

## 最 終 報 告 書

2-*tert*-ブチル-5-メチルフェノール（被験物質番号 K-1366）の  
コイにおける濃縮度試験

（試験番号：51366）

化学物質評価研究機構  
久留米研究所

## 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 通商産業省

試験の表題 2-tert-ブチル-5-メチルフェノール（被験物質番号 K-1366）の  
コイにおける濃縮度試験

試験番号 51366

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命令第4条に規定する試験施設について」（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、昭和63年11月18日改正）及び「OECD Principles of Good Laboratory Practice」(May 12, 1981)に従って実施したものです。

2000年2月24日

運営管理者



## 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 通商産業省

試験の表題 2-tert-ブチル-5-メチルフェノール（被験物質番号 K-1366）のコイ  
における濃縮度試験

試験番号 51366

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	1999年11月8日	1999年11月8日	1999年11月8日
	1999年11月25日	1999年11月25日	1999年11月25日
	1999年12月20日	1999年12月20日	1999年12月20日
	2000年2月4日	2000年2月4日	2000年2月4日
試験実施状況	1999年11月9日	1999年11月18日	1999年11月24日
	1999年11月16日	1999年11月18日	1999年11月24日
	1999年11月17日	1999年11月18日	1999年11月24日
	1999年11月24日	1999年11月29日	1999年12月1日
	1999年12月3日	1999年12月14日	1999年12月14日
	1999年12月8日	1999年12月14日	1999年12月14日
	1999年12月9日	1999年12月14日	1999年12月14日
生データ及び最終報告書	2000年2月24日	2000年2月24日	2000年2月24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。

2000年2月24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 G L P .....	1
試験日程 .....	2
試験資料の保管 .....	2
試験関係者 .....	2
最終報告書の作成 .....	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 .....	8
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 .....	22
5. 試験結果 .....	22
6. 備 考 .....	24

表 題 2-*tert*-ブチル-5-メチルフェノール (被験物質番号 K-1366) の  
コイにおける濃縮度試験

試験委託者 通商産業省  
(〒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  
(〒830-0023) 福岡県久留米市中央町 19-14  
運営管理者 [REDACTED]

試験目的 K-1366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 305」に定め  
る“Bioaccumulation : Flow-through Fish Test (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命令第4条に規定する試験施設について」  
(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、  
昭和63年11月18日改正)を適用した。

(2) OECD-GLP

「OECD Principles of Good Laboratory Practice」(May 12,  
1981)を適用した。

## 試験日程

試験開始日	1999年11月 8日
ばく露開始日	1999年11月17日
ばく露終了日	1999年12月20日
試験終了日	2000年 2月16日

## 試験資料の保管

## (1) 被験物質

同一ロットの被験物質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

試験により得られた分析結果、測定結果、観察結果、その他試験ノート等最終報告書の作成に用いた生データ、試験計画書、指示書、資料等は最終報告書の写しと共に、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


飼育管理責任者



急性毒性試験担当者


## 最終報告書の作成

試験責任者

2000年 2月16日

氏名



## 要 約

## 試験の表題

2-tert-ブチル-5-メチルフェノール（被験物質番号 K-1366）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      10 $\mu$ g/L<br>第2濃度区      1 $\mu$ g/L      |
| (3) ばく露期間   | 33日間   |
| (4) ばく露方法   | 連続流水式  |
| (5) 分 析 方 法 | 試験水分析    高速液体クロマトグラフィー<br>供試魚分析    高速液体クロマトグラフィーー質量分析法 |

## 試験結果

- |                  |                              |
|------------------|------------------------------|
| (1) 96時間LC50値    | 6.13mg/L                     |
| (2) 定常状態における濃縮倍率 | 第1濃度区    63倍<br>第2濃度区    52倍 |

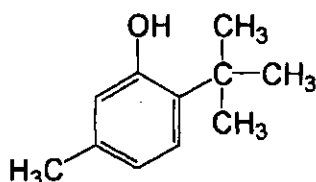
## 1. 被 験 物 質

本報告書においてK-1366は、次の名称等を有するものとする。

1.1 名 称 2-*tert*-ブチル-5-メチルフェノール

## 1.2 構造式等

構造式



分子式  $C_{11}H_{16}O$

分子量 164.24

## 1.3 入手先、商品名、等級及びロット番号\*1

(1) 入 手 先

(2) 商 品 名

(3) 等 級

(4) ロット番号 FHE01

\*1 入手先添付資料による。

## 1.4 純 度\*1

被 験 物 質 98.3%

被験物質は純度100%として取り扱った。



### 1.5 被験物質の確認

に記載の赤外吸収スペクトルと久留米事業所において測定したスペクトルが一致することを確認した (Fig. 16参照)。また、質量スペクトル (Fig. 17参照) 及び核磁気共鳴スペクトル (Reference 2参照) についても測定を行い、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      冷蔵保存
- (2) 安定性確認      ばく露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. 16参照)。

### 1.7 試験条件下での安定性

ばく露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

### 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>   |
| (2) 供       | 給 源 | 中島養魚場<br>(住所 〒 869-0123 熊本県玉名郡長洲町大字長洲 2029)   |
| (3) 蓄 養 条 件 |     | 魚の入手時に目視観察をして異常のあるものを除去し、蓄養槽で薬浴後、流水状態で6日間飼育した。  |
| (4) じゅん化条件  |     | 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、 $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ の水温の流水状態で23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52日間飼育した。 |
| (5) 体       | 重   | 平均 0.37g  |
| (6) 全       | 長   | 平均 3.5 cm   |
| (7) 感受性試験   |     | 同一ロット (TF0-990823) 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0.621mg/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

久留米事業所にて1999年8月6日及び1999年10月26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 210, Fish, Early-life Stage Toxicity Test」（July 17, 1992）又は「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）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	ガラス製ガロンびん	
(2) 試験液量	3.85L×2/濃度区	
(3) 試験温度	ばく露開始時	24.4～24.6℃
	ばく露終了時	24.5～24.7℃
(4) 溶存酸素濃度	ばく露開始時	8.2mg/L
	ばく露終了時	5.2～6.1mg/L
(5) pH	ばく露開始時	7.9～8.0
	ばく露終了時	7.8～8.0
(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 (8～16時間毎に換水)	

## 2.5 原液調製法

## (1) 分散剤

HCO-20

## (2) 調製方法

被験物質とその20倍量のHCO-20を練り合わせ、イオン交換水に溶解して被験物質濃度として1000mg/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 1999年11月 8日 ～ 1999年11月12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 6.13mg/L (Fig. 3参照)

### 3. 濃縮度試験の実施

#### 3.1 供試魚

- |                |         |  |
|----------------|---------|--|
| (1) 魚          | 種       | コイ <u>Cyprinus carpio</u>  |
| (2) 供          | 給 源     | 杉島養魚場<br>(住所 〒 866-0024 熊本県八代市郡築一番町 123-2)<br>供試魚受入日 1999年 9月17日   |
| (3) 蓄 養 条 件    |         | 魚の入手時に目視観察をして異常のあるものを除去し、受入槽で薬浴後、流水状態で3日間飼育した。   |
| (4) じゅん化条件     |         | 蓄養後、寄生虫駆除の薬浴を行った後、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、 $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 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22日間飼育した。 |
| (5) ばく露開始前の全長等 |         |  |
|                | 全 長     | 平均 $8 \pm 4\text{cm}$  |
|                | ロ ッ ト   | TFC-990917   |
| (6) 年          | 齢       | 当歳魚  |
| (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<br>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

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	100L容ガラス製水槽	
(3) 試験水量	原液2mL/分及び試験用水1000mL/分の割合で 1443L/日を試験水槽に供した。	
(4) 原液タンク	10L容テドラーバック 交換頻度 3回程度/週	
(5) 試験温度	第1濃度区	25.3～25.8℃
	第2濃度区	25.1～25.6℃
	対照区	25.1～25.7℃
(6) 溶存酸素濃度	第1濃度区	7.0～ 7.4mg/L (Fig. 11参照)
	第2濃度区	6.9～ 7.4mg/L (Fig. 12参照)
	対照区	8.0～ 8.2mg/L (Fig. 13参照)
(7) pH	第1濃度区	7.4～ 7.7
	第2濃度区	7.4～ 7.7
	対照区	7.5～ 7.9
(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	40尾 (ばく露開始時)
	対照区	8尾 (ばく露開始時)
(10) ばく露期間	33日間	
(11) 実施場所	213アクアトロン室	

## 3.4 原液調製法

## (1) 分散剤

2.5の(1)に同じ。

## (2) 調製方法

## ・第1濃度区

2.5の(2)と同様にして被験物質濃度として5mg/Lの原液を調製した。

## ・第2濃度区

2.5の(2)と同様にして被験物質濃度として0.5mg/Lの原液を調製した。

## ・対照区

HCO-20をイオン交換水に溶解して100mg/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 10 $\mu$ g/L

第2濃度区 1 $\mu$ g/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     | 試験期間中は、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、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質量分析法 (LC-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)に分けて行った。

対照区はばく露開始前及びばく露終了時に行い、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。

### 3.7.2 分析試料の前処理

#### (1) 試験水中の被験物質

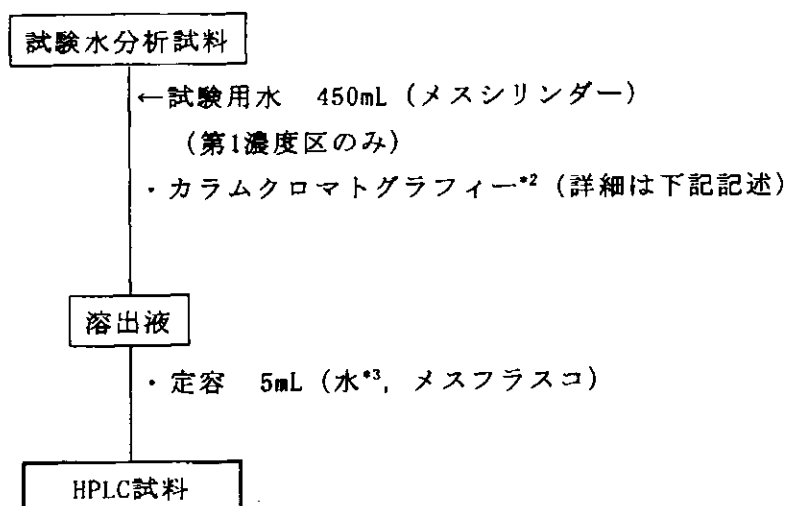
試験水槽から

第1濃度区            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



#### \*2 カラムクロマトグラフの条件

セップパック C18

(洗浄法 : アセトニトリル 5mL、水\*3 5mL)

負荷法 試料液全量を負荷した。

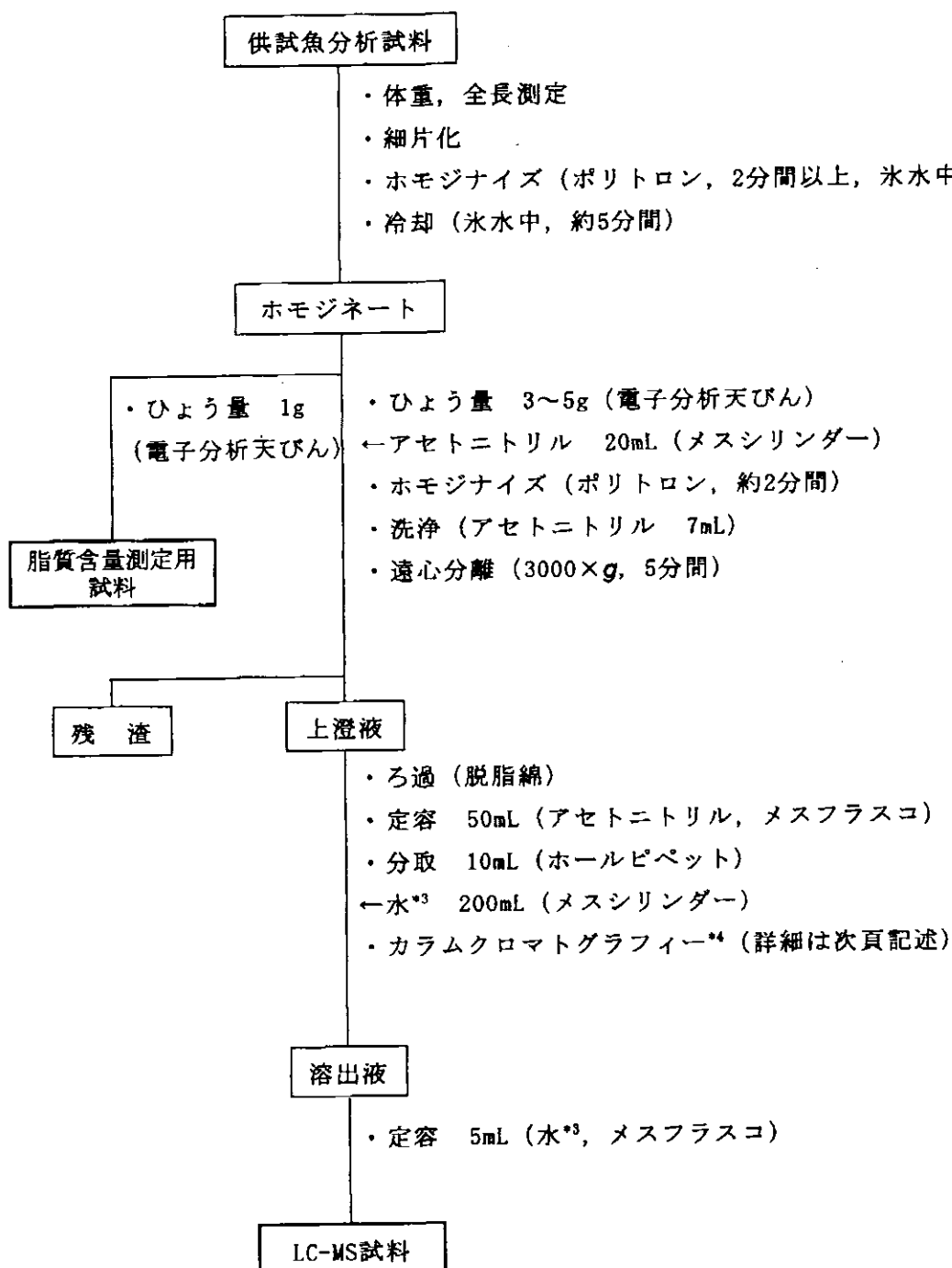
溶出法 アセトニトリル 2.5mLで溶出した。

\*3 水道水を超純水製造システムを用いて処理した水。

## (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質量分析法 (LC-MS) 試料とした。

## フロースキーム





\*4 カラムクロマトグラフの条件

セップパック C<sub>18</sub>

(洗浄法 : アセトニトリル 5mL、水<sup>\*3</sup> 5mL)

負荷法 全量を負荷した。

溶出法 アセトニトリル／水<sup>\*3</sup> (2/1 V/V) 3mLで溶出した。

### 3.7.3 被験物質の定量分析

#### (1) 試験水分分析

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 (Table-6, 7、Fig.6参照)。

#### (a) 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-10AD
検 出 器	島津製作所製 SPD-10A
カラム恒温槽	島津製作所製 CTO-10A
カ ラ ム	L-column ODS 15cm×4.6mm I.D. ステンレス製
カラム温度	35℃
溶 離 液	アセトニトリル/水 <sup>*3</sup> (7/3 V/V)
流 量	1.0mL/min
測 定 波 長	275nm (Fig.15参照)
注 入 量	100μL
検 出 器 出 力	2V/AU

#### (b) 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。

被験物質100mgを正確にはかりとり、アセトニトリルに溶解して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10mg/Lの被験物質溶液を調製し、さらにアセトニトリル/水<sup>\*3</sup>(1/1 V/V)で希釈して0.10mg/Lの標準溶液とした。

#### (c) 検量線の作成

(b)の標準溶液の調製と同様にして0.050、0.10及び0.20mg/Lの標準溶液を調製した。これらを(a)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400μV・sec (被験物質濃度0.0025mg/L) とした (Fig.4参照)。

## (2) 供試魚分析

前処理を行って得られたLC-MS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質量分析法により被験物質を分析した。なお、被験物質濃度が検量線の範囲を越えた場合は、その範囲にはいるように希釈し分析した。LC-MS試料中の被験物質濃度は、標準溶液及びLC-MS試料のマスフラグメン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-9, 10, 11、Fig. 9, 10, 11参照)。

## (a) 定量条件

機	器	高速液体クロマトグラフー質量分析計
高速液体クロマトグラフ		
		ウォータース社製 Alliance 2690
質量分析計		ウォータース社製 ZMD

液体クロマトグラフ条件

カ	ラ	ム	L-column ODS
			15cm×2.1mm I.D. ステンレス製
	カラム温度		40℃
溶	離	液	A(10%) : アセトニトリル
			B(60%) : メタノール
			C(30%) : 水 <sup>*3</sup>
流		量	0.2mL/min
注	入	量	5μL

質量分析計条件

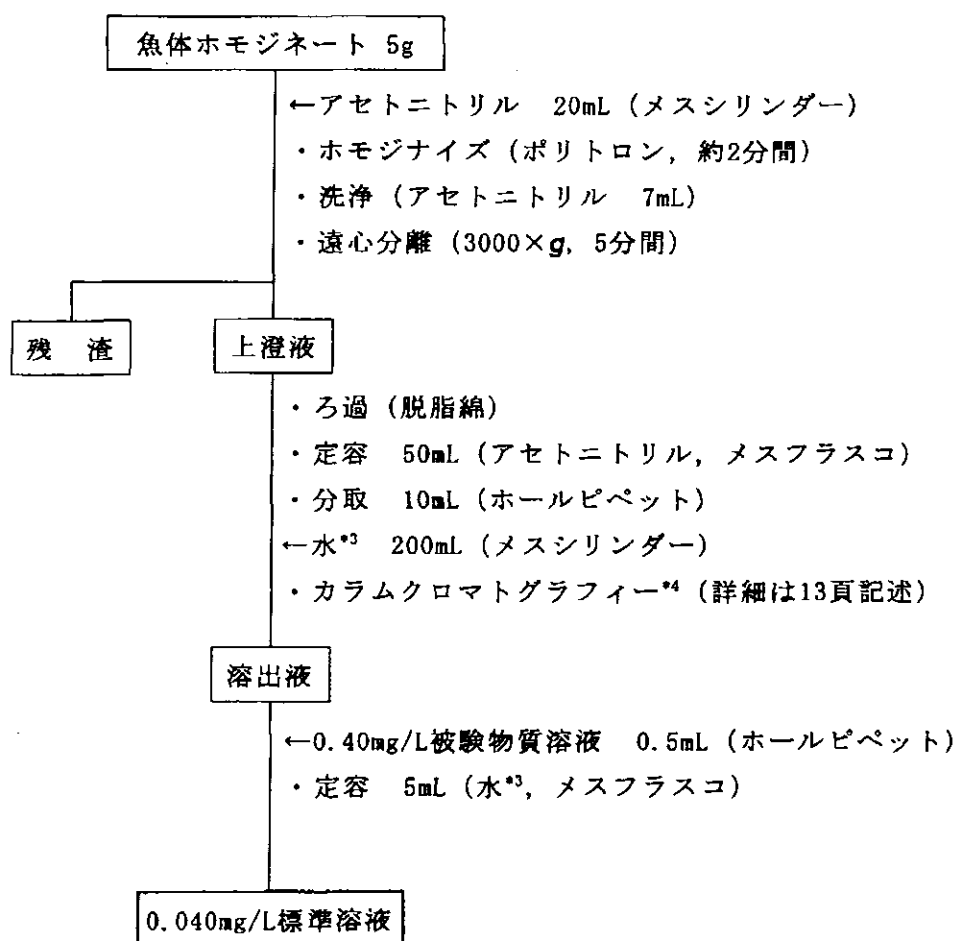
イオン化法	エレクトロスプレー
検出イオン	負イオン
コーン電圧	40V
イオン源温度	150℃
脱溶媒システム温度	400℃
脱溶媒ガス流量	350L/hr
測定イオン	m/z 163

## (b) 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。

被験物質100mgを正確にはかりとり、アセトニトリルに溶解して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10mg/Lの被験物質溶液を調製し、さらに水<sup>\*3</sup>で希釈して0.40mg/Lの被験物質溶液とした。これを以下のフロースキームに従って前処理し、0.040mg/Lの標準溶液を調製した。

## フロースキーム



## (c) 検量線の作成

(b)の標準溶液の調製と同様にして0.20、0.40及び0.80mg/Lの標準溶液を調製した。これらを(b)のフロースキームに従って前処理し、0.020、0.040及び0.080mg/Lの標準溶液を調製した。これらを(a)の定量条件に従って分析し、得られたそれぞれのマスフラグメン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650（被験物質濃度0.00099mg/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魚体ホモジネート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魚体ホモジネートについて、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、ブランク試験においてクロマトグラム上及びマスフラグメントグラム上、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値とした（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0.5μg添加）

94.8%, 96.1%      平均 95.5%

## 供試魚分析（被験物質2μg添加）

87.8%, 91.0%      平均 89.4%

## 3.7.5 供試魚中の脂質含量

対照区の供試魚ホモジネートよりひょう量した脂質含量測定用試料（3.7.2 (2)参照）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結果、それぞれの平均値は以下のとおりであった。

ばく露開始前      2.23%  
 ばく露終了後      2.59%

また、第1及び第2濃度区の供試魚ホモジネートよりひょう量した脂質含量測定用試料を用いて脂質含量の測定を行った。

Table-1      脂質含量

(単位 %)

濃度区	7日後	14日後	21日後	28日後	33日後
1	2.68	2.00	2.45	1.97	1.60
2	2.59	2.06	1.90	1.92	1.91

### 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の定量下限濃度

3.7.3(1)(c)の検量線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            0.26 µg/L

第2濃度区            0.026µg/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の定量下限濃度

3.7.3(2)(c)の検量線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は分析に用いた魚体ホモジネートを5gとしたとき5.5ng/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) 又は魚体ホモジネート (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 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

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

$\overline{Cws}$  : 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）

$Cw(n)$  : 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

#### (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

$Cf(m)$  : m回目の供試魚中平均被験物質濃度（FBを差し引いた値）

FB : 対照区におけるばく露開始前及び終了時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

#### (3) 定常状態における濃縮倍率の算出

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

$BCFss$  : 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

$\overline{Cws}$  : 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

なお、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%以内とした。



## (4) 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	0.6倍
第2濃度区	5.7倍

## 3.7.8 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)

$S$  : 脂質含量測定用試料のひょう量値(g)

## 3.8 数値の取扱い

数値の丸め方は、JIS Z 8202-1985 参考3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-2に示されるように、設定値の90%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-2 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	21日後	28日後	33日後	平均 (標準偏差)	Table	Fig.
1	9.90	9.95	9.78	9.35	9.41	9.51	9.65 (0.260)	6	6
2	0.974	0.947	1.03	0.938	0.972	0.924	0.964 (0.0374)	7	

##### 5.2 濃縮倍率

濃縮倍率をTable-3に示した。

Table-3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。被験物質のコイに対する濃縮性の程度は、濃縮倍率で第1濃度区において41～92倍、第2濃度区において39～93倍であった。

Table-3 濃縮倍率

濃度区	7日後	14日後	21日後	28日後	33日後	Table	Fig.
1	92	56	73	48	41	9	9
	78	88	76	64	74		
2	93	73	63	50	53	10	10
	72	52	39	52	48		

### 5.3 定常状態における濃縮倍率の算出

5.2の結果から、21、28及び33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94%、第2濃度区において95%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	28日後	33日後	平均	Table	Fig.
1	9.35	9.41	9.51	9.42	6, 9	6
2	0.938	0.972	0.924	0.945	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 63倍

第2濃度区 52倍

### 5.4 供試魚の外観観察等

異常は認められなかった。

## 6. 備 考

試験に使用した主要な装置・機器、特殊器具、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	:	東京理化学器械製	型 GMW
溶存酸素測定装置	:	飯島電子工業製	型 F-102
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、試薬  
装置・機器

高速液体クロマトグラフ	:	14頁参照
高速液体クロマトグラフー質量分析計	:	15頁参照
天びん	:	ザルトリウス社製 型 1702MP8 メトラー社製 型 AE163 ザルトリウス社製 型 1404MP8 エー・アンド・ディ社製 型 FA-2000
紫外可視分光光度計	:	島津製作所製 型 UV-2200A
ロータリーエバポレーター	:	東京理化学器械製 型 N-1
ホモジナイザー（ポリトロン）	:	キネマチカ社製 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
遠心分離機	:	久保田製作所製 型 6900

## 特殊器具

セップパック 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
メタノール	:	和光純薬工業製	HPLC用
メタノール	:	和光純薬工業製	試薬一級
クロロホルム	:	キシダ化学製	試薬特級
硫酸ナトリウム	:	片山化学工業製	試薬一級
HCO-20	:	日光ケミカルズ製	
精製水	:	高杉製薬製	日本薬局方

## (3) 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

高速液体クロマトグラフィー質量分析計

: マイクロマス社製 型 Quattro II