

最 終 報 告 書

2,6-ジ-*tert*-ブチル-4-*sec*-ブチルフェノール (被験物質番号 K-1760) の
コイにおける濃縮度試験

(試験番号 : 505164)

2008 年 3 月 31 日

財団法人化学物質評価研究機構

久留米事業所

本文書は正本を正確に電子化したものです。

財団法人化学物質評価研究機構 久留米事業所

2008 年 3 月 31 日

試験責任者

最 終 報 告 書

2,6-ジ-*tert*-ブチル-4-*sec*-ブチルフェノール（被験物質番号 K-1760）の
コイにおける濃縮度試験

（試験番号：505164）

2008 年 3 月 31 日

財団法人化学物質評価研究機構
水質汚濁研究所

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 経済産業省

試験の表題 2,6-ジ-*tert*-ブチル-4-*sec*-ブチルフェノール (被験物質番号 K-1760) の
コイにおける濃縮度試験

試験番号 505164

上記試験は以下のGLPに従って実施したものです。

- (1) 「新規化学物質等に係る試験を実施する試験施設に関する基準について」 (平成15年
11月21日、薬食発第1121003号、平成15・11・17製局第3号、環保企発第031121004号)
に規定する「新規化学物質等に係る試験を実施する試験施設に関する基準」
- (2) 「OECD Principles of Good Laboratory Practice」 (November 26, 1997)

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。

2008 年 3 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 経済産業省

試験の表題 2,6-ジ-*tert*-ブチル-4-*sec*-ブチルフェノール (被験物質番号 K-1760) の
コイにおける濃縮度試験

試験番号 505164

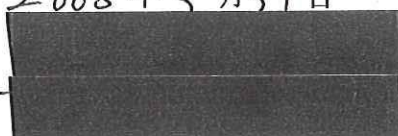
本最終報告書は、試験の方法、手順が正確に記載され、試験結果は生データを正確に反映していることを保証します。

なお、監査又は査察の結果については、下記の通り試験責任者及び運営管理者に報告しました。

監査又は査察内容	監査又は査察日	報告日 (試験責任者及び運営管理者)
試験計画書草案	2007 年 12 月 21 日	2007 年 12 月 21 日
試験計画書	2007 年 12 月 21 日	2007 年 12 月 21 日
試験計画書の変更	2007 年 12 月 28 日	2007 年 12 月 28 日
	2008 年 1 月 10 日	2008 年 1 月 10 日
	2008 年 1 月 15 日	2008 年 1 月 15 日
	2008 年 3 月 5 日	2008 年 3 月 5 日
	2008 年 3 月 14 日	2008 年 3 月 17 日
急性毒性試験	2007 年 12 月 25 日	2007 年 12 月 25 日
原液調製操作時	2008 年 1 月 18 日	2008 年 1 月 18 日
試験水分析操作時	2008 年 1 月 9 日	2008 年 1 月 9 日
供試魚分析操作時	2008 年 1 月 17 日	2008 年 1 月 17 日
部位別試験	2008 年 3 月 5 日	2008 年 3 月 5 日
排泄試験	2008 年 3 月 13 日	2008 年 3 月 13 日
生データ、最終報告書草案	2008 年 3 月 31 日	2008 年 3 月 31 日
最終報告書	2008 年 3 月 31 日	2008 年 3 月 31 日

2008 年 3 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 GLP	1
試験日程	2
試資料の保管	2
試験関係者	2
最終報告書の承認	2
要 約	3
1. 被 験 物 質	5
2. 急性毒性試験の実施	7
3. 濃縮度試験の実施	10
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	25
5. 試験結果	26
6. 考 察	30
7. 備 考	30

Tables

Table-1	試験水中の被験物質濃度 [本文中記載]
Table-2	濃縮倍率 [本文中記載]
Table-3	濃縮倍率の変動 [本文中記載]
Table-4	定常状態における試験水中の被験物質濃度 [本文中記載]
Table-5	排泄試験における残留率 [本文中記載]
Table-6	各部位における被験物質濃度及び濃縮倍率 [本文中記載]
Table-7	Calculation table for recovery and blank test (analysis of test water)
Table-8	Calculation table for analysis of test water (Level 1)
Table-9	Calculation table for analysis of test water (Level 2)
Table-10	Calculation table for recovery and blank test (analysis of test fish)
Table-11	Calculation table for analysis of test fish (Level 1)
Table-12	Calculation table for analysis of test fish (Level 2)
Table-13	Calculation table for analysis of test fish (Control)
Table-14	Calculation table for analysis of test fish in depuration test (Level 1)
Table-15	Calculation table for analysis of test fish in depuration test (Level 2)
Table-16	Calculation table for analysis in each part of test fish (Level 1)
Table-17	Calculation table for analysis in each part of test fish (Level 2)
Reference 1	Analytical results of dilution water

Figures

- Fig.1 Correlation between exposure period and bioconcentration factor (Level 1)
- Fig.2 Correlation between exposure period and bioconcentration factor (Level 2)
- Fig.3 Concentration-mortality curve
- Fig.4-1 Chromatograms of LC-MS/MS analysis for calibration curve (test water)
- Fig.4-2 Calibration curve of test item (analysis of test water)
- Fig.5 Chromatograms of LC-MS/MS analysis for recovery and blank test (analysis of test water)
- Fig.6 Chromatograms of LC-MS/MS analysis for test water
- Fig.7-1 Chromatograms of LC-MS/MS analysis for calibration curve (test fish)
- Fig.7-2 Calibration curve of test item (analysis of test fish)
- Fig.8 Chromatograms of LC-MS/MS analysis for recovery and blank test (analysis of test fish)
- Fig.9 Chromatograms of LC-MS/MS analysis for test fish (Level 1)
- Fig.10 Chromatograms of LC-MS/MS analysis for test fish (Level 2)
- Fig.11 Chromatograms of LC-MS/MS analysis for test fish (Control)
- Fig.12 Chromatograms of LC-MS/MS analysis for test fish in depuration test (Level 1)
- Fig.13 Chromatograms of LC-MS/MS analysis for test fish in depuration test (Level 2)
- Fig.14 Depuration curve (Level 1)
- Fig.15 Depuration curve (Level 2)
- Fig.16 Chromatograms of LC-MS/MS analysis in each part of test fish (Level 1)
- Fig.17 Chromatograms of LC-MS/MS analysis in each part of test fish (Level 2)
- Fig.18-1 IR spectrum of test item measured before experimental start
- Fig.18-2 IR spectrum of test item measured after experimental completion
- Fig.19 Mass spectrum of test item
- Fig.20 Mass/Mass spectrum of test item
- Fig.21 NMR spectrum of test item

表 題	2,6-ジ- <i>tert</i> -ブチル-4- <i>sec</i> -ブチルフェノール(被験物質番号 K-1760) のコイにおける濃縮度試験
試験委託者	経済産業省 (〒100-8901) 東京都千代田区霞が関一丁目3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 (〒839-0801) 福岡県久留米市宮ノ陣三丁目2番7号
試験目的	K-1760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	本試験は以下の試験法に従って行った。 (1)「新規化学物質等に係る試験の方法について」(平成15年11月21日、薬食発第1121002号、平成15・11・13製局第2号、環境企発第031121002号)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〉 (2)「OECD Guidelines for Testing of Chemicals」に定める "Bioconcentration : Flow-through Fish Test (Guideline 305, June 14, 1996)"
適用 GLP	本試験は以下の基準を適用した。 (1)「新規化学物質等に係る試験を実施する試験施設に関する基準について」(平成15年11月21日、薬食発第1121003号、平成15・11・17製局第3号、環境企発第031121004号)に規定する「新規化学物質等に係る試験を実施する試験施設に関する基準」 (2)「OECD Principles of Good Laboratory Practice」(November 26, 1997)

試験日程

試験開始日	2007年12月21日
実験開始日	2008年1月4日
実験終了日	2008年3月25日
試験終了日	2008年3月31日

試験資料の保管

(1) 被験物質


同一ロットの供試試料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、試験委託書、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 試験第二課

 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

2008年3月31日

試験責任者

要 約

試験の表題

2,6-ジ-*tert*-ブチル-4-*sec*-ブチルフェノール (被験物質番号 K-1760) のコイにおける
濃縮度試験

試験条件

急性毒性試験

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

濃縮度試験

供 試 魚	コイ
試験濃度	第1濃度区 10 µg/L 第2濃度区 1 µg/L
ばく露期間	60日間
排泄期間	20日間
ばく露方法	連続流水式
分析方法	液体クロマトグラフィー—タンデム質量分析法

試験結果

96時間LC₅₀値 3.64mg/L

定常状態における濃縮倍率

第1濃度区 32000倍

第2濃度区 33000倍

排泄半減期 第1濃度区 17日

第2濃度区 15日

各部位における濃縮倍率

濃度区	部 位	濃縮倍率
1	外 皮	28000 21000
	頭 部	40000 38000
	内 臓	84000 89000
	可食部	19000 18000
2	外 皮	31000 30000
	頭 部	46000 45000
	内 臓	110000 100000
	可食部	21000 16000

1. 被験物質

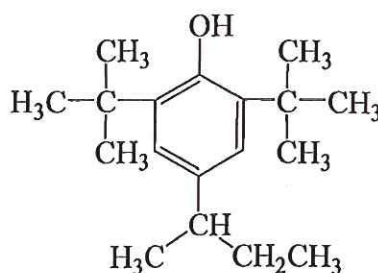
本報告書においてK-1760は、次の名称等を有するものとする。

1.1 名 称

2,6-ジ-*tert*-ブチル-4-*sec*-ブチルフェノール

1.2 構造式等

構 造 式



分 子 式 $C_{18}H_{30}O$

分 子 量 262.43

CAS 番 号 17540-75-9

1.3 供給者、商品名及びロット番号^{*1}

供 給 者

[REDACTED]

商 品 名

4-*sec*-Butyl-2,6-di-*tert*-butylphenol, 96%

ロット番号

[REDACTED]

1.4 純 度^{*1}

被 験 物 質 96.4% (GAS LIQUID CHROMATOGRAPHY)

不 純 物 残り3.6%は不明

被験物質は純度100%として取り扱った。

*1 供給者添付資料による。

1.5 被験物質の確認

被験物質の赤外吸収スペクトルを測定し、独立行政法人産業技術総合研究所の有機化合物スペクトルデータベースに記載のスペクトルと一致することを確認した (Fig.18参照)。また、質量スペクトル (Fig.19, 20参照) 及び核磁気共鳴スペクトル (Fig.21参照) 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確認

保管条件	冷暗所保存
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.18参照)。

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. 急性毒性試験の実施

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 Oryzias latipes

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

財団法人化学物質評価研究機構 久留米事業所

（住所 〒839-0801 福岡県久留米市宮ノ陣三丁目2番7号）

供試魚のふ化日 2007年 3月30日

じゅん化開始日 2007年 8月 8日

(3) じゅん化条件

期 間 等	供試魚を目視観察して異常のあるものを除去し、じゅん化水槽へ搬入し薬浴を実施した。その後、水温 $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ の流水状態で40日間じゅん化した。選別後、同温度の流水状態で更に57日間じゅん化した。その間異常のあるものは除去した。再度選別して薬浴を実施した後、同温度の流水状態で39日間じゅん化した。
薬 浴	じゅん化水槽へ搬入して、水産用OTC（塩酸オキシテトラサイクリン）50mg/Lと塩化ナトリウム6g/Lの薬浴を24時間実施した。再度選別して、塩化ナトリウム6g/Lの薬浴を24時間実施した。

(4) 体 重

平均 0.31g

(5) 全 長

平均 3.3cm

(6) 感受性試験

同一ロット（TFO-070808- I）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0.563mg/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

試験用水の水質については2008年1月7日に採水し、測定を行った結果をReference 1に示す。試験用水は以下に示す基準のいずれかに適合していることを確認した。

- ① 「水道法に基づく水質基準」 (平成15年5月30日改正 厚生労働省令第101号)
- ② 「OECD Guidelines for Testing of Chemicals」 "Fish, Early-life Stage Toxicity Test (Guideline 210, July 17, 1992)"
- ③ 「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)
- ④ 「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)
- ⑤ 「OECD Guidelines for Testing of Chemicals」 "Bioconcentration : Flow-through Fish Test (Guideline 305, June 14, 1996)"

2.4 原液調製法

(1) 分散剤

HCO-40

N,N-ジメチルホルムアミド

(2) 調製方法

供試試料とその5倍量のHCO-40を*N,N*-ジメチルホルムアミドに溶解して被験物質濃度として10.0g/Lの原液を調製した。

2.5 試験条件

(1) 試験濃度

8.00mg/L、3.64mg/L、1.65mg/L、0.751mg/L、0.343mg/L及び対照区

(2) 試験水槽

ガラス製ガロンびん (密閉系)

(3) 試験液量

3.85L×2/濃度区

(4) 供試魚数

10尾/濃度区（5尾/水槽で2水槽使用した。）

(5) 試験温度

ばく露開始時 24.0～24.3℃

換水前 24.9℃

(6) 溶存酸素濃度

ばく露開始時 8.1mg/L

換水前 5.3～6.0mg/L

(7) pH

ばく露開始時 8.1

換水前 7.8～7.9

(8) ばく露期間

96時間

(9) ばく露方法

半止水式（8～16時間毎に換水）

2.6 試験の実施

実施場所 アクアトロン室B

試験実施日 2007年12月24日 ～ 2008年12月28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 3.64mg/L (Fig.3参照)

3. 濃縮度試験の実施

定常状態における濃縮倍率が1000倍を超えたため、部位別試験及び排泄試験を行った。

3.1 供 試 魚

(1) 魚 種

コイ Cyprinus carpio

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

財団法人化学物質評価研究機構 久留米事業所

(住所 〒839-0801 福岡県久留米市宮ノ陣三丁目2番7号)

供試魚のふ化日 2007年 2月26日

じゅん化開始日 2007年10月23日

(3) じゅん化条件

期 間 等 受入槽及び蓄養槽で試験魚サイズまで養成後、じゅん化水槽へ搬入して薬浴した。その後、水温 $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 未満の流水状態で27日間じゅん化した。その間異常のあるものは除去した。再度選別して試験水槽へ移し、薬浴した。その後、同温度の流水状態で44日間じゅん化した。

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の薬浴を24時間実施した。試験水槽では水産用OTC 50mg/Lと塩化ナトリウム7g/Lの薬浴を24時間実施した。

(4) 全 長

7.2～13.0cm

(5) ロ ッ ト

TFC-071023

(6) 年 齢

当才魚

(7) 餌 料	
種 類	コイ稚魚育成用配合飼料
組 成	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（休日は1回にまとめた。） 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

ばく露期間

第1及び第2濃度区 70L容ガラス製揮発性物質用試験水槽

対照区 70L容ガラス製水槽

排泄期間

70L容ガラス製水槽

(3) 試験水量

ばく露期間 原液0.04mL/分及び試験用水2000mL/分の割合で2880L/日を
試験水槽に供した。

排泄期間 試験用水2000mL/分で2880L/日を試験水槽に供した。

(4) 原液タンク

1L容ガラス製褐色びん

交換頻度 2～3回/月

(5) 試験温度

第1濃度区 24.5～25.0℃

第2濃度区 24.5～25.0℃

対 照 区 24.1～24.5℃

(6) 溶存酸素濃度

第1濃度区	5.8～7.5mg/L
第2濃度区	5.7～7.1mg/L
対 照 区	7.0～8.2mg/L

(7) pH

第1濃度区	7.5～7.8
第2濃度区	7.5～7.8
対 照 区	7.7～7.9

(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	54尾（実験開始時）
対 照 区	14尾（実験開始時）

(10) ばく露期間

60日間

理由： 60日間で定常状態に達したため。

(11) 排 泄 期 間

20日間

理由： 排泄半減期が得られたため。

(12) 実 施 場 所

アクアトロニ室A

3.4 原液調製法

(1) 分 散 剤

2.4の(1)に同じ。

(2) 調製方法

第1濃度区

2.4の(2)と同様にして被験物質濃度として500mg/Lの原液を調製した。

第2濃度区

第1濃度区の原液を*N,N*-ジメチルホルムアミドで希釈して被験物質濃度として50.0mg/Lの原液を調製した。

対照区

HCO-40を*N,N*-ジメチルホルムアミドに溶解してHCO-40濃度として2500mg/Lの原液を調製した。

3.5 試験濃度

各濃度区は以下の被験物質濃度とした。同時に、対照区を設定した。

第1濃度区 10 µg/L

第2濃度区 1 µg/L

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（休日は1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週1回測定記録した。

(4) 溶存酸素濃度

溶存酸素計を用いて週1回測定記録した。

(5) pH測定

pH計を用いて実験期間中に6回測定記録した。

(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液体クロマトグラフィー・タンデム質量分析法（LC-MS/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。

排泄試験の供試魚分析は4回行い、1回当りの採取尾数は4尾とし、2群（2尾1群）に分けて行った。

部位別試験の供試魚分析は1回行い、採取尾数は2尾とし、1尾ずつ分析した。

対照区は実験開始前及び実験終了後に行い、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、脂質含量測定用として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 分析試料の前処理法

(1) 試験水中の被験物質

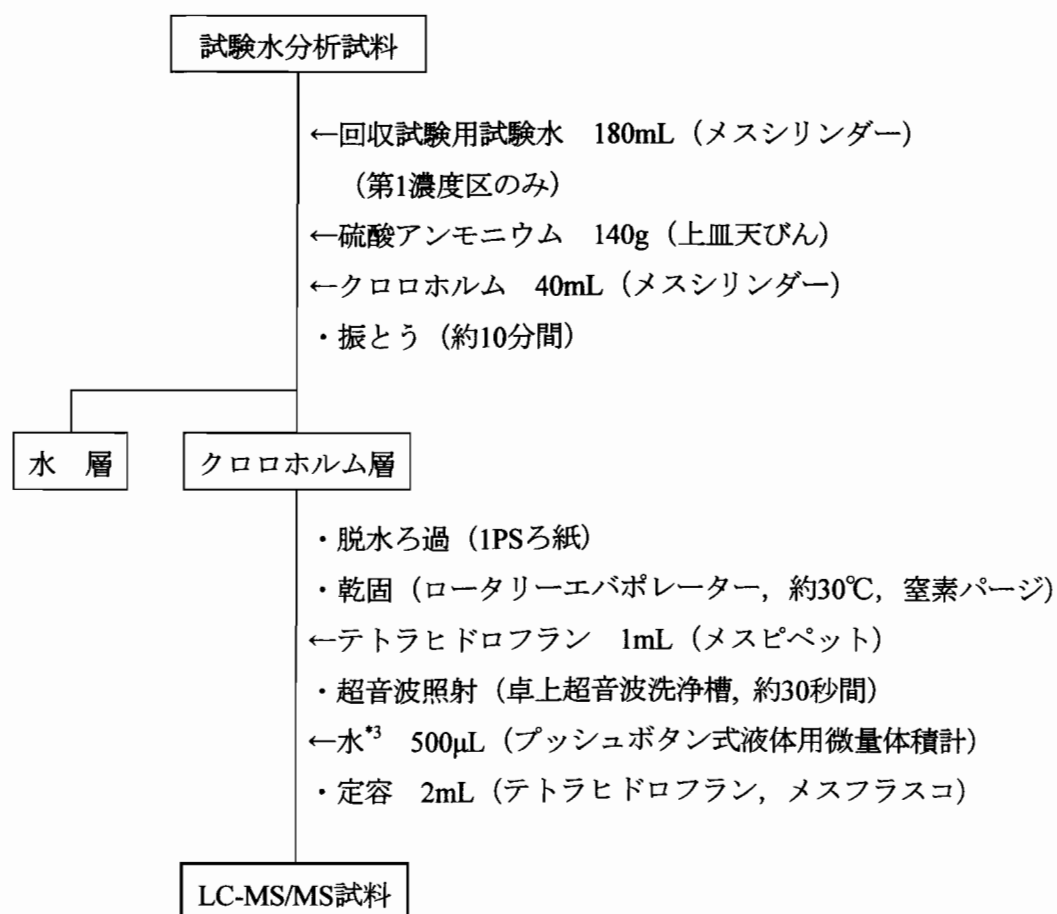
試験水槽から

第1濃度区 20mL

第2濃度区 200mL

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、液体クロマトグラフィー・タンデム質量分析法（LC-MS/MS）試料とした。

フロースキーム

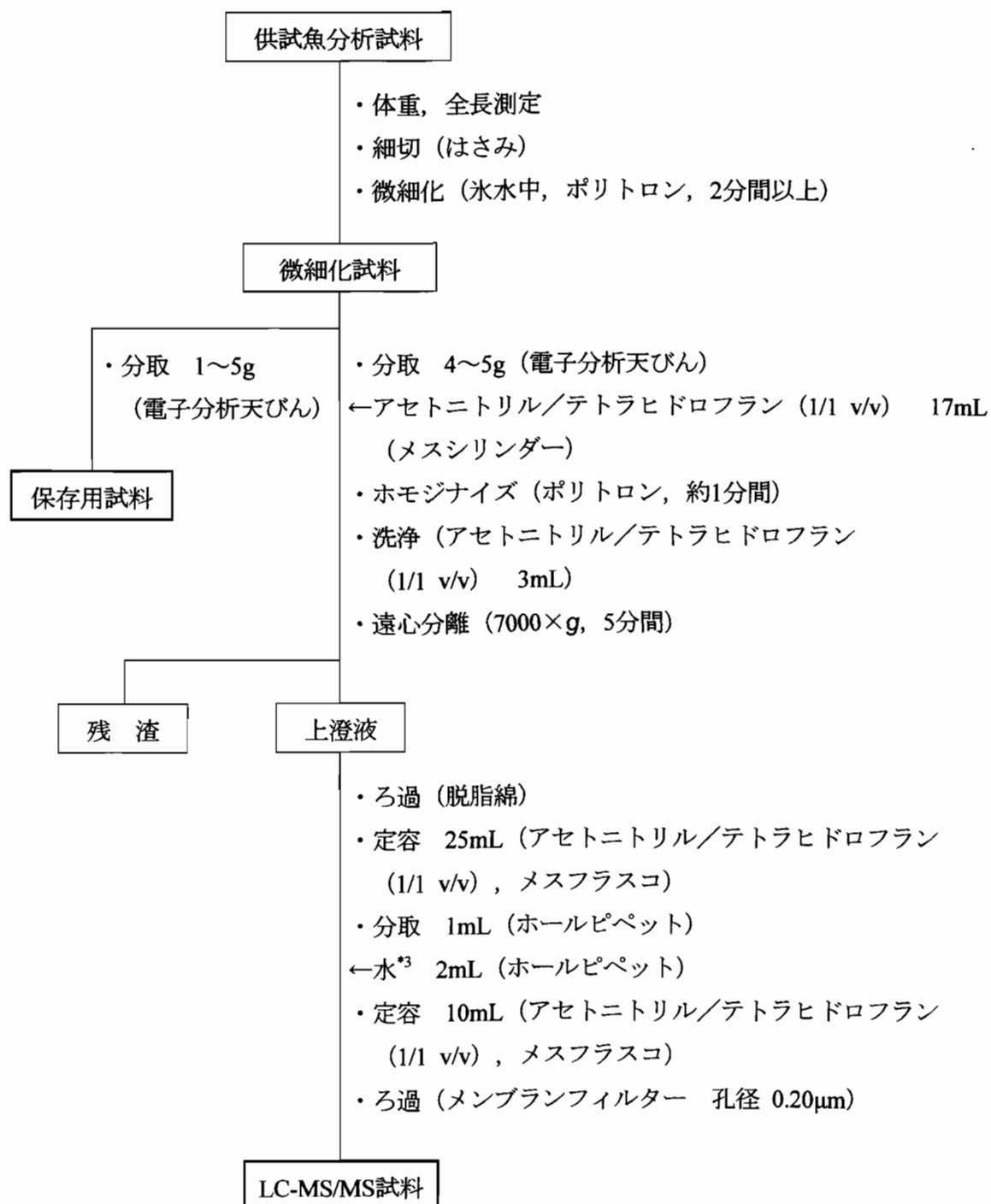


*3 水道水を超純水製造システムで処理した水。

(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、液体クロマトグラフィー—タンデム質量分析法（LC-MS/MS）試料とした。ただし、部位別試験においては供試魚前処理フロースキーム中の微細化、保存用試料の分取、分析試料の分取は行わなかった。

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/MS試料について、下記の定量条件に基づき液体クロマトグラフィー・タンデム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超えた場合は、その範囲にはいるように供試魚分析と同様に前処理した供試魚ブランク試料を用いて希釈し分析した。LC-MS/MS試料中の被験物質濃度は、標準溶液及びLC-MS/MS試料のクロマ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-8, 9、Fig.6、Table-11, 12, 13, 14, 15, 16, 17、Fig.9, 10, 11, 12, 13, 16, 17参照)。

(1) 定量条件

機 器	液体クロマトグラフィー質量分析計
液体クロマトグラフ	Agilent製 Agilent 1100
質量分析計	Micromass製 Quattro Ultima

液体クロマトグラフ条件

カラム	L-column ODS (15cm×2.1mmI.D., 化学物質評価研究機構製)
カラム温度	40℃
溶離液	A(15%) : 水 ³ /0.5mol/L酢酸ジ- <i>n</i> -ブチルアンモニウム溶液 (100/1 v/v) B(85%) : テトラヒドロフラン/メタノール/ 0.5mol/L酢酸ジ- <i>n</i> -ブチルアンモニウム溶液 (80/20/1 v/v/v)
流量	0.2mL/min
注入量	20μL

質量分析計条件

イオン化法	エレクトロスプレーイオン化法 (ESI)
検出イオン	負イオン
検出法	選択反応モニタリング (SRM)
プリカーサーイオン	m/z 261.1 [(M-H)] (Fig.19参照)
プロダクトイオン	m/z 231.1 [(M-C ₂ H ₆ -H)] (Fig.20参照)
イオン源温度	135℃
脱溶媒システム温度	450℃
コーン電圧	10V
コリジョンエネルギー	35eV

(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。

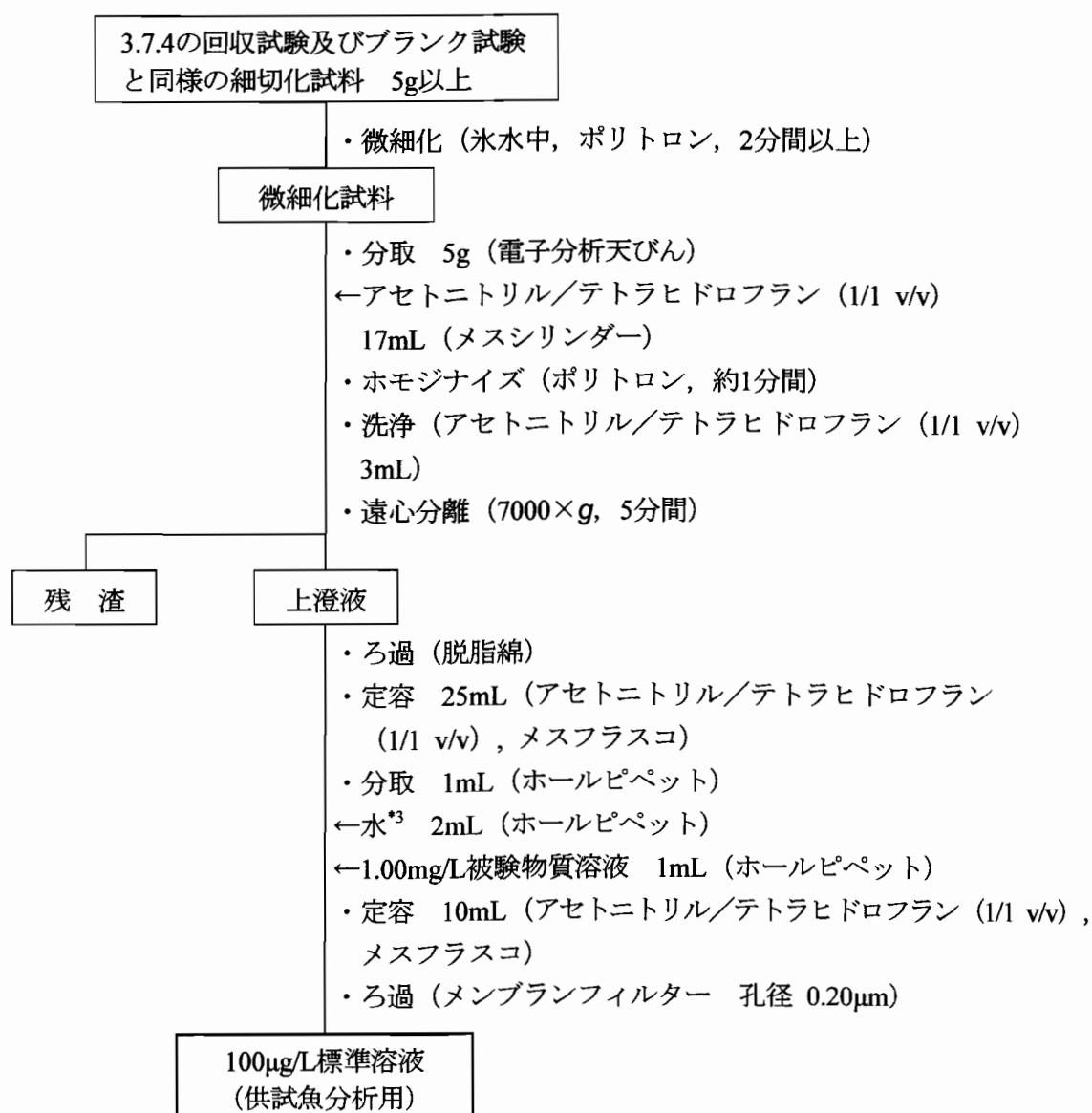
(a) 試験水分析

供試試料100mgを正確にはかりとり、テトラヒドロフランに溶解して1000mg/Lの被験物質溶液を調製した。これをテトラヒドロフラン/水^{*3} (75/25 v/v) で希釈して100 μ g/Lの標準溶液とした。

(b) 供試魚分析

供試試料100mgを正確にはかりとり、テトラヒドロフランに溶解して1000mg/Lの被験物質溶液を調製した。これをアセトニトリル/テトラヒドロフラン (1/1 v/v) で希釈して1.00mg/Lの被験物質溶液を調製した。これを用いて下記のフロースキームに従って前処理操作を行い、100 μ g/Lの標準溶液とした。

フロースキーム



(3) 検量線の作成

(a) 試験水分析

(2)(a)の標準溶液の調製と同様にして50.0、100及び200 $\mu\text{g/L}$ 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。

ピーク面積の定量下限は、ノイズレベルを考慮して200（被験物質濃度6.1 $\mu\text{g/L}$ ）とした（Fig.4参照）。

(b) 供試魚分析

(2)(b)の標準溶液の調製と同様にして50.0、100及び200 $\mu\text{g/L}$ 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。

ピーク面積の定量下限は、ノイズレベルを考慮して150（被験物質濃度8.8 $\mu\text{g/L}$ ）とした（Fig.7参照）。

3.7.4 回収試験及びブランク試験

(1) 方 法

3.7.2の試験水及び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、回収試験用試験水及び細切した魚(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回収試験用試験水及び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。供試魚分析の回収試験及びブランク試験における微細化試料の分取量は5gとした。回収試験及びブランク試験は、各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、ブランク試験においてクロマトグラム上、被験物質ピーク位置にはピークは認められなかった。分析操作における各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-7, 10、Fig.5, 8参照)。

分析操作における回収率

試験水分析 (被験物質200ng添加)

83.4%,	83.5%	平均	83.5%
--------	-------	----	-------

供試魚分析 (被験物質50000ng添加)

82.2%,	82.5%	平均	82.4%
--------	-------	----	-------

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-8, 9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定量下限濃度

3.7.3(3)(a)の検量線の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 0.73 µg/L

第2濃度区 0.073 µg/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-11, 12, 13, 14, 15, 16, 17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定量下限濃度

3.7.3(3)(b)の検量線の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530ng/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

$$\overline{Cw} = \{Cw(1) + \cdots + Cw(n)\} / n$$

- \overline{Cw} : 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)
 $Cw(1)$: 1回目の試験水中被験物質濃度 (μg/L)
 $Cw(n)$: 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

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

- \overline{Cw} : 濃縮倍率算出のための試験水中平均被験物質濃度 (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) 濃縮倍率の算出

$$BCF = \frac{Cf}{\overline{Cw}}$$

- BCF : 濃縮倍率
 Cf : 供試魚中被験物質濃度 (FBを差し引いた値) (ng/g)
 \overline{Cw} : 濃縮倍率算出のための試験水中平均被験物質濃度 (μg/L)
 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 (ブランク) 濃度の平均値 (ng/g)

(3) m回目の濃縮倍率の平均値

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

BCF_m : m回目の濃縮倍率の平均値 (群数2(a,b))

$BCF_{a,b}$: m回目における各群の濃縮倍率

n : m回目に分析した群数

ただし、不検出がある測定日の濃縮倍率の平均値は求めない。

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（BCFss）の算出法

定常状態における濃縮倍率（BCFss）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

$$\overline{C_{ws}} = \{C_{w(n-2)} + C_{w(n-1)} + C_{w(n)}\} / 3$$

$\overline{C_{ws}}$: 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）（ $\mu\text{g/L}$ ）

$C_{w(n)}$: 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（ $\mu\text{g/L}$ ）

(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

$$\overline{C_{fs}} = \{C_{f(m-2)} + C_{f(m-1)} + C_{f(m)}\} / 3$$

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

$C_{f(m)}$: 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（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

$$\text{BCFss} = \overline{C_{fs}} / \overline{C_{ws}}$$

BCFss : 定常状態における濃縮倍率

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

$\overline{C_{ws}}$: 定常状態における濃縮倍率算出のための試験水中の平均被験物質濃度（ $\mu\text{g/L}$ ）

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、下記の倍率を超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	61 倍
第2濃度区	620 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82%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 μg/L)

濃度区	5日後	13日後	26日後	39日後	49日後	60日後	平均 (標準偏差)	Table	Fig
1	9.11	8.92	8.66	8.39	8.63	8.63	8.72 (0.254)	8	6
2	0.858	0.882	0.865	0.824	0.864	0.878	0.862 (0.0207)	9	

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14000～38000倍、第2濃度区において14000～40000倍であった。

Table-2 濃縮倍率

() 内は平均値

濃度区	13日後	26日後	39日後	49日後	60日後	Table	Fig
1	14000	22000	26000	31000	35000	11	9
	15000	22000	27000	32000	38000		
	(14000)	(22000)	(27000)	(32000)	(36000)		
2	16000	24000	26000	33000	37000	12	10
	14000	22000	29000	33000	40000		
	(15000)	(23000)	(27000)	(33000)	(38000)		

5.3 定常状態における濃縮倍率

定常状態に達したかどうかを確認するために、濃縮倍率の変動をTable-3に示した。

Table-3 濃縮倍率の変動（得られた結果を5ケタまで表示した値）

濃度区		39日後	49日後	60日後	3回の平均
1	平均濃縮倍率	26609	31536	36473	31539
	3回の平均からの乖離率 (%)	15.633	0.0093552	15.642	
2	平均濃縮倍率	27435	33166	38148	32916
	3回の平均からの乖離率 (%)	16.650	0.75793	15.892	

上記の結果から、39、49及び60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-4に示されるように、第1濃度区及び第2濃度区において設定値の86%であった。

Table-4 定常状態における試験水中の被験物質濃度

(単位 $\mu\text{g/L}$)

濃度区	39日後	49日後	60日後	平均	Table	Fig.
1	8.39	8.63	8.63	8.55	8, 11	6
2	0.824	0.864	0.878	0.855	9, 12	

(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 32000倍
第2濃度区 33000倍

5.4 排泄試験

61日間ばく露した供試魚を試験用水（被験物質及び分散剤を含まない水）に移し、供試魚中の被験物質を経時的に分析した。

供試魚中の被験物質の残留率は、定常状態における供試魚中被験物質濃度の平均値を100として、排泄試験開始2、8、14及び20日後の供試魚中被験物質の残留率（%）を算出した（Table-14, 15、Fig.12, 13参照）。

また、排泄試験における残留率と排泄期間との相関をFig.14, 15に示した。

これらの結果から、排泄半減期は第1濃度区で17日、第2濃度区で15日であった。

Table-5 排泄試験における残留率

(単位 %)

濃度区	2日後	8日後	14日後	20日後	Table	Fig.
1	99 107	78 74	74 50	49 48	14	12
2	123 107	80 83	65 68	49 47	15	13

5.5 部位別試験

61日間ばく露した供試魚を各試験区から2尾ずつ採取し、外皮（頭部を除く皮、うろこ、ひれ、消化管、えら）、頭部、内臓（消化管以外の臓器）及び可食部（前記の部分を除いた残部）に大別し、各重量を測った後、各部位における被験物質を分析した。分析法は3.7と同様とした。ただし、供試魚前処理フロースキーム中の微細化、保存用試料の分取、分析試料の分取は行わなかった。

各部位における被験物質濃度及び濃縮倍率をTable-6に示した。なお、試験水中の被験物質濃度は部位別試験を実施した時までの連続3回の平均被験物質濃度とした。

Table-6 各部位における被験物質濃度及び濃縮倍率

濃度区	部 位	各部位における被験物質濃度 (ng/g)	濃縮倍率	Table	Fig.
1	外 皮	240000 179000	28000 21000	16	16
	頭 部	344000 324000	40000 38000		
	内 臓	715000 759000	84000 89000		
	可食部	158000 157000	19000 18000		
2	外 皮	26500 25600	31000 30000	17	17
	頭 部	39000 38200	46000 45000		
	内 臓	96900 89400	110000 100000		
	可食部	18100 14000	21000 16000		

5.6 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	4.16%
実験終了後	5.34%

5.7 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

本試験における実験終了後の脂質含量（平均値）の変動は、実験開始前に対して+28%であり、開始時の±25%の範囲を超えた。実験開始前及び実験終了後の脂質含量の平均値が、お互いに差があるかを調べるために、各3点の測定データを用いて分散分析を行った。その結果、有意水準 $p=0.05$ としたとき有意差なしとなった。従って、本試験における+28%の変動は、生物個体差（生理的条件や摂餌量等）のばらつきの範囲内であると考えられる。なお、脂質含量の変動及びばらつきについては、給餌方法等の検討を継続し改善を目指している。

7. 備 考

試験に使用した主要な装置・機器、特殊器具及び試薬等

(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	：	日本精密科学製	型 SP-D-2500
		日本精密科学製	型 SP-Y-2500(S)
溶存酸素測定装置	：	飯島電子工業製	型 ID-100
pH計	：	東亜電波工業製	型 HM-14P
		東亜ディーケーケー製	型 HM-21P

(2) 分析及び原液調製に使用した装置・機器、特殊器具及び試薬

装置・機器

液体クロマトグラフィー質量分析計	：	17頁参照	
天びん	：	ザルトリウス製	型 BP301S
		ザルトリウス製	型 CP324S
		エー・アンド・ディ製	型 FA-2000
フーリエ変換赤外分光光度計	：	島津製作所製	型 IRPrestige-21
ロータリーエバポレーター	：	東京理化器械製	型 N-1000K
		東京理化器械製	型 N-1000K2
振とう機	：	タイテック製	型 SR-2w
ホモジナイザー（ポリトロン）	：	キネマチカ製	型 PT3100
遠心分離機	：	日立工機製	型 CR21G
卓上超音波洗浄槽	：	ヤマト科学製	型 ブランソニック52

特殊器具

メンブランフィルター : 日本ミリポア製
Millex-LG 孔径 0.20μm

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
テトラヒドロフラン : 関東化学製 HPLC用
クロロホルム : 和光純薬工業製 試薬特級
N,N-ジメチルホルムアミド : ナカライテスク製 試薬一級
硫酸アンモニウム : 関東化学製 試薬一級
HCO-40 : 日光ケミカルズ製
0.5mol/L酢酸ジ-n-ブチルアンモニウム溶液
: 東京化成工業製 イオンペア試薬

(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 : ザルトリウス製 型 BP301S
ザルトリウス製 型 CP324S
メトラー製 型 AB204-S
ロータリーエバポレーター : 東京理化工機製 型 N-1000K2
ホモジナイザー (ポリトロン) : キネマチカ製 型 PT3100
ホモジナイザー (オートセルマスター)
: アズワン製 型 CM-200
真空ポンプ : 真空機工製 型 DAH-20C
真空機工製 型 DA-20D
真空機工製 型 DTC-41
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 : 関東化学製 試薬一級