

最 終 報 告 書

2-*tert*-ブチル-*p*-クレゾール（被験物質番号 K-1610）のヨイにおける濃縮度試験

（試験番号：51610）

化学物質評価研究機構
残留薬理学部

陳 述 書

財団法人 化学物質評価研究機構
久留米事業所

試験委託者 新エネルギー・産業技術総合開発機構

試験の表題 2-*tert*-ブチル-*p*-クレゾール（被験物質番号 K-1610）のコイに
おける濃縮度試験

試験番号 51610

本最終報告書（写し）は、上記試験の最終報告書を正確にコピーしたものです。

2002年 / 月3 / 日

運営管理者

[Redacted Signature]

[Redacted Stamp]

陳 述 書

財団法人 化学物質評価研究機構
久留米事業所

試験委託者 新エネルギー・産業技術総合開発機構

試験の表題 2-*tert*-ブチル-*p*-クレゾール (被験物質番号 K-1610) のコイに
おける濃縮度試験

試験番号 51610

上記試験は、「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」(環保業第39号、薬発第229号、59基局第85号、昭和59年3月31日、平成12年3月1日改正)及び「OECD Principles of Good Laboratory Practice」(November 26, 1997)に従って実施したものです。

また、本最終報告書は生データを正確に反映しており、試験データが有効であることを確認しています。

2002 年 1 月 31 日

試験責任者

信 頼 性 保 証 書

財団法人 化学物質評価研究機構
久留米事業所

試験委託者 新エネルギー・産業技術総合開発機構

試験の表題 2-tert-ブチル-p-クレゾール（被験物質番号 K-1610）のコイに
おける濃縮度試験

試験番号 51610

上記試験は財団法人化学物質評価研究機構久留米事業所の信頼性保証部門が監査及び査察を実施しており、監査又は査察を行った内容、日付並びに試験責任者及び運営管理者に報告を行った日付は以下の通りです。

監査又は査察内容	監査又は査察日	報告日（試験責任者）	報告日（運営管理者）
試験計画書	2001年12月7日	2001年12月7日	2001年12月7日
	2002年1月9日	2002年1月9日	2002年1月9日
試験実施状況	2001年12月11日	2001年12月11日	2001年12月11日
	2001年12月21日	2001年12月27日	2001年12月27日
	2001年12月26日	2001年12月27日	2001年12月27日
	2002年1月9日	2002年1月17日	2002年1月17日
	2002年1月16日	2002年1月17日	2002年1月17日
	2002年1月17日	2002年1月17日	2002年1月17日
生データ及び最終報告書	2002年1月31日	2002年1月31日	2002年1月31日

本最終報告書は、試験の方法が正確に記載されており、内容が試験計画及び標準操作手順に従い、かつ、生データを正確に反映していることを保証します。

2002年 / 月31日

信頼性保証部門責任者



目 次

	頁
表 題	1
試験委託者	1
試験施設	1
試験目的	1
試験法	1
適用 G L P	1
試験日程	2
試験資料の保管	2
試験関係者	2
最終報告書の承認	2
要 約	3
1. 被 験 物 質	4
2. 急性毒性試験	6
3. 濃縮度試験の実施	9
4. 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
5. 試験結果	19
6. 備 考	21

表 題	2- <i>tert</i> -ブチル- <i>p</i> -クレゾール（被験物質番号 K-1610）のコイにおける濃縮度試験
試験委託者	新エネルギー・産業技術総合開発機構 （〒170-6028）東京都豊島区東池袋三丁目1番1号
試験施設	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 19-14
試験目的	K-1610のコイにおける濃縮性の程度について知見を得る。
試験法	「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、昭和49年7月13日、平成10年10月8日改正）に規定する〈魚介類の体内における化学物質の濃縮度試験〉及び「OECD Guidelines for Testing of Chemicals」に定める“Bioconcentration : Flow-through Fish Test (Guideline 305, June 14, 1996)”に準拠した。
適用 G L P	(1) 化学物質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関する基準」（環保業第39号、薬発第229号、59基局第85号、昭和59年3月31日、平成12年3月1日改正）を適用した。 (2) OECD-GLP 「OECD Principles of Good Laboratory Practice」（November 26, 1997）を適用した。

試験日程

試験開始日	2001年12月 7日
実験開始日	2001年12月18日
実験終了日	2002年 1月15日
試験終了日	2002年 1月31日

試験資料の保管

(1) 被験物質

同一ロットの被験物質が分解度試験終了後にすでに保管されているため、本試験終了後には保管しない。

(2) 生データ、資料等

生データ、試験計画書、試験依頼書、その他必要な資料等は最終報告書と共に、試験委託者から通知を受けるまでの期間、久留米事業所資料保管室に保管する。

試験関係者

試験責任者

所属 試験第一課

試験担当者
(濃縮度試験の実施)

飼育管理責任者

急性毒性試験担当者

最終報告書の承認

2002年 / 月31日

試験責任者

要 約

試験の表題

2-tert-ブチル-p-クレゾール（被験物質番号 K-1610）のコイにおける濃縮度試

試験条件

急性毒性試験

- | | |
|-----------|------------------|
| (1) 供 試 魚 | ヒメダカ |
| (2) ばく露期間 | 96時間 |
| (3) ばく露方法 | 半止水式（8～16時間毎に換水） |

濃縮度試験

- | | |
|-------------|-------------------------|
| (1) 供 試 魚 | コイ |
| (2) 試 験 濃 度 | 第1濃度区 10 μ g/L |
| | 第2濃度区 1 μ g/L |
| (3) ばく露期間 | 28日間 |
| (4) ばく露方法 | 連続流水式 |
| (5) 分 析 方 法 | 高速液体クロマトグラフィー質量分析法 |

試験結果

- | | |
|------------------|--------------|
| (1) 96時間LC50値 | 2.24mg/L |
| (2) 定常状態における濃縮倍率 | 第1濃度区 99倍 |
| | 第2濃度区 62倍 |

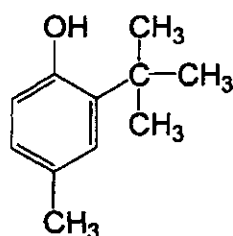
1. 被 験 物 質

本報告書においてK-1610は、次の名称等を有するものとする。

1.1 名 称 2-*tert*-ブチル-*p*-クレゾール

1.2 構造式等

構造式



分子式 $C_{11}H_{16}O$

分子量 164.24

1.3 入手先、商品名、等級及びロット番号*1

(1) 入 手 先 [REDACTED]

(2) 商 品 名 [REDACTED]

(3) 等 級 [REDACTED]

(4) ロット番号 FGF01

*1 入手先添付資料による。

1.4 純 度*1

被 験 物 質 99.9% (GC法)

被験物質は純度100%として取り扱った。

1.5 被験物質の確認

赤外吸収スペクトル (Fig. 14参照)、質量スペクトル (Fig. 15参照) 及び核磁気共鳴スペクトル (Fig. 16参照) により構造を確認した。

1.6 保管条件及び保管条件下での安定性

(1) 保管条件 冷蔵保存

(2) 安定性確認 実験開始前及び終了後に被験物質の赤外吸収スペクトルを測定した結果、両スペクトルは一致し、保管条件下で安定であることを確認した (Fig. 14参照)。

1.7 試験条件下での安定性

実験開始前に予備検討を行い、試験条件下で安定であることを確認した。

2. 急性毒性試験

2.1 試験方法

「工場排水試験方法，魚類による急性毒性試験」（JIS K 0102-1998 の 71.）の方法に準じて行った。

2.2 供試魚

- | | |
|---------------------|--|
| (1) 魚 種 | ヒメダカ <u>Oryzias latipes</u>
選択理由：コイと感受性が類似しており、供試魚として入手し易いため。 |
| (2) 供給源 | 小川商店
(住所 〒 830-0049 福岡県久留米市大石町 181) |
| (3) 蓄養条件
期 間 等 | 魚の入手時に目視観察をして異常のあるものを除去し、蓄養槽で病気予防及び寄生虫駆除の薬浴を行った後、流水状態で57日間飼育した。 |
| 薬 浴 | 病気予防としてエルバージュ20mg/Lと塩化ナトリウム7g/Lの混合薬浴を24時間実施した。寄生虫駆除としてホルマリン30μL/Lの24時間薬浴を2回実施した。 |
| (4) じゅん化条件
期 間 等 | 蓄養後、じゅん化水槽へ搬入し薬浴した後、じゅん化を行った。その間異常のあるものは除去し、25±2℃の水温の流水状態で26日間飼育した。その後、再度選別及び薬浴を実施した後、流水状態で18日間飼育した。 |
| 薬 浴 | じゅん化水槽ではエルバージュ20mg/Lと塩化ナトリウム7g/Lの混合薬浴を24時間実施した。再選別後、エルバージュ20mg/Lと塩化ナトリウム7g/Lの混合薬浴を24時間実施した。 |
| (5) 体 重 | 平均 0.36g |
| (6) 全 長 | 平均 3.4cm |
| (7) 感受性試験 | 同一ロット (TF0-011022) の供試魚による基準物質PCP-Na [ペンタクロロフェノールナトリウム 試薬 東京化成工業製] の48時間LC50値は0.704mg/Lであった。 |

2.3 試験用水

(1) 種類

久留米事業所敷地内で揚水した地下水

(2) 水質確認

久留米事業所にて2001年9月3日に採水し、測定又は分析を行った結果をReference 1に示す（測定頻度1回/6ヶ月）。各項目の測定又は分析値は「水道法に基づく水質基準」（平成4年12月21日改正 厚生省令第69号）、「水産用水基準」（社団法人 日本水産資源保護協会 昭和58年3月）、「OECD Guidelines for Testing of Chemicals」"Fish, Early-life Stage Toxicity Test (Guideline 210, July 17, 1992)", 「水質汚濁に係る環境基準」（平成11年2月22日改正 環境庁告示第14号）又は「OECD Guidelines for Testing of Chemicals」"Bioconcentration : Flow-through Fish Test (Guideline 305, June 14, 1996)"に記載されている濃度以下であることを確認した。

2.4 試験条件

(1) 試験水槽	ガラス製ガロンびん	
(2) 試験液量	3.85L×2/濃度区	
(3) 試験温度	ばく露開始時	24.0℃
	換水前	23.9～24.0℃
(4) 溶存酸素濃度	ばく露開始時	8.1mg/L
	換水前	6.6～ 7.2mg/L
(5) pH	ばく露開始時	8.3～ 8.4
	換水前	8.0～ 8.2
(6) 供試魚数	10尾/濃度区	
(7) ばく露期間	96時間	
(8) ばく露方法	半止水式（8～16時間毎に換水）	

2.5 原液調製法

(1) 分散剤

ジメチルスルホキシド

(2) 調製方法

被験物質をジメチルスルホキシドに溶解して10.0g/Lの原液を調製した。

2.6 試験の実施

- (1) 実施場所 214LC50室
- (2) 試験実施日 2001年12月10日 ～ 2001年12月14日

2.7 96時間LC50値の算出

Doudoroff法で行った。

2.8 試験結果

被験物質の96時間LC50値 2.24mg/L (Fig. 3参照)

3. 濃縮度試験の実施

3.1 供試魚

- | | | |
|------------|---|---|
| (1) 魚 | 種 | コイ <u>Cyprinus carpio</u> |
| | | 選択理由：過去の知見との整合性を考慮するため及び
大きさが扱い易いため。 |
| (2) 供 | 給 | 源 |
| | | 杉島養魚場 |
| | | (住所 〒 866-0024 熊本県八代市郡築一番町 123-2) |
| | | 供試魚受入日 2001年10月15日 |
| (3) 蓄 | 養 | 条 件 |
| | 期 | 間 等 |
| | | 魚の入手時に目視観察をして異常のあるものを除去し、
受入槽で病気予防及び寄生虫駆除の薬浴を行った後、
流水状態で13日間飼育した。 |
| | 薬 | 浴 |
| | | 病気予防として水産用OTC 50mg/Lと塩化ナトリウム7g/L
の混合薬浴を24時間実施した。寄生虫駆除としてホルマ
リン30μL/Lの24時間薬浴を1回実施した。 |
| (4) じゅん化条件 | | |
| | 期 | 間 等 |
| | | 蓄養後、じゅん化水槽へ搬入し、再度薬浴した後、じゅ
ん化を行った。その間異常のあるものは除去し、25±2℃
の水温の流水状態で15日間飼育した。さらに試験水槽へ
移し、薬浴後、同温度の流水状態で32日間飼育した。 |
| | 薬 | 浴 |
| | | じゅん化水槽では水産用OTC 50mg/Lと塩化ナトリウム
7g/Lの混合薬浴を24時間実施した。試験水槽ではエルバ
ージュ20mg/Lと塩化ナトリウム7g/Lの混合薬浴を24時間
実施した。 |
| (5) 全 | 長 | 6.4～8.3cm |
| (6) ロ | ッ | ト |
| | | TFC-011015 |
| (7) 年 | 齢 | 当才魚 |
| (8) 餌 | 料 | |
| | 種 | 類 |
| | 組 | 成 |
| | | コイ稚魚育成用配合飼料 |
| | | たん白質含量 43.0%以上 |
| | | 脂 質 含 量 3.0%以上 |
| | 製 | 造 元 |
| | | 日本配合飼料株式会社 |
| | 給 | 餌 方 法 |
| | | 供試魚体重の約2%相当量を1日2回に分けて給餌した。
ただし、供試魚の採取前24時間は給餌を止めた。 |

3.2 試験用水

2.3に同じ。

3.3 試験及び環境条件

(1) 試験水供給方法	久留米事業所組立流水式装置を用いて供給した。
(2) 試験水槽	100L容ガラス製水槽
(3) 試験水量	原液2mL/分及び試験用水800mL/分の割合で1155L/日を試験水槽に供した。
(4) 原液タンク	25L容ガラス製びん 交換頻度 1～2回程度/週
(5) 試験温度	第1濃度区 25.0～25.4℃ 第2濃度区 25.0～25.3℃ 対照区 24.7～25.1℃
(6) 溶存酸素濃度	第1濃度区 7.9～ 8.1mg/L (Fig. 11参照) 第2濃度区 7.8～ 8.1mg/L (Fig. 12参照) 対照区 7.8～ 8.1mg/L (Fig. 13参照)
(7) pH	第1濃度区 8.0 第2濃度区 8.1 対照区 7.9～ 8.0
(8) 照光時間	白色蛍光灯による人工照明 (14時間明/10時間暗)
(9) 供試魚数	第1及び第2濃度区 28尾 (ばく露開始時) 対照区 12尾 (ばく露開始時)
(10) ばく露期間	28日間 設定理由：予備試験の結果、28日間で定常状態に達すると予想されたため。
(11) 実施場所	213アクアトロム室

3.4 原液調製法

(1) 分散剤

2.5の(1)に同じ。

(2) 調製方法

・第1濃度区

2.5の(2)と同様にして10.0g/Lの被験物質溶液を調製し、これをイオン交換水で希釈して被験物質濃度として4.00mg/Lの原液を調製した。

・第2濃度区

2.5の(2)と同様にして10.0g/Lの被験物質溶液を調製し、これをイオン交換水で希釈して被験物質濃度として0.400mg/Lの原液を調製した。

・対照区

ジメチルスルホキシドをイオン交換水に溶解し、ジメチルスルホキシド濃度として400mg/Lの原液を調製した。

3.5 試験濃度

96時間LC50予備値及び被験物質の分析感度を考慮して、

第1濃度区 10 μ g/L

第2濃度区 1 μ g/L

に被験物質濃度を設定した。同時に、空試験として対照区を設定した。

3.6 観察、測定及び清掃

- | | |
|------------|------------------------------------|
| (1) 供試魚の観察 | 供試魚の健康状態等を1日に2回目視観察した。 |
| (2) 試験水量 | メスシリンダーを用いて1日に1回測定記録した。 |
| (3) 試験温度 | アルコール温度計を用いて1日に1回測定記録した。 |
| (4) 溶存酸素濃度 | 溶存酸素計を用いて1週間に2回測定記録した。 |
| (5) pH測定 | pH計を用いて1週間に1回以上測定記録した。 |
| (6) 清掃 | 実験期間中は、コイの排泄物、水槽壁の汚れ等を1日に1回程度除去した。 |

3.7 試験水及び供試魚の分析

試験水及び供試魚中の被験物質分析は高速液体クロマトグラフィー質量分析法（LC-MS）により行った。

3.7.1 分析回数

(1) 試験水

試験水分析は第1、第2濃度区ともばく露期間中、最初の供試魚分析までに1回及び供試魚分析と同時に行った。1回当りの分析試料は1点とした。

(2) 供試魚

供試魚分析は第1、第2濃度区ともばく露期間中に5回行い、1回当りの採取尾数は4尾とし、2群(2尾1群)*2に分けて行った。

対照区は実験開始前及び終了後に行い、1回当りの採取尾数は4尾とし、2群(2尾1群)に分けて分析した。さらに、脂質測定用として2尾を追加で取り上げ、3群(2尾1群)とした。

*2 個体ごとの分析では、脂質含量測定のための保存用試料が十分得られな
いため2尾1群とした。

3.7.2 分析試料の前処理

(1) 試験水中の被験物質

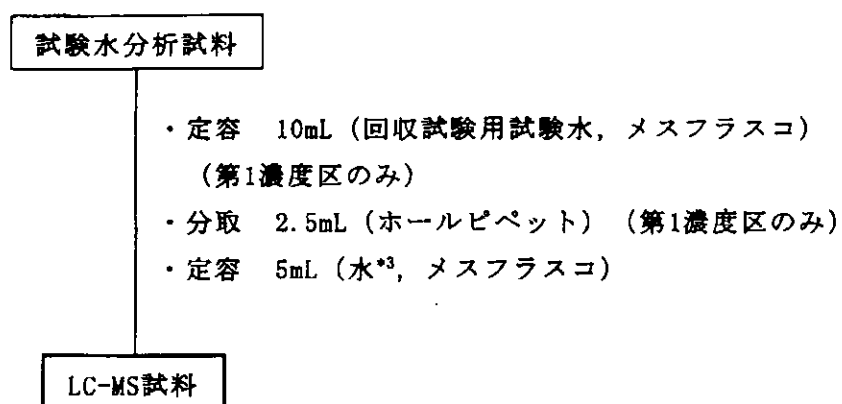
試験水槽から

第1濃度区 1mL

第2濃度区 2.5mL

を採取し、以下のフロースキームに従って前処理操作を行い、高速液体クロマトグラフィー質量分析法（LC-MS）試料とした。

フロースキーム

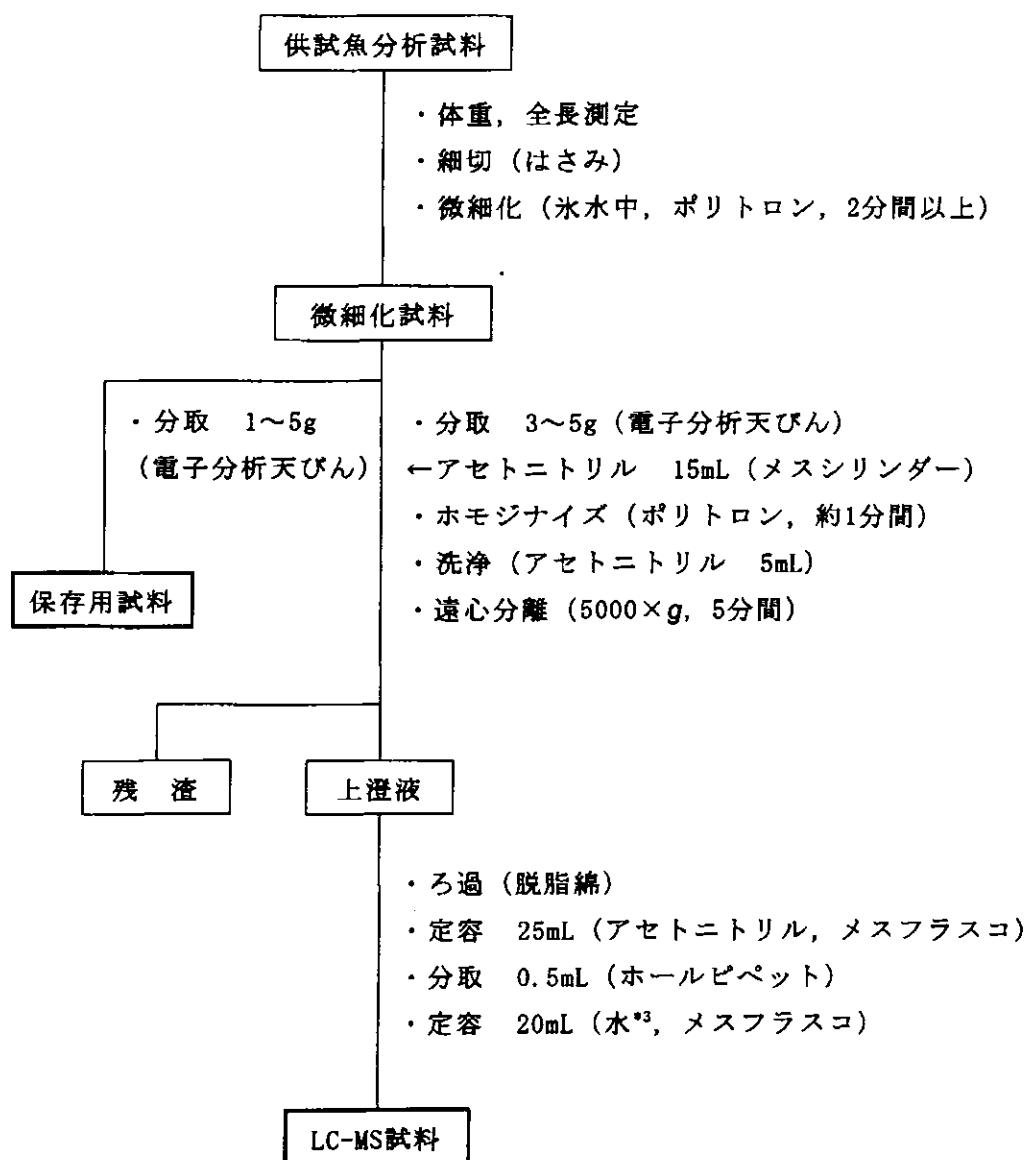


*3 水道水を超純水装置システムを用いて処理した水。

(2) 供試魚中の被験物質

試験水槽から供試魚を採取し、以下のフロースキームに従って前処理操作を行い、高速液体クロマトグラフィー質量分析法 (LC-MS) 試料とした。

フロースキーム



3.7.3 被験物質の定量分析

前処理を行って得られたLC-MS試料について、下記の定量条件に基づき高速液体クロマトグラフィー質量分析法により被験物質を分析した。なお、供試魚分析において被験物質濃度が検量線の範囲を越えた場合は、その範囲にはいるように希釈し分析した。LC-MS試料中の被験物質濃度は、標準溶液及びLC-MS試料のマスフラグメントグラム上で得られたピーク面積を比較し、比例計算して求めた (Table-4, 5, Fig.6, Table-7, 8, 9, Fig.8, 9, 10参照)。

(1) 定量条件

機	器	高速液体クロマトグラフー質量分析計
	高速液体クロマトグラフ	
		ウォーターズ社製 2690
質量分析計		ウォーターズ社製 ZMD

液体クロマトグラフ条件

カラム	Eclipse XDB-C18
	15cm×3.0mmI.D. ステンレス製
カラム温度	40℃
溶離液	メタノール／水 ^{*3} (75/25 V/V)
流量	0.5mL/min
注入量	100μL

質量分析計条件

イオン化法	エレクトロスプレー
検出イオン	負イオン
検出方法	選択イオンモニタリング
コーン電圧	40V
イオン源温度	120℃
脱溶媒システム温度	350℃
脱溶媒ガス流量	350L/hr
測定イオン	m/z 163

(2) 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行った。

被験物質100mgを正確にはかりとり、アセトニトリルに溶解して1000mg/Lの被験物質溶液を調製した。これを水^{a)}で希釈して0.500 μ g/Lの標準溶液とした。

(3) 検量線の作成

(2)の標準溶液の調製と同様にして0.250、0.500及び1.00 μ g/Lの標準溶液を調製した。これらを(1)の定量条件に従って分析し、得られたそれぞれのマスフラグメン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。

ピーク面積の定量下限は、ノイズレベルを考慮して400（被験物質濃度0.025 μ g/L）とした（Fig.4参照）。

3.7.4 回収試験及びブランク試験

(1) 方 法

試験水分析は前処理が希釈のみのため回収率100%とした。また、被験物質を加えない回収試験用試験水についてブランク試験を行った。一方、供試魚分析操作における被験物質の回収率を求めるため、細切した魚(10g)に被験物質原液を添加し、回収試験を行った。また、被験物質を加えない細切した魚について、回収試験と同じ操作によりブランク試験を行った。回収試験及びブランク試験は、2点について測定した。

(2) 結 果

(1)の方法により測定した結果、各々のブランク試験においてマスフラグメントグラム上、被験物質ピーク位置にはピークは認められなかった。供試魚分析操作における2点の回収率及び平均回収率は下記に示すとおりであり、平均回収率を分析試料中の被験物質濃度を求める場合の補正值とした(Table-6、Fig.7参照)。

供試魚分析操作における回収率(被験物質1000ng添加)

95.9%, 95.5% 平均 95.7%

3.7.5 供試魚中の脂質含量

対照区の供試魚微細化試料を用いて、クロロホルム/メタノール抽出を行い、重量分析により脂質含量の測定を行った。

3.7.6 分析試料中の被験物質濃度の算出及び定量下限

(1) 試験水分析試料中の被験物質濃度の算出

Table-4, 5の計算式に従って計算し、計算結果は有効数字3ケタに丸めて表示した。

(2) 試験水中の被験物質の定量下限濃度

3.7.3(3)の検量線作成で求めた被験物質の定量下限より、試験水中の定量下限濃度*4はそれぞれ、

第1濃度区 0.50 µg/L

第2濃度区 0.050µg/L

と算出される。

(3) 供試魚分析試料中の被験物質濃度の算出

Table-7, 8, 9及びの計算式に従って計算し、計算結果は有効数字3ケタに丸めて表示した。

(4) 供試魚中の被験物質の定量下限濃度

3.7.3(3)の検量線作成で求めた被験物質の定量下限より、供試魚中の定量下限濃度*4は供試魚微細化試料を5gとしたとき5.2ng/gと算出される。

$$*4 \text{ 被験物質定量下限濃度 (}\mu\text{g/L又はng/g)} = \frac{A}{\frac{B}{100} \times \frac{C \times E}{D}}$$

A：検量線上定量下限濃度 (µg/L)

B：回収率 (%)

C：試験水採取量 (mL) 又は供試魚微細化試料 (g)

D：最終液量 (mL)

E：分取比

計算結果は有効数字2ケタに丸めた。

3.7.7 ばく露期間における試験水の全平均被験物質濃度の算出法

$$\overline{C_{wt}} = \{C_w(1) + \cdots + C_w(n)\} / n$$

$\overline{C_{wt}}$: 試験水の全平均被験物質濃度 (μg/L)

n : 試験水分析の数 (測定回数)

$C_w(1)$: 1回目の試験水中被験物質濃度 (μg/L)

$C_w(n)$: n 回目の試験水中被験物質濃度 (μg/L)

3.7.8 濃縮倍率 (BCF) の算出法

濃縮倍率 (BCF) は、以下の式に従って算出した。

(1) 濃縮倍率算出のための試験水中平均被験物質濃度の算出

$$\overline{C_w} = \{C_w(n-1) + C_w(n)\} / 2 \quad (\text{供試魚分析1回目})$$

$$\overline{C_w} = \{C_w(n-2) + C_w(n-1) + C_w(n)\} / 3 \quad (\text{供試魚分析2回目以降})$$

$\overline{C_w}$: 濃縮倍率算出のための試験水中平均被験物質濃度 (μg/L)

$C_w(n)$: 供試魚分析と同時に求めた試験水分析 n 回目の被験物質濃度 (μg/L)

(2) 濃縮倍率の算出

$$BCF = \frac{C_f}{\overline{C_w}}$$

BCF : 濃縮倍率

C_f : 供試魚中被験物質濃度 (ng/g)

$\overline{C_w}$: 濃縮倍率算出のための試験水中平均被験物質濃度 (μg/L)

(4) m 回目の濃縮倍率の平均値

$$BCF_m = (BCF_a + BCF_b) / n$$

$BCF_{m, Lm}$: m 回目の濃縮倍率の平均値 (個体数又は群数2(a, b))

$BCF_{a, b}$: m 回目におけるそれぞれの濃縮倍率

$BCF_{La, b}$: m 回目におけるそれぞれの濃縮倍率 (脂質含量を測定した場合)

n : m 回目に分析した個体数又は群数

3.7.9 定常状態に達したことの確認方法

定常状態に達したことの判断は、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%以内とする。

定常状態に達したことの判定基準： $V(m-2)$, $V(m-1)$, $V(m) \leq 20$ (%)

$$V(m-2) = \frac{|BCF(m-2) - \overline{BCF}|}{\overline{BCF}} \times 100$$

$$V(m-1) = \frac{|BCF(m-1) - \overline{BCF}|}{\overline{BCF}} \times 100$$

$$V(m) = \frac{|BCF(m) - \overline{BCF}|}{\overline{BCF}} \times 100$$

$V(m-2)$, $V(m-1)$, $V(m)$: 濃縮倍率の平均値からの乖離率(%)

$BCF(m-2)$, $BCF(m-1)$, $BCF(m)$: $m-2$, $m-1$, m 回目における個体数又は群数 n の濃縮倍率の平均値

\overline{BCF} : $\{BCF(m-2) + BCF(m-1) + BCF(m)\} / 3$

3.7.10 定常状態における濃縮倍率 (BCF_{ss}) の算出法

定常状態における濃縮倍率 (BCF_{ss}) は、次の式により算出した。

(1) 定常状態における濃縮倍率算出のための試験水中平均被験物質濃度の算出

$$\overline{Cws} = \{Cw(n-2) + Cw(n-1) + Cw(n)\} / 3$$

\overline{Cws} : 定常状態における濃縮倍率算出のための試験水中平均被験物質濃度 (原則として最後の供試魚分析までの3回の連続した試験水中の平均被験物質濃度) (μg/L)

$Cw(n)$: 供試魚分析と同時に求めた試験水分析n回目の被験物質濃度 (μg/L)

(2) 定常状態における供試魚中の平均被験物質濃度の算出

$$\overline{Cfs} = \{Cf(m-2) + Cf(m-1) + Cf(m)\} / 3$$

\overline{Cfs} : 定常状態における供試魚中の平均被験物質濃度 (ng/g)

$Cf(m)$: m回目の供試魚中平均被験物質濃度 (FBを差し引いた値) (ng/g)

FB : 対照区における実験開始前及び終了後の供試魚中の被験物質又は被験物質の見掛け (ブランク) 濃度の平均値 (ng/g)

(3) 定常状態における濃縮倍率の算出

$$BCF_{ss} = \overline{Cfs} / \overline{Cws}$$

\overline{Cfs} : 定常状態における供試魚中の平均被験物質濃度 (ng/g)

\overline{Cws} : 定常状態における濃縮倍率算出のための試験水中平均被験物質濃度 (μg/L)

BCF_{ss} : 定常状態における濃縮倍率

3.7.11 算出可能な濃縮倍率

3.7.6(4)で求めた供試魚中の被験物質定量下限濃度より、下記の倍率を越えて濃縮されたとき濃縮倍率の算出が可能となる。ただし、試験水中の被験物質濃度はすべての試験水分析における平均被験物質濃度を用いた。

第1濃度区	0.54倍
第2濃度区	5.5 倍

3.7.12 脂質含量の算出法

脂質含量は次式により求めた。

$$\text{脂質含量 (\%)} = \frac{T - T_0}{S} \times 100$$

T_0 : 容器のひょう量値(g)

T : 重量分析用試料(容器を含む)のひょう量値(g)

S : 供試魚微細化試料の分取量(g)

3.8 数値の取扱い

数値の丸め方は、JIS Z 8401:1999 規則Bの方法に従った。また、計算処理に用いた数値は途中で丸めずに使用した。

試験水中の被験物質濃度及び供試魚中の被験物質濃度は有効数字3ケタに丸め、濃縮倍率は有効数字2ケタに丸めて表示した。

4. 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

当該要因はなかった。

5. 試験結果

5.1 試験水中の被験物質濃度

試験水中の被験物質濃度はTable-1に示されるように、設定値の93%以上が保持された。また、被験物質濃度の変動は測定値の平均に対して±20%以内に保たれた。

Table-1 試験水中の被験物質濃度

(単位 $\mu\text{g/L}$)

濃度区	1日後	3日後	10日後	16日後	22日後	28日後	平均 (標準偏差)	Table	Fig.
1	9.75	9.47	9.82	9.74	9.68	9.35	9.64 (0.183)	4	6
2	0.971	0.938	0.957	0.956	0.946	0.964	0.955 (0.0116)	5	

5.2 濃縮倍率

濃縮倍率をTable-2に示した。

Table-2の濃縮倍率とばく露期間との相関をFig. 1及びFig. 2に示した。ばく露期間中の濃縮倍率は第1濃度区において69～120倍、第2濃度区において53～85倍であった。

Table-2 濃縮倍率

() 内は平均値

濃度区	3日後	10日後	16日後	22日後	28日後	Table	Fig.
1	75 69 (72)	84 99 (92)	87 82 (84)	120 100 (110)	100 95 (99)	7	8
2	75 85 (80)	58 74 (66)	63 53 (58)	69 67 (68)	65 58 (61)	8	9

5.3 定常状態における濃縮倍率

5.2の結果から、16、22及び28日後における濃縮倍率（平均）はその3回の分析における濃縮倍率の平均値に対して変動が20%以内であったため、定常状態に達していると判断した。それらの結果を用いて、定常状態における濃縮倍率を算出した。

(1) 定常状態における試験水中の被験物質濃度

定常状態における試験水中の平均被験物質濃度はTable-3に示されるように、第1濃度区において設定値の96%、第2濃度区において96%であった。

Table-3 定常状態における試験水中の被験物質濃度

(単位 mg/L)

濃度区	16日後	22日後	28日後	平均	Table	Fig.
1	9.74	9.68	9.35	9.59	4, 7	6
2	0.956	0.946	0.964	0.955	5, 8	

(2) 定常状態における濃縮倍率

定常状態における濃縮倍率は以下のとおりであった。

第1濃度区 99倍

第2濃度区 62倍

5.4 供試魚の脂質含量

供試魚中の平均脂質含量は以下のとおりであった。

実験開始前 2.28%

実験終了後 2.99%

5.5 供試魚の外観観察等

異常は認められなかった。

6. 考 察

脂質含量について

実験終了後の脂質含量が実験開始前に対して130%程度あった。しかし、本試験において、第1濃度区、第2濃度区ともに濃縮倍率は定常状態に達しており、脂質の増加に伴う影響は確認できなかった。これらのことを考慮した場合においても、本試験における濃縮倍率は定常状態に達したと考えられる。

7. 備 考

試験に使用した主要な装置・機器、試薬等

(1) 試験系（飼育施設）に係わる装置

原液供給用微量定量ポンプ	:	東京理化学器械製	型 GMW
溶存酸素測定装置	:	飯島電子工業製	型 F-102
pH計	:	東亜電波工業製	型 HM-14P

(2) 分析及び原液調製に使用した装置・機器及び試薬

装置・機器

高速液体クロマトグラフ質量分析計

: 15頁参照

天びん	:	ザルトリウス社製	型 BP301S
		メトラー社製	型 AE163
		エー・アンド・ディ社製	型 FA-2000

ホモジナイザー（ポリトロン）	:	キネマチカ社製	型 PT3100
遠心分離機	:	日立工機製	型 CR21G

試薬

アセトニトリル	:	和光純薬工業製	HPLC用
メタノール	:	和光純薬工業製	HPLC用

(3) 脂質含量測定に使用した装置・機器及び試薬

装置・機器

天びん	: ザルトリウス社製	型 BP301S
	メトラー社製	型 AE163
ロータリーエバポレーター	: 東京理化工機製	型 N-1
ホモジナイザー (オートセルマスター)		
	: 井内盛栄堂製	型 CM-200
真空ポンプ	: 真空機工製	型 DA-20D
	真空機工製	型 DAH-20C
真空デシケータ	: 井内盛栄堂製	型 VL

試薬

精製水	: 高杉製薬製	日本薬局方
メタノール	: 和光純薬工業製	試薬一級
クロロホルム	: 和光純薬工業製	試薬特級
硫酸ナトリウム (無水)	: 片山化学工業製	試薬一級

(4) 被験物質の構造確認に使用した装置・機器

フーリエ変換赤外分光光度計	: 島津製作所製	型 FTIR-8200PC
ガスクロマトグラフィー質量分析計		
	: 日本電子製	型 JMS-700QQ
フーリエ変換核磁気共鳴装置	: 日本電子製	型 JNM-MT60FT