

## 最終報告書

魚介類の体内における K-1551 の濃縮度試験

JCL018043

2001 年 10 月 10 日

試験委託者：財団法人 化学物質評価研究機構

試験受託者：株式会社日本医学臨床検査研究所

バイオアッセイ事業部

## 複 写 証 明 書 (追加-1)

株式会社日本医学臨床検査研究所

バイオアッセイ事業部 西脇ラボ

試験表題 : 微生物等による K-1551 の濃縮度試験

試験番号 : JCL018043

試験責任者 :

試験委託者 : 財団法人 化学物質評価研究機構

〒112-0004 東京都文京区後楽 1 丁目 4 番 25 号

これは、上記試験の最終報告書の訂正及び信頼性保証  
証明書追-1 から正確に複写されたものであることを証  
明します。

2001 年 10 月 18 日

運営管理者 :

信頼性保証証明書 追 ー 1

(最終報告書)

本最終報告書の訂正にともない監査を実施し、その記載内容が適切であることを確認致しました。

試験の種類：濃縮度試験

試験委託者：財団法人 化学物質評価研究機構

試験施設：株式会社日本医学臨床検査研究所 バイオアッセイ事業部 西脇ラボ

試験表題：魚介類の体内における K-1551 の濃縮度試験

試験番号：JCL018043

試験責任者：[REDACTED]

試験期間：2001年 7月24日 ～ 2001年10月10日

監査対象	監査日	報告日	試験責任者
	運営管理者		
最終報告書の訂正	： 2001年10月18日	2001年10月18日	2001年10月18日

株式会社日本医学臨床検査研究所  
バイオアッセイ事業部

2001年10月18日 信頼性保証部門責任者

[REDACTED]

## 最終報告書訂正書-1

株式会社日本医学臨床検査研究所  
 バイオアッセイ事業部 西脇ラボ

最終報告書を下記の通り訂正致します。

表題および試験番号	魚介類の体内における K-1551 の濃縮度試験	JCL018043
試験の種類	濃縮度試験	
事項	Table 10 のタイトル	
理由	試験委託者による記載ミスの指摘に従って訂正を行う。	
内容	<p>目次</p> <p>添付資料</p> <p>(訂正前)</p> <p>Appendix5 Table 10</p> <p>Concentration of the test substance in test water at <u>steady-state</u></p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>(訂正後)</p> <p>Appendix5 Table 10</p> <p>Concentration of the test substance in test water at <u>steady-state</u></p> <p>41 頁</p> <p>(訂正前)</p> <p>Appendix5 Table 10</p> <p>Concentration of the test substance in test water at <u>steady-state</u></p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>(訂正後)</p> <p>Appendix5 Table 10</p> <p>Concentration of the test substance in test water at <u>steady-state</u></p>	

2001 年 10 月 18 日

試験責任者



## 信頼性保証証明書

(最終報告書)

本試験結果が、本試験計画書及び標準操作手順書に従って実施された  
試験の生データを正確に反映していることを保証致します。

試験の種類：濃縮度試験

試験委託者：財団法人 化学物質評価研究機構

試験施設：株式会社日本医学臨床検査研究所 バイオアッセイ事業部 西脇ラボ

試験表題：魚介類の体内における K-1551 の濃縮度試験

試験番号：JCL018043

試験責任者：[REDACTED]

試験期間：2001年 7月24日 ～ 2001年10月10日

監査及び査察対象	監査及び査察日	報告日 運営管理者	試験責任者
試験計画書	: 2001年 7月24日	2001年 7月24日	2001年 7月24日
試験計画書変更	: 2001年 9月18日	2001年 9月18日	2001年 9月18日
試験計画書変更・追加	: 2001年 9月26日	2001年 9月26日	2001年 9月26日
魚類急性毒性試験期間中	: 2001年 8月 2日	2001年 8月 2日	2001年 8月 2日
濃縮度試験実験開始	: 2001年 8月 7日	2001年 8月 7日	2001年 8月 7日
濃縮度試験実験期間中	: 2001年 8月28日	2001年 8月28日	2001年 8月28日
最終報告書草案	: 2001年10月 2日	2001年10月 2日	2001年10月 2日
最終報告書草案再監査	: 2001年10月 5日	2001年10月 5日	2001年10月 5日
最終報告書	: 2001年10月10日	2001年10月10日	2001年10月10日

株式会社日本医学臨床検査研究所  
バイオアッセイ事業部

2001年10月10日 信頼性保証部門責任者

[REDACTED]

## 目次

要約	1
1 表題	2
2 試験番号	2
3 試験目的	2
4 試験法	2
5 試験委託者	2
6 試験施設	2
7 試験関係者の氏名及び所属	2
8 試験期間	2
9 被験物質	4
10 供試魚	6
11 主な試薬	8
12 主な機器・装置	8
13 魚類急性毒性試験の実施	9
14 濃縮度試験の実施	14
15 濃縮倍率の算出方法	16
16 試験の有効性	19
17 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	19
18 試験結果	19
19 数値の取扱い	21
20 試資料の保管	21
21 最終報告書の変更	22
22 GLP 基準への適合	22
23 最終報告書の承認	22

## 要 約

## 1. 表題

魚介類の体内における K-1551 の濃縮度試験

## 2. 試験結果

魚類急性毒性試験(ヒメダカ)の結果

48 時間 LC50 値 : 0.47 mg/L

96 時間 LC50 値 : 0.23 mg/L

濃縮度試験(コイ)の結果

低濃度区(設定濃度 : 0.6 µg/L)

定常状態における試験水中被験物質濃度の平均値 : 0.489 µg/L  
(最小値～最大値 : 0.467 ~ 0.533 µg/L)

定常状態における魚体中被験物質濃度の平均値 : <15 ng/g

定常状態における生物濃縮係数(BCF<sub>ss</sub>) : <31.6

高濃度区(設定濃度 : 6.0 µg/L)

定常状態における試験水中被験物質濃度の平均値 : 4.59 µg/L  
(最小値～最大値 : 4.17 ~ 5.21 µg/L)

定常状態における魚体中被験物質濃度の平均値 : 171 ng/g

定常状態における生物濃縮係数(BCF<sub>ss</sub>) : 37.3

各濃度区における実験期間中の濃縮倍率

試験区	14 日目	17 日目	21 日目	24 日目	28 日目
低濃度区	<31.6	<31.7	<31.6	<31.1	<30.7
高濃度区	32.1	37.6	37.7	36.2	39.7

## 3. 結論

ポリ塩化ビフェニル、ヘキサクロロベンゼン及びポリ塩化ナフタレン等の濃縮性の高い物質(濃縮倍率: 約 10<sup>4</sup> 倍)に比べ、K-1551 は高濃縮性ではないと判断された。

## 1 表題

魚介類の体内における K-1551 の濃縮度試験

## 2 試験番号

JCL018043

## 3 試験目的

「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」(昭和 49 年総理府・厚生省・通商産業省令第 1 号、昭和 61 年改正)第 2 条第 2 項に基づき、魚介類の体内における K-1551 の生物濃縮性の知見を得ることを目的とした。

## 4 試験法

「新規化学物質等に係る試験の方法について」(昭和 49 年環保業第 5 号・薬発第 615 号・49 基局第 392 号、平成 10 年改正)また、「OECD Test Guideline 305」において規定されている魚介類のうち特に魚類の体内における化学物質の濃縮度試験法によった。

## 5 試験委託者

名 称 : 財団法人 化学物質評価研究機構

所在地 : 〒112-0004 東京都文京区後楽 1 丁目 4 番 25 号

## 6 試験施設

名 称 : 株式会社日本医学臨床検査研究所 バイオアッセイ事業部 西脇ラボ

所在地 : 〒677-0032 兵庫県西脇市中畑町 17-18

## 7 試験関係者の氏名及び所属

試験責任者 : [REDACTED] (バイオアッセイ事業部 西脇ラボ)

試験担当者(物理・化学系) : [REDACTED] (バイオアッセイ事業部 西脇ラボ)

試験担当者(生物系) : [REDACTED] (バイオアッセイ事業部 西脇ラボ)

試験担当者(生物系) : [REDACTED] (バイオアッセイ事業部 西脇ラボ)

## 8 試験期間

試験開始日 2001 年 7 月 24 日

魚類急性毒性試験実験期間 自 2001 年 7 月 31 日

至 2001 年 8 月 4 日



濃縮度試験実験開始日	2001 年 8 月 7 日
濃縮度試験実験終了日	2001 年 9 月 4 日
試験終了日	2001 年 10 月 10 日

## 試験日程表

2001. 7.24	試験開始
2001. 7.31	魚類急性毒性試験実験開始
2001. 8. 4	魚類急性毒性試験実験終了
2001. 8. 4	濃縮度試験装置始動
2001. 8. 6	試験水中被験物質濃度測定(-1日目)
2001. 8. 7	濃縮度試験実験開始 試験水中被験物質濃度測定(0日目) 魚体中脂質含有率測定
2001. 8.10	試験水中被験物質濃度測定(3日目)
2001. 8.14	試験水中被験物質濃度測定(7日目)
2001. 8.17	試験水中被験物質濃度測定(10日目)
2001. 8.20	試験水中被験物質濃度測定(13日目)
2001. 8.21	試験水中及び魚体中被験物質濃度測定(14日目) 魚体中脂質含有率測定
2001. 8.24	試験水中及び魚体中被験物質濃度測定(17日目)
2001. 8.28	試験水中及び魚体中被験物質濃度測定(21日目) 魚体中脂質含有率測定
2001. 8.31	試験水中及び魚体中被験物質濃度測定(24日目)
2001. 9. 4	試験水中及び魚体中被験物質濃度測定(28日目) 魚体中脂質含有率測定
2001. 9.19	濃縮度試験装置停止
2001. 9.21	最終報告書草案作成開始

2001.10.5	┌───	最終報告書作成開始
2001.10.10	└───	最終報告書作成 試験終了

## 9 被験物質

### 9-1 名 称

名 称 : 4-(フェニルアゾ)アニリン

略 称 : K-1551

CAS No. : 60-09-3

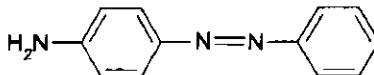
### 9-2 提供者及びロット番号

提 供 者 : 財団法人 化学物質評価研究機構 久留米事業所

〒 830-0023 福岡県久留米市中央町 19 番 14 号

ロット番号 : SEF0192

### 9-3 構造式、分子式及び分子量

構 造 式 : 

分 子 式 : C<sub>12</sub>H<sub>11</sub>N<sub>3</sub>

分 子 量 : 197.24

### 9-4 純 度

純 度 : 99.5% (HPLC 法、示差屈折計検出器)<sup>1)</sup>

不純物の名称及び含量 : 不明物 ; 0.5%<sup>1)</sup>

### 9-5 物理化学的性状

外 観 : だいたい色粉末<sup>2)</sup>

沸 点 : 350°C 以上<sup>3)</sup>

融 点 : 124 ~ 128°C<sup>4)</sup>

密 度 : 1.213 g/cm<sup>3</sup> (25 ± 1°C)<sup>3)</sup>

溶 解 性 : 対水 ; 難溶 [<0.1 g/100 mL (19°C)]<sup>4)</sup>

: 対メタノール ; 可溶<sup>3)</sup>

<sup>1)</sup>: 株式会社日本医学臨床検査研究所西脇ラボにおける測定結果より引用

<sup>2)</sup>: XXXXXXXXXX (提供者による被験物質の購入元) の当該ロット検

- 3) : [REDACTED] の測定データより引用
- 4) : [REDACTED] 提供の製品安全データシートより引用  
査成績表より引用
- 5) : [REDACTED] より引用

#### 9-6 同 定

実験開始前に赤外分光光度計を用いて吸収スペクトルを測定し、[REDACTED]  
[REDACTED] 提示資料による赤外吸収スペクトル及び当該試験施設測定 of 赤外吸収スペクトルが一致することを確認した [Appendix 5 Fig.4 (p.51)]。

#### 9-7 保管条件及び保管条件下での安定性確認

##### (1) 保管条件

室温 (デシケーター内) ・遮光

##### (2) 保管条件下での安定性確認

実験終了後に、室温保管していた被験物質の赤外吸収スペクトルを測定した。  
被験物質の安定性は 9-6 で測定した実験開始前の赤外吸収スペクトルと比較したところ、変化は認められなかったことから、被験物質は保管条件下で安定であったことを確認した [Appendix 5 Fig.5 (p.52)]。

#### 9-8 試験条件下での安定性確認

濃縮度試験の実験期間中に調製した被験物質原液を用い、高速液体クロマトグラフによるピーク面積値及び保持時間、分解生成物の有無等によって安定性確認を行った。

調製時の被験物質原液濃度を 100.0% とし、調製後 5, 9 及び 13 日目の残存率 (%) の測定を行った。調製後 13 日目の残存率は低濃度区で 101.3%、高濃度区で 97.5% であった [Table 1 (p.6), Appendix 5 Fig.6 (p.53)]。

以上の結果より、試験条件下での高濃度区及び低濃度区の被験物質原液は 13 日間は安定であるとし、被験物質原液の使用期間は調製後 13 日間以内とした。

Table 1 Stability test of the test substance under test condition

Passage Days	Standard Solution (25 mg/L) Peak Area	Stock Solution of Low Exposure Level (1.50 mg/L)			Stock Solution of High Exposure Level (15.0 mg/L)		
		Peak Area	Concentration <sup>*1</sup> (mg/L)	Remains Rate (%)	Peak Area	Concentration <sup>*2</sup> (mg/L)	Remains Rate (%)
0	1521010	1831587	1.51	100.0	1925357	15.8	100.0
5	1539411	1854375	1.51	100.0	1926447	15.6	98.7
9	1577691	1920126	1.52	100.7	1939137	15.4	97.5
13	1574970	1926223	1.53	101.3	1941370	15.4	97.5

※: Concentration =  $25 \times \text{Peak area of the sample} / \text{Peak area of the standard solution}$   
 $\times \text{Dilution rate} / \text{Concentration rate (20)}$

Concentration<sup>\*1</sup>: not diluted

Concentration<sup>\*2</sup>: diluted to 10 times

## 10 供試魚

### 10-1 試験用水

蓄養・じゅん化及び試験に用いる水は、活性炭により脱塩素した水道水とした。

なお、試験用水の残留塩素濃度は 0.02 mg/L 以下であった。

### 10-2 魚類急性毒性試験に用いる供試魚

魚体重あたりの試験水量を少なくするために、魚体重の小さいヒメダカを供試魚として魚類急性毒性試験を実施した。

#### (1) 魚種及び入手先

魚 種：ヒメダカ

入手先：名称 ；新家養魚場

所在地；〒 639-1001 奈良県大和郡山市九条町 1061

#### (2) 蓄養

ロット番号：M01G

供試魚は受入時に選別を行った後、安定期間中に疾病予防の目的で 0.5%塩化ナトリウム溶液による 24 時間の殺菌・消毒をした。その後、蓄養を行った。

#### (3) じゅん化

ロット番号 ；M01G-01

じゅん化水槽：No.3

蓄養時の全長が  $2.0 \pm 1.0$  cm の基準に入る大きさの供試魚であったので、選別を行わずにじゅん化を開始した。標準操作手順書〔供試魚のじゅん化 (SOP/HBS/027)〕に従って、2001 年 7 月 16 日から  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  でじゅん化を行った。実験開始前の 7 日間の死亡率が総魚数の 3.2%であったので、実験を開始した。

## (4) 給餌

供試魚への給餌は原則として朝夕の1日2回、魚体重の1～2%の飼料を毎日行った。但し、休祭日が続く場合、2日間を限度とし連続3日以上あけることなく行った。また、実験開始24時間前より給餌は行わなかった。

飼料は乾燥配合飼料4C(日本配合飼料)を乳鉢で細片化したものを使用した。

## (5) 実験開始時の供試魚の体重及び全長(n=10)

平均体重 :  $0.09 \pm 0.01$  g

平均全長 :  $2.2 \pm 0.1$  cm

## 10-3 濃縮度試験に用いる供試魚

濃縮度試験には魚体中濃度測定での定量限界値を考慮して、体重約10gのコイを用いた。

## (1) 魚種及び入手先

魚種 : コイ

入手先 : 名称 : 山口養魚場

所在地 ; 〒 579-8066 大阪府東大阪市下六万寺町 1丁目 6番 7号

## (2) 蓄養

ロット番号 : K00I

供試魚の受入時の死魚、損傷、疾病、衰弱の個体数は10%以下であった。

## (3) じゅん化

ロット番号 : K00I-03

じゅん化水槽 : No.2

供試魚は全長が6～8cmで、均一の体重の魚を選別し、じゅん化を開始した。また、脂質含有率が3%程度になるように給餌を行い、標準操作手順書〔供試魚のじゅん化(SOP/HBS/027)〕に従って、2001年7月18日から $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ になるようにじゅん化を行った。

実験開始前の7日間の死亡率が総魚数の0%であったので、実験を開始した。

## (4) 給餌

供試魚への給餌は原則として毎日行った。但し、休祭日が続く場合、2日間を限度とし連続3日以上あけることなく行った。給餌は朝夕の1日2回、魚体重の1～2%の飼料を食べ残しがないように与えた。

飼料は乾燥配合飼料 4C(日本配合飼料)を使用した。

供試魚の脂質含有率が試験条件を満たすように 7%の肝油(日本薬局方)を添加した。

(5) 実験開始時の供試魚の体重及び全長 (n=10)

平均体重 :  $7.2 \pm 1.1$  g

平均全長 :  $8.7 \pm 0.5$  cm

11 主な試薬

試薬名	等級	メーカー
ペンタクロフェノールナトリウム塩 (以下「PCP-Na 塩」と略す)	化学用	和光純薬工業
クロロホルム	特級	和光純薬工業
メタノール	特級	和光純薬工業
アセトン	特級	和光純薬工業
ベンゼン	特級	和光純薬工業
HCO-40	—	日光ケミカルズ
アセトニトリル	液体クロマトグラフ	和光純薬工業
ジエチレングリコール	特級	和光純薬工業
超純水(以下「純水」と記す)	—	純水製造装置により製造
エムボアディスクカートリッジ	C18HD(10 mm/6mL)	3M

12 主な機器・装置

機器・装置名	型式	メーカー	(SOP 番号)
高速液体クロマトグラフ (以下「HPLC」と略す)	LC-6A システム-II (8号機)	島津製作所	(SOP/OME/040)
pH メーター	F-14 (1号機)	堀場製作所	(SOP/OME/120)
ロータリーエバポレーター	RE-121-B	柴田科学	(SOP/OME/130)
ホモジナイザー	Model K	KINEMATICA	(SOP/OME/230)
赤外分光光度計	IR-460	島津製作所	(SOP/OME/192)
蓄養・じゅん化設備	ヒメダカ : じゅん化水槽 (No.3) コイ : じゅん化水槽 (No.2)	自家製	(SOP/OME/540)
魚類延長毒性試験装置 (3.0 L)	—	自家製	(SOP/OME/560)

低温恒温水循環装置	CTP-101 (No.2) CTP-301 (No.2)	東京理化器械	(SOP/OME/580)
濃縮度試験装置 (100 L)	(1 号機)	自家製	(SOP/OME/550)
電子分析天秤	BP110S	ザルトリウス	(SOP/OME/094)
電子天びん	B610	ザルトリウス	(SOP/OME/093)
ミニケミカルポンプ	SP-D-2500 (S) (No.1, 2, 3, 4)	日本精密科学	(SOP/OME/590)
デジタルポンプ	7524-10 (No.1, 2, 3, 4)	ヤマト科学	(SOP/OME/591)
残留塩素測定器 (オルトトリジン法)	—	井内盛栄堂	(SOP/OME/600)
濾過装置	エーハイム 2260 エーハイム 2213 (No.3, 5, 7)	ワーナー・ランパート	(SOP/OME/610) (SOP/OME/611)
活性炭カートリッジ	TCC-W1 (No.4, 5, 8 ~ 13)	アドバンテック	(SOP/OME/620)
電子式サーモスタット	シーパレックス 5020 (No.1)	NISSO	(SOP/OME/641)
自動温度制御装置	(No.1, 3)	増田理化	(SOP/OME/650)
ポータブル pH 計	HM-11P	東亜電波工業	(SOP/OME/121)
ハンディー pH メーター	D-14	堀場製作所	(SOP/OME/122)
ポータブル溶存酸素計	DO-11P	東亜電波工業	(SOP/OME/211)
ハンディー溶存酸素メーター	OM-14	堀場製作所	(SOP/OME/212)
活性炭ろ過器	PCF (全機)	オルガノ	(SOP/OME/621)
純水製造装置	MILLI-QSP システム	ミリポア	(SOP/OME/220)

### 13 魚類急性毒性試験の実施

魚類急性毒性試験を行い、濃縮度試験における被験物質の試験水濃度決定の参考とした。

#### 13-1 供試魚の PCP-Na 塩検定

魚類急性毒性試験の信頼性を得るため、PCP-Na 塩検定を実施し抵抗力に異常がないロットであることを確認した。

##### (1) 試験条件

- ① 実験期間：96 時間
- ② 試験水温：25.0 ± 2.0°C
- ③ 照明：室内光、16 時間明／8 時間暗

④試験液量：3.0 L、ガラス製

⑤実験方式：半止水式(48 時間毎に換水)

⑥生物数：10 尾／濃度区

⑦給餌：無給餌

⑧検定濃度：対照区, 0.13, 0.20, 0.30, 0.45, 0.67 及び 1.00 mg/L

(2) 実験期間中の水質

①水温：24.6 ～ 25.9 ℃

②pH：7.5 ～ 8.2

③溶存酸素濃度：7.2 ～ 8.1 mg/L

(3) 検定結果の算出

24, 48, 72 及び 96 時間後における供試魚の死亡率を求め、Probit 法により 48 時間 LC50 値及び 96 時間 LC50 値を算出した [Table 2 (p.10), Fig.1 (p11)]。

48 時間 LC50 値：0.56 mg/L

96 時間 LC50 値：0.33 mg/L

(4) 結果の判定

96 時間 LC50 値は 0.33 mg/L で基準値 0.3 ～ 0.7 mg/L の範囲内であったので、このロットの抵抗力は正常であると判断し試験に用いた。

Table 2 Mortality in PCP-Na salt inspection

Nominal Concentration (mg/L)	Mortality (%)			
	24 Hour	48 Hour	72 Hour	96 Hour
Control	0	0	10	10
0.13	0	0	0	10
0.20	0	0	20	30
0.30	10	10	10	40
0.45	10	10	40	50
0.67	60	70	100	100
1.00	100	100	100	100



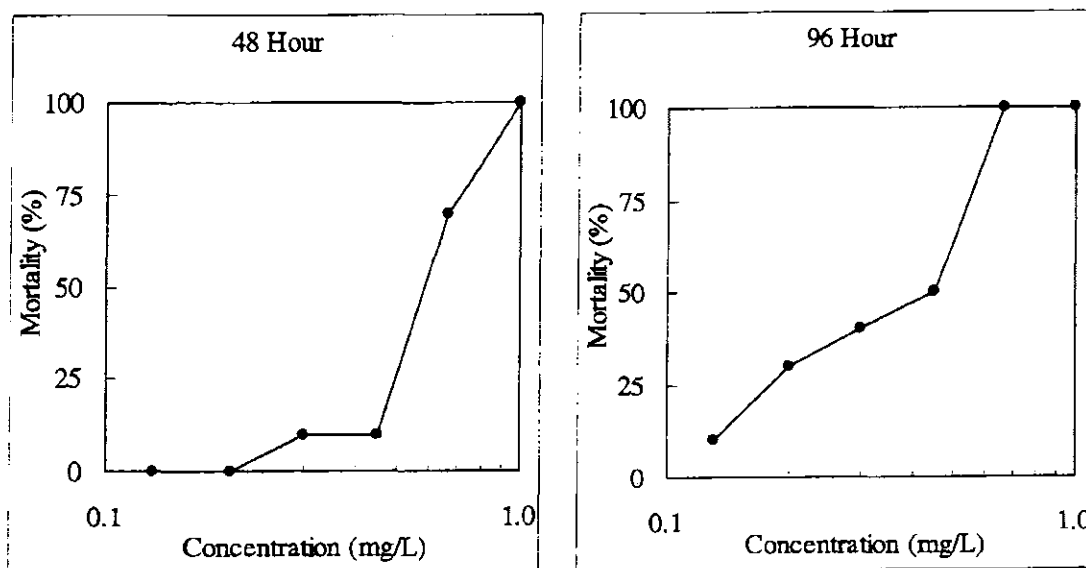


Fig.1 Mortality in PCP-Na salt inspection

### 13 - 2 魚類急性毒性試験 (LC50 値測定)

試験の方法については、OECD テストガイドライン 203 及び JIS K0102 の 71 で定められた方法に準じた魚類急性毒性試験に関する標準操作手順書 (SOP/ATT/011, SOP/ATT/012, SOP/ATT/013) に従った。

#### (1) 試験条件

- ① 実験期間 : 96 時間
- ② 試験水温 :  $25.0 \pm 2.0^{\circ}\text{C}$
- ③ 照明 : 室内光、16 時間明 / 8 時間暗
- ④ 試験液量 : 7.0 L 容、ガラス製
- ⑤ 実験方式 : 流水式 (換水回数 ; 8 回 / 日)
- ⑥ 生物数 : 10 尾 / 濃度区
- ⑦ 給餌 : 無給餌
- ⑧ 試験水濃度 : 対照区, 助剤対照区, 0.15, 0.27, 0.49, 0.89, 1.60 mg/L
- ⑨ 流量設定 : 試験用水 ; 40 mL/min  
原液 ; 0.1 mL/min
- ⑩ 原液濃度 : 60, 108, 196, 356, 640 mg/L
- ⑪ 調製方法 : 被験物質 1.60 g 及び HCO-40 32.0 g を秤量し、アセトニトリルで溶解させた後 1.0 L 容ナスフラスコに移し入れ、ロータリーエバポレーター (40°C) で濃縮乾固した。これに純水約 500 mL を加え

溶解させた後、純水で 2.0 L に定容して 800 mg/L 被験物質原液を調製した。この原液を下表に従って純水で希釈して各原液を調製した。

また、HCO-40 12.8 g を秤量し、被験物質原液の調製と同様の操作で助剤原液 1.0 L を調製した。

これらの原液は 13 - 2 (1) ⑨ の条件に従って、試験用水で 400 倍に希釈し各試験水を調製した。

また、試験用水を用いた対照区を設定した。

試験水濃度 (mg/L)	800 mg/L 被験 物質原液 (mL)	純水 (mL)	被験物質原液 濃度 (mg/L)
0.15	75	925	60
0.27	135	865	108
0.49	245	755	196
0.89	445	555	356
1.60	800	200	640

## (2) 観察・管理

供試魚の観察は、実験開始直後及び 24, 48, 72, 96 時間後まで行った [Table 3 (p.13)]。対照区及び助剤対照区において 10% の死魚が確認されたが、残りの供試魚に異常等は見られなかった。

また、試験水の水温、pH 及び溶存酸素濃度の測定は実験開始前及びその後 24 時間ごとに 96 時間後まで行った。実験期間中の試験水の水温、pH 及び溶存酸素濃度の測定結果を以下に示す。

水温 : 24.9 ~ 25.1 °C

pH : 7.2 ~ 7.6

溶存酸素濃度 : 7.2 ~ 8.1 mg/L

## (3) 魚類急性毒性試験の試験水中の被験物質濃度測定

試験水中の被験物質濃度は HPLC 法により測定し、検量線の直線性及び同時再現性 (n=3) の検討については魚類急性毒性試験の実験開始前に実施した [詳細は Appendix 1 (p.24-26)]。各試料について 1 回測定とした [詳細は Appendix 5 Table 7 (p.39)]。

## (4) LC50 値の算出

96 時間後における供試魚の死亡率は、0.15 mg/L 濃度区で 0%、0.27 mg/L 濃度区で 90 %であった。Probit 法により 48 時間 LC50 値及び 96 時間 LC50 値を算出した [Table 3, Fig.2 (p.13)]。

48 時間 LC50 値 : 0.47 mg/L

96 時間 LC50 値 : 0.23 mg/L

Table 3 Mortality in acute toxicity test

Nominal Concentration (mg/L)	Mortality (%)			
	24 Hhour	48 Hour	72 Hour	96 Hour
Control	0	10	10	10
Solvent Control	0	10	10	10
0.15	0	0	0	0
0.27	0	0	60	90
0.49	0	60	100	100
0.89	30	100	100	100
1.60	100	100	100	100

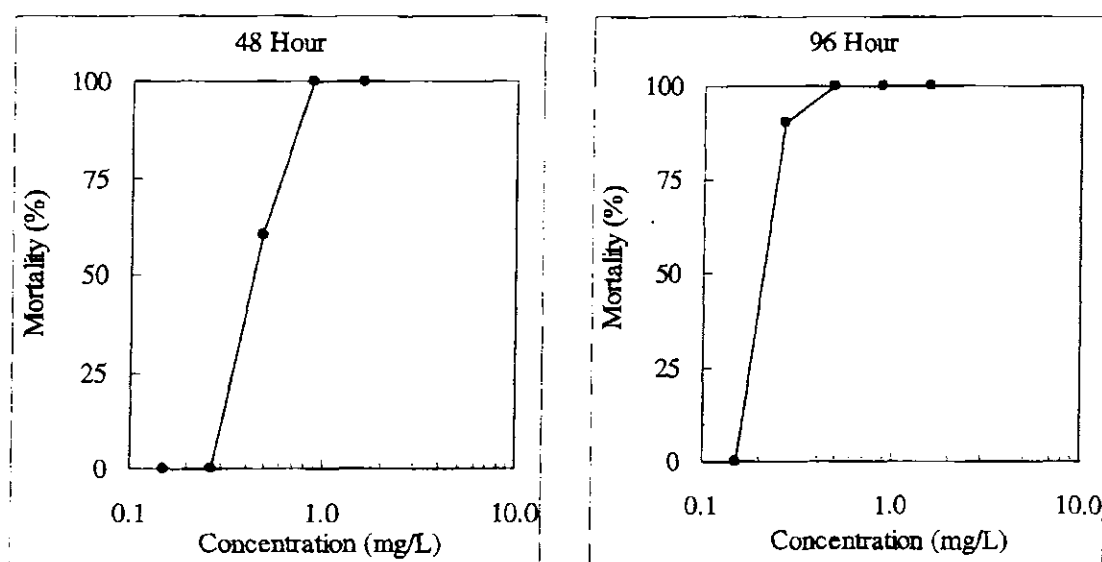


Fig. 2 Mortality in acute toxicity test

## 14 濃縮度試験の実施

被験物質(K-1551)の濃縮性はBCFssを算出することにより求めた。

## 14-1 被験物質濃度の設定

魚類急性毒性試験における96時間LC50値(0.23 mg/L)及び試験水中の被験物質濃度のHPLC分析による定量限界値[0.005 mg/L(実質定量限界値0.1 µg/L); Appendix 2 2-6 参照(p.28)]を考慮し、濃縮度試験の試験水濃度を以下のとおり設定した。

低濃度区	0.6 µg/L
高濃度区	6.0 µg/L (低濃度区 × 10)

## 14-2 試験条件等

## (1) 試験条件

- ①実験期間 : 28日間
- ②試験水温 : 25.0 ± 2.0°C
- ③照明 : 室内光、16時間明／8時間暗
- ④試験水槽 : 100 L 容、ガラス製
- ⑤実験方式 : 流水式(換水回数; 7回／日)
- ⑥生物数 : 60尾／濃度区
- ⑦給餌 : 魚体重の1～2%を投与した(原則として1日2回)。
- ⑧試験水濃度: 低濃度区 0.6 µg/L  
高濃度区 6.0 µg/L
- ⑨流量設定 : 試験用水 500 mL/min  
原液 0.2 mL/min
- ⑩原液濃度 : 低濃度区 1.50 mg/L  
高濃度区 15.0 mg/L

## (2) 被験物質原液の調製

被験物質原液は試験用水によって2500倍に希釈されることを考慮して、以下のように調製した。

・被験物質45 mg及びHCO-40 900 mgを秤量し、アセトニトリルで溶解させた後500 mL容ナスフラスコに移し入れ、ロータリーエバポレーター(40°C)で濃縮乾固した。これに純水約300 mLを加え溶解させた後、3.0 Lに定容して高濃度区被験物質原液(15.0 mg/L)を調製した。

- ・高濃度区被験物質原液 300 mL をメスシリンダーで分取し、純水 2700 mL を添加して、低濃度区被験物質原液 (1.50 mg/L) を調製した。
- ・HCO-40 900 mg を秤量し、アセトニトリルで溶解させた後 500 mL 容ナスフラスコに移し入れ、ロータリーエバポレーター (40°C) で濃縮乾固した。これに純水約 300 mL を加え溶解させた後、3.0 L に定容して助剤対照区原液 (300 mg/L) を調製した。

#### 14-3 供試魚の投入

じゅん化水槽の供試魚から全長が約 6 ～ 7 cm、病気又は外観や行動に異常がなく均一の体重の魚を選別し、60 尾を各試験水槽に投入した。

#### 14-4 観察・管理

##### (1) 供試魚の観察

実験期間中、原則として毎日供試魚の行動について異常がないこと及び外観について良好であることを確認した。

##### (2) 試験水の管理

実験期間中の試験水の水温、pH 及び溶存酸素濃度の測定結果を以下に示す [詳細は Appendix 5 Fig.7 (p.54)]。

水温 : 24.4 ～ 25.7°C

pH : 7.0 ～ 7.6

溶存酸素濃度 : 6.4 ～ 8.2 mg/L

#### 14-5 試験水中の被験物質濃度測定

実験期間中、試験水は実験開始前、実験当日及び実験開始後 1 週間に 2 回以上、各濃度区の試験水約 50 mL を採取した。試験水中の被験物質濃度は HPLC 法により測定した [詳細は Appendix 2 参照 (p27-30)]。

定常状態における各濃度区の試験水中の被験物質濃度の平均値を下記に示した [詳細は Appendix 5 Table 9-11 (p.41-43), Appendix 5 Fig.8 (p.55-65)]。

低濃度区 (設定濃度 : 0.6 µg/L)

定常状態における試験水中被験物質濃度の平均値 : 0.489 µg/L  
(最小値～最大値 : 0.467 ～ 0.533 µg/L)

高濃度区 (設定濃度 : 6.0 µg/L)

定常状態における試験水中被験物質濃度の平均値 : 4.59 µg/L  
(最小値～最大値 : 4.17 ～ 5.21 µg/L)

## 14 - 6 供試魚の魚体中の被験物質濃度測定

魚体中の被験物質濃度は HPLC 法により測定した〔詳細は Appendix 3 参照 (p.31-35)〕。

供試魚の採取は、試験水中被験物質濃度が定常状態になってから 48 時間以上の間隔をあけ、各水槽毎に 6 尾ずつ採取した。

採取した供試魚は速やかに屠殺し、全長・体重を測定した〔Appendix 5 Table 8 (p.40)〕。低濃度区及び高濃度区の供試魚は 2 尾(2 尾 1 群とする)ずつホモジナイズして、これより約 10 g を分取し、被験物質の濃度測定試料とした(各濃度区につき 4 尾、2 群)。助剤対照区の供試魚 1 群については濃度区の供試魚と同様の前処理を行い、魚体中の被験物質濃度測定時にその抽出液で標準溶液を調製した。なお、実験開始時、14、21 及び 28 日目に助剤対照区の供試魚(1 群)について、その一部(約 5 g)を分取して脂質含有率を測定した。

また、実験開始前の供試魚 3 尾及び実験終了時の助剤対照区の供試魚 2 尾を空試験の被験物質濃度測定に用いた。

分析に用いなかった魚体は、試験終了時まで冷凍保存した。

定常状態における魚体中の被験物質濃度を下記に示した〔詳細は Appendix 5 Table 12 (p.44-50), Appendix 5 Fig.9 (p.66-71)〕。

## 低濃度区

定常状態における魚体中被験物質濃度の平均値 : <15 ng/g

## 高濃度区

定常状態における魚体中被験物質濃度の平均値 : 171 ng/g

## 14 - 7 供試魚の魚体中の脂質含有率測定

脂質含有率測定に用いる供試魚は 14 - 6 に従って採取した。脂質含有率測定試料は、助剤対照区の供試魚(1 群)について、その一部(約 5 g)を分取して測定した〔詳細は Appendix 4 Table 6 (p.38)〕。

## 14 - 8 部位別濃度測定及び排泄試験

濃縮度試験において、魚体中の被験物質濃度の濃縮倍率が  $10^3$  倍以下であったため、部位別濃度測定及び排泄試験は実施しなかった。

## 15 濃縮倍率の算出方法

## 15 - 1 試験水中の被験物質濃度算出

HPLC 分析で得られたピーク面積値より試験水中の被験物質濃度を算出した〔詳細は Appendix 2 (p.27-30)〕。

## 15-2 魚体中の被験物質濃度算出

HPLC 分析で得られたピーク面積値より魚体中の被験物質濃度を算出した〔詳細は Appendix 3 (p.31-35)〕。

## 15-3 生物濃縮係数 (BCFss)

## (1) 魚体中被験物質濃度測定時における濃縮倍率

以下の式により濃縮倍率を算出した。

$$\text{濃縮倍率} = \frac{C_{fn} - C_{fb}}{C_{wn}}$$

$C_{fn}$  : n 日目の平均魚体中被験物質濃度 (ng/g)

$C_{wn}$  : n 日目までの平均試験水中被験物質濃度 (μg/L)

$C_{fb}$  : 空試験における実験開始前の平均魚体中被験物質濃度 (ng/g)

実験期間中の濃縮倍率を Table 4, 5 (p.17, 18) 及び Fig.3 (p.18) に示した。

Table 4 Bioconcentration factor during the exposure period (Low exposure level)

Exposure period (day)	Concentration of test substance in test fish		Mean concentration of test substance in test water : $C_{wn}$ (μg/L)	BCF
		Mean (ng/g)		
14	I	<15	0.474	<31.6
	II	<15		
17	I	<15	0.473	<31.7
	II	<15		
21	I	<15	0.475	<31.6
	II	<15		
24	I	<15	0.482	<31.1
	II	<15		
28	I	<15	0.489	<30.7
	II	<15		
Mean concentration on 21, 24, 28 days ( $C_{fn}$ ) : <15			0.489	BCFss = <31.6

BCF : Bioconcentration factor

Table 5 Bioconcentration factor during the exposure period (High exposure level)

Exposure period (day)	Concentration of test substance in test fish		Mean concentration of test substance in test water : C <sub>wn</sub> (µg/L)	BCF
	cfn (ng/g)	Mean (ng/g)		
14	I	151	4.39	32.1
	II	130		
17	I	184	4.34	37.6
	II	142		
21	I	172	4.46	37.7
	II	163		
24	I	168	4.50	36.2
	II	158		
28	I	176	4.59	39.7
	II	187		
Mean concentration on 21, 24, 28 days (C <sub>fn</sub> ) :171			4.59	BCF <sub>ss</sub> = 37.3

BCF : Bioconcentration factor

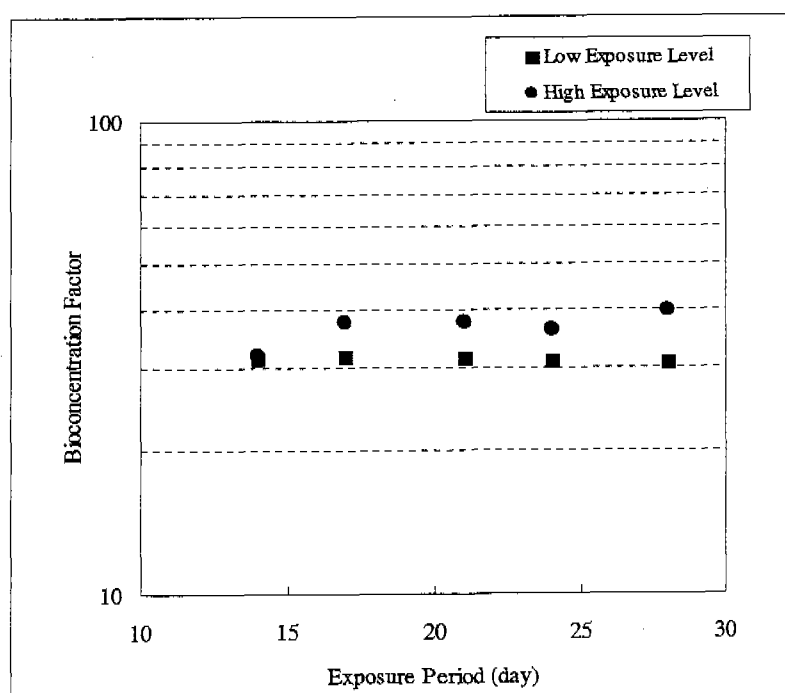


Fig.3 Bioconcentration factors during the exposure period



(2) 定常状態における BCF<sub>ss</sub>

以下の式により BCF<sub>ss</sub> を算出した。

$$BCF_{ss} = \frac{C_f - C_{fB}}{C_w}$$

C<sub>f</sub> : 定常状態<sup>\*1</sup>における魚体中被験物質濃度の平均 (ng/g)

C<sub>w</sub> : 定常状態<sup>\*2</sup>における試験水中被験物質濃度の平均 (μg/L)

C<sub>fB</sub> : 空試験における実験開始前及び実験終了時の魚体中の平均被験物質濃度 (ng/g)

\*1 : 48 時間以上の測定間隔で連続した 3 回の測定における濃縮倍率の変動が 20%以内である場合

\*2 : 測定値の平均に対して ±20%以内である場合

実験開始 21, 24, 28 日目の濃縮倍率は低濃度区において <31.6, <31.1, <30.7、高濃度区において 37.7, 36.2, 39.7 であった。

従って、低濃度区は最高値の <31.6 を採用し、高濃度区は 37.3 を BCF<sub>ss</sub> とした。

低濃度区の BCF<sub>ss</sub> : <31.6

高濃度区の BCF<sub>ss</sub> : 37.3

## 16 試験の有効性

16-1 試験水の水温は 25.0 ± 2.0℃、溶存酸素濃度は飽和酸素濃度の 60%以上であった。

16-2 試験水中の被験物質の濃度の変動は、定常状態における被験物質の濃度の測定値の平均に対して ±20%以内に保たれていた。

16-3 助剤対照区及び低濃度区の供試魚において、実験終了時まで死亡又は病気などの異常は 0%であった。高濃度区の供試魚において死亡又は病気などの異常が 8.3% (60 尾中 5 尾) 確認されたが、残りの供試魚に異常は見られなかった。

以上のことより、本試験が有効であることを確認した。

## 17 試験成績の信頼性に影響を及ぼしたと思われる環境要因

試験成績の信頼性に影響を及ぼしたと思われる環境要因はなかった。

## 18 試験結果

## 18-1 試験結果

実験期間中の K-1551 生物濃縮係数 (BCF<sub>ss</sub>) は低濃度区で <31.6、高濃度区で 37.3 であり、いずれも 10<sup>3</sup> 倍以下であった。

## 18 - 2 考察

## (1) 試験水濃度の設定及び供試魚への影響

濃縮度試験の試験水濃度は 0.6 及び 6.0  $\mu\text{g/L}$  を設定した。被験物質の定量限界値[0.005  $\text{mg/L}$  : 実質定量限界値 0.1  $\mu\text{g/L}$ ]を考慮し、96 時間  $\text{LC}_{50}$  値(0.23  $\text{mg/L}$  ; ヒメダカ)の 1/38.3 及び 1/383 に相当する濃度となった。これらの試験水濃度で濃縮度試験を実施したところ、高濃度区において実験開始 7 日目より衰弱する供試魚(コイ)が観察され、実験開始 11 日目までに 3 尾の死亡個体と 2 尾の衰弱個体を除去した。除去した供試魚( $n=5$ )の平均体重及び平均全長は 5.6 g 及び 7.9 cm で、実験開始時の供試魚( $n=10$ )の平均体重(7.2 g)及び平均全長(8.7 cm)に比べて 10 ~ 20%程度小さな個体であったことから、比較的小さな供試魚に被験物質の毒性が顕著に現れたと判断した。なお、実験開始 12 日目以降から実験終了時まで残りの供試魚に異常はみられなかった。従って、残りの供試魚に被験物質の毒性の影響はなかったと判断した。また、実験期間を通じて助剤対照区及び低濃度区の供試魚は正常であった。

## (2) 定常状態における試験水濃度

実験期間中の試験水中被験物質濃度は、実験開始 3 ~ 7 日の間に設定濃度と比べて -19.1 ~ -26.9%と低い推移を示した。これらの推移は高濃度区で実験開始 7 日目には -5.9%、低濃度区で実験開始 10 日目には -4.5%となったことから、この時点で試験水濃度は定常状態に達したと判断した[Appendix 5 Table 9, 10 (p.41)]。

定常状態における試験水中被験物質濃度の平均値(最低濃度 ~ 最高濃度)は低濃度区(設定濃度 : 0.6  $\mu\text{g/L}$ )で 0.489  $\mu\text{g/L}$  (0.467 ~ 0.533  $\mu\text{g/L}$ )、高濃度区(設定濃度 : 6.0  $\mu\text{g/L}$ )で 4.59  $\mu\text{g/L}$  (4.17 ~ 5.21  $\mu\text{g/L}$ )と一定した値を示した。

## (3) 魚体中被験物質濃度

供試魚のサンプリングは実験開始 14, 17, 21, 24, 28 日目に行い、魚体中被験物質濃度を測定した。低濃度区の魚体中被験物質濃度はすべて定量限界値未満(<15  $\text{ng/g}$ )であった。高濃度区の魚体中被験物質濃度は 141, 163, 168, 163 及び 182  $\text{ng/g}$  (2 群の平均値)であった[Appendix 5 Table 12 (p.44-50)]。

## (4) 濃縮倍率(BCF)及び生物濃縮係数(BCFss)

実験開始 21, 24, 28 日目の BCF は低濃度区で <31.6, <31.1, <30.7、高濃度区で 37.7, 36.2, 39.7 とほぼ一定になった。これより、魚体中被験物質濃度は定常状態に達したと判断した。

定常状態における魚体中被験物質濃度から求めた BCFss は低濃度区で <31.6、高濃度区で 37.3 であった[Table 4, 5 (p.17, 18)]。

### (5) 魚体試料中の被験物質及びその代謝物

魚体中被験物質濃度の分析チャートに被験物質以外の数本のピークが検出された[Appendix 6 Fig.10 (p.73)]。これらの物質についての化学構造は未確認であるが、被験物質の代謝物である可能性が示唆された。

これら代謝物と考えられるピークを被験物質と同様に扱って濃度の算出を行った[Appendix 6 Table 13 (p.72)]。代謝物と考えられる物質の魚体中濃度は低濃度区においてすべて定量限界値未満(<15ng/g)であり、高濃度区においても 141 ~ 182 ng/g とすべて被験物質濃度より低い濃度であった。被験物質とその代謝物と考えられる物質濃度の合計から算出した BCF は低濃度区で 20.9 ~ 65.4、高濃度区で 53.2 ~ 60.2 となり、いずれも BCF は 100 倍未満であった。

これらのことより、被験物質は魚体中で代謝される可能性があるが、これらの物質の濃縮性は被験物質の濃縮性と同様に低いと考えられた。

### (6) 総括

以上の結果より、ポリ塩化ビフェニル、ヘキサクロロベンゼン及びポリ塩化ナフタレン等の濃縮性の高い物質の濃縮性(10<sup>4</sup>倍程度)に比べて、本被験物質(K-1551)は高濃縮性の物質ではないと判断した。

## 19 数値の取扱い

### 19-1 数値の記載

生物濃縮係数(BCF<sub>ss</sub>)は、小数点以下 2 桁目を丸めて 1 桁まで記載した。

### 19-2 数値の丸め方

JIS Z8401 で定められた方法に準じた。

### 19-3 数値の確認

濃縮度試験において試験水中の被験物質濃度測定の結果、得られたデータが設定濃度からかけはなれたり、供試魚の魚体中被験物質濃度測定の結果、かけはなれたデータはなかった。

## 20 試資料の保管

記録及び試資料の保管は、「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関する基準」第 11 章に準じ、当該試験施設の試資料保存施設にて、次に掲げる期間保管するものとする。

但し、当該試験施設が業務を停止し、かつ、法的な継承者を持たない場合は、その試資料は、当該試験の委託者である財団法人 化学物質評価研究機構の保管施設に移管されるものとする。

## 20 - 1 生データ、資料等

生データ、資料等について「化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律」(昭和 48 年法律第 117 号。以下「化審法」という。)第 4 条第 1 項第 1 号又は第 2 号又は第 3 号に該当する旨の通知を受けた後 10 年間とする。

- ・主計画表
- ・試験計画書
- ・生データ及び最終報告書
- ・信頼性保証部門による査察等の記録
- ・職員の資格、訓練、経験等の記録
- ・機器類の保守点検、校正の記録、報告書
- ・コンピュータ化されたシステムの有効性確認記録
- ・全標準操作手順書の経時的ファイル
- ・環境モニター記録

## 20 - 2 被験物質、対照物質その他の試料及び標本

被験物質、対照物質その他の試料及び標本について「化審法」第 4 条第 1 項第 1 号又は第 2 号又は第 3 号に該当する旨の通知を受けた後 10 年間又は安定に保存しうる期間のいずれか短い方の期間とする。

## 21 最終報告書の変更

最終報告書を訂正する場合には、試験責任者は訂正の内容及び理由を「最終報告書訂正書」(様式.16)に明記し、試験委託者に提出する。また、その写しを信頼性保証部門担当者に提出する。「最終報告書訂正書」(様式.16)は、当該試験施設及び試験委託者において最終報告書とともに保管される。

## 22 GLP 基準への適合

本試験は「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関する基準」(平成 12 年改正)に基づいて実施されたものである。

## 23 最終報告書の承認

最終報告書は、試験計画書に従って実施した試験結果に基づいて作成されたものである。

試験責任者

2007 年 10 月 10 日

:

## Appendix 1 魚類急性毒性試験の試験水中の被験物質濃度測定方法

## 1-1 機器の分析条件

## ・ 使用分析機器

HPLC	: LC-6A システム- II
ポンプ	: LC-6A
システムコントローラー	: SCL-6A
オートサンプラー	: SIL-6A
カラムオープン	: CTO-6A
検出器 (UV-VIS)	: SPD-10A
データ処理装置	: C-R4A

## ・ 測定条件

分析カラム	: Inertsil ODS-3 (4.6 mm I.D. × 150 mm) (GL サイエンス)
移動相	: アセトニトリル / 純水 = 60 : 40 (v/v)
流速	: 1.0 mL/min
カラム温度	: 40°C
検出波長 (VIS)	: 380 nm
チャートスピード	: 2 mm/min
試料注入量	: 10 µL

## 1-2 K-1551 標準溶液の調製

被験物質 10.0 mg を精秤しアセトニトリルで溶解した後、100 mL に定容し、100 mg/L 標準原液を調製した。さらに、この標準原液を移動相で希釈し、50, 25, 10, 5 及び 1 mg/L の標準溶液を調製した。

## 1-3 検量線の作成

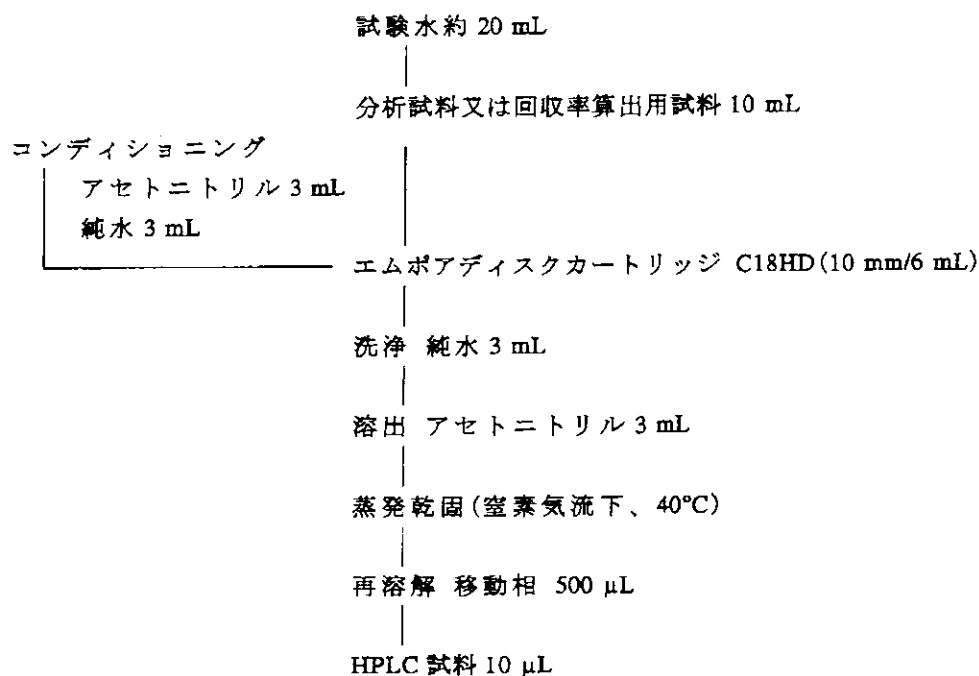
1-2 で調製した標準溶液を検量線作成試料として HPLC に 10 µL を注入した。

## 1-4 試料の前処理法

各試験水は実験開始時と 48 時間後及び実験終了時に採水を行った。採水量は約 20 mL とし、これを分析試料とした。

各分析試料 10 mL をあらかじめアセトニトリル 3 mL 及び純水 3 mL でコンディショニングしたエムボアディスクカートリッジ C18HD (10 mm/6 mL) に添加した。これを純水 3 mL で洗浄した後、アセトニトリル 3 mL で溶出した。溶出液を窒素気流下 (40°C) で蒸発乾固させて、残渣に移動相 500 µL を加えて再溶解させた。これを HPLC 試料として 10 µL を注入した。

フローチャートを次頁に示す。



#### 1-5 定量方法(濃度算出)

ピークの同定は保持時間により行い、定量は被験物質のピーク面積値による直接定量法によって行った。すなわち、標準溶液のピーク面積値(y)と標準溶液濃度(x)との関係を用いて最小二乗法により検量線式を求めた。

$$y = ax + b$$

x: 標準溶液濃度  
y: ピーク面積値  
a: 検量線の傾き  
b: y 軸切片

試験水中の被験物質濃度は、検量線式を用いた以下の式より求めた。

$$\text{試験水中の被験物質濃度 (mg/L)} = [1/a \times \text{ピーク面積値} - b/a] / 20^{**} \times 100 / \text{回収率}(\%)$$

\*\* : 濃縮倍率の補正值

#### 1-6 試験水濃度算出に用いる回収率

回収率算出試料は、13-2 (1) に基づき 1 mg/L 試験水及び助剤試験水を調製した。これらの試料を 1-4 に従って前処理を行った。標準溶液を用いて作成した検量線式からその試料濃度を求め、設定濃度に対する試料濃度の割合を試験水濃度算出に用いる回収率とした。

#### 1-7 測定値の処理方法

各試料について 1 回測定とした。

測定値が設定値の  $\pm 20\%$  の範囲内であったので、設定値を用いて LC50 値を算出した [Appendix 5 Table 7(p.39)]。

## 1-8 検討結果

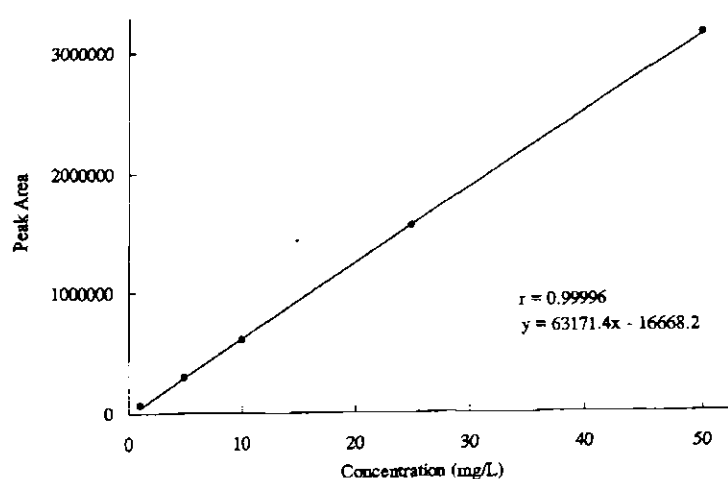
検量線の直線性( $r$ )及び同時再現性を確認したところ、 $r = 0.99996$  及び  $CV = 0.6 \sim 1.7\%$ と良好な結果が得られた[Appendix 1 Table 1, Appendix 1 Fig.1 (p26)]。

また、測定を妨害するピークも認められなかった。

Appendix 1 Table 1 Intra-assay precision of calibration curve

Standard Solution (mg/L)	No.	Peak Area	Mean	S.D.	CV(%)
1	1	58075	58508	377	0.6
	2	58686			
	3	58763			
5	1	301441	300164	1394	0.5
	2	298677			
	3	300374			
10	1	604304	607780	5289	0.9
	2	613867			
	3	605168			
25	1	1526948	1548960	20345	1.3
	2	1552857			
	3	1567075			
50	1	3148284	3149849	54838	1.7
	2	3205453			
	3	3095810			

Appendix 1 Fig. 1 Calibration curve for the test substance



This calibration curve was calculated from the mean of the peak area.

## Appendix 2 濃縮度試験の試験水中の被験物質濃度測定方法

## 2-1 機器の分析条件

試料注入量 : 50  $\mu$ L

分析条件は Appendix 1-1 に従った。

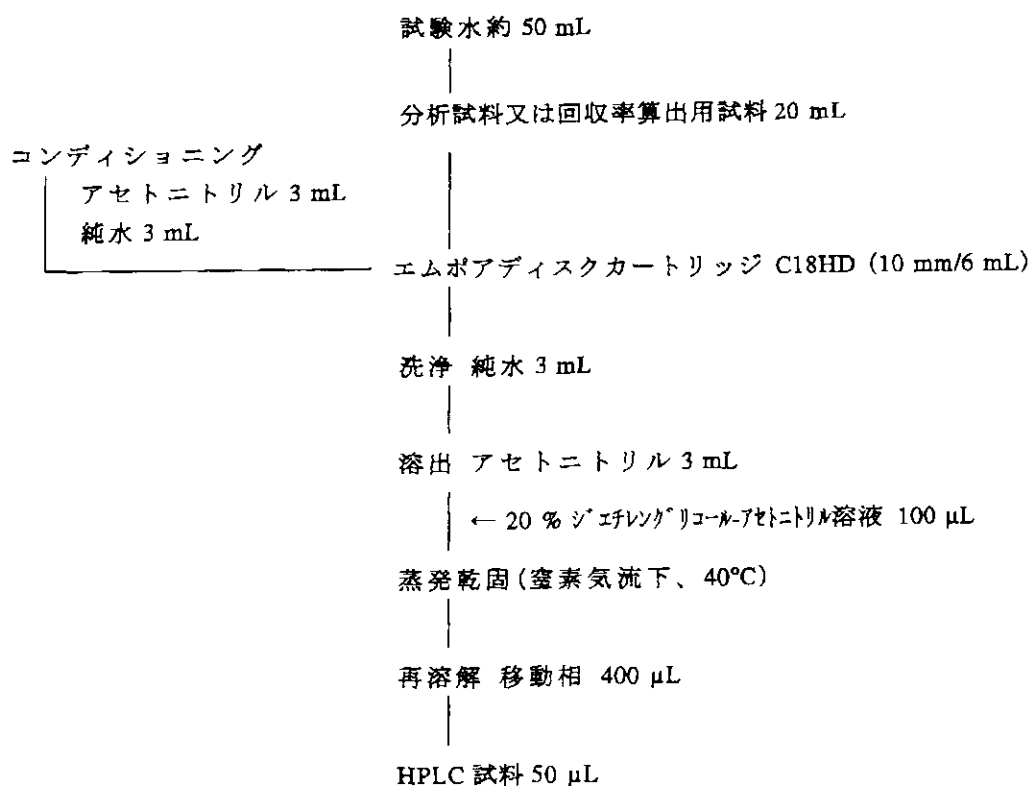
## 2-2 K-1551 標準溶液の調製

Appendix 1-2 で調製した 100 mg/L 標準原液を移動相で希釈し、300 及び 30  $\mu$ g/L の標準溶液を調製した。

## 2-3 試料の調製

各分析試料 20 mL をあらかじめアセトニトリル 3 mL 及び純水 3 mL でコンディショニングしたエムポアディスクカートリッジ C18HD (10 mm/6 mL) に添加した。これを純水 3 mL で洗浄した後、アセトニトリル 3 mL で溶出した。溶出液に 20% ジエチレングリコール-アセトニトリル溶液を 100  $\mu$ L 加え、窒素気流下 (40°C) で蒸発乾固させて、残渣に移動相 400  $\mu$ L を加えて再溶解させた。これを HPLC 試料として 50  $\mu$ L を注入した。

試料の前処理法のフローチャートを下記に示す。





## 2-4 定量方法

以下の式により試験水の被験物質濃度を算出した。

$$\text{試験水中被験物質濃度 (cwn: } \mu\text{g/L)} = \frac{P \times A(\text{std}) \times B(W) \times C \times D \times 100}{A(W) \times B(\text{std}) \times E \times F}$$

cwn : n 日目の試験水中被験物質濃度 ( $\mu\text{g/L}$ )

P : 標準溶液濃度 ( $\mu\text{g/L}$ )

A(std) : 標準溶液注入量 ( $\mu\text{L}$ )

A(W) : 分析試料注入量 ( $\mu\text{L}$ )

B(std) : 標準溶液注入時の測定値

B(W) : 分析試料注入時の測定値

C : 希釈倍率・分取比

D : 前処理における最終液量 (mL)

E : 回収率 (%)

F : 採取量 (mL)

## 2-5 回収率の検討結果

14 - 2 (2) で調製した被験物質原液を試験用水で 2500 倍に希釈し回収率算出用試料とした。これを 2-3 に従って処理を行い回収率を求めた。試験水における低濃度区の平均回収率は  $93.0 \pm 0.2\%$ 、 $CV = 0.2\%$  及び高濃度区の平均回収率は  $96.6 \pm 1.5\%$ 、 $CV = 1.6\%$  と良好な結果が得られた [Appendix 2 Table 2 (p.29)]。また、助剤対照区試験水において分析を妨害する夾雑ピークは検出されなかった。

従って、本処理法は試験水分析法として十分信頼できるものであると考えられた。

## 2-6 HPLC による定量限界値の設定

Appendix 1-2 で調製した 100 mg/L 標準原液を移動相で希釈して 0.10, 0.05, 0.02, 0.01 及び 0.005 mg/L の標準溶液を調製した。

これらの標準溶液を 3 回測定し、平均値、標準偏差、変動係数 (CV) 及び直線性 (r) を算出した。0.10 ~ 0.005 mg/L 標準溶液の変動係数は 0.3 ~ 8.8%、直線性は 0.99993 と良好な結果が得られた [Appendix 2 Table 3 (p.29), Appendix 2 Fig.2 (p.30)]。

以上の結果より、標準溶液の定量限界値を 0.005 mg/L とし、これ未満の濃度を参考値とした。また、試験水は前処理により 50 倍に濃縮されるので、試験水の実質定量限界値は 0.1  $\mu\text{g/L}$  となった。

## Appendix 3 濃縮度試験の魚体中の被験物質濃度測定方法

## 3-1 機器の分析条件

試料注入量 : 50  $\mu$ L

分析条件は Appendix 1-1 に従った。

## 3-2 K-1551 標準溶液の調製

Appendix 1-2 で調製した 100 mg/L 標準原液を助剤対照区の魚体抽出液で希釈し、300 及び 30  $\mu$ g/L の標準溶液を調製した。

## 3-3 回収率算出用試料の調製

試験に使用していない供試魚を細片化し、ホモジナイズした魚体 10 g をはかりとった ( $n=3$ )。これに 10 mg/L 標準溶液 150  $\mu$ L を添加して回収率算出試料を調製した。この濃度は魚体中濃度に換算すると 0.15  $\mu$ g/g で、低濃度区試験水濃度の 250 倍、高濃度区試験水濃度の 25 倍となった。

また、被験物質を添加していない魚体 10 g ( $n=3$ ) にアセトニトリル 150  $\mu$ L を添加し、空試験として前処理を行った。

回収率算出用試料の前処理方法は、供試魚の前処理に従って行い測定結果の平均値から回収率を算出した。

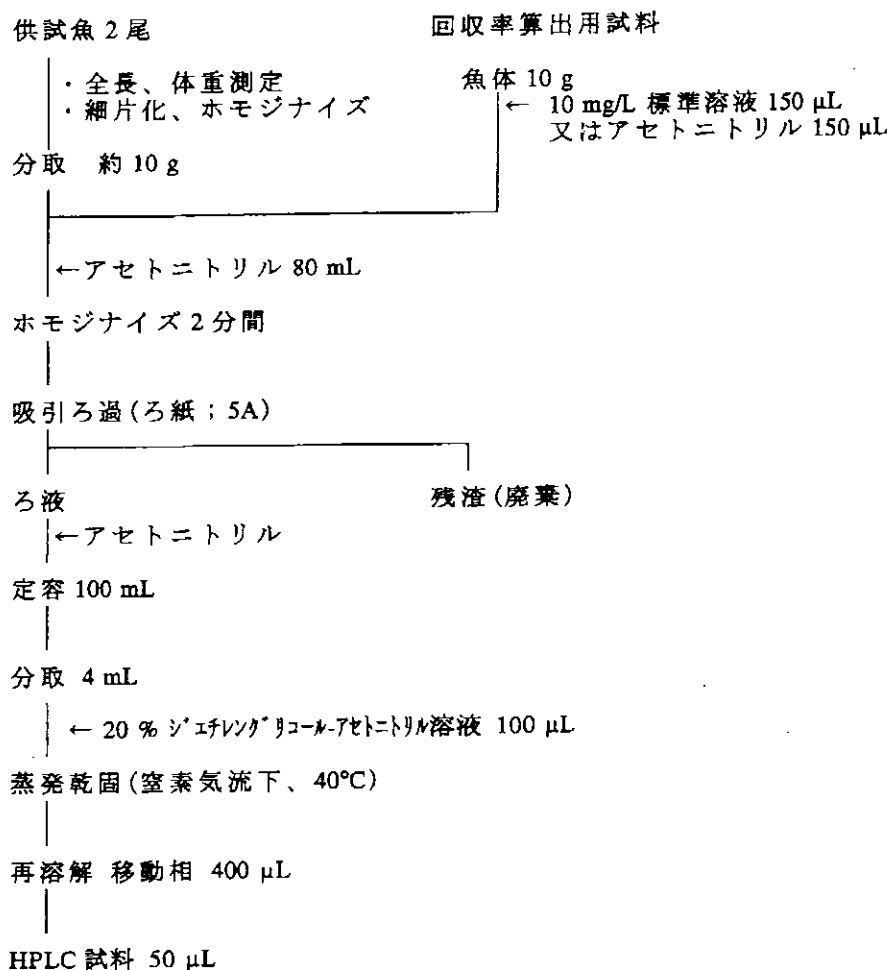
また、魚体中濃度測定の定量限界値についても検討を行った。

## 3-4 供試魚の前処理法

供試魚は屠殺したのち水分を拭きとり、全長・体重を測定した。各濃度区の供試魚 2 尾ずつをビーカーに入れ細片化しホモジナイズした (なお、2 尾の合計重量が 10 g を超える場合は、ホモジナイズした後に約 10 g になるように試料を秤量して抽出に用いた)。

これにアセトニトリル 80 mL を加え、2 分間ホモジナイズし、ろ紙 (SA: アドバンテック) を用いて吸引ろ過した。次に吸引瓶内のろ液を 100 mL 容メスフラスコに移し入れ、アセトニトリルで定容した。この溶液 4 mL を分取し、20% ジエチレングリコール-アセトニトリル溶液を 100  $\mu$ L 加えて窒素気流下 (40  $^{\circ}$ C) で蒸発乾固させ、残渣に移動相 400  $\mu$ L を加え再溶解させた後、この溶液を HPLC 試料として 50  $\mu$ L 注入した。

供試魚の前処理法のフローチャートを次頁に示す。



### 3.5 定量方法

以下の式により魚体中の被験物質濃度の算出をした。

$$\text{魚体中被験物質濃度 (cfng/g)} = \frac{P \times A(\text{std}) \times B(f) \times C \times D \times 100}{A(f) \times B(\text{std}) \times E \times F}$$

cfng : n 日目の魚体中被験物質濃度 (ng/g)

P : 標準溶液濃度 (μg/L)

A (std) : 標準溶液注入量 (μL)

A (f) : 分析試料注入量 (μL)

B (std) : 標準溶液注入時の測定値

B (f) : 分析試料注入時の測定値

C : 希釈倍率・分取比

D : 前処理における最終液量 (mL)

E : 回収率 (%)

F : 採取量 (g)

## 3-6 回収率の検討結果

3-3 に従って調製した回収率算出用試料を 3-4 に従って処理を行い回収率を求めた。平均回収率は  $94.6 \pm 5.0\%$  で、 $CV = 5.3\%$  と良好な結果が得られた。また、空試験において分析を妨害する夾雑ピークは検出されなかった [Appendix 3 Table 4 (p.33), Appendix 3 Fig.3 (p.34)]。

従って、本処理法は魚体中分析法として十分信頼できるものであると考えられた。

Appendix 3 Table 4 Recovery rate of the concentration of the test substance in test fish

Samples	Standard Solution ( $\mu\text{g/L}$ )	Peak Area of Standard Solution	Peak Area of Sample	Recovery (%)	Mean	S.D.	CV(%)
Recovery Sample	300	89410	43760	97.9	94.6	5.0	5.3
			43405	97.1			
			39678	88.8			
Blank Test	300	89410	N.D.	—	—	—	—
			N.D.	—			
			N.D.	—			

## 3-7 定量限界値の設定

魚体中濃度が 0.030 及び 0.015  $\mu\text{g/g}$  になるように、2 及び 1  $\text{mg/L}$  標準溶液を魚体 10 g にそれぞれ 150  $\mu\text{L}$  添加して回収処理を行った。その回収率は  $95.3 \pm 3.4\%$ 、 $\text{CV} = 3.6\%$  及び  $95.2 \pm 2.8\%$ 、 $\text{CV} = 2.9\%$ であった「Appendix 3 Table 5 (p.35)」。

以上のことより、魚体中濃度 0.015  $\mu\text{g/g}$  を定量限界値とし、これ未満の濃度を参考値とした。

Appendix 3 Table 5 Lower limit of quantitaion of the concentration of the test substance in test fish

Nominal Concentration in Test Fish ( $\mu\text{g/g}$ )	Standard Solution ( $\mu\text{g/L}$ )	Peak Area of Standard Solution	Peak Area of Sample	Recovery (%)	Mean	SD	CV (%)
0.030	30	9270	8675	93.6	95.3	3.4	3.6
			8627	93.1			
			9192	99.2			
0.015	30	9270	4563	98.4	95.2	2.8	2.9
			4340	93.6			
			4339	93.6			

## Appendix 4 供試魚の魚体中の脂質含有率測定

## 4-1 脂質含有率測定に用いる供試魚

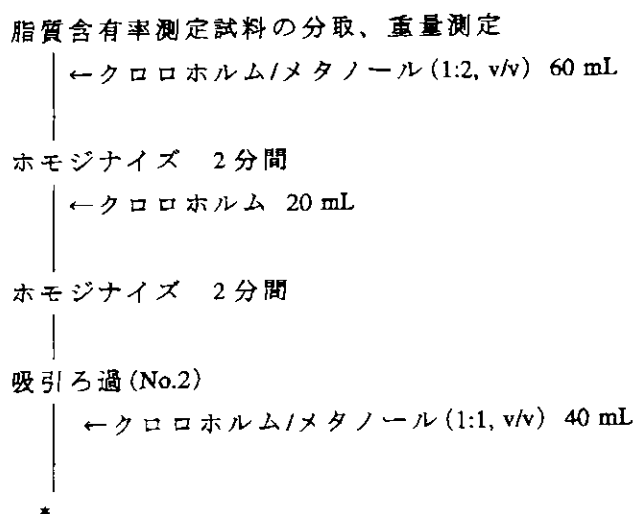
助剤対照区の供試魚(1群)の一部(約 5g)を分取して重量を測定したものを脂質含有率測定試料とした。

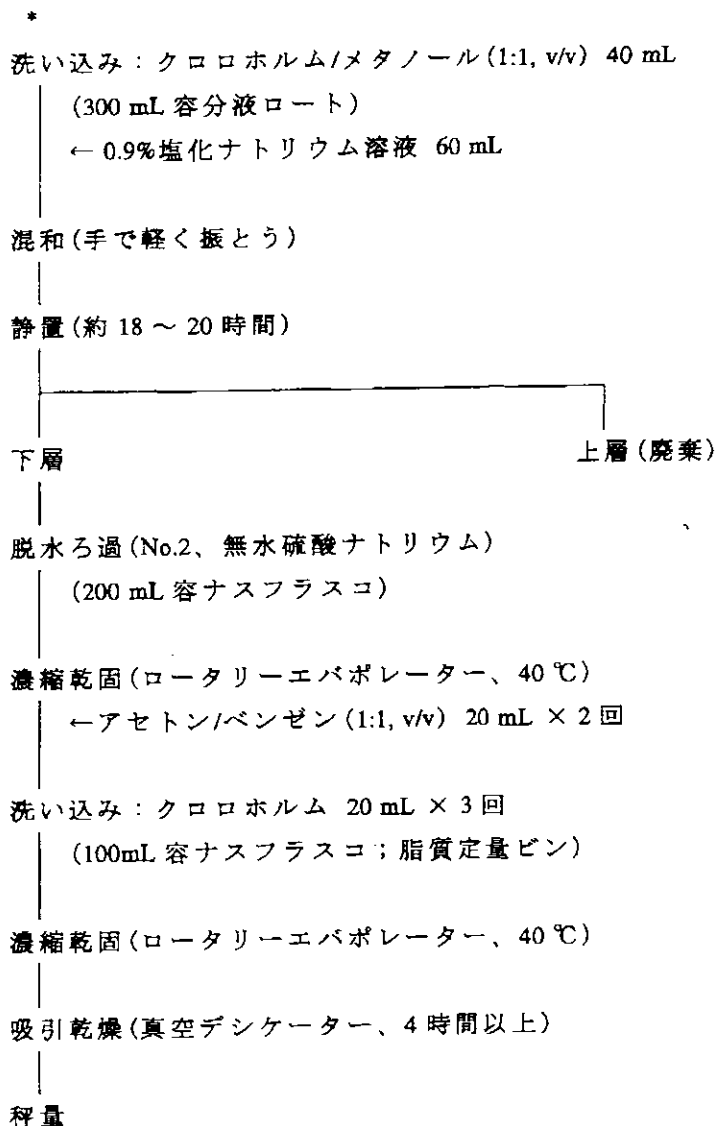
## 4-2 脂質の抽出操作

4-1 で分取した脂質含有率測定試料にクロロホルム/メタノール(1:2, v/v) 60 mL を加えて2分間ホモジナイズした。さらにクロロホルム 20 mL を加えて2分間ホモジナイズした。これをブフナーロートを用いてろ紙(No.2)で吸引ろ過した。この時、残渣物をクロロホルム/メタノール(1:1, v/v) 40 mL でブフナーロートに洗い込んだ。次に吸引びん内のろ液を 300 mL 容分液ロートに移し入れ、クロロホルム/メタノール(1:1, v/v) 40 mL で吸引びん内を洗い込んだ。これに 0.9%塩化ナトリウム溶液 60 mL を加えて、手で軽く振とうして 18 ~ 20 時間静置した。

300 mL 容分液ロートの溶液が二層に分かれたのち、下層を無水硫酸ナトリウムを入れたろ紙を用いて脱水ろ過しながら、200 mL 容ナスフラスコに移し入れた。これをロータリーエバポレーター(40 °C)で濃縮させた。濃縮にはアセトン/ベンゼン(1:1, v/v) 20 mL を2回加えて水分を共沸させた。濃縮させた残渣物をクロロホルム 20 mL で溶解させて、100 mL 容ナスフラスコ(脂質定量ビン)に洗い込んだ。この操作を3回繰り返した。これをロータリーエバポレーター(40 °C)で濃縮乾固させたのち、真空デシケーターで吸引乾燥を4時間以上行った。

脂質の抽出操作のフローチャートを以下に示す。





#### 4-3 脂質の重量測定

100 mL 容ナスフラスコ(脂質定量ビン)をあらかじめ真空デシケーター内で約 18 ~ 20 時間乾燥させたのち、重量を測定した。これを用いて 4-2 に従って脂質の抽出を行い、吸引乾燥させた 100 mL 容ナスフラスコ(脂質定量ビン)の重量を測定した。

供試魚の脂質含有率は次式に従って求め、脂質含有率は小数点 2 桁で表示した。

$$\text{脂質含有率(\%)} = \frac{(B-A)}{C} \times 100$$

A：空の脂質定量ビンの重量(g)

B：脂質定量ビンの重量 + 脂質の重量(g)

C：抽出に用いた魚体重量(g)

## 4.4 脂質含有率の測定結果

助剤対照区の供試魚(1群)について、実験開始時、14、21及び28日目に脂質含有率測定を行った。脂質含有率の測定結果は2.46、3.02、2.24及び2.22%となり、その変動幅は20.0%であった[Appendix 4 Table 6 (p.38)]。

実験開始時と終了時、及び被験物質濃度測定試料における脂質含有率の測定結果から供試魚の脂質含有率は2～3%に保たれていた。

Appendix 4 Table 6 Lipid content of test fish during the exposure period (Solvent control level)

Exposure Period (day)	Test Fish No.	Weight (g)	Length (cm)	Lipid Content (%)
0	1	8.5	9.2	2.46
	2	8.4	9.2	
14	3	8.9	9.4	3.02
	4	8.2	9.2	
21	3	9.8	9.4	2.24
	4	9.3	9.4	
28	3	8.8	9.2	2.22
	4	8.8	9.2	



## Appendix 7 被験物質の同定(マスペクトル)

## 7-1 LC/MS/MS の分析条件

LC/MS/MS 装置 [API3000 システム VI、MDS SCIEX、(SOP/OME/037)]

質量分析計 (API3000、MDS SCIEX)

高速液体クロマトグラフ alliance セパレーションモジュール (Waters 2690、Waters)

データ処理装置 (Power Macintosh G4、Apple Computer)

プリンター (MICROLINE 1035PS、OKI)

## LC/MS/MS の条件

導入部：シリンジポンプ	: Pump II (HARVARD APPARATUS)
シリンジ	: 0.10 mL(Hamilton)
試料の希釈溶媒	: 10 mmol/L ぎ酸-メタノール溶液
流速	: 5 $\mu$ L/min
MS/MS：イオン化法	: Turbo Ion Spray 正イオン検出モード
イオンスプレー電圧	: 5500 V
ヒーターガス温度	: 室温
マルチプライヤー電圧	: 1800 V
ターボイオンスプレーガス流量	: 0 mL/min
ネブライザーガス	: 7 BIT
カーテンガス	: 9 BIT
コリジョンガス	: 7 BIT
モニタしたイオンの範囲	: m/z 50 - 300

## 7-2 測定試料の調製

Appendix 1-2 で調製した 100 mg/L 標準原液をアセトニトリルで希釈し 10 mg/L 標準溶液を調製した。10 mg/L 標準溶液、純水及び 10 mmol/L ぎ酸-メタノール溶液を 1:1:1 (v/v/v) で希釈し測定試料を調製した。

## 7-3 被験物質の同定

7-2 で調製した測定試料を用いて被験物質のマスペクトルを測定したところ、被験物質の質量数 (197.24) と一致することを確認した [Appendix 7 Fig. 11 (p.75)]。