

環境庁殿

試 験 報 告 書

N-ニトロソジフェニルアミンのオオミジンコ (*Daphnia magna*) に対する繁殖阻害試験

(試験番号：6 B 7 0 8 G)

1997年3月31日作成


株式会社三菱化学安全科学研究所


8. 試験関係者：

試験責任者

[REDACTED]

[REDACTED]

(1997年 3月31日)

試験担当者

[REDACTED]

[REDACTED]

(1997年 3月31日)

[REDACTED]

[REDACTED]

(1997年 3月31日)

[REDACTED]

[REDACTED]

(1997年 3月31日)

[REDACTED]

[REDACTED]

(1997年 3月31日)

分析担当者

[REDACTED]

[REDACTED]

(1997年 3月31日)

9. 試験期間： 試験開始日

1997年 1月16日

試験終了日

1997年 3月31日

暴露期間

1997年 2月12日～1997年 3月5日

10. 保管：

試験に関する下記の記録及び試資料は、試験報告書作成後10年間、当研究所試資料保管施設に保管する。その後の保管については別途協議の上定める。

- 1) 試験計画書，同変更の記録
- 2) 試験報告書
- 3) 生データ
- 4) 信頼性保証業務担当者の監査・査察記録
- 5) 被験物質
- 6) その他必要なもの

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： 環境庁



表題： N-ニトロソジフェニルアミンのオオミジンコ (*Daphnia magna*) に対する
繁殖阻害試験

試験番号： 6 B 7 0 8 G

本試験は環境庁のG L P規則に従って実施したものである。

1 9 9 7 年 3 月 3 1 日

運営管理者



信 頼 性 保 証 証 明

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： 環境庁

表題： N-ニトロソジフェニルアミンのオオミジンコ (*Daphnia magna*) に対する
繁殖阻害試験

試験番号： 6 B 7 0 8 G

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	1997年 2月12日	1997年 2月12日
	1997年 3月 5日	1997年 3月 5日
試験報告書監査	1997年 3月31日	1997年 3月31日

1997年 3月31日

信頼性保証担当者：

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

試験実施概要

1. 表題： N-ニトロソジフェニルアミンのオオミジンコ (*Daphnia magna*) に対する繁殖阻害試験
2. 試験目的： N-ニトロソジフェニルアミンについて、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 (NOECr) および産仔数を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GLP： 本試験は環境庁のGLP規則に準拠した。
5. 試験委託者
名称： 環境庁
住所： 〒100 東京都千代田区霞ヶ関一丁目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 XXXXXXXXXX
6. 試験受託者：
名称： 株式会社三菱化学安全科学研究所
所在地： 〒105 東京都港区芝二丁目1-30
7. 試験施設：
名称： 株式会社三菱化学安全科学研究所 横浜研究所
所在地： 〒227 神奈川県横浜市青葉区鴨志田町1000番地

目 次

	頁
要 旨	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	11
3.5 試験液の調製	12
3.6 試験液の分析	12
3.7 試験操作	12
4 結果の算出	13
4.1 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	13
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 試験液中の被験物質濃度	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)	17
5.5 50%繁殖阻害濃度 (ErC50)	17
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)	17
5.7 試験液の水温, 溶存酸素濃度および p H	17
Table 1~10	18~28
Figure 1, 2	21, 23
付属資料-1 希釈水の水質	29~30
付属資料-2 試験液の分析方法	31~37
付属資料-3 ミジンコの観察結果	38~45

要 旨

試験委託者

環境庁

表 題

N-ニトロソジフェニルアミンのオオミジンコ (*Daphnia magna*)に対する繁殖阻害試験

試験番号

6 B 7 0 8 G

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： N-ニトロソジフェニルアミン
- 2) 暴露方式： 半止水式(暴露開始後、2日毎に試験液の全量を交換)
- 3) 供試生物： オオミジンコ (*Daphnia magna*)
- 4) 暴露期間： 21日間
- 5) 試験濃度(設定値)： 対照区, 助剤対照区, 0.100, 0.320, 1.00, 3.20, 10.0 mg/L
(公比 3.2, 助剤濃度一定：80 mg/L, HCO-30 および DMF使用)
- 6) 試験液量： 800 mL
- 7) 連数： 4 容器／濃度区
- 8) 供試生物数： 40頭／濃度区 (1 連に付き10頭で1 濃度区40頭)
- 9) 試験温度： 20±1℃
- 10) 照明： 16時間明／8時間暗
- 11) 被験物質の分析： H P L C 法

結 果

1) 試験液中の被験物質濃度

暴露期間中に測定した試験液の換水前の被験物質濃度が、設定値の±20%を越えたため、各影響濃度の算出には実測値（時間加重平均値）を採用した。

2) 21 日間の親ミジンコの半数致死濃度（LC50）：

4.42 mg/L （95%信頼限界：3.68～5.43 mg/L）

3) 21 日間の 50% 繁殖阻害濃度（ErC50）：

0.924 mg/L （95%信頼限界：0.793～1.08 mg/L）

4) 21 日間の最大無作用濃度（NOECr）：0.075 mg/L

5) 21 日間の最小作用濃度（LOECr）：0.260 mg/L

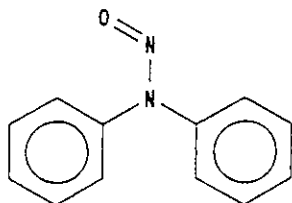
1 被験物質

1.1 名称，構造式および物理化学的性状

名 称： N-ニトロソジフェニルアミン

(略称 NDPA，識別符号 6B708G)

構造式：



分子式： $C_{12}H_{10}N_2O$

分子量^{*1}： 198.22

融点^{*2}： 66.5℃

水溶解度^{*2}： 不溶

1-オクタノール／水分配係数 (logP)： 2.38^{*2}， 3.13^{*3}

光分解性^{*2}： 低濃度で光分解性有り

*1:供給者提供資料

*2:化学物質分析法開発調査報告書総覧（上巻），環境庁環境保健部保健調査室編
（平成3年）

*3:

1.2 供試試料

純度^{*1}： >98%（当社測定値）

ロット番号^{*1}： CAG0075

供給者：

供給量^{*1}： 100g（25gx4）

入手日： 1996年12月25日

外観^{*1}： 暗黄褐色結晶～結晶性粉末

*1:供給者提供資料

1.3 被験物質の確認および保管条件下での安定性

被験物質は当研究所の冷蔵庫に保管した。

入手した被験物質の赤外吸収スペクトルを測定し、被験物質の構造と矛盾が認められないことを確認した。試験終了時にも赤外吸収スペクトルを測定し、試験開始前に測定したスペクトルと比較した。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

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、1995年7月18日に国立環境研究所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）による48時間の半数遊泳阻害濃度（ EC_{50} ）は 0.23 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

継代中のものから幼体を抱えた肉眼的に健康かつ十分な大きさの雌成体を選別し、別に用意したビーカーに移し、翌日、産出された幼体を別のビーカーに分けた。この幼体（1997年 1月29日生まれ）を供試ミジンコの親とし、以下の条件で飼育した。成熟し幼体を産むようになったら1週間に2回幼体を除去した。2週目に入り暴露開始前日に、その前2週間の死亡率が0%で休眠卵や雄が発生しなかったバッチから、育苗内に幼体を持つ雌成体を選別し、翌日（24時間以内）産出された幼体を試験に用いた（1997年 2月12日暴露開始）。

- 1) 飼育水: 希釈水 (3.2参照)
- 2) 飼育密度: 幼体時 35または70 頭/3L 飼育水
成体後 35 頭/3L 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: *Chlorella vulgaris*
- 6) 給餌量: ミジンコ 1 頭当たり 0.1~0.2 mgC (有機炭素含量) / 日

3 試験方法

3.1 試験条件

- 1) 暴露方式： 半止水式(暴露開始後，2日毎に試験液の全量を交換)
- 2) 暴露期間： 21日間
- 3) 試験液量： 800 mL (溶存酸素濃度を維持するため，試験液量を増やした。)
- 4) 連数： 4容器／濃度区
- 5) 供試生物数： 40頭／濃度区 (1連につき10頭で1濃度区40頭)
- 6) 試験温度： $20 \pm 1^{\circ}\text{C}$
- 7) 照明： 室内光，16時間明／8時間暗
- 8) 餌： *Chlorella vulgaris*
- 9) 給餌量： ミジンコ1頭当たり 0.1～0.2 mgC (有機炭素含量)／日

3.2 希釈水

脱塩素水 (横浜市水道水を活性炭処理し，残留塩素等を除去した後，充分通気したもの) を使用した。希釈水の硬度は 65 mg/L (CaCO_3 換算)，pHは 8.2であった。

[付属資料－1]

3.3 試験容器および恒温槽等

- 1) 試験容器： 1L 容ガラスビーカー
- 2) 恒温槽： PVC 製水槽 (恒温装置 TAITEC 製 COOLNIT CL-80F 型)
- 3) 水温計： 横河電機製 2455 02 型
- 4) 溶存酸素計： 電気化学計器製 DOL-10 型
- 5) pH計： 東亜電波工業製 HM-40V 型

3.4 試験濃度の設定

オオミジンコに対する48時間急性遊泳阻害試験の結果(48hr-EiC50値: 10.1 mg/L)から，本試験は公比 3.2で5段階を設定した。各濃度区は以下の通りである。

また，被験物質が低濃度で光分解を受けやすいことが示唆されていたので，暴露期間を通して換水頻度を一定とするため，2日毎に試験液の全量を交換した。

対照区，助剤対照区，0.100，0.320，1.00，3.20，10.0 mg/L

3.5 試験液の調製

被験物質 400 mg を秤取して DMF 2000 mg に溶解させた後、HCO-30 1200 mg を加え攪はん・混合した。これを純水で希釈し 500 mL に定容とし、被験物質濃度 800 mg/L の原液を調製した。同時に被験物質を含まない助剤原液 6400 mg/L (DMF 4000 mg/L, HCO-30 2400 mg/L) を調製した。

1.0 L 容のガラスビーカーに希釈水 800mL を入れ、上記被験物質原液を各濃度に応じて添加した後、助剤濃度が一定 (80 mg/L) になるように助剤原液を加え、各試験液を調製した。

助剤対照区には、被験物質を含まないもの (助剤濃度 : 80 mg/L) を調製した。

対照区には、希釈水のみを用いた。

3.6 試験液の分析

全濃度区 (但し、各 1 試験容器) について、暴露期間中に 4 回 (調製時および 2 日後の換水前で 1 回) 0.75 mL ずつ試験液を採取し、アセトニトリルを等量添加後、HPLC により分析した。アセトニトリルで調製した標準溶液 (5.00 mg/L) は、等量の水で希釈したものを HPLC 測定試料とした。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 (D.O.) , pH を測定後、ガラスピペットを用いて供試ミジンコを投入し、その時点を暴露開始時とした。その際、ピペット内の飼育水が、全量で試験液量に対して 1 % 以内となるようにした。その後、換水毎にミジンコを新しい試験液に移しかえ、21 日後まで飼育した。暴露期間中は毎日一定量の給餌を行った (3.1 参照)。

・ミジンコの観察 :

(親ミジンコ) 観察は生存数、遊泳阻害数、育苗内に卵を持つ個体数および大きさと状態を対照区と比較し、毎日記録した。計数後の親ミジンコの死亡個体は取り除いた。

(産出幼体) 幼体産出後は、幼体の生死を計数した。随胎卵および休眠卵の発生等について、換水時に観察し記録した。計数後の幼体は取り除いた。最初の幼体産出日を、初産日として記録した。

- ・水質測定： 水温、溶存酸素濃度(D.O.)およびpHを、全濃度区（但し、各1試験容器）について、暴露期間中に3回（調製時および2日後の換水前で1回）換水前後に測定した。

4 結果の算出

4.1 親ミジンコの半数致死濃度 (LC50) の算出

各濃度区での親ミジンコの死亡数と供試個体数（40頭）から、Moving average法により14および21日間暴露の半数致死濃度 (LC50)およびその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頭当たりの暴露期間中の累積産仔数 (TF) および平均累積産仔数 (\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
 - F_n : 暴露開始n回後の観察時の幼体数（但し、生存幼体）
 - P_n : 暴露開始n回後の観察時の親の数
 - P_{n-1} : 暴露開始n-1回後の観察時の親の数
 - P_0 : 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、 $P_{n-1} + P_n$ 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: 濃度区当たりの連数（試験容器数：4）

ErC50 値の算出

各濃度区での累積産仔数と助剤対照区での累積産仔数の比から、各濃度区での累積産仔数に及ぼす阻害率を求めた。その値を用いて、Moving average 法により14および21日間暴露の50% 繁殖阻害濃度 (ErC50) およびその95%信頼限界を算出した。その際、供試個体数に 100 (%)、助剤対照区の値を100%とする)、死亡数に助剤対照区の値に対する各濃度区での阻害率 (%) を適用した。なお、阻害率算出において、マイナスの値を示すものについては、0 %阻害とした。

4.3 最大無作用濃度 (NOECr)および最小作用濃度 (LOECr)

各試験容器毎の親 1 頭当たりの累積産仔数を算出し、各濃度区と助剤対照区との有意差の有無を Dunnettの多重比較検定 ($\alpha=0.05$, 両側) により求め、有意差が認められない最高濃度 (最大無作用濃度: NOECr) および有意差が認められる最低濃度 (最小作用濃度: LOECr) を決定した。

統計解析には、Yukms ソフトウェア Statlight 「#4 多群の比較」 (Yukms Corp., 東京) を用いた。

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

該当する事象はなかった。

5.2 試験液中の被験物質濃度

試験液調製時の濃度は 0.081～9.98 mg/L (設定値 0.100～10.0 mg/L) であり、換水前の濃度は 0.050～10.2 mg/L であった。また、各濃度区の被験物質実測濃度の設定値に対する割合は調製時で 81～106%、換水前で 50～102% であった。

したがって、暴露期間中に測定した試験液の換水前の被験物質濃度が、設定値の±20%を越えたため、各影響濃度の算出には実測値(時間加重平均値)を採用した。

[Table 1 (p.18～19), 付属資料-2]

5.3 ミジンコの観察結果

親ミジンコの死亡数および死亡率

対照区および助剤対照区での親ミジンコの死亡率は暴露終了時点でいずれも3%であり、試験成立条件である20%以下の基準を満たした。

暴露終了時の親ミジンコの死亡率は、0.100 mg/L 区で8%、0.320 mg/L 区で0%、1.00 mg/L 区で3%、3.20 mg/L 区で8%および10.0 mg/L 区で100%であった。

[Table 2-1, 2-2 (p.20), Figure 1 (p.21) 付属資料-3]

初産日

対照区での親ミジンコの初産日は暴露開始7および8日後であり、助剤対照区では全容器とも7日後で、試験成立条件である9日以内の基準を満たした。

各濃度区における親ミジンコの初産日は、0.100 および 0.320 mg/L区で暴露開始7日後、1.00 mg/L区で7および8日後であった。3.20 mg/L区では暴露開始10および14日後であった。また、10.0 mg/L区では幼体は産出されなかった。

[Table 3 (p.22), 付属資料-3]

平均累積産仔数

対照区および助剤対照区の21日間での親ミジンコ1頭当たりの平均累積産仔数は71頭および76頭であり、試験成立条件である平均累積産仔数40頭の基準を満たした。

各濃度区における21日間での親ミジンコ1頭当たりの平均累積産仔数は、0.100 mg/L区で80頭、0.320 mg/L区で62頭、1.00 mg/L区で57頭、3.20 mg/L区では5頭であった。

[Table 4 (p.23), Figure 2 (p.23) 付属資料-3]

親ミジンコの大きさと状態

1.00 mg/L区において暴露開始3および4日後に、親ミジンコが対照区と比較して小さいことが認められた。3.20 mg/L区において暴露開始2日後以降13日後まで、親ミジンコが対照区と比較して小さいことが、さらに14日後以降暴露終了時までにはかなり小さいことが認められた。最高濃度区の10.0 mg/L区においては暴露開始2日後以降、親ミジンコが対照区と比較して小さいことが認められ、開始3日後には全親ミジンコが死亡した。

その他の濃度区においては、全暴露期間を通して対照区と比較して親ミジンコの大きさに差は認められなかった。

休眠卵の発生等

全暴露期間を通して、対照区および全濃度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)

14日間の親ミジンコの半数致死濃度 (LC50) は 4.62 mg/L (Moving average法) で、その95%信頼限界は 3.84~5.71 mg/Lであった。21日間の親ミジンコの半数致死濃度 (LC50) は 4.42 mg/L (Moving average法) で、その95%信頼限界は 3.68~5.43 mg/Lであった。

[Table 5 (p.24)]

5.5 50%繁殖阻害濃度 (ErC50)

14日間の50%繁殖阻害濃度 (ErC50) は、1.86 mg/L (Moving average法) で、その95%信頼限界は 1.59~2.19 mg/Lであった。また、21日間のErC50は、0.924 mg/L (Moving average法) で、その95%信頼限界は 0.793~1.08 mg/Lであった。

[Table 6 (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)

親ミジンコ 1 頭あたりの累積産仔数に及ぼす21日間の最大無作用濃度 (NOECr) は 0.075 mg/L で、最小作用濃度 (LOECr) は 0.260 mg/L であった。

[Table 7 (p.25)]

5.7 試験液の水温、溶存酸素濃度およびpH

21日間の暴露期間中の水温は 19.4~20.4 °Cであり、設定範囲内であった。

溶存酸素濃度は 6.4~8.6 mg/Lであり、全ての試験容器で飽和溶存酸素濃度の60%以上が維持された (20.0°C水中の飽和溶存酸素濃度: 8.8 mg/L)。

pHは 7.5~8.2 であり、変動は1以内であった。

以上のことから、水温、溶存酸素濃度およびpHは、ミジンコの成育条件として適切な範囲内であったと思われる。

[Table 8 (p.26), Table 9 (p.27), Table 10 (p.28)]

以上

Table 1-1 Measured Concentrations of the Test Substance during a 21-day Exposure of *Daphnia magna* under the Semi-Static Test Conditions

Nominal Concentration (mg/L)	Measured Concentration(mg/L)		Percent of Nominal	
	0 day new	2 day old	0 day new	2 day old
Control	< 0.006	< 0.006	—	—
Solvent Control	< 0.006	< 0.006	—	—
0.100	0.093	0.067	93	67
0.320	0.334	0.241	104	75
1.00	0.953	0.777	95	78
3.20	3.05	2.64	95	83
10.0	9.98	10.2	100	102

Nominal Concentration (mg/L)	Measured Concentration(mg/L)		Percent of Nominal	
	6 day new	8 day old	6 day new	8 day old
Control	< 0.006	< 0.006	—	—
Solvent Control	< 0.006	< 0.006	—	—
0.100	0.102	0.054	102	54
0.320	0.335	0.193	105	60
1.00	1.06	0.738	106	74
3.20	3.37	2.60	105	81
10.0	*	*	*	*

new: freshly prepared test solution

old: test solutions 2days after preparation

*: No measurement was made because all parental *Daphnia* were dead.

Table 1-2 Measured Concentrations of the Test Substance during a 21-day Exposure of *Daphnia magna* under the Semi-Static Test Conditions

Nominal Concentration (mg/L)	Measured Concentration(mg/L)		Percent of Nominal	
	14day new	16 day old	14 day new	16day old
Control	< 0.006	< 0.006	----	----
Solvent Control	< 0.006	< 0.006	----	----
0.100	0.097	0.055	97	55
0.320	0.319	0.202	100	63
1.00	0.993	0.761	99	76
3.20	3.25	2.89	102	90
10.0	*	*	*	*

Nominal Concentration (mg/L)	Measured Concentration (mg/L)		Percent of Nominal		Time-weighted Mean during 21days (mg/L)
	18 day new	20 day old	18 day new	20 day old	
Control	< 0.006	< 0.006	----	----	----
Solvent Control	< 0.006	< 0.006	----	----	----
0.100	0.081	0.050	81	50	0.075
0.320	0.281	0.169	88	53	0.260
1.00	0.889	0.615	89	62	0.856
3.20	2.87	2.57	90	80	2.92
10.0	*	*	*	*	10.1**

new: freshly prepared test solution

old: test solutions 2days after preparation

*: No measurement was made because all parental *Daphnia* were dead.

** : Time-weighted Mean during 3days

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

Nominal Conc.	Days																					
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
cont.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1
sol. cont.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1
0.100 mg/L	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	3	3	3	3
0.320 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	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
3.20 mg/L	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	3
10.0 mg/L	0	0	18	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40

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

Nominal Conc. (mg/L)	Measured Conc. (mg/L)	Days					
		1	2	4	7	14	21
cont.	---	0	0	0	0	0	3
sol. cont.	---	0	0	0	0	0	3
0.100	0.075	0	3	3	3	5	8
0.320	0.260	0	0	0	0	0	0
1.00	0.856	0	0	0	3	3	3
3.20	2.92	0	0	0	3	5	8
10.0	10.1	0	45	100	100	100	100

Figure 1 Cumulative Numbers of Dead Parental *Daphnia*

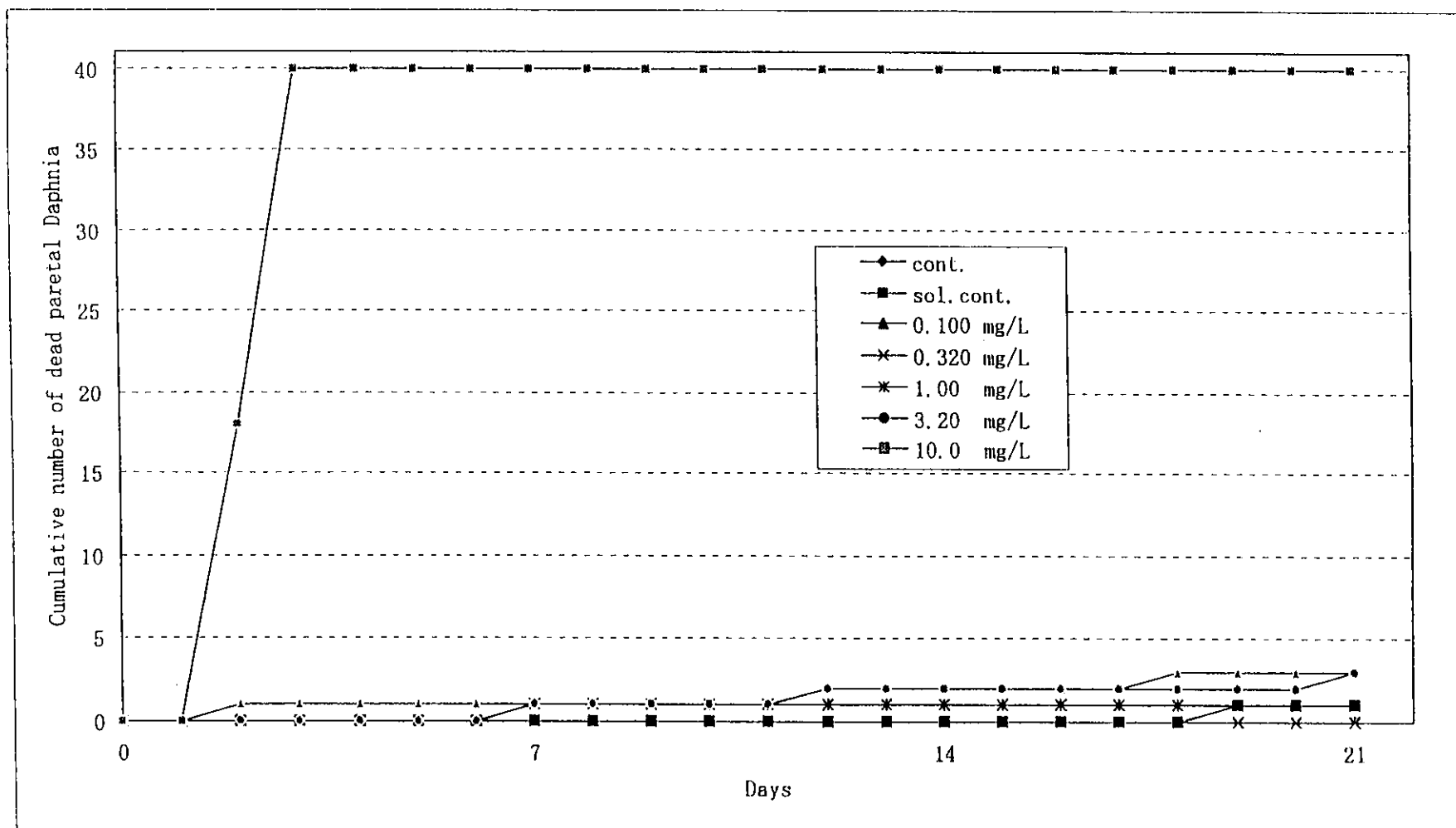


Table 3 Time (day) to First Brood Production

Vessel No.	Nominal Concentration(mg/L)						
	Solvent						
	Control	control	0.100	0.320	1.00	3.20	10.0
1	7	7	7	7	8	10	-
2	7	7	7	7	8	14	-
3	7	7	7	7	7	14	-
4	8	7	7	7	8	10	-
Mean	7.25	7.00	7.00	7.00	7.75	12.00	-

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

Nominal Conc. (mg/L)	Measured Conc. (mg/L)	Days									
		0	7	8	10	12	14	16	18	20	21
cont.	—	0.0	1.8	4.3	11.4	18.3	29.5	32.9	38.0	50.0	71.0
sol. cont.	—	0.0	3.6	4.6	12.1	16.4	19.8	23.2	43.9	51.8	76.1
0.100	0.075	0.0	4.3	5.6	12.0	16.0	22.6	26.5	46.4	53.8	80.3
0.320	0.260	0.0	2.3	3.6	10.0	14.1	17.8	19.9	29.4	36.1	61.7
1.00	0.856	0.0	0.2	3.1	5.2	13.0	21.0	23.6	30.8	40.1	56.6
3.20	2.92	0.0	0.0	0.0	0.1	0.1	2.1	4.4	4.7	5.2	5.4
10.0	10.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

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

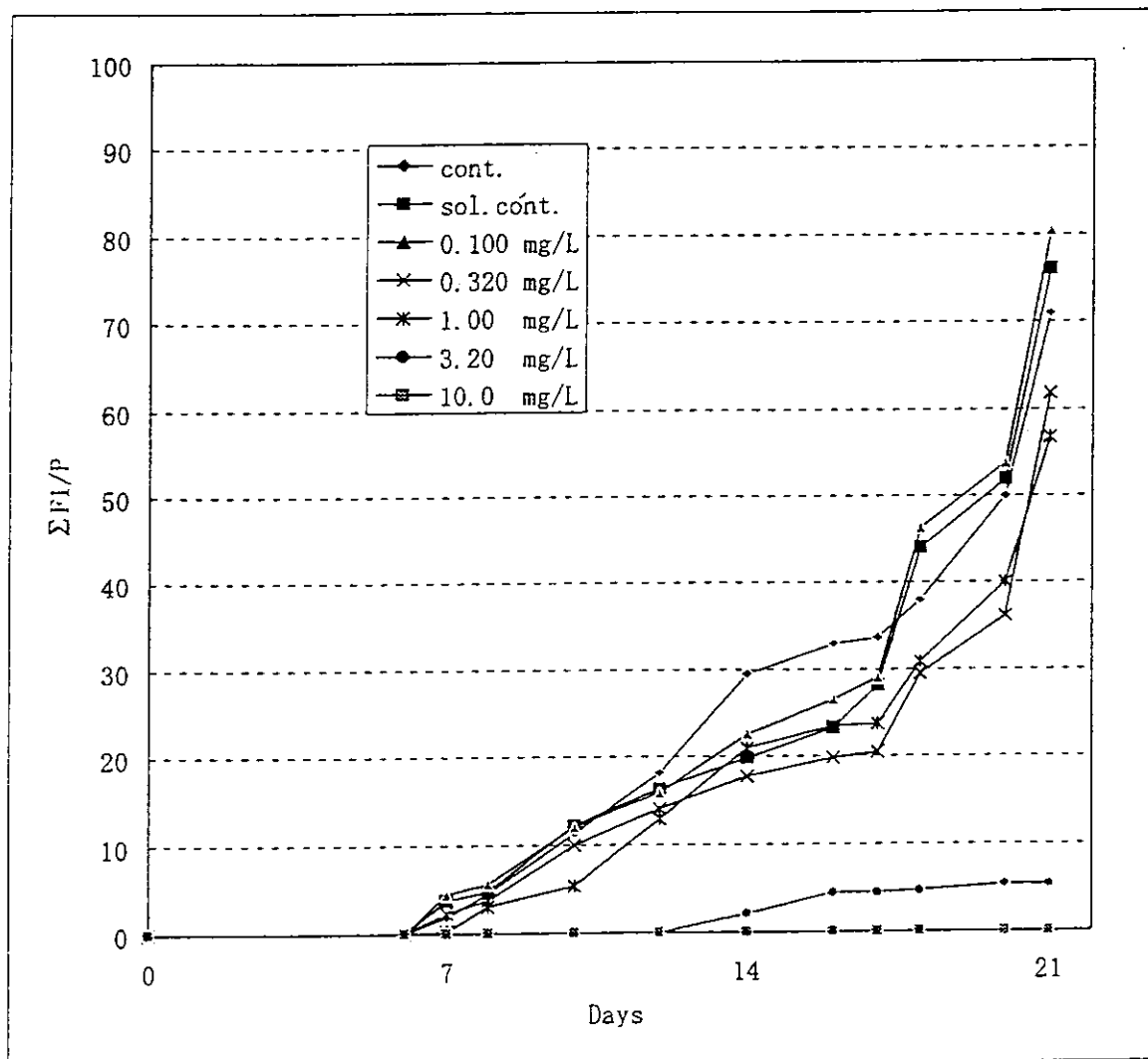


Table 5 Calculated LC50 Values for Parental *Daphnia*

Exposure period (day)	LC50 (mg/L)	95 % Confidence limits (mg/L)	Statistical method
14	4.62	3.84 - 5.71	Moving average
21	4.42	3.68 - 5.43	Moving average

Table 6 Calculated ErC50 Values for Inhibition of Reproduction

Exposure period (day)	ErC50 (mg/L)	95 % Confidence limits (mg/L)	Statistical method
14	1.86	1.59 - 2.19	Moving average
21	0.924	0.793 - 1.08	Moving average

Table 7 Mean cumulative numbers of juveniles produced per adult in
control and test vessels after 21 days
(by Dunnett multiple comparison procedure, Two-sided test)

Vessel No.	Nominal Concentration, mg/L (Measured Concentration, mg/L)						
	Control	Sol. cont.	0.100 (0.075)	0.320 (0.260)	1.00 (0.856)	3.20 (2.92)	10.0 (10.1)
1	66.1	87.0	70.0	59.7	50.7	5.5	0.0
2	86.4	65.5	74.9	61.0	47.0	3.0	0.0
3	66.0	69.3	94.0	67.9	64.0	5.5	0.0
4	65.5	82.7	82.1	58.0	64.8	7.5	0.0
Mean	71.0	76.1	80.3	61.7	56.6	5.4	0.0
S.D.	10.3	10.3	10.4	4.3	9.1	1.8	0.0
Inhibition rate(%)	—		-5.4	19.0	25.6	92.9	100.0
Significant difference				*	**	**	**

*: Indicates a significant difference($\alpha=0.05$) from the solvent control.

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

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

		Temperature, °C						
days		Nominal Concentration (mg/L)						
		Control	Sol. cont	0.100	0.320	1.00	3.20	10.0
2	new	19.8	20.1	20.1	20.2	20.2	20.3	20.3
3	old	—a	—a	—a	—a	—a	—a	19.8
6	new	20.0	20.0	20.1	20.1	20.1	20.4	—
8	old	20.3	19.9	20.0	20.2	20.1	20.3	—
14	new	19.5	19.5	19.4	19.4	19.4	19.4	—
16	old	19.9	20.2	20.0	20.0	20.0	19.9	—
18	new	19.9	19.9	20.0	20.1	20.2	20.3	—
20	old	19.8	19.8	19.9	19.8	19.8	19.8	—

new: freshly prepared test solutions

old: test solutions after 1-2 days exposure

—a : No measurement was made because test solutions were not renewed.

— : No measurement was made because all parental *Daphnia* were dead.

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

D.O. (mg/L)		Nominal Concentration (mg/L)						
days		Control	Sol. cont	0.100	0.320	1.00	3.20	10.0
2	new	8.2	8.2	8.3	8.3	8.3	8.2	8.3
3	old	—a	—a	—a	—a	—a	—a	7.9
6	new	8.0	8.2	8.2	8.2	8.1	8.1	—
8	old	7.7	7.1	7.1	7.2	7.5	8.0	—
14	new	8.3	8.3	8.4	8.4	8.4	8.4	—
16	old	7.0	6.4	6.6	6.5	6.8	7.4	—
18	new	8.5	8.5	8.6	8.6	8.4	8.6	—
20	old	6.8	6.7	6.9	7.1	7.1	8.1	—

new: freshly prepared test solutions

old: test solutions after 1-2 days exposure

—a : No measurement was made because test solutions were not renewed.

— : No measurement was made because all parental *Daphnia* were dead.

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

pH		Nominal Concentration (mg/L)						
days		Control	Sol. cont	0.100	0.320	1.00	3.20	10.0
2	new	8.0	8.2	8.2	8.1	8.1	8.2	8.1
3	old	—a	—a	—a	—a	—a	—a	8.0
6	new	8.1	8.0	8.1	8.2	8.2	8.2	—
8	old	7.7	7.6	7.6	7.6	7.7	7.9	—
14	new	8.1	8.1	8.0	8.1	8.0	8.0	—
16	old	7.7	7.5	7.6	7.5	7.6	7.9	—
18	new	8.2	8.2	8.2	8.2	8.2	8.2	—
20	old	7.6	7.6	7.6	7.7	7.7	8.0	—

new: freshly prepared test solutions

old: test solutions after 1-2 days exposure

—a : No measurement was made because test solutions were not renewed.

— : No measurement was made because all parental *Daphnia* were dead.

付属資料－ 1

希釈水の水質

Water Quality of Dilution Water

Parameter	Concentration
COD	1 mg/L
Total phosphorus	<0.01 mg/L
pH	8.2 (22°C)
Coliform group bacteria	N.D.
Mercury	<0.0001 mg/L
Copper	0.0007 mg/L
Cadmium	<0.001 mg/L
Zinc	0.01 mg/L
Lead	<0.01 mg/L
Aluminium	0.02 mg/L
Nickel	0.01 mg/L
Chromium	<0.005 mg/L
Manganese	<0.1 mg/L
Tin	<0.01 mg/L
Iron	0.12 mg/L
Cyanide	<0.001 mg/L
Free chlorine	<0.01 mg/L
Bromide ion	<0.10 mg/L
Fluoride	0.12 mg/L
Sulfide ion	<0.03 mg/L
Ammonium ion	<0.10 mg/L
Arsenic	<0.005 mg/L
Selenium	<0.005 mg/L
Evaporation residue	150 mg/L
Electric conductivity	180 μ S/cm
Total hardness (as CaCO ₃)	65 mg/L
Alkalinity	52 mg/L
Sodium	10 mg/L
Potassium	1.6 mg/L
Calcium	18 mg/L
Magnesium	5.3 mg/L

measured date: February 4, 1997

付属資料－ 2

試験液の分析方法

試験液の分析方法

1 試験液の分析方法

各試験液 0.75 mLを 測定用バイアルに採取し、アセトニトリル 0.75 mLを加え混合し、HPLCにより分析した。アセトニトリルで調製した標準溶液（5.00 mg/L）は、等量の水で希釈したものを HPLC測定試料とした。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た。

2 高速液体クロマトグラフィー（HPLC）測定条件

（装置）

高速液体クロマトグラフ：	Hewlett Packard製 HP-1100型
ワークステーション：	HPキーステーション (Windows 95)
パソコン：	HP Vectra XM, ディスプレイ； Vectra VCA 1280
プリンター：	HP製 LASER JET 4 PLUS
デガッサー：	G1322A型
送液ポンプ：	G1312A型
オートサンプラ：	G1313A型
カラムオーブン：	G1316A型
紫外可視分光検出器：	G1314A型

（条件）

カラム：	ODS Hypersil, 5 μ m, 4 x125 mm (Hewlett Packard Inc.)
カラム温度：	35℃
溶離液：	Acetonitrile 70 %, Water 30 %
流速：	1.0 mL/min
測定波長：	243 nm
試料注入量：	50 μ L

3 検量線

被験物質の1000 mg/L アセトニトリル溶液を調製し、順次、アセトニトリルで希釈し、0, 0.01, 0.02, 0.05, 0.10, 0.20, 0.50, 1.0, 2.0, 5.0, 10, 20, 50 mg/L の標準溶液を調製した。この標準溶液を一定量採取し水で等量希釈したものをHPLC測定試料とした。横軸に濃度を (mg/L) , 縦軸にピーク面積 (count表示) をとり、検量線を作成した。検量線はほぼ原点を通る直線となり、最小二乗法による直線回帰式の相関係数は1.000と良好であった。

4 定量限界

最小検出ピーク面積を500 countに設定し、これに相当する試験液中の被験物質濃度 0.006 mg/Lを定量限界とした。

5 添加回収試験

HPLC直接注入法のため添加回収試験は実施しなかった。

Figure A-2-1 Calibration Curve by HPLC Analysis

Input Data		
No	Concentration (mg/L)	Peak Area (count)
0	0	0
1	0.01	592
2	0.02	1280
3	0.05	3427
4	0.10	7436
5	0.20	14477
6	0.50	39466
7	1.00	81845
8	2.00	160827
9	5.00	418117
10	10.0	833704
11	20.0	1701386
12	50.0	4251140

$$Y = -3,570 + 85,100 X$$

$$r = 0.999$$

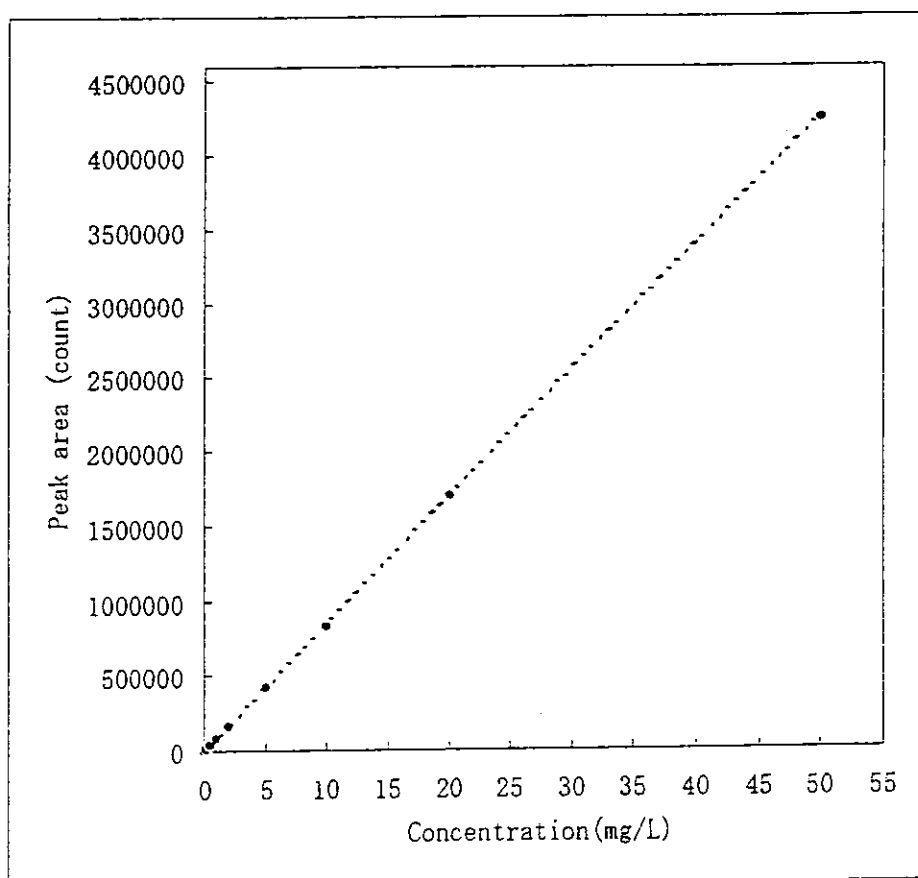
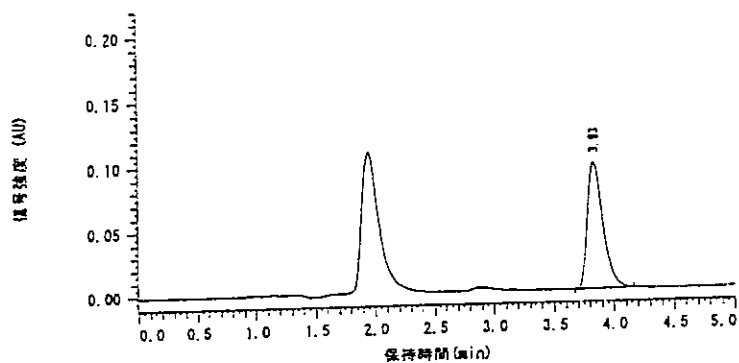


Figure A-2-2 Representative Chromatograms

(1) Standard 5.00 mg/L; Day 0



データ収集用分析ファイル: NDPA-5min
 作成者: XXXXXXXXXX
 システム A (メイン): L-7100
 溶離液 A: ACN 70%
 システム B (補助): L-7100
 溶離液 A: Water 30%
 コラム:
 NDPA, 220nm, 70%ACN

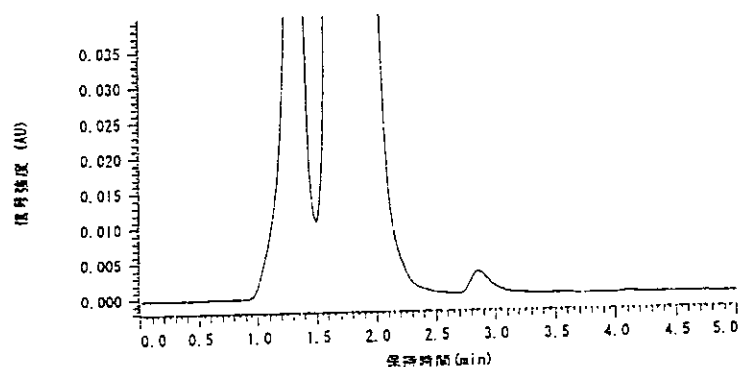
カラム名: Inertsil ODS-2, 150mm

検出器: 面積

定量計算方法: 面積%

NO	保持時間	面積	濃度	BC
1	3.83	427044	100.000	MC
		427044	100.000	

(2) Solvent control ; Day 0 (new)



データ収集用分析ファイル: NDPA-5min
 作成者: XXXXXXXXXX
 システム A (メイン): L-7100
 溶離液 A: ACN 70%
 システム B (補助): L-7100
 溶離液 A: Water 30%
 コラム:
 NDPA, 220nm, 70%ACN

カラム名: Inertsil ODS-2, 150mm

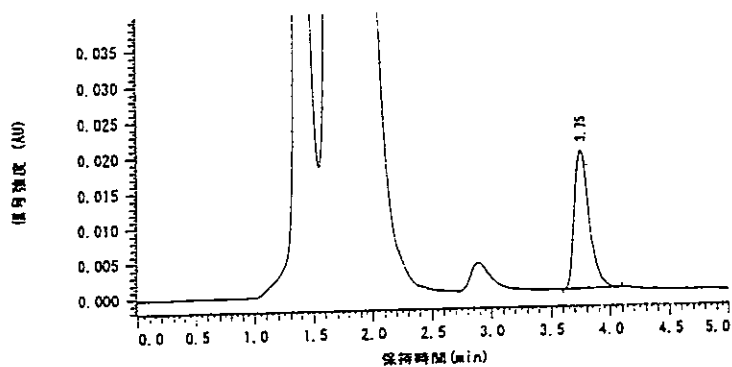
検出器: 面積

定量計算方法: 面積%

NO	保持時間	面積	濃度	BC
		0	0.000	

Figure A-2-2 Continued

(3) 1.00 mg/L nominal; Day 0 (new)



分析用試料: NOPA-5min
作成者:
* ソフトウェア: L-7100
* ソフトウェア: ACN 70%
* ソフトウェア: L-7100
* ソフトウェア: Water 30%
* ソフトウェア: NOPA, 220nm, 70%ACN

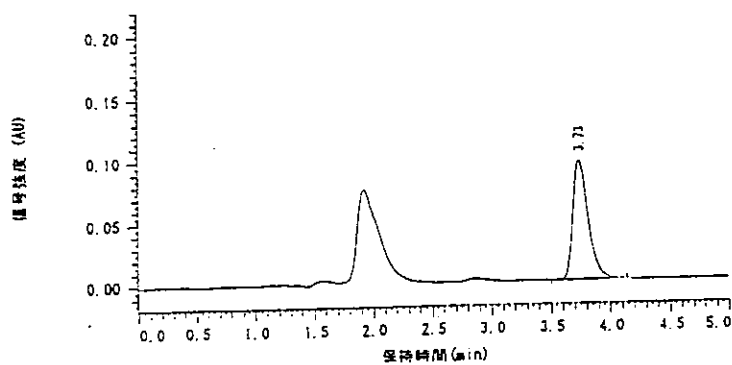
カラム名: Inertsil ODS-2, 150mm

定量方法: 面積

定量計算方法: 面積%

NO	保持時間	面積	濃度1	BC
1	3.75	81418	100.000	BB
		81418	100.000	

(4) Standard 5.00 mg/L; Day 2



分析用試料: NOPA-5min
作成者:
* ソフトウェア: L-7100
* ソフトウェア: ACN 70%
* ソフトウェア: L-7100
* ソフトウェア: Water 30%
* ソフトウェア: NOPA, 220nm, 70%ACN

カラム名: Inertsil ODS-2, 150mm

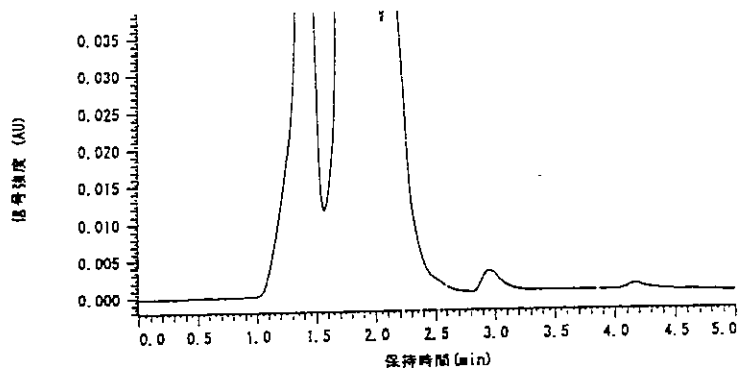
定量方法: 面積

定量計算方法: 面積%

NO	保持時間	面積	濃度1	BC
1	3.73	417342	100.000	BB
		417342	100.000	

Figure A-2-2 Continued

(5) Solvent control ; Day 2 (old)



データ収集用分析ファイル: NDPA-5min

カラム名: Inertsil ODS-2, 150mm

作成者:

ポンプA(メイン): L-7100

溶剤液A: ACN 70%

ポンプB(補助): L-7100

溶剤液B: Water 30%

コナト:

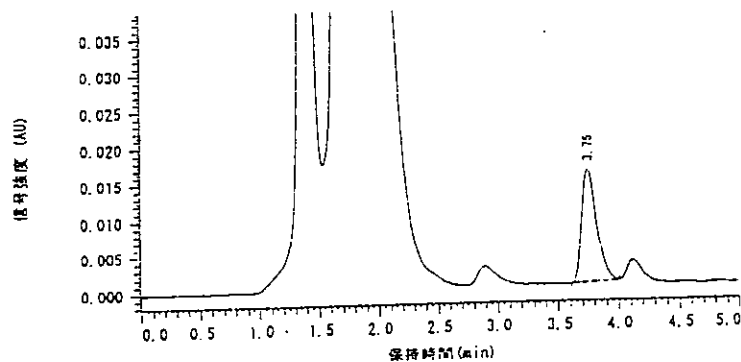
NDPA, 220nm, 70%ACN

ピーク定量: 面積

定量計算方法: 面積%

NO	保持時間	面積	濃度1	BC
		0	0.000	

(6) 1.00 mg/L nominal; Day 2 (old)



データ収集用分析ファイル: NDPA-5min

カラム名: Inertsil ODS-2, 150mm

作成者:

ポンプA(メイン): L-7100

溶剤液A: ACN 70%

ポンプB(補助): L-7100

溶剤液B: Water 30%

コナト:

NDPA, 220nm, 70%ACN

ピーク定量: 面積

定量計算方法: 面積%

NO	保持時間	面積	濃度1	BC
1	3.75	64894	100.000	55
		64894	100.000	

付属資料－3

ミジンコの観察結果

Appendix 3-1 Result of repropduction test

(Test chemical: NDPA)

(Chemical conc.: 0 mg/L, Dispersant conc.: 0 mg/L)

Rep. No.	Counts	Time																					Total
		2/13	2/14	2/15	2/16	2/17	2/18	2/19	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	
		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	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	--	
	Live		0		0		0	14	21		71		85		90		36	6	49		103	186	661
	Dead		0		0		0	7	2		37		37		36		64	1	61		4	0	249
	Total		0		0		0	21	23		108		122		126		100	7	110		107	186	910
	Reproductivity/P		0.0		0.0		0.0	1.4	2.1		7.1		8.5		9.0		3.6	0.6	4.9		10.3	18.6	
	Cumulative reproductivity		0.0		0.0		0.0	1.4	3.5		10.6		19.1		28.1		31.7	32.3	37.2		47.5	66.1	66.1
2	P generation	Live	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	--	
	Live		0		0		0	29	40		55		40		144		48	5	37		161	305	864
	Dead		0		0		0	1	0		16		48		10		1	1	108		2	2	189
	Total		0		0		0	30	40		71		88		154		49	6	145		163	307	1053
	Reproductivity/P		0.0		0.0		0.0	2.9	4.0		5.5		4.0		14.4		4.8	0.5	3.7		16.1	30.5	
	Cumulative reproductivity		0.0		0.0		0.0	2.9	6.9		12.4		16.4		30.8		35.6	36.1	39.8		55.9	86.4	86.4
3	P generation	Live	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	9	9	9	--
	Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	--
	Live		0		0		0	27	1		123		125		69		22	5	40		74	149	635
	Dead		0		0		0	2	0		17		29		14		65	0	65		6	44	242
	Total		0		0		0	29	1		140		154		83		87	5	105		80	193	877
	Reproductivity/P		0.0		0.0		0.0	2.7	0.1		12.3		12.5		6.9		2.2	0.5	4.0		8.2	16.6	
	Cumulative reproductivity		0.0		0.0		0.0	2.7	2.8		15.1		27.6		34.5		36.7	37.2	41.2		49.4	66.0	66.0
4	P generation	Live	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	--	
	Live		0		0		0	0	40		33		28		145		30	16	45		133	185	655
	Dead		0		0		0	0	4		15		95		19		4	0	119		8	51	315
	Total		0		0		0	0	44		48		123		164		34	16	164		141	236	970
	Reproductivity/P		0.0		0.0		0.0	0.0	4.0		3.3		2.8		14.5		3.0	1.6	4.5		13.3	18.5	
	Cumulative reproductivity		0.0		0.0		0.0	0.0	4.0		7.3		10.1		24.6		27.6	29.2	33.7		47.0	65.5	65.5

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

Appendix 3-2 Result of reproduction test

(Test chemical: NDPA)

(Chemical conc.: 0 mg/L, Dispersant conc.: 80 mg/L)

Rep. No.	Counts	Time																					Total
		2/13	2/14	2/15	2/16	2/17	2/18	2/19	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	
		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	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	9	9	9	---
	Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	---
	Live		0		0		0	45	16		93		78		29		29	22	230		51	244	837
	Dead		0		0		0	2	3		7		6		0		0	0	1		1	0	20
	Total		0		0		0	47	19		100		84		29		29	22	231		52	244	867
	Reproductivity/P		0.0		0.0		0.0	4.5	1.6		9.3		7.8		2.9		2.9	2.2	23.0		5.7	27.1	
	Cumulative reproductivity		0.0		0.0		0.0	4.5	6.1		15.4		23.2		26.1		29.0	31.2	54.2		59.9	87.0	87.0
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	0	---
	Live		0		0		0	40	1		57		33		35		31	132	69		83	174	655
	Dead		0		0		0	15	2		0		0		0		1	2	0		0	0	20
	Total		0		0		0	55	3		57		33		35		32	134	69		83	174	675
	Reproductivity/P		0.0		0.0		0.0	4.0	0.1		5.7		3.3		3.5		3.1	13.2	6.9		8.3	17.4	
	Cumulative reproductivity		0.0		0.0		0.0	4.0	4.1		9.8		13.1		16.6		19.7	32.9	39.8		48.1	65.5	65.5
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	0	---
	Live		0		0		0	38	10		56		40		48		41	22	120		120	198	693
	Dead		0		0		0	9	0		5		0		0		0	0	1		2	0	17
	Total		0		0		0	47	10		61		40		48		41	22	121		122	198	710
	Reproductivity/P		0.0		0.0		0.0	3.8	1.0		5.6		4.0		4.8		4.1	2.2	12.0		12.0	19.8	
	Cumulative reproductivity		0.0		0.0		0.0	3.8	4.8		10.4		14.4		19.2		23.3	25.5	37.5		49.5	69.3	69.3
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	0	---
	Live		0		0		0	22	11		94		20		26		33	27	209		53	332	827
	Dead		0		0		0	5	5		25		0		0		1	3	2		0	0	41
	Total		0		0		0	27	16		119		20		26		34	30	211		53	332	868
	Reproductivity/P		0.0		0.0		0.0	2.2	1.1		9.4		2.0		2.6		3.3	2.7	20.9		5.3	33.2	
	Cumulative reproductivity		0.0		0.0		0.0	2.2	3.3		12.7		14.7		17.3		20.6	23.3	44.2		49.5	82.7	82.7

The time (days) to first brood: 1: 7 days, 2: 7 days, 3: 7 days, 4: 7 days.

Appendix 3-3 Result of reproduction test

(Test chemical: NDPA)

(Chemical conc.: 0.100 mg/L, Dispersant conc.: 80 mg/L)

Rep. No.	Counts	Time																					Total		
		2/13	2/14	2/15	2/16	2/17	2/18	2/19	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			
		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	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	--		
	F1 generation	Live		0		0		0	53	10		37		33		62		32	36	137		86	214	700	
			Dead		0		0		0	13	0		9		0		0		0	2	1		0	0	25
			Total		0		0		0	66	10		46		33		62		32	38	138		86	214	725
	Reproductivity/P		0.0		0.0		0.0	5.3	1.0		3.7		3.3		6.2		3.2	3.6	13.7		8.6	21.4			
	Cumulative reproductivity		0.0		0.0		0.0	5.3	6.3		10.0		13.3		19.5		22.7	26.3	40.0		48.6	70.0	70.0		
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	--		
	F1 generation	Live		0		0		0	20	10		66		52		40		26	24	143		15	353	749	
			Dead		0		0		0	3	2		11		0		0		1	3	4		0	0	24
			Total		0		0		0	23	12		77		52		40		27	27	147		15	353	773
	Reproductivity/P		0.0		0.0		0.0	2.0	1.0		6.6		5.2		4.0		2.6	2.4	14.3		1.5	35.3			
	Cumulative reproductivity		0.0		0.0		0.0	2.0	3.0		9.6		14.8		18.8		21.4	23.8	38.1		39.6	74.9	74.9		
3	P generation	Live	10	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	--		
		Dead	0	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	63	10		69		38		106		44	18	189		117	192	846	
			Dead		0		0		0	1	3		11		0		0		1	0	3		1	0	20
			Total		0		0		0	64	13		80		38		106		45	18	192		118	192	866
	Reproductivity/P		0.0		0.0		0.0	7.0	1.1		7.7		4.2		11.8		4.9	2.0	21.0		13.0	21.3			
	Cumulative reproductivity		0.0		0.0		0.0	7.0	8.1		15.8		20.0		31.8		36.7	38.7	59.7		72.7	94.0	94.0		
4	P generation	Live	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	9	9	9	9	9	9	8	8	8	8	--		
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	--		
	F1 generation	Live		0		0		0	28	20		77		31		39		45	22	173		51	222	708	
			Dead		0		0		0	5	1		19		0		0		3	1	5		1	0	36
			Total		0		0		0	33	21		96		31		39		48	23	178		52	222	743
	Reproductivity/P		0.0		0.0		0.0	2.8	2.0		7.7		3.3		4.3		5.0	2.4	20.4		6.4	27.8			
	Cumulative reproductivity		0.0		0.0		0.0	2.8	4.8		12.5		15.8		20.1		25.1	27.5	47.9		54.3	82.1	82.1		

The time (days) to first brood: 1: 7 days, 2: 7 days, 3: 7 days, 4: 7 days.

Appendix 3-4 Result of reproduction test

(Test chemical: NDPA)

(Chemical conc.: 0.320 mg/L, Dispersant conc.: 80 mg/L)

Rep. No.	Counts	Time																					Total		
		2/13	2/14	2/15	2/16	2/17	2/18	2/19	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			
		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	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	--		
	F1 generation	Live		0		0		0	32	5		54		20		49		23	14	85		72	243	597	
			Dead		0		0		0	0	5		10		0		1		0	0	0		1	0	17
			Total		0		0		0	32	10		64		20		50		23	14	85		73	243	614
		Reproductivity/P		0.0		0.0		0.0	3.2	0.5		5.4		2.0		4.9		2.3	1.4	8.5		7.2	24.3		
		Cumulative reproductivity		0.0		0.0		0.0	3.2	3.7		9.1		11.1		16.0		18.3	19.7	28.2		35.4	59.7	59.7	
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	--		
	F1 generation	Live		0		0		0	23	11		83		42		20		21	4	80		17	309	610	
			Dead		0		0		0	0	0		2		5		0		0	1	0		0	0	8
			Total		0		0		0	23	11		85		47		20		21	5	80		17	309	618
		Reproductivity/P		0.0		0.0		0.0	2.3	1.1		8.3		4.2		2.0		2.1	0.4	8.0		1.7	30.9		
		Cumulative reproductivity		0.0		0.0		0.0	2.3	3.4		11.7		15.9		17.9		20.0	20.4	28.4		30.1	61.0	61.0	
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	--		
	F1 generation	Live		0		0		0	18	19		68		50		30		19	3	103		86	283	679	
			Dead		0		0		0	2	1		6		3		0		2	1	0		1	0	16
			Total		0		0		0	20	20		74		53		30		21	4	103		87	283	695
		Reproductivity/P		0.0		0.0		0.0	1.8	1.9		6.8		5.0		3.0		1.9	0.3	10.3		8.6	28.3		
		Cumulative reproductivity		0.0		0.0		0.0	1.8	3.7		10.5		15.5		18.5		20.4	20.7	31.0		39.6	67.9	67.9	
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	--		
	F1 generation	Live		0		0		0	17	17		52		54		49		20	4	88		91	188	580	
			Dead		0		0		0	0	10		5		5		0		0	0	2		0	0	22
			Total		0		0		0	17	27		57		59		49		20	4	90		91	188	602
		Reproductivity/P		0.0		0.0		0.0	1.7	1.7		5.2		5.4		4.9		2.0	0.4	8.8		9.1	18.8		
		Cumulative reproductivity		0.0		0.0		0.0	1.7	3.4		8.6		14.0		18.9		20.9	21.3	30.1		39.2	58.0	58.0	

The time (days) to first brood: 1: 7 days, 2: 7 days, 3: 7 days, 4: 7 days.

Appendix 3-5 Result of reproduction test

(Test chemical: NDPA)

(Chemical conc.: 1.00 mg/L, Dispersant conc.: 80 mg/L)

Rep. No.	Counts	Time																					Total		
		2/13	2/14	2/15	2/16	2/17	2/18	2/19	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			
		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	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	--		
	F1 generation	Live		0		0		0	0	44		22		49		93		7	2	66		121	103	607	
			Dead		0		0		0	0	13		3		0		2		0	1	1		1	1	22
		Total		0		0		0	0	57		25		49		95		7	3	67		122	104	629	
	Reproductivity/P		0.0		0.0		0.0	0.0	4.4		2.2		4.9		9.3		0.7	0.2	6.6		12.1	10.3			
	Cumulative reproductivity		0.0		0.0		0.0	0.0	4.4		6.6		11.5		20.8		21.5	21.7	28.3		40.4	60.7	60.7		
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	--		
	F1 generation	Live		0		0		0	0	35		21		76		99		18	4	38		57	122	470	
			Dead		0		0		0	0	15		5		0		0		0	2	1		0	0	23
		Total		0		0		0	0	50		26		76		99		18	6	39		57	122	493	
	Reproductivity/P		0.0		0.0		0.0	0.0	3.5		2.1		7.6		9.9		1.8	0.4	3.8		5.7	12.2			
	Cumulative reproductivity		0.0		0.0		0.0	0.0	3.5		5.6		13.2		23.1		24.9	25.3	29.1		34.8	47.0	47.0		
3	P generation	Live	10	10	10	10	10	10	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	--		
		Dead	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	--		
	F1 generation	Live		0		0		0	8	18		15		77		79		29	2	103		101	145	577	
			Dead		0		0		0	1	7		17		0		1		0	0	0		1	2	29
		Total		0		0		0	9	25		32		77		80		29	2	103		102	147	606	
	Reproductivity/P		0.0		0.0		0.0	0.8	2.0		1.7		8.6		8.8		3.2	0.2	11.4		11.2	16.1			
	Cumulative reproductivity		0.0		0.0		0.0	0.8	2.8		4.5		13.1		21.9		25.1	25.3	36.7		47.9	64.0	64.0		
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	--		
	F1 generation	Live		0		0		0	0	17		25		100		41		44	2	62		83	274	648	
			Dead		0		0		0	0	4		12		5		2		0	1	0		0	0	24
		Total		0		0		0	0	21		37		105		43		44	3	62		7	274	672	
	Reproductivity/P		0.0		0.0		0.0	0.0	1.7		2.5		10.0		4.1		4.4	0.2	6.2		8.3	27.4			
	Cumulative reproductivity		0.0		0.0		0.0	0.0	1.7		4.2		14.2		18.3		22.7	22.9	29.1		37.4	64.8	64.8		

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

Appendix 3-6 Result of reprodution test

(Test chemical: NDPA)

(Chemical conc.: 3.20 mg/L, Dispersant conc.: 80 mg/L)

Rep. No.	Counts	Time																					Total
		2/13	2/14	2/15	2/16	2/17	2/18	2/19	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	
		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	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	--
	F1 generation	Live		0		0		0	0	0	3		0		16		14	0	2		14	6	55
		Dead		0		0		0	0	0	1		0		0		0	0	0		14	0	15
		Total		0		0		0	0	0	4		0		16		14	0	2		28	6	70
	Reproductivity/P			0.0		0.0		0.0	0.0	0.0	0.3		0.0		1.6		1.4	0.0	0.2		1.4	0.6	
	Cumulative reproductivity			0.0		0.0		0.0	0.0	0.0	0.3		0.3		1.9		3.3	3.3	3.5		4.9	5.5	5.5
	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	--
	F1 generation	Live		0		0		0	0	0	0		0		2		24	0	3		1	0	30
		Dead		0		0		0	0	0	3		0		4		4	0	1		0	0	12
		Total		0		0		0	0	0	3		0		6		28	0	4		1	0	42
2	Reproductivity/P			0.0		0.0		0.0	0.0	0.0	0.0		0.0		0.2		2.4	0.0	0.3		0.1	0.0	
	Cumulative reproductivity			0.0		0.0		0.0	0.0	0.0	0.0		0.0		0.2		2.6	2.6	2.9		3.0	3.0	3.0
	P generation	Live	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	9	--
		Dead	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		0		14		29	0	5		5	2	55
		Dead		0		0		0	0	0	3		0		1		4	0	0		2	0	10
		Total		0		0		0	0	0	3		0		15		33	0	5		7	2	65
	Reproductivity/P			0.0		0.0		0.0	0.0	0.0	0.0		0.0		1.4		2.9	0.0	0.5		0.6	0.2	
	Cumulative reproductivity			0.0		0.0		0.0	0.0	0.0	0.0		0.0		1.4		4.3	4.3	4.8		5.3	5.5	5.5
	P generation	Live	10	10	10	10	10	9	9	9	9	9	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	--
		Dead	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	--
3	F1 generation	Live		0		0		0	0	0	1		1		37		21	0	1		0	0	61
		Dead		0		0		0	0	0	1		0		0		2	0	0		1	0	4
		Total		0		0		0	0	0	2		1		37		23	0	1		1	0	65
	Reproductivity/P			0.0		0.0		0.0	0.0	0.0	0.1		0.1		4.6		2.6	0.0	0.1		0.0	0.0	
	Cumulative reproductivity			0.0		0.0		0.0	0.0	0.0	0.1		0.2		4.8		7.4	7.4	7.5		7.5	7.5	7.5
	P generation	Live	10	10	10	10	10	9	9	9	9	9	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	--
		Dead	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	--
	F1 generation	Live		0		0		0	0	0	1		1		37		21	0	1		0	0	61
		Dead		0		0		0	0	0	1		0		0		2	0	0		1	0	4
		Total		0		0		0	0	0	2		1		37		23	0	1		1	0	65
	Reproductivity/P			0.0		0.0		0.0	0.0	0.0	0.1		0.1		4.6		2.6	0.0	0.1		0.0	0.0	
	Cumulative reproductivity			0.0		0.0		0.0	0.0	0.0	0.1		0.2		4.8		7.4	7.4	7.5		7.5	7.5	7.5

The time (days) to first brood: 1: 10 days, 2: 14 days, 3: 14 days, 4: 10 days.

Appendix 3-7 Result of reproduction test

(Test chemical: NDPA)

(Chemical conc.: 10.0 mg/L, Dispersant conc.: 80 mg/L)

Rep. No.	Counts	Time																					Total
		2/13	2/14	2/15	2/16	2/17	2/18	2/19	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	
		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	10	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	--
		Dead	0	5	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	--
		Live		0	0																		0
	F1 generation	Dead		0	0																		0
		Total		0	0																		0
	Reproductivity/P			0.0	0.0																		
	Cumulative reproductivity			0.0	0.0																		0.0
2	P generation	Live	10	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	--
		Dead	0	6	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	--
		Live		0	0																		0
	F1 generation	Dead		0	0																		0
		Total		0	0																		0
	Reproductivity/P			0.0	0.0																		
	Cumulative reproductivity			0.0	0.0																		0.0
3	P generation	Live	10	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	--
		Dead	0	4	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	--
		Live		0	0																		0
	F1 generation	Dead		0	0																		0
		Total		0	0																		0
	Reproductivity/P			0.0	0.0																		
	Cumulative reproductivity			0.0	0.0																		0.0
4	P generation	Live	10	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	--
		Dead	0	3	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	--
		Live		0	0																		0
	F1 generation	Dead		0	0																		0
		Total		0	0																		0
	Reproductivity/P			0.0	0.0																		
	Cumulative reproductivity			0.0	0.0																		0.0

The time (days) to first brood: 1: - days, 2: - days, 3: - days, 4: - days.