

環境庁殿

試 験 報 告 書

D L－メチオニンのオオミジンコ (*Daphnia magna*) に対する繁殖阻害試験

(試験番号：NO1998－生11)

1999年 7月30日

株式会社クニミネ工業

陳 述 書

株式会社クレハ分析センター

試験委託者： 環境庁

表題： DL-メチオニンのオオミジンコ (*Daphnia magna*) に対する繁殖阻害試験

試験番号： NO1998-生11

上記試験は環境庁のGLP規則に従って実施したものである。

1999年 7月30日

運営管理者



信 頼 性 保 証 証 明

株式会社クレハ分析センター

試験委託者： 環境庁

表題： DL-メチオニンのオオミジンコ (*Daphnia magna*) に対する
繁殖阻害試験

試験番号： NO1998-生11

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	運営管理者への 報告日	試験責任者への 報告日
試験実施状況査察	1999年6月11日	1999年6月11日	1999年6月11日
	1999年6月17日	1999年6月17日	1999年6月17日
	1999年6月25日	1999年6月25日	1999年6月25日
	1999年7月 2日	1999年7月 2日	1999年7月 2日
試験報告書監査	1999年7月26日	1999年7月26日	1999年7月26日

1999年7月30日

信頼性保証業務担当者：



試験実施概要

1. 表題：D L－メチオニンのオオミジンコ (*Daphnia magna*) に対する繁殖阻害試験
2. 試験目的：D L－メチオニンについて、オオミジンコ (*Daphnia magna*) に対する繁殖阻害試験を21日間行い、最小作用濃度 (LOEC) と最大無作用濃度 (NOEC) を求め、可能な限り50%繁殖阻害濃度 (EC50) も求める。
3. 適用ガイドライン： 本試験は、OECD化学品テストガイドラインNo. 202「ミジンコ類、急性遊泳阻害試験および繁殖試験」(1984年4月採択)の改訂版であるガイドラインNo. 211「オオミジンコ繁殖試験」(1997年4月提案)に準拠した。
4. 適用GLP：本試験は環境庁のGLP規則に準拠した。
5. 試験委託者
名称： 環境庁
住所： 〒100-8975 東京都千代田区霞ヶ関一丁目2-2
委託責任者： 環境庁企画調整局環境保健部環境安全課環境リスク評価室
室長補佐 XXXXXXXXXX
6. 試験受託者：
名称： 株式会社クレハ分析センター
所在地： 〒974-8686 福島県いわき市錦町落合16番地
7. 試験施設：
名称： 株式会社クレハ分析センター
所在地： 〒974-8686 福島県いわき市錦町落合16番地

8. 試験関係者：

試験責任者（生物）	■■■■■	■■■■■	（1999年 7月30日）
試験責任者（理化学）	■■■■■	■■■■■	（1999年 7月30日）
試験担当者（生物）	■■■■■	■■■■■	（1999年 7月30日）
試験担当者（生物）	■■■■■	■■■■■	（1999年 7月30日）
試験担当者（生物）	■■■■■	■■■■■	（1999年 7月30日）
試験担当者（生物）	■■■■■	■■■■■	（1999年 7月30日）
試験担当者（理化学）	■■■■■	■■■■■	（1999年 7月30日）

9. 試験期間： 試験開始日 1999年 1月 4日
試験終了日 1999年 7月30日
暴露期間 1999年 6月11日～
1999年 7月2日

10. 保管：

試験計画書、生データ、記録文書および試験報告書は、試験報告書作成後10年間、株式会社クレハ分析センター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上決定する。

目 次

	頁
要旨	7
1. 被験物質	8
1. 1 名称、構造式および物理化学的性状	8
1. 2 供試試料	8
1. 3 被験物質の確認および保管条件下での安定性	8
2. 供試生物	9
3. 試験方法	9
3. 1 試験条件	9
3. 2 希釈水	10
3. 3 試験装置、試験容器および恒温槽等	10
3. 4 試験濃度の設定	10
3. 5 試験液の調製	10
3. 6 試験液の分析	10
3. 7 試験操作	10
4. 結果の算出	11
4. 1 親ミジンコの半数致死濃度（LC50）の算出	11
4. 2 50%繁殖阻害濃度（EC50）の算出	11
4. 3 最大無作用濃度（NOEC）および最小作用濃度（LOEC）	11
5. 結果および考察	12
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	12
5. 2 試験水中の被験物質濃度	12
5. 3 ミジンコの観察結果	12
5. 4 親ミジンコの半数致死濃度（LC50）	13
5. 5 50%繁殖阻害濃度（EC50）	13
5. 6 累積産仔数に及ぼす最大無作用濃度（NOEC）および最小作用濃度（LOEC）	13
5. 7 試験水の水温、溶存酸素濃度、pHおよび硬度	13
Table 1～11	14～23
Figure 1, 2	16, 19
付属資料－1 希釈水の水質	
付属資料－2 試験液の分析方法	
付属資料－3 ミジンコの観察結果	

要 旨

試験委託者 環境庁

表 題 DL-メチオニンのオオミジンコ (*Daphnia magna*) に対する
繁殖阻害試験

試験番号 NO1998-生11

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4月採択)の改訂版であるガイドライン No.211「オオミジンコ繁殖試験」(1997年4月提案)に準拠して実施した。

- 1) 被験物質: DL-メチオニン
- 2) 暴露方法: 半止水式(週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: 対照区、100、32および10mg/L
- 6) 試験液量: 1容器(連)につき80ml
- 7) 連数: 1濃度区につき10連
- 8) 供試生物数: 10頭/濃度区(1連につき1頭)
- 9) 試験温度: $20 \pm 1^{\circ}\text{C}$
- 10) 照明: 16時間明/8時間暗
- 11) 被験物質の分析: HPLC法

結 果

1) 試験液中の被験物質濃度

被験物質が設定濃度の $\pm 20\%$ 以内であり、設定濃度を用いて計算を行った。

- 2) 21日間の親ミジンコの50%致死濃度(LC50): 100mg/L以上
- 3) 21日間の50%繁殖阻害濃度(EC50): 100mg/L以上
- 4) 21日間の最大無作用濃度(NOEC): 32mg/L
- 5) 21日間の最小無作用濃度(LOEC): 100mg/L

無作用濃度
修正あり

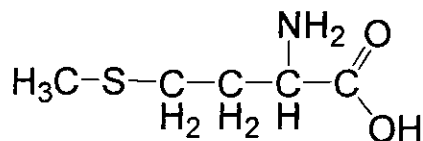
1. 被験物質

1. 1 名称、構造式および物理化学的性状

名称： DL-メチオニン

(CAS： 59-51-8)

構造式：



分子式： $\text{CH}_3\text{S}(\text{CH}_2)_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$

分子量： 149.21

安定性： 安定

1-オクタノール／水分配係数(log P)： 報告されていない

水への溶解度： 33.81 g/L (25℃)

蒸気圧： 報告されていない

1. 2 供試試料

購入先： XXXXXXXXXX

入手先： XXXXXXXXXX

入手日： 1998年11月20日

ロット番号： ACH6705

外観： 白色粉末

純度及び不純物： 100.3%

1. 3 被験物質の確認および保管条件下での安定性

被験物質は当施設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結果、スペクトルに変化は認められなかったことより被験物質は当施設の冷蔵庫に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、1997年2月5日に国立環境研究所より入手したものを、(株)クレハ分析センター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(EC50)は0.79mg/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(1999年5月19日生まれ)を供試ミジンコの親とし、以下の条件で飼育した。成熟し幼体を産むようになったら1週間に少なくとも2回以上幼体を除去した。3週目に入り暴露開始前日に、その前2週間の死亡率が0%で休眠卵や雄が発生しなかったバッチから、育房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(1999年6月11日暴露開始)。

飼育水： 希釈水(3.2参照)

飼育密度： 15頭/L飼育水

水温： 20±1℃

照明： 室内光、16時間明/8時間暗

餌： *Chlorella vulgaris*

給餌量： ミジンコ1頭当たり*Chlorella vulgaris*を0.15mgC(有機炭素含量)/日の割合で与えた。

3. 試験方法

3.1 試験条件

1) 暴露方法： 半止水式

2) 暴露期間： 21日間

3) 試験液量： 1容器(連)につき80mL

4) 連数： 10容器(連)/濃度区

5) 供試生物数： 10頭/1濃度区(1連につき1頭)

6) 試験温度： 20±1℃

7) 照明： 室内光、16時間明(1200lux以下)/8時間暗

8) 給餌量： ミジンコ1頭当たり*Chlorella vulgaris*を0.15～0.18mgC(有機炭素含量)/日

3. 2 希釈水

脱塩素水（呉羽化学工業株式会社錦工場内の工業用水（塩素処理を行い、飲料水グレードのもの）を活性炭処理で残留塩素等を除去し、空気による曝気処理を行ったもの）を使用した。希釈水の水質として、硬度が38mg/L（CaCO₃換算）、pHが7.5であった。

また、1999年2月2日の希釈水の分析結果を〔付属資料－1〕に示した。

3. 3 試験装置、試験容器および恒温槽等

試験容器： 100mL容ガラス製ビーカー

恒温槽： 恒温室

水温計： 水銀温度計

pH計： 東亜電波工業（HM－30V）

溶存酸素計： 飯島電子工業（B－505）

ICP発光分析装置： 日立306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は1000mg/L以上であることから、100mg/Lから始めて、それ以下の濃度を公比3.2で3段階設定した。各濃度区は以下の通りである。

（対照区、100、32、10mg/L）

3. 5 試験液の調製

1000mg/Lの濃度のDL－メチオニンを原液として希釈水で調製し、その所定量を1Lメスフラスコに入れ希釈水で定容し試験液とした。

3. 6 試験液の分析

全濃度区（但し、各1試験容器）について、暴露期間中に3回（換水前後で計6回）の頻度で10mLずつ採取し、HPLCにより分析した。試験水の分析に際しては、試料測定毎に標準溶液の測定を行い、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（DO）、pHおよび硬度を測定後、ガラスピペットを用いて供試ミジンコを投入し、その時点を暴露開始時とした。その際、ピペット内の飼育水が、全量で試験液量に対して1%以内となるようにした。その後、換水毎にミジンコを新しい試験液に移しかえ、21日目まで飼育した。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) 生死、遊泳状態および外観の異常の有無を毎日観察して、記録した。

計数後の死亡個体は取り除いた。

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

死亡幼体、墮胎卵および休眠卵の発生等については、その有無を毎日観察し記録した。最初の幼体産出日を、初産日として記録した。

- ・水質測定 : 水温、溶存酸素濃度 (D.O.)、pHを全濃度区 (但し、各1試験容器) について、暴露期間中に少なくとも3回 (調製時および換水前で1回) 換水前後に測定した。硬度は対照区について測定を行った。

4 結果の算出

4. 1 親ミジンコの半数致死濃度 (LC50) の算出

各濃度区での親ミジンコの死亡数は10%以内であることから、21日間の半数致死濃度 (LC50) は試験最高濃度以上とした。

4. 2 50%繁殖阻害濃度 (EC50) の算出

各濃度区での生存親1頭当たりの平均累積産仔数 (生存幼体) から阻害百分率を算出した。阻害百分率を濃度に対してプロットし、試験最高濃度においても阻害百分率が50%を越えないので21日間の50%繁殖阻害濃度 (EC50) は試験最高濃度以上とした。

4. 3 最大無作用濃度 (NOEC) および最小作用濃度 (LOEC) と

各濃度区毎の21日間暴露の生存親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 multiple comparison 法により求め、対照区と有意差が認められない最高濃度 (最大無作用濃度: NOEC) および有意差が認められる最低濃度 (最小作用濃度: LOEC) を決定した。

統計解析には、統計処理手順書 (Z992050、992051) に従った。

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 認められなかった。

5. 2 試験水中の被験物質濃度

暴露開始当日、10日目および19日目の試験液調製時の被験物質濃度は設定値10～100mg/Lに対して、それぞれ9.85～101mg/L、9.81～101mg/Lおよび9.55～98.4mg/Lであり、設定値に対する割合はそれぞれ99～101%、98～101%および96～98%であった。また、3日目、12目および21日目の換水前の濃度はそれぞれ10.2～108mg/L、10.3～105mg/Lおよび9.94～105mg/Lであり、設定値に対する割合はそれぞれ102～108%、103～107%、99～105%であった。

[Table-1 (p. 14)、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0%であり、試験成立条件である20%以下の基準を満たした。

[Table2-1, 2-2 (p. 15)、Figure1 (p. 16) 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後8～9日後であった。

[Table3- (p. 17) 付属資料-3]

平均累積産仔数

対照区の21日間での親ミジンコ1頭当たりの平均累積産仔数は86.3頭であり、試験成立条件である平均累積産仔数60頭の基準を満たした。

[Table-4 (P. 18)、Figure-2 (P. 19)、付属資料-3]

休眠卵の発生等

対照区および各試験濃度区で休眠卵は認められなかった。

5. 4 親ミジンコの半数致死濃度 (LC50)

21日間暴露の親ミジンコの半数致死濃度 (LC50) は100mg/L以上であった。

[Table-5 (P. 20)]

5. 5 50%繁殖阻害濃度 (EC50)

21日間暴露の50%繁殖阻害濃度 (EC50) は、100mg/L以上であった。(Table 6)

[Table-6 (P. 20)]

5. 6 累積産仔数に及ぼす最大無作用濃度 (NOEC) および最小作用濃度 (LOEC)

親ミジンコ1頭あたりの累積産仔数に及ぼす21日間の最大無作用濃度 (NOEC) は32mg/Lであり、最小作用濃度 (LOEC) は100mg/Lであった。

[Table-7 (P. 21)]

5. 7 試験水の水温、溶存酸素濃度、pHおよび硬度

21日間の暴露期間中の水温は20.5~21.0℃であり、設定範囲内であった。
溶存酸素濃度は8.4~8.7mg/Lであり、すべての濃度区で飽和溶存酸素濃度の60%以上が維持された(20.0℃の飽和溶存酸素濃度: 8.84mg/L)。

pHは7.5~8.0であり、変動は1以下であった。

硬度は38~45mg/Lであり、設定範囲内であった。

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

[Table-8、9、10、11 (P. 22、23)]

以 上

Table. 1 Measured Concentration of DL-methionine 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	3 day old	new	old
Control	N. D.	N. D.	----	----
10	9.85	10.2	99	102
32	31.7	34.5	99	108
100	101	108	101	108

Nominal Concentration mg/L	Measured Concentration (mg/L)		Percent of Nominal	
	10 day new	12 day old	new	old
Control	N. D.	N. D.	----	----
10	9.81	10.3	98	103
32	32.1	34.1	100	107
100	101	105	101	105

Nominal Concentration mg/L	Measured Concentration (mg/L)		Percent of Nominal	
	19 day new	21 day old	new	old
Control	N. D.	N. D.	----	----
10	9.55	9.94	96	99
32	31.4	33.1	98	103
100	98.4	105	98	105

new : freshly prepared test solution

old : test solutions 48,72 hours after freshly prepared

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

Nominal 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	0	0	0	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
32	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

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

Nominal Conc. (mg/L)	Days					
	1	2	4	7	14	21
Control	0	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0	0
32	0	0	0	0	0	0
100	0	0	0	0	10	10

Figure 1 Cumulative Numbers of Dead Parental *Daphnia magna*

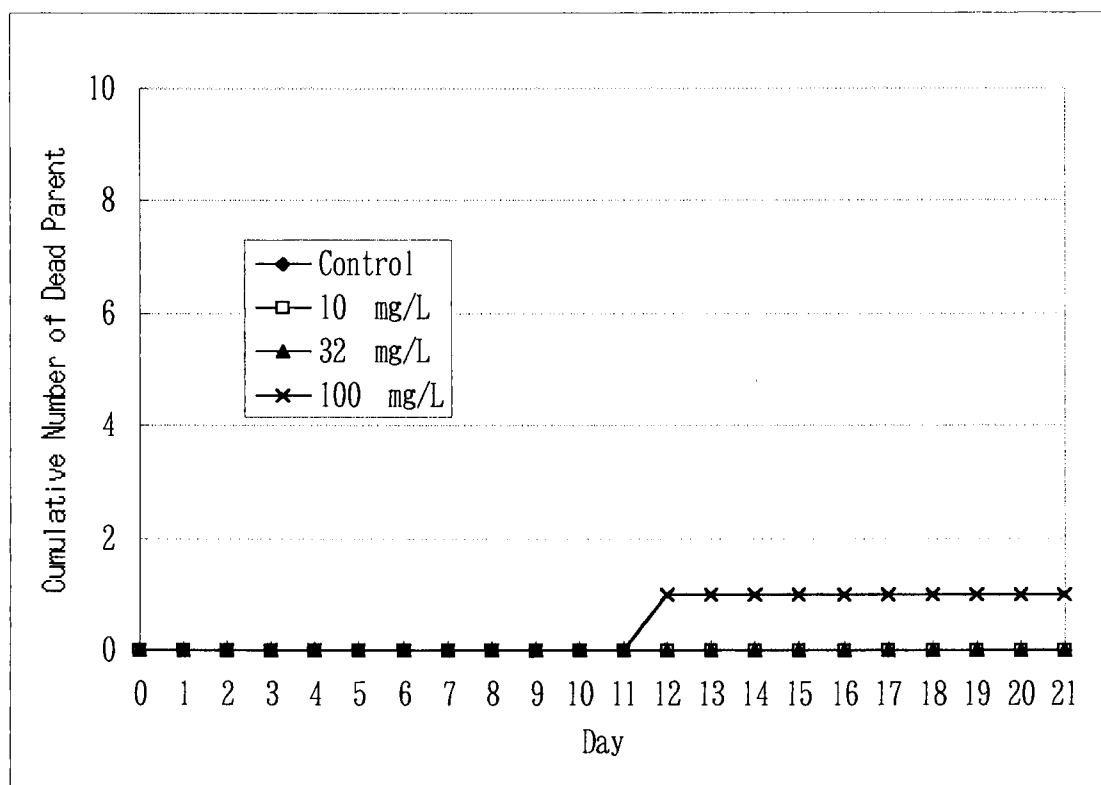


Table 3 Time (days) to First Brood Production

Vessel No.	Nominal Concentration (mg/L)			
	Control	10	32	100
1	8	9	8	11
2	8	8	8	8
3	8	9	8	-
4	8	8	9	9
5	8	8	8	8
6	8	9	8	17
7	9	8	8	17
8	8	9	8	8
9	8	8	8	9
10	8	8	8	8
Mean	8.1	8.4	8.1	10.6

Vessel 2, NC100
8
修正あり

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

Nominal Conc. (mg/L)	Measured Conc. (mg/L)	Days																	
		0	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	
Control	Control	0	0	0	6.7	7.4	8.8	19.1	20.1	28.0	34.1	36.1	50.4	61.5	65.2	75.9	84.1	86.3	
10	9.95	0	0	0	3.0	5.8	5.8	12.7	15.2	18.6	27.9	27.9	30.4	50.0	50.0	53.4	78.2	78.2	
32	32.8	0	0	0	5.1	5.8	6.7	14.1	14.1	17.3	27.0	27.0	33.4	49.5	49.5	59.0	80.1	80.1	
100	103	0	0	0	0.8	3.6	3.6	5.4	8.3	8.3	10.6	12.8	12.8	23.6	26.4	28.9	43.4	47.2	

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

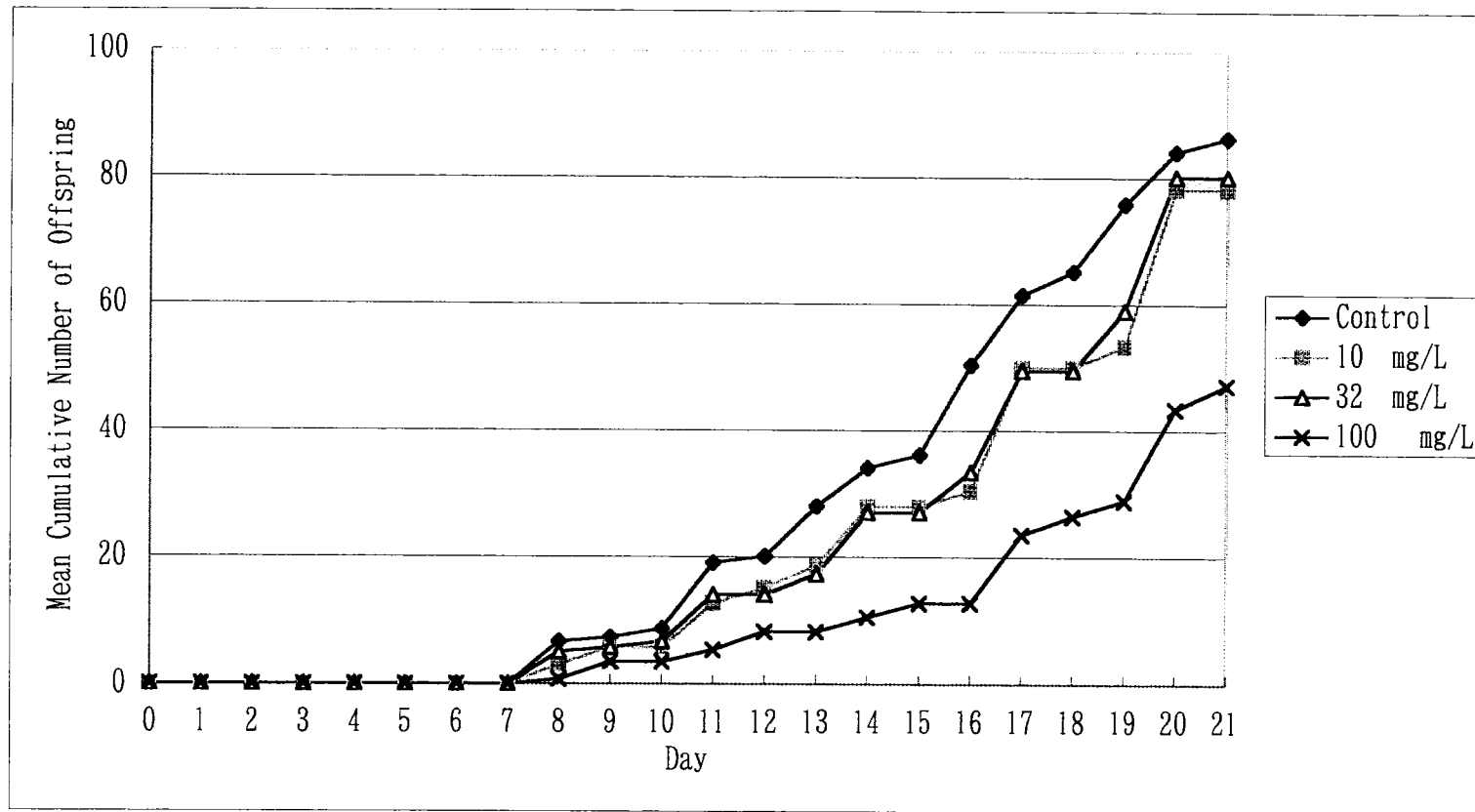


Table 5 Calculated LC50 Values for Parental *Daphnia magna*

Exposure period (day)	LC50 (mg/L)	95% Confidence limit (mg/L)	Statistical method
21	> 100	–	–

Table 6 Calculated EC50 Values for Inhibition of Reproduction

Exposure period (day)	EC50 (mg/L)	95% Confidence limit (mg/L)	Statistical method
21	> 100	–	–

Table 7 Cumulative numbers of juveniles produced per adult alive for 21days

Vessel No.	Nominal Concentration, mg/L (Measured Concentration, mg/L)			
	Control	10 (9.95)	32 (32.8)	100 (103)
1	85	64	83	53
2	91	93	53	—
3	94	82	95	0
4	96	72	75	78
5	62	69	80	50
6	107	84	83	1
7	96	82	72	10
8	74	77	77	75
9	89	79	96	113
10	69	80	87	45
Mean	86.3	78.2	80.1	47.2
S.D.	13.9	8.2	12.4	38.5
Inhibition ratio (%)		9.4	7.2	45.3
Significant difference		N.S	N.S.	*

N.S. : Indicate a no- significant difference by Dunnett multiple comparison procedure

*. : Indicate a significant difference by Dunnett multiple comparison procedure

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

		Temperature, (°C)			
		Nominal Concentration (mg/L)			
days		Control	10	32	100
0	new	20.8	20.9	20.8	20.8
3	old	21.0	21.0	20.9	20.9
10	new	20.8	21.0	21.0	21.0
12	old	20.7	20.6	20.7	20.5
19	new	21.0	20.9	21.0	21.0
21	old	21.0	20.9	20.9	21.0

new : freshly prepared test solution

old : test solutions after 48 ,72 hours exposure

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

		D. O. (mg/L)			
		Nominal Concentration (mg/L)			
days		Control	10	32	100
0	new	8.6	8.6	8.6	8.7
3	old	8.6	8.4	8.5	8.5
10	new	8.6	8.6	8.6	8.5
12	old	8.4	8.4	8.5	8.5
19	new	8.7	8.6	8.6	8.7
21	old	8.5	8.4	8.4	8.4

new : freshly prepared test solution

old : test solutions after 48 ,72 hours exposure

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

		pH			
		Nominal Concentration (mg/L)			
days		Control	10	32	100
0	new	7.5	7.5	7.5	7.5
3	old	8.0	8.0	7.9	7.9
10	new	7.8	7.9	7.9	7.8
12	old	7.6	7.7	7.8	7.8
19	new	7.8	7.9	7.9	7.8
21	old	7.7	7.8	7.8	7.8

new : freshly prepared test solution

old : test solutions after 48 ,72 hours exposure

Table 11 Total hardness (as CaCO₃) during a 21-day *Daphnia magna* Reproduction
Inhibition Test (Semi-Static Test)

		Total hardness (as CaCO ₃) (mg/L)			
		Nominal Concentration (mg/L)			
days		Control	10	32	100
0	new	38	38	38	39
3	old	40	42	42	42
10	new	38	38	38	38
12	old	39	40	39	39
19	new	43	43	44	43
21	old	45	44	43	43

new : freshly prepared test solution

old : test solutions after 48 ,72 hours exposure

付属試料－ 1

希釈水の水質

(全 1 頁)

Water Quality of Dilute Water

Parameter	Concentration	
Coliform group bacteria	N. D.	
pH	8.1	-
BOD	<0.5	mg/L
COD	<0.5	mg/L
Mercury	<0.0005	mg/L
Copper	<0.01	mg/L
Cadmium	<0.002	mg/L
Zinc	<0.01	mg/L
Lead	<0.005	mg/L
Aluminium	<0.02	mg/L
Nickel	<0.005	mg/L
Chromium	<0.05	mg/L
Manganese	<0.02	mg/L
Tin	<0.1	mg/L
Iron	<0.1	mg/L
Cyanide	<0.1	mg/L
Free Chlorine	<0.05	Lmg/
Bromide ion	<0.2	mg/L
Fluoride	0.04	mg/L
Sulfide ion	<0.5	mg/L
Ammonium ion	<0.03	mg/L
Arsenic	<0.005	mg/L
Selenium	<0.005	mg/L
Evaporation residue	61	mg/L
Electric conductivity	7.4	mS/m
Total hardness (as CaCO ₃)	25.8	mg/L
Alkalinity	29.5	mg/L
Sodium	5.6	mg/L
Potassium	1.1	mg/L
Calcium	8.1	mg/L
Magnesium	1.8	mg/L
Total organophosphorous pesticide	<0.003	mg/L
Herbicide Simazine	<0.0003	mg/L
Herbicide Thiobencarb	<0.002	mg/L
Fungicide Thiuram	<0.0006	mg/L

Sampling Date : 1999.02.02

付属試料－2

試験液の分析方法

(全24頁)

DL-メチオニン の分析法

(株)クレハ分析センター

試料 : 試験液

化学名及び化学式

DL-Methionine

分子式 : $C_5H_{11}NO_2S$
 化学式 : $CH_3SCH_2CH_2CH(NH_2)COOH$
 分子量 : m. w 149.21

物理的化学的性質

液体、融点 : 281℃
 性状 : 水に可溶
 : 白色の薄片状結晶か結晶性粉末

① 分析法

1) 装置及び器具

高速液体クロマトグラフ : LC-10AD 島津製作所
 検出器 (UV) : SPD-10A 島津製作所
 オートインジェクタ : SIL-6B 島津製作所
 インテグレーター : C-R5A (CHROMATOPAC) 島津製作所
 メスフラスコ : 容量 100 mL 褐色
 ホールピペット : 容量 1 mL、10 mL、20 mL
 マイクロシリンジ : 容量 100 μ L

2) 試薬

アセトニトリル : 試薬 高速液体クロマトグラフィー用 和光純薬 (株)
 水 : 超純水 Milli-RX 12 α Millipore
 DL-メチオニン : 試薬 特級

3) DL-メチオニン標準原液 (1000 mg/L)

DL-メチオニン標準品の 0.100 g を容量 100 mL のメスフラスコに量りとり、水を標線まで加える。

4) 高速液体クロマトグラフの操作条件

分離管 : Shim-pack CLC-ODS 150 mm \times 6 mm ID 島津製作所
 検出波長 : UV 210 nm
 溶離液 : 0.7 mL + (アセトニトリル 3.5 : 水 6.5 V/V) 1000 mL
 流量 : 1.05 mL/min
 感度 : 0.128 AFUS
 記録紙速度 : 5 mm/min
 保持時間 : 2.3 min
 試料量 : 20 μ L

5) 検量線の作成

DL-メチオニンの標準原液に水を加えて希釈し、200、100、10、1 mg/L の標準溶液を調整する。この液 20 μ L を上記条件の高速液体クロマトグラフに注入し、クロマトグラムを画かせ、ピーク面積を記録させる。
 濃度を縦軸に、横軸にピークの面積をとり検量線を作成する。

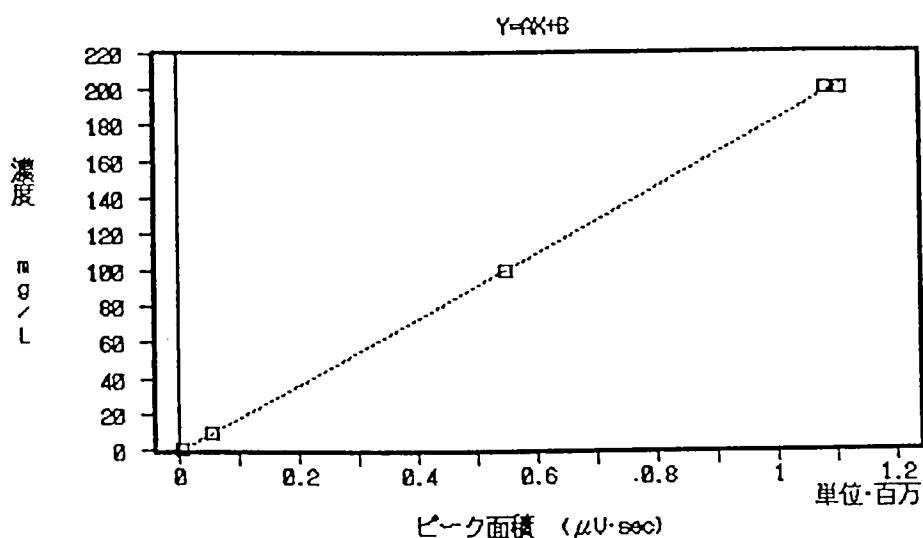
(注-1) (注-2)

1. 検量線作成

表-1 Input Date

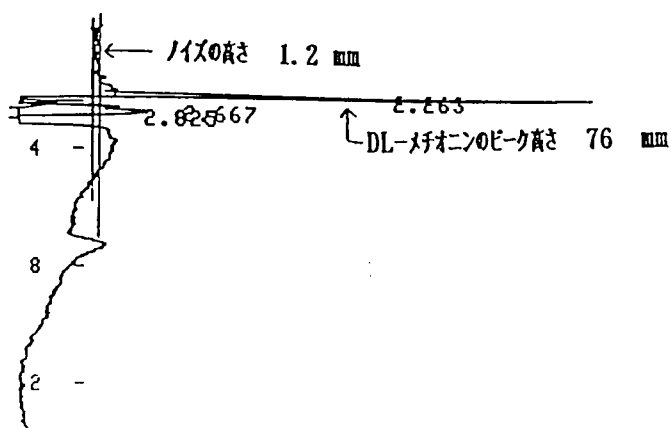
No	標準溶液濃度 (mg/L)	ピーク面積 ($\mu V \cdot sec$)
1	1.0	5173
2	10.0	54618
3	100.0	548022
4	200.0	1107339

図-1 検量線



2. 検出限界及び定量下限値の計算

図-2 クロマトグラム



ATTEN 0

- ・ DL-メチオン濃度 0.5 mg/L
- ・ DL-メチオニンのピーク高さ 76 mm
- ・ ノイズの高さ 1.2 mm

< 計算式 >

(S/N=3) としたとき

$$\frac{3 \times \frac{1.2}{2}}{76.0} \times 0.5 = 0.01 \text{ (mg/L)}$$

検出限界
↓

検出限界の 5 倍とすると、
定量下限値は 0.05 mg/L となる。

計算により、

検出限界 0.01 mg/L
定量下限値 0.05 mg/L

6) 分析操作 (例 1000 mg/L 試料溶液)

50 mLのメスフラスコに水約 10 mLをとり、これに、試料溶液の 5 mLをホールピペットにて量りとり、水を標線まで加える。

この液 20 μ Lを前記条件の高速液体クロマトグラフに注入し、クロマトグラムを画かせ、DL-メチオニンの保持時間に相当するピークの面積を記録させ、検量線より濃度を求める。

(注-3) (注-4)

② 添加回収率試験

DL-メチオニンの標準原液に水を加えて希釈し、100 と 10 mg/Lの試験溶液を調整し、繰り返し測定により回収率を求めた結果、良好な回収率を得た。

Table 1. 添加回収率の測定結果

試料濃度 (mg/L)	測定値 (mg/L)	回収率 (%)	平均回収率 (%)	変動係数 (%)
1	10.05 10.07 10.07	101 101 101	101.0	0.09
2	100.2 100.5 100.6	100 101 101	100.7	0.17

③ 保存安定性試験

DL-メチオニンの標準原液に水を加えて希釈し、1000、100、10、1 mg/Lの試験溶液を調整した。この試験溶液を 4 $^{\circ}$ Cの冷暗所に保存した時の 3日後の経時測定により保存安定性を求めた結果、いずれの濃度においても顕著な濃度変化は見られなかった。

設定濃度 (mg/L)	3日後の経時濃度 (mg/L)		
	1回目	2回目	平均
0	ND	ND	ND
1.00	0.97	0.97	0.97
10.0	10.1	10.1	10.1
100.0	100.1	100.4	100.3
1000	1002	1002	1002

(注-5)

(注-1) 連日に測定を行なう場合は、2濃度以上の標準溶液にて検量線をチェックし、変動の無いことを確認し測定すること。

(注-2) 定量下限値：0.05 mg/L ND：定量下限値未満

(注-3) 試料溶液の濃度は 100 mg/L～1 mg/L に調整し測定すること。

(注-4) 1 mg/L 試料溶液の場合は、1 mg/L と 10 mg/L の標準溶液で作成した検量線を用いて濃度を求める。

(注-5) 試料溶液の保管は、4 $^{\circ}$ Cの冷暗所に保管すること。

④ 標準溶液の液体クロマトグラム (検量線作成用)

図-3

1.0 mg/L

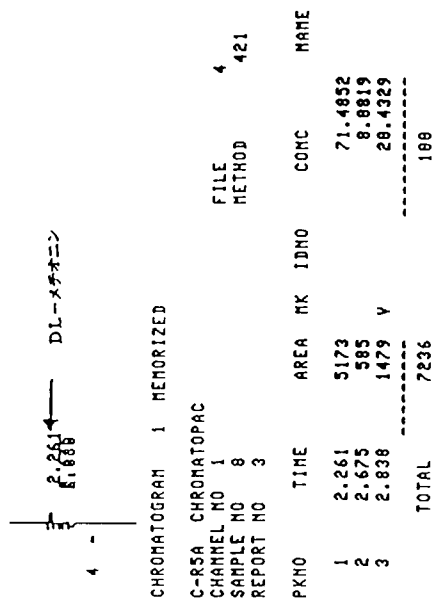


図-4

10.0 mg/L

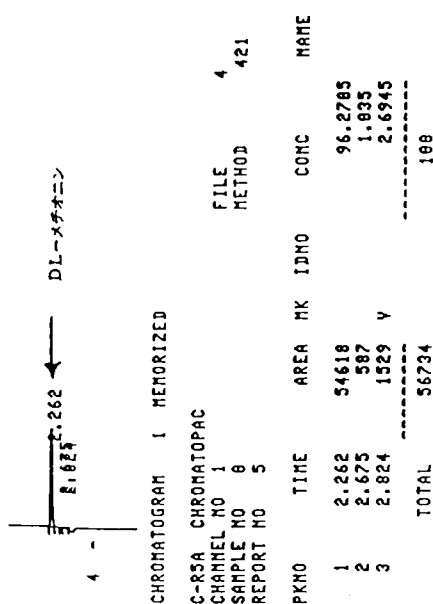


図-5

100.0 mg/L

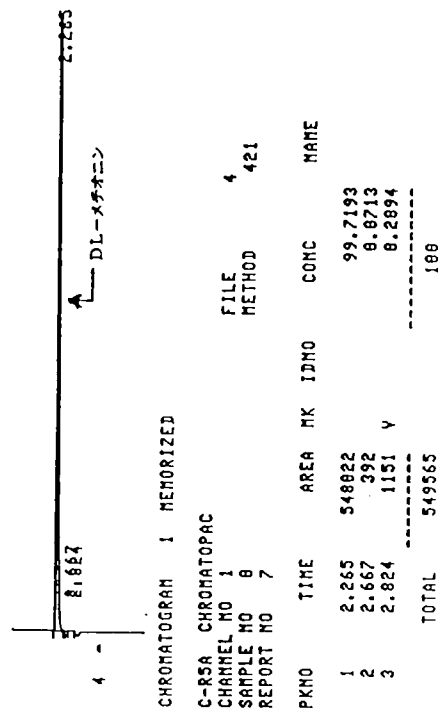


図-6

200.0 mg/L

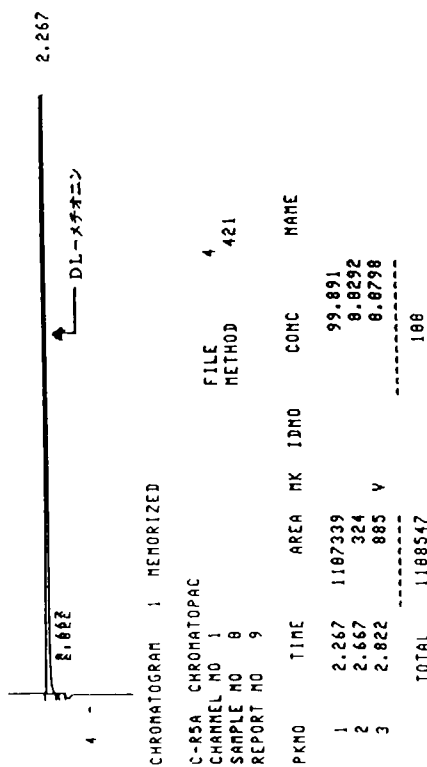
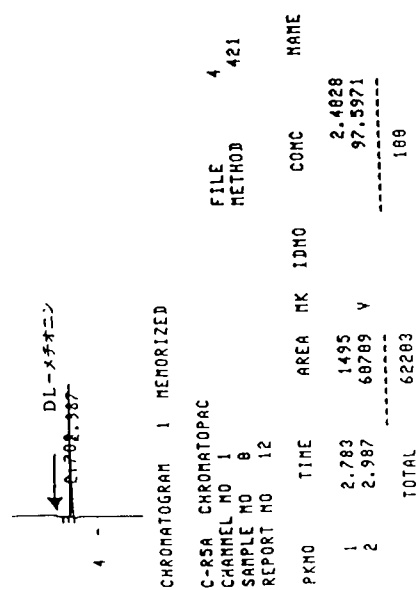


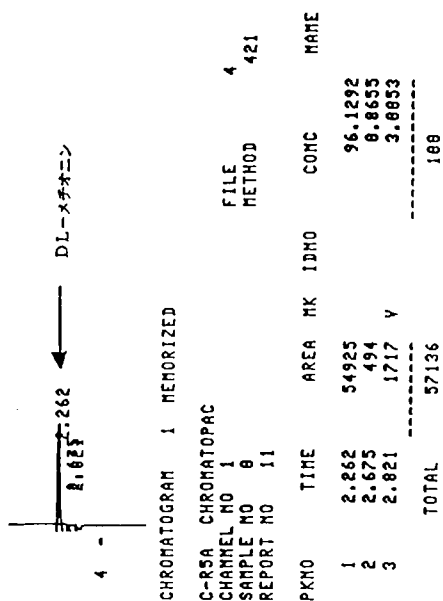
図-7

対照区 (無添加区)

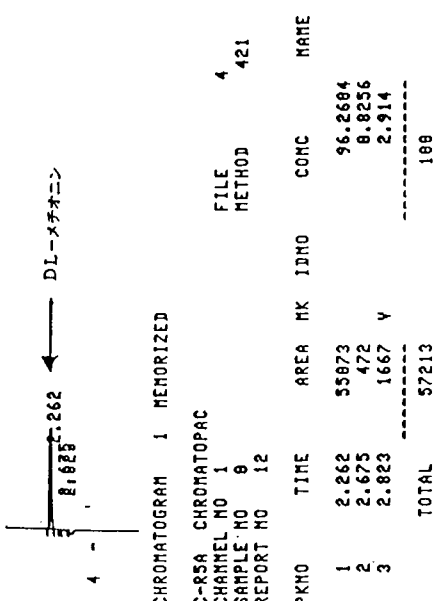


⑤ 添加回収率試験の液体クロマトグラム

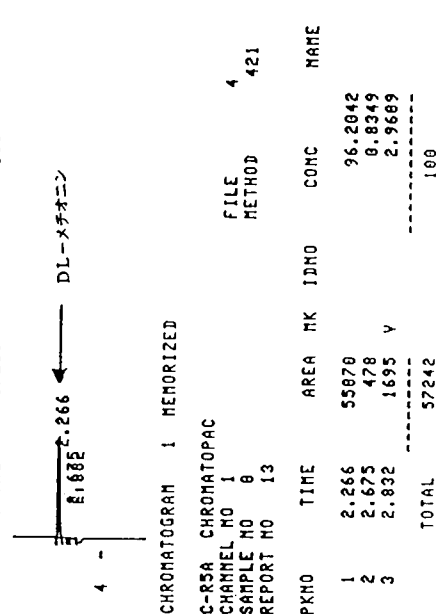
☒-8
10.0 mg/L
n-1



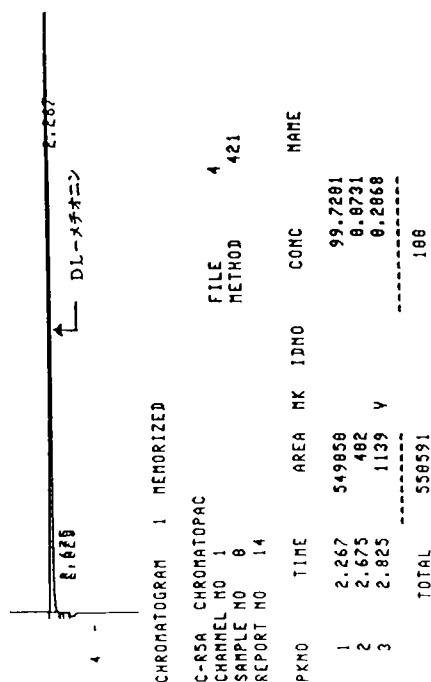
☒-9
10.0 mg/L
n-2



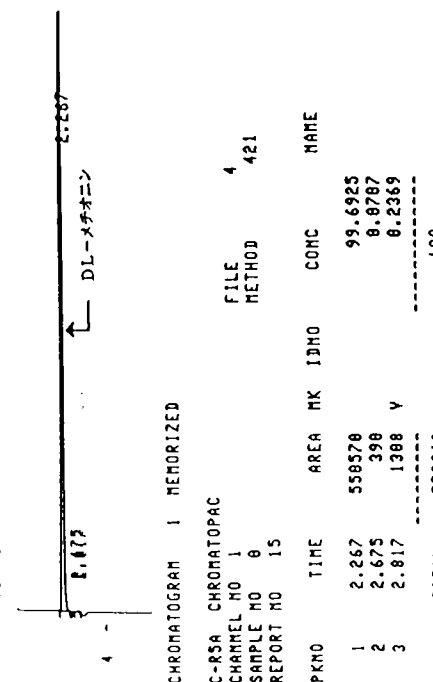
☒-10
10.0 mg/L
n-3



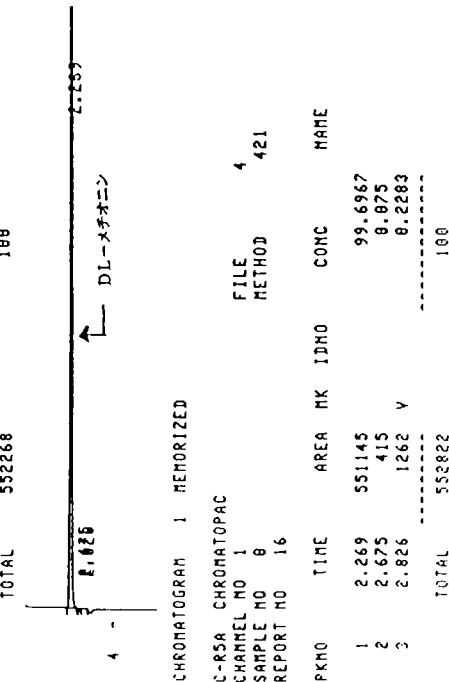
☒-11
100.0 mg/L
n-1



☒-12
100.0 mg/L
n-2



☒-13
100.0 mg/L
n-3



⑥ 保存安定性試験の液体クロマトグラム

図-14

1.0 mg/L
3日後

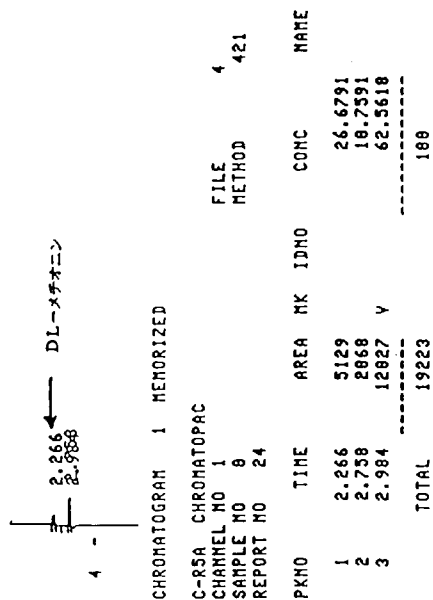


図-15

10.0 mg/L
3日後

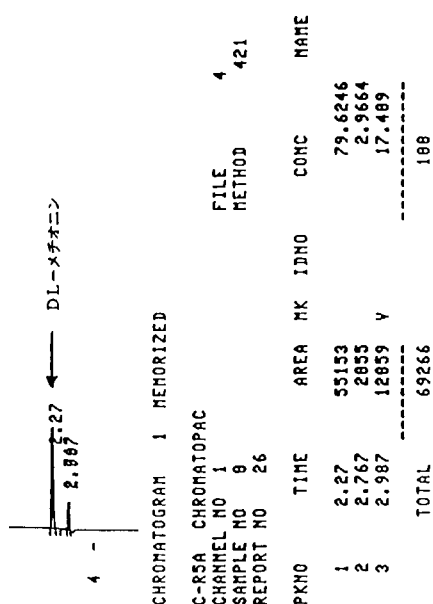


図-16

100.0 mg/L
3日後

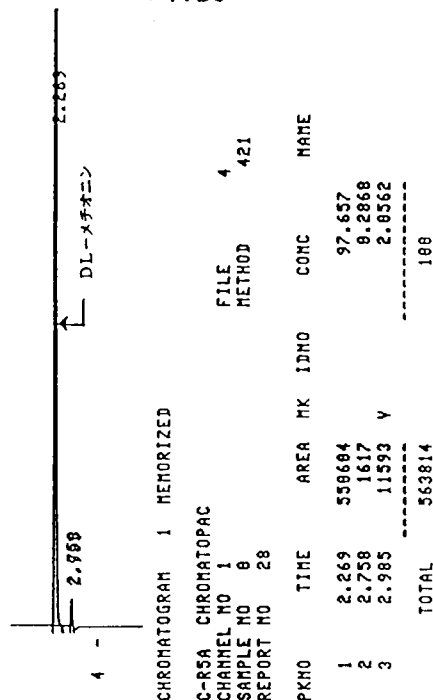
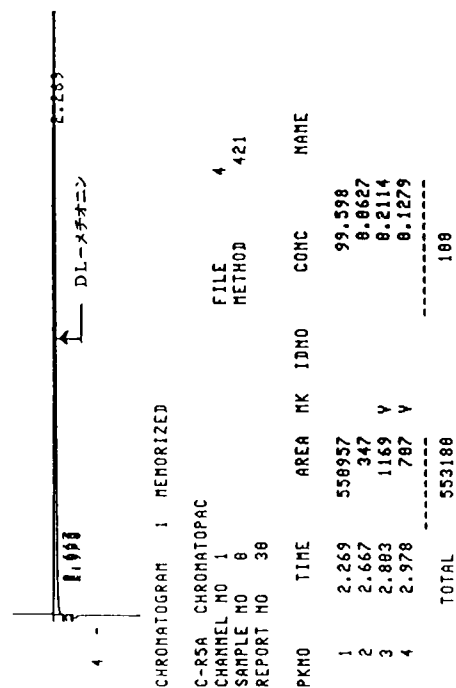


図-17

1000 mg/L
3日後



試験結果の液体クロマトグラム

試験名 : DL-メチオニンのオオミジンコ (*Daphnia magna*) に対する
繁殖阻害試験 (試験番号: NO1998生-11)

暴露開始時

図-18

標準溶液

200 mg/L n-1

暴露開始時

図-19

標準溶液

200 mg/L n-2

暴露開始時

図-20

標準溶液

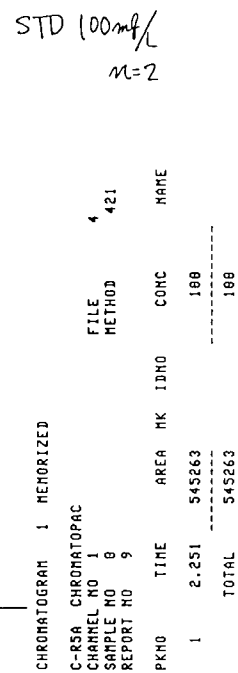
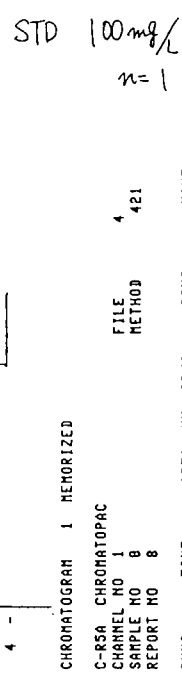
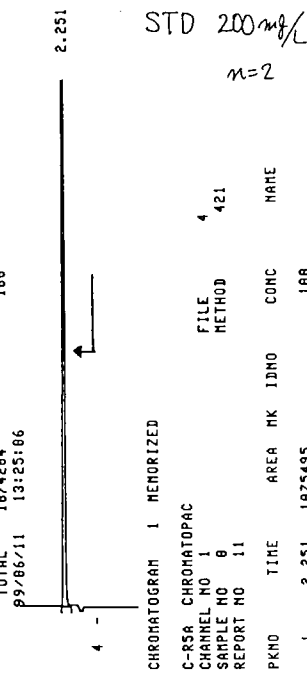
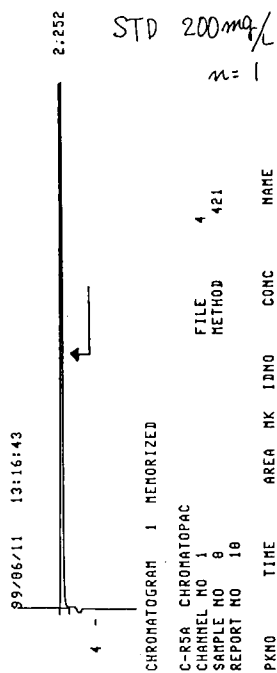
100 mg/L n-1

暴露開始時

図-21

標準溶液

100 mg/L n-2



暴露開始時

図-22

標準溶液

10 mg/L n-1

暴露開始時

図-23

標準溶液

10 mg/L n-2

暴露開始時

図-24

標準溶液

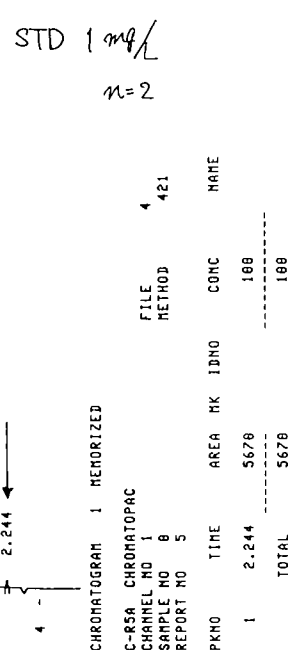
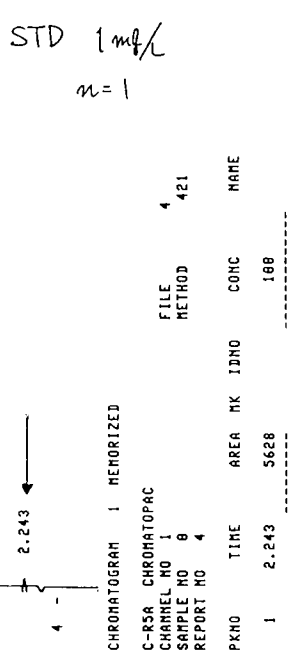
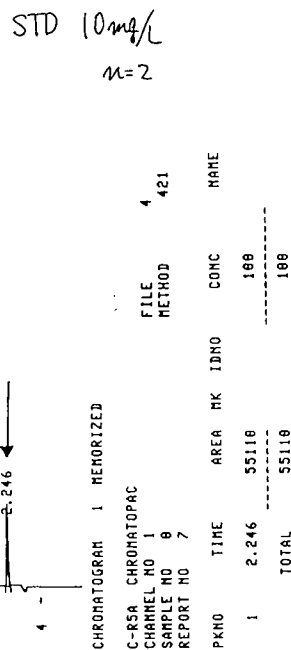
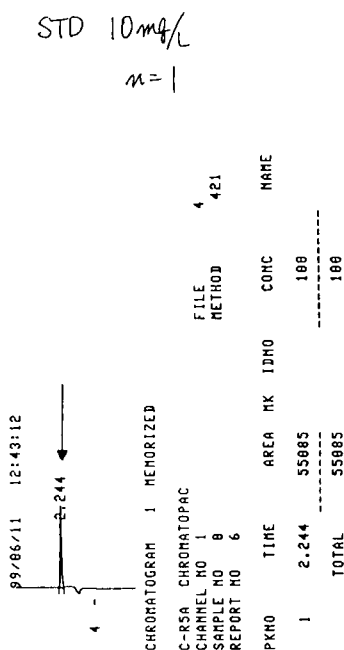
1 mg/L n-1

暴露開始時

図-25

標準溶液

1 mg/L n-2



暴露開始時
図-26
対照区
生11-136-1

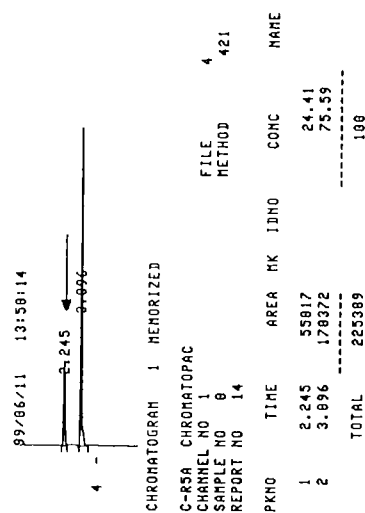
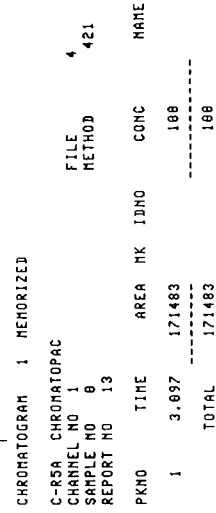
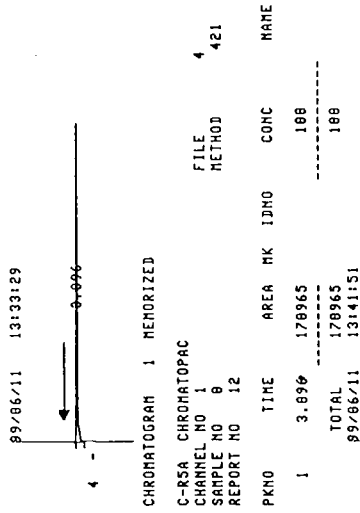
暴露開始時
図-27
対照区
生11-136-2

暴露開始時
図-28
10 mg/L
生11-135-1

生11-136 対照区
n=1

生11-136 対照区
n=2

生11-135 10 mg/L
n=1



暴露開始時
図-29
10 mg/L
生11-135-2

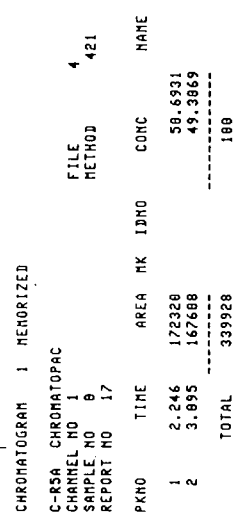
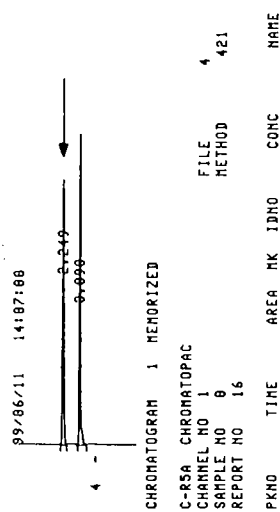
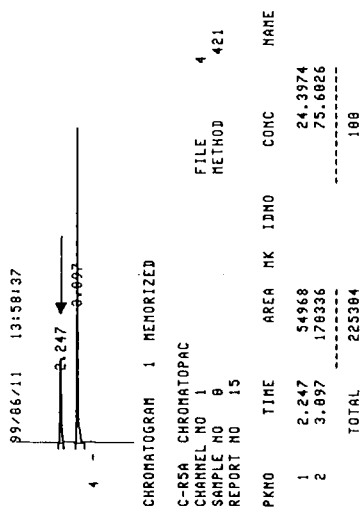
暴露開始時
図-30
32 mg/L
生11-134-1

暴露開始時
図-31
32 mg/L
生11-134-2

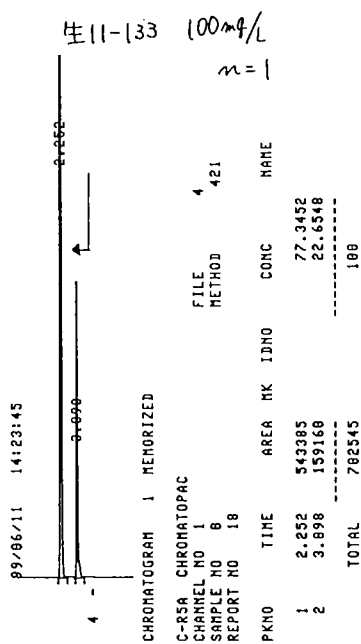
生11-135 10 mg/L
n=2

生11-134 32 mg/L
n=1

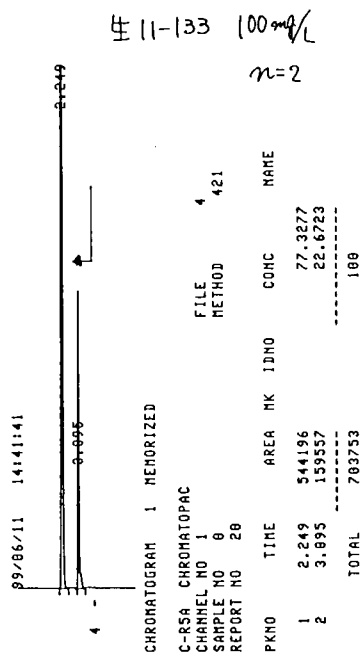
生11-134 32 mg/L
n=2



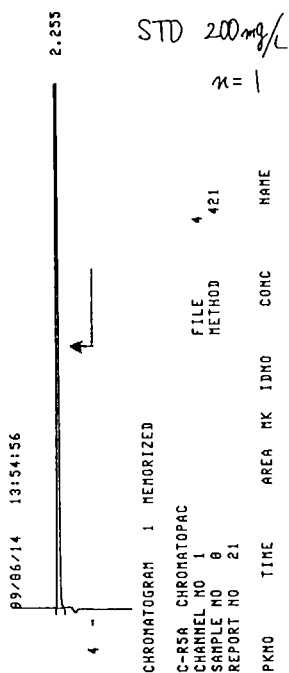
暴露開始時
 図-32
 100 mg/L
 生11-133-1



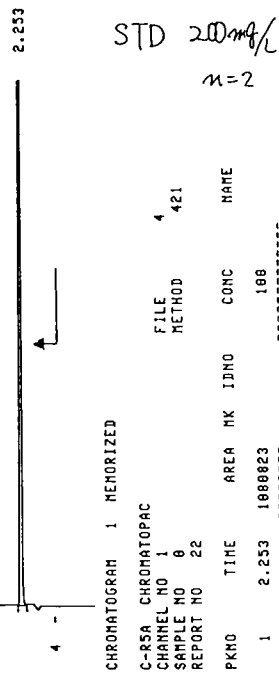
暴露開始時
 図-33
 100 mg/L
 生11-133-2



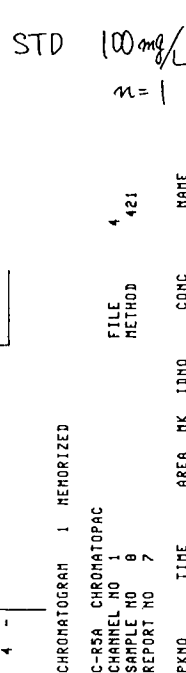
暴露第一週換水前
 圖-34
 標準溶液
 200 mg/L n-1



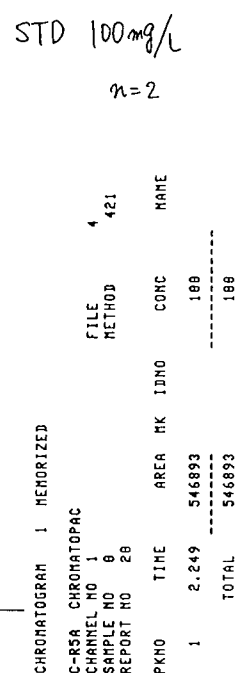
暴露第一週換水前
 圖-35
 標準溶液
 200 mg/L n-2



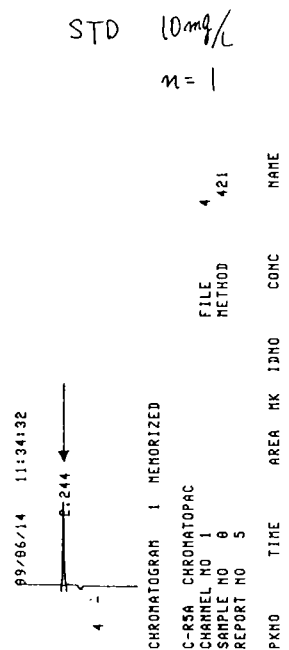
暴露第一週換水前
 圖-36
 標準溶液
 100 mg/L n-1



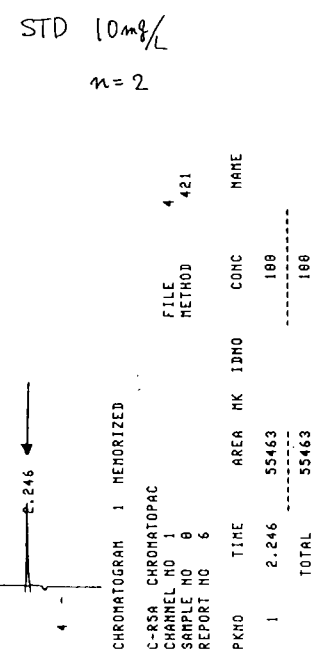
暴露第一週換水前
 圖-37
 標準溶液
 100 mg/L n-2



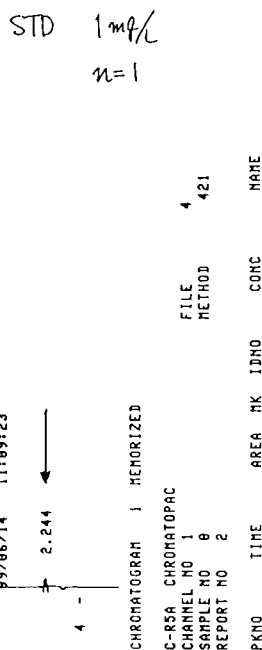
暴露第一週換水前
 圖-38
 標準溶液
 10 mg/L n-1



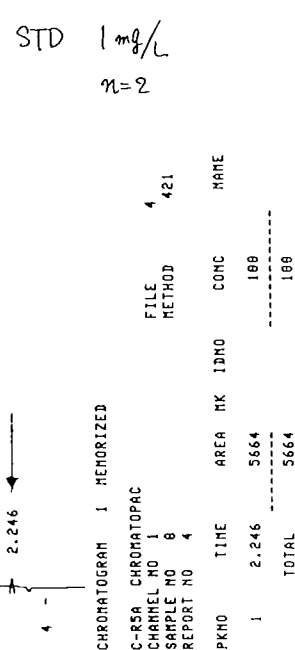
暴露第一週換水前
 圖-39
 標準溶液
 10 mg/L n-2



暴露第一週換水前
 圖-40
 標準溶液
 1 mg/L n-1

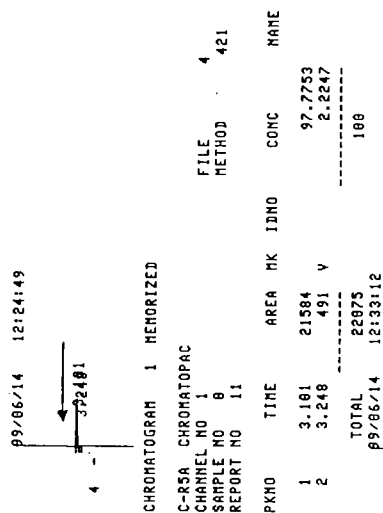


暴露第一週換水前
 圖-41
 標準溶液
 1 mg/L n-2



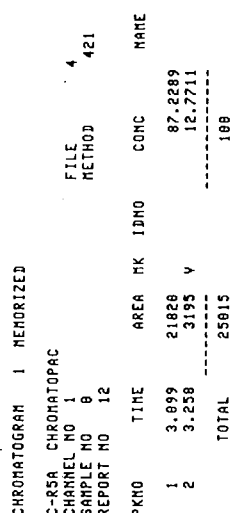
暴露第一週換水前
 図-4 2
 対照区
 生-11-140-1

生11-140 対照区
 n=1



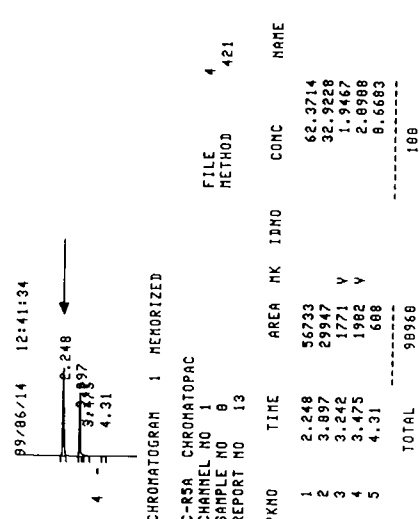
暴露第一週換水前
 図-4 3
 対照区
 生-11-140-2

生11-140 対照区
 n=2



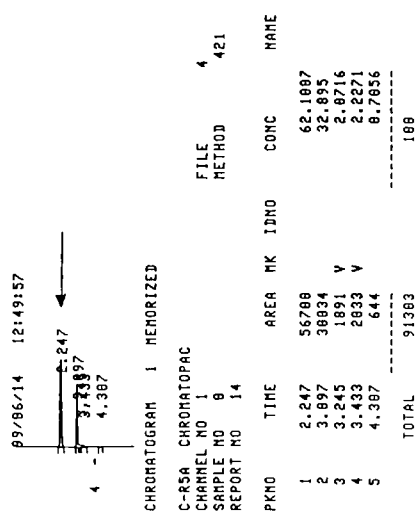
暴露第一週換水前
 図-4 4
 10 mg/L
 生-11-139-1

生11-139 10mg/L
 n=1



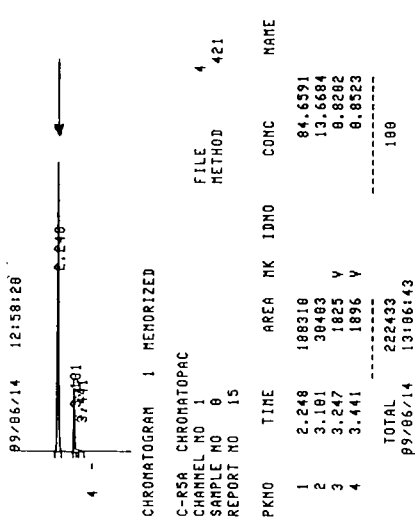
暴露第一週換水前
 図-4 5
 10 mg/L
 生-11-139-2

生11-139 10mg/L
 n=2



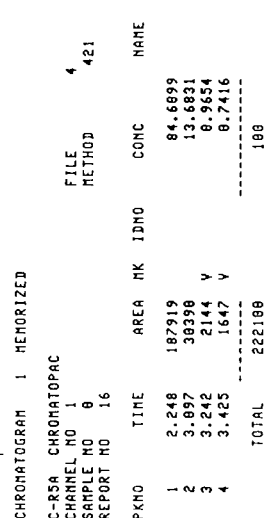
暴露第一週換水前
 図-4 6
 32 mg/L
 生-11-138-1

生11-138 32mg/L
 n=1



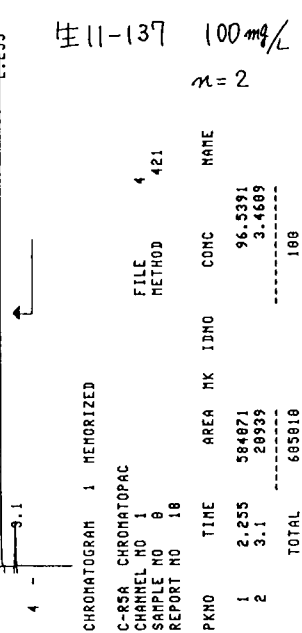
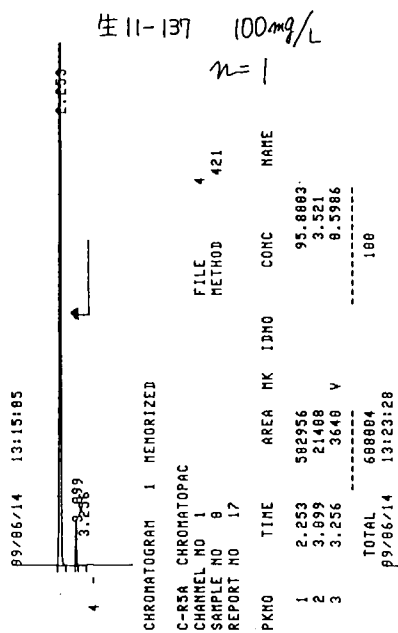
暴露第一週換水前
 図-4 7
 32 mg/L
 生-11-138-2

生11-138 32mg/L
 n=2

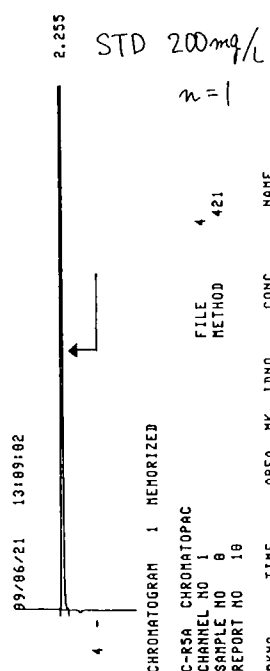


暴露第一週換水前
 図-48
 100 mg/L
 生11-137-1

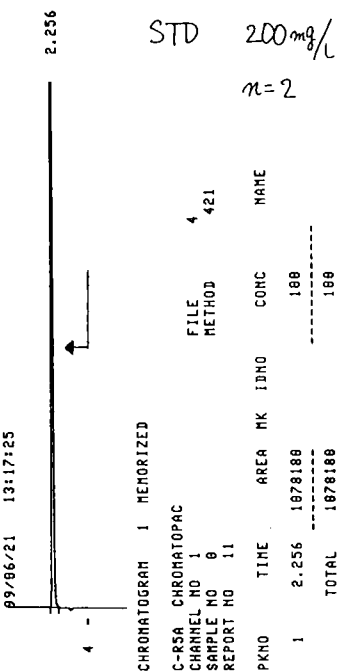
暴露第一週換水前
 図-49
 100 mg/L
 生11-137-2



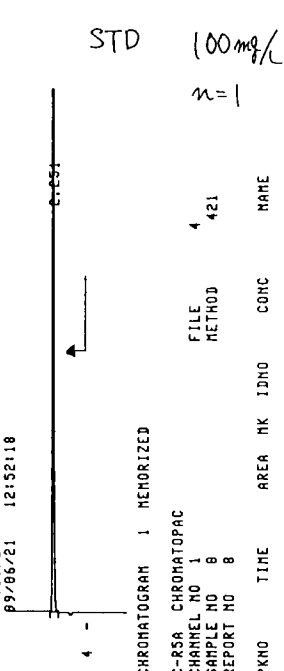
暴露第二週換水後
図-50
標準溶液
200 mg/L n-1



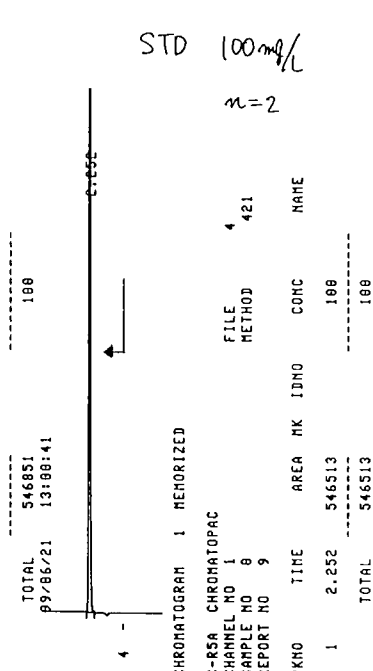
暴露第二週換水後
図-51
標準溶液
200 mg/L n-2



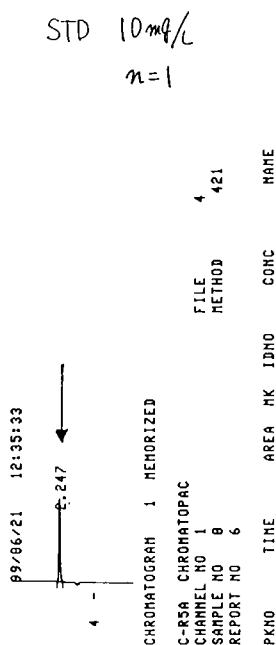
暴露第二週換水後
図-52
標準溶液
100 mg/L n-1



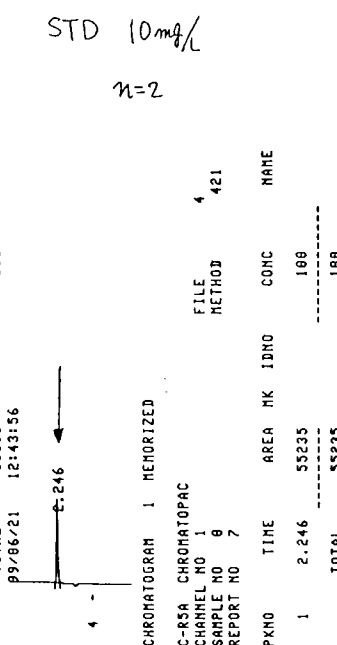
暴露第二週換水後
図-53
標準溶液
100 mg/L n-2



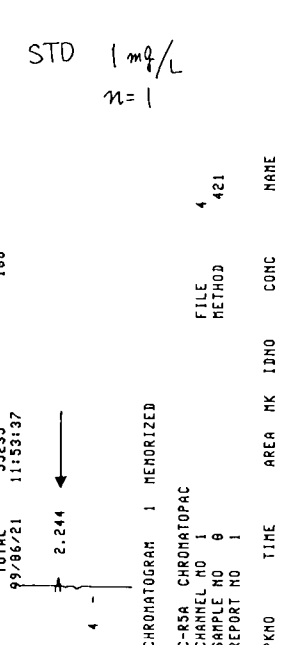
暴露第二週換水後
図-54
標準溶液
10 mg/L n-1



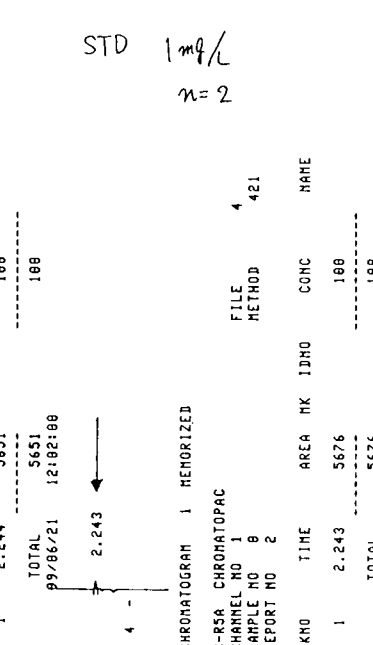
暴露第二週換水後
図-55
標準溶液
10 mg/L n-2



暴露第二週換水後
図-56
標準溶液
1 mg/L n-1

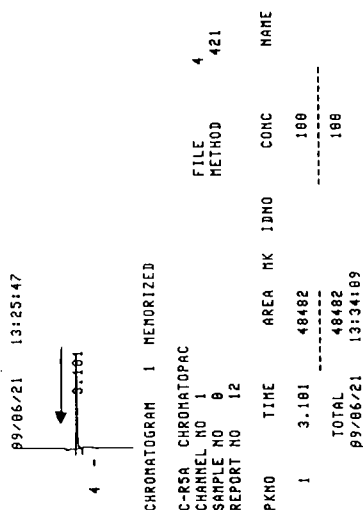


暴露第二週換水後
図-57
標準溶液
1 mg/L n-2



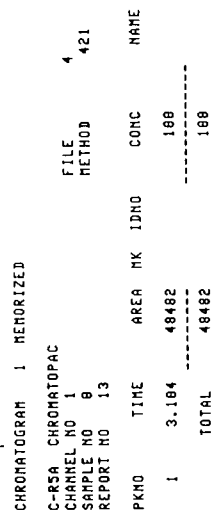
暴露第二週換水後
図-5 8
対照区
生-11-144-1

生11-144 対照区
n=1



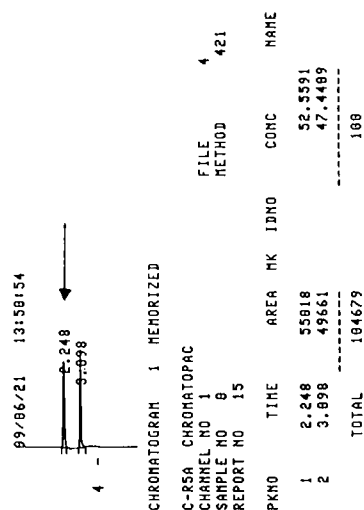
暴露第二週換水後
図-5 9
対照区
生-11-144-2

生11-144 対照区
n=2



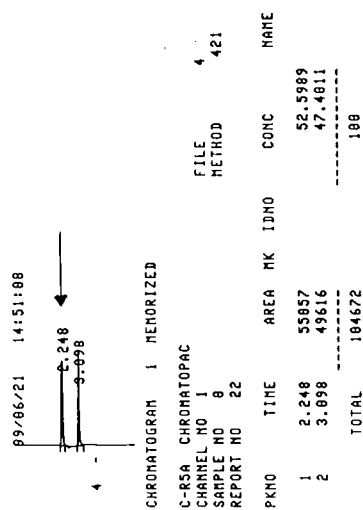
暴露第二週換水後
図-6 0
10 mg/L
生-11-143-1

生11-143 10mg/L
n=1



暴露第二週換水後
図-6 1
10 mg/L
生-11-143-2

生11-143 10mg/L
n=2



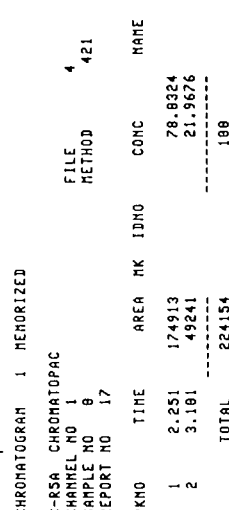
暴露第二週換水後
図-6 2
32 mg/L
生-11-142-1

生11-142 32mg/L
n=1

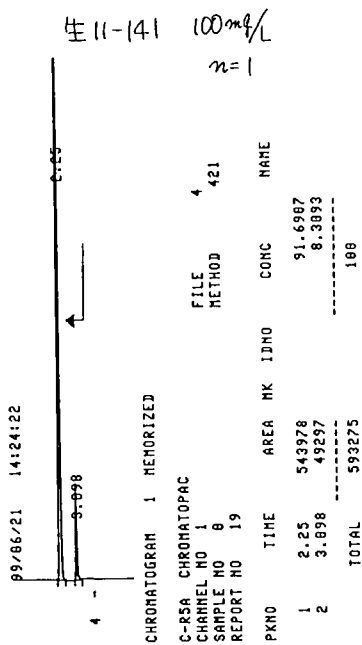


暴露第二週換水後
図-6 3
32 mg/L
生-11-142-2

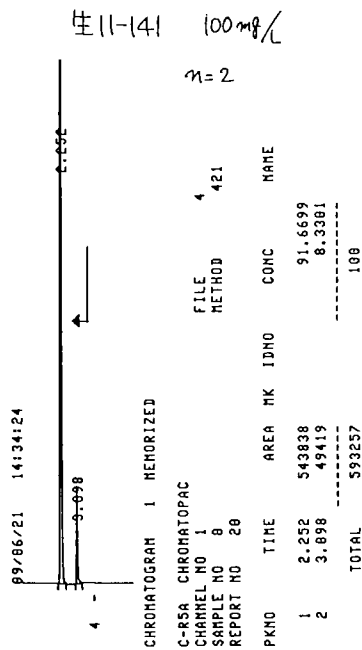
生11-142 32mg/L
n=2



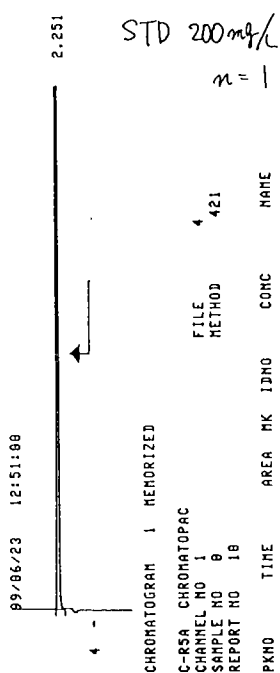
暴露第二週換水後
 図-64
 100 mg/L
 生11-141-1



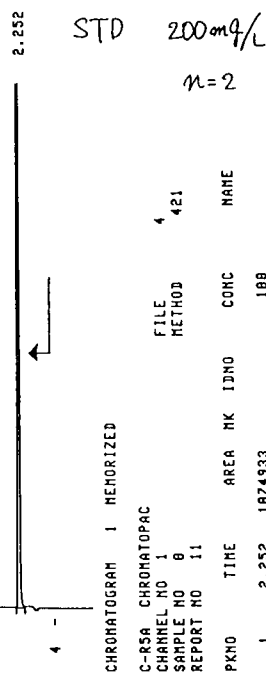
暴露第二週換水後
 図-65
 100 mg/L
 生11-141-2



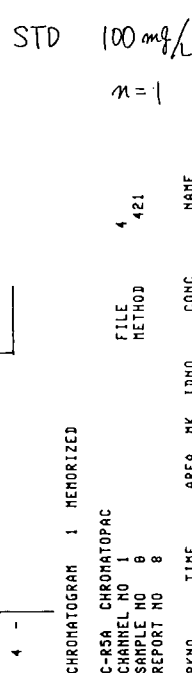
暴露第二週換水前
 圖-66
 標準溶液
 200 mg/L n-1



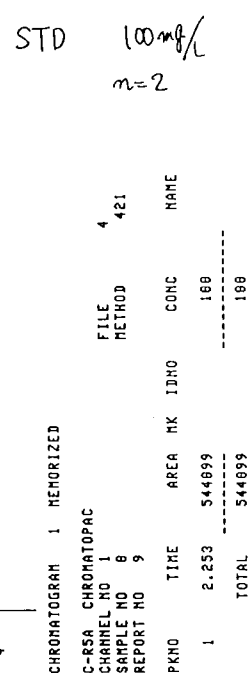
暴露第二週換水前
 圖-67
 標準溶液
 200 mg/L n-2



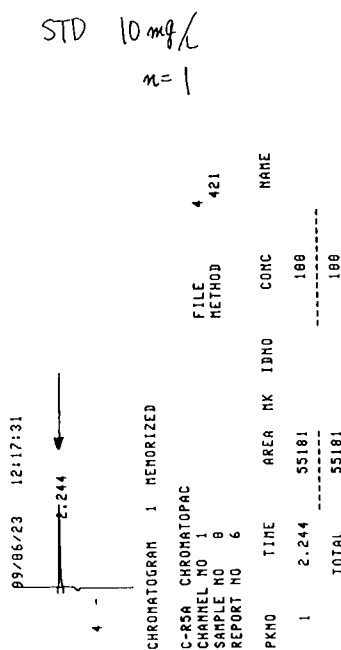
暴露第二週換水前
 圖-68
 標準溶液
 100 mg/L n-1



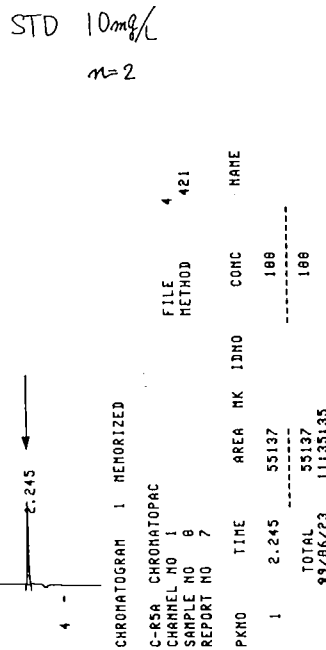
暴露第二週換水前
 圖-69
 標準溶液
 100 mg/L n-2



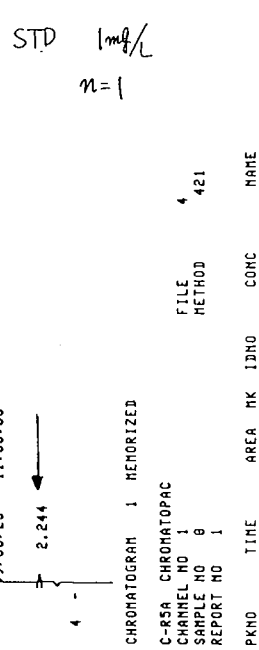
暴露第二週換水前
 圖-70
 標準溶液
 10 mg/L n-1



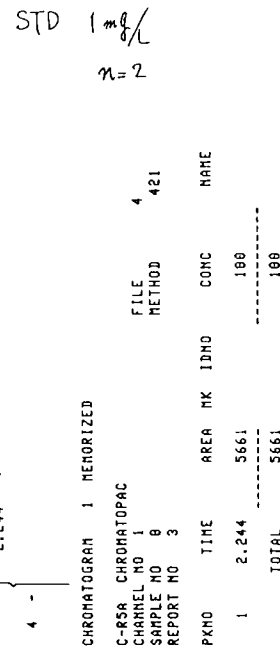
暴露第二週換水前
 圖-71
 標準溶液
 10 mg/L n-2



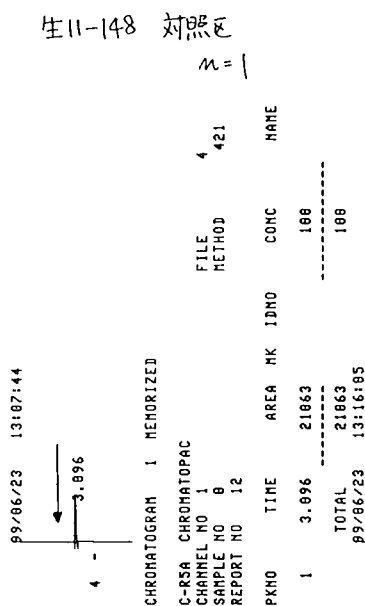
暴露第二週換水前
 圖-72
 標準溶液
 1 mg/L n-1



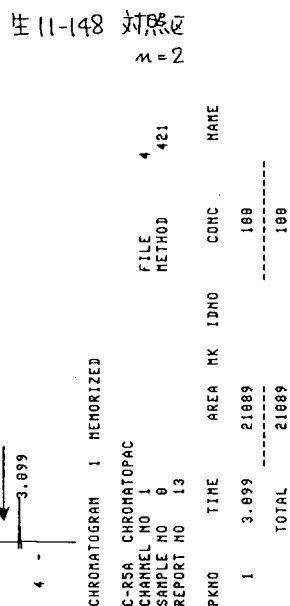
暴露第二週換水前
 圖-73
 標準溶液
 1 mg/L n-2



暴露第二週換水前
図-74
対照区
生11-148-1



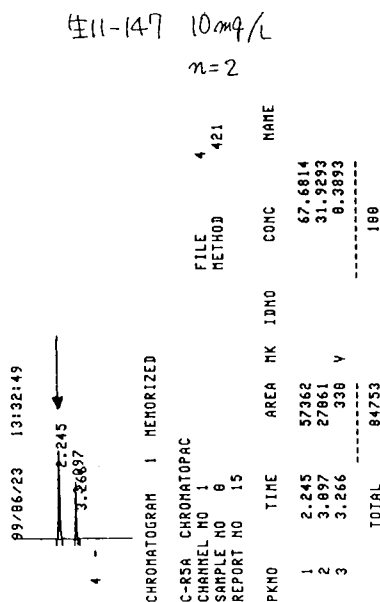
暴露第二週換水前
図-75
対照区
生11-148-2



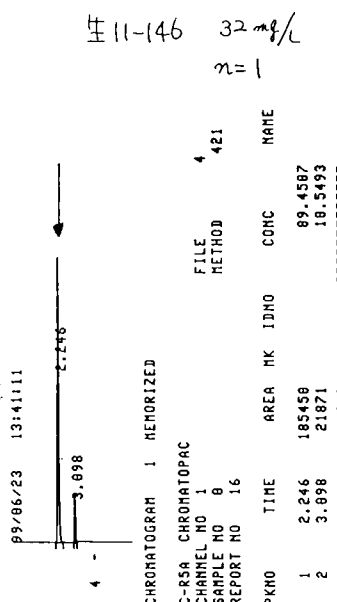
暴露第二週換水前
図-76
10 mg/L
生11-147-1



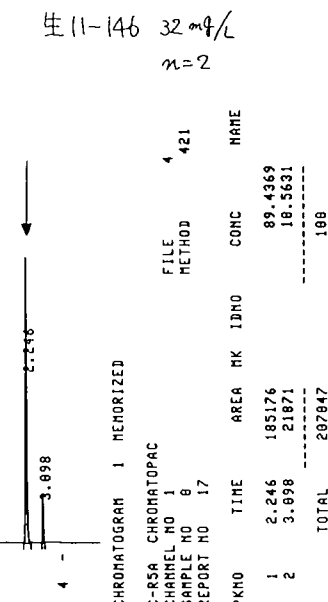
暴露第二週換水前
図-77
10 mg/L
生11-147-2



暴露第二週換水前
図-78
32 mg/L
生11-146-1

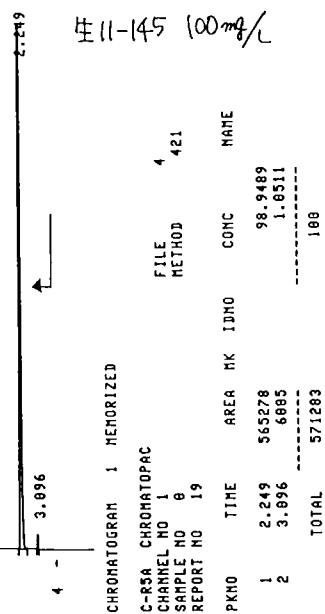
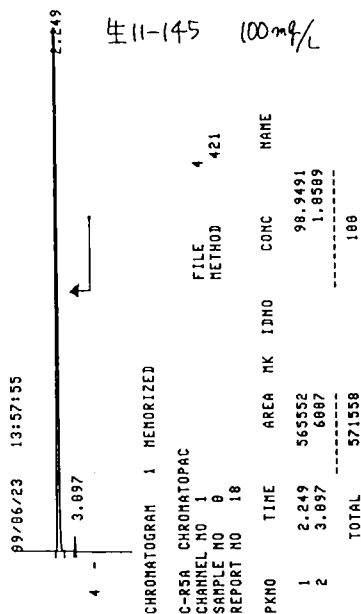


暴露第二週換水前
図-79
32 mg/L
生11-146-2

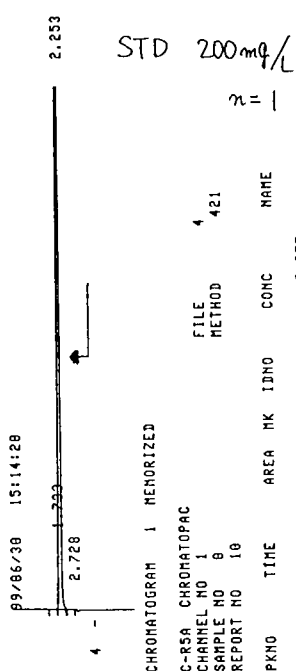


暴露第二週換水前
 図-80
 100 mg/L
 生11-145-1

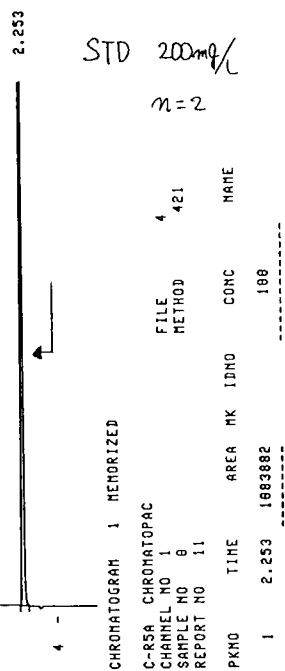
暴露第二週換水前
 図-81
 100 mg/L
 生11-145-2



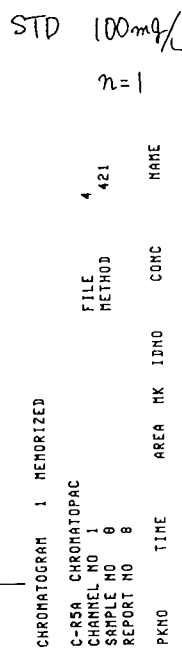
暴露第三週換水後
図-82
標準溶液
200 mg/L n-1



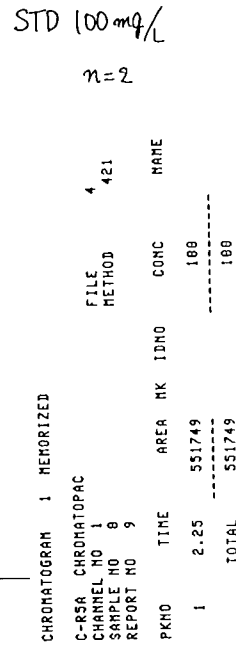
暴露第三週換水後
図-83
標準溶液
200 mg/L n-2



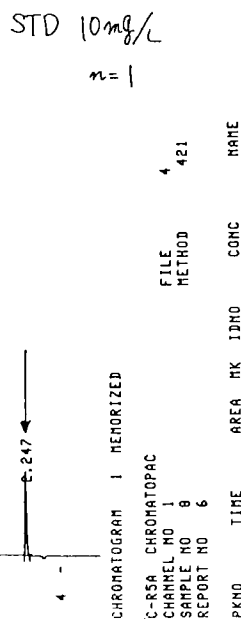
暴露第三週換水後
図-84
標準溶液
100 mg/L n-1



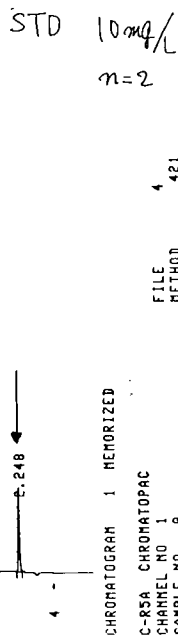
暴露第三週換水後
図-85
標準溶液
100 mg/L n-2



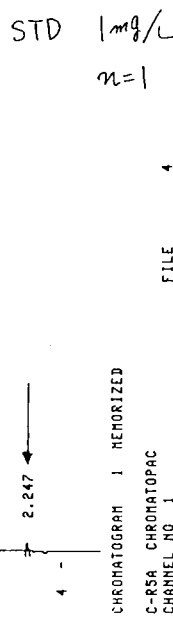
暴露第三週換水後
図-86
標準溶液
10 mg/L n-1



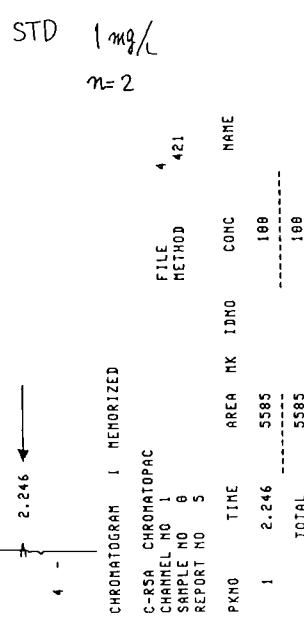
暴露第三週換水後
図-87
標準溶液
10 mg/L n-2



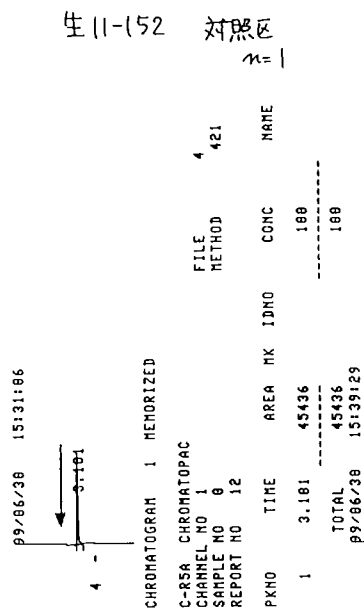
暴露第三週換水後
図-88
標準溶液
1 mg/L n-1



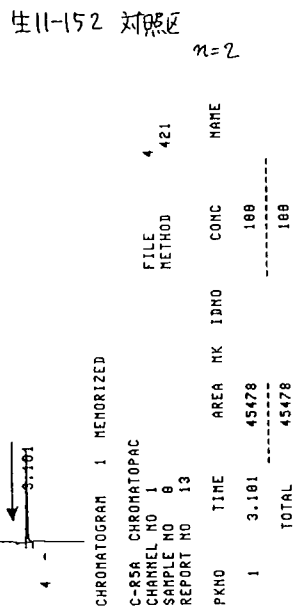
暴露第三週換水後
図-89
標準溶液
1 mg/L n-2



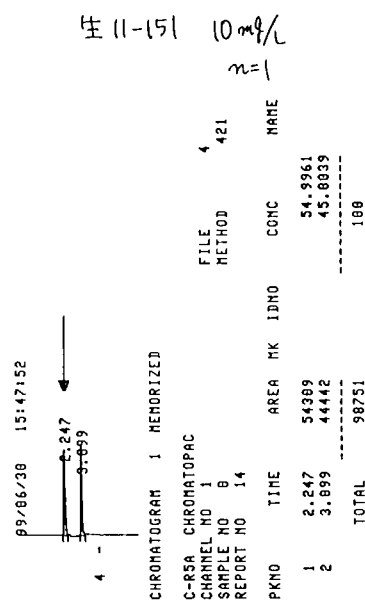
暴露第三週換水後
 図-90
 対照区
 生11-152-1



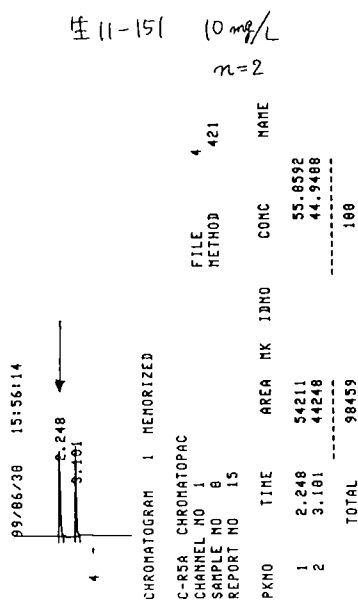
暴露第三週換水後
 図-91
 対照区
 生11-152-2



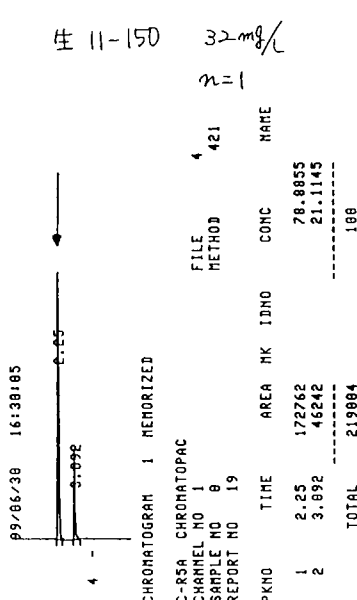
暴露第三週換水後
 図-92
 10 mg/L
 生11-151-1



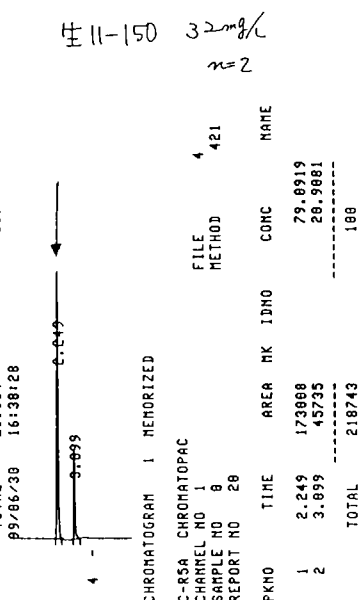
暴露第三週換水後
 図-93
 10 mg/L
 生11-151-2



暴露第三週換水後
 図-94
 32 mg/L
 生11-150-1

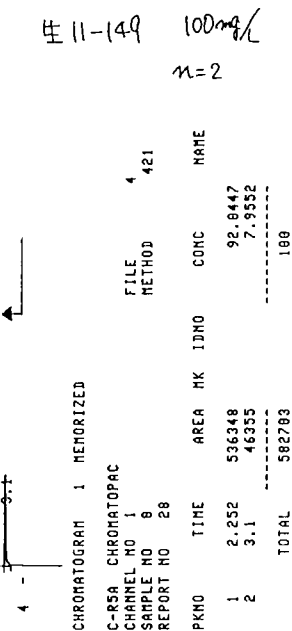
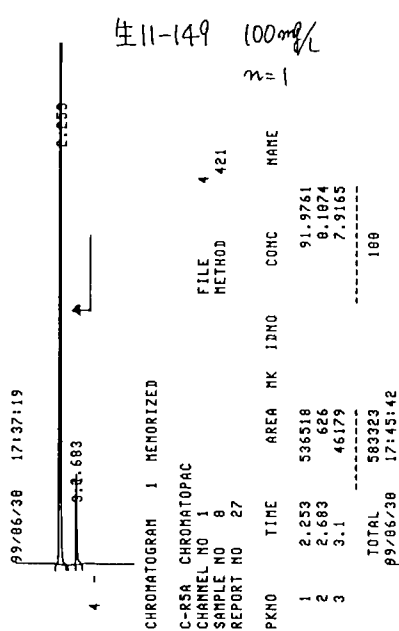


暴露第三週換水後
 図-95
 32 mg/L
 生11-150-2

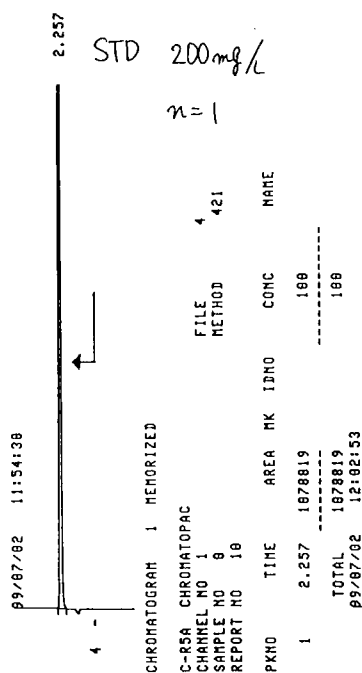


暴露第三週換水後
 図-96
 100 mg/L
 生-11-149-1

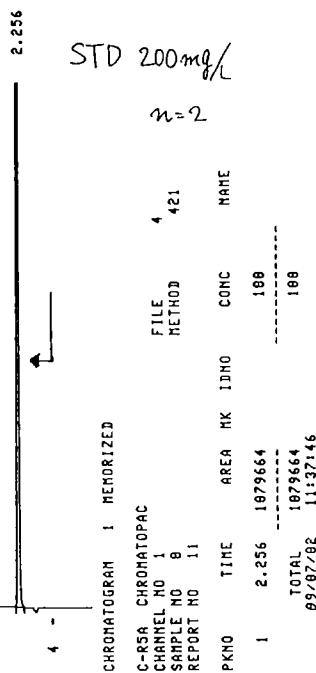
暴露第三週換水後
 図-97
 100 mg/L
 生-11-149-2



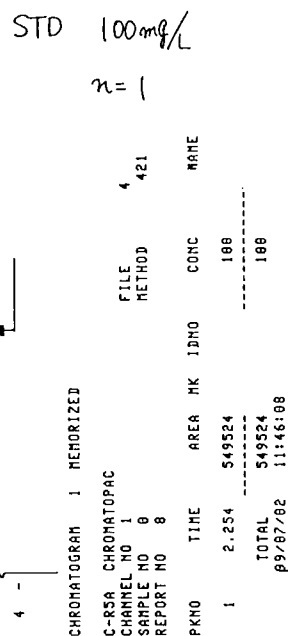
暴露終了時
図-98
標準溶液
200 mg/L n-1



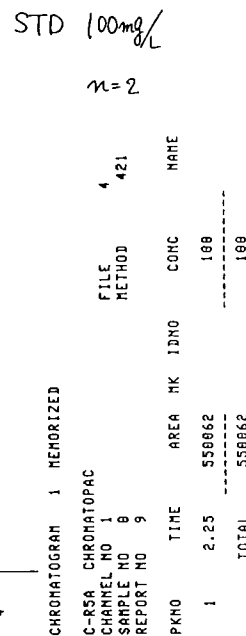
暴露終了時
図-99
標準溶液
200 mg/L n-2



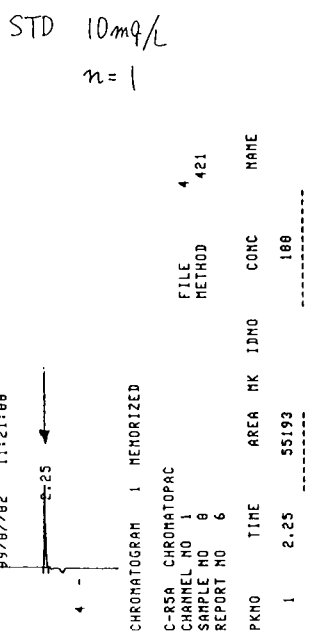
暴露終了時
図-100
標準溶液
100 mg/L n-1



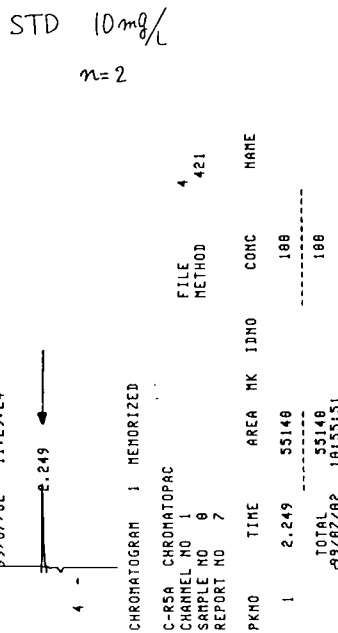
暴露終了時
図-101
標準溶液
100 mg/L n-2



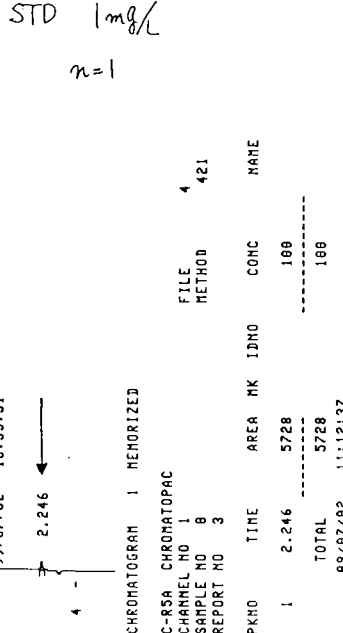
暴露終了時
図-102
標準溶液
10 mg/L n-1



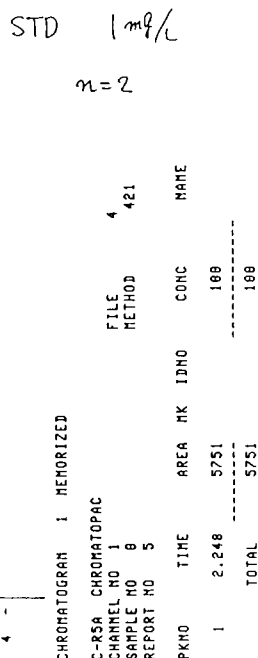
暴露終了時
図-103
標準溶液
10 mg/L n-2



暴露終了時
図-104
標準溶液
1 mg/L n-1

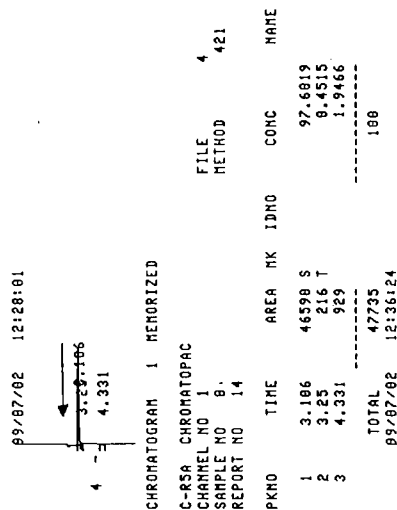


暴露終了時
図-105
標準溶液
1 mg/L n-2



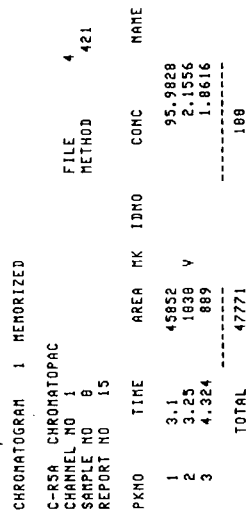
暴露終了時
図-106
対照区
生-11-156-1

生 11-156 対照区
n=1



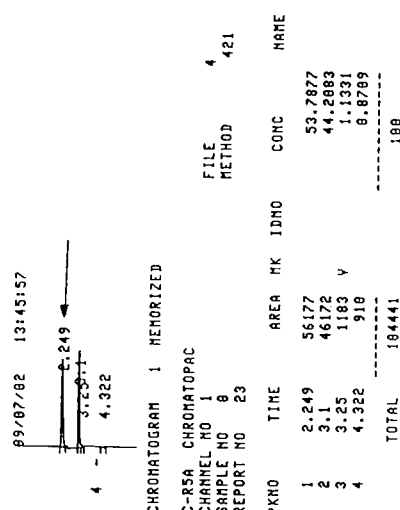
暴露終了時
図-107
対照区
生-11-156-2

生 11-156 対照区
n=2



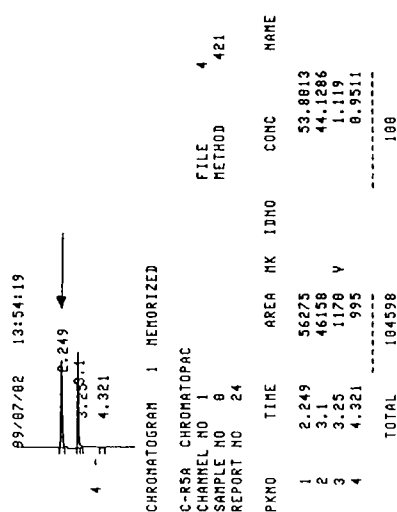
暴露終了時
図-108
10 mg/L
生-11-155-1

生 11-155 10mg/L
n=1



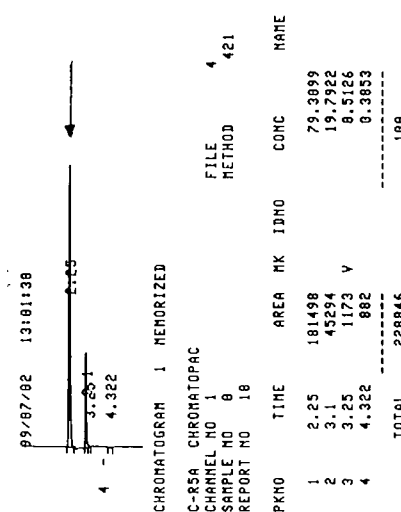
暴露終了時
図-109
10 mg/L
生-11-155-2

生 11-155 10mg/L
n=2



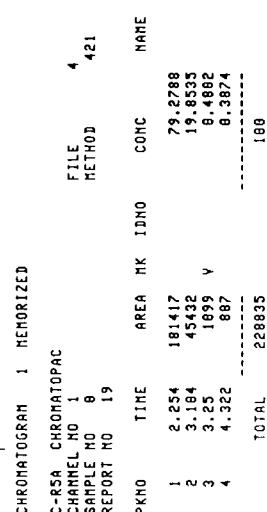
暴露終了時
図-110
32 mg/L
生-11-154-1

生 11-154 32mg/L
n=1



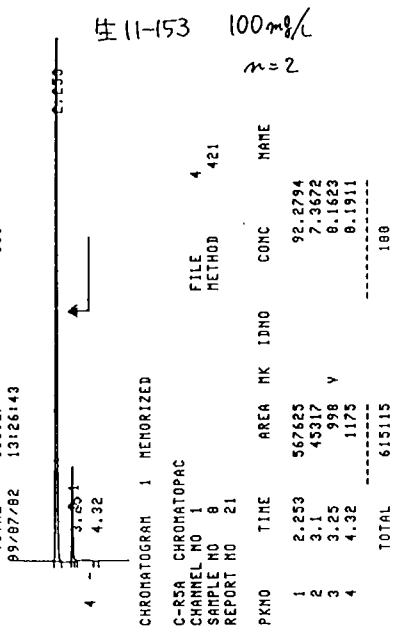
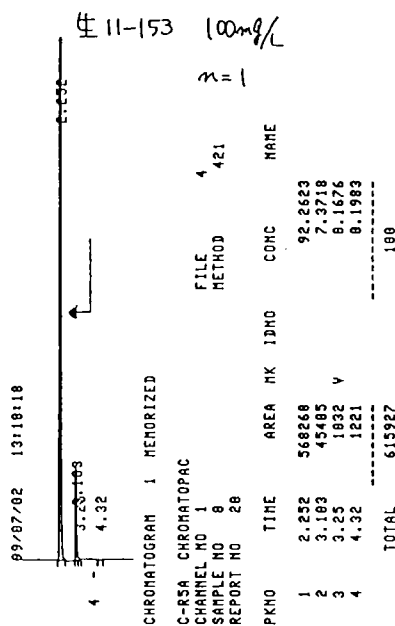
暴露終了時
図-111
32 mg/L
生-11-154-2

生 11-154 32mg/L
n=2



暴露終了時
 図-112
 100 mg/L
 生-11-153-1

暴露終了時
 図-113
 100 mg/L
 生-11-153-2



以上

付属試料－3

ミジンコの観察結果

(全4頁)

Appendix 3-1 Result of Reproduction Test

(Test Chemical : DL-Methionine)

Control

Rep. No.		Time																					Total
		6/12	6/13	6/14	6/15	6/16	6/17	6/18	6/19	6/20	6/21	6/22	6/23	6/24	6/25	6/26	6/27	6/28	6/29	6/30	7/1	7/2	
		1d	2d	3d	4d	5d	6d	7d	8d	9d	10d	11d	12d	13d	14d	15d	16d	17d	18d	19d	20d	21d	
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	8	0	0	13	0	15	0	0	25	2	0	22	0	0	85
	Cumulative reproductivity	0	0	0	0	0	0	0	8	8	8	21	21	36	36	36	61	63	63	85	85	85	85
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	7	0	0	18	0	23	0	0	27	1	0	15	0	0	91
	Cumulative reproductivity	0	0	0	0	0	0	0	7	7	7	25	25	48	48	48	75	76	76	91	91	91	91
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	14	0	0	17	0	0	31	0	0	24	0	0	94
	Cumulative reproductivity	0	0	0	0	0	0	0	8	8	22	22	22	39	39	39	70	70	70	94	94	94	94
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	8	0	0	10	0	15	0	0	32	0	0	31	0	0	96
	Cumulative reproductivity	0	0	0	0	0	0	0	8	8	8	18	18	33	33	33	65	65	65	96	96	96	96
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	8	0	0	13	0	0	15	0	0	26	0	0	0	0	62
	Cumulative reproductivity	0	0	0	0	0	0	0	8	8	8	21	21	21	36	36	36	62	62	62	62	62	62
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	9	0	0	14	0	0	16	0	0	29	0	0	39	0	107
	Cumulative reproductivity	0	0	0	0	0	0	0	9	9	9	23	23	23	39	39	39	68	68	68	107	107	107
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	7	0	0	10	0	0	20	0	0	37	0	0	22	96
	Cumulative reproductivity	0	0	0	0	0	0	0	0	7	7	7	17	17	17	37	37	37	74	74	74	96	96
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	6	0	0	13	0	0	13	0	0	24	0	0	18	0	74
	Cumulative reproductivity	0	0	0	0	0	0	0	6	6	6	19	19	19	32	32	32	56	56	56	74	74	74
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	7	0	0	11	0	0	17	0	0	29	0	0	25	0	89
	Cumulative reproductivity	0	0	0	0	0	0	0	7	7	7	18	18	18	35	35	35	64	64	64	89	89	89
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	11	0	9	0	0	28	0	0	15	0	0	69
	Cumulative reproductivity	0	0	0	0	0	0	0	6	6	6	17	17	26	26	26	54	54	54	69	69	69	69

The time (days) to first brood: 1: 8 days, 2: 8 days, 3: 8 days, 4: 8 days, 5: 8 days,
6: 8 days, 7: 9 days, 8: 8 days, 9: 8 days, 10: 8 days.

Appendix 3-2 Result of Reproduction Test

(Test Chemical : DL-Methionine)

10 mg/L

Rep. No.		Time																					
		6/12	6/13	6/14	6/15	6/16	6/17	6/18	6/19	6/20	6/21	6/22	6/23	6/24	6/25	6/26	6/27	6/28	6/29	6/30	7/1	7/2	
		1d	2d	3d	4d	5d	6d	7d	8d	9d	10d	11d	12d	13d	14d	15d	16d	17d	18d	19d	20d	21d	Total
1	Fl generation Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	Fl generation Live	0	0	0	0	0	0	0	0	8	0	8	0	0	11	0	0	16	0	0	21	0	64
	Cumulative reproductivity	0	0	0	0	0	0	0	0	8	8	16	16	16	27	27	27	43	43	43	64	64	64
2	P generation Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	---	
	Fl generation Live	0	0	0	0	0	0	0	5	0	0	11	0	18	0	0	25	0	0	34	0	0	93
	Cumulative reproductivity	0	0	0	0	0	0	0	5	5	5	16	16	34	34	34	59	59	59	93	93	93	93
3	P generation Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	---	
	Fl generation Live	0	0	0	0	0	0	0	0	7	0	0	7	0	11	0	0	22	0	0	35	0	82
	Cumulative reproductivity	0	0	0	0	0	0	0	0	7	7	7	14	14	25	25	25	47	47	47	82	82	82
4	P generation Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	---	
	Fl generation Live	0	0	0	0	0	0	0	7	0	0	10	0	0	11	0	0	23	0	0	21	0	72
	Cumulative reproductivity	0	0	0	0	0	0	0	7	7	7	17	17	17	28	28	28	51	51	51	72	72	72
5	P generation Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	---	
	Fl generation Live	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	11	0	16	0	0	0	19	0	0	21	0	69
	Cumulative reproductivity	0	0	0	0	0	0	0	2	2	2	13	13	29	29	29	29	48	48	48	69	69	69
6	P generation Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	---	
	Fl generation Live	0	0	0	0	0	0	0	0	7	0	0	9	0	14	0	0	24	0	0	30	0	84
	Cumulative reproductivity	0	0	0	0	0	0	0	0	7	7	7	16	16	30	30	30	54	54	54	84	84	84
7	P generation Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	---	
	Fl generation Live	0	0	0	0	0	0	0	7	0	0	9	0	0	12	0	0	21	0	0	33	0	82
	Cumulative reproductivity	0	0	0	0	0	0	0	7	7	7	16	16	16	28	28	28	49	49	49	82	82	82
8	P generation Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	---	
	Fl generation Live	0	0	0	0	0	0	0	0	6	0	0	9	0	12	0	0	24	0	0	26	0	77
	Cumulative reproductivity	0	0	0	0	0	0	0	0	6	6	6	15	15	27	27	27	51	51	51	77	77	77
9	P generation Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	---	
	Fl generation Live	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0	10	0	0	12	0	0	24	0	0	29	0	79
	Cumulative reproductivity	0	0	0	0	0	0	0	4	4	4	14	14	14	26	26	26	50	50	50	79	79	79
10	P generation Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	---	
	Fl generation Live	0	0	0	0	0	0	0	5	0	0	10	0	0	10	0	0	23	0	0	32	0	80
	Cumulative reproductivity	0	0	0	0	0	0	0	5	5	5	15	15	15	25	25	25	48	48	48	80	80	80

The time (days) to first brood:

1: 9 days, 2: 8 days, 3: 9 days, 4: 8 days, 5: 8 days,
6: 9 days, 7: 8 days, 8: 9 days, 9: 8 days, 10: 8 days.

Appendix 3-3 Result of Reproduction Test

(Test Chemical : DL-Methionine)

32 mg/L

Rep. No.	Time																					Total
	6/12	6/13	6/14	6/15	6/16	6/17	6/18	6/19	6/20	6/21	6/22	6/23	6/24	6/25	6/26	6/27	6/28	6/29	6/30	7/1	7/2	
	1d	2d	3d	4d	5d	6d	7d	8d	9d	10d	11d	12d	13d	14d	15d	16d	17d	18d	19d	20d	21d	
1	P generation Live	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	11	0	0	17	0	0	21	0	0	83	
	Cumulative reproductivity	0	0	0	0	0	0	0	6	6	6	17	17	17	34	34	34	55	55	55	83	
2	P generation Live	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	5	0	0	7	0	0	17	0	0	53	
	Cumulative reproductivity	0	0	0	0	0	0	0	3	3	3	8	8	8	15	15	15	32	32	32	53	
3	P generation Live	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	4	0	0	12	0	0	27	0	0	95	
	Cumulative reproductivity	0	0	0	0	0	0	0	8	8	8	12	12	12	24	24	24	51	51	51	95	
4	P generation Live	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	7	0	9	0	0	13	0	0	23	0	0	75	
	Cumulative reproductivity	0	0	0	0	0	0	0	0	7	7	16	16	16	29	29	29	52	52	52	75	
5	P generation Live	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	9	1	0	17	0	0	25	0	0	24	80	
	Cumulative reproductivity	0	0	0	0	0	0	0	4	4	13	14	14	31	31	31	56	56	56	80	80	
6	P generation Live	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	10	0	15	0	0	22	0	0	33	83	
	Cumulative reproductivity	0	0	0	0	0	0	0	3	3	3	13	13	28	28	28	50	50	50	83	83	
7	P generation Live	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	8	0	0	9	0	0	19	0	2	72	
	Cumulative reproductivity	0	0	0	0	0	0	0	7	7	7	15	15	15	24	24	24	43	43	45	72	
8	P generation Live	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	7	0	0	12	0	0	20	0	0	77	
	Cumulative reproductivity	0	0	0	0	0	0	0	7	7	7	14	14	14	26	26	26	46	46	46	77	
9	P generation Live	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	10	0	0	16	0	0	26	0	0	96	
	Cumulative reproductivity	0	0	0	0	0	0	0	7	7	7	17	17	17	33	33	33	59	59	59	96	
10	P generation Live	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	9	0	0	11	0	17	8	0	36	87	
	Cumulative reproductivity	0	0	0	0	0	0	0	6	6	6	15	15	15	26	26	43	51	51	87	87	

The time (days) to first brood: 1: 8 days, 2: 8 days, 3: 8 days, 4: 9 days, 5: 8 days,
6: 8 days, 7: 8 days, 8: 8 days, 9: 8 days, 10: 8 days.

Appendix 3-4 Result of Reproduction Test

(Test Chemical : DL-Methionine)

100 mg/L

			100 mg/L																						
Rep. No.			Time																				Total		
			6/12	6/13	6/14	6/15	6/16	6/17	6/18	6/19	6/20	6/21	6/22	6/23	6/24	6/25	6/26	6/27	6/28	6/29	6/30	7/1		7/2	
			1d	2d	3d	4d	5d	6d	7d	8d	9d	10d	11d	12d	13d	14d	15d	16d	17d	18d	19d	20d	21d		
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	1	0	0	0	0	0	21	0	0	31	0		
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	22	22	22	53	53		
2	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0									---		
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	1	3	0	0	0	0									4		
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	1	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4		
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	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		
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	7	0	0	4	0	5	0	0	23	0	0	39	0		
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	7	7	7	11	11	16	16	16	39	39	39	78	78		
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	0	0	6	0	0	3	0	0	18	0	0	19	0		
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	4	4	4	10	10	10	13	13	13	31	31	31	50	50		
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	1	0	0	0	1		
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1		
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	0	0	0	3	0	0	6	1		
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	3	3	9	10		
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	1	5	0	0	1	0	10	0	0	22	0	0	36	0		
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	1	6	6	6	7	7	17	17	17	39	39	39	75	75		
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	0	0	21	0	0	20	0	0	26	0	0	33		
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	13	13	13	34	34	34	54	54	54	80	80	80	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	2	0	0	10	0	0	2	0	0	9	0	22	0	0		
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	2	2	2	12	12	12	14	14	14	23	23	45	45	45		

The time (days) to first brood:

1:	11 days.	2:	7 days.	3:	- days.	4:	9 days.	5:	8 days.
6:	17 days.	7:	17 days.	8:	8 days.	9:	9 days.	10:	8 days.

最終報告書修正書

試験名： D L－メチオニンのオオミジンコ (*Daphnia magna*) に対する繁殖阻害試験

試験番号： 1998－生11

該当するページ： p-7, p-17

① p-7

修正する項目等：

訂正または追加前の内容（____部分の修正）

結 果

5) 21日間の最小無作用濃度 (LOEC) : 100 mg/L

訂正または追加後の内容

5) 21日間の最小作用濃度 (LOEC) : 100 mg/L

訂正または追加の理由： 記載ミス

② p-17

修正する項目等：

訂正または追加前の内容（____部分の修正）

Table 3 Time (days) to First Brood Production

Vessel No.	Nominal Concentration (mg/L)			
	Control	10	32	100
1	8	9	8	11
2	8	8	8	<u>8</u>
3	8	9	8	-
4	8	8	9	9
5	8	8	8	8
6	8	9	8	17
7	9	8	8	17
8	8	9	8	8
9	8	8	8	9
10	8	8	8	8
Mean	8.1	8.4	8.1	<u>10.6</u>

訂正または追加後の内容

Vessel No.	Nominal Concentration (mg/L)			
	Control	10	32	100
1	8	9	8	11
2	8	8	8	<u>7</u>
3	8	9	8	-
4	8	8	9	9
5	8	8	8	8
6	8	9	8	17
7	9	8	8	17
8	8	9	8	8
9	8	8	8	9
10	8	8	8	8
Mean	8.1	8.4	8.1	<u>10.4</u>

訂正または追加の理由： 記載ミス

試験責任者氏名：



承認月日 2002 年 3 月 29 日