

最終報告書

o-tert-ブチルフェノール (被験物質番号 K-81C) のコイにおける濃縮度試験

(試験番号: 505162)

2008 年 3 月 31 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

2008 年 4 月 2 日

試験責任者



最終報告書

o-tert-ブチルフェノール（被験物質番号 K-81C）のコイにおける濃縮度試験

（試験番号：505162）

2008年3月31日

財団法人化学物質評価研究機構

水質汚濁対策部

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 *o*-tert-ブチルフェノール (被験物質番号 K-81C) のコイにおける
濃縮度試験

試験番号 505162

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。

2008年3月3日

試験責任者

[Redacted Signature]
[Redacted Name]

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 *o*-tert-ブチルフェノール（被験物質番号 K-81C）のコイにおける
濃縮度試験

試験番号 505162

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	2008年1月18日	2008年1月18日
試験計画書	2008年1月21日	2008年1月21日
急性毒性試験	2008年1月22日	2008年1月22日
原液調製操作時	2008年1月29日	2008年1月29日
試験水分析操作時	2008年1月31日	2008年1月31日
供試魚分析操作時	2008年2月6日	2008年2月6日
生データ、最終報告書草案	2008年3月31日	2008年3月31日
最終報告書	2008年3月31日	2008年3月31日

2008年3月31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	23
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	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 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

表 題	<i>o</i> -tert-ブチルフェノール（被験物質番号 K-81C）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-81C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	2008年1月21日
実験開始日	2008年1月29日
実験終了日	2008年2月26日
試験終了日	2008年3月31日

試験資料の保管

(1) 被験物質

同一ロットの供試試料が分解度試験終了後にすでに保管されているため、本試験終了後には保管しない。

(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

 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

2008年3月3日

試験責任者

要 約

試験の表題

o-tert-ブチルフェノール (被験物質番号 K-81C) 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 (24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 20 µg/L 第2濃度区 2 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LC₅₀値 3.54mg/L

定常状態における濃縮倍率

第1濃度区	62 倍
第2濃度区	78 倍

1. 被験物質

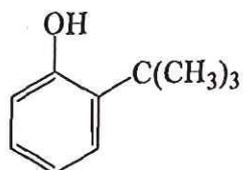
本報告書においてK-81Cは、次の名称等を有するものとする。

1.1 名 称

o-*tert*-ブチルフェノール

1.2 構造式等

構造式



分子式 $C_{10}H_{14}O$

分子量 150.22

CAS番号 88-18-6

1.3 供給者、商品名、等級及びロット番号^{*1}

供給者	████████████████████
商品名	<i>o</i> - <i>t</i> -ブチルフェノール
等級	██████████
ロット番号	██████████

1.4 純 度^{*1}

被験物質	99.9% (毛管カラムGC)
不純物	水分 0.01%
	残り0.09%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 被験物質の確認

赤外吸収スペクトル (Fig.13参照)、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。

1.6 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)。

1.7 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

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 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 2007年 8月20日

じゅん化開始日 2007年12月12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13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25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）50mg/Lと塩化ナトリウム6g/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6g/Lの薬浴を24時間実施した。

(4) 体重

平均 0.24g

(5) 全長

平均 3.0cm

(6) 感受性試験

同一ロット（T FO-071212）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0.563mg/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2008年1月7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

ジメチルスルホキシド

(2) 調製方法

供試試料をジメチルスルホキシドに溶解して被験物質濃度として10.0g/Lの原液を調製した。

2.5 試験条件

(1) 試験濃度

5.00mg/L、2.50mg/L、1.25mg/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 24.0°C

換水前 24.8~24.9°C

(6) 溶存酸素濃度

ばく露開始時 8.2mg/L

換水前 6.2~6.7mg/L

(7) pH

ばく露開始時 8.1

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 (24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 2008年1月21日 ~ 2008年1月25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 3.54mg/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 2007年 6月 3日

じゅん化開始日 2007年11月28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42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18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の薬浴を24時間実施した。

(4) 全 長

7.4~9.6cm

(5) ロ ッ ト

TFC-071128

(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

原液0.04mL/分及び試験用水800mL/分の割合で1152L/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 2回/月

(5) 試験温度

第1濃度区 24.0～24.2℃

第2濃度区 24.0～24.2℃

対照区 24.0～24.1℃

(6) 溶存酸素濃度

第1濃度区 7.7～8.2mg/L

第2濃度区 7.6～8.1mg/L

対照区 7.8～8.2mg/L

(7) pH

第1濃度区	8.0、8.1
第2濃度区	8.0、8.1
対 照 区	8.1、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	28尾（実験開始時）
対 照 区	12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)と同じ。

(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400mg/Lの原液を調製した。

第2濃度区

第1濃度区で調製した400mg/Lの原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40.0mg/Lの原液を調製した。

対照区

ジメチルスルホキシドを原液とした。

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	20 μ g/L
第2濃度区	2 μ g/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。

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

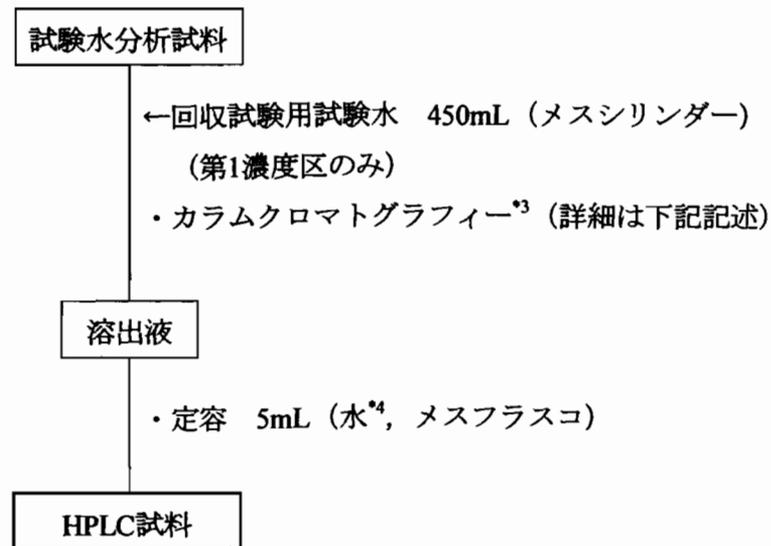
試験水槽から

第1濃度区 50mL

第2濃度区 500mL

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 カラムクロマトグラフの条件

セップバック プラス C₁₈(洗浄法 : アセトニトリル, 水*⁴ 各5mL)

負荷法 全量負荷した。

溶出法 アセトニトリル 2.5mL

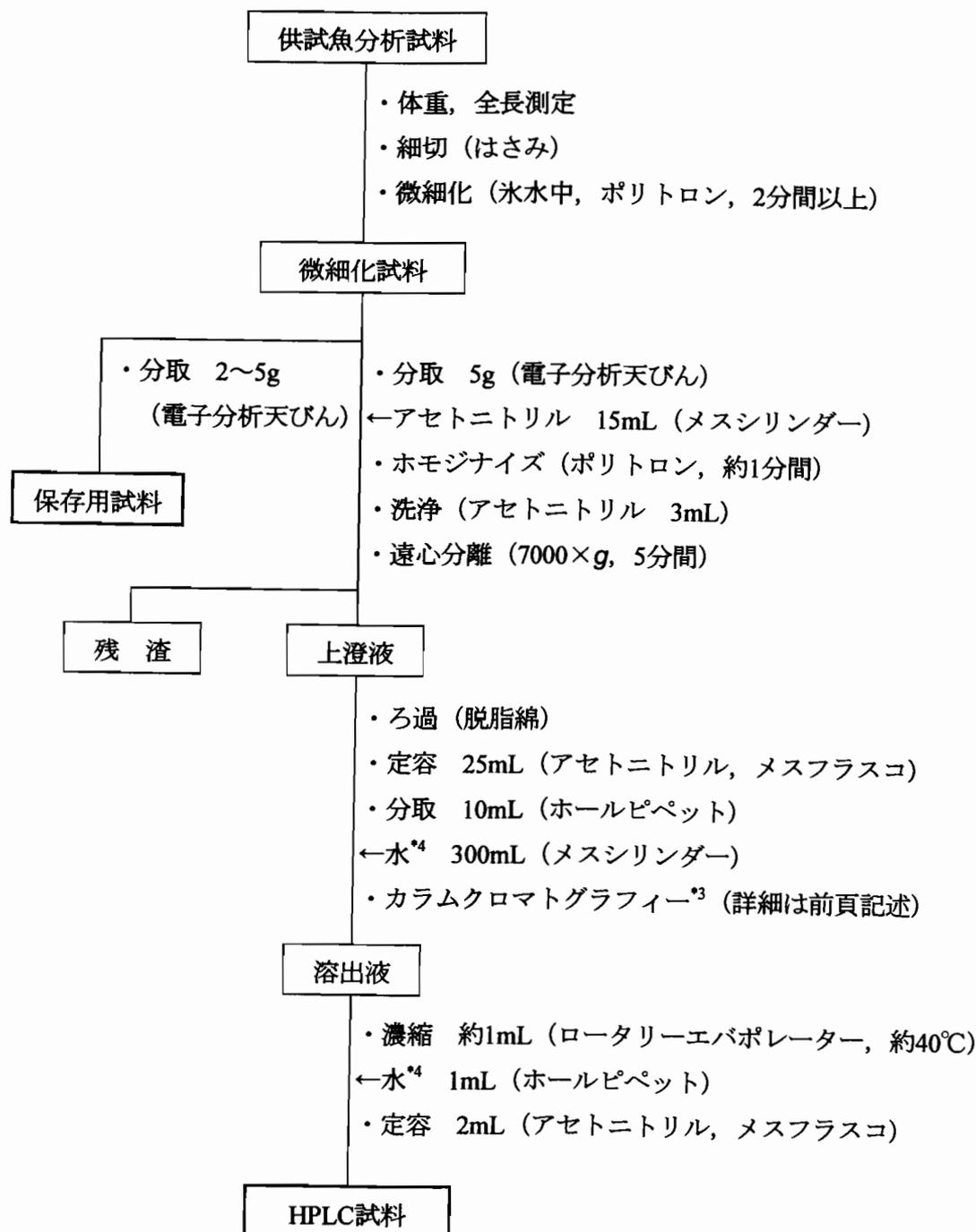
溶出液を分析に供した。

*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、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



3.7.3 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。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。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 (Table-6, 7, Fig.6, Table-9, 10, 11, Fig.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-20ACHT
システムコントローラー	島津製作所製 CBM-20A
デガッサー	島津製作所製 DGU-20A3
カラム	Shim-pack XR-ODS (50mm×2.0mmI.D., 島津製作所製)
カラム温度	40℃
溶 離 液	A (60%) : 水*4 B (40%) : アセトニトリル
流 量	0.3mL/min
測 定 波 長	270nm (Fig.12参照)
注 入 量	20μL
検 出 器 出 力	2V/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100mgを正確にはかりとり、ジメチルスルホキシドに溶解して1000mg/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40.0mg/Lの被験物質溶液とし、さらにアセトニトリル/水^{*4} (1/1 v/v) で希釈して200 μ g/Lの標準溶液とした。

(b) 供試魚分析

供試試料100mgを正確にはかりとり、ジメチルスルホキシドに溶解して1000mg/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50.0mg/Lの被験物質溶液とし、さらにアセトニトリル/水^{*4} (1/1 v/v) で希釈して500 μ g/Lの標準溶液とした。

(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100、200及び400 μ 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 μ V \cdot sec (被験物質濃度19 μ 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250、500及び1000 μ 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1500 μ V \cdot sec (被験物質濃度30 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

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、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 (Table-5, 8、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1000ng添加)

96.0%, 96.1% 平均 96.0%

供試魚分析 (被験物質5000ng添加)

86.5%, 79.1% 平均 82.8%

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-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。

(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*5はそれぞれ、

第1濃度区 2.0 µg/L

第2濃度区 0.20µg/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-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。

(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*5は供試魚微細化試料を5gとしたとき37ng/gと算出される。

$$*5 \text{ 被験物質定量下限濃度 (}\mu\text{g/L又はng/g)} = \frac{A}{\frac{B}{100} \times \frac{C \times E}{D}}$$

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

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

- $\overline{C_w}$: 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 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

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

\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（ $\mu\text{g/L}$ ）

(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

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

\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 ）

(3) 定常状態における濃縮倍率の算出

$$BCF_{ss} = \overline{Cfs} / \overline{Cws}$$

BCF_{ss} : 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（ $\mu\text{g/L}$ ）

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	1.8倍
第2濃度区	18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、ほぼ設定値が保持された。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 μg/L)

濃度区	2日後	8日後	10日後	15日後	21日後	28日後	平均 (標準偏差)	Table	Fig
1	20.8	20.3	20.7	20.3	20.5	20.8	20.6 (0.22)	6	6
2	2.07	2.05	2.07	2.10	2.06	2.05	2.07 (0.017)	7	

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40～85倍、第2濃度区において63～89倍であった。

Table-2 濃縮倍率

() 内は平均値

濃度区	8日後	10日後	15日後	21日後	28日後	Table	Fig
1	85	40	48	73	74	9	9
	73	53	59	56	61		
	(79)	(46)	(53)	(65)	(68)		
2	78	80	75	63	79	10	10
	79	78	88	74	89		
	(78)	(79)	(82)	(68)	(84)		

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		15日後	21日後	28日後	3回の平均
1	平均濃縮倍率	53.468	64.517	67.729	61.905
	3回の平均からの乖離率 (%)	13.628	4.2205	9.4080	
2	平均濃縮倍率	81.847	68.388	84.074	78.103
	3回の平均からの乖離率 (%)	4.7937	12.438	7.6450	

上記の結果から、15、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、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103%、第2濃度区において104%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	15日後	21日後	28日後	平均	Table	Fig.
1	20.3	20.5	20.8	20.5	6,9	6
2	2.10	2.06	2.05	2.07	7,10	

(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 62 倍
第2濃度区 78 倍

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	4.15%
実験終了後	3.77%

5.5 供試魚の外観観察等

異常は認められなかった。

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 SP-D-2500
	日本精密科学製	型 SP-Y-2500(S)
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 BP301S
	ザルトリウス製	型 CP324S
	メトラー製	型 AB204-S
	エー・アンド・ディ製	型 FA-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
ロータリーエバポレーター	: 東京理化学器械製	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

特殊器具

セップパック プラス C18 : 日本ウォーターズ製

試薬

アセトニトリル : 和光純薬工業製 HPLC用
ジメチルスルホキシド : ナカライテスク製 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 : ザルトリウス製 型 BP301S
メトラ製 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