

環境省殿

本写しは原本と相違ありません

(株)三菱化学安全科学研究所

横浜研究所 運営管理者

## 最 終 報 告 書

四塩化炭素の

オオミジンコ (*Daphnia magna*) に対する繁殖阻害試験

(試験番号：A020366-3)

2003年10月31日

株式会社三菱化学安全科学研究所

# 陳 述 書

株式会社三菱化学安全科学研究所

横浜研究所

試 験 委 託 者 : 環境省

表 題 : 四塩化炭素のオオミジンコ (*Daphnia magna*) に対する  
繁殖阻害試験

試 験 番 号 : A020366-3

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

また、本試験は下記のGLPに従って実施したものである。

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)

2003年10月31日

試験責任者



# 信 頼 性 保 証 書

株式会社三菱化学安全科学研究所

横浜研究所

試 験 委 託 者 : 環境省

表 題 : 四塩化炭素のオオミジンコ (*Daphnia magna*) に対する  
繁殖阻害試験

試 験 番 号 : A020366-3

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

## 記

実 施 事 項	実 施 日	運営管理者および 試験責任者への報告日
試験計画書監査	2003年 7月16日	2003年 7月16日
試験の査察	試験液の調製	2003年 7月23日
	ミジンコの投入	2003年 7月23日
	ミジンコの観察	2003年 8月13日
最終報告書監査	2003年10月31日	2003年10月31日

2003年10月31日

信頼性保証部門担当者



## 試験実施概要

1. 表 題 : 四塩化炭素のオオミジンコ (*Daphnia magna*) に対する繁殖阻害試験  
(試験番号 : A020366-3)
2. 試験目的 : 被験物質のオオミジンコ (*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 (EC50) も求める。
3. 適用ガイドライン : 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)
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 : 環境省  
〒100-8975 東京都千代田区霞が関一丁目2-2  
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 XXXXXXXXXX
6. 試験受託者 : 株式会社三菱化学安全科学研究所  
〒105-0014 東京都港区芝二丁目1番30号
7. 試験施設 : 株式会社三菱化学安全科学研究所 横浜研究所  
〒227-0033 神奈川県横浜市青葉区鴨志田町1000番地

8. 試験責任者 : ██████████  
生態科学研究部  
(2003年9月1日付, グループ再編により名称変更)

9. 試験担当者 : ██████████ ██████████ (2003年10月31日)  
(試験実施)

██████████ ██████████ (2003年10月31日)  
(試験実施, 報告書作成)

██████████ ██████████ (2003年10月31日)  
(試験実施)

██████████ ██████████ (2003年10月31日)  
(試験実施)

██████████ ██████████ (2003年10月31日)  
(試験実施)

██████████ ██████████ (2003年10月31日)  
(分析実施)

10. 試験日程 : 試験開始日 2003年 7月16日  
実験開始日 2003年 7月23日  
実験終了日 2003年 8月13日  
試験終了日 2003年10月31日

11. 保管 : 試験計画書, 生データ, 被験物質, 記録文書および最終報告書は, 横浜研究所の保管施設に保管する。  
保管期間は, 最終報告書作成後10年間とし, 以後の保管は試験委託者と協議の上, 決定する。  
ただし, 被験物質については, 最終報告書作成後10年間または品質低下をおこさないで安定に保存しうる期間のいずれか短い方の期間とする。

## 目 次

	頁
要 約	7
1 被験物質	9
1.1 名称, 構造式および物理化学的性状	9
1.2 供試試料	9
1.3 被験物質の確認および保管条件下での安定性	10
2 供試生物	10
3 試験方法	11
3.1 試験条件	11
3.2 希釈水	11
3.3 試験容器および恒温槽等	11
3.4 試験濃度の設定	12
3.5 試験液の調製	12
3.6 試験液の分析	13
3.7 試験操作	13
4 結果の算出	14
4.1 阻害濃度算出に用いる被験物質濃度の決定	14
4.2 親ミジンコの半数致死濃度 (LC50) の算出	14
4.3 50%繁殖阻害濃度 (EC50) の算出	14
4.4 最大無作用濃度 (NOEC) および最小作用濃度 (LOEC)	15
5 結果および考察	16
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	16
5.2 試験液中の被験物質濃度	16
5.3 ミジンコの観察結果	16
5.4 親ミジンコの半数致死濃度 (LC50)	17
5.5 50%繁殖阻害濃度 (EC50)	17
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)	17
5.7 試験液の水温, 溶存酸素濃度, pH および硬度	17
5.8 試験計画書からの逸脱事項	17
Table 1~11	18~27
Figure 1, 2	20, 23
付属資料-1 希釈水の組成	28~29
付属資料-2 試験液の分析	30~37
付属資料-3 ミジンコの観察結果	38~44
付属資料-4 結果の算出	45~47

## 要 約

試験委託者： 環境省

表 題： 四塩化炭素のオオミジンコ (*Daphnia magna*) に対する繁殖阻害試験

試験番号： A020366-3

試験方法：

- 1) 適用ガイドライン： 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)
- 2) 暴露方式： 半止水式(毎日試験液の全量を交換)  
水面をテフロンシートで被覆
- 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, 0.400, 1.00, 2.40, 6.40, 16.0 mg/L  
(設定値) (公比: 2.5)
- 6) 試験液量： 80 mL/容器
- 7) 連 数： 10容器/試験区
- 8) 供試生物数： 10頭/試験区 (1頭/容器)
- 9) 試験温度： 20±1℃
- 10) 照 明： 室内光, 16時間明 (800 lux以下) / 8時間暗
- 11) 分 析 法： ガスクロマトグラフィー質量分析 (GC/MS)

試験結果：

1) 試験液中の被験物質濃度

試験液の分析の結果、測定値の設定値に対する割合は、調製時において 43～61%、換水前において 35～49%であった。被験物質は揮発性であるため、調製時に損失はするものの試験液の水面を覆うことにより、暴露期間中の濃度は比較的安定であった。

2) 21日間暴露後の結果

	(mg/L)	95%信頼区間 (mg/L)
親ミジンコの半数致死濃度 (LC50)	> 7.73	算出不可
50%繁殖阻害濃度 (EC50)	1.82	1.57～2.16
最大無作用濃度 (NOEC)	0.494	—
最小作用濃度 (LOEC)	1.01	—



### 1.3 被験物質の確認および保管条件下での安定性

試験開始前に、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、被験物質の特性が認められることを確認した。

試験期間中、被験物質は当研究所の試験物質保管用デシケータ（保管条件：室温，暗所，窒素封入）内に保管した。また，試験終了時にも赤外吸収スペクトルを測定し，試験開始時に測定したスペクトルと比較した。その結果，スペクトルに変化はなかったことより被験物質は保管中は安定であったと判断された。

## 2 供試生物

- 1) 和名： オオミジンコ
- 2) 学名： *Daphnia magna*
- 3) 入手先： 環境庁国立環境研究所（現 独立行政法人国立環境研究所）
- 4) 入手日： 1995年 7月18日
- 5) 感受性： 定期的（約6ヶ月毎）に基準物質（重クロム酸カリウム，試薬特級）による急性遊泳阻害試験を行い，供試生物の感受性を調べている。1998年6月以降の48時間の半数遊泳阻害濃度（EC50）は、以下の通りである。

平均値±標準偏差＝0.75±0.17 mg/L, n=11  
(最小値～最大値＝0.57～1.02 mg/L)

- 6) 生育段階： 雌の幼体（24時間以内令）
- 7) 供試生物を得るための親ミジンコの飼育条件：
  - 飼育水： 希釈水（3.2 参照）
  - 飼育密度： 1頭／80mL（25頭／2L）以下
  - 飼育容器： 2L ガラス製容器
  - 水温： 20±1℃
  - 溶存酸素濃度： 飽和濃度の60%以上
  - pH： 6.7～8.5
  - 照明： 室内光，16時間明（800 lux以下）／8時間暗
  - 飼育期間： 2003年 7月 9日～2003年 7月23日
  - 暴露開始前2週間の親の死亡率： 0%
  - 休眠卵および雄の発生： 無し
  - 餌の種類： *Chlorella vulgaris*（単細胞緑藻類）  
（藻類培養液を遠心分離し，希釈水に置換して使用）
  - 給餌量： 0.2 mg C（有機炭素含量）／頭／日
  - 飼育水の交換： 定期的に（3回／週）交換。幼体は極力，毎日除去。

### 3 試験方法

#### 3.1 試験条件

- 1) 暴露方式： 半止水式（毎日試験液の全量を交換）  
水面をテフロンシートで被覆
- 2) 暴露期間： 21日間
- 3) 試験液量： 80 mL/容器
- 4) 連数： 10容器/試験区
- 5) 供試生物数： 10頭/試験区（1頭/容器）
- 6) 試験温度： 20±1℃
- 7) 溶存酸素濃度： 飽和濃度の60%以上  
(暴露期間中のエアレーションは実施していない)
- 8) pH： 試験液のpH調整は行わなかった
- 9) 硬度： 約 250 mg/L (CaCO<sub>3</sub>換算)
- 10) 照明： 室内光, 16時間明 (800 lux 以下) /8時間暗
- 11) 給餌： 種類: *Chlorella vulgaris* (単細胞緑藻類)  
(藻類培養液を遠心分離し, 希釈水に置換して使用)  
量: 0.15 mg C (有機炭素含量) /頭/日

#### 3.2 希釈水

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」に記載されている調製水, Elendt M4 を用いた。組成を付属資料-1 に示した。

#### 3.3 試験容器および恒温槽等

- 1) 試験容器： 100mL容ガラスビーカー（試験容器には蓋をし, 水面をテフロンシートで覆った）
- 2) 恒温槽： 塩ビ製水槽（恒温装置, タイテック製 カルニットCL-80F型）
- 3) 水温計： 横河電機製 2455 02型 No. 1
- 4) 溶存酸素計： 電気化学計器製 DOL-10型 No. 2
- 5) pH計： 東亜電波工業製 HM-40V型 No. 1
- 6) 硬度測定キット： 共立理化学研究所製 WAD-TH

### 3.4 試験濃度の設定

オオミジンコに対する急性遊泳阻害試験の結果（48時間  $E_{iC50}$ 値：16.5 mg/L（設定値），8.09 mg/L（測定値））に基づき，本試験濃度を次のように決定した。

対照区，0.400，1.00，2.40，6.40，16.0 mg/L

（公比：2.5）

### 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  $20 \pm 1^\circ\text{C}$  とした。

以下の表の通りに，被験物質原液を調製した。

		被験物質原液
調製方法	被験物質採取量	160 mg (被験物質を 100 $\mu\text{L}$ 採取*)
	定容液	希釈水
	定容量	1000 mL
	溶解方法	超音波による機械的溶解 (10 分間)
	被験物質濃度	160 mg/L
調製頻度		暴露開始時および 2～4 日毎
保管条件等		冷蔵，暗所，気相なし
上記条件下での安定性		5 日間安定

\*：比重より算出

試験液は，試験濃度に応じた量の被験物質原液を採取し，希釈水で 1.0 L に定容した。

1 濃度区につき 10 個の試験容器に各 80 mL 入れた。

対照区は希釈水のみとした。

調製時の試験液の状態（外観）は対照区および 0.400～6.40 mg/L 区において無色透明，16.0 mg/L 区においては淡黄色透明であった。

### 3.6 試験液の分析

全試験区各1試験容器について、暴露期間中3回、換水前後の各試験液を分析用に採取した。対照、0.400、1.00、2.40、6.40 mg/L区については10mLを採取し、アセトンを100 $\mu$ L添加し混合した。16.0 mg/L区については1mLを採取し、精製水を9mL、アセトンを100 $\mu$ L添加し混合した。分析はGC/MSにより行った。各試験液の被験物質濃度は、標準溶液のピーク面積との比から定量し、21日間の時間加重平均を求めた。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および硬度を測定後、ガラスピペットを用いて供試ミジンコを投入し、その時点を暴露開始時とした。ミジンコ投入の際、試験液量に対するピペット内の飼育水が全量で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日後まで飼育した。暴露期間中は毎日一定量の給餌を行った(3.1参照)。また、以下の要領で、ミジンコの観察および水質測定を行った。

#### 1) ミジンコの観察：

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

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

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

#### 4 結果の算出

##### 4.1 阻害濃度算出に用いる被験物質濃度の決定

阻害濃度の算出に用いる被験物質濃度は、測定値（平均）とした。

##### 4.2 親ミジンコの半数致死濃度（LC50）の算出

21日間の各試験区における、親ミジンコの死亡数と供試個体数（10頭）から死亡率（%）を求め、以下の方法で半数致死濃度（21d-LC50）を可能な限り決定した。

最高濃度区における死亡率	≥ 50%	< 50%
LC50の決定方法	Binomial法, Moving average法, Probit法での算出結果から適切と判断されたものを採用。 可能な限り95%信頼区間を算出。	推定される濃度領域を記載する
死亡数の経時変化グラフの記載	記載する。	記載する。

##### 4.3 50%繁殖阻害濃度（EC50）の算出

対照区に対する各濃度区での生存親1頭当たりの平均累積産仔数（生存幼体）から繁殖率%（A）を求め、繁殖阻害率\*%（100-A）を算出し、以下の方法で21日間の50%繁殖阻害濃度（21d-EC50）を可能な限り決定した。

観察された阻害率の最大値	≥ 50%	< 50%
EC50の決定方法	Logistic 曲線による回帰分析（Logit 法） 95%信頼区間を算出。	推定される濃度領域を記載する
平均累積産仔数の濃度区別の経時変化のグラフの記載	記載する。	記載する。

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

4.4 最大無作用濃度 (NOEC) および 最小作用濃度 (LOEC) \*

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

\* 最大無作用濃度 (NOEC) : 対照区に比べ、有意な繁殖阻害が認められない最高濃度

最小作用濃度 (LOEC) : 対照区に比べ、有意な繁殖阻害が認められる最低濃度

\*\* 統計的手法 (産仔の有無に関わらず親が死亡した場合は算出から除外)

多群の比較 (対照区以外に2群以上ある)	
Bartlett の等分散検定	
等分散が認められる場合	等分散が認められない場合
一元配置分散分析 (ANOVA)  パラメトリックの Dunnett, Williams または Scheffe の多重比較検定	Kruskal-Wallisの検定  ノンパラメトリックの Dunnett, Williams または Scheffe の多重比較検定
Yukms ソフトウェア Statlight 「#4 多群の比較」 (Yukms Corp, 東京)	

## 5 結果および考察

### 5.1 試験成績の信頼性に影響を及ぼしたと思われる環境要因

該当する事象はなかった。

### 5.2 試験液中の被験物質濃度

暴露期間中に3回、換水前後の試験液中の被験物質濃度を測定した。その結果を Table 1, クロマトグラムを付属資料-2に示した。

試験液の分析(3.6 参照)の結果、測定値の設定値に対する割合は、調製時において43~61%, 換水前において35~49%であった。被験物質は揮発性であるため、調製時に損失はするものの試験液の水面を覆うことにより、暴露期間中の濃度は比較的安定であった。

### 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

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

対照区における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。最高濃度区における死亡率は暴露終了時で30%であった。

#### 初産日

各試験区における親ミジンコの初産日を Table 3 に示した。

対照区における親ミジンコの初産日は、暴露開始9日以内であり、正常な範囲内と判断された。最高濃度区においては3頭が初産前に死亡し、残り7頭が初産のないまま暴露終了を迎えた。

#### 平均累積産仔数

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

対照区における21日間での親ミジンコ1頭当たりの平均累積産仔数は101頭であり、試験成立条件である60頭以上の基準を満たした。

最高濃度区においては3頭が初産前に死亡し、残り7頭が初産のないまま暴露終了を迎えた。

## 休眠卵の発生等

暴露期間を通して、全試験区において休眠卵の発生は認められなかった。

### 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) を Table 5 および以下に示した。

21日間 LC50 : > 7.73 mg/L (95%信頼区間 : 算出不可)

### 5.5 50%繁殖阻害濃度 (EC50)

21日間暴露の50%繁殖阻害濃度 (EC50) を Table 6 および以下に、算出結果を付属資料-4に示した。

21日間 EC50 : 1.82 mg/L (95%信頼区間 : 1.57~2.16 mg/L)

### 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日間暴露の最大無作用濃度 (NOEC) および最小作用濃度 (LOEC) を Table 7 および以下に、算出結果を付属資料-4に示した。

21日間 NOEC : 0.494 mg/L

21日間 LOEC : 1.01 mg/L

### 5.7 試験液の水温、溶存酸素濃度、pH および硬度

暴露期間中における試験液の水温を Table 8、溶存酸素濃度を Table 9、pHを Table 10、硬度を Table 11 に示した。

水温はすべての試験区で $20 \pm 1^\circ\text{C}$ で、溶存酸素濃度はすべての試験液槽で飽和溶存酸素濃度 ( $20.0^\circ\text{C}$ の飽和溶存酸素濃度 : 8.8 mg/L) の60%以上であり、いずれも試験基準を満たした。pHはミジンコの飼育環境として適正範囲 (6.0~9.0で1.5の変動内) 内であった。また硬度も適正範囲内 (約250 mg/L) であった。

### 5.8 試験計画書からの逸脱事項

該当する事象はなかった。

以上

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

Nominal Concentration (mg/L)	Date→	Measured Concentration (mg/L)						TWM*1 (mg/L)	% of Nominal
		0 New	1 Old	7 New	8 Old	14 New	15 Old		
Control		<0.0004	<0.0004	<0.0004	<0.0004	<0.0004	<0.0004	-	-
0.400		0.209	0.196	0.241	0.162	0.172	0.150	0.187	47
1.00		0.605	0.468	0.605	0.390	0.491	0.428	0.494	49
2.40		1.10	1.00	1.10	0.838	1.09	0.921	1.01	42
6.40		3.25	2.91	3.51	2.55	2.96	2.55	2.94	46
16.0		8.04	7.55	8.96	6.54	8.35	7.08	7.73	48

Table 1-2 Measured Concentration as a Percentage of Nominal

Nominal Concentration (mg/L)	Date→	Measured Concentration as a Percentage of Nominal					
		0 New	1 Old	7 New	8 Old	14 New	15 Old
0.400		52	49	60	41	43	38
1.00		61	47	61	39	49	43
2.40		46	42	46	35	45	38
6.40		51	45	55	40	46	40
16.0		50	47	56	41	52	44

New: Freshly prepared test solution

Old: Old test solution before renewal

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

	Concentration (mg/L)			% of Nominal		
	Min.	~	Max.	Min.	~	Max.
New	0.172	~	8.96	43	~	61
Old	0.150	~	7.55	35	~	49

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

Nominal conc.	Measured conc. *1	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
0.400 mg/L	0.187 mg/L	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1.00 mg/L	0.494 mg/L	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2.40 mg/L	1.01 mg/L	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6.40 mg/L	2.94 mg/L	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16.0 mg/L	7.73 mg/L	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

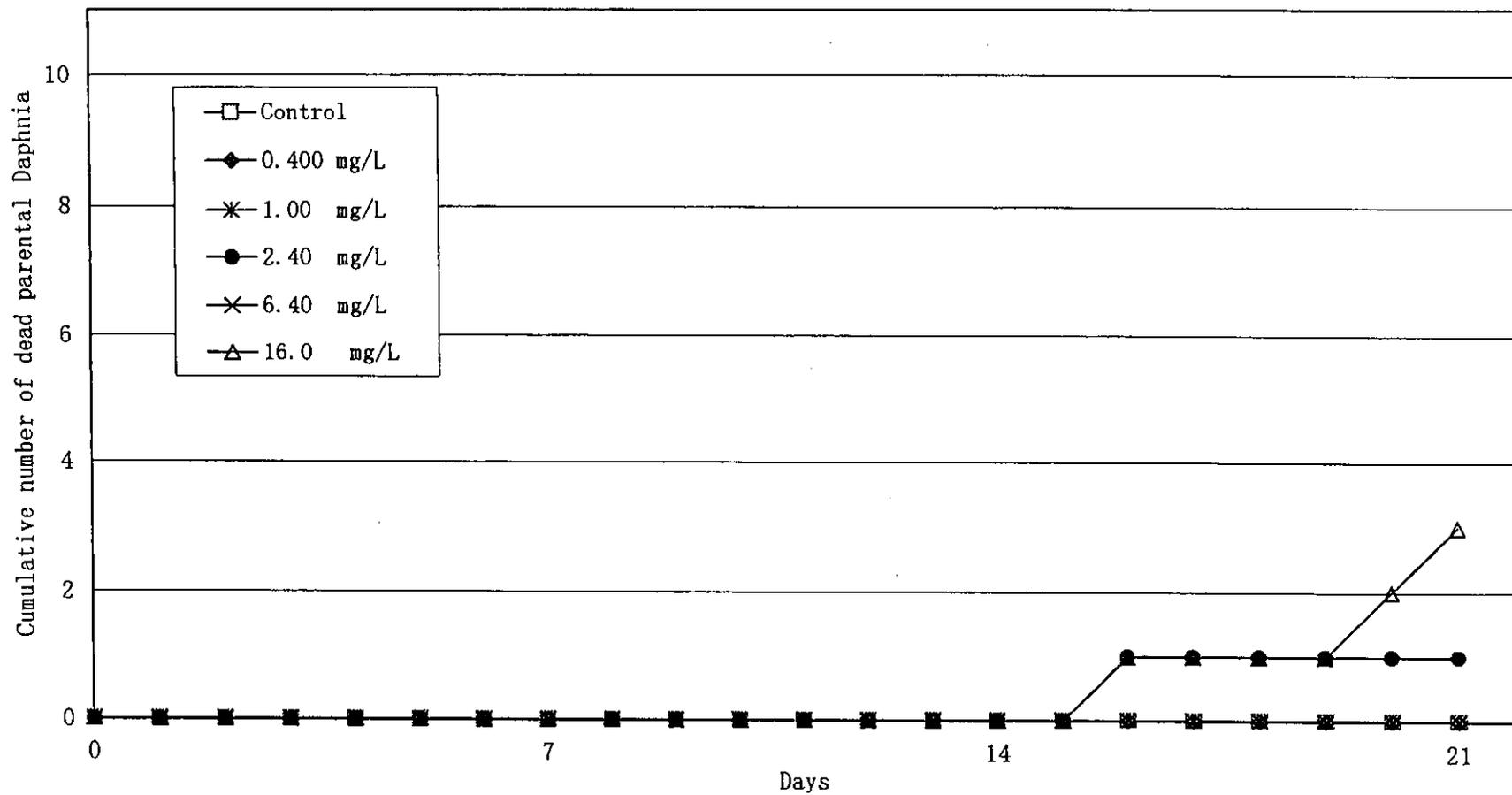
\*1: Time-weighted mean measured concentration

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

Nominal conc.	Measured conc. *1	Days					
		1	2	4	7	14	21
Control	--	0	0	0	0	0	0
0.400 mg/L	0.187 mg/L	0	0	0	0	0	0
1.00 mg/L	0.494 mg/L	0	0	0	0	0	0
2.40 mg/L	1.01 mg/L	0	0	0	0	0	10
6.40 mg/L	2.94 mg/L	0	0	0	0	0	0
16.0 mg/L	7.73 mg/L	0	0	0	0	0	30

\*1: Time-weighted mean measured concentration

Figure 1 Cumulative Number of Dead Parental *Daphnia*



Values in legend are given in the nominal concentration.

Table 3 Time (Days) to First Brood Production

Vessel No.	Nominal Concentration, mg/L (Measured Concentration* <sup>1</sup> , mg/L)					
	Control	0.400 (0.187)	1.00 (0.494)	2.40 (1.01)	6.40 (2.94)	16.0 (7.73)
1	9	9	9	9	16	-
2	9	9	9	9	8	-
3	9	9	9	9	12	-
4	9	9	9	9	9	*
5	9	9	9	9	9	*
6	9	9	9	9	9	*
7	8	9	9	9	11	*
8	9	9	8	9	11	*
9	9	9	9	9	11	*
10	9	9	9	9	9	*
Min	8	9	8	9	8	>21
Max	9	9	9	9	16	>21

\*1: Time-weighted mean measured concentration

-: The parental *Daphnia* was dead before first brood production.

\*: No brood production for 21 days.

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

Nominal Conc.	Measured conc. *1	Days															
		6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
Control	---	0.0	0.0	0.6	15.9	17.2	20.1	32.0	46.4	50.1	50.1	72.8	72.8	75.4	86.4	98.4	100.8
0.400 mg/L	0.187 mg/L	0.0	0.0	0.0	16.1	16.1	16.1	35.8	45.9	45.9	51.4	73.6	73.6	73.6	95.3	99.6	99.6
1.00 mg/L	0.494 mg/L	0.0	0.0	0.5	12.4	12.4	14.2	34.2	38.9	43.2	48.8	65.9	68.4	69.1	90.0	92.0	94.4
2.40 mg/L	1.01 mg/L	0.0	0.0	0.0	8.1	8.1	8.1	28.8	30.3	30.3	34.0	49.2	49.2	49.2	74.3	74.3	74.3
6.40 mg/L	2.94 mg/L	0.0	0.0	0.1	2.2	2.2	5.7	7.0	7.2	9.0	12.2	14.8	14.8	18.5	24.0	24.8	30.1
16.0 mg/L	7.73 mg/L	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

\*1: All parental *Daphnia* were dead during a 21-days testing period.

Figure 2 Time Course of  $\Sigma F1/P$  for Each Concentration Level

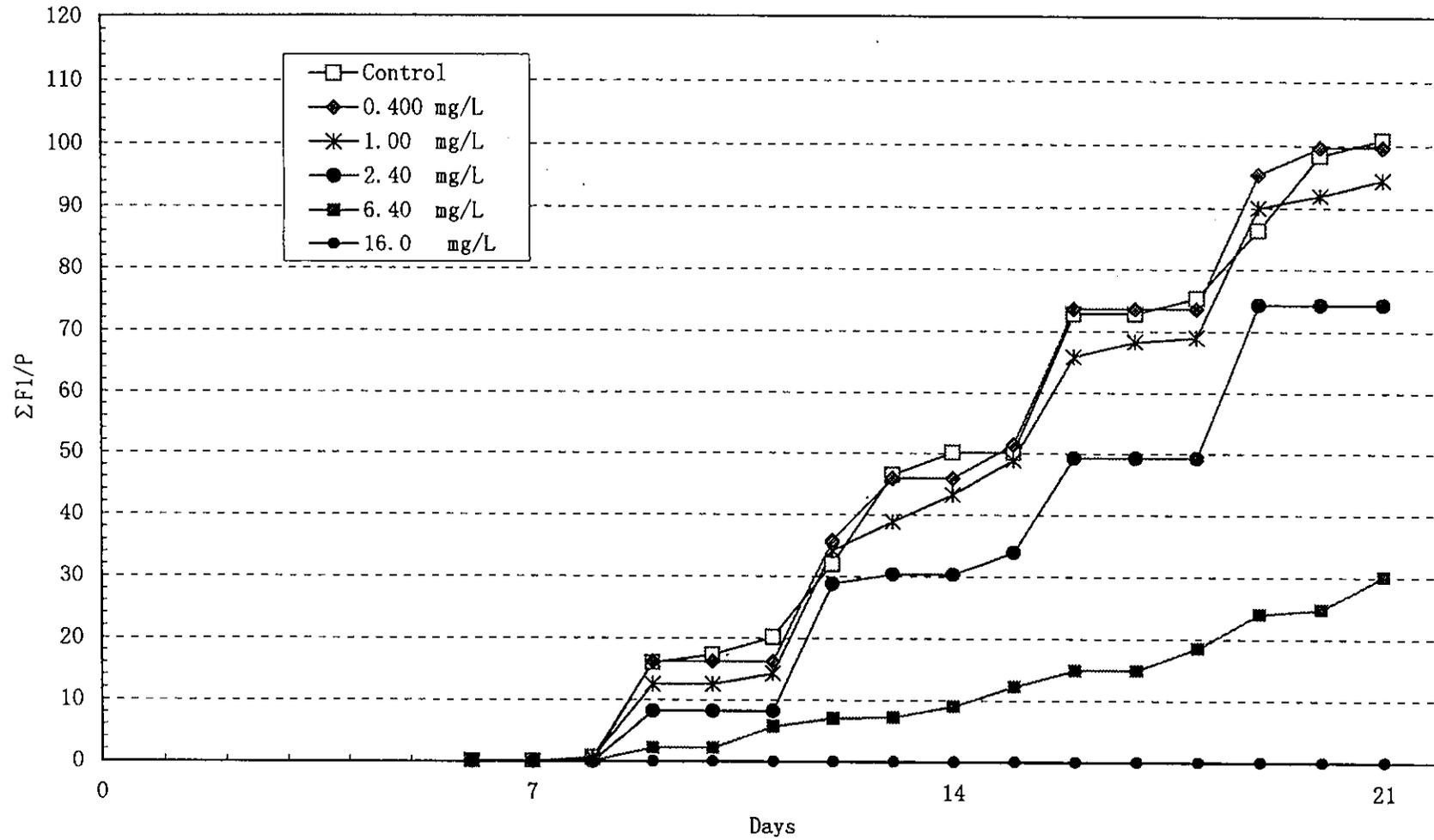


Table 5      Calculated LC50 Values for Parental *Daphnia*

Exposure Period (day)	LC50 (mg/L)	95% Confidence limits (mg/L)	Statistical method
21	> 7.73	--	--

--: Could not be determined

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

Table 6      Calculated EC50 Values for Inhibition of Reproduction

Exposure Period (day)	EC50*1 (mg/L)	95% Confidence limits (mg/L)	Statistical method
21	1.82	1.57 - 2.16	Logit

\*1: Using the concentrations of 0.187 - 7.73 mg/L

Table 7 Cumulative Number of Juveniles Produced per Adult Alive for 21 Days in Each Test Vessel and Results of Statistical Comparison of the Mean Values (by Dunnett's Multicomparison Test)

Vessel No.	Nominal Concentration, mg/L (Measured Concentration*1, mg/L)					
	Control	0.400 (0.187)	1.00 (0.494)	2.40 (1.01)	6.40 (2.94)	16.0 (7.73)
1	100	97	95	59	6	D
2	102	106	90	58	50	D
3	102	93	97	77	29	D
4	85	105	75	62	26	0
5	95	98	85	95	8	0
6	97	103	114	63	25	0
7	122	105	96	88	72	0
8	100	95	123	85	32	0
9	105	109	88	82	22	0
10	100	85	81	D	31	0
Mean	100.8	99.6	94.4	74.3	30.1	0.0
S. D.	9.2	7.4	14.6	14.0	19.2	0.0
Inhibition rate(%)		1.2	6.3	26.3	70.1	100.0
Significant difference		-	-	**	**	++

\*1: Time-weighted mean measured concentration.

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

-: Indicates no significant difference.

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

\*\* : Indicates a significant difference ( $\alpha=0.01$ ) from the control.

++ : Statistical comparison test could not be performed for this concentration.

However, we concluded that this concentration level showed adverse effect on *Daphnia* reproduction.

No Observed Effect Concentration (NOEC): 0.494 mg/L

Lowest Observed Effect Concentration (LOEC): 1.01 mg/L

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

Nominal Concentration (mg/L)	Measured Concentration* <sup>1</sup> (mg/L)	Date→	Temperature (°C)								Min.	Max.
			0 new	1 old	7 new	8 old	14 new	15 old	20 new	21 old		
Control	--		19.8	20.0	20.0	19.6	20.0	20.0	20.1	19.9	19.6	20.1
0.400	0.187		20.2	20.1	20.2	19.7	20.1	20.1	20.1	19.9	19.7	20.2
1.00	0.494		20.2	20.1	20.2	19.7	20.1	20.1	20.2	19.9	19.7	20.2
2.40	1.01		20.3	20.1	20.2	19.7	20.1	20.1	20.2	19.9	19.7	20.3
6.40	2.94		20.3	20.1	20.1	19.7	20.1	20.1	20.2	19.9	19.7	20.3
16.0	7.73		20.3	20.1	20.1	19.7	20.1	20.1	20.2	19.9	19.7	20.3
<b>Total</b>											19.6	20.3

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

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

Nominal Concentration (mg/L)	Measured Concentration* <sup>1</sup> (mg/L)	Date→	D.O. (mg/L)								Min.	Max.
			0 new	1 old	7 new	8 old	14 new	15 old	20 new	21 old		
Control	--		8.8	8.6	8.8	8.2	8.8	7.9	8.8	7.7	7.7	8.8
0.400	0.187		8.8	8.7	8.8	8.2	8.7	8.0	8.8	7.8	7.8	8.8
1.00	0.494		8.8	8.5	8.8	8.2	8.7	8.0	8.8	7.7	7.7	8.8
2.40	1.01		8.7	8.6	8.8	8.2	8.7	8.2	8.8	7.7	7.7	8.8
6.40	2.94		8.8	8.6	8.8	8.2	8.8	8.4	8.7	7.8	7.8	8.8
16.0	7.73		8.7	8.6	8.8	8.8	8.7	8.8	8.7	8.6	8.6	8.8
<b>Total</b>											7.7	8.8

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

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

Nominal Concentration (mg/L)	Measured Concentration*1 (mg/L)	Date→	pH								Min.	Max.
			0 new	1 old	7 new	8 old	14 new	15 old	20 new	21 old		
Control	--		8.4	8.2	8.2	7.8	8.3	7.6	8.3	7.7	7.6	8.4
0.400	0.187		8.4	8.2	8.2	7.7	8.2	7.6	8.3	7.7	7.6	8.4
1.00	0.494		8.3	8.1	8.2	7.7	8.2	7.6	8.3	7.7	7.6	8.3
2.40	1.01		8.3	8.1	8.2	7.7	8.2	7.7	8.2	7.7	7.7	8.3
6.40	2.94		8.3	8.1	8.2	7.7	8.2	7.7	8.2	7.7	7.7	8.3
16.0	7.73		8.3	8.1	8.1	7.9	8.1	7.9	8.1	7.9	7.9	8.3
Total											7.6	8.4

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

Table 11 Total Hardness (as CaCO<sub>3</sub>) during a 21-day Period under the Semi-Static Condition

Nominal Concentration (mg/L)	Measured Concentration*1 (mg/L)	Date→	Total hardness (as CaCO <sub>3</sub> , mg/L) <sup>a</sup>								Min.	Max.
			0 new	1 old	7 new	8 old	14 new	15 old	20 new	21 old		
Control	--		270	275	270	270	270	270	265	270	265	275
0.400	0.187		275	270	270	270	270	270	265	265	265	275
1.00	0.494		270	270	270	270	270	270	265	265	265	270
2.40	1.01		270	270	270	270	270	270	265	270	265	270
6.40	2.94		275	270	270	270	270	270	270	265	265	275
16.0	7.73		270	270	270	270	270	270	265	265	265	270
Total											265	275

\*1: Time-weighted mean measured concentration  
 a: These values were determined by a total hardness measurement kit.  
 The same lot of this kit showed approximately 10~15 mg/L higher value than the theoretical standard value.  
 new: freshly prepared test solution, old: old test solution before renewal

## 付属資料－ 1

希积水の組成

Table A-1 Elendt M4 medium recommended by OECD Guideline No. 211

used as dilution water

Macro nutrients	Concentration (mg/L)
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	293.8
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	123.3
KCl	5.80
$\text{NaHCO}_3$	64.8
$\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$	10.0
$\text{NaNO}_3$	0.274
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0.143
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	0.184

Trace elements	Concentration ( $\mu\text{g/L}$ )
$\text{H}_3\text{BO}_3$	2859.5
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	360.5
LiCl	306.0
RbCl	71.0
$\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	152.0
NaBr	16.0
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	63.0
$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	16.8
$\text{ZnCl}_2$	13.0
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	10.0
KI	3.25
$\text{Na}_2\text{SeO}_3$	2.19
$\text{NH}_4\text{VO}_3$	0.575
$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	2500
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	995.5

Vitamines	Concentration ( $\mu\text{g/L}$ )
Thiamine hydrochloride	75.0
Cyanocobalamine(B12)	1.00
Biotine	0.750

## 付属資料－ 2

試験液の分析

## 1 試験液の分析方法

1) 各試験液を分析用に採取した。対照, 0.400, 1.00, 2.40, 6.40mg/L区については 10mL を採取し, アセトンを 100 $\mu$ L 添加し混合した。16.0mg/L区については 1mL を採取し, 精製水を 9mL, アセトンを 100 $\mu$ L 添加し混合した。分析はGC/MSにより行った。クロマトグラムの例をFigure A-2-2(2), (3), (5), (6)に示した。

2) 精製水 10mLを測定用バイアルに採取し, アセトンで調製した標準溶液 100 $\mu$ Lを添加し混合後, GC/MSにより分析した。クロマトグラムの例をFigure A-2-2(1), (4)に示した。

3) 各試験液の被験物質濃度は, 各分析時に測定した標準溶液のピーク面積を用いて, 一点検量法により定量した。

なお, 暴露開始前に試験濃度範囲の全域にわたって検量線を作成し, 直線性を確認している。(「3 検量線」参照)

## 2 ガスクロマトグラフィー質量分析 (GC/MS) 測定条件 (装置)

ガスクロマトグラフ質量分析計 (ヘッドスペースサンプラ付き) No.1

ガスクロマトグラフ (GC) : Agilent Technologies 6890 型  
ヘッドスペースサンプラ (HSS) : Agilent Technologies 7694 型  
質量選択検出器 (MSD) : Agilent Technologies 5973N 型  
データ処理部 : ミステーション (Windows NT)

(条件)

### [GC 条件]

カラム : J&W DB-1701 60m×0.25mm×1.0μm  
キャリアーガス : ヘリウム 1.0mL/min (Constant flow)  
オープン温度 : 100°C (3min) → 20°C/min → 240°C (2min)  
注入口温度 : 250°C  
MS インターフェース温度 : 200°C  
注入条件 : スプリット (スプリット比=50:1)  
注入量 : 3.0mL (HSS サンプラ容量)

### [HSS 条件]

温度条件 : Oven=60°C, LOOP=120°C, Transfer Line=200°C  
イベント時間 : GC Cycle Time=20 分  
Vial Equilibration Time=20 分  
Pressurization Time=0.2 分  
Loop Fill Time=0.03 分  
Loop Equilibration Time=0.2 分  
Inject Time=0.2 分  
バイアルパラメータ : Shake=2

### [MSD 条件]

温度条件 : イオン源=230°C, 四重極マス・フィルタ=150°C  
SIM (Selected Ion Monitoring) 条件 :  
Solvent Delay=6min  
Quant ion=116.9m/z  
Qualify ion=118.9m/z

## 3 検量線

アセトンを用い、0, 1.00~500 mg/Lの標準溶液を調製した。この標準溶液100μLを採取し10mLの精製水に添加したもの (100倍希釈) をGC/MSで測定した。横軸に濃度 (mg/L) を、縦軸にピーク面積 (count) をとり、検量線を作成した。検量線の最小二乗法による直線回帰式の相関係数は、1.00と良好であった。作成した検量線をFigure A-2-1に示した。

#### 4 検出限界

最小検出ピーク面積を 10000 countに設定し、これに相当する試験液中の被験物質濃度0.0004 mg/Lを検出限界とした。

#### 5 添加回収試験

分析前処理は「1 試験液の分析方法」に示したように、試験液を採取する操作だけであるので、添加回収試験の必要はなかった。したがって、回収率の補正は行わなかった。

Figure A-2-1 Calibration curve

No.	Concentration (mg/L)	Peak Area (count)
1	0	0
2	0.0100	633105
3	0.0200	1183236
4	0.0500	2498099
5	0.100	5195287
6	0.200	10044964
7	0.500	23925278
8	1.00	48827941
9	2.00	97553159
10	5.00	239415714

$$Y = 48,036,791X$$

$$r = 1.00$$

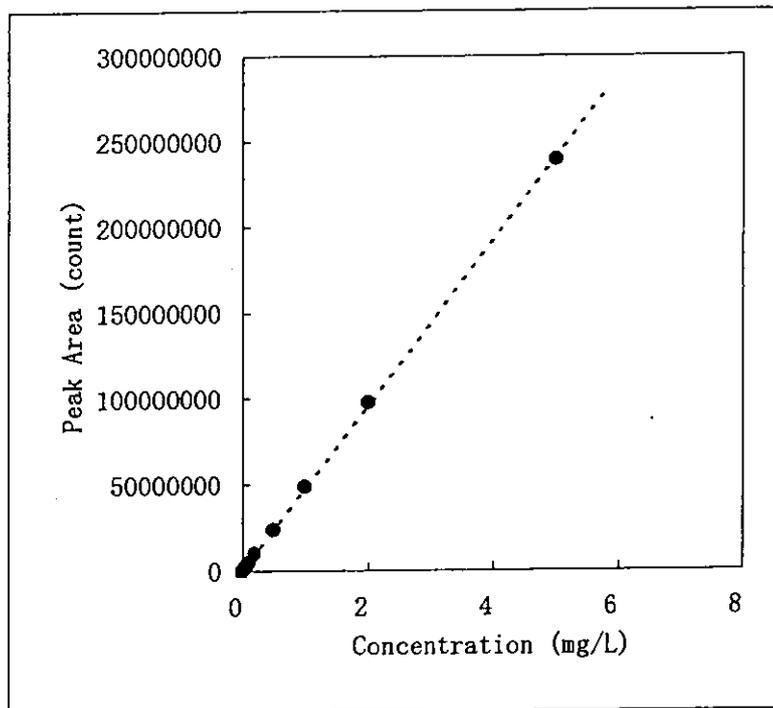
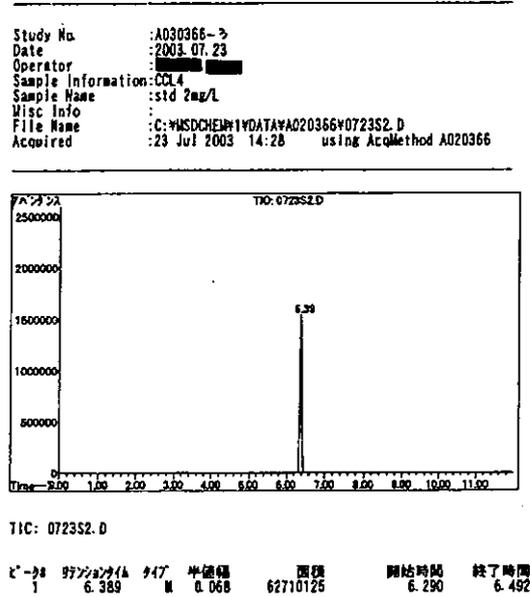


Figure A-2-2 Representative chromatograms

(1) Standard 2.00 mg/L ; Day 0



(2) Control ; Day 0

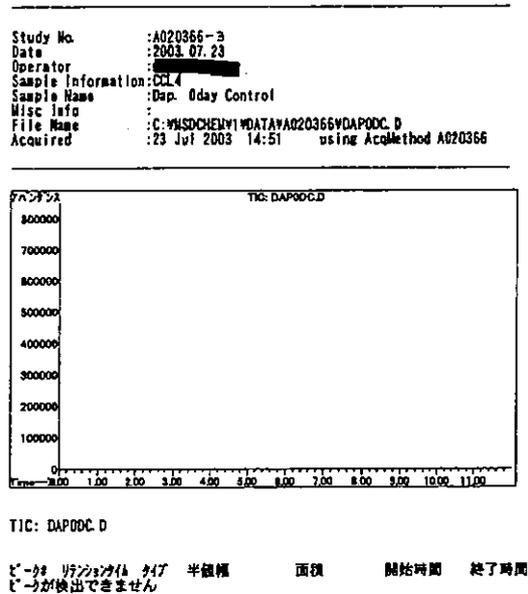
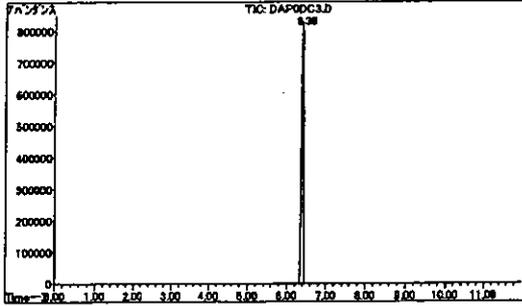


Figure A-2-2 Continued

(3) 2.40 mg/L nominal ; Day 0

Study No. : A020366-3  
Date : 2003.07.23  
Operator :   
Sample Information: CCL4  
Sample Name : Day 0 day Conc. 3  
Misc Info :  
File Name : C:\MSDCHEM1\DATA\A020366\DAPODC3.D  
Acquired : 23 Jul 2003 15:55 using AcqMethod A020366

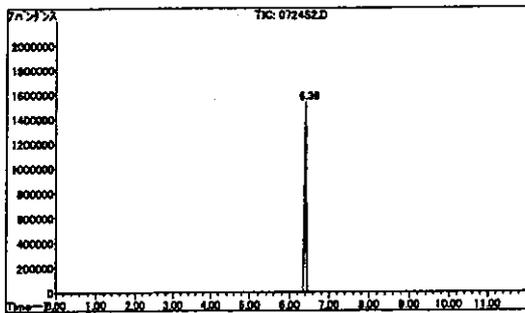


TIC: DAPODC3.D

ピーク	リテンション	タイプ	半値幅	面積	開始時間	終了時間
1	6.382	M	0.070	3464046	6.287	6.510

(4) Standard 2.00 mg/L ; Day 1

Study No. : A020366-3  
Date : 2003.07.24  
Operator :   
Sample Information: CCL4  
Sample Name : std 2mg/L  
Misc Info :  
File Name : C:\MSDCHEM1\DATA\A020366\0724S2.D  
Acquired : 24 Jul 2003 11:46 using AcqMethod A020366



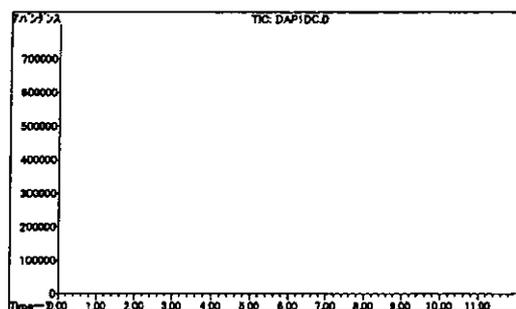
TIC: 0724S2.D

ピーク	リテンション	タイプ	半値幅	面積	開始時間	終了時間
1	6.382	M	0.067	61338918	6.295	6.501

Figure A-2-2 Continued

(5) Control ; Day 1

Study No. : A020366-3  
 Date : 2003.07.24  
 Operator :   
 Sample Information: CCL4  
 Sample Name : Dep. 1day Control  
 Misc Info :  
 File Name : C:\MSDCHEM\1\DATA\A020366\DAPIDC.D  
 Acquired : 24 Jul 2003 12:07 using AcqMethod A020366

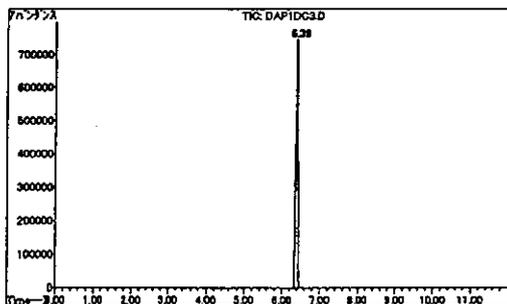


TIC: DAPIDC.D

ピーク 保留時間 タイプ 半値幅 面積 開始時間 終了時間  
 ピークが検出できません

(6) 2.40 mg/L nominal ; Day 1

Study No. : A020366-3  
 Date : 2003.07.24  
 Operator :   
 Sample Information: CCL4  
 Sample Name : Dep. 1day Conc. 3  
 Misc Info :  
 File Name : C:\MSDCHEM\1\DATA\A020366\DAPIDC3.D  
 Acquired : 24 Jul 2003 13:12 using AcqMethod A020366



TIC: DAPIDC3.D

ピーク 保留時間 タイプ 半値幅 面積 開始時間 終了時間  
 1 6.392 W 0.069 30751265 6.300 6.498

## 付属資料-3

ミジンコの観察結果

## Appendix 3-1 Result of reproduction test

Test chemical: CCL4

(Untreated control)

Rep. No.	Counts	Time																				Total	
		7/24	7/25	7/26	7/27	7/28	7/29	7/30	7/31	8/1	8/2	8/3	8/4	8/5	8/6	8/7	8/8	8/9	8/10	8/11	8/12		8/13
		1 d	2 d	3 d	4 d	5 d	6 d	7 d	8 d	9 d	10 d	11 d	12 d	13 d	14 d	15 d	16 d	17 d	18 d	19 d	20 d		21 d
1	P generation	Live	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	0	0	29	0	0	0	27	0	0	28	0	0
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	16	16	16	45	45	45	45	72	72	72	100	100	100
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	12	0	0	32	0	0	0	30	0	0	28	0	0
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	12	12	12	44	44	44	44	74	74	74	102	102	102
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	21	0	0	0	30	0	0	26	0	0	2	23	0
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	21	21	21	21	51	51	51	77	77	77	79	102	102
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	16	1	0	0	24	0	0	17	0	0	0	27	0
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	16	17	17	17	41	41	41	58	58	58	58	85	85
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	10	12	0	0	28	0	0	21	0	0	0	24	0
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	10	22	22	22	50	50	50	71	71	71	71	95	95
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	15	0	0	28	0	0	0	26	0	0	28	0	0
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	15	15	15	43	43	43	43	69	69	69	97	97	97
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	6	0	0	29	0	0	37	0	0	0	26	0	0	24
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	6	6	6	35	35	35	72	72	72	72	98	98	98	122
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	22	0	0	0	29	0	0	26	0	0	0	23	0
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	22	22	22	22	51	51	51	77	77	77	77	100	100
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	20	0	0	0	33	0	0	29	0	0	0	23	0
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	20	20	20	20	53	53	53	82	82	82	82	105	105
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	21	0	0	30	0	0	0	25	0	0	24	0	0
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	21	21	21	51	51	51	51	76	76	76	100	100	100

## Appendix 3-2 Result of reproduction test

Test chemical: CCL4

(Concentration 1)

Rep. No.	Counts	Time																				Total		
		7/24	7/25	7/26	7/27	7/28	7/29	7/30	7/31	8/1	8/2	8/3	8/4	8/5	8/6	8/7	8/8	8/9	8/10	8/11	8/12		8/13	
		1 d	2 d	3 d	4 d	5 d	6 d	7 d	8 d	9 d	10 d	11 d	12 d	13 d	14 d	15 d	16 d	17 d	18 d	19 d	20 d		21 d	
1	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	97	
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0	21	0	0	0	28	0	0	28	0	0	0	20	0	97
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	21	21	21	21	49	49	49	77	77	77	77	97	97	97
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	106
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0	19	0	0	31	0	0	0	28	0	0	28	0	0	106
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	19	19	19	50	50	50	50	78	78	78	106	106	106	106
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	93
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0	13	0	0	29	0	0	0	26	0	0	25	0	0	93
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	13	13	13	42	42	42	42	68	68	68	93	93	93	93
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	105
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0	17	0	0	0	33	0	0	30	0	0	25	0	0	105
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	17	17	17	17	50	50	50	80	80	80	105	105	105	105
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	98
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0	9	0	0	34	0	0	29	0	0	0	26	0	0	98
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	9	9	9	43	43	43	72	72	72	72	98	98	98	98
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	103
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0	15	0	0	30	0	0	0	27	0	0	31	0	0	103
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	15	15	15	45	45	45	45	72	72	72	103	103	103	103
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	105
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0	20	0	0	33	0	0	5	21	0	0	26	0	0	105
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	20	20	20	53	53	53	58	79	79	79	105	105	105	105
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	95
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0	16	0	0	10	15	0	0	29	0	0	25	0	0	95
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	16	16	16	26	41	41	41	70	70	70	95	95	95	95
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	109
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0	15	0	0	30	0	0	21	12	0	0	31	0	0	109
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	15	15	15	45	45	45	66	78	78	78	109	109	109	109
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	85
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0	16	0	0	0	25	0	0	21	0	0	0	23	0	85
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	16	16	16	16	41	41	41	62	62	62	62	85	85	85

## Appendix 3-3 Result of reproduction test

Test chemical: CCL4

(Concentration 2)

Rep. No.	Counts	Time																				Total		
		7/24	7/25	7/26	7/27	7/28	7/29	7/30	7/31	8/1	8/2	8/3	8/4	8/5	8/6	8/7	8/8	8/9	8/10	8/11	8/12		8/13	
		1 d	2 d	3 d	4 d	5 d	6 d	7 d	8 d	9 d	10 d	11 d	12 d	13 d	14 d	15 d	16 d	17 d	18 d	19 d	20 d		21 d	
1	P generation	Live	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	0	0	28	0	0	0	27	0	0	25	0	0	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	15	15	15	43	43	43	43	70	70	70	95	95	95	95
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	9	0	0	26	2	0	0	28	0	0	25	0	0	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	9	9	9	35	37	37	37	65	65	65	90	90	90	90
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	7	0	0	31	0	0	30	0	0	0	29	0	0	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	7	7	7	38	38	38	68	68	68	68	97	97	97	97
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	14	0	0	17	0	0	0	21	0	0	23	0	0	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	14	14	14	31	31	31	31	52	52	52	75	75	75	75
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	15	0	0	0	22	0	0	23	0	0	25	0	0	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	15	15	15	15	37	37	37	60	60	60	85	85	85	85
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	20	0	0	35	0	0	26	1	0	0	32	0	0	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	20	20	20	55	55	55	81	82	82	82	114	114	114	114
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	18	0	0	29	0	0	0	21	0	0	28	0	0	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	18	18	18	47	47	47	47	68	68	68	96	96	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	1	
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0	5	0	0	18	1	0	43	0	0	25	7	0	0	24
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	5	5	5	23	24	24	67	67	67	92	99	99	99	123
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	10	0	0	31	1	0	0	25	0	0	21	0	0	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	10	10	10	41	42	42	42	67	67	67	88	88	88	88
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	11	0	0	2	22	0	0	25	0	0	1	20	0	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	11	11	11	13	35	35	35	60	60	60	61	81	81	81

## Appendix 3-4 Result of reproduction test

Test chemical: CCL4

(Concentration 3)

Rep. No.	Counts	Time																					Total	
		7/24	7/25	7/26	7/27	7/28	7/29	7/30	7/31	8/1	8/2	8/3	8/4	8/5	8/6	8/7	8/8	8/9	8/10	8/11	8/12	8/13		
		1 d	2 d	3 d	4 d	5 d	6 d	7 d	8 d	9 d	10 d	11 d	12 d	13 d	14 d	15 d	16 d	17 d	18 d	19 d	20 d	21 d		
1	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	59	
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0	8	0	0	19	0	0	0	7	0	0	25	0	0	59
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	8	8	8	27	27	27	27	34	34	34	59	59	59	59
2	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	58	
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0	5	0	0	0	13	0	0	16	0	0	24	0	0	58
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	5	5	5	5	18	18	18	34	34	34	58	58	58	58
3	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	77	
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0	5	0	0	28	0	0	4	14	0	0	26	0	0	77
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	5	5	5	33	33	33	37	51	51	51	77	77	77	77
4	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	62	
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0	8	0	0	14	1	0	0	18	0	0	21	0	0	62
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	8	8	8	22	23	23	23	41	41	41	62	62	62	62
5	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	95	
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0	6	0	0	36	0	0	29	0	0	0	24	0	0	95
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	6	6	6	42	42	42	71	71	71	71	95	95	95	95
6	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	63	
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	21	0	0	0	13	0	0	27	0	0	63
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	2	23	23	23	23	36	36	36	63	63	63	63
7	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	88	
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0	15	0	0	24	0	0	0	23	0	0	26	0	0	88
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	15	15	15	39	39	39	39	62	62	62	88	88	88	88
8	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	85	
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0	10	0	0	25	0	0	0	23	0	0	27	0	0	85
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	10	10	10	35	35	35	35	58	58	58	85	85	85	85
9	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	82	
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0	14	0	0	19	0	0	0	23	0	0	26	0	0	82
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	14	14	14	33	33	33	33	56	56	56	82	82	82	82
10	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	36	
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0	12	0	0	5	11	0	0	8						36
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	12	12	12	17	28	28	28	36						36

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

## Appendix 3-5 Result of reproduction test

Test chemical: CCL4

(Concentration 4)

Rep. No.	Counts	Time																				Total	
		7/24	7/25	7/26	7/27	7/28	7/29	7/30	7/31	8/1	8/2	8/3	8/4	8/5	8/6	8/7	8/8	8/9	8/10	8/11	8/12		8/13
		1 d	2 d	3 d	4 d	5 d	6 d	7 d	8 d	9 d	10 d	11 d	12 d	13 d	14 d	15 d	16 d	17 d	18 d	19 d	20 d		21 d
1	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	6
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	3	0	0
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	3	3	3	6	6	6
2	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	50
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	11	0	0	0	16	0	0	11	0	0	11
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	12	12	12	12	28	28	28	39	39	39	50
3	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	29
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0	0	11	0	0	14	0	0	0
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	4	4	4	15	15	15	29	29	29	29
4	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	26
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	5	0	0	0	2	0	0	17	0	0
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	2	7	7	7	7	9	9	9	26	26	26
5	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	8
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	1	0	0	0	0	0	5	0	0
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	2	2	3	3	3	3	3	3	8	8	8
6	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	25
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	1	1	0	0	4	0	0	17	0	0
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	2	3	4	4	4	8	8	8	25	25	25
7	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	72
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	12	0	0	16	0	0	0	18	0	0	26
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	12	12	12	28	28	28	28	46	46	46	72
8	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	32
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	0	0	2	0	0	0	4	0	0	16
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	10	10	12	12	12	12	16	16	16	32
9	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	22
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	16	0	0	4	0	0	0
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	2	2	18	18	18	22	22	22	22
10	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	31
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0	15	0	0	3	0	0	0	6	0	0	7	0	0
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	15	15	15	18	18	18	18	24	24	24	31	31	31

Appendix 3-6 Result of reproduction test

Test chemical: CCL4

(Concentration 5)

Rep. No.	Counts	Time																					Total	
		7/24 1 d	7/25 2 d	7/26 3 d	7/27 4 d	7/28 5 d	7/29 6 d	7/30 7 d	7/31 8 d	8/1 9 d	8/2 10 d	8/3 11 d	8/4 12 d	8/5 13 d	8/6 14 d	8/7 15 d	8/8 16 d	8/9 17 d	8/10 18 d	8/11 19 d	8/12 20 d	8/13 21 d		
1	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0							
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	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						--	
2	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0			
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	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			--
3	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0			
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	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			--
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	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
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	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
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	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
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	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
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	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
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	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
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	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

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

付属資料－４

結果の算出

Table A-4-1 Calculation of the EC50 (21days)

Logit method		Filename : A366-5.DAT								
No.	DOSE	N	R	Percent	Y'	Y (nw)	y	Y'	Y' - Y	
1	7.730	100.000	99.900	0.999	99.900	2.8( 0.100)	6.907	2.792	0.000	
2	2.940	100.000	70.100	0.701	70.100	2.6(20.960)	0.852	0.924	-1.650	
3	1.010	100.000	26.300	0.263	26.300	-0.5(19.383)	-1.030	-1.141	-0.664	
4	0.494	100.000	6.300	0.063	6.300	-2.5( 5.903)	-2.700	-2.523	-0.004	
5	0.187	100.000	1.200	0.012	1.200	-5.3( 1.186)	-4.411	-4.400	0.893	

Chi-SQR Cal.....	first	2.22027
Chi-SQR [0.05,df=1]...		7.81472
beta.....		1.93239
alpha.....		-1.16026
Stimulate Value D10...		0.584722
D90...		5.68299
D50...		1.8229
95percent Confidence limit		g= 0.04100
by fieller.....		1.57144- 2.15954

Table A-4-2 Calculation of the NOEC, LOEC (21days)

**Input Data Table**

No.	Control	Conc. 1	Conc. 2	Conc. 3	Conc. 4	Conc. 5
	(Group1)	(Group2)	(Group3)	(Group4)	(Group5)	(Group6)
1	100	97	95	59	6	*
2	102	106	90	58	50	*
3	102	93	97	77	29	*
4	85	105	75	62	26	0
5	95	98	85	95	8	0
6	97	103	114	63	25	0
7	122	105	96	88	72	0
8	100	95	123	85	32	0
9	105	109	88	82	22	0
10	100	85	81	*	31	0

Group	Samples	Mean	S. E.	S. D.	Variance
1	10	100.8000	2.9242	9.2472	85.5111
2	10	99.6000	2.3247	7.3515	54.0444
3	10	94.4000	4.6145	14.5922	212.9333
4	9	74.3333	4.6786	14.0357	197.0000
5	10	30.1000	6.0872	19.2495	370.5444

Method	vs	Side	Stat.	0.05	0.01	0.001 Prob.
Bartlett test			0 <u>9.2705</u>	9.4877	< 13.2767	18.4668 0.0547

Method	vs	Side	Stat.	0.05	0.01	0.001 Prob.
1-way ANOVA			0 <u>48.2151</u>	> 2.5837	3.7784	5.5880 1.54E-15

SS	DF	MS	Fcal.	Prob.	0.05	0.01	0.001
35.431	4	8.857	6546	48.2151	0.0000	2.5837	3.7784 5.5880
8.083	44	183.7114					
43.514	48						

Method	vs	Side	Stat.	0.05	0.01	0.001 Prob.
Dunnett	1 vs 2		2 0.1980	2.5334	3.1685	999.9900 0.9989
Dunnett	1 vs 3		2 1.0558	2.5334	3.1685	999.9900 0.6762
Dunnett	1 vs 4		2 <u>4.2499</u>	2.5334	> 3.1685	999.9900 0.000419 **
Dunnett	1 vs 5		2 <u>11.6637</u>	2.5334	> 3.1685	999.9900 1.41E-06 **

Method	vs	Side	Stat.	0.05	0.01	0.001 Prob.
Williams (1971, 1972, 1977)	1 vs 2		2 0.1980	2.0153	2.6914	999.9900 999.9900
Williams (1971, 1972, 1977)	1 vs 3		2 1.0558	2.0766	2.7314	999.9900 999.9900
Williams (1971, 1972, 1977)	1 vs 4		2 <u>4.2499</u>	2.0957	> 2.7417	999.9900 999.9900 **
Williams (1971, 1972, 1977)	1 vs 5		2 <u>11.6637</u>	2.1041	> 2.7451	999.9900 999.9900 **