

受理番号	S01-3784
試験番号	43784

最 終 報 告 書

シクロヘキセンのコイにおける濃縮度試験

2002年 5月30日

化学物質環境影響評価機構

化学物質環境影響評価機構

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 シクロヘキセンのコイにおける濃縮度試験

試験番号 43784

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5月30日

試験責任者

[Redacted Signature]

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 シクロヘキセンのコイにおける濃縮度試験

試験番号 43784

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。

なお、本陳述書は最終報告書の改訂のため、2002年 5月30日発行の陳述書に追加発行したものです。

2002年 6月13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 シクロヘキセンのコイにおける濃縮度試験

試験番号 43784

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	2002年 3月 25日	2002年 3月 25日	2002年 3月 25日
試験実施状況	2002年 3月 26日	2002年 3月 26日	2002年 3月 26日
	2002年 4月 4日	2002年 4月 15日	2002年 4月 15日
	2002年 4月 9日	2002年 4月 15日	2002年 4月 15日
	2002年 4月 12日	2002年 4月 15日	2002年 4月 15日
	2002年 4月 26日	2002年 5月 1日	2002年 5月 1日
	2002年 4月 30日	2002年 5月 1日	2002年 5月 1日
	2002年 5月 1日	2002年 5月 1日	2002年 5月 1日
生データ及び最終報告書	2002年 5月 30日	2002年 5月 30日	2002年 5月 30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 5月 30日

信頼性保証部門責任者

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 シクロヘキセンのコイにおける濃縮度試験

試験番号 43784

上記試験の最終報告書の修正箇所について監査を実施し、当該箇所には問題がないことを確認しました。監査の結果については、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 日	報告日（試験責任者）	報告日（運営管理者）
2002 年 6 月 13 日	2002 年 6 月 13 日	2002 年 6 月 13 日

本信頼性保証書は2002年 5月30日発行の信頼性保証書に追加発行したものです。

2002 年 6 月 13 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	24
5. 試験結果	24
6. 備 考	26

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	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-4	第1濃度区試験水分析計算表
Table-5	第2濃度区試験水分析計算表
Table-6	回収試験及びブランク試験 (供試魚分析) 計算表
Table-7	第1濃度区供試魚分析計算表
Table-8	第2濃度区供試魚分析計算表
Table-9	対照区供試魚分析計算表
Reference 1	試験用水の水質測定表

Figures

Fig. 1	ばく露期間－濃縮倍率相関図 (第1濃度区)
Fig. 2	ばく露期間－濃縮倍率相関図 (第2濃度区)
Fig. 3	急性毒性試験における被験物質濃度－死亡率曲線
Fig. 4	試験水分析用検量線
Fig. 5	ブランク試験 (試験水分析) GC-MSマスフラグメントグラム
Fig. 6	試験水分析GC-MSマスフラグメントグラム
Fig. 7	供試魚分析用検量線
Fig. 8	回収試験及びブランク試験 (供試魚分析) GC-MSマスフラグメントグラム
Fig. 9	第1濃度区供試魚分析GC-MSマスフラグメントグラム
Fig. 10	第2濃度区供試魚分析GC-MSマスフラグメントグラム
Fig. 11	対照区供試魚分析GC-MSマスフラグメントグラム
Fig. 12	第1濃度区試験水中の溶存酸素濃度
Fig. 13	第2濃度区試験水中の溶存酸素濃度
Fig. 14	対照区試験水中の溶存酸素濃度
Fig. 15	被験物質の質量スペクトル
Fig. 16-1	被験物質の赤外吸収スペクトル (実験開始前)
Fig. 16-2	被験物質の赤外吸収スペクトル (実験終了後)
Fig. 17	被験物質の核磁気共鳴スペクトル

試験番号 43784

表 題 シクロヘキセン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
(〒830-0023) 福岡県久留米市中央町 19-14

試験目的 シクロヘキセン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	2002年 3月 25日
実験開始日	2002年 3月 29日
実験終了日	2002年 4月 26日
試験終了日	2002年 5月 30日

試験資料の保管

(1) 被験物質


被験物質約5gを保管用容器に入れ密栓後、安定に保存しうる期間久留米事業所
試験保管室に保管する。

(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


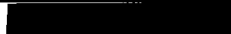


急性毒性試験担当者




最終報告書の承認

試験責任者

 2002年 5月 30日



要 約

試験の表題

シクロヘキセンのコイにおける濃縮度試験

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 100 μ g/L
第2濃度区 10 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 | ガスクロマトグラフィー質量分析法 |

試験結果

- | | |
|------------------|----------------------------------|
| (1) 96時間LC50値 | >10.0mg/L |
| (2) 定常状態における濃縮倍率 | 第1濃度区 14倍
第2濃度区 32倍 |

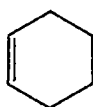
1. 被 験 物 質

本報告書において被験物質は、次の名称等を有するものとする。

1.1 名 称 シクロヘキセン

1.2 構造式等

構造式



分子式 C_6H_{10}

分子量 82.14

1.3 入手先、商品名、規格及びロット番号*1

(1) 入 手 先

(2) 商 品 名

(3) 規 格

(4) ロット番号

1.4 純 度*1

(1) 被 験 物 質 99.7%

(2) 不 純 物 水分 0.01%

被験物質は純度100%として取り扱った。

*1 入手先添付資料による。

1.5 被験物質の確認

質量スペクトル (Fig. 15参照)、赤外吸収スペクトル (Fig. 16参照) 及び核磁気共鳴スペクトル (Fig. 17参照) により構造を確認した。

1.6 物理化学的性状^{*1}

常温における性状	無色澄明の液体
密度	0.810g/mL(20℃)

^{*1} 入手先添付資料による。

1.7 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. 16参照)。 |

1.8 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 |
| | 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9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10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34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 0.28g |
| (6) 全 | 長 | 平均 3.1cm |
| (7) 感受性試験 | | 同一ロット (TF0-020202) の供試魚による基準物質PCP-Na [ペンタク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0.577mg/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2002年2月8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	24.1～24.2℃
	換水前	23.8～23.9℃
(4) 溶存酸素濃度	ばく露開始時	8.1mg/L
	換水前	6.4～7.6mg/L
(5) pH	ばく露開始時	7.8～7.9
	換水前	7.6～7.7
(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

N,N-ジメチルホルムアミド

(2) 調製方法

被験物質を*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10g/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 2002年 3月25日 ～ 2002年 3月29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 $>10.0\text{mg/L}^{*2}$ (Fig. 3参照)

*2 この際の使用した分散剤 (*N,N*-ジメチルホルムアミド) の濃度は、 1000mg/L となり、その分散剤の96時間LC50値が 11200mg/L であることから、分散剤の毒性の影響を考慮してこれ以上の高濃度の試験は行わなかった。

3. 濃縮度試験の実施

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 〒 830-0023 福岡県久留米市中央町19-14)

供試魚のふ化日 2001年12月 9日

じゅん化開始日 2002年 2月20日

(3) じゅん化条件

期 間 等

受入槽でふ化仔魚を試験魚サイズまで養成後、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、 $25 \pm 2^\circ\text{C}$ の水温の流水状態で14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21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。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。

(4) 全 長

5.8～7.4cm

(5) ロ ッ ト

TFC-011209-III

(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	第1及び第2濃度区 100L容ガラス製揮発性物質用試験水槽 対照区 100L容ガラス製水槽
(3) 試験水量	第1濃度区 原液0.02mL/分及び試験用水2000mL/分の割合で 2880L/日を試験水槽に供した。 第2濃度区 原液0.002mL/分及び試験用水2000mL/分の割合で 2880L/日を試験水槽に供した。 対照区 原液2mL/分及び試験用水2000mL/分の割合で 2883L/日を試験水槽に供した。
(4) 原液タンク	第1濃度区 250mL容ガラス製びん（冷蔵庫中で冷却） 第2濃度区 100mL容ガラス製びん（冷蔵庫中で冷却） 対照区 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 25.2～25.7℃ 第2濃度区 24.9～25.2℃ 対照区 24.9～25.2℃
(6) 溶存酸素濃度	第1濃度区 7.4～7.9mg/L (Fig. 12参照) 第2濃度区 7.6～8.0mg/L (Fig. 13参照) 対照区 7.8～8.1mg/L (Fig. 14参照)
(7) pH	第1濃度区 7.5～7.9 第2濃度区 7.6～8.0 対照区 7.6～8.0
(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 29尾（ばく露開始時） 対照区 16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)と同様にして被験物質濃度として10g/Lの原液を調製した。

・第2濃度区

2.5の(2)と同様にして被験物質濃度として10g/Lの原液を調製した。

・対照区

N,N-ジメチルホルムアミドをイオン交換水に溶解して10mL/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 100 μ g/L

第2濃度区 10 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ガスクロマトグラフィー質量分析法 (GC-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)*³に分けて行った。

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、脂質測定用として6尾を取り上げ、3群(2尾1群)とした。

*3 個体ごとの分析では、分析感度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

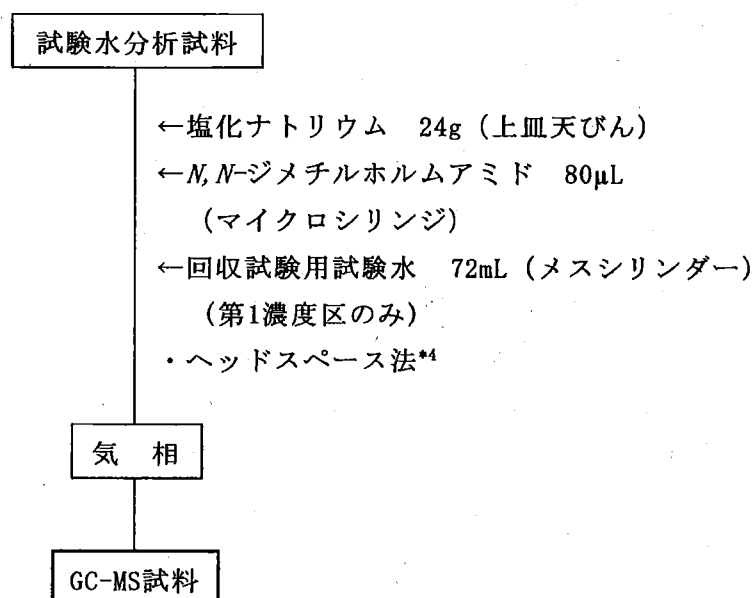
試験水槽から

第1濃度区 8mL

第2濃度区 80mL

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、ガスクロマトグラフィー質量分析法（GC-MS）試料とした。

フロースキーム



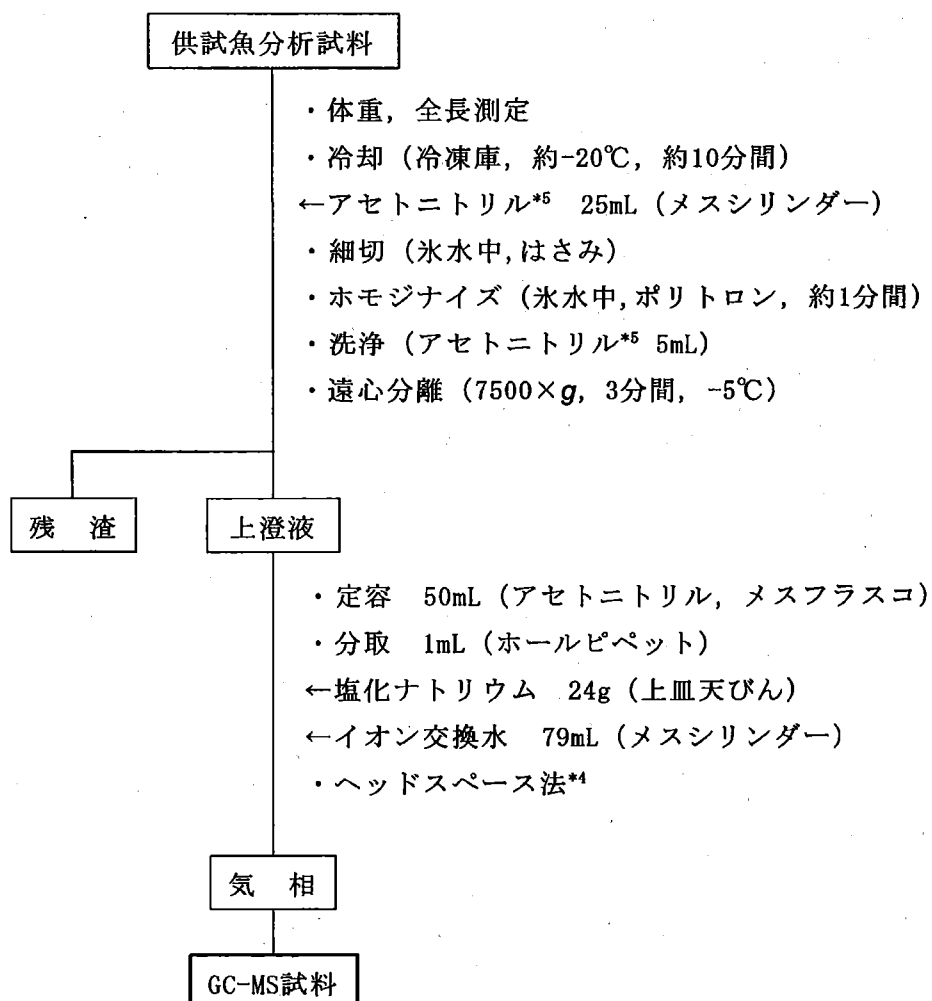
*4 ヘッドスペース法の条件

容 器	125mL容バイアル瓶
加熱温度	約80℃
加熱時間	約15分間

(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、ガスクロマトグラフィー質量分析法（GC-MS）試料とした。

フロースキーム



*5 冷蔵庫 (約5℃) で冷却したもの。

3.7.3 被験物質の定量分析

前処理を行って得られたGC-MS試料について、下記の定量条件に基づきガス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。GC-MS試料中の被験物質濃度は、標準試料及びGC-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. 9, 10, 11参照)。

(1) 定量条件

機	器	ガスクロマトグラフー質量分析計
		島津製作所製 QP-5000

ガスクロマトグラフ条件

カラム	PONA 50m×0.2mm I. D. 膜厚0.50μm
カラム温度	50℃ (2min) → 170℃ (2min)
昇温速度	30℃/min
試料導入部温度	150℃
キャリアガス	ヘリウム (圧力 239.3kPa, 全流量 28.9mL/min)
注入量	250μL
注入法	スプリット法
スプリット比	1/20

質量分析計条件

インターフェイス温度	250℃
イオン化モード	EI
イオン化電圧	70eV
測定イオンm/z	82.10

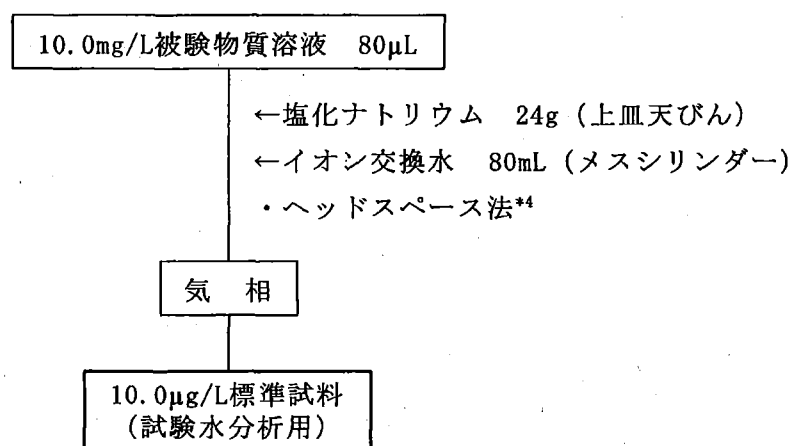
(2) 標準試料の調製

分析試料中の被験物質濃度を求めるための標準試料の調製は次のように行った。

(a) 試験水分析

被験物質100mgを正確にはかりとり、*N,N*-ジメチルホルムアミドに溶解して10.0g/Lの被験物質溶液を調製した。さらに、これを*N,N*-ジメチルホルムアミドで希釈して10.0mg/Lの被験物質溶液を調製した。これを用いて以下のフロースキームに従って前処理操作を行ったものを10.0 μ g/Lの標準試料とした。

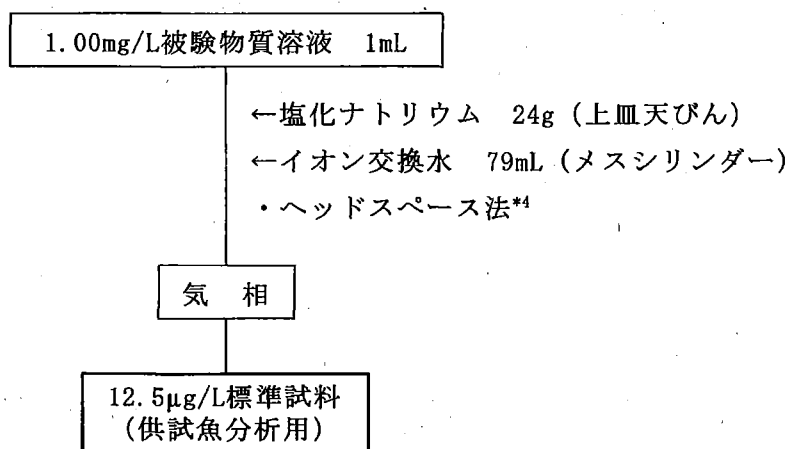
フロースキーム



(b) 供試魚分析

被験物質100mgを正確にはかりとり、*N,N*-ジメチルホルムアミドに溶解して10.0g/Lの被験物質溶液を調製した。さらに、これをアセトニトリルで希釈して1.00mg/Lの被験物質溶液を調製した。これを用いて以下のフロースキームに従って前処理操作を行ったものを12.5 μ g/Lの標準試料とした。

フロースキーム



(3) 検量線の作成

(a) 試験水分析

(2) (a)の標準試料の調製と同様にして5.00、10.0及び20.0 μ g/Lの標準試料を調製した。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1000 (被験物質濃度0.26 μ g/L) とした (Fig. 4参照)。

(b) 供試魚分析

(2) (b)の標準試料の調製と同様にして6.25、12.5及び25.0 μ g/Lの標準試料を調製した。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1000 (被験物質濃度0.27 μ 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

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、回収試験用供試魚（10g）腹腔内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-6、Fig.5, 8参照）。

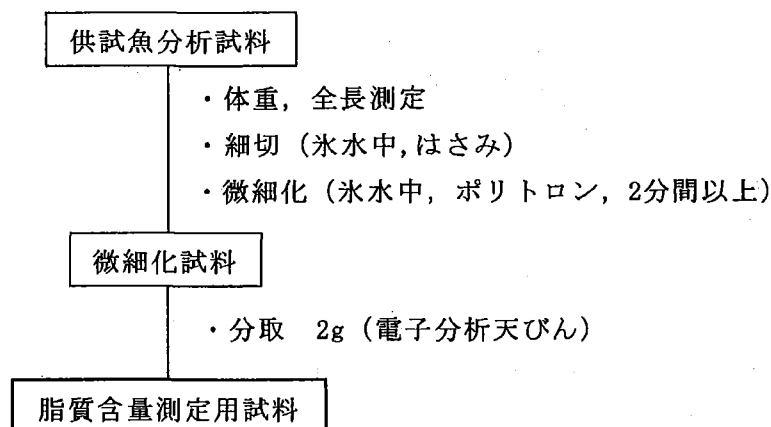
供試魚分析操作における回収率（被験物質50000ng添加）

78.0%, 83.7% 平均 80.9%

3.7.5 供試魚中の脂質含量

脂質含量の測定は、対照区の供試魚を用いて実験開始前及び実験終了後に行った。1回当たりの採取尾数は6尾とし、3群（2尾1群）に分けて測定した。採取した供試魚は以下のフロースキームにより前処理操作を行い、脂質含量の測定を分取後直ちにクロロホルム／メタノール抽出操作から行った。

フロースキーム



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)(a)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*6はそれぞれ、

第1濃度区 2.6 µg/L

第2濃度区 0.26µg/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)(b)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*6は供試魚体重を10gとしたとき130ng/gと算出される。

$$*6 \text{ 被験物質定量下限濃度 (}\mu\text{g/L又はng/g)} = \frac{A}{\frac{B}{100} \times \frac{C \times E}{D}}$$

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) 又は供試魚体重 (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

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

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

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 ($\mu\text{g/L}$)

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

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 ($\mu\text{g/L}$)

$C_w(n)$: 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) 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 (FBを差し引いた値) (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 ($\mu\text{g/L}$)

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 (個体数又は群数2(a, b))

BCF_a, b : m 回目における各個体又は各群の濃縮倍率

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。（濃縮倍率が100倍未満の場合、濃縮倍率の変動が20%を超えても28日後には定常状態に達しているとみなす。）

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

(1) 第1濃度区

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。

$$BCF_{ss} = \overline{C_{fs}} / C_{ws}$$

BCF_{ss} : 定常状態における濃縮倍率

C_{fs} : 28日後における供試魚中の平均被験物質濃度
(FBを差し引いた値) (ng/g)

C_{ws} : 28日後における試験水中被験物質濃度 (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け (ブランク) 濃度の平均値 (ng/g)

(2) 第2濃度区

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。

(a) 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) (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)

(b) 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)

(c) 定常状態における濃縮倍率の算出

$$BCF_{ss} = \overline{C_{fs}} / \overline{C_{ws}}$$

BCF_{ss} : 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平均被験物質濃度 (μg/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	1.4倍
第2濃度区	16 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77%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	5日後	7日後	11日後	14日後	21日後	28日後	平均 (標準偏差)	Table	Fig.
1	103	90.5	91.0	102	90.7	95.9	95.5 (5.78)	4	6
2	7.76	8.53	8.55	8.60	7.85	7.93	8.20 (0.393)	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12～38倍、第2濃度区において23～45倍であった。

Table-2 濃縮倍率

() 内は平均値

濃度区	7日後	11日後	14日後	21日後	28日後	Table	Fig.
1	23	17	38	30	12	7	9
	30	25	32	28	15		
	(26)	(21)	(35)	(29)	(14)		
2	38	26	23	26	30	8	10
	23	28	37	27	45		
	(30)	(27)	(30)	(27)	(37)		

5.3 定常状態における濃縮倍率

(1) 第1濃度区

5.2の結果から、最後の連続した3回の分析における濃縮倍率（平均）の変動は20%を越えたが、濃縮倍率はすべて100倍未満であったため、28日後には定常状態に達しているとみなした。よって、3.7.10(1)に従って算出し、定常状態における濃縮倍率は14倍となった。

(2) 第2濃度区

5.2の結果から、14、21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、3.7.10(2)に従い、定常状態における濃縮倍率を算出した。

(a) 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、設定値の81%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 $\mu\text{g/L}$)

濃度区	14日後	21日後	28日後	平均	Table	Fig.
2	8.60	7.85	7.93	8.13	5, 8	6

(b) 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32倍であった。

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	2.71%
実験終了後	2.21%

5.6 供試魚の外観観察等

異常は認められなかった。

6. 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	:	東京理化器械製	型 GMW
		日立製作所製	型 L-6000
		島津製作所製	型 LC-10AD
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

ガスクロマトグラフー質量分析計

: 15頁参照

天びん : ザルトリウス社製 型 BP301S
メトラートレド社製

型 PB602

フーリエ変換赤外分光光度計 : 島津製作所製 型 FTIR-8200PC

フーリエ変換核磁気共鳴装置 : 日本電子製 型 JNM-MY60FT

ホモジナイザー（ポリトロン） : キネマチカ社製 型 PT3000

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

N,N-ジメチルホルムアミド : ナカライテスク製 試薬一級

塩化ナトリウム : マナック製 試薬一級

(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
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 (ポリトロン)	:	キネマチカ社製	型 PT3000
		キネマチカ社製	型 PT3100
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)	:	シグマ アルドリッチ ジャパン製	試薬一級