

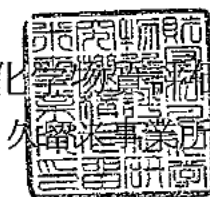
受付番号	642-06-S-4806
試験番号	44806

最 終 報 告 書

13F-OLEのコイにおける濃縮度試験

2007 年 7 月 19 日

財団法人化学物質評価研究機構



本文書は正本を正確に転写したものです。

財団法人 化学物質評価研究機構 久留米事業所

2007 年 7 月 20 日

試験責任者

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 ダイキン工業株式会社

試験の表題 13F-OLEのコイにおける濃縮度試験

試験番号 44806

上記試験は以下のGLPに従って実施したものです。

- (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)

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。

2007 年 7 月 19 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 ダイキン工業株式会社

試験の表題 13F-OLEのコイにおける濃縮度試験

試験番号 44806

本最終報告書は、試験の方法、手順が正確に記載され、試験結果は生データを正確に反映していることを保証します。

なお、監査又は査察の結果については、下記の通り試験責任者及び運営管理者に報告しました。

監査又は査察内容	監査又は査察日	報告日 (試験責任者及び運営管理者)
試験計画書草案	2007 年 4 月 23 日	2007 年 4 月 23 日
試験計画書	2007 年 4 月 23 日	2007 年 4 月 23 日
試験計画書の変更	2007 年 7 月 4 日	2007 年 7 月 5 日
急性毒性試験	2007 年 4 月 24 日	2007 年 4 月 24 日
原液調製操作時	2007 年 5 月 8 日	2007 年 5 月 8 日
試験水分析操作時	2007 年 5 月 9 日	2007 年 5 月 9 日
供試魚分析操作時	2007 年 5 月 22 日	2007 年 5 月 23 日
生データ、最終報告書草案	2007 年 7 月 18 日	2007 年 7 月 18 日
最終報告書	2007 年 7 月 19 日	2007 年 7 月 19 日

2007 年 7 月 19 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. 供試試料	5
3. 急性毒性試験の実施	6
4. 濃縮度試験の実施	9
5. 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	25
6. 試験結果	26
7. 考 察	28
8. 備 考	29

Tables

Table-1	試験水中の被験物質濃度 [本文中記載]
Table-2	濃縮倍率 [本文中記載]
Table-3	濃縮倍率の変動 [本文中記載]
Table-4	定常状態における試験水中の被験物質濃度 [本文中記載]
Table-5	Calculation table for analysis of test water (Level 1)
Table-6	Calculation table for analysis of test water (Level 2)
Table-7	Calculation table for recovery and blank test (analysis of test fish)
Table-8	Calculation table for analysis of test fish (Level 1)
Table-9	Calculation table for analysis of test fish (Level 2)
Table-10	Calculation table for analysis of test fish (Control)
Reference 1	Analytical results of dilution water

Figures

Fig.1	Correlation between exposure period and bioconcentration factor (Level 1)
Fig.2	Correlation between exposure period and bioconcentration factor (Level 2)
Fig.3	Concentration-mortality curve
Fig.4-1	Mass fragmentograms of GC-MS analysis for calibration curve (analysis of test water)
Fig.4-2	Calibration curve of test item (analysis of test water)
Fig.5	Mass fragmentograms of GC-MS analysis for blank test (analysis of test water)
Fig.6	Mass fragmentograms of GC-MS analysis for test water
Fig.7-1	Mass fragmentograms of GC-MS analysis for calibration curve (analysis of test fish)
Fig.7-2	Calibration curve of test item (analysis of test fish)
Fig.8	Mass fragmentograms of GC-MS analysis for recovery and blank test (analysis of test fish)
Fig.9	Mass fragmentograms of GC-MS analysis for test fish (Level 1)
Fig.10	Mass fragmentograms of GC-MS analysis for test fish (Level 2)
Fig.11	Mass fragmentograms of GC-MS analysis for test fish (Control)
Fig.12	Mass spectrum of test item
Fig.13-1	IR spectrum of test item measured before experimental start
Fig.13-2	IR spectrum of test item measured after experimental completion
Reference 2	IR spectrum supplied by sponsor

表 題	13F-OLEのコイにおける濃縮度試験
試験委託者	ダイキン工業株式会社 (〒566-8585) 大阪府摂津市西一津屋 1-1
試験施設	財団法人化学物質評価研究機構 久留米事業所 (〒839-0801) 福岡県久留米市宮ノ陣三丁目2番7号
試験目的	13F-OLE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	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)

試験日程

試験開始日	2007年4月23日
実験開始日	2007年4月28日
実験終了日	2007年6月27日
試験終了日	2007年7月19日

試資料の保管

(1) 被験物質

供試試料を保管用容器に入れ密栓後、化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律（以下「化審法」と記す）第4条第1項若しくは第2項、第4条の2第2項、第3項若しくは第8項、第5条の4第2項、第24条第2項又は第25条の3第2項の規定による通知を受けた後10年間、又は品質低下をおこさないで安定に保管しうる期間のいずれか短い方の期間、久留米事業所試料保管室に保管する。保管期間経過後の処置又は廃棄に際しては試験委託者と協議の上決定する。

(2) 生データ、資料等

生データ、試験計画書、試験委託書、被験物質調査票、その他必要な資料等は最終報告書と共に、化審法第4条第1項若しくは第2項、第4条の2第2項、第3項若しくは第8項、第5条の4第2項、第24条第2項又は第25条の3第2項の規定による通知を受けた後10年間、久留米事業所資料保管室に保管する。保管期間経過後の処置は試験委託者と協議の上決定する。

試験関係者

試験責任者

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

2007年7月19日

試験責任者

要 約

試験の表題

13F-OLEのコイにおける濃縮度試験

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 (8~16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 $\mu\text{g/L}$ 第2濃度区 0.1 $\mu\text{g/L}$
ばく露期間	60日間
ばく露方法	連続流水式
分 析 方 法	ガスクロマトグラフィー質量分析法

試験結果

96時間LC50値	>10.0mg/L
-----------	-----------

定常状態における濃縮倍率

第1濃度区	380 倍
第2濃度区	300 倍

1. 被験物質

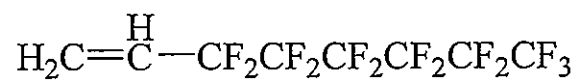
本報告書において13F-OLEは、次の名称等を有するものとする。

1.1 名 称^{*1}

3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8-トリデカフルオロ-オクタ-1-エン

1.2 構造式等^{*1}

構造式



分子式 $\text{C}_8\text{H}_3\text{F}_{13}$

分子量 346.09

CAS番号 25291-17-2

^{*1} 試験委託者提供資料による。

2. 供 試 試 料

2.1 供給者及びロット番号^{*1}

供 給 者	ダイキン工業株式会社
ロット番号	061122HM

2.2 純 度^{*1}

被 験 物 質	99.8%
不 純 物	不明成分 0.2%

被験物質は純度100%として取り扱った。

2.3 被験物質の確認

試験委託者提供の赤外吸収スペクトルと久留米事業所の当該測定スペクトルが一致することを確認した (Fig.13、Reference 2参照)。

2.4 物理化学的性状

常温における性状 ^{*1}	無色透明液体	
沸 点 ^{*1}	106°C (760mmHg)	
密 度 ^{*1}	1.560g/cm ³ (20°C)	
溶 解 度	水	1.21mg/L (フラスコ法, 25°C) (当機構測定データ)
	ジメチルスルホキシド	不溶 ^{*1}
	アセトン	可溶 (任意に混合) ^{*1}

*1 試験委託者提供資料による。

2.5 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 (Fig.13参照)。

2.6 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。

3. 急性毒性試験の実施

3.1 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。

3.2 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）

供試魚受入日 2006年12月28日

(3) じゅん化条件

期 間 等 供試魚の受入時に目視観察を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55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59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）50mg/Lと塩化ナトリウム6g/Lの混合薬浴を24時間実施した。再度選別して、水産用OTC 50mg/Lと塩化ナトリウム6g/Lの混合薬浴を24時間実施した。

(4) 体 重

平均 0.28g

(5) 全 長

平均 3.2cm

(6) 感受性試験

同一ロット（TFO-061228）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0.668mg/Lであった。

3.3 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

試験用水の水質については2007年1月29日に採水し、測定を行った結果をReference 1に示す。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)"

3.4 原液調製法

(1) 分散剤

N,N-ジメチルホルムアミド

Tween-80

(2) 調製方法

供試試料とその10倍量のTween-80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10.0g/Lの原液を調製した。

3.5 試験条件

(1) 試験濃度

10.0mg/L及び対照区

(2) 試験水槽

ガラス製ガロンびん (密閉系)

(3) 試験液量

3.85L×2/濃度区

(4) 供試魚数

10尾/濃度区 (5尾/水槽で2水槽使用した。)

(5) 試験温度

ばく露開始時 24.0℃

換水前 24.6℃

(6) 溶存酸素濃度

ばく露開始時 8.2mg/L

換水前 6.1～6.3mg/L

(7) pH

ばく露開始時 8.1

換水前 7.9

(8) ばく露期間

96時間

(9) ばく露方法

半止水式 (8～16時間毎に換水)

3.6 試験の実施

実施場所 アクアトロン室B

試験実施日 2007年 4月23日 ～ 2007年 4月27日

3.7 96時間LC50値の算出

Doudoroff法で行った。

3.8 試験結果

被験物質の96時間LC50値 $>10.0\text{mg/L}^{*2}$ (Fig.3参照)

*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1000mg/L となり、その分散剤の96時間LC50値が11200mg/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。

4. 濃縮度試験の実施

4.1 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)

供試魚のふ化日 2006年 9月 3日

じゅん化開始日 2007年 2月15日

(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56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14日間じゅん化した。

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

6.8~10.9cm

(5) ロ ッ ト

TFC-070215

(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。

4.2 試験用水

3.3に同じ。

4.3 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

第1及び第2濃度区 70L容ガラス製揮発性物質用試験水槽

対 照 区 70L容ガラス製水槽

(3) 試験水量

原液0.05mL/分及び試験用水2000mL/分の割合で2880L/日を試験水槽に供した。

(4) 原液タンク

1L容ガラス製びん（冷蔵庫中で冷却）

交換頻度 1～2回/週

(5) 試験温度

第1濃度区 24.2～24.8℃

第2濃度区 24.0～24.6℃

対 照 区 24.2～24.6℃

(6) 溶存酸素濃度

第1濃度区 6.9～7.3mg/L

第2濃度区 6.9～7.3mg/L

対 照 区 7.4～8.0mg/L

(7) pH

第1濃度区	7.7
第2濃度区	7.7~8.0
対 照 区	7.9~8.1

(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	47尾（実験開始時）
対 照 区	18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) 実 施 場 所

アクアトロン室A

4.4 原液調製法

(1) 分 散 剤

3.4の(1)に同じ。

(2) 調 製 方 法

第1濃度区

3.4の(2)と同様にして被験物質濃度として1000mg/Lの被験物質溶液を調製した。これを*N,N*-ジメチルホルムアミドで希釈して40.0mg/Lの原液を調製した。

第2濃度区

第1濃度区の原液を*N,N*-ジメチルホルムアミドで希釈して4.00mg/Lの原液を調製した。

対照区

Tween-80を*N,N*-ジメチルホルムアミドに溶解してTween-80濃度として400mg/Lの原液を調製した。

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

第2濃度区 0.1 $\mu\text{g/L}$

4.6 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回測定記録した。

(5) pH測定

pH計を用いて実験期間中に3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。

4.7 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。

4.7.1 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) ^{*3}に分けて行った。

対照区は実験開始前及び実験終了後に行い、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。また、脂質含量測定用として別途6尾を取り上げ、3群 (2尾1群) に分けて測定した。

*3 個体ごとの分析では、分析感度が十分得られないため2尾1群とした。

4.7.2 分析試料の前処理法

(1) 試験水中の被験物質

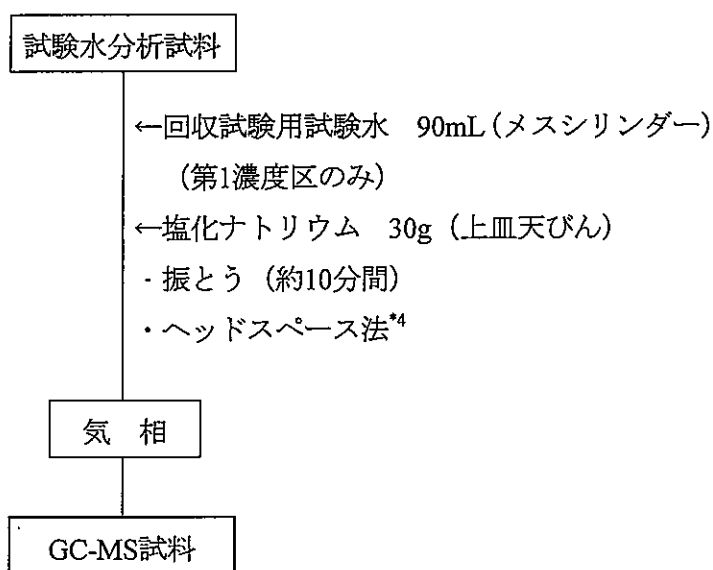
試験水槽から

第1濃度区 10mL

第2濃度区 100mL

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



*4 ヘッドスペース法条件

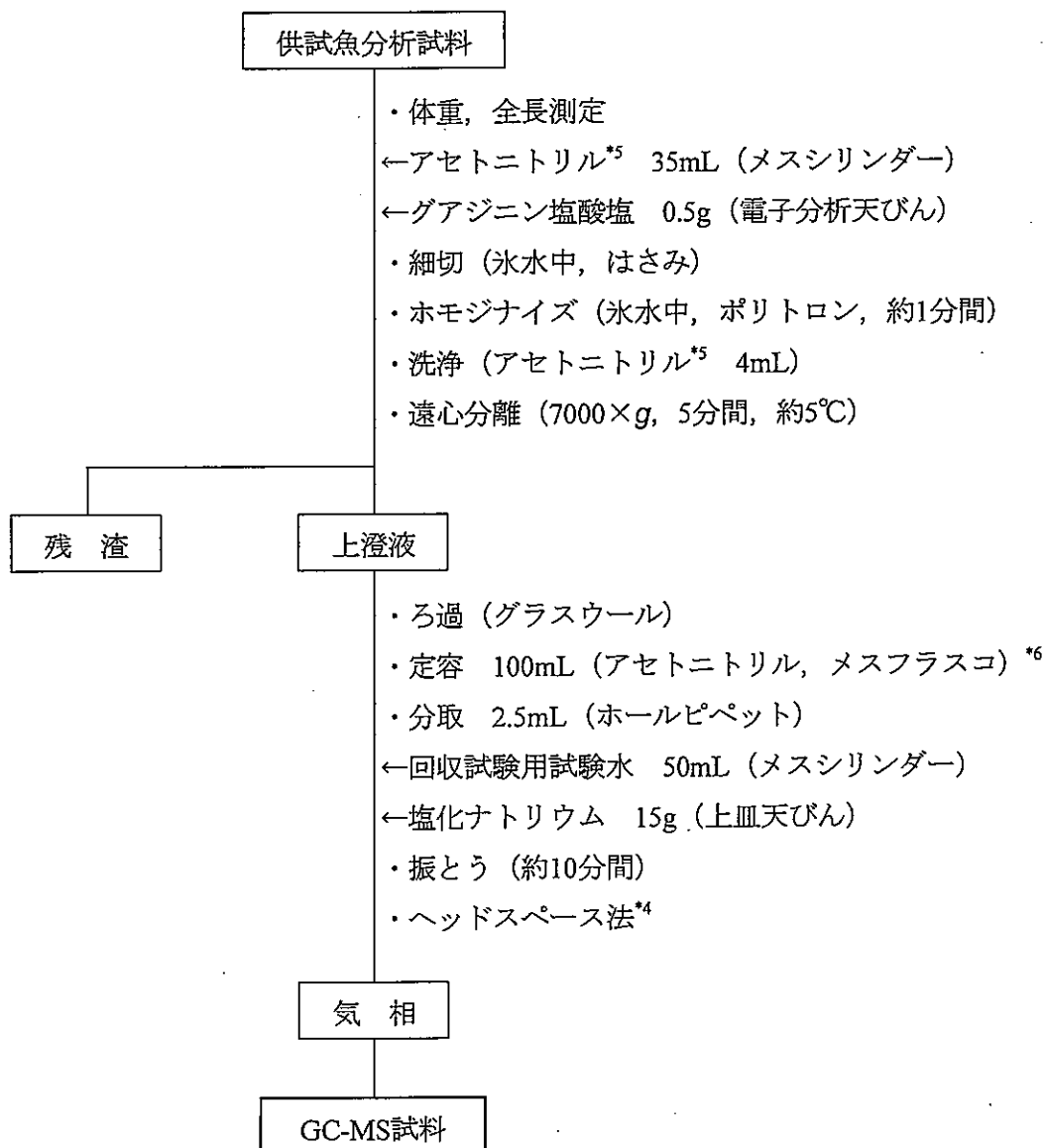
容 器 125mL容バイアルビン

加 温 70℃、20分間以上

(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）試料とした。

フロースキーム



*5 あらかじめ氷水中で冷却したもの。

*6 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、定容100mLの試料を適宜希釈した。

4.7.3 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超えた場合は、その範囲にはいるように希釈し分析した(*6参照)。GC-MS試料中の被験物質濃度は、標準試料及び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-5, 6, Fig.6, Table-8, 9, 10, Fig.9, 10, 11参照)。

(1) 定 量 条 件

機	器	ガスクロマトグラフー質量分析計
		島津製作所製 GCMS-QP2010

ガスクロマトグラフ条件

カ	ラ	ム	PONA 膜厚 0.5 μ m (Agilent製)
			50m $\times$ 0.2mmI.D. フューズドシリカ製
カ	ラ	ム 温 度	40 $^{\circ}$ C (2min) $\rightarrow$ 200 $^{\circ}$ C (1min)
			(昇温速度 15 $^{\circ}$ C/min)
キャ	リア	ガス	ヘリウム
制	御	モ	ード
			線速度 (27.8cm/sec)
全	流	量	13.9mL/min
カ	ラ	ム 流 量	0.99mL/min
注	入	口 温 度	150 $^{\circ}$ C
注	入	量	0.1mL
注	入	法	スプリット注入法
ス	プ	リット比	10 : 1
圧		力	203.3kPa

質量分析計条件

イ	オン	化 法	電子イオン化法 (EI)
検	出	法	選択イオンモニタリング (SIM)
測定	イオン	(m/z)	51.0 (CHF ₂) ⁺ (Fig.12参照)
イ	オン	源 温 度	250 $^{\circ}$ C
イ	オン	化 電 圧	70V
インタ	フェース	温 度	250 $^{\circ}$ C

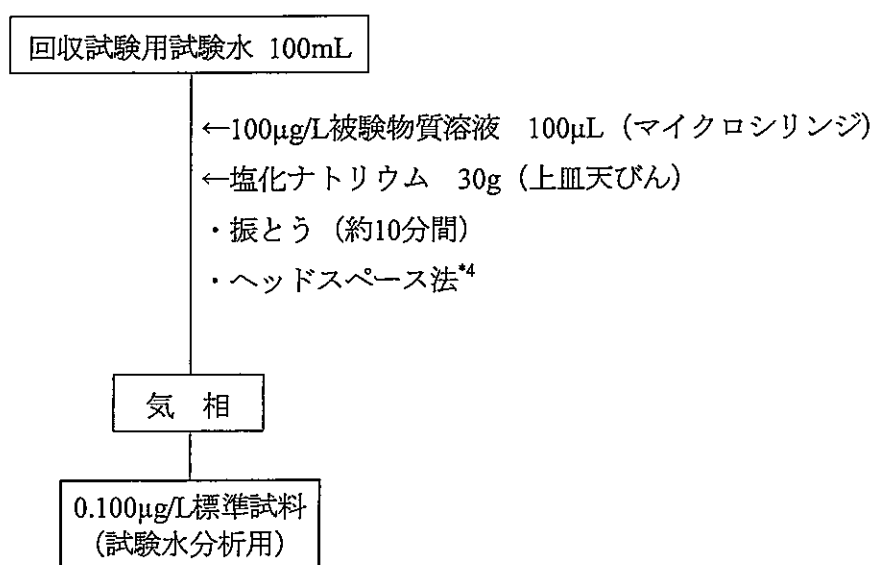
(2) 標準試料の調製

分析試料中の被験物質濃度を求めるための標準試料の調製は次のように行った。

(a) 試験水分析

供試試料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100 μ g/Lの被験物質溶液とした。さらに、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、0.100 μ g/Lの標準試料とした。

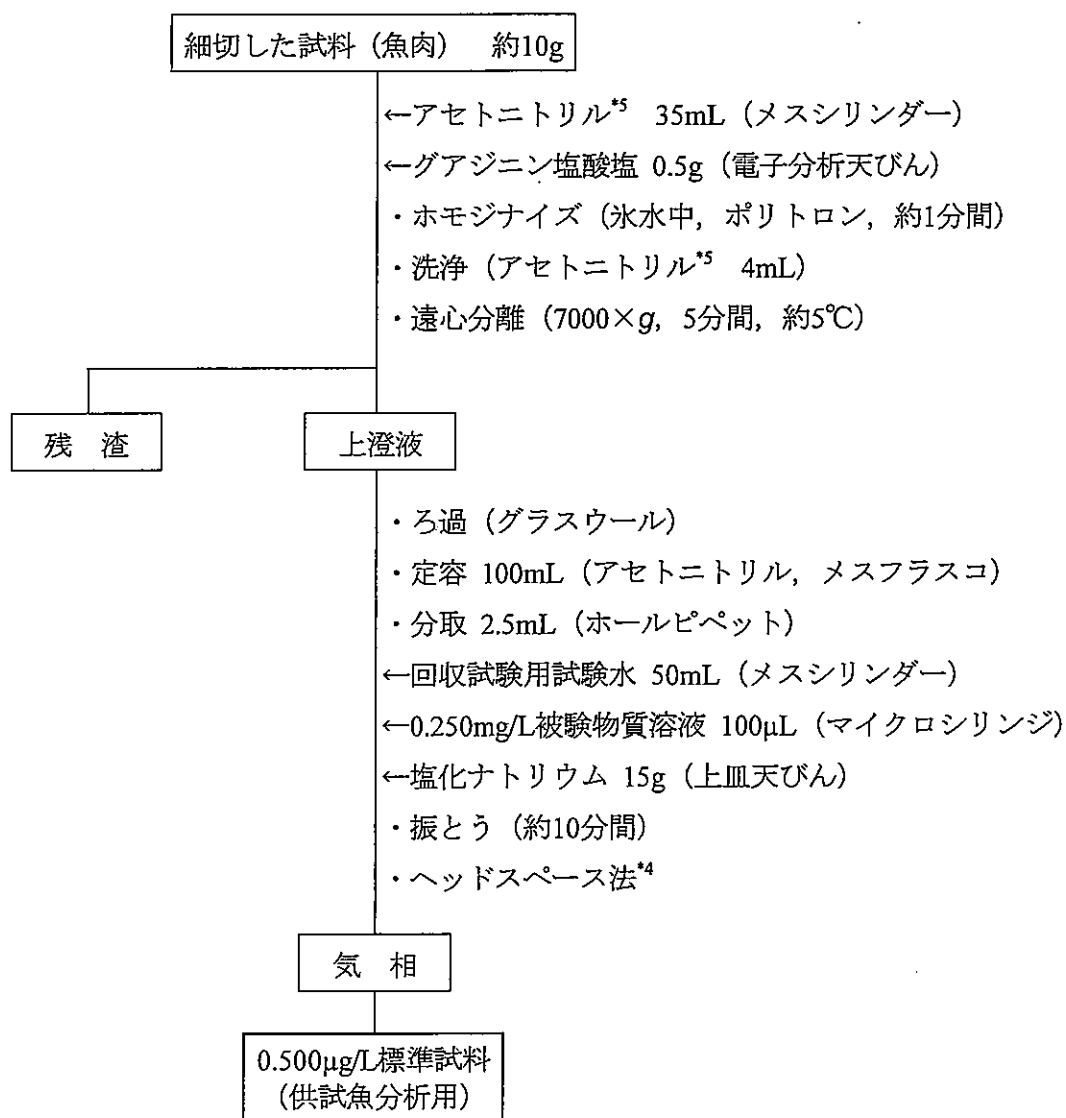
フロースキーム



(b) 供試魚分析

供試試料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0.250mg/Lの被験物質溶液とした。さらに、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の標準試料とした。

フロースキーム



(3) 検量線の作成

(a) 試験水分析

(2)(a)の標準試料の調製と同様にして0.0500、0.100及び0.200 $\mu\text{g/L}$ の標準試料を調製した。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40000（被験物質濃度0.0097 $\mu\text{g/L}$ ）とした（Fig.4参照）。

(b) 供試魚分析

(2)(b)の標準試料の調製と同様にして0.250、0.500及び1.00 $\mu\text{g/L}$ の標準試料を調製した。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14000（被験物質濃度0.051 $\mu\text{g/L}$ ）とした（Fig.7参照）。

4.7.4 回収試験及びブランク試験

(1) 方法

試験水分析は試験水をヘッドスペース法により直接分析したため回収試験は行わなかった。また、被験物質を加えない回収試験用試験水についてブランク試験を行った。一方、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、魚（2尾）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魚（2尾）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、各々のブランク試験においてマスフラグメントグラム上、被験物質ピーク位置にはピークは認められなかった。供試魚分析操作における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-7、Fig.5、8参照）。

分析操作における回収率

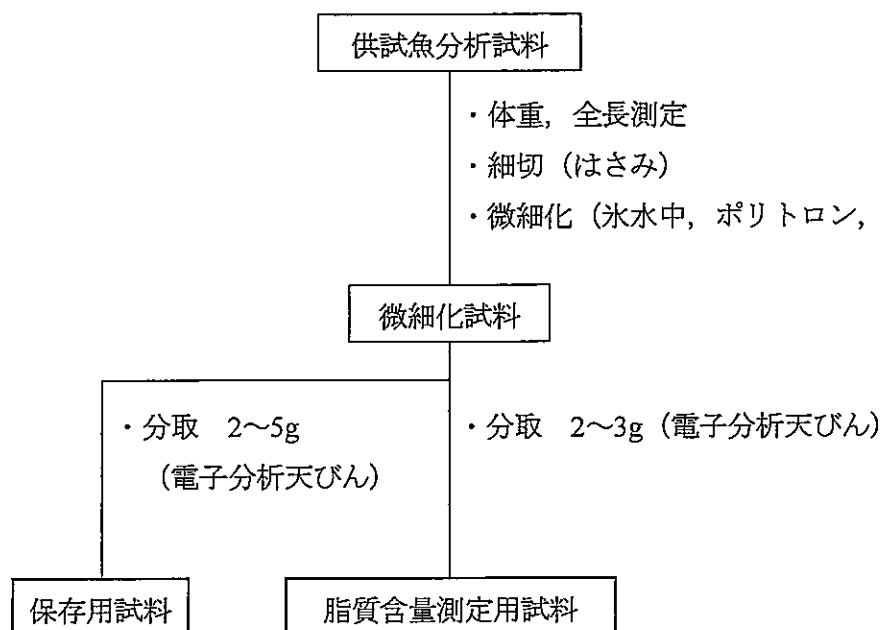
供試魚分析（被験物質1000ng添加）

87.0%,	86.5%	平均	86.8%
--------	-------	----	-------

4.7.5 供試魚中の脂質含量

脂質含量の測定は、対照区の供試魚を用いて実験開始前及び実験終了後に行った。1回当たりの採取尾数は6尾とし、3群（2尾1群）に分けて測定した。採取した供試魚は以下のフロースキームにより前処理操作を行い、脂質含量の測定用試料とした。これ以降の操作はクロロホルム／メタノール抽出操作から行った。

フロースキーム



4.7.6 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-5, 6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定量下限濃度

4.7.3(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^{*7}はそれぞれ、

第1濃度区 0.097 µg/L

第2濃度区 0.0097 µg/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-8, 9, 10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定量下限濃度

4.7.3(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^{*7}は供試魚体重を10gとしたとき12ng/gと算出される。

$$*7 \text{ 被験物質定量下限濃度 (}\mu\text{g/L又はng/g)} = \frac{A}{\frac{B}{100} \times \frac{C \times E}{D}}$$

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。

4.7.7 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

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

$\overline{Cw}$: 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)

$Cw(1)$: 1回目の試験水中被験物質濃度 ($\mu\text{g/L}$)

$Cw(n)$: n 回目の試験水中被験物質濃度 ($\mu\text{g/L}$)

4.7.8 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

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

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

$\overline{Cw}$: 濃縮倍率算出のための試験水中平均被験物質濃度 ($\mu\text{g/L}$)

$Cw(n)$: 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 ($\mu\text{g/L}$)

(2) 濃縮倍率の算出

$$BCF = \frac{Cf}{\overline{Cw}}$$

BCF : 濃縮倍率

Cf : 供試魚中被験物質濃度 (FBを差し引いた値) (ng/g)

$\overline{Cw}$: 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

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

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。

4.7.9 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

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

4.7.10 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

$$\overline{Cws} = \{Cw(n-2) + Cw(n-1) + Cw(n)\} / 3$$

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

(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

$$\overline{Cfs} = \{Cf(m-2) + Cf(m-1) + Cf(m)\} / 3$$

$\overline{Cfs}$: 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)

(3) 定常状態における濃縮倍率の算出

$$BCFss = \overline{Cfs} / \overline{Cws}$$

BCFss : 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の平均被験物質濃度 ($\mu\text{g/L}$)

4.7.11 算出可能な濃縮倍率

4.7.6(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 13 倍

第2濃度区 130 倍

4.7.12 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)

4.8 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。

5. 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。

6. 試験結果

6.1 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 $\mu\text{g/L}$)

濃度区	4日後	11日後	24日後	38日後	47日後	60日後	平均 (標準偏差)	Table	Fig
1	0.978	0.879	0.915	0.993	0.927	0.879	0.929 (0.0482)	5	6
2	0.0954	0.0979	0.0870	0.0969	0.0835	0.0873	0.0913 (0.00611)	6	

6.2 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290～760倍、第2濃度区において270～500倍であった。

Table-2 濃縮倍率

() 内は平均値

濃度区	11日後	24日後	38日後	47日後	60日後	Table	Fig
1	380	760	290	460	410	8	9
	490	440	420	380	290		
	(440)	(600)	(350)	(420)	(350)		
2	460	480	360	300	270	9	10
	500	450	300	270	290		
	(480)	(460)	(330)	(290)	(280)		

6.3 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		38日後	47日後	60日後	3回の平均
1	平均濃縮倍率	354.94	421.30	347.42	374.55
	3回の平均からの乖離率 (%)	5.2366	12.480	7.2440	
2	平均濃縮倍率	329.45	285.93	282.00	299.13
	3回の平均からの乖離率 (%)	10.137	4.4107	5.7270	

上記の結果から、38、47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93%、第2濃度区において89%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	38日後	47日後	60日後	平均	Table	Fig.
1	0.993	0.927	0.879	0.933	5, 8	6
2	0.0969	0.0835	0.0873	0.0892	6, 9	

(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 380倍
第2濃度区 300倍

6.4 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。

実験開始前	3.64%
実験終了後	4.83%

6.5 供試魚の外観観察等

異常は認められなかった。

7. 考 察

脂質含量について

本試験における実験終了後の脂質含量（平均値）の変動は、実験開始前に対して+33%であり、開始時の±25%の範囲を超えた。その原因の一つとして、ばく露期間が60日と長期間であったことにより成長に伴い脂質含量が変動したことが考えられる。なお、脂質含量の変動及びばらつきについては、給餌方法等の検討を継続し改善を目指している。

8. 備 考

試験に使用した主要な装置・機器及び試薬等

(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	:	フロム製	型 301M
溶存酸素測定装置	:	飯島電子工業製	型 ID-100
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ィー質量分析計	:	16頁参照	
天びん	:	ザルトリウス製	型 BP301S
		ザルトリウス製	型 CP324S
		ザルトリウス製	型 1404MP8
		メトラートレド製	型 PB602
		エー・アンド・ディ製	型 FA-2000
フーリエ変換赤外分光光度計	:	島津製作所製	型 IRPrestige-21
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）	:	キネマチカ製	型 PT3100
遠心分離機	:	日立工機製	型 CR21G
ウォーターバス	:	東京理化学器械製	型 NTT-2400

試 薬

アセトニトリル	:	和光純薬工業製	HPLC用
<i>N,N</i> -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
Tween 80	:	和光純薬工業製	化学用
グアニジン塩酸塩	:	和光純薬工業製	試薬特級

(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	: ザルトリウス製	型 BP301S
	メトラー製	型 AB204-S
ロータリーエバポレーター	: 東京理化工機製	型 N-1000K2
ホモジナイザー (ポリトロン)	: キネマチカ製	型 PT3100
ホモジナイザー (オートセルマスター)		
	: アズワン製	型 CM-200
真空ポンプ	: 真空機工製	型 DA-20D
	真空機工製	型 DTC-41
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	: 関東化学製	試薬一級

Table-5 Calculation table for analysis of test water (Level 1)

Study No. 44806

Sample description	A	I
Standard 0.100µg/L	425991	
Test water after 4 days	416500	0.978
Standard 0.100µg/L	403696	
Test water after 11 days	354832	0.879
Standard 0.100µg/L	413506	
Test water after 24 days	378454	0.915
Standard 0.100µg/L	411998	
Test water after 38 days	409078	0.993
Standard 0.100µg/L	434266	
Test water after 47 days	402704	0.927
Standard 0.100µg/L	451199	
Test water after 60 days	396807	0.879
Average concentration of test item in test water 0.929 (S.D. 0.0482)		
A: Peak area A(std) : Standard A(t) : Sample B: Ratio of portion used for analysis 1 C: Final volume 100mL H: Volume of test water taken out 10mL I: Concentration of test item in test water (µg/L) $I = P \times (A(t) / A(std)) / B \times C / H$ J: Average concentration of test item in test water (µg/L) $J = (I(1) + \dots + I(n)) / n$ n : Number of test water analyses (n = 6) I (1) : First analysis of test water I (n) : Last analysis of test water $S.D. = \sqrt{\frac{n \times \sum_{i=1}^n I(i)^2 - \left(\sum_{i=1}^n I(i) \right)^2}{n \times (n - 1)}}$ P: Concentration of test item in standard 0.100µg/L See Fig. 6		

July 19, 2007

Name _____

Table-6

Calculation table for analysis of test water (Level 2)

Study No. 44806

Sample description	A	I
Standard 0.100µg/L	425991	
Test water after 4 days	406366	0.0954
Standard 0.100µg/L	403696	
Test water after 11 days	395059	0.0979
Standard 0.100µg/L	413506	
Test water after 24 days	359795	0.0870
Standard 0.100µg/L	411998	
Test water after 38 days	399303	0.0969
Standard 0.100µg/L	434266	
Test water after 47 days	362477	0.0835
Standard 0.100µg/L	451199	
Test water after 60 days	393997	0.0873
Average concentration of test item in test water 0.0913 (S.D. 0.00611)		
A: Peak area A(std) : Standard A(t) : Sample B: Ratio of portion used for analysis 1 C: Final volume 100mL H: Volume of test water taken out 100mL I: Concentration of test item in test water (µg/L) $I = P \times (A(t) / A(std)) / B \times C / H$ J: Average concentration of test item in test water (µg/L) $J = (I(1) + \dots + I(n)) / n$ n : Number of test water analyses (n = 6) I (1) : First analysis of test water I (n) : Last analysis of test water $S.D. = \sqrt{\frac{n \times \sum_{i=1}^n I(i)^2 - \left(\sum_{i=1}^n I(i) \right)^2}{n \times (n - 1)}}$ P: Concentration of test item in standard 0.100µg/L See Fig. 6		

July 19, 2007

Name _____

Table-7 Calculation table for recovery and blank test (analysis of test fish)

Study No. 44806

Sample description	A	C	D	E	F	G
Standard 0.500µg/L	134086					
Recovery a	116713	2.5/100	50	-	870	87.0
Recovery b	116047	2.5/100	50	-	865	86.5
						Average
						86.8
Standard 0.500µg/L	138034					
Blank a	n.d.	2.5/100	50	-	-	
Blank b	n.d.	2.5/100	50	-	-	
				Average		
				-		
(a, b : individual sample)						
A: Peak area A(std) : Standard A(t) : Sample B: Ratio of portion used for analysis 1 C: Ratio of portion used for analysis (extracted solution) D: Final volume (mL) E: Amount of blank in test fish (ng) F: Amount of test item recovered (ng) $F = P \times (A(t) / A(std)) / B / C \times D - E$ G: Recovery rate (%) $G = F / Q \times 100$ P: Concentration of test item in standard 0.500µg/L Q: Amount of test item added (1000ng) See Fig. 8						

July 19, 2007

Name _____

Table-8 Calculation table for analysis of test fish (Level 1)

Study No. 44806

Sample description	A	D	G	K	H	J	M	O
Standard 0.500µg/L	166321							
Test fish after 11 days a	111150	5	10.8	356	0.928	380	440	-
Test fish after 11 days b	149007	5	11.3	457	0.928	490		
Standard 0.500µg/L	147947							
Test fish after 24 days a	131758	10	14.6	703	0.924	760	600	-
Test fish after 24 days b	78556	10	15.0	408	0.924	440		
Standard 0.500µg/L	164266							
Test fish after 38 days a	143696	5	18.4	274	0.929	290	350	460
Test fish after 38 days b	105563	10	19.2	386	0.929	420		
Standard 0.500µg/L	165974							
Test fish after 47 days a	130273	10	20.6	439	0.945	460	420	460
Test fish after 47 days b	216243	5	21.0	357	0.945	380		
Standard 0.500µg/L	140666							
Test fish after 60 days a	125480	10	27.0	381	0.933	410	350	370
Test fish after 60 days b	87951	10	26.9	268	0.933	290		
(a, b : individual sample)								
BCFss : 380								
A: Peak area A(std) : Standard A(t) : Sample B: Ratio of portion used for analysis 2.5/100 C: Final volume 50mL D: Dilution factor E: Average concentration of blank in analysis of control 0ng/g F: Recovery rate 86.8% G: Weight of test fish (g) K: Concentration of test item in test fish (ng/g) $K = \{ P \times (A(t) / A(std)) / B \times D \times C / G - E \} / F \times 100$ H: Average concentration of test item in test water (µg/L) $H = \{ I(n-2) + I(n-1) + I(n) \} / m$ n : Number of test water analyses ; m = 2 when n = 2, m = 3 when n ≥ 3 I: Concentration of test item in test water (µg/L) J: BCF $J = K / H$ M: Average value of BCF(a) and BCF(b) $M = \{ BCF(a) + BCF(b) \} / 2$ O: Average value of BCF $O = \{ M(n-2) + M(n-1) + M(n) \} / 3$ P: Concentration of test item in standard 0.500µg/L K: Average value of K (ng/g) $K = \{ K(n-1)a + K(n-1)b \} / 2$ $BCFss = [\{ K(n-3) + K(n-2) + K(n-1) \} / 3] / [\{ I(n-2) + I(n-1) + I(n) \} / 3]$ See Fig. 9								

Table-9 Calculation table for analysis of test fish (Level 2)

Study No. 44806

Sample description	A	D	G	K	H	J	M	O
Standard 0.500 μ g/L	141546							
Test fish after 11 days a	57356	1	10.6	44.0	0.0966	460	480	-
Test fish after 11 days b	62769	1	10.6	48.2	0.0966	500		
Standard 0.500 μ g/L	147324							
Test fish after 24 days a	84920	1	14.8	44.9	0.0934	480	460	-
Test fish after 24 days b	82074	1	15.4	41.7	0.0934	450		
Standard 0.500 μ g/L	150108							
Test fish after 38 days a	89058	1	20.4	33.5	0.0939	360	330	420
Test fish after 38 days b	74702	1	20.2	28.4	0.0939	300		
Standard 0.500 μ g/L	156677							
Test fish after 47 days a	77433	1	21.4	26.6	0.0891	300	290	360
Test fish after 47 days b	74551	1	22.5	24.4	0.0891	270		
Standard 0.500 μ g/L	140471							
Test fish after 60 days a	81377	1	27.8	24.0	0.0892	270	280	300
Test fish after 60 days b	94026	1	29.3	26.3	0.0892	290		
(a, b : individual sample)								
BCFss : 300								

A: Peak area

A(std) : Standard A(t) : Sample

B: Ratio of portion used for analysis 2.5/100

C: Final volume 50mL

D: Dilution factor

E: Average concentration of blank in analysis of control 0ng/g

F: Recovery rate 86.8%

G: Weight of test fish (g)

K: Concentration of test item in test fish (ng/g)

$$K = \{ P \times (A(t) / A(std)) / B \times D \times C / G - E \} / F \times 100$$

H: Average concentration of test item in test water (μ g/L)

$$H = \{ I(n-2) + I(n-1) + I(n) \} / m$$

n : Number of test water analyses ; m = 2 when n = 2, m = 3 when n $\geq$ 3I: Concentration of test item in test water (μ g/L)

J: BCF

$$J = K / H$$

M: Average value of BCF(a) and BCF(b)

$$M = \{ BCF(a) + BCF(b) \} / 2$$

O: Average value of BCF

$$O = \{ M(n-2) + M(n-1) + M(n) \} / 3$$

P: Concentration of test item in standard 0.500 μ g/L

K: Average value of K (ng/g)

$$\bar{K} = \{ K(n-1)a + K(n-1)b \} / 2$$

$$BCFss = [\{ \bar{K}(n-3) + \bar{K}(n-2) + \bar{K}(n-1) \} / 3] / [\{ I(n-2) + I(n-1) + I(n) \} / 3]$$

See Fig. 10

Table-10 Calculation table for analysis of test fish (Control)

Study No. 44806

Sample description	A	E	G	I
Standard 0.500 μ g/L	160931			
Before the experimental start a	n.d.	-	8.97	-
Before the experimental start b	n.d.	-	8.39	-
Standard 0.500 μ g/L	132041			
After the experimental completion a	n.d.	-	25.0	-
After the experimental completion b	n.d.	-	24.5	-
				Average
				-
(a, b : individual sample)				
A: Peak area A(std) : Standard A(t) : Sample B: Ratio of portion used for analysis 2.5/100 C: Final volume 50mL E: Amount of blank in analysis of control (ng) $E = P \times (A(t) / A(std)) / B \times C$ G: Weight of test fish (g) I: Concentration of blank in test fish (ng/g) $I = E / G$ P: Concentration of test item in standard 0.500μg/L See Fig. 11				

July 19, 2007

Name _____

Item	Unit	Measured value	Standard value	Detection limit
Total hardness (Ca, Mg)	mg/L	14.2	< 300 ^{*1}	0.1
Suspended solid	mg/L	< 1	< 20 ^{*2}	1
pH	—	8.0	6.5 ~ 8.5 ^{*3}	—
Total organic carbon	mg/L	0.3	< 2 ^{*2}	0.1
Chemical oxygen demand	mg/L	2.3	< 5 ^{*3}	0.5
Residual chlorine	mg/L	< 0.02	< 0.02 ^{*3}	0.02
Ammonia nitrogen	mg/L	0.02	< 1 ^{*3}	0.01
Total cyan	mg/L	< 0.01	n.d. ^{*3}	0.01
Alkalinity	mg/L	101	—	1
Electric conductivity	μS/cm	278	—	—
Organic phosphorus	mg/L	< 0.1	n.d. ^{*3}	0.1
Alkylmercury	mg/L	< 0.0005	n.d. ^{*3}	0.0005
Mercury	mg/L	< 0.0005	< 0.0005 ^{*3}	0.0005
Cadmium	mg/L	< 0.001	< 0.01 ^{*3}	0.001
Cr ⁶⁺	mg/L	< 0.01	< 0.05 ^{*3}	0.01
Lead	mg/L	< 0.005	< 0.1 ^{*3}	0.005
Arsenic	mg/L	0.004	< 0.05 ^{*3}	0.001
Iron	mg/L	0.02	< 1.0 ^{*3}	0.01
Copper	mg/L	< 0.005	< 0.005 ^{*3}	0.005
Cobalt	mg/L	< 0.001	< 0.001 ^{*5}	0.001
Manganese	mg/L	< 0.01	< 0.05 ^{*1}	0.01
Zinc	mg/L	< 0.005	< 1.0 ^{*1}	0.005
Aluminium	mg/L	0.007	< 0.2 ^{*1}	0.001
Nickel	mg/L	< 0.001	< 0.001 ^{*5}	0.001
Silver	mg/L	< 0.0001	< 0.0001 ^{*5}	0.0001
Organochlorine pesticides				
1,2-Dichloropropane	mg/L	< 0.0001	< 0.06 ^{*4}	0.0001
Chlorothalonil	mg/L	< 0.0001	< 0.04 ^{*4}	0.0001
Propyzamide	mg/L	< 0.0001	< 0.008 ^{*4}	0.0001
Chloronitrofen	mg/L	< 0.0001	< 0.0001 ^{*1}	0.0001
Simazine	mg/L	< 0.001	< 0.003 ^{*4}	0.001
Thiobencarb	mg/L	< 0.0001	< 0.02 ^{*4}	0.0001
Organophosphorous pesticides				
Diazinon	mg/L	< 0.0001	< 0.005 ^{*4}	0.0001
Isoxathion	mg/L	< 0.0001	< 0.008 ^{*4}	0.0001
Fenitrothion	mg/L	< 0.0001	< 0.003 ^{*4}	0.0001
EPN	mg/L	< 0.0001	< 0.006 ^{*4}	0.0001
Dichlorvos	mg/L	< 0.0001	< 0.01 ^{*4}	0.0001
Iprobenfos	mg/L	< 0.0001	< 0.008 ^{*4}	0.0001
PCB	mg/L	< 0.0005	n.d. ^{*4}	0.0005
Coliform bacteria count	—	n.d.	n.d. ^{*1}	—
Fluorine compound	mg/L	1.3	< 1.5 ^{*3}	0.1
Anionic surfactant	mg/L	< 0.01	< 0.2 ^{*1}	0.01

*1 Ministerial ordinance of the Ministry of Health, Labour and Welfare No.101 (Revised May 30, 2003)

*2 OECD Guidelines for Testing of Chemicals, Fish, Early-life Stage Toxicity Test (Guideline 210, July 17, 1992)

*3 Water quality criteria for fisheries (Japan Fisheries Resource Conservation Association, March 1983)

*4 Environmental Quality Standards for Water Pollutants No.14 (Revised February 22, 1999, Environment Agency)

*5 OECD Guidelines for Testing of Chemicals, Bioconcentration : Flow-through Fish Test (Guideline 305, June 14, 1996)

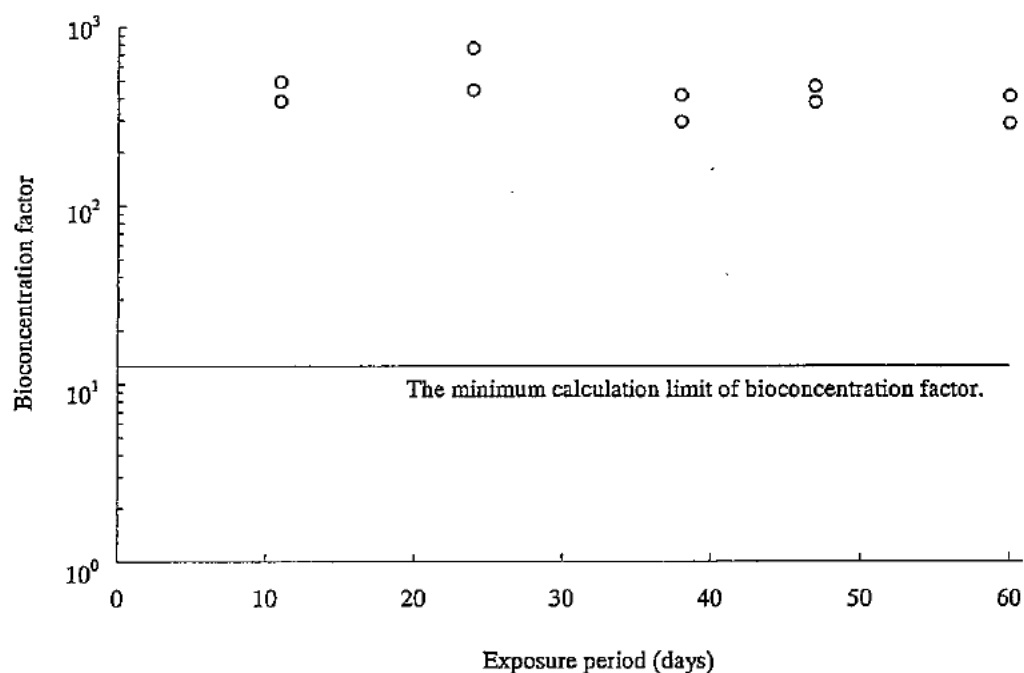


Fig.1 Correlation between exposure period and bioconcentration factor (Level 1).

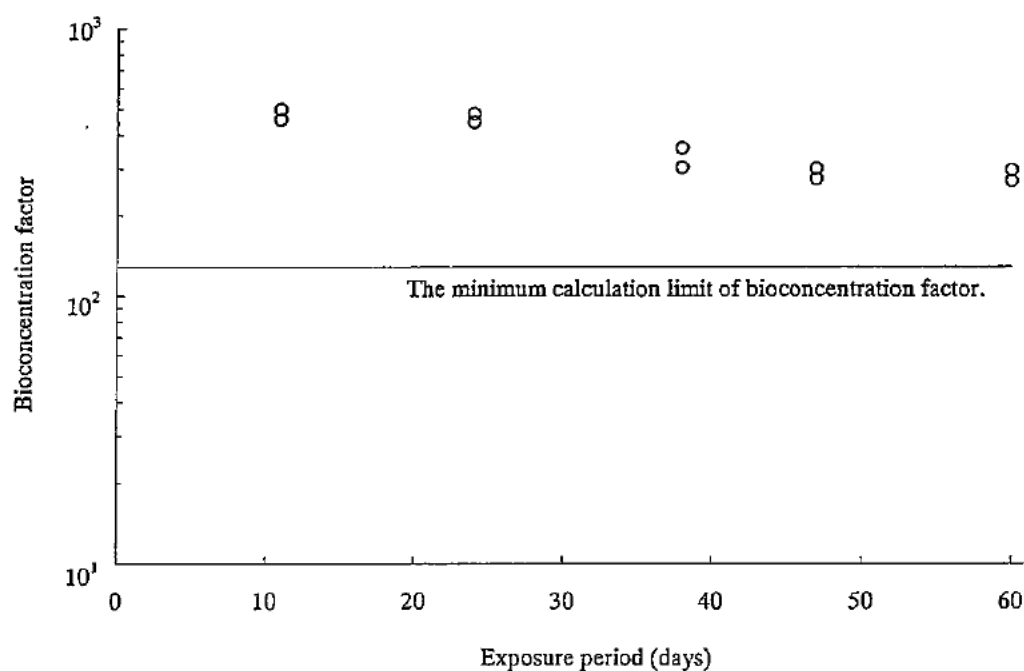
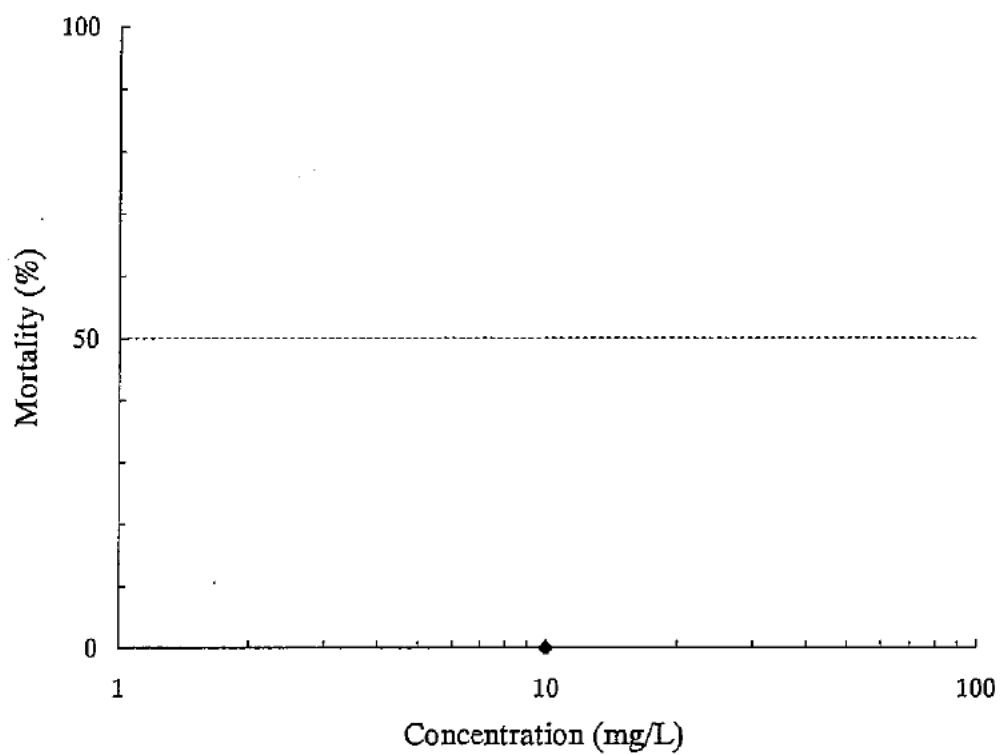


Fig.2 Correlation between exposure period and bioconcentration factor (Level 2).

96-hour LC50 > 10.0 mg/L (Doudoroff)



Concentration (mg/L)	Cumulative Mortality (%)			
	24 hours	48 hours	72 hours	96 hours
Control	0	0	0	0
10.0	0	0	0	0

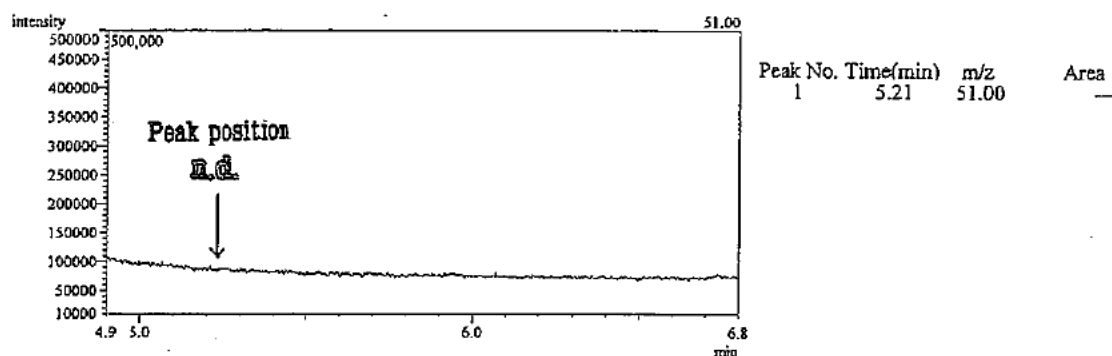
Fig. 3 Concentration - mortality curve.

Date : April 27, 2007 Name

Solvent

Operating date : Mar. 29, 2007

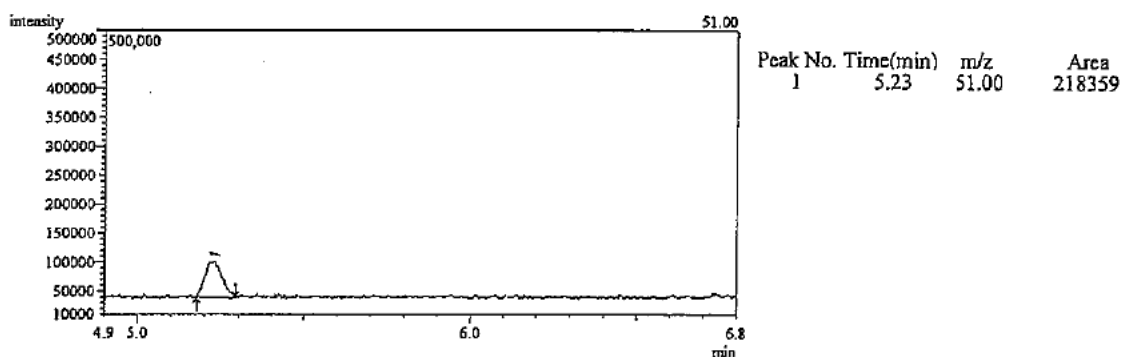
File name : C:\GCMSsolution\Data\Section 2\新規\44806\070329\002.qgd



Standard 0.0500 ug/L

Operating date : Mar. 29, 2007

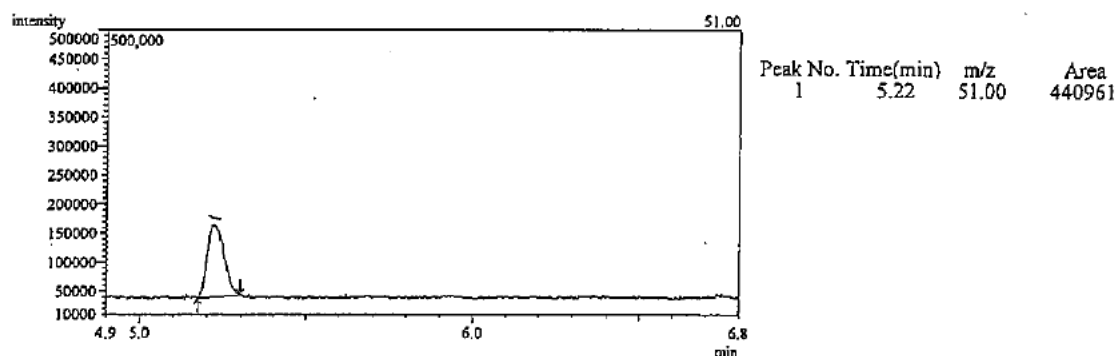
File name : C:\GCMSsolution\Data\Section 2\新規\44806\070329\109.qgd



Standard 0.100 ug/L

Operating date : Mar. 29, 2007

File name : C:\GCMSsolution\Data\Section 2\新規\44806\070329\110.qgd



Standard 0.200 ug/L

Operating date : Mar. 29, 2007

File name : C:\GCMSsolution\Data\Section 2\新規\44806\070329\111.qgd

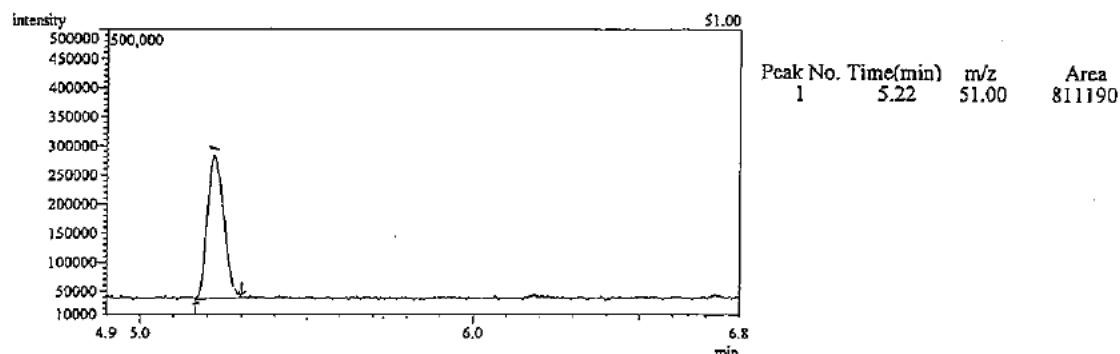
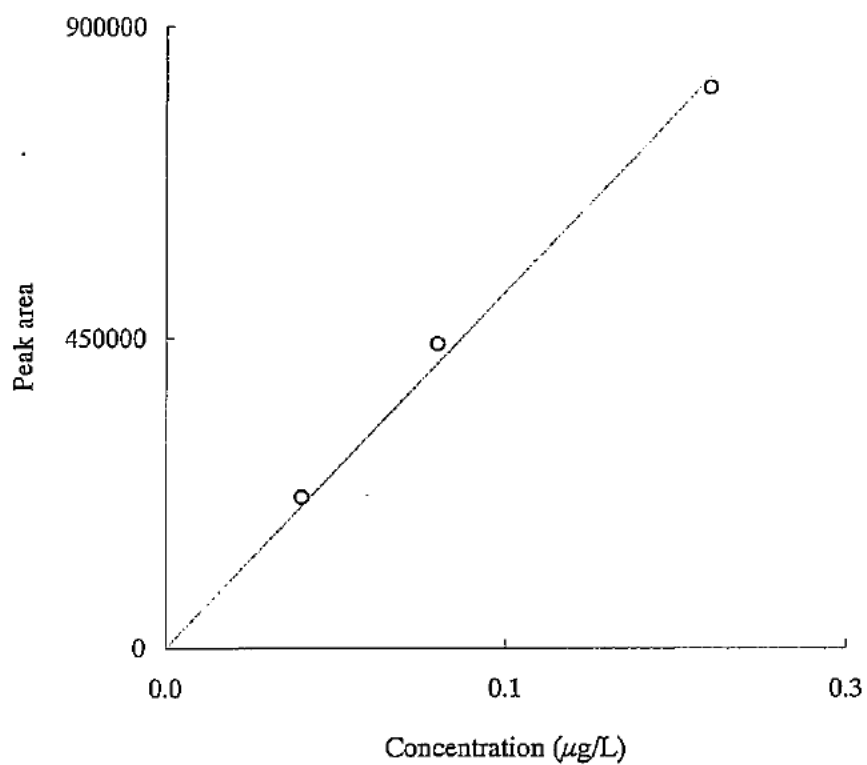


Fig. 4 - 1 Mass fragmentograms of GC-MS analysis for calibration curve (analysis of test water).

Date : Mar. 29, 2007 Name :



$$y = 4138134x$$

$$r = 0.997$$

Concentration ($\mu\text{g/L}$)	Peak area
0.0500	218359
0.100	440961
0.200	811190

Fig. 4 - 2 Calibration curve of test item (analysis of test water).

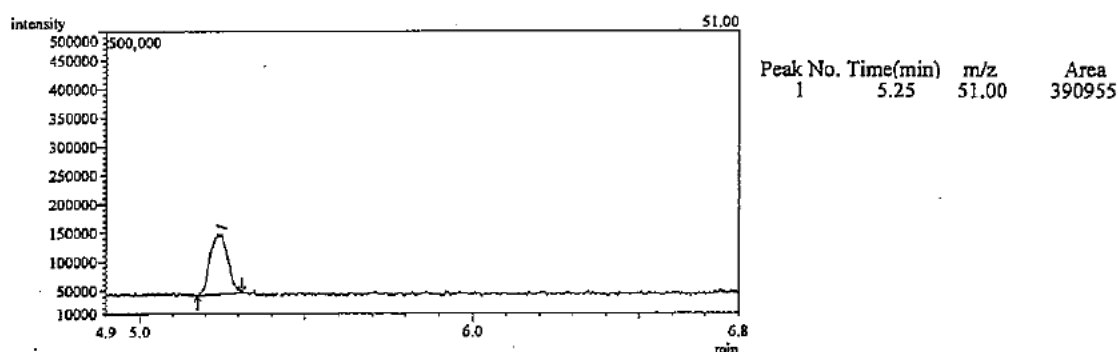
March 29, 2007

Name

Standard 0.100 ug/L

Operating date : Mar. 29, 2007

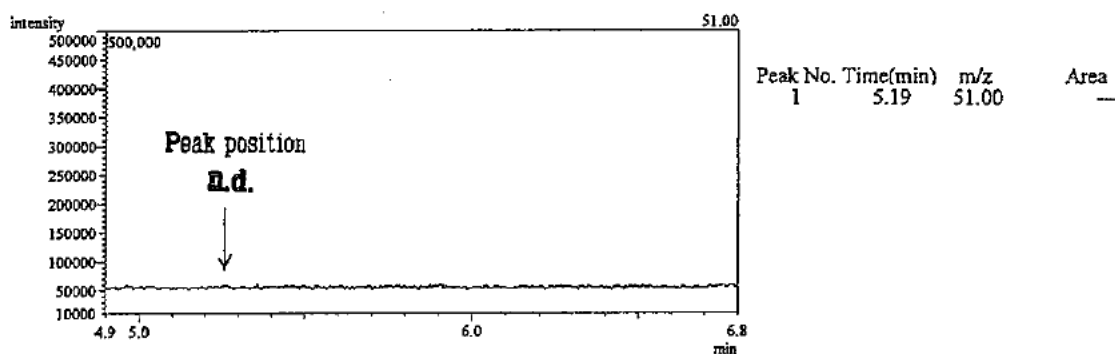
File name : C:\GCMSsolution\Data\Section 2\新規\44806\070329\100.qgd



Blank test of test water - a

Operating date : Mar. 29, 2007

File name : C:\GCMSsolution\Data\Section 2\新規\44806\070329\101.qgd



Blank test of test water - b

Operating date : Mar. 29, 2007

File name : C:\GCMSsolution\Data\Section 2\新規\44806\070329\102.qgd

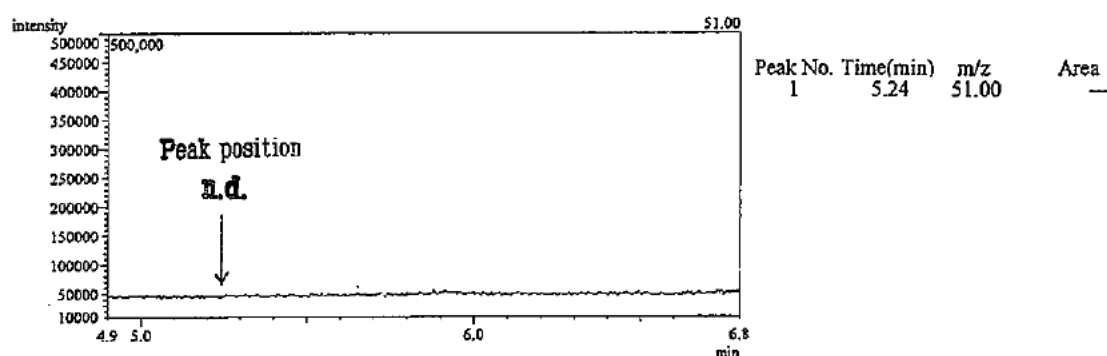


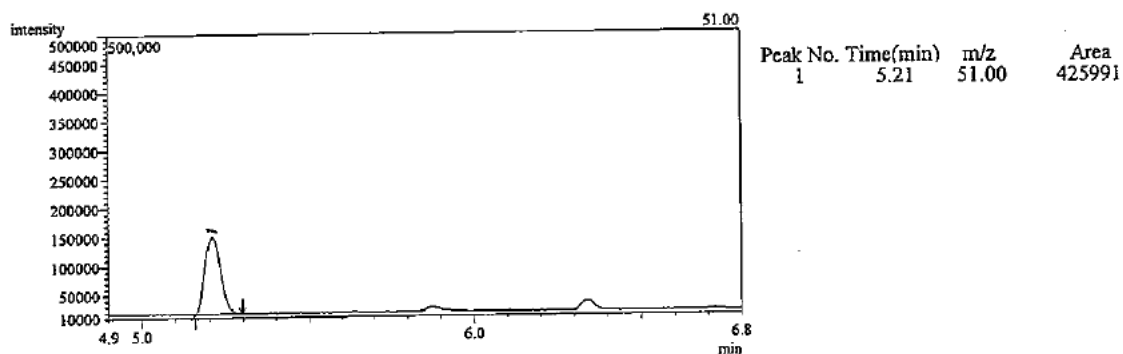
Fig. 5 Mass fragmentograms of GC-MS analysis for blank test (analysis of test water).

Date : Jul. 19, 2007 Name :

Standard 0.100 ug/L

Operating date : May. 02, 2007

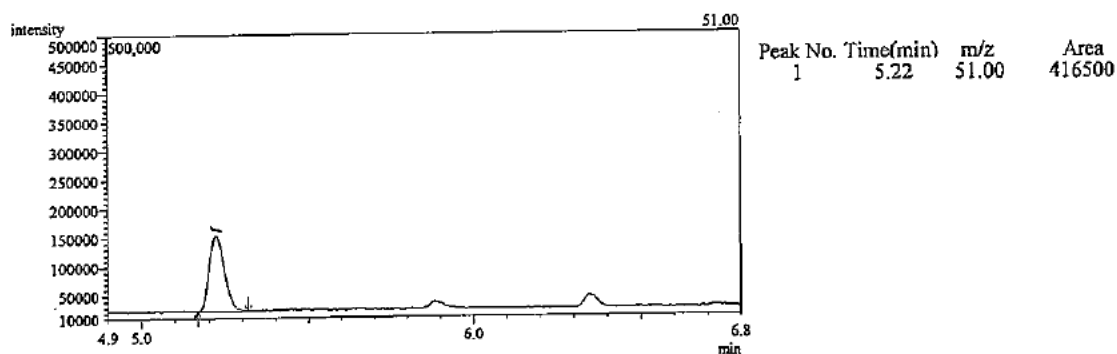
File name : C:\GCMSsolution\Data\Section 2\新規\44806\A4\001.qgd



Test water after 4 days (Level 1)

Operating date : May. 02, 2007

File name : C:\GCMSsolution\Data\Section 2\新規\44806\A4\002.qgd



Test water after 4 days (Level 2)

Operating date : May. 02, 2007

File name : C:\GCMSsolution\Data\Section 2\新規\44806\A4\003.qgd

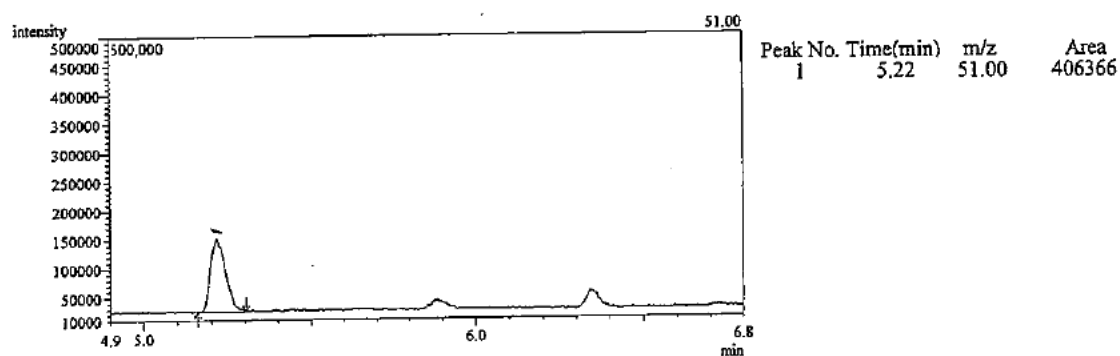


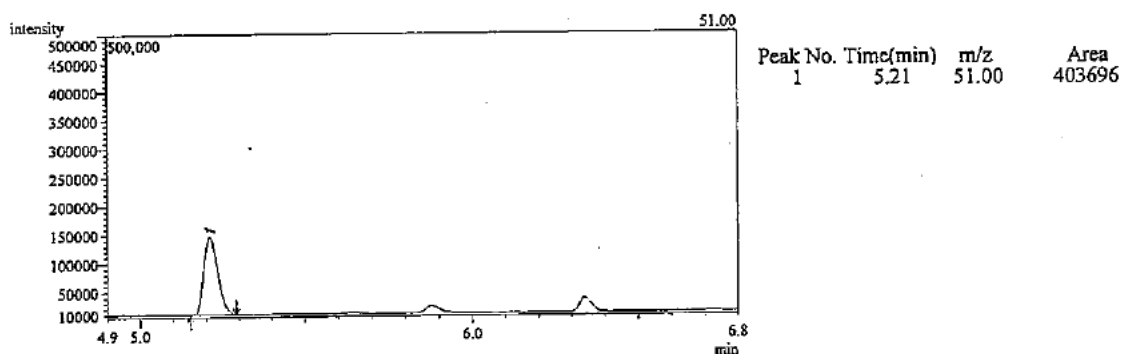
Fig. 6 - 1 Mass fragmentograms of GC-MS analysis for test water.

Date : May. 02, 2007 Name :

Standard 0.100 ug/L

Operating date : May. 09, 2007

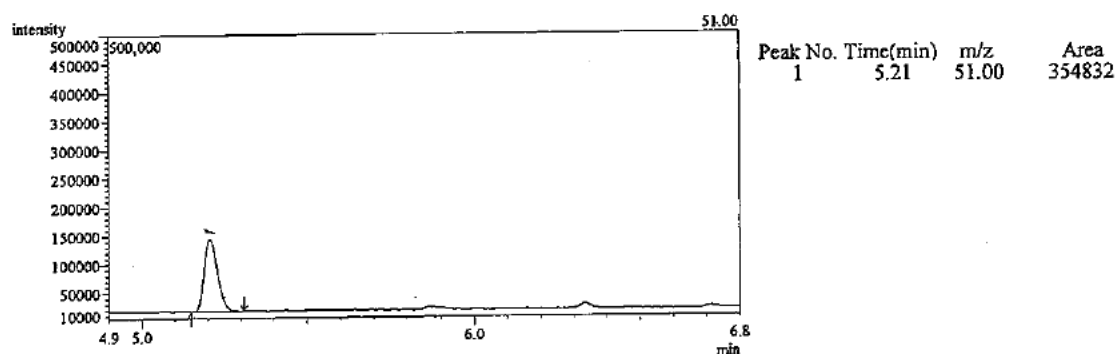
File name : C:\GCMSsolution\Data\Section 2\新規¥44806¥A11¥001.qgd



Test water after 11 days (Level 1)

Operating date : May. 09, 2007

File name : C:\GCMSsolution\Data\Section 2\新規¥44806¥A11¥002.qgd



Test water after 11 days (Level 2)

Operating date : May. 09, 2007

File name : C:\GCMSsolution\Data\Section 2\新規¥44806¥A11¥003.qgd

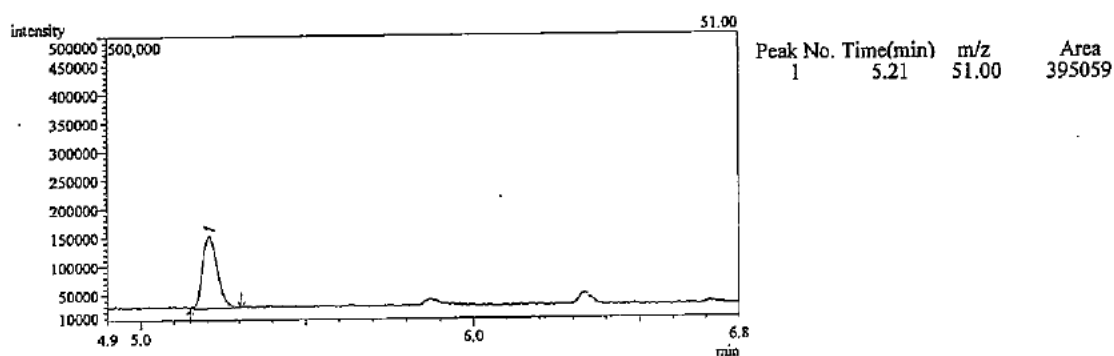


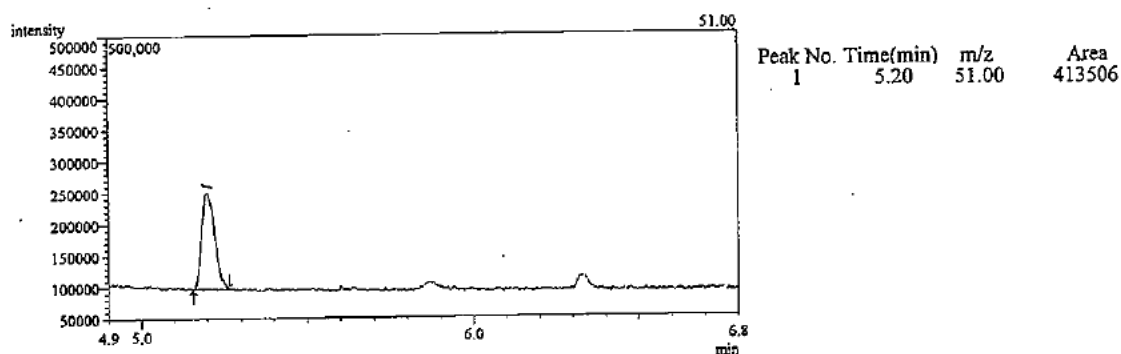
Fig. 6 - 2 Mass fragmentograms of GC-MS analysis for test water.

Date : May. 09, 2007 Name :

Standard 0.100 ug/L

Operating date : May. 22, 2007

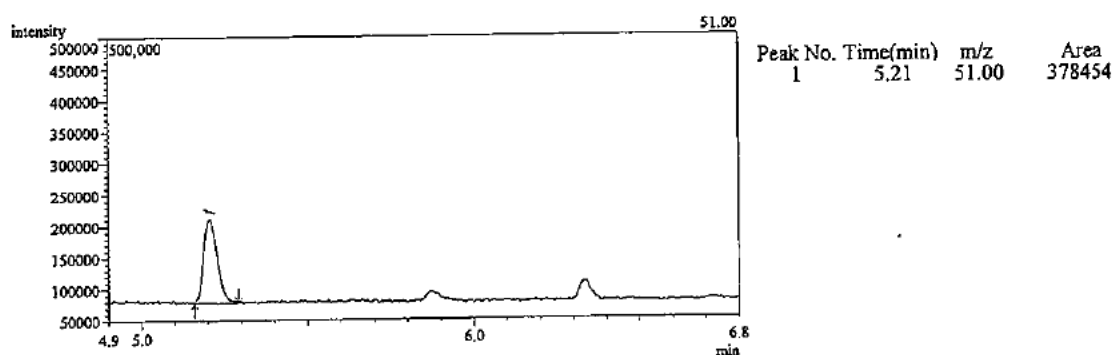
File name : C:\GCMSsolution\Data\Section 2\新規\44806\A24\004.qgd



Test water after 24 days (Level 1)

Operating date : May. 22, 2007

File name : C:\GCMSsolution\Data\Section 2\新規\44806\A24\005.qgd



Test water after 24 days (Level 2)

Operating date : May. 22, 2007

File name : C:\GCMSsolution\Data\Section 2\新規\44806\A24\006.qgd

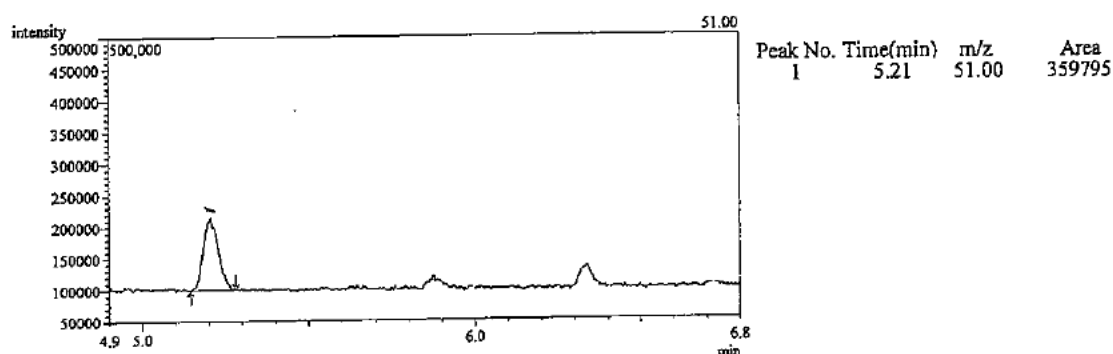


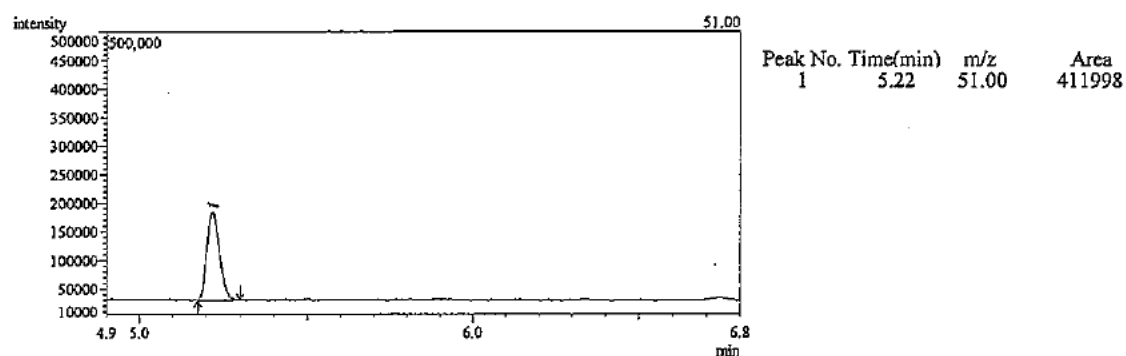
Fig. 6 - 3 Mass fragmentograms of GC-MS analysis for test water.

Date : May. 22, 2007 Name :

Standard 0.100 ug/L

Operating date : Jun. 05, 2007

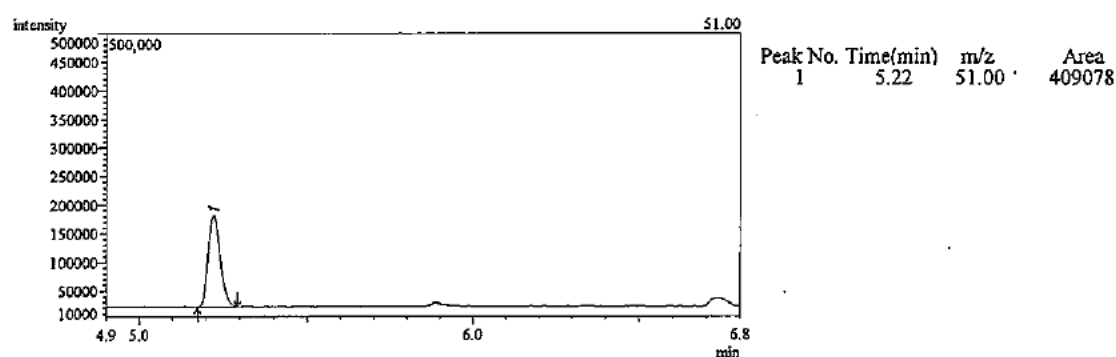
File name : C:\GCMSsolution\Data\Section 2\新規\44806\A38\001.qgd



Test water after 38 days (Level 1)

Operating date : Jun. 05, 2007

File name : C:\GCMSsolution\Data\Section 2\新規\44806\A38\002.qgd



Test water after 38 days (Level 2)

Operating date : Jun. 05, 2007

File name : C:\GCMSsolution\Data\Section 2\新規\44806\A38\003.qgd

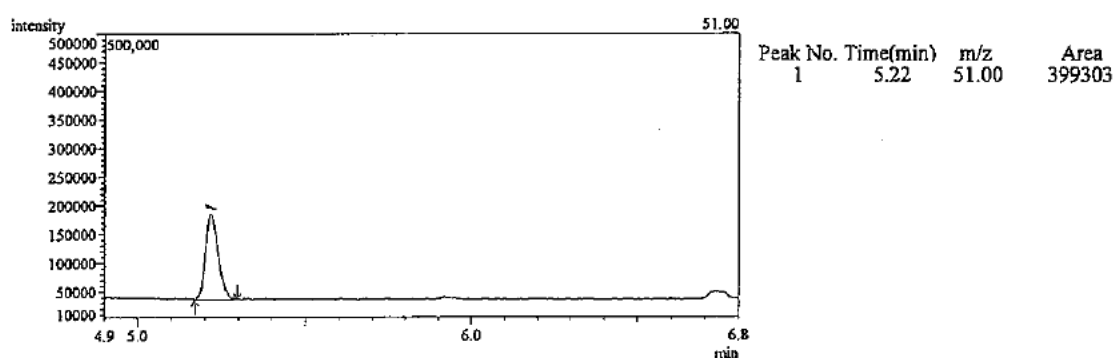


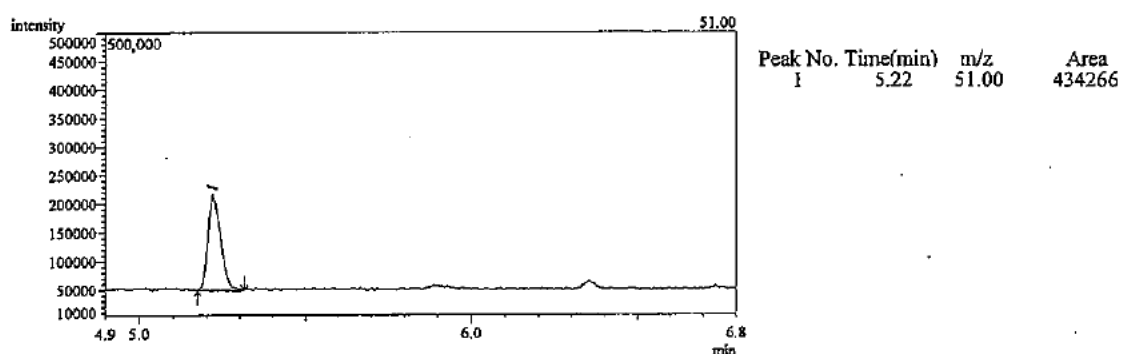
Fig. 6 - 4 Mass fragmentograms of GC-MS analysis for test water.

Date : Jun. 05, 2007 Name :

Standard 0.100 ug/L

Operating date : Jun. 14, 2007

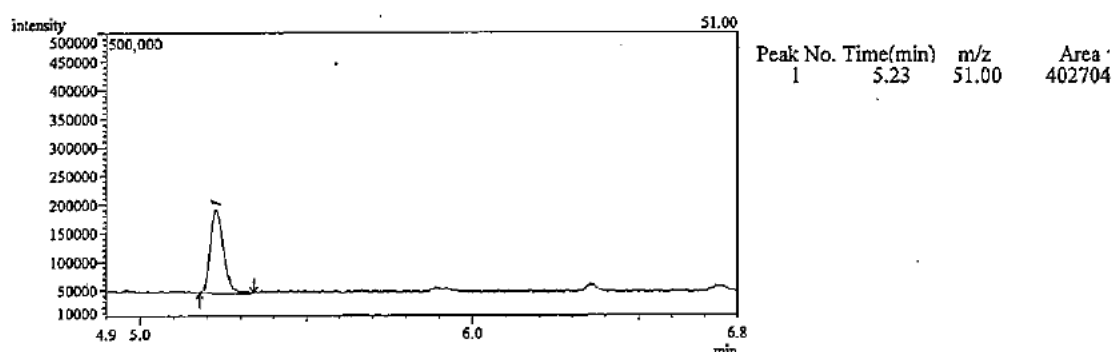
File name : C:\GCMSsolution\Data\Section 2\新規\44806\A47\003.qgd



Test water after 47 days (Level 1)

Operating date : Jun. 14, 2007

File name : C:\GCMSsolution\Data\Section 2\新規\44806\A47\004.qgd



Test water after 47 days (Level 2)

Operating date : Jun. 14, 2007

File name : C:\GCMSsolution\Data\Section 2\新規\44806\A47\005.qgd

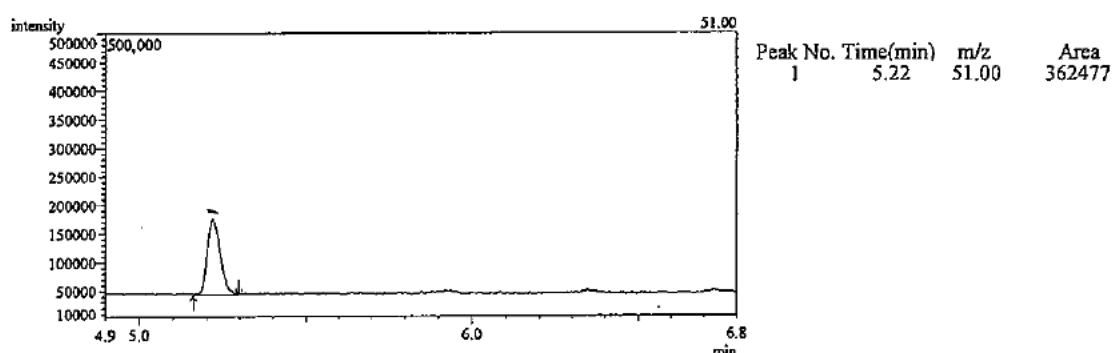


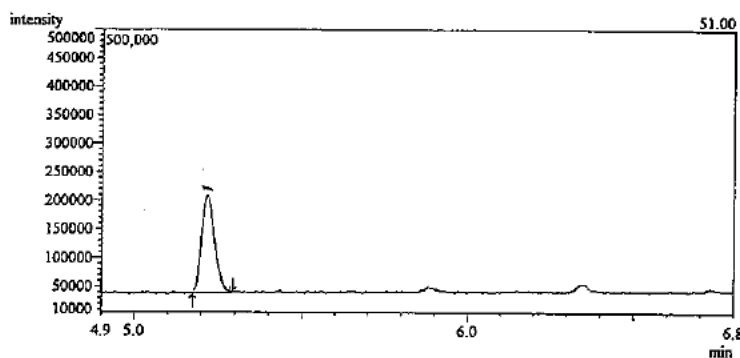
Fig. 6 - 5 Mass fragmentograms of GC-MS analysis for test water.

Date : Jun. 14, 2007 Name :

Standard 0.100 ug/L

Operating date : Jun. 27, 2007

File name : C:\GCMSsolution\Data\Section 2\新規\44806\A60\006.qgd

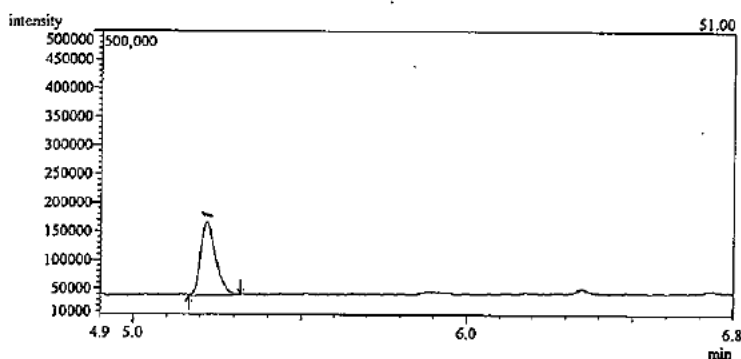


Peak No.	Time(min)	m/z	Area
1	5.22	51.00	451199

Test water after 60 days (Level 1)

Operating date : Jun. 27, 2007

File name : C:\GCMSsolution\Data\Section 2\新規\44806\A60\007.qgd

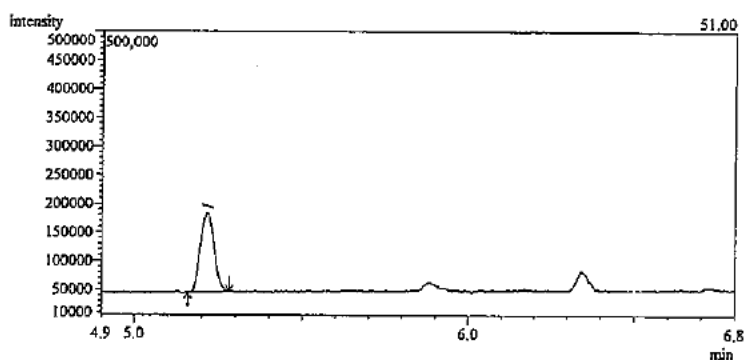


Peak No.	Time(min)	m/z	Area
1	5.22	51.00	396807

Test water after 60 days (Level 2)

Operating date : Jun. 27, 2007

File name : C:\GCMSsolution\Data\Section 2\新規\44806\A60\008.qgd



Peak No.	Time(min)	m/z	Area
1	5.22	51.00	393997

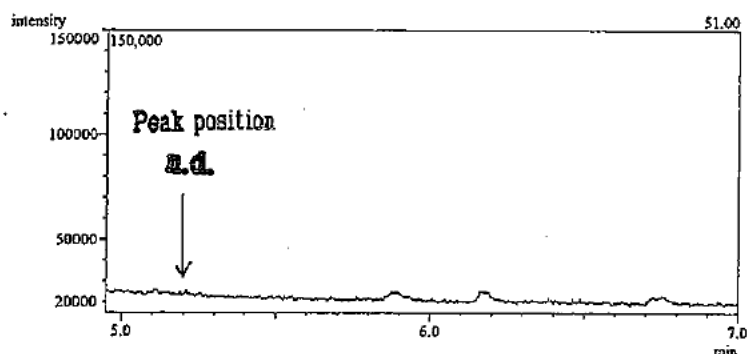
Fig. 6 - 6 Mass fragmentograms of GC-MS analysis for test water.

Date : Jun. 27, 2007 Name :

Solvent

Operating date : Apr. 24, 2007

File name : C:\GCMSsolution\Data\Section 2\新規\44806\070424\F003.qgd

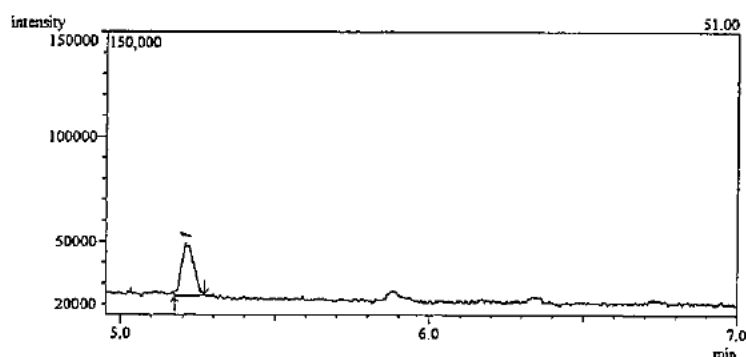


Peak No.	Time(min)	m/z	Area
1	5.21	51.00	---

Standard 0.250 ug/L

Operating date : Apr. 24, 2007

File name : C:\GCMSsolution\Data\Section 2\新規\44806\070424\F004.qgd

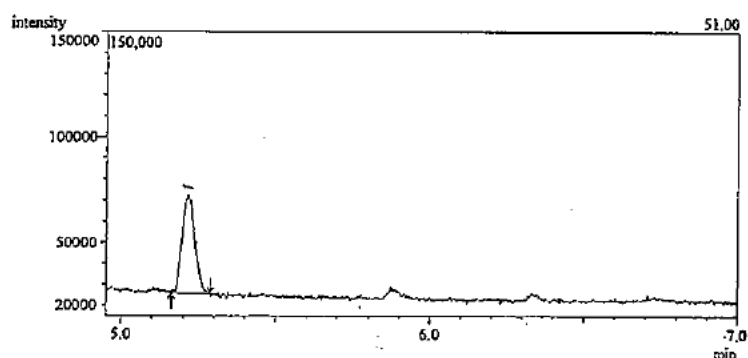


Peak No.	Time(min)	m/z	Area
1	5.21	51.00	69074

Standard 0.500 ug/L

Operating date : Apr. 24, 2007

File name : C:\GCMSsolution\Data\Section 2\新規\44806\070424\F005.qgd

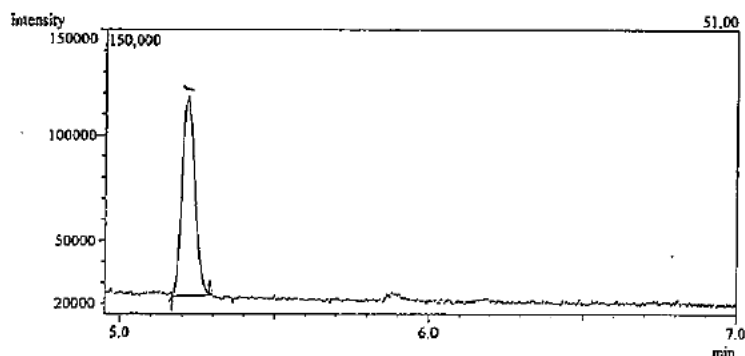


Peak No.	Time(min)	m/z	Area
1	5.21	51.00	138533

Standard 1.00 ug/L

Operating date : Apr. 24, 2007

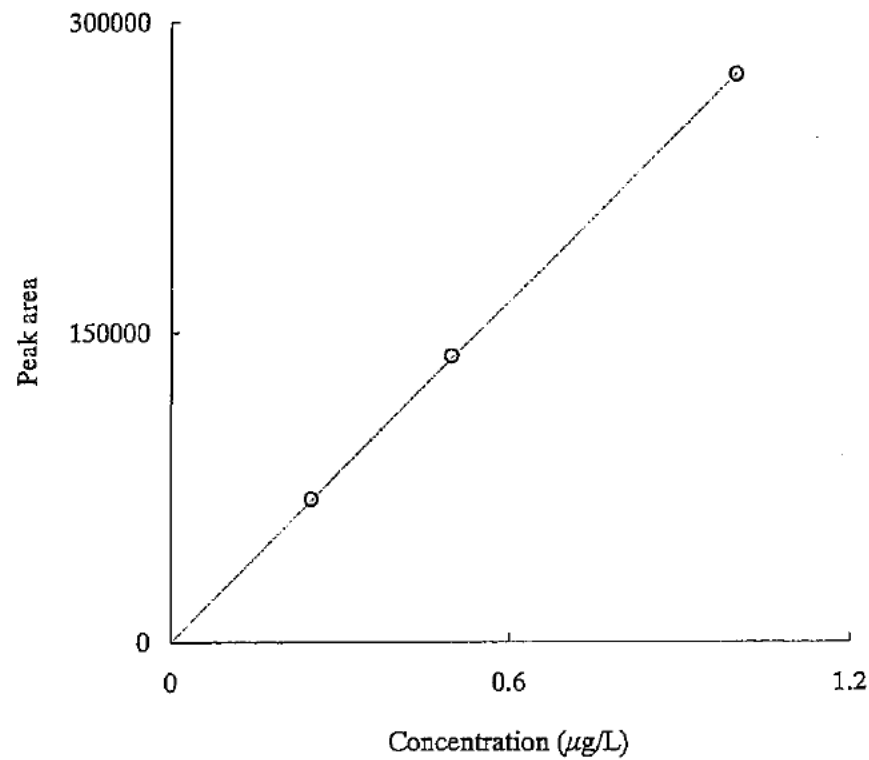
File name : C:\GCMSsolution\Data\Section 2\新規\44806\070424\F006.qgd



Peak No.	Time(min)	m/z	Area
1	5.22	51.00	274582

Fig. 7 - 1 Mass fragmentograms of GC-MS analysis for calibration curve (analysis of test fish).

Date : Apr. 24, 2007 Name :



$$y = 275137x$$

$$r = 1.000$$

Concentration (µg/L)	Peak area
0.250	69074
0.500	138533
1.00	274582

Fig. 7-2 Calibration curve of test item
(analysis of test fish).

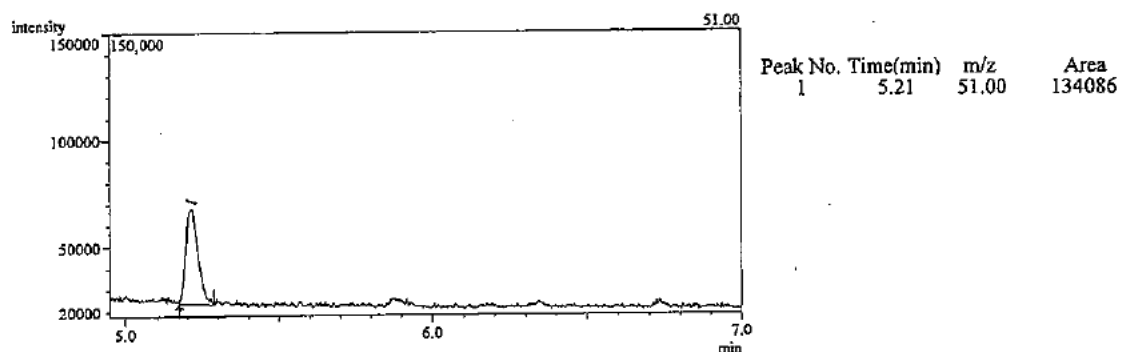
April 24, 2007

Name _____

Standard 0.500 ug/L

Operating date : Apr. 24, 2007

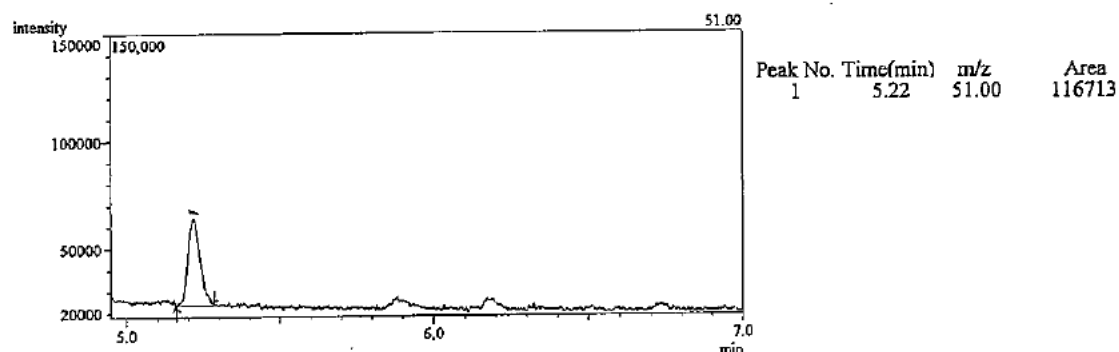
File name : C:\GCMSsolution\Data\Section 2\新規\44806\070424f\008.qgd



Recovery test from test fish - a

Operating date : Apr. 24, 2007

File name : C:\GCMSsolution\Data\Section 2\新規\44806\070424f\009.qgd



Recovery test from test fish - b

Operating date : Apr. 24, 2007

File name : C:\GCMSsolution\Data\Section 2\新規\44806\070424f\010.qgd

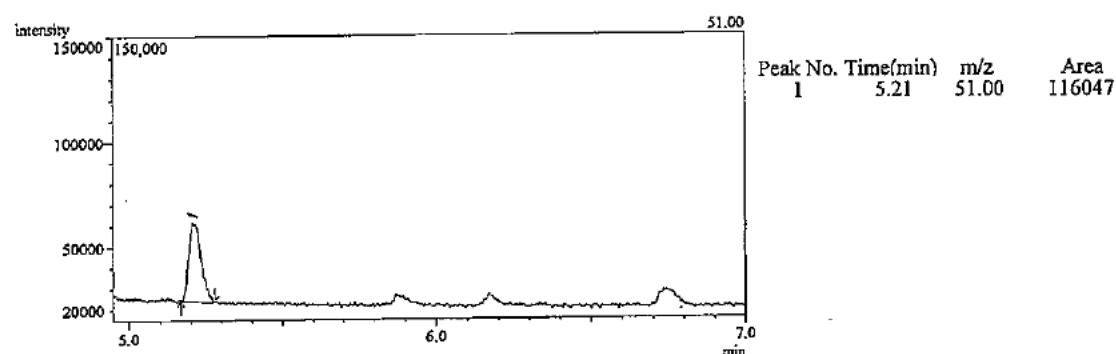


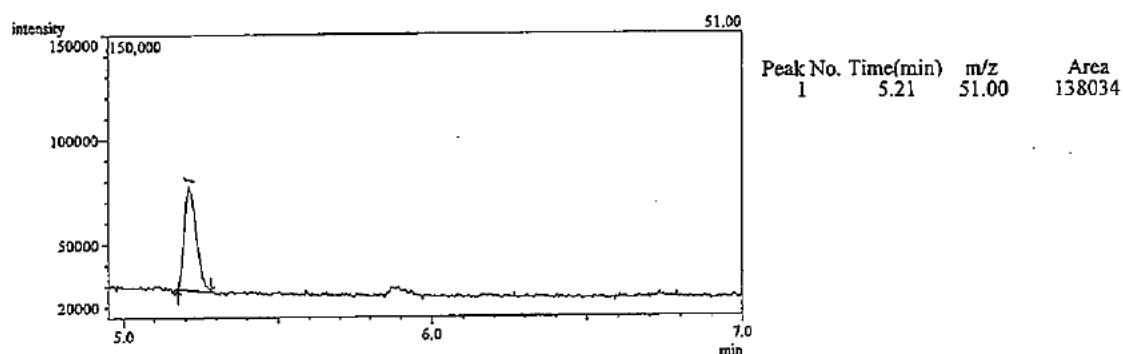
Fig. 8 - 1 Mass fragmentograms of GC-MS analysis for recovery and blank test (analysis of test fish).

Date : Apr. 24, 2007 Name :

Standard 0.500 ug/L

Operating date : Apr. 24, 2007

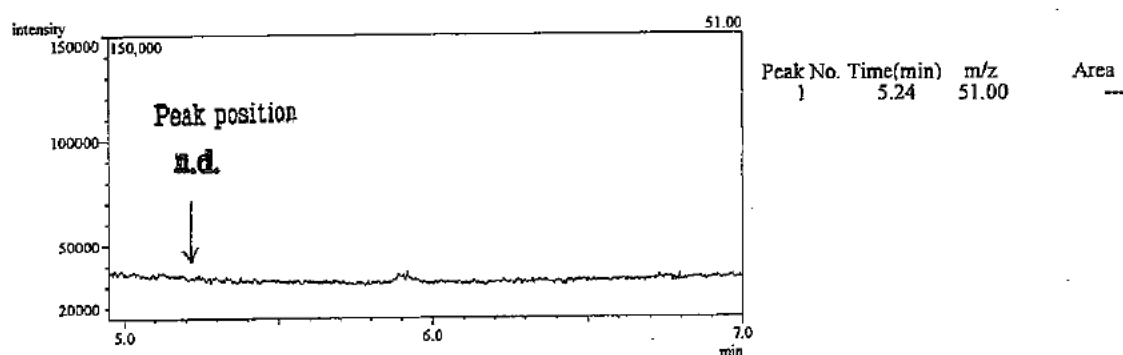
File name : C:\GCMSsolution\Data\Section 2\新規\44806\070424f\000.qgd



Blank test of test fish - a

Operating date : Apr. 24, 2007

File name : C:\GCMSsolution\Data\Section 2\新規\44806\070424f\001.qgd



Blank test of test fish - b

Operating date : Apr. 24, 2007

File name : C:\GCMSsolution\Data\Section 2\新規\44806\070424f\002.qgd

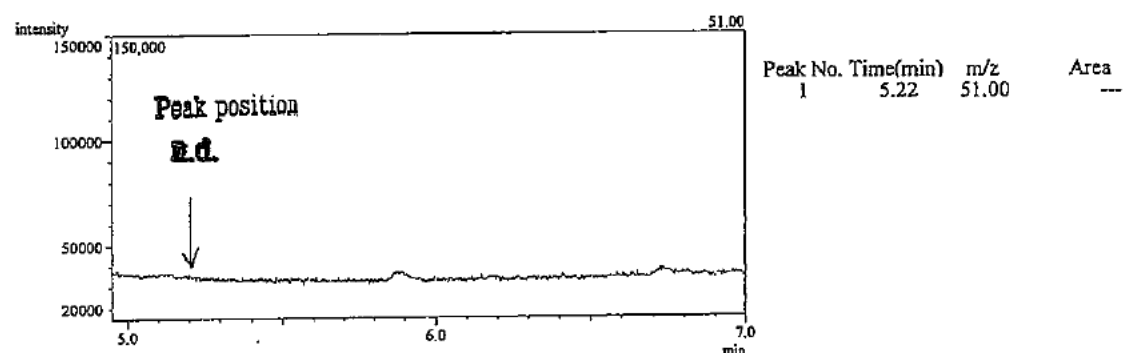


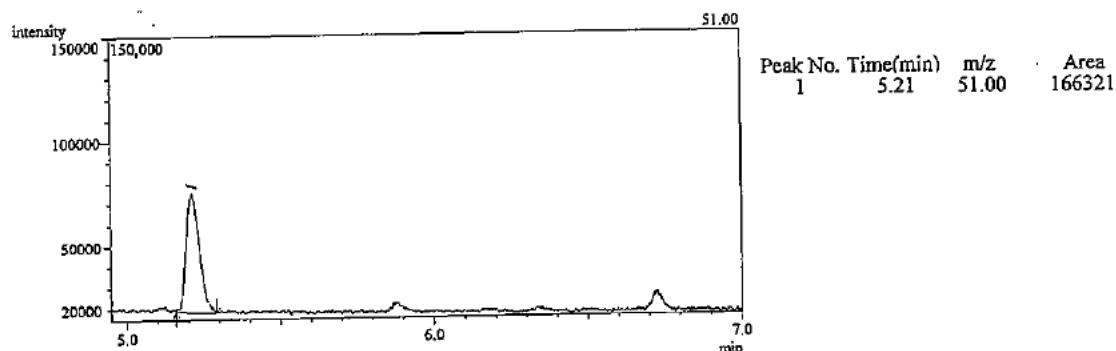
Fig. 8 - 2 Mass fragmentograms of GC-MS analysis for recovery and blank test (analysis of test fish).

Date : Apr. 24, 2007 Name :

Standard 0.500 ug/L

Operating date : May. 09, 2007

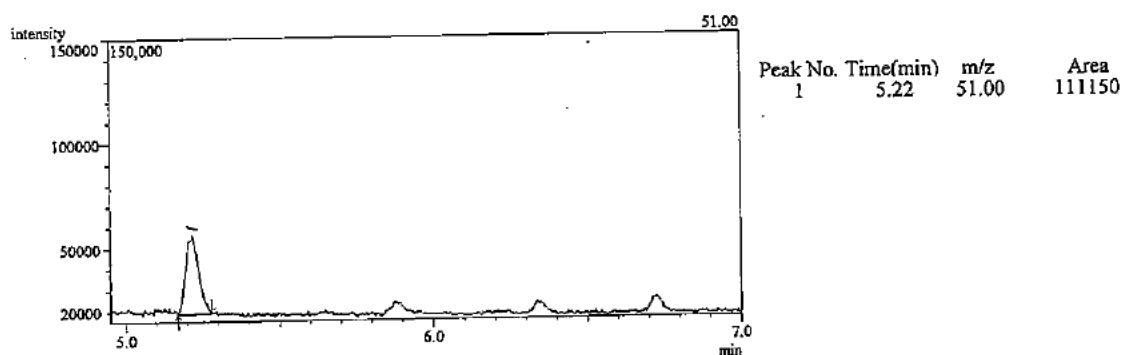
File name : C:\GCMSsolution\Data\Section 2\新規\44806\A11\07.qgd



Test fish after 11 days (Level 1-a)(D-5)

Operating date : May. 09, 2007

File name : C:\GCMSsolution\Data\Section 2\新規\44806\A11\08.qgd



Test fish after 11 days (Level 1-b)(D-5)

Operating date : May. 09, 2007

File name : C:\GCMSsolution\Data\Section 2\新規\44806\A11\09.qgd

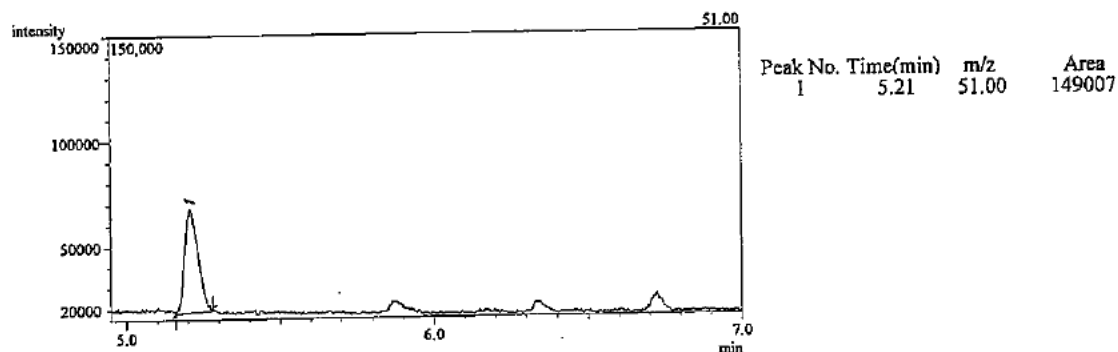


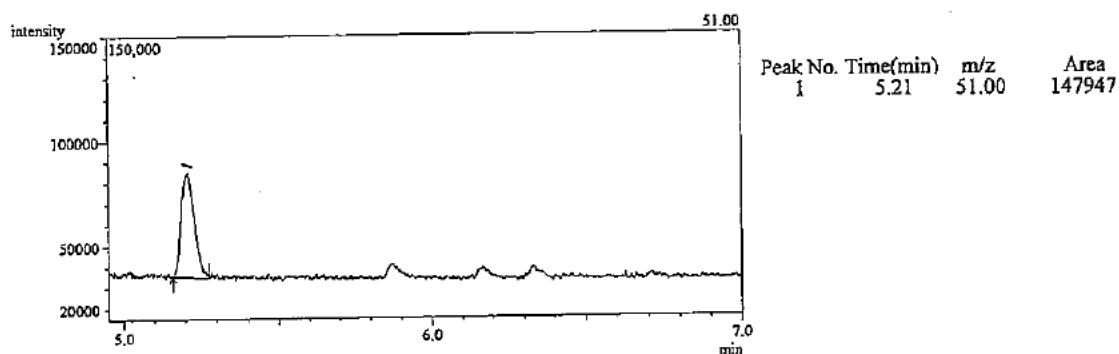
Fig. 9 - 1 Mass fragmentograms of GC-MS analysis for test fish (Level 1).

Date : May. 09, 2007 Name :

Standard 0.500 ug/L

Operating date : May. 22, 2007

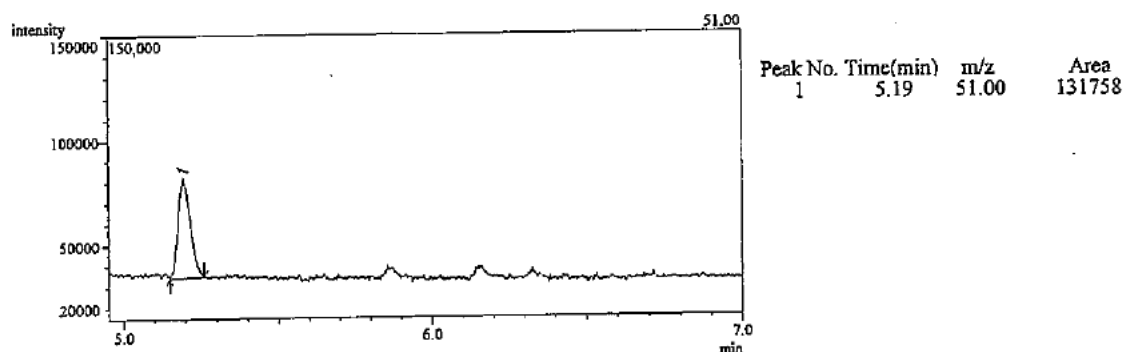
File name : C:\GCMSSolution\Data\Section 2\新規\44806\A24\014.qgd



Test fish after 24 days (Level 1-a)(D-10)

Operating date : May. 22, 2007

File name : C:\GCMSSolution\Data\Section 2\新規\44806\A24\015.qgd



Test fish after 24 days (Level 1-b)(D-10)

Operating date : May. 22, 2007

File name : C:\GCMSSolution\Data\Section 2\新規\44806\A24\016.qgd

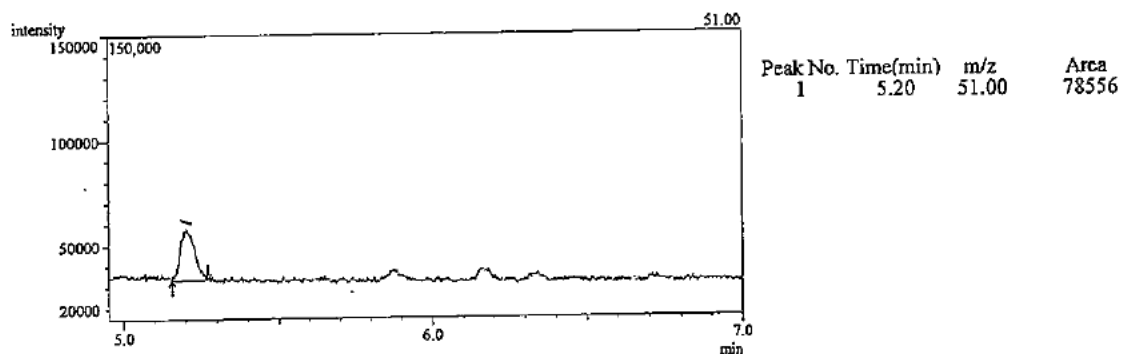


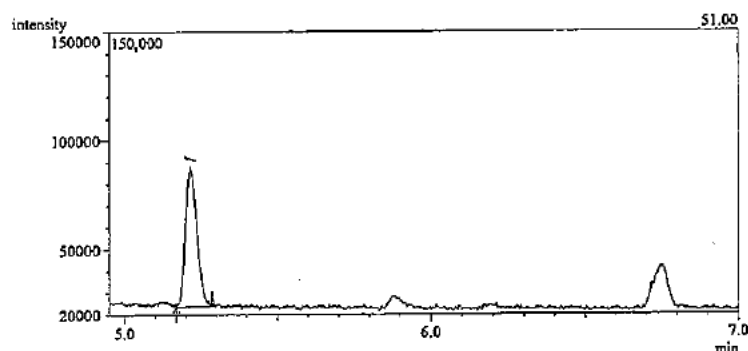
Fig. 9 - 2 Mass fragmentograms of GC-MS analysis for test fish (Level 1).

Date : May. 22, 2007 Name

Standard 0.500 ug/L

Operating date : Jun. 05, 2007

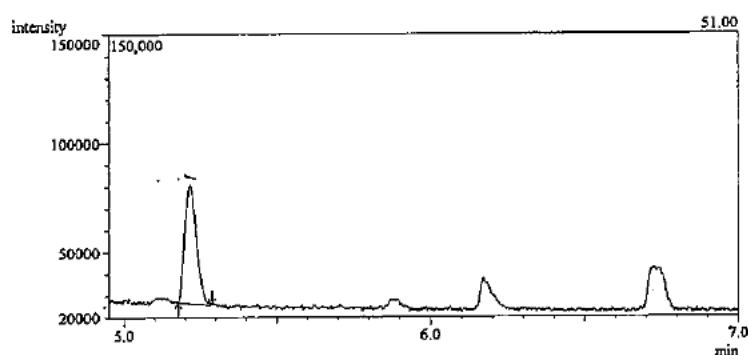
File name : C:\GCMSsolution\Data\Section 2\新規\44806\A38\008.qgd



Test fish after 38 days (Level 1-a)(D-5)

Operating date : Jun. 05, 2007

File name : C:\GCMSsolution\Data\Section 2\新規\44806\A38\009.qgd



Test fish after 38 days (Level 1-b)(D-10)

Operating date : Jun. 05, 2007

File name : C:\GCMSsolution\Data\Section 2\新規\44806\A38\010.qgd

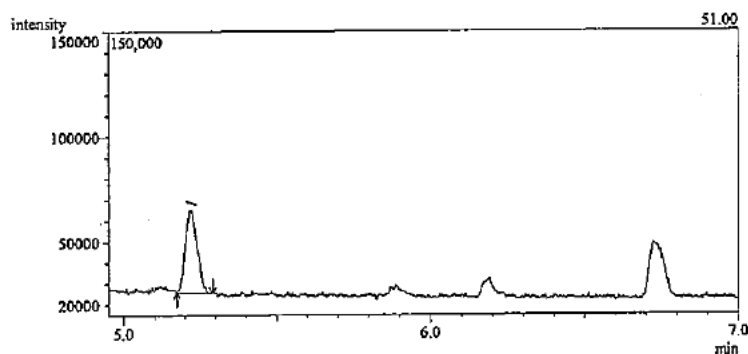


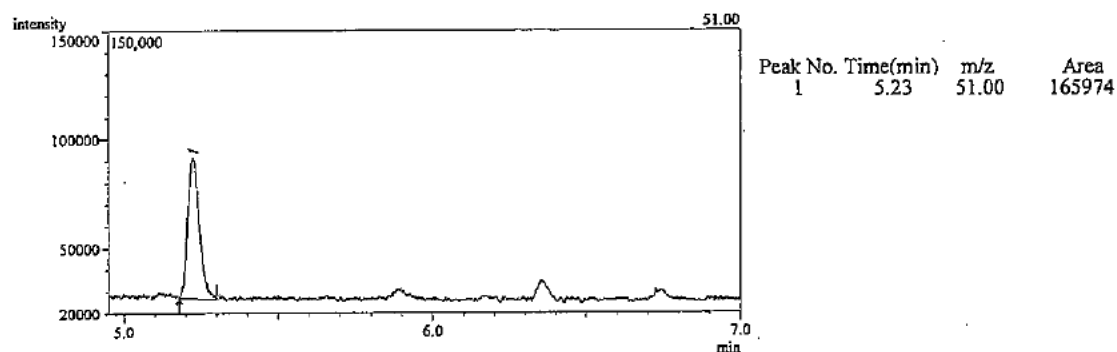
Fig. 9 - 3 Mass fragmentograms of GC-MS analysis for test fish (Level 1).

Date : Jun. 05, 2007 Name :

Standard 0.500 ug/L

Operating date : Jun. 14, 2007

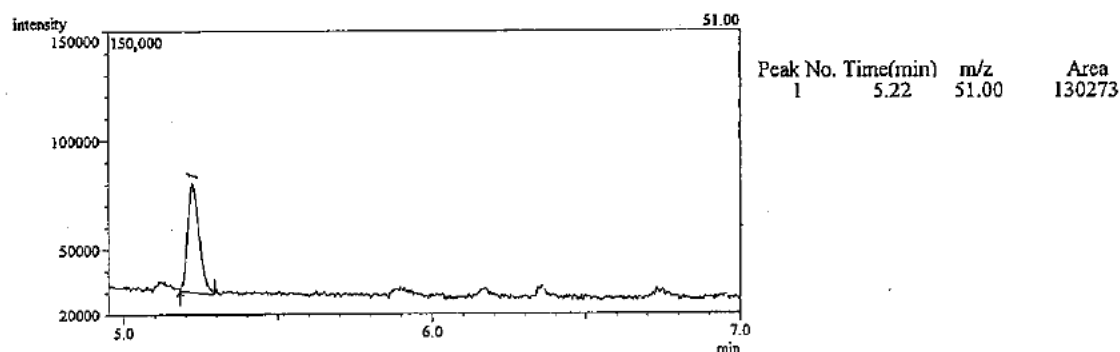
File name : C:\GCMSsolution\Data\Section 2\新規\44806\A47\019.qgd



Test fish after 47 days (Level 1-a)(D-10)

Operating date : Jun. 14, 2007

File name : C:\GCMSsolution\Data\Section 2\新規\44806\A47\020.qgd



Test fish after 47 days (Level 1-b)(D-5)

Operating date : Jun. 14, 2007

File name : C:\GCMSsolution\Data\Section 2\新規\44806\A47\021.qgd

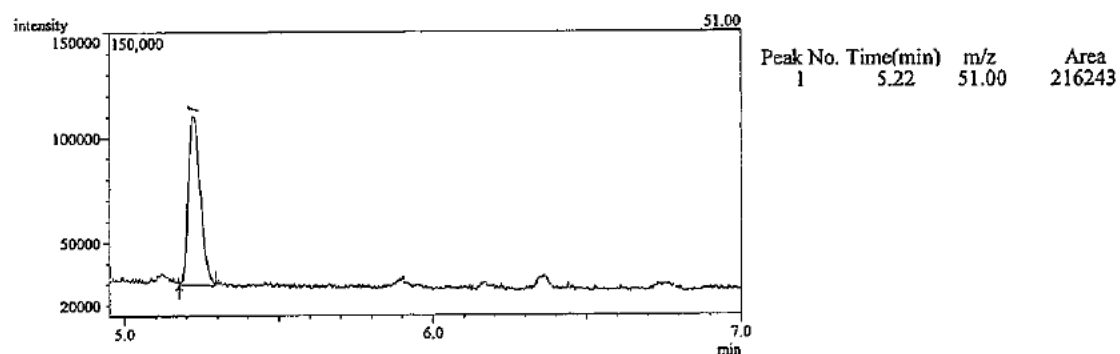


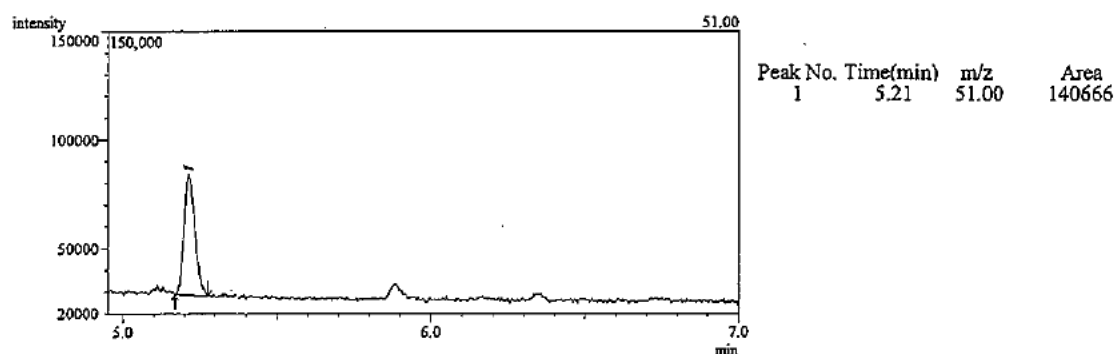
Fig. 9 - 4 Mass fragmentograms of GC-MS analysis for test fish (Level 1).

Date : Jun. 14, 2007 Name :

Standard 0.500 ug/L

Operating date : Jun. 27, 2007

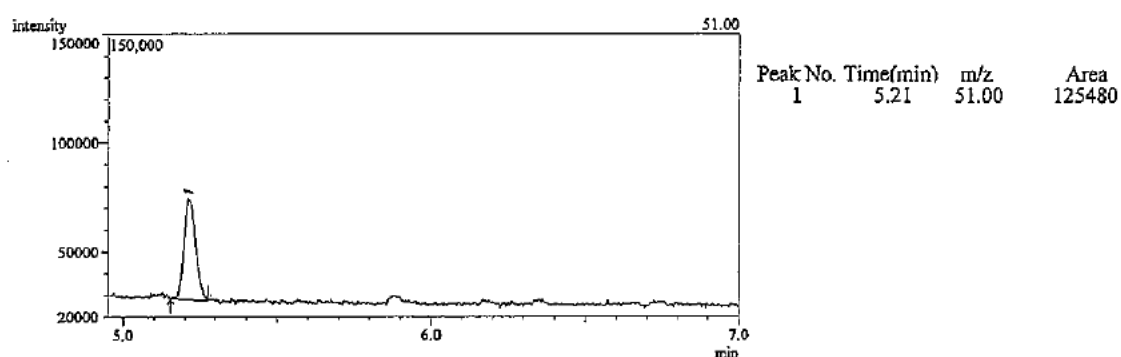
File name : C:\GCMSsolution\Data\Section 2\新規\44806\A60\011.qgd



Test fish after 60 days (Level 1-a)(D+10)

Operating date : Jun. 27, 2007

File name : C:\GCMSsolution\Data\Section 2\新規\44806\A60\012.qgd



Test fish after 60 days (Level 1-b)(D+10)

Operating date : Jun. 27, 2007

File name : C:\GCMSsolution\Data\Section 2\新規\44806\A60\013.qgd

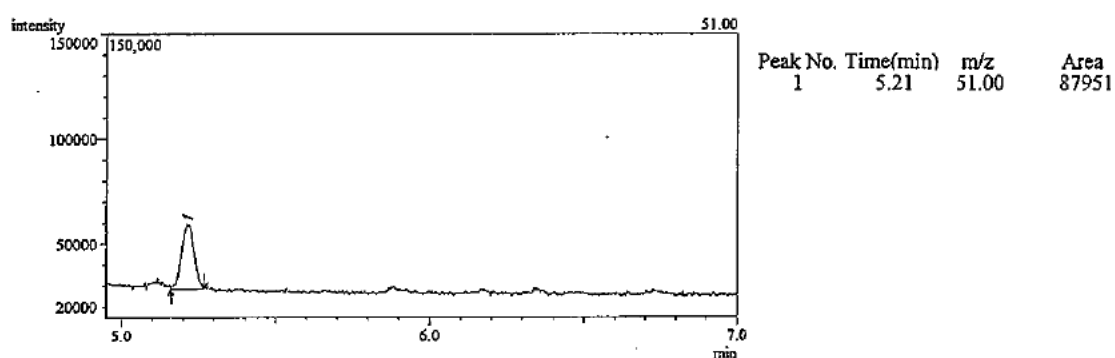


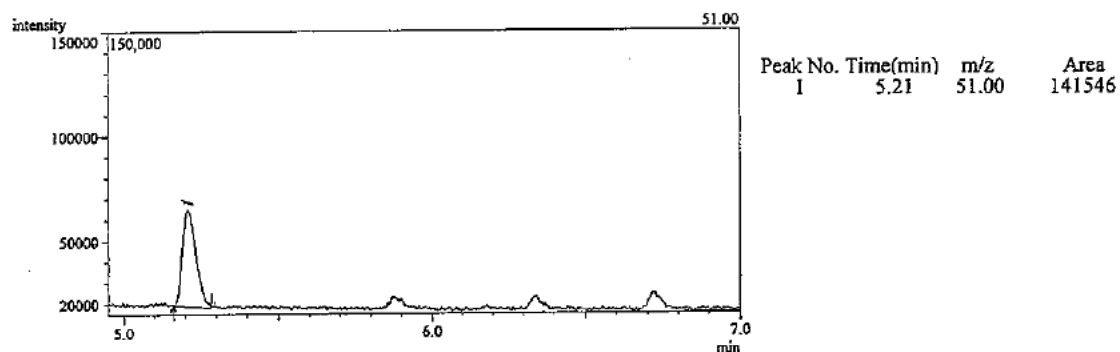
Fig. 9 - 5 Mass fragmentograms of GC-MS analysis for test fish (Level 1).

Date : Jun. 27, 2007 Name :

Standard 0.500 ug/L

Operating date : May. 09, 2007

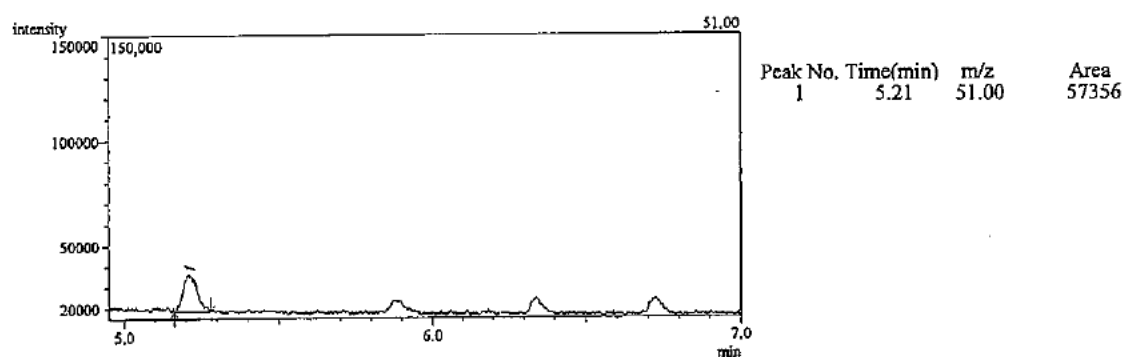
File name : C:\GCMSsolution\Data\Section 2\新規\44806\A11\04.qgd



Test fish after 11 days (Level 2-a)

Operating date : May. 09, 2007

File name : C:\GCMSsolution\Data\Section 2\新規\44806\A11\05.qgd



Test fish after 11 days (Level 2-b)

Operating date : May. 09, 2007

File name : C:\GCMSsolution\Data\Section 2\新規\44806\A11\06.qgd

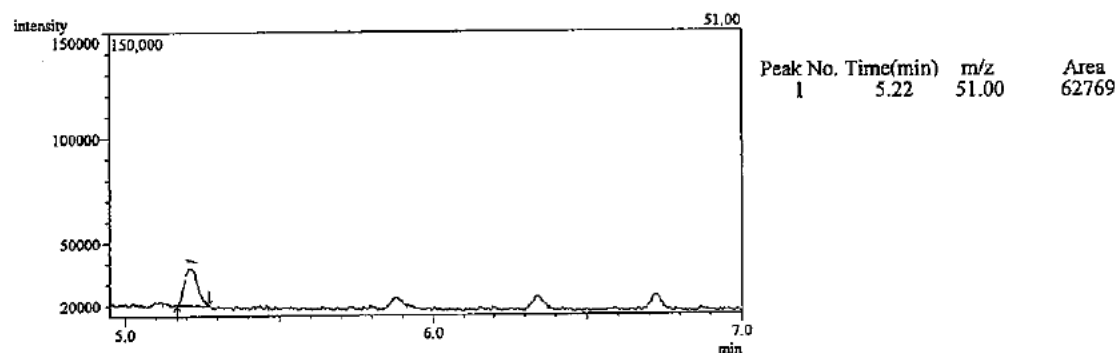


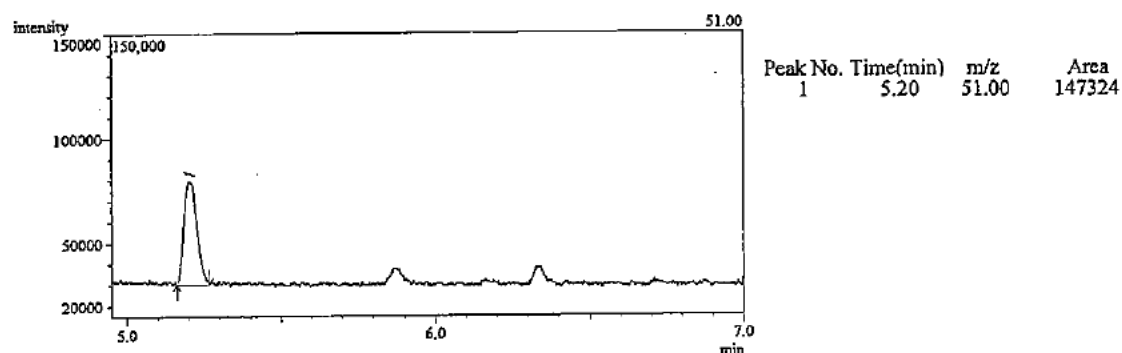
Fig. 10 - 1 Mass fragmentograms of GC-MS analysis for test fish (Level 2).

Date : May. 09, 2007 Name :

Standard 0.500 ug/L

Operating date : May. 22, 2007

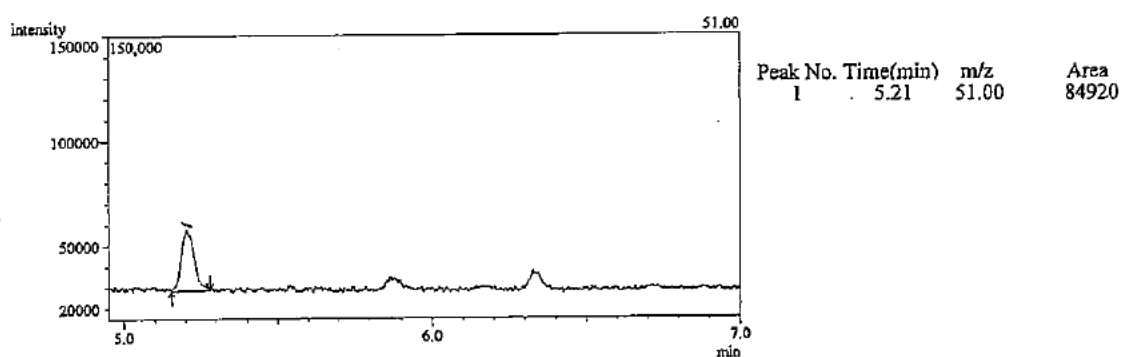
File name : C:\GCMSsolution\Data\Section 2\新規\44806\A24\018.qgd



Test fish after 24 days (Level 2-a)

Operating date : May. 22, 2007

File name : C:\GCMSsolution\Data\Section 2\新規\44806\A24\019.qgd



Test fish after 24 days (Level 2-b)

Operating date : May. 22, 2007

File name : C:\GCMSsolution\Data\Section 2\新規\44806\A24\020.qgd

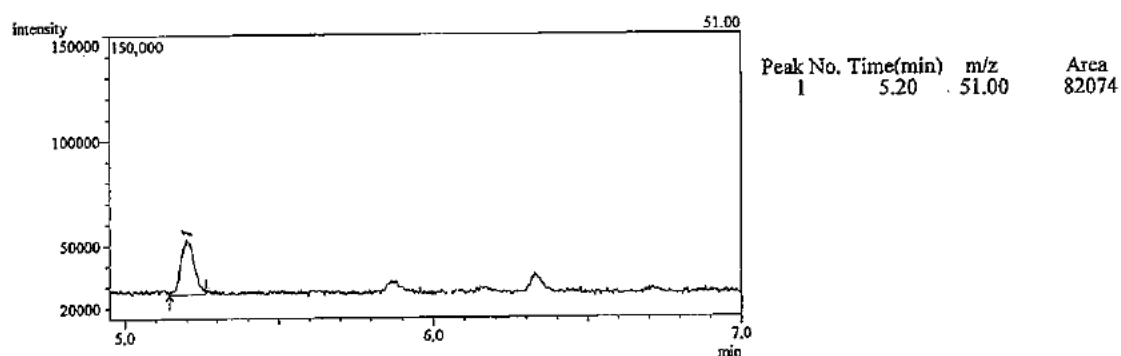


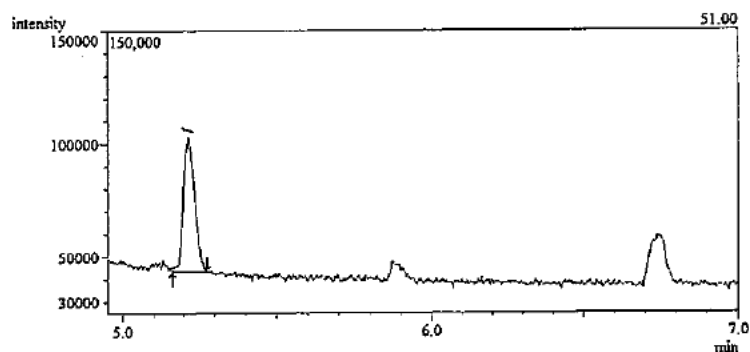
Fig. 10 - 2 Mass fragmentograms of GC-MS analysis for test fish (Level 2).

Date : May. 22, 2007 Name :

Standard 0.500 ug/L

Operating date : Jun. 05, 2007

File name : C:\GCMSsolution\Data\Section 2\新規\44806\A38\005.qgd

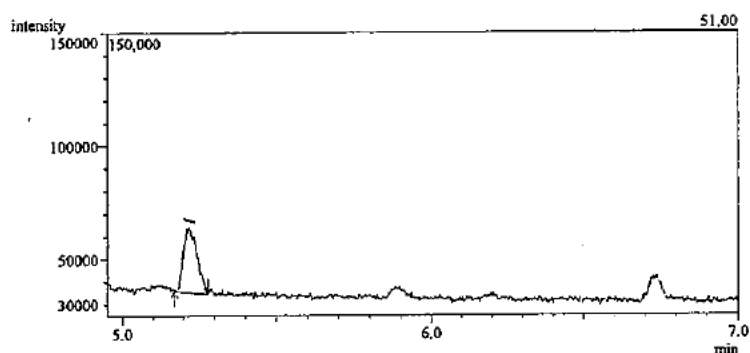


Peak No.	Time(min)	m/z	Area
1	5.21	51.00	150108

Test fish after 38 days (Level 2-a)

Operating date : Jun. 05, 2007

File name : C:\GCMSsolution\Data\Section 2\新規\44806\A38\006.qgd

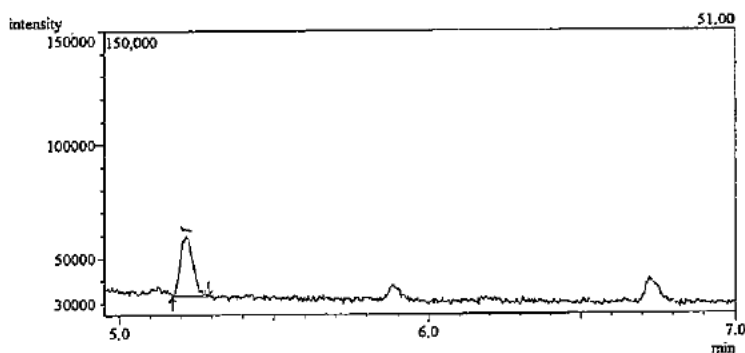


Peak No.	Time(min)	m/z	Area
1	5.22	51.00	89058

Test fish after 38 days (Level 2-b)

Operating date : Jun. 05, 2007

File name : C:\GCMSsolution\Data\Section 2\新規\44806\A38\007.qgd



Peak No.	Time(min)	m/z	Area
1	5.22	51.00	74702

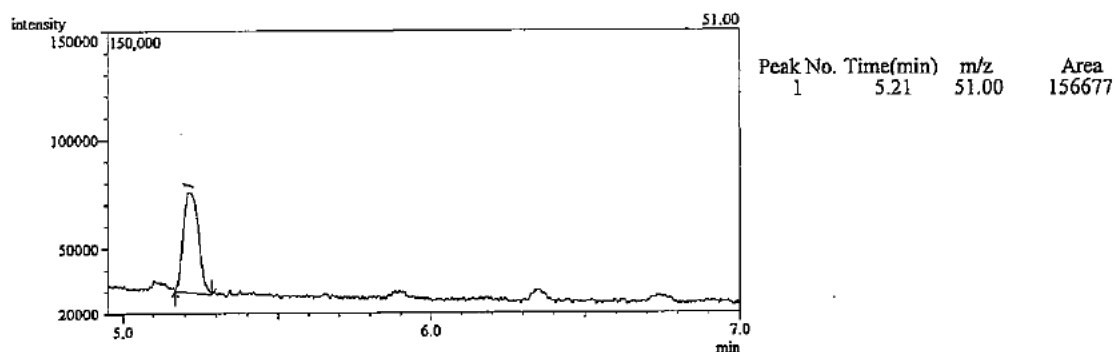
Fig. 10 - 3 Mass fragmentograms of GC-MS analysis for test fish (Level 2).

Date : Jun. 05, 2007 Name

Standard 0.500 ug/L

Operating date : Jun. 14, 2007

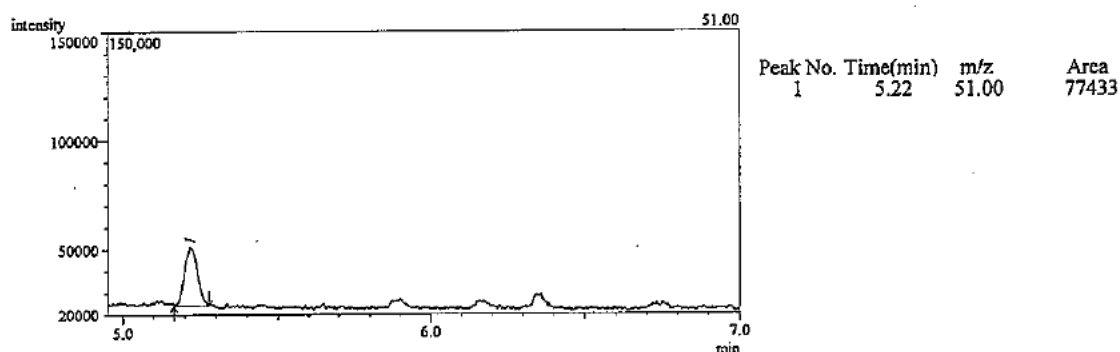
File name : C:\GCMSsolution\Data\Section 2\新規\44806\A47\009.qgd



Test fish after 47 days (Level 2-a)

Operating date : Jun. 14, 2007

File name : C:\GCMSsolution\Data\Section 2\新規\44806\A47\010.qgd



Test fish after 47 days (Level 2-b)

Operating date : Jun. 14, 2007

File name : C:\GCMSsolution\Data\Section 2\新規\44806\A47\011.qgd

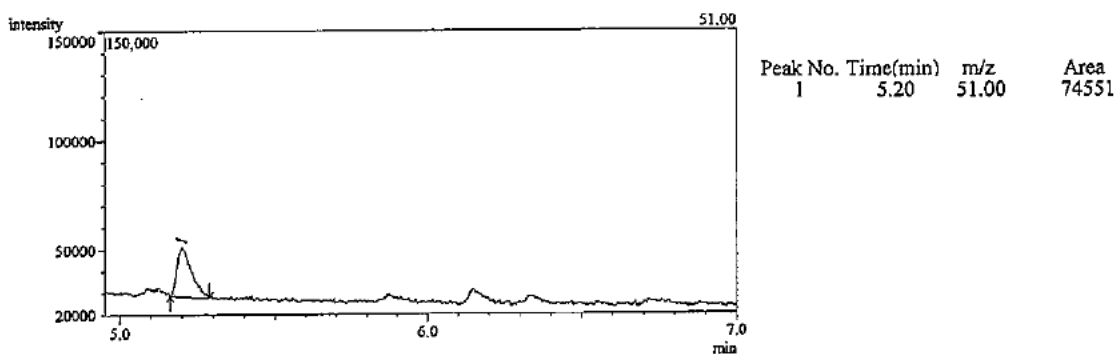


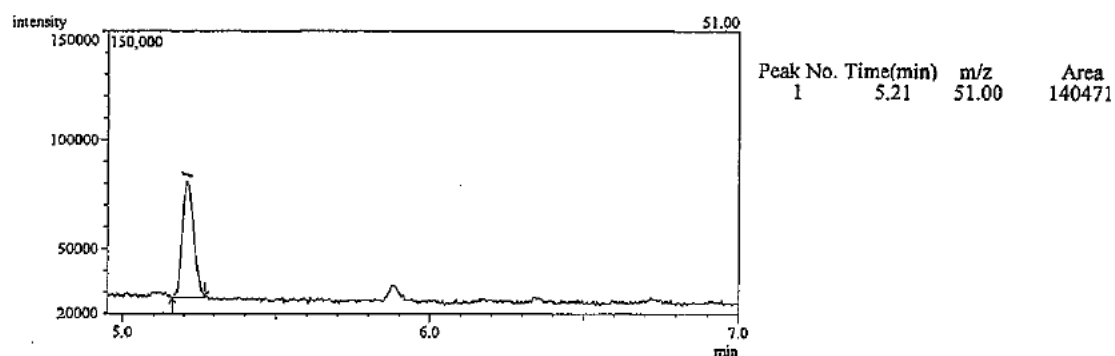
Fig. 10 - 4 Mass fragmentograms of GC-MS analysis for test fish (Level 2).

Date : Jun. 14, 2007 Name :

Standard 0.500 ug/L

Operating date : Jun. 27, 2007

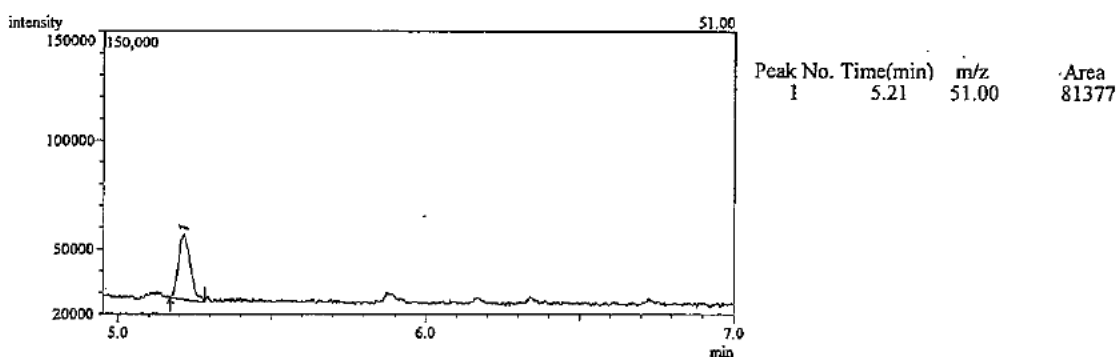
File name : C:\GCMSsolution\Data\Section 2\新規\44806\A60\015.qgd



Test fish after 60 days (Level 2-a)

Operating date : Jun. 27, 2007

File name : C:\GCMSsolution\Data\Section 2\新規\44806\A60\016.qgd



Test fish after 60 days (Level 2-b)

Operating date : Jun. 27, 2007

File name : C:\GCMSsolution\Data\Section 2\新規\44806\A60\017.qgd

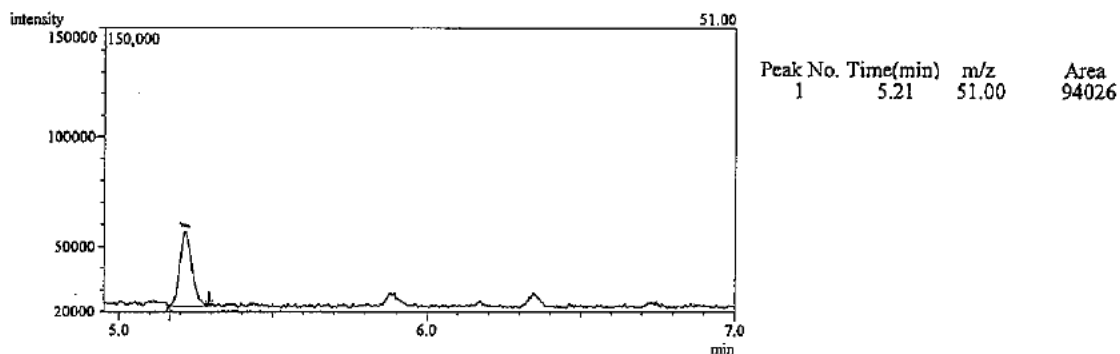


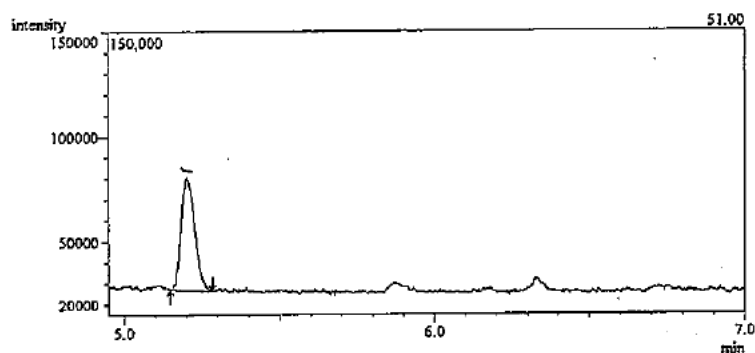
Fig. 10 - 5 Mass fragmentograms of GC-MS analysis for test fish (Level 2).

Date : Jun. 27, 2007 Name :

Standard 0.500 ug/L

Operating date : Apr. 28, 2007

File name : C:\GCMSsolution\Data\Section 2\新規\44806\A0\001.qgd

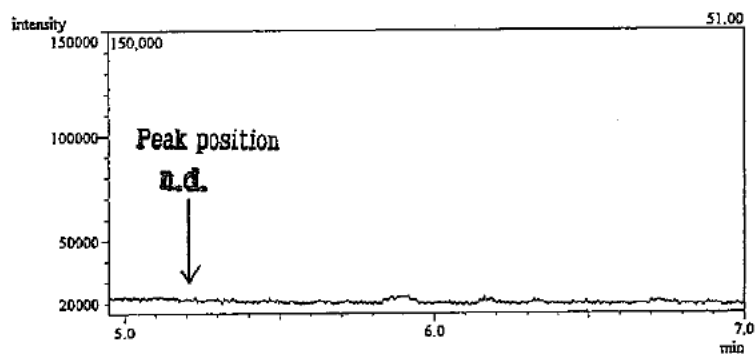


Peak No.	Time(min)	m/z	Area
1	5.20	51.00	160931

Before the experimental start (Control - a)

Operating date : Apr. 28, 2007

File name : C:\GCMSsolution\Data\Section 2\新規\44806\A0\002.qgd

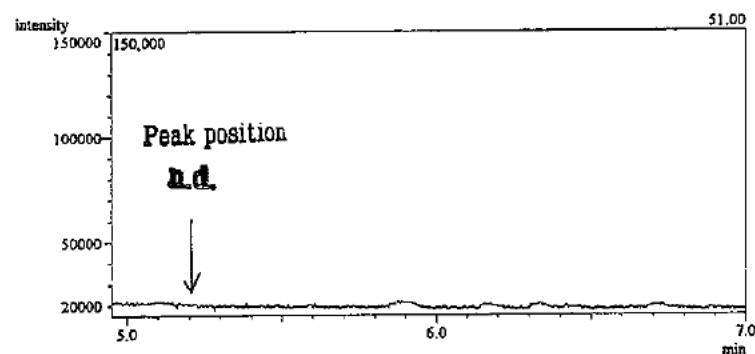


Peak No.	Time(min)	m/z	Area
1	5.16	51.00	—

Before the experimental start (Control - b)

Operating date : Apr. 28, 2007

File name : C:\GCMSsolution\Data\Section 2\新規\44806\A0\003.qgd



Peak No.	Time(min)	m/z	Area
1	5.22	51.00	—

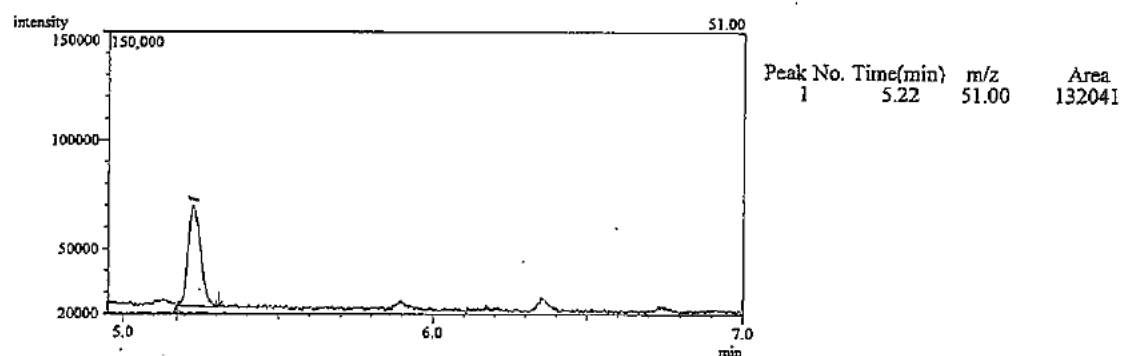
Fig. 11 - 1 Mass fragmentograms of GC-MS analysis for test fish(Control).

Date : Apr. 28, 2007 Name :

Standard 0.500 ug/L

Operating date : Jun. 28, 2007

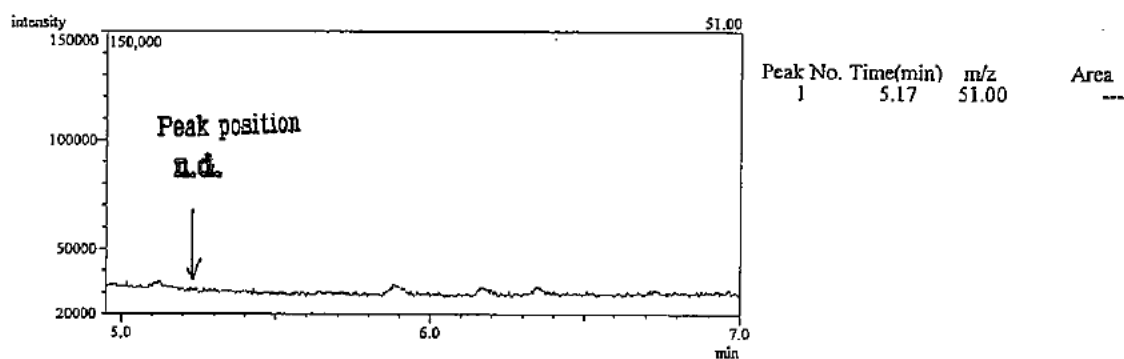
File name : C:\GCMSsolution\Data\Section 2\新規\44806\A61\001.qgd



After the experimental completion (Control - a)

Operating date : Jun. 28, 2007

File name : C:\GCMSsolution\Data\Section 2\新規\44806\A61\002.qgd



After the experimental completion (Control - b)

Operating date : Jun. 28, 2007

File name : C:\GCMSsolution\Data\Section 2\新規\44806\A61\003.qgd

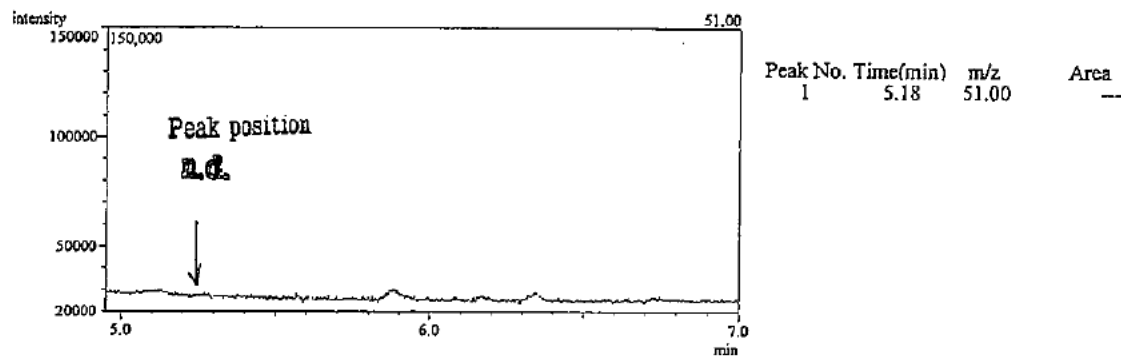


Fig. 11 - 2 Mass fragmentograms of GC-MS analysis for test fish(Control).

Date : Jun. 28, 2007 Name :

Instrument Shimadzu GCMS-QP2010

Sample Test item

GC Conditions

Column PONA (Fused silica)

Size 50 m x 0.2 mm I.D., Film thickness 0.5 μ m

Temp. 40°C(2min) $\rightarrow$ 200°C(1min)

Temp. rate 15°C/min

Sample size 0.1 mL (Head space gas)

Inlet mode (Split), Injection temp. 150°C

Linear velocity 27.8 cm/sec

Total flow 53.5 mL/min, Column flow 0.99 mL/min(linear velocity)

Split ratio 50:1

MS Conditions

Ionization mode EI

Measurement mode Scan

Monitoring ion m/z m/z 50.0~380

Ionization voltage 70V

Inter face temp 250°C

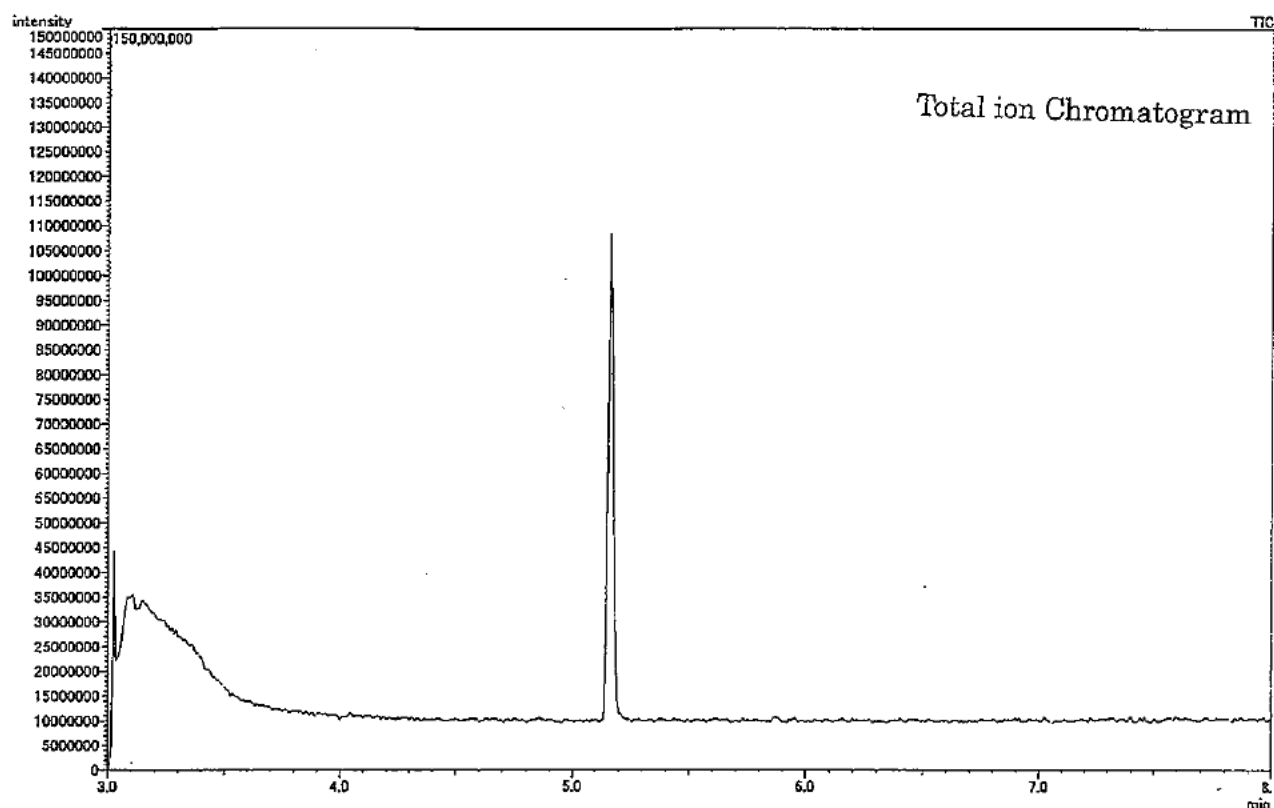
Ion source temperature 250°C

Fig. 12 - 1 Mass spectrum of test item(analytical conditions).

Date July 19, 2007 Operator

Operating date : Mar. 08, 2007

File name : C:\GCMSsolution\Data\Section 2\新規\44806\070208\003.qgd



Peak No. 1 RTime:5.16(Scan#:260)
MassPeaks:212 BasePeak:77(5831496)
RawMode:Averaged 5.13-5.19(257-264)

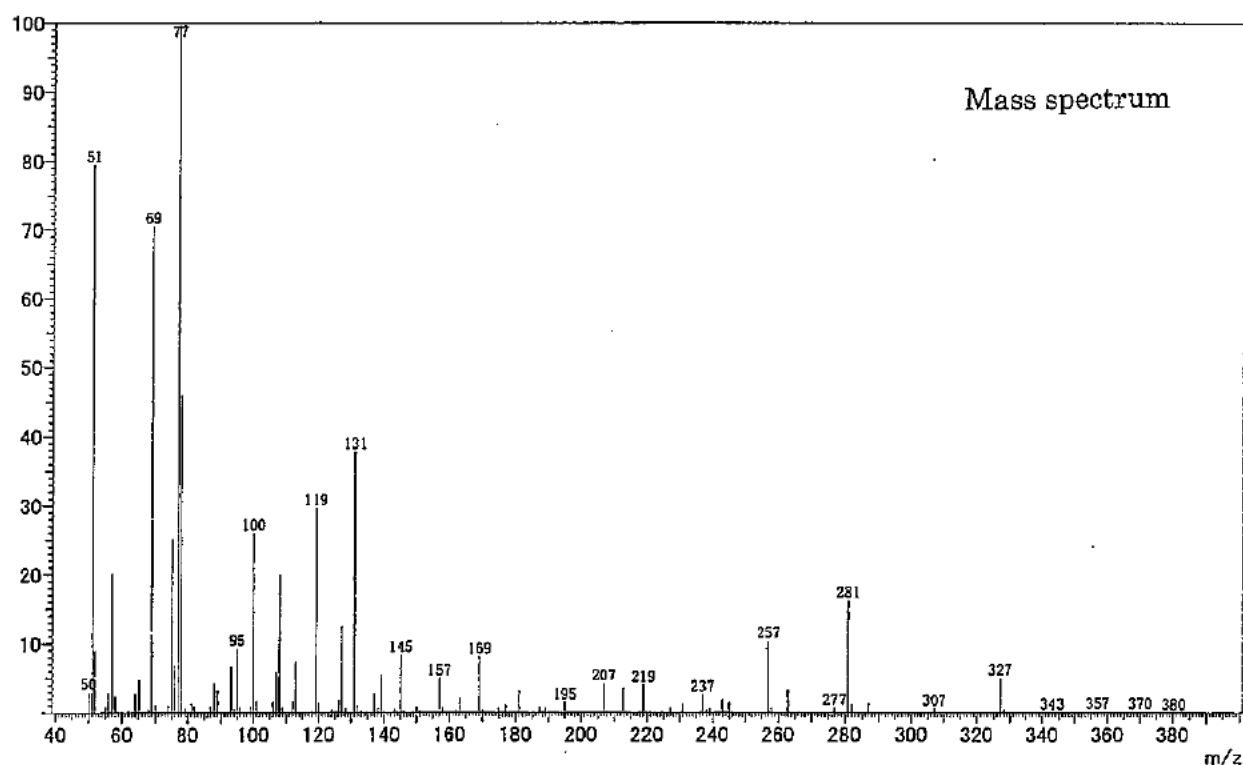


Fig.1 2-2

Mass spectrum of test item.

Date : Mar. 08, 2007 Name :

Operating date : Mar. 08, 2007

File name : C:\GCMSsolution\Data\Section 2\新規\44806\070308\003.qgd

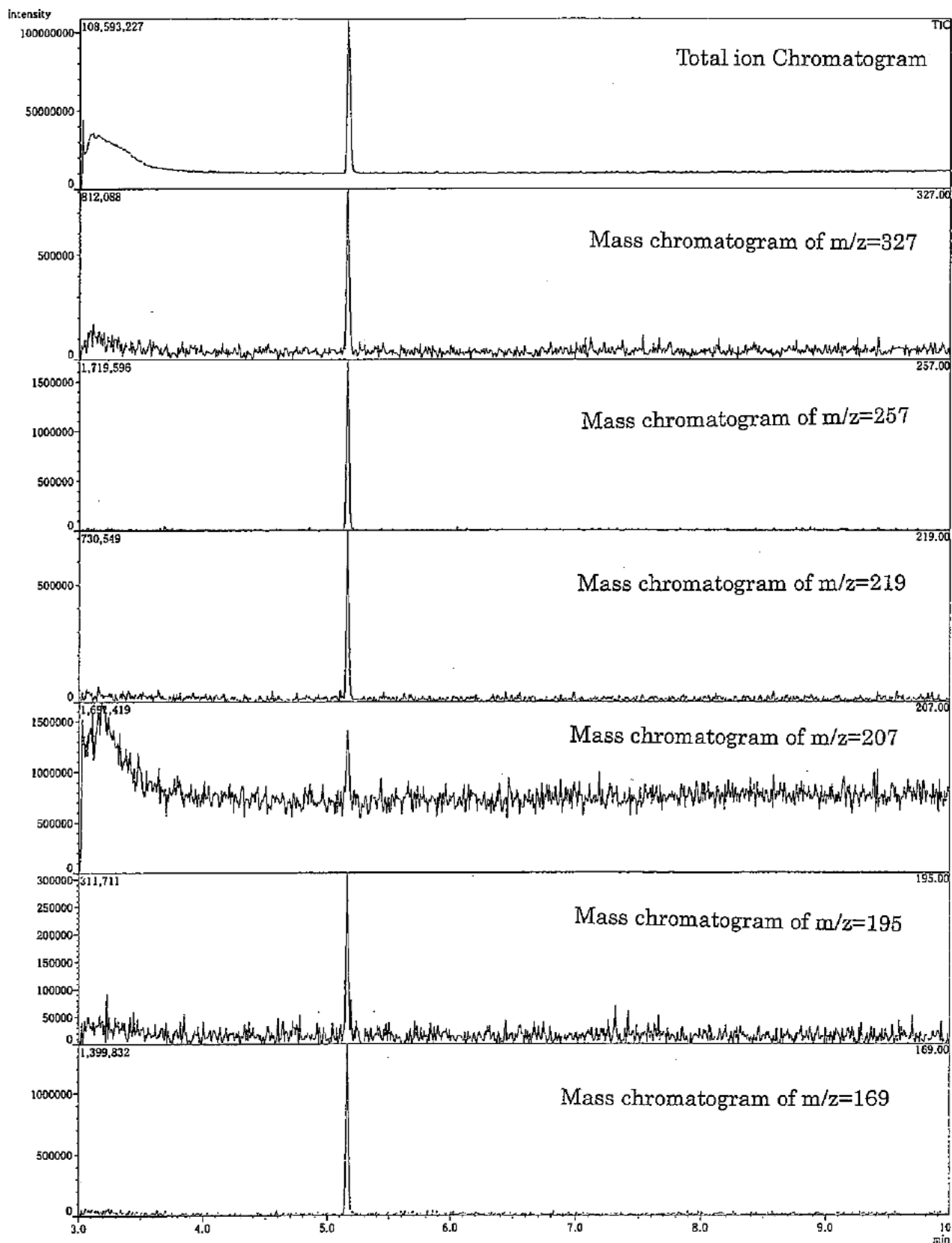


Fig. 12 -3 Mass spectrum of test item.

Date : Mar. 08, 2007 Name :

Operating date : Mar. 08, 2007

File name : C:\GCMSsolution\Data\Section 2\新規\44806\070308\003.qgd

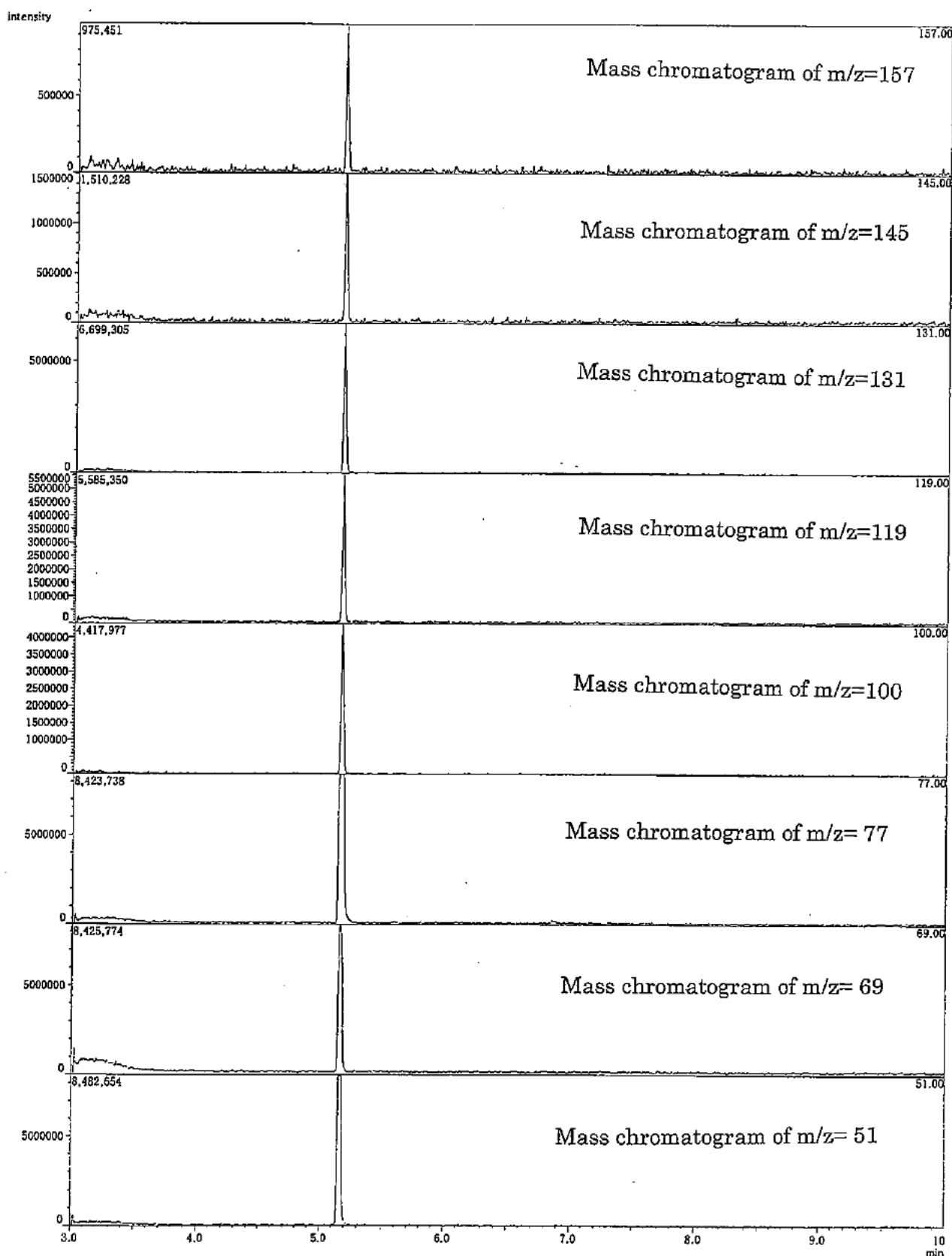


Fig. 12 -4 Mass spectrum of test item.

Date : Mar. 08, 2007 Name :

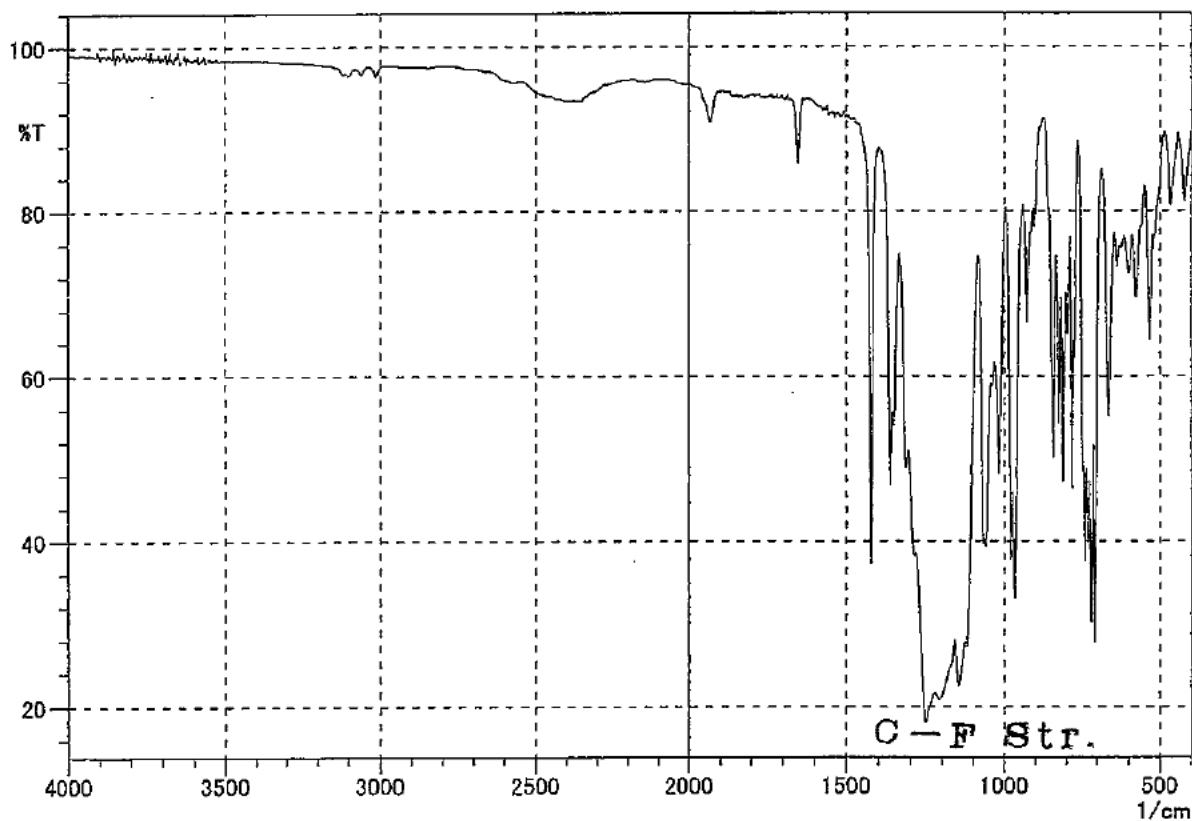


Mass number 346

m/z	Fragment ion
327	$(\text{C}_8\text{H}_3\text{F}_{12})^+$
257	$(\text{C}_7\text{H}_2\text{F}_9)^+$
219	$(\text{C}_7\text{H}_2\text{F}_7)^+$
207	$(\text{C}_6\text{H}_2\text{F}_7)^+$
195	$(\text{C}_5\text{H}_2\text{F}_7)^+$
169	$(\text{C}_6\text{H}_2\text{F}_5)^+$
157	$(\text{C}_5\text{H}_2\text{F}_5)^+$
145	$(\text{C}_4\text{H}_2\text{F}_5)^+$
131	$(\text{C}_3\text{F}_5)^+$
119	$(\text{C}_2\text{F}_5)^+$
100	$(\text{C}_2\text{F}_4)^+$
77	$(\text{C}_3\text{H}_3\text{F}_2)^+$
69	$(\text{CF}_3)^+$
51	$(\text{CHF}_2)^+$

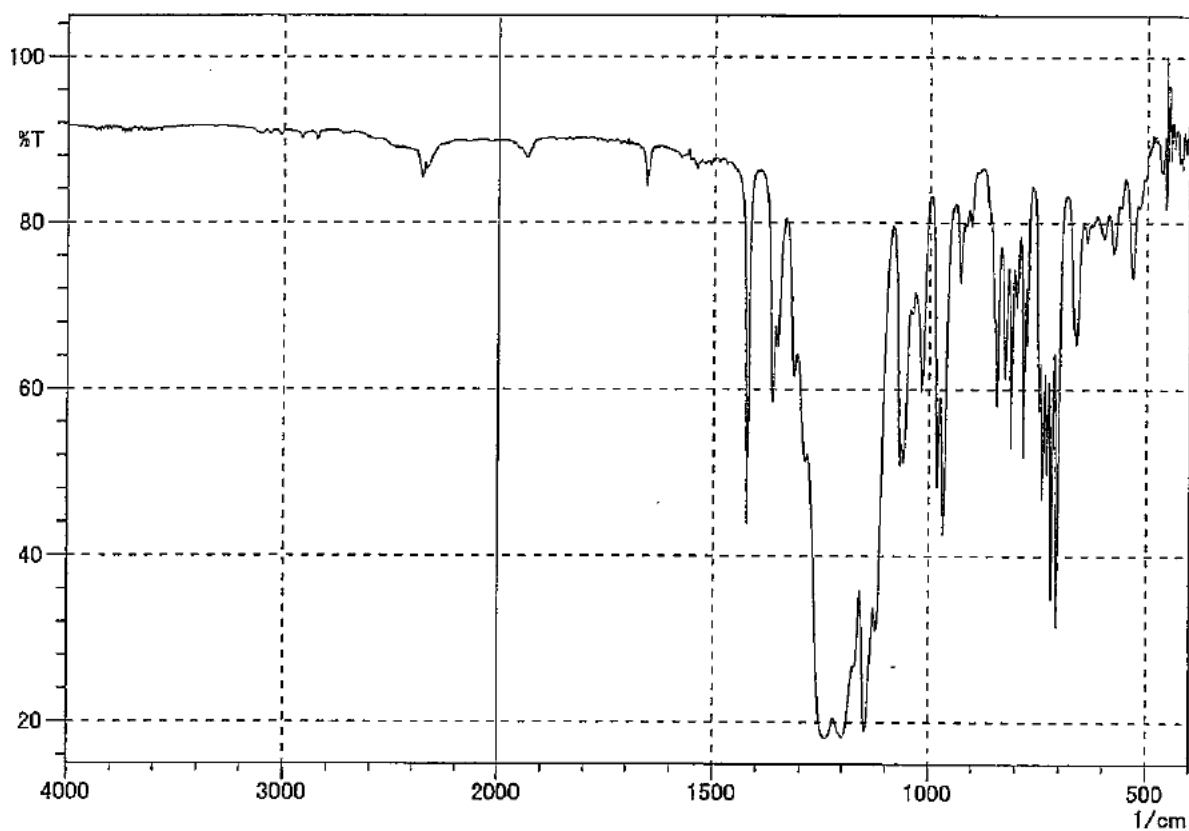
Fig. 12 - 5 Mass spectrum of test item.

Date Mar. 8, 2007 Operator



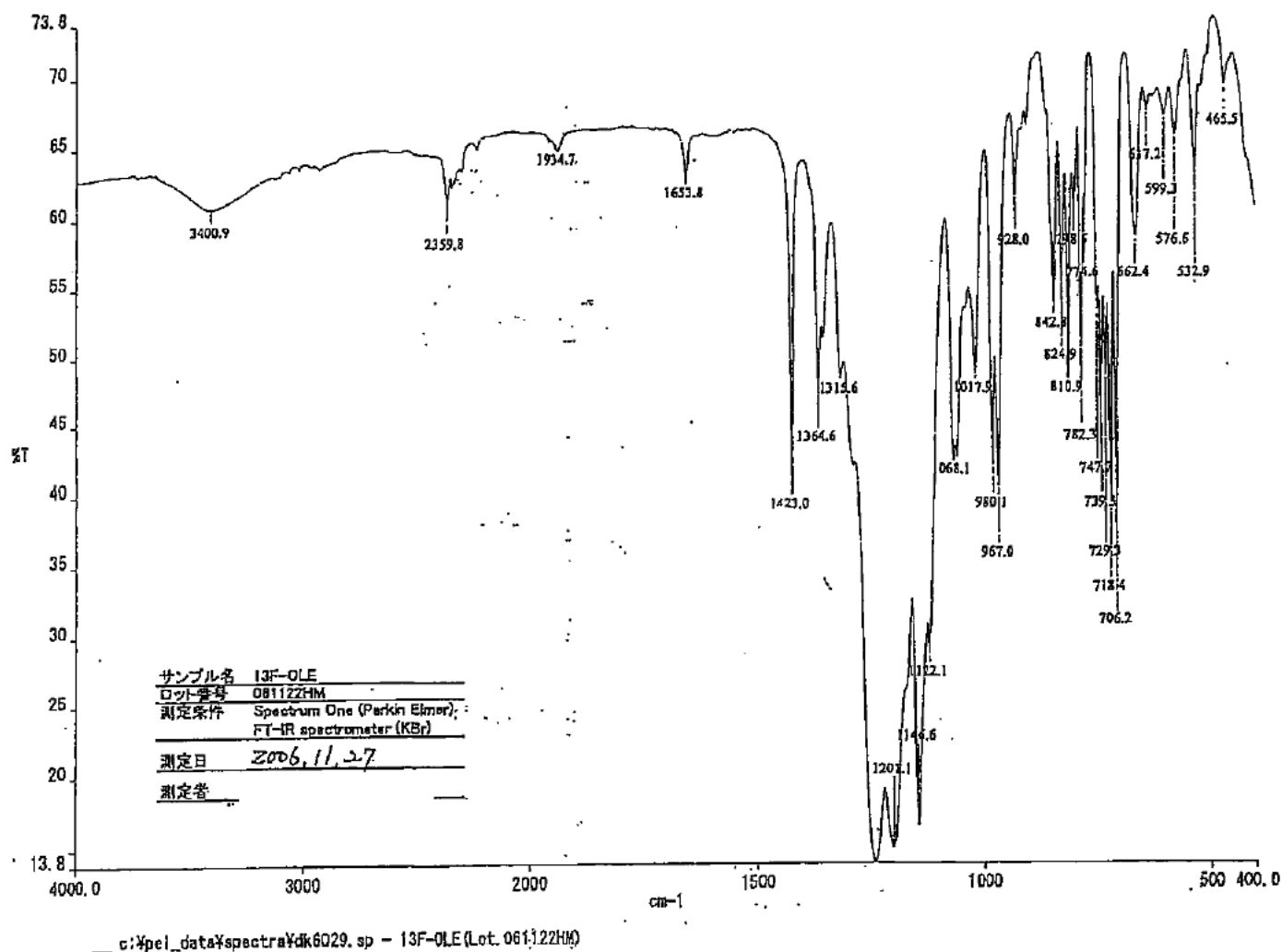
Instrument : Shimadzu IRPrestige-21
Study No. : 44806
Sample : Test item
Method : Neat
Date : December 11, 2006
Name :

Fig.1 3 - 1 IR spectrum of test item measured before experimental start.



Instrument : Shimadzu IRPrestige-21
Study No. : 44806
Sample : Test item
Method : Neat
Date : Jun. 29, 2007
Name :

Fig. 13 - 2 IR spectrum of test item measured after experimental completion.



Reference 2

IR spectrum supplied by sponsor.