

最 終 報 告 書

p-フェニレンジアミン（被験物質番号 K-196）のコイにおける濃縮度試験

（試験番号：50196）

化学物質濃縮試験機構
久保田三郎

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 新エネルギー・産業技術総合開発機構

試験の表題 *p*-フェニレンジアミン（被験物質番号 K-196）のコイにおける濃縮
度試験

試験番号 50196

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 4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 新エネルギー・産業技術総合開発機構

試験の表題 p-フェニレンジアミン（被験物質番号 K-196）のコイにおける濃縮
度試験

試験番号 50196

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 1 月 15 日	2002 年 1 月 15 日	2002 年 1 月 15 日
	2002 年 2 月 8 日	2002 年 2 月 8 日	2002 年 2 月 8 日
	2002 年 2 月 15 日	2002 年 2 月 15 日	2002 年 2 月 15 日
	2002 年 3 月 26 日	2002 年 3 月 26 日	2002 年 3 月 26 日
	2002 年 4 月 10 日	2002 年 4 月 10 日	2002 年 4 月 10 日
試 験 実 施 状 況	2002 年 1 月 22 日	2002 年 1 月 24 日	2002 年 1 月 24 日
	2002 年 1 月 29 日	2002 年 1 月 30 日	2002 年 1 月 30 日
	2002 年 2 月 8 日	2002 年 2 月 15 日	2002 年 2 月 15 日
	2002 年 2 月 13 日	2002 年 2 月 15 日	2002 年 2 月 15 日
	2002 年 2 月 14 日	2002 年 2 月 15 日	2002 年 2 月 15 日
	2002 年 2 月 15 日	2002 年 2 月 15 日	2002 年 2 月 15 日
	2002 年 2 月 26 日	2002 年 2 月 28 日	2002 年 2 月 28 日
生データ及び最終報告書	2002 年 4 月 10 日	2002 年 4 月 10 日	2002 年 4 月 10 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 4 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
試験実施機関	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	20
5. 試験結果	21
6. 考 察	23
7. 備 考	24

表 題	p-フェニレンジアミン（被験物質番号 K-196）のコイにおける濃縮度試験
試験委託者	新エネルギー・産業技術総合開発機構 （〒170-6028）東京都豊島区東池袋三丁目1番1号
試験実施機関	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 財団法人 化学物質評価研究機構 東京事業所 （〒345-0043）埼玉県北葛飾郡杉戸町下高野1600
試験目的	K-196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 1月15日
実験開始日	2002年 2月 6日
実験終了日	2002年 3月 6日
試験終了日	2002年 4月10日

試験資料の保管

(1) 被験物質

非標識被験物質約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料保管室に保管する。標識被験物質は全量使用するため保管しない。

(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 試験第一課

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

2002年4月10日

試験責任者



要 約

試験の表題

p-フェニレンジアミン（被験物質番号 K-196）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（24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 0.8 µg/L |
| | 第2濃度区 0.08µg/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 | 液体シンチレーション計数法 |

試験結果

- | | |
|------------------|--------------|
| (1) 96時間LC50値 | 0.367mg/L |
| (2) 定常状態における濃縮倍率 | 第1濃度区 32倍 |
| | 第2濃度区 72倍 |

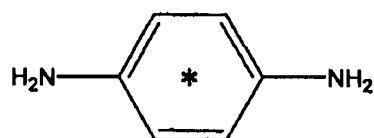
1. 被 験 物 質

本報告書においてK-196は、次の名称等を有するものとする。

1.1 名 称 *p*-フェニレンジアミン

1.2 構造式等

構造式



* 標識部位

分子式 $C_6H_8N_2$

分子量 182.8^{*1} (標識被験物質, 二塩酸塩として)
108.14 (非標識被験物質)

1.3 標識被験物質の入手先、商品名、比放射能、ロット番号及び放射化学的純度^{*1}

- | | |
|-------------|-----------------|
| (1) 入 手 先 | [REDACTED] |
| (2) 商 品 名 | [REDACTED] |
| (3) 比 放 射 能 | 10.4MBq/mg |
| (4) ロット番号 | CFQ12860 |
| (5) 放射化学的純度 | 98.9% (HPLCによる) |

標識被験物質は常温では不安定であり、塩酸塩として入手した。入手試料は純度100%として取り扱い、塩酸塩であることを考慮して含有量補正(含有率: 60.0%)を行った。

*1 [REDACTED] 添付資料による。

1.4 非標識被験物質の入手先、商品名、等級、ロット番号及び純度*2

- | | |
|-----------|----------------------|
| (1) 入 手 先 | ████████████████████ |
| (2) 商 品 名 | ████████████████████ |
| (3) 等 級 | ████████ |
| (4) ロット番号 | DWM1728 |
| (5) 純 度 | 99.3% |

非標識被験物質は純度100%として取り扱った。

*2 ██████████ 添付資料による。

1.5 被験物質の確認

非標識被験物質については赤外吸収スペクトル (Fig.8参照)、標識被験物質については質量スペクトル (Reference 3参照) 及び核磁気共鳴スペクトル (Reference 4参照) 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

- | | |
|-------------|---|
| (1) 保 管 条 件 | 標識被験物質 イオン交換水に溶解し冷蔵庫で保存
非標識被験物質 冷蔵保存 |
| (2) 安定性確認 | 標識被験物質について実験開始前及び終了後に被験物質の高速液体クロマトグラフィーを行った結果、保管条件下で安定であることを確認した (Fig.7参照)。非標識被験物質について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.8参照)。 |

1.7 試験条件下での安定性

実験開始前に標識被験物質を用いて予備検討を行い、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 件 | 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57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26日間飼育した。その後、再度選別及び薬浴を実施した後、流水状態で井水により47日間、活性炭処理した脱塩素水道水により12～19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 0.32～0.36g |
| (6) 全 | 長 | 平均 3.2～3.3cm |
| (7) 感受性試験 | | 同一ロット (TF0-011022) 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LC50値は0.704mg/Lであった。 |

2.3 試験用水

(1) 種類

活性炭ろ過装置（オルガノ株式会社製）を通した久留米事業所の水道水

(2) 水質確認

久留米事業所にて2001年9月12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	円形ガラス製水槽	
(2) 試験液量	4L/濃度区	
(3) 試験温度	ばく露開始時	24.1～24.2℃
	換水前	23.9～24.1℃
(4) 溶存酸素濃度	ばく露開始時	8.1mg/L
	換水前	6.8～ 7.9mg/L
(5) pH	ばく露開始時	7.7～ 7.8
	換水前	7.2～ 7.3
(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（24時間毎に換水）	
(9) 遮光	試験期間中遮光条件下で実施した。	

2.5 原液調製法

非標識被験物質をイオン交換水に溶解して1000mg/Lの被験物質溶液を調製した。これをイオン交換水に溶解して被験物質濃度として100mg/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 1月21日 ～ 2002年 2月 1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 0.367mg/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

福岡県矢部川漁業協同組合

(住所 〒 834-0012 福岡県八女市大字山内 748)

供試魚受入日 2001年11月 8日

(3) 蓄 養 条 件

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、
受入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16日間飼育した。

薬 浴

病気予防として水産用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。寄生虫駆除としてホルマ
リン30μL/Lの24時間薬浴を1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、再度薬浴した後、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31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井水（久留米事業所
敷地内で揚水した地下水）で17日間飼育した後、東京
事業所 生物実験室の試験水槽へ移し、薬浴後、同温度
の流水状態で活性炭処理した脱塩素水道水で21日間飼育
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) 全 長

5.5～7.3cm

(6) ロ ッ ト

TFC-011108

(7) 年 齢

当才魚

(8) 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

(1) 種 類

活性炭ろ過装置（オルガノ株式会社製）を通した東京事業所の水道水

(2) 水質確認

東京事業所にて2001年11月22日に採水し、測定又は分析を行った結果をReference 2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。

3.3 試験及び環境条件

- | | |
|-------------|---|
| (1) 試験水供給方法 | 東京事業所組立流水式装置を用いて供給した。 |
| (2) 試験水槽 | 50L容ガラス製水槽 |
| (3) 試験水量 | 原液0.1mL/分及び試験用水150mL/分の割合で216L/日を試験水槽に供した。 |
| (4) 原液タンク | 500mL容褐色ガラス製びん
交換頻度 2～3回程度/週 |
| (5) 試験温度 | 第1濃度区 24.8～25.3℃
第2濃度区 25.0～25.2℃
対照区 25.1～25.2℃ |
| (6) 溶存酸素濃度 | 第1濃度区 7.7～7.9mg/L (Fig.4参照)
第2濃度区 7.6～7.8mg/L (Fig.5参照)
対照区 7.6～7.8mg/L (Fig.6参照) |
| (7) pH | 第1濃度区 7.2～7.4
第2濃度区 7.3～7.4
対照区 7.3～7.4 |
| (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 30尾（ばく露開始時）
対照区 12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 | 東京事業所 生物実験室 |

3.4 原液調製法

・第1濃度区

標識被験物質を2.5と同様にして被験物質濃度として1.20mg/Lの原液を調製した。

・第2濃度区

標識被験物質を2.5と同様にして被験物質濃度として0.120mg/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 0.8 µg/L

第2濃度区 0.08µg/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週間に2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シンチレーション計数法により行った。

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尾とした。

対照区は実験開始前及び終了後に行い、1回当りの採取尾数は4尾とした。さらに、脂質測定用として別途6尾を取り上げ、3群(2尾1群)に分けて分析した。

3.7.2 分析試料の前処理

(1) 試験水中の被験物質

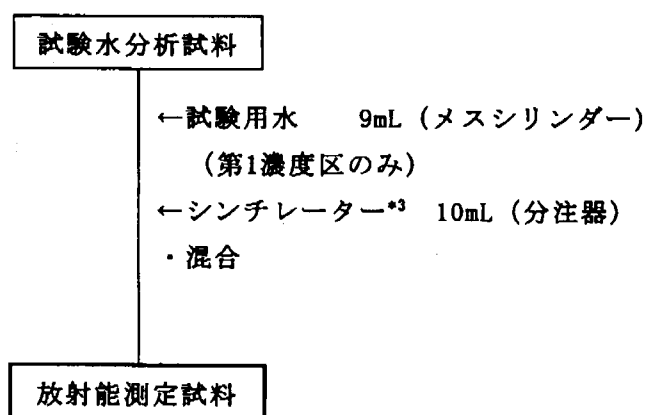
試験水槽から

第1濃度区 1mL

第2濃度区 10mL

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、放射能測定試料とした。

フロースキーム

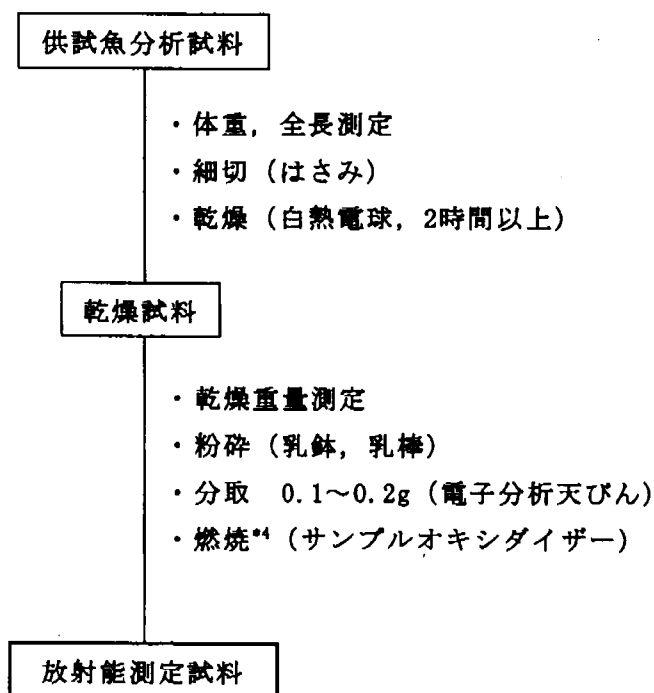


*3 ウルチマゴールドXR (パッカー社製)

(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、放射能測定試料とした。

フロースキーム



*4 燃焼条件

機	器	サンプルオキシダイザー パッカー社製 307型
燃	焼	1.5分間
二酸化炭素吸収剤		カーボソープE (パッカー社製)
シンチレーター		パーマフローE (パッカー社製)

上記フロースキーム中の分取以降はn=3で行った。

3.7.3 被験物質の定量分析

前処理を行って得られた放射能測定試料について、下記の定量条件に基づき液体シンチレーション計数法により壊変率を測定した。放射能測定試料中の被験物質濃度は、壊変率を絶対量に換算して求めた。なお、供試魚分析については3.7.2(2)に示した3点の試料を測定し、その平均魚体中濃度を算出した(Table-4, 5, 7, 8, 9参照)。

定量条件

機	器	液体シンチレーションアナライザー
		パッカード社製 トライカーブ 3100TR型
核	種	^{14}C
測 定 時 間		3分間
測 定 回 数		1回
モ	ー	ド
		DPM

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、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、細切した魚(5g)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、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壊変率は定量下限以下であった。供試魚分析操作における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-6参照)。

供試魚分析操作における回収率(被験物質40ng添加)

90.8%, 94.3% 平均 92.6%

3.7.5 供試魚中の脂質含量

対照区の供試魚を東京事業所にて体重・全長測定した後、航空便にて冷蔵運搬し、久留米事業所にて供試魚の細切・微細化を行った後、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

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

壊変率の定量下限は分析機器の感度を考慮して45DPMとした。これより、試験水中の定量下限濃度*5は

第1濃度区 0.043 µg/L

第2濃度区 0.0043µg/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

壊変率の定量下限は分析機器の感度を考慮して45DPMとした。これより、供試魚中の定量下限濃度*5は供試魚体重を5g、供試魚乾燥重量を1g、供試魚粉碎試料を0.2gとしたとき0.047ng/gと算出される。

$$\text{*5 被験物質定量下限濃度} = \frac{A \times \frac{G}{100}}{B \times C \times D \times \frac{E}{F} \times \frac{H}{100}}$$

(µg/L又はng/g)

A : 壊変率の定量下限値 (DPM)

B : 変換係数 60 (DPM/Bq)

C : 比放射能 10.4 (Bq/ng)

D : 試験水採取量 (mL) 又は供試魚粉碎試料 (g)

E : 供試魚体重 (g)

F : 供試魚乾燥重量 (g)

G : 含有率 60.0 (%)

H : 回収率 (%)

E及びFは供試魚中の定量下限濃度算出の場合のみ用いた。

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 (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 (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)

(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

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。

(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) (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) 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)

(3) 定常状態における濃縮倍率の算出

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

$\overline{C_{fs}}$: 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)

BCF_{ss} : 定常状態における濃縮倍率

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	0.058倍
第2濃度区	0.61 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87%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	7日後	14日後	20日後	23日後	28日後	平均 (標準偏差)	Table
1	0.826	0.782	0.794	0.831	0.811	0.813	0.809 (0.0187)	4
2	0.0753	0.0693	0.0752	0.0788	0.0807	0.0784	0.0763 (0.00401)	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20～42倍、第2濃度区において35～98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	20日後	23日後	28日後	Table
1	20	32	23	28	42	7
	23	34	33	29	34	
	26	29	27	32	31	
	23	42	35	29	39	
	(23)	(34)	(29)	(29)	(37)	
2	59	42	65	60	66	8
	45	35	38	65	83	
	35	36	36	43	41	
	39	57	74	37	98	
	(44)	(43)	(53)	(51)	(72)	

5.3 定常状態における濃縮倍率

5.3.1 第1濃度区

5.2の結果から、20、23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、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-3に示されるように、設定値の102%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	20日後	23日後	28日後	平均	Table
1	0.831	0.811	0.813	0.818	4, 7

(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 32倍

5.3.2 第2濃度区

5.2の結果から、濃縮倍率は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。定常状態における濃縮倍率は、28日後の濃縮倍率（72倍）とした。

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	3.44%
実験終了後	5.16%

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

(1) 放射性同位体による標識化合物を用いた経緯

本被験物質は魚類への毒性が強く、LC50値が低いため、試験可能な設定濃度では汎用の機器分析が困難であったため、濃縮度試験の実施が不可能であった。そこで、放射性同位体による標識化合物を用いた試験を実施した。

(2) 供試魚の脂質含量について

実験終了後の脂質含量が実験開始前に対して150%程度あった。本試験では、脂質含量の測定は対照区の供試魚微細化試料を用いており、第1及び第2濃度区の各供試魚分析時の供試魚微細化試料を用いた脂質含量の測定を実施していない。従って、脂質の増加に伴う濃縮倍率への影響は確認できなかった。

(3) 濃縮性の評価について

試験水中及び供試魚中の被験物質の定量は、液体シンチレーション計数法により放射性同位体の壊変率を測定し、絶対量に換算して行い、変化物を含めた被験物質の濃縮性について評価を行った。

7. 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	:	ヤマト科学製	型 7524-40/50
試験用水供給用定量ポンプ	:	ヤマト科学製	型 7524-40/50
溶存酸素測定装置	:	堀場製作所製	型 OM-12
		飯島電子工業製	型 F-102
pH計	:	東亜電波工業製	型 HM-20P
		堀場製作所製	型 F-22
		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

液体シンチレーションアナライザー

: 15頁参照

天びん : ザルトリウス社製 型 BP301S
 ザルトリウス社製 型 BP1200

サンプルオキシダイザー : 14頁参照

試薬

ウルチマゴールドXR : パッカード社製
 カーボソープE : パッカード社製
 パーマフローE : パッカード社製

(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	: ザルトリウス社製	型 BP301S
	メトラー社製	型 AE163
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 (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)	: 片山化学工業製	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 FTIR-8200PC
フローシンチレーションアナライザー		
	: パッカード社製	型 500TR
高速液体クロマトグラフ	: 島津製作所製	型 LC-10A
紫外可視分光光度計	: 島津製作所製	型 UV-2200A