

資料1-3 1,4-ビス(イソプロピルアミノ)アントラキノン(被験物質番号 K-1763) のコイにおける濃縮度試験  
(流水式暴露試験、試験番号 505166)

1,4-ビス(イソプロピルアミノ)アントラキノン (被験物質番号 K-1763) の  
コイにおける濃縮度試験 (流水式暴露試験、試験番号 505166)

## 1. 被 験 物 質

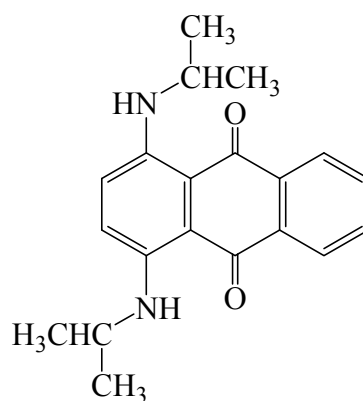
本報告書において被験物質は、次の名称等を有するものとする。

### 1.1 名 称

1,4-ビス(イソプロピルアミノ)アントラキノン

### 1.2 構 造 式 等

構 造 式



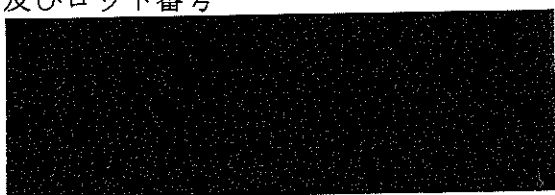
分 子 式       $C_{20}H_{22}N_2O_2$

分 子 量      322.40

CAS 番 号      14233-37-5

1.3 供給者、商品名及びロット番号<sup>\*1</sup>

供給者  
商品名  
ロット番号



<sup>\*1</sup> 供給者添付資料による。

## 1.4 純度

被験物質 100% (HPLC による) (当機構測定データ)

## 1.5 被験物質の確認

被験物質の赤外吸収スペクトルは、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スペクトルと一致することを確認した。また、質量スペクトル及び核磁気共鳴スペクトル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確認

保管条件 室温暗所保存

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。

## 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。

1,4-ビス(イソプロピルアミノ)アントラキノン（被験物質番号 K-1763）の  
コイにおける濃縮度試験（流水式暴露試験、試験番号 505166）

要 約

試 験 法

本試験は以下の試験法に従って行った。

- (1) 「新規化学物質等に係る試験の方法について」（平成15年11月21日、薬食発第1121002号、平成15・11・13製局第2号、環保企発第031121002号）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〉
- (2) 「OECD Guidelines for Testing of Chemicals」に定める  
"Bioconcentration : Flow-through Fish Test (Guideline 305, June 14, 1996)"

適 用 GLP

本試験は以下の基準を適用した。

- (1) 「新規化学物質等に係る試験を実施する試験施設に関する基準について」（平成15年11月21日、薬食発第1121003号、平成15・11・17製局第3号、環保企発第031121004号）に規定する「新規化学物質等に係る試験を実施する試験施設に関する基準」
- (2) 「OECD Principles of Good Laboratory Practice」（November 26, 1997）

## 試験条件

## 急性毒性試験

供 試 魚 ヒメダカ  
 ばく露期間 96 時間  
 ばく露方法 半止水式 (24 時間毎に換水)

## 濃縮度試験

供 試 魚 コイ  
 試験濃度 第 1 濃度区 1 µg/L  
 第 2 濃度区 0.1 µg/L  
 ばく露期間 60 日間  
 排泄期間 9 日間  
 ばく露方法 連続流水式  
 分析方法 液体クロマトグラフィー質量分析法

## 試験結果

96 時間 LC<sub>50</sub> 値 >0.100 mg/L

## 定常状態における濃縮倍率

第 1 濃度区 5400 倍  
 第 2 濃度区 5300 倍

排泄半減期 第 1 濃度区 3.0 日  
 第 2 濃度区 3.4 日

## 各部位における濃縮倍率

濃度区	部 位	濃縮倍率
1	外 皮	9800 5800
	頭 部	7900 7600
	内 臓	42000 9900
	可食部	4300 4700
2	外 皮	5200 4400
	頭 部	4700 6900
	内 臓	7700 16000
	可食部	2300 2900

## 1. 急性毒性試験の実施

### 1.1 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 0102-2008の71.）の方法に準じて行った。

### 1.2 供試魚

#### (1) 魚種

ヒメダカ Oryzias latipes

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

財団法人化学物質評価研究機構 久留米事業所

（住所 〒839-0801 福岡県久留米市宮ノ陣三丁目2番7号）

#### (3) じゅん化条件

期間等 供試魚を目視観察して異常のあるものを除去し、じゅん化水槽へ搬入し薬浴を実施した。その後、水温  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  の流水状態で 63 日間じゅん化した。その間異常のあるものは除去した。再度選別して薬浴を実施した後、同温度の流水状態で 52 日間じゅん化した。

薬浴 じゅん化水槽へ搬入して、水産用 OTC（塩酸オキシテトラサイクリン）50 mg/L と塩化ナトリウム 6 g/L の薬浴を 24 時間実施した。再度選別して、塩化ナトリウム 6 g/L の薬浴を 24 時間実施した。

#### (4) 体重

平均 0.23 g

#### (5) 全長

平均 3.0 cm

#### (6) 感受性試験

同一ロット（TFO-080818）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  $\text{LC}_{50}$  値は 0.642 mg/L であった。

### 1.3 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

試験用水は以下に示す基準のいずれかに適合していることを確認した。

- ① 「水道法に基づく水質基準」（平成 15 年 5 月 30 日改正 厚生労働省令第 101 号）
- ② 「OECD Guidelines for Testing of Chemicals」 "Fish, Early-life Stage Toxicity Test (Guideline 210, July 17, 1992)"
- ③ 「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）
- ④ 「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）
- ⑤ 「OECD Guidelines for Testing of Chemicals」 "Bioconcentration : Flow-through Fish Test (Guideline 305, June 14, 1996)"

### 1.4 原液調製法

#### (1) 分散剤

HCO-20

*N,N*-ジメチルホルムアミド

#### (2) 調製方法

供試試料とその 100 倍量の HCO-20 を *N,N*-ジメチルホルムアミドに溶解し、被験物質濃度として 1000 mg/L の原液を調製した。

### 1.5 試験条件

#### (1) 試験濃度

0.100 mg/L 及び対照区

#### (2) 試験水槽

円形ガラス製水槽

#### (3) 試験液量

4 L/濃度区

## (4) 供試魚数

10 尾/濃度区

## (5) 試験温度

ばく露開始時 24.3～24.4℃

換水前 25.0℃

## (6) 溶存酸素濃度

ばく露開始時 8.1～8.2 mg/L

換水前 7.7～7.8 mg/L

## (7) pH

ばく露開始時 8.2

換水前 8.5

## (8) ばく露期間

96 時間

## (9) ばく露方法

半止水式（24 時間毎に換水）

## (10) ばく露気

ばく露期間中連続してエアレーションを行った。

## 1.6 試験の実施

実施場所 アクアトロン室 B

1.7 96 時間 LC<sub>50</sub> 値の算出

Doudoroff 法で行った。

## 1.8 試験結果

被験物質の 96 時間 LC<sub>50</sub> 値 >0.100 mg/L<sup>\*2</sup>

\*2 この際の使用した分散剤 (N,N-ジメチルホルムアミド) の濃度は、約 100 mg/L となり、その分散剤の 96 時間 LC<sub>50</sub> 値が 11200 mg/L であることから、分散剤の毒性の影響を考慮してこれ以上の高濃度の試験は行わなかった。

## 2. 濃縮度試験の実施

定常状態における濃縮倍率が 1000 倍を超えたため、部位別試験及び排泄試験を行った。

### 2.1 供 試 魚

#### (1) 魚 種

コイ Cyprinus carpio

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 〒839-0801 福岡県久留米市宮ノ陣三丁目 2 番 7 号)

#### (3) じゅん化条件

期 間 等 受入槽及び蓄養槽で試験魚サイズまで養成後、じゅん化水槽へ搬入して薬浴した。その後、水温  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  未満の流水状態で 32 日間じゅん化した。その間異常のあるものは除去した。再度選別して試験水槽へ移し、薬浴した。その後、同温度の流水状態で 27 日間じゅん化した。

薬 浴 じゅん化水槽では水産用 OTC 50 mg/L と塩化ナトリウム 7 g/L の薬浴を 24 時間実施した。試験水槽では水産用 OTC 50 mg/L と塩化ナトリウム 7 g/L の薬浴を 24 時間実施した。

#### (4) 全 長

6.2～10.2 cm

#### (5) ロ ッ ト

TFC-081024

#### (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（休日は 1 回にまとめた。） 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

1.3 に同じ。

## 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

70 L 容ガラス製水槽

## (3) 試験水量

ばく露期間 原液 0.1 mL/分及び試験用水 2000 mL/分の割合で 2880 L/日を  
試験水槽に供した。

排泄期間 試験用水 2000 mL/分の割合で 2880 L/日を試験水槽に供した。

## (3) 試験水量

原液 0.1 mL/分及び試験用水 2000 mL/分の割合で 2880 L/日を試験水槽に供した。

## (4) 原液タンク

1 L 容ガラス製褐色びん

交換頻度 1～2 回／週

## (5) 試験温度

第 1 濃度区 24.3～24.9℃

第 2 濃度区 24.3～25.0℃

対 照 区 24.5～25.0℃

## (6) 溶存酸素濃度

第 1 濃度区	7.4～8.0 mg/L
第 2 濃度区	7.3～7.9 mg/L
対 照 区	7.5～8.0 mg/L

## (7) pH

第 1 濃度区	7.6～8.0
第 2 濃度区	7.6～8.0
対 照 区	7.6～8.0

## (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	52 尾（実験開始時）
対 照 区	12 尾（実験開始時）

## (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

9 日間

理由： 排泄半減期が得られたため。

## (12) 実 施 場 所

アクアトロニ室 A

## 2.4 原液調製法

## (1) 分 散 剤

1.4 の(1)に同じ。

## (2) 調製方法

### 第1濃度区

2.4の(2)と同様にして1000 mg/Lの被験物質溶液を調製し、さらに*N,N*-ジメチルホルムアミドで希釈して、被験物質濃度として20.0 mg/Lの原液を調製した。

### 第2濃度区

第1濃度区で調製した20.0 mg/Lの被験物質溶液を*N,N*-ジメチルホルムアミドで希釈して、被験物質濃度として2.00 mg/Lの原液を調製した。

### 対照区

HCO-20を*N,N*-ジメチルホルムアミドに溶解し、HCO-20濃度として2000 mg/Lの原液を調製した。

## 2.5 試験濃度

各濃度区は以下の被験物質濃度とした。同時に、対照区を設定した。

第1濃度区      1 μg/L

第2濃度区      0.1 μg/L

## 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（休日は1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週1～2回測定記録した。

### (4) 溶存酸素濃度

溶存酸素計を用いて週1～2回測定記録した。

### (5) pH測定

pH計を用いて実験期間中に5回測定記録した。

### (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回当たりの分析試料は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8回行い、1回当たりの採取尾数は4尾とし、2群（2尾1群）<sup>\*3</sup>に分けて行った。

排泄試験の供試魚分析は4回行い、1回当たりの採取尾数は4尾とし、2群（2尾1群）に分けて行った。

部位別試験の供試魚分析は1回行い、採取尾数は2尾とし、1尾ずつ分析した。

対照区は実験開始前及び実験終了後に行い、1回当たりの採取尾数は4尾とし、2群（2尾1群）に分けて分析した。さらに、脂質含量測定用として2尾を追加で取り上げ、3群（2尾1群）とした。

<sup>\*3</sup> 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 分析試料の前処理法

## (1) 試験水中の被験物質

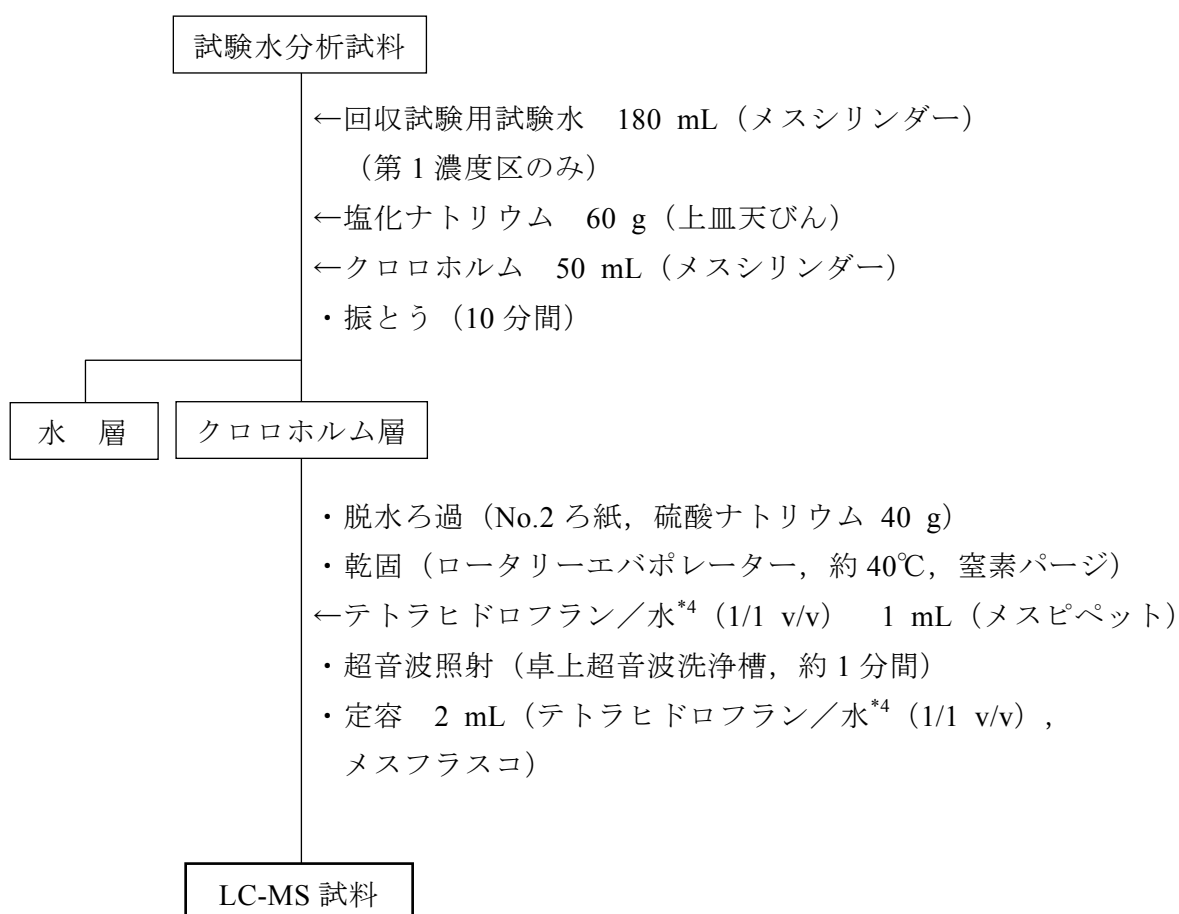
試験水槽から

第1濃度区 20 mL

第2濃度区 200 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、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

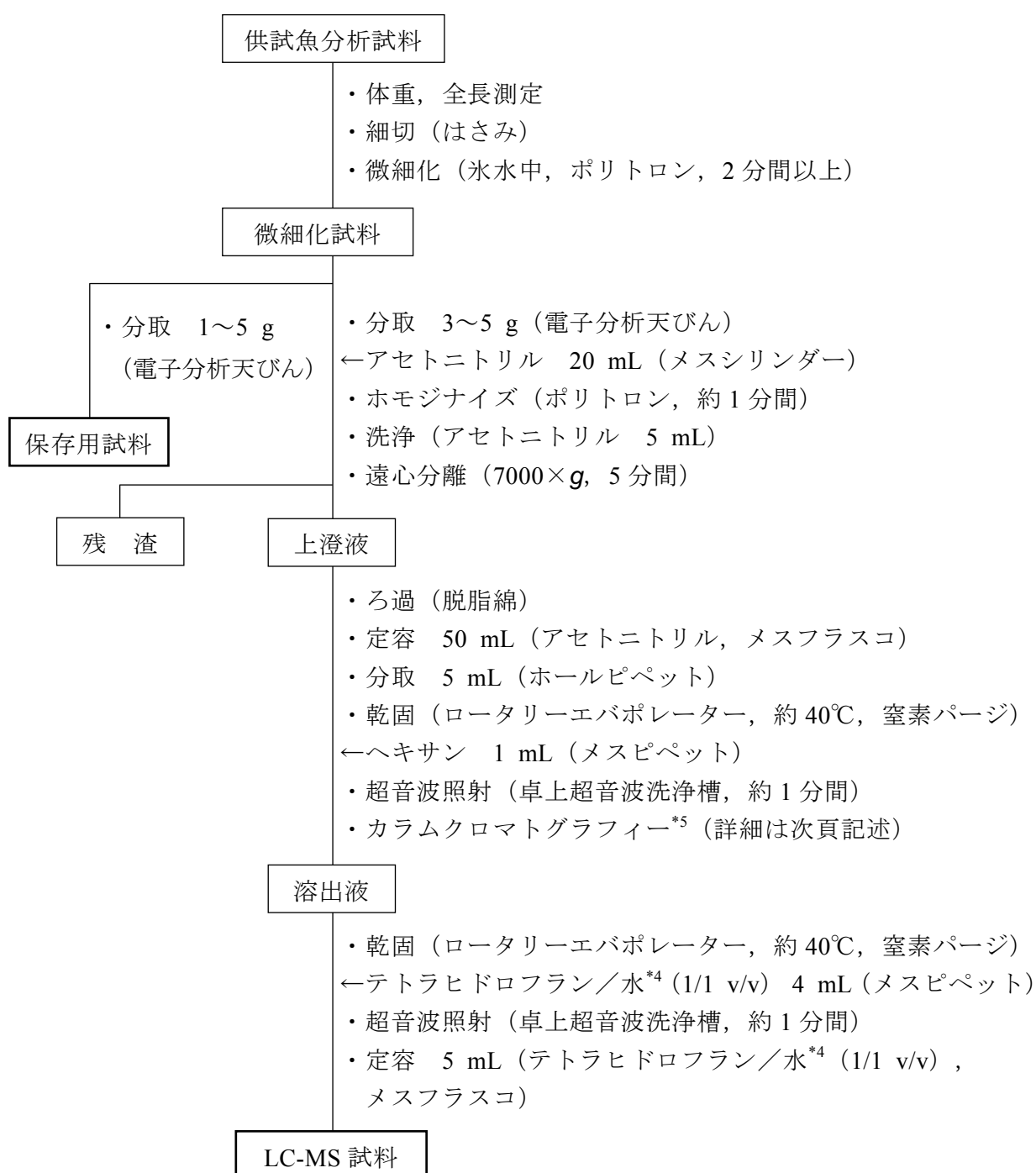


\*4 水道水を超純水製造システムで処理した水。

## (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、液体クロマトグラフィー質量分析法（LC-MS）試料とした。ただし、部位別試験においては供試魚分析の前処理フロースキーム中の微細化、保存用試料の分取、分析試料の分取は行わなかった。

## フロースキーム



## \*5 カラムクロマトグラフの条件

## Sep-Pak Plus Silica

(洗浄法：ヘキサン 約 10 mL)

負荷法 全量負荷した。

溶出法 第 1 溶出液 ヘキサン (ナスフラスコを洗い込み、負荷した)

10 mL

第 2 溶出液 ヘキサン／酢酸エチル (10/1 v/v) 10 mL

第 2 溶出液を分析に供した。

## 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超えた場合は、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。

## (1) 定量条件

機 器	液体クロマトグラフ質量分析計
液体クロマトグラフ	Waters 製 Alliance2695 セパレーションモジュール
質量分析計	Micromass 製 Quattro Ultima Pt

液体クロマトグラフ条件

カラム	L-column ODS (15 cm×2.1 mm I.D., 化学物質評価研究機構製)
カラム温度	40℃
溶離液	A (60%): テトラヒドロフラン/25 mmol/L 酢酸アンモニウム含有のメタノール溶液 (4/1 v/v) C (40%): 5 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液
流量	0.2 mL/min
注入量	5 µL

質量分析計条件

イオン化法	エレクトロスプレーイオン化法 (ESI)
検出イオン	正イオン
検出法	選択イオンモニタリング (SIM)
測定イオン(m/z)	m/z 323.2 (M+H) <sup>+</sup>
イオン源温度	120℃
脱溶媒システム温度	400℃
コーン電圧	35 V

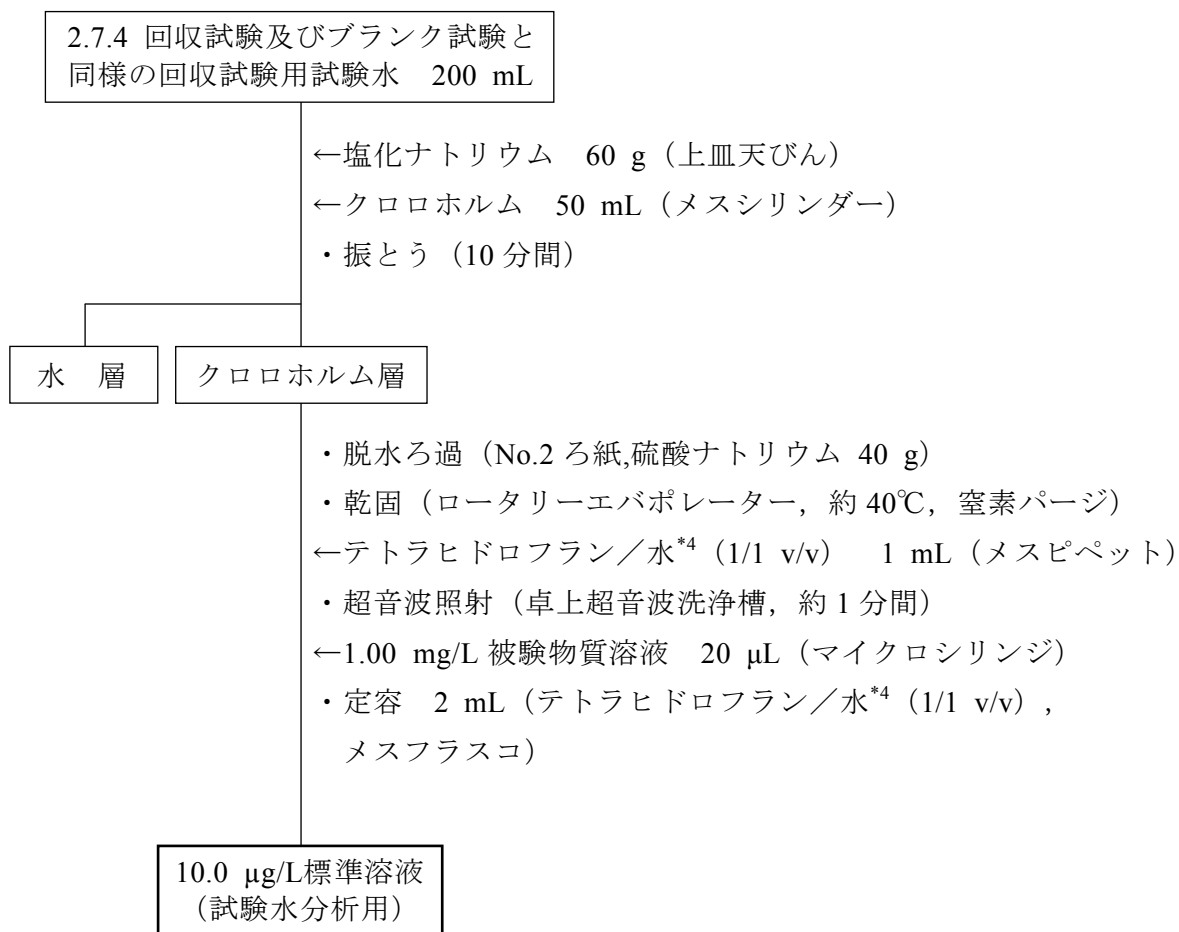
## (2) 標準溶液の調製

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

供試試料 100 mg を正確にはかりとり、テトラヒドロフランに溶解して 1000 mg/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<sup>\*4</sup> (1/1 v/v) で希釈して 1.00 mg/L の被験物質溶液とした。これを用いて以下のフロースキームに従って前処理操作を行い、10.0 µg/L の標準溶液とした。

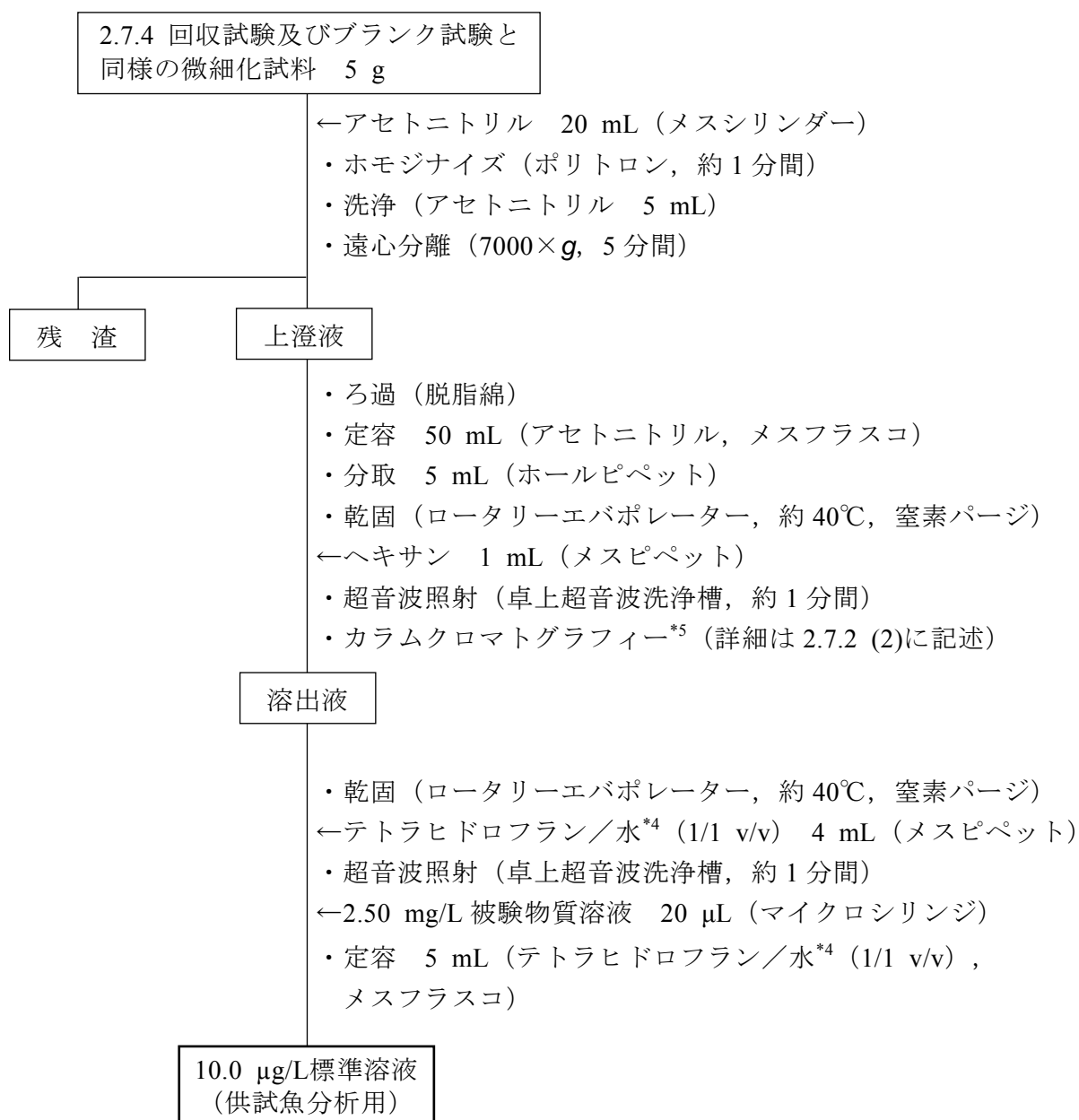
フロースキーム



## (b) 供試魚分析

供試試料 100 mg を正確にはかりとり、テトラヒドロフランに溶解して 1000 mg/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<sup>\*4</sup> (1/1 v/v) で希釈して 2.50 mg/L の被験物質溶液とした。これを用いて以下のフロースキームに従って前処理操作を行い、10.0 µg/L の標準溶液とした。

## フロースキーム



## (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 5.00、10.0 及 20.0  $\mu\text{g/L}$  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 7000（被験物質濃度 0.57  $\mu\text{g/L}$ ）とした。

## (b) 供試魚分析

(2)(b)の標準溶液の調製と同様にして 5.00、10.0 及 20.0  $\mu\text{g/L}$  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 4000（被験物質濃度 0.53  $\mu\text{g/L}$ ）とした。

## 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（10 g）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。供試魚分析の回収試験及びブランク試験における微細化試料の分取量は 5 g とした。回収試験及びブランク試験は、各 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。

## 分析操作における回収率

試験水分析（被験物質 20.0 ng 添加）

99.2%,            94.6%            平均 96.9%

供試魚分析（被験物質 1000 ng 添加）

85.7%,            84.1%            平均 84.9%

## 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。

## 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

試験水中の被験物質濃度は以下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。

試験水中被験物質濃度の計算法

$$C_w = \left[ \frac{P \times A(f) \times C}{A(std) \times B} \right] \times \frac{100}{E \times D}$$

$C_w$  : 試験水中被験物質濃度 ( $\mu\text{g/L}$ )

$P$  : 標準溶液の濃度 ( $\mu\text{g/L}$ )

$A(std)$  : 標準溶液の測定値

$A(f)$  : 試料の測定値

$B$  : 分取比

$C$  : 最終液量 (mL)

$D$  : 試験水採取量 (mL)

$E$  : 回収率 (%)

## (2) 試験水中の被験物質定量下限濃度

2.7.3(3)(a)の検量線の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\*6はそれぞれ、

第 1 濃度区      0.058     $\mu\text{g/L}$

第 2 濃度区      0.0058    $\mu\text{g/L}$

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) 供試魚分析試料中の被験物質濃度の算出

供試魚中の被験物質濃度は以下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。

供試魚中被験物質濃度の計算法

$$C_f = \left[ \frac{P \times A(f) \times B \times D}{A(\text{std}) \times C \times G} - K \right] \times \frac{100}{E}$$

$C_f$	: 供試魚中被験物質濃度 (ng/g)
$P$	: 標準溶液の濃度 (μg/L)
$A(\text{std})$	: 標準溶液の測定値
$A(f)$	: 試料の測定値
$B$	: 希釈倍率
$C$	: 分取比
$D$	: 最終液量 (mL)
$E$	: 回収率 (%)
$G$	: 供試魚微細化試料 (g)
$I$	: 試験水中平均被験物質濃度 (μg/L)
$K$	: 平均ブランク濃度 <sup>*6</sup> (ng/g)

\*6 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け（ブランク）濃度の平均値

## (4) 供試魚中の被験物質定量下限濃度

2.7.3(3)(b)の検量線の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<sup>\*6</sup>は供試魚微細化試料を5gとしたとき6.2 ng/gと算出される。

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

$A$	: 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

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

$\overline{C_w}$  : 試験水の全平均被験物質濃度 (μg/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 (μg/L)

$C_w(n)$  : n 回目の試験水中被験物質濃度 (μg/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

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

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

$\overline{C_w}$  : 濃縮倍率算出のための試験水中平均被験物質濃度 (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) 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 (μg/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け (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

$$\text{BCFm} = (\text{BCFa} + \text{BCFb}) / n$$

BCFm : m 回目の濃縮倍率の平均値 (群数 2(a,b))

BCFa,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

ただし、不検出がある測定日の濃縮倍率の平均値は求めない。

## 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 :  $V(m-2), V(m-1), V(m) \leq 20 (\%)$

$$V(m-2) = \frac{| \text{BCF}(m-2) - \overline{\text{BCF}} |}{\overline{\text{BCF}}} \times 100$$

$$V(m-1) = \frac{| \text{BCF}(m-1) - \overline{\text{BCF}} |}{\overline{\text{BCF}}} \times 100$$

$$V(m) = \frac{| \text{BCF}(m) - \overline{\text{BCF}} |}{\overline{\text{BCF}}} \times 100$$

$V(m-2), V(m-1), V(m)$  : 濃縮倍率の平均値からの乖離率 (%)

$\text{BCF}(m-2), \text{BCF}(m-1), \text{BCF}(m)$  : m-2, m-1, m 回目における群数 n の濃縮倍率の平均値

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

## 2.7.10 定常状態における濃縮倍率（BCFss）の算出法

定常状態における濃縮倍率（BCFss）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）（ $\mu\text{g/L}$ ）

$C_{w(n)}$  : 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) 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（ $\text{ng/g}$ ）

$C_{f(m)}$  :  $m$  回目の供試魚中平均被験物質濃度（FB を差し引いた値）（ $\text{ng/g}$ ）

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（ $\text{ng/g}$ ）

## (3) 定常状態における濃縮倍率の算出

$$\text{BCFss} = \overline{C_{fs}} / \overline{C_{ws}}$$

BCFss : 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（ $\text{ng/g}$ ）

$\overline{C_{ws}}$  : 定常状態における濃縮倍率算出のための試験水中の平均被験物質濃度（ $\mu\text{g/L}$ ）

## 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、下記の倍率を超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	7.2 倍
第 2 濃度区	74 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 81%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	12 日後	20 日後	22 日後	25 日後	28 日後	34 日後	48 日後	60 日後	平均 (標準偏差)
1	0.887	0.835	0.808	0.900	0.892	0.842	0.869	0.834	0.898	0.863 (0.0337)
2	0.0836	0.0835	0.0828	0.0882	0.0853	0.0834	0.0857	0.0837	0.0830	0.0844 (0.00175)

### 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 2300～6700 倍、第 2 濃度区において 2000～7400 倍であった。

Table-2 濃縮倍率

( ) 内は平均値

濃度区	12 日後	20 日後	22 日後	25 日後	28 日後	34 日後	48 日後	60 日後
1	4100	4500	3400	3800	6000	5700	6700	5000
	6400	2300	3700	2500	3400	4500	6300	4500
	(5300)	(3400)	(3600)	(3200)	(4700)	(5100)	(6500)	(4700)
2	5500	2700	3400	2200	3600	5300	2600	4100
	3300	2100	4100	2000	2700	5700	6400	7400
	(4400)	(2400)	(3700)	(2100)	(3200)	(5500)	(4500)	(5800)

## 4.3 定常状態における濃縮倍率

定常状態に達したかどうかを確認するために、濃縮倍率の変動を Table-3 に示した。

Table-3 濃縮倍率の変動（得られた結果を 5 ケタまで表示した値）

濃度区		34 日後	48 日後	60 日後	3 回の平均
1	平均濃縮倍率	5105.3	6521.3	4747.5	5458.0
	3 回の平均からの乖離率 (%)	6.4624	19.479	13.017	
2	平均濃縮倍率	5480.4	4496.5	5760.4	5245.8
	3 回の平均からの乖離率 (%)	4.4727	14.283	9.8104	

上記の結果から、34、48 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-4 に示されるように、第 1 濃度区において設定値の 87%、第 2 濃度区において 84%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	34 日後	48 日後	60 日後	平 均
1	0.869	0.834	0.898	0.867
2	0.0857	0.0837	0.0830	0.0841

## (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      5400 倍

第 2 濃度区      5300 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 1、2、5 及び 9 日後の供試魚中被験物質の残留率（%）を算出した。

これらの結果から、排泄半減期は第 1 濃度区で 3.0 日、第 2 濃度区で 3.4 日であった。

Table-5 排泄試験における残留率  
(単位 %)

濃度区	1 日後	2 日後	5 日後	9 日後
1	72	92	42	19
	79	77	47	9
2	51	54	37	20
	55	88	45	7

#### 4.5 部位別試験

60 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、保存用試料の分取、分析試料の分取は行わなかった。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-6 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
1	外 皮	8520 5030	9800 5800
	頭 部	6890 6550	7900 7600
	内 臓	36300 8570	42000 9900
	可食部	3750 4050	4300 4700
2	外 皮	435 368	5200 4400
	頭 部	399 581	4700 6900
	内 臓	647 1370	7700 16000
	可食部	196 243	2300 2900

## 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	2.73%
実験終了後	3.42%

## 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

定常状態における脂質含量について

本試験に用いた供試魚の脂質含量は、試験開始前が 2.73%であった。しかしながら、定常状態を確認した最後の 3 回の供試魚の脂質含量は、下表のとおりであり、本物質の濃縮倍率の評価に脂質含量の影響はなかったと判断した。

定常状態における脂質含量

(単位 %)

濃度区	試 料	34 日後	48 日後	60 日後
1	a	4.24	4.10	4.74
	b	3.70	4.68	3.84
2	a	3.50	3.54	4.10
	b	5.05	6.81	6.86