

最終報告書

N,N-ビス(2-ヒドロキシエチル)オレアミド (被験物質番号 K-2052) のコイにおける濃縮度試験

(試験番号 : 505235)

2012 年 3 月

一般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。
一般財団法人 化学物質評価研究機構 久留米事業所
2012 年 3 月 12 日
試験責任者

陳 述 書

一般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 *N,N*-ビス(2-ヒドロキシエチル)オレアミド (被験物質番号 K-2052) のコイに
おける濃縮度試験

試験番号 505235

上記試験は以下の GLP に従って実施したものである。

「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について」(平成 23 年 3 月
31 日、薬食発 0331 第 8 号、平成 23・03・29 製局第 6 号、環企発第 110331010 号) に定める
「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」

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
した。

2022 年 3 月 12 日

試験責任者

—  —

信頼性保証書

一般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 *N,N*-ビス(2-ヒドロキシエチル)オレアミド (被験物質番号 K-2052) の
コイにおける濃縮度試験

試験番号 505235

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する。

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	2012年1月19日	2012年1月19日
試験計画書	2012年1月20日	2012年1月20日
試験水分析回収試験	2012年1月24日	2012年1月24日
供試魚分析回収試験	2012年1月24日	2012年1月24日
急性毒性試験	2012年1月24日	2012年1月24日
原液調製操作時	2012年1月27日	2012年1月30日
試験水分析操作時	2012年1月30日	2012年1月30日
供試魚分析操作時	2012年2月3日	2012年2月3日
試験計画書からの逸脱1	2012年2月29日	2012年2月29日
試験計画書の変更1	2012年3月6日	2012年3月6日
生データ、最終報告書草案	2012年3月8日	2012年3月8日
生データ、最終報告書草案再 査察	2012年3月9日	2012年3月9日
最終報告書	2012年3月12日	2012年3月12日

2012年3月12日

信頼性保証部門責任者

目 次

	頁
1. 表 題	6
2. 試験委託者	6
3. 試験施設	6
4. 試験目的	6
5. 試験法	6
6. GLP 基準	6
7. 試験日程	6
8. 試資料の保管	7
9. 試験関係者	7
10. 最終報告書の承認	7
11. 要 約	8
12. 試験材料	9
12.1 被験物質	9
12.2 分散剤	10
12.3 供試魚	10
13. 急性毒性試験の実施	11
13.1 試験方法	11
13.2 感受性試験	11
13.3 試験用水	11
13.4 原液調製法	11
13.5 試験条件	12
13.6 試験の実施	12
13.7 96 時間 LC ₅₀ 値の算出	12
13.8 試験結果	12
14. 濃縮度試験の実施	12
14.1 試験用水	12
14.2 試験及び環境条件	12
14.3 原液調製法	13
14.4 試験濃度	13
14.5 観察、測定及び清掃	13
14.6 試験水及び供試魚の分析	13
14.7 試験結果の算出法	20
14.8 数値の取扱い	22
15. 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	22
16. 試験計画書から逸脱した事項	22
17. 試験結果及び考察	23
17.1 試験水中の被験物質濃度	23

17.2	濃縮倍率.....	23
17.3	定常状態における濃縮倍率.....	23
17.4	供試魚の脂質含量.....	24
17.5	供試魚の外観観察等.....	24
17.6	考 察.....	24
18.	備 考.....	24

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	Calculation table for recovery and blank test (analysis of test water)
Table-6	Calculation table for analysis of test water (Level 1)
Table-7	Calculation table for analysis of test water (Level 2)
Table-8	Calculation table for recovery and blank test (analysis of test fish)
Table-9	Calculation table for analysis of test fish (Level 1)
Table-10	Calculation table for analysis of test fish (Level 2)
Table-11	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 LC-MS/MS analysis for calibration curve (analysis of 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 (analysis of 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	Mass spectrum of LC-MS analysis for test item
Fig. 13	Mass spectrum of LC-MS/MS analysis for test item
Fig. 14-1	IR spectrum of test item measured before experimental start
Fig. 14-2	IR spectrum of test item measured after experimental completion

1. 表 題

N,N-ビス(2-ヒドロキシエチル)オレアミド (被験物質番号 K-2052) のコイにおける濃縮度試験

2. 試験委託者

名 称 経済産業省
住 所 〒100-8901 東京都千代田区霞が関一丁目3番1号

3. 試験施設

名 称 一般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

4. 試験目的

K-2052 のコイにおける濃縮性について知見を得る。

5. 試験法

「新規化学物質等に係る試験の方法について」(平成23年3月31日、薬食発0331第7号、平成23・03・29製局第5号、環保企発第110331009号)に定める「魚介類の体内における化学物質の濃縮度試験」

ただし、一部試験法から逸脱した。逸脱の内容については「15. 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」に記した。

6. GLP 基準

「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23年3月31日、薬食発0331第8号、平成23・03・29製局第6号、環保企発第110331010号)に定める「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」

7. 試験日程

試験開始日	2012年1月20日
実験開始日	2012年1月27日
実験終了日	2012年2月24日
試験終了日	2012年3月12日

8. 試資料の保管

試験計画書（正本）、最終報告書（正本）、生データ及びその他の記録、並びに被験物質は当試験施設に保管する。

保管期間は試験委託者から通知を受けるまでの期間とする。なお、保管期間中の被験物質の安定性は確認しない。

保管期間終了後の処置（継続保管、廃棄又は返却）は、試験委託者と協議の上決定する。

9. 試験関係者

試験責任者

試験担当者（濃縮度試験の実施）

試験担当者（急性毒性試験の実施）

飼育管理責任者

所属 試験第二課

10. 最終報告書の承認

2012年3月12日

試験責任者

11. 要 約

試験条件

a) 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 (24 時間毎に換水)

b) 濃縮度試験

供試魚	コイ
試験濃度	第 1 濃度区 84.8 µg/L 第 2 濃度区 8.48 µg/L
試験温度	第 1 濃度区 24.0~24.1°C 第 2 濃度区 23.9~24.0°C 対照区 23.8~24.0°C

ただし、ばく露 17 日後 (2012 年 2 月 13 日) においては、全ての試験区において、およそ 6 時間 (17 時~23 時) にわたって、設定温度 (25±2°C 未満) の範囲である 23°C を下回り、最大で 21°C まで低下した。

ばく露期間	28 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

a) 急性毒性試験

96 時間 LC₅₀ 値 >15.3 mg/L

b) 濃縮度試験

	定常状態における濃縮倍率
第 1 濃度区	150 倍
第 2 濃度区	190 倍

12. 試験材料

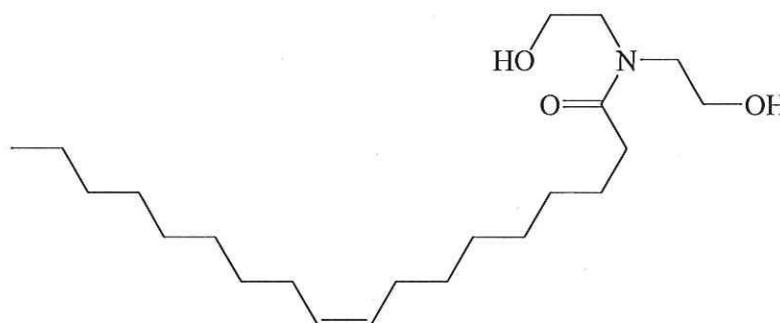
12.1 被験物質

a) 名称等

名称	<i>N,N</i> -ビス(2-ヒドロキシエチル)オレアミド
被験物質番号	K-2052
CAS 番号	93-83-4

b) 構造式等

構造式



分子式	$C_{22}H_{43}NO_3$
分子量	369.57

c) 供試試料

被験物質純度	84.8% (当試験施設測定データ)
不純物	不明 5 成分 15.2% (当試験施設測定データ)
供給者	[REDACTED]
商品名	[REDACTED]
ロット番号	[REDACTED]
被験物質は純度で補正して取り扱った。	

d) 物理化学的性状

対水溶解度	>848 mg/L (目視)
-------	----------------

e) 保管条件

室温暗所保管した。

f) 被験物質の同一性及び保管条件下における安定性の確認

当試験施設において被験物質の赤外吸収スペクトル及び質量スペクトルにより構造を確認した (Figs. 12, 13 及び 14 参照)。また、実験開始前及び終了後の赤外吸収スペクトルを比較することにより、保管条件下における被験物質の安定性を確認した (Fig. 14 参照)。

g) 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。

h) 取扱い上の注意

手袋、マスク、保護めがね及び白衣を着用し、皮膚、目への接触及び吸入を避けた。

12.2 分散剤

急性毒性試験及び濃縮度試験の原液調製に下記の分散剤を使用した。

12.2.1 HCO-40

a) 名称等

商品名 NIKKOL HCO-40
CAS 番号 61788-85-0

b) 供給者

供給者 日光ケミカルズ

12.2.2 ジメチルスルホキシド

a) 名称等

商品名 ジメチルスルホキシド
CAS 番号 67-68-5

b) 供給者及び等級

供給者 ナカライテスク
等級 試薬一級

12.3 供試魚

a) 急性毒性試験

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
供給源 一般財団法人化学物質評価研究機構 久留米事業所
ロット TFO-111109
体重 0.20～0.28 g
全長 2.9～3.2 cm

b) 濃縮度試験

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やすいため
供給源 一般財団法人化学物質評価研究機構 久留米事業所
じゅん化条件 水産用 OTC (塩酸オキシテトラサイクリン 共立製薬) 及び塩化ナトリウム (塩事業センター) を用いて薬浴した後に、以下の条件でじゅん化した。
期間 30 日間
水温 25±2℃未満
じゅん化期間中の全体の死亡率は 5%未満であった。
ロット TFC-111201
全長 6.1～8.5 cm (実験開始時 6.1～7.1 cm)
年齢 当歳魚

餌料	種類	こい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
	給餌方法	供試魚体重の約3%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。

13. 急性毒性試験の実施

13.1 試験方法

JIS K 0102-2010 の 71.の方法に準じて行った。

13.2 感受性試験

同一ロットの供試魚による基準物質ペンタクロロフェノールナトリウム [PCP-Na CAS 番号 131-52-2 東京化成工業 ロット番号 GE01] の 48 時間 LC₅₀ 値は 0.669 mg/L であった。

13.3 試験用水

a) 種類

久留米事業所敷地内で揚水した地下水

b) 水質確認

試験用水の水質については 2012 年 1 月 11 日に採水し、測定を行った結果を Reference 1 に示した。試験用水は、測定した 41 項目のうち、アルカリ度及び電気伝導度を除く 39 項目について、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, No.210, July 17, 1992, "Fish, Early-life Stage Toxicity Test"
- 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, No.305, June 14, 1996, "Bioconcentration : Flow-through Fish Test"

13.4 原液調製法

供試試料をジメチルスルホキシドに溶解した後、供試試料の 20 倍量の HCO-40 を加え、ジメチルスルホキシドを用いて、4.24 g/L の原液を調製した。

13.5 試験条件

試験濃度	15.3 mg/L、8.48 mg/L 及び対照区
試験水槽	円形ガラス製水槽
試験液量	4 L/濃度区
供試魚数	10 尾/濃度区
試験温度	ばく露開始時 24.1°C 換水前 (1 回目) 24.3°C
溶存酸素濃度	ばく露開始時 8.0 mg/L 換水前 (1 回目) 7.4~7.9 mg/L
pH	ばく露開始時 8.1 換水前 (1 回目) 8.1
ばく露期間	96 時間
ばく露方法	半止水式 (24 時間毎に換水)
ばっ気	ばく露期間中、連続してエアレーションを行った。
照光時間	16 時間明/8 時間暗 (白色蛍光灯による人工照明)

13.6 試験の実施

実施場所	アクアトロン室 B
試験実施日	2012 年 1 月 23 日 ~ 2012 年 1 月 27 日

13.7 96 時間 LC₅₀ 値の算出

試験濃度区で 50%以上の死亡率が得られなかったため、LC₅₀は「>試験濃度」と表示した。

13.8 試験結果

被験物質の 96 時間 LC ₅₀ 値	>15.3 mg/L (Fig. 3 参照)
対照区において、症状は認められなかった。	

14. 濃縮度試験の実施

14.1 試験用水

13.3 に同じ。

14.2 試験及び環境条件

試験水供給方法	久留米事業所組立流水式装置
試験水槽	70 L 容ガラス製水槽
試験水量	原液 0.02 mL/分及び試験用水 800 mL/分の割合で 1152 L/日を試験水槽に供した。
原液タンク	500 mL 容ガラス製褐色びん 交換頻度 1~2 回/週
試験温度	第 1 濃度区 24.0~24.1°C 第 2 濃度区 23.8~24.0°C 対照区 23.8~24.0°C

ただし、ばく露 17 日後 (2012 年 2 月 13 日) においては、全ての試験区において、およそ 6 時間 (17 時~23 時の間) にわたって、設定温度 (25±2°C 未満) の範囲である 23°C を下回り、第 1 濃度区で 21.4°C、第 2 濃度区で 21.5°C 及び対照区で 21.2°C まで低下した。

溶存酸素濃度	第1濃度区	7.5～8.0 mg/L
	第2濃度区	7.6～8.0 mg/L
	対照区	7.5～8.0 mg/L
pH	第1濃度区	7.7, 7.8
	第2濃度区	7.7, 7.8
	対照区	7.8, 7.8
ばっ気	連続してエアレーションを行った。	
照光時間	14時間明/10時間暗（白色蛍光灯による人工照明）	
供試魚数	第1及び第2濃度区	24尾（実験開始時）
	対照区	10尾（実験開始時）
ばく露期間	28日間	
	設定理由	28日間で定常状態に達したため
実施場所	アクアトロン室A	

14.3 原液調製法

1) 第1濃度区

13.4と同様にして被験物質濃度として3390 mg/Lの原液を調製した。

2) 第2濃度区

第1濃度区で調製した3390 mg/Lの被験物質溶液をジメチルスルホキシドで希釈して被験物質濃度として339 mg/Lの原液を調製した。

3) 対照区

HCO-40をジメチルスルホキシドに溶解し、HCO-40濃度として80.0 g/Lの原液を調製した。

14.4 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 84.8 µg/L

第2濃度区 8.48 µg/L

14.5 観察、測定及び清掃

供試魚の観察 1日に2回（休日は1回）観察記録した。

試験水量 1日に1回測定記録した。

試験温度 毎日測定記録した。

溶存酸素濃度 週1回測定記録した。

pH測定 実験開始直後及び終了前の2回測定記録した。

清掃 コイの排泄物等を1日に1回程度除去した。

14.6 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。

14.6.1 分析回数

a) 試験水

試験水分析は第1及び第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。

b) 供試魚

供試魚分析は第1及び第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、脂質含量測定のための保存用試料が十分得られなかったため2群(2尾1群)に分けて行った。

最後の連続した3回の測定では、48時間以上の間隔となるように供試魚を採取し、最後の測定は28日後とした。

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。さらに、両分析において、それぞれ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。

14.6.2 分析試料の前処理法

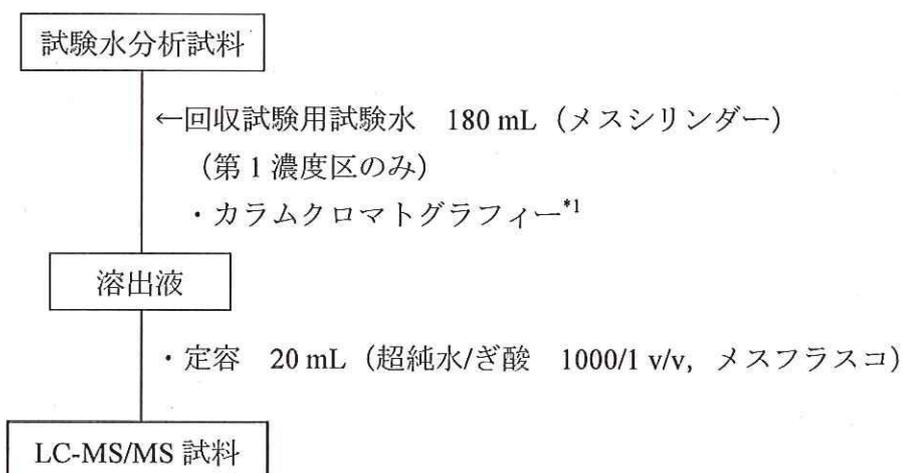
a) 試験水中の被験物質

第1濃度区 20 mL (メスシリンダー)

第2濃度区 200 mL (メスシリンダー)

を試験水槽から採取し、以下のフロースキームにより前処理操作を行い、LC-MS/MS試料とした。

フロースキーム



*1 カラムクロマトグラフの条件

Sep-Pak Plus C₁₈

(洗浄法: メタノール, 超純水 各約 10 mL)

負荷法 全量負荷した。

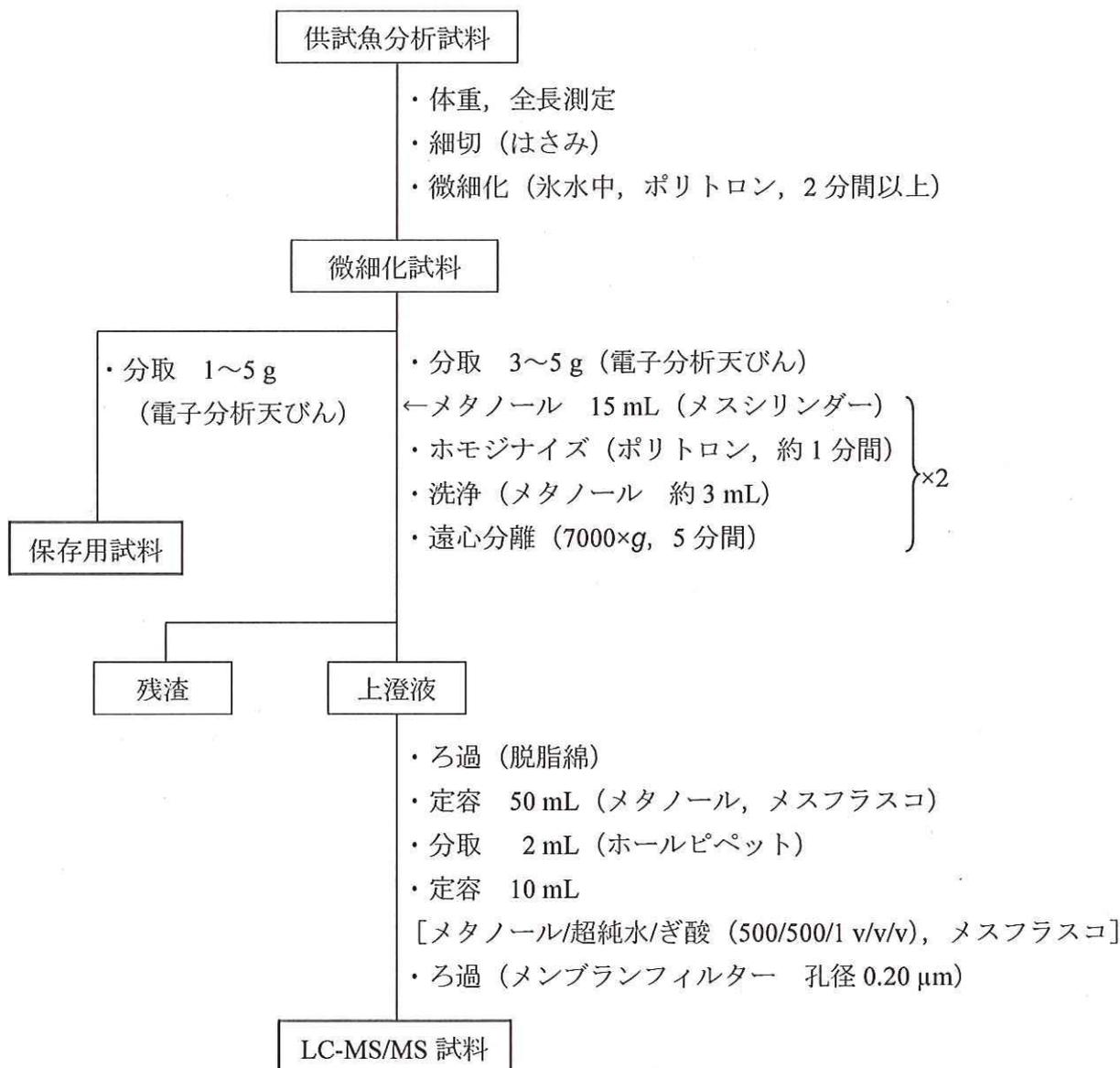
溶出法 溶出液 メタノール/ぎ酸 (1000/1 v/v) 10 mL

溶出液を分析に供した。

b) 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、LC-MS/MS 試料とした。

フロースキーム



14.6.3 被験物質の定量分析

a) 定量方法

被験物質の定量は1濃度の標準溶液を用いた絶対検量線法で行った。

本定量方法の有効性を確認するため、42.4、84.8及び170 µg/Lの3濃度の試験水及び供試魚分析用の標準溶液を用いて検量線を作成した (Figs. 4, 7 参照)。その結果、得られたそれぞれの回帰式が原点を通る直線であったことから有効性が確認された。

b) 分析条件

機 器	液体クロマトグラフー質量分析計
液体クロマトグラフ	ACQUITY UPLC (Waters)
質量分析計	Quattro Premier XE (Waters)

液体クロマトグラフ条件

カラム ACQUITY UPLC BEH C₈
(50 mm × 2.1 mm I.D., 粒子径 1.7 µm, Waters)

カラム温度 40°C

溶離液 A:超純水/ ぎ酸 (1000/1 v/v)
B:メタノール/ ぎ酸 (1000/1 v/v)

グラジエント条件

時間 (min)	A (%)	B (%)
0.0	60	40
1.0	60	40
6.0	5	95
8.0	5	95

流 量 0.3 mL/min

注入量 10 µL (Partial Loop With Needle Overfill)

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	正イオン
検出法	選択反応モニタリング (SRM)
イオン源温度	120°C
脱溶媒システム温度	400°C

プリカーサーイオン (<i>m/z</i>)	プロダクトイオン (<i>m/z</i>)	コーン電圧 (V)	コリジョンエネルギー (eV)
370.3	106.1	30	20
371.3	106.1	30	20

c) 標準溶液の調製及び被験物質濃度の算出

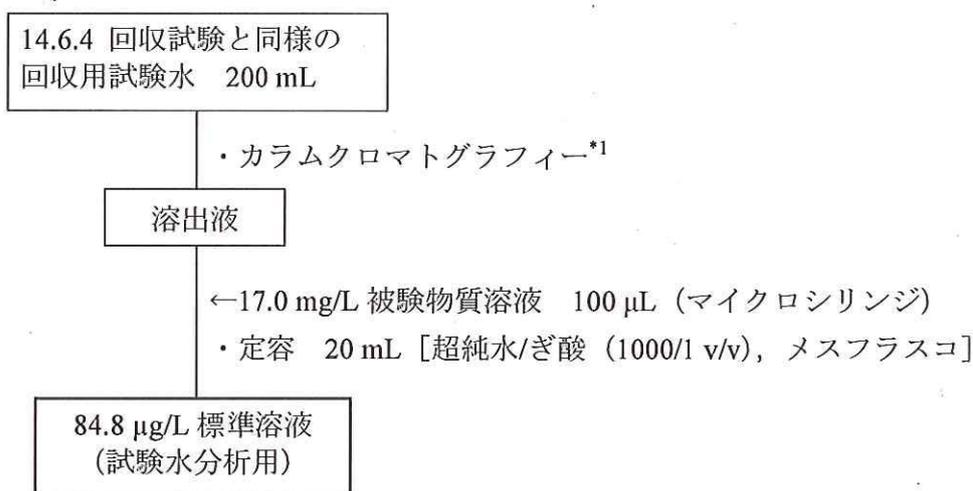
1) 試験水分析

供試試料 100 mg を電子分析天びんで正確にはかりとり、メタノールに溶解して 848 mg/L の被験物質溶液を調製した。これをメタノールで希釈して 17.0 mg/L の被験物質溶液とした。これを用いて以下のフロースキームにより前処理操作を行い、84.8 µg/L の標準溶液を調製した。

LC-MS/MS 試料中の被験物質の濃度は、84.8 µg/L の標準溶液及び 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 (Tables- 6, 7, Fig. 6 参照)。

ピーク面積の定量下限は、ノイズレベルを考慮して 7000 (被験物質濃度 8.4 µg/L) とした (Fig. 4 参照)。

フロースキーム



*1 カラムクロマトグラフの条件

Sep-Pak Plus C₁₈

(洗浄法: メタノール, 超純水 各約 10 mL)

負荷法 全量負荷した。

溶出法 溶出液 メタノール/ぎ酸 (1000/1 v/v) 10 mL

溶出液を分析に供した。

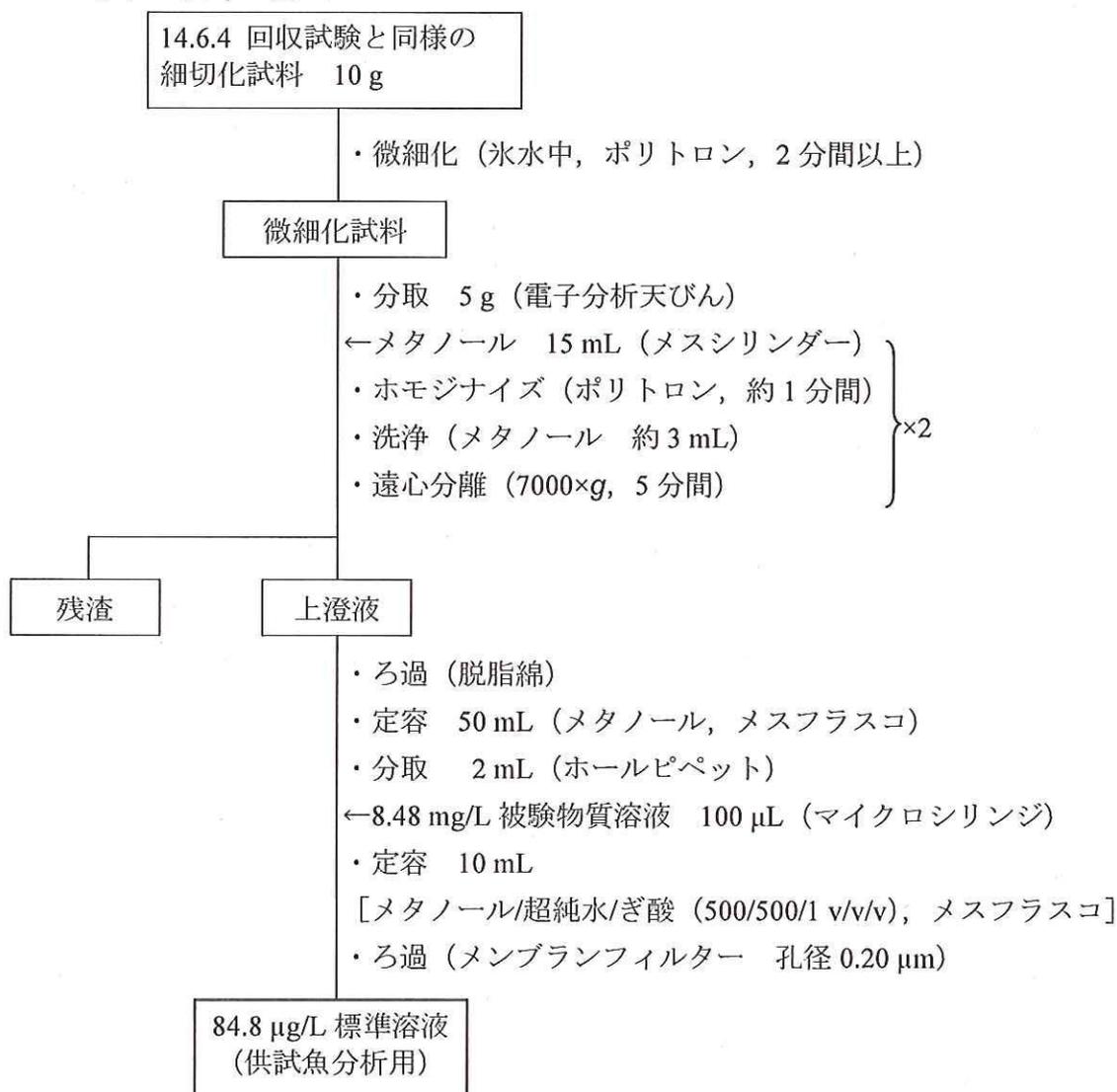
2) 供試魚分析

供試試料 100 mg を電子分析天びんで正確にはかりとり、メタノールに溶解して 848 mg/L の被験物質溶液を調製した。これをメタノールで希釈して 8.48 mg/L の被験物質溶液とした。これを用いて以下のフロースキームにより前処理操作を行い、84.8 $\mu\text{g/L}$ の標準溶液を調製した。

LC-MS/MS 試料中の被験物質濃度は、84.8 $\mu\text{g/L}$ の標準溶液及び 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 (Tables-9, 10, 11, Figs. 9, 10, 11 参照)。なお、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希釈し分析した。

ピーク面積の定量下限は、ノイズレベルを考慮して 3000 (被験物質濃度 3.1 $\mu\text{g/L}$) とした (Fig. 7 参照)。

フロースキーム



14.6.4 回収試験

a) 方法

14.6.2 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。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 5 g 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。

b) 結果

a)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-5, 8、Figs. 5, 8 参照)。

分析操作における回収率

試験水分析

被験物質添加量 (1.70 µg)

= 第 2 濃度区設定濃度 (8.48 µg/L) × 採水量 (200 mL)

添加方法 (17.0 mg/L の被験物質原液を 100 µL)

86.3%, 81.0% 平均 83.6%

供試魚分析

被験物質添加量 (42.4 µg)

= 第 2 濃度区設定濃度 (8.48 µg/L) × 仮定した濃縮倍率 (500 倍) × 魚体重 (10 g)

添加方法 (424 mg/L の被験物質原液を 100 µL)

93.8%, 98.8% 平均 96.3%

14.6.5 供試魚中の脂質含量

実験終了後における供試魚の脂質含量が開始時の±25%以内であるか否かを確認するために、脂質含量の測定は、対照区の保存用試料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。常法に従い、クロロホルム/メタノール抽出操作を行い、脂質含量を測定した。

14.6.6 分析試料中の被験物質濃度の算出及び定量下限

a) 試験水分析試料中の被験物質濃度の算出

Tables-6, 7 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。

b) 試験水中の被験物質定量下限濃度

14.6.3 c) 1)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^{*2}はそれぞれ、

第 1 濃度区 10 µg/L

第 2 濃度区 1.0 µg/L

と算出される。

c) 供試魚分析試料中の被験物質濃度の算出

Tables-9, 10, 11 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。

d) 供試魚中の被験物質定量下限濃度

14.6.3 c) 2) 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*2は供試魚微細化試料を5gとしたとき160 ng/gと算出される。

$$*2 \text{ 被験物質定量下限濃度 (}\mu\text{g/L 又は ng/g)} = \frac{A}{\frac{B}{100} \times \frac{C \times E}{D}}$$

A : 検量線上定量下限濃度 ($\mu\text{g/L}$)

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。

14.7 試験結果の算出法

14.7.1 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

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

\overline{Cw} : 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)

Cw(1) : 1回目の試験水中被験物質濃度 ($\mu\text{g/L}$)

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

14.7.2 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。

a) 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

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

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

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

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

b) 濃縮倍率の算出

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

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

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)

c) m 回目の濃縮倍率の平均値

$$BCFm = (BCFa + BCFb) / n$$

BCFm : m 回目の濃縮倍率の平均値 (群数 2(a,b))

BCFa,b : m 回目における各群の濃縮倍率

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。

14.7.3 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： $V(m-2), V(m-1), V(m) \leq 20$ (%)

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

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

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

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

$\text{BCF}(m-2), \text{BCF}(m-1), \text{BCF}(m)$: $m-2, m-1, m$ 回目における群数 n の濃縮倍率の平均値
 $\overline{\text{BCF}}$: $\{\text{BCF}(m-2) + \text{BCF}(m-1) + \text{BCF}(m)\} / 3$

14.7.4 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。

- 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

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

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

$Cw(n)$: 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 ($\mu\text{g/L}$)

- 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

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

\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 (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

$$\text{BCFss} = \overline{Cfs} / \overline{Cws}$$

BCFss : 定常状態における濃縮倍率

\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の平均被験物質濃度 ($\mu\text{g/L}$)

14.7.5 算出可能な濃縮倍率

14.6.6 d) で求めた供試魚中の被験物質定量下限濃度より、下記の倍率以上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 Table-1 に示した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 1.8 倍

第 2 濃度区 19 倍

14.7.6 脂質含量の算出法

脂質含量は次式により求めた。

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

T_0 : 容器の質量 (g)

T : 容器を含む脂質重量のひょう量値 (g)

S : 供試魚微細化試料の分取量 (g)

14.8 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。

15. 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

2012 年 2 月 13 日に希釈水温度制御のため温水の循環が停止した。その結果、ばく露 17 日後の試験水温がおよそ 6 時間 (17 時～23 時) にわたって、設定温度 (25±2℃未満) の範囲である 23℃を下回り、最大で 21℃まで低下し、設定温度の±2℃未満から逸脱した。

なお、試験水温低下がみられた期間において、外観観察による魚の異常等は認められず、被験物質の試験水中での析出等はみられなかった。また、Arnot and Gobas (2006) の BCF 予測式を用いて異なる水温における定常状態の濃縮倍率を算出したところ以下のとおりであった。

- ・ log K_{ow} 3 の物質の定常状態の濃縮倍率 : 58 倍 (試験水 15℃)、58 倍 (試験水 25℃)
- ・ log K_{ow} 5 の物質の定常状態の濃縮倍率 : 5451 倍 (試験水 15℃)、5202 倍 (試験水 25℃)

ばく露 17 日後以前の 2 回の濃縮倍率 (試験水温低下が発生する以前の 14 日後まで) と試験水温低下後の 21、25 及び 28 日後の濃縮倍率は同程度であり、本試験結果をもって被験物質の濃縮性を評価できると判断した。以上のことから、本試験における試験水温低下が試験の信頼性と完全性に及ぼす影響はないと判断した。

Arnot JA, Gobas FAPC. 2006. A review of bioconcentration factor (BCF) and bioaccumulation factor (BAF) assessments for organic chemicals in fish. *Environ Rev* 14:257–297.

16. 試験計画書から逸脱した事項

試験計画書には、試験温度を「25±2℃未満」としていたが、ばく露 17 日後の試験水温がおよそ 6 時間 (17 時～23 時) にわたって、設定温度 (25±2℃未満) の範囲である 23℃を下回り、最大で 21℃まで低下し、設定温度の±2℃未満から逸脱した。

試験の信頼性と完全性に及ぼす影響については「15.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」に記載した。

17. 試験結果及び考察

17.1 試験水中の被験物質濃度

試験水中の被験物質濃度を Table-1 に示した。被験物質濃度は設定値の 87%以上が保持され、そ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	3日後	7日後	14日後	21日後	25日後	28日後	平均 (標準偏差)	Table	Fig.
1	87.6	91.1	77.3	90.6	89.4	89.6	87.6 (5.20)	6	6
2	8.94	9.04	8.04	7.63	7.92	7.41	8.16 (0.679)	7	

17.2 濃縮倍率

濃縮倍率を Table-2 に、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 130~200 倍、第 2 濃度区において 150~220 倍であった。

Table-2 濃縮倍率

() 内は平均値

濃度区	7日後	14日後	21日後	25日後	28日後	Table	Fig.
1	150	160	130	170	130	9	9
	180	150	140	160	200		
	(160)	(160)	(130)	(170)	(160)		
2	200	180	190	170	200	10	10
	190	190	180	150	220		
	(190)	(180)	(190)	(160)	(210)		

17.3 定常状態における濃縮倍率

濃縮倍率の変動を Table-3 に示し、計算途中の数値とみなし、値を丸めずに 5 ケタの数値を用いて定常状態に達したかどうかを確認した。

Table-3 濃縮倍率の変動

濃度区		21日後	25日後	28日後	3回の平均
1	平均濃縮倍率	132.82	167.60	161.46	153.96
	3回の平均からの乖離率 (%)	13.729	8.8576	4.8715	
2	平均濃縮倍率	187.07	162.04	212.09	187.07
	3回の平均からの乖離率 (%)	0.0013	13.378	13.376	

上記の結果から、21、25 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 0~14%と 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。

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-4 に示すように、第 1 濃度区において設定値の 106%、第 2 濃度区において 90%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	21 日後	25 日後	28 日後	平均	Table	Fig.
1	90.6	89.4	89.6	89.8	6, 9	6
2	7.63	7.92	7.41	7.65	7, 10	

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以下のとおりであった。

第 1 濃度区 150 倍

第 2 濃度区 190 倍

17.4 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。実験終了後の脂質含量 (平均値) の変動は、実験開始前に対して -11% であり $\pm 25\%$ 以内であった。

実験開始前 4.25%

実験終了後 3.77%

17.5 供試魚の外観観察等

異常は認められなかった。

17.6 考 察

試験の有効性

試験法に規定された試験の有効性の基準は下記のとおりである。

- 1) 温度変動は $\pm 2^\circ\text{C}$ 未満であること。
- 2) 溶存酸素濃度は、飽和酸素濃度の通常 60% 以下にならないこと。
- 3) 流水式及び半止水式のいずれの場合も、水槽中の被験物質濃度の変動は、取込期間中の測定値の平均に対して $\pm 20\%$ 以内に保たれること。
- 4) 死亡又は病気などの異常は、対照区及び試験区の魚において試験終了時に 10% 未満であること。

このうち、項目 2)、3) 及び 4) については試験の有効性を満たした。一方、項目 1) については、「15. 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」のとおり、実験期間中に試験水の温度範囲 (25°C の $\pm 2^\circ\text{C}$) から逸脱した。しかしながら本逸脱前 (ばく露 7 及び 14 日後) の濃縮倍率 (150~200 倍) と逸脱後 (ばく露 21、25 及び 28 日後) の濃縮倍率 (130~220 倍) に大きな差は認められなかった。また、試験水温の変動に対して、試験水中での被験物質等の析出は認められず、供試魚の外観観察でも異常等は確認されなかった。以上のことから、試験水温の変動が被験物質の濃縮性評価に与える影響は小さく、被験物質の濃縮性の程度を妥当に評価できたと考えられる。

18. 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

a) 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	301M
溶存酸素測定装置	: 飯島電子工業	ID-100
pH 計	: 東亜ディーケーケー	HM-21P

b) 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ー質量分析計	:	16 頁参照
天びん	:	ザルトリウス LP4200S
	:	ザルトリウス BP301S
	:	エー・アンド・デイ FA-2000
	:	エー・アンド・デイ FX-2000i
	:	エー・アンド・デイ GF-2000
フーリエ変換赤外分光光度計	:	島津製作所 IRPrestige-21
ホモジナイザー (ポリトロン)	:	キネマチカ PT3100
遠心分離機	:	日立工機 CR21G

特殊器具

Sep-Pak Plus C ₁₈	:	日本ウォーターズ
メンブランフィルター	:	日本ミリポア Millex-LG 孔径 0.20 μm

試薬

超純水	:	水道水を超純水製造システムで処理した水
メタノール	:	和光純薬工業 HPLC 用
ジメチルスルホキシド	:	ナカライテスク 試薬一級
ぎ酸	:	和光純薬工業 試薬特級
HCO-40	:	日光ケミカルズ

c) 脂質含量測定に使用した装置・機器及び試薬

装置・機器

ホモジナイザー (ポリトロン)	:	キネマチカ PT3100
天びん	:	ザルトリウス BP301S
	:	メトラー・トレド AB204-S
真空ポンプ	:	アルバック機工 DA-20D
真空デシケータ	:	井内盛栄堂 VL
ホモジナイザー (オートセルマスター)	:	アズワン CM-200
ロータリーエバポレーター	:	東京理化器械 N-1000K

試薬

精製水	:	高杉製薬 日本薬局方
メタノール	:	和光純薬工業 試薬一級
クロロホルム	:	和光純薬工業 試薬特級
硫酸ナトリウム	:	関東化学 試薬一級