

環境庁殿

## 最 終 報 告 書

アニリンのオオミジンコ(*Daphnia magna*)に対する繁殖阻害試験

(試験番号：91753)

1997 年 5 月 15 日作成

財団法人 化学環境検査協会  
化学品安全センター 化学物質研究所

陳 述 書

財団法人 化 学 品 検 査 協 会  
化学品安全センター 久留米研究所

試験委託者： 環境庁

表 題： アニリンのオオミジンコ(*Daphnia magna*)に対する繁殖阻害試験

試験番号： 91753

上記試験は契約書別添 2「生態影響試験実施に関する基準」(平成 7 年 9 月 26 日)に  
準拠したものである。

1997年 5月 15日

運営管理者

A large black rectangular redaction box covering the signature area of the document.

## 信 頼 性 保 証 書

財団法人 化 学 品 検 査 協 会  
化学品安全センター 久留米研究所

試験委託者： 環境庁

表 題： アニリンのオオミジンコ(*Daphnia magna*)に対する繁殖阻害試験

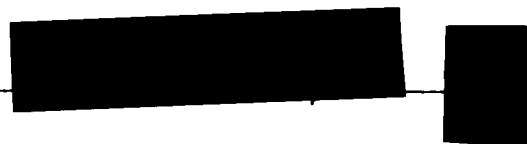
試験番号： 91753

本試験は試験計画書及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。

監査又は査察内容	実施日	報告日(運営管理者)	報告日(試験責任者)
試験計画書監査	1997年 4月 1日	1997年 4月 1日	1997年 4月 1日
試験実施状況査察	1997年 4月 3日	1997年 4月 8日	1997年 4月 8日
試験実施状況査察	1997年 4月17日	1997年 4月30日	1997年 4月30日
試験実施状況査察	1997年 4月24日	1997年 4月30日	1997年 4月30日
最終報告書監査	1997年 5月15日	1997年 5月15日	1997年 5月15日

1997年 5月15日

信頼性保証部門責任者



## 試験実施概要

### 1 表 題

アニリンのオオミジンコ(*Daphnia magna*)に対する繁殖阻害試験

### 2 試験目的

アニリンについて、オオミジンコ(*Daphnia magna*)に対する繁殖阻害試験を21日間行い、繁殖状態に対照区と有意差の認められない最高濃度(NOEC<sub>r</sub>)及び産仔数を50%減少させると算定される濃度(50%繁殖阻害濃度:ErC50)を求める。

### 3 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、急性遊泳阻害試験及び繁殖試験」(1984年)に準拠した。

### 4 適用GLP

本試験は契約書別添 2「生態影響試験実施に関する基準」(平成 7 年 9 月 26 日)に準拠した。

### 5 試験委託者

名 称: 環境庁

住 所: (〒100)東京都千代田区霞が関 1-2-2

### 6 試験受託者

名 称: 財団法人 化学品検査協会

住 所: (〒136)東京都江東区亀戸 5-6-21

### 7 試験施設

名 称: 化学品安全センター 久留米研究所

住 所: (〒830)福岡県久留米市中央町 19-14

運営管理者: XXXXXXXXXX

8 試験関係者

試験責任者

[REDACTED]

試験担当者

生物試験担当

[REDACTED]

分析担当

[REDACTED]

データ処理担当

[REDACTED]

試験資料管理部門責任者

[REDACTED]

9 最終報告書の承認

1997年 5 月 15 日

試験責任者

氏名

[REDACTED]

10 試験期間

試験開始日

1997 年 4 月 1 日

試験終了日

1997 年 5 月 15 日

暴露期間

1997 年 4 月 3 日 ~ 1997 年 4 月 24 日

11 保 管

試験計画書、生データ、記録文書、最終報告書及び被験物質は、最終報告書作成後10年間、財団法人 化学品検査協会 化学品安全センター 久留米研究所の保管施設に保管する。その後の保管については試験委託者と協議のうえ決定する。

## 目 次

	頁
要 旨 .....	1
1 被 験 物 質 .....	2
1.1 名称、構造式及び物理化学的性状 .....	2
1.2 被験物質の確認及び保管条件下での安定性 .....	3
2 試 験 生 物 .....	3
3 試 験 方 法 .....	4
3.1 試 験 条 件 .....	4
3.2 希 釈 水 .....	4
3.3 試験容器及び恒温槽等 .....	4
3.4 試験濃度の設定 .....	4
3.5 試験液の調製 .....	5
3.6 試験液の分析 .....	5
3.7 試 験 操 作 .....	5
3.8 数値の取扱い .....	5
4 結果の算出 .....	6
4.1 親ミジンコの半数致死濃度(LC50)の算出 .....	6
4.2 50%繁殖阻害濃度(ErC50)の算出 .....	6
4.3 最大無作用濃度(NOECr)及び最小作用濃度(LOECr) .....	7
5 結果及び考察 .....	7
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 .....	7
5.2 試験液中の被験物質濃度 .....	7
5.3 ミジンコの観察結果 .....	7
5.4 親ミジンコの50%致死濃度(LC50) .....	8
5.5 50%繁殖阻害濃度(ErC50) .....	9
5.6 累積産仔数に及ぼす最大無作用濃度(NOECr)及び最小作用濃度(LOECr) .....	9
5.7 試験液の水温、溶存酸素濃度及びpH .....	9
5.8 試験液の状態 .....	9

Table 1～10 .....	10～18
------------------	-------

Figure 1, 2 .....	19, 20
-------------------	--------

付属資料－1 希釈水の水質

付属資料－2 試験液の分析方法及び分析チャート

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 題アニリンのオオミジンコ(*Daphnia magna*)に対する繁殖阻害試験試験番号

91753

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、急性遊泳阻害試験及び繁殖試験」(1984年)に準拠して実施した。

- 1) 被験物質： アニリン
- 2) 試験生物： オオミジンコ(*Daphnia magna*)
- 3) 生物数： 40頭/1試験区(1連につき10頭で1試験区40頭)
- 4) 暴露期間： 21日間
- 5) 暴露方式： 半止水式(1日1回、試験液を交換)
- 6) 試験濃度： 0.100、0.0500、0.0250、0.0125及び0.00625 mg/L(公比：2.0)  
及び対照区
- 7) 連 数： 1試験区につき4連
- 8) 試験液量： 1容器(1連)につき800 mL
- 9) 試験水温： 20±1℃
- 10) 照 明： 16時間明/8時間暗
- 11) 試験液中の被験物質の分析： 高速液体クロマトグラフィー (HPLC)  
(0、1、11、12、18及び19日目)

結 果

- 1) 21日間の親ミジンコの50%致死濃度(LC50)  
=0.0255 mg/L(95%信頼限界：0.0228～0.0286 mg/L)
- 2) 21日間の50%繁殖阻害濃度(ErC50)  
=0.0172 mg/L(95%信頼限界：0.0159～0.0186 mg/L)
- 3) 最大無作用濃度(NOECr)=0.00625 mg/L
- 4) 最小作用濃度(LOECr)=0.0125 mg/L  
(上記濃度は、全て設定値に基づく値)

## 1 被験物質

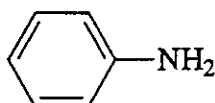
本報告書においてアニリンは、次の名称及び品質等を有するものとする。

被験物質に関する情報については供給者提供の添付資料等によった。

## 1.1 名称、構造式及び物理化学的性状

- 1) 名 称 : アニリン  
(CAS番号 62-53-3)

- 2) 構 造 式 :



- 3) 分 子 式 :  $C_6H_7N$   
 4) 分 子 量 : 93.13  
 5) 外 観 : ごくうすい黄色澄明の液体 <sup>#1</sup>  
 6) 安 定 性 : 不明  
 7) 1-オクタノール／水分配係数(logP) :  $\log Kow = 0.90$  <sup>#4</sup>  
 8) pKa : PKb 9.30 <sup>#4</sup>  
 9) 水への溶解度 : 3.4 mL/100 mL (20℃) <sup>#3</sup>  
 10) 蒸 気 圧 : 0.3 mmHg (20℃) <sup>#2</sup>  
 11) 純度及び不純物 : 含量 100.0% <sup>#1</sup>  
                                 水分 0.03% <sup>#1</sup>  
                                 不揮発物 0.01%以下 <sup>#1</sup>  
                                 ニトロベンゼン 0.003%以下 <sup>#1</sup>  
 12) ロット番号 : LEG5649  
 13) 供 給 者 : XXXXXXXXXX  
 14) 供 給 量 : 500 mL  
 15) 入 手 日 : 1996 年 12 月 25 日

情 報 源

- #1 : 供給者提供の添付資料  
 #2 : Karel Verschueren, "Handbook of Environmental Data on Organic Chemicals"  
       2nd Ed., Van Nostrand Reinhold, 1983.  
 #3 : 化学大事典編集委員会編「化学大事典」(共立出版) 1960.  
 #4 : Hazardous Substances Data Bank(HSDB), U.S. National Library of Medicine  
       (1995).



## 1.2 被験物質の確認及び保管条件下での安定性

被験物質は当研究所の冷蔵庫に保管した。

入手した被験物質について赤外吸収スペクトルを測定し、被験物質の特性と矛盾が認められないことを確認した。暴露終了後にも同様にスペクトルを測定し、暴露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無かったことより被験物質は当研究所の冷蔵庫に保管中は安定であったと判断された。

## 2 試験生物

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、U.S. EPA Environmental Research Laboratory, Duluthより入手したものを、当研究所において継代飼育しているものである。また、基準物質(重クロム酸カリウム、試薬特級、和光純薬工業株式会社)の48時間 $EC_{50}$ は0.283 mg/Lであった。

供試する幼体を得るためのミジンコの飼育方法

継代飼育している2～4週令のミジンコを試験生物の親とした。成熟し幼体を生むようになったら少なくとも、試験前日に幼体を除去した。但し、死亡個体の多いバッチ、休眠卵や雄が生じたバッチのミジンコは使用しなかった。

- 1) 飼育水： 希釈水(3.2参照)
- 2) 飼育密度： 10頭／800 mL飼育水
- 3) 水温：  $20\pm 1^{\circ}\text{C}$
- 4) 照明： 室内光、16時間明／8時間暗
- 5) 餌： 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。
- 6) 給餌量： ミジンコ1頭当たり*Chlorella vulgaris*を0.1 ～ 0.2 mgC(有機炭素含量)／日の割合で与えた。この範囲でミジンコの成育段階に応じて段階的に餌の量を変えて与えた。

### 3 試験方法

#### 3.1 試験条件

- 1) 暴露方式： 被験物質を含む試験液へ試験生物を暴露する薬浴方式を用いた。試験は、1回／日の頻度で試験液を交換する半止水式で行った。
- 2) 暴露期間： 21日間
- 3) 連 数： 1試験区に付き4連
- 4) 生物数： 40頭／1試験区(1連に付き10頭で1試験区40頭)
- 5) 試験液量： 1容器(1連)に付き800 mL
- 6) 試験水温： 20±1℃
- 7) 照 明： 室内光、16時間明／8時間暗
- 8) 給 餌 量： ミジンコ1頭当たり*Chlorella vulgaris*を0.1 ～ 0.2 mgC(有機炭素含量)／日の割合で与えた。

#### 3.2 希 釈 水

脱塩素水道水(久留米市水道水を活性炭処理し、残留塩素等を除去したもので、充分通気した)を使用した。希釈水の主な水質として、硬度は55.6 mg/L( $\text{CaCO}_3$ 換算)、pHは7.7であった。希釈水使用時にはオルトトリジン法によって残留塩素濃度が0.02 mg/L以下であることを確認した。

[付属資料-1]

#### 3.3 試験容器及び恒温槽等

- 1) 試 験 容 器： 1,000 mL容のガラス製容器(外径12.0 cm、高さ12.5 cm)を用いた。
- 2) 恒 温 槽： 加温冷却機によって試験容器内の水温を20±1℃に維持する恒温槽を用いた。
- 3) 水 温 計： 検定済ガラス製棒状温度計
- 4) pH 計： ガラス電極式水素イオン濃度計 HM-14P 型(東亜電波工業)
- 5) 溶存酸素計： 溶存酸素計58型(Yellow Springs Instrument Co., Inc.)

#### 3.4 試験濃度の設定

急性遊泳阻害試験の結果である48-h  $\text{EiC}_{50}$ 値(0.316 mg/L)及び本試験に先立ち行った予備試験の結果から、試験濃度は0.100 mg/Lを最高濃度として公比2.0で5濃度区(0.100、0.0500、0.0250、0.0125及び0.00625 mg/L)を決定した。対照には希釈水のみを対照区を設けた。

### 3.5 試験液の調製

必要量の被験物質を希釈水に溶解させ、1,000 mg/Lの溶液を調製した。この溶液をさらに希釈水で100倍に希釈して10.0 mg/Lの試験原液を調製した。試験液は、各濃度区毎に必要な量の試験原液と希釈水を混合して調製し、4個の試験容器に分割した。

### 3.6 試験液の分析

全試験区(但し、4試験容器の中層より等量を採取したものを混合した1試料/1試験区)について、暴露期間中に6回(換水前後のものを3回繰り返し)の頻度で採取し、換水前のものについては遠心分離(3,000 rpmで10分間)をして餌を除いた後、そのまま若しくは希釈してHPLCにより分析した。試験液の分析に際しては、標準溶液(濃度0.0500 mg/L)の測定を行い、そのピーク面積比から定量した。詳細は付属資料-2に示した。

### 3.7 試験操作

試験液の水温、溶存酸素濃度、pHを測定後、試験生物を投入し、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試験生物を投入した。その際、試験液量に対して、ピペット内の飼育水は全量で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) 毎日、生存数、遊泳阻害数、大きさと状態を対照区と比較して観察した。死亡した親ミジンコは計数後に取り除いた。

(産出幼体) 換水前に幼体の生死の数及び休眠卵の発生等について観察した。計数後の幼体は取り除いた。最初の幼体産出日を記録した。

・水質測定：水温、溶存酸素濃度、pHを全試験区(但し、各1試験容器)について、暴露期間中に10回(換水前後のものを5回繰り返し)の頻度で測定した。

### 3.8 数値の取扱い

数値の丸め方は、JIS Z 8202-1985 参考 3 規則 B によった。

## 4 結果の算出

得られたデータを基に以下3項目の結果を算出した。結果の算出には、被験物質の測定濃度が設定値の±20%以内であったので設定濃度を用いた。

## 4.1 親ミジンコの半数致死濃度(LC50)の算出

各濃度区での親ミジンコの死亡数と供試個体数(40頭)を用いて、Binomial及びProbit法により14及び21日目の半数致死濃度(LC50)及びその95%信頼限界を算出した。

## 4.2 50%繁殖阻害濃度(ErC50)の算出

累積産仔数の算出

各試験容器の親1頭当たりの試験期間中の累積産仔数(TF)及び平均累積産仔数( $\overline{TF}$ )を以下の式より求めた。

$$TF = \sum_{n=1}^{ne} \frac{2 \times Fn}{Pn-1 + Pn}$$

ここで、

$n$  : 幼体観察回数

$Fn$  :  $n$ 回目の幼体数(但し、生存幼体)

$Pn$  : 暴露開始後 $n$ 回目の観察時の親の数

$Pn-1$  :  $n-1$ 回目の親の数

$P0$  : 最初に幼体を観察した日の前日の親の数

$ne$  : 最終観察回

(但し、 $Pn-1 + Pn$ が0の場合は、無視した。)

$$\overline{TF} = \frac{\sum_{n=1}^m TF_n}{m}$$

ここで、

$TF_n$  : 各試験容器の累積産仔数

$m$  : 濃度区当たりの系列数(試験容器数 : 4)

ErC50値の算出

Moving average法により50%繁殖阻害濃度(ErC50)を算出した。但し、供試個体数に対照区の平均累積産仔数を、生存数に各濃度区での平均累積産仔数を適用して計算した。14及び21日目のErC50値を算出し、それらの95%信頼限界も示した。

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

4.2に示した方法で算出した各試験容器毎の親1頭当たりの累積産仔数について、Bartlett法による等分散検定を行った後、各濃度区と対照区との有意差の有無を一元配置分散分析及びDunnnettの多重比較法により求め、対照区と有意差の認められない最高濃度(最大無作用濃度：NOECr)及び有意差の認められる最低濃度(最小作用濃度：LOECr)を決定した。

### 5 結果及び考察

#### 5.1 試験成績の信頼性に影響を及ぼしたと思われる環境要因

該当する要因はなかった。

#### 5.2 試験液中の被験物質濃度

試験液調製時の被験物質の測定濃度の設定値に対する割合は89.0～104%、2～3日後(換水前)で82.6～96.4%であった。

[Table 1 (p.10), 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及び死亡率

対照区での親ミジンコの累積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。

0.00625 mg/L区及び0.0125 mg/L区では殆ど死亡はみられなかったが、0.0500 mg/L区及び0.100 mg/L区では暴露開始2日目より死亡がみられ始め、5日目までに全個体死亡し、また0.0250 mg/L区では暴露開始4日目より死亡がみられ始め、暴露終了時では42.5%の累積死亡率であり、対照区と統計的にも有意差がみられた。

(上記濃度は、全て設定濃度を示す)

[ $p=0.05$ , 統計的方法：Kruskal-Wallisの順位和検定及び  
ノンパラメトリックの多重比較法(Scheffé)]

[Table 2 (p.11), Figure 1 (p.19), 付属資料－3]

初産日

対照区での親ミジンコの初産日は7日であり、試験成立条件である9日以内の基準を満たした。

0.0625 mg/L区及び0.0125 mg/L区及び0.0250 mg/L区での初産日は平均7.3日であり、対照区と有意差はなかったが、0.0250 mg/L区での初産日は平均8日であり、対照区と有意差がみられた。0.0500 mg/L区及び0.100 mg/L区では幼体の産出はみられなかった。

(上記濃度は、全て設定濃度を示す)

[ $p=0.05$ ,統計的方法：Kruskal-Wallisの順位和検定及び  
ノンパラメトリックの多重比較法(Scheffé)]

[Table 3 (p.12)]

平均累積産仔数

対照区での親ミジンコ1頭当たりの平均累積産仔数は124頭であり、試験成立条件である40頭の基準を満たした。

0.00625 mg/L区での親ミジンコ1頭当たりの平均累積産仔数は117頭であり、対照区と有意差はみられなかった。0.0125 mg/L区及び0.0250mg/L区での親ミジンコ1頭当たりの平均累積産仔数は対照区よりも少なく、統計的にも有意差がみられた。

(上記濃度は、全て設定濃度を示す)

( $p=0.01$ ,統計的方法：一元配置分散分析及びDunnettの多重比較法)

[Table 4 (p.13), Figure 2 (p.20),付属資料-3]

親ミジンコの大きさと状態

すべての濃度区において、死亡に至る例を除き対照区と比較して大きさや状態に殆ど違いはみられなかった。

休眠卵の発生等

暴露期間中、休眠卵の発生はいずれの試験区でもみられなかった。

落下卵はいずれの試験区でも観察されたが、0.0125 mg/L区と0.0250 mg/L区では対照区よりもやや多く観察された。

(上記濃度は、全て設定濃度を示す)

## 5.4 親ミジンコの50%致死濃度(LC50)

21日間の親ミジンコの50%致死濃度(LC50)は0.0125 mg/L(設定濃度)であった。

[Table 5 (p.14)]

## 5.5 50%繁殖障害濃度(ErC50)

設定濃度に基づいて算出した14日間の50%繁殖障害濃度(ErC50)は、0.0161 mg/Lであり、その95%信頼限界は0.0145～0.0179 mg/Lであった。また、21日間のErC50は、0.0172 mg/Lであり、その95%信頼限界は0.0159～0.0186 mg/Lであった。  
(上記濃度は、全て設定濃度を示す)

[Table 6 (p.14)]

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

親ミジンコ1頭当たりの累積産仔数に及ぼす21日間の最大無作用濃度(NOECr)は0.00625 mg/Lであり、最小作用濃度(LOECr)は0.0125 mg/Lであった。  
(上記濃度は、全て設定濃度を示す)

( $p=0.05$ ,統計的方法：一元配置分散分析及びDunnnettの多重比較法)

[Table 7 (p.15)]

## 5.7 試験液の水温、溶存酸素濃度及びpH

暴露期間中に測定した水温は20.2～20.7℃であり、 $20\pm1$ ℃の範囲であった。  
溶存酸素濃度は7.8～9.0 mg/Lであり、飽和溶存酸素濃度の60%以上であった(20.0℃の飽和溶存酸素濃度：8.84 mg/L)。pHは7.3～7.7であり、変動は1以下であった。

以上のことから、水温、溶存酸素濃度及びpH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 (p.16～18)]

## 5.8 試験液の状態

試験液調製時には無色透明であり、クロレラを給餌した後は淡緑色を呈していた。換水前ではその色が薄くなり、その程度はミジンコの数が多い時ほど著しかった。

以 上

Table 1. Concentrations of aniline in reproduction test using *Daphnia magna* under semi-static conditions

Nominal concentration (mg/L)	Measured concentration (mg/L) (Percent of nominal)			
	0-day <sup>a)</sup>	1-day <sup>b)</sup>	11-day <sup>a)</sup>	12-day <sup>b)</sup>
Control	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
0.00625	0.00556 (89.0)	0.00522 (83.5)	0.00575 (92.1)	0.00567 (90.7)
0.0125	0.0114 (91.4)	0.0103 (82.6)	0.0123 (98.1)	0.0116 (92.6)
0.0250	0.0242 (96.7)	0.0225 (89.9)	0.0236 (94.4)	0.0222 (88.7)
0.0500	0.0510 (102.0)	0.0481 (96.2)	-	-
0.100	0.104 (104)	0.0964 (96.4)	-	-

Table 1. (continued)

Nominal concentration (mg/L)	Measured concentration (mg/L) (Percent of nominal)		Time-weighted mean <sup>c)</sup> (mg/L)
	18-day <sup>a)</sup>	19-day <sup>b)</sup>	
Control	n.d.	n.d.	-
0.00625	0.00639 (102)	0.00522 (83.5)	0.00563 (90.0)
0.0125	0.0124 (99.2)	0.0109 (87.2)	0.0115 (91.8)
0.0250	0.0236 (94.4)	0.0221 (88.2)	0.0230 (92.0)
0.0500	-	-	0.0495 (99.1)
0.100	-	-	0.0999 (99.9)

n.d. : &lt; 0.00200 mg/L

The values in parentheses express percent of nominal.

a) fresh solutions

b) expired solutions

c) The values are expressed as time-weighted means calculated by the following equation:

$$\{(C_0 - C_1)/(\ln C_0 - \ln C_1) + (C_{11} - C_{12})/(\ln C_{11} - \ln C_{12}) + (C_{18} - C_{19})/(\ln C_{18} - \ln C_{19})\}/3$$

where

 $C_x$  : the measured concentration at x-day $\ln C_x$  : the natural logarithm of  $C_x$



Table 2. Cumulative number of dead parental *Daphnia* during exposure to aniline

Nominal concentration (mg/L)	Exposure time (day)										
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Control	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	( 0)	( 0)	( 0)	( 0)	( 0)	( 0)	( 0)	( 0)	( 0)	( 0)	( 0)
0.00625	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	( 0)	( 0)	( 0)	( 0)	( 0)	( 0)	( 0)	( 0)	( 0)	( 0)	( 0)
0.0125	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	( 0)	( 0)	( 0)	( 0)	( 0)	( 0)	( 0)	( 0)	( 0)	( 0)	( 0)
0.0250	0	0	0	0	1	9	10	13	14	15	16
	( 0)	( 0)	( 0)	( 0)	(2.5)	(22.5)	(25.0)	(32.5)	(35.0)	(37.5)	(40.0)
0.0500	0	0	30	37	39	40	40	40	40	40	40
	( 0)	( 0)	(75.0)	(92.5)	(97.5)	(100)	(100)	(100)	(100)	(100)	(100)
0.100	0	0	40	40	40	40	40	40	40	40	40
	( 0)	( 0)	(100)	(100)	(100)	(100)	(100)	(100)	(100)	(100)	(100)

Table 2. (continued)

Nominal concentration (mg/L)	Exposure time (day)										
	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)
0.00625	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	( 0)	( 0)	( 0)	( 0)	( 0)	( 0)	( 0)	( 0)	( 0)	( 0)	( 0)
0.0125	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1
	( 0)	( 0)	( 0)	( 0)	( 0)	( 0)	(2.5)	(2.5)	(2.5)	(2.5)	(2.5)
0.0250	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17	17
	(42.5)	(42.5)	(42.5)	(42.5)	(42.5)	(42.5)	(42.5)	(42.5)	(42.5)	(42.5)	(42.5)
0.0500	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40
	(100)	(100)	(100)	(100)	(100)	(100)	(100)	(100)	(100)	(100)	(100)
0.100	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40
	(100)	(100)	(100)	(100)	(100)	(100)	(100)	(100)	(100)	(100)	(100)

The values in parentheses express mortality (%) of *Daphnia*.

Table 3. Time (days) required to first brood production during exposure to aniline

Nominal concentration (mg/L)	Vessel No.				Mean
	1	2	3	4	
Control	7	7	7	7	7.0
0.00625	7	8	7	7	7.3
0.0125	7	8	8	8	7.8
0.0250	8	8	8	8	8.0
0.0500	-	-	-	-	-
0.100	-	-	-	-	-

Table 4. Mean cumulative number of juveniles produced per adult ( $\Sigma F_1/P$ )  
during exposure to aniline

Nominal concentration (mg/L)	Exposure time (day)										
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Control	0	0	0	0	0	0	0	0.6	6.7	6.7	9.3
0.00625	0	0	0	0	0	0	0	0.4	6.3	6.3	9.7
0.0125	0	0	0	0	0	0	0	0.3	3.7	3.7	5.4
0.0250	0	0	0	0	0	0	0	0	0.4	0.4	0.5
0.0500	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0.100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Table 4. (continued)

Nominal concentration (mg/L)	Exposure time (day)										
	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
Control	33.6	33.6	41.8	71.5	71.5	84.0	99.1	99.1	100	124	124
0.00625	28.4	28.4	39.2	65.9	65.9	82.3	93.1	93.1	93.1	116	117
0.0125	28.6	28.6	37.2	59.7	59.7	73.0	83.9	83.9	83.9	103	103
0.0250	3.3	3.3	3.6	9.4	9.4	11.7	17.7	17.7	18.7	27.3	27.3
0.0500	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0.100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Table 5. Calculated LC50 values of aniline for parental *Daphnia* based on nominal concentrations

Exposure time (day)	LC50 (mg/L)	95-Percent confidence limits (mg/L)	Statistical method
14	0.0267	0.0125 ~ 0.0500	binomial
21	0.0255	0.0228 ~ 0.0286	probit

Table 6. Calculated ErC50 values of aniline for inhibition of reproduction based on nominal concentrations

Exposure time (day)	ErC50 (mg/L)	95-Percent confidence limits (mg/L)	Statistical method
14	0.0161	0.0145 ~ 0.0179	moving average
21	0.0172	0.0159 ~ 0.0186	moving average

Table 7. Significance test of difference between the mean cumulative numbers of juveniles produced per adult in control and test vessels after 21days exposure to aniline

Nominal concentration (mg/L)	Vessel No.				Mean	S.D.	Significant difference
	1	2	3	4			
Control	126	126	131	115	124	6.7	
0.00625	112	127	115	113	117	7.2	
0.0125	112	103	94	103	103	7.4	**
0.0250	25	40	22	23	27	8.6	**
0.0500	0	0	0	0	0	0	-
0.100	0	0	0	0	0	0	-

\*\* : Significantly different from Control at  $p < 0.01$ .

The data of 0.0500 and 0.100 mg/L were omitted from statistical analysis.

No observed effect concentration (NOECr) = 0.00625 mg/L

Lowest observed effect concentration (LOECr) = 0.0125 mg/L

Table 8. Temperature of test solutions during 21-day *Daphnia* reproduction inhibition test to aniline

Nominal concentration (mg/L)	Temperature (°C)									
		0-day	1-day	5-day	6-day	10-day	11-day	15-day	16-day	20-day 21-day
Control	New	20.2		20.7		20.3		20.3		20.6
	Old		20.5		20.6		20.5		20.3	20.5
0.00625	New	20.2		20.7		20.2		20.3		20.6
	Old		20.5		20.7		20.5		20.3	20.6
0.0125	New	20.2		20.7		20.2		20.3		20.5
	Old		20.5		20.7		20.6		20.4	20.6
0.0250	New	20.2		20.7		20.2		20.4		20.5
	Old		20.5		20.6		20.6		20.4	20.6
0.0500	New	20.2		n	n	n	n	n	n	n
	Old		20.5	n	n	n	n	n	n	n
0.100	New	20.2		n	n	n	n	n	n	n
	Old		20.5	n	n	n	n	n	n	n

new : freshly prepared test solutions

old : test solutions after 24 hours exposure

n : No measurement was made because all *Daphnia* died at this observation time.

Table 9. Dissolved oxygen concentrations of test solutions during 21-day *Daphnia* reproduction inhibition test to aniline

Nominal concentration (mg/L)	Dissolved oxygen concentration (mg/L)										
		0-day	1-day	5-day	6-day	10-day	11-day	15-day	16-day	20-day	21-day
Control	New	9.0		8.8		8.9		8.6		8.9	
	Old		8.7		7.9		8.2		8.2		8.4
0.00625	New	8.9		8.9		8.9		8.6		8.9	
	Old		8.7		7.9		8.2		8.2		8.3
0.0125	New	8.9		8.9		8.9		8.6		8.9	
	Old		8.7		7.8		8.0		8.1		8.4
0.0250	New	8.9		8.9		8.9		8.6		8.9	
	Old		8.8		8.1		8.4		8.5		8.6
0.0500	New	8.9		n	n	n	n	n	n	n	n
	Old		8.8	n	n	n	n	n	n	n	n
0.100	New	8.9		n	n	n	n	n	n	n	n
	Old		8.8	n	n	n	n	n	n	n	n

new : freshly prepared test solutions

old : test solutions after 24 hours exposure

n : No measurement was made because all *Daphnia* died at this observation time.

Table 10. pH values of test solutions during 21-day *Daphnia* reproduction inhibition test to aniline

Nominal concentration (mg/L)	pH									
		0-day	1-day	5-day	6-day	10-day	11-day	15-day	16-day	20-day 21-day
Control	New	7.6		7.6		7.7		7.6		7.7
	Old		7.6		7.3		7.4		7.5	7.4
0.00625	New	7.6		7.5		7.7		7.6		7.6
	Old		7.7		7.3		7.4		7.4	7.3
0.0125	New	7.6		7.6		7.7		7.6		7.6
	Old		7.6		7.3		7.3		7.4	7.4
0.0250	New	7.6		7.6		7.7		7.6		7.6
	Old		7.6		7.3		7.5		7.6	7.5
0.0500	New	7.7		n	n	n	n	n	n	n
	Old		7.7	n	n	n	n	n	n	n
0.100	New	7.7		n	n	n	n	n	n	n
	Old		7.7	n	n	n	n	n	n	n

new : freshly prepared test solutions

old : test solutions after 24 hours exposure

n : No measurement was made because all *Daphnia* died at this observation time.



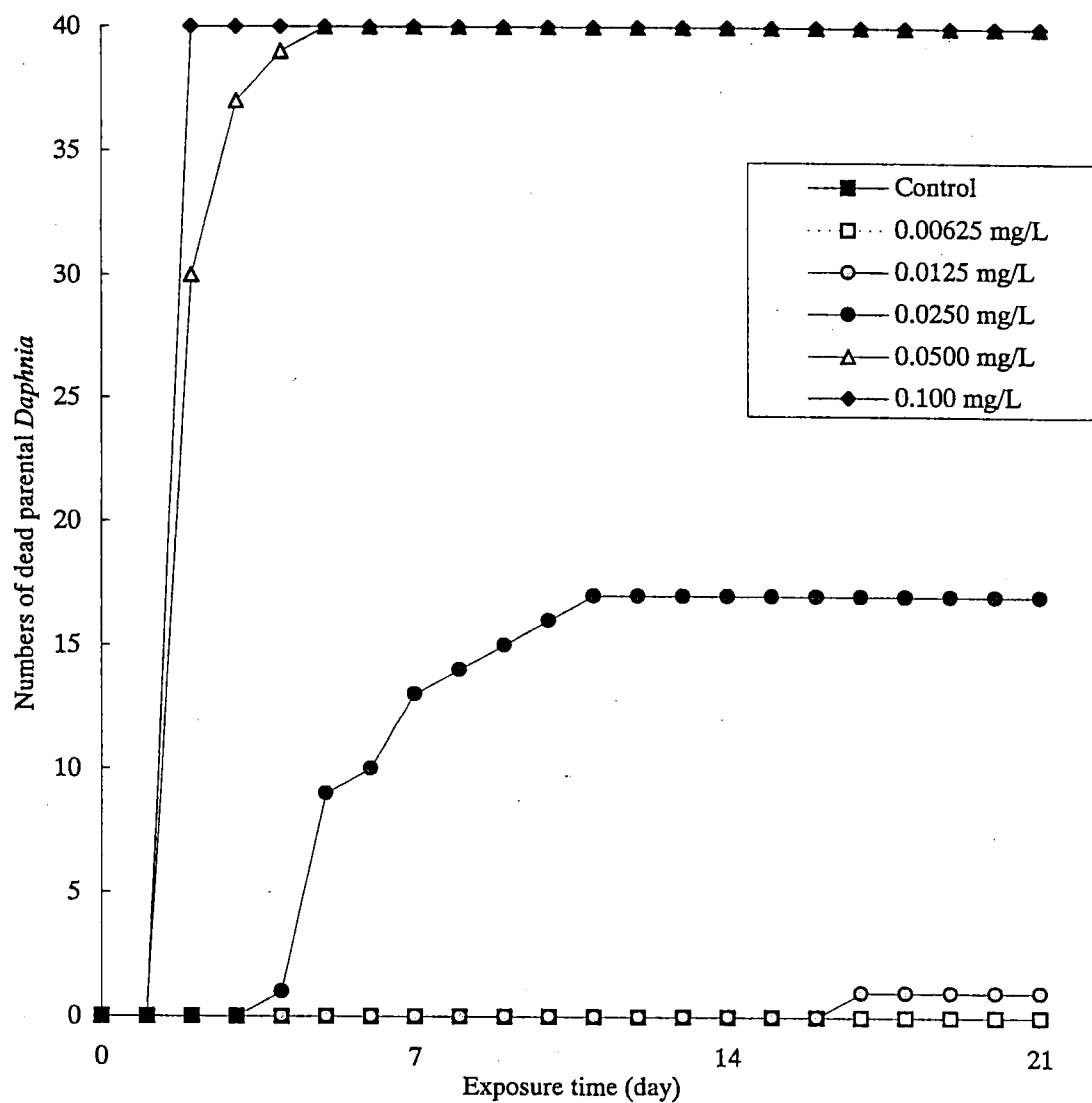


Figure 1. Cumulative numbers of dead parental *Daphnia*.

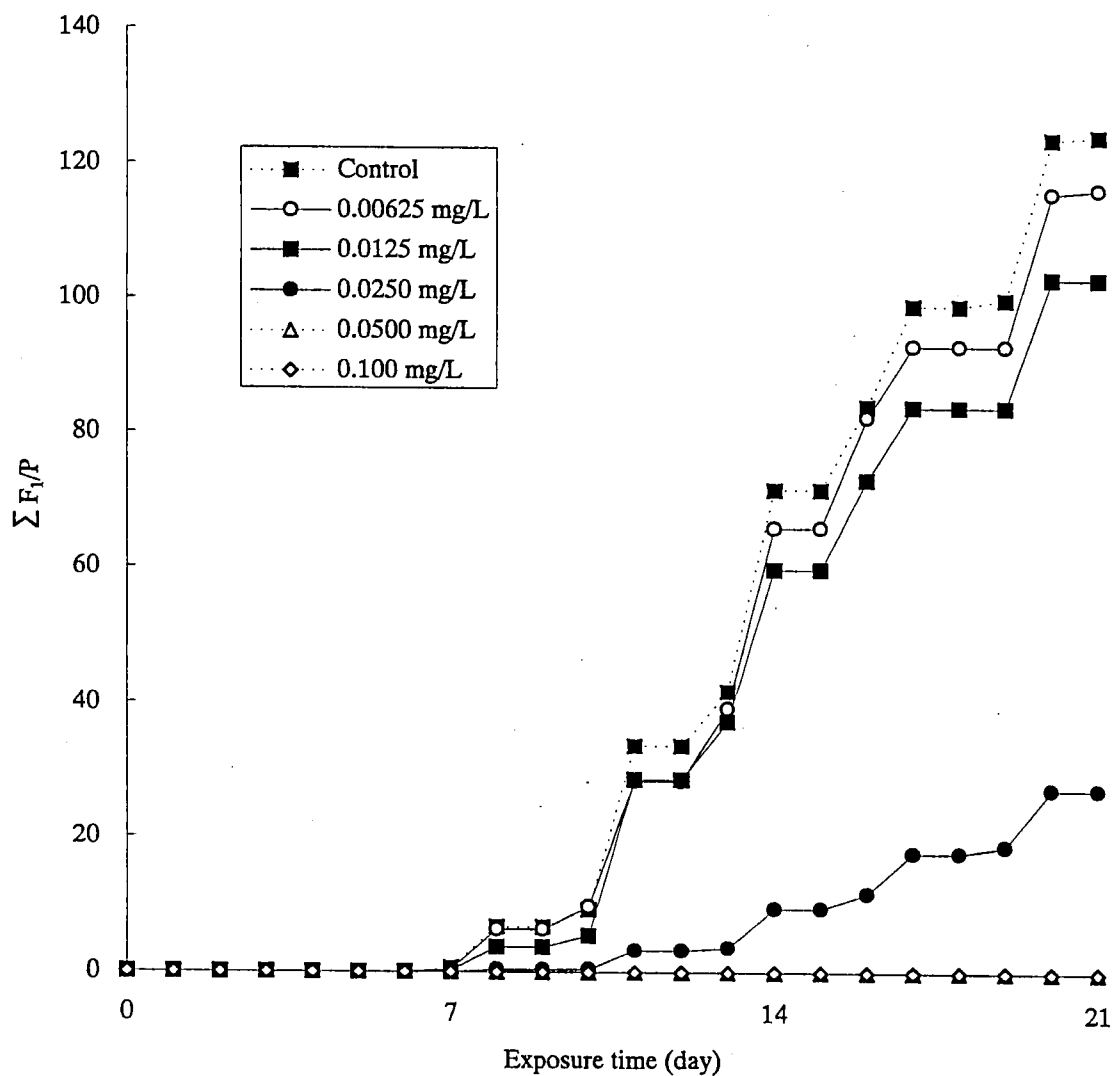


Figure 2. Mean cumulative numbers of juveniles produced per adult ( $\Sigma F_1/P$ ).

## 付属資料－1

希釈水の水質

(全 2 頁)

## Appendix 1. Water quality of dilution water

Parameter	Concentration	Lower limit
	1997.Feb.4	of detection
pH	7.7	
COD (mg/L)	0.2	
Coliform group bacteria (MPN/100mL)	0	
Total phosphorus (mg/L)	0.007	
Total mercury (mg/L)	N.D.	0.0005
Copper (mg/L)	N.D.	0.005
Cadmium (mg/L)	N.D.	0.005
Zinc (mg/L)	N.D.	0.01
Lead (mg/L)	N.D.	0.005
Aluminium (mg/L)	N.D.	0.1
Nickel (mg/L)	N.D.	0.01
Total chromium (mg/L)	N.D.	0.02
Manganese (mg/L)	N.D.	0.01
Tin (mg/L)	N.D.	0.5
Iron (mg/L)	0.05	0.01
Cyanide (mg/L)	N.D.	0.1
Free chlorine (mg/L)	N.D.	0.01
Bromide ion (mg/L)	N.D.	0.1
Fluoride (mg/L)	N.D.	0.15
Sulfide ion (mg/L)	N.D.	0.1
Ammonia nitrogen (mg/L)	N.D.	0.01
Arsenic (mg/L)	N.D.	0.002
Selenium (mg/L)	N.D.	0.002
Evaporation residue (mg/L)	120	
Electric conductivity (μs/cm)	171	
Total hardness (as CaCO <sub>3</sub> ) (mg/L)	55.6	
Alkalinity (mg/L)	37.5	
Sodium (mg/L)	14.9	
Potassium (mg/L)	3.76	
Calcium (mg/L)	14.8	
Magnesium (mg/L)	4.52	

## Appendix 1. (continued)

Parameter		Concentration	Lower limit
		1997.Feb.4	of detection
1,2-Dichloropropane	(mg/L)	N.D.	0.006
Diazinon	(mg/L)	N.D.	0.0005
Isoxathion	(mg/L)	N.D.	0.0008
Fenitrothion (MEP)	(mg/L)	N.D.	0.0003
Isoprothiolane	(mg/L)	N.D.	0.004
Oxine copper	(mg/L)	N.D.	0.004
Chlorothalonil (TPN)	(mg/L)	N.D.	0.004
Propyzamide	(mg/L)	N.D.	0.0008
EPN	(mg/L)	N.D.	0.0006
Dichlorvos (DDVP)	(mg/L)	N.D.	0.001
Fenobucarb (BPMC)	(mg/L)	N.D.	0.002
Iprobenfos (IBP)	(mg/L)	N.D.	0.0008
Chlornitrofen (CNP)	(mg/L)	N.D.	0.0005
Thiram	(mg/L)	N.D.	0.0006
Simazine (CAT)	(mg/L)	N.D.	0.0003
Thiobencarb	(mg/L)	N.D.	0.002
PCB	(mg/L)	N.D.	0.0005

N.D. : not detected

## 付属資料－2

試験液の分析方法及び分析チャート

(全 10 頁)

試 験 名 : ミジンコ繁殖阻害試験

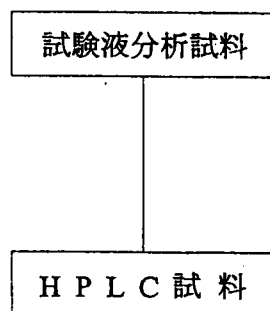
被験物質物質名 : アニリン

1) 試験液の分析方法

(1) 試験液の前処理操作

混合した溶液はそのまま若しくは希釈水で希釈して、以下のフロースキームに従い高速液体クロマトグラフィー(HPLC)によって分析した。

フロースキーム



HPLC試料中の被験物質濃度は、クロマトグラム上の被験物質のピーク面積を濃度既知の標準溶液のピーク面積と比較し、比例計算して求めた。

(2) 被験物質溶液の調製

被験物質 100 mg を正確にはかりとり、アセトニトリルに溶解して 1,000 mg/L の被験物質溶液を調製した。これをアセトニトリルで希釈して 10.0 mg/L の被験物質溶液を調製した。

(3) 標準溶液の調製

分析試料中の被験物質濃度を求めるための標準溶液の調製は次のようにして行った。10.0 mg/L の被験物質溶液を希釈水で希釈して 0.0500 mg/L の標準溶液とした。

## 2) HPLCの分析条件

機 器	高速液体クロマトグラフ
ポンプ	島津製作所製 LC-10AD
検出器	島津製作所製 SPD-10AV
オートインジェクター	島津製作所製 SIL-10Axi
カラム	L-column ODS (化学品検査協会製) 15 cm×4.6 mm φ ステンレス製
カラム温度	40℃
溶離液	アセトニトリル/蒸留水 (30/70 V/V)
流量	1.0 mL/min
測定波長	280 nm
注入量	400 $\mu$ L
感 度	
検出器	1 AU/1 V
記録計	ATTEN 2 <sup>3</sup>

## 3) 検量線の作成

(3)の標準溶液の調製と同様にして0.00200、0.0100、0.0500及び0.250 mg/Lの標準溶液を調製した。これらを分析機器の定量条件に従って分析し、得られたそれぞれのクロマトグラム上のピーク面積と濃度により、検量線を作成した。



Content of figure

- Figure 1. Calibration curve of aniline by HPLC analysis.
- Figure 2-1. Example of chromatogram.  
( standard solution of 0.0500 mg/L, 0-day )
- Figure 2-2. Example of chromatogram.  
( fresh test solution of 0.0250 mg/L as nominal concentration,  
0-day )
- Figure 2-3. Example of chromatogram.  
( fresh test solution of control, 0-day )
- Figure 2-4. Example of chromatogram.  
( standard solution of 0.0500 mg/L, 1-day )
- Figure 2-5. Example of chromatogram.  
( expired test solution of 0.0250 mg/L as nominal concentration,  
1-day )
- Figure 2-6. Example of chromatogram.  
( expired test solution of control, 1-day )

## Input data

Run	Concentration (mg/L)	Peak area ( $\mu\text{V}\cdot\text{sec}$ )
1	0.00200	698
2	0.0100	3713
3	0.0500	21930
4	0.250	105698

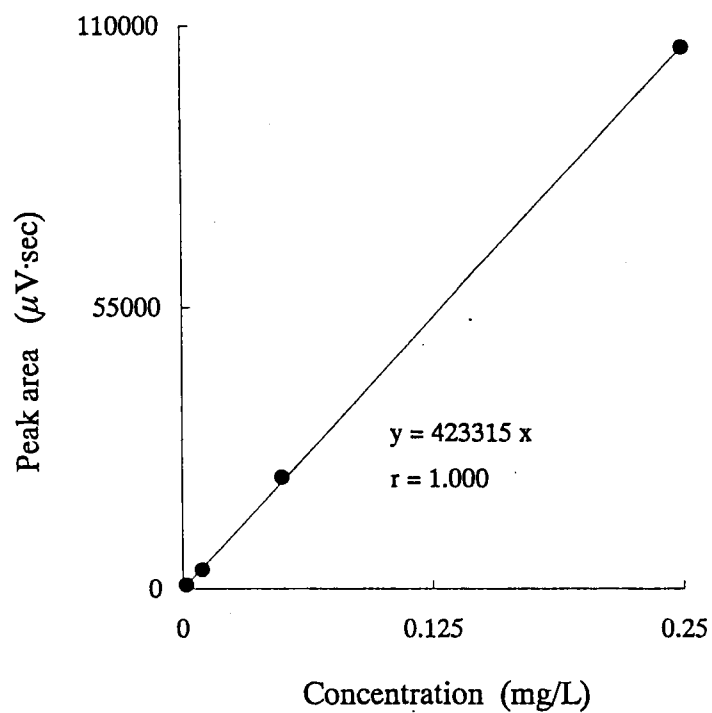


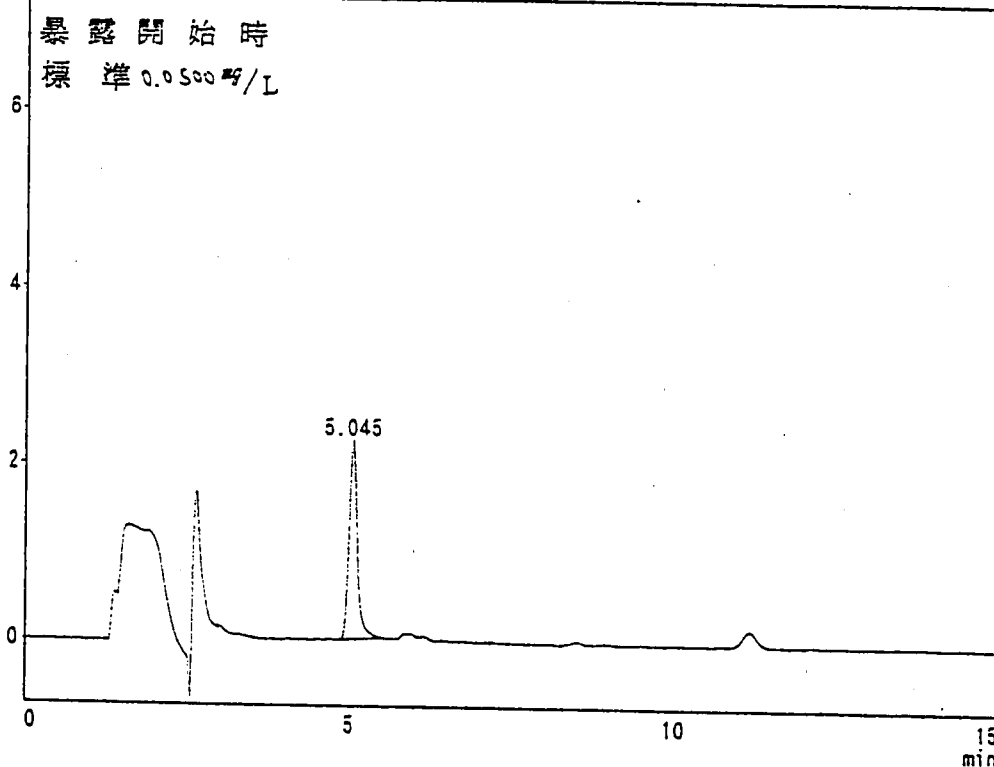
Figure 1. Calibration curve of aniline by HPLC analysis.

CLASS-LC10 システム番号=1 Ch=1 レポート番号=618 データ=1753H05.D12 97/04/03 20:58:04  
 サンプル : ANR/std.  
 ID : 0.05ppm  
 サンプル量 : 100  
 タイプ : 標準試料  
 検出器 : SPD-10AV シングル  
 プロベータ名 : XXXXXXXXXX  
 メソッド名 : ANR-1.M40

1997. 4. 4

\*\*\* クロマトグラム \*\*\*  
 mAbs

試験番号 91753



\*\*\* ピークレポート \*\*\*

PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	5.045	20713	2267		1		7ニリン

-----

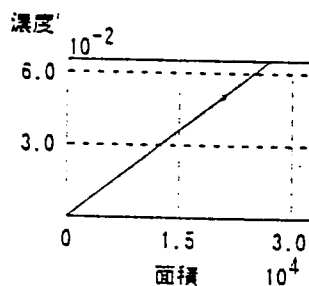
20713 2267

\*\*\* キャリブレーション結果 \*\*\*

\*\* ID テーブル \*\*

IDNO	成分名	時間	濃度	F1	F2
1	7ニリン	5.05	0.05	2.413908e-006	

\*\* 検量線 \*\*



IDNO: 1  
 NAME: 7ニリン  
 TIME: 5.05

濃度 面積  
 (1) 0.05 20713

F1 F2  
 (1) 2.41391e-006 0  
 r2 = 1

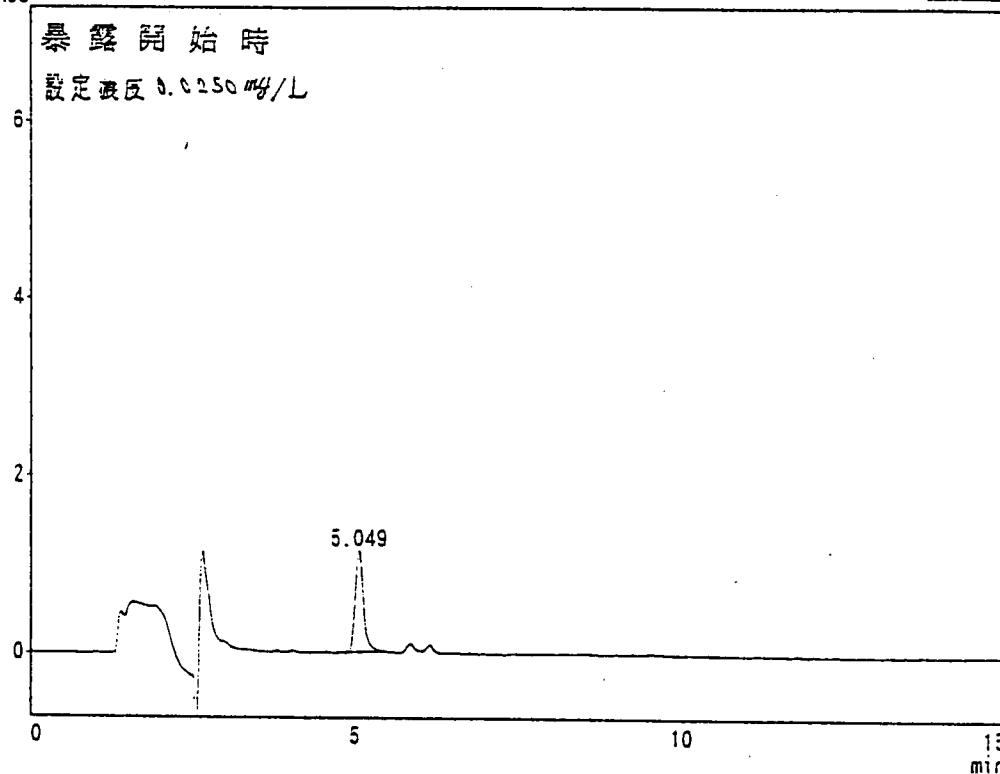
Figure 2-1. Example of chromatogram.  
 ( standard solution of 0.0500 mg/L, 0-day )

CLASS-LC10 システム番号=1 Ch=1 レポート番号=621 データ=1753H0C.D11 97/04/03 21:50:34  
 サンプル : ANR/D3/0d  
 ID : 0.0250  
 サンプル量 : 100  
 タイプ : 未知試料  
 検出器 : SPD-10AV シンク  
 オペレータ名 :   
 メソッド名 : ANR-1.M40

1997. 4. 4

\*\*\* クロマトグラム \*\*\*  
 mAbs

試験番号 91753



\*\*\* ヒートマップ \*\*\*

PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	5.049	10010	1131		1	0.0242	7ニリン
		10010	1131				
		0.0242					

Figure 2-2. Example of chromatogram.

( fresh test solution of 0.0250 mg/L as nominal concentration, 0-day )

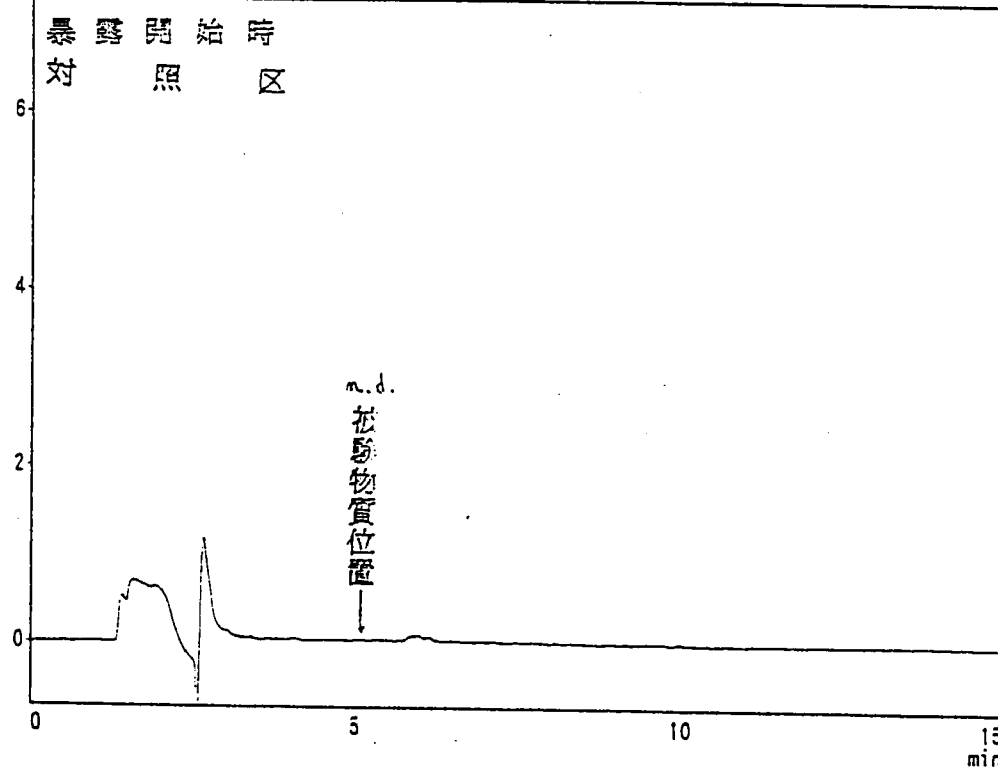
CLASS-LC10 システム番号=1 Ch=1 レポート番号=616 テータ=1753H0Z.D11 97/04/03 20:23:04  
 サンプル : ANR/D6/0d  
 ID : 対照区  
 サンプル量 : 100  
 タイプ : 未知試料  
 検出器 : SPD-10AV シグナル  
 オペレータ名 : XXXXXXXXXX  
 メソッド名 : ANR-1.M40

1997. 4. 4

\*\*\* クロマトグラム \*\*\*

試験番号 91753

mAbs



\*\*\* ピークレポート \*\*\*  
 !! ピークがありません !!

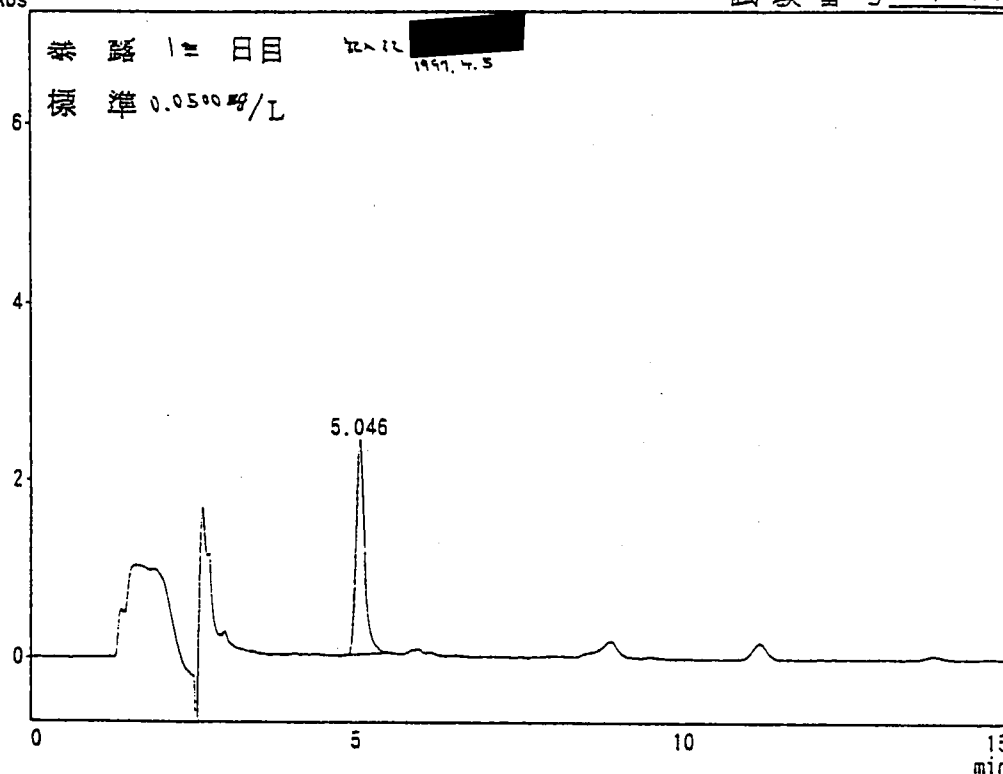
Figure 2-3. Example of chromatogram.  
 ( fresh test solution of control, 0-day )

サンプル : ANR/std.  
 ID : 0.05ppm  
 サンプル量 : 100  
 タイプ : 標準試料  
 検出器 : SPD-10AV シンクル  
 モデラ名 : XXXXXXXXXX  
 メソッド名 : ANR-1.M40

1997.4.5

\*\*\* クロマトグラム \*\*\*  
mAbs

試験番号 91753



\*\*\* ピークレポート \*\*\*

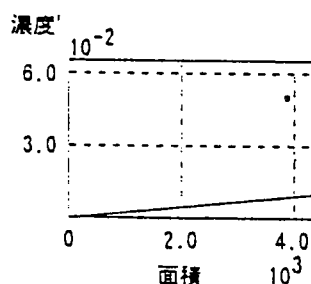
PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	5.046	22046	2434		1		7ニリン

\*\*\* キャリブレーション結果 \*\*\*

\*\* ID テーブル \*\*

IDNO	成分名	時間	濃度	F1	F2
1	7ニリン	5.05	0.05	2.267985e-006	

\*\* 検量線 \*\*



IDNO: 1  
 NAME: 7ニリン  
 TIME: 5.05

濃度'	面積
(1) 0.05	3875

F1	F2
(1) 2.26799e-006	0

r2 = 1

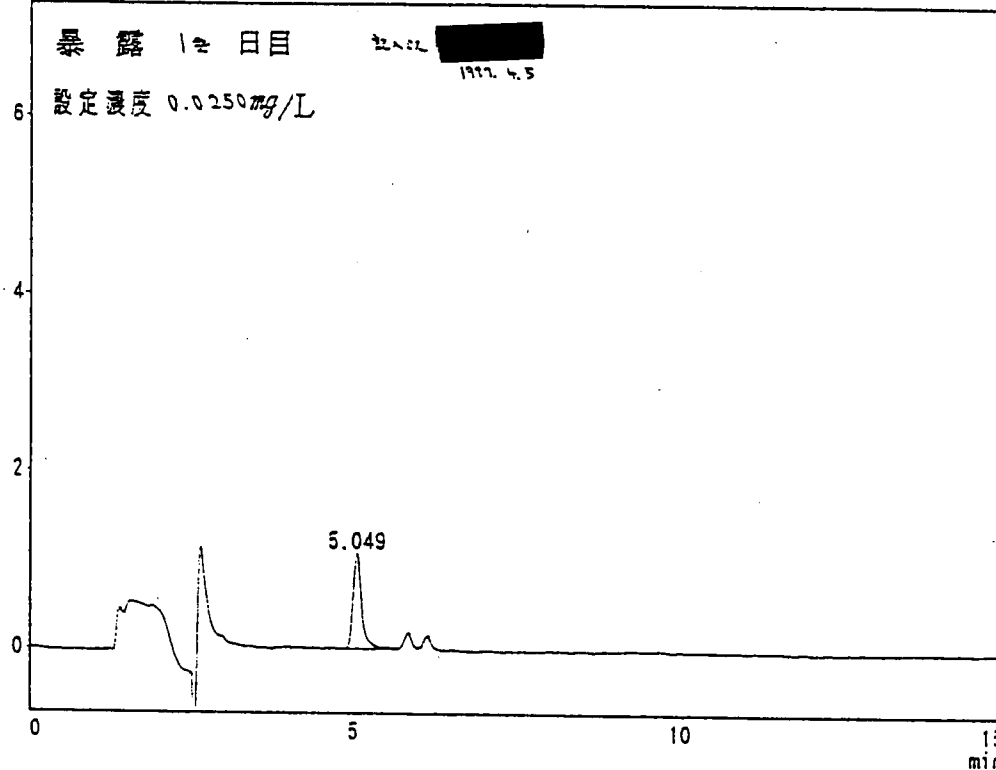
Figure 2-4. Example of chromatogram.  
( standard solution of 0.0500 mg/L, 1-day )

CLASS-LC10 システム番号=1 Ch=1 レポート番号=713 データ=1753H2C.D11 97/04/04 21:58:52  
 サンプル : ANR/D3/ed 22.12 1997.4.5  
 ID : 0.0250  
 サンプル量 : 100  
 タイプ : 未知試料  
 検出器 : SPD-10AV シングル  
 モデラ名 :  
 メソッド名 : ANR-1.M40

1997.4.5

\*\*\* クロマトグラム \*\*\*  
 mAbs

試験番号 91753



\*\*\* ヒートマップ \*\*\*

PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	5.049	9911	1066		1	0.0225	7ニリン
		9911	1066			0.0225	

Figure 2-5. Example of chromatogram.

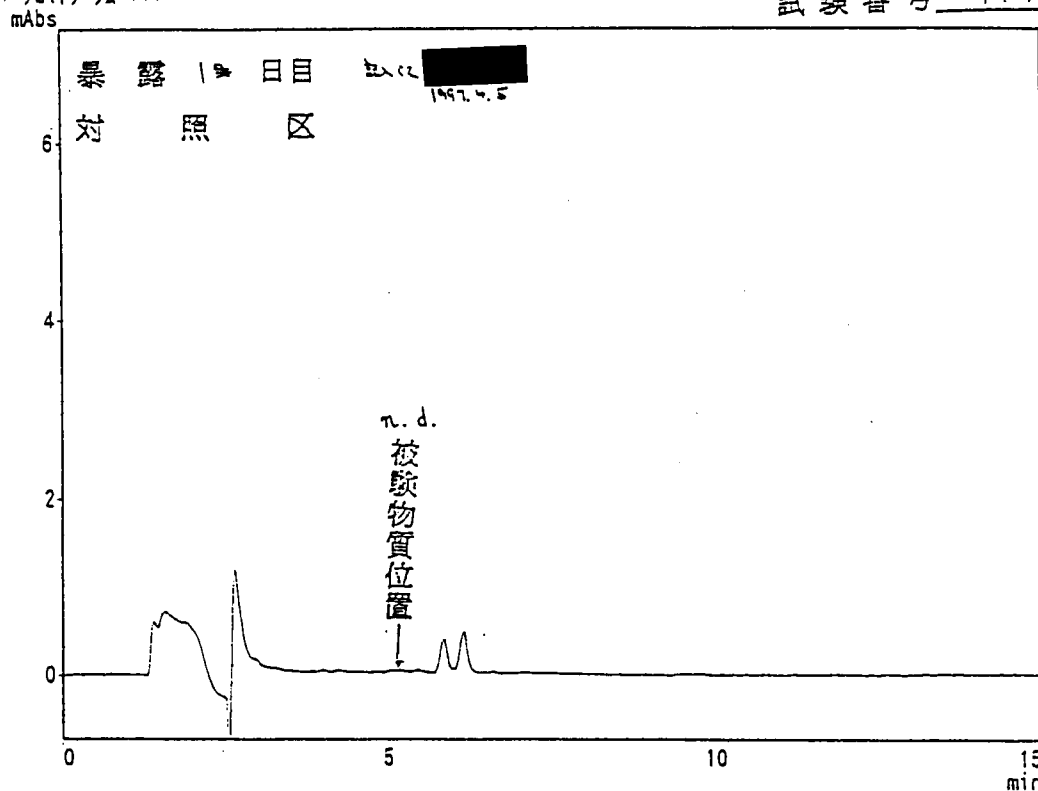
( expired test solution of 0.0250 mg/L as nominal concentration, 1-day )

CLASS-LC10 システム番号=1 Ch=1 レポート番号=684 データ=1753H2Z.D11 97/04/04 20:17:52  
 サンプル : ANR/D6/2d 試料名 [REDACTED]  
 ID : 対照区 1997.4.5  
 サンプル量 : 100  
 タイプ : 未知試料  
 検出器 : SPD-10AV シンク  
 オペレータ名 : [REDACTED]  
 メソッド名 : ANR-1.M40

1997.4.5

\*\*\* クロマトグラム \*\*\*

試験番号 91753



\*\*\* ヒートマップ \*\*\*  
 !! ヒートがありません !!

Figure 2-6. Example of chromatogram.  
 ( expired test solution of control, 1-day )



付属資料－3

ミジンコの観察結果

(全 6 頁)

## Appendix 3-1. Result of reproduction test

( Nominal concentration : Control )

Rep. No.	Counts	Time																					Total
		4/4	4/5	4/6	4/7	4/8	4/9	4/10	4/11	4/12	4/13	4/14	4/15	4/16	4/17	4/18	4/19	4/20	4/21	4/22	4/23	4/24	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	
1	P generation	Live	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	-
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-
	F <sub>1</sub> generation	Live						5	47	0	29	242	0	75	312	0	86	216	0	5	244	0	1261
		Dead						0	0	0	0	0	0	3	3	0	0	0	0	0	0	0	6
	Total							5	47	0	29	242	0	78	315	0	86	216	0	5	244	0	1267
								0.5	4.7	0.0	2.9	24.2	0.0	7.5	31.2	0.0	8.6	21.6	0.0	0.5	24.4	0.0	126
Cumulative reproductivity								0.5	5.2	5.2	8.1	32.3	32.3	39.8	71.0	71.0	79.6	101.2	101.2	101.7	126.1	126.1	
2	P generation	Live	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	-
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-
	F <sub>1</sub> generation	Live						8	55	0	42	256	0	114	266	0	111	139	0	0	264	0	1255
		Dead						0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	2
	Total							8	55	0	42	257	0	114	267	0	111	139	0	0	264	0	1257
								0.8	5.5	0.0	4.2	25.6	0.0	11.4	26.6	0.0	11.1	13.9	0.0	0.0	26.4	0.0	126
Cumulative reproductivity								0.8	6.3	6.3	10.5	36.1	36.1	47.5	74.1	74.1	85.2	99.1	99.1	99.1	125.5	125.5	
3	P generation	Live	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	-
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-
	F <sub>1</sub> generation	Live						10	70	0	30	222	0	85	316	0	178	121	0	35	244	0	1311
		Dead						0	0	0	0	0	0	0	9	0	0	0	0	0	0	0	9
	Total							10	70	0	30	222	0	85	325	0	178	121	0	35	244	0	1320
								1.0	7.0	0.0	3.0	22.2	0.0	8.5	31.6	0.0	17.8	12.1	0.0	3.5	24.4	0.0	131
Cumulative reproductivity								1.0	8.0	8.0	11.0	33.2	33.2	41.7	73.3	73.3	91.1	103.2	103.2	106.7	131.1	131.1	
4	P generation	Live	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	-
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-
	F <sub>1</sub> generation	Live						1	73	0	0	255	0	52	296	0	125	127	0	0	203	20	1152
		Dead						0	0	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	0	0	5
	Total							1	73	0	0	255	0	52	301	0	125	127	0	0	203	20	1157
								0.1	7.3	0.0	0.0	25.5	0.0	5.2	29.6	0.0	12.5	12.7	0.0	0.0	20.3	2.0	115
Cumulative reproductivity								0.1	7.4	7.4	7.4	32.9	32.9	38.1	67.7	67.7	80.2	92.9	92.9	92.9	113.2	115.2	

## Appendix 3-2. Result of reproduction test

(Nominal concentration : 0.00625 mg/L )

		( Nominal concentration : 0.00625 mg/L )																						
Rep. No	Counts		Time																				Total	
			4/4	4/5	4/6	4/7	4/8	4/9	4/10	4/11	4/12	4/13	4/14	4/15	4/16	4/17	4/18	4/19	4/20	4/21	4/22	4/23		4/24
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20		21
1	P generation	Live	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	-	
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	
	F <sub>1</sub> generation	Live							11	54	0	60	140	0	82	289	0	81	185	0	0	187	27	1116
		Dead							1	3	0	0	10	0	1	7	0	0	1	0	0	0	0	23
	Total								12	57	0	60	150	0	83	296	0	81	186	0	0	187	27	1139
	Cumulative reproductivity								1.1	5.4	0.0	6.0	14.0	0.0	8.2	28.9	0.0	8.1	18.5	0.0	0.0	18.7	2.7	112
2	P generation	Live	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	-	
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	
	F <sub>1</sub> generation	Live							0	60	0	32	219	0	99	333	0	232	60	0	0	237	0	1272
		Dead							0	5	0	0	4	0	1	28	0	0	0	0	0	4	0	42
	Total								0	65	0	32	223	0	100	361	0	232	60	0	0	241	0	1314
	Cumulative reproductivity								0.0	6.0	0.0	3.2	21.9	0.0	9.9	33.3	0.0	23.2	6.0	0.0	0.0	23.7	0.0	127
3	P generation	Live	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	-	
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	
	F <sub>1</sub> generation	Live							2	57	0	36	180	0	134	208	0	221	67	0	0	243	0	1148
		Dead							0	6	0	0	7	0	2	22	0	0	2	0	0	2	0	41
	Total								2	63	0	36	187	0	136	230	0	221	69	0	0	245	0	1189
	Cumulative reproductivity								0.2	5.7	0.0	3.6	18.0	0.0	13.4	20.8	0.0	22.1	6.7	0.0	0.0	24.3	0.0	115
4	P generation	Live	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	-	
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	
	F <sub>1</sub> generation	Live							2	67	0	6	210	0	115	239	0	124	118	0	0	246	0	1127
		Dead							0	4	0	0	4	0	2	10	0	1	1	0	0	0	0	22
	Total								2	71	0	6	214	0	117	249	0	125	119	0	0	246	0	1149
	Cumulative reproductivity								0.2	6.7	0.0	0.6	21.0	0.0	11.5	23.9	0.0	12.4	11.8	0.0	0.0	24.6	0.0	113
Cumulative reproductivity								0.2	6.9	6.9	7.5	28.5	28.5	40.0	63.9	63.9	76.3	88.1	88.1	88.1	112.7	112.7		

## Appendix 3-3. Result of reproduction test

(Nominal concentration : 0.0125 mg/L )

Rep. No	Counts		(Nominal concentration : 0.0125 mg/L)																					Total	
			Time																						
			4/4	4/5	4/6	4/7	4/8	4/9	4/10	4/11	4/12	4/13	4/14	4/15	4/16	4/17	4/18	4/19	4/20	4/21	4/22	4/23	4/24		
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21		
1	P generation	Live	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	9	9	9	9	9	-	
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	-
	F <sub>1</sub> generation	Live								10	18	0	43	216	0	175	170	0	173	87	0	0	205	0	1097
		Dead								0	13	0	0	11	0	3	28	0	0	1	0	0	1	0	57
		Total								10	31	0	43	227	0	178	198	0	173	88	0	0	206	0	1154
	Cumulative reproductivity									1.0	1.8	0.0	4.3	21.6	0.0	17.5	17.0	0.0	17.3	9.2	0.0	0.0	22.8	0.0	112
2	P generation	Live	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	-	
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	
	F <sub>1</sub> generation	Live								0	38	0	6	232	0	54	242	0	154	87	0	0	220	0	1033
		Dead								0	15	0	0	8	0	5	42	0	0	4	0	0	11	0	85
		Total								0	53	0	6	240	0	59	284	0	154	91	0	0	231	0	1118
	Cumulative reproductivity									0.0	3.8	0.0	0.6	23.2	0.0	5.4	24.2	0.0	15.4	8.7	0.0	0.0	22.0	0.0	103
3	P generation	Live	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	-	
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	
	F <sub>1</sub> generation	Live								0	48	0	7	243	0	71	243	0	89	139	0	0	102	0	942
		Dead								0	11	0	0	4	0	4	36	0	1	10	0	7	98	1	172
		Total								0	59	0	7	247	0	75	279	0	90	149	0	7	200	1	1114
	Cumulative reproductivity									0.0	4.8	0.0	0.7	24.3	0.0	7.1	24.3	0.0	8.9	13.9	0.0	0.0	10.2	0.0	94
4	P generation	Live	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	-	
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	
	F <sub>1</sub> generation	Live								0	35	0	12	236	0	45	245	0	116	118	0	0	222	0	1029
		Dead								0	11	0	0	14	0	5	37	0	0	1	0	0	2	0	70
		Total								0	46	0	12	250	0	50	282	0	116	119	0	0	224	0	1099
	Cumulative reproductivity									0.0	3.5	0.0	1.2	23.6	0.0	4.5	24.5	0.0	11.6	11.8	0.0	0.0	22.2	0.0	103
Cumulative reproductivity									0.0	3.5	3.5	4.7	28.3	28.3	32.8	57.3	57.3	68.9	80.7	80.7	80.7	102.9	102.9		

## Appendix 3-4. Result of reproduction test

( Nominal concentration : 0.0250 mg/L )

		( Nominal concentration : 0.0250 mg/L )																							
Rep. No	Counts		Time																					Total	
			4/4	4/5	4/6	4/7	4/8	4/9	4/10	4/11	4/12	4/13	4/14	4/15	4/16	4/17	4/18	4/19	4/20	4/21	4/22	4/23	4/24		
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21		
1	P generation	Live	10	10	10	9	8	7	7	7	6	6	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	-	
		Dead	0	0	0	1	2	3	3	3	4	4	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	-	
	F <sub>1</sub> generation	Live								0	2	0	2	26	0	0	21	0	2	35	0	0	39	0	127
		Dead								0	21	1	3	62	0	3	35	0	0	24	0	0	13	0	162
	Total									0	23	1	5	88	0	3	56	0	2	59	0	0	52	0	289
	Cumulative reproductivity									0.0	0.3	0.0	0.3	4.7	0.0	0.0	4.2	0.0	0.4	7.0	0.0	0.0	7.8	0.0	25
2	P generation	Live	10	10	10	10	7	7	6	5	5	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	-	
		Dead	0	0	0	0	3	3	4	5	5	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	-	
	F <sub>1</sub> generation	Live								0	4	0	0	14	0	6	35	0	19	20	0	15	48	0	161
		Dead								0	18	4	0	41	0	2	48	0	16	13	0	8	9	0	159
	Total									0	22	4	0	55	0	8	83	0	35	33	0	23	57	0	320
	Cumulative reproductivity									0.0	0.7	0.0	0.0	3.5	0.0	1.5	8.8	0.0	4.8	5.0	0.0	3.8	12.0	0.0	40
3	P generation	Live	10	10	10	10	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	-	
		Dead	0	0	0	0	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	-	
	F <sub>1</sub> generation	Live								0	4	0	0	18	0	0	40	0	3	35	0	0	52	0	152
		Dead								0	20	0	0	67	0	0	79	0	0	72	0	0	29	2	269
	Total									0	24	0	0	85	0	0	119	0	3	107	0	0	81	2	421
	Cumulative reproductivity									0.0	0.6	0.0	0.0	2.6	0.0	0.0	5.7	0.0	0.4	5.0	0.0	0.0	7.4	0.0	22
4	P generation	Live	10	10	10	10	9	9	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	-	
		Dead	0	0	0	0	1	1	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	-	
	F <sub>1</sub> generation	Live								0	0	0	0	2	0	0	31	0	24	50	0	3	48	0	158
		Dead								0	27	0	0	61	0	4	68	0	0	53	0	4	35	0	252
	Total									0	27	0	0	63	0	4	99	0	24	103	0	7	83	0	410
	Cumulative reproductivity									0.0	0.0	0.0	0.0	0.3	0.0	0.0	4.4	0.0	3.4	7.1	0.0	0.4	6.9	0.0	23
									0.0	0.0	0.0	0.0	0.3	0.3	0.3	4.7	4.7	8.1	15.3	15.3	15.7	22.6	22.6		

### Appendix 3-5. Result of reproduction test

( Nominal concentration : 0.0500 mg/L )

[illegible]

