

環境省殿

最 終 報 告 書

2,3-ジメチルアニリンのオオミジンコ (*Daphnia magna*) に対する繁殖阻害試験

(試験番号：第15043号)

2004年3月31日

財団法人 日本食品分析センター 多摩研究所

試験実施概要

1. 表 題：2,3-ジメチルアニリンのオオミジンコ (*Daphnia magna*) に対する繁殖阻害試験
2. 試験目的：2,3-ジメチルアニリンのオオミジンコ (*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. 試験方法：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)に準拠
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」(環安第242号, 2001年)
5. 試験委託者：
 - 1) 名称：環境省
 - 2) 住所：〒100-8975 東京都千代田区霞ヶ関1丁目2番2号
 - 3) 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 [REDACTED]
6. 試験受託者：
 - 1) 名称：財団法人 日本食品分析センター
 - 2) 住所：〒151-0062 東京都渋谷区元代々木町52番1号
 - 3) 代表者：[REDACTED]
7. 試験施設：
 - 1) 名称：財団法人 日本食品分析センター 多摩研究所
 - 2) 住所：〒206-0025 東京都多摩市永山6丁目11番10号
〒206-0025 東京都多摩市永山6丁目21番6号(別館)
 - 3) 運営管理者：[REDACTED] (多摩研究所長)

8. 試験責任者

所 属：環境科学部環境生物安全課
氏 名：[REDACTED]

9. 分析担当責任者

所 属：応用試験部 農薬試験課
氏 名：[REDACTED]

10. 試験担当者

生物系

所 属：環境科学部 環境生物安全課
氏 名：[REDACTED]

分析系

所 属：応用試験部 農薬試験課
氏 名：[REDACTED]

11. 試験日程

試験開始日：2003年12月1日

実験開始日：2003年12月8日(本試験1回目)

実験中止日：2003年12月19日(本試験1回目)

実験開始日：2004年1月19日(本試験2回目[再試験1回目])

実験中止日：2004年1月28日(本試験2回目[再試験1回目])

実験開始日：2004年3月2日(本試験3回目[再試験2回目])

実験終了日：2004年3月23日(本試験3回目[再試験2回目])

試験終了日：2004年3月31日

12. 記録及び資料の保管

試験に関する下記の記録及び試資料は、1) については最終報告書作成後10年間または品質低下を起さずに保存し得る期間のいずれか短い方の期間、2) から5) については10年間、財団法人日本食品分析センター多摩研究所資料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別途協議の上、定める。

- 1) 被験物質
- 2) 試験計画書
- 3) 生データ及び最終報告書
- 4) 信頼性保証部門の検閲記録
- 5) その他必要なもの

13. 最終報告書の承認

試験責任者

所 属： 財団法人 日本食品分析センター 多摩研究所 環境科学部環境生物安全課

氏 名：   2004年 3月 31日 承認

目次

	頁
要 旨	7
1 被験物質	9
1.1 名称, 構造式及び物理化学的性状	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 試験容器及び恒温槽等	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	12
3.7 試験操作	12
4 結果の算出	13
4.1 結果の算出に用いた試験濃度の決定	13
4.2 親ミジンコの半数致死濃度 (LC_{50}) の算出	13
4.3 50 %繁殖阻害濃度 (EC_{50}) の算出	13
4.4 最大無作用濃度 (NOEC) 及び最小作用濃度 (LOEC)	13
4.5 試験容器間の均一性解析	13
4.6 統計的手法	14
5 結果及び考察	14
5.1 試験液中の被験物質濃度	14
5.2 試験液の状態	14
5.3 ミジンコの観察結果	14
5.4 親ミジンコの半数致死濃度 (21d- LC_{50})	15
5.5 50 %繁殖阻害濃度 (EC_{50})	15
5.6 最大無作用濃度 (NOEC) 及び最小作用濃度 (LOEC)	15
5.7 試験液の水溫, 溶存酸素濃度, pH 及び硬度	16
5.8 試験計画書からの逸脱事項	16
5.9 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
5.10 試験の妥当性	16
5.11 結果の評価と考察	16

Table 1～2	17～18
Figure 1	19
Table 3～4	20～21
Figure 2～3	22
Table 5～11	23～26
付属資料-1 希釈水の水質	27
付属資料-2 予備試験結果	28
付属資料-3 統計処理データ	29～32
付属資料-4 試験液中の被験物質濃度の分析方法	33～37
付属資料-5 ミジンコの観察結果	38～46

要 旨

試験委託者

環境省

表 題

2,3-ジメチルアニリンのオオミジンコ (*Daphnia magna*) に対する繁殖阻害試験

試験番号

第15043号

試験方法

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) に準拠

- 1) 被験物質：2,3-ジメチルアニリン
- 2) 暴露方式：半止水式 (48 時間毎全量換水)
- 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, 0.032, 0.056, 0.10, 0.18, 0.32, 0.56 及び 1.0 mg/l
公比 ; 1.8
- 6) 試験液量 : 80 ml/容器
- 7) 連 数 : 10 容器/1 試験区
- 8) 供試生物数 : 10 頭/試験区 (1 頭/1 容器)
- 9) 試験温度 : 19.0~20.3 °C
- 10) 溶存酸素濃度 : 8.5~9.4 mg/l (暴露期間中, エアレーションは行わなかった。)
- 11) pH : 7.6~8.2 (試験液の pH 調整は行わなかった。)
- 12) 硬 度 : 71~79 mg/l (CaCO₃ 換算)
- 13) 照 明 : 室内光, 16 時間明期/8 時間暗期
- 14) 餌 料 : 単細胞緑藻類 [*Chlorella vulgaris* 及び *Scenedesmus subspicatus* を 1:1 (V/V) に混合した。]
(藻類培養液を遠心操作により, 希釈水に置換して給餌した。)
- 15) 給 餌 量 : 開始時~7 日後 ; 0.10~0.15 mgC (有機体炭素) /頭/日
8 日後~14 日後 ; 0.15 mgC (有機体炭素) /頭/日
15 日後~20 日後 ; 0.15 mgC (有機体炭素) /頭/日
- 16) 希 釈 水 : 水道水 (茨城県つくば市) を脱塩素したもの
- 17) 分 析 法 : 高速液体クロマトグラフ法

結 果

以下の値は測定値(算術平均)を基に示した。

- 1) 親ミジンコの半数致死濃度(21d-LC₅₀)
算出せず(濃度-死亡率間に用量反応性が認められなかったため、算出を行わなかった。)
- 2) 50 %繁殖阻害濃度(EC₅₀)
0.18 mg/l (95 %信頼区間 ; 0.17~0.19 mg/l) Logit 法により算出した。
- 3) 最大無作用濃度(NOEC)
0.091 mg/l, Dunnett の多重比較検定法により算出した。
- 4) 最小作用濃度(LOEC)
0.17 mg/l, Dunnett の多重比較検定法により算出した。

1 被験物質

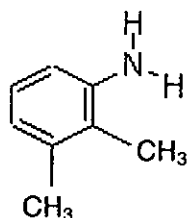
1.1 名称、構造式及び物理化学的性状

名 称： 2,3-ジメチルアニリン

別 名： o-キシリジン¹⁾, 2,3-キシリジン¹⁾, 2,3-ジメチルフェニルアミン¹⁾
2,3-アミノジメチルベンゼン¹⁾

CAS No.: 87-59-2

構造式：



分子式： $C_8H_{11}N$

分子量： 121.2¹⁾

沸点： 221~222 °C²⁾

融点： 2.5 °C¹⁾, <-15 °C²⁾

水溶解度： 微溶¹⁾, 水に難溶²⁾

比重： —

pKa： —

logPow： 2.21¹⁾

蒸気圧： 0.1 mmHg (25 °C)¹⁾

その他： 難分解性²⁾

出典：

1) 浦野 紘平：“PRTR・MSDS対象化学物質の毒性ランクと物性情報”， 第1版, 496 (2001)
化学工業日報社

2) [REDACTED]

1.2 供試試料

純度： 99.2 %

ロット番号： SEE4863

供給者： [REDACTED]

受領量： 25 ml×4本

受領日： 2003年11月28日

外観： 暗赤色澄明の液体

1.3 保管方法及び保管条件下での安定性

1) 保管方法

被験物質は当センターの被験物質保管庫(冷蔵庫)に保管した。

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分光光度計により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。また、試験終了時にも同様にスペクトルを測定し、試験開始前のスペクトルと変化が認められないことを確認した。その結果、被験物質は保管条件下において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 等：自家繁殖(2003年3月7日、国立環境研究所より入手)

4) 基準物質による検定の結果：基準物質(重クロム酸カリウム、試薬特級)による48時間の半量泳阻害濃度(EiC₅₀)は0.47 mg/l(2003年11月10日)であった。当センターにおける1995年12月以降のEiC₅₀値のバックグラウンドデータ(0.55±0.15 mg/l)と比較した結果、供試生物の感受性は、通常の状態にあると判断した。

5) 試験使用の齢：雌の幼体(生後24時間以内齢)

6) 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。この幼体を供試ミジンコの親とし、以下の条件で25日間(2004年2月6日～3月2日)飼育した。成熟し幼体を産むようになったら1週間に3回幼体を除去した。暴露開始前日に育苗内に幼体を持つ雌成体を選別し、翌日(24時間以内)、親ミジンコ(25日齢)より産出された幼体を試験に用いた。

試験には、産出された幼体から健康で肉眼的に正常な個体をランダムに選別して使用した。産仔が初産の場合や親ミジンコの死亡が多い容器は使用しなかった。なお、飼育期間中、親ミジンコの成育は良好で、産出幼体の死産、墮胎卵、休眠卵及び雄の発生は認められなかった。飼育密度を35頭から25頭/l飼育水に変更した以降の親ミジンコの死亡率は17%であった。

親ミジンコの飼育条件

① 飼 育 水：希釈水(3.2参照)

② 飼育方法：半止水式(週3回全量換水を行った。)

③ 飼育容器：1 l 容ガラス製ビーカー

④ 飼育密度：開始時～4日後；35頭/l飼育水，5日後～25日後；25頭/l飼育水

⑤ 水 温：19.6～20.7℃

⑥ 照 明：室内光，16時間明期/8時間暗期

⑦ 餌 料：単細胞緑藻類(*Chlorella vulgaris*)

(藻類培養液を遠心操作により、希釈水に置換して給餌した。)

- ⑧ 給 餌：開始時～7日後 ; 0.01～0.06 mgC (有機体炭素) /頭/日
8日後～14日後 ; 0.06～0.10 mgC (有機体炭素) /頭/日
15日後～25日後 ; 0.10～0.12 mgC (有機体炭素) /頭/日

3 試験方法

3.1 試験条件

- 1) 暴露方式：半止水式 (48 時間毎全量換水)
- 2) 暴露期間：21 日間
- 3) 試験液量：80 ml/容器
- 4) 連 数：10 容器/1 試験区
- 5) 供試生物数：10 頭/試験区 (1 頭/1 容器)
- 6) 試験温度：19.0～20.3 ℃
- 7) 溶存酸素濃度：8.5～9.4 mg/l (暴露期間中，エアレーションは行わなかった。)
- 8) pH : 7.6～8.2 (試験液の pH 調整は行わなかった。)
- 9) 硬 度：71～79 mg/l (CaCO₃ 換算)
- 10) 照 明：室内光，16 時間明期/8 時間暗期
- 11) 餌 料：単細胞緑藻類 [*Chlorella vulgaris* 及び *Scenedesmus subspicatus* を 1:1 (V/V) に混合した。]
(藻類培養液を遠心操作により，希釈水に置換して給餌した。)
- 12) 給 餌 量：開始時～7日後 ; 0.10～0.15 mgC (有機体炭素) /頭/日
8日後～14日後 ; 0.15 mgC (有機体炭素) /頭/日
15日後～20日後 ; 0.15 mgC (有機体炭素) /頭/日

3.2 希釈水

脱塩素水 (水道水 (茨城県つくば市) を充分通気し，残留塩素等を除去したもの。) を使用した。
脱塩素水使用時には，残留塩素が無いことを確認した。硬度は 75 mg/l (CaCO₃ 換算)，pH は 7.3 であった。

希釈水の定期的な水質測定結果は付属資料-1 に示した。

3.3 試験容器及び恒温槽等

- 1) 試験容器：100 ml 容ガラス製ビーカー (容器のサイズ；内径 約 5 cm×高さ 約 7 cm) を用いた。
試験容器にはゴミの侵入や試験液の蒸散を防ぐ意味で蓋をした。
- 2) 恒 温 室：21.84R-4410 [日立冷熱株式会社]
- 3) 水 温 計：AP-210 [安立計器株式会社]
- 4) 溶存酸素計：DO-14P [東亜ディーケーケー株式会社]
- 5) pH 計：HM-14P [東亜ディーケーケー株式会社]
- 6) 塩素比色計：OT-I 型 [理研光学株式会社]

3.4 試験濃度の設定

繁殖阻害試験の予備試験(暴露期間 13 日間)結果より、1.0 mg/l の濃度区では墮胎卵及び産仔された幼体に死亡個体が多く、0.10 mg/l の濃度区では対照区と同等の産仔が認められたことに基づき、本試験では、当初、1.0 mg/l 以下の濃度を公比 1.8 で 7 濃度区を設定し、試験を開始したが、本試験 1 回目では、暴露開始から 9～11 日後、本試験 2 回目(再試験)では 8～9 日後の対照区において産仔された幼体に生残個体が少なく、死亡個体が多く観察されたことから、実験を中止した。

明確な原因が不明であったため、試験実施状況等の検討確認を行ったが特に問題は認められず、繁殖試験において時折経験することがある何らかの要因によって、多くの死亡幼体が観察されたと判断した。

以上の経緯から、本試験 3 回目(再試験 2 回目)では、試験濃度の変更等は行わずに、1.0 mg/l 以下の濃度を公比 1.8 で 7 濃度区(0.032, 0.056, 0.10, 0.18, 0.32, 0.56 及び 1.0 mg/l)設定した。

なお、予備試験の結果は付属資料-2 に示した。

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、恒温室内で 20 ± 1 ℃にした。

被験物質を超音波処理により希釈水に溶解させ被験物質原液を調製した。

この被験物質原液を希釈水に添加して各濃度区の試験液を調製した。

対照区には、希釈水のみが無処理の対照区を設けた。

なお、被験物質は純度が 99.2 %と高純度であったため、純度を考慮せず秤取した。よって、設定した試験濃度は、供試試料の濃度として示した。また、被験物質原液は用時調製とした。

3.6 試験液の分析

試験液中の被験物質濃度の分析は、高速液体クロマトグラフを用いて、全試験区について暴露開始時(0日後)、2日後の換水前、6日後の換水後、8日後の換水前、14日後の換水後及び16日後の換水前の計6回行い、その算術平均値を求めた。暴露開始時、6及び14日後の換水後は、分析用試料を同時に調製した容器から試験液を採取して分析用試験液とした。また、2、8及び16日後の換水前は、各試験区のそれぞれ10連の試験容器から全量混合した試験液を採取し、それぞれ分析用試験液とした。採取量は、対照区、0.032 mg/l及び0.056 mg/l濃度区では200 ml、その他の濃度区では100 mlとした。

なお、分析方法は付属資料-4 に示した。

3.7 試験操作

試験液の水溫、溶存酸素濃度、pH及び硬度を測定後、供試ミジンコを投入し、その時点を暴露開始時とした。先端が比較的広口のガラスピペットを用いて供試ミジンコを投入した。その際、試験液量に対して、ピペット内の希釈水は全量で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日後まで飼育した。暴露期間中は毎日給餌を行った。

・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載した。計数後の死亡個体は取り除いた。換水時に新しい試験液に移す際は、古い試験液は極力入らないようにした。

[産出幼体]：最初の産仔から毎日幼体の生存数を計数し、計数後の幼体は取り除いた。死亡幼体、墮胎卵、休眠卵の発生等についてはその有無を観察した。最初の幼体産出日（初産日）を記録した。

・水質測定

各試験区の水温、溶存酸素濃度及びpHを、全試験区について、暴露開始時、換水前後及び暴露終了時に測定した。また、各試験区の硬度を、全試験区について、暴露開始時、2日後の換水前、6日後の換水後、8日後の換水前、14日後の換水後及び16日後の換水前に測定した。

暴露開始時及び各時間の換水後については同一容器で調製した試験液について実施した。各換水前及び暴露終了時には全容器から全量混合したものについて実施した。

なお、暴露期間中の試験液についてはその状態（外観等）を観察し、記録した。

4 結果の算出

4.1 結果の算出に用いた試験濃度の決定

結果の算出に用いた試験濃度は測定値（算術平均）とした。

4.2 親ミジンコの半数致死濃度（LC₅₀）の算出

本試験では、各濃度区において10～60 %の親ミジンコの死亡が観察されたが、濃度と死亡率の間に用量反応性が認められなかったため、21日間の50 %致死濃度（LC₅₀）の算出は行わなかった。

また、死亡数の試験区別の経時変化のグラフを記載した。

4.3 50 %繁殖阻害濃度（EC₅₀）の算出

対照区と各濃度区において21日間生存した親1頭当たりの平均累積産仔数から算出した繁殖阻害率を用いて、Logit法により、21日間の50 %繁殖阻害濃度（EC₅₀）を算出した。それらの95 %信頼区間も算出した。また、平均累積産仔数の試験区別の経時変化のグラフを記載した。

4.4 最大無作用濃度（NOEC）及び最小作用濃度（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、各試験区と対照区との有意差の有無をBartlettの等分散検定、一元配置分散分析（ANOVA）及びDunnettの多重比較検定（片側、有意水準： $\alpha=0.05$ ）により求め、対照区と有意差の認められない最高濃度（NOEC）及び有意差の認められる最低濃度（LOEC）を決定した。

* 最大無作用濃度（NOEC）：繁殖状態に対照区と有意差の認められない最高濃度

最小作用濃度（LOEC）：繁殖状態に対照区と有意差の認められる最低濃度

4.5 試験容器間の均一性解析

異常値が認められなかったため、試験容器間の均一性解析は実施しなかった。

4.6 統計的手法

本試験結果に使用した統計ソフトを以下に示した。また、統計ソフトの入力値とその出力結果を付属資料-3に示した。

Eco-Tox Statics version 2.2

5 結果及び考察

5.1 試験液中の被験物質濃度

暴露開始時, 2日後の換水前, 6日後の換水後, 8日後の換水前, 14日後の換水後及び16日後の換水前に試験液中の被験物質濃度を測定し, その結果をTable 1に示した。

暴露開始時, 6日後の換水後及び14日後の換水後の試験液中の測定濃度は, それぞれ0.026~1.00 mg/l, 0.029~0.984 mg/l, 0.031~1.01 mg/l (設定濃度: 0.032~1.0 mg/l)であり, 設定濃度に対する割合は, 暴露開始時が81~100%, 6日後の換水後が88~98%及び14日後の換水後が95~101%であった。

また, 2日後の換水前, 8日後の換水前及び16日後の換水前の試験液中の測定濃度は, それぞれ0.028~0.946 mg/l, 0.026~0.979 mg/l, 0.024~0.947 mg/l (設定濃度: 0.032~1.0 mg/l)であり, 設定濃度に対する割合は, 2日後の換水前が88~95%, 8日後の換水前が80~98%及び16日後の換水前が75~96%であった。

各濃度区の設定濃度に対する測定濃度の算術平均値は0.032 mg/lで0.027 mg/l, 0.056 mg/lで0.051 mg/l, 0.10 mg/lで0.091 mg/l, 0.18 mg/lで0.165 mg/l, 0.32 mg/lで0.304 mg/l, 0.56 mg/lで0.537 mg/l及び1.0 mg/lで0.978 mg/lであり, 測定濃度は設定濃度の±20%以内を維持できた。よって, 本被験物質は試験液中で安定であったと考えられた。

以上のことから, 以下の値(親ミジンコの半数致死濃度, 50%繁殖阻害濃度, 最大無作用濃度及び最小作用濃度)は測定値から算出した算術平均値を基に示した。

5.2 試験液の状態

暴露開始時の試験液は無色透明であった。また, 2日後の換水前の試験液は, 全ての濃度において開始時と比較して変化が認められなかった。

5.3 ミジンコの観察結果

1) 親ミジンコの累積死亡数及び死亡率

21日後の親ミジンコの死亡率は対照区及び0.027 mg/lで10%, 0.051 mg/lで20%, 0.091 mg/lで50%, 0.165 mg/l及び0.304 mg/lで60%, 0.537 mg/lで20%, 0.978 mg/lで50%であった。

各試験区における親ミジンコの累積死亡数をTable 2-1及びFigure 1に示した。親ミジンコの死亡率をTable 2-2に示した。

2) 親ミジンコの状態

暴露開始より9日後から、遊泳障害が0.051 mg/lの濃度区で2個体、0.091 mg/lの濃度区で5個体、0.165 mg/l及び0.304 mg/lの濃度区で6個体、0.537 mg/lの濃度区で2個体観察された。0.978 mg/lの濃度区では暴露開始より12～13日後に遊泳障害が2個体観察された。なお、対照区と比較して小さい個体は全ての濃度区で観察されなかった。

3) 産出幼体等の状態

暴露開始より8日以降、死亡幼体及び墮胎卵が全ての濃度区で観察された。死亡幼体及び墮胎卵を産出する個体の割合は、高濃度区になるほど高くなった。また、対照区においても、わずかながら死亡幼体及び墮胎卵が観察された。なお、全ての試験区で休眠卵の発生は認められなかった。

4) 初産日

各濃度区の初産日は、0.027 mg/l、0.051 mg/l及び0.091 mg/lで7～9日後、0.165 mg/l及び0.304 mg/lで8～9日後、0.537 mg/l及び0.978 mg/lで8～12日後であった。

対照区は9日後であった。

各試験区における初産日をTable 3に示した。

5) 平均累積産仔数

各濃度区の21日後の生存親1頭当たりの平均累積産仔数は、0.027 mg/lで178.0頭、0.051 mg/lで166.8頭、0.091 mg/lで154.6頭、0.165 mg/lで98.5頭、0.304 mg/lで14.8頭、0.537 mg/lで1.3頭及び0.978 mg/lで0.6頭であった。

対照区の生存親1頭当たりの平均累積産仔数は、164.9頭であった。

各試験区における生存親1頭当たりの平均累積産仔数をTable 4及びFigure 2に示した。

5.4 親ミジンコの半数致死濃度(21d-LC₅₀)

21日後の親ミジンコの半数致死濃度(21d-LC₅₀)をTable 5及び以下に示した。

親ミジンコの半数致死濃度(21d-LC₅₀): 算出せず*

*濃度-死亡率間に用量反応性が認められなかったため、算出を行わなかった。

5.5 50%繁殖阻害濃度(EC₅₀)

21日後の50%繁殖阻害濃度(EC₅₀)をTable 6及び以下に示した。また、濃度-繁殖阻害率のグラフをFigure 3に示した。

50%繁殖阻害濃度(EC₅₀): 0.18 mg/l(95%信頼区間; 0.17～0.19 mg/l)

Logit法により算出した。

5.6 最大無作用濃度(NOEC)及び最小作用濃度(LOEC)

最大無作用濃度(NOEC)及び最小作用濃度(LOEC)をTable 7及び以下に示した。

最大無作用濃度 (NOEC) : 0.091 mg/l (Dunnett の多重比較検定法により算出した。)

最小作用濃度 (LOEC) : 0.17 mg/l (Dunnett の多重比較検定法により算出した。)

5.7 試験液の水溫、溶存酸素濃度、pH 及び硬度

試験液の水溫を Table 8, 溶存酸素濃度を Table 9, pH を Table10, 硬度を Table11 に示した。

暴露期間中の各試験区の水溫は 19.0~20.3 °C, 溶存酸素濃度は 8.5~9.4 mg/l, pH は 7.6~8.2, 硬度は 71~79 mg/l (CaCO₃ 換算) であり, 水溫は 20±1 °C, 溶存酸素濃度は 3 mg/l 以上, pH は 6.0~9.0, 硬度は 10~250 mg/l の範囲で試験環境条件を満たしていた。

5.8 試験計画書からの逸脱事項

なし。

5.9 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

なし。

5.10 試験の妥当性

暴露終了時に対照区の親ミジンコの死亡率が 10 % (20 %以下), 平均累積産仔数が 164.9 頭 (60 頭以上) であったため, 本試験の成立が確認された。

5.11 結果の評価と考察

試験液中の被験物質濃度の分析結果から, 被験物質濃度は一定に保たれていたことが確認された。よって, 暴露期間中の供試生物は, ほぼ設定濃度通りの被験物質に連続的に暴露されていたと判断した。

本試験では, 親ミジンコの死亡について, 濃度と死亡率に用量反応性が認められなかった。本試験で設定した試験濃度範囲のうち, 0.165 mg/l を中心とした前後の濃度区では初産と親ミジンコの遊泳阻害が同時に観察される傾向にあり, 最高試験濃度区では, それらとは関係なく死亡が観察されたことから, 本被験物質による特徴的な影響であると考えられた。

なお, 本試験では対照区の産仔において死産が観察された。これらは, 産出された生存幼体に対して, わずかな数であり, 繁殖試験において時折観察される程度の状態であったことから, 試験結果に与える影響は無いと判断した。

Table 1. Measured Concentration of the Test Substance in the Test Water during 21-day Exposure Period

(Semi-Static Condition)

Nominal Concentration (mg/l)	Date	Measured Concentration (mg/l)												Mean ^a Measured Concentration (mg/l)	Percent of Nominal
		0 (New)	Percent of Nominal	2 (Old)	Percent of Nominal	6 (New)	Percent of Nominal	8 (Old)	Percent of Nominal	14 (New)	Percent of Nominal	16 (Old)	Percent of Nominal		
Control		< 0.002	---	< 0.002	---	< 0.002	---	< 0.002	---	< 0.002	---	< 0.002	---	---	---
0.032		0.026	81	0.028	88	0.029	91	0.026	81	0.031	97	0.024	75	0.027	84
0.056		0.056	100	0.052	93	0.049	88	0.047	84	0.053	95	0.046	82	0.051	91
0.10		0.092	92	0.091	91	0.092	92	0.087	87	0.096	96	0.088	88	0.091	91
0.18		0.177	98	0.170	94	0.169	94	0.144	80	0.177	98	0.151	84	0.165	92
0.32		0.312	98	0.299	93	0.310	97	0.288	90	0.320	100	0.294	92	0.304	95
0.56		0.557	99	0.528	94	0.550	98	0.508	91	0.546	98	0.535	96	0.537	96
1.0		1.00	100	0.946	95	0.984	98	0.979	98	1.01	101	0.947	95	0.978	98

a : Arithmetic Mean, New : freshly prepared test solution, Old : test solution after 48 Hours exposure

	Concentration (mg/l)			% of Nominal		
	Min.		Max.	Min.		Max.
New	0.026	~	1.01	81	~	101
Old	0.024	~	0.979	75	~	98

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

Nominal Concentration (mg/l)	Mean ^a Measured Concentration (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	1	1	1	1	1	1	1	1
0.032	0.027	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
0.056	0.051	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
0.10	0.091	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	2	2	2	4	4	4	5	5	5	5	5
0.18	0.165	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	5	5	5	5	5	5	5	5	6	6	6	6
0.32	0.304	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	4	5	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
0.56	0.537	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
1.0	0.978	0	0	2	2	3	3	3	3	3	3	3	3	3	4	5	5	5	5	5	5	5	5	5

a : Arithmetic Mean

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

Nominal Concentration (mg/l)	Mean ^a Measured Concentration (mg/l)	Days					
		1	2	4	7	14	21
Control	—	0	0	0	0	0	10
0.032	0.027	0	0	0	0	10	10
0.056	0.051	0	0	0	0	20	20
0.10	0.091	0	0	0	0	20	50
0.18	0.165	0	0	0	0	50	60
0.32	0.304	0	0	0	0	60	60
0.56	0.537	0	0	0	0	20	20
1.0	0.978	0	20	30	30	50	50

a : Arithmetic Mean

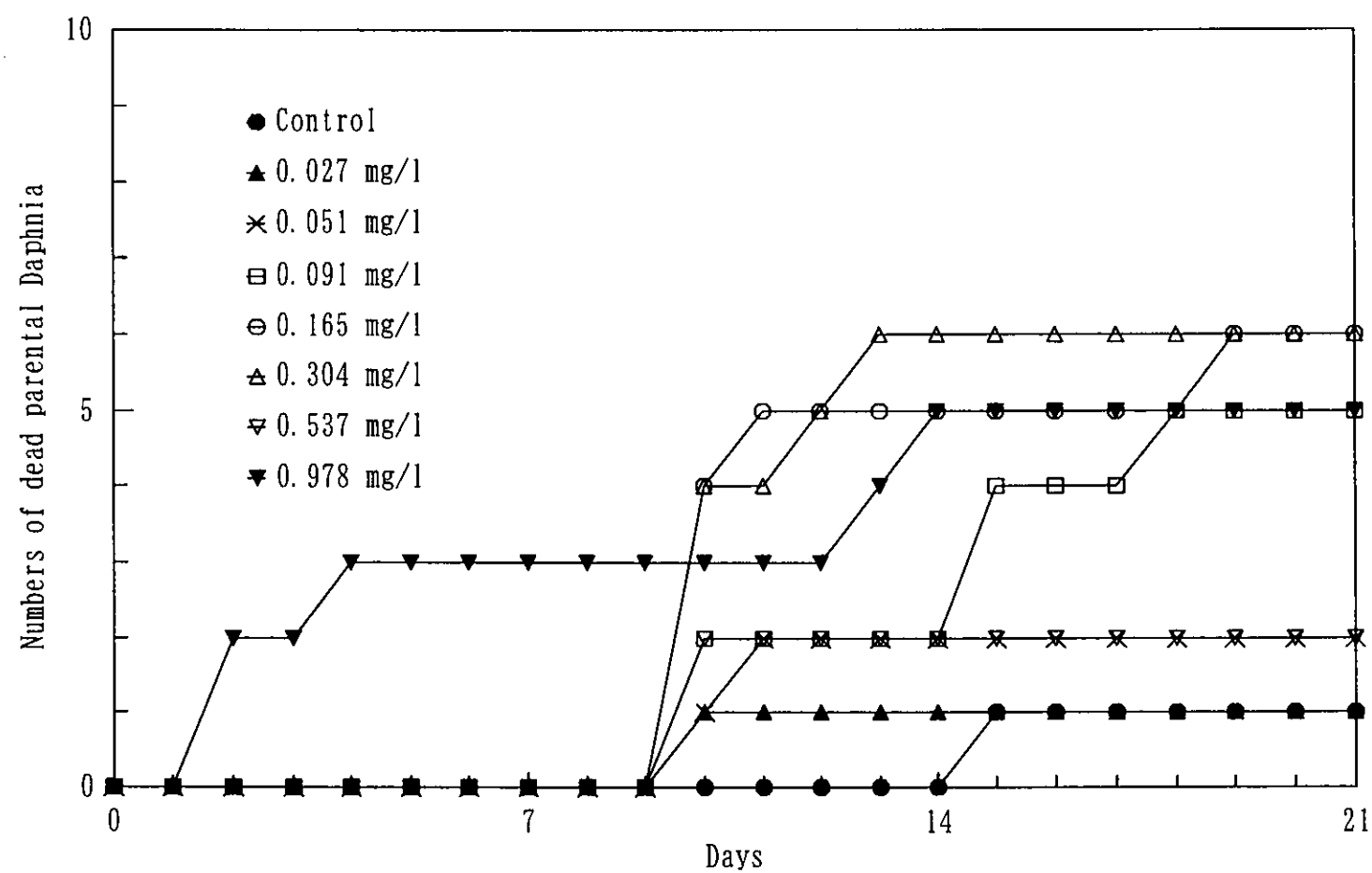


Figure 1. Cumulative Numbers of Dead Parental *Daphnia*

Table 3. Time (Days) to First Brood Production

No.	Nominal Concentration (mg/l)							
	[Mean ^a Measured Concentration (mg/l)]							
	Control	0.032 [0.027]	0.056 [0.051]	0.10 [0.091]	0.18 [0.165]	0.32 [0.304]	0.56 [0.537]	1.0 [0.978]
1	9	7	8	9 (D)	9 (D)	9 (D)	10	— (D)
2	9	9	7	7	8 (D)	9 (D)	11	— (D)
3	9	9	9	9 (D)	9 (D)	9	12	8 (D)
4	9 (D)	7	9	9	8	9	10	8
5	9	9	9	8	9 (D)	9 (D)	10	12 (D)
6	9	9	9	9 (D)	9 (D)	— (D)	— (D)	— (D)
7	9	9 (D)	9	7	8	9 (D)	9 (D)	8
8	9	9	9 (D)	9 (D)	8	8	8	11
9	9	9	9 (D)	8 (D)	8	9 (D)	11	8
10	9	9	8	9	9 (D)	8	8	8
Min.	9	7	7	7	8	8	8	8
Max.	9	9	9	9	9	9	12	12

a : Arithmetic Mean

D : The parental *Daphnia* was dead during a 21-day testing period.

— : No brood production was observed during a 21-day testing period.

Table 4. Mean Cumulative Numbers of Living Young per Surviving Parental *Daphnia* for 21 Days ($\Sigma F1/P$)
(Base for the data were the values standardized on the numbers of surviving parental *Daphnia* of each of the ten parallels.)

Nominal Concentration (mg/l)	Mean ^a Measured Concentration (mg/l)	Days															
		6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
Control	—	0.0	0.0	0.0	13.0	13.0	13.0	44.8	44.8	44.8	89.8	89.8	89.8	130.3	130.3	130.3	164.9
0.032	0.027	0.0	1.0	1.0	15.6	18.8	32.8	56.0	56.2	72.8	94.1	94.2	111.4	138.0	138.0	152.2	178.0
0.056	0.051	0.0	0.5	1.9	11.8	20.9	23.3	45.9	57.3	63.5	86.2	99.5	105.9	129.3	141.2	147.1	166.8
0.10	0.091	0.0	2.0	4.8	9.6	19.8	27.4	45.6	66.0	73.2	94.4	99.4	107.0	125.0	130.8	139.2	154.6
0.18	0.165	0.0	0.0	0.3	0.3	6.3	6.3	6.3	35.5	35.8	35.8	69.5	69.8	69.8	98.5	98.5	98.5
0.32	0.304	0.0	0.0	0.3	0.5	1.0	1.3	1.8	4.3	4.3	6.8	10.8	10.8	12.3	12.5	12.5	14.8
0.56	0.537	0.0	0.0	0.0	0.0	0.3	0.3	0.4	0.4	0.4	1.0	1.0	1.0	1.1	1.1	1.1	1.3
1.0	0.978	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.2	0.4	0.4	0.4	0.6	0.6

a : Arithmetic Mean

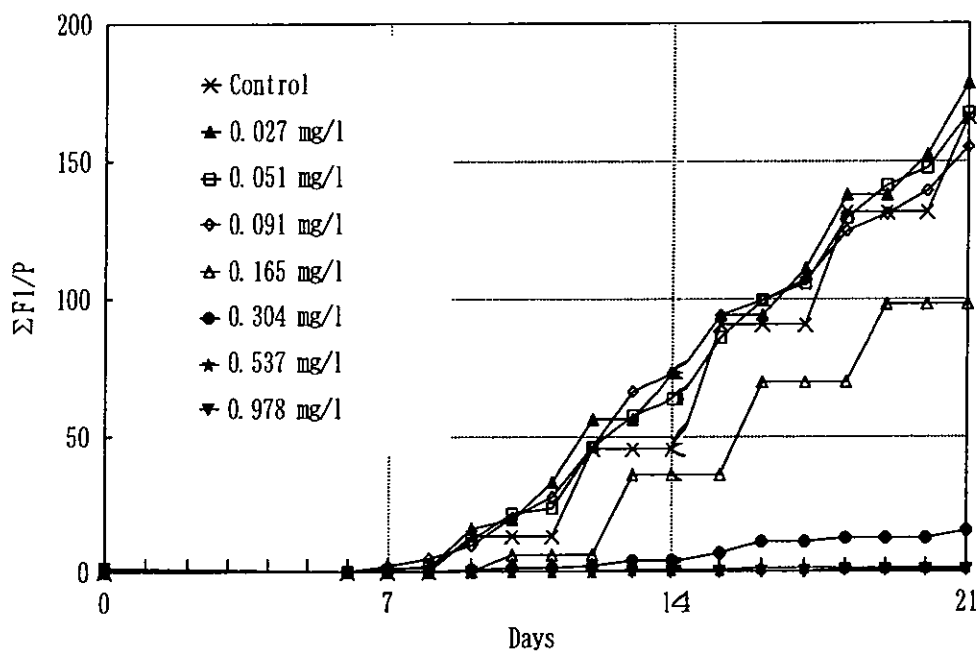


Figure 2. Time Course of $\Sigma F1/P$ for Each Concentration Level

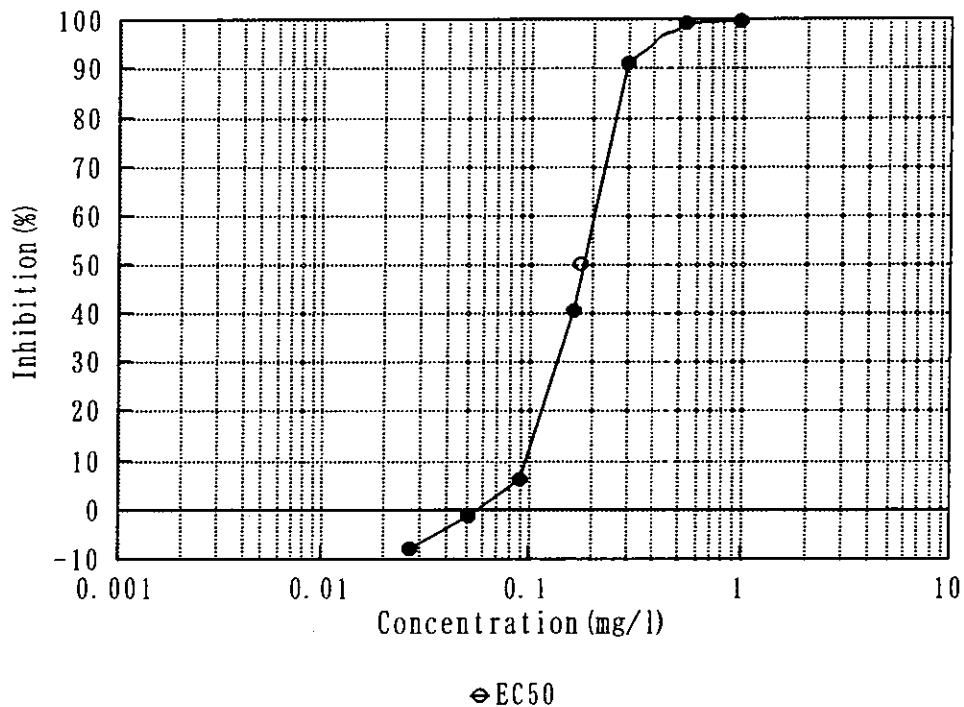


Figure 3. Concentration- Inhibition of Reproduction Curve

Table 5. Calculated LC_{50} Values for Parental *Daphnia*

Exposure Period (Days)	LC_{50} (mg/l)	95-Percent Confidence Limits (mg/l)	Statistical Method
21	not calculated	—	—

Table 6. Calculated EC_{50} Values for Inhibition of Reproduction

Exposure Period (Days)	EC_{50} (mg/l)	95-Percent Confidence Limits (mg/l)	Statistical Method
21	0.18	0.17~0.19	Logit

Table 7. Cumulative Numbers of Living Young per Surviving Parental *Daphnia* for 21 Days in Each Test Vessel and Result of Statistical Comparison of the Mean Values (by Dunnett's Multicomparison Test)

No.	Nominal Concentration (mg/l)							
	[Mean ^a Measured Concentration (mg/l)]							
	Control	0.032 [0.027]	0.056 [0.051]	0.10 [0.091]	0.18 [0.165]	0.32 [0.304]	0.56 [0.537]	1.0 [0.978]
1	173	222	186	D	D	D	6	D
2	186	179	205	160	D	D	0	D
3	160	175	140	D	D	27	1	D
4	D	215	132	131	69	1	1	0
5	166	216	186	169	D	D	1	D
6	158	202	154	D	D	D	D	D
7	168	D	162	158	105	D	D	1
8	159	133	D	D	115	15	0	2
9	167	99	D	D	105	D	1	0
10	147	161	169	155	D	16	0	0
Mean	164.9	178.0	166.8	154.6	98.5	14.8	1.3	0.6
S. D.	10.9	41.7	24.8	14.2	20.2	10.7	2.0	0.9
Inhibition rate (%)		-7.9	-1.2	6.2	40.3	91.0	99.2	99.6
Significant difference		—	—	—	**	**	**	**
NOEC				○				
LOEC					○			

a : Arithmetic Mean

** : $\alpha=0.01$ (significant difference)

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

Table 8. Temperature

(Semi-Static Condition)

Nominal Concentration (mg/l)	Mean ^a Measured Concentration (mg/l)	Date	Temperature (°C)						Min.	Max.
			0 New	2 Old	6 New	8 Old	14 New	16 Old		
Control	—		19.3	19.8	20.2	19.9	20.3	19.7	19.3	20.3
0.032	0.027		19.4	19.6	19.3	20.2	19.3	19.6	19.3	20.2
0.056	0.051		19.4	19.6	19.3	20.3	19.2	19.4	19.2	20.3
0.10	0.091		19.9	19.8	19.4	20.2	19.1	19.5	19.1	20.2
0.18	0.165		19.7	20.0	19.0	20.2	19.2	19.8	19.0	20.2
0.32	0.304		19.6	19.8	19.2	20.3	19.2	19.6	19.2	20.3
0.56	0.537		19.6	20.0	19.0	20.2	19.2	19.6	19.0	20.2
1.0	0.978		19.7	20.2	19.4	20.3	19.5	19.7	19.4	20.3
Range									19.0	20.3

a : Arithmetic Mean

New : Freshly prepared test solution , Old : Test solution after 48 hours exposure

Table 9. Dissolved Oxygen Concentration

(Semi-Static Condition)

Nominal Concentration (mg/l)	Mean ^a Measured Concentration (mg/l)	Date	Dissolved Oxygen Concentration (mg/l)						Min.	Max.
			0 New	2 Old	6 New	8 Old	14 New	16 Old		
Control	—		8.9	8.7	8.9	9.2	9.0	9.0	8.7	9.2
0.032	0.027		8.8	9.2	8.9	8.7	8.9	8.7	8.7	9.2
0.056	0.051		8.8	9.2	8.9	8.5	8.8	8.8	8.5	9.2
0.10	0.091		8.8	9.3	8.9	8.7	8.9	8.7	8.7	9.3
0.18	0.165		8.8	9.3	8.9	8.6	8.9	8.9	8.6	9.3
0.32	0.304		8.9	9.4	8.8	8.8	8.9	9.2	8.8	9.4
0.56	0.537		8.9	9.3	8.8	8.9	8.9	8.8	8.8	9.3
1.0	0.978		8.7	9.3	8.8	9.3	8.9	9.0	8.7	9.3
Range									8.5	9.4

a : Arithmetic Mean

New : Freshly prepared test solution , Old : Test solution after 48 hours exposure

Table 10. pH Values

(Semi-Static Condition)

Nominal Concentration (mg/l)	Mean ^a Measured Concentration (mg/l)	Date	pH						Min.	Max.
			0 New	2 Old	6 New	8 Old	14 New	16 Old		
Control	—		7.8	7.9	7.6	7.7	7.6	7.6	7.6	7.9
0.032	0.027		7.7	8.1	7.7	7.7	7.8	7.6	7.6	8.1
0.056	0.051		7.7	8.1	7.7	7.6	7.8	7.6	7.6	8.1
0.10	0.091		7.7	8.1	7.8	7.6	7.8	7.6	7.6	8.1
0.18	0.165		7.7	8.1	7.8	7.6	7.8	7.8	7.6	8.1
0.32	0.304		7.7	8.2	7.8	7.7	7.8	8.0	7.7	8.2
0.56	0.537		7.8	8.2	7.8	7.7	7.8	7.6	7.6	8.2
1.0	0.978		7.8	8.2	7.8	8.0	7.8	7.9	7.8	8.2
Range									7.6	

a : Arithmetic Mean

New : Freshly prepared test solution , Old : Test solution after 48 hours exposure

Table 11. Total Hardness (as CaCO₃)

(Semi-Static Condition)

Nominal Concentration (mg/l)	Mean ^a Measured Concentration (mg/l)	Date	Total Hardness (as CaCO ₃ , mg/l)						Min.	Max.
			0 New	2 Old	6 New	8 Old	14 New	16 Old		
Control	—		76	77	76	79	76	77	76	79
0.032	0.027		74	75	74	76	73	76	73	76
0.056	0.051		73	75	75	78	75	77	73	78
0.10	0.091		73	75	73	77	75	77	73	77
0.18	0.165		75	75	75	79	75	77	75	
0.32	0.304		74	76	75	79	71	74	71	79
0.56	0.537		74	77	74	77	74	79	74	79
1.0	0.978		74	76	74	76	74	78	74	78
Range									71	79

a : Arithmetic Mean

New : Freshly prepared test solution , Old : Test solution after 48 hours exposure

付属資料-1：希釈水の水質

Quality of Test Water

Parameter	Concentration	Parameter	Concentration
pH Value	8.0 (17℃)	Iprobenfos (IBP)	< 0.0005 mg/l
Coliform Group	Not Detected	Chlornitrofen (CNP)	< 0.00001 mg/l
Total residue	200 mg/l	Chemical oxygen demand (COD _{Cr})	< 10 mg/l
Phenols	< 0.005 mg/l	Biochemical oxygen demand	< 1 mg/l
Total hardness (as CaCO ₃)	74 mg/l	Suspended solids	< 1 mg/l
NO ₃ -N and NO ₂ -N	< 0.2 mg/l	Phosphorus	< 0.01 mg/l
Fluorine	0.15 mg/l	Bromide ion	< 0.5 mg/l
Dichloromethane	< 0.001 mg/l	Sulfide ion (S ²⁻)	< 0.01 mg/l
Carbon tetrachloride	< 0.0002 mg/l	Electricconductivity (25℃)	32 mS/m
1,2-Dichloroethane	< 0.0002 mg/l	Alkalinity (CaCO ₃)	48 mg/l
1,1-Dichloroethylene	< 0.001 mg/l	Total organic carbon (TOC)	1.6 mg/l
Cis-1,2-Dichloroethylene	< 0.001 mg/l	Ammonium nitrogen (NH ₃ -N)	< 0.04 mg/l
1,1,1-Trichloroethane	< 0.001 mg/l	PCB	< 0.0005 mg/l
1,1,2-Trichloroethane	< 0.0005 mg/l	Mercury	< 0.0001 mg/l
Trichloroethylene	< 0.001 mg/l	Cadmium	< 0.001 mg/l
Tetrachloroethylene	< 0.001 mg/l	Cyanide	< 0.005 mg/l
1,3-Dichloropropene	< 0.0002 mg/l	Lead	< 0.001 mg/l
Benzene	< 0.001 mg/l	Chromium (VI)	< 0.005 mg/l
Chloroform	< 0.001 mg/l	Arsenic	< 0.001 mg/l
Thiram	< 0.0005 mg/l	Selenium	< 0.001 mg/l
Simazine (CAT)	< 0.0002 mg/l	Nickel	< 0.001 mg/l
Thiobencarb	< 0.001 mg/l	Copper	< 0.01 mg/l
Isoxathion	< 0.0005 mg/l	Zinc	< 0.005 mg/l
Diazinon	< 0.0005 mg/l	Aluminum	< 0.05 mg/l
Fenitrothion (MEP)	< 0.0002 mg/l	Manganese	< 0.005 mg/l
Isoprotiolane	< 0.001 mg/l	Iron	< 0.03 mg/l
Chlorothalonil (TPN)	< 0.001 mg/l	Tin	< 0.1 mg/l
Propyzamide	< 0.0005 mg/l	Sodium	31 mg/l
EPN	< 0.0005 mg/l	Potassium	6.1 mg/l
Dichlorvos (DDVP)	< 0.001 mg/l	Calcium	17 mg/l
Fenobucarb (BPMC)	< 0.001 mg/l	Magnesium	7.6 mg/l

Date: December 5, 2003

付属資料-2：予備試験結果

予備試験結果を Table 1 に示した。

Table 1. Cumulative Numbers of Living Young per Surviving Parental *Daphnia* for 13 Days in Each Test Vessel

No.	Nominal Concentration (mg/l)			
	Control	0.010	0.10	1.0
1	36	55	44	0
2	31	44	50	0
3	56	69	39	0
4	31	29	42	0
5	42	50	49	0
6	23	35	45	0
7	51	48	26	0
8	25	30	D	0
9	38	57	52	0
10	38	38	26	0
Mean	37.1	45.5	41.4	0.0
S. D.	10.5	12.8	9.6	0.0
Inhibition rate (%)		-22.6	-11.6	100

付属資料-3：統計処理データ

統計ソフトの入力値とその出力結果を以下に示した。

Input Data

ミジンコ 繁殖試験 (産仔) 1X10, 4X10

DMA

ファイル名= 2110008 更新日: 2004/03/23

区 濃度 連 実測数 (影響・死亡) -----

	mg/L	(log)	0	21 day	7	0.537	(-0.27)	1	0	6
1	0	(-)	1	0	173	7	0.537	(-0.27)	2	0
1	0	(-)	2	0	186	7	0.537	(-0.27)	3	0
1	0	(-)	3	0	160	7	0.537	(-0.27)	4	0
1	0	(-)	4	0	166	7	0.537	(-0.27)	5	0
1	0	(-)	5	0	158	7	0.537	(-0.27)	6	0
1	0	(-)	6	0	168	7	0.537	(-0.27)	7	0
1	0	(-)	7	0	159	7	0.537	(-0.27)	8	0
1	0	(-)	8	0	167	8	0.978	(-9.66)	1	0
1	0	(-)	9	0	147	8	0.978	(-9.66)	2	0
2	0.027	(-1.56)	1	0	222	8	0.978	(-9.66)	3	0
2	0.027	(-1.56)	2	0	179	8	0.978	(-9.66)	4	0
2	0.027	(-1.56)	3	0	175	8	0.978	(-9.66)	5	0
2	0.027	(-1.56)	4	0	215					
2	0.027	(-1.56)	5	0	216	[対照に対する] 割合 (%)				
2	0.027	(-1.56)	6	0	202	区	濃度	21d		
2	0.027	(-1.56)	7	0	133	mg/L	(log)	oung		
2	0.027	(-1.56)	8	0	99	1	0.027	(-1.56)	-7.951	
2	0.027	(-1.56)	9	0	161	2	0.051	(-1.29)	-1.128	
3	0.051	(-1.29)	1	0	186	3	0.091	(-1.04)	6.2399	
3	0.051	(-1.29)	2	0	205	4	0.165	(-0.78)	40.262	
3	0.051	(-1.29)	3	0	140	5	0.304	(-0.51)	91.054	
3	0.051	(-1.29)	4	0	132	6	0.537	(-0.27)	99.241	
3	0.051	(-1.29)	5	0	186	7	0.978	(-9.66)	99.636	
3	0.051	(-1.29)	6	0	154	EC50 計算に用いたデータ (Probit, Logit 法)				
3	0.051	(-1.29)	7	0	162	区	濃度	21d		
3	0.051	(-1.29)	8	0	169	mg/L	(log)	Start	oung	
4	0.091	(-1.04)	1	0	160	1	0.027	(-1.56)	164.88	1.6489
4	0.091	(-1.04)	2	0	131	2	0.051	(-1.29)	164.88	1.6489
4	0.091	(-1.04)	3	0	169	3	0.091	(-1.04)	164.88	10.288
4	0.091	(-1.04)	4	0	158	4	0.165	(-0.78)	164.88	66.388
4	0.091	(-1.04)	5	0	155	5	0.304	(-0.51)	164.88	150.13
5	0.165	(-0.78)	1	0	69	6	0.537	(-0.27)	164.88	163.23
5	0.165	(-0.78)	2	0	105	7	0.978	(-9.66)	164.88	163.23
5	0.165	(-0.78)	3	0	115					
5	0.165	(-0.78)	4	0	105					
6	0.304	(-0.51)	1	0	27					
6	0.304	(-0.51)	2	0	1					
6	0.304	(-0.51)	3	0	15					
6	0.304	(-0.51)	4	0	16					

EC₅₀ for inhibition of reproduction after 21 days exposure

ミジンコ 繁殖試験(産仔) 1X10, 4X10 EC50, LC50 の推定結果(要約)
DMA 更新日: 2004/03/23

----- ロジット法 -----

mg/L	----- 21d -----	young -----
	入力(%)	推定(%)
0.027	-13.11 (-7.9)	-- (-)
0.051	-1.861 (-1.1)	-- (-)
0.091	10.288 (6.24)	9.0972 (5.52)
0.165	66.388 (40.2)	68.741 (41.6)
0.304	150.13 (91.0)	148.97 (90.3)
0.537	163.63 (99.2)	-- (-)
0.978	164.28 (99.6)	-- (-)

Y=A+BX	係数(標準誤差)
A;	7.2492 (6218)
B;	9.6928 (8042)

回帰式の適合度の検定 χ^2 検定値 (P:0.05) = 右側

逸脱度 χ^2	.3932	< 3.8414	OK
ピアソン χ^2	.3970	< 3.8414	OK
AIC	403.04		

推定 ECx

EC10 (mg/L)	.10603
95%Range	.09679 < * < .11303
EC20 (mg/L)	.12855
95%Range	.11875 < * < .13685
EC50 (mg/L)	.17869
95%Range	.16846 < * < .18976
EC80 (mg/L)	.24838
95%Range	.23897 < * < .26313
EC90 (mg/L)	.30115
95%Range	.29321 < * < .31858

NOEC and LOEC values for reproduction after 21 days exposure

●● 21d NOEC 産仔の推定結果の書き出し =====> * =5%で有意, ** =1%で有意 ●●
DMA ミジンコ 繁殖試験 (産仔) 1X10, 4X10 生物量は 1 を掛けてある

◎ NOEC 計算用元データ -----

濃度 mg/L	0	0.027	0.051	0.091	0.165	0.304	0.537	0.978	平均
1	173	222	186	160	69	27	6	0	
2	186	179	205	131	105	1	0	1	
3	160	175	140	169	115	15	1	2	
4	166	215	132	158	105	16	1	0	
5	158	216	186	155	-	-	1	0	
6	168	202	154	-	-	-	0	-	
7	159	133	162	-	-	-	1	-	
8	167	99	169	-	-	-	0	-	
9	147	161	-	-	-	-	-	-	
平均	164.888	178	166.75	154.6	98.5	14.75	1.25	0.6	108.826
標準偏差	10.913	41.668	24.835	14.188	20.223	10.657	1.9821	.8944	

◎ 各濃度区の対照平均に対する相対量 -----

濃度 mg/L	0	0.027	0.051	0.091	0.165	0.304	0.537	0.978
1	104.92	134.64	112.80	97.04	41.85	16.37	3.64	0.00
2	112.80	108.56	124.33	79.45	63.68	0.61	0.00	0.61
3	97.04	106.13	84.91	102.49	69.74	9.10	0.61	1.21
4	100.67	130.39	80.05	95.82	63.68	9.70	0.61	0.00
5	95.82	131.00	112.80	94.00	-	-	0.61	0.00
6	101.89	122.51	93.40	-	-	-	0.00	-
7	96.43	80.66	98.25	-	-	-	0.61	-
8	101.28	60.04	102.49	-	-	-	0.00	-
9	89.15	97.64	-	-	-	-	-	-
平均	100	107.95	101.12	93.760	59.737	8.9454	.7581	.3639

◎ バートレットの等分散性の検定 -----

χ^2 二乗検定値 (p:0.05)=14.067 (p:0.01)=18.475 自由度=7
計算値 (62.529) > 14.067 5%の危険率で等分散性を認めない。

◎ クラスカル・ワリスの順位検定 (Kruskal-Wallis test): 全順位法 -----

順位	濃度 mg/L	0	0.027	0.051	0.091	0.165	0.304	0.537	0.978
1	42	52	46	33.5	18	17	14	3.5	
2	46	44	49	23	20.5	9.5	3.5	9.5	
3	33.5	43	26	40.5	22	15	9.5	13	
4	37	50	24	30.5	20.5	16	9.5	3.5	
5	30.5	51	46	29	-	-	9.5	3.5	
6	39	48	28	-	-	-	3.5	-	
7	32	25	36	-	-	-	9.5	-	
8	38	19	40.5	-	-	-	3.5	-	
9	27	35	-	-	-	-	-	-	
平均順位		36.111	40.777	36.937	31.3	20.25	14.375	7.8125	6.6

χ^2 二乗検定基準値 (p:0.05)=14.067 (p:0.01)=18.475 自由度=7
計算値 (40.064) => (14.06) 5%の危険率で有意差を認める。

◎ ノンパラメトリック Dunnett 型の検定法

濃度 mg/L	0	0.027	0.051	0.091	0.165	0.304	0.537	0.978
計算値	-	1.3687	.1929	-1.269	-2.781	-2.777	-3.494	-3.013
Dunnett 確率		0.0856	0.4235	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000

▲ 参考：等分散性を認めた場合の計算 -----

等分散性の仮定を満足しないため、順位検定を行った。

毒性試験のような場合は、等分散性の仮定を満足しないことが多い。

順位検定は情報の脱落を伴うため、検出力が低くなる。

そのため、[等分散性の仮定を満足すると仮定した]分析結果をしめす。

◎ 一元配置分散分析（全ての濃度区の平均数に差がないとみなせるか）-----

要因	平方和	自由度	平均平方	検定値 (F)
処理	295643.4	7	42234.77	86.17718
誤差	21564.06	44	490.0923	
全体	317207.5	51		
F検定基準値	(p:0.05)=2.2263 (p:0.01)=3.0762 自由度= 7 : 44			
計算値 (86.17)	> 2.2263			

5%の危険率で「濃度区間に差がない」仮説を棄却する。

即ち、濃度区間に差があるとみなす。

◎ Dunnett 型の検定（どの濃度区が対照に比べて差があるかを特定する）-----

濃度 mg/L	0	0.027	0.051	0.091	0.165	0.304	0.537	0.978
計算値	-	-1.256	-0.173	.8332	4.9904**	11.285**	15.212**	13.304**
Dunnett 確率		1.0000	1.0000	0.6073	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001

付属資料-4：試験液中の被験物質濃度の分析方法

1. 標準品

被験物質を使用した。

2. 試薬、試液及び標準溶液の調製

2.1 試薬

アセトニトリル：高速液体クロマトグラフ用

水：活性炭フィルター、逆浸透膜及びイオン交換樹脂で精製したもの

2.2 試液

アセトニトリル-水 (1:1 V/V)：アセトニトリル500 ml及び水500 mlを混合した。

アセトニトリル-水 (6:4 V/V)：アセトニトリル600 ml及び水400 mlを混合した。

2.3 標準溶液の調製

標準品約25 mgを精密に量り取りアセトニトリルに溶解して50 mlとし、これを標準原液とした。この標準原液をアセトニトリルで希釈して40 mg/l溶液を調製し、この一定量を取り同量の水を混合した後、アセトニトリル-水 (1:1 V/V) で適宜希釈して0.005, 0.025, 0.1及び0.2 mg/lの標準溶液を調製した。

3. 試料溶液の調製

3.1 試験液分析法

3.1.1 濃縮法（対照区並びに 0.032, 0.056, 0.10 及び 0.18 mg/l の試験液）

リザーバーの先端にアダプターを介して PLS-2 ミニカラムを接続し、ミニカラム吸引装置に固定した。リザーバーにアセトニトリル、水各 5 ml を入れて流下させ、ミニカラムを洗浄した。

試験液を採取し、リザーバーに移し流下させた。流出液を捨てた後、アセトニトリル 5 ml を流下させ、2,3-ジメチルアニリンを溶出させた。溶出液を 20 ml のメスフラスコにとり、水 5 ml を混合した後、アセトニトリル-水 (1:1 V/V) で 20 ml 定容とした。各試験液の採取量及び最終液量の関係は 5.2 に記載した。

3.1.2 希釈法（0.32, 0.56及び1.0 mg/lの試験液）

試験液をメスフラスコに正確に量り取り、同量のアセトニトリルを混合した後、アセトニトリル-水 (1:1 V/V) で定容した。各試験液の採取量及び最終液量の関係は 3.2 に記載した。

3.2 数量関係の一覧表

試験液	試験液採取量 (ml)	定容量 (ml)
対照区並びに0.032及び0.056 mg/lの試験液	50	20
0.10及び0.18 mg/lの試験液	20	20
0.32 mg/lの試験液	5	10
0.56 mg/lの試験液	2.5	10
1.0 mg/lの試験液	2.5	20

4. 分析機器操作条件

高速液体クロマトグラフ操作条件

ポンプ：LC-10AD [株式会社 島津製作所]

検出器：紫外分光光度計 SPD-10A [株式会社 島津製作所]

カラム：Inertsil Ph, φ4.6 mm×25 cm [ジーエルサイエンス株式会社]

カラム温度：40 ℃

移動相：アセトニトリル-水 (6:4 V/V)

流量：1.0 ml/min

測定波長：205 nm

データ処理装置：C-R4A [株式会社 島津製作所]

5. 定量

2.3で調製した標準溶液及び3.で調製した試料溶液40 μlを4.の高速液体クロマトグラフに注入した。標準品の重量とピーク高から検量線を作成し、試験水中の2,3-ジメチルアニリン濃度を算出した。

6. 検出限界

$$\text{検出限界} : \frac{0.2 \text{ ng}}{1,000} \times \frac{20 \text{ ml} \times 1,000}{40 \text{ } \mu\text{l}} \times \frac{1}{50 \text{ ml}} = 0.002 \text{ mg/l}$$

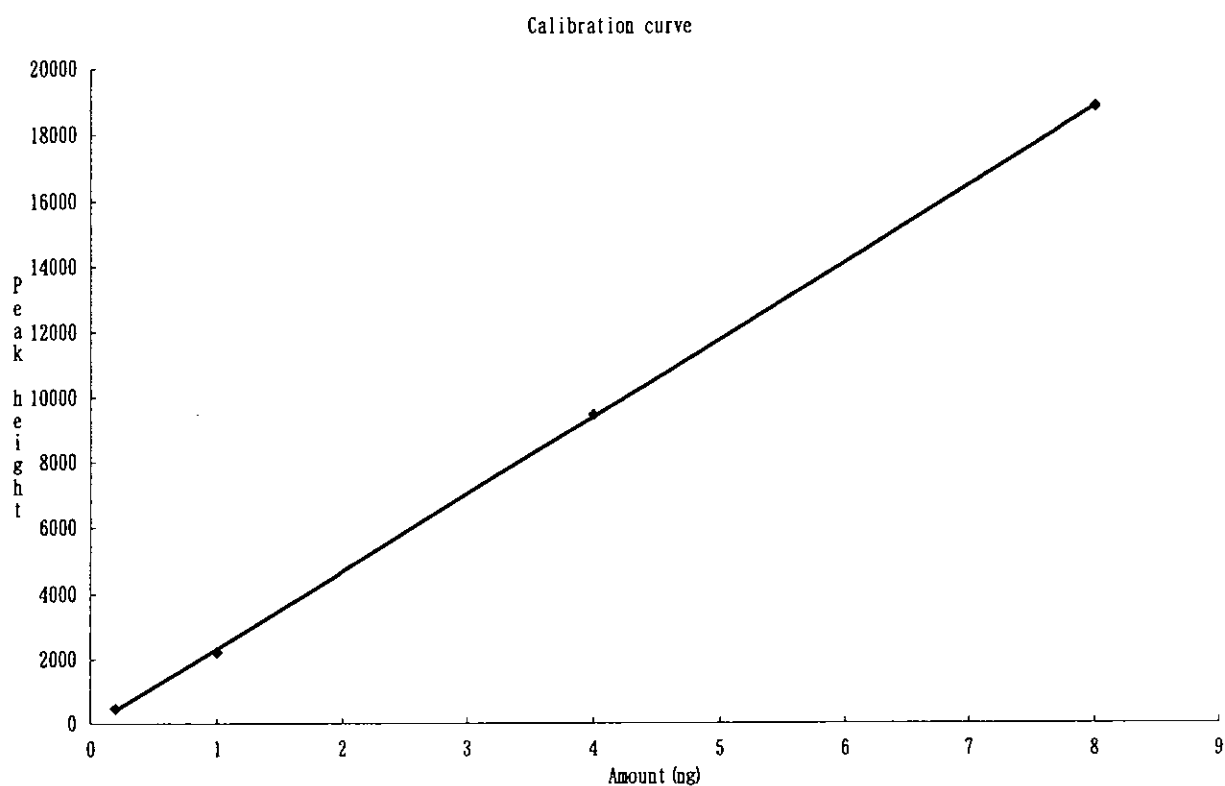
7. 添加回収試験

7.1 低濃度添加

希釈水に被験物質を0.01 mg/lになるように添加し、この溶液を用いて添加回収試験を行った。試験は併行測定3回で実施し、回収率は110.6 %, 104.5 %, 98.0 % (平均104.4 %)であった。

7.2 高濃度添加

希釈水に被験物質を1 mg/lになるように添加し、この溶液を用いて添加回収試験を行った。試験は併行測定3回で実施し、回収率は101.4 %, 100.8 %, 99.1 % (平均100.4 %)であった。

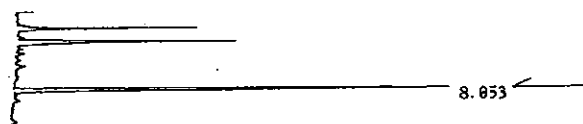


Amount (ng)	Peak height (μV)
8	18,833
4	9,463
1	2,207
0.2	461

Figure 1. Calibration curve of 2,3-dimethylaniline by HPLC analysis

Standard (0.2 mg/l): 0 day

CHROMATOPAC C-R4A CH=1 REPORT No.=49 クロマト=2:15041R.C18 04/03/02 15:21:36



** 定量計算結果 **

CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	1	8.053	231758	18833	S		100	
TOTAL			231758	18833			100	

Control: 0 day

波形処理/計算エラー Ch=1, 1: 生ピークがありません。

CHROMATOPAC C-R4A CH=1 REPORT No.=53 クロマト=2:15041R.C22 04/03/02 16:19:38

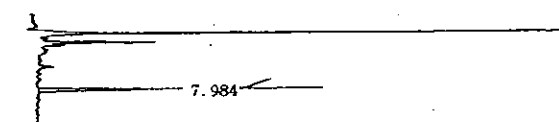


** 定量計算結果 **

CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
TOTAL			0	0			0	

Test solution (0.032 mg/l): 0 day

CHROMATOPAC C-R4A CH=1 REPORT No.=54 クロマト=2:15041R.C23 04/03/02 16:41:09

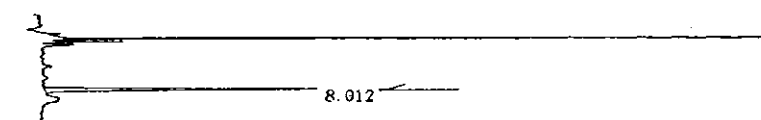


** 定量計算結果 **

CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	1	7.984	73677	6142			100	
TOTAL			73677	6142			100	

Test solution (1.0 mg/l): 0 day

CHROMATOPAC C-R4A CH=1 REPORT No.=60 クロマト=2:15041R.C29 04/03/02 18:50:17



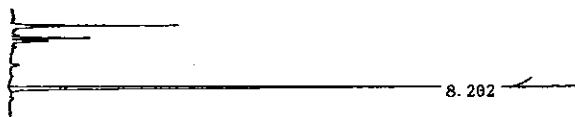
** 定量計算結果 **

CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	1	8.012	151794	11817			100	
TOTAL			151794	11817			100	

Figure 2-1. Representative chromatograms

Standard (0.2 mg/l): 2 days

CHROMATOPAC C-R4A CH=1 REPORT No.=31 クロマト=2:150432.C01 04/03/04 14:30:56

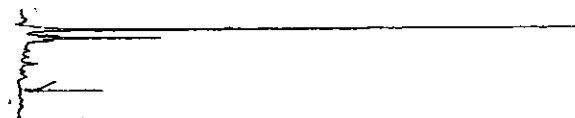


**** 定量計算結果 ****

CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	2	8.202	236161	18774	V		100	
TOTAL			236161	18774			100	

Control: 2 days old*

波形処理/計算エラー Ch=1, 1: 生ピークがありません。
CHROMATOPAC C-R4A CH=1 REPORT No.=35 クロマト=2:150432.C05 04/03/04 15:28:59

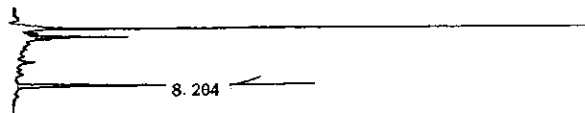


**** 定量計算結果 **** 注意 15-有 CALERROR: 1

CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
TOTAL			0	0			0	

Test solution (0.032 mg/l): 2 days old*

CHROMATOPAC C-R4A CH=1 REPORT No.=36 クロマト=2:150432.C06 04/03/04 15:50:30

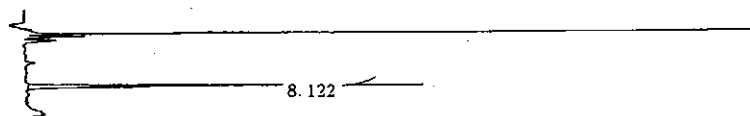


**** 定量計算結果 ****

CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	1	8.204	80484	6480			100	
TOTAL			80484	6480			100	

Test solution (1.0 mg/l): 2 days old*

CHROMATOPAC C-R4A CH=1 REPORT No.=42 クロマト=2:150432.C12 04/03/04 17:59:37



**** 定量計算結果 ****

CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	1	8.122	147140	11118			100	
TOTAL			147140	11118			100	

* old: Test solution after 2 days exposure

Figure 2-2. Representative chromatograms

付属資料-5：ミジンコの観察記録

Table A-1 Result of reproduction test: Control

Rep. No.	Counts	Time																						
		3/3 1d	3/4 2d	3/5 3d	3/6 4d	3/7 5d	3/8 6d	3/9 7d	3/10 8d	3/11 9d	3/12 10d	3/13 11d	3/14 12d	3/15 13d	3/16 14d	3/17 15d	3/18 16d	3/19 17d	3/20 18d	3/21 19d	3/22 20d	3/23 21d	total	
1	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 ^F	0	0	32	0	0	53	0	0	48	0	0	28	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	12	12	12	44	44	44	97	97	97	145	145	145	173	173
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 ^F	0	0	35	0	0	52	0	0	49	0	0	38	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	12	12	12	47	47	47	99	99	99	148	148	148	186	186
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	12 ^F	0	0	33	0	0	49	0	0	31 ^x	0	0	35	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	12	12	12	45	45	45	94	94	94	125 ^x	125	125	160	160
4	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0 ^x								
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0	10 ^F	0	0	30	0	0	18 ^x							
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	10	10	10	40	40	40	58 ^x						---	
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	12 ^F	0	0	36	0	0	42	0	0	44	0	0	32	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	12	12	12	48	48	48	90	90	90	134	134	134	166	166
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	13 ^F	0	0	30	0	0	43	0	0	38 ^x	0	0	34	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	13	13	13	43	43	43	86	86	86	124 ^x	124	124	158	158
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	15 ^F	0	0	30	0	0	48	0	0	43 ^Δ	0	0	32	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	15	15	15	45	45	45	93	93	93	136 ^x	136	136	168	168
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	11 ^F	0	0	29	0	0	42	0	0	43 ^x	0	0	34	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	11	11	11	40	40	40	82	82	82	125 ^x	125	125	159	159
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	17 ^F	0	0	31	0	0	42	0	0	42 ^x	0	0	35	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	17	17	17	48	48	48	90	90	90	132 ^x	132	132	167	167
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	13 ^F	0	0	30	0	0	34 ^x	0 ^x	0	27 ^x	0	0	43	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	13	13	13	43	43	43	77	77	77	104 ^x	104	104	147	147

P generation: ○; not detected immobility, ×; mortality. F1 generation: F; observed the first brood, △; observed aborted eggs, ×; observed dead offspring
 ---: not included for calculation because the parental Daphnia was dead during a 21-day testing period

Table A-2 Result of reproduction test: Nominal concentration: 0.032 mg/l Measured concentration: 0.027 mg/l

Rep. No.	Counts	Time																						
		3/3 1d	3/4 2d	3/5 3d	3/6 4d	3/7 5d	3/8 6d	3/9 7d	3/10 8d	3/11 9d	3/12 10d	3/13 11d	3/14 12d	3/15 13d	3/16 14d	3/17 15d	3/18 16d	3/19 17d	3/20 18d	3/21 19d	3/22 20d	3/23 21d	total	
1	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	5 ^F	0	0	24	0	58	1	0	48	1	0	48	0	0	37	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	5	5	5	29	29	87	88	88	136	137	137	185	185	185	222	
2	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1		
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0	14 ^F	0	3	41 ^x	0	22	20	0	0	47	0	0	32	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	14	14	17	58	58	80	100	100	100	147	147	147	179	
3	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1		
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0	18 ^F	0	39	0	0	33	0	0	48	0 ^x	0	37	0	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	18	18	57	57	57	90	90	90	138	138	138	175		
4	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1		
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	4 ^F	0	16	2	0	56	0	0	50	0	0	44	0	0	43	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	4	4	20	22	22	78	78	78	128	128	128	172	172	172	215	
5	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1		
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0	19 ^F	0	43	0 ^x	0	52	0	0	55	0	0	47	0	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	19	19	62	62	62	114	114	114	169	169	169	216		
6	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1		
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0	20 ^F	3	41	0	0	42	0	0	52 ^x	0	0	44	0	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	20	23	64	64	64	106	106	106	158	158	158	202		
7	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0 ^x												
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0	17 ^F	0												
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	17	17										---		
8	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1		
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0	15 ^F	0	0	22 ^x	0	0	36	0	0	30	0	0	30	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	15	15	15	37	37	37	73	73	73	103	103	103	133	
9	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1		
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0	12 ^F	0	0	16	1	0	8	0	0	22	0	0	40	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	12	12	12	28	29	29	37	37	37	59	59	59	99	
10	P generation	Live	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1		
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0	17 ^F	0	0	16	0	0	30 ^x	0	0	48	0	0	50	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	17	17	17	33	33	33	63	63	63	111	111	111	161	
P generation: ○: not detected immobility ×: mortality F1 generation: F: observed the first F1 generation, x: observed the first F1 generation with immobility																								

P generation: ○; not detected immobility, ×; mortality. F1 generation: F; observed the first brood, △; observed aborted eggs, ×; observed dead offspring
 ---: not included for calculation because the parental Daphnia was dead during a 21-day testing period

Table A-3 Result of reproduction test: Nominal concentration: 0.056 mg/l Measured concentration: 0.051 mg/l

Rep. No.	Counts	Time																					
		3/3 1d	3/4 2d	3/5 3d	3/6 4d	3/7 5d	3/8 6d	3/9 7d	3/10 8d	3/11 9d	3/12 10d	3/13 11d	3/14 12d	3/15 13d	3/16 14d	3/17 15d	3/18 16d	3/19 17d	3/20 18d	3/21 19d	3/22 20d	3/23 21d	total
1	P generation Live	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o
	F1 generation Live	0	0	0	0	0	0	0	8 ^p	0	31	0	0	48	0	0	51	0	0	48	0	0	0
	Cumulative reproductivity	0	0	0	0	0	0	0	8	8	39	39	39	87	87	87	138	138	138	186	186	186	186
2	P generation Live	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o
	F1 generation Live	0	0	0	0	0	0	4 ^r	0	0	20	0	56	0	0 [△]	54	0	0	40 ^x	0	0	31	0
	Cumulative reproductivity	0	0	0	0	0	0	4	4	4	24	24	80	80	80	134	134	134	174 ^x	174	174	205	205
3	P generation Live	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o
	F1 generation Live	0	0	0	0	0	0	0	0	11 ^r	0	0	31	1	0	36	0	0	29 ^x	0	0	32	0
	Cumulative reproductivity	0	0	0	0	0	0	0	0	11	11	11	42	43	43	79	79	79	108 ^x	108	108	140	140
4	P generation Live	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o
	F1 generation Live	0	0	0	0	0	0	0	0	18 ^r	0	0	2 [△]	0	0	33	0	0	43	0	0	36	0
	Cumulative reproductivity	0	0	0	0	0	0	0	0	18	18	18	20	20	20	53	53	53	96	96	96	132	132
5	P generation Live	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o
	F1 generation Live	0	0	0	0	0	0	0	0	19 ^r	0	19	15 ^x	0	40	0	0	46	0	0	47	0	0
	Cumulative reproductivity	0	0	0	0	0	0	0	0	19	19	38	53	53	93	93	93	139	139	139	186	186	186
6	P generation Live	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o
	F1 generation Live	0	0	0	0	0	0	0	0	14 ^r	0	0	40 ^x	0	0	38	0	0	38 [△]	0	0	24	0
	Cumulative reproductivity	0	0	0	0	0	0	0	0	14	14	14	54 ^x	54	54	92	92	92	130 ^x	130	130	154	154
7	P generation Live	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o
	F1 generation Live	0	0	0	0	0	0	0	0	17 ^r	1 ^x	0	37 ^x	0	10	20	0	5	37	0	0	35	0
	Cumulative reproductivity	0	0	0	0	0	0	0	0	17	18	18	55 ^x	55	65 ^x	85 ^x	85	90	127	127	127	162	162
8	P generation Live	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o
	F1 generation Live	0	0	0	0	0	0	0	0	15 ^r	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Cumulative reproductivity	0	0	0	0	0	0	0	0	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15
9	P generation Live	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o
	F1 generation Live	0	0	0	0	0	0	0	0	12 ^r	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Cumulative reproductivity	0	0	0	0	0	0	0	0	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
10	P generation Live	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o
	F1 generation Live	0	0	0	0	0	0	0	3 ^r	0	21	0	0	42	0	0	56	0	0	47 ^x	0	0	0
	Cumulative reproductivity	0	0	0	0	0	0	0	3	3	24	24	24	66	66	66	122	122	122	169	169	169	169

P generation: ○; not detected immobility, △; immobility, ×; mortality. F1 generation: P; observed the first brood, △; observed aborted eggs, ×; observed dead offspring

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

Table A-4 Result of reproduction test: Nominal concentration: 0.10 mg/l Measured concentration: 0.091 mg/l

Rep. No.	Counts	Time																						
		3/3 1d	3/4 2d	3/5 3d	3/6 4d	3/7 5d	3/8 6d	3/9 7d	3/10 8d	3/11 9d	3/12 10d	3/13 11d	3/14 12d	3/15 13d	3/16 14d	3/17 15d	3/18 16d	3/19 17d	3/20 18d	3/21 19d	3/22 20d	3/23 21d	total	
1	P generation	Live	1 [○]	1 [○]	1 [○]	1 [○]	1 [○]	1 [○]	1 [○]	1 [○]	1 [△]	1 [△]	1 [△]	1 [△]	1 [△]	1 [△]	1 [△]	1 [△]	0 ^x					
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0	19 ^p	0	0	0	0	0	0	0	0					
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	19	19	19	19	19	19	19	19	19				---	
2	P generation	Live	1 [○]	1 [○]	1 [○]	1 [○]	1 [○]	1 [○]	1 [○]	1 [○]	1 [○]	1 [○]	1 [○]	1 [○]	1 [○]	1 [○]	1 [○]	1 [○]	1 [○]	1 [○]	1 [○]	1 [○]		
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	5 ^p	0	0	27 ^x	0	3	51	0	37	0	0	33	4	0 [△]	0	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	5	5	5	32	32	35	86	86	123	123	123	156	160	160	160	
3	P generation	Live	1 [○]	1 [○]	1 [○]	1 [○]	1 [○]	1 [○]	1 [○]	1 [○]	1 [○]	1 [○]	1 [○]	1 [○]	1 [△]	0 ^x								
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0	13 ^p	0	18	16	0	41	0							
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	13	13	31	47	47	88	88						---	
4	P generation	Live	1 [○]	1 [○]	1 [○]	1 [○]	1 [○]	1 [○]	1 [○]	1 [○]	1 [○]	1 [○]	1 [○]	1 [○]	1 [○]	1 [○]	1 [○]	1 [○]	1 [○]	1 [○]	1 [○]	1 [○]		
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0	13 ^p	0	0	42 [△]	1	0	37	0	0	16	0	0	22	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	13	13	13	55	56	56	93	93	93	109	109	109	131	
5	P generation	Live	1 [○]	1 [○]	1 [○]	1 [○]	1 [○]	1 [○]	1 [○]	1 [○]	1 [○]	1 [○]	1 [○]	1 [○]	1 [○]	1 [○]	1 [○]	1 [○]	1 [○]	1 [○]	1 [○]	1 [○]		
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	14 ^p	0	0	38	0	0	36	0	0	38	0	0	42	1	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	14	14	14	52	52	52	88	88	88	126	126	126	168	169	
6	P generation	Live	1 [○]	1 [○]	1 [○]	1 [○]	1 [○]	1 [○]	1 [○]	1 [○]	1 [△]	1 [△]	1 [△]	1 [△]	1 [△]	1 [△]	0 ^x							
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0	12 ^p	0	0	0	0	0	0							
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	12	12	12	12	12	12	12						---	
7	P generation	Live	1 [○]	1 [○]	1 [○]	1 [○]	1 [○]	1 [○]	1 [○]	1 [○]	1 [○]	1 [○]	1 [○]	1 [○]	1 [○]	1 [○]	1 [○]	1 [○]	1 [○]	1 [○]	1 [○]	1 [○]		
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	5 ^p	0	0	24	0	0	49	0	16	25	0	14	25	0	0	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	5	5	5	29	29	29	78	78	94	119	119	133	158	158	158	
8	P generation	Live	1 [○]	1 [○]	1 [○]	1 [○]	1 [○]	1 [○]	1 [○]	1 [○]	1 [△]	1 [△]	1 [△]	1 [△]	1 [△]	1 [△]	0 ^x							
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0	14 ^p	0												
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	14	14											---	
9	P generation	Live	1 [○]	1 [○]	1 [○]	1 [○]	1 [○]	1 [○]	1 [○]	1 [○]	1 [○]	0 ^x												
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	10 ^p	0	0												
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	10	10	10											---	
10	P generation	Live	1 [○]	1 [○]	1 [○]	1 [○]	1 [○]	1 [○]	1 [○]	1 [○]	1 [○]	1 [○]	1 [○]	1 [○]	1 [○]	1 [○]	1 [○]	1 [○]	1 [○]	1 [○]	1 [○]	1 [○]		
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0	11 ^p	0	0	46	1	0	16	0	0	27	0	0	54	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	11	11	11	57	58	58	74	74	74	101	101	101	155	
P generation: ○: not detected immobility. △: immobility. x: mortality. F1 generation: p: observed the first band. △: observed the second band. x: observed the third band.																								

P generation: ○; not detected immobility, △; immobility, ×; mortality, F1 generation: †; observed the first brood, △; observed aborted eggs, ×; observed dead offspring
 ---: not included for calculation because the parental Daphnia was dead during a 21-day testing period

Table A-5 Result of reproduction test: Nominal concentration: 0.18 mg/l Measured concentration: 0.165 mg/l

Rep. No.	Counts	Time																						
		3/3 1d	3/4 2d	3/5 3d	3/6 4d	3/7 5d	3/8 6d	3/9 7d	3/10 8d	3/11 9d	3/12 10d	3/13 11d	3/14 12d	3/15 13d	3/16 14d	3/17 15d	3/18 16d	3/19 17d	3/20 18d	3/21 19d	3/22 20d	3/23 21d	total	
1	P generation	Live	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	11 [†]	0	0	20 ^{△×}	0	18 ^{△×}	13 [×]	0	0	0	0			
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	11	11	11	31	31	49	62	62	62	62		---		
2	P generation	Live	1 [○]	1 [○]	1 [○]	1 [○]	1 [○]	1 [○]	1 [○]	1 [○]	1 [△]	0 [×]												
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	2 ^{†×}	0	0												
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	2	2	2									---			
3	P generation	Live	1 [○]	1 [○]	1 [○]	1 [○]	1 [○]	1 [○]	1 [○]	1 [○]	1 [△]	0 [×]												
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0	2 ^{†△×}	0												
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	2	2									---			
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	4 ^{△×}	0	0	18	0	0	28 ^{△×}	0	0	19 ^{△×}	0		
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	4	4	22	22	22	50	50	50	69	69		
5	P generation	Live	1 [○]	1 [○]	1 [○]	1 [○]	1 [○]	1 [○]	1 [○]	1 [○]	1 [△]	0 [×]												
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0	6 ^{†△×}	0												
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	6	6									---			
6	P generation	Live	1 [○]	1 [○]	1 [○]	1 [○]	1 [○]	1 [○]	1 [○]	1 [○]	1 [△]	1 [△]	0 [×]											
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0	9 [†]	0 [×]	0											
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	9	9	9								---			
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	8 ^{△×}	0	0	33	0	0	34 ^{△×}	1	0	29 [△]	0		
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	0	8	8	8	41	41	41	75	76	76	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 [○]			
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	1 ^{†△}	0	5 ^{△×}	0	0	34	0	0	37	0	0	38	0		
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	1	1	6	6	6	40	40	40	77	77	77	115	115		
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	7 ^{△×}	0	0	32	1 ^{△×}	0	36 [△]	0	0	29 ^{△×}	0 [×]		
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	0	7	7	7	39	40	40	76	76	76	105	105		
10	P generation	Live	1 [○]	1 [○]	1 [○]	1 [○]	1 [○]	1 [○]	1 [○]	1 [○]	1 [△]	0 [×]												
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0	4 ^{†△×}	0												
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	4	4									---			

P generation: ○: not detected immobility, △: immobility, ×: mortality. F1 generation: †: observed the first brood, △: observed aborted eggs, ×: observed dead offspring

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

Table A-6 Result of reproduction test: Nominal concentration: 0.32 mg/l Measured concentration: 0.304 mg/l

Rep. No.	Counts	Time																					
		3/3 1d	3/4 2d	3/5 3d	3/6 4d	3/7 5d	3/8 6d	3/9 7d	3/10 8d	3/11 9d	3/12 10d	3/13 11d	3/14 12d	3/15 13d	3/16 14d	3/17 15d	3/18 16d	3/19 17d	3/20 18d	3/21 19d	3/22 20d	3/23 21d	total
1	P generation Live	1 [○]	1 [○]	1 [○]	1 [○]	1 [○]	1 [○]	1 [○]	1 [○]	1 [△]	1 [△]	1 [△]	0 ^x										
	F1 generation Live	0	0	0	0	0	0	0	0	1 ^F	0	0	4 ^x										
	Cumulative reproductivity	0	0	0	0	0	0	0	0	1 ^F	0	0	4 ^x										
2	P generation Live	1 [○]	1 [○]	1 [○]	1 [○]	1 [○]	1 [○]	1 [○]	1 [○]	1 [△]	0 ^x	1	5										---
	F1 generation Live	0	0	0	0	0	0	0	0	2 ^F	0												
	Cumulative reproductivity	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2												---
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	1 ^F	0	0	2 [△]	0	0	10 [△]	0	0	6 [△]	0	0	8 [△]	
	Cumulative reproductivity	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	3	3	3	13	13	13	19	19	19	27	27
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	0 ^F	0	0 [△]	0 [△]	0	0 [△]	0	0	0	0 [△]	0	0	1 [△]	
	Cumulative reproductivity	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
5	P generation Live	1 [○]	1 [○]	1 [○]	1 [○]	1 [○]	1 [○]	1 [○]	1 [○]	1 [△]	0 ^x												---
	F1 generation Live	0	0	0	0	0	0	0	0	0 ^F	0												
	Cumulative reproductivity	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 [△]	0 ^x												---
	F1 generation Live	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0												
	Cumulative reproductivity	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0												
7	P generation Live	1 [○]	1 [○]	1 [○]	1 [○]	1 [○]	1 [○]	1 [○]	1 [○]	1 [△]	0 ^x												---
	F1 generation Live	0	0	0	0	0	0	0	0	0 ^F	0												
	Cumulative reproductivity	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 [○]	1 [○]	1 [○]	
	F1 generation Live	0	0	0	0	0	0	0	0	1 ^F	0	0	1 ^x	0	5 [△]	0	0	7 [△]	0	0	1 [△]	0 [△]	0
	Cumulative reproductivity	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	2	2	7	7	7	14	14	14	15	15	15
9	P generation Live	1 [○]	1 [○]	1 [○]	1 [○]	1 [○]	1 [○]	1 [○]	1 [○]	1 [△]	1 [△]	1 [△]	1 [△]	0 ^x									
	F1 generation Live	0	0	0	0	0	0	0	0	3 ^F	0	0	0	0 [△]									
	Cumulative reproductivity	0	0	0	0	0	0	0	0	3	3	3	3	3									---
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	0 ^F	0	2 [△]	0	0	5 [△]	0	0	9 [△]	0	0	0 [△]	0 ^x	0
	Cumulative reproductivity	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	2	7	7	7	16	16	16	16	16	16	16

P generation: ○; not detected immobility, △; immobility, ×; mortality. F1 generation: F; observed the first brood, △; observed aborted eggs, ×; observed dead offspring
 ---: not included for calculation because the parental Daphnia was dead during a 21-day testing period

Table A-7 Result of reproduction test: Nominal concentration: 0.56 mg/l Measured concentration: 0.537 mg/l

Rep. No.	Counts	Time																						
		3/3 1d	3/4 2d	3/5 3d	3/6 4d	3/7 5d	3/8 6d	3/9 7d	3/10 8d	3/11 9d	3/12 10d	3/13 11d	3/14 12d	3/15 13d	3/16 14d	3/17 15d	3/18 16d	3/19 17d	3/20 18d	3/21 19d	3/22 20d	3/23 21d	total	
1	P generation	Live	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0	1 ^p _{Δx}	0	0 ^Δ _x	0	0	5 ^Δ _x	0	0	0 ^Δ _x	0	0	0	0	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	6	6	6	6	6	6	6	6	
2	P generation	Live	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0 ^Δ	0	0 ^p _{Δx}	0	0	0 ^Δ	0	0	0 ^Δ	0 ^Δ	0	0 ^Δ	0	0	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
3	P generation	Live	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0 ^Δ	0 ^Δ	0	1 ^p _{Δx}	0	0	0 ^Δ _x	0	0	0 ^Δ	0	0	0 ^Δ	0 ^Δ	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
4	P generation	Live	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0 ^Δ	0	1 ^p _{Δx}	0	0	0 ^Δ	0	0	0 ^Δ _x	0	0	0 ^Δ	0	0		
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
5	P generation	Live	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0	0 ^p _{Δx}	0	0	0 ^Δ	0 ^Δ	0 ^Δ	0	0	0 ^Δ _x	0	0	1 ^Δ _x	1 ^Δ _x	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	
6	P generation	Live	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^Δ _x	0 ^x												
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0 ^Δ	0													
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0												
7	P generation	Live	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^Δ _x	0 ^x												
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0 ^p _x	0													
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0												
8	P generation	Live	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0 ^p _{Δx}	0	0	0 ^Δ _x	0	0 ^Δ	0 ^Δ	0	0 ^Δ _x	0	0	0 ^Δ	0	0	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
9	P generation	Live	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0	0 ^Δ	0	0 ^p _{Δx}	0 ^Δ _x	0	0	0 ^Δ	0	0	1 ^Δ	0	0	0 ^Δ	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	
10	P generation	Live	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	1 ^o	
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0	0 ^p _{Δx}	0	0	0	0	0 ^Δ	0	0 ^Δ	0	0	0 ^Δ	0	0	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

P generation: ○; not detected immobility, △; immobility, ×; mortality, F1 generation: P; observed the first brood, △; observed aborted eggs, ×; observed dead offspring
 ---: not included for calculation because the parental Daphnia was dead during a 21-day testing period

Table A-8 Result of reproduction test: Nominal concentration: 1.0 mg/l Measured concentration: 0.978 mg/l

Rep. No.	Counts	Time																						
		3/3 1d	3/4 2d	3/5 3d	3/6 4d	3/7 5d	3/8 6d	3/9 7d	3/10 8d	3/11 9d	3/12 10d	3/13 11d	3/14 12d	3/15 13d	3/16 14d	3/17 15d	3/18 16d	3/19 17d	3/20 18d	3/21 19d	3/22 20d	3/23 21d	total	
1	P generation	Live	1 [○]	0 [×]																				
	F1 generation	Live	0	0																				
	Cumulative reproductivity		0	0																			---	
2	P generation	Live	1 [○]	1 [○]	1 [○]	0 [×]																		
	F1 generation	Live	0	0	0	0																		
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0																	---	
3	P generation	Live	1 [○]	1 [○]	1 [○]	1 [○]	1 [○]	1 [○]	1 [○]	1 [○]	1 [○]	1 [○]	1 [○]	1 [△]	0 [×]									
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0 ^F _x	0	0 [△]	0	0 [△]	0									
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	0 ^F _x	0	0	0	0	0							---	
4	P generation	Live	1 [○]	1 [○]	1 [○]	1 [○]	1 [○]	1 [○]	1 [○]	1 [○]	1 [○]	1 [○]	1 [○]	1 [○]	1 [○]	1 [○]	1 [○]	1 [○]	1 [○]	1 [○]	1 [○]	1 [○]	1 [○]	
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0 ^F _x	0	0 [△]	0	0	0 [△]	0	0	0	0	0 [△]	0	0	0 [△]	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	0 ^F _x	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 [△]	0 [×]										
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0	0 [△]	0	0	0 ^F _x	0									
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 ^F _x	0								---	
6	P generation	Live	1 [○]	0 [×]																				
	F1 generation	Live	0	0																				
	Cumulative reproductivity		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 [○]	1 [○]	1 [○]	
	F1 generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	0 ^F _x	0	0 [△]	0	0	0 [△]	0	0	1 [△]	0	0	0 [△]	0	0	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	0 ^F _x	0	0	0	0 [△]	0	0	1	1	1	1	1	1	
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	0	0 ^F _x	0	0	0 [△]	0	0	1 [△]	0 [×]	0	1 [△]	0	0	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1 [×]	1	2	2	2	
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 ^F _x	0	0 [△]	0	0	0 [△]	0	0	0 [△]	0	0	0 [△]	0	0	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
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 ^F _x	0	0 [△]	0	0 [△]	0	0	0 [△]	0	0	0 [△]	0	0	0 [△]	
	Cumulative reproductivity		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 [△]	0	0	0	
P generation: ○ = not detected immobility; △ = immobility; × = mortality; F1 generation: 0 ^F _x = not detected immobility; 0 [△] = immobility; 0 [×] = mortality																								

P generation: ○; not detected immobility, △; immobility, ×; mortality, F1 generation: F; observed the first brood, △; observed aborted eggs, ×; observed dead offspring
 ---: not included for calculation because the parental Daphnia was dead during a 21-day testing period

陳述書

1 試験委託者
環境省

2 試験番号
第15043号

3 試験の表題
2,3-ジメチルアニリンのオオミジンコ (*Daphnia magna*) に対する繁殖阻害試験

上記試験は、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)を遵守して実施したものです。

なお、試験実施にあたっては、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)を遵守しました。

2004年 3月 31日

財団法人 日本食品分析センター 多摩研究所

試験責任者



信頼性保証書

1 試験委託者
環境省

2 試験番号
第15043号

3 試験の表題
2,3-ジメチルアニリンのオオミジンコ(*Daphnia magna*)に対する繁殖阻害試験

4 検閲
本試験の検閲は、財団法人 日本食品分析センター 多摩研究所 信頼性保証部門の標準操作手順書に従い、以下のとおり実施した。

検 閲 内 容	検閲実施日	試験責任者への 報告年月日	運営管理者への 報告年月日
試験計画書	2003年12月01日	2003年12月02日	2003年12月02日
被験物質の受領	2003年12月01日	2003年12月02日	2003年12月02日
試験計画書	2003年12月08日	2003年12月08日	2003年12月08日
試験の実施	2003年12月08日	2003年12月09日	2003年12月09日
試験の実施, 試薬等, 機器	2003年12月09日	2003年12月09日	2003年12月09日
分析の実施, 検体, 試薬等, 機器	2003年12月10日	2003年12月11日	2003年12月11日
試験計画書	2003年12月24日	2003年12月24日	2003年12月24日
試験の実施	2004年01月19日	2004年01月20日	2004年01月20日
試験の実施, 試薬等, 機器	2004年01月20日	2004年01月20日	2004年01月20日
分析の実施, 検体, 試薬等, 機器	2004年01月21日	2004年01月22日	2004年01月22日
試験計画書	2004年03月02日	2004年03月03日	2004年03月03日
試験の実施, 機器	2004年03月02日	2004年03月03日	2004年03月03日
分析の実施, 検体, 試薬等, 機器	2004年03月02日	2004年03月03日	2004年03月03日
試験の実施, 試薬等	2004年03月10日	2004年03月10日	2004年03月10日
試験の実施	2004年03月17日	2004年03月17日	2004年03月17日
試験の実施, 被験物質	2004年03月23日	2004年03月23日	2004年03月23日
試験中の保管文書	2004年03月29日	2004年03月29日	2004年03月29日
最終報告書草案及び生データ	2004年03月29日	2004年03月29日	2004年03月29日
最終報告書	2004年03月31日	2004年03月31日	2004年03月31日

上記検閲の結果、本試験最終報告書は試験に用いた方法が正確に記載され、報告結果は試験の生データを正確に反映していることを確認した。

2004 年 3 月 31 日

財団法人 日本食品分析センター 多摩研究所
信頼性保証部門責任者

