

最終報告書

4,4'-ビス(クロロメチル)ビフェニル (被験物質番号 K-1835) のコイにおける濃縮度試験

(試験番号 : 505171)

2009年3月10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

2009年3月10日

試験責任者



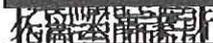
最終報告書

4,4'-ビス(クロロメチル)ビフェニル (被験物質番号 K-1835) のコイにおける濃縮度試験

(試験番号 : 505171)

2009 年 3 月 10 日

財団法人  研究機構





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 4,4-ビス(クロロメチル)ビフェニル (被験物質番号 K-1835) のコイに
おける濃縮度試験

試験番号 505171

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)

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。

2009 年 3 月 10 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 4,4'-ビス(クロロメチル)ビフェニル (被験物質番号 K-1835) のコイに
おける濃縮度試験

試験番号 505171

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	2009年1月16日	2009年1月16日
試験計画書	2009年1月19日	2009年1月19日
試験計画書の変更	2009年1月20日	2009年1月20日
急性毒性試験	2009年1月20日	2009年1月20日
原液調製操作時	2009年1月29日	2009年1月30日
試験水分析操作時	2009年1月27日	2009年1月27日
供試魚分析操作時	2009年1月30日	2009年1月30日
生データ、最終報告書草案	2009年3月6日	2009年3月6日
最終報告書	2009年3月10日	2009年3月10日

2009年3月10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. 急性毒性試験の実施	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	25
6. 考 察	26
7. 備 考	28

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	Calculation table for recovery and blank test (analysis of test water)
Table-4	Calculation table for analysis of test water (Level 1)
Table-5	Calculation table for analysis of test water (Level 2)
Table-6	Calculation table for recovery and blank test (analysis of test fish)
Table-7	Calculation table for analysis of test fish (Level 1)
Table-8	Calculation table for analysis of test fish (Level 2)
Table-9	Calculation table for analysis of test fish (Control)
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 HPLC analysis for calibration curve (analysis of test water)
- Fig. 4-2 Calibration curve of test item (analysis of test water)
- Fig. 5 Chromatograms of HPLC analysis for recovery and blank test (analysis of test water)
- Fig. 6 Chromatograms of HPLC analysis for test water
- Fig. 7-1 Chromatograms of HPLC analysis for calibration curve (analysis of test fish)
- Fig. 7-2 Calibration curve of test item (analysis of test fish)
- Fig. 8 Chromatograms of HPLC analysis for recovery and blank test (analysis of test fish)
- Fig. 9 Chromatograms of HPLC analysis for test fish (Level 1)
- Fig. 10 Chromatograms of HPLC analysis for test fish (Level 2)
- Fig. 11 Chromatograms of HPLC analysis for test fish (Control)
- Fig. 12 UV-VIS spectrum of test item
- Fig. 13-1 IR spectrum of test item measured before experimental start
- Fig. 13-2 IR spectrum of test item measured after experimental completion
- Fig. 14 Mass spectrum of test item
- Fig. 15 NMR spectrum of test item
- Reference 2 Chromatograms of LC-MS/MS analysis (analysis of converted product B)
- Reference 3 Chromatograms of LC-MS/MS analysis (analysis of converted product A)

表 題	4,4'-ビス(クロロメチル)ビフェニル (被験物質番号 K-1835) 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-1835 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、環保企発第 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)

試験日程

試験開始日	2009年1月19日
実験開始日	2009年1月23日
実験終了日	2009年2月20日
試験終了日	2009年3月10日

試験資料の保管

(1) 被験物質

供試試料を保管用容器に入れ密栓後、品質低下を起こさないで安定に保存しうる期間、久留米事業所試料保管室に保管する。

(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

2009年3月10日

試験責任者

要 約

試験の表題

4,4'-ビス(クロロメチル)ビフェニル (被験物質番号 K-1835) 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	28日間
ばく露方法	連続流水式
分析方法	高速液体クロマトグラフィー

試験結果

96時間 LC ₅₀ 値	0.973 mg/L
濃縮倍率	第1濃度区 5.0倍以下 第2濃度区 48倍以下

1. 被験物質

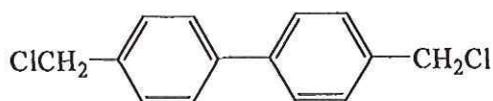
本報告書において K-1835 は、次の名称等を有するものとする。

1.1 名 称

4,4'-ビス(クロロメチル)ビフェニル

1.2 構造式等

構造式



分子式 $C_{14}H_{12}Cl_2$

分子量 251.15

CAS 番号 1667-10-3

1.3 供給者、商品名及びロット番号^{*1}

供給者	████████████████████
商品名	4,4'-Bis(chloromethyl)biphenyl
ロット番号	████████

1.4 純 度^{*1}

被験物質	95.6% (GC による。)
不純物	残り 4.4%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 対水溶解度

20.1 µg/L (カラム溶出法, 20°C ; 当機構測定データ)

1.6 被験物質の確認

被験物質の赤外吸収スペクトル (Fig. 13 参照) は、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。また、質量スペクトル (Fig. 14 参照) 及び核磁気共鳴スペクトル (Fig. 15 参照) により構造を確認した。

1.7 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. 13 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、試験条件下で設定値の 50~60%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 0102-2008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 2008年4月14日

じゅん化開始日 2008年8月20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63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87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）50 mg/L と塩化ナトリウム 6 g/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 6 g/L の薬浴を24時間実施した。

(4) 体重

平均 0.22 g

(5) 全長

平均 3.0 cm

(6) 感受性試験

同一ロット（TFO-080818）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 LC_{50} 値は 0.642 mg/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 2009 年 1 月 14 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

アセトン
HCO-40

(2) 調製方法

試験区

供試試料をアセトンに超音波を照射して溶解し、供試試料の 10 倍量の HCO-40 を加えた後、アセトンで定容し、被験物質濃度として 2.00 g/L の原液を調製した。

2.5 試験条件

(1) 試験濃度

1.50 mg/L、0.750 mg/L、0.375 mg/L 及び対照区

(2) 試験水槽

円形ガラス製水槽

(3) 試験液量

4 L/濃度区

(4) 供試魚数

10 尾/濃度区

(5) 試験温度

ばく露開始時 24.2°C

換水前 25.0°C

(6) 溶存酸素濃度

ばく露開始時 8.2 mg/L

換水前 6.9~7.0 mg/L

(7) pH

ばく露開始時 8.0

換水前 8.0

(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 2009年1月19日 ~ 2009年1月23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 0.973 mg/L (Fig. 3 参照)

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 〒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 2008年6月15日

じゅん化開始日 2008年11月13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33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36日間じゅん化した。

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

(4) 全 長

6.0~9.1 cm

(5) ロ ッ ト

TFC-081111

(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

70 L 容ガラス製水槽

(3) 試験水量

原液 0.2 mL/分及び試験用水 2000 mL/分の割合で 2880 L/日を試験水槽に供した。

(4) 原液タンク

3 L 容ガラス製褐色びん

交換頻度 1~2 回/週

(5) 試験温度

第 1 濃度区 25.0~25.3°C

第 2 濃度区 24.5~25.0°C

対 照 区 25.0°C

(6) 溶存酸素濃度

第 1 濃度区 6.9~7.8 mg/L

第 2 濃度区 7.0~7.8 mg/L

対 照 区 7.0~7.7 mg/L

(7) pH

第1濃度区	7.6、7.8
第2濃度区	7.6、7.8
対 照 区	7.7、7.8

(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（実験開始時）
対 照 区	20尾（実験開始時）

(10) ばく露期間

28日間

理由：28日間で定常状態に達したため。

(11) 実施場所

アクアトロン室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100 mg/Lの原液を調製した。

第2濃度区

第1濃度区で調製した被験物質溶液をアセトンで希釈して、被験物質濃度として10.0 mg/Lの原液を調製した。

対照区

HCO-40をアセトンに溶解して、HCO-40濃度として1000 mg/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2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高速液体クロマトグラフィー（HPLC）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回当たりの分析試料は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回当たりの採取尾数は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実験終了後に行い、1回当たりの採取尾数は4尾とし、2群（2尾1群）に分けて分析した。また、脂質含量測定用として別途6尾を取り上げ、3群（2尾1群）に分けて測定した。

*2 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 分析試料の前処理法

(1) 試験水中の被験物質

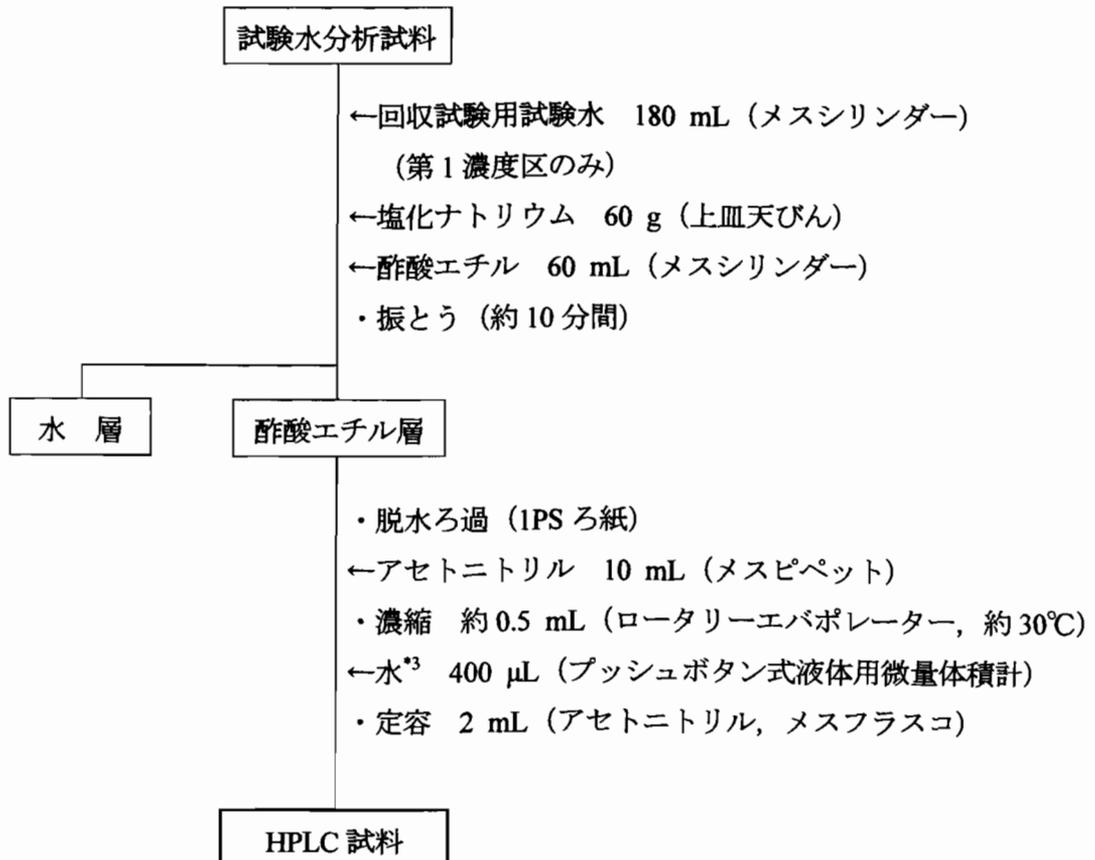
試験水槽から

第1濃度区 20 mL

第2濃度区 200 mL

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（HPLC）試料とした。

フロースキーム

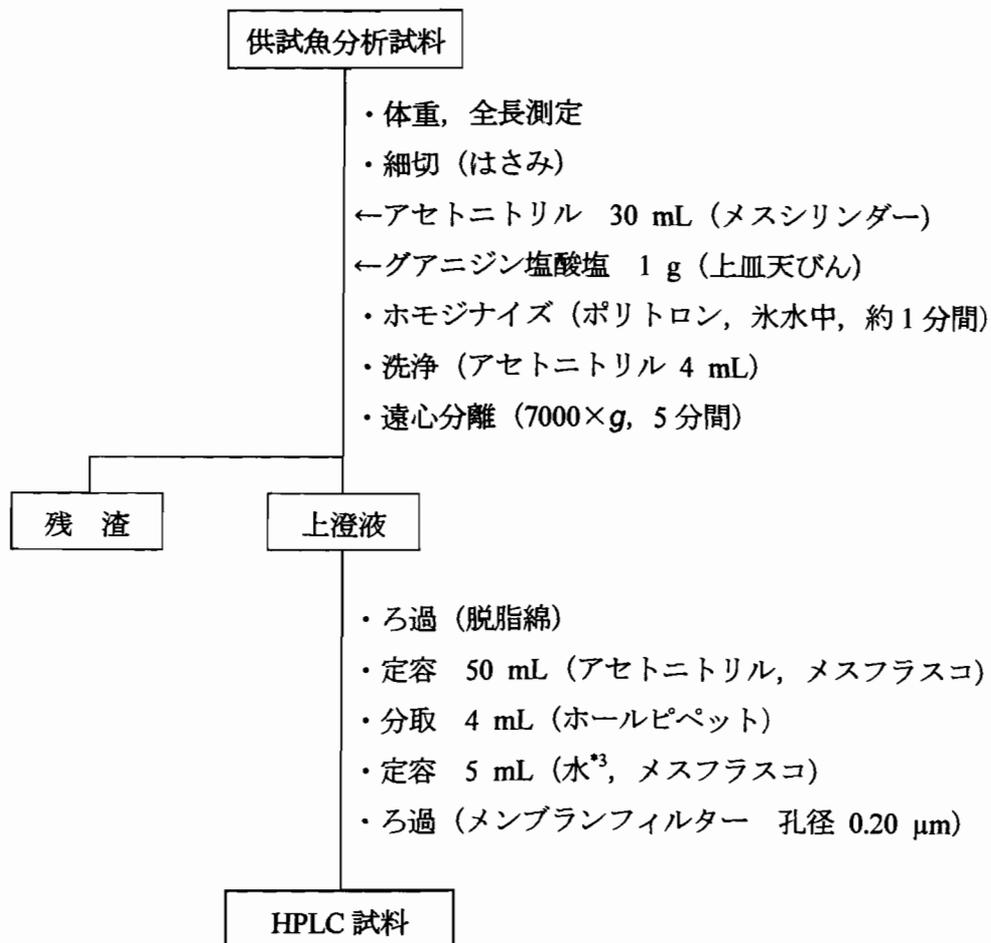


*3 水道水を超純水製造システムで処理した水。

(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、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）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 HPLC 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により被験物質を分析した。HPLC 試料中の被験物質濃度は、標準溶液及び HPLC 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 (Tables-4, 5, Fig. 6, Tables-7, 8, 9, Figs. 9, 10, 11 参照)。

(1) 定量条件

機 器	高速液体クロマトグラフ
ポ ン プ	島津製作所製 LC-20AD
紫外可視分光検出器	島津製作所製 SPD-20AV
カラムオープン	島津製作所製 CTO-20A
オートインジェクター	島津製作所製 SIL-20AC _{HT}
システムコントローラー	島津製作所製 CBM-20Alite
デガッサー	島津製作所製 DGU-20A ₃
カ ラ ム	L-column ODS (化学物質評価研究機構製) 15 cm × 2.1 mm I.D.
カ ラ ム 温 度	40℃
溶 離 液	A 液 (45%) : 水 ^{*3} B 液 (55%) : アセトニトリル
流 量	0.2 mL/min
測 定 波 長	264 nm (Fig. 12 参照)
注 入 量	10 µL
検 出 器 出 力	2 V/AU

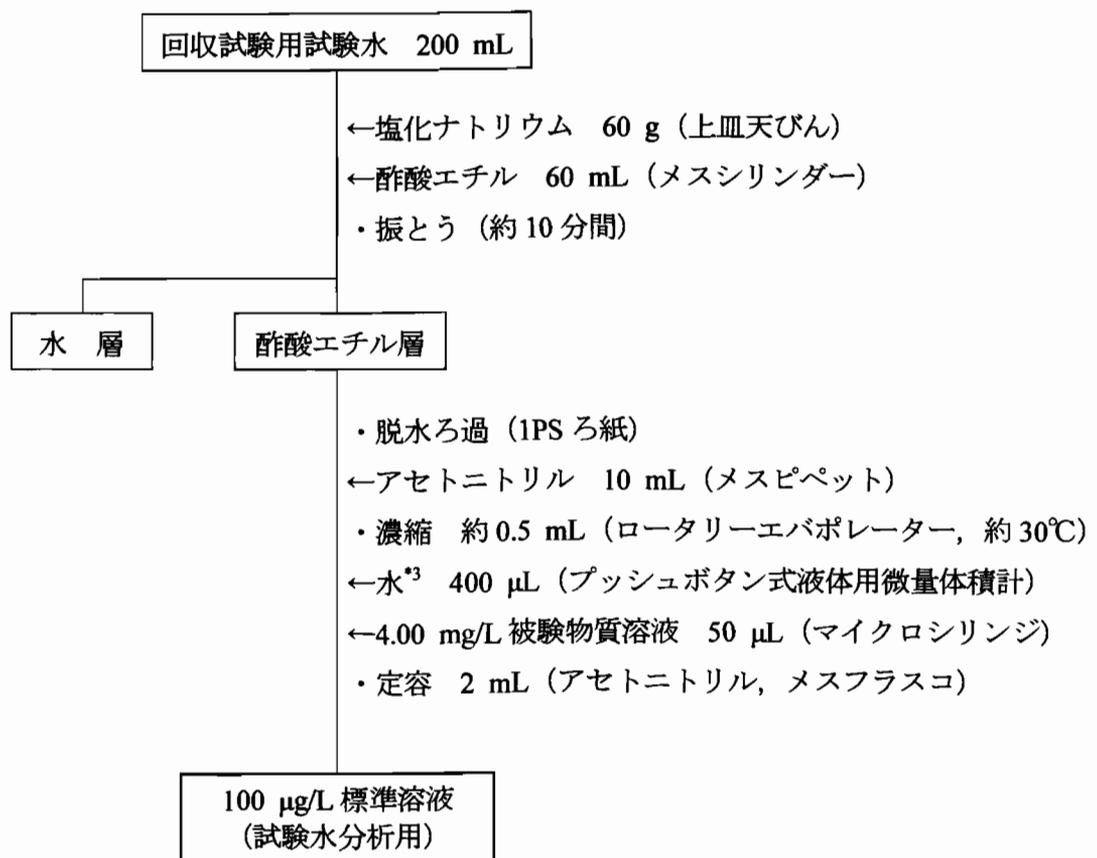
(2) 標準溶液の調製

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 100 mg を正確にはかりとり、テトラヒドロフランに溶解して 1000 mg/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で希釈して 40.0 mg/L の被験物質溶液を調製した。これをアセトニトリルで希釈して 4.00 mg/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 µg/L の標準溶液とした。

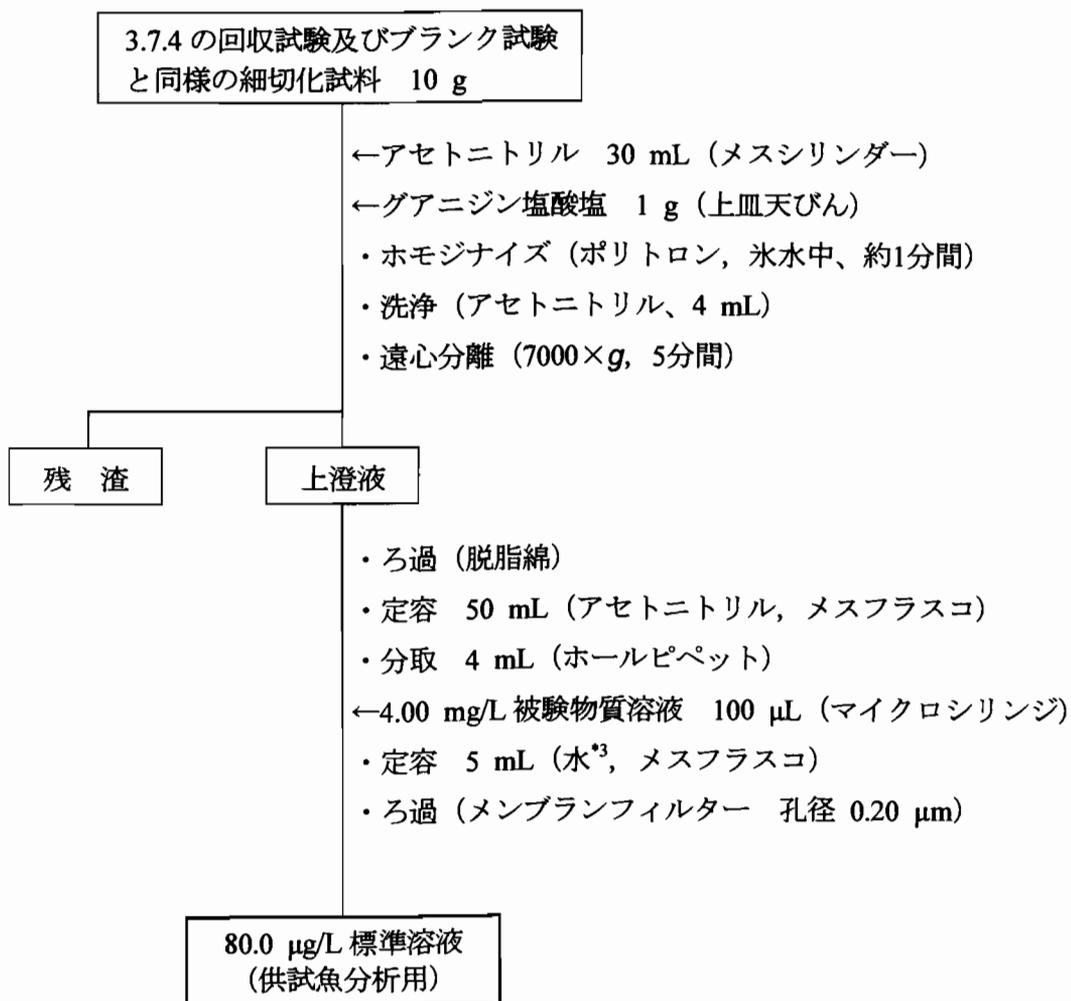
フロースキーム



(b) 供試魚分析

供試試料 100 mg を正確にはかりとり、テトラヒドロフランに溶解して 1000 mg/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で希釈して 40.0 mg/L の被験物質溶液を調製した。これをアセトニトリルで希釈して 4.00 mg/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、80.0 $\mu\text{g/L}$ 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 1000 $\mu\text{V} \cdot \text{sec}$ (被験物質濃度 3.3 $\mu\text{g/L}$) 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 40.0、80.0 及び 160 $\mu\text{g/L}$ 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 1000 $\mu\text{V} \cdot \text{sec}$ (被験物質濃度 3.2 $\mu\text{g/L}$) 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 (10 g) 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。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 (Tables-3, 6, Figs. 5, 8 参照)。

分析操作における回収率

試験水分析 (被験物質 200 ng 添加)

96.9%, 99.7% 平均 98.3%

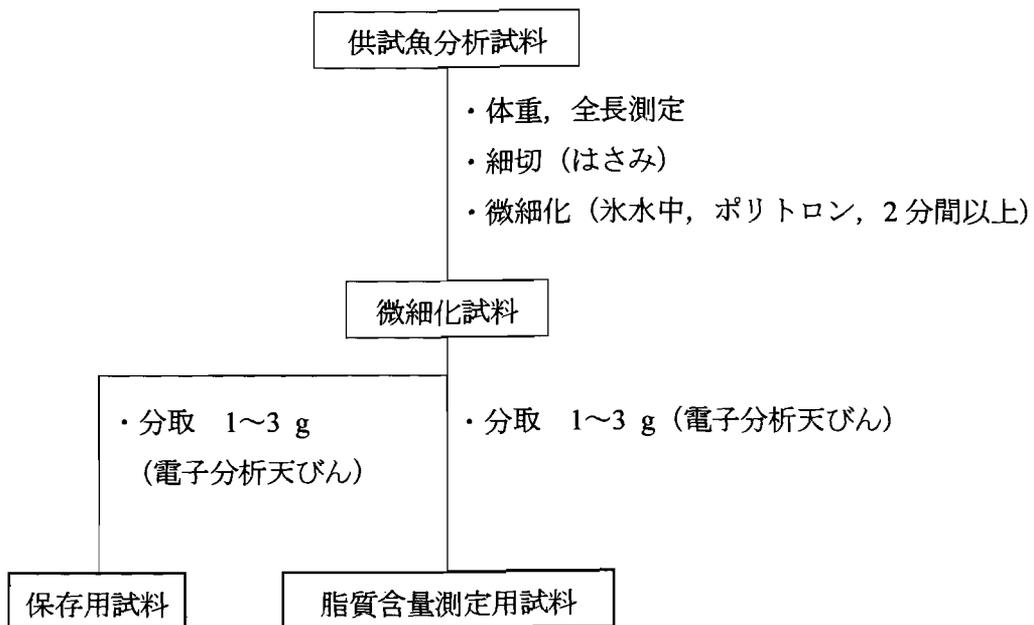
供試魚分析 (被験物質 5000 ng 添加)

70.1%, 70.5% 平均 70.3%

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、脂質含量の測定用試料とした。これ以降の操作はクロロホルム/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

Tables-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 0.33 µg/L

第2濃度区 0.033 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

濃縮性が認められる場合、Tables-7, 8, 9 の計算式に従って計算するが、被験物質の測定値は定量下限以下であった。

(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は供試魚体重を 10 g としたとき 29 ng/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

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

- $\overline{C_w}$: 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

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

- 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 (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。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 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	5.0 倍
第2濃度区	48 倍

3.7.11 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 51%~62%であった。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	4日後	7日後	13日後	20日後	25日後	28日後	平均 (標準偏差)	Table	Fig
1	6.17	5.91	5.97	5.67	5.68	5.08	5.75 (0.379)	4	6
2	0.611	0.608	0.610	0.580	0.594	0.586	0.598 (0.0133)	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 5.0 倍以下、第 2 濃度区において 48 倍以下であった。

Table-2 濃縮倍率

濃度区	7日後	13日後	20日後	25日後	28日後	Table	Fig
1	≤ 5.0	7	9				
	≤ 5.0						
2	≤ 48	8	10				
	≤ 48						

5.3 定常状態における濃縮倍率

5.2の結果から、最後の連続した3回の分析においてすべて不検出であったため、定常状態における濃縮倍率は算出できなかった。しかし、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。

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	4.11%
実験終了後	4.51%

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

6.1 試験濃度について

被験物質の96時間LC₅₀値は0.973 mg/Lであったが、被験物質の水中安定性から、第1濃度区の試験濃度をLC₅₀値の1/100を超える10μg/Lで実施した。そこで、上記設定濃度による試験への信頼性と完全性に及ぼす影響を下記のとおり検討した。

ばく露期間中の第1濃度区の供試魚体重は第2濃度区と比較して、大きな差が認められなかった。さらに、試験期間中の供試魚観察においても、供試魚への異常等は認められなかった。以上のことから、上記の試験濃度において、被験物質による供試魚への生理的影響はなかったと考えられ、試験の信頼性と完全性に及ぼす影響はないと判断した。

実験期間中の供試魚体重 (g)

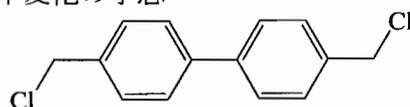
	7日後	13日後	20日後	25日後	28日後
第1濃度区	5.08	5.90	6.33	6.10	6.99
	4.84	5.69	5.86	7.08	6.51
	5.73	5.69	6.83	6.40	5.81
	5.46	5.69	6.50	5.72	7.30
第2濃度区	4.54	5.60	6.23	6.15	6.46
	5.97	5.49	6.92	6.21	6.56
	5.26	5.68	6.28	6.93	6.53
	5.62	5.62	6.62	7.26	6.48

6.2 試験水中の被験物質の存在形態

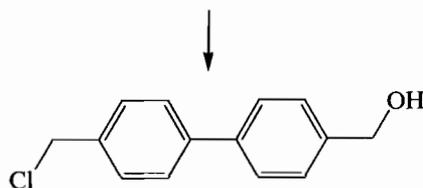
被験物質の水中の安定性については、試験原液に使用する助剤、溶媒及び試験水の種類を検討し、被験物質が最も安定であった本試験条件を採用した。また、試験水の換水率を上げる目的で、試験水の流速を設備で可能な最大流量で行った。しかしながら、試験水中の被験物質濃度は試験期間中に変動は認められなかったものの、第1濃度区で設定値の51～62%、第2濃度区で設定値の58～61%であった。

予備検討で実施した、供試魚なしの試験条件下での水中安定性の確認においても、試験水中の被験物質濃度は、本試験と同様の傾向を示した。また、試験水の前処理操作では被験物質の良好な回収率が得られたこと、及び試験原液中の被験物質濃度は安定であったことから、試験水中の被験物質濃度の低下の原因は、供試魚による被験物質の取込みではなく、試験水中において被験物質が一部加水分解すると予想された（下記参照）。そこで、試験水中の変化物の確認を下記のとおり行った。

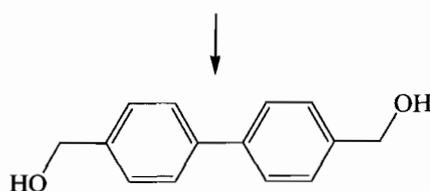
被験物質の水中変化の予想



被験物質；4,4'-ビス(クロロメチル)ビフェニル (log Kow=5.36)



変化物A；4,4'-クロロメチルビフェニルメタノール (log Kow=3.64)



変化物B；4,4'-ビフェニルジメタノール (log Kow=2.33)

(1) 変化物 B の生成確認

被験物質は水中で脱クロル化により水酸化体である 4,4'-ビフェニルジメタノール（変化物 B）の生成が予想された。そこで、変化物 B の標品を入手し、被験物質と同様の前処理操作で変化物 B が回収できることを確認した後、試験水中の変化物 B の生成の確認を LC-MS/MS を用いて実施した。その結果、第1濃度区の試験水を前処理して濃縮した試料（試料 A とする）から、被験物質濃度に換算して 0.054 µg/L の変化物 B の生成が確認された。しかしながら、第1濃度区の試験水中の被験物質濃度は 51%～62% (5.08～6.17 µg/L) であることから、変化物 B の生成が試験水中の被験物質濃度の低下の大きな原因ではないと考えられた（Reference 2 参照）。

(2) 変化物 A の生成確認

4,4'-クロロメチルビフェニルメタノールについては、被験物質と変化物 B の中間体として水中に存在することが予想されたが、その標品の入手が困難であったため、下記のとおり検討を行った。

被験物質、変化物 A 及び変化物 B の log Kow (KOWWIN ver.1.67 より算出) はそれぞれ、5.36、3.64 及び 2.33 であることから、変化物 A はクロマトグラム上において、変化物 B (溶出時間 12.0 分) と被験物質 (溶出時間 19.9 分) の間に溶出されることが予想された。そこで、「(1)変化物 B の生成確認」中の試料 A 及び試験水ブランク試料について、LC-MS によるスキャン分析を行い、クロマトグラム上の 12.0 分から 19.9 分間の MS スペクトルを比較することで、変化物 A の生成の有無を確認した。その結果、試料 A から、変化物 A 由来と考えられる顕著なピークは検出されなかった (Reference 3 参照)。

以上のことから、試験水中で被験物質は一部加水分解し、1%程度の 4,4'-ビフェニルジメタノール (変化物 B) が生成するものの、中間体である 4,4'-クロロメチルビフェニルメタノール (変化物 A) の生成も確認されないことから、被験物質濃度低下の大きな原因は特定できなかった。

6.3 供試魚中の被験物質の存在形態

供試魚への被験物質の濃縮性は認められなかったことから、被験物質は魚体内においても、速やかに脱ハロゲン化し、種々の抱合体となって排泄されると推測される。

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	:	フロム製	型 301M
デガッサー	:	フロム製	型 702
	:	フロム製	型 152
溶存酸素測定装置	:	飯島電子工業製	型 ID-100
pH 計	:	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

高速液体クロマトグラフ	:	16 頁参照	
天びん	:	ザルトリウス製	型 LP4200S
		ザルトリウス製	型 BP301S
		ザルトリウス製	型 CP324S
		メトラー・トレド製	型 XP205
		エー・アンド・ディ製	型 FA-2000
		エー・アンド・ディ製	型 GF-2000
フーリエ変換赤外分光光度計	:	島津製作所製	型 IRPrestige-21
紫外可視分光光度計	:	日本分光製	型 V-650
フーリエ変換核磁気共鳴装置	:	日本電子製	型 JNM-MY60FT
液体クロマトグラフー質量分析計			
質量分析計	:	Waters 製	型 Quattro Premier XE
液体クロマトグラム	:	Waters 製	型 ACQUITY UPLC
ロータリーエバポレーター	:	東京理化学器械製	型 N-1000K2
振とう機	:	タイテック製	型 SR-2DW
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
超音波洗浄器	:	エスエヌディ製	型 US-105

特殊器具

メンブランフィルター	:	アドバンテック製 DISMIC-25HP(PTFE) 孔径 0.20 μm
------------	---	--

試 薬

アセトニトリル	:	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
アセトニトリル	:	ナカライテスク製	試薬一級
アセトン	:	和光純薬工業製	試薬一級
テトラヒドロフラン	:	和光純薬工業製	試薬一級
酢酸エチル	:	関東化学製	試薬一級
塩化ナトリウム	:	マナック製	試薬一級
ぎ酸	:	和光純薬工業製	試薬特級
HCO-40	:	日光ケミカルズ製	
グアニジン塩酸塩	:	和光純薬工業製	試薬特級
4,4'-ビフェニルジメタノール	:	和光純薬工業製	

(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 DA-20D
	真空機工製	型 DAH-20C
	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