

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 ポリブロモビフェニル (Br5-6) [2, 2', 4, 5', 6-ペンタブロモビフェニルと2, 2', 4, 4', 6, 6'-ヘキサブロモビフェニルとの等量混合物]
(被験物質番号 K-519A) のコイにおける濃縮度試験

試験番号 50519A

本最終報告書（電子媒体上のPDFファイル）は、上記試験の最終報告書を正確にコピーしたものです。

2003年4月17日

運営管理者

[Redacted signature block]

最 終 報 告 書

ポリブロモビフェニル (Br5-6) [2, 2', 4, 5', 6-ペンタブロモビフェニルと2, 2', 4, 4', 6, 6'-ヘキサブロモビフェニルとの等量混合物] (被験物質番号 K-519A) のコイにおける濃縮度試験

(試験番号 : 50519A)

財団法人
化学物質評価研究機構
残留物事業所

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 新エネルギー・産業技術総合開発機構

試験の表題 ポリブロモビフェニル (Br5-6) [2, 2', 4, 5', 6-ペンタブロモビフェニルと2, 2', 4, 4', 6, 6'-ヘキサブロモビフェニルとの等量混合物]
(被験物質番号 K-519A) のコイにおける濃縮度試験

試験番号 50519A

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 4 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 新エネルギー・産業技術総合開発機構

試験の表題 ポリブロモビフェニル (Br5-6) [2, 2', 4, 5', 6-ペンタブロモビフェニルと2, 2', 4, 4', 6, 6'-ヘキサブロモビフェニルとの等量混合物]
(被験物質番号 K-519A) のコイにおける濃縮度試験

試験番号 50519A

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 9 月 27 日	2002 年 9 月 27 日	2002 年 9 月 27 日
	2002 年 11 月 29 日	2002 年 12 月 2 日	2002 年 12 月 2 日
	2002 年 12 月 10 日	2002 年 12 月 10 日	2002 年 12 月 10 日
	2003 年 3 月 10 日	2003 年 3 月 11 日	2003 年 3 月 11 日
	2003 年 3 月 24 日	2003 年 3 月 24 日	2003 年 3 月 24 日
試 験 実 施 状 況	2002 年 9 月 30 日	2002 年 9 月 30 日	2002 年 9 月 30 日
	2002 年 10 月 1 日	2002 年 10 月 1 日	2002 年 10 月 1 日
	2002 年 10 月 9 日	2002 年 10 月 11 日	2002 年 10 月 11 日
	2002 年 10 月 10 日	2002 年 10 月 11 日	2002 年 10 月 11 日
	2002 年 10 月 23 日	2002 年 11 月 7 日	2002 年 11 月 7 日
	2002 年 11 月 6 日	2002 年 11 月 7 日	2002 年 11 月 7 日
	2002 年 11 月 25 日	2002 年 11 月 25 日	2002 年 11 月 25 日
	2002 年 12 月 10 日	2002 年 12 月 18 日	2002 年 12 月 18 日
	2002 年 12 月 17 日	2002 年 12 月 18 日	2002 年 12 月 18 日
	2002 年 12 月 18 日	2002 年 12 月 18 日	2002 年 12 月 18 日
生データ及び最終報告書	2003 年 4 月 17 日	2003 年 4 月 17 日	2003 年 4 月 17 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 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	23
5. 試験結果	23
6. 考 察	28
7. 備 考	29

表 題	ポリブロモビフェニル (Br5-6) [2, 2', 4, 5', 6-ペンタブロモビフェニルと2, 2', 4, 4', 6, 6'-ヘキサブロモビフェニルとの等量混合物] (被験物質番号 K-519A) 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
試験目的	K-519A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 9月27日
実験開始日	2002年10月10日
実験終了日	2003年 1月24日
試験終了日	2003年 4月17日

試験資料の保管

(1) 被験物質

被験物質は本試験において全量使用したため、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

2003 年 4 月 17 日

試験責任者

要 約

試験の表題

ポリブロモビフェニル(Br5-6) [2, 2', 4, 5', 6-ペンタブロモビフェニルと2, 2', 4, 4', 6, 6'-ヘキサブロモビフェニルとの等量混合物] (被験物質番号 K-519A) 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 1 µg/L
第2濃度区 0.1µg/L |
| (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 | 高速液体クロマトグラフィー |

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 ピークA 21000倍
ピークB 11000倍
第2濃度区 ピークA 22000倍
ピークB 11000倍 |
| (3) 排泄半減期 | 第1濃度区 ピークA 28日
ピークB 31日
第2濃度区 ピークA 29日
ピークB 37日 |
| (4) 各部位における濃縮倍率 | Table-5参照 (27頁) |

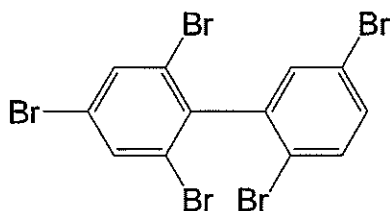
1. 被驗物質

本報告書においてK-519Aは、次の名称等を有するものとする。

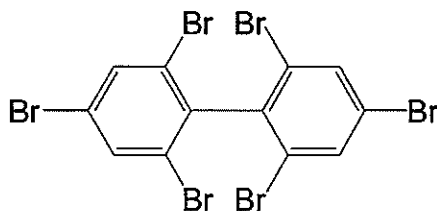
- 1.1 名 称 2, 2', 4, 5', 6-ペンタブロモビフェニルと2, 2', 4, 4', 6, 6'-ヘキサ
ブロモビフェニルとの等量混合物

1.2 構造式等.

構造式



①2, 2', 4, 5', 6-ペンタブロモビフェニル



②2, 2', 4, 4', 6, 6'-ヘキサブromoビフェニル

分子式	①C ₁₂ H ₅ Br ₅	②C ₁₂ H ₄ Br ₆
分子量	①548.69	②627.58
CAS No.	①59080-39-6	②59261-08-4

1.3 入手先、商品名及びロット番号*

- (1) 入 手 先
(2) 商 品 名
(3) ロット番号

*1 入手先添付資料による。

1.4 純 度*2

被 験 物 質 100%

*2 HPLCによる。

2, 2', 4, 5', 6-ペンタブロモビフェニルと2, 2', 4, 4', 6, 6'-ヘキサブロモビフェニルそれぞれ約5mg×20本をヘキサンに溶解し、混合した後、ロータリーエバポレーターを用い減圧下でゆっくりヘキサンを留去して回収したものを被験物質 (172.8mg) とした。それぞれの物質の成分組成は2, 2', 4, 5', 6-ペンタブロモビフェニル 52.1%、2, 2', 4, 4', 6, 6'-ヘキサブロモビフェニル 47.9% (HPLCによる) であった。

1.5 被験物質の確認

赤外吸収スペクトル (Fig. 21参照)、質量スペクトル (Fig. 22参照) 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 室温保存

(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. 21参照)。

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

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) 畜 | 養 | 条 |
| | 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35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10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76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 0.31g |
| (6) 全 | 長 | 平均 3.1cm |
| (7) 感受性試験 | | 同一ロット（TF0-020701）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0.600mg/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2002年11月1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 24.9℃
	換水前 25.1℃
(4) 溶存酸素濃度	ばく露開始時 8.1mg/L
	換水前 6.3mg/L
(5) pH	ばく露開始時 8.1
	換水前 7.9
(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）

2.5 原液調製法

(1) 分散剤

ジメチルスルホキシド

(2) 調製方法

被験物質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 2002年 9月30日 ～ 2002年10月 4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 $>0.100\text{mg/L}^{*3}$ (Fig. 3参照)

*3 対水溶解度を考慮して0.100mg/Lを上限とした。

3. 濃縮度試験の実施

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 | 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 2002年 7月 2日 |
| (3) 畜 | 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40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、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28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26日間飼育した。 |
| | 薬 | 浴 |
| | | じゅん化水槽では水産用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。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 | 7.7～13.7cm |
| (6) ロ | ッ | ト |
| | | TFC-020702 |
| (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

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0.04mL/分及び試験用水1000mL/分の割合で1440L/日を試験水槽に供した。
ばく露期間	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	
(4) 原液タンク	1L容ガラス製褐色びん
	交換頻度 2回程度/月
(5) 試験温度	第1濃度区 24.3～25.5℃
	第2濃度区 24.7～25.6℃
	対照区 24.5～25.4℃
(6) 溶存酸素濃度	第1濃度区 7.7～8.1mg/L (Fig.17参照)
	第2濃度区 7.7～8.1mg/L (Fig.18参照)
	対照区 8.0～8.1mg/L (Fig.19参照)
(7) pH	第1濃度区 7.8～8.3
	第2濃度区 7.8～8.3
	対照区 7.9～8.3
(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 46尾 (ばく露開始時)
	対照区 12尾 (ばく露開始時)
(10) ばく露期間	60日間
	設定：60日間で定常状態に達したため。
(11) 排泄期間	45日間
	設定：排泄半減期が得られたため。
(12) 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1000mg/Lの被験物質溶液を調製し、これ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25.0mg/Lの原液を調製した。

・第2濃度区

2.5の(2)と同様にして1000mg/Lの被験物質溶液を調製し、これ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2.50mg/Lの原液を調製した。

・対照区

ジメチルスルホキシド

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 1 $\mu\text{g/L}$

第2濃度区 0.1 $\mu\text{g/L}$

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 | 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。

被験物質は2成分の混合物であるため高速液体クロマトグラフィーで分析したところ、2,2',4,5',6-ペンタブロモビフェニル、2,2',4,4',6,6'-ヘキサブロモビフェニルの溶出順で2本のピークが検出された。そこで、各々のピークについて定量を行った。ただし、各ピークの濃度は、成分組成を考慮せず、3.7.3(2) 標準溶液の調製で示す被験物質濃度として表示した。各ピークは溶出順にピークA、ピークBとした。

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)*4に分けて行った。

また、濃縮倍率が1000倍を越えたため、部位別試験及び排泄試験を行った。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、脂質含量測定用試料の分取、分析試料の分取は行わなかった。供試魚分析は排泄期間中に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。

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2尾を追加で取り上げ、3群(2尾1群)とした。

*4 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

(1) 試験水中の被験物質

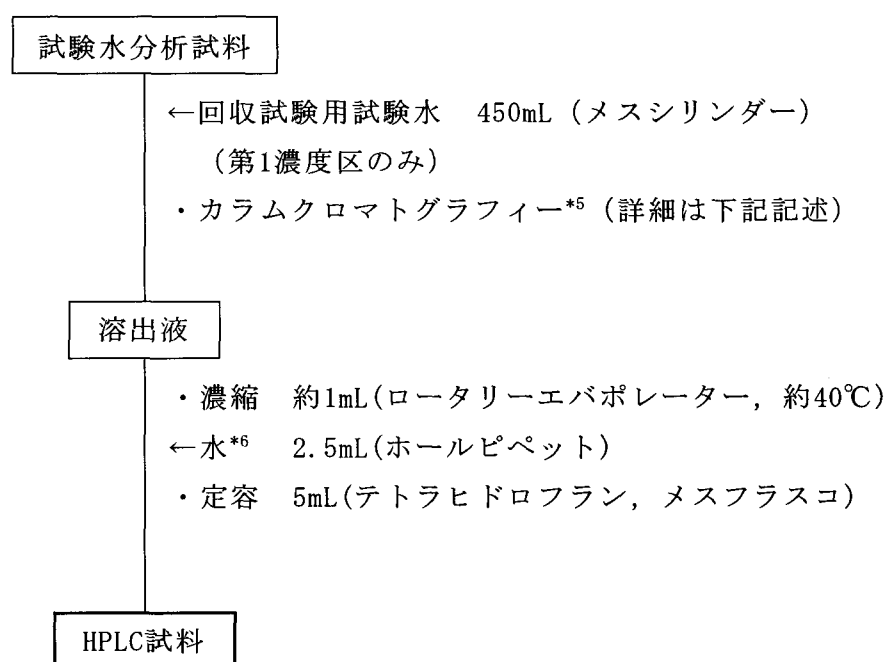
試験水槽から

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



*5 カラムクロマトグラフの条件

セップパック C₁₈

（洗浄法：テトラヒドロフラン，水*6 各10mL）

負荷法 全量負荷

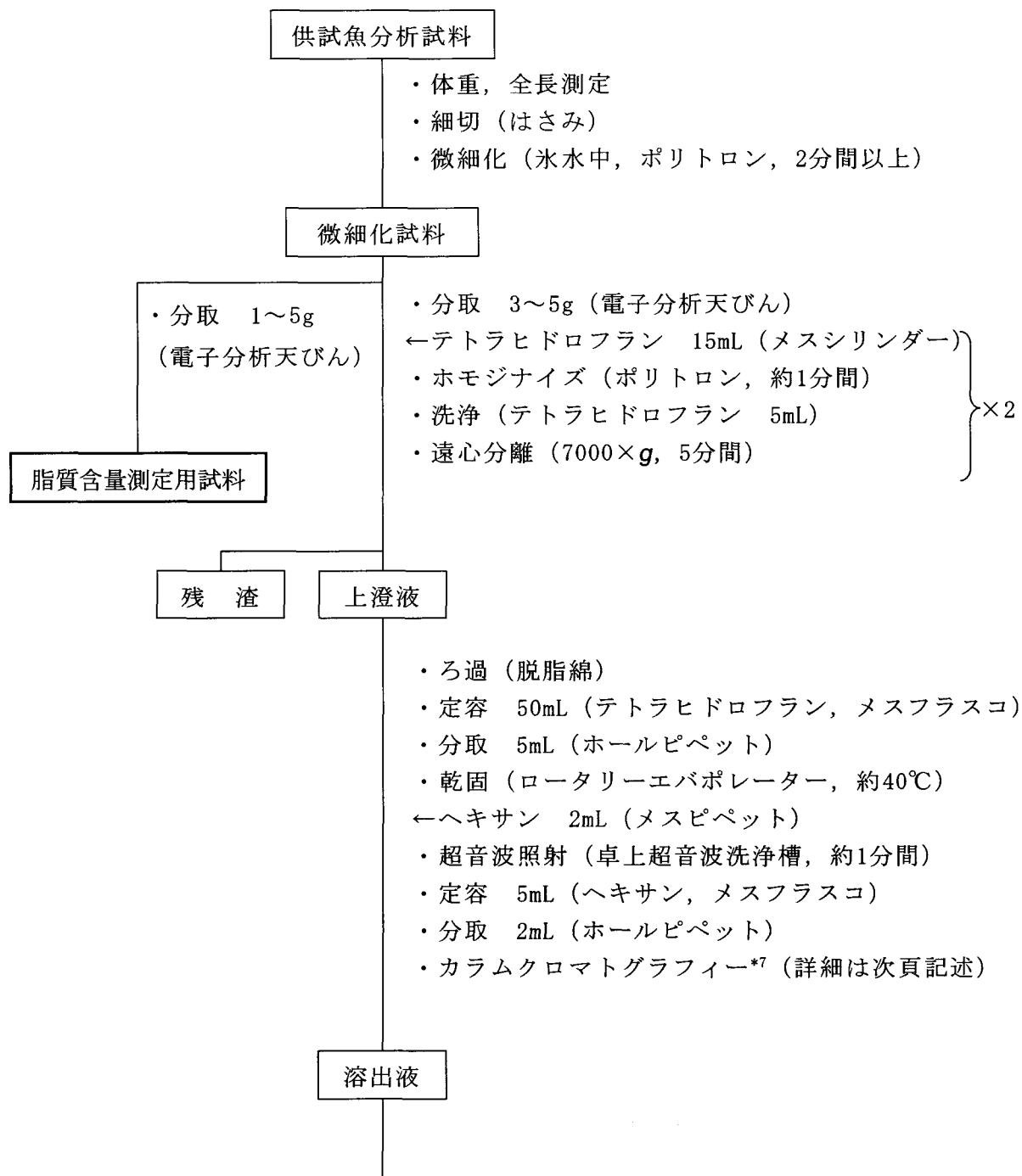
溶出法 第1溶出液 テトラヒドロフラン 5mL
第1溶出液を分析に供した。

*6 水道水を超純水装置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、HPLC試料とした。

フロースキーム



次頁へ続く

前頁より続く

- ・ 乾固（ロータリーエバポレーター，約40℃）
- ← テトラヒドロフラン／水^{*6}（1/1 V/V）
4mL（メスピペット）
- ・ 超音波照射（卓上超音波洗浄槽，約1分間）
- ・ 定容 10mL（テトラヒドロフラン／水^{*6}（1/1 V/V），
メスラスコ）

HPLC試料

*7 カラムクロマトグラフの条件

セップパック 塩基性アルミナ

（洗浄法：ヘキサン 10mL）

負荷法 全量負荷

溶出法 第1溶出液 ヘキサン 10mL

負荷分及び第1溶出液を分析に供した。

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越えた場合は、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-7, 8, Fig.6、Table-10, 11, 12, 13, 14, 15, 16、Fig.8, 9, 10, 11, 14, 15, 16 参照)。

(1) 定量条件

機 器	高速液体クロマトグラフ 島津製作所製 LC-2010A
カ ラ ム	L-column ODS (化学物質評価研究機構製) 15cm×4.6mmI.D.
カ ラ ム 温 度	40℃
溶 離 液	アセトニトリル／水*6 (85/15 V/V)
流 量	1.0mL/min
測 定 波 長	225nm (Fig.20参照)
注 入 量	100μL
検 出 器 出 力	2.0V/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。

被験物質10.1mgを正確にはかりとり、アセトニトリルに溶解して202mg/Lの被験物質溶液を調製した。これをテトラヒドロフラン／水*6 (1/1 V/V) で希釈して10.1μg/Lの標準溶液とした。

(3) 検量線の作成

(2)の標準溶液の調製と同様にして5.05、10.1及び20.2μg/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250μV・sec (被験物質濃度 ピークA 0.50μg/L, ピークB 0.51μg/L) とした (Fig.4参照)。

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。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-6, 9、Fig.5, 7参照）。

分析操作における回収率

試験水分析（被験物質 50ng添加）

ピークA	90.1%,	86.7 %	平均	88.4%
ピークB	84.6%,	84.6%	平均	84.6%

供試魚分析（被験物質 5000ng添加）

ピークA	83.7%,	87.1%	平均	85.4%
ピークB	87.4%,	84.7%	平均	86.1%

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。

また、第1及び第2濃度区の供試魚微細化試料を用いて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-7, 8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)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*8 はそれぞれ、

第1濃度区	ピークA	0.057 µg/L
	ピークB	0.060 µg/L
第2濃度区	ピークA	0.0057µg/L
	ピークB	0.0060µg/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-10, 11, 12, 13, 14, 15及び16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)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*8は供試魚微細化試料を5gとしたとき

ピークA	29ng/g
ピークB	29ng/g

と算出される。

$$*8 \quad \text{被験物質定量下限濃度 (µg/L又はng/g)} = \frac{A}{\frac{B}{100} \times \frac{C \times E}{D}}$$

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

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

$\overline{C_{wt}}$: 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

$$BCF = \frac{C_f}{\overline{C_w}}$$

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

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 (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

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

BCF_{ss} : 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	ピークA	30倍
	ピークB	31倍

第2濃度区	ピークA	300倍
	ピークB	300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82%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	ピーク	1日後	13日後	27日後	41日後	55日後	60日後	平均 (標準偏差)	Table	Fig.
1	A	0.831	0.977	1.04	0.936	1.02	1.00	0.967 (0.0758)	7-1	6
	B	0.875	0.935	0.960	0.947	1.02	1.01	0.959 (0.0544)	7-2	
2	A	0.0821	0.103	0.102	0.101	0.0992	0.102	0.0981 (0.00799)	8-1	
	B	0.0824	0.101	0.0983	0.0952	0.100	0.102	0.0967 (0.00743)	8-1	

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 ピークA 12000～23000倍
 ピークB 9400～16000倍

第2濃度区 ピークA 11000～24000倍
 ピークB 4700～12000倍

であった。

Table-2 濃縮倍率

() 内は平均値

濃度区	ピーク	13日後	27日後	41日後	55日後	60日後	Table	Fig.
1	A	12000 12000 (12000)	23000 23000 (23000)	20000 19000 (19000)	22000 21000 (21000)	21000 21000 (21000)	10-1	8
	B	9500 9400 (9400)	16000 15000 (15000)	12000 10000 (11000)	11000 12000 (12000)	12000 12000 (12000)	10-2	
2	A	11000 12000 (12000)	19000 21000 (20000)	22000 21000 (22000)	24000 22000 (23000)	23000 22000 (23000)	11-1	9
	B	4800 4700 (4700)	10000 12000 (11000)	11000 11000 (11000)	11000 11000 (11000)	10000 10000 (10000)	11-2	

5.3 定常状態における濃縮倍率

5.2の結果から、41、55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、設定値の

第1濃度区 ピークA 99%
 ピークB 99%

第2濃度区 ピークA 100%
 ピークB 99%

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	ピーク	41日後	55日後	60日後	平均	Table	Fig.
1	A	0.936	1.02	1.00	0.985	7-1, 10-1	6
	B	0.947	1.02	1.01	0.994	7-2, 10-2	
2	A	0.101	0.0992	0.102	0.101	8-1, 11-1	
	B	0.0952	0.100	0.102	0.0993	8-2, 11-2	

(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 ピークA 21000倍
 ピークB 11000倍

第2濃度区 ピークA 22000倍
 ピークB 11000倍

5.4 排泄試験

61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7、17、31及び45日後の供試魚中被験物質の残留率（%）を算出した（Table-12, 13、Fig. 10, 11参照）。

また、排泄試験における残留率と排泄期間との相関をFig. 12, 13に示した。

これらの結果から、排泄半減期は

第1濃度区 ピークA 28日
 ピークB 31日

第2濃度区 ピークA 29日
 ピークB 37日

であった。

Table-4 排泄試験における残留率

(単位 %)

濃度区	ピーク	7日後	17日後	31日後	45日後	Table	Fig.
1	A	90 96	78 84	58 59	38 35	12-1	10
	B	98 110	85 88	67 68	42 45	12-2	
2	A	92 93	82 80	61 66	35 37	13-1	11
	B	97 100	85 84	65 65	49 49	13-2	

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、脂質含量測定用試料の分取、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-5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-5 各部位における被験物質濃度及び濃縮倍率

濃度区	ピーク	部 位	各部位における被験物質濃度 (ng/g)	濃縮倍率	Table	Fig.
1	A	外 皮	35400 26000	36000 26000	15-1	15
		頭 部	34600 31200	35000 32000		
		内 臓	69300 53700	70000 55000		
		可食部	14100 12900	14000 13000		
	B	外 皮	18800 15700	19000 16000	15-2	
		頭 部	15500 13900	16000 14000		
		内 臓	36500 30500	37000 31000		
		可食部	7500 6950	7500 7000		
2	A	外 皮	2240 2160	22000 21000	16-1	16
		頭 部	3120 2900	31000 29000		
		内 臓	8660 8710	86000 87000		
		可食部	1110 1120	11000 11000		
	B	外 皮	1510 1460	15000 15000	16-2	
		頭 部	1570 1270	16000 13000		
		内 臓	4500 4800	45000 48000		
		可食部	537 600	5400 6000		

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	4.03%
実験終了後	5.31%

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

(1) 試験水中の被験物質濃度について

本試験において、試験水中の被験物質濃度が試験水分析1日後において設定値の82～88%であった。13日後以降には設定値の94%以上が保持されていることから、試験水中の被験物質濃度低下は魚体内への取り込み等によるものと考えられる。

(2) 脂質含量について

脂質含量の変動が実験開始前に対して終了時に25%を越えた。一方、ばく露期間中の供試魚分析時に脂質含量の測定を行ったところ、脂質含量による補正を行っても濃縮倍率に大きな違いは認められなかった。本試験において第1濃度区、第2濃度区ともに濃縮倍率は定常状態に達していることから、脂質の増加に伴う影響はないと思われる。