

# 最 終 報 告 書

2,4-ジイソシアナトトルエン（被験物質番号 K-311）のコイにおける濃縮度試験

（試験番号：50311）

化学物質評価研究機構  
外国産品部

## 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 新エネルギー・産業技術総合開発機構

試験の表題 2,4-ジイソシアナトトルエン (被験物質番号 K-311) のコイにおける  
濃縮度試験

試験番号 50311

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。

2003 年 3 月 3 / 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 2,4-ジイソシアナトトルエン（被験物質番号 K-311）のコイにおける  
濃縮度試験

試験番号 50311

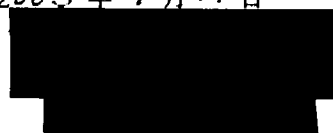
上記試験は財団法人化学物質評価研究機構久留米事業所の信頼性保証部門が監査又は査察を実施しており、監査又は査察を行った内容、日付並びに試験責任者及び運営管理者に報告を行った日付は以下の通りです。

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 11 月 8 日	2002 年 11 月 8 日	2002 年 11 月 8 日
	2002 年 12 月 9 日	2002 年 12 月 9 日	2002 年 12 月 9 日
	2002 年 12 月 19 日	2002 年 12 月 19 日	2002 年 12 月 19 日
試 験 実 施 状 況	2002 年 11 月 12 日	2002 年 11 月 27 日	2002 年 11 月 27 日
	2002 年 11 月 25 日	2002 年 11 月 27 日	2002 年 11 月 27 日
	2002 年 11 月 26 日	2002 年 11 月 27 日	2002 年 11 月 27 日
	2002 年 11 月 27 日	2002 年 11 月 27 日	2002 年 11 月 27 日
	2002 年 11 月 28 日	2002 年 12 月 3 日	2002 年 12 月 3 日
	2002 年 11 月 29 日	2002 年 12 月 3 日	2002 年 12 月 3 日
	2002 年 12 月 2 日	2002 年 12 月 3 日	2002 年 12 月 3 日
生データ及び最終報告書	2003 年 4 月 7 日	2003 年 4 月 11 日	2003 年 4 月 11 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。

2003 年 4 月 11 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 .....	22
5. 試験結果 .....	22
6. 考 察 .....	24
7. 備 考 .....	25

表 題	2,4-ジイソシアナートルエン（被験物質番号 K-311）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-311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GLP	(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11月 8日
実験開始日	2002年11月18日
実験終了日	2003年 1月17日
試験終了日	2003年 3月31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 化学物質安全室

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

2003 年 3 月 31 日

試験責任者

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

## 要 約

## 試験の表題

2,4-ジイソシアナトトルエン（被験物質番号 K-311）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 0.8 $\mu\text{g/g}$<br>第2濃度区 0.08 $\mu\text{g/g}$ |
| (3) ばく露期間   | 60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    | >0.100mg/L               |
| (2) 定常状態における濃縮倍率 | 第1濃度区 180倍<br>第2濃度区 130倍 |

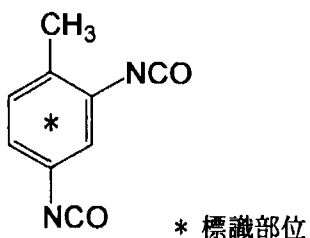
## 1. 被 験 物 質

本報告書においてK-311は、次の名称等を有するものとする。

1.1 名 称 2,4-ジイソシアナトトルエン

1.2 構造式等

構造式



分子式  $C_9H_6N_2O_2$

分子量 174.16 (非標識被験物質)  
176.2 (標識被験物質)\*1

CAS No. 584-84-9

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 | 13.6MBq/mg          |
| (4) ロット番号   | CFQ13218            |
| (5) 放射化学的純度 | 98.4% (radio-GCによる) |

標準試験液はトルエン溶液として入手した。

標識被験物質は純度100%として取り扱った。

\*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 | ██████████           |
| (5) 純 度   | 97.7%                |

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.7参照)、標識被験物質については質量スペクトル (Reference 3参照) 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 | 冷暗所保存  |
| (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.8参照)。また、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.7参照)。 |

#### 1.7 試験条件下での安定性

被験物質は水中で速やかに変化すると考えられ、試験条件下においても同様と考えられるが、変化物については確認できなかった。しかし、標識被験物質を用いた予備試験の結果、標識化合物としての濃度は試験水槽中で安定であることを確認した。一方、試験原液については、実験開始前に非標識被験物質を用いて予備検討を行った結果、室温・遮光条件下でアセトン中、7日後に94%の残留が認められた。そこで、本試験では2日あるいは3日に1回の頻度で原液交換を行うことで、標識被験物質を供給し、変化物を含む標識化合物による濃縮度試験を実施した。

## 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><br>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<br>(住所 〒 869-0123 熊本県玉名郡長洲町大字長洲 2029)   |
| (3) 畜養条件<br>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39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<br>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13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23日間、活性炭処理した脱塩素水道水により9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 0.32g  |
| (6) 全 長           | 平均 3.3 cm   |
| (7) 感受性試験         | 同一ロット (TF0-020919) 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

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2002年9月30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	25.2℃
	換水前	25.0℃
(4) 溶存酸素濃度	ばく露開始時	8.1mg/L
	換水前	6.6mg/L
(5) pH	ばく露開始時	8.0
	換水前	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（8～16時間毎に換水）	
(9) 遮光	ばく露期間中、遮光条件下で実施した。	

## 2.5 原液調製法

## (1) 分散剤

アセトン

## (2) 調製方法

非標識被験物質をアセトンに溶解して、1000mg/Lの被験物質溶液を調製した。

## 2.6 試験の実施

- |           |                           |
|-----------|---------------------------|
| (1) 実施場所  | 214LC50室                  |
| (2) 試験実施日 | 2002年11月11日 ～ 2002年11月15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 > 0.100mg/L\*<sup>3</sup> (Fig. 3参照)

\*3 被験物質が水中で変化すること及び溶解性が低いことを考慮して、これ以上の高濃度の試験は行わなかった。

### 3. 濃縮度試験の実施

#### 3.1 供試魚

- |         |   |  |
|---------|---|--|
| (1) 魚   | 種 | コイ <i>Cyprinus carpio</i>  |
|         |   | 選択理由：過去の知見との整合性を考慮するため及び<br>大きさが扱い易いため。  |
| (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 2002年 9月12日   |
| (3) 畜   | 養 | 条  |
|         | 期 | 間  |
|         | 等 |  |
|         | 薬 | 浴  |
|         |   | 魚の入手時に目視観察をして異常のあるものを除去し、<br>受入槽で病気予防及び寄生虫駆除の薬浴を行った後、<br>流水状態で18日間飼育した。<br>病気予防として水産用OTC（塩酸オキシテトラサイクリン）<br>50mg/Lと塩化ナトリウム7g/Lの混合薬浴を24時間実施し<br>た。寄生虫駆除としてホルマリン30μL/Lの24時間薬浴を2<br>回実施した。   |
| (4) じゅん | 化 | 条  |
|         | 期 | 間  |
|         | 等 |  |
|         | 薬 | 浴  |
|         |   | 蓄養後、じゅん化水槽へ搬入し、再度薬浴した後、じゅん化<br>を行った。その間異常のあるものは除去し、25±2℃の水温<br>の流水状態で17日間飼育した。さらに試験水槽へ移し、薬<br>浴後、同温度の流水状態で井水（久留米事業所敷地内で揚<br>水した地下水）で9日間飼育した後、東京事業所 生物実験<br>室の試験水槽へ移し、薬浴後、同温度の流水状態で活性炭<br>処理した脱塩素水道水で17日間飼育した。<br>じゅん化水槽では水産用OTC 50mg/Lと塩化ナトリウム7g/L<br>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<br>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 | 6.1～9.8cm  |
| (6) ロ   | ッ | TFC-020912   |
| (7) 年   | 齢 | 当才魚  |
| (8) 餌   | 料 |  |
|         | 種 | 類  |
|         | 組 | 成  |
|         | 製 | 造  |
|         | 元 |  |
|         | 給 | 餌  |
|         | 方 | 法  |
|         |   | コイ稚魚育成用配合飼料<br>たん白質含量 43.0%以上<br>脂 質 含 量 3.0%以上<br>日本配合飼料株式会社<br>供試魚体重の約2%相当量を1日2回に分けて給餌した。<br>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2002年10月28日に採水し、測定又は分析を行った結果をReference 2に示す。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0.04mL/分及び試験用水400mL/分の割合で576L/日を試験水槽に供した。   |
| (4) 原液タンク   | 250mL容ガラス褐色製びん<br>交換頻度 2～3回程度/週   |
| (5) 試験温度    | 第1濃度区 24.7～25.0℃<br>第2濃度区 24.8～25.1℃<br>対照区 24.8～25.1℃                                  |
| (6) 溶存酸素濃度  | 第1濃度区 7.1～8.3mg/L (Fig.4参照)<br>第2濃度区 7.1～8.4mg/L (Fig.5参照)<br>対照区 7.1～7.9mg/L (Fig.6参照) |
| (7) pH      | 第1濃度区 6.8～7.3<br>第2濃度区 6.8～7.3<br>対照区 6.9～7.3   |
| (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)<br>対照区 14尾 (ばく露開始時)  |
| (10) ばく露期間  | 60日間<br>設定理由: 28日間では定常状態に達しなかったため。  |
| (11) 実施場所   | 東京事業所 生物実験室   |

### 3.4 原液調製法

#### (1) 分散剤

2.5の(1)に同じ。

#### (2) 調製方法

##### ・第1濃度区

標識被験物質及び非標識被験物質を2.5の(2)と同様にして、それぞれ8mg/Lの被験物質溶液を調製した。これらを標識被験物質溶液／非標識被験物質溶液が1/4 (V/V) の割合になるように混合して、被験物質濃度として8mg/Lの原液を調製した。

##### ・第2濃度区

標識被験物質を2.5の(2)と同様にして被験物質濃度として0.8mg/Lの原液を調製した。

##### ・対照区

標識被験物質及び非標識被験物質を含まないアセトンを経原液として供給した。

### 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7回行い、1回当りの採取尾数は4尾とし、2群(2尾1群)\*4に分けて行った。

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、2群(2尾1群)に分けて分析した。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。

\*4 個体ごとの分析では、放射能測定用の乾燥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

#### (1) 試験水中の被験物質

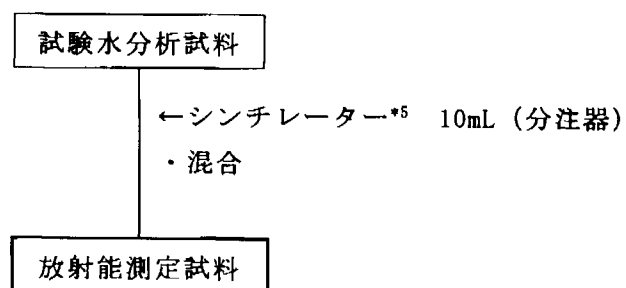
試験水槽から

第1濃度区      10mL

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。

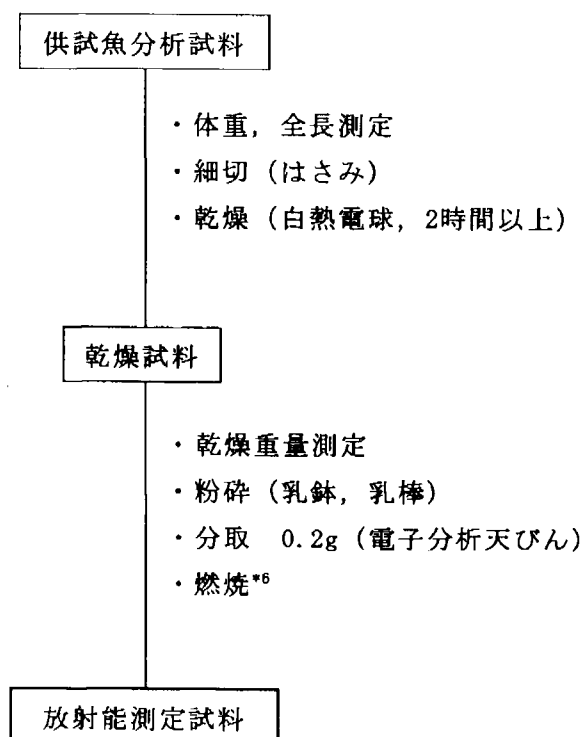
フロースキーム



\*5 ウルチマゴールドXR (パッカード社製)

## (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。



## \*6 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	時 間
		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 0.2g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	$^{14}\text{C}$
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-6参照)。

供試魚分析操作における回収率(被験物質 40ng添加)

101%, 99.2% 平均 99.9%

### 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-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60DPMとした。これより、試験水中の定量下限濃度\*7 はそれぞれ、

第1濃度区            0.037 µg/L

第2濃度区            0.0074µg/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60DPMとした。これより、供試魚中の定量下限濃度\*7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0.074ng/gと算出される。

$$\text{*7 被験物質定量下限濃度} = \frac{A}{B \times C \times D \times \frac{E}{F} \times \frac{H}{100} \times G}$$

(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 13.6 (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 : 放射能比 (第1濃度区 0.2, 第2濃度区 1.0)

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

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

$\overline{C_w}$  : 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) ( $\text{ng/g}$ )

$\overline{C_w}$  : 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 ( $\text{ng/g}$ )

## (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

## 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<sub>ss</sub>) の算出法

定常状態における濃縮倍率 (BCF<sub>ss</sub>) 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) (μg/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 (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

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

$\overline{Cfs}$  : 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平均被験物質濃度 (μg/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	0.092倍
第2濃度区	0.96 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-1 試験水中の被験物質濃度

(単位  $\mu\text{g/L}$ )

濃度区	1日後	4日後	11日後	18日後	22日後	36日後	50日後	60日後	平均 (標準偏差)	Table
1	0.796	0.756	0.846	0.785	0.790	0.789	0.795	0.835	0.799 (0.0287)	4
2	0.0723	0.0751	0.0773	0.0755	0.0795	0.0761	0.0786	0.0789	0.0767 (0.00240)	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43～210倍、第2濃度区において25～380倍であった。

Table-2 濃縮倍率

( ) 内は平均値

濃度区	4日後	11日後	18日後	22日後	36日後	50日後	60日後	Table
1	50 43 (46)	100 130 (120)	130 180 (150)	180 170 (180)	190 150 (170)	180 210 (200)	160 180 (170)	7
2	27 25 (26)	130 100 (120)	180 150 (160)	380 230 (310)	120 140 (130)	110 120 (110)	150 130 (140)	8

### 5.3 定常状態における濃縮倍率

5.2の結果から、36、50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-3に示されるように、第1濃度区において設定値の101%、第2濃度区において97%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	36日後	50日後	60日後	平均	Table
1	0.789	0.795	0.835	0.806	4, 7
2	0.0761	0.0786	0.0789	0.0779	5, 8

#### (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      180倍  
第2濃度区      130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      3.15%  
実験終了後      3.32%

### 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

本被験物質は水中で速やかに変化し、本体での濃度維持が困難であること及び変化の形態が不明であり変化物が特定できないことから、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) 濃縮倍率について

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、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	: 日本精密科学製	型 SP-D-2500
	ユニフローズ製	型 uf-4004S
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	: 飯島電子工業製	型 F-102
	堀場製作所製	型 OM-12
pH計	: 東亜電波工業製	型 HM-14P
	東亜電波工業製	型 HM-20P
	堀場製作所製	型 F-22

## (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

液体シンチレーションアナライザー	: 16頁参照	
サンプルオキシダイザー	: 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

## 試薬

アセトン	: 和光純薬工業製	試薬特級
ウルチマゴールドXR	: パッカーダ社製	
カーボソープE	: パッカーダ社製	
パーマフローE	: パッカーダ社製	

## (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	: メトラー社製	型 AE163
	: ザルトリウス社製	型 BP1200
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 (ポリトロン)	: キネマチカ製	型 PCU11
		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 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	: キシダ化学製	試薬特級
硫酸ナトリウム (無水)	: シグマ アルドリッチ ジャパン製	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		
	: パッカー社製	型 500TR
高速液体クロマトグラフ	: 島津製作所製	型 LC-10A