

最 終 報 告 書

2-(2-ヒドロキシ-3,5-ジ-*t*-ブチルフェニル)-5-クロロベンゾトリアゾール
[別名：2-(3,5-ジ-*tert*-ブチル-2-ヒドロキシフェニル)-5-クロロベンゾ
トリアゾール]（被験物質番号 K-334）のコイにおける濃縮度試験

（試験番号：50334Ⅲ）

化学物質評価研究機構
残留基準部

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-(2-ヒドロキシ-3,5-ジ-*t*-ブチルフェニル)-5-クロロベンゾトリアゾール [別名: 2-(3,5-ジ-*tert*-ブチル-2-ヒドロキシフェニル)-5-クロロベンゾトリアゾール] (被験物質番号 K-334) のコイにおける濃縮度試験

試験番号 50334Ⅲ

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29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-(2-ヒドロキシ-3,5-ジ-*tert*-ブチルフェニル)-5-クロロベンゾトリアゾール〔別名：2-(3,5-ジ-*tert*-ブチル-2-ヒドロキシフェニル)-5-クロロベンゾトリアゾール〕（被験物質番号 K-334）のコイにおける濃縮度試験

試験番号 50334Ⅲ

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5日	2002年11月5日	2002年11月5日
	2002年11月29日	2002年12月2日	2002年12月2日
	2002年12月20日	2002年12月20日	2002年12月20日
試験実施状況	2002年11月6日	2002年11月7日	2002年11月7日
	2002年11月7日	2002年11月7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22日	2002年11月25日	2002年11月25日
	2002年12月6日	2002年12月9日	2002年12月9日
	2002年12月9日	2002年12月9日	2002年12月9日
	2003年1月7日	2003年1月16日	2003年1月16日
	2003年1月8日	2003年1月16日	2003年1月16日
	2003年1月9日	2003年1月16日	2003年1月16日
	2003年1月15日	2003年1月16日	2003年1月16日
	2003年1月16日	2003年1月16日	2003年1月16日
	2003年1月16日	2003年1月16日	2003年1月16日
生データ及び最終報告書	2003年3月24日	2003年3月24日	2003年3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。

2003年3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 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. 濃縮度試験の実施	6
3. 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	21
4. 試験結果	21
5. 考 察	24
6. 備 考	25

表 題	2-(2-ヒドロキシ-3,5-ジ- <i>t</i> -ブチルフェニル)-5-クロロベンゾトリアゾール〔別名：2-(3,5-ジ- <i>tert</i> -ブチル-2-ヒドロキシフェニル)-5-クロロベンゾトリアゾール〕（被験物質番号 K-334）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-334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	<p>(1) 化学物質GLP</p> <p>「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。</p> <p>(2) OECD-GLP</p> <p>「OECD Principles of Good Laboratory Practice」（November 26, 1997）を適用した。</p>

試験日程

試験開始日	2002年11月 5日
実験開始日	2002年11月 7日
実験終了日	2003年 2月17日
試験終了日	2003年 3月24日

試験資料の保管

(1) 被験物質

同一ロットの被験物質が濃縮度試験（50334Ⅱ）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





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）

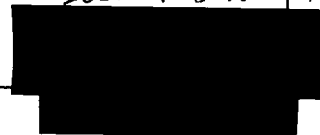





飼育管理責任者



最終報告書の承認

試験責任者

 2003年3月24日


要 約

試験の表題

2-(2-ヒドロキシ-3,5-ジ-*t*-ブチルフェニル)-5-クロロベンゾトリアゾール
 [別名:2-(3,5-ジ-*tert*-ブチル-2-ヒドロキシフェニル)-5-クロロベンゾトリアゾール]
 (被験物質番号 K-334) のコイにおける濃縮度試験

試験条件

濃縮度試験

(1) 供 試 魚	コイ
(2) 試験濃度	第1濃度区 0.1 µg/L
	第2濃度区 0.01µg/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質量分析法

試験結果

(1) 定常状態における濃縮倍率	第1濃度区	7600倍
	第2濃度区	6500倍
(2) 排泄半減期	第1濃度区	21日
	第2濃度区	43日
(3) 各部位における濃縮倍率	Table-5参照 (24頁)	

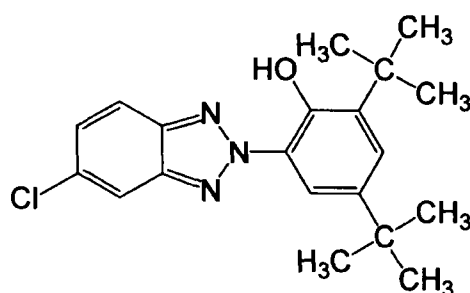
1. 被 驗 物 質

本報告書においてK-334は、次の名称等を有するものとする。

1.1 名 称 2-(3,5-ジ-*tert*-ブチル-2-ヒドロキシフェニル)-5-クロロベンゾ
トリアゾール

1.2 構造式等

構造式



分子式 $C_{20}H_{24}ClN_3O$

分子量 357.88

CAS No. 3864-99-1

1.3 入手先、商品名、等級及びロット番号*

(1) 入手先

(2) 商 品 名

(3) 等 級

(4) ロット番号 APP5003

*1 入手先添付資料による。

1.4 純 度^{*1}

被 験 物 質 99.9% (HPLC法)

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

独立行政法人 産業技術総合研究所の有機化合物スペクトルデータベース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. 20参照)。また、質量スペクトル (Fig. 21参照) 及び核磁気共鳴スペクトル (Fig. 22参照) 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 冷暗所保存

(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. 20参照)。

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. 濃縮度試験の実施

2.1 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 |
| | | 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 2002年 9月12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18日間飼育した。 |
| | 薬 浴 | 病気予防として水産用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。
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17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16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 | 6.6～12.1cm |
| (6) ロ ッ ト | | TFC-020912 |
| (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。 |

2.2 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。

2.3 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

ばく露期間

原液0.04mL/分及び試験用水800mL/分の割合で1152L/日を試験水槽に供した。

排泄期間

試験用水800mL/分の割合で1152L/日を試験水槽に供した。

(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 24.5～25.1℃

第2濃度区 24.5～25.3℃

対照区 24.3～25.1℃

(6) 溶存酸素濃度

第1濃度区 6.4～8.1mg/L (Fig. 17参照)

第2濃度区 7.3～8.1mg/L (Fig. 18参照)

対照区 7.6～8.1mg/L (Fig. 19参照)

(7) pH

第1濃度区 8.0～8.2

第2濃度区 7.9～8.2

対照区 7.9～8.2

(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 50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
理由：60日間で定常状態に達したため。
- (11) 排泄期間 41日間
理由：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

2.4 原液調製法

(1) 分散剤

N,N-ジメチルホルムアミド

(2) 調製方法

・第1濃度区

被験物質を *N,N*-ジメチルホルムアミ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。

・第2濃度区

被験物質を *N,N*-ジメチルホルムアミドに溶解して被験物質濃度として 0.2mg/L の原液を調製した。

・対照区

N,N-ジメチルホルムアミドを原液とした。

2.5 試験濃度

被験物質は50334Ⅱにおける第3、第4濃度区において濃度依存が認められたため、

第1濃度区 0.1 µg/L

第2濃度区 0.01µg/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。

2.6 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。

2.7 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質量分析法（LC-MS）により行った。

2.7.1 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。

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6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。

*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。

2.7.2 分析試料の前処理

(1) 試験水中の被験物質

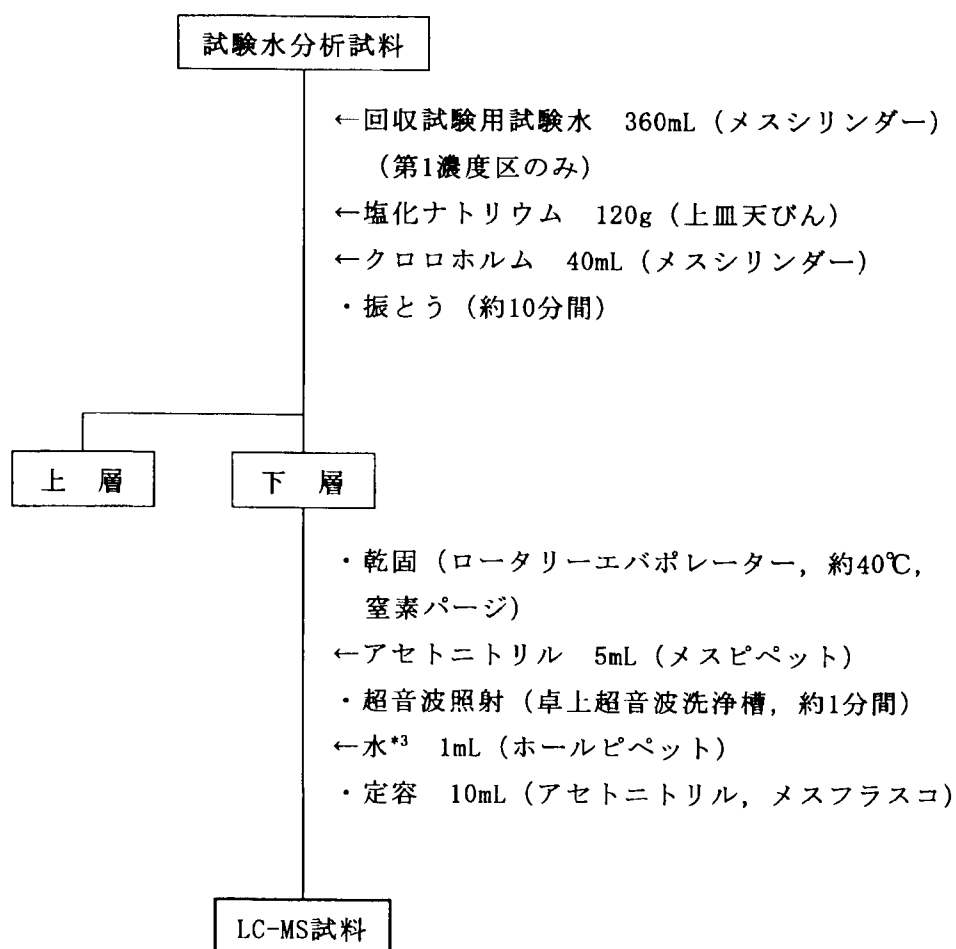
試験水槽から

第1濃度区 40mL

第2濃度区 400mL

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

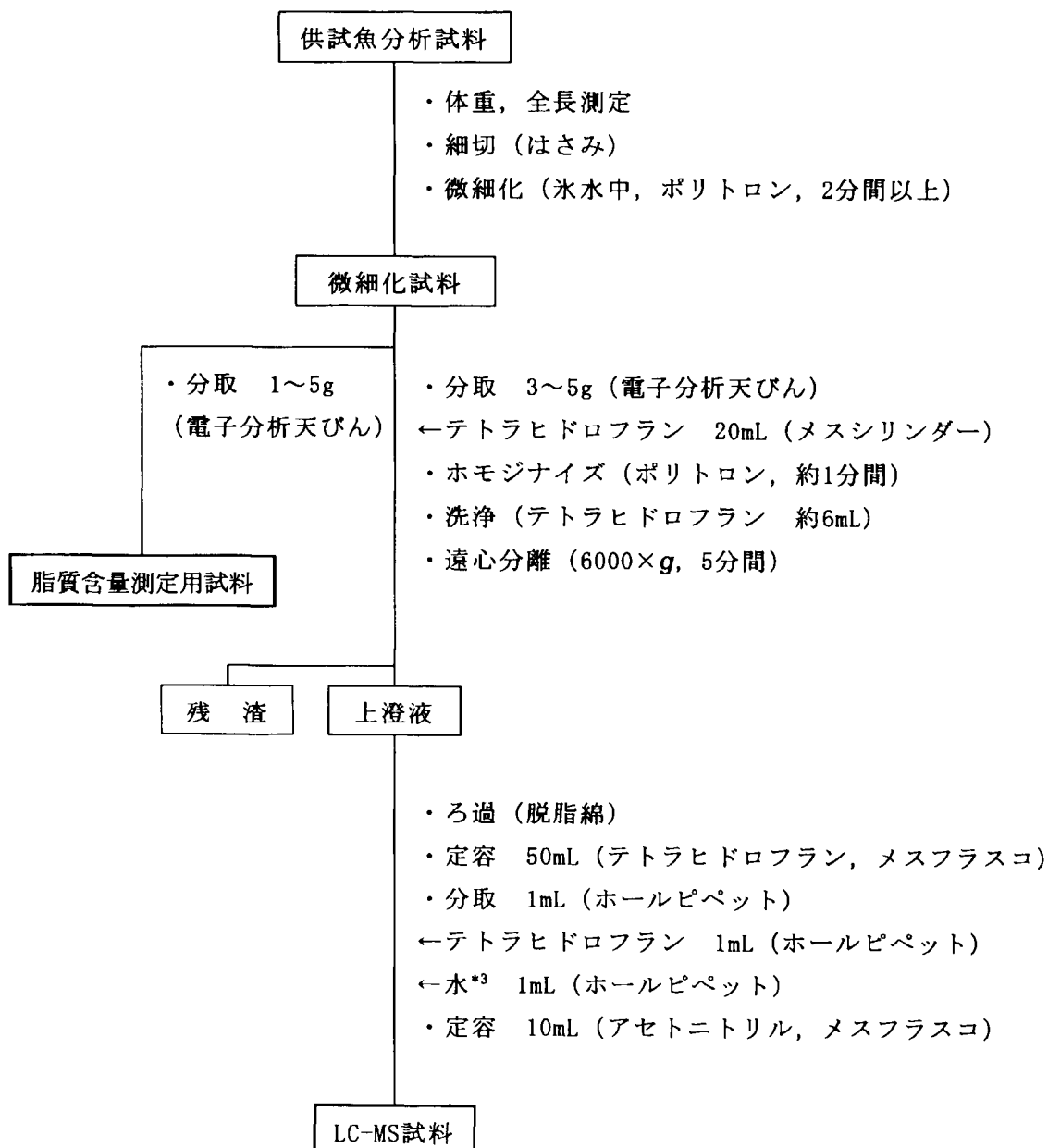


*3 水道水を超純水装置システムを用いて処理した水。

(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、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



2.7.3 被験物質の定量分析

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、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。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-7, 8, Fig. 5, 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ー質量分析計
高速液体クロマトグラフ	Agilent Technologies社製 Agilent 1100
質 量 分 析 計	Micromass社製 Quattro Ultima

高速液体クロマトグラフ条件

カ ラ ム	Eclipse XDB-C18 (Agilent Technologies社製) 15cm×3.0mmI. D.
カ ラ ム 温 度	25℃
溶 離 液	メタノール／水*3 (98/2 V/V)
流 量	0.5mL/min
注 入 量	100μL

質量分析計条件

イ オ ン 化 法	大気圧化学イオン化法 (APCI)
検 出 イ オ ン	負イオン
検 出 法	選択イオンモニタリング (SIM)
測 定 イ オ ン	m/z 356
イオン原温度	120℃
プローブ温度	300℃
コ ー ン 電 圧	65V
コーンガス流量	60L/hr

(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。

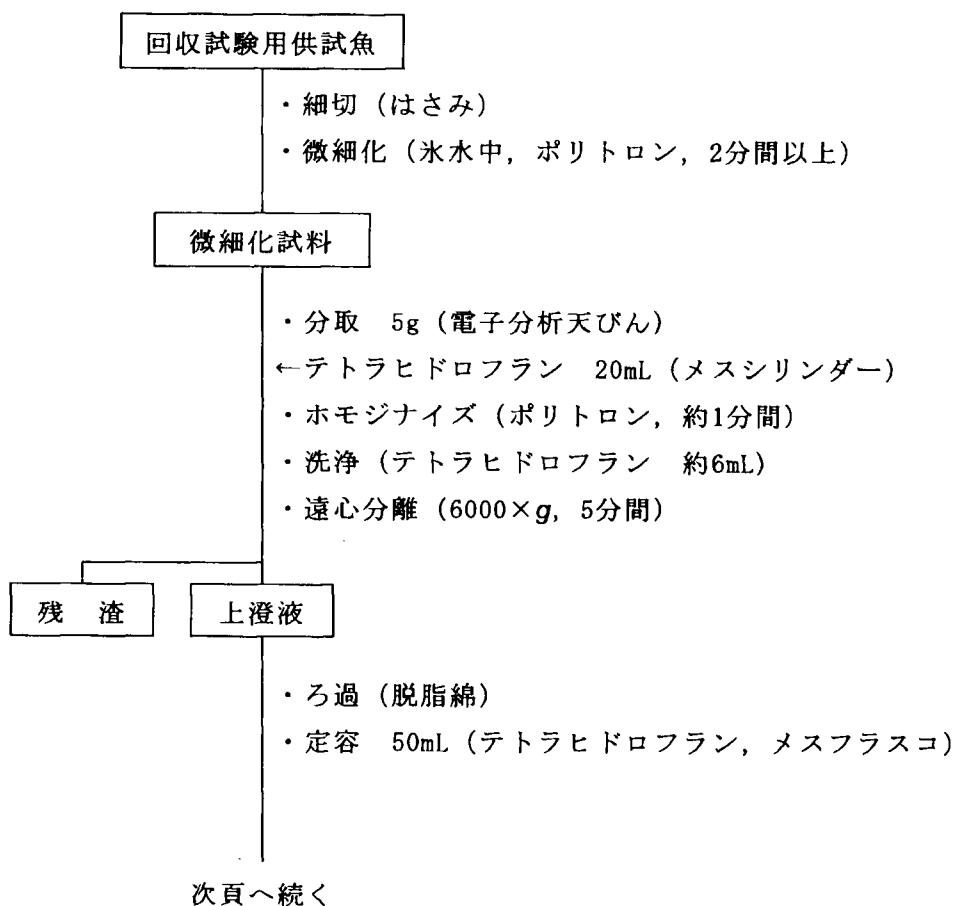
(a) 試験水分析

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／水*3 (9/1 V/V) で希釈して0.400 μ g/Lの標準溶液とした。

(b) 供試魚分析

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5.00 μ g/Lの被験物質溶液とした。これを用いて下記のフロースキームに従って前処理操作を行い、0.500 μ g/Lの標準溶液を調製した。

フロースキーム



前頁より続く

- ・分取 1mL (ホールピペット)
- ←5.00 μ g/L 被験物質溶液 1mL (ホールピペット)
- ←テトラヒドロフラン 1mL (ホールピペット)
- ←水*3 1mL (ホールピペット)
- ・定容 10mL (アセトニトリル, メスフラスコ)

0.500 μ g/L標準溶液

(3) 検量線の作成

(a) 試験水分析

(2) (a)の標準溶液の調製と同様にして、0.200、0.400及び0.800 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500 (被験物質濃度 0.020 μ g/L) とした (Fig.3参照)。

(b) 供試魚分析

(2) (b)の標準溶液の調製と同様にして、0.250、0.500及び1.00 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 550 (被験物質濃度 0.025 μ g/L) とした (Fig.6参照)。

2.7.4 回収試験及びブランク試験

(1) 方 法

2.7.2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值とした（Table-6, 9、Fig. 4, 7 参照）。

分析操作における回収率

試験水分析（被験物質 4ng添加）

98.4%, 98.3% 平均 98.3%

供試魚分析（被験物質 500ng添加）

83.1%, 87.0% 平均 85.0%

2.7.5 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。

2.7.6 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

2.7.3(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*4はそれぞれ、

第1濃度区 0.0050 µg/L

第2濃度区 0.00050µg/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*4は供試魚微細化試料を5gとしたとき3.0ng/gと算出される。

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

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。

2.7.7 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

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

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

2.7.8 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

$\overline{C_w} = \{C_w(n-1) + C_w(n)\} / 2$ (供試魚分析1回目)
 $\overline{C_w} = \{C_w(n-2) + C_w(n-1) + C_w(n)\} / 3$ (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

2.7.9 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} : $\{BCF(m-2) + BCF(m-1) + BCF(m)\} / 3$

2.7.10 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）

2.7.11 算出可能な濃縮倍率

2.7.6(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	32倍
第2濃度区	310倍

2.7.12 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)

2.8 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。

3. 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。

4. 試験結果

4.1 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	7日後	15日後	29日後	43日後	50日後	60日後	平均 (標準偏差)	Table	Fig.
1	0.0987	0.0927	0.0903	0.0924	0.0901	0.0937	0.0930 (0.00313)	7	5
2	0.00977	0.00909	0.00902	0.00958	0.00980	0.00988	0.00952 (0.000375)	8	

4.2 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3400～9000倍、第2濃度区において3400～8800倍であった。

Table-2 濃縮倍率

() 内は平均値

濃度区	15日後	29日後	43日後	50日後	60日後	Table	Fig.
1	3400 3500 (3500)	5600 5800 (5700)	7000 8100 (7500)	7100 9000 (8100)	7700 6800 (7300)	10	8
2	3400 3900 (3600)	7100 7300 (7200)	7100 6700 (6900)	8800 6400 (7600)	6200 5100 (5700)	11	9

4.3 定常状態における濃縮倍率

4.2の結果から、43、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92%、第2濃度区において98%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	43日後	50日後	60日後	平均	Table	Fig.
1	0.0924	0.0901	0.0937	0.0921	7, 10	5
2	0.00958	0.00980	0.00988	0.00975	8, 11	

(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	7600倍
第2濃度区	6500倍

4.4 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8、15、20、23、29及び41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濃度区で21日、第2濃度区で43日であった。

Table-4 排泄試験における残留率

（単位 %）

濃度区	8日後	15日後	20日後	23日後	29日後	41日後	Table	Fig.
1	51	51	39	30	37	14	12	10
	66	52	55	46	33	26		
2	71	58	50	39	41	36	13	11
	87	35	48	35	40	47		

4.5 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2.7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	部 位	各部位における被験物質濃度 (ng/g)	濃縮倍率	Table	Fig.
1	外 皮	1170 862	13000 9400	15	15
	頭 部	1630 1200	18000 13000		
	内 臓	2210 3750	24000 41000		
	可食部	687 553	7500 6000		
2	外 皮	71.1 90.2	7300 9200	16	16
	頭 部	116 130	12000 13000		
	内 臓	143 147	15000 15000		
	可食部	39.5 50.4	4000 5200		

4.6 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	4.22%
実験終了後	4.39%

4.7 供試魚の外観観察等

異常は認められなかった。

5. 考 察

濃縮倍率について

試験番号50334Ⅱ（試験設定濃度：第3濃度区 1μg/L, 第4濃度区 0.1μg/L）の定常状態における濃縮倍率は、第3濃度区 900倍, 第4濃度区 4700倍であり濃度依存性が認められたが、本試験における第1濃度区及び第2濃度区の濃縮倍率に濃度依存性は認められなかった（Table-2参照）。

従って、本試験の濃縮倍率は平衡に達したと考えられる。

6. 備 考

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	: 日本精密科学製	型 SP-D-2500
	ユニフローズ製	型 uf-4004S
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

高速液体クロマトグラフィー質量分析計	: 12頁参照	
天びん	: ザルトリウス社製	型 BP301S
	メトラー社製	型 AE163
	エー・アンド・ディ社製	型 FA-2000
ロータリーエバポレーター	: 東京理化学器械製	型 N-1000V
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	: 日立工機製	型 CR21G

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
テトラヒドロフラン	: 関東化学製	HPLC用
クロロホルム	: キシダ化学製	試薬特級
N,N-ジメチルホルムアミド	: 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

(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 BP301S
	ザルトリウス社製	型 CP324S

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 (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
高速液体クロマトグラフー質量分析計		
	: ウォーターズ社製	型 ZMD
フーリエ変換核磁気共鳴装置	: 日本電子製	型 JNM-MY60FT