

受理番号	S01-3780
試験番号	43780

最 終 報 告 書

1,4-ジメチル-2-(1-フェニルエチル)ベンゼンのコイにおける濃縮度試験

2002年 6月 6日

化学物質評価研究機構
水質汚濁研究所

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 経済産業省

試験の表題 1,4-ジメチル-2-(1-フェニルエチル)ベンゼンのコイにおける濃縮
度試験

試験番号 43780

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6月6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 経済産業省

試験の表題 1,4-ジメチル-2-(1-フェニルエチル)ベンゼンのコイにおける濃縮
度試験

試験番号 43780

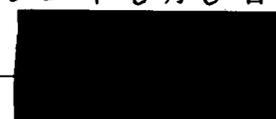
上記試験は財団法人化学物質評価研究機構久留米事業所の信頼性保証部門が監査及び査察を実施しており、監査又は査察を行った内容、日付並びに試験責任者及び運営管理者に報告を行った日付は以下の通りです。

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2月18日	2002年2月18日	2002年2月18日
	2002年2月25日	2002年2月26日	2002年2月26日
	2002年4月15日	2002年4月16日	2002年4月16日
試験実施状況	2002年2月19日	2002年2月27日	2002年2月27日
	2002年2月21日	2002年2月27日	2002年2月27日
	2002年2月25日	2002年2月27日	2002年2月27日
	2002年2月26日	2002年2月27日	2002年2月27日
	2002年2月27日	2002年2月27日	2002年2月27日
	2002年3月4日	2002年3月13日	2002年3月13日
	2002年3月12日	2002年3月13日	2002年3月13日
	2002年3月13日	2002年3月13日	2002年3月13日
	2002年3月26日	2002年4月5日	2002年4月5日
	2002年3月27日	2002年4月5日	2002年4月5日
	2002年4月5日	2002年4月5日	2002年4月5日
	生データ及び最終報告書	2002年6月6日	2002年6月6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6月6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	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	24
5. 試験結果	25
6. 考 察	29
7. 備 考	30

試験番号 43780

表 題 1,4-ジメチル-2-(1-フェニルエチル)ベンゼン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
(〒830-0023) 福岡県久留米市中央町 19-14

試験目的 1,4-ジメチル-2-(1-フェニルエチル)ベンゼン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 2月18日
実験開始日	2002年 2月26日
実験終了日	2002年 4月 9日
試験終了日	2002年 6月 6日

試験資料の保管

(1) 被験物質

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。

(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 試験第二課

 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 6月 6日

試験責任者



要 約

試験の表題

1,4-ジメチル-2-(1-フェニルエチル)ベンゼン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 1 µg/L
第2、2A及び2B濃度区 0.1µg/L |
| (3) ばく露期間 | 42日間 |
| (4) ばく露方法 | 連続流水式 |
| (5) 分析方法 | ガスクロマトグラフィー—質量分析法 |

試験結果

- | | |
|------------------|--|
| (1) 96時間LC50値 | 0.511mg/L |
| (2) 定常状態における濃縮倍率 | 第1濃度区 760倍
第2濃度区 620倍
第2A濃度区 810倍
第2B濃度区 540倍 |

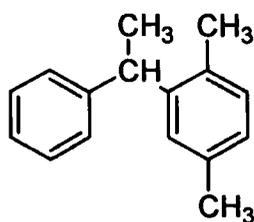
1. 被 験 物 質

本報告書において被験物質は、次の名称等を有するものとする。

1.1 名 称 1,4-ジメチル-2-(1-フェニルエチル)ベンゼン

1.2 構造式等

構造式*1



分子式 C₁₆H₁₈

分子量 210.31

1.3 提供者及びロット番号*1

- (1) 提 供 者 XXXXXXXXXX
(2) ロット番号 PPXE000204

*1 提供者添付資料による。

1.4 純 度*1

- | | | |
|-------------|--------------------------|--------|
| (1) 被 験 物 質 | 99.0% | |
| (2) 不 純 物 | ジアリールアルカン類 | : 0.6% |
| | Indan, 1-methyl-3-phenyl | : 0.3% |
| | その他構造不明炭化水素類 | : 0.1% |

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

質量スペクトル (Fig. 21参照)、赤外吸収スペクトル (Fig. 22参照) 及び核磁気共鳴スペクトル (Fig. 23参照) により構造を確認した。

1.6 物理化学的性状*1

常温における性状	無色透明液体
融点	0℃以下
沸点	蒸留範囲 初留点 287.0℃ 95% 289.0℃ 終点 292.0℃
蒸気圧	0.1Pa以下 (25℃)
密度	0.989g/cm ³ (15℃)

*1 提供者添付資料による。

1.7 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 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. 22参照)。

1.8 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) 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28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7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42日間、活性炭処理した脱塩素水道水により10～12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 0.28～0.29g |
| (6) 全長 | | 平均 3.3cm |
| (7) 感受性試験 | | 同一ロット (TF0-011215) の供試魚による基準物質PCP-Na [ベンタク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	24.0～24.2℃
	換水前	24.0～24.5℃
(4) 溶存酸素濃度	ばく露開始時	8.1mg/L
	換水前	6.8～ 7.5mg/L
(5) pH	ばく露開始時	7.4～ 7.5
	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）	

2.5 原液調製法

(1) 分散剤

HCO-40

(2) 調製方法

被験物質とその10倍量のHCO-40を練り合わせた後、イオン交換水を加え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 2月18日 ~ 2002年 2月24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 0.511mg/L (Fig. 5参照)

3. 濃縮度試験の実施

助剤の影響を調べるため、以下の4条件で濃縮度試験を行った。

第1濃度区	H区	} 助剤を使用する条件
第2濃度区	L区	
対照区		
第2A濃度区	L-A区	助剤を使用しない条件
第2B濃度区	L-B区	溶媒を使用する条件

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		財団法人 化学物質評価研究機構 久留米事業所 (住所 〒 830-0023 福岡県久留米市中央町19-14) 供試魚のふ化日 2001年12月 9日 じゅん化開始日 2002年 1月21日
(3) じゅん化条件	期間等	受入槽でふ化仔魚を試験魚サイズまで養成後、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14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活性炭処理した脱塩素水道水で20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。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。
(4) 全長		4.8~7.7cm
(5) ロット		TFC-011209
(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

ばく露期間

H区、L区及び対照区

原液2.0mL/分及び試験用水400mL/分の割合で
579L/日を試験水槽に供した。

L-A区

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。

L-B区

原液0.02mL/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

H区、L区及び対照区

25L容ガラス製びん

L-A区

なし

L-B区

500mL容ガラス製びん

交換頻度 1回程度/週

(5) 試験温度

H区 24.7～25.2℃

L区 24.6～25.1℃

L-A区 24.8～25.3℃

L-B区 24.7～25.2℃

対照区 24.7～25.3℃

(6) 溶存酸素濃度

H区 7.9～8.1mg/L (Fig. 16参照)

L区 8.0～8.1mg/L (Fig. 17参照)

L-A区 8.0～8.1mg/L (Fig. 18参照)

L-B区 7.9～8.1mg/L (Fig. 19参照)

対照区 8.1mg/L (Fig. 20参照)

(7) pH	H区	7.5～ 8.0
	L区	7.5～ 7.9
	L-A区	7.6～ 7.9
	L-B区	7.6～ 7.9
	対照区	7.7～ 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	H区、L区、L-A区及びL-B区	47尾 (ばく露開始時)
	対照区	12尾 (ばく露開始時)
(10) ばく 露 期 間	42日間	
	設定理由：予備試験の結果、28日間では定常状態に達しないと予想されたため。	

3.4 原液調製法

(1) 分散剤

2.5の(1)に同じ。

(2) 調製方法

・H区

2.5の(2)と同様にして被験物質濃度として0.2mg/Lの原液を調製した。

・L区

2.5の(2)と同様にして被験物質濃度として0.02mg/Lの原液を調製した。

・L-A区

対水溶解度の測定法に用いた方法により飽和水溶液を原液として調製した。

・L-B区

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2mg/Lの原液を調製した。

・対照区

HCO-40をイオン交換水に溶解して2mg/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、

H区 1 µg/L

L区、L-A区及びL-B区 0.1µg/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ガスクロマトグラフィー—質量分析法(GC-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)*2に分けて行った。

対照区は実験開始前及び終了後に行った。実験開始前は、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。実験終了後は、1回当りの採取尾数は8尾とし、4群(2尾1群)に分けて分析した。また、脂質測定用としては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

(1) 試験水中の被験物質

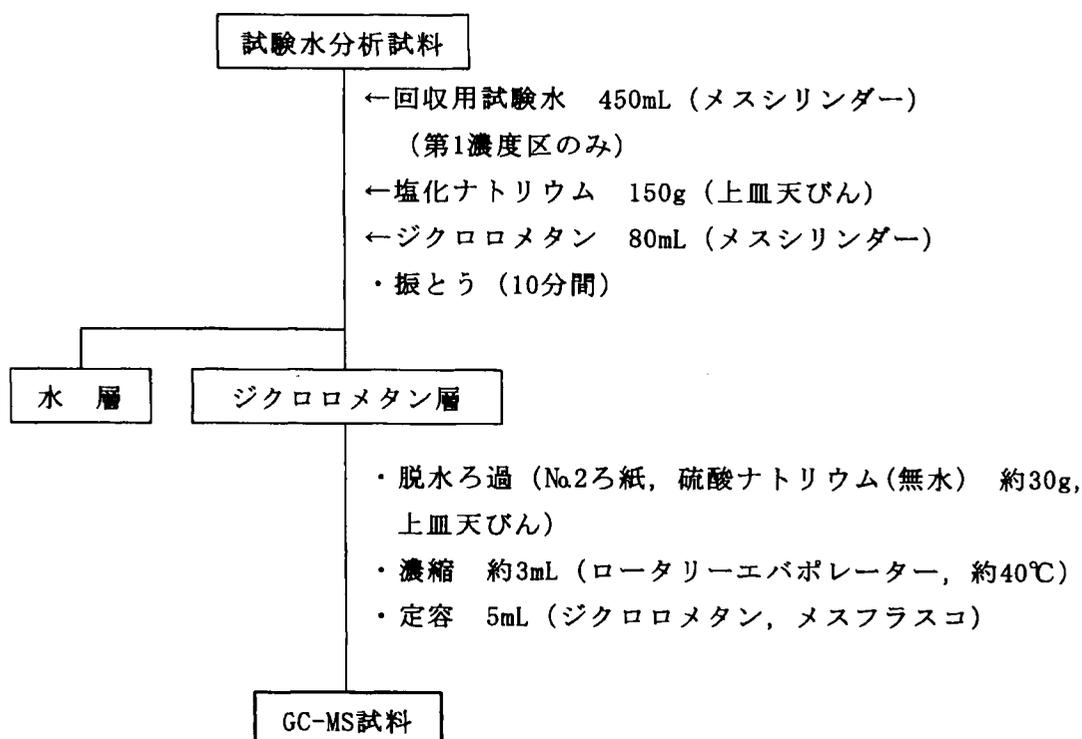
試験水槽から

第1濃度区 50mL

第2濃度区 500mL

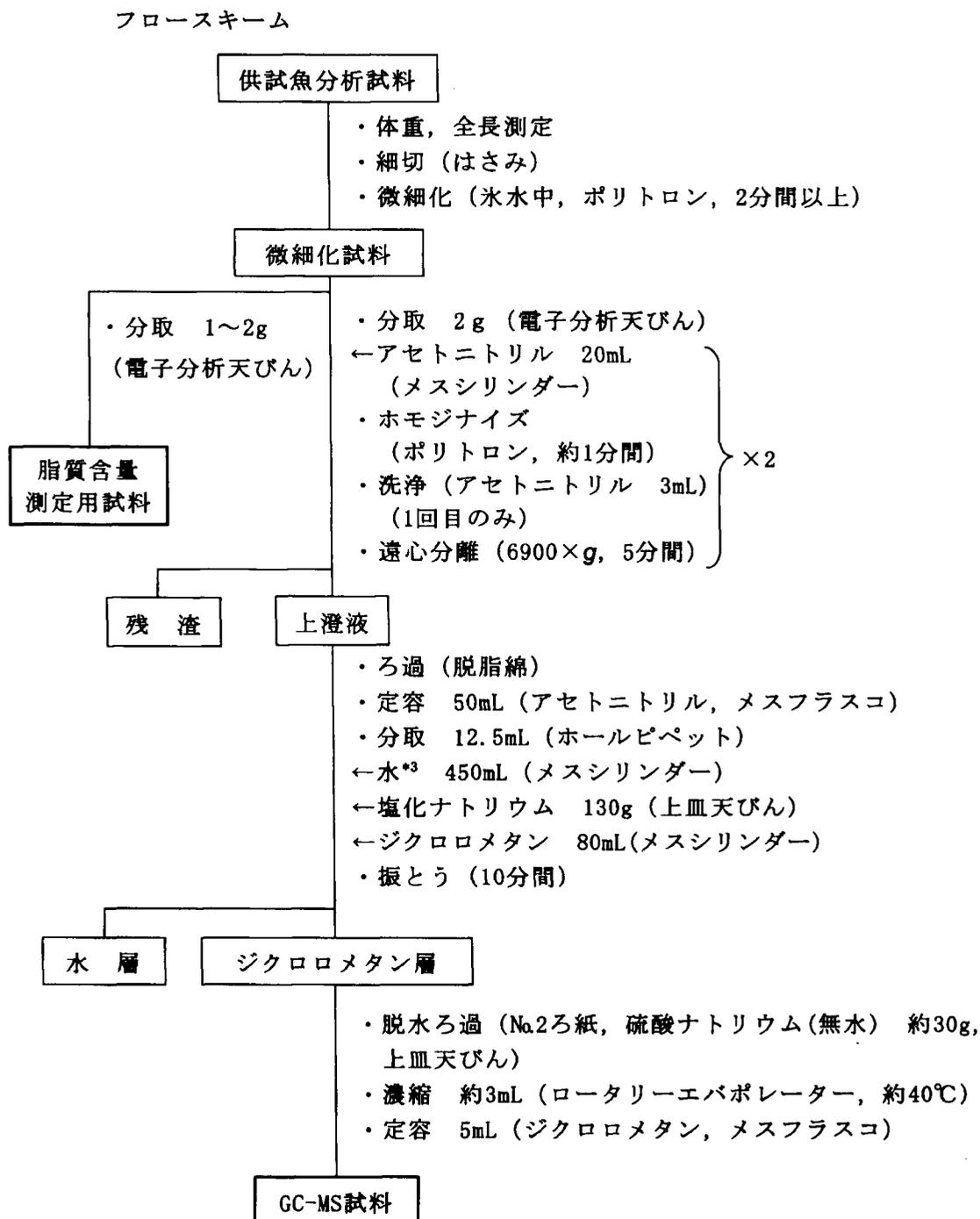
を採取し、以下のフロースキームに従って前処理操作を行いガスクロマトグラフィー質量分析法 (GC-MS) 試料とした。

フロースキーム



(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、ガスクロマトグラフィー質量分析法 (GC-MS) とした。



*3 水道水を超純水製造システムを用いて処理した水。

3.7.3 被験物質の定量分析

前処理を行って得られたGC-MS試料について、下記の定量条件に基づきガス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、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。GC-MS試料中の被験物質濃度は、標準溶液及びGC-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-7, 8, 9, 10, Fig.8, 9, Table-12, 13, 14, 15, 16, Fig.11, 12, 13, 14, 15参照)。

(1) 定量条件

機	器	ガスクロマトグラフー質量分析計
		サーモクエスト製 Polaris Q

ガスクロマトグラフ条件

カラム	HP-5MS 30m×0.25mmI. D. ヒューズドシリカ製 膜厚 0.25µm
カラム温度	50℃(3min) → 250℃(5min)
昇温速度	30℃/min
試料導入部温度	250℃
キャリアガス	ヘリウム
スプリット流量	50mL/min
カラムヘッド圧	100kPa
注 入 量	2µL
注 入 法	スプリットレス注入法
スプリットレス時間	1min

質量分析計条件

インターフェース温度	250℃
イオン源温度	250℃
イオン化法	電子衝撃イオン化法 (EI)
イオン化エネルギー	70eV
測定イオン	m/z 195

(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100mgを正確にはかりとり、ジクロロメタンに溶解して1000mg/Lの被験物質溶液を調製した。これをジクロロメタンで希釈して10.0 μ g/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5.00、10.0及び20.0 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300（被験物質濃度0.24 μ g/L）とした（Fig.6参照）。

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、試験水分析のブランク試験においてはマスフラグメントグラム上、被験物質のピーク位置にピークは認められなかった。一方、供試魚のブランク試験においてマスフラグメントグラム上、被験物質のピーク位置にピークが認められたため、2点のブランク値の平均値（35.8ng）を差し引いて回収率を求めた。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, 11, Fig. 7, 10参照）。

分析操作における回収率

試験水分析（被験物質50ng添加）

92.3%, 91.0% 平均 91.7%

供試魚分析（被験物質1000ng添加）

76.2%, 72.8% 平均 74.5%

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の保存用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**はそれぞれ、

第1濃度区 0.027 µg/L

第2濃度区 0.0027µg/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-12, 13, 14, 15, 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**は供試魚微細化試料を2gとしたとき3.3ng/gと算出される。

$$*4 \text{ 被験物質定量下限濃度 (}\mu\text{g/L又はng/g)} = \frac{A}{\frac{B}{100} \times \frac{C \times E}{D}}$$

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) 平均脂質含量当たりの濃縮倍率の算出（脂質含量を測定し、平均脂質含量当たりで計算する場合）

$$BCF_L = \frac{BCF}{L} \times L_{ave}$$

BCF_L : 平均脂質含量当たりの濃縮倍率

BCF : 濃縮倍率

L : 脂質含量(%)

L_{ave} : 平均脂質含量(%)

- (4) m回目の濃縮倍率の平均値

$$BCF_m = (BCF_a + BCF_b) / n$$

又は、

$$BCF_{Lm} = (BCF_{La} + BCF_{Lb}) / n \text{ (脂質含量を測定した場合)}$$

$BCF_{m, Lm}$: 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

$BCF_{La, b}$: m回目における各個体又は各群の濃縮倍率
（脂質含量を測定した場合）

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) H区

(a) 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

$$\overline{C_{ws}} = \{C_w(k-n) + \dots + C_w(k-2) + C_w(k-1) + C_w(k)\} / (n+1)$$

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

$C_w(k-n)$: 濃縮倍率が極大値を示したときの試験水中被験物質濃度 (μg/L)

(n+1) : 算出に用いる分析の回数

(b) 定常状態における供試魚中の平均被験物質濃度の算出

$$\overline{C_{fs}} = \{C_f(m-n) + \dots + C_f(m-2) + C_f(m-1) + C_f(m)\} / (n+1)$$

$\overline{C_{fs}}$: 定常状態における供試魚中の平均被験物質濃度 (ng/g)

$C_f(m-n)$: 濃縮倍率が極大値を示したときの供試魚中被験物質濃度 (FBを差し引いた値) (ng/g)

$C_f(m)$: m回目まで分析したときの最後の供試魚中被験物質濃度 (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ブランク濃度の平均値 (ng/g)

(n+1) : 算出に用いる分析の回数

(c) 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

(2) L区、L-A区及びL-B区

(a) 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（ $\mu\text{g/L}$ ）

(b) 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 ）

(c) 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（ $\mu\text{g/L}$ ）

3.7.11 算出可能な濃縮倍率

対照区の供試魚をばく露開始前に2群、ばく露終了後に4群分析した結果、マスフラグメントグラム上被験物質ピーク位置にピークが認められたため、供試魚中の被験物質濃度は、前記6点のブランク濃度の平均値（5.34ng/g）を差し引いて算出した。

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。

H区	3.5倍
L区	36 倍
L-A区	34 倍
L-B区	32 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84%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 μg/L)

濃度区	7日後	14日後	21日後	28日後	35日後	42日後	平均 (標準偏差)	Table	Fig.
H	0.883	0.850	0.908	1.01	0.976	1.02	0.942 (0.0716)	7	8
L	0.0982	0.0841	0.0841	0.0928	0.0864	0.0964	0.0903 (0.00629)	8	
L-A	0.0849	0.0858	0.103	0.0944	0.0996	0.100	0.0947 (0.00775)	9	9
L-B	0.103	0.0998	0.0988	0.101	0.106	0.0964	0.101 (0.0033)	10	

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H区において310倍～930倍、L区において420倍～1100倍、L-A区において470倍～1200倍及びL-B区において430倍～690倍であった。

Table-2 濃縮倍率

() 内は平均値

濃度区	14日後	21日後	28日後	35日後	42日後	Table	Fig.
H	780	520	500	770	570	12	11
	550	310	490	930	830		
	(670)	(420)	(490)	(850)	(700)		
L	650	640	540	690	450	13	12
	500	540	420	640	1100		
	(570)	(590)	(480)	(660)	(780)		
L-A	540	470	780	780	1200	14	13
	760	560	710	810	620		
	(650)	(520)	(750)	(800)	(900)		
L-B	610	430	660	650	540	15	14
	690	650	490	420	450		
	(650)	(540)	(580)	(540)	(490)		

上記の各濃縮倍率を、3.7.8(3)の式を用いて平均脂質含量H区3.61%及びL区3.77% (Table-5参照) に対する濃縮倍率に換算してTable-3に示した。

Table-3 平均脂質含量で補正した濃縮倍率

() 内は平均値

濃度区	14日後	21日後	28日後	35日後	42日後	Table	Fig.
H	650	510	410	790	640	17	11
	710	460	480	810	780		
	(680)	(490)	(450)	(800)	(710)		
L	640	760	510	560	540	18	12
	580	750	450	640	720		
	(610)	(760)	(480)	(600)	(630)		

5.3 定常状態における濃縮倍率

5.2の結果から、H区においては、最後の連続した3回の分析における濃縮倍率(平均)は変動が20%を越えた。そこで、平均脂質含量に対する濃縮倍率に換算した(Table-3参照)。その結果、最後の連続した3回の分析における濃縮倍率(平均)は変動が20%を越えた。しかし、35日後における濃縮倍率が極大値を示し、これ以降上昇傾向を示さなかったため、定常状態に達していると判断した。35及び42日後の値を用いて定常状態における濃縮倍率を算出した。

L区においては、最後の連続した3回の分析における濃縮倍率(平均)は変動が20%を越えた。そこで、平均脂質含量に対する濃縮倍率に換算した(Table-3参照)。その結果、28、35及び42日後において濃縮倍率(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。28、35及び42日後の値を用いて、定常状態における濃縮倍率を算出した。

L-A及びL-B区においては、28、35及び42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。28、35及び42日後の値を用いて、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、H区において設定値の100%、L区において92%、L-A区において98%及びL-B区において101%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	28日後	35日後	42日後	平均	Table	Fig.
H		0.976	1.02	1.00	7, 12	8
L	0.0928	0.0864	0.0964	0.0918	8, 13	
L-A	0.0944	0.0996	0.100	0.0981	9, 14	9
L-B	0.101	0.106	0.0964	0.0101	10, 15	

(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。

H区	760倍
L区	620倍
L-A区	810倍
L-B区	540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。また、第1及び第2濃度区の脂質含量をTable-5に示した。

実験開始前 2.48%
 実験終了後 3.92%

Table-5 脂質含量 (単位 %)
 () 内は平均値

濃度区	14日後	21日後	28日後	35日後	42日後	全平均
H	4.34	3.68	4.46	3.52	3.24	3.61
	2.78	2.48	3.62	4.13	3.85	
	(3.56)	(3.08)	(4.04)	(3.83)	(3.54)	
L	3.78	3.13	3.98	4.64	3.11	3.77
	3.24	2.72	3.54	3.76	5.77	
	(3.51)	(2.93)	(3.76)	(4.20)	(4.44)	
L-A	2.16	3.25	3.21	2.61	5.22	3.27
	2.99	3.30	3.75	3.46	2.75	
	(2.57)	(3.28)	(3.48)	(3.04)	(3.99)	
L-B	3.20	3.02	3.62	3.72	3.92	3.45
	2.95	4.04	4.06	2.73	3.25	
	(3.07)	(3.53)	(3.84)	(3.23)	(3.59)	

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) 助剤が濃縮倍率に及ぼす影響

各試験区間の濃縮倍率の平均値に差異があるか否かを調べるために有意差検定を行った。一般に濃縮倍率は、魚体中の脂質含量に依存するため、脂質含量1%当たりの濃縮倍率を有意差検定に用いた。Reference 6より、脂質含量1%当たりの濃縮倍率は全ばく露期間を通して顕著な上昇傾向は認められず、ほぼ同程度の濃縮倍率を示していることから、すべての値を用いて検定を行った。脂質含量1%当たりの濃縮倍率におけるすべての平均値と変動係数を以下に示した。

濃縮倍率の平均値（脂質含量1%当たり）

試験区	平均	変動係数(%)
H	170	25
L	160	17
L-A	220	20
L-B	170	21

分散分析には、SPSS for Windows (SPSS Inc., USA)を用いた。Levene検定により、等分散性が認められたため、一元配置分散分析 (one-way ANOVA) を行った。これより得られた有意確率から、有意水準 $p=0.05$ としたときに有意差があるかどうかを以下に示した。

各試験区における平均値の有意差検定結果

試験区	H	L	L-A
L	0.951		
L-A	0.056	0.015	
L-B	0.974	1.000	0.020

* 有意水準 $p=0.05$ のとき有意差あり

各試験区において、L区とL-A区及びL-A区とL-B区の組み合わせのみ有意差ありとなった。しかし、各試験区における脂質含量1%当たりのBCFの範囲はH区が110～220倍、L区が120～200倍、L-A区が140～300倍、L-B区が120～240倍であり、L-A区のBCFが他の試験区より顕著に高くない。よって、本物質の魚体中への取り込みにおいて助剤による顕著な阻害はないと考えられる。

(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後に25%を超えた。本試験中の脂質含量は2.10～5.77%であった。過去の知見から、生理的条件や給餌状態などの変動により60%程度の脂質含量の差が生じるケースは少なくない。従って、本試験における脂質含量の低下は個体差の範囲内であると考えられる。

7. 備 考

7.1. 対水溶解度の測定

7.1.1 試験の実施

(1) 試験装置及び器具

送液ポンプ	日立製作所製	L-6000
pHメーター	東亜電波工業製	HM-60S

(2) 溶解度測定用カラムの調製

被験物質140mgをアセトンに溶解し、約7gの担体を添加した。その後、ロータリーエバポレーターを用い減圧下でゆっくりアセトンを留去し、充填剤を調製した。この充填剤をカラムに充填し、溶解度測定用カラムを調製した。

カラム	25cm×8mm I.D.	ステンレス製
担体	CPG (Controlled-Pore Glass, 20/80メッシュ, 平均孔径3125Å)	
被験物質含量	約2.0wt%	

(3) 試験条件

試験水	精製水
試験温度	25±1℃
試験連数	5 (連続する5フラクション)
流量	0.2mL/min、0.4mL/min
捕集方法	約10mLずつを試験管に捕集した。

(4) 試験操作

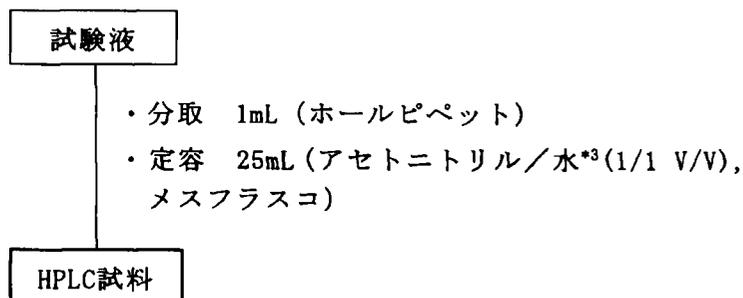
試験温度下において、溶解度測定用カラムに高純度窒素ガスでパブリングしながら試験水を一定流量で流し、溶出した画分を試験管に捕集し試験液とした。各試験液のpHを測定した。なお、試験液を捕集する時期は、溶解度測定用カラムからの被験物質の溶出濃度が平衡に達したことを確認した後とした。

(5) 試験液の分析

(a) 試験液の前処理

溶解度測定用カラムから捕集した試験液は、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 水道水を超純水製造システムを用いて処理した水。

(b) 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。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（Reference 2, 4参照）。

ピーク面積の定量下限は、ノイズレベルを考慮して $1000\mu\text{V}\cdot\text{sec}$ （被験物質濃度 $3.17\mu\text{g/L}$ とした（Reference 3参照））。

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-10AD
検出器		島津製作所製 SPD-10A
カラム		L-column ODS 15cm×2.1mmI. D. ステンレス製
溶離液		アセトニトリル/水*3(8/2 V/V)
流量		0.2mL/min
測定波長		210nm
注入量		30 μL
検出器出力		1V/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。

提供試料100mgを電子分析天びんで正確にはかりとり、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/水^{*3} (1/1 V/V)で希釈して25.0μg/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12.5、25.0及び50.0μg/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 (Reference 3 参照)。

(6) 溶解度の算出

Reference 2の計算式に従って計算した。

(7) 数値の取扱い

数値の丸め方は、JIS Z 8401 : 1999 規則Bの方法に従い、有効数字3ケタで表示した。

7.1.2 試験結果

測定結果を以下に示す。

流 量	pH	溶 解 度 (mg/L)			標準偏差	最大差*5 (%)
		測定値	平均値	全平均値		
0.4mL/min	6.9	0.995	1.01	1.02	0.00270	8.60
	6.8	0.984				
	6.9	1.07				
	6.7	0.978				
	6.9	1.02				
0.2mL/min	6.9	1.04	1.02	1.02	0.00270	8.60
	6.8	1.01				
	6.7	1.01				
	6.8	1.02				
	6.8	1.02				

*5 最大差(%) = (最大測定値 - 最小測定値) / 最大測定値 × 100

7.2 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	:	日立製作所製	型 L-6000
		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・機器及び試薬

装置・機器

ガスクロマトグラフー質量分析計

	:	15頁参照	
高速液体クロマトグラフ	:	31頁参照	
送液ポンプ	:	30頁参照	
pHメーター	:	30頁参照	
天びん	:	ザルトリウス社製	型 LP4200S
		ザルトリウス社製	型 BP301S
		メトラートレド社製	型 PB602

フーリエ変換赤外分光光度計	:	島津製作所製	型 FTIR-8200PC
紫外可視分光光度計	:	島津製作所製	UV-2200A
ロータリーエバポレーター	:	東京理化学器械製	型 N-J
振とう機	:	大洋科学工業製	型 SR-II W
ホモジナイザー（ポリトロン）	:	キネマチカ社製	型 PT3100
遠心分離機	:	日立工機製	型 CR21G

試薬

アセトニトリル	:	ナカライテスク製	試薬一級
ジクロロメタン	:	和光純薬工業製	試薬一級
ジメチルスルホキシド	:	ナカライテスク製	試薬一級
塩化ナトリウム	:	マナック製	試薬一級
りん酸	:	和光純薬工業製	試薬特級
HCO-40	:	日光ケミカルズ製	
CPG	:	フナコシ製	研究用
精製水	:	高杉製薬製	日本薬局方
アセトニトリル	:	和光純薬工業製	HPLC用
アセトン	:	和光純薬工業製	試薬一級

キャリアーガス

高純度窒素ガス	:	福岡酸素製	JIS一級相当品
---------	---	-------	----------

(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
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
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