

環境庁殿

## 試 験 報 告 書

3,5,5-トリメチル-2-シクロヘキセン-1-オンのオオミジンコ (*Daphnia magna*) に対する  
繁殖阻害試験

(試験番号：NMMP/E97/3060)

平成 9 年 6 月 30 日作成

株式会社東レリサーチセンター

# 陳 述 書

株式会社東レリサーチセンター  
名古屋研究部

試験委託者 : 環境庁

表題 : 3,5,5-トリメチル-2-シクロヘキセン-1-オンのオオミジンコ (*Daphnia magna*)  
に対する繁殖阻害試験

試験番号 : NMMP/E97/3060

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。

平成 9 年 6 月 30 日

運営管理者

[Redacted signature area]

# 信 頼 性 保 証 証 明

株式会社東レリサーチセンター  
名古屋研究部



試験委託者 : 環境庁

表題 : 3,5,5-トリメチル-2-シクロヘキセン-1-オンのオオミジンコ (*Daphnia magna*)  
に対する繁殖阻害試験

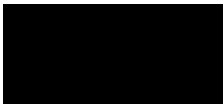
試験番号 : NMMP/E97/3060

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

## 記

	実施日	運営管理者および 試験責任者への報告日
試験実施状況査察	平成 9 年 2 月 21 日	平成 9 年 2 月 25 日
試験報告書監査	平成 9 年 6 月 20 日	平成 9 年 6 月 23 日
	平成 9 年 6 月 30 日	
信頼性保証担当者 :	 	

## 試験実施概要

1. 表題 : 3,5,5-トリメチル-2-シクロヘキセン-1-オンのオオミジンコ (*Daphnia magna*) に対する繁殖阻害試験
2. 試験目的 : 3,5,5-トリメチル-2-シクロヘキセン-1-オンについて、オオミジンコ (*Daphnia magna*) に対する繁殖阻害試験を 21 日間行い、繁殖状態に对照区と有意差の認められない最高濃度 (NOECr) 及び産仔数を 50% 減少させると算定される濃度 (50% 繁殖阻害濃度: ErC50) を求める。
3. 適用ガイドライン : 本試験は、OECD 化学品テストガイドライン No. 202 「ミジンコ類、急性遊泳阻害試験および繁殖試験」 (1984 年) に準拠した。
4. 適用 G L P : 本試験は環境庁の G L P 規則に準拠した。
5. 試験委託者  
名称 : 環境庁  
住所 : (〒100) 東京都千代田区霞が関 1-2-2  
委託担当者 : 環境庁企画調整局環境保健部環境安全課 保健専門官 
6. 試験受託者  
名称 : 株式会社東レリサーチセンター  
所在地 : (〒103) 東京都千代田区日本橋室町 3-1-8 都ビル内
7. 試験施設  
名称 : 株式会社東レリサーチセンター 名古屋研究部  
所在地 : (〒455) 愛知県名古屋市港区大江町 9-1

8. 試験関係者：

試験責任者	■■■■■	■■■■■	(平成 9 年 6 月 30 日)
試験担当者	■■■■■	■■■■■	(平成 9 年 6 月 30 日)
試験担当者	■■■■■	■■■■■	(平成 9 年 6 月 30 日)
試験担当者	■■■■■	■■■■■	(平成 9 年 6 月 30 日)
試験担当者	■■■■■	■■■■■	(平成 9 年 6 月 30 日)
試験担当者	■■■■■	■■■■■	(平成 9 年 6 月 30 日)
試験担当者	■■■■■	■■■■■	(平成 9 年 6 月 30 日)
試験担当者	■■■■■	■■■■■	(平成 9 年 6 月 30 日)

9. 試験期間：

試験開始日 平成 9 年 2 月 10 日

曝露期間 平成 9 年 2 月 19 日 ～ 平成 9 年 3 月 12 日

試験終了日 平成 9 年 6 月 30 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、株式会社東レリサーチセンター名古屋研究部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 .....	8
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 保管方法及び保管条件下の安定性の確認 .....	9
2 供試生物 .....	11
3 試験方法 .....	11
3.1 試験条件 .....	11
3.2 希釈水 .....	12
3.3 試験容器および恒温槽等 .....	12
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 .....	13
4.1 親ミジンコの半数致死濃度 (LC50) の算出 .....	13
4.2 50%繁殖阻害濃度 (ErC50) の算出 .....	14
4.3 最大無作用濃度 (NOECr) および最小作用濃度 (LOECr) .....	14
5 結果および考察 .....	15
5.1 試験成績の信頼性に影響を及ぼしたと思われる環境要因 .....	15
5.2 試験水中の被験物質濃度 .....	15
5.3 ミジンコの観察結果 .....	15
5.4 親ミジンコの半数致死濃度 (LC50) .....	16
5.5 50%繁殖阻害濃度 (ErC50) .....	16
5.6 累積産仔数に及ぼす最大無作用濃度 (NOECr) および最小作用濃度 (LOECr) .	16
5.7 試験水の水温、溶存酸素濃度および pH.....	16
Table 1~10 .....	17~27
Figure 1,2 .....	20, 22

付属資料-1 希釈水 (M4 調製水)

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

3,5,5-トリメチル-2-シクロヘキセン-1-オンのオオミジンコ (*Daphnia magna*) に対する繁殖阻害試験

### 試験番号

NMMP/E97/3060

### 試験方法

本試験は、OECD 化学品テストガイドライン No. 202 「ミジンコ類、急性遊泳阻害試験および繁殖試験」 (1984年) に準拠して実施した。

- 1) 被験物質 : 3,5,5-トリメチル-2-シクロヘキセン-1-オン
- 2) 暴露方法 : 半止水式 (換水 3回/週)
- 3) 供試生物 : オオミジンコ (*Daphnia magna*)
- 4) 暴露期間 : 21日間
- 5) 連数 : 1濃度区につき4連
- 6) 生物数 : 40頭/1濃度区 (1連につき10頭で1濃度区40頭)
- 7) 試験濃度 : 対照区および100mg/L (設定濃度)
- 8) 試験液量 : 400 mL
- 9) 照明 : 室内光、16時間明/8時間暗
- 10) 試験水温 : 20±1℃

### 結 果

- 1) 21日間の親ミジンコの半数致死濃度 (LC50) = 100 mg/L 以上
- 2) 21日間の50% 繁殖阻害濃度 (ErC50) = 100 mg/L 以上
- 3) 最大無作用濃度 (NOECr) = 100 mg/L 以上
- 4) 対照区と有意差の認められる最低濃度 (LOECr) = 100 mg/L 以上  
(上記の値は、すべて設定濃度に基づく値である)



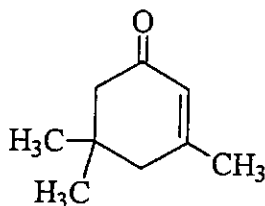
## 1 被験物質

### 1.1 名称、構造式および物理化学的性状

名 称 : 3,5,5-トリメチル-2-シクロヘキセン-1-オン

識別符号 : I P

構造式 :



分子式 :  $C_9H_{14}O$

分子量 : 138.21

1-オクタノール／水分配係数 ( $\log P$ ) : 1.70

水溶性 : 12000 ppm (20℃)

融点 : -8.10℃

沸点 : 214.0～215.2℃

水への溶解度 : 微溶 (1.2%/20℃)

蒸気圧 (mmHg) : 0.380～1.000 (20.0～38.0℃)

生化学的性質 : 濃縮性なし～低い

(上記の数値はMSDSから引用した)

### 1.2 供試試料

入手先 : XXXXXXXXXX

入手日 : 平成8年12月26日

ロット番号 : FGD 01

供給量 : 500g

外観 : 無色透明 液体

純度 : 97.0%以上

### 1.3 保管方法及び保管条件下の安定性の確認

#### 1) 保管方法

被験物質は光を遮断した試料保管庫に室温で保管した。

## 2) 被験物質の確認及び保管条件下の安定性

入手した被験物質について赤外吸収スペクトル測定、NMR スペクトル測定および高速液体クロマトグラフ分析を行い、被験物質の特性ピークが認められることおよび純度を確認した。試験終了時にも同様に測定・分析し、試験開始前に測定したスペクトルおよび高速液体クロマトグラフ分析純度を比較した結果、変化は無かった。

従って、被験物質は当研究部の試料保管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時間以内のオオミジンコ (*Daphnia magna*) の幼体を用いた。

本種は、国立環境研究所より入手したものを、当研究部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時間急性遊泳阻害濃度 (48hr-EiC50) が 0.42mg/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て、別に用意したビーカーに移し、それぞれ翌日に産出された幼体を別のビーカーに分けた。この幼体を供試ミジンコの親とし、以下の条件で22日間馴化した。成熟し幼体を産むようになってから、1週間に少なくとも2回以上幼体を除去した。

暴露開始前日に幼体を除去し、翌日産出された幼体を試験に用いた。死亡個体は少なく、休眠卵や雄は全く生じなかった。

飼育水	: 希釈水 (3.2参照)
飼育密度	: 20~50 頭/L 飼育水 (但し、成熟個体の場合は、25頭以下/Lとした)
水温	: 20±1℃
照明	: 室内光、16時間明/8時間暗
餌	: <i>Chlorella vulgaris</i>
給餌量	: ミジンコ1頭当たり <i>Chlorella vulgaris</i> を0.1~0.2 mgC (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 (換水3回/週)
- 2) 暴露期間 : 21日間
- 3) 連数 : 1濃度区につき4連
- 4) 生物数 : 40頭/1濃度区 (1連につき10頭で1濃度区40頭)
- 5) 試験液量 : 400 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

OECD テストガイドライン 202 Part II ドラフト(1995 年 8 月)記載の M4 調製水 (付属資料-1 参照) を使用した。従って、希釈水使用時のオルトトリジン法等による、残留塩素の有無の確認、全硬度の測定は行わなかった。

希釈水の pH は 7.6 であった。

[付属資料-1 (p. 28)]

### 3.3 試験容器および恒温槽等

試験容器 : 500mL 容ガラスビーカー

恒温槽 : 恒温水槽および水循環装置 (ヤマト科学 クールライン CL100)

水温計 : pH 計内蔵温度計

pH 計 : pH メーター (堀場製作所 カスタニー LAB pH メーター F-22)

溶存酸素計 : DO METER (堀場製作所 OM-14)

### 3.4 試験濃度の設定

オオミジンコに対する 48 時間急性遊泳阻害濃度 (48hr-EiC50) が 224mg/L であり、かつ 134mg/L で遊泳阻害が観察されなかったため、100mg/L だけの限度試験とした。

(対照区および 100 mg/L の濃度区)

### 3.5 試験液の調製

- 1) 被験物質 0.4 wt% 溶液を希釈水に添加し、設定濃度の試験液を必要量調製した。
- 2) 希釈水のみを対照区に設けた。
- 3) 1 濃度区につき 4 個の試験容器を用意し、各試験容器に試験液を 400mL ずつ入れた。
- 4) 試験液の状態 (外観等) を観察し、無色透明で沈殿等が無いことを確認した。

### 3.6 試験液の分析

対照区と濃度区（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）、即ち試験開始時（0日目）、7日目および19日目の試験液調製時とそれらの2日後（換水前）に各ビーカーより試験水 1.5mL を採取し、高速液体クロマトグラフ分析により被験物質濃度を分析した。試験水の分析に際しては、測定日毎に標準溶液（濃度 10.0、50.0、100.0mg/L）の測定を行い、検量係数を求めて被験物質濃度を測定した。

詳細は付属資料－2（p.30）に示した。

### 3.7 試験操作

試験液の水温、溶存酸素濃度（D.O.）、pHを測定後、供試ミジンコを投入し、その時点暴露開始時とした。先端を太くしたエッペンドルフピペットを用いて供試ミジンコを投入した。その際、試験液量に対して、ピペット内の飼育水は全量で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、生死を計数した。また、状態を観察して異常（遊泳障害、外観等）が認められた場合はその状況を記録した。計数後の親ミジンコの死亡個体は取り除いた。換水時に新しい試験液に親ミジンコを移す際は、古い試験液は極力入らないようにした。

（産出幼体）換水毎に、幼体の生存数および死亡幼体の有無、墮胎卵、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。

・水温：全濃度区（但し、各1試験容器）について、毎週1回、換水前後で測定した。

・溶存酸素濃度（D.O.）：

全濃度区（但し、各1試験容器）について、毎週1回、換水前後で測定した。

・pH：全濃度区（但し、各1試験容器）について、毎週1回、換水前後で測定した。

## 4 結果の算出

### 4.1 親ミジンコの半数致死濃度（LC50）の算出

限度試験のため、死亡率が50%未満であることを確認し、半数致死濃度（LC50）は試験区の濃度以上であるとした。

#### 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。

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

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  
Po : 最初に幼体を観察した日の前日の親の数  
Pn-1 : n-1回目の観察時の親の数  
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、

- TFn : 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

限度試験のため、F検定およびt検定 (有意水準5%、Yukms 統計ライブラリー I 統計解析編) により対照区と試験区の平均累積産仔数に有意差が認められなければ、50%繁殖阻害濃度 (ErC50) は試験濃度以上であるとした。

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

4.2 に示したように各試験容器毎の親 1 頭当たりの累積産仔数を算出し、濃度区と対照区との有意差の有無をF検定およびt検定 (有意水準 5%、Yukms 統計ライブラリー I 統計解析編) により求めた。F検定で有意差が認められない場合は Student、有意差が認められた場合は Aspin-Welch を使用した。

限度試験のため、有意差が認められなければ最大無作用濃度 (NOECr) および最小作用濃度 (LOECr) は共に試験区の濃度以上であるとした。

## 5 結果および考察

### 5.1 試験成績の信頼性に影響を及ぼしたと思われる環境要因

試験成績の信頼性に影響を及ぼした要因は、無かった。

### 5.2 試験水中の被験物質濃度

暴露開始時（0日目）、7日目および19日目の換水後の被験物質濃度は96.2～96.6mg/L（設定値100mg/L）であり、設定値に対する割合は96.2%～96.6%であった。

また、それらの2日後（換水前）の濃度は93.6mg/L～96.5mg/Lであり、設定値に対する割合は93.6%～96.5%であった。すべての実測値は設定値の±20%以内であったので結果の算出には設定値を用いた。

[Table 1-1 (p. 17)]

[Table 1-2 (p. 18)]

[付属資料-2(p. 30)]

### 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。

親ミジンコの死亡は対照区、濃度区ともに21日間、全く観察されなかった。

被験物質濃度が100mg/Lの濃度区で、暴露終了時の親ミジンコの死亡率は、0%であった。

[Table 2-1, 2-2(p. 19)]

[Figure 1(p. 20)]

[付属資料-3(p. 38)]

#### 初産日

対照区での親ミジンコの初産日は7～8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。100mg/Lの濃度区では、親ミジンコの初産日は8～9日であった。

[Table 3(p. 21)]

[付属資料-3(p. 38)]

#### 平均累積産仔数

対照区での親ミジンコの平均累積産仔数は42.68頭であり、試験成立条件である40頭の基準を満たした。濃度区における平均累積産仔数は34.45頭であった。

[Table 4 (p. 22)]

[Figure 2 (p. 22)]

[付属資料-3(p. 38)]

#### 休眠卵の発生等

対照区および試験濃度区において、休眠卵等は全く生じなかった。

#### 5.4 親ミジンコの半数致死濃度 (LC50)

試験区 (100mg/L) で親ミジンコの死亡は観察されなかったことから、半数致死濃度 (LC50) は100mg/L以上であった。

[Table 5(p. 23)]

#### 5.5 50%繁殖阻害濃度 (ErC50)

平均累積産仔数が対照区と比較して有意差がないことから、50%繁殖阻害濃度 (ErC50) は100mg/L以上であった。

[Table 6(p. 23)]

[Table 7(p. 24)]

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

平均累積産仔数が対照区と比較して有意差がないことから、平均累積産仔数に及ぼす21日間の最大無作用濃度 (NOECr) は100mg/L以上であり、最小作用濃度 (LOECr) も100mg/L以上であった。

[Table 7(p. 24)]

#### 5.7 試験水の水温、溶存酸素濃度およびpH

21日間の試験期間中の水温は20.1 ~ 20.8 °Cであり、20°C ± 1 °Cの設定どおりであった。溶存酸素濃度は7.20 ~ 9.65 mg/Lであり、すべての試験水槽で飽和溶存酸素濃度の60%以上であった (20.0°Cの飽和溶存酸素濃度: 8.84mg/L)。pHは7.2 ~ 7.8であり、変動は1.0以下であった。

以上のことから、水温、溶存酸素濃度および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(p. 25)]

[Table 9(p. 26)]

[Table 10(p. 27)]

以 上



Table 1-1 Measured Concentrations of 3,5,5-Trimethyl-2-cyclohexen-1-one during a 21-day Exposure of *Daphnia magna* under Semi-Static Test Conditions

Nominal Concentration (mg/L)	Measured concentration (mg/L)			Percent of Nominal	
	0 day new	2 day old	Mean	0 day new	2 day old
Control	<0.05	<0.05	----	----	----
100	96.6	93.6	95.1	96.6	93.6

Nominal Concentration (mg/L)	Measured concentration (mg/L)			Percent of Nominal	
	7 day new	9 day old	Mean	7 day new	9 day old
Control	<0.05	<0.05	----	----	----
100	96.6	96.5	96.6	96.6	96.5

Nominal Concentration (mg/L)	Measured concentration (mg/L)			Percent of Nominal	
	19 day new	21 day old	Mean	19 day new	21 day old
Control	<0.05	<0.05	----	----	----
100	96.2	94.8	95.5	96.2	94.8

new : freshly prepared test solutions

old : test solutions after 2 days exposure period

$$\text{Mean: } \frac{\text{Conc0} - \text{Conc1}}{\ln(\text{Conc0}) - \ln(\text{Conc1})}$$

*Conc0* is the measured concentration at the start of each renewal period.  
*Conc1* is the measured concentration at the end of each renewal period.

Table 1-2 Time-weighted Mean of Measured Concentrations of 3,5,5-Trimethyl-2-cyclohexen-1-one during a 21-day Exposure of *Daphnia magna* under Semi-Static Test Conditions

Nominal (mg/L)	Time-weighted Mean (mg/L)	Percent of Nominal (%)
Control	---	---
100	95.7	95.7

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

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
100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

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

Nominal conc. (mg/L)	Days	
	14	21
Control	0	0
100	0	0

Figure 1 Cumulative Numbers of Dead Parental *Daphnia*

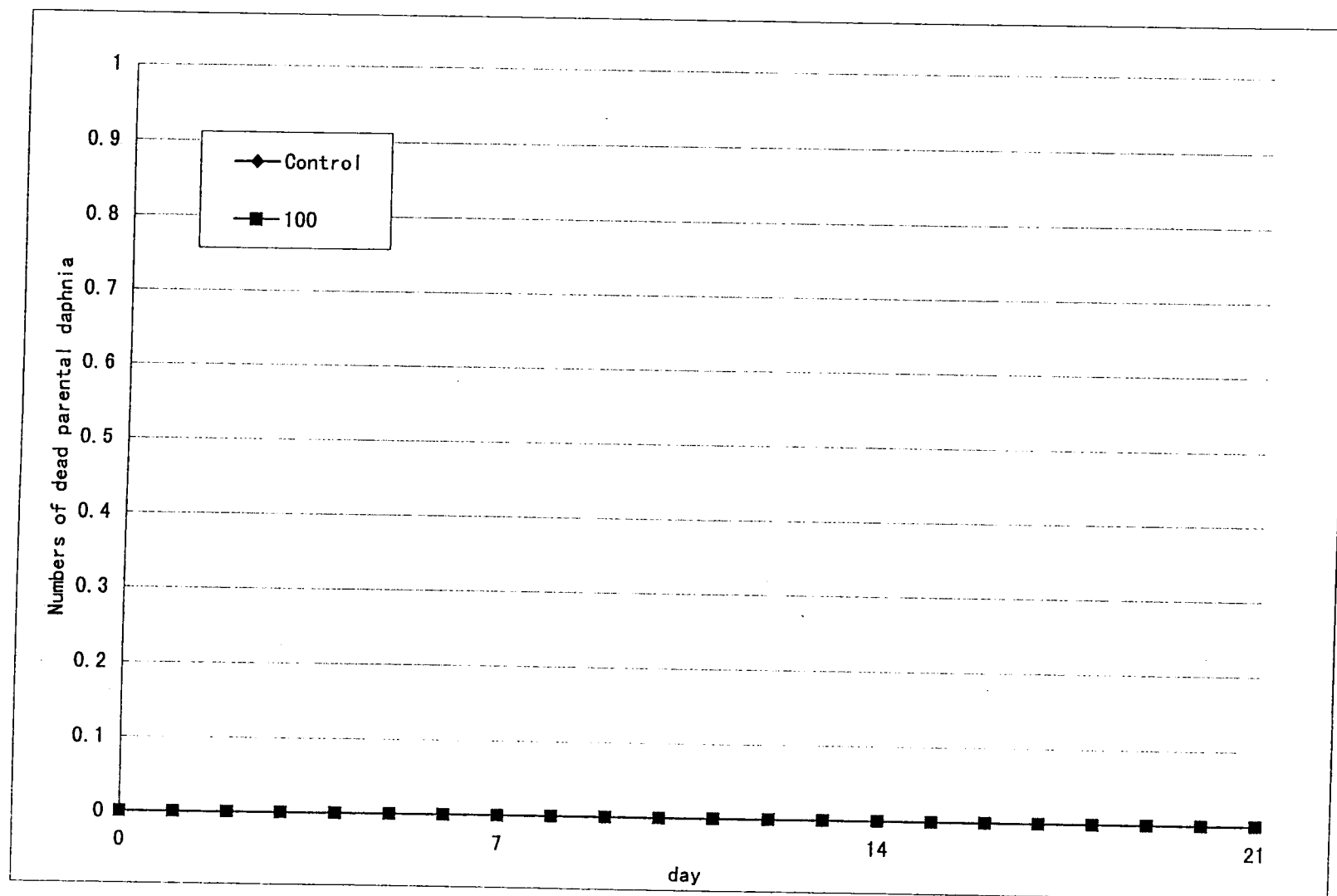


Table 3 Time (days) to First Brood Production

Vessel No.	Control	Nominal concentration (mg/L)
		100
1	8	8
2	8	9
3	7	9
4	7	8
Mean	7.5	8.5

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

Nominal conc. (mg/L)	Days									
	1	2	5	7	9	12	14	16	19	21
Control	0.00	0.00	0.00	0.45	1.80	8.95	14.90	22.48	32.48	42.68
100	0.00	0.00	0.00	0.00	0.93	4.68	9.28	16.25	22.75	34.45

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

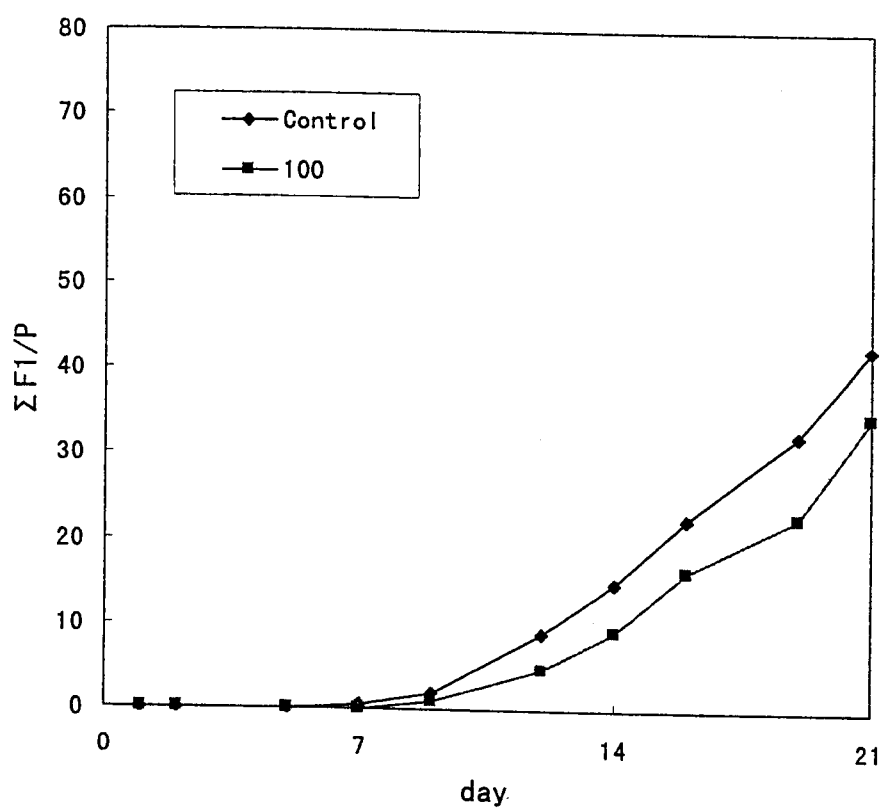


Table 5 Calculated LC50 Values for Parental *Daphnia*

Exposure period (day)	LC50 (mg/L)	95 % Confidence limits (mg/L)			Statistical method
14	>100	-	~	-	-
21	>100	-	~	-	-

Table 6 Calculated ErC50 Values for Inhibition of Reproduction

Exposure period (day)	ErC50 (mg/L)	95 % Confidence limits (mg/L)			Statistical method
14	>100	-	~	-	-
21	>100	-	~	-	-

Table 7 Significance Test of Difference between the Mean Cumulative Numbers of Juveniles Produced per Adult in Control and Test Vessels after 21 Days (Two-sided test of F-test and t-test)

Vessel No.	Concentration (mg/L)	
	control	100
1	43.30	26.80
2	46.30	31.00
3	38.50	45.50
4	42.60	34.50
Mean	42.68	34.45
Variance	10.323	64.177
S.D.	3.213	8.011
F-test (Probability)		0.0838
Equality		Yes
t-test (Probability)		0.1053
Significant difference (95%)		No

No observed effect concentration (NOECr) >100.0 mg/L

Lowest effect concentration (LOECr) >100.0 mg/L



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

Nominal Concentration (mg/L)	Temperature(°C)							
	0 day new	2 day old	7 day new	9 day old	14 day new	16 day old	19 day new	21 day old
Control	20.4	20.2	20.6	20.8	20.5	20.3	20.5	20.4
100	20.3	20.1	20.6	20.1	20.4	20.1	20.3	20.4

new: freshly prepared test solutions

old: test solutions after 2 days exposure period

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

Nominal Concentration (mg/L)	Dissolved Oxygen Concentration (mg/L)							
	0 day	2 day	7 day	9 day	14 day	16 day	19 day	21 day
	new	old	new	old	new	old	new	old
Control	9.24	8.66	8.99	8.07	9.12	7.33	9.34	7.63
100	9.47	8.67	8.67	7.79	9.25	7.20	9.65	7.43

new: freshly prepared test solutions

old: test solutions after 2 days exposure period

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

Nominal Concentration (mg/L)	pH							
	0 day	2 day	7 day	9 day	14 day	16 day	19 day	21 day
	new	old	new	old	new	old	new	old
Control	7.6	7.6	7.8	7.5	7.3	7.3	7.4	7.4
100	7.5	7.7	7.4	7.3	7.4	7.3	7.4	7.2

new: freshly prepared test solutions

old: test solutions after 2 days exposure period

## 付 属 資 料 - 1

希釈水 (M4 調製水)

(全 1 頁)

Appendix 1  
M4 medium

Salt and Vitamine	Concentration (mg/L)
$H_3BO_3$	2.860
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	0.361
$LiCl$	0.306
$RbCl$	0.071
$SrCl_2 \cdot 6H_2O$	0.152
$NaBr$	0.016
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0.063
$CuCl_2 \cdot 2H_2O$	0.017
$ZnCl_2$	0.013
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0.010
$KI$	0.00325
$Na_2SeO_3$	0.00219
$NH_4VO_3$	0.00058
$Na_2EDTA \cdot 2H_2O$	2.5
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0.996
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	123.3
$KCl$	5.8
$NaHCO_3$	64.8
$NaNO_3$	0.274
$KH_2PO_4$	0.143
$K_2HPO_4$	0.184
Thiamine hydrochloride	0.075
Cyanocobalamine (V. B <sub>12</sub> )	0.001
D(+)Biotin (V. H)	0.00075
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	293.8
$Na_2SiO_3 \cdot 9H_2O$	2.5

## 付属資料－2

試験液の分析方法

(全 6 頁)

## 試験液の分析方法

### 1 試験液の分析方法

各試験水槽より試験水 0.5～1.5 mL をバイアル瓶に採取する。

HPLCのオートサンプラーにセットして一定量を自動注入する。

検量線から被験物質濃度を求める。

### 2 高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 測定条件

カラム : C18 5  $\mu$ m  $\phi$ 、4.6 mm  $\phi$   $\times$  150 mm

カラム温度 : 40℃

注入量 : 20  $\mu$ L

検出波長 : 235 nm

移動相 : A/B = 50/50

A = 水/アセトニトリル/酢酸 = 84.5/15/0.5

B = 水/アセトニトリル/酢酸 = 9.5/90/0.5

流 量 : 1.0 mL/min

### 3 検量線

標準原液を希釈して、定量限界付近から予想測定濃度が含まれる5ポイントの標準液を測定し、直線性を確認した。

[ Figure 1(p.32)]

測定日毎に標準溶液（3ポイント以上）の測定を行い、この検量線により定量した。

### 4 添加回収試験

希釈水に標準液の一定量を添加して、回収率を求めた。

3,5,5-トリメチル-2-シクロヘキセン-1-オン 10.0 mg/L の回収率は 95.1%であり、25.0 mg/L の回収率は 97.9%であった。

Appendix 2

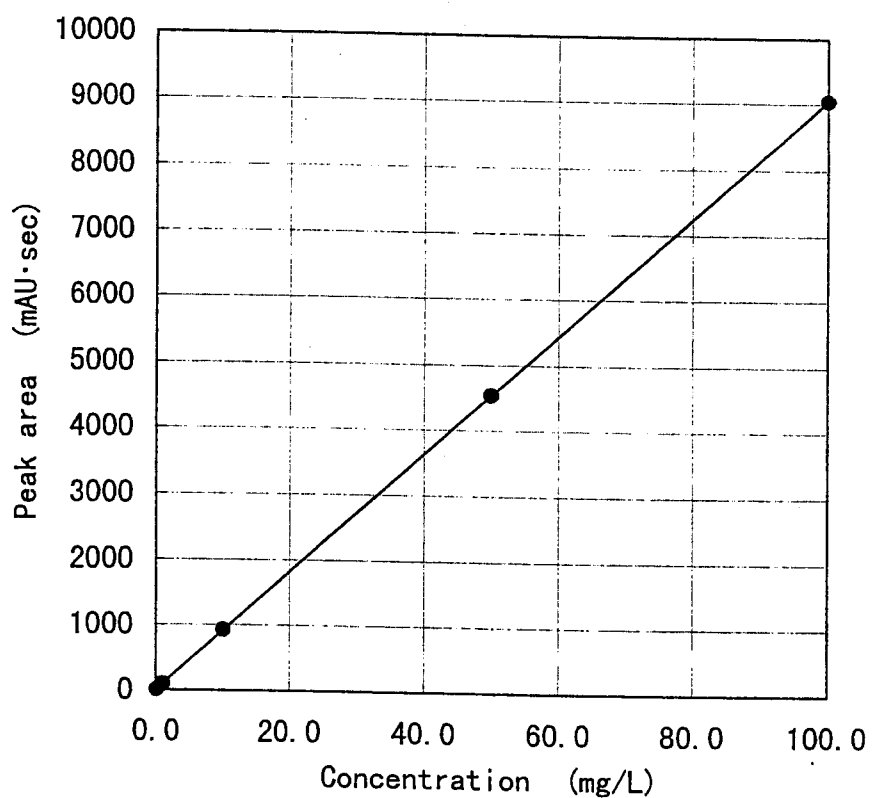
Figure 1 Calibration Curve of 3,5,5-Trimethyl-2-cyclohexen-1-one by HPLC Analysis

Input Data		
No.	Concentration (mg/L)	Peak Area (mAU·sec)
1	0.10	12.00823
2	1.00	96.80765
3	10.0	926.50433
4	50.0	4538.85547
5	100.0	9044.68457

$$Y (\text{Peak Area}) = 8.73399 + 90.41872 X (\text{Concentration})$$

$$r^2 = 1.00000$$

$r^2$  : coefficient of correlation

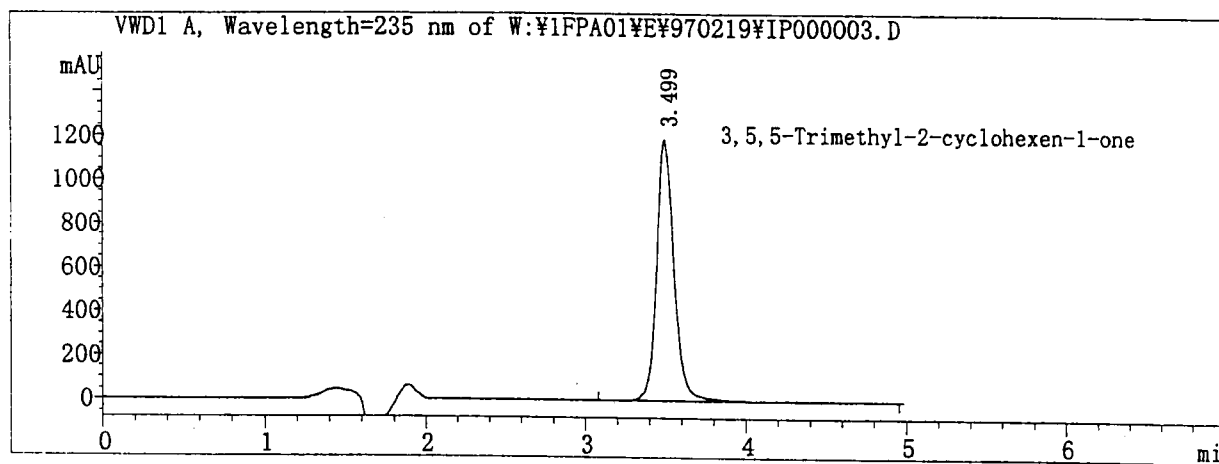




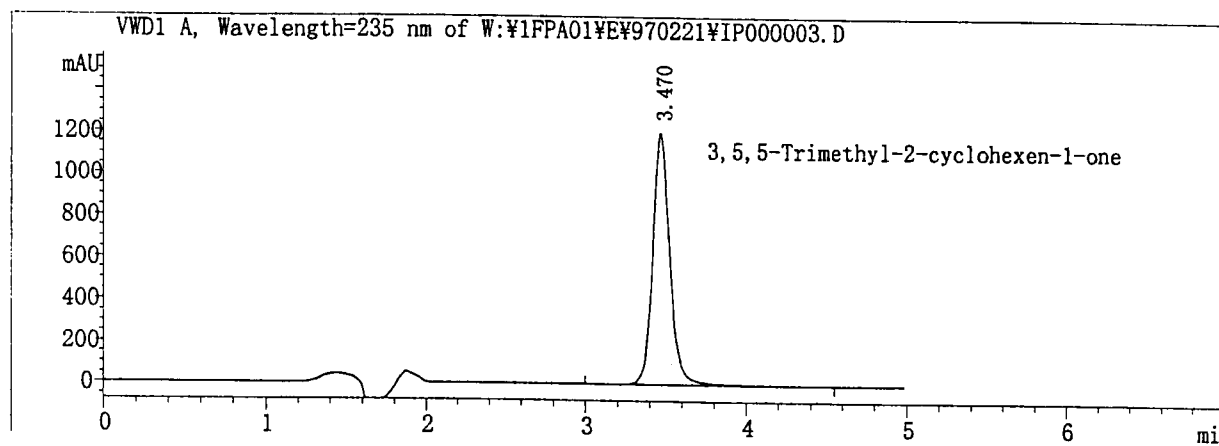
Appendix 2

Figure 2 Representative Chromatograms

(1) Standard 100.0 mg/L; Day 0



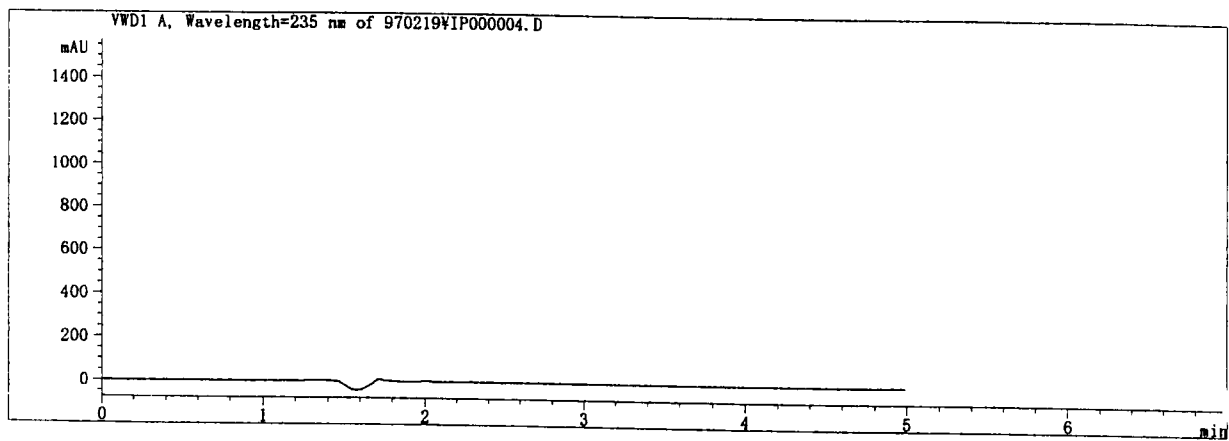
(2) Standard 100.0 mg/L; Day 2



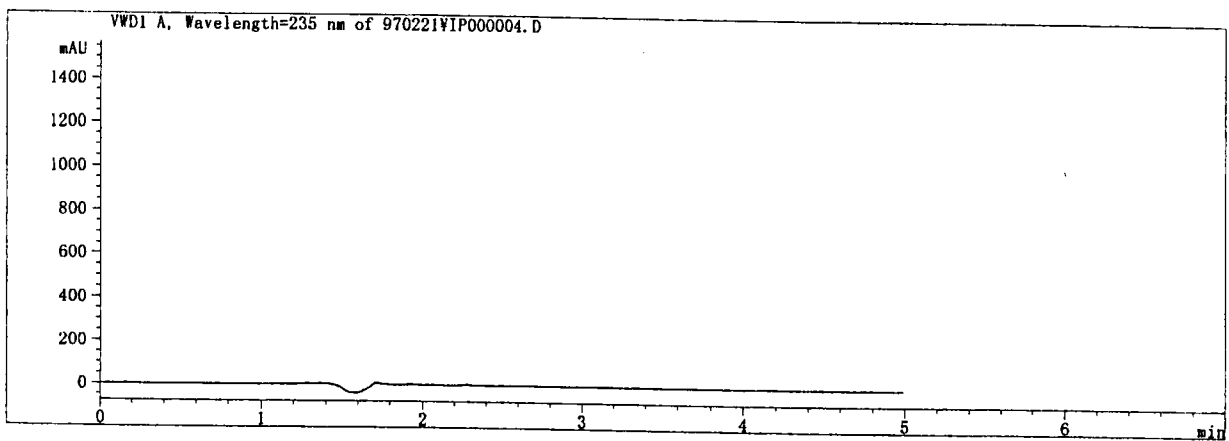
Appendix 2

Figure 2 Continued

(3) Control ; Day 0 (new)



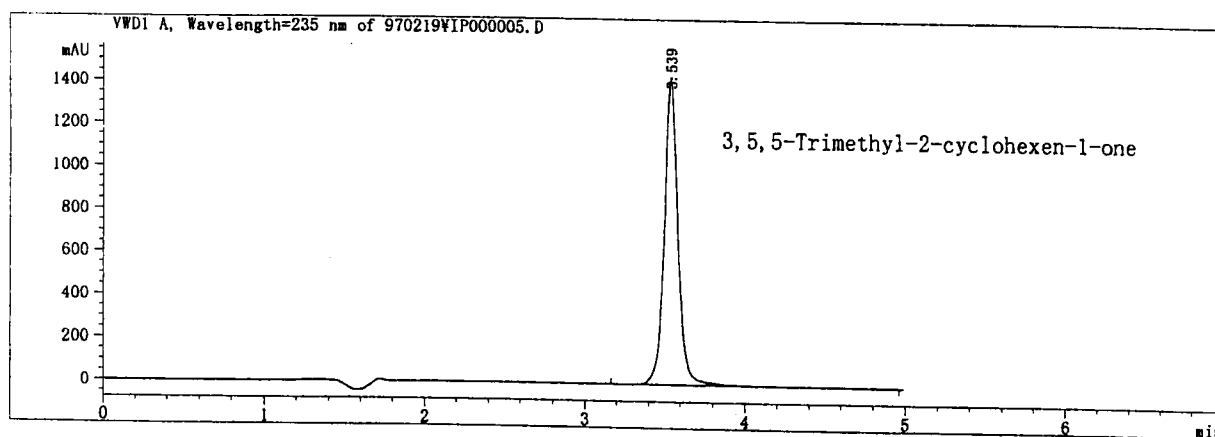
(4) Control ; Day 2 (old)



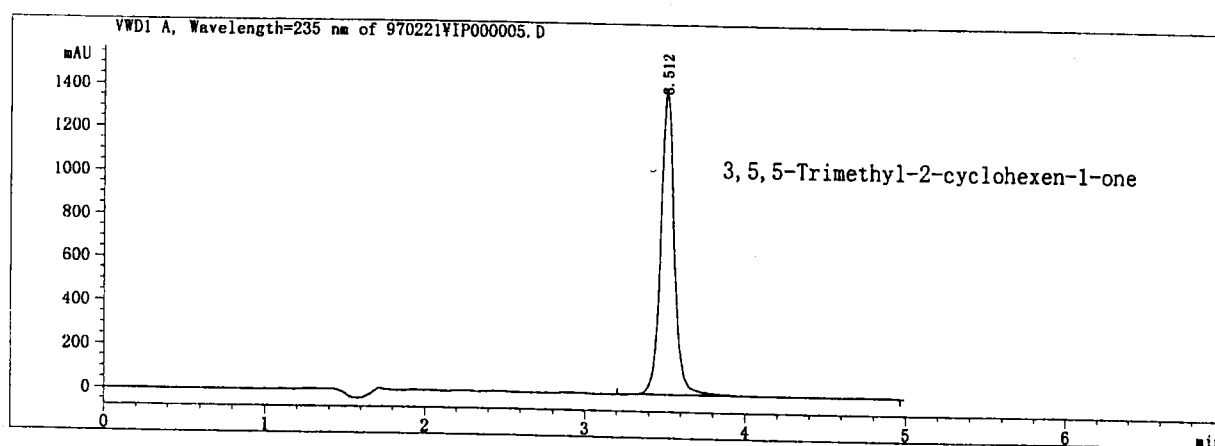
Appendix 2

Figure 2 Continued

(5) 100 mg/L nominal; Day 0 (new)



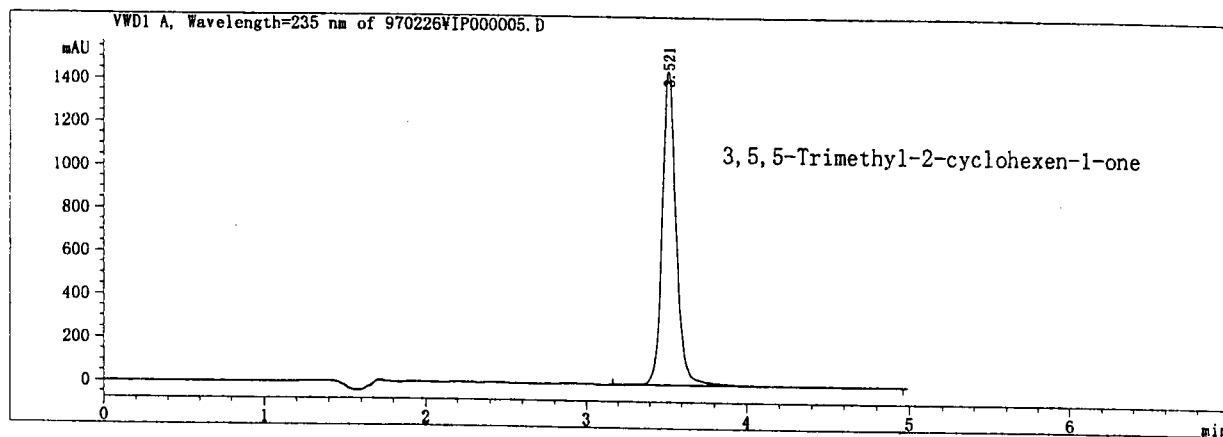
(6) 100 mg/L nominal; Day 2 (old)



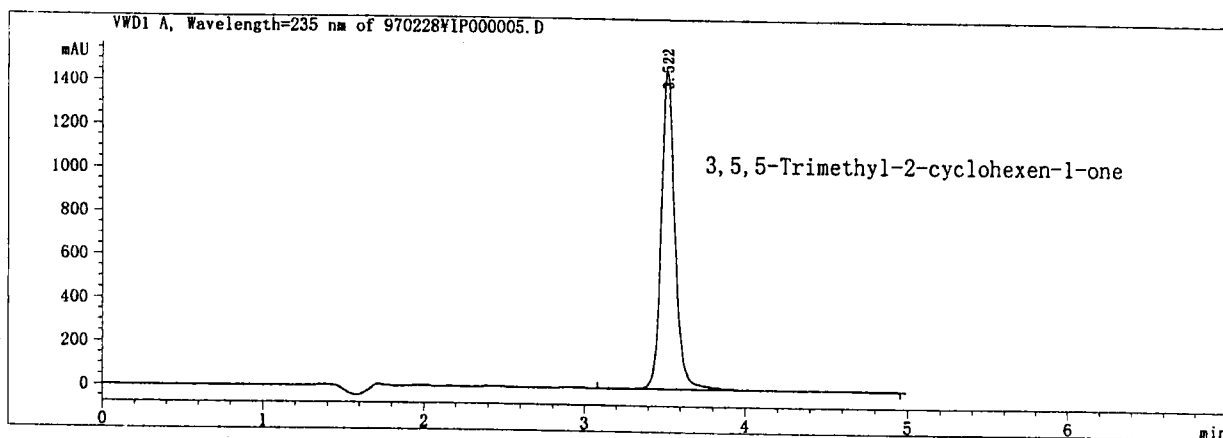
Appendix 2

Figure 2 Continued

(7) 100 mg/L nominal; Day 7 (new)



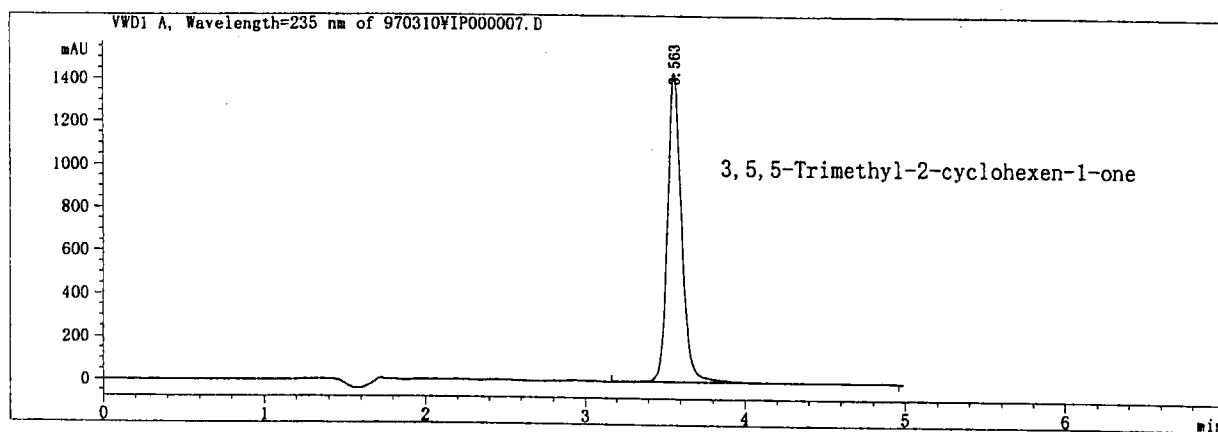
(8) 100 mg/L nominal; Day 9 (old)



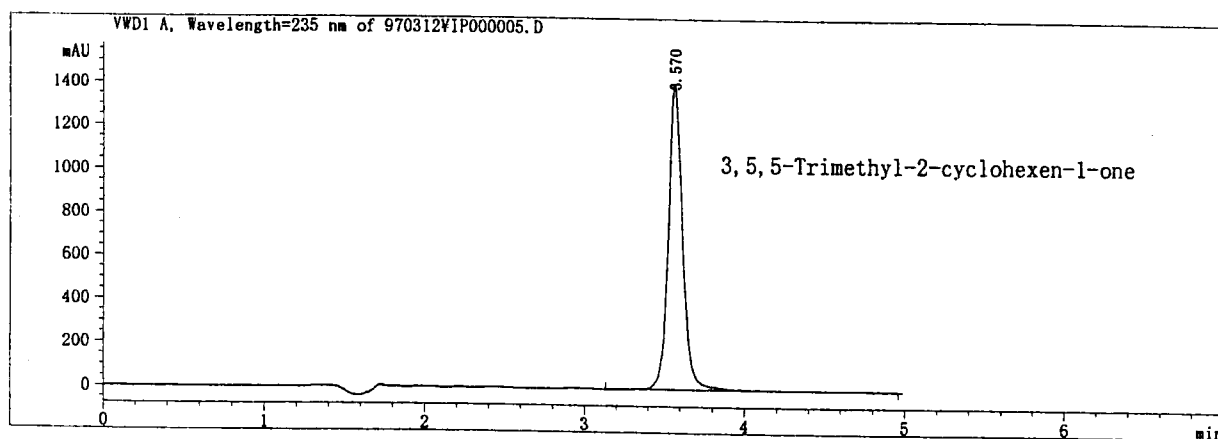
Appendix 2

Figure 2 Continued

(9) 100 mg/L nominal; Day 19 (new)



(10) 100 mg/L nominal; Day 21 (old)



### 付属資料－3

ミジンコの観察結果

(全2頁)

Appendix 3-1 Result of Reproduction Test

		( Nominal										0.00 mg/L, Dispersant conc. :										0.00 mg/L)	
		Time																					
Counts		2/20	2/21	2/22	2/23	2/24	2/25	2/26	2/27	2/28	3/1	3/2	3/3	3/4	3/5	3/6	3/7	3/8	3/9	3/10	3/11	3/12	Total
No.		1d	2d	3d	4d	5d	6d	7d	8d	9d	10d	11d	12d	13d	14d	15d	16d	17d	18d	19d	20d	21d	
	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	0	--
1	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	3	8	--	--	56	--	43	--	75	--	--	156	--	92	433
	Reproductivity/P	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.30	0.80	--	--	5.60	--	4.30	--	7.50	--	--	15.60	--	9.20	43.30
	Cumulative reproductivity	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.30	1.10	1.10	1.10	6.70	6.70	11.00	11.00	18.50	18.50	18.50	34.10	34.10	43.30	--
	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	0	--
2	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	5	2	--	--	165	--	58	--	66	--	--	84	--	83	463
	Reproductivity/P	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.50	0.20	--	--	16.50	--	5.80	--	6.60	--	--	8.40	--	8.30	46.30
	Cumulative reproductivity	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.50	0.70	0.70	0.70	17.20	17.20	23.00	23.00	29.60	29.60	29.60	38.00	38.00	46.30	--
	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	0	--
3	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	11	--	22	--	--	22	--	55	--	83	--	--	81	--	111	385
	Reproductivity/P	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.10	--	2.20	--	--	2.20	--	5.50	--	8.30	--	--	8.10	--	11.10	38.50
	Cumulative reproductivity	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.10	1.10	3.30	3.30	3.30	5.50	5.50	11.00	11.00	19.30	19.30	19.30	27.40	27.40	38.50	--
	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	0	--
4	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	7	--	14	--	--	43	--	82	--	79	--	--	79	--	122	426
	Reproductivity/P	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.70	--	1.40	--	--	4.30	--	8.20	--	7.90	--	--	7.90	--	12.20	42.60
	Cumulative reproductivity	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.70	0.70	2.10	2.10	2.10	6.40	6.40	14.60	14.60	22.50	22.50	22.50	30.40	30.40	42.60	--
The time (days) to first brood		1;	8 days,				2;	8 days,				3;	7 days,				4;	7 days,					

Appendix 3-2 Result of Reproduction Test

		( Nominal 100.00 mg/L, Dispersant conc. : 0.00 mg/L)																							
		Time																							
Counts		2/20	2/21	2/22	2/23	2/24	2/25	2/26	2/27	2/28	3/1	3/2	3/3	3/4	3/5	3/6	3/7	3/8	3/9	3/10	3/11	3/12	Total		
No.		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	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	--		
	Fl generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	4	6	--	--	23	--	38	--	58	--	--	71	--	68	268	
	Reproductivity/P		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.40	0.60	--	--	2.30	--	3.80	--	5.80	--	--	7.10	--	6.80	26.80	
Cumulative reproductivity		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.40	1.00	1.00	1.00	3.30	3.30	7.10	7.10	12.90	12.90	12.90	20.00	20.00	26.80	--		
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	--		
	Fl generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0	8	--	--	39	--	25	--	63	--	--	55	--	120	310	
	Reproductivity/P		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.80	--	--	3.90	--	2.50	--	6.30	--	--	5.50	--	12.00	31.00	
Cumulative reproductivity		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.80	0.80	0.80	4.70	4.70	7.20	7.20	13.50	13.50	13.50	19.00	19.00	31.00	--		
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	--		
	Fl generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0	2	--	--	47	--	90	--	60	--	--	68	--	188	455	
	Reproductivity/P		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.20	--	--	4.70	--	9.00	--	6.00	--	--	6.80	--	18.80	45.50	
Cumulative reproductivity		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.20	0.20	0.20	4.90	4.90	13.90	13.90	19.90	19.90	19.90	26.70	26.70	45.50	--		
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	--		
	Fl generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	6	11	--	--	41	--	31	--	98	--	--	66	--	92	345	
	Reproductivity/P		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.60	1.10	--	--	4.10	--	3.10	--	9.80	--	--	6.60	--	9.20	34.50	
Cumulative reproductivity		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.60	1.70	1.70	1.70	5.80	5.80	8.90	8.90	18.70	18.70	18.70	25.30	25.30	34.50	--		
The time (days) to first brood			1;	8 days,				2;	9 days,				3;	9 days,				4;	8 days,						