



最 終 報 告 書

ペルフルオロヘキサデカン酸（被験物質番号 K-1789）のヨイにおける濃縮度試験

（試験番号：505114）

2006 年 10 月 17 日

財団法人化学物質評価研究機構

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 独立行政法人 新エネルギー・産業技術総合開発機構

試験の表題 ペルフルオロヘキサデカン酸 (被験物質番号 K-1789) のコイにおける
濃縮度試験

試験番号 505114

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。

2006 年 10 月 17 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 独立行政法人 新エネルギー・産業技術総合開発機構

試験の表題 ペルフルオロヘキサデカン酸（被験物質番号 K-1789）のコイにおける
濃縮度試験

試験番号 505114

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	2006 年 4 月 6 日	2006 年 4 月 7 日
試験計画書	2006 年 4 月 7 日	2006 年 4 月 7 日
試験計画書の変更	2006 年 6 月 13 日	2006 年 6 月 13 日
	2006 年 7 月 25 日	2006 年 7 月 26 日
急性毒性試験	2006 年 4 月 10 日	2006 年 4 月 10 日
脂質含量測定時	2006 年 4 月 13 日	2006 年 4 月 17 日
	2006 年 4 月 14 日	2006 年 4 月 17 日
原液調製操作時	2006 年 5 月 12 日	2006 年 5 月 12 日
試験水分析操作時	2006 年 4 月 27 日	2006 年 4 月 27 日
供試魚分析操作時	2006 年 5 月 25 日	2006 年 5 月 25 日
部位別試験	2006 年 6 月 13 日	2006 年 6 月 13 日
排泄試験	2006 年 6 月 22 日	2006 年 6 月 22 日
生データ、最終報告書草案	2006 年 10 月 12 日	2006 年 10 月 13 日
最終報告書	2006 年 10 月 17 日	2006 年 10 月 17 日

2006 年 10 月 17 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	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	23
5. 試験結果	24
6. 考 察	28
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	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 parts of test fish (Level 1)
Table-17	Calculation table for analysis in each parts 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 (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 (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 parts of test fish (Level 1)
- Fig.17 Chromatograms of LC-MS/MS analysis in each parts 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

表 題	ペルフルオロヘキサデカン酸（被験物質番号 K-1789）のコイにおける濃縮度試験
試験委託者	独立行政法人 新エネルギー・産業技術総合開発機構 （〒212-8554）神奈川県川崎市幸区大宮町1310番
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-1789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	<p>本試験は以下の試験法に従って行った。</p> <p>(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〉</p> <p>(2) 「OECD Guidelines for Testing of Chemicals」に定める "Bioconcentration : Flow-through Fish Test (Guideline 305, June 14, 1996)"</p>
適用 GLP	<p>本試験は以下の基準を適用した。</p> <p>(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」</p> <p>(2) 「OECD Principles of Good Laboratory Practice」(November 26, 1997)</p>

試験日程

試験開始日	2006年4月7日
実験開始日	2006年4月13日
実験終了日	2006年8月30日
試験終了日	2006年10月17日

試験資料の保管

(1) 被験物質

被験物質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

2006年10月17日

試験責任者

要 約

試験の表題

ペルフルオロヘキサデカン酸（被験物質番号 K-1789）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 1 μg/L |
| | 第2濃度区 0.1 μg/L |
| (3) ばく露期間 | 60日間 |
| (4) 排 泄 期 間 | 77日間 |
| (5) ばく露方法 | 連続流水式 |
| (6) 分 析 方 法 | 液体クロマトグラフィーータンデム質量分析法 |

試験結果

(1) 96時間LC50値 >0.150mg/L

(2) 定常状態における濃縮倍率

第1濃度区 4800倍

第2濃度区 4700倍

(3) 排泄半減期

第1濃度区 36日

第2濃度区 34日

(4) 各部位における濃縮倍率

濃度区	部 位	濃縮倍率
1	外 皮	5000 6100
	頭 部	4400 4700
	内 臓	5200 5300
	可食部	1600 1800
2	外 皮	5100 4300
	頭 部	4500 5200
	内 臓	12000 8400
	可食部	2200 2500

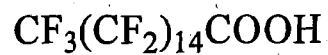
1. 被験物質

本報告書においてK-1789は、次の名称等を有するものとする。

1.1 名 称 ペルフルオロヘキサデカン酸

1.2 構造式等

構造式



分子式 $\text{C}_{16}\text{HF}_{31}\text{O}_2$

分子量 814.13

CAS番号 67905-19-5

1.3 入手先、商品名及びロット番号^{*1}

- | | |
|-----------|----------------------------|
| (1) 入 手 先 | |
| (2) 商 品 名 | Perfluorohexadecanoic acid |
| (3) ロット番号 | 90007089 |

1.4 純 度^{*1}

- | | |
|-------------|---------------------------------------|
| (1) 被 験 物 質 | 100.67% (Aqueous acid-base titration) |
| (2) 不 純 物 | 水分 0.34% (Karl-Fisher) |

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

赤外吸収スペクトル (Fig.18参照) 及び質量スペクトル (Fig.19, 20参照) 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

- (1) 保 管 条 件 室温暗所保存
- (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.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

急性毒性試験は被験物質の対水溶解度値以下で行った。被験物質の対水溶解度測定値は0.153mg/Lであったため、この濃度以下で試験を行った。また、対水溶解度以下では被験物質の毒性影響はないと予想されたため、急性毒性試験は対水溶解度以下での限度試験とした。

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 |
| | | 中島養魚場 |
| | | （住所 〒869-0123 熊本県玉名郡長洲町大字長洲 2029） |
| | | 供試魚受入日 2006年 1月27日 |
| (3) 蓄 | 養 | 条 |
| | 期 | 間 |
| | 等 | 魚の受入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37日間飼育した。 |
| | 薬 | 浴 |
| | | 病気予防として水産用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を実施した。その後、水温25±2℃の流水状態で14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、流水状態で16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 50mg/Lと塩化ナトリウム6g/Lの混合薬浴を24時間実施した。再度選別して、水産用OTC 50mg/Lと塩化ナトリウム6g/Lの混合薬浴を24時間実施した。 |
| (5) 体 | 重 | 平均 0.20g |
| (6) 全 | 長 | 平均 2.9cm |
| (7) 感 | 受 | 性 |
| | 試 | 験 |
| | | 同一ロット（TFO-060308）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0.521mg/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2006年7月3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

被験物質とその1倍量のHCO-40を*N,N*-ジメチルホルムアミドに超音波照射しながら溶解し、被験物質濃度として200mg/Lの原液を調製した。

2.5 試験条件

- | | | |
|------------|------------------|-------------|
| (1) 試験濃度 | 0.150mg/L及び対照区 | |
| (2) 試験水槽 | 円形ガラス製水槽 | |
| (3) 試験液量 | 4L/濃度区 | |
| (4) 供試魚数 | 10尾/濃度区 | |
| (5) 試験温度 | ばく露開始時 | 24.8～24.9℃ |
| | 換水前 | 25.0℃ |
| (6) 溶存酸素濃度 | ばく露開始時 | 8.1mg/L |
| | 換水前 | 6.8～6.9mg/L |
| (7) pH | ばく露開始時 | 8.0 |
| | 換水前 | 7.9～8.0 |
| (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

- | | |
|-----------|---------------------------|
| (1) 実施場所 | アクアトロン室B |
| (2) 試験実施日 | 2006年 4月 9日 ～ 2006年 4月13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 >0.150mg/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 <u>Cyprinus carpio</u> |
| | | 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 | 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 2005年11月27日 |
| | | じゅん化開始日 2006年 1月31日 |
| (3) じゅん化条件 | | |
| | 期 間 等 | 受入槽及び蓄養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て薬浴した。その後、水温 $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 未満の流水状態で50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20日間じゅん化した。 |
| | 薬 浴 | じゅん化水槽では水産用OTC 50mg/Lと塩化ナトリウム7g/Lの混合薬浴を24時間実施した。試験水槽では水産用OTC 50mg/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 | 6.9～15.1cm |
| (5) ロ ッ ト | | TFC-060131 |
| (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 | 70L容ガラス製水槽 |
| (3) 試験水量 | |
| ばく露期間 | 原液0.02mL/分及び試験用水1000mL/分の割合で1440L/日を試験水槽に供した。 |
| 排泄期間 | 試験用水1000mL/分で1440L/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 1～2回/月 |
| (5) 試験温度 | 第1濃度区 23.8～25.0℃ |
| | 第2濃度区 23.8～24.9℃ |
| | 対照区 23.6～24.9℃ |
| (6) 溶存酸素濃度 | 第1濃度区 7.4～8.0mg/L |
| | 第2濃度区 7.0～8.2mg/L |
| | 対照区 7.3～8.3mg/L |
| (7) pH | 第1濃度区 7.6～8.0 |
| | 第2濃度区 7.7～8.0 |
| | 対照区 7.7～8.1 |
| (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 12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 | 77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50.0mg/Lの原液を調製した。

・第2濃度区

第1濃度区で調製した50.0mg/Lの被験物質溶液を*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5.00mg/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、HCO-40濃度として50.0mg/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 1 µg/L

第2濃度区 0.1µg/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1～2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14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

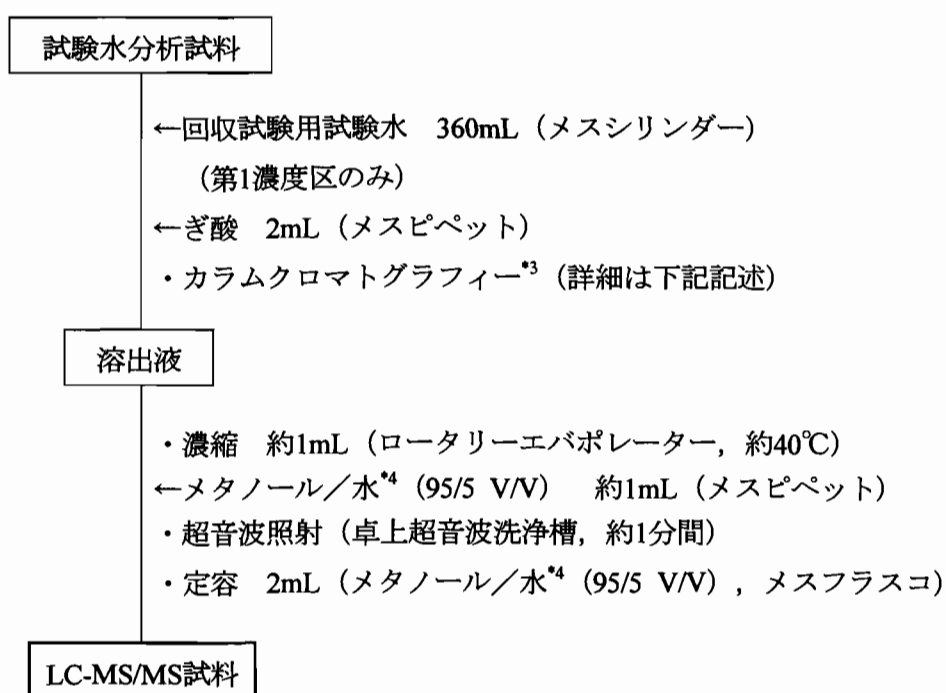
試験水槽から

第1濃度区 40mL

第2濃度区 400mL

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 カラムクロマトグラフの条件

セップパック C₈

(洗浄法 : メタノール、水*4 各10mL)

負荷法 全量負荷した。

溶出法 溶出液 メタノール 10mL

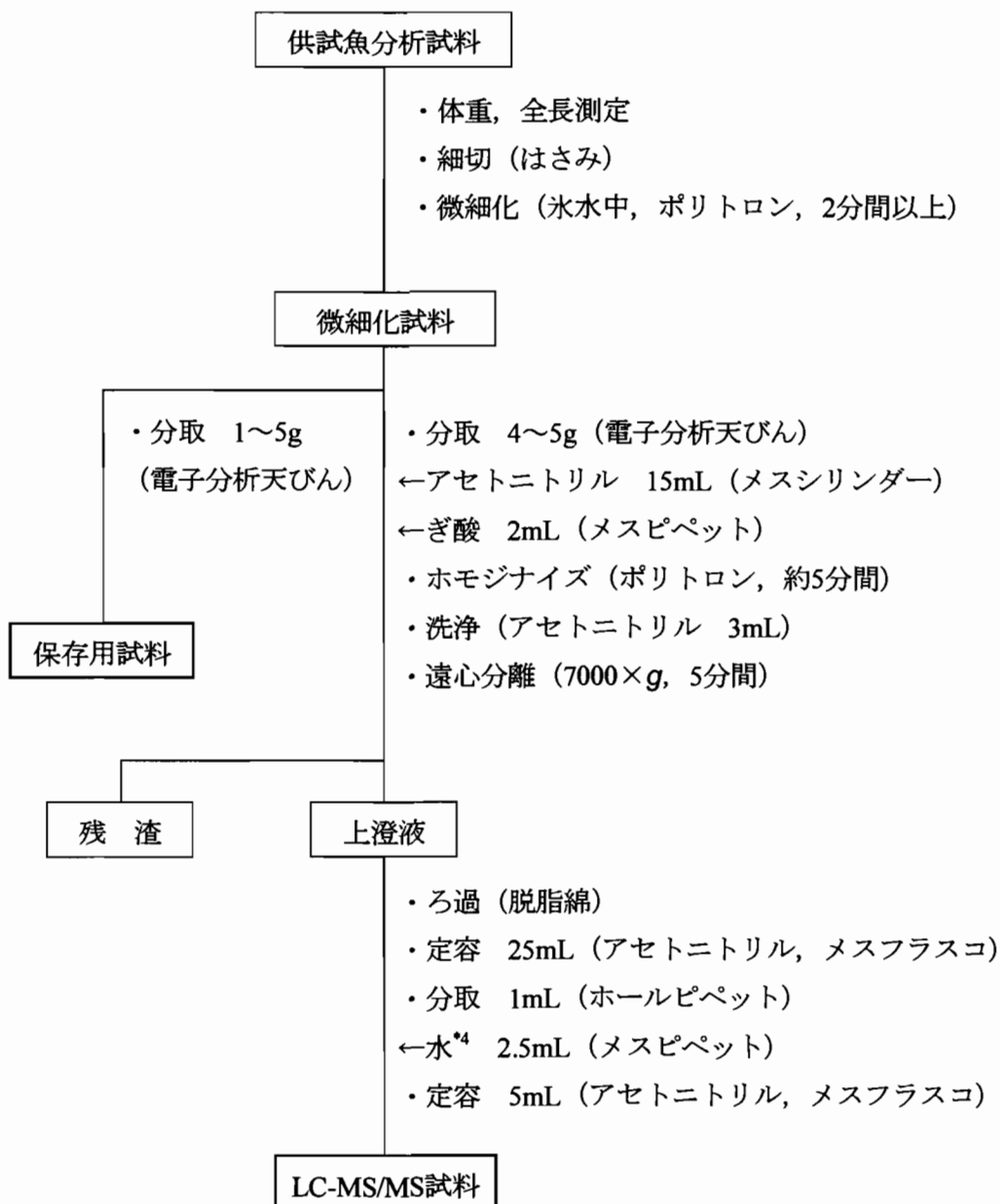
溶出液を分析に供した。

*4 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	
高速液体クロマトグラフ	HEWLETT PACKARD製	HP-1100
質量分析計	Micromass製	Quattro-LC

液体クロマトグラフ条件

カラム	L-column ODS (化学物質評価研究機構製) 15cm×2.1mmI.D.
カラム温度	35℃
溶離液	A液 (95%) : メタノール*5 B液 (5%) : 水*4,5
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 (ESI)
検出イオン	負イオン
検出法	選択反応モニタリング (SRM)
プレカーサーイオン	m/z 813.3 (M-H) ⁻ (Fig.19参照)
プロダクトイオン	m/z 769.0 (M-COOH) ⁻ (Fig.20参照)
イオン源温度	150℃
脱溶媒システム温度	400℃
コーン電圧	10V
コリジョンエネルギー	15eV

*5 5mmol/L酢酸ジ-*n*-ブチルアンモニウム含有。

(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。

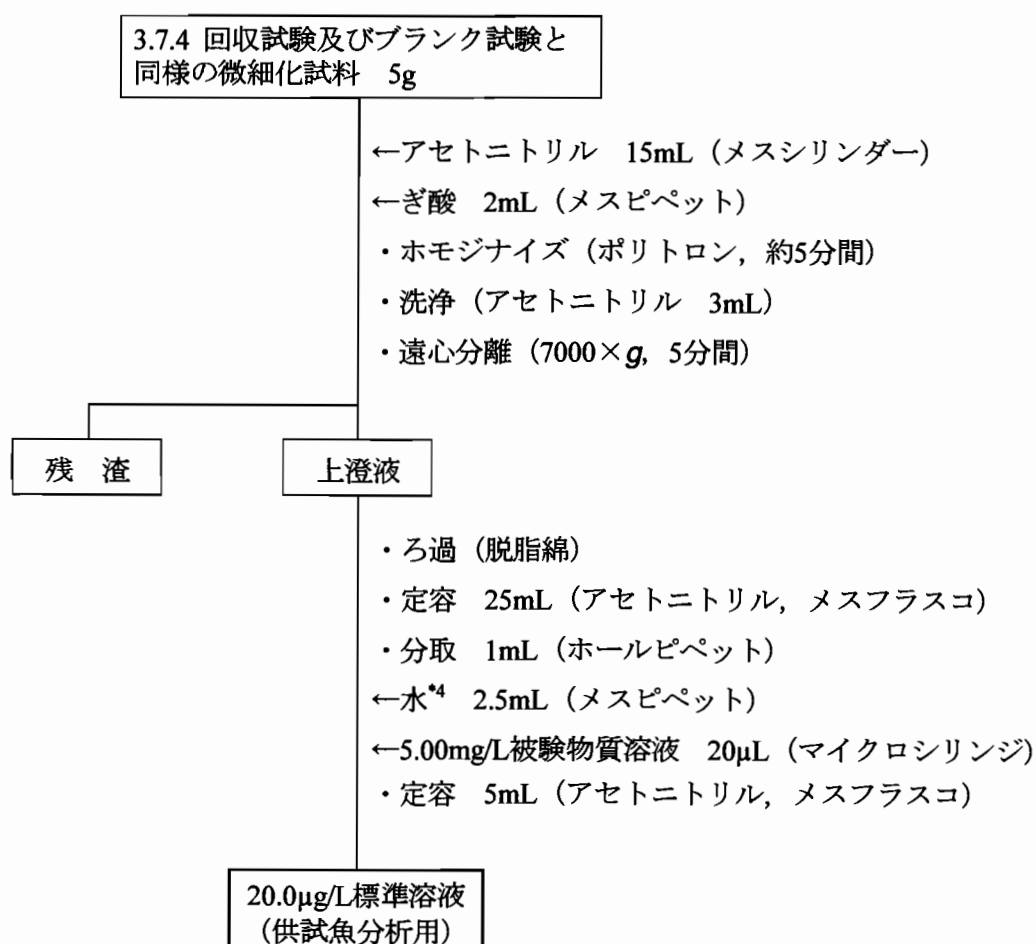
(a) 試験水分析

被験物質10.0mgを正確にはかりとり、メタノールに溶解して100mg/Lの被験物質溶液を調製した。これをメタノール／水^{*4}（95/5 V/V）で希釈して20.0μg/Lの標準溶液とした。

(b) 供試魚分析

被験物質10.0mgを正確にはかりとり、メタノールに溶解して100mg/Lの被験物質溶液を調製し、これをアセトニトリル／水^{*4}（1/1 V/V）で希釈して5.00mg/Lの被験物質溶液を調製した。さらにこれを以下のフロースキームに従って前処理操作を行い、20.0μg/Lの標準溶液を調製した。

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10.0、20.0及び40.0 $\mu\text{g/L}$ 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100 (被験物質濃度0.75 $\mu\text{g/L}$)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10.0、20.0及び40.0 $\mu\text{g/L}$ 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100 (被験物質濃度0.91 $\mu\text{g/L}$)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、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40ng添加)

96.8%, 93.0% 平均 94.9%

供試魚分析 (被験物質5000ng添加)

92.6%, 93.0% 平均 92.8%

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の定量下限濃度

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*6はそれぞれ、

第1濃度区 0.039 µg/L

第2濃度区 0.0039µg/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の定量下限濃度

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*6は供試魚微細化試料を5gとしたとき25ng/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

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

$\overline{C_w}$: 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)

$C_w(1)$: 1回目の試験水中被験物質濃度 (μg/L)

$C_w(n)$: 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

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

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

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

(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 (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け（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	25倍
第2濃度区	250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98%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	1日後	14日後	28日後	42日後	53日後	60日後	平均 (標準偏差)	Table	Fig
1	1.03	1.02	0.987	0.983	0.993	0.977	0.998 (0.0203)	8	6
2	0.104	0.101	0.100	0.0977	0.0984	0.0995	0.100 (0.0023)	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2000～5700倍、第2濃度区において2000～5900倍であった。

Table-2 濃縮倍率

() 内は平均値

濃度区	14日後	28日後	42日後	53日後	60日後	Table	Fig
1	2000	3600	4500	4300	5500	11	9
	2300	3900	4300	4500	5700		
	(2100)	(3700)	(4400)	(4400)	(5600)		
2	2000	3300	4200	4200	5200	12	10
	2100	3600	4400	4200	5900		
	(2000)	(3400)	(4300)	(4200)	(5500)		

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		42日後	53日後	60日後	3回の平均
1	平均濃縮倍率	4384.6	4366.0	5607.6	4786.1
	3回の平均からの乖離率 (%)	8.3881	8.7775	17.165	
2	平均濃縮倍率	4305.4	4176.3	5549.6	4677.1
	3回の平均からの乖離率 (%)	7.9459	10.707	18.653	

上記の結果から、42、53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濃度区において設定値の98%、第2濃度区において99%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	42日後	53日後	60日後	平均	Table	Fig.
1	0.983	0.993	0.977	0.984	8,11	6
2	0.0977	0.0984	0.0995	0.0985	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 4800倍
第2濃度区 4700倍

5.4 排泄試験

62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8、22、36及び77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及び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36日、第2濃度区で34日であった。

Table-5 排泄試験における残留率

(単位 %)

濃度区	8日後	22日後	36日後	77日後	Table	Fig.
1	106 111	92 91	79 84	29 29	14	12
2	113 128	101 92	89 88	29 31	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	4900 5990	5000 6100	16	16
	頭 部	4320 4610	4400 4700		
	内 臓	5150 5170	5200 5300		
	可食部	1540 1800	1600 1800		
2	外 皮	502 425	5100 4300	17	17
	頭 部	444 516	4500 5200		
	内 臓	1200 831	12000 8400		
	可食部	214 243	2200 2500		

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	3.61%
実験終了後	5.29%

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+47%であり、開始時の±25%の範囲を超えた。その原因の一つとして、実験期間が140日と長期間であったことにより成長に伴い脂質含量が変動したことが考えられる。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 NP-KX-1005
		フロム製	型 301M
デガッサー	:	フロム製	型 702
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

(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	:	16頁参照	
天びん	:	ザルトリウス製	型 BP301S
		メトラー製	型 AT201
		メトラー製	型 AB204-S
		エー・アンド・ディ製	型 FA-2000
ロータリーエバポレーター	:	東京理化器械製	型 N-NJ
		東京理化器械製	型 N-1000K
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
超音波洗浄器	:	エスエヌディ製	型 US-105

特殊器具

セップパック プラス C₈ : 日本ウォーターズ製

試藥

メタノール	:	和光純薬工業製	HPLC用
アセトニトリル	:	ナカライテスク製	試薬一級
メタノール	:	和光純薬工業製	試薬一級
<i>N,N</i> -ジメチルホルムアミド	:	ナカライテスク製	試薬一級
ギ酸	:	和光純薬工業製	試薬特級
HCO-40	:	日光ケミカルズ製	
0.5mol/L酢酸ジ- <i>n</i> -ブチルアンモニウム	:	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

裝置・機器

天びん	： ザルトリウス製	型 BP301S
	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-1000K
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）		
	： 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 DTC-21
真空デシケータ	： 井内盛栄堂製	型 VL

試藥

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

(4) 被験物質の構造確認に使用した装置・機器

フーリエ変換赤外分光光度計 : 島津製作所製 型 IRPrestige-21
液体クロマトグラフィー質量分析計 : Micromass製 型 Quattro-LC