

陳 述 書

財団法人 化学品検査協会

化学品安全センター久留米研究所

試験委託者 通商産業省

試験の表題 *N*-モノ又はジシクロヘキシル-2-ベンゾチアゾリルスルフェンアミド
[*N*, *N*-ジシクロヘキシル-2-ベンゾチアゾリルスルフェンアミド
(被験物質番号 K-1231)にて試験実施]のコイにおける濃縮度
試験

試験番号 51231Ⅱ

上記試験は、「新規化学物質に係る試験及び指定化学物質に係る有害性の調査の項目等を定める命令第4条に規定する試験施設について」（環保業第39号、薬発第229号、59基局第85号、昭和59年3月31日、昭和63年11月18日改正）に定める「新規化学物質に係る試験及び指定化学物質に係る有害性の調査の項目等を定める命令第4条に規定する試験施設に関する基準」及び「OECD Principles of Good Laboratory Practice」(May 12, 1981)に従って実施したものです。

平成 8 年 3 月 / 日

運営管理者



目 次

	頁
要 約	1
1. 表 題	2
2. 試験委託者	2
3. 試験施設	2
4. 試験目的	2
5. 試験方法	2
6. 適用する優良試験所基準	2
7. 試験期間	3
8. 試験関係者	3
9. 最終報告書作成日	3
10. 最終報告書の承認	3
11. 被験物質	4
12. 濃縮度試験の実施	6
13. 試験結果	1 4
14. 考 察	1 5
15. 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	1 5
16. 試資料の保管	1 6
17. 備 考	1 6
18. 表及び図の内容	1 7
付表及び付図	

信頼性保証書

財団法人 化学品検査協会
化学品安全センター久留米研究所

試験委託者 通商産業省

試験の表題 *N*-モノ又はジシクロヘキシル-2-ベンゾチアゾリルスルフェンアミド [*N,N*-ジシクロヘキシル-2-ベンゾチアゾリルスルフェンアミド (被験物質番号 K-1231) にて試験実施] のコイにおける濃縮度試験

試験番号 51231II

上記試験は財団法人化学品検査協会化学品安全センター久留米研究所の信頼性保証部門が監査及び査察を実施しており、監査又は査察を行った日付並びに運営管理者及び試験責任者に報告を行った日付は以下の通りです。

監査又は査察日	報告日 (運営管理者)	報告日 (試験責任者)
平成 7年12月12日	平成 7年12月12日	平成 7年12月12日
平成 8年 1月19日	平成 8年 1月29日	平成 8年 1月29日
平成 8年 1月26日	平成 8年 1月29日	平成 8年 1月29日
平成 8年 2月 8日	平成 8年 2月15日	平成 8年 2月15日
平成 8年 3月 1日	平成 8年 3月 1日	平成 8年 3月 1日

本最終報告書は、試験の方法が正確に記載されており、内容が試験計画及び標準操作手順に従い、かつ、生データを正確に反映していることを保証します。

平成 8 年 3 月 1 日
信頼性保証部門責任者



要 約

1. 試験の表題

N-モノ又はジシクロヘキシル-2-ベンゾチアゾリルスルフェンアミド [*N*, *N*-ジシクロヘキシル-2-ベンゾチアゾリルスルフェンアミド (被験物質番号 K-1231) にて試験実施] のコイにおける濃縮度試験

2. 試験条件

濃縮度試験

(1) 供試魚	コイ
(2) 試験濃度	第3濃度区 0.01mg/L
(3) ばく露期間	8週間
(4) ばく露方法	連続流水式
(5) 分析方法	高速液体クロマトグラフィー

3. 試験結果

濃縮倍率	第3濃度区 331~916倍
------	----------------

4. 被験物質の安定性

被験物質は保管条件下及び試験条件下で安定であることを確認した。

最終報告書

試験番号 51231II

1. 表 題 N-モノ又はジシクロヘキシル-2-ベンゾチアゾリルスルフェンアミド〔N, N-ジシクロヘキシル-2-ベンゾチアゾリルスルフェンアミド（被験物質番号 K-1231）にて試験実施〕のコイにおける濃縮度試験
2. 試験委託者 名 称 通商産業省
住 所 (〒100) 東京都千代田区霞が関一丁目3番1号
3. 試験施設 名 称 財団法人 化学品検査協会
化学品安全センター久留米研究所
住 所 (〒830) 福岡県久留米市中央町19-14
TEL (0942) 34-1500
運営管理者 XXXXXXXXXX
4. 試験目的 K-1231のコイにおける濃縮性の程度について知見を得る。
5. 試験方法 「新規化学物質に係る試験の方法について」（環保業第5号、薬発第615号、49基局第392号、昭和49年7月13日）に規定する〈魚介類の体内における化学物質の濃縮度試験〉及び「OECD Guidelines for Testing of Chemicals」(May 12, 1981)に定める”Bioaccumulation : 305C, Degree of Bioconcentration in Fish”に準拠した。
6. 適用する優良試験所基準 「新規化学物質に係る試験及び指定化学物質に係る有害性の調査の項目等を定める命令第4条に規定する試験施設について」（環保業第39号、薬発第229号、59基局第85号、昭和59年3月31日、昭和63年11月18日改正）に定める「新規化学物質に係る試験及び指定化学物質に係る有害性の調査の項目等を定める命令第4条に規定する試験施設に関する基準」（以下「GLP基準」という。）及び「OECD Principles of Good Laboratory Practice」(May 12, 1981)に適合して行った。

7. 試験期間

(1) 試験開始日 平成 7年12月12日

(2) ばく露開始日 平成 7年12月14日

(3) ばく露終了日 平成 8年 2月 8日

(4) 試験終了日 平成 8年 2月15日

8. 試験関係者

試験責任者

試験担当者

飼育管理責任者

急性毒性試験担当者

試験資料管理部門責任者

9. 最終報告書作成日

平成 8年 2月15日

作成者

10. 最終報告書の承認

平成 8年 2月15日

試験責任者

氏名

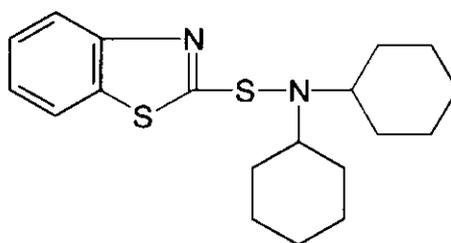
11. 被験物質

本報告書においてK-1231は、次の名称及び構造式等を有するものとする。

11.1 名 称 *N,N*-ジシクロヘキシル-2-ベンゾチアゾリルスルフェン
アミド

11.2 構造式等

構造式



分子式 $C_{19}H_{26}N_2S_2$

分子量 346.56

11.3 純 度^{*1} 99%以上
不純物 ジベンゾチアジルジスルフィド

11.4 提供者、商品名及びロット番号^{*1}

- (1) 提 供 者 [REDACTED]
(2) 商 品 名 [REDACTED]
(3) ロット番号 407012

*1 提供者添付資料による。

11.5 被験物質の確認

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

11.6 保管条件及び保管条件下での安定性

(1) 保管条件 冷蔵保存

(2) 安定性確認 ばく露開始前及び終了後に被験物質の赤外吸収スペクトルを測定した結果、両スペクトルは一致し、保管条件下で安定であることを確認した (Fig. 1 1 参照)。

11.7 試験条件下での安定性

ばく露開始前に予備検討を行い、試験条件下で安定であることを確認した。

12. 濃縮度試験の実施

12.1 供試魚

- (1) 魚 種 コイ Cyprinus carpio
- (2) 供給源 杉島養魚場
(住所 〒 866 熊本県八代市郡築一番町 123-2)
供試魚受入日 平成 7年10月17日
- (3) 蓄養条件 魚の入手時に目視観察をして異状のあるものを除去し、受入槽で薬浴後、流水状態で5日間飼育した。
- (4) じゅん化条件 蓄養後、寄生虫駆除の薬浴を行った後、じゅん化水槽へ搬入し、再度薬浴した後、じゅん化を行った。その間異状のあるものは除去し、 25 ± 2 ℃の水温の流水状態で39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9日間飼育した。
じゅん化終了日 平成 7年12月 4日
- (5) ばく露開始前の体重、体長等
- | | | |
|-------|----|--------|
| 体 重 | 平均 | 23.2 g |
| 体 長 | 平均 | 9.6 cm |
| 脂質含有率 | 平均 | 4.0 % |
- ロット TFC-951017 の測定値
測定日 平成 7年11月30日
- (6) 餌 料
- | | |
|---------|--|
| 種 類 | コイ用ペレット状配合飼料 |
| 製 造 元 | 日本配合飼料株式会社 |
| 給 餌 方 法 | 供試魚体重の約2%相当量を1日2回に分けて給餌した。
ただし、供試魚の採取前日は給餌を止めた。 |

12.2 試験用水

(1) 種類

久留米研究所敷地内で揚水した地下水

(2) 水質確認

当研究所にて平成8年2月1日に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56号), 「水産用水基準」(社団法人 日本水産資源保護協会 昭和58年3月)又は「OECD Guideline for Testing of Chemicals 210, Fish, Early-life Stage Toxicity Test」に記載されている濃度以下であることを確認した。

12.3 試験及び環境条件

- | | |
|-------------|--|
| (1) 試験水供給方法 | 当研究所組立流水式装置を用いた。 |
| (2) 試験水槽 | 70L容ガラス製水槽 |
| (3) 試験水量 | 原液2mL/分及び試験用水800mL/分の割合で1155L/日を試験水槽に供した。 |
| (4) 試験温度 | 25±2℃ |
| (5) 溶存酸素濃度 | 第3濃度区 6.6~7.7mg/L (Fig. 8参照)
対照区 7.6~8.1mg/L (Fig. 9参照) |
| (6) 供試魚数 | 第3濃度区 15尾(ばく露開始時)
対照区 5尾(ばく露開始時) |
| (7) ばく露期間 | 8週間 |
| (8) 実施場所 | 213アクアトロン室 |

12.4 原液調製法

(1) 分散剤

HCO-20

オリーブ油

(2) 調製方法

・第3濃度区

被験物質とその20倍量のHCO-20及び20倍量のオリーブ油をアセトンに溶解してアセトンを留去した後、イオン交換水で溶解してガラス製原液タンク中の濃度を4 mg/Lに調製した。

・対照区

HCO-20及びオリーブ油をアセトンに溶解してアセトンを留去した後、イオン交換水で溶解してガラス製原液タンク中のHCO-20濃度及びオリーブ油濃度がそれぞれ80 mg/Lとなるように調製した。

以上を25 L容のガラス製原液タンクより、試験水槽に供給した。

12.5 試験濃度

被験物質は第1濃度区及び第2濃度区において濃度依存性が認められたため、第3濃度区0.01 mg/Lを設定し、同時に、空試験として対照区を設定した。

12.6 観察、測定等

- | | |
|------------|------------------------------------|
| (1) 供試魚の観察 | 供試魚の健康状態等を1日に2回目視観察した。 |
| (2) 試験水量 | メスシリンダーを用いて1日に1回測定記録した。 |
| (3) 試験温度 | アルコール温度計を用いて1日に1回測定記録した。 |
| (4) 溶存酸素濃度 | 溶存酸素計を用いて1週間に2回測定記録した。 |
| (5) その他 | 試験期間中は、コイの排泄物、水槽壁の汚れ等を1日に1回程度除去した。 |

12.7 試験水及び供試魚中の被験物質分析

12.7.1 分析回数

試験水中の被験物質分析は、ばく露期間中、毎週2回計16回行い、1回当りの分析試料は1点とした。また、供試魚中の被験物質分析はばく露開始後、2、4、6及び8週の計4回行い、1回当りの分析試料は2尾とした。対照区はばく露開始前及びばく露終了時に行い、1回当りの分析試料は2尾とした。

12.7.2 分析試料の前処理

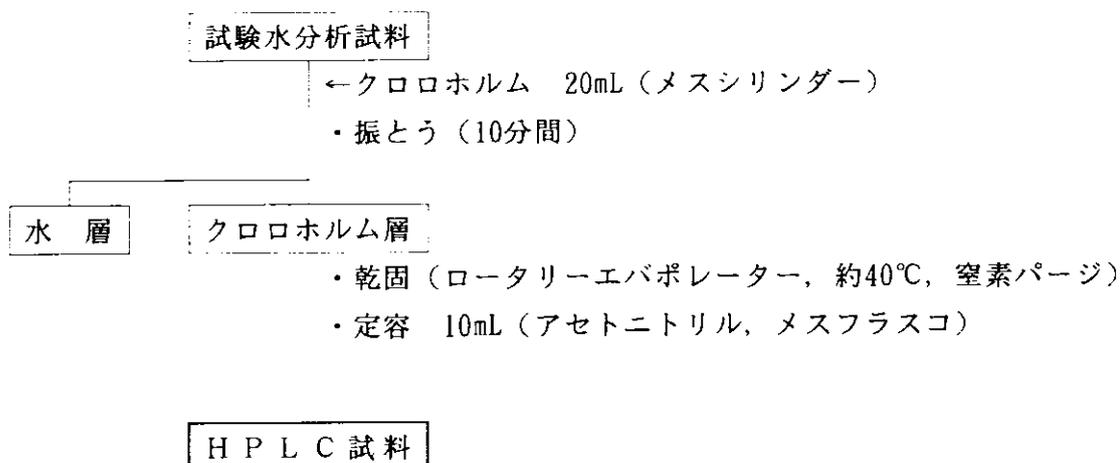
(1) 試験水

試験水槽から

第3濃度区 50 mL

を採取し、以下のフロースキームに従って前処理操作を行い、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）試料とした。

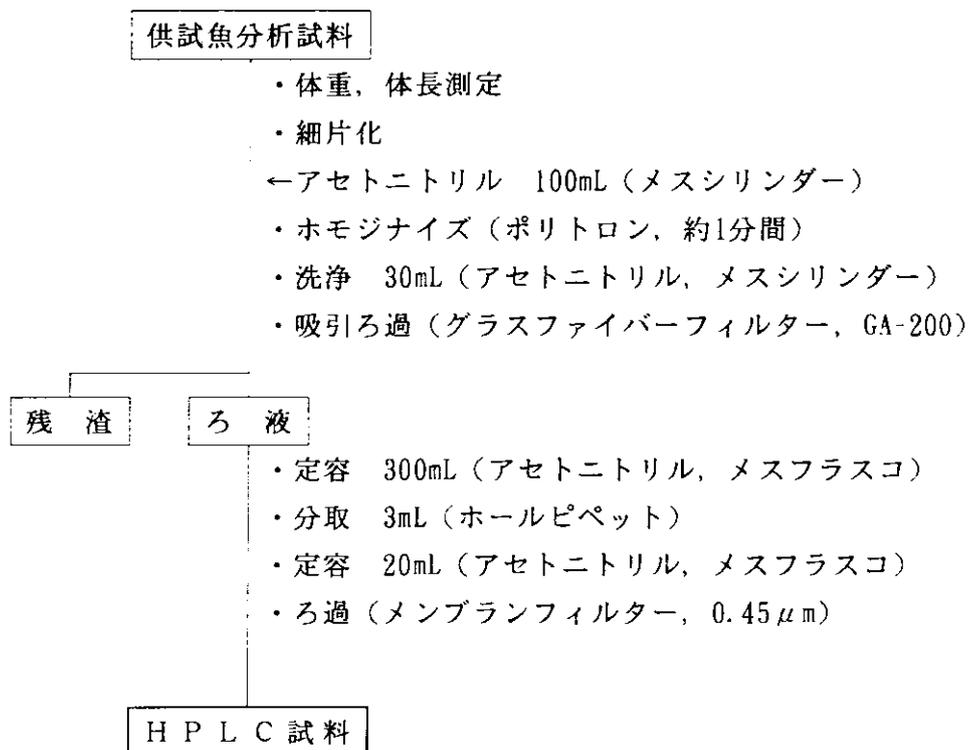
フロースキーム



(2) 供試魚

試験水槽から供試魚を採取し、以下のフロースキームに従って前処理操作を行い、HPLC試料とした。

フロースキーム



12.7.3 被験物質の定量分析

12.7.2の前処理を行って得られたHPLC試料は、下記の定量条件に基づき高速液体クロマトグラフィーにより被験物質の定量を行った。供試魚中の被験物質分析のHPLC試料は適宜希釈し、検量線の濃度範囲になるように被験物質濃度を調整した。最終定容液中の被験物質濃度は、クロマトグラム上の被験物質のピーク面積を濃度既知の標準溶液のピーク面積と比較し、比例計算して求めた (Table-4、Fig. 4、Table-6、7、Fig. 6、7参照)。

(1) 定量条件

機	器	高速液体クロマトグラフ
	ポンプ	島津製作所製 LC-10AD
	検出器	島津製作所製 SPD-10A
カ	ラ	L-column ODS
	ム	15cm×4.6mmφ ステンレス製
溶	離	アセトニトリル/テトラヒドロフラン(9/1 V/V)
液		
流	量	1.0mL/min
測	定	280nm (Fig. 10参照)
波	長	
注	入	100μL
量		
感	度	
	検出器	1AU/V
	記録計	レンジ 5mV

(2) 標準溶液の調製

分析試料中の被験物質濃度を求めるための標準溶液の調製は次のように行った。

被験物質100mgを正確にはかりとり、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0.050mg/Lの標準溶液とした。

(3) 検量線の作成

(2)の標準溶液の調製と同様にして0.025、0.050及び0.10 mg/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200 $\mu\text{V}\cdot\text{sec}$ (被験物質濃度0.93 $\mu\text{g/L}$)とした (Fig. 2 参照)。

12.7.4 回収試験及びブランク試験

(1) 方法

12.7.2の試験水及び供試魚分析操作における被験物質の回収率を求めるため、回収試験用試験水及び魚体ホモジネートに被験物質原液を添加し、回収試験を行った。また、被験物質を加えない回収試験用試験水及び魚体ホモジネートについて、回収試験と同じ操作によりブランク試験を行った。回収試験及びブランク試験は、2点について測定した。この結果、ブランク試験においてクロマトグラム上、被験物質ピーク位置にはピークは認められなかった。分析操作における各2点の回収率及び平均回収率は下記に示すとおりであり、平均回収率を分析試料中の被験物質濃度を求める場合の補正值とした (Table-3, 5, Fig. 3, 5 参照)。

(2) 結果

分析操作における回収率

試験水分析 (被験物質0.5 μg 添加)

97.3%, 97.2% 平均97.3%

供試魚分析 (被験物質9.0 μg 添加)

87.9%, 92.5% 平均90.2%

12.7.5 分析試料中の被験物質濃度の算出及び定量下限

(1) 試験水分析試料中の被験物質濃度の算出

Table-4の計算式に従って計算し、計算結果は有効数字3ケタに丸めて表示した。

(2) 試験水中の被験物質の定量下限濃度

12.7.3(3)の検量線作成で求めた被験物質の定量下限より、試験水中の被験物質の定量下限濃度*2は0.19 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-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。

(4) 供試魚中の被験物質の定量下限濃度

12.7.3(3)の検量線作成で求めた被験物質の定量下限より、供試魚中の被験物質の定量下限濃度*2は供試魚体重を30gとしたとき68 ng/gと算出される。

$$*2 \text{ 被験物質定量下限濃度 (}\mu\text{g/L又はng/g)} = \frac{\text{A}}{\frac{\text{B}}{100}} \times \frac{\text{C} \times \text{E}}{\text{D}}$$

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。

12.8 濃縮倍率（BCF）の算出

Table-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。

なお、12.7.5(4)で求めた供試魚中の被験物質定量下限濃度より、下記の倍率を越えて濃縮されたとき濃縮倍率の算出が可能となる。

第3濃度区 7.1倍

12.9 数値の取扱い

数値の丸め方は、JIS Z 8202-1985 参考3規則Bの方法に従った。

13. 試験結果

13.1 試験水中の被験物質濃度

試験水中の被験物質濃度をTable-1に示す。

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

	2 週	4 週	6 週	8 週	付 表	付 図
第3濃度区	9.65	9.71	9.70	9.69	Table 4	Fig. 4

試験水中の平均被験物質濃度はTable-1に示されるように、設定値の約95%以上が保持された。

13.2 濃縮倍率

濃縮倍率をTable-2に示す。

Table-2 濃縮倍率

	2 週	4 週	6 週	8 週	付 表	付 図
第3濃度区	505	762	916	651	Table-6	Fig. 6
	331	538	618	527		

Table-2の濃縮倍率とばく露期間との相関をFig.1に示した。また、被験物質のコイに対する濃縮性の程度は、濃縮倍率で331～916倍であった。

13.3 供試魚の外観観察等

異状は認められなかった。

14. 考 察

試験番号51231の第2濃度区の濃縮倍率は74～316倍であり、本試験結果と比べて濃度依存性が認められた(Table-2参照)。そこで、試験番号51231Ⅲとして、第3濃度区の1/10の濃度である第4濃度区を設定して試験を行うこととした。

15. 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。

16. 試資料の保管

16.1 被験物質

同一ロットの被験物質が分解度試験及び分配係数試験終了後にすでに保管されているため、本試験終了後には保管しない。

16.2 生データ、資料等

試験により得られた分析結果、測定結果、観察結果、その他試験ノート等最終報告書の作成に用いた生データ、試験計画書、指示書、資料等は最終報告書と共に、試験委託者から通知を受けるまでの期間、当研究所資料保管室に保管する。

17. 備考

17.1 試験に使用した主要な装置・機器、特殊器具、試薬等

(1) 試験系（飼育施設）に係わる装置

原液供給用微量定量ポンプ	:	東京理化学器械製	型 GMW
溶存酸素測定装置	:	飯島精密工業製	型 552

(2) 分析及び原液調製に使用した装置・機器、特殊器具、試薬 装置・機器

高速液体クロマトグラフ	:	11頁参照	
電子分析天びん	:	島津製作所製	型 AEX-200B
電子上皿天びん	:	ザルトリウス製	型 1404 MP8
		研精工業製	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-1
振とう機	:	入江商会製	TS式
ホモジナイザー（ポリトロン）	:	キネマチカ社製	型 PT10-35

特殊器具

メンブランフィルター	:	野村マイクロサイエンス製	
		型 シルフィル-FN	

試薬

アセトニトリル	:	和光純薬工業製	HPLC用
テトラヒドロフラン	:	関東化学製	HPLC用
アセトン	:	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
HCO-20	:	日光ケミカルズ製	
オリーブ油	:	和光純薬工業製	