

## 最終報告書

魚介類の体内における K-1556 の濃縮度試験

JCL018053

2002 年 1 月 24 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

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-1556 の濃縮度試験

試験番号 : JCL018053

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(正本)から正確に  
複写されたものであることを証明します。

2002年1月29日

運営管理者 :

# 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-1556 の濃縮度試験

試験番号：JCL018053

試験責任者：[REDACTED]

試験期間：2001年10月10日 ～ 2002年 1月24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10月10日	2001年10月10日	2001年10月10日
試験計画書変更	: 2001年11月 9日	2001年11月 9日	2001年11月 9日
魚類急性毒性試験期間中	: 2001年10月18日	2001年10月18日	2001年10月18日
濃縮度試験実験開始	: 2001年10月26日	2001年10月26日	2001年10月26日
濃縮度試験再実験開始	: 2001年11月27日	2001年11月27日	2001年11月27日
濃縮度試験再実験期間中	: 2001年12月18日	2001年12月18日	2001年12月18日
最終報告書草案	: 2002年 1月17日	2002年 1月17日	2002年 1月17日
最終報告書	: 2002年 1月24日	2002年 1月24日	2002年 1月24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

2002年 1月24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	9
12 主な機器・装置	9
13 魚類急性毒性試験の実施	10
14 濃縮度試験の実施	14
15 濃縮倍率の算出方法	17
16 試験の有効性	20
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	20
18 試験結果	20
19 数値の取扱い	21
20 試資料の保管	21
21 最終報告書の訂正	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-1556 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 : >100 mg/L

96 時間 LC50 値 : >100 mg/L

濃縮度試験(コイ)の結果

低濃度区(設定濃度 : 0.1 mg/L)

定常状態における試験水中被験物質濃度の平均値 : 0.100 mg/L  
(最小値～最大値 : 0.096 ~ 0.107 mg/L)

定常状態における魚体中被験物質濃度の平均値 : <1.0 µg/g

定常状態における生物濃縮係数 (BCF<sub>ss</sub>) : <10.0

高濃度区(設定濃度 : 1.0 mg/L)

定常状態における試験水中被験物質濃度の平均値 : 0.99 mg/L  
(最小値～最大値 : 0.91 ~ 1.05 mg/L)

定常状態における魚体中被験物質濃度の平均値 : <1.0 µg/g

定常状態における生物濃縮係数 (BCF<sub>ss</sub>) : <1.0

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	<10.0	<10.1	<10.0	<10.0	<10.0
高濃度区	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0

## 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-1556 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-1556 の濃縮度試験

## 2 試験番号

JCL018053

## 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化学物質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 : (バイオアッセイ事業部 西脇ラボ)

試験担当者(物理・化学系) : (バイオアッセイ事業部 西脇ラボ)

試験担当者(生物系) : (バイオアッセイ事業部 西脇ラボ)

試験担当者(生物系) : (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 10 月 10 日

魚類急性毒性試験実験期間 自 2001 年 10 月 16 日

至 2001 年 10 月 20 日

濃縮度試験実験開始日	2001 年 10 月 26 日
濃縮度試験実験中止日	2001 年 11 月 2 日
濃縮度試験再実験開始日	2001 年 11 月 27 日
濃縮度試験再実験終了日	2001 年 12 月 25 日
試験終了日	2002 年 1 月 24 日

## 試験日程表

2001.10.10	試験開始
2001.10.16	魚類急性毒性試験実験開始
2001.10.20	魚類急性毒性試験実験終了 濃縮度試験装置始動
2001.10.25	試験水中被験物質濃度測定(-1日目)
2001.10.26	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
2001.10.30	試験水中被験物質濃度測定(4日目)
2001.11. 1	試験水中被験物質濃度測定(6日目)
2001.11. 2	試験水中被験物質濃度測定(7日目) 濃縮度試験実験中止
2001.11.21	濃縮度試験装置再始動
2001.11.26	試験水中被験物質濃度測定(-1日目)
2001.11.27	濃縮度試験再実験開始 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
2001.11.30	試験水中被験物質濃度測定(3日目)
2001.12. 4	試験水中被験物質濃度測定(7日目)
2001.12. 7	試験水中被験物質濃度測定(10日目)
2001.12.11	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
2001.12.14	試験水中及び魚体中被験物質濃度測定(17日目)
2001.12.18	試験水中及び魚体中被験物質濃度測定(21日目)

\*

	*	
2001.12.21	—	試験水中及び魚体中被験物質濃度測定(24日目)
2001.12.25	—	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 濃縮度試験再実験終了
2001.12.26	—	濃縮度試験装置停止
2001.12.28	—	最終報告書草案作成開始
2002. 1.18	—	最終報告書作成開始
2002. 1.24	—	最終報告書作成 試験終了

## 9 被験物質

### 9-1 名 称

IUPAC 名 : (2,4-ジクロロフェノキシ)酢酸

略 称 : K-1556

CAS No. : 94-75-7

### 9-2 提供者及びロット番号

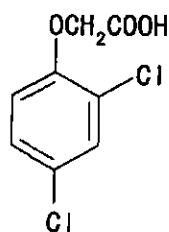
提 供 者 : 財団法人 化学物質評価研究機構 久留米事業所

〒 830-0023 福岡県久留米市中央町 19 番 14 号

ロット番号 : ELJ6538

### 9-3 構造式、分子式及び分子量

構 造 式 :



分 子 式 :  $C_8H_6Cl_2O_3$

分 子 量 : 221.04

### 9-4 純度

純 度 : 99.5%<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 : うすい赤褐色結晶性粉末  
融 点 : 138.9°C<sup>1)</sup>  
沸 点 : 350°C 以上<sup>2)</sup>  
密 度 : 1.545 g/cm<sup>3</sup><sup>3)</sup>  
溶 解 性 : 対水 ; 620 mg/L (25°C)<sup>3)</sup>

<sup>1)</sup> : XXXXXXXXXX (提供者による被験物質の購入元)の当該ロット  
検査成績表より引用

<sup>2)</sup> : 財団法人 化学物質評価研究機構の測定データシートより引用

<sup>3)</sup> : 化学大辞典より引用

## 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、試験委託者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.5 (p.52)]。

## 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.6 (p.53)]。

## 9-8 試験条件下での安定性確認

濃縮度試験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の測定により得られるピーク面積値及び保持時間、分解生成物によるピーク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 7 及び 14 日目の残存率 (%)の測定を行った。調製後 14 日目の残存率は低濃度区で 99.2%、高濃度区で 98.7%であった [Table 1 (p.6), Appendix 5 Fig.7 (p.54)]。

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 14 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 14 日間以内とした。

Table 1 Stability test of the test substance under test condition

Passage Days	Standard Solution (50mg/L) Peak Area	Stock Solution of Low Exposure Level (500 mg/L)			Stock Solution of High Exposure Level (5000 mg/L)		
		Peak Area	Concentration <sup>*1</sup> (mg/L)	Remains Rate (%)	Peak Area	Concentration <sup>*2</sup> (mg/L)	Remains Rate (%)
0	1089050	1087037	499	100.0	1073943	4931	100.0
7	1090860	1081455	496	99.4	1059982	4858	98.5
14	1091532	1080836	495	99.2	1062640	4868	98.7

※:Concentration = 50 × [Peak area of the sample / Peak area of the standard solution]  
× Dilution rate

Concentration<sup>\*1</sup>: diluted to 10 times

Concentration<sup>\*2</sup>: diluted to 100 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、十分にばっ気を行った。

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

魚類急性毒性試験には取り扱いが容易なヒメダカを供試魚として用いた。

#### (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：M01H

供試魚は受入時の死魚、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 ；M01H-01

じゅん化水槽：No.1

蓄養時の全長が 2.0 ± 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 3.4%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 :  $0.18 \pm 0.03$  g

平均全長 :  $2.7 \pm 0.2$  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 4 g 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-04

じゅん化水槽 : No.2

供試魚は全長が 7 cm で、約 4 g 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 ~ 5%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)〕に従いじゅん化を行った。

実験開始前の 7 日間の死亡率が総魚数の 0.0%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。

#### 10-4 濃縮度試験の再実験に用いる供試魚

濃縮度試験の再実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3g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：K01I

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：K01I-03

じゅん化水槽：No.2

供試魚は全長が6cmで、約3g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3～5%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)〕に従いじゅん化を行った。

再実験開始前の7日間の死亡率が総魚数の0.0%であったので、再実験を開始した。

##### (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) 再実験開始時の供試魚の体重及び全長 (n=10)

平均体重 :  $3.2 \pm 0.6$  g平均全長 :  $6.3 \pm 0.5$  cm

## 11 主な試薬

試薬名	等級	メーカー
ペンタクロ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
りん酸	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-10A システム (15号機)	島津製作所	(SOP/OME/041)
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.1) 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	(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.3, 4)	日本精密科学	(SOP/OME/590)
残留塩素測定器(オルトリソン法)	—	井内盛栄堂	(SOP/OME/600)
濾過装置	エーハイム 2260	ワーナー・ランバート	(SOP/OME/610)
	エーハイム 2213 (No.3,6)		(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)
微量高速冷却遠心機	MRX-150	トミー精工	(SOP/OME/111)
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 : 23.7 ~ 23.9°C

② pH : 7.5 ~ 7.8

③ 溶存酸素濃度 : 7.3 ~ 8.3 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.11), Fig.1 (p12)]。

48 時間 LC50 値 : 0.43 mg/L

96 時間 LC50 値 : 0.35 mg/L

(4) 結果の判定

96 時間 LC50 値は 0.35 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実験に用いた。

Table 2 Mortality in PCP-Na salt inspection

Nominal Concentration (mg/L)	Mortality (%)			
	24 Hours	48 Hours	72 Hours	96 Hours
Control	0	0	0	0
0.13	0	0	0	0
0.20	0	0	10	10
0.30	0	0	20	20
0.45	40	60	80	80
0.67	80	100	100	100
1.00	100	100	100	100

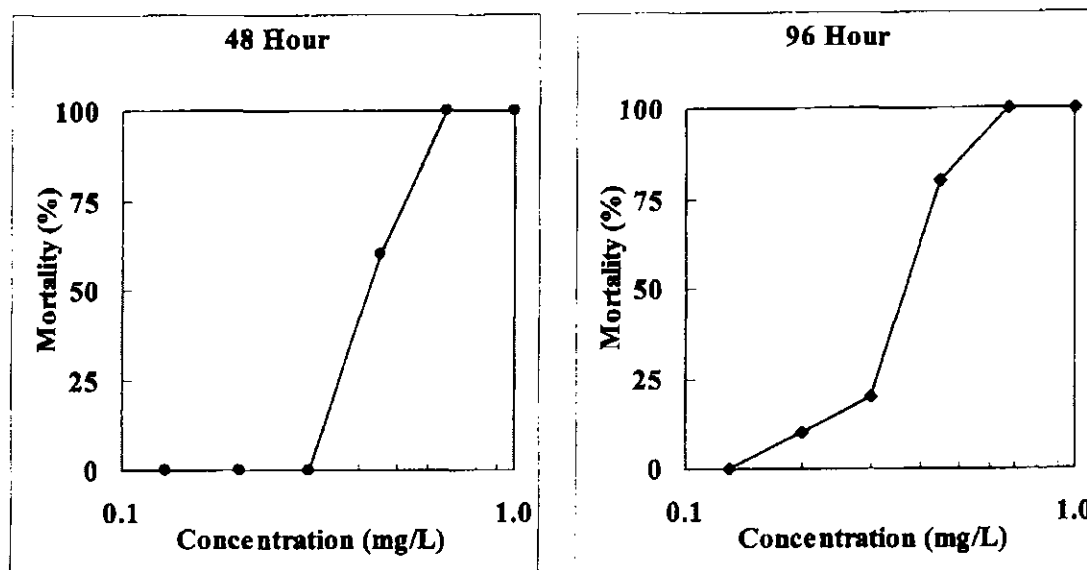


Fig.1 Mortality in PCP-Na salt inspection

### 13 - 2 魚類急性毒性試験 (LC50 値測定)

試験方法は、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 : 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 試験濃度 : 対照区, 10, 18, 32, 56, 100 mg/L
- ⑨ 調製方法 : 被験物質を 300, 200 及び 200 mg 秤量し、3, 2 及び 2 L の試験用水に添加した後、一昼夜攪拌し溶解させ、7 L の 100 mg/L 被験物質原液を調製した。これら原液を次表に従って、試験用水に添加して試験液を調製した。  
また、試験用水 3 L を用いた対照区を設定した。



試験水濃度 (mg/L)	100 mg/L 被験 物質原液 (mL)	試験用水 (mL)
10	300	2700
18	540	2460
32	960	2040
56	1680	1320
100	3000	-

## (2) 観察・管理

供試魚の観察は、実験開始直後及び 24, 48, 72, 96 時間後に行った[Table 3 (p.14)]。対照区を含むすべての濃度区において、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実験開始 24, 48, 72, 96 時間後に行った。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 : 23.6 ~ 24.2°C

pH : 7.3 ~ 7.7

溶存酸素濃度 : 8.0 ~ 8.2 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 法により測定した。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 [Appendix 1 (p.24-26)]。各試料について 1 回測定とした [Appendix 5 Table 7 (p.40)]。

## (4) LC50 値の算出

96 時間後における供試魚の死亡率は、すべての濃度区で 0%であったため、以下のように、>100 mg/L とした。[Table 3 (p.14), Fig.2 (p.14)]。

48 時間 LC50 値 : >100 mg/L

96 時間 LC50 値 : >100 mg/L

Table 3 Mortality in acute toxicity test

Nominal Concentration (mg/L)	Mortality (%)			
	24 Hours	48 Hours	72 Hours	96 Hours
Control	0	0	0	0
10	0	0	0	0
18	0	0	0	0
32	0	0	0	0
56	0	0	0	0
100	0	0	0	0

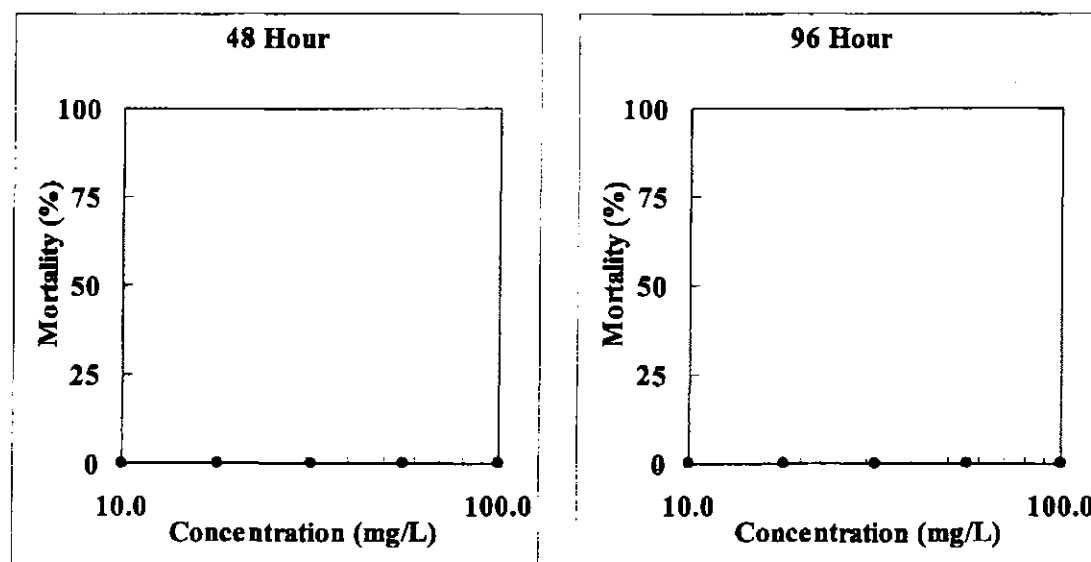


Fig. 2 Mortality in acute toxicity test

#### 14 濃縮度試験の実施

##### 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 (>100 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 [0.1 mg/L (実質定量限界値 0.01 mg/L)]; Appendix 2-6 (p.28), Appendix 2 Table 3 (p.29)] 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      0.1 mg/L

高濃度区      1.0 mg/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 :  $25.0 \pm 2.0^{\circ}\text{C}$
- ③照明 : 室内光、16 時間明 / 8 時間暗
- ④試験水槽 : 100 L、ガラス製
- ⑤実験方式 : 流水式(換水回数; 7 回 / 日)
- ⑥生物数 : 50 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 0.1 mg/L  
高濃度区 1.0 mg/L
- ⑨流量設定 : 試験用水 500 mL/min  
原液 0.1 mL/min
- ⑩原液濃度 : 低濃度区 500 mg/L  
高濃度区 5000 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 5000 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 5 g 及び HCO-40 150 g を秤量し、アセトニトリルで溶解した後、ロータリーエバポレーターでアセトニトリルを除去した。これに純水を加えて溶解させた後、1 L に定容して高濃度区被験物質原液(5000 mg/L)を調製した。
- ・高濃度区被験物質原液 100 mL を分取し、純水 900 mL に添加して、低濃度区被験物質原液(500 mg/L)を調製した。
- ・HCO-40 150 g を秤量し、アセトニトリルに溶解させた後、ロータリーエバポレーターでアセトニトリルを除去した。これに純水を加えて溶解させた後、1 L に定容して助剤対照区原液を調製した。

## 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 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、50 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

再実験期間中、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。なお、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観察を行った。

## (2) 試験水の管理

再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[Appendix 5 Fig.8 (p.55)]。

水温 : 24.3 ~ 25.3°C

pH : 7.2 ~ 7.8

溶存酸素濃度 : 7.0 ~ 8.2 mg/L

## 14 - 5 試験水中の被験物質濃度測定

再実験期間中、試験水は再実験開始前、再実験当日及び再実験開始後 1 週間に 2 回以上、各濃度区の試験水約 20 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[Appendix 2 (p.27-31)]。

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[Appendix 5 Table 9-10 (p.42-44), Appendix 5 Fig.9 (p.56-65)]。

低濃度区(設定濃度 : 0.1 mg/L)

定常状態における試験水中被験物質濃度の平均値 : 0.100 mg/L  
(最小値~最大値 : 0.096 ~ 0.107 mg/L)

高濃度区(設定濃度 : 1.0 mg/L)

定常状態における試験水中被験物質濃度の平均値 : 0.99 mg/L  
(最小値~最大値 : 0.91 ~ 1.05 mg/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[Appendix 3 (p.32-36)]。

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げ、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.41)]。低濃度区及び高濃度区の供試魚は 2 尾(2 尾を 1 群とする)ずつホモジナイズして、被験物質の濃度測定試料とした(各濃度区につき 2 群)。また、再実験開始時、14 日目及び再実験終了時(28 日目)に助剤対照区の供試魚 1 群の脂質含

有率を測定した[Appendix 4 (p.37-39)]。また、再実験開始前の供試魚 3 群及び再実験終了時の助剤対照区の供試魚 2 群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[Appendix 5 Table 11 (p.45-51), Appendix 5 Fig.10 (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 : <1.0 µg/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 : <1.0 µg/g

### 14 - 7 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[Appendix 2 (p.27-31)]。

### 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[Appendix 3 (p.32-36)]。

### 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 (µg/g)

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

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

再実験期間中の濃縮倍率を Table 4, 5 (p.18, 19) 及び Fig.3 (p.19) に示した。

## (2) 定常状態における BCFss

以下の式により BCFss を算出した。

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

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

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

$C_{fB}$  : 空試験における再実験開始前及び再実験終了時の魚体中の平均被験物質濃度 (μg/g)

<sup>\*1</sup> : 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

<sup>\*2</sup> : 測定値の平均に対して ±20%以内である場合

再実験開始 21, 24, 28 日目の魚体中被験物質濃度の平均は、低濃度区及び高濃度区ともに <1.0 μg/g であり、再実験期間中の試験水中被験物質濃度の平均は低濃度区で 0.100 mg/L、高濃度区で 0.99 mg/L であった。よって、BCFss を以下のように算出した。

低濃度区の BCFss : <10.0

高濃度区の BCFss : <1.0

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

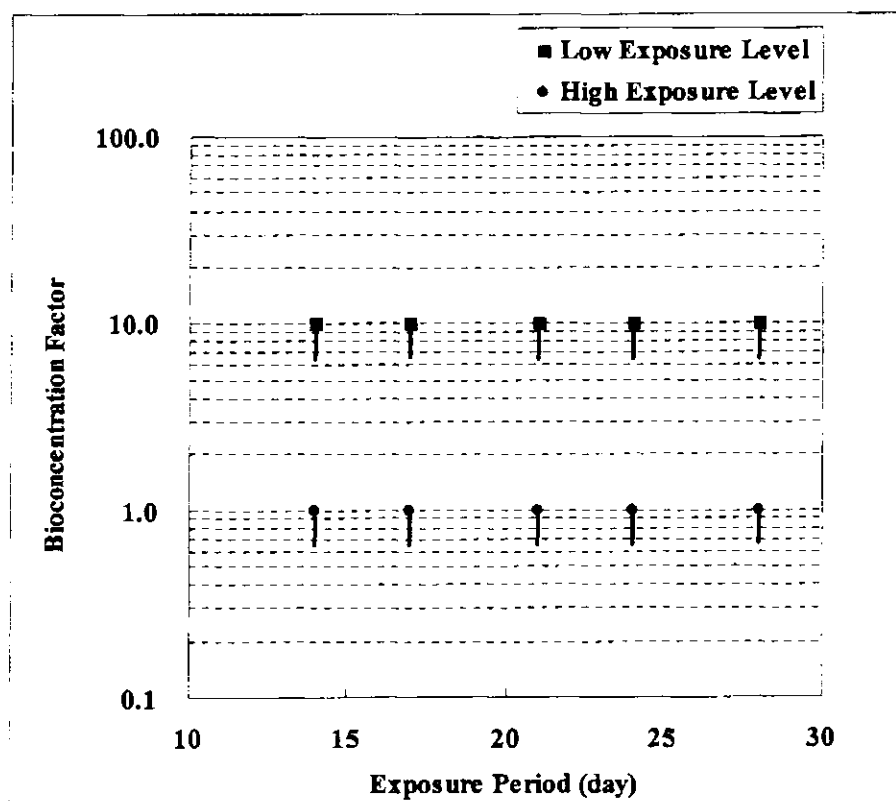
Exposure period (day)	Concentration of test substance in test fish		Mean concentration of test substance in test water : $C_w$ (mg/L)	BCF
	$C_{fn}$ (μg/g)	Mean ( $C_{fn}$ : μg/g)		
14	I	<1.0	0.100	<10.0
	II	<1.0		
17	I	<1.0	0.099	<10.1
	II	<1.0		
21	I	<1.0	0.100	<10.0
	II	<1.0		
24	I	<1.0	0.100	<10.0
	II	<1.0		
28	I	<1.0	0.100	<10.0
	II	<1.0		
Mean concentration on 21, 24, 28 days ( $C_f$ ) : <1.0			$C_w$ : 0.100	BCFss: <10.0

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>w</sub> (mg/L)	BCF
	c <sub>fn</sub> (μg/g)	Mean (C <sub>fn</sub> : μg/g)		
14	I	<1.0	0.97	<1.0
	II	<1.0		
17	I	<1.0	0.98	<1.0
	II	<1.0		
21	I	<1.0	0.99	<1.0
	II	<1.0		
24	I	<1.0	0.99	<1.0
	II	<1.0		
28	I	<1.0	0.99	<1.0
	II	<1.0		
Mean concentration on 21, 24, 28 days (C <sub>f</sub> ) : <1.0			C <sub>w</sub> : 0.99	BCF <sub>ss</sub> : <1.0

BCF : Bioconcentration factor



The vertical lines show under plot values.

Fig.3 Bioconcentration factors during the exposure period

## 16 試験の有効性

16-1 再実験において、試験水の水温は  $25.0 \pm 2.0^{\circ}\text{C}$ 、溶存酸素濃度は飽和酸素濃度の 60%以上であった。

16-2 再実験において、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  $\pm 20\%$ 以内に保たれていた。

16-3 再実験において、助剤対照区及び各濃度区で再実験終了時までに死亡及び疾病などの異常は観察されなかった。

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

濃縮度試験において助剤対照区及び各濃度区のすべての水槽の供試魚が基準の 10%を超える死亡が確認され実験を中止した。しかし、再実験を行ったところ 28 日間の再実験終了時において、助剤対照区及び各濃度区のすべての水槽の供試魚に死亡及び疾病などの異常は観察されなかった。よって、本試験の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と考えられた。

## 18 試験結果

### 18-1 試験結果

再実験期間中の K-1556 の生物濃縮係数 (BCF<sub>ss</sub>) は低濃度区で  $<10.0$ 、高濃度区で  $<1.0$  であり、いずれも  $10^3$  倍以下であった。

### 18-2 考察

濃縮度試験の再実験において、試験水濃度は 96 時間 LC50 値 ( $>100 \text{ mg/L}$ ; ヒメダカ) の 1/100 及び 1/1000 の濃度である  $1.0$  及び  $0.1 \text{ mg/L}$  に設定した。これら試験水濃度で実施した濃縮度試験の再実験において供試魚 (コイ) の行動及び外観に異常は認められなかった。

再実験期間中の試験水中被験物質濃度は、低濃度区 (設定濃度:  $0.1 \text{ mg/L}$ ) で平均値  $0.100 \text{ mg/L}$  ( $0.096 \sim 0.107 \text{ mg/L}$ )、高濃度区 (設定濃度:  $1.0 \text{ mg/L}$ ) で平均値  $0.99 \text{ mg/L}$  ( $0.91 \sim 1.05 \text{ mg/L}$ ) と一定した値を示し、設定濃度とほぼ一致していた [Appendix 5 Table 9-10 (p.42-44)]。

供試魚のサンプリングは再実験開始後 14, 17, 21, 24, 28 日目に行い、魚体中被験物質濃度を測定した。低濃度区及び高濃度区の魚体中被験物質濃度はすべて定量下限値未満 ( $<1.0 \mu\text{g/g}$ ) であった [Appendix 5 Table 11 (p.45-51)]。



再実験開始後 21, 24, 28 日目の濃縮倍率は低濃度区ですべて<10.0、高濃度区ですべて<1.0 となった。この結果から、魚体中被験物質濃度は定常状態に達したとみなし、生物濃縮係数(BCFss)は低濃度区で<10.0、高濃度区で<1.0 と算出した。

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( $10^4$  倍程度)に比べて、本被験物質(K-1556)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(BCFss)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 最終報告書の訂正

最終報告書を訂正する場合には、試験責任者は訂正の事項、理由、内容を「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。

2002 年 / 月 24 日

試験責任者

:

[Redacted Signature]

## 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

上記以外の分析条件は Appendix 1-1 に従った。

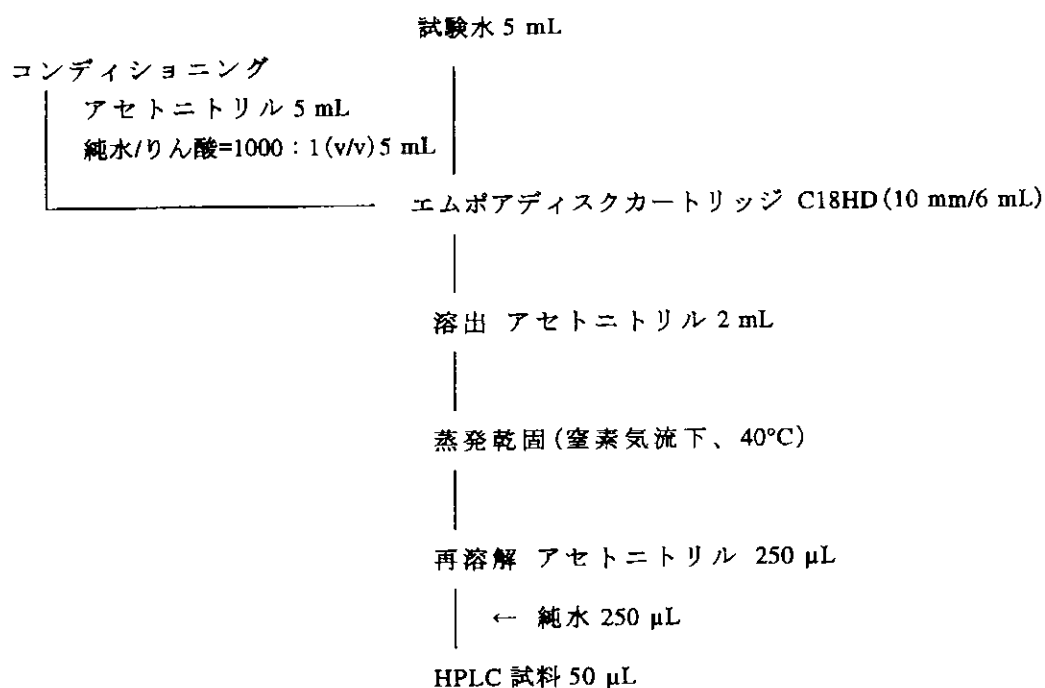
## 2-2 K-1556 標準溶液の調製

Appendix 1-2 で調製した 125.0 mg/L 標準原液を純水で希釈し、20.0 及び 2.0 mg/L の標準原液を調製した。これら標準原液 300  $\mu$ L にアセトニトリル 300  $\mu$ L を加え 10.0 及び 1.0 mg/L の標準溶液を調製した。これら標準溶液を HPLC に 50  $\mu$ L 注入した。

## 2-3 試料の調製

各試験水 5 mL をあらかじめアセトニトリル 5 mL、純水/りん酸=1000:1(v/v) 5 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、アセトニトリル 2 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、残渣にアセトニトリル 250  $\mu$ L を加え再溶解させ、さらに純水 250  $\mu$ L を加え混和させた。これを HPLC 試料として 50  $\mu$ L 注入した。

試料の前処理法のフローチャートを以下に示す。



## 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。

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

cwn : n 日目の試験水中被験物質濃度 (mg/L)

P : 標準溶液濃度 (mg/L)

A (std) : 標準溶液注入量 (μL)

A (W) : 分析試料注入量 (μL)

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 5000 倍に希釈し回収率算出用試料とした。これを Appendix 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 96.2%、CV=0.8 % 及び高濃度区の平均回収率は 96.3%、CV = 2.2% と良好な結果が得られた [Appendix 2 Table 2 (p.29), Appendix 2 Fig.2 (p.30)]。また、助剤対照区試験水において分析を妨害する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 125.0 mg/L 標準原液を純水で希釈し、20.0, 5.0, 2.0, 0.6 及び 0.2 mg/L の標準原液を調製した。これら標準原液 300 μL にアセトニトリル 300 μL を加え 10.0, 2.5, 1.0, 0.3 及び 0.1 mg/L の標準溶液を調製した。これら標準溶液を HPLC に 50 μL 注入した。

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。10.0 ~ 0.1 mg/L 標準溶液の変動係数は 0.1 ~ 1.1%、直線性は  $r=1.00000$  と良好な結果が得られた [Appendix 2 Table 3 (p.29), Appendix 2 Fig.3 (p.31)]。

以上の結果より、標準溶液の定量限界値を 0.1 mg/L とし、定量限界値未満の濃度を参考値とした。また、試験水は前処理により 10 倍に濃縮されるので、試験水の実質定量限界値は 0.01 mg/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

分析条件は Appendix 1-1 に従った。

#### 3-2 K-1556 標準溶液の調製

Appendix 1-2 で調製した 125.0 mg/L 標準原液を純水で希釈し、20.0 及び 2.0 mg/L の標準原液を調製した。これら標準原液 300  $\mu$ L にアセトニトリル 300  $\mu$ L を加え 10.0 及び 1.0 mg/L の標準溶液を調製し HPLC 試料とした。

#### 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 100.0 mg/L 標準原液 500  $\mu$ L を添加し、回収率算出用試料を調製した。この濃度は、魚体中濃度に換算すると 5  $\mu$ g/g になり、低濃度区試験水濃度の 50 倍、高濃度区試験水濃度の 5 倍となった。

また、被験物質を添加していない魚体 10 g に純水 500  $\mu$ L を添加し、同様に 3 検体を前処理し、空試験とした。

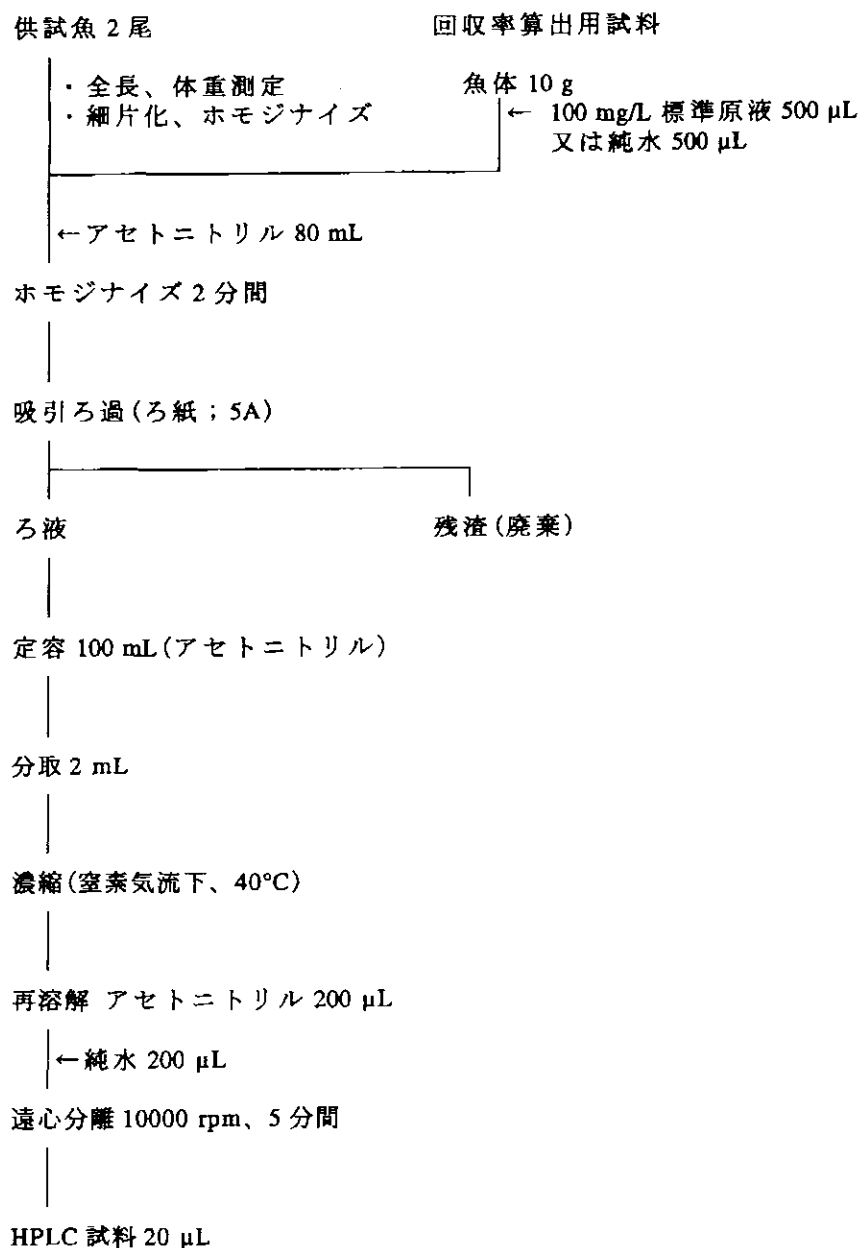
回収率算出用試料の前処理方法は、供試魚の前処理に従って行い測定結果の平均値から回収率を算出した。

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取り、全長・体重を測定し、2 尾ずつをピーカーに入れ細片化しホモジナイズした。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 (5A: 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 2 mL を分取し、窒素気流下 (40°C) で蒸発乾固させたのち、アセトニトリル 200  $\mu$ L で再溶解した。この溶液に純水 200  $\mu$ L を添加して混和させた後、10000 rpm で 5 分間遠心分離し、その上清を HPLC 試料として 20  $\mu$ 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を算出した。

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

cfn : n 日目の魚体中被験物質濃度 ( $\mu\text{g/g}$ )

P : 標準溶液濃度 ( $\text{mg/L}$ )

A(std) : 標準溶液注入量 ( $\mu\text{L}$ )

A(f) : 分析試料注入量 ( $\mu\text{L}$ )

- 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

Appendix 3-3 に従って調製した回収率算出用試料を Appendix 3-4 に従って処理を行い回収率を求めた。平均回収率は 90.2% で、CV=2.3% 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ピークは検出されなかった [Appendix 3 Table 4 (p.34), Appendix 3 Fig.4 (p.35)]。

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 (mg/L)	Peak Area of Standard Solution	Peak Area of Sample	Recovery (%)	Mean (%)	S.D.	CV (%)
Blank Sample	2.5	53443	N.D.	—	—	—	—
			N.D.	—			
			N.D.	—			
Recovery Sample	2.5	53443	46850	87.7	90.2	2.1	2.3
			48911	91.5			
			48778	91.3			

N.D. : Not Detectable

## 3-7 定量限界値の設定

魚体中濃度が 1.0 及び 0.5  $\mu\text{g/g}$  になるように、100 mg/L 標準原液を魚体 10 g に 100 及び 50  $\mu\text{L}$  添加して回収処理を行った。その結果、平均回収率は魚体中濃度 1.0  $\mu\text{g/g}$  では平均回収率 93.2%、CV=4.2 と良好な結果が得られた。また、魚体中濃度 0.5  $\mu\text{g/g}$  では平均回収率 115.8%、CV=10.3%となり、回収率は 100%、CV は 10%を超える結果となった[Appendix 3 Table 5 (p.36)]。

以上のことより、魚体中濃度 1.0  $\mu\text{g/g}$  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 The lower limit of quantitation of the concentration of the test substance in test fish

Nominal Concentration in Test Fish ( $\mu\text{g/g}$ )	Standard Solution (mg/L)	Peak Area of Standard Solution	Peak Area of Sample	Recovery (%)	Mean (%)	SD	CV (%)
1.0	0.50	10314	9837	95.4	93.2	3.9	4.2
			9149	88.7			
			9843	95.4			
0.5	0.25	5053	5257	104.0	115.8	11.9	10.3
			6455	127.7			
			5843	115.6			



## 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

再実験開始時の供試魚(2尾:2尾を1群とした)及び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。

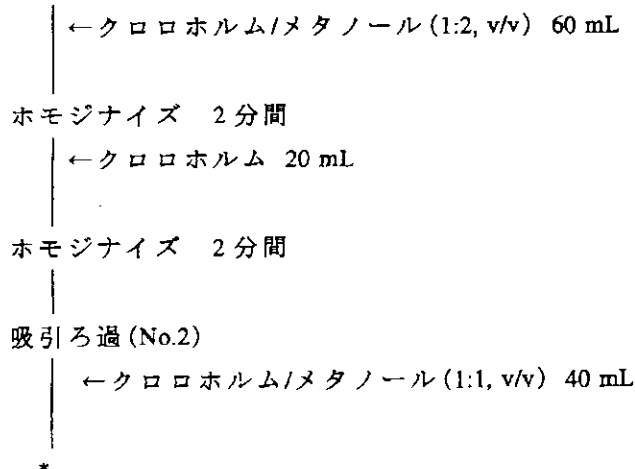
## 4-2 脂質の抽出操作

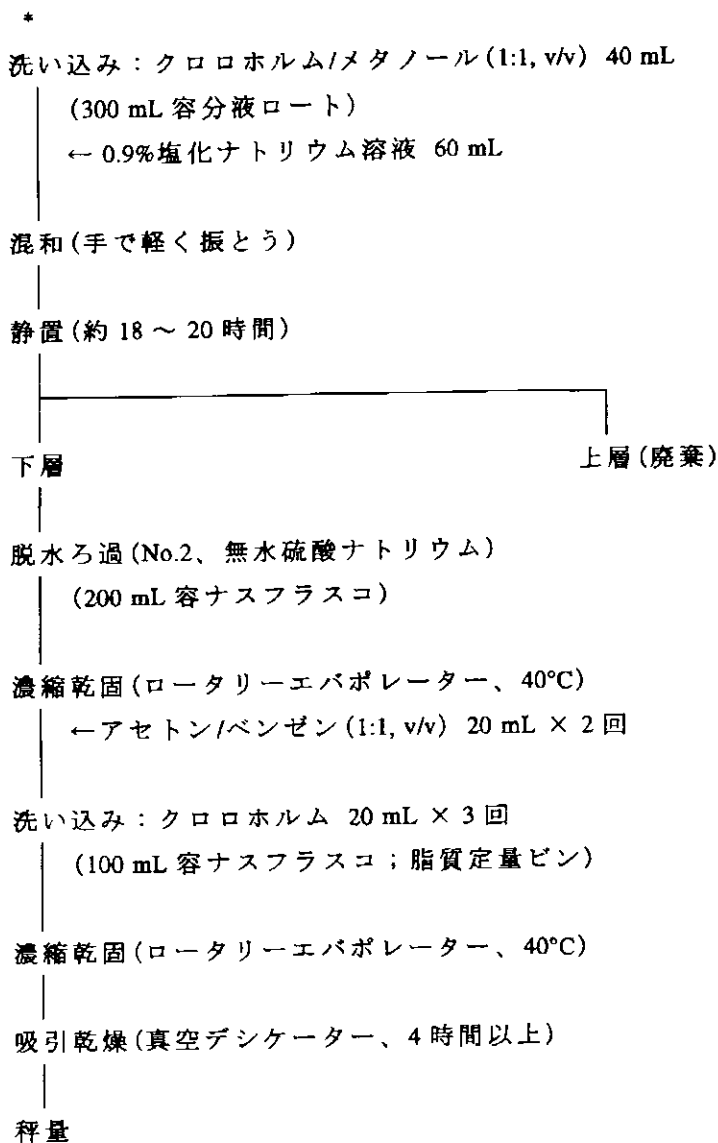
4-1で分取した脂質含有率測定試料にクロロホルム/メタノール(1:2, v/v) 60 mLを加えて2分間ホモジナイズした。さらにクロロホルム 20 mLを加えて2分間ホモジナイズした。これをブフナーロートを用いてろ紙(No.2)で吸引ろ過した。この時、残渣物をクロロホルム/メタノール(1:1, v/v) 40 mLでブフナーロートに洗い込んだ。次に吸引びん内のろ液を300 mL容分液ロートに移し入れ、クロロホルム/メタノール(1:1, v/v) 40 mLで吸引びん内を洗い込んだ。これに0.9%塩化ナトリウム溶液 60 mLを加えて、手で軽く振とうして18~20時間静置した。

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。濃縮時にはアセトン/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。

脂質含有率測定試料の分取、重量測定





#### 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

再実験開始時の供試魚(2尾:2尾を1群とした)と、再実験開始後14日目及び再実験終了時(28日目)の助剤対照区の供試魚(1群)について、脂質含有率測定を行った。脂質含有率の測定結果は2.62, 2.44, 及び2.47%となり、再実験終了時における脂質含有率の変動は、再実験開始時に対して-5.7%であった[Appendix 4 Table 6(p.39)]。

再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	—	3.8	6.8	2.62
	—	3.4	6.6	
14	1	4.7	7.5	2.44
	2	4.0	6.8	
28	5	5.3	7.6	2.47
	6	4.0	7.0	

## Appendix 6 被験物質の同定(マスペクトル)

## 6-1 高速液体クロマトグラフー質量分析計(以下「LC/MS/MS」と略す)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 塩酸-メタノール溶液
流速	: 5 $\mu$ L/min
MS/MS：イオン化法	: Turbo Ion Spray
	負イオン検出モード
イオンスプレー電圧	: -4600 V
ヒーターガス温度	: 室温
マルチブライヤー電圧	: 2200 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	: 6 BIT
カーテンガス	: 9 BIT
コリジョンガス	: 4 BIT
モニタしたイオンの範囲	: m/z 50 - 300

## 6-2 測定試料の調製

30 mg/L 標準溶液、28%アンモニア水で pH 8.0 に調整した 20 mmol/L 塩酸アンモニウム水溶液及びアセトニトリルを 1:1:1 (v/v/v) で希釈し測定試料を調製した。

## 6-3 被験物質の同定

Appendix 6-2 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、(m/z 219、221、223)を 9:6:1 の割合で示した。また、(m/z 265、267、269)に同様にピークを確認した。

これらより被験物質は Cl を 2 個含み、これらの m/z 平均が  $[M-H]^-$  ピークにあたる (m/z 220) 及び  $[M+HCOOH-H]^-$  ピークにあたる (m/z 266) であることから、被験物質の質量数 (221.04) と一致することを確認した [Appendix 6 Fig. 11 (p.73)]。