

財団法人化学物質評価研究機構殿

本写しは原本と相違ありません

(株)三菱化学安全科学研究所
横浜研究所 運営管理者
[Redacted]

最 終 報 告 書

K-1637のコイへの濃縮度試験

(試験番号：A020241)

2003年 2月26日

株式会社三菱化学安全科学研究所

陳 述 書

株式会社三菱化学安全科学研究所
横浜研究所

試験委託者： 財団法人化学物質評価研究機構

表 題： K-1637のコイへの濃縮度試験

試験番号： A020241

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

また、本試験は下記のG L Pに従って実施したものである。

「新規化学物質に係る試験及び指定化学物質に係る有害性の調査の項目等を定める省令第4条に規定する試験施設について」（環保業第39号，薬発第229号，59基局第85号，1984；一部改正2000）

2003年 2月26日

試験責任者

[Redacted Signature]

[Redacted Stamp]

信 頼 性 保 証 書

株式会社三菱化学安全科学研究所
横浜研究所

試験委託者： 財団法人化学物質評価研究機構

表 題： K-1637のコイへの濃縮度試験

試験番号： A020241

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

記

実 施 事 項	実 施 日	運営管理者および 試験責任者への報告日
試験計画書監査	2002年10月29日	2002年10月29日
試験の査察	フィード原液の調製	2002年11月 6日
	魚の投入	2002年11月 8日
	魚の分析	2002年11月22,25日
	試験水の分析	2002年11月29日
最終報告書監査	2003年 2月26日	2003年 2月26日

信頼性保証部門担当者： 2003年 2月26日

試 験 実 施 概 要

1. 表 題： K-1637のコイへの濃縮度試験
(試験番号：A020241)
2. 試験目的： 被験物質のコイへの濃縮度試験を行い、濃縮性を評価する。
3. 適用ガイドライン： 「新規化学物質等に係る試験の方法について」（環保業第 5 号，薬発第 615 号，49 基局第 392 号，1974；一部改正 1998）
4. 適用GLP： 「新規化学物質に係る試験及び指定化学物質に係る有害性の調査の項目等を定める省令第 4 条に規定する試験施設について」（環保業第 39 号，薬発第 229 号，59 基局第 85 号，1984；一部改正 2000）
5. 試験委託者： 財団法人化学物質評価研究機構
福岡県久留米市中央町 19 番 14 号
委託責任者
[REDACTED]
6. 試験受託者： 株式会社三菱化学安全科学研究所
東京都港区芝二丁目 1 番 30 号
7. 試験施設： 株式会社三菱化学安全科学研究所 横浜研究所
神奈川県横浜市青葉区鴨志田町 1000 番地

8. 試験責任者： [REDACTED]
生態化学グループ

9. 試験担当者： [REDACTED]
(試験実施，生データ整理)

10. 試験日程：	試験開始日	2002年10月29日
	取込開始日	2002年11月 8日
	取込終了日	2003年 1月 7日
	排泄開始日	2003年 1月 8日
	排泄終了日	2003年 1月22日
	試験終了日	2003年 2月26日

11. 保 管： 試験計画書，生データ，被験物質，記録文書および最終報告書は，横浜研究所の保管施設に保管する。

保管期間は，最終報告書作成後 10 年間とし，以降の保管は試験委託者と協議の上，決定する。

ただし，被験物質については，上記通知を受けるまでの期間または品質低下をおこさないで安定に保存しうる期間のいずれか短い方の期間とする。

目 次

	頁
要 約 -----	8
1 被験物質 -----	10
1.1 名称、構造式及び物理化学的性状	10
1.2 供試試料	10
1.3 被験物質の確認	11
1.4 保管方法および保管条件下での安定性	11
2 試験の概要 -----	11
3 試験用水 -----	11
4 急性毒性試験 -----	12
4.1 供試魚	12
4.2 試験条件	12
4.3 試験液の調製	13
4.4 結果	13
5 分析方法 -----	13
5.1 機器及び試薬	13
5.2 ガスクロマトグラフ質量分析計（GC/MS）測定条件	14
5.3 検量線の作成	14
5.4 試験水中の被験物質の分析方法	15
5.5 魚体中の被験物質の分析方法	16
5.6 ブランク試験及び添加回収試験	17
6 濃縮度試験方法 -----	18
6.1 供試魚	18
6.2 試験条件	18
6.3 濃縮度試験装置	19
6.4 試験水の調製	19
6.5 試験条件下の安定性	20
6.6 魚の投入及び管理	20
6.7 被験物質の濃度測定	20
6.8 濃縮倍率	21

7 結果及び考察	22
7.1 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	22
7.2 供試魚の管理	22
7.3 試験水中の被験物質濃度	22
7.4 魚体中の被験物質濃度及び濃縮倍率	22
7.5 部位別の濃縮倍率	23
7.6 排泄試験	23

Tab. 1~12	24~32
-----------	-------

Fig. 1~14	26~29, 31~42
-----------	--------------

Appendix

1 Information on the test substance	全 5 頁
2 Dilution water quality	全 2 頁
3 Chromatograms (Analysis of the test substance in the test water)	全 11 頁
4 Chromatograms (Analysis of the test substance in the test fish)	全 15 頁
5 Chromatograms (Analysis of the test substance in the tissues)	全 5 頁
6 Chromatograms (Analysis of the test substance in the test fish)	
Depuration period	全 9 頁

要 約

試験委託者：財団法人化学物質評価研究機構

表 題：K-1637のコイへの濃縮度試験

試験番号：A020241

試験期間：2002年10月29日～2003年 2月26日

試験方法：「新規化学物質等に係る試験の方法について」（環保業第5号，薬発第615号，49基局第392号，1974；一部改正1998）に準拠した。

・試験水の供給：流水式（800 L/日）

・試験水中の被験物質濃度（設定）：

第一濃度区 0.001 mg/L

第二濃度区 0.0001 mg/L

・試験水中の助剤濃度：

第一濃度区 HCO-40 0.02 mg/L, 2-メトキシエタノール ≒ 25ppm (v/v)

第二濃度区 HCO-40 0.002 mg/L, 2-メトキシエタノール ≒ 25ppm (v/v)

コントロール区 HCO-40 0.02 mg/L, 2-メトキシエタノール = 25ppm (v/v)

・取込期間：60日間

・排泄期間：14日間

・分析方法：前処理後，ガスクロマトグラフ質量分析計（GC/MS）により測定した。

・ヒメダカに対する96時間-LC50値：0.18 mg/L

・魚体中脂質含量：開始時 6.2% (n=3, 4.9～7.5%)

終了時 5.1% (n=3, 3.8～6.5%)

結 果： 濃縮倍率測定結果を下記に示した。

・第一濃度区

取 込 期 間	7 日 目	14 日 目	21 日 目	28 日 目	35 日 目	49 日 目	60 日 目
平均水中濃度 (mg/L)	0.000852	0.000831	0.000815	0.000820	0.000826	0.000835	0.000839
濃縮倍率 1	4620	6210	8040	6260	4650	5530	8450
BCF _{ss} 6280 2	5230	5560	6250	7040	6330	7040	7010

・第二濃度区

取 込 期 間	7 日 目	14 日 目	21 日 目	28 日 目	35 日 目	49 日 目	60 日 目
平均水中濃度 (mg/L)	0.0000917	0.0000885	0.0000863	0.0000864	0.0000860	0.0000863	0.0000858
濃縮倍率 1	4020	6110	5490	9240	7650	8690	6800
BCF _{ss} 7720 2	4620	6290	5540	7700	8410	7790	6450

考 察： 魚体中濃度は、第一濃度区では $3.84 \sim 7.09 \mu\text{g/g}$ であり、第二濃度区では $0.369 \sim 0.799 \mu\text{g/g}$ で、濃縮倍率は、第一濃度区では 4620～8450 で、第二濃度区では 4020～9240 であった。第一濃度区および第二濃度区の取込開始後 35、49 および 60 日目の連続した 3 回の測定による濃縮倍率（平均）の変動は 20%以内であり、定常状態を確認した。定常状態における濃縮倍率（BCF_{ss}）は第一濃度区で 6280、第二濃度区で 7720 であった。

被験物質の濃縮部位を調べるため各濃度区取込終了時（61 日目）の魚各 2 尾を頭部、内臓、可食部（筋肉、骨）及び外皮（皮、鱗）の 4 部位に解剖し、分析した。濃縮倍率は、内臓が他の部位に比べて相対的に高く、可食部が低かった。

各部位での濃縮倍率は以下の通りであった。

部 位	第一濃度区 (61日目)	第二濃度区 (61日目)
頭部	9240	8550
内臓	22400	21500
可食部	4720	5060
外皮	7320	8480

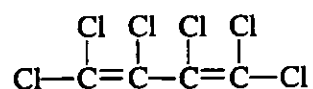
濃縮倍率が 1000 倍を超えたため、取込終了（61 日目）後、14 日間の排泄試験を行った。排泄試験での魚体中の被験物質濃度は経時的に減少し、生物学的半減期（BHL）は、第一濃度区で 4.4 日、第二濃度区で 5.6 日と算出された。

1 被験物質

1.1 名称，構造式および物理化学的性状

名称*： 六塩化ブタジエン
(略称：K-1637)

構造式*：



分子式： C_4Cl_6

分子量*： 260.76

比重*： 1.68

溶解度*： 水に不溶。アルコール，エーテルに可溶。

*：委託者提供資料による。

1.2 供試試料

供給者：

受領量： 25 g (NET)

受領日： 2002年 7月31日

ロット番号*： FAV01

純度*： 96.0% (GC)

外観*： 微黄色透明液体

*：委託者提供資料による。

1.3 被験物質の確認

委託者より供給された被験物質について、質量スペクトルを測定した。測定したスペクトルは、米国立標準技術研究所の質量スペクトルデータベース（NIST107）のスペクトル（分子イオン，フラグメントイオン）が一致することから、被験物質は委託者より提示された構造を有する物質であることを確認した。

（装置）島津製作所製 GC-17A型

また、赤外吸収スペクトルを測定した。独立行政法人 産業技術総合研究所の有機化合物のスペクトル・データベースから提示された構造を有する化合物の標準スペクトルを入手し、スペクトルが一致することおよび特性吸収が認められることより、被験物質は委託者より提示された構造を有する物質であることを確認した。

（装置）フーリエ変換赤外分光分析装置：Nicolet製 AVATAR 320型

さらに核磁気共鳴スペクトルを測定し、構造を確認した。

[Appendix 1]

1.4 保管方法および保管条件下での安定性

被験物質は当研究所内の試験物質保管用冷蔵庫（保管条件：冷蔵，暗所）内に保管した。実験終了後にも赤外吸収スペクトルを測定し，試験開始前に測定したスペクトルと比較した。その結果，スペクトルに変化はなかったことより被験物質は保管条件下で安定であったと判断された。

（装置）フーリエ変換赤外分光分析装置：Nicolet 製 AVATAR 320 型 [Appendix 1]

2 試験の概要

「新規化学物質等に係る試験の方法について」（環保業第5号，薬発第615号，49基局第392号，1974；一部改正1998）に準拠して実施した。

濃縮度試験装置（Fig.1 (p.33)）を，第一濃度区（高濃度区）および第二濃度区（低濃度区）として2系列設置し，被験物質を含む水中でコイを飼育した。また，コントロール区として1系列設置し被験物質を含まない水中でコイを飼育した。この間，水中及び魚体中被験物質濃度を定期的に測定し，その対比により濃縮倍率を求めコイへの濃縮性を評価した。

試験水中濃度は，ヒメダカを用いて急性毒性試験を行い，96hr-LC₅₀ 値の 1/100 以下（第一濃度区），1/1000 以下（第二濃度区）に設定した。

3 試験用水

試験用水は，横浜市水道水を活性炭処理後，活性炭で除去できない極微量の遊離塩素を中和するため希釈水にチオ硫酸ナトリウム水溶液を添加（添加量は水中濃度として約0.08mg/l程度である。）することにより脱塩素した。この水を24℃に加温または冷却し，ばっ気した希釈水を用いた（希釈水の水質は6ヶ月毎に水質検査を行い，水産用水基準に適合していることを確認したものである。）。

[Appendix 2]

4 急性毒性試験

OECD化学品テストガイドライン203「魚類急性毒性試験」(1992)に準じて96hr-LC₅₀の測定を行った。なお、試験液中の被験物質の濃度測定は行わず、結果(LC₅₀)は設定濃度をもとに算出した。

4.1 供試魚

1) 魚種: ヒメダカ (*Oryzias latipes*, メダカ科)

入手先: 網島フィッシング (神奈川県横浜市港北区網島西5-18-1)

入手日: 2002年 7月29日

ロット番号: 02-H-0729

予備処理: 入手時に目視観察をして異常のあるものを除去し、流水状態で飼育した。
じゅん化期間中には薬浴は行っていない。

全長: 2±1cm

体重: 約0.2g

2) じゅん化

水槽No: B-9

水温: 24±1℃

期間: 2週間以上

餌の種類: テトラベルケ社製テトラミン

給餌: 魚体重の2%相当(毎日、但し試験前24時間無給餌)

試験前1週間の死亡魚の割合: <5%

4.2 試験条件

試験濃度: 0(コントロール区), 0.05, 0.1, 0.2, 0.4mg/L

飼育密度: 7尾/濃度区

試験水量: 5.0L

水温: 24±1℃

液交換: あり(24時間毎)

エアレーション: なし(密閉条件)

溶存酸素濃度: 飽和溶存酸素濃度の≥60%

給餌: なし

試験期間: 96時間

4.3 試験液の調製

1) 試験区

被験物質 0.1g を採取し、40% (w/v) HCO-40/2-メトキシエタノール溶液 5mL に溶解後、2-メトキシエタノールで 20mL に定容した。この溶液 0.05, 0.1, 0.2, 0.4mL を分取し、それぞれ希釈水に溶解、5L とした (被験物質濃度 0.05, 0.1, 0.2, 0.4mg/L, HCO-40 濃度 1, 2, 4, 8mg/L, 2-メトキシエタノール濃度=9, 18, 36, 72ppm (v/v))。

2) 対照区

40% (w/v) HCO-40/2-メトキシエタノール溶液 0.4mL を採取し、希釈水に溶解、5L とした (HCO-40 濃度 8mg/L, 2-メトキシエタノール濃度=72ppm (v/v))。

4.4 結 果

被験物質の 96hr- LC_{50} は、0.18mg/L (Doudoroff 法) であった。 [Fig. 2 (p. 34)]

従って、急性毒性試験の結果より、濃縮度試験における試験水中被験物質濃度を、96hr- LC_{50} 値の 1/100 以下及び 1/1000 以下である 0.001 及び 0.0001mg/L に設定した。

5 分 析 方 法

5.1 機器及び試薬

(機器)

電子天秤：	メトラー製 AG204型 (No.1, 2)
	メトラー製 PB3002型 (No.2)
	メトラー・トレド製 PB3002-S型 (No.2)
ホモジナイザー：	日本精機製作所製 AM型 (No.3, 4, 5, 7)
アスピレーター：	ヤマト科学製 WP-15型 (No.1)
	増田理化工業製 PP-11型 (No.1)

(試薬)

アセトニトリル：	純正化学製	試薬特級
----------	-------	------

5.2 ガスクロマトグラフ質量分析計 (GC/MS) 測定条件

(装置)

ガスクロマトグラフ質量分析計 (ヘッドスペースサンブラ付き), No1

ガスクロマトグラフ (GC): Agilent Technologies 6890 型

ヘッドスペースサンブラ (HSS): Agilent Technologies 7694 型

質量選択検出器 (MSD): Agilent Technologies 5973N 型

データ処理部: クミステーション (Windows NT)

(条件)

[GC 条件]

カラム: J&W DB-5MS 60m×0.25mm×1.0μm

キャリアーガス: ヘリウム 0.8mL/min (Constant flow)

オープン温度: 60℃ (2min) → 20℃/min → 260℃ (3min)

注入口温度: 200℃

MS インターフェース温度: 200℃

注入条件: スプリットレス (サンプリングタイム: 2分)

注入量: 3.0mL (HSS サンプル容量)

[HSS 条件]

温度条件: Oven=60℃, LOOP=120℃, Transfer Line=200℃

イベント時間: GC Cycle Time=21分

Vial Equilibration Time=20分

Pressurization Time=0.2分

Loop Fill Time=0.03分

Loop Equilibration Time=0.2分

Inject Time=0.2分

バイアルパラメータ: Shake=2 (HIGH)

[MSD 条件]

温度条件: イオン源=230℃, 四重極マス・フィルタ=150℃

SIM (Selected Ion Monitoring) 条件:

Solvent Delay=5min

Quant ion= 190.0, 225.0, 260.0 m/z

5.3 検量線の作成

被験物質 50mg を採取し、40% (w/v) HCO-40/2-メトキシエタノール溶液 2.5mL に溶解後、アセトニトリルで 50mL に定容した (1000 mg/L)。これをアセトニトリルで希釈し、0.005, 0.01, 0.02mg/L の標準原液を調製した。これらの標準原液を 0.1mL 採取し、精製水*10mL の入った HSS バイアルに添加後、直ちに蓋をした。また、40% (w/v) HCO-40/2-メトキシエタノール溶液 2.5mL をアセトニトリルで 50mL に定容して被験物質濃度 0mg/L の溶液を調製した。これらを 5.2 の測定条件にてピーク面積を測定し、横軸に濃度を、縦軸にピーク面積 (count 表示) をとり、検量線 (被験物質濃度として 0~0.0002mg/L) を作成した。検量線はほぼ原点を通る直線となり、最小二乗法による直線回帰式の相関係数は 0.9998 と良好であった。 [Fig. 3~4 (p. 35~36)]

試料の分析に当っては、試料測定毎に精製水 10mL の入った HSS バイアルに 0.01mg/L 標

準原液を 0.1mL 添加後直ちに蓋をした標準溶液（被験物質濃度として 0.0001mg/L）の測定を行い、そのピーク面積比から定量した。

*精製水：JIS K0557 A4グレードの水
ヤマト科学製 超純水製造装置，WR600A

5.4 試験水中の被験物質の分析方法

下記の操作手順に従って分析した。

第一濃度区

精製水 9mL + アセトニトリル 0.1mL の入った HSS バイアルに試験水 1.0mL を採取後直ちに蓋をする

(希釈倍率 10)

GC/MS測定

第二濃度区

HSS バイアルに試験水 10mL を採取し、アセトニトリル 0.1mL を添加後直ちに蓋をする

GC/MS測定

(標準溶液の分析方法)

HSS バイアルに精製水 10mL を採取し、標準原液 (0.01mg/L) 0.1mL を添加後直ちに蓋をする

GC/MS測定

5.5 魚体中の被験物質の分析方法

下記の操作手順に従って分析した。

魚体2尾 重量測定 (約10g)

氷冷下でハサミで細切

←アセトニトリル 40mL

ホモジナイズ (5分, 回転速度 約8000rpm), 氷冷下

軽く吸引・ろ過 (キヤロート S-60 ろ紙)

アセトニトリル層

残さ

←アセトニトリル 40mL

ホモジナイズ (3分, 回転速度 約8000rpm), 氷冷下

軽く吸引・ろ過 (キヤロート S-60 ろ紙)

アセトニトリル層

残さ

←アセトニトリル

廃棄

定容 100mL

(検量線の上限以上の場合, 検量線の範囲内の濃度まで希釈する。)

0.1mL (分取比率 1000) を精製水 10mL の入った HSS バイアルに添加後, 直ちに蓋をする

GC/MS測定

5.6 ブランク試験及び添加回収試験

GC/MS分析において、標準溶液（濃度 0.0001mg/L）のピーク面積の 5%に相当する 0.000005mg/L を、検出限界とした。

1) 試験水

・ブランク試験

コントロール区より試験水を採取し、5.4 の第二濃度区の手順に従って 2 回分析した。測定値は検出限界未満となり、試験水中濃度として <0.000005mg/L であった。

[Tab. 1 (p. 24) , Fig. 5 (p. 37)]

・添加回収試験

第一濃度区、第二濃度区ともに試験液を直接バイアルに採取して分析したため、添加回収試験は実施しなかった。

2) 魚体

・ブランク試験

取込開始時にコントロール区より採取した魚体 4 尾を 5.5 の操作に従って 2 尾ずつ 2 回分析した。取込終了時にも同様にコントロール区より採取した魚体を用いて分析を行った。測定値は検出限界未満となり、魚体中濃度として <0.006 μ g/g であった。

[Tab. 2 (p. 24) , Fig. 6 (p. 38~39)]

・添加回収試験

コントロール区より採取した魚体 2 尾に、被験物質濃度 1mg/L アセトニトリル溶液（HCO-40 20mg/L 含む）1mL を添加し、5.5 の操作に従って分析し回収率を求めた。魚体重量（2 尾の合計）10g の時、添加した被験物質の魚体中濃度は 0.1 μ g/g であり、第一濃度区試験水濃度（0.001mg/L）の 100 倍相当である。4 回分析を行ったところ、平均添加回収率は 87.7%、最大値と最小値の差は 7.8%、標準偏差 3.4%で定量性は良好であった。平均添加回収率の値を用いて魚体の分析値を回収率補正した。

[Tab. 3 (p. 25) , Fig. 7 (p. 40~41)]

6 濃 縮 度 試 験 方 法

6.1 供試魚

- 1) 供試魚： コイ (*Cyprinus carpio*, コイ科)
入手先： 三京水産(株) (東京都新宿区市谷田町1-1)
入手日： 2002年 7月 1日
ロット： 02-K-0701
予備処理： 入手時に目視観察をして異常のあるものを除去し、流水状態で飼育した。
じゅん化期間中には薬浴は行っていない。
全 長： 8±4cm
体 重： 約 5g
年 齢： 孵化後一年以内の魚

2) じゅん化

- 水槽No： C-1
水 温： 24±2℃
期 間： 2週間以上
餌の種類： (株)キョーリン製ベビーゴールド
給 餌： 魚体重の約 2%相当
試験前1週間の死亡魚の割合： < 5%

6.2 試験条件

1) 試験濃度 (設定濃度)

- 第一濃度区： 0.001mg/L (助剤 HCO-40 0.02mg/L, 2-メキシタノール ≒25ppm (v/v))
第二濃度区： 0.0001mg/L (助剤 HCO-40 0.002mg/L, 2-メキシタノール ≒25ppm (v/v))
コントロール区： 0mg/L (助剤 HCO-40 0.02mg/L, 2-メキシタノール ≒25ppm (v/v))

2) 希釈水供給量： 800L/日 (換水回数 16 回/日)

3) フィード原液供給量： 20mL/日

4) 飼育密度 (取込開始時)

- 第一濃度区： 60尾/50L試験水 (1.0gあたり 1L/日以上)
第二濃度区： 60尾/50L試験水 (1.0gあたり 1L/日以上)
コントロール区： 24尾/50L試験水 (1.0gあたり 1L/日以上)

5) 試験温度： 24±2℃

6) 溶存酸素濃度： 飽和溶存酸素濃度の60%以上 (24℃の場合は 5mg/L以上)

7) エアレーション： なし (密閉条件)

- 8) pH : 6.0~8.5
9) 照光時間, 照明タイプ : 約 16hr/日, H f 蛍光ランプ (波長 400-700nm)
10) 取込期間 : 60 日間

6.3 濃縮度試験装置

概要を Fig. 1 (p. 33) に示した。

6.4 試験水の調製

1) フィード原液の調製

(第一濃度区)

被験物質 20mg

←40% (w/v) HCO-40/2-メキシタノール溶液 1mL
←2-メキシタノール

溶解定容 500mL

被験物質濃度 : 40mg/L
HCO-40 濃度 : 800mg/L

(第二濃度区)

第一濃度区フィード原液 50mL

←2-メキシタノール

溶解定容 500mL

被験物質濃度 : 4mg/L
HCO-40 濃度 : 80mg/L

(コントロール区)

40% (w/v) HCO-40/2-メキシタノール溶液 1mL

←2-メキシタノール

溶解定容 500mL

HCO-40 濃度 : 800mg/L

調製頻度 : 約 20 日間毎

2) 試験水の調製

1) により調製したフィード原液を、フィード原液供給用定量ポンプを用い希釈混合管へ供給し、希釈水供給用定量ポンプにより供給された希釈水と混合して所定の試験濃度にした後、試験水槽へ供給した。
[Fig. 1 (p. 33)]

6.5 試験条件下の安定性

6.4 1) の第二濃度区フィード原液（被験物質濃度 4mg/L）を室内に放置し、0, 12, 21 日後に、アセトニトリルで 40000 倍に希釈した後、GC/MSで分析し、フィード原液中の被験物質濃度の経時変化を調べた。

21 日後も初期濃度の 101% (3.58mg/L→3.61mg/L) が検出され、被験物質はフィード原液中で安定であった。
[Tab. 4 (p. 25) , Fig. 8 (p. 42)]

6.6 魚の投入及び管理

1 日間以上空運転し、所定の試験濃度が保たれていることを確認した後、コイを試験水槽に投入し試験を開始した。

飼育期間中下記について観察、測定を行った。

1) 給 餌

株式会社キョーリン製ベビーゴールドを、1 日 1 回（休日は除く）体重の約 2% 量給餌した。

2) 供試魚の状態

形状、遊泳、摂餌状況を観察した。

3) 溶存酸素及び水温

試験水サンプリング日に測定した。 卓上溶存酸素計：電気化学計器製 DOL-10 型 (No.1)
携帯用温度計：横河電機製 2455 02 型 (No.4)

4) 脂質含量

取込開始時及び終了時に、コントロール区から採取したコイの脂質含量を測定した。
（それぞれ n=3）。

5) pH

取込開始時及び終了時に測定した。 卓上 pH 計：東亜電波工業製 HM-40V 型 (No.1)

6.7 被験物質の濃度測定

1) 試験水

取込開始時（0 日目）、7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 60, 61 日目にサンプリングし、5.4 の方法により被験物質濃度を測定した。

2) 魚体

取込開始後、7、14、21、28、35、49、60 日目にコイ 4 尾ずつサンプリングし、2 尾ずつ 2 回に分け、5.5 の方法により被験物質濃度を測定した。

また、取込終了時（61 日目）、2 尾サンプリングし、部位別分析を行った。

濃縮倍率が 1000 倍を超えたため、取込終了（61 日目）後に残った魚を用いて排泄試験を行った。排泄開始後 1、4、7、14 日目に各濃度区から 4 尾ずつをサンプリングし、取込期間中と同様の方法により被験物質濃度を測定した。

6.8 濃縮倍率

1) 濃縮倍率の算出

次式により各測定時における濃縮倍率を算出する。

$BCF = \text{各測定時における } C_f / \text{各測定時までの } C_w \text{ (平均)}$

なお定常状態に達した場合、定常状態における濃縮倍率も次式により算出する。

$BCF_{ss} = \text{定常状態における } C_f \text{ (平均)} / \text{定常状態における } C_w \text{ (平均)}$

BCF : 各測定時における濃縮倍率

BCF_{ss} : 定常状態における濃縮倍率

C_f : 魚体中濃度 ($\mu\text{g/g}$)

C_w : 試験水中濃度 (mg/L)

定常状態：48時間以上の間隔で連続した3回の測定における濃縮倍率の変動が20%以内の場合に定常状態に達したとみなす。 C_f および C_w の平均は取込終了までの最後の連続した3回の測定から算出する。ただし試験期間中の濃縮倍率が100倍未満の場合、濃縮倍率の変動が20%以上であっても定常状態に達しているとみなす。この場合 BCF_{ss} の算出は行わない。

2) 濃縮倍率測定限界

魚体ブランク試験の結果、被験物質は検出されず、検出限界濃度は $<0.006 \mu\text{g/g}$ であった。魚体重量によっても変わるが、試験水の設定濃度 0.001mg/L （第一濃度区）では、約 6 倍以上、 0.0001mg/L （第二濃度区）では、約 60 倍以上濃縮した時、濃縮倍率が測定できる。

7 結果 及 び 考 察

試験計画書からの逸脱

溶存酸素および水温の測定について、計画書では溶存酸素および水温の測定は試験水サンプリング時に測定することになっていたが、取込開始後 56 日目に試験水サンプリング時以外にも測定を行った。水質測定結果はすべて正常範囲内であり、水質の測定回数を多く行ったことによる試験への影響は無かったと判断した。

7.1 試験成績の信頼性に影響を及ぼしたと思われる環境要因

該当する事象はなかった。

7.2 供試魚の管理

実験期間中、すべての水槽中の溶存酸素濃度は飽和溶存酸素濃度の $\geq 60\%$ 、水温は $24 \pm 2^\circ\text{C}$ であり、いずれも試験条件を満たした。pH は魚類の飼育環境として適正範囲 (6.0 ~ 8.5) 内であった。実験期間中、すべての濃度区において死亡または異常は $<10\%$ であった。また、実験期間中の生存魚に形状、遊泳、摂餌等の異常は認められなかったことより、正常に飼育されたことを確認した。

脂質含量： 開始時 6.2% (n=3, 4.9~7.5%)

終了時 5.1% (n=3, 3.8~6.5%)

(終了時における脂質含量平均値は、開始時の $\pm 25\%$ 以内であった。)

7.3 試験水中の被験物質濃度

取込期間中の平均試験水中濃度は、第一濃度区が 0.000847mg/L 、第二濃度区が 0.0000861mg/L とほぼ設定通りであった。濃度の変動係数は、第一濃度区が 8.4%、第二濃度区が 7.0% であった。また、試験水中の被験物質濃度の変動は、測定値の平均に対して $\pm 20\%$ 以内であった。

[Tab. 5~6 (p. 26~27), Fig. 9~10 (p. 26~27), Appendix 3]

7.4 魚体中の被験物質濃度及び濃縮倍率

取込期間中の魚体中濃度は、第一濃度区が $3.84 \sim 7.09 \mu\text{g/g}$ 、第二濃度区が $0.369 \sim 0.799 \mu\text{g/g}$ であった。濃縮倍率 (BCF) は第一濃度区が 4620~8450、第二濃度区が 4020~9240 であった。

第一濃度区および第二濃度区の入込開始後 35, 49 および 60 日目の連続した 3 回の測定による濃縮倍率 (平均) の変動が 20% 以内であり、定常状態を確認した。定常状態におけ

る濃縮倍率（ BCF_{ss} ）は第一濃度区で6280、第二濃度区で7720であった。

[Tab. 7~8 (p. 28~29) , Fig. 11~12 (p. 28~29) , Appendix 4]

7.5 部位別の濃縮倍率

被験物質の濃縮部位を調べるため各濃度区取込終了時（61日目）の魚各2尾を頭部、内臓、可食部（筋肉、骨）及び外皮（皮、鱗）の4部位に解剖し、分析した。濃縮倍率は、内臓が他の部位に比べて相対的に高く、可食部が低かった。

各部位での濃縮倍率は以下の通りであった。

部 位	第一濃度区 (61日目)	第二濃度区 (61日目)
頭部	9240	8550
内臓	22400	21500
可食部	4720	5060
外皮	7320	8480

[Tab. 9~10 (p. 30) , Appendix 5]

7.6 排泄試験

排泄試験での魚体中の被験物質濃度は一般に下記の式で表されることより、この式を用いて最小二乗法により係数を算出し、生物学的半減期（BHL）を求めた。

$$C_t = C_0 \times e^{-kt}$$

C_t : 排泄期間中の t 日目における魚体中被験物質濃度 ($\mu\text{g/g}$)

C_0 : 取込終了時の魚体中の被験物質濃度の平均値 ($\mu\text{g/g}$)

k : 排泄速度定数 (1/日)

t : 排泄経過時間 (日)

$$BHL = \ln 2 / k$$

BHL : 生物学的半減期 (日)

また魚体中の被験物質残留率は、次式で算出した。

$$R = C_t / C_0 \times 100$$

R : 魚体中の被験物質残存率 (%)

魚体中濃度より生物学的半減期を算出した結果、第一濃度区で4.4日、第二濃度区で5.6日であった。

[Tab. 11~12 (p. 31~32) , Fig. 13~14 (p. 31~32) , Appendix 6]

以 上