	55	0	0	45	1	0	48	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	18	18	18	69	69	69	124	124	124	169	170	170	218	218
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	13 <sup>F</sup>	0	0	38	0	0	58	0	0	46	0	0	0	51	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	13	13	13	51	51	51	109	109	109	155	155	155	155	206	206
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	12 <sup>F</sup>	0	0	47	0	0	60	0	0	47	0	0	44		
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	12	12	12	59	59	59	119	119	119	166	166	166	210	210	
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	17 <sup>F</sup>	0	0	45	1	0	51	0	0	49	0	0	5		
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	17	17	17	62	63	63	114	114	114	163	163	163	168	168	
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	10 <sup>F</sup>	0	0	38	0	0	52	0	0	0	47	0	0	46	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	10	10	10	48	48	48	100	100	100	100	147	147	147	193	193
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	14 <sup>F</sup>	1	0	47	0	0	55	0	0	53	0	0	0		
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	14	15	15	62	62	62	117	117	117	170	170	170	170	170	
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	19 <sup>F</sup>	0	0	50	0	0	51	0	0	48	0	0	0		
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	19	19	19	69	69	69	120	120	120	168	168	168	168	168	
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	11 <sup>F</sup>	1	7	46	0	0	55	0	0	43	0	0	39		
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	11	12	19	65	65	65	120	120	120	163	163	163	202	202	
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	11 <sup>F</sup>	1	34	11	0	0	54	0	0	45	0	0	36		
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	11	12	46	57	57	57	111	111	111	156	156	156	192	192	
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 <sup>F</sup>	0	0	46	0	0	17	42	0	0	47	0	0	38	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	12	12	12	58	58	58	75	117	117	117	164	164	164	202	202
P generation: ○; not detected immobility      F1 generation: F; observed the first brood																								

P generation: ○; not detected immobility

F1 generation: F; observed the first brood



Table A-3 Result of reproduction test: Nominal concentration: 1.8 mg/l Measured concentration: 1.78 mg/l

Rep. No.	Counts	Time																					
		1/30 1d	1/31 2d	2/1 3d	2/2 4d	2/3 5d	2/4 6d	2/5 7d	2/6 8d	2/7 9d	2/8 10d	2/9 11d	2/10 12d	2/11 13d	2/12 14d	2/13 15d	2/14 16d	2/15 17d	2/16 18d	2/17 19d	2/18 20d	2/19 21d	total
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	0	14 <sup>F</sup>	0	0	50	0	0	50	0	0	40	0	0	46
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	14	14	14	64	64	64	114	114	114	154	154	154	200
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	14 <sup>F</sup>	0	0	48	0	0	49	0	0	44	0	0	44
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	14	14	14	62	62	62	111	111	111	155	155	155	199
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	9 <sup>F</sup>	0	0	41	0	0	61	0	0	41	0	0	0	53
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	9	9	9	50	50	50	111	111	111	152	152	152	152	205
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	16 <sup>F</sup>	0	0	55	0	0	39	0	0	40	0	0	0
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	16	16	16	71	71	71	110	110	110	150	150	150	150
5	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	16 <sup>F</sup>	0	0	38	2	0	59	0	0	41	8	0	0
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	16	16	16	54	56	56	115	115	115	156	164	164	164
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	16 <sup>F</sup>	0	0	35	0	0	50	0	0	47	0	0	41	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	16	16	16	51	51	51	101	101	101	148	148	148	189	189
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	0	13 <sup>F</sup>	0	40	0	0	60	0	0	54	0	0	43	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	13	13	53	53	53	113	113	113	167	167	167	210	210
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	13 <sup>F</sup>	0	0	48	0	0	49	0	0	43	0	0	48
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	13	13	13	61	61	61	110	110	110	153	153	153	201
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	0	13 <sup>F</sup>	0	46	0	0	0	50	0	0	47	0	0	40
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	13	13	59	59	59	59	109	109	109	156	156	156	196
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	0	10 <sup>F</sup>	0	15	21	0	0	60	0	0	42	0	0	41
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	10	10	25	46	46	46	106	106	106	148	148	148	189

P generation: ○; not detected immobility F1 generation: F; observed the first brood

Table A-4 Result of reproduction test: Nominal concentration: 3.2 mg/l Measured concentration: 3.30 mg/l

Rep. No.	Counts	Time																					
		1/30	1/31	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	
		1d	2d	3d	4d	5d	6d	7d	8d	9d	10d	11d	12d	13d	14d	15d	16d	17d	18d	19d	20d	21d	total
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	11 <sup>F</sup>	0	0	31	0	0	57	4	0	0	47	0	0	39
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	11	11	11	42	42	42	99	103	103	103	150	150	150	189
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 <sup>F</sup>	0	0	40	0	0	57	0	0	52	0	0	0	53
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	11	11	11	51	51	51	108	108	108	160	160	160	160	213
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	0	15 <sup>F</sup>	0	0	45	0	0	54	0	0	50	0	0	46
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	15	15	15	60	60	60	114	114	114	164	164	164	210
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	12 <sup>F</sup>	0	0	44	3	0	49	0	0	41 <sup>△</sup>	0	0	34
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	12	12	12	56	59	59	108	108	108	149	149	149	183
5	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	16 <sup>F</sup>	0	7	42	0	0	48	1	0	45	0	0	46
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	16	16	23	65	65	65	113	114	114	159	159	159	205
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	0	10 <sup>F</sup>	0	0	54	0	0	55	0	0	49	0	0	30
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	10	10	10	64	64	64	119	119	119	168	168	168	198
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	9 <sup>F</sup>	0	0	43	0	0	55	2	0	0	47	0	0	48
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	9	9	9	52	52	52	107	109	109	109	156	156	156	204
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	12 <sup>F</sup>	0	39	4	0	0	55	0	0	41	0	0	37
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	12	12	51	55	55	55	110	110	110	151	151	151	188
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	15 <sup>F</sup>	1	0	34	0	0	0	54	0	0	52	0	0	39
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	15	16	16	50	50	50	50	104	104	104	156	156	156	195
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	0	14 <sup>F</sup>	0	0	51	0	0	55	0	0	48	0	0	0
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	14	14	14	65	65	65	120	120	120	168	168	168	168
P generation: ○: not detected immobility      F1 generation: F: observed the first brood, △: observed aborted eggs, ×: observed dead offspring																							

P generation: ○: not detected immobility F1 generation: F: observed the first brood, △: observed aborted eggs, ×: observed dead offspring

Table A-5 Result of reproduction test: Nominal concentration: 5.6 mg/l Measured concentration: 5.49 mg/l

Rep. No.	Counts	Time																					
		1/30 1d	1/31 2d	2/1 3d	2/2 4d	2/3 5d	2/4 6d	2/5 7d	2/6 8d	2/7 9d	2/8 10d	2/9 11d	2/10 12d	2/11 13d	2/12 14d	2/13 15d	2/14 16d	2/15 17d	2/16 18d	2/17 19d	2/18 20d	2/19 21d	total
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	21 <sup>F</sup>	0	0	51	2	0	46	0	0	6	28 <sup>△</sup>	0	0	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	21	21	21	72	74	74	120	120	120	126	154	154	154	154
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 <sup>F</sup>	0	0	43	0	0	53	0	0	48	0	0	42	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	11	11	11	54	54	54	107	107	107	155	155	155	197	197
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	13 <sup>F</sup>	0	0	45	0	0	51	0	0	51	0	0	0	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	13	13	13	58	58	58	109	109	109	160	160	160	160	160
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	11 <sup>F</sup>	0	0	34	0	0	57	0	0	53	0	0	42 <sup>△</sup>	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	11	11	11	45	45	45	102	102	102	155	155	155	197	197
5	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 <sup>F</sup>	0	0	47	2	0	58	0	0	50	0	0	47	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	4	4	4	51	53	53	111	111	111	161	161	161	208	208
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	14 <sup>F</sup>	0	0	44	1	0	56	0	0	50	0	0	0	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	14	14	14	58	59	59	115	115	115	165	165	165	165	165
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	11 <sup>F</sup>	0	0	30	1	0	49	0	0	46 <sup>△</sup>	0	0	47	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	11	11	11	41	42	42	91	91	91	137	137	137	184	184
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	11 <sup>F</sup>	0	0	48	0	0	60	0	0	42 <sup>△</sup>	0	0	49	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	11	11	11	59	59	59	119	119	119	161	161	161	210	210
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	4 <sup>F</sup>	0	0	36	0	0	0	48	0	0	44	0	0	40	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	4	4	4	40	40	40	40	88	88	88	132	132	132	172	172
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	12 <sup>F</sup>	0	0	51	0	0	58	0	0	45	0	0	3	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	12	12	12	63	63	63	121	121	121	166	166	166	169	169
P generation: ○; not detected immobility      F1 generation: F; observed the first brood,    △; observed aborted eggs																							

P generation: ○; not detected immobility F1 generation: F; observed the first brood, △; observed aborted eggs

Table A-6 Result of reproduction test: Nominal concentration: 10 mg/l Measured concentration: 10.0 mg/l

Rep. No.	Counts	Time																					
		1/30 1d	1/31 2d	2/1 3d	2/2 4d	2/3 5d	2/4 6d	2/5 7d	2/6 8d	2/7 9d	2/8 10d	2/9 11d	2/10 12d	2/11 13d	2/12 14d	2/13 15d	2/14 16d	2/15 17d	2/16 18d	2/17 19d	2/18 20d	2/19 21d	total
1	P generation	Live	1 <sup>○</sup>	1 <sup>○</sup>	1 <sup>○</sup>	1 <sup>○</sup>	1 <sup>○</sup>	1 <sup>○</sup>	1 <sup>○</sup>	1 <sup>○</sup>	1 <sup>○</sup>	1 <sup>○</sup>	1 <sup>○</sup>	1 <sup>○</sup>	1 <sup>○</sup>	1 <sup>○</sup>	1 <sup>○</sup>	1 <sup>○</sup>	1 <sup>○</sup>	1 <sup>○</sup>	1 <sup>○</sup>	1 <sup>○</sup>	
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	29 <sup>♀</sup>	0	0	32	0	0	41	0	0	38	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	29	29	29	61	61	61	102	102	102	140	140
2	P generation	Live	1 <sup>○</sup>	1 <sup>○</sup>	1 <sup>○</sup>	1 <sup>○</sup>	1 <sup>○</sup>	1 <sup>○</sup>	1 <sup>○</sup>	1 <sup>○</sup>	1 <sup>○</sup>	1 <sup>○</sup>	1 <sup>○</sup>	1 <sup>○</sup>	1 <sup>○</sup>	1 <sup>○</sup>	1 <sup>○</sup>	1 <sup>○</sup>	1 <sup>○</sup>	1 <sup>○</sup>	1 <sup>○</sup>	1 <sup>○</sup>	
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	4 <sup>♀</sup>	0	0	27 <sup>△</sup>	0	0	44	0	0	48	0	0	39	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	4	4	4	31	31	31	75	75	75	123	123	123	162	162
3	P generation	Live	1 <sup>○</sup>	1 <sup>○</sup>	1 <sup>○</sup>	1 <sup>○</sup>	1 <sup>○</sup>	1 <sup>○</sup>	1 <sup>○</sup>	1 <sup>○</sup>	1 <sup>○</sup>	1 <sup>○</sup>	1 <sup>○</sup>	1 <sup>○</sup>	1 <sup>○</sup>	1 <sup>○</sup>	1 <sup>○</sup>	1 <sup>○</sup>	1 <sup>○</sup>	1 <sup>○</sup>	1 <sup>○</sup>	1 <sup>○</sup>	
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	3 <sup>♀</sup>	0	0	26	0	0	28	0	0	45	0	0	42	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	3	3	3	29	29	29	57	57	57	102	102	102	144	144
4	P generation	Live	1 <sup>○</sup>	1 <sup>○</sup>	1 <sup>○</sup>	1 <sup>○</sup>	1 <sup>○</sup>	1 <sup>○</sup>	1 <sup>○</sup>	1 <sup>○</sup>	1 <sup>○</sup>	1 <sup>○</sup>	1 <sup>○</sup>	1 <sup>○</sup>	1 <sup>○</sup>	1 <sup>○</sup>	1 <sup>○</sup>	1 <sup>○</sup>	1 <sup>○</sup>	1 <sup>○</sup>	1 <sup>○</sup>	1 <sup>○</sup>	
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	4 <sup>♀</sup>	0	0	40	0	0	53	0	0	41	0	0	41	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	4	4	4	44	44	44	97	97	97	138	138	138	179	179
5	P generation	Live	1 <sup>○</sup>	1 <sup>○</sup>	1 <sup>○</sup>	1 <sup>○</sup>	1 <sup>○</sup>	1 <sup>○</sup>	1 <sup>○</sup>	1 <sup>○</sup>	1 <sup>○</sup>	1 <sup>○</sup>	1 <sup>○</sup>	1 <sup>○</sup>	1 <sup>○</sup>	1 <sup>○</sup>	1 <sup>○</sup>	1 <sup>○</sup>	1 <sup>○</sup>	1 <sup>○</sup>	1 <sup>○</sup>	1 <sup>○</sup>	
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0	0	34 <sup>♀</sup>	0	0	59	0	0	0	25 <sup>△</sup>	0	0	57 <sup>△</sup>	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	0	34	34	34	93	93	93	93	118	118	118	175	175
6	P generation	Live	1 <sup>○</sup>	1 <sup>○</sup>	1 <sup>○</sup>	1 <sup>○</sup>	1 <sup>○</sup>	1 <sup>○</sup>	1 <sup>○</sup>	1 <sup>○</sup>	1 <sup>○</sup>	1 <sup>○</sup>	1 <sup>○</sup>	1 <sup>○</sup>	1 <sup>○</sup>	1 <sup>○</sup>	1 <sup>○</sup>	1 <sup>○</sup>	1 <sup>○</sup>	1 <sup>○</sup>	1 <sup>○</sup>	1 <sup>○</sup>	
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 <sup>△</sup>	0	0	4 <sup>♀</sup>	24 <sup>△</sup>	0	0	40	0	0	28 <sup>△</sup>	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	28	28	28	68	68	68	96	96
7	P generation	Live	1 <sup>○</sup>	1 <sup>○</sup>	1 <sup>○</sup>	1 <sup>○</sup>	1 <sup>○</sup>	1 <sup>○</sup>	1 <sup>○</sup>	1 <sup>○</sup>	1 <sup>○</sup>	1 <sup>○</sup>	1 <sup>○</sup>	1 <sup>○</sup>	1 <sup>○</sup>	1 <sup>○</sup>	1 <sup>○</sup>	1 <sup>○</sup>	1 <sup>○</sup>	1 <sup>○</sup>	1 <sup>○</sup>	1 <sup>○</sup>	
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	1 <sup>♀</sup>	0	0	1	0	0	46	0	0	27 <sup>×</sup>	0	0	48	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	2	2	2	48	48	48	75	75	75	123	123
8	P generation	Live	1 <sup>○</sup>	1 <sup>○</sup>	1 <sup>○</sup>	1 <sup>○</sup>	1 <sup>○</sup>	1 <sup>○</sup>	1 <sup>○</sup>	1 <sup>○</sup>	1 <sup>○</sup>	1 <sup>○</sup>	1 <sup>○</sup>	1 <sup>○</sup>	1 <sup>○</sup>	1 <sup>○</sup>	1 <sup>○</sup>	1 <sup>○</sup>	1 <sup>○</sup>	1 <sup>○</sup>	1 <sup>○</sup>	1 <sup>○</sup>	
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	15 <sup>△</sup>	0	0	40	0	0	32	0	0	23 <sup>△</sup>	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	15	15	15	55	55	55	87	87	87	110	110
9	P generation	Live	1 <sup>○</sup>	1 <sup>○</sup>	1 <sup>○</sup>	1 <sup>○</sup>	1 <sup>○</sup>	1 <sup>○</sup>	1 <sup>○</sup>	1 <sup>○</sup>	1 <sup>○</sup>	1 <sup>○</sup>	1 <sup>○</sup>	1 <sup>○</sup>	1 <sup>○</sup>	1 <sup>○</sup>	1 <sup>○</sup>	1 <sup>○</sup>	1 <sup>○</sup>	1 <sup>○</sup>	1 <sup>○</sup>	1 <sup>○</sup>	
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	2 <sup>♀</sup>	0	0	14 <sup>△</sup>	19 <sup>△</sup>	0	49	0	0	36	0	0	39 <sup>△</sup>	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	2	2	2	16	35	35	84	84	84	120	120	120	159	159
10	P generation	Live	1 <sup>○</sup>	1 <sup>○</sup>	1 <sup>○</sup>	1 <sup>○</sup>	1 <sup>○</sup>	1 <sup>○</sup>	1 <sup>○</sup>	1 <sup>○</sup>	1 <sup>○</sup>	1 <sup>○</sup>	1 <sup>○</sup>	1 <sup>○</sup>	1 <sup>○</sup>	1 <sup>○</sup>	1 <sup>○</sup>	1 <sup>○</sup>	1 <sup>○</sup>	1 <sup>○</sup>	1 <sup>○</sup>	1 <sup>○</sup>	
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	32 <sup>♀</sup>	0	0	46	0	0	34	0	0	46	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	32	32	32	78	78	78	112	112	112	158	158
P generation: ○: not detected immobility      F1 generation: F: observed the first brood,    △: observed aborted eggs,    ×: observed dead offspring																							

P generation: ○: not detected immobility F1 generation: F: observed the first brood, △: observed aborted eggs, ×: observed dead offspring

Table A-7 Result of reproduction test: Nominal concentration: 18 mg/l Measured concentration: 18.1 mg/l

Rep. No.	Counts	Time																						
		1/30 1d	1/31 2d	2/1 3d	2/2 4d	2/3 5d	2/4 6d	2/5 7d	2/6 8d	2/7 9d	2/8 10d	2/9 11d	2/10 12d	2/11 13d	2/12 14d	2/13 15d	2/14 16d	2/15 17d	2/16 18d	2/17 19d	2/18 20d	2/19 21d	total	
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	0	0	0	0	0	0	4 <sup>F</sup> <sub>△</sub>	0	0	1 <sup>F</sup> <sub>△</sub>	0	0	11 <sup>F</sup> <sub>△</sub>		
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	4	4	5	5	5	16	16	
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	6 <sup>F</sup> <sub>△</sub>	0	0	33 <sup>F</sup> <sub>△</sub>	0	0	17 <sup>F</sup> <sub>△</sub>		
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6	6	6	39	39	39	56	56	
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	0	0	0	0	0	1 <sup>F</sup>	5 <sup>F</sup> <sub>△</sub>	0	0	8 <sup>F</sup> <sub>△</sub>	0	0	0 <sup>F</sup> <sub>△</sub>		
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	6	6	6	14	14	14	14	14	
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	3 <sup>F</sup> <sub>△</sub>	0	0	3 <sup>F</sup> <sub>△</sub>	0	0	0	3 <sup>F</sup> <sub>△</sub>	0	0		
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	3	3	6	6	6	6	9	9	9	9	
5	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	1 <sup>F</sup> <sub>△</sub>	0	0	4 <sup>F</sup> <sub>△</sub>	0	0	0		
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	5	5	5	5	5	
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	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 <sup>F</sup> <sub>△</sub>	0	0	13 <sup>F</sup> <sub>△</sub>		
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	13	13	
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	0	0	0	0	0	0	7 <sup>F</sup> <sub>△</sub>	0	0	3 <sup>F</sup> <sub>△</sub>	0	0	19 <sup>F</sup> <sub>△</sub>		
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7	7	7	10	10	10	29	29	
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	0	2 <sup>F</sup> <sub>△</sub>	0	0	3 <sup>F</sup> <sub>△</sub>	0	0	2 <sup>F</sup> <sub>△</sub>		
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	2	5	5	5	7	7	
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	0	0	0	8 <sup>F</sup> <sub>△</sub>	0	0	7 <sup>F</sup> <sub>△</sub>	2	0	13 <sup>F</sup> <sub>△</sub>	2 <sup>F</sup> <sub>△</sub>	0	0		
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8	8	8	15	17	17	30	32	32	32	32	
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	0	0	0	2 <sup>F</sup> <sub>△</sub>	0	0	6 <sup>F</sup> <sub>△</sub>	0	0	0	0 <sup>F</sup> <sub>△</sub>	0	0		
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	2	8	8	8	8	8	8	8	8	
P generation : ○ ; not detected immobility      F1 generation : F ; observed the first brood,    △ ; observed aborted eggs,    × ; observed dead offspring																								

P generation: ○; not detected immobility F1 generation: F; observed the first brood, △; observed aborted eggs, ×; observed dead offspring

Table A-8 Result of reproduction test: Nominal concentration: 32 mg/l Measured concentration: 32.6 mg/l

Rep. No.	Counts	Time																						
		1/30 1d	1/31 2d	2/1 3d	2/2 4d	2/3 5d	2/4 6d	2/5 7d	2/6 8d	2/7 9d	2/8 10d	2/9 11d	2/10 12d	2/11 13d	2/12 14d	2/13 15d	2/14 16d	2/15 17d	2/16 18d	2/17 19d	2/18 20d	2/19 21d	total	
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	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	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	1	
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	3	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	3	
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	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	4	5		
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	5	5		
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	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
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	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
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	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
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	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	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	1	
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
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	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	
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	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
P generation: ○; not detected immobility      F1 generation: F; observed the first brood, △; observed aborted eggs, ×; observed dead offspring																								

P generation: ○; not detected immobility F1 generation: F; observed the first brood, △; observed aborted eggs, ×; observed dead offspring

## 陳述書

1 試験委託者  
環境省

2 試験番号  
第14013号

3 試験の表題  
エチレンジアミン四酢酸のオオミジンコ (*Daphnia magna*) に対する繁殖阻害試験

上記試験は、日本国環境省総合環境政策局環境保健部環境安全課環境リスク評価室長通知「生態影響試験実施に関する基準の改正について」（別添）「生態影響試験実施に関する基準」（環保安第242号，2001年）を遵守して実施したものです。

2003 年 3 月 31 日

財団法人 日本食品分析センター 多摩研究所

運営管理者



## 陳述書

1 試験委託者

環境省

2 試験番号

第14013号

3 試験の表題

エチレンジアミン四酢酸のオオミジンコ (*Daphnia magna*) に対する繁殖阻害試験

上記試験は、日本国環境省総合環境政策局環境保健部環境安全課環境リスク評価室長通知「生態影響試験実施に関する基準の改正について」(別添)「生態影響試験実施に関する基準」(環保安第242号, 2001年)を遵守して実施したものです。

なお、試験実施にあたっては、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)を遵守しました。

2003 年 3 月 31 日

財団法人 日本食品分析センター 多摩研究所

試験責任者





## 信頼性保証書

1 試験委託者

環境省

2 試験番号

第14013号

3 試験の表題

エチレンジアミン四酢酸のオオミジンコ (*Daphnia magna*) に対する繁殖阻害試験

4 検閲

本試験の検閲は、財団法人 日本食品分析センター 多摩研究所 信頼性保証部門の標準操作手順書に従い、以下のとおり実施した。

検 閲 内 容	検閲実施日	試験責任者への 報告年月日	運営管理者への 報告年月日
試験計画書	2002年12月20日	2002年12月20日	2002年12月20日
被験物質の受領	2003年01月08日	2003年01月09日	2003年01月09日
試験の実施	2003年01月28日	2003年01月29日	2003年01月29日
試験計画書	2003年01月29日	2003年01月31日	2003年01月31日
試験の実施	2003年01月29日	2003年01月31日	2003年01月31日
分析の実施, 試薬等 機器, 検体	2003年01月29日	2003年01月31日	2003年01月31日
試験の実施, 試薬等, 機器	2003年01月31日	2003年02月03日	2003年02月03日
分析の実施	2003年02月10日	2003年02月12日	2003年02月12日
試験の実施, 被験物質	2003年02月13日	2003年02月14日	2003年02月14日
試験の実施	2003年02月20日	2003年02月21日	2003年02月21日
試験中の保管文書	2003年03月25日	2003年03月25日	2003年03月25日
最終報告書草案及び生データ	2003年03月28日	2003年03月28日	2003年03月28日
最終報告書	2003年03月31日	2003年03月31日	2003年03月31日

上記検閲の結果、本試験最終報告書は試験に用いた方法が正確に記載され、報告結果は試験の生データを正確に反映していることを確認した。

2003 年 3 月 31 日

財団法人 日本食品分析センター 多摩研究所  
信頼性保証部門責任者

