

環境庁殿

最 終 報 告 書

6-tert-ブチル-*m*-クレゾールのオオミジンコ(*Daphnia magna*)に対する繁殖阻害試験

(試験番号：92043)

1999 年 5 月 6 日作成

財団法人 化学品検査協会
化学品安全センター 久留米研究所

陳 述 書

財団法人 化 学 品 検 査 協 会
化学品安全センター 久留米研究所

試験委託者： 環境庁

表 題： 6-tert-ブチル-m-クレゾールのオオミジンコ(*Daphnia magna*)に対する
繁殖阻害試験

試 験 番 号： 92043

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

1999年 5月 6日

運営管理者



信 頼 性 保 証 書

財団法人 化 学 品 検 査 協 会
化学品安全センター 久留米研究所

試験委託者：環境庁

表 題：6-*tert*-ブチル-*m*-クレゾールのオオミジンコ(*Daphnia magna*)に対する
繁殖阻害試験

試験番号：92043

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

監査又は査察内容	実施日	報告日(運営管理者)	報告日(試験責任者)
試験計画書監査	1999年1月7日	1999年1月7日	1999年1月7日
試験計画書の変更監査	1999年4月1日	1999年4月2日	1999年4月2日
試験実施状況査察	1999年3月15日	1999年4月7日	1999年4月6日
試験実施状況査察	1999年3月29日	1999年4月7日	1999年4月6日
試験実施状況査察	1999年4月5日	1999年4月7日	1999年4月6日
最終報告書監査	1999年5月6日	1999年5月6日	1999年5月6日

1999年5月6日

信頼性保証部門責任者



試験実施概要

1 表 題

6-tert-ブチル-m-クレゾールのオオミジンコ(*Daphnia magna*)に対する繁殖阻害試験

2 試験目的

6-tert-ブチル-m-クレゾールについて、オオミジンコ(*Daphnia magna*)に対する繁殖阻害試験を21日間行い、繁殖状態に及ぼす最小作用濃度(LOEC)と最大無作用濃度(NOEC)を求め、できる限り産仔数を50%減少させると算定される濃度(50%繁殖阻害濃度：EC50)を求める。

3 試験方法

本試験は、OECD化学品テストガイドライン No.202「ミジンコ類、急性遊泳阻害試験及び繁殖試験」(1984年4月採択)の改訂版であるガイドラインNo.211「オオミジンコ繁殖試験」(1997年4月提案)に準拠した。

4 GLPの適用

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

5 試験委託者

名 称： 環境庁

住 所： (〒100-0013)東京都千代田区霞が関 1-2-2

6 試験受託者

名 称： 財団法人 化学品検査協会

住 所： (〒136-0071)東京都江東区亀戸 5-6-21

7 試験施設

名 称： 化学品安全センター 久留米研究所

住 所： (〒830-0023)福岡県久留米市中央町 19-14

運営管理者： XXXXXXXXXX

8 試験関係者

試験責任者

[REDACTED]

試験担当者

生物試験担当

[REDACTED]

分析担当

[REDACTED]

9 最終報告書の作成

1999年 5 月 6 日

試験責任者

氏名

[REDACTED]

10 試験期間

試験開始日

1999 年 1 月 7 日

試験終了日

1999 年 5 月 6 日

暴露期間

1999 年 3 月 15 日 ~ 1999 年 4 月 5 日

11 保 管

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

目 次

	頁
要 旨	1
1 被 験 物 質	2
1.1 名称、構造式及び物理化学的性状	2
1.2 被験物質の確認及び保管条件下での安定性	3
2 試 験 生 物	3
3 試 験 方 法	4
3.1 試 験 条 件	4
3.2 希 釈 水	4
3.3 試験容器及び恒温槽等	4
3.4 試験濃度の設定	4
3.5 試験液の調製	5
3.6 被験物質の分析	5
3.7 試 験 操 作	5
3.8 数値の取扱い	5
4 結果の算出	6
4.1 親ミジンコの半数致死濃度(LC50)の算出	6
4.2 50%繁殖阻害濃度(EC50)の算出	6
4.3 最大無作用濃度(NOEC)及び最小作用濃度(LOEC)	7
5 結果及び考察	7
5.1 試験成績の信頼性に影響を及ぼしたと思われる環境要因	7
5.2 試験液中の被験物質濃度	7
5.3 ミジンコの観察結果	7
5.4 親ミジンコの50%致死濃度(LC50)	8
5.5 50%繁殖阻害濃度(EC50)	8
5.6 繁殖に及ぼす最大無作用濃度(NOEC)及び最小作用濃度(LOEC)	9
5.7 試験液の水温、溶存酸素濃度(DO)、pH及び硬度	9
5.8 試験液の状態	9
Table 1～11	10～19
Figure 1, 2	20, 21

付属資料－1 希釈水の水質

付属資料－2 試験液の分析方法及び分析チャート

付属資料－3 ミジンコの観察結果

要 旨

試験委託者

環境庁

表 題6-tert-ブチル-m-クレゾールのオオミジンコ(*Daphnia magna*)に対する繁殖阻害試験試験番号

92043

試験方法

本試験は、OECD化学品テストガイドライン No.202「ミジンコ類、急性遊泳阻害試験及び繁殖試験」(1984年4月採択)の改訂版であるガイドラインNo.211「オオミジンコ繁殖試験」(1997年4月提案)に準拠して実施した。

- 1) 被 験 物 質： 6-tert-ブチル-m-クレゾール
- 2) 試 験 生 物： オオミジンコ(*Daphnia magna*)
- 3) 生 物 数： 20頭／1試験区(1連につき5頭で1試験区20頭)
- 4) 暴 露 期 間： 21日間
- 5) 暴 露 方 式： 半止水式(2日に1回試験液を交換、プラスチック製蓋を使用)
- 6) 試 験 濃 度： 2.00、1.00、0.500、0.250及び0.125 mg/L(公比：2.0)及び対照区
- 7) 連 数： 1試験区につき4連
- 8) 試 験 液 量： 1試験容器(1連)につき500 mL
- 9) 試 験 水 温： 20±1℃
- 10) 照 明： 16時間明(1,200 lux以下)／8時間暗
- 11) 試験液中の被験物質の分析： 高速液体クロマトグラフィー (HPLC)
(0、2、8、10、16及び18日目)

結 果

- 1) 21日間の親ミジンコの50%致死濃度(LC50)
=0.895 mg/L (95%信頼限界：0.703～1.20 mg/L)
- 2) 21日間の50%繁殖阻害濃度(EC50)
=0.586 mg/L(95%信頼限界：0.523～0.660 mg/L)
- 3) 最大無作用濃度(NOEC)
=0.250 mg/L
- 4) 最小作用濃度(LOEC)
=0.500 mg/L
(上記濃度は、全て設定濃度に基づく)

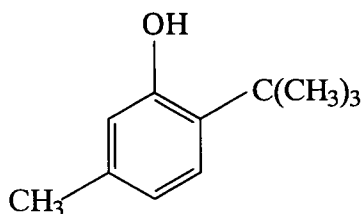
1 被 験 物 質

本最終報告書において6-*tert*-ブチル-*m*-クレゾールは、次の名称及び品質等を有するものとする。被験物質に関する情報については供給者提供の添付資料等によった。

1.1 名称、構造式及び物理化学的性状

- 1) 名 称： 6-*tert*-ブチル-*m*-クレゾール
(CAS番号 88-60-8)

- 2) 構 造 式：



- 3) 分 子 式： $C_{11}H_{16}O$
4) 分 子 量： 164.24
5) 外 観： 赤味の黄色透明液体^{*1}
6) 安 定 性： 不明
7) 1-オクタノール／水分配係数(logP)： 不明
8) pKa： 不明
9) 水への溶解度： 不明
10) 蒸 気 圧： 不明
11) 純 度： 98.3% (GC法)^{*1}
12) ロット番号： FHE01
13) 供 給 者： [REDACTED]

情 報 源

*1： 供給者提供の添付資料

1.2 被験物質の確認及び保管条件下での安定性

被験物質は当研究所の冷蔵庫に保管した。

入手した被験物質について赤外吸収スペクトルを測定し、被験物質の特性と矛盾が認められないことを確認した。暴露終了後にも同様にスペクトルを測定し、暴露開始前に測定したスペクトルと比較した結果、スペクトルに変化はなかったことより被験物質は暴露終了時まで安定であったと確認された。

2 試験生物

試験には生後24時間令以内のオオミジンコ(*Daphnia magna*)の幼体を用いた。

本種は、英国Sheffield大学(所在地; Sheffield S10 2UQ, United Kingdom)より分譲されたものを、当研究所において継代飼育しているものである。また、基準物質(重クロム酸カリウム、試薬特級、和光純薬工業株式会社)の48時間 EiC_{50} は0.135 mg/Lであった。

試験生物を得るためのミジンコの飼育方法

継代飼育している2～4週令のミジンコを試験生物の親とした。成熟し幼体を生むようになったら少なくとも、試験前日に幼体を除去した。

- 1) 飼育水：希釈水(3.2参照)
- 2) 飼育密度：10～30頭／800 mL飼育水
- 3) 水温：20±1℃
- 4) 照明：室内光、16時間明／8時間暗
- 5) 餌：単細胞緑藻類(*Chlorella vulgaris*)
藻類培養液を遠心操作により、希釈水に置換して給餌した。
- 6) 給餌量：ミジンコ1頭当たり *Chlorella vulgaris* を0.1～0.2 mgC(有機炭素含量)／日の割合で与えた。この範囲でミジンコの成育段階に応じて段階的に餌の量を変えて与えた。

3 試験方法

3.1 試験条件

- 1) 暴露方式：被験物質を含む試験液へ試験生物を暴露する薬浴方式を用いた。
試験は、2日に1回試験液を交換する半止水式で行った。
- 2) 暴露期間：21日間
- 3) 連数：1試験区に付き4連
- 4) 生物数：20頭／1試験区(1連に付き5頭で1試験区20頭)
- 5) 試験液量：1試験容器(1連)に付き500 mL
- 6) 試験水温：20±1℃
- 7) 照明：室内光、16時間明(1,200 lux以下)／8時間暗
- 8) 給餌量：ミジンコ1頭当たり*Chlorella vulgaris*を0.1～0.2 mgC(有機炭素含量)／日の割合で与えた。

3.2 希釈水

脱塩素水(久留米市水道水を活性炭処理し、残留塩素等を除去したもので、充分通気した)を使用した。希釈水使用時にはオルトトリジン法によって残留塩素濃度が0.02 mg/L以下であることを確認した。

[付属資料－1]

3.3 試験容器及び恒温槽等

- 1) 試験容器：蓋付500 mL容ガラス製容器(外径10.0 cm、高さ12.0 cm)
- 2) 恒温槽：加温冷却機によって試験容器内の水温を20±1℃に維持する恒温槽を用いた。
- 3) 水温計：検定済ガラス製棒状温度計
- 4) pH計：ガラス電極式水素イオン濃度計HM-14P型(東亜電波工業)
- 5) 溶存酸素計：溶存酸素計58型(Yellow Springs Instrument Co., Inc.)

3.4 試験濃度の設定

急性遊泳阻害試験の結果である48時間*Ei*C50(3.04 mg/L)及び本試験に先立ち行った予備試験の結果から、試験濃度は2.00 mg/Lを最高濃度として公比2.0で5濃度区(2.00、1.00、0.500、0.250及び0.125 mg/L)を設定した。対照には希釈水のみに対照区を設けた。

3.5 試験液の調製

必要量の被験物質に希釈水を加え、超音波照射しながら攪拌し、100 mg/Lの試験原液を調製した。試験液は、各濃度区毎に必要な量の試験原液と希釈水を混合して調製し、各試験容器に分割した。

3.6 被験物質の分析

全試験区(ただし、各1試験容器)について、暴露期間中に6回(換水前後のものを3回繰り返し)の頻度で採取し、換水前のものについては遠心分離(3,000 rpmで10分間)をして餌を除いた後、HPLCにより分析した。試験液中の被験物質の分析に際しては、標準溶液(濃度0.0500 mg/L)の測定を行い、そのピーク面積比から定量した。詳細は付属資料-2に示した。

3.7 試験操作

試験液の水温、溶存酸素濃度(DO)、pH及び硬度を測定後、試験生物を投入し、その時点を暴露開始時とした。先端が比較的広口のガラスピペットを用いて試験生物を投入した。その際、試験液量に対して、ピペット内の飼育水は全量で1%以内を目安とした。その後、換水毎にミジンコを新しい試験液に移しかえ、21日目まで暴露した。暴露期間中は毎日給餌を行った(3.1参照)。

・ミジンコの観察：

(親ミジンコ) 毎日、生存数、遊泳阻害数、大きさと状態を対照区と比較して観察した。死亡した親ミジンコは計数後に取り除いた。

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

・水質測定：水温、DO、pH及び硬度を全試験区(ただし、各1試験容器)について、暴露期間中に6回(換水前後のものを3回繰り返し)の頻度で測定した。硬度はEDTA滴定法により測定した。

3.8 数値の取扱い

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

4 結果の算出

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

4.1 親ミジンコの半数致死濃度(LC50)の算出

各濃度区での親ミジンコの死亡数と供試個体数(20頭)を用いて、14及び21日目のLC50を算出した。

4.2 50%繁殖阻害濃度(EC50)の算出

累積産仔数の算出

各試験容器(親1頭当たり)の暴露期間中の累積産仔数(TF)及び平均累積産仔数(\overline{TF})を以下の式より求めた。

$$TF = \sum_{n=1}^{ne} F_n$$

ここで、

n : 幼体観察回数

F_n : n 回目の幼体数(ただし、生存幼体)

ne : 最終観察回

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

ここで、

n : 試験容器数

TF_n : 各試験容器(親1頭当たり)の累積産仔数

m : 試験区当たりの系列数(最大4)

EC50の算出

Moving average法によりEC50を算出した。ただし、供試個体数に对照区の平均累積産仔数を、生存数に各濃度区での平均累積産仔数を適用して計算した。14及び21日目のEC50を算出し、それらの95%信頼限界も示した。

4.3 最大無作用濃度(NOEC)及び最小作用濃度(LOEC)

4.2に示した方法で算出した各試験容器毎の親1頭当たりの累積産仔数について、Bartlett法による等分散検定を行った後、各濃度区と対照区との有意差の有無を一元配置分散分析及びDunnettの多重比較法により求めた。この結果に初産日の検定結果及び観察された親並びに産出幼体の状態等も含めて、NOEC及びLOECを決定した。

5 結果及び考察

5.1 試験成績の信頼性に影響を及ぼしたと思われる環境要因

該当する要因はなかった。

5.2 試験液中の被験物質濃度

試験液調製時の被験物質の測定濃度の設定値に対する割合は96.9～104%、2日後(換水前)で85.9～98.4 %であった。いずれの測定値もほぼ設定どおりであった。

[Table 1 (p.10), 付属資料－2]

5.3 ミジンコの観察結果

親ミジンコの死亡数及び死亡率

対照区での親ミジンコの累積死亡率は暴露終了時で10%であり、試験成立条件である20%以下の基準を満たした。

0.125～0.500 mg/L区では暴露終了時に5～20%の累積死亡率がみられた。1.00 mg/L区では50%、2.00 mg/L区では暴露開始19日目までに全個体死亡し、対照区と比較して統計的に有意差がみられた。

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

[Table 2 (p.11), Figure 1 (p.20), 付属資料－3]

初 産 日

いずれの濃度区も初産日は8日であり、対照区と同じであった。

(統計的方法：Kruskal-Wallisの順位和検定)

[Table 3 (p.12)]

平均累積産仔数

対照区での親ミジンコ1頭当たりの平均累積産仔数は136頭であり、試験成立条件である60頭の基準を満たした。

0.125及び0.250 mg/L区での親ミジンコ1頭当たりの平均累積産仔数はそれぞれ119及び126頭であり、対照区と有意差はみられなかった。0.500 mg/L区での親ミジンコ1頭当たりの平均累積産仔数は68頭であり、対照区よりも少なく、統計的にも有意差がみられた。

(統計的方法：一元配置分散分析及びDunnettの多重比較法)

[Table 4 (p.13), Figure 2 (p.21), 付属資料－3]

親ミジンコの大きさと状態

暴露期間中、1.00及び0.500 mg/L区では対照区と比較して成長阻害と体色の明化がほぼ全個体で観察された。また、0.250及び0.125 mg/L区では体色明化、クロレラの付着等が数個体みられた。

休眠卵の発生等

暴露期間中、休眠卵の発生はいずれの試験区でもみられなかった。

死亡仔虫及び落下卵はいずれの試験区でも観察されたが、被験物質濃度との相関はみられなかった。

5.4 親ミジンコの50%致死濃度(LC50)

設定濃度に基づいて算出した14日間の親ミジンコのLC50は1.71 mg/Lであった。また、21日間のLC50は0.895 mg/Lであり、その95%信頼限界は0.703～1.20 mg/Lであった。

[Table 5 (p.14)]

5.5 50%繁殖阻害濃度(EC50)

14日間のEC50は0.903 mg/Lであり、その95%信頼限界は0.790～1.05 mg/Lであった。また、21日間のEC50は0.586 mg/Lであり、その95%信頼限界は0.523～0.660 mg/Lであった。

[Table 6 (p.14)]

5.6 繁殖に及ぼす最大無作用濃度(NOEC)及び最小作用濃度(LOEC)

平均累積産仔数についての有意差検定の結果、0.250 mg/L区では有意差はなかったが、0.500 mg/L区は対照区よりも少なく有意な差が認められた。また、この濃度区では成長阻害と体色の明化がほぼ全個体で観察された。従って、親ミジンコの繁殖に及ぼす21日間のNOECは0.250 mg/Lであり、LOECは0.500 mg/Lであると評価した。

(統計的方法：一元配置分散分析及びDunnnettの多重比較法)

[Table 7 (p.15)]

5.7 試験液の水溫、DO、pH及び硬度

暴露期間中に測定した水溫は20.1～20.3℃であり、 20 ± 1 ℃の範囲であった。DOは8.4～9.0 mg/Lであり、飽和溶存酸素濃度の60%以上であった。(20.0℃の飽和溶存酸素濃度：8.84 mg/L)。pHは7.3～7.6であり、変動は1.5以下であった。硬度は43.0～49.0 mgCaCO₃/Lであり、10～250 mgCaCO₃/Lの範囲であった。

以上のことから、水溫、DO、pH及び硬度については、ミジンコの生育条件としては適切な範囲であったと思われる。

[Table 8～11 (p.16～19)]

5.8 試験液の状態

試験液調製時には無色透明であり、換水前ではクロレラを給餌したことにより淡緑色を呈していた。

以 上

Table 1. Concentrations of 6-*tert*-butyl-*m*-cresol in reproduction test using *Daphnia magna* under semi-static conditions

Nominal concentration (mg/L)	Measured concentration (mg/L) (Percentage of nominal)			
	0-day ^{a)}	2-day ^{b)}	8-day ^{a)}	10-day ^{b)}
Control	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
0.125	0.129 (103)	0.122 (97.2)	0.123 (98.5)	0.107 (85.9)
0.250	0.254 (102)	0.238 (95.1)	0.242 (96.9)	0.226 (90.3)
0.500	0.508 (102)	0.490 (98.0)	0.497 (99.5)	0.447 (89.3)
1.00	0.981 (98.1)	0.951 (95.1)	0.987 (98.7)	0.892 (89.2)
2.00	1.98 (98.9)	1.84 (91.8)	1.95 (97.6)	1.83 (91.7)

Table 1. (continued)

Nominal concentration (mg/L)	Measured concentration (mg/L) (Percentage of nominal)		Time-weighted mean ^{c)} (mg/L)
	16-day ^{a)}	18-day ^{b)}	
Control	n.d.	n.d.	-
0.125	0.130 (104)	0.119 (95.5)	0.122 (97.3)
0.250	0.255 (102)	0.232 (92.8)	0.241 (96.4)
0.500	0.515 (103)	0.483 (96.6)	0.490 (98.0)
1.00	1.02 (102)	0.971 (97.1)	0.967 (96.7)
2.00	2.08 (104)	1.97 (98.4)	1.94 (97.0)

n.d. : < 0.0100 mg/L

a) fresh solutions

b) expired solutions

c) The values are expressed as time-weighted means calculated

by the following equation:

$$\{2(C_0 - C_2)/(\ln C_0 - \ln C_2) + 2(C_8 - C_{10})/(\ln C_8 - \ln C_{10}) + 2(C_{16} - C_{18})/(\ln C_{16} - \ln C_{18})\}/6$$

where

C_x : the measured concentration at x-day

$\ln C_x$: the natural logarithm of C_x .

Table 2. Cumulative number of dead parental *Daphnia* during exposure to 6-*tert*-butyl-*m*-cresol

Nominal concentration (mg/L)	Exposure time (day)										
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Control	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
0.125	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
0.250	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
0.500	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
1.00	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
2.00	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)

Table 2. (continued)

Nominal concentration (mg/L)	Exposure time (day)										
	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
Control	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (5.0)	2 (10.0)	2 (10.0)	2 (10.0)	2 (10.0)
0.125	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (10.0)	3 (15.0)	3 (15.0)	3 (15.0)	3 (15.0)
0.250	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (10.0)	2 (10.0)	4 (20.0)
0.500	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (5.0)	1 (5.0)	1 (5.0)	1 (5.0)	1 (5.0)
1.00	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	6 (30.0)	7 (35.0)	7 (35.0)	7 (35.0)	8 (40.0)	10 (50.0)
2.00	0 (0)	0 (0)	6 (30.0)	14 (70.0)	16 (80.0)	19 (95.0)	19 (95.0)	20 (100)	20 (100)	20 (100)	20 (100)

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

Table 3. Time (days) required to first brood production during exposure to
6-*tert* -butyl-*m* -cresol

Nominal concentration (mg/L)	Vessel No.				Mean
	1	2	3	4	
Control	8	8	8	8	8.0
0.125	8	8	8	8	8.0
0.250	8	8	8	8	8.0
0.500	8	8	8	8	8.0
1.00	8	8	8	8	8.0
2.00	8	8	8	8	8.0

Table 4. Mean cumulative number of juveniles produced per adult ($\Sigma F_1/P$) during exposure to 6-*tert*-butyl-*m*-cresol

Nominal concentration (mg/L)	Exposure time (day)										
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Control	0	0	0	0	0	0	0	0	19.5	19.5	21.0
0.125	0	0	0	0	0	0	0	0	17.8	17.8	21.5
0.250	0	0	0	0	0	0	0	0	18.5	18.5	27.4
0.500	0	0	0	0	0	0	0	0	16.7	16.7	17.4
1.00	0	0	0	0	0	0	0	0	15.7	15.7	18.2
2.00	0	0	0	0	0	0	0	0	3.7	5.3	5.6

Table 4. (continued)

Nominal concentration (mg/L)	Exposure time (day)										
	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
Control	45.7	45.7	45.7	69.7	69.7	69.7	96.1	98.9	98.9	120	136
0.125	41.6	41.6	41.6	59.8	61.1	61.1	85.9	91.4	91.4	108	119
0.250	42.3	42.3	42.3	65.4	66.5	66.5	88.3	93.5	93.5	114	126
0.500	39.8	39.8	39.8	50.0	50.4	50.4	56.9	59.7	59.8	61.6	68.4
1.00	36.8	36.8	36.8	38.8	38.9	38.9	38.9	38.9	38.9	38.9	38.9
2.00	7.4	7.4	7.4	7.4	7.4	7.4	7.4	7.4	7.4	7.4	7.4

Table 5. Calculated LC50 values of 6-*tert*-butyl-*m*-cresol for parental *Daphnia* based on nominal concentrations

Exposure time (day)	LC50 (mg/L)	95-Percent confidence limits (mg/L)	Statistical method
14	1.71	-	Binomial
21	0.895	0.703 – 1.20	Moving average

Table 6. Calculated EC50 values of 6-*tert*-butyl-*m*-cresol for inhibition of reproduction based on nominal concentrations

Exposure time (day)	EC50 (mg/L)	95-Percent confidence limits (mg/L)	Statistical method
14	0.903	0.790 – 1.05	Moving average
21	0.586	0.523 – 0.660	Moving average

Table 7. Significance test of difference between the mean cumulative numbers of juveniles produced per adult in control and test vessels after 21days exposure to 6-*tert*-butyl-*m*-cresol

Nominal concentration (mg/L)	Vessel No.				Mean	S.D.	Significant difference
	1	2	3	4			
Control	130	148	130	138	136	8.5	
0.125	122	103	114	137	119	14.3	
0.250	123	126	133	121	126	5.2	
0.500	63	82	79	50	68	15.0	**
1.00	35	38	43	40	39	3.4	-
2.00	8	7	5	10	7	1.9	-

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

The data of 1.00 and 2.00 mg/L were omitted from statistical analysis.

Table 8. Temperature of test solutions during 21-day *Daphnia* reproduction test to 6-*tert*-butyl-*m*-cresol

Nominal concentration (mg/L)		Temperature (°C)					
		0-day	2-day	8-day	10-day	16-day	18-day
Control	New	20.3		20.1		20.1	
	Old		20.3		20.3		20.2
0.125	New	20.3		20.1		20.1	
	Old		20.3		20.3		20.2
0.250	New	20.3		20.1		20.1	
	Old		20.3		20.3		20.2
0.500	New	20.3		20.1		20.1	
	Old		20.3		20.3		20.2
1.00	New	20.3		20.1		20.1	
	Old		20.3		20.2		20.2
2.00	New	20.3		20.1		20.1	
	Old		20.3		20.1		20.2

New : freshly prepared test solutions

Old : test solutions after 48 hours

Table 9. Dissolved oxygen concentrations of test solutions during 21-day *Daphnia* reproduction test to 6-*tert*-butyl-*m*-cresol

Nominal concentration (mg/L)		Dissolved oxygen concentration (mg/L)					
		0-day	2-day	8-day	10-day	16-day	18-day
Control	New	8.9		8.7		8.6	
	Old		9.0		8.6		8.4
0.125	New	8.9		8.7		8.6	
	Old		9.0		8.6		8.4
0.250	New	8.9		8.7		8.6	
	Old		9.0		8.6		8.4
0.500	New	8.9		8.7		8.6	
	Old		9.0		8.6		8.5
1.00	New	8.9		8.7		8.6	
	Old		9.0		8.6		8.5
2.00	New	8.9		8.7		8.6	
	Old		9.0		8.7		8.8

New : freshly prepared test solutions

Old : test solutions after 48 hours

Table 10. pH values of test solutions during 21-day *Daphnia* reproduction test to 6-*tert*-butyl-*m*-cresol

Nominal concentration (mg/L)		pH					
		0-day	2-day	8-day	10-day	16-day	18-day
Control	New	7.4		7.5		7.5	
	Old		7.6		7.5		7.3
0.125	New	7.4		7.5		7.5	
	Old		7.6		7.5		7.3
0.250	New	7.4		7.5		7.5	
	Old		7.5		7.5		7.3
0.500	New	7.4		7.5		7.5	
	Old		7.6		7.5		7.5
1.00	New	7.4		7.5		7.5	
	Old		7.5		7.5		7.5
2.00	New	7.4		7.5		7.5	
	Old		7.6		7.5		7.5

New : freshly prepared test solutions

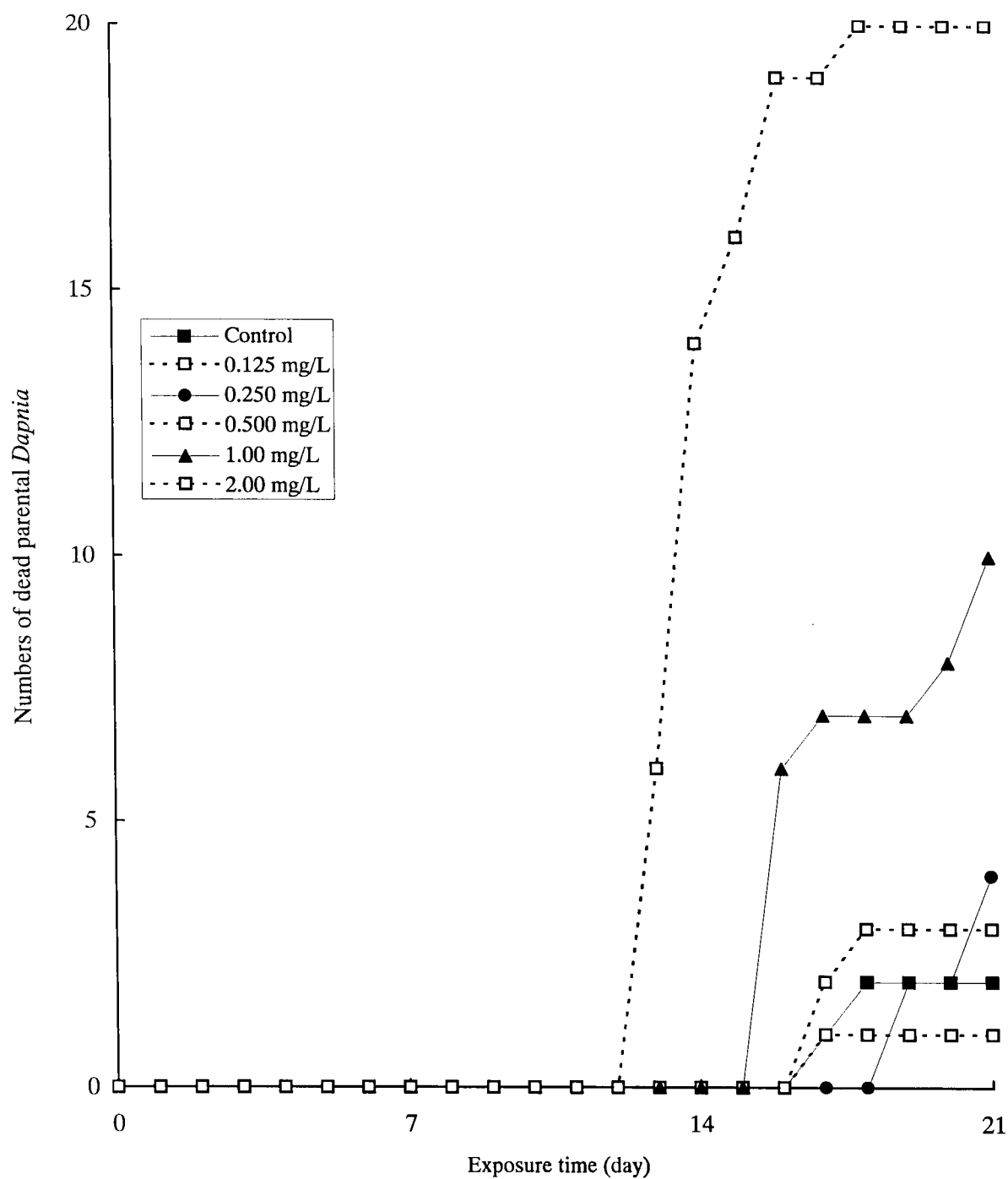
Old : test solutions after 48 hours

Table 11. Total hardness of test solutions during 21-day *Daphnia* reproduction test to 6-*tert*-butyl-*m*-cresol

Nominal concentration		Total hardness (mgCaCO ₃ /L)					
(mg/L)		0-day	2-day	8-day	10-day	16-day	18-day
Control	New	44.6		48.6		44.0	
	Old		43.6		49.0		43.0
0.125	New	44.0		48.6		44.0	
	Old		43.8		48.4		43.0
0.250	New	44.4		48.6		44.0	
	Old		44.0		48.6		43.0
0.500	New	44.4		48.6		43.6	
	Old		44.6		49.0		43.4
1.00	New	44.0		49.0		43.6	
	Old		44.6		48.6		43.0
2.00	New	44.4		49.0		44.0	
	Old		45.0		48.8		43.4

New : freshly prepared test solutions

Old : test solutions after 48 hours

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

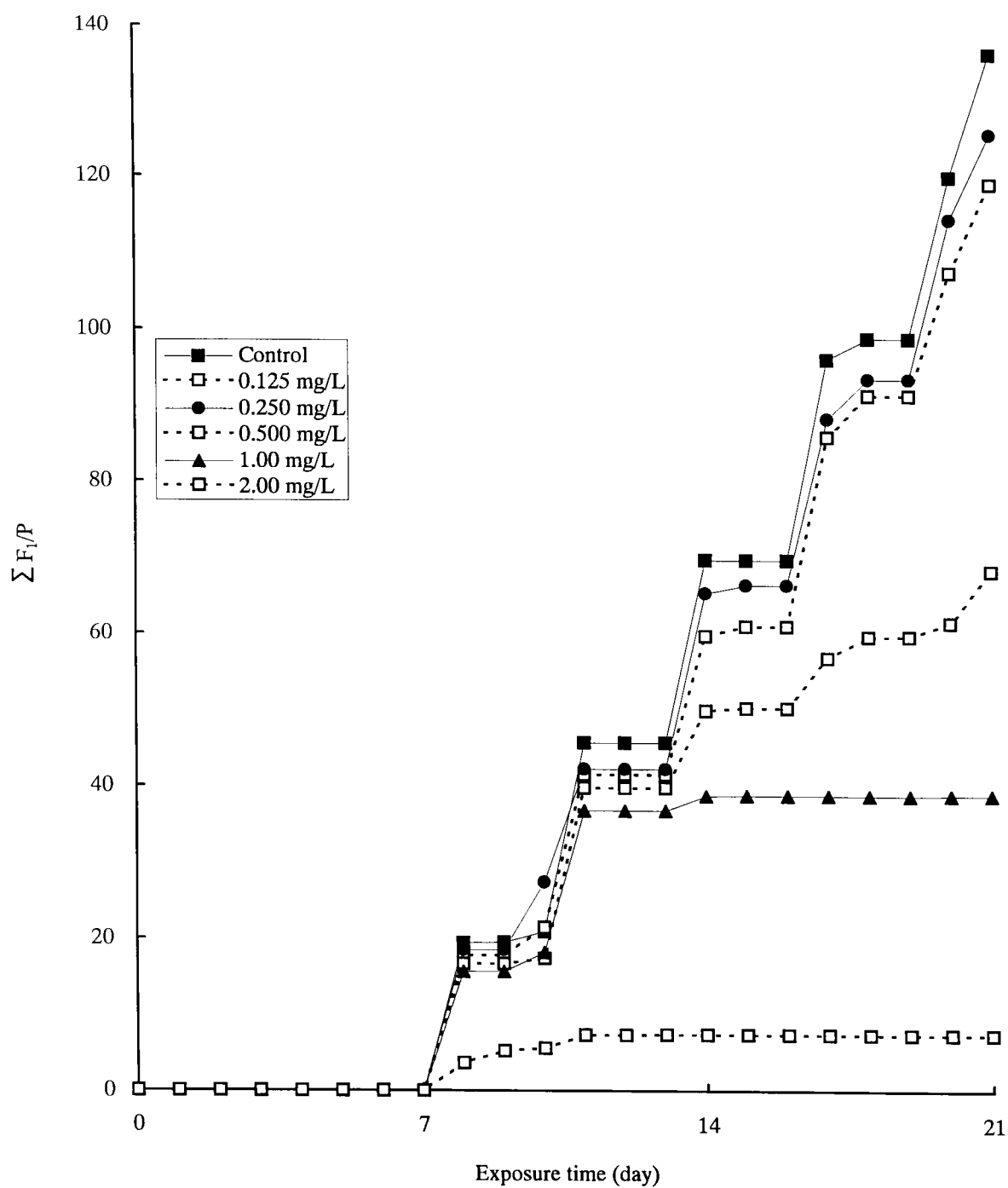


Figure 2. Mean cumulative numbers of juveniles produced per adult ($\Sigma F_1/P$).

付属資料－1

希釈水の水質

(全 2 頁)

Appendix 1. Water quality of dilution water

Parameter	Concentration	Lower limit
	1999.Feb.3	of detection
pH	7.5	
COD (mg/L)	1.7	
Coliform group bacteria (MPN/100 mL)	0	
Total phosphorus (mg/L)	0.006	
Total mercury (mg/L)	n.d.	0.0005
Copper (mg/L)	n.d.	0.005
Cadmium (mg/L)	n.d.	0.005
Zinc (mg/L)	n.d.	0.01
Lead (mg/L)	n.d.	0.005
Aluminium (mg/L)	n.d.	0.1
Nickel (mg/L)	n.d.	0.01
Total chromium (mg/L)	n.d.	0.02
Manganese (mg/L)	n.d.	0.01
Tin (mg/L)	n.d.	0.5
Iron (mg/L)	0.03	
Cyanide (mg/L)	n.d.	0.1
Free chlorine (mg/L)	n.d.	0.01
Bromide ion (mg/L)	n.d.	0.1
Fluoride (mg/L)	n.d.	0.15
Sulfide ion (mg/L)	n.d.	0.1
Ammonia nitrogen (mg/L)	0.02	
Arsenic (mg/L)	n.d.	0.002
Selenium (mg/L)	n.d.	0.002
Evaporation residue (mg/L)	121	
Electric conductivity (μs/cm)	172	
Total hardness (as CaCO ₃) (mg/L)	52.0	
Alkalinity (mg/L)	33.0	
Sodium (mg/L)	14.0	
Potassium (mg/L)	3.52	
Calcium (mg/L)	11.6	
Magnesium (mg/L)	5.59	

Appendix 1. (continued)

Parameter		Concentration	Lower limit of detection
		1999.Feb.3	
1,2-Dichloropropane	(mg/L)	n.d.	0.006
Diazinon	(mg/L)	n.d.	0.0005
Isoxathion	(mg/L)	n.d.	0.0008
Fenitrothion (MEP)	(mg/L)	n.d.	0.0003
Isoprothiolane	(mg/L)	n.d.	0.004
Oxine cupper	(mg/L)	n.d.	0.004
Chlorothalonil (TPN)	(mg/L)	n.d.	0.004
Propyzamide	(mg/L)	n.d.	0.0008
EPN	(mg/L)	n.d.	0.0006
Dichlorvos (DDVP)	(mg/L)	n.d.	0.001
Fenobucarb (BPMC)	(mg/L)	n.d.	0.002
Iprobenfos (IBP)	(mg/L)	n.d.	0.0008
Chlornitrofen (CNP)	(mg/L)	n.d.	0.0005
Thiram	(mg/L)	n.d.	0.0006
Simazine (CAT)	(mg/L)	n.d.	0.0003
Thiobencarb	(mg/L)	n.d.	0.002
PCB	(mg/L)	n.d.	0.0005

n.d. : not detected

付属資料－2

試験液の分析方法及び分析チャート

(全 6 頁)

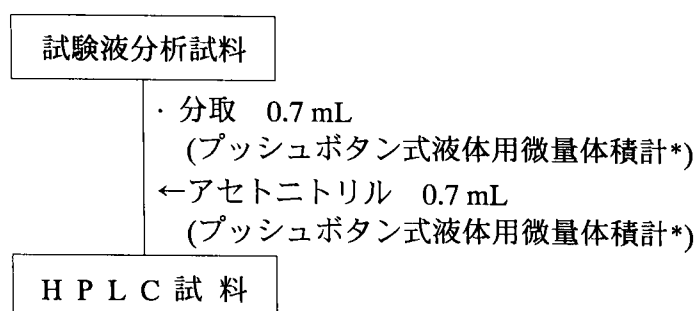
試 験 名 : ミジンコ繁殖阻害試験
 被 験 物 質 名 : 6-*tert*-ブチル-*m*-クレゾール

1) 試験液の分析方法

(1) 試験液の前処理操作

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

フロースキーム



* エッペンドルフ社製

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

(2) 被験物質溶液の調製

被験物質100 mgを電子分析天びんで正確にはかりとり、アセトニトリルに溶解して1,000 mg/Lの被験物質溶液を調製した。これを脱塩素水で希釈して1.00 mg/Lの被験物質溶液を調製した。

(3) 標準溶液の調製

分析試料中の被験物質濃度を求めるための標準溶液の調製は次のようにして行った。1.00 mg/Lの被験物質溶液をアセトニトリル/脱塩素水 1/1 (v/v) になるように希釈して0.0500 mg/Lの標準溶液とした。

2) 定量条件

機 器	高速液体クロマトグラフ
ポンプ	島津製作所製 LC-10AD
検出器	島津製作所製 SPD-10A
オートインジェクター	島津製作所製 SIL-10A
カラム	L-column ODS (化学品検査協会製) 15 cm×4.6 mmφ ステンレス製
カラム温度	40℃
溶離液	アセトニトリル/蒸留水 70/30 (v/v)
流量	1.0 mL/min
測定波長	275 nm
注入量	400 μ L
感度	
検出器	1 AU/1 V
記録計	ATTEN 2 ²

3) 検量線の作成

1)(3)の標準溶液の調製と同様にして0.00500、0.0250、0.0500及び0.100 mg/Lの標準溶液を調製した。これらを2)の定量条件に従って分析し、得られたそれぞれのクロマトグラム上のピーク面積と濃度により、検量線を作成した。

Table of Attached Figures

Figure 1.	Calibration curve of 6- <i>tert</i> -butyl- <i>m</i> -cresol by HPLC analysis.
Figure 2-1.	Example of chromatogram. (standard solution of 0.0500 mg/L, 0-day)
Figure 2-2.	Example of chromatogram. (fresh test solution of 0.500 mg/L as nominal concentration, 0-day)
Figure 2-3.	Example of chromatogram. (fresh test solution of control, 0-day)
Figure 2-4.	Example of chromatogram. (standard solution of 0.0500 mg/L, 2-day)
Figure 2-5.	Example of chromatogram. (expired test solution of 0.500 mg/L as nominal concentration, 2-day)
Figure 2-6.	Example of chromatogram. (expired test solution of control, 2-day)

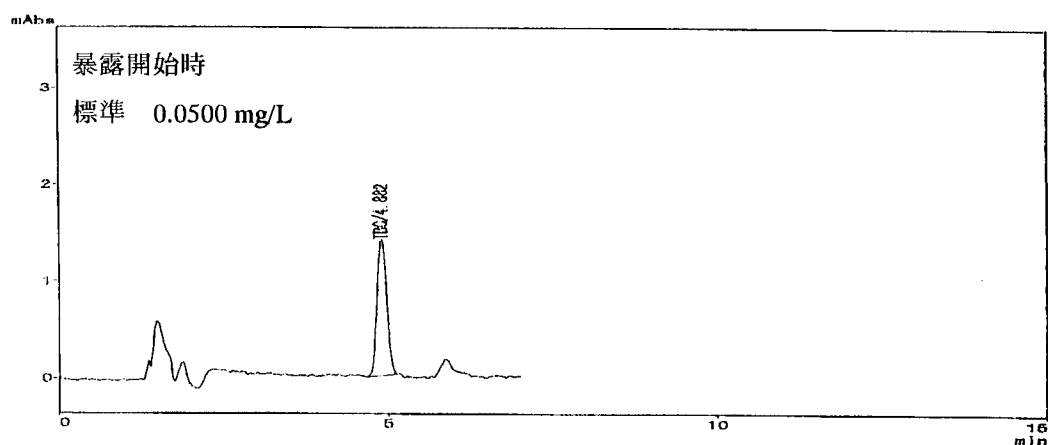


Figure 2-1. Example of chromatogram.
(standard solution of 0.0500 mg/L, 0-day)

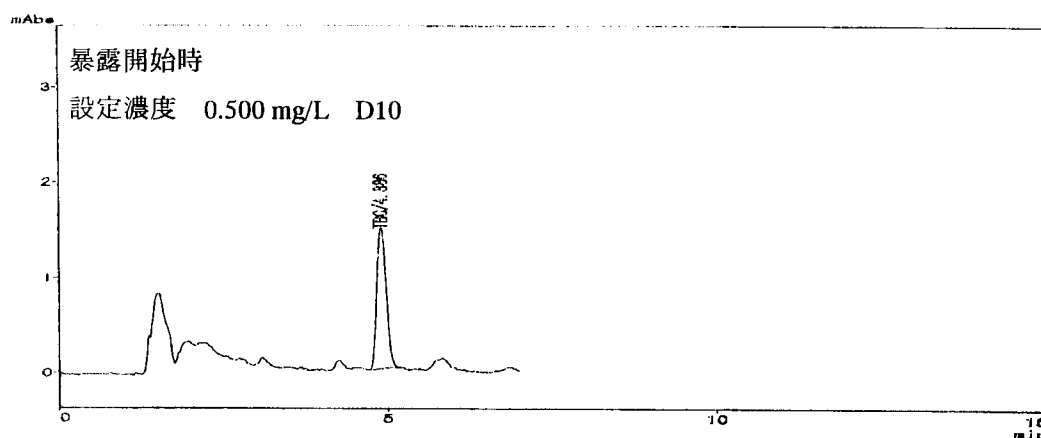


Figure 2-2. Example of chromatogram.
(fresh test solution of 0.500 mg/L as nominal concentration, 0-day)

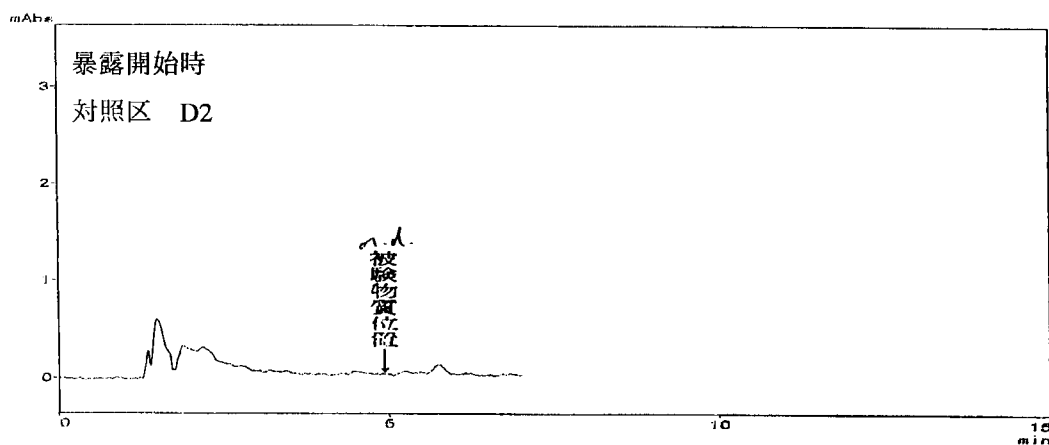


Figure 2-3. Example of chromatogram.
(fresh test solution of control, 0-day)

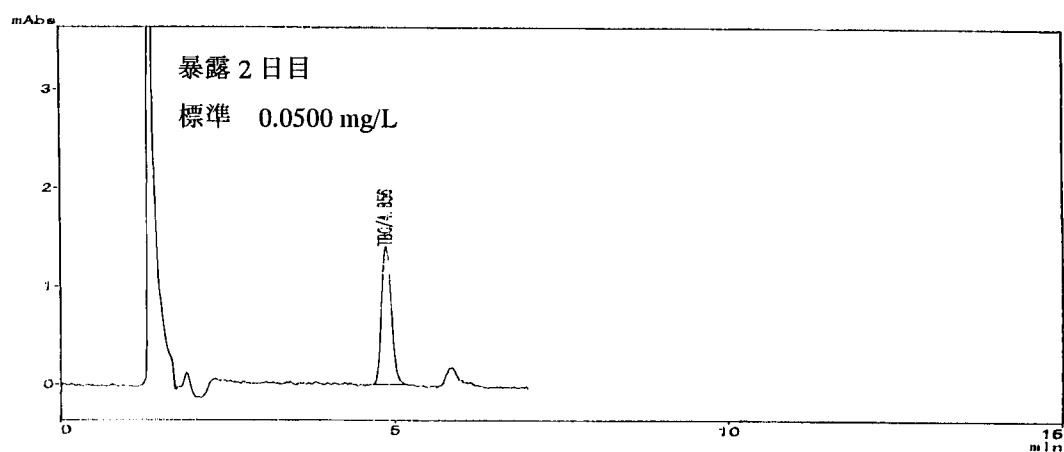


Figure 2-4. Example of chromatogram.
(standard solution of 0.0500 mg/L, 2-day)

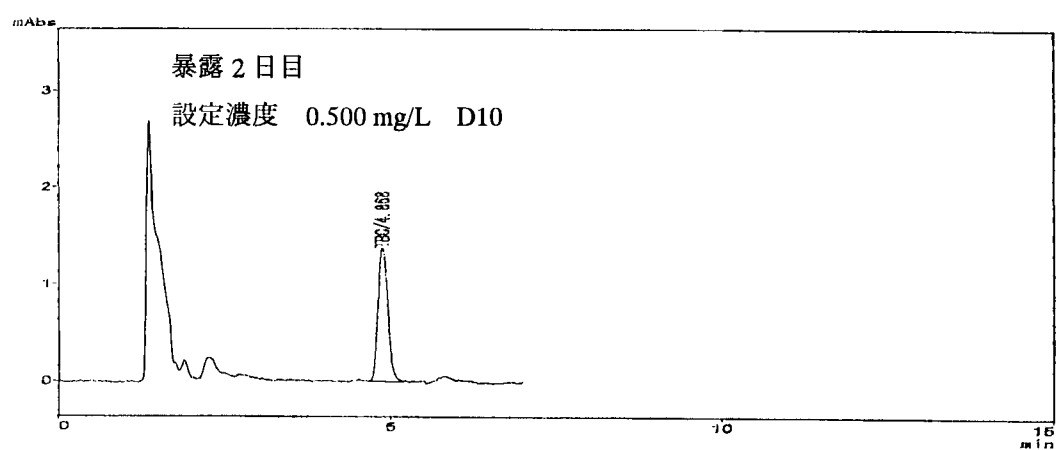


Figure 2-5. Example of chromatogram.
(expired test solution of 0.500 mg/L as nominal concentration, 2-day)

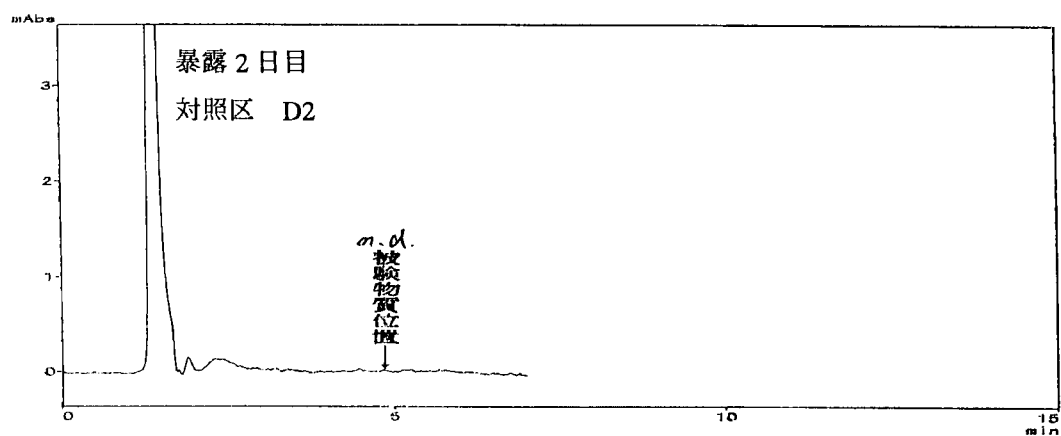
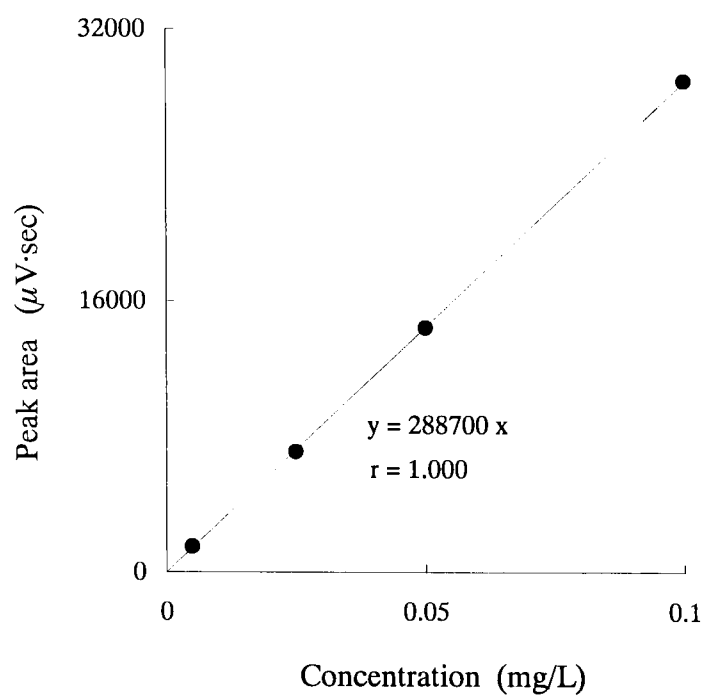


Figure 2-6. Example of chromatogram.
(expired test solution of control, 2-day)

Input data

Run	Concentration (mg/L)	Peak area ($\mu\text{V}\cdot\text{sec}$)
1	0.00500	1485
2	0.0250	7069
3	0.0500	14389
4	0.100	28928

Figure 1. Calibration curve of 6-*tert*-butyl-*m*-cresol by HPLC analysis.

付属資料－3

ミジンコの観察結果

(全 6 頁)

Appendix 3-1. Result of reproduction test

(Nominal concentration : Control)

			Time																					Total
Rep. No.	Counts		3/16	3/17	3/18	3/19	3/20	3/21	3/22	3/23	3/24	3/25	3/26	3/27	3/28	3/29	3/30	3/31	4/1	4/2	4/3	4/4	4/5	
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	
1	P generation	Live	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	4	4	4	4	4	-
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	-
	F ₁ generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	100	1	0	132	0	0	92	0	0	81	30	0	76	81	593
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	14	0	0	0	1	0	0	0	18
	Total		0	0	0	0	0	0	0	100	1	0	135	0	0	106	0	0	81	31	0	76	81	611
	Cumulative reproductivity		0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	20.0	0.2	0.0	26.4	0.0	0.0	18.4	0.0	0.0	18.0	7.5	0.0	19.0	20.3	130
2	P generation	Live	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	-
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-
	F ₁ generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	102	0	0	139	0	0	138	0	0	150	19	0	47	144	739
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	3	0	0	6	0	0	0	0	0	0	0	10
	Total		0	0	0	0	0	0	0	103	0	0	142	0	0	144	0	0	150	19	0	47	144	749
	Cumulative reproductivity		0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	20.4	0.0	0.0	27.8	0.0	0.0	27.6	0.0	0.0	30.0	3.8	0.0	9.4	28.8	148
3	P generation	Live	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	-
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-
	F ₁ generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	95	0	3	121	0	0	118	0	0	139	0	0	133	41	650
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	2	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	6
	Total		0	0	0	0	0	0	0	96	0	3	123	0	0	121	0	0	139	0	0	133	41	656
	Cumulative reproductivity		0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	19.0	0.0	0.6	24.2	0.0	0.0	23.6	0.0	0.0	27.8	0.0	0.0	26.6	8.2	130
4	P generation	Live	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	4	4	4	4	-
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	-
	F ₁ generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	92	0	26	103	0	0	132	0	0	148	0	0	118	32	651
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	4
	Total		0	0	0	0	0	0	0	92	0	26	105	0	0	134	0	0	148	0	0	118	32	655
	Cumulative reproductivity		0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	18.4	0.0	5.2	20.6	0.0	0.0	26.4	0.0	0.0	29.6	0.0	0.0	29.5	8.0	138

Appendix 3-2. Result of reproduction test

(Nominal concentration : 0.125 mg/L)

(Nominal concentration : 0.125 mg/L)																								
Rep. No.	Counts		Time																					Total
			3/16	3/17	3/18	3/19	3/20	3/21	3/22	3/23	3/24	3/25	3/26	3/27	3/28	3/29	3/30	3/31	4/1	4/2	4/3	4/4	4/5	
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	
1	P generation	Live	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	3	3	3	3	3	-	
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	2	2	2	-
	F ₁ generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	82	0	0	93	0	0	67	6	0	122	29	0	68	29	496
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	7	0	0	0	0	0	0	0	9
	Total		0	0	0	0	0	0	0	82	0	0	95	0	0	74	6	0	122	29	0	68	29	505
	Cumulative reproductivity		0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	16.4	0.0	0.0	18.6	0.0	0.0	13.4	1.2	0.0	30.5	9.7	0.0	22.7	9.7	122
2	P generation	Live	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	-	
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	
	F ₁ generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	94	0	11	129	0	0	43	1	0	109	20	0	39	68	514
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	2	0	0	24	0	0	0	0	0	0	0	27
	Total		0	0	0	0	0	0	0	95	0	11	131	0	0	67	1	0	109	20	0	39	68	541
	Cumulative reproductivity		0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	18.8	0.0	2.2	25.8	0.0	0.0	8.6	0.2	0.0	21.8	4.0	0.0	7.8	13.6	103
3	P generation	Live	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	4	4	4	4	-	
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	-
	F ₁ generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	96	0	31	82	0	0	132	1	0	93	11	0	55	45	546
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	6	0	0	0	0	0	0	0	0	10	0	17
	Total		0	0	0	0	0	0	0	96	0	32	88	0	0	132	1	0	93	11	0	65	45	563
	Cumulative reproductivity		0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	19.2	0.0	6.2	16.4	0.0	0.0	26.4	0.2	0.0	18.6	2.4	0.0	13.8	11.3	114
4	P generation	Live	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	-	
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	
	F ₁ generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	84	0	31	98	0	0	122	18	0	143	29	0	102	58	685
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
	Total		0	0	0	0	0	0	0	84	0	31	99	0	0	122	18	0	143	29	0	102	58	686
	Cumulative reproductivity		0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	16.8	0.0	6.2	19.6	0.0	0.0	24.4	3.6	0.0	28.6	5.8	0.0	20.4	11.6	137
Cumulative reproductivity		0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	16.8	16.8	23.0	42.6	42.6	42.6	67.0	70.6	70.6	99.2	105.0	105.0	125.4	137.0		

Appendix 3-3. Result of reproduction test

(Nominal concentration : 0.250 mg/L)

Rep. No.	Counts		Time																					Total
			3/16	3/17	3/18	3/19	3/20	3/21	3/22	3/23	3/24	3/25	3/26	3/27	3/28	3/29	3/30	3/31	4/1	4/2	4/3	4/4	4/5	
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	
1	P generation	Live	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	4	-
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	-
	F ₁ generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	90	0	16	84	0	0	86	19	0	89	48	0	52	116	600
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	5
	Total		0	0	0	0	0	0	0	90	0	16	85	0	0	90	19	0	89	48	0	52	116	605
	Cumulative reproductivity		0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	18.0	0.0	3.2	16.8	0.0	0.0	17.2	3.8	0.0	17.8	9.6	0.0	10.4	25.8	123
2	P generation	Live	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	4	4	4	-
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	-
	F ₁ generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	94	0	29	112	0	0	123	0	0	117	13	0	83	30	601
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	8	0	0	0	0	0	0	0	10
	Total		0	0	0	0	0	0	0	94	0	29	114	0	0	131	0	0	117	13	0	83	30	611
	Cumulative reproductivity		0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	18.8	0.0	5.8	22.4	0.0	0.0	24.6	0.0	0.0	23.4	2.6	0.0	20.8	7.5	126
3	P generation	Live	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	4	4	3	-
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	2	-
	F ₁ generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	93	0	42	72	0	0	134	3	0	124	26	0	111	22	627
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	7
	Total		0	0	0	0	0	0	0	93	0	42	76	0	0	137	3	0	124	26	0	111	22	634
	Cumulative reproductivity		0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	18.6	0.0	8.4	14.4	0.0	0.0	26.8	0.6	0.0	24.8	5.2	0.0	27.8	6.3	133
4	P generation	Live	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	-
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-
	F ₁ generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	93	0	91	29	0	0	119	0	0	107	17	0	124	26	606
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Total		0	0	0	0	0	0	0	93	0	91	29	0	0	119	0	0	107	17	0	124	26	606
	Cumulative reproductivity		0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	18.6	0.0	18.2	5.8	0.0	0.0	23.8	0.0	0.0	21.4	3.4	0.0	24.8	5.2	121

Appendix 3-4. Result of reproduction test

(Nominal concentration : 0.500 mg/L)

Rep. No.	Counts		Time																					Total
			3/16	3/17	3/18	3/19	3/20	3/21	3/22	3/23	3/24	3/25	3/26	3/27	3/28	3/29	3/30	3/31	4/1	4/2	4/3	4/4	4/5	
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	
1	P generation	Live	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	4	4	4	4	4	-
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	-
	F ₁ generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	83	0	1	128	0	0	44	0	0	5	16	0	0	26	303
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	5	0	0	0	0	0	0	0	7
	Total		0	0	0	0	0	0	0	83	0	1	130	0	0	49	0	0	5	16	0	0	26	310
	Cumulative reproductivity		0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	16.6	0.0	0.2	25.6	0.0	0.0	8.8	0.0	0.0	1.1	4.0	0.0	0.0	6.5	63
2	P generation	Live	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	-
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-
	F ₁ generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	87	0	0	113	0	0	89	0	0	44	16	0	0	63	412
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7	0	0	0	1	0	0	0	8
	Total		0	0	0	0	0	0	0	87	0	0	113	0	0	96	0	0	44	17	0	0	63	420
	Cumulative reproductivity		0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	17.4	0.0	0.0	22.6	0.0	0.0	17.8	0.0	0.0	8.8	3.2	0.0	0.0	12.6	82
3	P generation	Live	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	-
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-
	F ₁ generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	79	0	13	107	0	0	67	2	0	73	0	1	36	15	393
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
	Total		0	0	0	0	0	0	0	79	0	13	109	0	0	67	2	0	73	0	1	36	15	395
	Cumulative reproductivity		0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	15.8	0.0	2.6	21.4	0.0	0.0	13.4	0.4	0.0	14.6	0.0	0.2	7.2	3.0	79
4	P generation	Live	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	-
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-
	F ₁ generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	85	0	0	100	0	0	4	5	0	9	20	0	0	26	249
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	3
	Total		0	0	0	0	0	0	0	85	0	0	101	0	0	5	5	0	9	21	0	0	26	252
	Cumulative reproductivity		0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	17.0	0.0	0.0	20.0	0.0	0.0	0.8	1.0	0.0	1.8	4.0	0.0	0.0	5.2	50

Appendix 3-5. Result of reproduction test

(Nominal concentration : 1.00 mg/L)

Rep. No.	Counts		Time																					Total
			3/16	3/17	3/18	3/19	3/20	3/21	3/22	3/23	3/24	3/25	3/26	3/27	3/28	3/29	3/30	3/31	4/1	4/2	4/3	4/4	4/5	
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	
1	P generation	Live	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	4	3	3	3	3	1	-
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	2	2	2	4	-
	F ₁ generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	77	0	0	93	0	0	5	0	0	0	0	0	0	0	175
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4
	Total		0	0	0	0	0	0	0	78	0	0	96	0	0	5	0	0	0	0	0	0	0	179
	Cumulative reproductivity		0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	15.4	0.0	0.0	18.6	0.0	0.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	35
2	P generation	Live	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	2	2	2	2	2	2	-
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	3	3	3	3	3	-
	F ₁ generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	86	0	0	97	0	0	5	0	0	0	0	0	0	0	188
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3
	Total		0	0	0	0	0	0	0	86	0	0	100	0	0	5	0	0	0	0	0	0	0	191
	Cumulative reproductivity		0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	17.2	0.0	0.0	19.4	0.0	0.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	38
3	P generation	Live	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	3	3	3	3	2	2	-
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	2	2	3	3	-
	F ₁ generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	74	0	10	112	0	0	18	1	0	0	0	0	0	0	215
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	2	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	6
	Total		0	0	0	0	0	0	0	75	0	10	114	0	0	21	1	0	0	0	0	0	0	221
	Cumulative reproductivity		0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	14.8	0.0	2.0	22.4	0.0	0.0	3.6	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	43
4	P generation	Live	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	-
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-
	F ₁ generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	76	0	41	70	0	0	11	1	0	0	0	0	1	0	200
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	2	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	5
	Total		0	0	0	0	0	0	0	77	0	41	72	0	0	13	1	0	0	0	0	1	0	205
	Cumulative reproductivity		0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	15.2	0.0	8.2	14.0	0.0	0.0	2.2	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.2	0.0	40
Cumulative reproductivity			0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	15.2	15.2	23.4	37.4	37.4	37.4	39.6	39.8	39.8	39.8	39.8	39.8	40.0	40.0	

Appendix 3-6. Result of reproduction test

(Nominal concentration : 2.00 mg/L)

			(Nominal concentration : 2.00 mg/L)																					
Rep. No.	Counts		Time																					Total
			3/16	3/17	3/18	3/19	3/20	3/21	3/22	3/23	3/24	3/25	3/26	3/27	3/28	3/29	3/30	3/31	4/1	4/2	4/3	4/4	4/5	
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	
1	P generation	Live	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	1	1	0	0	0	0	0	0	-
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	4	5	5	5	5	5	5	-
	F ₁ generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	28	5	1	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	39
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8
	Total		0	0	0	0	0	0	0	36	5	1	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	47
	Cumulative reproductivity		0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	5.6	1.0	0.2	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	-	-	-	-	-	-	8
2	P generation	Live	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	2	2	1	0	0	0	0	0	-	
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	3	4	5	5	5	5	5	-	
	F ₁ generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	17	6	0	10	0	1	0	0	0	0	0	0	0	34	
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	14	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	16	
	Total		0	0	0	0	0	0	0	31	6	0	11	0	2	0	0	0	0	0	0	0	50	
	Cumulative reproductivity		0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.4	1.2	0.0	2.0	0.0	0.3	0.0	0.0	-	-	-	-	-	-	7
3	P generation	Live	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	3	1	1	1	1	0	0	0	-	
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	4	4	4	4	5	5	5	-	
	F ₁ generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	6	6	6	8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	26	
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	11	2	1	2	0	0	1	0	0	0	0	0	0	17	
	Total		0	0	0	0	0	0	0	17	8	7	10	0	0	1	0	0	0	0	0	0	43	
	Cumulative reproductivity		0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.2	1.2	1.2	1.6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	-	-	-	-	5
4	P generation	Live	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	4	2	1	0	0	0	0	0	-	
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	3	4	5	5	5	5	5	-	
	F ₁ generation	Live	0	0	0	0	0	0	0	22	15	0	12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	49	
		Dead	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	7	
	Total		0	0	0	0	0	0	0	26	15	0	14	1	0	0	0	0	0	0	0	0	56	
	Cumulative reproductivity		0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	4.4	3.0	0.0	2.4	0.0	0.0	0.0	0.0	-	-	-	-	-	-	10