

最終報告書

2-[2-ヒドロキシ-3, 5-ジアルキル(C4, 5)フェニル]ベンゾトリアゾール[2-(2'-ヒドロキシ-3', 5'-ジ-tert-ブチルフェニル)ベンゾトリアゾール(被験物質番号 K-1352)にて試験実施]のコイにおける濃縮度試験

財団法人 化学工業協会
化学工業安全衛生研究所

陳 述 書

財団法人 化学品検査協会

化学品安全センター久留米研究所

試験委託者 通商産業省

試験の表題 2-[2-ヒドロキシ-3,5-ジアルキル(C4,5)フェニル]ベン
ゾトリアゾール[2-(2'-ヒドロキシ-3',5'-ジ-*tert*-
ブチルフェニル)ベンゾトリアゾール(被験物質番号 K-1352)
にて試験実施]のコイにおける濃縮度試験

試験番号 51352

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)に定める「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関する基準」及び「OECD Principles of Good Laboratory Practice」(May 12, 1981)に従って実施したものです。

平成10年10月5日

運営管理者



信 頼 性 保 証 書

財団法人 化学品検査協会
化学品安全センター久留米研究所

試験委託者 通商産業省

試験の表題 2- [2-ヒドロキシ-3, 5-ジアルキル (C4, 5) フェニル] ベン
ゾトリアゾール [2- (2'-ヒドロキシ-3', 5'-ジ-tert-
ブチルフェニル) ベンゾトリアゾール (被験物質番号 K-1352)
にて試験実施] のコイにおける濃縮度試験

試験番号 51352

上記試験は財団法人化学品検査協会化学品安全センター久留米研究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、日付並びに運営管理者及び試験責任者に報告を
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 (運営管理者)	報告日 (試験責任者)
試験計画書	平成10年 3月 5日	平成10年 3月 5日	平成10年 3月 5日
	平成10年 4月 22日	平成10年 4月 22日	平成10年 4月 22日
	平成10年 5月 15日	平成10年 5月 18日	平成10年 5月 15日
	平成10年 5月 29日	平成10年 5月 29日	平成10年 5月 29日
	平成10年 6月 16日	平成10年 6月 18日	平成10年 6月 16日
	平成10年 6月 19日	平成10年 6月 19日	平成10年 6月 19日
試験実施状況	平成10年 3月 10日	平成10年 3月 11日	平成10年 3月 11日
	平成10年 4月 2日	平成10年 4月 3日	平成10年 4月 3日
	平成10年 4月 28日	平成10年 5月 12日	平成10年 5月 12日
	平成10年 5月 1日	平成10年 5月 12日	平成10年 5月 12日
	平成10年 5月 12日	平成10年 5月 18日	平成10年 5月 14日
	平成10年 6月 4日	平成10年 6月 5日	平成10年 6月 5日
生データ及び最終報告書	平成10年10月 5日	平成10年10月 5日	平成10年10月 5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。

平成10年10月5日

信頼性保証部門責任者

目 次

	頁
要 約	1
1. 表 題	2
2. 試験委託者	2
3. 試験施設	2
4. 試験目的	2
5. 試験方法	2
6. 適用する優良試験所基準	2
7. 試験期間	3
8. 試験関係者	3
9. 最終報告書の作成	3
10. 被験物質	4
11. 急性毒性試験	6
12. 濃縮度試験の実施	8
13. 試験結果	21
14. 参考試験	23
15. 考 察	27
16. 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	27
17. 試資料の保管	28
18. 備 考	28
19. 表及び図の内容	30

付表及び付図

要 約

1. 試験の表題

2-[2-ヒドロキシ-3, 5-ジアルキル(C4, 5)フェニル]ベンゾトリアゾール[2-(2'-ヒドロキシ-3', 5'-ジ-*tert*-ブチルフェニル)ベンゾトリアゾール(被験物質番号 K-1352)にて試験実施]のコイにおける濃縮度試験

2. 試験条件

2.1 急性毒性試験

- | | |
|-----------|------------------|
| (1) 供試魚 | ヒメダカ |
| (2) ばく露期間 | 48時間 |
| (3) ばく露方法 | 半止水式(8~16時間毎に換水) |

2.2 濃縮度試験

- | | |
|-----------|--|
| (1) 供試魚 | コイ |
| (2) 試験濃度 | 第1濃度区 10 $\mu\text{g/L}$
第2濃度区 1 $\mu\text{g/L}$
第3濃度区 0.1 $\mu\text{g/L}$ |
| (3) ばく露期間 | 第1濃度区 14週間
第2濃度区 14週間
第3濃度区 10週間 |
| (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 |

3. 試験結果

- | | |
|---------------|--|
| (1) 48時間LC50値 | 500mg/L以上 |
| (2) 濃縮倍率 | 第1濃度区 365~2250倍
第2濃度区 1380~8180倍
第3濃度区 2960~10000倍 |

4. 被験物質の安定性

被験物質は保管条件下及び試験条件下で安定であることを確認した。

最終報告書

試験番号 51352

1. 表 題 2-[2-ヒドロキシ-3, 5-ジアルキル(C4, 5)フェニル]ベンゾトリアゾール[2-(2'-ヒドロキシ-3', 5'-ジ-*tert*-ブチルフェニル)ベンゾトリアゾール(被験物質番号 K-1352)にて試験実施]のコイにおける濃縮度試験
2. 試験委託者 名 称 通商産業省
住 所 (〒100-8901)東京都千代田区霞が関一丁目3番1号
3. 試験施設 名 称 財団法人 化学品検査協会
化学品安全センター久留米研究所
住 所 (〒830-0023)福岡県久留米市中央町19-14
TEL (0942) 34-1500
運営管理者 XXXXXXXXXX
4. 試験目的 K-1352のコイにおける濃縮性の程度について知見を得る。
5. 試験方法 「新規化学物質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)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」(May 12, 1981)に定める"Bioaccumulation: 305C, Degree of Bioconcentration in Fish"に準拠した。
6. 適用する優良試験所基準 「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)に定める「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関する基準」(以下「GLP基準」という。)及び「OECD Principles of Good Laboratory Practice」(May 12, 1981)に適合して行った。

7. 試験期間

(1) 試験開始日	平成10年 3月 5日
(2) ばく露開始日	第1及び第2濃度区 平成10年 3月19日 第3濃度区 平成10年 4月23日
(3) ばく露終了日	第1及び第2濃度区 平成10年 6月25日 第3濃度区 平成10年 7月 2日
(4) 試験終了日	平成10年 9月14日

8. 試験関係者

試験責任者

試験担当者

飼育管理責任者

急性毒性試験担当者

試験資料管理部門責任者

9. 最終報告書の作成

平成10年 9月14日

試験責任者

氏名

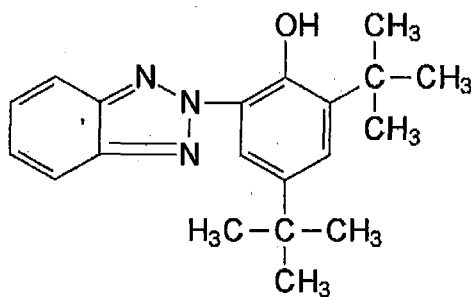
10. 被 験 物 質

本報告書においてK-1352は、次の名称及び構造式等を有するものとする。

10.1 名 称 2- (2'-ヒドロキシ-3', 5'-ジ-*tert*-ブチル
フェニル) ベンゾトリアゾール

10.2 構造式等

構造式



分子式 $C_{20}H_{25}N_3O$

分子量 323.43

10.3 純 度^{*1}

被 験 物 質 1 0 0 %

*1 HPLCによる。

10.4 入手先、商品名及びロット番号^{*2}

(1) 入 手 先

(2) 商 品 名

(3) ロット番号

*2 入手先添付資料による。

10.5 被験物質の確認

赤外吸収スペクトル (Fig. 3 1 参照)、質量スペクトル (Fig. 3 2 参照) 及び核磁気共鳴スペクトル (Fig. 3 3 参照) により構造を確認した。

10.6 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. 3 1 参照)。

10.7 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。

11. 急性毒性試験

11.1 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 0102-1993 の 71.）の方法に準じて行った。

11.2 供試魚

- | | | |
|------------|---|--|
| (1) 魚 | 種 | ヒメダカ <u>Oryzias latipes</u> |
| (2) 供 | 給 | 源 |
| | | 中島養魚場
(住所 〒 869-0123 熊本県玉名郡長洲町大字長洲 2029) |
| (3) 蓄 | 養 | 条 |
| | | 件 |
| (4) じゅん化条件 | | 魚の入手時に目視観察をして異状のあるものを除去し、蓄養槽で薬浴後、流水状態で13日間飼育した。 |
| (5) 体 | 重 | 平均 0.25 g |
| (6) 全 | 長 | 平均 3.1 cm |
| (7) 検 | 定 | 田端健二 ^{*3} の方法に準じ、塩化第二水銀検定合格魚と同一ロット(TFO-971202)のものを試験に供した。 |

*3 用水と廃水, 14, 1297-1303 (1972)

11.3 試験用水

- (1) 種 類
久留米研究所敷地内で揚水した地下水
- (2) 水質確認

当研究所にて平成10年2月5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)又は「OECD Guidelines for Testing of Chemicals 210, Fish, Early-life Stage Toxicity Test」(July 17, 1992)に記載されている濃度以下であることを確認した。

11.4 試験条件

(1) 試験水槽	円形ガラス製水槽
(2) 試験液量	4 L / 濃度区
(3) 試験温度	25 ± 2 °C
(4) 溶存酸素濃度	ばく露開始時 8.0 mg/L ばく露終了時 6.2 mg/L
(5) pH	ばく露開始時 7.5 ばく露終了時 7.7
(6) 供試魚数	10尾 / 濃度区
(7) ばく露期間	48時間
(8) ばく露方法	半止水式 (8 ~ 16時間毎に換水)

11.5 原液調製法

(1) 分散剤

HCO-20

オリーブ油

(2) 調製方法

被験物質とその20倍量のHCO-20及び10倍量のオリーブ油をアセトンに溶解し、アセトン留去後イオン交換水に溶解して被験物質濃度として1000 mg/Lの原液を調製した。

11.6 試験の実施

- | | |
|-----------|---------------------------|
| (1) 実施場所 | 214 LC50室 |
| (2) 試験実施日 | 平成10年 3月 9日 ~ 平成10年 3月11日 |

11.7 48時間LC50値の算出

Doudoroff法で行った。

11.8 試験結果

被験物質の48時間LC50値 500 mg/L以上 (Fig. 4 参照)

12. 濃縮度試験の実施

本試験において第1濃度区と第2濃度区の間に濃度依存性が認められた。そこで新たに第3濃度区を設定し、本試験を実施した。

12.1 供試魚

12.1.1 第1及び第2濃度区

- | | |
|-------------------|--|
| (1) 魚 種 | コイ <u>Cyprinus carpio</u> |
| (2) 供 給 源 | 杉島養魚場
(住所 〒 866-0024 熊本県八代市郡築一番町 123-2)
供試魚受入日 平成 9年11月 4日 |
| (3) 蓄 養 条 件 | 魚の入手時に目視観察をして異状のあるものを除去し、受入槽で薬浴後、流水状態で63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。その間異状のあるものは除去し、 $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ の水温の流水状態で35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30日間飼育した。 |
| (5) ばく露開始前の体重、体長等 | |
| 体 重 | 平均 21.9 g |
| 体 長 | 平均 9.4 cm |
| 脂質含有率 | 平均 3.7 % |
| ロット | TFC-971104-II 測定値 |
| 測定日 | 平成10年 2月16日 |
| (6) 餌 料 | |
| 種 類 | コイ用ペレット状配合飼料 |
| 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、供試魚の採取前日は給餌を止めた。 |

12.1.2 第3濃度区

- (1) 魚 種 コイ Cyprinus carpio
- (2) 供 給 源 杉島養魚場
(住所 〒 866-0024 熊本県八代市郡築一番町 123-2)
供試魚受入日 平成10年 1月16日
- (3) 蓄 養 条 件 魚の入手時に目視観察をして異状のあるものを除去し、
受入槽で薬浴後、流水状態で46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
異状のあるものは除去し、 $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ の水温の流水状態
で24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23日間飼育した。
- (5) ばく露開始前の体重、体長等
- | | | |
|-------|----|--------|
| 体 重 | 平均 | 24.2 g |
| 体 長 | 平均 | 9.9 cm |
| 脂質含有率 | 平均 | 3.6 % |
- ロット TFC-980116 測定値
測定日 平成10年 3月20日
- (6) 餌 料
- | | |
|---------|--|
| 種 類 | コイ用ペレット状配合飼料 |
| 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、供試魚の採取前日は給餌を止めた。 |

12.2 試験用水

11.3に同じ。

12.3 試験及び環境条件

12.3.1 第1及び第2濃度区

- | | |
|-------------|---|
| (1) 試験水供給方法 | 当研究所組立流水式装置を用いた。 |
| (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800mL/分の割合で
1155L/日を試験水槽に供した。 |
| (4) 原液タンク | 25L容ガラス製びん |
| (5) 試験温度 | 25±2℃ |
| (6) 溶存酸素濃度 | 第1濃度区 7.1～8.0mg/L (Fig. 18参照)
第2濃度区 7.2～8.1mg/L (Fig. 19参照)
対照区 7.6～8.1mg/L (Fig. 20参照) |
| (7) 供試魚数 | 第1及び第2濃度区 18尾(ばく露開始時)
対照区 5尾(ばく露開始時) |
| (8) ばく露期間 | 14週間 |
| (9) 実施場所 | 213アクアトロン室 |

12.3.2 第3濃度区

- | | |
|-------------|--|
| (1) 試験水供給方法 | 当研究所組立流水式装置を用いた。 |
| (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800mL/分の割合で
1155L/日を試験水槽に供した。 |
| (4) 原液タンク | 25L容ガラス製びん |
| (5) 試験温度 | 25±2℃ |
| (6) 溶存酸素濃度 | 第3濃度区 6.9～7.7mg/L (Fig. 21参照)
対照区 7.8～8.0mg/L (Fig. 22参照) |
| (7) 供試魚数 | 第3濃度区 20尾(ばく露開始時)
対照区 5尾(ばく露開始時) |
| (8) ばく露期間 | 10週間 |
| (9) 実施場所 | 213アクアトロン室 |

12.4 原液調製法

(1) 分散剤

11.5の(1)に同じ。

(2) 調製方法

・第1濃度区

11.5の(2)と同様にして被験物質濃度として4 mg/Lの原液を調製した。

・第2濃度区

11.5の(2)と同様にして被験物質濃度として0.4 mg/Lの原液を調製した。

・第1及び第2濃度区の対照区

HCO-20及びオリーブ油をアセトンに溶解し、アセトン留去後、イオン交換水に溶解してHCO-20濃度として80 mg/L、オリーブ油濃度として40 mg/Lの原液を調製した。

・第3濃度区

11.5の(2)と同様にして被験物質濃度として0.04 mg/Lの原液を調製した。

・第3濃度区の対照区

HCO-20及びオリーブ油をアセトンに溶解し、アセトン留去後、イオン交換水に溶解してHCO-20濃度として0.8 mg/L、オリーブ油濃度として0.4 mg/Lの原液を調製した。

12.5 試験濃度

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

第2濃度区 1 $\mu\text{g/L}$

第3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。

12.6 観察、測定等

- (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) その他 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。

12.7 試験水及び供試魚中の被験物質分析

12.7.1 分析回数

試験水分析は第1及び第2濃度区においてばく露期間中、毎週2回計28回、第3濃度区において計20回行い、1回当りの分析試料は1点とした。また、供試魚分析は第1及び第2濃度区においてばく露開始後、2, 4, 6, 8, 10, 12及び14週の計7回、第3濃度区においてばく露開始後、2, 4, 6, 8及び10週の計5回行い、1回当りの分析試料は2尾とした。第1及び第2濃度区の対照区、第3濃度区の対照区ともにばく露開始前及びばく露終了時に行い、1回当りの分析試料は2尾とした。

12.7.2 分析試料の前処理

(1) 試験水

試験水槽から

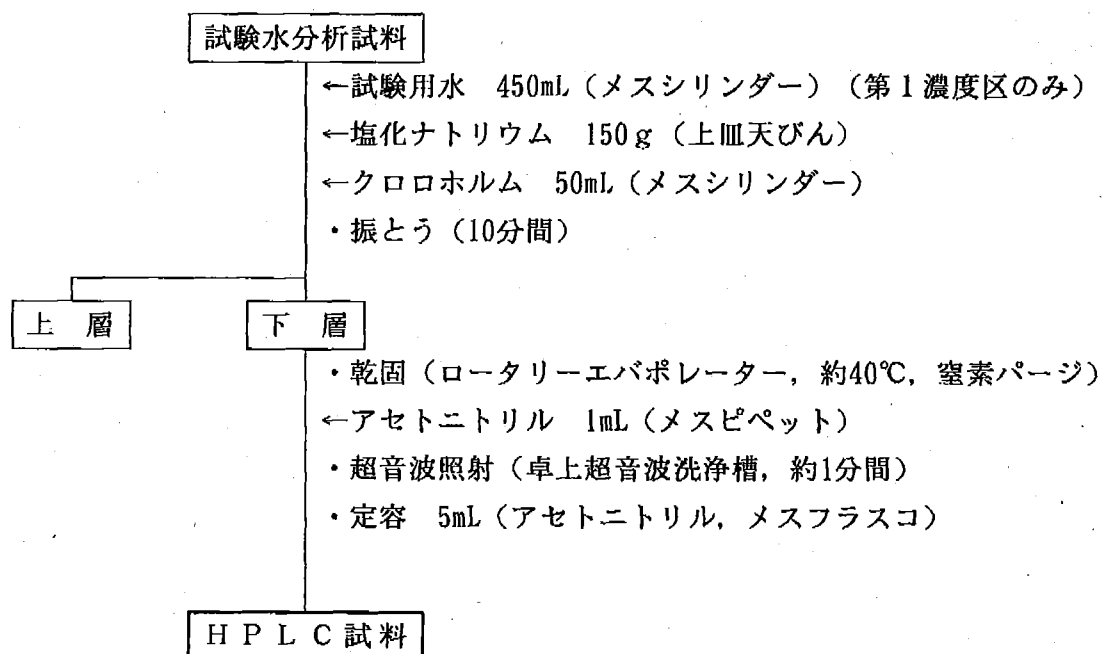
第1濃度区 50 mL

第2濃度区 500 mL

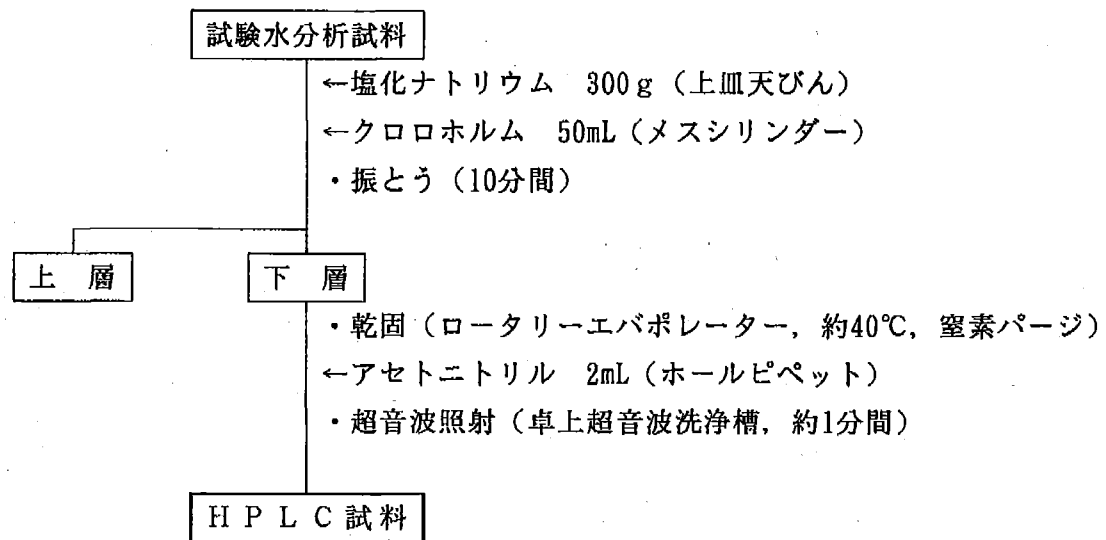
第3濃度区 1000 mL

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。

第1及び第2濃度区フロースキーム



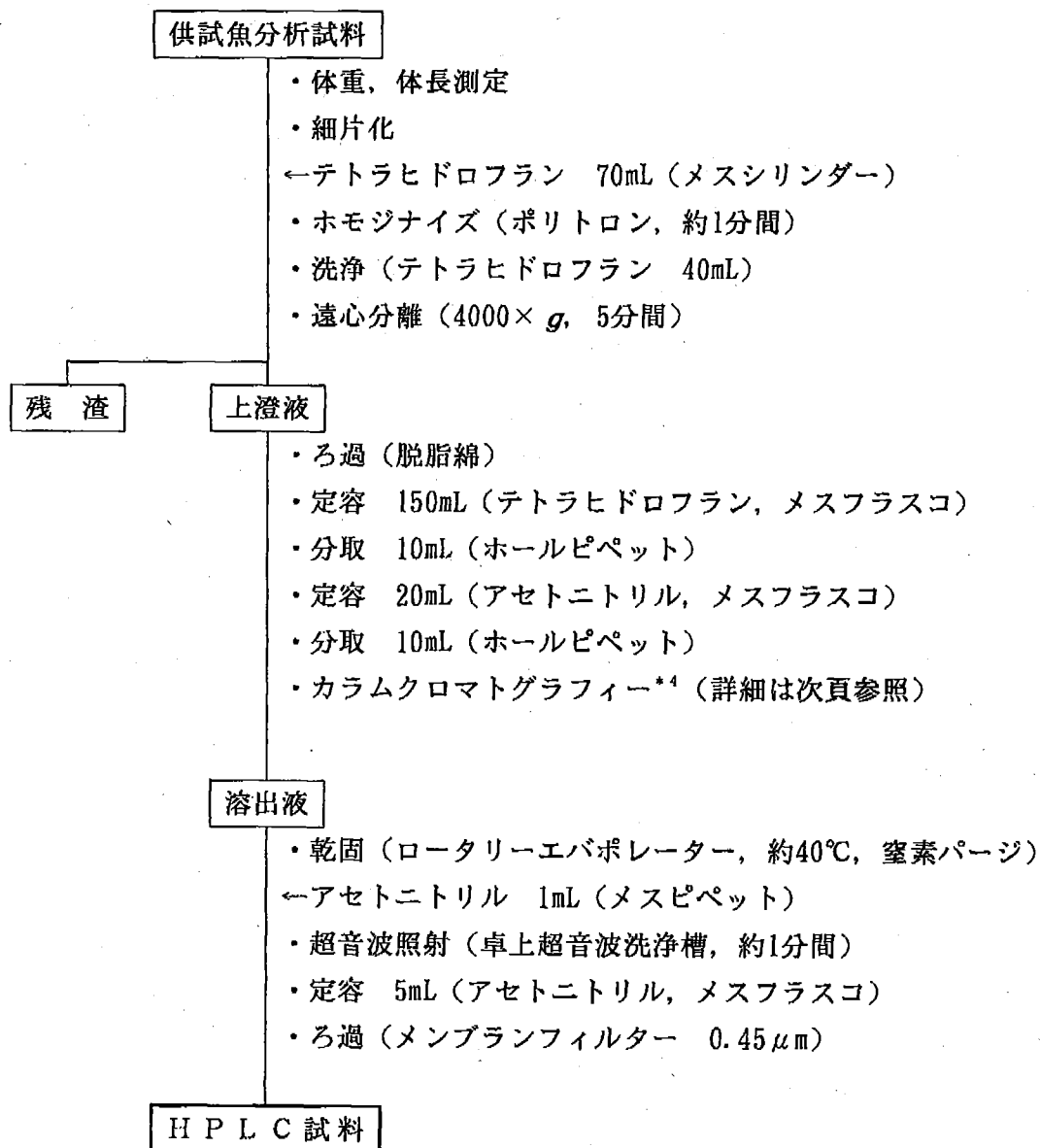
第3濃度区フローズキーム



(2) 供 試 魚

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



*4 カラムクロマトグラフの条件

セップパック C₁₈

(洗浄法：精製水、テトラヒドロフラン／アセトニトリル(1/1 V/V)各10mL)

負荷法 全量負荷した。

溶出法 第1 溶出液 テトラヒドロフラン／アセトニトリル(1/1 V/V)
10mL

負荷分及び第1 溶出液を分析に供した。

12.7.3 被験物質の定量分析

12.7.2の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。供試魚中の被験物質の定量は、HPLC試料を適宜希釈し、検量線の濃度範囲になるように被験物質濃度を調整した。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, 9、Fig. 9, 10、Table-11, 12, 13, 14, 15、Fig. 13, 14, 15, 16, 17参照)。

(1) 定量条件

機 器	高速液体クロマトグラフ
ポ ン プ	日本分光製 PU-980
検 出 器	日本分光製 UV-970
カ ラ ム	CAPCELL PAK C18 15cm×4.6mmI.D. ステンレス製 (第1及び第2濃度区試験水分析, 供試魚分析) CAPCELL PAK C18 15cm×4.6mmI.D. ステンレス製 25cm×4.6mmI.D. ステンレス製 } *5 (第3濃度区試験水分析)
溶 離 液	アセトニトリル (試験水分析) アセトニトリル/精製水(9/1 V/V) (供試魚分析)
流 量	1.0 mL/min
測 定 波 長	300 nm (Fig. 30 参照)
注 入 量	100 µL
検出器出力	1.0 V/AU

*5 2本のカラムを連結して分析に使用した。

(2) 標準溶液の調製

①第1及び第2濃度区試験水分析、供試魚分析

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 100 mg を正確にはかりとり、アセトニトリルに溶解して 1000 mg/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 100 μ g/L の標準溶液とした。

②第3濃度区試験水分析

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 100 mg を正確にはかりとり、アセトニトリルに溶解して 1000 mg/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 μ g/L の標準溶液とした。

(3) 検量線の作成

①第1及び第2濃度区試験水分析、供試魚分析

(2)①の標準溶液の調製と同様にして 50、100 及び 200 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 500 μ V \cdot sec (被験物質濃度 試験水分析 1.8 μ g/L、供試魚分析 1.9 μ g/L) とした (Fig. 5, 1.1 参照)。

②第3濃度区試験水分析

(2)②の標準溶液の調製と同様にして 25、50 及び 100 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 400 μ V \cdot sec (被験物質濃度 1.5 μ g/L) とした (Fig. 6 参照)。

12.7.4 回収試験及びブランク試験

(1) 方 法

12.7.2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、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, 6, 10、Fig. 7, 8, 12 参照)。

分析操作における回収率

第1及び第2濃度区試験水分析 (被験物質 $0.5 \mu\text{g}$ 添加)

94.9%, 92.2% 平均93.6%

第3濃度区試験水分析 (被験物質 $0.1 \mu\text{g}$ 添加)

75.5%, 72.5% 平均74.0%

供試魚分析 (被験物質 $15 \mu\text{g}$ 添加)

91.8%, 88.3% 平均90.0%

12.7.5 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, 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。

(2) 試験水中の被験物質の定量下限濃度

12.7.3(3)の検量線作成で求めた被験物質の定量下限より、試験水中の被験物質の定量下限濃度*6はそれぞれ、

第1濃度区 0.19 $\mu\text{g/L}$

第2濃度区 0.019 $\mu\text{g/L}$

第3濃度区 0.0041 $\mu\text{g/L}$

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-11, 12, 13, 14, 15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

12.7.3(3)の検量線作成で求めた被験物質の定量下限より、供試魚中の被験物質の定量下限濃度*6は供試魚体重を30gとしたとき10ng/gと算出される。

$$*6 \quad \text{被験物質定量下限濃度} (\mu\text{g/L又はng/g}) = \frac{A}{\frac{B}{100} \times \frac{C \times E}{D}}$$

A : 検量線上定量下限濃度 ($\mu\text{g/L}$)

B : 回収率 (%)

C : 試験水採取量 (mL) 又は供試魚体重 (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。

12.8 濃縮倍率（BCF）の算出

Table-1 1, 1 2, 1 3 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。

なお、12.7.5(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。

第 1 濃度区	1. 0 倍
第 2 濃度区	1 2 倍
第 3 濃度区	1 2 1 倍

12.9 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。

13. 試験結果

13.1 試験水中の被験物質濃度

試験水中の被験物質濃度を Table-1 に示す。

試験水中の平均被験物質濃度は Table-1 に示されるように、設定値の 80 % 以上が保持された。

Table-1 試験水中の被験物質濃度（ばく露開始時からの測定値の平均値）
（単位 $\mu\text{g/L}$ ）

濃度区	2 週	4 週	6 週	8 週	10 週	12 週	14 週	Table	Fig.
1	9.70	9.59	9.77	9.85	9.91	9.93	9.98	7	9
2	0.829	0.818	0.845	0.860	0.872	0.881	0.892	8	
3	0.0774	0.0836	0.0850	0.0853	0.0855			9	10

13.2 濃縮倍率

濃縮倍率をTable-2に示す。

Table-2の濃縮倍率とばく露期間との相関をFig. 1、Fig. 2及びFig. 3に示した。また、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365～2250倍、第2濃度区において1380～8180倍、第3濃度区において2960～10000倍であった。

Table-2 濃 縮 倍 率

濃度区	2 週	4 週	6 週	8 週	10 週	12 週	14 週	Table	Fig.
1	365	1050	1020	1260	2250	703	1540	11	13
	429	1070	952	1150	1570	1510	1340		
2	1380	3320	3970	3080	6200	8180	4020	12	14
	1820	4640	3340	5570	7200	7390	4720		
3	2960	5890	5360	8530	7740			13	15
	4910	4960	6920	10000	9600				

13.3 供試魚の外観観察等

異状は認められなかった。

14. 参考試験

14.1 試験目的

被験物質の供試魚の各部位における濃縮性の程度及び供試魚からの排泄性の程度について知見を得る。

14.2 部位別試験

14.2.1 試験方法

第1、第2濃度区はばく露開始後14週、第3濃度区はばく露開始後10週の供試魚を外皮（頭部を除く皮、うろこ、ひれ、消化管、えら）、頭部、内臓（消化管及び肝臓以外の臓器）、可食部（前記の部分を除いた残部）及び肝臓の部位に大別した。各部位別試料を12.7に従って分析し、各部位への濃縮倍率を算出した。

14.2.2 試験結果

Table-16, 17, 18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。

試験結果をTable-3に示す。

Table-3 部位別試験結果

濃度区	部 位	被験物質濃度 ($\mu\text{g/g}$)	濃 縮 倍 率	Table	Fig.
1	外 皮	14.0	1410	16	23
		19.9	1990		
	頭 部	29.0	2910		
		27.1	2710		
	内 臓	30.7	3080		
		27.9	2800		
	可食部	12.1	1210		
		8.17	818		
	肝 臓	31.2	3120		
		18.9	1900		
2	外 皮	3.89	4360	17	24
		9.35	10500		
	頭 部	6.27	7030		
		16.6	18600		
	内 臓	1.63	1820		
		14.9	16700		
	可食部	1.50	1680		
		4.10	4600		
	肝 臓	3.08	3450		
		14.1	15800		
3	外 皮	1.37	16000	18	25
		0.593	6940		
	頭 部	1.34	15700		
		1.11	12900		
	内 臓	0.997	11700		
		0.389	4550		
	可食部	0.449	5260		
		0.240	2800		
	肝 臓	2.14	25000		
		0.822	9610		

14.3 排泄試験

14.3.1 試験方法

第1、第2濃度区はばく露開始後4週、第3濃度区はばく露開始後10週の供試魚を下記条件の被験物質及び分散剤を含まない試験用水を供給する試験水槽に移して行った。供試魚分析は、移した時から第1、第2濃度区は6日後、9日後及び14日後の計3回、第3濃度区は3日後、7日後及び14日後の計3回、1回当たりの分析試料は2尾とし、12.7に従って行った。

〈試験及び環境条件〉

試験水槽 100L容ガラス製水槽
試験水量 試験用水800mL／分の割合で1152L／日を試験水槽に供した。
試験温度 $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$

14.3.2 供試魚中の被験物質の残留率

供試魚中の被験物質の残留率は、以下の式により計算し、計算結果は有効数字3ケタに丸めて表示した。

$$PF_n = \frac{\frac{F_n}{W}}{CF_{4(10)}} \times 100$$

PF_n : 排泄開始後n日の供試魚中の被験物質残留率(%)
F_n : 排泄開始後n日の供試魚中の被験物質絶対量(μg)
W : 魚体重(g)
CF₄₍₁₀₎ : ばく露開始後4週(10週)の供試魚中の平均被験物質濃度(μg/g)

14.3.3 試験結果

14.3.2で算出した残留率及び供試魚中の被験物質濃度をTable-4に、残留率と排泄期間の関係をFig. 29に示した。

Table-4-1 排泄試験結果（第1及び第2濃度区）

濃度区	6日後		9日後		14日後		Table	Fig.
	被験物質濃度 ($\mu\text{g/g}$)	残留率 (%)	被験物質濃度 ($\mu\text{g/g}$)	残留率 (%)	被験物質濃度 ($\mu\text{g/g}$)	残留率 (%)		
1	4.79	67.2	4.77	67.0	6.50	91.3	19	26
	6.30	88.3	4.73	66.3	3.81	53.5		
2	2.85	119	1.78	74.7	1.82	76.4	20	27
	4.10	172	1.76	73.5	0.347	14.5		

Table-4-2 排泄試験結果（第3濃度区）

濃度区	3日後		7日後		14日後		Table	Fig.
	被験物質濃度 ($\mu\text{g/g}$)	残留率 (%)	被験物質濃度 ($\mu\text{g/g}$)	残留率 (%)	被験物質濃度 ($\mu\text{g/g}$)	残留率 (%)		
3	0.931	126	0.633	85.5	0.468	63.2	21	28
	0.651	87.9	0.726	98.0	0.669	90.3		

上記の被験物質濃度（C）と排泄期間（t）の関係は最小二乗法より、

第1濃度区： $\log C = -0.0044 \times t + 3.7471$

第2濃度区： $\log C = -0.0782 \times t + 3.9834$

第3濃度区： $\log C = -0.0129 \times t + 2.9267$

となる。これより、

第1濃度区の半減期（ $t_{1/2}$ ）は、

$$t_{1/2} = 0.693 / -2.303 / -0.0044$$

すなわち、約68日、

第2濃度区の半減期（ $t_{1/2}$ ）は、

$$t_{1/2} = 0.693 / -2.303 / -0.0782$$

すなわち、約4日、

第3濃度区の半減期（ $t_{1/2}$ ）は、

$$t_{1/2} = 0.693 / -2.303 / -0.0129$$

すなわち、約23日、

となる。

15. 考 察

(1) 濃縮倍率について

本試験における濃縮倍率は、第1濃度区で365～2250倍、第2濃度区で1380～8180倍となり、濃度依存性が認められた。そこで第3濃度区を設定し、本試験を実施した。第3濃度区における濃縮倍率は2960～10000倍で、第2濃度区との間に濃度依存性は認められなかった。

(2) 試験水中の被験物質濃度について

試験水中の被験物質濃度が第1濃度区において設定濃度の98%程度だったのに対し、第2濃度区で86%程度、第3濃度区で83%程度だった。そこで、第3濃度区についてばく露終了後に供試魚を取り除き、試験水分析を行ったところ、被験物質濃度はほぼ設定値に回復した。以上の結果より、試験水中の被験物質濃度の低下は、供試魚への取り込み及び吸着等の影響によるものと考えられる。

(3) 部位別、排泄試験について

本試験において、第1、第2及び第3濃度区ともに高い濃縮性が認められたため、部位別試験及び排泄試験を実施した。部位別試験については、代謝物の存在を確認するため、内臓を肝臓とその他の内臓部に分けて実施した。

部位別試験の結果は14.2に示したように、被験物質の各部位における濃縮倍率は外皮及び可食部に比べて、内臓、肝臓、頭部が高かった。また、分析試料から代謝物は確認できなかった。

排泄試験の結果は14.3に示したように、被験物質の半減期は第1濃度区で約68日、第2濃度区で約4日、第3濃度区で約23日となり、濃度区間及び個体間のバラツキが認められた。そこで、バラツキが大きいデータを除いて半減期を求めたところ、第1濃度区で約16日、第2濃度区で約17日、第3濃度区で約38日となり、バラツキは少なくなった。

16. 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。

17. 試資料の保管

17.1 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。

17.2 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と共に、試験委託者から通知を受けるまでの期間、当研究所資料保管室に保管する。

18. 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	:	東京理化器械製	型 GMW
溶存酸素測定装置	:	飯島電子工業製	型 F-102

(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	:	17頁参照	
紫外可視分光光度計	:	島津製作所製	型 UV-2200A
電子分析天びん	:	島津製作所製	型 AEX-200B
		ザルトリウス社製	型 1702MP8
電子上皿天びん	:	ザルトリウス社製	型 1404MP8
		研精工業製	型 FA-2000
ロータリーエバポレーター	:	東京理化器械製	型 N-1
振とう機	:	タイテック製	型 SR-2W
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	:	久保田製作所製	型 6900

特殊器具

セップパック C₁₈ : 日本ミリポアリミテッド製
メンブランフィルター 0.45 μ m : 野村マイクロサイエンス製

試薬

アセトニトリル : 和光純薬工業製 HPLC用
テトラヒドロフラン : 関東化学製 HPLC用
精製水 : 高杉製薬製 日本薬局方
アセトン : 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
塩化ナトリウム : マナック製 試薬一級
HCO-20 : 日光ケミカルズ製
オリーブ油 : 和光純薬工業製

(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
ガスクロマトグラフー質量分析計 : 日本電子製 型 JMS-DX303
超電導フーリエ変換核磁気共鳴装置 : 日立製作所製 型 R-3000